

1. 一种抗CD19嵌合抗原受体 (CAR), 所述抗CD19 CAR包含:
具有三个HCDR1、HCDR2和HCDR3以及LCDR1、LCDR2和LCDR3的抗CD19结合结构域, 其中
所述HCDR1包含根据SEQ ID NO:2-4中任一项的氨基酸序列; 所述HCDR2包含根据SEQ ID NO:5-7中任一项的氨基酸序列; 所述HCDR3包含根据SEQ ID NO:8-10中任一项的氨基酸序列; 所述LCDR1包含根据SEQ ID NO:12-14中任一项的氨基酸序列; 所述LCDR2包含根据SEQ ID NO:15-17中任一项的氨基酸序列; 并且所述LCDR3包含根据SEQ ID NO:18-20中任一项的氨基酸序列, 或者其中所述HCDR1包含根据SEQ ID NO:24-26中任一项的氨基酸序列; 所述HCDR2包含根据SEQ ID NO:27-29中任一项的氨基酸序列; 所述HCDR3包含根据SEQ ID NO:30-32中任一项的氨基酸序列; 所述LCDR1包含根据SEQ ID NO:34-36中任一项的氨基酸序列; 所述LCDR2包含根据SEQ ID NO:37-39中任一项的氨基酸序列; 并且所述LCDR3包含根据SEQ ID NO:40-42中任一项的氨基酸序列;
跨膜结构域;
共刺激结构域; 以及
包含CD3 ϵ 信号传导结构域、CD3 γ 信号传导结构域、CD3 δ 信号传导结构域或DAP12信号传导结构域中的一者的信号传导结构域。
2. 根据权利要求1所述的抗CD19 CAR, 所述抗CD19 CAR包括包含所述HCDR1、所述HCDR2和所述HCDR3的重链可变结构域; 以及包含所述LCDR1、所述LCDR2和所述LCDR3的第一轻链可变结构域, 其中:
所述重链可变结构域与SEQ ID NO:1至少80%相同; 并且
所述轻链可变结构域与SEQ ID NO:11至少80%相同; 或者
所述重链可变结构域与SEQ ID NO:24至少80%相同; 并且
所述轻链可变结构域与SEQ ID NO:33至少80%相同。
3. 根据权利要求1或2中任一项所述的抗CD19 CAR, 其中所述HCDR1、所述HCDR2、所述HCDR3, 所述LCDR1、所述LCDR2和所述LCDR3由单个多肽组成。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的抗CD19 CAR, 其中所述抗CD19结合结构域包含scFv。
5. 根据权利要求4所述的抗CD19 CAR, 其中所述scFv包含根据SEQ ID NO:21或43中的一项的氨基酸序列。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的抗CD19 CAR, 其中所述信号传导结构域包含具有根据SEQ ID NO:52的氨基酸序列的CD3 ϵ 信号传导结构域。
7. 根据权利要求1至5中任一项所述的抗CD19 CAR, 其中所述信号传导结构域包含具有根据SEQ ID NO:57的氨基酸序列的CD3 γ 信号传导结构域。
8. 根据权利要求1至5中任一项所述的抗CD19 CAR, 其中所述信号传导结构域包含具有根据SEQ ID NO:55的氨基酸序列的CD3 δ 信号传导结构域。
9. 根据权利要求1至5中任一项所述的抗CD19 CAR, 其中所述信号传导结构域包含具有根据SEQ ID NO:59的氨基酸序列的DAP12信号传导结构域。
10. 根据权利要求1至9中任一项所述的抗CD19 CAR, 其中所述跨膜结构域包含CD28跨膜结构域。
11. 根据权利要求1至10中任一项所述的抗CD19 CAR, 其中所述共刺激结构域包含CD28

共刺激结构域。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的抗CD19 CAR,所述抗CD19CAR包含根据SEQ ID NO:62、65、67和69中任一项的氨基酸序列。

13. 一种核酸,所述核酸编码根据权利要求1至12中任一项所述的抗CD19 CAR。

14. 一种重组载体,所述重组载体包含根据权利要求13所述的核酸。

15. 一种宿主细胞,所述宿主细胞用根据权利要求13所述的核酸或者根据权利要求14所述的重组载体转导。

16. 根据权利要求15所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞包括T细胞、iNKT细胞或NK细胞。

17. 一种药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求16所述的T细胞、iNKT细胞和/或NK细胞。

18. 一种治疗有需要的患者的疾病的方法,所述方法包括向所述患者施用根据权利要求16所述的T细胞、iNKT细胞和/或NK细胞,或者根据权利要求17所述的药物组合物。

19. 一种在受试者中诱导免疫应答或者使受试者对癌症免疫的方法,所述方法包括向所述受试者施用根据权利要求16所述的T细胞、iNKT细胞和/或NK细胞,或者向所述患者施用根据权利要求17所述的药物组合物。

20. 根据权利要求18或19所述的方法,其中所述癌症是急性淋巴细胞性白血病(ALL)(包括非T细胞ALL)、急性髓系白血病、B细胞幼淋巴细胞白血病、B细胞急性淋巴性白血病(“BALL”)、母细胞性浆细胞样树突细胞瘤、伯基特淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、慢性髓细胞白血病(CML)、慢性髓系白血病、慢性或急性白血病、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、毛细胞白血病、霍奇金病、恶性淋巴组织增生性疾病、MALT淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、意义未明的单克隆丙种球蛋白血症(MGUS)、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常和骨髓增生异常综合征、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、浆细胞增生性疾病(包括无症状性骨髓瘤(郁积型多发性骨髓瘤或惰性骨髓瘤)、浆母细胞性淋巴瘤、浆细胞样树突细胞瘤、浆细胞瘤(包括浆细胞恶液质;孤立性骨髓瘤;孤立性浆细胞瘤;髓外浆细胞瘤和多发性浆细胞瘤)、POEMS综合征(也称为Crow-Fukase综合征;Takatsuki病;以及PEP综合征)、原发纵隔大B细胞淋巴瘤(PMBCL)、小细胞或大细胞滤泡性淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤(SMZL)、系统性淀粉样蛋白轻链型淀粉样变性、T细胞急性淋巴性白血病(“TALL”)、T细胞淋巴瘤、转化滤泡性淋巴瘤、或Waldenstrom巨球蛋白血症、套细胞淋巴瘤(MCL)、转化滤泡性淋巴瘤(TFL)、原发性纵隔B细胞淋巴瘤(PMBCL)、多发性骨髓瘤、毛细胞淋巴瘤/白血病或它们的组合。

21. 一种嵌合抗原受体(CAR),所述CAR包含具有选自由SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88和SEQ ID NO:89组成的组的氨基酸序列的CD3 ϵ 信号传导结构域。

22. 根据权利要求21所述的CAR,其中所述CAR包含对选自由以下组成的组的抗原具有特异性的结合结构域:707-AP(707丙氨酸脯氨酸)、AFP(阿尔法(a)-甲胎蛋白)、ART-4(由T4细胞识别的腺癌抗原)、BAGE(B抗原;b-连环蛋白/m、b-连环蛋白/突变的)、BCMA(B细胞成熟抗原)、Bcr-abl(裂点簇区-Abelson)、CAIX(碳酸酐酶IX)、CD19(分化簇19)、CD20(分化簇20)、CD22(分化簇22)、CD30(分化簇30)、CD33(分化簇33)、CD44v7/8(分化簇44,外显子7/8)、CAMEL(黑色素瘤上的CTL识别的抗原)、CAP-1(癌胚抗原肽1)、CASP-8(半胱天冬酶8)、

CDC27m(突变的细胞分裂周期蛋白27)、CDK4/m(突变的环化素依赖性激酶4)、CEA(癌胚抗原)、C型凝集素样-1(CLL-1)、CT(癌/睾丸(抗原))、Cyp-B(亲环蛋白B)、DAM(黑色素瘤上的分化抗原)、EGFR(表皮生长因子受体)、EGFRvIII(表皮生长因子受体变体III)、EGP-2(表皮糖蛋白2)、EGP-40(表皮糖蛋白40)、ErbB2、3、4(成红细胞白血病病毒癌基因同源物-2、-3、

4)、ELF2M(突变的延伸因子2)、ETV6-AML1(Ets变体基因6/急性髓样白血病1基因ETS)、FBP(叶酸盐结合蛋白)、fAChR(胎儿乙酰胆碱受体)、G250(糖蛋白250)、GAGE(G抗原)、GD2(二唾液酸神经节苷2)、GD3(二唾液酸神经节苷3)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(GPC3)、GnT-V(N-乙酰葡萄糖胺转移酶V)、Gp100(糖蛋白100kD)、HAGE(解旋酶抗原)、HER-2/neu(人表皮受体2/神经;也称为EGFR2)、HLA-A(人白细胞抗原A)、HPV(人乳头瘤病毒)、HSP70-2M(突变的热休克蛋白70-2)、HST-2(人环状体肿瘤因子2)、hTERT或hTRT(人端粒酶逆转录酶)、iCE(肠道羧基酯酶)、IL-13R-a2(白介素13受体亚基 α -2)、KIAA0205、KDR(激酶插入区受体)、 κ 轻链、LAGE(L抗原)、LDLR/FUT(低密度脂质受体/GDP-L-岩藻糖:b-D-半乳糖苷酶2-a-L岩藻糖基转移酶)、LeY(Lewis-Y抗体)、L1 CAM(L1细胞粘附分子)、MAGE(黑色素瘤抗原)、MAGE-A1(黑色素瘤相关抗原1)、间皮素、鼠CMV感染细胞、MART-1/Melan-A(由T细胞识别的黑色素瘤抗原1/黑色素瘤抗原A)、MC1 R(黑皮质素1受体)、肌球蛋白/m(突变的肌球蛋白)、MUC1(粘蛋白1)、MUM-1、-2、-3(黑色素瘤遍在突变蛋白1、2、3)、NA88-A(患者M88的NAcDNA克隆)、NKG2D(自然杀伤组2、成员D)配体、NY-BR-1(纽约乳腺分化抗原1)、NY-ESO-1(纽约食管鳞状细胞癌-1)、癌胚抗原(h5T4)、P15(蛋白质15)、p190较小bcr-abl(190KD蛋白质bcr-abl)、Pml/RARa(前髓细胞性白血病/视黄酸受体a)、PRAME(黑色素瘤的优先表达抗原)、PSA(前列腺特异性抗原)、PSCA(前列腺干细胞抗原)、PSMA(前列腺特异性膜抗原)、RAGE(肾抗原)、RU1或RU2(肾遍在蛋白1或2)、SAGE(肉瘤抗原)、SART-1或SART-3(排斥肿瘤的鳞状抗原1或3)、SSX1、-2、-3、4(滑膜肉瘤X1、-2、-3、-4)、TAA(肿瘤相关抗原)、TAG-72(肿瘤相关糖蛋白72)、TEL/AML1(易位Ets家族白血病/急性髓样白血病1)、TPI/m(突变的磷酸丙糖异构酶)、TRP-1(酪氨酸酶相关蛋白1或gp75)、TRP-2(酪氨酸酶相关蛋白2)、TRP-2/INT2(TRP-2/内含子2)、VEGF-R2(血管内皮生长因子受体2)和WT1(Wilms肿瘤基因)。

23. 根据权利要求21所述的CAR,其中所述CAR由双顺反子核酸构建体编码。

24. 根据权利要求21至23中任一项所述的CAR,其中所述CAR包含对CD19具有特异性的结合结构域。

25. 根据权利要求21所述的CAR,其中所述CD3 ϵ 信号传导结构域由与选自SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80和SEQ ID NO:81组成的组的序列具有至少90%序列同一性的核酸编码。

26. 根据权利要求21所述的CAR,其中当所述CAR在细胞中表达时,与具有野生型CD3 ϵ 信号传导结构域而不是具有选自SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88和SEQ ID NO:89组成的组的氨基酸序列的CD3 ϵ 信号传导结构域的对应该CAR相比,所述CAR表现出更程度的向细胞膜的运输。

27. 一种多核苷酸,所述多核苷酸编码根据权利要求21所述的CAR。

28. 一种载体,所述载体包含根据权利要求27所述的多核苷酸。

29. 一种宿主细胞,所述宿主细胞包含根据权利要求28所述的载体。

30. 根据权利要求29所述的宿主细胞,其中所述细胞选自T细胞、iNKT细胞或NK细胞组成的组。

31. 一种药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求29所述的宿主细胞。
32. 一种治疗有需要的患者的疾病或病症的方法,所述方法包括施用根据权利要求29所述的宿主细胞。
33. 一种制备CAR T细胞的方法,所述方法包括提供根据权利要求21所述的CAR的表达。
34. 一种CD3 ϵ 信号传导结构域,所述CD3 ϵ 信号传导结构域具有选自SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88和SEQ ID NO:89组成的组的氨基酸序列。
35. 根据权利要求34所述的CD3 ϵ 信号传导结构域,其中所述CD3 ϵ 信号传导结构域由与选自SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80和SEQ ID NO:81组成的组的序列具有至少90%序列同一性的核酸编码。
36. 根据权利要求34所述的CD3 ϵ 信号传导结构域,其中所述CD3 ϵ 信号传导结构域由嵌合抗原受体(CAR)组成。
37. 根据权利要求36所述的CD3 ϵ 信号传导结构域,其中所述CAR包含对选自以下组成的组的抗原具有特异性的结合结构域:707-AP(707丙氨酸脯氨酸)、AFP(阿尔法(a)-甲胎蛋白)、ART-4(由T4细胞识别的腺癌抗原)、BAGE(B抗原;b-连环蛋白/m、b-连环蛋白/突变的)、BCMA(B细胞成熟抗原)、Bcr-abl(裂点簇区-Abelson)、CAIX(碳酸酐酶IX)、CD19(分化簇19)、CD20(分化簇20)、CD22(分化簇22)、CD30(分化簇30)、CD33(分化簇33)、CD44v7/8(分化簇44,外显子7/8)、CAMEL(黑色素瘤上的CTL识别的抗原)、CAP-1(癌胚抗原肽1)、CASP-8(半胱天冬酶8)、CDC27m(突变的细胞分裂周期蛋白27)、CDK4/m(突变的环化素依赖性激酶4)、CEA(癌胚抗原)、C型凝集素样-1(CLL-1)、CT(癌/睾丸(抗原))、Cyp-B(亲环蛋白B)、DAM(黑色素瘤上的分化抗原)、EGFR(表皮生长因子受体)、EGFRvIII(表皮生长因子受体变体III)、EGP-2(表皮糖蛋白2)、EGP-40(表皮糖蛋白40)、ErbB2、3、4(成红细胞白血病病毒癌基因同源物-2、-3、4)、ELF2M(突变的延伸因子2)、ETV6-AML1(Ets变体基因6/急性髓样白血病1基因ETS)、FBP(叶酸结合蛋白)、fAChR(胎儿乙酰胆碱受体)、G250(糖蛋白250)、GAGE(G抗原)、GD2(二唾液酸神经节苷2)、GD3(二唾液酸神经节苷3)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(GPC3)、GnT-V(N-乙酰葡萄糖胺转移酶V)、Gp100(糖蛋白100kD)、HAGE(解旋酶抗原)、HER-2/neu(人表皮受体2/神经;也称为EGFR2)、HLA-A(人白细胞抗原A)、HPV(人乳头瘤病毒)、HSP70-2M(突变的热休克蛋白70-2)、HST-2(人环状体肿瘤因子2)、hTERT或hTRT(人端粒酶逆转录酶)、iCE(肠道羧基酯酶)、IL-13R-a2(白介素13受体亚基 α -2)、KIAA0205、KDR(激酶插入区受体)、 κ 轻链、LAGE(L抗原)、LDLR/FUT(低密度脂质受体/GDP-L-岩藻糖:b-D-半乳糖苷酶2-a-L岩藻糖基转移酶)、LeY(Lewis-Y抗体)、L1 CAM(L1细胞粘附分子)、MAGE(黑色素瘤抗原)、MAGE-A1(黑色素瘤相关抗原1)、间皮素、鼠CMV感染细胞、MART-1/Melan-A(由T细胞识别的黑色素瘤抗原1/黑色素瘤抗原A)、MC1 R(黑皮质素1受体)、肌球蛋白/m(突变的肌球蛋白)、MUC1(粘蛋白1)、MUM-1、-2、-3(黑色素瘤遍在突变蛋白1、2、3)、NA88-A(患者M88的NA cDNA克隆)、NKG2D(自然杀伤组2、成员D)配体、NY-BR-1(纽约乳腺分化抗原1)、NY-ESO-1(纽约食管鳞状细胞癌-1)、癌胚抗原(h5T4)、P15(蛋白质15)、p190较小bcr-abl(190KD蛋白质bcr-abl)、Pml/RARa(前髓细胞性白血病/视黄酸受体a)、PRAME(黑色素瘤的优先表达抗原)、PSA(前列腺特异性抗原)、PSCA(前列腺干细胞抗原)、PSMA(前列腺特异性膜抗原)、RAGE(肾抗原)、RU1或RU2(肾遍在蛋白1或2)、SAGE(肉瘤抗原)、SART-1或SART-3(排斥肿瘤的鳞状抗原1或3)、SSX1、-2、-3、4(滑膜肉瘤X1、-2、-3、-4)、TAA(肿瘤相关抗原)、TAG-72(肿

瘤相关糖蛋白72)、TEL/AML1(易位Ets家族白血病/急性髓样白血病1)、TPI/m(突变的磷酸丙糖异构酶)、TRP-1(酪氨酸酶相关蛋白1或gp75)、TRP-2(酪氨酸酶相关蛋白2)、TRP-2/INT2(TRP-2/内含子2)、VEGF-R2(血管内皮生长因子受体2)和WT1(Wilms肿瘤基因)。

38. 根据权利要求36所述的CD3 ϵ 信号传导结构域,其中所述CAR由双顺反子核酸构建体编码。

39. 根据权利要求36至38中任一项所述的CD3 ϵ 信号传导结构域,其中所述CAR包含对CD19具有特异性的结合结构域。

40. 根据权利要求36所述的CD3 ϵ 信号传导结构域,其中当所述CAR在细胞中表达时,与具有野生型CD3 ϵ 信号传导结构域而不是具有选自SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88和SEQ ID NO:89组成的组的氨基酸序列的CD3 ϵ 信号传导结构域的对应CAR相比,所述CAR表现出更高层次的向细胞膜的运输。

41. 一种多核苷酸,所述多核苷酸编码根据权利要求34所述的CD3 ϵ 信号传导结构域。

42. 一种载体,所述载体包含根据权利要求41所述的多核苷酸。

43. 一种宿主细胞,所述宿主细胞包含根据权利要求42所述的载体。

44. 根据权利要求43所述的宿主细胞,其中所述细胞选自T细胞、iNKT细胞或NK细胞组成的组。

45. 一种治疗有需要的患者的疾病或病症的方法,所述方法包括施用根据权利要求43所述的宿主细胞。

46. 一种药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求43所述的宿主细胞。

47. 一种制备CAR T细胞的方法,所述方法包括提供根据权利要求36所述的CAR的表达。

48. 一种改善CAR向细胞膜运输的方法,其中所述CAR被设计成表达具有选自SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88和SEQ ID NO:89组成的组的氨基酸序列的CD3 ϵ 信号传导结构域。

49. 根据权利要求48所述的方法,其中所述CD3 ϵ 信号传导结构域由与选自SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80和SEQ ID NO:81组成的组的序列具有至少90%序列同一性的核酸编码。

50. 一种改善CAR向细胞膜运输的方法,其中所述CAR被设计成包含具有对野生型CD3 ϵ 信号传导结构域的一个或多个突变、缺失或插入的CD3 ϵ 信号传导结构域。

嵌合抗原受体的信号传导结构域

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2021年10月18日提交并且名称为“Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cell Therapy”的美国临时专利申请号63/256,956的优先权权益,该专利申请的全部内容以引用方式并入本文。

技术领域

[0003] 本公开涉及细胞疗法领域,并且更具体地涉及嵌合抗原受体 (CAR) 细胞疗法。

背景技术

[0004] 人癌本质上由正常细胞构成,这些正常细胞发生了遗传转化或表观遗传转化而变成异常癌细胞。这样一来,癌细胞开始表达与正常细胞所表达的那些不同的蛋白质和其他抗原。身体的先天免疫系统可使用这些异常肿瘤抗原来特异性地靶向和杀死癌细胞。然而,癌细胞采用各种机制来防止免疫细胞(诸如T和B淋巴细胞)成功靶向癌细胞。

[0005] 目前的T细胞疗法依赖于经富集或修饰的人T细胞来靶向和杀死患者体内的癌细胞。为了增加T细胞靶向和杀死特定癌细胞的能力,已开发了工程化T细胞以表达将T细胞引导至特定靶癌细胞的构建体的方法。包含能够与特定肿瘤抗原相互作用的结合结构域的嵌合抗原受体 (CAR) 允许T细胞靶向并杀灭表达特定肿瘤抗原的癌细胞。

[0006] 需要产生抗原受体修饰的T细胞的改善方法,用于在自体或同种异体环境中特异性靶向和杀死癌细胞。

发明内容

[0007] 本发明公开了嵌合抗原受体 (CAR),其包含至少一个抗原结合结构域,跨膜结构域,共刺激结构域;以及包含CD3 ϵ 信号传导结构域、CD3 γ 信号传导结构域、CD3 δ 信号传导结构域或DAP-12信号传导结构域中的一者的信号传导结构域。

[0008] 在某些实施方案中,CAR包含具有HCDR1、HCDR2和HCDR3和LCDR1、LCDR2和LCDR3的抗CD19结合结构域,其中HCDR1包含根据SEQ ID NO:2-4中任一项的氨基酸序列;HCDR2包含根据SEQ ID NO:5-7中任一项的氨基酸序列;HCDR3包含根据SEQ ID NO:8-10中任一项的氨基酸序列;LCDR1包含根据SEQ ID NO:12-14中任一项的氨基酸序列;LCDR2包含根据SEQ ID NO:15-17中任一项的氨基酸序列;并且LCDR3包含根据SEQ ID NO:18-20中任一项的氨基酸序列。

[0009] 在某些实施方案中,CAR包含具有HCDR1、HCDR2和HCDR3和LCDR1、LCDR2和LCDR3的抗CD19结合结构域,其中HCDR1包含根据SEQ ID NO:24-26中任一项的氨基酸序列;HCDR2包含根据SEQ ID NO:27-29中任一项的氨基酸序列;HCDR3包含根据SEQ ID NO:30-32中任一项的氨基酸序列;LCDR1包含根据SEQ ID NO:34-36中任一项的氨基酸序列;LCDR2包含根据SEQ ID NO:37-39中任一项的氨基酸序列;并且LCDR3包含根据SEQ ID NO:40-42中任一项的氨基酸序列。

[0010] 在实施方案中, CAR包括包含HCDR1、HCDR2和HCDR3的重链可变结构域;以及包含LCDR1、LCDR2和LCDR3的第一轻链可变结构域,其中:重链可变结构域与SEQ ID NO:1至少80%相同;并且轻链可变结构域与SEQ ID NO:11至少80%相同;或者重链可变结构域与SEQ ID NO:24至少80%相同;并且轻链可变结构域与SEQ ID NO:33至少80%相同。

[0011] 在实施方案中,HCDR1、HCDR2、HCDR3,LCDR1、LCDR2和LCDR3由单个多肽组成。

[0012] 在实施方案中,抗CD19结合结构域包含scFv。在实施方案中,scFv包含根据SEQ ID NO:21或43中的一项的氨基酸序列。

[0013] 在实施方案中,信号传导结构域包含具有根据SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88和SEQ ID NO:89中任一项的氨基酸序列的CD3 ϵ 信号传导结构域。在实施方案中,信号传导结构域包含具有根据SEQ ID NO:57的氨基酸序列的CD3 γ 信号传导结构域。在实施方案中,信号传导结构域包含具有根据SEQ ID NO:55的氨基酸序列的CD3 δ 信号传导结构域。在实施方案中,信号传导结构域包含具有根据SEQ ID NO:59的氨基酸序列的DAP-12信号传导结构域。

[0014] 在实施方案中,跨膜结构域是CD28跨膜结构域。在实施方案中,共刺激结构域包含CD28共刺激结构域。

[0015] 在实施方案中,抗CD19 CAR包含根据SEQ ID NO:62、65、67和69中任一项的氨基酸序列。

[0016] 公开了编码本文公开的CAR的核酸。本发明公开了包含此类核酸的重组载体。本发明公开了用此类核酸和重组载体转导的宿主细胞。在实施方案中,宿主细胞包括T细胞、iNKT细胞或NK细胞。

[0017] 本发明公开了包含此类T细胞、iNKT细胞和/或NK细胞的药物组合物。本发明公开了治疗有需要的患者的疾病的方法,该方法包括向患者施用T细胞、iNKT细胞和/或NK细胞或药物组合物。本发明公开了在受试者中诱导免疫应答或者使受试者对癌症免疫的方法,该方法包括向受试者施用T细胞、iNKT细胞和/或NK细胞或者向患者施用药物组合物。在实施方案中,癌症是急性淋巴细胞性白血病(ALL)(包括非T细胞ALL)、急性髓系白血病、B细胞幼淋巴细胞白血病、B细胞急性淋巴性白血病(“BALL”)、母细胞性浆细胞样树突细胞瘤、伯基特淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、慢性髓细胞白血病(CML)、慢性髓系白血病、慢性或急性白血病、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、毛细胞白血病、霍奇金病、恶性淋巴组织增生性疾病、MALT淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、意义未明的单克隆丙种球蛋白血症(MGUS)、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常和骨髓增生异常综合征、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、浆细胞增生性疾病(包括无症状性骨髓瘤(郁积型多发性骨髓瘤或惰性骨髓瘤)、浆母细胞性淋巴瘤、浆细胞样树突细胞瘤、浆细胞瘤(包括浆细胞恶液质;孤立性骨髓瘤;孤立性浆细胞瘤;髓外浆细胞瘤和多发性浆细胞瘤)、POEMS综合征(也称为Crow-Fukase综合征;Takatsuki病;以及PEP综合征)、原发纵隔大B细胞淋巴瘤(PMBC)、小细胞或大细胞滤泡性淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤(SMZL)、系统性淀粉样蛋白轻链型淀粉样变性、T细胞急性淋巴性白血病(“TALL”)、T细胞淋巴瘤、转化滤泡性淋巴瘤、或Waldenstrom巨球蛋白血症、套细胞淋巴瘤(MCL)、转化滤泡性淋巴瘤(TFL)、原发性纵隔B细胞淋巴瘤(PMBCL)、多发性骨髓瘤、毛细胞淋巴瘤/白血病或它们的组合。

附图说明

[0018] 图1示出了具有信号传导结构域的抗CD19 CAR的实施方案,该信号传导结构域选自由CD3 ζ 、密码子优化的CD3 ϵ 、密码子优化的 ϵ (Δ 181-185)、密码子优化的 ϵ (R183K)和密码子优化的 ϵ (S178N.R183K)组成的组,该抗CD19 CAR为具有第二代CD20 CD3 ζ (CD20z) CAR的双顺反子形式。

[0019] 图2示出了具有信号传导结构域的抗CD19 CAR的实施方案,该信号传导结构域选自由密码子优化的 ϵ (Δ 181-185)、密码子优化的 ϵ (R183K)和密码子优化的 ϵ (S178N.R183K)组成的组。

[0020] 图3示出了具有信号传导结构域的抗CD19 CAR的实施方案,该信号传导结构域选自由 ζ 、 ζ 1xx、 ϵ 、 δ 、 γ 、Dap12、密码子优化的 ζ 和密码子优化的 ϵ 组成的组。

具体实施方式

[0021] 术语

[0022] 为了更容易理解本公开,下面首先定义某些术语。在整个说明书中阐述了以下术语和其他术语的附加定义。

[0023] 如本说明书和所附权利要求书中所使用的,单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数指代物,除非上下文另有明确规定。

[0024] 除非特别说明或从上下文中显而易见,否则如本文所用,术语“或”被理解为包含性的并且涵盖“或”和“和”两者。

[0025] 本文所使用的术语“和/或”应被视为两个指定特征或部件中的每一者连同或不连同另一者的具体公开。因此,如在本文中诸如“A和/或B”之类的短语中使用的术语“和/或”旨在包括A和B;A或B;A(单独);以及B(单独)。同样,如诸如“A、B和/或C”之类的短语中使用的术语“和/或”旨在涵盖以下每个方面:A、B和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);以及C(单独)。

[0026] 如本文所用,术语“例如”仅以举例的方式使用,并非旨在进行限制,并且不应被解释为仅指代说明书中明确列举的那些项目。

[0027] 术语“或更多”、“至少”、“超过”等例如“至少一个”被理解为包括但不限于至少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、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149或150、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000或超过所述值。还包括其间任何更大的数字或分数。

[0028] 相反,术语“不超过”包括小于所述值的每个值。例如,“不超过100个核苷酸”包括100、99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、89、88、87、86、85、84、83、82、81、80、79、78、77、76、75、74、73、72、71、70、69、68、67、66、65、64、63、62、61、60、59、58、57、56、55、54、53、52、51、50、49、48、47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、

25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1和0个核苷酸。还包括其间任何更小的数字或分数。

[0029] 术语“多个”、“至少两个”、“两个或更多个”、“至少第二”等被理解为包括但不限于至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149或150、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000或更多。还包括其间任何更大的数字或分数。

[0030] 在整个说明书中，词语“包括”或诸如“包含”或“具有”之类的变型形式将被理解为暗示包含所述元素、整数或步骤或者元素、整数或步骤的组，但不排除任何其他元素、整数或步骤或者元素、整数或步骤的组。应当理解，无论本文在何处用语言“包括”描述各方面，还提供了按照“由...组成”和/或“基本上由...组成”描述的其他类似方面。

[0031] 除非特别说明或从上下文明显看出，术语“约”是指在如本领域普通技术人员所确定的特定值或组成的可接受误差范围内的值或组成，这将部分地取决于如何测量或确定该值或组成，即测量系统的局限性。例如，根据本领域的实践，“约”或“基本上由...组成”可意指在一个或超过一个标准偏差内。“约”或“基本上由...组成”可意指至多10%（即，±10%）的范围。因此，“约”可被理解为在比所述值大或小10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、0.01%或0.001%内。例如，约5mg可以包括介于4.5mg与5.5mg之间的任何量。此外，特别是相对于生物系统或过程，这些术语可以意指某个值的至多一个数量级或至多5倍。当在本公开中提供特定值或组成时，除非另有说明，否则“约”或“基本上由...组成”的含义应被假定在该特定值或组成的可接受误差范围内。

[0032] 如本文所述，任何浓度范围、百分比范围、比率范围或整数范围应被理解为包括在所述范围内的任何整数的值，以及在适当时其分数（诸如整数的十分之一和百分之一），除非另有说明。

[0033] 本文使用的单位、前缀和符号使用它们的国际单位制(SI)接受的形式提供。数字范围包括定义该范围的数字。

[0034] 除非另有定义，否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本公开相关领域的普通技术人员通常理解的含义。例如，Juo，“生物医学与分子生物学简明词典(The Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology)”，第2版，2001年，CRC出版社(CRC Press)；“细胞与分子生物学词典(The Dictionary of Cell&Molecular Biology)”，第5版，2013年，学术出版社(Academic Press)；以及“牛津生物化学与分子生物学词典(The Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology)”，Cammack等人编辑，第2版，2006年，Oxford University Press)为本领域技术人员提供了本公开中使用的许多术语的通用词典。

[0035] “施用”是指使用本领域技术人员已知的各种方法和递送系统中的任何一种将药剂物理引入受试者，诸如本文公开的工程化T细胞。用于本文所公开的制剂的示例性施用途

径包括静脉内、肌内、皮下、腹膜内、脊髓或其他肠胃外施用途径(例如,通过注射或输注)。短语“肠胃外施用”意指除了肠内和局部施用之外的施用模式(通常通过注射),并且包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、淋巴内、病灶内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注,以及体内电穿孔。在一些实施方案中,经由非肠胃外途径(例如,口服)施用制剂。其他非肠胃外途径包括局部、表皮或粘膜施用途径,例如鼻内、阴道、直肠、舌下或局部。施用也可以例如进行一次、进行多次,以及/或者在一个或多个延长的时段内进行。

[0036] 术语“活化的”和“活化”是指已经被充分刺激以诱导可检测的细胞增殖的T细胞的状态。在一个实施方案中,活化还可以与诱导的细胞因子产生和可检测的效应子功能相关联。术语“活化的T细胞”主要是指正在增殖的T细胞。单独通过TCR产生的信号可能不足以完全活化T细胞,并且可能还需要一种或多种次级或共刺激信号。因此,T细胞活化包括通过TCR/CD3复合物产生的初级刺激信号,以及一种或多种次级共刺激信号。共刺激可以通过已接受初级活化信号(诸如通过TCR/CD3复合物进行刺激)的T细胞引起的增殖和/或细胞因子产生来证明。

[0037] 术语“药剂”可以指任何种类的分子或实体,或多个分子或实体,其中任一者可以是例如多肽、核酸、糖、脂质、小分子、金属、细胞(诸如T细胞或此类细胞的祖细胞)或生物体(例如,其级分或提取物)或它们的组分。在一些实施方案中,药剂可以以分离的或纯的形式使用。在一些实施方案中,药剂可以以粗制或不纯的形式使用。在一些实施方案中,药剂可以作为群体、集合或文库提供,例如可以对其进行筛选以识别或表征其中存在的成员。

[0038] 术语“同种异体”是指来源于一个个体并且随后引入相同物种的另一个个体的任何材料,例如同种异体T细胞移植。

[0039] 术语“自体”是指来源于相同个体并且稍后再次引入该个体的任何材料。例如,本文所述的工程化自体细胞疗法方法涉及从患者收集淋巴细胞,然后将其工程化以表达例如CAR构建体,随后施用回同一患者。

[0040] 术语“抗体”(Ab)包括但不限于特异性结合抗原的糖蛋白免疫球蛋白。一般来讲,抗体可以包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链,或者其抗原结合分子。每条H链包含重链可变区(在本文中缩写为VH)和重链恒定区。重链恒定区包含三个恒定结构域CH1、CH2和CH3。每条轻链包含轻链可变区(在本文中缩写为VL)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个恒定结构域CL。VH区和VL区可以进一步细分为高变区(称为互补决定区(CDR)),其间散布更保守的区域(称为框架区(FR))。每个VH和VL包含三个CDR和四个FR,其从氨基末端到羧基末端的排列顺序如下:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。Ab的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,该宿主组织或因子包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)。一般来讲,人抗体是大约150kD的四聚体作用剂,其由两个相同的重(H)链多肽(各约50kD)和两个相同的轻(L)链多肽(各约25kD)组成,这些多肽彼此缔合成通常称为“Y形”结构的结构。重链和轻链通过单个二硫键彼此连结或连接;另外两个二硫键将重链铰链区彼此连接,使得二聚体彼此连接并且形成四聚体。天然产生的抗体也是糖基化的,例如在CH2结构域上糖基化。

[0041] 术语“人抗体”旨在包括具有由人免疫球蛋白序列产生、装配或衍生的可变结构域

序列和恒定结构域序列、或者与其不可区分的序列的抗体。在一些实施方案中,抗体(或抗体组分)可以被认为是“人的”,即使它们的氨基酸序列包含不是由人种系免疫球蛋白序列编码的残基或元件(例如,通过体外随机或位点特异性诱变引入的变异或者通过体内体细胞突变引入的变异)。术语“人源化”旨在包括具有以下可变结构域的抗体:该可变结构域具有来源于非人物种(例如,小鼠)的可变结构域的序列,其被修饰为与人种系编码序列更相似。在一些实施方案中,“人源化”抗体包含一个或多个基本上具有人框架结构域的氨基酸序列的框架结构域,以及一个或多个基本上具有非人抗体的氨基酸序列的互补决定区。在一些实施方案中,人源化抗体包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常为人免疫球蛋白恒定结构域的至少一部分。在一些实施方案中,人源化抗体可以包含人重链恒定结构域的C_H1、铰链、C_H2、C_H3,以及任选地,C_H4区。

[0042] 抗体可以包括例如单克隆抗体、重组产生的抗体、单特异性抗体、多特异性抗体(包括双特异性抗体)、人抗体、工程化的抗体、人源化的抗体、嵌合抗体、免疫球蛋白、合成抗体、包含两个重链和两个轻链分子的四聚体抗体、抗体轻链单体、抗体重链单体、抗体轻链二聚体、抗体重链二聚体、抗体轻链-抗体重链对、内体、抗体融合体(有时在本文中称为“抗体缀合物”)、异源缀合物抗体、单结构域抗体、单价抗体、单链抗体或单链Fv(scFv)、骆驼化抗体、亲和体、Fab片段、F(ab')₂片段、二硫键连接的Fv(sdFv)、抗独特型(抗Id)抗体(包括例如抗抗Id抗体)、微型抗体、结构域抗体、合成抗体(有时在本文中称为“抗体模拟物”),以及上述任一种抗体的抗原结合片段。在某些实施方案中,本文所述的抗体是指多克隆抗体群体。抗体还可以包括例如Fab'片段、Fd'片段、Fd片段、分离的CDR、单链Fv、多肽-Fc融合体、单结构域抗体(例如,鲨鱼单结构域抗体,诸如IgNAR或其片段)、骆驼科动物抗体、单链双抗体或串联双抗体(TandAb[®])、Anticalins[®]、Nanobodies[®]微型抗体、BiTE[®]、锚蛋白重复蛋白或DARPIN[®]、Avimers[®]、DART、TCR样抗体、Adnectins[®]、Affilins[®]、Trans-bodies[®]、Affibodies[®]、TrimerX[®]、微量蛋白抗体、Fynomers[®]、Centyrins[®]和KALBITOR[®]。

[0043] 免疫球蛋白可以来源于任何通常已知的同种型,包括但不限于IgA、分泌型IgA、IgG、IgE和IgM。IgG亚类也是本领域技术人员众所周知的,包括但不限于人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。“同种型”是指由重链恒定区基因编码的Ab类或亚类(例如,IgM或IgG1)。举例来说,术语“抗体”包括天然存在的抗体和非天然存在的抗体;单克隆抗体和多克隆抗体;嵌合抗体和人源化抗体;人抗体或非人抗体;全合成抗体;和单链抗体。非人抗体可以通过重组方法人源化,以降低其在人体内的免疫原性。在未明确说明的情况下,并且除非上下文另外指示,否则术语“抗体”还包括前述免疫球蛋白中的任一种免疫球蛋白的抗原结合片段或抗原结合部分,并且包括单价和二价的片段或部分,以及单链抗体。

[0044] “抗原结合分子”、“抗原结合部分”、“抗原结合片段”、“抗体片段”或“抗原结合结构域”是指包含衍生该分子的抗体的抗原结合部分(例如,CDR)的任何分子。抗原结合分子可以包含抗原互补决定区(CDR)。抗体片段的示例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段、dAb、线性抗体、scFv抗体以及由抗原结合分子形成的多特异性抗体。肽体(即,包含肽结合结构域的Fc融合分子)是合适的抗原结合分子的另一个示例。在一些实施方案中,抗原结合分子结合肿瘤细胞上的抗原。在一些实施方案中,抗原结合分子结合参与过度增殖性疾

病的细胞上的抗原或者病毒或细菌抗原。在某些实施方案中,抗原结合分子是嵌合抗原受体(CAR)。在某些实施方案中,抗原结合分子或结构域结合CD19。在某些实施方案中,抗原结合分子或结构域为特异性结合抗原的抗体片段,包括其互补决定区(CDR)中的一者或多者。在另外的实施方案中,抗原结合分子是单链可变区片段(scFv)。

[0045] 在一些情况下,CDR与参考抗体(例如,本公开的抗体)中发现的CDR和/或本公开中提供的CDR的序列基本上相同。在一些实施方案中,CDR与参考CDR(例如,本公开中,例如表4中提供的CDR)基本上相同,因为与参考CDR相比,其序列相同或者含有1、2、3、4或5个(例如,1-5个)氨基酸取代。在一些实施方案中,CDR与参考CDR基本上相同,因为其显示与参考CDR具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%(例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的序列同一性。在一些实施方案中,CDR与参考CDR基本上相同,因为其显示与参考CDR具有至少96%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。在一些实施方案中,CDR与参考CDR基本上相同,因为与参考CDR相比,该CDR内缺失、添加或取代了一个氨基酸,而该CDR的氨基酸序列在其他方面与参考CDR的氨基酸序列相同。在一些实施方案中,CDR与参考CDR基本上相同,因为与参考CDR相比,该CDR内缺失、添加或取代了2、3、4或5(例如2至5个)氨基酸,而该CDR的氨基酸序列在其他方面与参考CDR的氨基酸序列相同。在各种实施方案中,抗原结合片段与参考抗体结合相同的抗原。在各种实施方案中,抗原结合片段与参考抗体交叉竞争,例如,与参考抗体结合基本上相同或相同的表位。

[0046] 抗原结合片段可以通过任何方式产生。例如,在一些实施方案中,抗原结合片段可以通过完整抗体的片段化来以酶促方式或化学方式产生。在一些实施方案中,抗原结合片段可以重组产生(诸如通过表达工程化核酸序列)。在一些实施方案中,抗原结合片段可以是完全或部分合成产生的。在一些实施方案中,抗原结合片段可以具有至少约50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190个或更多个氨基酸的长度;在一些实施方案中,至少约200个氨基酸(例如,50-100个、50-150个、50-200个或100-200个氨基酸)的长度。

[0047] 术语“可变区”或“可变结构域”可互换使用。可变区通常是指抗体的一部分,一般指轻链或重链的一部分,通常是成熟重链中的氨基末端的约110至120个氨基酸和成熟轻链中的约90至115个氨基酸,其在抗体之间在序列中存在广泛差异并且用于特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。序列的变异性集中在称为互补决定区(CDR)的那些区域中,而可变结构域中的更高度保守的区域称为框架区(FR)。不希望受任何特定机制或理论的束缚,据信轻链和重链的CDR主要负责抗体与抗原的相互作用和特异性。在某些实施方案中,可变区是人可变区。在某些实施方案中,可变区包括啮齿动物或鼠CDR和人框架区(FR)。在实施方案中,可变区是灵长类动物(例如,非人灵长类动物)可变区。在某些实施方案中,可变区包括啮齿动物或鼠CDR和灵长类动物(例如,非人灵长类动物)框架区(FR)。

[0048] 术语“VL”和“VL结构域”可互换使用,以指代抗体或其抗原结合分子的轻链可变区。

[0049] 术语“VH”和“VH结构域”可互换使用,以指代抗体或其抗原结合分子的重链可变区。

[0050] 通常使用CDR的许多定义:Kabat编号、Chothia编号、AbM编号或Contact编号。AbM

定义是Oxford Molecular的AbM抗体建模软件所使用的两种定义之间的折衷。Contact定义基于对可获得的复杂晶体结构的分析。

[0051] 表1.CDR编号

环	Kabat	AbM	Chothia	Contact
L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
[0052] H1	H31--H35B (Kabat 编号)	H26--H35B	H26--H32..34	H30--H35B
H1	H31--H35 (Chothia 编号)	H26--H35	H26--H32	H30--H35
H2	H50--H65	H50--H58	H52--H56	H47--H58
H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

[0053] 术语“Kabat编号”和类似术语是本领域公认的,是指对抗体或其抗原结合分子的重链可变区和轻链可变区中的氨基酸残基进行编号的系统。在某些方面,抗体的CDR可以根据Kabat编号系统来确定(参见例如,Kabat EA和Wu TT(1971) Ann NY Acad Sci 190:382-391,以及Kabat EA等人,(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,美国卫生与公众服务部,NIH公开号91-3242)。使用Kabat编号系统,抗体重链分子内的CDR通常存在于以下氨基酸位置处:氨基酸位置31至35,其在35(在Kabat编号方案中称为35A和35B)之后任选地可以包括一个或两个附加的氨基酸(CDR1);氨基酸位置50至65(CDR2);以及氨基酸位置95至102(CDR3)。使用Kabat编号系统,抗体轻链分子内的CDR通常存在于以下氨基酸位置处:氨基酸位置24至34(CDR1),氨基酸位置50至56(CDR2),以及氨基酸位置89至97(CDR3)。在一个具体的实施方案中,已根据Kabat编号方案确定本文所述抗体的CDR。

[0054] 在某些方面,抗体的CDR可根据Chothia编号方案确定,其是指免疫球蛋白结构环的位置(参见例如Chothia C&Lesk AM,(1987), J Mol Biol 196:901-917;Al-Lazikani B等人,(1997) J Mol Biol 273:927-948;Chothia C等人,(1992) J Mol Biol 227:799-817;Tramontano A等人,(1990) J Mol Biol 215(1):175-82;以及美国专利7,709,226号)。通常,当使用Kabat编号惯例时,Chothia CDR-H1环存在于重链氨基酸26至32、33或34处,Chothia CDR-H2环存在于重链氨基酸52至56,并且Chothia CDR-H3环存在于重链氨基酸95至102处,而Chothia CDR-L1环存在于轻链氨基酸24至34处,Chothia CDR-L2环存在于轻链氨基酸50至56处,并且Chothia CDR-L3环存在于轻链氨基酸89至97处。当使用Kabat编号惯例编号时,Chothia CDR-H1环的末端根据环的长度在H32与H34之间变化(这是因为Kabat编号方案将插入置于H35A和H35B处;如果35A和35B都不存在,则环在32处结束;如果仅存在35A,则环在33处结束;如果35A和35B都存在,则环在34处结束。在一个具体的实施方案中,已根据Chothia编号方案确定本文所述抗体的CDR。

[0055] 术语“恒定区”和“恒定结构域”可互换使用并且具有本领域的普通含义。恒定区是抗体部分,例如,轻链和/或重链的羧基末端部分,其不直接参与抗体与抗原的结合,但是可以表现出各种效应子功能,诸如与Fc受体相互作用。免疫球蛋白分子的恒定区通常具有相

对于免疫球蛋白可变结构域更保守的氨基酸序列。

[0056] 术语“重链”在参考抗体使用时,可以指基于恒定结构域的氨基酸序列的任何不同类型,例如 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ ,其分别产生IgA、IgD、IgE、IgG和IgM类抗体,包括IgG亚类,例如IgG₁、IgG₂、IgG₃和IgG₄。

[0057] 术语“轻链”在参考抗体使用时,可以指基于恒定结构域的氨基酸序列的任何不同类型,例如 κ 或 λ 。轻链氨基酸序列在本领域中是众所周知的。在具体实施方案中,轻链是人轻链。

[0058] “抗原”是指可以刺激人或动物中的抗体产生或T细胞响应的化合物、组合物或物质,包括被注射或吸收到人或动物中的组合物(诸如包含肿瘤特异性蛋白质的组合物)。抗原与特异性体液免疫或细胞免疫的产物反应,该免疫包括由异源性抗原(诸如本发明所公开的抗原)诱导的那些。“靶标抗原”或“感兴趣的靶标抗原”是基本上未在其他正常(所需)细胞的表面上发现并且本文设想的CAR的结合结构域被设计成与之结合的抗原。本领域技术人员将容易理解,任何大分子(包括几乎所有蛋白质或肽)都可以充当抗原。抗原可以内源性表达,即由基因组DNA表达,或者可以重组表达。抗原可以对于某种组织(诸如癌细胞)具有特异性,或者可以广泛表达。此外,较大分子的片段可以充当抗原。在一个实施方案中,抗原是肿瘤抗原。在一个具体实施方案中,抗原是CD19的全部或片段。在某些实施方案中,抗原可包括但不限于707-AP(707丙氨酸脯氨酸)、AFP(阿尔法(a)-甲胎蛋白)、ART-4(由T4细胞识别的腺癌抗原)、BAGE(B抗原;b-连环蛋白/m、b-连环蛋白/突变的)、BCMA(B细胞成熟抗原)、Bcr-abl(裂点簇区-Abelson)、CAIX(碳酸酐酶IX)、CD19(分化簇19)、CD20(分化簇20)、CD22(分化簇22)、CD30(分化簇30)、CD33(分化簇33)、CD44v7/8(分化簇44,外显子7/8)、CAMEL(黑色素瘤上的CTL识别的抗原)、CAP-1(癌胚抗原肽1)、CASP-8(半胱天冬酶8)、CDC27m(突变的细胞分裂周期蛋白27)、CDK4/m(突变的环化素依赖性激酶4)、CEA(癌胚抗原)、C型凝集素样-1(CLL-1)、CT(癌/睾丸(抗原))、Cyp-B(亲环蛋白B)、DAM(黑色素瘤上的分化抗原)、EGFR(表皮生长因子受体)、EGFRvIII(表皮生长因子受体变体III)、EGP-2(表皮糖蛋白2)、EGP-40(表皮糖蛋白40)、ErbB2、3、4(成红细胞白血病病毒癌基因同源物-2、-3、4)、ELF2M(突变的延伸因子2)、ETV6-AML1(Ets变体基因6/急性髓样白血病1基因ETS)、FBP(叶酸结合蛋白)、fAChR(胎儿乙酰胆碱受体)、G250(糖蛋白250)、GAGE(G抗原)、GD2(二唾液酸神经节苷2)、GD3(二唾液酸神经节苷3)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(GPC3)、GnT-V(N-乙酰葡萄糖胺转移酶V)、Gp100(糖蛋白100kd)、HAGE(解旋酶抗原)、HER-2/neu(人表皮受体2/神经;也称为EGFR2)、HLA-A(人白细胞抗原A)、HPV(人乳头瘤病毒)、HSP70-2M(突变的热休克蛋白70-2)、HST-2(人环状体肿瘤因子2)、hTERT或hTRT(人端粒酶逆转录酶)、iCE(肠道羧基酯酶)、IL-13R-a2(白介素13受体亚基 α -2)、KIAA0205、KDR(激酶插入区受体)、 κ 轻链、LAGE(L抗原)、LDLR/FUT(低密度脂质受体/GDP-L-岩藻糖:b-D-半乳糖苷酶2-a-L岩藻糖基转移酶)、LeY(Lewis-Y抗体)、L1 CAM(L1细胞粘附分子)、MAGE(黑色素瘤抗原)、MAGE-A1(黑色素瘤相关抗原1)、间皮素、鼠CMV感染细胞、MART-1/Melan-A(由T细胞识别的黑色素瘤抗原1/黑色素瘤抗原A)、MC1 R(黑皮质素1受体)、肌球蛋白/m(突变的肌球蛋白)、MUC1(粘蛋白1)、MUM-1、-2、-3(黑色素瘤遍在突变蛋白1、2、3)、NA88-A(患者M88的NA cDNA克隆)、NKG2D(自然杀伤组2、成员D)配体、NY-BR-1(纽约乳腺分化抗原1)、NY-ESO-1(纽约食管鳞状细胞癌-1)、癌胚抗原(h5T4)、P15(蛋白质15)、p190较小bcr-abl(190KD蛋白质bcr-abl)、Pml/

RARa (前髓细胞性白血病/视黄酸受体a)、PRAME (黑色素瘤的优先表达抗原)、PSA (前列腺特异性抗原)、PSCA (前列腺干细胞抗原)、PSMA (前列腺特异性膜抗原)、RAGE (肾抗原)、RU1或RU2 (肾遍在蛋白1或2)、SAGE (肉瘤抗原)、SART-1或SART-3 (排斥肿瘤的鳞状抗原1或3)、SSX1、-2、-3、-4 (滑膜肉瘤X1、-2、-3、-4)、TAA (肿瘤相关抗原)、TAG-72 (肿瘤相关糖蛋白72)、TEL/AML1 (易位Ets家族白血病/急性髓样白血病1)、TPI/m (突变的磷酸丙糖异构酶)、TRP-1 (酪氨酸酶相关蛋白1或gp75)、TRP-2 (酪氨酸酶相关蛋白2)、TRP-2/INT2 (TRP-2/内含子2)、VEGF-R2 (血管内皮生长因子受体2) 或WT1 (Wilms肿瘤基因)。

[0059] “靶标”是由结合结构域、抗原结合系统、CAR或抗原结合剂(例如,抗体)结合的任何分子。

[0060] “抗原特异性靶向区域”(ASTR)是指靶向特异性抗原的CAR区域。CAR上的靶向区域是细胞外的。在一些实施方案中,抗原特异性靶向区域包含抗体或其功能等同物或其片段或其衍生物,并且每个靶向区域靶向不同的抗原。靶向区域可包含全长重链、Fab片段、单链Fv(scFv)片段、二价单链抗体或双抗体,它们中的每一者对靶标抗原是特异性的。然而,存在许多替代物,诸如连接的细胞因子(其导致识别携带细胞因子受体的细胞)、亲和体、来自天然存在的受体的配体结合结构域、受体(例如在肿瘤细胞上)的可溶性蛋白质/肽配体、肽以及促进免疫应答的疫苗,它们各自可用于本公开的各种实施方案中。事实上,如本领域技术人员所理解的,几乎任何以高亲和力结合给定抗原的分子都可用作抗原特异性靶向区域。

[0061] “抗原递呈细胞”或“APC”是指处理抗原并且将抗原递呈给T细胞的细胞。示例性APC包括树突状细胞、巨噬细胞、B细胞、某些活化的上皮细胞,以及能够进行TCR刺激和适当的T细胞共刺激的其他细胞类型。

[0062] “抗肿瘤作用”是指可以表现为肿瘤体积减小、肿瘤细胞数目减少、肿瘤细胞增殖减少、转移瘤数目减少、总生存期或无进展生存期延长、预期寿命延长,或者与肿瘤相关的各种生理症状改善的生物学作用。抗肿瘤作用还可以指预防肿瘤的发生。

[0063] 如果一个事件或实体的存在、级别和/或形式与另一个事件或实体的存在、级别和/或形式相关,则两个事件或实体彼此“关联”。例如,如果实体(例如,多肽、遗传标记、代谢物、微生物等)的存在、水平和/或形式与疾病、障碍或病症的发病率和/或对疾病、障碍或病症的易感性关联(例如,跨越相关群体),则认为该实体与疾病、障碍或病症相关联。例如,如果两个或更多个实体直接或间接地相互作用,则它们在物理上彼此“关联”,使得它们彼此在物理上接近和/或保持彼此接近(例如,结合)。在另外的示例中,彼此物理缔合的两个或更多个实体彼此共价连接或连接,或非共价缔合,例如通过氢键、范德华相互作用、疏水相互作用、磁性以及它们的组合。

[0064] “结合亲和力”通常是指分子(例如,抗体)的单个结合位点与其结合配偶体(例如,抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另外指明,否则“结合亲和力”是指反映结合对的成员(例如,抗体和抗原)之间的1:1相互作用的内在结合亲和力。分子X对其配偶体Y的亲和力通常可以由解离常数(K_D)表示。可以以本领域已知的多种方式测量和/或表达亲和力,包括但不限于平衡解离常数(K_D)和平衡缔合常数(K_A)。 K_D 由koff/kon的商计算,而 K_A 由kon/koff的商计算。kon是指例如抗体与抗原的缔合速率常数,并且koff是指例如抗体与抗原的解离。kon和koff可以通过本领域普通技术人员已知的技术确定,诸如BIAcore®或

KinExA。

[0065] 术语“ K_D ” (M) 指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数,或抗体或抗体结合片段与抗原结合的解离平衡常数。 K_D 与结合亲和力之间存在反比关系,因此 K_D 值越小,亲和力越高,即越强。因此,术语“较高亲和力”或“较强亲和力”涉及形成相互作用的较高能力并且因此涉及较小的 K_D 值,并且相反地,术语“较低亲和力”或“较弱亲和力”涉及形成相互作用的较低能力并且因此涉及较大的 K_D 值。在一些情况下,特定分子(例如,抗体)对其相互作用配偶体分子(例如,抗原X)的结合亲和力(或 K_D)相比于该分子(例如,抗体)对另一相互作用配偶体分子(例如抗原Y)的结合亲和力较高,可表示为通过将较大的 K_D 值(较低或较弱的亲和力)除以较小的 K_D 值(较高或较强的亲和力)所确定的结合比率,例如表示为5倍或10倍大的结合亲和力,视情况而定。

[0066] 术语“ k_d ” (sec⁻¹或1/s) 是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率常数,或抗体或抗体结合片段的解离速率常数。所述值也被称为 k_{off} 值。

[0067] 术语“ k_a ” (M⁻¹×sec⁻¹或1/M) 是指特定抗体-抗原相互作用的缔合速率常数,或抗体或抗体结合片段的缔合速率常数。

[0068] 术语“ K_A ” (M⁻¹或1/M) 是指特定抗体-抗原相互作用的缔合平衡常数,或抗体或抗体结合片段的缔合平衡常数。通过将 k_a 除以 k_d 获得缔合平衡常数。

[0069] 术语“结合”通常是指两个或更多个实体之间的非共价结合。直接结合涉及实体或部分之间的物理接触。“间接”结合涉及通过与一个或多个中间实体物理接触的方式的物理交互。两个或更多个实体之间的结合可以在多种背景中的任一种中评估,例如,其中相互作用的实体或部分在分离中或在更复杂系统的背景中研究(例如,当与载体实体共价地或以其他方式缔合时和/或在生物系统诸如细胞中)。

[0070] 术语“免疫特异性结合”、“免疫特异性识别”、“特异性结合”和“特异性识别”在抗体的情境下是类似的术语,并且是指结合抗原(例如,表位或免疫复合物)的分子,因为这种结合是本领域技术人员所理解的。例如,与抗原特异性结合的分子可与其他肽或多肽结合,通常具有较低的亲和力,如通过例如免疫测定法、**BIACORE**[®]、KinExA 3000仪器(Sapidyne Instruments,Boise,ID)或本领域已知的其他测定法所测定的。在一个具体的实施方案中,与抗原特异性结合的分子与具有一定 K_A 的抗原结合,当分子与另一种抗原结合时, K_A 为至少2log、2.5log、3log、4log或更大。与结合结构域、抗体或CAR与不是靶标(即,非靶标)的实体的缔合相比,结合可包括结合结构域、抗体或CAR与结合结构域、抗体或CAR的靶标的优先缔合。在一些实施方案中,如果与结合结构域、抗体或CAR与非靶标的结合相比,结合结构域、抗体或CAR与靶标之间的结合大于2倍、大于5倍、大于10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或大于100倍,则结合结构域、抗体或CAR选择性地结合靶标。在一些实施方案中,如果结合亲和力小于约 10^{-5} M、小于约 10^{-6} M、小于约 10^{-7} M、小于约 10^{-8} M或小于约 10^{-9} M,则结合结构域、抗体或CAR选择性地结合靶标。

[0071] 在另一个实施方案中,与抗原特异性结合的分子以约 1×10^{-7} M的离解常数(K_d)结合。在一些实施方案中,当 K_d 为 1×10^{-9} M至约 5×10^{-9} M时,抗原结合分子以“高亲和力”与抗原特异性结合。在一些实施方案中,当 K_d 为 1×10^{-10} M至约 5×10^{-10} M时,抗原结合分子以“非常高的亲和力”与抗原特异性结合。在一个实施方案中,抗原结合分子具有 10^{-9} M的 K_d 。在一个实施方案中,解离速率小于约 1×10^{-5} 。在实施方案中,抗原结合分子以约 1×10^{-10} M至约 $5 \times$

10^{-10} M的 K_d 结合CD19。

[0072] 在某些实施方案中,本文提供了与靶标人抗原结合的抗体或其抗原结合分子,例如,在某些实施方案中,该抗原结合分子以比对另一种靶标抗原高5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%或更高的亲和力与CD19结合,如通过例如放射免疫测定、表面等离子共振或动力学排阻测定所测量的。在一个具体的实施方案中,本文所述的结合人靶标抗原的抗体或其抗原结合分子将以小于10%、15%或20%的抗体或其抗原结合分子与人抗原的结合与另一种靶标抗原结合,如通过例如放射免疫测定、表面等离子体共振或动力学排阻测定所测量的。

[0073] “癌症”是指一组广泛的各种疾病,特征在于体内异常细胞的不受控制的生长。不受调节的细胞分裂和生长导致恶性肿瘤的形成,该恶性肿瘤侵袭邻近组织并且还可通过淋巴系统或血流转移到身体的远端部分。“癌”或“癌组织”可包括肿瘤。可以通过本公开的方法治疗的癌症的示例包括但不限于免疫系统的癌症,包括淋巴瘤、白血病、骨髓瘤和其他白细胞恶性肿瘤。在一些实施方案中,本公开的方法可以用于减小来源于例如以下癌症的肿瘤的肿瘤大小:骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈癌、皮肤或眼内恶性黑素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛区癌、胃癌、睾丸癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、多发性骨髓瘤、霍奇金氏病、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、原发性纵隔大B细胞淋巴瘤(PMBC)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、转化滤泡性淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤(SMZL)、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、慢性或急性白血病、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、急性淋巴细胞性白血病(ALL)(包括非T细胞ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、儿童实体瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾脏或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管生成、脊髓轴肿瘤、脑干胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西氏肉瘤、表皮样癌、鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤、环境引起的癌症(包括石棉引起的那些癌症)、其他B细胞恶性肿瘤,以及所述癌症的组合。在一个具体实施方案中,癌症是多发性骨髓瘤。特定癌症可能对化疗或放疗有应答,或者癌症可能是难治性的。难治性癌症是指不适于外科手术干预的癌症,并且该癌症最初对化疗或放疗无应答,或者该癌症随时间推移而变得无应答。癌症还包括二线或更多线全身疗法之后的复发或难治性癌症,包括弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)非特指型、二线或更多线全身疗法之后的原发性纵隔大B细胞淋巴瘤、高级别B细胞淋巴瘤、以及由滤泡性淋巴瘤引起的DLBCL,以及滤泡性淋巴瘤。

[0074] “趋化因子”是一种介导细胞趋化性或定向运动的细胞因子。趋化因子的示例包括但不限于IL-8、IL-16、嗜酸性粒细胞活化趋化因子、嗜酸性粒细胞活化趋化因子-3、巨噬细胞源趋化因子(MDC或CCL22)、单核细胞趋化蛋白1(MCP-1或CCL2)、MCP-4、巨噬细胞炎性蛋白1 α (MIP-1 α 、MIP-1a)、MIP-1 β (MIP-1b)、 γ 诱导蛋白10(IP-10)和胸腺活化调节趋化因子(TARC或CCL17)。

[0075] “嵌合抗原受体”或“CAR”是指被工程化为包含结合结构域以及在抗原结合后活化免疫细胞(例如T细胞,诸如幼稚T细胞、中枢记忆T细胞、效应记忆T细胞、iNKT细胞、NK细胞或它们的组合)的手段的分子。CAR也称为人工T细胞受体、嵌合T细胞受体或嵌合免疫受体。在一些实施方案中,CAR包含结合结构域、细胞外结构域、跨膜结构域、一个或多个共刺激结构域,以及细胞内信号传导结构域。已经被基因工程化以表达嵌合抗原受体的T细胞可以称

为CAR T细胞。

[0076] “细胞外结构域” (或“ECD”) 是指多肽的一部分, 当多肽存在于细胞膜中时, 该部分被理解为位于细胞膜的外部、在细胞外空间中。

[0077] 如本文所用, 术语“细胞外配体结合结构域” 是指能够结合配体 (例如, 细胞表面分子) 的寡肽或多肽。例如, 可选择细胞外配体结合结构域来识别在与特定疾病状态 (例如, 癌症) 相关的靶标细胞上充当细胞表面标志物的配体。可作为配体的细胞表面标志物的示例包括与病毒、细菌和寄生虫感染、自身免疫疾病和癌细胞相关的那些。

[0078] CAR的结合结构域之后可以是“间隔区”或“铰链”, 其是指移动抗原结合结构域远离效应细胞表面以实现适当的细胞/细胞接触、抗原结合和活化的区域 (Patel等人, Gene Therapy, 1999; 6: 412-419)。CAR中的铰链区通常在跨膜结构域(TM) 与结合结构域之间。在某些实施方案中, 铰链区是免疫球蛋白铰链区并且可以是野生型免疫球蛋白铰链区或改变的野生型免疫球蛋白铰链区。本文所述的CAR中使用的其他示例性铰链区包括来源于1型膜蛋白质 (诸如CD8 α 、CD4、CD28和CD7) 的细胞外区域的铰链区, 其可以是来自这些分子的野生型铰链区, 或者可以改变。

[0079] “跨膜”区或结构域是CAR的部分, 其将细胞外结合部分锚定到免疫效应细胞的质膜上, 并促进结合结构域与靶标抗原的结合。跨膜结构域可以是CD3 ζ 跨膜结构域, 然而可使用的其他跨膜结构域包括从CD8 α 、CD4、CD28、CD45、CD9、CD16、CD22、CD33、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137和CD154获得的那些。在一个实施方案中, 跨膜结构域是CD137的跨膜结构域。在某些实施方案中, 跨膜结构域是合成的, 在这种情况下, 其将主要包含疏水性残基诸如亮氨酸和缬氨酸。

[0080] “细胞内信号传导结构域”或“信号传导结构域”是指嵌合抗原受体蛋白的以下部分: 其参与将结合靶标抗原的有效CAR的消息转导进免疫效应细胞的内部中, 以引发效应细胞功能, 例如活化、细胞因子产生、增殖和细胞毒性活性, 包括将细胞毒性因子释放到CAR结合的靶标细胞, 或者用抗原结合至细胞外CAR结构域引发的其他细胞应答。术语“效应子功能”是指细胞的特化功能。例如, T细胞的效应子功能可以是细胞溶解活性或者有助于活性 (包括细胞因子分泌)。因此, 术语“细胞内信号传导结构域”或“信号传导结构域”在本文中可互换使用, 是指转导效应子功能信号并且引导细胞执行特化功能的蛋白质部分。虽然通常可以采用整个细胞内信号传导结构域, 但是在许多情况下, 不必使用整个结构域。在使用细胞内信号传导结构域的截短部分的情况下, 可以使用此类截短部分替代整个结构域, 只要其转导效应子功能信号即可。术语“细胞内信号传导结构域”意在包括该细胞内信号传导结构域的足以转导效应子功能信号的任何截短部分。细胞内信号传导结构域也称为“信号转导结构域”, 并且通常来源于人CD3或FcR γ 链的部分。

[0081] 已知单独通过T细胞受体产生的信号不足以完全活化T细胞, 并且还需要次级或共刺激信号。因此, T细胞活化可被称为由以下两个不同类别的细胞质信号传导序列介导: 通过T细胞受体启动抗原依赖性初级活化的那些 (初级细胞质信号传导序列) 和以抗原非依赖性方式起作用以提供次级或共刺激信号的那些 (次级细胞质信号传导序列)。以初级活化方式起作用的细胞质信号传导序列可含有被称为基于免疫受体酪氨酸的活化基序或ITAM的信号传导基序。在本公开中特别有用的含有ITAM的初级细胞质信号传导序列的示例包括来源于DAP-12、CD3 γ 、CD3 δ 和CD3 ϵ 的那些。

[0082] 如本文所用,术语“共刺激信号传导结构域”或“共刺激结构域”是指CAR的包含共刺激分子的细胞内结构域的部分。共刺激分子是不同于抗原受体或Fc受体的细胞表面分子,其在与抗原结合时提供T淋巴细胞有效活化和功能所需的第二信号。此类共刺激分子的示例包括CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40 (CD134)、CD30、CD40、PD-1、ICOS (CD278)、LFA-1、CD2、CD7、LIGHT、NKD2C、B7-H2和特异性结合CD83的配体。因此,虽然本公开提供了来源于CD28和4-1BB的示例性共刺激结构域,但也设想其他共刺激结构域用于本文所述的CAR。包含一个或多个共刺激信号传导结构域可增强表达CAR受体的T细胞的功效和扩增。细胞内信号传导结构域和共刺激信号传导结构域可以任何串联顺序连接到跨膜结构域的羧基末端。

[0083] 尽管工程化以含有来自CD3或FcR γ 的信号传导结构域的基于scFv的CAR已显示递送用于T细胞活化和效应子功能的有效信号,但它们不足以在不存在伴随共刺激信号的情况下引发促进T细胞存活和扩增的信号。含有结合结构域、铰链、跨膜和信号传导结构域以及一个或多个共刺激信号传导结构域(例如,来源于4-1BB、CD28、CD137、CD134和CD278的细胞内共刺激结构域)的其他CAR可更有效地指导体外表达CAR的T细胞中以及动物模型和癌症患者中的抗肿瘤活性以及增加的细胞因子分泌、溶解活性、存活和增殖 (Milone等人, *Molecular Therapy*, 2009; 17: 1453-1464; Zhong等人, *Molecular Therapy*, 2010; 18: 413-420; Carpenito等人, *PNAS*, 2009; 106: 3360-3365)。

[0084] “共刺激信号”是指与诸如TCR/CD3连接之类的初级信号联合引起T细胞应答(诸如但不限于增殖和/或对关键分子的上调或下调)的信号。

[0085] “共刺激配体”包括抗原递呈细胞上的分子,其特异性结合T细胞上的同源共刺激分子。共刺激配体的结合提供了介导T细胞反应(包括但不限于增殖、活化、分化等)的信号。共刺激配体诱导除了刺激分子提供的初级信号之外的信号,例如,通过T细胞受体(TCR)/CD3复合物与装载有肽的主要组织相容性复合物(MHC)分子的结合。共刺激配体可包括但不限于3/TR6、4-1BB配体、结合To11配体受体的激动剂或抗体、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、CD30配体、CD40、CD7、CD70、CD83、疱疹病毒侵入介体(HVEM)、人白细胞抗原G (HLA-G)、ILT4、免疫球蛋白样转录物(ILT)3、诱导型共刺激配体(ICOS-L)、细胞间粘附分子(ICAM)、与B7-H3特异性结合的配体、淋巴毒素 β 受体、MHC I类链相关蛋白A (MICA)、MHC I类链相关蛋白B (MICB)、OX40配体、PD-L2或程序性死亡(PD)-L1。共刺激配体包括但不限于与T细胞上存在的共刺激分子特异性结合的抗体,诸如但不限于4-1BB、B7-H3、CD2、CD27、CD28、CD30、CD40、CD7、ICOS、与CD83特异性结合的配体、淋巴细胞功能相关抗原1 (LFA-1)、自然杀伤细胞受体C (NKG2C)、OX40、PD-1或肿瘤坏死因子超家族成员14 (TNFSF14或LIGHT)。

[0086] “共刺激分子”是T细胞上的同源结合伴侣,其与共刺激配体特异性结合,从而介导T细胞的共刺激反应,诸如但不限于增殖。共刺激分子包括但不限于,“共刺激分子”是T细胞上的同源结合伴侣,其与共刺激配体特异性结合,从而介导T细胞的共刺激应答,诸如但不限于增殖。共刺激分子包括但不限于4-1BB/CD137、B7-H3、BAFFR、BLAME (SLAMF8)、BTLA、CD33、CD45、CD100 (SEMA4D)、CD103、CD134、CD137、CD154、CD16、CD160 (BY55)、CD18、CD19、CD19a、CD2、CD22、CD247、CD27、CD276 (B7-H3)、CD28、CD29、CD3 (α ; β ; δ ; ϵ ; γ ; ζ)、CD30、CD37、CD4、CD40、CD49a、CD49D、CD49f、CD5、CD64、CD69、CD7、CD80、CD83配体、CD84、CD86、CD8 α 、CD8 β 、CD9、CD96 (Tactile)、CD1-1a、CD1-1b、CD1-1c、CD1-1d、CDS、CEACAM1、CRT AM、DAP-

10、DNAM1 (CD226)、Fc γ 受体、GADS、GITR、HVEM (LIGHTR)、IA4、ICAM-1、ICAM-1、ICOS、Iga (CD79a)、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、整合素、ITGA4、ITGA4、ITGA6、ITGAD、ITGAE、ITGAL、ITGAM、ITGAX、ITGB2、ITGB7、ITGB1、KIRDS2、LAT、LFA-1、LFA-1、LIGHT、LIGHT (肿瘤坏死因子超家族成员14; TNFSF14)、LTBR、Ly9 (CD229)、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1 (CD11a/CD18)、MHC I类分子、NKG2C、NKG2D、NKp30、NKp44、NKp46、NKp80 (KLRF1)、OX40、PAG/Cbp、PD-1、PSGL1、SELPLG (CD162)、信号传导淋巴细胞活化分子、SLAM (SLAMF1; CD150; IPO-3)、SLAMF4 (CD244; 2B4)、SLAMF6 (NTB-A; Ly108)、SLAMF7、SLP-76、TNF、TNFr、TNFR2、Toll配体受体、TRANCE/RANKL、VLA1或VLA-6或者它们的片段、截短或组合。

[0087] “保守氨基酸取代”是其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基替换的氨基酸取代。具有侧链的氨基酸残基的家族已在本领域中定义。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电的极性侧链的氨基酸(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、具有 β -支链侧链的氨基酸(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳族侧链的氨基酸(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。在某些实施方案中,可以用具有相似侧链的氨基酸残基替换CDR内或者抗体或其抗原结合分子的框架区内的一个或多个氨基酸残基。一般来讲,如果两个序列在对应位置含有保守氨基酸取代,则通常被认为是“基本上类似的”。例如,某些氨基酸通常被分类为“疏水性”或“亲水性”氨基酸,并且/或者具有“极性”或“非极性”侧链。一个氨基酸被取代为相同类型的另一个氨基酸可以被认为是保守取代。示例性的氨基酸分类汇总在以下的表2和表3中:

[0088] 表2

氨基酸	三字母	单字母	特性	特性	亲水性指数
丙氨酸	Ala	A	无极性	中性	1.8
精氨酸	Arg	R	极性	阳性	-4.5
天冬酰胺	Asn	N	极性	中性	-3.5
天冬氨酸	Asp	D	极性	阴性	-3.5
半胱氨酸	Cys	C	无极性	中性	2.5
[0089] 谷氨酸	Glu	E	极性	阴性	-3.5
谷氨酰胺	Gln	Q	极性	中性	-3.5
甘氨酸	Gly	G	无极性	中性	-0.4
组氨酸	His	H	极性	阳性	-3.2
异亮氨酸	Ile	I	无极性	中性	4.5
亮氨酸	Leu	L	无极性	中性	3.8
赖氨酸	Lys	K	极性	阳性	-3.9
甲硫氨酸	Met	M	无极性	中性	1.9
苯丙氨酸	Phe	F	无极性	中性	2.8
脯氨酸	Pro	P	无极性	中性	-1.6
[0090] 丝氨酸	Ser	S	极性	中性	-0.8
苏氨酸	Thr	T	极性	中性	-0.7
色氨酸	Trp	W	无极性	中性	-0.9
酪氨酸	Tyr	Y	极性	中性	-1.3
缬氨酸	Val	V	无极性	中性	4.2

[0091] 表3

[0092]	不明确的氨基酸	三字母	单字母
	天冬酰胺或天冬氨酸	Asx	B
	谷氨酰胺或谷氨酸	Glx	Z
	亮氨酸或异亮氨酸	Xle	J
	未指定或未知的氨基酸	Xaa	X

[0093] “组合疗法”是指个体同时暴露于两种或更多种治疗方案(例如,两个或更多个治疗部分)的那些情况。在一些实施方案中,两个或更多个方案可以同时施用;在一些实施方案中,此类方案可以相继施用(例如,第一方案的所有“剂量”在施用任何剂量的第二方案之前施用);在一些实施方案中,此类作用剂以重叠给药方案施用。在一些实施方案中,“施用”组合疗法可以涉及将一种或多种作用剂或者模式施用于接受该组合中的其他作用剂或者模式的受试者。为清楚起见,组合疗法不需要将各作用剂在单个组合物中一起施用(或甚至不必同时施用),然而在一些实施方案中,两种或更多种作用剂或者它们的活性部分可以在组合的组合物中、或者甚至在组合的化合物(例如,作为单一化学复合物或共价实体的一部分)中一起施用。

[0094] “对应于”可用于通过与适当的参考分子或组合物比较来指定分子或组合物中结构元素的位置/身份。例如,在一些实施方案中,聚合物中的单体残基(例如,多肽中的氨基酸残基或多核苷酸中的核酸残基)可被鉴定为“对应于”适当参考聚合物中的残基。例如,为了简单起见,多肽中的残基可以使用基于参考相关多肽的规范编号系统来指定,使得例如“对应于”位置100处残基的氨基酸实际上不必是氨基酸链中的第100个氨基酸,条件是它对应于参考多肽中位置100处发现的残基。可使用多种序列比对策略,包括软件程序,例如BLAST、CS-BLAST、CUDASW++、DIAMOND、FASTA、GGSEARCH/GLSEARCH、GenoogLe、HMMER、HHpred/HHsearch、IDF、Infernal、KLAST、USEARCH、parasail、PSI-BLAST、PSI-Search、ScalaBLAST、Sequillab、SAM、SSEARCH、SWAPHI、SWAPHI-LS、SWIMM或SWIPE,其可用于例如鉴定根据本公开的多肽和/或核酸中的“相应”残基。

[0095] 如果抗原与第一抗原结合分子之间的相互作用阻断、限制、抑制或以其他方式降低参考结合分子与抗原相互作用的能力,则该抗原结合分子(诸如抗体、其抗原结合片段、CAR或TCR)与参考结合分子(诸如抗体或其抗原结合片段)“交叉竞争”。交叉竞争可以是完全的,例如,抗原结合分子与抗原的结合完全阻断参考结合分子结合抗原的能力,或者其可以是部分的,例如,抗原结合分子与抗原的结合降低参考抗原结合分子结合抗原的能力。在某些实施方案中,与参考抗原结合分子交叉竞争的抗原结合分子结合与参考抗原结合分子相同或重叠的表位。在其他实施方案中,与参考抗原结合分子交叉竞争的抗原结合分子结合与参考抗原结合分子不同的表位。许多类型的竞争结合测定可用于确定一种抗原结合分子是否与另一种竞争,例如:固相直接或间接放射免疫测定(RIA);固相直接或间接酶免疫测定(EIA);夹心竞争测定(Stahli等人,1983,Methods in Enzymology 9:242-253);固相直接生物素-亲和素EIA(Kirkland等人,1986,J.Immunol.137:3614-3619);固相直接标记测定、固相直接标记夹心测定(Harlow和Lane,1988,Antibodies,A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press);使用1-125标记的固相直接标记RIA(Morel等人,1988, Molec.Immunol.25:7-15);固相直接生物素-亲和素EIA(Cheung等人,1990,Virology 176:

546-552);以及直接标记的RIA(Moldenhauer等人,1990,Scand.J.Immunol.32:77-82)。

[0096] “细胞因子”是指对与特异性抗原接触作出应答而由一个细胞释放的非抗体蛋白,其中细胞因子与第二细胞相互作用以介导第二细胞中的应答。细胞因子可以由细胞内源性表达或者被施用于受试者。细胞因子可由免疫细胞(包括巨噬细胞、B细胞、T细胞和肥大细胞)释放以传播免疫反应。细胞因子可以在受体细胞中诱导各种应答。细胞因子可以包括稳态细胞因子、趋化因子、促炎细胞因子、效应子和急性期蛋白。例如,包括白介素(IL)7和IL-15在内的稳态细胞因子促进免疫细胞存活和增殖,并且促炎细胞因子可以促进炎性应答。稳态细胞因子的示例包括但不限于IL-2、IL-4、IL-5、IL-7、IL-10、IL-12p40、IL-12p70、IL-15和干扰素(IFN) γ 。促炎细胞因子的示例包括但不限于IL-1a、IL-1b、IL-6、IL-13、IL-17a、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、TNF- β 、成纤维细胞生长因子(FGF)2、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、可溶性细胞间粘附分子1(sICAM-1)、可溶性血管细胞粘附分子1(sVCAM-1)、血管内皮生长因子(VEGF)、VEGF-C、VEGF-D和胎盘生长因子(PLGF)。效应子的示例包括但不限于颗粒酶A、颗粒酶B、可溶性Fas配体(sFasL)和穿孔素。急性期蛋白的示例包括但不限于C反应蛋白(CRP)和血清淀粉样蛋白A(SAA)。

[0097] 所谓“减少”或“降低”或“减小”,通常是指与由单独的媒介物(即,活性部分)或对照分子/组合物引起的生理响应相比,本文所设想的组合物产生、引发或引起较小的生理响应(即,下游效应)的能力。“减少的”或“降低的”量通常是“统计上显著的”量,并且可以包括为媒介物即对照组合物所产生的应答(参考应答)的1/1.1、1/1.2、1/1.5、1/2、1/2.5、1/3、1/3.5、1/4、1/4.5、1/5、1/5.5、1/6、1/6.5、1/7、1/7.5、1/8、1/8.5、1/9、1/9.5、1/10、1/15、1/20、1/30或更少(例如,1/500、1/1000)(就分母而言,包括在前述数字之间且大于1的所有整数和小数,例如1.5、1.6、1.7、1.8等)的减少。

[0098] 术语“结构域”是指实体的一部分。在一些实施方案中,“结构域”与实体的结构和/或功能特征相关联,例如,使得当结构域与其亲本实体的其余部分在物理上分离时,它基本上或完全保留结构和/或功能特征。在一些实施方案中,结构域可以包括实体的一部分,当与该(亲本)实体分离并与不同的(接收者)实体链接或连接时,该部分基本上保留和/或在接收者实体上赋予一种或多种结构和/或功能特征,例如在亲本实体中表征的。在一些实施方案中,结构域是分子(例如,小分子、碳水化合物、脂质、核酸或多肽)的一部分。在一些实施方案中,结构域是多肽的区段;在一些这样的实施方案中,结构域的特征在于结构元素(例如,氨基酸序列或序列基序、 α -螺旋特征、 β -折叠特征、卷曲螺旋特征、无规卷曲特征等)和/或功能特征(例如,结合活性、酶活性、折叠活性、信号传导活性等)。

[0099] 术语“剂型”可以用于指施用于受试者的活性剂(例如,抗原结合系统或抗体)的物理离散单元。一般来讲,每个这种单元均含有预定数量的活性剂。在一些实施方案中,这种数量是适用于根据已经被确定为当施用于相关群体时与期望或有益结果相关的给药方案施用的单位剂量(或其整个部分)。施用于受试者的治疗组合物或治疗剂的总量由一个或多个执业医师确定,并且可以涉及施用多于一种剂型。

[0100] 术语“给药方案”可以用于指单独地施用于受试者的一组一个或多个单位剂量。在一些实施方案中,给定治疗剂具有推荐的给药方案,其可以涉及一个或多个剂量。在一些实施方案中,给药方案包括多个剂量,其中每个剂量在时间上与其他剂量分开。在一些实施方案中,给药方案包括多个剂量,并且连续剂量彼此分开相等长度的时间段;在一些实施方案

中,给药方案包括多个剂量,并且连续剂量彼此分开至少两种不同长度的时间段。在一些实施方案中,给药方案内的所有剂量具有相同的单位剂量。在一些实施方案中,给药方案内的不同剂量具有不同的量。在一些实施方案中,给药方案包括第一量的第一剂量,之后是与第一量不同的第二量的一个或多个附加剂量。在一些实施方案中,周期性地调整给药方案以实现期望或有益的结果。

[0101] “效应细胞”是指表达一种或多种Fc受体并且介导一种或多种效应子功能的免疫系统细胞。在一些实施方案中,效应细胞可以包括但不限于单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树突状细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、血小板、大颗粒淋巴细胞、朗格汉斯细胞、自然杀伤(NK)细胞、T淋巴细胞和B淋巴细胞中的一种或多种。效应细胞可以来自任何生物体,包括但不限于人、小鼠、大鼠、兔和猴。

[0102] “效应子功能”是指抗体Fc区与Fc受体或配体的相互作用的生物学结果。效应子功能包括但不限于抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)和补体介导的细胞毒性(CMC)。效应子功能可以是抗原结合依赖性的、抗原结合非依赖性的或两者兼有。ADCC是指通过免疫效应细胞裂解抗体结合的靶标细胞。不希望受任何理论的束缚,ADCC通常被理解为涉及携带Fc受体(FcR)的效应细胞识别并随后杀死抗体包被的靶标细胞(例如,在它们的表面上表达抗体与之结合的抗原的细胞)。介导ADCC的效应细胞可以包括免疫细胞,包括但不限于自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞中的一种或多种。

[0103] “表位”是指抗体可特异性结合的抗原的局部区域。表位可以是例如多肽的连续氨基酸(线性表位或连续表位),或者表位可以例如一同来自一个或多个多肽的两个或更多个非连续区域(构象表位、非线性表位、不连续表位或非连续表位)。在某些实施方案中,抗体与之结合的表位可以通过以下方式来确定:例如,NMR光谱、X射线衍射结晶学研究、ELISA测定、与质谱联用的氢/氘交换(例如,液相色谱电喷雾质谱)、基于阵列的寡肽扫描测定,和/或诱变映射(例如,定点诱变映射)。对于X射线晶体学,结晶可以使用本领域已知的任何方法完成(例如,Giegér等人,(1994)Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 50(Pt 4):339-350;McPherson A(1990)Eur J Biochem 189:1-23;Chayen NE(1997)Structure 5:1269-1274;McPherson A(1976)J Biol Chem 251:6300-6303)。抗体:抗原晶体可以使用众所周知的X射线衍射技术来研究,并且可以使用以下计算机软件进行精制:诸如X-PLOR(Yale University,1992,由Molecular Simulations,Inc.传播;参见例如Meth Enzymol(1985)第114卷和第115卷,Wyckoff HW等人编辑;U.S.2004/0014194和BUSTER(Bricogne G(1993)Acta Crystallogr DBiol Crystallogr 49(Pt 1):37-60;Bricogne G(1997)Meth Enzymol 276A:361-423,Carter CW编辑;Roversi P等人,(2000)Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 56(Pt 10):1316-1323)。可以使用本领域技术人员已知的任何方法来完成诱变映射研究。参见例如Champe M等人,(1995)J Biol Chem 270:1388-1394以及Cunningham BC和Wells JA(1989)Science 244:1081-1085,获得诱变技术(包括丙氨酸扫描诱变技术)的描述。

[0104] 关于基因、蛋白质和/或核酸的“内源”是指该基因、蛋白质和/或核酸天然存在于细胞诸如免疫细胞中。

[0105] “外源”是指将剂诸如核酸、基因或蛋白质例如从外部来源引入细胞中。引入细胞

的核酸是外源的,即使它编码天然存在于细胞中的蛋白质。此类编码蛋白质的核酸的外源引入可用于增加蛋白质的表达,使其水平超过在类似条件下,例如不引入外源核酸的细胞中天然存在的水平。

[0106] 术语“赋形剂”是指可以包含在组合物中例如以提供或有助于所需的稠度或稳定效应的作用剂。在一些实施方案中,合适的赋形剂可以包括例如淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、稻米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、二醇、水、乙醇等。

[0107] 如本文所述的材料或实体的“片段”或“部分”具有包括(例如,物理实体或抽象实体的)整体的离散部分的结构。在一些实施方案中,片段缺少存在于整体中的一个或多个部分。在一些实施方案中,片段由存在于整体中的特征结构元件、结构域或部分组成,或者包含存在于整体中的特征结构元件、结构域或部分。在一些实施方案中,聚合物片段包含存在于整体聚合物中的至少3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、25个、30个、35个、40个、45个、50个、55个、60个、65个、70个、75个、80个、85个、90个、95个、100个、110个、120个、130个、140个、150个、160个、170个、180个、190个、200个、210个、220个、230个、240个、250个、275个、300个、325个、350个、375个、400个、425个、450个、475个、500个或更多个单体单元(例如,残基)或者由其组成。在一些实施方案中,聚合物片段包含存在于整体聚合物中的单体单元(例如,残基)的至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、25%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多(例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)或者由其组成。在一些实施方案中,整体材料或实体可以被称为片段的“亲本”。

[0108] 术语“融合多肽”或“融合蛋白”通常是指包含至少两个区段的多肽。一般来讲,含有至少两个此类区段的多肽在这两个区段为以下部分的情况下被认为是融合多肽:(1)在自然界中不包含在相同的肽中,以及/或者(2)之前没有在单个多肽中彼此连结或连接,以及/或者(3)已经通过人工(女性/男性)的操作彼此连结或连接。在实施方案中,CAR是融合蛋白。

[0109] 术语“基因产物”或“表达产物”通常是指从基因转录的RNA(加工前和/或加工后)或由从基因转录的RNA编码的多肽(修饰前和/或修饰后)。

[0110] 术语“基因工程改造的”或“工程改造的”是指修饰细胞的基因组的方法,包括但不限于删除编码区或非编码区或者其一部分,或者插入编码区或其一部分。在一些实施方案中,经修饰的细胞是淋巴细胞,例如T细胞,其可以从患者或供体获得。可以对细胞进行修饰以表达掺入该细胞的基因组中的外源性构建体,诸如嵌合抗原受体(CAR)。工程化通常包括由人工来操纵。例如,当在自然界中未以该顺序连结或连接在一起的两个或更多个序列通过人工操纵以在工程化多核苷酸中直接彼此连结或连接时,多核苷酸被认为是“工程化的”。在通过分子生物学技术操纵细胞的情况下,如果细胞或生物体已经被操纵以使得其遗传信息被改变(例如,之前不存在的新遗传物质已经例如通过转化、体细胞杂交、转染、转导、电穿孔或其他机制被引入,或者之前存在的遗传物质例如通过取代或缺失突变、或通过其他方案被改变或去除),则认为该细胞或生物体是“工程化的”。在一些实施方案中,结合剂是经修饰的淋巴细胞,例如T细胞,其可以从患者或供体获得。可以对工程化细胞进行修

饰以表达掺入该细胞的基因组中的外源性构建体,诸如嵌合抗原受体(CAR)。工程化多核苷酸或结合剂的子代通常被称为“工程化的”,即使实际操纵是在先前的实体上进行的。在一些实施方案中,“工程化的”是指已经设计和生产的实体。术语“设计的”是指以下作用剂:(i)其结构是由人工选择的;(ii)其通过需要人工的方法产生;和/或(iii)其不同于天然物质和其他已知作用剂。

[0111] “T细胞受体”或“TCR”是指存在于T细胞表面上的抗原识别分子。在正常T细胞发育期间,四个TCR基因即 α 、 β 、 γ 和 δ 中的每一者可以重新排列,从而导致高度多样化的TCR蛋白质。在实施方案中,本文公开的T细胞已被工程化以减少、消除和/或抑制TCR受体的 α 链的表面表达。

[0112] 术语“异源的”是指来自除天然存在的序列以外的任何来源。例如,作为共刺激蛋白的一部分包含的异源序列是不天然存在的氨基酸,即不与野生型人共刺激蛋白一致。例如,异源核苷酸序列是指不同于野生型人共刺激蛋白编码序列的核苷酸序列。

[0113] 术语“同一性”是指聚合分子之间,例如核酸分子(例如,DNA分子和/或RNA分子)之间和/或多肽分子之间的总体相关性。用于计算两个所提供的多肽序列之间的百分比同一性的方法是已知的。例如,可以通过出于最佳比较目的比对两个核酸或多肽序列来进行这两个序列的百分比同一性的计算(例如,可以在第一序列和第二序列中的一者或两者中引入空位以用于最佳比对,并且可以出于比较目的而忽略不相同的序列)。然后比较对应位置处的核苷酸或氨基酸。当第一序列中的位置被与第二序列中的对应位置相同的残基(例如,核苷酸或氨基酸)占据时,则分子在该位置是相同的。两个序列之间的百分比同一性是这些序列共享的相同位置的数目的函数,任选地考虑空位的数目和每个空位的长度,可能需要引入空位来用于最佳比对这两个序列。序列的比较或比对以及两个序列之间的百分比同一性的确定可以使用数学算法诸如BLAST(基本局部比对搜索工具)来实现。在一些实施方案中,如果聚合物分子的序列至少25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%相同(例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%相同),则认为它们是彼此“同源的”。

[0114] 为了计算百分比同一性,进行比较的序列通常以给出这些序列之间的最大匹配的方式比对。可以用于确定百分比同一性的计算机程序的一个示例为GCG程序包,其包括GAP(Devereux等人,1984,Nucl. Acid Res.12:387;Genetics Computer Group,University of Wisconsin, Madison, Wis.)。计算机算法GAP用于比对要确定其百分比序列同一性的两个多肽或多核苷酸。将序列进行比对以最佳匹配它们各自的氨基酸或核苷酸(“匹配的跨度”,如通过该算法确定的)。在某些实施方案中,该算法还使用标准比较矩阵(参见Dayhoff等人,1978,Atlas of Protein Sequence and Structure5:345-352中的PAM 250比较矩阵;Henikoff等人,1992,Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:10915-10919中的BLOSUM 62比较矩阵)。其他算法也可用于比较氨基酸序列或核酸序列,包括在商业计算机程序中可用的那些,诸如用于核苷酸序列的BLASTN,以及用于氨基酸序列的BLASTP、带空位BLAST和PSI-BLAST。示例性的此类程序描述于以下文献中:Altschul等人,Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3):403-410,1990;Altschul等人,Methods in Enzymology;Altschul等人,“Gapped BLAST and PSI-BLAST:a new generation of protein database search programs,”Nucleic Acids Res.25:3389-3402,1997;

Baxevanis等人, *Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*, Wiley, 1998; 以及 Misener 等人 (编辑), *Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132)*, Humana Press, 1999。除了识别相似的序列之外, 上文提到的程序还通常提供相似性程度的指示。在一些实施方案中, 如果两个序列的对应残基中的至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或更多在相关残基延伸段(例如, 85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)上是相似和/或相同的, 则认为这两个序列是基本上相似的。在一些实施方案中, 相关延伸段是完整序列。在一些实施方案中, 相关延伸段为至少10个、至少15个、至少20个、至少25个、至少30个、至少35个、至少40个、至少45个、至少50个、至少55个、至少60个、至少65个、至少70个、至少75个、至少80个、至少85个、至少90个、至少95个、至少100个、至少125个、至少150个、至少175个、至少200个、至少225个、至少250个、至少275个、至少300个、至少325个、至少350个、至少375个、至少400个、至少425个、至少450个、至少475个、至少500个或更多个残基。具有显著的序列相似性的序列可以是彼此的同源物。

[0115] 当提及核酸或其片段时, 术语“基本同一性”或“基本上相同”表示当用合适的核苷酸插入或缺失与另一核酸(或其互补链)最佳比对时, 在至少约95%、更优选地至少约96%、97%、98%或99%的核苷酸碱基中存在核苷酸序列同一性, 如通过任何公知的序列同一性算法诸如FASTA、BLAST或Gap所测量的, 如下文所讨论。在某些情况下, 与参考核酸分子具有基本同一性的核酸分子可编码与参考核酸分子编码的多肽具有相同或基本上相似氨基酸序列的多肽。

[0116] 当应用于多肽时, 术语“基本相似性”或“基本上相似”意指两个肽序列在最佳比对时, 诸如通过程序GAP或BESTFIT使用默认空位权重, 共享至少95%序列同一性、甚至更优选地至少98%或99%序列同一性。优选地, 不相同的残基位置因保守氨基酸取代而不同。

[0117] 术语“改善”、“增加”、“抑制”和“减少”表示相对于基线或其他参考测量的值。在一些实施方案中, 适当的参比测量可以包括在某些系统中(例如, 在单个个体中)在不存在(例如, 之前和/或之后)药剂或治疗的在其他方面可比较的条件下, 或在存在适当的可比较的参比药剂的情况下的测量。在一些实施方案中, 适当的参比测量可以包括在已知或预期在相关药剂或治疗存在下以可比较的方式响应的可比较系统中的测量。

[0118] “免疫反应”是指免疫系统的细胞(例如, T淋巴细胞、B淋巴细胞、自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、树突细胞和中性粒细胞)和这些细胞中的任何细胞或肝脏产生的可溶性大分子(包括Ab、细胞因子和补体)的作用, 导致选择性地靶向、结合、损害、破坏和/或清除来自脊椎动物身体的侵入病原体、被病原体感染的细胞或组织、癌细胞或其他异常细胞、或在自身免疫或病理性炎症的情况下的正常人细胞或组织。

[0119] 术语“免疫疗法”是指通过包括诱导、增强、抑制或以其他方式改变免疫反应的方法来治疗罹患疾病或者有患上疾病或复发的风险的受试者。免疫疗法的示例包括但不限于NK细胞、iNKT细胞和T细胞疗法。T细胞疗法可包括过继性T细胞疗法、肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)免疫疗法、自体细胞疗法、工程化的自体细胞疗法(eACT™)和同种异体T细胞移植。T细胞疗法的示例描述于美国专利公布2014/0154228号和2002/0006409号、美国专利号5,728,

388号和国际公布WO 2008/081035号中。

[0120] 免疫疗法的T细胞可以来自本领域已知的任何来源。例如，T细胞可以从造血干细胞群体外分化或者可以从受试者获得，例如用于在工程化后移植到第二受试者中。T细胞可以获自例如外周血单核细胞(PBMC)、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、来自感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾组织和肿瘤。此外，T细胞可以来源于本领域中可用的一种或多种T细胞系。还可使用技术人员已知的多种技术(诸如FICOLL™分离和/或血液单采术)从收集自受试者的血液单位中获得T细胞。分离T细胞疗法用T细胞的附加方法公开于美国专利公布2013/0287748号中，该专利公布全文以引用方式并入本文。

[0121] 术语“体外”是指在人工环境中发生的事件，例如在试管、反应容器、细胞培养物等中，而不是在多细胞生物体内。术语“体外细胞”是指离体培养的任何细胞。具体地，体外细胞可以包括T细胞。术语“体内”是指在多细胞生物体诸如人或非人动物体内发生的事件。

[0122] 术语“分离的”是指以下物质：(1) 已经与该物质在较早时间与其缔合或者该物质原本会与其缔合的至少一些组分分离，以及/或者(2) 存在于包含有限或限定的量或浓度的一种或多种已知或未知污染物的组合物中。在一些实施方案中，分离的物质可以与该物质在较早时间与其缔合的其他非物质组分(例如，该物质之前与其缔合或者原本会与其缔合的其他组分或污染物)的约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或超过约99%(例如，85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)分离。在某些情况下，如果物质存在于含有量或浓度有限或减少的相同或相似类型的分子的组合物中，则该物质是分离的。例如，在某些情况下，如果核酸、DNA或RNA物质存在于含有量或浓度有限或减少的非物质核酸、DNA或RNA分子的组合物中，则该核酸、DNA或RNA物质是分离的。例如，在某些情况下，如果多肽物质存在于含有量或浓度有限或减少的非物质多肽分子的组合物中，则该多肽物质是分离的。在某些实施方案中，量可以是例如相对于存在于组合物中的期望物质的量测量的量。在某些实施方案中，有限的量可以是不超过组合物中的物质的量的100%(例如，不超过组合物中的物质的量的1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%(例如，85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%))的量。在某些情况下，组合物就所选择的物质而言是纯的或基本上纯的。在一些实施方案中，分离的物质的纯度为约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或大于约99%(例如，85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)。如果物质基本上不含其他组分或污染物，则该物质是“纯的”。在一些实施方案中，在已经与某些其他组分诸如一种或多种载剂或赋形剂(例如，缓冲剂、溶剂、水等)混合后，物质仍可以被认为是“分离的”或甚至“纯的”；在此类实施方案中，在不包含此类载剂或赋形剂的情况下计算该物质的分离度或纯度百分比。

[0123] “接头”(L)或“接头结构域”或“接头区域”是指长度为约1至100个氨基酸的寡肽区或多肽区，其例如将CAR和/或scFv的任何结构域/区连结在一起，或甚至将这些多肽中的一者或多者连结在一起。接头可以由柔性残基如甘氨酸和丝氨酸组成，使得相邻的蛋白质结构域相对于彼此自由移动。当需要确保两个相邻结构域在空间上不相互干扰时，可以使用更长的接头。接头可以是可切割的或不可切割的。可切割接头的示例包括2A接头(例如

T2A)、2A样接头或其功能等同物以及它们的组合。其他接头对于本领域技术人员而言是显而易见的,并且可以与本公开结合使用。接头可以是将不同元件彼此连接的多元件剂的一部分。例如,包含两个或更多个功能或结构域的多肽可在此类结构域之间包含将它们彼此连接的一段氨基酸。在一些实施方案中,包含接头元件的多肽具有一般形式S1-L-S2的总体结构,其中S1和S2可相同或不同并且表示通过接头彼此关联的两个结构域。在一些实施方案中,多肽接头的长度为至少2、3、4、5、6、7、8、9、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或更多个氨基酸(例如,长度为1至10、1至20、1至30、1至40、1至50、1至60、1至70、1至80、1至90、1至100、10至20、10至30、10至40、10至50、10至60、10至70、10至80、10至90或10至100个氨基酸)。在一些实施方案中,接头的特征在于它倾向于不采用刚性三维结构,而是为多肽提供柔性。在另一个示例中,其可用于连接待表达的一种或多种多肽。其他接头包括不可切割接头。许多接头被用于实现本发明,包括“柔性接头”。后者富含甘氨酸。Klein等人, *Protein Engineering, Design&Selection*第27卷,第10期,第325-330页,2014;Priyanka等人, *Protein Sci.*, 2013年2月;22(2):153-167。

[0124] 在一些实施方案中,接头是合成接头。合成接头可具有约10个氨基酸至约200个氨基酸的长度,例如10至25个氨基酸、25至50个氨基酸、50至75个氨基酸、75至100个氨基酸、100至125个氨基酸、125至150个氨基酸、150至175个氨基酸或175至200个氨基酸。合成接头可具有10至30个氨基酸的长度,例如10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸。合成接头可具有30至50个氨基酸的长度,例如30至35个氨基酸、35至40个氨基酸、40至45个氨基酸或45至50个氨基酸。

[0125] 在一些实施方案中,接头是柔性接头。在一些实施方案中,接头富含甘氨酸(Gly或G)残基。在一些实施方案中,接头富含丝氨酸(Ser或S)残基。在一些实施方案中,接头富含甘氨酸和丝氨酸残基。在一些实施方案中,接头具有一个或多个甘氨酸-丝氨酸残基对(GS),例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个或更多个GS对。

[0126] 术语“淋巴细胞”包括自然杀伤(NK)细胞、T细胞、iNKT细胞或B细胞。NK细胞是一种细胞毒性(对细胞有毒的)淋巴细胞,其代表固有免疫系统的组分。NK细胞排斥肿瘤和被病毒感染感染的细胞。它通过细胞凋亡或程序性细胞死亡的过程起作用。它们被称为“自然杀手”,因为它们不需要活化即可杀死细胞。T细胞在细胞介导的免疫(无抗体参与)中起作用。其T细胞受体(TCR)将它们自己与其他淋巴细胞类型区分开。胸腺是免疫系统的专门器官,主要负责T细胞的成熟。T细胞有六种类型,即:辅助T细胞(例如,CD4+细胞)、细胞毒性T细胞(也称为TC、细胞毒性T淋巴细胞、CTL、T杀伤细胞、溶细胞性T细胞、CD8+T细胞或杀伤性T细胞)、记忆T细胞((i) 干记忆 T_{SCM} 细胞(如幼稚细胞)是CD45RO⁻、CCR7⁺、CD45RA⁺、CD62L⁺(L-选择素)、CD27⁺、CD28⁺和IL-7R α ⁺,但它们还表达大量的CD95、IL-2R β 、CXCR3和LFA-1,并显示出许多记忆细胞特有的功能属性);(ii) 中枢记忆 T_{CM} 细胞表达L-选择素和CCR7,它们分泌IL-2,但不分泌IFN γ 或IL-4,以及(iii) 然而,效应记忆 T_{EM} 细胞不表达L-选择素或CCR7,但产生效应细胞因子(如IFN γ 和IL-4)、调节性T细胞(Treg、抑制性T细胞或CD4+CD25+调节性T细胞)、自然杀伤T细胞(NKT)和 γ δ T细胞。另一方面,B细胞在体液免疫(有抗体参与)中起作用。其制造抗体和抗原并发挥抗原递呈细胞(APC)的作用,并在通过抗原相互作用活化后转变为记忆B细胞。在哺乳动物中,未成熟B细胞在其名称所来源的骨髓中形成。

[0127] 术语“中和”是指结合配体并防止或降低该配体的生物学作用的抗原结合分子、scFv、抗体或其片段。在一些实施方案中，抗原结合分子、scFv、抗体或其片段直接阻断配体上的结合位点，或通过间接方式（例如，配体中的结构或能量改变）改变配体的结合能力。在一些实施方案中，抗原结合分子、scFv、抗体或其片段防止与其结合的蛋白质执行生物学功能。

[0128] “核酸”是指核苷酸的任何聚合链。核酸可以是DNA、RNA或它们的组合。在一些实施方案中，核酸包含一个或多个天然核酸残基。在一些实施方案中，核酸包含一种或多种核酸类似物。在一些实施方案中，核酸通过以下方式中的一种或多种来制备：从天然来源分离、通过基于互补模板进行聚合来酶促合成（体内或体外）、在重组细胞或系统中繁殖，以及化学合成。在一些实施方案中，核酸的长度为至少3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000或更多个残基（例如，20至100个、20至500个、20至1000个、20至2000个，或者20至5000个或更多个残基）。在一些实施方案中，核酸是部分或全部单链的；在一些实施方案中，核酸是部分或全部双链的。在一些实施方案中，核酸具有包含至少一个编码多肽的元件的核苷酸序列，或者是编码多肽的序列的补体序列。

[0129] “可操作地连接”是指所述组分处于允许它们以其预期方式起作用的关系中的并置关系。例如，“可操作地连接”至功能元件的控制元件以使得在与控制元件相容的条件下实现功能元件的表达和/或活性的方式缔合。

[0130] “患者”包括罹患癌（例如，前列腺癌）的任何人。术语“受试者”和“患者”在本文可互换使用。

[0131] 术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换使用，并且是指由通过肽键共价连接的氨基酸残基构成的化合物。蛋白质或肽包含至少两个氨基酸，并且对可以构成蛋白质或肽的序列的最大氨基酸数目没有限制。多肽包括包含通过肽键彼此连接的两个或更多个氨基酸的任何肽或蛋白质。如本文所用，该术语是指短链（其在本领域中通常也称为例如肽、寡肽和寡聚物）和长链（其在本领域中通常称为蛋白质，蛋白质有很多类型）。“多肽”包括例如生物活性片段、基本上同源的多肽、寡肽、同二聚体、异二聚体、多肽的变体、修饰的多肽、衍生物、类似物、融合蛋白等等。多肽包括天然肽、重组肽、合成肽或它们的组合。

[0132] 术语“药学上可接受的”是指当施用于接受者时对其接受者无害、或者任何有害作用被对其接受者的有益效果胜过的分子或组合物。就用于配制如本文所公开的组合物的载剂、稀释剂或赋形剂而言，药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂必须与该组合物的其他成分相容，并且对其接受者无害，或者任何有害作用必须被对接受者的有益效果胜过。术语“药学上可接受的载剂”意指涉及将作用剂从身体的一部分携带或运输到另一部分（例如，从一个器官到另一个器官）的药学上可接受的材料、组合物或媒介物，诸如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂或溶剂包封材料。存在于药物组合物中的每种载剂从以下意义上说必须是“可接受的”：与制剂的其他成分相容并且对患者无害，或者任何有害作用必须被对接受者的有益效果胜过。可以充当药学上可接受的载剂的材料的一些示例包括：糖，诸如乳糖、葡萄糖和蔗糖；淀粉，诸如玉米淀粉和马铃薯淀粉；纤维素及其衍生物，诸如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素；粉末状黄蓍胶；麦芽；明胶；滑石；赋形剂，诸如可可油和栓剂

蜡;油,诸如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;二醇,诸如丙二醇;多元醇,诸如甘油、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇;酯,诸如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,诸如氢氧化镁和氢氧化铝;藻酸;无热原水;等渗盐水;林格氏溶液;乙醇;pH缓冲溶液;聚酯、聚碳酸酯和/或聚酸酐;以及药物制剂中所采用的其他无毒相容物质。

[0133] 术语“药物组合物”是指其中活性剂与一种或多种药学上可接受的载剂一起配制的组合物。在一些实施方案中,活性剂以适用于在治疗方案中施用的单位剂量存在,当施用于相关受试者或群体时,该治疗方案示出实现预定治疗效果的统计上显著的概率。在一些实施方案中,药物组合物可以被配制用于以固体或液体形式施用,包括但不限于适合于以下各项的形式:口服施用,例如灌服剂(水性或非水性溶液剂或混悬剂)、片剂(例如,靶向颊面、舌下和全身吸收的那些)、大丸药、散剂、颗粒剂、施用于舌的糊剂;肠胃外施用,例如通过皮下、肌内、静脉内或硬膜外注射,作为例如无菌溶液剂或混悬剂,或者缓释制剂;局部施加,例如作为霜剂、软膏剂或控释贴剂,或者施加于皮肤、肺部或口腔的喷雾剂;阴道内或直肠内施用,例如,作为阴道栓剂、霜剂或泡沫;舌下施用;眼部施用;经皮施用;或经鼻、经肺施用和经其他粘膜表面施用。

[0134] 术语“增殖”是指细胞分裂(对称或非对称的细胞分裂)的增加。在一些实施方案中,“增殖”是指T细胞的对称或非对称分裂。当经处理样品中的细胞数量与未经处理样品中的细胞相比增加时,发生“增殖增加”。

[0135] 术语“参考”描述了相对于其进行比较的标准物或对照物。例如,在一些实施方案中,将感兴趣的作用剂、动物、个体、群体、样品、序列或值与作为作用剂、动物、个体、群体、样品、序列或值的参考物或对照物进行比较。在一些实施方案中,参考物或对照物与感兴趣的测试、测量或测定基本上同时进行测试、测量和/或测定。在一些实施方案中,参考物或对照物是历史参考物或对照物,其任选地体现在有形介质中。一般来讲,在与评估的条件或情况相当的条件或情况下测定或表征参考物或对照物。当存在足够的相似性以证明对所选择的参考物或对照物的依赖和/或比较是正确的时。

[0136] “调节性T细胞”(“Treg”、“Treg细胞”或“Tregs”)是指参与控制某些免疫活动例如自身免疫、过敏和对感染的应答的CD4+T淋巴细胞谱系。调节性T细胞可以调节T细胞群的活动,并且还可以影响某些先天免疫系统细胞类型。Treg可以通过生物标志物CD4、CD25和Foxp3的表达以及CD127的低表达来鉴定。天然存在的Treg细胞通常占外周CD4+T淋巴细胞的约5%-10%。然而,肿瘤微环境内的Treg细胞(即,肿瘤浸润性Treg细胞)可以占总CD4+T淋巴细胞群的多达20%至30%。

[0137] 术语“样品”通常是指从感兴趣的来源获得或衍生的材料的等分试样。在一些实施方案中,感兴趣的来源是生物或环境来源。在一些实施方案中,感兴趣的来源可以包括细胞或生物体,诸如细胞群、组织或动物(例如,人)。在一些实施方案中,感兴趣的来源包括生物组织或流体。在一些实施方案中,生物组织或流体可包括羊水、房水、腹水、胆汁、骨髓、血液、母乳、脑脊液、耳垢、乳糜、食糜、射精、内淋巴、渗出液、粪便、胃酸、胃液、淋巴液、粘液、心包液、外淋巴液、腹膜液、胸膜液、脓液、发炎性分泌物、唾液、皮脂、精液、血清、包皮垢、痰、滑液、汗液、泪液、尿液、阴道分泌物、玻璃体液、呕吐物和/或它们的组合或组分。在一些实施方案中,生物流体可以包括细胞内液、细胞外液、血管内液(血浆)、间质液、淋巴液和/或跨细胞液。在一些实施方案中,生物流体可包括植物渗出物。在一些实施方案中,生物组

织或样品可以例如通过抽吸、活组织检查(例如,细针或组织活组织检查)、拭子(例如,口腔、鼻腔、皮肤或阴道拭子)、刮擦、手术、洗涤或灌洗(例如,支气管肺泡、导管、鼻腔、眼部、口腔、子宫、阴道或其他洗涤或灌洗)来获得。在一些实施方案中,生物样品包含从个体获得的细胞。在一些实施方案中,样品是通过任何合适的方式直接从感兴趣的来源获得的“原始样品”。在一些实施方案中,如从上下文将清楚的,术语“样品”是指通过处理原始样品(例如,通过除去一种或多种药剂的一种或多种组分和/或通过向其中添加一种或多种药剂)获得的制剂。这样的“经处理的样品”可以包括例如从样品中提取的核酸或蛋白质或通过使原始样品经受一种或多种技术诸如核酸的扩增或逆转录、某些组分的分离和/或纯化等而获得的核酸或蛋白质。

[0138] “单链可变片段”、“单链抗体可变片段”或“scFv”抗体是指包含通过接头肽连接的仅重链和轻链的可变区的抗体形式。

[0139] 术语“癌症的分期”是指对癌症进展水平的定性或定量评估。在一些实施方案中,用于确定癌症分期的标准可包括但不限于以下中之一者或多者:癌症位于身体中何处、肿瘤大小、癌症是否已扩散到淋巴结、癌症是否已扩散到身体的一个或多个不同部分等。在一些实施方案中,可使用所谓的TNM系统对癌症进行分期,根据TNM系统,T是指通常称为原发性肿瘤的主要肿瘤的大小和程度;N是指患有癌症的附近淋巴结的数目;并且M是指癌症是否已经转移。在一些实施方案中,癌症可被称为0期(存在未扩散至附近组织的异常细胞,也称为原位癌,或CIS;CIS不是癌症,尽管可能变成癌症),I-III期(存在癌症;数目越高,肿瘤越大并且其扩散到附近组织中越多),或IV期(癌症已扩散到身体的远端部分)。在一些实施方案中,癌症可被指定为选自以下项组成的组的分期:原位;局部化的(癌症限于其开始的地方,没有其已扩散的迹象);区域性的(癌症已扩散到附近的淋巴结、组织或器官);远端(癌症已扩散到身体的远端部分);以及未知的(没有足够的信息来确定分期)。

[0140] “刺激”是指通过刺激分子与其同源配体的结合而诱导的初级应答,其中该结合介导信号转导事件。“刺激分子”是T细胞上的分子(例如,T细胞受体(TCR)/CD3复合物),其与抗原递呈细胞上递呈的同源刺激配体特异性结合。“刺激配体”是当在抗原递呈细胞(例如,APC、树突细胞、B细胞等)上递呈时可与T细胞上的刺激分子特异性结合,从而介导T细胞的初级应答(包括但不限于活化、起始免疫应答、增殖等)的配体。刺激配体包括但不限于抗CD3抗体(诸如OKT3)、装载有肽的MHC I类分子、超激动剂抗CD2抗体和超激动剂抗CD28抗体。

[0141] 短语“治疗剂”可指当施用于生物体时引起所需药理学作用的任何药剂。在一些实施方案中,如果药剂在适当群体中表现出统计上显著的作用,则该药剂被视为治疗剂。在一些实施方案中,合适的群体可以是模型生物或人类受试者的群体。在一些实施方案中,可根据生物标志物的存在或不存在等,通过各种标准,诸如特定年龄组、性别、遗传背景、预先存在的临床状况来定义适当的群体。在一些实施方案中,治疗剂是可用于减轻、改善、缓解、抑制、预防疾病、障碍和/或病症的一种或多种症状或特征、延迟其发作、降低其严重性和/或降低其发生率的物质。在一些实施方案中,治疗剂是在其可以上市销售以施用于人之前已经或需要被政府机构批准的药剂。在一些实施方案中,治疗剂是需要医学处方才能施用于人的药剂。

[0142] 治疗剂(例如,工程化的CAR T细胞)的“治疗有效量”、“有效剂量”、“有效量”或“治

疗有效剂量”是当单独使用或与另一种治疗剂联合使用时,保护受试者免受疾病发作或促进疾病消退(通过疾病症状的严重程度的减轻、无症状疾病期的频率和持续时间的增加或因患病导致的障碍或残疾的预防来证实)的任何量。可使用技术人员已知的多种方法来评估治疗剂促进疾病消退的能力,诸如在临床试验期间的人类受试者中,在预测对人的功效的动物模型系统中,或通过体外测定法中测定药剂的活性。

[0143] 术语“转导”和“转导的”是指经由病毒载体将外源DNA引入细胞中的过程(参见Jones等人,“Genetics:principles and analysis,”Boston:Jones&Bartlett Publ.(1998))。在一些实施方案中,载体是逆转录病毒载体、DNA载体、RNA载体、腺病毒载体、杆状病毒载体、Epstein-Barr病毒载体、乳头病毒载体、牛痘病毒载体、单纯疱疹病毒载体、腺病毒相关载体、慢病毒载体或它们的任何组合。

[0144] “转化”是指将外源性DNA引入宿主细胞中的任何过程。转化可以使用各种方法在自然条件或人工条件下进行。转化可以使用用于将外来核酸序列插入原核或真核宿主细胞中的任何已知方法来实现。在一些实施方案中,基于正在被转化的宿主细胞和/或将要被插入的核酸来选择一些转化方法。转化方法可以包括但不限于病毒感染、电穿孔和脂质转染。在一些实施方案中,“转化的”细胞稳定地转化,原因是插入的DNA能够作为自主复制质粒或作为宿主染色体的一部分进行复制。在一些实施方案中,转化的细胞可以表达引入的核酸。

[0145] 受试者的“治疗”或“处理”是指在受试者上执行的任何类型的干预或过程,或对受试者施用活性剂,目的是逆转、缓解、改善、抑制、减慢或预防与疾病相关联的症状、并发症或病症或者生化指标的发作、进展、发展、严重程度或复发。在一个实施方案中,“治疗”包括部分缓解。在另一个实施方案中,“治疗”或“处理”包括完全缓解。在一些实施方案中,治疗可以是对未表现出相关疾病、障碍和/或病症的体征的受试者和/或仅表现出疾病、障碍和/或病症的早期体征的受试者的治疗。在一些实施方案中,这样的治疗可以是对表现出相关疾病、障碍和/或病症的一种或多种已确定体征的受试者的治疗。在一些实施方案中,治疗可以是对已被诊断为患有相关疾病、障碍和/或病症的受试者的治疗。在一些实施方案中,治疗可以是已知具有一种或多种易感性因子的受试者,这些易感性因子在统计学上与相关疾病、障碍和/或病症发展的增加的风险相关。

[0146] 术语“载体”是指经修饰以包含或掺入所提供的核酸序列的受体核酸分子。一种类型的载体是“质粒”,是指附加的DNA可以连接到其中的环状双链DNA分子。另一种类型的载体是病毒载体,其中可以将附加的DNA区段连接到病毒基因组中。某些载体能够在它们所引入的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体,以及附加型哺乳动物载体)。其他载体(例如,非附加型哺乳动物载体)可以在引入宿主细胞中时整合到宿主细胞的基因组中,并且由此与宿主基因组一起复制。此外,某些载体包含引导与它们可操作地连接的插入基因表达的序列。此类载体在本文中可以被称为“表达载体”。标准技术可以用于将载体工程化,例如,如存在于Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第2版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(1989))中的标准技术,该文献以引用方式并入本文。

[0147] 出于本公开的目的,“基因”包括编码基因产物的DNA区域(参见下文),以及调节基因产物的产生的所有DNA区域,无论此类调控序列是否与编码和/或转录序列相邻。因此,基因包括但不必限于启动子序列、终止子、翻译调控序列诸如核糖体结合位点和内部核糖体

进入位点、增强子、沉默子、绝缘子、边界元件、复制起点、基质附着位点和基因座控制区。

[0148] 除非特别地指出相反的情况,否则本公开可以采用在本领域的技术范围内的化学方法、生物化学方法、有机化学方法、分子生物学方法、微生物学方法、重组DNA技术、遗传学方法、免疫学方法和细胞生物学方法,其中许多方法在下文出于说明的目的进行描述。此类技术在文献中有完整的解释。参见例如,Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第3版,2001);Maniatis等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(1982);Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley and Sons,2008年7月更新);Short Protocols in Molecular Biology:A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience;Glover,DNA Cloning:A Practical Approach,第I和第II卷(IRL Press, Oxford,1985);Anand,Techniques for the Analysis of Complex Genomes,(Academic Press,New York,1992);Transcription and Translation(B.Hames和S.Higgins编辑,1984);Perbal,A Practical Guide to Molecular Cloning(1984);Harlow和Lane,Antibodies,(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1998) Current Protocols in Immunology Q.E.Coligan,A.M.Kruisbeek,D.H.Margulies,E.M.Shevach和W.Strober编辑,1991);Annual Review of Immunology;以及期刊中的专题著作,诸如Advances in Immunology。

[0149] 本文公开了靶向一种或多种细胞表面抗原的下一代CAR T细胞疗法,用于治疗B细胞恶性肿瘤,诸如复发或难治性(r/r)B细胞恶性肿瘤。同种异体嵌合抗原受体(CAR)T细胞可由源自健康人供体的T细胞工程化。自体嵌合抗原受体(CAR)T细胞可以从适当的人类癌症患者工程化。这些工程化T细胞经历编码CAR构建体的基因的工程化逆转录病毒载体的插入,在某些方面为抗CD19 CAR。下一代CAR构建体利用五个信号传导结构域中的一个信号传导结构域,包括CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、新的、修饰的CD3 ϵ 或DAP-12,作为CAR中CD3 ζ 标准的替代物。

[0150] CD19(也称为分化簇19、B淋巴细胞抗原CD19、B淋巴细胞表面抗原B4、B4、CVID3、分化抗原CD19)是由人类的CD19基因编码的蛋白质。除非另外指明,否则应当理解,本公开中提及CD19涉及人CD19。其存在于B细胞的表面上。由于CD19表达是B细胞的标志,因此其可用作抗原,例如用于识别B细胞和由B细胞产生的癌细胞,例如B细胞淋巴瘤。抗CD19抗体可以结合在例如外周血和脾中的B淋巴细胞、B细胞慢性淋巴细胞白血病(B-CLL)细胞、前淋巴细胞白血病(PLL)细胞、毛细胞白血病(HCL)细胞、普通急性淋巴细胞白血病(CALL)细胞、前B急性淋巴细胞白血病(前B-ALL)细胞和NULL急性淋巴细胞白血病(NULL-ALL)细胞上表达的CD19,以提供一些非限制性示例。包括包含抗CD19结合结构域的抗原结合系统的示例性药物产品是药物产品 **YESCARTA[®]**。**YESCARTA[®]**是CD19定向的基因修饰的自体T细胞免疫疗法(参见**YESCARTA[®]**FDA批准的包装插页,其关于涉及免疫疗法的方法和组合物的全部内容以引用方式并入本文)。包括包含抗CD19结合结构域的抗原结合系统的另一种示例性药物产品是药物产品 **KYMRIAH[®]**。

[0151] **YESCARTA[®]**和 **KYMRIAH[®]**均包含衍生自抗人CD19抗体的抗体结合结构域。许多抗CD19抗体被认为结合CD19基因的外显子4中编码的CD19表位。其他抗CD19结合结

构域可识别CD19的不同表位,或具有不同亲和力的相同表位。

[0152] 本公开的抗CD19结合结构域可包含如存在于本文所述的抗体中的抗原结合序列。在一些实施方案中,本公开的抗CD19结合结构域包含本文提供的抗原结合片段。

[0153] 在各种实施方案中,本公开的抗CD19结合结构域包含本文提供的至少一个HCDR,例如表4或表5中公开的至少一个HCDR。在各种实施方案中,本公开的抗CD19结合结构域包含本文所提供的两个HCDR,例如表4或表5中所公开的至少两个HCDR。在各种实施方案中,本公开的抗CD19结合结构域包含本文所提供的三个HCDR,例如表4或表5中所公开的三个HCDR。

[0154] 在各种实施方案中,本公开的抗CD19结合结构域包含本文提供的至少一个LCDR,例如表4或表5中公开的至少一个LCDR。在各种实施方案中,本公开的抗CD19结合结构域包含本文所提供的两个LCDR,例如表4或表5中所公开的至少两个LCDR。在各种实施方案中,本公开的抗CD19结合结构域包含本文所提供的三个LCDR,例如表4或表5中所公开的三个LCDR。

[0155] 在各种实施方案中,本公开的抗CD19结合结构域包含本文所提供的至少一个HCDR,例如表4或表5中所公开的至少一个HCDR,以及本文所提供的至少一个LCDR,例如表4或表5中所公开的至少一个LCDR。在各种实施方案中,本公开的抗CD19结合结构域包含本文所提供的两个HCDR,例如表4或表5中所公开的至少两个HCDR,以及本文所提供的两个LCDR,例如表4或表5中所公开的至少两个LCDR。在各种实施方案中,本公开的抗CD19结合结构域包含本文所提供的三个HCDR,例如表4或表5中所公开的三个HCDR,以及本文所提供的三个LCDR,例如表4或表5中所公开的三个LCDR。

[0156] 在各种实施方案中,本公开的抗CD19结合结构域包含本文公开的重链可变结构域的至少一个重链框架区(重链FR),例如表4或表5中公开的重链可变结构域的至少一个重链FR。在各种实施方案中,本公开的抗CD19结合结构域包含本文公开的重链可变结构域的两个重链FR,例如表4或表5中公开的重链可变结构域的至少两个重链FR。在各种实施方案中,本公开的抗CD19结合结构域包含本文公开的重链可变结构域的三个重链FR,例如表4或表5中公开的重链可变结构域的三个重链FR。

[0157] 在各种实施方案中,本公开的抗CD19结合结构域包含本文公开的轻链可变结构域的至少一个轻链FR,例如表4或表5中公开的轻链可变结构域的至少一个轻链FR。在各种实施方案中,本公开的抗CD19结合结构域包含本文公开的轻链可变结构域的两个轻链FR,例如表4或表5中公开的轻链可变结构域的至少两个轻链FR。在各种实施方案中,本公开的抗CD19结合结构域包含本文公开的轻链可变结构域的三个轻链FR,例如表4或表5中公开的轻链可变结构域的三个轻链FR。

[0158] 在各种实施方案中,本公开的抗CD19结合结构域包含本文公开的重链可变结构域的至少一个重链FR,例如表4或表5中公开的重链可变结构域的至少一个重链FR,和本文公开的轻链可变结构域的至少一个轻链FR,例如表4或表5中公开的轻链可变结构域的至少一个轻链FR。在各种实施方案中,本公开的抗CD19结合结构域包含本文公开的重链可变结构域的两个重链FR,例如表4或表5中公开的重链可变结构域的至少两个重链FR,和本文公开的轻链可变结构域的两个轻链FR,例如表4或表5中公开的轻链可变结构域的至少两个轻链FR。在各种实施方案中,本公开的抗CD19结合结构域包含本文公开的重链可变结构域的三个

个重链FR,例如表4或表5中公开的重链可变结构域的三个重链FR,和本文公开的轻链可变结构域的三个轻链FR,例如表4或表5中公开的轻链可变结构域的三个轻链FR。

[0159] 在各种实施方案中,本公开的抗CD19结合结构域包含一个、两个或三个FR,其一起或各自单独地与表4或表5中公开的重链可变结构域的重链可变结构域的对应FR具有至少75%同一性(例如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)。在各种实施方案中,本公开的抗CD19结合结构域包含一个、两个或三个FR,其一起或各自单独地与表4或表5中公开的轻链可变结构域的轻链可变结构域的对应FR具有至少75%同一性(例如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)。

[0160] 在各种实施方案中,本公开的抗CD19结合结构域包含至少一个与表4或表5中所公开的重链可变结构域具有至少75%的序列同一性(例如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的重链可变结构域。在各种实施方案中,本公开的抗CD19结合结构域包含两个各自与表4或表5中所公开的重链可变结构域具有至少75%的序列同一性(例如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的重链可变结构域,这些重链可变结构域可以相同或不同。

[0161] 在各种实施方案中,本公开的抗CD19结合结构域包含至少一个与表4或表5中所公开的轻链可变结构域具有至少75%的序列同一性(例如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的轻链可变结构域。在各种实施方案中,本公开的抗CD19结合结构域包含两个各自与表4或表5中所公开的轻链可变结构域具有至少75%的序列同一性(例如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的轻链可变结构域,这些轻链可变结构域可以相同或不同。

[0162] 在各种实施方案中,本公开的抗CD19结合结构域包含至少一个与表4或表5中所公开的重链可变结构域具有至少75%的序列同一性(例如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的重链可变结构域,以及至少一个与表4或表5中公开的轻链可变结构域具有至少75%的序列同一性(例如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的轻链可变结构域。

[0163] 在各种实施方案中,本公开的抗CD19结合结构域包含两个各自与表4或表5中所公开的重链可变结构域具有至少75%的序列同一性(例如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的重链可变结构域,以及两个各自与表4或表5中所公开的轻链可变结构域具有至少75%的序列同一性(例如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的轻

链可变结构域,其中在各种实施方案中,(i)重链可变结构域中的每一者可以相同或不同;或者(ii)轻链可变结构域中的每一者可以相同或不同。

[0164] 表4:示例性抗CD19抗体序列(Ab1)

SEQ ID NO:	描述	序列
1	重链可变结构域	EVKLQESGPGVLVAPSQLSVTCTVSGVSLPDYGVS WIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYN SALKSRLTIHK DNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSY AMDYWGQGTSVTVSS
2	CDRH1 IMGT (Prot)	GVSLPDYG
3	CDRH1 Kabat (Prot)	DYGVS
4	CDRH1 Chothia (Prot)	GVSLPDY
5	CDRH2 IMGT (Prot)	IWGSETT
6	CDRH2 Kabat (Prot)	VIWGSETTYYN SALKS
7	CDRH2 Chothia (Prot)	WGSET
8	CDRH3 IMGT (Prot)	AKHYYYGGSYAMDY
9	CDRH3 Kabat (Prot)	HYYYGGSYAMDY
10	CDRH3 Chothia (Prot)	HYYYGGSYAMDY

[0165]

[0166]

11	轻链可变结构域	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWY QQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYS LTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEIT
12	CDRL1 IMGT (Prot)	RASQDISKYLN
13	CDRL1 Kabat (Prot)	RASQDISKYLN
14	CDRL1 Chothia (Prot)	RASQDISKYLN
15	CDRL2 IMGT (Prot)	HTSRLHS
16	CDRL2 Kabat (Prot)	HTSRLHS
17	CDRL2 Chothia (Prot)	HTSRLHS
18	CDRL3 IMGT (Prot)	QQGNTLPYT
19	CDRL3 Kabat (Prot)	QQGNTLPYT
20	CDRL3 Chothia (Prot)	QQGNTLPYT
21	scFv (Prot)	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWY QQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYS LTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGS TSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSV TCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWVWSE TTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS
22	接头 (Prot)	GSTSGSGKPGSGEGSTKG

[0167] 表5: 示例性抗CD19抗体序列 (Ab2)

[0168]

SEQ ID NO:	描述	序列
23	重链可变结构域	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKDSGGTFSSYAIS WVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTTNYAQQFQGRVTI TADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREVAAD WLDPWGQGLTVTVSS
24	CDRH1 IMGT (Prot)	GGTFSSYA
25	CDRH1 Kabat (Prot)	SYAIS
26	CDRH1 Chothia (Prot)	GGTFSSY

	27	CDRH2 IMGT (Prot)	IPIFGTT
	28	CDRH2 Kabat (Prot)	GIPIFGTTNYAQQFQG
	29	CDRH2 Chothia (Prot)	PIFG
	30	CDRH3 IMGT (Prot)	AREAVAADWLDP
	31	CDRH3 Kabat (Prot)	EAVAADWLDP
	32	CDRH3 Chothia (Prot)	AVAADWLD
	33	轻链可变结构域	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSRFTFGPGTKVDIK
	34	CDRL1 IMGT (Prot)	QSVSSSY
	35	CDRL1 Kabat (Prot)	RASQSVSSSYLA
	36	CDRL1 Chothia (Prot)	SQSVSSSY
[0169]	37	CDRL2 IMGT (Prot)	GAS
	38	CDRL2 Kabat (Prot)	GASSRAT
	39	CDRL2 Chothia (Prot)	GAS
	40	CDRL3 IMGT (Prot)	QQYGSSRFT
	41	CDRL3 Kabat (Prot)	QQYGSSRFT
	42	CDRL3 Chothia (Prot)	YGSSRF
	43	scFv (Prot)	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSRFTFGPGTKVDIK GSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLVQSGAEVKKPGSS VKVSKKDSGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGII PIFGTTNYAQQFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCAREAVAADWLDPWGQGLVTVSS
	22	接头 (Prot)	GSTSGSGKPGSGEGSTKG

[0170] 嵌合抗原受体 (CAR) 是可以引导或重定向T细胞 (例如, 供体T细胞) 以靶向选定抗原的工程化受体。CAR可以被工程化以识别抗原, 并且当与该抗原 (诸如CD19) 结合时, 活化免疫细胞以攻击和破坏携带该抗原的细胞。当这些抗原存在于肿瘤细胞上时, 表达CAR的免疫细胞可靶向并杀死肿瘤细胞。CAR通常包含介导抗原结合的细胞外结合结构域 (例如, 抗CD19结合结构域)、当CAR存在于细胞表面或细胞膜时跨越或被理解为跨越细胞膜的跨膜结构域, 以及细胞内 (或细胞质) 信号传导结构域。

[0171] 一个或多个抗原结合结构域决定抗原结合系统的靶标。结合结构域可包含与任何

感兴趣的抗原的结合结构域,例如本公开所提供的抗体,例如本公开的结合基序。结合结构域至少部分用于嵌合抗原受体中,因为它们可以被工程化以表达为单链的一部分以及其他CAR组分。关于CAR中的结合基序结构域,参见例如美国专利7,741,465号和6,319,494号以及Eshhar等人,Cancer Immunol Immunotherapy (1997) 45:131-136;Krause等人,J.Exp.Med.,第188卷,第4期,1998 (619-626);Finney等人,Journal of Immunology,1998,161:2791-2797,它们中的每一者以引用方式并入本文。结合结构域或scFv是包含重链可变结构域和轻链可变结构域的单链抗原结合片段,其中重链可变结构域和轻链可变结构域连接或连接在一起。关于结合结构域,参见例如美国专利号7,741,465和6,319,494以及Eshhar等人,Cancer Immunol Immunotherapy (1997) 45:131-136,它们中的每一者以引用方式并入本文。结合结构域在来源于亲本抗体时,可以保留亲本抗体中的一些、保留全部亲本抗体或基本上保留亲本抗体与靶标抗原的结合。在一些实施方案中,本文设想的CAR包含抗原特异性结合结构域,该抗原特异性结合结构域可以是与癌细胞上表达的抗原结合的scFv(鼠scFv、人scFv或人源化scFv)。在一个特定的实施方案中,scFv结合CD19。

[0172] 在某些实施方案中,本文设想的CAR可以包含介于各种结构域之间(例如,介于VH结构域与VL结构域之间)的接头残基,其被添加用于获得分子的适当间隔构象。本文设想的CAR可以包含一个、两个、三个、四个或五个或者更多个接头。在一些实施方案中,接头的长度为约1个至约25个氨基酸、约5个至约20个氨基酸或者约10个至约20个氨基酸,或者任何中间长度的氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度为1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个或更多个氨基酸。

[0173] 接头的说明性示例包括甘氨酸聚合物(G)_n;甘氨酸-丝氨酸聚合物(G₁₋₅S₁₋₅)_n,其中n是至少为1、2、3、4或5的整数;甘氨酸-丙氨酸聚合物;丙氨酸-丝氨酸聚合物;以及本领域已知的其他柔性接头。甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物是相对非结构化的,因此可以能够充当融合蛋白的结构域之间的中性系链,诸如本文所述的CAR。甘氨酸甚至比丙氨酸进入更多的phi-psi空间,并且受到的限制比具有较长侧链的残基小得多(参见Scheraga, Rev.Computational Chem.11173-142(1992))。本文所设想的其他接头包括Whitlow接头(参见Whitlow,Protein Eng.6(8):989-95(1993))。普通技术人员将认识到,在一些实施方案中,CAR的设计可以包括全部或部分柔性的接头,使得该接头可以包括柔性接头以及一个或多个赋予较小柔性结构的部分,以提供所需的CAR结构。在一个实施方案中,本文所述的任何构建体可以包含“GS”接头。在另一个实施方案中,本文所述的任何构建体包含“GSG”接头。在示例中,甘氨酸-丝氨酸接头包含氨基酸序列GS(SEQ ID NO:45)或由其组成。在示例中,甘氨酸-丝氨酸接头包含氨基酸序列GGSGGGGS(SEQ ID NO:46)或由其组成。在另一个实施方案中,本文所述的CAR包含与SEQ ID NO:22具有至少75%的序列同一性(诸如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的氨基酸序列。

[0174] 在某些实施方案中,本公开的抗CD19结合结构域包括结合结构域,其包含本公开的重链可变结构域、本公开的轻链可变结构域,以及与SEQ ID NO:22具有至少75%的序列同一性(例如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的接头。在某些实施方案

中,本公开的抗CD19结合结构域包括含有根据SEQ ID NO:22的接头的结合结构域。

[0175] 本文所述的工程化CAR还可以在scFv或抗原结合结构域的N-末端处包含N-末端信号肽或标签。在一个实施方案中,可以使用异源性信号肽。该抗原结合结构域或scFv可以融合至前导肽或信号肽,该前导肽或信号肽引导新生蛋白质进入内质网并且随后易位至细胞表面。应当理解,一旦含有信号肽的多肽在细胞表面处表达,在内质网中加工该多肽和易位至细胞表面的过程中,该信号肽通常以蛋白水解方式去除。因此,多肽(诸如本文所述的CAR构建体)通常在细胞表面处表达为缺少信号肽的成熟蛋白质,而该多肽的前体形式包括信号肽。可以使用本领域已知的任何合适的信号序列。类似地,还可以使用本领域已知的任何已知标签序列。在某些实施方案中,本公开的结合结构域包括抗CD19结合结构域,其包含本公开的重链可变结构域、本公开的轻链可变结构域,以及与SEQ ID NO:44 (MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO:44)) 具有至少75%的序列同一性(例如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的信号序列。

[0176] 在实施方案中,CAR包含scFv,该scFv还包含可变区连接序列。“可变区连接序列”是以下氨基酸序列:其将重链可变区连接到轻链可变区并且提供与两个亚结合结构域的相互作用相容的间隔区功能,使得所得的多肽与包含相同的轻链可变区和重链可变区的抗体相比,保留了对相同靶标分子的特异性结合亲和力。在一个实施方案中,可变区连接序列的长度为1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个或更多个氨基酸。

[0177] 在实施方案中,CAR的结合结构域之后是一个或多个“间隔区结构域”,间隔区结构域是指移动抗原结合结构域远离效应细胞表面以实现适当的细胞/细胞接触、抗原结合和活化的区域(Patel等人, Gene Therapy, 1999;6:412-419)。该间隔区结构域可以来源于天然来源、合成来源、半合成来源或重组来源。在某些实施方案中,间隔区结构域是免疫球蛋白的一部分,包括但不限于一个或多个重链恒定区,例如CH2和CH3。该间隔区结构域可以包含天然存在的免疫球蛋白铰链区或改变的免疫球蛋白铰链区的氨基酸序列。

[0178] CAR的结合结构域之后通常可以是一个或多个“铰链结构域”,该铰链结构域在将抗原结合结构域远离效应细胞表面定位中起作用,以实现适当的细胞/细胞接触、抗原结合和活化。CAR通常包含介于结合结构域与跨膜结构域之间的一个或多个铰链结构域。该铰链结构域可以来源于天然来源、合成来源、半合成来源或重组来源。该铰链结构域可以包含天然存在的免疫球蛋白铰链区或改变的免疫球蛋白铰链区的氨基酸序列。

[0179] 在一些实施方案中,本公开的抗原结合系统可包含铰链,该铰链是、来自或来源于免疫球蛋白样铰链结构域(例如,包含其全部或片段)。在一些实施方案中,铰链结构域来自或衍生自免疫球蛋白。在一些实施方案中,铰链结构域选自IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgD、IgE或IgM的铰链或其片段。

[0180] 铰链可以来源于天然来源或合成来源。适用于本文所述的CAR中的铰链结构域包括来源于1型膜蛋白质(诸如CD8 α 、CD4、CD28和CD7)的细胞外区域的铰链区,其可以是来自这些分子的野生型铰链区,或者可以改变,例如截短的CD28铰链结构域。铰链可以来源于天然来源或合成来源。在一些实施方案中,本公开的抗原结合系统可以包含铰链,该铰链是、来自或来源于下列各项(例如,包含下列各项的全部或片段):CD2、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD4、

CD7、CD8 α 、CD8 β 、CD11a (ITGAL)、CD11b (ITGAM)、CD11c (ITGAX)、CD11d (ITGAD)、CD18 (ITGB2)、CD19 (B4)、CD27 (TNFRSF7)、CD28、CD28T、CD29 (ITGB1)、CD30 (TNFRSF8)、CD40 (TNFRSF5)、CD48 (SLAMF2)、CD49a (ITGA1)、CD49d (ITGA4)、CD49f (ITGA6)、CD66a (CEACAM1)、CD66b (CEACAM8)、CD66c (CEACAM6)、CD66d (CEACAM3)、CD66e (CEACAM5)、CD69 (CLEC2)、CD79A (B细胞抗原受体复合物相关 α 链)、CD79B (B细胞抗原受体复合物相关 β 链)、CD84 (SLAMF5)、CD96 (Tactile)、CD100 (SEMA4D)、CD103 (ITGAE)、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD150 (SLAMF1)、CD158A (KIR2DL1)、CD158B1 (KIR2DL2)、CD158B2 (KIR2DL3)、CD158C (KIR3DP1)、CD158D (KIRDL4)、CD158F1 (KIR2DL5A)、CD158F2 (KIR2DL5B)、CD158K (KIR3DL2)、CD160 (BY55)、CD162 (SELPLG)、CD226 (DNAM1)、CD229 (SLAMF3)、CD244 (SLAMF4)、CD247 (CD3- ζ)、CD258 (LIGHT)、CD268 (BAFFR)、CD270 (TNFSF14)、CD272 (BTLA)、CD276 (B7-H3)、CD279 (PD-1)、CD314 (NKG2D)、CD319 (SLAMF7)、CD335 (NK-p46)、CD336 (NK-p44)、CD337 (NK-p30)、CD352 (SLAMF6)、CD353 (SLAMF8)、CD355 (CRTAM)、CD357 (TNFRSF18)、诱导型T细胞共刺激因子 (ICOS)、LFA-1 (CD11a/CD18)、NKG2C、DAP-10、ICAM-1、NKp80 (KLRP1)、IL-2R β 、IL-2R γ 、IL-7R α 、LFA1-1、SLAMF9、LAT、GADS (GrpL)、SLP-76 (LCP2)、PAG1/CBP、CD83配体、Fc γ 受体、MHC 1类分子、MHC 2类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白、细胞因子受体、整合素、活化NK细胞受体,或To11配体受体,或者它们的片段或组合。在实施方案中,该铰链结构域包含CD28铰链区。在实施方案中,本文所述的CAR包含来自CD28的铰链结构域,该铰链结构域具有与SEQ ID NO:47 (IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKP (SEQ ID NO:47)) 具有至少75%的序列同一性 (诸如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%) 的氨基酸序列。在实施方案中,该铰链结构域包含CD28T铰链区。在实施方案中,本文所述的CAR包含来自CD28的铰链结构域,该铰链结构域具有与SEQ ID NO:48 (LDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKP (SEQ ID NO:48)) 具有至少75%的序列同一性 (诸如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%) 的氨基酸序列。在实施方案中,该铰链结构域包含CD8a铰链区。在实施方案中,本文所述的CAR包含来自CD8a的铰链结构域,该铰链结构域具有与SEQ ID NO:49或77 (FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACD (SEQ ID NO:49), TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO:77)) 具有至少75%的序列同一性 (诸如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%) 的氨基酸序列。

[0181] 这些铰链结构域的多核苷酸和多肽序列是已知的。在一些实施方案中,编码铰链结构域的多核苷酸包含与已知核苷酸序列至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100% (例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%) 相同的核苷酸序列。在一些实施方案中,铰链结构域的多肽序列包含与已知多肽序列至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100% (例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%) 相同的多肽序列。

[0182] 一般来讲,“跨膜结构域”(例如,抗原结合系统的跨膜结构域)是指当存在于细胞表面或细胞膜(例如,跨越细胞膜的一部分或全部)的分子中时,具有存在于膜中的属性的结构域。本公开的抗原结合系统的共刺激结构域还可以包含跨膜结构域和/或细胞内信号传导结构域。不需要跨膜结构域中的每个氨基酸都存在于膜中。例如,在一些实施方案中,跨膜结构域的特征在于蛋白质的指定片段或部分基本上位于膜中。可以使用多种算法分析氨基酸或核酸序列以预测蛋白质亚细胞定位(例如,跨膜定位)。程序psort (PSORT.org)和Prosites (prosite.expasy.org)是这种程序的示例。

[0183] 本文所述的抗原结合系统中包含的跨膜结构域的类型不限于任何类型。在一些实施方案中,选择与结合结构域和/或细胞内结构域天然相关联的跨膜结构域。在一些情况下,跨膜结构域包含一个或多个氨基酸的修饰(例如,缺失、插入和/或取代),例如,以避免此类结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合,以最小化与受体复合物的其他成员的相互作用。跨膜结构域可以来源于天然来源或合成来源。在来源是天然来源的情况下,结构域可以来源于任何膜结合蛋白质或跨膜蛋白质。示例性跨膜结构域可以来源于(例如,可以至少包括以下各项的跨膜结构域) T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链, CD28、CD3 ϵ 、CD3 δ 、CD3 γ 、CD45、CD4、CD5、CD7、CD8、CD8 α 、CD8 β 、CD9、CD11a、CD11b、CD11c、CD11d、CD16、CD22、CD27、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、TNFSFR25、CD154、4-1BB/CD137、活化NK细胞受体、免疫球蛋白、B7-H3、BAFFR、BLAME (SLAMF8)、BTLA、CD100 (SEMA4D)、CD103、CD160 (BY55)、CD18、CD19、CD19a、CD2、CD247、CD276 (B7-H3)、CD29、CD30、CD40、CD49a、CD49D、CD49f、CD69、CD84、CD96 (Tactile)、CDS、CEACAM1、CRT AM、细胞因子受体、DAP-10、DNAM1 (CD226)、Fc γ 受体、GADS、GITR、HVEM (LIGHTR)、IA4、ICAM-1、ICAM-1、Ig α (CD79a)、IL-2R β 、IL-2R γ 、IL-7R α 、诱导型T细胞共刺激因子 (ICOS)、整合素、ITGA4、ITGA4、ITGA6、ITGAD、ITGAE、ITGAL、ITGAM、ITGAX、ITGB2、ITGB7、ITGB1、KIRDS2、LAT、LFA-1、LFA-1, 与CD83结合的配体、LIGHT、LIGHT、LTBR、Ly9 (CD229)、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1; CD1-1a/CD18)、MHC 1类分子、NKG2C、NKG2D、Nkp30、Nkp44、Nkp46、Nkp80 (KLRF1)、OX-40、PAG/Cbp、程序性死亡-1 (PD-1)、PSGL1、SELPLG (CD162)、信号传导淋巴细胞活化分子 (SLAM蛋白)、SLAM (SLAMF1; CD150; IPO-3)、SLAMF4 (CD244; 2B4)、SLAMF6 (NTB-A; Ly108)、SLAMF7、SLP-76、TNF受体蛋白、TNFR2、TNFSF14、To11配体受体、TRANCE/RANKL、VLA1或VLA-6, 或者它们的片段、截短形式或组合。在一些实施方案中,跨膜结构域可以是合成的(并且可以例如主要包括疏水性残基,诸如亮氨酸和缬氨酸)。在一些实施方案中,在合成跨膜结构域的每个端部处均包含苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体。在一些实施方案中,跨膜结构域直接连结或连接到细胞质结构域。在一些实施方案中,短的寡肽或多肽接头(例如,长度介于2个氨基酸与10个氨基酸之间)可以形成介于跨膜结构域与细胞内结构域之间的连接部。在一些实施方案中,接头是甘氨酸-丝氨酸双联体。在实施方案中,本文所述的CAR包含来自CD28的TM结构域,该TM结构域具有与SEQ ID NO:50 (FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO:50))具有至少75%的序列同一性(诸如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的氨基酸序列。在实施方案中,本文所述的CAR包含来自CD8a的TM结构域,该TM结构域具有与SEQ ID NO:51或SEQ ID NO:78 (IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN (SEQ ID NO:51), IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO:78))具有至少75%的序列同一性(诸如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或

100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的氨基酸序列。

[0184] 本文提供的跨膜结构域的多核苷酸和多肽序列是已知的。在一些实施方案中,编码跨膜结构域的多核苷酸包含与已知核苷酸序列至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%(例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)相同的核苷酸序列。在一些实施方案中,跨膜结构域的多肽序列包含与已知多肽序列至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%(例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)相同的多肽序列。任选地,短间隔区可以在CAR的任何或一些细胞外、跨膜和细胞内结构域之间形成连接。

[0185] 可以在抗原与免疫细胞结合时转导信号的细胞内信号传导结构域是已知的,它们中的任一个可以包含在本公开的抗原结合系统中。例如,已知T细胞受体(TCR)的细胞质序列在TCR与抗原结合后引发信号转导(参见例如Brownlie等人,Nature Rev.Immunol.13:257-269(2013))。

[0186] 在实施方案中,本文设想的CAR包含细胞内信号传导结构域。“细胞内信号传导结构域”是指CAR的部分,其参与将结合靶标抗原的有效CAR的消息转导进免疫效应细胞的内部中,以引发效应细胞功能,例如活化、细胞因子产生、增殖和细胞毒性活性,包括将细胞毒性因子释放到CAR结合的靶标细胞,或者用抗原结合至细胞外CAR结构域引发的其他细胞应答。在一些实施方案中,信号传导结构域和/或活化结构域包含衍生自CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 或DAP-12或它们的片段、截短或组合的细胞质信号传导结构域。

[0187] 术语“效应子功能”是指细胞的特化功能。例如,T细胞的效应子功能可以是细胞溶解活性或者有助于活性(包括细胞因子分泌)。因此,术语“细胞内信号传导结构域”是指蛋白质的该部分:其转导效应子功能信号并且引导细胞执行特化功能。虽然通常可以采用整个细胞内信号传导结构域,但是在许多情况下,不必使用整个结构域。在使用细胞内信号传导结构域的截短部分的情况下,可以使用此类截短部分替代整个结构域,只要其转导效应子功能信号即可。术语“细胞内信号传导结构域”意在包括该细胞内信号传导结构域的足以转导效应子功能信号的任何截短部分。

[0188] 在一个实施方案中,CAR具有CD3 ϵ 结构域,该结构域具有与根据以下的氨基酸序列具有至少75%的序列同一性(诸如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的氨基酸序列:KNRKAKAKPVTRGAGAGGRQGRQNKERPPVPNPDYEPPIRKGQRDLYS GLNQRRRI (SEQ ID NO:52)。在实施方案中,CD3 ϵ 结构域由与具有根据以下的序列的核酸具有至少75%的序列同一性(诸如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的核酸编码:AAGAACCGGAAGGCCAAGGCCAAGCCTGTGACAAGAGGTGCTGGTGCTGGCGGCAGACAGAGAGGCCAGAACAAAGAAAGACCTCCTCCTGTGCCTAATCCTGACTACGAGCCCATCCGGAAGGGCCAGAGAGATCTGTACAGCGGCTGAACCAGCGGGGATT (SEQ ID NO:53)。

[0189] 在实施方案中,CD3 ϵ 结构域由与具有根据以下的序列的核酸具有至少75%的序列同一性(诸如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的核酸编码:

[0190] AAGAACCGCAAAGCAAAGGCAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCAGGGGGACGACAACGCGGTCA GAATAAGGAACGCCCGCCTCCAGTACCAAATCCAGATTATGAACCAATTTCGGAAGGGACAACGCGATCTCTACTCC GGTCTCAATCAGAGGCGAATT (SEQ ID NO:54)。

[0191] 在一个实施方案中,CAR具有新的CD3 ϵ 结构域(称为 ϵ -C0 (Δ 181-185)),该结构域具有与根据以下的氨基酸序列具有至少75%的序列同一性(诸如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的氨基酸序列:

[0192] KNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPVPNPDYEP IRKGQRDLYSGL (SEQ ID NO:87)。在实施方案中,CD3 ϵ 结构域(称为 ϵ -C0 (Δ 181-185))由与具有根据以下的序列的核酸具有至少75%的序列同一性(诸如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的核酸编码:

[0193] AAGAACCGCAAAGCAAAGGCAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCAGGGGGACGACAACGCGGTCA GAATAAGGAACGCCCGCCTCCAGTACCAAATCCAGATTATGAACCAATTTCGGAAGGGACAACGCGATCTCTACTCC GGTCTC (SEQ ID NO:79)。

[0194] 在一个实施方案中,CAR具有新的CD3 ϵ 结构域(称为 ϵ -C0 (R183K)),该结构域具有与根据以下的氨基酸序列具有至少75%的序列同一性(诸如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的氨基酸序列:

[0195] KNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPVPNPDYEP IRKGQRDLYSGLNQGRI (SEQ ID NO:88)。在实施方案中,CD3 ϵ 结构域(称为 ϵ -C0 (R183K))由与具有根据以下的序列的核酸具有至少75%的序列同一性(诸如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的核酸编码:

[0196] AAGAACCGCAAAGCAAAGGCAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCAGGGGGACGACAACGCGGTCA GAATAAGGAACGCCCGCCTCCAGTACCAAATCCAGATTATGAACCAATTTCGGAAGGGACAACGCGATCTCTACTCC GGTCTCAATCAGAAGCGAATT (SEQ ID NO:80)。

[0197] 在一个实施方案中,CAR具有新的CD3 ϵ 结构域(称为 ϵ -C0 (S178N.R183K)),该结构域具有与根据以下的氨基酸序列具有至少75%的序列同一性(诸如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的氨基酸序列:

[0198] KNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPVPNPDYEP IRKGQRDLYNGLNQGRI (SEQ ID NO:89)。在实施方案中,CD3 ϵ 结构域由与具有根据以下的序列的核酸具有至少75%的序列同一性(诸如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的核酸编码:

[0199] AAGAACCGCAAAGCAAAGGCAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCAGGGGGACGACAACGCGGTCA GAATAAGGAACGCCCGCCTCCAGTACCAAATCCAGATTATGAACCAATTTCGGAAGGGACAACGCGATCTCTACAAC

GGTCTCAATCAGAAGCGAATT (SEQ ID NO:81)。

[0200] 在某些方面,新的CD3 ϵ 结构域、 ϵ -C0 (Δ 181-185)、 ϵ -C0 (R183K) 和 ϵ -C0 (S178N.R183K)改善CAR向细胞膜的运输。

[0201] 在一个实施方案中,CAR具有CD3 δ 结构域,该结构域具有与根据以下的氨基酸序列具有至少75%的序列同一性(诸如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的氨基酸序列:GHETGRLSGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK (SEQ ID NO:55)。在实施方案中,CD3 δ 结构域由与具有根据以下的序列的核酸具有至少75%的序列同一性(诸如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的核酸编码:

[0202] GGACACGAAACAGGCAGACTTCTGGCGCCGCTGATACACAGGCCCTGCTGAGAAACGACCAGGTGTACCAGCCTCTGAGAGACAGAGATGACGCCAGTACTCTCACCTCGGCGGCAATTGGGCCAGAAACAAG (SEQ ID NO:56)。

[0203] 在一个实施方案中,CAR具有CD3 γ 结构域,该结构域具有与根据以下的氨基酸序列具有至少75%的序列同一性(诸如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的氨基酸序列:GQDGVQRSRASDKQTLNPNDQLYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRRN (SEQ ID NO:57)。在实施方案中,CD3 γ 结构域由与具有根据以下的序列的核酸具有至少75%的序列同一性(诸如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的核酸编码:

[0204] GGACAGGATGGCGTCAGACAGAGCAGAGCCAGCGACAAGCAAACCCTGCTGCCTAACGACCAGCTGTACCAGCCTCTGAAGGACAGAGAGGACGACCAGTACAGCCATCTGCAGGGCAACCAGCTGCGGAGAAAC (SEQ ID NO:58)。

[0205] 在一个实施方案中,CAR具有DAP-12结构域,该结构域具有与根据以下的氨基酸序列具有至少75%的序列同一性(诸如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的氨基酸序列:YFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRP YYK (SEQ ID NO:59)。在实施方案中,DAP-12结构域由与具有根据以下的序列的核酸具有至少75%的序列同一性(诸如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的核酸编码:TACTTCCTGGGCAGACTGGTGCCTAGAGGAAGAGGAGCTGCTGAGGCTGCTACCAGAAAGCAGAGAATCACCGAGACCGAGAGCCCTTACCAGGAGCTGCAGGGACAGAGAAGCGACGTGTACAGCGACCTGAACACCCAGAGACCTTACTACAAG (SEQ ID NO:60)。

[0206] 已知单独通过TCR产生的信号不足以完全活化T细胞,并且可能还需要次级或共刺激信号。因此,T细胞活化可以被称为由以下两个不同类别的细胞内信号传导结构域介导:通过TCR(例如,TCR/CD3复合物)启动抗原依赖性初级活化的初级信号传导结构域,以及以抗原非依赖性方式起作用以提供次级或共刺激信号的共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中,本文设想的CAR包含细胞内信号传导结构域,该细胞内信号传导结构域包括一个或多个“共刺激信号传导结构域”和“初级信号传导结构域”。

[0207] 本文设想的CAR包含一个或多个共刺激信号传导结构域,以增强表达CAR受体的T细胞的功效和扩增。如本文所用,术语“共刺激信号传导结构域”或“共刺激结构域”是指共刺激分子的细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,共刺激分子可以包括CD27、CD28、CD137 (4-1BB)、OX40 (CD134)、CD30、CD40、PD-1、ICOS (CD278)、CTLA4、LFA-1、CD2、CD7、LIGHT、TRIM、LCK3、SLAM、DAPI0、LAG3、HVEM、NKD2C和CD83。在实施方案中,本文所述的CAR包含CD28共刺激结构域,该共刺激结构域具有与SEQ ID NO:61具有至少75%的序列同一性(诸如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的氨基酸序列。RSKRSRLHSDYMN MTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO:61)。

[0208] 在实施方案中,本文所述的CAR包含4-1BB共刺激结构域,该共刺激结构域具有与SEQ ID NO:77具有至少75%的序列同一性(诸如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的氨基酸序列。KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE (SEQ ID NO:77)。

[0209] CAR的组分可使用生物技术的常规技术交换或“交换”为等效组分。为了仅提供几个非限制性和部分示例,本公开的CAR可以包含如本文提供的结合结构域与本文提供的铰链和本文提供的共刺激结构域的组合。在某些示例中,本公开的CAR可以包含如本文提供的前导序列连同如本文提供的结合结构域与本文提供的铰链和本文提供的共刺激结构域的组合。

[0210] 在某些方面,本公开包括编码本文提供的抗CD19结合结构域的核酸。在某些另外的方面,本公开包括编码本文提供的抗体的核酸,包括但不限于编码抗CD19结合结构域的核酸。在某些另外的方面,本公开包括编码本文提供的抗原结合系统的核酸,包括但不限于编码抗CD19嵌合抗原受体的核酸。

[0211] 在实施方案中,抗CD19 CAR构建体具有与根据以下的氨基酸序列具有至少75%的序列同一性(诸如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的氨基酸序列:

[0212] DIQMTQTSSLSASLGDVRTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYH

[0213] TSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGG

[0214] TKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGGLVAPSQSLSVTCTVSGV

[0215] SLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGETTYNSALKSRLTIKDNSKSQ

[0216] VFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSAAAL

[0217] DNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWLVVVGGVLACYSLLVTVA

[0218] FIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSKNR

[0219] KAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPVPNPDYEP IRKGQRDLYSGLNQRRRI (SEQ ID NO:62)。在实施方案中,抗CD19 CAR由与具有根据以下的序列的核酸具有至少75%的序列同一性(诸如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的核酸编码:GATATACAGATGACCCAAACG ACGTCTAGCCTCAGTGCCTCACTCGGGGATCGGGTGACAATTAGCTGCAGGGCTAGCCAGGATATTTCAAATATC TTAAGTGGTATCAACAAAAGCCAGATGGAACCGTAAACTGCTCATATACCACACCAGTCGCTGCATTCAGGGGT TCCGAGCCGCTTTTCTGGGAGCGGTAGCGGAACtGA tTATAGCTTGACAATAAGCAACCTCGAGCAGGAAGACATT

GCGACGTACTTCTGTCAGCAAGGGAACACGCTGCCGTATACCTTCGGTGGCGGCACTAAACTGGAAATCACGGGATCTACGTCTGGATCCGGAAAACCTGGATCTGGTGAAGGATCCACTAAAGGCGAAGTCAAGTTGCAAGAGTCTGGACCTGGTCTCGTGGCACCTTCACAGTCACTCTCCGTTACCTGTACCGTATCTGGAGTTTCACTTCCCGACTATGGCGTGTTCATGGATACGCCAACCCGCGAAAAGGTCTTGAATGGCTGGGCGTTATCTGGGGATCCGAAACCACATACTACA ACTCTGCGCTCAAGTCACGGCTGACTATTATAAAGGACAATTCAAAGAGCCAAGTGTTCCTGAAAATGAACAGCCTGCAGACTGATGACTGCAATATATTACTGCGCCAAGCATTACTATTACGGCGGATCTTACGCGATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCTCTGTAACAGTCAGCTCCGCGGCCGATTGGACAATGAAAAATCCAATGGCACAATAATTCATGTAAAGGGCAAACACTTGTGTCCTAGCCCACTCTTTCCTGGTCCGTCTAAACCGTTTTGGGTGCTCGTTGTGGTTGGAGGCGTCTGGCTTGTACTCTCTGTTGGTACTGTAGCCTTTATAATATTCTGGGTTAGAAGCAAACGAAGTAGGCTTTTACATTCAGACTATATGAACATGACACCAAGACGCCCCGGCCCCACAAGAAAACACTATCAGCCCTATGCTCCGCTCGGGACTTCGCTGCTTACCGAAGCAAGAACC GCAAAGCAAAGGCAAAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCAGGGGACGACAACGCGGTCAGAATAAGGAACGCCGCTCCAGTACCAAATCCAGATTATGAACCAATTCGGAAGGGACAACGCGATCTACTCCGGTCTCAATCAGAGGCGAATT (SEQ ID NO:63)。在实施方案中,抗CD19 CAR由与具有根据以下的序列的核酸具有至少75%的序列同一性(诸如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的核酸编码:GACATCCAAATGACCCAAACCACCTCCTCCCTGAGCGCCTCCCTTGAGACCGAGTTACCATCTCCTGCCGAGCTTCTCAAGACATCTCCAAGTACTTGAATTGGTATCAACA AAAGCCCGACGGAACCGTGAAGCTGCTGATCTACCACACATCCCGGCTGCACTCTGGCGTTCCTCAAGATTCTCCGGCTCTGGAAGCGGAACCGACTACTCCCTGACCATCTCCAACCTGGAGCAAGAGGACATCGCTACCTACTTCTGCC AACAAGGCAACACCCTGCCTTACACCTTCGGAGGAGGAACCAAGCTGGAGATCACCGGAAGCACAAGCGGATCTGGCAAGCCTGGAAGCGGAGAGGGAAGCACAAGGGAGAGGTGAAGCTGCAAGAGAGCGGACCTGGATTGGTGGCCCCCTCACAATCCCTGAGCGTTACATGCACTGTGAGCGGCGTGTCCCTTCTGACTACGGCGTTTCTGGATCCGCCAACCTCCAAGAAAAGGACTGGAGTGGCTGGGAGTGATCTGGGGAAGCGAGACCACCTACTACA ACTCCGCCCTGAAGAGCCGACTGACCATCATCAAGGACA ACTCCAAGAGCCAAGTGTTCCTGAAGATGAACTCTCTCCAACCAGCAGACCCGCTATCTACTACTGCGCTAAGCACTACTACTACGGAGGAAGCTACGCTATGGACTACTGGGACAAGGCACCTCTGTGACCGTCTCCTCTGCCCGGCTCTGGACAACGAGAAGCAACGGAACCATCATCCACGTGAAGGGAAGCACCTGTGCCCTCTCCTCTGTTCCCTGGACCCTCCAAGCCTTTCTGGGTGCTCGTGGTGGTGGGAGGAGTGCTGGCTTGTACTCCCTGCTTGTGACCGTGGCTTTCATCATCTTCTGGGTTAGAAGCAAGAGAAGCAGACTGCTGCACAGCGACTACATGAACATGACCCCTAGAAGGCCCGGACCTACCAGAAAGCACTACCAGCCTTACGCTCCTCCTAGAGACTTCGCTGCTTACAGAAGCAAGAACCGGAAGGCCAAGCCTGTGACAAGAGGTGCTGGTGTGGCGGCAGACAGAGAGGCCAGAACAAGAAAAGACCTCCTCCTGTGCCTAATCCTGACTACGAGCCATCCGGAAGGGCCAGAGAGATCTGTACAGCGCCTGAACCAGCGGCGGATT (SEQ ID NO:64)。

[0220] 在实施方案中,抗CD19 CAR构建体具有与根据以下的氨基酸序列具有至少75%的序列同一性(诸如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的氨基酸序列:

[0221] DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYH

[0222] TSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGG

[0223] TKLEITGSTSGSKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGV

[0224] SLPDYGVSWIRQPPRKLEWLGVWSETTYNSALKSRLTI IKDNSKSQ

[0225] VFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAAL
 [0226] DNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWLVVVVGGVLACYSLLVTVA
 [0227] FIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSGHETGRLSGAADTQALLRNDQ
 VYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK (SEQ ID NO:65)。在实施方案中,抗CD19 CAR由与具有根据以下的序列的核酸具有至少75%的序列同一性(诸如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的核酸编码:

[0228] GACATCCAAATGACCCAAACCACCTCCTCCCTGAGCGCCTCCCTTGA
 [0229] GACCGAGTTACCATCTCCTGCCGAGCTTCTCAAGACATCTCCAAGTAC
 [0230] TTGAATTGGTATCAACAAAAGCCCGACGGAACCGTGAAGCTGCTGAT
 [0231] CTACCACACATCCCGGCTGCACTCTGGCGTTCCTCAAGATTCTCCGG
 [0232] CTCTGGAAGCGGAACCGACTACTCCCTGACCATCTCCAACCTGGAGCA
 [0233] AGAGGACATCGCTACCTACTTCTGCCAACAAGGCAACACCCTGCCTTA
 [0234] CACCTTCGGAGGAGGAACCAAGCTGGAGATCACCGGAAGCACAAGCG
 [0235] GATCTGGCAAGCCTGGAAGCGGAGAGGGAAGCACCAAGGGAGAGGT
 [0236] GAAGCTGCAAGAGAGCGGACCTGGATTGGTGGCCCCCTCACAATCCC
 [0237] TGAGCGTTACATGCACTGTGAGCGGCGTGTCCCTTCTGACTACGGCG
 [0238] TTTCTGGATCCGCCAACCTCCAAGAAAGGGACTGGAGTGGCTGGGA
 [0239] GTGATCTGGGAAGCGGAGACCACCTACTACAACCTCCGCCCTGAAGAG
 [0240] CCGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTGTTCCTGA
 [0241] AGATGAACTCTCTCAAACCGACGACACCGCTATCTACTACTGCGCTA
 [0242] AGCACTACTACTACGGAGGAAGCTACGCTATGGACTACTGGGGACAA
 [0243] GGCACCTCTGTGACCGTCTCCTCTGCCGCCGCTCTGGACAACGAGAAG
 [0244] AGCAACGGAACCATCATCCACGTGAAGGAAAGCACCTGTGCCCTC
 [0245] TCCTCTGTTCCCTGGACCCTCCAAGCCTTTCTGGGTGCTCGTGGTGGTG
 [0246] GGAGGAGTGCTGGCTTGCTACTCCCTGCTTGTGACCGTGGCTTTCATC
 [0247] ATCTTCTGGGTTAGAAGCAAGAGAAGCAGACTGCTGCACAGCGACTA
 [0248] CATGAACATGACCCCTAGAAGGCCCGGACCTACCAGAAAGCACTACC
 [0249] AGCCTTACGCTCCTCCTAGAGACTTCGCTGCTTACAGAAGCGGACACG
 [0250] AAACAGGCAGACTTTCTGGCGCCGCTGATACACAGGCCCTGCTGAGA
 [0251] AACGACCAGGTGTACCAGCCTCTGAGAGACAGAGATGACGCCAGTACTCTCACCTCGGCGGCAATTG
 GGCCAGAAACAAG (SEQ ID NO:66)。

[0252] 在实施方案中,抗CD19 CAR构建体具有与根据以下的氨基酸序列具有至少75%的序列同一性(诸如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的氨基酸序列:

[0253] DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYH
 [0254] TSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGG
 [0255] TKLEITGSTSGSKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGV
 [0256] SLPDYGVSWIRQPPRKLEWLGVWSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQ

[0257] VFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAAL
 [0258] DNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWLVVVVGGVLACYSLLVTVA
 [0259] FIIFWVRSKRSLRHSDYMNMPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSGQDGVQRASDKQTLLPNDQ
 LYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRRN (SEQ ID NO:67)。

[0260] 在实施方案中,抗CD19 CAR由与具有根据以下的序列的核酸具有至少75%的序列同一性(诸如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的核酸编码:

[0261] GACATCCAAATGACCCAAACCACCTCCTCCCTGAGCGCTCCCTTGA
 [0262] GACCGAGTTACCATCTCCTGCCGAGCTTCTCAAGACATCTCCAAGTAC
 [0263] TTGAATTGGTATCAACAAAAGCCCGACGGAACCGTGAAGCTGCTGAT
 [0264] CTACCACACATCCCGGCTGCACTCTGGCGTTCCTCAAGATTCTCCGG
 [0265] CTCTGGAAGCGGAACCGACTACTCCCTGACCATCTCCAACCTGGAGCA
 [0266] AGAGGACATCGCTACCTACTTCTGCCAACAAGGCAACACCCTGCCTTA
 [0267] CACCTTCGGAGGAGGAACCAAGCTGGAGATCACCGGAAGCACAAGCG
 [0268] GATCTGGCAAGCCTGGAAGCGGAGAGGGAAGCACCAAGGGAGAGGT
 [0269] GAAGCTGCAAGAGAGCGGACCTGGATTGGTGGCCCCCTCACAATCCC
 [0270] TGAGCGTTACATGCACTGTGAGCGGCGTGTCCCTTCTGACTACGGCG
 [0271] TTTCTGGATCCGCCAACCTCCAAGAAAGGGACTGGAGTGGCTGGGA
 [0272] GTGATCTGGGAAGCGGAGACCACCTACTACAACCTCCGCCCTGAAGAG
 [0273] CCGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTGTTCCTGA
 [0274] AGATGAACTCTCTCAAACCGACGACACCGCTATCTACTACTGCGCTA
 [0275] AGCACTACTACTACGGAGGAAGCTACGCTATGGACTACTGGGGACAA
 [0276] GGCACCTCTGTGACCGTCTCCTCTGCCGCCGCTCTGGACAACGAGAAG
 [0277] AGCAACGGAACCATCATCCACGTGAAGGAAAGCACCTGTGCCCTC
 [0278] TCCTCTGTTCCCTGGACCCTCCAAGCCTTTCTGGGTGCTCGTGGTGGTG
 [0279] GGAGGAGTGCTGGCTTGCTACTCCCTGCTTGTGACCGTGGCTTTCATC
 [0280] ATCTTCTGGGTTAGAAGCAAGAGAAGCAGACTGCTGCACAGCGACTA
 [0281] CATGAACATGACCCCTAGAAGGCCCGGACCTACCAGAAAGCACTACC
 [0282] AGCCTTACGCTCCTCCTAGAGACTTCGCTGCTTACAGAAGCGGACAGG
 [0283] ATGGCGTCAGACAGAGCAGAGCCAGCGACAAGCAAACCCTGCTGCCT
 [0284] AACGACCAGCTGTACCAGCCTCTGAAGGACAGAGAGGACGACCAGTACAGCCATCTGCAGGGCAACCA
 GCTGCGGAGAAAC (SEQ ID NO:68)。

[0285] 在实施方案中,抗CD19 CAR构建体具有与根据以下的氨基酸序列具有至少75%的序列同一性(诸如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的氨基酸序列:

[0286] DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYH
 [0287] TSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGG
 [0288] TKLEITGSTSGSKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGV
 [0289] SLPDYGVSWIRQPPRKLEWLGVWSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQ

- [0290] VFLKMNSLQTD DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAAL
- [0291] DNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFVWL VVVGGVLACYSLLVTVA
- [0292] FIIFWVRSKRSRL LHS DYMNMT PRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAA YRSYFL
- [0293] GRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGGQRSDVYSDLNTQRPYK (SEQ ID NO:69)。
- [0294] 在实施方案中,抗CD19 CAR由与具有根据以下的序列的核酸具有至少75%的序列同一性(诸如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的核酸编码:
- [0295] GACATCCAAATGACCCAAACCACCTCCTCCCTGAGCGCTCCCTTGA
- [0296] GACCGAGTTACCATCTCCTGCCGAGCTTCTCAAGACATCTCCAAGTAC
- [0297] TTGAATTGGTATCAACAAAAGCCCGACGGAACCGTGAAGCTGCTGAT
- [0298] CTACCACACATCCCGGCTGCACTCTGGCGTTCCTCAAGATTCTCCGG
- [0299] CTCTGGAAGCGGAACCGACTACTCCCTGACCATCTCCAACCTGGAGCA
- [0300] AGAGGACATCGCTACCTACTTCTGCCAACAAGGCAACACCCTGCCTTA
- [0301] CACCTTCGGAGGAGGAACCAAGCTGGAGATCACCGGAAGCACAAGCG
- [0302] GATCTGGCAAGCCTGGAAGCGGAGAGGGAAGCACCAAGGGAGAGGT
- [0303] GAAGCTGCAAGAGAGCGGACCTGGATTGGTGGCCCCCTCACAATCCC
- [0304] TGAGCGTTACATGCACTGTGAGCGGCGTGTCCCTTCTGACTACGGCG
- [0305] TTTCTGGATCCGCCAACCTCCAAGAAAGGGACTGGAGTGGCTGGGA
- [0306] GTGATCTGGGAAGCGAGACCACCTACTACAACCTCCGCCCTGAAGAG
- [0307] CCGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTGTTCCTGA
- [0308] AGATGAACTCTCTCAAACCGACGACACCGCTATCTACTACTGCGCTA
- [0309] AGCACTACTACTACGGAGGAAGCTACGCTATGGACTACTGGGGACAA
- [0310] GGCACCTCTGTGACCGTCTCCTCTGCCGCCGCTCTGGACAACGAGAAG
- [0311] AGCAACGGAACCATCATCCACGTGAAGGAAAGCACCTGTGCCCTC
- [0312] TCCTCTGTTCCCTGGACCCTCCAAGCCTTTCTGGGTGCTCGTGGTGGTG
- [0313] GGAGGAGTGCTGGCTTGCTACTCCCTGCTTGTGACCGTGGCTTTCATC
- [0314] ATCTTCTGGGTTAGAAGCAAGAGAAGCAGACTGCTGCACAGCGACTA
- [0315] CATGAACATGACCCTAGAAGGCCCGGACCTACCAGAAAGCACTACC
- [0316] AGCCTTACGCTCCTCCTAGAGACTTCGCTGCTTACAGAAGCTACTTCC
- [0317] TGGGCAGACTGGTGCCTAGAGGAAGAGGAGCTGCTGAGGCTGCTACC
- [0318] AGAAAGCAGAGAATCACCGAGACCGAGAGCCCTTACCAGGAGCTGCA
- [0319] GGGACAGAGAAGCGACGTGTACAGCGACCTGAACACCCAGAGACCTTACTACAAG (SEQ ID NO:70)。
- [0320] 在实施方案中,抗CD19 CAR构建体具有与根据以下的氨基酸序列具有至少75%的序列同一性(诸如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的氨基酸序列:
- [0321] DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYL N WYQQKPDGTVKLLIYH
- [0322] TSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGG
- [0323] TKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESG PGLVAPSQSLSVTCTVSGV

[0324] SLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTI IKDNSKSQ
[0325] VFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAAL
[0326] DNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVA
[0327] FIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVK
[0328] FRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR
[0329] KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR (SEQ ID NO:71)。

[0330] 在实施方案中,抗CD19 CAR由与具有根据以下的序列的核酸具有至少75%的序列同一性(诸如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的核酸编码:

[0331] GACATCCAAATGACCCAAACCACCTCCTCCCTGAGCGCTCCCTTGGA
[0332] GACCGAGTTACCATCTCCTGCCGAGCTTCTCAAGACATCTCCAAGTAC
[0333] TTGAATTGGTATCAACAAAAGCCCGACGGAACCGTGAAGCTGCTGAT
[0334] CTACCACACATCCCGGCTGCACTCTGGCGTTCCTCAAGATTCTCCGG
[0335] CTCTGGAAGCGGAACCGACTACTCCCTGACCATCTCCAACCTGGAGCA
[0336] AGAGGACATCGCTACCTACTTCTGCCAACAAGGCAACACCCTGCCTTA
[0337] CACCTTCGGAGGAGGAACCAAGCTGGAGATCACCGGAAGCACAAGCG
[0338] GATCTGGCAAGCCTGGAAGCGGAGAGGGAAGCACCAAGGGAGAGGT
[0339] GAAGCTGCAAGAGAGCGGACCTGGATTGGTGGCCCCCTCACAAATCCC
[0340] TGAGCGTTACATGCACTGTGAGCGGCGTGTCCCTTCTGACTACGGCG
[0341] TTTCTGGATCCGCCAACCTCCAAGAAAGGGACTGGAGTGGCTGGGA
[0342] GTGATCTGGGAAGCGAGACCACCTACTACAACCTCCGCCCTGAAGAG
[0343] CCGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTGTTCCTGA
[0344] AGATGAACTCTCTCCAAACCGACGACACCGCTATCTACTACTGCGCTA
[0345] AGCACTACTACTACGGAGGAAGCTACGCTATGGACTACTGGGGACAA
[0346] GGCACCTCTGTGACCGTCTCCTCTGCCGCCGCTCTGGACAACGAGAAG
[0347] AGCAACGGAACCATCATCCACGTGAAGGAAAGCACCTGTGCCCTC
[0348] TCCTCTGTTCCCTGGACCCTCCAAGCCTTTCTGGGTGCTCGTGGTGGTG
[0349] GGAGGAGTGCTGGCTTGCTACTCCCTGCTTGTGACCGTGGCTTTCATC
[0350] ATCTTCTGGGTTAGAAGCAAGAGAAGCAGACTGCTGCACAGCGACTA
[0351] CATGAACATGACCCCTAGAAGGCCCGGACCTACCAGAAAGCACTACC
[0352] AGCCTTACGCTCCTCCTAGAGACTTCGCTGCTTACAGAAGCAGGGTGA
[0353] AGTTCTCAAGAAGCGCTGACGCTCCTGCTTACCAACAAGGCCAAAAC
[0354] CAACTGTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGAAGAGAGGAATACGACGT
[0355] CCTGGACAAGAGAAGAGGAAGAGACCCTGAGATGGGAGGAAAGCCA
[0356] AGAAGAAAGAACCCTCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTGCAAAAGG
[0357] ACAAGATGGCTGAGGCTTACTCCGAGATCGGAATGAAGGGAGAGAGA
[0358] AGAAGAGGAAAGGGACACGACGACTGTACCAAGGCCTGAGCACCG
[0359] CTACCAAGGACACCTACGACGCTCTGCACATGCAAGCCCTGCCTCCTAGG (SEQ ID NO:72)。

[0360] 在实施方案中,抗CD19 CAR构建体具有与根据以下的氨基酸序列具有至少75%的序列同一性(诸如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的氨基酸序列:

[0361] DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYH
 [0362] TSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGG
 [0363] TKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGV
 [0364] SLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGETTYNSALKSRLTI IKDNSKSQ
 [0365] VFLKMNSLQTD DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAAL
 [0366] DNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFVWL VVVGGVLACYSLLVTVA
 [0367] FIIFWVRSKRSRL LHS DYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVK
 [0368] FRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRR
 [0369] KNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 73)。

[0370] 在实施方案中,抗CD19 CAR由与具有根据以下的序列的核酸具有至少75%的序列同一性(诸如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的核酸编码:

[0371] GACATCCAAATGACCCAAACCACCTCCTCCCTGAGCGCCTCCCTTGGA
 [0372] GACCGAGTTACCATCTCCTGCCGAGCTTCTCAAGACATCTCCAAGTAC
 [0373] TTGAATTGGTATCAACAAAAGCCCGACGGAACCGTGAAGCTGCTGAT
 [0374] CTACCACACATCCCGGCTGCACTCTGGCGTTCCTCAAGATTCTCCGG
 [0375] CTCTGGAAGCGGAACCGACTACTCCCTGACCATCTCCAACCTGGAGCA
 [0376] AGAGGACATCGCTACCTACTTCTGCCAACAAGGCAACACCCTGCCTTA
 [0377] CACCTTCGGAGGAGGAACCAAGCTGGAGATCACCGGAAGCACAAGCG
 [0378] GATCTGGCAAGCCTGGAAGCGGAGAGGGAAGCACCAAGGGAGAGGT
 [0379] GAAGCTGCAAGAGAGCGGACCTGGATTGGTGGCCCCCTCACAAATCCC
 [0380] TGAGCGTTACATGCACTGTGAGCGGCGTTCCTTCTGACTACGGCG
 [0381] TTTCTGGATCCGCCAACCTCCAAGAAAGGGACTGGAGTGGCTGGGA
 [0382] GTGATCTGGGAAGCGAGACCACCTACTACAACCTCCGCCCTGAAGAG
 [0383] CCGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTGTTCCTGA
 [0384] AGATGAACTCTCTCAAACCGACGACACCGCTATCTACTACTGCGCTA
 [0385] AGCACTACTACTACGGAGGAAGCTACGCTATGGACTACTGGGGACAA
 [0386] GGCACCTCTGTGACCGTCTCCTCTGCCGCCGCTCTGGACAACGAGAAG
 [0387] AGCAACGGAACCATCATCCACGTGAAGGGAAAGCACCTGTGCCCTC
 [0388] TCCTCTGTTCCCTGGACCCTCCAAGCCTTTCTGGGTGCTCGTGGTGGTG
 [0389] GGAGGAGTGCTGGCTTGCTACTCCCTGCTTGTGACCGTGGCTTTCATC
 [0390] ATCTTCTGGGTTAGAAGCAAGAGAAGCAGACTGCTGCACAGCGACTA
 [0391] CATGAACATGACCCTAGAAGGCCCGGACCTACCAGAAAGCACTACC
 [0392] AGCCTTACGCTCCTCCTAGAGACTTCGCTGCTTACAGAAGCCGGGTGA
 [0393] AGTTCTCAAGAAGCGCTGACGCTCCTGCTTACCAACAAGGCCAAAAC

[0394] CAACTGTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGAAGAGAGGAATACGACGT

[0395] CCTGGACAAGAGAAGAGGAAGAGACCCTGAGATGGGAGGAAAAGCCA

[0396] AGAAGAAAGAACCCTCAAGAGGGCCTGTTTAACGAGCTGCAAAAAGGA

[0397] CAAGATGGCTGAGGCTTTCTCCGAGATCGGAATGAAGGGAGAGAGAA

[0398] GAAGAGGAAAGGGACACGACGGACTGTTCCAAGCCTGAGCACCGCT

[0399] ACCAAGGACACCTTCGACGCTCTGCACATGCAAGCCTGCCTCCTAGG (SEQ ID NO:74)。

[0400] 在实施方案中,抗CD19 CAR构建体具有与根据以下的氨基酸序列具有至少75%的序列同一性(诸如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的氨基酸序列:

[0401] DIQMTQTTSSLSASLGDVRTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYH

[0402] TSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGG

[0403] TKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGGLVAPSQSLSVTCTVSGV

[0404] SLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWSETTYNSALKSRLTIKDNSKSKQ

[0405] VFLKMNSLQTDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSAAAL

[0406] DNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVWLVVVGGVLACYSLLVTVA

[0407] FIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVK

[0408] FRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR

[0409] KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:75)。

[0410] 在实施方案中,抗CD19 CAR由与具有根据以下的序列的核酸具有至少75%的序列同一性(诸如,至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或100%同一性;例如,85%-90%、85%-95%、85%-100%、90%-95%、90%-100%或95%-100%)的核酸编码:

[0411] GATATACAGATGACCCAAACGACGTCTAGCCTCAGTGCCTCACTCGG

[0412] GGATCGGGTGACAATTAGCTGCAGGGCTAGCCAGGATATTTCAAAAT

[0413] ATCTTAACTGGTATCAACAAAAGCCAGATGGAACCGTAAAACTGCTC

[0414] ATATACCACACCAGTCGCCTGCATTCAGGGGTTCCGAGCCGCTTTTCT

[0415] GGGAGCGGTAGCGGAACtGAtTATAGCTTGACAATAAGCAACCTCGAG

[0416] CAGGAAGACATTGCGACGTACTTCTGTGCAAGGGAACACGCTGCC

[0417] GTATACCTTCGGTGGCGGCACTAAACTGGAAATCACGGGATCTACGTC

[0418] TGGATCCGAAAACCTGGATCTGGTGAAGGATCCACTAAAGGCGAAG

[0419] TCAAGTTGCAAGAGTCTGGACCTGGTCTCGTGGCACCTTCACAGTCAC

[0420] TCTCCGTTACCTGTACCGTATCTGGAGTTTCACTTCCCGACTATGGCGT

[0421] GTCATGGATACCCAACCACCGCGAAAAGGTCTTGAATGGCTGGGCG

[0422] TTATCTGGGGATCCGAAACCACATACTACAACCTCTGCGCTCAAGTCAC

[0423] GGCTGACTATTATAAAGGACAATTCAAAGAGCCAAGTGTTCCTGAAA

[0424] ATGAACAGCCTGCAGACTGATGACACTGCAATATATTAATGCGCCAA

[0425] GCATTACTATTACGGCGGATCTTACGCGATGGATTATTGGGGCCAGGG

[0426] CACCTCTGTAACAGTCAGCTCCGCGGCCGATTGGACAATGAAAAAT

[0427] CCAATGGCACAATAATTCATGTAAAGGGCAAACACTTGTGTCTTAGCC

[0428] CACTCTTTCCTGGTCCGTCTAAACCGTTTTGGGTGCTCGTTGTGGTTGG
 [0429] AGGCGTCCTGGCTTGTTACTCTCTGTTGGTGACTGTAGCCTTTATAATA
 [0430] TTCTGGGTTAGAAGCAAACGAAGTAGGCTTTTACATTCAGACTATATG
 [0431] AACATGACACCAAGACGCCCCGGCCCCACAAGAAAACTATCAGCC
 [0432] CTATGCTCCGCCTCGGGACTTCGCTGCTTACCGAAGCAGAGTTAAGTT
 [0433] CAGCAGGAGCGCCGACGACCTGCCTACCAaCAAGGGCAGAATCAAC
 [0434] TGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGACGGGAGGAATACGATGTGCTG
 [0435] GACAAGAGGAGAGGCAGAGACCCCGAGATGGGCGGCAAACCTAGAA
 [0436] GAAAGAACCCCCAGGAGGGCCTGTATAATGAGCTCCAGAAGGATAAG
 [0437] ATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAAAGAAGAA
 [0438] GAGGCAAGGGCCACGACGGCCTCTACCAGGGCTTAAGCACAGCTACT
 [0439] AAGGACACCTACGACGCCCTGCACATGCAAGCTCTGCCCCCTAGA (SEQ ID NO:76)。

[0440] 一般来讲,应当理解,任何适当的一种或多种病毒载体均可以用于转导本文所述的工程化构建体。在本文所述的一个实施方案中,用编码如本文所述的工程化抗CD19 CAR的逆转录病毒载体(例如, γ -逆转录病毒载体)转导细胞(例如,T细胞)。

[0441] 如本文所用,术语“逆转录病毒”是指将其基因组RNA逆转录为线性双链DNA拷贝并且随后将其基因组DNA共价整合到宿主基因组中的RNA病毒。适用于一些实施方案中的说明性逆转录病毒包括但不限于:莫洛尼鼠白血病病毒(M-MuLV)、莫洛尼鼠肉瘤病毒(MoMSV)、哈维鼠肉瘤病毒(HaMuSV)、鼠乳腺肿瘤病毒(MuMTV)、长臂猿白血病病毒(GaLV)、猫白血病病毒(FLV)、泡沫病毒、弗里德鼠白血病病毒、鼠干细胞病毒(MSCV)、劳斯肉瘤病毒(RSV)和慢病毒。

[0442] 如本文所用,术语“慢病毒”是指复杂逆转录病毒的组(或属)。说明性慢病毒包括但不限于:HIV(人类免疫缺陷病毒;包括HIV 1型和HIV 2型);羊进行性间质肺炎病毒(VMV);羊关节炎脑炎病毒(CAEV);马传染性贫血病毒(EIAV);猫免疫缺陷病毒(FIV);牛免疫缺陷病毒(BIV);和猴免疫缺陷病毒(SIV)。

[0443] 术语“载体”在本文中用于指能够转移或转运另一种核酸分子的核酸分子。转移的核酸通常与载体核酸分子连接,例如插入载体核酸分子中。载体可以包括在细胞中直接自主复制的序列,或者可以包括足以允许整合到宿主细胞DNA中的序列。可用的载体包括例如质粒(例如,DNA质粒或RNA质粒)、转座子、粘粒、细菌人工染色体和病毒载体。可用的病毒载体包括例如复制缺陷型逆转录病毒和慢病毒。

[0444] 如对于本领域技术人员将显而易见的是,术语“病毒载体”广泛地用于指包括通常促进核酸分子转移或整合到细胞基因组中的病毒衍生的核酸元件的核酸分子(例如,转移质粒),或者介导核酸转移的病毒颗粒。病毒颗粒通常将包括各种病毒组分,并且有时除核酸之外还包括宿主细胞组分。

[0445] 术语“病毒载体”可以指能够将核酸转移到细胞中或转移到转移的核酸本身的病毒或病毒颗粒。病毒载体和转移质粒含有主要来源于病毒的结构性和/或功能性遗传元件。术语“逆转录病毒载体”是指含有主要来源于逆转录病毒的结构性和功能性遗传元件或其部分的病毒载体或质粒。术语“慢病毒载体”是指含有主要来源于慢病毒的结构性和功能性遗传元件或其部分(包括LTR)的病毒载体或质粒。术语“杂交载体”是指含有逆转录病毒(例

如慢病毒)序列和非逆转录病毒序列两者的载体、LTR或其他核酸。在一个实施方案中,杂交载体是指包含用于逆转录、复制、整合和/或包装的逆转录病毒(例如慢病毒)序列的载体或转移质粒。

[0446] 在一些实施方案中,术语“慢病毒载体”、“慢病毒表达载体”可以用于指慢病毒转移质粒和/或感染性慢病毒颗粒。在本文提到诸如克隆位点、启动子、调节元件、异源性核酸等元件的情况下,应当理解,这些元件的序列以RNA形式存在于本公开的慢病毒颗粒中并且以DNA形式存在于本公开的DNA质粒中。在本文所述的一个实施方案中,表达载体是慢病毒表达载体。

[0447] 原病毒的每个端部处是称为“长末端重复序列”或“LTR”的结构术语“长末端重复序列(LTR)”是指位于逆转录病毒DNA的端部处的碱基对结构域,这些结构域在其天然序列的语境中是直接重复序列并且含有U3区、R区和U5区。LTR通常提供对于逆转录病毒基因的表达(例如,启动、起始和基因转录物的多聚腺苷酸化)和病毒复制十分重要的功能。LTR含有许多调节信号,包括转录控制元件、多聚腺苷酸化信号,以及病毒基因组的复制和整合所需的序列。病毒LTR被分成三个区域,称为U3、R和U5。U3区含有增强子元件和启动子元件。U5区是介于引物结合位点与R区之间的序列,并且含有多聚腺苷酸化序列。R(重复序列)区侧接U3区和U5区。LTR由U3区、R区和U5区构成,并且既出现在病毒基因组的5'端处,也出现在病毒基因组的3'端处。与5'LTR相邻的是该基因组的逆转录所必需的序列(tRNA引物结合位点),以及用于将病毒RNA高效地包装到颗粒中所必需的序列(Psi位点)。

[0448] 如本文所用,术语“包装信号”或“包装序列”是指位于逆转录病毒基因组内的用于将病毒RNA插入病毒衣壳或颗粒中所需的序列,参见例如Clever等人,1995. *J of Virology*,第69卷,第4期;第2101-2109页。几种逆转录病毒载体使用病毒基因组的衣壳化所需的最小包装信号(也称为psi['P]序列)。因此,如本文所用,术语“包装序列”、“包装信号”、“psi”和符号“'P”用于指代在病毒颗粒形成期间逆转录病毒RNA链的衣壳化所需的非编码序列。

[0449] 在各种实施方案中,载体包括经修饰的5'LTR和/或3'LTR。所述LTR中的任一者或两者可以包括一个或多个修饰,包括但不限于一个或多个缺失、插入或取代。对3'LTR进行修饰通常是为了通过使慢病毒系统或逆转录病毒系统成为病毒复制缺陷型来提高所述系统的安全性。如本文所用,术语“复制缺陷型”是指不能完成有效复制,使得不产生感染性病毒体(例如,复制缺陷型慢病毒子代)的病毒。术语“复制型”是指能够复制,使得病毒的病毒复制能够产生感染性病毒体(例如,复制型慢病毒子代)的野生型病毒或突变型病毒。

[0450] “自身失活”(SIN)载体是指以下复制缺陷型载体(例如,逆转录病毒载体或慢病毒载体):其中被称为U3区的右侧(3')LTR增强子-启动子区已经被修饰(例如,通过缺失或取代),以阻止病毒转录超出第一轮病毒复制。这是因为右侧(3')LTR U3区在病毒复制期间用作左侧(5')LTR U3区的模板,因此,没有U3增强子-启动子就不能产生病毒转录物。在本公开的另一个实施方案中,对3'LTR进行修饰,使得U5区被替换,例如用理想的多聚腺苷酸序列替换。应当指出的是,本文还设想了对LTR的修饰,诸如对3'LTR、5'LTR或3'LTR和5'LTR两者的修饰。

[0451] 通过用异源性启动子替换5'LTR的U3区以在病毒颗粒的产生期间驱动病毒基因组的转录,提供了附加的安全性增强。可以使用的异源性启动子的示例包括例如猿猴病毒40

(SV40) (例如,早期或晚期) 启动子、巨细胞病毒 (CMV) (例如,立即早期) 启动子、莫洛尼鼠白血病毒 (MoMLV) 启动子、劳斯肉瘤病毒 (RSV) 启动子和单纯性疱疹病毒 (HSV) (胸苷激酶) 启动子。典型的启动子能够以Tat非依赖性方式驱动高水平的转录。这种替换降低了重组产生复制型病毒的可能性,因为该病毒生产系统中没有完整的U3序列。在某些实施方案中,异源性启动子在控制病毒基因组的转录方式中具有附加的优点。例如,异源性启动子可以是诱导型的,使得仅当存在诱导因子时才会发生所有或部分病毒基因组的转录。诱导因子包括但不限于一种或多种化学化合物或在其中培养宿主细胞的生理条件(诸如温度或pH)。

[0452] 在一些实施方案中,病毒载体包含TAR元件。术语“TAR”是指位于慢病毒R区中的“反式活化应答”遗传元件(例如,HIV)LTR。该元件与慢病毒反式激活因子(tat)遗传元件相互作用,以增强病毒复制。

[0453] “R区”是指逆转录病毒LTR内的开始于封端基团的起点(即,转录起点)并且终止于紧接多聚腺苷酸片段起点之前的区域。R区也被定义为侧接U3区和U5区。R区在逆转录期间起到允许将新生DNA从基因组的一端转移到另一端的作用。

[0454] 如本文所用,术语“FLAP元件”是指其序列包括逆转录病毒(例如,HIV-1或HIV-2)的中央多聚嘌呤片段和中央终止序列(cPPT和CTS)的核酸。合适的FLAP元件描述于美国专利6,682,907号和Zennou等人,2000,Cell,101:173中。在HIV-1逆转录期间,正链DNA在中央多聚嘌呤片段(cPPT)处的中央起始以及中央终止序列(CTS)处的中央终止导致形成三链DNA结构:HIV-1中央DNA瓣。虽然不希望受到任何理论的束缚,但是DNA瓣可以充当慢病毒基因组输入细胞核的顺式活性决定簇并且/或者可以增加病毒的滴度。

[0455] 在一个实施方案中,逆转录病毒或慢病毒转移载体包含一个或多个输出元件。术语“输出元件”是指调节RNA转录物从细胞核到细胞质的转运的顺式作用转录后调节元件。RNA输出元件的示例包括但不限于人类免疫缺陷病毒(HIV) rev应答元件(RRE)(参见例如Cullen等人,1991.JVirol.65:1053;和Cullen等人,1991.Cell 58:423),以及乙型肝炎病毒转录后调节元件(HPRE)。一般来讲,RNA输出元件被放置在基因的3'UTR内,并且可以作为一个或多个拷贝插入。

[0456] 在其他实施方案中,通过结合转录后调节元件、高效的多聚腺苷酸化位点以及任选地结合进入载体的转录终止信号来增加异源性序列在病毒载体中的表达。多种转录后调节元件可以增加异源性核酸在蛋白质处的表达,例如,土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件(WPRE;Zufferey等人,1999,JVirol.,73:2886);乙型肝炎病毒中存在的转录后调节元件(HPRE)(Huang等人,Mol.Cell.Biol.,5:3864);及其他(Liu等人,1995,Genes Dev.,9:1766)。

[0457] 在一些实施方案中,载体可以包含具有转录或翻译调节活性的调节性寡核苷酸。这种寡核苷酸可以用于多种基因表达构型中,用于调节对表达的控制。转录调节性寡核苷酸可以增加(增强)或降低(沉默)重组表达构建体的表达水平。调节性寡核苷酸可以以环境特定的方式选择性地调节表达,包括例如用于赋予多核苷酸组织特异性表达、发育阶段特异性表达或类似的表达,包括组成型或诱导型表达。本公开的调节性寡核苷酸还可以是表达载体或重组核酸分子的组分,包括可操作地连接至可表达的多核苷酸的调节性寡核苷酸。调节元件可以具有从几个核苷酸到几百个核苷酸的各种长度。

[0458] 引导异源性核酸转录物的高效终止和多聚腺苷酸化的元件增加了异源性基因表

达。转录终止信号通常在多聚腺苷酸化信号的下游发现。在一些实施方案中,载体包含位于编码待表达多肽的多核苷酸的3'端的多聚腺苷酸化序列。如本文所用,术语“多聚腺苷酸化位点”或“多聚腺苷酸化序列”代表通过RNA聚合酶II引导新生RNA转录物的终止和多聚腺苷酸化的DNA序列。多聚腺苷酸化序列可以通过将多聚腺苷酸尾添加到编码序列的3'端来促进mRNA稳定性,并且因此有助于增加翻译效率。重组转录物的高效多聚腺苷酸化是期望的,因为缺少多聚腺苷酸尾的转录物不稳定并且迅速降解。可以在本公开的载体中使用的多聚腺苷酸化信号的说明性示例包括理想的多聚腺苷酸化序列(例如AATAAA、ATATAA、AGTAAA)、牛生长激素多聚腺苷酸化序列(BGHpA)、兔 β -珠蛋白多聚腺苷酸化序列(r β gpA),或者本领域已知的另一种合适的异源性或内源性多聚腺苷酸化序列。

[0459] 本文还描述了“密码子优化的”核酸。“密码子优化的”核酸是指已经被改变以使得密码子对于在特定系统(诸如特定的物种或物种组)中的表达最佳的核酸序列。例如,可以通过以下方式优化核酸序列以在哺乳动物细胞或特定哺乳动物物种(诸如人细胞)中表达:用在该物种的基因中更频繁或最频繁使用的密码子替换天然序列的至少一个、多于一个或大量的密码子。密码子优化没有改变编码蛋白质的氨基酸序列。

[0460] 本公开中提出的密码子优化的核苷酸序列可以呈现与表达功效相关的改善的特性。在一些实施方案中,可以优化待转录的DNA序列以促进更高效的转录和/或翻译。在一些实施方案中,该DNA序列可以在顺式调节元件(例如,TATA盒、终止信号和蛋白质结合位点)、人工重组位点、chi位点、CpG二核苷酸含量、阴性CpG岛、GC含量、聚合酶滑移位点和/或与转录相关的其他元件方面进行优化;该DNA序列可以在隐蔽剪接位点、mRNA二级结构、mRNA的稳定自由能、重复序列、RNA不稳定基序和/或与mRNA加工和稳定性相关的其他元件方面进行优化;该DNA序列可以在密码子使用偏好性、密码子适应性、内部chi位点、核糖体结合位点(例如,IRES)、未成熟多聚腺苷酸化位点、Shine-Dalgarno(SD)序列和/或与翻译相关的其他元件方面进行优化;并且/或者该DNA序列可以在密码子背景、密码子-反密码子相互作用、翻译暂停位点和/或与蛋白质折叠相关的其他元件方面进行优化。

[0461] 载体可以具有一个或多个LTR,其中任何LTR包含一个或多个修饰,诸如一个或多个核苷酸取代、添加或缺失。载体可以还包含:一个或多个伴随元件,以增加转导效率(例如,cPPT/FLAP);病毒包装(例如,Psi(Ψ)包装信号、RRE);以及/或者增加治疗基因表达的其他元件(例如,多聚腺苷酸化序列),并且可以任选地包含WPRE或HPRE。技术人员将理解,许多其他不同的实施方案可以由本公开的现有实施方案制成。

[0462] “宿主细胞”包括用本公开的重组载体或多核苷酸进行体内、离体或体外转染、感染或转导的细胞。宿主细胞可以包括包装细胞、生产者细胞,以及用病毒载体感染的细胞。在一些实施方案中,将用本公开的病毒载体感染的宿主细胞施用于需要治疗的受试者。在某些实施方案中,术语“靶标细胞”可与宿主细胞互换使用,并且是指所需细胞类型的经转染、感染或转导的细胞。在一些实施方案中,靶标细胞是T细胞。

[0463] 大规模病毒颗粒生产通常是获得合理的病毒滴度所必需的。病毒颗粒通过将转移载体转染到包含病毒结构和/或伴随基因(例如,gag、pol、env、tat、rev、vif、vpr、vpu、vpX或nef基因或其他逆转录病毒基因)的包装细胞系中而产生。

[0464] 如本文所用,术语“包装载体”是指缺少包装信号并且包含编码一种、两种、三种、四种或更多种病毒结构和/或伴随基因的多核苷酸的表达载体或病毒载体。通常,包装载体

包含在包装细胞中,并且经由转染、转导或感染而引入细胞中。用于转染、转导或感染的方法是本领域技术人员众所周知的。可以经由转染、转导或感染将本公开的逆转录病毒/慢病毒转移载体引入包装细胞系中,以产生生产者细胞或细胞系。本公开的包装载体可以通过常见方法(包括例如磷酸钙转染、脂质转染或电穿孔)引入人类细胞或细胞系中。在一些实施方案中,将包装载体连同主要选择性标记物(诸如新霉素、潮霉素、嘌呤霉素、杀稻瘟菌素、博来霉素、胸苷激酶、DHFR、Gln合成酶或ADA)引入细胞中,然后在存在适当药物的情况下进行选择,并且分离克隆。选择性标记物基因可以物理地连接到通过包装载体(例如,通过IRES或自切割病毒肽)编码的基因。

[0465] 病毒包膜蛋白(env)确定可以最终被由细胞系产生的重组逆转录病毒感染和转化的宿主细胞的范围。就慢病毒(诸如HIV-1、HIV-2、SIV、FIV和EIV)而言,env蛋白质包括gp41和gp120。在一些实施方案中,通过本公开的包装细胞表达的病毒env蛋白在来自病毒gag和pol基因的单载体上编码,如先前已经描述的。

[0466] 可以在本文所述的实施方案中采用的逆转录病毒衍生的env基因的说明性示例包括但不限于:MLV包膜、IOAI包膜、BAEV、FeLV-B、RDI 14、SSAV、Ebola、Sendai、FPV(禽类瘟疫病毒)和流感病毒包膜。类似地,可以利用对来自RNA病毒(例如,以下RNA病毒科:微小核糖核酸病毒科、杯状病毒科、星状病毒科、披膜病毒科、黄病毒科、冠状病毒科、副粘病毒科、弹状病毒科、丝状病毒科、正粘病毒科、布尼亚病毒科、沙粒病毒科、呼肠孤病毒科、双RNA病毒科、逆转录病毒科)以及来自DNA病毒(以下病毒科:肝病毒科、圆环病毒科、细小病毒科、乳多空病毒科、腺病毒科、疱疹病毒科、痘病毒科和虹彩病毒科)的包膜进行编码的基因。代表性示例包括FeLV、VEE、HFVW、WDSV、SFV、Rabies、ALV、BIV、BL V、EBV、CAEV、SNV、ChTL V、STLV、MPMV、SMRV、RAV、FuSV、MH2、AEV、AMV、CTIO和EIAV。

[0467] 在其他实施方案中,用于假型化本公开的病毒的包膜蛋白包括但不限于以下病毒中的任一者:甲型流感(诸如H1N1、H1N2、H3N2和H5N1(禽流感))、乙型流感和丙型流感病毒,甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、戊型肝炎病毒、轮状病毒、诺瓦克病毒组中的任一种病毒、肠道腺病毒、细小病毒、登革热病毒、猴痘病毒、单股负链病毒目(Mononegavirales)、狂犬病病毒属(Lyssavirus)(诸如狂犬病病毒)、拉各斯蝙蝠病毒、莫科拉病毒、杜文黑基病毒、欧洲蝙蝠病毒1和2以及澳大利亚蝙蝠病毒、短时热病毒属(Ephemerovirus)、水泡病毒属(Vesiculovirus)、水泡性口炎病毒(VSV)、疱疹病毒(诸如单纯性疱疹病毒1型和2型)、带状疱疹病毒、巨细胞病毒、爱泼斯坦-巴尔二氏病毒(EBV)、人类疱疹病毒(HHV)、人类疱疹病毒6型和8型、人类免疫缺陷病毒(HIV)、乳头瘤病毒、鼠 γ 疱疹病毒、沙粒病毒属(Arenaviruses)(诸如阿根廷出血热病毒、玻利维亚出血热病毒、Sabia相关出血热病毒、委内瑞拉出血热病毒、拉沙热病毒、马丘波病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV))、布尼亚病毒科(诸如克里米亚-刚果出血热病毒)、汉坦病毒、肾综合征出血热致病病毒、裂谷热病毒、丝状病毒科(丝状病毒)(包括埃博拉出血热和马尔堡出血热)、黄病毒科(包括凯沙奴森林病(Kaysanur Forest disease))病毒、鄂木斯克出血热病毒、蜱传脑炎致病病毒和副粘病毒科(诸如亨德拉病毒和尼帕病毒)、大天花和小天花(天花病毒)、甲病毒属(诸如委内瑞拉马脑炎病毒、东部马脑炎病毒、西部马脑炎病毒、SARS相关冠状病毒(SARS-Co V)、西尼罗河病毒,或者任何脑炎致病病毒。

[0468] 如本文所用,术语“假型”或“假型化”是指其病毒包膜蛋白已经用具有其他特征的

另一种病毒的病毒包膜蛋白替代的病毒。例如,HIV可以用水泡性口炎病毒G-蛋白(VSV-G)包膜蛋白来假型化,这允许HIV感染较宽范围的细胞,因为HIV包膜蛋白(由env基因编码)通常将该病毒靶向CD4+递呈细胞。

[0469] 如本文所用,术语“包装细胞系”用于提及不含包装信号但却稳定或瞬时地表达对于病毒颗粒的正确包装必不可少的病毒结构蛋白质和复制酶(例如,gag、pol和env)的细胞系。可以采用任何合适的细胞系来制备本公开的包装细胞。一般来讲,细胞是哺乳动物细胞。在另一个实施方案中,用于产生包装细胞系的细胞是人细胞。可以用于产生包装细胞系的合适的细胞系包括例如CHO细胞、BHK细胞、MDCK细胞、C3H 10T1/2细胞、FLY细胞、Psi-2细胞、BOSC 23细胞、P A317细胞、WEHI细胞、COS细胞、BSC 1细胞、BSC 40细胞、BMT 10细胞、VERO细胞、W138细胞、MRC5细胞、A549细胞、HTI080细胞、293细胞、293T细胞、B-50细胞、3T3细胞、NIH3T3细胞、HepG2细胞、Saos-2细胞、Huh7细胞、HeLa细胞、W163细胞、211细胞和211A细胞。

[0470] 如本文所用,术语“生产者细胞系”是指能够产生重组逆转录病毒颗粒的细胞系,包括包装细胞系和包含包装信号的转移载体构建体。感染性病毒颗粒和病毒储备溶液的产生可以使用常规技术进行。制备病毒储备溶液的方法是本领域已知的,并且由例如Y.Soneoka等人,(1995) Nucl. Acids Res. 23:628-633和N.R.Landau等人(1992) J Virol. 66:5110-5113。可以使用常规技术从包装细胞中收集感染性病毒颗粒。例如,如本领域已知的,感染性颗粒可以通过细胞裂解或者收集细胞培养物的上清液来收集。任选地,如果需要,可以将收集的病毒颗粒纯化。合适的纯化技术是本领域技术人员众所周知的。

[0471] 使用逆转录病毒或慢病毒载体借助于病毒感染而不是通过转染递送基因或其他多核苷酸序列被称为“转导”。在一个实施方案中,逆转录病毒载体通过感染和原病毒整合来转导到细胞中。在某些实施方案中,如果靶标细胞(例如,T细胞)包含通过使用病毒或逆转录病毒载体感染而递送到细胞的基因或其他多核苷酸序列,则是“转导的”。在一些实施方案中,转导的细胞在其细胞基因组中包含通过逆转录病毒或慢病毒载体递送的一个或多个基因或者其他多核苷酸序列。

[0472] 在一些实施方案中,宿主细胞表达本公开的构建体中的一种或多种构建体(例如,抗CD19 CAR)。可以将所述宿主细胞施用于受试者,以治疗和/或预防T细胞恶性肿瘤。可以根据本公开的某些实施方案利用的与将病毒载体用于基因疗法中有关的其他方法可以在以下文献中找到:例如,Kay,M.A.(1997) Chest 111(第6期增刊):138S-142S;Ferry,N.和Heard,J.M.(1998) Hum. Gene Ther. 9:1975-81;Shiratory,Y.等人,(1999) Liver 19:265-74;Oka,K.等人,(2000) Curr. Opin. Lipidol. 11:179-86;Thule,P.M.和Liu,J.M.(2000) Gene Ther. 7:1744-52;Yang,N.S.(1992) Crit. Rev. Biotechnol. 12:335-56;Alt,M.(1995) J Hepatol. 23:746-58;Brody,S.L.和Crystal,R.G.(1994) Ann. NY Acad. Sci. 716:90-101;Strayer,D.S.(1999) Expert Opin. Investig. Drugs 8:2159-2172;Smith-Arica,J.R.和Bartlett,J.S.(2001) Curr. Cardiol. Rep. 3:43-49;以及Lee,H.C.等人(2000) Nature 408:483-8。

[0473] 除了引入CAR之外,本公开的工程化T细胞可被进一步工程化以减少和/或消除TCR α 和B2M的表达,例如使用靶向TRAC和B2M基因的一种或多种ZFN或CRISPR/sgrNA。应当理解,ZFN靶向的细胞后代本身可能不包含本文所述的分子、多核苷酸和/或载体,但是在这些细

胞中,TCR和/或B2M基因被失活。

[0474] 本文所述的组合物可包含如本文所考虑的T细胞组合物。本文描述的一个实施方案是包含表达抗CD19 CAR的修饰的T细胞的组合物,其中表达(诸如TCR和B2M的可检测表面表达)已被减少和/或消除。组合物包括但不限于药物组合物。“药物组合物”是指以药学上可接受或生理上可接受的溶液配制,用于单独地或与一种或多种其他治疗方式组合施用于细胞或动物的组合物。还应当理解,如果需要,本公开的组合物还可以与其他作用剂组合施用,所述其他作用剂诸如细胞因子、生长因子、激素、小分子、化学治疗剂、前药、药物、抗体或其他各种药物活性剂。对于组合物中还可以包含的其他组分几乎没有限制,只要附加的作用剂不会不利地影响组合物递送预期疗法的能力即可。

[0475] 短语“药学上可接受的”在本文中用于指在合理的医学判断范围内,适用于与人类和动物的组织接触而没有过度的毒性、刺激、变应性应答或者其他问题或并发症,与合理的利益/风险比相称的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0476] 如本文所用,“药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂”包括但不限于任何助剂、载剂、赋形剂、助流剂、甜味剂、稀释剂、防腐剂、染料/着色剂、风味增强剂、表面活性剂、润湿剂、分散剂、悬浮剂、稳定剂、等渗剂、溶剂、表面活性剂或乳化剂,它们已由美国食品药品监督管理局批准为可被接受用于人或家养动物。示例性药学上可接受的载剂包括但不限于糖,诸如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,诸如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,诸如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;黄蓍胶;麦芽;明胶;滑石;可可脂、蜡、动物和植物脂肪、石蜡、硅酮、膨润土、硅酸、氧化锌;油,诸如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;二醇,诸如丙二醇;多元醇,诸如甘油、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇;酯,诸如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,诸如氢氧化镁和氢氧化铝;藻酸;无热原水;等渗盐水;林格氏溶液;乙醇;磷酸盐缓冲溶液;以及用于药物制剂中的任何其他相容物质。

[0477] 在本文所述的一个实施方案中,本公开的组合物包含一定量的本文所设想的经修饰的T细胞。通常可以指出,包含本文所设想的T细胞的药物组合物可以按以下剂量施用: 10^2 个至 10^{10} 个细胞/kg体重、 10^5 个至 10^9 个细胞/kg体重、 10^5 个至 10^8 个细胞/kg体重、 10^5 个至 10^7 个细胞/kg体重、 10^7 个至 10^9 个细胞/kg体重,或 10^7 个至 10^8 个细胞/kg体重,包括这些范围内的所有整数值。细胞的数目将取决于组合物旨在用于的最终用途,其中包含的细胞的类型也将取决于该最终用途。经修饰以表达工程化的TCR或CAR的T细胞可以按这些范围内的剂量多次施用。所述细胞可以是正在接受疗法的患者的同种异体细胞、同源细胞、异种细胞或自体细胞。如果需要,治疗还可以包括施用如本文所述的有丝分裂原(例如,PHA)或淋巴因子、细胞因子和/或趋化因子(例如,IFN- γ 、IL-2、IL-7、IL-15、IL-12、TNF- α 、IL-18和TNF- β 、GM-CSF、IL-4、IL-13、Flt3-L、RANTES、MIP1 α 等),以增强输注的T细胞的移植和功能。

[0478] 一般来讲,如本文所述的包含经活化和扩增的细胞的组合物可以用于治疗和预防在免疫受损或免疫抑制的个体中出现的疾病。在一些情况下,本文所设想的包含经修饰的T细胞的组合物用于治疗癌症。本文所述的经修饰的T细胞可以单独施用,或者与载剂、稀释剂、赋形剂和/或其他组分(诸如IL-2、IL-7和/或IL-15,或者其他细胞因子或细胞群)组合作为药物组合物施用。在一些实施方案中,本文所设想的药物组合物包含一定量的经基因修饰的T细胞,其与一种或多种药学上或生理上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂组合。

[0479] 本文所设想的包含经修饰的T细胞的药物组合物可以还包含缓冲剂,诸如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等;碳水化合物,诸如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露糖醇;蛋白质;多肽或氨基酸,诸如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂,诸如EDTA或谷胱甘肽;助剂(例如,氢氧化铝);和防腐剂。本公开的组合物可以被配制用于肠胃外施用,例如,血管内(静脉内或动脉内)、腹膜内或肌内施用。

[0480] 液体药物组合物(无论是溶液剂、混悬剂,还是其他类似的形式)可以包含以下各项中的一者或多者:无菌稀释剂(诸如注射用水)、盐水溶液(诸如生理盐水)、林格氏溶液、等渗氯化钠、固定油(诸如合成的甘油单酯或甘油二酯,其可以用作溶剂或悬浮介质)、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他溶剂;抗菌剂,诸如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,诸如乙二胺四乙酸;缓冲剂,诸如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐,以及用于调节张性的作用剂,诸如氯化钠或右旋糖。该肠胃外制备物可以封闭在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。还包括无菌可注射药物组合物。

[0481] 在一些实施方案中,本文所设想的组合物包括单独的或者与一种或多种治疗剂组合的有效量的扩增的经修饰的T细胞组合物。因此,所述T细胞组合物可以单独施用或与其他已知的癌症治疗(诸如放射疗法、化学疗法、移植、免疫疗法、激素疗法、光动力学疗法等)组合施用。所述组合物也可以与抗生素和抗病毒剂组合施用。此类治疗剂在本领域中可以被接受为用于如本文所述的疾病状态(诸如癌症)的治疗。在一个实施方案中,本文所设想的组合物还可以与TGF- β 的抑制剂(例如小分子抑制剂LY55299)一起施用。所设想的示例性治疗剂包括细胞因子、生长因子、类固醇、NSAID、DMARD、抗炎剂、化学治疗剂、放射疗法、治疗性抗体,或者其他活性剂和辅助剂。

[0482] 在某些实施方案中,本文设想的包含T细胞的组合物可以与任何数量的化学治疗剂联合施用。化学治疗剂的说明性示例包括但不限于:烷基化剂,诸如噻替哌和环磷酰胺(CYTOXANTM);烷基磺酸盐,诸如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡;氮丙啶,诸如苯佐替哌、卡波醌、美妥替哌和乌瑞替哌;乙烯亚胺和甲基蜜胺,包括六甲蜜胺、三亚乙基蜜胺、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酰胺和三羟甲基蜜胺(trimethylolomelamine resume);氮芥,诸如苯丁酸氮芥、萘氮芥、胆磷酰胺、雌莫司汀、异环磷酰胺、二氯甲基二乙胺、盐酸甲氧氮芥、美法仑、新氮芥、苯芥胆甾醇、泼尼莫司汀、曲磷胺、尿嘧啶氮芥;亚硝基脲,诸如卡莫司汀、氯脲霉素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀、雷莫司汀;抗生素,诸如阿克拉霉素、放线菌素、葱霉素、重氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素C、卡奇霉素、卡柔比星、洋红霉素、嗜癌霉素、色霉素、放线菌素D、柔红霉素、地托比星、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素、霉酚酸、诺拉霉素、橄榄霉素、培洛霉素、泊非霉素、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑霉素、链脲霉素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星;抗代谢物,诸如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,诸如二甲叶酸、甲氨蝶呤、蝶罗呤、三甲曲沙;嘌呤类似物,诸如氟达拉滨、6-巯嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,诸如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷、5-FU;雄性激素,诸如卡普睾酮、丙酸屈他雄酮、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯;抗肾上腺素,诸如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦;叶酸补充剂,诸如亚叶酸;醋葡醛内酯;醛磷酰胺糖苷;氨基乙酰丙酸;安吡啶;布沙莫司汀;比生群;依达曲沙;地磷酰胺;秋水仙胺;地吡醌;依洛尼塞(elformithine);依利醋铵;依托格鲁;硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;

氯尼达明;米托胍脲;米托蒽醌;莫派达醇;二胺硝吡啶;喷司他丁;蛋氨酸芥;吡柔比星;鬼臼酸;2-乙基酰肼;丙卡巴肼;PSK[®];雷佐生;西佐喃;锗螺胺;细交链孢菌酮酸;三亚胺醌;2,2',2''-三氯三乙胺;乌拉坦;长春地辛;达卡巴嗪;甘露莫司汀;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌泊溴烷;加西托星(gacytosine);阿拉伯糖苷("Ara-C");环磷酰胺;噻替哌;紫杉烷类,例如紫杉醇(TAXOL[®], Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)和多西他赛(TAXOTERE[®], Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France);苯丁酸氮芥;吉西他滨;6-硫鸟嘌呤;巯嘌呤;甲氨蝶呤;铂类似物,诸如顺铂和卡铂;长春碱;铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;丝裂霉素C;米托蒽醌;长春新碱;长春瑞滨;诺维本;诺消灵;替尼泊苷;道诺霉素;氨蝶呤;希罗达;伊班膦酸盐;CPT-11;拓扑异构酶抑制剂RPS2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);视黄酸衍生物,诸如Targretin[™](蓓萨罗丁)、Panretin[™](阿利维A酸);ONTAK[™](地尼白介素);埃斯帕米霉素(esperamicin);卡培他滨;以及上述任何物质的药学上可接受的盐、酸或衍生物。该定义中还包括抗激素剂,其用于调节或抑制激素对肿瘤的作用,诸如抗雌激素,包括例如他莫昔芬、雷洛昔芬、抑制芳香化酶的4(5)-咪唑、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、雷洛昔芬盐酸盐、LY117018、奥那司通和托瑞米芬(法乐通);和抗雄激素,诸如氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮丙瑞林和戈舍瑞林;以及上述任何物质的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0483] 多种其他的治疗剂可以与本文所述的组合物联合使用。在一个实施方案中,包含T细胞的组合物与抗炎剂一起施用。抗炎剂或抗炎药包括但不限于类固醇和糖皮质激素(包括倍他米松、布地奈德、地塞米松、醋酸氢化可的松、氢化可的松、氢化可的松、甲泼尼龙、泼尼松龙、泼尼松、曲安西龙);非甾体抗炎药(NSAIDs),包括阿司匹林、布洛芬、萘普生、甲氨蝶呤、柳氮磺吡啶、来氟米特、抗TNF药物、环磷酰胺和霉酚酸酯。

[0484] 在一些实施方案中,NSAID选自由以下项组成的组:布洛芬、萘普生、萘普生钠、Cox-2抑制剂诸如VIOXX[®](罗非考昔)和CELEBREX[®](塞来考昔),以及水杨酸盐。示例性止痛剂选自由以下项组成的组:对乙酰氨基酚、羟考酮、曲马朵或盐酸丙氧芬。示例性糖皮质激素选自由以下项组成的组:可的松、地塞米松、氢化可的松、甲泼尼龙、泼尼松龙或泼尼松。示例性生物应答调节剂包括针对细胞表面标记物(例如,CD4、CD5等)的分子、细胞因子抑制剂诸如TNF拮抗剂(例如,依那西普(ENBREL[®]))、阿达木单抗(HUMIRA[®])和英夫利昔单抗(REMICADE[®])、趋化因子抑制剂和粘附分子抑制剂。生物反应调节剂包括单克隆抗体以及分子的重组形式。示例性的改善病情抗风湿药物(DMARD)包括巯唑嘌呤、环磷酰胺、环孢菌素、甲氨蝶呤、青霉胺、来氟米特、柳氮磺吡啶、羟氯喹、金制剂(口服(金诺芬)和肌内)和米诺环素。

[0485] 在其他实施方案中,适用于与本文所设想的经CAR修饰的T细胞组合的治疗性抗体包括但不限于:阿巴伏单抗(abagovomab)、阿德木单抗(adecatumumab)、阿夫土珠单抗(afutuzumab)、阿仑单抗(alemtuzumab)、阿妥莫单抗(altumomab)、阿麦妥单抗(amatuximab)、安那莫单抗(anatumomab)、阿西莫单抗(arcitumomab)、巴威单抗(bavituximab)、贝妥莫单抗(bectumomab)、贝伐珠单抗(bevacizumab)、比瓦妥珠单抗(bivatuzumab)、博纳吐单抗(blinatumomab)、本妥昔单抗(brentuximab)、坎妥珠单抗(cantuzumab)、卡妥索单抗(catumaxomab)、西妥昔单抗(cetuximab)、西他土珠单抗(citatumumab)、西妥木单抗(cixutumumab)、克利妥珠单抗(clivatuzumab)、可那木单抗

(conatumumab)、达雷妥尤单抗(daratumumab)、曲齐妥单抗(drozitumab)、度利戈妥单抗(duligotumab)、杜西格单抗(dusigitumab)、地莫单抗(detumomab)、达西珠单抗(dacetuzumab)、达洛珠单抗(dalotuzumab)、埃克莫昔单抗(ecromeximab)、埃罗妥珠单抗(elotuzumab)、恩司昔单抗(ensituximab)、厄妥索单抗(ertumaxomab)、埃达珠单抗(etaracizumab)、法妥珠单抗(farietuzumab)、非拉妥珠单抗(ficlatuzumab)、芬妥木单抗(figitumumab)、弗兰妥他单抗(flanvotumab)、氟妥昔单抗(futuximab)、加尼单抗(ganitumab)、吉妥单抗(gemtuzumab)、吉妥昔单抗(girentuximab)、格伦巴单抗(glembatumumab)、替伊莫单抗(ibritumomab)、伊戈单抗(igovomab)、伊马曲单抗(imgatuzumab)、英达妥昔单抗(indatuximab)、奥英妥珠单抗(inotuzumab)、英妥木单抗(intetumumab)、伊匹单抗(ipilimumab)、伊妥木单抗(iratumumab)、拉贝珠单抗(labetuzumab)、来沙木单抗(lexatumumab)、林妥珠单抗(lintuzumab)、洛尔妥珠单抗(lorvotuzumab)、卢卡木单抗(lucatumumab)、马帕木单抗(mapatumumab)、马妥珠单抗(matuzumab)、米拉妥珠单抗(milatuzumab)、明瑞莫单抗(minretumomab)、米妥莫单抗(mitumomab)、莫西妥单抗(moxetumomab)、纳那妥单抗(namatumab)、那普妥莫单抗(naptumomab)、耐昔妥珠单抗(necitumumab)、尼妥珠单抗(nimotuzumab)、诺非妥莫单抗(nofetumomab)、奥卡妥珠单抗(ocaratuzumab)、奥法木单抗(ofatumumab)、奥拉单抗(olaratumab)、奥纳妥珠单抗(onartuzumab)、莫妥组单抗(oportuzumab)、奥戈伏单抗(oregovomab)、帕尼单抗(panitumumab)、帕萨妥珠单抗(parsatuzumab)、帕曲妥单抗(patritumab)、培妥莫单抗(pemtumomab)、帕妥珠单抗(pertuzumab)、平妥莫单抗(pintumomab)、普林木单抗(pritumumab)、雷克图玛单抗(racotumomab)、雷曲妥单抗(radretumab)、利妥木单抗(rilotumumab)、利妥昔单抗(rituximab)、罗妥木单抗(robatumumab)、沙妥莫单抗(satumomab)、西罗珠单抗(sibrotuzumab)、司妥昔单抗(siltuximab)、辛妥珠单抗(simtuzumab)、索洛他单抗(solitomab)、替组单抗(tacatumumab)、塔普妥单抗(taplutumomab)、特那妥单抗(tenatumomab)、替妥木单抗(teprotumumab)、替加妥珠单抗(tigatumumab)、托西莫单抗(tositumomab)、曲妥珠单抗(trastuzumab)、土考妥珠单抗(tucotuzumab)、乌布妥昔单抗(ublituximab)、维妥珠单抗(veltuzumab)、沃瑟妥珠单抗(vorsetuzumab)、伏妥莫单抗(votumumab)、扎芦木单抗(zalutumumab)、CC49和3F8。

[0486] 在一些实施方案中,本文所述的组合物与细胞因子联合施用。如本文所用,所谓“细胞因子”,意指由一个细胞群释放的作为细胞间介质作用于另一种细胞的蛋白质的通用术语。此类细胞因子的示例是淋巴因子、单核因子、趋化因子和传统的多肽激素。细胞因子包括生长激素,诸如人生长激素、N-甲硫氨酰人生长激素和牛生长激素;甲状旁腺激素;甲状旁腺素;胰岛素;胰岛素原;松弛素;松弛素原;糖蛋白激素,诸如促滤泡激素(FSH)、促甲状腺激素(TSH)和促黄体激素(LH);肝细胞生长因子;成纤维细胞生长因子;催乳素;胎盘催乳素;肿瘤坏死因子- α 和肿瘤坏死因子- β ;苗勒氏管抑制物质;小鼠促性腺激素相关肽;抑制素;激活素;血管内皮生长因子;整合素;血小板生成素(TPO);神经生长因子,诸如NGF- β ;血小板生长因子;转化生长因子(TGF),诸如TGF- α 和TGF- β ;胰岛素样生长因子-I和胰岛素样生长因子-II;红细胞生成素(EPO);骨诱导因子;干扰素,诸如干扰素- α 、干扰素- β 和干扰素- γ ;集落刺激因子(CSF),诸如巨噬细胞-CSF(M-CSF);粒细胞-巨噬细胞-CSF(GM-CSF);

和粒细胞-CSF (G-CSF) ;白介素 (IL) , 诸如IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-15;肿瘤坏死因子, 诸如TNF- α 或TNF- β ;和其他多肽因子, 包括LIF和kit配体 (KL) 。如本文所用, 术语细胞因子包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质, 以及天然序列细胞因子的生物学活性等同物。

[0487] 任何细胞均可以用作本公开的多核苷酸、载体或多肽的宿主细胞。在一些实施方案中, 该细胞可以是原核细胞、真菌细胞、酵母细胞或高等真核细胞 (诸如哺乳动物细胞) 。合适的原核细胞包括但不限于: 真细菌, 诸如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体, 例如肠杆菌科 (Enterobactehaceae) , 诸如埃希氏菌属 (Escherichia) , 例如大肠杆菌 (E.coli) ;肠杆菌属 (Enterobacter) ;欧文氏菌属 (Erwinia) ;克雷伯氏菌属 (Klebsiella) ;变形杆菌属 (Proteus) ;沙门氏菌属 (Salmonella) , 例如鼠伤寒沙门氏菌 (Salmonella typhimurium) ;沙雷氏菌属 (Serratia) , 例如粘质沙雷氏菌 (Serratia marcescans) , 以及志贺氏菌属 (Shigella) ;杆菌 (Bacilli) 诸如枯草芽孢杆菌 (B.subtilis) 和地衣芽孢杆菌 (B.licheniformis) ;假单胞菌属 (Pseudomonas) , 诸如铜绿假单胞菌 (P.aeruginosa) ;以及链霉菌属 (Streptomyces) 。在一些实施方案中, 该细胞是人细胞。在一些实施方案中, 该细胞是免疫细胞。

[0488] 在一些实施方案中, 该免疫细胞选自以下项组成的组: T细胞、B细胞、肿瘤浸润性淋巴细胞 (TIL) 、TCR表达细胞、自然杀伤 (NK) 细胞、树突状细胞、粒细胞、先天淋巴样细胞、巨核细胞、单核细胞、巨噬细胞、血小板、胸腺细胞和骨髓细胞。在一个实施方案中, 免疫细胞是工程化同种异体T细胞。与抗体疗法或独立的CAR修饰T细胞不同, 经过修饰以表达抗CD19 CAR的T细胞 (或上述任何细胞) 能够在体内复制, 并且因此有助于长期持久性, 这可导致持续的癌症疗法。

[0489] 在另一个实施方案中, 表达抗CD19 CAR的T细胞可以经历T细胞扩增, 使得治疗性T细胞群可以保持或持续延长的时段。因此, 本文所述的另一个实施方案是一种扩增T细胞群的方法, 包括向对其有需要的受试者施用治疗有效量的本文所述的T细胞。

[0490] 在本文所述的一个实施方案中, T细胞群在7天之后保持介于约50%至约100%之间、在7天之后保持介于约60%至约90%之间, 或者在7天之后保持介于约70%至约80%之间。在本文所述的另一个实施方案中, T细胞群在7天之后保持在约50%、在7天之后保持在约60%、在7天之后保持在约70%、在7天之后保持在约80%、在7天之后保持在约90% , 或者在7天之后保持在约100%。

[0491] 本文所述的另一个实施方案是一种治疗有需要的受试者的癌症的方法, 包括施用有效量 (例如, 治疗有效量) 的组合物, 该组合物包含如本文所述的表达CAR的T细胞。施用的数量和频率将由诸如患者的病症以及患者疾病的类型和严重程度等因素确定, 尽管可以通过临床试验确定适当的剂量。

[0492] 本文所述的另一个实施方案是一种治疗有需要的受试者的肝癌的方法, 包括施用有效量 (例如, 治疗有效量) 的组合物, 该组合物包含如本文所述的表达CAR构建体的T细胞。施用的数量和频率将由诸如患者的病症以及患者疾病的类型和严重程度等因素确定, 尽管可以通过临床试验确定适当的剂量。

[0493] 在一些实施方案中, 包含用载体基因修饰的T细胞的组合物用于治疗各种癌症, 该载体包含可操作地连接到编码表达CAR的多核苷酸的启动子。

[0494] 在其他实施方案中,提供了一些方法,包括将治疗有效量的本文所设想的经修饰的T细胞或者包含所述T细胞的组合物单独地或与一种或多种治疗剂组合施用于对其有需要的患者。在某些实施方案中,本公开的细胞用于治疗有患上癌症的风险的患者。因此,本公开提供了用于治疗或预防癌症的方法,包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本公开的经修饰的T细胞。

[0495] 本领域的普通技术人员将认识到,可能需要多次施用本公开的组合物来实现所需疗法。例如,可以在1周、2周、3周、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、1年、2年、5年、10年或更长时间的跨度上施用组合物1次、2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次或10次或者更多次。

[0496] 在某些实施方案中,可能期望将活化的T细胞施用于受试者,然后重新抽血(或进行血液单采术),根据本公开从中活化T细胞,并且将这些活化和扩增的T细胞重新输注给患者。该过程可以每几周进行多次。在某些实施方案中,T细胞可以从10cc至400cc的抽血中活化。不受理论的束缚,使用这种多次抽血/多次重新输注方案可以用于选出某些T细胞群。

[0497] 施用本文所设想的组合物可以按任何方便的方式进行,包括通过气溶胶吸入、注射、摄食、输液、植入或移植。在一些实施方案中,以肠胃外方式施用组合物。如本文所用,短语“肠胃外施用”和“以肠胃外方式施用”是指除了肠内和局部施用以外的施用模式(通常通过注射),并且包括但不限于血管内、静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、肿瘤内、心脏内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内和胸骨内注射和输注。在一个实施方案中,本文所设想的组合物通过直接注射到肿瘤、淋巴结或感染部位中来施用于受试者。

[0498] 在一个实施方案中,向有需要的受试者施用有效量的组合物,以增加对该受试者的癌症的细胞免疫应答。免疫应答可以包括由能够杀死受感染细胞、调节性T细胞的细胞毒性T细胞介导的细胞免疫应答,以及辅助性T细胞应答。也可以诱导体液免疫应答,其主要由能够活化B细胞从而导致抗体产生的辅助性T细胞介导。多种技术可以用于分析由本公开的组合物诱导的免疫应答的类型,这些技术在本领域中被充分描述;例如,Current Protocols in Immunology,编辑:John E.Coligan、Ada M.Kruisbeek、David H.Margulies、Ethan M.Shevach、Warren Strober,(2001) John Wiley&Sons,NY,N.Y.。

[0499] 就T细胞介导的杀伤而言,CAR-配体结合启动向T细胞的CAR信号传导,导致多种T细胞信号传导通路被活化,所述T细胞信号传导通路诱导T细胞产生或释放能够通过各种机制诱导靶标细胞凋亡的蛋白质。这些T细胞介导的机制包括(但不限于)细胞内细胞毒性颗粒从T细胞转移到靶标细胞中、T细胞分泌可以直接地(或经由募集其他杀伤效应细胞间接地)诱导靶标细胞杀伤的促炎性细胞因子,以及T细胞表面上的死亡受体配体(例如,FasL)的上调,所述死亡受体配体在与靶标细胞上的其同源死亡受体(例如,Fas)结合后诱导靶标细胞凋亡。

[0500] 在实施方案中,本文所述的是一种治疗被诊断患有癌症的受试者的方法,包括从供体中取出T细胞、用包含编码工程化表达本文所述的CAR构建体的核酸的载体对所述T细胞进行基因修饰,从而产生经修饰的T细胞群,并且将经修饰的T细胞群施用于与供体不同的患者。

[0501] 用于施用本文所述的细胞组合物的方法包括以下任何方法:其能够有效地导致在

受试者中重新引入直接表达工程化CAR的离体的经基因修饰的免疫效应细胞,或者重新引入在引入受试者中时分化为表达工程化表达本文所述的抗CD19 CAR构建体的成熟免疫效应细胞的免疫效应细胞的经基因修饰的祖细胞。

[0502] 尽管为了清楚理解的目的,已经通过说明和示例相当详细地描述了前述公开内容,但是根据本公开的教导内容,对于本领域的普通技术人员来说显而易见的是,在不背离所附权利要求的实质或范围的前提下,可以对其进行某些改变和修改。以下实施例仅以说明的方式提供,而非以限制的方式提供。本领域技术人员将容易地认识到可以改变或修改以产生基本上类似的结果的多种非关键参数。

[0503] 实施例

[0504] 实施例1

[0505] 对于信号传导结构域选择含有ITAM的结构域代替CD3 ζ 作为下一代抗CD19嵌合抗原受体(CAR)以增强治疗潜力。将具有抗CD19 scFv、CD28铰链、CD28跨膜、CD28共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域架构的抗CD19第二代嵌合抗原受体(CAR)用作亲本模板来工程化和合成七个子构建体。这些构建体此后被称为CD19- ζ -1xx、CD19- ϵ 、CD19- δ 、CD19- γ 、CD19-Dap12、CD19- ζ -C0(密码子优化的)和CD19- ϵ -C0(密码子优化的)。为了产生子构建体,亲本模板的核酸3316至3651处的CD3 ζ 信号传导结构域被以下序列取代:

[0506] ζ 1xx:

[0507] RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQUALPPR(SEQ ID NO 77)。

[0508] ϵ :

[0509] KNRKAKAKPVTRGAGAGGRQGRGQNKERPPVPNPDYEP IRKGQRDLYSGLNQRRRI(SEQ ID NO 52)

[0510] δ :

[0511] GHETGRLSGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK(SEQ ID NO 55)。

[0512] γ :

[0513] GQDGVRQSRASDKQTLLPNDQLYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRRN(SEQ ID NO 57)。

[0514] Dap12:

[0515] YFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGRSDVYSDLNTQRPYYK(SEQ ID NO 59)。

[0516] ζ -C0:

[0517] RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR(SEQ ID NO 78)。

[0518] 将本文所述的CAR构建体克隆到慢病毒载体(LVV)中,该慢病毒载体包括鼠干细胞病毒(mSCV)启动子以驱动CAR的组成型表达。

[0519] 以下实施例中使用的CAR包括CD8a信号序列,其具有如上所述的抗CD19 scFv、CD28铰链、CD28跨膜结构域、CD28共刺激结构域和信号传导结构域架构。

[0520] 实施例2

[0521] CAR-T产物细胞由来自健康人供体的血液单采术材料制造。洗涤收集的血液单采术材料,与抗CD8抗体连接的磁珠一起温育,并使用CliniMACS[®]细胞分离系统(Miltenyi Biotech)按照制造商的说明书使用抗CD8抗体连接的磁珠进行处理,以富集CD8+T细胞,然后将其冷冻保存。如上所述,使用抗CD4抗体连接的磁珠洗涤和处理得阴性级分,以富集CD4

+T细胞,然后将其冷冻保存。将分离的CD4+和CD8+原代人T细胞在补充有2.6% OpTmizer CTS™T细胞扩增补充剂、2.5% CTS免疫细胞血清替代物、1%青霉素/链霉素/L-谷氨酰胺和305国际单位/mL人白介素(IL)-2的OpTmizer CTS™T细胞扩增基础培养基(下文中称为完全OpTmizer™培养基)中解冻。将T细胞以 1.5×10^6 个细胞/mL的密度重悬于含有 $1.66 \mu\text{g/mL}$ 抗CD28抗体(克隆28.2)的完全OpTmizer™培养基中,然后接种到用 $1.23 \mu\text{g/mL}$ 抗CD3抗体(克隆OKT3)预包被的T-75烧瓶中以诱导T细胞活化(第0天)。在活化后第1天,以20的感染复数(MOI)用编码亲本抗CD19 CAR的LVV或子构建体 ϵ 、 δ 、 γ 和Dap12转导细胞。将由 ζ CO和 ϵ CO构建体组成的附加实验组以5的MOI转导,并且将未转导(NTD)样品用作阴性对照。在第3天用完全OpTmizer™培养基洗涤T细胞,将其归一化并再扩增4天(第3至7天)。在收获时间点(第7天),将细胞冷冻保存以供将来使用。在扩增期间的多个时间点(第3至7天),使用Vi-CELL进行细胞计数,并且通过添加完全OpTmizer™培养基将细胞密度归一化至 0.5 至 1×10^6 个细胞/mL。在这些时间点,在Vi-CELL上记录平均细胞活力、直径和细胞密度。

[0522] 从第0天至第7天跟踪不同实验组中的每个实验组的细胞计数、细胞活力和细胞直径,并总结在表6中。

实验组	细胞计数 (10^6)				活力 (%)				直径 (μM)			
	第 0 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天	第 0 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天	第 0 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天
NTD	7.9	8.3	65.6	370.5	96.7	88.6	90.3	93.7	8.6	12.0	12.1	10.8
ζ	7.9	9.9	78.9	336.9	96.7	87.6	91.9	92.5	8.6	11.4	12.1	11.0
ϵ	7.9	7.4	60.0	213.6	96.7	85.9	88.0	89.2	8.6	11.7	12.1	10.9
δ	7.9	7.6	63.0	301.3	96.7	87.3	90.1	92.1	8.6	11.8	12.1	11.1
γ	7.9	8.8	69.0	331.8	96.7	87.4	90.3	92.1	8.6	11.7	12.2	10.9
Dap12	7.9	7.51	58.3	325.5	96.7	85.6	89.4	92.8	8.6	12.0	12.1	11.0
ζ -CO	7.9	8.9	59.3	312.4	96.7	89.2	89.6	91.0	8.6	11.8	12.3	11.1
ϵ -CO	7.9	8.0	53.2	229.8	96.7	86.4	85.9	80.8	8.6	11.4	12.5	11.2
ζ 1xx	7.9	8.6	72.4	348.9	96.7	89.6	92.5	93.1	8.62	11.7	12.1	10.9

[0524] 在第0天刺激每个实验组总共 7.9×10^6 个细胞。在七天制造过程结束时, ϵ 、 ϵ CO和CD19-RVV构建体在略高于 200×10^6 个总细胞下扩增最少。产物细胞的直径被用作T细胞活化的间接量度,并且显示在制造期间任何组之间没有显著差异。

[0525] 实施例3

[0526] 在第6天和第7天通过流式细胞术测量CAR表达,以确定CAR-T产物细胞的转导效率。T细胞用一组针对CD3、CD4、CD8和Whitlow接头(CAR)的荧光团缀合抗体染色,并且通过流式细胞术表征以确定转导效率和CD4+/CD8+T细胞比率。CAR表达(抗CD19 CAR)的评估通过针对存在于抗CD19 scFv中的Whitlow接头的荧光团缀合抗体来实现。还使用可固定细胞活力染料来进行活细胞的特异性分析。通过在 4°C 下与适当的抗体混合物一起温育20分钟,随后用染色缓冲液洗涤2次,对细胞进行染色,随后通过在磷酸盐缓冲盐水或Hank平衡盐溶液中的0.6%多聚甲醛中在室温下温育10分钟来固定。所有流式细胞仪数据都在FACSCanto™仪器上收集,并使用FlowJo软件分析数据。

[0527] 在制造的第6天和第7天使用Whitlow接头染色和随后的流式细胞术分析来测量

CAR表达(表7)。实验组在第6天显示了范围从81.5%到91.9%的可比较CAR表达,并在第7天保持相对稳定。唯一的例外是 ϵ 构建体,其在第6天具有74.2%的最低CAR表达,并且在第7天也显著下降至58.4%。

实验组	转导%			
	第 0 天	第 3 天	第 6 天	第 7 天
NTD	不适用	不适用	不适用	不适用
ζ	不适用	不适用	81.5	83.9
ϵ	不适用	不适用	74.2	58.4
δ	不适用	不适用	91.8	90.4
γ	不适用	不适用	91.9	89.9
Dap12	不适用	不适用	91.7	91.3
ζ -CO	不适用	不适用	89.1	94.3
ϵ -CO	不适用	不适用	90.3	95.1
ζ 1xx	不适用	不适用	88.2	87.9

[0529] 实施例4

[0530] 与单独铺板的靶细胞发出的信号相比,T细胞介导的细胞毒性作为共培养孔中靶荧光素酶信号减少的函数进行测量。在收获日(制造的第7天)冷冻保存从健康供体血液单采术中获得的T细胞所制造的T细胞产物。在共培养的第0天,在开始与靶细胞共培养之前,将T细胞产物解冻并在完全OpTmizer™培养基中静置过夜。就在共培养开始前,将每个T细胞样品的等分试样与一组针对CD3、CD4、CD8和Whitlow接头(CAR)的抗体荧光团一起温育,并通过流式细胞术进行分析以评价转导效率。使用定制的抗体评估总转导效率,该抗体结合单链可变片段(scFv)的重链和轻链之间的Whitlow接头。然后用CellTrace™Violet (CTV) 试剂标记T细胞,并且随后用R-10%培养基[补充有10%胎牛血清、青霉素链霉素L-谷氨酰胺和HEPES的RPMI-1640培养基]洗涤。将一部分CTV标记的样品固定并储存在4°C下直至第4天,此时通过流式细胞术与第4天共培养样品并行地分析样品以评估CTV信号的初始水平(CTV最大值)。将T细胞产物和表达荧光素酶的靶细胞在R-10%培养基中以不同的效应物与靶标(E:T)比率(范围从3:1到1:243)铺板在一起(共培养的第0天)。将T细胞产物连续稀释3倍,同时每孔的靶细胞数目保持恒定在20,000个细胞。阳性靶细胞包括Nalm6(CD19+)和ST486(CD19+)。作为对照,在不存在任何靶细胞(即,单独T细胞)的情况下培养T细胞产物以评估在不存在抗原刺激的情况下T细胞功能的基础水平。将共培养物在37°C下温育1或4天,并如下所述执行功能评估。

[0531] 解冻并静置过夜后,将每个实验组的样品针对CD3、CD4、CD8和Whitlow接头(CAR)染色以评估它们的恢复百分比和CAR表达。然后通过添加NTD细胞将各组归一化至最低转导百分比(43.7%)。这样做是为了确保所有样品在下游测定中具有相同数量的CAR+样品。产物细胞成功地归一化,并且范围为41.0%至46.8%(表8)。观察到 ϵ 构建体下调细胞表面上的CAR,并且在与靶细胞共培养开始时下降至27.7% CAR+。

表 8: 在共培养设置的第 0 天 CAR-T 产物细胞的 CAR 表达

实验组	转导%	
	预归一化/静置过夜	后归一化
NTD	不适用	不适用
ζ	83.4	41.9
ε	43.7	27.7
δ	86.4	42.1
γ	85.7	41.0
Dap12	88.1	43.1
ζ-CO	93.7	42.5
ε-CO	94.1	43.6
ζ 1xx	87.1	43.8

[0532]

[0533] 与单独铺板的靶细胞发出的信号相比, T细胞介导的细胞毒性作为共培养孔中靶荧光素酶信号减少的函数进行测量。在共培养开始后的第1天和第4天, 将终浓度为0.14mg/mL的D-荧光素底物添加到共培养孔中, 并且将板在黑暗中以37°C下温育10分钟。在VarioSkan™LUX或VarioSkan®Flash多模式微板读取器中立即读取发光信号。T细胞介导的细胞毒性计算如下:

[0534] 细胞毒性% = [1 - (感兴趣的样品/单独靶标对照)的荧光素酶信号]*100

[0535] 第1天(表9)和第4天(表10)读出显示了所有两种抗原表达细胞系(Nalm6和ST486)的当量剂量依赖性细胞毒性, 构建体之间没有显著差异。

表 9
第 1 天功能表征数据: 一式三份的 Nalm6 细胞系的细胞毒性百分比

实验组	E:T 比率						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	17.1	5.2	-0.1	7.8	-0.1	0.1	-5.3
	18.5	0.4	-0.3	12.5	-1.8	1.3	-1.5
	11.5	8.9	4.0	5.0	6.3	3.6	-3.1
ζ	92.4	64.3	27.1	19.1	-0.6	-6.6	-7.6
	92.8	64.8	29.6	22.5	-4.4	0.0	-0.1
	91.5	59.2	33.4	15.8	20.1	2.1	0.1
ε	90.5	59.6	27.6	18.5	1.2	-0.5	-3.6
	91.7	59.4	21.0	17.0	1.9	-2.1	-6.0
	90.7	62.5	37.0	14.9	20.2	15.9	14.8
δ	78.4	45.1	25.1	17.4	0.0	2.5	0.9
	79.1	42.4	21.2	16.7	1.0	0.2	-3.4
	75.5	47.6	24.8	10	20	16.3	13.4
γ	73.4	44.3	23.2	14.9	2.1	1.6	-3.8
	74.7	40.5	16.3	17.9	0.8	0.7	0.0
	70.1	40.0	24.0	12.6	6.7	3.0	4.2
Dap12	83.2	51.6	29.2	21.5	5.8	-1.0	-3.9
	82.3	46.2	22.2	20.1	3.0	1.2	0.7
	81.2	48.3	22.6	12.0	13.8	3.3	2.6
ζ-CO	94.5	74.2	41.8	25.7	3.9	3.7	-1.8
	96.4	68.3	34.6	23.5	5.9	3.4	-1.1

[0536]

[0537]		93.4	70.0	34.4	21.0	3.1	0.4	1.5
	ε-CO	89.3	54.5	24.3	21.9	4.6	6.1	-0.6
		86.1	50.3	23.5	20.4	3.7	0.1	2.6
		88.8	46.3	26.8	13.8	5.5	5.3	0.0
	ζ 1xx	88.9	59.2	27.0	18.4	-0.8	-1.1	-1.8
		87.6	56.0	21.3	17.9	-2.4	-2.7	-0.2
85.2		55.7	37.7	15.0	14.4	20.3	19.0	

表 10
第 4 天功能表征数据：一式三份的 Nalm6 细胞系的细胞毒性百分比

实验组	E:T 比率						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	60.3	20.4	7.1	-1.8	-1.3	-6.8	0.6
	57.8	20.9	4.9	-2.5	-4.2	-4.1	-0.9
	64.9	16.6	-2.7	-3.2	-2.3	-5.6	-0.2
ζ	100.1	100.1	97.2	77.9	43.6	21.3	6.9
	100.1	99.9	95.7	73.3	37.3	18.1	8.8
	100.1	100.1	98.2	79.8	37.2	16.1	6.2
ε	100.1	100.1	98.2	59.3	11.4	-1.6	-6.3
	100.1	100.1	96.5	46.1	13.9	-0.9	1.6
	100.1	100.1	98.2	58.1	13.4	-1.7	-3.3
δ	100.1	100.1	98.0	64.0	30.6	4.0	-2.3
	100.1	100.1	96.4	62.5	25.1	7.3	5.5
	100.1	100.1	97.5	64.9	27.8	6.9	2.4
γ	100.1	100.1	96.2	61.4	25.9	4.6	-1.0
	100.1	100.0	94.0	60.4	20.6	6.1	0.1
	100.1	100.1	96.4	62.7	23.0	3.3	-1.4
Dap12	100.1	100.1	98.1	73.8	33.7	4.2	-1.0
	100.1	100.1	96.7	68.6	26.8	4.0	3.5
	100.1	100.1	98.9	73.1	28.6	-1.8	-0.3
ζ-CO	100.1	100.1	99.9	85.0	42.5	9.5	1.8
	100.1	100.1	99.4	81.3	40.6	14.7	2.6
	100.1	100.1	99.5	84.9	46.3	11.8	-0.1
ε-CO	100.1	100.0	97.5	61.2	27.0	5.1	-1.8
	100.1	99.9	96.4	58.2	26.9	6.4	-2.6
	100.0	100.0	96.9	62.4	27.0	0.3	0.1
ζ 1xx	100.1	100.1	97.5	68.6	36.8	6.8	5.2
	100.1	100.1	94.3	63.7	23.3	13.3	5.3
	100.1	100.1	97.8	67.2	34.5	10.0	5.2

[0539] 实施例5

[0540] 在如前一实施例中所述的共培养开始后的第1天,收集上清液,并根据制造商的说明书使用Discovery V-**PLEX**[®]Pro inflammatory Panel 1人用试剂盒分析细胞因子水平。具体地,分析来自以1:1E:T比率铺板的T细胞产物与表达抗原的Nalm6和ST486的共培养物的上清液的由抗原接合介导的干扰素γ (IFN-γ)、IL-2和肿瘤坏死因子α (TNF-α)分泌的水平。并行分析来自不存在靶细胞(单独T细胞)的情况下培养的T细胞的上清液,以评估

在不存在抗原的情况下细胞因子产生的基础水平。将所有样品稀释至检测范围内。

[0541] 从1:1E:T比率收集上清液,并通过MSD分析IFN- γ 、IL-2和TNF- α 分泌。分析表明,当与表达抗原的细胞系Na1m6和ST486共培养时,所有构建体分泌细胞因子(表11)。与 ζ 和 ζ -CO基准对照相比, ζ 1xx、 ε -CO和一定程度的 δ 都分泌相当高水平的促炎细胞因子。与 ζ 和 ζ -CO基准对照相比, ε 、 γ 和Dap12产生较低水平的细胞因子。当与ST486细胞系分泌的水平相比时,与Na1m6细胞系的共培养引起更高水平的细胞因子,然而,构建体的总体分级模式在两种细胞系中是一致的。另一方面,当单独培养或与表达抗原的细胞系一起培养时,NTD对照组不分泌任何可测量或显著水平的细胞因子。

表 11
第 1 天功能表征数据: 通过 MSD 对 Nalm6 和 ST486 细胞系中的 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 的细胞因子分析

实验组	细胞因子	Nalm6	% CV	ST486	% CV	单独 T 细胞	% CV	
[0542] NTD	IFN- γ	720.2	28.8	1289.0	24.1	16.9	0.0	
	TNF- α	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
	IL-2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
ζ	IFN- γ	96335.4	20.9	27645.8	15.0	200.9	0.0	
	TNF- α	1394.4	12.0	424.3	15.6	0.0	0.0	
	IL-2	1857.6	10.8	275.0	27.0	0.0	0.0	
ε	IFN- γ	40251.9	28.0	14887.6	11.6	126.8	0.0	
	TNF- α	495.8	14.0	226.2	10.8	0.0	0.0	
	IL-2	217.6	1.5	62.4	23.8	0.0	0.0	
δ	IFN- γ	58829.3	20.0	16827.2	5.3	60.8	0.0	
[0543]	TNF- α	1071.2	7.7	338.2	9.9	0.0	0.0	
	IL-2	1189.5	5.2	148.0	15.3	0.0	0.0	
	γ	IFN- γ	37352.4	19.5	8944.0	3.9	47.3	0.0
		TNF- α	582.5	3.6	136.9	7.0	0.0	0.0
		IL-2	418.6	7.9	29.1	26.2	0.0	0.0
	Dap12	IFN- γ	44462.9	20.6	12763.5	7.9	67.3	0.0
		TNF- α	625.8	3.5	171.9	10.7	0.0	0.0
		IL-2	467.8	9.0	47.7	48.1	0.0	0.0
	ζ -CO	IFN- γ	101222.2	20.4	31320.8	4.0	67.3	0.0
		TNF- α	1310.0	5.7	442.6	2.1	0.0	0.0
		IL-2	1559.1	3.7	247.9	18.0	0.0	0.0
	ε -CO	IFN- γ	81122.0	20.3	27685.4	3.3	148.8	0.0
		TNF- α	857.5	9.8	374.9	3.6	0.0	0.0
		IL-2	1180.8	11.1	257.8	7.2	0.0	0.0
	ζ 1xx	IFN- γ	80623.9	26.4	22041.0	5.4	175.2	0.0
TNF- α		1126.6	11.4	352.4	3.6	0.0	0.0	
IL-2		1493.0	15.3	227.7	12.3	0.0	0.0	

[0544] 实施例6

[0545] 在共培养开始后的第4天,收获以1:1E:T比率与靶细胞铺板的T细胞产物,用一组

抗体荧光团染色以鉴定T细胞,并通过流式细胞术进行分析。与单独培养的T细胞产物(单独T细胞)的增殖能力相比,通过流式细胞术分析响应于表达抗原的靶细胞的CTV染料的细胞分裂驱动稀释来确定T细胞产物的增殖能力,这用于评估在没有刺激的情况下稳态增殖的基础水平。通过流式细胞术并行分析在共培养设置当天固定的CTV标记的T细胞(CTV最大值),以评估细胞增殖前的初始CTV信号的强度。

[0546] Cell Trace Violet (CTV) 标记的稀释用于评估增殖。当产物CAR-T细胞分裂时,染料随着每次分裂而稀释,并且因此,当与第0天细胞相比时,较低的CTV MFI指示增殖。当单独培养或与抗原表达细胞系一起培养时,在NTD对照组中观察到最小的稳态或抗原非依赖性增殖。当针对ST486细胞系培养时,所有其他构建体显相当的MFI水平。当与Nalm6细胞系一起培养时, ζ -CO和 ϵ 均具有最低的CTV MFI,表明更强的增殖。所有其他构建体都对同一靶系具有相当的增殖水平。完整总结可见于表12中。

实验组	Nalm6	ST486	单独 T 细胞
NTD	19120	15672	19256
ζ	5762	4997	17367
ϵ	4193	5257	11481
δ	5874	6186	16613
γ	6418	7869	20137
Dap12	5725	7365	17696
ζ -CO	3441	4211	15277
ϵ -CO	5812	5103	21260
ζ 1xx	5427	5359	18286

[0547] 实施例7

[0549] 对于体内研究,在注射前一天,将如上所述制备的抗CD19产物CAR T细胞从冷冻贮藏中取出,在37°C水浴中解冻,并且重悬于预热的完全OpTmizer™培养基中。将细胞悬浮液的等分试样在台盼蓝中稀释并手动计数细胞。将细胞悬浮液在室温下以400×g离心5分钟,并且吸出上清液。然后将细胞以2.0至5.0×10⁶个细胞/mL重悬于完全OpTmizer™培养基中,并且在37°C/5% CO₂温育箱中培养过夜。在注射的当天,将NTD T细胞与CAR+T细胞以指定的比率合并以通过总细胞数使测试组归一化。将均匀细胞悬浮液的等分试样在台盼蓝溶液中稀释并使用血细胞计数器手动计数细胞以确定细胞的注射前活力。然后将细胞悬浮液在4°C下以200×g离心10分钟。吸出每个小瓶的上清液,并且在室温下将细胞沉淀重悬于DPBS中。测试两个CAR T细胞剂量:5.0×10⁵和2.0×10⁶个CAR+细胞/组。在植入后,用台盼蓝溶液稀释来自每种悬浮液的剩余细胞的等分试样并计数以确定植入后细胞活力。

[0550] 将相同总数的T细胞(2.4×10⁶个细胞)施用于每个治疗组中的小鼠。基于抗CD19 CAR转导效率,对将施用于每个治疗组的剂量进行归一化以对于每个组递送相同总数的T细胞。

[0551] 使用IVIS 5光学成像系统进行体内BLI。在约1%至2%异氟烷气体麻醉下对动物进行成像。每只小鼠IP注射0.2mL/20g D-荧光素,并且在注射后10分钟以俯卧位然后仰卧位成像。使用电荷耦合器件(CCD)芯片的大分箱,并且调节暴露时间以从在图像中在每只小

鼠中可观察到的转移性肿瘤获得至少几百个计数并且避免CCD芯片的饱和。在第6、13、20、27、34、41和48天收集BLI图像。使用Living Image 4.7.1版软件分析图像。将全身固定体积感兴趣区域 (ROI) 放置在每只动物的俯卧和仰卧图像上,并基于动物标识进行标记。计算并导出所有ROI的总通量(光子/秒),其中定制编写的脚本将对于每只小鼠发现的各种信号列表,以促进组间分析。将俯卧和仰卧感兴趣区域相加在一起以估计全身肿瘤负荷。

[0552] 每个实验组的BLI总结在表13中。接受媒介物对照或NTD细胞的组没有显示出肿瘤控制,并且由于高肿瘤负荷,两组在第20天被安乐死。在第13天,所有高剂量构建体都显示出显著且相当的功效。高剂量组中肿瘤控制的丧失早在第20天开始。高剂量组的 ϵ -C0、Dap12和 ζ 1XX维持肿瘤控制直至在第48天研究终止。

[0553] 从研究开始,低剂量组中的肿瘤控制是更易变的。 ζ 1xx在早期具有最佳肿瘤控制,并且在整个研究中保持其功效。 ϵ -C0在前三个读出中表现出最小的肿瘤控制,但随后在第27天在所有小鼠中显示出突然且完全的肿瘤控制,并且在整个研究的剩余部分中维持该肿瘤控制。在持续到研究结束的五只小鼠中的三只小鼠中, ϵ 在第34天显示出类似的晚期肿瘤控制。由于高肿瘤负荷,剩余的两只小鼠最终被安乐死。尽管有更多的变化,但Dap12在低剂量下显示出与其在高剂量研究中类似的肿瘤控制功效。特别地,一只小鼠似乎在第27天开始失去肿瘤控制,但随后在第48天恢复肿瘤控制。

	第 6 天	第 13 天	第 20 天	第 27 天	第 34 天	第 41 天	第 48 天
[0554] 媒介物	5.70E+07	2.14E+10	1.56E+11				
	4.96E+07	2.07E+10	1.28E+11				
	5.62E+07	2.26E+10	1.02E+11				
	4.25E+07	2.03E+10	1.34E+11				
	2.61E+07	1.62E+10	9.01E+10				
NTD	5.62E+07	2.19E+10	1.50E+11				
	2.62E+07	1.19E+10	9.40E+10				
	4.92E+07	1.97E+10	1.11E+11				
	4.18E+07	1.78E+10	9.67E+10				

[0555]

	5.74E+07	1.60E+10	1.27E+11				
ϵ (5E5)	3.17E+07	9.08E+06	1.86E+07	1.22E+06	6.94E+05	8.57E+05	8.93E+05
	5.46E+07	1.55E+07	2.81E+08	2.45E+09	8.25E+05	8.94E+05	1.02E+06
	5.94E+07	2.57E+07	8.71E+07	2.56E+09	1.24E+11		
	3.93E+07	5.34E+07	1.30E+09	9.95E+08	1.06E+07	2.70E+07	4.23E+06
	4.42E+07	4.66E+07	5.03E+08	3.32E+09	3.98E+10	9.85E+10	
δ (2E6)	5.97E+07	7.89E+05	8.52E+05	7.74E+05	7.64E+05	9.26E+05	2.22E+06
	5.43E+07	8.14E+05	8.03E+05	7.48E+05	7.16E+05	5.97E+05	9.86E+05
	3.73E+07	8.93E+05	7.57E+05	7.99E+05	7.37E+06	1.88E+08	7.91E+09
	3.49E+07	8.59E+05	9.92E+05	8.21E+05	1.01E+06	1.15E+06	1.14E+06
	4.44E+07	8.84E+05	1.46E+06	1.30E+06	5.17E+06	2.13E+07	1.51E+08
δ (5E5)	6.25E+07	1.58E+06	1.53E+06	1.55E+06	9.61E+05	7.58E+05	7.34E+05
	5.37E+07	3.33E+07	3.85E+06	5.04E+06	1.58E+08	4.31E+09	2.37E+10
	4.84E+07	1.63E+07	1.19E+08	5.33E+06	1.60E+06	1.43E+07	5.58E+08
	2.96E+07	2.02E+06	9.34E+07	1.85E+09	7.08E+09	1.12E+10	4.70E+10
	3.85E+07	5.34E+06	3.09E+06	2.65E+07	6.85E+09	8.03E+08	1.20E+07
γ (2E6)	3.85E+07	9.60E+05	7.93E+05	7.37E+05	8.41E+06	1.77E+08	1.11E+10
	6.26E+07	1.04E+06	9.63E+05	7.41E+05	9.52E+05	2.64E+06	7.53E+07
	4.55E+07	8.43E+05	7.65E+05	5.96E+05	1.65E+06	8.39E+05	7.27E+05
	2.97E+07	9.05E+05	7.96E+05	7.40E+05	3.62E+06	1.32E+08	9.97E+09
	5.31E+07	6.22E+05	1.06E+06	7.53E+05	1.14E+06	1.24E+08	6.14E+09
γ (5E5)	3.09E+07	5.77E+06	1.71E+07	6.61E+08	1.44E+10	2.43E+10	5.18E+09
	5.28E+07	3.46E+07	1.24E+07	1.55E+08	1.39E+09	2.44E+06	1.38E+06
	6.27E+07	3.04E+07	2.11E+07	8.96E+07	9.76E+07	3.92E+08	2.85E+09
	3.76E+07	2.60E+07	2.10E+08	1.46E+08	8.88E+09	5.52E+10	
	4.60E+07	3.49E+06	4.15E+06	3.32E+07	8.46E+07	3.57E+09	1.62E+10
Dap1 2 (2E6)	4.67E+07	1.01E+06	9.08E+05	7.37E+05	1.03E+06	1.92E+06	1.05E+06
	3.10E+07	8.80E+05	7.88E+05	7.33E+05	9.11E+05	1.55E+06	7.12E+05
	6.33E+07	9.11E+05	1.23E+06	7.46E+05	7.70E+05	1.67E+06	8.30E+05
	3.70E+07	9.45E+05	8.30E+05	8.39E+05	8.82E+05	1.72E+06	9.20E+05
	5.24E+07	8.75E+05	1.06E+06	8.59E+05	1.13E+06	2.13E+06	8.41E+05
Dap1 2 (5E5)	3.69E+07	9.94E+05	9.22E+05	7.98E+05	7.52E+05	1.70E+06	9.51E+05
	6.37E+07	3.56E+06	3.15E+06	1.42E+07	1.12E+06	1.68E+06	9.18E+05
	3.12E+07	5.41E+06	3.69E+06	2.80E+08	2.84E+09	1.29E+08	9.88E+05
	5.20E+07	1.23E+06	8.99E+05	7.79E+05	1.09E+07	1.47E+06	5.84E+05
	4.67E+07	1.14E+06	8.74E+05	6.81E+05	7.76E+05	1.54E+06	8.81E+05
ζ -CO (2E6)	3.62E+07	1.14E+06	1.84E+06	9.89E+06	7.24E+07	5.05E+08	1.01E+06
	2.72E+07	9.86E+05	2.26E+06	5.22E+07	1.10E+10	4.26E+08	3.53E+07
	7.18E+07	2.18E+06	7.91E+05	8.01E+05	1.70E+06	8.12E+07	2.05E+09
	5.10E+07	1.05E+06	1.08E+06	1.21E+06	9.76E+05	1.09E+06	7.52E+05
	4.83E+07	1.43E+06	2.80E+06	5.00E+07	2.36E+08	2.07E+06	1.15E+06
ζ -CO (5E5)	7.24E+07	2.10E+07	1.19E+07	5.65E+08	2.75E+10	1.19E+08	6.57E+07
	2.67E+07	1.21E+06	8.73E+06	4.56E+08	4.22E+08	1.60E+06	9.52E+05
	3.61E+07	9.48E+06	2.05E+07	8.72E+08	4.24E+09	2.46E+07	5.10E+06
	5.06E+07	5.67E+06	1.38E+07	3.41E+08	2.27E+09	1.15E+09	6.31E+08
	4.11E+07	2.95E+07	2.91E+07	1.60E+09	2.27E+10	9.11E+10	2.80E+10
ϵ -CO	4.25E+07	1.20E+06	6.99E+05	8.92E+05	9.26E+05	1.09E+06	1.08E+06

[0556]	(2E6)	3.57E+07	9.05E+05	7.41E+05	7.97E+05	8.20E+05	1.02E+06	9.12E+05
		5.01E+07	1.11E+06	7.32E+05	8.47E+05	8.07E+05	9.47E+05	1.12E+06
		7.34E+07	8.06E+05	7.28E+05	8.15E+05	8.70E+05	8.80E+05	8.66E+05
		2.90E+07	1.01E+06	7.35E+05	8.70E+05	9.52E+05	1.07E+06	1.02E+06
	ϵ -CO (5E5)	3.50E+07	7.97E+08	1.47E+09	1.06E+06	1.18E+06	1.25E+06	1.26E+06
		4.25E+07	3.23E+08	1.47E+09	8.90E+05	9.61E+05	1.10E+06	6.87E+05
		4.92E+07	3.94E+08	4.44E+08	9.13E+05	8.40E+05	1.16E+06	9.43E+05
		2.81E+07	7.75E+07	6.65E+08	8.45E+05	9.78E+05	1.11E+06	1.03E+06
		7.74E+07	1.36E+08	3.30E+08	9.72E+05	9.65E+05	1.27E+06	1.08E+06
	ζ 1xx (2E6)	5.53E+07	8.26E+05	7.03E+05	6.64E+05	7.29E+05	8.34E+05	8.46E+05
		5.85E+07	7.04E+05	7.94E+05	6.84E+05	7.38E+05	8.70E+05	8.28E+05
		4.05E+07	8.02E+05	8.53E+05	6.34E+05	7.94E+05	7.76E+05	7.06E+05
		4.83E+07	7.98E+05	7.91E+05	7.33E+05	8.15E+05	8.45E+05	9.63E+05
	ζ 1xx (5E5)	2.74E+07	8.59E+05	8.38E+05	1.13E+06	8.34E+05	8.70E+05	9.61E+05
		5.90E+07	1.57E+06	1.20E+06	2.26E+07	9.42E+05	9.44E+05	9.98E+05
		3.50E+07	2.29E+06	9.56E+05	7.49E+05	8.15E+05	1.08E+06	9.61E+05
4.41E+07		9.23E+06	2.07E+07	1.77E+07	9.04E+05	9.48E+05	1.03E+06	
3.94E+07		3.50E+06	3.27E+06	1.33E+06	8.11E+05	9.81E+05	7.68E+05	
	5.51E+07	5.59E+06	1.45E+06	2.05E+06	7.72E+05	9.54E+05	9.32E+05	

[0557] 实施例8

[0558] 对于离体ddPCR分析,通过眶后窦收集每周100 μ l的血液体积并储存在冰上。在T细胞注射后24小时开始对动物取样,并且在整个研究持续时间于第8、15、22、29、36和43天每周持续一次。根据制造商的说明书使用KingFisher™ Flex (小体积) 进行DNA纯化,然后通过内部Kite方案和Bio-Rad仪器对纯化的DNA进行ddPCR。

[0559] 为了评估体内CAR T细胞扩增和持久性,通过ddPCR分析外周血中每 μ g DNA的CAR拷贝(表14)。分析限于显示改善的肿瘤控制的构建体(ζ 1xx、Dap12和 ϵ -CO)。如在Na1m6肿瘤模型中的标准抗CD19 CAR所预期的那样, ζ 在小鼠外周血中表现出很少或没有扩增。然而, ϵ -CO和较小程度的 ζ 1xx和Dap12在两种治疗剂量下均增加了小鼠外周血中CAR T细胞峰值扩增和持久性。

	第 1 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 35 天
[0560] 媒介物	0.00E+00	3.88E-03	0.00E+00			
	7.91E-03	0.00E+00	0.00E+00			
	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00			

[0561]

	4.56E-03	1.85E-03	0.00E+00			
	6.94E-03	2.61E-03	0.00E+00			
NTD	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00			
	0.00E+00	5.36E-03	3.10E-03			
	4.22E-03	0.00E+00	0.00E+00			
	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00			
	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00			
	7.27E-02	3.03E-01	1.13E-01	9.41E-02	8.81E-01	2.62E+00
		1.06E-01	4.53E-03	1.36E-01	9.35E-01	1.50E+00
ζ (2E6)	1.20E-01	5.31E-01	5.82E-03	2.56E-02	2.70E-02	1.25E+00
	3.53E-01	1.44E-01	8.30E-03	1.91E-02	2.65E-02	1.79E-01
	3.36E-01	8.36E-01	6.26E-02	8.51E-03	3.00E-02	2.68E-01
	5.79E-01	5.09E-02	7.91E-03	8.67E-02	3.89E-01	4.29E-02
	1.25E-01	3.33E-01	1.80E-02	5.71E-02	2.06E-02	7.68E-01
ζ (5E5)	2.22E-02	2.02E-01	5.50E-03	1.34E-02	2.67E+00	2.18E+00
	1.67E-01	1.66E-01	1.11E-01	5.04E-02	3.10E-01	6.50E-01
	1.64E-01	5.94E-02	0.00E+00	1.34E-01	1.51E-01	1.07E-01
	7.27E-02	3.03E-01	1.13E-01	9.41E-02	8.81E-01	2.62E+00
		1.06E-01	4.53E-03	1.36E-01	9.35E-01	1.50E+00
Dap12 (2E6)	2.52E-01	2.52E+00	2.33E-01	1.65E-01	2.35E-02	1.87E-01
	8.40E-02	2.31E+00	3.45E-01	5.22E-01	7.69E-01	1.73E+00
	1.48E-01	2.76E+00	1.45E-01	2.82E-01	1.99E-01	1.75E-01
	7.20E-02	1.04E+00	5.66E-01	1.81E+00	1.55E+00	2.09E+00
	2.52E-01	1.23E+00	2.76E-01	9.82E-03	9.13E-02	3.39E+00
Dap12 (5E5)	6.40E-02	4.32E-01	1.24E+00	3.98E-01	2.23E+00	2.08E+00
	4.36E-01	3.65E-01	1.08E-01	3.20E-01	1.39E+01	2.60E+00
	9.60E-02	1.32E-01	9.15E-02	4.36E-01	6.12E+00	5.05E+01
	1.92E-01	4.69E-01	1.36E+00	3.23E-01	7.11E+00	0.00E+00
	7.60E-02	6.14E-01	5.73E-01	3.79E+01	8.67E+00	7.62E+00
ε -CO (2E6)	3.76E-01	8.87E+00	2.57E+01	1.44E+02	6.06E+01	2.12E+02
	8.40E-02	2.46E+00	2.63E+00	1.53E+02	2.42E+02	1.40E+02
	3.08E-01	1.96E+00	3.01E+00	1.56E+02	1.34E+02	5.83E+01
	1.56E-01	3.59E+00	8.98E-01	8.78E+01	4.13E+02	2.44E+02
	2.12E-01	1.85E+00	5.95E+00	2.27E+02	4.65E+02	3.61E+02
ε -CO (5E5)	6.80E-02	1.72E-01	2.57E+00	2.20E+01	1.26E+02	4.90E+02
	2.84E-01	2.36E-01	4.77E-01	5.42E+01	1.42E+02	3.61E+02
	1.84E-01		1.71E+01	3.13E+02	1.22E+02	1.69E+02
	3.20E-01		1.73E+00	9.09E+01	5.20E+01	6.21E+01
	8.00E-02	2.32E-01	1.92E+00	1.29E+02	4.08E+01	8.49E+01
ζ 1xx (2E6)	1.96E-01	9.51E+00	5.64E-01	9.47E+00	2.08E+01	5.62E+01
	1.24E-01	6.42E+00	8.06E-01	2.28E+00	6.61E+00	1.87E+01
	8.00E-02	5.61E+00	7.52E-01	1.95E+00	5.59E-01	1.35E+00
	1.60E-01	3.79E-01	2.17E-01	7.47E-01	1.46E+00	2.39E+00
	5.08E-01	4.49E+00	5.98E-01	1.50E-01	1.11E+00	4.21E-01
ζ 1xx (5E5)	4.80E-02	1.08E+00	8.70E-01	4.41E+00	1.65E+01	6.01E+01
	1.48E-01	2.90E-01	1.13E+00	1.31E+01	3.47E+01	3.23E+01
	1.08E-01	2.01E-01	5.33E-03	1.18E+01	2.45E+00	2.74E+00

[0562]

	3.32E-01	1.17E-01	1.44E+00	1.58E+01	3.59E+00	1.77E+00
	1.04E-01	1.58E-01	2.39E-01	4.21E+00	1.19E+01	6.39E+00

[0563] 实施例9

[0564] 以下实施例描述了三个新的第二代CD19/CD20双顺反子CAR构建体,其利用三个新

的CD19_CD3 ϵ -C0突变结构域之一作为基准抗CD19对照CAR中CD3 ζ 的替代。在具有CD20 CAR的双顺反子构建体中,相对于野生型CD3 ϵ -C0,三个CD3 ϵ 突变体表现出改善的CD19 CAR向膜的表达。所有都成功转导并在原代人T细胞中表达。这些新的CAR构建体通过体外测定法表征。

[0565] 构建体设计。抗CD19 CD3 ζ 第二代嵌合抗原受体 (CAR) (下文中称为CD19z) 用于产生具有序列ATGGCACTTCCAGTCACCGCACTCTTGCTTCCACTGGCCTTGTGCTGCATGCTGCGCGCCAGATATACAGATGACCCAAACGACGTCTAGCCTCAGTGCCTGACTCGGGGATCGGGTGACAATTAGCTGCAGGGCTAGCCAGGATATTTCAAAATATCTTAACTGGTATCAACAAAAGCCAGATGGAACCGTAAACTGCTCATATACCACACCAGTCGCCTGCATTCAGGGGTTCCGAGCCGCTTTTCTGGGAGCGGTAGCGGAACtGAtTATAGCTTGACAATAAGCAACCTCGAGCAGGAAGACATTGCGACGTACTTCTGTCAGCAAGGGAACACGCTGCCGTATACCTTCGGTGGCGGCACTAACTGGAAATCACGGGATCTACGTCTGGATCCGAAAACCTGGATCTGGTGAAGGATCCACTAAAGGCGAAGTCAAGTTGCAAGAGTCTGGACCTGGTCTCGTGGCACCTTACAGTCACTCTCCGTTACCTGTACCGTATCTGGAGTTTCACTTCCCGACTATGGCGTGTATGGATACGCCAACCACCGCGAAAAGGTCTTGAATGGCTGGGCGTTATCTGGGGATCCGAAACCACATACTACAACCTCTGCGCTCAAGTCACGGCTGACTATTATAAAGGACAATTCAAAGAGCCAAGTGTCTCTGAAAATGAACAGCCTGCAGACTGATGACACTGCAATATATTACTGCGCCAAGCATTACTATTACGGCGGATCTTACGCGATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCTCTGTAACAGTCAGCTCCGCGGCCGCATTGGACAATGAAAAATCCAATGGCACAATAATTCATGTAAAGGGCAAACACTTGTGTCTTAGCCCACTCTTTCCTGGTCCGTCTAAACCGTTTTGGTGTCTCGTTGTGGTTGGAGGCGTCTGGCTTGTACTCTCTGTTGGTACTGTAGCCTTTATAATATTCTGGGTTAGAAGCAAACGAAGTAGGCTTTTACATTCAGACTATATGAACATGACACCAAGACGCCCGGCCCAAGAAAACACTATCAGCCCTATGCTCCGCCTCGGGACTTCGCTGCTTACCGAAGCAAGAACCGCAAAGCAAAGGCAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCAGGGGGACGACAACGCGGTCA GAATAAGGAACGCCCGCCTCCAGTACCAAATCCAGATTATGAACCAATTCGGAAGGGACAACGCGATCTCTACTCCGGTCTCAATCAGAGGCGAATT (SEQ ID NO:54)

[0566] ϵ -C0:

[0567] AAGAACCGCAAAGCAAAGGCAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCAGGGGGACGACAACGCGGTCA GAATAAGGAACGCCCGCCTCCAGTACCAAATCCAGATTATGAACCAATTCGGAAGGGACAACGCGATCTCTACTCCGGTCTCAATCAGAGGCGAATT (SEQ ID NO:54)

[0568] ϵ -C0 (Δ 181-185) :

[0569] AAGAACCGCAAAGCAAAGGCAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCAGGGGGACGACAACGCGGTCA GAATAAGGAACGCCCGCCTCCAGTACCAAATCCAGATTATGAACCAATTCGGAAGGGACAACGCGATCTCTACTCCGGTCTC (SEQ ID NO:79)

[0570] ϵ -C0 (R183K) :

[0571] AAGAACCGCAAAGCAAAGGCAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCAGGGGGACGACAACGCGGTCA GAATAAGGAACGCCCGCCTCCAGTACCAAATCCAGATTATGAACCAATTCGGAAGGGACAACGCGATCTCTACTCCGGTCTCAATCAGAAGCGAATT (SEQ ID NO:80)

[0572] ϵ -C0 (S178N, R183K)

[0573] AAGAACCGCAAAGCAAAGGCAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCAGGGGGACGACAACGCGGTCA

GAATAAGGAACGCCCGCCTCCAGTACCAAATCCAGATTATGAACCAATTCGGAAGGGACAACGCGATCTCTACAAC
GGTCTCAATCAGAAGCGAATT (SEQ ID NO:81)

[0574] CD19 ζ CAR构建体和那些含有CD3 ϵ -CO和CD3 ϵ 信号传导结构域中的突变的构建体随后通过将T2A弗林蛋白酶可切割区与第二代CD20 CD3 ζ (CD20z) CAR整合而以双顺反子形式组装,以产生两种不同CAR的共表达,此后称为CD19z/CD20z、CD19 ϵ (Δ 181-185) /CD20z、CD19 ϵ (R183K) /CD20z和CD19 ϵ (S178N.R183K) /CD20z,如图1所示。

[0575] CAR T-细胞产物的制造。洗涤来自健康人供体的血液单采术材料,与抗CD8抗体连接的磁珠一起温育,并使用CliniMACS[®]细胞分离系统 (Miltenyi Biotech) 按照制造商的说明书进行处理,以富集CD8+T细胞,然后将其冷冻保存。如上所述,使用抗CD4抗体连接的磁珠洗涤和处理得阴性级分,以富集CD4+T细胞,然后将其冷冻保存。将分离的CD4+和CD8+原代人T细胞在补充有2.6% OpTmizer CTS[™]T细胞扩增补充剂、2.5%CTS免疫细胞血清替代物、1%青霉素/链霉素/L-谷氨酰胺和305国际单位/mL人白介素 (IL) -2的OpTmizer CTS[™]T细胞扩增基础培养基(下文中称为完全OpTmizer[™]培养基)中解冻。将T细胞以 1.5×10^6 个细胞/mL的密度重悬于含有1.66 μ g/mL抗CD28抗体(克隆28.2)的完全OpTmizer[™]培养基中,然后接种到用1.23 μ g/mL抗CD3抗体(克隆OKT3)预包被的PL07袋中以诱导T细胞活化(第0天)。在活化后第1天,用编码亲本双顺反子CD19z/CD20z CAR的LVV和含有CD19- ϵ -CO/CD20z CAR的构建体以10的MOI转导细胞。非转导(NTD)样品作为阴性对照。在第3天用完全OpTmizer[™]培养基洗涤T细胞,将其归一化并再扩增9天(第3至9天)。在收获时间点(第9天),将细胞冷冻保存以供将来表达评估。在扩增期间的多个时间点(第3至9天),使用Vi-CELL进行细胞计数,并且通过添加完全OpTmizer[™]培养基将细胞密度归一化至 0.5×10^6 个细胞/mL。在这些时间点,在Vi-CELL上记录平均细胞活力、直径和细胞密度。

[0576] CD3 ϵ -CO/CD 20z CAR的表达确定。将制造的D9 CD19z/CD20z、CD19- ϵ -CO/CD20z和NTD细胞解冻并在OpTmizer[™]培养基中静置过夜以评估CAR表达。通过使用huCD19-His重组肽和抗独特型抗体(24C12)分别评估CD19和CD20 CAR的个体表达来评估表达。评估每种CAR的并行膜和细胞内表达。

[0577] CAR T-细胞产物的制造。洗涤来自健康人供体的血液单采术材料,与抗CD8抗体连接的磁珠一起温育,并使用CliniMACS[®]细胞分离系统 (Miltenyi Biotech) 按照制造商的说明书进行处理,以富集CD8+T细胞,然后将其冷冻保存。如上所述,使用抗CD4抗体连接的磁珠洗涤和处理得阴性级分,以富集CD4+T细胞,然后将其冷冻保存。将分离的CD4+和CD8+原代人T细胞在补充有2.6% OpTmizer CTS[™]T细胞扩增补充剂、2.5%CTS免疫细胞血清替代物、1%青霉素/链霉素/L-谷氨酰胺和305国际单位/mL人白介素 (IL) -2的OpTmizer CTS[™]T细胞扩增基础培养基(下文中称为完全OpTmizer[™]培养基)中解冻。将T细胞以 1.5×10^6 个细胞/mL的密度重悬于含有1.66 μ g/mL抗CD28抗体(克隆28.2)的完全OpTmizer[™]培养基中,然后接种到用1.23 μ g/mL抗CD3抗体(克隆OKT3)预包被的PL07袋中以诱导T细胞活化(第0天)。在活化后第1天,用编码亲本双顺反子CD19z/CD20z CAR的LVV或含有CD19- ϵ -CO (Δ 181-185) /CD20z、CD19- ϵ -CO (R183K) /CD20z或CD19- ϵ -CO (S178N.R183K) /CD20z的构建体以10的MOI转导细胞。非转导(NTD)样品作为阴性对照。在第3天用完全OpTmizer[™]培养基洗涤T细胞,将其归一化并再扩增6天(第3至9天)。在收获时间点(第9天),将细胞冷冻保存以供将来使用。在扩增期间的多个时间点(第3至9天),使用Vi-CELL进行细胞计数,并且通

过添加完全OpTmizer™培养基将细胞密度归一化至 0.5×10^6 个细胞/mL。在这些时间点,在Vi-CELL上记录平均细胞活力、直径和细胞密度。

[0578] 在第7天和第9天通过流式细胞术测量CAR表达。T细胞用一组荧光团缀合抗体染色,并且通过流式细胞术表征以确定转导效率和CD4+/CD8+T细胞比率。每个CAR组的表达评估通过荧光团缀合的抗FMC63(抗CD19 CAR的独特型,也称为CDL)和24C12(抗CD20 CAR的独特型)抗体来实现。使用KIP-1、定制的抗体评估总CAR转导效率,该抗体结合CD19和CD20 CAR的单链可变片段(scFv)的重链和轻链之间的Whitlow接头。可固定的细胞活力染料允许对活细胞进行特异性分析。通过在4℃下与适当的抗体混合物一起温育30分钟,随后用染色缓冲液洗涤2次,对细胞进行染色,随后通过在磷酸盐缓冲盐水中的多聚甲醛中在室温下温育10分钟来固定。所有流式细胞仪数据都在Attune NxT仪器上收集,并使用FlowJo软件分析数据。

[0579] 第0天共培养设置。在收获日(制造的第9天)冷冻保存从健康供体血液单采术中获得的T细胞所制造的T细胞产物。随后将T细胞产物解冻并在完全R-10%培养基[补充有10%胎牛血清、青霉素链霉素L-谷氨酰胺和HEPES的RPMI-1640培养基]中静置过夜,然后开始与靶细胞共培养。就在共培养开始前,将每个T细胞样品的等分试样与一组抗体荧光团一起温育,并通过流式细胞术进行分析以评价转导效率。每个CAR组的表达评估通过荧光团缀合的抗FMC63(抗CD19 CAR的独特型,也称为CDL)和24C12(抗CD20 CAR的独特型)抗体来实现。使用KIP-1、定制的抗体评估总CAR转导效率,该抗体结合CD19和CD20 CAR的单链可变片段(scFv)的重链和轻链之间的Whitlow接头。然后用CellTrace™Violet (CTV) 试剂标记T细胞,并且随后用R-10%培养基洗涤。将一部分CTV标记的样品固定并储存在4℃下直至第4天,此时通过流式细胞术与第4天共培养样品并行地分析样品以评估CTV信号的初始水平(CTV最大值)。将T细胞产物和表达荧光素酶的靶细胞在R-10%培养基中以不同的效应物与靶标(E:T)比率(范围从3:1到1:243)铺板在一起(共培养的第0天)。将T细胞产物连续稀释3倍,同时每孔的靶细胞数目保持恒定在25,000个细胞。阳性靶细胞包括Raji (CD19+/CD20+)、Nalm6 MHC I/II KO (CD19+.CD20+)和ST486 (CD19+/CD20+),而Raji CD19 KO (CD19-/CD20+)、Raji CD20 KO (CD19+/CD20-)和K-562 (CD19-/CD20-)用作抗原阴性对照。在不存在任何靶细胞(即,单独T细胞)的情况下培养T细胞产物以评估在不存在抗原刺激的情况下T细胞功能的基础水平。将共培养物在37℃下温育1或4天,并如下所述执行功能评估。

[0580] 第1天和第4天细胞毒性。与单独铺板的靶细胞发出的信号相比,T细胞介导的细胞毒性作为共培养孔中靶荧光素酶信号减少的函数进行测量。在共培养开始后的第1天和第4天,将终浓度为0.14mg/mL的D-荧光素底物添加到共培养孔中,并且将板在黑暗中在37℃下温育10分钟。在PerkinElmer EnVision®多模式微板读取器中立即读取发光信号。T细胞介导的细胞毒性计算如下:

[0581] 细胞毒性% = [1 - (感兴趣的样品/单独靶标对照)的荧光素酶信号]*100。

[0582] 第1天细胞因子产生。在共培养开始后的第1天,收集上清液,并根据制造商的说明书使用Meso Scale Discovery V-PLEX Pro inflammatory Panel 1人用试剂盒分析细胞因子水平。具体地,分析来自以1:1E:T比率铺板的T细胞产物与表达抗原的Raji (CD19+CD20+)、Raji CD19敲除(KO) (CD19-CD20+)、Raji CD20敲除(KO) (CD19+CD20-)、Nalm6 MHC I/II敲除(KO) (CD19+CD20最小值)、ST486 (CD19+CD20+)和K-562 (CD19-CD20-)的共培养物的上

清液的由抗原接合介导的干扰素 γ (IFN- γ)、IL-2和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)分泌的水平。并行分析来自抗原阴性共培养物 (K-562) 的上清液以评估在不存在抗原的情况下细胞因子产生的基础水平。将所有样品稀释至检测范围内。

[0583] 第4天增殖。在共培养开始后的第4天,收获以3:1E:T比率与靶细胞铺板的T细胞产物,用一组抗体荧光团染色以鉴定T细胞,并通过流式细胞术进行分析。与单独培养的T细胞产物(单独T细胞)的增殖能力相比,通过流式细胞术分析响应于表达抗原的靶细胞的CTV染料的细胞分裂驱动稀释来确定T细胞产物的增殖能力,这用于评估在没有刺激的情况下稳态增殖的基础水平。通过流式细胞术并行分析在共培养设置当天固定的CTV标记的T细胞(CTV最大值),以评估细胞增殖前的初始CTV信号的强度。

[0584] CAR-T产物细胞的制造。从第0天至第9天跟踪不同实验组中的每个实验组的细胞计数、细胞活力和细胞直径,并总结在表15中。

[0585]

表 15: 转导构建体的九天扩增数据

实验组	细胞计数 (10 ⁶)					活力 (%)					直径 (μm)					
	第1天	第3天	第6天	第8天	第9天	第0天	第3天	第6天	第8天	第9天	第0天	第1天	第3天	第6天	第8天	第9天
NTD	8.4	6.65	55.9	90.5	110.4	92.4	85.7	87.8	92.1	92.8	7.91	8.73	10.9	10.0	9.38	9.29
CD19z/ CD20z	8.4	10.1	85.3	148	235	92.4	81.0	85.0	93.4	94.8	7.91	8.73	11.2	10.0	9.54	9.49
CD19 ε-CO/ CD20z	8.4	6.0	50.4	104	118	92.4	83.4	82.8	89.4	96.7	7.91	8.73	11.2	10.5	9.82	9.93

[0586] 第9天CAR-T产物细胞的转导效率。使用huCD19-His重组肽和抗CD20 CAR独特型(24C12)抗体,经由膜和细胞内染色条件在解冻和回收的过夜第9天细胞上测量CAR表达以单独检测每种CAR。在膜透化条件下,CD19 CAR在CD19 ϵ -CO/CD20z构建体中的表达从14%增加至53.5%。CD20 CAR在染色条件或构建体中的表达保持类似,在膜可渗透条件下增加约11%-12%。转导百分比汇总于表16中。

实验组	%转导 (huCD19-His+) CD19 CAR		%转导 (24C12+) CD20 CAR	
	膜	细胞内	膜	细胞内
NTD	不适用	不适用	不适用	不适用
CD19z/CD20z	49.23	44.9	40.1	52.6
CD19 ϵ -CO/CD20z	14.4	53.5	63.4	74

[0588] CAR-T产物细胞的制造。从第0天至第9天跟踪不同实验组中的每个实验组的细胞计数、细胞活力和细胞直径,并总结在表17中。

实验组	细胞计数 (10^6)				活力 (%)				直径 (μm)			
	第 1 天	第 3 天	第 6 天	第 9 天	第 0 天	第 3 天	第 6 天	第 9 天	第 0 天	第 3 天	第 6 天	第 9 天
NTD	3.9	4.5	21	147	92.2	77.0	90.8	94.6	8.9	10.5	9.6	10.0
CD19z/CD20z	3.9	5.6	32	159	92.2	70.1	89.3	95.3	8.9	10.9	9.9	10.0
CD19 ϵ -CO (Δ 181-185)/CD20z	3.9	4.8	26	98	92.2	71.8	84.1	88.3	8.9	10.8	10.6	10.5
CD19 ϵ -CO (R183K)/CD20z	3.9	2.4	16	68	92.2	69.3	77.7	90.3	8.9	10.8	10.6	10.5
CD19 ϵ -CO (S178N, R183K)/CD20z	3.9	4.6	24	119	92.2	74.2	84.4	93.6	8.9	10.6	10.4	10.3

[0590] CAR-T产物细胞的转导效率。经由KIP-1(总)、CDL(CD19 CAR)和24C12(CD20 CAR)染色和随后的流式细胞术分析,在制造第7天和/或第9天测量CAR表达(表18)。实验组在第7天显示相当的总CAR表达和个体CAR表达,对于表达CD3 ϵ -CO突变体的构建体在85%至98%的范围内,并且对于CD19z/CD20z在42%至49%的范围内。所有构建体的CAR表达在第9天保持相对稳定。

表 18: 转导构建体在制造期间的表达数据

实验组	%转导 (Kip1+) 总 CAR				%转导 (CDL+) CD19 CAR				%转导 (24C12+) CD20 CAR			
	第 0 天	第 3 天	第 7 天	第 9 天	第 0 天	第 3 天	第 7 天	第 9 天	第 0 天	第 3 天	第 7 天	第 9 天
	NTD	不适用	不适用	不适用	不适用	不适用	不适用	不适用	不适用	不适用	不适用	不适用
CD19z/ CD20z	不适用	不适用	不适用	42.2	不适用	不适用	44.1	39.0	不适用	不适用	47.6	49.0
CD19 ε-CO (Δ181-185)/ CD20z	不适用	不适用	不适用	90.2	不适用	不适用	91.7	85.8	不适用	不适用	97.6	94.9
CD19 ε-CO (R183K)/ CD20z	不适用	不适用	不适用	91.1	不适用	不适用	92.3	86.3	不适用	不适用	98.5	97.4
CD19 ε-CO (S178N. R183K)/ CD20z	不适用	不适用	不适用	86.3	不适用	不适用	88.8	79.5	不适用	不适用	97.6	95.9

[0591] 在共培养设置的第0天CAR-T产物细胞的转导效率。解冻并静置过夜后,将每个实验组的样品染色以评估它们的恢复百分比和CAR表达。然后通过添加NTD细胞将各组归一化至每24C12表达的最低转导百分比(31%)。这样做是为了确保所有样品在下游测定中具有相同数量的CAR+样品。产物细胞被归一化,并且通过CD20 CAR表达范围为22%至32%(表19)。

表 19: 在共培养设置的第 0 天 CAR-T 产物细胞的 CAR 表达

实验组	%转导 (Kip1+) 总 CAR		%转导 (CDL+) CD19 CAR		%转导 (24C12+) CD20 CAR	
	预归一化/ 静置过夜	后归一化	预归一化/ 静置过夜	后归一化	预归一化/ 静置过夜	后归一化
	NTD	不适用	不适用	不适用	不适用	不适用
CD19z/CD20z	34.5	32.8	34.6	30.4	33.8	32.0
CD19 ε-CO (Δ181-185)/ CD20z	80.6	22.2	76.7	19.5	83.8	24.5
CD19 ε-CO (R183K)/ CD20z	81.4	19.4	75.2	15.7	85.6	22.4
CD19 ε-CO (S178N.R183K)/ CD20z	72.7	24.3	67.4	20.0	76.3	27.3

[0592] 细胞毒性。第1天(表20)和第4天(表21)读出显示了抗原表达细胞系Raji的剂量依赖性细胞毒性,构建体之间没有显著差异。

实验组	E:T 比率						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	-1.8	-2.2	-6.4	-0.7	-5.9	-0.8	5.1
	-2	-3.2	0.9	-2.8	-9.3	-0.6	-1.5
	-3.8	-8.2	-6.3	-5.8	-14.8	-4.9	-7.1
CD19z/CD20z	26.1	11.2	1.8	-0.5	-7.1	-7.5	-5.2
	24.8	6.6	4.1	1.3	-6.6	-6.7	0.3
	21.2	2.4	0.5	-3	-10.4	-9.1	-7.6
CD19 ϵ -CO (Δ 181-185)/ CD20z	22.4	4.8	0.2	2.8	-8.3	-3	-2.4
	26.4	4.7	2.5	-1.5	-9.9	-0.5	-4.4
	20.8	7.8	-5.5	-2.4	-14.3	-11	-10
CD19 ϵ -CO (R183K)/ CD20z	26.2	10.5	5.8	-1.3	-4.9	-7.4	-10.3
	22.4	7.3	1.1	1.8	-3.9	-5.3	-1.8
	18.8	3.1	2.3	-7.7	-12	-12.9	-11.4
CD19 ϵ -CO (S178N. R183K)/ CD20z	30	10.7	4.9	0.4	-7.8	-5	-4.4
	23	11.1	3.3	2.1	-7.1	-0.1	-2
	24.7	3.2	-0.4	-5.2	-9.3	-4.8	-4.3

实验组	E:T 比率						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	38.8	14.1	4.1	-1.3	-7.8	-11	-4.5
	46.3	16.4	6.4	-5.8	-10.9	-8.6	-7.9
	36.8	15.4	3.6	-10.2	-9.4	-12.8	-7

CD19z/CD20z	83.7	35.6	20	5.3	-1.7	-7.8	-4.8
	85.2	29.8	17.1	-1.1	-10.8	-9.6	-2
	90.9	30.8	13.9	3	-11.1	-10.9	-10.8
CD19 ϵ -CO (Δ 181-185)/ CD20z	81.8	41.1	23.5	-0.8	-7.3	-11	-7.9
	84.3	39.7	16.3	-0.4	-13.1	-10	-8
	84.9	37.3	22.1	-0.4	-9.4	-6.4	-9.3
CD19 ϵ -CO (R183K)/ CD20z	76.8	40.1	19.5	1.8	-8.4	-10.3	-7.3
	75.8	32.8	18.8	1.6	-12.9	-10.1	-6.6
	82	40.6	19.4	3.7	-16.4	-13.7	-6.4
CD19 ϵ -CO (S178N. R183K)/ CD20z	82	38.6	22.6	10.7	-7.3	-8	-6.9
	84.1	35.3	19	0.1	-12.2	-8.6	-5.5
	87.5	38.5	20.1	-0.1	-8.5	-6.3	-1.6

[0599] 第1天(表22)和第4天(表23)读出显示了抗原表达细胞系Raji CD19 KO的剂量依赖性细胞毒性,构建体之间没有显著差异。

实验组	E:T 比率						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	-6.3	-10.3	-7.2	-7.6	-12.1	-8.9	-9.4
	4.3	1.2	-1.3	-0.7	-6.9	-5.1	-3
	-0.2	-5.2	-2.4	-4.3	-9.5	-5.3	-3
CD19z/CD20z	22.1	6.4	0	-4.4	-9.4	-9.5	-9
	26.7	9.5	4.3	-1.1	-8.9	-6.5	-7.6
	24.9	6.5	1.4	-4.8	-11.8	-10.1	-5.6
CD19 ϵ -CO (Δ 181-185)/ CD20z	23.4	5.2	-3.1	-7.3	-16.2	-11.8	-6
	27.9	8.6	1	-4.7	-10.1	-9.3	-4.2
	23.7	7.8	1.6	-12.9	-20.1	-10.5	-6
CD19 ϵ -CO (R183K)/ CD20z	22.8	6.6	-3.5	-5.4	-12.4	-7.9	-6.4
	27.4	6.9	2	-7.3	-15.8	-8.6	-8.9
	22.9	7.1	-1	-6.7	-15.8	-12.8	-6.9
CD19 ϵ -CO (S178N, R183K)/ CD20z	27.3	9	1.4	-3.8	-12	-10.2	-9.5
	30.1	12.5	1.6	-3.3	-13.8	-9.5	-5.2
	27.3	9.4	0.2	-4.2	-18.7	-10.1	-8.3

[0600]

[0601]

实验组	E:T 比率						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	34	12	-0.3	-5.5	-9.5	-9.6	-5.9
	36	11.5	0.2	-5.3	-10.8	-8.7	不适用
	34.2	12.4	0.8	-3.5	-10.6	-7.3	-6.2
CD19z/CD20z	79.9	42.9	17.3	-3.9	-8.2	-12.8	-7.3
	81.7	44.2	16.5	-2.1	-9.1	-11.1	-8.1
	80.7	44.6	17.4	-0.9	-11.9	-12.1	-10.3
CD19 ϵ -CO (Δ 181-185)/ CD20z	80.7	47.6	21.1	-1.4	-10.9	-12.3	-7
	79	47.7	19.7	2.3	-12.7	-13.9	-5.5
	82.2	47.6	18.4	-1.3	-12.1	-14.1	-7.1
CD19 ϵ -CO (R183K)/ CD20z	78.9	42.3	17.8	-2.4	-14.7	-12.2	-5.7
	77.9	42.9	16.6	-0.8	-11.6	-12.4	-8.1
	79.3	44.9	15.7	-2.9	-15.4	-9.5	不适用
CD19 ϵ -CO (S178N, R183K)/ CD20z	85.2	52	20.3	0.5	-13.8	-13.1	-9.2
	84.4	50.2	21.2	-0.2	-11.6	-12.2	-8.6
	85	49.2	18.7	-1.2	-12.2	-9.1	-8.1

[0602] 第1天(表24)和第4天(表25)读出显示了抗原表达细胞系Raji CD20 KO的剂量依赖性细胞毒性,构建体之间没有显著差异。

表 24
第 1 天功能表征数据：一式三份的 Raji CD20KO 细胞系的细胞毒性百分比

实验组	E:T 比率						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	4.2	-6.8	-5	-0.7	-5	-4.2	-4.8
	9.9	-1.3	-3.7	-1.6	-5.2	-4.5	4.3
	6.3	-3.3	0.4	-2.8	-5.6	-3.1	-1.7
CD19z/CD20z	64.7	34.4	13.1	2.2	-5.7	-8	-2.4
	66.5	35.9	20.7	6.3	-3.1	-2.3	0.1
	64.4	32.7	16	3.8	-7.6	-3.1	-1.6
CD19 ϵ -CO (Δ 181-185)/ CD20z	61.1	28.6	8.9	-1.3	-9.2	-3.3	0.7
	60.5	28.9	11	3.6	-3.5	-1.8	2.9
	57.9	31.3	14.4	-4.5	-17.8	-5.2	-1
CD19 ϵ -CO (R183K)/	59.7	31.4	14.3	1.9	-8.4	-9.2	-3.1
	61	31.2	14.3	3.4	-5.9	-1.9	1.9

[0603]

[0604]

表 25
第 4 天功能表征数据：一式三份的 Raji CD20 KO 细胞系的细胞毒性百分比

实验组	E:T 比率						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	47.2	14.5	-2.5	-11.5	-15.9	-11.1	-5.3
	48	10.8	0.9	-7.5	-9.3	-6.1	-3.1
	45.1	12.3	-2.4	-9.2	-9.3	-12	5.2
CD19z/CD20z	98.8	89.6	51.9	16.8	-5.9	-4.3	-4.4
	99.5	90	58.1	26.4	0.1	3.9	-2.9
	99.4	92.3	67.4	18.9	-7.5	-4.7	6.4
CD19 ϵ -CO (Δ 181-185)/ CD20z	94.9	82.2	46.7	14.9	-3.4	-8	0.3
	95.3	83.2	49	20.8	3	0.5	0.5
	95.4	89.9	63.3	21.7	-2.8	-5.3	-3.4
CD19 ϵ -CO (R183K)/ CD20z	94.6	80	42.9	7.3	-1	-1.8	1.9
	95.5	83.1	44.1	13.5	-0.9	-3.1	4.9
	96.4	88.4	63	25.1	5.2	-11.8	-8.6
CD19 ϵ -CO (S178N.R183K)/ CD20z	92.3	81.8	49.6	14.5	-6.9	-0.8	5
	91.8	81.4	49.3	20.5	0.2	-1.9	5.5
	93.9	88.9	68.7	14.2	-2.3	-11.7	10.1

[0605] 第 1 天 (表 26) 和第 4 天 (表 27) 读出显示了抗原表达细胞系 Na1m6MHC I/II KO 的剂量依赖性细胞毒性, 构建体之间没有显著差异。

实验组	E:T 比率							
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243	
[0606] NTD	-1.2	-5.2	-8	-6.1	-11.1	-8.3	-9.5	
	4.5	-1.7	-0.4	-4.8	-8.3	-6	-4.4	
	3	-2	-1.9	-2.2	-6	-6.1	-4	
CD19z/CD20z	97.3	82.4	45.3	16.6	-0.8	-4.4	-4.6	
	97.9	81.2	43.6	13.9	-2.9	-5.6	-1.4	
	96.2	79.7	43.8	18.8	-2.4	-5.9	-4.6	
CD19 ϵ -CO	94.2	63.1	30.4	8.7	-7.3	-7.8	-7.2	
[0607] (Δ 181-185)/ CD20z	93.9	65.6	29.1	5.6	-7.5	-11.4	-6.9	
	91.9	61.9	28.5	4.7	-8.2	-5.2	-3.7	
	CD19 ϵ -CO (R183K)/ CD20z	93.2	61.4	24.7	4.4	-7.7	-8.9	-6.2
		93.1	61.2	24.9	5.1	-10.6	-7	-8
	CD19 ϵ -CO (S178N.R183K)/ CD20z	92.4	63	27.6	1.9	-9.5	-9.1	-5.3
		95.4	66.7	29.6	8.2	-7	-8.7	-6.9
		94.7	67.9	30	8.9	-9.7	-5.7	-6
		94.8	66.7	31.4	4.2	-6	-6.4	-6.7

实验组	E:T 比率						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
[0608] NTD	6	-3.3	不适用	-15	0	-18.5	不适用
	4.8	-5.3	不适用	-16.1	-4.6	-15	不适用
	4.8	-2.3	不适用	-15.4	0.9	-19.4	不适用
CD19z/CD20z	100	100	98.4	83.9	47.9	13.8	不适用
	100	100	98.6	84.6	52.3	14.9	不适用
	100	100	98.8	87.9	52.1	20.6	不适用
CD19 ϵ -CO (Δ 181-185)/ CD20z	100	99.3	80.5	20.5	-6.3	-19.1	不适用
	100	99.6	77	20.7	-12	-20.1	不适用
	100	99.8	81.8	16	-3.2	-20.6	不适用
CD19 ϵ -CO (R183K)/ CD20z	100	99.3	75.4	12	-10.6	-16	不适用
	100	98.9	75.8	10.4	-11.5	-17	不适用
	100	99.8	80.5	9.8	-9.6	-18.7	不适用
CD19 ϵ -CO (S178N.R183K)/ CD20z	100	100	86.1	24	-4.6	-17.5	不适用
	100	99.9	82.8	22.9	-6.2	-17.1	不适用
	100	100	90.8	24.8	-10.2	-18.7	不适用

[0609] 第1天(表26)和第4天(表27)读出显示了抗原表达细胞系ST486的剂量依赖性细胞毒性,构建体之间没有显著差异。

实验组	E:T 比率						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	3.6	-5.7	-7.9	-10.3	-12.8	-10.3	7.3
	10.3	0.4	-1.2	-3.2	-7.2	-4.8	-4.7
	0.4	-3.1	-1.5	-0.6	-3.1	-2.7	0.4

CD19z/CD20z	98.3	86.2	45.6	15.4	-7.7	-9.2	-8.2
	98.2	86.3	53.7	18.9	0.8	-5	-4.4
	97.3	85.2	51	21.7	3.4	-1.4	0.1
CD19 ϵ -CO (Δ 181-185)/ CD20z	98.1	87.2	51.6	12.6	-7.4	-9.7	-7.7
	98.5	87.5	53.2	18.1	-7.8	-7.5	-4.2
	98	87.8	49.2	16.7	-0.8	0.5	-1.9
CD19 ϵ -CO (R183K)/ CD20z	98.1	86.6	48	11.1	-8.4	-7.8	-5.3
	98.1	86.2	50.3	15.5	-8.1	-5.7	-8
	97.5	83.8	46.8	17.4	-1.4	-3.7	-1.7
CD19 ϵ -CO (S178N.R183K)/ CD20z	98.5	89.2	55.4	15.6	-4.3	-8.2	-7.6
	98.8	90	55.3	19.8	-4.7	-4.4	-4.7
	98.4	89.7	54.7	21.5	-0.6	2.5	-2.5

实验组	E:T 比率						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	59.2	8.5	-8.1	-12.5	0.3	-12.3	30.4
	44.5	4.5	-6.2	-9.5	1.8	-9.7	25.5
	46.5	-3.7	-13.4	-17.9	9.6	-23.9	16.2
CD19z/CD20z	100	99.9	99.2	88.1	53	24.4	22.9
	99.9	100	98.1	83.6	49.6	20.7	17.8
	99.9	99.9	99.6	84.3	46.2	7.8	10.7
CD19 ϵ -CO (Δ 181-185)/ CD20z	99.9	100	98.5	80.5	39	0.9	8.4
	99.9	99.9	99.6	82.5	34.9	7.4	14.7
	99.8	99.9	99.8	80.4	27.6	1.1	1.9
CD19 ϵ -CO (R183K)/ CD20z	100	100	98	76.9	29.4	2.3	8.9
	99.9	99.9	98.4	77.2	35.5	4.6	17
	99.8	99.9	99.3	71.1	27.6	-0.4	1.1
CD19 ϵ -CO (S178N.R183K)/ CD20z	99.9	100	99.4	86.3	45	13	4.6
	99.9	99.9	99.2	85.5	50.3	8.4	14.2
	99.8	99.9	99.9	89.4	39.5	3.9	22.3

[0613] 第1天(表28)和第4天(表29)读出显示了抗原表达细胞系K-562的剂量依赖性细胞毒性,构建体之间没有显著差异。

实验组	E:T 比率						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	-3.9	-9.2	-6.8	-4.5	-8.2	-11.4	-5.7
	5.1	-8.3	1.5	-0.3	0	0.3	0.8
	-1.2	-4.8	-1	-2.3	-6.8	-6.8	-1.6
CD19z/CD20z	-8.1	-6.9	-3.7	-3.5	-12.2	-9.7	-3.7
	-3.4	-7.7	2.5	-3.3	-7	-2.4	2.2
	-1.8	-8.3	-4.9	-4.3	-8.5	-2.3	-2.6
CD19 ϵ -CO (Δ 181-185)/ CD20z	-0.1	-8.2	-2.1	-10.8	-15.2	-9.5	-2.1
	3.5	-10.5	-5.6	-7.8	-14.1	-12.3	-2.6
	6.5	-7.7	-8.9	-12.9	-18.9	-10.2	1.2
CD19 ϵ -CO (R183K)/ CD20z	4.8	-4.9	-1	-11.6	-13.4	-9.2	-3
	5.4	-4.7	-1	-4.2	-15.3	-7.6	2.2
	7.5	-6.6	-11.2	-7.2	-15.9	-11.2	2.6
CD19 ϵ -CO (S178N.R183K)/ CD20z	-1.9	-8.3	-5.5	-10.3	-13	-8.5	-4
	5.3	-6.1	-2	-8.8	-10.6	-9.8	2.4
	6.6	-3.5	-5.9	-13.2	-18.2	-5.9	2.1

[0614]

[0615]

实验组	E:T 比率						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	6.3	-9.7	-14.1	-24.7	-25.6	-25.6	17.5
	2.2	-0.1	-17.4	-19.4	-20.4	-21.4	不适用
	6.4	-3.8	-14.5	-15.6	-23.2	-18.8	-9.5
CD19z/CD20z	-8.1	-6.9	-3.7	-3.5	-12.2	-9.7	-3.7
	-3.4	-7.7	2.5	-3.3	-7	-2.4	2.2
	-1.8	-8.3	-4.9	-4.3	-8.5	-2.3	-2.6
CD19 ϵ -CO (Δ 181-185)/ CD20z	-0.1	-8.2	-2.1	-10.8	-15.2	-9.5	-2.1
	3.5	-10.5	-5.6	-7.8	-14.1	-12.3	-2.6
	6.5	-7.7	-8.9	-12.9	-18.9	-10.2	1.2
CD19 ϵ -CO (R183K)/ CD20z	4.8	-4.9	-1	-11.6	-13.4	-9.2	-3
	5.4	-4.7	-1	-4.2	-15.3	-7.6	2.2
	7.5	-6.6	-11.2	-7.2	-15.9	-11.2	2.6
CD19 ϵ -CO (S178N.R183K)/ CD20z	-1.9	-8.3	-5.5	-10.3	-13	-8.5	-4
	5.3	-6.1	-2	-8.8	-10.6	-9.8	2.4
	6.6	-3.5	-5.9	-13.2	-18.2	-5.9	2.1

[0616] 第 1 天细胞因子产生。从 1:1E:T 比率收集上清液, 并通过 MSD 分析 IFN- γ 、IL-2 和 TNF- α 分泌。分析表明, 当与表达抗原的细胞系 Raji、Raji CD19 KO、Raji CD20 KO、Nalm6 MHC I/II KO 和 ST486 共培养时, 所有构建体 (表 30 和表 31) 分泌细胞因子。CD3 ϵ -CO 突变体构建体在所有细胞系中都分泌相似水平的细胞因子。当与 ST486 细胞系分泌的水平相比时, 与 Raji 和 Nalm6 细胞系的共培养引起更高水平的细胞因子, 然而, 构建体的总体分级模式在所有细胞系中是一致的。另一方面, 当单独培养或与表达抗原的细胞系一起培养时, NTD 对照

组不分泌任何可测量或显著水平的细胞因子。INF γ <1.76pg/mL、IL-2<0.890pg/mL和TNF α <0.690pg/mL的细胞因子测量低于测定法的定量限(<LOQ)。

[0617]

实验组	细胞因子	Raji Avg pg/mL	% CV	Raji CD19 KO Avg pg/mL	% CV	Raji CD20 KO Avg pg/mL	% CV
NTD	IFN- γ	152	10	113.7	14	136.3	3
	IL-2	180.3	17	17.2	18	17.16	27
	TNF- α	6.4	41	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
CD19z/ CD20z	IFN- γ	82649.3	10	43944.5	4	37889.3	11
	IL-2	4497	9	1162.23	7	1867.5	3
	TNF- α	845.8	10	324.8	2	347.4	8
CD19 ϵ -CO (Δ 181-185)/ CD20z	IFN- γ	66484.9	15	42188.2	7	28774.2	24
	IL-2	3146.7	6	1282.2	6	1397.4	16
	TNF- α	32.6	5	56.8	18	9.8	4
CD19 ϵ -CO (R183K)/ CD20z	IFN- γ	61523.6	2	42984.9	3	28355.8	3
	IL-2	3139	8	1503.8	8	1249.9	3
	TNF- α	18.9	3	16.0	5.0	19.2	8
CD19 ϵ -CO (S178N.R183K)/ CD20z	IFN- γ	55819.4	1	43493.9	6	32833.1	20
	IL-2	2184.5	2	1226.3	6	971.3	5
	TNF- α	487.6	6	294.2	1	247.7	1

[0618]

实验组	细胞因子	Nalm6 MHC I/II KO Avg pg/mL	% CV	ST486 Avg pg/mL	% CV	K562 Avg pg/mL	% CV
NTD	IFN- γ	17.7	64	176.7	16	146.7	27
	IL-2	<LOQ	<LOQ	29.58	41	<LOQ	<LOQ
	TNF- α	3.8	14	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
CD19z/CD20z	IFN- γ	62212.8	4	62767.7	4	12.8	12
	IL-2	2962	6	2939.7	6	<LOQ	<LOQ
	TNF- α	679.4	8	627.2	2	<LOQ	<LOQ
CD19 ϵ -CO (Δ 181-185)/ CD20z	IFN- γ	48370.7	6	48368.5	6	177.6	67
	IL-2	1737.9	5	1485.9	10	<LOQ	<LOQ
	TNF- α	56.8	14	12.6	4	<LOQ	<LOQ
CD19 ϵ -CO (R183K)/ CD20z	IFN- γ	48617.6	17	47661.9	6	177.6	67
	IL-2	1387.2	6	1435.6	11	<LOQ	<LOQ
	TNF- α	48.1	16	32.2	10	<LOQ	<LOQ
CD19 ϵ -CO (S178N.R183K)/ CD20z	IFN- γ	42380.4	12	45879.7	3	159.8	64
	IL-2	1360	16	1175.9	5	<LOQ	<LOQ
	TNF- α	353.5	7	329.5	4	<LOQ	<LOQ

[0619] 第4天增殖。Cell TraceTMViolet (CTV) 标记的稀释用于评估增殖。当产物CAR-T细

胞分裂时,染料随着每次分裂而稀释,并且因此,当与第0天细胞相比时,较低的CTV MFI指示增殖。当单独培养或与抗原表达细胞系一起培养时,在NTD对照组中观察到最小的稳态或抗原非依赖性增殖。当针对Raji、Raji CD19 KO、Raji CD20 KO、Nalm6 MHC I/II KO、ST486和K-562细胞系培养时,所有构建体都显示出相当的MFI水平。完整总结可见于表32中。

实验组	Raji	Raji CD19 KO	Raji CD20 KO	Nalm6 MHC I/II KO	ST486	K562	单独 T 细胞
NTD	16924	17079	18037	18326	17914	17752	27568
CD19z/CD20z	12518	12155	11410	11670	10262	20396	31696
CD19 ϵ -CO (Δ 181-185)/CD20z	11910	11384	10193	11005	12433	19049	26396
CD19 ϵ -CO (R183K)/CD20z	11723	10735	10332	11410	12489	17996	23440
CD19 ϵ -CO (S178N.R183K)/CD20z	10425	9722	8689	8289	10472	18578	25045

[0621] 实施例10

[0622] 以下实施例描述了与具有CD3 ζ 信号传导结构域的基准抗CD19对照CAR相比,利用 ϵ -CO(Δ 181-185)、 ϵ -CO(R183K)和 ϵ -CO(S178N.R183K)信号传导结构域的抗CD19 CAR,这显示显著改善的体内肿瘤控制。这些在CD3 ϵ 信号传导域内具有突变的新的第二代CAR构建体也与原始CD3 ϵ -CO构建体进行比较。所有都成功转导并在原代人T细胞中表达。体内研究证明,当与CD3 ζ 基准对照相比时, ϵ -CO和 ϵ -CO突变体构建体的优良肿瘤控制、CAR扩增和持久性,证明利用CD3 ϵ 信号传导结构域的抗CD19 CAR具有增强的体内功效。

[0623] 构建体设计。使用具有序列ATGGCTCTGCCTGTGACCGCTCTGCTGTTGCCCTTGCTTTACTCCTGCACGCCGCAAGACCCGACATCCAAATGACCCAAACCACCTCCTCCCTGAGCGCCTCCCTTGGAGACCGAGTACCATCTCCTGCCGAGCTTCTCAAGACATCTCCAAGTACTTGAATTGGTATCAACAAAAGCCCGACGGAACCGTGAA GCTGCTGATCTACCACACATCCCGGCTGCACTCTGGCGTTCCTCAAGATTCTCCGGCTCTGGAAGCGGAACCGAC TACTCCCTGACCATCTCCAACCTGGAGCAAGAGGACATCGCTACCTACTTCTGCCAACAAGGCAACACCCTGCCTT ACACCTTCGGAGGAGGAACCAAGCTGGAGATCACCGGAAGCACAAGCGGATCTGGCAAGCCTGGAAGCGGAGAGGG AAGACCAAGGGAGAGGTGAAGCTGCAAGAGAGCGGACCTGGATTGGTGGCCCCCTCACAATCCCTGAGCGTTACA TGCCTGTGAGCGCGTGTCCCTTCTGACTACGGCGTTTCTGGATCCGCCAACCTCCAAGAAAGGGACTGGAGT GGCTGGGAGTGATCTGGGAAGCGAGACCACCTACTACAACCTCCGCCCTGAAGAGCCGACTGACCATCATCAAGGA CAACTCCAAGAGCCAAGTGTTCCTGAAGATGAACTCTCTCCAAACCGACGACACCGCTATCTACTACTGCGCTAAG CACTACTACTACGGAGGAAGCTACGCTATGGACTACTGGGACAAGGCACCTCTGTGACCGTCTCCTCTGCCGCCG CTCTGGACAACGAGAAGAGCAACGGAACCATCATCCACGTGAAGGGAAAGCACCTGTGCCCTCTCCTCTGTTCCC TGGACCCTCCAAGCCTTTCTGGGTGCTCGTGGTGGTGGGAGGAGTGCTGGCTTGCTACTCCCTGCTTGTGACCGTG GCTTTCATCATCTTCTGGGTTAGAAGCAAGAGAAGCAGACTGCTGCACAGCGACTACATGAACATGACCCCTAGAA

GGCCCCGACCTACCAGAAAGCACTACCAGCCTTACGCTCCTCCTAGAGACTTCGCTGCTTACAGAAGCAGGGTGAA
GTTCTCAAGAAGCGCTGACGCTCCTGCTTACCAACAAGGCCAAAACCAACTGTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGA
AGAGAGGAATACGACGTCCTGGACAAGAGAAGAGGAAGAGACCCTGAGATGGGAGGAAAGCCAAGAAGAAAGAACC
CTCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTGCAAAGGACAAGATGGCTGAGGCTTACTCCGAGATCGGAATGAAGGGAGA
GAGAAGAAGAGGAAAGGGACACGACGGACTGTACCAAGGCCTGAGCACCCTACCAAGGACACCTACGACGCTCTG
CACATGCAAGCCCTGCCTCCTAGG (SEQ ID NO:91) 的抗CD19第二代嵌合抗原受体 (CAR) (下文中
称为 ζ) 作为亲本模版来工程化和合成子构建体。还制备了在 ϵ -CO信号传导结构域内含有突
变的构建体,并将其称为 ϵ -CO (Δ 181-185)、 ϵ -CO (R183K) 和 ϵ -CO (S178N.R183K)。为了产生
子构建体,起始于亲本模板的核酸3316至3651的CD3 ζ 信号传导蛋白被以下序列取代(参见
图2):

[0624] ϵ -CO (Δ 181-185) :

[0625] AAGAACCGCAAAGCAAAGGCAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCAGGGGGACGACAACGCGGTCA
GAATAAGGAACGCCCGCTCCAGTACCAAATCCAGATTATGAACCAATTCGGAAGGGACAACGCGATCTCTACTCC
GGTCTC (SEQ ID NO:79)

[0626] ϵ -CO (R183K) :

[0627] AAGAACCGCAAAGCAAAGGCAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCAGGGGGACGACAACGCGGTCA
GAATAAGGAACGCCCGCTCCAGTACCAAATCCAGATTATGAACCAATTCGGAAGGGACAACGCGATCTCTACTCC
GGTCTCAATCAGAAGCGAATT (SEQ ID NO:80)

[0628] ϵ -CO (S178N.R183K)

[0629] AAGAACCGCAAAGCAAAGGCAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCAGGGGGACGACAACGCGGTCA
GAATAAGGAACGCCCGCTCCAGTACCAAATCCAGATTATGAACCAATTCGGAAGGGACAACGCGATCTCTACAAC
GGTCTCAATCAGAAGCGAATT (SEQ ID NO:81)。

[0630] CAR T-细胞产物的制造。洗涤来自健康人供体的血液单采术材料,与抗CD8抗体连
接的磁珠一起温育,并使用 **CliniMACS[®]** 细胞分离系统 (Miltenyi Biotech) 按照制造商
的说明书进行处理,以富集CD8⁺T细胞,然后将其冷冻保存。如上所述,使用抗CD4抗体连接
的磁珠洗涤和处理得阴性级分,以富集CD4⁺T细胞,然后将其冷冻保存。将分离的CD4⁺和CD8⁺
+原代人T细胞在补充有2.6% OpTmizer[™]CTS T细胞扩增补充剂、2.5% CTS免疫细胞血清替
代物、1% 青霉素/链霉素/L-谷氨酰胺和305国际单位/mL人白介素 (IL) -2的OpTmizer
CTS[™]T细胞扩增基础培养基(下文中称为完全OpTmizer[™]培养基)中解冻。将T细胞以 $1.0 \times$
 10^6 个细胞/mL的密度重悬于含有 $1.66 \mu\text{g/mL}$ 抗CD28抗体(克隆28.2)的完全OpTmizer[™]培养
基中,然后接种到用 $1.23 \mu\text{g/mL}$ 抗CD3抗体(克隆OKT3)预包被的T-25烧瓶中以诱导T细胞活
化(第0天)。在活化后第1天,用编码亲本抗CD19CAR的LVV或子构建体 ϵ -CO、 ϵ -CO (Δ 181-
185)、 ϵ -CO (R183K) 或 ϵ -CO (S178N.R183K) 以5或10的MOI转导细胞。非转导 (NTD) 样品作为阴
性对照。在第3天用完全OpTmizer[™]培养基洗涤T细胞,将其归一化并再扩增6天(第3至9天)。
在收获时间点(第9天),将细胞冷冻保存以供将来使用。在扩增期间的多个时间点(第3至9
天),使用Vi-CELL进行细胞计数,并且通过添加完全OpTmizer[™]培养基将细胞密度归一化至
 0.5×10^6 个细胞/mL。在这些时间点,在Vi-CELL上记录平均细胞活力、直径和细胞密度。

[0631] 在第6天和第9天通过流式细胞术测量CAR表达。T细胞用一组荧光团缀合抗体染
色,并且通过流式细胞术表征以确定转导效率和CD4⁺/CD8⁺T细胞比率。通过荧光团缀合的

KIP-1实现对CAR表达(抗CD19 CAR)的评估。可固定的细胞活力染料允许对活细胞进行特异性分析。通过在4°C下与适当的抗体混合物一起温育30分钟,随后用染色缓冲液洗涤2次,对细胞进行染色,随后通过在磷酸盐缓冲液中的多聚甲醛中在室温下温育10分钟来固定。所有流式细胞仪数据都在Fortessa-X20仪器上收集,并使用FlowJo软件分析数据。

[0632] 第0天共培养设置。在收获日(制造的第9天)冷冻保存从健康供体血液单采术中获得的T细胞所制造的T细胞产物。随后将T细胞产物解冻并在完全R-10%培养基[补充有10%胎牛血清、青霉素链霉素L-谷氨酰胺和HEPES的RPMI-1640培养基]中静置过夜,然后开始与靶细胞共培养。就在共培养开始前,将每个T细胞样品的等分试样与一组抗体荧光团一起温育,并通过流式细胞术进行分析以评价转导效率。使用KIP-1、定制的抗体评估总转导效率,该抗体结合单链可变片段(scFv)的重链和轻链之间的Whitlow接头。然后用CellTrace™Violet (CTV)试剂标记T细胞,并且随后用R-10%培养基洗涤。将一部分CTV标记的样品固定并储存在4°C下直至第4天,此时通过流式细胞术与第4天共培养样品并行地分析样品以评估CTV信号的初始水平(CTV最大值)。将T细胞产物和表达荧光素酶的靶细胞在R-10%培养基中以不同的效应物与靶标(E:T)比率(范围从3:1到1:243)铺板在一起(共培养的第0天)。将T细胞产物连续稀释3倍,同时每孔的靶细胞数目保持恒定在25,000个细胞。阳性靶细胞包括Raji (CD19+)、Nalm6 (CD19+)、ST486 (CD19+)和Raji CD19 KO (CD19-)或K562 (CD19-)。作为对照,在不存在任何靶细胞(即,单独T细胞)的情况下培养T细胞产物以评估在不存在抗原刺激的情况下T细胞功能的基础水平。将共培养物在37°C下温育1或4天,并如下所述执行功能评估。

[0633] 第1天和第4天细胞毒性。与单独铺板的靶细胞发出的信号相比,T细胞介导的细胞毒性作为共培养孔中靶荧光素酶信号减少的函数进行测量。在共培养开始后的第1天和第4天,将终浓度为0.14mg/mL的D-荧光素底物添加到共培养孔中,并且将板在黑暗中以37°C下温育10分钟。在PerkinElmer EnVision®多模式微板读取器中立即读取发光信号。T细胞介导的细胞毒性计算如下:

[0634] 细胞毒性% = [1 - (感兴趣的样品/单独靶标对照)的荧光素酶信号]*100。

[0635] 第1天细胞因子产生。在共培养开始后的第1天,收集上清液,并根据制造商的说明书使用Meso Scale Discovery V-PLEX Pro inflammatory Panel 1人用试剂盒分析细胞因子水平。具体地,分析来自以1:1E:T比率铺板的T细胞产物与表达抗原的Raji、Nalm6和ST486的共培养物的上清液的由抗原接合介导的干扰素 γ (IFN- γ)、IL-2和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)分泌的水平。并行分析来自在不存在靶细胞(单独T细胞)的情况下或在抗原阴性共培养物(Raji CD19 KO或K562)中培养的T细胞的上清液,以评估在不存在抗原的情况下细胞因子产生的基础水平。将所有样品稀释至检测范围内。

[0636] 第4天增殖。在共培养开始后的第4天,收获以1:1E:T比率与靶细胞铺板的T细胞产物,用一组抗体荧光团染色以鉴定T细胞,并通过流式细胞术进行分析。与单独培养的T细胞产物(单独T细胞)的增殖能力相比,通过流式细胞术分析响应于表达抗原的靶细胞的CTV染料的细胞分裂驱动稀释来确定T细胞产物的增殖能力,这用于评估在没有刺激的情况下稳态增殖的基础水平。通过流式细胞术并行分析在共培养设置当天固定的CTV标记的T细胞(CTV最大值),以评估细胞增殖前的初始CTV信号的强度。

[0637] 连续杀伤。类似于上述共培养设置,在第0天将产物CAR-T细胞针对CAR表达归一

化。在R-10%培养基中以1:1E:T比率将T细胞与表达抗原的Na1m6靶系共培养。每隔3-4天，在新的R-10%培养基中用附加25,000个Na1m6 (CD19+) 靶细胞激发培养物。细胞毒性(与上述细胞毒性类似地评估)和CD3+T细胞计数(在Attune细胞仪上分析)在添加更多靶细胞的每一轮进行测量。对于第9-13轮,在添加Na1m6靶细胞之前将总孔体积分成1/3。

[0638] CAR-T产物细胞的制造。从第0天至第9天跟踪不同实验组中的每个实验组的细胞计数、细胞活力和细胞直径,并总结在表33和表34中。

表 33
转导构建体-供体 1 的九天扩增数据

实验组	细胞计数 (10 ⁶)				活力 (%)				直径 (μM)			
	第 0 天	第 3 天	第 7 天	第 9 天	第 0 天	第 3 天	第 7 天	第 9 天	第 0 天	第 3 天	第 7 天	第 9 天
NTD	4.0	5.1	47.1	106.0	88.1	83	75.8	83.6	8.0	11.4	9.9	10.1
ζ-CO	4.0	4.9	44.2	118.0	88.1	76.6	73.5	81.6	8.0	11.9	10.0	10.1
ε-CO	4.0	5.1	38.0	92.2	88.1	83.5	73.4	81.4	8.0	11.8	10.2	10.2
ε-CO (Δ181-185)	4.0	4.7	39.9	117.0	88.1	72.4	76.0	76.2	8.0	11.9	10.2	10.1
ε-CO (R183K)	4.0	4.6	37.8	92.5	88.1	82.6	71.9	82.7	8.0	12.4	10.1	10.1
ε-CO (S178N. R183K)	4.0	5.0	47.1	120.2	88.1	73.8	76.7	85.2	8.0	11.7	10.2	10.1
ζ 1xx	4.0	5.1	52.0	191.4	88.1	79.3	77.0	87.0	8.0	12.4	10.0	9.9

表 34
转导构建体-供体 2 的九天扩增数据

实验组	细胞计数 (10 ⁶)				活力 (%)				直径 (μM)			
	第 0 天	第 3 天	第 7 天	第 9 天	第 0 天	第 3 天	第 7 天	第 9 天	第 0 天	第 3 天	第 7 天	第 9 天
NTD	6.6	13.7	130.2	540.4	78.6	79.5	91.2	96.6	9.3	11.0	9.7	10.1
ε-CO	3.3	5.8	37.1	136.0	78.6	77.5	82.5	91.9	9.3	11.0	9.9	10.1
ε-CO (Δ181-185)	3.3	4.6	41.6	132.0	78.6	75.5	88.1	93.5	9.3	11.6	9.7	10.0
ε-CO (R183K)	3.3	5.3	35.4	122.0	78.6	76.8	83.5	92.1	9.3	11.1	9.9	9.8
ε-CO (S178N. R183K)	3.3	5.6	44.0	158.2	78.6	75.8	89.4	93.6	9.3	10.6	9.8	10.1
ζ 1xx	3.3	5.4	45.7	180.7	78.6	82.2	89.0	93.0	9.3	11.7	9.5	9.9

[0641] CAR-T产物细胞的转导效率。在制造的第6天或第7天和第9天经由KIP-1染色和随后的流式细胞术分析测量CAR表达(表35)。实验组显示供体1在第7天的相当的CAR表达在83%至95%的范围内,并且供体2在第6天的相当的CAR表达在82%至96%的范围内。两个供体的CAR表达在第9天保持相对稳定。

实验组	%转导 (Kip1+) -供体 1				%转导 (Kip1+) -供体 2			
	第 0 天	第 3 天	第 7 天	第 9 天	第 0 天	第 3 天	第 6 天	第 9 天
NTD	不适用	不适用	不适用	不适用	不适用	不适用	不适用	不适用
ζ-CO	不适用	不适用	96.5	93.1	不适用	不适用	不适用	不适用
ε-CO	不适用	不适用	98.0	94.9	不适用	不适用	94.9	88.1
ε-CO (Δ181-185)	不适用	不适用	96.3	89.6	不适用	不适用	93.2	82.2
ε-CO (R183K)	不适用	不适用	98.3	95.2	不适用	不适用	95.1	88.0
ε-CO (S178N. R183K)	不适用	不适用	97.1	89.7	不适用	不适用	95.5	84.6
ζ 1xx	不适用	不适用	91.4	83.2	不适用	不适用	82.8	84.1

[0643] 在共培养设置的第0天CAR-T产物细胞的转导效率。解冻并静置过夜后,将每个实验组的样品染色以评估它们的恢复百分比和CAR表达。然后通过添加NTD细胞将各组归一化至最低转导百分比(对于供体1为75%,并且对于供体2为74%)。这样做是为了确保所有样品在下游测定中具有相同数量的CAR+样品。产物细胞被成功地归一化,并且对于供体1的范围为68%至73%,而对于供体2的范围为73%至78%(表36)。

实验组	%转导 (Kip1+) -供体 1		%转导 (Kip1+) -供体 2	
	预归一化/静置过夜	后归一化	预归一化/静置过夜	后归一化
NTD	不适用	不适用	不适用	不适用
ζ-CO	90	72	不适用	不适用
ε-CO	92	68	85	77
ε-CO (Δ181-185)	83	72	72	78
ε-CO (R183K)	92	70	84	78
ε-CO	83	73	79	78
(S178N. R183K)				
ζ 1xx	75	69	79	73

[0646] 细胞毒性。来自供体1的第1天(表37)和第4天(表38)读出显示了抗原表达细胞系Na1m6的剂量依赖性细胞毒性,构建体之间没有显著差异。

[0647]

实验组	E:T 比率						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	16.1	12.3	11.9	14.1	4.3	5.9	7.1
	4.8	5.6	0.9	-10.6	-17.3	-12.2	-3.5
	3.9	-0.1	1.6	-7.3	-13.1	-9.5	0.2
ζ -CO	99.9	98.8	82.8	56.2	25.3	17.1	8.9
	100	98.4	80.6	50.4	14.6	-4.8	0.8
	99.8	96.7	74.2	44.5	10.8	-3	2.3
ϵ -CO	99.9	97.9	80.9	51.8	21.7	17.5	10.8
	99.9	97.8	79.2	42.8	9.6	-10	0.9
	99.9	96	72.7	36.3	3.1	-5.9	4.7
ϵ -CO (Δ 181-185)	99.9	98.1	80.9	48.3	17.3	13.5	2.3
	99.9	96.9	77.4	36.3	4.4	-11.7	-4.6
	99.9	95.2	71.7	28.6	-3.2	-12	0.1
ϵ -CO (R183K)	99.9	97.6	80.2	45.7	19.4	11.9	1.3
	99.9	97	79.1	43.1	8.9	-7.7	-4.5
	99.6	95.2	72.3	35.3	-3.1	-8	-3.2
ϵ -CO (S178N, R183K)	99.9	99.3	87.2	55.4	16.8	4.2	-0.6
	99.9	99.1	84.1	48.8	12.5	-3.3	-5.5
	99.8	97.9	80.2	42.8	9.9	-5.8	0.1
ζ 1xx	99.9	99.4	89	61.9	26.1	13.8	7.7
	100	99.2	86.4	55.6	16.9	-4.4	5.9
	99.8	97.5	81.6	44.5	12.5	-9.6	2.1

[0648]

实验组	E:T 比率						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	15.2	0.8	-9.6	-10.7	-9.6	-11.1	0.6

[0649]		12.9	-2.6	-12.8	-13.2	-18.3	-14	-6.2
		11	0.3	-9.7	-12.6	-12.5	-11.7	-2.5
	ζ-CO	100	100	98.4	83.9	47.9	13.8	7.1
		100	100	98.6	84.6	52.3	14.9	9.4
		100	100	98.8	87.9	52.1	20.6	10.2
	ε-CO	100	100	97.8	83.4	41.8	12.5	9.3
		100	100	98.3	81.2	44.8	7.8	5.3
		100	100	98.6	86.7	47	6.7	10.2
	ε-CO (Δ181-185)	100	100	98.9	83.6	41.7	9.2	8.8
		100	100	98.6	85	41.2	11.6	1.2
		100	100	99.5	90	48.4	15	4.8
	ε-CO (R183K)	100	100	98	81	45.6	18.1	4.4
		100	100	97.8	82.9	44.6	12.7	2.9
		100	100	98.9	84.6	45.5	14.7	2.9
	ε-CO (S178N. R183K)	100	100	99.3	88	55.9	16.8	8.7
		100	100	99.6	89.9	56	15	4.7
		100	100	99.8	92.8	65.4	17.9	6.6
	ζ 1xx	100	100	99.4	90.5	56.4	18.5	6.7
		100	100	99.4	90.3	61.5	20.5	15
		100	100	99.5	91.8	65.8	26.7	15.4

[0650] 来自供体1的第1天(表39)和第4天(表40)读出显示了抗原表达细胞系Raji的剂量依赖性细胞毒性,构建体之间没有显著差异。

实验组	E:T 比率						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	8.9	-2.3	-10.2	-10	-13.6	-23.6	-19.7
	15.9	7.2	-1	-15.6	-8.8	-32.8	-1.3
	8.1	2.1	-0.1	-26.4	-32.8	-34.7	2.2
ζ-CO	85.6	58.5	19.7	-10.7	-16.1	-29.6	1.2
	86.2	59.2	29.7	-11.8	-19.9	-28.7	8.2
	83.5	51.6	18	-20.2	-27.9	-39.7	-5.8
ε-CO	80	50.4	17.3	-16.7	-20.5	-21.6	6.3
	78.8	50.4	20.6	-22.1	-23	-30.8	3.5
	76.8	44.6	19.7	-18.5	-36.4	-36.8	-7.7
ε-CO (Δ181-185)	80	48.6	21.4	-4.9	-19.6	-30.9	-20.1
	81.2	48.9	22.5	-23.1	-19.3	-33.1	1.2

[0652]		80	41.2	17.7	-30.4	-31.9	-36.7	-6.6
	ε-CO (R183K)	78.3	45.9	21.1	-13.2	-21.6	-25.8	-10.1
		78	45.3	27.4	-11.3	-21.1	-24.6	7.3
		80	40.2	13.4	-28.5	-39	-37.8	1
	ε-CO (S178N. R183K)	87.4	57.6	27.1	-5.9	-19.8	-18.1	-4.1
		87.2	57.6	26.6	-13.4	-25.7	-25.4	3.6
		87.1	50.7	25.9	-32	-19.9	-25.3	1.3
	ζ 1xx	92.1	65.3	19.3	-4.6	-17.4	-19.1	-7.2
		93	67.5	37.6	-9.5	-13.5	-20.8	-5.7
		91.9	59.1	32	-19.6	-32.3	-34.1	3.9

表 40
来自供体 1 的第 4 天功能表征数据：一式三份的 Raji 细胞系的细胞毒性百分比

实验组	E:T 比率						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	42.6	21.1	7.8	2.9	-3.2	-4.3	-5.1
	35.6	16.5	8.3	3	-3.9	-3.9	-2.9
	36.6	16.5	4	-2.9	-7.9	-7.1	-2.5
ζ-CO	99.8	92.3	19.4	0.6	0.4	-3.7	-2.9
	99.8	93.9	14.1	-3.6	-4.7	-8.2	-1.5
	99.5	92.3	18.9	-0.3	-3.4	-9.3	-6.7
ε-CO	99.7	74	6.5	2.2	-4.5	-3.7	-5.3
	99.6	73.7	9.7	-6.7	-7.2	-4.5	-5.5
	99.7	76	12.4	0.1	-4.7	-6.8	-1
ε-CO (Δ181-185)	99.3	70.3	4.4	1.6	-4.2	-1.6	-3.8
	99.2	62.9	3.6	-1.8	-4.1	-4.7	-9.3
	99.3	65.3	5.4	3	-3.9	-7.2	-2
ε-CO (R183K)	99.8	76.5	11.6	3.1	-3.6	-8.1	-3.6
	99.8	73.1	5.1	0.6	2.9	3.1	-3
	99.8	81	7.8	0.7	-3.2	-9	0
ε-CO (S178N. R183K)	99.7	91.1	12	0	-3.5	-9.9	4.7
	99.8	90.4	8.5	1.4	-2.1	-1	-6.8
	99.7	88.6	13.8	2.1	-1.2	-6.8	-6.9
ζ 1xx	99.7	95.9	24.7	-3.6	0	-7.2	-3.1
	99.7	94.6	20.3	-1.4	-2.7	-8.4	-6.8
	99.7	95.6	24.4	-2.1	-5.6	-8.2	-9

[0654] 来自供体1的第1天(表41)和第4天(表42)读出显示了抗原表达细胞系ST486的剂量依赖性细胞毒性,构建体之间没有显著差异。

[0655]

实验组	E:T 比率						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	12.4	0.8	-11.6	-16.5	-19.9	-19.6	-10.7
	18	4	-6.6	-14	-22.3	-19.1	-5.1
	8.5	1.8	-2.7	-11.1	-11.7	-6.8	-5.8
ζ-CO	99.6	98.7	85.2	47.8	6.7	-14.8	-3.1
	99.7	98.5	84.2	47.7	6.9	-15.5	-2
	99.6	98.8	88.4	49.8	17	-3.2	-2.4
ε-CO	99.7	96.3	82	31.9	-0.3	-14.8	-5.1
	99.7	98.1	83.4	36.3	3	-15	-1.9
	99.6	95	83.2	48.4	10.8	-1.9	-4.1
ε-CO (Δ181-185)	99.4	98.1	80	32.5	-0.4	-15	-6.1
	99.3	95.5	78.1	39.8	0.1	-14.2	-6.7
	99.4	98.1	85.7	42.3	8.1	-8.7	-2.6
ε-CO (R183K)	99.4	95.2	79.5	37	-2.9	-13	-6.1
	99.4	96.9	80.4	31.1	-2.5	-13.5	-2.9
	99.6	95.9	83.4	47	11	-2.9	-3.4
ε-CO (S178N. R183K)	99.6	98.9	87.7	49.9	8.2	-9.3	-5
	99.6	97	86.8	48.1	8	-5.6	-1
	99.6	99.1	90.3	54.8	19.7	2.2	1.2
ζ 1xx	99.7	99.2	90.1	53.7	12.1	-12.3	-7.5
	99.7	98.9	91.6	55.9	6.1	-6	-2.6
	99.6	98.1	91.4	61.5	17.8	-3.5	-2.9

[0656]

实验组	E:T 比率						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	66.1	-1.8	-21.9	-25.9	-31.6	-28.9	-6.5
	68.6	0.5	-12.3	-18.1	-23.8	-18.3	-5.8
	63.5	0.3	-13.1	-22.5	-29.3	-17.3	-7.3
ζ-CO	100	99.9	99.9	94.8	64.2	30	22.4
	100	99.8	99.9	93.4	65.3	39.5	19.7
	99.9	99.9	99.9	93.7	68.8	31	21
ε-CO	99.9	100	100	92.6	55.3	16.4	14.9
	100	100	99.9	88	61.1	28	15.1
	99.9	100	99.9	92.6	58.8	23.1	17.4

[0657]

ε-CO (Δ181-185)	100	99.9	100	93.8	63.3	29.2	6.4
	99.9	100	99.9	91.1	62.5	34.2	4.3
	99.9	100	100	94.4	62.7	23.3	1
ε-CO (R183K)	100	99.9	100	92.8	56.3	18.9	1.4
	100	99.8	99.7	89.1	58.1	29.5	12.4
	99.9	99.9	100	90.9	60.5	23.7	11.8
ε-CO (S178N. R183K)	100	100	99.9	97.2	71.2	29.4	14.6
	99.9	99.9	99.9	96.1	67.9	41.2	23.5
	99.9	99.9	99.9	97.6	75.2	40.2	7.4
ζ 1xx	100	100	99.9	98.5	69.3	30.8	9.8
	99.9	99.9	99.9	98.1	74.8	31.8	12.6
	99.9	99.9	100	95.9	67.7	37.8	12.2

[0658] 来自供体2的第1天(表43)和第4天(表44)读出显示了抗原表达细胞系Nalm6的剂量依赖性细胞毒性,构建体之间没有显著差异。

[0659]

表 43
来自供体 2 的第 1 天功能表征数据: 一式三份的 Nalm6 细胞系的细胞毒性百分比

实验组	E:T 比率						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	-4.3	3.4	-6	-4.7	-6.1	-6.2	-5.5
	2.2	4.5	-2.2	-3.4	-3.8	-4	-5.8
	1.8	7.5	2.4	-2.5	-3.5	-5.6	-6.6
ε-CO	97.1	86	55	20.4	4.1	-3.6	-3.4
	98.4	87.2	54.6	18.1	3.6	-3.8	-3.2
	99.2	91.7	55.3	20.5	2.8	-4	-4.1
ε-CO (Δ181-185)	94.5	82.5	50.9	17	0.8	-2.1	-3.9
	98.1	83.2	50.9	20.1	0.6	-2.4	-2.5
	99.4	88.7	48.8	16.6	-0.6	-4.8	-4
ε-CO (R183K)	97.8	86	55.3	22.8	5.8	1.5	-6.3
	98.2	87.2	55.4	20.1	7.4	-1.5	-7
	99.6	90.5	56.4	19.2	4.3	-1.3	-4.2
ε-CO (S178N. R183K)	96.5	86.7	54.3	22	4.4	-1.1	-2.4
	98.2	87.9	53.2	21	1.5	-1.1	-5.3
	99.7	92.4	56	17	3.3	-3.7	-5.5
ζ 1xx	96.2	85	58.4	23.5	3.6	-0.5	-3.1
	96.9	84.9	55.7	24.7	5.5	-0.7	-5.3
	99.4	91.3	61.1	21.4	5.1	-3	-2.6

[0660]

实验组	E:T 比率						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	23.4	-3	-6.1	-5.2	-4.4	-4	14.2
	26.2	0.9	-17.6	-13	-9.6	-11	13
	25	6	-14	-14.2	-7	-6.1	12.9
ϵ -CO	100	99.5	93.5	69.2	29.5	3.7	14
	100	99.8	96.7	67.2	28	-1.6	12
	100	100	99.1	78.5	18.4	-2.6	14.9
ϵ -CO (Δ 181-185)	100	100	95.8	67	24.5	0	13.2
	100	99.9	96.1	73.9	25	-6	12.5
	100	100	99.4	77.4	22	-3.8	17.3
ϵ -CO(R183K)	100	99.7	94.4	73.7	31.8	2.1	12.4
	100	100	94.5	69.2	27.3	1.2	16.6
	100	100	99	78.4	24.4	-7.4	16
ϵ -CO (S178N, R183K)	100	100	94.5	72.1	29.7	4	11
	100	100	96.2	75.3	24.5	-2	11.2
	100	100	99.5	82.5	30.7	-2.4	13.5
ζ 1xx	100	99.8	95.1	71.3	30.6	6.4	11.7
	100	99.8	95.7	71.5	31.3	1	15.5
	100	100	99.1	81.3	29.7	8.1	18

[0661] 来自供体2的第1天(表45)和第4天(表46)读出显示了抗原表达细胞系Raji的剂量依赖性细胞毒性,构建体之间没有显著差异。

[0662]

实验组	E:T 比率						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	-7	2	-6.7	-1.5	-6.2	-9.2	-10.9
	-2.7	2	0.6	-4.7	-5.3	-5.6	-2.7
	-3.8	0.6	-2.1	-3.4	-4.7	-4	-3.1
ϵ -CO	62.7	37.6	13.6	1.8	-2.2	-4.1	-3.4
	64.2	33.8	13	2.6	-3.2	-5.5	-3.1
	67.6	35.3	12.1	-1.3	-5.2	-4.6	-2.3
ϵ -CO (Δ 181-185)	54.7	32.1	11.4	-0.1	-3.1	-4.7	-5.2
	57.2	28.8	11.9	-0.2	-3.8	-6.3	-2.6
	60.3	31	9.4	1.3	-5.4	-2.9	-2.8

[0663]	ε-CO (R183K)	64	38	9.6	1.9	-6.2	-5.7	-4.1
		64.4	35.8	15.5	1.3	-3.5	-6.2	-2.5
		68.8	39	11.1	2.3	-4.6	-4.6	-4.2
	ε-CO (S178N. R183K)	60.2	32.9	10.1	4.3	-3.2	-5.3	-2.8
		62.1	33.1	14.7	2.1	-2.1	-6.2	-1.5
		63.8	36.4	13.6	2.2	-4	-3.8	-2.8
	ζ 1xx	62.2	37.6	8.9	0.8	-4.7	-6.8	-6.6
		64.8	36.1	8.3	-0.8	-6	-6.1	-4.8
		67.6	35.9	9.7	-1	-6.6	-6.6	-4.2

表 46 来自供体 2 的第 4 天功能表征数据: 一式三份的 Raji 细胞系的细胞毒性百分比							
实验组	E:T 比率						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	16.6	14.7	-5.4	-3.1	-5.5	-6.6	13.1
	10.2	6.6	-15.2	-11.5	-14	-13.1	9.8
	3.9	6.2	-22.6	-21.8	-16.5	-20	8.8
ε-CO	100	98.4	51.8	16.7	5.7	1.6	20.7
	100	98.9	64.7	25.1	0.6	-4	16.9
	100	98.5	67.8	23.9	1.3	-10.9	16.2
ε-CO (Δ181-185)	99.8	93	41.9	12.4	2.3	1.9	16.9
	99.7	94.2	46.5	12.2	-2.4	-6	14.1
	99.5	94	53.9	11.9	-8.7	-11.4	14.5
ε-CO (R183K)	100	98.1	52	19.3	4	-0.6	22
	100	98.6	58.4	16.5	3.8	-4.5	18.7
	100	98.1	65.6	20.3	-1.3	-9.1	18.7
ε-CO (S178N. R183K)	99.9	96.3	51	19.6	5.8	0.9	20.1
	99.9	97.5	63.9	20.9	1	-4	15.9
	99.9	96.6	63.5	20.9	-0.2	-12.1	14.7
ζ 1xx	100	95.2	43.6	18.1	4.4	3.2	18.9
	99.9	96.8	55.6	16.6	-1.7	-6.3	16.3
	99.9	97.6	62.2	11.6	-0.6	-9.1	12.9

[0665] 来自供体2的第1天(表47)和第4天(表48)读出显示了抗原表达细胞系ST486的剂量依赖性细胞毒性,构建体之间没有显著差异。

[0666]

实验组	E:T 比率						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	9.1	5.5	-3.4	-2.9	-3.9	-5.1	-1.8
	8	7.8	-2.3	-1.9	-1.6	-1.3	-1.8
	3.9	6	0.3	-1.8	-5	-4	-6.9
ε-CO	95.8	83.2	52.4	17.8	4.1	-6.1	0.2
	96.1	83.5	48.3	17.9	1.9	-0.6	-1.8
	96.4	83	48.6	15.8	-4.3	-7.2	-1.2
ε-CO (Δ181-185)	94.6	81.1	43.9	16	3.3	2.1	-3.9
	95.6	80.6	41.6	12.6	0.9	-3.8	-2.2
	95.8	81.4	43.1	11.3	-1.9	-3.1	-4.7
ε-CO (R183K)	94.2	81.7	49.7	18.7	4.3	2.2	-3.9
	96.1	84.4	48.3	19.3	4.8	-1.4	-2.5
	95.5	81.2	49.2	17.3	-1.9	-3.3	-0.9
ε-CO (S178N, R183K)	95.1	81.6	47	20.6	1.8	-4.8	-2.4
	95.7	81.6	49.1	16.7	4.7	1	1.9
	96.1	80.2	45.7	14.9	0.7	-3.3	0.7
ζ 1xx	94.7	79.3	51.8	20.9	2.1	-4.9	-5
	95.6	82.8	50.7	20	4.1	-2.3	-0.8
	95.5	83	49.2	16.4	0.6	-4.2	-6.4

[0667]

实验组	E:T 比率						
	3:1	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
NTD	60	10.6	-10.7	-15.7	-13.8	-12.4	0.3
	81.7	5.9	-21.7	-23.8	-27.8	-25.5	-13.6
	98.5	3.5	-13.6	-22.6	-28	-22.1	-15.7
ε-CO	100	99.9	97.7	81.4	44.9	6	5.2
	100	99.9	98.4	78.2	38.5	-0.3	-4.9
	100	99.9	99.2	82.5	28.7	-3.9	-2.1
ε-CO (Δ181-185)	100	100	98.6	81.2	27.5	1.4	9.9
	100	99.9	98.4	70.8	18.3	-7.3	0
	100	99.9	99.3	79.5	14.8	-9.9	0.9
ε-CO (R183K)	99.9	99.9	98.6	80.9	37.9	3.2	6.6
	100	99.9	98	73.2	18	0.4	3.4
	100	100	99.4	78.4	19.1	-7.9	4.4

[0668]

ε-CO (S178N, R183K)	99.9	99.9	98.2	80.6	35.2	5	8.7
	99.9	99.8	98.5	79.4	36.4	0.4	4
	100	99.9	99.3	85.3	20.8	-3.8	0.9
ζ 1xx	99.9	99.9	97.2	77	36.2	11.2	7.5
	100	99.9	97.7	73.3	33.7	8.5	-7.2
	100	99.9	98.9	79.9	30	-10.7	-1.8

[0669] 第1天细胞因子产生。从1:1E:T比率收集上清液,并通过MSD分析IFN- γ 、IL-2和TNF- α 分泌。分析显示,当与表达抗原的细胞系Raji、Nalm6和ST486共培养时,来自供体1(表49)和供体2(表50)的所有构建体分泌细胞因子。 ϵ -CO构建体在所有细胞系中都分泌相似水平的细胞因子。当与ST486细胞系分泌的水平相比时,与Raji和Nalm6细胞系的共培养引起更高水平的细胞因子,然而,构建体的总体分级模式在所有细胞系中是一致的。另一方面,当单独培养或与表达抗原的细胞系一起培养时,NTD对照组不分泌任何可测量或显著水平的细胞因子。INF γ <1.76pg/mL、IL-2<0.890pg/mL和TNF α <0.690pg/mL的细胞因子测量低于测定法的定量限 (<LOQ)。

[0670]

表 49
来自供体 1 的第 1 天功能表征数据:
通过 MSD 对 Nalm6、Raji 和 ST486 细胞系中的 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 的细胞因子分析

实验组	细胞因子	Nalm6 Avg pg/mL	% CV	Raji Avg pg/mL	% CV	ST486 Avg pg/mL	% CV	单独 T 细胞 Avg pg/mL	% CV
NTD	IFN- γ	80.34	47.31	107.1	34.0	48.8	74.4	9.5	0
	TNF- α	7.455	89.23	4.6	17.0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	IL-2	<LOQ	<LOQ	25.8	10.7	7.6	0.0	<LOQ	<LOQ
ζ -CO	IFN- γ	59492	9.795	87703.0	6.4	21184.0	4.4	40.8	28.2
	TNF- α	787.7	2.009	886.7	4.6	159.4	6.6	<LOQ	<LOQ
	IL-2	2537	2.639	3946.0	5.8	355.9	2.9	<LOQ	<LOQ
ϵ -CO	IFN- γ	46010	15.13	77696.0	14.0	14368.0	11.2	<LOQ	<LOQ
	TNF- α	491	3.374	609.1	5.7	102.0	6.8	<LOQ	<LOQ
	IL-2	1369	4.467	2492.0	5.4	176.7	14.1	<LOQ	<LOQ
ϵ -CO (Δ 181-185)	IFN- γ	39789	19.61	42344.0	1.6	9089.0	4.2	<LOQ	<LOQ
	TNF- α	457.5	0.9958	439.8	6.0	67.5	5.0	<LOQ	<LOQ
	IL-2	1233	3.23	1576.0	1.2	142.1	2.7	<LOQ	<LOQ

[0671]

ϵ -CO (R183K)	IFN- γ	47032	10.03	65030.0	12.5	13994.0	7.2	<LOQ	<LOQ
	TNF- α	514.3	6.333	608.6	3.5	94.4	7.0	<LOQ	<LOQ
	IL-2	1458	1.115	2253.0	5.5	130.4	10.1	<LOQ	<LOQ
ϵ -CO (S178N. R183K)	IFN- γ	40935	1.924	61333.0	6.1	627.1	14.2	<LOQ	<LOQ
	TNF- α	384	2.205	461.5	6.3	63.2	6.3	<LOQ	<LOQ
	IL-2	864.7	1.906	1729.0	4.8	101.1	9.6	<LOQ	<LOQ
ζ 1xx	IFN- γ	47208	8.041	87703.0	12.9	6814.0	11.8	<LOQ	<LOQ
	TNF- α	671	2.794	886.7	4.5	70.8	4.7	<LOQ	<LOQ
	IL-2	974.2	6.685	3946.0	5.5	44.2	8.1	<LOQ	<LOQ

表 50
来自供体 2 的第 1 天功能表征数据:
通过 MSD 对 Nalm6、Raji 和 ST486 细胞系中的 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 的细胞因子分析

实验组	细胞因子	Nalm6 Avg pg/mL	% CV	Raji Avg pg/mL	% CV	ST486 Avg pg/mL	% CV	单独 T 细胞 Avg pg/mL	% CV
NTD	IFN- γ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	TNF- α	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	IL-2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
ϵ -CO	IFN- γ	22590	6.817	25597	13.68	7747	8.423	<LOQ	<LOQ
	TNF- α	337	8.108	364.9	4.323	149	4.631	<LOQ	<LOQ
	IL-2	561.2	3.67	890.4	7.355	162.8	6.672	<LOQ	<LOQ
ϵ -CO (Δ 181-185)	IFN- γ	21800	25.5	20054	17.09	7024	24.7	<LOQ	<LOQ
	TNF- α	334.4	8.974	304.8	2.257	114.8	7.499	<LOQ	<LOQ
	IL-2	738.4	3.888	863	8.073	177.6	13.02	<LOQ	<LOQ
ϵ -CO (R183K)	IFN- γ	20059	15.68	25805	9.312	7617	2.417	<LOQ	<LOQ
	TNF- α	271.2	6.115	310.6	4.641	109.2	3.469	<LOQ	<LOQ
	IL-2	406.1	6.488	703.8	9.69	107.8	6.429	<LOQ	<LOQ
ϵ -CO (S178N.R183K)	IFN- γ	21088	7.545	23819	3.331	6920	4.379	<LOQ	<LOQ
	TNF- α	288.3	5.261	319.1	1.502	110.2	2.425	<LOQ	<LOQ
	IL-2	644.9	4.876	932.1	4.962	202.9	6.91	<LOQ	<LOQ
ζ 1xx	IFN- γ	38985	8.731	54426	21.61	13036	17.44	<LOQ	<LOQ
	TNF- α	649.6	6.788	649.1	6.535	195.2	6.075	<LOQ	<LOQ
	IL-2	1054	6.141	1589	6.852	225.1	4.065	<LOQ	<LOQ

[0672]

[0673] 第4天增殖。Cell Trace Violet (CTV) 标记的稀释用于评估增殖。当产物CAR-T细胞分裂时,染料随着每次分裂而稀释,并且因此,当与第0天细胞相比时,较低的CTV MFI指示增殖。当单独培养或与抗原表达细胞系一起培养时,在NTD对照组中观察到最小的稳态或抗原非依赖性增殖。当针对Raji、Nalm6和ST486细胞系培养时,所有构建体显相当的MFI水平。

[0674] 供体1的完整总结可见于表51,并且供体2的完整总结可见于表52。

表 51
第 4 天功能表征数据: 通过 Cell Trace Violet (CTV) 染色对 Raji、Nalm6 和 ST486 细胞系的增殖分析。报告的值是 CTV 分布曲线的中值。

实验组	Raji	Nalm6	ST486	单独 T 细胞
NTD	12156	14618	14754	19120
ζ CO	3926	3305	2373	19256
ϵ -CO	4924	4594	2629	18502
ϵ -CO (Δ 181-185)	4462	4193	2849	18502
ϵ -CO (R183K)	4841	4444	2788	19165
ϵ -CO (S178N.R183K)	4308	3561	3126	18589
ζ 1xx	4272	4614	4041	19576

[0675]

[0676]

实验组	Raji	Nalm6	ST486	单独 T 细胞
NTD	18282	18552	17666	20460
ϵ -CO	2778	2797	2250	19868
ϵ -CO (Δ 181-185)	2766	2875	2235	20968
ϵ -CO (R183K)	2902	2935	2370	20814
ϵ -CO (S178N.R183K)	2548	2577	2176	21226
ζ 1xx	3101	4415	2595	25142

[0677] 连续杀伤。将产物 CAR-T 细胞针对 CAR 表达归一化，并与表达抗原的 Nalm6 靶系以 1:1E:T 比率共培养。每隔 3-4 天，用更多的 Nalm6 靶细胞激发培养物。细胞毒性 (表 53) 和 CD3+T 细胞计数 (表 54) 在添加更多靶细胞的每一轮进行测量。在 14 轮后，构建体之间没有显著差异。

[0678]

表 53
连续杀伤数据：一式六份的 Nalm6 细胞系的细胞毒性百分比

实验组	轮次													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
NTD	13.9	0	25.6	0	14.1	0	19.8	0	3.3	0	0	0	0	0
	12	0	20.3	0	4.3	0	15.4	0	0	0	0	0	0	0
	7.1	0	23.4	0	1.4	0	12.8	0	0	0	0	0	0.2	0
	8.5	0	20	0	0.5	0	11.4	0	5	0	13.2	0	3.6	0
	5.8	0	17.8	0	5.3	0	10.6	0	不适用	不适用	不适用	不适用	不适用	不适用
ζ-CO	9.2	0	18.5	0	7.2	0	14.4	0	2.2	0	26.4	0	6.3	0
	100	100	100	100	100	100	100.1	100.1	99.6	97.2	14.2	0	3.6	0
	100	100	100	100	100	100	100.1	100.1	100	99.9	77.5	0	0	0
	100	100	100	100	100	100	100.1	100.1	100	98.1	44.1	0	0	0
	100	100	100	100	100	100	100.1	100.1	99.8	98.7	17.4	0	3	0
	100	100	100	100	100	100	100.1	100.1	100.1	92.5	0	0	10.3	0
	100	100	100	100	100	100	100.1	100.1	100	99.9	99.5	45.1	0	0
	100	100	100	100	100	100	100.1	100.1	99.2	92.9	0	0	2.1	0
	100	100	100	100	100	100	100.1	100.1	99.6	91	0	0	0	0
	100	100	100	100	100	100	100.1	100.1	99.9	92	0	0	1.1	0
ε-CO	100	100	100	100	100	100	100.1	100.1	100	91.9	0	0	11.2	0
	100	100	100	100	100	100	100.1	100.1	100	93.8	0	0	15.1	0
	100	100	100	99.8	100	99.9	100.1	100.1	97.1	75.2	0	0	11.9	0
	100	100	100	100	100	100	100.1	100.1	98.6	94.9	0	0	3.6	0
	100	100	100	100	100	100	100.1	100.1	99.9	99.8	97.8	19.5	0	0
ε-CO (Δ181-185)	100	100	100	100	100	100	100.1	100.1	99.5	93.7	0	0	0	0
	100	99.9	100	100	100	100	100.1	100.1	99.9	98.1	0	0	1.7	0

[0679]

	100	100	100	100	100	100	100.1	100.1	100.1	99.1	95	0	0	0	3.3	0
	100	100	100	100	100	100	100.1	100.1	100.1	99.8	95.7	0	0	0	6.1	0
	100	99.9	100	99.9	99.9	100	100.1	100.1	100.1	99	86.1	0	0	0	0	0
	100	100	100	100	100	100	100.1	100.1	100.1	95.4	82.3	0	0	0	6.1	0
ε-CO (R183K)	99.9	100	100	100	100	100	100.1	100.1	100.1	98.9	86.7	0	0	0	0	0
	100	100	100	100	100	100	100.1	100.1	100.1	100.2	100	96.4	43.9	0	0	0
	99.9	100	100	100	100	100	100.1	100	100	97.7	71.4	0	0	0	5.2	0
	100	99.9	100	100	100	100	99.3	100	100	89.1	53.9	0	0	0	14.7	0
	100	100	100	100	100	100	100	100	100	97.9	89.6	0	0	0	0.3	0
	100	100	100	100	100	100	100.1	100	100	98.8	89.9	0	0	0	0	0
ε-CO (S178N, R183K)	100	100	100	100	100	100	100.1	100.1	100.1	98.2	95.7	0	0	0	2.6	0
	100	100	100	100	100	100	100.1	100.1	100.1	98.8	86.7	0	0	0	11.2	0
	100	100	100	100	100	100	100.1	100	100	100.1	99.9	95.4	31.1	0	0	0
	100	100	100	100	100	99.9	100.1	100	100	97.2	81	0	0	0	13.9	0
	100	99.9	100	100	100	99.9	100.1	100.1	100.1	100.2	100	99.8	89.7	0	0	0
	100	99.9	100	100	100	100	100.1	100.1	100.1	100.1	99.6	47.4	0	0	0	0
ζ 1xx	100	99.9	100	100	100	100	100	100.1	100.1	100.2	100	79	0	0	0	0
	100	99.9	100	100	100	100	100.1	100.1	100.1	100.1	99.7	89.6	66.8	0	0	0
	100	99.9	100	100	100	100	100.1	100.1	100.1	100.2	99.2	11.1	0	0	2.1	0
	100	99.9	100	100	99.9	100	100.1	100.1	100.1	100.2	100	98.1	83.6	0	0	0

[0680]

表 54
连续杀伤数据：一式六份的与 Nalm6 细胞系的共培养物中的 CD3+T 细胞计数
轮次

实验组	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
NTD	88	25	53	98	22	25	105	9	28	68	304	759	608
	103	6	35	43	30	6	58	41	42	51	456	456	4556
	90	30	22	65	38	16	60	23	28	101	506	152	3189
	148	13	19	73	63	13	65	33	70	101	759	608	4101
	113	28	25	63	30	22	95	28	180	68	911	0	456
	110	25	50	53	58	19	38	28	28	17	101	304	2278
ζ-CO	3200	10475	52000	39500	29500	25750	24925	14588	2531	4219	11846	2278	911
	5075	22950	57250	40000	29500	30000	41500	22163	9878	40500	3443	5164	7746
	7625	31750	59250	42250	33000	22725	35750	28088	3645	9720	8201	7290	8657
	8675	37000	48250	48000	34750	35750	43750	27938	2318	6278	4759	2278	4556
	5325	24275	47000	36250	34000	22175	30000	29025	3803	4556	962	1367	1823
	5925	24800	45500	44750	32750	23825	51750	26288	10598	82350	31590	9720	10024
ε-CO	3825	7775	24250	26000	23275	24700	19350	18825	1789	1148	1215	608	3645
	6300	10700	40000	43250	36250	25750	41500	28950	1676	439	2734	3645	2278
	7675	14325	58750	52000	46000	29250	41500	23850	2104	405	2025	2582	2734
	7850	12150	62500	34000	35250	24825	23975	28613	1373	4556	1215	608	1367
	6850	9175	19925	47500	35500	32250	24150	28688	2689	2599	6075	2886	2278
	5700	7275	19400	35000	18025	29000	28000	13538	349	439	1721	1367	911
ε-CO (Δ181-185)	6925	26250	26500	22850	21425	19400	19725	12263	2070	2261	3038	1671	4556
	9200	34000	26250	22350	34250	19200	22100	15600	8595	76275	4455	2582	3189
	11150	32750	35250	15100	26750	32750	19775	13050	923	1890	2025	1367	2278
	12400	38750	33500	13025	35500	25500	19225	16088	2711	7324	1418	759	2278
	11375	34000	17625	16175	32750	32000	23025	14325	1598	979	5063	1215	3645

[0681]

	7900	26750	20800	17675	32750	24875	21500	13913	585	608	456	456	911
	3175	3250	7700	4225	38250	7000	12050	14250	878	945	1114	1114	2734
	4975	4850	18375	26750	32500	17200	15075	9900	765	675	810	810	911
ε-CO (R183K)	5225	9725	33000	26250	33000	18300	17200	14325	641	945	2025	1367	3645
	8975	9400	39750	37750	21125	19025	22475	27300	15638	74925	13365	10328	8201
	5275	4625	28500	20475	27250	21125	34500	14363	259	574	1114	1671	4556
	4525	7325	27500	26250	31750	31000	198	4875	169	709	557	759	3189
ε-CO (S178N, R183K)	9000	23525	28250	18250	27250	27500	26000	9788	1069	1485	2430	1215	2734
	13075	36500	20100	16800	35750	19950	21125	14850	1766	1384	1823	1823	2734
	16875	44250	16250	18500	33500	32500	38000	11363	2723	19305	11036	3645	3645
	18575	42750	22500	10225	35250	45500	33500	21225	698	878	2025	3341	1367
	13400	38750	23550	17750	41000	21175	26000	33225	28013	92138	35438	20959	4101
	9725	36000	27500	21500	29250	34750	34000	15375	405	270	810	456	456
ζ 1xx	4850	4475	20450	28000	40750	30000	34000	38625	33413	102600	112388	61965	6379
	7225	9700	34500	29000	24950	25500	73500	36413	9698	14546	6176	20351	4101
	8375	14725	46250	32500	31250	41000	38000	41250	15075	30848	5974	14884	7746
	7850	20700	42750	33000	30000	42500	64000	32025	11183	39150	34223	60750	30071
	6525	8425	40750	35250	45500	25500	48000	26438	7740	6008	7088	1974	456
	6625	8250	26750	44000	26750	23850	74250	62250	60525	96188	22984	12758	30983

[0682] 实施例11

[0683] 如本文所述,评估了其他含ITAM的蛋白质,其可替代CD3ζ作为抗CD19第二代嵌合抗原受体(CAR)中的信号传导结构域并增强CAR T细胞产物的治疗潜力。设计了5个新的第

二代CAR构建体,其利用五种新信号传导结构域之一,包括CD3 ϵ 、CD3 δ 、CD3 γ 和Dap12,作为基准抗CD19对照CAR中CD3 ζ 的替代物。所有都成功转导并在原代人T细胞中表达。这些新的CAR构建体通过体外测定法表征,并显示出相当的CAR T细胞功能性。体内研究证明,当与CD3 ζ 基准对照相比时, ϵ -C0构建体的优良肿瘤控制、CAR扩增和持久性,证明利用CD3 ϵ 信号传导结构域的抗CD19CAR具有增强的体内功效。此处显示,与具有CD3 ζ 信号传导结构域的基准抗CD19对照CAR相比,利用CD3 ϵ 、Dap12、CD3 δ 或CD3 γ 信号传导结构域的抗CD19 CAR在体内显示显著改善的肿瘤控制。

[0684] 构建体设计。使用具有序列ATGGCTCTGCCTGTGACCGCTCTGCTGTTGCCCTTGCTTTACTCCTGCACGCCGAAGACCCGACATCCAAATGACCCAAACCACCTCCTCCCTGAGCGCTCCCTTGGAGACCGAGTTACCATCTCCTGCCGAGCTTCTCAAGACATCTCCAAGTACTTGAATTGGTATCAACAAAAGCCCGACGGAACCGTGAACTGCTGCTGATCTACCACACATCCCGGCTGCACTCTGGCGTTCCCTCAAGATTCTCCGGCTCTGGAAGCGGAACCGACTACTCCCTGACCATCTCCAACCTGGAGCAAGAGGACATCGCTACCTACTTCTGCCAACAAGGCAACACCCTGCCTTACACCTTCGGAGGAGGAACCAAGCTGGAGATCACCGAAGCACAAGCGGATCTGGCAAGCCTGGAAGCGGAGAGGAAAGCACCAAGGGAGAGGTGAAGCTGCAAGAGAGCGGACCTGGATTGGTGGCCCCCTACAATCCCTGAGCGTTACATGCACTGTGAGCGGCGTGTCCTTCTGACTACGGCGTTTTCTGGATCCGCCAACCTCCAAGAAAGGGACTGGAGTGGCTGGGAGTGATCTGGGGAAGCGAGACCACCTACTACAACCTCCGCCCTGAAGAGCCGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTGTTCCTGAAGATGAACTCTCTCCAAACCGACGACACCGCTATCTACTACTGCGCTAAGCACTACTACTACGGAGGAAGCTACGCTATGGACTACTGGGACAAGGCACCTCTGTGACCGTCTCCTCTGCCGCCGCTCTGGACAACGAGAAGAGCAACGGAACCATCATCCACGTGAAGGGAAAGCACCTGTGCCCTCTCCTCTGTTCCCTGGACCCTCCAAGCCTTTCTGGGTGCTCGTGGTGGTGGGAGGAGTGCTGGCTTGCTACTCCCTGCTTGTGACCGTGGCTTTTCATCATCTTCTGGGTTAGAAGCAAGAGAAGCAGACTGCTGCACAGCGACTACATGAACATGACCCCTAGAAGGCCCGACCTACCAGAAAGCACTACCAGCCTTACGCTCCTCCTAGAGACTTCGCTGCTTACAGAAGCAGGGTGAA GTTCTCAAGAAGCGCTGACGCTCCTGCTTACCAACAAGGCCAAAACCAACTGTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGAAGAGAGGAATACGACGTCCTGGACAAGAGAAGAGGAAGAGACCCTGAGATGGGAGGAAAGCCAAGAAGAAAGAACCCTCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTGCAAAAGGACAAGATGGCTGAGGCTTACTCCGAGATCGGAATGAAGGGAGAGAGAAGAAGAGGAAAGGGACACGACGGACTGTACCAAGGCCTGAGCACCCTACCAAGGACACCTACGACGCTCTGCACATGCAAGCCCTGCCTCCTAGG (SEQ ID NO:91) 的抗CD19第二代嵌合抗原受体(CAR) (下文称为 ζ)作为亲本模版来工程化和合成七个子构建体。这些构建体在下文中称为 ζ_{1xx} 、 ϵ 、 δ 、 γ 、Dap12、 ζ -C0和 ϵ -C0。为了产生子构建体,亲本模板的核酸3316至3651处的CD3 ζ 信号传导蛋白被以下序列取代(参见图3);

[0685] ζ_{1xx} :

[0686] CGGGTGAAGTTCTCAAGAAGCGCTGACGCTCCTGCTTACCAACAAGGCCAAAACCAACTGTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGAAGAGAGGAATACGACGTCCTGGACAAGAGAAGAGGAAGAGACCCTGAGATGGGAGGAAAGCCAAGAAGAAAGAACCTCAAGAGGGCCTGTTTAACGAGCTGCAAAAGGACAAGATGGCTGAGGCTTTCTCCGAGATCGGAATGAAGGGAGAGAGAAGAAGAGGAAAGGGACACGACGGACTGTTCCAAGCCTGAGCACCCTACCAAGGACACCTACGACGCTCTGCACATGCAAGCCCTGCCTCCTAGG (SEQ ID NO:82)

[0687] ϵ :

[0688] AAGAACCAGGAAAGGCCAAGGCCAAGCCTGTGACAAGAGGTGCTGGTGGCTGGCGGCAGACAGAGAGGCCA GAACAAAGAAAGACCTCCTCCTGTGCCTAATCCTGACTACGAGCCCATCCGGAAGGGCCAGAGAGATCTGTACAGC

GGCCTGAACCAGCGGCGGATT (SEQ ID NO:53)

[0689] δ :

[0690] GGACACGAAACAGGCAGACTTTCTGGCGCCGCTGATACACAGGCCCTGCTGAGAAACGACCAGGTGTA
CCAGCCTCTGAGAGACAGAGATGACGCCAGTACTCTCACCTCGGCGGCAATTGGGCCAGAAACAAG (SEQ ID
NO:83)

[0691] γ :

[0692] GGACAGGATGGCGTCAGACAGAGCAGAGCCAGCGACAAGCAAACCTGCTGCCTAACGACCAGCTGTA
CCAGCCTCTGAAGGACAGAGAGGACGACCAGTACAGCCATCTGCAGGGCAACCAGCTGCGGAGAAAC (SEQ ID
NO:84)

[0693] Dap12:

[0694] TACTTCCTGGGCAGACTGGTGCCTAGAGGAAGAGGAGCTGCTGAGGCTGCTACCAGAAAGCAGAGAAT
CACCGAGACCGAGAGCCCTTACCAGGAGCTGCAGGGACAGAGAAGCGACGTGTACAGCGACCTGAACACCCAGAGA
CCTTACTACAAG (SEQ ID NO:85)

[0695] ζ -CO:

[0696] AGAGTTAAGTTCAGCAGGAGCGCCGACGCACCTGCCTACCAaCAAGGGCAGAATCAACTGTACAACGA
GCTGAACCTGGGCAGACGGGAGGAATACGATGTGCTGGACAAGAGGAGAGGCAGAGACCCCGAGATGGGCGGCAAA
CCTAGAAGAAAGAACCCCGAGGAGGCGCTGTATAATGAGCTCCAGAAGGATAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGA
TCGGCATGAAGGGCGAAAGAAGAAGAGGCAAGGGCCACGACGGCCTCTACCAGGGCTTAAGCACAGCTACTAAGGA
CACCTACGACGCCCTGCACATGCAAGCTCTGCCCCCTAGA (SEQ ID NO:86)

[0697] ϵ -CO:

[0698] AAGAACCPCAAAGCAAAGGCAAACCCGTCACACGAGGAGCGGGCGCAGGGGACGACAACGCGGTCA
GAATAAGGAACGCCCGCCTCCAGTACCAAATCCAGATTATGAACCAATTCGGAAGGGACAACGCGATCTCTACTCC
GGTCTCAATCAGAGGCGAATT (SEQ ID NO:54)

[0699] CAR T-细胞产物的制造。洗涤来自健康人供体的血液单采术材料,与抗CD8抗体连接的磁珠一起温育,并使用 **CliniMACS[®]** 细胞分离系统 (Miltenyi Biotech) 按照制造商的说明书进行处理,以富集CD8+T细胞,然后将其冷冻保存。如上所述,使用抗CD4抗体连接的磁珠洗涤和处理得阴性级分,以富集CD4+T细胞,然后将其冷冻保存。将分离的CD4+和CD8+原代人T细胞在补充有2.6% OpTmizer[™]CTS T细胞扩增补充剂、2.5% CTS免疫细胞血清替代物、1%青霉素/链霉素/L-谷氨酰胺和305国际单位/mL人白介素(IL)-2的OpTmizer[™]CTS T细胞扩增基础培养基(下文中称为完全OpTmizer[™]培养基)中解冻。将T细胞以 1.5×10^6 个细胞/mL的密度重悬于含有 $1.66 \mu\text{g/mL}$ 抗CD28抗体(克隆28.2)的完全OpTmizer[™]培养基中,然后接种到用 $1.23 \mu\text{g/mL}$ 抗CD3抗体(克隆OKT3)预包被的T-75烧瓶中以诱导T细胞活化(第0天)。在活化后第1天,以20的MOI用编码亲本抗CD19 CAR的LVV或子构建体 ϵ 、 δ 、 γ 和Dap12转导细胞。将由 ζ CO和 ϵ CO构建体组成的附加实验组以5的MOI转导,并且将未转导(NTD)样品用作阴性对照。在第3天用完全OpTmizer[™]培养基洗涤T细胞,将其归一化并再扩增4天(第3至7天)。在收获时间点(第7天),将细胞冷冻保存以供将来使用。在扩增期间的多个时间点(第3至7天),使用Vi-CELL进行细胞计数,并且通过添加完全OpTmizer[™]培养基将细胞密度归一化至 0.5 至 1×10^6 个细胞/mL。在这些时间点,在Vi-CELL上记录平均细胞活力、直径和细胞密度。

[0700] 在第6天和第7天通过流式细胞术测量CAR表达。T细胞用一组荧光团缀合抗体染色,并且通过流式细胞术表征以确定转导效率和CD4⁺/CD8⁺T细胞比率。通过荧光团缀合的KIP-1实现对CAR表达(抗CD19 CAR)的评估。可固定的细胞活力染料允许对活细胞进行特异性分析。通过在4℃下与适当的抗体混合物一起温育20分钟,随后用染色缓冲液洗涤2次,对细胞进行染色,随后通过在磷酸盐缓冲盐水或Hank平衡盐溶液中的0.6%多聚甲醛中在室温下温育10分钟来固定。所有流式细胞仪数据都在FACS Canto仪器上收集,并使用FlowJo软件分析数据。

[0701] 第0天共培养设置。在收获日(制造的第7天)冷冻保存从健康供体血液单采术中获得的T细胞所制造的T细胞产物。随后在开始与靶细胞共培养之前,将T细胞产物解冻并在完全OpTmizer™培养基中静置过夜。就在共培养开始前,将每个T细胞样品的等分试样与一组抗体荧光团一起温育,并通过流式细胞术进行分析以评价转导效率。使用KIP-1、定制的抗体评估总转导效率,该抗体结合单链可变片段(scFv)的重链和轻链之间的Whitlow接头。然后用CellTrace™Violet (CTV) 试剂标记T细胞,并且随后用R-10%培养基[补充有10%胎牛血清、青霉素链霉素L-谷氨酰胺和HEPES的RPMI-1640培养基]洗涤。将一部分CTV标记的样品固定并储存在4℃下直至第4天,此时通过流式细胞术与第4天共培养样品并行地分析样品以评估CTV信号的初始水平(CTV最大值)。将T细胞产物和表达荧光素酶的靶细胞在R-10%培养基中以不同的效应物与靶标(E:T)比率(范围从3:1到1:243)铺板在一起(共培养的第0天)。将T细胞产物连续稀释3倍,同时每孔的靶细胞数目保持恒定在20,000个细胞。阳性靶细胞包括Nalm6 (CD19⁺)和ST486 (CD19⁺)。作为对照,在不存在任何靶细胞(即,单独T细胞)的情况下培养T细胞产物以评估在不存在抗原刺激的情况下T细胞功能的基础水平。将共培养物在37℃下温育1或4天,并如下所述执行功能评估。

[0702] 第1天细胞毒性。与单独铺板的靶细胞发出的信号相比,T细胞介导的细胞毒性作为共培养孔中靶荧光素酶信号减少的函数进行测量。在共培养开始后的第1天和第4天,将终浓度为0.14mg/mL的D-荧光素底物添加到共培养孔中,并且将板在黑暗中以37℃下温育10分钟。在VarioSkán™LUX或VarioSkán®Flash多模式微板读取器中立即读取发光信号。T细胞介导的细胞毒性计算如下:

[0703] 细胞毒性% = [1 - (感兴趣的样品/单独靶标对照)的荧光素酶信号] * 100。

[0704] 第1天细胞因子产生。在共培养开始后的第1天,收集上清液,并根据制造商的说明书使用Meso Scale Discovery V-PLEX Pro inflammatory Panel 1人用试剂盒分析细胞因子水平。具体地,分析来自以1:1E:T比率铺板的T细胞产物与表达抗原的Nalm6和ST486的共培养物的上清液的由抗原接合介导的干扰素 γ (IFN- γ)、IL-2和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)分泌的水平。并行分析来自在不存在靶细胞(单独T细胞)的情况下培养的T细胞的上清液,以评估在不存在抗原的情况下细胞因子产生的基础水平。将所有样品稀释至检测范围内。

[0705] 第4天增殖。在共培养开始后的第4天,收获以1:1E:T比率与靶细胞铺板的T细胞产物,用一组抗体荧光团染色以鉴定T细胞,并通过流式细胞术进行分析。与单独培养的T细胞产物(单独T细胞)的增殖能力相比,通过流式细胞术分析响应于表达抗原的靶细胞的CTV染料的细胞分裂驱动稀释来确定T细胞产物的增殖能力,这用于评估在没有刺激的情况下稳态增殖的基础水平。通过流式细胞术并行分析在共培养设置当天固定的CTV标记的T细胞(CTV最大值),以评估细胞增殖前的初始CTV信号的强度。

[0706] 体内研究(剂量1-剂量2-剂量3)。制备抗CD19产物CAR T细胞和NTD细胞,并将冷冻小瓶中的冷冻细胞在干冰上运送。在收到后,将冷冻小瓶储存在液氮中。在注射前一天,将小瓶从冷冻贮藏中取出,在37°C水浴中解冻,并将细胞重悬于含有305国际单位(IU)/mL白介素(IL)-2的预热的完全OpTmizer™培养基中。将细胞悬浮液在室温下以400×g离心5分钟,并且吸出并弃去上清液。然后将细胞沉淀重悬于完全OpTmizer™培养基和305IU/mL IL-2中,并使用Vi-CELL BLU自动细胞计数器通过台盼蓝染料排除法分析细胞悬浮液的等分试样的细胞计数和活力。然后将细胞以2.0-5.0×10⁶细胞/mL重悬于完全OpTmizer™培养基和305IU/mL IL-2中,转移到培养瓶中并在37°C/5% CO₂温育箱中培养过夜。在注射当天,在重悬细胞后,使用Vi-CELL BLU自动细胞计数器计数每种条件的等分试样,以确定细胞浓度和细胞的注射前活力。然后将细胞悬浮液在4°C下以400×g离心5分钟。吸出并弃去上清液,并且将细胞沉淀重悬于冷PBS中。在研究之后,测试不同的CAR T细胞剂量:

[0707] 对于剂量1:1剂量的1.0×10⁷CAR+细胞/组,

[0708] 对于剂量2:1剂量的2.0×10⁶CAR+细胞/组,

[0709] 对于剂量3:3剂量的CAR+细胞/组:1.0×10⁶、2.0×10⁵或4.0×10⁴。

[0710] 治疗组和剂量归一化。对于每个研究,将相同总数的T细胞施用于每个处理组中的小鼠。基于抗CD19 CAR转导效率,对施用于每个治疗组的剂量进行归一化以对于每个组递送相同总数的T细胞。

[0711] 体内生物发光成像。使用IVIS Lumina S5光学成像系统(Xenogen, Alameda, CA)进行体内BLI。在约1%至2%异氟烷气体麻醉下对五只动物一次成像。每只小鼠腹膜内(IP)注射150mg/kg D-荧光素,并在注射后15分钟以俯卧位成像。使用电荷耦合器件(CCD)芯片的中等分箱,并且调节暴露时间(2秒至2分钟)以从在图像中在每只小鼠中可观察到的播散性肿瘤获得至少几百个计数并且避免CCD芯片的饱和。一周收集两次BLI图像。使用Living Image 4.7.3版软件(Xenogen, Alameda, CA)分析图像。将全身固定体积感兴趣区域(ROI)放置在每只动物的俯卧图像上,并基于动物标识进行标记。计算并输出所有ROI的总通量(光子/秒)。

[0712] 离体ddPCR和流式细胞术分析。通过眶后窦在EDTA包被的管中收集每周100μL的血液体积,并直接冷冻用于随后的ddPCR分析或处理以通过流式细胞术分析。在T细胞注射后24小时开始对动物取样,并且在整个研究持续时间每周持续一次。对于ddPCR,根据制造商的说明书使用KingFisher™Flex(小体积)从全血进行基因组DNA纯化,然后通过内部Kite方案和Bio-Rad仪器对纯化的DNA进行ddPCR。对于流式细胞术分析,按照内部Kite方案,使用荧光染料缀合的抗体对全血染色,然后在流式细胞仪上进行分析。使用用于流式细胞术的CountBright™绝对计数珠获得血液中的绝对细胞计数。

[0713] 体内研究(剂量1)。该研究评价了体内潜在的抗原非依赖性T细胞扩增和持续CAR T细胞的功能性。治疗开始时不同时间点的体重从初始值的变化总结于表62中。来自所有组的所有小鼠随着时间推移增加体重,直到第49天,与没有毒性一致。在第49天,将来自每组的所有4只小鼠(除了ε-CO组)安乐死以用于离体分析,并且在第50天,将来自每组的其他4只小鼠植入Nalm6-luc MHC I/II双敲除(DKO)肿瘤细胞(静脉内(IV)100μL中的5.0×10⁵),并且记录所有剩余小鼠的体重变化直至第85天研究结束。从第50天至第85天,来自ε-CO组的小鼠显示体重增加直至研究结束,但来自媒介物、NTD和ζ-CO组的小鼠具有与肿瘤负荷相关的

[0716]

表 62 (续)

ζ-CO										ε-CO																									
-5.7	-2.5	1.6	-4	0	2	-1	0	-6.1	-3.1	-2	0	-4.3	1.9	2	6.9	-4.1	-0.5	10.2	2.5	3.5	9.1	-7	4	3	7.6	7.5	3	2.5	2.5	2.9	2	10	5.4	4	13.9
3.1	-0.5	8.6	0.5	2.5	-11.6	-10	-12.6	0.4	-1	-1.9	-1	1.2	0.5	-4	6.5	-4.1	-0.5	10.2	2.5	3.5	9.1	-7	4	3	7.6	7.5	3	2.5	2.5	2.9	2	10	5.4	4	13.9
-1.6	0.5	10.8	2	9.1	-7	-3	2.5	6.2	2.5	2.9	2	10	5.4	4	13.9	-1.6	0.5	10.8	2	9.1	-7	-3	2.5	6.2	2.5	2.9	2	10	5.4	4	13.9				
4.7	0.5	10.2	6	14.1	4	3	7.6	7.5	3	2.9	6.1	11.2	8.4	6.5	17.4	4.7	0.5	10.2	6	14.1	4	3	7.6	7.5	3	2.9	6.1	11.2	8.4	6.5	17.4				
11.4	1	19.9	11.6	16.2	9	5	12.1	14.1	7.6	7.7	7.6	17.1	12.3	11.9	20.9	11.4	1	19.9	11.6	16.2	9	5	12.1	14.1	7.6	7.7	7.6	17.1	12.3	11.9	20.9				
7.3	-2	18.8	4.5	15.7	14.6	9.5	8.1	12.3	10.1	8.7	12.6	15.3	11.8	12.4	24.4	7.3	-2	18.8	4.5	15.7	14.6	9.5	8.1	12.3	10.1	8.7	12.6	15.3	11.8	12.4	24.4				
11.9	3.5	22	8	17.2	14.1	8.5	16.7	13.7	11.6	9.2	14.6	22.4	13.8	13.9	11.9	11.9	3.5	22	8	17.2	14.1	8.5	16.7	13.7	11.6	9.2	14.6	22.4	13.8	13.9	13.9	11.9			
6.7	3.5	17.2	9	14.6	13.6	6.5	17.7	13.2	13.1	10.1	12.1	22.9	14.3	13.4	11.9	6.7	3.5	17.2	9	14.6	13.6	6.5	17.7	13.2	13.1	10.1	12.1	22.9	14.3	13.4	13.4	11.9			
4.7	4	15.6	8	15.7	14.1	5	18.7	12.3	14.1	8.2	13.1	27.1	16.3	12.9	14.4	4.7	4	15.6	8	15.7	14.1	5	18.7	12.3	14.1	8.2	13.1	27.1	16.3	12.9	12.9	14.4			
10.9	6	16.1	12.1	18.2	14.6	6.5	22.7	14.5	16.2	9.2	9.1	25.3	15.8	13.9	20.9	10.9	6	16.1	12.1	18.2	14.6	6.5	22.7	14.5	16.2	9.2	9.1	25.3	15.8	13.9	13.9	20.9			
8.3	5.5	17.2	11.1	20.2	8.5	8.5	22.7	18.5	12.6	13	11.6	26.5	16.3	15.4	6.5	8.3	5.5	17.2	11.1	20.2	8.5	8.5	22.7	18.5	12.6	13	11.6	26.5	16.3	15.4	15.4	6.5			
				12.1	13.6	11	21.2	21.1	16.2	15.5	21.7	27.6	25.1	21.9	11.9					12.1	13.6	11	21.2	21.1	16.2	15.5	21.7	27.6	25.1	21.9	21.9	11.9			
				7.1	10.6	7	12.6	19.8	12.1	15.5	16.7	31.2	18.7	9.5	15.4					7.1	10.6	7	12.6	19.8	12.1	15.5	16.7	31.2	18.7	9.5	9.5	15.4			
				7.6	11.1	6.5	14.6	18.9	11.1	16.4	16.2	32.4	21.2	9.5	14.4					7.6	11.1	6.5	14.6	18.9	11.1	16.4	16.2	32.4	21.2	9.5	9.5	14.4			
								18.5	13.6	15.0	18.2	34.7	25.6	11.9	20.9					18.5	13.6	15.0	18.2	34.7	25.6	11.9	11.9	20.9							
								19.8	12.6	14.0	16.2	35.9	26.6	12.9	22.4					19.8	12.6	14.0	16.2	35.9	26.6	12.9	12.9	22.4							

[0717]

表 63

T 细胞输注后的天数	媒介物					NTD				
	1.64E+06	1.64E+06	1.39E+06	1.92E+06	1.67E+06	1.53E+06	1.29E+06	1.02E+06	1.02E+06	1.02E+06
56	1.64E+06	1.64E+06	1.39E+06	1.92E+06	1.67E+06	1.53E+06	1.29E+06	1.02E+06	1.02E+06	1.02E+06
60	3.08E+07	4.13E+07	2.87E+07	1.85E+07	3.86E+07	2.04E+07	2.29E+07	3.55E+07	3.55E+07	3.55E+07
67	7.01E+09	6.49E+09	5.63E+09	9.02E+09	4.68E+09	6.05E+09	6.97E+09	6.53E+09	6.53E+09	6.53E+09
70	1.56E+10	2.06E+10	9.75E+09	1.65E+10	1.80E+10	1.41E+10	1.15E+10	1.32E+10	1.32E+10	1.32E+10
81										
85										

表 63 (续)

	ζ-CO					ε-CO				
	1.72E+06	1.19E+06	1.22E+06	7.20E+05	7.64E+05	9.01E+05	7.34E+05	7.34E+05	7.34E+05	7.34E+05
1.57E+06	1.72E+06	1.19E+06	1.22E+06	7.20E+05	7.64E+05	9.01E+05	7.34E+05	7.34E+05	7.34E+05	7.34E+05
2.12E+07	8.97E+06	2.17E+07	2.80E+07	8.50E+05	8.22E+05	7.74E+05	9.29E+05	9.29E+05	9.29E+05	9.29E+05
3.36E+09	4.02E+09	5.87E+09	3.91E+09	7.29E+05	7.71E+05	6.80E+05	6.34E+05	6.34E+05	6.34E+05	6.34E+05
1.25E+10	1.09E+10	1.29E+10	1.13E+10	7.38E+05	8.04E+05	8.00E+05	5.38E+05	5.38E+05	5.38E+05	5.38E+05
				6.50E+05	7.19E+05	6.75E+05	5.52E+05	5.52E+05	5.52E+05	5.52E+05
				6.84E+05	6.51E+05	6.59E+05	7.65E+05	7.65E+05	7.65E+05	7.65E+05

[0718] 离体流式细胞术分析。为了评估体内CAR T细胞扩增和持久性,通过流式细胞术分析外周血的CD3+CAR+细胞数/随时间推移的血液的μL(表64)。ζ-CO组在小鼠的外周血中没有表现出CAR T细胞扩增,因为CD3+CAR+细胞在20天后稳定下降至达到<1个细胞/μL。然而,

复发直至第47天由于高肿瘤负荷而安乐死。相比之下,ε-CO组在第0天1次初始肿瘤植入后或在第21、28、35、42和63天用Na1m6 MHC I/IIDKO的5次后续肿瘤再激发后维持完全的肿瘤清除直至在第84天终止研究,证明这些细胞与ζCO基准对照相比显著改善了肿瘤控制。

[0721]

表 65

肿瘤接种后的天数	媒介物										NTD					ζ-CO													
	1.9	1.9	2	3.5	1	1.7	1.4	1.3	4.8	-0.5	1.5	-0.9	0.5	0	1	1.5	-0.5	4.8	1.3	1.4	1.7	1.3	4.8	-0.5	1.5	-0.9	0.5	0	1
7	1.9	1.9	2	3.5	1	1.7	1.4	1.3	4.8	-0.5	1.5	-0.9	0.5	0	1	1.5	-0.5	4.8	1.3	1.4	1.7	1.3	4.8	-0.5	1.5	-0.9	0.5	0	1
11	3.7	4.8	7.6	8.9	-1.9	8.7	11.8	2.2	8.7	3.9	2	-6.5	7	4.9	2.5	2	-6.5	8.7	2.2	8.7	11.8	2.2	8.7	3.9	2	-6.5	7	4.9	2.5
14	8.4	5.2	10.6	9.4	0	5.7	9.1	0	8.7	4.3	0.5	-4.1	8	7.4	15.2	0.5	-4.1	8.7	0	5.7	9.1	0	8.7	4.3	0.5	-4.1	8	7.4	15.2
18	7	8.1	12.6	11.4	-3.4	-3.9	4.5	-0.4	8.2	4.8	4.4	-2.3	10.4	10.3	15.7	4.4	-2.3	8.2	-0.4	-3.9	4.5	-0.4	8.2	4.8	4.4	-2.3	10.4	10.3	15.7
21											2.9	1.8	9.5	8.4	7.6	2.9	1.8								2.9	1.8	9.5	8.4	7.6
24											7.3	0.5	14.9	13.3	18.2	7.3	0.5								7.3	0.5	14.9	13.3	18.2
28											7.3	0.5	14.9	13.3	18.2	7.3	0.5								7.3	0.5	14.9	13.3	18.2
32											6.8	0	13.4	13.3	15.2	6.8	0								6.8	0	13.4	13.3	15.2
35											6.3	-0.9	14.4	13.3	13.6	6.3	-0.9								6.3	-0.9	14.4	13.3	13.6
41											6.3	4.1	10.9	9.9	19.7	6.3	4.1								6.3	4.1	10.9	9.9	19.7
47											7.3	2.3	7	13.8	5.1	7.3	2.3								7.3	2.3	7	13.8	5.1
55																													
67																													
77																													
84																													

表 65 (续)

ε-CO	ζ-CO 肿瘤再激发										ε-CO 肿瘤再激发																																																										
	-7.8	5.2	4.4	2.4	-0.4	2	-2.9	-5.9	-10.2	-1.9	4.3	1	-5.6	2	0.9	-5.5	-0.9	8.3	0.5	-1	1	-6.8	0.4	-1.3	10.3	9.2	8.2	4	20.7	1	0.5	-7.1	6.1	2.9	12.6	-4.2	1	3.3	-3.7	-1.8	11.5	-3.9	3.8	4.9	5.1	1.7	0.4	13.4	9.7	9.7	4.8	21.7	2.9	7.9	-5.3	8.5	7.2	17.8	0	7.9	9.4	-5.1	-4.1	16.1	-1.5	6.7	8.3	6.8	0.9
	-7.8	5.2	4.4	2.4	-0.4	2	-2.9	-5.9	-10.2	-1.9	4.3	1	-5.6	2	0.9	-5.5	-0.9	8.3	0.5	-1	1	-6.8	0.4	-1.3	10.3	9.2	8.2	4	20.7	1	0.5	-7.1	6.1	2.9	12.6	-4.2	1	3.3	-3.7	-1.8	11.5	-3.9	3.8	4.9	5.1	1.7	0.4	13.4	9.7	9.7	4.8	21.7	2.9	7.9	-5.3	8.5	7.2	17.8	0	7.9	9.4	-5.1	-4.1	16.1	-1.5	6.7	8.3	6.8	0.9

[0725]

表 66 (续 3)

ε-CO 肿瘤再激发											
1.95E+06	1.56E+06	2.00E+06	1.54E+06	2.87E+06	2.06E+06	1.63E+06	1.93E+06	1.34E+06			
8.37E+05	7.06E+05	7.10E+05	7.33E+05	6.03E+05	7.35E+05	5.81E+05	7.59E+05	5.87E+05			
7.20E+05	6.55E+05	7.16E+05	7.59E+05	8.19E+05	7.93E+05	9.69E+05	9.20E+05	6.51E+05			
7.19E+05	7.11E+05	8.77E+05	7.51E+05	7.80E+05	7.33E+05	7.57E+05	7.52E+05	5.94E+05			
7.95E+05	7.29E+05	7.10E+05	8.54E+05	9.77E+05	7.81E+05	6.91E+05	8.38E+05	1.04E+06			
7.33E+05	6.59E+05	7.18E+05	8.05E+05	6.44E+05	7.35E+05	7.52E+05	6.92E+05	6.69E+05			
8.29E+05	8.01E+05	9.04E+05	1.06E+06	8.40E+05	8.47E+05	8.06E+05	8.78E+05	8.69E+05			
8.99E+05	8.54E+05	8.60E+05	9.16E+05	9.00E+05	8.57E+05	9.42E+05	9.29E+05	8.47E+05			
1.03E+06	1.03E+06	1.12E+06	1.04E+06	8.66E+05	8.71E+05	8.39E+05	8.81E+05	7.98E+05			
7.58E+05	8.69E+05	6.97E+05	7.31E+05	8.19E+05	1.00E+06	8.09E+05	9.39E+05	8.29E+05			
8.02E+05	7.53E+05	7.02E+05	6.44E+05	7.85E+05	8.25E+05	9.45E+05	8.31E+05	7.63E+05			
7.79E+05	7.69E+05	7.73E+05	8.35E+05	8.13E+05	7.55E+05	7.35E+05	8.00E+05	7.33E+05			
9.14E+05	9.78E+05	9.71E+05	1.09E+06	9.81E+05	1.01E+06	9.33E+05	8.67E+05	1.07E+06			
9.81E+05	8.62E+05	1.20E+05	9.61E+05	1.16E+06	9.13E+05	1.05E+06	9.41E+05	1.19E+06			
6.54E+05	7.18E+05	6.99E+05	7.62E+05	6.65E+05	8.11E+05	7.16E+05	7.55E+05	7.39E+05			
8.73E+05	7.11E+05	7.51E+05	7.58E+05	7.78E+05	9.71E+05	8.71E+05	1.02E+05	7.87E+05			
8.67E+05	8.75E+05	8.97E+05	8.82E+05	8.41E+05	9.01E+05	7.47E+05	7.57E+05	7.45E+05			

[0726] 体内研究(剂量3)。该研究评价了ε-CO CAR T细胞相对于ζ1xx CAR T细胞的抗肿瘤功效和PK。治疗开始时不同时间点的体重从初始值的变化总结于表67中。在下列组中随时间推移增加肿瘤负荷:媒介物、NTD、ε-CO和ζ1xx在4e4和2e5剂量下,导致平均体重减轻和/或不良临床体征,此后将所有动物从研究中移除。相比之下,由于对肿瘤负荷的显著控制,来自1e6剂量下的ε-CO和ζ1xx的所有小鼠在研究期间保持一致的体重。

[0727] 每个实验组的BLI总结在表68中。媒介物和NTD组没有显示肿瘤控制,并且到第26天由于高肿瘤负荷而被安乐死。在4e4剂量组中,ε-CO组中5只小鼠中的1-2只小鼠和ζ1xx组中5只小鼠中的3只小鼠未显示肿瘤控制,并且由于高肿瘤负荷而被安乐死。在2e5的剂量

下,仅 ζ 1xx组在5只小鼠中的2只小鼠中没有显示出肿瘤控制。相比之下,剂量为 $2e5$ 的 ϵ -C0小鼠全部控制肿瘤直至第57天该剂量的终点,例外是第7组中的1只小鼠在第26天被发现死亡。所有高剂量构建体, $1e6$ 下的 ϵ -C0和 ζ 1xx维持肿瘤控制直到第57天,此后用Na1m6 MHC I/IIDKO肿瘤移植再激发各组。直到当研究终止时的第105天,所有再激发组($1e6$ 下的 ϵ -C0和 ζ 1xx)类似地维持完全的肿瘤清除。

[0728]

表 67

肿瘤接种后的 天数	G1.媒介物						G2.NTD						G3. ϵ -CO ($1e6$)						G4. ϵ -CO ($2e5$)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
	3.7	5.8	1	8.2	0.5	0.4	1.2	0.5	5.3	4.7	-4.7	-1.6	-2.5	0.4	-2	4.8	-1.2	-1.3	-0.9	3	7	4.6	0.5	2	7.7	-0.5	0	6.1	-3.2	6.2	6.5	-3	7	-0.4	0.4	0.4	0.4	3.4	11	4.1	0.5	-0.5	6.8	0.5	3.1	5.3	-4.6	7.2	5.6	-3	-0.4	0.4	0.4	1.2	8.1	-2.4	0.4	0.4	3.8	15	3.7	-1.4	0	7.2	0	-0.9	3.2	-5.9	7.7	3.4	-4.3	-1.6	-0.4	0	-1.2	8.6	-2	1.3	1.3	6.4	19	8.3	0.5	-0.5	7.7	1.9	0	5.7	2.3	7.2	0.4	-2.6	1.2	4.7	0	-1.6	8.1	1.2	-0.4	2.6	2.1	22	5.5	-2.4	0.5	6.3	0.5	-2.2	2.4	0.5	4.8	-0.9	-1.7	2	5.9	0.4	-0.4	8.6	0	4.8	2.1	26	-7.8	-13.5	-7.4	1.4	-3.8	-10.3	-2.8	-7.8	-1.9	-11.2	-0.4	3.6	6.4	-0.4	-1.6	12.4	0.4	2.2	9.3	7.7	29											2.1	11.3	8.9	0.4	2.8	15.1	-0.4	4	7	7.2	33											6.8	15.4	14.4	2.8	5.7	17.7	2.9	11	8.4	9.8	36											8.5	13.8	13.6	7.2	6.1	28	6.9	11	11	13.6	43											7.3	10.1	13.6	5.6	4.9	29.6	2.4	7	9.3	3.8	47											3	11.7	16.5	9.6	7.7	26.9	2.9	1.8	4.4	6.4	50											3.8	9.3	15.3	12.8	4.5	25.8	2.4	4.4	4.4	6.4	54											11.5	15	22.9	20.4	8.1	28	7.8	10.6	9.7	10.2	57											8.1	14.2	20.3	22.8	8.5	32.3	10.6	7.5	11.5	11.9	67											9	17.4	19.1	14.8	3.3						81											5.6	22.7	14.4	16	6.5						84											9.4	11.3	17.8	21.6	10.6						88											14.5	19	13.6	18.8	14.2						95											6.4	16.2	12.7	20.4	5.7						99											7.7	13	11	24.4	4.9						104											11.1	25.5	20.8	25.6	9.3				

[0729]

表 67 (续 1)

G5.ε-CO (4e4)		G6.ε CO (Δ181-185) (1e6)						G7.ε CO (Δ 181-185) (2e5)			G8.ε CO (Δ 181-185) (4e4)								
2.7	0.4	-0.5	-1.6	0	-2.5	-1.2	0.8	0.5	0.4	-3.3	0.5	4.6	0.5	5.7	-2.5	-1.3	-0.4	-2.2	-1.9
2.3	0.4	-1.4	0	1.2	-3	-2.8	1.2	1.4	-3.1	-4.1	0	5.1	-1.9	4.7	-3	-0.4	0.4	-2.7	-1
2.7	0.8	-0.5	0.8	2.4	5.5	-3.2	5.1	1.8	-3.1	-10.3	-1.1	3.2	-2.4	2.1	-6.4	-1.3	1.1	-2.7	2.4
0.5	-2.1	-0.5	1.6	0	4.7	-2.4	2.7	3.6	-2	-9.5	0	3.7	0	4.2	-9.7	-3.1	-7.2	-4.4	1.4
1.8	4.6	0	2	-1.2	4.7	-4	3.5	5	1.6	-7	5.8	1.9	1.9	4.7	-5.9	2.2	2.6	4	5.3
3.2	7.1	1.9	4.4	0	5.5	-3.6	2.7	6.3	2	-6.2	6.3	1.9	3.3	5.7	-5.5	1.3	1.5	4.9	5.7
6.4	6.7	3.3	2	0	8.5	0.8	7.8	7.2	5.9	-0.4	8.4	11.1		10.9	-1.7	5.3	2.6	4.4	9.1
12.8	0.4	6.2	-0.8	3.6	8.5	0.8	8.2	8.1	4.7	2.9	9.5	5.6		9.9	1.7	6.2	4.5	6.7	11.5
20.1	-7.9	10.4	-4.4	8	12.3	5.2	7.8	7.7	4.7	0	11.1	6.5		13.5	6.8	10.1	9.4	4.9	4.3
14.6	-24.3	12.3	-23.7	14	20.3	8.4	14.4	12.6	7.8	6.6		22.1	9.7	20.3	9.7	17.6	8.3	14.2	-6.7
18.3		11.8		8.4	9.7	10.8	17.1	15.8	9.4	-1.2		22.1	7.9	21.9	5.5	18.9	9.4	4.4	-24.4
15.5		19		10.8	9.7	2.4	12.8	10.4	3.5	3.3		24.7	10.2	26.6	4.2	14.1	6.8	8.4	
11		16.6		11.2	10.6	5.6	15.6	13.1	3.5	2.9		22.1	10.2	30.7	5.9	14.1	3.8	11.6	
13.2		16.6		9.6	20.3	6	25.7	17.1	7.5	-0.8		22.6	14.4	29.2	6.4	24.7	-6.4	18.7	
21		19.9		13.6	18.2	8	24.1	19.4	11.4	3.7		25.3	15.7	37.5	8.9	19.4	8.3	14.2	
					12.3	5.6	30.7	23	11.4										
					14.4	10.4	23.3	17.1	7.5										
					15.7	12.4	26.1	21.2	6.7										
					24.2	15.3	25.3	27	12.9										
					15.3	9.2	24.5	19.4	9										
					14	7.6	27.2	19.4	12.5										
					20.3	16.5	24.1	14.4	12.9										

[0730]

表 67 (续 2)

G9.ε CO (R183K) (1e6)		G10.ε CO (R183K) (2e5)			G11.ε CO (R183K) (4e4)			G12.ζ 1xx (1e6)											
-1.8	-0.9	2.7	-0.5	-0.4	-0.9	7.6	0	-1	1.2	-3.3	-1	0.9	2.1	0	0	1.4	0.9	1	-0.5
-7.1	-0.5	3.6	-0.5	0.4	0.9	7.2	1.8	1	0	-4.1	-1.6	0.4	2.6	1	1.4	1.9	0.9	0.5	-1.4
-5.4	-1.9	3.6	-1	-1.7	-0.4	0.4	-0.4	2.9	4.3	-2.1	4.1	3.5	3.4	1	1.9	1.4	4.8	0.5	3.3
-5.4	2.3	3.2	1	-0.9	0.4	1.3	0	4.4	5.5	-2.9	5.2	4.4	3.8	4.2	2.8	1.9	3.9	3.1	4.7
-8.9	2.3	0	-0.5	-0.4	-0.9	4.5	3.6	2.9	4.9	-1.2	4.1	1.3	2.6	5.7	4.2	1.4	4.4	6.2	1.9
-7.6	3.7	1.4	1	1.3	-1.3	4.9	2.2	4.4	6.1	-1.2	4.7	1.8	1.7	6.3	4.2	2.3	0.4	8.2	3.3
-5.4	6.5	5	9.6	5.1	1.7	1.3	9.4	9.3	8.6	2.5	6.7	4.4	4.3	9.4	4.2	3.7	4.4	9.3	8.5
-4	10.2	5.4	14.1	6.4	5.1	4.9	13.8	7.8	13.5	0.8	3.6	7.1	1.7		6.1	1.9	8.3	13.4	7.5
-1.8	16.3	9.5	22.7	14.5	8.1	9.9	17.4	10.8	13.5	-2.9	7.8	11.9	6		8.5	4.2	9.6	13.9	11.7
1.3	22.3	11.3	16.2	19.1	9.4	12.6	22.3	11.3	1.9	-25.5	19.2	11.5	13.2		13.7	15.9	17	22.7	18.3
8.9	22.3	21.6	18.7	19.1	6.4	11.2	17.4	6.4	25.2		20.7	15	8.1		17.9	20.6	17.9	16.5	21.1
11.2	14	14.9	23.7	14	10.3	12.1	20.5	7.4	28.8		23.3	11.1	9.8		20.3	15.9	18.8	14.9	23.5
-0.9	19.5	14.9	22.7	12.3	10.7	9.4	19.6	7.8	25.8		25.4	12.8	9		17.9	16.8	16.6	15.5	23
2.2	25.6	16.2	22.7	21.3	11.5	10.3	21.4	8.8	27		17.1	12.4	2.6		17	17.3	19.2	19.1	25.8
7.6	26.5	19.8	21.7	21.3	10.7	11.2	20.5	13.2	30.1		20.2	14.6	6.4		22.2	17.8	21	23.2	22.1
0.9	20.9	17.1	29.3	18.3											19.8	20.6	24.5	19.6	22.1
3.1	25.1	23	19.7	18.3											20.8	25.2	24.5	19.1	24.4
6.3	23.7	28.4	23.7	15.3											21.7	31.8	23.6	22.7	23.5
8.5	25.1	19.8	24.7	18.7											24.1	33.6	30.6	28.4	21.6
4.9	27	18	25.8	24.7											25	24.3	34.9	23.2	21.1
0.9	24.2	18.5	24.2	20.9											24.1	24.3	33.2	24.2	23
11.6	30.7	17.1	31.8	20.9											28.3	25.2	38.9	27.3	27.7

[0733]

表 68 (续 1)

G3.e-CO (1e6)										G4.e-CO (2e5)									
1.63E+06	1.79E+06	1.81E+06	1.81E+06	1.81E+06	1.81E+06	1.81E+06	1.81E+06	1.81E+06	1.81E+06	2.56E+06	2.67E+06	1.72E+06	2.50E+06	3.15E+06	1.94E+06				
1.23E+06	1.43E+06	1.04E+06	1.04E+06	1.04E+06	1.04E+06	1.04E+06	1.04E+06	1.04E+06	1.04E+06	1.46E+06	6.35E+06	7.49E+06	6.52E+06	1.39E+07	5.45E+06				
1.07E+06	1.81E+06	1.10E+06	1.10E+06	1.10E+06	1.10E+06	1.10E+06	1.10E+06	1.10E+06	1.10E+06	1.38E+06	2.87E+06	4.05E+06	5.89E+06	1.68E+07	7.22E+06				
1.41E+06	1.51E+06	1.24E+06	1.24E+06	1.24E+06	1.24E+06	1.24E+06	1.24E+06	1.24E+06	1.24E+06	1.23E+06	1.83E+06	3.99E+06	5.97E+06	1.46E+07	4.02E+06				
9.60E+05	8.80E+05	9.09E+05	9.09E+05	9.09E+05	9.09E+05	9.09E+05	9.09E+05	9.09E+05	9.09E+05	1.04E+06	1.02E+06	1.49E+06	1.09E+06	1.13E+06	1.07E+06				
8.93E+05	9.23E+05	7.23E+05	7.23E+05	7.23E+05	7.23E+05	7.23E+05	7.23E+05	7.23E+05	7.23E+05	1.70E+05	9.40E+05	1.21E+06	1.09E+06	1.14E+06	1.32E+06				
8.80E+05	9.37E+05	9.53E+05	9.53E+05	9.53E+05	9.53E+05	9.53E+05	9.53E+05	9.53E+05	9.53E+05	9.83E+05	1.25E+06	1.31E+06	8.89E+05	1.10E+06	1.18E+06				
1.19E+06	1.20E+06	1.07E+06	1.07E+06	1.07E+06	1.07E+06	1.07E+06	1.07E+06	1.07E+06	1.07E+06	1.19E+06	1.24E+06	1.35E+06	9.17E+05	1.13E+06	1.15E+06				
8.76E+05	9.83E+05	8.77E+05	8.77E+05	8.77E+05	8.77E+05	8.77E+05	8.77E+05	8.77E+05	8.77E+05	8.29E+05	1.28E+06	1.30E+06	1.33E+06	1.04E+06	1.33E+06				
8.07E+05	8.70E+05	6.07E+05	6.07E+05	6.07E+05	6.07E+05	6.07E+05	6.07E+05	6.07E+05	6.07E+05	7.65E+05	1.13E+06	1.21E+06	9.41E+05	1.14E+06	1.21E+06				
7.86E+05	8.55E+05	1.10E+05	1.10E+05	1.10E+05	1.10E+05	1.10E+05	1.10E+05	1.10E+05	1.10E+05	9.46E+05	1.17E+06	1.15E+06	1.02E+06	1.05E+06	1.24E+06				
1.55E+06	1.34E+06	1.25E+06	1.25E+06	1.25E+06	1.25E+06	1.25E+06	1.25E+06	1.25E+06	1.25E+06	1.14E+06	1.24E+06	1.31E+06	1.09E+06	1.28E+06	1.30E+06				
1.18E+06	1.42E+06	1.17E+06	1.17E+06	1.17E+06	1.17E+06	1.17E+06	1.17E+06	1.17E+06	1.17E+06	1.03E+06	1.11E+06	1.17E+06	1.27E+06	9.18E+05	9.65E+05				
8.62E+05	1.18E+06	8.75E+05	8.75E+05	8.75E+05	8.75E+05	8.75E+05	8.75E+05	8.75E+05	8.75E+05	1.01E+06	1.30E+06	1.29E+06	8.71E+05	1.04E+06	8.90E+05				
8.61E+05	1.02E+06	1.02E+05	1.02E+05	1.02E+05	1.02E+05	1.02E+05	1.02E+05	1.02E+05	1.02E+05	9.36E+05	1.22E+06	1.04E+06	8.71E+05	8.82E+05	8.27E+05				
8.79E+05	9.78E+05	8.27E+05	8.27E+05	8.27E+05	8.27E+05	8.27E+05	8.27E+05	8.27E+05	8.27E+05	9.38E+05	1.08E+06	1.36E+06	1.02E+06	1.12E+06	1.05E+06				
5.02E+05	5.27E+05	6.89E+05	6.89E+05	6.89E+05	6.89E+05	6.89E+05	6.89E+05	6.89E+05	6.89E+05	5.35E+05									
8.62E+05	8.14E+05	9.70E+05	9.70E+05	9.70E+05	9.70E+05	9.70E+05	9.70E+05	9.70E+05	9.70E+05	8.40E+05	6.35E+05								
9.43E+05	1.24E+06	1.03E+05	1.03E+05	1.03E+05	1.03E+05	1.03E+05	1.03E+05	1.03E+05	1.03E+05	9.15E+05	8.18E+05								
5.07E+05	6.80E+05	5.79E+05	5.79E+05	5.79E+05	5.79E+05	5.79E+05	5.79E+05	5.79E+05	5.79E+05	5.62E+05	5.67E+05								
6.75E+05	7.56E+05	6.41E+05	6.41E+05	6.41E+05	6.41E+05	6.41E+05	6.41E+05	6.41E+05	6.41E+05	7.63E+05	7.12E+05								
8.91E+05	8.19E+05	8.84E+05	8.84E+05	8.84E+05	8.84E+05	8.84E+05	8.84E+05	8.84E+05	8.84E+05	8.21E+05	8.16E+05								
7.47E+05	9.10E+05	8.79E+05	8.79E+05	8.79E+05	8.79E+05	8.79E+05	8.79E+05	8.79E+05	8.79E+05	8.10E+05	7.31E+05								
7.01E+05	6.47E+05	7.91E+05	7.91E+05	7.91E+05	7.91E+05	7.91E+05	7.91E+05	7.91E+05	7.91E+05	6.81E+05	6.00E+05								
5.74E+05	5.92E+05	5.66E+05	5.66E+05	5.66E+05	5.66E+05	5.66E+05	5.66E+05	5.66E+05	5.66E+05	6.06E+05	6.63E+05								

[0734]

表 68 (续 2)

G5.ε-CO (4e4)										G6.ε CO (Δ 181-185) (1e6)									
1.84E+06	1.50E+06	7.13E+05	1.65E+06	1.70E+06	1.96E+06	2.06E+06	2.09E+06	3.88E+06	2.23E+06	1.84E+06	1.50E+06	7.13E+05	1.65E+06	1.70E+06	1.96E+06	2.06E+06	2.09E+06	3.88E+06	2.23E+06
8.92E+06	7.41E+06	1.51E+07	9.48E+06	7.71E+06	1.94E+06	1.36E+06	1.73E+06	1.96E+06	2.10E+06	8.92E+06	7.41E+06	1.51E+07	9.48E+06	7.71E+06	1.94E+06	1.36E+06	1.73E+06	1.96E+06	2.10E+06
8.68E+07	7.78E+07	2.46E+08	1.31E+08	6.56E+07	1.16E+06	1.13E+06	1.37E+06	1.46E+06	1.15E+06	8.68E+07	7.78E+07	2.46E+08	1.31E+08	6.56E+07	1.16E+06	1.13E+06	1.37E+06	1.46E+06	1.15E+06
5.40E+08	8.16E+08	7.58E+08	8.96E+08	2.38E+08	1.47E+06	1.46E+06	1.38E+06	1.57E+06	1.44E+06	5.40E+08	8.16E+08	7.58E+08	8.96E+08	2.38E+08	1.47E+06	1.46E+06	1.38E+06	1.57E+06	1.44E+06
3.23E+07	2.74E+09	3.70E+08	1.00E+09	1.50E+09	9.24E+05	1.08E+06	1.01E+06	9.73E+05	1.44E+05	3.23E+07	2.74E+09	3.70E+08	1.00E+09	1.50E+09	9.24E+05	1.08E+06	1.01E+06	9.73E+05	1.44E+05
2.41E+08	3.50E+09	5.98E+07	4.53E+09	5.50E+07	1.06E+06	1.13E+06	1.04E+06	1.05E+06	1.04E+06	2.41E+08	3.50E+09	5.98E+07	4.53E+09	5.50E+07	1.06E+06	1.13E+06	1.04E+06	1.05E+06	1.04E+06
1.10E+08	9.13E+09	1.94E+08	1.13E+10	1.28E+08	1.04E+06	1.05E+06	1.03E+06	1.19E+06	1.05E+06	1.10E+08	9.13E+09	1.94E+08	1.13E+10	1.28E+08	1.04E+06	1.05E+06	1.03E+06	1.19E+06	1.05E+06
1.61E+08	1.39E+10	3.12E+08	1.55E+10	3.02E+08	1.06E+06	1.10E+06	1.09E+06	1.05E+06	8.45E+05	1.61E+08	1.39E+10	3.12E+08	1.55E+10	3.02E+08	1.06E+06	1.10E+06	1.09E+06	1.05E+06	8.45E+05
5.95E+08	3.80E+10	1.09E+09	5.72E+10	9.93E+08	1.01E+06	9.77E+05	8.65E+05	9.75E+06	1.37E+06	5.95E+08	3.80E+10	1.09E+09	5.72E+10	9.93E+08	1.01E+06	9.77E+05	8.65E+05	9.75E+06	1.37E+06
1.26E+09	9.87E+10	2.90E+09	7.34E+10	2.12E+09	1.03E+06	9.62E+05	1.21E+06	1.03E+06	1.47E+06	1.26E+09	9.87E+10	2.90E+09	7.34E+10	2.12E+09	1.03E+06	9.62E+05	1.21E+06	1.03E+06	1.47E+06
1.14E+06		9.54E+05		1.15E+06	1.43E+06	1.06E+06	9.10E+05	1.06E+06	1.24E+06	1.14E+06		9.54E+05		1.15E+06	1.43E+06	1.06E+06	9.10E+05	1.06E+06	1.24E+06
1.27E+06		1.11E+06		1.21E+06	9.30E+05	1.17E+06	1.29E+06	9.96E+05	1.07E+06	1.27E+06		1.11E+06		1.21E+06	9.30E+05	1.17E+06	1.29E+06	9.96E+05	1.07E+06
1.18E+06		9.67E+05		9.68E+06	9.68E+05	9.41E+05	8.96E+05	9.98E+05	9.07E+05	1.18E+06		9.67E+05		9.68E+06	9.68E+05	9.41E+05	8.96E+05	9.98E+05	9.07E+05
1.01E+06		8.99E+05		1.24E+06	9.40E+05	9.64E+05	1.03E+06	1.10E+06	1.07E+06	1.01E+06		8.99E+05		1.24E+06	9.40E+05	9.64E+05	1.03E+06	1.10E+06	1.07E+06
9.60E+05		9.51E+05		8.81E+05	9.62E+05	9.29E+05	9.39E+05	9.78E+05	1.07E+06	9.60E+05		9.51E+05		8.81E+05	9.62E+05	9.29E+05	9.39E+05	9.78E+05	1.07E+06
9.48E+05		9.43E+05		1.22E+06	1.01E+06	9.75E+06	1.06E+06	1.11E+06	8.54E+05	9.48E+05		9.43E+05		1.22E+06	1.01E+06	9.75E+06	1.06E+06	1.11E+06	8.54E+05
					5.58E+05	5.41E+05	5.48E+05	7.06E+05	6.81E+05						5.58E+05	5.41E+05	5.48E+05	7.06E+05	6.81E+05
					8.97E+05	1.02E+06	1.05E+06	1.02E+06	1.10E+06						8.97E+05	1.02E+06	1.05E+06	1.02E+06	1.10E+06
					7.28E+05	8.35E+05	7.25E+05	8.55E+05	7.02E+05						7.28E+05	8.35E+05	7.25E+05	8.55E+05	7.02E+05
					8.56E+05	9.60E+05	8.88E+05	9.88E+05	7.85E+05						8.56E+05	9.60E+05	8.88E+05	9.88E+05	7.85E+05
					7.90E+05	7.94E+05	7.37E+05	1.02E+06	8.50E+05						7.90E+05	7.94E+05	7.37E+05	1.02E+06	8.50E+05
					1.01E+06	9.93E+05	8.36E+05	1.09E+06	1.02E+06						1.01E+06	9.93E+05	8.36E+05	1.09E+06	1.02E+06
					9.18E+05	9.64E+05	8.16E+05	8.42E+05	7.88E+05						9.18E+05	9.64E+05	8.16E+05	8.42E+05	7.88E+05
					9.58E+05	1.13E+06	1.01E+06	1.20E+06	1.05E+06						9.58E+05	1.13E+06	1.01E+06	1.20E+06	1.05E+06
					1.08E+06	1.10E+06	9.71E+05	1.12E+06	9.68E+06						1.08E+06	1.10E+06	9.71E+05	1.12E+06	9.68E+06

[0736]

表 68 (续 4)

		G9.ε CO (R183K) (1e6)						G10.ε CO (R183K) (2e5)										
3.05E+06	4.45E+06	2.32E+06	2.89E+06	3.33E+06	2.11E+06	2.23E+06	2.96E+06	2.84E+06	3.50E+06	1.73E+06	2.00E+06	2.09E+06	1.11E+06	1.80E+06	1.59E+07	1.70E+07	1.55E+07	1.91E+07
1.13E+06	1.44E+06	1.02E+06	1.44E+06	1.18E+06	2.92E+06	7.70E+06	1.35E+07	9.31E+06	1.28E+07	1.48E+06	1.28E+06	1.18E+06	1.61E+06	1.61E+06	9.03E+06	2.23E+07	1.80E+07	2.60E+07
1.25E+06	1.21E+06	9.96E+05	9.49E+05	1.20E+06	1.11E+06	1.56E+06	3.26E+07	3.51E+06	2.15E+06	1.13E+06	1.14E+06	1.00E+06	1.09E+06	1.05E+06	1.02E+06	2.52E+06	1.04E+06	1.11E+06
1.11E+06	1.05E+06	1.03E+06	9.12E+05	1.05E+06	9.09E+05	1.10E+06	1.18E+06	1.04E+06	1.03E+06	1.08E+06	9.12E+05	9.06E+05	9.64E+05	9.38E+05	1.15E+06	1.01E+06	1.04E+06	1.12E+06
1.31E+06	1.36E+06	1.12E+06	1.15E+06	1.40E+06	1.21E+06	1.24E+06	1.12E+06	1.28E+06	1.11E+06	1.27E+06	1.10E+06	1.05E+06	1.11E+06	1.09E+06	1.05E+06	1.15E+06	9.95E+05	1.27E+06
6.04E+06	5.69E+05	6.25E+05	6.51E+05	6.21E+05	7.45E+05	6.58E+05	6.15E+05	7.80E+05	8.52E+05	1.04E+06	1.06E+06	1.02E+06	1.20E+06	1.29E+06	1.31E+06	1.11E+06	1.00E+06	9.90E+06
1.08E+06	1.06E+06	1.08E+06	1.12E+06	9.11E+05	1.02E+06	1.26E+06	9.20E+05	1.03E+06	1.07E+06	1.00E+06	9.91E+05	1.00E+06	1.02E+06	1.04E+06	1.11E+06	8.31E+05	1.11E+06	1.02E+06
8.98E+05	1.12E+06	1.10E+06	1.15E+06	1.04E+06	9.41E+05	1.07E+06	7.66E+05	9.14E+05	8.88E+05	1.03E+06	1.01E+06	1.27E+06	4.89E+05	4.73E+05	1.33E+06	9.35E+05	1.16E+06	1.02E+06
4.98E+05	4.73E+05	4.89E+05	4.73E+05	5.26E+05	1.10E+06					8.61E+05	1.24E+06	7.65E+05	9.46E+05	1.04E+06				
8.54E+05	1.11E+06	9.42E+05	7.41E+05	1.03E+06						1.10E+06	9.41E+05	8.73E+05	9.10E+05	9.83E+05				
8.32E+05	6.89E+05	8.78E+05	8.62E+05	8.13E+05						9.05E+05	1.10E+06	6.72E+05	1.05E+06	9.59E+05				
6.20E+05	8.26E+05	5.50E+05	8.37E+05	1.06E+06						1.15E+06	7.29E+05	8.90E+05	1.02E+06	9.10E+05				
9.11E+05	7.75E+05	9.10E+05	9.21E+05	9.06E+05														

[0737]

表 68 (续 5)

G11.ε CO (R183K) (4e4)										G12.ζ 1xx (1e6)																																																																																																																																																																																																																																																																								
3.42E+06	3.48E+06	2.77E+08	2.87E+06	2.64E+06	4.54E+06	4.92E+06	5.44E+06	2.29E+06	5.23E+06	5.31E+06	3.15E+07	3.23E+07	3.31E+08	2.39E+07	2.99E+07	5.13E+07	2.86E+06	3.50E+06	2.35E+06	2.97E+06	3.80E+06	2.90E+08	2.77E+08	1.03E+09	3.31E+08	3.05E+08	6.05E+08	1.23E+06	1.30E+06	1.54E+06	1.21E+06	1.35E+06	9.78E+08	1.09E+09	7.47E+09	1.03E+09	9.80E+08	1.93E+09	1.32E+06	1.39E+06	1.23E+06	1.32E+06	1.10E+06	6.40E+09	6.18E+09	3.49E+09	7.47E+09	6.27E+09	8.15E+09	1.61E+06	1.26E+06	1.19E+06	1.34E+06	8.34E+06	6.53E+09	3.96E+09	1.73E+08	3.49E+09	2.12E+09	1.16E+10	1.01E+06	8.33E+05	8.40E+05	9.04E+05	3.67E+06	1.72E+10	4.60E+08	1.99E+07	1.73E+08	2.71E+08	2.61E+10	1.13E+06	1.10E+06	1.02E+06	1.06E+06	1.09E+06	2.34E+10	2.09E+08	4.98E+07	1.99E+07	9.50E+06		1.04E+06	1.09E+06	9.97E+05	1.03E+06	9.89E+05	5.72E+10	8.33E+08	1.08E+06	4.98E+07	2.40E+07		1.26E+06	1.24E+06	1.12E+06	1.20E+06	1.18E+06		9.93E+06	1.32E+06	1.08E+06	1.01E+06		5.99E+05	8.60E+05	7.70E+05	8.21E+05	7.86E+05		3.09E+07	1.33E+06	1.32E+06	1.02E+06		1.15E+06	9.51E+05	1.05E+06	1.21E+06	8.73E+05		2.83E+07	7.79E+05	1.33E+06	1.10E+06		9.68E+05	9.71E+05	9.28E+05	9.00E+05	9.03E+05		2.35E+07	1.31E+06	7.79E+05	6.62E+05		1.02E+06	1.05E+06	1.26E+06	1.09E+06	1.18E+06		4.55E+07	1.10E+06	1.31E+06	9.20E+05		1.13E+06	1.04E+06	1.02E+06	1.06E+06	1.05E+06		9.92E+07	1.01E+06	1.10E+06	7.86E+05		1.09E+06	1.10E+06	9.14E+05	1.08E+06	9.18E+05		1.13E+07		1.01E+06	1.02E+06		1.02E+06	1.04E+06	1.16E+06	1.01E+06	1.12E+06							6.97E+05	6.22E+05	6.66E+05	6.19E+05	7.17E+05							1.17E+06	9.10E+05	7.50E+05	9.02E+05	9.51E+05							1.20E+06	9.35E+05	9.50E+05	1.23E+06	9.41E+05							7.15E+05	8.87E+05	1.13E+06	9.09E+05	9.14E+05							8.33E+05	9.84E+05	9.05E+05	8.47E+05	8.34E+05							1.14E+06	1.04E+06	8.26E+05	9.30E+05	9.43E+05							1.14E+06	1.10E+06	1.11E+06	8.49E+05	1.09E+06							9.49E+05	8.83E+05	8.07E+05	7.12E+05	7.81E+05							8.54E+05	7.50E+05	7.92E+05	1.03E+06	7.04E+05
3.15E+07	3.23E+07	3.31E+08	2.39E+07	2.99E+07	5.13E+07	2.86E+06	3.50E+06	2.35E+06	2.97E+06	3.80E+06	2.90E+08	2.77E+08	1.03E+09	3.31E+08	3.05E+08	6.05E+08	1.23E+06	1.30E+06	1.54E+06	1.21E+06	1.35E+06	9.78E+08	1.09E+09	7.47E+09	1.03E+09	9.80E+08	1.93E+09	1.32E+06	1.39E+06	1.23E+06	1.32E+06	1.10E+06	6.40E+09	6.18E+09	3.49E+09	7.47E+09	6.27E+09	8.15E+09	1.61E+06	1.26E+06	1.19E+06	1.34E+06	8.34E+06	6.53E+09	3.96E+09	1.73E+08	3.49E+09	2.12E+09	1.16E+10	1.01E+06	8.33E+05	8.40E+05	9.04E+05	3.67E+06	1.72E+10	4.60E+08	1.99E+07	1.73E+08	2.71E+08	2.61E+10	1.13E+06	1.10E+06	1.02E+06	1.06E+06	1.09E+06	2.34E+10	2.09E+08	4.98E+07	1.99E+07	9.50E+06		1.04E+06	1.09E+06	9.97E+05	1.03E+06	9.89E+05	5.72E+10	8.33E+08	1.08E+06	4.98E+07	2.40E+07		1.26E+06	1.24E+06	1.12E+06	1.20E+06	1.18E+06		9.93E+06	1.32E+06	1.08E+06	1.01E+06		5.99E+05	8.60E+05	7.70E+05	8.21E+05	7.86E+05		3.09E+07	1.33E+06	1.32E+06	1.02E+06		1.15E+06	9.51E+05	1.05E+06	1.21E+06	8.73E+05		2.83E+07	7.79E+05	1.33E+06	1.10E+06		9.68E+05	9.71E+05	9.28E+05	9.00E+05	9.03E+05		2.35E+07	1.31E+06	7.79E+05	6.62E+05		1.02E+06	1.05E+06	1.26E+06	1.09E+06	1.18E+06		4.55E+07	1.10E+06	1.31E+06	9.20E+05		1.13E+06	1.04E+06	1.02E+06	1.06E+06	1.05E+06		9.92E+07	1.01E+06	1.10E+06	7.86E+05		1.09E+06	1.10E+06	9.14E+05	1.08E+06	9.18E+05		1.13E+07		1.01E+06	1.02E+06		1.02E+06	1.04E+06	1.16E+06	1.01E+06	1.12E+06							6.97E+05	6.22E+05	6.66E+05	6.19E+05	7.17E+05							1.17E+06	9.10E+05	7.50E+05	9.02E+05	9.51E+05							1.20E+06	9.35E+05	9.50E+05	1.23E+06	9.41E+05							7.15E+05	8.87E+05	1.13E+06	9.09E+05	9.14E+05							8.33E+05	9.84E+05	9.05E+05	8.47E+05	8.34E+05							1.14E+06	1.04E+06	8.26E+05	9.30E+05	9.43E+05							1.14E+06	1.10E+06	1.11E+06	8.49E+05	1.09E+06							9.49E+05	8.83E+05	8.07E+05	7.12E+05	7.81E+05							8.54E+05	7.50E+05	7.92E+05	1.03E+06	7.04E+05											
2.90E+08	2.77E+08	1.03E+09	3.31E+08	3.05E+08	6.05E+08	1.23E+06	1.30E+06	1.54E+06	1.21E+06	1.35E+06	9.78E+08	1.09E+09	7.47E+09	1.03E+09	9.80E+08	1.93E+09	1.32E+06	1.39E+06	1.23E+06	1.32E+06	1.10E+06	6.40E+09	6.18E+09	3.49E+09	7.47E+09	6.27E+09	8.15E+09	1.61E+06	1.26E+06	1.19E+06	1.34E+06	8.34E+06	6.53E+09	3.96E+09	1.73E+08	3.49E+09	2.12E+09	1.16E+10	1.01E+06	8.33E+05	8.40E+05	9.04E+05	3.67E+06	1.72E+10	4.60E+08	1.99E+07	1.73E+08	2.71E+08	2.61E+10	1.13E+06	1.10E+06	1.02E+06	1.06E+06	1.09E+06	2.34E+10	2.09E+08	4.98E+07	1.99E+07	9.50E+06		1.04E+06	1.09E+06	9.97E+05	1.03E+06	9.89E+05	5.72E+10	8.33E+08	1.08E+06	4.98E+07	2.40E+07		1.26E+06	1.24E+06	1.12E+06	1.20E+06	1.18E+06		9.93E+06	1.32E+06	1.08E+06	1.01E+06		5.99E+05	8.60E+05	7.70E+05	8.21E+05	7.86E+05		3.09E+07	1.33E+06	1.32E+06	1.02E+06		1.15E+06	9.51E+05	1.05E+06	1.21E+06	8.73E+05		2.83E+07	7.79E+05	1.33E+06	1.10E+06		9.68E+05	9.71E+05	9.28E+05	9.00E+05	9.03E+05		2.35E+07	1.31E+06	7.79E+05	6.62E+05		1.02E+06	1.05E+06	1.26E+06	1.09E+06	1.18E+06		4.55E+07	1.10E+06	1.31E+06	9.20E+05		1.13E+06	1.04E+06	1.02E+06	1.06E+06	1.05E+06		9.92E+07	1.01E+06	1.10E+06	7.86E+05		1.09E+06	1.10E+06	9.14E+05	1.08E+06	9.18E+05		1.13E+07		1.01E+06	1.02E+06		1.02E+06	1.04E+06	1.16E+06	1.01E+06	1.12E+06							6.97E+05	6.22E+05	6.66E+05	6.19E+05	7.17E+05							1.17E+06	9.10E+05	7.50E+05	9.02E+05	9.51E+05							1.20E+06	9.35E+05	9.50E+05	1.23E+06	9.41E+05							7.15E+05	8.87E+05	1.13E+06	9.09E+05	9.14E+05							8.33E+05	9.84E+05	9.05E+05	8.47E+05	8.34E+05							1.14E+06	1.04E+06	8.26E+05	9.30E+05	9.43E+05							1.14E+06	1.10E+06	1.11E+06	8.49E+05	1.09E+06							9.49E+05	8.83E+05	8.07E+05	7.12E+05	7.81E+05							8.54E+05	7.50E+05	7.92E+05	1.03E+06	7.04E+05																						
9.78E+08	1.09E+09	7.47E+09	1.03E+09	9.80E+08	1.93E+09	1.32E+06	1.39E+06	1.23E+06	1.32E+06	1.10E+06	6.40E+09	6.18E+09	3.49E+09	7.47E+09	6.27E+09	8.15E+09	1.61E+06	1.26E+06	1.19E+06	1.34E+06	8.34E+06	6.53E+09	3.96E+09	1.73E+08	3.49E+09	2.12E+09	1.16E+10	1.01E+06	8.33E+05	8.40E+05	9.04E+05	3.67E+06	1.72E+10	4.60E+08	1.99E+07	1.73E+08	2.71E+08	2.61E+10	1.13E+06	1.10E+06	1.02E+06	1.06E+06	1.09E+06	2.34E+10	2.09E+08	4.98E+07	1.99E+07	9.50E+06		1.04E+06	1.09E+06	9.97E+05	1.03E+06	9.89E+05	5.72E+10	8.33E+08	1.08E+06	4.98E+07	2.40E+07		1.26E+06	1.24E+06	1.12E+06	1.20E+06	1.18E+06		9.93E+06	1.32E+06	1.08E+06	1.01E+06		5.99E+05	8.60E+05	7.70E+05	8.21E+05	7.86E+05		3.09E+07	1.33E+06	1.32E+06	1.02E+06		1.15E+06	9.51E+05	1.05E+06	1.21E+06	8.73E+05		2.83E+07	7.79E+05	1.33E+06	1.10E+06		9.68E+05	9.71E+05	9.28E+05	9.00E+05	9.03E+05		2.35E+07	1.31E+06	7.79E+05	6.62E+05		1.02E+06	1.05E+06	1.26E+06	1.09E+06	1.18E+06		4.55E+07	1.10E+06	1.31E+06	9.20E+05		1.13E+06	1.04E+06	1.02E+06	1.06E+06	1.05E+06		9.92E+07	1.01E+06	1.10E+06	7.86E+05		1.09E+06	1.10E+06	9.14E+05	1.08E+06	9.18E+05		1.13E+07		1.01E+06	1.02E+06		1.02E+06	1.04E+06	1.16E+06	1.01E+06	1.12E+06							6.97E+05	6.22E+05	6.66E+05	6.19E+05	7.17E+05							1.17E+06	9.10E+05	7.50E+05	9.02E+05	9.51E+05							1.20E+06	9.35E+05	9.50E+05	1.23E+06	9.41E+05							7.15E+05	8.87E+05	1.13E+06	9.09E+05	9.14E+05							8.33E+05	9.84E+05	9.05E+05	8.47E+05	8.34E+05							1.14E+06	1.04E+06	8.26E+05	9.30E+05	9.43E+05							1.14E+06	1.10E+06	1.11E+06	8.49E+05	1.09E+06							9.49E+05	8.83E+05	8.07E+05	7.12E+05	7.81E+05							8.54E+05	7.50E+05	7.92E+05	1.03E+06	7.04E+05																																	
6.40E+09	6.18E+09	3.49E+09	7.47E+09	6.27E+09	8.15E+09	1.61E+06	1.26E+06	1.19E+06	1.34E+06	8.34E+06	6.53E+09	3.96E+09	1.73E+08	3.49E+09	2.12E+09	1.16E+10	1.01E+06	8.33E+05	8.40E+05	9.04E+05	3.67E+06	1.72E+10	4.60E+08	1.99E+07	1.73E+08	2.71E+08	2.61E+10	1.13E+06	1.10E+06	1.02E+06	1.06E+06	1.09E+06	2.34E+10	2.09E+08	4.98E+07	1.99E+07	9.50E+06		1.04E+06	1.09E+06	9.97E+05	1.03E+06	9.89E+05	5.72E+10	8.33E+08	1.08E+06	4.98E+07	2.40E+07		1.26E+06	1.24E+06	1.12E+06	1.20E+06	1.18E+06		9.93E+06	1.32E+06	1.08E+06	1.01E+06		5.99E+05	8.60E+05	7.70E+05	8.21E+05	7.86E+05		3.09E+07	1.33E+06	1.32E+06	1.02E+06		1.15E+06	9.51E+05	1.05E+06	1.21E+06	8.73E+05		2.83E+07	7.79E+05	1.33E+06	1.10E+06		9.68E+05	9.71E+05	9.28E+05	9.00E+05	9.03E+05		2.35E+07	1.31E+06	7.79E+05	6.62E+05		1.02E+06	1.05E+06	1.26E+06	1.09E+06	1.18E+06		4.55E+07	1.10E+06	1.31E+06	9.20E+05		1.13E+06	1.04E+06	1.02E+06	1.06E+06	1.05E+06		9.92E+07	1.01E+06	1.10E+06	7.86E+05		1.09E+06	1.10E+06	9.14E+05	1.08E+06	9.18E+05		1.13E+07		1.01E+06	1.02E+06		1.02E+06	1.04E+06	1.16E+06	1.01E+06	1.12E+06							6.97E+05	6.22E+05	6.66E+05	6.19E+05	7.17E+05							1.17E+06	9.10E+05	7.50E+05	9.02E+05	9.51E+05							1.20E+06	9.35E+05	9.50E+05	1.23E+06	9.41E+05							7.15E+05	8.87E+05	1.13E+06	9.09E+05	9.14E+05							8.33E+05	9.84E+05	9.05E+05	8.47E+05	8.34E+05							1.14E+06	1.04E+06	8.26E+05	9.30E+05	9.43E+05							1.14E+06	1.10E+06	1.11E+06	8.49E+05	1.09E+06							9.49E+05	8.83E+05	8.07E+05	7.12E+05	7.81E+05							8.54E+05	7.50E+05	7.92E+05	1.03E+06	7.04E+05																																												
6.53E+09	3.96E+09	1.73E+08	3.49E+09	2.12E+09	1.16E+10	1.01E+06	8.33E+05	8.40E+05	9.04E+05	3.67E+06	1.72E+10	4.60E+08	1.99E+07	1.73E+08	2.71E+08	2.61E+10	1.13E+06	1.10E+06	1.02E+06	1.06E+06	1.09E+06	2.34E+10	2.09E+08	4.98E+07	1.99E+07	9.50E+06		1.04E+06	1.09E+06	9.97E+05	1.03E+06	9.89E+05	5.72E+10	8.33E+08	1.08E+06	4.98E+07	2.40E+07		1.26E+06	1.24E+06	1.12E+06	1.20E+06	1.18E+06		9.93E+06	1.32E+06	1.08E+06	1.01E+06		5.99E+05	8.60E+05	7.70E+05	8.21E+05	7.86E+05		3.09E+07	1.33E+06	1.32E+06	1.02E+06		1.15E+06	9.51E+05	1.05E+06	1.21E+06	8.73E+05		2.83E+07	7.79E+05	1.33E+06	1.10E+06		9.68E+05	9.71E+05	9.28E+05	9.00E+05	9.03E+05		2.35E+07	1.31E+06	7.79E+05	6.62E+05		1.02E+06	1.05E+06	1.26E+06	1.09E+06	1.18E+06		4.55E+07	1.10E+06	1.31E+06	9.20E+05		1.13E+06	1.04E+06	1.02E+06	1.06E+06	1.05E+06		9.92E+07	1.01E+06	1.10E+06	7.86E+05		1.09E+06	1.10E+06	9.14E+05	1.08E+06	9.18E+05		1.13E+07		1.01E+06	1.02E+06		1.02E+06	1.04E+06	1.16E+06	1.01E+06	1.12E+06							6.97E+05	6.22E+05	6.66E+05	6.19E+05	7.17E+05							1.17E+06	9.10E+05	7.50E+05	9.02E+05	9.51E+05							1.20E+06	9.35E+05	9.50E+05	1.23E+06	9.41E+05							7.15E+05	8.87E+05	1.13E+06	9.09E+05	9.14E+05							8.33E+05	9.84E+05	9.05E+05	8.47E+05	8.34E+05							1.14E+06	1.04E+06	8.26E+05	9.30E+05	9.43E+05							1.14E+06	1.10E+06	1.11E+06	8.49E+05	1.09E+06							9.49E+05	8.83E+05	8.07E+05	7.12E+05	7.81E+05							8.54E+05	7.50E+05	7.92E+05	1.03E+06	7.04E+05																																																							
1.72E+10	4.60E+08	1.99E+07	1.73E+08	2.71E+08	2.61E+10	1.13E+06	1.10E+06	1.02E+06	1.06E+06	1.09E+06	2.34E+10	2.09E+08	4.98E+07	1.99E+07	9.50E+06		1.04E+06	1.09E+06	9.97E+05	1.03E+06	9.89E+05	5.72E+10	8.33E+08	1.08E+06	4.98E+07	2.40E+07		1.26E+06	1.24E+06	1.12E+06	1.20E+06	1.18E+06		9.93E+06	1.32E+06	1.08E+06	1.01E+06		5.99E+05	8.60E+05	7.70E+05	8.21E+05	7.86E+05		3.09E+07	1.33E+06	1.32E+06	1.02E+06		1.15E+06	9.51E+05	1.05E+06	1.21E+06	8.73E+05		2.83E+07	7.79E+05	1.33E+06	1.10E+06		9.68E+05	9.71E+05	9.28E+05	9.00E+05	9.03E+05		2.35E+07	1.31E+06	7.79E+05	6.62E+05		1.02E+06	1.05E+06	1.26E+06	1.09E+06	1.18E+06		4.55E+07	1.10E+06	1.31E+06	9.20E+05		1.13E+06	1.04E+06	1.02E+06	1.06E+06	1.05E+06		9.92E+07	1.01E+06	1.10E+06	7.86E+05		1.09E+06	1.10E+06	9.14E+05	1.08E+06	9.18E+05		1.13E+07		1.01E+06	1.02E+06		1.02E+06	1.04E+06	1.16E+06	1.01E+06	1.12E+06							6.97E+05	6.22E+05	6.66E+05	6.19E+05	7.17E+05							1.17E+06	9.10E+05	7.50E+05	9.02E+05	9.51E+05							1.20E+06	9.35E+05	9.50E+05	1.23E+06	9.41E+05							7.15E+05	8.87E+05	1.13E+06	9.09E+05	9.14E+05							8.33E+05	9.84E+05	9.05E+05	8.47E+05	8.34E+05							1.14E+06	1.04E+06	8.26E+05	9.30E+05	9.43E+05							1.14E+06	1.10E+06	1.11E+06	8.49E+05	1.09E+06							9.49E+05	8.83E+05	8.07E+05	7.12E+05	7.81E+05							8.54E+05	7.50E+05	7.92E+05	1.03E+06	7.04E+05																																																																		
2.34E+10	2.09E+08	4.98E+07	1.99E+07	9.50E+06		1.04E+06	1.09E+06	9.97E+05	1.03E+06	9.89E+05	5.72E+10	8.33E+08	1.08E+06	4.98E+07	2.40E+07		1.26E+06	1.24E+06	1.12E+06	1.20E+06	1.18E+06		9.93E+06	1.32E+06	1.08E+06	1.01E+06		5.99E+05	8.60E+05	7.70E+05	8.21E+05	7.86E+05		3.09E+07	1.33E+06	1.32E+06	1.02E+06		1.15E+06	9.51E+05	1.05E+06	1.21E+06	8.73E+05		2.83E+07	7.79E+05	1.33E+06	1.10E+06		9.68E+05	9.71E+05	9.28E+05	9.00E+05	9.03E+05		2.35E+07	1.31E+06	7.79E+05	6.62E+05		1.02E+06	1.05E+06	1.26E+06	1.09E+06	1.18E+06		4.55E+07	1.10E+06	1.31E+06	9.20E+05		1.13E+06	1.04E+06	1.02E+06	1.06E+06	1.05E+06		9.92E+07	1.01E+06	1.10E+06	7.86E+05		1.09E+06	1.10E+06	9.14E+05	1.08E+06	9.18E+05		1.13E+07		1.01E+06	1.02E+06		1.02E+06	1.04E+06	1.16E+06	1.01E+06	1.12E+06							6.97E+05	6.22E+05	6.66E+05	6.19E+05	7.17E+05							1.17E+06	9.10E+05	7.50E+05	9.02E+05	9.51E+05							1.20E+06	9.35E+05	9.50E+05	1.23E+06	9.41E+05							7.15E+05	8.87E+05	1.13E+06	9.09E+05	9.14E+05							8.33E+05	9.84E+05	9.05E+05	8.47E+05	8.34E+05							1.14E+06	1.04E+06	8.26E+05	9.30E+05	9.43E+05							1.14E+06	1.10E+06	1.11E+06	8.49E+05	1.09E+06							9.49E+05	8.83E+05	8.07E+05	7.12E+05	7.81E+05							8.54E+05	7.50E+05	7.92E+05	1.03E+06	7.04E+05																																																																													
5.72E+10	8.33E+08	1.08E+06	4.98E+07	2.40E+07		1.26E+06	1.24E+06	1.12E+06	1.20E+06	1.18E+06		9.93E+06	1.32E+06	1.08E+06	1.01E+06		5.99E+05	8.60E+05	7.70E+05	8.21E+05	7.86E+05		3.09E+07	1.33E+06	1.32E+06	1.02E+06		1.15E+06	9.51E+05	1.05E+06	1.21E+06	8.73E+05		2.83E+07	7.79E+05	1.33E+06	1.10E+06		9.68E+05	9.71E+05	9.28E+05	9.00E+05	9.03E+05		2.35E+07	1.31E+06	7.79E+05	6.62E+05		1.02E+06	1.05E+06	1.26E+06	1.09E+06	1.18E+06		4.55E+07	1.10E+06	1.31E+06	9.20E+05		1.13E+06	1.04E+06	1.02E+06	1.06E+06	1.05E+06		9.92E+07	1.01E+06	1.10E+06	7.86E+05		1.09E+06	1.10E+06	9.14E+05	1.08E+06	9.18E+05		1.13E+07		1.01E+06	1.02E+06		1.02E+06	1.04E+06	1.16E+06	1.01E+06	1.12E+06							6.97E+05	6.22E+05	6.66E+05	6.19E+05	7.17E+05							1.17E+06	9.10E+05	7.50E+05	9.02E+05	9.51E+05							1.20E+06	9.35E+05	9.50E+05	1.23E+06	9.41E+05							7.15E+05	8.87E+05	1.13E+06	9.09E+05	9.14E+05							8.33E+05	9.84E+05	9.05E+05	8.47E+05	8.34E+05							1.14E+06	1.04E+06	8.26E+05	9.30E+05	9.43E+05							1.14E+06	1.10E+06	1.11E+06	8.49E+05	1.09E+06							9.49E+05	8.83E+05	8.07E+05	7.12E+05	7.81E+05							8.54E+05	7.50E+05	7.92E+05	1.03E+06	7.04E+05																																																																																								
	9.93E+06	1.32E+06	1.08E+06	1.01E+06		5.99E+05	8.60E+05	7.70E+05	8.21E+05	7.86E+05		3.09E+07	1.33E+06	1.32E+06	1.02E+06		1.15E+06	9.51E+05	1.05E+06	1.21E+06	8.73E+05		2.83E+07	7.79E+05	1.33E+06	1.10E+06		9.68E+05	9.71E+05	9.28E+05	9.00E+05	9.03E+05		2.35E+07	1.31E+06	7.79E+05	6.62E+05		1.02E+06	1.05E+06	1.26E+06	1.09E+06	1.18E+06		4.55E+07	1.10E+06	1.31E+06	9.20E+05		1.13E+06	1.04E+06	1.02E+06	1.06E+06	1.05E+06		9.92E+07	1.01E+06	1.10E+06	7.86E+05		1.09E+06	1.10E+06	9.14E+05	1.08E+06	9.18E+05		1.13E+07		1.01E+06	1.02E+06		1.02E+06	1.04E+06	1.16E+06	1.01E+06	1.12E+06							6.97E+05	6.22E+05	6.66E+05	6.19E+05	7.17E+05							1.17E+06	9.10E+05	7.50E+05	9.02E+05	9.51E+05							1.20E+06	9.35E+05	9.50E+05	1.23E+06	9.41E+05							7.15E+05	8.87E+05	1.13E+06	9.09E+05	9.14E+05							8.33E+05	9.84E+05	9.05E+05	8.47E+05	8.34E+05							1.14E+06	1.04E+06	8.26E+05	9.30E+05	9.43E+05							1.14E+06	1.10E+06	1.11E+06	8.49E+05	1.09E+06							9.49E+05	8.83E+05	8.07E+05	7.12E+05	7.81E+05							8.54E+05	7.50E+05	7.92E+05	1.03E+06	7.04E+05																																																																																																			
	3.09E+07	1.33E+06	1.32E+06	1.02E+06		1.15E+06	9.51E+05	1.05E+06	1.21E+06	8.73E+05		2.83E+07	7.79E+05	1.33E+06	1.10E+06		9.68E+05	9.71E+05	9.28E+05	9.00E+05	9.03E+05		2.35E+07	1.31E+06	7.79E+05	6.62E+05		1.02E+06	1.05E+06	1.26E+06	1.09E+06	1.18E+06		4.55E+07	1.10E+06	1.31E+06	9.20E+05		1.13E+06	1.04E+06	1.02E+06	1.06E+06	1.05E+06		9.92E+07	1.01E+06	1.10E+06	7.86E+05		1.09E+06	1.10E+06	9.14E+05	1.08E+06	9.18E+05		1.13E+07		1.01E+06	1.02E+06		1.02E+06	1.04E+06	1.16E+06	1.01E+06	1.12E+06							6.97E+05	6.22E+05	6.66E+05	6.19E+05	7.17E+05							1.17E+06	9.10E+05	7.50E+05	9.02E+05	9.51E+05							1.20E+06	9.35E+05	9.50E+05	1.23E+06	9.41E+05							7.15E+05	8.87E+05	1.13E+06	9.09E+05	9.14E+05							8.33E+05	9.84E+05	9.05E+05	8.47E+05	8.34E+05							1.14E+06	1.04E+06	8.26E+05	9.30E+05	9.43E+05							1.14E+06	1.10E+06	1.11E+06	8.49E+05	1.09E+06							9.49E+05	8.83E+05	8.07E+05	7.12E+05	7.81E+05							8.54E+05	7.50E+05	7.92E+05	1.03E+06	7.04E+05																																																																																																														
	2.83E+07	7.79E+05	1.33E+06	1.10E+06		9.68E+05	9.71E+05	9.28E+05	9.00E+05	9.03E+05		2.35E+07	1.31E+06	7.79E+05	6.62E+05		1.02E+06	1.05E+06	1.26E+06	1.09E+06	1.18E+06		4.55E+07	1.10E+06	1.31E+06	9.20E+05		1.13E+06	1.04E+06	1.02E+06	1.06E+06	1.05E+06		9.92E+07	1.01E+06	1.10E+06	7.86E+05		1.09E+06	1.10E+06	9.14E+05	1.08E+06	9.18E+05		1.13E+07		1.01E+06	1.02E+06		1.02E+06	1.04E+06	1.16E+06	1.01E+06	1.12E+06							6.97E+05	6.22E+05	6.66E+05	6.19E+05	7.17E+05							1.17E+06	9.10E+05	7.50E+05	9.02E+05	9.51E+05							1.20E+06	9.35E+05	9.50E+05	1.23E+06	9.41E+05							7.15E+05	8.87E+05	1.13E+06	9.09E+05	9.14E+05							8.33E+05	9.84E+05	9.05E+05	8.47E+05	8.34E+05							1.14E+06	1.04E+06	8.26E+05	9.30E+05	9.43E+05							1.14E+06	1.10E+06	1.11E+06	8.49E+05	1.09E+06							9.49E+05	8.83E+05	8.07E+05	7.12E+05	7.81E+05							8.54E+05	7.50E+05	7.92E+05	1.03E+06	7.04E+05																																																																																																																									
	2.35E+07	1.31E+06	7.79E+05	6.62E+05		1.02E+06	1.05E+06	1.26E+06	1.09E+06	1.18E+06		4.55E+07	1.10E+06	1.31E+06	9.20E+05		1.13E+06	1.04E+06	1.02E+06	1.06E+06	1.05E+06		9.92E+07	1.01E+06	1.10E+06	7.86E+05		1.09E+06	1.10E+06	9.14E+05	1.08E+06	9.18E+05		1.13E+07		1.01E+06	1.02E+06		1.02E+06	1.04E+06	1.16E+06	1.01E+06	1.12E+06							6.97E+05	6.22E+05	6.66E+05	6.19E+05	7.17E+05							1.17E+06	9.10E+05	7.50E+05	9.02E+05	9.51E+05							1.20E+06	9.35E+05	9.50E+05	1.23E+06	9.41E+05							7.15E+05	8.87E+05	1.13E+06	9.09E+05	9.14E+05							8.33E+05	9.84E+05	9.05E+05	8.47E+05	8.34E+05							1.14E+06	1.04E+06	8.26E+05	9.30E+05	9.43E+05							1.14E+06	1.10E+06	1.11E+06	8.49E+05	1.09E+06							9.49E+05	8.83E+05	8.07E+05	7.12E+05	7.81E+05							8.54E+05	7.50E+05	7.92E+05	1.03E+06	7.04E+05																																																																																																																																				
	4.55E+07	1.10E+06	1.31E+06	9.20E+05		1.13E+06	1.04E+06	1.02E+06	1.06E+06	1.05E+06		9.92E+07	1.01E+06	1.10E+06	7.86E+05		1.09E+06	1.10E+06	9.14E+05	1.08E+06	9.18E+05		1.13E+07		1.01E+06	1.02E+06		1.02E+06	1.04E+06	1.16E+06	1.01E+06	1.12E+06							6.97E+05	6.22E+05	6.66E+05	6.19E+05	7.17E+05							1.17E+06	9.10E+05	7.50E+05	9.02E+05	9.51E+05							1.20E+06	9.35E+05	9.50E+05	1.23E+06	9.41E+05							7.15E+05	8.87E+05	1.13E+06	9.09E+05	9.14E+05							8.33E+05	9.84E+05	9.05E+05	8.47E+05	8.34E+05							1.14E+06	1.04E+06	8.26E+05	9.30E+05	9.43E+05							1.14E+06	1.10E+06	1.11E+06	8.49E+05	1.09E+06							9.49E+05	8.83E+05	8.07E+05	7.12E+05	7.81E+05							8.54E+05	7.50E+05	7.92E+05	1.03E+06	7.04E+05																																																																																																																																															
	9.92E+07	1.01E+06	1.10E+06	7.86E+05		1.09E+06	1.10E+06	9.14E+05	1.08E+06	9.18E+05		1.13E+07		1.01E+06	1.02E+06		1.02E+06	1.04E+06	1.16E+06	1.01E+06	1.12E+06							6.97E+05	6.22E+05	6.66E+05	6.19E+05	7.17E+05							1.17E+06	9.10E+05	7.50E+05	9.02E+05	9.51E+05							1.20E+06	9.35E+05	9.50E+05	1.23E+06	9.41E+05							7.15E+05	8.87E+05	1.13E+06	9.09E+05	9.14E+05							8.33E+05	9.84E+05	9.05E+05	8.47E+05	8.34E+05							1.14E+06	1.04E+06	8.26E+05	9.30E+05	9.43E+05							1.14E+06	1.10E+06	1.11E+06	8.49E+05	1.09E+06							9.49E+05	8.83E+05	8.07E+05	7.12E+05	7.81E+05							8.54E+05	7.50E+05	7.92E+05	1.03E+06	7.04E+05																																																																																																																																																										
	1.13E+07		1.01E+06	1.02E+06		1.02E+06	1.04E+06	1.16E+06	1.01E+06	1.12E+06							6.97E+05	6.22E+05	6.66E+05	6.19E+05	7.17E+05							1.17E+06	9.10E+05	7.50E+05	9.02E+05	9.51E+05							1.20E+06	9.35E+05	9.50E+05	1.23E+06	9.41E+05							7.15E+05	8.87E+05	1.13E+06	9.09E+05	9.14E+05							8.33E+05	9.84E+05	9.05E+05	8.47E+05	8.34E+05							1.14E+06	1.04E+06	8.26E+05	9.30E+05	9.43E+05							1.14E+06	1.10E+06	1.11E+06	8.49E+05	1.09E+06							9.49E+05	8.83E+05	8.07E+05	7.12E+05	7.81E+05							8.54E+05	7.50E+05	7.92E+05	1.03E+06	7.04E+05																																																																																																																																																																					
						6.97E+05	6.22E+05	6.66E+05	6.19E+05	7.17E+05							1.17E+06	9.10E+05	7.50E+05	9.02E+05	9.51E+05							1.20E+06	9.35E+05	9.50E+05	1.23E+06	9.41E+05							7.15E+05	8.87E+05	1.13E+06	9.09E+05	9.14E+05							8.33E+05	9.84E+05	9.05E+05	8.47E+05	8.34E+05							1.14E+06	1.04E+06	8.26E+05	9.30E+05	9.43E+05							1.14E+06	1.10E+06	1.11E+06	8.49E+05	1.09E+06							9.49E+05	8.83E+05	8.07E+05	7.12E+05	7.81E+05							8.54E+05	7.50E+05	7.92E+05	1.03E+06	7.04E+05																																																																																																																																																																																
						1.17E+06	9.10E+05	7.50E+05	9.02E+05	9.51E+05							1.20E+06	9.35E+05	9.50E+05	1.23E+06	9.41E+05							7.15E+05	8.87E+05	1.13E+06	9.09E+05	9.14E+05							8.33E+05	9.84E+05	9.05E+05	8.47E+05	8.34E+05							1.14E+06	1.04E+06	8.26E+05	9.30E+05	9.43E+05							1.14E+06	1.10E+06	1.11E+06	8.49E+05	1.09E+06							9.49E+05	8.83E+05	8.07E+05	7.12E+05	7.81E+05							8.54E+05	7.50E+05	7.92E+05	1.03E+06	7.04E+05																																																																																																																																																																																											
						1.20E+06	9.35E+05	9.50E+05	1.23E+06	9.41E+05							7.15E+05	8.87E+05	1.13E+06	9.09E+05	9.14E+05							8.33E+05	9.84E+05	9.05E+05	8.47E+05	8.34E+05							1.14E+06	1.04E+06	8.26E+05	9.30E+05	9.43E+05							1.14E+06	1.10E+06	1.11E+06	8.49E+05	1.09E+06							9.49E+05	8.83E+05	8.07E+05	7.12E+05	7.81E+05							8.54E+05	7.50E+05	7.92E+05	1.03E+06	7.04E+05																																																																																																																																																																																																						
						7.15E+05	8.87E+05	1.13E+06	9.09E+05	9.14E+05							8.33E+05	9.84E+05	9.05E+05	8.47E+05	8.34E+05							1.14E+06	1.04E+06	8.26E+05	9.30E+05	9.43E+05							1.14E+06	1.10E+06	1.11E+06	8.49E+05	1.09E+06							9.49E+05	8.83E+05	8.07E+05	7.12E+05	7.81E+05							8.54E+05	7.50E+05	7.92E+05	1.03E+06	7.04E+05																																																																																																																																																																																																																	
						8.33E+05	9.84E+05	9.05E+05	8.47E+05	8.34E+05							1.14E+06	1.04E+06	8.26E+05	9.30E+05	9.43E+05							1.14E+06	1.10E+06	1.11E+06	8.49E+05	1.09E+06							9.49E+05	8.83E+05	8.07E+05	7.12E+05	7.81E+05							8.54E+05	7.50E+05	7.92E+05	1.03E+06	7.04E+05																																																																																																																																																																																																																												
						1.14E+06	1.04E+06	8.26E+05	9.30E+05	9.43E+05							1.14E+06	1.10E+06	1.11E+06	8.49E+05	1.09E+06							9.49E+05	8.83E+05	8.07E+05	7.12E+05	7.81E+05							8.54E+05	7.50E+05	7.92E+05	1.03E+06	7.04E+05																																																																																																																																																																																																																																							
						1.14E+06	1.10E+06	1.11E+06	8.49E+05	1.09E+06							9.49E+05	8.83E+05	8.07E+05	7.12E+05	7.81E+05							8.54E+05	7.50E+05	7.92E+05	1.03E+06	7.04E+05																																																																																																																																																																																																																																																		
						9.49E+05	8.83E+05	8.07E+05	7.12E+05	7.81E+05							8.54E+05	7.50E+05	7.92E+05	1.03E+06	7.04E+05																																																																																																																																																																																																																																																													
						8.54E+05	7.50E+05	7.92E+05	1.03E+06	7.04E+05																																																																																																																																																																																																																																																																								

ε-CO相比显示有限的扩增。所有ε-CO组类似地证明在小鼠的外周血中,特别是在2e5和4e4治疗组中,稳健的CAR T细胞扩增和持久性。

[0740]

表 69

肿瘤接种后的 天数	G1.媒介物			G2.NTD			G3.ε-CO (1e6)						G4.ε-CO (2e5)						
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	329.67	242.62	743.49	581.48	465.02	73	36.41	184.25	84.31	95.97
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2148.61	736.43	3049.64	1111.11	733.62	101.67	297.34	97.52	48.29	192.99
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6139.29	6331.33	4301.27	7192.81	3089.58	9365.08	3182.9	12211.67	3785.66	5860.66
28										2579.25	1767.5	1622.14	1958.58	837.7	16474.46	4720.97	7252.28	3340.53	3412.55
35											5008.08	3562.14	3990.33	2107.82	1700.77	10178.57	3930.85	11362.67	11500.95
42										2457.83	2160.15	1234.44	2256.06	1431.61	22877.85	8703.7	2144.69	6166.19	12860.52

表 69 (续 1)

G5.ε-CO (4e4)			G6.ε-CO (Δ 181-185) (1e6)						G7.ε-CO (Δ 181-185) (2e5)					
34.06	13.7	20.8	35.75	16.99	300.66	795.45	479.78	278.88	327.87	81.7	61.68	40.99	83.75	78.13
505.72	57.64	122.35	45.18	97.15	472.97	394.62	981.82	234	176.42	30.67	71.17	14.81	35.63	61.19
401.29	61.76	454.55	88.24	340.78	5370.22	2657.34	5684.36	2874.16	3215.74	5654.45	1536.44	10466.96	3611.35	3330.63
1103.8	339.09	4287.62	615.31	5737.18	1300.37	1804.74	2051.76	1742.52	1395.66	1362.23	12794.9	14279.97	0	5024.33
15541.85	1938.11	9038.63	2081.73	17734.86	557.62	1428.73	2884.78	2976.3	357.14	537.58	0	14614.3	7491.18	0
3477.81	0	6799.7	0	19946.81	1460.99	150.79	1142.48	1096.24	692.52	606.52	0	3477.12	8501.2	2880.75

[0741]

表 69 (续 2)

G8.ε CO (Δ 181-185) (4e4)			G9.ε CO (R183K) (1e6)						
1.8	1.43	4.66	1.81	0	261.81	643.01	591.49	409.32	345.47
285.04	424.96	224.09	73.42	43.52	733.27	702.27		0	473.8
1092.8	823.42	728.76	1044.1	236.58	2493.42	2069.89	2244.9	3132.53	1287.73
1746.31	3692.52	197.69	1671.36	1826.92	833.9	1157.63	1465.59	1106.35	1096.41
2623.38	1837.27	1676.07	822.7	957.03	1216.49	1942.43	1989.27	1128.3	6210.77
3398.13	3627.85	1900.65	1966.69	1043.93	3768.39	0	3502	874.7	735.53

表 69 (续 3)

G10.ε CO (R183K) (2e5)				G11.ε CO (R183K) (4e4)					
120.9	113.74	0	97.33	226.69	16.82	40.63	29.49	16.87	13.21
116.14	234.99	131.04	65.94	86.73	37.59	70.92	84.37	29.98	95.92
8213.58	3532.34	992.7	1203.93	2547.33	171.06	298.3	102.12	173.89	31.45
2378.69	4095.74	1510.42	1446.77	8071.43	732.54	2266.24	1123.09	1055.16	1785.71
5681.21	9858.1	2149.95	8534.67	7705.19	3992.95	400	1279.83	272.02	2291.99
7585.11	5750.69	1527.86	4683.12	5032.8		171.37	1902.79	90.23	

[0742]

表 69 (续 4)

G12.ζ 1xx (1e6)			G13.ζ 1xx (2e5)					G14.ζ 1xx (4e4)						
301.58	408.23	381.72	320.2	284.05	36.21	52.69	76.22	16.01	47.26	0	49.88	16	26.9	19.43
151.4	0	13.16	0	62.12	259.29	63.42	237.09	117.32	94.25	43.52	77.51	31.6	46.95	623.7
142.76	190.48	148.15	250.63	173.51	0	37.02	27.88	0	46	88.63	109.17		106.8	21.71
401.22	270.58	205.25	339.9	794.61	155.47	40.5	9.17	16.06	54.42	25.92	911.16	410.13	92.23	
446.99	513.91		2386.39	296.57	120.03	316.07	242.94	370.37	0	1041.12	0	0	380.23	
565.37	82.15	267.98	407.24	781.41	296.97	817.83	129.31	381.25	185.05	58.19	0	0	502.16	

[0743] 一般来讲,在以下权利要求书中,所使用的术语不应被解释为将权利要求限制于说明书和权利要求书中所公开的具体实施方案,而是应被解释为包括所有可能的实施方案,连同此类权利要求所授权的等同方案的完整范围。因此,权利要求不受本公开的限制。

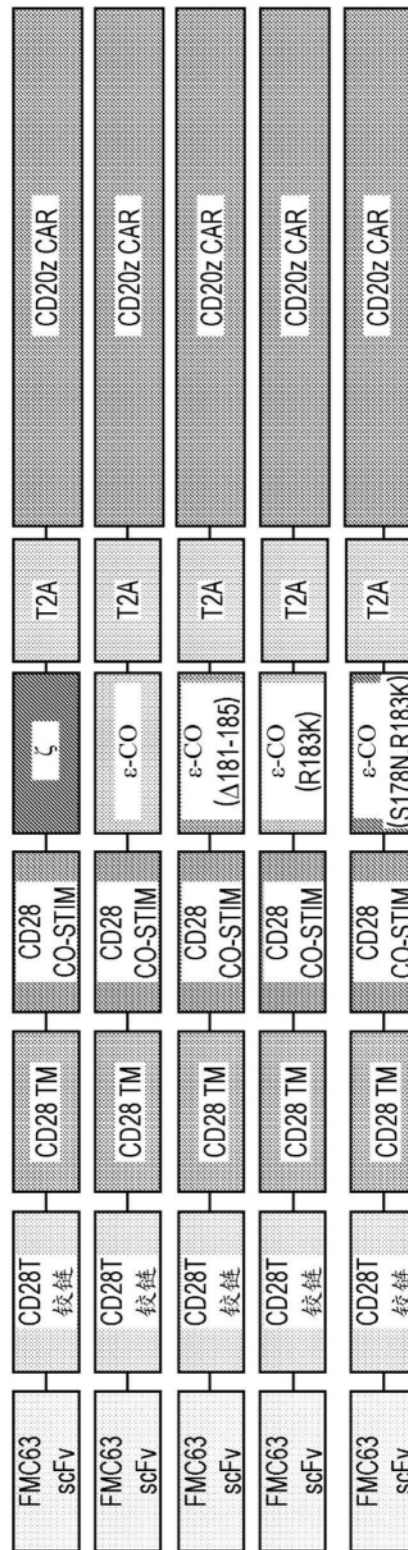


图1

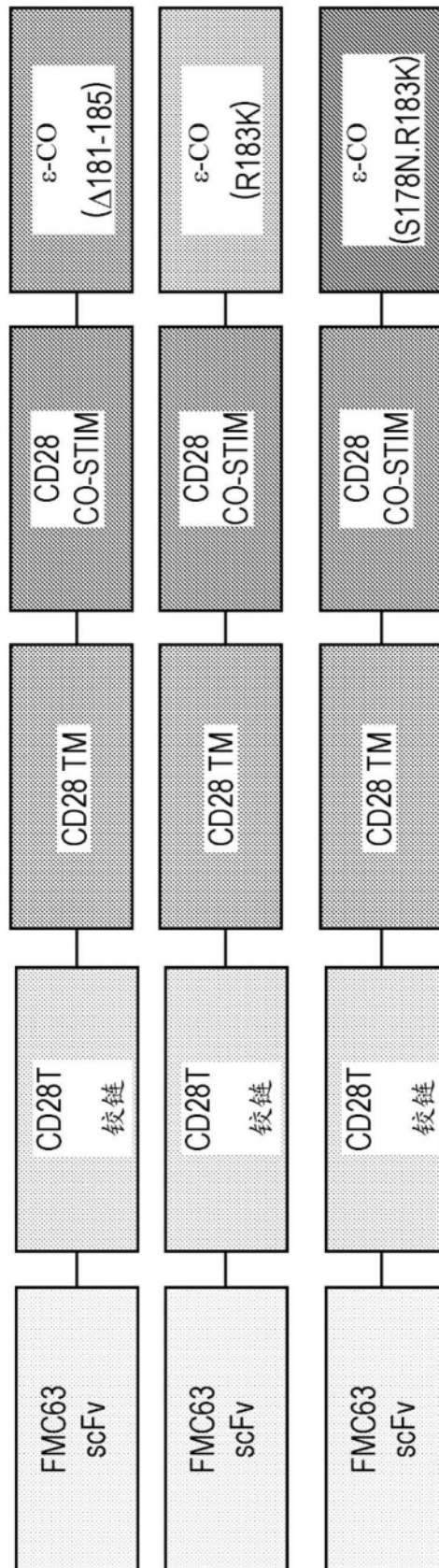


图2

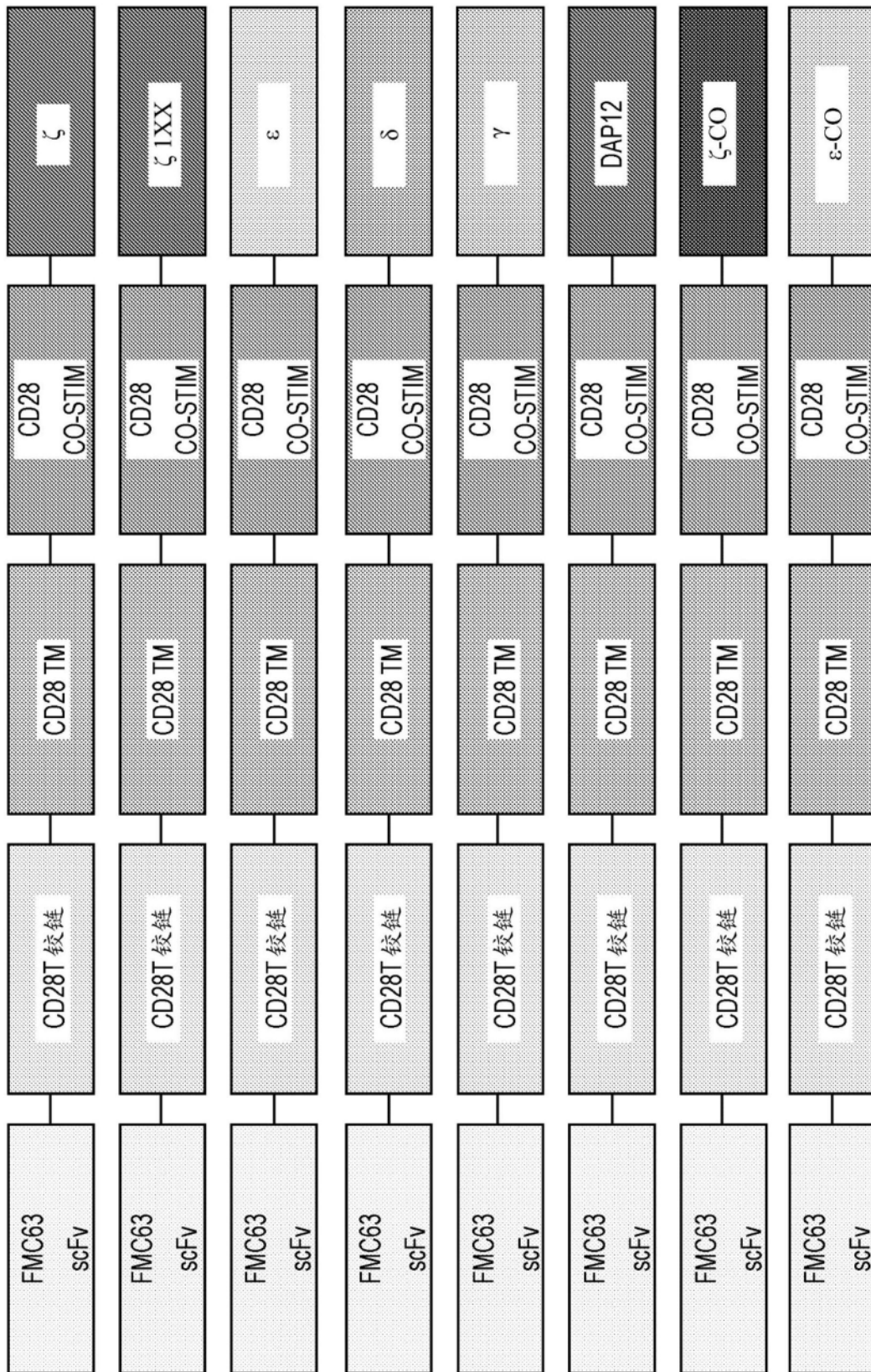


图3