



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111655270 A

(43)申请公布日 2020.09.11

(21)申请号 201880086462.6

(74)专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322

(22)申请日 2018.11.14

代理人 龙淳

(30)优先权数据

62/585,879 2017.11.14 US

(51)Int.Cl.

A61K 35/17(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.07.14

A61K 38/20(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/061003 2018.11.14

C07K 14/54(2006.01)

C07K 14/725(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/099483 EN 2019.05.23

C07K 16/28(2006.01)

(71)申请人 纪念斯隆-凯特琳癌症中心

地址 美国纽约州

(72)发明人 A·丹尼安 R·J·布伦特延斯

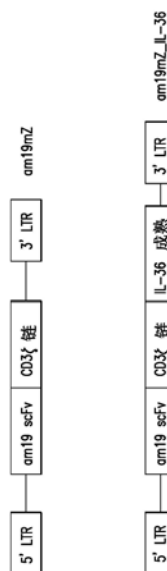
权利要求书4页 说明书48页 附图12页

(54)发明名称

分泌IL-36的免疫应答细胞及其用途

(57)摘要

本公开提供了用于增强针对癌症和病原体的免疫应答的方法和组合物。本发明涉及包括抗原识别受体(例如,嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR))、并表达水平升高的IL-36的免疫应答细胞。在某些实施方式中,改造的免疫应答细胞是抗原导向的,并具有增强的免疫激活特性。



1. 一种分离的免疫应答细胞,其包括:
 - (a) 与抗原结合的抗原识别受体,和
 - (b) 外源性IL-36多肽或其片段。
2. 一种分离的免疫应答细胞,其包括:
 - (a) 与抗原结合的抗原识别受体,和
 - (b) 在内源性IL-36基因座的修饰的启动子,其中所述修饰的启动子增强内源性IL-36基因的基因表达。
3. 根据权利要求2所述的分离的免疫应答细胞,其中所述修饰包括将内源性启动子用组成型启动子或诱导型启动子替换,或者将组成型启动子或诱导型启动子插入内源性IL-36基因座的启动子区。
4. 根据权利要求3所述的分离的免疫应答细胞,其中所述组成型启动子选自CMV启动子、EF1a启动子、SV40启动子、PGK1启动子、Ubc启动子、 β -肌动蛋白启动子和CAG启动子。
5. 根据权利要求3所述的分离的免疫应答细胞,其中所述诱导型启动子选自四环素应答元件(TRE)启动子和雌激素应答元件(ERE)启动子。
6. 根据权利要求1-5中任一项所述的分离的免疫应答细胞,其中所述抗原是肿瘤抗原或病原体抗原。
7. 根据权利要求1-6中任一项所述的分离的免疫应答细胞,其中所述外源性IL-36多肽是分泌的。
8. 根据权利要求1-7中任一项所述的分离的免疫应答细胞,其中所述抗原识别受体是T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)。
9. 根据权利要求1-8中任一项所述的分离的免疫应答细胞,其中所述抗原识别受体是外源性的或内源性的。
10. 根据权利要求1-9中任一项所述的分离的免疫应答细胞,其中所述抗原识别受体是重组表达的。
11. 根据权利要求1-10中任一项所述的分离的免疫应答细胞,其中所述抗原识别受体是从载体表达的。
12. 根据权利要求1-11中任一项所述的分离的免疫应答细胞,其中所述外源性IL-36多肽是从载体表达的。
13. 根据权利要求1-12中任一项所述的分离的免疫应答细胞,其中所述细胞选自T细胞、自然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、调节性T细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、人胚胎干细胞和可分化出淋巴样细胞的多能干细胞。
14. 根据权利要求1-13中任一项所述的分离的免疫应答细胞,其中所述免疫应答细胞是自体的。
15. 根据权利要求1-14中任一项所述的分离的免疫应答细胞,其中所述抗原是肿瘤抗原。
16. 根据权利要求15所述的分离的免疫应答细胞,其中所述肿瘤抗原选自CD19、MUC16、MUC1、CA1X、CEA、CD8、CD7、CD10、CD20、CD22、CD30、CLL1、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD49f、CD56、CD74、CD133、CD138、EGP-2、EGP-40、EpCAM、erb-B2, 3, 4、FBP、胎儿乙酰胆碱受体、叶酸受体-a、GD2、GD3、HER-2、hTERT、IL-13R-a2、K-轻链、KDR、LeY、L1细胞粘附分子、

MAGE-A1、间皮素、ERBB2、MAGEA3、p53、MART1、GP100、蛋白酶3 (PR1)、酪氨酸酶、存活蛋白、hTERT、EphA2、NKG2D配体、NY-ES0-1、癌胚抗原 (h5T4)、PSCA、PSMA、ROR1、TAG-72、VEGF-R2、WT-1、BCMA、CD123、CD44V6、NKCS1、EGF1R、EGFR-VIII、CD99、CD70、ADGRE2、CCR1、LILRB2、PRAME和ERBB。

17. 根据权利要求16所述的分离的免疫应答细胞,其中所述抗原是CD19。

18. 根据权利要求1-17中任一项所述的分离的免疫应答细胞,其中所述IL-36多肽在氨基末端包括异源性信号序列。

19. 根据权利要求18所述的分离的免疫应答细胞,其中所述异源性信号序列选自IL-2信号序列、 κ 前导序列、CD8前导序列及其组合。

20. 根据权利要求19所述的分离的免疫应答细胞,其中所述异源性信号序列是IL-2信号序列。

21. 根据权利要求1-20中任一项所述的分离的免疫应答细胞,其中所述抗原识别受体是CAR。

22. 根据权利要求21所述的分离的免疫应答细胞,其中所述CAR包括细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域。

23. 根据权利要求22所述的分离的免疫应答细胞,其中所述CAR不包括共刺激信号传导结构域。

24. 根据权利要求23所述的分离的免疫应答细胞,其中所述CAR为19z。

25. 根据权利要求1-24中任一项所述的分离的免疫应答细胞,其中所述IL-36肽是IL-36 α 、IL-36 β 、IL-36 γ 的成熟形式或其功能性片段。

26. 根据权利要求1-24中任一项所述的分离的免疫应答细胞,其中所述IL-36肽包括与SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31或SEQ ID NO:32所示的序列具有至少约80%同源性的氨基酸序列。

27. 根据权利要求26所述的分离的免疫应答细胞,其中所述IL-36肽包括SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31或SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列。

28. 根据权利要求1-27中任一项所述的分离的免疫应答细胞,其中所述外源性IL-36多肽增强所述免疫应答细胞的免疫应答。

29. 根据权利要求28所述的分离的免疫应答细胞,其中所述外源性IL-36多肽增加所述免疫应答细胞的抗肿瘤细胞因子产生。

30. 根据权利要求29所述的分离的免疫反应细胞,其中所述抗肿瘤细胞因子选自IL-10、GM-CSF和IFN- γ 。

31. 一种药物组合物,其包括有效量的根据权利要求1-30中任一项所述的免疫应答细胞和药学上可接受的赋形剂。

32. 根据权利要求31所述的药物组合物,其用于治疗肿瘤。

33. 一种减轻受试者的肿瘤负荷的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的免疫应答细胞或包括其的药物组合物,其中所述免疫应答细胞包括

(a) 与抗原结合的抗原识别受体和外源性IL-36多肽;或

(b) 与抗原结合的抗原识别受体和在内源性IL-36基因座的修饰的启动子,其中所述修

饰的启动子增强内源性IL-36基因的基因表达。

34. 根据权利要求33所述的方法,其中所述方法减少肿瘤细胞的数量。

35. 根据权利要求33所述的方法,其中所述方法减小肿瘤的大小。

36. 根据权利要求33所述的方法,其中所述方法根除所述受试者中的肿瘤。

37. 一种治疗和/或预防肿瘤的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的免疫应答细胞或包括其的药物组合物,其中所述免疫应答细胞包括:

(a) 与抗原结合的抗原识别受体和外源性IL-36多肽;或

(b) 与抗原结合的抗原识别受体和在内源性IL-36基因座的修饰的启动子,其中所述修饰的启动子增强内源性IL-36基因的基因表达。

38. 一种延长患有肿瘤的受试者的存活的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的免疫应答细胞或包括其的药物组合物,其中所述免疫应答细胞包括:

(a) 与抗原结合的抗原识别受体和外源性IL-36多肽;或

(b) 与抗原结合的抗原识别受体和在内源性IL-36基因座的修饰的启动子,其中所述修饰的启动子增强内源性IL-36基因的基因表达。

39. 根据权利要求37或38所述的方法,其中所述肿瘤选自血液癌、B细胞白血病、多发性骨髓瘤、成淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病、非霍奇金淋巴瘤和卵巢癌。

40. 根据权利要求39所述的方法,其中所述肿瘤是B细胞白血病、多发性骨髓瘤、成淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病或非霍奇金淋巴瘤,并且所述抗原是CD19。

41. 根据权利要求39所述的方法,其中所述肿瘤是卵巢癌,并且所述抗原是MUC16。

42. 一种响应于受试者中的肿瘤抗原或病原体抗原而增加免疫激活细胞因子产生的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的免疫应答细胞或包括其的药物组合物,其中所述免疫应答细胞包括:

(a) 与抗原结合的抗原识别受体和外源性IL-36多肽;或

(b) 与抗原结合的抗原识别受体和在内源性IL-36基因座的修饰的启动子,其中所述修饰的启动子增强内源性IL-36基因的基因表达。

43. 根据权利要求42所述的方法,其中所述免疫激活细胞因子选自IL-10、GM-SCF和IFN- γ 。

44. 根据权利要求33-43中任一项所述的方法,其中所述免疫应答细胞是根据权利要求1-30中任一项所述的免疫应答细胞。

45. 根据权利要求33-43中任一项所述的方法,其中所述药物组合物是根据权利要求31或32所述的药物组合物。

46. 一种在有需要的受试者中治疗血液癌的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的T细胞,其中所述T细胞包括

(a) 结合CD19的抗原识别受体和外源性IL-36多肽;或

(b) 结合CD19的抗原识别受体,和在内源性IL-36基因座的修饰的启动子,其中所述修饰的启动子增强内源性IL-36基因的基因表达。

47. 根据权利要求46所述的方法,其中所述血液癌选自B细胞白血病、多发性骨髓瘤、急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病和非霍奇金淋巴瘤。

48. 一种产生抗原特异性免疫应答细胞的方法,所述方法包括向免疫应答细胞中引入

(a) 编码与抗原结合的抗原识别受体的第一核酸序列;和 (b) 编码外源性IL-36多肽或其片段的第二核酸序列,其中所述第一核酸序列和所述第二核酸序列中的每一个任选地可操作地连接有启动子元件。

49. 根据权利要求48所述的方法,其中所述第一核酸序列和所述第二核酸序列之一或二者包括在载体中。

50. 根据权利要求49所述的方法,其中所述载体是逆转录病毒载体。

51. 一种核酸组合物,其包括 (a) 编码抗原识别受体的第一核酸序列和 (b) 编码外源性IL-36多肽或其片段的第二核酸序列,所述第一核酸序列和所述第二核酸序列中的每一个任选地可操作地连接有启动子元件。

52. 根据权利要求51所述的核酸组合物,其中所述第一核酸序列和所述第二核酸序列之一或二者包括在载体中。

53. 根据权利要求52所述的核酸组合物,其中所述载体是逆转录病毒载体。

54. 一种载体,其包括根据权利要求51-53中任一项所述的核酸组合物。

55. 一种试剂盒,其包括根据权利要求1-30中任一项所述的免疫应答细胞、根据权利要求31或32所述的药物组合物、根据权利要求51-53中任一项所述的核酸组合物、或根据权利要求54所述的载体。

56. 根据权利要求55所述的试剂盒,其中所述试剂盒进一步包括用于治疗 and/或预防肿瘤、病原体感染、自身免疫性疾病或同种异体移植的书面说明书。

57. 根据权利要求1-30中任一项所述的免疫应答细胞在治疗中的用途。

58. 根据权利要求1-30中任一项所述的免疫应答细胞在减轻肿瘤负荷中的用途。

59. 根据权利要求1-30中任一项所述的免疫应答细胞在治疗和/或预防肿瘤中的用途。

60. 根据权利要求1-30中任一项所述的免疫应答细胞在延长患有肿瘤的受试者的存活中的用途。

61. 根据权利要求1-30中任一项所述的免疫应答细胞在响应于受试者中的肿瘤抗原或病原体抗原而增加免疫激活细胞因子的产生中的用途。

62. 根据权利要求31或32所述的药物组合物在治疗中的用途。

63. 根据权利要求31或32所述的药物组合物在减轻肿瘤负荷中的用途。

64. 根据权利要求31或32所述的药物组合物在治疗和/或预防肿瘤中的用途。

65. 根据权利要求31或32所述的药物组合物在延长患有肿瘤的受试者的存活中的用途。

66. 根据权利要求31或32所述的药物组合物在响应于受试者中的肿瘤抗原或病原体抗原而增加免疫激活细胞因子的产生中的用途。

67. 根据权利要求1-30中任一项所述的免疫应答细胞在制备药物中的用途,所述药物用于减轻肿瘤负荷、治疗和/或预防肿瘤、延长患有肿瘤的受试者的存活和/或响应于受试者中的肿瘤抗原或病原体抗原增加免疫激活细胞因子的产生。

68. 根据权利要求31或32所述的药物组合物在制备药物中的用途,所述药物用于减轻肿瘤负荷、治疗和/或预防肿瘤、延长患有肿瘤的受试者的存活和/或响应于受试者中的肿瘤抗原或病原体抗原增加免疫激活细胞因子的产生。

分泌IL-36的免疫应答细胞及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2017年11月14日提交的美国临时申请号62/585,879的优先权,其全部内容通过引用合并于此,并要求其优先权。

技术领域

[0003] 本公开的主题提供了用于增强针对癌症和病原体的免疫应答的方法和组合物。本发明涉及免疫应答细胞,其包括经工程改造表达IL-36多肽的抗原识别受体(例如,嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR))。这些改造的免疫应答细胞是抗原导向的,促进其他细胞因子的募集并显示出增强的抗靶标功效。

背景技术

[0004] 尽管目前有可用的疗法,大多数成人B细胞恶性肿瘤,包括急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病和非霍奇金淋巴瘤仍无法治愈。基因改造的自体T细胞的过继治疗已显示出对黑色素瘤和惰性B细胞恶性肿瘤的治疗功效的证据。通过引入编码对这些抗原特异的人工T细胞受体(称为嵌合抗原受体(CAR))的基因,可以修饰T细胞以靶向肿瘤相关抗原。免疫疗法是一种靶向疗法,具有提供治疗癌症的潜力。

[0005] 然而,恶性细胞会适应产生免疫抑制性微环境,以保护自身免受免疫识别和消除。这种“敌对”的肿瘤微环境对涉及刺激免疫应答的治疗方法(例如靶向T细胞疗法)提出了挑战。为了改善CAR-或TCR-改造的T细胞的抗肿瘤作用,已经进行了各种修饰。例如,Pegram等人描述了组成型分泌白介素12(IL-12)的CAR-改造的T细胞的小鼠模型,显示出对CD19⁺肿瘤细胞的细胞毒性增加(Pegram等人,BLOOD,第119卷,第18期,2012)。然而,IL-12的分泌导致白介素2(IL-2)的抑制,白介素2(IL-2)是一种重要的细胞因子,其促进T和B淋巴细胞的增殖和抗肿瘤作用。Dotti等人公开了组成型分泌白介素15(IL-15)和基于诱导型胱天蛋白酶9的自杀基因(iC9)的CAR改造的T细胞,其显示出对CD19⁺肿瘤细胞的细胞毒性增加(US 20130071414 A1)。该修饰的CAR-T细胞在体内和体外均显示出不变的IL-2表达水平。因此,迫切需要用于治疗肿瘤的新的治疗策略。

发明内容

[0006] 本公开的主题提供了(a)表达针对所关注的靶抗原的抗原识别受体(例如,CAR或TCR)和(b)表达(并分泌)白介素36(“IL-36”)多肽(例如,IL-36 α 、IL-36 β 和/或IL-36 γ)的免疫应答细胞(例如,T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞、自然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、自然杀伤T(NK-T)细胞或调节性T细胞)。在某些非限制性实施方式中,免疫应答细胞包括以可表达形式编码IL-36多肽的核苷酸(例如,编码IL-36多肽的核酸)。

[0007] 本公开的主题还提供了免疫应答细胞,其包括(a)针对所关注的靶抗原的抗原识别受体(例如,CAR或TCR),和(b)在内源性(天然)IL-36基因座的修饰的启动子,其中修饰的启动子增强内源性IL-36基因座的基因表达。在某些非限制性实施方式中,修饰包括将内源

性启动子用组成型启动子或诱导型启动子替换,或将组成型启动子或诱导型启动子插入内源性IL-36基因座的启动子区域。在某些非限制性实施方式中,组成型启动子选自CMV启动子、EF1a启动子、SV40启动子、PGK1启动子、Ubc启动子、 β -肌动蛋白启动子和CAG启动子。在某些非限制性实施方式中,诱导型启动子选自四环素应答元件(TRE)启动子和雌激素应答元件(ERE)启动子。

[0008] 在某些实施方式中,免疫应答细胞组成型表达IL-36多肽(IL-36蛋白的成熟或非成熟形式)。在某些实施方式中,IL-36多肽被分泌。抗原识别受体可以是TCR或CAR。在某些实施方式中,抗原识别受体是CAR。在某些实施方式中,免疫应答细胞选自T细胞、天然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、调节性T细胞、天然杀伤T(NK-T)细胞、人胚胎干细胞和可分化出淋巴样细胞的多能干细胞。在某些实施方式中,免疫应答细胞是自体的。

[0009] 此外,本公开的主题提供了使用这样的免疫应答细胞来诱导和/或增强免疫应答,和/或用于治疗 and/或预防肿瘤(例如,癌症)、传染病和其他会受益于增强的免疫应答的疾病/病症的方法。

[0010] 在某些非限制性实施方式中,本公开的主题提供了分离的免疫应答细胞,该免疫应答细胞(a)包括与抗原结合的抗原识别受体,并且(b)表达或分泌IL-36多肽。在某些实施方式中,免疫应答细胞包括外源性IL-36多肽。在某些实施方式中,免疫应答细胞包括编码IL-36多肽的核酸。在某些实施方式中,抗原识别受体与抗原的结合能够激活免疫应答细胞。在某些实施方式中,抗原识别受体是CAR。

[0011] 本公开的主题还提供了包括本文公开的免疫应答细胞的组合物。在某些实施方式中,组合物是包括药学上可接受的赋形剂的药物组合物。在某些实施方式中,药物组合物用于治疗 and/或预防肿瘤(例如,癌症),其中与抗原识别受体结合的抗原是肿瘤抗原。

[0012] 本公开的主题提供了本文公开的免疫应答细胞或本文公开的组合物在治疗中的用途,例如在减轻肿瘤负荷、治疗和/或预防肿瘤、延长患有肿瘤的受试者的存活和/或响应于受试者中的肿瘤抗原或病原体抗原而增加免疫激活细胞因子的产生中的用途。

[0013] 本公开的主题还提供了治疗和/或预防受试者中肿瘤的方法。在某些实施方式中,该方法包括向受试者施用有效量的本文公开的免疫应答细胞或药物组合物。本公开的主题还提供了减轻受试者的肿瘤负荷的方法。在某些实施方式中,该方法包括向受试者施用有效量的本文公开的免疫应答细胞或药物组合物。本公开的主题进一步提供了延长患有肿瘤(例如,癌症)的受试者的存活的方法。在某些实施方式中,该方法包括向受试者施用有效量的本文公开的免疫应答细胞或药物组合物。

[0014] 本公开的主题还提供了增强或提高受试者中对靶抗原的免疫应答的方法。在某些实施方式中,该方法包括向受试者施用有效量的本文公开的免疫应答细胞或药物组合物。该细胞可以表达和分泌IL-36多肽,从而增强受试者对靶抗原的免疫应答。

[0015] 本公开的主题还提供响应于受试者中的癌症抗原或病原体抗原而增加免疫激活细胞因子产生的方法。在某些实施方式中,该方法包括向受试者施用有效量的本文公开的免疫应答细胞或药物组合物。在某些非限制性实施方式中,免疫激活细胞因子选自IL-10、GM-SCF和IFN- γ 。本公开的主题还提供在对其有需要的受试者中治疗血液癌的方法。在某些实施方式中,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文公开的免疫应答细胞或药物组合物。在某些实施方式中,细胞是T细胞。在某些实施方式中,与抗原识别受体结合的抗原是

CD19。

[0016] 本公开的主题还提供了用于产生本文公开的免疫应答细胞的方法。在某些实施方式中,该方法包括向免疫应答细胞中引入(a)编码与抗原结合的抗原识别受体的第一核酸序列和(b)编码IL-36多肽的第二核酸序列。

[0017] 本公开的主题进一步提供了核酸组合物,其包括(a)编码与抗原结合的抗原识别受体(例如,CAR或TCR)的第一核酸序列,和(b)编码IL-36多肽(IL-36的成熟形式或非成熟形式)的第二核酸序列。

[0018] 在某些非限制性实施方式中,第一核酸序列或第二核酸序列可操作地连接有在免疫应答细胞中组成型或诱导型表达的启动子元件。第一核酸序列的启动子可以与第二核酸序列的启动子相同或不同。在某些非限制性实施方式中,第一核酸序列和第二核酸序列中的每一个可操作地连接有在免疫应答细胞中组成型或诱导型表达的启动子元件。第一核酸序列和第二核酸序列之一或二者可以包括在载体中,所述载体可以是同一载体(双顺反子)或单独的载体。在某些非限制性实施方式中,载体是病毒载体,例如逆转录病毒载体。

[0019] 在某些实施方式中,核酸组合物包括在载体中。在某些非限制性实施方式中,载体是病毒载体,例如逆转录病毒载体。本公开的主题还提供了包括本文公开的核酸组合物的载体。

[0020] 本公开的主题提供了试剂盒,其用于诱导和/或增强免疫应答和/或治疗和/或预防肿瘤(例如,癌症)或病原体感染。在某些实施方式中,试剂盒包括本文公开的免疫应答细胞、本文公开的药物组合物、本文公开的核酸组合物或本文公开的载体。在某些实施方式中,试剂盒还包括用于诱导和/或增强免疫应答和/或治疗和/或预防肿瘤或病原体感染的书面说明书。

[0021] 在各种非限制性实施方式中,免疫应答细胞是其预期的受体受试者自体的。

[0022] 在本文描述的任何方面的各个实施方式中,抗原识别受体是TCR或CAR。在本文描述的任何方面的各种实施方式中,抗原识别受体是外源性的或内源性的。在本文描述的任何方面的各个实施方式中,抗原识别受体是重组表达的。在本文描述的任何方面的各个实施方式中,抗原识别受体是从载体表达的。在本文所描述的任何方面的各个实施方式中,抗原识别受体是CAR。在某些实施方式中,CAR包括细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域。在某些实施方式中,其中CAR不包括共刺激信号传导结构域。在某些实施方式中,CAR为19z。

[0023] 在本文描述的任何方面的各个实施方式中,抗原识别受体是TCR。在某些实施方式中,TCR是重组TCR。在某些实施方式中,TCR是非天然存在的TCR。在某些实施方式中,TCR与任何天然存在的TCR的区别在于至少一个氨基酸残基。在某些实施方式中,TCR由天然存在的TCR通过至少一个氨基酸残基修饰。

[0024] 在本文描述的任何方面的各个实施方式中,与抗原识别受体结合的抗原是肿瘤抗原或病原体抗原。在某些实施方式中,抗原是肿瘤抗原。在本文描述的任何方面的各个实施方式中,肿瘤抗原选自CD19、MUC16、MUC1、CA1X、CEA、CD8、CD7、CD10、CD20、CD22、CD30、CD33、CLL1、CD34、CD38、CD41、CD44、CD49f、CD56、CD74、CD133、CD138、感染巨细胞病毒(CMV)的细胞抗原、EGP-2、EGP-40、EpCAM、erb-B2、3、4、FBP、胎儿乙酰胆碱受体、叶酸受体- α 、GD2、GD3、HER-2、hTERT、IL-13R-a2、 κ -轻链、KDR、LeY、L1细胞粘附分子、MAGE-A1、间皮素、ERBB2、

MAGEA3、p53、MART1、GP100、蛋白酶3 (PR1)、酪氨酸酶、存活蛋白 (Survivin)、hTERT、EphA2、NKG2D配体、NY-ES0-1、癌胚抗原 (h5T4)、PSCA、PSMA、ROR1、TAG-72、VEGF-R2、WT-1、BCMA、CD123、CD44V6、NKCS1、EGF1R、EGFR-VIII、CD99、CD70、ADGRE2、CCR1、LILRB2、PRAME和ERBB。在某些实施方式中,抗原是CD19。与所述抗原特异性结合的氨基酸序列是本领域已知的,或者可以使用本领域已知的方法来制备;实例包括免疫球蛋白、免疫球蛋白的可变区(例如可变片段(“Fv”)或二价可变片段(“Fab”))、单链抗体等。在某些实施方式中,抗原是病原体抗原。

[0025] 在本文所描述的任何方面的各种非限制性实施方式中,外源性IL-36多肽是分泌的。在本文描述的任何方面的各种非限制性实施方式中,IL-36多肽包括在载体中(并表达)。在本文描述的任何方面的各种非限制性实施方式中,IL-36多肽在氨基末端包括异源性信号序列(例如,与IL-36天然不相关的信号序列)。在本文所述的任何方面的各种实施方式中,异源性信号序列选自IL-2信号序列、 κ 前导序列、CD8前导序列,及其组合和/或合成变体,其保留促进IL-36多肽(成熟或非成熟)分泌的能力。在某些实施方式中,IL-36肽是IL-36 α 、IL-36 β 、IL-36 γ 的成熟形式或其功能性片段。在某些实施方式中,IL-36肽包括与SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31或SEQ ID NO:32所示的序列具有至少约80%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,其中IL-36肽包括SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31或SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列。在本文描述的任何方面的各个实施方式中,IL-36多肽增强免疫应答细胞的免疫应答。在某些实施方式中,外源性IL-36多肽增加抗肿瘤细胞因子的产生。在某些实施方式中,抗肿瘤细胞因子选自IL-10、GM-CSF和IFN- γ 。

[0026] 在本文描述的任何方面的各个实施方式中,所述方法减少肿瘤细胞的数量、减小肿瘤的大小、根除受试者中的肿瘤、减轻受试者中的肿瘤负荷、根除受试者中的肿瘤负荷、增加复发/再发生的时间、和/或增加生存期。

[0027] 本公开的主题可应用的示例性肿瘤包括,但不限于,白血病(例如,急性白血病、急性淋巴细胞性白血病、急性髓细胞性白血病a、急性成髓细胞性白血病、急性早幼粒细胞白血病、急性粒单核细胞白血病、急性单核细胞性白血病、急性红白血病、慢性白血病、慢性髓细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病)、真性红细胞增多症、淋巴瘤(霍奇金氏病、非霍奇金氏病)、Waldenstrom's巨球蛋白血症、重链疾病以及实体瘤,例如肉瘤和癌(例如,纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内膜肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺瘤、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝癌、尼罗河导管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、Wilm's肿瘤、宫颈癌、子宫癌、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤(oligodendroglioma)、神经鞘瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、成神经细胞瘤和成视网膜细胞瘤)。

[0028] 在本文所述的任何方面的各种非限制性实施方式中,所述肿瘤是血液癌、B细胞白血病、多发性骨髓瘤、成淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病、非霍奇金淋巴瘤和卵巢癌中的一种或更多种。在某些实施方式中,血液癌是B细胞白血病、多发性骨髓瘤、急

性成淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病和非霍奇金淋巴瘤中的一种或更多种。在某些实施方式中,抗原是CD19。在某些实施方式中,肿瘤是卵巢癌,并且抗原是MUC16。

附图说明

[0029] 可以结合附图来理解通过实施例给出的以下详细描述,但并不旨在将本公开的主题限于所描述的具体实施方式。

[0030] 图1A-1D显示了各种CAR构建体的代表。A) am19mZ(第一代CAR,其包括大鼠抗小鼠CD19 scFv和包括小鼠CD3 ζ 多肽的细胞内信号传导结构域。am19mZ的氨基酸序列和相应的核苷酸序列分别示于SEQ ID NO:5和65);和ah19mZ_IL-36(分泌鼠IL-36的第一代CAR(am19mZ))的示意图。两个CAR均利用CD28近端细胞外和跨膜结构域作为铰链。在所有的鼠CAR构建体中,细胞因子都是通过自切割P2A元件与CAR隔开的。B) 并入组成型分泌的鼠IL36- α 的第一代抗小鼠CD 19myc-tag CAR。C) 并入组成型分泌的鼠IL36- β 的第一代抗小鼠CD 19myc-tag CAR。D) 并入组成型分泌的鼠IL36- γ 的第一代抗小鼠CD 19myc-tag CAR。所有载体均包括SFG主链。

[0031] 图2显示了各种CAR构建体的细胞表面表达的流式细胞术分析。证实了分泌IL-36 β (d5M19ZTSB)和 γ (d5M19ZTSG)的抗CD19myc-tag第一代CAR和包括M19del(非功能性CAR)、M19Z(第一代CAR)的对照构建体的表面表达。d5B6emp用作阴性对照。

[0032] 图3显示了用各种CAR构建体转导的T细胞中的鼠粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的分泌。下表列出了所示样本之间的平均差异、95%置信区间和校正后的P值。

[0033] 图4显示了用各种CAR构建体转导的T细胞中的鼠干扰素 γ (mINF- γ)的分泌。下表列出了所示样本之间的平均差异、95%置信区间和校正后的P值。

[0034] 图5显示了用各种CAR构建体转导的T细胞中的鼠白介素10(IL-10)的分泌。下方的表列出了所示样本之间的平均差异、95%的置信区间和校正后的P值。

[0035] 图6A-6C显示了用各种修饰的T细胞治疗的荷瘤小鼠的存活曲线。A) 所有受试者的存活曲线。未经治疗(未经治疗的对照组);am19MTmZ(第一代CAR,其包括大鼠抗小鼠CD19 scFv和包括小鼠CD3 ζ 多肽的细胞内信号传导结构域);am19MTmZpIL36B(分泌鼠IL-36 β 的第一代CAR(am19mZ)),和am19MTmZpIL36G(分泌鼠IL-36 γ 的第一代CAR(am19mZ))。中位存活数如下方的表所示。B) am19MTmZ(M19Z)和am19MTmZpIL36B(M19Z_36B)的存活曲线。中位存活数如下方的表所示。C) am19MTmZ(M19Z)和am19MTmZpIL36G(M19Z_36G)的存活曲线。中位存活数如下方的表所示。

[0036] 图7显示了C57BL/6小鼠的存活曲线。通过尾静脉注射向小鼠接种100万小鼠CD19+EL4肿瘤细胞(EL4-CD19)。在第二天,小鼠接受(未经任何预处理化疗):无CAR T细胞(未经治疗),2,500,000m19m28mz(同基因(syngeneic)的基于抗小鼠CD19 CD28的第二代CAR T细胞),2,500,000m19mz-IL36Y(同基因的抗-小鼠CD19第一代分泌IL36- γ 的CAR T细胞)或m19m28mz-IL36Y(同基因的基于抗小鼠CD19 CD28的第二代分泌IL36- γ 的CAR T细胞)。

[0037] 图8显示了荷瘤小鼠中促炎性细胞因子的分泌。通过尾静脉注射向C57BL/6小鼠接种了100万小鼠CD19+EL4肿瘤细胞(EL4-CD19)。在第二天,小鼠接受(未经任何预处理化疗):无CAR T细胞(未经治疗),2,500,000m19m28mz(同基因的基于抗小鼠CD19 CD28的第二代CAR T细胞),2,500,000m19mz-IL36Y(同基因的抗小鼠CD19第一代分泌IL36- γ 的CAR T

细胞)或m19m28mz-IL36Y(同基因的基于抗小鼠CD19 CD28的第二代分泌IL36- γ 的CAR T细胞)。收集血清,并使用基于Luminex珠的多重测定法分析细胞因子水平。

[0038] 图9显示了荷瘤小鼠中的B细胞发育不全。通过尾静脉注射向C57BL/6小鼠接种100万小鼠CD19+EL4肿瘤细胞(EL4-CD19)。在第二天,小鼠接受(未经任何预处理化疗):无CAR T细胞(未经治疗),2,500,000m19m28mz(同基因的基于抗小鼠CD19 CD28的第二代CAR T细胞),2,500,000m19mz-IL36Y(同基因的抗-小鼠CD 19第一代分泌IL36- γ 的CAR T细胞)或m19m28mz-IL36Y(同基因的基于抗小鼠CD19 CD28的第二代分泌IL36- γ 的CAR T细胞)。RBC裂解后,使用流式细胞术测定外周B细胞的百分比(CD19+细胞占CD45+细胞的百分比)。

具体实施方式

[0039] 本公开的主题提供细胞,包括遗传修饰的免疫应答细胞(例如,T细胞、NK细胞或CTL细胞),其包括抗原识别受体(例如,TCR或CAR)和可分泌的IL-36多肽(例如,外源性IL-36多肽或编码IL-36多肽的核酸)的组合。本公开的主题还提供了使用这样的细胞来诱导和/或增强对靶抗原的免疫应答,和/或治疗和/或预防肿瘤或其他的要求增加抗原特异性免疫应答的疾病/病症的方法。本公开的主题至少部分地基于以下发现:可分泌的IL-36多肽增强了包括抗原识别受体的免疫应答细胞(例如,表达CAR的T细胞或表达TCR的T细胞)的抗肿瘤作用。观察到IL-36多肽和抗原识别受体(例如,CAR,例如19z CAR)在T细胞上的共表达导致细胞因子分泌增加。

[0040] 恶性细胞已发展出一系列保护自身免受免疫识别和消除的机制。本公开的主题在肿瘤微环境中提供免疫原性,用于消灭肿瘤,代表了优于常规过继T细胞疗法的重大进步。本公开的主题提供了前述一些或所有辅助治疗的选择,例如用全身辐射、高剂量化疗和/或输注后细胞因子支持对宿主进行预先调节。

[0041] 1. 定义

[0042] 除非另有定义,否则本文中使用的所有科技术语具有本领域技术人员通常理解的含义。以下参考文献为技术人员提供了对本公开的主题中使用的许多术语的通常定义: Singleton等人,微生物学和分子生物学词典(Dictionary of Microbiology and Molecular Biology)(1994年第2版);剑桥科学技术词典(The Cambridge Dictionary of Science and Technology)(Walker编著,1988);遗传学词汇(The Glossary of Genetics),第5版,R.Rieger等(编著),Springer Verlag(1991);和Hale&Marham,哈珀·柯林斯生物学词典(The Harper Collins Dictionary of Biology)(1991年)。如本文所用,除非另有说明,否则以下术语具有以下赋予它们的含义。

[0043] 如本文所用,术语“约”或“近似”是指在特定值的可接受误差范围内,如本领域普通技术人员所确定的,其将部分取决于如何测量或确定该值,即,测量系统的局限性。例如,根据本领域的实践,“约”可以表示在3个或超过3个标准偏差之内。另外可选地,“约”可以表示给定值的至多20%,例如,至多10%,至多5%或至多1%的范围。另外可选地,特别是关于生物系统或方法,该术语可以意指在数值的一个数量级内,例如在一个值的5倍之内或在2倍之内。

[0044] “激活免疫应答细胞”是指信号转导的诱导或细胞中蛋白质表达的变化,导致免疫应答的启动。例如,当CD3链响应于配体结合和基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(IT AM)聚

集时,就会产生信号转导级联反应。在某些实施方式中,当内源性TCR或外源性CAR与抗原结合时,发生免疫突触的形成,其包括在结合的受体(例如,CD4或CD8,CD3 $\gamma/\delta/\epsilon/\zeta$ 等)附近的许多分子的聚集。膜结合信号分子的这种聚集使CD3链中含有的ITAM基序磷酸化。该磷酸化反过来启动了T细胞激活途径,最终激活了转录因子,例如NF- κ B和AP-1。这些转录因子诱导T细胞的整体基因表达,从而增加IL-2的产生,用于主调节T细胞蛋白的增殖和表达,进而启动T细胞介导的免疫应答。

[0045] “刺激免疫应答细胞”是指导致强烈和持续的免疫应答的信号。在各种实施方式中,这发生在免疫细胞(例如,T细胞)激活之后,或通过包括但不限于CD28、CD137(4-1BB)、OX40、CD40和ICOS的受体同时介导。接收多种刺激信号对于建立强烈且长期的T细胞介导的免疫应答可能很要。T细胞可以迅速被抑制并且对抗原无应答。尽管这些共刺激信号的作用可能有所不同,但它们通常会导致基因表达增加,从而生成寿命、增殖性和抗凋亡性T细胞,其对抗原应答强烈,用于彻底和持续的根除。

[0046] 如本文所用,术语“抗原识别受体”是指能够响应于其与抗原的结合而激活免疫或免疫应答细胞(例如,T细胞)的受体。抗原识别受体的非限制性实例包括天然或内源性T细胞受体(“TCR”)和嵌合抗原受体(“CAR”)。

[0047] 如本文所用,术语“抗体”不仅是指完整的抗体分子,而且是指保留免疫原结合能力的抗体分子的片段。这样的片段在本领域中也是公知的,并且在体外和体内均经常使用。因此,如本文所用,术语“抗体”不仅是指完整的免疫球蛋白分子,而且也指公知的活性片段F(ab')₂和Fab。缺少完整抗体Fc片段的F(ab')₂和Fab片段,从循环中清除得更快,并且可能具有更少的完整抗体的非特异性组织结合(Wahl等人,J.Nucl.Med.24:316-325(1983))。如本文所用,抗体包括完整的天然抗体、双特异性抗体;嵌合抗体;Fab、Fab'、单链V区片段(scFv)、融合多肽和非常规抗体。在某些实施方式中,抗体是糖蛋白,其包括通过二硫键相互连接的至少两个重(H)链和两个轻(L)链。每条重链由重链可变区(在本文中简称为V_H)和重链恒定(C_H)区组成。重链恒定区由三个结构域CH1、CH2和CH3组成。每条轻链由轻链可变区(在本文中简称为V_L)和轻链恒定C_L区组成。轻链恒定区由一个结构域C_L组成。V_H区和V_L区可进一步细分为高变区,称为互补决定区(CDR),其间散布有更保守的区,称为框架区(FR)。每个V_H和V_L由三个CDR和四个FR组成,它们从氨基端到羧基端按以下顺序排列:FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3,FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,所述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)。

[0048] 如本文所用,“CDR”定义为抗体的互补决定区氨基酸序列,其是免疫球蛋白重链和轻链的高变区。参见,例如,Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第4版,Department of Health and Human Services,National Institutes of Health(1987)。通常,抗体在可变区中包括三个重链和三个轻链CDR或CDR区。CDR提供大多数接触残基,以使抗体与抗原或表位结合。在某些实施方式中,使用Kabat系统勾勒出CDR区域(Kabat,E.A,等(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,Department of Health and Human Services,NIH出版号91-3242)。

[0049] 如本文所用,术语“单链可变片段”或“scFv”是共价连接以形成V_H:V_L异二聚体的免疫球蛋白的重链(V_H)和轻链(V_L)的可变区的融合蛋白。V_H和V_L直接连接,或通过肽编码接

头(linker)(例如10、15、20、25个氨基酸)连接,该接头将V_H的N端与V_L的C端连接,或将V_H的C端与V_L的N端相连。接头通常富含甘氨酸以提高柔性,并富含丝氨酸或苏氨酸以提高溶解度。尽管去除了恒定区并引入了接头,scFv蛋白仍保留了原始免疫球蛋白的特异性。单链Fv多肽抗体可以由如Huston等(Proc.Nat.Acad.Sci.USA,85:5879-5883,1988)所述的包括V_H和V_L编码序列的核酸表达。另外,参见美国专利第5,091,513号、第5,132,405号和第4,956,778号;以及美国专利公开第20050196754号和第20050196754号。已经描述了具有抑制活性的拮抗scFv(参见,例如,Zhao等,Hybridoma(Larchmt)2008 27(6):455-51;Peter等,J Cachexia Sarcopenia Muscle 2012年8月12日;Shieh等,J Immunol 2009 183(4):2277-85;Giomarelli等,Thromb Haemost 2007 97(6):955-63;Fife等,J Clin Invest 2006 116(8):2252-61;Brocks等,Immunotechnology1997 3(3):173-84;Moosmayer等,Ther Immunol 1995 2(10:31-40)。已经描述了具有刺激活性的激动性scFv(参见,例如,Peter等,J Bioi Chem 2003 25278(38):36740-7;Xie等,Nat Biotech 1997 15(8):768-71;Ledbetter等,Crit Rev Immunol 1997 17(5-6):427-55;Ho等,BioChim Biophys Acta 2003 1638(3):257-66)。

[0050] 如本文所用,术语“亲和力(affinity)”是指结合强度的度量。亲和力可以取决于抗体结合位点和抗原决定簇之间立体化学拟合的紧密度、它们之间接触面积的大小和/或带电和疏水基团的分布。如本文所用,术语“亲和力”还包括“抗体亲抗原性(avidity)”,其是指在形成可逆复合物之后抗原-抗体键的强度。计算抗体对抗原的亲和力的方法是本领域已知的,包括但不限于各种抗原结合实验,例如功能测定法(例如流式细胞术测定法)。

[0051] 如本文所用,术语“嵌合抗原受体”或“CAR”是指包括与能够激活或刺激免疫应答细胞的细胞内信号传导结构域融合的细胞外抗原结合结构域和跨膜结构域分子。在某些实施方式中,CAR的细胞外抗原结合结构域包括scFv。scFv可以源自融合抗体的可变重和轻区。另外可选地或额外地,scFv可以源自Fab's(而不是抗体,例如获自Fab文库)。在某些实施方式中,将scFv融合至跨膜结构域,然后融合至细胞内信号传导结构域。在某些实施方式中,选择CAR,以便对抗原具有高的结合亲和力或抗体亲抗原性。

[0052] 如本文所用,术语“核酸分子”包括编码所关注多肽(例如IL-36多肽)或其片段的任何核酸分子。这样的核酸分子不需要与内源性核酸序列100%同源性或同一性,而是可以表现出基本同一性。与内源性序列具有“基本同一性”或“基本同源性”的多核苷酸通常能够与双链核酸分子的至少一条链杂交。“杂交”是指在各种严格条件下在互补多核苷酸序列(例如,本文描述的基因)或其部分之间形成双链分子的配对。(参见,例如,Wahl,G.M.和S.L.Berger(1987)Methods Enzymol.152:399;Kimmel,A.R.(1987)Methods Enzymol.152:507)。

[0053] 例如,严格的盐浓度通常将小于约750mM NaCl和75mM柠檬酸三钠,例如小于约500mM NaCl和50mM柠檬酸三钠,或小于约250mM NaCl和25mM柠檬酸三钠。在没有有机溶剂例如甲酰胺的情况下可以获得低严格度的杂交,而在至少约35%的甲酰胺,例如至少约50%的甲酰胺的存在下可以获得高严格度的杂交。严格的温度条件通常将包括至少约30℃、至少约37℃或至少约42℃的温度。改变其他参数,例如杂交时间、去污剂(例如十二烷基硫酸钠(SDS))的浓度、以及包括或排除载体DNA,都是本领域技术人员公知的。通过根据需要组合这些各种条件来实现各种严格度水平。在某些实施方式中,杂交将在30℃下在750mM

NaCl、75mM柠檬酸三钠和1%SDS中进行。在某些实施方式中，杂交将在37℃下在500mM NaCl、50mM柠檬酸三钠、1%SDS、35%甲酰胺和100μg/ml变性鲑鱼精DNA(ssDNA)中进行。在某些实施方式中，杂交将在42℃下在250mM NaCl、25mM柠檬酸三钠、1%SDS、50%甲酰胺和200μg/ml ssDNA中进行。在这些条件下可用的变化对于本领域技术人员将是显而易见的。

[0054] 对于大多数应用，杂交后的洗涤步骤在严格度方面也有变化。洗涤严格条件可以通过盐浓度和温度来定义。如上所述，可以通过降低盐浓度或通过提高温度来提高洗涤严格度。例如，洗涤步骤的严格盐浓度可以小于约30mM NaCl和3mM柠檬酸三钠，例如，小于约15mM NaCl和1.5mM柠檬酸三钠。洗涤步骤的严格温度条件通常将包括至少约25℃、至少约42℃或至少约68℃的温度。在某些实施方式中，洗涤步骤将在25℃下在30mM NaCl、3mM柠檬酸三钠和0.1%SDS中进行。在某些实施方式中，洗涤步骤将在42℃下在15mM NaCl、1.5mM柠檬酸三钠和0.1%SDS中进行。在某些实施方式中，洗涤步骤将在68℃下在15mM NaCl、1.5mM柠檬酸三钠和0.1%SDS中进行。这些条件的其他变化对于本领域技术人员将是显而易见的。杂交技术是本领域技术人员公知的，并且描述于例如Benton和Davis(Science196:180, 1977);Grunstein和Rogness(Proc.Natl.Acad.Sci.,USA 72:3961,1975);Ausubel等(分子生物学最新研究方法(Current Protocols in Molecular Biology),Wiley Interscience,纽约,2001年);Berger和Kimmel(分子克隆技术指南(Guide to Molecular Cloning Techniques),1987年,Academic Press,纽约);和Sambrook等,分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual),Cold Spring Harbor Laboratory Press,纽约。

[0055] “基本同一性”或“基本同源性”是指多肽或核酸分子与参考氨基酸序列(例如,本文所述的任一氨基酸序列)或核酸序列(例如,本文描述的任一核酸序列)表现出至少约50%同源性或同一性。在某些实施方式中,这样的序列与用于比较的氨基酸或核酸序列具有至少约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99%或至少约100%同源性或同一性。

[0056] 序列同一性可以通过使用序列分析软件(例如,威斯康星大学生物技术中心遗传学计算机组的序列分析软件包,1710University Avenue,Madison,Wis.53705,BLAST、BESTFIT、GAP或PILEUP/PRETTYBOX程序)进行测量。这些软件通过将同源性程度分配给各种置换、缺失和/或其他修饰来匹配相同或相似的序列。保守置换通常包括以下组内的置换:甘氨酸、丙氨酸;缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸;天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺;丝氨酸、苏氨酸;赖氨酸、精氨酸;和苯丙氨酸、酪氨酸。在确定同一性程度的示例性方法中,可以使用BLAST程序,其中e-3和e-100之间的概率评分指示密切相关的序列。

[0057] “类似物”是指具有参考多肽或核酸分子功能的结构相关的多肽或核酸分子。

[0058] 如本文所用,术语“配体”是指与受体结合分子。在某些实施方式中,配体与另一细胞上的受体结合,从而允许细胞间识别和/或相互作用。

[0059] 如本文所用,术语“组成型表达”或“组成型表达的”是指在所有生理条件下表达或表达的。

[0060] “疾病”是指损害或干扰细胞、组织或器官的正常功能的任何状况、疾病或病症,例如瘤形成和细胞的病原体感染。

[0061] “有效量”是指足以具有治疗作用的量。在某些实施方式中,“有效量”是足以阻止、

改善或抑制肿瘤的持续增殖、生长或转移(例如,侵袭或迁移)的量。

[0062] “增强耐受性”是指阻止靶向移植的器官或组织的自反应性细胞或免疫应答性细胞的活性。

[0063] “内源性”是指核酸分子或多肽通常在细胞或组织中表达。

[0064] “外源性”是指核酸分子或多肽不是内源性存在细胞中的。因此,术语“外源性”将涵盖在细胞中表达的任何重组核酸分子或多肽,例如外源(foreign)、异源性和过表达的核酸分子和多肽。“外源性”核酸是指天然野生型细胞中不存在的核酸。例如,外源性核酸可以通过序列、位置/定位或两者而不同于内源性对应物。为了清楚起见,外源性核酸相对于其天然内源性对应物可以具有相同或不同的序列;其可以通过遗传改造引入至细胞本身或其祖细胞,并且可以任选地可操作地连接有另外可选的控制序列,例如非天然启动子或分泌序列。

[0065] “异源核酸分子或多肽”是指核酸分子(例如cDNA、DNA或RNA分子)或多肽通常不存在于细胞或从细胞得到的样品中。该核酸可以来自另一个生物,或者可以是,例如,通常不在细胞或样品中表达的mRNA分子。

[0066] “免疫应答细胞”是指在免疫应答或祖细胞或其后代中起作用的细胞。

[0067] “调节”是指正或负改变。示例性调节包括约1%、约2%、约5%、约10%、约25%、约50%、约75%或约100%的变化。

[0068] “增加”是指正改变至少约5%。改变可以为约5%、约10%、约25%、约30%、约50%、约75%、约100%或更多。

[0069] “减少”是指负改变至少约5%。改变可以为约5%、约10%、约25%、约30%、约50%、约75%或甚至约100%。

[0070] “分离的细胞”是指与天然伴随细胞的分子和/或细胞组分相分离的细胞。

[0071] 术语“分离的”、“纯化的”或“生物学上纯的”是指物质在不同程度上不含在其原始状态下通常与其伴随的组分。“分离”表示与原始来源或环境隔离的程度。“纯化”表示隔离程度高于分离。“纯化的”或“生物纯的”蛋白质充分不含其他物质,使得任何杂质均不会实质性地影响蛋白质的生物学特性或引起其他不利后果。也就是说,如果核酸或肽通过重组DNA技术生产而基本不含细胞材料、病毒材料或培养基,或者通过化学合成而基本不含化学前体或其他化学品,则其是纯化的。纯度和均质性通常使用分析化学技术确定,例如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱法。术语“纯化的”可以表示核酸或蛋白质在电泳凝胶中产生基本上一个条带。对于可以进行修饰(例如磷酸化或糖基化)的蛋白质,不同的修饰可以产生不同的分离的蛋白质,可以将其分别纯化。

[0072] 如本文所用,术语“抗原结合结构域”是指能够特异性结合细胞上存在的特定抗原决定簇或抗原决定簇组的结构域。

[0073] 如本文所用,“接头”应指共价连接两个或更多个多肽或核酸以使它们彼此连接的官能团(例如化学或多肽)。如本文所用,“肽接头”是指用于将两种蛋白质偶联在一起(例如,偶联V_H和V_L结构域)的一个或更多个氨基酸。在某些实施方式中,所述接头包括GGGGSGGGSGGGGS[SEQ ID NO:23]所示的序列。

[0074] “肿瘤(neoplasm)”是指以细胞或组织的病理性增生及其随后向其他组织或器官的迁移或侵袭为特征的疾病。肿瘤的生长通常是不受控制的和进行性的,并且在不引起正

常细胞增殖或者导致正常细胞增殖停止的条件下发生。肿瘤可以影响多种细胞类型、组织或器官,其包括但不限于选自以下的器官:膀胱、骨骼、大脑、乳房、软骨、神经胶质、食道、输卵管、胆囊、心脏、肠、肾脏、肝脏、肺、淋巴结、神经组织、卵巢、胰腺、前列腺、骨骼肌、皮肤、脊髓、脾脏、胃、睾丸、胸腺、甲状腺、气管、泌尿生殖道、输尿管、尿道,子宫和阴道、或其组织或细胞类型。肿瘤包括癌症,例如肉瘤、肿瘤或浆细胞瘤(浆细胞的恶性肿瘤)。

[0075] “受体”是指存在于细胞膜上的选择性结合一个或多个配体的多肽或其一部分。

[0076] “识别”是指选择性地结合靶标。识别肿瘤的T细胞可以表达与肿瘤抗原结合的受体(例如TCR或CAR)。

[0077] “参考”或“对照”是指比较的标准。例如,可以将表达CAR和scFv的细胞与scFv-抗原结合的水平与仅表达CAR的相应细胞与scFv-抗原结合的水平进行比较。

[0078] “分泌的”是指多肽通过内质网、高尔基体以及作为在细胞质膜上瞬时融合从而将蛋白质释放到细胞外的囊泡通过分泌途径从细胞释放。

[0079] “信号序列”或“前导序列”是指存在于新合成的蛋白质的N-末端的指导它们进入分泌途径的肽序列(例如5、10、15、20、25或30个氨基酸)。示例性前导序列包括,但不限于,IL-2信号序列:MYRMQLLSICIALSLALVTNS[SEQ ID NO:8](人)、MYSMQLASCVTLLVLLVNS[SEQ ID NO:24](小鼠)、κ前导序列:METPAQLLFLLLLWLPDTTG[SEQ ID NO:25](人),METDTLLLVWLLLWVPGSTG[SEQ ID NO:26](小鼠);CD8前导序列:MALPVTALLPLALLLHAARP[SEQ ID NO:27](人);截短的人CD8信号肽:MALPVTALLPLALLLHA[SEQ ID NO:80](人);白蛋白信号序列:MKWVTFISLLFSSAYS[SEQ ID NO:28](人);泌乳素信号序列:MDSKGSSQKGSRLLLLLVVSNLLLCQGVVS[SEQ ID NO:29](人)。“可溶”是指多肽在水性环境中可自由扩散(例如,未与膜结合)。

[0080] “特异性结合”是指多肽或其片段识别并结合所关注的生物分子(例如多肽)但基本上不识别并结合样品(例如生物样品,其自然包括本文公开的多肽)中的其他分子。

[0081] 如本文所用,术语“肿瘤抗原”是指与正常或非IS赘生性细胞相比在肿瘤细胞上唯一或差异性表达的抗原(例如,多肽)。在某些实施方式中,肿瘤抗原包括由肿瘤表达的任何多肽,其能够通过抗原识别受体激活或诱导免疫应答(例如,CD19,MUC-16),或者能够通过受体-配体结合抑制免疫应答(例如CD47,PD-L1/L2,B7.1/2)。

[0082] 术语“包括”,“含有”旨在具有美国专利法中赋予它们的广义含义,并且可以表示“包括”,“涵盖”等。

[0083] 如本文所用,“治疗”是指试图改变所治疗的个体或细胞的疾病进程的临床干预,并且可以用于预防或在临床病理过程中进行。治疗的治疗作用包括,但不限于,预防疾病的发生或复发、减轻症状、减少疾病的任何直接或间接病理后果、预防转移、降低疾病进展的速度、改善或减轻疾病状态以及和缓解或改善预后。通过预防疾病或病症的进展,治疗不仅可以预防在受影响或诊断的受试者或怀疑患有该病症的受试者中由于病症引起的恶化,而且治疗可以在有患病症或怀疑患有该病症风险的受试者中预防该病症的发作或该病症的症状。

[0084] 本文中的“个体”或“受试者”是脊椎动物,例如人或非人动物,例如哺乳动物。哺乳动物包括,但不限于,人、灵长类动物、农场动物、运动动物、啮齿动物和宠物。非人动物受试者的非限制性实例包括啮齿动物,如小鼠、大鼠、仓鼠和豚鼠;兔子;狗;猫;绵羊;猪;山羊;

牛;马;和非人灵长类动物,例如猿和猴子。如本文所用,术语“免疫受损的”是指受试者具有免疫缺陷。该受试者非常容易遭受机会性感染,这种感染是由通常不会在免疫系统健康的人中导致疾病、但是会影响免疫系统功能差或受抑制的人的生物体引起的。

[0085] 在以下公开中描述了本公开主题的其他方面,其均在本公开主题的范围内。

[0086] 2. 抗原识别受体

[0087] 本公开内容提供了与所关注的抗原结合的抗原识别受体。在某些实施方式中,抗原识别受体是嵌合抗原受体(CAR)。在某些实施方式中,抗原识别受体是T细胞受体(TCR)。抗原识别受体可以与肿瘤抗原或病原体抗原结合。

[0088] 2.1. 抗原

[0089] 在某些实施方式中,抗原识别受体与肿瘤抗原结合。任何肿瘤抗原(抗原肽)均可以用于本文所述的肿瘤相关的实施方式中。抗原来源包括,但不限于,癌蛋白质。抗原可以表达成肽,或者表达成完整蛋白或其一部分。完整蛋白或其一部分可以是天然的或诱变的。肿瘤抗原的非限制性实例包括碳酸酐酶IX(CA1X)、癌胚抗原(CEA)、CD8、CD7、CD10、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CLL1、CD34、CD38、CD41、CD44、CD49f、CD56、CD74、CD133、CD138、CD123、CD44V6、巨细胞病毒(CMV)感染细胞的抗原(例如细胞表面抗原)、上皮糖蛋白-2(EGP-2)、上皮糖蛋白-40(EGP-40)、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、受体酪氨酸蛋白激酶erb-B2,3,4(erb-B2,3,4)、叶酸结合蛋白(FBP)、胎儿乙酰胆碱受体(AChR)、叶酸受体- α 、神经节苷脂G2(GD2)、神经节苷脂G3(GD3)、人表皮生长因子受体2(HER-2)、人端粒酶逆转录酶(hTERT)、白介素13受体亚基 α -2(IL-13R α 2)、 κ -轻链、激酶插入结构域受体(KDR)、路易斯Y(LeY)、L1细胞粘附分子(L1CAM)、黑色素瘤抗原家族A,1(MAGE-A1)、粘蛋白16(MUC16)、粘蛋白1(MUC1)、间皮素(MSLN)、ERBB2、MAGE A3、p53、MART1、GP100、蛋白酶3(PR1)、酪氨酸酶、存活蛋白、hTERT、EphA2、NKG2D配体、癌-睾丸抗原NY-ES0-1、癌胚抗原(h5T4)、前列腺干细胞抗原(PSCA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、ROR1、肿瘤相关糖蛋白72(TAG-72)、血管内皮生长因子R2(VEGF-R2)和Wilms肿瘤蛋白(WT-1)、BCMA、NKCS1、EGF1R、EGFR-VIII、CD99、CD70、ADGRE2、CCR1、LILRB2、PRAME和ERBB。

[0090] 在某些实施方式中,抗原识别受体与CD19结合。在某些实施方式中,抗原识别受体与鼠CD19多肽结合。在某些实施方式中,鼠CD19多肽包括如SEQ ID NO:61所示的氨基酸序列。

```
RPQKSLLEVEEGGNVLPCLPDSSPVSSSEKLAWYRGNQSTPFLELSPGSPGLGLHVGS
LGILLVIVNVDHMGGFYLCQKRPPFKDIWQPAWTVNVEDSGEMFRWNASDVRDLDCDL
[0091] RNRSSGSHRSTSGS QLYVWAKDHPKVWGTPVCAPRGSSLNQSLINQDLTVAPGSTLWL
SCGVPPVPVAKGSISWTHVHPRRPNVSLLSLSLGGEHPVREMWWGSLLLLPQATALDE
GTYCYCLRGNLTIERHVKVIARSAVWLWLLRTGG [SEQ ID NO:61]
```

[0092] 在某些实施方式中,抗原识别受体与人CD19多肽结合。在某些实施方式中,人CD19多肽包括如SEQ ID NO:62所述的氨基酸序列。

PEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKPFLLKLSLGLPGLGIHMRPL
AIWLFIFNVSQQMGFFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGELFRWNVSDLGGLGCGLK
[0093] NRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPPCLPPRDSLNOQSLSQDLTMAPGSTL
WLSGCVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKDDRPARDMWVMTGLLLLPRATAQD
AGKYYCHRGNLTMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWK [SEQ ID NO:62]

[0094] 在某些实施方式中,抗原识别受体与人或鼠CD19蛋白质的细胞外结构域结合。

[0095] 在某些实施方式中,抗原识别受体与病原体抗原结合,例如,用于治疗 and/或预防病原体感染或其他传染性疾病,例如,在免疫受损的受试者中。病原体的非限制性实例包括能够引起疾病的病毒、细菌、真菌、寄生虫和原生动物。

[0096] 病毒的非限制性实例包括,逆转录病毒科 (Retroviridae) (例如,人免疫缺陷病毒,例如HIV-1 (也称为HDTV-III、LAVE或HTLV-III/LAV或HIV-III;以及其他分离株,例如HIV-LP);小RNA病毒科 (Picornaviridae) (例如脊髓灰质炎病毒、甲型肝炎病毒、肠病毒、人柯萨奇病毒、鼻病毒、艾柯病毒);杯状病毒科 (Caliciviridae) (例如引起肠胃炎的菌株);披膜病毒科 (Togaviridae) (例如马脑炎病毒、风疹病毒);黄病毒科 (Flaviridae) (例如登革热病毒、脑炎病毒、黄热病毒);冠状病毒科 (Coronaviridae) (例如冠状病毒);弹状病毒科 (Rhabdoviridae) (例如水疱性口炎病毒、狂犬病病毒);丝状病毒科 (Filoviridae) (例如埃博拉病毒);副粘病毒科 (Paramyxoviridae) (例如副流感病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、呼吸道合胞病毒);正粘病毒科 (Orthomyxoviridae) (例如流感病毒);布尼亚病毒科 (Bunyaviridae) (例如汉坦病毒、bunga病毒、静脉病毒和奈拉病毒);沙粒病毒科 (Arenaviridae) (出血热病毒);呼肠孤病毒科 (Reoviridae) (例如呼肠孤病毒、环状病毒 (orbiviruses) 和轮状病毒);双RNA病毒科 (Birnaviridae);嗜肝DNA病毒科 (Hepadnaviridae) (乙型肝炎病毒);细小病毒科 (Parvoviridae) (细小病毒);乳多空病毒科 (Papovaviridae) (乳头瘤病毒、多瘤病毒);腺病毒科 (Adenoviridae) (大多数腺病毒);疱疹病毒科 (Herpesviridae) (单纯疱疹病毒 (HSV) 1和2、水痘带状疱疹病毒、巨细胞病毒 (CMV)、疱疹病毒);痘病毒科 (Poxviridae) (天花病毒、牛痘病毒、痘病毒);和虹彩病毒科 (Iridoviridae) (例如非洲猪瘟病毒);以及未分类的病毒 (例如,丁型肝炎的病原体 (被认为是乙肝病毒的缺陷卫星 (defective satellite)),非甲、非乙型肝炎的病原体 (类1=内部传播;类2=经肠胃外传播 (即,丙型肝炎);诺沃克 (Norwalk) 和相关病毒,以及星状病毒)。

[0097] 细菌的非限制性实例包括葡萄球菌 (Staphylococci)、链球菌 (Streptococcus)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas species*) 和沙门氏菌属 (*Salmonella species*)。传染性细菌的具体实例包括但不限于,幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*)、伯氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*)、嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*)、分枝杆菌属 (*Mycobacteria sps*) (例如结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*)、鸟分枝杆菌 (*M. avium*)、胞内分枝杆菌 (*M. intracellulare*)、堪萨斯分枝杆菌 (*M. kansasii*)、戈登分枝杆菌 (*M. goodii*))、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、淋病奈瑟氏菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟氏球菌 (*Neisseria meningitidis*)、单核细胞增生性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)、酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) (A组链球菌)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) (B组链球菌)、链球菌 (viridans组)、粪链球

菌 (*Streptococcus faecalis*)、牛链球菌 (*Streptococcus bovis*)、链球菌 (厌氧属)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、致病性弯曲杆菌属 (*pathogenic Campylobacter sp.*)、肠球菌属 (*Enterococcus sp.*)、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*)、炭疽杆菌 (*Bacillus anthracis*)、白喉棒状杆菌 (*Corynebacterium diphtheriae*)、棒状杆菌属 (*Corynebacterium sp.*)、红斑丹毒丝菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*)、破伤风梭菌 (*Clostridium tetani*)、产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*)、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、多杀性巴斯德氏菌 (*Pasturella multocida*)、拟杆菌属 (*Bacteroides sp.*)、具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*)、念珠状链杆菌 (*Streptobacillus moniliformis*)、梅毒螺旋体 (*Treponema pallidum*)、极细密螺旋体 (*Treponema pertenuis*)、钩端螺旋体 (*Leptospira*)、立克次氏体 (*Rickettsia*) 和衣氏放线菌 (*Actinomyces israelii*)。

[0098] 在某些实施方式中,病原体抗原是存在于巨细胞病毒 (CMV) 中的病毒抗原、存在于爱泼斯坦巴尔病毒 (Epstein Barr Virus) (EBV) 中的病毒抗原、存在于人免疫缺陷病毒 (HIV) 中的病毒抗原或存在于流感病毒中的病毒抗原。

[0099] 2.2. T细胞受体 (TCR)

[0100] 在某些实施方式中,抗原识别受体是TCR。TCR是二硫键连接的异二聚体蛋白,其由两条可变链组成,这些可变链表达为与不变CD3链分子的复合物的一部分。TCR被发现于T细胞的表面上,并负责将抗原识别成与主要组织相容性复合物 (MHC) 分子结合的肽。在某些实施方式中,TCR包括 α 链和 β 链 (分别由TRA和TRB编码)。在某些实施方式中,TCR包括 γ 链和 δ 链 (分别由TRG和TRD编码)。

[0101] TCR的每条链均由两个细胞外结构域组成:可变(V)区和恒定(C)区。恒定区靠近细胞膜,其后是跨膜区和短的胞质尾区。可变区与肽/MHC复合物结合。两条链的可变结构域均具有三个互补决定区 (CDR)。

[0102] 在某些实施方式中,TCR可以与三个二聚体信号传导模块CD3 δ/ϵ 、CD3 γ/ϵ 和CD247 ζ/ζ 或 ζ/η 形成受体复合物。当TCR复合物与其抗原和MHC (肽/MHC) 结合时,表达TCR复合物的T细胞被激活。

[0103] 在某些实施方式中,抗原识别受体是重组TCR。在某些实施方式中,抗原识别受体是非天然存在的TCR。在某些实施方式中,非天然存在的TCR与任何天然存在的TCR的区别在于至少一个氨基酸残基。在某些实施方式中,非天然存在的TCR与任何天然存在的TCR的区别在于至少约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9、约10、约11、12、约13、约14、约15、约20、约25、约30、约40、约50、约60、约70、约80、约90、约100个或更多个氨基酸残基。在某些实施方式中,非天然存在的TCR由天然存在的TCR通过至少一个氨基酸残基修饰获得。在某些实施方式中,非天然存在的TCR由天然存在的TCR通过至少约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约20、约25、约30、约40、约50、约60、约70、约80、约90、约100个或更多个氨基酸残基修饰获得。

[0104] 2.3. 嵌合抗原受体 (CAR)

[0105] 在某些实施方式中,抗原识别受体是CAR。CAR是改造的受体,其将所关注的特异性移植或赋予免疫效应细胞。CAR可以用于将单克隆抗体的特异性移植到T细胞上;通过逆转录病毒载体促进其编码序列的转移。

[0106] 存在有三代CAR。“第一代”CAR通常由细胞外抗原结合结构域(例如scFv)组成,该结构域与跨膜结构域融合,而跨膜结构域与细胞质/细胞内信号传导结构域融合。“第一代”CAR可以提供从头抗原识别,并通过单个融合分子中的CD3 ζ 链信号传导结构域来导致CD4⁺和CD8⁺T细胞的激活,而不依赖于HLA介导的抗原呈递。“第二代”CAR将来自各种共刺激分子(例如CD28、4-1BB、ICOS、OX40)的细胞内信号传导结构域添加到CAR的胞质尾区,以向T细胞提供其他信号。“第二代”CAR包括提供共刺激(例如CD28或4-1BB)和激活(CD3 ζ)的CAR。“第三代”CAR包括提供多重共刺激(例如,CD28和4-1BB)和激活(CD3 ζ)的CAR。在某些实施方式中,抗原识别受体是第一代CAR。在某些实施方式中,抗原识别受体是第二代CAR。

[0107] 在某些非限制性实施方式中,CAR的细胞外抗原结合结构域(体现为例如scFv或其类似物)与抗原结合的解离常数(K_d)为约 2×10^{-7} M或更小。在某些实施方式中, K_d 为约 2×10^{-7} M或更小,约 1×10^{-7} M或更小,约 9×10^{-8} M或更小,约 1×10^{-8} M或更小,约 9×10^{-9} M或更小,约 5×10^{-9} M或更小,约 4×10^{-9} M或更小,约 3×10^{-9} M或更小,约 2×10^{-9} M或更小,或约 1×10^{-9} M或更小。在某些非限制性实施方式中, K_d 为约 3×10^{-9} M或更小。在某些非限制性实施方式中, K_d 为约 1×10^{-9} M至约 3×10^{-7} M。在某些非限制性实施方式中, K_d 为约 1.5×10^{-9} M至约 3×10^{-7} M。在某些非限制性实施方式中, K_d 为约 1.5×10^{-9} M至约 2.7×10^{-7} M。

[0108] 细胞外抗原结合结构域(例如,在scFv或其类似物中)的结合可以通过例如酶联免疫吸附测定法(ELISA)、放射免疫测定法(RIA)、FACS分析法、生物测定法(例如生长抑制)或Western Blot测定法来测定。这些测定法中的每一种通常通过采用对所关注复合物具有特异性的标记试剂(例如抗体或scFv)来检测具体关注的蛋白质-抗体复合物的存在。例如,scFv可以被放射性标记,并用于放射免疫测定法(RIA)(参见,例如,Weintraub, B., 放射免疫测定的原理(Principles of Radioimmunoassays),放射配体测定技术的第七次培训课程(Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques),内分泌学会(The Endocrine Society),1986年3月,通过引用并入本文)。放射性同位素可通过诸如使用 γ 计数器或闪烁计数器的方法或通过放射自显影来检测。在某些实施方式中,CAR的细胞外抗原结合结构域用荧光标记物标记。荧光标记物的非限制性示例包括绿色荧光蛋白(GFP)、蓝色荧光蛋白(例如EBFP、EBFP2、Azurite和mKalama1)、青色荧光蛋白(例如ECFP、Cerulean和CyPet)和黄色荧光蛋白(例如,YFP、Citrine、Venus和YPet)。

[0109] 根据本公开的主题,CAR可以包括细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,其中细胞外抗原结合结构域特异性结合抗原,例如肿瘤抗原或病原体抗原。

[0110] 在某些实施方式中,本公开的CAR的细胞外抗原结合结构域是鼠scFv。在某些实施方式中,本公开的CAR的细胞外抗原结合结构域是与鼠CD19多肽结合的鼠scFv。在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域是鼠scFv,其包括氨基酸序列SEQ ID NO:59,并特异性结合鼠CD19多肽(例如,包括SEQ ID NO:61所示的氨基酸序列的鼠CD19多肽)。在某些实施方式中,编码氨基酸序列SEQ ID NO:59的核苷酸序列如SEQ ID NO:60所示。在某些实施方式中,鼠scFv包括重链可变区(V_H),其包括SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列。在某些实施方式中,鼠scFv包括轻链可变区(V_L),其包括SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列。在某些实施方式中,鼠scFv包括重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L),重链可变区(V_H)包括SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列,轻链可变区(V_L)包括SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列,任选地在 V_H 和 V_L 之间具有(iii)接头序列,例如接头肽。在某些实施方式中,接头包括具有SEQ ID NO:23所示序列

的氨基酸。在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域包括V_H,其包括与SEQ ID NO:49具有至少约80% (例如,至少约85%、至少约90%或至少约95%)同源性的氨基酸序列。例如,细胞外抗原结合结构域包括V_H,其包括与SEQ ID NO:49具有约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域包括V_H,其包括SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列。在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域包括V_L,其包括与SEQ ID NO:50具有至少约80% (例如,至少约85%、至少约90%或至少约95%)同源性的氨基酸序列。例如,细胞外抗原结合结构域包括V_L,其包括与SEQ ID NO:50具有约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域包括V_L,其包括SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列。在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域包括V_H和V_L,上述V_H包括与SEQ ID NO:49具有至少约80% (例如,至少约85%、至少约90%或至少约95%)同源性的氨基酸序列,上述V_L包括与SEQ ID NO:50具有至少约80% (例如,至少约85%、至少约90%或至少约95%)同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域包括:包括SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列的V_H和包括SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列的V_L。在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域包括:包括SEQ ID NO:43所示氨基酸序列的V_H CDR1或其保守修饰物、包括SEQ ID NO:44所示氨基酸序列的V_H CDR2或其保守修饰物和包括SEQ ID NO:45所示氨基酸序列的V_H CDR3或其保守修饰物。在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域包括:包括SEQ ID NO:43所示氨基酸序列的V_H CDR1、包括SEQ ID NO:44所示氨基酸序列的V_H CDR2和包括SEQ ID NO:45所示氨基酸序列的V_H CDR3。在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域包括:包括SEQ ID NO:46所示氨基酸序列的V_L CDR1或其保守修饰物、包括SEQ ID NO:47所示氨基酸序列的V_L CDR2或其保守修饰物和包括SEQ ID NO:48所示氨基酸序列的V_L CDR3或其保守修饰物。在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域包括:包括SEQ ID NO:46所示氨基酸序列的V_L CDR1、包括SEQ ID NO:47所示氨基酸序列的V_L CDR2和包括SEQ ID NO:48所示氨基酸序列的V_L CDR3。在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域包括:包括SEQ ID NO:43所示氨基酸序列的V_H CDR1或其保守修饰物、包括SEQ ID NO:44所示氨基酸序列的V_H CDR2或其保守修饰物、包括SEQ ID NO:45所示氨基酸序列的V_H CDR3或其保守修饰物、包括SEQ ID NO:46所示氨基酸序列的V_L CDR1或其保守修饰物、包括SEQ ID NO:47所示氨基酸序列的V_L CDR2或其保守修饰物和包括SEQ ID NO:48所示氨基酸序列的V_L CDR3或其保守修饰物。在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域包括:包括SEQ ID NO:43所示氨基酸序列的V_H CDR1、包括SEQ ID NO:44所示氨基酸序列的V_H CDR2、包括SEQ ID NO:45所示氨基酸序列的V_H CDR3、包括SEQ ID NO:46所示氨基酸序列的V_L CDR1、包括SEQ ID NO:47所示氨基酸序列的V_L CDR2和包括SEQ ID NO:48所示氨基酸序列的V_L CDR3。

[0111] 在某些实施方式中,本公开的CAR的细胞外抗原结合结构域是与人CD19多肽结合的鼠scFv。在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域是鼠scFv,其包括氨基酸序列SEQ ID NO:63,并特异性结合人CD19多肽(例如,包括SEQ ID NO:62所示氨基酸序列的人CD19多肽)。在某些实施方式中,编码的氨基酸序列SEQ ID NO:63的核苷酸序列如SEQ ID NO:64所

示。在某些实施方式中,鼠scFv包括重链可变区(V_H),其包括SEQ ID NO:57所示的氨基酸序列。在某些实施方式中,鼠scFv包括轻链可变区(V_L),其包括SEQ ID NO:58所示的氨基酸序列。在某些实施方式中,鼠scFv包括:包括SEQ ID NO:57所示氨基酸序列的V_H和包括SEQ ID NO:58所示氨基酸序列的V_L,任选地在V_H和V_L之间具有(iii)接头序列,例如接头肽。在某些实施方式中,接头包括具有SEQ ID NO:23所示序列的氨基酸。在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域包括V_H,其包括与SEQ ID NO:57具有至少约80%(例如,至少约85%、至少约90%或至少约95%)同源性的氨基酸序列。例如,细胞外抗原结合结构域包括V_H,其包括与SEQ ID NO:57具有约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域包括V_H,其包括SEQ ID NO:57所示的氨基酸序列。在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域包括V_L,其包括与SEQ ID NO:58具有至少约80%(例如,至少约85%、至少约90%或至少约95%)同源性的氨基酸序列。例如,细胞外抗原结合结构域包括V_L,其包括与SEQ ID NO:58具有约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域包括V_L,其包括SEQ ID NO:58所示的氨基酸序列。某些实施方式,细胞外抗原结合结构域包括V_H和V_L,上述V_H包括与SEQ ID NO:57具有至少约80%(例如,至少约85%、至少约90%或至少约95%)同源性的氨基酸序列,V_L包括与SEQ ID NO:58具有至少约80%(例如,至少约85%、至少约90%或至少约95%)同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域包括:包括SEQ ID NO:57所示氨基酸序列的V_H和包括如SEQ ID NO:58所示氨基酸序列的V_L。在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域包括:包括SEQ ID NO:51所示氨基酸序列的V_H CDR1或其保守修饰物、包括SEQ ID NO:52所示氨基酸序列的V_H CDR2或其保守修饰物和包括SEQ ID NO:53所示氨基酸序列的V_H CDR3或其保守修饰物。在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域包括:包括SEQ ID NO:51所示氨基酸序列的V_H CDR1、包括SEQ ID NO:52所示氨基酸序列的V_H CDR2和包括SEQ ID NO:53所示氨基酸序列的V_H CDR3。在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域包括:包括SEQ ID NO:54所示氨基酸序列的V_L CDR1或其保守修饰物、包括SEQ ID NO:55所示氨基酸序列的V_L CDR2或其保守修饰物和包括SEQ ID NO:56所示氨基酸序列的V_L CDR3或其保守修饰物。在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域包括:包括SEQ ID NO:54所示氨基酸序列的V_L CDR1、包括SEQ ID NO:55所示氨基酸序列的V_L CDR2和包括SEQ ID NO:56所示氨基酸序列的V_L CDR3。在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域包括:包括SEQ ID NO:51所示氨基酸序列的V_H CDR1或其保守修饰物、包括SEQ ID NO:52所示氨基酸序列的V_H CDR2或其保守修饰物、包括SEQ ID NO:53所示氨基酸序列的V_H CDR3或其保守修饰物、包括SEQ ID NO:54所示氨基酸序列的V_L CDR1或其保守修饰物、包括SEQ ID NO:55所示氨基酸序列的V_L CDR2或其保守修饰物和包括SEQ ID NO:56所示氨基酸序列的V_L CDR3或其保守修饰物。在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域包括:包括SEQ ID NO:51所示氨基酸序列的V_H CDR1、包括SEQ ID NO:52所示氨基酸序列的V_H CDR2、包括SEQ ID NO:53所示氨基酸序列的V_H CDR3、包括SEQ ID NO:54所示氨基酸序列的V_L CDR1、包括SEQ ID NO:55所示氨基酸序列的V_L CDR2和包括SEQ ID NO:56所示氨基酸序列的V_L CDR3。

[0112] 表1

CDRs		抗小鼠 CD19 scFv (1D3)		
		1	2	3
V _H	a.a.	FYYMH [SEQ ID NO: 43]	RIDPEDESTK YSEKFNK [SEQ ID NO: 44]	GGYYFDY [SEQ ID NO: 45]
V _L	a.a.	QASEDIYSGLA [SEQ ID NO: 46]	GASDLQD [SEQ ID NO: 47]	QQGLTYPRT [SEQ ID NO: 48]
全 V _H		EVQLQQSGAE LVRPGTSVKL SCKVSGDTIT FYYMHFVKQR PGQGLEWIGR IDPEDESTKY SEKFNKATL TADTSSNTAY LKLSSLTSED TATYFCIYGG YYFDYWQGV MVTVSS [SEQ ID NO: 49]		
全 V _L		DIQMTQSPAS LSTSLGETVT IQQASEDIY SGLAWYQQKP GKSPQLLIYG ASDLQDGVPS RFGSGSGTQ YSLKITSMT EDEGVYFCQQ GLTYPRTFGG GTKLELKR [SEQ ID NO: 50]		
scFv		MASPLTRFLS LNLLLLGESI ILGSGEAEVQ LQQSGAELVR PGTSVKLSCK VSGDTITFYF MHFVKQRPGQ GLEWIGRIDP EDESTKYSEK FKNKATLTAD TSSNTAYLKL SSLTSEDAT YFCIYGGYF DYWGQGVMT VSSGGGGSGG GSGGGGSDI QMTQSPASLS TSLGETVTIQ CQASEDIYSG LAWYQQKPGK SPQLLIYGAS DLQDGVPSRF SSGSGTQYS LKITSMTQTED EGVYFCQQGL TYPRTFGGGT KLELKR [SEQ ID NO: 59]		
DNA		ATGGCCTCACCGTTGACCCGCTTCTGTGCGCTGAACCTGCTGCTGGGTGAGTCG ATTATCCTGGGGAGTGAGAAAGCTGAAGTCCAGTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTT GTGAGACCTGGGACCTCTGTGAAGTTATCTTGCAAAGTTTCTGGCGATACCATTACA TTTTACTACATGCACTTTGTGAAGCAAAGGCTGGACAGGGTCTGGAATGGATAGGA AGGATTGATCCTGAGGATGAAAGTACTAAATATTCTGAGAAGTTCAAAAACAAGGCG ACACTCACTGCAGATACATCTTCCAACACAGCCTACCTGAAGCTCAGCAGCCTGACC TCTGAGGACACTGCAACCTATTTTTGTATCTACGGAGGATACTACTTTGATTACTGG GGCCAAGGGGTCATGGTCACAGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGA TCTGGTGGAGGTGGATCTGACATCCAGATGACACAGTCTCCAGCTTCCCTGTCTACA TCTCTGGGAGAACTGTCACCATCCAATGTCAAGCAAGTGAGGACATTTACAGTGGT TTAGCGTGGTATCAGCAGAAGCCAGGAAATCTCCTCAGCTCCTGATCTATGGTGCA AGTGACTTACAAGACGGCGTCCCATCACGATTCAGTGGCAGTGGATCTGGCACACAG TATTCTCTCAAGATCACCAGCATGCAAAGTGAAGATGAAGGGGTTTATTTCTGTCAA		
		CAGGGTTTAAAGTATCCTCGGACGTTCCGGTGGCGGCACCAAGCTGGAATTGAAACGG [SEQ ID NO: 60]		

[0113]

[0114]

[0115] 表2

CDRs		抗人 CD19 scFv (SJ25C1)		
		1	2	3
V _H	a.a.	GYAFSS [SEQ ID NO: 51]	YPGDGD [SEQ ID NO: 52]	KTISSVVDV [SEQ ID NO: 53]
V _L	a.a.	NVGTNVA [SEQ ID NO: 54]	SATYRN [SEQ ID NO: 55]	FCQQYNRY [SEQ ID NO: 56]
全 V _H		EVKLQQSGAE LVRPGSSVKI SCKASGYAFS SYWMNWKQR PGQGLEWIGQ IYPGDGDTNY NGKFKGQATL TADKSSSTAY MQLSGLTSED SAVYFCARKT ISSVVDVDFYFD YWGQGTTVTV SS [SEQ ID NO: 57]		
全 V _L		DIELTQSPKF MSTSVGDRVS VTCKASQNVG TNVAWYQQKP GQSPKPLIYS ATYRNSGVPD RFTGSGSGTD FTLTITNVQS KDLADYFCQQ YNRYPYTSGG GTKLEIKR [SEQ ID NO: 58]		
scFv		MALPVTALLL PLALLLHAEV KLQQSGAELV RPGSSVKISC KASGYAFSSY WMNWKQRPG QGLEWIGQIY PGDGDNTYNG KFKGQATLTA DKSSSTAYMQ LSGLTSEDSA VYFCARKTIS SVVDFYFDYW GQGTTVTVSS GGGGSGGGGS GGGGSDIELT QSPKFMSTSV GDRVSVTCKA SQNVGTNVAW YQQKPGQSPK PLIYSATYRN SGVPDRFTGS GSGTDFTLTI TNVQSKDLAD YFCQQYNRYP YTSGGGKLE IKR [SEQ ID NO: 63]		
DNA		ATGGCTCTCCCAGTGACTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCATGCAGAG GTGAAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCTCAGTGAAGATT TCCTGCAAGGCTTCTGGCTATGCATTCAGTAGCTACTGGATGAAGTGGGTGAAGCAG AGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTATCCTGGAGATGGTGATACT AACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTCAAGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGC ACAGCCTACATGCAGCTCAGCGGCCAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTCTGT GCAAGAAAGACCATTAGTTCGGTAGTAGATTTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGG GGTGGATCTGACATTGAGCTCACCCAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGA GACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATGTAGCCTGG TATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACCAGTATTTACTCGGCAACCTACCGG AACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC ACCATCACTAACGTGCAGTCTAAAGACTTGGCAGACTATTTCTGTCAACAATATAAC AGGTATCCGTACACGTCCGGAGGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGG [SEQ ID NO: 64]		

[0116]

[0117] 如本文所用,术语“保守序列修饰”是指不显著影响或改变本公开的包括氨基酸序列的CAR(例如,CAR的细胞外抗原结合结构域)的结合特性的氨基酸修饰。保守修饰可以包括氨基酸置换、添加和缺失。可以通过本领域已知的标准技术(例如定点诱变和PCR介导的诱变)将修饰引入本公开的CAR的人scFv中。氨基酸可以根据其物理化学性质(例如电荷和极性)分为几组。保守氨基酸置换是其中氨基酸残基被相同组内的氨基酸取代的氨基酸置换。例如,氨基酸可以按电荷分类:带正电荷的氨基酸包括赖氨酸、精氨酸、组氨酸,带负电荷的氨基酸包括天冬氨酸、谷氨酸,中性电荷氨基酸包括丙氨酸、天冬酰胺、半胱氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。另外,氨基酸可以按极性分类:极性氨基酸包括精氨酸(碱性极性)、天冬酰胺、天冬氨酸(酸性极性)、谷氨酸(酸性极性)、谷氨酰胺、组氨酸(碱性极性)、赖氨酸(碱性极性)、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸;非极性氨基酸包括丙氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸和缬氨酸。因此,CDR区内的一个或更多个氨基酸残基可以被来自相同组的其他氨基酸残基取代,改变的抗体可以使用本文所述的功能测定法测试保留功能(即,(c)至(1)中列出的功能)。在某些实施方式中,在指定序列或CDR区内不超过一个、不超过两个、不超过三个、不超过四个、不超过五个残基被改变。

[0118] 相对于指定序列,包括与指定序列(例如,SEQ ID NO:49、50、57和58)具有至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%(例如,约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约

96%、约97%、约98%或约99%)同源性的V_H和/或V_L氨基酸序列可以含有置换(例如,保守置换)、插入或缺失,但保留结合靶抗原(例如,CD19)的能力。在某些实施方式中,在指定序列(例如,SEQ ID NO:49、50、57和58)中,总共1至10个氨基酸被置换、插入和/或缺失。在某些实施方式中,置换、插入或缺失发生在细胞外抗原结合结构域的CDR之外的区(例如,在FR中)。在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域包括选自SEQ ID NO:49、50、57和58(包括该序列(SEQ ID NO:49、50、57和58)的翻译后修饰物)的V_H和/或V_L序列。

[0119] 如本文所用,两个氨基酸序列之间的同源性百分比等同于两个序列之间的同一性百分比。两个序列之间的同一性百分比是该序列共享的相同位置数的函数(即,%同源性=相同位置数#/位置总数#×100),其中考虑了空位数和每个空位的长度,需要引入这些空位以实现两个序列的最佳比对。序列的比较和两个序列之间同一性百分比的确定可以使用数学算法来完成。

[0120] 可以使用E.Meyers和W.Miller(Comput.Appl.Biosci.,4:11-17(1988))的算法确定两个氨基酸序列之间的同源性百分比,该算法已合并到ALIGN程序(2.0版)中),使用PAM120权重残基表,空位长度罚分为12,空位罚分为4。此外,两个氨基酸序列之间的同源性百分比可以使用Needleman和Wunsch(J.Mol.Biol.48:444-453(1970))算法来确定,该算法已被整合到GCG软件包(可从www.gcg.com获得)中的GAP程序中,使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵,并且空位权重为16、14、12、10、8、6或4,长度权重为1、2、3、4、5或6。

[0121] 额外地或另外可选地,本公开的主题的氨基酸序列可以进一步用作“查询序列”以对公共数据库进行搜索,例如,以识别相关序列。可以使用Altschul等((1990)J.Mol.Biol.215:403-10)的XBLAST程序(2.0版)执行此类搜索。可以使用XBLAST程序进行BLAST蛋白质搜索,得分=50,字长=3,以获得与本文公开的指定序列(例如,scFv m903、m904、m905、m906和m900的重链和轻链可变区序列)同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的空位比对,可以如Altschul等,(1997)Nucleic Acids Res.25(17):3389-3402中所述使用Gapped BLAST。当使用BLAST和Gapped BLAST程序时,可以使用各个程序(例如XBLAST和NBLAST)的默认参数。

[0122] 2.3.1.CAR的细胞外抗原结合结构域

[0123] 在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域特异性地与抗原结合。在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域是scFv。在某些实施方式中,scFv是人scFv。在某些实施方式中,scFv是人源化scFv。在某些实施方式中,scFv是鼠scFv。在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域是Fab,其任选地被交联。在某些实施方式中,细胞外抗原结合结构域是F(ab)₂。在某些实施方式中,任何前述分子可以包括在具有异源序列的融合蛋白中以形成细胞外抗原结合结构域。在某些实施方式中,通过用抗原-Fc融合蛋白筛选scFv噬菌体文库来鉴定scFv。在某些实施方式中,抗原是肿瘤抗原。在某些实施方式中,抗原是病原体抗原。

[0124] 2.3.2.CAR的跨膜结构域

[0125] 在某些非限制性实施方式中,CAR的跨膜结构域包括跨越膜的至少一部分的疏水性 α 螺旋。不同的跨膜结构域导致不同的受体稳定性。抗原识别后,受体聚集,信号被传递至细胞。根据本公开的主题,CAR的跨膜结构域可以包括CD8多肽、CD28多肽、CD3 ζ 多肽、CD4多肽、4-1BB多肽、OX40多肽、ICOS多肽、合成肽(并非基于与免疫应答相关的蛋白质)或其组合。

[0126] 在某些实施方式中,跨膜结构域包括CD8多肽。在某些实施方式中,CD8多肽包括或具有与如下提供的NCBI参考编号为NP_001139345.1 (SEQ ID NO:9)的序列具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性(本文中的同源性可以使用标准软件,例如BLAST或FASTA确定)的氨基酸序列或该其片段,和/或可以任选地包括至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸置换。在某些实施方式中,CD8多肽包括或具有作为SEQ ID NO:9的连续部分的氨基酸序列,其长度为至少20、或至少30、或至少40、或至少50且至多235个氨基酸。另外可选地或额外地,在非限制性的各种实施方式中,CD8多肽包括或具有SEQ ID NO:9的氨基酸1至235、1至50、50至100、100至150、150至200或200至235的氨基酸序列。在某些实施方式中,本公开的CAR包括跨膜结构域,其包括CD8多肽,该CD8多肽包括或具有SEQ ID NO:9的氨基酸137至209的氨基酸序列。

[0127] MALPVTALLLPLALLLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGETVELKQVLLSNPTSGCSWLFQPRGAAASPTFLL
YLSQNKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYYFCSALSNSIMYFSHFVFPVFLPAKPTTTPA
PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYCNHRNRRR
VCKCPRPVVKSGDKPSSLARYV [SEQ ID NO: 9]

[0128] 在某些实施方式中,CD8多肽包括或具有与如下提供的NCBI参考编号为AAA92533.1 (SEQ ID NO:10)的序列具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性(本文中的同源性可以使用标准软件,例如BLAST或FASTA确定)的氨基酸序列或其片段,和/或可以任选地包括至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸置换。在某些实施方式中,CD8多肽包括或具有作为SEQ ID NO:10的连续部分的氨基酸序列,其长度为至少20、或至少30、或至少40、或至少50、或至少60、或至少70、或至少100、或至少200且至多247个氨基酸。另外可选地或额外地,在非限制性的各种实施方式中,CD8多肽包括或具有SEQ ID NO:10的氨基酸1至247、1至50、50至100、100至150、150至200、151至219、或200至247的氨基酸序列。在某些实施方式中,本公开的CAR包括跨膜结构域,其包括CD8多肽,该CD8多肽包括或具有SEQ ID NO:10的氨基酸151至219的氨基酸序列。

[0129] 1 MASPLTRFLS LNLLLMGESI ILGSGEAKPQ APELRIFPKK MDAELGQKVD LVCEVLGSVS
61 QGCSWLFQNS SSKLPQPTFV VYMASSHNI TWDEKLNSSK LFAVRDNTN KYVLTLNKFS
121 KENEGYYFCS VISNSVMYFS SVVPVLQKVN STTTKEVLR T PPSVHPTGTS QPQRPEDCRP
181 RGSVKGTGLD FACDIYIWAP LAGICVAPLL SLIITLICYH RSRKRVCCKCP RPLVRQEGKP
241 RPSEKIV [SEQ ID NO: 10]

[0130] 在某些实施方式中,CD8多肽包括或具有SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,其提供如下:

[0131] STTTKPVLRTSPSVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSKVGTGLDFACDIYIWAPLAGICVALLLSLIITLICY
[SEQ ID NO: 11]

[0132] 根据本公开的主题,“CD8核酸分子”是指编码CD8多肽的多核苷酸。

[0133] 在某些实施方式中,编码具有SEQ ID NO:11所示氨基酸序列的CD8多肽的CD8核酸分子包括或具有如下提供的具有SEQ ID NO:12所示序列的核酸。

[0134] TCTACTACTACCAAGCCAGTGCTGCGAACTCCCTCACCTGTGCACCCTACCGGGACATCTCAGCCCCAGAG
 ACCAGAAGATTGTTCGGCCCCGTGGCTCAGTGAAGGGGACCGGATTGGACTTCGCCTGTGATATTTACATCT
 GGGCACCCCTTGGCCGGAATCTGCGTGGCCCTTCTGCTGTCTTGGATCATCACTCTCATCTGCTAC [SEQ ID
 NO: 12]

[0135] 在某些实施方式中,本公开的CAR的跨膜结构域包括CD28多肽。CD28多肽可以具有与如下提供的NCBI参考编号为P10747或NP_006130 (SEQ ID NO:2)的序列具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性的氨基酸序列或其片段,和/或可以任选地包括至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸置换。在某些实施方式中,CD28多肽包括或具有作为SEQ ID NO:2的连续部分的氨基酸序列,其长度为至少20、或至少30、或至少40、或至少50且至多220个氨基酸。另外可选地或额外地,在非限制性的各种实施方式中,CD28多肽包括或具有SEQ ID NO:2的氨基酸1至220、1至50、50至100、100至150、114至220、150至200、或200至220的氨基酸序列。在某些实施方式中,包括在本公开的CAR的跨膜结构域中的CD8多肽包括或具有SEQ ID NO:2的氨基酸153至179的氨基酸序列。

[0136] SEQ ID NO:2提供如下:

[0137] 1 MLRLLALNL FPSIQVTGNK ILVKQSPMLV AYDNAVNLSC KYSYNLFSRE FRASLHKGLD
 61 SAVEVCVVYV NYSQQLQVYS KTGFCNDGKL GNEVTFYLV NLYVNQTDIY FCKIEVMYPP
 121 PYLDNEKSNG TIIHVKGKHL CPSPLFPGPS KPFWVWLVVVG GVLACYSLLV TVAFIIFWVR
 181 SKRSRLLHSD YNMTPRRPG PTRKHYQPYA PPRDFAAAYS [SEQ ID NO: 2]

[0138] 根据本公开的主题,“CD28核酸分子”是指编码CD28多肽的多核苷酸。在某些实施方式中,编码具有SEQ ID NO:2的氨基酸153至179的CD28多肽的CD28核酸分子包括或具有如下文提供的具有SEQ ID NO:22所示序列的核酸。

[0139] ttttgggtgctggtggtggttggaggagtcctggcttgctatagcttgctagtaacagtggcctttattat
 tttctgggtg [SEQ ID NO: 22]

[0140] 在某些实施方式中,CAR的细胞内信号传导结构域包括鼠CD28跨膜结构域。鼠CD28跨膜结构域可以包括或具有与SEQ ID NO:76具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性的氨基酸序列或其片段,和/或可以任选地包括至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸置换。SEQ ID NO:76提供如下:
 FWALVVVAGV LFCYGLLVTV ALCVIWT [SEQ ID NO: 76]。

[0141] 编码氨基酸序列SEQ ID NO:76的示例性核酸序列如SEQ ID NO:77所示,其在下面提供。

[0142] TTTTGGGCACTGGTTCGTGGTTGCTGGAGTCTGTTTGTATGGCTTGCTAGTGACAGTGGCTCTTTGTGT
 TATCTGGACA [SEQ ID NO: 77]

[0143] 在某些实施方式中,CAR的细胞内信号传导结构域包括人CD28跨膜结构域。人CD28跨膜结构域可以包括或具有与SEQ ID NO:78具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性的氨基酸序列或其片段,和/或可以任选地包括至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸置换。SEQ ID NO:78提供如下:
 FWVLVVVGGV LACYSLLVTV AFIIIFWV [SEQ ID NO: 78]。

[0144] 编码氨基酸序列SEQ ID NO:78的示例性核酸序列如SEQ ID NO:79所示,其在下面

提供。

[0145] TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTAT
TTTCTGGGTG [SEQ ID NO: 79]

[0146] 在某些非限制性实施方式中, CAR还可以包括将细胞外抗原结合结构域与跨膜结构域连接的间隔区(spacer region)。间隔区可以具有足够的柔性, 以允许抗原结合结构域在不同方向上定向, 以促进抗原识别。间隔区可以是来自IgG1的铰链区, 或者是免疫球蛋白的CH₂CH₃区和CD3的一部分、CD28多肽的一部分(例如, SEQ ID NO:2的一部分)、CD8多肽的一部分(例如SEQ ID NO:9的一部分或SEQ ID NO:10的一部分)、前述任一项的变体, 该变体与其具有至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%的同源性, 或者是合成的间隔序列。

[0147] 2.3.3. CAR的细胞内信号传导结构域

[0148] 在某些非限制性实施方式中, CAR的细胞内信号传导结构域包括CD3 ζ 多肽, 其可以激活或刺激细胞(例如淋巴谱系的细胞, 例如T细胞)。CD3 ζ 包括3个ITAM, 并在结合抗原后将激活信号传递至细胞(例如, 淋巴谱系的细胞, 例如T细胞)。CD3 ζ -链的细胞内信号传导结构域是来自内源性TCR的信号的主要传递者。在某些实施方式中, CD3 ζ 多肽包括或具有与NCBI参考编号为NP_932170(SEQ ID NO:1)的序列具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性的氨基酸序列或其片段, 和/或可以任选地包括至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸置换。在某些非限制性实施方式中, CD3 ζ 多肽包括或具有作为SEQ ID NO:1的连续部分的长度为至少20、或至少30、或至少40、或至少50且至多164个氨基酸的氨基酸序列。另外可选地或额外地, 在非限制性的各种实施方式中, CD3 ζ 多肽包括或具有SEQ ID NO:1的氨基酸1至164、1至50、50至100、100至150、或150至164的氨基酸序列。在某些实施方式中, CD3 ζ 多肽包括或具有SEQ ID NO:1的氨基酸52至164的氨基酸序列。

[0149] SEQ ID NO:1提供如下:

[0150] 1 MKWKALFTAA ILQAQLPITE AQSFGLLDPK LCYLLDGILF IYGVILTALF LRVKFSRSAD
61 APAYQQGQNQ LYNELNLGRR EYDVLDKRR GRDPEMGGKP QRRKNPQEGL YNELQKDKMA
121 EAYSEIGMKG ERRRGKGHG LYQGLSTATK DTYDALHMQA LPPR [SEQ ID NO: 1]

[0151] 在某些实施方式中, CD3 ζ 多肽包括或具有与NCBI参考编号为NP_001106864.2(SEQ ID NO:13)的序列具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性的氨基酸序列或其片段, 和/或可以任选地包括至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸置换。在某些非限制性实施方式中, CD3 ζ 多肽包括或具有作为SEQ ID NO:13的连续部分的长度为至少约20、或至少约30、或至少约40、或至少约50、或至少约90、或至少约100且至多188个氨基酸的氨基酸序列。另外可选地或额外地, 在非限制性的各种实施方式中, CD3 ζ 多肽包括或具有SEQ ID NO:13的氨基酸1至164、1至50、50至100、52至142、100至150、或150至188的氨基酸序列。在某些实施方式中, CD3 ζ 多肽包括或具有SEQ ID NO:13的氨基酸52至142的氨基酸序列。

[0152] SEQ ID NO:13如下提供:

[0153] 1 MKWKVSVLAC ILHVRFPGAE AQSFGLLDPK LCYLLDGILF IYGVIIITALY LRAKFSRSAE
61 TAANLQDPNQ LYNELNLGR RREEYDVLEKKR ARDPEMGGKQ RRRNPQEGVY NALQKDKMAE
121 AYSEIGTKGE RRRGKGDGL YQDSHFQAVQ FGRRREREGS ELTRTLGLRA RPKACRHKPK
181 LSLPAAVS [SEQ ID NO: 13]

[0154] 在某些实施方式中,CD3 ζ 多肽包括或具有SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列,其提供如下:

[0155] RAKFSRSAETAANLQDPNQLYNELNLGRREEYDVLEKKRARDPEMGGKQRRRNPQEGVYNALQK
DKMAEAYSEIGTKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLAPR [SEQ ID NO: 14]

[0156] 根据本公开的主题,“CD3 ζ 核酸分子”是指编码CD3 ζ 多肽的多核苷酸。在某些实施方式中,编码具有SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的CD3 ζ 多肽的CD3 ζ 核酸分子包括或具有如下提供的SEQ ID NO:15所示的核苷酸序列。

[0157] AGAGCAAAATTCAGCAGGAGTGCAGAGACTGCTGCCAACCTGCAGGACCCCAACCAGCTCTACAATGAGCT
CAATCTAGGGCGAAGAGAGGAATATGACGTCTTGGAGAAGAAGCGGGCTCGGGATCCAGAGATGGGAGGCA
AACAGCAGAGGAGGAGGAACCCCAAGGCGTATACAATGCACTGCAGAAAGACAAGATGGCAGAAGCC
TACAGTGAGATCGGCACAAAAGGCGAGAGGCGGAGAGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAG
CACTGCCACCAAGGACACCTATGATGCCCTGCATATGCAGACCCTGGCCCCTCGCTAA [SEQ ID NO:
15]

[0158] 在某些实施方式中,CAR的细胞内信号传导结构域包括鼠CD3 ζ 多肽。鼠CD3 ζ 多肽可以包括或具有与SEQ ID NO:72具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性的氨基酸序列或其片段,和/或可以任选地包括至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸置换。SEQ ID NO:72提供如下:

[0159] RAKFSRSAET AANLQDPNQL YNELNLGRRE EYDVLEKKRA RDPEMGGKQQ RRRNPQEGVY
NALQKDKMAE AYSEIGTKGE RRRGKGDGL YQGLSTATKD TYDALHMQL APR [SEQ ID NO:
72]

[0160] 编码氨基酸序列SEQ ID NO:72的示例性核酸序列如SEQ ID NO:73所示,其在下面提供。

[0161] AGAGCAAAATTCAGCAGGAGTGCAGAGACTGCTGCCAACCTGCAGGACCCCAACCAGCTCTACAATGAGCT
CAATCTAGGGCGAAGAGAGGAATATGACGTCTTGGAGAAGAAGCGGGCTCGGGATCCAGAGATGGGAGGCA
AACAGCAGAGGAGGAGGAACCCCAAGGCGTATACAATGCACTGCAGAAAGACAAGATGGCAGAAGCC
TACAGTGAGATCGGCACAAAAGGCGAGAGGCGGAGAGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAG
CACTGCCACCAAGGACACCTATGATGCCCTGCATATGCAGACCCTGGCCCCTCGC [SEQ ID NO: 73]

[0162] 在某些实施方式中,CAR的细胞内信号传导结构域包括人CD3 ζ 多肽。人CD3 ζ 多肽可以包括或具有与SEQ ID NO:74具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性的氨基酸序列或其片段,和/或可以任选地包括至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸置换。SEQ ID NO:74提供如下:

[0163] RVKFSRSADA PAYQQGQNQL YNELNLGRRE EYDVLDKRRG RDPEMGGKPR RKNPQEGLYN
ELQKDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGDGLY QGLSTATKDT YDALHMQLALP PR [SEQ ID NO:
74]

[0164] 编码氨基酸序列SEQ ID NO:74的示例性核酸序列如SEQ ID NO:75所示,其在下面

提供。

```

AGAGTGAAAGTTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCT
CAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAA
[0165] AGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTAC
AGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTAC
AGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC [SEQ ID NO: 75]

```

[0166] 在某些非限制性实施方式中，CAR的细胞内信号传导结构域不包括共刺激信号传导区，即，CAR是第一代CAR。

[0167] 在某些非限制性实施方式中，CAR的细胞内信号传导结构域还包括至少一个共刺激性信号传导区。在某些实施方式中，共刺激区包括至少一种共刺激分子，其可以提供最佳的淋巴细胞活化。如本文所用，“共刺激分子”是指淋巴细胞对抗原的有效应答所要求的除抗原受体或其配体以外的细胞表面分子。至少一个共刺激信号传导区可以包括CD28多肽、4-1BB多肽、OX40多肽、ICOS多肽、DAP-10多肽或其组合。共刺激分子可以与共刺激配体结合，该共刺激配体是在细胞表面上表达的蛋白质，其一经与其受体结合会产生共刺激反应，即影响到抗原与其CAR分子结合时产生的刺激细胞内反应。共刺激配体包括，但不限于CD80、CD86、CD70、OX40L和4-1BBL。作为一实例，4-1BB配体（即4-1BBL）可以与4-1BB（也称为“CD137”）结合，以提供细胞内信号，其与CAR信号组合诱导CAR⁺T细胞的效应细胞功能。美国专利7,446,190中公开了包括细胞内信号传导结构域的CAR，所述细胞内信号传导结构域包括有包括4-1BB、ICOS或DAP-10的共刺激信号区，该文献通过引用整体并入本文。

[0168] 在某些实施方式中，CAR的细胞内信号传导结构域包括有包括CD28多肽的共刺激信号传导区。CD28多肽可以包括或具有与NCBI参考编号为P10747或NP_006130 (SEQ ID NO: 2) 的序列具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性的氨基酸序列或其片段，和/或可以任选地包括至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸置换。在某些非限制性实施方式中，CD28多肽包括或具有作为SEQ ID NO:2的连续部分的长度为至少20、或至少30、或至少40、或至少50且至多220个氨基酸的氨基酸序列。另外可选地或额外地，在非限制性的各种实施方式中，CD28多肽包括或具有SEQ ID NO:2的氨基酸1至220、1至50、50至100、100至150、114至220、150至200、或200至220的氨基酸序列。在某些实施方式中，CAR的细胞内信号传导结构域包括共刺激信号传导区，其包括CD28多肽，该CD28多肽包括或具有SEQ ID NO:2的氨基酸180至220的氨基酸序列。

[0169] 在某些实施方式中，CD28多肽可以包括或具有与NCBI参考编号为NP_031668.3 (SEQ ID NO:16) 的序列具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性的氨基酸序列或其片段，和/或可以任选地包括至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸置换。在某些非限制性实施方式中，CD28多肽包括或具有作为SEQ ID NO:16的连续部分的长度为至少约20、或至少约30、或至少约40、或至少约50且至多218个氨基酸的氨基酸序列。另外可选地或额外地，在非限制性的各种实施方式中，CD28多肽包括或具有SEQ ID NO:16的氨基酸1至218、1至50、50至100、100至150、114至220、150至200、178至218、或200至220的氨基酸序列。在某些实施方式中，本公开的CAR的共刺激信号传导区包括CD28多肽，该CD28多肽包括或具有SEQ ID NO:16的氨基酸178至218。

[0170] SEQ ID NO:16提供如下：

[0171] 1 MTLRLLFLAL NFFSVQVTEN KILVKQSPLL VVDSNEVSL S CRYSYNLLAK EFRASLYKGV
61 NSDVEVCVGN GNFTYQPQFR SNAEFNCDGD FNETVTFRL WNLHVNHTDI YFCKIEFMYP
121 PPYLDNERSN GTIIHIKEKH LCHTQSSPKL FWALVVVAGV LFCYGLLVTV ALCVIWTNSR
181 RNRLQLSDYM NMTPRRPLT RKPYPYAPA R DFAAYRP [SEQ ID NO: 16]

[0172] 根据本公开的主题，“CD28核酸分子”是指编码CD28多肽的多核苷酸。在某些实施方式中，编码包括在本公开的CAR的共刺激信号区中的CD28多肽（例如，SEQ ID NO:16的氨基酸178至218）的CD28核酸分子包括或具有SEQ ID NO:17所示的核苷酸序列，其在以下提供。

[0173] AATAGTAGAAGGAACAGACTCCTTCAAAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGGAGGCCTGGGCTCACTCG
AAAGCCTTACCAGCCCTACGCCCTGCCAGAGACTTTGCAGCGTACCGCCCC [SEQ ID NO: 17]

[0174] 在某些实施方式中，CAR的细胞内信号传导结构域包括CD28的鼠细胞内信号传导结构域。CD28的鼠细胞内信号传导结构域可以包括或具有与SEQ ID NO:68具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性的氨基酸序列或其片段，和/或可以任选地包括至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸置换。SEQ ID NO:68提供如下：

[0175] NSRRNRLQLS DYMNMTPRRP GLTRKPYQPY APARDFAAAYR P [SEQ ID NO: 68]

[0176] 编码氨基酸序列SEQ ID NO:68的示例性核酸序列如SEQ ID NO:69所示，其提供如下。

[0177] AATAGTAGAAGGAACAGACTCCTTCAAAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGGAGGCCTGGGCTCACTCG
AAAGCCTTACCAGCCCTACGCCCTGCCAGAGACTTTGCAGCGTACCGCCCC [SEQ ID NO: 69]

[0178] 在某些实施方式中，CAR的细胞内信号传导结构域包括CD28的人细胞内信号传导结构域。CD28的人细胞内信号传导结构域可以包括或具有与SEQ ID NO:70具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性的氨基酸序列或其片段，和/或可以任选地包括至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸置换。SEQ ID NO:70提供如下：

[0179] RSKRSRLLHS DYMNMTPRRP GPTRKHYQPY APPRDFAAAYR S [SEQ ID NO: 70]

[0180] 编码氨基酸序列SEQ ID NO:70的示例性核酸序列如SEQ ID NO:71所示，其在下面提供。

[0181] AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCG
CAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC [SEQ ID NO: 71]

[0182] 在某些实施方式中，CAR的细胞内信号传导结构域包括共刺激信号传导区，其包括两个共刺激分子：CD28和4-1BB，或CD28和OX40。

[0183] 4-1BB可以充当肿瘤坏死因子（TNF）配体并具有刺激活性。4-1BB多肽可以包括或具有与NCBI参考编号为P41273或NP_001552（SEQ ID NO:3）的序列具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性的氨基酸序列或其片段，和/或可以任选地包括至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸置换。

[0184] SEQ ID NO:3提供如下：

1 MGNSCYNIVA TLLLVNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR
 61 TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC
 [0185] 121 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPPAPARE
 181 PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG
 241 CSCRFPEEEEE GGCEL [SEQ ID NO: 3]

[0186] 根据本公开的主题，“4-1BB核酸分子”是指编码4-1BB多肽的多核苷酸。

[0187] 在某些实施方式中，CAR的细胞内信号传导结构域包括4-1BB的细胞内信号传导结构域。4-1BB的细胞内信号传导结构域可以包括或具有与SEQ ID NO:66具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性的氨基酸序列或其片段，和/或可以任选地包括至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸置换。SEQ ID NO:66提供如下：

[0188] KRGRKKLLYI FKQPFMRPVQ TTQEEDGCSC RFPEEEEEGGC EL [SEQ ID NO: 66]

[0189] 编码氨基酸序列SEQ ID NO:66的示例性核酸序列如SEQ ID NO:67所示，其提供如下。

AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCA
 [0190] AGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG [SEQ ID
 NO: 67]

[0191] OX40多肽可以包括或具有与NCBI参考编号为P43489或NP_003318 (SEQ ID NO:18)的序列具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性的氨基酸序列或其片段，和/或可以任选地包括至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸置换。

[0192] SEQ ID NO:18提供如下：

1 MCVGARRLGR GPCAAALLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ
 61 NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK
 [0193] 121 PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ
 181 GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL
 241 RRDQRLPPDA HKPPGGGSFR TPIQEEQADA HSTLAKI [SEQ ID NO: 18]

[0194] 根据本公开的主题，“OX40核酸分子”是指编OX40多肽的多核苷酸。

[0195] ICOS多肽可以包括或具有与NCBI参考编号为NP_036224 (SEQ ID NO:19)的序列具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性的氨基酸序列或其片段，和/或可以任选地包括至多一个或至多两个或至多三个保守氨基酸置换。

[0196] SEQ ID NO:19提供如下：

1 MKSGLWYFFL FCLRIKVLTG EINGSANYEM FIFHNGGVQI LCKYPDIVQQ FKMQLLKGQQ
 61 ILCDLTKTKG SGN TVSIKSL KFCHS QLSNN SVSFFLYNLD HSHANYFYFCN LSIFDPPPFK
 [0197] 121 VTLTG GYLHI YESQLCCQLK FWLPIGCAAF VVVCILGCIL ICWLTKKKYS SSVHDPNGEY
 181 MFMRAVNTAK KSRLTDVTL [SEQ ID NO: 19]

[0198] 根据本公开的主题，“ICOS核酸分子”是指编码ICOS多肽的多核苷酸。

[0199] 在某些实施方式中，本公开的CAR还包括诱导型启动子，用于在人细胞中表达核酸序列。用于表达CAR基因的启动子可以是组成型启动子，例如泛素蛋白C (UbiC) 启动子。

[0200] 在某些实施方式中,本公开的CAR包括与CD 19(例如鼠CD19)结合的细胞外抗原结合结构域、包括CD28多肽的跨膜结构域和包括CD3 ζ 多肽(例如鼠CD3 ζ 多肽)的细胞内信号传导结构域,其中细胞内信号传导结构域不包括共刺激信号传导区,即CAR是第一代CAR。在某些实施方式中,CAR被命名为“m19mz”(或“am19mz”)。在某些实施方式中,CAR(例如m19mz)包括与下文提供的SEQ ID NO:5所示氨基酸序列具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性的氨基酸序列。

[0201]

MASPLTRFLS	LNLLLLGESI	ILGSGEAEVQ	LQQSGAELVR	PGTSVKLSCK	VSGDTITFYF
MHFVKQRPQ	GLEWIGRIDP	EDESTKYSEK	FKNKATLTAD	TSSNTAYLKL	SSLTSEDAT
YFCIYGGYF	DYWGQGVMT	VSSGGGSGG	GGSGGGSDI	QMTQSPASLS	TSLGETVTIQ
CQASEDIYSG	LAWYQKPGK	SPQLLIYGAS	DLQDGVPSRF	SGSGSGTQYS	LKITSMQTED
EGVYFCQQGL	TYPRTFGGGT	KLELKRAAAE	QKLISEEDLI	EFMYPPPYLD	NERSNGTIIH
IKEKHLCHTQ	SSPKLFWALV	VVAGVLF CYG	LLVTVALCVI	WTRAKFSRSA	ETAANLQDPN
QLYNELNLGR	REEYDVLEKK	RARDPEMGGK	QQRRRNPQEG	VYNALQKDKM	AEAYSEIGTK

GERRRKGKHD GLYQGLSTAT KDTYDALHMQ TLAPR [SEQ ID NO:5]

[0202] SEQ ID NO:5在氨基酸1至27位包括CD8前导序列,并且能够结合CD 19(例如鼠CD 19)。

[0203] 编码氨基酸序列SEQ ID NO:5的示例性核酸序列如SEQ ID NO:65所示,其提供如下。

[0204]

```

ATGGCCTCACCGTTGACCCGCTTTCTGTGCTGCTGCTGCTGCTGGGTGAGTCGATTATCCTGGG
GAGTGGAGAAGCTGAAGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTTGTGAGACCTGGGACCTCTGTGA
AGTTATCTTGCAAAGTTTCTGGCGATACCATTACATTTTACTACATGCACTTTGTGAAGCAAAGGCCT
GGACAGGGTCTGGAATGGATAGGAAGGATTGATCCTGAGGATGAAAGTACTAAATATTCTGAGAAGTT
CAAAAACAAGGCGACACTCACTGCAGATACATCTTCCAACACAGCCTACCTGAAGCTCAGCAGCCTGA
CCTCTGAGGACACTGCAACCTATTTTTGTATCTACGGAGGATACTACTTTGATTACTGGGGCCAAGGG
GTCATGGTCACAGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGA
CATCCAGATGACACAGTCTCCAGCTTCCCTGTCTACATCTCTGGGAGAACTGTCACCATCCAATGTC
AAGCAAGTGAGGACATTTACAGTGGTTTAGCGTGGTATCAGCAGAAGCCAGGGAAATCTCCTCAGCTC
CTGATCTATGGTGCAAGTGACTTACAAGACGGCGTCCCATCACGATTCAGTGGCAGTGGATCTGGCAC
ACAGTATTCTCTCAAGATCACCAGCATGCAAAGTGAAGATGAAGGGGTTTATTTCTGTCAACAGGGTT
TAACGTATCCTCGGACGTTCCGGTGGCGGCACCAAGCTGGAATTGAAACGGGCGGCCGAGAACAGAAA
CTGATCTCTGAAGAAGACCTGATTGAGTTCATGTACCCTCCGCCTTACCTAGACAACGAGAGGAGCAA
TGGAACTATTATTCACATAAAAGAGAAACATCTTTGTCACTCAGTCATCTCCTAAGCTGTTTTGGG
CACTGGTCTGTTGCTGGAGTCTGTTTTGTTATGGCTTGCTAGTGACAGTGGCTCTTTGTGTTATC
TGGAACAAGAGCAAATTCAGCAGGAGTGCAGAGACTGCTGCCAACCTGCAGGACCCCAACCAGCTCTA
CAATGAGCTCAATCTAGGGCGAAGAGAGGAATATGACGTCTTGGAGAAGAAGCGGGCTCGGGATCCAG
AGATGGGAGGCAAACAGCAGAGGAGGAGGAACCCCAAGGAGGCGTATACAATGCACTGCAGAAAGAC
AAGATGGCAGAAGCCTACAGTGAGATCGGCACAAAAGGCGAGAGGCGGAGAGGCAAGGGGCACGATGG
CCTTTACCAGGTCTCAGCACTGCCACCAAGGACACCTATGATGCCCTGCATATGCAGACCTGGCCC
CTCGCTAA [SEQ ID NO: 65]

```

[0205] 在某些实施方式中,本公开的CAR包括与CD 19(例如鼠CD19)结合的细胞外抗原结

合结构域、包括CD28多肽的跨膜结构域、和包括CD3 ζ 多肽(例如鼠CD3 ζ 多肽)和包括CD28多肽(例如鼠CD28多肽)的共刺激信号传导区的细胞内信号传导结构域。在某些实施方式中, CAR被命名为“m19m28z”(或“am19m28z”)。在某些实施方式中, CAR(例如m19m28z)包括与下文提供的SEQ ID NO:6所示氨基酸序列具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性的氨基酸序列。

```

MASPLTRFLS  INLLLLGESI  ILGSGEAEVQ  LQQSGAELVR  PGTSVKLSCK  VSGDTITFFY
MHFVKQRPGQ  GLEWIGRIDP  EDESTKYSEK  FKNKATLTAD  TSSNTAYLKL  SSLTSEDAT
YFCIYGGYYF  DYWGQGMVT  VSSGGGGSGG  GSGGGGSDI  QMTQSPASLS  TSLGETVTIQ
CQASEDIYSG  LAWYQQKPGK  SPQLLIYGAS  DLQDGVPSRF  SGSGSGTQYS  LKITSMQTED
[0206] EGVYFCQQGL  TYPRTFGGGT  KLELKRAAAE  QKLISEEDLI  EFMYPPIYLD  NERSNGTIIH
IKEKHLCHTQ  SSPKLFWALV  VVAGVLFYCG  LLVTVALCVI  WTNSRRNRL  QSDYMNMTPR
RPGLTRKPYQ  PYAPARDFAA  YRPRAKFSRS  AETAANLQDP  NQLYNELNLG  RREEYDVLEK
KRARPEMGG  KQQRRRNPQE  GVNALQKDK  MAEAYSEIGT  KGERRRGKGH  DGLYQGLSTA
TKDITYDALHM  QTLAPR [SEQ ID NO: 6]

```

[0207] SEQ ID NO:6在氨基酸1至27位包括CD8前导序列,并且能够与CD19(例如鼠CD19)结合。编码氨基酸序列SEQ ID NO:6的示例性核酸序列如SEQ ID NO:7所示,其提供如下。

```

ATGGCCCTCACCGTTGACCCGCTTTCTGTGCGTGAACCTGCTGCTGCTGGGTGAGTCGATTATCCTGGGGAG
TGGAGAAGCTGAAGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTTGTGAGACCTGGGACCTCTGTGAAGTTAT
CTTGCAAAGTTTCTGGCGATACCATTACATTTTACTACATGCACTTTGTGAAGCAAAGGCCTGGACAGGGT
CTGGAATGGATAGGAAGGATTGATCCTGAGGATGAAAGTACTAAATATTCTGAGAAGTTCAAAAACAAGGC
GACACTCACTGCAGATACATCTTCCAACACAGCCTACCTGAAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACACTG
CAACCTATTTTTGTATCTACGGAGGATACTACTTTGATTACTGGGGCCAAGGGGTGATGGTCACAGTCTCC
TCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGACATCCAGATGACACAGTCTCC
AGCTTCCCTGTCTACATCTCTGGGAGAACTGTCACCATCCAATGTCAAGCAAGTGAGGACATTTACAGTG
GTTTAGCGTGGTATCAGCAGAAGCCAGGGAAATCTCCTCAGCTCCTGATCTATGGTGCAAGTGACTTACAA
GACGGCGTCCCATCACGATTCAAGTGGCAGTGGATCTGGCACACAGTATTCTCTCAAGATCACCAGCATGCA
[0208] AACTGAAGATGAAGGGGTTTATTTCTGTCAACAGGGTTTAACTATCCTCGGACGTTCCGGTGGCGGCACCA
AGCTGGAATTGAAACGGGCGGCCGAGAACAGAACTGATCTCTGAAGAAGACCTGATTGAGTTCATGTAC
CCTCCGCCTTACCTAGACAACGAGAGGAGCAATGGAACATATTATTCACATAAAAGAGAAACATCTTTGTCA
TACTCAGTCATCTCCTAAGCTGTTTTGGGCACCTGGTCTGGTGGTGGTGGAGTCTGTTTTGTTATGGCTTGC
TAGTGACAGTGGCTCTTTGTGTTATCTGGACAAATAGTAGAAGGAACAGACTCCTTCAAAGTGACTACATG
AACATGACTCCCCGGAGGCCTGGGCTCACTCGAAAGCCTTACCAGCCCTACGCCCTGCCAGAGACTTTGC
AGCGTACCGCCCCAGAGCAAATTCAGCAGGAGTGCAGAGACTGCTGCCAACCTGCAGGACCCCAACCAGC
TCTACAATGAGCTCAATCTAGGGCGAAGAGAGGAATATGACGTCTTGGAGAAGAAGCGGGCTCGGGATCCA
GAGATGGGAGGCAAACAGCAGAGGAGGAGGAAACCCCGAGGAAGGCGTATACAATGCACTGCAGAAAAGACAA
GATGGCAGAAGCCTACAGTGAGATCGGCACAAAAGGCGAGAGGCGGAGAGGCAAGGGGCACGATGGCCTTT
ACCAGGGTCTCAGCACTGCCACCAAGGACACCTATGATGCCCTGCATATGCAGACCCTGGCCCTCGCTAA
[SEQ ID NO: 7]

```

[0209] 在某些实施方式中,本公开的CAR包括与CD19(例如人CD19)结合的细胞外抗原结合结构域、包括CD28多肽的跨膜结构域、和包括CD3 ζ 多肽(例如鼠CD3 ζ 多肽)的细胞内信号传导结构域,其中细胞内信号传导结构域不包括共刺激信号传导区,即CAR是第一代CAR。在

某些实施方式中, CAR命名为“ah19mz”。在某些实施方式中, CAR (例如, ah19mz) 包括与下文提供的SEQ ID NO:33所示氨基酸序列具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性的氨基酸序列。SEQ ID NO:33在氨基酸1至18位包括CD8前导序列, 并且能够与CD19 (例如人CD19) 结合。

[0210] MALPVTALLL PLALLLHAEV KLQQSGAELV RPGSSVKISC KASGYAFSSY WMNWKQRPG
 QGLEWIGQIY PGDGDNTYNG KFKGQATLTA DKSSSTAYMQ LSGLTSEDSA VYFCARKTIS
 SVVDFYFDYW GQGTTVTVSS GGGGSGGGGS GGGGSDIELT QSPKFMSTSV GDRVSVTCKA
 SQNVGTNVAV YQQKPGQSPK PLIYSATYRN SGVPDRFTGS GSGTDFTLTI TNVQSKDLAD
 YFCQQYNRY P YTSGGGKLE IKRAAAIEFM YPPPYLDNER SNGTIIHIKE KHLCHTQSSP
 KLFWALVVVA GVLFCYGLLV TVALCVIWTR AKFSRSAETA ANLQDPNQLY NELNLGRREE
 YDVLEKKRAR DPEMGGKQQR RRPQEGVYN ALQDKMAEA YSEIGTKGER RRGKGHGGLY
 QGLSTATKDT YDALHMQTLA PR [SEQ ID NO: 33]

[0211] 编码氨基酸序列SEQ ID NO:33的示例性核酸序列如SEQ ID NO:34所示, 其提供如下。

[0212] ATGGCTCTCCCAGTGACTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCATGCAGAGGTGAAGCTGCA
 GCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGCTTCTGGCTATG
 CATTACAGTAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAG
 ATTTATCCTGGAGATGGTGATACTAATACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTCAAGCCACACTGACTGCAGA
 CAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCGGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCT
 GTGCAAGAAAGACCATTAGTTCGGTAGTAGATTTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTC
 ACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGACATTGAGCT
 CACCCAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAAGCCTGCAAGGCCAGTC
 AGAATGTGGTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACCACTGATTTAC
 TCGGCAACCTACCGAACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTAC
 TCTCACCATCACTAACGTGCAGTCTAAAGACTTGGCAGACTATTTCTGTCAACAATATAACAGGTATC
 CGTACACGTCCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGGGCGGCCGAATTGAGTTCATGTACCCT
 CCGCCTTACCTAGACAACGAGAGGAGCAATGGAATATTATTACATAAAAAGAGAAACATCTTTGTCA
 TACTCAGTCATCTCCTAAGCTGTTTTGGGCACTGGTCTGGTGGTGGTGGAGTCTGTTTTGTTATGGCT
 TGCTAGTGACAGTGGCTCTTTGTGTTATCTGGACAAGAGCAAAATTCAGCAGGAGTGCAGAGACTGCT
 GCCAACCTGCAGGACCCCAACCAGCTCTACAATGAGCTCAATCTAGGGCGAAGAGAGGAATATGACGT
 CTTGGAGAAGAAGCGGGCTCGGGATCCAGAGATGGGAGGCAAACAGCAGAGGAGGAGGAACCCCCAGG
 AAGGCGTATACAATGCACTGCAGAAAGACAAGATGGCAGAAGCCTACAGTGAGATCGGCACAAAAGGC
 GAGAGGCGGAGAGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGCACTGCCACCAAGGACACCTA
 TGATGCCCTGCATATGCAGACCTGGCCCCCTCGCTAA [SEQ ID NO: 34]

[0213] 在某些实施方式中, 本公开的CAR包括与CD 19 (例如人CD19) 结合的细胞外抗原结合结构域、包括CD28多肽的跨膜结构域和包括CD3 ζ 多肽 (例如人CD3 ζ 多肽) 的细胞内信号传导结构域, 其中细胞内信号传导结构域不包括共刺激信号传导区, 即CAR是第一代CAR。在某些实施方式中, CAR命名为“ah19hz”。在某些实施方式中, CAR (例如, ah19hz) 包括与下文提供的SEQ ID NO:35所示氨基酸序列具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性的氨基酸序列。SEQ ID NO:35在氨基酸1至18位包括CD8前导序列, 并且能够与CD19 (例如人CD19) 结合。

[0214] MALPVTALLL PLALLLHAEV KLQSGAELV RPGSSVKISC KASGYAFSSY WMNWVKQRPG
 QGLEWIGQIY PGDGDNTYNG KFKGQATLTA DKSSSTAYMQ LSGLTSEDSA VYFCARKTIS
 SVVDFYFDYW GQGTTVTVSS GGGGSGGGGS GGGGSDIELT QSPKFMSTSV GDRVSVTCKA
 SQNVGTNVAW YQQKPGQSPK PLIYSATYRN SGVPDRFTGS GSGTDFTLTI TNVQSKDLAD
 YFCQQYNRY P YTSGGGTKLE IKRAAAIEVM YPPPYLDNEK SNGTI IHVKG KHLCPSPFLP
 GPSKPFWVLV VVGGVLACYS LLVTVAFIIF WVRVKFSRSA DAPAYQQQN QLYNELNLGR
 REEYDVLDR RGRDPEMGGK PRRKNPQEGL YNELQKDKMA EAYSEIGMKG ERRRGKGHGD
 LYQGLSTATK DTYDALHMQA LPPR [SEQ ID NO: 35]

[0215] 编码SEQ ID NO:35的氨基酸序列的示例性核酸序列如SEQ ID NO:36所示,其提供如下。

[0216] ATGGCTCTCCCAGTGACTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCATGCAGAGGTGAAGCTGCA
 GCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGCTTCTGGCTATG
 CATTCAGTAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAG
 ATTTATCCTGGAGATGGTGATACTAATACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTCAAGCCACACTGACTGCAGA
 CAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCGGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCT
 GTGCAAGAAAGACCATTAGTTCGGTAGTAGATTTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTC
 ACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGACATTGAGCT
 CACCCAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTC
 AGAATGTGGGTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACCACTGATTTAC
 TCGGCAACCTACCGGAACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTAC
 TCTCACCATCACTAACGTGCAGTCTAAAGACTTGGCAGACTATTTCTGTCAACAATATAACAGGTATC
 CGTACACGTCCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGGGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTATCCT
 CCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCC
 AAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCTGGCTT
 GCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTCTGGGTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCA
 GACGCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGA
 GTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACC
 CTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAAGATTGGGATG
 AAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGA
 CACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAG [SEQ ID NO: 36]

[0217] 在某些实施方式中,本公开的CAR包括与CD 19(例如人CD19)结合的细胞外抗原结合结构域、包括CD28多肽的跨膜结构域、和包括CD3 ζ 多肽(例如鼠CD3 ζ 多肽)和包括CD28多肽(例如鼠CD28多肽)的共刺激信号传导区的细胞内信号传导结构域。在某些实施方式中,CAR被命名为“ah19m28z”。在某些实施方式中,CAR(例如ah19m28z)包括与下文提供的SEQ ID NO:37所示氨基酸序列具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性的氨基酸序列。SEQ ID NO:37在氨基酸1至18位包括CD8前导序列,并且能够与CD19(例如人CD19)结合。

MALPVTALLL PLALLLHAEV KLQQSGAELV RPGSSVKISC KASGYAFSSY WMNWVKQRPG
 QGLEWIGQIY PGDGDNTNYG KFKGQATLTA DKSSSTAYMQ LSGLTSEDSA VYFCARKTIS
 SVVDFYFDYW GQGTTVTVSS GGGGSGGGGS GGGGSDIELT QSPKFMSTSV GDRVSVTCKA
 SQNVGTNVAW YQQKPGQSPK PLIYSATYRN SGVPDRFTGS GSGTDFTLTI TNVQSKDLAD
 [0218] YFCQQYNRYP YTSGGGTKLE IKRAAAIEFM YPPPYLDNER SNGTIIHIKE KHLCHTQSSP
 KLFWALVVVA GVLFCYGLLV TVALCVIWTN SRRNRLQSD YNMTPRRPG LTRKPYQPYA
 PARDFAAAYRP RAKFSRSAET AANLQDPNQL YNELNLGRRE EYDVLEKKRA RDPPEMGGKQQ
 RRRNPQEGVY NALQKDKMAE AYSEIGTKGE RRRGKGDHGL YQGLSTATKD TYDALHMQTL
 APR [SEQ ID NO: 37]

[0219] 编码氨基酸序列SEQ ID NO:37的示例性核酸序列如SEQ ID NO:38所示,其提供如下。

ATGGCTCTCCCAGTGACTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCATGCAGAGGTGAAGCTGCA
 GCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGCTTCTGGCTATG
 CATTCAGTAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAG
 ATTTATCCTGGAGATGGTGATACTAATACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTCAAGCCACACTGACTGCAGA
 CAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCGGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCT
 GTGCAAGAAAGACCATTAGTTCGGTAGTAGATTTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTC
 ACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGACATTGAGCT
 CACCCAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTC
 AGAATGTGGGTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACCACTGATTTAC
 TCGGCAACCTACCGAACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTAC
 TCTCACCATCACTAACGTGCAGTCTAAAGACTTGGCAGACTATTTCTGTCAACAATATAACAGGTATC
 [0220] CGTACACGTCCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGGGCGGCCGCAATTGAGTTCATGTACCCT
 CCGCCTTACCTAGACAACGAGAGGAGCAATGGAATATTATTACATAAAAAGAGAAACATCTTTGTCA
 TACTCAGTCATCTCCTAAGCTGTTTTGGGCACTGGTCTGGTTGCTGGAGTCTGTTTTGTTATGGCT
 TGCTAGTGACAGTGGCTCTTTGTGTTATCTGGACAAATAGTAGAAGGAACAGACTCCTTCAAAGTGAC
 TACATGAACATGACTCCCCGGAGGCCTGGGCTCACTCGAAAGCCTTACCAGCCCTACGCCCTGCCAG
 AGACTTTGCAGCGTACCGCCCCAGAGCAAATTCAGCAGGAGTGCAGAGACTGCTGCCAACCTGCAGG
 ACCCCAACCAGCTCTACAATGAGCTCAATCTAGGGCGAAGAGAGGAATATGACGTCTTGGAGAAGAAG
 CGGGCTCGGGATCCAGAGATGGGAGGCAAACAGCAGAGGAGGAGGAACCCCCAGGAAGGCGTATACAA
 TGCACTGCAGAAAGACAAGATGGCAGAAGCCTACAGTGAGATCGGCACAAAAGGCGAGAGGCGGAGAG
 GCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGTCTCAGCACTGCCACCAAGGACACCTATGATGCCCTGCAT
 ATGCAGACCCTGGCCCCCTCGCTGA [SEQ ID NO: 38]

[0221] 在某些实施方式中,本公开的CAR包括与CD 19(例如人CD19)结合的细胞外抗原结合结构域、包括CD28多肽的跨膜结构域、和包括CD3 ζ 多肽(例如人CD3 ζ 多肽)和包括CD28多肽(例如人CD28多肽)的共刺激信号传导区的细胞内信号传导结构域。在某些实施方式中,CAR被命名为“ah19h28z”。在某些实施方式中,CAR(例如ah19h28z)包括与下文提供的SEQ ID NO:39所示氨基酸序列具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性的氨基酸序列。SEQ ID NO:39在氨基酸1至18位包括CD8前导序列,并且能够与CD19(例如人CD19)结合。

MALPVTALLL PLALLLHAEV KLQQSGAELV RPGSSVKISC KASGYAFSSY WMNWVKQRPG
 QGLEWIGQIY PGDGDNTYNG KFKGQATLTA DKSSSTAYMQ LSGLTSEDSA VYFCARKTIS
 SVVDFYFDYW GQGTTVTVSS GGGGSGGGGS GGGGSDIELT QSPKFMSTSV GDRVSVTCKA
 SQNVGTNVAW YQQKPGQSPK PLIYSATYRN SGVPDRFTGS GSGTDFTLTI TNVQSKDLAD
 [0222] YFCQQYNRY P YTSGGGTKLE IKRAAAIEVM YPPPYLDNEK SNGTIIHVKG KHLCPSPFLFP
 GPSKPFWVLV VVGGVLACYS LLVTVAFIIF WVRSKRSRLL HSDYMNMTPR RGPTRKHVYQ
 PYAPPRDFAA YRSRVKFSRS ADAPAYQQGQ NQLYNELNLG RREEYDVLDK RRGRDPEMGG
 KPRRKNPQEG LYNELQKDKM AEAYSEIGMK GERRRGKGDH GLYQGLSTAT KDTYDALHMQ
 ALPPR [SEQ ID NO: 39]

[0223] 编码氨基酸序列SEQ ID NO:39的示例性核酸序列如SEQ ID NO:40所示,其提供如下。

ATGGCTCTCCAGTGACTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCATGCAGAGGTGAAGCTGCA
 GCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGCTTCTGGCTATG
 CATTTCAGTAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAG
 ATTTATCCTGGAGATGGTGATACTAATACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTCAAGCCACACTGACTGCAGA
 CAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCGGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCT
 GTGCAAGAAAGACCATTAGTTCGGTAGTAGATTTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTC
 ACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGACATTGAGCT
 CACCCAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTC
 AGAATGTGGGTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACCACTGATTTAC
 TCGGCAACCTACCGGAACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTAC
 TCTCACCATCACTAACGTGCAGTCTAAAGACTTGGCAGACTATTTCTGTCAACAATATAACAGGTATC
 [0224] CGTACACGTCCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGGGCGGCCGAATTGAAGTTATGTATCCT
 CCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCC
 AAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCTGGCTT
 GCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTG
 CACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGC
 CCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGT
 ACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTG
 GACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCT
 GTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCC
 GGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCC
 CTTACATGCAGGCCCTGCCCTCGCTAG [SEQ ID NO: 40]

[0225] 在某些实施方式中,本公开的CAR包括与CD 19(例如人CD19)结合的细胞外抗原结合结构域、包括CD28多肽的跨膜结构域、和包括CD3 ζ 多肽(例如人CD3 ζ 多肽)和包括4-1BB多肽(例如人4-1BB多肽)的共刺激信号传导区的细胞内信号传导结构域。在某些实施方式中,CAR被命名为“ah19hBBz”。在某些实施方式中,CAR(例如ah19hBBz)包括与下文提供的SEQ ID NO:41所示氨基酸序列具有至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源性的氨基酸序列。SEQ ID NO:41在氨基酸1至18位包括CD8前导序列,并且能够与CD19(例如人CD19)结合。

MALPVTALLL PLALLLHAEV KLQQSGAELV RPGSSVKISC KASGYAFSSY WMNWVKQRPG
 QGLEWIGQIY PGDGDNTYNG KFKGQATLTA DKSSSTAYMQ LSGLTSEDSA VYFCARKTIS
 SVVDFYFDYW GQGTTVTVSS GGGSGGGGS GGGSDIELT QSPKFMSTSV GDRVSVTCKA
 SQNVGTNVAW YQQKPGQSPK PLIYSATYRN SGVPDRFTGS GSGTDFTLTI TNVQSKDLAD
 [0226] YFCQQYNRY P YTSGGGTKLE IKRAAAIEVM YPPPYLDNEK SNGTIIHVKG KHLCPSP LFP
 GPSKPFWVLV VVGGVLACYS LLVTVAFIIF WVKRGRKLL YIFKQPFMRP VQTTQEEDGC
 SCRFPEEEEG GCELRVKFSR SADAPAYQQG QNQLYNELNL GRREEYDVL D KRRGRDPEMG
 GKPRRKNPQE GLYNELQKDK MAEAYSEIGM KGERRRGKGH DGLYQGLSTA TKD TYDALHM
 QALPPR [SEQ ID NO: 41]

[0227] 编码氨基酸序列SEQ ID NO:41的示例性核酸序列如SEQ ID NO:42所示,其提供如下。

ATGGCTCTCCAGTGACTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCATGCAGAGGTGAAGCTGCA
 GCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGCTTCTGGCTATG
 CATTTCAGTAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAG
 ATTTATCCTGGAGATGGTGATACTAACAATGAAAGTTCAAGGGTCAAGCCACACTGACTGCAGA
 CAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCGGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCT
 GTGCAAGAAAGACCATTAGTTCGGTAGTAGATTTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTC
 ACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGACATTGAGCT
 CACCCAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTC
 AGAATGTGGGTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACCACTGATTTAC
 TCGGCAACCTACCGGAACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTAC
 TCTCACCATCACTAACGTGCAGTCTAAAGACTTGGCAGACTATTTCTGTCAACAATATAACAGGTATC
 [0228] CGTACACGTCCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGGGCGGCCGAATTGAAGTTATGTATCCT
 CCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCC
 AAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCTGGCTT
 GCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTG
 TATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCG
 ATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAAGTGAAGTTTCAAGAGGAGCGCAGACGCCCCCG
 CGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTT
 TTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGG
 CCTGTACAATGAAGTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAAGTGGGATGAAAGGCGAGC
 GCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGAC
 GCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAG [SEQ ID NO: 42]

[0229] 本公开的主题还提供了核酸组合物,其包括编码与抗原结合的抗原识别受体的第一核酸序列和编码外源性IL-36多肽的第二核酸序列。

[0230] 3. 免疫应答细胞

[0231] 本公开的主题提供了免疫应答细胞,其包括(a)与抗原结合的抗原识别受体(例如,CAR或TCR),和(b)可分泌的IL-36多肽。在某些实施方式中,可分泌的IL-36多肽是外源性IL-36多肽。在某些实施方式中,抗原识别受体能够激活免疫应答细胞。在某些实施方式中,可分泌的IL-36多肽(例如外源性IL-36多肽,诸如编码IL-36多肽的核酸)能够促进免疫

应答细胞的抗肿瘤作用。可以将免疫应答细胞用抗原识别受体和外源性IL-36多肽转导,使得细胞共表达抗原识别受体和外源性IL-36多肽。

[0232] 本公开的主题的免疫应答细胞可以是淋巴谱系(lymphoid lineage)的细胞。淋巴谱系,包括B、T和自然杀伤(NK)细胞,提供抗体的产生、细胞免疫系统的调节、血液中外源试剂的检测、宿主外源细胞的检测等。淋巴谱系的免疫应答细胞的非限制性实例包括T细胞、自然杀伤(NK)细胞、胚胎干细胞和多能干细胞(例如,可以由其分化出淋巴样细胞的那些)。T细胞可以是在胸腺中成熟的淋巴细胞,主要负责细胞介导的免疫。T细胞参与适应性免疫系统。本公开主题的T细胞可以是任何类型的T细胞,包括,但不限于,辅助T细胞、细胞毒性T细胞、记忆T细胞(包括中央记忆T细胞、干细胞样记忆T细胞(或干样记忆T细胞)和两种效应记忆T细胞:例如 T_{EM} 细胞和 T_{EMRA} 细胞)、调节性T细胞(也称为抑制性T细胞)、自然杀伤性T细胞、粘膜相关性不变T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞。细胞毒性T细胞(CTL或杀伤性T细胞)是能够诱导被感染的体细胞或肿瘤细胞死亡的T淋巴细胞的一个子集。患者自身的T细胞可以被基因改造成通过引入抗原识别受体(例如CAR或TCR)而靶向特定的抗原。在某些实施方式中,免疫应答细胞是T细胞。该T细胞可以是 $CD4^+$ T细胞或 $CD8^+$ T细胞。在某些实施方式中,T细胞是 $CD4^+$ T细胞。在某些实施方式中,T细胞是 $CD8^+$ T细胞。

[0233] 自然杀伤(NK)细胞可以是淋巴细胞,它是细胞介导的免疫力的一部分,并在先天免疫应答中发挥作用。NK细胞不要求事先激活便可对靶细胞发挥细胞毒性作用。

[0234] 本公开主题的人淋巴细胞的类型包括,但不限于,外周供体淋巴细胞,例如以下文献中公开者:Sadelain,M.等,2003,Nat Rev Cancer3:35-45(公开了遗传修饰成表达CAR的外周供体淋巴细胞);Morgan,R.A.等,2006Science 314:126-129(公开经遗传修饰成表达包括 α 和 β 异二聚体的全长肿瘤抗原识别性T细胞受体复合物的外周供体淋巴细胞);Panelli,M.C.,等.2000J Immunol 164:495-504;Panelli,M.C.,等.2000J Immunol 164:4382-4392(公开了源自肿瘤活组织检查中的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的淋巴细胞培养物);和Dupont,J.,等.2005Cancer Res 65:5417-5427;Papanicolaou,G.A.,等.2003Blood 102:2498-2505(公开了使用人工抗原呈递细胞(AAPC)或脉冲树突状细胞选择性地体外扩增的抗原特异性外周血白细胞)。免疫应答细胞(例如,T细胞)可以是自体的、非自体的(例如,同种异体的)、或者在体外源自于改造的祖细胞或干细胞。

[0235] 本公开的免疫应答细胞能够调节肿瘤微环境。肿瘤具有对宿主免疫应答敌对的微环境,该微环境涉及恶性细胞保护自身免受免疫识别和消除的一系列机制。这种“敌对的肿瘤微环境”包括多种免疫抑制因子,其包括浸润性调节性 $CD4^+$ T细胞(Tregs)、髓样衍生抑制细胞(MDSC)、肿瘤相关巨噬细胞(TAM)、包括TGF- β 的免疫抑制细胞因子、以及靶向由活化的T细胞表达的免疫抑制受体(CTLA-4和PD-1)的配体的表达。这些免疫抑制机制在维持耐受性和抑制不适当的免疫应答中发挥作用,但是在肿瘤微环境内,这些机制阻止了有效的抗肿瘤免疫应答。在遇到目标肿瘤细胞后,这些免疫抑制因子可以共同诱导过继转移的CAR修饰的T细胞明显的无反应性或凋亡。

[0236] 在某些实施方式中,本公开的免疫应答细胞的抗肿瘤细胞因子的分泌增加,所述抗肿瘤细胞因子包括,但不限于,IL-36、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、IFN- γ 、IL-10、IL-6、IL-12、CXCL1、CCL1、IL-23和CXCL10。在某些实施方式中,本公开的免疫应答细胞的IL-36、GM-CSF、IFN- γ 、IL-10或其组合的分泌增加。

[0237] 白介素36

[0238] 白介素36细胞因子家族包括四个:IL-36 α 、IL-36 β 、IL-36 γ 和IL-36Ra。IL-36 α 、IL-36 β 和IL-36 γ 是IL-36受体(IL-36R)的激动剂,而IL-36Ra是IL-36受体的拮抗剂。

[0239] 白介素36 α (IL-36 α)也称为IL36A;FIL1;FIL1E;IL1F6;IL-1F6;IL1(EPSILON);FIL1(EPSILON)。GenBank ID:27179(人),54448(小鼠),296541(大鼠),523429(牛),100065063(马)。IL-36 α 的蛋白质产物包括,但不限于,NCBI参考序列NP_055255.1、XP_011509267.1、XP_005263696.1和XP_016859295.1。

[0240] 白介素36 β (IL-36 β)也称为IL36B;FIL1;FIL1H;IL1F8;IL1H2;IL-1F8;IL-1H2;IL1-ETA;FIL1-(ETA);FILI-(ETA)。GenBank ID:27177(人),69677(小鼠),362076(大鼠),100297786(牛),483068(狗),100065096(马)。IL-36 β 的蛋白质产物包括,但不限于,NCBI参考序列NP_055253.2、NP_775270.1和XP_011509264.1。

[0241] 白介素36 γ (IL-36 γ)也称为IL36G;IL1E;IL1F9;IL1H1;IL-1F9;IL-1H1;IL1RP2;IL-1RP2。GenBank ID:56300(人),215257(小鼠),499744(大鼠),615762(牛),100686137(狗),100065031(马)。IL-36 γ 的蛋白质产物包括,但不限于,NCBI参考序列NR_001265497.1和NP_062564.1。

[0242] 白介素36受体拮抗剂(IL-36RA)也称为IL36RN,FIL1;FIL1D;IL1F5;IL1L1;PSORP;IL1HY1;IL1RP3;IL36RA;IL-36Ra;PSORS14;FIL1(Delta)。GenBank ID:26525(人),54450(小鼠),311783(大鼠),518514(牛),611869(狗),100065154(马)。白介素36拮抗剂的蛋白质产物包括,但不限于,NCBI参考序列NP_036407.1和NP_775262.1。

[0243] IL-36 α 、IL-36 β 和IL-36 γ 细胞因子由嗜中性粒细胞、皮肤细胞和其他细胞产生。它们通过与IL-36受体(IL-36R)结合发挥作用,并激活下游信号传导通路。用IL-36 α 、IL-36 β 和IL-36 γ 刺激后,自然杀伤(NK)细胞和某些T细胞释放出其他细胞因子,例如IFN- γ 、IL-10和GM-CSF,它们可以进一步激活其他类型的免疫应答细胞。用IL-36 α 、IL-36 β 和IL-36 γ 激活后,树突状细胞可以释放IL-6、IL-12、CXCL1、CCL1、IL-23和CXCL10,它们可以进一步调节其他类型的免疫应答细胞

[0244] 在某些实施方式中,术语“IL-36”或“IL-36细胞因子”是指从细胞分泌后的IL-36 α 、IL-36 β 和/或IL-36 γ 的生物活性形式(例如,信号肽被切除的形式)。

[0245] 在某些实施方式中,IL-36多肽是人IL-36多肽。

[0246] 在某些实施方式中,人IL-36 α 多肽包括或具有以下提供的SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列。在某些实施方式中,人IL-36 α 多肽包括或具有与SEQ ID NO:4所示的序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约99%或至少约100%同源性或同一性的氨基酸序列。

KIDTPQQGSIQDINHRVWVLQDQTLIAVPRKDRMSPVTTIALISCRHVETLEKDRGNPIYLGLNGLNLCMLC

[0247] AKVGDQPTLQLKEKDIMDLYNQPEPVKSFILFYHSQSGRNSTFESVAFPGWFIIVSSEGGCPLILTQELGKANTTDFGLTMLF (SEQ ID NO: 4)

[0248] 在某些实施方式中,人IL-36 β 多肽包括或具有如下提供的SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列。在某些实施方式中,人IL-36 β 多肽包括或具有与SEQ ID NO:20所示的序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约99%或至少约100%同源性或同一性的氨基酸序列。

REAAPKSYAIRDSRQMVVWVLSGNSLIAAPLSRSIKPVTLHLIACRDTEFSDKEKGNMVYLGIKGKDLCLFC

[0249] AEIQGKPTLQLKLGSDNIGKDTCKWLVGIHTCINLDVRESCFMGTLDQWIGVGRKKWSSSQHHHLRK
KDKDFSSMRTNIGMPGRM (SEQ ID NO: 20)

[0250] 在某些实施方式中,人IL-36 γ 多肽包括或具有如下提供的SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列。在某些实施方式中,人IL-36 γ 多肽包括或具有与SEQ ID NO:21所示的序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约99%或至少约100%同源性或同一性的氨基酸序列。

SMCKPITGTINDLNQQVWTLQGQNLVAVPRSDSVTPVTVAVITCKYPEALEQGRGDPITYLGIQNPEMCLYC

[0251] EKVGEOPTLQLKEQKIMDLYGQPEPVKPFIFYRAKTGRTSTLESVAFPDWFIIASSKRDQPIILTSELGKSY
NTAFELNIND [SEQ ID NO: 21]

[0252] 在某些实施方式中,IL-36多肽是鼠IL-36多肽。

[0253] 在某些实施方式中,鼠IL-36 α 多肽包括或具有以下提供的SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列。在某些实施方式中,鼠IL-36 α 多肽包括或具有与SEQ ID NO:30所示的序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约99%或至少约100%同源性或同一性的氨基酸序列。

GRETPDFGEVFDLQDQVWIFRNQALVTVPRSHRVTVPVSVTILPCKYPESELEQDKGIAIYLGIONPDKCLFC

[0254] KEVNGHPTLLLKEEKILDLYHHPEPMKPFIFYHTRTGGTSTFESVAFPGHYIASSKTGNPIFLTSSKKEYY
NINFNLDIKS [SEQ ID NO: 30]

[0255] 在某些实施方式中,鼠IL-36 β 多肽包括或具有以下提供的SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列。在某些实施方式中,鼠IL-36 β 多肽包括或具有与SEQ ID NO:31所示的序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约99%或至少约100%同源性或同一性的氨基酸序列。

SSQSPRNYRVHDSQQMVWVLTGNTLTAVPASNNVKPVILSLIACRDTEFQDVKKGNLVFLGIKRNRLCFCC

[0256] VEMEGKPTLQLKEVDIMNLYKERKAQKAFIFYHGIESTSVFQSVLYPGWFIATSSIERQTIILTHQRGKL
VNTNFYIESEK [SEQ ID NO: 31]

[0257] 在某些实施方式中,鼠IL-36 γ 多肽包括或具有以下提供的SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列。在某些实施方式中,鼠IL-36 γ 多肽包括或具有与SEQ ID NO:32所示的序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约99%或至少约100%同源性或同一性的氨基酸序列。

GRETPDFGEVFDLQDQVWIFRNQALVTVPRSHRVTVPVSVTILPCKYPESELEQDKGIAIYLGIONPDKCLFC

[0258] KEVNGHPTLLLKEEKILDLYHHPEPMKPFIFYHTRTGGTSTFESVAFPGHYIASSKTGNPIFLTSSKKEYY
NINFNLDIKS [SEQ ID NO: 32]

[0259] 在某些实施方式中,术语“IL-36”或“IL-36细胞因子”是指从细胞分泌后的IL-36RA的生物活性形式(例如,信号肽被切除的形式)。

[0260] 在某些实施方式中,可分泌的IL-36多肽是指多肽或蛋白质,其细胞因子部分具有与IL-36 α (GenBank ID:27179(人),54448(小鼠),296541(大鼠),523429(牛),100065063(马))、IL-36 β (GenBank ID:27177(人),69677(小鼠),362076(大鼠),100297786(牛),483068(狗),100065096(马))、IL-36 γ (GenBank ID:56300(人),215257(小鼠),499744(大鼠),615762(牛),100686137(狗),100065031(马))的蛋白质产物的细胞因子部分或其具有免疫刺激活性的片段具有至少约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约

99%或约100%的同源性。在某些非限制性实施方式中,可分泌的IL-36多肽包括细胞因子部分和信号肽,其任选地由接头肽连接。可分泌的IL-36多肽的非限制性实例包括NCBI参考序列NP_055255.1、XP_011509267.1、XP_005263696.1、XP_016859295.1、NP_055253.2、NP_775270.1、XP_011509264.1、NP_001265497.1和NP_062564.1。

[0261] 在某些非限制性实施方式中,可分泌的IL-36多肽包括信号肽,例如IL-2信号肽、 κ 前导序列、CD8前导序列或具有基本等同活性的肽。在某些实施方式中,可分泌的IL-36多肽包括IL-2信号肽。在某些实施方式中,IL-2信号肽包括或具有如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列。

[0262] 未纯化的CTL来源可以是本领域已知的任何来源,例如骨髓、胎儿、新生儿或成年或其他造血细胞来源,例如胎肝、外周血或脐带血。可以采用各种技术来分离细胞。例如,阴性选择法可以最初去除非CTL.mAb对于鉴定与特定细胞谱系和/或阳性和阴性选择的分化阶段相关的标记物特别有用。

[0263] 最初可以通过相对粗略的分离除去大部分终末分化的细胞。例如,最初可以使用磁珠分离来去除大量不相关的细胞,在某些实施方式中,在分离细胞之前将去除总造血细胞的至少约80%,通常至少70%。

[0264] 分离的程序包括,但不限于,密度梯度离心;重置(resetting);与改变细胞密度的颗粒偶联;用抗体包被的磁珠进行磁分离;亲和色谱;与mAb结合或结合使用的细胞毒性剂,包括但不限于补体和细胞毒素;以及用附着于固体基质(例如板、芯片)的抗体淘选、淘析或任何其他方便的技术。

[0265] 分离和分析的技术包括,但不限于,流式细胞术,其可以具有不同的复杂程度,例如多个颜色通道、低角度和钝角光散射检测通道、阻抗通道。

[0266] 通过使用与死细胞关联的染料,例如碘化丙啶(PI),可以针对死细胞选择细胞。在某些实施方式中,将细胞收集在包括2%胎牛血清(FCS)或0.2%牛血清白蛋白(BSA)的培养基或任何其他合适的例如无菌等渗培养基中。

[0267] 4. 载体

[0268] 免疫应答细胞(例如,T细胞或NK细胞)的遗传修饰可以通过将基本上均质的细胞组合物用重组DNA构建体转导来完成。在某些实施方式中,逆转录病毒载体(γ -逆转录病毒或慢病毒)用于将DNA构建体引入细胞。例如,可以将编码抗原识别受体的多核苷酸克隆到逆转录病毒载体中,并且可以从其内源启动子、逆转录病毒长末端重复序列或对所关注的靶细胞类型具有特异性的启动子驱动表达。也可以使用非病毒载体。

[0269] 对于将免疫应答细胞初始遗传修饰成包括抗原识别受体(例如,CAR或TCR),通常使用逆转录病毒载体用于转导,然而可以使用任何其他合适的病毒载体或非病毒递送系统。可以在单个多顺反子表达盒、单个载体的多个表达盒或多个载体中构建抗原识别受体和IL-36多肽。产生多顺反子表达盒的元件的实例包括,但不限于,各种病毒和非病毒内部核糖体进入位点(IRES,例如,FGF-1 IRES、FGF-2 IRES、VEGF IRES、IGF-II IRES、NF- κ B IRES、RUNX1 IRES、p53 IRES、甲型肝炎 IRES、丙型肝炎 IRES、瘟病毒 IRES、口蹄疫病毒 IRES、小核糖核酸病毒 IRES、脊髓灰质炎病毒 IRES 和脑心肌炎病毒 IRES) 和可裂解的接头(例如2A肽,例如P2A、T2A、E2A和F2A肽)。逆转录病毒载体和合适的包装系的组合也是合适的,其中衣壳蛋白将具有感染人细胞的功能。已知各种产生双嗜性病毒的细胞系,其包括,但不限

于,PA12 (Miller等,(1985) Mol. Cell. Biol. 5:431-437); PA317 (Miller等,(1986) Mol. Cell. Biol. 6:2895-2902); 和CRIP (Danos等,(1988) Proc. Acad. Sci. USA 85:6460-6464)。非双嗜性粒子也是合适的,例如,用VSVG、RD114或GALV包膜假型化的粒子和本领域已知的任何其他粒子。

[0270] 可能的转导方法还包括细胞与生产细胞的直接共培养,例如通过Bregni等.(1992) Blood 80:1418-1422的方法,或单独用病毒上清液或含有或不含有适当生长因子和聚阳离子的浓缩载体原种培养,例如通过Xu,等.(1994) Exp. Hemat. 22:223-230; 和Hughes,等.(1992) J. Clin. Invest. 89:1817的方法。

[0271] 可以使用其他转导病毒载体来修饰免疫应答细胞。在某些实施方式中,所选择的载体表现出高的感染效力和稳定的整合和表达(参见,例如,Cayouette等, Human Gene Therapy 8:423-430,1997;Kido等,Current Eye Research 15:833-844,1996;Bloomer等, Journal of Virology 71:6641-6649,1997;Naldini等,Science 272:263-267,1996;和Miyoshi等,Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:10319,1997)。可以使用的其他病毒载体包括,例如,腺病毒、慢病毒和腺相关病毒载体、牛痘病毒、牛乳头瘤病毒或疱疹病毒,例如爱泼斯坦-巴尔病毒(另外,参见例如,以下文献的载体:Miller, Human Gene Therapy 15-14, 1990;Friedman, Science 244:1275-1281,1989;Eglitis等, BioTechniques 6:608-614, 1988;Tolstoshev等,Current Opinion in Biotechnology 1:55-61,1990;Sharp, The Lancet 337:1277-1278,1991;Cornetta等, Nucleic Acid Research and Molecular Biology 36:311-322,1987;Anderson, Science 226:401-409,1984;Moen, Blood Cells 17:407-416,1991;Miller等, Biotechnology 7:980-990,1989;LeGal La Salle等, Science 259:988-990,1993;和Johnson, Chest 107:77S-83S,1995)。逆转录病毒载体发展地特别好,并已用于临床(Rosenberg等, N. Engl. J. Med 323:370,1990;Anderson等, U.S. Pat. No. 5,399,346)。

[0272] 也可以使用非病毒方法用于免疫应答细胞的遗传修饰。例如,核酸分子可以通过以下方法引入免疫应答细胞中:在脂质转染的情况下施用核酸(Feigner等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:7413,1987;Ono等, Neuroscience Letters 17:259,1990;Brigham等, Am. J. Med. Sci. 298:278,1989;Staubinger等, Methods in Enzymology 101:512,1983), 脱唾液酸血清类粘蛋白-聚赖氨酸缀合(Wu等, Journal of Biological Chemistry 263:14621,1988;Wu等, Journal of Biological Chemistry 264:16985,1989), 或手术条件下的微注射(Wolff等, Science 247:1465,1990)。其他非病毒的基因转移方法包括使用磷酸钙、DEAE葡聚糖、电穿孔和原生质体融合的体外转染。脂质体也可能对将DNA递送到细胞中有益。也可以通过将正常核酸转移到可离体培养的细胞类型(例如,自体或异源原代细胞或其后代)中,从而完成将正常基因移植到受试者的受影响组织中,之后,将细胞(或其后代)注射到目标组织或全身注射。重组受体也可以使用转座酶或靶向核酸酶(例如锌指核酸酶、大范围核酸酶(meganucleases)或TALE核酸酶、CRISPR)衍生或获得。瞬时表达可以通过RNA电穿孔获得。

[0273] 成簇的规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)系统是在原核细胞中发现的基因组编辑工具。当用于基因组编辑时,该系统包括Cas9(一种能够使用crRNA作为其向导来修饰DNA的蛋白质),CRISPR RNA(crRNA,含有Cas9用来引导其到达宿主DNA正确片段的RNA,以及

与tracrRNA结合的区域(通常是发夹环形式),与Cas9形成活性复合物),反式激活crRNA(tracrRNA,与crRNA结合,与Cas9形成活性复合物),以及DNA修复模板的可选片段(指导细胞修复过程允许插入特定DNA序列的DNA)。CRISPR/Cas9通常采用质粒来转染靶细胞。crRNA需要针对每种应用进行设计,因为这是Cas9用来识别并直接结合细胞中靶DNA的序列。携带CAR表达盒的修复模板还需要针对每种应用进行设计,因为它必须与切口任一侧的序列重叠,并编码插入序列。多个crRNA和tracrRNA可以包装在一起以形成单向导RNA(sgRNA)。该sgRNA可以与Cas9基因连接在一起并制成质粒,以便被转染到细胞中。

[0274] 锌指核酸酶(ZFN)是一种人工的限制性内切酶,其通过将锌指DNA结合结构域与DNA切割结构域结合而产生。锌指结构域可以被改造成靶向特定的DNA序列,其允许锌指核酸酶靶向基因组内的期望序列。各个ZFN的DNA结合结构域通常包括多个独立的锌指重复序列,并且每个都可以识别多个碱基对。产生新的锌指结构域的最常见方法是结合具有已知特异性的较小锌指“模块”。ZFN中最常见的切割结构域是来自II型限制性核酸内切酶FokI的非特异性切割结构域。使用内源性同源重组(HR)机制和带有CAR表达盒的同源DNA模板,ZFN可以用于将CAR表达盒插入基因组。当靶向序列被ZFN切割后,HR机制搜索受损染色体与同源DNA模板之间的同源性,然后在染色体的两个断裂末端之间复制模板的序列,从而将同源DNA模板整合到基因组中。

[0275] 转录激活因子样效应子核酸酶(TALEN)是限制性内切酶,其可以改造成切割特定的DNA序列。TALEN系统的工作原理几乎与ZFN相同。它们是通过将转录激活因子样效应子DNA结合结构域与DNA切割结构域结合而产生的。转录激活因子样效应子(TALE)由具有两个可变位置的33-34个氨基酸重复基序组成,上述可变位置对特定核苷酸有很强的识别能力。通过组装这些TALE的阵列,可以对TALE DNA结合结构域进行改造,以结合所需的DNA序列,从而指导核酸酶切割基因组中的特定位置。用于多核苷酸疗法的cDNA表达可以从任何合适的启动子(例如人巨细胞病毒(CMV)、猿猴病毒40(SV40)或金属硫蛋白启动子)得以指导,并由任何适当的哺乳动物调节元件或内含子(例如延伸因子1a增强子/启动子/内含子结构)调节。例如,如果需要的话,已知优先在特定细胞类型中指导基因表达的增强子可以用来指导核酸的表达。所用的增强子可以包括,但不限于,被表征成组织或细胞特异性增强子的那些。另外可选地,如果将基因组克隆用作治疗构建体,则可以通过同基因调节序列介导,或者,如果需要,通过源自于异源性来源的包括上述任何启动子或调节元件中任意者的调节序列介导。

[0276] 得到的细胞可以在与未修饰细胞相似的生长条件下生长,由此修饰的细胞可以被扩增并用于多种目的。

[0277] 5. 增强内源性IL-36基因表达

[0278] 可以使用任何靶向基因组编辑方法来修饰IL-36基因座的启动子/增强子区,从而增强免疫应答细胞中IL-36的内源性表达。在某些实施方式中,修饰包括将内源性启动子用组成型启动子或诱导型启动子替换,或将组成型启动子或诱导型启动子插入IL-36基因座的启动子区。在某些实施方式中,组成型启动子位于IL-36基因座上,以驱动内源性IL-36基因的基因表达。合适的组成型启动子包括,但不限于,CMV启动子、EF1a启动子、SV40启动子、PGK1启动子、Ubc启动子、 β -肌动蛋白启动子和CAG启动子。另外可选地或额外地,条件或诱导型启动子位于IL-36基因座上,以驱动内源性IL-36基因的基因表达。条件启动子的非限

制性实例包括四环素应答元件 (TRE) 启动子和雌激素应答元件 (ERE) 启动子。另外,可以将增强子元件置于启动子区以外的区域中。

[0279] 6. 基因组编辑方法

[0280] 可以使用任何靶向基因组编辑方法来修饰IL-36基因座的启动子/增强子区域。在某些实施方式中,使用CRISPR系统来修饰IL-36基因座的启动子/增强子区。在某些实施方式中,使用锌指核酸酶来修饰IL-36基因座的启动子/增强子区。在某些实施方式中,使用TALEN系统来修饰IL-36基因座的启动子/增强子区。

[0281] 用于递送基因组编辑剂/系统的方法可以根据需要而变化。在某些实施方式中,选择的基因组编辑方法的组件(component)作为DNA构建体在一个或多个质粒中递送。在某些实施方式中,组件通过病毒载体递送。常见的递送方法包括但不限于,电穿孔、显微注射、基因枪、穿刺(impalefection)、流体静压力、连续输注、超声处理、磁转染、腺相关病毒、病毒载体的包膜蛋白假型、能复制的载体顺式和反式作用元件、单纯疱疹病毒和化学媒介物(例如寡核苷酸、脂复合物、聚合物小体、多复合物、树状聚合物、无机纳米颗粒和穿透细胞的肽)。

[0282] 可以在IL-36基因座内的任何位置进行修饰,或者在影响IL-36基因的基因表达的任何位置进行修饰。在某些实施方式中,修饰发生在IL-36基因的转录起始位点的上游。在某些实施方式中,修饰发生在IL-36基因的转录起始位点和蛋白质编码区之间。在某些实施方式中,修饰发生在IL-36基因的蛋白质编码区的下游。在某些实施方式中,修饰发生在IL-36基因的转录起始位点的上游,其中该修饰产生新的转录起始位点。

[0283] 7. 多肽和类似物

[0284] 在本公开的主题中还包括,在免疫应答细胞中表达时以增强其抗肿瘤活性的方式修饰的CD19、CD28、CD3 ζ 和IL-36多肽或其片段。本公开的主题提供了通过产生序列变化来优化氨基酸序列或核酸序列的方法。这些变化可以包括某些突变、缺失、插入或翻译后修饰。本公开的主题还包括本文公开的任何天然存在的多肽(包括但不限于CD19、CD28、CD3 ζ 和IL-36)的类似物。类似物可以通过氨基酸序列差异、通过翻译后修饰或通过两者与本文公开的天然存在的多肽不同。类似物可表现出与本公开主题的全部或部分天然存在的氨基酸序列具有至少约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或更多的同源性。序列比较的长度是至少5、10、15或20个氨基酸残基,例如至少25、50或75个氨基酸残基,或超过100个氨基酸残基。同样,在确定同一性程度的示例性方法中,可以使用BLAST程序,其概率得分在 e^{-3} 和 e^{-100} 之间,指示密切相关的序列。修饰包括多肽的体内和体外化学衍生化,例如乙酰化、羧化、磷酸化或糖基化;这些修饰可以在多肽合成或加工过程中或在用分离的修饰酶处理之后发生。类似物也可以通过一级序列的变化而不同于天然存在的多肽。这些包括天然和诱导的遗传变异(例如,如Sambrook, Fritsch和Maniatis, 分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning: A Laboratory Manual) (第2版), CSH出版社, 1989, 或Ausubel等, 同上, 中所述, 其由于通过辐射或暴露于乙烷甲基硫酸盐中的随机诱变或通过位点特异性诱变而产生)。还包括环化的肽、分子和类似物, 其含有除L-氨基酸以外的残基, 例如D-氨基酸或非天然存在的或合成的氨基酸, 例如 β 或 γ 氨基酸。

[0285] 除了全长多肽, 本公开主题还提供了本文公开的任一多肽或肽结构域的片段。如本文所用, 术语“片段”是指至少5、10、13或15个氨基酸。在某些实施方式中, 片段包括至少

20个连续氨基酸、至少30个连续氨基酸或至少50个连续氨基酸。在某些实施方式中,片段包括至少60至80、100、200、300或更多个连续氨基酸。片段可以通过本领域技术人员已知的方法产生,或者可以由通常的蛋白质加工产生(例如,从新生多肽中去除生物活性不需要的氨基酸,或者通过另外可选的mRNA剪接或另外可选地蛋白质加工事件去除氨基酸)。

[0286] 非蛋白质类似物具有设计成模仿本文公开的蛋白质(例如,IL-36)的功能活性的化学结构。这样的类似物可能超过原始多肽的生理活性。类似物设计的方法在本领域中是众所周知的,可以根据这些方法通过修饰化学结构来进行类似物的合成,以使所得的类似物在免疫应答细胞中表达时增加原始多肽的抗肿瘤活性。这些化学修饰包括,但不限于,置换另外可选地的R基团和改变参考多肽在特定碳原子处的饱和度。在某些实施方式中,蛋白质类似物对体内降解具有相对抗性,从而在给药后导致更长久的治疗效果。用于测量功能活性的测定包括,但不限于,以下实施例中描述的那些。

[0287] 8. 给药

[0288] 可以将包括本公开的免疫应答细胞的组合物系统地或直接提供给受试者,以诱导和/或增强对抗原的免疫应答和/或治疗和/或预防肿瘤、病原体感染或传染性疾病。在某些实施方式中,将本公开的免疫应答细胞或包括其的组合直接注射到所关注的器官(例如,受肿瘤影响的器官)中。另外可选地,例如,通过向循环系统(例如,肿瘤血管)给药,将本公开的免疫应答细胞或包括其的组合间接地提供给所关注的器官。在施用细胞或组合物之前、之中或之后可以提供扩增和分化剂,以增加体外或体内T细胞、NK细胞或CTL细胞的产生。

[0289] 本公开的免疫应答细胞可以在任何生理上可接受的载体中给药,通常是血管内给药,然而它们也可以被引入骨骼或其他方便部位,在这些部位细胞可以找到合适的再生和分化部位(例如胸腺)。通常,将施用至少约 1×10^5 个细胞,最终达到约 1×10^{10} 个或更多。本公开的免疫应答细胞可以包括纯化的细胞群体。本领域技术人员可以使用各种公知的方法,例如荧光激活细胞分选(FACS)来容易地确定群体中本公开的免疫应答细胞的百分比。在包括本公开的免疫应答细胞的群体中,纯度的合适范围是约50%至约55%、约5%至约60%、以及约65%至约70%。在某些实施方式中,纯度为约70%至约75%、约75%至约80%、或约80%至约85%。在某些实施方式中,纯度为约85%至约90%、约90%至约95%、和约95%至约100%。剂量可以由本领域技术人员容易地调节(例如,纯度降低可能需要增加剂量)。可以通过注射、导管等引入细胞。

[0290] 本公开的组合物可以是包括本公开的免疫应答细胞或其祖细胞和药学上可接受的载体的药物组合物。给药可以是自体的或异体的。例如,可以从一受试者获得免疫应答细胞或祖细胞,并将其施用于相同受试者或不同的相容受试者。外周血来源的免疫应答细胞或其后代(例如,体内、离体或体外来源)可以通过局部注射使用,包括导管给药、全身注射、局部注射、静脉内注射或肠胃外给药。当施用本公开的主题的治疗组合物(例如,包括本公开的免疫应答细胞的药物组合物)时,可以将其配制成单位剂量可注射形式(溶液剂、悬浮剂、乳剂)。

[0291] 9. 剂型

[0292] 包括本公开的免疫应答细胞的组合物可以方便地以无菌液体制剂的形式提供,例如等渗水溶液剂、悬浮剂、乳剂、分散剂或粘性组合物,其可以缓冲至选定的pH。液体制剂通

常比凝胶、其他粘性组合物和固体组合物更容易制备。另外，液体组合物在某种程度上更方便给药，尤其是通过注射。另一方面，可以在适当的粘度范围内配制粘性组合物，以提供与特定组织的更长的接触时间。液体或粘性组合物可以包括载体，所述载体可以是溶剂或分散介质，其包括例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、多元醇（例如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等）及其合适的混合物。

[0293] 可以通过将遗传修饰的免疫应答细胞掺入所需量的适当溶剂中，并根据需要掺入不同量的其他成分来制备无菌注射溶液。这样的组合物可以与合适的载体、稀释剂或赋形剂例如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等混合。组合物也可以冻干。所述组合物可以包括辅助物质，例如润湿剂、分散剂或乳化剂（例如，甲基纤维素）、pH缓冲剂、胶凝剂或增粘剂、防腐剂、矫味剂、颜料等，这取决于给药途径和所需制剂。可以参考标准教科书，例如“REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE”，1985年第17版，以引用方式并入本文，以制备合适的制剂，而无需进行过多的实验。

[0294] 可以添加增强组合物的稳定性和无菌性的各种添加剂，包括抗微生物防腐剂、抗氧化剂、螯合剂和缓冲剂。可以通过各种抗细菌和抗真菌剂，例如对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、山梨酸等来确保防止微生物的作用。通过使用延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶可以延长可注射药物形式的吸收。然而，根据本公开的主题，所使用的任何媒介物、稀释剂或添加剂将必须与遗传修饰的免疫应答细胞或其祖细胞相容。

[0295] 组合物可以是等渗的，即它们可以具有与血液和泪液相同的渗透压。组合物所需的等渗性可以使用氯化钠或其他药学上可接受的试剂例如葡萄糖、硼酸、酒石酸钠、丙二醇或其他无机或有机溶质来实现。氯化钠特别适合于含有钠离子的缓冲剂。

[0296] 如果需要，可使用药学上可接受的增稠剂将组合物的粘度保持在选定水平。例如，甲基纤维素易于经济地获得，并且易于使用。其他合适的增稠剂包括，例如，黄原胶、羧甲基纤维素、羟丙基纤维素、卡波姆等。增稠剂的浓度可以取决于选择的试剂。重要的是要使用能够达到所选粘度的用量。显然，合适载体和其他添加剂的选择将取决于确切的给药途径和特定剂型的性质，例如液体剂型（例如，是否将组合物配制成溶液剂、悬浮液、凝胶剂或其他液体形式，例如定时释放形式或液体填充形式）。

[0297] 对于所治疗的受试者，要施用的细胞数量将有所不同。在一实施方式中，将约 10^4 至约 10^{10} 、约 10^5 至约 10^9 、或约 10^6 至约 10^8 的本公开的免疫应答细胞向人受试者施用。可以以更少的数量施用更有效的细胞。在某些实施方式中，将至少约 1×10^8 、约 2×10^8 、约 3×10^8 、约 4×10^8 或约 5×10^8 的本公开的免疫应答细胞向人受试者施用。可以根据每个受试者的个体因素，包括其大小、年龄、性别、体重和具体受试者的状况，来确定有效剂量的精确确定。本领域技术人员从本公开和本领域知识中可以容易地确定剂量。

[0298] 本领域技术人员可以容易地确定组合物中和在方法中施用的细胞和任选的添加剂、媒介物和/或载体的量。通常，任何添加剂（除活性细胞和/或药剂外）在磷酸盐缓冲盐水中的存在量为0.001%至50%（重量）溶液，并且活性成分以微克至毫克的数量级存在，例如约0.0001wt%至约5wt%、约0.0001wt%至约1wt%、约0.0001wt%至约0.05wt%或约0.001wt%至约20wt%、约0.01wt%至约10wt%或约0.05wt%至约5wt%。对于要施用于动物或人的任何组合物，可以确定以下：毒性，例如通过在合适的动物模型例如啮齿类动物如小鼠中确定致死剂量（LD）和LD50；组合物的剂量，其中的组分浓度和施用组合物的时机，引

起合适的反应。根据技术人员知识、本公开和本文引用的文献,这种确定不需要过度的实验。并且,可以确定连续给药的时间而无需过多的实验。

[0299] 10. 治疗方法

[0300] 本公开的主题提供了用于在对其有需要的受试者中诱导和/或增加免疫应答的方法。本公开的免疫应答细胞和包括其的组合物可以用于治疗和/或预防受试者的肿瘤。本公开的免疫应答细胞和包括其的组合物可以用于延长患有肿瘤的受试者的存活。本公开的免疫应答细胞和包括其的组合物还可以用于治疗和/或预防受试者例如免疫功能低下的人受试者中的病原体感染或其他传染性疾。这些方法包括施用有效量的本公开的免疫应答细胞或包括其的组合物(例如药物组合物),以实现期望的效果,无论是减轻现有病症还是预防复发。对于治疗,施用的量是有效产生所需效果的量。可以在一次或一系列给药中提供有效量。可以大剂量或通过连续灌注来提供有效量。

[0301] “有效量”(或“治疗有效量”)是足以在治疗后产生有益或期望的临床结果的量。可以以一剂或多剂剂量将有效量施用于受试者。就治疗而言,有效量是足以缓解、改善、稳定、逆转或减慢疾病进展或以其他方式减少疾病病理后果的量。有效量通常由医师根据具体情况确定,并且在本领域技术人员的能力范围内。当确定合适的剂量以达到有效量时,通常要考虑几个因素。这些因素包括受试者的年龄、性别和体重、所治疗的疾病、疾病的严重程度以及所施用的免疫应答细胞的形式和有效浓度。

[0302] 对于使用抗原特异性T细胞的过继免疫疗法,通常输注约 10^6 - 10^{10} (例如约 10^9)范围内的细胞剂量。在将本公开的细胞施用于宿主并随后分化时,特异性针对特定抗原的T细胞被诱导。修饰的细胞可以通过本领域已知的任何方法施用,其包括,但不限于,静脉内、皮下、结内、肿瘤内、鞘内、胸膜内、腹膜内和直接向胸腺施用。

[0303] 本公开的主题提供了用于治疗和/或预防受试者中的肿瘤的方法。该方法可以包括向患有肿瘤的受试者施用有效量的本公开的免疫应答细胞或包括其的组合物。

[0304] 肿瘤的非限制性实例包括血液癌(例如白血病、淋巴瘤和骨髓瘤)、卵巢癌、乳腺癌、膀胱癌、脑癌、结肠癌、肠癌、肝癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌、胃癌、成胶质细胞瘤、喉癌、黑色素瘤、成神经细胞瘤、腺癌、神经胶质瘤、软组织肉瘤和各种癌(包括前列腺癌和小细胞肺癌)。合适的癌还包括肿瘤学领域中任何已知的癌,其包括,但不限于,星形细胞瘤、纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、少突胶质细胞瘤、室管膜瘤、成神经管细胞瘤、原始神经外胚层肿瘤(PNET)、软骨肉瘤、成骨肉瘤、胰腺导管腺癌、小细胞和大细胞肺腺癌、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、鳞状细胞癌、支气管肺泡癌、上皮腺癌及其肝转移灶、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤(lymphangi endotheliosarcoma)、肝癌、胆管癌、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、基底细胞癌、汗腺癌、乳头状癌、皮脂腺癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、威尔姆斯氏瘤(Wilms' tumor)、睾丸瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突胶质细胞瘤、脑膜瘤、成神经细胞瘤、成视网膜细胞瘤、白血病、多发性骨髓瘤、Waldenstrom's巨球蛋白血症、和重链疾病、诸如导管和小叶腺癌的乳腺肿瘤、子宫颈的鳞状和腺癌、子宫和卵巢上皮癌、前列腺腺癌、膀胱移行鳞状细胞癌、B和T细胞淋巴瘤(结节性和弥漫性)浆细胞瘤、急性和慢性白血病、恶性黑色素瘤、软组织肉瘤和平滑肌肉瘤。在某些实施方式中,所述肿瘤选自血液癌(例如白血病、淋巴瘤和骨髓瘤)、卵巢癌、前列腺癌、乳腺

癌、膀胱癌、脑癌、结肠癌、肠癌、肝癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌、胃癌、成胶质细胞瘤和喉癌。在某些实施方式中，本公开的免疫应答细胞和包括其的组合物可以用于治疗和/或预防不适合于常规治疗干预的血液癌（例如白血病、淋巴瘤和骨髓瘤）或卵巢癌。

[0305] 受试者可以患有疾病的晚期(advanced)形式，在这种情况下，治疗目标可以包括缓解或逆转疾病进展和/或减轻副作用。受试者可以具有已经对其进行过治疗的病史，在这种情况下，治疗目标通常包括降低或延迟复发风险。

[0306] 用于治疗合适的人受试者通常包括可以通过临床标准区分的两个治疗组。患有“晚期疾病”或“高肿瘤负荷”的受试者是携带临床上可测量肿瘤的受试者。临床上可测量的肿瘤可以根据肿瘤肿块检测的肿瘤（例如，通过触诊、CAT扫描、超声检查、乳房X线影像或X射线；单独的阳性生化或组织病理学标志物不足以识别该人群）。向这些受试者施用药物组合物，以引发抗肿瘤反应，目的在于减轻其状况。理想地，结果是减小了肿瘤块，但任何临床改善都可构成获益。临床改善包括降低风险或进展速度或减少肿瘤病理后果。

[0307] 第二组合适的受试者在本领域中称为“佐剂组”。这些是有过肿瘤史但对另一种治疗方式有反应的个体。先前的疗法可以包括，但不限于，手术切除、放疗和传统化疗。结果，这些个体没有临床上可测量的肿瘤。然而，他们被怀疑有在原发肿瘤部位附近的或转移的疾病进展风险。该组可以进一步细分成高风险和低风险个体。根据在初始治疗之前或之后观察到的特征进行细分。这些特征在临床领域中是已知的，并且针对每种不同的肿瘤适当地定义。高危亚组的典型特征是肿瘤已侵犯了邻近组织，或显示淋巴结受累。

[0308] 另一组具有肿瘤的遗传易感性，但尚未证实肿瘤的临床体征。例如，对于与乳腺癌相关的基因突变测试呈阳性、但仍处于育龄的妇女，可能希望接受本文所述的一种或更多种免疫应答细胞进行预防性治疗，以防止肿瘤的发生，直到适合进行预防性手术。

[0309] 由于与肿瘤抗原结合的抗原识别受体和增强免疫应答细胞抗肿瘤作用的可分泌的IL-36多肽（例如外源性IL-36多肽）表面表达的结果，过继转移的T或NK细胞在肿瘤部位被赋予增强的和选择性的溶细胞活性。此外，在其定位于肿瘤或病毒感染及其增殖之后，T细胞将肿瘤或病毒感染位点转变成高传导性环境，以用于范围广泛的参与生理抗肿瘤或抗病毒应答的多种免疫细胞（肿瘤浸润淋巴细胞、NK细胞、NKT细胞、树突状细胞和巨噬细胞）。

[0310] 另外，本公开的主题提供了用于在例如免疫受损的受试者中治疗和/或预防病原体感染（例如病毒感染、细菌感染、真菌感染、寄生虫感染或原生动物感染）的方法。该方法可以包括向患有病原体感染的受试者施用有效量的本公开的免疫应答细胞或包括其的组合物。易于治疗的示例性病毒感染包括，但不限于，巨细胞病毒(CMV)、爱泼斯坦巴尔病毒(EBV)、人免疫缺陷病毒(HIV)和流感病毒感染。

[0311] 可以对本公开的免疫应答细胞（例如，T细胞）进行进一步修饰，以避免或最小化免疫并发症（称为“恶性T细胞转化”）的风险，例如移植物抗宿主病(GvHD)，或者当健康组织表达与肿瘤细胞相同的靶抗原时，会导致类似于GvHD的结果。该问题的潜在解决方案是将自杀基因改造到本公开的免疫应答细胞中。合适的自杀基因包括，但不限于，单纯疱疹病毒胸苷激酶(hsv-tk)、诱导型Caspase 9自杀基因(iCasp-9)和截短的人表皮生长因子受体(EGFRt)多肽。在某些实施方式中，自杀基因是EGFRt多肽。EGFRt多肽可以通过施用抗EGFR单克隆抗体（例如西妥昔单抗）来实现T细胞消除。EGFRt可以共价连接至本公开的CAR的抗原识别受体的上游。自杀基因可以包括在包括编码本公开的CAR的核酸的载体内。以此方

式,在恶性T细胞转化(例如,GVHD)过程中施用设计成激活自杀基因的前药(例如,前药(例如,可以激活iCasp-9的AP1903)),会触发自杀基因激活的表达CAR的T细胞的凋亡。将自杀基因并入本公开的CAR中提高安全性水平,并能够在很短的时间内消除大部分CAR T细胞。可以在CAR T细胞输注后的给定时间点抢先消除并入有自杀基因的本公开的免疫应答细胞(例如,T细胞),或在毒性的最早迹象时将其根除。

[0312] 11. 试剂盒

[0313] 本公开的主题提供了用于在受试者中诱导和/或增强免疫应答和/或治疗和/或预防肿瘤或病原体感染的试剂盒。在某些实施方式中,试剂盒包括有效量的本公开的免疫应答细胞或包括其的药物组合物。在某些实施方式中,试剂盒包括无菌容器;这样的容器可以是盒子、安瓿、瓶、小瓶、管、袋、小袋、泡罩包装或本领域已知的其他合适的容器形式。这些容器可以由塑料、玻璃、层压纸、金属箔或其他适合于容纳药物的材料制成。在某些非限制性实施方式中,试剂盒包括编码针对所关注的抗原的抗原识别受体(例如,CAR或TCR)的分离的核酸分子和编码可表达(和可分泌)形式的IL-36多肽的分离的核酸分子,其可以任选地包括在相同或不同的载体中。

[0314] 如果需要的话,将免疫应答细胞和/或核酸分子与将细胞或核酸分子施用于患有肿瘤或病原体或免疫疾病或有发展成肿瘤或病原体或免疫疾病的受试者的说明书一起提供。说明书通常包括有关使用组合物用于治疗或预防肿瘤或病原体感染的信息。在某些实施方式中,说明书包括以下至少一项:治疗剂的描述;用于治疗或预防肿瘤、病原体感染或免疫疾病或其症状的剂量表和给药;注意事项;警告;适应症;禁忌症;过剂量信息;不良反应;动物药理学;临床研究;和/或参考文献。这些说明书可以直接打印在容器上(如果有的话),或者作为粘贴在容器上的标签,或者作为单独的纸页、小册子、卡片或文件夹提供在容器内或与容器一起。

[0315] 实施例

[0316] 除非另有说明,否则本公开的实践采用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术,其在技术人员的能力范围内。这些技术在以下文献中充分地解释:例如,“分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)”,第二版(Sambrook,1989);“寡核苷酸合成(Oligonucleotide Synthesis)”(Gait,1984);“动物细胞培养(Animal Cell Culture)”(Freshney,1987);“酶学方法(Methods in Enzymology)”“实验免疫学手册(Handbook of Experimental Immunology)”(Weir,1996);“哺乳动物细胞的基因转移载体(Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells)”(Miller和Calos,1987年);“分子生物学的最新方法(Current Protocols in Molecular Biology)”(Ausubel,1987年);“PCR:聚合酶链反应(PCR:The Polymerase Chain Reaction)”,(Mullis,1994年);“免疫学的最新方法(Current Protocols in Immunology)”(Coligan,1991年)中充分地解释了这些技术。这些技术适用于本文公开的多核苷酸和多肽的产生,并且因此可以在制备和实施本文公开的主题中予以考虑。在以下部分中将讨论用于具体实施例的特别有用的技术。

[0317] 提出以下实施例以向本领域普通技术人员提供有关如何制备和使用本公开的细胞和组合物的完整公开和描述,而不旨在限制发明人认为的他们的发明的范围。

[0318] 实施例1-分泌白介素36(IL-36)的CAR-T细胞

[0319] 介绍

[0320] 产生了表达第一代抗CD19 CAR和可分泌的IL-36多肽的遗传修饰的T细胞。与不包括可分泌的IL-36多肽的对照抗CD19 CAR-T细胞相比,分泌IL-36的CAR-T细胞表现出改善。分泌IL-36的CAR-T细胞在鼠模型中表现出延长的存活曲线。

[0321] 结果

[0322] CAR构建体

[0323] 如图1A所示,在SFG逆转录病毒载体主链中产生/构建具有或不具有可分泌的鼠IL-36多肽的鼠抗CD19 CAR构建体,例如am19mZ和am19mZ_IL-36。图1B显示了第一代抗小鼠CD19 myc-tag CAR的构建体,其包括组成型分泌的鼠IL-36 α ,其中鼠IL-36 α 具有SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列。图1C显示了并入组成型分泌的鼠IL-36 β 的第一代抗小鼠CD19myc-tag CAR的构建体,其中鼠IL-36 α 具有SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列。图1D显示了并入组成型分泌的鼠IL-36 γ 的第一代抗小鼠CD19myc-tag CAR的构建体,其中鼠IL-36 α 具有SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列。

[0324] 用上述各种构建体之一转导T细胞。

[0325] 细胞表面地CAR表达

[0326] 通过流式细胞术分析证实了这些AR构建体在小鼠T细胞(从脾脏收获后第5天,开始转导后第4天)的细胞表面的CAR表达,结果如图2所示。分泌IL-36 β (d5M19ZTSB)和 γ (d5M19ZTSG)的CD19myc-tag第一代CAR T细胞的表面表达分别显示在第1行的第一个和第二个散点图中。d5B6emp(未转导的C57BL/6小鼠脾细胞)用作阴性对照。M19z是指包括不具有可分泌的IL-36多肽的第一代抗CD19CAR的T细胞,用作阳性对照。

[0327] 细胞因子分泌增加

[0328] 通过流式细胞术测量修饰的T细胞的细胞因子分泌/产生,结果显示在图3中。与对照细胞,即仅表达M19Z而不表达可分泌的IL-36多肽的T细胞相比,分泌IL-36的表达CAR的T细胞在CD19⁺肿瘤细胞(EL4Sm19)中表现出鼠GM-CSF分泌的增加。

[0329] 如图4所示,与对照细胞,即仅表达M19Z而不表达可分泌的IL-36多肽的T细胞相比,分泌IL-36的表达CAR的T细胞在CD19⁺肿瘤细胞(EL4Sm19)中表现出鼠干扰素 γ (mINF- γ)分泌的增加。

[0330] 如图5所示,与对照细胞,即仅表达M19Z而不表达可分泌的IL-36多肽的T细胞相比,分泌IL-36的表达CAR的T细胞在CD19⁺肿瘤细胞(EL4Sm19)中表现出鼠白介素10(IL-10)分泌的增加。

[0331] 具有EL4SmCD19⁺肿瘤的具有免疫能力的同基因小鼠的存活

[0332] 在具有免疫能力的同基因疾病模型中研究了修饰的T细胞,其中评估了具有EL4SmCD19⁺肿瘤的具有免疫能力的同基因小鼠的长期存活。用 1×10^6 EL4Sm19tc(EL4肿瘤细胞来自Sigma,异位表达鼠CD19)接种C57BL/8小鼠。肿瘤接种一天后,随后用 5×10^6 CAR T细胞治疗小鼠,所述CAR T细胞用各种CAR构建体转导,追踪存活率。图6显示了所有受试者的存活曲线。如图6A所示,与未经治疗的小鼠相比,分泌IL-36的表达CAR的T细胞(例如,am19MTmZpIL36B和am19MTmZpIL36G)均诱导了荷瘤小鼠的长期存活。此外,am19MTmZ(M19Z)和am19MTmZpIL36B(M19Z_36B)的比较(见图6B)以及am19MTmZ(M19Z)和am19MTmZpIL36G(M19Z_36G)的比较(见图6C)显示,与没有IL-36分泌的CAR-T细胞相比,用分泌IL36 β 和 γ 的

表达CAR的T细胞治疗的小鼠的存活显著增加。

[0333] 实施例2

[0334] 同基因的分泌IL36 γ 的鼠CAR T细胞提高了荷瘤小鼠的存活率。

[0335] 通过尾静脉注射,对8-12周龄的C57BL/6小鼠接种了100万小鼠CD19+EL4肿瘤细胞(EL4-CD19)。在第二天,小鼠接受(未接受任何预处理化疗):无CAR T细胞(未经治疗),2,500,000m19m28mz(同基因的基于抗小鼠CD19 CD28的第二代CAR T细胞),2,500,000m19mz-IL36Y(同基因的抗小鼠CD19的第一代分泌IL36- γ 的CAR T细胞)或m19m28mz-IL36Y(同基因的基于抗小鼠CD19 CD28的第二代分泌IL36- γ 的CAR T细胞)。跟踪存活率,如图7所示。结果表明,与不分泌IL36- γ 的CAR T细胞相比,第一代和第二代分泌IL36- γ 的CAR T细胞均显著提高了存活率,并诱导了长期缓解。这些结果表明,分泌IL36- γ 的CAR T细胞比其非分泌性对应物更有效。

[0336] 同基因的分泌IL36- γ 的鼠CAR T细胞使荷瘤小鼠中促炎性细胞因子分泌增加。

[0337] 该实施例中描述的用CAR T细胞治疗的小鼠在第7天使眼睛出血,收集血清并使用基于Luminex珠的多重测定法分析细胞因子水平。图8显示的结果表明,与未经治疗的小鼠或接受m19m28mz的小鼠相比,接受m19mz-IL36Y或m19m28mz-IL36Y的小鼠具有显著更高的干扰素 γ 和TNF- α 的血清水平,表明分泌IL36- γ 的CAR T细胞在体内的功能增强。

[0338] 同基因的分泌IL36- γ 的鼠CAR T细胞在荷瘤小鼠中诱导B细胞发育不全。

[0339] 该实施例中描述的用CAR T细胞治疗的小鼠在第7天使眼睛出血。在RBC裂解后,利用流式细胞术确定外周B细胞的百分比(CD19+细胞占CD45+细胞的百分比)。如图9所示,与未经治疗的小鼠或接受m19m28mz的小鼠相比,接受分泌IL36- γ 的CAR T细胞的小鼠表现出显著降低的外周可检测B细胞水平。结果表明,分泌IL36- γ 的CAR T细胞比其非分泌性对应物更加有效,因为它们能够诱导更深水平的B细胞发育不全——靶向CD19的CAR T细胞疗法背景下体内CAR T细胞效力的替代标志物。

[0340] 本公开的主题的实施方式

[0341] 从前文描述中将显而易见的是,可以对本公开的主题进行变化和修改以将其应用于各种用途和条件。这样的实施方式也在所附权利要求的范围内。

[0342] 本文所述变量定义中的要素列表包括将变量定义成列出的要素的任何单个要素或组合(或子组合)。本文所述实施方式包括将该实施方式作为任何单一实施方式或与任何其他实施方式或其部分相结合。

[0343] 本说明书中提到的所有专利和出版物都以相同的程度通过引用并入本文,就如同每个独立的专利和出版物都被具体地和单独地指出通过引用并入一样。

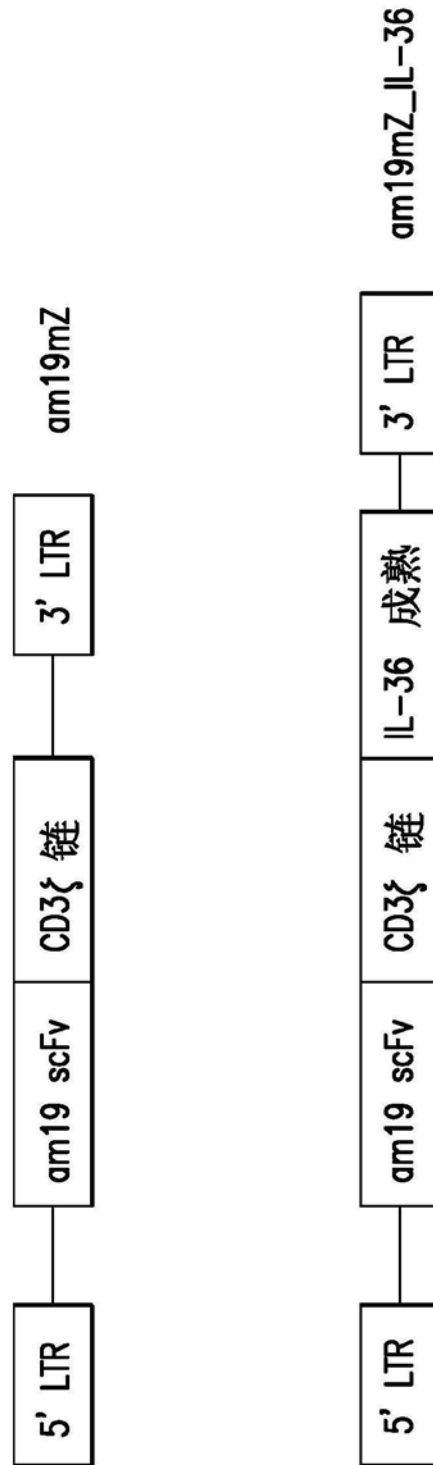


图1A

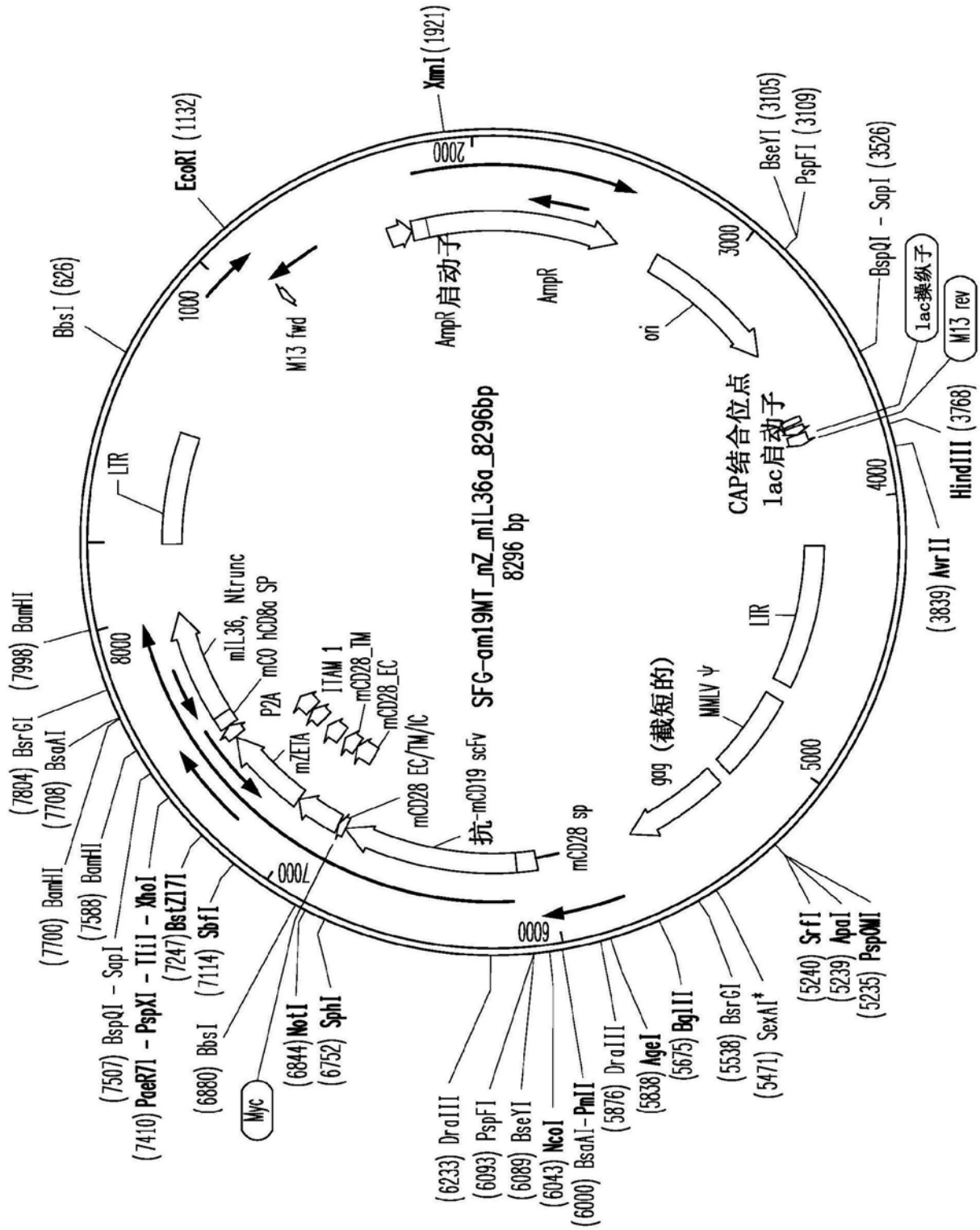


图1B

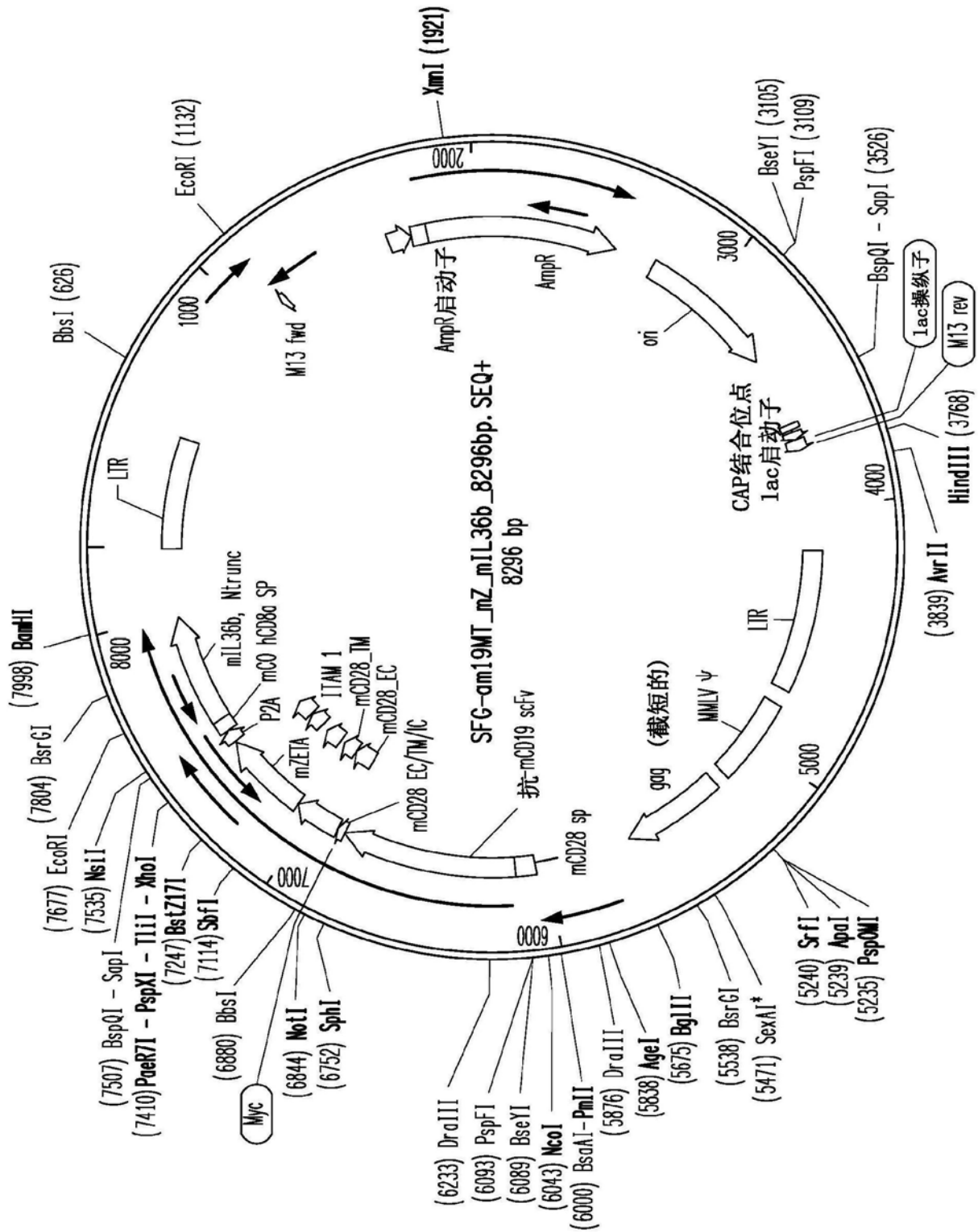


图1C

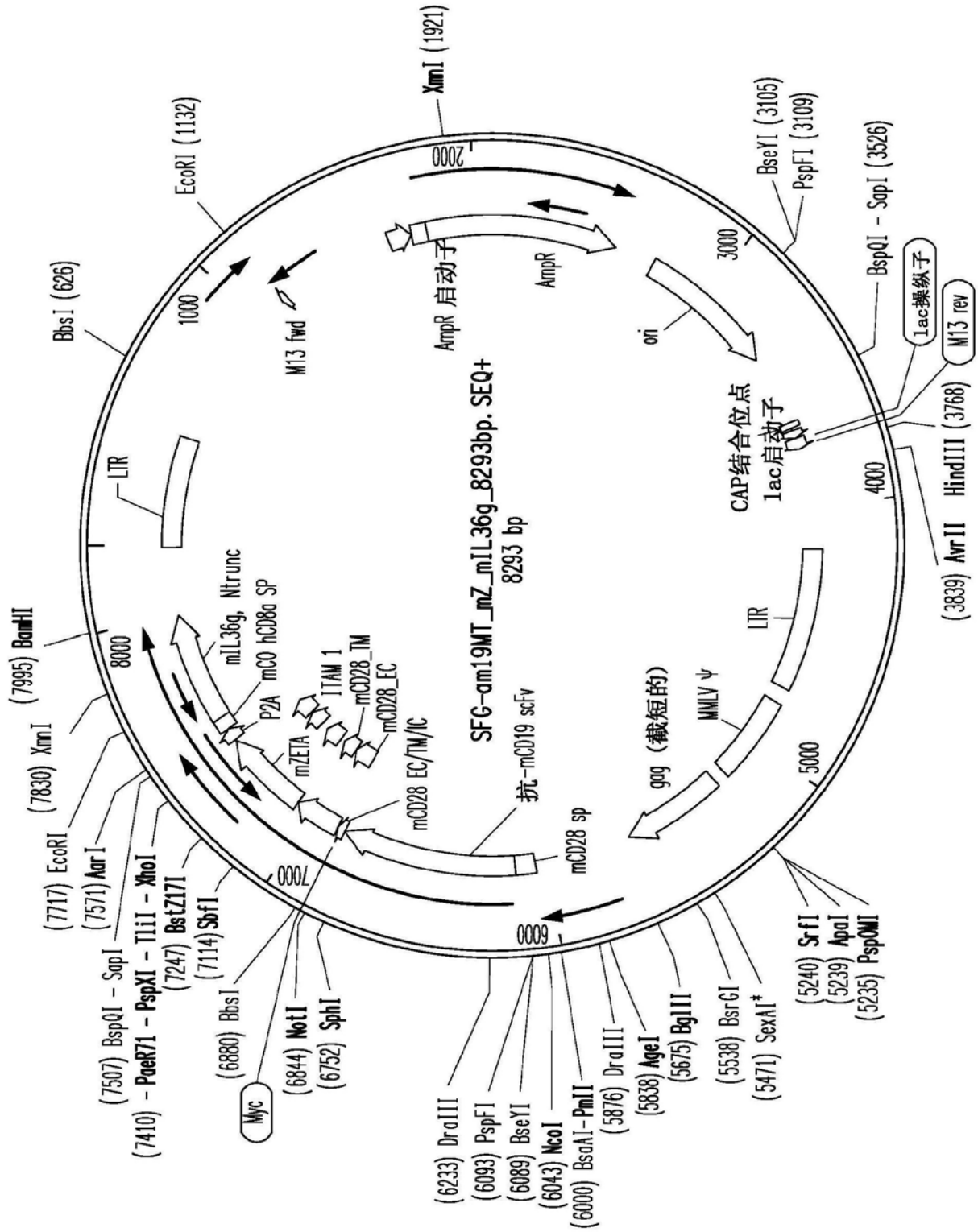


图1D

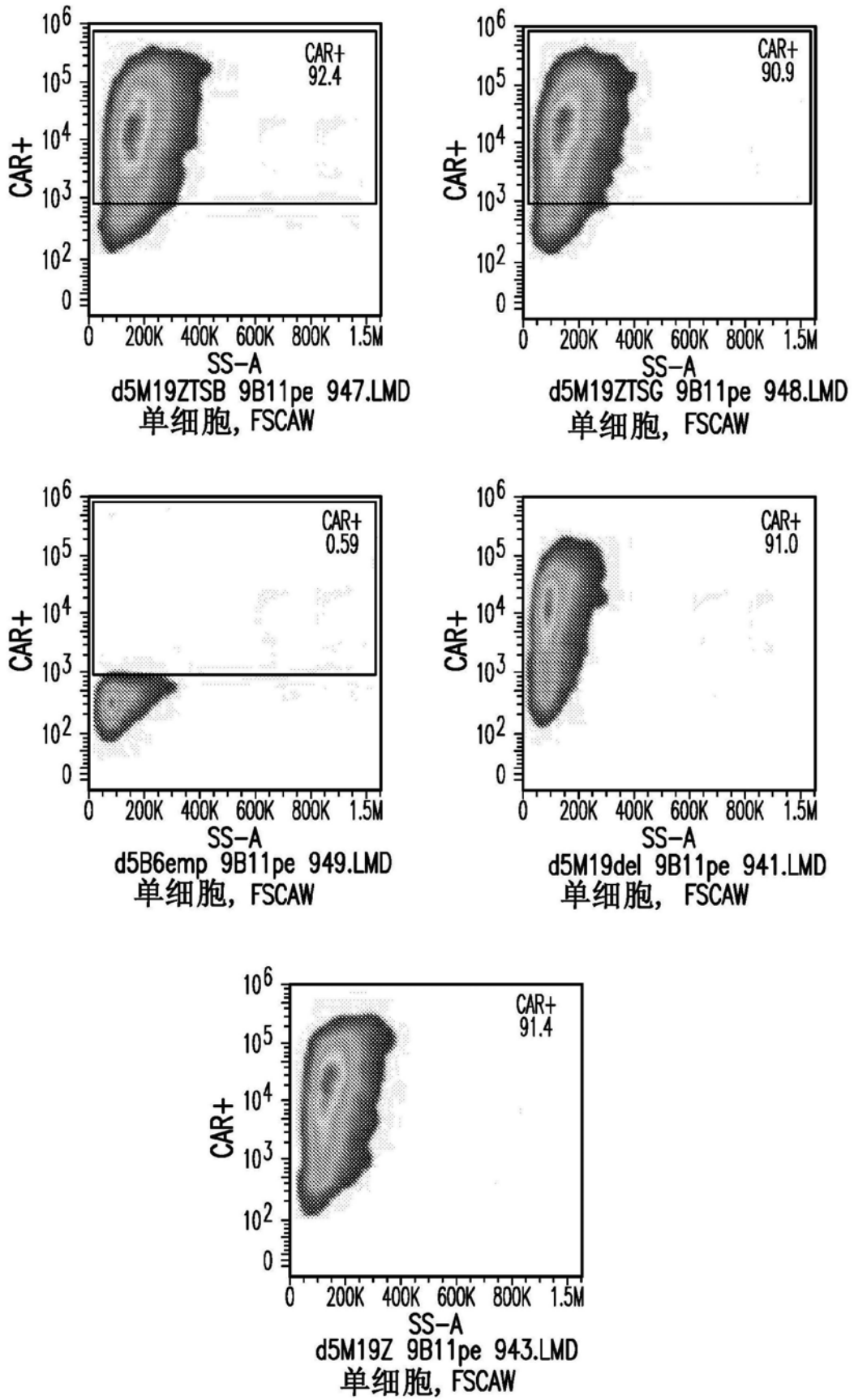
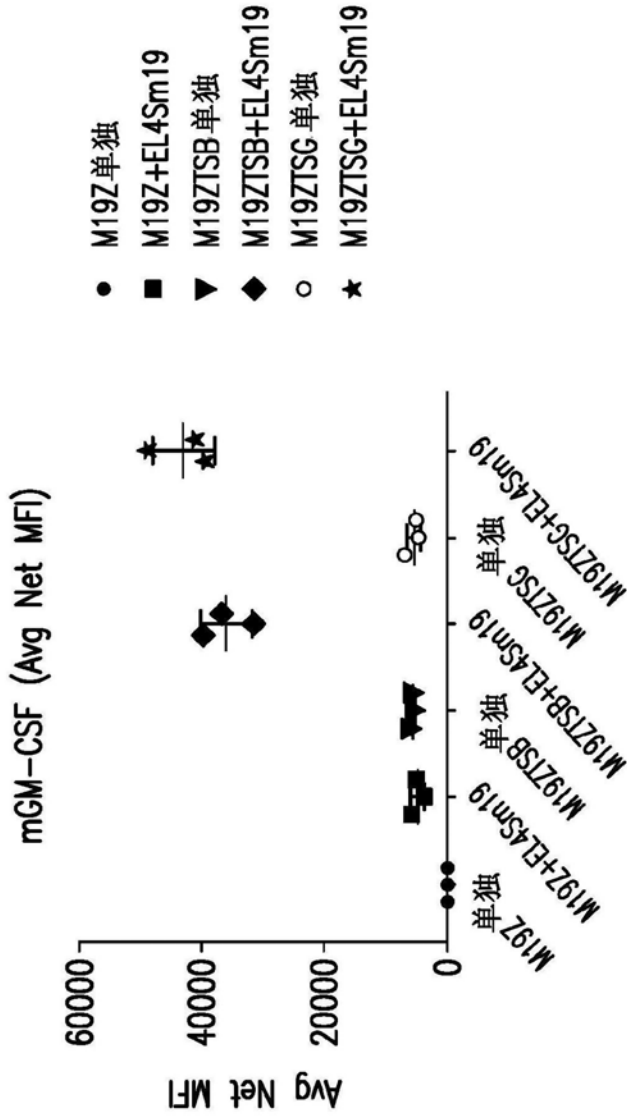
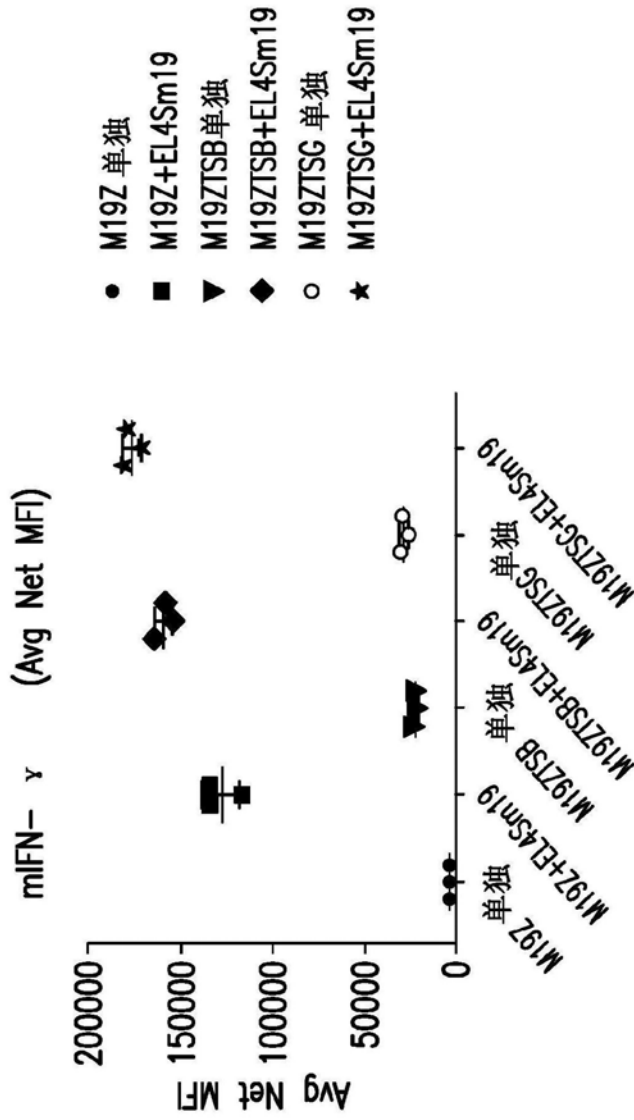


图2



Dunnett's 多重比较检验	平均差异	差异的95% CI	显著性?	汇总	校正后的P值	B-?
M19Z+EL4Sm19 vs M19Z 单独	4440	-2067 至 10947	无	ns	0.2328	A M19Z 单独
M19Z+EL4Sm19 vs. M19ZTSB 单独	-786.7	-7294 至 5720	无	ns	0.9958	C M19ZTSB 单独
M19Z+EL4Sm19 vs. M19ZTSB+EL4Sm19	-31264	-37771 至 -24757	有	***	0.0001	D M19ZTSB+EL4Sm19
M19Z+EL4Sm19 vs. M19ZTSG 单独	-5772	-7084 至 5930	无	ns	0.9986	E M19ZTSG 单独
M19Z+EL4Sm19 vs. M19ZTSG+EL4Sm19	-38359	-44866 至 -31852	有	***	0.0001	F M19ZTSG+EL4Sm19
检验细节	平均1	平均2	平均差异	差异的SE	n1	n2 q
M19Z+EL4Sm19 vs. M19Z 单独	4643	203	4440	3	3	3 1.98
M19Z+EL4Sm19 vs. M19ZTSB 单独	4643	5430	-7867	3	3	3 0.3508

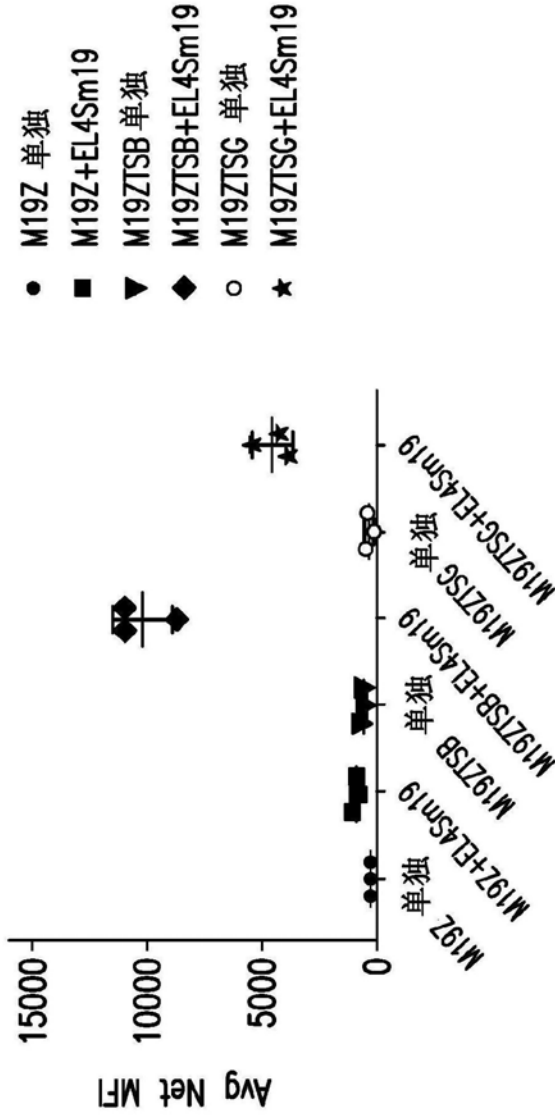
图3



Dunnett's 多重比较检验	平均差异	差异的95% CI	显著性?	汇总	经校正的P值	B-?
M19Z+EL4Sm19 vs M19Z 单独	125163	112682 至 137643	有	***	0.0001	A
M19Z+EL4Sm19 vs. M19ZTSB 单独	106232	93752 至 118712	有	***	0.0001	C
M19Z+EL4Sm19 vs. M19ZTSB+EL4Sm19	-31172	-43652 至 -18692	有	***	0.0001	D
M19Z+EL4Sm19 vs. M19ZTSG 单独	99811	87331 至 112291	有	***	0.0001	E
M19Z+EL4Sm19 vs. M19ZTSG+EL4Sm19	-48790	-61271 至 -36310	有	***	0.0001	F
检验细节	平均1	平均2	平均差异	差异的SE	n1	n2
M19Z+EL4Sm19 vs. M19Z 单独	128067	2905	125163	4302	3	3
M19Z+EL4Sm19 vs. M19ZTSB 单独	128067	21835	106232	4302	3	3
						q

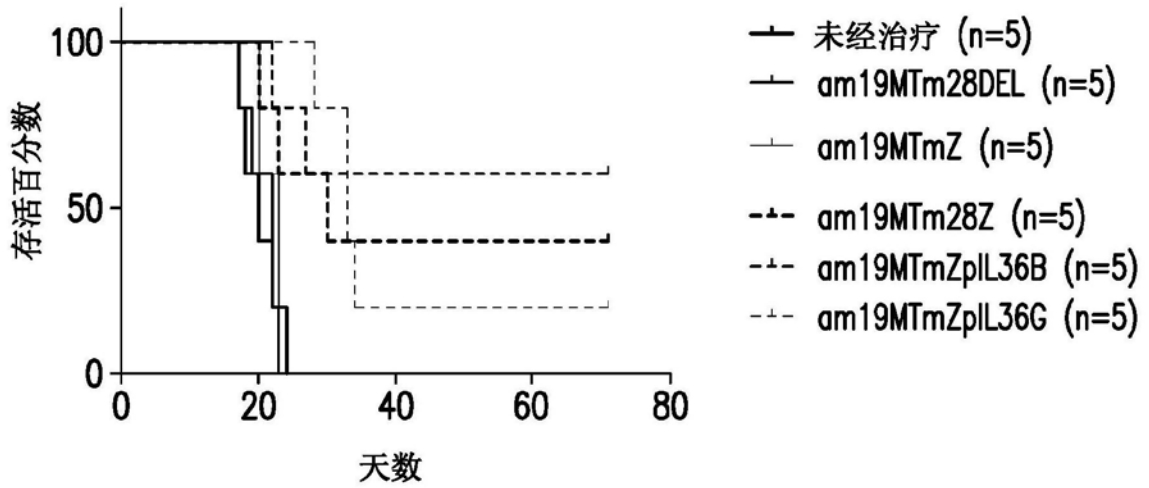
图4

mIL-10 (Avg Net MFI)



Dunnett's 多重比较检验	平均差异	差异的95% CI	显著性?	汇总	调整的P值	B-?
M19Z+EL4Sm19 vs M19Z 单独	772.2	-748.8 to 2293	有	ns	0.4744	A
M19Z+EL4Sm19 vs. M19ZTSB 单独	359.7	-1161 to 1181	有	ns	0.9322	C
M19Z+EL4Sm19 vs. M19ZTSB+EL4Sm19	-9269	-10790 to -7748	有	***	0.0001	D
M19Z+EL4Sm19 vs. M19ZTSG 单独	570.5	-950.5 to 2092	有	ns	0.7192	E
M19Z+EL4Sm19 vs. M19ZTSG+EL4Sm19	-3622	-5143 to -2101	有	***	0.0001	F
检验细节	平均1	平均2	平均差异	差异的SE	n1	n2
M19Z+EL4Sm19 vs. M19Z 单独	904.9	132.8	772.2	524.2	3	3
M19Z+EL4Sm19 vs. M19ZTSB 单独	904.9	545.3	359.7	524.2	3	3
						q
						1.473
						0.6861

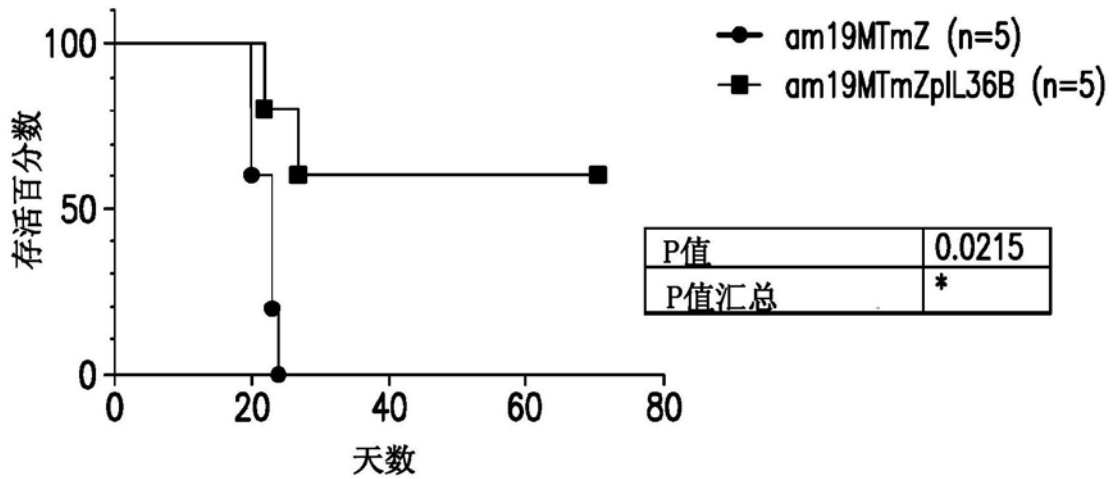
图5



	未经治疗 (n=5)	am19MTm28DEL (n=5)	am19MTmZ (n=5)	am19MTm28Z (n=5)	am19MTmZpIL36B (n=5)	am19MTmZpIL36G (n=5)
中位存活期	22	20	23	30	不明确	33

图6A

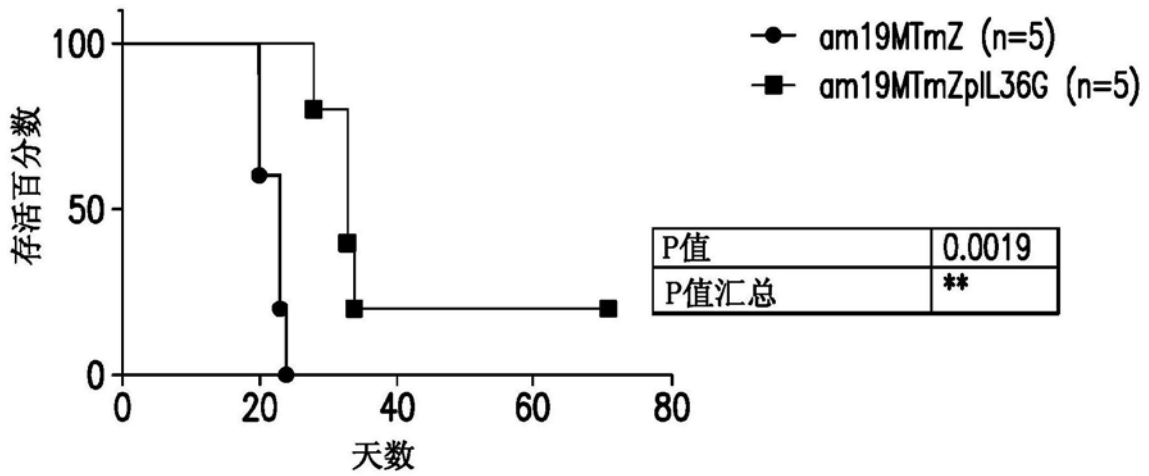
存活比例，M19Z vs M19Z_36B的存活率



中位存活期	
am19MTmZ	23
am19MTmZpIL36B	不明确

图6B

存活比例, M19Z vs M19Z_36G的存活率



中位存活期		
am19MTmZ (n=5)	23	
am19MTmZpIL36G	33	
比率 (及其倒数)	0.697	1.435
比率的95%CI	0.1872 至 2.596	0.3853 至 5.343

图6C

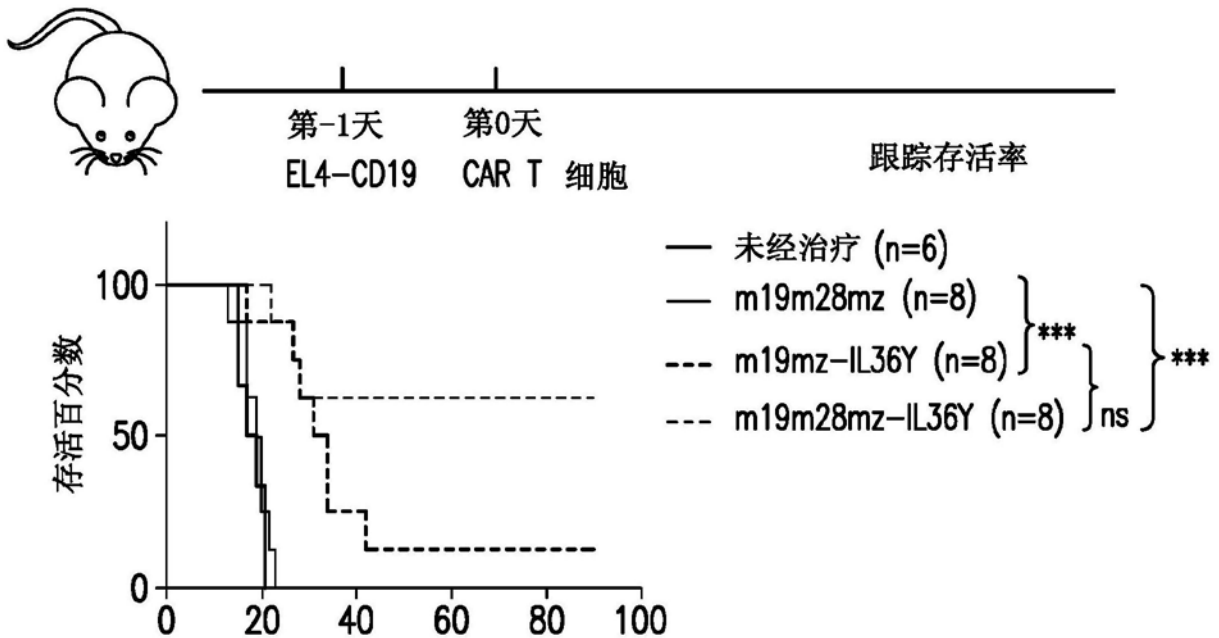


图7

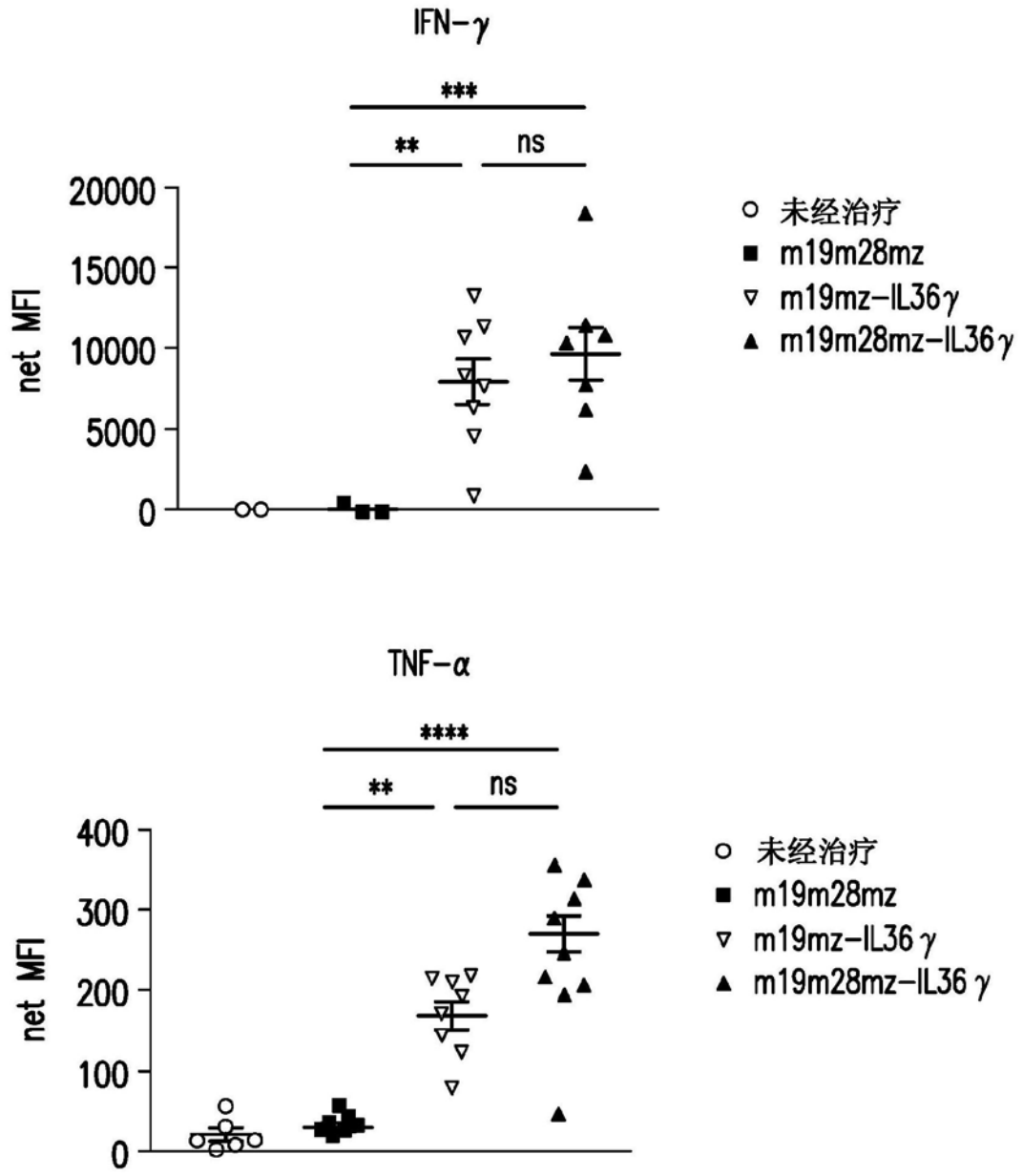


图8

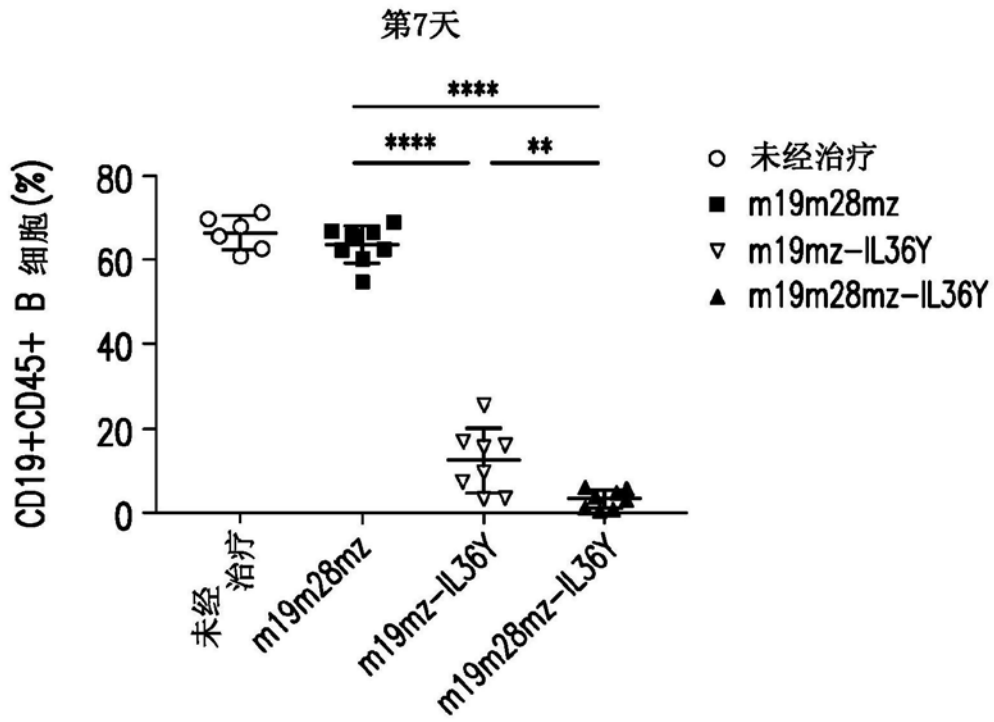


图9