



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114746438 A

(43) 申请公布日 2022. 07. 12

(21) 申请号 202080079493.6

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

(22) 申请日 2020.09.23

专利代理人 王永伟

(30) 优先权数据

62/904,340 2019.09.23 US

(51) Int. Cl.

C07K 14/705 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.05.16

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 35/17 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/052227 2020.09.23

A61K 38/17 (2006.01)

C12N 5/0783 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2021/061778 EN 2021.04.01

(71) 申请人 宾夕法尼亚大学董事会

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 S·A·阿尔贝尔达 E·普尔

L·托德

权利要求书6页 说明书69页

序列表23页 附图27页

(54) 发明名称

通过靶向成纤维细胞激活蛋白 (FAP) 使肿瘤组织破裂

(57) 摘要

本发明涉及包含能够结合成纤维细胞激活蛋白 (FAP) 的嵌合抗原受体 (CAR) 的组合物和方法,其用于治疗与FAP在犬、小鼠、或人肿瘤相关细胞上的表达相关的疾病、障碍或状况。

Table with 4 columns: 位置 (Position), 核苷酸 (Nucleotide), 氨基酸 (Amino Acid), 分子量 (Molecular Weight). It contains a long sequence of nucleotides and amino acids with corresponding molecular weights.

1. 嵌合抗原受体 (CAR), 其包括能够结合成纤维细胞激活蛋白 (FAP) 的抗原结合结构域、跨膜结构域、和胞内结构域, 其中所述抗原结合结构域包括:

重链可变区, 其包括三个重链互补决定区 (HCDR), 其中 HCDR1 包含氨基酸序列 YTITSYSLH (SEQ ID NO:1), HCDR2 包含氨基酸序列 EINPANGDHNFSKFEIK (SEQ ID NO:2), 并且 HCDR3 包含氨基酸序列 LDDSRFHWFYFDV (SEQ ID NO:3); 和

轻链可变区, 其包括三个轻链互补决定区 (LCDR), 其中 LCDR1 包含氨基酸序列 TASSSVSYMY (SEQ ID NO:4), LCDR2 包含氨基酸序列 LTSNLA (SEQ ID NO:5), 并且 LCDR3 包含氨基酸序列 QQWSGYPPIT (SEQ ID NO:6)。

2. 根据权利要求1所述的CAR, 其中所述抗原结合结构域包含:

(a) 重链可变区, 其包含与 SEQ ID NO:7 同一性至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 的氨基酸序列; 和/或

(b) 轻链可变区, 其包含与 SEQ ID NO:9 同一性至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 的氨基酸序列; 和/或

(c) 重链可变区, 其包含与 SEQ ID NO:7 同一性至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 的氨基酸序列; 和轻链可变区, 其包含与 SEQ ID NO:9 同一性至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 的氨基酸序列; 和/或

(d) 选自全长抗体或其抗原结合片段、Fab、单链可变片段 (scFv)、或单结构域抗体的抗原结合结构域; 和/或

(e) 单链可变片段 (scFv), 其包含与 SEQ ID NO:11 或 13 同一性至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 的氨基酸序列。

3. 根据权利要求1-2中任一项所述的CAR, 其中所述CAR:

(a) 能够结合成纤维细胞激活蛋白 (FAP); 和/或

(b) 能够结合人 FAP; 和/或

(c) 能够结合犬 FAP; 和/或

(d) 能够结合鼠 FAP; 和/或

(e) 能够结合人、犬、和鼠 FAP; 和/或

(f) 进一步包括铰链结构域, 其中所述铰链结构域包括 CD8 α 的铰链结构域。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的CAR, 其中所述跨膜结构域:

(a) 选自人工疏水序列, 和 I 型跨膜蛋白、T 细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、OX40 (CD134)、4-1BB (CD137)、ICOS (CD278) 和 CD154 的跨膜结构域, 或源自杀伤免疫球蛋白样受体 (KIR) 的跨膜结构域; 和/或

(b) 包括 CD8 的跨膜结构域; 和/或

(c) 包括 CD8 α 的跨膜结构域; 和/或

(d) 包括源自杀伤免疫球蛋白样受体 (KIR) 的跨膜结构域。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的CAR, 其中所述胞内结构域:

(a) 包括共刺激信号传导结构域和胞内信号传导结构域; 和/或

(b) 包括选自 TNFR 超家族中蛋白质的蛋白质、CD28、4-1BB (CD137)、OX40 (CD134)、PD-1、CD7、LIGHT、CD83L、DAP10、DAP12、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、ICOS (CD278)、NKG2C 和 B7-H3 (CD276) 的共刺激结构域中的一种或多种, 或其变

体,或源自杀伤免疫球蛋白样受体(KIR)的胞内结构域;和/或

(c) 包括4-1BB的共刺激结构域;和/或

(d) 包括DAP12的共刺激结构域;和/或

(e) 包括CD28的共刺激结构域;和/或

(f) 包括4-1BB的共刺激结构域和CD28的共刺激结构域;和/或

(g) 包括DAP12的共刺激结构域和CD28的共刺激结构域;和/或

(h) 包括胞内结构域,所述胞内结构域选自:人CD3 ζ 链(CD3 ζ)、Fc γ RIII、Fc γ RI、Fc受体的胞质尾、携带基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)的胞质受体、TCR ζ 、FcR γ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的胞质信号传导结构域,或其变体;和/或

(i) 所述胞内信号传导结构域包括CD3 ζ 的胞内结构域。

6. 能够结合成纤维细胞激活蛋白(FAP)的嵌合抗原受体(CAR),其包含与SEQ ID NO:23或25同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

7. 核酸,其包含编码根据权利要求1-6中任一项所述的CAR的多核苷酸序列。

8. 核酸,其包含编码能够结合FAP的嵌合抗原受体(CAR)的多核苷酸序列,所述嵌合抗原受体(CAR)包括抗原结合结构域、跨膜结构域、和胞内结构域,其中所述抗原结合结构域包括:

重链可变区,其包括三个重链互补决定区(HCDR),其中HCDR1包含氨基酸序列YTITSYSLH(SEQ ID NO:1),HCDR2包含氨基酸序列EINPANGDHNFSKFEIK(SEQ ID NO:2),并且HCDR3包含氨基酸序列LDDSRFHWFYFDV(SEQ ID NO:3);和

轻链可变区,其包括三个轻链互补决定区(LCDR),其中LCDR1包含氨基酸序列TASSSVSYMY(SEQ ID NO:4),LCDR2包含氨基酸序列LTSNLA(SEQ ID NO:5),并且LCDR3包含氨基酸序列QQWSGYPPIT(SEQ ID NO:6)。

9. 根据权利要求8所述的核酸,其中所述抗原结合结构域:

(a) 包括由与SEQ ID NO:8同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的多核苷酸序列编码的重链可变区;和/或

(b) 包括由与SEQ ID NO:10同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的多核苷酸序列编码的轻链可变区;和/或

(c) 包括由与SEQ ID NO:8同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的多核苷酸序列编码的重链可变区;和由与SEQ ID NO:10同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的多核苷酸序列编码的轻链可变区;和/或

(d) 包括由与SEQ ID NO:12或14同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的多核苷酸序列编码的单链可变片段(scFv)。

10. 根据权利要求8-9中任一项所述的核酸,其中:

(a) 所述跨膜结构域包括CD8 α 的跨膜结构域;和/或

(b) 所述胞内结构域包括共刺激信号传导结构域和胞内信号传导结构域;和/或

(c) 所述胞内结构域包括共刺激信号传导结构域,所述共刺激信号传导结构域包括4-1BB的共刺激结构域;和/或

(d) 所述胞内结构域包括DAP12的共刺激结构域;和/或

(e) 所述胞内结构域包括CD28的共刺激结构域;和/或

- (f) 所述胞内结构域包括4-1BB的共刺激结构域和CD28的共刺激结构域;和/或
(g) 所述胞内结构域包括DAP12的共刺激结构域和CD28的共刺激结构域;和/或
(h) 所述胞内信号传导结构域包括CD3 ζ 的胞内结构域。

11. 核酸,其包含与SEQ ID NO:22或24同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的多核苷酸序列。

12. 载体,其包含根据权利要求8-11中任一项所述的核酸。

13. 根据权利要求12所述的载体,其中所述载体是表达载体和/或所述载体选自DNA载体、RNA载体、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、和逆转录病毒载体。

14. 修饰的免疫细胞或其前体细胞,其包含根据权利要求1-7中任一项所述的CAR、根据权利要求8-11中任一项所述的核酸、或根据权利要求12-13中任一项所述的载体。

15. 修饰的免疫细胞或其前体细胞,其包含能够结合成纤维细胞激活蛋白 (FAP) 的嵌合抗原受体 (CAR),其中所述CAR包括:

重链可变区,其包括三个重链互补决定区 (HCDR),其中HCDR1包含氨基酸序列YTITSYSLH (SEQ ID NO:1),HCDR2包含氨基酸序列EINPANGDHNFSKFEIK (SEQ ID NO:2),并且HCDR3包含氨基酸序列LDDSRFHWFYFDV (SEQ ID NO:3);和

轻链可变区,其包括三个轻链互补决定区 (LCDR),其中LCDR1包含氨基酸序列TASSSVSYMY (SEQ ID NO:4),LCDR2包含氨基酸序列LTSNLA (SEQ ID NO:5),并且LCDR3包含氨基酸序列QQWSGYPPIT (SEQ ID NO:6)。

16. 根据权利要求15所述的修饰的免疫细胞,其中所述CAR包括:

(a) 重链可变区,其包含与SEQ ID NO:7同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;和

轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:9同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;和/或

(b) 单链可变片段 (scFv),其包含与SEQ ID NO:11或13同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;和/或

(c) 与SEQ ID NO:23或25同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

17. 根据权利要求14-16中任一项所述的修饰的细胞,其中所述CAR:

(a) 能够结合FAP;和/或

(b) 能够结合人FAP;和/或

(c) 能够结合犬FAP;和/或

(d) 能够结合小鼠FAP;和/或

(e) 能够结合人、犬、和小鼠FAP。

18. 根据权利要求14-17中任一项所述的修饰的细胞,其中所述修饰的细胞:

(a) 是修饰的T细胞;和/或

(b) 是修饰的NK细胞;和/或

(c) 是自体细胞;和/或

(d) 是从人对象获得的自体细胞;和/或

(e) 是从犬对象获得的自体细胞;和/或

(f) 是同种异体细胞。

19. 药物组合物,其包含治疗有效量的根据权利要求14-18中任一项所述的修饰的细胞,和药学上可接受的赋形剂。

20. 治疗对其需要的对象中的疾病的方法,包括向所述对象施用有效量的根据权利要求14-18中任一项所述的修饰的细胞,或根据权利要求19所述的药物组合物。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中

(a) 所述疾病选自免疫性疾病、血液疾病、自身免疫性疾病、纤维化、和癌症;和/或

(b) 所述疾病是癌症;和/或

(c) 所述疾病是心脏纤维化;和/或

(d) 所述疾病是癌症,并且所述癌症包括表达FAP的癌症相关细胞。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中

(a) 所述表达FAP的癌症相关细胞是癌症相关成纤维细胞(CAF);和/或

(b) 所述表达FAP的癌症相关细胞是表达FAP的脂肪细胞;和/或

(c) 所述表达FAP的癌症相关细胞是肿瘤相关巨噬细胞(TAM);和/或

(d) 所述表达FAP的癌症相关细胞是肿瘤相关嗜中性粒细胞(TAN);和/或

(e) 所述表达FAP的癌症相关细胞是骨髓来源抑制细胞(MDSC);和/或

(f) 所述表达FAP的癌症相关细胞是癌症起始细胞。

23. 治疗对其需要的对象中的癌症的方法,包括向所述对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体(CAR)的修饰的免疫细胞,其中所述CAR包括:

重链可变区,其包含与SEQ ID NO:7同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;和

轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:9同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;

其中所述癌症包含表达成纤维细胞激活蛋白(FAP)的癌症相关细胞。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中所述CAR结合表达FAP的癌症相关细胞而不结合不表达FAP的细胞。

25. 治疗对其需要的对象中的癌症的方法,其中所述癌症与表达成纤维细胞激活蛋白(FAP)的癌症相关成纤维细胞相关,所述方法包括向所述对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体(CAR)的修饰的T细胞,其中所述CAR包括:

重链可变区,其包含与SEQ ID NO:7同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;和

轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:9同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

26. 治疗对其需要的对象中的癌症的方法,其中所述癌症与表达成纤维细胞激活蛋白(FAP)的癌症相关巨噬细胞相关,所述方法包括向所述对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体(CAR)的修饰的T细胞,其中所述CAR包括:

重链可变区,其包含与SEQ ID NO:7同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;和

轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:9同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、

98%、99%、或100%的氨基酸序列。

27. 治疗对其需要的对象中的癌症的方法,其中所述癌症与表达成纤维细胞激活蛋白(FAP)的癌症相关嗜中性粒细胞相关,所述方法包括向所述对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体(CAR)的修饰的T细胞,其中所述CAR包括:

重链可变区,其包含与SEQ ID NO:7同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;和

轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:9同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

28. 治疗对其需要的对象中的癌症的方法,其中所述癌症与表达成纤维细胞激活蛋白(FAP)的癌症相关成纤维细胞相关,所述方法包括向所述对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体(CAR)的修饰的T细胞,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:23或25同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

29. 治疗对其需要的对象中的癌症的方法,其中所述癌症与表达成纤维细胞激活蛋白(FAP)的癌症相关巨噬细胞相关,所述方法包括向所述对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体(CAR)的修饰的T细胞,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:23或25同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

30. 治疗对其需要的对象中的癌症的方法,其中所述癌症与表达成纤维细胞激活蛋白(FAP)的癌症相关嗜中性粒细胞相关,所述方法包括向所述对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体(CAR)的修饰的T细胞,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:23或25同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

31. 治疗对其需要的对象中的实体肿瘤的方法,其中所述肿瘤与表达成纤维细胞激活蛋白(FAP)的癌症相关成纤维细胞相关,所述方法包括向所述对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体(CAR)的修饰的T细胞,其中所述CAR包括:

重链可变区,其包含与SEQ ID NO:7同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;和

轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:9同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

32. 治疗对其需要的对象中的实体肿瘤的方法,其中所述肿瘤与表达成纤维细胞激活蛋白(FAP)的癌症相关巨噬细胞相关,所述方法包括向所述对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体(CAR)的修饰的T细胞,其中所述CAR包括:

重链可变区,其包含与SEQ ID NO:7同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;和

轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:9同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

33. 治疗对其需要的对象中的实体肿瘤的方法,其中所述肿瘤与表达成纤维细胞激活蛋白(FAP)的癌症相关嗜中性粒细胞相关,所述方法包括向所述对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体(CAR)的修饰的T细胞,其中所述CAR包括:

重链可变区,其包含与SEQ ID NO:7同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;和

轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:9同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

34.根据权利要求20-33中任一项所述的方法,还包括施用免疫检查点抑制剂、肿瘤抗原疫苗、或赘生性细胞靶向疗法。

35.根据权利要求20-34中任一项所述的方法,其中所述对象是人。

36.根据权利要求20-35中任一项所述的方法,其中所述对象是非人动物。

通过靶向成纤维细胞激活蛋白 (FAP) 使肿瘤组织破裂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35 U.S.C. §119 (e) 有权要求2019年9月23日提交的美国临时专利申请号62/904,340的优先权,其特此通过引用以其全部内容并入。

[0003] 关于联邦资助的研究或开发的声明

[0004] 本发明是在美国国立卫生研究院授予的授权号CA172921和CA217805下通过政府支持完成的。政府对本发明享有一定的权利。

背景技术

[0005] 肿瘤由异质细胞群构成,包括转化细胞和大量未转化细胞。尽管不同细胞类型的流行性因肿瘤和肿瘤进展的不同阶段而异,但它们包括浸润性炎症和免疫细胞、内皮细胞和间充质来源的平滑肌细胞、周细胞、和肿瘤相关成纤维细胞 (TAF)。TAF是一种异质群体,可以在表型上与正常成纤维细胞区分开来。成纤维细胞激活蛋白 (FAP) 已成为肿瘤以及肉芽组织中和纤维变性病变中反应性成纤维细胞的标志物。

[0006] FAP是一种II型跨膜细胞表面蛋白,属于后脯氨酸二肽基氨基肽酶家族,与二肽基氨基肽酶IV (DPPIV/CD26) 具有最高的相似性。FAP在超过90%的人上皮癌中由TAF和周细胞选择性表达。它还在胚胎发育过程中、伤口愈合组织中、和慢性炎症与纤维变性状况 (如肝硬化和特发性肺纤维化) 中以及骨和软组织肉瘤和某些黑素瘤上表达。然而,在良性病变或正常成人组织中检测不到FAP的表达,而DPPIV在多种细胞类型中更广泛地表达。体外研究表明,FAP具有二肽基氨基肽酶和氨基肽酶活性,包括能够降解明胶和I型胶原蛋白的胶原分解活性,但它的体内底物 (一种或多种) 尚未确定。

[0007] 本领域需要开发通过直接靶向由肿瘤相关细胞表达的FAP来治疗癌症的疗法。本发明解决了这种需要。

发明内容

[0008] 如本文所述,本发明涉及包含能够结合成纤维细胞激活蛋白 (FAP) 的嵌合抗原受体 (CAR) 的组合物和方法,其用于治疗与FAP在犬、小鼠、或人肿瘤相关细胞上的表达相关的疾病、障碍或状况。

[0009] 一方面,本发明提供了嵌合抗原受体 (CAR),其包括能够结合成纤维细胞激活蛋白 (FAP) 的抗原结合结构域、跨膜结构域、和胞内结构域。抗原结合结构域包括:重链可变区,其包括三个重链互补决定区 (HCDR),其中HCDR1包含氨基酸序列YTITSYSLH (SEQ ID NO:1),HCDR2包含氨基酸序列EINPANGDHNHFSEKFEIK (SEQ ID NO:2),并且HCDR3包含氨基酸序列LDDSRFHWFYFDV (SEQ ID NO:3);和轻链可变区,其包括三个轻链互补决定区 (LCDR),其中LCDR1包含氨基酸序列TASSSVSYMY (SEQ ID NO:4),LCDR2包含氨基酸序列LTSNLA (SEQ ID NO:5),并且LCDR3包含氨基酸序列QQWSGYPPIT (SEQ ID NO:6)。

[0010] 在某些实施方式中,抗原结合结构域包括:(a) 重链可变区,其包含与SEQ ID NO:7同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;和/或

(b) 轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:9同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;和/或(c)重链可变区,其包含与SEQ ID NO:7同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;和轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:9同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;和/或(d)选自全长抗体或其抗原结合片段、Fab、单链可变片段(scFv)、或单链结构域抗体的抗原结合结构域;和/或(e)单链可变片段(scFv),其包含与SEQ ID NO:11或13同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0011] 在某些实施方式中,CAR:(a)能够结合成纤维细胞激活蛋白(FAP);和/或(b)能够结合人FAP;和/或(c)能够结合犬FAP;和/或(d)能够结合鼠FAP;和/或(e)能够结合人、犬、和鼠FAP;和/或(f)进一步包括铰链结构域,其中铰链结构域包括CD8 α 的铰链结构域。

[0012] 在某些实施方式中,跨膜结构域:(a)选自人工疏水序列,和I型跨膜蛋白、T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、OX40(CD134)、4-1BB(CD137)、ICOS(CD278)和CD154的跨膜结构域,或源自杀伤免疫球蛋白样受体(KIR)的跨膜结构域;和/或(b)包括CD8的跨膜结构域;和/或(c)包括CD8 α 的跨膜结构域;和/或(d)包括源自杀伤免疫球蛋白样受体(KIR)的跨膜结构域。

[0013] 在某些实施方式中,胞内结构域:(a)包括共刺激信号传导结构域和胞内信号传导结构域;和/或(b)包括选自TNFR超家族中蛋白质的蛋白质、CD28、4-1BB(CD137)、OX40(CD134)、PD-1、CD7、LIGHT、CD83L、DAP10、DAP12、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、ICOS(CD278)、NKG2C和B7-H3(CD276)的共刺激结构域中的一种或多种,或其变体,或源自杀伤免疫球蛋白样受体(KIR)的胞内结构域;和/或(c)包括4-1BB的共刺激结构域;和/或(d)包括DAP12的共刺激结构域;和/或(e)包括CD28的共刺激结构域;和/或(f)包括4-1BB的共刺激结构域和CD28的共刺激结构域;和/或(g)包括DAP12的共刺激结构域和CD28的共刺激结构域;和/或(h)包括胞内结构域,所述胞内结构域选自:人CD3 ζ 链(CD3 ζ)、Fc γ RIII、Fc γ RI、Fc受体的胞质尾、携带基于免疫受体酪氨酸的激活基序(immunoreceptor tyrosine-base activation motif)(ITAM)的胞质受体、TCR ζ 、FcR γ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的胞质信号传导结构域,或其变体;和/或(i)胞内信号传导结构域包括CD3 ζ 的胞内结构域。

[0014] 另一方面,本发明提供了能够结合成纤维细胞激活蛋白(FAP)的嵌合抗原受体(CAR),其包含与SEQ ID NO:23或25同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0015] 另一方面,本发明提供了核酸,其包含编码本文所考虑的任意CAR的多核苷酸序列。

[0016] 另一方面,本发明提供了核酸,其包含编码能够结合FAP的嵌合抗原受体(CAR)的多核苷酸序列,所述嵌合抗原受体(CAR)包括抗原结合结构域、跨膜结构域、和胞内结构域,其中抗原结合结构域包括:重链可变区,其包括三个重链互补决定区(HCDR),其中HCDR1包含氨基酸序列YTITSYSLH(SEQ ID NO:1),HCDR2包含氨基酸序列EINPANGDHNFSKFEIK(SEQ ID NO:2),并且HCDR3包含氨基酸序列LDDSRFHWFYFDV(SEQ ID NO:3);和轻链可变区,其包括三个轻链互补决定区(LCDR),其中LCDR1包含氨基酸序列TASSSVSYMY(SEQ ID NO:4),LCDR2包含氨基酸序列LTSNLA(SEQ ID NO:5),并且LCDR3包含氨基酸序列QQWSGYPPIT(SEQ ID

NO:6)。

[0017] 在某些实施方式中,抗原结合结构域:(a)包括由与SEQ ID NO:8同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的多核苷酸序列编码的重链可变区;和/或(b)包括由与SEQ ID NO:10同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的多核苷酸序列编码的轻链可变区;和/或(c)包括由与SEQ ID NO:8同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的多核苷酸序列编码的重链可变区;和由与SEQ ID NO:10同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的多核苷酸序列编码的轻链可变区;和/或(d)包括由与SEQ ID NO:12或14同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的多核苷酸序列编码的单链可变片段(scFv)。

[0018] 在某些实施方式中,(a)跨膜结构域包括CD8 α 的跨膜结构域;和/或(b)胞内结构域包括共刺激信号传导结构域和胞内信号传导结构域;和/或(c)胞内结构域包括共刺激信号传导结构域,所述共刺激信号传导结构域包括4-1BB的共刺激结构域;和/或(d)胞内结构域包括DAP12的共刺激结构域;和/或(e)胞内结构域包括CD28的共刺激结构域;和/或(f)胞内结构域包括4-1BB的共刺激结构域和CD28的共刺激结构域;和/或(g)胞内结构域包括DAP12的共刺激结构域和CD28的共刺激结构域;和/或(h)胞内信号传导结构域包括CD3 ζ 的胞内结构域。

[0019] 另一方面,本发明提供了核酸,其包含与SEQ ID NO:22或24同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的多核苷酸序列。

[0020] 另一方面,本发明提供了包含本文所考虑的任意核酸的载体。在某些实施方式中,载体是表达载体和/或载体选自DNA载体、RNA载体、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、和逆转录病毒载体。

[0021] 另一方面,本发明提供了修饰的免疫细胞或其前体细胞,其包含本文所考虑的任意CAR、任意核酸、或任意载体。

[0022] 另一方面,本发明提供了修饰的免疫细胞或其前体细胞,其包含能够结合成纤维细胞激活蛋白(FAP)的嵌合抗原受体(CAR),其中CAR包括:重链可变区,其包括三个重链互补决定区(HCDR),其中HCDR1包含氨基酸序列YTITSYSLH(SEQ ID NO:1),HCDR2包含氨基酸序列EINPANGDHNHFSEKFEIK(SEQ ID NO:2),并且HCDR3包含氨基酸序列LDDSRFHWFYFDV(SEQ ID NO:3);和轻链可变区,其包括三个轻链互补决定区(LCDR),其中LCDR1包含氨基酸序列TASSSVSYMY(SEQ ID NO:4),LCDR2包含氨基酸序列LTSNLA(SEQ ID NO:5),并且LCDR3包含氨基酸序列QQWSGYPPIT(SEQ ID NO:6)。

[0023] 在某些实施方式中,CAR包括:(a)重链可变区,其包含与SEQ ID NO:7同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;和轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:9同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;和/或(b)单链可变片段(scFv),其包含与SEQ ID NO:11或13同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;和/或(c)与SEQ ID NO:23或25同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0024] 在某些实施方式中,CAR:(a)能够结合FAP;和/或(b)能够结合人FAP;和/或(c)能够结合犬FAP;和/或(d)能够结合小鼠FAP;和/或(e)能够结合人、犬、和小鼠FAP。

[0025] 在某些实施方式中,修饰的细胞:(a)是修饰的T细胞;和/或(b)是修饰的NK细胞;和/或(c)是自体细胞;和/或(d)是从人对象获得的自体细胞;和/或(e)是从犬对象获得的自体细胞;和/或(f)是同种异体细胞。

[0026] 另一方面,本发明提供了药物组合物,其包含治疗有效量的本文所考虑的任意修饰的细胞,和药学上可接受的赋形剂。

[0027] 另一方面,本发明提供了治疗对其需要的对象中的疾病的方法,包括向对象施用有效量的任意修饰的细胞,或所考虑的任意药物组合物。

[0028] 在某些实施方式中,(a)疾病选自免疫性疾病、血液疾病、自身免疫性疾病、纤维化、和癌症;和/或(b)疾病是癌症;和/或(c)疾病是心脏纤维化;和/或(d)疾病是癌症,并且癌症包括表达FAP的癌症相关细胞。

[0029] 在某些实施方式中,(a)表达FAP的癌症相关细胞是癌症相关成纤维细胞(CAF);和/或(b)表达FAP的癌症相关细胞是表达FAP的脂肪细胞;和/或(c)表达FAP的癌症相关细胞是肿瘤相关巨噬细胞(TAM);和/或(d)表达FAP的癌症相关细胞是肿瘤相关嗜中性粒细胞(TAN);和/或(e)表达FAP的癌症相关细胞是骨髓来源抑制细胞(MDSC);和/或(f)表达FAP的癌症相关细胞是癌症起始细胞。

[0030] 另一方面,本发明提供了治疗对其需要的对象中的癌症的方法,包括向对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体(CAR)的修饰的免疫细胞,其中CAR包括:重链可变区,其包含与SEQ ID NO:7同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;和轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:9同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;其中癌症包含表达成纤维细胞激活蛋白(FAP)的癌症相关细胞。

[0031] 在某些实施方式中,CAR结合表达FAP的癌症相关细胞而不结合不表达FAP的细胞。

[0032] 另一方面,本发明提供了治疗对其需要的对象中的癌症的方法,其中癌症与表达成纤维细胞激活蛋白(FAP)的癌症相关成纤维细胞相关。方法包括向对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体(CAR)的修饰的T细胞,其中CAR包括:重链可变区,其包含与SEQ ID NO:7同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;和轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:9同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0033] 另一方面,本发明提供了治疗对其需要的对象中的癌症的方法,其中癌症与表达成纤维细胞激活蛋白(FAP)的癌症相关巨噬细胞相关。方法包括向对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体(CAR)的修饰的T细胞,其中CAR包括:重链可变区,其包含与SEQ ID NO:7同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;和轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:9同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0034] 另一方面,本发明提供了治疗对其需要的对象中的癌症的方法,其中癌症与表达成纤维细胞激活蛋白(FAP)的癌症相关嗜中性粒细胞相关。方法包括向对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体(CAR)的修饰的T细胞,其中CAR包括:重链可变区,其包含与SEQ ID NO:7同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;和轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:9同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、

97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0035] 另一方面,本发明提供了治疗对其需要的对象中的癌症的方法,其中癌症与表达成纤维细胞激活蛋白(FAP)的癌症相关成纤维细胞相关。方法包括向对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体(CAR)的修饰的T细胞,其中CAR包含与SEQ ID NO:23或25同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0036] 另一方面,本发明提供了治疗对其需要的对象中的癌症的方法,其中癌症与表达成纤维细胞激活蛋白(FAP)的癌症相关巨噬细胞相关。方法包括向对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体(CAR)的修饰的T细胞,其中CAR包含与SEQ ID NO:23或25同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0037] 另一方面,本发明提供了治疗对其需要的对象中的癌症的方法,其中癌症与表达成纤维细胞激活蛋白(FAP)的癌症相关嗜中性粒细胞相关。方法包括向对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体(CAR)的修饰的T细胞,其中CAR包含与SEQ ID NO:23或25同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0038] 另一方面,本发明提供了治疗对其需要的对象中的实体肿瘤的方法,其中肿瘤与表达成纤维细胞激活蛋白(FAP)的癌症相关成纤维细胞相关。方法包括向对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体(CAR)的修饰的T细胞,其中CAR包括:重链可变区,其包含与SEQ ID NO:7同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;和轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:9同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0039] 另一方面,本发明提供了治疗对其需要的对象中的实体肿瘤的方法,其中肿瘤与表达成纤维细胞激活蛋白(FAP)的癌症相关巨噬细胞相关,包括向对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体(CAR)的修饰的T细胞,其中CAR包括:重链可变区,其包含与SEQ ID NO:7同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;和轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:9同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0040] 另一方面,本发明提供了治疗对其需要的对象中的实体肿瘤的方法,其中肿瘤与表达成纤维细胞激活蛋白(FAP)的癌症相关中性粒细胞相关,包括向对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体(CAR)的修饰的T细胞,其中CAR包括:重链可变区,其包含与SEQ ID NO:7同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;和轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:9同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0041] 在某些实施方式中,方法还包括施用免疫检查点抑制剂、肿瘤抗原疫苗、或赘生性细胞(neoplastic cell)靶向疗法。

[0042] 在某些实施方式中,对象是人。在某些实施方式中,对象是非人动物。

附图说明

[0043] 当结合附图阅读时,以下对本发明优选实施方式的详细描述将得到更好理解。以示例本发明为目的,附图中显示了目前优选的实施方式。然而,应理解,本发明不限于附图中所示的实施方式的确切安排和手段。

[0044] 图1是NCBI (XM_005640252.2) 中列出的犬FAP基因序列与使用该NCBI序列产生的两个引物的PCR反应产物之间的序列比对。在核苷酸水平上,产物在T127和A603(右)处具有两个保守的碱基对取代。

[0045] 图2是展示重组犬FAP构建物在转导入BALB/c 3T3细胞后的表达的流式细胞术图。

[0046] 图3是展示产生克隆4G5抗FAP抗体的杂交瘤细胞的生成的流式细胞术图。犬FAP转导的BALB/c 3T3细胞用于免疫14周龄BALB/c小鼠。然后将脾细胞与sp2/0细胞融合,并针对PKH标记的MC KOSA亲本(FAP无效)和表达犬FAP转基因的MC KOSA.K9FAP细胞筛选所得的杂交瘤。一次染色由杂交瘤产生的抗体提供。使用山羊抗小鼠IgG二抗进行二次染色,之后通过流式细胞术读出。

[0047] 图4A-图4B是展示4G5犬FAP CD8H BB CD3Z CAR构建物(SEQ ID NO:22&SEQ ID NO:23)的HG2L版本的序列和特征的序列图。

[0048] 图5A-图5B是展示4G5犬FAP CD8H BB CD3Z CAR构建物(SEQ ID NO:24&SEQ ID NO:25)的L2HG版本的序列和特征的序列图。

[0049] 图6A-图6D是显示基于4G5的CAR T细胞在使用表达小鼠和犬FAP蛋白的细胞系作为靶标的共培养细胞毒性测定期间的体外功能的一系列图。用抗小鼠FAP 73.3抗体染色鼠3T3细胞以验证与用抗人FAP F19和小鼠IgG同种型对照的阴性对照染色相比FAP的表达(图6A)。测量细胞毒性和激活的测定采用靶细胞杀伤——通过发光测量(图6B),而IFN γ 产生通过ELISA测量(图6C)。通过使用MC KOSA细胞作为靶标,测量IFN γ 产生的类似共培养研究来评估犬FAP的识别(图6D)。

[0050] 图7A-图7E是显示FAP CAR T细胞在与FAP阴性HT1080靶细胞共培养后的体外功能的一系列图。在共培养24小时后,通过ELISA分析上清液,测定测量了标记的靶细胞的细胞毒性(图7A)和IFN γ 产生(图7B)。然后对HT1080细胞进行转导以表达高水平的重组人FAP(图7C)。这些细胞在随后与FAP CAR T细胞的体外共培养测定中被用作靶标。24小时后,通过发光评估靶细胞的细胞毒性(图7D)并通过ELISA评估IFN γ 产生(图7E)。这些研究中使用的T细胞群组包括未转导的对照T细胞(NTD)和作为对照的高亲和力F19 FAP CAR T细胞。“HL”和“LH”分别是指基于4G5的CAR的HG2L和2LHG版本。

[0051] 图8A-图8C是展示抗FAP CAR T细胞在与WI-38细胞的体外共培养测定中的细胞毒性功能的一系列图。WI-38细胞是表达中等水平的FAP蛋白(通过流式细胞术证明)的成纤维细胞细胞系(图8A)。采用靶细胞杀伤进行随后的细胞毒性测定——通过发光测量(图8B),而IFN γ 产生(图8C)被测量为读数。误差棒表示每组中重复样品之间的标准偏差。 $*p \leq 0.05$ 针对的是在2.5:1的效应物与靶标的比下,F19、HL和LH CAR vs. NTD对照细胞(图8B)和F19 vs. LH与LH vs. HL细胞(图8C)。INS表示在HL和NTD组中,在所有的效应物与靶标的比下均未测量到显著的细胞因子。

[0052] 图9A-图9C是展示表达抗FAP CAR的T细胞在使用表达低FAP的HOS细胞作为靶标的体外测定中的细胞毒性功能的一系列图。FAP表达的流式细胞术验证了这些细胞的FAP蛋白的低表面表达(图9A)。这些靶细胞随后用于与各种抗FAP CAR T细胞或未转导的对照T细胞(NTD)的体外共培养细胞毒性功能测定。在共培养24小时后通过发光评估标记的靶细胞的细胞毒性(图9B),并通过上清液的ELISA评估T细胞产生的IFN γ (图9C)。误差棒表示每个实验组中,在各个效应物与靶标的比下的重复样品之间的标准偏差。 $*p \leq 0.05$ 针对的是在20:

1的效应物与靶标的比下,F19 CAR T细胞vs.HL与LH基于4G5的CAR T细胞。“NS”表示在相同的效应物与靶标的比下,HL和LH CAR T细胞之间无统计学差异。

[0053] 图10是显示肿瘤组织细胞即CD90+FAP+肿瘤相关成纤维细胞的百分比的一系列图。A549细胞被植入NSG小鼠体内并生长14天,然后被切除、分离和染色。细胞最初关于CD45阴性细胞进行门控(左图)。对CD90+/FAP+细胞进行门控示出了肿瘤相关成纤维细胞的百分比(中图)。测定了相比同种型对照(左图)的门控。

[0054] 图11A-图11B是显示在NSG小鼠中建立并用2000万个激活的、未转导的对照T细胞“NTD”、1000万个表达73.3抗FAP scFv“73.3”的CAR T细胞、1000万个表达HGL2 4G5CAR的T细胞“HL”、1000万个表达L2HG 4G5 CAR的T细胞“LH”、或PBS媒介物对照“PBS”的过继转移所处理的A549肿瘤生长的图。在实验期间,在所指示的时间点评估肿瘤体积(图11A)。17或18天后,收获肿瘤并称量(图11B)。误差棒表示每个实验组中动物之间的标准偏差。 $p < 0.0423$ 关于与未转导的对照组相比的HL和LH 4G5FAP CAR组(图11A)。 $*p \leq 0.05$ 关于HL、LH和表达73.3的CAR T细胞vs未转导的(NTD)对照T细胞(图11B)。

[0055] 图12是显示在体外,表达HL-4G5 CAR的NK细胞的细胞毒能力的图。NK-92NK细胞系的细胞经转导以表达4G5FAP CAR,然后用于通过与标记的人癌症相关成纤维细胞共培养体进行外杀伤测定。未转导的NK92细胞被用作对照细胞。以所指示的效应物与靶标的比将工程改造的和对照NK92细胞与靶成纤维细胞一起孵育。误差棒表示每个实验组在每个时间点的重复孔之间的标准偏差。

[0056] 图13是显示动物实验的结果的图,示出了表达HL-4G5 CAR的NK细胞的活性。在第1天对携带已建立的人SSC15(头颈癌)肿瘤的小鼠注射2000万个FAPCAR-NK92细胞,并在第4、8、11和14天用1000万个细胞进行加强。在第18天处死小鼠并对肿瘤称重。注射了FAPCAR-NK92细胞的小鼠的肿瘤明显小于未处理的肿瘤。

具体实施方式

[0057] 本发明提供了用于修饰的免疫细胞或其前体(例如,修饰的T细胞)的组合物和方法,其包含能够结合人成纤维细胞激活蛋白(FAP)的嵌合抗原受体(CAR)。所提供的组合物和方法可用于治疗免疫性疾病、血液疾病、自身免疫性疾病、纤维化(例如,心脏纤维化)和/或癌症。

[0058] 应当理解,本公开中描述的方法不限于本文公开的特定方法和实验条件,因此这样的方法和条件可以变化。还应理解,本文采用的术语学仅出于描述特定实施方式的目的,而不意图是限制性的。

[0059] 此外,除非另有指示,否则本文描述的实验使用本领域技术范围内的常规的分子和细胞生物学和免疫学技术。这样的技术对于熟练的技术人员来说是公知的,并且在文献中充分地说明。参见,例如,Ausubel等人著,Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, Inc., NY, N.Y. (1987-2008) (包括所有增刊)、MR Green和J.Sambrook的Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第四版)、以及Harlow等人, Antibodies: A Laboratory Manual, Chapter 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (2013, 第2版)。

[0060] A. 定义

[0061] 除非另外定义,否则本文使用的技术和科学术语都具有与本领域普通技术人员的通常理解相同的含义。在有任何潜在模棱两可的情况下,本文提供的定义优先于任何字典或外在的定义。除非上下文另有要求,否则单数术语应包括复数,并且复数术语应包括单数。除非另有说明,否则“或”的使用是指“和/或”。术语“包括(including)”以及诸如“包括(includes)”和“包括的(included)”之类的其它形式的使用不是限制性的。

[0062] 总体上,关于本文描述的细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学和蛋白质与核酸化学以及杂交所使用的命名法在本领域中是公知且常用的。除非另有说明,否则本文提供的方法和技术总体上是根据本领域公知并且如在整个本说明书中引用和讨论的各种一般的和更具体的参考文献中所述的常规方法进行的。酶促反应和纯化技术是根据制造商的说明书进行的,如本领域通常完成的或如本文所述的那样。关于本文描述的分析化学、合成有机化学以及药用和药物化学所使用的命名法,以及本文描述的分析化学、合成有机化学以及药用和药物化学的实验室程序和技术是本领域公知和常用的那些。标准技术用于化学合成、化学分析、药物制备、配制和递送以及患者的治疗。

[0063] 为了更容易理解本公开,选择的术语定义如下。还应理解,本文使用的术语学仅出于描述特定实施方式的目的,而不意图是限制性的。

[0064] 冠词“一个”和“一种”在本文中用于指代一个或多个(即,指代至少一个)该冠词的语法对象。举例来说,“一个元素”意为一个元素或多个元素。

[0065] 如本文所用,术语“约”或“大约”在数值之前表示该值加上或减去该值的10%的范围。

[0066] 如本文所用,“激活(活化,Activation)”指的是已经被充分地刺激以诱导可检测的细胞增殖的T细胞的状态。激活也可以与诱导的细胞因子产生和可检测的效应物功能相关联。术语“激活的T细胞”指的是正经历细胞分裂的T细胞等。

[0067] 如本文所用,“减轻”疾病是指降低疾病的一种或多种症状的严重性。

[0068] 如本文所用,术语“抗体”是指与抗原特异性结合的免疫球蛋白分子。抗体可以是源自天然来源或源自重组来源的完整免疫球蛋白,并且可以是完整免疫球蛋白的免疫反应部分。抗体一般是免疫球蛋白分子的四聚体。四聚体可以是天然存在的或由单链抗体或抗体片段重建。抗体还包括可以天然存在的或由单链抗体或抗体片段构建的二聚体。本发明中的抗体可以以多种形式存在,包括例如多克隆抗体、单克隆抗体、Fv、Fab和F(ab')₂以及单链抗体(scFv)、人源化抗体、和人抗体(Harlow等人,1999,In:Using Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,NY;Harlow等人,1989,In:Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor,New York;Houston等人,1988,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883;Bird等人,1988,Science 242:423-426)。

[0069] 术语“抗体片段”是指完整抗体的一部分,并且指代完整抗体的抗原决定可变区。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段、线性抗体、scFv抗体、单结构域抗体,例如骆驼(camelid)抗体(Riechmann,1999,Journal of Immunological Methods 231:25-38),由对靶标展现出足够亲和力的VL或VH结构域构成,以及由抗体片段形成的多特异性抗体。抗体片段还包括人抗体或人源化抗体或人抗体或人源化抗体的部分。

[0070] 如本文所用,“抗体重链”是指所有抗体分子其天然存在构象中存在的两种类型的多肽链中的较大者。

[0071] 如本文所用,“抗体轻链”是指所有抗体分子其天然存在构象中存在的两种类型的多肽链中的较小者。 κ 和 λ 轻链是指两个主要抗体轻链同种型。

[0072] 如本文所用,术语“合成抗体”是指利用重组DNA技术生成的抗体,如,例如,本文所述的由噬菌体表达的抗体。该术语还应被解释意为通过合成编码抗体的DNA分子(并且该DNA分子表达抗体蛋白质)或限定抗体的氨基酸序列而生成的抗体,其中该DNA或氨基酸序列已利用本领域可获得和公知的合成DNA或氨基酸序列技术获得。

[0073] 如本文所用,术语“抗原”或“Ag”被定义为引起免疫应答的分子。这种免疫应答可涉及抗体产生,或特定免疫学感受态细胞的激活,或两者兼之。本领域技术人员将会理解,任何大分子,包括基本上所有蛋白质或肽,都可充当抗原。此外,抗原可以来源于重组DNA或基因组DNA。技术人员将会理解,包含编码引起免疫应答的蛋白质的核苷酸序列或部分核苷酸序列的任何DNA因此编码如本文所用的术语“抗原”。此外,本领域技术人员将理解,抗原无需纯粹地由基因的全长核苷酸序列编码。显而易见,本发明包括但不限于使用多于一个基因的部分核苷酸序列,并且这些核苷酸序列以引起期望的免疫应答的各种组合排列。而且,技术人员将理解抗原完全无需由“基因”编码。显而易见,抗原可以被合成生成或可以源自生物样品。这种生物样品可以包括但不限于组织样品、肿瘤样品、细胞或生物流体。

[0074] 如本文所用的术语“抗肿瘤效果”是指可以通过肿瘤体积减小、肿瘤细胞数量减少、转移数量减少、预期寿命增加、或与癌性状况相关的各种生理症状减轻而展现的生物学效果。“抗肿瘤效果”还可以通过本发明的肽、多核苷酸、细胞和抗体预防肿瘤最初发生的能力而展现。

[0075] 如本文所用,术语,“自体的”意指源自同一个体的任何物质,其随后被再引入该个体。

[0076] “同种异体的”指的是源自同一物种的不同动物的移植体。

[0077] 如本文所用的术语“癌症”被定义为以异常细胞快速且不受控生长为特征性疾病。癌细胞可以局部扩散或通过血流和淋巴系统扩散到身体的其它部位。各种癌症的实例包括但不限于乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、胰腺癌、结直肠癌、肾癌、肝癌、脑癌、淋巴瘤、白血病、肺癌等。在某些实施方式中,癌症是甲状腺髓样癌。

[0078] 如本文所用,术语“保守序列修饰”意图指代不显著影响或改变含有该氨基酸序列的抗体的结合特征的氨基酸修饰。这种保守修饰包括氨基酸取代、添加和删除。修饰可以通过本领域已知的标准技术,如定点诱变和PCR介导的诱变,被引入本发明的抗体中。保守氨基酸取代是氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基置换的氨基酸取代。具有相似侧链的氨基酸残基家族在本领域中已被定义。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电的极性侧链的氨基酸(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、具有 β -分支侧链的氨基酸(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳族侧链的氨基酸(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,本发明的抗体的CDR区内的一个或多个氨基酸残基可以被来自同一侧链家族的其它氨基酸残基置换,并且可以利用本文描述的功能试验来测试改变后的抗体的FAP结合能力。

[0079] 如本文使用的术语“共刺激配体”包括抗原呈递细胞(例如,aAPC、树突状细胞、B细

胞等)上的这样的分子:特异性结合T细胞上的同源共刺激分子,从而除通过例如将TCR/CD3复合物与使用肽负载的MHC分子结合提供的初级信号之外,还提供介导T细胞应答——包括但不限于增殖、激活、分化等——的信号。共刺激配体可以包括但不限于CD7、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、诱导型共刺激配体 (ICOS-L)、细胞间粘附分子 (ICAM)、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB、HVEM、淋巴毒素 β 受体、3/TR6、ILT3、ILT4、HVEM、结合Toll配体受体和与B7-H3特异性结合的配体的激动剂或抗体。共刺激配体还包括与存在于T细胞上的共刺激分子特异性结合的抗体等,如但不限于CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、和与CD83特异性结合的配体。

[0080] “共刺激分子”是指与共刺激配体特异性地结合从而介导通过T细胞的共刺激应答——诸如但不限于增殖——的T细胞上的同源结合配偶体。共刺激分子包括但不限于MHC I类分子、BTLA和Toll配体受体。

[0081] 如本文所用的术语“下调”是指减少或消除一个或多个基因的基因表达。

[0082] 当在FAP的表达或活性水平的背景下使用时,术语“失调的”是指与在其它方面相同的健康动物、生物体、组织、细胞或其组分中的表达水平或活性所不同的FAP表达或活性水平。术语“失调的”还指与在其它方面相同的健康动物、生物体、组织、细胞或其组分中的调节相比发生改变的FAP表达和活性水平的调节。

[0083] “有效量”或“治疗有效量”在本文中可互换使用,并且是指如本文所述有效实现特定生物学结果或提供治疗或预防益处的化合物、制剂、材料、或组合物的量。这样的结果可以包括但不限于当施用于哺乳动物时与在不存在本发明组合物的情况下检测到的免疫应答相比,引起可检测水平的免疫抑制或耐受的量。免疫应答可以容易地通过大量本领域公认的方法进行评估。本领域技术人员会理解本文所施用的组合物的量是变化的,并且可以基于许多因素容易地确定,例如所治疗的疾病或状况、所治疗的哺乳动物的年龄和健康状况以及身体状况、疾病的严重程度、所施用的特定化合物等。

[0084] “编码”是指多核苷酸如基因、cDNA或mRNA中的具体核苷酸序列充当用于合成生物过程中具有限定的核苷酸(即,rRNA、tRNA和mRNA)序列或限定的氨基酸序列的其它多聚体和大分子的模板的固有性质以及由此产生的生物学性质。因此,基因编码蛋白质——如果对应于该基因的mRNA的转录和翻译在细胞或其它生物系统中产生该蛋白质的话。用作基因或cDNA的转录模板的编码链(其核苷酸序列与mRNA序列相同并且通常被提供在序列表中)和非编码链都可以被称为编码该基因或cDNA的蛋白质或其它产物。除非另有说明,否则“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括彼此为简并形式且编码同一氨基酸序列的所有核苷酸序列。编码蛋白质的核苷酸序列和RNA可包括内含子。

[0085] 如本文所用,“内源”是指来自生物体、细胞、组织或系统内或在生物体、细胞、组织或系统内产生的任何物质。

[0086] 如本文所用的术语“表位”被定义为抗原上可引发免疫应答、诱导B和/或T细胞应答的小化学分子。抗原可以具有一个或多个表位。大多数抗原有许多表位;即,它们是多价的。通常,一个表位的大小约为10个氨基酸和/或糖。优选地,表位为约4-18个氨基酸,更优选约5-16个氨基酸,且甚至更优选6-14个氨基酸,更优选约7-12个,并且最优选约8-10个氨基酸。本领域技术人员认为,通常来说,整个三维结构而非该分子的具体线性序列才是抗

原特异性的主要标准,因此将一个表位与另一个表位区分开来。基于本公开,本发明中使用的肽可以是表位。

[0087] 如本文所用,术语“外源”是指从生物体、细胞、组织或系统外引入或在生物体、细胞、组织或系统外产生的任何物质。

[0088] 如本文所用,术语“扩大”是指数量增加,如T细胞数量增加。在一个实施方式中,离体扩大的T细胞的数量相对于原来存在于培养物中的数量增加。在另一实施方式中,离体扩大的T细胞的数量相对于培养物中的其它细胞类型增加。如本文所用,术语“离体”是指已经从活生物体(例如,人)移出并在该生物体外(例如,在培养皿、试管或生物反应器中)繁殖的细胞。

[0089] 如本文所用,术语“表达”被定义为特定核苷酸序列通过其启动子驱动的转录和/或翻译。

[0090] “表达载体”是指包含重组多核苷酸的载体,该重组多核苷酸包含与待表达的核苷酸序列可操作地连接的表达控制序列。表达载体包含充足的用于表达的顺式作用元件;用于表达的其它元件可以由宿主细胞提供或在体外表达系统中提供。表达载体包括本领域已知的所有那些表达载体,如包含该重组多核苷酸的粘粒、质粒(例如,裸露的或包含在脂质体中的)和病毒(例如,慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0091] 如本文所用,“同源的”是指两个多聚体分子之间,例如两个核酸分子之间——如两个DNA分子或两个RNA分子之间——或两个多肽分子之间的亚单位序列同一性。当两个分子中的亚单位位置均被同一单体亚单位占据时;例如,如果两个DNA分子中每一个中的一个位置均被腺嘌呤占据,则其在该位置处是同源的。两个序列之间的同源性是匹配或同源位置的数量的直接函数;例如,如果两个序列中的一半位置(例如,十个亚单位长度的多聚体中的五个位置)是同源的,则这两个序列是50%同源的;如果90%的位置(例如,10个中的9个)匹配或同源,则这两个序列是90%同源的。

[0092] “人源化”和“嵌合”形式的非人(例如,鼠)抗体是包含源自非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗体的其它抗原结合子序列)。就大部分而言,人源化抗体和嵌合抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的互补决定区(CDR)的残基被来自具有期望的特异性、亲和力和能力的非人物种(供体抗体)如小鼠、大鼠或兔的CDR的残基置换。在一些情况下,人免疫球蛋白的Fv框架区(FR)残基被相应的非人残基置换。此外,人源化抗体和嵌合抗体可以包含在受体抗体和导入的CDR或框架序列中均找不到的残基。这些修饰被进行以进一步改进和优化抗体性能。总体上,人源化抗体和嵌合抗体将包含基本上全部的至少一个可变结构域,一般两个可变结构域,其中全部或基本上全部CDR区对应于非人免疫球蛋白的CDR区,并且全部或基本上全部FR区是人免疫球蛋白序列的FR区。人源化抗体和嵌合抗体最佳地还将包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,一般是人免疫球蛋白的。世界卫生组织(WHO)国际非专有名称(INN)专家组定义了将非人衍生抗体视为“人源化”的要求。根据指南,候选抗体与人序列的比较应通过International Immunogenetics Information System® (IMGT®) DomainGapAlign工具(www.imgt.org)进行。此工具查询抗体种系可变区基因的IMGT®数据库,其中仅针对种系序列可变区外显子进行比对评分,因此从分析中省略了部分CDR3和J区。对于待“人源化”的抗体,除了“比其它物种更接近人”之外,最热门的“中选者(hit)”应

该是人,并且与人序列的同一性必须至少为85%,否则该抗体将被指定为是“嵌合的”。更多细节参见Jones等人,Nature,321:522-525,1986;Reichmann等人,Nature,332:323-329,1988;Presta,Curr.Op.Struct.Biol.,2:593-596,1992。

[0093] “全人”是指整个分子是人来源的或由与人形式抗体相同的氨基酸序列构成的免疫球蛋白,如抗体。

[0094] 如本文所用,“说明材料”包括可用于传达本发明组合和方法的有用性的出版物、记录、图、或任何其它表达介质。例如,本发明的试剂盒的说明材料可以例如被附于含有本发明的核酸、肽、和/或组合物的容器,或者与含有核酸、肽、和/或组合物的容器一起装运。可选地,说明材料可以与容器分开装运,目的是说明材料和化合物被接受者配合地使用。

[0095] 如本文所用的“同一性”是指两个多聚体分子之间,特别是两个氨基酸分子之间,如两个多肽分子之间的亚单位序列同一性。当两个氨基酸序列在相同位置处具有相同的残基时;例如,如果两个多肽分子中的每一个中的一个位置被精氨酸占据,则其在该位置处具有同一性。同一性或在比对中两个氨基酸序列在相同位置处具有相同残基的程度通常以百分比表示。两个氨基酸序列之间的同一性是匹配或同一位置数量的直接函数;例如,如果两个序列中一半位置(例如,10个氨基酸长度的多聚体中的5个位置)相同,则两个序列具有50%同一性;如果90%的位置(例如,10个中的9个)匹配或相同,则两个氨基酸序列具有90%同一性。

[0096] 如本文所用,术语“免疫应答”被定义为在淋巴细胞将抗原分子识别为外源并引起抗体形成和/或激活淋巴细胞以根除该抗原时发生的对抗原的细胞响应。

[0097] 本文使用的术语“免疫抑制”是指减少整体免疫应答。

[0098] “分离的”是指自天然状态改变或移出的。例如,活体动物中天然存在的核酸或肽不是“分离的”,但是与其天然状态的共存物质部分或完全分开的同一核酸或肽是“分离的”。分离的核酸或蛋白质可以以基本上纯化的形式存在,或者可以存在于非天然环境,如,例如宿主细胞中。

[0099] 在本发明的上下文中,对于常出现的核酸碱基使用以下缩写。“A”是指腺苷,“C”是指胞嘧啶(胞苷, cytosine),“G”是指鸟苷,“T”是指胸苷,“U”是指尿苷。除非另有说明,否则“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括作为彼此的简并形式并且编码同一氨基酸序列的所有核苷酸序列。短语编码蛋白质或RNA的核苷酸序列还可以包括内含子,使得编码该蛋白质的核苷酸序列在一些形式中可以含有内含子(一个或多个)。

[0100] 如本文所用,“慢病毒”是指逆转录病毒科的一个属。慢病毒在逆转录病毒中的独特之处在于能够感染非分裂细胞;其可以将大量的遗传信息传递到宿主细胞的DNA中,因此其是基因传递载体的最有效的方法之一。HIV、SIV和FIV都是慢病毒的实例。衍生自慢病毒的载体提供了实现体内显著水平基因转移的手段。

[0101] 如本文所用,术语“修饰的”意为本发明的分子或细胞的状态或结构改变。分子可以以多种方式被修饰,包括化学上、结构上、和功能上的修饰。细胞可以通过核酸引入而被修饰。

[0102] 如本文所用,术语“调节”是指与不存在治疗或化合物的对象中的应答水平相比,和/或与其它方面相同但未经治疗的对象的应答水平相比,介导对象中的应答水平的可检

测的增加或减少。该术语包括干扰和/或影响天然信号或应答,由此介导对象(优选人)的有益治疗响应。

[0103] 术语“寡核苷酸”一般是指短的多核苷酸。将理解的是,当核苷酸序列由DNA序列(即A、T、C、G)表示时,这也包括“U”置换“T”的RNA序列(即,A、U、C、G)。

[0104] 术语“可操作地连接”是指调控序列与异源核酸序列之间的导致后者的表达的功能性连接。例如,当使第一核酸序列与第二核酸序列处于功能性关系时,第一核酸序列与第二核酸序列被可操作地连接。例如,如果启动子影响编码序列的转录或表达,则启动子可操作地连接至编码序列。总体上,可操作地连接的DNA序列是连续的,并且在连接两个蛋白编码区需要时处于同一阅读框中。

[0105] 免疫原性组合物的“肠胃外”施用包括例如皮下(s.c)、静脉内(i.v.)、肌内(i.m.)、或胸骨内注射、或输注技术。

[0106] 如本文所用,术语“多核苷酸”被定义为核苷酸链。此外,核酸是核苷酸的多聚体。因此,如本文所使用的核酸和多核苷酸是可互换的。本领域技术人员具有如下公知常识:核酸是多核苷酸,其可被水解成单体“核苷酸”。单体核苷酸可被水解成核苷。如本文所用,多核苷酸包括但不限于通过本领域任何可利用的手段(非限制地包括重组手段,即利用普通克隆技术和PCRTM由重组文库或细胞基因组克隆核酸序列)以及通过合成手段获得的所有核酸序列。

[0107] 如本文所用,术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换使用,并且是指由通过肽键共价连接的氨基酸残基构成的化合物。蛋白质或肽必定含有至少两个氨基酸,并且对于可构成蛋白质或肽序列的氨基酸最大数量没有限制。多肽包括包含通过肽键彼此连接的两个或多个氨基酸的任何肽或蛋白质。如本文所用,该术语既指代短链(其在本领域中也常被称为例如肽、寡肽和低聚物),也指代较长链(其总体上在本领域被称为蛋白质,其中有很多种类)。“多肽”包括例如生物活性片段、基本上同源的多肽、寡肽、同二聚体、异二聚体、多肽变体、修饰的多肽、衍生物、类似物、融合蛋白及其它。多肽包括天然肽、重组肽、合成肽、或其组合。

[0108] 如本文所用,术语“启动子”被定义为启动多核苷酸序列的特异性转录所需的由细胞的合成机构或引入的合成机构所识别的DNA序列。

[0109] 如本文所用,术语“启动子/调控序列”意为与启动子/调控序列可操作地连接的基因产物的表达所需的核酸序列。在一些情况下,此序列可以是核心启动子序列,并且在其它情况下,此序列还可以包括基因产物表达所需的增强子序列和其它调控元件。启动子/调控序列可以例如是以组织特异性方式表达基因产物的启动子/调控序列。

[0110] “组成型”启动子是在细胞的大多数或全部生理条件下,在与编码或限定基因产物的多核苷酸可操作地连接时导致基因产物在细胞中产生的核苷酸序列。

[0111] “诱导型”启动子是基本上只有在与启动子相对应的诱导物在细胞中存在时,才在与编码或限定基因产物的多核苷酸可操作地连接时导致基因产物在细胞中产生的核苷酸序列。

[0112] “组织特异性”启动子是基本上只有在与启动子相对应的组织类型的细胞时,才在与编码或限定基因的多核苷酸可操作地连接时导致基因产物在细胞中产生的核苷酸序列。

[0113] “信号转导途径”是指对信号从细胞一部分向细胞另一部分的传递有影响的各种信号转导分子之间的生物化学关系。短语“细胞表面受体”包括能够接收信号并将信号跨过细胞的质膜传递的分子和分子复合物。“细胞表面受体”的一个实例是人FAP。

[0114] “单链抗体”是指通过重组DNA技术形成的抗体,其中免疫球蛋白重链和轻链片段使用氨基酸工程改造段(an engineered span of amino acids)相互连接以将抗体的Fv区概括为单个多肽。生成单链抗体的各种方法是已知的,包括在美国专利号4,694,778;Bird (1988) Science 242:423-442;Huston等人(1988) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883;Ward等人(1989) Nature 334:54454;Skerra等人(1988) Science 242:1038-1041中描述的那些。

[0115] 如本文关于抗体所使用的术语“特异性结合”意为识别特定抗原但不实质上识别或结合样品中的其它分子的抗体。例如,特异性结合来自一个物种的一种抗原的抗体也可以结合来自一个或多个物种的该种抗原。但是,这种交叉物种反应性本身并不使抗体为特异性的归类发生改变。在另一个实例中,特异性结合一种抗原的抗体也可以结合该抗原的不同等位基因形式。然而,这种交叉反应性本身并不使抗体为特异性的归类发生改变。在一些情况下,术语“特异性的结合”或“特异性结合”可在涉及抗体、蛋白质或肽与第二化学物种的相互作用时使用,意指该相互作用取决于化学物种上特定结构(例如,抗原决定簇或表位)的存在;例如,抗体识别和结合特定的蛋白质结构而非总体上识别和结合蛋白质。如果抗体对表位“A”具有特异性,则包含表位A(或游离的无标记A)的分子的存在在包含带标记“A”和该抗体的反应中将使与抗体结合的带标记A的量减少。

[0116] 术语“刺激”意为通过刺激分子(例如,TCR/CD3复合物)与其同源配体结合,从而介导信号转导事件(诸如但不限于,经由TCR/CD3复合物的信号转导)引起的初次应答。刺激可以介导某些分子的表达改变,如TGF- β 下调和/或细胞骨架结构重整和类似情况。

[0117] 本文使用的术语“刺激分子”意为T细胞上与抗原呈递细胞上存在的同源刺激配体特异性结合分子。

[0118] 如本文所用,“刺激配体”意为在存在于抗原呈递细胞(例如,aAPC、树突状细胞、B细胞等)上时可以与T细胞上的同源结合配偶体(在本文中称为“刺激分子”)特异性结合从而介导T细胞的初次应答(包括但不限于激活、免疫应答的启动、增殖等)的配体。刺激配体在本领域中是公知的并且尤其包括装载有肽的MHC I类分子、抗CD3抗体、超激动剂抗CD28抗体、和超激动剂抗CD2抗体。

[0119] 术语“对象”旨在包括可引发免疫应答的活生物体(例如,哺乳动物)。如本文使用的“对象”或“患者”可以是人或非人哺乳动物。非人哺乳动物包括例如家畜和宠物,如羊科、牛科、猪科、犬科、猫科和鼠科的哺乳动物。优选地,对象是人。

[0120] “靶位点”或“靶序列”是指限定结合分子可以在足以使结合发生的条件下特异性结合的核酸部分的基因组核酸序列。在一些实施方式中,靶序列是指限定结合分子可以在足以使结合发生的条件下特异性结合的核酸部分的基因组核酸序列。

[0121] 如本文所用,“基本上纯化的”细胞是基本上不含其它细胞类型的细胞。基本上纯化的细胞也指代已经与在其天然存在状态下其通常相关的其它细胞类型分离的细胞。在一些情况下,基本上纯化的细胞群指代均质的细胞群。在其它情况下,此术语仅指已经与在其天然状态下其天然相关的细胞分离的细胞。在一些实施方式中,细胞被体外培养。在其它实

施方式中,细胞不被体外培养。

[0122] 如本文所用,术语“治疗性”意为治疗和/或预防。治疗效果通过疾病状态的抑制、缓解或根除而获得。

[0123] 如本文所用,术语“转染”或“转化”或“转导”是指将外源核酸转移或引入宿主细胞中的过程。“转染”或“转化”或“转导”的细胞是已经用外源核酸转染、转化或转导的细胞。该细胞包括原生对象细胞和其后代。

[0124] 如本文所用,短语“在转录控制下”或“可操作地连接”意为启动子相对于多核苷酸处于恰当的位置和定向以控制通过RNA聚合酶进行的转录的开始和多核苷酸的表达。

[0125] 本文所用的“治疗”疾病意为降低对象所经历的疾病或障碍的至少一种征兆或症状的频率或严重程度。

[0126] “载体”是包含分离的核酸并且可被用于将该分离的核酸递送至细胞内部的物质组合物。多种载体在本领域已知,包括但不限于线性多核苷酸、与离子型或两亲性化合物相关的多核苷酸、质粒和病毒。因此,术语“载体”包括自主复制的质粒或病毒。该术语还应被解释为包括促进核酸到细胞中转移的非质粒和非病毒化合物,如,例如,聚赖氨酸化合物、脂质体等。病毒载体的实例包括但不限于仙台病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体等。

[0127] “异种的”是指来源于不同物种的动物的移植物。

[0128] 范围:贯穿本公开,本发明的各个方面可以以范围形式展示。应理解,范围形式的描述仅仅是为了方便和简洁,而不应被解释为对本发明的范围的僵硬限制。因此,范围的描述应该被认为是已具体公开了该范围内所有可能的子范围以及个体数值。例如,诸如1至6的范围描述应被认为已具体公开了子范围,如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等,以及该范围内的个体数值,例如1、2、2.7、3、4、5、5.3和6。这不论范围宽度地适用。

[0129] B. 嵌合抗原受体

[0130] 本发明提供了用于治疗实体肿瘤的治疗剂(例如,嵌合抗原受体)。实体肿瘤的成功治疗受到各种障碍的阻碍,包括例如肿瘤微环境。肿瘤包括癌细胞以及包含细胞和非细胞组分的基质隔室。肿瘤基质已被证明在癌症的发展,包括进展和转移中具有关键作用。本发明提供了靶向肿瘤基质的CAR,其中基质中的潜在细胞靶标包括癌症相关成纤维细胞(CAF)。CAF已被证明增强肿瘤生长和扩散的几乎所有方面。CAF呈现出对治疗剂(例如,药物和免疫细胞)的屏障,为肿瘤细胞提供生长信号,并具有主动的免疫抑制性。

[0131] 本发明提供了能够结合成纤维细胞激活蛋白(FAP)的嵌合抗原受体(CAR)。FAP是一种II型跨膜丝氨酸蛋白酶,在超过90%的常见的人上皮癌的基质中表达。在某些肿瘤中,它由癌症相关成纤维细胞选择性表达。在良性肿瘤或正常成人静止组织中未检测到FAP的表达。

[0132] 在某些实施方式中,对象CAR包括能够结合FAP的抗原结合结构域、跨膜结构域、和胞内结构域。还提供了用于修饰的免疫细胞或其前体(例如,修饰的T细胞)的组合物和方法,其包括CAR。因此,在一些实施方式中,免疫细胞已被遗传修饰以表达CAR。还提供了编码所述CAR的核酸、编码所述核酸的载体、和包含所述CAR、载体或核酸的修饰的细胞(例如,修饰的T细胞)。

[0133] 在某些实施方式中,CAR能够结合人FAP。在某些实施方式中,CAR能够结合犬FAP。

在某些实施方式中, CAR能够结合鼠FAP。在某些实施方式中, CAR能够结合人、犬和鼠FAP。在此类实施方式中, 抗原结合结构域可称为具有跨物种反应性。跨物种反应性抗原结合结构域可用于可翻译研究, 其中靶向人的抗原结合结构域还结合不同物种(例如, 模式生物体)中的相同抗原, 从而允许在疾病模型中测试相同的抗原结合结构域。

[0134] 本发明的对象CAR包括能够结合FAP的抗原结合结构域、跨膜结构域、和胞内结构域。本发明的对象CAR可以任选地包括铰链结构域。因此, 本发明的对象CAR包括能够结合FAP的抗原结合结构域、铰链结构域、跨膜结构域、和胞内结构域。

[0135] 抗原结合结构域可以可操作地连接到CAR的其它结构域, 如跨膜结构域或胞内结构域, 两者(在本文别处描述), 以在细胞中表达。在一个实施方式中, 编码抗原结合结构域的第一核酸序列可操作地连接到编码跨膜结构域的第二核酸, 并且进一步可操作地连接到编码胞内结构域的第三核酸序列。

[0136] 本文所述的抗原结合结构域可与本文所述的任意跨膜结构域、本文所述的任意胞内结构域或胞质结构域、或本文所述的可包括在本发明的CAR中的任意其它结构域组合。本发明的对象CAR还可以包括如本文所述的铰链结构域。本发明的对象CAR还可以包括如本文所述的间隔区结构域。在一些实施方式中, 抗原结合结构域、跨膜结构域、和胞内结构域中的每一个由连接体分隔。

[0137] 抗原结合结构域

[0138] CAR的抗原结合结构域是CAR的用于结合特异性靶抗原, 包括蛋白质、碳水化合物和糖脂类的胞外区域。本发明的对象CAR包括能够成纤维细胞激活蛋白(FAP)的抗原结合结构域。

[0139] 抗原结合结构域可以包括与抗原结合的任意结构域, 并且可以包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、合成抗体、人抗体、人源化抗体、非人抗体、及其任意片段。在一些实施方式中, 抗原结合结构域部分包含哺乳动物抗体或其片段。抗原结合结构域的选择可取决于靶细胞表面上存在的抗原的类型和数量。

[0140] 在一些实施方式中, 抗原结合结构域选自全长抗体、抗原结合片段、Fab、单链可变片段(scFv)、或单结构域抗体。在一些实施方式中, 本发明的FAP结合结构域选自FAP特异性抗体、FAP特异性Fab、和FAP特异性scFv。在一个实施方式中, FAP结合结构域是FAP特异性抗体。在一个实施方式中, FAP结合结构域是FAP特异性Fab。在一个实施方式中, FAP结合结构域是FAP特异性scFv。

[0141] 如本文所用, 术语“单链可变片段”或“scFv”是免疫球蛋白(例如, 小鼠或人)的经共价连接形成VH: :VL异二聚体的重链(VH)可变区与轻链(VL)可变区的融合蛋白。重链(VH)和轻链(VL)直接连接或通过将VH的N-末端与VL的C-末端, 或将VH的C-末端与VL的N-末端连接的编码肽的连接体连接。在一些实施方式中, 抗原结合结构域(例如, FAP结合结构域)包括具有从N-末端到C-末端的构型——VH-连接体-VL的scFv。在一些实施方式中, 抗原结合结构域包括具有从N-末端到C-末端的构型——VL-连接体-VH的scFv。本领域技术人员将能够选择适当的构型用于本发明。

[0142] 通常, 连接体为了柔韧性(flexibility)而富含甘氨酸, 以及为了溶解性而富含丝氨酸或苏氨酸。连接体可以连接胞外抗原结合结构域的重链可变区和轻链可变区。连接体的非限制性实例公开于Shen等人, Anal.Chem. 80(6):1910-1917(2008)和WO 2014/087010

中,其内容特此通过引用以其整体并入。本领域已知各种连接体序列,非限制地包括甘氨酸丝氨酸(GS)连接体,例如(GS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:31)、(GGGS)_n(SEQ ID NO:32)和(GGGGS)_n(SEQ ID NO:33),其中n代表至少为1的整数。示例性连接体序列可包括氨基酸序列,其非限制地包括GGSG(SEQ ID NO:34)、GGSGG(SEQ ID NO:35)、GSGSG(SEQ ID NO:36)、GSGGG(SEQ ID NO:37)、GGGSG(SEQ ID NO:38)、GSSSG(SEQ ID NO:39)、GGGGS(SEQ ID NO:40)、GGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:15)等。本领域技术人员将能够选择合适的连接体序列用于本发明。在一个实施方式中,本发明的抗原结合结构域包括重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH和VL由具有氨基酸序列GGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:15)的连接体序列分隔,所述连接体序列可由核酸序列GGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTCGGGTGGCGCGGATCT(SEQ ID NO:41)编码。

[0143] 尽管去除了恒定区并引入了连接体,但ScFv蛋白保留了原始免疫球蛋白的特异性。单链Fv多肽抗体可以由包含VH-和VL-编码序列的核酸表达,如Huston等人(Proc.Nat.Acad.Sci.USA,85:5879-5883,1988)所述。另见美国专利号5,091,513、5,132,405和4,956,778;和美国专利公开号20050196754与20050196754。已描述了具有抑制活性的拮抗性scFv(参见,例如,Zhao等人,Hybridoma(Larchmt)2008 27(6):455-51;Peter等人,J Cachexia Sarcopenia Muscle 2012August 12;Shieh等人,J Immunol 2009 183(4):2277-85;Giomarelli等人,Thromb Haemost 2007 97(6):955-63;Fife et al.,J Clin Invest 2006 116(8):2252-61;Brocks等人,Immunotechnology 1997 3(3):173-84;Moosmayer等人,Ther Immunol 1995 2(10:31-40)。已描述了具有刺激活性的激动性scFv(参见,例如,Peter等人,J Biol Chem 200325278(38):36740-7;Xie等人,Nat Biotech 1997 15(8):768-71;Ledbetter等人,Crit Rev Immunol 1997 17(5-6):427-55;Ho等人,Biochim Biophys Acta 2003 1638(3):257-66)。

[0144] 如本文所用,“Fab”是指与抗原结合但为单价且不具有Fc部分的抗体结构的片段,例如,被木瓜蛋白酶消化的抗体产生两个Fab片段和一个Fc片段(例如,重(H)链恒定区;不结合抗原的Fc区)。

[0145] 如本文所用,“F(ab')₂”是指通过胃蛋白酶消化完整IgG抗体产生的抗体片段,其中此片段具有两个抗原结合(ab') (二价)区,其中每个(ab')区包含两条单独的氨基酸链,一部分H链通过S-S键与轻(L)链连接以用于结合抗原,而其中剩余的H链部分连接在一起。“F(ab')₂”片段可以分成两个独立的Fab'片段。

[0146] 在一些实施方式中,抗原结合结构域可源自CAR最终将会用于的同一物种。例如,对用于人而言,CAR的抗原结合结构域可以包括人抗体或其片段。在一些实施方式中,抗原结合结构域可源自CAR最终将会用于的不同物种。例如,对用于人而言,CAR的抗原结合结构域可以包括鼠抗体、或犬抗体、或其片段。

[0147] 在某些实施方式中,抗原结合结构域包括包含三个重链互补决定区(HCDR)的重链可变区。在某些实施方式中,HCDR1包含氨基酸序列YTITSYSLH(SEQ ID NO:1),和/或HCDR2包含氨基酸序列EINPANGDHNFSSEKFEIK(SEQ ID NO:2),和/或HCDR3包含氨基酸序列LDDSRFHWFYFDV(SEQ ID NO:3)。抗原结合结构域还包括包含三个轻链互补决定区(LCDR)的轻链可变区。在某些实施方式中,LCDR1包含氨基酸序列TASSSVSYMY(SEQ ID NO:4),和/或LCDR2包含氨基酸序列LTSNLA(SEQ ID NO:5),和/或LCDR3包含氨基酸序列QQWSGYPPIT(SEQ

ID NO:6)。

[0148] 在某些实施方式中,抗原结合结构域包括包含三个重链互补决定区(HCDR)的重链可变区,其中HCDR1包含氨基酸序列GYTITSYSLH(SEQ ID NO:27),和/或HCDR2包含氨基酸序列EINPANGDHNFSSEKFEIK(SEQ ID NO:2)和/或HCDR3包含氨基酸序列LDDSRFHWFYFDV(SEQ ID NO:3)。在某些实施方式中,抗原结合结构域还包括包含三个轻链互补决定区(LCDR)的轻链可变区,其中LCDR1包含氨基酸序列TASSSVSYMY(SEQ ID NO:4),和/或LCDR2包含氨基酸序列LTSNLAS(SEQ ID NO:30),和/或LCDR3包含氨基酸序列QQWSGYPPIT(SEQ ID NO:6)。

[0149] 在某些实施方式中,抗原结合结构域包括包含三个重链互补决定区(HCDR)的重链可变区,其中HCDR1包含氨基酸序列YTITSYSLH(SEQ ID NO:1),和/或HCDR2包含氨基酸序列EINPANGDHNFSSEKFEIKAT(SEQ ID NO:28),和/或HCDR3包含氨基酸序列TRLDDSRFHWFYFDV(SEQ ID NO:29)。在某些实施方式中,抗原结合结构域还包括包含三个轻链互补决定区(LCDR)的轻链可变区,其中LCDR1包含氨基酸序列TASSSVSYMY(SEQ ID NO:4),和/或LCDR2包含氨基酸序列LTSNLA(SEQ ID NO:5),和/或LCDR3包含氨基酸序列QQWSGYPPIT(SEQ ID NO:6)。

[0150] 在某些实施方式中,抗原结合结构域包括包含如本文所述的三个重链互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3中任一个的重链可变区。在某些实施方式中,抗原结合结构域包括包含如本文所述的三个轻链互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3中任一个的轻链可变区。在某些实施方式中,抗原结合结构域包括本文所述的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3的任意组合。鉴于本文提供的重链和轻链可变区序列,技术人员将能够基于氨基酸编号容易地确定相关的互补决定区。

[0151] 在某些实施方式中,抗原结合结构域的重链可变区(VH)包含与SEQ ID NO:7同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列和/或轻链可变区(VH)包含与SEQ ID NO:9同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0152] 在某些实施方式中,抗原结合结构域选自全长抗体或其抗原结合片段、Fab、单链可变片段(scFv)、或单结构域抗体。在某些实施方式中,抗原结合结构域是包含与SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:13同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的单链可变片段(scFv)。

[0153] 本领域技术人员将已知抗原结合结构域序列的容许的变化。例如,在一些实施方式中,抗原结合结构域包含与SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、9、11、13、27、28、29、或30中列出的任意氨基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0154] 在一些实施方式中,本公开的CAR可以对一种或多种靶细胞上的一个或多个靶抗原具有亲和力。在一些实施方式中,CAR可以对靶细胞上的一个或多个靶抗原具有亲和力。在这样的实施方式中,CAR是双特异性CAR,或多特异性CAR。在一些实施方式中,CAR包括赋予对一个或多个靶抗原的亲和力的一个或多个靶特异性结合结构域。在一些实施方式中,CAR包括赋予对相同靶抗原的亲和力的一个或多个靶特异性结合结构域。例如,包括对相同靶抗原具有亲和力的一个或多个靶特异性结合结构域的CAR可以结合靶抗原的不同表位。当CAR中存在多个靶特异性结合结构域时,结合结构域可以串联布置并且可以被连接体肽

分隔。例如,在包括两个靶特异性结合结构域的CAR中,结合结构域通过寡肽或多肽连接体、Fc铰链区、或膜铰链区在单个多肽链上彼此共价连接。

[0155] 跨膜结构域

[0156] 本发明的CAR可以包括将CAR的抗原结合结构域与CAR的胞内结构域连接的跨膜结构域。对象CAR的跨膜结构域是能够跨越细胞(例如,免疫细胞或其前体)的质膜的区域。在一些实施方式中,跨膜结构域用于插入细胞膜,例如真核细胞的细胞膜中。在一些实施方式中,跨膜结构域插入在CAR的抗原结合结构域与胞内结构域之间。

[0157] 在一些实施方式中,跨膜结构域天然地与CAR中的一个或多个结构域相关联(结合,associated)。在一些实施方式中,可以选择或通过一个或多个氨基酸取代修饰跨膜结构域,以避免这样的结构域与相同或不同的表面膜蛋白的跨膜结构域结合,以最小化与受体复合物的其它成员的相互作用。

[0158] 跨膜结构域可以源自天然或合成来源。在天然来源的情况下,该结构域可以源自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白,例如,I型跨膜蛋白。在合成来源的情况下,跨膜结构域可以是促进CAR插入细胞膜的任意人工序列,例如,人工疏水序列。本发明中具体应用的跨膜结构域的实例非限制地包括源自以下的跨膜结构域(即,包含以下的至少跨膜区(一个或多个)):T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD7、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134(OX-40)、CD137(4-1BB)、CD154(CD40L)、ICOS(CD278)、T α 1L样受体1(TLR1)、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9,或源自杀伤免疫球蛋白样受体(KIR)的跨膜结构域。

[0159] 在某些实施方式中,跨膜结构域包括CD8的跨膜结构域。在某些实施方式中,CD8的跨膜结构域是CD8 α 的跨膜结构域。在某些实施方式中,跨膜结构域包含SEQ ID NO:17中列出的氨基酸序列。在某些实施方式中,跨膜结构域包括源自杀伤免疫球蛋白样受体(KIR)的跨膜结构域。

[0160] 在一些实施方式中,跨膜结构域可以是合成的,在这种情况下,其将主要包含疏水性残基,如亮氨酸和缬氨酸。优选地,将在合成跨膜结构域的每个末端发现苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体。

[0161] 本文所述的跨膜结构域可与本文所述的任意抗原结合结构域、本文所述的任意胞内结构域、或本文所述的可包括在对象CAR中的任意其它结构域组合。

[0162] 在一些实施方式中,跨膜结构域还包括铰链区。本发明的对象CAR还可以包括铰链区。CAR的铰链区是位于抗原结合结构域与跨膜结构域之间的亲水区。在一些实施方式中,此结构域促进CAR的适当的蛋白质折叠。铰链区是CAR的任选组分。铰链区可以包括选自抗体的Fc片段、抗体的铰链区、抗体的CH2区、抗体的CH3区、人工铰链序列或其组合的结构域。铰链区的实例非限制地包括CD8a铰链、由可短至三个甘氨酸(Gly)的多肽制成的人工铰链、以及IgG(例如,人IgG4)的CH1和CH3结构域。

[0163] 在一些实施方式中,本公开的对象CAR包括铰链区,该铰链区将抗原结合结构域与进而连接至胞内结构域的跨膜结构域连接。铰链区优选地能够支撑抗原结合结构域以识别并结合靶细胞上的靶抗原(参见,例如,Hudecek等人,Cancer Immunol.Res.(2015) 3(2):125-135)。在一些实施方式中,铰链区是柔韧性的结构域,因此允许抗原结合结构域具有最佳识别细胞如肿瘤细胞上靶抗原的特异性结构和密度的结构(Hudecek等人,同上)。铰链区

的柔韧性允许铰链区采用许多不同的构象。

[0164] 在一些实施方式中,铰链区是免疫球蛋白重链铰链区。在一些实施方式中,铰链区是源自受体的铰链区多肽(例如,源自CD8的铰链区)。

[0165] 铰链区可具有如下长度:约4个氨基酸至约50个氨基酸,例如,约4个aa至约10个aa、约10个aa至约15个aa、约15个aa至约20个aa、约20个aa至约25个aa、约25个aa至约30个aa、约30个aa至约40个aa、或约40个aa至约50个aa。在一些实施方式中,铰链区可以具有如下长度:大于5aa、大于10个aa、大于15个aa、大于20个aa、大于25个aa、大于30个aa、大于35个aa、大于40个aa、大于45个aa、大于50个aa、大于55个aa、或更多。

[0166] 合适的铰链区可以容易地选择并且可以是许多合适长度中的任一个,如1个氨基酸(例如,Gly)至20个氨基酸,从2个氨基酸至15个氨基酸,从3个氨基酸至12个氨基酸氨基酸,包括4个氨基酸至10个氨基酸、5个氨基酸至9个氨基酸、6个氨基酸至8个氨基酸、或7个氨基酸至8个氨基酸,并且可以是1、2、3、4、5、6或7个氨基酸。合适的铰链区可以具有大于20个氨基酸(例如,30、40、50、60个或更多个氨基酸)的长度。

[0167] 例如,铰链区包括甘氨酸多聚体($(G)_n$)、甘氨酸-丝氨酸多聚体(包括,例如, $(GS)_n$ 、 $(GSGGS)_n$ (SEQ ID NO:31)和 $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO:32),其中n是至少是一的整数)、甘氨酸-丙氨酸多聚体、丙氨酸-丝氨酸多聚体、和本领域已知的其它柔韧性连接体。可以使用甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸多聚体;Gly和Ser两者是相对非结构的(unstructured),因此可以充当组分之间的中性连接物(neutral tether)。可以使用甘氨酸多聚体;甘氨酸实现了比均一的丙氨酸显著更多的 Φ - Ψ (phi-psi)空间,并且比具有较长侧链的残基受到的限制要少得多(参见,例如,Scheraga,Rev.Computational.Chem.(1992)2:73-142)。示例性铰链区可包含氨基酸序列,该氨基酸序列包括但不限于GGSG(SEQ ID NO:34)、GGSGG(SEQ ID NO:35)、GSSGG(SEQ ID NO:36)、GSGGG(SEQ ID NO:37)、GGGSG(SEQ ID NO:38)、GSSSG(SEQ ID NO:39)等。

[0168] 在一些实施方式中,铰链区是免疫球蛋白重链铰链区。免疫球蛋白铰链区氨基酸序列是本领域已知的;参见,例如,Tan等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1990)87(1):162-166;和Huck等人,Nucleic Acids Res.(1986)14(4):1779-1789。作为非限制性实例,免疫球蛋白铰链区可包括以下氨基酸序列中的一个:DKTHT(SEQ ID NO:42);CPPC(SEQ ID NO:43);CPEPKSCDTPPPCPR(SEQ ID NO:44)(参见,例如,Glaser等人,J.Biol.Chem.(2005)280:41494-41503);ELKTPLGDTTHT(SEQ ID NO:45);KSCDKTHTCP(SEQ ID NO:46);KCCVDCP(SEQ ID NO:47);KYGPPCP(SEQ ID NO:48);EPKSCDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:49)(人IgG1铰链);ERKCCVECP(SEQ ID NO:50)(人IgG2铰链);ELKTPLGDTTHTCPRCP(SEQ ID NO:51)(人IgG3铰链);SPNMVPHAHHAQ(SEQ ID NO:52)(人IgG4铰链);等。

[0169] 铰链区可包含人IgG1、IgG2、IgG3、或IgG4铰链区的氨基酸序列。在一个实施方式中,铰链区相比于野生型(天然存在的)铰链区可包括一个或多个氨基酸取代和/或插入和/或缺失。例如,人IgG1铰链的His229可用Tyr取代,使得该铰链区包含序列EPKSCDKTYTTPPPC(SEQ ID NO:53);参见,例如,Yan等人,J.Biol.Chem.(2012)287:5891-5897。

[0170] 在某些实施方式中,铰链区可包含源自人CD8,或其变体的氨基酸序列。在某些实施方式中,CAR包含CD8 α 铰链序列。在某些实施方式中,铰链区包含氨基酸序列TTTTAPRPPT PAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD(SEQ ID NO:16)。

[0171] 胞内结构域

[0172] 本发明的对象CAR还包括胞内结构域。在某些实施方式中,胞内结构域包括共刺激信号传导结构域和胞内信号传导结构域。CAR的胞内结构域负责激活表达CAR的细胞(例如,免疫细胞)的至少一种效应物功能。胞内结构域转导效应物功能信号并指导细胞(例如,免疫细胞)执行其专门的功能,例如,伤害和/或毁坏靶细胞。

[0173] 用于本发明的胞内结构域的实例包括但不限于表面受体的胞质部分、共刺激分子、和一致作用以发起T细胞中信号转导的任意分子,以及这些元件的任意衍生物或变体和具有相同功能能力的任意合成序列。

[0174] 胞内结构域的实例非限制性地包括T细胞受体复合物的 ζ 链或其任意同系物,例如, η 链、Fc γ R1 γ 和 β 链、MB 1 (Iga) 链、B29 (Ig) 链等、人CD3 ζ 链、CD3多肽(Δ 、 δ 和 ϵ)、syk家族酪氨酸激酶(Syk、ZAP 70等)、src家族酪氨酸激酶(Lck、Fyn、Lyn等),以及参与T细胞转导的其它分子,如CD2、CD5和CD28。在一个实施方式中,胞内信号传导结构域可以是人CD3 ζ 链、Fc γ R1III、Fc γ R1、Fc受体的胞质尾区、携带基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)的胞质受体、及其组合。

[0175] 在某些实施方式中,CAR的胞内结构域包括一种或多种共刺激分子的任意部分,诸如来自CD2、CD3、CD8、CD27、CD28、ICOS (CD278)、4-1BB、PD-1、其任意衍生物或变体、其具有相同功能能力的任意合成序列、及其任意组合的至少一个信号传导结构域。在某些实施方式中,胞内结构域包括选自以下的蛋白质的共刺激结构域:TNFR超家族中的蛋白质、CD28、4-1BB (CD137)、OX40 (CD134)、PD-1、CD7、LIGHT、CD83L、DAP10、DAP12、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、ICOS、NKG2C和B7-H3 (CD276),源自杀伤免疫球蛋白样受体(KIR)的胞内结构域、或其变体。

[0176] 此外,适用于对象CAR的变体胞内信号传导结构域是本领域已知的。YMF基序存在于ICOS中并且是一种募集PI3K的p85和p50 α 亚基两者的SH2结合基序,从而导致AKT信号传导增强。参见,例如,Simpson等人(2010)Curr.Opin.Immunol.,22:326-332。在一个实施方式中,可以生成包含YMF基序的CD28胞内结构域变体。YMN基序存在于CD28胞质结构域中并且是已知的磷脂酰肌醇3-激酶(PI3-K)和Grb2的结合位点。见,Harada等人(2003)J.Exp.Med.,197(2):257-262。在一个实施方式中,可以生成包含YMN基序的ICOS胞内结构域变体。

[0177] 在某些实施方式中,胞内结构域包括4-1BB的共刺激结构域。在某些实施方式中,4-1BB的共刺激结构域包含SEQ ID NO:18中列出的氨基酸序列。在某些实施方式中,胞内结构域包括CD28的共刺激结构域。在某些实施方式中,CD28的共刺激结构域包含SEQ ID NO:19中列出的氨基酸序列。在某些实施方式中,胞内结构域包括DAP12的共刺激结构域。在某些实施方式中,DAP12的共刺激结构域包含SEQ ID NO:20中列出的氨基酸序列。在某些实施方式中,胞内结构域包括4-1BB的共刺激结构域和CD28的共刺激结构域。在某些实施方式中,胞内结构域包括DAP12的共刺激结构域和CD28的共刺激结构域。

[0178] 胞内结构域的其它实例包括来自一种或多种分子或受体的片段或结构域,包括但不限于TCR、CD3 ζ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD86、通用Fc γ R γ 、Fc γ R β (Fc ϵ R1b)、CD79a、CD79b、Fc γ R1Ia、DAP10、DAP12、T细胞受体(TCR)、CD8、CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX9、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、KIR家族蛋白、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、

B7-H3、与CD83特异性结合的配体、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM (LIGHTR)、SLAMF7、NKp80 (KLRP1)、CD127、CD160、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (触觉 (Tactile))、CEACAM1、CRT AM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、Toll样受体1 (TLR1)、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、本文所述的其它共刺激分子、其任何衍生物、变体或片段、具有相同作用能力的共刺激分子的任何合成序列、和其任何组合。

[0179] 胞内结构域的其它实例非限制地包括若干类型的各种其它免疫信号传导受体的胞内信号传导结构域,包括但不限于第一代、第二代、和第三代T细胞信号传导蛋白,其包括CD3、B7家族共刺激、和肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 超家族受体 (参见,例如, Park和Brentjens, *J. Clin. Oncol.* (2015) 33 (6):651-653)。另外,胞内信号传导结构域可包括NK细胞与NKT细胞所用的信号传导结构域 (参见,例如, Hermanson和Kaufman, *Front. Immunol.* (2015) 6:195), 如NKp30 (B7-H6) 的信号传导结构域 (参见,例如, Zhang等人, *J. Immunol.* (2012) 189 (5):2290-2299), 以及DAP 12 (参见,例如, Topfer等人, *J. Immunol.* (2015) 194 (7):3201-3212)、NKG2D、NKp44、NKp46、DAP10、和CD3z的信号传导结构域。

[0180] 在某些实施方式中,胞内结构域包括选自以下的胞内信号传导结构域:人CD3 ζ 链 (CD3 ζ)、Fc γ RIII、Fc ϵ RI、Fc受体的胞质尾区、携带基于免疫受体酪氨酸的激活基序 (ITAM) 的胞质受体、TCR ζ 、Fc ϵ R γ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的胞质信号传导结构域、或其变体。在某些实施方式中,胞内结构域包括CD3 ζ 的胞内结构域或其变体。在某些实施方式中,CD3 ζ 的胞内结构域包含SEQ ID NO:21中列出的氨基酸序列。

[0181] 适用于本发明的对象CAR的胞内结构域包括响应于CAR的激活 (即,由抗原和二聚试剂激活) 提供有区别的且可检测到的信号 (例如,该细胞增加产生一种或多种细胞因子;靶基因转录的变化;蛋白质活性的变化;细胞行为的变化,例如,细胞死亡;细胞增殖;细胞分化;细胞存活;细胞信号传导应答的调节;等等) 的任意期望的信号传导结构域。在一些实施方式中,胞内结构域包括至少一个 (例如,一个、两个、三个、四个、五个、六个等) 如下所述的ITAM基序。在一些实施方式中,胞内结构域包括DAP10/CD28型信号传导链。在一些实施方式中,胞内结构域不共价地与膜结合CAR连接,而代替地在细胞质中扩散。

[0182] 适用于本发明的对象CAR的胞内结构域包括含有基于免疫受体酪氨酸的激活基序 (ITAM) 的胞内信号传导多肽。在一些实施方式中,ITAM基序在胞内结构域中重复两次,其中ITAM基序的第一实例和第二实例彼此由6至8个氨基酸分隔。在一个实施方式中,对象CAR的胞内结构域包含3个ITAM基序。

[0183] 在一些实施方式中,胞内结构域包括含有基于免疫受体酪氨酸的激活基序 (ITAM) 的人免疫球蛋白受体,诸如但不限于Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIC、Fc γ RIIIA、FcRL5 (参见,例如, Gillis等人, *Front. Immunol.* (2014) 5:254)。

[0184] 合适的胞内结构域可以是源自含有ITAM基序的多肽的含有ITAM基序的部分。例如,合适的胞内结构域可以是来自任意含有ITAM基序的蛋白的含有ITAM基序的结构域。因

此,合适的胞内结构域无需含有其所源自的整个蛋白的整个序列。合适的含有ITAM基序的多肽的实例包括但不限于: DAP12、FCER1G (Fc ϵ 受体I γ 链)、CD3D (CD3 δ)、CD3E (CD3 ϵ)、CD3G (CD3 γ)、CD3Z (CD3 ζ)、和CD79A (抗原受体复合物相关蛋白 α 链)。

[0185] 在一个实施方式中,胞内结构域源自DAP12 (也称为TYROBP; TYRO蛋白酪氨酸激酶结合蛋白; KARAP; PLOSL; DNAX-激活蛋白12; KAR相关蛋白; TYRO蛋白酪氨酸激酶结合蛋白; 杀伤激活受体相关蛋白; 杀伤-激活受体-相关蛋白; 等等)。在一个实施方式中,胞内结构域源自FCER1G (也称为FCRG; Fc ϵ 受体I γ 链; Fc受体 γ -链; fc- ϵ RI- γ ; fcR γ ; fceR1 γ ; 高亲和力免疫球蛋白 ϵ 受体亚基 γ ; 免疫球蛋白E受体,高亲和力 γ 链; 等等)。在一个实施方式中,胞内结构域源自T-细胞表面糖蛋白CD3 δ 链 (也称为CD3D; CD3-DELTA; T3D; CD3抗原, δ 亚基; CD3 δ ; CD3d抗原, δ 多肽 (TiT3复合物); OKT3, δ 链; T-细胞受体T3 δ 链; T-细胞表面糖蛋白CD3 δ 链; 等等)。在一个实施方式中,胞内结构域源自T-细胞表面糖蛋白CD3 ϵ 链 (也称为CD3e、T-细胞表面抗原T3/Leu-4 ϵ 链、T-细胞表面糖蛋白CD3 ϵ 链、AI504783、CD3、CD3 ϵ 、T3e等)。在一个实施方式中,胞内结构域源自T-细胞表面糖蛋白CD3 γ 链 (也称为CD3G、T-细胞受体T3 γ 链、CD3- Γ 、T3G、 γ 多肽 (TiT3复合物)等)。在一个实施方式中,胞内结构域源自T-细胞表面糖蛋白CD3 ζ 链 (也称为CD3Z、T-细胞受体T3 ζ 链、CD247、CD3-Z、CD3H、CD3Q、T3Z、TCRZ等)。

[0186] 在一个实施方式中,胞内结构域源自CD79A (也称为B-细胞抗原受体复合物相关蛋白 α 链; CD79a抗原 (免疫球蛋白相关 α); MB-1膜糖蛋白; ig- α ; 膜结合免疫球蛋白相关蛋白; 表面IgM相关蛋白; 等等)。在一个实施方式中,适用于本公开的FN3 CAR的胞内结构域包括DAP10/CD28型信号传导链。在一个实施方式中,适用于本公开的FN3 CAR的胞内结构域包括ZAP70多肽。在一些实施方式中,胞内结构域包括TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、或CD66d的胞质信号传导结构域。在一个实施方式中,CAR中的胞内结构域包括人CD3 ζ 的胞质信号传导结构域。

[0187] 尽管通常可以使用整个胞内结构域,但是在许多情况下无需使用整个链。就使用胞内结构域的截短部分而言,这样的截短部分可用于代替完整的链,只要其转导效应物功能信号即可。胞内结构域包括足以转导效应物功能信号的胞内结构域的任意截短部分。

[0188] 本文所述的胞内结构域可与本文所述的任意抗原结合结构域、本文所述的任意跨膜结构域、或可包括在CAR中的本文所述的任意其它结构域组合。

[0189] 各个CAR结构域序列 (较链、跨膜和胞内结构域) 的容许的改变将是本领域技术人员已知的。例如,在一些实施方式中,CAR结构域包含与SEQ ID NO: 15、16、17、18、19、20或21中列出的任意氨基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%的序列同一性的氨基酸序列。

[0190] 一方面,本发明提供了包括能够结合成纤维细胞激活蛋白 (FAP) 的抗原结合结构域、跨膜结构域、和胞内结构域的嵌合抗原受体 (CAR)。抗原结合结构域包括: 包含三个重链互补决定区 (HCDR) 的重链可变区,其中HCDR1包含氨基酸序列YTITSYSLH (SEQ ID NO: 1), HCDR2包含氨基酸序列EINPANGDHNHFSEKFEIK (SEQ ID NO: 2), 并且HCDR3包含氨基酸序列LDDSRFHWFYFDV (SEQ ID NO: 3); 和/或包含三个轻链互补决定区 (LCDR) 的轻链可变区,其中LCDR1包含氨基酸序列TASSSVSYMY (SEQ ID NO: 4), LCDR2包含氨基酸序列LTSNLA (SEQ ID

NO:5),并且LCDR3包含氨基酸序列QQWSGYPPIT (SEQ ID NO:6)。

[0191] 还提供了能够结合FAP的CAR,所述CAR包括抗原结合结构域、跨膜结构域、和胞内结构域,其中抗原结合结构域包括:重链可变区,其包含与SEQ ID NO:7同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;和/或轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:9同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0192] 还提供了能够结合FAP的CAR,所述CAR包括与SEQ ID NO:11或13同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列的抗原结合结构域。

[0193] 进一步提供了能够结合FAP的CAR,所述CAR包含与SEQ ID NO:23或25同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0194] 表1:核酸和氨基酸序列

SEQ ID NO:	名称	氨基酸/核苷酸序列
1	4G5 HCDR1	YTITSYSLH
2	4G5 HCDR2	EINPANGDHNFSKFEIK

3	4G5 HCDR3	LDDSRFHWFYFDV
4	4G5 LCDR1	TASSSVSYMY
5	4G5 LCDR2	LTSNLA
6	4G5 LCDR3	QQWSGYPPIT
7	4G5VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTITSYSLHWVKQRPGQGLE WIGEINPANGDHNHSEKFEIKATLTVDSSSNTAFMQLSRLTSEDSAVYY CTRLDDSRFHWFYFDVWGAGTTVTVSS
8	4G5VH	CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAACTGGTAAAGCCTGG GGCTTCAGTGAAGTTGTCCTGCAAGGCGTCTGGCTACACCATCAC CAGCTACTCTCTGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCT TGAGTGGATTGGAGAGATTAATCCTGCCAATGGTGATCATAACTTC AGTGAGAAGTTCGAGATCAAGGCCACACTGACTGTAGACAGCTCC TCCAACACAGCATTATGCAACTCAGCAGGCTGACATCTGAGGAC TCTGCGGTCTATTACTGTACAAGATTGGACGATAGTAGTTCCACT GGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCTCT CA
9	4G5VL	QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCTASSSVSYMYWYQQKPRSSPKPWI FLTSNLASGVPARFSGRSGTSFSLTISSMEAEDAATYYCQQWSGYPP ITFGSGTKLEIK
10	4G5VL	CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCGCTCATGTCTGCTTCTCCAG GGGAGAAGGTCACCATGACCTGCACTGCCAGCTCAAGTGTTAGTT ACATGTACTGGTACCAGCAGAAGCCACGATCCTCCCCAAACCCT GGATTTTCTCACCTCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTT CAGTGGCCGTGGGTCTGGGACCTCTTCTCTCTCACAATCAGCAG CATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAG TGGTTACCCACCCATCACATTCGGCTCGGGGACAAAGTTGAAAT AAAA
[0196]	4G5ScFv (VL>VH)	QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCTASSSVSYMYWYQQKPRSSPKPWI FLTSNLASGVPARFSGRSGTSFSLTISSMEAEDAATYYCQQWSGYPP ITFGSGTKLEIKGGGGSGGGSGGGGSQVQLQQPGAELVKPGASVKL SCKASGYTITSYSLHWVKQRPGQGLEWIGEINPANGDHNHSEKFEIKA TLTVDSSSNTAFMQLSRLTSEDSAVYYCTRLDDSRFHWFYFDVWGAG TTVTVSS
	4G5ScFv (VL>VH)	CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCGCTCATGTCTGCTTCTCCAG GGGAGAAGGTCACCATGACCTGCACTGCCAGCTCAAGTGTTAGTT ACATGTACTGGTACCAGCAGAAGCCACGATCCTCCCCAAACCCT GGATTTTCTCACCTCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTT CAGTGGCCGTGGGTCTGGGACCTCTTCTCTCTCACAATCAGCAG CATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAG TGGTTACCCACCCATCACATTCGGCTCGGGGACAAAGTTGAAAT AAAAGGTGGAGGTGGCAGCGGAGGAGGTGGTCCGGCGGTGGA GGAAGCCAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAACTGGTAAA GCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCCTGCAAGGCGTCTGGCTACAC CATCACCAGCTACTCTCTGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACA AGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTAATCCTGCCAATGGTGATCAT AACTTCAGTGAGAAGTTCGAGATCAAGGCCACACTGACTGTAGAC AGCTCCTCAACACAGCATTATGCAACTCAGCAGGCTGACATCT GAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAGATTGGACGATAGTAGGT TCCACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCG TCTCCTCA
	4G5ScFv (VH>VL)	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTITSYSLHWVKQRPGQGLE WIGEINPANGDHNHSEKFEIKATLTVDSSSNTAFMQLSRLTSEDSAVYY CTRLDDSRFHWFYFDVWGAGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQIVLT QSPALMSASPGEKVTMTCTASSSVSYMYWYQQKPRSSPKPWI FLTSNLASGVPARFSGRSGTSFSLTISSMEAEDAATYYCQQWSGYPPITFGS

		GTKLEIK
14	4G5ScFv (VH>VL)	CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAACTGGTAAAGCCTGG GGCTTCAGTGAAGTTGTCCTGCAAGGCGTCTGGCTACACCATCAC CAGCTACTCTCTGCACTGGGTGAAGCAGAGGCTGGACAAGGCCT TGAGTGGATTGGAGAGATTAATCCTGCCAATGGTGATCATAACTTC AGTGAGAAGTTCGAGATCAAGGCCACACTGACTGTAGACAGCTCC TCCAACACAGCATTTCATGCAACTCAGCAGGCTGACATCTGAGGAC TCTGCGGTCTATTACTGTACAAGATTGGACGATAGTAGGTTCCACT GGTACTTCGATGTCCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCT CAGGTGGAGGTGGCAGCGGAGGAGGTGGGTCCGGCGGTGGAGGA AGCCAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCGCTCATGTCTGCTTCTC CAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCACTGCCAGCTCAAGTGTTA GTTACATGTACTGGTACCAGCAGAAGCCACAGTCTCCCCCAAAC CCTGGATTTTCTCACCTCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCG CTTCAGTGGCCGTGGGTCTGGGACCTCTTCTCTCTCAATCAGC AGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGG AGTGGTTACCCACCCATCACATTCCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAA ATAAAA
15	连接体	GGGSGGGSGGGGS
16	CD8 α 铰链	TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD
17	CD8跨膜结构域	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY
18	4-1BBICD	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE
19	CD28 ICD	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
20	DAP12 ICD	ERWCSNKKNAAVMDQEPAGNRTVNSEDSDEQDHQEVSYA
21	CD3 ζ ICD	RVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGYQ GLSTATKDTYDALHMQUALPPR
22	4G5_HG2L_CD8 H_BB_CD3Z CAR	ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGC TGCATGCCGCTAGACCCGGATCCCAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTG GGGCTGAACTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCCTGCA AGGCGTCTGGCTACACCATCACCAGCTACTCTCTGACTGGGTGA AGCAGAGGCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGAGAGAGATTAATC CTGCCAATGGTGATCATAACTTCAGTGAGAAGTTCGAGATCAAGG CCACACTGACTGTAGACAGCTCCTCCAACACAGCATTTCATGCAAC TCAGCAGGCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAG ATTGGACGATAGTAGGTTCCACTGGTACTTCGATGTCCTGGGGCGCA GGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGCAGCGGAGG AGGTGGGTCCGGCGGTGGAGGAAGCCAAATTGTTCTCACCCAGTC TCCAGCGCTCATGTCTGCTTCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGAC CTGCACTGCCAGCTCAAGTGTAGTTACATGTACTGGTACCAGCAG AAGCCACGATCCTCCCCAAACCCTGGATTTTCTCACCTCCAACC TGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCCGTGGGTCTGGGA CCTCTTTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGC CACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTGGTTACCCACCCATCACATTC GGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAATCCG Gaaccacgacgccagcgccg cgaccaccaacaccgcccaccatcgcgtcgcagccctgtccctgcgcccagggcgctgcccga gcggcgggggcgagtgacacagggggctggactcgcctgtgatctacatctggcgccctgg cgggactgtgggtctctctctgactggttateacccttactgcaaacggggcagaagaactctg tatatattcaacaaccattatgagaccagtacaaactactcaagaggagatgctgtagctccgattcca gaagaagaagaaggagatgtaactgagagtgaagttcagcaggagcagacgccccgcgtacaag cagggccagaaccagctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtagatgtttggacaagag acgtggccgggaccctgagatgggggaaagccgagaaggaaaccctcaggaaggcctgtacaatga actgcagaagataagatggcgaggcctacagtgaattgggatgaaaggcgagcggggaggggcaa ggggcacgatggcctttaccagggtctcagtagaccaccaaggacacctacgacgcccttccatgcagg

[0197]

[0198]

		cctgccccctcgctaa
23	4G5_HG2L_CD8 H_BB_CD3Z CAR	MALPVTALLLPLALLLHAARPGSQVQLQQPGAELVKPGASVKLSCK ASGYTITSYSLHWVKQRPQGLEWIGEINPANGDHNFSKFEIKATLT VDSSNTAFMQLSRLTSEDSAVYYCTRLDDSRFHWFYFDVWGAGTTV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSIQVLTQSPALMSASPGEKVTMTCTASSS VSYMYWYQQKPRSSPKPWIFLTSNLASGVPARFSGRSGTSFSLTISS MEAEDAATYYCQQWSGYPPITFGSGTKLEIKSGTTTTAPRPPTPAPTIA SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLV ITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRL VKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQUALPPR
24	4G5_L2HG_CD8 H_BB_CD3Z CAR	ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGC TGCATGCCGCTAGACCCGGATCCCAAATTGTTCTACCCAGTCTCC AGCGCTCATGTCTGCTTCTCCAGGGGAGAAGGTACCATGACCTG CACTGCCAGCTCAAGTGTTAGTTACATGTAAGTACCAGCAGAA GCCACGATCCTCCCCAAACCCTGGATTTTTCTCACCTCCAACCTG GCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAAGTGGCCGTGGGTCTGGGACC TCTTTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCA CTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTGGTTACCCACCATCACATTCGG CTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAAGGTGGAGGTGGCAGCGGAG GAGGTGGGTCCGGCGGTGGAGGAAGCCAGGTCCAACGACAGCAG CCTGGGGCTGAAGTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAAGTGAAGTTGTCC TGCAAGGCGTCTGGCTACACCATCACCAGCTACTCTCTGCACTGG GTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAAGTGGATTGGAGAGATT AATCCTGCCAATGGTGATCATAACTTCAGTGAGAAGTTCGAGATCA AGGCCACTGACTGTAGACAGCTCCTCCAACACAGCATTCATCAT AACTCAGCAGGCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTAC AAGATTGGACGATAGTAGGTTCCACTGGTACTTCGATGTCTGGGGC GCAGGGACCACGGTCAACGCTCTCTCATCCGgaaccacgagccagcgcgcg gaccaccaacacgcgcccaccatcgctgcagccctgtccctgcccagaggcgtgcccggccag cggcggggggcgcagtgacacgaggggctggaactcgctgtgatatctacatctggcgccttggcc gggactgtgggctctctctgtcactggttatcaccttactgcaaacggggcagaaagaaactcgtat atattcaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggagatggctgtagctgcccgatttcaga agaagaagaaggagatgtaactgagagtgaagtcagcaggagcgcagacgccccgcgtacaagca gggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggatgagatgtttggacaagagac gtggccgggaccctgagatgggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaa tgcaaaaataagatggcggagcctacagtgagattgggatgaaaggcagcggcggaggggcgaag gggcacgatggccttaccaggtctcagtagaccaccaaggacacctacgagcccttcacatgcaggc cctgccccctcgctaa
25	4G5_L2HG_CD8 H_BB_CD3Z CAR	MALPVTALLLPLALLLHAARPGSQVLTQSPALMSASPGEKVTMTCT ASSSVSYMYWYQQKPRSSPKPWIFLTSNLASGVPARFSGRSGTSFSL TISSMEAEDAATYYCQQWSGYPPITFGSGTKLEIKGGGGSGGGGSGG GGSQVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTITSYSLHWVKQRPQG GLEWIGEINPANGDHNFSKFEIKATLTVDSSNTAFMQLSRLTSEDSA VYYCTRLDDSRFHWFYFDVWGAGTTVTVSSGTTTTAPRPPTPAPTIA SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLV ITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRL VKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQUALPPR
26	全长的犬FAP	ATGAAGACGTGGTAAAAATTGATTTTGGAGTTGCCACCTCTGCTG TGCTTGCTTTATTGGTGATGTGCATTGCTTACGTCCTTCAAGAGTT CATGACTCCGAAGGAGGTACAACAAGAGCACTCACACTGGAGGAT ATTTTAAATGGGACATTTACCTATAAAAACATTTTTTCCAAACTGGAT TTCAGGACAAGAATATCTTCATCAGTCTACAGATAATGATATAGTAT

[0199]

		ATTACAATATTGAAACAGGAGAATCATATACCATTTTGGAGTAATGCC ACCATGAAAAGTGTGAATGCTTCAAATTATGGCTTATCACCTGATC GTCAATTTGCATATCTAGAAAAGTGATTATCAAAGCTTTGGAGATAC TCTTACACTGCAACATATCACATCTATAACCTCAATAATGGAGAGTT TATAAGAAGAAATGAGCTTCCTCGTCCAATTCAGTATTTATGCTGGT CGCCTGTTGGGAGTAAATTAGCATATGTCTATCAAAACAATATCTAT TTGAAACAAAGACCAGAAGACCCACCTTTTCAAATAACATATAATG GAAGAGAAAATAAAATATTCAATGGAATCCCAGACTGGGTATATGA AGAGGAAATGCTTGCTACAAAACATGCTCTCTGGTGGTCTCCTAAT GGAAAATTTTGGCATATGCAGAATTTAATGATACAGAGATAACCAG TTATTGCCTATTCTATTATGGTGATGAACAATATCCTAGAACAATAA ATATTCCATACCCAAAGGCTGGAGCTAAGAACCCTGTTGTTCCGGAT CTTTATTATCGATAACCACTTATCCTCAGCAGACAGATCCCAGAGAA GTGCCAGTTCAGCAATGATAGCATCAAGTGATTATTTATTTACAGTTG GCTCACATGGGTTACTGATGAACGAGTATGTTTGCAGTGGCTAAAA AGAATCCAGAACGTTTCAGTTCTGTCCATATGTGATTTACAGGGAAG GCTGGCAGACATGGGATTGTCCAAAGGCCCAGGAACATATAGAAG AAAGCAGAACTGGATGGGCTGGTGGATTCTTTGTTTCAACACCAG TTTTTCAGCTATGATGCCATTTCTACTACAAAATATTTAGCGACAAG GATGGCTACAAACATATTTACTATATCAAAGACACTGTGGAAAATG CTATTCAAATTACAAGTGGCAAGTGGGAGGCCATAAATATATTCAG AGTAACACAGGATTCAGTGTTTTATTCTAGCAATGAATTTGAAGAC TACCCAGGAAGAAGAAATATCTATAGAATTAGCATTGGAAGCTCTC CTCCAAGCAAAAAGTGCATTACTTGCCATCTAAGGAAAGAAAGGT GCCAATATTACACAGCAAGTTTCAGTGACTACGCCAAGTCAATATGC ACTTATCTGCTATGGCCCAGGCCCTCCCATTCCACCCTTCTATGACG GCCACACTGATCAAGAAATTAATAATCCTGGAAGAAAACAAAGAAT TGAAAATGCTTTGAAAATATCCAGCTGCCTAAAGAGGAAATTA AGAACTTGAAGTGGATGATATTACTTTATGGTACAAGATGATGCT TCCTCCCCGTTTGCAGATCAAAGAAGTATCCCTTGCTAATTCAA GTGTATGGTGGTCCCTGCAGTCAGAGCGTAAAGTCTGTATTCAGTA TTAATTGGATTTCTTATCTTGCAAGTAAGGAAGGGATAGTCATTGCC TTGGTGGATGGCCGAGGAACAGCTTACCAAGGTGACAAACTCCTG TATGCAGTATATCGAAAGCTGGGTGTTTATGAAGTTGAGGACCAGA TCACAGCCGTCAGAAAATTCATAGAAATGGGTTTCATTGATGAAAA AAGAATAGCCATATGGGGCTGGTCTTATGGAGGCTATGTTTCATCA CTGGCCCTTGCTTCAGGAACCTGGTCTTTTCAAATGTGGGATAGCAG TGGCTCCTGTCTCCAGCTGGGAATATTACGCATCTATCTACACAGA ACGATTTCATGGGCCTCCAACAAAGAACGATAATCTCGAGCACTA CAAAAATTCAACTGTGATGGCAAGAGCAGAATATTTTCAGAAATGT AGACTATCTTCTCATCCACGGAACAGCAGATGATAATGTGCACTTT CAAACTCAGCACAGATTGCTAAAGCTCTGGTTAATGCACAAGTG GATTTCCAGGCAATGTGGTACTCTGACCAGAACCATGGCATAACCCG GCCTGTCTCGAAGCACTTATATACCCGCATGACCCACTTCCTAAA GCAGTGTTTTCTTTGTCCGACTGA
27	4G5 HCDR1	GYTITSYSLH
28	4G5 HCDR2	EINPANGDHNHFSEKFEIKAT
29	4G5 HCDR3	TRLDDSRFHWYFDV
30	4G5 LCDR2	LTSNLAS

[0200] C. 核酸和表达载体

[0201] 本公开提供了编码CAR的核酸。本公开的核酸可以包含编码本文公开的任一种CAR的多核苷酸序列。

[0202] 在一个实施方式中,本公开的核酸包含编码能够结合FAP的嵌合抗原受体(CAR)的多核苷酸序列,所述嵌合抗原受体(CAR)包括抗原结合结构域、跨膜结构域、和胞内结构域。抗原结合结构域包括包含三个重链互补决定区(HCDR)的重链可变区和包含三个轻链互补决定区(LCDR)的轻链可变区。

[0203] 在某些实施方式中,抗原结合结构域包括包含三个重链互补决定区(HCDR)的重链

可变区。在某些实施方式中，HCDR1包含氨基酸序列YTITSYSLH (SEQ ID NO:1)，和/或HCDR2包含氨基酸序列EINPANGDHNFSKFEIK (SEQ ID NO:2)，和/或HCDR3包含氨基酸序列LDDSRFHWFYFDV (SEQ ID NO:3)。抗原结合结构域还包括包含三个轻链互补决定区 (LCDR) 的轻链可变区。在某些实施方式中，LCDR1包含氨基酸序列TASSSVSYMY (SEQ ID NO:4)，和/或LCDR2包含氨基酸序列LTSNLA (SEQ ID NO:5)，和/或LCDR3包含氨基酸序列QQWSGYPPIT (SEQ ID NO:6)。

[0204] 在某些实施方式中，抗原结合结构域包括包含三个重链互补决定区 (HCDR) 的重链可变区。在某些实施方式中，HCDR1包含氨基酸序列GYTITSYSLH (SEQ ID NO:27)，和/或HCDR2包含氨基酸序列EINPANGDHNFSKFEIK (SEQ ID NO:27) NO:2)，和/或HCDR3包含氨基酸序列LDDSRFHWFYFDV (SEQ ID NO:3)。抗原结合结构域还包括包含三个轻链互补决定区 (LCDR) 的轻链可变区。在某些实施方式中，LCDR1包含氨基酸序列TASSSVSYMY (SEQ ID NO:4)，和/或LCDR2包含氨基酸序列LTSNLAS (SEQ ID NO:30)，和/或LCDR3包含氨基酸序列QQWSGYPPIT (SEQ ID NO:6)。

[0205] 在某些实施方式中，抗原结合结构域包括包含三个重链互补决定区 (HCDR) 的重链可变区。在某些实施方式中，HCDR1包含氨基酸序列YTITSYSLH (SEQ ID NO:1)，和/或HCDR2包含氨基酸序列EINPANGDHNFSKFEIKAT (SEQ ID NO:28)，和/或HCDR3包含氨基酸序列TRLDDSRFHWFYFDV (SEQ ID NO:29)。抗原结合结构域还包括包含三个轻链互补决定区 (LCDR) 的轻链可变区。在某些实施方式中，LCDR1包含氨基酸序列TASSSVSYMY (SEQ ID NO:4)，和/或LCDR2包含氨基酸序列LTSNLA (SEQ ID NO:5)，和/或LCDR3包含氨基酸序列QQWSGYPPIT (SEQ ID NO:6)。

[0206] 在某些实施方式中，抗原结合结构域包括包含如本文所述的三个重链互补决定区 HCDR1、HCDR2和HCDR3中任一个的重链可变区。在某些实施方式中，抗原结合结构域包括包含如本文所述的三个轻链互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3中任一个的轻链可变区。在某些实施方式中，抗原结合结构域包括本文所述的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3的任意组合。鉴于本文提供的重链和轻链可变区序列，技术人员将能够基于氨基酸编号容易地确定相关的互补决定区。

[0207] 在某些实施方式中，抗原结合结构域包括由与SEQ ID NO:8同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的多核苷酸序列编码的重链可变区和/或由与SEQ ID NO:10同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的多核苷酸序列编码的轻链可变区。

[0208] 在某些实施方式中，抗原结合结构域包括由与SEQ ID NO:12或14同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的多核苷酸序列编码的单链可变片段 (scFv)。

[0209] 还提供了核酸，其包含编码能够结合FAP的CAR的多核苷酸序列，所述CAR包括抗原结合结构域、跨膜结构域、和胞内结构域，其中抗原结合结构域包括：由与SEQ ID NO:8同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的多核苷酸序列编码的重链可变区；和由与SEQ ID NO:10同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的多核苷酸序列编码的轻链可变区。

[0210] 进一步提供了核酸，其包含与SEQ ID NO:22或24同一性至少80%、85%、90%、

95%、96%、97%、98%、99%、或100%的多核苷酸序列。

[0211] 在一些实施方式中,提供本公开的核酸用于例如在哺乳动物细胞中产生如本文所述的CAR。在一些实施方式中,本公开的核酸提供了编码CAR的核酸的扩增。

[0212] 在一些实施方式中,本公开的核酸包含第一多核苷酸序列和第二多核苷酸序列。在某些实施方式中,第一多核苷酸序列包括编码本公开的靶向FAP的CAR的多核苷酸序列。在一些实施方式中,本公开的靶向FAP的CAR可以与其它治疗剂,例如但不限于免疫疗法(如免疫肿瘤抗体疗法和检查点阻断)、开关共刺激受体、或其它CAR-T疗法组合使用。因此,在这样的实施方式中,第二多核苷酸序列可包括编码抗癌抗体、检查点阻断分子、开关共刺激受体、或第二嵌合抗原受体的多核苷酸序列。

[0213] 第一和第二多核苷酸序列可以通过连接体分隔。用于本公开的连接体允许多个蛋白由同一核酸序列(例如,多顺反子序列或双顺反子序列)编码,其被翻译为解离成单独的蛋白组分的多蛋白。在某些实施方式中,核酸从5'到3'包括第一多核苷酸序列、连接体和第二多核苷酸序列。在某些实施方式中,核酸从5'到3'包括第二多核苷酸序列、连接体和第一多核苷酸序列。

[0214] 在一些实施方式中,连接体包含编码内部核糖体进入位点(IRES)的核酸序列。如本文所用,“内部核糖体进入位点”或“IRES”是指促进内部核糖体直接进入蛋白编码区的起始密码子(如ATG),进而引起对该基因的帽独立性(cap-independent)翻译的元件。各种内部核糖体进入位点是本领域技术人员已知的,其非限制地包括可获自以下的IRES:病毒或细胞mRNA来源,例如,免疫球蛋白重链结合蛋白(BiP);血管内皮生长因子(VEGF);成纤维细胞生长因子2;胰岛素样生长因子;翻译起始因子eIF4G;酵母转录因子TFIID和HAP4;和可获自以下的IRES:例如,心病毒、鼻病毒、口蹄疫病毒、HCV、弗兰德鼠白血病毒(FrMLV)、和莫洛尼鼠白血病毒(MoMLV)。本领域技术人员将能够选择用于本发明的适合的IRES。

[0215] 在一些实施方式中,连接体包含编码自切割肽的核酸序列。如本文所用,“自切割肽”或“2A肽”是指允许多个蛋白编码为多蛋白的寡肽,多蛋白在转录后解离成组分蛋白。术语“自切割”的使用不意图暗示蛋白水解切割反应。各种自切割肽或2A肽是本领域技术人员已知的,其非限制性包括在小核糖核酸病毒科病毒家族成员中发现的那些,例如,口蹄疫病毒(FMDV)、马甲型鼻炎病毒(ERAV)、明脉扁刺蛾β四体病毒(TaV)和猪捷申病毒-1(PTV-1);和心病毒,如泰勒病毒(Theilovirus)和脑心肌炎病毒。源自FMDV、ERAV、PTV-1、和TaV的2A肽在本文中分别被称为“F2A”、“E2A”、“P2A”和“T2A”。本领域技术人员将能够选择用于本发明的适合的自切割肽。

[0216] 在一些实施方式中,连接体进一步包含编码弗林蛋白酶切割位点的核酸序列。弗林蛋白酶是无所不在地表达的蛋白酶,位于反式高尔基体中并在蛋白前体分泌前对其加工。弗林蛋白酶在其共有识别序列的COOH-末端切割。各种弗林蛋白酶共有识别序列(或“弗林蛋白酶切割位点”)是本领域技术人员已知的,其非限制地包括Arg-X1-Lys-Arg(SEQ ID NO:117)或Arg-X1-Arg-Arg(SEQ ID NO:118)、X2-Arg-X1-X3-Arg(SEQ ID NO:119)和Arg-X1-X1-Arg(SEQ ID NO:120),如Arg-Gln-Lys-Arg(SEQ ID NO:121),其中X1是任意天然存在的氨基酸,X2是Lys或Arg,并且X3是Lys或Arg。本领域技术人员将能够选择用于本发明的适合的弗林蛋白酶切割位点。

[0217] 在一些实施方式中,连接体包含编码弗林蛋白酶切割位点和2A肽的组合适用的核酸序

列。实例非限制地包括：包含编码弗林蛋白酶和F2A的核酸序列的连接体、包含编码弗林蛋白酶和E2A的核酸序列的连接体、包含编码弗林蛋白酶和P2A的核酸序列的连接体、包含编码弗林蛋白酶和T2A的核酸序列的连接体。本领域技术人员将能够选择用于本发明的适合的组合。在这样的实施方式中，连接体可进一步包含在弗林蛋白酶和2A肽之间的间隔区序列。各种间隔区序列是本领域已知的，其非限制地包括甘氨酸丝氨酸(GS)间隔区，如(GS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:31)和(GGGS)_n(SEQ ID NO:32)，其中n代表至少为1的整数。示例性间隔区序列可包含氨基酸序列，其非限制地包括GGSG(SEQ ID NO:34)、GGSGG(SEQ ID NO:35)、GSGSG(SEQ ID NO:36)、GSGGG(SEQ ID NO:37)、GGGSG(SEQ ID NO:38)、GSSSG(SEQ ID NO:39)等。本领域技术人员将能够选择用于本发明的适合的间隔区序列。

[0218] 在一些实施方式中，本公开的核酸可以可操作地连接至转录控制元件，例如启动子和增强子等。合适的启动子和增强子元件是本领域技术人员已知的。

[0219] 在某些实施方式中，编码外源CAR的核酸与启动子可操作地连接。在某些实施方式中，启动子是磷酸甘油酸激酶-1(PGK)启动子。

[0220] 为了在细菌细胞中表达，合适的启动子包括但不限于lacI、lacZ、T3、T7、gpt、 λ P和trc。为了在真核细胞中表达，合适的启动子包括但不限于轻链和/或重链免疫球蛋白基因启动子元件和增强子元件；巨细胞病毒即时早期启动子；单纯疱疹病毒胸腺嘧啶激酶启动子；早期和晚期SV40启动子；存在于来自逆转录病毒的长末端重复序列的启动子；小鼠金属硫蛋白-I启动子；和各种本领域已知的组织特异性启动子。合适的可逆启动子(包括可逆诱导型启动子)是本领域已知的。这样的可逆启动子可从多种生物体分离和源自多种生物体，例如，真核生物和原核生物。对源自第一生物体的可逆启动子的修饰用于第二生物体(例如，第一原核生物和第二真核生物、第一真核生物和第二原核生物等)是本领域公知的。这样的可逆启动子和基于这样的可逆启动子的系统还包含其它控制蛋白，包括但不限于醇调控启动子(例如，醇脱氢酶I(alcA)基因启动子、响应于醇反式激活蛋白(A1cR)的启动子等)、四环素调控启动子(例如，包括Tet激活子(TetActivators)、TetON、TetOFF等的启动子系统)、类固醇调控启动子(例如，大鼠糖皮质激素受体启动子系统、人雌性激素受体启动子系统、类视黄醇启动子系统、甲状腺启动子系统、蜕皮素启动子系统、米非司酮启动子系统)、金属调控启动子(例如，金属硫蛋白启动子系统)、发病机理相关调控启动子(例如，水杨酸调控启动子、乙烯调控启动子、苯并噻二唑调控启动子等)、温度调控启动子(例如，热诱导型启动子(例如，HSP-70、HSP-90、大豆热激启动子等)、光调控启动子、合成诱导型启动子等)。

[0221] 在一些实施方式中，启动子是CD8细胞特异性启动子、CD4细胞特异性启动子、嗜中性粒细胞特异性启动子、或NK特异性启动子。例如，可以使用CD4基因启动子；参见，例如，Salmon等人Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90:7739；和Marodon等人(2003) Blood 101:3416。作为另一实例，可以使用CD8基因启动子。可通过使用NcrI(p46)启动子实现NK细胞特异性表达；参见，例如，Eckelhart等人Blood (2011) 117:1565。

[0222] 为了在酵母细胞中表达，合适的启动子是组成型启动子，如ADH1启动子、PGK1启动子、ENO启动子、PYK1启动子等；或可调控启动子，如GAL1启动子、GAL10启动子、ADH2启动子、PHOS启动子、CUP1启动子、GALT启动子、MET25启动子、MET3启动子、CYC1启动子、HIS3启动子、ADH1启动子、PGK启动子、GAPDH启动子、ADC1启动子、TRP1启动子、URA3启动子、LEU2启动

子、ENO启动子、TP1启动子、和AOX1(例如,用于毕赤酵母属)。对适合的载体和启动子进行选择完全是在本领域普通技术人员的水平内的。用于原核宿主细胞的合适的启动子包括但不限于噬菌体T7 RNA聚合酶启动子;trp启动子;lac操纵子启动子;杂合启动子,例如,lac/tac杂合启动子、tac/trc杂合启动子、trp/lac启动子、T7/lac启动子;trc启动子;tac启动子等;araBAD启动子;体内调控启动子,如ssaG启动子或相关启动子(参见,例如,美国专利公开号20040131637)、pagC启动子(Pulkinen和Miller, *J. Bacteriol.* (1991) 173 (1) :86-93;Alpuche-Aranda等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992) 89 (21) :10079-83)、nirB启动子(Harborne等人 *Mol. Micro.* (1992) 6 :2805-2813)等(参见,例如, Dunstan等人, *Infect. Immun.* (1999) 67 :5133-5141;McKelvie等人, *Vaccine* (2004) 22 :3243-3255;和Chatfield等人, *Biotechnol.* (1992) 10 :888-892); $\sigma 70$ 启动子,例如,共有 $\sigma 70$ 启动子(参见,例如,GenBank登录号AX798980、AX798961、和AX798183);稳定期启动子,例如,dps启动子、spv启动子等;源自毒力岛SPI-2 (pathogenicity island SPI-2)的启动子(参见,例如, W096/17951);actA启动子(参见,例如,Shetron-Rama等人, *Infect. Immun.* (2002) 70 :1087-1096);rpsM启动子(参见,例如,Valdivia和Falkow *Mol. Microbiol.* (1996) .22 :367);tet启动子(参见,例如,Hillien, W.和Wissmann, A. (1989) In Saenger, W.和Heinemann, U. (eds), *Topics in Molecular and Structural Biology, Protein--Nucleic Acid Interaction*. Macmillan, London, UK, 第10卷, 第143-162页);SP6启动子(参见,例如, Melton等人, *Nucl. Acids Res.* (1984) 12 :7035);等等。用于原核生物(如大肠杆菌)的合适的强启动子包括但不限于Trc、Tac、T5、T7、和P Λ 。用于细菌宿主细胞的操纵子的非限制性实例包括乳糖启动子操纵子(当与乳糖接触时, LacI抑制蛋白改变构象,进而防止Lad抑制蛋白与操纵子结合)、色氨酸启动子操纵子(当与色氨酸复合时, TrpR抑制蛋白具有结合操纵子的构象;在色氨酸不存在时, TrpR抑制蛋白具有不与操纵子结合的构象)、和tac启动子操纵子(参见,例如, deBoer等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1983) 80 :21-25)。

[0223] 合适的启动子的其它实例包括即时早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列。此启动子序列是强组成型启动子序列,能够驱动与其可操作地连接的任意多核苷酸序列的高水平表达。还可以使用其它组成型启动子序列,包括但不限于猿猴病毒40(SV40)早期启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)或人免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复序列(LTR)启动子、MoMuLV启动子、禽白血病病毒启动子、爱泼斯坦-巴尔病毒即时早期启动子、劳斯肉瘤病毒启动子、EF-1 α 启动子、以及人基因启动子,诸如但不限于,肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、血红蛋白启动子、和肌酸激酶启动子。进一步,本发明不应限于组成型启动子的使用。诱导型启动子也被考虑作为本发明的一部分。诱导型启动子的使用提供了分子开关,该分子开关能够能够开启诱导型启动子可操作地连接的多核苷酸序列的表达(当期望这种表达时),或使该表达关闭(当不期望该表达时)。诱导型启动子的实例包括但不限于金属硫蛋白(metallothionine)启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子、和四环素启动子。

[0224] 在一些实施方式中,含有合适的启动子的基因座或构建物或转基因通过诱导系统的诱导,是不可逆地开关的。用于诱导不可逆开关的合适的系统是本领域公知的,例如,不可逆开关的诱导可利用Cre-lox介导的重组(参见,例如, Fuhrmann-Benzakein, 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000) 28 :e99,其公开内容通过引用并入本文)。本领域已知的重组酶、核酸内切酶、连接酶、重组位点等的任意合适的重组都可用于产生不可逆地开关的启

动子。本文其它部分描述的用于执行位点特异性重组的方法、机理、和要求可用于产生不可逆地开关的启动子,并且是本领域公知的,参见,例如,Grindley等人Annual Review of Biochemistry (2006) 567-605;和Tropp,Molecular Biology (2012) (Jones&Bartlett Publishers,Sudbury,Mass.) (其公开内容通过引用并入本文)。

[0225] 在一些实施方式中,本公开的核酸进一步包含编码CAR诱导表达盒的核酸序列。在一个实施方式中,CAR诱导表达盒用于产生一经CAR信号传导就释放的转基因多肽产物。参见,例如,Chmielewski和Abken,Expert Opin.Biol.Ther. (2015) 15 (8) :1145-1154;和Abken,Immunotherapy (2015) 7 (5) :535-544。在一些实施方式中,本公开的核酸进一步包含编码可操作地连接至T-细胞激活响应启动子的细胞因子的核酸序列。在一些实施方式中,可操作地连接至T-细胞激活响应启动子的细胞因子存在于单独的核酸序列上。在一个实施方式中,细胞因子是IL-12。

[0226] 本公开的核酸可存在于表达载体和/或克隆载体内。表达载体可包括可选标记物、复制起始点、和提供载体的复制和/或维护的其它特征。合适的表达载体包括,例如,质粒、病毒载体等。本领域技术人员已知多种合适的载体和启动子;很多都可商业获得以用于产生对象重组构建物。以下载体通过实例的方式提供并且不应以任何方式解释为是限制性的:细菌的:pBs、phagescript、PsiX174、pBluescript SK、pBs KS、pNH8a、pNH16a、pNH18a、pNH46a (Stratagene,La Jolla,Calif.,USA);pTrc99A、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、和pRIT5 (Pharmacia,Uppsala,瑞典)。真核生物的:pWLneo、pSV2cat、pOG44、PXR1、pSG (Stratagene)pSVK3、pBPV、pMSG和pSVL (Pharmacia)。

[0227] 表达载体通常具有靠近启动子序列的便利的限制性位点,以提供编码异源蛋白质的核酸序列的插入。在表达宿主中有效的 (operative) 可选标记物可以存在。合适的表达载体包括但不限于病毒载体 (例如基于以下的病毒载体:牛痘病毒;脊髓灰质炎病毒;腺病毒 (参见,例如,Li等人,Invest.Ophthalmol.Vis.Sci. (1994) 35:2543-2549;Borras等人,Gene Ther. (1999) 6:515-524;Li和Davidson,Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1995) 92:7700-7704;Sakamoto等人,H.Gene Ther. (1999) 5:1088-1097;WO 94/12649,WO 93/03769;W093/19191;WO 94/28938;WO 95/11984和WO 95/00655);腺相关病毒 (参见,例如,Ali等人,Hum.Gene Ther. (1998) 9:81-86,Flannery等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1997) 94:6916-6921;Bennett等人,Invest.Ophthalmol.Vis.Sci. (1997) 38:2857-2863;Jomary等人,Gene Ther. (1997) 4:683-690,Rolling等人,Hum.Gene Ther. (1999) 10:641-648;Ali等人,Hum.Mol.Genet. (1996) 5:591-594;Srivastava in WO 93/09239,Samulski等人,J.Vir. (1989) 63:3822-3828;Mendelson等人,Virol. (1988) 166:154-165;和Flotte等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1993) 90:10613-10617);SV40;单纯疱疹病毒;人免疫缺陷病毒 (参见,例如,Miyoshi等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1997) 94:10319-23;Takahashi等人,J.Virol. (1999) 73:7812-7816);逆转录病毒载体 (例如,鼠白血病病毒、脾坏死病毒、和源自以下逆转录病毒的载体:如劳斯肉瘤病毒、哈维肉瘤病毒、禽白血病病毒、人免疫缺陷病毒、骨髓增生肉瘤病毒、和乳腺肿瘤病毒);等等。

[0228] 适合使用的其它表达载体是,例如,但不限于慢病毒载体、 γ 逆转录病毒载体、泡沫病毒载体、腺相关病毒载体、腺病毒载体、痘病毒载体、疱疹病毒载体、工程改造的杂合病毒载体、转座子介导的载体等。病毒载体技术在本领域是公知的,并且例如在Sambrook等

人,2012,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第1-4卷,Cold Spring Harbor Press, NY)和其它病毒学和分子生物学手册中描述。可用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒、和慢病毒。

[0229] 总体上,合适的载体包含在至少一种生物体中具有功能的复制起始点、启动子序列、便利的限制性核酸内切酶位点、和一个或多个可选标记物(例如,WO 01/96584;W001/29058;和美国专利号6,326,193)。

[0230] 在一些实施方式中,表达载体(例如,慢病毒载体)可用于将CAR导入到免疫细胞或其前体(例如,T细胞)中。因此,本发明的表达载体(例如,慢病毒载体)可包含编码CAR的核酸。在一些实施方式中,表达载体(例如,慢病毒载体)将包含将辅助其中所编码的CAR的功能表达的其它元件。在一些实施方式中,包含编码CAR的核酸的表达载体进一步包含哺乳动物启动子。在一个实施方式中,载体进一步包含延长因子-1- α 启动子(EF-1 α 启动子)。EF-1 α 启动子的使用可提高下游转基因(例如,编码CAR的核酸序列)表达的效率。生理启动子(例如,EF-1 α 启动子)不太可能诱导整合介导的基因毒性,而可能废除逆转录病毒载体转化干细胞的能力。适用于载体(例如,慢病毒载体)的其它生理启动子对本领域技术人员是已知的,并且可并入到本发明的载体中。在一些实施方式中,载体(例如,慢病毒载体)进一步包含可提供可提高滴定度和基因表达的非必需顺式作用序列。非必需顺式作用序列的一个非限制实例是中心多聚嘌呤区(central polypurine tract)和中心终止序列(cPPT/CTS),其对高效逆转录和核输入是很重要的。其它非必需顺式作用序列对本领域技术人员是已知的,并且可并入到本发明的载体(例如,慢病毒载体)中。在一些实施方式中,载体进一步包含转录后调控元件。转录后调控元件可提高RNA转录、提高转基因表达和稳定RNA转录物。转录后调控元件的一个实例是土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)。因此,在一些实施方式中,本发明的载体进一步包含WPRE序列。各种转录后调控元件对本领域技术人员是已知的,并且可并入到本发明的载体(例如,慢病毒载体)中。本发明的载体可进一步包含其它元件,如用于RNA运输、包装序列的rev应答元件(RRE),和5'和3'长末端重复序列(LTR)。术语“长末端重复序列”或“LTR”是指碱基对的位于逆转录病毒DNA末端的包含U3、R和U5区域的结构域。LTR总体上提供逆转录病毒基因表达(例如,启动、起始和基因转录物的聚腺苷酸化)和病毒复制所需的功能。在一个实施方式中,本发明的载体(例如,慢病毒载体)包括3' U3缺失的LTR。因此,本发明的载体(例如,慢病毒载体)可包含本文所述的元件的任意组合,以增强转基因的功能表达的效率。例如,本发明的载体(例如,慢病毒载体)除编码CAR的核酸外可包括WPRE序列、cPPT序列、RRE序列、5' LTR、3' U3缺失的LTR'。

[0231] 本发明的载体可以是自失活载体。如本文所用,术语“自失活载体”是指3' LTR增强启动子区(U3区)已被修饰(例如,通过缺失或取代)的载体。自失活载体可防止病毒转录超出第一轮病毒复制。因此,自失活载体能够感染,然后仅一次就能整合到宿主基因组(例如,哺乳动物基因组)中,并且无法进一步去除(passed)。因此,自失活载体可大大地降低产生具有复制能力的病毒的风险。

[0232] 在一些实施方式中,本发明的核酸可以是RNA,例如,体外合成的RNA。用于体外合成RNA的方法是本领域技术人员已知的;可以使用任何已知的方法来合成包含编码本公开的CAR的序列的RNA。用于将RNA导入到宿主细胞的方法是本领域已知的。参见,例如,Zhao等人Cancer Res. (2010) 15:9053。将包含编码本公开的CAR的核苷酸序列的RNA导入到宿主细

胞可在体外或离体或者体内实施。例如,可用包含编码本公开的CAR的核苷酸序列的RNA将宿主细胞(例如,NK细胞、细胞毒性T淋巴细胞等)体外或离体电穿孔。

[0233] 为了评估多肽或其部分的表达,待导入细胞的表达载体还可以包含可选标记基因或报告基因,或两者,以便于从寻求通过病毒载体转染或感染的细胞群中鉴定和选择表达细胞。在一些实施方式中,可选标记物可携带在单独的DNA片段上并在共转染程序中使用。可选标记物和报告基因的两侧都可以有适当的调控序列,以能够在宿主细胞中表达。有用的可选标记物非限制地包括抗生素抗性基因。

[0234] 报告基因用于鉴定潜在转染的细胞和用于评价调控序列的功能性。一般来说,报告基因是不存在于受体生物体或组织中或由其表达的编码多肽的基因,该多肽的表达通过某些易于检测的特性(例如,酶活性)来表现。报告基因的表达在DNA导入受体细胞后的适当时间进行评估。合适的报告基因可非限制地包括编码萤光素酶、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、分泌型碱性磷酸酶的基因,或绿色荧光蛋白基因(例如,Ui-Tei等人,2000FEBS Letters 479:79-82)。

[0235] D. 修饰的免疫细胞

[0236] 本发明提供了修饰的免疫细胞或其前体(例如,T细胞),其包含能够结合FAP(例如,人、犬和/或小鼠FAP)的嵌合抗原受体(CAR)。本发明还包括修饰的免疫细胞或其前体,其包含本文公开的任意CAR、本文公开的任意核酸、或本文公开的任意载体。

[0237] 本发明的一个方面提供了修饰的免疫细胞或其前体细胞,其包含能够结合FAP的CAR,其中CAR包括:包含三个重链互补决定区(HCDR)的重链可变区和包含三个轻链互补决定区(LCDR)的轻链可变区。

[0238] 在某些实施方式中,抗原结合结构域包括包含三个重链互补决定区(HCDR)的重链可变区。在某些实施方式中,HCDR1包含氨基酸序列YTITSYSLH(SEQ ID NO:1),和/或HCDR2包含氨基酸序列EINPANGDHNFSKFEIK(SEQ ID NO:2),和/或HCDR3包含氨基酸序列LDDSRFHWFYFDV(SEQ ID NO:3)。抗原结合结构域还包括包含三个轻链互补决定区(LCDR)的轻链可变区。在某些实施方式中,LCDR1包含氨基酸序列TASSSVSYMY(SEQ ID NO:4),和/或LCDR2包含氨基酸序列LTSNLA(SEQ ID NO:5),和/或LCDR3包含氨基酸序列QQWSGYPPIT(SEQ ID NO:6)。

[0239] 在某些实施方式中,抗原结合结构域包括包含三个重链互补决定区(HCDR)的重链可变区。在某些实施方式中,HCDR1包含氨基酸序列GYTITSYSLH(SEQ ID NO:27),和/或HCDR2包含氨基酸序列EINPANGDHNFSKFEIK(SEQ ID NO:2),和/或HCDR3包含氨基酸序列LDDSRFHWFYFDV(SEQ ID NO:3)。抗原结合结构域还包括包含三个轻链互补决定区(LCDR)的轻链可变区。在某些实施方式中,LCDR1包含氨基酸序列TASSSVSYMY(SEQ ID NO:4),和/或LCDR2包含氨基酸序列LTSNLAS(SEQ ID NO:30),和/或LCDR3包含氨基酸序列QQWSGYPPIT(SEQ ID NO:6)。

[0240] 在某些实施方式中,抗原结合结构域包括包含三个重链互补决定区(HCDR)的重链可变区。在某些实施方式中,HCDR1包含氨基酸序列YTITSYSLH(SEQ ID NO:1)和/或HCDR2包含氨基酸序列EINPANGDHNFSKFEIKAT(SEQ ID NO:28),和/或HCDR3包含氨基酸序列TRLDDSRFHWFYFDV(SEQ ID NO:29)。抗原结合结构域还包括包含三个轻链互补决定区(LCDR)的轻链可变区。在某些实施方式中,LCDR1包含氨基酸序列TASSSVSYMY(SEQ ID NO:4),和/

或LCDR2包含氨基酸序列LTSNLA (SEQ ID NO:5), 和/或LCDR3包含氨基酸序列QQWSGYPPIT (SEQ ID NO:6)。

[0241] 在某些实施方式中, 抗原结合结构域包括包含如本文所述的三个重链互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3中任一个的重链可变区。在某些实施方式中, 抗原结合结构域包括包含如本文所述的三个轻链互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3中任一个的轻链可变区。在某些实施方式中, 抗原结合结构域包括本文所述的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3的任意组合。鉴于本文提供的重链和轻链可变区序列, 技术人员将能够基于氨基酸编号容易地确定相关的互补决定区。

[0242] 本发明的另一方面提供了修饰的免疫细胞或其前体细胞, 其包含能够结合FAP的CAR, 其中CAR包括: 重链可变区, 其包含与SEQ ID NO:7同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列和/或轻链可变区, 其包含与SEQ ID NO:9同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0243] 还提供了修饰的免疫细胞或其前体细胞, 其包含能够结合FAP的CAR, 其中CAR包括包含与SEQ ID NO:11或13同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列的单链可变片段(scFv)。

[0244] 进一步提供了修饰的免疫细胞或其前体细胞, 其包含能够结合FAP的CAR, 其中CAR包含与SEQ ID NO:23或25同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0245] 在某些实施方式中, 修饰的细胞是修饰的T细胞。在某些实施方式中, 修饰的细胞是修饰的NK细胞。在某些实施方式中, 修饰细胞是自体细胞。在某些实施方式中, 修饰细胞是从人对象获得的自体细胞。在某些实施方式中, 修饰的细胞是从犬对象获得的自体细胞。在某些实施方式中, 修饰细胞是同种异体细胞。

[0246] E. 免疫细胞的来源

[0247] 在某些实施方式中, 从对象获得免疫细胞(例如, T细胞)的来源以供离体操纵。供离体操纵的免疫细胞的来源还可包括, 例如, 自体或异源供体血液、脐带血、或骨髓。例如, 免疫细胞的来源可来自待用本发明的修饰的免疫细胞处理的对象, 例如, 对象的血液、对象的脐带血、或对象的骨髓。对象的非限制性实例包括人、狗、猫、小鼠、大鼠、及其转基因种属。优选地, 对象是人。

[0248] 免疫细胞可从多种来源获得, 包括血液、外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脾组织、脐带、淋巴、或淋巴器官。免疫细胞是免疫系统的细胞, 如先天性免疫或适应性免疫的细胞, 例如, 髓样细胞或淋巴样细胞, 包括淋巴细胞, 一般是T细胞和/或NK细胞。其它示例性细胞包括干细胞, 如多能干细胞和多潜能干细胞, 包括诱导多潜能干细胞(iPSC)。在某些方面中, 这些细胞是人细胞。对于待处理的对象, 这些细胞可以是同种异体和/或自体的。这些细胞一般是原代细胞, 诸如那些从对象直接分离和/或从对象分离并冷冻的细胞。

[0249] 在某些实施方式中, 免疫细胞是T细胞, 例如, CD8+T细胞(例如, CD8+幼稚T细胞、中枢记忆T细胞、或效应记忆T细胞)、CD4+T细胞、自然杀伤T细胞(NKT细胞)、调节T细胞(Treg)、干细胞记忆T细胞、淋巴祖细胞、造血干细胞、自然杀伤细胞(NK细胞)或树枝状细胞。在一些实施方式中, 细胞是单核细胞或粒细胞, 例如, 髓样细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树枝状细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、和/或嗜碱性粒细胞。在一个实施方式中, 靶细胞

是诱导多潜能干 (iPS) 细胞或源自 iPS 细胞的细胞, 例如, 从对象产生的 iPS 细胞, 经操纵以改变 (例如, 诱导一个或多个靶基因的突变) 或操纵一个或多个靶基因的表达, 并分化成例如 T 细胞, 例如 CD8+T 细胞 (例如, CD8+幼稚 T 细胞、中枢记忆 T 细胞、或效应记忆 T 细胞)、CD4+T 细胞、干细胞记忆 T 细胞、淋巴祖细胞或造血干细胞。

[0250] 在一些实施方式中, 细胞包括一个或多个 T 细胞亚群或其它细胞类型, 如整个 T 细胞群、CD4+细胞、CD8+细胞、及其亚群, 如由功能、激活状态、成熟度、分化潜能、扩大、再循环、定位、和/或持久能力、抗原特异性、抗原受体类型、在特定器官或隔室中的存在、标记物或细胞因子分泌分布 (profile)、和/或分化程度所定义的那些。在 T 细胞和/或 CD4+T 细胞和/或 CD8+T 细胞的亚型和亚群中是幼稚 T (TN) 细胞、效应 T 细胞 (TEFF)、记忆 T 细胞及其亚型, 如干细胞记忆 T 细胞 (TSCM)、中枢记忆 T 细胞 (TCM)、效应记忆 T (TEM)、或终末分化效应记忆 T 细胞、肿瘤浸润性淋巴细胞 (TIL)、未成熟 T 细胞、成熟 T 细胞、辅助性 T 细胞、细胞毒性 T 细胞、粘膜相关恒定 T (MAIT) 细胞、天然存在的和适应性调节 T (Treg) 细胞、辅助性 T 细胞, 如 TH1 细胞、TH2 细胞、TH3 细胞、TH17 细胞、TH9 细胞、TH22 细胞、滤泡辅助性 T 细胞、 α/β T 细胞、和 δ/γ T 细胞。在某些实施方式中, 可以使用本领域中可获得的任意数量的 T 细胞系。

[0251] 在一些实施方式中, 方法包括从对象分离免疫细胞, 对其制备、处理、培养、和/或工程改造。在一些实施方式中, 工程改造的细胞的制备包括一个或多个培养和/或制备步骤。用于工程改造的细胞可从样品 (如生物样品, 例如, 获自或源自对象的生物样品) 中分离。在一些实施方式中, 从中分离细胞的对象是患有疾病或状况或需要细胞疗法或将要对其施用细胞疗法的对象。在一些实施方式中, 对象是需要特定治疗干预 (诸如细胞进行分离、处理、和/或工程改造的过继性细胞疗法) 的人。因此, 一些实施方式中的细胞是原代细胞, 例如, 原代人细胞。样品包括组织、流体、和直接取自对象的其它样品, 以及得自一个或多个处理步骤, 如分离、离心、基因工程改造 (例如用病毒载体转导)、洗涤、和/或孵育的样品。生物样品可以是直接从生物来源获得的样品, 或者是经过处理的样品。生物样品包括但不限于体液, 如血液、血浆、血清、脑脊液、滑液、尿液和汗液、组织和器官样品, 包括源自其中的经处理的样品。

[0252] 在一些方面中, 细胞所源自或分离的样品是血液样品或源自血液的样品, 或是单采血液成分术产物或白细胞提取法产物, 或者源自单采血液成分术产物或白细胞提取法产物。示例性样品包括全血、外周血单核细胞 (PBMC)、白细胞、骨髓、胸腺、组织活检、肿瘤、白血病、淋巴瘤、淋巴结、肠相关淋巴组织、粘膜相关淋巴组织、脾、其它淋巴组织、肝、肺、胃、肠、结肠、肾、胰腺、乳腺、骨、前列腺、子宫颈、睾丸、卵巢、扁桃体、或其它器官、和/或源自其的细胞。在细胞疗法 (例如, 过继性细胞疗法) 的背景下, 样品包括来自自体来源和同种异体来源的样品。

[0253] 在一些实施方式中, 细胞源自细胞系, 例如 T 细胞系。一些实施方式中的细胞来自异种来源, 例如来自小鼠、大鼠、非人灵长类动物、和猪。在一些实施方式中, 细胞的分离包括一个或多个制备步骤和/或基于非亲和力的细胞分离步骤。在一些实例中, 细胞在一种或多种试剂的存在下被洗涤、离心、和/或孵育, 从而例如去除不需要的组分、富集所期望的组分、裂解或去除对特定试剂敏感的细胞。在一些实例中, 基于一种或多种特性 (如密度、粘附特性、大小、敏感性和/或对特定组分的抗性) 分离细胞。在一些实施方式中, 细胞系是 NK 细胞系 (例如, NK92 或 NK92-MI 细胞系)。

[0254] 在一些实例中,例如通过单采血液成分术或白细胞提取法从对象的循环血液中获得细胞。在一些方面中,样品含有淋巴细胞,淋巴细胞包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其它有核白细胞、红细胞、和/或血小板,并且在一些方面中包含除红细胞和血小板之外的细胞。在一些实施方式中,洗涤从对象收集的血细胞,从而例如去除血浆部分并将细胞置于适当的缓冲液或介质中以用于后续处理步骤。在一些实施方式中,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤细胞。在一些方面中,根据制造商的说明书,通过切向流过滤(TFF)来完成洗涤步骤。在一些实施方式中,细胞在洗涤后重悬于多种生物相容性缓冲液中。在某些实施方式中,去除血细胞样品的组分并且将细胞直接重悬于培养基中。在一些实施方式中,方法包括基于密度的细胞分离方法,诸如通过裂解红细胞并通过Percoll或Ficoll梯度离心从外周血制备白细胞。

[0255] 在一个实施方式中,通过单采血液成分术或白细胞提取法获得来自个体的循环血液的免疫细胞。单采血液成分术产物通常含有淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其它有核白细胞、红细胞、和血小板。可洗涤通过单采血液成分术收集的细胞以去除血浆部分并将细胞置于适当的缓冲液或介质如磷酸盐缓冲盐水(PBS)中,或洗涤溶液缺乏钙并且可能缺乏镁或可能缺乏许多(甚至所有的)二价阳离子以用于后续处理步骤。洗涤后,细胞可重悬于多种生物相容性缓冲液中,诸如,例如无钙无镁的PBS。可选地,可以去除单采血液成分术样品的不期望的组分,并将细胞直接重悬于培养基中。

[0256] 在一些实施方式中,分离方法包括基于一种或多种特异性分子,如表面标记物(例如,表面蛋白)、胞内标记物、或核酸在细胞中的表达或存在来分离不同的细胞类型。在一些实施方式中,可以使用基于这些标记物的任意已知的分离方法。在一些实施方式中,分离是基于亲和力或免疫亲和力的分离。例如,在一些方面中,分离包括基于细胞的表达或一种或多种标记物(通常是细胞表面标记物)的表达水平对细胞和细胞群进行的分离,例如,通过与特异性地结合到这种标记物的抗体或结合配偶体孵育,之后大体上是洗涤步骤和将结合了抗体或结合配偶体的细胞与未结合该抗体或结合配偶体的细胞分离。

[0257] 这种分离步骤可以基于阳性选择,其中保留已结合试剂的细胞以供进一步使用;和/或基于阴性选择,其中保留未结合抗体或结合配偶体的细胞。在一些实例中,这两部分都被保留以供进一步使用。在一些方面中,阴性选择在没有可用于在异种群体中特异性地识别细胞类型的抗体的情况下会特别有用,使得基于由除了所期望的群体之外的细胞所表达的标记物进行分离是最佳的。分离无需导致特定细胞群或表达特定标记物的细胞的100%富集或去除。例如,对特定类型的细胞(诸如表达标记物的细胞)的阳性选择或富集是指增加此类细胞的数量或百分比,但不必导致不表达该标记物的细胞的完全缺失。同样地,特定类型细胞(诸如表达标记物的细胞)的阴性选择、去除、或耗竭是指减少此类细胞的数量或百分比,但不必导致完全去除所有此类细胞。

[0258] 在一些实例中,进行多轮分离步骤,其中从一个步骤经阳性选择或阴性选择的部分经历另一分离步骤,诸如后续的阳性选择或阴性选择。在一些实例中,单个分离步骤可同时耗竭表达多个标记物的细胞,诸如通过将细胞与多个抗体或结合配偶体孵育,每个抗体或结合配偶体都对阴性选择所靶向的标记物具有特异性。同样地,通过将细胞与在各种细胞类型上表达的多个抗体或结合配偶体孵育,可以同时阳性选择出多种细胞类型。

[0259] 在一些实施方式中,针对对一个或多个特定标记物(如表面标记物)呈阳性(标记

物⁺)或表达高水平(标记物^高)的细胞来富集T细胞群中的一个或多个或使其从上述细胞中耗竭,或针对对一个或多个标记物呈阴性(标记物⁻)或表达低水平(标记物^低)的细胞来富集T细胞群中的一个或多个或使其从上述细胞中耗竭。例如,在一些方面中,通过阳性选择技术或阴性选择技术分离T细胞的特异性亚群,诸如呈阳性的或表达高水平的一个或多个表面标记物的细胞,例如CD28⁺、CD62L⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺、和/或CD45R0⁺T细胞。在一些情况下,此类标记物是在某些T细胞群(如非记忆细胞)上缺失或以相对较低水平表达,但在某些其它T细胞群(如记忆细胞)上存在或以相对较高水平表达的标记物。在一个实施方式中,针对呈阳性的或表达高表面水平CD45R0、CCR7、CD28、CD27、CD44、CD127、和/或CD62L的细胞来富集(即,阳性选择)细胞(如CD8⁺细胞或T细胞,例如,CD3⁺细胞)和/或使其从呈阳性的或表达高表面水平CD45RA的细胞中耗竭(例如,阴性选择)。在一些实施方式中,针对呈阳性的或表达高表面水平CD122、CD95、CD25、CD27、和/或IL7-Ra(CD127)的细胞来富集细胞或使其从上述细胞中耗竭。在一些实例中,针对对CD45R0呈阳性(或对CD45RA呈阴性)且对CD62L呈阳性的细胞来富集CD8⁺T细胞。例如,可以使用CD3/CD28共轭磁珠(例如,DYNABEADS®M-450 CD3/CD28 T Cell Expander)阳性选择CD3⁺、CD28⁺T细胞。

[0260] 在一些实施方式中,通过非T细胞(如B细胞、单核细胞、或其它白细胞)上表达的标记物(如CD14)的阴性选择,从PBMC样品中分离T细胞。在一些方面中,CD4⁺或CD8⁺选择步骤用于分离CD4⁺辅助T细胞和CD8⁺细胞毒性T细胞。通过对在一个或多个幼稚、记忆、和/或效应T细胞亚群上表达或表达达到相对较高程度的标记物进行阳性选择或阴性选择,可将此类CD4⁺和CD8⁺群体进一步分类为亚群。在一些实施方式中,通过基于与相应亚群相关联的表面抗原的阳性选择或阴性选择,针对幼稚、中枢记忆、效应记忆、和/或中枢记忆干细胞来进一步富集CD8⁺细胞或使其从上述细胞中耗竭。在一些实施方式中,对中枢记忆T(TCM)细胞进行富集以提高功效,从而在施用后诸如提高长期存活、扩大、和/或移植,这在某些方面在此类亚群中是尤其稳健的(robust)。在一些实施方式中,将富集TCM的CD8⁺T细胞和CD4⁺T细胞组合,进一步增强了功效。

[0261] 在一些实施方式中,记忆T细胞存在于CD8⁺外周血淋巴细胞的CD62L⁺和CD62L⁻亚群中。可诸如使用抗CD8抗体和抗CD62L抗体,针对CD62L⁻CD8⁺和/或CD62L⁺CD8⁺部分来富集PBMC或将其从上述部分中耗竭。在一些实施方式中,CD4⁺T细胞群和CD8⁺T细胞亚群,例如,是针对中枢记忆T(TCM)细胞富集的亚群。在一些实施方式中,对中枢记忆T(TCM)细胞的富集基于CD45R0、CD62L、CCR7、CD28、CD3、和/或CD127的阳性或高表面表达;在一些方面中,其基于对表达或高表达CD45RA和/或粒酶B的细胞的阴性选择。在一些方面中,通过耗竭表达CD4、CD14、CD45RA的细胞和对表达CD62L的细胞阳性选择或富集来进行针对TCM细胞富集的CD8⁺群体的分离。一方面,对中枢记忆T(TCM)细胞进行的富集以基于CD4表达所选择的细胞的阴性部分开始,该阴性部分经历基于CD14和CD45RA的表达的阴性选择,并且经历基于CD62L的阳性选择。在一些方面中,这种选择是同时进行的,而在其它方面中,是以任一顺序按顺序进行的。在一些方面中,用于制备CD8⁺细胞群或亚群的相同的基于CD4表达的选择步骤也用于生成CD4⁺细胞群或亚群,使得来自基于CD4的分离的阳性部分和阴性部分都得以保留,并且任选地在一个或多个其它阳性选择或阴性向选择步骤之后用于方法的后续步骤中。

[0262] 通过鉴定具有细胞表面抗原的细胞群,将CD4+T辅助细胞分类为幼稚细胞、中枢记忆细胞、和效应细胞。CD4+淋巴细胞可通过标准方法获得。在一些实施方式中,幼稚CD4+T淋巴细胞是CD45RO⁻、CD45RA⁺、CD62L⁺、CD4+T细胞。在一些实施方式中,中枢记忆CD4+细胞是CD62L⁺和CD45RO⁺。在一些实施方式中,效应CD4+细胞是CD62L⁻和CD45RO⁺。在一个实例中,为了通过阴性选择富集CD4+细胞,单克隆抗体混合物通常包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR、和CD8的抗体。在一些实施方式中,抗体或结合配偶体结合到固体载体或基质,如磁珠或顺磁珠,以允许分离供阳性选择和/或阴性选择的细胞。

[0263] 在一些实施方式中,细胞在基因工程改造之前或与之相关时被孵育和/或培养。孵育步骤可以包括培养(culture)、培养(cultivation)、刺激、激活、和/或繁殖。在一些实施方式中,在刺激条件或刺激剂存在下孵育组合物或细胞。这种条件包括那些被设计用于诱导细胞在群体中增殖、扩大、激活、和/或存活以模拟抗原暴露,和/或为基因工程改造(诸如为导入重组抗原受体)准备(prime)细胞的条件。这些条件可包括以下中的一项或多项:特定的培养基、温度、氧含量、二氧化碳含量、时间、试剂,例如,营养素、氨基酸、抗生素、离子、和/或刺激因子(如细胞因子、趋化因子、抗原、结合配偶体、融合蛋白、重组可溶性受体)、以及被设计以使细胞激活的任意其它试剂。在一些实施方式中,刺激条件或试剂包括一种或多种试剂,例如,配体,其能够激活TCR复合物的胞内信号传导结构域。在一些方面中,该试剂在T细胞中开启或启动TCR/CD3胞内信号传导级联。此类试剂可包括抗体,诸如对TCR组分和/或共刺激受体具有特异性的抗体,例如,例如结合到固体载体(诸如珠)的抗CD3、抗CD28,和/或一种或多种细胞因子。任选地,扩大方法可进一步包含向培养基中添加抗CD3和/或抗CD28抗体的步骤(例如,以至少约0.5ng/ml的浓度)。在一些实施方式中,刺激剂包括IL-2和/或IL-15,例如,至少约10单位/mL的IL-2浓度。

[0264] 在另一实施方式中,通过裂解红细胞并耗竭单核细胞,例如通过PERCOLL™梯度离心将T细胞从外周血中分离出来。可选地,T细胞可以从脐带中分离出来。在任何情况下,特定的T细胞亚群都可以通过阳性选择技术或阴性选择技术进一步分离。

[0265] 可以从表达某些抗原,包括但不限于CD34、CD8、CD14、CD19、和CD56的细胞中耗竭如此分离的脐带血单核细胞。可使用分离的抗体、包含抗体的生物样品(如腹水)、结合到物理载体的抗体、和细胞结合抗体来完成对这些细胞的耗竭。

[0266] 通过阴性选择富集T细胞群可以使用针对以阴性方式选择的细胞所特有的表面标记物的抗体的组合来实现。优选方法是通过使用针对阴性选择的细胞上存在的细胞表面标记物的单克隆抗体混合物的阴性磁性免疫粘附或流式细胞术进行细胞分选和/或选择。例如,为了通过阴性选择富集CD4⁺细胞,单克隆抗体混合物通常包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR、和CD8的抗体。

[0267] 为了通过阳性选择或阴性选择来分离所期望的细胞群,可以改变细胞的浓度和表面(例如,颗粒,如珠子)。在某些实施方式中,会期望显著减少珠子和细胞混合在一起的体积(即,增加细胞的浓度),以确保细胞和珠子的最大接触。例如,在一个实施方式中,使用20亿个细胞/ml的浓度。在一个实施方式中,使用10亿个细胞/ml的浓度。在其它实施方式中,使用大于1亿个细胞/ml。在其它实施方式中,使用1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、或5000万个细胞/ml的细胞浓度。在又一实施方式中,使用7500、8000、8500、9000、9500万个或1亿个细胞/ml的细胞浓度。在其它实施方式中,可使用1.25亿或1.5亿个细胞/

ml的浓度。使用高浓度可导致细胞产量增加、细胞激活、和细胞扩大。

[0268] T细胞也可以在洗涤步骤后冷冻,不需要去除单核细胞的步骤。虽然不希望受到理论的束缚,但冷冻和随后的解冻步骤通过去除细胞群中的粒细胞和在某种程度上去除单核细胞提供了更为均一的产物。在去除血浆和血小板的洗涤步骤之后,细胞可以悬浮在冷冻溶液中。虽然许多冷冻溶液和参数在本领域中是已知的并且在此背景下将是有用的,但在非限制性实例中,一种方法涉及使用含有20%DMSO和8%人血清白蛋白的PBS,或其它合适的细胞冷冻介质。然后以每分钟1°C的速率将细胞冷冻至-80°C,并储存在液氮储罐的汽相中。可使用受控冷冻的其它方法,也可在-20°C下或在液氮中立即进行非受控冷冻。

[0269] 在一个实施方式中,T细胞包含在诸如外周血单核细胞、脐带血细胞、纯化的T细胞群、和T细胞系的细胞群内。在另一实施方式中,外周血单核细胞包含T细胞群。在又一实施方式中,纯化的T细胞包含T细胞群。

[0270] 在某些实施方式中,可从样品中分离T调节细胞(Treg)。样品可包括但不限于脐带血或外周血。在某些实施方式中,通过流式细胞术分选分离Treg。在分离之前,可通过本领域已知的任何手段对样品进行Treg富集。可将分离的Treg冷冻保存,和/或在使用前扩大。分离Treg的方法在美国专利号7,754,482、8,722,400和9,555,105以及美国专利申请号13/639,927(其内容以其整体并入本文中)中描述。

[0271] F. 治疗方法

[0272] 本文所述的修饰的免疫细胞(例如,T细胞或NK细胞)可以包括在用于免疫疗法的组合物中。组合物可以包括药物组合物并且进一步包括药学上可接受的载体。可以将治疗有效量的包含修饰的T细胞或NK细胞的药物组合物施用于对其需要的对象。

[0273] 一方面,本发明包括治疗对其需要的对象中的疾病或状况的方法。方法包括向对象施用有效量的本发明的修饰的T细胞。另一方面,本发明包括治疗对象中的疾病或状况的方法,包括向对象施用包含有效量的本发明的修饰的T细胞的药物组合物。另一方面,本发明包括用于过继性细胞转移疗法的方法,包括向对其需要的对象施用有效量的本发明的修饰的T细胞。可以治疗的疾病包括但不限于免疫性疾病、血液疾病、自身免疫性疾病、纤维化、和癌症。

[0274] 施用免疫细胞以用于过继性细胞疗法的方法是已知的,并且可结合所提供的方法和组合物使用。例如,过继性T细胞疗法方法在授权Gruenberg等人的美国专利申请公开号2003/0170238;授权Rosenberg的美国专利号4,690,915;Rosenberg(2011)Nat Rev Clin Oncol.8(10):577-85)中进行了描述。参见,例如,Themeli等人(2013)Nat Biotechnol.31(10):928-933;Tsukahara等人(2013)Biochem Biophys Res Commun 438(1):84-9;Davila等人(2013)PLoS ONE 8(4):e61338。在一些实施方式中,细胞疗法(例如,过继性T细胞疗法)通过自体转移进行,其中细胞从待接受细胞疗法的对象中分离或以其它方式从待接受细胞疗法的对象制备,或来自源自这样的对象的样品。因此,在某些方面中,细胞源自对象(例如,需要治疗的患者),并且细胞在分离和处理之后被施用至同一个对象。

[0275] 在一些实施方式中,细胞疗法(例如,过继性T细胞疗法)通过同种异体转移来实施,其中细胞从除了待接受或最终接受细胞疗法的对象以外的对象(例如,第一对象)分离和/或以其它方式制备。在这样的实施方式中,然后将细胞施用至同一物种的不同对象,例如,第二对象。在一些实施方式中,第一对象和第二对象在遗传上是相同的。在一些实施方

式中,第一对象和第二对象在遗传上是相似的。在一些实施方式中,第二对象表达与第一对象相同的HLA类别或超型。

[0276] 在一些实施方式中,在施用细胞或含有细胞的组合物之前,对象已用靶向疾病或状况(例如,肿瘤)的治疗剂治疗。在一些方面中,对象是其它治疗剂是难治的或对其无反应。在一些实施方式中,对象例如在用其它治疗干预(包括化疗、放射、和/或造血干细胞移植(HSCT),例如,同种异体HSCT)治疗之后患有持久性或复发性疾病。在一些实施方式中,尽管对象已对其它疗法有抗性,但施用仍有效地治疗对象。

[0277] 在一些实施方式中,对象对其它治疗剂有反应,并且用该治疗剂治疗减轻了疾病负担。在一些方面中,对象最初对治疗剂有反应,但随着时间的推移表现出疾病或状况的复发。在一些实施方式中,对象没有复发。在一些这样的实施方式中,对象被确定处于复发风险,诸如处于高复发风险,因此预防性地施用细胞,从而例如降低复发的可能性或防止复发。在一些方面中,对象之前没有接受其它治疗剂的治疗。

[0278] 在一些实施方式中,对象例如在用其它治疗干预(包括化疗、放射、和/或造血干细胞移植(HSCT),例如,同种异体HSCT)治疗之后患有持久性或复发性疾病。在一些实施方式中,尽管对象已对其它疗法有抗性,但施用仍有效地治疗对象。

[0279] 本发明的修饰的免疫细胞可施用动物(例如,狗),优选哺乳动物,甚至更优选是人,以治疗癌症。在某些实施方式中,癌症包括表达FAP的癌症相关细胞。在某些实施方式中,表达FAP的癌症相关细胞是癌症相关成纤维细胞(CAF)。在某些实施方式中,表达FAP的癌症相关细胞是表达FAP的脂肪细胞。在某些实施方式中,表达FAP的癌症相关细胞是肿瘤相关巨噬细胞(TAM)。在某些实施方式中,表达FAP的癌症相关细胞是肿瘤相关嗜中性粒细胞(TAN)。在某些实施方式中,表达FAP的癌症相关细胞是骨髓来源抑制细胞(MDSC)。在某些实施方式中,表达FAP的癌症相关细胞是癌症起始细胞。

[0280] 此外,本发明的细胞可用于治疗与癌症相关的任何状况,特别是针对肿瘤细胞(一种或多种)的细胞介导的免疫应答,其中期望治疗或减轻疾病。待用本发明的修饰的细胞或药物组合物治疗的癌症类型包括癌、胚细胞瘤和肉瘤,和某些白血病或淋巴恶性肿瘤、良性和恶性肿瘤、和恶性瘤,例如肉瘤、癌和黑素瘤。其它示例性癌症包括但不限于乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、子宫颈癌、皮肤癌、胰腺癌、结直肠癌、肾癌、肝癌、脑癌、淋巴瘤、白血病、肺癌、甲状腺癌等。癌症可以是非实体肿瘤(如血液肿瘤)或实体肿瘤。成人肿瘤/癌症和儿童肿瘤/癌症也包括在内。在一个实施方式中,癌症是实体肿瘤或血液肿瘤。在一个实施方式中,癌症是癌。在一个实施方式中,癌症是肉瘤。在一个实施方式中,癌症是白血病。在一个实施方式中,癌症是实体肿瘤。

[0281] 实体肿瘤的成功治疗受到各种障碍,包括例如肿瘤微环境的阻碍。肿瘤包括癌细胞以及包含细胞组分和非细胞组分的基质隔室。肿瘤基质已表明在癌症的发展,包括进展和转移中起到关键作用。本公开的CAR可用于通过靶向肿瘤基质来治疗疾病或状况的方法中,其中基质中潜在的细胞靶标包括癌症相关成纤维细胞(CAF)。CAF已表明增强肿瘤生长和扩散的几乎每个方面。CAF呈现出对治疗剂(例如,药物和免疫细胞)的屏障,为肿瘤细胞提供生长信号,并具有主动的免疫抑制性。

[0282] 本发明提供了能够结合成纤维细胞激活蛋白(FAP)的嵌合抗原受体(CAR)。FAP是一种II型跨膜丝氨酸蛋白酶,在超过90%的常见的人上皮癌的基质中表达。在某些肿瘤中,

它由癌症相关成纤维细胞选择性表达。在良性肿瘤或正常成人静止组织中未检测到FAP的表达。

[0283] 在一些实施方式中,本公开的方法采用本公开的修饰的免疫细胞与其它治疗剂,例如但不限于免疫疗法(如免疫肿瘤抗体疗法和检查点阻断)、开关共刺激受体、或其它CAR-T疗法组合。

[0284] 实体肿瘤是通常不包含囊肿或液体区的组织的异常肿块。实体肿瘤可以是良性或恶性的。不同类型的实体肿瘤以形成它们的细胞类型命名(如肉瘤、癌和淋巴瘤)。实体肿瘤(如肉瘤和癌)的实例包括纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨肉瘤和其它肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏肿瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、淋巴恶性肿瘤、胰腺癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝细胞癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、甲状腺髓样癌、乳头状甲状腺癌、嗜铬细胞瘤、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞癌、胆管癌、绒膜癌、维尔姆斯氏肿瘤、子宫颈癌、睾丸肿瘤、精原细胞瘤、膀胱癌、黑色素瘤和CNS肿瘤(如神经胶质瘤(如脑干神经胶质瘤和混合神经胶质瘤)、成胶质细胞瘤(也被称为多形性成胶质细胞瘤)星形细胞瘤、CNS淋巴瘤、生殖细胞瘤、成神经管细胞瘤、神经鞘瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、神经细胞瘤、视网膜母细胞瘤和脑转移)。在某些实施方式中,癌症是星形细胞瘤。在某些实施方式中,癌症是高级星形细胞瘤。

[0285] 可顺应(amenable to)本文公开方法所进行的疗法的癌包括但不限于食管癌、肝细胞癌、基底细胞癌(一种皮肤癌形式)、鳞状细胞癌(各种组织)、膀胱癌(包括移行细胞癌(膀胱恶性肿瘤))、支气管癌、结肠癌、结直肠癌、胃癌、肺癌(包括肺部小细胞癌和非小细胞癌)、肾上腺皮质癌、甲状腺癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、肾细胞癌、导管原位癌或胆管癌、绒膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、维尔姆斯氏肿瘤、子宫颈癌、子宫癌、睾丸癌、成骨癌、上皮癌、和鼻咽癌。

[0286] 可顺应本文公开方法所进行的疗法的肉瘤包括但不限于纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、脊索瘤、成骨肉瘤、骨肉瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏肉瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、和其它软组织肉瘤。

[0287] 在某些示例性实施方式中,本发明的修饰的免疫细胞用于治疗骨髓瘤,或与骨髓瘤相关的状况。骨髓瘤或与其相关的状况的实例包括但不限于轻链骨髓瘤、非分泌性骨髓瘤、意义未明单克隆免疫球蛋白血症(monoclonal gamopathy of undetermined significance)(MGUS)、浆细胞瘤(例如,单发性、多发性单发性、髓外浆细胞瘤)、淀粉样变性、和多发性骨髓瘤。在一个实施方式中,本公开的方法用于治疗多发性骨髓瘤。在一个实施方式中,本公开的方法用于治疗难治性骨髓瘤。在一个实施方式中,本公开的方法用于治疗复发性骨髓瘤。

[0288] 在某些示例性实施方式中,本发明的修饰的免疫细胞用于治疗黑色素瘤,或与黑色素瘤相关的状况。黑色素瘤或与其相关的状况的实例包括但不限于浅表扩展性黑色素瘤、结节性黑色素瘤、恶性小痣、肢端着色斑性黑色素瘤、无色素性恶性黑色素瘤、或皮肤黑色素瘤(例如,皮肤、眼、外阴、阴道、直肠黑色素瘤)。在一个实施方式中,本公开的方法用于治疗皮肤黑色素瘤。在一个实施方式中,本公开的方法用于治疗难治性黑色素瘤。在一个实施方式中,本公开的方法用于治疗复发性黑色素瘤。

[0289] 在又其它示例性实施方式中,本发明的修饰的免疫细胞用于治疗肉瘤,或与肉瘤相关的状况。肉瘤或与其相关的状况的实例包括但不限于血管肉瘤、软骨肉瘤、尤因氏肉瘤、纤维肉瘤、胃肠间质瘤、平滑肌肉瘤、脂肪肉瘤、恶性外周神经鞘瘤、骨肉瘤、多形性肉瘤、横纹肌肉瘤、和滑膜肉瘤。在一个实施方式中,本公开的方法用于治疗滑膜肉瘤。在一个实施方式中,本公开的方法用于治疗脂肪肉瘤,如粘液/圆细胞脂肪肉瘤、分化/去分化脂肪肉瘤、和多形性脂肪肉瘤。在一个实施方式中,本公开的方法用于治疗粘液/圆细胞脂肪肉瘤。在一个实施方式中,本公开的方法用于治疗难治性肉瘤。在一个实施方式中,本公开的方法用于治疗复发性肉瘤。

[0290] 在某些实施方式中,本文公开的方法用于治疗免疫性疾病。可以治疗的免疫性疾病包括但不限于硬皮病和关节炎(如类风湿或骨关节炎)。

[0291] 在某些实施方式中,本文公开的方法用于治疗血液疾病。可以治疗的血液疾病包括但不限于多发性骨髓瘤或骨髓纤维化。

[0292] 在某些实施方式中,本文公开的方法用于治疗任意类型的纤维化,包括但不限于肺纤维化、肝纤维化、皮肤纤维化(瘢痕疙瘩和硬皮病)、肠纤维化、和肾纤维化。在某些实施方式中,本文公开的方法用于治疗心脏纤维化。可以治疗的其它疾病或障碍包括但不限于高血压性心脏病、舒张功能障碍、射血分数保留的心力衰竭、心肌梗塞、缺血性心肌病、肥大性心肌病、心律失常(包括心房颤动)、致心律失常的右室发育不全、扩张性心肌病(包括特发性和家族性形式)、高血压性心脏病、遗传的形式(包括肌营养不良)、传染性心肌病(例如,恰加斯病、风湿热)、移植性心肌病、辐射诱发的心脏纤维化、自身免疫(结节性心肌病、狼疮)、毒素或药物相关的、淀粉样变性、糖尿病性心肌病、和其它类型的心脏纤维化,包括但不限于反应性间质纤维化(reactive interstitial fibrosis)、替代性纤维变性、浸润性间质纤维化(infiltrative interstitial fibrosis)、和心内膜心肌纤维化症。

[0293] 就经历疗法的对象而言,待施用的本发明的细胞可以是自体的。

[0294] 本发明的细胞的施用可以本领域技术人员已知的任何便利方式实施。本发明的细胞可通过雾化吸入、注射、摄取、输注、植入、或移植施用于对象。本文所述的组合物可经动脉、皮下、皮内、瘤内(intratumorally)、节内(intranodally)、髓内(intramedullary)、肌肉内、通过静脉内(i.v.)注射、或腹膜内施用给患者。在其它情况下,将本发明的细胞直接注射到对象的炎症部位、对象的局部疾病部位、淋巴结、器官、肿瘤等。

[0295] 在一些实施方式中,以所期望剂量(dosage)施用细胞,所期望剂量在一些方面中包括所期望剂量(dose)或细胞数或细胞类型(一种或多种)和/或所期望的细胞类型比。因此,在一些实施方式中,细胞的剂量基于细胞的总数(或每kg体重的数量)和单独的群体或亚型的期望的比,诸如CD4⁺与CD8⁺的比。在一些实施方式中,细胞的剂量基于单独的群体或单独的细胞类型中所期望的细胞总数(或每kg体重的数量)。在一些实施方式中,剂量基于这样的特征的组合,如单独的群体中所期望的总的细胞数、所期望的比、和所期望的总的细胞数。

[0296] 在一些实施方式中,在总细胞的所期望剂量(如T细胞的所期望剂量)的容许差异下或在容许差异内施用细胞群或细胞亚型(如CD8⁺T细胞和CD4⁺T细胞)。在一些方面中,所期望剂量是所期望的细胞数或施用细胞的对象的每单位体重所期望的细胞数,例如,细胞数/kg。在一些方面中,所期望剂量等于最小细胞数或每单位体重最小细胞数,或在最小细

胞数或每单位体重最小细胞数以上。在一些方面中,在以所期望剂量施用的总细胞中,单独的群体或亚型以所期望的输出比(如 $CD4^+$ 与 $CD8^+$ 的比)或接近所期望的输出比(例如,在这种比的某个容许差异或误差内)存在。

[0297] 在一些实施方式中,在一种或多种单独的细胞群或细胞亚型的所期望剂量(如 $CD4^+$ 细胞的所期望剂量和/或 $CD8^+$ 细胞的所期望剂量)的容许差异下或在该容许差异内施用细胞。在一些方面中,所期望剂量是该亚型或群体细胞的所期望数量,或是施用细胞的对象的每单位体重此类细胞的所期望的数量,例如,细胞数/kg。在一些方面中,所期望剂量等于该群体或亚型细胞的最小数或在该群体或亚型细胞的最小数以上,或等于每单位体重该群体或亚型细胞的最小数或在每单位体重该群体或亚型细胞的最小数以上。因此,在一些实施方式中,剂量基于总细胞的所期望的固定剂量和所期望的比,和/或基于单独的亚型或亚群中一种或多种(例如,每一种)的所期望的固定剂量。因此,在一些实施方式中,剂量基于T细胞的所期望的固定剂量或最小剂量和 $CD4^+$ 与 $CD8^+$ 细胞的所期望的比,和/或基于 $CD4^+$ 和/或 $CD8^+$ 细胞的所期望的固定剂量或最小剂量。

[0298] 在某些实施方式中,这些细胞,或细胞亚型的单独的群体以如下范围向对象施用:约100万至约1000亿个细胞,诸如,例如,100万至约500亿个细胞(例如,约500万个细胞、约250万个细胞、约5亿个细胞、约10亿个胞、约50亿个细胞、约200亿个细胞、约300亿个细胞、约400亿个细胞,或上述值中任意两个所限定的范围),如约1000万至约1000亿个细胞(例如,约2000万个细胞、约3000万个细胞、约4000万个细胞、约6000万个细胞、约7000万个细胞、约8000万个细胞、约9000万个细胞、约100亿个细胞、约250亿个细胞、约500亿个细胞、约750亿个细胞、约900亿个细胞,或上述值中任意两个所限定的范围),并且在某些情况下约1亿个细胞至约500亿个细胞(例如,约1.2亿个细胞、约2.5亿个细胞、约3.5亿个细胞、约4.5亿个细胞、约6.5亿个细胞、约8亿个细胞、约9亿个细胞、约30亿个细胞、约300亿个细胞、约450亿个细胞)或在这些范围内的任意值。

[0299] 在一些实施方式中,总细胞的剂量和/或细胞的单独亚群的剂量在以下范围内:在等于或约 1×10^5 个细胞/kg至约 1×10^{11} 个细胞/kg之间, 10^4 ,和等于或约 10^{11} 个细胞/千克(kg)体重,如在 10^5 与 10^6 个细胞/kg体重之间,例如,等于或约 1×10^5 个细胞/kg体重、 1.5×10^5 个细胞/kg体重、 2×10^5 个细胞/kg体重、或 1×10^6 个细胞/kg体重。例如,在一些实施方式中,在以下某个误差范围下或在该误差范围内施用细胞:在等于或约 10^4 与等于或约 10^9 个T细胞/千克(kg)体重之间,如在 10^5 与 10^6 个T细胞/kg体重之间,例如,等于或约 1×10^5 个T细胞/kg体重、 1.5×10^5 个T细胞/kg体重、 2×10^5 个T细胞/kg体重、或 1×10^6 个T细胞/kg体重。在其它示例性实施方式中,用于本公开方法的修饰的细胞的合适的剂量范围非限制地包括约 1×10^5 个细胞/kg至约 1×10^6 个细胞/kg、约 1×10^6 个细胞/kg至约 1×10^7 个细胞/kg、约 1×10^7 个细胞/kg约 1×10^8 个细胞/kg、约 1×10^8 个细胞/kg约 1×10^9 个细胞/kg、约 1×10^9 个细胞/kg约 1×10^{10} 个细胞/kg、约 1×10^{10} 个细胞/kg约 1×10^{11} 个细胞/kg。在示例性实施方式中,用于本公开方法的合适的剂量是约 1×10^8 个细胞/kg。在示例性实施方式中,用于本公开方法的合适的剂量是约 1×10^7 个细胞/kg。在其它实施方式中,合适的剂量是约 1×10^7 个总细胞至约 5×10^7 个总细胞。在一些实施方式中,合适的剂量是约 1×10^8 个总细胞至约 5×10^8 个总细胞。在一些实施方式中,合适的剂量是约 1.4×10^7 个总细胞至约 1.1×10^9 个总细胞。在示例性实施方式中,用于本公开方法的合适的剂量是约 7×10^9 个总细胞。

[0300] 在一些实施方式中,在以下某个误差范围下或在该误差范围内施用细胞:在等于或约 10^4 与等于或约 10^9 个 $CD4^+$ 和/或 $CD8^+$ 细胞/kg体重之间,如在 10^5 与 10^6 个 $CD4^+$ 和/或 $CD8^+$ 细胞/kg体重之间,例如,等于或约 1×10^5 个 $CD4^+$ 和/或 $CD8^+$ 细胞/kg、 1.5×10^5 个 $CD4^+$ 和/或 $CD8^+$ 细胞/kg体重、 2×10^5 个 $CD4^+$ 和/或 $CD8^+$ 细胞/kg体重、或 1×10^6 个 $CD4^+$ 和/或 $CD8^+$ 细胞/kg体重。在一些实施方式中,在以下某个误差范围下或在该误差范围内施用细胞:大于,和/或至少约 1×10^6 、约 2.5×10^6 、约 5×10^6 、约 7.5×10^6 、或约 9×10^6 个 $CD4^+$ 细胞,和/或至少约 1×10^6 、约 2.5×10^6 、约 5×10^6 、约 7.5×10^6 、或约 9×10^6 个 $CD8^+$ 细胞,和/或至少约 1×10^6 、约 2.5×10^6 、约 5×10^6 、约 7.5×10^6 、或约 9×10^6 个T细胞。在一些实施方式中,在以下某个误差范围下或在该误差范围内施用细胞:在约 10^8 与 10^{12} 个T细胞之间或在约 10^{10} 与 10^{11} 个T细胞之间、在约 10^8 与 10^{12} 个 $CD4^+$ 细胞之间或在约 10^{10} 与 10^{11} 个 $CD4^+$ 细胞之间、和/或在约 10^8 与 10^{12} 个 $CD8^+$ 细胞之间或在约 10^{10} 与 10^{11} 个 $CD8^+$ 细胞之间。

[0301] 在一些实施方式中,在多个细胞群或亚型(如 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 细胞或亚型)的所期望的输出比的容许范围下或在该容许范围内施用细胞。在一些方面中,所期望的比可以是具体的比或者可以是比的范围,例如,在一些实施方式中,所期望的比(例如, $CD4^+$ 细胞与 $CD8^+$ 细胞的比)在等于或约5:1与等于或约5:1(或大于约1:5与小于约5:1)之间,或在等于或约1:3与等于或约3:1(或大于约1:3与小于约3:1)之间,如在等于或约2:1与等于或约1:5之间(或大于约1:5与小于约2:1之间,如等于或约5:1、4.5:1、4:1、3.5:1、3:1、2.5:1、2:1、1.9:1、1.8:1、1.7:1、1.6:1、1.5:1、1.4:1、1.3:1、1.2:1、1.1:1、1:1、1:1.1、1:1.2、1:1.3、1:1.4、1:1.5、1:1.6、1:1.7、1:1.8、1:1.9、1:2、1:2.5、1:3、1:3.5、1:4、1:4.5或1:5)。在一些方面中,容许差异在所期望的比的约1%、约2%、约3%、约4%、约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%内,包含这些范围之间的任意值。

[0302] 在一些实施方式中,以单剂量或多剂量向对其需要的对象施用修饰的细胞的剂量。在一些实施方式中,以多剂量施用修饰的细胞的剂量,例如,一周一次或每7天一次、每两周一次或每14天一次、每3周一次或每21天一次、每4周一次或每28天一次。在示例性实施方式中,向对其需要的对象施用单剂量的修饰的细胞。在示例性实施方式中,通过快速静脉内输注向对其需要的对象施用单剂量的修饰的细胞。

[0303] 对于疾病的预防或治疗,适当的剂量可取决于待治疗疾病的类型、细胞或重组受体的类型、疾病的严重程度和过程、是否出于预防或治疗目的施用细胞、先前疗法、对象的临床病史和对细胞的反应、以及主治医师的判断。在一些实施方式中,组合物和细胞一次或通过一系列治疗适当地施用于对象。

[0304] 在一些实施方式中,作为组合治疗的一部分来施用细胞,诸如与其它治疗性干预(如抗体或工程改造的细胞或受体或试剂,如细胞毒性剂或治疗剂或抗肿瘤疫苗)同时施用或以任意顺序与其按顺序施用。在一些实施方式中细胞同时或以任意顺序按顺序与一种或多种其它治疗剂共同施用,或结合另一治疗性干预施用。在一些情况下,细胞与另一种疗法在时间上足够接近地共同施用,使得细胞群增强一种或多种其它治疗剂的效果,反之亦然。在一些实施方式中,在一种或多种其它治疗剂之前施用细胞。在一些实施方式中,在一种或多种其它治疗剂之后施用细胞。在一些实施方式中,一种或多种其它试剂包括细胞因子,如IL-2,从而例如增强持久性。在一些实施方式中,方法包括化疗剂的施用。

[0305] 在某些实施方式中,本发明的修饰的细胞(例如,包含CAR的修饰的细胞)可以与免

疫检查点的抑制剂组合施用于对象。免疫检查点的实例包括但不限于CTLA-4、PD-1和TIM-3。抗体可用于抑制免疫检查点(例如,抗PD1、抗CTLA-4、或抗TIM-3抗体)。例如,修饰的细胞可以与靶向例如PD-1(程序性死亡1蛋白)的抗体或抗体片段组合施用。抗PD-1抗体的实例包括但不限于派姆单抗(pembrolizumab)(KEYTRUDA®, 以前是lambrolizumab,也称为MK-3475)和纳武单抗(nivolumab)(BMS-936558、MDX-1106、ONO-4538、OPDIVA®)或其抗原结合片段。在某些实施方式中,修饰的细胞可以与抗PD-L1抗体或其抗原结合片段组合施用。抗PD-L1抗体的实例包括但不限于BMS-936559、MPDL3280A(TECENTRIQ®, 阿特珠单抗(Atezolizumab))和MEDI4736(德瓦鲁单抗(Durvalumab), Imfinzi)。在某些实施方式中,修饰的细胞可以与抗-CTLA-4抗体或其抗原结合片段组合施用。抗CTLA-4抗体的实例包括但不限于伊匹单抗(Ipilimumab)(商品名Yervoy)。也可以使用其它类型的免疫检查点调节剂,包括但不限于小分子、siRNA、miRNA、和CRISPR系统。免疫检查点调节剂可以在包含CAR的修饰的细胞之前、之后、或与其同时施用。在某些实施方式中,包含免疫检查点调节剂的组合治疗可以提高包含本发明修饰的细胞的治疗的治疗功效。

[0306] 在细胞施用后,在一些实施方式中,例如通过多种已知方法中的任意种来测量的工程改造的细胞群的生物活性。评估参数包括工程改造的或天然的T细胞或其它免疫细胞在体内(例如,通过成像)或在体外(例如,通过ELISA或流式细胞术)与抗原的特异性结合。在某些实施方式中,可使用本领域已知的任何合适的方法测量工程改造的细胞破坏靶细胞的能力,如,例如Kochenderfer等人, *J. Immunotherapy*, 32(7):689-702(2009), 和Herman等人 *J. Immunological Methods*, 285(1):25-40(2004)中描述的细胞毒性测定。在某些实施方式中,通过测定一种或多种细胞因子(如CD 107a、IFN γ 、IL-2和TNF)的表达和/或分泌来测量细胞的生物活性。在一些方面中,生物活性是通过评估临床结果,如肿瘤负担或负荷的减少来衡量的。

[0307] 在某些实施方式中,对象被提供二级治疗(secondary treatment)。二级治疗包括但不限于化疗、放疗、外科手术、和药物。

[0308] 在一些实施方式中,可以在CAR T细胞疗法之前施用给对象调理疗法(conditioning therapy)。在一些实施方式中,调理疗法包括向对象施用有效量的环磷酰胺。在一些实施方式中,调理疗法包括向对象施用有效量的氟达拉滨。在优选的实施方式中,调理疗法包括向对象施用有效量的环磷酰胺和氟达拉滨的组合。在CAR T细胞疗法之前施用调理疗法可提高CAR T细胞疗法的功效。美国专利号9,855,298(其通过引用以其整体并入本文)中描述了针对T细胞疗法对患者进行调理的方法。

[0309] 在一些实施方式中,本公开的具体剂量方案包括在施用修饰的T细胞之前的淋巴细胞耗竭步骤(lymphodepletion step)。在示例性实施方式中,淋巴细胞耗竭步骤包括环磷酰胺和/或氟达拉滨的施用。

[0310] 在一些实施方式中,淋巴细胞耗竭步骤包括以约200mg/m²/天与约2000mg/m²/天之间(例如,200mg/m²/天、300mg/m²/天、或500mg/m²/天)的剂量施用环磷酰胺。在示例性实施方式中,环磷酰胺的剂量是约300mg/m²/天。在一些实施方式中,淋巴细胞耗竭步骤包括以约20mg/m²/天与约900mg/m²/天之间(例如,20mg/m²/天、25mg/m²/天、30mg/m²/天、或60mg/m²/天)的剂量施用氟达拉滨。在示例性实施方式中,氟达拉滨的剂量是约30mg/m²/天。

[0311] 在一些实施方式中,淋巴细胞耗竭步骤包括以约200mg/m²/天与约2000mg/m²/天之

间(例如,200mg/m²/天、300mg/m²/天、或500mg/m²/天)的剂量施用环磷酰胺,和以约20mg/m²/天与约900mg/m²/天之间(例如,20mg/m²/天、25mg/m²/天、30mg/m²/天、或60mg/m²/天)的剂量施用氟达拉滨。在示例性实施方式中,淋巴细胞耗竭步骤包括以约300mg/m²/天的剂量施用环磷酰胺,和以约30mg/m²/天的剂量施用氟达拉滨。

[0312] 在示例性实施方式中,环磷酰胺的给药是三天内300mg/m²/天,而氟达拉滨的给药是三天内30mg/m²/天。

[0313] 相对于在第0天输注T细胞(例如,CAR-T、TCR-T、修饰的T细胞等),在第-6天至第-4天安排淋巴细胞耗竭化疗的给药(窗口为-1天,即,在第-7天至第-5天给药)。

[0314] 在示例性实施方式中,对于患有癌症的对象,该对象在施用修饰的T细胞前接受包括静脉内输注3天300mg/m²环磷酰胺的淋巴细胞耗竭化疗。在示例性实施方式中,对于患有癌症的对象,该对象在施用修饰的T细胞前接受包括静脉内输注3天300mg/m²环磷酰胺的淋巴细胞耗竭化疗。

[0315] 在示例性实施方式中,对于患有癌症的对象,该对象接受淋巴细胞耗竭化疗,淋巴细胞耗竭化疗包括剂量为约20mg/m²/天与约900mg/m²/天之间(例如,20mg/m²/天、25mg/m²/天、30mg/m²/天、或60mg/m²/天)的氟达拉滨。在示例性实施方式中,对于患有癌症的对象,该对象接受包括剂量为30mg/m²氟达拉滨达3天的淋巴细胞耗竭化疗。

[0316] 在示例性实施方式中,对于患有癌症的对象,该对象接受淋巴细胞耗竭化疗,淋巴细胞耗竭化疗包括剂量为约200mg/m²/天与约2000mg/m²/天之间(例如,200mg/m²/天、300mg/m²/天、或500mg/m²/天)的环磷酰胺,和剂量为约20mg/m²/天与约900mg/m²/天之间(例如,20mg/m²/天、25mg/m²/天、30mg/m²/天、或60mg/m²/天)的氟达拉滨。在示例性实施方式中,对于患有癌症的对象,该对象接受淋巴细胞耗竭化疗,淋巴细胞耗竭化疗包括剂量为约300mg/m²/天的环磷酰胺和剂量为30mg/m²的氟达拉滨达3天。

[0317] 本发明的细胞可按剂量和途径施用,并且有时在适当的临床前与临床实验和试验中确定。细胞组合物可按在这些范围内的剂量多次施用。本发明的细胞的施用可与可用于治疗由本领域技术人员所确定的期望的疾病或状况的其它方法组合。

[0318] 本领域已知,输注CAR T细胞后的不良效果之一是免疫激活的开始,免疫激活的开始被称为细胞因子释放综合征(CRS)。CRS是导致炎症细胞因子升高的免疫激活。CRS是一种已知的中靶毒性(on-target toxicity),其发展可能与功效相关。临床测量和实验室测量的范围从轻度CRS(全身症状和/或2级器官毒性)到严重CRS(sSCR;3级以上的器官毒性、攻击性临床干预、和/或潜在的生命威胁)。临床特征包括:高热、不适、疲劳、肌痛、恶心、厌食、心动过速/低血压、毛细血管渗漏、心机能障碍、肾功能损害、肝功能衰竭、和弥散性血管内凝血。CAR T-细胞输注后,细胞因子,包括干扰素- γ 、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、IL-10、和IL-6显示出显著升高。一种CRS特征是细胞因子包括IL-6(严重升高)、IFN- γ 、TNF- α (中度)和IL-2(轻度)的升高。还观察到包括铁蛋白和C-反应蛋白(CRP)在内的临床上可用的炎症标志物的升高与CRS综合征相关。CRS的存在通常与过继转移的细胞的扩大和进行性免疫激活有关。已经证明,CRS的严重程度取决于输注时的疾病负担,因为肿瘤负担重的患者经历更多的sCRS。

[0319] 因此,本发明提供了在CRS诊断之后适当的CRS管理策略,以减轻不受控制的炎症的生理症状,而不减少工程改造的细胞(例如,CAR T细胞)的抗肿瘤功效。CRS管理策略是本

领域已知的。例如,可施用全身性皮质类固醇以快速逆转sCRS(例如,3级CRS)的症状,而不损害初始抗肿瘤反应。

[0320] 在一些实施方式中,可施用抗IL-6R抗体。抗IL-6R抗体的实例是食品和药品监督管理局批准的单克隆抗体托珠单抗(tocilizumab),也称为atlizumab(市场上称为Actemra或RoActemra)。托珠单抗是一种针对白介素-6受体(IL-6R)的人源化单克隆抗体。托珠单抗的施用已证明CRS几乎立即被逆转。

[0321] CRS通常根据观察到的综合征的严重程度进行管理,并为此量身定制干预措施。CRS管理决策可能基于临床体征和症状以及对干预措施的反应,而不仅仅是实验室值。

[0322] 轻中度病例一般采用充分缓解症状所需的流体疗法、非甾体抗炎药(NSAID)和抗组胺剂进行症状管理。更严重的病例包括任意程度的血液动力学不稳定的患者;患有任意的血液动力学不稳定,建议施用托珠单抗。在一些实施方式中,CRS的一线管理可以是60分钟内IV 8mg/kg的标记剂量(不超过800mg/剂量)的托珠单抗;托珠单抗可重复Q8小时。如果对第一剂量的托珠单抗反应不理想,可以考虑额外剂量的托珠单抗。托珠单抗可以单独施用,也可以与皮质类固醇疗法联用。持续性或进行性CRS症状、12-18小时内临床改善不足或对托珠单抗反应差的患者可采用大剂量皮质类固醇疗法进行治疗,一般IV氢化可的松100mg或甲泼尼龙1-2mg/kg。对于血液动力学不稳定或呼吸症状较严重的患者,可在CRS早期施用大剂量皮质类固醇疗法。CRS管理指南可基于已发布的标准(Lee等人(2019) *Biol Blood Marrow Transplant*, doi.org/10.1016/j.bbmt.2018.12.758; Neelapu等人(2018) *Nat Rev Clin Oncology*, 15:47; Teachey等人(2016) *Cancer Discov*, 6(6):664-679)。

[0323] 在用CAR-T疗法治疗的患者中观察到与巨噬细胞激活综合征(MAS)或噬血细胞性淋巴组织细胞增多症(HLH)一致的特征(Henter, 2007),与CRS的临床表现一致。MAS似乎是对CRS引起的免疫激活的反应,因此应被视为CRS的一种表现。MAS类似于HLH(也是对免疫刺激的反应)。MAS的临床综合征的特点是高等级的非缓解性发热、影响三个谱系中至少两个谱系的细胞减少、以及肝脾大。它与高血清铁蛋白、可溶性白介素-2受体和甘油三酯,以及循环的自然杀伤(NK)活性的降低有关。

[0324] 包含本发明的CAR的修饰的免疫细胞可以用于本文所述的治疗方法中。一方面,本发明包括治疗对其需要的对象中的癌症的方法,包括向对象施用本文公开的任一种修饰的免疫细胞或前体细胞。本发明的另一方面包括治疗对其需要的对象中的癌症的方法,包括向对象施用由本文公开的任一种方法产生的修饰的免疫细胞或前体细胞。

[0325] 本发明的一个方面提供了治疗对其需要的对象中的癌症的方法,包括向对象施用有效量的包含能够结合FAP的CAR的修饰的免疫细胞,其中CAR包括:重链可变区,其包含与SEQ ID NO:7同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;和轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:9同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列,其中癌症包括表达成纤维细胞激活蛋白(FAP)的癌症相关细胞。

[0326] 在某些实施方式中,CAR结合表达FAP的癌症相关细胞而不结合不表达FAP的细胞。在某些实施方式中,CAR结合表达FAP的癌症相关细胞,包括高水平的FAP表达。在某些实施方式中,CAR不结合不表达FAP的细胞。在某些实施方式中,CAR不结合表达基础水平的FAP的细胞,包括低水平的FAP表达。

[0327] 本发明的另一个方面提供了治疗对其需要的对象中的癌症的方法,其中癌症与表达成纤维细胞激活蛋白(FAP)的癌症相关成纤维细胞相关,包括向对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体(CAR)的修饰的T细胞。CAR包括:重链可变区,其包含与SEQ ID NO:7同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;和轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:9同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0328] 本发明的又一方面提供了治疗对其需要的对象中的癌症的方法,其中癌症与表达成纤维细胞激活蛋白(FAP)的癌症相关巨噬细胞相关。方法包括向对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体(CAR)的修饰的T细胞,其中CAR包括:重链可变区,其包含与SEQ ID NO:7同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;和轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:9同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0329] 本发明的又另一方面提供了治疗对其需要的对象中的癌症的方法,其中癌症与表达成纤维细胞激活蛋白(FAP)的癌症相关嗜中性粒细胞相关。方法包括向对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体(CAR)的修饰的T细胞,其中CAR包括:重链可变区,其包含与SEQ ID NO:7同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;和轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:9同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0330] 还提供了治疗对其需要的对象中的癌症的方法,其中癌症与表达成纤维细胞激活蛋白(FAP)的癌症相关成纤维细胞相关。方法包括向对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体(CAR)的修饰的T细胞,其中CAR包含与SEQ ID NO:23或25同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0331] 还提供了治疗对其需要的对象中的癌症的方法,其中癌症与表达成纤维细胞激活蛋白(FAP)的癌症相关巨噬细胞相关。方法包括向对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体(CAR)的修饰的T细胞,其中CAR包含与SEQ ID NO:23或25同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0332] 还提供了治疗对其需要的对象中的癌症的方法,其中癌症与表达成纤维细胞激活蛋白(FAP)的癌症相关嗜中性粒细胞相关。方法包括向对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体(CAR)的修饰的T细胞,其中CAR包含与SEQ ID NO:23或25同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%的氨基酸序列。

[0333] 还提供了治疗对其需要的对象中的实体肿瘤的方法,其中肿瘤与表达成纤维细胞激活蛋白(FAP)的癌症相关成纤维细胞相关。方法包括向对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体(CAR)的修饰的T细胞,其中CAR包括:重链可变区,其包含与SEQ ID NO:7同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;和轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:9至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%同一性的氨基酸序列。

[0334] 还提供了治疗对其需要的对象中的实体肿瘤的方法,其中肿瘤与表达成纤维细胞激活蛋白(FAP)的癌症相关巨噬细胞相关。方法包括向对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体(CAR)的修饰的T细胞,其中CAR包括:重链可变区,其包含与SEQ ID NO:7同

一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列；和轻链可变区，其包含与SEQ ID NO:9同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0335] 还提供了治疗对其需要的对象中的实体肿瘤的方法，其中肿瘤与表达成纤维细胞激活蛋白 (FAP) 的癌症相关嗜中性粒细胞相关。方法包括向对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体 (CAR) 的修饰的T细胞，其中CAR包括：重链可变区，其包含与SEQ ID NO:7同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列；和轻链可变区，其包含与SEQ ID NO:9同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0336] 在某些实施方式中，方法还包括施用免疫检查点抑制剂、肿瘤抗原疫苗、或赘生性细胞靶向疗法。肿瘤抗原疫苗由致癌病毒蛋白、癌细胞、部分癌细胞、或纯肿瘤抗原制成。肿瘤抗原疫苗的实例包括但不限于人乳头瘤病毒抗原 (即HPV6或HPV7)、爱泼斯坦-巴尔病毒蛋白、癌胚抗原 (如MAGE、NY-ESO等)、过表达的肿瘤蛋白 (如间皮素或维尔姆斯氏肿瘤1抗原)，或针对独立的肿瘤新抗原制成的疫苗。其它赘生性细胞靶向疗法包括但不限于细胞毒性化学疗法、单克隆抗体疗法 (单独或作为免疫毒素)、双特异性抗体、酪氨酸激酶抑制剂、PARP抑制剂、蛋白酶体抑制剂、免疫调节剂 (如lenolinamide)、抗细胞凋亡剂等。这还包括使用肿瘤靶向的CAR T细胞、NK细胞、或修饰的T淋巴细胞的过继性T细胞转移。

[0337] 在某些实施方式中，对象是人。在某些实施方式中，对象是非人动物。

[0338] 本发明的方法可用于瞬时消融 (ablate) FAP阳性基质细胞，从而导致肿瘤相关基质瞬时耗竭，和作为单一疗法抑制肿瘤生长和/或具有与肿瘤细胞定向疗法和免疫疗法 (如疫苗)；联合给出的累加的或协同的抗肿瘤活性。例如，联合疗法可以包括使用本公开的修饰的免疫细胞与其它常规疗法组合，如最近开发的免疫疗法，诸如检查点阻断和肿瘤抗原疫苗接种，以及赘生性细胞靶向疗法。

[0339] G. 免疫细胞的扩大

[0340] 不管是在对细胞进行修饰以表达对象CAR之前还是之后，都可以使用例如在美国专利号6,352,694;6,534,055;6,905,680;6,692,964;5,858,358;6,887,466;6,905,681;7,144,575;7,067,318;7,172,869;7,232,566;7,175,843;5,883,223;6,905,874;6,797,514;6,867,041；和美国公开号20060121005中描述的方法使细胞激活并在数量上扩大细胞。例如，本发明的T细胞可通过接触附着了刺激CD3/TCR复合物相关信号的试剂和刺激T细胞表面上的共刺激分子的配体的表面来扩大。具体而言，T细胞群可通过接触抗CD3抗体或其抗原结合片段、或固定在表面上的抗CD28抗体，或通过与结合钙离子载体的蛋白激酶C激活剂 (例如，苔藓抑制素) 接触来刺激。为了对T细胞表面的辅助分子进行共刺激，使用结合辅助分子的配体。例如，在适合刺激T细胞增殖的条件下，T细胞可与抗CD3抗体和抗CD28抗体接触。抗CD28抗体的实例包括9.3、B-T3、XR-CD28 (Diaclone, Besancon, 法国)，并且这些可如本领域已知的其它方法和试剂那样在本发明中使用 (参见，例如，ten Berge等人，Transplant Proc. (1998) 30 (8) :3975-3977;Haanen等人，J.Exp.Med. (1999) 190 (9) :1319-1328；和Garland等人，J.Immunol.Methods (1999) 227 (1-2) :53-63)。

[0341] 通过本文公开的方法扩大T细胞可乘以约10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、

2000倍、3000倍、4000倍、5000倍、6000倍、7000倍、8000倍、9000倍、10,000倍、100,000倍、1,000,000倍、10,000,000倍、或更大,以及在其之间的任意和全部或部分整数。在一个实施方式中,T细胞在约20倍至约50倍的范围内扩大。

[0342] 培养后,T细胞可在培养设备中的细胞培养基中孵育一段时间,或直到细胞达到汇合(confluency)或高细胞密度以供最佳传代,之后再将细胞递送至另一培养设备。培养设备可以是通常用于体外培养细胞的任何培养设备。优选地,在将细胞递送到另一培养设备之前,汇合水平为70%或更高。更优选地,汇合水平为90%或更高。一段时间可以是适合细胞体外培养的任何时间。在T细胞培养过程中,可随时更换T细胞培养基。优选地,大约每2到3天更换一次T细胞培养基。然后从培养设备中获取T细胞,随之可立即使用T细胞或将其冷冻保存以供之后使用。在一个实施方式中,本发明包括冷冻保存经扩大的T细胞。在将核酸导入T细胞之前使冷冻保存的T细胞解冻。

[0343] 在另一实施方式中,方法包括分离T细胞并扩大T细胞。在另一实施方式中,本发明还包含在扩大之前冷冻保存T细胞。在又一实施方式中,将冷冻保存的T细胞解冻以用编码嵌合膜蛋白的RNA进行电穿孔。

[0344] 另一种离体扩大细胞的程序在美国专利号5,199,942(通过引用并入本文)中描述。扩大,如美国专利号5,199,942中描述的,可以是本文所述其它扩大方法的替代方案或除此之外的其它方法。简而言之,T细胞的离体培养和扩大包含添加细胞生长因子(如美国专利号5,199,942中描述的细胞生长因子)或其它因子(如flt3-L、IL-1、IL-3、和c-kit配体)。在一个实施方式中,扩大T细胞包含用选自flt3-L、IL-1、IL-3和c-kit配体的因子来培养T细胞。

[0345] 如本文所述的培养步骤(如本文所述与试剂接触或在电穿孔后)可以非常短暂,例如小于24小时,如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小时。如本文进一步所述的培养步骤(如本文所述与试剂接触)可以更长,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14天或更多天。

[0346] 各种术语被用来描述培养中的细胞。细胞培养通常是指从活的生物体中取出并在受控条件下生长的细胞。原代细胞培养是在第一次继代培养之前,直接从生物体中取出的细胞、组织或器官的培养。当细胞被置于促进细胞生长和/或分裂的条件下的生长培养基中时,细胞在培养中扩大,从而产生更多的细胞群。当细胞在培养中扩大时,细胞增殖的速率通常是通过细胞数量加倍所需的时间来衡量的,也就是所谓的加倍时间。

[0347] 每一轮继代培养都被称为一次传代。当细胞进行继代培养时,它们被称为已经传代。特定的细胞群或细胞系,有时指代其已传代的次数或以其已传代的次数为特征。例如,传代十次的所培养的细胞群可被称为P10培养。原代培养,即从组织中分离细胞后的第一次培养,称为P0。第一次继代培养后,细胞被描述为次代培养(P1或第1代)。第二次继代培养后,细胞变成第三代培养(P2或第2代),依此类推。本领域技术人员将理解,在传代期间可能存在多种群体加倍;因此培养物的群体加倍的数大于传代数。传代期间细胞的扩大(即,群体加倍的数)取决于许多因素,包括但不限于接种密度、底物、培养基、和传代间隔时间。

[0348] 在一个实施方式中,细胞可培养数小时(约3小时)至约14天或其间的任意小时整数值。适合T细胞培养的条件包括适合的培养基(例如,极限必需培养基或RPMI培养基1640或,X-vivo 15,(Lonza)),其可包含增殖和存活所必需的因子,包括血清(例如,胎牛血清或

人血清)、白介素-2 (IL-2)、胰岛素、IFN- γ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF- β 和TNF- α ,或本领域技术人员已知的用于细胞生长的任意其它添加剂。用于细胞生长的其它添加剂包括但不限于表面活性剂、人血浆蛋白制剂(plasmanate)和还原剂,如N-乙酰半胱氨酸和2-巯基乙醇。培养基可包括RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo 15和X-Vivo 20、Optimizer,添加氨基酸、丙酮酸钠和维生素,无血清或补充适量的血清(或血浆)或一组确定的激素,和/或足以使T细胞生长和扩大的量的细胞因子(一种或多种)。抗生素(例如,青霉素和链霉素)只包含在实验培养物中,而不包含在待输注到对象体内的细胞培养物中。靶细胞维持和支持生长所需的条件下,例如,适当的温度(例如,37°C)和大气(例如,空气加5%的二氧化碳)。

[0349] 用于培养T细胞的培养基可包括可共同刺激T细胞的试剂。例如,能够刺激CD3的试剂是针对CD3的抗体,而能够刺激CD28的试剂是针对CD28的抗体。通过本文公开的方法分离的细胞可扩大约10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、2000倍、3000倍、4000倍、5000倍、6000倍、7000倍、8000倍、9000倍,10,000倍、100,000倍、1,000,000倍、10,000,000倍或更大。在一个实施方式中,T细胞在约20倍至约50倍或更大的范围内扩大。在一个实施方式中,通过抗CD3抗体包被的KT64.86人工抗原呈递细胞(aAPC)来扩大人T调节细胞。用于使T细胞扩大和激活的方法可在美国专利号7,754,482、8,722,400、和9,555,105(其内容以其整体并入本文)中找到。

[0350] 在一个实施方式中,扩大T细胞的方法可进一步包括分离扩大的T细胞以供进一步应用。在另一实施方式中,扩大的方法可进一步包括随后对扩大的T细胞进行电穿孔,之后进行培养。随后的电穿孔可包括向扩大的T细胞群中导入编码试剂的核酸,诸如用核酸对扩大的T细胞转导、对扩大的T细胞转染、或对扩大的T细胞电穿孔,其中试剂进一步刺激T细胞。试剂可刺激T细胞(诸如通过刺激进一步的扩大)、效应物功能、或其它T细胞功能。

[0351] H. 产生基因修饰免疫细胞的方法

[0352] 本公开提供了产生或生成用于肿瘤免疫疗法(例如,过继性免疫疗法)的本发明的修饰的免疫细胞或其前体(例如,T细胞或NK细胞)的方法。

[0353] 在一些实施方式中,通过表达载体将CAR导入细胞中。本文提供了包含本发明的编码CAR的核酸序列的表达载体。合适的表达载体包括慢病毒载体、 γ 逆转录病毒载体、泡沬病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体、腺病毒载体、工程改造的杂合病毒、裸DNA,包括但不限于转座子介导的载体,如睡美人、Piggybak、和整合酶类,如Phi31。一些其它合适的表达载体包括单纯疱疹病毒(HSV)表达载体和逆转录病毒表达载体。

[0354] 在某些实施方式中,编码CAR的核酸通过病毒转导被导入细胞中。在某些实施方式中,病毒转导包括使免疫细胞或前体细胞与包含编码CAR的核酸的病毒载体接触。在某些实施方式中,病毒载体是腺相关病毒(AAV)载体。在某些实施方式中,AAV载体包含土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)。在某些实施方式中,AAV载体包含多聚腺苷酸化(多聚A)序列。在某些实施方式中,多聚A序列是牛生长激素(BGH)多聚A序列。

[0355] 腺病毒表达载体基于腺病毒,腺病毒整合到基因组DNA的能力低,但转染宿主细胞的效率高。腺病毒表达载体包含的腺病毒序列足以:(a)支持表达载体的包装并(b)在宿主细胞中最终表达CAR。在一些实施方式中,腺病毒基因组是36kb的线性双链DNA,其中外来

DNA序列(例如,编码CAR的核酸)可进行插入以取代腺病毒DNA的大片段,从而制成本发明的表达载体(参见,例如,Danthinne和Imperiale, Gene Therapy (2000) 7 (20):1707-1714)。

[0356] 另一表达载体基于腺相关病毒(AAV),腺相关病毒利用腺病毒偶联的系统。此AAV表达载体整合到宿主基因组的频率高。其可感染非分裂细胞,从而使其用于例如在组织培养物中或体内将基因递送到哺乳动物细胞中。AAV载体对宽泛的宿主范围具有感染性。有关AAV载体的生成和使用的细节在美国专利号5,139,941和4,797,368中描述。

[0357] 逆转录病毒表达载体能够整合到宿主基因组中,从而递送大量的外来基因物质、感染广谱的物种和细胞类型、并被包装到特殊的细胞系中。逆转录病毒载体通过将核酸(例如,编码CAR的核酸)插入到病毒基因组中的某些位置从而产生复制缺陷的病毒来构建。尽管逆转录病毒载体能够感染多种细胞类型,但是CAR的整合与稳定表达要求宿主细胞的分裂。

[0358] 慢病毒载体源自慢病毒,慢病毒是复合物逆转录病毒,除了常见的逆转录病毒基因gag、pol和env之外,慢病毒载体还包含具有调控和结构功能的其它基因(参见,例如,美国专利号6,013,516和5,994,136)。慢病毒的一些实例包括人免疫缺陷病毒(HIV-1、HIV-2)和猿猴免疫缺陷病毒(SIV)。慢病毒载体是通过多次消减HIV毒力基因而产生的,例如,使基因env、vif、vpr、vpu和nef缺失,从而使得该载体在生物学上是安全的。慢病毒载体能够感染非分裂细胞并且可用于例如编码CAR的核酸的体内和离体基因转移和表达(参见,例如,美国专利号5,994,136)。

[0359] 包括本发明的核酸的表达载体可通过本领域技术人员已知的任何手段导入到宿主细胞中。如果需要,表达载体可包括用于转染的病毒序列。可选地,表达载体可通过融合、电穿孔、生物射弹、转染、脂质转染等导入。在导入表达载体之前,宿主细胞可在培养物中生长和扩大,之后对载体的导入和整合进行适当处理。宿主细胞然后被扩大并且可借助载体中存在的标记物来筛选。本领域已知可以使用的各种标记物,并且可以包括hprt、新霉素抗性、胸腺嘧啶激酶、潮霉素抗性等。如本文所用,术语“细胞”、“细胞系”和“细胞培养”可以互换使用。在一些实施方式中,宿主细胞是免疫细胞或其前体,例如T细胞、NK细胞、或NKT细胞。

[0360] 本发明还提供了基因工程改造的细胞,其包括并且稳定表达本公开的CAR。在一些实施方式中,基因工程改造的细胞是能够引起治疗相关的成果的基因工程改造的T-淋巴细胞(T细胞)、幼稚T细胞(TN)、记忆T细胞(例如,中枢记忆T细胞(TCM)、效应记忆细胞(TEM))、自然杀伤细胞(NK细胞)、和巨噬细胞。在某些实施方式中,基因工程改造的细胞是自体细胞。在某些实施方式中,修饰的细胞抗T细胞耗尽。

[0361] 修饰的细胞(例如,包含CAR)可通过用包括本公开的核酸的表达载体稳定转染宿主细胞产生。生成本公开的修饰的细胞的其它方法非限制地包括化学转变方法(例如,使用磷酸钙、树枝状大分子、脂质体和/或阳离子聚合物)、非化学转变方法(例如,电穿孔、光学转变、基因电转移和/或流体动力学递送)和/或基于粒子的方法(例如,穿刺转染(impalefection)、使用基因枪和/或磁性转染(magnetofection))。表达本公开的CAR的转染后的细胞可离体扩大。

[0362] 将表达载体导入宿主细胞的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂质体转染、粒子轰击、显微注射、电穿孔等。用于产生包括载体和/或外源核酸的细胞的方法在本领域是公知的。参

见,例如,Sambrook等人(2001),*Molecular Cloning:A Laboratory Manual*,Cold Spring Harbor Laboratory,New York。将表达载体导入宿主细胞的化学方法包括胶体分散系统,如大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠子、和基于脂质的系统,包括水包油乳液、胶束、混合胶束、和脂质体。

[0363] 适合使用的脂质可从商业来源获得。例如,可以从Sigma,St.Louis,MO获得二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(“DMPC”);双十六烷基磷酸(dicetyl phosphate) (“DCP”)可从K&K Laboratories (PlannView,NY)获得;胆固醇(“Choi”)可从Calbiochem-Behring获得;二肉豆蔻酰磷脂酰甘油(“DMPG”)和其它脂质可从Avanti Polar Lipids,Inc. (Birmingham,AL)获得。氯仿或氯仿/甲醇中的脂质储备溶液可储存在-20℃左右。氯仿可作为唯一溶剂,因为它比甲醇更容易蒸发。“脂质体”是上位术语,其涵盖由封闭的脂质双层或聚集物的生成所形成的多种单一和多层的脂质载体。脂质体的特征可在于具有囊泡结构,该囊泡结构具有磷脂双层膜和内部水性介质。多层膜脂质体具有由水性介质分开的多个脂质层。当磷脂悬浮在过量的水溶液中时,它们会自发形成。脂质组分在形成封闭结构之前经历自重排,并在脂质双层之间截留水和溶解的溶质(Ghosh等人,1991*Glycobiology* 5:505-10)。还涵盖在溶液中结构不同于正常囊泡结构的组合物。例如,脂质可以呈胶束结构,或者仅仅作为脂质分子的非均匀聚集物而存在。也考虑了lipofectamine-核酸复合物。

[0364] 无论用于将外源核酸导入宿主细胞或以其它方式将细胞暴露于本发明的抑制剂的方法如何,为了确认宿主细胞中存在核酸,可以执行各种测定。此类测定包括,例如,本领域技术人员公知的分子生物学测定,如DNA印迹法和RNA印迹法、RT-PCR和PCR;生物化学测定,诸如,例如通过免疫手段(ELISA和蛋白质印迹)或通过落入本发明范围的本文所述的用于鉴别试剂的测定来检测特定肽的存在或不存在。

[0365] 在一个实施方式中,导入到宿主细胞的核酸是RNA。在另一个实施方式中,RNA是mRNA。例如,在某些实施方式中,编码CAR的核酸是mRNA并且mRNA被导入(例如,转导)到宿主细胞中。在另一实施方式中,RNA是包含体外转录的RNA或合成RNA的mRNA。RNA可利用聚合酶链式反应(PCR)生成的模板,通过体外转录产生。来自任意来源的感兴趣的DNA都可通过PCR直接转换成模板,以供使用适当的引物和RNA聚合酶体外合成mRNA。DNA的来源可以是,例如,基因组DNA、质粒DNA、噬菌体DNA、cDNA、合成DNA序列或任意其它适当的DNA来源。

[0366] PCR可用于生成mRNA体外转录的模板,然后将其导入细胞中。执行PCR的方法在本领域是公知的。用于PCR的引物被设计成具有与用作PCR模板的DNA区域基本上互补的区域。如本文所用,“基本上互补的”是指引物序列中的大多数或所有碱基互补的核苷酸序列。基本上互补的序列能够在用于PCR的退火条件下与预期DNA模板退火或杂交。引物可被设计成与DNA模板的任何部分基本上互补。例如,可以设计引物来扩增基因的通常在细胞中转录的部分(开放阅读框),包括5'UTR和3'UTR。引物还可被设计用于扩增基因的编码特定的感兴趣结构域的部分。在一个实施方式中,引物被设计成扩增人cDNA的编码区,包括5'UTR和3'UTR的全部或部分。用于PCR的引物通过本领域公知的合成方法产生。“正向引物”是指含有核苷酸区域的引物,该核苷酸与待扩增DNA序列上游的DNA模板上的核苷酸基本上互补。“上游”在本文中用于指代相对于编码链扩增的DNA序列的5'位。“反向引物”是指含有核苷酸区域的引物,该核苷酸与待扩增DNA序列下游的双链DNA模板基本上互补。“下游”在本文中用于指代相对于编码链扩增的DNA序列的3'位。

[0367] 也可以使用能够促进RNA的稳定性和/或翻译效率的化学结构。该RNA优选具有5'UTR和3'UTR。在一个实施方式中,5'UTR的长度在0和3000个核苷酸之间。添加到编码区的5'UTR序列和3'UTR序列的长度可以通过不同的方法改变,包括但不限于设计对UTR的不同区域退火的PCR引物。使用此方法,本领域普通技术人员可以修改在经转录的RNA转染之后实现最佳翻译效率所需的5'UTR和3'UTR长度。

[0368] 5'UTR和3'UTR可以是感兴趣的基因的天然存在的内源性5'UTR和3'UTR。可选地,可以通过将对感兴趣的基因而言是非内源性的UTR序列并入正向引物和反向引物中或通过模板的任意其它修改来添加这些UTR序列。对感兴趣的基因而言是非内源性的UTR序列的使用可用于改变RNA的稳定性和/或翻译效率。例如,已知3'UTR序列中富含AU的元件会降低mRNA的稳定性。因此,可以基于本领域公知的UTR的特性来选择或设计3'UTR以提高经转录的RNA的稳定性。

[0369] 在一个实施方式中,5'UTR可包含内源基因的Kozak序列。可选地,当如上所述通过PCR添加对感兴趣的基因而言是非内源性的5'UTR时,可以通过添加该5'UTR序列来重新设计共有Kozak序列。Kozak序列可以提高一些RNA转录物的翻译效率,但并不是所有RNA都需要Kozak序列才能实现高效翻译。许多mRNA对Kozak序列的要求是本领域已知的。在其它实施方式中,5'UTR可源自这样的RNA病毒:其RNA基因组在细胞中是稳定的。在其它实施方式中,可在3'UTR或5'UTR中使用各种核苷酸类似物以阻止mRNA的核酸外切酶降解。

[0370] 为了能够从DNA模板合成RNA而不需要基因克隆,转录启动子应附着在待转录的序列上游的DNA模板上。在充当RNA聚合酶启动子的序列被添加到正向引物的5'端时,RNA聚合酶启动子被并入到待转录的开放阅读框上游的PCR产物中。在一个实施方式中,如本文其它部分所述,启动子是T7聚合酶启动子。其它有用的启动子包括但不限于T3和SP6RNA聚合酶启动子。本领域已知T7、T3和SP6启动子的共有核苷酸序列。

[0371] 在一个实施方式中,mRNA在5'端有一个帽和一个3'多聚(A)尾,其决定核糖体结合、翻译的起始和mRNA在细胞中的稳定性。在环状DNA模板(例如,质粒DNA)上,RNA聚合酶产生不适合在真核细胞中表达的长的多联体产物。在3'UTR端线性化的质粒DNA的转录产生正常大小的mRNA,其即使在转录后经过聚腺苷酸化,在真核转染中也是没有作用的。

[0372] 在线性DNA模板上,噬菌体T7 RNA聚合酶可以将转录物的3'端延伸到模板的最后一个碱基之外(Schenborn和Mierendorf,Nuc Acids Res.,13:6223-36(1985);Nacheva和Berzal-Herranz,Eur.J.Biochem.,270:1485-65(2003))。

[0373] 转录DNA模板的多聚A/T片段可在PCR期间通过使用包含多聚T尾(如100T尾(大小可为50-5000T))的反向引物产生,或在PCR之后通过任意其它方法(包括但不限于DNA连接或体外重组)产生。多聚(A)尾也提供RNA的稳定性并减少其降解。一般来说,多聚(A)尾的长度与经转录的RNA的稳定性呈正相关。在一个实施方式中,多聚(A)尾在100和5000个腺苷之间。

[0374] 利用多聚(A)聚合酶,如大肠杆菌多聚A聚合酶(E-PAP),在体外转录后,RNA的多聚(A)尾可以进一步延伸。在一个实施方式中,将多聚(A)尾的长度从100个核苷酸增加到300和400个核苷酸之间导致RNA的翻译效率提高约两倍。另外,不同化学基团在3'端的附着可以提高mRNA的稳定性。这种附着可以包含修饰的/人工的核苷酸、适体和其它化合物。例如,可以使用多聚(A)聚合酶将ATP类似物并入多聚(A)尾中。ATP类似物可以进一步提高RNA的

稳定性。

[0375] 5'帽也为RNA分子提供稳定性。在优选实施方式中,通过本文公开的方法产生的RNA包括5'帽。利用本领域已知并在本文中描述的技术提供5'帽(Cougot,等人,Trends in Biochem.Sci.,29:436-444(2001);Stepinski,等人,RNA,7:1468-95(2001);Elango,等人,Biochim.Biophys.Res.Commun.,330:958-966(2005))。

[0376] 在一些实施方式中,诸如以体外转录的RNA的形式将RNA电穿孔到细胞中。可包括适合细胞电穿孔的任何溶质——其可含有促进细胞通透性和活力的因子,如糖、肽、脂质、蛋白质、抗氧化剂、和表面活性剂。

[0377] 在一些实施方式中,编码本公开的CAR的核酸将是RNA,例如,体外合成的RNA。用于体外合成RNA的方法是本领域已知的;可以使用任何已知的方法来合成包含编码CAR的序列的RNA。用于将RNA导入宿主细胞的方法是本领域已知的。参见,例如,Zhao等人Cancer Res.(2010)15:9053。将包含编码CAR的核苷酸序列的RNA导入宿主细胞可在体外或离体或者在体内实施。例如,可用包含编码CAR的核苷酸序列的RNA,在体外或离体对宿主细胞(例如,NK细胞、细胞毒性T淋巴细胞等)电穿孔。

[0378] 所公开的方法可应用于在癌症、干细胞、急慢性感染、和自身免疫疾病领域中对基础研究和治疗中的T细胞活性进行调节,包括评估基因修饰T细胞杀死靶癌细胞的能力。

[0379] 该方法还提供了通过改变例如启动子或输入RNA的量,在宽范围内控制表达水平的能力,从而使单独调控表达水平成为可能。此外,基于PCR的mRNA产生技术大大促进了具有不同结构及其结构域组合的mRNA的设计。

[0380] 本发明的RNA转染方法的一个优点是RNA转染基本上瞬时的并且是无载体的。RNA转基因可被递送到淋巴细胞中并在短暂的(brief)体外细胞激活后在其中表达——作为最小表达盒而不需要任何其它的病毒序列。在这些条件下,转基因整合到宿主细胞基因组是不可能的。由于RNA的转染效率以及能够均一地修饰整个淋巴细胞群,因此不需要对细胞克隆。

[0381] 用体外转录的RNA(IVT-RNA)对T细胞进行基因修饰,采用了两种不同的策略,这两种策略都已在各种动物模型上进行了测试。通过脂质体转染或电穿孔,用体外转录的RNA转染细胞。为了实现所转移的IVT-RNA的长时间表达,期望使用各种修饰来稳定IVT-RNA。

[0382] 一些IVT载体在文献中是已知的,它们以标准化的方式被用作体外转录的模板,并且以产生稳定RNA转录物的方式被基因修饰。本领域中目前使用的方案基于具有以下结构的质粒载体:实现RNA转录的5'RNA聚合酶启动子,之后是在3'和/或5'侧有非翻译区(UTR)的感兴趣的基因,以及含有50-70个A核苷酸的3'聚腺苷盒。在体外转录之前,环状质粒在聚腺苷盒下游被II型限制酶线性化(识别序列对应于切割位点)。因此,聚腺苷盒对应于转录物中后来的多聚(A)序列。此程序导致一些核苷酸在线性化后仍然作为酶切位点的部分,并延伸或掩盖3'端的多聚(A)序列。尚不清楚这种非生理性的突出端是否会影响到胞内由这种构建物产生的蛋白质的量。

[0383] 另一方面,通过电穿孔将RNA构建物递送到细胞中。例如,参见US 2004/0014645、US 2005/0052630A1、US 2005/0070841A1、US 2004/0059285A1、US 2004/0092907A1中教导的将核酸构建物电穿孔到哺乳动物细胞中的制剂和方法。任何已知细胞类型的电穿孔所需的各种参数(包括电场强度)在相关研究文献以及该领域的众多专利和申请中是普遍知晓

的。参见美国专利号6,678,556、美国专利号7,171,264、和美国专利号7,173,116。用于电穿孔的治疗性应用的设备可商业获得,例如MedPulser™ DNA Electroporation Therapy System(Inovio/Genetronics, San Diego, Calif.),并在诸如美国专利号6,567,694;美国专利号6,516,223、美国专利号5,993,434、美国专利号6,181,964、美国专利号6,241,701、和美国专利号6,233,482的专利中描述;电穿孔也可用于体外对细胞转染,如US20070128708A1中所述。电穿孔也可用于在体外将核酸传递到细胞中。因此,利用本领域技术人员已知的多种可获得的装置和电穿孔系统中的任意种进行的电穿孔介导的将核酸(包括表达构建物)施用细胞,展示了用于将感兴趣的RNA递送到靶细胞的令人兴奋的新手段。

[0384] I. 药物组合物和制剂

[0385] 还提供了包含治疗有效量的本文公开的修饰的细胞的药物组合物。在组合物当中,是用于施用以诸如用于过继性细胞疗法的药物组合物和制剂。还提供了用于向对象(例如,患者)施用细胞和组合物的治疗方法。

[0386] 还提供了包括用于施用的细胞的组合物,该组合物包括药物组合物和制剂,如单位剂型组合物,单位剂型组合物包括以给定剂量或其部分来施用的细胞的数量。药物组合物和制剂通常包括一种或多种任选的药学上可接受的载体或赋形剂。在一些实施方式中,组合物包括至少一种其它的治疗剂。

[0387] 术语“药物制剂”是指这样的制剂:这种形式的该制剂允许其中所含活性成分的生物活性有效且不含有对将施用该制剂的对象具有不可接受的毒性的其它成分。“药学上可接受的载体”是指药物制剂中除活性成分外,对于对象无毒的成分。药学上可接受的载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂、或防腐剂。在一些方面中,载体的选择部分地由特定细胞和/或施用方法确定。因此,存在多种合适的制剂。例如,药物组合物可以含有防腐剂。合适的防腐剂可包括,例如,羟苯甲酯、羟苯丙酯、苯甲酸钠、和苯扎氯铵。在一些方面中,使用两种或更多种防腐剂的混合物。防腐剂或其混合物通常以按总组合物的重量计约0.0001%至约2%的量存在。例如,Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol, A. Ed. (1980)对载体进行了描述。所采用的剂量和浓度下的药学上可接受的载体通常对接受者是无毒的,并且包括但不限于:缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲氯铵);苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯类,如羟苯甲酯或羟苯丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、双糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐反离子,如钠;金属络合物(例如锌-蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂,如聚乙二醇(PEG)。

[0388] 在一些方面中,缓冲剂包括在组合物中。合适的缓冲剂包括,例如,柠檬酸、柠檬酸钠、磷酸、磷酸钾、和各种其它酸和盐。在一些方面中,使用两种或更多种缓冲剂的混合物。缓冲剂或其混合物通常以按总组合物的重量计约0.001%至约4%的量存在。制备可施用的药物组合物的方法是已知的。示例性方法在例如Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (2005年5月1日)中有更详细的描

述。

[0389] 制剂可包括水溶液。制剂或组合物还可包含多于一种的活性成分，活性成分可用于用细胞治疗的特定适应症、疾病或状况，优选活性与所述细胞互补的活性成分，其中各自的活性彼此不产生不利影响。此类活性成分适当地以对预期目的有效的量组合存在。因此，在一些实施方式中，药物组合物进一步包括其它药学活性剂或药物，如化疗剂，例如天门冬酰胺酶、白消安、卡铂、顺铂、柔红霉素、阿霉素、氟尿嘧啶、吉西他滨 (gemcitabine)、羟基脲、甲氨蝶呤、紫杉醇、利妥昔单抗 (rituximab)、长春花碱、和/或长春新碱。在一些实施方式中，药物组合物含有有效治疗或预防疾病或状况的量 (如治疗有效或预防有效量) 的细胞。在一些实施方式中，通过对所治疗的对象周期性评估来监测治疗或预防功效。所期望的剂量可通过细胞的单次弹丸施用、细胞的多次弹丸施用，或通过细胞的连续输注施用来递送。

[0390] 制剂包括口服、静脉内、腹膜内、皮下、肺部、经皮、肌肉内、鼻内、口腔、舌下、或栓剂施用的制剂。在一些实施方式中，肠胃外施用细胞群。如本文所用，术语“肠胃外”包括静脉内、肌肉内、皮下、直肠、阴道、和腹膜内施用。在一些实施方式中，利用外周全身性递送，通过静脉内注射、腹膜内注射、或皮下注射将细胞施用对象。在一些实施方式中，组合物作为无菌液体制剂提供，例如等渗水溶液、悬浮液、乳液、分散体、或粘性组合物，其在某些方面可缓冲至选定的pH值。液体制剂通常比凝胶、其它粘性组合物和固体组合物更容易制备。另外，液体组合物更便于施用，尤其是通过注射。另一方面，粘性组合物可在适当的粘度范围内配制以提供与特定组织的较长接触时间。液体组合物或粘性组合物可包含载体，其可以是溶剂或分散介质，溶剂或分散介质含有，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) 及其合适的混合物。

[0391] 无菌可注射溶液可通过将细胞并入溶剂中制备，诸如与合适的载体、稀释剂或赋形剂 (如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等) 混合。组合物可包含辅助物质，如润湿剂、分散剂或乳化剂 (例如，甲基纤维素)、pH缓冲剂、凝胶或粘性增强添加剂、防腐剂、调味剂、和/或色素，这取决于施用途径和所期望的制剂。在某些方面可以参考标准文本来制备合适的制剂。

[0392] 可以添加各种增强组合物的稳定性和无菌性的添加剂，包括抗菌防腐剂、抗氧化剂、螯合剂、和缓冲剂。各种抗菌剂和抗真菌剂，例如，对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚和山梨酸可以确保对微生物作用的预防。通过使用延迟吸收的试剂 (例如，单硬脂酸铝和明胶) 可以延长可注射的药物形式的吸收。

[0393] 待用于体内施用的制剂通常是无菌的。无菌性可以很容易地实现，例如通过无菌过滤膜来过滤。

[0394] 本文提到或引用的文章、专利和专利申请以及所有其它文件和以电子方式获得的信息的内容特此通过引用以其整体并入，其程度与所指示通过引用将每一个独立的出版物具体且独立地并入一样。申请人保留将来自任何此类文章、专利、专利申请、或其它实体和电子文件中的任何以及所有材料和信息实体并入本申请的权利。

[0395] J. 本公开的实施方式

[0396] 在某些方面中，本发明提供了嵌合抗原受体 (CAR)，其包括能够结合成纤维细胞激活蛋白 (FAP) 的抗原结合结构域、跨膜结构域、和胞内结构域，其中抗原结合结构域包括：重

链可变区,其包括三个重链互补决定区(HCDR),其中HCDR1包含氨基酸序列YTITSYSLH(SEQ ID NO:1),HCDR2包含氨基酸序列EINPANGDHNHFSEKFEIK(SEQ ID NO:2),并且HCDR3包含氨基酸序列LDDSRFHWFYFDV(SEQ ID NO:3);和轻链可变区,其包括三个轻链互补决定区(LCDR),其中LCDR1包含氨基酸序列TASSSVSYMY(SEQ ID NO:4),LCDR2包含氨基酸序列LTSNLA(SEQ ID NO:5),并且LCDR3包含氨基酸序列QQWSGYPPIT(SEQ ID NO:6)。

[0397] 在某些实施方式中,抗原结合结构域包括重链可变区,所述重链可变区包含与SEQ ID NO:7同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。在某些实施方式中,抗原结合结构域包括轻链可变区,所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:9同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。在某些实施方式中,抗原结合结构域包括重链可变区,所述重链可变区包含与SEQ ID NO:7同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;和轻链可变区,所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:9同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0398] 在某些实施方式中,抗原结合结构域选自全长抗体或其抗原结合片段、Fab、单链可变片段(scFv)、或单结构域抗体。

[0399] 在某些实施方式中,抗原结合结构域是单链可变片段(scFv),所述单链可变片段(scFv)包含与SEQ ID NO:11或13同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0400] 在某些实施方式中,CAR能够结合成纤维细胞激活蛋白(FAP)。在某些实施方式中,CAR能够结合人FAP。在某些实施方式中,CAR能够结合犬FAP。在某些实施方式中,CAR能够结合鼠FAP。在某些实施方式中,CAR能够结合人、犬、和鼠FAP。

[0401] 在某些实施方式中,CAR进一步包括铰链结构域。在某些实施方式中,铰链结构域包括CD8 α 的铰链结构域。

[0402] 在某些实施方式中,跨膜结构域选自选自人工疏水序列,和I型跨膜蛋白、T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、OX40(CD134)、4-1BB(CD137)、ICOS(CD278)和CD154的跨膜结构域,或源自杀伤免疫球蛋白样受体(KIR)的跨膜结构域。在某些实施方式中,跨膜结构域包括CD8的跨膜结构域。在某些实施方式中,跨膜结构域包括CD8 α 的跨膜结构域。在某些实施方式中,跨膜结构域包括源自杀伤免疫球蛋白样受体(KIR)的跨膜结构域。

[0403] 在某些实施方式中,胞内结构域包括共刺激信号传导结构域和胞内信号传导结构域。在某些实施方式中,胞内结构域包括选自TNFR超家族中蛋白质的蛋白质、CD28、4-1BB(CD137)、OX40(CD134)、PD-1、CD7、LIGHT、CD83L、DAP10、DAP12、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、ICOS(CD278)、NKG2C和B7-H3(CD276)的共刺激结构域中的一种或多种,或其变体,或源自杀伤免疫球蛋白样受体(KIR)的胞内结构域。在某些实施方式中,胞内结构域包括4-1BB的共刺激结构域。在某些实施方式中,胞内结构域包括DAP12的共刺激结构域。在某些实施方式中,胞内结构域包括CD28的共刺激结构域。在某些实施方式中,胞内结构域包括4-1BB的共刺激结构域和CD28的共刺激结构域。在某些实施方式中,胞内结构域包括DAP12的共刺激结构域和CD28的共刺激结构域。

[0404] 在某些实施方式中,胞内信号传导结构域包括胞内结构域,所述胞内结构域选自:

人CD3 ζ 链(CD3 ζ)、Fc γ RIII、Fc γ RI、Fc受体的胞质尾、携带基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)的胞质受体、TCR ζ 、FcR γ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的胞质信号传导结构域,或其变体。在某些实施方式中,胞内信号传导结构域包括CD3 ζ 的胞内结构域。

[0405] 另一方面,本发明提供了能够结合FAP的嵌合抗原受体(CAR),所述嵌合抗原受体(CAR)包括抗原结合结构域、跨膜结构域、和胞内结构域,其中抗原结合结构域包括:重链可变区,其包含与SEQ ID NO:7同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;和轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:9同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0406] 在某些实施方式中,抗原结合结构域包括单链可变片段(scFv)。在某些实施方式中,scFv从N-末端到C-末端包括:重链可变区、连接体、和轻链可变区。在某些实施方式中,scFv从N-末端到C-末端包括:轻链可变区、连接体、和重链可变区。在某些实施方式中,连接体包含SEQ ID NO:15。

[0407] 另一方面,本发明提供了能够结合FAP的嵌合抗原受体(CAR),所述嵌合抗原受体(CAR)包括包含与SEQ ID NO:11或13同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列的抗原结合结构域。

[0408] 另一方面,本发明提供了能够结合成纤维细胞激活蛋白(FAP)的嵌合抗原受体(CAR),所述嵌合抗原受体(CAR)包含与SEQ ID NO:23或25同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0409] 另一方面,本发明提供了核酸,其包含编码本文所考虑的任意CAR的多核苷酸序列。

[0410] 另一方面,本发明提供了核酸,其包含编码能够结合FAP的嵌合抗原受体(CAR)的多核苷酸序列,所述嵌合抗原受体(CAR)包括抗原结合结构域、跨膜结构域、和胞内结构域,其中抗原结合结构域包括:重链可变区,其包括三个重链互补决定区(HCDR),其中HCDR1包含氨基酸序列YTITSYSLH(SEQ ID NO:1),HCDR2包含氨基酸序列EINPANGDHNFSKFEIK(SEQ ID NO:2),并且HCDR3包含氨基酸序列LDDSRFHWFYFDV(SEQ ID NO:3);和轻链可变区,其包括三个轻链互补决定区(LCDR),其中LCDR1包含氨基酸序列TASSVSYMY(SEQ ID NO:4),LCDR2包含氨基酸序列LTSNLA(SEQ ID NO:5),并且LCDR3包含氨基酸序列QQWSGYPPIT(SEQ ID NO:6)。

[0411] 在某些实施方式中,抗原结合结构域包括由与SEQ ID NO:8同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的多核苷酸序列编码的重链可变区。在某些实施方式中,抗原结合结构域包括由与SEQ ID NO:10同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的多核苷酸序列编码的轻链可变区。在某些实施方式中,抗原结合结构域包括由与SEQ ID NO:8同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的多核苷酸序列编码的重链可变区;和由与SEQ ID NO:10同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的多核苷酸序列编码的轻链可变区。

[0412] 在某些实施方式中,抗原结合结构域包括由与SEQ ID NO:12或14同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的多核苷酸序列编码的单链可变片段(scFv)。

[0413] 在某些实施方式中,跨膜结构域包括CD8 α 的跨膜结构域。

[0414] 在某些实施方式中,胞内结构域包括共刺激信号传导结构域和胞内信号传导结构域。在某些实施方式中,共刺激信号传导结构域包括4-1BB的共刺激结构域。在某些实施方式中,胞内结构域包括DAP12的共刺激结构域。在某些实施方式中,胞内结构域包括CD28的共刺激结构域。在某些实施方式中,胞内结构域包括4-1BB的共刺激结构域和CD28的共刺激结构域。在某些实施方式中,胞内结构域包括DAP12的共刺激结构域和CD28的共刺激结构域。在某些实施方式中,胞内信号传导结构域包括CD3 ζ 的胞内结构域。

[0415] 另一方面,本发明提供了包含编码能够结合成纤维细胞激活蛋白 (FAP) 的嵌合抗原受体 (CAR) 的多核苷酸序列的核酸,所述嵌合抗原受体 (CAR) 包括抗原结合结构域、跨膜结构域、和胞内结构域,其中抗原结合结构域包括由与SEQ ID NO:8同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的多核苷酸序列编码的重链可变区;和由与SEQ ID NO:10同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的多核苷酸序列编码的轻链可变区。

[0416] 另一方面,本发明提供了核酸,其包含与SEQ ID NO:22或24同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的多核苷酸序列。

[0417] 另一方面,本发明提供了包含本文所考虑的任意核酸的载体。在某些实施方式中,载体是表达载体。在某些实施方式中,载体选自DNA载体、RNA载体、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、和逆转录病毒载体。

[0418] 另一方面,本发明提供了修饰的免疫细胞或其前体细胞,其包含本文所考虑的任意CAR、本文所考虑的任意核酸、或本文所考虑的任意载体。

[0419] 另一方面,本发明提供了修饰的免疫细胞或其前体细胞,其包含能够结合成纤维细胞激活蛋白 (FAP) 的嵌合抗原受体 (CAR),其中CAR包括:重链可变区,其包括三个重链互补决定区 (HCDR),其中HCDR1包含氨基酸序列YTITSYSLH (SEQ ID NO:1),HCDR2包含氨基酸序列EINPANGDHNHFSEKFEIK (SEQ ID NO:2),并且HCDR3包含氨基酸序列LDDSRFHWFYFDV (SEQ ID NO:3);和轻链可变区,其包括三个轻链互补决定区 (LCDR),其中LCDR1包含氨基酸序列TASSSVSYMY (SEQ ID NO:4),LCDR2包含氨基酸序列LTSNLA (SEQ ID NO:5),并且LCDR3包含氨基酸序列QQWSGYPPIT (SEQ ID NO:6)。

[0420] 另一方面,本发明提供了修饰的免疫细胞或其前体细胞,其包含能够结合成纤维细胞激活蛋白 (FAP) 的嵌合抗原受体 (CAR),其中CAR包括:重链可变区,其包含与SEQ ID NO:7同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;和轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:9同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0421] 另一方面,本发明提供了修饰的免疫细胞或其前体细胞,其包含能够结合成纤维细胞激活蛋白 (FAP) 的嵌合抗原受体 (CAR),其中CAR包括包含与SEQ ID NO:11或13同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列的单链可变片段 (scFv)。

[0422] 另一方面,本发明提供了修饰的免疫细胞或其前体细胞,其包含能够结合成纤维细胞激活蛋白 (FAP) 的嵌合抗原受体 (CAR),其中CAR包含与SEQ ID NO:23或25同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0423] 在某些实施方式中, CAR能够结合FAP。在某些实施方式中, CAR能够结合人FAP。在某些实施方式中, CAR能够结合犬FAP。在某些实施方式中, CAR能够结合小鼠FAP。

[0424] 在某些实施方式中, CAR能够结合人、犬、和小鼠FAP。

[0425] 在某些实施方式中, 修饰的细胞是修饰的T细胞。在某些实施方式中, 修饰的细胞是修饰的NK细胞。在某些实施方式中, 修饰的细胞是自体细胞。在某些实施方式中, 修饰的细胞是从人对象获得的自体细胞。在某些实施方式中, 修饰的细胞是从犬对象获得的自体细胞。在某些实施方式中, 修饰的细胞是同种异体细胞。

[0426] 另一方面, 本发明提供了药物组合物, 其包含治疗有效量的本文所考虑的任意修饰的细胞, 和药学上可接受的赋形剂。

[0427] 另一方面, 本发明提供了治疗对其需要的对象中的疾病的方法, 包括向对象施用有效量的任意修饰的细胞, 或所考虑的任意药物组合物。

[0428] 在某些实施方式中, 疾病选自免疫性疾病、血液疾病、自身免疫性疾病、纤维化、和癌症。在某些实施方式中, 疾病是癌症。在某些实施方式中, 所述疾病是心脏纤维化。

[0429] 在某些实施方式中, 癌症包括表达FAP的癌症相关细胞。在某些实施方式中, 表达FAP的癌症相关细胞是癌症相关成纤维细胞 (CAF)。在某些实施方式中, 表达FAP的癌症相关细胞是表达FAP的脂肪细胞。在某些实施方式中, 表达FAP的癌症相关细胞是肿瘤相关巨噬细胞 (TAM)。在某些实施方式中, 表达FAP的癌症相关细胞是肿瘤相关嗜中性粒细胞 (TAN)。在某些实施方式中, 表达FAP的癌症相关细胞是骨髓来源抑制细胞 (MDSC)。在某些实施方式中, 表达FAP的癌症相关细胞是癌症起始细胞。

[0430] 另一方面, 本发明提供了治疗对其需要的对象中的癌症的方法, 包括向对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体 (CAR) 的修饰的免疫细胞, 其中CAR包括: 重链可变区, 其包含与SEQ ID NO:7同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列; 和轻链可变区, 其包含与SEQ ID NO:9同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列; 其中癌症包含表达成纤维细胞激活蛋白 (FAP) 的癌症相关细胞。在某些实施方式中, CAR结合表达FAP的癌症相关细胞而不结合不表达FAP的细胞。

[0431] 另一方面, 本发明提供了治疗对其需要的对象中的癌症的方法, 其中癌症与表达成纤维细胞激活蛋白 (FAP) 的癌症相关成纤维细胞相关, 所述方法包括向对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体 (CAR) 的修饰的T细胞, 其中CAR包括: 重链可变区, 其包含与SEQ ID NO:7同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列; 和轻链可变区, 其包含与SEQ ID NO:9同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0432] 另一方面, 本发明提供了治疗对其需要的对象中的癌症的方法, 其中癌症与表达成纤维细胞激活蛋白 (FAP) 的癌症相关巨噬细胞相关, 所述方法包括向对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体 (CAR) 的修饰的T细胞, 其中CAR包括: 重链可变区, 其包含与SEQ ID NO:7同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列; 和轻链可变区, 其包含与SEQ ID NO:9同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0433] 另一方面, 本发明提供了治疗对其需要的对象中的癌症的方法, 其中癌症与表达

成纤维细胞激活蛋白 (FAP) 的癌症相关嗜中性粒细胞相关,所述方法包括向对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体 (CAR) 的修饰的T细胞,其中CAR包括:重链可变区,其包含与SEQ ID NO:7同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;和轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:9同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0434] 另一方面,本发明提供了治疗对其需要的对象中的癌症的方法,其中癌症与表达成纤维细胞激活蛋白 (FAP) 的癌症相关成纤维细胞相关,所述方法包括向对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体 (CAR) 的修饰的T细胞,其中CAR包含与SEQ ID NO:23或25同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0435] 另一方面,本发明提供了治疗对其需要的对象中的癌症的方法,其中癌症与表达成纤维细胞激活蛋白 (FAP) 的癌症相关巨噬细胞相关,所述方法包括向对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体 (CAR) 的修饰的T细胞,其中CAR包含与SEQ ID NO:23或25同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0436] 另一方面,本发明提供了治疗对其需要的对象中的癌症的方法,其中癌症与表达成纤维细胞激活蛋白 (FAP) 的癌症相关嗜中性粒细胞相关,所述方法包括向对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体 (CAR) 的修饰的T细胞,其中CAR包含与SEQ ID NO:23或25同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0437] 另一方面,本发明提供了治疗对其需要的对象中的实体肿瘤的方法,其中肿瘤与表达成纤维细胞激活蛋白 (FAP) 的癌症相关成纤维细胞相关,所述方法包括向对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体 (CAR) 的修饰的T细胞,其中CAR包括:重链可变区,其包含与SEQ ID NO:7同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;和轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:9同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0438] 另一方面,本发明提供了治疗对其需要的对象中的实体肿瘤的方法,其中肿瘤与表达成纤维细胞激活蛋白 (FAP) 的癌症相关巨噬细胞相关,所述方法包括向对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体 (CAR) 的修饰的T细胞,其中CAR包括:重链可变区,其包含与SEQ ID NO:7同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;和轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:9同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0439] 另一方面,本发明提供了治疗对其需要的对象中的实体肿瘤的方法,其中肿瘤与表达成纤维细胞激活蛋白 (FAP) 的癌症相关嗜中性粒细胞相关,所述方法包括向对象施用有效量的包含能够结合FAP的嵌合抗原受体 (CAR) 的修饰的T细胞,其中CAR包括:重链可变区,其包含与SEQ ID NO:7同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列;和轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:9同一性至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的氨基酸序列。

[0440] 在某些实施方式中,方法还包括施用免疫检查点抑制剂、肿瘤抗原疫苗、或赘生性细胞靶向疗法。

[0441] 在某些实施方式中,对象是人。在某些实施方式中,对象是非人动物。

[0442] 尽管已经参照其具体实施方式描述了本发明,但是本领域技术人员应该理解,在

不背离本发明的真实精神和范围的情况下,可以做出各种改变和等同物替换。对于本领域技术人员而言将显而易见的是,在不脱离本文所公开的实施方案的范围的情况下,可以使用合适的等同物对本文描述的方法进行其它合适的修改和改编。另外,可以做出许多修改以使特定情况、材料、物质组成、过程、一个或多个工艺步骤适应本发明的目的、精神和范围。所有这些修改都旨在落入所附权利要求的范围内。现在已经详细描述了某些实施方式,通过参考以下实例将会对其更清楚地了解,这些实施方式仅出于说明的目的被包括在内而不旨在限制。

[0443] 实验实施例

[0444] 通过参考以下实验实施例进一步详细描述本发明。提供这些实施例仅仅是为了说明的目的,而不旨在限制,除非另有说明。因此,本发明绝不应被解释为受限于以下实施例,而是应被解释为涵盖由于本文提供的教导而显而易见的任何和所有改动。

[0445] 无进一步描述时,认为本领域的普通技术人员能够利用前文描述和下文示例性实施例来制备和应用本发明的化合物以及实践请求保护的方法。因此,下文工作实施例具体地指出了本发明的优选实施方式,而不被解释为以任何方式限制本公开的其余部分。

[0446] 现对本文公开的实验的执行中所使用的材料和方法进行描述。

[0447] 犬FAP基因序列的生物信息学推断:使用犬FAP的NCBI预测序列(XM_005640252.2)设计PCR引物。得到的PCR产物在蛋白质水平上与预测序列100%匹配。在核苷酸水平上T127和A603有两个保守的碱基对置换。

[0448] 犬FAP cDNA PCR、亚克隆和表达:用1ml TRIzol (Life Technologies,#15596-026)处理汇合的10cm培养皿的表达内源FAP的犬SK骨肉瘤细胞,并按照制造商方案提取总RNA。使用SuperScript First Strand合成试剂盒(Life Technologies,#11904-018)从5 μ g总RNA中逆转录cDNA。此cDNA充当降落PCR的模板,使用以下引物:正向5' ATGTAGACGTGGTTAAAAATTG (SEQ ID NO:54);反向5' CGTCATCTTCAGTCGGACAA (SEQ ID NO:55)。在1%琼脂糖凝胶上检测到2291bp的扩增子。

[0449] 将得到的PCR产物纯化并克隆到pGEM-T Easy (Promega)中并测序。此穿梭载体是线性化的并且包含单一“T”突出端。这允许利用通过Taq聚合酶添加到PCR产物中的3'“A”突出端对PCR产物进行简单的非定向克隆。在此基础上,使用EcoRI克隆位点将cDNA非定向地克隆到质粒pcDNA3.1中。

[0450] 使用SpeI切除cDNA并使用XbaI打开pLenti6/v5-D-TOPO,将犬FAP cDNA从pcDNA3.1亚克隆到慢病毒质粒(pLenti6/v5-D-TOPO)中。这些限制位点具有兼容的末端。这样产生了犬FAP.pLenti6/v5-D-TOPO。

[0451] 将犬FAP.pLenti6/v5-D-TOPO与包装质粒(pMD2.G,pCMV Δ R8.2)共转染到HEK 293细胞中。48小时后收获含有病毒的上清液。通过p24 ELISA测定病毒滴度,并以0.5:1至10:1的不同MOI's转导Balb/C 3T3成纤维细胞。

[0452] 利用流式细胞术确认Balb/C 3T3.犬FAP中转基因的表达。使用的一抗是来自R&Dsystems的生物素化绵羊抗huFAP多克隆抗体(5 μ g/ml)。二抗是来自Biolegend的APC-链霉亲和素(1 μ g/ml)。

[0453] 免疫和杂交瘤生成:用表达全长犬FAP的BALB/c 3T3细胞免疫14周龄的BALB/c.FAP^{-/-}小鼠。所有注射均在腹膜内给予并且由0.5mL无菌PBS中的1x10⁷个细胞构成。初始

免疫后在第14天和第28天加强;然后在第42天使动物流血,之后在第56天加强,在第63天流血,并在第70、217和238天再加强三次。2017年第241天收获脾脏,制备单细胞悬液,并通过UPENN杂交瘤Core Facility将脾细胞与sp2/0细胞融合。使用杂交瘤上清液作为一抗并用AF488山羊抗小鼠IgG作为二抗,最初通过FACS在MC KOSA亲本(FAP无效) vs. 表达犬FAP转基因的MC KOSA.K9FAP上筛选杂交瘤上清液。克隆4G5被鉴定为对所转导的细胞而非亲本细胞有反应,并在其它细胞上进行筛选以确认与表达FAP的细胞而非FAP阴性细胞的反应性:人原代成纤维细胞、表达鼠或人FAP转基因的BALB/c 3T3、犬原代成纤维细胞、SK KOSA(表达FAP)、和BALB/c 3T3(FAP阴性)细胞。然后使用Thermo Fisher Rapid ELISA小鼠mAb分型试剂盒#37503确定4G5为IgG1k同种型抗体。

[0454] 4G5嵌合抗原受体的生成:将从4G5杂交瘤细胞系中分离的总RNA逆转录成cDNA,并使用小鼠可变链引物文库进行PCR扩增以鉴定杂交瘤序列。5' RACE被用作获得独特单克隆4G5抗体序列的替代方法。对扩增的条带进行Topo克隆并确定序列。重复这些程序以确认分离序列的完整性。合成所有分离的和序列验证的可变链ORF并用于重链和轻链组合以获得所期望的CAR形式的scFV。

[0455] 高滴度慢病毒载体产生:在RPMI 1640、10%非热灭活FBS、2mM谷氨酰胺、10mM HEPE、100IU/mL青霉素和100 μ g/ml链霉素中培养的293T人胚肾细胞中将各质粒包装到慢病毒中。以每个T 175组织培养瓶 12×10^6 个来接种细胞,24小时后用7 μ g的pCIVSVg、18 μ g的pRSV-Rev、18 μ g的pGAG/POL和15 μ g的感兴趣的质粒(4G5 CAR)进行转染。在转染后24和48小时收集含有病毒的上清液,并通过在4 $^{\circ}$ C下以15,000g离心过夜将病毒浓缩300倍并冷冻保存直至使用。通过在不同的病毒稀释度下转导Sup-T1细胞(在RPMI+10%FBS+P/S中培养)来评估病毒滴度,并在转染后48小时,使用F(ab')₂片段抗体对细胞进行染色以通过流式细胞术检测细胞表面上的CAR构建物。

[0456] T细胞转导:白细胞提取法后,通过阴性选择从健康志愿者供体分离原代人CD4⁺和CD8⁺T细胞。在不添加外源IL-2的情况下,用磁珠培养1:1的比的原代CD4⁺和CD8⁺T细胞,磁珠以1:3的T细胞与珠的比涂覆有抗CD3/抗CD28。大约24小时后,用MOI大约5的慢病毒载体转导T细胞。使用Multisizer 3Coulter计数器监测细胞计数和细胞大小12-15天。根据需要完全的培养细胞直到休止期,然后用于杀伤测定或被冷冻保存。

[0457] 体外杀伤测定:在加入CAR T细胞前24小时,以3,000-10,000个细胞/孔接种靶细胞,三次重复。考虑到活的CAR阳性T细胞,以不同的效应物与靶标的比将CAR T细胞添加到培养物中,CAR阳性T细胞是用蓝色活/死和F(ab')₂片段抗体染色,通过流式细胞术分析确定的。共培养持续24小时,收集上清液并通过ELISA分析IFN- γ 和颗粒酶B的产生,并测定每孔的活细胞百分比。对于表达萤光素酶的靶细胞,首先将孔洗好。裂解剩余的细胞并通过在GloMax Multi检测系统上使用萤光素酶测定系统来测定萤光素酶活性。对于未标记的细胞,将MTS试剂加入孔中1-4小时。洗涤孔并在490nm下读取吸光度。CAR T细胞介导的细胞毒性被测定为在没有T细胞的情况下靶细胞的信号百分比。

[0458] 体内研究:将人腺癌A549细胞注射到NSG小鼠中。14天后,当肿瘤大小为约150mm³时,收获一些肿瘤,解离成单细胞悬液,并通过流式细胞仪测定FAP在肿瘤相关成纤维细胞上的表达。首先对细胞关于CD45阴性细胞进行门控,然后关于CD90⁺/FAP⁺细胞进行门控。此时,约2000万个总T细胞被IV注射到剩余的携带肿瘤的小鼠中。注射前对CAR T细胞的分析

显示转导效率约为50%。组包括：1) 仅用PBS注射，2) 用2000万个未转导的激活T细胞注射，3) 用1000万个73.3CAR T细胞注射，3) 用1000万个HGL2 CART注射，和4) 用1000万个L2HG CART注射。然后在接下来的12天内跟进肿瘤生长。

[0459] 实施例1：用于设计PCR引物的犬FAP基因序列的生物信息学推断

[0460] 通过PCR扩增犬FAP基因并将该序列与犬FAP的序列进行比较。使用犬FAP的NCBI预测序列(XM_005640252.2)设计犬FAP特异性PCR引物。得到的PCR产物在蛋白质水平上与犬FAP的序列100%匹配(图1)。随后的测序显示犬FAP在核苷酸水平上于T127和A603处具有两个保守的碱基对置换。

[0461] 实施例2：犬FAP cDNA PCR、亚克隆、测序和表达

[0462] 作为生成抗犬FAP抗体的第一步，创建了能够生成重组犬FAP蛋白的构建物。为了提供犬FAP cDNA，对表达内源FAP的犬SK骨肉瘤细胞进行基于TRIzol的RNA提取，然后将分离的RNA逆转录为cDNA。此cDNA用作降落PCR的模板，其产生2291bp的扩增子。将扩增的PCR产物纯化并克隆到穿梭载体中，这允许对PCR产物进行简单的非定向克隆。在此基础上，将cDNA克隆到真核表达质粒中。将犬FAP cDNA亚克隆到慢病毒质粒中以允许转导入哺乳动物细胞系中。将得到的犬FAP-慢病毒构建物与包装质粒共转染到HEK 293细胞中。48小时后收获含有病毒的上清液。通过p24 ELISA测定病毒滴度，并以0.5:1至10:1的不同MOI转导BALB/c来源的3T3成纤维细胞。利用流式细胞术确认3T3-犬FAP细胞中转基因的表达(图2)。

[0463] 实施例3：克隆4G5抗FAP抗体的产生

[0464] 用经转导以表达全长犬FAP的BALB/c 3T3成纤维细胞免疫14周龄的BALB/c.FAP^{-/-}小鼠。所有注射均在腹膜内给予并且由0.5mL无菌PBS中的 1×10^7 个细胞构成。初始免疫之后是在接下来的八个月内以定期间隔进行六次加强免疫。在研究结束时，收集脾脏，并将所得的单细胞悬液用于通过与sp2/0细胞融合生成杂交瘤。筛选所得的杂交瘤中产生抗犬FAP抗体的杂交瘤。作为初始筛选，通过流式细胞术鉴定能够使表达犬FAP转基因的MC KOSA细胞染色但不能使FAP无效MC KOSA亲本细胞染色而产生免疫球蛋白的细胞(图3)。结果，4G5克隆被鉴定为潜在的候选者。后续研究进一步表明，该克隆产生的免疫球蛋白能够使表达FAP的人原代成纤维细胞、表达鼠或人FAP转基因的BALB/c 3T3细胞、犬原代成纤维细胞、和表达FAP的SK KOSA细胞染色。类似地，4G5免疫球蛋白不能使FAP阴性亲本BALB/c 3T3细胞染色，进一步表明了其特异性。最后，使用商业的基于ELISA的抗体分型试剂盒来表征由4G5产生的免疫球蛋白作为小鼠-IgG1- κ 同种型抗体。将4G5与小鼠IgG1同种型对照进行比较的后续蛋白质凝胶证实了此观察结果。

[0465] 实施例4：4G5嵌合抗原受体(CAR)的生成

[0466] 将从4G5杂交瘤细胞系中分离的总RNA逆转录成cDNA，并使用小鼠可变链引物文库进行PCR扩增以鉴定杂交瘤序列。5' RACE被用作获得独特单克隆4G5抗体序列的替代方法。对扩增的条带进行Topo克隆并确定序列。重复这些程序以确认分离序列的完整性。合成所有分离的和序列验证的可变链ORF并用于重链和轻链组合以获得所期望的CAR形式的scFV。

[0467] 将免疫球蛋白重链和轻链插入到包含2个串联信号传导结构域4-1BB和CD3 ζ 的一组质粒盒中。选择FAP-CD3 ζ :4-1BB“双激活结构域”构建物vs.“三激活结构域”构建物(也包括CD28激活结构域)的原因如下：1) 双构建物更适合多功能细胞因子的产生；2) 双构建物和三构建物在体外和体内有相似的功效；3) 含有CD28结构域的CAR存在一些安全问题；4) 与双

结构域mRNA相比,T细胞中三结构域mRNA的持久性显著降低。制备了先是重链之后是轻链(HL)的构建物(图4)(SEQ ID NO:23)和先是轻链之后是重链(LH)的构建物(图5)(SEQ ID NO:25)。

[0468] 实施例5:4G5 CAR T细胞对表达FAP的靶细胞表现出特异性IFN- γ 和细胞毒性

[0469] 为了证明FAP靶向CAR细胞在体外的功能,基于4G5的CAR表达T细胞被用于与表达鼠FAP的3T3细胞和表达犬FAP的犬MC-KOSA细胞的体外共培养测定。为了验证FAP表达,小鼠3T3细胞用鼠抗FAP抗体73.3染色(图6A)。抗人FAP抗体F19和IgG同种型用作对照。在共培养测定中,所有4G5 CAR T细胞都能够识别和杀伤3T3^{muFAP}靶细胞。细胞毒性和IFN γ 的产生被用作读数(图6B-图6C)。使用犬MC-KOSA细胞作为靶标并使用IFN γ 产生作为识别和激活的度量进行随后的共培养测定(图6D)。总之,这些数据证明了基于4G5的CAR T细胞能够识别表达鼠和犬FAP的靶细胞。

[0470] 实施例6:4G5CAR T细胞展现出对高FAP表达细胞的强杀伤活性,但在与低FAP表达细胞共培养时未能激活

[0471] FAP通常由非肿瘤相关组织,包括骨髓干细胞、胰岛 α 细胞和间充质干细胞以低水平表达。将CAR细胞毒性集中在肿瘤相关成纤维细胞上而同时使对无关组织的附带损害最小的一种方法是选择无法针对表达低水平FAP的细胞激活的抗原结合结构域。为了评估4G5CAR的亲合力,在体外将在其表面上表达各种水平的huFAP的人细胞系与4G5 CAR T细胞共培养。然后通过IFN- γ 分泌和靶细胞的细胞毒性杀伤来评估CAR T细胞激活。表达源自可获得的充分表征的高亲合力抗FAP F19抗体的CAR的T细胞被用作阳性对照。

[0472] 没有CAR对不表达FAP的HT1080细胞有反应(图7A-图7B)。当HT1080细胞被转导以表达高水平的人FAP(图7C)时,表达F19和4G5 CAR的T细胞都能够识别和杀伤这些靶细胞,其中F19 CAR细胞展现出在较低效应物与靶标的比下更大的细胞毒性和IFN γ 产生(图7D-图7E)。为了观察对中等水平的FAP表达的认识,随后的研究使用了WI38细胞系(图8A)。F19 CAR T细胞容易识别并杀伤这些靶标,而4G5 CAR T细胞就IFN γ 分泌和细胞毒性这两方面的响应明显较弱(图8B-图8C)。有趣的是,4G5CAR的LH形式明显优于HL形式,后者仅在超过1.25:1的效应物与靶标的比时才产生显著降低水平的IFN γ 和可测量的细胞毒性。不希望受理论束缚,这些结果表明了HL vs LH scFv构建的明显的功能效应。最后,只有F19-CAR识别并杀伤表达甚至非常低水平的FAP的细胞(HOS细胞,图9A)。即使在高达20:1的效应物与靶标的比下,4G5 CAR T细胞也没有可测量的细胞毒性效应而仅产生可忽略不计水平的IFN γ ,而F19细胞具有明显更好的响应——采用两种读数(图9B-图9C)。

[0473] 当比较源自两种抗体的CAR时,发现4G5CAR更具特异性;与不表达FAP的细胞共培养时未观察到响应,而更重要的是,4G5CAR对表达低水平FAP的细胞(像HOS)具有最小或无细胞毒性。4G5 CAR的HG2L和L2HG变体两者产生的细胞毒性与靶细胞上的人FAP表达水平成正比,这对于F19 CAR T细胞则不然。

[0474] 实施例7:FAP CAR T细胞在动物模型中的效果

[0475] 将人腺癌系A549的异种移植肿瘤移植到NSG小鼠中。然后在生长14天后——此时肿瘤为约150mm³——评估肿瘤是否存在FAP+成纤维细胞。肿瘤组织的流式细胞术分析表明约8.5%的CD45阴性细胞是CD90+/FAP+成纤维细胞(图10)。此时,约2000个万总T细胞被IV注射。注射前对CAR T细胞的分析显示约50%的转导。组包括:1) 仅用PBS注射,2) 用2000万

个未转导的激活T细胞注射,3)用1000万个73.3CAR T细胞注射,3)用1000万个HGL2 CART注射,和4)用1000万个L2HG CART注射。然后在接下来的12天内跟进肿瘤生长。结果显示,与对照和73.3CAR表达细胞相比,LH和HL CAR均显著减小了肿瘤的大小(图11A)。同样,与媒介物和未转导的对照相比,用三种FAP CAR (73.3、4G5 HL和4G5 LH)中的每一种的治疗导致在17-18天后肿瘤重量显著降低(图11B)。这些结果一起表明CART靶向FAP减少肿瘤生长的能力,以及基于4G5的CAR优于基于73.3的抗FAP CAR构建物。

[0476] 实施例8:4G5FAP-CAR在NK-92细胞中具有体外功效

[0477] 除了在CD4+和CD8+T细胞中的表达外,还发现NK细胞中的CAR表达导致抗肿瘤细胞毒性。为了观察在NK细胞中表达基于4G5的FAP CAR的效果,将构建物转导入称为NK-92的NK细胞系中。在体外转导和扩大之后,然后将工程改造的NK-92细胞用于与从人肿瘤中分离的癌症相关成纤维细胞的体外共培养测定(图12)。结果显示,与未转导的NK92细胞相比,NK92-4G5FAP CAR细胞在所测定的每个效应物与靶标的比下都表现出显著的细胞毒活性。

[0478] 在第1天对携带已建立的人SSC15(头颈癌)肿瘤的免疫缺陷小鼠注射2000万个表达HL-4G5 CAR的NK92细胞(FAPCAR-NK92)细胞,并在第4、8、11和14天用1000万个细胞加强。在第18天处死小鼠并称量肿瘤。来自注射了FAPCAR-NK92细胞的小鼠的肿瘤明显小于未处理的肿瘤(图13)。这些结果表明,细胞毒性NK细胞群也将成为基于抗FAP CAR疗法的有效效应物。

[0479] 其它实施方式

[0480] 本文对变量的任何定义中的元素罗列记载包括该变量被定义为所列元素中的任何单个元素或组合(或子组合)。本文的实施方式的记载包括作为任何单个实施方式或与任何其它实施方式或其部分组合的实施方式。

[0481] 本文引用的每个专利、专利申请和出版物的公开内容其整体在此通过引用并入本文。虽然已经参考具体实施方式公开了本发明,但显然本领域技术人员可以在未偏离本发明的实际精神和范围的情况下想到本发明的其它实施方式5和变型。所附权利要求意图被解释为包括所有这样的实施方式和等同变型。

Ser Leu His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn Pro Ala Asn Gly Asp His Asn Phe Ser Glu Lys Phe
 50 55 60
 Glu Ile Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Ser Ser Ser Asn Thr Ala Phe
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Leu Asp Asp Ser Arg Phe His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 8

<211> 363

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 4G5 VH

<400> 8

caggccaac tgcagcagcc tggggctgaa ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagttg 60
 tcttgcaagg cgtctggcta caccatcacc agctactctc tgcactgggt gaagcagagg 120
 cctggacaag gccttgagtg gattggagag attaactctg ccaatgggtga tcataacttc 180
 agtgagaagt tcgagatcaa ggccacactg actgtagaca gctcctcaa cacagcattc 240
 atgcaactca gcaggctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtac aagattggac 300
 gatagtaggt tccactggta cttcgatgtc tggggcgcag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 4G5 VL

<400> 9

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Phe
 35 40 45

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Pro Ile
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 10

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 4G5 VL

<400> 10

caaattgttc tcaccagtc tccagcgtc atgtctgctt ctccagggga gaaggtcacc 60
 atgacctgca ctgccagtc aagtgttagt tacatgtact ggtaccagca gaagccacga 120
 tcctcccca aaccctggat tttctcacc tccaacctgg cttctggagt ccctgctcgc 180
 ttcagtggcc gtgggtctgg gacctcttc tctctcaaa tcagcagcat ggaggctgaa 240
 gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg agtggttacc cacccatcac attcggctcg 300
 gggacaaagt tggaaataaa a 321

<210> 11

<211> 243

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 4G5 scFv VLVH

<400> 11

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Phe
 35 40 45
 Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Pro Ile

	85		90		95
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser					
	100		105		110
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln					
	115		120		125
Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys					
	130		135		140
Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Thr Ser Tyr Ser Leu His Trp Val Lys					
145		150		155	160
Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Ala					
	165		170		175
Asn Gly Asp His Asn Phe Ser Glu Lys Phe Glu Ile Lys Ala Thr Leu					
	180		185		190
Thr Val Asp Ser Ser Ser Asn Thr Ala Phe Met Gln Leu Ser Arg Leu					
	195		200		205
Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Leu Asp Asp Ser					
	210		215		220
Arg Phe His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr					
225		230		235	240

Val Ser Ser

<210> 12

<211> 729

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 4G5 scFv VLVH

<400> 12

```

caaattgttc tcaccagtc tccagcgtc atgtctgctt ctccagggga gaaggtcacc 60
atgacctgca ctgccagtc aagtgttagt tacatgtact ggtaccagca gaagccacga 120
tcctcccca aaccctgat tttctcacc tccaacctgg cttctggagt cctgctcgc 180
ttcagtggcc gtgggtctgg gacctcttc tctctcaaa tcagcagcat ggaggctgaa 240
gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg agtggttacc cacccatcac attcggctcg 300
gggacaaaagt tggaaataaa aggtggaggt ggcagcggag gaggtgggtc cggcgggtgga 360
ggaagccagg tccaactgca gcagcctggg gctgaactgg taaagcctgg ggcttcagtg 420
aagttgtcct gcaaggcgtc tggetacacc atcaccagct actctctgca ctgggtgaag 480
cagaggcctg gacaaggcct tgagtggatt ggagagatta atcctgcca tggtgatcat 540
aacttcagtg agaagtcca gatcaaggcc aactgactg tagacagctc ctccaacaca 600
gcattcatgc aactcagcag gctgacatct gaggactctg cggcttatta ctgtacaaga 660
ttggacgata gtaggtcca ctggtacttc gatgtctggg ggcagggac cacggtcacc 720

```


<210> 14
 <211> 729
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 4G5 scFv VHVL
 <400> 14
 cagggtccaac tgcagcagcc tggggctgaa ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagttg 60
 tcctgcaagg cgtctggcta caccatcacc agctactctc tgcactgggt gaagcagagg 120
 cctggacaag gccttgagtg gattggagag attaactctg ccaatgggtga tcataacttc 180
 agtgagaagt tcgagatcaa ggccacactg actgtagaca gctctctcaa cacagcattc 240
 atgcaactca gcaggetgac atctgaggac tctgcggtct attactgtac aagattggac 300
 gatagtaggt tccactggta cttcgatgtc tggggcgcag ggaccacggt cacctctctc 360
 tcaggtaggag gtggcagcgg aggaggtggg tccggcgggt gaggaagcca aattgttctc 420
 acccagtctc cagcgtcat gtctgcttct ccaggggaga aggtcacat gacctgcact 480
 gccagctcaa gtgttagtta catgtactgg taccagcaga agccacgatc ctccccaaa 540
 ccctggattt ttctcacctc caacctggtc tctggagtcc ctgctcgctt cagtggccgt 600
 gggctctggga cctctttctc tctcacaatc agcagcatgg aggctgaaga tgctgccact 660
 tattactgcc agcagtggag tggttacca ccatcacat tcggctcggg gacaaagttg 720
 gaaataaaa 729

<210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 连接体
 <400> 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 16
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CD8 α 铰链
 <400> 16

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
 1 5 10 15
 Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly

20 25 30
 Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
 35 40 45
 <210> 17
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CD8跨膜结构域
 <400> 17
 Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr
 20
 <210> 18
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 41BB ICD
 <400> 18
 Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
 1 5 10 15
 Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
 20 25 30
 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu
 35 40
 <210> 19
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CD28 ICD
 <400> 19
 Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
 1 5 10 15
 Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
 20 25 30
 Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

35 40

<210> 20
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> DAP12 ICD
 <400> 20
 Glu Arg Trp Cys Ser Asn Lys Lys Asn Ala Ala Val Met Asp Gln Glu
 1 5 10 15
 Pro Ala Gly Asn Arg Thr Val Asn Ser Glu Asp Ser Asp Glu Gln Asp
 20 25 30
 His Gln Glu Val Ser Tyr Ala
 35

<210> 21
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CD3ζICD
 <400> 21
 Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
 1 5 10 15
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 20 25 30
 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 35 40 45
 Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 50 55 60
 Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 65 70 75 80
 Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 85 90 95
 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 100 105 110

<210> 22
 <211> 1476
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> 4G5HG2LCD8HBBCD3Z CAR

<400> 22

```

atggccctgc ctgtgacagc cctgctgctg cctctggctc tgctgctgca tgccgctaga 60
cccggatccc aggtccaact gcagcagcct ggggctgaac tggtaaagcc tggggcttca 120
gtgaagttgt cctgcaaggc gtctggctac accatcacca gctactctct gcaactgggtg 180
aagcagaggc ctggacaagg ccttgagtgg attggagaga ttaatcctgc caatgggtgat 240
cataacttca gtgagaagtt cgagatcaag gccacactga ctgtagacag ctctccaac 300
acagcattca tgcaactcag caggctgaca tctgaggact ctgcggtcta ttactgtaca 360
agattggacg atagtagggt ccaactggtagc ttcgatgtct ggggcgcagg gaccacgggtc 420
accgtctcct cagggtggagg tggcagcggg ggaggtgggt cgggcgggtg aggaagccaa 480
attgtttctca cccagtctcc agcgtctcatg tctgcttctc caggggagaa ggtcaccatg 540
acctgcaactg ccagctcaag tgtagttac atgtactggt accagcagaa gccacgatcc 600
tccccaaac cctggatgtt tctcacctcc aacctggctt ctggagtccc tgctcgcttc 660
agtggccctg ggtctgggac ctctttctct ctcaaatca gcagcatgga ggctgaagat 720
gctgccactt attactgcca gcagtggagt ggttaccac ccatcacatt cggctcgggg 780
acaagttgg aaataaaatc cggaaccacg acgccagcgc cgcgaccacc aacaccggcg 840
cccaccatcg cgtcgcagcc cctgtccctg cgcccagagg cgtgccggcc agcggcgggg 900
ggcgcagtgc acacgagggg gctggacttc gcctgtgata tctacatctg ggcgcccttg 960
gccgggactt gtggggctct tctcctgtca ctggttatca ccctttactg caaacggggc 1020
agaaagaaac tcctgtatat attcaaaaa ccatttatga gaccagtaca aactactcaa 1080
gaggaagatg gctgtagctg ccgatttcca gaagaagaag aaggaggatg tgaactgaga 1140
gtgaagttca gcaggagcgc agacgcccc gcgtacaagc agggccagaa ccagctctat 1200
aacgagctca atctaggacg aagagaggag tacgatgttt tggacaagag acgtggccgg 1260
gaccctgaga tggggggaaa gccgagaagg aagaaccctc aggaaggcct gtacaatgaa 1320
ctgcagaaaag ataagatggc ggaggcctac agtgagattg ggatgaaagg cgagcggcgg 1380
aggggcaagg ggcacgatgg cctttaccag ggtctcagta cagccaccaa ggacacctac 1440
gacgcccttc acatgcaggc cctgccccct cgctaa 1476

```

<210> 23

<211> 491

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 4G5HG2LCD8HBBCD3Z CAR

<400> 23

```

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1           5           10          15
His Ala Ala Arg Pro Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala
           20           25           30

```

Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser
 35 40 45
 Gly Tyr Thr Ile Thr Ser Tyr Ser Leu His Trp Val Lys Gln Arg Pro
 50 55 60
 Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Ala Asn Gly Asp
 65 70 75 80
 His Asn Phe Ser Glu Lys Phe Glu Ile Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp
 85 90 95
 Ser Ser Ser Asn Thr Ala Phe Met Gln Leu Ser Arg Leu Thr Ser Glu
 100 105 110
 Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Leu Asp Asp Ser Arg Phe His
 115 120 125
 Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
 145 150 155 160
 Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu
 165 170 175
 Lys Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
 180 185 190
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Phe Leu
 195 200 205
 Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg Gly
 210 215 220
 Ser Gly Thr Ser Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp
 225 230 235 240
 Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Pro Ile Thr
 245 250 255
 Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser Gly Thr Thr Thr Pro
 260 265 270
 Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu
 275 280 285
 Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His
 290 295 300
 Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu
 305 310 315 320
 Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr
 325 330 335
 Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe

	340		345		350										
Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg
	355		360		365										
Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser
	370		375		380										
Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Lys	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr
385			390		395				400						
Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys
	405		410		415										
Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn
	420		425		430										
Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu
	435		440		445										
Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly
450			455		460										
His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr
465			470		475										480
Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg					
	485		490												

<210> 24

<211> 1476

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 4G5L2HGCD8HBBBCD3Z CAR

<400> 24

```

atggccctgc ctgtgacagc cctgctgctg cctctggctc tgctgctgca tgccgctaga 60
cccggatccc aaattgttct caccagctct ccagcgetca tgtctgcttc tccaggggag 120
aaggtcacca tgacctgac tgccagctca agtgtagtt acatgtactg gtaccagcag 180
aagccacgat cctcccccaa acctggatt tttctacct ccaacctggc ttctggagtc 240
cctgctcgct tcagtggcgg tgggtctggg accttttct ctctcacaat cagcagcatg 300
gaggctgaag atgctgccac ttattactgc cagcagtgga gtggttacc acccatcaca 360
ttcggctcgg ggacaaagtt ggaaataaaa ggtggaggtg gcagcggagg aggtgggtcc 420
ggcggtgagg gaagccaggt ccaactgcag cagcctgggg ctgaactggt aaagcctggg 480
gcttcagtga agttgtcctg caaggcgtct ggctacacca tcaccagcta ctctctgcac 540
tgggtgaagc agaggcctgg acaaggcctt gaggtgattg gagagattaa tcttgccaat 600
ggtgatcata acttcagtga gaagtctgag atcaaggcca cactgactgt agacagctcc 660
tccaacacag cattcatgca actcagcagg ctgacatctg aggactctgc ggtctattac 720
tgtacaagat tggacgatag taggttccac tggtacttcg atgtctgggg cgcagggacc 780

```

acggtcaccg tctcctcatc cggaaccacg acgccagegc cgcgaccacc aacaccggcg 840
cccaccatcg cgtcgcagcc cctgtccctg cgcccagagg cgtgccggcc agcggcgggg 900
ggcgcagtg acacgagggg gctggacttc gcctgtgata tctacatctg ggcgccttg 960
gccgggactt gtgggtcct tctcctgtca ctggttatca ccctttactg caaacggggc 1020
agaaagaaac tctgtatat attcaaaca ccatattatga gaccagtaca aactactcaa 1080
gaggaagatg gctgtagctg ccgatttcca gaagaagaag aaggaggatg tgaactgaga 1140
gtgaagttca gcaggagcgc agacgcccc gcgtacaagc agggccagaa ccagctctat 1200
aacgagctca atctaggacg aagagaggag tacgatgttt tggacaagag acgtggccgg 1260
gacctgaga tggggggaaa gccgagaagg aagaaccctc aggaaggcct gtacaatgaa 1320
ctgcagaaaag ataagatggc ggaggcctac agtgagattg ggatgaaagg cgagcgccgg 1380
aggggcaagg ggcaagatgg cctttaccag ggtctcagta cagccacca ggacacctac 1440
gacgcccttc acatgcagge cctgccccct cgctaa 1476

<210> 25

<211> 491

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 4G5L2HGCD8HBBCD3Z CAR

<400> 25

Met	Ala	Leu	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu
1				5					10					15	
His	Ala	Ala	Arg	Pro	Gly	Ser	Gln	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala
			20					25					30		
Leu	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Thr	Ala
			35					40					45		
Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Tyr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Arg	Ser
			50				55					60			
Ser	Pro	Lys	Pro	Trp	Ile	Phe	Leu	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val
65					70					75					80
Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Arg	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Phe	Ser	Leu	Thr
					85					90					95
Ile	Ser	Ser	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
					100					105				110	
Trp	Ser	Gly	Tyr	Pro	Pro	Ile	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu
									115					120	
Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
									130					135	
Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly
145										150					160

Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Thr Ser
165 170 175

Tyr Ser Leu His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
180 185 190

Ile Gly Glu Ile Asn Pro Ala Asn Gly Asp His Asn Phe Ser Glu Lys
195 200 205

Phe Glu Ile Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Ser Ser Ser Asn Thr Ala
210 215 220

Phe Met Gln Leu Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
225 230 235 240

Cys Thr Arg Leu Asp Asp Ser Arg Phe His Trp Tyr Phe Asp Val Trp
245 250 255

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ser Gly Thr Thr Thr Pro
260 265 270

Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu
275 280 285

Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His
290 295 300

Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu
305 310 315 320

Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr
325 330 335

Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe
340 345 350

Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg
355 360 365

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

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
385 390 395 400

Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
405 410 415

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
420 425 430

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

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

His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr

465	470	475	480
Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
	485	490	
<210> 26			
<211> 2283			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 全长犬FAP			
<400> 26			
atgaagacgt ggtaaaaaat tgtatttggga gttgccacct ctgctgtgct tgctttattg 60			
gtgatgtgca ttgtcttacg tccttcaaga gttcatgact ccgaaggagg tacaacaaga 120			
gcactcacac tggaggatat tttaaatggg acatttacct ataaaacatt ttttccaac 180			
tggatttcag gacaagaata tcttcatcag tctacagata atgatatagt atattacaat 240			
attgaaacag gagaatcata taccattttg agtaatgcca ccatgaaaag tgtgaatgct 300			
tcaaattatg gcttatcacc tgatcgtcaa tttgcatatc tagaaagtga ttattcaaag 360			
ctttggagat actcttacac tgcaacatat cacatctata acctcaataa tggagagttt 420			
ataagaagaa atgagcttcc tcgtccaatt cagtatttat gctggtcgcc tgttgggagt 480			
aaattagcat atgtctatca aaacaatata tatttgaaac aaagaccaga agaccacct 540			
tttcaaataa catataatgg aagagaaaat aaaatattca atggaatccc agactgggta 600			
tatgaagagg aaatgcttgc taaaaacat gctctctggt ggtctcctaa tggaaaattt 660			
ttggcatatg cagaatttaa tgatacagag ataccagtta ttgcctattc ctattatggt 720			
gatgaacaat atcctagaac aataaatatt ccataccbaa aggctggagc taagaacct 780			
gttgttcgga tctttattat cgataccact tatcctcagc agacaggtcc cagagaagtg 840			
ccagttccag caatgatagc atcaagtgat tattatttca gttggctcac atgggttact 900			
gatgaacgag tatgtttgca gtggctaaaa agaatccaga acgtttcagt tctgtccata 960			
tgtgatattca gggaaggctg gcagacatgg gattgtccaa aggcccagga acatatagaa 1020			
gaaagcagaa ctggatgggc tgggtggattc tttgtttcaa caccagtttt cagctatgat 1080			
gccatttcat actacaaaat atttagcgac aaggatggct acaaacatat tcaactatc 1140			
aaagacactg tggaaaatgc tattcaaatt acaagtggca agtgggaggc cataaatata 1200			
ttcagagtaa cacaggattc actgttttat tctagcaatg aatttgaaga ctaccagga 1260			
agaagaaata tctatagaat tagcattgga agctctctc caagcaaaaa gtgcattact 1320			
tgccatctaa ggaaagaaaag gtgccaatat tacacagcaa gtttcagtga ctacgccaaag 1380			
tactatgcac ttatctgcta tggcccagc cteccattt ccacccttca tgacggccac 1440			
actgatcaag aaattaaaaat cctggaagaa aacaaagaat tggaaaatgc tttgaaaaat 1500			
atccagctgc ctaaagagga aattaagaaa cttgaagtgg atgatattac tttatggtac 1560			
aagatgatgc ttctccccg gtttgacaga tcaaagaagt atcccttgct aattcaagtg 1620			
tatggtggtc cctgcagtca gagcgtaaaag tctgtattca gtattaattg gatttcttat 1680			
cttgcaagta aggaagggat agtcattgcc ttggtggatg gccgaggaac agcttaccba 1740			

<220>
<223> 连接体
<220>
<221> 重复
<222> (1) .. (5)
<223> 重复n次,其中n代表至少为1的整数
<400> 33
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5
<210> 34
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 连接体
<400> 34
Gly Gly Ser Gly
1
<210> 35
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 连接体
<400> 35
Gly Gly Ser Gly Gly
1 5
<210> 36
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 连接体
<400> 36
Gly Ser Gly Ser Gly
1 5
<210> 37
<211> 5
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 连接体
<400> 37
Gly Ser Gly Gly Gly
1 5
<210> 38
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 连接体
<400> 38
Gly Gly Gly Ser Gly
1 5
<210> 39
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 连接体
<400> 39
Gly Ser Ser Ser Gly
1 5
<210> 40
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 连接体
<400> 40
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5
<210> 41
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 连接体

<400> 41

ggtggcgggtg gctcgggcgg tggtaggtcg ggtggcggcg gatct 45

<210> 42

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 铰链

<400> 42

Asp Lys Thr His Thr

1 5

<210> 43

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 铰链

<400> 43

Cys Pro Pro Cys

1

<210> 44

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 铰链

<400> 44

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg

1 5 10 15

<210> 45

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 铰链

<400> 45

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr

1 5 10

<210> 46

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 铰链

<400> 46

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro

1 5 10

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 铰链

<400> 47

Lys Cys Cys Val Asp Cys Pro

1 5

<210> 48

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 铰链

<400> 48

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro

1 5

<210> 49

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 铰链

<400> 49

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

<210> 50

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 铰链

<400> 50

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 51

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 铰链

<400> 51

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys

1 5 10 15

Pro

<210> 52

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 铰链

<400> 52

Ser Pro Asn Met Val Pro His Ala His His Ala Gln

1 5 10

<210> 53

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 铰链

<400> 53

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr Tyr Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

<210> 54

<211> 22

<212> DNA

<213> 引物

<400> 54

atgtagacgt ggttaaaaat tg 22

<210> 55

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 55

cgtcaccttc agtcggacaa 20

范围 1:1 至 760 图

分数	比特(4102)	E值法	组成矩阵调节	一致性	相似性	缺失或插入
1584	0.0		760/760(100%)	760/760(100%)	0/760(0%)	
查询	1	MKTMLKIVFGVATSAVLALLVWCIVLRPSRVHDSGGTTRALTLIEDILNGTFTYKTFPPN	60			
对象	1	MKTMLKIVFGVATSAVLALLVWCIVLRPSRVHDSGGTTRALTLIEDILNGTFTYKTFPPN	60			
查询	61	WISGQEYLHQSTNDIIVYNIETGESYTIISNATHKSVKASNYGLSPDRQFAYLESQYSK	120			
对象	61	WISGQEYLHQSTNDIIVYNIETGESYTIISNATHKSVKASNYGLSPDRQFAYLESQYSK	120			
查询	121	LWRYSYATYHYLNLNGEFIRRHLPRIQYLCMSPVGSKLAVYVQMIYKQRPEDPP	180			
对象	121	LWRYSYATYHYLNLNGEFIRRHLPRIQYLCMSPVGSKLAVYVQMIYKQRPEDPP	180			
查询	181	FQITYNGRENKIFINGIPDMVYEEEMLATKHALMSPNGKFLAYAEFNDTEIPVIAYSYYG	240			
对象	181	FQITYNGRENKIFINGIPDMVYEEEMLATKHALMSPNGKFLAYAEFNDTEIPVIAYSYYG	240			
查询	241	DEQYPRITINIPYKAGAKNPVRFIFIDITYPQQTGPREVPVPAVIASSDYVFSKLTWNT	300			
对象	241	DEQYPRITINIPYKAGAKNPVRFIFIDITYPQQTGPREVPVPAVIASSDYVFSKLTWNT	300			
查询	301	DERVCLQMLKRIQNVSVLSICDFREGMQTWDCPKAQEHEESRTGKAGGFVSTPVPVFSYD	360			
对象	301	DERVCLQMLKRIQNVSVLSICDFREGMQTWDCPKAQEHEESRTGKAGGFVSTPVPVFSYD	360			
查询	361	AISYYKIFSDXGDKYKHITVDVENAIQITSGKWEAIIHFRVTQDLSFYSSNHEFEDYPG	420			
对象	361	AISYYKIFSDXGDKYKHITVDVENAIQITSGKWEAIIHFRVTQDLSFYSSNHEFEDYPG	420			
查询	421	RRNIYRISIGSSPPSKKCIICHLRERCOYVYASFDYAKYVYALICYGPGLPISITLHOGH	480			
对象	421	RRNIYRISIGSSPPSKKCIICHLRERCOYVYASFDYAKYVYALICYGPGLPISITLHOGH	480			
查询	481	TDQEKILEENKLENAKNIQLPKEEIKKLEVDQITLWYKMWLPPRFDRSKKYPPLLIQV	540			
对象	481	TDQEKILEENKLENAKNIQLPKEEIKKLEVDQITLWYKMWLPPRFDRSKKYPPLLIQV	540			
查询	541	YGGPCSQSVKSVFSINMISYLASKEGIVIALVDRGTAYQGDKLLVAVYRKLGVYEVEDQ	600			
对象	541	YGGPCSQSVKSVFSINMISYLASKEGIVIALVDRGTAYQGDKLLVAVYRKLGVYEVEDQ	600			
查询	601	ITLVRKFIENGFIDEKRIAINGMVYGGVWSSLASGTLGLKCGIYAVPVSSNMEYYASIV	660			
对象	601	ITLVRKFIENGFIDEKRIAINGMVYGGVWSSLASGTLGLKCGIYAVPVSSNMEYYASIV	660			
查询	661	TERFNGLPTKIDNLEHYKNSTVMARAEYFRWVYLLIHGTADDWVHFQISAQIAKALVNA	720			
对象	661	TERFNGLPTKIDNLEHYKNSTVMARAEYFRWVYLLIHGTADDWVHFQISAQIAKALVNA	720			
查询	721	QVDFQANVYSDQNHGIPGLSSKHLVTRMTHFLKQCFSLSD	760			
对象	721	QVDFQANVYSDQNHGIPGLSSKHLVTRMTHFLKQCFSLSD	760			

T127

A603

图1

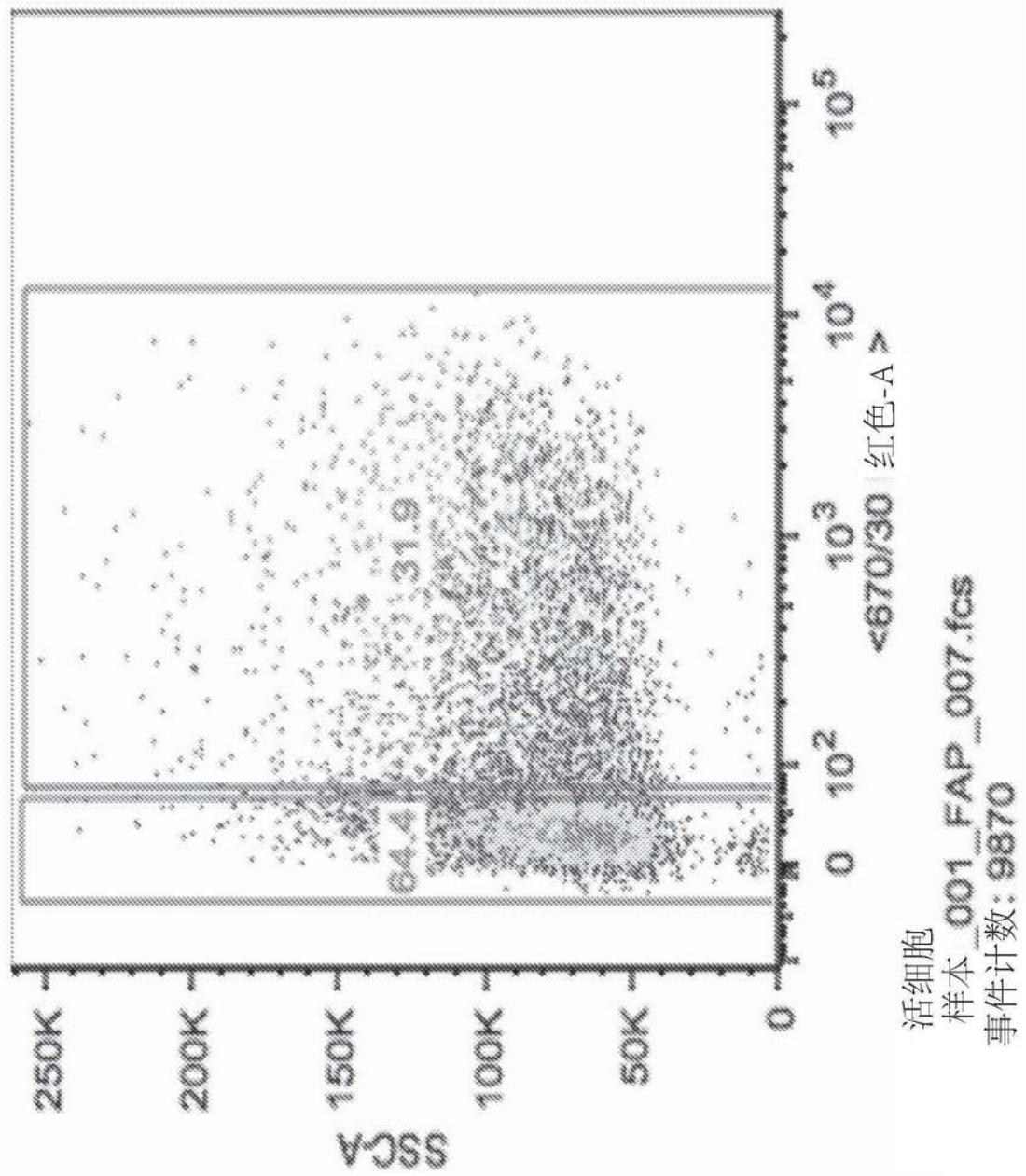


图2

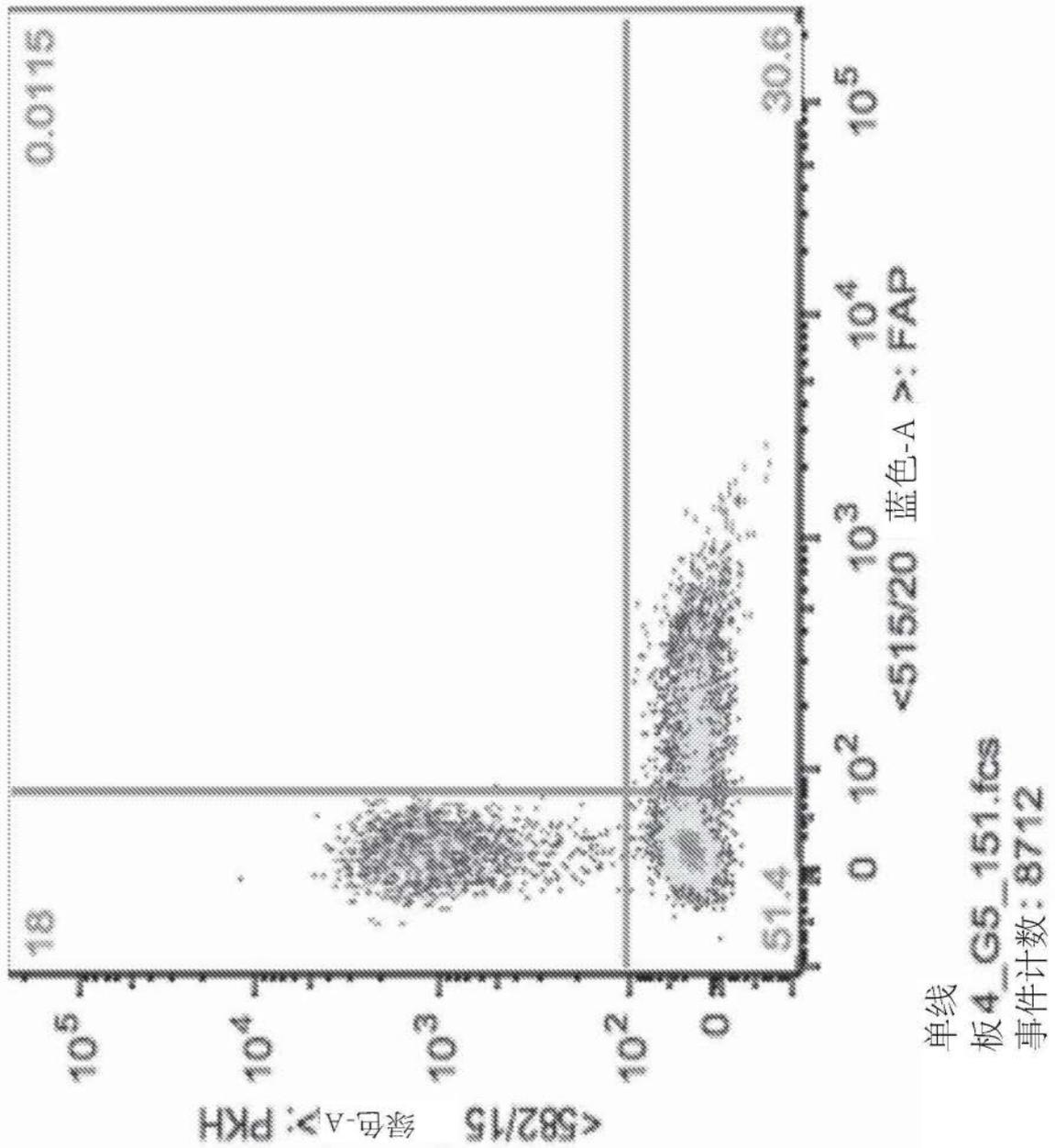


图3

犬 FAP(HG2L)-CD8H-BB-CD3Z CAR



图4B

犬 FAP(2LHG)-CD8H-BB-CD3Z CAR

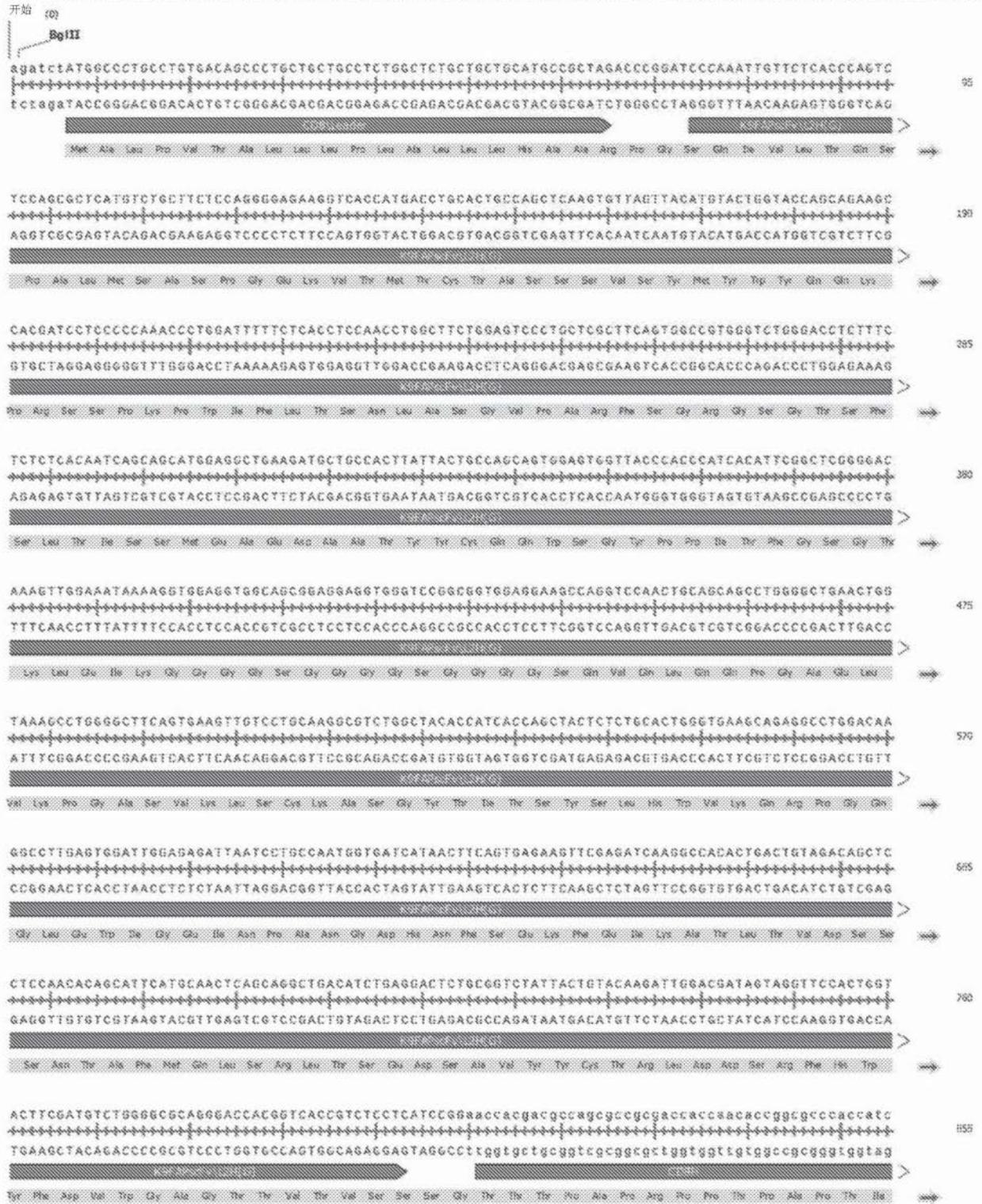


图5A

犬 FAP(2LHG)-CD8H-BB-CD3Z CAR

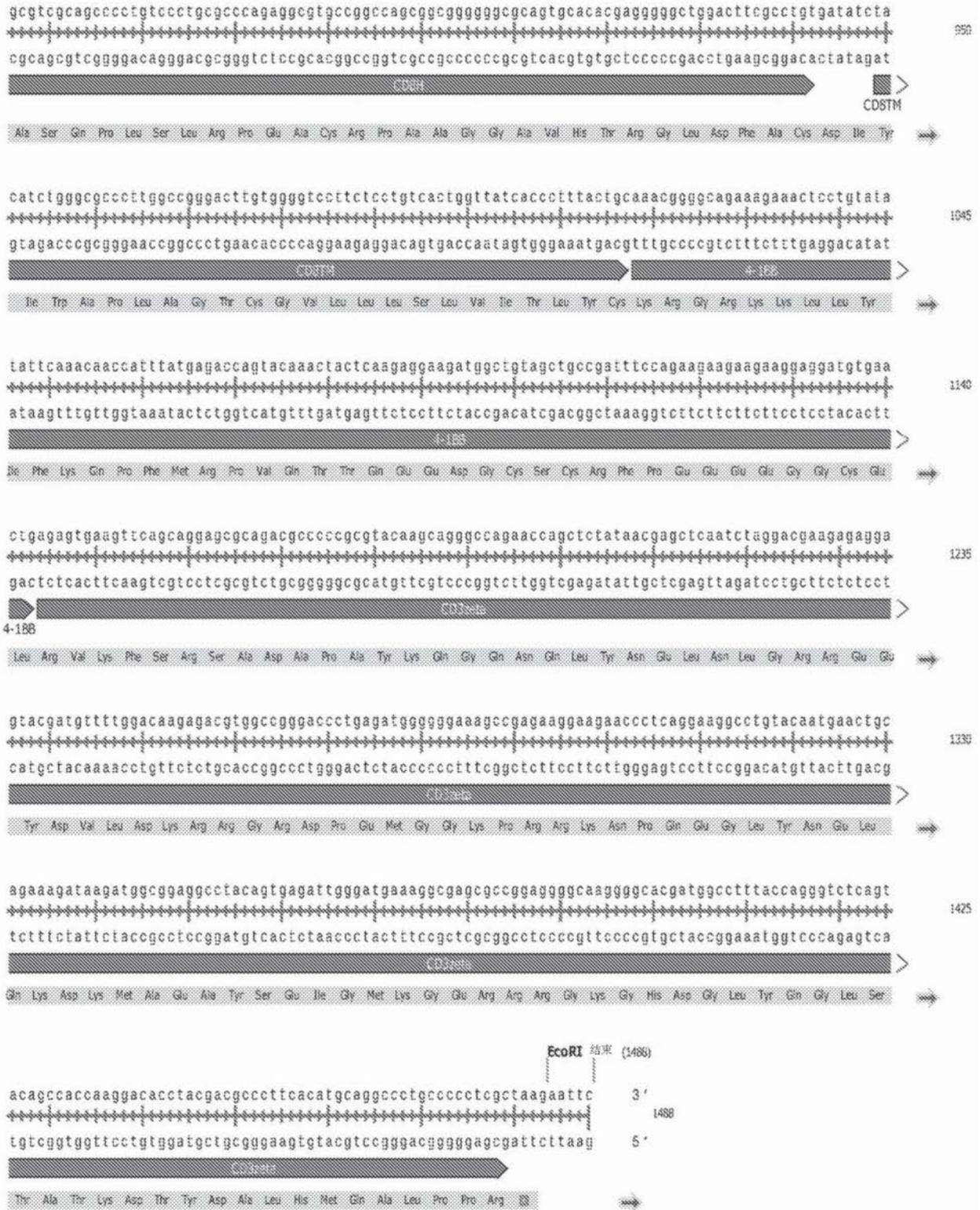


图5B

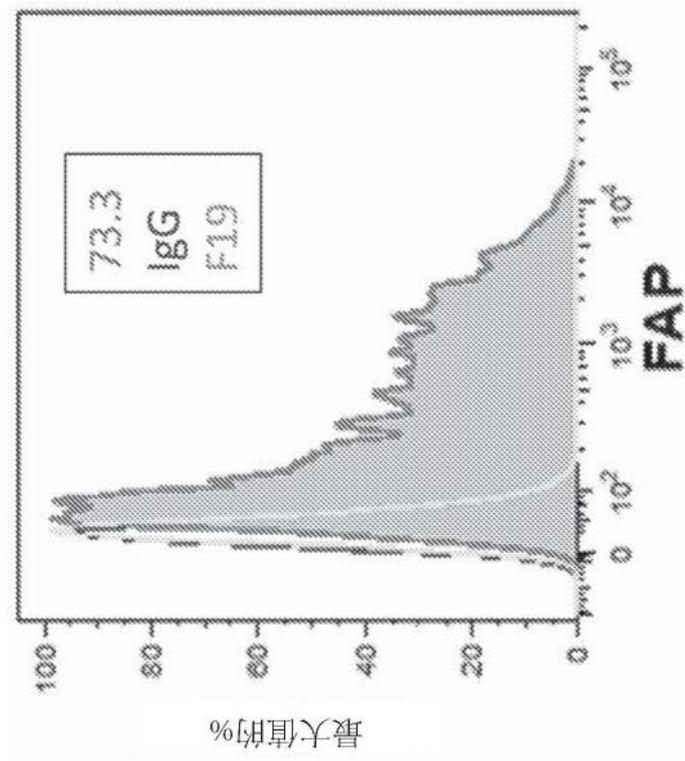


图6A

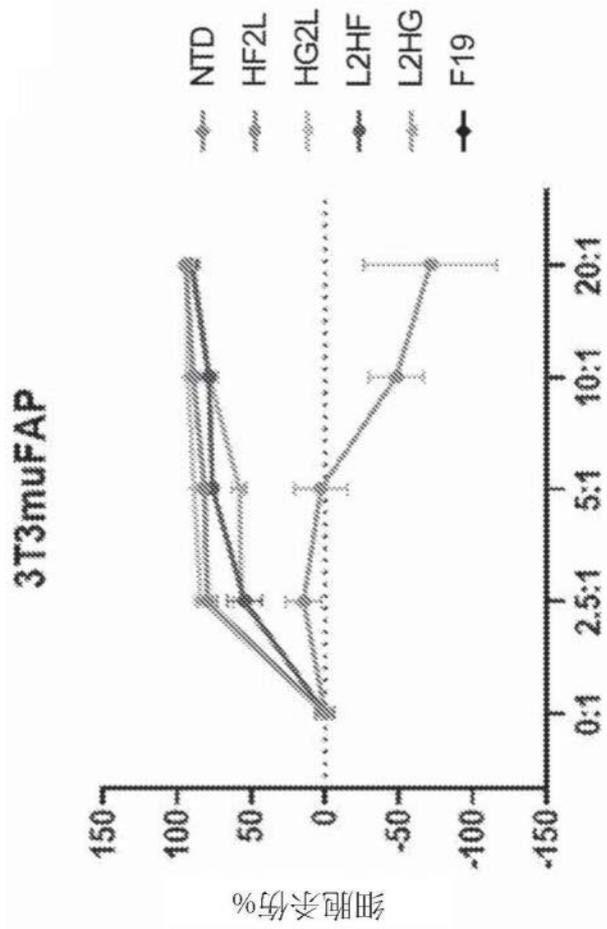


图6B

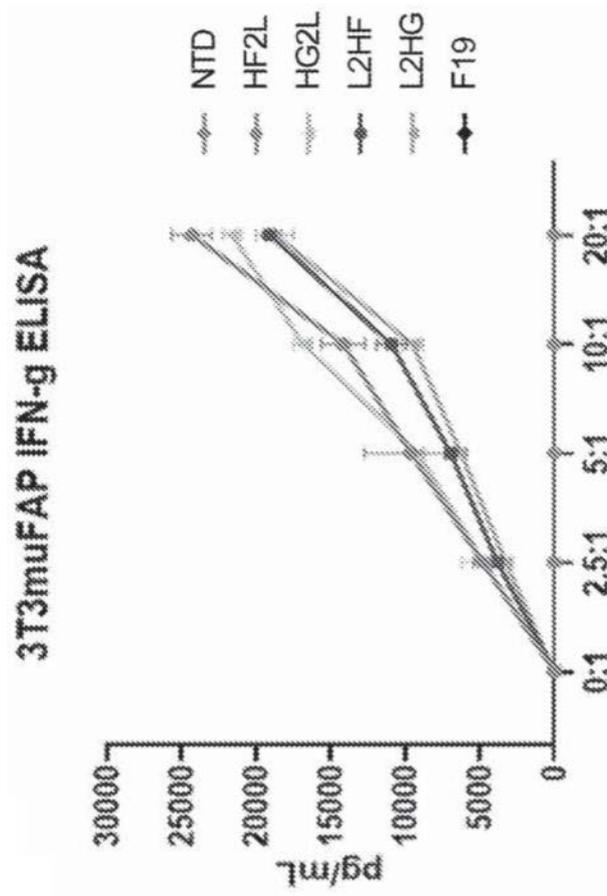


图6C

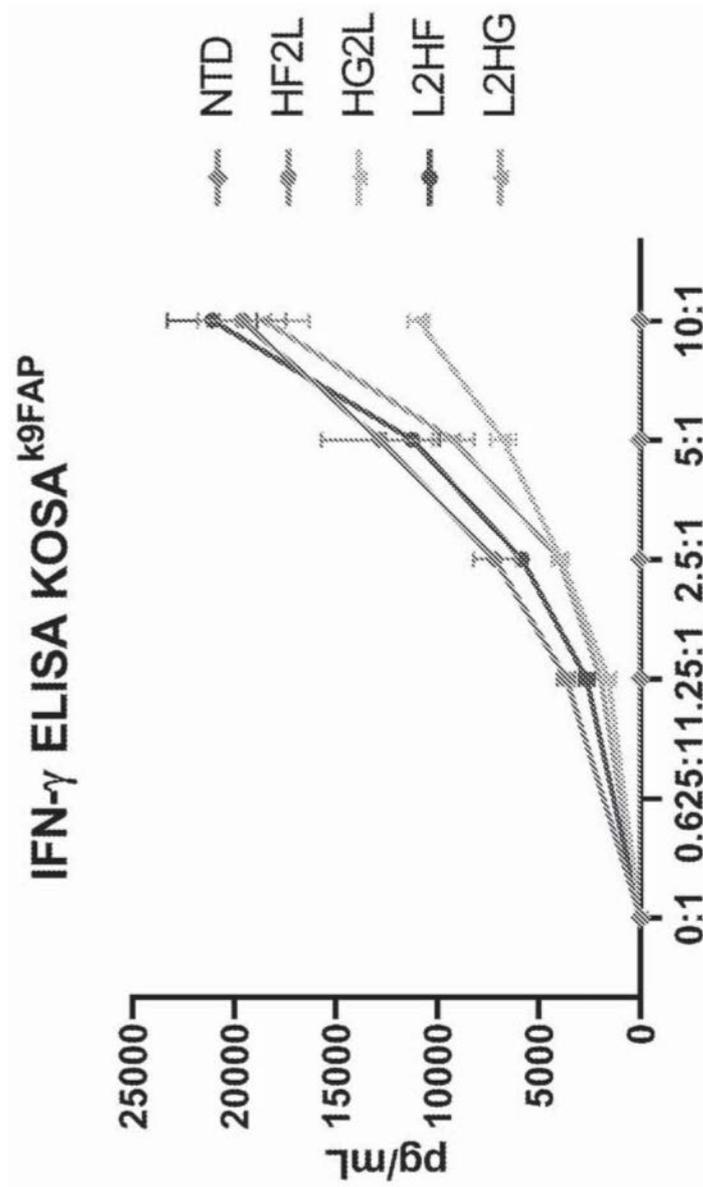


图6D

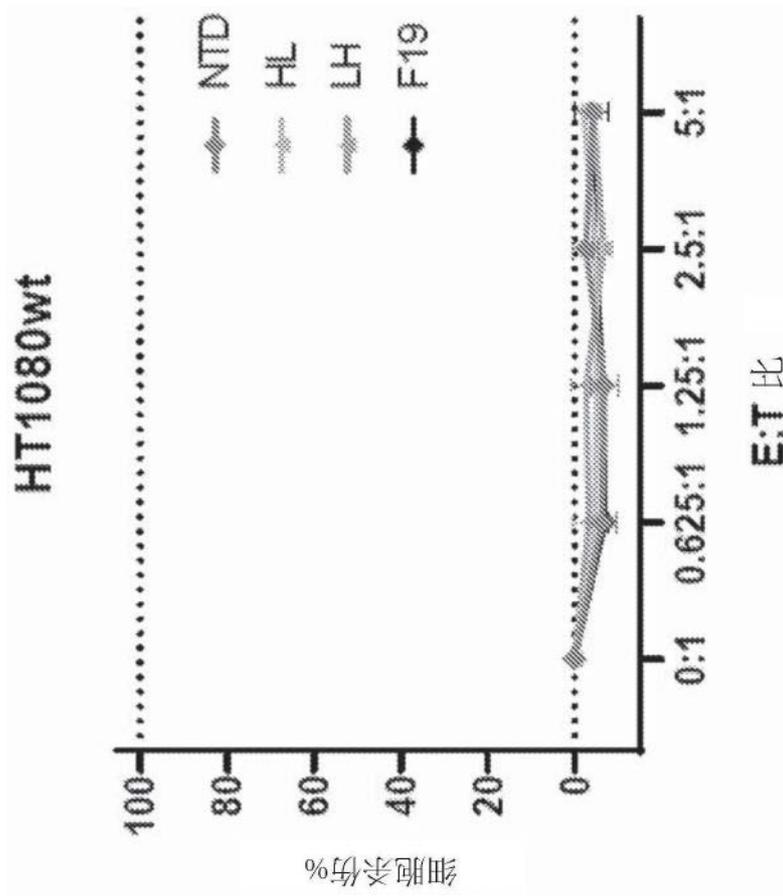


图7A

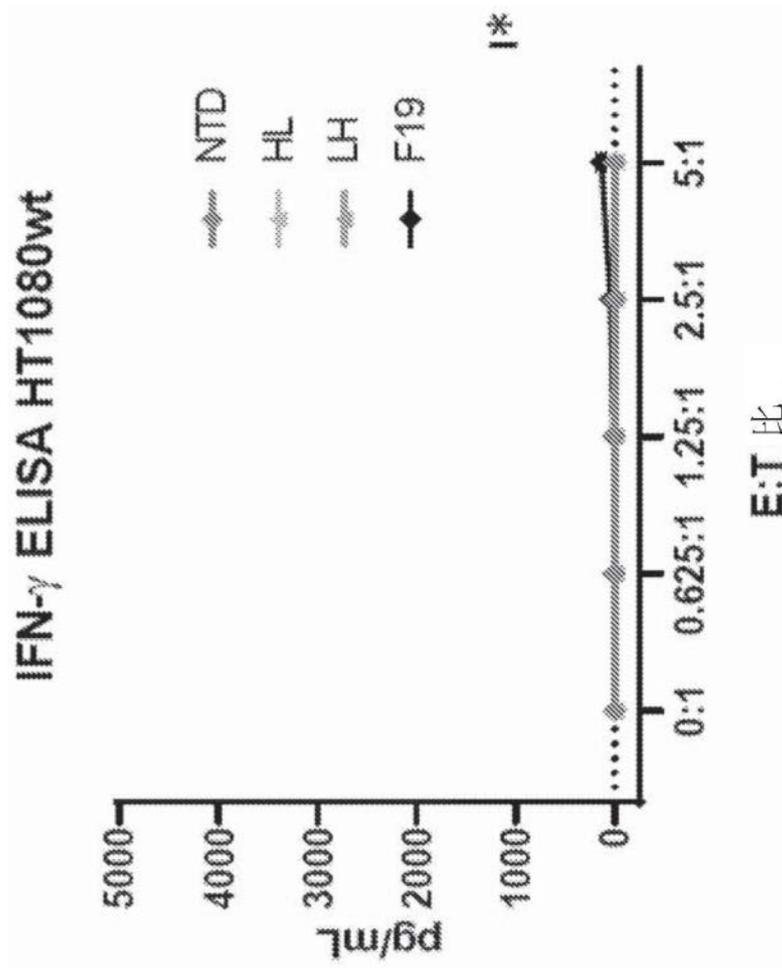


图7B

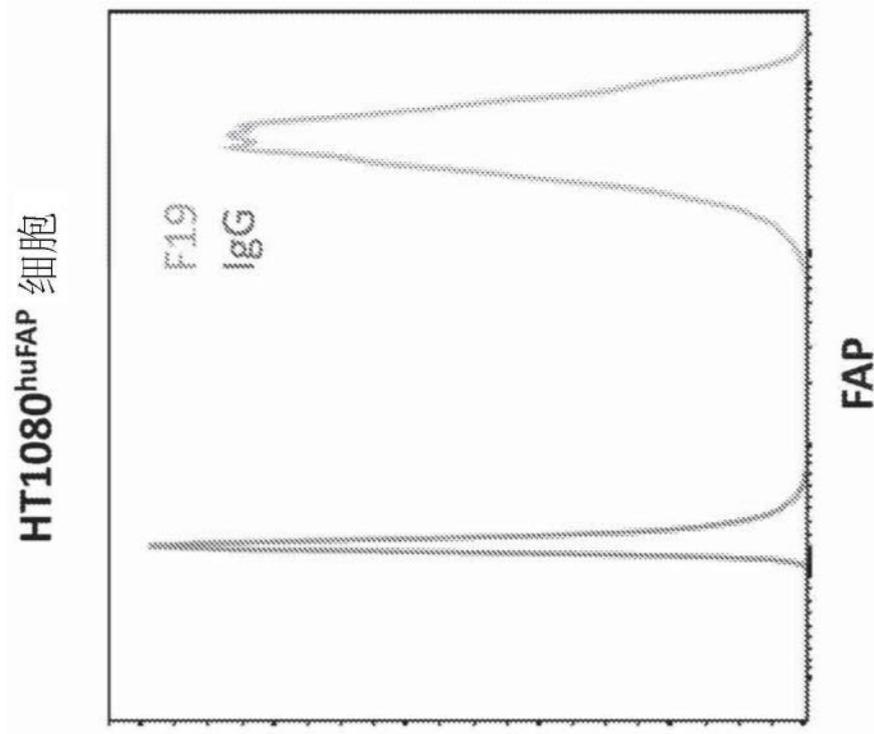


图7C

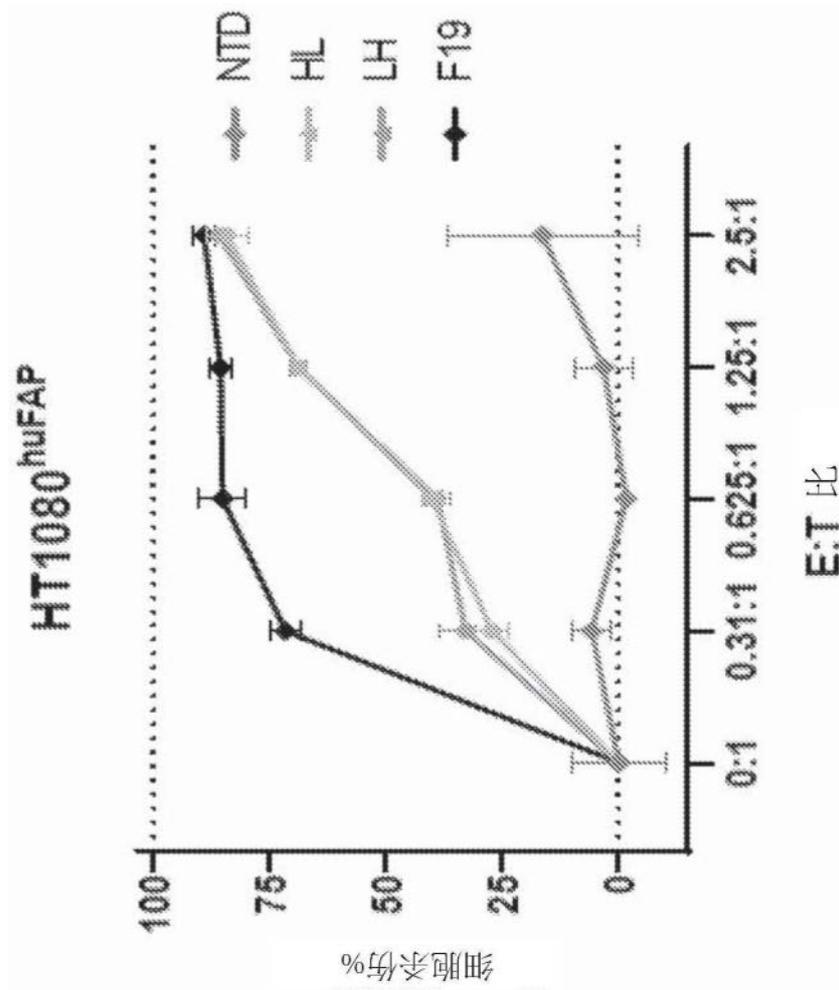


图7D

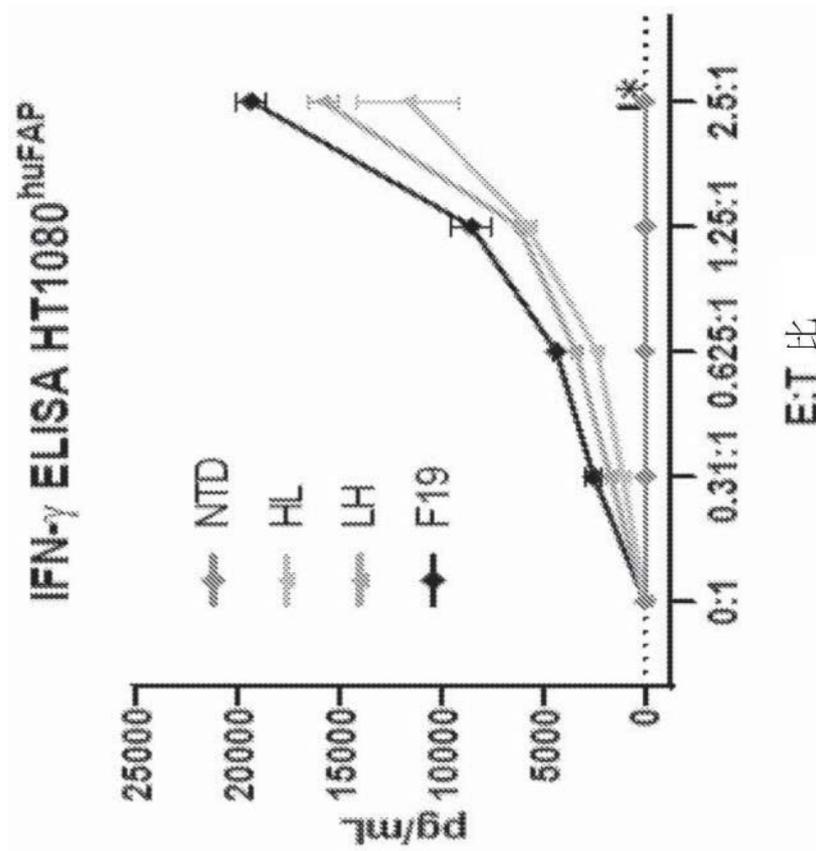


图7E

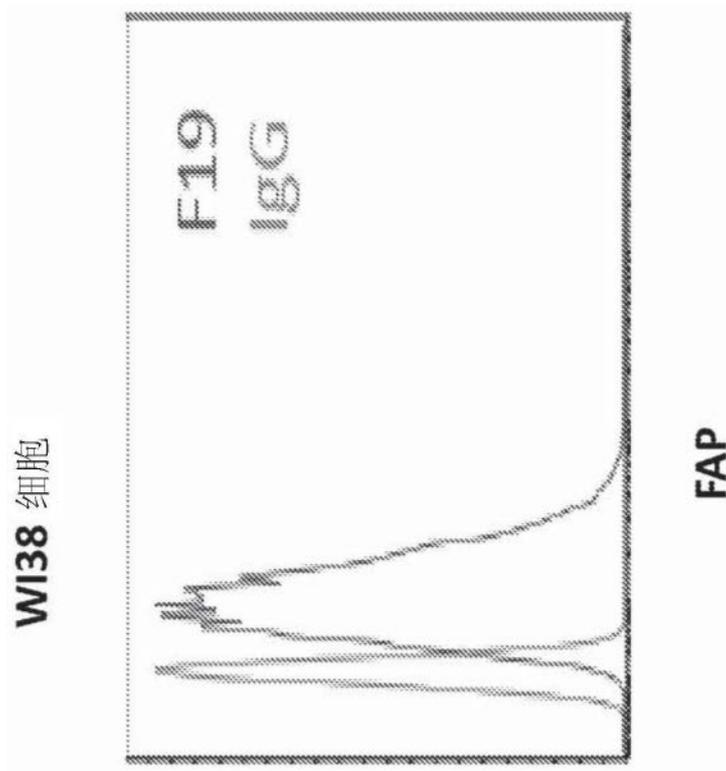


图8A

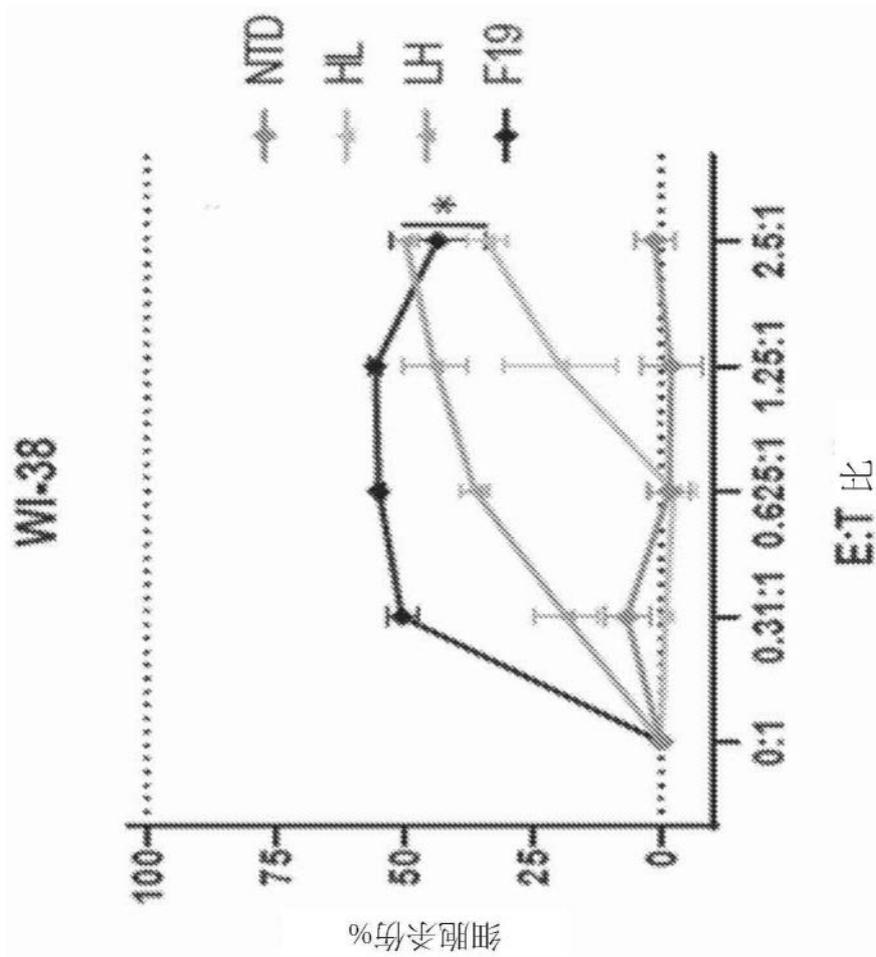


图8B

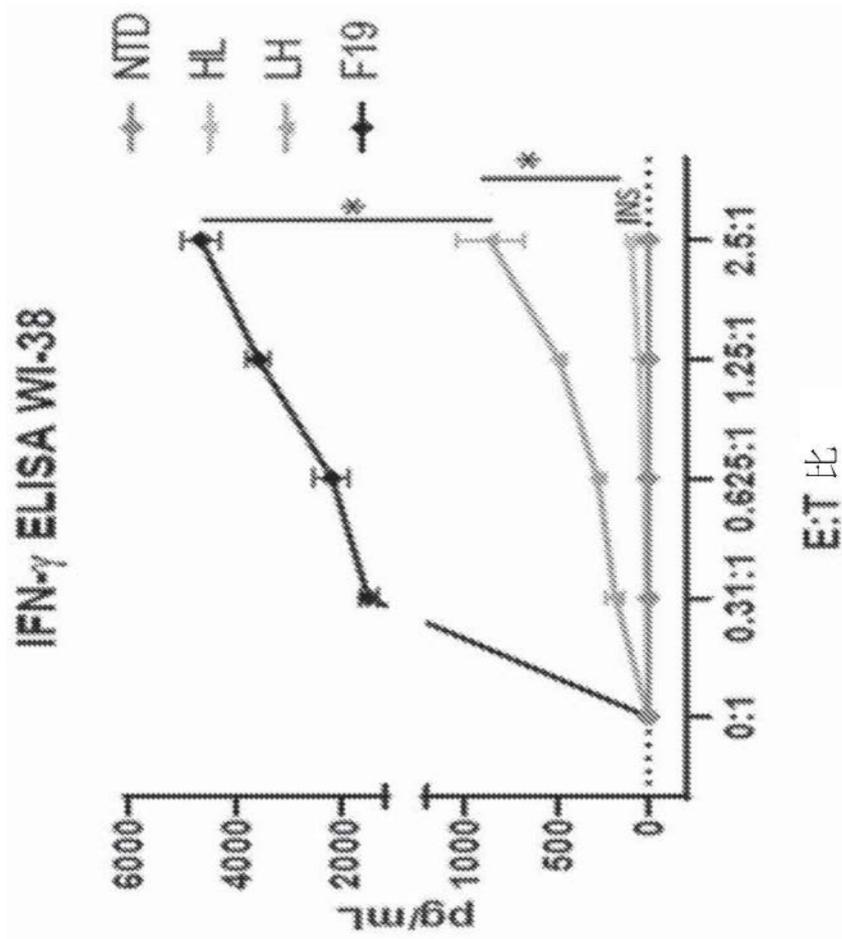


图8C

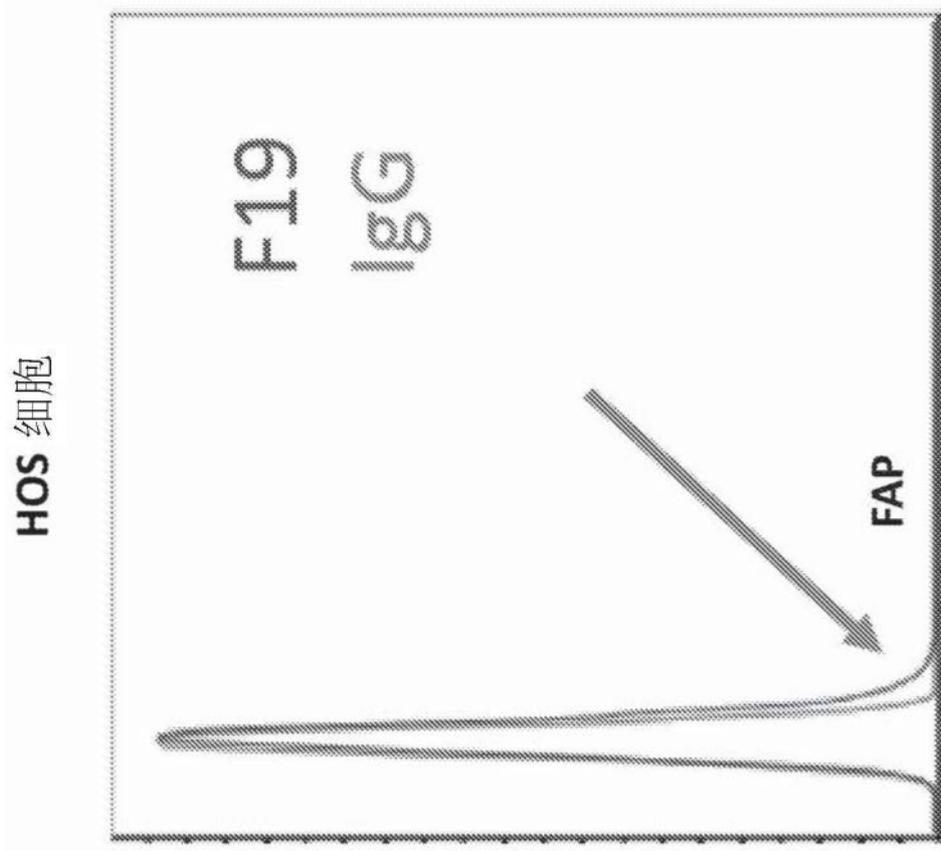


图9A

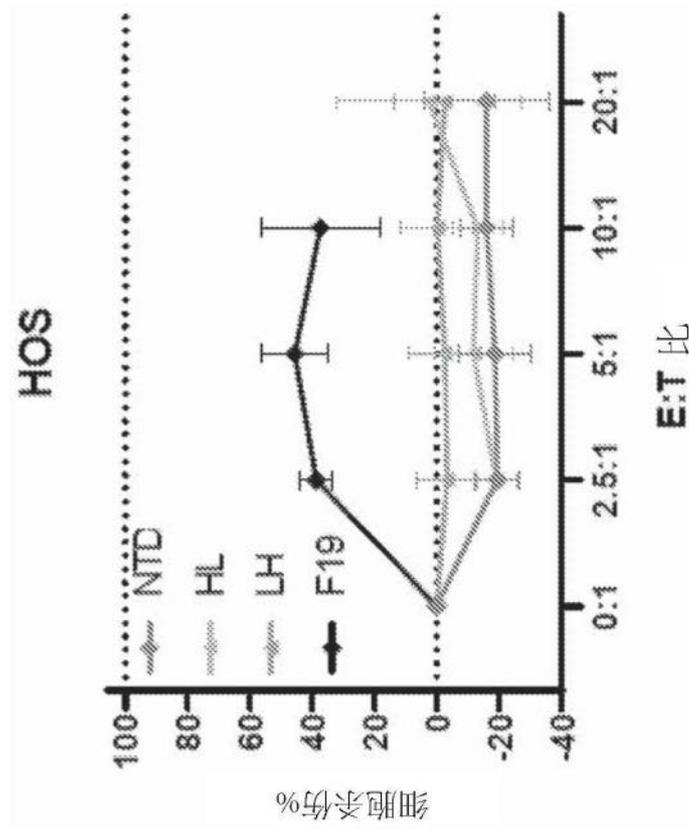


图9B

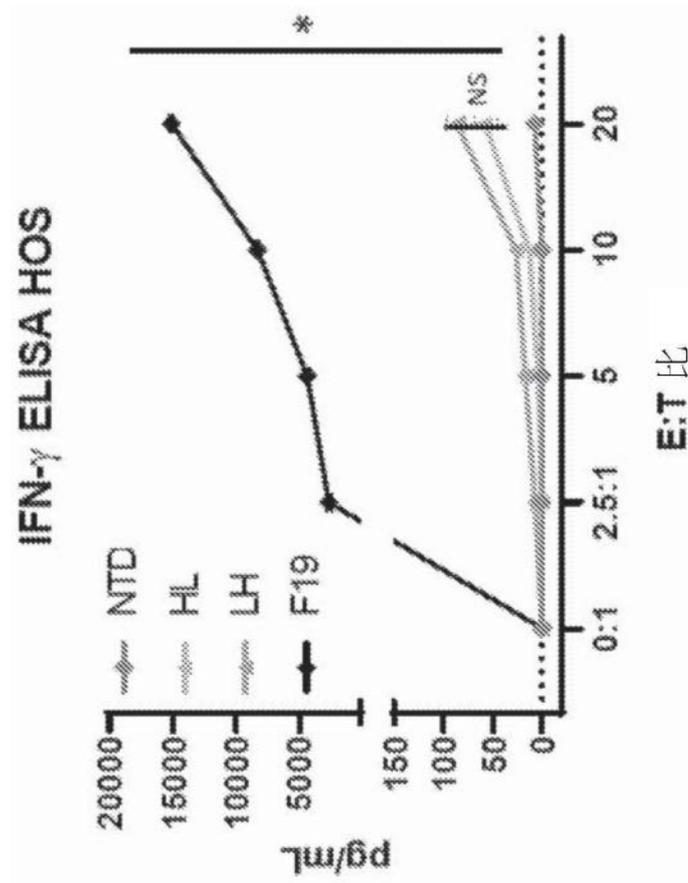


图9C

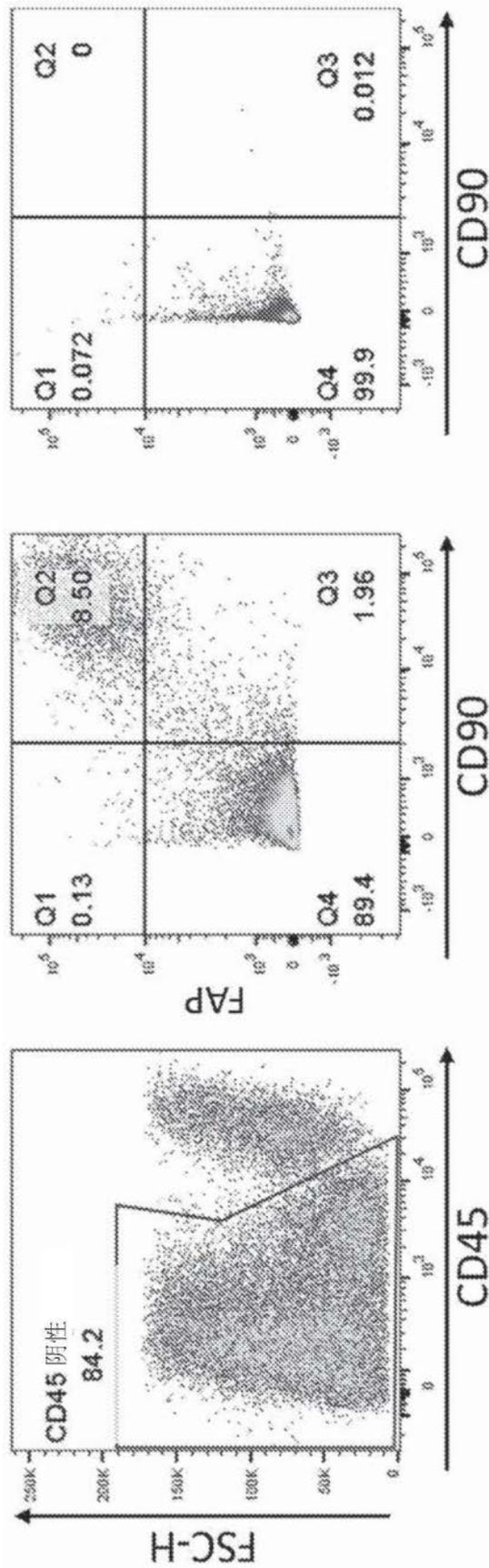


图10

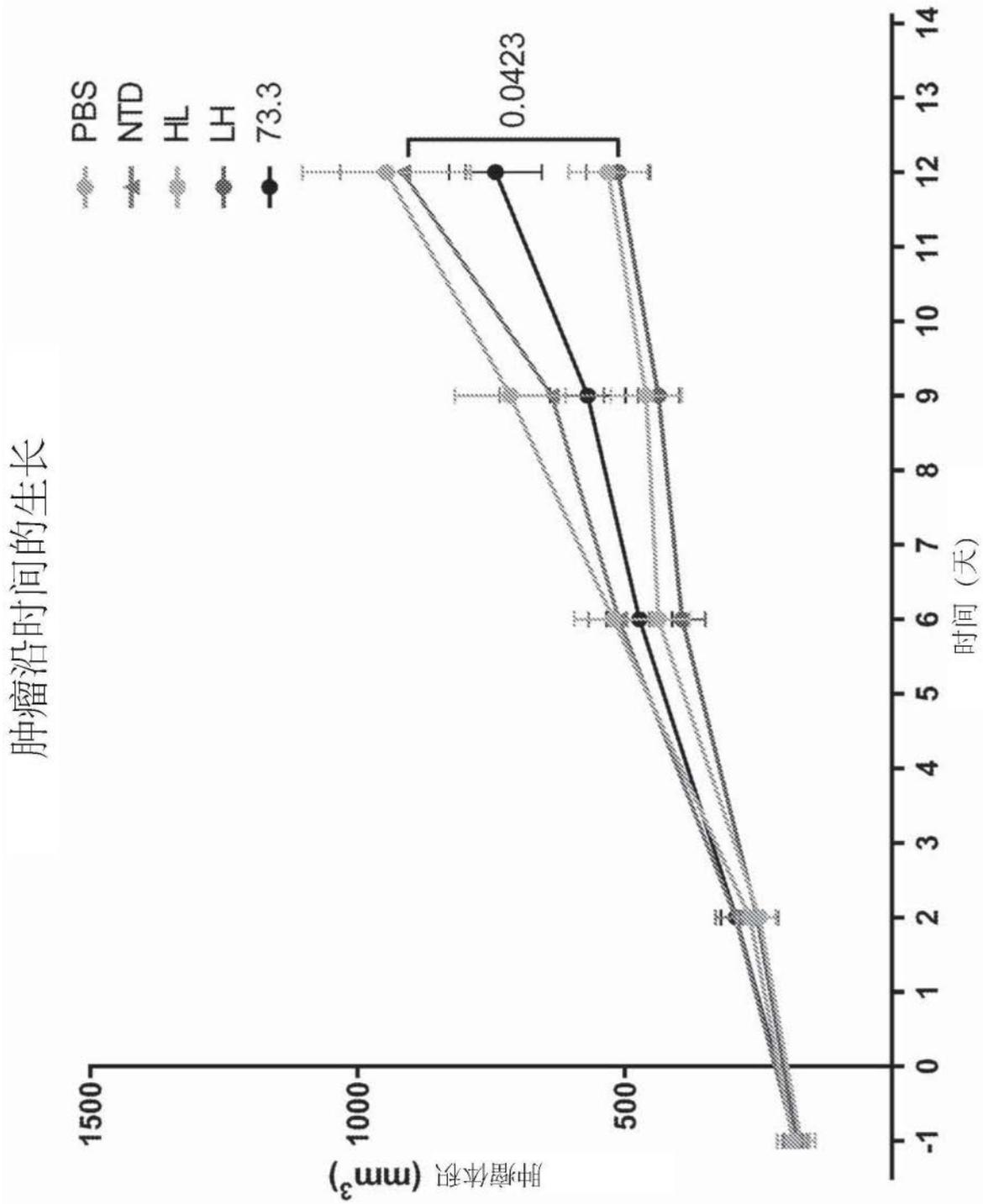


图11A

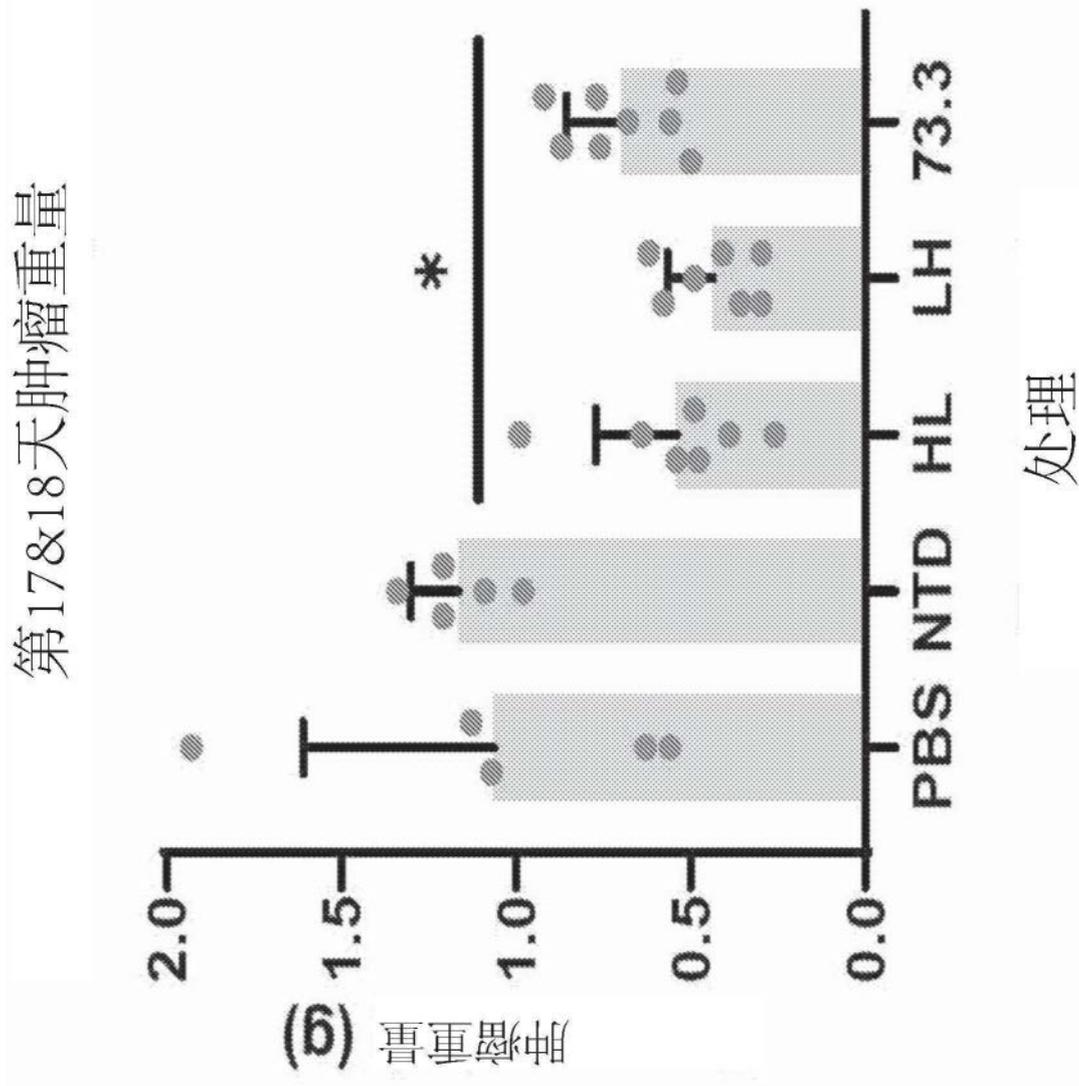


图11B

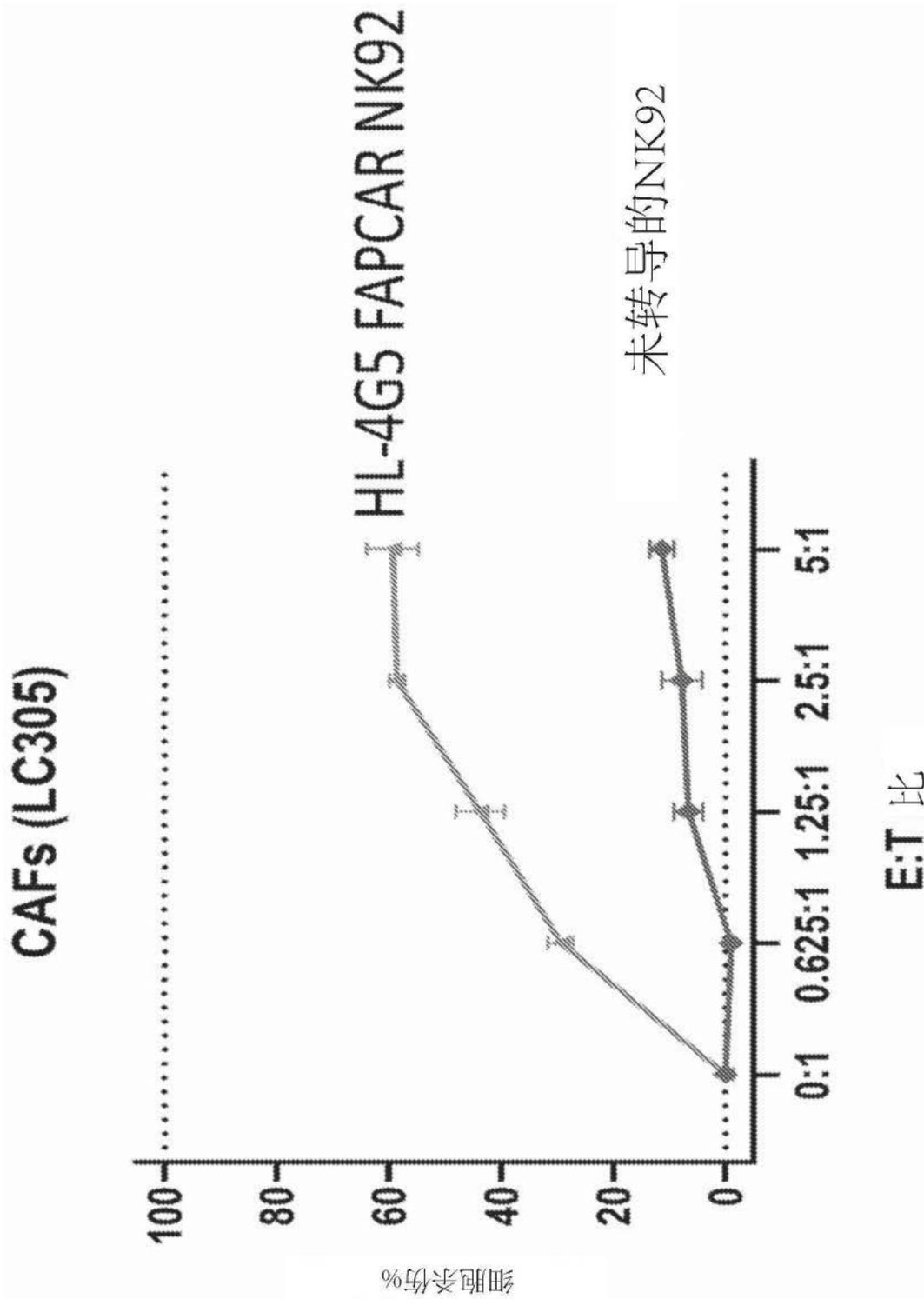


图12

FAPCAR-NK92 SSC15 肿瘤重量研究

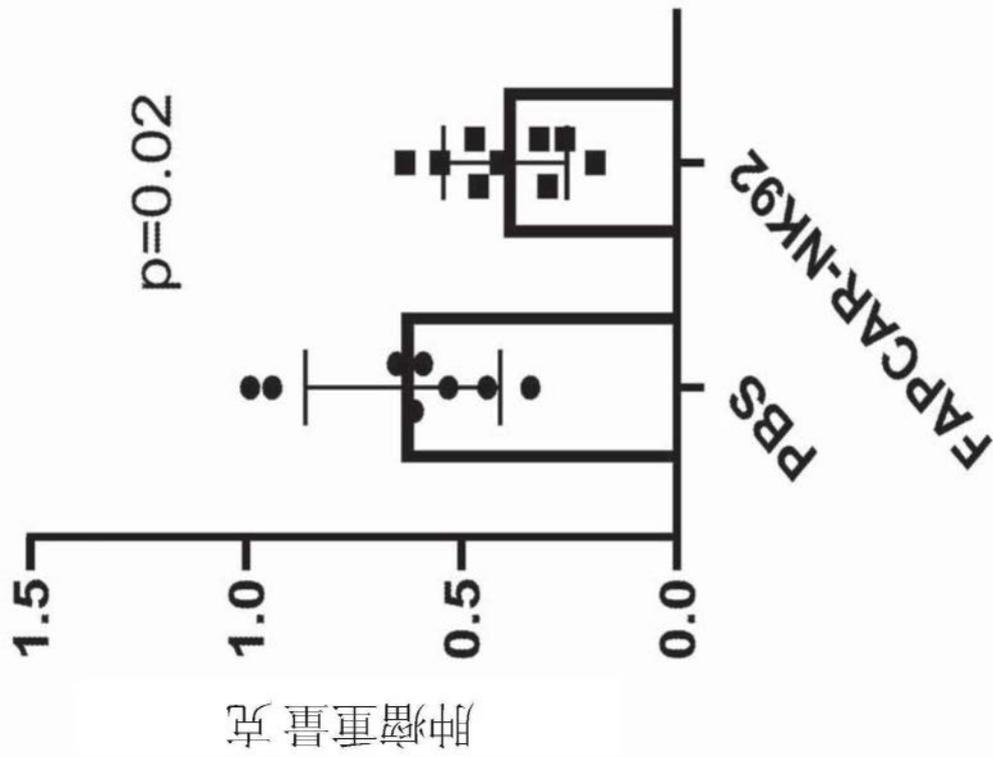


图13