



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116635423 A

(43) 申请公布日 2023. 08. 22

(21) 申请号 202180084959.6

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所  
11256

(22) 申请日 2021.10.15

专利代理师 陈文平 王北南

(30) 优先权数据

63/092,736 2020.10.16 US

63/151,483 2021.02.19 US

(51) Int.Cl.

C07K 16/30 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.06.15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/055302 2021.10.15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/082059 EN 2022.04.21

(71) 申请人 森迪生物科学公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 B·S·加里森 M·E·鸿

N·弗兰克尔

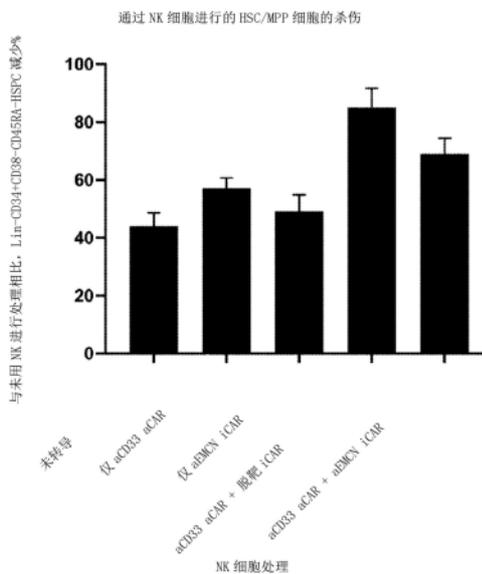
权利要求书3页 说明书93页 附图16页

(54) 发明名称

嵌合受体及其使用方法

(57) 摘要

本文提供了EMCN特异性抗原结合结构域和包含EMCN特异性抗原结合的嵌合蛋白。本文还提供了针对包含所述EMCN特异性抗原结合结构域的蛋白质的细胞、核酸、载体、组合物和方法。



1. 一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性的抗原结合结构域和异源性分子或部分,其中所述抗原结合结构域包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中

(a)所述VH包含:

重链互补决定区1(CDR-H1),所述CDR-H1具有RYDMH(SEQ ID NO:102)的氨基酸序列,

重链互补决定区2(CDR-H2),所述CDR-H2具有VIWGNGNTHYHSALKS(SEQ ID NO:103)的氨基酸序列,以及

重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列,并且

所述VL包含:

轻链互补决定区1(CDR-L1),所述CDR-L1具有KSSQSLVASDENTYLN(SEQ ID NO:10)的氨基酸序列,

轻链互补决定区2(CDR-L2),所述CDR-L2具有QVSKLDS(SEQ ID NO:11)的氨基酸序列,并且

轻链互补决定区3(CDR-L3),所述CDR-L3具有LQGIHLPWT(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列,并且

其中参考抗体的所述CDR-H1、所述CDR-H2、所述CDR-H3、所述CDR-L1、所述CDR-L2和所述CDR-L3的氨基酸序列基于Kabat编号方案来定义;或者

(b)所述VH包含:

重链互补决定区1(CDR-H1),所述CDR-H1具有GFSLSRV(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列,重链互补决定区2(CDR-H2),所述CDR-H2具有WGNGN(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列,和重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列,并且

所述VL包含:

轻链互补决定区1(CDR-L1),所述CDR-L1具有KSSQSLVASDENTYLN(SEQ ID NO:10)的氨基酸序列,轻链互补决定区2(CDR-L2),所述CDR-L2具有QVSKLDS(SEQ ID NO:11)的氨基酸序列,和轻链互补决定区3(CDR-L3),所述CDR-L3具有LQGIHLPWT(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列,并且

其中所述参考抗体的所述CDR-H1、所述CDR-H2、所述CDR-H3、所述CDR-L1、所述CDR-L2和所述CDR-L3的氨基酸序列基于Chothia编号方案来定义;或者

(c)所述VH包含:

重链互补决定区1(CDR-H1),所述CDR-H1包含在SEQ ID NO:1的所述VH区氨基酸序列内,重链互补决定区2(CDR-H2),所述CDR-H2包含在SEQ ID NO:1的所述VH区氨基酸序列内,和重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3包含在SEQ ID NO:1的所述VH区氨基酸序列内,并且

所述VL包含:

轻链互补决定区1(CDR-L1),所述CDR-L1包含在SEQ ID NO:9的所述VL区氨基酸序列内,轻链互补决定区2(CDR-L2),所述CDR-L2包含在SEQ ID NO:9的所述VL区氨基酸序列内,和轻链互补决定区3(CDR-L3),所述CDR-L3包含在SEQ ID NO:9的所述VL区氨基酸序列内,并且

任选地其中所述参考抗体的所述CDR-H1、所述CDR-H2、所述CDR-H3、所述CDR-L1、所述

CDR-L2和所述CDR-L3的氨基酸序列基于Kabat或Chothia编号方案来定义。

2. 如权利要求1所述的嵌合蛋白,其中所述VH区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

3. 如权利要求1或权利要求2所述的嵌合蛋白,其中所述VL区包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

4. 如权利要求1至权利要求3中任一项所述的嵌合蛋白,其中所述抗原结合结构域包括单链可变片段(scFv)。

5. 如权利要求4所述的嵌合蛋白,其中所述scFv的所述VH和所述VL由肽接头分开。

6. 如权利要求5所述的嵌合蛋白,其中所述抗原结合结构域包含结构VH-L-VL或VL-L-VH,其中VH是重链可变结构域,L是肽接头,并且VL是轻链可变结构域。

7. 如权利要求4至权利要求6中任一项所述的嵌合蛋白,其中所述scFv包含选自由以下各项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:17-22。

8. 如权利要求1至权利要求7中任一项所述的嵌合蛋白,其中所述嵌合蛋白是嵌合抗原受体(CAR),并且其中所述异源性分子或部分包含选自由以下各项组成的组的多肽:跨膜结构域、一个或多个胞内信号传导结构域、铰链结构域、间隔区、一个或多个肽接头以及它们的组合。

9. 如权利要求8所述的嵌合蛋白,其中所述CAR是包含一个或多个胞内抑制性结构域的抑制性CAR,所述胞内抑制性结构域抑制免疫反应。

10. 如权利要求9所述的嵌合蛋白,其中所述胞内抑制性结构域包括酶促抑制性结构域或胞内抑制性共信号传导结构域。

11. 一种经工程化的核酸,所述经工程化的核酸编码如权利要求1至权利要求10中任一项所述的嵌合蛋白。

12. 一种表达载体,所述表达载体包含如权利要求11所述的经工程化的核酸。

13. 一种分离的细胞,所述分离的细胞包含如权利要求11所述的经工程化的核酸或如权利要求12所述的表达载体。

14. 一种经工程化的细胞群,所述经工程化的细胞群表达如权利要求11所述的经工程化的核酸或如权利要求12所述的表达载体。

15. 如权利要求13或权利要求14所述的细胞或细胞群,其中所述细胞或细胞群还包含在所述细胞表面上表达的一种或多种肿瘤靶向性嵌合受体。

16. 如权利要求15所述的细胞或细胞群,其中所述一种或多种肿瘤靶向性嵌合受体中的每种是嵌合抗原受体(CAR)或经工程化的T细胞受体。

17. 如权利要求13至权利要求16中任一项所述的细胞或细胞群,其中所述细胞或细胞群选自由以下各项组成的组:T细胞、CD8+T细胞、CD4+T细胞、 $\gamma$ - $\delta$ T细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、调节性T细胞、病毒特异性T细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、自然杀伤(NK)细胞、B细胞、肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)、先天淋巴样细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性细胞、中性粒细胞、骨髓细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突细胞、红细胞、血小板细胞、人胚胎干细胞(ESC)、ESC源性细胞、多能干细胞、间充质基质细胞(MSC)、诱导性多能干细胞(iPSC)和iPSC源性细胞。

18. 一种药物组合物,所述药物组合物包含有效量的如权利要求13至权利要求17中任一项所述的经工程化的细胞或细胞群和药学上可接受的载剂、药学上可接受的赋形剂或它

们的组合。

19. 一种在受试者中刺激针对肿瘤细胞的细胞介导的免疫反应的方法,所述方法包括将治疗有效剂量的如权利要求13至权利要求17中任一项所述的细胞中的任一种或者如权利要求18所述的组合物施用于患有肿瘤的受试者。

20. 一种治疗患有肿瘤的受试者的方法,所述方法包括施用治疗有效剂量的如权利要求13至权利要求17中任一项所述的细胞中的任一种或者如权利要求18所述的组合物。

## 嵌合受体及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2021年2月19日提交的美国临时申请63/151,483和2020年10月16日提交的美国临时申请63/092,736的权益,这两个临时申请中的每个据此以引用的方式整体并入用于所有目的。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有序列表,该序列表已通过EFS-Web提交并且据此以引用的方式整体并入。所述ASCII副本创建于20XX年XX月XX日,命名为XXXXXUS\_sequences\_listing.txt,大小为X,XXX,XXX字节。

### 背景技术

[0005] 基于嵌合抗原受体(CAR)的过继性细胞疗法被用于重定向免疫反应性细胞(诸如T细胞)的特异性和功能,已经在淋巴恶性肿瘤患者中显示出功效(Pule等人,Nat.Med.(14):1264-1270(2008);Maude等人,N Engl JMed.(371):1507-17(2014);Brentjens等人,Sci Transl Med.(5):177ra38(2013))。CAR T细胞已经显示出在表达CD19的恶性肿瘤患者中诱导完全缓解,这些患者的化学疗法已经导致耐药性和肿瘤进展。CD19 CAR疗法的成功为治疗其他血液恶性肿瘤(诸如急性髓系白血病(AML))带来了希望。急性骨髓性白血病是成人中最常见的急性白血病。AML是骨髓系血细胞癌,其特征在于积聚于骨髓和血液中的异常细胞的快速生长,以及干扰正常血细胞。有时,AML可以扩散到大脑、皮肤或牙龈。针对AML的标准化学疗法治疗在过去40年中没有发生实质性变化(Pulte等人,2008),总体存活期仍然很短。

[0006] 开发针对AML的CAR疗法的一个挑战是缺乏合适的靶标。鉴定适当的CAR靶标的的能力对于有效靶向和治疗肿瘤而不损害表达相同的靶抗原的正常细胞是重要的。因此,仍然需要靶向AML细胞而不靶向正常细胞或组织的基于CAR-T细胞的AML疗法。

### 发明内容

[0007] 本文提供了一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性的抗原结合结构域和异源性分子或部分,其中所述抗原结合结构域包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中:(a)所述VH包含:重链互补决定区1(CDR-H1),所述CDR-H1具有RYDMH(SEQ ID NO:102)的氨基酸序列,重链互补决定区2(CDR-H2),所述CDR-H2具有VIWGNNGNTHYSALKS(SEQ ID NO:103)的氨基酸序列,和重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列,并且所述VL包含:轻链互补决定区1(CDR-L1),所述CDR-L1具有KSSQSLVASDENTYLN(SEQ ID NO:10)的氨基酸序列,轻链互补决定区2(CDR-L2),所述CDR-L2具有QVSKLDS(SEQ ID NO:11)的氨基酸序列,和轻链互补决定区3(CDR-L3),所述CDR-L3具有LQGIHLPWT(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列,并且其中参考抗体的所述CDR-H1、所述CDR-H2、所述CDR-H3、所述CDR-L1、所述CDR-L2和所述CDR-L3的氨基酸序列基于Kabat编号方案来定义;(b)所述VH包含:重链互补决定区1(CDR-H1),所述CDR-H1具

有GFSLSRV (SEQ ID NO:2)的氨基酸序列,重链互补决定区2 (CDR-H2),所述CDR-H2具有WGNGN (SEQ ID NO:3)的氨基酸序列,和重链互补决定区3 (CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD (SEQ ID NO:4)的氨基酸序列,并且所述VL包含:轻链互补决定区1 (CDR-L1),所述CDR-L1具有KSSQSLVASDENTYLN (SEQ ID NO:10)的氨基酸序列,轻链互补决定区2 (CDR-L2),所述CDR-L2具有QVSKLDS (SEQ ID NO:11)的氨基酸序列,和轻链互补决定区3 (CDR-L3),所述CDR-L3具有LQGIHLPWT (SEQ ID NO:12)的氨基酸序列,其中参考抗体的所述CDR-H1、所述CDR-H2、所述CDR-H3、所述CDR-L1、所述CDR-L2和所述CDR-L3的氨基酸序列基于Chothia编号方案来定义;或者(c)所述VH包含:重链互补决定区1 (CDR-H1),所述CDR-H1包含在SEQ ID NO:1的所述VH区氨基酸序列内,重链互补决定区2 (CDR-H2),所述CDR-H2包含在SEQ ID NO:1的所述VH区氨基酸序列内,和重链互补决定区3 (CDR-H3),所述CDR-H3包含在SEQ ID NO:1的所述VH区氨基酸序列内,并且所述VL包含:轻链互补决定区1 (CDR-L1),所述CDR-L1包含在SEQ ID NO:9的所述VL区氨基酸序列内,轻链互补决定区2 (CDR-L2),所述CDR-L2包含在SEQ ID NO:9的所述VL区氨基酸序列内,和轻链互补决定区3 (CDR-L3),所述CDR-L3包含在SEQ ID NO:9的所述VL区氨基酸序列内,并且任选地其中参考抗体的所述CDR-H1、所述CDR-H2、所述CDR-H3、所述CDR-L1、所述CDR-L2和所述CDR-L3的氨基酸序列基于Kabat或Chothia编号方案来定义。

[0008] 在一些方面,所述抗原结合结构域包含重链可变 (VH) 区和轻链可变 (VL) 区,其中所述VH包含:重链互补决定区1 (CDR-H1),所述CDR-H1具有RYDMH (SEQ ID NO:102)的氨基酸序列,重链互补决定区2 (CDR-H2),所述CDR-H2具有VIWGNGNTHYHSALKS (SEQ ID NO:103)的氨基酸序列,和重链互补决定区3 (CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD (SEQ ID NO:4)的氨基酸序列,并且所述VL包含:轻链互补决定区1 (CDR-L1),所述CDR-L1具有KSSQSLVASDENTYLN (SEQ ID NO:10)的氨基酸序列,轻链互补决定区2 (CDR-L2),所述CDR-L2具有QVSKLDS (SEQ ID NO:11)的氨基酸序列,和轻链互补决定区3 (CDR-L3),所述CDR-L3具有LQGIHLPWT (SEQ ID NO:12)的氨基酸序列,并且其中参考抗体的所述CDR-H1、所述CDR-H2、所述CDR-H3、所述CDR-L1、所述CDR-L2和所述CDR-L3的氨基酸序列基于Kabat编号方案来定义。

[0009] 在一些方面,所述抗原结合结构域包含重链可变 (VH) 区和轻链可变 (VL) 区,其中所述VH包含:重链互补决定区1 (CDR-H1),所述CDR-H1具有GFSLSRV (SEQ ID NO:2)的氨基酸序列,重链互补决定区2 (CDR-H2),所述CDR-H2具有WGNGN (SEQ ID NO:3)的氨基酸序列,和重链互补决定区3 (CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD (SEQ ID NO:4)的氨基酸序列,并且所述VL包含:轻链互补决定区1 (CDR-L1),所述CDR-L1具有KSSQSLVASDENTYLN (SEQ ID NO:10)的氨基酸序列,轻链互补决定区2 (CDR-L2),所述CDR-L2具有QVSKLDS (SEQ ID NO:11)的氨基酸序列,和轻链互补决定区3 (CDR-L3),所述CDR-L3具有LQGIHLPWT (SEQ ID NO:12)的氨基酸序列,其中参考抗体的所述CDR-H1、所述CDR-H2、所述CDR-H3、所述CDR-L1、所述CDR-L2和所述CDR-L3的氨基酸序列基于Chothia编号方案来定义。

[0010] 在一些方面,所述抗原结合结构域包含重链可变 (VH) 区和轻链可变 (VL) 区,其中所述VH包含:重链互补决定区1 (CDR-H1),所述CDR-H1包含在SEQ ID NO:1的所述VH区氨基酸序列内,重链互补决定区2 (CDR-H2),所述CDR-H2包含在SEQ ID NO:1的所述VH区氨基酸序列内,和重链互补决定区3 (CDR-H3),所述CDR-H3包含在SEQ ID NO:1的所述VH区氨基酸序列内,并且所述VL包含:轻链互补决定区1 (CDR-L1),所述CDR-L1包含在SEQ ID NO:9的所

述VL区氨基酸序列内,轻链互补决定区2(CDR-L2),所述CDR-L2包含在SEQ ID NO:9的所述VL区氨基酸序列内,和轻链互补决定区3(CDR-L3),所述CDR-L3包含在SEQ ID NO:9的所述VL区氨基酸序列内,并且任选地其中参考抗体的所述CDR-H1、所述CDR-H2、所述CDR-H3、所述CDR-L1、所述CDR-L2和所述CDR-L3的氨基酸序列基于Kabat或Chothia编号方案来定义。

[0011] 在一些方面,所述VH区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。在一些方面,所述VL区包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0012] 在一些方面,所述抗原结合结构域包括单链可变片段(scFv)。在一些方面,所述scFv的所述VH和所述VL由肽接头分开。在一些方面,所述抗原结合结构域包含结构VH-L-VL或VL-L-VH,其中VH是重链可变结构域,L是肽接头,并且VL是轻链可变结构域。在一些方面,所述scFv包含选自自由以下各项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:17-22。

[0013] 在一些方面,所述嵌合蛋白是嵌合抗原受体(CAR),并且其中所述异源性分子或部分包含选自自由以下各项组成的组的多肽:跨膜结构域、一个或多个胞内信号传导结构域、铰链结构域、间隔区、一个或多个肽接头以及它们的组合。

[0014] 在一些方面,所述CAR是包含一个或多个胞内抑制性结构域的抑制性CAR,所述胞内抑制性结构域抑制免疫反应。在一些方面,所述胞内抑制性结构域包含酶促抑制性结构域或胞内抑制性共信号传导结构域。

[0015] 本文还提供了一种经工程化的核酸,所述核酸编码如上文所述的嵌合蛋白。

[0016] 本文还提供了一种表达载体,所述表达载体包含如上文所述的经工程化的核酸。

[0017] 本文还提供了一种分离的细胞,所述分离的细胞包含如上文所述的经工程化的核酸。

[0018] 本文还提供了一种经工程化的细胞群,所述经工程化的细胞群表达如上文所述的经工程化的核酸或表达载体。

[0019] 在一些方面,所述分离的细胞或细胞群还包含在所述细胞表面上表达的一种或多种肿瘤靶向性嵌合受体。在一些方面,所述一种或多种肿瘤靶向性嵌合受体是嵌合抗原受体(CAR)或经工程化的T细胞受体。

[0020] 在一些方面,所述细胞或细胞群选自自由以下各项组成的组:T细胞、CD8+T细胞、CD4+T细胞、 $\gamma$ - $\delta$ T细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、调节性T细胞、病毒特异性T细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、自然杀伤(NK)细胞、B细胞、肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)、先天淋巴样细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性细胞、中性粒细胞、骨髓细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突细胞、红细胞、血小板细胞、人胚胎干细胞(ESC)、ESC源性细胞、多能干细胞、间充质基质细胞(MSC)、诱导性多能干细胞(iPSC)和iPSC源性细胞。

[0021] 本文还提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含有效量的如上文所述的细胞或经工程化的细胞群和药学上可接受的载剂、药学上可接受的赋形剂或者它们的组合。

[0022] 本文还提供了一种在受试者中刺激针对肿瘤细胞的细胞介导的免疫反应的方法,所述方法包括将治疗有效剂量的如上文所述的细胞或如上文所述的组合物中的任一者施用于患有肿瘤的受试者。

[0023] 本文还提供了一种治疗患有肿瘤的受试者的方法,所述方法包括施用治疗有效剂量的如上文所述的细胞或如上文所述的组合物中的任一者。

[0024] 本文还提供了一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性

的抗原结合结构域和异源性分子或部分,其中所述抗原结合结构域包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,并且其中所述VH包含重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD (SEQ ID NO:4)的氨基酸序列。

[0025] 本文还提供了一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性的抗原结合结构域和异源性分子或部分,其中所述抗原结合结构域包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VH包含重链互补决定区1(CDR-H1)、重链互补决定区2(CDR-H2)和重链互补决定区3(CDR-H3),并且其中所述CDR-H1、所述CDR-H2和所述CDR-H3的氨基酸序列包含在SEQ ID NO:1的所述VH区氨基酸序列内。

[0026] 本文还提供了一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性的抗原结合结构域和异源性分子或部分,其中所述抗原结合结构域包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,并且其中所述VH包含:(a)重链互补决定区1(CDR-H1),所述CDR-H1具有GFSLSRV (SEQ ID NO:2)的氨基酸序列,重链互补决定区2(CDR-H2),所述CDR-H2具有WGNGN (SEQ ID NO:3)的氨基酸序列,和重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD (SEQ ID NO:4)的氨基酸序列,或者(b)重链互补决定区1(CDR-H1),所述CDR-H1具有RYDMH (SEQ ID NO:102)的氨基酸序列,重链互补决定区2(CDR-H2),所述CDR-H2具有VIWGNGNTHYSALKS (SEQ ID NO:103)的氨基酸序列,和重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD (SEQ ID NO:4)的氨基酸序列。

[0027] 在一些方面,所述VL包含轻链互补决定区1(CDR-L1)、轻链互补决定区2(CDR-L2)和轻链互补决定区3(CDR-L3),其中所述CDR-L1、所述CDR-L2和所述CDR-L3的氨基酸序列包含在SEQ ID NO:9的所述VL区氨基酸序列内。在一些方面,参考抗体的所述CDR-L1、所述CDR-L2和所述CDR-L3的氨基酸序列基于Kabat编号方案来定义。在一些方面,参考抗体的所述CDR-L1、所述CDR-L2和所述CDR-L3的氨基酸序列基于Chothia编号方案来定义。在一些方面,所述VL包含:轻链互补决定区1(CDR-L1),所述CDR-L1具有KSSQSLVASDENTYLN (SEQ ID NO:10)的氨基酸序列,轻链互补决定区2(CDR-L2),所述CDR-L2具有QVSKLDS (SEQ ID NO:11)的氨基酸序列,和轻链互补决定区3(CDR-L3),所述CDR-L3具有LQGIHLPWT (SEQ ID NO:12)的氨基酸序列。

[0028] 本文还提供了一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性的抗原结合结构域和异源性分子或部分,其中所述抗原结合结构域包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VL包含轻链互补决定区1(CDR-L1)、轻链互补决定区2(CDR-L2)和轻链互补决定区3(CDR-L3),并且其中所述CDR-L1、所述CDR-L2和所述CDR-L3的氨基酸序列包含在SEQ ID NO:9的所述VL区氨基酸序列内。在一些方面,参考抗体的所述CDR-L1、所述CDR-L2和所述CDR-L3的氨基酸序列基于Kabat编号方案来定义。在一些方面,参考抗体的所述CDR-L1、所述CDR-L2和所述CDR-L3的氨基酸序列基于Chothia编号方案来定义。

[0029] 本文还提供了一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性的抗原结合结构域和异源性分子或部分,其中所述抗原结合结构域包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,并且其中所述VL包含:轻链互补决定区1(CDR-L1),所述CDR-L1具有KSSQSLVASDENTYLN (SEQ ID NO:10)的氨基酸序列,轻链互补决定区2(CDR-L2),所述CDR-L2具有QVSKLDS (SEQ ID NO:11)的氨基酸序列,和轻链互补决定区3(CDR-L3),所述CDR-L3具有LQGIHLPWT (SEQ ID NO:12)的氨基酸序列。

[0030] 在一些方面,所述VH包含重链互补决定区1(CDR-H1)、重链互补决定区2(CDR-H2)、和重链互补决定区3(CDR-H3),其中所述CDR-H1、所述CDR-H2和所述CDR-H3的氨基酸序列包含在SEQ ID NO:1的所述VH区氨基酸序列内。在一些方面,所述VH包含:重链互补决定区1(CDR-H1),所述CDR-H1具有GFSLSR(Y)(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列,重链互补决定区2(CDR-H2),所述CDR-H2具有WGNGN(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列,和重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列。在一些方面,所述VH包含:重链互补决定区1(CDR-H1),所述CDR-H1具有RYDMH(SEQ ID NO:102)的氨基酸序列,重链互补决定区2(CDR-H2),所述CDR-H2具有VIWNGNTHYHSALKS(SEQ ID NO:103)的氨基酸序列,和重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列。

[0031] 本文还提供了一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性的抗原结合结构域和异源性分子或部分,其中所述抗原结合结构域包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VH包含:(a)重链互补决定区1(CDR-H1),所述CDR-H1具有GFSLSR(Y)(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列,重链互补决定区2(CDR-H2),所述CDR-H2具有WGNGN(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列,和重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列,或者(b)重链互补决定区1(CDR-H1),所述CDR-H1具有RYDMH(SEQ ID NO:102)的氨基酸序列,重链互补决定区2(CDR-H2),所述CDR-H2具有VIWNGNTHYHSALKS(SEQ ID NO:103)的氨基酸序列,和重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列,并且其中所述VL包含:轻链互补决定区1(CDR-L1),所述CDR-L1具有KSSQSLVASDENTYLN(SEQ ID NO:10)的氨基酸序列,轻链互补决定区2(CDR-L2),所述CDR-L2具有QVSKLDS(SEQ ID NO:11)的氨基酸序列,和轻链互补决定区3(CDR-L3),所述CDR-L3具有LQGIHLPWT(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列。

[0032] 在一些方面,所述VH区包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列。在一些方面,所述VH区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0033] 在一些方面,所述VL区包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列。在一些方面,所述VL区包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0034] 本文还提供了一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性的抗原结合结构域和异源性分子或部分,其中所述抗原结合结构域包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,并且其中所述VL包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列。在一些方面,所述VH区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。在一些方面,所述VL区包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列。在一些方面,所述VL区包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0035] 本文还提供了一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性的抗原结合结构域和异源性分子或部分,其中所述抗原结合结构域包含抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,并且其中所述VL包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至

少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列。在一些方面,所述VL区包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。在一些方面,所述VH区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0036] 本文还提供了一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性的抗原结合结构域和异源性分子或部分,其中所述抗原结合结构域与参考抗体或其抗原结合片段竞争与EMCN的结合,其中所述参考抗体或其抗原结合片段包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VH包含:重链互补决定区1(CDR-H1),所述CDR-H1具有GFSLTRY(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列,重链互补决定区2(CDR-H2),所述CDR-H2具有WGNGN(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列,和重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列,并且其中所述VL包含:轻链互补决定区1(CDR-L1),所述CDR-L1具有KSSQSLVASENTYLN(SEQ ID NO:10)的氨基酸序列,轻链互补决定区2(CDR-L2),所述CDR-L2具有QVSKLDS(SEQ ID NO:11)的氨基酸序列,和轻链互补决定区3(CDR-L3),所述CDR-L3具有LQGIHLPWT(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列。

[0037] 本文还提供了一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性的抗原结合结构域和异源性分子或部分,其中所述抗原结合结构域结合与参考抗体或其抗原结合片段基本上相同的EMCN表位,其中所述参考抗体或其抗原结合片段包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VH包含:重链互补决定区1(CDR-H1),所述CDR-H1具有GFSLTRY(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列,重链互补决定区2(CDR-H2),所述CDR-H2具有WGNGN(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列,和重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列,并且其中所述VL包含:轻链互补决定区1(CDR-L1),所述CDR-L1具有KSSQSLVASENTYLN(SEQ ID NO:10)的氨基酸序列,轻链互补决定区2(CDR-L2),所述CDR-L2具有QVSKLDS(SEQ ID NO:11)的氨基酸序列,和轻链互补决定区3(CDR-L3),所述CDR-L3具有LQGIHLPWT(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列。

[0038] 本文还提供了一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性的抗原结合结构域和异源性分子或部分,其中所述抗原结合结构域结合与参考抗体或其抗原结合片段所结合的EMCN表位相同的人EMCN的表位,其中所述参考抗体或其抗原结合片段包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VH包含:重链互补决定区1(CDR-H1),所述CDR-H1具有GFSLTRY(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列,重链互补决定区2(CDR-H2),所述CDR-H2具有WGNGN(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列,和重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列,并且其中所述VL包含:轻链互补决定区1(CDR-L1),所述CDR-L1具有KSSQSLVASENTYLN(SEQ ID NO:10)的氨基酸序列,轻链互补决定区2(CDR-L2),所述CDR-L2具有QVSKLDS(SEQ ID NO:11)的氨基酸序列,和轻链互补决定区3(CDR-L3),所述CDR-L3具有LQGIHLPWT(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列。在一些方面,所述参考抗体或其抗原结合片段的所述VH区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。在一些方面,所述参考抗体或其抗原结合片段的所述VL区包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0039] 在一些方面,所述抗原结合结构域包括F(ab)片段、F(ab')片段或单链可变片段(scFv)。在一些方面,所述抗体或其抗原结合片段包含单链可变片段(scFv)。

[0040] 在一些方面,所述scFv的所述VH和所述VL由肽接头分开。在一些方面,所述抗原结合结构域包含结构VH-L-VL或VL-L-VH,其中VH是重链可变结构域,L是肽接头,并且VL是轻

链可变结构域。在一些方面,在一些方面,所述肽接头包含选自以下各项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:23-39。

[0041] 在一些方面,所述scFv包含选自以下各项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:17-22。

[0042] 在一些方面,所述嵌合蛋白是抗体-药物缀合物,并且其中所述异源性分子或部分包括治疗剂。

[0043] 在一些方面,所述嵌合蛋白是嵌合抗原受体(CAR),并且其中所述异源性分子或部分包含选自以下各项组成的组的多肽:跨膜结构域、一个或多个胞内信号传导结构域、铰链结构域、间隔区、一个或多个肽接头以及它们的组合。在一些方面,所述CAR包括跨膜结构域。在一些方面,所述CAR包含一个或多个胞内信号传导结构域。在一些方面,所述CAR是包含一个或多个胞内信号传导结构域的活化性CAR,所述胞内信号传导结构域刺激免疫反应。在一些方面,所述CAR是包含一个或多个胞内抑制性结构域的抑制性CAR,所述胞内抑制性结构域抑制免疫反应。在一些方面,所述胞内抑制性结构域包含酶促抑制性结构域。在一些方面,所述胞内抑制性结构域包括胞内抑制性共信号传导结构域。在一些方面,所述CAR包含在所述抗原结合结构域和所述跨膜结构域之间的间隔区。在一些方面,所述间隔区具有选自SEQ ID NO:40-48组成的组的氨基酸序列。

[0044] 本文还提供了一种对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性的单链可变片段(scFv),所述单链可变片段包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VH包含具有RIKD(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列的重链互补决定区3(CDR-H3)。

[0045] 本文还提供了一种对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性的单链可变片段(scFv),其中所述抗原结合结构域包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VH包含重链互补决定区1(CDR-H1)、重链互补决定区2(CDR-H2)和重链互补决定区3(CDR-H3),并且其中所述CDR-H1、所述CDR-H2和所述CDR-H3的氨基酸序列包含在SEQ ID NO:1的所述VH区氨基酸序列内。在一些方面,参考抗体的所述CDR-H1、所述CDR-H2和所述CDR-H3的氨基酸序列基于Kabat编号方案来定义。在一些方面,参考抗体的所述CDR-H1、所述CDR-H2和所述CDR-H3的氨基酸序列基于Chothia编号方案来定义。

[0046] 本文还提供了一种对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性的单链可变片段(scFv),其中所述抗原结合结构域包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,并且其中所述VH包含:重链互补决定区1(CDR-H1),所述CDR-H1具有RYDMH(SEQ ID NO:102)的氨基酸序列,重链互补决定区2(CDR-H2),所述CDR-H2具有VIWGNNGNTHYSALKS(SEQ ID NO:103)的氨基酸序列,和重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列,其中参考抗体的所述CDR-H1、所述CDR-H2、所述CDR-H3、所述CDR-L1、所述CDR-L2和所述CDR-L3的氨基酸序列基于Kabat编号方案来定义;或者(b)重链互补决定区1(CDR-H1),所述CDR-H1具有GFSLSRY(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列,重链互补决定区2(CDR-H2),所述CDR-H2具有WGNGN(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列,和重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列,其中参考抗体的所述CDR-H1、所述CDR-H2、所述CDR-H3、所述CDR-L1、所述CDR-L2和所述CDR-L3的氨基酸序列基于Chothia编号方案来定义。

[0047] 在一些方面,所述scFv的所述VL包含轻链互补决定区1(CDR-L1)、轻链互补决定区2(CDR-L2)和轻链互补决定区3(CDR-L3),其中所述CDR-L1、所述CDR-L2和所述CDR-L3的氨

氨基酸序列包含在SEQ ID NO:9的所述VL区氨基酸序列内。

[0048] 在一些方面,所述scFv的所述VL包含:轻链互补决定区1(CDR-L1),所述CDR-L1具有KSSQSLVASENTYLN(SEQ ID NO:10)的氨基酸序列,轻链互补决定区2(CDR-L2),所述CDR-L2具有QVSKLDS(SEQ ID NO:11)的氨基酸序列,和轻链互补决定区3(CDR-L3),所述CDR-L3具有LQGIHLPWT(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列。

[0049] 本文还提供了一种对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性的单链可变片段(scFv),其中所述抗原结合结构域包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VL包含轻链互补决定区1(CDR-L1)、轻链互补决定区2(CDR-L2)和轻链互补决定区3(CDR-L3),并且其中所述CDR-L1、所述CDR-L2和所述CDR-L3的氨基酸序列包含在SEQ ID NO:9的所述VL区氨基酸序列内。在一些方面,参考抗体的所述CDR-H1、所述CDR-H2、所述CDR-H3、所述CDR-L1、所述CDR-L2和所述CDR-L3的氨基酸序列基于Kabat编号方案来定义。在一些方面,参考抗体的所述CDR-H1、所述CDR-H2、所述CDR-H3、所述CDR-L1、所述CDR-L2和所述CDR-L3的氨基酸序列基于Chothia编号方案来定义。

[0050] 本文还提供了一种对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性的单链可变片段(scFv),其中所述抗原结合结构域包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,并且其中所述VL包含:轻链互补决定区1(CDR-L1),所述CDR-L1具有KSSQSLVASENTYLN(SEQ ID NO:10)的氨基酸序列,轻链互补决定区2(CDR-L2),所述CDR-L2具有QVSKLDS(SEQ ID NO:11)的氨基酸序列,和轻链互补决定区3(CDR-L3),所述CDR-L3具有LQGIHLPWT(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列。

[0051] 在一些方面,所述scFv的所述VH包含重链互补决定区1(CDR-H1)、重链互补决定区2(CDR-H2)和重链互补决定区3(CDR-H3),其中所述CDR-H1、所述CDR-H2和所述CDR-H3的氨基酸序列包含在SEQ ID NO:1的所述VH区氨基酸序列内。在一些方面,参考抗体的所述CDR-H1、所述CDR-H2和所述CDR-H3的氨基酸序列基于Kabat编号方案来定义。在一些方面,参考抗体的所述CDR-H1、所述CDR-H2和所述CDR-H3的氨基酸序列基于Chothia编号方案来定义。

[0052] 在一些方面,所述scFv的所述VH包含:重链互补决定区1(CDR-H1),所述CDR-H1具有GFSLSRYS(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列,重链互补决定区2(CDR-H2),所述CDR-H2具有WGNGN(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列,和重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列。

[0053] 在一些方面,所述scFv的所述VH包含:或重链互补决定区1(CDR-H1),所述CDR-H1具有RYDMH(SEQ ID NO:102)的氨基酸序列,重链互补决定区2(CDR-H2),所述CDR-H2具有VIWGNGNTHYSALKS(SEQ ID NO:103)的氨基酸序列,和重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列。

[0054] 本文还提供了一种对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性的单链可变片段(scFV),其中所述抗原结合结构域包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VH包含:重链互补决定区1(CDR-H1),所述CDR-H1具有GFSLSRYS(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列,重链互补决定区2(CDR-H2),所述CDR-H2具有WGNGN(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列,和重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列,或者(b)重链互补决定区1(CDR-H1),所述CDR-H1具有RYDMH(SEQ ID NO:102)的氨基酸序列,重链互补决定区2(CDR-H2),所述CDR-H2具有VIWGNGNTHYSALKS(SEQ ID NO:103)的氨基酸序列,和重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列,并且其中所述VL包含:轻链

互补决定区1(CDR-L1),所述CDR-L1具有KSSQSLVASDENTYLN(SEQ ID NO:10)的氨基酸序列,轻链互补决定区2(CDR-L2),所述CDR-L2具有QVSKLDS(SEQ ID NO:11)的氨基酸序列,和轻链互补决定区3(CDR-L3),所述CDR-L3具有LQGIHLPWT(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列。

[0055] 在一些方面,所述scFv的所述VH包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0056] 在一些方面,所述scFv的所述VH包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0057] 在一些方面,所述scFv的所述VL包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0058] 在一些方面,所述scFv的所述VL包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0059] 本文还提供了一种对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性的单链可变片段(scFV),其中所述抗原结合结构域包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,并且其中所述VH包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0060] 在一些方面,所述scFv的所述VH区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0061] 在一些方面,所述scFv的所述VL区包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0062] 在一些方面,所述scFv的所述VL区包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0063] 本文还提供了一种单链可变片段(scFV),所述scFV包含对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域包含抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,并且其中所述VL包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0064] 在一些方面,所述scFv的所述VH区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0065] 本文还提供了一种单链可变片段(scFV),所述scFV包含对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域与参考抗体或其抗原结合片段竞争与EMCN的结合,其中所述参考抗体或其抗原结合片段包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VH包含:重链互补决定区1(CDR-H1),所述CDR-H1具有GFSLSR(Y)(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列,重链互补决定区2(CDR-H2),所述CDR-H2具有WGNGN(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列,和重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列,并且其中所述VL包含:轻链互补决定区1(CDR-L1),所述CDR-L1具有KSSQSLVASDENTYLN(SEQ ID NO:10)的氨基酸序列,轻链互补决定区2(CDR-L2),所述CDR-L2具有QVSKLDS(SEQ ID NO:11)的氨基酸序列,和轻链互补决定区3(CDR-L3),所述CDR-L3具有LQGIHLPWT(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列,其中参考抗体的所述CDR-H1、所述CDR-H2、所述CDR-H3、所述CDR-L1、所述CDR-L2和所述CDR-L3的氨基酸序列基于Chothia注释和编号方案来定义。

[0066] 本文还提供了一种单链可变片段(scFV),所述scFV包含对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域结合与参考抗体或其抗原结合片段基

本上相同的EMCN表位,其中所述参考抗体或其抗原结合片段包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VH包含:重链互补决定区1(CDR-H1),所述CDR-H1具有GFSLSR(Y)(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列,重链互补决定区2(CDR-H2),所述CDR-H2具有WGNGN(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列,和重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列,并且其中所述VL包含:轻链互补决定区1(CDR-L1),所述CDR-L1具有KSSQSLVASENTYLN(SEQ ID NO:10)的氨基酸序列,轻链互补决定区2(CDR-L2),所述CDR-L2具有QVSKLDS(SEQ ID NO:11)的氨基酸序列,和轻链互补决定区3(CDR-L3),所述CDR-L3具有LQGIHLPWT(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列,其中参考抗体的所述CDR-H1、所述CDR-H2、所述CDR-H3、所述CDR-L1、所述CDR-L2和所述CDR-L3的氨基酸序列基于Chothia注释和编号方案来定义。

[0067] 在一些方面,如上文所述的scFv包含选自SEQ ID NO:17-22组成的组的氨基酸序列。

[0068] 本文还提供了一种单链可变片段(scFV),所述scFV包含对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域结合与参考抗体或其抗原结合片段所结合的EMCN表位相同的人EMCN的表位,其中所述参考抗体或其抗原结合片段包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VH包含:重链互补决定区1(CDR-H1),所述CDR-H1具有GFSLSR(Y)(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列,重链互补决定区2(CDR-H2),所述CDR-H2具有WGNGN(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列,和重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列,并且其中所述VL包含:轻链互补决定区1(CDR-L1),所述CDR-L1具有KSSQSLVASENTYLN(SEQ ID NO:10)的氨基酸序列,轻链互补决定区2(CDR-L2),所述CDR-L2具有QVSKLDS(SEQ ID NO:11)的氨基酸序列,和轻链互补决定区3(CDR-L3),所述CDR-L3具有LQGIHLPWT(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列,其中参考抗体的所述CDR-H1、所述CDR-H2、所述CDR-H3、所述CDR-L1、所述CDR-L2和所述CDR-L3的氨基酸序列基于Chothia注释和编号方案来定义。

[0069] 在一些方面,所述参考抗体或其抗原结合片段的所述VH区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0070] 在一些方面,所述参考抗体或其抗原结合片段的所述VL区包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0071] 本文还提供了一种组合物,所述组合物包含本文提供的嵌合蛋白或scFv中的任一种以及药学上可接受的载剂、药学上可接受的赋形剂或者它们的组合。

[0072] 本文还提供了一种经工程化的核酸,所述经工程化的核酸编码本文提供的嵌合蛋白或scFv中的任一种。本文还提供了一种表达载体,所述表达载体包含本文提供的经工程化的核酸中的任一种。

[0073] 本文还提供了一种组合物,所述组合物包含本文提供的经工程化的核酸中的任一种或本文提供的表达载体中的任一种以及药学上可接受的载剂、药学上可接受的赋形剂或者它们的组合。

[0074] 本文还提供了一种制备经工程化的细胞的方法,所述方法包括用本文提供的经工程化的核酸中的任一种或本文提供的表达载体中的任一种转导分离的细胞。

[0075] 本文还提供了一种经工程化的细胞,所述经工程化的细胞通过本文提供的方法中

的任一种来产生。

[0076] 本文还提供了一种分离的细胞,所述分离的细胞包含本文提供的经工程化的核酸中的任一种、本文提供的表达载体中的任一种或者本文提供的组合物中的任一种。

[0077] 本文还提供了一种经工程化的细胞群,所述经工程化的细胞群表达本文提供的经工程化的核酸中的任一种、本文提供的表达载体中的任一种。

[0078] 本文还提供了一种分离的细胞或细胞群,所述分离的细胞或细胞群包含本文提供的嵌合蛋白或scFv中的任一种。

[0079] 本文还提供了一种经工程化的细胞群,所述经工程化的细胞群表达本文提供的嵌合蛋白中的任一种。在一些方面,所述嵌合蛋白是重组表达的。在一些方面,所述嵌合蛋白从载体或所述细胞的基因组的选定基因座表达。在一些方面,所述细胞或细胞群还包含在所述细胞表面上表达的一种或多种肿瘤靶向性嵌合受体。在一些方面,所述一种或多种肿瘤靶向性嵌合受体中的每种是嵌合抗原受体(CAR)或经工程化的T细胞受体。在一些方面,所述细胞或细胞群选自自由以下各项组成的组:T细胞、CD8+T细胞、CD4+T细胞、 $\gamma$ - $\delta$ T细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、调节性T细胞、病毒特异性T细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、自然杀伤(NK)细胞、B细胞、肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)、先天淋巴样细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性细胞、中性粒细胞、骨髓细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突细胞、红细胞、血小板细胞、人胚胎干细胞(ESC)、ESC源性细胞、多能干细胞、间充质基质细胞(MSC)、诱导性多能干细胞(iPSC)和iPSC源性细胞。在一些方面,所述细胞是自体的。在一些方面,所述细胞是同种异体的。

[0080] 本文还提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含有效量的本文提供的细胞或经工程化的细胞群中的任一种以及药学上可接受的载剂、药学上可接受的赋形剂或者它们的组合。

[0081] 本文还提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含有效量的表达本文提供的嵌合蛋白中的任一种的经遗传修饰的细胞以及药学上可接受的载剂、药学上可接受的赋形剂或者它们的组合。在一些方面,所述药物组合物用于治疗 and/或预防肿瘤。

[0082] 本文还提供了一种治疗有需要的受试者的方法,所述方法包括施用治疗有效剂量的本文提供的组合物中的任一种或本文提供的细胞中的任一种。

[0083] 本文还提供了一种在受试者中刺激针对肿瘤细胞的细胞介导的免疫反应的方法,所述方法包括将治疗有效剂量的本文提供的组合物中的任一种或本文提供的细胞中的任一种施用于患有肿瘤的受试者。

[0084] 本文还提供了一种治疗患有肿瘤的受试者的方法,所述方法包括施用治疗有效剂量的本文提供的组合物中的任一种或本文提供的细胞中的任一种。

[0085] 在一些方面,所述方法包括施用包含表达如本文所述的抑制物的免疫健全细胞或细胞群的组合物,并且所述细胞或细胞群还表达一种或多种肿瘤靶向性嵌合受体。在一些方面,与施用等同组合物的方法相比,所述方法使脱靶效应减少,所述等同组合物包含含有所述一种或多种肿瘤靶向性嵌合受体但缺乏所述抑制性CAR的细胞或细胞群。

[0086] 本文还提供了一种用于治疗 and/或预防肿瘤的试剂盒,所述试剂盒包括本文提供的嵌合蛋白中的任一种。在一些方面,所述试剂盒还包括使用所述嵌合蛋白来产生用于治疗 and/或预防受试者的肿瘤一种或多种抗原特异性细胞的书面说明。

[0087] 本文还提供了一种用于治疗 and/或预防肿瘤的试剂盒,所述试剂盒包括本文提供的细胞或细胞群中的任一种。在一些方面,所述试剂盒还包含使用所述细胞来治疗和/或预防受试者的肿瘤的书面说明。

[0088] 本文还提供了一种用于治疗 and/或预防肿瘤的试剂盒,所述试剂盒包括本文提供的分离的核酸中的任一种。在一些方面,所述试剂盒还包括使用所述核酸来产生用于治疗 and/或预防受试者的肿瘤一种或多种抗原特异性细胞的书面说明。

[0089] 本文还提供了一种用于治疗 and/或预防肿瘤的试剂盒,所述试剂盒包括本文提供的载体中的任一种。在一些方面,所述试剂盒还包括使用所述载体来产生用于治疗 and/或预防受试者的肿瘤一种或多种抗原特异性细胞的书面说明。

[0090] 本文还提供了一种用于治疗 and/或预防肿瘤的试剂盒,所述试剂盒包括本文提供的组合物中的任一种。在一些方面,所述试剂盒还包含使用所述组合物来治疗和/或预防受试者的肿瘤的书面说明。

## 附图说明

[0091] 专利或申请文件含有至少一幅彩图。带有彩图的本专利或专利申请公布的副本将应请求和支付必要费用后由专利局提供。

[0092] 参考以下描述和附图将更好地理解本公开的这些和其他特征、方面和优点。

[0093] 图1. 使用Chothia命名方案的抗体-1 (Ab1) 的轻链可变区的测序结果。

[0094] 图2. 使用Chothia命名方案的抗体-1 (Ab1) 的重链可变区的测序结果。

[0095] 图3A. 建立EMCN表达基线的门控策略。

[0096] 图3B. 未进行病毒转导的对照细胞系,显示基线EMCN表达。

[0097] 图3C. 在转导后第3天,经转导的细胞系显示EMCN表达。

[0098] 图4A. 在使用1 $\mu$ g/mL嘌呤霉素进行21天药物选择后,经转导的细胞系在转导后第24天显示EMCN表达。

[0099] 图4B. 在使用0.5 $\mu$ g/mL嘌呤霉素进行21天药物选择后,经转导的细胞系在转导后第24天显示EMCN表达。

[0100] 图5. 为了对经工程化为表达EMCN的细胞进行分析而建立EMCN表达基线的门控策略。

[0101] 图6A. 建立CAR表达基线的门控策略使用未进行病毒转导的对照来建立。

[0102] 图6B. 针对CAR构建体SB00819、SB01052、SB02405和SB02406的经转导的细胞的CAR表达。

[0103] 图6C. 针对CAR构建体SB02407、SB02408、SB02409和SB02410的经转导的细胞的CAR表达。

[0104] 图7A. 在FLT3特异性或CD33特异性CAR T细胞与亲本Mo1m13(上图)或SEM(下图)共温育后的杀伤百分比(归一化为未进行病毒转导的T细胞对照)。

[0105] 图7B. 在FLT3特异性或CD33特异性CAR T细胞与经工程化为表达EMCN的Mo1m13(上图)或SEM(下图)靶细胞共温育后的杀伤百分比(归一化为未进行病毒转导的T细胞对照)。

[0106] 图8显示了在通过流式细胞术评估的NK细胞转导后,抗FLT3 aCAR和具有抗EMCN结合结构域的各种iCAR形式的表达谱(包括共表达)。每个条件1至3个生物学重复(以单独的

点表示)。

[0107] 图9显示了NK细胞介导的杀伤(上图)和细胞因子分泌(下图)。图中显示了经工程化为共表达抗FLT3 aCAR和指定的抗EMCN iCAR的各种NK细胞。“单独”=单独呈递的每种类型的SEM细胞(左上图)。“混合”=在同一培养物中混合在一起的两种类型的SEM细胞(右上图)。每个条件1至3个生物学重复(以单独的点表示)。每次测量3个技术复制,X和Y SEM在相关位置绘制。KLRG1在其iCAR保护为负的位置处不显示。

[0108] 图10显示了与表达各种嵌合抗原受体的NK细胞共培养的造血干细胞和祖细胞(HSPC)的杀伤百分比。

### 具体实施方式

[0109] 除非另外指明,否则本公开的实践将采用本领域的技术范围内的分子生物学、化学、生物化学、病毒学和免疫学的常规方法。这些技术在文献中有充分解释。参见,例如,Hepatitis C Viruses:Genomes and Molecular Biology(S.L.Tan编,Taylor&Francis,2006);Fundamental Virology,第3<sup>版</sup>,第I和II卷(B.N.Fields和D.M.Knipe编);Handbook of Experimental Immunology,第I-IV卷(D.M.Weir和C.C.Blackwell编,Blackwell Scientific Publications);A.L.Lehninger,Biochemistry(Worth Publishers,Inc.,最新增补卷);Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第3<sup>版</sup>,2001);Methods In Enzymology(S.Colowick和N.Kaplan编,Academic Press,Inc.)。

[0110] 定义

[0111] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术术语、符号和其他科学术语旨在具有本领域的技术人员通常理解的含义。在一些情况下,为了清楚和/或便于参考起见,本文定义了具有通常理解的含义的术语,并且在本文中囊括这些定义不一定被解释为表示与本领域通常理解的不同。本文描述或引用的技术和程序通常是本领域的技术人员充分理解以及使用常规方法而普遍采用的,例如,Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual第4版(2012)Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY中描述的广泛采用的分子克隆方法。视情况而定,除非另外说明,否则涉及使用商购获得的试剂盒和试剂的程序通常根据制造商确定的方案和条件来进行。

[0112] 如本文所用,除非上下文另外明确指明,否则单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数指代物。除非另外特别指明,否则术语“包括”、“诸如”等等旨在表达不受限制的包括。

[0113] 如本文所用,除非另外特别指明,否则术语“包含”还特别包括实施方案“由.....组成”和“基本上由.....组成”。

[0114] 术语“约”表示和涵盖指定值以及大于和小于该值的范围。在某些实施方案中,术语“约”表示指定值 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 或 $\pm 1\%$ 。在某些实施方案中,在适用的情况下,术语“约”表示指定值 $\pm$ 该值的一个标准偏差。

[0115] 如本文所用,术语“刺激细胞介导的免疫反应”或“刺激免疫反应”是指产生由一种或多种细胞类型或细胞群引起的免疫反应的信号。免疫刺激性活性可以包括促炎性活性。在多个实施方案中,免疫反应发生在免疫细胞(例如,T细胞或NK细胞)活化之后或者通过受体以及它们相应的配体伴随介导,所述受体包括但不限于CD28、CD137(4-1BB)、OX40、CD40

和ICOS,所述配体包括B7-1、B7-2、OX-40L和4-1BBL。此类多肽可以存在于肿瘤微环境中,并且可以活化对赘生物细胞的免疫反应。在多个实施方案中,促进、刺激或者激动促炎性多肽和/或它们的配体可以增强免疫反应性细胞的免疫反应。不受特定理论的束缚,接收多个刺激性信号(例如,共刺激)对于建立强效而长期的细胞介导的免疫反应(诸如T细胞介导的免疫反应)是重要的,就T细胞介导的免疫反应而言,在不存在共刺激性信号的情况下,T细胞可以受到抑制并且对抗原无反应(也称为“T细胞无反应性”)。虽然各种共刺激信号,尤其是相互组合的影响,可以有所不同,并且仍然只得到部分理解,但是共刺激通常引起基因表达增加,从而产生长期、增殖性和凋亡耐受性细胞,诸如T细胞或NK细胞,这些细胞对抗原产生强烈反应,例如在考虑表达同源抗原的靶细胞的完全和/或持续根除方面。

[0116] 如本文所用,术语“嵌合抗原受体”或者“CAR”是指重组多肽构建体,它包含至少胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和胞质信号传导结构域(在本文中也称为“胞内信号传导结构域”)(包含功能性信号传导结构域)。

[0117] 如本文所用,术语“活化性CAR”或“aCAR”是指能够在活化性的表达CAR的细胞中诱导信号转导或蛋白质表达的变化的CAR构建体/构造物,所述构建体/构造物在结合至同源aCAR配体时引发、活化、刺激或增加免疫反应。

[0118] 如本文所用,术语“抑制性CAR”或“iCAR”是指能够在抑制性的表达CAR的细胞中诱导信号转导或蛋白质表达的变化的CAR构建体/构造物,所述CAR构建体/构造物在结合至同源iCAR配体时预防、减弱、抑制、降低、减少、阻碍或压制免疫反应,诸如减少接受或已经接受一种或多种刺激性信号(包括共刺激性信号)的免疫反应性细胞的活化。

[0119] 如本文所用,术语“胞内信号传导结构域”是指通过在细胞内传递信息而发挥作用以经由确定的信号传导途径来调节细胞活性的蛋白质的功能部分,所述调节细胞活性通过产生第二信使或通过对此类信使产生反应而充当效应子来进行。

[0120] 如本文所用,术语“胞外抗原结合结构域”或“抗原结合结构域”(ABD)是指特异性识别或结合至给定抗原或表位的多肽序列或多肽复合物,诸如提供EMCN特异性结合的本文所述的嵌合蛋白的多肽序列或多肽复合物部分。ABD(或抗体、抗原结合片段和/或包含它们的嵌合蛋白)被称为“识别”ABD特异性结合的表位(或更一般而言,抗原),并且表位被称为是ABD的“识别特异性”或“结合特异性”。ABD被称为以特定的亲和力结合至其特定抗原或表位。如本文所述,“亲和力”是指一个分子与另一个分子之间的非共价分子间力的相互作用的强度。亲和力,即相互作用的强度,可以表示为解离平衡常数(KD),其中KD值较小指分子间的相互作用越强。抗体构建体的KD值通过本领域熟知的方法来测量,所述方法包括但不限于生物层干涉测量法(例如Octet/FORTEBIO®)、表面等离子共振(SPR)技术(例如Biacore®)和细胞结合测定法(例如,流式细胞术)。通过亲和力评估的特异性结合可以指在ABD与其同源抗原或表位之间具有亲和力的结合分子,其中KD值小于 $10^{-6}$ M、 $10^{-7}$ M、 $10^{-8}$ M、 $10^{-9}$ M或 $10^{-10}$ M。特异性结合可以另外包括识别和结合所关注的生物分子(例如,多肽)而不特异性识别和结合样品(例如,天然包含本公开的多肽的生物样品)中的其他分子。在某些实施方案中,特异性结合是指ABD、抗体或抗原结合片段与表位或抗原或抗原决定簇之间的结合,结合方式使得结合可以与相同或相似的表位、抗原或抗原决定簇的第二制备物置换或竞争。

[0121] ABD可以是抗体。如本文所用,术语“抗体”是指来源于与抗原特异性结合的免疫球

蛋白分子的蛋白质或多肽序列。抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体、多链抗体或单链抗体或完整免疫球蛋白,并且可以来源于天然来源或重组来源。抗体可以是免疫球蛋白分子的四聚体。

[0122] ABD可以是抗体的抗原结合片段。如本文所用,术语“抗原结合片段”是指完整抗体或其重组变体的至少一部分,该部分足以赋予抗原结合片段与靶标(诸如抗原或表位)的识别和特异性结合。抗原结合片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、scFv、线性抗体、单结构域抗体(诸如sdAb(VL或VH)、骆驼科动物VHH结构域)和由抗原结合片段(诸如包含在铰链区处通过二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段)形成的多特异性抗体以及抗体的分离的CDR或其他表位结合片段。抗原结合片段也可以并入单结构域抗体、大抗体、微抗体、纳米抗体、内抗体、双价抗体、三价抗体、四价抗体、v-NAR和双-scFv中(参见,例如,Hollinger和Hudson,Nature Biotechnology 23:1126-1 136,2005)。抗原结合片段也可以接枝到基于多肽(诸如纤连蛋白III型(Fn3))的支架中(参见美国专利6,703,199,该专利描述了纤连蛋白多肽微抗体)。

[0123] 结合分子(诸如本文所述的嵌合蛋白)中的ABD的数量限定了结合分子的“效价”。具有单个ABD的结合分子是“单价的”。具有多个ABD的结合分子被称为“多价的”。具有两个ABD的多价结合分子是“二价的”。具有三个ABD的多价结合分子是“三价的”。具有四个ABD的多价结合分子是“四价的”。在多个多价实施方案中,多个ABD中的全部都具有相同的识别特异性并且可以被称为“单特异性多价”结合分子。在其他多价实施方案中,多个ABD中的至少两个具有不同的识别特异性。此类结合分子是多价的和“多特异性的”。在ABD共同具有两种识别特异性的多价实施方案中,结合分子是“双特异性的”。在ABD共同具有三种识别特异性的多价实施方案中,结合分子是“三特异性的”。在ABD共同具有针对相同的抗原上存在的不同的表位的多种识别特异性的多价实施方案中,结合分子是“多互补位的”。ABD共同识别相同的抗原上的两个表位的多价实施方案是“双互补位的”。

[0124] 在多个多价实施方案中,结合分子的多价改善了结合分子针对特定靶标的亲合力。如本文所述,“亲合力”是指两个或更多个分子(例如针对特定靶标的多价结合分子)之间的相互作用的总强度,其中亲合力是由多个ABD的亲合力提供的累积相互作用强度。亲合力可以通过与用于确定亲和力的方法相同的方法来测量,如上文所述。在某些实施方案中,结合分子针对特定靶标的亲合力使得相互作用是特异性结合相互作用,其中两个分子之间的亲合力具有小于 $10^{-6}$ M、 $10^{-7}$ M、 $10^{-8}$ M、 $10^{-9}$ M或 $10^{-10}$ M的KD值。在某些实施方案中,结合分子针对特定靶标的亲合力具有的KD值使得相互作用是特异性结合相互作用,其中单独的ABD的一种或多种亲合力不具有符合它们各自的抗原或表位对他们自身的特异性结合的KD值。在某些实施方案中,亲合力是由多个ABD针对共有特定靶标或复合物上的单独的抗原(诸如单个细胞上存在的单独的抗原)的亲合力提供的累积相互作用强度。在某些实施方案中,亲合力是由多个ABD针对共有单个抗原上的单独的表位的亲合力提供的累积相互作用强度。

[0125] 如本文所用,术语“单链可变片段”或“scFv”是指包含至少一个包含轻链的可变区的抗原结合片段和至少一个包含重链的可变区的抗原结合片段的融合蛋白,其中轻链链可变区和重链可变区通过短柔性多肽接头紧密连接,能够表达为单链多肽,并且其中scFv保持其所来源于的完整抗体的特异性。除非另外指明,否则如本文所用,scFv可以具有任意顺序的VL可变区和VH可变区,例如,关于多肽的N-末端和C-末端,scFv可以包含VL-接头-VH或

者可以包含VH-接头-VL。

[0126] 如本文所用,“可变区”是指由重组事件产生的可变序列,例如,在B细胞中的免疫球蛋白基因或T细胞中的T细胞受体(TCR)基因中的V、J和/或D区段重组之后。在免疫球蛋白基因中,可变区通常由它们所来源于的抗体链限定,例如,VH是指抗体重链的可变区,VL是指抗体轻链的可变区。选定的VH和选定的VL可以缔合在一起形成赋予抗原特异性和结合亲和力的抗原结合结构域。

[0127] 如本文所用,术语“互补决定区”或“CDR”是指赋予抗原特异性和结合亲和力的抗体可变区VH和VL内的序列。例如,通常,每个重链可变区中有三个CDR(例如,HCDR1、HCDR2和HCDR3),每个轻链可变区中有三个CDR(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。可以使用多种熟知的方案中的任一种来确定给定CDR的精确氨基酸序列边界,这些方案包括Kabat等人(1991),“Sequences of Proteins of Immunological Interest,”第5版Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(“Kabat”编号方案),Al-Lazikani等人,(1997) JMB 273,927-948(“Chothia”编号方案)或它们的组合描述的那些。在Kabat编号方案下,在一些实施方案中,重链可变结构域(VH)中的CDR氨基酸残基被编号为31-35(HCDR1)、50-65(HCDR2)和95-102(HCDR3);轻链可变结构域(VL)中的CDR氨基酸残基被编号为24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)和89-97(LCDR3)。在Chothia编号方案下,在一些实施方案中,VH中的CDR氨基酸被编号为26-32(HCDR1)、52-56(HCDR2)和95-102(HCDR3);VL中的CDR氨基酸残基被编号为26-32(LCDR1)、50-52(LCDR2)和91-96(LCDR3)。在组合Kabat和Chothia编号方案中,在一些实施方案中,CDR对应于作为Kabat CDR、Chothia CDR或它们二者的一部分的氨基酸残基。例如,在一些实施方案中,CDR对应于VH(例如,哺乳动物VH,例如,人VH)中的氨基酸残基26-35(HCDR1)、50-65(HCDR2)和95-102(HCDR3);VL(例如,哺乳动物VL,例如,人VL)中的氨基酸残基24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)和89-97(LCDR3)。在多个实施方案中,CDR是哺乳动物序列,包括但不限于小鼠、大鼠、仓鼠、兔、骆驼、驴、山羊和人序列。在一个优选的实施方案中,CDR是人序列。在多个实施方案中,CDR是天然存在的序列。

[0128] 如本文所用,术语“框架区”或“FR”是指抗体可变区VH和VL内的一般保守的序列,这些序列作为散布的CDR的支架,通常在FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4布置方式(从N-末端到C-末端)中。在多个实施方案中,FR是哺乳动物序列,包括但不限于小鼠、大鼠、仓鼠、兔、骆驼、驴、山羊和人序列。在具体实施方案中,FR是人序列。在多个实施方案中,FR是天然存在的序列。在多个实施方案中,FR是合成序列,包括但不限于合理设计的序列。

[0129] 如本文所用,术语“抗体重链”是指以天然存在的构象存在于抗体分子中的两种类型的多肽链中的较大者,并且通常决定抗体所属的类别。

[0130] 如本文所用,术语“抗体轻链”是指以天然存在的构象存在于抗体分子中的两种类型的多肽链中的较小者。Kappa( $\kappa$ )和lambda( $\lambda$ )轻链是指两种主要的抗体轻链同种型。

[0131] 如本文所用,术语“重组抗体”是指使用重组DNA技术产生的抗体,例如,由噬菌体或酵母表达系统表达的抗体。该术语还应被解释为意指已经通过编码抗体的DNA分子的合成产生的抗体,并且所述DNA分子表达抗体蛋白,或指定抗体的氨基酸序列,其中所述DNA或氨基酸序列已经使用本领域可用和熟知的重组DNA或氨基酸序列技术获得。

[0132] 如本文所用,术语“抗原”或“Ag”是指引发免疫反应的分子。这种免疫反应可以涉及抗体产生,或特定免疫健全细胞的活化,或二者兼有。技术人员将理解任何大分子(包括

几乎所有蛋白质或肽)都可以作为抗原。

[0133] 如本文所用,术语“抗肿瘤作用”或“抗肿瘤活性”是指可以通过多种方式表现的生物学作用,所述方式包括但不限于例如肿瘤体积减小、肿瘤细胞数量减少、转移数量减少、预期寿命增加、肿瘤细胞增殖减少、肿瘤细胞存活率降低或与癌性病症相关的多种生理症状的改善。“抗肿瘤作用”也可以通过本公开的肽、多核苷酸、细胞和抗体在首先预防肿瘤的发生方面(诸如在预防性疗法或治疗方面)的能力来表现。

[0134] 如本文所用,术语“自体”是指来源于同一受试者的任何材料,该材料随后被再次引入该受试者中。

[0135] 如本文所用,术语“同种异体”是指来源于与受试者相同物种的不同动物的任何材料,该材料被引入该受试者中。当一个或多个基因座处的基因不不同时,两个或更多个受试者被称为彼此同种异体。在一些实施方案中,来自相同物种的个体的同种异体材料在遗传上不同程度(例如,在特定基因,诸如MHC等位基因处)可以足以进行抗原相互作用。在一些实施方案中,来自相同物种的个体的同种异体材料在遗传上相似程度(例如,在特定基因,诸如MHC等位基因处)可以足以不能进行抗原相互作用。

[0136] 本公开的分离的核酸分子包括编码本公开的多肽或其片段的任何核酸分子。此类核酸分子不需要与内源性核酸序列100%同源或相同,但是通常将表现出基本同一性。与内源性序列具有“基本同一性”或“基本同源性”的核酸通常能够与双链核酸分子的至少一条链杂交。如本文所用,“杂交”是指在各种严格性条件下配对以在互补多核苷酸序列(例如,本文所述的基因)或它们的部分之间形成双链分子。例如,严格盐浓度可以是小于约750mM NaCl和75mM柠檬酸三钠、小于约500mM NaCl和50mM柠檬酸三钠、或小于约250mM NaCl和25mM柠檬酸三钠。低严格性杂交可以在不存在有机溶剂(例如,甲酰胺)的情况下获得,而高严格性杂交可以在存在至少约35%甲酰胺或至少约50%甲酰胺的情况下获得。严格温度条件通常将包括至少约30℃、至少约37℃或至少约42℃的温度。不同的其他参数,诸如杂交时间、洗涤剂(例如,十二烷基硫酸钠(SDS))的浓度以及运载体DNA的包含或排除,是本领域的技术人员熟知的。不同水平的严格性可以通过根据需要组合这些不同的条件来实现。

[0137] 所谓“基本上相同”或“基本上同源”意指多肽或核酸分子表现出与参考氨基酸序列(例如,本文所述的氨基酸序列中的任一者)或核酸序列(例如,本文所述的核酸序列中的任一者)至少约50%同源或相同。优选地,这种序列在氨基酸水平或核酸上与用于比较的序列至少约60%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%或约100%同源或相同。序列同一性通常使用序列分析软件(例如,Genetics Computer Group,University of Wisconsin Biotechnology Center,1710University Avenue,Madison,Wis.53705的序列分析软件包、BLAST、BESTFIT、GAP或PILEUP/PRETTYBOX程序)来测量。这种软件通过将同源性程度分配给各种置换、缺失和/或其他修饰来匹配相同或相似的序列。保守置换通常包括以下组内的置换:甘氨酸、丙氨酸;缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸;天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺;丝氨酸、苏氨酸;赖氨酸、精氨酸;和苯丙氨酸、酪氨酸。在确定同一性程度的示例性方法中,可以使用BLAST程序,其中e-3和e-100之间的概率分数表示密切相关的序列。

[0138] 如本文所用,术语“编码”是指多核苷酸(诸如基因、cDNA或mRNA)中的特定核苷酸序列作为生物学过程中的其他聚合物和大分子合成的模板的固有性质,所述聚合物和大分子具有确定的核苷酸序列(例如,rRNA、tRNA和mRNA)或确定的氨基酸序列中的任一者以及

由此产生的生物学性质。因此,如果对应于基因的rRNA的转录和翻译在细胞或其他生物系统中产生蛋白质,则基因、cDNA或RNA编码蛋白质。编码链(它的核苷酸序列与mRNA序列相同,并且通常提供于序列表中)和非编码链(用作基因或cDNA转录的模板)二者均可以被称为编码基因或cDNA的蛋白质或其他产物。除非另外指明,否则“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括为彼此简并形式且编码相同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,在这个意义上,编码蛋白质的核苷酸序列可以在一些形式中含有内含子。

[0139] 如本文所用,术语“配体”是指结合至受体的分子。具体而言,配体结合另一个细胞上的受体,允许细胞间识别和/或相互作用。

[0140] 术语“有效量”和“治疗有效量”在本文中可互换使用,并且是指有效实现特定生物学结果的如本文所述的化合物、制剂、材料或组合物的量。在一些实施方案中,“有效量”或“治疗有效量”是足以阻止、改善或抑制所关注的疾病或障碍(例如,骨髓疾病)的持续增殖、生长或转移的量。

[0141] 如本文所用,术语“免疫反应性细胞”是指在免疫反应(例如,免疫效应子反应)中发挥功能的细胞或者其祖细胞或子代。免疫效应子细胞的实例包括但不限于 $\alpha/\beta$ T细胞、 $\gamma/\delta$ T细胞、B细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、肥大细胞和骨髓源性吞噬细胞。

[0142] 如本文所用,术语“免疫效应子反应”或“免疫效应子功能”是指例如增强或促进靶细胞的免疫攻击的免疫反应性细胞的功能或反应。例如,免疫效应子功能或反应可以指促进靶细胞的杀伤或者生长或增殖抑制的T细胞或NK细胞的性质。就T细胞而言,初级刺激和共刺激是免疫效应子功能或反应的实例。

[0143] 如本文所用,术语“柔性多肽接头”或“接头”是指由氨基酸(诸如甘氨酸和/或丝氨酸残基)组成的肽接头,所述肽接头单独或组合使用,将可变重链区和可变轻链区连接在一起。在一个实施方案中,柔性多肽接头是Gly/Ser接头,并且包含氨基酸序列(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>n</sub>或(Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>n</sub>,其中n为等于或大于1的正整数。例如,n=1,n=2,n=3,n=4,n=5,n=6,n=7,n=8,n=9或n=10。在一些实施方案中,柔性多肽接头包括但不限于Gly<sub>4</sub>Ser或(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>。在其他实施方案中,接头包括(Gly<sub>2</sub>Ser)、(GlySer)或(Gly<sub>3</sub>Ser)的多个重复单元。在一些实施方案中,柔性多肽接头包括Whitlow接头(例如,GSTSGSGKPGSGEGSTKG[SEQ ID NO:38])。例如W02012/138475中描述的接头也包括在本公开的范围之内。

[0144] 如本文所用,术语“治疗(treat、treatment和treating)”是指由一种或多种疗法(例如,本公开的一种或多种治疗剂诸如CAR)的施用引起的增殖性疾病(例如,癌症)的进展、严重性和/或持续时间的减少或改善,或者增殖性病征的一种或多种症状(优选地,一种或多种可辨别的症状)的改善。在一些实施方案中,减少或改善是指增殖性疾病的至少一个可测量的物理参数的改善,所述参数诸如肿瘤的生长,不一定是患者可辨别的。在其他实施方案中,术语“治疗(treat、treatment和treating)”是指在物理上(通过例如可辨别的症状的稳定)或在生理上(通过例如物理参数的稳定)对增殖性疾病的进展进行抑制,或二者兼有。在一些实施方案中,减少或改善包括肿瘤大小或癌性细胞计数的减少或稳定。

[0145] 如本文所用,术语“受试者”旨在包括这样的活生物体(例如,哺乳动物、人),其中可以在该活生物体中引发免疫反应。

[0146] 本公开的其他方面在以下部分中有所描述并且在要求保护的本发明的范围内。

[0147] 其他解释惯例

[0148] 本文所述的范围应理解为该范围内的所有值的简写,包括所述端点在内。例如,1至50的范围应理解为包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49和50的任何数字、数字的组合或子范围。

[0149] 除非另外指明,否则提及具有一个或多个立体中心的化合物意指其每种立体异构体以及立体异构体的所有组合。

[0150] 内皮粘蛋白特异性嵌合蛋白和抗原结合结构域

[0151] 本公开提供了结合至内皮粘蛋白(EMCN)的抗原结合结构域(例如,单链可变片段)、包含结合至EMCN的抗原结合结构域的嵌合蛋白以及编码此类抗原结合结构域和嵌合蛋白的核酸。不希望受理论的束缚,EMCN是唾液酸糖蛋白,它干扰粘着斑复合物的组装并且抑制细胞与胞外基质之间的相互作用。在一些实施方案中,EMCN特异性嵌合蛋白结合至人EMCN(例如,Uniprot Q9ULC0,该序列以引用的方式并入本文用于所有目的)或其表位片段。EMCN可以在造血干细胞和祖细胞(HSPC)上表达。EMCN可以在通常被认为是健康的细胞(诸如健康的HSPC)上表达。EMCN特异性抗体此前已有所描述,所述抗体包括CBFYE-0213、V.7.C7.1、L4B1、L5F12、L10B5、L3F12、L6H3、L6H10(在本文中也称为Ab1)、L9H8和L10F12,如J.Path.,2002年5月,160(5):1669-1681中所述,该文献以引用的方式并入本文用于所有目的。

[0152] 本公开提供了一种EMCN特异性抗原结合结构域,所述结构域具有表A中列出的氨基酸序列中的一者或多者。

[0153] 在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VH包含重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列。在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VH包含重链互补决定区1(CDR-H1)、重链互补决定区2(CDR-H2)和重链互补决定区3(CDR-H3),其中所述CDR-H1、所述CDR-H2和所述CDR-H3的氨基酸序列包含在SEQ ID NO:1的所述VH区氨基酸序列内。在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VH包含重链互补决定区1(CDR-H1),所述CDR-H1具有GFSLSR(Y)(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列,重链互补决定区2(CDR-H2),所述CDR-H2具有WGNGN(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列,和重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列。在一些实施方案中,具有上述VH序列的EMCN特异性抗原结合结构域可以具有轻链互补决定区1(CDR-L1)、轻链互补决定区2(CDR-L2)和轻链互补决定区3(CDR-L3),其中所述CDR-L1、所述CDR-L2和所述CDR-L3的氨基酸序列包含在SEQ ID NO:9的所述VL区氨基酸序列内。在一些实施方案中,具有上述VH序列的EMCN特异性抗原结合结构域可以具有重链互补决定区1(CDR-L1),所述CDR-L1具有KSSQSLVASENTYLN(SEQ ID NO:10)的氨基酸序列,重链互补决定区2(CDR-L2),所述CDR-L2具有QVSKLDS(SEQ ID NO:11)的氨基酸序列,和重链互补决定区3(CDR-L3),所述CDR-L3具有LQGIHLPWT(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列。

[0154] 在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有重链可变(VH)区和轻链可变

(VL)区,其中所述VL包含轻链互补决定区1(CDR-L1)、轻链互补决定区2(CDR-L2)和轻链互补决定区3(CDR-L3),其中所述CDR-L1、所述CDR-L2和所述CDR-L3的氨基酸序列包含在SEQ ID NO:9的所述VL区氨基酸序列内。在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VL包含轻链互补决定区1(CDR-L1),所述CDR-L1具有KSSQSLVASDENTYLN(SEQ ID NO:10)的氨基酸序列,轻链互补决定区2(CDR-L2),所述CDR-L2具有QVSKLDS(SEQ ID NO:11)的氨基酸序列,和轻链互补决定区3(CDR-L3),所述CDR-L3具有LQGIHLPWT(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列。在一些实施方案中,具有上述VL序列的EMCN特异性抗原结合结构域可以具有重链互补决定区1(CDR-H1)、重链互补决定区2(CDR-H2)、和重链互补决定区3(CDR-H3),其中所述CDR-H1、所述CDR-H2和所述CDR-H3的氨基酸序列包含在SEQ ID NO:1的所述VH区氨基酸序列内。在一些实施方案中,具有上述VL序列的EMCN特异性抗原结合结构域可以具有重链互补决定区1(CDR-H1),所述CDR-H1具有GFSLSRYS(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列,重链互补决定区2(CDR-H2),所述CDR-H2具有WGNGN(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列,和重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列。

[0155] 在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中:(1)所述VH包含重链互补决定区1(CDR-H1),所述CDR-H1具有GFSLSRYS(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列,重链互补决定区2(CDR-H2),所述CDR-H2具有WGNGN(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列,和重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列,并且(2)所述VL包含轻链互补决定区1(CDR-L1),所述CDR-L1具有KSSQSLVASDENTYLN(SEQ ID NO:10)的氨基酸序列,轻链互补决定区2(CDR-L2),所述CDR-L2具有QVSKLDS(SEQ ID NO:11)的氨基酸序列,和轻链互补决定区3(CDR-L3),所述CDR-L3具有LQGIHLPWT(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列。

[0156] 在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有VH区,所述VH区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有VH区,所述VH区包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0157] 在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有VL区,所述VL区包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有VL区,所述VL区包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0158] 在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有(1)VH区,所述VH区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,以及(2)VL区,所述VL区包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列,或VL区,所述VL区包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有(1)VH区,所述VH区包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列,以及(2)VL区,所述VL区包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列,或

VL区,所述VL区包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0159] 在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有(1)VL区,所述VL区包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,以及(2)VH区,所述VH区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,或VH区,所述VH区包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有VL区,所述VL区包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列,以及(2)VH区,所述VH区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,或VH区,所述VH区包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0160] 在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域与参考抗体或其抗原结合片段竞争,所述参考抗体或其抗原结合片段具有重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中:(1)所述VH包含重链互补决定区1(CDR-H1),所述CDR-H1具有GFSLSR(Y)(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列,重链互补决定区2(CDR-H2),所述CDR-H2具有WGNGN(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列,和重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列,并且(2)所述VL包含轻链互补决定区1(CDR-L1),所述CDR-L1具有KSSQSLVASDENTYLN(SEQ ID NO:10)的氨基酸序列,轻链互补决定区2(CDR-L2),所述CDR-L2具有QVSKLDS(SEQ ID NO:11)的氨基酸序列,和轻链互补决定区3(CDR-L3),所述CDR-L3具有LQGIHLPWT(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列。

[0161] 在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域结合与参考抗体或其抗原结合片段相同或基本上相同的表位(例如,不同的人EMCN表位),所述参考抗体或其抗原结合片段具有重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中:(1)所述VH包含重链互补决定区1(CDR-H1),所述CDR-H1具有GFSLSR(Y)(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列,重链互补决定区2(CDR-H2),所述CDR-H2具有WGNGN(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列,和重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列,并且(2)所述VL包含轻链互补决定区1(CDR-L1),所述CDR-L1具有KSSQSLVASDENTYLN(SEQ ID NO:10)的氨基酸序列,轻链互补决定区2(CDR-L2),所述CDR-L2具有QVSKLDS(SEQ ID NO:11)的氨基酸序列,和轻链互补决定区3(CDR-L3),所述CDR-L3具有LQGIHLPWT(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列。在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域结合与参考抗体或其抗原结合片段相同或基本上相同的表位(例如,不同的人EMCN表位),所述参考抗体或其抗原结合片段具有VH,所述VH包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域结合与参考抗体或其抗原结合片段相同或基本上相同的表位(例如,不同的人EMCN表位),所述参考抗体或其抗原结合片段具有VL,所述VL包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0162] EMCN特异性抗原结合结构域可以具有本文所述的形式中的任一者,诸如Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、scFv、线性抗体、单结构域抗体(诸如sdAb(VL或VH))、骆驼科动物VHH和多特异性形式。在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有F(ab)形式。在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有F(ab')形式。

[0163] 在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有单链可变片段(scFv)形式,

包含具有本文所述的肽接头(例如,参见表1)中的任一者的scFv形式。在一些实施方案中,EMCN特异性抗原结合结构域具有结构VH-L-VL或VL-L-VH,其中L是肽接头。本公开还提供了嵌合蛋白和编码此类嵌合蛋白的核酸,所述嵌合蛋白包含EMCN特异性抗原结合结构域,所述EMCN特异性抗原结合结构域具有表A中列出的氨基酸序列中的一者或多者。所述嵌合蛋白可以包含如上文所述的EMCN特异性抗原结合结构域中的任一者。

[0164] 嵌合抗原受体(CAR)

[0165] 本公开的某些方面涉及嵌合受体,所述嵌合受体具有本文所述的EMCN特异性抗原结合结构域中的任一者并且能够特异性结合至EMCN蛋白、EMCN源性抗原或EMCN源性表位。在一些实施方案中,嵌合受体是嵌合抗原受体(CAR)。一般而言,CAR是嵌合蛋白,包含抗原结合结构域以及与抗原结合结构域异源的多肽分子(诸如与抗原结合结构域可以来源的抗体异源的肽)。与抗原结合结构域异源的多肽分子可以包括但不限于跨膜结构域、一个或多个胞内信号传导结构域、铰链结构域、间隔区、一个或多个肽接头或它们的组合。

[0166] 在一些实施方案中,CAR是将所关注的特异性(例如,EMCN)接枝到或赋予免疫效应细胞的经工程化的受体。在某些实施方案中,CAR可以用于将抗体的特异性接枝到免疫反应性细胞(诸如T细胞)。在一些实施方案中,本公开的CAR包含与跨膜结构域融合、与一个或多个胞内信号传导结构域融合的胞外抗原结合结构域(例如,scFv)。

[0167] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体是活化性嵌合抗原受体(aCAR,除非另外指明,否则一般也称为CAR)。在一些实施方案中,嵌合抗原受体与其同源配体的结合足以诱导免疫反应性细胞的活化。在一些实施方案中,嵌合抗原受体与其同源配体的结合足以诱导免疫反应性细胞的刺激。在一些实施方案中,免疫反应性细胞的活化导致靶细胞的杀伤。在一些实施方案中,免疫反应性细胞的活化导致免疫反应性细胞表达和/或分泌细胞因子或趋化因子。在一些实施方案中,免疫反应性细胞的刺激导致免疫反应性细胞表达和/或分泌细胞因子或趋化因子。在一些实施方案中,免疫反应性细胞的刺激诱导免疫反应性细胞的增殖。在一些实施方案中,免疫反应性细胞的活化和/或刺激可以是上述反应的组合。

[0168] 本公开的CAR可以是第一代、第二代或第三代CAR。“第一代”CAR包含单个胞内信号传导结构域,该结构域通常来源于T细胞受体链。“第一代”CAR通常具有来自CD3- $\zeta$ (CD3 $\zeta$ )链的胞内信号传导结构域,该结构域是来自内源性TCR的信号的主要传递者。“第一代”CAR可以提供从头抗原识别并且使CD4<sup>+</sup>T细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞通过它们的单个融合分子中的CD3链信号传导结构域活化,而与HLA介导的抗原呈递无关。“第二代”CAR将来自各种共刺激分子(例如,CD28、4-1BB、ICOS、OX40)中的一种的第二胞内信号传导结构域添加至CAR的胞质尾区,以将另外的信号提供给T细胞。“第二代”CAR提供共刺激(例如,CD28或4-1BB)和活化(CD3 $\zeta$ )。临床前研究表明,“第二代”CAR可以改善免疫反应性细胞(诸如T细胞)的抗肿瘤活性。“第三代”CAR具有多个胞内共刺激信号传导结构域(例如,CD28和4-1BB)和胞内活化信号传导结构域(CD3 $\zeta$ )。

[0169] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体是嵌合抑制性受体(iCAR)。在一些实施方案中,一种或多种嵌合抑制性受体结合在来源于组织的非肿瘤细胞上表达的抗原,所述组织选自以下各项组成的组:脑、神经元组织、内分泌、骨、骨髓、免疫系统、内皮组织、肌肉、肺、肝、胆囊、胰腺、胃肠道、肾、膀胱、男性生殖器官、女性生殖器官、脂肪、软组织和皮肤。

[0170] 在一些实施方案中,嵌合抑制性受体(例如EMCN特异性嵌合抑制性受体)可以例如与在本公开的细胞(例如,免疫反应性细胞)上表达的一种或多种活化性嵌合受体(例如,活化性嵌合TCR或CAR)一起用作非逻辑门,该非逻辑门控制、调节或者抑制一种或多种活化性嵌合受体的一种或多种活性。例如,如果健康细胞表达被肿瘤靶向性嵌合受体识别的抗原和被嵌合抑制性受体识别的抗原二者,则表达肿瘤相关抗原的免疫反应性细胞可以结合至健康细胞。在这种情况下,抑制性嵌合抗原还将结合健康细胞上的同源配体,并且嵌合抑制性受体的抑制功能将通过肿瘤靶向性嵌合受体来降低、减少、预防或抑制免疫反应性细胞的活化(“非逻辑门控”)。在一些实施方案中,本公开的嵌合抑制性受体可以抑制本公开的细胞(例如,免疫反应性细胞)的一种或多种活性。在一些实施方案中,免疫反应性细胞可以包含一种或多种肿瘤靶向性嵌合受体以及一种或多种靶向在肿瘤上未表达或通常被认为表达的抗原(例如,EMCN)的嵌合抑制性受体。同一免疫反应性细胞中的肿瘤靶向性嵌合受体和嵌合抑制性受体的组合可以用于降低中靶非肿瘤毒性。

[0171] 在一些实施方案中,本公开的CAR的胞外抗原结合结构域以约 $2 \times 10^{-7}$ M或更小、约 $1 \times 10^{-7}$ M或更小、约 $9 \times 10^{-8}$ M或更小、约 $1 \times 10^{-8}$ M或更小、约 $9 \times 10^{-9}$ M或更小、约 $5 \times 10^{-9}$ M或更小、约 $4 \times 10^{-9}$ M或更小、约 $3 \times 10^{-9}$ M或更小、约 $2 \times 10^{-9}$ M或更小或者约 $1 \times 10^{-9}$ M或更小的解离常数( $K_d$ )结合至一种或多种抗原(例如,EMCN)。在一些实施方案中, $K_d$ 的范围是从约 $2 \times 10^{-7}$ M至约 $1 \times 10^{-9}$ M。

[0172] 本公开的CAR的胞外抗原结合结构域的结合可以通过例如酶联免疫吸附测定法(ELISA)、放射免疫测定法(RIA)、FACS分析、生物测定法(例如,生长抑制)、生物层干涉测量法(例如Octet/FORTEBIO®)、表面等离子体共振(SPR)技术(例如Biacore®)或蛋白质印迹测定法来测定。这些测定法中的每种通常通过采用对所关注的复合物具有特异性的标记试剂(例如,抗体或scFv)来检测所特别关注的蛋白质-抗体复合物的存在。例如,scFv可以被放射性标记并且用于RIA测定法。放射性同位素可以通过使用 $\gamma$ 计数器或闪烁计数器等手段或通过放射自显影法来检测。在某些实施方案中,CAR的胞外抗原结合结构域用荧光标记物来标记。荧光标记物的非限制性实例包括绿色荧光蛋白(GFP)、蓝色荧光蛋白(例如,EBFP、EBFP2、Azurite和mKalamal)、青色荧光蛋白(例如,ECFP、Cerulean和CyPet)和黄色荧光蛋白(例如,YFP、Citrine、Venus和YPet)。在某些实施方案中,CAR的胞外抗原结合结构域用对胞外抗原结合结构域具有特异性的二抗来标记,并且其中所述二抗是被标记的(例如,放射性标记或用荧光标记物来标记)。

[0173] 在一些实施方案中,本公开的CAR包含结合至EMCN(例如,EMCN蛋白、EMCN源性抗原或EMCN源性表位)的胞外抗原结合结构域、跨膜结构域以及一种或多种胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,胞外抗原结合结构域包括scFv。在一些实施方案中,胞外抗原结合结构域包括Fab片段,该Fab片段可以是交联的。在某些实施方案中,胞外结合结构域是 $F(ab)_2$ 片段。

[0174] 胞外抗原结合结构域

[0175] 本公开的CAR的胞外抗原结合结构域特异性结合至EMCN(例如,EMCN蛋白、EMCN源性抗原或EMCN源性表位)。在某些实施方案中,胞外抗原结合结构域结合至在造血干细胞上表达的EMCN。在某些实施方案中,胞外抗原结合结构域结合至在通常被认为是健康的细胞(诸如健康的HSPC)上表达的EMCN。在一些实施方案中,EMCN是人EMCN。

[0176] 本公开的抗原结合结构域可以包含结合至抗原的任何结构域,所述结构域包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、双特异性抗体、缀合抗体、人抗体、人源化抗体以及它们的功能片段,所述功能片段包括但不限于单结构域抗体(sdAb)(诸如,骆驼科动物源性纳米抗体的重链可变结构域(VH)、轻链可变结构域(VL)和可变结构域(VHH)),以及本领域已知的充当抗原结合结构域的替代性支架(诸如重组纤连蛋白结构域、T细胞受体(TCR)、具有增强的亲和力的重组TCR或者它们的片段,例如,单链TCR),等等。在一些情况下,抗原结合结构域来源于最终使用CAR的同一物种是有利的。

[0177] 在一些实施方案中,胞外抗原结合结构域包括抗体。在某些实施方案中,抗体是人抗体。在某些实施方案中,抗体是嵌合抗体。在一些实施方案中,胞外抗原结合结构域包括抗体的抗原结合片段。

[0178] 在一些实施方案中,胞外抗原结合结构域包括F(ab)片段。在某些实施方案中,胞外抗原结合结构域包括F(ab')片段。

[0179] 在一些实施方案中,胞外抗原结合结构域包括scFv。在一些实施方案中,胞外抗原结合结构域包括两个单链可变片段(scFv)。在一些实施方案中,两个scFv中的每个结合至同一抗原上的不同表位。在一些实施方案中,胞外抗原结合结构域包括第一scFv和第二scFv。在一些实施方案中,第一scFv和第二scFv结合同一抗原上的不同表位。在某些实施方案中,scFv是哺乳动物scFv。在某些实施方案中,scFv是嵌合scFv。在某些实施方案中,scFv包含重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)。

[0180] 在某些实施方案中,VH和VL由肽接头分开。在某些实施方案中,肽接头包含表1中所示的氨基酸序列中的任一者。在某些实施方案中,scFv包含结构VH-L-VL或VL-L-VH,其中VH是重链可变结构域,L是肽接头,并且VL是轻链可变结构域。在一些实施方案中,一个或多个scFv中的每个包含结构VH-L-VL或VL-L-VH,其中VH是重链可变结构域,L是肽接头,并且VL是轻链可变结构域。当有两个或更多个scFv连接在一起时,每个scFv可以通过肽连接连接至下一个scFv。在一些实施方案中,一个或多个scFv中的每个由肽接头分开。

[0181] 表1-肽接头

[0182]

接头	氨基酸序列	SEQ ID NO
(G <sub>2</sub> S) <sub>1</sub> scFv 接头	GGG	23
(G <sub>2</sub> S) <sub>2</sub> scFv 接头	GGSGGS	24
(G <sub>2</sub> S) <sub>3</sub> scFv 接头	GGSGGSGGS	25
(G <sub>2</sub> S) <sub>4</sub> scFv 接头	GGSGGSGGSGGS	26
(G <sub>2</sub> S) <sub>5</sub> scFv 接头	GGSGGSGGSGGSGGS	27
(G <sub>3</sub> S) <sub>1</sub> scFv 接头	GGGS	28
(G <sub>3</sub> S) <sub>2</sub> scFv 接头	GGGSGGGS	29
(G <sub>3</sub> S) <sub>3</sub> scFv 接头	GGGSGGGS	30
(G <sub>3</sub> S) <sub>4</sub> scFv 接头	GGGSGGGS	31
(G <sub>3</sub> S) <sub>5</sub> scFv 接头	GGGSGGGS	32
(G <sub>4</sub> S) <sub>1</sub> 接头	GGGGS	33
(G <sub>4</sub> S) <sub>2</sub> 接头	GGGGS	34

[0183]	(G <sub>4</sub> S) <sub>3</sub> 接头	GGGSGGGSGGGGS	35
	(G <sub>4</sub> S) <sub>4</sub> 接头	GGGSGGGSGGGSGGGGS	36
	(G <sub>4</sub> S) <sub>5</sub> 接头	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS	37
	Whitlow 接头	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	38
	scFv 接头 2	EAAAKEEAAKEAAKEAAK	39

[0184] 在一些实施方案中,免疫效应细胞包含第一嵌合受体和第二嵌合受体。第一嵌合受体的抗原结合结构域和第二嵌合受体的抗原结合结构域可以是本文所述的或本领域已知的适当的抗原结合结构域。例如,第一抗原结合结构域或第二抗原结合结构域可以是一个或多个抗体、抗体的抗原结合片段、F(ab)片段、F(ab')片段、单链可变片段(scFv)或单结构域抗体(sdAb)。在一些实施方案中,第一嵌合受体和/或第二嵌合受体的抗原结合结构域包括两个单链可变片段(scFv)。在一些实施方案中,两个scFv中的每个结合至同一抗原上的不同表位。在一些实施方案中,第一嵌合受体的抗原结合结构域可以对EMCN具有特异性,并且嵌合受体可以对第二不同抗原(诸如癌症抗原(例如,在骨髓细胞(诸如AML细胞)上表达的抗原))具有特异性。

[0185] 在一些实施方案中,胞外抗原结合结构域包含单结构域抗体(sdAb)。在某些实施方案中,sdAb是人源化sdAb。在某些实施方案中,sdAb是嵌合sdAb。

[0186] 在一些实施方案中,本公开的CAR可以包含两个或更多个抗原结合结构域、三个或更多个抗原结合结构域、四个或更多个抗原结合结构域、五个或更多个抗原结合结构域、六个或更多个抗原结合结构域、七个或更多个抗原结合结构域、八个或更多个抗原结合结构域、九个或更多个抗原结合结构域或者十个或更多个抗原结合结构域。在一些实施方案中,两个或更多个抗原结合结构域中的每个结合同一抗原。在一些实施方案中,两个或更多个抗原结合结构域中的每个结合同一抗原的不同表位。在一些实施方案中,两个或更多个抗原结合结构域中的每个结合不同抗原。

[0187] 在一些实施方案中,CAR包含两个抗原结合结构域。在一些实施方案中,两个抗原结合结构域通过柔性接头彼此附接。在一些实施方案中,两个抗原结合结构域中的每个可以独立地选自抗体、抗体的抗原结合片段、scFv、sdAb、重组纤连蛋白结构域、T细胞受体(TCR)、具有增强的亲和力的重组TCR和单链TCR。在一些实施方案中,包含两个抗原结合结构域的双特异性CAR或串联CAR(tanCAR)。

[0188] 在某些实施方案中,双特异性CAR或tanCAR包含含有双特异性抗体或抗体片段(例如,scFv)的抗原结合结构域。在一些实施方案中,在双特异性抗体分子的每个抗体或抗体片段(例如,scFv)内,VH可以在VL的上游或下游。在一些实施方案中,上游抗体或抗体片段(例如,scFv)与其VH(VH<sub>1</sub>)布置在一起,其VH在其VL(VL<sub>1</sub>)上游,并且下游抗体或抗体片段(例如,scFv)与其VL(VL<sub>2</sub>)布置在一起,其VL在其VH(VH<sub>2</sub>)上游,以使得整个双特异性抗体分子具有布置方式VH<sub>1</sub>-VL<sub>1</sub>-VL<sub>2</sub>-VH<sub>2</sub>。在其他实施方案中,上游抗体或抗体片段(例如,scFv)与其VL(VL<sub>1</sub>)布置在一起,其VL在其VH(VH<sub>1</sub>)上游,并且下游抗体或抗体片段(例如,scFv)与其VH(VH<sub>2</sub>)布置在一起,其VH在其VL(VL<sub>2</sub>)上游,以使得整个双特异性抗体分子具有布置方式VL<sub>1</sub>VH<sub>1</sub>-VL<sub>2</sub>-VH<sub>2</sub>。在一些实施方案中,如果构建体被布置为VH<sub>1</sub>-VL<sub>1</sub>-VL<sub>2</sub>-VH<sub>2</sub>,则接头被设置在两个抗体或抗体片段(例如,scFv)之间,例如,在VL<sub>1</sub>和VL<sub>2</sub>之间,或者如果构建体被布置为VL<sub>1</sub>-VH<sub>1</sub>-VH<sub>2</sub>-VL<sub>2</sub>,则接头被设置在VH<sub>1</sub>和VH<sub>2</sub>之间。接头可以是如本文所述的接头,例如,

(Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>n</sub>接头,其中n为1、2、3、4、5或6。通常,两个scFv之间的接头应足够长,以避免两个scFv的结构域之间的错配。在一些实施方案中,接头被设置于第一scFv的VL和VH之间。在一些实施方案中,接头被设置于第二scFv的VL和VH之间。在具有多个接头的构建体中,任何两个或更多个接头可以相同或不同。因此,在一些实施方案中,双特异性CAR或tanCAR包含VL、VH,并且可以进一步包含具有如本文所述的布置方式的一个或多个接头。

[0189] 在一些实施方案中,嵌合受体包含二价CAR。在一些实施方案中,二价CAR是EMCN二价CAR。在一些实施方案中,二价EMCN CAR包含表A中所示的抗EMCN序列中的一者或多者。在一些实施方案中,二价EMCN CAR的ABD各自包含相同的ABD。

[0190] 在一些实施方案中,嵌合受体包含双顺反子嵌合抗原受体。在一些实施方案中,双顺反子嵌合抗原受体包含EMCN CAR。在一些实施方案中,双顺反子EMCN CAR包含表A中所示的抗EMCN序列中的一者或多者。

[0191] 跨膜结构域

[0192] 在一些实施方案中,本公开的CAR的跨膜结构域(例如,本文所述的EMCN特异性CAR)包含疏水性 $\alpha$ 螺旋,该 $\alpha$ 螺旋跨越细胞膜的至少一部分。已经表明,不同的跨膜结构域可以产生不同的受体稳定性。在抗原识别后,受体聚集并且将信号传输至细胞。在一些实施方案中,本公开的CAR的跨膜结构域可以包含CD8多肽、CD28多肽、CD3- $\zeta$ 多肽、CD4多肽、4-1BB多肽、OX40多肽、ICOS多肽、CTLA-4多肽、PD-1多肽、LAG-3多肽、2B4多肽、BTLA多肽、LIR-1(LILRB1)多肽的跨膜结构域,或者可以是合成肽或其任何组合。

[0193] 在一些实施方案中,跨膜结构域来源于CD8多肽。可以使用任何合适的CD8多肽。示例性CD8多肽包括但不限于NCBI参考号NP\_001139345和AAA92533.1。在一些实施方案中,跨膜结构域来源于CD28多肽。可以使用任何合适的CD28多肽。示例性CD28多肽包括但不限于NCBI参考号NP\_006130.1和NP\_031668.3。在一些实施方案中,跨膜结构域来源于CD3- $\zeta$ 多肽。可以使用任何合适的CD3- $\zeta$ 多肽。示例性CD3- $\zeta$ 多肽包括但不限于NCBI参考号NP\_932170.1和NP\_001106862.1。在一些实施方案中,跨膜结构域来源于CD4多肽。可以使用任何合适的CD4多肽。示例性CD4多肽包括但不限于NCBI参考号NP\_000607.1和NP\_038516.1。在一些实施方案中,跨膜结构域来源于4-1BB多肽。可以使用任何合适的4-1BB多肽。示例性4-1BB多肽包括但不限于NCBI参考号NP\_001552.2和NP\_001070977.1。在一些实施方案中,跨膜结构域来源于OX40多肽。可以使用任何合适的OX40多肽。示例性OX40多肽包括但不限于NCBI参考号NP\_003318.1和NP\_035789.1。在一些实施方案中,跨膜结构域来源于ICOS多肽。可以使用任何合适的ICOS多肽。示例性ICOS多肽包括但不限于NCBI参考号NP\_036224和NP\_059508。在一些实施方案中,跨膜结构域来源于CTLA-4多肽。可以使用任何合适的CTLA-4多肽。示例性CTLA-4多肽包括但不限于NCBI参考号NP\_005205.2和NP\_033973.2。在一些实施方案中,跨膜结构域来源于PD-1多肽。可以使用任何合适的PD-1多肽。示例性PD-1多肽包括但不限于NCBI参考号NP\_005009和NP\_032824。在一些实施方案中,跨膜结构域来源于LAG-3多肽。可以使用任何合适的LAG-3多肽。示例性LAG-3多肽包括但不限于NCBI参考号NP\_002277.4和NP\_032505.1。在一些实施方案中,跨膜结构域来源于2B4多肽。可以使用任何合适的2B4多肽。示例性2B4多肽包括但不限于NCBI参考号NP\_057466.1和NP\_061199.2。在一些实施方案中,跨膜结构域来源于BTLA多肽。可以使用任何合适的BTLA多肽。示例性BTLA多肽包括但不限于NCBI参考号NP\_861445.4和NP\_001032808.2。可以使用任何合适的

LIR-1 (LILRB1) 多肽。示范性LIR-1 (LILRB1) 多肽包括但不限于NCBI参考号NP\_001075106.2和NP\_001075107.2。

[0194] 在一些实施方案中,跨膜结构域包含这样的多肽,所述多肽包含与NCBI参考号NP\_001139345、AAA92533.1、NP\_006130.1、NP\_031668.3、NP\_932170.1、NP\_001106862.1、NP\_000607.1、NP\_038516.1、NP\_001552.2、NP\_001070977.1、NP\_003318.1、NP\_035789.1、NP\_036224、NP\_059508、NP\_005205.2、NP\_033973.2、NP\_005009、NP\_032824、NP\_002277.4、NP\_032505.1、NP\_057466.1、NP\_061199.2、NP\_861445.4或NP\_001032808.2或它们的片段的序列至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同源的氨基酸序列。在一些实施方案中,同源性可以使用标准软件(诸如BLAST或FASTA)来确定。在一些实施方案中,多肽可以包含一个保守氨基酸置换、最多两个保守氨基酸置换或最多三个保守氨基酸置换。在一些实施方案中,多肽可以具有作为长度为至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90、至少100、至少110、至少120、至少130、至少140、至少150、至少160、至少170、至少180、至少190、至少200、至少210、至少220、至少230或至少240个氨基酸的NCBI参考号NP\_001139345、AAA92533.1、NP\_006130.1、NP\_031668.3、NP\_932170.1、NP\_001106862.1、NP\_000607.1、NP\_038516.1、NP\_001552.2、NP\_001070977.1、NP\_003318.1、NP\_035789.1、NP\_036224、NP\_059508、NP\_005205.2、NP\_033973.2、NP\_005009、NP\_032824、NP\_002277.4、NP\_032505.1、NP\_057466.1、NP\_061199.2、NP\_861445.4或NP\_001032808.2的连续部分的氨基酸序列。

[0195] 可以衍生出跨膜结构域的合适的多肽的其他实例包括但不限于T细胞受体的 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\zeta$ 链的跨膜区、CD27、CD3 $\epsilon$ 、CD45、CD5、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、KIRDS2、CD2、CD27、LFA-1 (CD11a、CD18)、GITR、CD40、BAFFR、HVEM (LIGHTR)、SLAMF7、NKp80 (KLRP1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD160、CD19、IL2R $\beta$ 、IL2R $\gamma$ 、IL7R $\alpha$ 、ITGA1、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、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、PAG/Cbp、NKG2D和NG2C。

[0196] 在一些实施方案中,跨膜结构域包含序列IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT (SEQ ID NO: 82)。在一些实施方案中,跨膜结构域包含序列IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHR (SEQ ID NO: 83)。在一些实施方案中,跨膜结构域包含序列IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN (SEQ ID NO: 84)。

[0197] 在一些方面,跨膜结构域还包含相同蛋白质的胞外结构域的至少一部分。

[0198] 间隔区

[0199] 在一些实施方案中,本公开的CAR (例如,本文所述的EMCN特异性CAR) 可以另外包含间隔区,该间隔区将胞外抗原结合结构域连接至跨膜结构域。间隔区的柔性可以足以允许抗原结合结构域以不同方向定向以促进抗原识别。在一些实施方案中,间隔区可以是来自人蛋白质的铰链。例如,铰链可以是人Ig (免疫球蛋白) 铰链,包括但不限于IgG4铰链、IgG2铰链、CD8a铰链或IgD铰链。在一些实施方案中,间隔区可以包含IgG4铰链、IgG2铰链、IgD铰链、CD28铰链、KIR2DS2铰链、LNGFR铰链或PDGFR- $\beta$ 胞外接头。在一些实施方案中,间隔

区定位于抗原结合结构域和跨膜结构域之间。在一些实施方案中,间隔区可以包含表2中列出的氨基酸序列中的任一者,或者与表2中列出的氨基酸序列中的任一者至少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%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码本公开的间隔区中的任一者的核酸可以包含表3中列出的核酸序列中的任一者,或者与表3中列出的核酸序列中的任一者至少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%相同的核酸序列。

[0200] 表2-间隔基氨基酸序列

氨基酸序列	SEQ NO	ID	描述
AAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP SPLFPGPSKP	40		CD28 铰链
ESKYGPPCPSCP	41		IgG4 最小铰链
ESKYGPPAPSAP	42		IgG4 最小铰链, 无二硫键
ESKYGPPCPPCP	43		IgG4 S228P 最小铰链, 增强的二硫键形成
EPKSCDKTHTCP	44		IgG1 最小铰链
AAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLA GTCGVLLLSLVITLYCNHRN	45		延伸的 CD8a 铰链
ACPTGLYTHSGECKACNLGEGVAQPCGANQ TVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTECVGLQ SMSAPCVEADDAVCRCAYGYYQDETTGRCEA CRVCEAGSLVFSCQDKQNTVCEECPDGTYS DEADAEC	46		LNGFR 铰链
ACPTGLYTHSGECKACNLGEGVAQPCGANQ TVC	47		截短的 LNGFR 铰链 (TNFR-Cys1)
AVGQDTQEIVVPHSLPFKV	48		PDGFR-β 胞外接头

[0202] 表3-间隔核酸序列

核酸序列	SEQ NO	ID	描述
GCAGCAGCTATCGAGGTGATGTATCCTCCGC CCTACCTGGATAATGAAAAGAGTAATGGGA CTATCATTGTAATAAGGGAAGCATCTTTG TCCTTCTCCCCTTTTCCCCGGTCCGTCTAAAC CT	49		CD28 铰链

核酸序列	SEQ ID NO	描述
GAAAGCAAGTACGGTCCACCTTGCCCTAGCTGTCCG	50	IgG4 最小铰链
GAATCCAAGTACGGCCCCCAGCGCCTAGTGCCCCA	51	IgG4 最小铰链, 无二硫键
GAATCTAAATATGGCCCGCCATGCCCGCCTTGCCCCA	52	IgG4 S228P 最小铰链, 增强的二硫键形成
GAACCGAAGTCTTGTGATAAACTCATACTGCCCCG	53	IgG1 最小铰链
GCTGCTGCTTTCGTACCCGTGTTCCCTCCCTGCTAAGCCTACGACTACCCCGCACCGAGACCACCCACGCCAGCACCCACGATTGCTAGCCAGCCCCTTAGTTTGCAGCCAGAAAGCTTGTCGGCCTGCTGGTGGCGCGGTACATACCCGCGGCCTTGATTTGCTTGCATATATATATCTGGCGCCTCTGGCCGGAACATGCGGGGTCCTCCTCCTTCTGTTATTACTCTCTACTGTAATCACAGGAAT	5654	延伸的 CD8a 铰链
GCCTGCCCGACCGGGCTCTACACTCATAGCGGGGAATGTTGTAAGGCATGTAACCTGGGGTAGGGCGTCGCACAGCCCTGCGGAGCTAACCAAACAGTGTGCGAACCCCTGCCTCGATAGTGTGACGTTCTCTGATGTTGTATCAGCTACAGAGCCTTGCAAACCATGTAAGTACTGAGTGCCTGGACTTCAGTCAATGAGCGCTCCATGTGTGGAGGCAGATGATGCGGTCTGTCGATGTGCTTACGGATACTACCAAGACGAGACAACAGGGCGGTGCGAGGCCTGTAGAGTTTGTGAGGCGGGCTCCGGGCTGGTGTTCATGTCAAGACAAGCAAATAACGGTCTGTGAAGAGTGCCCTGATGGCACCTACTCAGACGAAGCAGATGCAGAATGC	55	LNGFR 铰链
GCCTGCCCTACAGGACTCTACACGCATAGCGGTGAGTGTGTAAGCATGCAACCTCGGGGAAGGTGTAGCCCAGCCATGCGGGGCTAACAAACCGTTTGC	56	截短的 LNGFR 铰链 (TNFR-Cys1)
GCTGTGGGCCAGGACACGCAGGAGGTCATGTGGTGCCACACTCCTTGCCCTTAAGGTG	57	PDGFR-β 胞外接头

[0204]

[0205] 在一些实施方案中, 间隔区包含 SEQ ID NO: 40 中所示的序列。在一些实施方案中, 间隔区包含 SEQ ID NO: 41 中所示的序列。在一些实施方案中, 间隔区包含 SEQ ID NO: 42 中所示的序列。在一些实施方案中, 间隔区包含 SEQ ID NO: 43 中所示的序列。在一些实施方案中, 间隔区包含 SEQ ID NO: 44 中所示的序列。在一些实施方案中, 间隔区包含 SEQ ID NO: 45 中所示的序列。在一些实施方案中, 间隔区包含 SEQ ID NO: 46 中所示的序列。在一些实施方案中, 间隔区包含 SEQ ID NO: 47 中所示的序列。在一些实施方案中, 间隔区包含 SEQ ID NO: 48 中所示的序列。在一些实施方案中, 间隔区包含 SEQ ID NO: 49 中所示的序列。在一些实施方案中, 间隔区包含序列 TTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO: 85)。在一些实施方案中, 间隔区包含序列 ALSNSIMYFSHFVFPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO: 86)。在一些实施方案中, 间隔区包含序列 FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO: 87)。

[0206] 在一些实施方案中, 本公开的 CAR 可以另外包含长度在 2 个氨基酸残基和 10 个氨基

酸残基之间并且可以在CAR的跨膜结构域和胞质区之间形成连接的短寡肽或多肽接头。合适的接头的非限制性实例是甘氨酸-丝氨酸双联体。在一些实施方案中,接头包含氨基酸序列GGCKJSGGCKJS (SEQ ID NO:88)。

[0207] 胞内信号传导结构域

[0208] 在一些实施方案中,本公开的CAR (例如,本文所述的EMCN特异性CAR) 包含一个或多个胞质结构域或胞质结构区。CAR的胞质结构域或胞质区可以包含胞内信号传导结构域。

[0209] 可以用于本公开的CAR的合适的胞内信号传导结构域的实例包括但不限于T细胞受体 (TCR) 的胞质序列和在抗原受体接合后协同作用以调节信号转导的协同受体,以及这些序列的任何衍生物或变体和具有相同的功能能力的任何重组序列。

[0210] 不希望受理论的束缚,据信单独通过TCR产生的信号不足以完全活化T细胞,因此通常还需要次级和/或共刺激信号才能完全活化。因此,T细胞活化可以由两种不同类别的胞质信号传导序列介导,即通过TCR (初级胞内信号传导结构域) 来启动抗原依赖性初级活化的那些序列,以及以非抗原依赖性方式发挥作用以提供次级或共刺激信号 (次级胞质结构域,例如,共刺激结构域) 的那些序列。此外,T细胞信号传导和功能 (例如,活化性信号传导级联) 可以通过胞内抑制性共信号传导结构域由T细胞中存在的抑制性受体来负向调节。

[0211] 在一些实施方案中,本公开的CAR的胞内信号传导结构域可以包含抑制性胞内信号传导结构域。可以使用的抑制性胞内结构域的实例包括PD-1、CTLA4、TIGIT、BTLA和LIR-1 (LILRB1)、TIM3、KIR3DL1、NKG2A、LAG3、SLAP1、SLAP2、Dok-1、Dok-2、LAIR1、GRB-2、CD200R、SIRP $\alpha$ 、HAVR、GITR、PD-L1、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR3DL2、CD94、KLRG-1、CEACAM1、LIR2、LIR3、LIR5、SIGLEC-2和SIGLEC-10。在一些实施方案中,抑制性胞内信号传导结构域包含一个或多个胞内抑制性共信号传导结构域。在一些实施方案中,一个或多个胞内抑制性共信号传导结构域通过肽接头 (例如,参见表2) 或间隔物或铰链序列 (例如,参见表3) 连接至其他结构域 (例如,跨膜结构域)。在一些实施方案中,当存在两个或更多个胞内抑制性共信号传导结构域时,两个或更多个胞内抑制性共信号传导结构域可以通过肽接头 (例如,参见表2) 或间隔物或铰链序列 (例如,参见表3) 来连接。在一些实施方案中,胞内抑制性共信号传导结构域是抑制性结构域。在一些实施方案中,嵌合蛋白的一个或多个胞内抑制性共信号传导结构域包含一种或多种含ITIM的蛋白质或其片段。ITIM是在很多抑制性免疫受体的胞质尾区中存在的保守氨基酸序列。含ITIM的蛋白质的实例包括PD-1、TIGIT、BTLA和LIR-1 (LILRB1)、TIM3、KIR3DL1、NKG2A、LAG3、LAIR1、SIRP $\alpha$ 、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR3DL2、CD94、KLRG-1、CEACAM1、LIR2、LIR3、LIR5、SIGLEC-2和SIGLEC-10。在一些实施方案中,一个或多个胞内抑制性共信号传导结构域包含一种或多种非ITIM支架蛋白或其片段。在一些实施方案中,一种或多种非ITIM支架蛋白或其片段选自GRB-2、Dok-1、Dok-2、SLAP、LAG3、HAVR、GITR和PD-L1。抑制性胞内信号传导结构域可以另外包含酶促抑制性结构域。在一些实施方案中,酶促抑制性结构域包含酶促催化结构域。在一些实施方案中,酶促催化结构域来源于选自由以下各项组成的组的酶:CSK、SHP-1、PTEN、CD45、CD148、PTP-MEG1、PTP-PEST、c-CBL、CBL-b、PTPN22、LAR、PTPH1、SHIP-1和RasGAP。信号传导的酶促调节的实例在 Pavel Otáhal等人 (Biochim Biophys Acta, 2011年2月;1813(2):367-76), Kosugi A.等人 (Involvement of SHP-1 tyrosine phosphatase in TCR-mediated signaling pathways in lipid rafts, Immunity, 2001 Jun;14(6):669-80) 以及 Stanford等人 (Regulation of

TCR signaling by tyrosine phosphatases:from immune homeostasis to autoimmunity, Immunology, 2012年9月;137(1):1-19)中有更详细的描述,这些文献中的每篇以引用的方式并入本文用于所有目的。

[0212] 在一些实施方案中,本公开的CAR的胞内信号传导结构域可以包含初级信号传导结构域,它以刺激性方式或抑制性方式调节TCR复合物的初级活化。以刺激性方式发挥作用的初级胞内信号传导结构域可以含有信号传导基序,该基序称为基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)。可以用于本公开的CAR的合适的含ITAM的初级胞内信号传导结构域的实例包括但不限于CD3- $\zeta$ 、FcR $\gamma$ 、FcR $\beta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278(也称为“ICOS”)、Fc $\epsilon$ RI、DAP10、DAP12和CD66d的那些。

[0213] 在一些实施方案中,本公开的CAR(例如本文所述的EMCN特异性CAR)包含胞内信号传导结构域,例如CD3- $\zeta$ 多肽的初级信号传导结构域。本公开的CD3- $\zeta$ 多肽可以具有与NCBI参考号NP\_932170或NP\_001106864.2或其片段的序列至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同源的氨基酸序列。在一些实施方案中,CD3- $\zeta$ 多肽可以包含一个保守氨基酸置换、最多两个保守氨基酸置换或最多三个保守氨基酸置换。在一些实施方案中,多肽可以具有作为长度为至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90、至少100、至少110、至少120、至少130、至少140、至少150、或至少160、至少170或至少180个氨基酸的NCBI参考号NP\_932170或NP\_001106864.2的连续部分的氨基酸序列。

[0214] 在其他实施方案中,初级信号传导结构域包含经修饰的ITAM结构域,例如,与天然ITAM结构域相比具有改变(例如,增加或减少)的活性的突变的ITAM结构域。在一个实施方案中,初级信号传导结构域包含经修饰的含ITAM的初级胞内信号传导结构域,例如,优化和/或截短的含ITAM的初级胞内信号传导结构域。在一个实施方案中,初级信号传导结构域包含一个、两个、三个、四个或更多个ITAM基序。

[0215] 在一些实施方案中,本公开的CAR的胞内信号传导结构域可以单独包含CD3- $\zeta$ 信号传导结构域,或者它可以与在本发明的CAR的背景下有用的任何其他所期望的胞内信号传导结构域组合。例如,CAR的胞内信号传导结构域可以包含CD3- $\zeta$ 链部分和共刺激信号传导结构域。共刺激信号传导结构域可以指包含共刺激分子的胞内结构域的CAR的一部分。本公开的共刺激分子是可以是淋巴细胞对抗原的有效反应所需的除了抗原受体或其配体之外的细胞表面分子。合适的共刺激分子的实例包括但不限于CD97、CD2、ICOS、CD27、CD154、CD8、OX40、4-1BB、CD28、ZAP40、CD30、GITR、HVEM、DAP10、DAP12、MyD88、2B4、CD40、PD-1、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、以及与CD83特异性结合的配体、MHC I类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白样蛋白、细胞因子受体、整合素、信号传导淋巴细胞活化分子(SLAM蛋白)、活化性NK细胞受体、BTLA、To11配体受体、CDS、ICAM-1、(CD11a/CD18)、BAFFR、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRP1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、IL2R $\beta$ 、IL2R $\gamma$ 、IL7R $\alpha$ 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、ITGB7、NKG2D、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、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、CD19a等等。

[0216] 在一些实施方案中,本公开的CAR的胞质部分内的胞内信号传导序列可以以随机或指定顺序彼此连接。在一些实施方案中,短寡肽或多肽接头,例如,长度在2个氨基酸和10个氨基酸之间(例如,2个氨基酸、3个氨基酸、4个氨基酸、5个氨基酸、6个氨基酸、7个氨基酸、8个氨基酸、9个氨基酸或10个氨基酸)的短寡肽或多肽接头可以形成胞内信号传导序列之间的连接。在一个实施方案中,甘氨酸-丝氨酸双联体可以用作合适的接头。在一个实施方案中,单个氨基酸,例如丙氨酸或甘氨酸,可以用作合适的接头。

[0217] 在一些实施方案中,胞内信号传导结构域包含两个或更多个共刺激信号传导结构域,例如,两个共刺激信号传导结构域、三个共刺激信号传导结构域、四个共刺激信号传导结构域、五个共刺激信号传导结构域、六个共刺激信号传导结构域、七个共刺激信号传导结构域、八个共刺激信号传导结构域、九个共刺激信号传导结构域、十个共刺激信号传导结构域或更多个共刺激信号传导结构域。在一个实施方案中,胞内信号传导结构域包含两个共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中,两个或更多个共刺激信号传导结构域通过本公开的接头(例如,表1中描述的接头中的任一者)分开。在一个实施方案中,接头是甘氨酸残基。在另一个实施方案中,接头是丙氨酸残基。

[0218] 在一些实施方案中,本公开的细胞表达CAR,所述CAR包含结合EMCN的抗原结合结构域、本公开的跨膜结构域、初级信号传导结构域以及一个或多个共刺激信号传导结构域。

[0219] 在一些实施方案中,本公开的细胞表达iCAR,所述iCAR包含结合EMCN的抗原结合结构域(例如,具有表A中列出的氨基酸序列中的一者或多者的EMCN特异性抗原结合结构域)、本公开的跨膜结构域以及一个或多个胞内抑制性共信号传导结构域。在一些实施方案中,本公开的细胞表达(1) CAR,所述CAR包含结合EMCN的抗原结合结构域(例如,具有表A中列出的氨基酸序列中的一者或多者的EMCN特异性抗原结合结构域)、本公开的跨膜结构域、初级信号传导结构域以及一个或多个共刺激信号传导结构域。

[0220] 在一些实施方案中,跨膜结构域来源于与一个或多个胞内信号传导结构域中的一个相同的蛋白质。在一些实施方案中,CAR是抑制性CAR并且包含跨膜结构域和至少一个胞内抑制性共信号传导结构域,每个胞内抑制性共信号传导结构域均来源于选自以下的蛋白质:PD-1、CTLA4、TIGIT、BTLA和LIR-1 (LILRB1)、TIM3、KIR3DL1、NKG2A、LAG3、SLAP1、SLAP2、Dok-1、Dok-2、LAIR1、GRB-2、CD200R、SIRP $\alpha$ 、HAVR、GITR、PD-L1、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR3DL2、CD94、KLRG-1、CEACAM1、LIR2、LIR3、LIR5、SIGLEC-2和SIGLEC-10。

[0221] 在一些实施方案中,跨膜结构域来源于第一蛋白质,并且一个或多个胞内信号传导结构域来源于与第一蛋白质不同的第二蛋白质。

[0222] 自然杀伤细胞受体(NKR) CAR

[0223] 在一些实施方案中,本公开的CAR(例如本文所述的EMCN特异性CAR)包含自然杀伤细胞受体(NKR)的一种或多种组分,从而形成NKR-CAR。NKR组分可以是来自任何合适的自然杀伤细胞受体的跨膜结构域、铰链结构域或胞质结构域,所述自然杀伤细胞受体包括但不限于杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR),诸如KIR2DL1、KIR2DL2/L3、KIR2DL4、KIR2DL5A、KIR2DL5B、KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DS3、KIR2DS4、DIR2DS5、KIR3DL1/S1、KIR3DL2、KIR3DL3、KIR2DP1和KIRSDPI;天然细胞毒性受体(NCR),诸如NKp30、NKp44、NKp46;免疫细胞受体的信号传导淋巴细胞活化分子(SLAM)家族,诸如CD48、CD229、2B4、CD84、NTB-A、CRACC、BLAME

和CD2F-10;Fc受体(FcR),诸如CD16和CD64;以及Ly49受体,诸如LY49A和LY49C。在一些实施方案中,NKR-CAR可以与衔接分子或胞内信号传导结构域(诸如DAP12)相互作用。包含NKR组分的CAR的示例性构型和序列在2014年9月18日公布的国际专利公布WO2014/145252中有所描述。

[0224] 其他嵌合受体靶标

[0225] 本公开的某些方面涉及嵌合受体和编码此类嵌合受体的核酸,所述嵌合受体结合至除了EMCN之外的所关注的抗原。本公开的某些方面涉及嵌合受体和细胞(诸如免疫反应性细胞)所述细胞已经被遗传修饰为表达此类嵌合受体中的一种或多种,所述嵌合受体结合至除了EMCN之外的所关注的抗原,以及使用此类受体和细胞来治疗和/或预防骨髓恶性肿瘤(诸如AML)和其他需要抗原特异性免疫反应的病理的方法。恶性细胞已经发展出一系列机制来保护自己免于免疫识别和消除。本公开提供了用于治疗此类恶性细胞的肿瘤微环境内的免疫原性。

[0226] 在一些实施方案中,第一嵌合受体包含结合EMCN的抗原结合结构域(例如,具有表A中列出的氨基酸序列中的一者或多者的EMCN特异性抗原结合结构域),并且第二嵌合受体包含结合第二抗原(诸如肿瘤相关抗原(例如,AML相关抗原))的另外的抗原结合结构域。在一些实施方案中,细胞可以表达对EMCN具有特异性的第一嵌合受体(例如,包含具有表A中列出的氨基酸序列中的一者或多者的EMCN特异性抗原结合结构域的CAR)和对第二抗原(诸如肿瘤相关抗原(例如,AML相关抗原))具有特异性的第二嵌合受体。在一些实施方案中,细胞可以表达对EMCN具有特异性的第一嵌合抑制性受体(例如,包含具有表A中列出的氨基酸序列中的一者或多者的EMCN特异性抗原结合结构域的抑制性CAR)和对第二抗原(诸如肿瘤相关抗原(例如,AML相关抗原))具有特异性的第二嵌合受体。例如,细胞(例如,免疫反应性细胞)可以被工程化为共表达或能够共表达iCAR和aCAR,所述iCAR包含结合EMCN的抗原结合结构域(例如,具有表A中列出的氨基酸序列中的一者或多者的EMCN特异性抗原结合结构域),所述aCAR靶向肿瘤相关抗原(例如,AML相关抗原)。结合至除了EMCN之外的抗原的合适的抗体包括任何抗体,天然的或合成的抗体、全长抗体或其片段、单克隆抗体或多克隆抗体,所述抗体足够强且特异地结合至第二抗原(例如肿瘤相关抗原(例如,AML相关抗原))。在一些实施方案中,商购获得的抗体可以用于结合至第二抗原(例如肿瘤相关抗原(例如,AML相关抗原))。本领域的技术人员使用常规测序技术可容易地获得商购获得的抗体的CDR。此外,本领域的技术人员能够基于此类商购获得的抗体的CDR来构建编码scFv和嵌合受体(例如,CAR和TCR)的核酸。

[0227] T细胞受体(TCR)

[0228] 本公开的某些方面涉及特异性结合至第二抗原(例如肿瘤相关抗原(例如,AML相关抗原))的嵌合受体,并且第二抗原的嵌合受体是经工程化的T细胞受体(TCR)。本公开的TCR是二硫键连接的异源二聚体蛋白质,该蛋白质含有两条可变链,这两条可变链表达为具有不变CD3链分子的复合物的一部分。TCR存在于T细胞的表面,负责将抗原识别为结合至主要组织相容性复合体(MHC)分子的肽。在某些实施方案中,本公开的TCR包含由TRA编码的 $\alpha$ 链和由TRB编码的 $\beta$ 链。在某些实施方案中,TCR包含 $\gamma$ 链和 $\delta$ 链(分别由TRG和TRD编码)。

[0229] TCR的每条链由两个细胞外结构域:即可变(V)区和恒定(C)区组成。恒定区靠近细胞膜,随后是跨膜区和短胞质尾区。可变区结合至肽/MHC复合物。可变区中的每个具有三个

互补决定区(CDR)。

[0230] 在某些实施方案中,TCR可以与三个二聚体信号传导模块CD3 $\delta$ / $\epsilon$ 、CD3 $\gamma$ / $\epsilon$ 以及CD247 $\zeta$ / $\zeta$ 或CD247 $\zeta$ / $\eta$ 形成受体复合物。当TCR复合物与其抗原和MHC(肽/MHC)接合时,表达TCR复合物的T细胞被活化。

[0231] 在一些实施方案中,本公开的TCR是重组TCR。在某些实施方案中,TCR是非天然存在的TCR。在某些实施方案中,TCR与天然存在的TCR的差异为至少一个氨基酸残基。在一些实施方案中,TCR与天然存在的TCR的差异为至少2个氨基酸残基、至少3个氨基酸残基、至少4个氨基酸残基、至少5个氨基酸残基、至少6个氨基酸残基、至少7个氨基酸残基、至少8个氨基酸残基、至少9个氨基酸残基、至少10个氨基酸残基、至少11个氨基酸残基、至少12个氨基酸残基、至少13个氨基酸残基、至少14个氨基酸残基、至少15个氨基酸残基、至少20个氨基酸残基、至少25个氨基酸残基、至少30个氨基酸残基、至少40个氨基酸残基、至少50个氨基酸残基、至少60个氨基酸残基、至少70个氨基酸残基、至少80个氨基酸残基、至少90个氨基酸残基、至少100个氨基酸残基或更多个氨基酸残基。在某些实施方案中,TCR被从天然存在的TCR修饰至少一个氨基酸残基。在一些实施方案中,TCR被从天然存在的TCR修饰至少2个氨基酸残基、至少3个氨基酸残基、至少4个氨基酸残基、至少5个氨基酸残基、至少6个氨基酸残基、至少7个氨基酸残基、至少8个氨基酸残基、至少9个氨基酸残基、至少10个氨基酸残基、至少11个氨基酸残基、至少12个氨基酸残基、至少13个氨基酸残基、至少14个氨基酸残基、至少15个氨基酸残基、至少20个氨基酸残基、至少25个氨基酸残基、至少30个氨基酸残基、至少40个氨基酸残基、至少50个氨基酸残基、至少60个氨基酸残基、至少70个氨基酸残基、至少80个氨基酸残基、至少90个氨基酸残基、至少100个氨基酸残基或更多个氨基酸残基。

[0232] 嵌合TCR

[0233] 在一些实施方案中,本公开的TCR包含一个或多个抗原结合结构域,所述抗原结合结构域可以接枝到TCR链(例如TCR $\alpha$ 链或TCR $\beta$ 链)的一个或多个恒定结构域,以产生嵌合TCR,所述嵌合TCR特异性结合至所关注的第二抗原(例如肿瘤相关抗原(例如,AML相关抗原))。不希望受理论的束缚,据信嵌合TCR可以在抗原结合时通过TCR复合物进行信号传导。例如,抗体或抗体片段(例如,scFv)可以被接枝到恒定结构域,例如,TCR链(诸如TCR $\alpha$ 链和/或TCR $\beta$ 链)的胞外恒定结构域、跨膜结构域和胞质结构域的至少一部分。又如,抗体或抗体片段的CDR可以被接枝到TCR $\alpha$ 链和/或 $\beta$ 链,以产生嵌合TCR,所述嵌合TCR特异性结合至第二抗原(例如肿瘤相关抗原(例如,AML相关抗原))。此类嵌合TCR可以通过本领域已知的方法产生(例如,Willemsen RA等人,Gene Therapy 2000;7:1369-1377;Zhang T等人,Cancer Gene Ther 2004 11:487-496;和Aggen等人,Gene Ther.2012年4月;19(4):365-74)。

[0234] 免疫反应性细胞

[0235] 本公开的某些方面涉及一种细胞,诸如免疫反应性细胞,所述细胞已经被基因工程化为包含一种或多种本公开的嵌合受体或一种或多种编码此类嵌合受体的核酸,并且涉及使用此类细胞来治疗骨髓恶性肿瘤(例如,AML)的方法。

[0236] 在一些实施方案中,细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,哺乳动物细胞是原代细胞。在一些实施方案中,哺乳动物细胞是细胞系。在一些实施方案中,哺乳动物细胞骨髓细胞、血细胞、皮肤细胞、骨细胞、肌肉细胞、神经元细胞、脂肪细胞、肝细胞或心脏细胞。

在一些实施方案中,细胞是干细胞。示例性干细胞包括但不限于胚胎干细胞(ESC)、诱导性多能干细胞(iPSC)、成体干细胞和组织特异性干细胞,诸如造血干细胞(血液干细胞)、间充质干细胞(MSC)、神经干细胞、上皮干细胞或皮肤干细胞。在一些实施方案中,细胞是从本公开的干细胞衍生或分化的细胞。在一些实施方案中,细胞是免疫细胞。本公开的免疫细胞可以从本公开的干细胞(例如,从ESC或iPSC)分离或分化。示例性免疫细胞包括但不限于T细胞(例如,辅助T细胞、细胞毒性T细胞、记忆T细胞、调节性T细胞、自然杀伤T细胞、 $\alpha\beta$ T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞)、B细胞、自然杀伤(NK)细胞、树突细胞、骨髓细胞、巨噬细胞和单核细胞。在一些实施方案中,细胞是神经元细胞。本公开的神经元细胞可以从本公开的干细胞(例如,从ESC或iPSC)分离或分化。示例性神经元细胞包括但不限于神经祖细胞、神经元(例如,感觉神经元、运动神经元、胆碱能神经元、 $\gamma$ -氨基丁酸能神经元、谷氨酸能神经元、多巴胺能神经元或血清素能神经元)、星形胶质细胞、少突胶质细胞和小胶质细胞。

[0237] 在一些实施方案中,细胞是免疫反应性细胞。本公开的免疫反应性细胞可以从本公开的干细胞(例如,从ESC或iPSC)分离或分化。本公开的示例性免疫反应性细胞包括但不限于淋巴谱系的细胞。包括B细胞、T细胞和自然杀伤(NK)细胞的淋巴谱系提供抗体的产生、细胞免疫系统的调节、血液中外源物质的检测、宿主外源细胞的检测等等。淋巴谱系的免疫反应性细胞的实例包括但不限于T细胞、自然杀伤(NK)细胞、胚胎干细胞、多能干细胞和诱导性多能干细胞(例如,可衍生或分化出淋巴细胞的那些细胞)。T细胞可以是在胸腺中成熟的淋巴细胞,主要负责细胞介导的免疫。T细胞涉及适应性免疫系统。在一些实施方案中,本公开的T细胞可以是任何类型的T细胞,包括但不限于T辅助细胞、细胞毒性T细胞、记忆T细胞(包括中央记忆T细胞、干细胞样记忆T细胞(或干样记忆T细胞))和两种类型的效应性记忆T细胞:例如, $T_{EM}$ 细胞和 $T_{EMRA}$ 细胞、调节性T细胞(也称为抑制性T细胞)、自然杀伤T细胞、粘膜相关性不变T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞。细胞毒性T细胞(CTL或杀伤T细胞)是T淋巴细胞的子集,该T淋巴细胞能够诱导受感染的体细胞或肿瘤细胞的死亡。通过引入一种或多种嵌合受体(诸如嵌合TCR或CAR),可以对患者自身的T细胞进行遗传修饰以靶向特定抗原。

[0238] 自然杀伤(NK)细胞可以是淋巴细胞,该淋巴细胞是细胞介导的免疫的一部分,并且在先天免疫反应期间发挥作用。NK细胞不需要事先活化即可对靶细胞发挥细胞毒性作用。

[0239] 在一些实施方案中,本公开的免疫反应性细胞是T细胞。本公开的T细胞可以是自体的、同种异体的,或者体外衍生自经工程化的祖细胞或干细胞。

[0240] 在一些实施方案中,本公开的免疫反应性细胞是具有缺陷型TCR- $\alpha\beta$ 的通用T细胞。开发通用T细胞的方法在本领域中有所描述,例如,Valton等人,Molecular Therapy (2015);23:9,1507-1518和Torikai等人,Blood 2012 119:5697-5705。

[0241] 在一些实施方案中,本公开的免疫反应性细胞是包含一种或多种本公开的嵌合受体的分离的免疫反应性细胞。在一些实施方案中,免疫反应性细胞包含一种或多种、两种或更多种、三种或更多种、四种或更多种、五种或更多种、六种或更多种、七种或更多种、八种或更多种、九种或更多种或十种或更多种本公开的嵌合受体。

[0242] 在一些实施方案中,免疫反应性细胞是T细胞。在一些实施方案中,免疫反应性细胞是自然杀伤(NK)细胞。

[0243] 在一些实施方案中,免疫反应性细胞表达或能够表达免疫受体。免疫受体通常能

能够在表达免疫受体的细胞中诱导信号转导或蛋白质表达的变化,从而在结合至同源配体时调节免疫反应(例如,调节、活化、启动、刺激、增加、预防、减弱、抑制、降低、减少、阻碍或压制免疫反应)。例如,当CD3链存在于TCR/CAR簇中以响应于配体结合时,产生基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)介导的信号转导级联。具体而言,在某些实施方案中,当内源性TCR、外源性TCR、嵌合TCR或CAR(特别是活化性CAR)结合它们各自的抗原时,形成免疫突触,所述形成包括在所结合的受体(例如CD4或CD8、CD3  $\gamma/\delta/\epsilon/\zeta$ 等)附近聚集许多分子。这种膜结合信号传导分子的聚集允许CD3链中包含的ITAM基序磷酸化,继而可以启动T细胞活化途径并最终活化转录因子(诸如NF- $\kappa$ B和AP-1)。这些转录因子能够诱导T细胞的全基因表达,以增加IL-2的产生,从而促进主调节性T细胞蛋白的增殖和表达,从而启动T细胞介导的免疫反应,诸如细胞因子产生和/或T细胞介导的杀伤。

[0244] 表达多个嵌合受体的细胞

[0245] 在一些实施方案中,本公开的细胞(例如,免疫反应性细胞)包含两种或更多种本公开的嵌合受体。在一些实施方案中,细胞包含两种或更多种嵌合受体,其中两种或更多种嵌合受体中的一种是嵌合抑制性受体。在一些实施方案中,细胞包含三种或更多种嵌合受体,其中三种或更多种嵌合受体中的至少一种是嵌合抑制性受体。在一些实施方案中,细胞包含四种或更多种嵌合受体,其中四种或更多种嵌合受体中的至少一种是嵌合抑制性受体。在一些实施方案中,细胞包含五种或更多种嵌合受体,其中五种或更多种嵌合受体中的至少一种是嵌合抑制性受体。

[0246] 在一些实施方案中,两种或更多种嵌合受体中的每种包含不同的抗原结合结构域,例如,结合至相同的抗原或不同的抗原的抗原结合结构域。在一些实施方案中,两种或更多种嵌合受体结合的每种抗原在相同的细胞(诸如骨髓细胞类型(例如,相同的AML细胞类型))上表达。

[0247] 在本公开的细胞(例如,免疫反应性细胞)表达两种或更多种不同的嵌合受体的实施方案中,不同的嵌合受体中的每种的抗原结合结构域可以被设计为使得抗原结合结构域不彼此相互作用。例如,本公开的细胞(例如,免疫反应性细胞)表达第一嵌合受体(例如,EMCN特异性嵌合受体)和第二嵌合受体,该细胞可以包含第一嵌合受体,该第一嵌合受体包含不与第二嵌合受体的抗原结合结构域形成缔合的抗原结合结构域。例如,第一嵌合受体的抗原结合结构域可以包含抗体片段,诸如scFv,而第二嵌合受体的抗原结合结构域可以包含VHH。

[0248] 不希望受理论的束缚,据信在具有多个嵌合膜包埋的受体(每个受体均包含抗原结合结构域)的细胞中,受体中的每个的抗原结合结构域之间的相互作用可以是不希望的,因为这种相互作用可以抑制抗原结合结构域中的一种或多种结合它们的同源抗原的能力。因此,在本公开的细胞(例如,免疫反应性细胞)表达两种或更多种嵌合受体的实施方案中,嵌合受体包含使此类抑制性相互作用最小化的抗原结合结构域。在一个实施方案中,一种嵌合受体的抗原结合结构域包括scFv,并且第二嵌合受体的抗原结合结构域包括单个VH结构域,例如骆驼科动物、鲨鱼或七鳃鳗单个VH结构域,或者来源于人或小鼠序列的单个VH结构域。

[0249] 在一些实施方案中,当存在于细胞的表面上时,第一嵌合受体的抗原结合结构域与其同源抗原的结合(例如,EMCN特异性嵌合受体与EMCN的结合)不会因第二嵌合受体的存

在而实质上减少。在一些实施方案中,在存在第二嵌合受体的情况下第一嵌合受体的抗原结合结构域与其同源抗原的结合是在不存在第二嵌合受体的情况下第一嵌合受体的抗原结合结构域与其同源抗原的结合的85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%。在一些实施方案中,当存在于细胞的表面上时,第一嵌合受体和第二嵌合受体的抗原结合结构域彼此缔合的程度小于二者均为scFv抗原结合结构域时的程度。在一些实施方案中,第一嵌合受体和第二嵌合受体的抗原结合结构域彼此缔合的程度比二者均为scFv抗原结合结构域时的程度少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%。

#### [0250] 嵌合抑制性受体

[0251] 在一些实施方案中,本公开的细胞(例如,免疫反应性细胞)包含一种或多种本公开的嵌合抑制性受体。在一些实施方案中,一种或多种嵌合抑制性受体中的每种包含抗原结合结构域,所述抗原结合结构域结合通常在正常细胞(例如,通常被认为是健康的细胞)而非肿瘤细胞(诸如AML细胞)上表达的抗原。在一些实施方案中,嵌合抑制性受体包含结合EMCN的抗原结合结构域(例如,具有表A中列出的氨基酸序列中的一者或多者的EMCN特异性抗原结合结构域)。

[0252] 在一些实施方案中,一种或多种嵌合抑制性受体结合在来源于组织的非肿瘤细胞上表达的抗原,所述组织选自由以下各项组成的组:脑、神经元组织、内分泌、骨、骨髓、免疫系统、内皮组织、肌肉、肺、肝、胆囊、胰腺、胃肠道、肾、膀胱、男性生殖器官、女性生殖器官、脂肪、软组织和皮肤。

[0253] 在一些实施方案中,嵌合抑制性受体(例如EMCN特异性嵌合抑制性受体)可以例如与在本公开的细胞(例如,免疫反应性细胞)上表达的一种或多种活化性嵌合受体(例如,活化性嵌合TCR或CAR)一起用作非逻辑门,该非逻辑门控制、调节或者抑制一种或多种活化性嵌合受体的一种或多种活性。在一些实施方案中,本公开的嵌合抑制性受体可以抑制本公开的细胞(例如,免疫反应性细胞)的一种或多种活性。

[0254] 在一些实施方案中,本公开的细胞包含一种或多种本公开的嵌合抑制性受体,并且还包含结合至一种或多种肿瘤相关抗原的肿瘤靶向性嵌合受体。在一些实施方案中,一种或多种肿瘤相关抗原包括AML相关抗原。在一些实施方案中,一种或多种肿瘤相关抗原包括CD33。在一些实施方案中,一种或多种肿瘤相关抗原包括FLT3。在一些实施方案中,一种或多种肿瘤相关抗原包括CD33和FLT3。不希望受理论的束缚,当施用表达结合至肿瘤相关抗原的肿瘤靶向性嵌合受体的免疫健全细胞时,如果肿瘤相关抗原也被健康细胞(诸如健康HSPC)表达,则进一步表达如本文所述的EMCN特异性嵌合抑制性受体可以减少肿瘤靶向性嵌合受体的脱靶效应。如本文所用,“脱靶效应”是指通过表达肿瘤靶向性嵌合受体的免疫健全细胞来杀伤脱靶细胞(即,也表达肿瘤相关抗原的非肿瘤细胞)。在一些实施方案中,减少的脱靶效应是减少对健康HSPC的杀伤。在一些实施方案中,与如本文公开的表达肿瘤靶向性抗原但不表达嵌合抑制性受体的等同免疫健全细胞相比,减少的脱靶效应是脱靶细胞的杀伤减少至少5%、减少至少10%、减少至少15%、减少至少20%、减少至少25%、减少至少30%、减少至少35%、减少至少40%、减少至少45%或减少至少50%。

#### [0255] 共刺激配体

[0256] 在一些实施方案中,本公开的细胞(例如,免疫反应性细胞)可以另外包含一种或多种重组或外源性共刺激配体。例如,细胞可以用一种或多种共刺激配体来进一步转导,以

使得细胞共表达或被诱导共表达一种或多种本公开的嵌合受体(例如,本文所述的EMCN特异性CAR)和一种或多种共刺激配体。不希望受理论的束缚,据信一种或多种嵌合受体与一种或多种共刺激配体之间的相互作用可以提供对细胞的完全活化重要的非抗原特异性信号。合适的共刺激配体的实例包括但不限于肿瘤坏死因子(TNF)超家族的成员和免疫球蛋白(Ig)超家族配体。TNF是涉及全身炎症的细胞因子,可刺激急性期反应。它的主要作用是调节免疫细胞。TNF超家族的成员共有很多共同特征。大多数TNF超家族成员被合成为含有短胞质区段和相对较长的胞外区的II型跨膜蛋白(胞外C-末端)。合适的TNF超家族成员的实例包括但不限于神经生长因子(NGF)、CD40L(CD40L)/CD154、CD137L/4-1BBL、TNF- $\alpha$ 、CD134L/OX40L/CD252、CD27L/CD70、Fas配体(FasL)、CD30L/CD153、肿瘤坏死因子 $\beta$ (TNF $\beta$ )/淋巴毒素- $\alpha$ (LT $\alpha$ )、淋巴毒素- $\beta$ (LT $\beta$ )、CD257/B细胞活化因子(BAFF)/Bly s/THANK/Ta11-1、糖皮质激素诱导的TNF受体配体(GITRL)和TNF相关凋亡诱导配体(TRAIL)、LIGHT(TNFSF14)。免疫球蛋白(Ig)超家族是一大类细胞表面和可溶性蛋白质,它涉及细胞的识别、结合或粘附过程。这些蛋白质与免疫球蛋白共有结构特征,并且具有免疫球蛋白结构域(折叠)。合适的免疫球蛋白超家族配体的实例包括但不限于CD80和CD86,它们二者都是CD28的配体,PD-L1/(B7-H1)(PD-1的配体)。在某些实施方案中,一种或多种共刺激配体选自4-1BBL、CD80、CD86、CD70、OX40L、CD48、TNFRSF14、PD-L1以及它们的组合。

#### [0257] 趋化因子受体

[0258] 在一些实施方案中,本公开的细胞(例如,免疫反应性细胞)包含一种或多种嵌合受体(例如,本文所述的EMCN特异性CAR)并且可以进一步包含一种或多种趋化因子受体。例如,趋化因子受体CCR2b或CXCR2在细胞(诸如T细胞)中的转基因表达增强向分泌CCL2或分泌CXCL1的实体瘤的运输(Craddock等人, *J Immunother.* 2010年10月;33(8):780-8和Kershaw等人 *Hum Gene Ther.* 2002年11月1日;13(16):1971-80)。不希望受理论的束缚,据信在本公开的表达嵌合受体的细胞上表达的趋化因子受体可以识别肿瘤分泌的趋化因子并且改善细胞对肿瘤的靶向,这可以促进细胞向肿瘤的浸润并且增强细胞的抗肿瘤功效。本公开的趋化因子受体可以包含天然存在的趋化因子受体、重组趋化因子受体或它们的趋化因子结合片段。可以在本公开的细胞上表达的合适的趋化因子受体的实例包括但不限于CXC趋化因子受体,诸如CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6或CXCR7;CC趋化因子受体,诸如CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10或CCR11;CX3C趋化因子受体,诸如CX3CR1;XC趋化因子受体,诸如XCR1;以及它们的趋化因子结合片段。在一些实施方案中,基于肿瘤分泌的趋化因子来选择要在细胞上表达的趋化因子受体。

#### [0259] 嵌合受体调节

[0260] 本公开的一些实施方案涉及调节本公开的表达嵌合受体的细胞的一种或多种嵌合受体活性(例如本文所述的EMCN特异性CAR)。有若干方法可以调节嵌合受体活性。在一些实施方案中,可调节嵌合受体(其中一种或多种嵌合受体活性可受控制)对于优化嵌合受体疗法的安全性和/或功效可以是所期望的。例如,使用与二聚化结构域融合的半胱天冬酶来诱导细胞凋亡(参见,例如,Di等人, *N Engl. J. Med.* 2011年11月3日;365(18):1673-1683)在嵌合受体疗法中可以用作安全性开关。在一些实施方案中,本公开的表达嵌合受体的细胞还可以表达诱导型半胱天冬酶-9(iCaspase-9), iCaspase-9在二聚化药物,诸如利米度塞(rimiducid)(IUPAC名称:[(1R)-3-(3,4-二甲氧基苯基)-1-[3-[2-[2-[[2-[3-[(1R)-3-

(3,4-二甲氧基苯基)-1-[(2S)-1-[(2S)-2-(3,4,5-三甲氧基苯基)丁酰基]哌啶-2-羰基]氧基丙基]苯氧基]乙酰基]氨基]乙基氨基]-2-氧代乙氧基]苯基]丙基](2S)-1-[(2S)-2-(3,4,5-三甲氧基苯基)丁酰基]哌啶-2-甲酸酯)的施用,诱导半胱天冬酶-9的活化并且引起细胞凋亡。在一些实施方案中,iCaspase-9含有结合结构域,该结合结构域包含二聚化的化学诱导剂(CID),它在存在CID的情况下介导二聚化,引起表达嵌合受体的细胞的诱导性和选择性地别除。

[0261] 或者,在一些实施方案中,本公开的嵌合受体可以通过利用使嵌合受体活性失活或者抑制嵌合受体活性的小分子或抗体来调节。例如,抗体可以通过诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)来除去表达嵌合受体的细胞。在一些实施方案中,本公开的表达嵌合受体的细胞可以进一步表达被能够诱导细胞死亡的分子识别的抗原,所述诱导细胞死亡通过ADCC或补体诱导的细胞死亡方式来进行。例如,本公开的表达嵌合受体的细胞可以进一步表达能够被抗体或抗体片段靶向的受体。可以被抗体或抗体片段靶向的合适的受体的实例包括但不限于EpCAM、VEGFR、整合素(例如, $\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha I3/4\beta 3$ 、 $\alpha 4\beta 7$ 、 $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha v$ )、TNF受体超家族的成员(例如,TRAIL-R1和TRAIL-R2)、PDGF受体、干扰素受体、叶酸受体、GPNMB、ICAM-1、HLA-DR、CEA、CA-125、MUC1、TAG-72、IL-6受体、5T4、GD2、GD3、CD2、CD3、CD4、CD5、CD11、CD11a/LFA-1、CD15、CD18/ITGB2、CD19、CD20、CD22、CD23/IgE受体、CD25、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD41、CD44、CD51、CD52、CD62L、CD74、CD80、CD125、CD147/basigin、CD152/CTLA-4、CD154/CD40L、CD195/CCR5、CD319/SLAMF7和EGFR以及它们的截短形式。

[0262] 在一些实施方案中,本公开的表达嵌合受体的细胞还可以表达截短的表皮生长因子受体(EGFR),所述EGFR缺乏信号传导能力但是保持被能够诱导ADCC的分子识别的表位(例如,W02011/056894)。

[0263] 在一些实施方案中,本公开的表达嵌合受体的细胞还包含高表达的致密标志物/自杀基因,所述致密标志物/自杀基因组合来自表达嵌合受体的细胞中的CD32和CD20抗原的靶表位,结合抗CD20抗体(例如,利妥昔单抗(rituximab)),使表达嵌合受体的细胞通过ADCC选择性地别除。剔除本公开的表达嵌合受体的细胞的其他方法可以包括但不限于单克隆抗CD52抗体的施用,该抗体选择性结合并且靶向表达嵌合受体的细胞以通过诱导ADCC来进行破坏。在一些实施方案中,表达嵌合受体的细胞可以使用嵌合受体配体(诸如抗独特型抗体)来选择性地靶向。在一些实施方案中,抗独特型抗体可以引起效应细胞活性,诸如ADCC或ADC活性。在一些实施方案中,嵌合受体配体可以进一步偶联至诱导细胞杀伤的试剂,诸如毒素。在一些实施方案中,本公开的表达嵌合受体的细胞可以进一步表达被本公开的细胞剔除剂识别的靶蛋白。在一些实施方案中,靶蛋白是CD20并且细胞剔除剂是抗CD20抗体。在这些实施方案中,一旦希望减少或消除表达嵌合受体的细胞,就施用细胞剔除剂。在一些实施方案中,细胞剔除剂是抗CD52抗体。

[0264] 在一些实施方案中,受调节的嵌合受体包含一组多肽,其中本公开的嵌合受体的组分被分配在单独的多肽或成员上。例如,该组多肽可以包含二聚化开关,在存在二聚化分子时,可以使多肽彼此偶联以形成功能性嵌合受体。

[0265] 编码EMCN特异性蛋白质的核酸构建体

[0266] 本公开的某些方面涉及编码一种或多种本公开的EMCN特异性蛋白质(例如本文所述的EMCN特异性CAR)的核酸(例如,分离的核酸)。在一些实施方案中,核酸是RNA构建体,诸

如信使RNA (mRNA) 转录物或经修饰的RNA。在一些实施方案中,核酸是DNA构建体。

[0267] 在一些实施方案中,本公开的核酸编码包含一个或多个抗原结合结构域(其中每个结构域结合至靶抗原(例如,EMCN))、跨膜结构域和一个或多个胞内信号传导结构域的嵌合受体。在一些实施方案中,核酸编码嵌合受体,所述嵌合受体包含抗原结合结构域、跨膜结构域、初级信号传导结构域(例如,CD3- $\zeta$ 结构域)和一个或多个共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中,核酸还包含编码间隔区的核苷酸序列。在一些实施方案中,抗原结合结构域通过间隔区连接至跨膜结构域。在一些实施方案中,间隔区包含选自表3中列出的核酸序列中的任一者的核酸序列。在一些实施方案中,核酸还包含编码前导序列的核苷酸序列。

[0268] 本公开的核酸可以使用本领域已知的任何合适的重组方法来获得,所述方法包括但不限于通过从表达所关注的基因的细胞中筛选文库,通过从已知包含基因的载体衍生所关注的基因,或者通过使用标准技术直接从含有基因的细胞和组织分离所关注的基因。或者,所关注的基因可以合成产生。

[0269] 在一些实施方案中,本公开的核酸包含在载体内。在一些实施方案中,本公开的核酸通过转座子、CRISPR/Cas9系统、TALEN或锌指核酸酶在细胞中表达。

[0270] 在一些实施方案中,编码本公开的嵌合受体的核酸的表达可以通过将核酸可操作地连接至启动子并且将构建体掺入表达载体中来实现。合适的载体可以在真核细胞中复制和整合。典型的克隆载体含有转录和翻译终止子、起始序列和可用于调节所期望的核酸表达的启动子。

[0271] 在一些实施方案中,使用标准基因递送方案,本公开的表达构建体还可以用于核酸免疫和基因疗法(例如,US5399346、US5580859和US5589466)。在一些实施方案中,本公开的载体是基因治疗载体。

[0272] 本公开的核酸可以克隆到多种类型的载体中。例如,核酸可以克隆到载体中,所述载体包括但不限于质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、动物病毒或粘粒。在一些实施方案中,载体可以是表达载体、复制载体、探针生成载体或测序载体。

[0273] 在一些实施方案中,质粒载体包含将本公开的核酸掺入宿主细胞基因组中的转座子/转座酶系统。使用转座子和转座酶质粒系统在免疫细胞中表达蛋白质的方法通常在Chicaybam L, Hum Gene Ther. 2019年4月; 30(4): 511-522. doi:10.1089/hum.2018.218; 和Ptáčková P, Cytotherapy. 2018年4月; 20(4): 507-520. doi:10.1016/j.jcyt.2017.10.001中有所描述,这些文献中的每篇据此以引用的方式整体并入。在一些实施方案中,转座子系统是睡美人(Sleeping Beauty)转座子/转座酶或piggyBac转座子/转座酶。

[0274] 在一些实施方案中,本公开的表达载体可以以病毒载体形式提供给细胞。合适的病毒载体系统是本领域熟知的。例如,病毒载体可以来源于逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒和慢病毒。在一些实施方案中,本公开的载体是慢病毒载体。慢病毒载体适用于长期基因转移,因为此类载体允许转基因的长期稳定整合以及在子细胞中繁殖。慢病毒载体也优于衍生自致癌逆转录病毒(例如,鼠白血病病毒)的载体,因为慢病毒载体可以转导非增殖性细胞。在一些实施方案中,本公开的载体是腺病毒载体(A5/35)。在一些实施方案中,本公开的载体含有在至少一种生物体中发挥功能的复制起点、启动子序列、方便的限制性核酸内切酶位点和一个或多个选择性标记(例如,W001/96584; W001/29058; 和US6326193)。对于将基因转移至哺乳动物细胞,已经开发出许多基于病毒的系统。可以使用

本领域已知的技术将选定的基因插入载体中并包装在逆转录病毒颗粒中。然后可以分离重组病毒并将重组病毒体内或离体递送至哺乳动物细胞中。许多逆转录病毒系统是本领域已知的。

[0275] 在一些实施方案中,本公开的载体包含另外的启动子元件,诸如调节转录起始频率的增强子。增强子通常定位于起始位点上游30bp至110bp的区域,虽然许多启动子已经显示出还含有起始位点下游的功能元件。启动子元件之间的间隔可以是柔性的,因此当元件相对于彼此倒置或移动时,启动子功能得以保留。例如,在胸苷激酶(tk)启动子中,启动子元件之间的间隔可以在活性开始下降之前增加至间隔50bp。根据启动子的不同,单个元件可以协同或独立发挥作用以活化转录。示例性启动子可以包括但不限于SFFV基因启动子、EFS基因启动子、CMV IE基因启动子、EF1a启动子、泛素C启动子和磷酸甘油激酶(PGK)启动子。

[0276] 在一些实施方案中,能够在哺乳动物细胞(诸如本公开的免疫反应性细胞)中表达本公开的核酸的启动子是EF1a启动子。天然EF1a启动子驱动延伸因子-1复合物的 $\alpha$ 亚基的表达,该复合物负责将氨酰基tRNA酶促递送至核糖体。EF1a启动子已经广泛用于哺乳动物表达质粒,并且已经显示出可有效驱动克隆到慢病毒载体中的核酸的嵌合受体表达。

[0277] 在一些实施方案中,能够在哺乳动物细胞(诸如本公开的免疫反应性细胞)中表达本公开的核酸的启动子是组成型启动子。例如,合适的组成型启动子是立即早期巨细胞病毒(CMV)启动子。CMV启动子是强组成型启动子,能够驱动可操作地连接至启动子的任何多核苷酸序列的高水平表达。其他合适的组成型启动子包括但不限于泛素C(UbiC)启动子、猿猴病毒40(SV40)早期启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、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(Epstein-Barr)病毒立即早期启动子、劳斯(Rous)肉瘤病毒启动子、肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、延伸因子-1a启动子、血红蛋白启动子和肌酸激酶启动子。

[0278] 在一些实施方案中,能够在哺乳动物细胞(诸如本公开的免疫反应性细胞)中表达本公开的核酸的启动子是诱导型启动子。诱导型启动子的使用可以提供分子开关,当启动子可操作地连接至核酸时,分子开关能够诱导或阻遏本公开的核酸的表达。诱导型启动子的实例包括但不限于金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素启动子。

[0279] 在一些实施方案中,本公开的载体可以进一步包含促进分泌的信号序列、多腺苷酸化信号和转录终止子、允许附加型复制的元件和/或允许选择的元件。

[0280] 在一些实施方案中,本公开的载体可以进一步包含选择性标记基因和/或报告基因,以促进从已经用载体转导的细胞群中鉴定和选择表达嵌合受体的细胞。在一些实施方案中,选择性标记可以由从载体分离并且用于共转染程序的核酸编码。选择性标记或报告基因可以侧接适当的调节序列以允许在宿主细胞中表达。选择性标记的实例包括但不限于抗生素抗性基因,诸如neo等等。

[0281] 在一些实施方案中,报告基因可以用于鉴定经转导的细胞和用于评估调控序列的功能。如本文所公开,报告基因是不存在于受体生物体或组织中或者不由受体生物体或组织表达的基因,该基因编码多肽,该多肽的表达产生容易检测的性质,诸如酶活性。报告基因的表达可以在将核酸引入受体细胞后的合适时间测定。报告基因的实例包括但不限于编码萤光素酶的基因、编码 $\beta$ -半乳糖苷酶的基因、编码氯霉素乙酰基转移酶的基因、编码分泌

型碱性磷酸酶的基因和编码绿色荧光蛋白的基因。合适的表达系统是本领域熟知的并且可以使用已知技术制备或商购获得。在一些实施方案中,具有显示出报告基因的最高表达水平的最小5'侧翼区的构建体被鉴定为启动子。此类启动子区可以连接至报告基因并用于评估试剂的调节启动子驱动的转录的能力。

[0282] 在一些实施方案中,包含编码本公开的嵌合受体的核酸序列的载体还包含编码增加嵌合受体活性的多肽的第二核酸。

[0283] 在表达EMCN特异性蛋白质的细胞包含两种或更多种异源性蛋白质(例如,两种或更多种嵌合受体)的实施方案中,单个核酸可以编码在单个调节控制元件(例如,启动子)下或者在核酸中包含的每个编码蛋白质的核苷酸序列的单独调节控制元件下的两种或更多种蛋白质。在表达EMCN特异性蛋白质的细胞包含两种或更多种异源性蛋白质的一些实施方案中,每种异源蛋白质可以由单独的核酸编码。在一些实施方案中,每个单独的核酸包含其自身的控制元件(例如,启动子)。在一些实施方案中,单个核酸编码两个或更多个嵌合受体并且编码嵌合受体的核苷酸序列在相同的阅读框中并且被表达为单个多肽链。在这些实施方案中,两个或更多个嵌合受体可以被一个或多个肽切割位点(诸如自切割位点或胞内蛋白酶的底物)分开。合适的肽切割位点可以包括但不限于T2A肽切割位点、P2A肽切割位点、E2A肽切割位点和F2A肽切割位点。在一些实施方案中,两个或更多个嵌合受体包含T2A肽切割位点。在一些实施方案中,两个或更多个嵌合受体包含E2A肽切割位点。在一些实施方案中,两个或更多个嵌合受体包含T2A和E2A肽切割位点。

[0284] 将基因引入和表达至细胞中的方法是本领域熟知的。例如,在一些实施方案中,表达载体可以通过物理、化学或生物学手段转移至宿主细胞中。用于将核酸引入宿主细胞的物理手段的实例包括但不限于磷酸钙沉淀、脂转染、粒子轰击、显微注射和电穿孔。用于将核酸引入宿主细胞的化学手段的实例包括但不限于胶体分散系统、大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠粒和基于脂质的系统(包括水包油乳液、胶束、混合胶束和脂质体)。用于将核酸引入宿主细胞的生物学手段的实例包括但不限于使用DNA和RNA载体。

[0285] 在一些实施方案中,脂质体可以用作非病毒递送系统,以将本公开的核酸或载体体外、离体或体内引入宿主细胞。在一些实施方案中,核酸可以与脂质缔合,例如通过包封在脂质体的水性内部、散布在脂质体的脂质双层内、经由连接分子(与脂质体和核酸二者缔合)附接至脂质体、包埋在脂质体中、与脂质体络合、分散在含有脂质的溶液中、与脂质混合、与脂质组合、作为悬浮液包含在脂质中、包含在胶束中或与胶束络合或者与脂质缔合。如本文所公开,脂质相关核酸或载体组合物不限于溶液中的任何特定结构。在一些实施方案中,此类组合物可以存在于双层结构中,作为胶束或具有“塌缩”结构。此类组合物也可以散布于溶液中,形成尺寸或形状不均匀的聚集体。如本文所公开,脂质是脂肪物质,该脂肪物质可以是天然存在的或合成的。在一些实施方案中,脂质可以包括天然存在于细胞质中的脂肪滴或者含有长链脂族烃及其衍生物(诸如脂肪酸、醇、胺、氨基醇和醛)的化合物类别。合适的脂质可以从商业来源获得并且包括但不限于二肉豆蔻基磷脂酰胆碱(“DMPC”)、二鲸蜡基磷酸(“DCP”)、胆固醇和二肉豆蔻基磷脂酰甘油(“DMPG”)。溶于氯仿或氯仿/甲醇中的脂质储液可以储存在约-20°C下。氯仿被用作溶剂,因为它比甲醇更容易蒸发。如本文所用,“脂质体”可以涵盖通过产生包封的脂质双层或聚集体来形成的多种单层和多层脂质媒介物。在一些实施方案中,脂质体可以表征为具有带磷脂双层膜和内部水性介质的囊泡

结构。在一些实施方案中,多层脂质体可以具有由水性介质分开的多个脂质层。当磷脂悬浮于过量的水溶液中时,多层脂质体可以自发形成。在一些实施方案中,脂质组分在形成封闭结构之前可以经历自我重排,并且可以在脂质双层之间包埋水和溶解的溶质。在一些实施方案中,脂质可以呈现胶束结构或者仅作为脂质分子的不均匀聚集体存在。

[0286] 在一些实施方案中,本公开的核酸或载体被引入哺乳动物宿主细胞,诸如本公开的免疫反应性细胞中。在一些实施方案中,本公开的核酸或载体在宿主细胞中的存在可以通过本领域已知的任何合适的测定法来确认,所述测定法包括但不限于Southern印迹测定、Northern印迹测定、RT-PCR、PCR、ELISA测定法和Western印迹测定法。

[0287] 在一些实施方案中,本公开的核酸或载体被稳定地转导到本公开的免疫反应性细胞中。在一些实施方案中,表现出核酸或载体的稳定表达的细胞在转导之后表达编码的嵌合受体至少1周、至少2周、至少3周、至少4周、至少5周、至少6周、至少7周、至少8周、至少3个月、至少6个月、至少9个月或至少12个月。

[0288] 在本公开的EMCN特异性蛋白质(例如,嵌合受体)在细胞中瞬时表达的实施方案中,本公开的编码EMCN特异性蛋白质的核酸或载体被转染到本公开的免疫反应性细胞中。在一些实施方案中,免疫反应性细胞在转染之后表达EMCN特异性蛋白质约4天、约5天、约6天、约7天、约8天、约9天、约10天、约11天、约12天、约13天、约14天或约15天。

[0289] 在一些实施方案中,核酸构建体编码双顺反子编码的嵌合抗原受体。在一些实施方案中,编码的双顺反子嵌合抗原受体包含EMCN CAR(诸如EMCN抑制性CAR)和对第二抗原具有特异性的CAR(诸如,肿瘤靶向性嵌合受体)。

[0290] 在一些实施方案中,核酸构建体编码二价嵌合抗原受体。在一些实施方案中,编码的二价嵌合抗原受体包含EMCN抗原结合结构域和第二抗原结合结构域。

[0291] 药物组合物和施用

[0292] 本公开的某些方面涉及包含一种或多种本公开的EMCN特异性蛋白质(例如,嵌合受体)或者表达此类一种或多种EMCN特异性蛋白质的本公开的免疫反应性细胞的组合物(例如,药物组合物)。在一些实施方案中,包含EMCN特异性蛋白质(例如,嵌合受体)或者表达此类EMCN特异性蛋白质的经遗传修饰的免疫反应性细胞的组合物可以全身或直接提供给受试者以用于治疗增殖性病症,诸如骨髓疾病。在某些实施方案中,组合物被直接注射到所关注的器官(例如,受障碍影响的器官)中。或者,组合物可以间接提供给所关注的器官,例如,通过施用于循环系统(例如,肿瘤脉管系统)。可以在组合物的施用之前、期间或之后提供扩增剂和分化剂,以增加T细胞、NK细胞或CTL细胞的体外或体内产生。

[0293] 包含本公开的经遗传修饰的细胞的组合物可以在任何生理上可接受的媒介物中施用,例如血管内施用,虽然它们也可以被引入骨或其他方便的位置,其中经遗传修饰的细胞可以找到再生和分化的适当部位(例如,胸腺)。在一些实施方案中,可以施用至少 $1 \times 10^5$ 个细胞,最终达到 $1 \times 10^{10}$ 或更多细胞。包含本公开的经遗传修饰的细胞的组合物可以包含纯化的细胞群。用于确定细胞群中的经遗传修饰的细胞的百分比的方法是本领域熟知的,并且包括但不限于荧光活化细胞分选(FACS)。在一些实施方案中,细胞群中的经遗传修饰的细胞的纯度可以为细胞群中约50%、约55%、约60%、或约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约97%、约98%、约99%或更多的细胞。剂量可以由本领域的技术人员容易地调整(例如,纯度降低可能需要增加剂量)。细胞可以通过注射、导管等等来

引入。在一些实施方案中,还可以包含因子,例如,IL-2、IL-3、IL-6、IL-11、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21、G-CSF、MCSF、GM-CSF、 $\gamma$ -干扰素和促红细胞生成素。

[0294] 在某些实施方案中,组合物是药物组合物,所述药物组合物包含经遗传修饰的细胞(诸如免疫反应性细胞或其祖细胞)和药学上可接受的载剂。施用可以是自体的或异源的。例如,免疫反应性细胞或祖细胞可以从一个受试者获得,并且施用于同一受试者或不同的、相容的受试者。在一些实施方案中,本公开的免疫反应性细胞或它们的子代可以来源于外周血细胞(例如,体内、离体或体外来源)并且可以通过局部注射施用,包括导管施用、全身注射、局部注射、静脉内注射或肠胃外施用。当施用本公开的治疗组合物(例如,含有本公开的经遗传修饰的细胞的药物组合物)时,该治疗组合物通常被配制成单位剂量注射用形式(溶液、悬浮液、乳液)。

[0295] 制剂

[0296] 本公开的某些方面涉及包含本公开的EMCN特异性蛋白质(例如,嵌合受体)或者表达此类蛋白质的经遗传修饰的细胞(例如,本公开的免疫反应性细胞)的组合物的制剂。在一些实施方案中,包含经遗传修饰的细胞的本公开的组合物可以作为无菌液体制备剂提供,所述制备剂包括但不限于等渗水溶液、悬浮液、乳液、分散体和粘性组合物,它们可以被缓冲至选定的pH。液体制备剂通常比凝胶、其他粘性组合物和固体组合物更容易制备。另外,液体组合物可以更便于施用,尤其是通过注射施用。在一些实施方案中,粘性组合物可以在适当的粘度范围内配制以提供更长的与特定组织的接触期。液体或粘性组合物可以包含载剂,该载剂可以是含有例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、多元醇(例如,甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)以及它们的合适的混合物的溶剂或分散介质。

[0297] 在一些实施方案中,无菌注射用溶液可以根据需要通过将溶于足量的适当溶剂中的本公开的经遗传修饰的细胞掺入各种量的任何其他组分来制备。此类组合物可以与合适的载剂、稀释剂或赋形剂(诸如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等等)掺和。在一些实施方案中,组合物也可以是冻干的。根据施用途径和所需的制备剂,组合物可以含有辅助物质,诸如润湿剂、分散剂、pH缓冲剂和抗微生物剂。

[0298] 在一些实施方案中,本公开的组合物可以另外包含各种添加剂,所述添加剂可以增强组合物的稳定性和无菌性。此类添加剂的实例包括但不限于抗微生物防腐剂、抗氧化剂、螯合剂和缓冲剂。在一些实施方案中,微生物污染可以通过包含各种抗细菌剂和抗真菌剂中的任一种来防止,所述抗细菌剂和抗真菌剂包括但不限于对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等等。本公开的注射用药物制剂的延长吸收可以通过使用合适的延迟吸收剂(诸如单硬脂酸铝和明胶)来实现。

[0299] 在一些实施方案中,本公开的组合物可以是等渗的,即具有与血液和泪液相同的渗透压。在一些实施方案中,所期望的等渗性可以使用例如氯化钠、右旋糖、硼酸、酒石酸钠、丙二醇或者其他无机或有机溶质来实现。

[0300] 在一些实施方案中,选择具有化学惰性并且不影响本公开的经遗传修饰的细胞的活力或功效的本公开的制剂的组分。

[0301] 关于本公开的经遗传修饰的细胞的治疗使用的一个考虑因素是实现最佳功效所需的细胞的数量。在一些实施方案中,待施用的细胞的数量将因接受治疗的受试者而异。在某些实施方案中,施用于有需要的受试者的经遗传修饰的细胞的数量可以在 $1 \times 10^4$ 个细胞

至 $1 \times 10^{10}$ 个细胞的范围内。在一些实施方案中,被认为是有效剂量的细胞的精确数量可以基于每个受试者各自的因素,这些因素包括他们的体格、年龄、性别、体重和特定受试者的状况。基于本公开和本领域的知识,本领域的技术人员可以容易地确定剂量。

[0302] 异源性部分和修饰

[0303] 在另外的系列实施方案中,本文的EMCN特异性蛋白质(例如包含具有表A中列出的氨基酸序列中的一者或多者的抗原结合结构域的EMCN特异性嵌合蛋白)包含另外的部分和/或修饰。

[0304] 药物缀合物

[0305] 在多个实施方案中,包含如本文所述的EMCN特异性抗原结合结构域的蛋白质被缀合至治疗剂(即药物)以形成抗体-药物缀合物。治疗剂包括但不限于化学治疗剂、显像剂(例如,放射性同位素)、免疫调节剂(例如,细胞因子、趋化因子或检查点抑制剂)和毒素(例如,细胞毒性剂)。在某些实施方案中,治疗剂通过接头肽附接至抗原结合结构域,如本文所更详细讨论。

[0306] 可以适用于将药物缀合至本文公开的抗原结合结构域(例如,具有表A中列出的氨基酸序列中的一者或多者)的制备抗体-药物缀合物(ADC)的方法在例如,美国专利8,624,003(锅法)、美国专利8,163,888(一步法)、美国专利5,208,020(两步法)、美国专利8,337,856、美国专利5,773,001、美国专利7,829,531、美国专利5,208,020、美国专利7,745,394、WO 2017/136623、WO 2017/015502、WO 2017/015496、WO 2017/015495、WO 2004/010957、WO 2005/077090、WO 2005/082023、WO 2006/065533、WO 2007/030642、WO 2007/103288、WO 2013/173337、WO 2015/057699、WO 2015/095755、WO 2015/123679、WO 2015/157286、WO 2017/165851、WO 2009/073445、WO 2010/068759、WO 2010/138719、WO 2012/171020、WO 2014/008375、WO 2014/093394、WO 2014/093640、WO 2014/160360、WO 2015/054659、WO 2015/195925、WO 2017/160754, Storz (MAbs. 2015年11月-12月;7(6):989-1009), Lambert等人(Adv Ther, 2017 34:1015). Diamantis等人(British Journal of Cancer, 2016, 114, 362-367), Carrico等人(Nat Chem Biol, 2007.3:321-2), We等人(Proc Natl Acad Sci USA, 2009.106:3000-5), Rabuka等人(Curr Opin Chem Biol., 2011 14:790-6), Hudak等人(Angew Chem Int Ed Engl., 2012:4161-5), Rabuka等人(Nat Protoc., 2012 7:1052-67), Agarwal等人(Proc Natl Acad Sci USA., 2013, 110:46-51), Agarwal等人(Bioconjugate Chem., 2013, 24:846-851), Barfield等人(Drug Dev. and D., 2014, 14:34-41), Drake等人(Bioconjugate Chem., 2014, 25:1331-41), Liang等人(J Am Chem Soc., 2014, 136:10850-3), Drake等人(Curr Opin Chem Biol., 2015, 28:174-80)和York等人(BMC Biotechnology, 2016, 16(1):23)中有所描述,这些文献中的每篇的全部教导内容据此以引用的方式整体并入。

[0307] 其他结合部分

[0308] 在多个实施方案中,EMCN特异性嵌合蛋白包含具有表A中列出的氨基酸序列中的一者或多者的抗原结合结构域以及一个或多个另外的结合部分。在某些实施方案中,结合部分是抗体片段或抗体形式,包括但不限于全长抗体、Fab片段、Fv、scFv、串联scFv、双价抗体、sc双价抗体、DART、tandAb、微抗体、骆驼科动物VHH以及本领域的技术人员已知的其他抗体片段或形式。示例性抗体和抗体片段形式在Brinkmann等人(MABS, 2017, 第9卷, 第2期,

182-212)中有所详细描述,该文献的全部教导内容以引用的方式并入本文。

[0309] 在特定实施方案中,一个或多个另外的结合部分附接至EMCN特异性抗原结合结构域的一个或多个肽的C-末端,所述结构域诸如VH和/或VL、Fab重链和/或轻链片段或者scFv。在特定实施方案中,一个或多个另外的结合部分附接至EMCN特异性抗原结合结构域的一个或多个肽的N-末端,所述结构域诸如VH和/或VL、Fab重链和/或轻链片段或者scFv。

[0310] 在某些实施方案中,一个或多个另外的结合部分对与EMCN不同的抗原或表位具有特异性。在某些实施方案中,一个或多个另外的结合部分对EMCN具有特异性。

[0311] 在某些实施方案中,一个或多个另外的结合部分使用体外方法附接至本文所述的抗原结合结构域(例如,具有表A中列出的氨基酸序列中的一者或多者),所述体外方法包括但不限于反应化学(例如,点击化学)和亲和标记系统。在某些实施方案中,一个或多个另外的结合部分通过Fc介导的结合(例如,蛋白A/G)附接至本文所述的抗原结合结构域(例如,具有表A中列出的氨基酸序列中的一者或多者)。在某些实施方案中,一个或多个另外的结合部分使用重组DNA技术附接至本文所述的抗原结合结构域(例如,具有表A中列出的氨基酸序列中的一者或多者),诸如编码融合产物的核苷酸序列在同一表达载体(例如,质粒)上的本文所述的抗原结合结构域与另外的结合部分之间。

[0312] 功能性/反应性基团

[0313] 在多个实施方案中,本文所述的抗原结合结构域(例如,具有表A中列出的氨基酸序列中的一者或多者)具有包含官能团或化学反应性基团的修饰,所述官能团或化学反应性基团可以用于下游过程,诸如连接至另外的部分(例如,药物缀合物和另外的结合部分)和下游纯化过程。

[0314] 在某些实施方案中,修饰是化学反应性基团,所述化学反应性基团包括但不限于反应性硫醇(例如,基于马来酰亚胺的反应性基团)、反应性胺(例如,基于N-羟基琥珀酰亚胺的反应性基团)、“点击化学”基团(例如反应性炔烃基团)和携带甲酰甘氨酸(FG1y)的醛。在某些实施方案中,修饰是官能团,所述官能团包括但不限于亲和肽序列(例如,HA、HIS、FLAG、GST、MBP和Strep系统等)。在某些实施方案中,官能团或化学反应性基团具有可切割的肽序列。在特定实施方案中,可切割的肽通过包括但不限于以下的手段来切割:光分解、化学切割、蛋白酶切割、还原条件和pH条件。在特定实施方案中,蛋白酶切割通过胞内蛋白酶来进行。在特定实施方案中,蛋白酶切割通过胞外或膜相关蛋白酶来进行。采用蛋白酶切割的ADC疗法在Choi等人(Theranostics,2012;2(2):156-178.)中有所更详细描述,该文献的全部教导内容据此以引用的方式并入。

[0315] 治疗方法

[0316] 本公开的某些方面涉及使用本公开的蛋白质(例如,嵌合受体)和表达此类蛋白质(例如,嵌合受体)的经遗传修饰的细胞(例如,免疫反应性细胞)来治疗有需要的受试者的方法。在一些实施方案中,本公开的方法可用于治疗受试者的癌症,诸如骨髓疾病。在一些实施方案中,骨髓疾病是骨髓增生异常综合征、骨髓增生性赘生物、慢性髓单核细胞白血病、急性骨髓性白血病(AML)、急性髓细胞性白血病、急性早幼粒细胞白血病、急性髓单核细胞白血病、慢性髓细胞性白血病或真性红细胞增多症。在一些实施方案中,骨髓疾病是AML。本公开的其他方面涉及本公开的嵌合受体和表达此类嵌合受体的经遗传修饰的细胞(例如,免疫反应性细胞)在用于治疗受试者(诸如免疫受损的人受试者)的病原体感染或其

他感染性疾病的方法中的使用。在一些实施方案中,本公开的方法可以包括以有效实现所期望的效果的量施用本公开的经遗传修饰的细胞,所述效果包括但不限于缓和现有病症、预防病症、治疗现有病症、管理现有病症或者预防病症的复发或反复。在一些实施方案中,有效量可以在本公开的经遗传修饰的细胞(例如,免疫反应性细胞)的一次或一系列施用中提供。在一些实施方案中,有效量可以通过推注或通过连续灌注提供。

[0317] 如本文所公开,“有效量”或“治疗有效量”是足以在治疗时影响有利的或期望的临床结果的量。有效量可以以一次或多次剂量施用于受试者。就治疗而言,有效量是足以缓和、改善、稳定、逆转或减缓疾病的进展,或者减少疾病的病理结果的量。有效量通常由内科医生根据具体情况确定并且在本领域的技术人员的技术范围内。在确定达到有效量的适当剂量时,通常会考虑若干因素。这些因素包括受试者的年龄、性别和体重、正在治疗的病症、病症的严重程度以及所施用的免疫反应性细胞的形式和有效浓度。

[0318] 对于使用抗原特异性细胞(例如,免疫反应性细胞,诸如T细胞)的过继性免疫疗法,通常输注在约 $1 \times 10^6$ 至 $1 \times 10^{10}$ 个细胞的范围内(例如,约 $1 \times 10^9$ 个细胞)的细胞剂量。在将细胞施用于受试者并随后分化时,诱导针对特定抗原具有特异性的免疫反应性细胞。在一些实施方案中,免疫反应性细胞的诱导可以包括但不限于诸如通过缺失或无反应性来使抗原特异性细胞失活。失活对于诸如在自身免疫性疾病中建立或重建耐受性特别有用。经遗传修饰的细胞可以通过本领域已知的任何方法来施用,所述方法包括但不限于静脉内、皮下、结内、瘤内、鞘内、胸膜内、腹膜内以及直接施用至胸腺。

[0319] 在一些实施方案中,使用方法涵盖抑制免疫反应的方法。抑制免疫反应可以指预防、减弱或抑制细胞介导的免疫反应,例如,免疫调节细胞的表面上表达的嵌合受体诱导的免疫反应。在实施方案中,所述方法包括预防、减弱或抑制免疫调节细胞的表面上表达的活化性嵌合受体的活化。

[0320] 在一些实施方案中,本公开的嵌合抑制性受体用于预防、减弱、抑制或压制肿瘤靶向性嵌合受体(例如,活化性CAR)引发的免疫反应。例如,免疫调节细胞表达识别抗原靶标1(例如,非肿瘤抗原)的抑制性嵌合抗原和识别不同的抗原靶标2(例如,肿瘤靶标)的肿瘤靶向性嵌合受体。在这个实例中,当免疫调节细胞接触靶细胞时,抑制性和肿瘤靶向性嵌合受体可以结合至或不结合至它们的同源抗原。在这个实例的情形中,当靶细胞是表达抗原靶标1和抗原靶标2二者的非肿瘤细胞时,抑制性嵌合受体和肿瘤靶向性受体二者都可以被活化。在这种情况下,抑制性嵌合受体的活化引起对肿瘤靶向性嵌合受体信号传导的预防、减弱或抑制,并且免疫调节细胞未被活化。类似地,在靶细胞是仅表达抗原靶标1的非肿瘤细胞的示例性例子中,只有抑制性嵌合受体可以被活化。相比之下,在靶细胞是仅表达抗原靶标2的肿瘤细胞的示例性例子中,抑制性嵌合受体不能被活化,而肿瘤靶向性嵌合受体可以被活化,从而引起使免疫调节细胞活化的信号转导。

[0321] 由肿瘤靶向性嵌合受体引发的免疫反应的抑制可以是肿瘤靶向性嵌合受体的活化的抑制或减少、肿瘤靶向性嵌合受体的信号转导的抑制或减少、或者免疫调节细胞的活化的抑制或减少。与肿瘤靶向性嵌合受体的活化、免疫调节细胞的信号转导或活化相比,与缺乏抑制性嵌合受体的免疫调节细胞相比,抑制性嵌合受体可以抑制肿瘤靶向性嵌合受体的活化、肿瘤靶向性嵌合受体的信号转导或肿瘤靶向性嵌合受体对免疫调节细胞的活化约1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、

90倍、100倍或更多倍。在一些实施方案中，抑制是指肿瘤靶向性嵌合受体在被活化之前或之后活性的降低或减小。

[0322] 免疫反应可以从活化的免疫调节细胞产生和分泌细胞因子或趋化因子。免疫反应可以是针对靶细胞的细胞介导的免疫反应。

[0323] 在一些实施方案中，嵌合抑制性受体能够压制活化的免疫调节细胞的细胞因子产生。在一些实施方案中，嵌合抑制性受体能够压制针对靶细胞的细胞介导的免疫反应，其中免疫反应由免疫调节细胞的活化诱导。

[0324] 治疗性处理

[0325] 在一些实施方案中，本公开的方法增加有需要的受试者的免疫反应。在一些实施方案中，本公开的方法包括用于治疗 and/或预防受试者的骨髓疾病的方法。在一些实施方案中，受试者是人。在一些实施方案中，适合疗法的人受试者可以包括可通过临床标准区分的两个治疗组。患有“晚期疾病”或“高肿瘤负荷”的受试者是携带可在临床上测量的肿瘤的受试者。可在临床上测量的肿瘤是可以根据肿瘤质量来检测的肿瘤（例如，根据白血病细胞的百分比、通过触诊、CAT扫描、超声检查、乳房X光检查或X射线检查来测量；它们本身的阳性生物化学或组织病理学标志物不足以鉴定该群体）。在一些实施方案中，本公开的药物组合物被施用于这些受试者以引发抗肿瘤反应，目的是缓解他们的病症。在一些实施方案中，肿瘤质量减少因药物组合物的施用而发生，但是任何临床改善都将构成有益效果。在一些实施方案中，临床改善包括降低风险或进展速率或者减少肿瘤的病理结果。在一些实施方案中，第二组合合适的人受试者是“佐剂组”受试者。这些受试者是具有骨髓疾病病史但是对另一种疗法模式有反应的个体。先前疗法可以包括但不限于手术切除、放射疗法和/或传统化学疗法。因此，这些个体不具有可在临床上测量的肿瘤。然而，他们被怀疑处于疾病进展的风险中，所述疾病在原始肿瘤部位附近，或通过转移产生。在一些实施方案中，该组可以进一步细分为高风险和低风险个体。可以根据初始治疗之前或之后观察到的特征来进行细分。这些特征在临床领域中是已知的，并且针对每种不同的骨髓疾病被适当地定义。高风险亚组的典型特征是肿瘤入侵邻近组织或显示出累及淋巴结。

[0326] 在如本文所述的增加免疫反应的任何和所有方面，特征或功能方面的任何增加或减少或改变是与未与如本文所述的免疫反应性细胞接触的细胞相比的。

[0327] 增加免疫反应可以是增强免疫反应或诱导免疫反应二者。例如，增加免疫反应涵盖开始或起始免疫反应，或者增加或放大正在进行的或现有的免疫反应。在一些实施方案中，治疗诱导免疫反应。在一些实施方案中，诱导的免疫反应是适应性免疫反应。在一些实施方案中，诱导的免疫反应是先天免疫反应。在一些实施方案中，治疗增强免疫反应。在一些实施方案中，增强的免疫反应是适应性免疫反应。在一些实施方案中，增强的免疫反应是先天免疫反应。在一些实施方案中，治疗增加免疫反应。在一些实施方案中，增加的免疫反应是适应性免疫反应。在一些实施方案中，增加的免疫反应是先天免疫反应。

[0328] 在一些实施方案中，另一组受试者是具有骨髓疾病遗传倾向但是尚未证实骨髓疾病的临床体征的那些。例如，对于与AML相关的遗传突变测试呈阳性但是仍处于育龄期的女性，可以受益于在预防性处理中接受本公开的细胞（例如，免疫反应性细胞）中的一种或多种，以预防AML的发生，直到适合进行预防性手术。在一些实施方案中，受试者可以患有晚期疾病形式，在这种情况下，治疗目标可以包括缓和或逆转疾病进展以及/或者改善副作用。

在一些实施方案中,受试者可以具有病症史,他们已经接受过治疗,在这种情况下,治疗目标通常可以包括减少或延迟复发的风险。

#### [0329] 组合疗法

[0330] 在一些实施方案中,表达一种或多种蛋白质(包含本公开的抗原结合结构域(例如,scFv),诸如本公开的嵌合受体)的本公开的经遗传修饰的细胞(例如,免疫反应性细胞)可以与其他已知的药剂和疗法组合使用。在一些实施方案中,本公开的组合疗法包括本公开的经遗传修饰的细胞,该细胞可以与一种或多种另外的治疗剂组合施用。在一些实施方案中,经遗传修饰的细胞和一种或多种另外的治疗剂可以同时、在同一或分开的组合物中或者依次施用。对于依次施用,可以首先施用遗传修饰,然后可以施用一种或多种另外的药剂,或者可以颠倒施用顺序。在一些实施方案中,经遗传修饰的细胞被进一步修饰为表达一种或多种另外的治疗剂。

[0331] 在一些实施方案中,本公开的经遗传修饰的细胞可以用于与手术、化学疗法、放射疗法、免疫抑制剂(例如,环孢菌素、硫唑嘌呤、氮甲蝶呤、霉酚酸酯和FK506)、抗体或其他免疫消融剂(例如,CAMPATH或抗CD3抗体)、细胞毒素、氟达拉滨(fludarabine)、环孢菌素(cyclosporin)、FK506、雷帕霉素(rapamycin)、霉酚酸、类固醇、FR901228、细胞因子、照射和肽疫苗组合的治疗方案。

[0332] 在一些实施方案中,本公开的经遗传修饰的细胞可以与淋巴细胞剔除剂组合使用。在免疫疗法之前,合适的淋巴细胞剔除剂降低或减少淋巴细胞,例如,B细胞淋巴细胞和/或T细胞淋巴细胞。合适的淋巴细胞剔除剂的实例包括但不限于氟达拉滨、环磷酰胺、皮质类固醇、阿仑单抗、全身照射(TBI)以及它们的任何组合。

[0333] 在一些实施方案中,本公开的经遗传修饰的细胞可以与化学治疗剂组合使用。合适的化学治疗剂包括但不限于蒽环(例如,多柔比星(doxorubicin))、长春花生物碱(例如,长春花碱(vinblastine)、长春新碱(vincristine)、长春地辛(vindesine)、长春瑞滨(vinorelbine))、烷基化剂(例如,环磷酰胺(cyclophosphamide)、达卡巴嗪(decarbazine)、美法仑(melphalan)、异环磷酰胺(ifosfamide)、替莫唑胺(temozolomide))、免疫细胞抗体(例如,阿仑单抗(alemtuzumab)、吉妥珠单抗(gemtuzumab)、利妥昔单抗(rituximab)、托西莫单抗(tositumomab))、抗代谢物(例如,叶酸拮抗剂、嘧啶类似物、嘌呤类似物和腺苷脱氨酶抑制剂,诸如氟达拉滨(fludarabine))、mTOR抑制剂、TNFR糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白(GITR)激动剂、蛋白酶体抑制剂(例如,阿克拉霉素A(aclacinomycin A)、胶霉毒素(gliotoxin)或硼替佐米(bortezomib))、免疫调节剂(诸如沙利度胺(thalidomide)或沙利度胺衍生物)(例如,来那度胺(lenalidomide))。

[0334] 适用于组合疗法的一般化学治疗剂的实例包括但不限于阿那曲唑(anastrozole) (Arimidex®)、比卡鲁胺(bicalutamide) (Casodex®)、硫酸博来霉素(bleomycin sulfate) (Blenoxane®)、白消安(busulfan) (Myleran®)、白消安注射液(Busulfex®)、卡培他滨(capecitabine) (Xeloda®)、N4-戊氧羰基-5-脱氧-5-氟胞苷、卡铂(carboplatin) (Paraplatin®)、卡莫司汀(carmustine) (BiCNU®)、苯丁酸氮芥(chlorambucil) (Leukeran®)、顺铂(cisplatin) (Piatinol®)、克拉屈滨

(cladribine) (Leustatin®)、环磷酰胺(cyclophosphamide) (Cytosan®或Neosar®)、阿糖胞苷(cytarabine)、胞嘧啶阿拉伯糖苷(Cytosar-U®)、阿糖胞苷脂质体注射液(DepoCyt®)、达卡巴嗪(dacarbazine) (DTIC-Dome®)、放线菌素D(Actinomycin D, cosmegen)、盐酸柔红霉素(daunorubicin hydrochloride) (Cerubidine®)、柠檬酸柔红霉素脂质体注射液(DaunoXome®)、地塞米松(dexamethasone)、多西他赛(docetaxel) (Taxotere®)、盐酸多柔比星(doxorubicin hydrochloride) (Adriamycin®, Rubex®)、依托泊苷(etoposide) (Vepesid®)、磷酸氟达拉滨(fludarabine phosphate) (Fludara®)、5-氟尿嘧啶(Adrucil®, Efudex®)、氟他胺(flutamide) (Eulexin®)、替扎他滨(tezacitibine)、吉西他滨(Gemcitabine) (二氟脱氧胞苷)、羟基脲(Hydrea®)、伊达比星(Idarubicin) (Idaniycin®)、异环磷酰胺(ifosfamide) (IFEX®)、伊立替康(irinotecan) (Camptosar®)、L-天冬酰胺酶(ELSPAR®)、甲酰四氢叶酸钙、美法仑(melphalan) (Alkeran®)、6-巯基嘌呤(Purinethol®)、氨甲蝶呤(Folex®)、米托蒽醌(mitoxantrone) (Novantrone®)、麦罗塔(mylotarg)、紫杉醇(paclitaxel) (Taxol®)、菲尼克斯(phoenix) (钇90/MX-DTPA)、喷司他汀(pentostatin)、聚苯丙生(polifeprosan) 20与卡莫司汀(carmustine) 植入膜剂(Gliadel®)、柠檬酸他莫昔芬(tamoxifen citrate) (Nolvadex®)、替尼泊苷(teniposide) (Vumon®)、6-巯鸟嘌呤、噻替哌(thiotepa)、替拉扎明(tirapazamine) (Tirazone®)、注射用盐酸托泊替康(topotecan hydrochloride) (Hycamptin®)、长春花碱(Velban®)、长春新碱(Oncovin®)和长春瑞滨(Navelbine®)。

[0335] 合适的烷基化剂的实例包括但不限于氮芥、乙烯亚胺衍生物、烷基磺酸盐、亚硝基脲和三氮烯、尿嘧啶芥(Aminouracil Mustard®)、

Chlorethaminacil®、Demethyldopan®、Desmethyldopan®、Haemanthamine®、Nordopan®、Uracil nitrogen mustard®、Uracilmostaza®、Uramustin®、Uramustine®)、氯甲碱(chlormethine) (Mustargen®)、环磷酰胺(Cytosan®、Neosar®、Clafen®)、Endoxan®、Procytox®、Rev immune™)、异环磷酰胺(Mitoxana®)、美法仑(melphalan) (Alkeran®)、苯丁酸氮芥(Chlorambucil) (Leukeran®)、哌泊溴烷(pipobroman) (Amedel®、Vercyte®)、三亚乙基蜜胺(Hemel®、Hexalen®、Hexastat®)、三亚乙基硫代磷酰胺、替莫唑胺(Temodar®)、噻替哌(Thioplex®)、白消安(Busilvex®、Myleran®)、卡莫司汀(carmustine) (BiCNU®)、洛莫司汀(lomustine) (CeeNU®)、链脲菌素(streptozocin) (Zanosar®)和达卡巴嗪(DTIC-Dome®)。另外的示例性烷基化剂包

包括但不限于奥沙利铂(Oxaliplatin)(Eloxatin®);替莫唑胺(Temodar®和Temodal®);放线菌素D(也称为actinomycin-D, Cosmegen®);美法仑(也称为L-PAM、L-溶肉瘤素和苯丙氨酸芥, Alkeran®);阿草特氨(Altretamme)(也称为六甲蜜胺(HMM), Hexalen®);卡莫司汀(BiCNU®);苯达莫司汀(Bendamustine)( Treanda® );白消安(Busulfex®和Myleran®);卡铂( Paraplatin® );洛莫司汀(也称为CCNU, CeeNU®);顺铂(也称为CDDP、Platinol®和Platinol®-AQ);苯丁酸氮芥(Leukeran®);环磷酰胺(Cytoxan®和Neosar®);达卡巴嗪(也称为DTIC、DIC和咪唑甲酰胺, DTIC-Dome®);阿草特氨(也称为六甲蜜胺(HMM), Hexalen®);异环磷酰胺(Ifex®);泼尼莫司汀(Prednumustine);甲基苄肼(Procarbazine)(Matulane®);双氯乙基甲胺(Mechlorethamine)(也称为氮芥、莫司汀和盐酸二氯甲基二乙胺, Mustargen®);链脲菌素(Zanosar®);噻替哌(也称为硫代磷酰胺、TESPA和TSPA, Thioplex®);环磷酰胺(Endoxan®、Cytosan®、Neosar®、Procytox®、Revimmune®);和盐酸苯达莫司汀(Treanda®)。

[0336] 合适的mTOR抑制剂的实例包括但不限于替西罗莫司(temsirolimus)、雷帕洛莫司(ridaforolimus)(地磷莫司(deferolimus))、AP23573、MK8669、依维莫司(everolimus)(Afimtor®或RAD001)、雷帕霉素(rapamycin)(AY22989, Sirolimus®)和XL765。

[0337] 合适的免疫调节剂的实例包括但不限于阿夫妥珠单抗(afutuzumab)、培非格司亭(pegfilgrastim)(Neulasta®)、来那度胺(CC-5013, Revlimid®)、沙利度胺(Thalomid®)、阿克替米(actimid)(CC4047)和IRX-2。

[0338] 合适的蒽环的实例包括但不限于多柔比星(Adriamycin®和Rubex®);博来霉素(bleomycin)(lenoxane®);柔红霉素(盐酸柔红霉素、道诺明(daunomyem)和盐酸红比霉素(rubidomycin hydrochloride), Cerubidine®);柔红霉素脂质体(柠檬酸柔红霉素脂质体, DaunoXome®);米托蒽醌(DHAD, Novantrone®);表柔比星(epirubicin)(Ellence™);伊达比星(Idamycin®、Idamycin PES®);丝裂霉素C(Mutamycin®);格尔德霉素(geldanamycin);除莠霉素(herbimycin);拉维霉素(ravidomycin);和脱乙酰基艾拉维多霉素(desacet lraavidomycin)。

[0339] 合适的长春花生物碱的实例包括但不限于酒石酸长春瑞滨(Navelbine®)、长春新碱(Oncovin®)和长春地辛(Eldisine®);长春花碱(也称为硫酸长春花碱、长春花碱硫酸盐(vincal leukoblastine)和VLB, Alkaban-AQ®和Velban®);和长春瑞滨(Navelbme®)。

[0340] 合适的蛋白酶体抑制剂的实例包括但不限于硼替佐米(Velcade®);卡非佐米(carfilzomib);马里佐米(marizomib)(NPI-0052);柠檬酸伊沙佐米(ixazomib citrate)(MLN-9708);德兰佐米(delanzomib)(CEP-18770);和ONX-0912。

[0341] 在一些实施方案中,本公开的经遗传修饰的细胞与CD20抑制剂(例如,抗CD20抗

体)或其片段组合施用。示例性抗CD20抗体包括但不限于利妥昔单抗(rituximab)、奥法木单抗(ofatumumab)、奥瑞珠单抗(ocrelizumab)、维妥珠单抗(veltuzumab)、阿托珠单抗(obinutuzumab)、TRU-015(Trubion Pharmaceuticals)、奥卡拉珠单抗(ocaratuzumab)和Prol31921。

[0342] 在一些实施方案中,本公开的经遗传修饰的细胞与溶瘤病毒组合施用。在一些实施方案中,溶瘤病毒能够在癌细胞中选择性地复制并且触发癌细胞的死亡或减缓癌细胞的生长。在一些情况下,溶瘤病毒对非癌细胞无影响或影响很小。合适的溶瘤病毒包括但不限于溶瘤腺病毒、溶瘤单纯疱疹病毒、溶瘤逆转录病毒、溶瘤细小病毒、溶瘤牛痘病毒、溶瘤辛德毕斯(Sinbis)病毒、溶瘤流感病毒或溶瘤RNA病毒(例如,溶瘤呼肠病毒、溶瘤新城疫病毒(NDV)、溶瘤麻疹病毒或溶瘤水疱性口炎病毒(VSV))。在一些实施方案中,溶瘤病毒是重组溶瘤病毒。

[0343] 在一些实施方案中,本公开的经遗传修饰的细胞与蛋白酪氨酸磷酸酶抑制剂(例如,SHP-1抑制剂或SHP-2抑制剂)组合施用于受试者。在一个实施方案中,本公开的经遗传修饰的细胞可以与激酶抑制剂组合使用。合适的激酶抑制剂的实例包括但不限于CDK4抑制剂、CDK4/6抑制剂、BTK抑制剂、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)抑制剂、mTOR抑制剂、MNK抑制剂和间变性淋巴瘤激酶(ALK)抑制剂。

[0344] 在一些实施方案中,本公开的经遗传修饰的细胞与骨髓源性抑制细胞(MDSC)的调节剂组合施用于受试者。MDSC在很多实体瘤的外周和肿瘤部位积聚。这些细胞压制T细胞反应,从而阻碍表达嵌合受体的细胞疗法的功效。不受理论的束缚,据信MDSC调节剂的施用增强本公开的经遗传修饰的细胞的功效。合适的MDSC的调节剂的实例包括但不限于MCS110和BLZ945。

[0345] 在一些实施方案中,本公开的经遗传修饰的细胞与抑制或降低免疫抑制性浆细胞的活性的药剂组合施用于受试者。免疫抑制性浆细胞已经显示出会阻碍T细胞依赖性免疫原性化学疗法,诸如奥沙利铂(Shalapour等人,Nature 2015,521:94-101)。在一个实施方案中,免疫抑制性浆细胞可以表达IgA、白介素(IL)-10和PD-L1中的一者或多者。

[0346] 在一些实施方案中,本公开的经遗传修饰的细胞与白介素-15(IL-15)多肽、白介素-15受体 $\alpha$ (IL-15Ra)多肽或者IL-15多肽和IL-15Ra多肽二者的组合一起施用于受试者。在一些实施方案中,本公开的经遗传修饰的细胞被进一步修饰为表达白介素-15(IL-15)多肽、白介素-15受体 $\alpha$ (IL-15Ra)多肽或者IL-15多肽和IL-15Ra多肽二者的组合。

[0347] 在一些实施方案中,向患有骨髓疾病(例如,AML)的受试者施用本公开的经遗传修饰的细胞与药剂(例如,细胞毒性剂或化疗剂)、生物疗法(例如,抗体,例如,单克隆抗体,或细胞疗法)或抑制剂(例如,激酶抑制剂)的组合。在一些实施方案中,向受试者施用本公开的经遗传修饰的细胞与细胞毒性剂的组合,所述细胞毒性剂例如CPX-351(Celator Pharmaceuticals)、阿糖胞苷、柔红霉素、沃沙洛星(vosaroxin)(Sunesis Pharmaceuticals)、沙帕西他滨(sapacitabine)(Cyclacel Pharmaceuticals)、伊达比星或米托蒽醌。CPX-351是包含摩尔比为5:1的阿糖胞苷和柔红霉素的脂质体制剂。在一些实施方案中,向受试者施用本文所述的表达嵌合受体的细胞与低甲基化剂的组合,所述低甲基化剂例如DNA甲基转移酶抑制剂,例如氮杂胞苷或地西他滨(decitabine)。在一些实施方案中,向受试者施用本公开的经遗传修饰的细胞与生物疗法的组合,所述生物疗法例如抗

体或细胞疗法,例如225Ac-林妥珠单抗(lintuzumab)(Actimab-A;Actinium Pharmaceuticals)、IPH2102(Innate Pharma/Bristol Myers Squibb)、SGN-CD33A(Seattle Genetics)或吉妥珠单抗奥唑米星(gemtuzumab ozogamicin)(Mylotarg;Pfizer)。在一些实施方案中,向受试者施用本公开的经遗传修饰的细胞与FLT3抑制剂的组合,所述FLT3抑制剂例如索拉非尼(sorafenib)(Bayer)、米喹妥林(midostaurin)(Novartis)、奎扎替尼(quizartinib)(Daiichi Sankyo)、克莱拉尼(crenoianib)(Arog Pharmaceuticals)、PLX3397(Daiichi Sankyo)、AKN-028(Akinion Pharmaceuticals)或ASP2215(Asteliast)。在一些实施方案中,向受试者施用本公开的经遗传修饰的细胞与异柠檬酸脱氢酶(IDH)抑制剂的组合,所述异柠檬酸脱氢酶抑制剂例如AG-221(Celgene/Agios)或AG-120(Agios/Celgene)。在一些实施方案中,向受试者施用本公开的经遗传修饰的细胞与细胞周期调节剂的组合,所述细胞周期调节剂例如Polo样激酶1(P1k1)的抑制剂,例如伏拉塞替(volasertib)(Boehringer Ingelheim);或细胞周期蛋白依赖性激酶9(Cdk9)的抑制剂,例如阿伏西地(alvocidib)(Tolero Pharmaceuticals/Sanofi Aventis)。在一些实施方案中,向受试者施用本公开的经遗传修饰的细胞与B细胞受体信号传导网络抑制剂的组合,所述B细胞受体信号传导网络抑制剂例如B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)抑制剂,例如维奈妥拉(venetoclax)(Abbvie/Roche);或Button酪氨酸激酶(Btk)的抑制剂,例如依鲁替尼(ibrutinib)(Pharmacyclics/Johnson&Johnson Janssen Pharmaceutical)。在一些实施方案中,向受试者施用本公开的经遗传修饰的细胞与M1氨基肽酶的抑制剂;组蛋白脱乙酰基酶(HDAC)的抑制剂,例如普西司他(pracinostat)(MEI Pharma);多激酶抑制剂,例如瑞格色替(rigosertib)(Onconova Therapeutics/Baxter/SymBio);或肽CXCR4反激动剂,例如BL-8040(BioLineRx)的组合。

[0348] 在一些实施方案中,可以向受试者施用增强本公开的经遗传修饰的细胞的活性或适合性的药剂。例如,药剂可以抑制调节或调控(例如抑制)T细胞功能的分子。在一些实施方案中,调节或调控T细胞功能的分子是抑制性分子。在一些实施方案中,抑制性分子(诸如程序性死亡1(PD-1))可以降低经遗传修饰的细胞产生免疫效应子反应的能力。合适的抑制性分子的实例包括但不限于PD-1、PD-L1、CTLA4、TIM3、CEACAM(例如,CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14或CD270)、KIR、A2aR、MHC I类、MHC II类、GAL9、腺苷和TGFβ。调节或调控(例如抑制)T细胞功能的分子的抑制,例如通过在DNA、RNA或蛋白质水平上抑制,可以优化本公开的经遗传修饰的细胞的性能。在一些实施方案中,药剂,例如抑制性核酸,例如抑制性核酸,例如抑制性核酸,例如dsRNA,例如siRNA或shRNA,成簇的规律间隔短回文重复序列(CRISPR)、转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)或锌指核酸内切酶(ZFN),可以用于抑制经遗传修饰的细胞中的抑制性分子的表达。在一个实施方案中,抑制剂是shRNA。在一些实施方案中,本公开的经遗传修饰的细胞可以被进一步修饰为表达抑制性核酸,例如抑制性核酸,例如抑制性核酸,例如dsRNA,例如siRNA或shRNA,成簇的规律间隔短回文重复序列(CRISPR)、转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)或锌指核酸内切酶(ZFN),可以用于抑制经遗传修饰的细胞中的抑制性分子的表达。

[0349] 在一个实施方案中,调节或调控(例如抑制)T细胞功能的药剂在本公开的经遗传修饰的细胞内被抑制。在此类实施方案中,抑制调节或调控(例如抑制)T细胞功能的分子的

表达的dsRNA分子连接至编码本公开的嵌合受体的组分(例如,所有组分)的核酸。在一个实施方案中,编码抑制调节或调控(例如抑制)T细胞功能的分子的表达的dsRNA分子的核酸分子可操作地连接至启动子,例如HI或U6衍生的启动子,以使得抑制调节或调控(例如抑制)T细胞功能的分子的表达的dsRNA分子被表达,例如在经遗传修饰的细胞内表达。在一个实施方案中,编码抑制调节或调控(例如抑制)T细胞功能的分子的表达的dsRNA分子的核酸分子存在于包含编码嵌合受体的组分(例如,所有组分)的核酸分子的同一体(例如,慢病毒载体)上。在这种实施方案中,编码抑制调节或调控(例如抑制)T细胞功能的分子的表达的dsRNA分子的核酸分子定位于载体(例如,慢病毒载体)上编码嵌合受体的组分(例如,所有组分)的核酸的5'-或3'-端。编码抑制调节或调控(例如抑制)T细胞功能的分子的表达的dsRNA分子的核酸分子可以在与编码嵌合受体的组分(例如,所有组分)的核酸相同或不同的方向上转录。在一个实施方案中,编码抑制调节或调控(例如抑制)T细胞功能的分子的表达的dsRNA分子的核酸分子存在于除了包含编码嵌合受体的组分(例如,所有组分)的核酸分子的载体之外的载体上。在一个实施方案中,编码抑制调节或调控(例如抑制)T细胞功能的分子的表达的dsRNA分子的核酸分子在经遗传修饰的细胞内瞬时表达。在一个实施方案中,编码抑制调节或调控(例如抑制)T细胞功能的分子的表达的dsRNA分子的核酸分子被稳定地整合进本公开的经遗传修饰的细胞的基因组中。

[0350] 在一个实施方案中,调节或调控(例如抑制)T细胞功能的药剂可以是结合至抑制性分子的抗体或抗体片段。例如,药剂可以是结合至PD-1、PD-L1、PD-L2或CTLA4的抗体或抗体片段。在一个实施方案中,药剂是结合至TIM3的抗体或抗体片段。在一个实施方案中,药剂是结合至LAG3的抗体或抗体片段。

[0351] 在一些实施方案中,增强经遗传修饰的细胞的活性的药剂是CEACAM抑制剂(例如,CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5抑制剂)。在一个实施方案中,CEACAM的抑制剂是抗CEACAM抗体分子。在一个实施方案中,增强本公开的经遗传修饰的细胞的活性的药剂是miR-17-92。在一些实施方案中,增强经遗传修饰的细胞的活性的药剂是CD40L。在一些实施方案中,增强经遗传修饰的细胞的活性的药剂是GM-CSF。在一些实施方案中,本公开的经遗传修饰的细胞被进一步修饰为表达结合至本公开的抑制性分子的抗体或抗体片段。

[0352] 在一个实施方案中,增强本公开的经遗传修饰的细胞的活性的药剂是细胞因子。细胞因子具有涉及免疫反应性细胞扩增、分化、存活和稳态的重要功能。可以施用于接受本公开的经遗传修饰的细胞的受试者的细胞因子包括但不限于IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-12、IL-15、IL-18和IL-21或它们的组合。细胞因子可以每天施用一次或每天施用多次,例如每天施用两次、每天施用三次或每天施用四次。细胞因子可以施用持续超过一天,例如细胞因子施用持续2天、3天、4天、5天、6天、1周、2周、3周或4周。例如,细胞因子每天施用一次,持续7天。在一些实施方案中,本公开的经遗传修饰的细胞被进一步修饰为表达一种或多种细胞因子,诸如IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-12、IL-15、IL-18和IL-21。

[0353] 在一些实施方案中,细胞因子可以与经遗传修饰的细胞同时或同步施用,例如,在同一天施用。细胞因子可以在与经遗传修饰的细胞相同的药物组合物中制备,或者可以在单独的药物组合物中制备。或者,细胞因子可以在施用经遗传修饰的细胞之后不久施用,例如在施用经遗传修饰的细胞之后1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天施用。在超过一天的施用方案中施用细胞因子的一些实施方案中,细胞因子施用方案的第一天可以与经遗传修饰的

细胞的施用同一天,或者细胞因子施用方案的第一天可以是在施用经遗传修饰的细胞之后1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天。在一个实施方案中,在第一天,经遗传修饰的细胞被施用于受试者,在第二天,细胞因子在接下来7天内的每天施用一次。在一些实施方案中,细胞因子在施用经遗传修饰的细胞之后施用持续一段时间,例如在施用经遗传修饰的细胞之后至少2周、3周、4周、6周、8周、10周、12周、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月或1年或更长的时间。在一个实施方案中,细胞因子在评估受试者对经遗传修饰的细胞的反应之后施用。

#### [0354] 试剂盒

[0355] 本公开的某些方面涉及用于治疗 and/或预防癌症(例如,AML)或其他疾病(例如,免疫相关或自身免疫性疾病)的试剂盒。在某些实施方案中,试剂盒包括治疗性或预防性组合物,所述组合物包含有效量的一种或多种蛋白质,所述蛋白质包含本公开的抗原结合结构域(例如,scFv)(诸如本公开的嵌合受体)、本公开的分离的核酸、本公开的载体和/或本公开的细胞(例如,免疫反应性细胞)。在一些实施方案中,试剂盒包括无菌容器。在一些实施方案中,此类容器可以是盒、安瓿瓶、瓶、小瓶、管、袋、小袋、泡罩包装或本领域已知的其他合适的容器形式。容器可以由塑料、玻璃、层合纸、金属箔或适合容纳药物的其他材料制成。

[0356] 在一些实施方案中,治疗性或预防性组合物与用于将治疗性或预防性组合物施用于患有癌症(例如,AML)或有发展成癌症的风险的受试者的说明一起提供。在一些实施方案中,说明可以包括关于使用组合物来治疗和/或预防障碍的信息。在一些实施方案中,说明包括但不限于治疗性或预防性组合物的描述、剂量排程、用于治疗或预防障碍或其症状的施用排程、注意事项、警告、适应症、禁忌症、过量信息、不良反应、动物药理学、临床研究和/或参考文献。在一些实施方案中,说明可以直接印刷在容器(当存在时)上,或者作为施加于容器的标签,或者提供于容器中或与容器一起提供的作为单页、小册子、卡片或文件夹。

#### [0357] 示例性实施方案

[0358] 1.一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性的抗原结合结构域和异源性分子或部分,其中所述抗原结合结构域包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,并且其中所述VH包含重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列。

[0359] 2.一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性的抗原结合结构域和异源性分子或部分,其中所述抗原结合结构域包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VH包含重链互补决定区1(CDR-H1)、重链互补决定区2(CDR-H2)和重链互补决定区3(CDR-H3),并且其中所述CDR-H1、所述CDR-H2和所述CDR-H3的氨基酸序列包含在SEQ ID NO:1的所述VH区氨基酸序列内,并且

[0360] 任选地其中参考抗体的所述CDR-H1、所述CDR-H2和所述CDR-H3的氨基酸序列基于Kabat或Chothia编号方案来定义。

[0361] 3.一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性的抗原结合结构域和异源性分子或部分,其中所述抗原结合结构域包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,并且其中所述VH包含:

[0362] (a)重链互补决定区1(CDR-H1),所述CDR-H1具有GFSLSR(Y)(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列,重链互补决定区2(CDR-H2),所述CDR-H2具有WGNGN(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列,和

重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列;或者

[0363] (b)重链互补决定区1(CDR-H1),所述CDR-H1具有RYDMH(SEQ ID NO:102)的氨基酸序列,

[0364] 重链互补决定区2(CDR-H2),所述CDR-H2具有VIWGNNGNTHYHSALKS(SEQ ID NO:103)的氨基酸序列,和重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列。

[0365] 4.如实施方案1至实施方案3中任一项所述的嵌合蛋白,其中所述VL的所述VL包含轻链互补决定区1(CDR-L1)、轻链互补决定区2(CDR-L2)和轻链互补决定区3(CDR-L3),其中所述CDR-L1、所述CDR-L2和所述CDR-L3的氨基酸序列包含在SEQ ID NO:9的所述VL区氨基酸序列内。

[0366] 5.如实施方案1至实施方案4中任一项所述的嵌合蛋白,其中所述VL包含:

[0367] 轻链互补决定区1(CDR-L1),所述CDR-L1具有KSSQSLVASDENTYLN(SEQ ID NO:10)的氨基酸序列,轻链互补决定区2(CDR-L2),所述CDR-L2具有QVSKLDS(SEQ ID NO:11)的氨基酸序列,和轻链互补决定区3(CDR-L3),所述CDR-L3具有LQGIHLPWT(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列。

[0368] 6.一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性的抗原结合结构域和异源性分子或部分,其中所述抗原结合结构域包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VL包含轻链互补决定区1(CDR-L1)、轻链互补决定区2(CDR-L2)和轻链互补决定区3(CDR-L3),并且其中所述CDR-L1、所述CDR-L2和所述CDR-L3的氨基酸序列包含在SEQ ID NO:9的所述VL区氨基酸序列内。

[0369] 7.一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性的抗原结合结构域和异源性分子或部分,其中所述抗原结合结构域包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,并且其中所述VL包含:

[0370] 轻链互补决定区1(CDR-L1),所述CDR-L1具有KSSQSLVASDENTYLN(SEQ ID NO:10)的氨基酸序列,轻链互补决定区2(CDR-L2),所述CDR-L2具有QVSKLDS(SEQ ID NO:11)的氨基酸序列,和轻链互补决定区3(CDR-L3),所述CDR-L3具有LQGIHLPWT(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列。

[0371] 8.如实施方案6或实施方案7所述的嵌合蛋白,其中所述VH包含重链互补决定区1(CDR-H1)、重链互补决定区2(CDR-H2)和重链互补决定区3(CDR-H3),其中所述CDR-H1、所述CDR-H2和所述CDR-H3的氨基酸序列包含在SEQ ID NO:1的所述VH区氨基酸序列内。

[0372] 9.如实施方案6至实施方案8中任一项所述的嵌合蛋白,其中:

[0373] 所述VH包含:

[0374] (a)重链互补决定区1(CDR-H1),所述CDR-H1具有GFSLSR(Y)(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列,重链互补决定区2(CDR-H2),所述CDR-H2具有WGNGN(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列,和重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列;或者

[0375] (b)重链互补决定区1(CDR-H1),所述CDR-H1具有RYDMH(SEQ ID NO:102)的氨基酸序列,

[0376] 重链互补决定区2(CDR-H2),所述CDR-H2具有VIWGNNGNTHYHSALKS(SEQ ID NO:103)的氨基酸序列,和重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD(SEQ ID NO:4)的氨基

酸序列。

[0377] 10. 一种嵌合蛋白, 所述嵌合蛋白包含对内皮粘蛋白 (EMCN) 具有特异性的抗原结合结构域和异源性分子或部分, 其中所述抗原结合结构域包含重链可变 (VH) 区和轻链可变 (VL) 区, 其中所述VH包含:

[0378] (a) 重链互补决定区1 (CDR-H1), 所述CDR-H1具有GFSLSRV (SEQ ID NO:2) 的氨基酸序列,

[0379] 重链互补决定区2 (CDR-H2), 所述CDR-H2具有WGNGN (SEQ ID NO:3) 的氨基酸序列, 以及

[0380] 重链互补决定区3 (CDR-H3), 所述CDR-H3具有RIKD (SEQ ID NO:4) 的氨基酸序列; 或者

[0381] (b) 重链互补决定区1 (CDR-H1), 所述CDR-H1具有RYDMH (SEQ ID NO:102) 的氨基酸序列,

[0382] 重链互补决定区2 (CDR-H2), 所述CDR-H2具有VIWNGNTHYHSALKS (SEQ ID NO:103) 的氨基酸序列, 以及

[0383] 重链互补决定区3 (CDR-H3), 所述CDR-H3具有RIKD (SEQ ID NO:4) 的氨基酸序列; 并且

[0384] 其中所述VL包含:

[0385] 轻链互补决定区1 (CDR-L1), 所述CDR-L1具有KSSQSLVASDENTYLN (SEQ ID NO:10) 的氨基酸序列,

[0386] 轻链互补决定区2 (CDR-L2), 所述CDR-L2具有QVSKLDS (SEQ ID NO:11) 的氨基酸序列, 以及

[0387] 轻链互补决定区3 (CDR-L3), 所述CDR-L3具有LQGIHLPWT (SEQ ID NO:12) 的氨基酸序列。

[0388] 11. 如实施方案1至实施方案10中任一项所述的嵌合蛋白, 其中所述VH区包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0389] 12. 如实施方案1至实施方案11中任一项所述的嵌合蛋白, 其中所述VH区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0390] 13. 如实施方案1至实施方案12中任一项所述的嵌合蛋白, 其中所述VL区包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0391] 14. 如实施方案1至实施方案12中任一项所述的嵌合蛋白, 其中所述VL区包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0392] 15. 一种嵌合蛋白, 所述嵌合蛋白包含对内皮粘蛋白 (EMCN) 具有特异性的抗原结合结构域和异源性分子或部分, 其中所述抗原结合结构域包含重链可变 (VH) 区和轻链可变 (VL) 区, 并且其中所述VL包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0393] 16. 如实施方案15所述的嵌合蛋白, 其中所述VH区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序

列。

[0394] 17. 如实施方案15或实施方案16所述的嵌合体,其中所述VL区包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0395] 18. 如实施方案17所述的嵌合蛋白,其中所述VL区包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0396] 19. 一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性的抗原结合结构域和异源性分子或部分,其中所述抗原结合结构域包含抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,并且其中所述VL包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0397] 20. 如实施方案19所述的嵌合蛋白,其中所述VL区包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0398] 21. 如实施方案19或实施方案20所述的嵌合蛋白,其中所述VH区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0399] 22. 一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性的抗原结合结构域和异源性分子或部分,其中所述抗原结合结构域与参考抗体或其抗原结合片段竞争与EMCN的结合,其中所述参考抗体或其抗原结合片段包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VH包含:

[0400] 重链互补决定区1(CDR-H1),所述CDR-H1具有GFSLSR(Y)(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列,

[0401] 重链互补决定区2(CDR-H2),所述CDR-H2具有WGNGN(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列,以及

[0402] 重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列,并且

[0403] 其中所述VL包含:

[0404] 轻链互补决定区1(CDR-L1),所述CDR-L1具有KSSQSLVASDENTYLN(SEQ ID NO:10)的氨基酸序列,

[0405] 轻链互补决定区2(CDR-L2),所述CDR-L2具有QVSKLDS(SEQ ID NO:11)的氨基酸序列,以及

[0406] 轻链互补决定区3(CDR-L3),所述CDR-L3具有LQGIHLPWT(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列,并且

[0407] 其中参考抗体的所述CDR-H1、所述CDR-H2、所述CDR-H3、所述CDR-L1、所述CDR-L2和所述CDR-L3的氨基酸序列基于Chothia注释和编号方案来定义。

[0408] 23. 一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性的抗原结合结构域和异源性分子或部分,其中所述抗原结合结构域结合与参考抗体或其抗原结合片段基本上相同的EMCN表位,其中所述参考抗体或其抗原结合片段包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VH包含:

[0409] 重链互补决定区1(CDR-H1),所述CDR-H1具有GFSLSR(Y)(SEQ ID NO:2)的氨基酸序

列,

[0410] 重链互补决定区2 (CDR-H2), 所述CDR-H2具有WGNGN (SEQ ID NO:3) 的氨基酸序列, 以及

[0411] 重链互补决定区3 (CDR-H3), 所述CDR-H3具有RIKD (SEQ ID NO:4) 的氨基酸序列, 并且

[0412] 其中所述VL包含:

[0413] 轻链互补决定区1 (CDR-L1), 所述CDR-L1具有KSSQSLVASDENTYLN (SEQ ID NO:10) 的氨基酸序列,

[0414] 轻链互补决定区2 (CDR-L2), 所述CDR-L2具有QVSKLDS (SEQ ID NO:11) 的氨基酸序列, 以及

[0415] 轻链互补决定区3 (CDR-L3), 所述CDR-L3具有LQGIHLPWT (SEQ ID NO:12) 的氨基酸序列,

[0416] 其中参考抗体的所述CDR-H1、所述CDR-H2、所述CDR-H3、所述CDR-L1、所述CDR-L2和所述CDR-L3的氨基酸序列基于Chothia注释和编号方案来定义。

[0417] 24. 一种嵌合蛋白, 所述嵌合蛋白包含对内皮粘蛋白 (EMCN) 具有特异性的抗原结合结构域和异源性分子或部分, 其中所述抗原结合结构域结合与参考抗体或其抗原结合片段结合的EMCN表位相同的人EMCN的表位, 其中所述参考抗体或其抗原结合片段包含重链可变 (VH) 区和轻链可变 (VL) 区, 其中所述VH包含:

[0418] 重链互补决定区1 (CDR-H1), 所述CDR-H1具有GFSLSRV (SEQ ID NO:2) 的氨基酸序列,

[0419] 重链互补决定区2 (CDR-H2), 所述CDR-H2具有WGNGN (SEQ ID NO:3) 的氨基酸序列, 以及

[0420] 重链互补决定区3 (CDR-H3), 所述CDR-H3具有RIKD (SEQ ID NO:4) 的氨基酸序列, 并且

[0421] 其中所述VL包含:

[0422] 轻链互补决定区1 (CDR-L1), 所述CDR-L1具有KSSQSLVASDENTYLN (SEQ ID NO:10) 的氨基酸序列,

[0423] 轻链互补决定区2 (CDR-L2), 所述CDR-L2具有QVSKLDS (SEQ ID NO:11) 的氨基酸序列, 以及

[0424] 轻链互补决定区3 (CDR-L3), 所述CDR-L3具有LQGIHLPWT (SEQ ID NO:12) 的氨基酸序列,

[0425] 其中参考抗体的所述CDR-H1、所述CDR-H2、所述CDR-H3、所述CDR-L1、所述CDR-L2和所述CDR-L3的氨基酸序列基于Chothia注释和编号方案来定义。

[0426] 25. 如实施方案22至实施方案24中任一项所述的嵌合蛋白, 其中所述参考抗体或其抗原结合片段的所述VH区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0427] 26. 如实施方案22至实施方案25中任一项所述的嵌合蛋白, 其中所述参考抗体或其抗原结合片段的所述VL区包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0428] 27. 如实施方案1至实施方案26中任一项所述的嵌合蛋白, 其中所述抗原结合结构域包括F(ab)片段、F(ab')片段或单链可变片段(scFV)。

- [0429] 28. 如实施方案27所述的嵌合蛋白,其中所述抗体或其抗原结合片段包括单链可变片段(scFv)。
- [0430] 29. 如实施方案1至实施方案28中任一项所述的嵌合蛋白,其中所述scFv的所述VH和所述VL由肽接头分开。
- [0431] 30. 如实施方案1至实施方案29中任一项所述的嵌合蛋白,其中所述抗原结合结构域包含结构VH-L-VL或VL-L-VH,其中VH是重链可变结构域,L是肽接头,并且VL是轻链可变结构域。
- [0432] 31. 如实施方案30的实施方案29所述的嵌合蛋白,其中所述肽接头包含选自由以下各项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:23-39。
- [0433] 32. 如实施方案28或实施方案29所述的嵌合蛋白,其中所述scFv包含选自由以下各项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:17-22。
- [0434] 33. 如实施方案1至实施方案32中任一项所述的嵌合蛋白,其中所述嵌合蛋白是抗体-药物缀合物,并且其中所述异源性分子或部分包括治疗剂。
- [0435] 34. 如实施方案1至实施方案32中任一项所述的嵌合蛋白,其中所述嵌合蛋白是嵌合抗原受体(CAR),并且其中所述异源性分子或部分包含选自由以下各项组成的组的多肽:跨膜结构域、一个或多个胞内信号传导结构域、铰链结构域、间隔区、一个或多个肽接头以及它们的组合。
- [0436] 35. 如实施方案34所述的嵌合蛋白,其中所述CAR包含跨膜结构域。
- [0437] 36. 如实施方案34或实施方案35所述的嵌合蛋白,其中所述CAR包含一个或多个胞内信号传导结构域。
- [0438] 37. 如实施方案34至实施方案36中任一项所述的嵌合蛋白,其中所述CAR是包含一个或多个胞内信号传导结构域的活化性CAR,所述胞内信号传导结构域刺激免疫反应。
- [0439] 38. 如实施方案34至实施方案36中任一项所述的嵌合蛋白,其中所述CAR是包含一个或多个胞内抑制性结构域的抑制性CAR,所述胞内抑制性结构域抑制免疫反应。
- [0440] 39. 如实施方案38所述的嵌合蛋白,其中所述胞内抑制性结构域包含酶促抑制性结构域。
- [0441] 40. 如实施方案38所述的嵌合蛋白,其中所述胞内抑制性结构域包括胞内抑制性共信号传导结构域。
- [0442] 41. 如实施方案35至实施方案40中任一项所述的嵌合蛋白,其中所述CAR包含在所述抗原结合结构域和所述跨膜结构域之间的间隔区。
- [0443] 42. 如实施方案41所述的嵌合蛋白,其中所述间隔区具有选自由SEQ ID NO:40-48组成的组的氨基酸序列。
- [0444] 43. 一种对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性的单链可变片段(scFv),所述单链可变片段包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VH包含具有RIKD(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列的重链互补决定区3(CDR-H3)。
- [0445] 44. 一种对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性的单链可变片段(scFv),其中所述抗原结合结构域包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VH包含重链互补决定区1(CDR-H1)、重链互补决定区2(CDR-H2)和重链互补决定区3(CDR-H3),并且其中所述CDR-H1、所述CDR-H2和所述CDR-H3的氨基酸序列包含在SEQ ID NO:1的所述VH区氨基酸序列内。

[0446] 45. 一种对内皮粘蛋白 (EMCN) 具有特异性的单链可变片段 (scFv), 其中所述抗原结合结构域包含重链可变 (VH) 区和轻链可变 (VL) 区, 并且其中所述VH包含:

[0447] (a) 重链互补决定区1 (CDR-H1), 所述CDR-H1具有GFSLSRV (SEQ ID NO:2) 的氨基酸序列, 重链互补决定区2 (CDR-H2), 所述CDR-H2具有WGNGN (SEQ ID NO:3) 的氨基酸序列, 和重链互补决定区3 (CDR-H3), 所述CDR-H3具有RIKD (SEQ ID NO:4) 的氨基酸序列; 或者

[0448] (b) 重链互补决定区1 (CDR-H1), 所述CDR-H1具有RYDMH (SEQ ID NO:102) 的氨基酸序列,

[0449] 重链互补决定区2 (CDR-H2), 所述CDR-H2具有VIWGNGNTHYHSALKS (SEQ ID NO:103) 的氨基酸序列, 以及

[0450] 重链互补决定区3 (CDR-H3), 所述CDR-H3具有RIKD (SEQ ID NO:4) 的氨基酸序列。

[0451] 46. 如实施方案43至实施方案45中任一项所述的scFv, 其中所述VL的所述VL包含轻链互补决定区1 (CDR-L1)、轻链互补决定区2 (CDR-L2) 和轻链互补决定区3 (CDR-L3), 其中所述CDR-L1、所述CDR-L2和所述CDR-L3的氨基酸序列包含在SEQ ID NO:9的所述VL区氨基酸序列内。

[0452] 47. 如实施方案43至实施方案46中任一项所述的scFv, 其中所述VL包含:

[0453] 轻链互补决定区1 (CDR-L1), 所述CDR-L1具有KSSQSLVASDENTYLN (SEQ ID NO:10) 的氨基酸序列, 轻链互补决定区2 (CDR-L2), 所述CDR-L2具有QVSKLDS (SEQ ID NO:11) 的氨基酸序列, 和轻链互补决定区3 (CDR-L3), 所述CDR-L3具有LQGIHLPWT (SEQ ID NO:12) 的氨基酸序列。

[0454] 48. 一种对内皮粘蛋白 (EMCN) 具有特异性的单链可变片段 (scFv), 其中所述抗原结合结构域包含重链可变 (VH) 区和轻链可变 (VL) 区, 其中所述VL包含轻链互补决定区1 (CDR-L1)、轻链互补决定区2 (CDR-L2) 和轻链互补决定区3 (CDR-L3), 并且其中所述CDR-L1、所述CDR-L2和所述CDR-L3的氨基酸序列包含在SEQ ID NO:9的所述VL区氨基酸序列内。

[0455] 49. 一种对内皮粘蛋白 (EMCN) 具有特异性的单链可变片段 (scFv), 其中所述抗原结合结构域包含重链可变 (VH) 区和轻链可变 (VL) 区, 并且其中所述VL包含:

[0456] 轻链互补决定区1 (CDR-L1), 所述CDR-L1具有KSSQSLVASDENTYLN (SEQ ID NO:10) 的氨基酸序列, 轻链互补决定区2 (CDR-L2), 所述CDR-L2具有QVSKLDS (SEQ ID NO:11) 的氨基酸序列, 和轻链互补决定区3 (CDR-L3), 所述CDR-L3具有LQGIHLPWT (SEQ ID NO:12) 的氨基酸序列。

[0457] 50. 如实施方案48或实施方案49所述的scFv, 其中所述VH包含重链互补决定区1 (CDR-H1)、重链互补决定区2 (CDR-H2) 和重链互补决定区3 (CDR-H3), 其中所述CDR-H1、所述CDR-H2和所述CDR-H3的氨基酸序列包含在SEQ ID NO:1的所述VH区氨基酸序列内。

[0458] 51. 如实施方案48至实施方案50中任一项所述的scFv, 其中所述VH包含:

[0459] (a) 重链互补决定区1 (CDR-H1), 所述CDR-H1具有GFSLSRV (SEQ ID NO:2) 的氨基酸序列, 重链互补决定区2 (CDR-H2), 所述CDR-H2具有WGNGN (SEQ ID NO:3) 的氨基酸序列, 和重链互补决定区3 (CDR-H3), 所述CDR-H3具有RIKD (SEQ ID NO:4) 的氨基酸序列; 或者

[0460] (b) 重链互补决定区1 (CDR-H1), 所述CDR-H1具有RYDMH (SEQ ID NO:102) 的氨基酸序列,

[0461] 重链互补决定区2 (CDR-H2), 所述CDR-H2具有VIWGNGNTHYHSALKS (SEQ ID NO:103)

的氨基酸序列,以及

[0462] 重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列

[0463] 52.一种对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性的单链可变片段(scFv),其中所述抗原结合结构域包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VH包含:

[0464] (a)重链互补决定区1(CDR-H1),所述CDR-H1具有GFSLSRV(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列,

[0465] 重链互补决定区2(CDR-H2),所述CDR-H2具有WGNGN(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列,以及

[0466] 重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列;或者

[0467] (b)重链互补决定区1(CDR-H1),所述CDR-H1具有RYDMH(SEQ ID NO:102)的氨基酸序列,

[0468] 重链互补决定区2(CDR-H2),所述CDR-H2具有VIWGNGNTHYHSALKS(SEQ ID NO:103)的氨基酸序列,以及

[0469] 重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列,并且

[0470] 其中所述VL包含:

[0471] 轻链互补决定区1(CDR-L1),所述CDR-L1具有KSSQSLVASDENTYLN(SEQ ID NO:10)的氨基酸序列,

[0472] 轻链互补决定区2(CDR-L2),所述CDR-L2具有QVSKLDS(SEQ ID NO:11)的氨基酸序列,以及

[0473] 轻链互补决定区3(CDR-L3),所述CDR-L3具有LQGIHLPWT(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列。

[0474] 53.如实施方案43至实施方案52中任一项所述的scFv,其中所述VH区包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0475] 54.如实施方案43至实施方案53中任一项所述的scFv,其中所述VH区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0476] 55.如实施方案43至实施方案54中任一项所述的scFv,其中所述VL区包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0477] 56.如实施方案43至实施方案55中任一项所述的scFv,其中所述VL区包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0478] 57.一种对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性的单链可变片段(scFv),其中所述抗原结合结构域包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,并且其中所述VH包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0479] 58.如实施方案57所述的scFv,其中所述VH区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0480] 59.如实施方案57或实施方案58所述的scFv,其中所述VL区包含与SEQ ID NO:9的

氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0481] 60. 如实施方案59所述的scFv,其中所述VL区包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0482] 61. 一种单链可变片段(scFv),所述scFv包含对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域包含抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,并且其中所述VL包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0483] 62. 如实施方案61所述的scFv,其中所述VL区包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0484] 63. 如实施方案61或实施方案62所述的scFv,其中所述VH区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0485] 64. 如实施方案43至实施方案63中任一项所述的scFv,其中所述scFv包含选自由以下各项组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:17-22。

[0486] 65. 一种单链可变片段(scFv),所述单链可变片段包含对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域与参考抗体或其抗原结合片段竞争与EMCN的结合,其中所述参考抗体或其抗原结合片段包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VH包含:

[0487] 重链互补决定区1(CDR-H1),所述CDR-H1具有GFSLSRV(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列,

[0488] 重链互补决定区2(CDR-H2),所述CDR-H2具有WGNGN(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列,以及

[0489] 重链互补决定区3(CDR-H3),所述CDR-H3具有RIKD(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列,并且

[0490] 其中所述VL包含:

[0491] 轻链互补决定区1(CDR-L1),所述CDR-L1具有KSSQSLVASDENTYLN(SEQ ID NO:10)的氨基酸序列,

[0492] 轻链互补决定区2(CDR-L2),所述CDR-L2具有QVSKLDS(SEQ ID NO:11)的氨基酸序列,以及

[0493] 轻链互补决定区3(CDR-L3),所述CDR-L3具有LQGIHLPWT(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列,

[0494] 其中参考抗体的所述CDR-H1、所述CDR-H2、所述CDR-H3、所述CDR-L1、所述CDR-L2和所述CDR-L3的氨基酸序列基于Chothia注释和编号方案来定义。

[0495] 66. 一种单链可变片段(scFv),所述单链可变片段包含对内皮粘蛋白(EMCN)具有特异性的抗原结合结构域,其中所述抗原结合结构域结合与参考抗体或其抗原结合片段基本上相同的EMCN表位,其中所述参考抗体或其抗原结合片段包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区,其中所述VH包含:

[0496] 重链互补决定区1(CDR-H1),所述CDR-H1具有GFSLSRV(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列,

[0497] 重链互补决定区2(CDR-H2),所述CDR-H2具有WGNGN(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列,

以及

[0498] 重链互补决定区3 (CDR-H3), 所述CDR-H3具有RIKD (SEQ ID NO:4) 的氨基酸序列, 并且

[0499] 其中所述VL包含:

[0500] 轻链互补决定区1 (CDR-L1), 所述CDR-L1具有KSSQSLVASDENTYLN (SEQ ID NO:10) 的氨基酸序列,

[0501] 轻链互补决定区2 (CDR-L2), 所述CDR-L2具有QVSKLDS (SEQ ID NO:11) 的氨基酸序列, 以及

[0502] 轻链互补决定区3 (CDR-L3), 所述CDR-L3具有LQGIHLPWT (SEQ ID NO:12) 的氨基酸序列,

[0503] 其中参考抗体的所述CDR-H1、所述CDR-H2、所述CDR-H3、所述CDR-L1、所述CDR-L2和所述CDR-L3的氨基酸序列基于Chothia注释和编号方案来定义。

[0504] 67. 一种单链可变片段 (scFv), 所述单链可变片段包含对内皮粘蛋白 (EMCN) 具有特异性的抗原结合结构域, 其中所述抗原结合结构域结合与参考抗体或其抗原结合片段结合的EMCN表位相同的人EMCN的表位, 其中所述参考抗体或其抗原结合片段包含重链可变 (VH) 区和轻链可变 (VL) 区, 其中所述VH包含:

[0505] 重链互补决定区1 (CDR-H1), 所述CDR-H1具有GFSLSRV (SEQ ID NO:2) 的氨基酸序列,

[0506] 重链互补决定区2 (CDR-H2), 所述CDR-H2具有WGNGN (SEQ ID NO:3) 的氨基酸序列, 以及

[0507] 重链互补决定区3 (CDR-H3), 所述CDR-H3具有RIKD (SEQ ID NO:4) 的氨基酸序列, 并且

[0508] 其中所述VL包含:

[0509] 轻链互补决定区1 (CDR-L1), 所述CDR-L1具有KSSQSLVASDENTYLN (SEQ ID NO:10) 的氨基酸序列,

[0510] 轻链互补决定区2 (CDR-L2), 所述CDR-L2具有QVSKLDS (SEQ ID NO:11) 的氨基酸序列, 并且

[0511] 其中参考抗体的所述CDR-H1、所述CDR-H2、所述CDR-H3、所述CDR-L1、所述CDR-L2和所述CDR-L3的氨基酸序列基于Chothia注释和编号方案来定义。

[0512] 68. 如实施方案65至实施方案67中任一项所述的scFv, 其中所述参考抗体或其抗原结合片段的所述VH区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0513] 69. 如实施方案65至实施方案68中任一项所述的scFv, 其中所述参考抗体或其抗原结合片段的所述VL区包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0514] 70. 一种组合物, 所述组合物包含如实施方案1至实施方案42中任一项所述的嵌合蛋白和药学上可接受的载剂、药学上可接受的赋形剂或它们的组合。

[0515] 71. 一种组合物, 所述组合物包含如实施方案43至实施方案69中任一项所述的scFv和药学上可接受的载剂、药学上可接受的赋形剂或它们的组合。

[0516] 72. 一种经工程化的核酸, 所述经工程化的核酸编码如实施方案1至实施方案42中任一项所述的嵌合蛋白。

- [0517] 73. 一种经工程化的核酸, 所述经工程化的核酸编码如实施方案43至实施方案69中任一项所述的scFv。
- [0518] 74. 一种表达载体, 所述表达载体包含如实施方案72所述的经工程化的核酸。
- [0519] 75. 一种表达载体, 所述表达载体包含如实施方案73所述的经工程化的核酸。
- [0520] 76. 一种组合物, 所述组合物包含如实施方案72所述的经工程化的核酸或如实施方案74所述的表达载体、和药学上可接受的载剂、药学上可接受的赋形剂或它们的组合。
- [0521] 77. 一种组合物, 所述组合物包含如实施方案73所述的经工程化的核酸或如实施方案75所述的表达载体、和药学上可接受的载剂、药学上可接受的赋形剂或它们的组合。
- [0522] 78. 一种制备经工程化的细胞的方法, 所述方法包括用如实施方案72所述的经工程化的核酸或如实施方案74所述的表达载体转导分离的细胞或细胞群。
- [0523] 79. 一种制备经工程化的细胞的方法, 所述方法包括用如实施方案73所述的经工程化的核酸或如实施方案75所述的表达载体转导分离的细胞或细胞群。
- [0524] 80. 一种通过如实施方案78所述的方法产生的经工程化的细胞。
- [0525] 81. 一种通过如实施方案79所述的方法产生的经工程化的细胞。
- [0526] 82. 一种分离的细胞, 所述分离的细胞包含如实施方案72所述的经工程化的核酸、如实施方案74所述的表达载体或如实施方案76所述的组合物。
- [0527] 83. 一种分离的细胞, 所述分离的细胞包含如实施方案73所述的经工程化的核酸、如实施方案75所述的表达载体或如实施方案77所述的组合物。
- [0528] 84. 一种经工程化的细胞群, 所述经工程化的细胞群表达如实施方案72所述的经工程化的核酸、如实施方案74所述的表达载体。
- [0529] 85. 一种经工程化的细胞群, 所述经工程化的细胞群表达如实施方案73所述的经工程化的核酸、如实施方案75所述的表达载体。
- [0530] 86. 一种分离的细胞, 所述分离的细胞包含如实施方案1至实施方案42中任一项所述的嵌合蛋白。
- [0531] 87. 一种分离的细胞, 所述分离的细胞包含如实施方案43至实施方案69中任一项所述的scFv。
- [0532] 88. 一种经工程化的细胞群, 所述经工程化的细胞群表达如实施方案1至实施方案42中任一项所述的嵌合蛋白。
- [0533] 89. 一种经工程化的细胞群, 所述经工程化的细胞群表达如实施方案43至实施方案69中任一项所述的scFv。
- [0534] 90. 如实施方案80、实施方案82、实施方案84、实施方案86和实施方案88中任一项所述的细胞或细胞群, 其中所述嵌合蛋白是重组表达的。
- [0535] 91. 如实施方案81、实施方案83、实施方案85、实施方案87和实施方案89中任一项所述的细胞或细胞群, 其中所述scFv是重组表达的。
- [0536] 92. 如实施方案80、实施方案82、实施方案84、实施方案86、实施方案88和实施方案90中任一项所述的细胞或细胞群, 其中所述嵌合蛋白从载体或所述细胞的基因组的选定基因座表达。
- [0537] 93. 如实施方案81、实施方案83、实施方案85、实施方案87、实施方案89和实施方案91中任一项所述的细胞或细胞群, 其中所述嵌合蛋白从载体或所述细胞的基因组的选定基

因座表达。

[0538] 94. 如实施方案80、实施方案82、实施方案84、实施方案86、实施方案88、实施方案90和实施方案92中任一项所述的细胞或细胞群,其中所述细胞或细胞群还包含在所述细胞表面上表达的一种或多种肿瘤靶向性嵌合受体。

[0539] 95. 如实施方案94所述的细胞或细胞群,其中所述一种或多种肿瘤靶向性嵌合受体中的每种是嵌合抗原受体(CAR)或经工程化的T细胞受体。

[0540] 96. 如实施方案94或实施方案95所述的细胞或细胞群,其中所述细胞或细胞群包含靶向第一肿瘤相关抗原的第一肿瘤靶向性嵌合受体,以及靶向第二肿瘤相关抗原的第二肿瘤靶向性嵌合受体。

[0541] 97. 如实施方案96所述的细胞或细胞群,其中所述第一肿瘤相关抗原包含CD33并且所述第二肿瘤相关抗原包含FLT3。

[0542] 98. 如实施方案94或实施方案95所述的细胞或细胞群,其中所述一种或多种肿瘤靶向性嵌合受体包含靶向CD33和FLT3的肿瘤靶向性嵌合受体。

[0543] 99. 如实施方案80、实施方案82、实施方案84、实施方案86、实施方案88、实施方案90、实施方案92和实施方案94至实施方案98中任一项所述的细胞或细胞群,其中所述细胞或细胞群选自由以下各项组成的组:T细胞、CD8+T细胞、CD4+T细胞、 $\gamma$ - $\delta$ T细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、调节性T细胞、病毒特异性T细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、自然杀伤(NK)细胞、B细胞、肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)、先天淋巴样细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、中性粒细胞、骨髓细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突细胞、红细胞、血小板细胞、人胚胎干细胞(ESC)、ESC源性细胞、多能干细胞、间充质基质细胞(MSC)、诱导性多能干细胞(iPSC)和iPSC源性细胞。

[0544] 100. 如实施方案80、实施方案82、实施方案84、实施方案86、实施方案88、实施方案90、实施方案92和实施方案94至实施方案98中任一项所述的细胞或细胞群,其中所述细胞或细胞群是NK细胞。

[0545] 101. 如实施方案80、实施方案82、实施方案84、实施方案86、实施方案88、实施方案90、实施方案92和实施方案94至实施方案100中任一项所述的细胞或细胞群,其中所述细胞是自体的。

[0546] 102. 如实施方案80、实施方案82、实施方案84、实施方案86、实施方案88、实施方案90、实施方案92和实施方案94至实施方案100中任一项所述的细胞或细胞群,其中所述细胞是同种异体的。

[0547] 103. 一种药物组合物,所述药物组合物包含有效量的如实施方案80、实施方案82、实施方案84、实施方案86、实施方案88、实施方案90、实施方案92和实施方案94至实施方案102中任一项所述的经工程化的细胞或细胞群和药学上可接受的载剂、药学上可接受的赋形剂或它们的组合。

[0548] 104. 一种药物组合物,所述药物组合物包含有效量的表达如实施方案1至实施方案42中任一项所述的嵌合蛋白的经遗传修饰的细胞和药学上可接受的载剂、药学上可接受的赋形剂或它们的组合。

[0549] 105. 如实施方案103或实施方案104所述的药物组合物,用于治疗 and/或预防肿瘤。

[0550] 106. 一种治疗有需要的受试者的方法,所述方法包括施用治疗有效剂量的如实施

方案70或实施方案76所述的组合物、或者如实施方案80、实施方案82、实施方案84、实施方案86、实施方案88、实施方案90、实施方案92和实施方案94至实施方案102中任一项所述的细胞中的任一种或者如实施方案103或实施方案104所述的组合物。

[0551] 107. 一种在受试者中刺激针对肿瘤细胞的细胞介导的免疫反应的方法,所述方法包括将治疗有效剂量的如实施方案70或实施方案76所述的组合物、或者如实施方案80、实施方案82、实施方案84、实施方案86、实施方案88、实施方案90、实施方案92和实施方案94至实施方案102中任一项所述的细胞中的任一种或者如实施方案103或实施方案104所述的组合物施用于患有肿瘤的受试者。

[0552] 108. 一种在受试者中抑制针对肿瘤细胞的细胞介导的免疫反应的方法,所述方法包括将治疗有效剂量的如实施方案70或实施方案76所述的组合物、或者如实施方案80、实施方案82、实施方案84、实施方案86、实施方案88、实施方案90、实施方案92和实施方案94至实施方案102中任一项所述的细胞中的任一种或者如实施方案103或实施方案104所述的组合物施用于患有肿瘤的受试者。

[0553] 109. 如实施方案108所述的方法,包括将如实施方案80、实施方案82、实施方案84、实施方案86、实施方案88、实施方案90、实施方案92和实施方案94至实施方案102中任一项所述的细胞中的任一种施用于受试者,其中所述分离的细胞或细胞群表达所述嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含如实施方案38所述的抑制性CAR。

[0554] 110. 一种治疗患有肿瘤的受试者的方法,所述方法包括施用治疗有效剂量的如实施方案76或实施方案76所述的组合物、或者如实施方案80、实施方案82、实施方案84、实施方案86、实施方案88、实施方案90、实施方案92和实施方案94至实施方案102中任一项所述的细胞中的任一种或者如实施方案103或实施方案104所述的组合物。

[0555] 111. 如实施方案106至实施方案107和实施方案110中任一项所述的方法,其中所述嵌合蛋白包含如实施方案38至实施方案40中任一项所述的抑制性CAR,并且所述细胞或细胞群还表达一种或多种肿瘤靶向性嵌合受体。

[0556] 112. 如实施方案111所述的方法,其中与施用等同组合物的方法相比,所述方法使脱靶效应减少,所述等同组合物包含含有所述一种或多种肿瘤靶向性嵌合受体但缺乏所述抑制性CAR的细胞或细胞群。

[0557] 113. 一种用于治疗 and/或预防肿瘤的试剂盒,所述试剂盒包括如实施方案1至实施方案42中任一项所述的嵌合蛋白。

[0558] 114. 如实施方案113所述的试剂盒,其中所述试剂盒还包括使用所述嵌合蛋白来产生用于治疗 and/或预防受试者的肿瘤一种或多种抗原特异性细胞的书面说明。

[0559] 115. 一种用于治疗 and/或预防肿瘤的试剂盒,所述试剂盒包括如实施方案80、实施方案82、实施方案84、实施方案86、实施方案88、实施方案90、实施方案92和实施方案94至实施方案102中任一项所述的细胞或细胞群。

[0560] 116. 如实施方案115所述的试剂盒,其中所述试剂盒还包含使用所述细胞来治疗 and/或预防受试者的肿瘤的书面说明。

[0561] 117. 一种用于治疗 and/或预防肿瘤的试剂盒,所述试剂盒包括如实施方案72所述的经工程化的核酸。

[0562] 118. 如实施方案117所述的试剂盒,其中所述试剂盒还包括使用所述核酸来产生

用于治疗和/或预防受试者的肿瘤一种或多种抗原特异性细胞的书面说明。

[0563] 119. 一种用于治疗和/或预防肿瘤的试剂盒,所述试剂盒包括如实施方案74所述的载体。

[0564] 120. 如实施方案119所述的试剂盒,其中所述试剂盒还包括使用所述载体来产生用于治疗 and/或预防受试者的肿瘤一种或多种抗原特异性细胞的书面说明。

[0565] 121. 一种用于治疗 and/或预防肿瘤的试剂盒,所述试剂盒包括如实施方案74、实施方案76和实施方案103至实施方案105中任一项所述的组合物。

[0566] 122. 如实施方案121所述的试剂盒,其中所述试剂盒还包含使用所述组合物来治疗 and/或预防受试者的肿瘤的书面说明。

[0567] 实施例

[0568] 以下是本公开的方法和组合物的实施例。应当理解,鉴于本文提供的一般描述,可以实践各种其他实施方案。

[0569] 以下是用于进行本公开要求保护的主题的特定实施方案的实施例。这些实施例仅出于说明的目的提供,并且不旨在以任何方式限制本公开的范围。已经努力确保所用的数字的准确性(例如,数量,温度等),但是当然应允许一些实验误差和偏差。

[0570] 实施例1:抗EMCN抗体序列测定

[0571] 方法

[0572] 抗体测序

[0573] 对大鼠抗人EMCN单克隆抗体克隆Ab1进行测序。简而言之,将含有免疫球蛋白链中的每条的样品用各种酶消化,然后通过LC-MS/MS来分析。使用从头肽测序从LC-MS/MS数据表征肽,然后将肽组装成抗体序列。

[0574] 结果

[0575] 对Ab1抗EMCN抗体进行肽测序。将多种酶消化的LC-MS/MS数据绘制到组装的抗体序列。在重链和轻链中,100%的氨基酸残基被至少5次肽扫描覆盖,具有大量支持碎片离子(数据未显示)。

[0576] 轻链和重链可变区的测序结果显示于图1和图2中,这两个图分别使用Chothia注释和编号方案。框架和互补决定区(CDR)根据Chothia注释和编号方案以及Kabat注释和编号方案进行注释。序列提供于表A中。鉴于亮氨酸(L)和异亮氨酸(I)具有相同的残基质量,这两种氨基酸的测定通过另外的分析来确定。

[0577] 表A-抗EMCN抗体(Ab1)序列

[0578]

氨基酸序列	SEQ ID NO	描述
QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLR RYDMHWVRQPPGQGLEWMGVWNGNT HYHSALKSRLSISRDTSKSQVFLKMNSLQT EDTAIFYFCTLRIKDWGPGTMVTVSS	1	抗 EMCN 抗体 Ab1 重链可变 (VH) 区
GFSLSR	2	基于 Chothia 编号的抗 EMCN 抗体 Ab1 重链互补决定区 1 (CDR-H1) 序列
RYDMH	102	基于 Kabat 编号的抗 EMCN 抗体 Ab1 重链互补决定区 1 (CDR-H1) 序列
WGNGN	3	基于 Chothia 编号的抗 EMCN 抗体 Ab1 重链互补决定区 2 (CDR-H2) 序列
VIWNGNTHYHSALKS	103	基于 Kabat 编号的抗 EMCN 抗体 Ab1 重链互补决定区 2 (CDR-H2) 序列

[0579]

氨基酸序列	SEQ ID NO	描述
RIKD	4	基于 Chothia 和 Kabat 编号的抗 EMCN 抗体 Ab1 重链互补决定区 3 (CDR-H3) 序列
QVQLKESGPGLVQPSQTLTCTVS	5	基于 Chothia 编号的抗 EMCN 抗体 Ab1 重链框架区 1 (HFR1) 序列
QVQLKESGPGLVQPSQTLTCTVSGFSL	104	基于 Kabat 编号的抗 EMCN 抗体 Ab1 重链框架区 1 (HFR1) 序列
DMHWVRQPPGQGLEWMGVI	6	基于 Chothia 编号的抗 EMCN 抗体 Ab1 重链框架区 2 (HFR2) 序列
WVRQPPGQGLEWMG	105	基于 Kabat 编号的抗 EMCN 抗体 Ab1 重链框架区 2 (HFR2) 序列
THYHSALKSRLSISRDTSKSQVFLKMNSLQ TEDITAIYFCTL	7	基于 Chothia 编号的抗 EMCN 抗体 Ab1 重链框架区 3 (HFR3) 序列
RLSISRDTSKSQVFLKMNSLQTEDTAIYFCT L	106	基于 Kabat 编号的抗 EMCN 抗体 Ab1 重链框架区 3 (HFR3) 序列
WGPGTMVTVSS	8	基于 Chothia 和 Kabat 编号的抗 EMCN 抗体 Ab1 重链框架区 4 (HFR4) 序列
DIVMTQTTPPSLSVALGQSVSISCKSSQSLVA SDENTYLNWLLQSPGRSPKRLIYQVSKLDS GVPDRFSGSGSEKDFTLKISRVEAEDLG VYCLQGIHLPWTFGGGKLELK	9	抗 EMCN 抗体 Ab1 轻链可变 (VL) 区
KSSQSLVASDENTYLN	10	基于 Chothia 和 Kabat 编号的抗 EMCN 抗体 Ab1 轻链互补决定区 1 (CDR-L1) 序列
QVSKLDS	11	基于 Chothia 和 Kabat 编号的抗 EMCN 抗体 Ab1 轻链互补决定区 2 (CDR-L2) 序列
LQGIHLPWT	12	基于 Chothia 和 Kabat 编号的抗 EMCN 抗体 Ab1 轻链互补决定区 3 (CDR-L3) 序列

氨基酸序列	SEQ ID NO	描述
DIVMTQTTPPSLSVALGQSVSIS	13	基于 Chothia 和 Kabat 编号的抗 EMCN 抗体 Ab1 轻链框架区 1 (LFR1) 序列
WLLQSPGRSPKRLIY	14	基于 Chothia 和 Kabat 编号的抗 EMCN 抗体 Ab1 轻链框架区 2 (LFR2) 序列
GVPDRFSGSGSEKDFTLKISRVEAEDLGVIY	15	基于 Chothia 和 Kabat 编号的抗 EMCN 抗体 Ab1 轻链框架区 3 (LFR3) 序列
FGGGTKLELK	16	基于 Chothia 和 Kabat 编号的抗 EMCN 抗体 Ab1 轻链框架区 4 (LFR4) 序列

[0581] 实施例2:EMCN靶细胞的生成

[0582] 方法

[0583] 慢病毒产生

[0584] 编码人内皮粘蛋白的慢病毒载体 (Origene产品目录号RC215698L4;人内皮粘蛋白 (EMCN)的Lenti ORF克隆,转录物变体1,mGFP)被用于生成表达EMCN的细胞系。使用以下组分来产生慢病毒:Lenti-X 293T包装细胞系(Clontech,产品目录号632180);LX293T完全生长培养基,不含抗生素;DMEM,高葡萄糖;1mM丙酮酸钠;10%FBS,热灭活;Opti-Mem I还原血清培养基(Gibco/Thermo Fisher;产品目录号31985);FuGene HD(Promega,产品目录号E2311);包膜、包装和转移载体质粒;VSV-G假型包膜载体(pMD2.G);含有可以与第2代和第3代转移载体(psMAX2)一起使用的Gag、Pol、Rev和Tat的包装载体。在转染前一天下午晚些时候,从90%汇合的10cm培养皿中取出293T(FT)细胞并以1:3稀释分配细胞,并且在37°C、5% CO2(在第二天转染时细胞应为60%-85%汇合)处正常温育细胞。

[0585] 根据以下方案为每个10cm培养皿准备转染反应:

[0586] 1. 在单独的1.7mL试管中为每个10cm培养皿准备转染反应。

[0587] 2. 在室温下添加900μL Opti-Mem I。

[0588] 3. 每个反应添加9μg载体骨架(含有所关注的基因)。

[0589] 4. 每个反应添加8μg包装载体。

[0590] 5. 每个反应添加1μg包膜载体(pMD2.G)。

[0591] 6. 通过快速涡旋3秒充分混合。

[0592] 7. 每个反应添加55μL Fugene HD。

[0593] 8. 通过快速用移液器上下移液20-30次来混合。

[0594] 9. 在室温下静置10分钟(允许DNA复合物形成)。

[0595] 10. 在培养皿周围缓慢逐滴添加混合物,然后轻轻地前后摇动5-10秒(不要旋转)进行混合。

[0596] 11. 将培养皿放入病毒培养箱中。

[0597] 在第2天和第3天使用血清移液器收获病毒上清液。使用Millipore steriflip 0.45 $\mu$ m过滤器除去细胞碎片。根据方案使用Lenti-X浓缩物(产品目录号631231和631232): 1) 将1体积的Lenti-X浓缩物与3体积的澄清上清液组合。轻轻颠倒混合; 2) 将混合物在冰上或4 $^{\circ}$ C处温育30分钟至过夜; (3) 在4 $^{\circ}$ C处以1,500 $\times$ g离心样品45分钟; (4) 小心除去并弃去上清液, 注意不要搅动沉淀; (5) 使用无菌PBS+0.1%BSA轻轻重悬原始体积1/10至1/100的沉淀。

[0598] 慢病毒转导

[0599] Molm13细胞系得自AddexBio(产品目录号C0003003), SEM细胞系得自German Collection of Microorganisms and Cell Culture GmbH(DSMZ编号ACC 546)。

[0600] 根据以下方案进行细胞系的慢病毒转导:

[0601] 1. 对于每个细胞系和条件(在RPMI+1%FBS中), 在24孔板中涂铺50万至100万个细胞(500 $\mu$ L)

[0602] 2. 将400K病毒转导至除了未进行病毒转导的对照之外的每个细胞系

[0603] 3. 将病毒(-80 $^{\circ}$ C储存)转移至1.5mL eppendorf管中

[0604] 4. 向病毒管中添加2.5 $\mu$ L LentiBlast-A并充分混合。添加2.5 $\mu$ L LentiBlast-B并充分混合

[0605] 5. 将离心机设置为32 $^{\circ}$ C、4000 $\times$ rpm预热10分钟

[0606] 6. 将病毒添加至平板中的细胞中并混合10X

[0607] 7. 将封口膜包裹在平板的外部

[0608] 8. 将平板置于离心机中以800 $\times$ g、32 $^{\circ}$ C离心1小时

[0609] 9. 在离心后, 向孔中再添加500 $\mu$ L的1%FBS RPMI培养基

[0610] 10. 在37 $^{\circ}$ C培养箱中放置过夜

[0611] 11. 添加3mL新鲜的完全培养基(10%FBS+RPMI)并在第二天转移至6孔板中

[0612] 嘌呤霉素选择

[0613] 在含0.5-3.33 $\mu$ g/mL嘌呤霉素的10%FBS+RPMI培养基中选择经转导的细胞。转导后三天添加嘌呤霉素, 每2-4天更换一次。在通过流式细胞术选择EMCN表达的过程中监测细胞。嘌呤霉素选择在转导后3天开始, 然后在细胞的体外培养过程中维持。

[0614] 用于FACS分析的染色

[0615] 根据以下方案对经转导的细胞和/或经嘌呤霉素选择的细胞进行抗体染色:

[0616] 1. 将500 $\mu$ L细胞等分到每个条件中(仅传代细胞和EMCN染色)

[0617] 2. 离心一次, 吸出上清液, 重悬于L/D混合物中并在冰上染色, 盖上盖子, 维持30分钟。1:1000L/D Aqua Fixability染料

[0618] 3. 用FACS缓冲液洗涤1X, 并在冰上重悬于初染液(1:100)或FACS缓冲液中1小时

[0619] 4. 用FACS缓冲液洗涤1X, 并在冰上将所有样品重悬于复染液(1:5000)中30分钟

[0620] 5. 用FACS缓冲液洗涤1X, 并重悬于200 $\mu$ L FACS缓冲液中, 然后在Cytotoflex流式细胞仪上收集。

[0621] 结果

[0622] 生成了表达EMCN的细胞系。具体而言, 已知表达所关注的潜在癌症靶标的细胞系

能够进行CAR介导的杀伤(例如,FLT3(CD135)和CD33(SIGLEC3))。在慢病毒转导和药物选择之后,通过流式细胞术评估经工程化的细胞的EMCN表达。用于建立EMCN表达基线的门控策略是使用仅传代细胞对照建立的(图3A)。如图3B所示,未进行病毒转导的对照细胞系均未表现出EMCN表达。如图3C所示,经转导的细胞系在转导后第3天表现出低水平表达。

[0623] 然后对经转导的细胞进行药物选择21天(在转导后第24天)。如图4A和图4B所示,在分别用1 $\mu$ g/m嘌呤霉素或0.5 $\mu$ g/mL嘌呤霉素培养后,经工程化的Molm13、Molm14、MV4-11和SEM细胞通过流式细胞术显示出表达EMCN的细胞在83%-99%之间。在0.5 $\mu$ g/mL嘌呤霉素中选择的经转导的PL-21显示出表达EMCN的细胞超过50%(PL-21在用1 $\mu$ g/mL嘌呤霉素选择后不能存活)。

[0624] 进一步评估经工程化的细胞的表达谱。用于建立EMCN表达基线的门控策略是使用仅传代细胞对照建立的(图5)。如表B所示,被工程化为表达EMCN的Molm13和SEM细胞均显示出EMCN表达高于对照,同时还显示出癌症靶标FLT3和CD33的维持表达。

[0625] 表B-被工程化为表达EMCN的细胞系的平均荧光强度(MFI)\*

细胞系	FLT3 表达		CD33 表达		EMCN 表达	
	(-) 对照	FLT3	(-) 对照	CD33	(-) 对照	EMCN
[0626] MOLM13-WT	53.4	3768	697	189032	52.1	133
MOLM13-EMCN	28.0	1749	193	138194	42.5	6269
SEM-WT	28.9	51314	287	1350	27.0	48.8
[0627] SEM-EMCN	15.4	59184	70.2	729	18.3	6472

[0628] MFI = 平均荧光强度 = 几何平均值;几何平均值通过FlowJo软件流式细胞术软件来计算;(-)对照 = 未染色的样品

[0629] 实施例3:抗EMCN活化性CAR评估

[0630] 方法

[0631] 慢病毒克隆和产生

[0632] 将CAR构建体克隆至慢病毒载体中。如上文所述,使用Lenti-X293T系统来产生慢病毒。所研究的CAR构建体的抗原特异性和结构域组织描述于下表C中,scFv氨基酸序列和核苷酸序列分别提供于表D和表E中。

[0633] 表C:CAR构建体(活化)

构建体	描述
SB00819	FLT3 CAR
SB01052	CD33 CAR
[0634] SB02405	CD8ss-Flag-EMCN Ab1 scFv (VH-(G4S)3-VL)-CD28 铰链/CD28 TM/CD28 ICD-CD3z
SB02406	CD8ss-Flag-EMCN Ab1 scFv (VL-(G4S)3-VH)-CD28 铰链/CD28 TM/CD28 ICD-CD3z
SB02407	CD8ss-Flag-EMCN Ab1 scFv (VH-(Whitlow)-VL)-CD28 铰链/CD28 TM/CD28 ICD-CD3z
SB02408	CD8ss-Flag-EMCN Ab1 scFv (VL-(Whitlow)-VH)-CD28 铰链/CD28 TM/CD28 ICD-CD3z
SB02409	CD8ss-Flag-EMCN Ab1 scFv (VH-(G4S)-VL)-CD28 铰链/CD28 TM/CD28 ICD-CD3z
SB02410	CD8ss-Flag-EMCN Ab1 scFv (VL-(G4S)-VH)-CD28 铰链/CD28 TM/CD28 ICD-CD3z

[0635] 表D: CAR scFv氨基酸序列

scFv	氨基酸序列 (粗体斜体表示接头序列)	SEQ ID NO
[0636] SB2405	QVQLKESGPGGLVQPSQTLTLCTVSGFSLSRDYDMHWVRQ PPGQGLEWMGVWGNNGNTHYHSALKSRLSISRDTSKSQV FLKMNSLQTEDTAIFYCTLRIKDWGPGTMVTVSS <b>GGGGS</b> <b>GGGSGGGG</b> DIVMTQTTPPSLSVALGQSVSISCKSSQSLV ASDENTYLNWLLQSPGRSPKRLIYQVSKLDSGVPDRFSGS GSEKDFTLKISRVEAEDLGVYYCLQGIHLPWTFGGGKLE LK	17
SB2406	DIVMTQTTPPSLSVALGQSVSISCKSSQSLVASDENTYLNWL LQSPGRSPKRLIYQVSKLDSGVPDRFSGSGSEKDFTLKISR VEAEDLGVYYCLQGIHLPWTFGGGKLELK <b>GGGSGGGG</b> <b>SGGGGS</b> QVQLKESGPGGLVQPSQTLTLCTVSGFSLSRDYDM HWVRQPPGQGLEWMGVWGNNGNTHYHSALKSRLSISR	18

[0637]

	TSKSQVFLKMNSLQTEDTAIFYCTLRIKDWGPGTMVTVSS	
SB2407	QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLRYDMHWVRQ PPGQGLEWMGVWGNNGNTHYHSALKSRLSISRDTSKSQV FLKMNSLQTEDTAIFYCTLRIKDWGPGTMVTVSS <b>GSTSGS</b> <b>GKPGSGEGSTKG</b> DIVMTQTTPPSLSVALGQSVSISCKSSQSL VASDENTYLNWLLQSPGRSPKRLIYQVSKLDSGVPDRFSG SGSEKDFTLKISRVEAEDLGVYYCLQGIHLPWTFGGGTKL ELK	19
SB2408	DIVMTQTTPPSLSVALGQSVSISCKSSQSLVASDENTYLNWL LQSPGRSPKRLIYQVSKLDSGVPDRFSGSGSEKDFTLKISR VEAEDLGVYYCLQGIHLPWTFGGGTKLELK <b>GSTSGS</b> <b>GKPG</b> <b>SGEGSTKG</b> QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLR YDMHWVRQPPGQGLEWMGVWGNNGNTHYHSALKSRLSI SRDTSKSQVFLKMNSLQTEDTAIFYCTLRIKDWGPGTMVT VSS	20
SB2409	QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLRYDMHWVRQ PPGQGLEWMGVWGNNGNTHYHSALKSRLSISRDTSKSQV FLKMNSLQTEDTAIFYCTLRIKDWGPGTMVTVSS <b>GGGGS</b> DIVMTQTTPPSLSVALGQSVSISCKSSQSLVASDENTYLNWL LQSPGRSPKRLIYQVSKLDSGVPDRFSGSGSEKDFTLKISR VEAEDLGVYYCLQGIHLPWTFGGGTKLELK	21
SB2410	DIVMTQTTPPSLSVALGQSVSISCKSSQSLVASDENTYLNWL LQSPGRSPKRLIYQVSKLDSGVPDRFSGSGSEKDFTLKISR VEAEDLGVYYCLQGIHLPWTFGGGTKLELK <b>GGGGS</b> QVQL KESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLRYDMHWVRQPPGQ GLEWMGVWGNNGNTHYHSALKSRLSISRDTSKSQVFLKM NSLQTEDTAIFYCTLRIKDWGPGTMVTVSS	22

[0638] 表E: CAR scFv核苷酸序列

[0639]

scFv	核苷酸序列	SEQ ID NO
SB2405	CAGGTGCAGCTGAAAGAGTCTGGACCTGGACTGGTGCA GCCAGCCAAACACTGAGCCTGACCTGTACCGTGCCG GCTTCAGCCTGAGCAGATACGACATGCACTGGGTCCGA CAGCCTCCAGGACAAGGCTTGGAATGGATGGGCGTGAT CTGGGGCAACGGCAACACACTATCACAGCGCCCTGA AGTCCCGGCTGAGCATCAGCAGAGATAACCAGCAAGAG CCAGGTGTTCTGAAGATGAACTCCCTCCAGACCGAGG ACACCGCCATCTATTTCTGCACCCTGCGGATCAAGGATT GGGGCCCTGGCACAATGGTCACCGTTTCTAGCGGAGGC GGAGGATCTGGTGGCGGAGGAAGTGGCGGAGGCGGTT CTGATATCGTGATGACCCAGACACCTCCTAGCCTGTCTG TGGCTCTGGGCCAGTCTGTGTCCATCAGCTGCAAGAGC AGCCAGTCTCTGGTGGCCAGCGACGAGAACACCTACCT GAATTGGCTGCTGCAAAGCCCCGGCAGAAGCCCCAAGA GACTGATCTACCAGGTGTCCAAGCTGGACAGCGGCGTG CCCGATAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGAGAAGGACTT CACCCTGAAGATCTCCAGAGTGGAAGCCGAGGACCTGG GCGTGTACTACTGTCTGCAAGGCATCCATCTGCCTTGG CCTTTGGAGGCGGCACAAAGCTGGAAGTGAAGGCCGCT	58

[0640]

<p>SB2406</p>	<p>GACATCGTGATGACCCAGACACCTCCTAGCCTGTCTGT                  GGCTCTGGGCCAGTCTGTGTCCATCAGCTGCAAGAGCA                  GCCAGTCTCTGGTGGCCAGCGACGAGAACACCTACCTG                  AATTGGCTGCTGCAAAGCCCCGGCAGAAGCCCCAAGAG                  ACTGATCTACCAGGTGTCCAAGCTGGACAGCGGCGTGC                  CCGATAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGAGAAGGACTTC                  ACCCTGAAGATCAGCAGAGTGGAAGCCGAGGACCTGG                  GCGTGTACTACTGTCTGCAAGGCATCCATCTGCCTTGA                  CCTTTGGCGGAGGCACAAAGCTGGAAGTAAAGGCGG                  CGGAGGAAGCGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTGGTGA                  TCTCAGGTGCAGCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGACTGGT                  GCAGCCTAGCCAAACACTGAGCCTGACCTGTACCGTGT                  CCGGCTTCAGCCTGAGCAGATACGACATGCACTGGGTC                  CGACAGCCTCCAGGACAAGGCTTGGAATGGATGGGCGT                  GATCTGGGGCAACGGCAACACACACTATCACAGCGCCC                  TGAAGTCCCGGCTGAGCATCTCCAGAGATAACCAGCAAG                  AGCCAGGTGTTCTGAAGATGAACTCCCTCCAGACCGA                  GGACACCGCCATCTATTTCTGCACCCTGCGGATCAAGG                  ATTGGGGCCCTGGCACAATGGTCACCGTGTCTAGCGCC                  GCT</p>	<p>59</p>
<p>SB2407</p>	<p>CAGGTGCAGCTGAAAGAGTCTGGACCTGGACTGGTGA                  GCCAGCCAAACACTGAGCCTGACCTGTACCGTGTCCG                  GCTTCAGCCTGAGCAGATACGACATGCACTGGGTCCGA                  CAGCCTCCAGGACAAGGCTTGGAATGGATGGGCGTGAT                  CTGGGGCAACGGCAACACACACTATCACAGCGCCCTGA                  AGTCCCGGCTGAGCATCAGCAGAGATAACCAGCAAGAG                  CCAGGTGTTCTGAAGATGAACTCCCTCCAGACCGAGG                  ACACCGCCATCTATTTCTGCACCCTGCGGATCAAGGATT                  GGGGCCCTGGCACAATGGTCACCGTGTCTAGCGGCAGC                  ACAAGCGGCTCTGGAAAACCTGGATCTGGCGAGGGCTC                  TACCAAGGGCGACATCGTGATGACCCAGACACCTCCTT                  CTCTGTCTGTGGCCCTGGGCCAGTCTGTGTCCATCAGCT                  GTAAAAGCAGCCAGTCTCTGGTGGCCAGCGACGAGAAC                  ACCTACCTGAATTGGCTGCTGCAAAGCCCCGGCAGAAG                  CCCCAGAGACTGATCTACCAGGTGTCCAAGCTGGACA                  GCGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGAG                  AAGGACTTCACCCTGAAGATCTCCAGAGTGGAAGCCGA                  GGACCTGGGCGTGTACTACTGTCTGCAAGGCATCCATC                  TGCCTTGGACCTTTGGCGGAGGCACAAAGCTGGAAGTGA                  AAGGCCGCT</p>	<p>60</p>
<p>SB2408</p>	<p>GACATCGTGATGACCCAGACACCTCCTAGCCTGTCTGT                  GGCTCTGGGCCAGTCTGTGTCCATCAGCTGCAAGAGCA                  GCCAGTCTCTGGTGGCCAGCGACGAGAACACCTACCTG                  AATTGGCTGCTGCAAAGCCCCGGCAGAAGCCCCAAGAG                  ACTGATCTACCAGGTGTCCAAGCTGGACAGCGGCGTGC                  CCGATAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGAGAAGGACTTC                  ACCCTGAAGATCAGCAGAGTGGAAGCCGAGGACCTGG                  GCGTGTACTACTGTCTGCAAGGCATCCATCTGCCTTGA                  CCTTTGGCGGAGGCACAAAGCTGGAAGTAAAGGGCAG                  CACAAGCGGCTCTGGCAAACCTGGATCTGGCGAGGGCT</p>	<p>61</p>

[0641]

	CTACCAAAGGCCAGGTGCAGCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGACTGGTGCAGCCTAGCCAAACACTGAGCCTGACCTGTACCGTGTCCGGCTTCAGCCTGAGCAGATACGACATGC ACTGGGTCCGACAGCCTCCAGGACAAGGCTTGGAATGG ATGGGCGTGATCTGGGGCAACGGCAACACACACTATCA CAGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGAGCATCTCCAGAGATA CCAGCAAGAGCCAGGTGTTCCCTGAAGATGAACTCCCTC CAGACCGAGGACACCGCCATCTATTTCTGCACCCTGCG GATCAAGGATTGGGGCCCTGGCACAATGGTCACCGTGT CTAGCGCCGCT	
SB2409	CAGGTGCAGCTGAAAGAGTCTGGACCTGGACTGGTGCAGCCAGCCAAACACTGAGCCTGACCTGTACCGTGTCCG GCTTCAGCCTGAGCAGATACGACATGCACTGGGTCCGA CAGCCTCCAGGACAAGGCTTGGAATGGATGGGCGTGAT CTGGGGCAACGGCAACACACACTATCACAGCGCCCTGA AGTCCCGGCTGAGCATCAGCAGAGATAACCAGCAAGAG CCAGGTGTTCCCTGAAGATGAACTCCCTCCAGACCGAGG ACACCGCCATCTATTTCTGCACCCTGCGGATCAAGGATT GGGGCCCTGGCACAATGGTCACCGTTTCTAGTGGTGGC GGAGGCAGCGACATCGTGATGACACAGACACCTCCAA GCCTGTCTGTGGCCCTGGGACAGTCCGTGTCTATCAGCT GCAAGAGCAGCCAGTCTCTGGTGGCCAGCGACGAGAA CACCTACCTGAATTGGCTGCTGCAAAGCCCCGGCAGAA GCCCAAGAGACTGATCTACCAGGTGTCCAAGCTGGAC AGCGGCGTGGCCGATAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGA GAAGGACTTCACCCTGAAGATCTCCAGAGTGGAAGCCG AGGACCTGGGCGTGTACTACTGTCTGCAAGGCATCCAT CTGCCTTGACCTTTGGAGGGCGGCACAAAGCTGGAAC TGAAGGCCGCT	62
SB2410	GACATCGTGATGACCCAGACACCTCCTAGCCTGTCTGT GGCTCTGGGCCAGTCTGTGTCCATCAGCTGCAAGAGCA GCCAGTCTCTGGTGGCCAGCGACGAGAACACCTACCTG AATTGGCTGCTGCAAAGCCCCGGCAGAAGCCCCAAGAG ACTGATCTACCAGGTGTCCAAGCTGGACAGCGGCGTGC CCGATAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGAGAAGGACTTC ACCCTGAAGATCAGCAGAGTGGAAGCCGAGGACCTGG GCGTGTACTACTGTCTGCAAGGCATCCATCTGCCTTGGA CCTTTGGCGGAGGCACAAAGCTGGAAC TGAAGGCGG CGGAGGATCCAGGTGCAGCTGAAAGAATCTGGCCCTG GACTGGTGCAGCCAGCCAAACACTGAGCCTGACCTGT ACCGTGTCCGGCTTCAGCCTGAGCAGATACGACATGCA CTGGGTCCGACAGCCTCCAGGACAAGGCTTGGAATGGA TGGGCGTGATCTGGGGCAACGGCAACACACACTATCAC AGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGAGCATCTCCAGAGATAC CAGCAAGAGCCAGGTGTTCCCTGAAGATGAACTCCCTCC AGACCGAGGACACCGCCATCTATTTCTGCACCCTGCGG ATCAAGGATTGGGGCCCTGGCACAATGGTCACCGTGTCT TAGCGCCGCT	63

[0642] T细胞测定法

[0643] 从人供体PBMC分离原代T细胞,并将原代T细胞冷冻。在转导之前,将T细胞解冻并用人T活化剂CD3/CD28 Dynabeads活化,并在含有IL-2的CTS OpTmizer T细胞扩增培养基中培养过夜。然后,通过以下步骤来用含有选定CAR载体的CAR慢病毒转导T细胞:除去一部

分培养基,并逐滴添加适量的慢病毒上清液,然后通过用移液器移液来轻轻混合。将细胞放置于培养箱中过夜,第二天添加另外的培养基以稀释病毒。然后正常培养细胞。转导后第4天,通过抗体染色和流式细胞术来评估CAR表达。

[0644] 对于功能测定,在转导后第9天将T细胞和靶细胞混合在一起并共培养(ET比率:1:1,96孔板,200 $\mu$ l总培养基体积)。为了区分靶细胞和T细胞,用CellTrace紫色染料对靶细胞进行染色。

[0645] 对于细胞毒性测定,在18小时共温育后收集细胞,并用Sytox红色细胞活力染料进行染色以区分活/死靶细胞。T细胞对靶细胞的细胞毒性通过流式细胞术进行评估(使用FlowJo软件进行分析),并表示为归一化为未进行病毒转导的T细胞对照的杀伤百分比。

[0646] 结果

[0647] 生成了对FLT3、CD33或EMCN的各种构建体具有特异性的CAR T细胞。每个受体均包含胞质信号传导结构域,以使得与靶抗原的结合应刺激免疫反应,诸如细胞因子产生和/或靶细胞杀伤。对于EMCN特异性CAR构建体,还评估了不同的VH和VL取向以及各种scFv接头(G4S、(G4S)<sub>3</sub>和Whitlow)。

[0648] 在原代人T细胞的慢病毒转导后,评估经工程化的细胞的CAR表达。建立CAR表达基线的门控策略使用未进行病毒转导的对照来建立(图6A)。如图6B和图6C所示,在61%-91%的经转导的细胞上观察到CAR表达。

[0649] 然后评估各种CAR T细胞的功能活性。将每种CAR T细胞与Mo1m13靶细胞、SEM靶细胞、经工程化为表达EMCN的Mo1m13靶细胞或经工程化为表达EMCN的SEM靶细胞共温育。亲本和经工程化的Mo1m13和SEM细胞系天然表达FLT3和CD33,如上文所示(参见图5C和图5D)。FLT3特异性或CD33特异性CAR T细胞与亲本Mo1m13(图7A;上图)或SEM(图7A;下图)靶细胞的共温育导致靶细胞杀伤(分别为第二列和第三列),而与EMCN特异性CAR T细胞共温育未显示出可检测水平的靶细胞杀伤(第4至9列)。相比之下,CAR T细胞与被工程化为表达EMCN的Mo1m13(图7B;上图)或SEM(图7B;下图)靶细胞的共温育导致FLT3特异性或CD33特异性CAR T细胞(分别为第二列和第三列)以及EMCN特异性CAR T细胞(第4至9列)的靶细胞杀伤。因此,用EMCN特异性CAR工程化的CAR T细胞对所有测试的构建体均表现出靶标特异性功能活性。

[0650] 实施例4:抗EMCN非门控CAR评估

[0651] 方法

[0652] 慢病毒克隆和产生

[0653] 将CAR构建体克隆至慢病毒载体中。如上文所述,使用Lenti-X293T系统来产生慢病毒。所研究的CAR构建体的抗原特异性和结构域组织描述于下表F中。

[0654] 表F:CAR构建体(活化和抑制)

构建体	描述
SB00819	FLT3 CAR#1
SB01052	CD33 CAR
SB02005	FLT3 CAR#2
SB02405	CD8ss-Flag-EMCN Ab1 scFv (VH-(G4S)3-VL)-CD28 铰链 /CD28 TM/CD28 ICD-CD3z
SB02406	CD8ss-Flag-EMCN Ab1 scFv (VL-(G4S)3-VH)-CD28 铰链 /CD28 TM/CD28 ICD-CD3z
SB02645	EMCN iCAR #1
SB02646	EMCN iCAR #2
[0655] SB02647	EMCN iCAR #3
SB02648	EMCN iCAR #4
SB02649	EMCN iCAR #5
SB02650	EMCN iCAR #6
SB02651	EMCN iCAR #7
SB02652	EMCN iCAR #8
SB02686	EMCN iCAR #9
SB02687	EMCN iCAR #10
SB02688	EMCN iCAR #11
SB02760	EMCN iCAR #12
SB02761	EMCN iCAR #13
SB02762	EMCN iCAR #14

#### [0656] T细胞测定法

[0657] 从人供体PBMC分离原代T细胞,并将原代T细胞冷冻。在转导之前,将T细胞解冻并用T活化剂CD3/CD28 Dynabeads活化,并在含有IL-2的CTS OpTmizer T细胞扩增培养基中培养过夜。然后,通过以下步骤来用含有选定EMCN特异性抑制性CAR载体的CAR慢病毒以及含有FLT3特异性或CD33特异性活化性CAR载体的CAR慢病毒转导T细胞:除去一部分培养基,并逐滴添加适量的慢病毒上清液,然后通过用移液器移液来轻轻混合。将细胞放置于培养箱中过夜,第二天添加另外的培养基以稀释病毒。然后正常培养细胞。转导后第4天,通过抗体染色和流式细胞术来评估CAR表达。

[0658] 对于功能测定,在转导后第9天将T细胞和靶细胞共培养(ET比率:1:1,96孔板,200  $\mu$ l总培养基体积)。为了区分靶细胞和T细胞,用CellTrace紫色染料对靶细胞进行染色。

[0659] 对于细胞因子产生测定,在5或18小时共培养后收集上清液,并储存在-80度处,用于通过Luminex测定法进行评估。

[0660] 对于细胞毒性测定,在18小时共温育后收集细胞,并用Sytox红色细胞活力染料进行染色以区分活/死靶细胞。细胞毒性通过流式细胞术(FlowJo)进行评估,并表示为归一化为未进行病毒转导的T细胞对照的杀伤百分比。

#### [0661] 结果

[0662] 生成对EMCN和FLT3具有特异性或者对EMCN和CD33具有特异性的CAR T细胞。FLT3和CD33 CAR均包含胞质信号传导结构域,以使得与靶抗原的结合应刺激免疫反应,诸如细胞因子产生和/或靶细胞杀伤。EMCN CAR包括抑制性胞质结构域,以使得与靶抗原的结合应抑制免疫反应,诸如通过FLT3特异性或CD33特异性CAR与它们各自的靶标结合刺激的免疫反应。这种系统被称为“非门控”。对于EMCN特异性CAR构建体,还评估了不同的VH和VL取向以及各种scFv接头(G4S、(G4S)3和Whitlow)。

[0663] 在原代人T细胞的慢病毒转导后,评估经工程化的细胞并确认CAR共表达。然后评估各种CAR T细胞的功能活性。CAR T细胞与亲本Molm13或SEM靶细胞的共温育导致靶细胞杀伤。相比之下,CAR T细胞与经工程化为表达EMCN的Molm13或SEM靶细胞的共温育导致靶细胞杀伤的减少或消除,而非亲本靶细胞的杀伤。因此,用具有抑制性胞质结构域的EMCN特异性CAR工程化的CAR T细胞显示出减少或最小化对表达EMCN的细胞的杀伤的能力,这建立了避免对EMCN阳性细胞的意外杀伤的有效非门控系统。

[0664] 实施例5:各种嵌合抑制性受体在减少NK细胞活化方面的评估方法和材料

[0665] 将单独的iCAR和aCAR构建体包装成慢病毒颗粒,并在使用含有500U/mL IL-2和20ng/ $\mu$ L IL-15的K562饲养细胞扩增10天后用于转导原代NK细胞。病毒量通过p24滴度(每次转导750,000pg)设定。iCAR构建体含有puroR盒,因此从转导后第4天至第7天将嘌呤霉素添加至NK细胞培养物中,此时通过流式细胞术来评估表达,并将NK细胞转移至微孔板中进行杀伤测定,12,500个NK细胞和总共50,000个肿瘤细胞。将NK细胞与(1)仅表达aCAR抗原FLT3的肿瘤细胞,(2)表达aCAR抗原FLT3和iCAR抗原EMCN的肿瘤细胞,或者(3)两种肿瘤细胞的混合类型一起培养。在16-18小时后,通过流式细胞术分析培养物,并对每种类型的剩余活靶细胞进行计数。aCAR介导的给定NK细胞类型的杀伤(扣除基线)通过以下方式定量:首先计算总杀伤(与仅靶标条件相比的靶标减少),然后减去对照(仅iCAR)NK细胞的总杀伤。iCAR介导的保护被定量为在存在或不存在iCAR抗原的情况下靶标之间的aCAR介导的杀伤的变化。分析杀伤测定法上清液的TNF $\alpha$ 分泌,并以类似于杀伤的方式计算aCAR和iCAR性能指标。对于表达分析,iCAR用aV5-Alexafluor 647进行染色,aCAR用aFLAG-BV-421进行染色。根据iCAR+/-和aCAR+/-表达状态将细胞分配到4个象限,以便能够评估“%aCAR+iCAR+”和“%非aCAR+iCAR-”(aCAR+iCAR-是非门控且具有潜在毒性的CAR-NK细胞,应避免使用)。为了进一步分析表达水平,我们测量了aCAR+iCAR+亚群的aCAR和iCAR的中位数荧光强度(MFI),我们通过各自荧光通道中未转导的NK细胞的MFI对中位数荧光强度进行归一化。对于每种iCAR,进行1-3个生物学重复(显示为具有相同标志物类型的不同点)。X和Y误差线(如适用):+/-平均值的标准误差。

[0666] 所评估的抗EMCN iCAR构建体使用表G中所示的参考胞内结构域的形式。所评估的抗FLT3 aCAR构建体也显示于表G中。

[0667]

表G-嵌合抑制性受体和肿瘤靶向性嵌合受体序列		
SEQ ID NO	名称	序列
89	抗 EMCN-CD8 铰链 - KIR2DL1 TM-KIR2DL1 iCAR (CD8 SS 以粗体表示)	<b>MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLKESGPGLVQPSQTL</b> SL TCTVSGFSLSR <sup>Y</sup> DMHWVRQPPGQGLEWMGVIWGNGNTHYH SALKSRLSISRDTSKSQVFLKMNSLQTEDTAIFYCTLRIKDWG PGTMVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSDIVMTQTTPPSLSVALGQS VSISCKSSQSLVASDENTYLNWLLQSPGRSPKRLIYQVSKLDS GVPDRFSGSGSEKDFTLKISRVEAEDLGVYYC <b>LQGIHLPWTF</b> G GGTKLELKGKPIP <b>NLLGLDSTNGAATTPAPRPPTPAPTIALQ</b> PLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDILIGTSVVII <b>LFI</b> LLFFL LHRWCSNKKNAAVMDQESAGNRTANSEDSDEQDPQEVTYT QLNHCVFTQRKITRPSQRPKTPPTDIIVYTELPNAESRSKVVSC P
90	抗 EMCN-CD8 铰链 - LIR1 TM-KLRG1 iCAR (CD8 SS 以粗体表示)	<b>MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLKESGPGLVQPSQTL</b> SL TCTVSGFSLSR <sup>Y</sup> DMHWVRQPPGQGLEWMGVIWGNGNTHYH SALKSRLSISRDTSKSQVFLKMNSLQTEDTAIFYCTLRIKDWG PGTMVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSDIVMTQTTPPSLSVALGQS VSISCKSSQSLVASDENTYLNWLLQSPGRSPKRLIYQVSKLDS GVPDRFSGSGSEKDFTLKISRVEAEDLGVYYC <b>LQGIHLPWTF</b> G GGTKLELKGKPIP <b>NLLGLDSTNGAATTPAPRPPTPAPTIALQ</b> PLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDVIGILVAVI <b>LLLLLL</b> LLFLIMTDSVIYS <b>MLE</b> LPTATQAQNDYGPQQKSSSSR <b>PSCSCL</b> GSG

[0668]

91	抗 EMCN-CD8 铰链 - KLRG1 TM-KLRG1 iCAR ( CD8 SS 以粗体表示 )	<b>MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLKESGPGLVQPSQTL</b> SL TCTVSGFSLSRDYDMHWVRQPPGQGLEWMGVIWGNNGNTHYH SALKSRLSISRDTSKSQVFLKMNSLQTEDTAIFYFCTLRIKDWG PGTMVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSDIVMTQTPPSLSVALGQS VSISCKSSQSLVASDENTYLNWLLQSPGRSPKRLIYQVSKLDS GVPDRFSGSGSEKDFTLKISRVEAEDLGVVYCLQGIHLPWTFG GGTKLELKGKPIPPLLGLDSTNGAATTPAPRPPTPAPTIALQ PLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDVAIALGLLLTAVLLSV LLYQWIMTDSVIYSMLELPTATQAQNDYGPQQKSSSSRPSCS CLGSG
92	抗 EMCN-CD8 铰链 - LAIR1 TM-LAIR1 iCAR ( CD8 SS 以粗体表示 )	<b>MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLKESGPGLVQPSQTL</b> SL TCTVSGFSLSRDYDMHWVRQPPGQGLEWMGVIWGNNGNTHYH SALKSRLSISRDTSKSQVFLKMNSLQTEDTAIFYFCTLRIKDWG PGTMVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSDIVMTQTPPSLSVALGQS VSISCKSSQSLVASDENTYLNWLLQSPGRSPKRLIYQVSKLDS GVPDRFSGSGSEKDFTLKISRVEAEDLGVVYCLQGIHLPWTFG GGTKLELKGKPIPPLLGLDSTNGAATTPAPRPPTPAPTIALQ PLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDILIGVSVVFLFCLLLL VLFCLHRQNQIKQGPFRSKDEEQKPPQRPDLAVDVLERTADK ATVNGLPKEDRETDTSAALAGSSQEVTYAQLDHWALTQRTA RAVSPQSTKPMASITYAAVARH
93	抗 EMCN-CD8 铰链 - LIR2 TM-LIR2 iCAR ( CD8 SS 以粗体表示 )	<b>MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLKESGPGLVQPSQTL</b> SL TCTVSGFSLSRDYDMHWVRQPPGQGLEWMGVIWGNNGNTHYH SALKSRLSISRDTSKSQVFLKMNSLQTEDTAIFYFCTLRIKDWG PGTMVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSDIVMTQTPPSLSVALGQS VSISCKSSQSLVASDENTYLNWLLQSPGRSPKRLIYQVSKLDS GVPDRFSGSGSEKDFTLKISRVEAEDLGVVYCLQGIHLPWTFG GGTKLELKGKPIPPLLGLDSTNGAATTPAPRPPTPAPTIALQ PLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDVIGILVAVVLLLLLLLL LLFLILRHRRQGHWTSTQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQ WRSSPAADAQEENLYAAVKDTQPEDGVEMDTRAAASEAPQ DVTYAQLHSLTLRRKATEPPPSQEREPPAEPESIYATLAIH
94	抗 EMCN-CD8 铰链 - LIR3 TM-LIR3 iCAR ( CD8 SS 以粗体表示 )	<b>MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLKESGPGLVQPSQTL</b> SL TCTVSGFSLSRDYDMHWVRQPPGQGLEWMGVIWGNNGNTHYH SALKSRLSISRDTSKSQVFLKMNSLQTEDTAIFYFCTLRIKDWG PGTMVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSDIVMTQTPPSLSVALGQS VSISCKSSQSLVASDENTYLNWLLQSPGRSPKRLIYQVSKLDS GVPDRFSGSGSEKDFTLKISRVEAEDLGVVYCLQGIHLPWTFG GGTKLELKGKPIPPLLGLDSTNGAATTPAPRPPTPAPTIALQ PLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDVLIGVSVAFVLLLFLL LFLLLRRQRHSHKRTSDQRKTDQFQRPAGAAETEPKDRGLLR SSPAADVQEENLYAAVKDTQSEDRVELDSQSPHDEDPAV YAPVKHSSPRREMASPPSSLSGFLDTKDRQVEEDRQMDTEA AASEASQDVTYAQLHSLTLRRKATEPPPSQEGEPPAEPESIYAT LAIH
95	抗 EMCN-CD8 铰链 - LIR5 TM-LIR5 iCAR	<b>MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLKESGPGLVQPSQTL</b> SL TCTVSGFSLSRDYDMHWVRQPPGQGLEWMGVIWGNNGNTHYH SALKSRLSISRDTSKSQVFLKMNSLQTEDTAIFYFCTLRIKDWG PGTMVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSDIVMTQTPPSLSVALGQS VSISCKSSQSLVASDENTYLNWLLQSPGRSPKRLIYQVSKLDS



99	抗 FLT3-scFv	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPG QGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCATFALFGFREQAFDIWGQGTTVTVSSGGGGG GGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYL NWFYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDLATYYCQQSYSTPFTFGPGTKVDIK
100	抗 FLT3-CD28/CD3ζ aCAR (IgK 信号序列以粗体表示; AGGS-Flag 以斜体表示)	<b>METDTLLLWVLLLWVPGSTG</b> <i>AGGS</i> <b>SDYKDDDDKGGSEVQLV</b> QSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCATFALFGFREQAFDIWGQGTTVTVSSGGGGSGGG GSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWY QQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ EDLATYYCQQSYSTPFTFGPGTKVDIKTTTTAPRPPTPAPTIAL QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWLVVVGGLVAC YLLVTVAFIIFWVRSKRSLHSDYMNMTPRRPGPTRKHVYQ PYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA EAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA LPPR
101	SS (IgK)-Flag- 抗 FLT3-CD28/CD3ζ aCAR 核苷酸序列 (Kozak 以粗体斜体表示)	<b><i>GCCGCCACC</i></b> ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGC TGCTTCTTTGGGTGCCCGGATCTACAGGTGCCGGCGGAAGC GACTACAAGGACGACGATGACAAAGGCGGCAGCGAGGTT CAACTGGTACAAAGCGGAGCCGAGGTAAGAAACCAGGG AGTAGCGTCAAAGTGTCTGCAAAGCCTCAGGCGGCACAT TCAGTAGCTATGCTATTTTCATGGGTACGCCAAGCACCAGG ACAGGGGCTGGAGTGGATGGGCGGGATTATCCCCATCTTC GGTACGGCAAACCTATGCACAAAAGTTCCAGGGACGAGTCA CCATCACGGCTGATAAGTCCACCTCCACCGCCTATATGGAG CTGAGTTCCCTTCGGAGCGAGGATACTGCTGTGTATTATTG TGCCACGTTTCGCACTGTTTCGGTTTTTCGGGAGCAGGCGTTT ATATTTGGGGACAAGGCACAACGGTCACGGTCAGTTCAGG CGGAGGGGGATCAGGGGGTGGGGGGTCAGGTGGCGGTGG AAGTGACATTCAGATGACCCAGAGTCCCTCTTCATTGAGTG CGAGCGTCGGTGATCGGGTTACGATAACCTGTAGGGCCTC CCAAAGTATATCATCATATTTGAACTGGTACCAACAGAAA CCTGGGAAAGCGCCGAAGCTCCTTATCTATGCTGCCAGCTC TTTGCAAAGCGGTGTGCCCTCACGGTTCCTCCGGTAGTGGGT CCGGGACCGACTTCACTTTGACCATCAGCAGCCTTCAGCCA GAGGATCTTGCCACTTATTACTGCCAGCAATCTTATAGCAC ACCGTTTACATTCGGTCCAGGCACAAAGGTAGACATTAAG ACCACCACACCAGCTCCTAGACCTCCAACCTCCTGCTCCTAC AATCGCCCTGCAGCCACTGAGTCTGAGGCCAGAGGCTTGT AGACCTGCTGCAGGCGGAGCCGTGCATACAAGAGGACTGG ATTTGCGCTGCGACTTCTGGGTGCTCGTGGTTGTTGGCGGA GTGCTGGCCTGTTACAGCCTGCTGGTTACCGTGGCCTTCAT CATCTTTTGGGTCCGAAGCAAGCGGAGCCGGCTGCTGCAC AGCGATTACATGAACATGACCCCTCGGAGGCCCGGACCTA CCAGAAAGCACTACCAGCCTTACGCTCCTCCTAGAGATTT GCCGCTACCGGTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGATCCGCCG ATGCTCCCGCCTATAAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAA

[0670]

[0671]	<pre>CGAGCTGAACCTGGGGAGAAGAGAAGAGTACGACGTGCT GGACAAGCGGAGAGGCAGAGATCCTGAAATGGGCGGCAA GCCAGACGGAAGAATCCTCAAGAGGGCCTGTATAATGAG CTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCG GAATGAAGGGCGAGCGCAGAAGAGGGCAAGGGACACGATG GACTGTACCAGGGACTGAGCACCGCCACCAAGGATACCTA TGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCTCCAAGATAA</pre>
--------	---

[0672] 结果

[0673] NK细胞被工程化为表达活化性嵌合抗原受体 (aCAR) 和抑制性嵌合抗原受体 (iCAR), 这些受体具有来源于不同的抑制性受体的各种抑制性结构域形式。NK细胞用仅 aCAR或与具有所示的各种抑制性结构域的 iCAR 的组合进行病毒转导。

[0674] 评估经工程化的NK细胞的CAR表达。如图8所示, 在aCAR+iCAR+NK细胞(上图)中, 抗FLT3 aCAR表达通常比背景高10倍, 抗EMCN iCAR通常比背景高100倍。LIR家族构建体表现出相对于其他构建体的显著高表达。还评估了CAR表达群体的表达谱(下图)并且显示出总群体含有少于5%的aCAR+iCAR-细胞, 并且各种iCAR形式具有不同百分比的aCAR+iCAR+群体, KLRG1、LIR2、LIR3、LIR5和SIGLEC-2显示始终有超过50%的细胞是aCAR+iCAR+。同样, 相对于其他构建体, LIR家族iCAR通常显示出更多的aCAR+iCAR+细胞。

[0675] 然后, 评估抗FLT3 aCAR诱导的NK细胞介导的靶细胞杀伤的抗EMCN iCAR减少以及NK细胞的细胞因子产生。测定单独的靶标SEM细胞中的每种(“单独”: 分别仅aCAR抗原FLT3 SEM细胞和共表达aCAR/iCAR抗原FLT3/EMCN的SEM细胞) 或者在靶标和非靶细胞的混合群体背景中(“混合”: 仅aCAR抗原FLT3 SEM细胞和在同一培养物中共表达aCAR/iCAR抗原FLT3/EMCN的SEM细胞) 的减少。如图9所示, 表达LIR2、LIR3、LIR5、KIR2DL1、LAIR1和SIGLEC-2抗EMCN iCAR形式的NK细胞在杀伤(上图)以及iCAR介导的杀伤(上图)和细胞因子减少(下图)保护方面显示出一致的aCAR介导的性能, SIGLEC-10和KLRG1构建体的性能差异更大。

[0676] 结果表明, NK细胞被成功工程化为共表达aCAR和iCAR, 尤其是抗EMCN iCAR, 在不存在iCAR配体的情况下以aCAR配体依赖性方式成功杀伤靶细胞并产生细胞因子, 并且以iCAR配体(抗EMCN)依赖性方式成功减少NK介导的杀伤和细胞因子产生。

[0677] 实施例6: EMCN iCAR对健康HSPC群体保护的评估

[0678] 方法和材料

[0679] 人造血干细胞和祖细胞 (HSPC) 表达CD33和EMCN二者, 因此, 评估靶向抗内皮粘蛋白 (aEMCN) 的抑制性CAR (iCAR) 保护HSPC免受抗CD33活化性CAR杀伤的能力。人CD34+骨髓源性造血干细胞和祖细胞来自A11Cells。用于流式细胞术的活力染料和抗体, 包括谱系混合物、CD34、CD38和CD45RA, 购自BD biosciences或Biolegend。使用CD3剔除和CD56阳性选择在内部从供体纯化NK细胞。NK细胞通过与表达膜栓系的IL-15和IL-21的K562细胞共培养来扩增。通过在retroectin涂覆的平板上旋转诱导, 使用编码在 $\gamma$ 逆转录病毒骨架中的CAR的合成构建体来转导NK细胞。为了制备编码CAR的逆转录病毒, 用合成构建体来转染GP2包装细胞。aCAR是具有抗CD33抗原结合结构域的第二代CAR, iCAR以类似的方式构建, 但是具有两个抑制性胞内结构域而不是活化性胞内结构域。用作对照的脱靶抑制性CAR (iCAR) 包含抗HER2结合结构域。抗EMCN iCAR包含SEQ ID NO:17的抗EMCN scFV、CD8铰链、LIR1跨膜结构域、LIR1的第一胞内结构域和KIR3DL1的第二胞内结构域。

[0680] 将HSPC解冻并用RPMI洗涤一次。将表达CAR的NK细胞用RPMI洗涤一次,然后以4:1E:T比率与HSPC以各种组合排列在微孔板中,并且以37摄氏度、5%CO<sub>2</sub>的条件温育过夜。将测定板离心,用抗体混合物和活力染料进行染色,并通过流式细胞术进行分析。从每个孔中获取固定体积,计算每个体积中的各种亚群的计数,并将该计数用于计算相对于无NK细胞的条件的杀伤(图10)。

[0681] 结果

[0682] 评估CAR转导的NK细胞对HSPC的杀伤,并且与通过未转导的NK细胞进行的杀伤进行比较。如图10所示,相对于与aEMCN iCAR NK细胞的共培养,与αCD33 aCAR NK细胞的共培养产生更多的HSPC杀伤。另外,相对于与表达αCD33 aCAR和αEMCN iCAR的NK细胞的共培养,与表达αCD33 aCAR和对脱靶抗原(不由HSPC表达)具有特异性的iCAR的NK细胞的共培养产生更多的杀伤。虽然双CAR转导的NK细胞条件使基线杀伤升高,但是与表达脱靶iCAR和αCD33 aCAR的NK细胞相比,表达αEMCN iCAR和αCD33 aCAR的NK细胞使HSPC的杀伤减少,这表明具有αEMCN iCAR介导的HSPC保护作用。

[0683] 实施例7:体内aEMCN iCAR活性的评估

[0684] 在小鼠模型中评估靶向抗内皮粘蛋白(aEMCN)的iCAR保护表达EMCN的细胞的能力。B细胞前体白血病细胞系(NALM6)细胞被用作靶细胞,并且被遗传修饰为表达仅FLT3(活化性抗原) (“癌症模型细胞”)或者表达FLT3和EMCN(安全性抗原)二者 (“健康模型细胞”)。小鼠模型由Jax hIL-15小鼠(NSG背景)组成,通过尾静脉途径注射这两种NALM6细胞类型(总共5e5个细胞)的1:1混合物。将小鼠分为3组,每组6只小鼠,每组接受3种NK细胞治疗中的一种,包括(A组)无NK细胞(PBS对照)、(B组)表达aFLT3 aCAR的NK细胞、或者(C组)表达aFLT3 aCAR和aEMCN iCAR二者的NK细胞。每周从这些小鼠身上收集外周血,并将外周血准备用于流式细胞分析,包括红细胞裂解以及抗体和活力染料染色,以辨别表达或不表达安全性抗原的NALM6细胞。虽然B组中的NK细胞表达aCAR并减少靶细胞数量,但是A组和B组中的NK细胞均不具有iCAR或者识别安全性抗原,所以两组中表达EMCN的靶细胞的百分比均保持在最初注射时的50%。然而,C组中的NK细胞识别EMCN+NALM6亚群上的安全性抗原,减少NK细胞介导的靶细胞杀伤。结果表明,与两个对照组相比,基于外周血中的EMCN+靶细胞的百分比的升高,非门控回路功能良好。

[0685] 以引用的方式并入

[0686] 本申请中引用的所有出版物、专利、专利申请和其他文档据此以引用的方式整体并入用于所有目的,如同每篇单独的出版物、专利、专利申请或其他文档被单独指示为以引用的方式并入用于所有目的的程度。

[0687] 等同物

[0688] 虽然已经展示和描述了各种具体实施方案,但是以上说明书不是限制性的。应当理解,可以进行各种改变而不会脱离本公开的精神和范围。在阅读本说明书后,本领域的技术人员将会了解很多变化。

[0689] 其他序列

[0690] 与本公开相关的其他序列提供于下文中:

	序列	SEQ ID NO	描述
[0691]	GGAGGCGGAGGATCTGGTGGCGGAGGAAGTGG CGGAGGCGGTTCT	64	(G4S) <sub>3</sub> 接头核酸
	GGTGGTGGTGGCAGTGGTGGCGGTGGCTCAGG TGGCGGCGGATCAGGCGGTGGTGGTTCTGGCG GCGGTGGATCT	65	(G4S) <sub>5</sub> 接头核酸
[0692]	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKK PGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEW MGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYME LSSLRSEDNAVYYCATFALFGFREQAFDIWGGT TVTSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSA SVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI YAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDLA TYYCQQSYSTPFTFGPGTKVDIKTTTPAPRPPTPAP TIALQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITKRGRKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSAD APAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPRGSSGTGMVSKGEELFTGVVPIVELDGDV NGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKICTTGKLPVP WPTLVTTLGYGLQCFARYPDHMKQHDFFKSAMP EGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRI ELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYITADKQ KNGIKANFKIRHNIEDGGVQLADHYQNTPIGDG PVLLPDNHLYSYQSALS KDPNEKRDHMLLEFVT AAGITLGMDELYK	66	SB00819 盒
	METDTLLLWVLLLVVPGSTGAGGSDYKDDDDK GGSVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT DYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIYPYNGGTGYNQ KFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDNAVYYC ARGRPAMDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGG GGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASEVDNY GISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQSGVPSRF SGSGSGTDFLTITSSLPDDFATYYCQQSKEVPWT FGQGTKVEIKSGAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTII HVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWVLLVVVGGVLACYS LLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPT RKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYKQ GQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	67	SB01052 盒

[0693]

序列	SEQ ID NO	描述
MALPVTALLLPLALLLHAARPAGGSDYKDDDDK GGSQVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLRY DMHWVRQPPGQGLEWMGVIWGNNGNTHYHSAL KSRLSISRDTSKSQVFLKMNSLQTEDTAIFYCTLRI KDWGPGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMT QTPPSSLVALGQSVSISCKSSQSLVASDENTYLNW LLQSPGRSPKRLIYQVSKLDSGVPDRFSGSGSEKD FTLKISRVEAEDLGVYYCLQGIHLPWTFGGGTKL ELKTTTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDLLPLGGLPLLITTCFCLFCCLRR HQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQ NSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCL EENKPGIVYASLNHSVIGPNSRLARNVKEAPTEYA SICVRS*	68	SB02645 盒
MALPVTALLLPLALLLHAARPAGGSDYKDDDDK GGSQVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLRY DMHWVRQPPGQGLEWMGVIWGNNGNTHYHSAL KSRLSISRDTSKSQVFLKMNSLQTEDTAIFYCTLRI KDWGPGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMT QTPPSSLVALGQSVSISCKSSQSLVASDENTYLNW LLQSPGRSPKRLIYQVSKLDSGVPDRFSGSGSEKD FTLKISRVEAEDLGVYYCLQGIHLPWTFGGGTKL ELKTTTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDLLPLGGLPLLITTCFCLFCCLRR HQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQ NSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCL EENKPGIVYASLNHSVIGPNSRLARNVKEAPTEYA SICVRS SGS GATNFSLLKQAGDVEENPGPMTEYKP TVRLATRDDVPRAVRTLAAAFADYPATRHTVDP DRHIERVTELQELFLTRVGLDIGKVWVADDGAAV AVWTTPESEAGAVFAEIGPRMAELSGSRLAAQQ QMEGLLAPHRPKEPAWFLATVGVSPDHQGKGLG SAVVLPGVAAERAGVPAFLETSAPRNLPFYERL GFTVTADVEVPEGPRTWCMTRKPGA*	69	SB02646 盒
MALPVTALLLPLALLLHAARPAGGSDYKDDDDK GGSQVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLRY DMHWVRQPPGQGLEWMGVIWGNNGNTHYHSAL KSRLSISRDTSKSQVFLKMNSLQTEDTAIFYCTLRI KDWGPGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMT QTPPSSLVALGQSVSISCKSSQSLVASDENTYLNW LLQSPGRSPKRLIYQVSKLDSGVPDRFSGSGSEKD FTLKISRVEAEDLGVYYCLQGIHLPWTFGGGTKL ELKTTTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDVIGILVAVILLLLLLLLLLLFLILRH RRQGKHWSTSTQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQ WRSSPAADAQEENLYAAVKHTQPEDGVEMDTRS PHDEDPAVTYAEVKHSRPRREMASPPSPLSGEFL DTKDRQAEEDRQMDTEAAASEAPQDVTYAQLHS LTLRREATEPPPSQEGPSPAVPSIYATLAIH*	70	SB02647 盒

[0694]

序列	SEQ ID NO	描述
MALPVTALLLPLALLLHAARPAGGSDYKDDDDK GGSQVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLSR DMHWVRQPPGQGLEWMGVIWGNNGNTHYHSAL KSRLSISRDTSKSQVFLKMNSLQTEDTAIFYCTLR KDWGPGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMT QTPPSLSVALGQSVSISCKSSQSLVASDENTYLNW LLQSPGRSPKRLIYQVSKLDSGVPDRFSGSGSEKD FTLKISRVEAEDLGVYYCLQGIHLPWTFGGGTKL ELKTTTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDVIGILVAVILLLLLLLLLLLFLILRH RRQKGHWSTQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQ WRSSPAADAQEENLYAAVKHTQPEDGVEMDTRS PHDEDPAVITYAEVKHSRPRREMASPPSPLSGEFL DTKDRQAEEDRQMDTEAAASEAPQDVITYAQLHS LTLRREATEPPPSQEGPSPAVPSIYATLAIHGSGAT NFSLLKQAGDVEENPGPMTEYKPTVRLATRDDVP RAVRTLAAAFADYPATRHTVDPDRHIERVTELQE LFLTRVGLDIGKVWVADDGAAVAVWTTPEVVEA GAVFAEIGPRMAELSGSRLAAQQQMEGLLAPHRP KEPAWFLATVGVSPDHQGGKGLGSAVVLPGVEAA ERAGVPAFLETSA PRNLPFYERLGFTVTADVEVPE GPRTWCMTRKPGA*	71	SB02648 盒
MALPVTALLLPLALLLHAARPAGGSDYKDDDDK GGSDIVMTQTPPSLSVALGQSVSISCKSSQSLVAS DENTYLNWLLQSPGRSPKRLIYQVSKLDSGVPDR FSGSGSEKDFTLKISRVEAEDLGVYYCLQGIHLPW TFGGGTKLELKGGGGSGGGGSGGGGSGVQLKES GPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLSRYDMHWVRQPP GQGLEWMGVIWGNNGNTHYHSALKSRLSISRDT KSQVFLKMNSLQTEDTAIFYCTLRKDWGPGTMV TVSSTTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPEACRPAAG GAVHTRGLDFACDLLPLGGLPLLITTCFLCFLCLR RHQGGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTR QNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPC LEENKPGIVYASLNHSVIGPNSRLARNVKEAPTEY ASICVRS*	72	SB02649 盒

[0695]

序列	SEQ ID NO	描述
MALPVTALLLPLALLLHAARPAGGSDYKDDDDK GGSQVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLSR DMHWVRQPPGQGLEWMGVIWGNNGNTHYHSAL KSRLSISRDTSKSQVFLKMNSLQTEDTAIFYCTLR KDWGPGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMT QTPPSLSVALGQSVSISCKSSQSLVASDENTYLNW LLQSPGRSPKRLIYQVSKLDSGVPDRFSGSGSEKD FTLKISRVEAEDLGVYYCLQGIHLPWTFGGGTKL ELKTTTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDLLPLGGLPLLITTCFLFCCLRR HQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQ NSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCL EENKPGIVYASLNHSVIGPNSRLARNVKEAPTEYA SICVRSRLRHRQGHWTSTQRKADFQHPAGAVG PEPTDRGLQWRSSPAADAQEENLYAAVKHTQPE DGVEMDTRSPHDEDPAVTYAEVKHSRPREMA SPPSPLSGEFLDTKDRQAEEDRQMDTEAAASEAP QDVTYAQLHSLTLRREATEPPPSQEGPSPAVPSIY ATLAIH*	73	SB02650 盒
MALPVTALLLPLALLLHAARPAGGSDYKDDDDK GGSDIVMTQTPPSLSVALGQSVSISCKSSQSLVAS DENTYLNWLLQSPGRSPKRLIYQVSKLDSGVPDR FSGSGSEKDFTLKISRVEAEDLGVYYCLQGIHLPW TFGGGTKLELKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLKES GPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLSRYDMHWVRQPP GQGLEWMGVIWGNNGNTHYHSALKSRLSISRDT SKSQVFLKMNSLQTEDTAIFYCTLRKDWGPGTMV TVSSTTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPEACRPAAG GAVHTRGLDFACDVIGILVAVILLLLLLLLLLLFLILR HRRQGHWTSTQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGL QWRSSPAADAQEENLYAAVKHTQPEDGVEMDTR SPHDEDPAVTYAEVKHSRPREMASPPSPLSGEF LDTKDRQAEEDRQMDTEAAASEAPQDVTYAQLH SLTLRREATEPPPSQEGPSPAVPSIYATLAIH*	74	SB02651 盒

[0696]

序列	SEQ ID NO	描述
MALPVTALLLPLALLLHAARPAGGSYKDDDDK GGSQVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLRY DMHWVRQPPGQGLEWMGVIWGNNGNTHYHSAL KSRLSISRDTSKSQVFLKMNSLQTEDTAIFYCTLRI KDWGPGTMVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIVMT QTPPSSLVALGQSVSISCKSSQSLVASENTYLNW LLQSPGRSPKRLIYQVSKLDSGVPDRFSGSGSEKD FTLKISRVEAEDLGVYYCLQGIHLPWTFGGGTKL ELKTTTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDVIGILVAVILLLLLLLLLLFLILRH RRQKGHWSTQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQ WRSSPAADAQEENLYAAVKHTQPEDGVEMDTRS PHDEDPQAVTYAEVKHSRPRREMASPPSPLSGEFL DTKDRQAEEDRQMDTEAAASEAPQDVTYAQLHS LTLRREATPPPSQEGPSPAVPSIYATLAIHRRHQ KQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQ VLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEEN KPGIVYASLNHSVIGPNSRLARNVKEAPTEYASIC VRS*	75	SB02652 盒
MALPVTALLLPLALLLHAARPAGGSYKDDDDK GGSQVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLRY DMHWVRQPPGQGLEWMGVIWGNNGNTHYHSAL KSRLSISRDTSKSQVFLKMNSLQTEDTAIFYCTLRI KDWGPGTMVTVSSGGGGSDIVMTQTPPSSLVAL GQSVSISCKSSQSLVASENTYLNWLLQSPGRSPK RLIYQVSKLDSGVPDRFSGSGSEKDFTLKISRVEA EDLGVYYCLQGIHLPWTFGGGTKLELKTTTPAPR PPTPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDLLPLGGLPLLITTCFCLFCCLRRHQGKQNELS DTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSET GIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVY ASLNHSVIGPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS*	76	SB02686 盒
MALPVTALLLPLALLLHAARPAGGSYKDDDDK GGSQVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLRY DMHWVRQPPGQGLEWMGVIWGNNGNTHYHSAL KSRLSISRDTSKSQVFLKMNSLQTEDTAIFYCTLRI KDWGPGTMVTVSSGGGGSDIVMTQTPPSSLVAL GQSVSISCKSSQSLVASENTYLNWLLQSPGRSPK RLIYQVSKLDSGVPDRFSGSGSEKDFTLKISRVEA EDLGVYYCLQGIHLPWTFGGGTKLELKTTTPAPR PPTPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDVIGILVAVILLLLLLLLLLFLILRHRHQGKHWS TQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPAADA QEENLYAAVKHTQPEDGVEMDTRSPHDEDPQAV TYAEVKHSRPRREMASPPSPLSGEFLDTKDRQAE EDRQMDTEAAASEAPQDVTYAQLHSLTLREAT EPPPSQEGPSPAVPSIYATLAIH*	77	SB02687 盒

[0697]

序列	SEQ ID NO	描述
MALPVTALLLPLALLLHAARPAGGSDYKDDDDK GGSQVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLRY DMHWVRQPPGQGLEWMGVIWGNNGNTHYHSAL KSRLSISRDTSKSQVFLKMNSLQTEDTAIFYCTLRI KDWGPGTMVTVSSGGGSDIVMTQTPPSLSVAL GQSVSISCKSSQSLVASENTYLNWLLQSPGRSPK RLIYQVSKLDSGVPDRFSGSGSEKDFTLKISRVEA EDLGVYYCLQGIHLPWTFGGGTKLELKTTTPAPR PPTPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDVIGILVAVILLLLLLLLLLLFLILRHRROGKHWT TQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPAADA QEENLYAAVKHTQPEDGVEMDTRSPHDEDPAV TYAEVKHSRPRREMASPPSPLSGEFLDTKDRQAE EDRQMDTEAAASEAPQDVITYAQLHSLTLRREAT EPPPSQEGPSPAVPSIYATLAIHRRHQGKQNELSDT AGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIY DNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASL NHSVIGPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS*	78	SB02688 盒
MALPVTALLLPLALLLHAARPAGGSDYKDDDDK GGSQVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLRY DMHWVRQPPGQGLEWMGVIWGNNGNTHYHSAL KSRLSISRDTSKSQVFLKMNSLQTEDTAIFYCTLRI KDWGPGTMVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIV MTQTPPSLSVALGQSVSISCKSSQSLVASENTYLN WLLQSPGRSPKRLIYQVSKLDSGVPDRFSGSGSE KDFTLKISRVEAEDLGVYYCLQGIHLPWTFGGG TKLELKTTTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACDLLPLGGLPLLITTCFCLFCCL RRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEAST RQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNP CLEENKPGIVYASLNHSVIGPNSRLARNVKEAPTE YASICVRS*	79	SB02760 盒
MALPVTALLLPLALLLHAARPAGGSDYKDDDDK GGSQVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLRY DMHWVRQPPGQGLEWMGVIWGNNGNTHYHSAL KSRLSISRDTSKSQVFLKMNSLQTEDTAIFYCTLRI KDWGPGTMVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIV MTQTPPSLSVALGQSVSISCKSSQSLVASENTYLN WLLQSPGRSPKRLIYQVSKLDSGVPDRFSGSGSE KDFTLKISRVEAEDLGVYYCLQGIHLPWTFGGG TKLELKTTTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACDVIGILVAVILLLLLLLLLLL FLILRHRROGKHWTSTQRKADFQHPAGAVGPEPTDR GLQWRSSPAADAQEENLYAAVKHTQPEDGVEMDT RSPHDEDPAVITYAEVKHSRPRREMASPPSPLSG EFLDTKDRQAEEDRQMDTEAAASEAPQDVITYAQ LHSLTLRREATEPPPSQEGPSPAVPSIYATLAIH*	80	SB02761 盒

[0698]

序列	SEQ ID NO	描述
MALPVTALLLPLALLLHAARPAGGSDYKDDDDK GGSQVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLSR DMHWVRQPPGQGLEWMGVIWGNNGNTHYHSAL KSRLSISRDTSKSQVFLKMNSLQTEDTAIFYFCTLR KDWGPGTMVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIV MTQTPPSLSVALGQSVSISCKSSQSLVASDENTYL NWLLQSPGRSPKRLIQVSKLDSGVPDRFSGSGSE KDFTLKISRVEAEDLGVYYCLQGIHLPWTFGGGT KLELKTTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPEACRPAA GGAVHTRGLDFACDVIGILVAVILLLLLLLLLLLFLIL RHRRQGKHWTSTQRKADFQHPAGAVGPEPTDRG LQWRSSPAADAQEENLYAAVKHTQPEDGVEMDT RSPHDEDPAVITYAEVKHSRPRREMASPPSPLSG EFLDTKDRQAEEDRQMDTEAAASEAPQDVITYAQ LHSLTLRREATEPPPSQEGPSPAVPSIYATLAIHRR HQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQ NSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCL EENKPGIVYASLNHNSVIGPNSRLARNVKEAPTEYA SICVRS*	81	SB02762 盒

抗体-1 (轻链) - 使用 chothia 方案的 CDR 注释

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
D	I	V	M	T	Q	T	P	P	S	L	S	V	A	L	G	Q	S	V	S	I	S
LFR1																					
23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
C	K	S	S	Q	S	L	V	A	S	D	E	N	T	Y	L	N	W	L	L	Q	S
CDR-L1																					
LFR2																					
45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
P	G	R	S	P	K	R	L	I	Y	Q	V	S	K	L	D	S	G	V	P	D	R
LFR2																					
CDR-L2																					
LFR3																					
67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88
F	S	G	S	G	S	E	K	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	L
LFR3																					
CDR-L3																					
LFR4																					
89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
G	V	Y	Y	C	L	Q	G	I	H	L	P	W	T	F	G	G	G	T	K	L	E
CDR-L4																					
LFR4																					
111	112																				
L	K																				

图1

抗体-1 (重链) - 使用 chothia 方案的 CDR 注释

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Q	V	Q	L	K	E	S	G	P	G	L	V	Q	P	S	Q	T	L	S	L	T	C
HFR1																					
23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
T	V	S	G	F	S	L	S	R	Y	D	M	H	W	V	R	Q	P	P	G	Q	G
CDR-III											HFR2										
45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
L	E	W	M	G	V	I	W	G	N	G	N	T	H	Y	H	S	A	L	K	S	R
HFR2											HFR3										
67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88
L	S	I	S	R	D	T	S	K	S	Q	V	F	L	K	M	N	S	L	Q	T	E
HFR3											HFR4										
89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
D	T	A	I	Y	F	C	T	L	R	I	K	D	W	G	P	G	T	M	V	T	V
CDR-III											HFR4										
111	112																				
S	S																				

图2

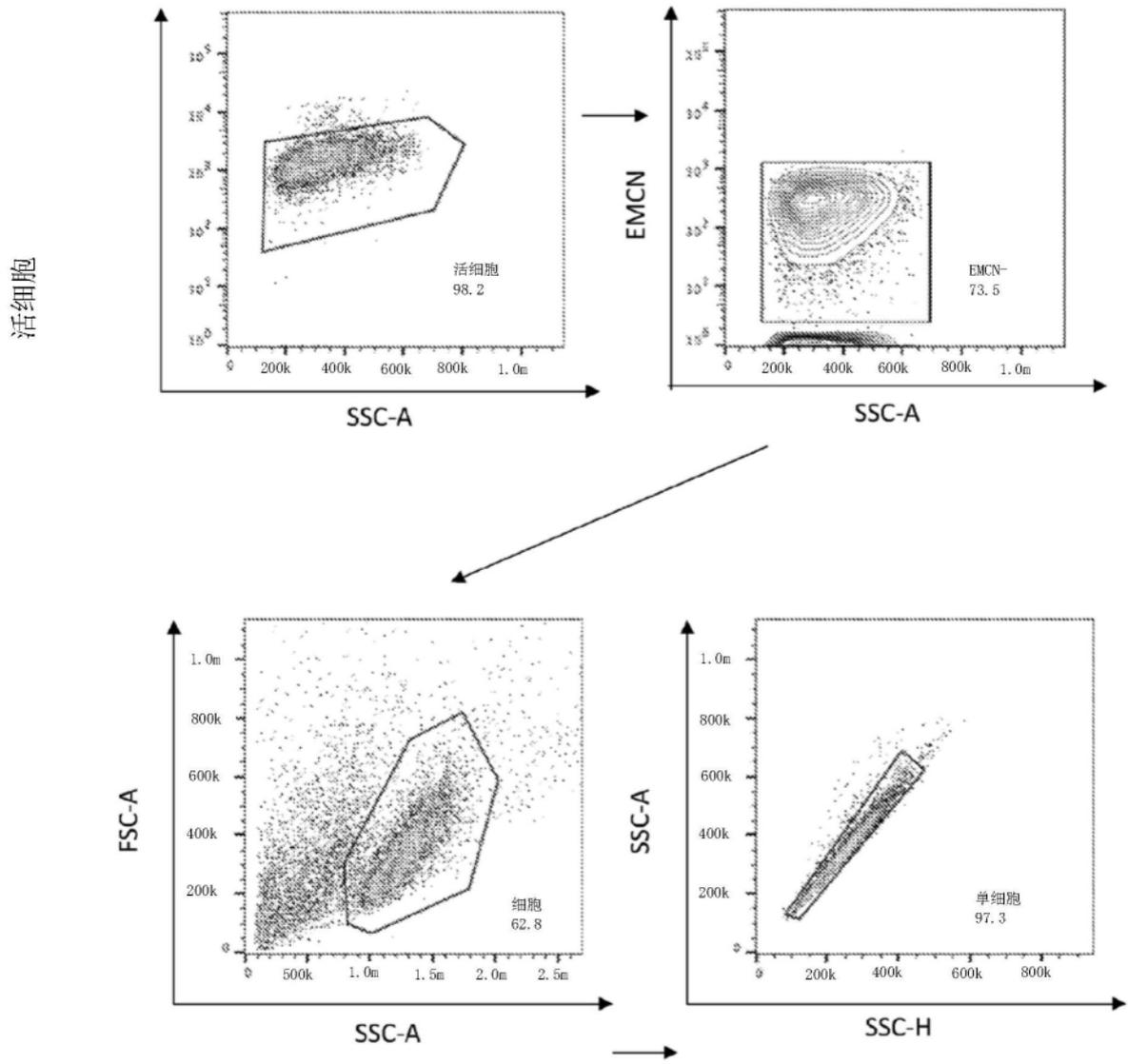


图3A

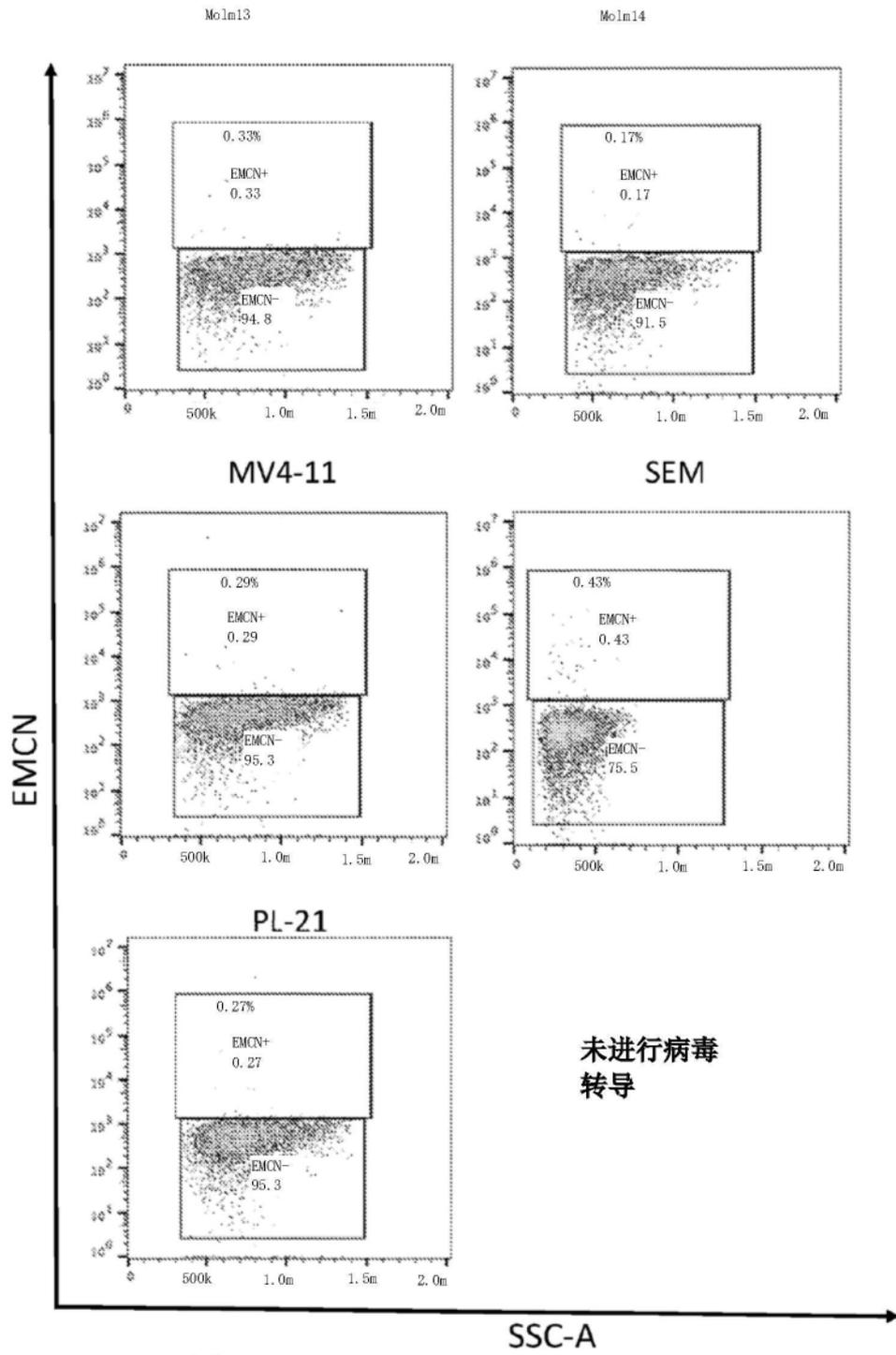


图3B

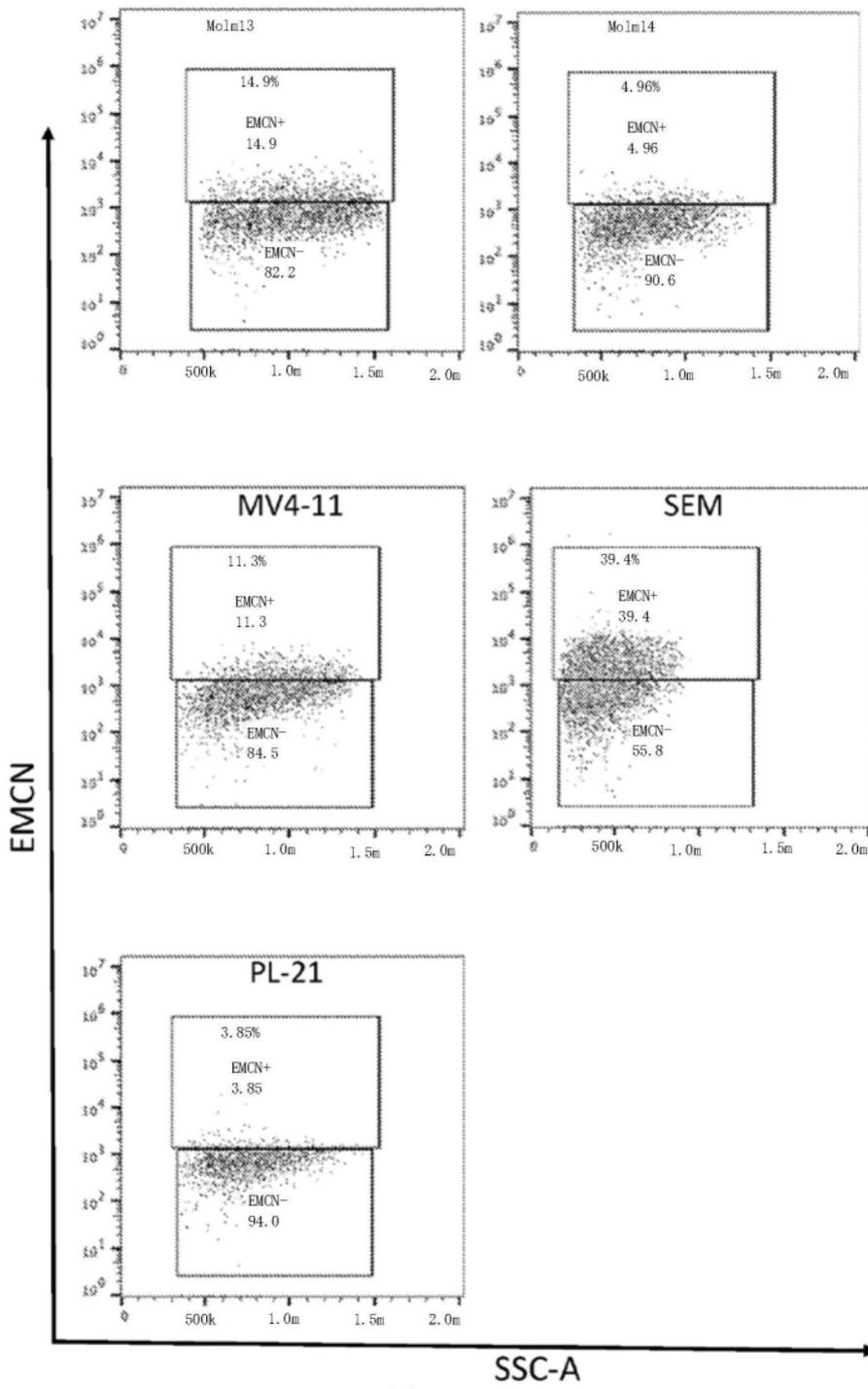


图3C

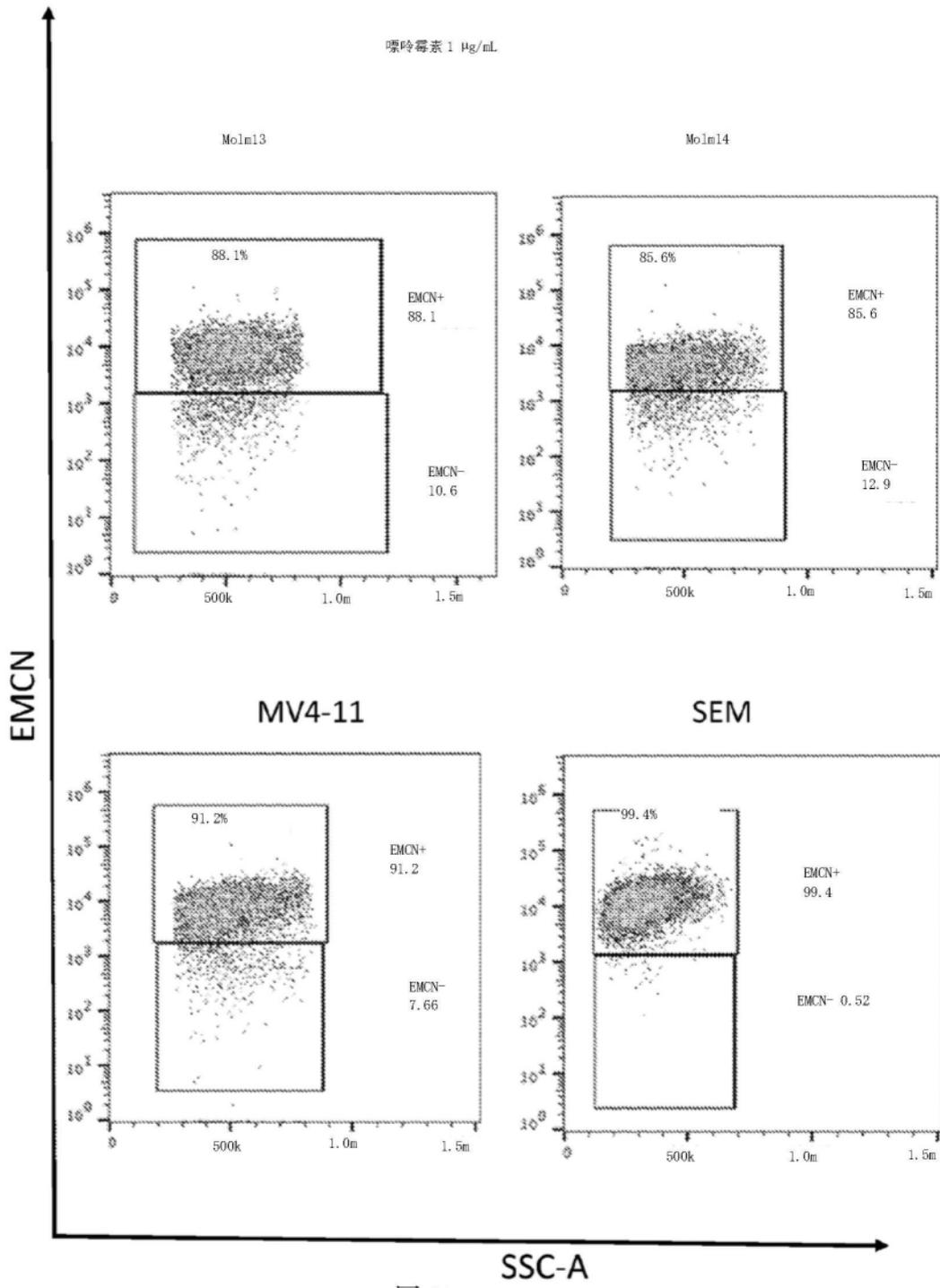


图4A

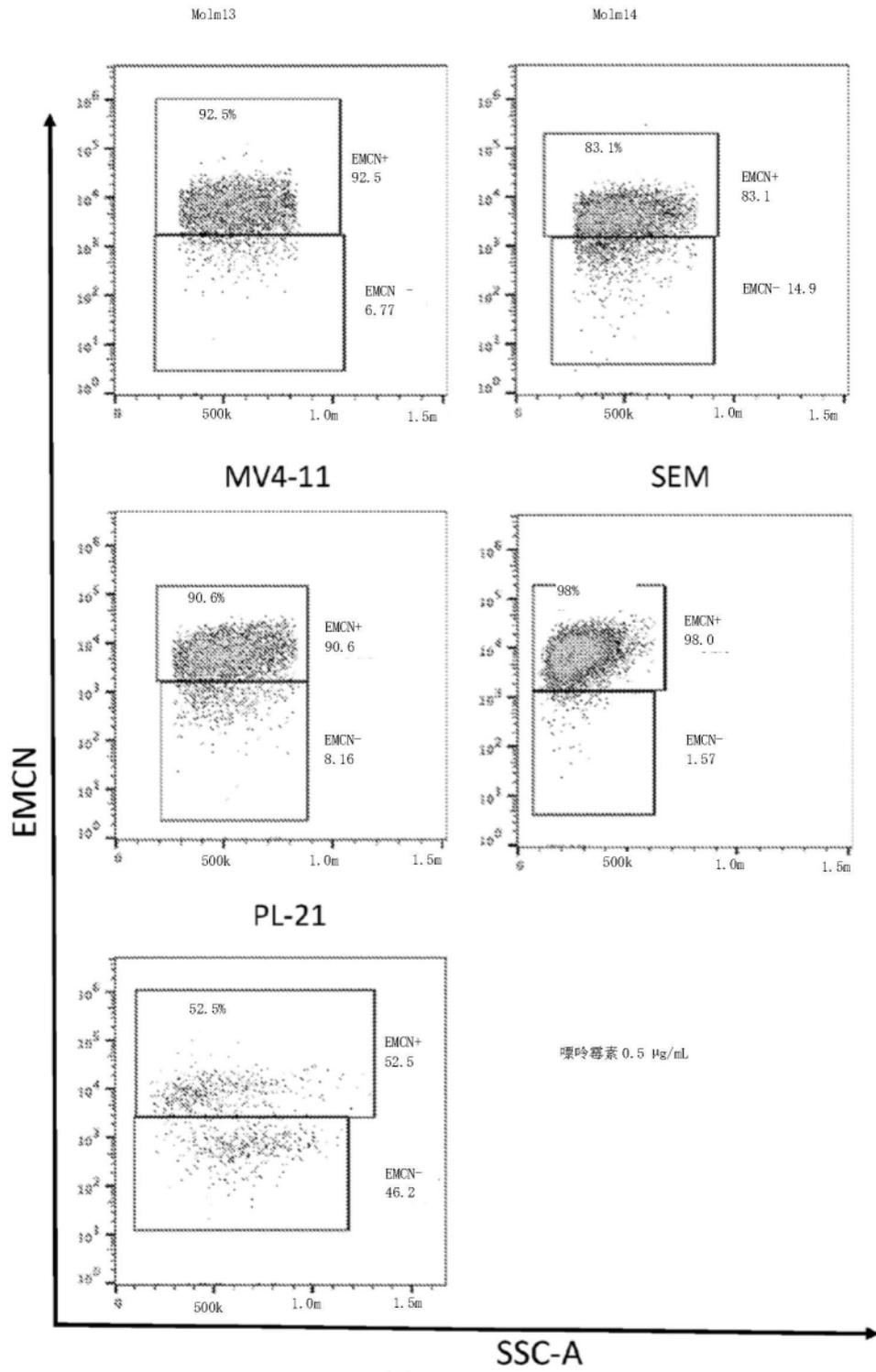


图4B

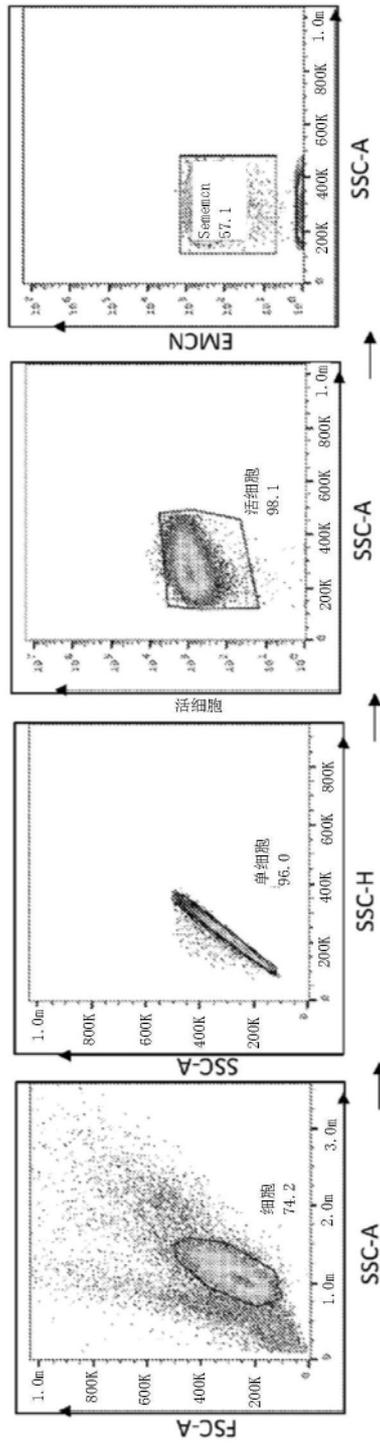


图5

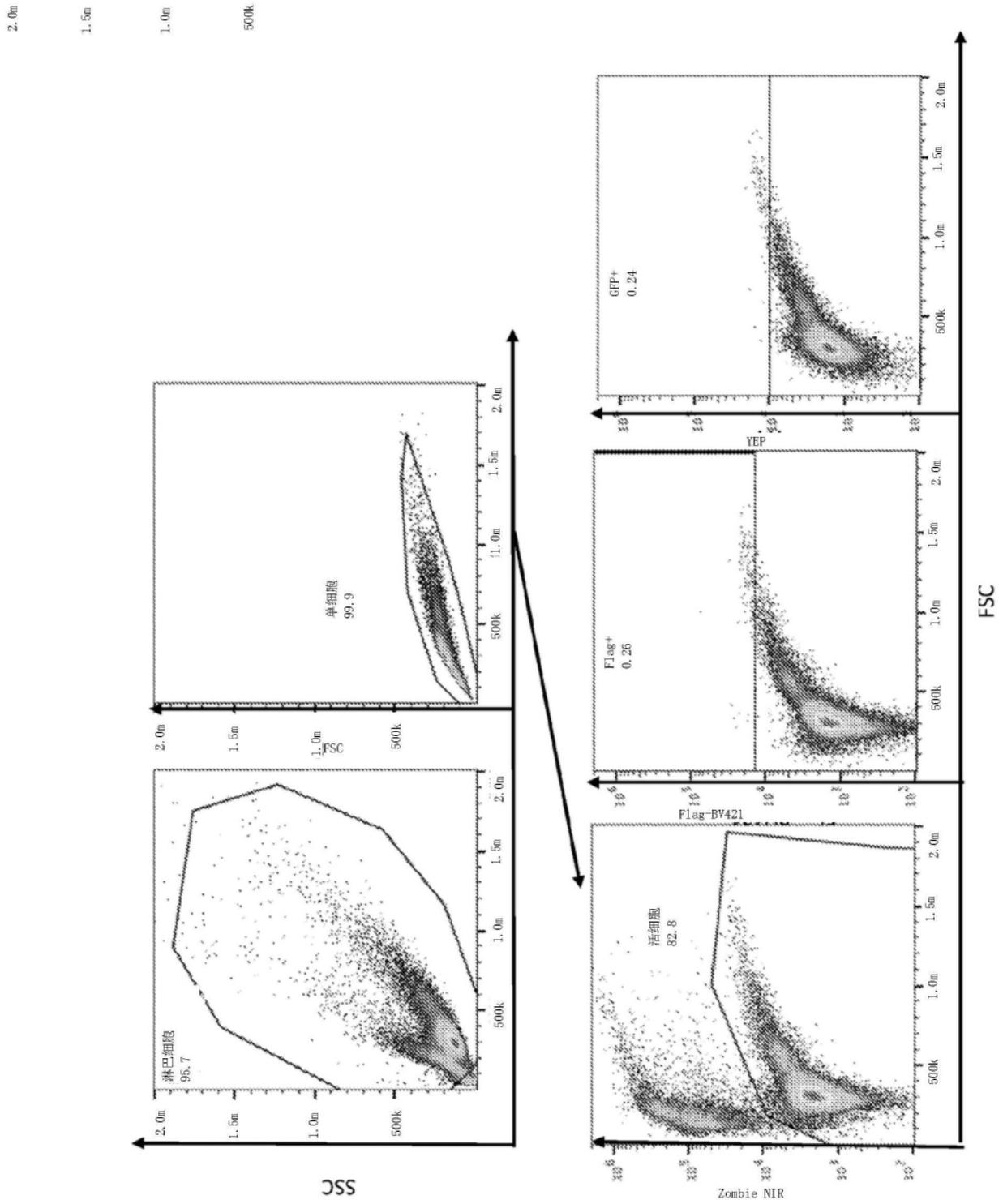


图6A

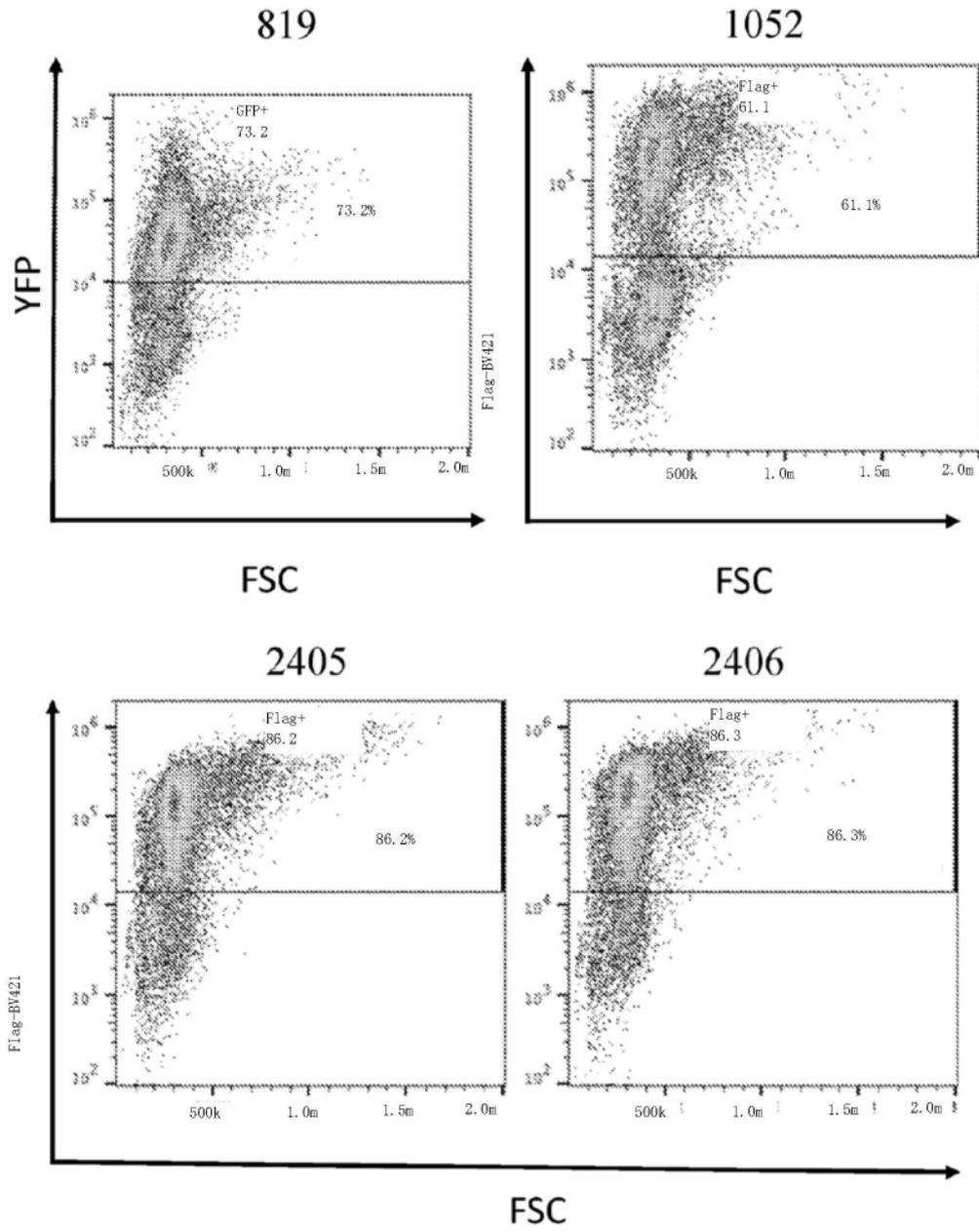


图6B

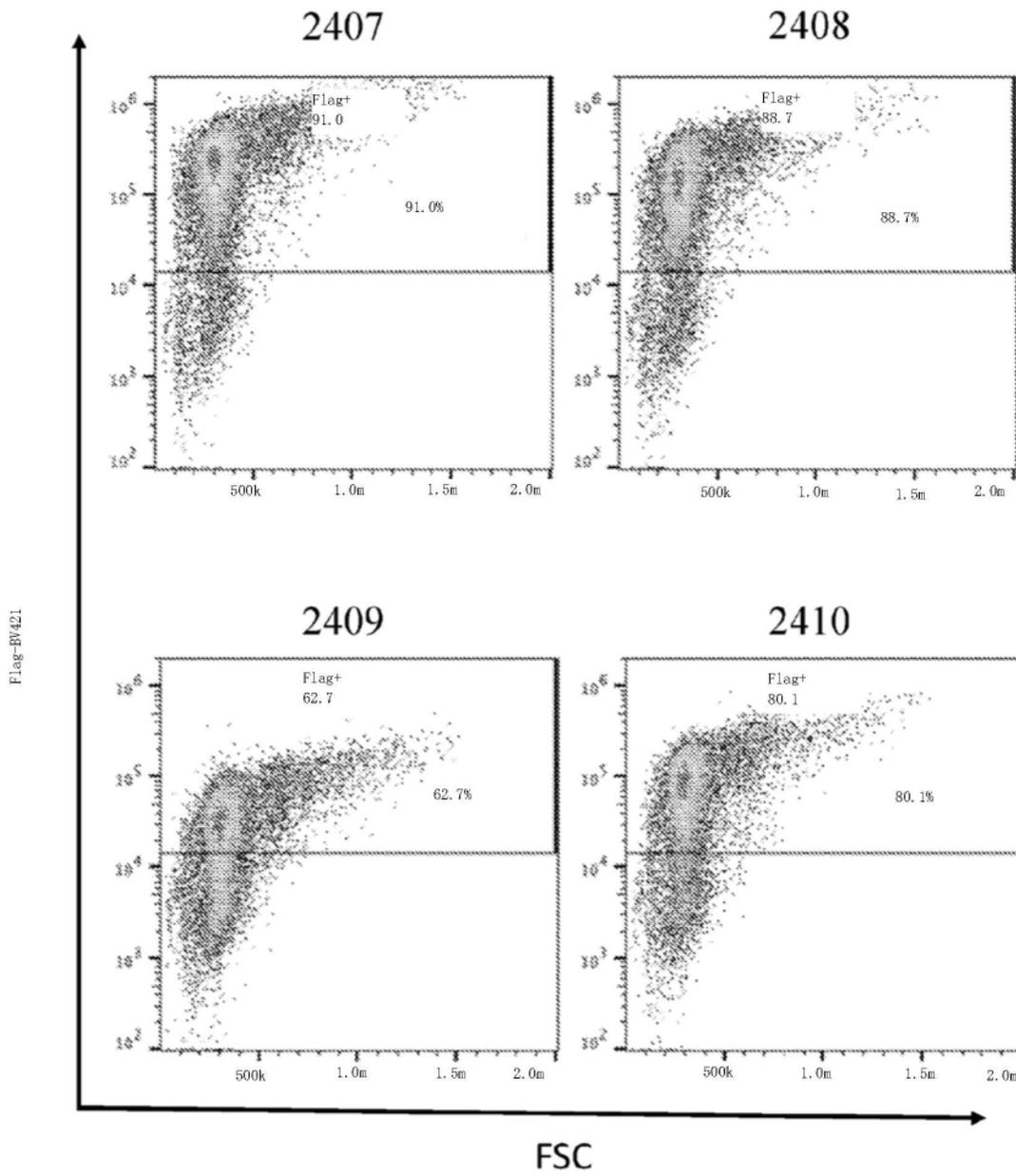


图6C

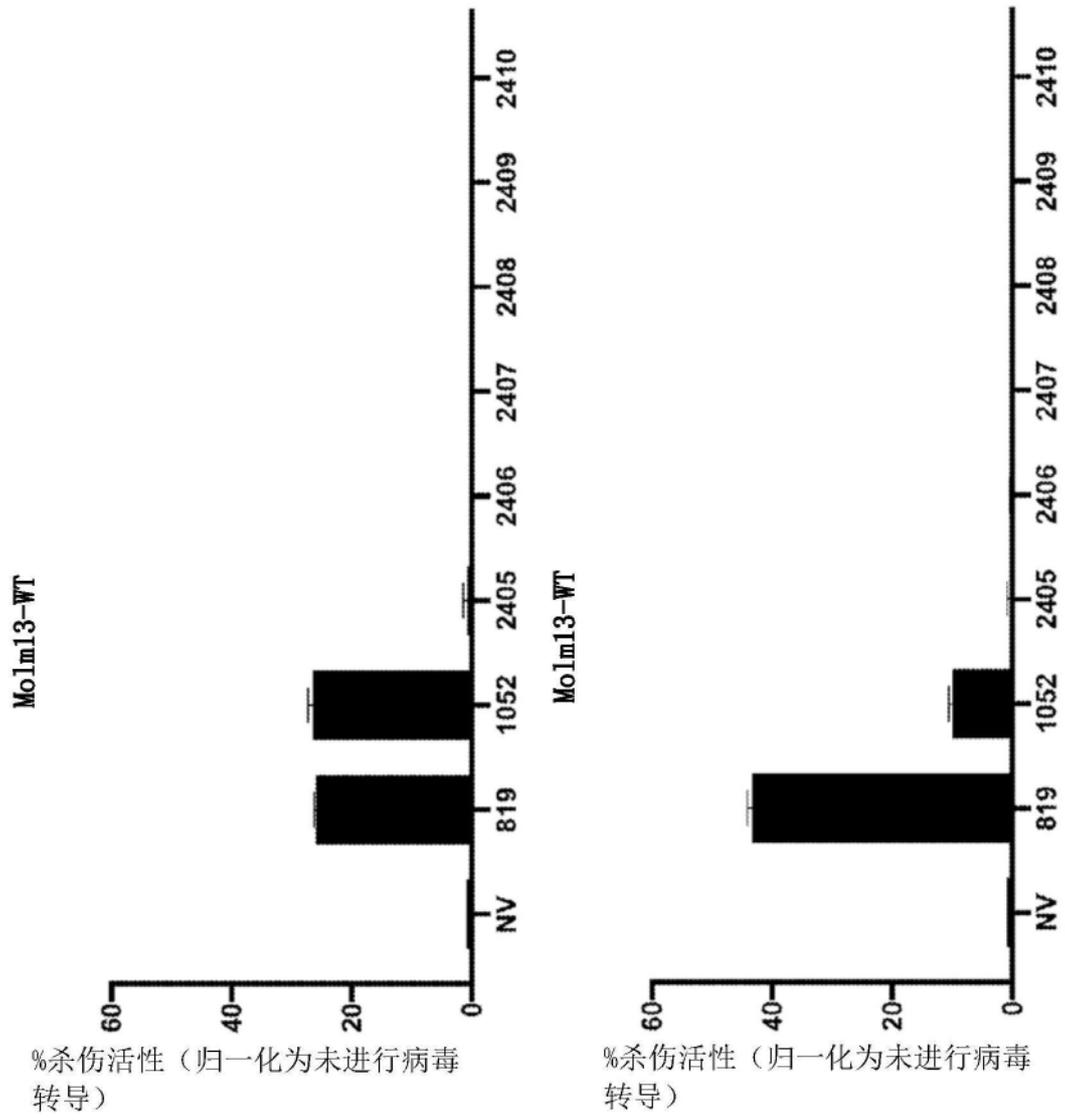


图7A

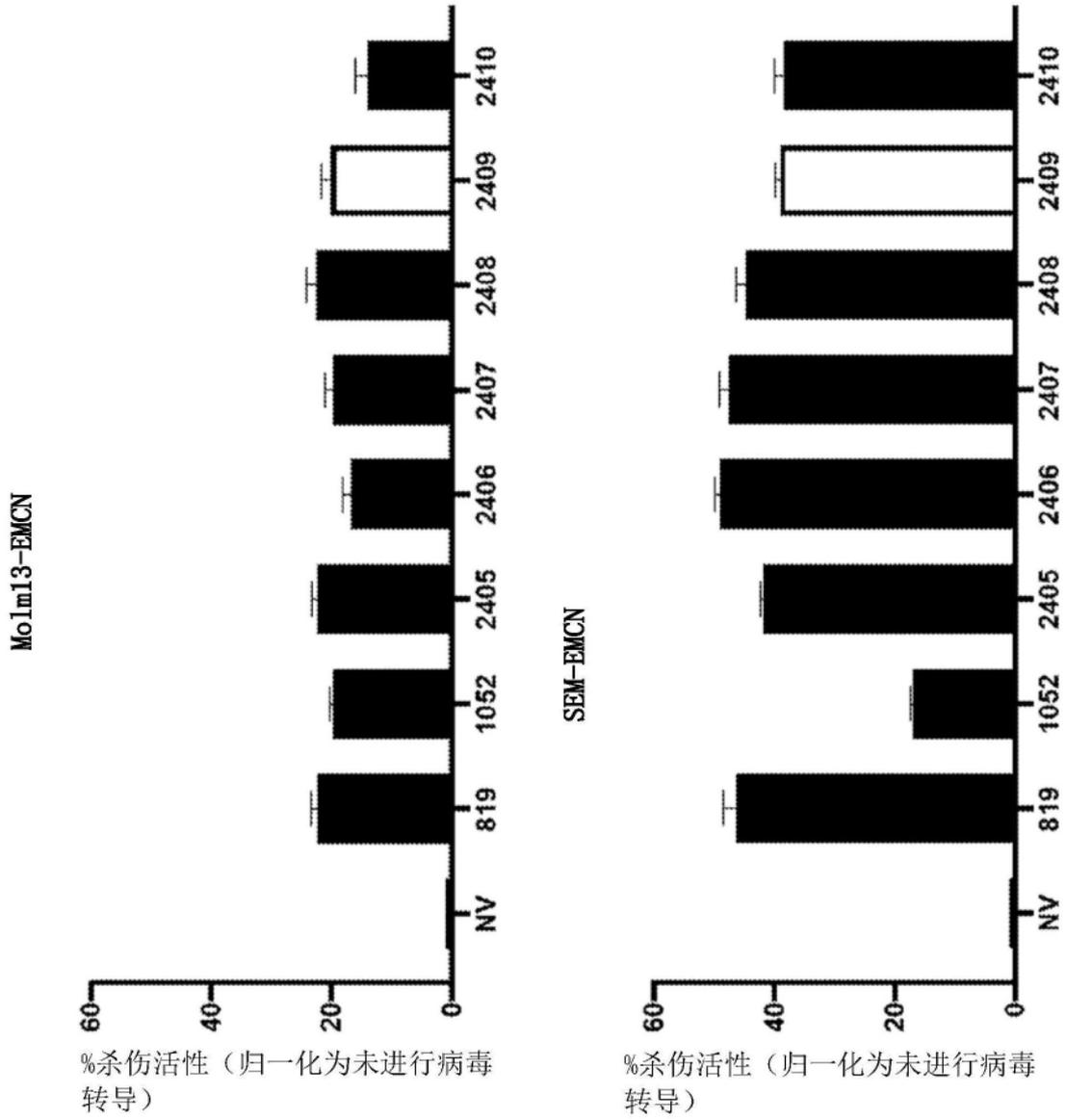


图7B

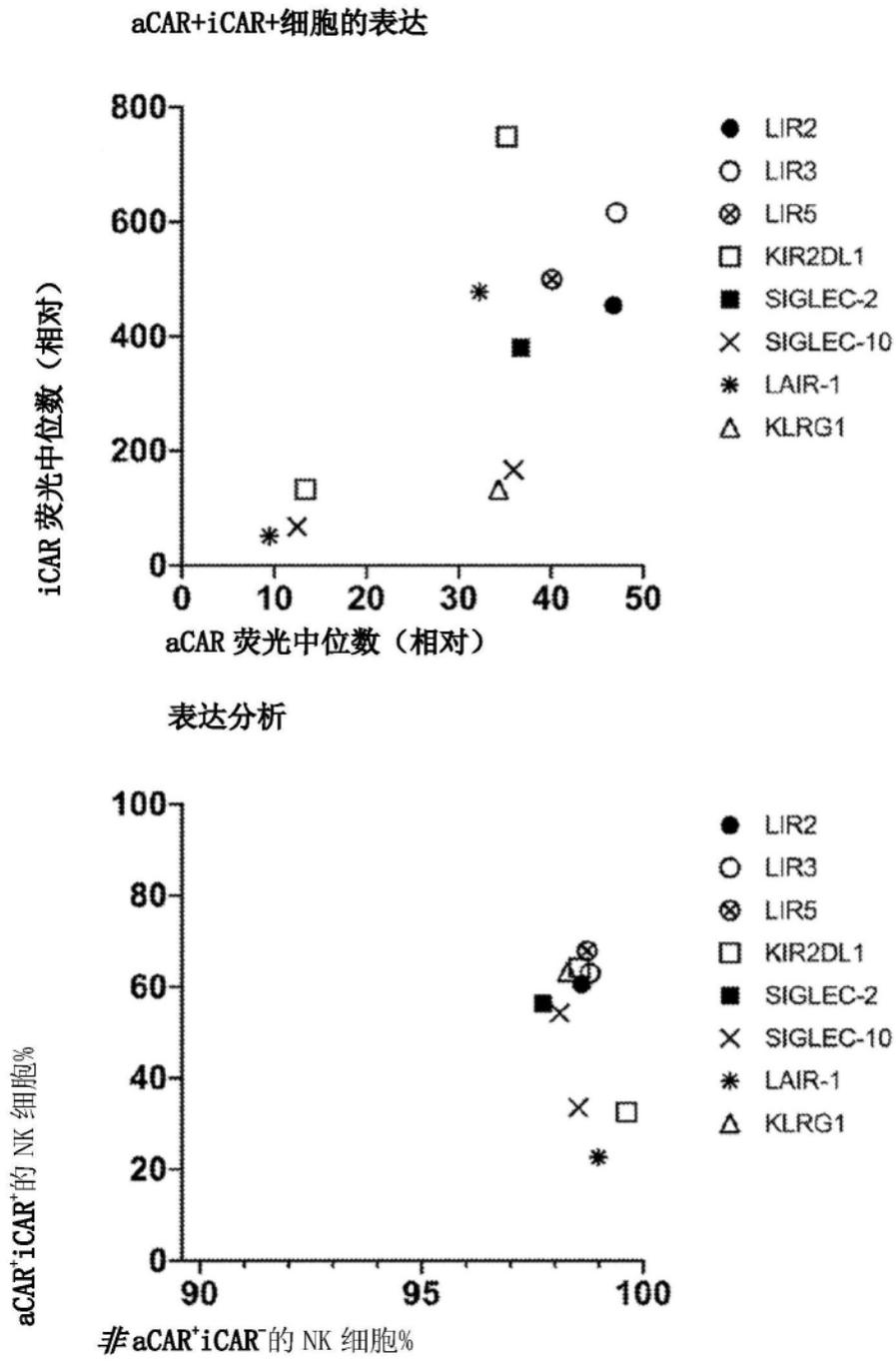


图8

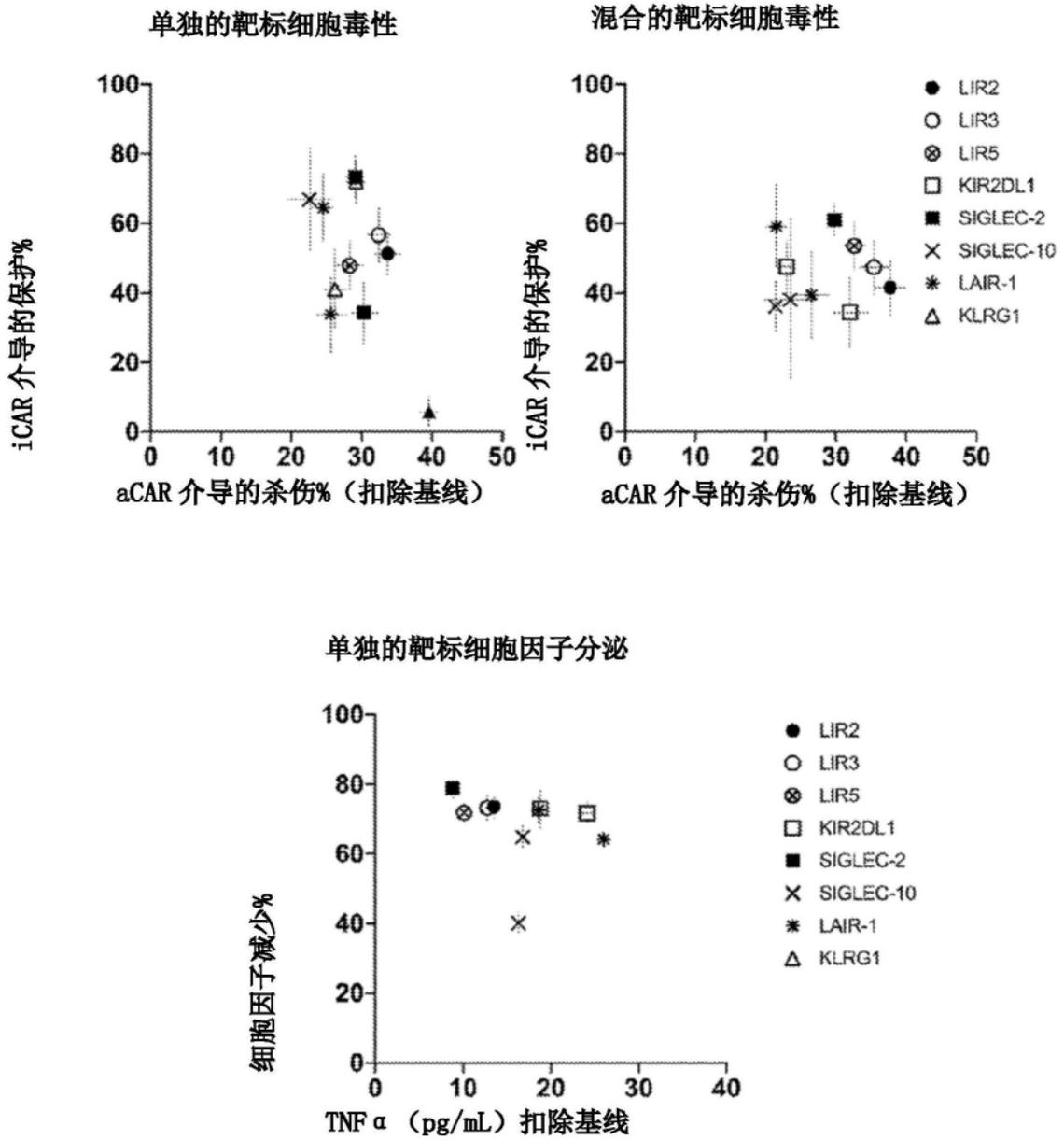


图9

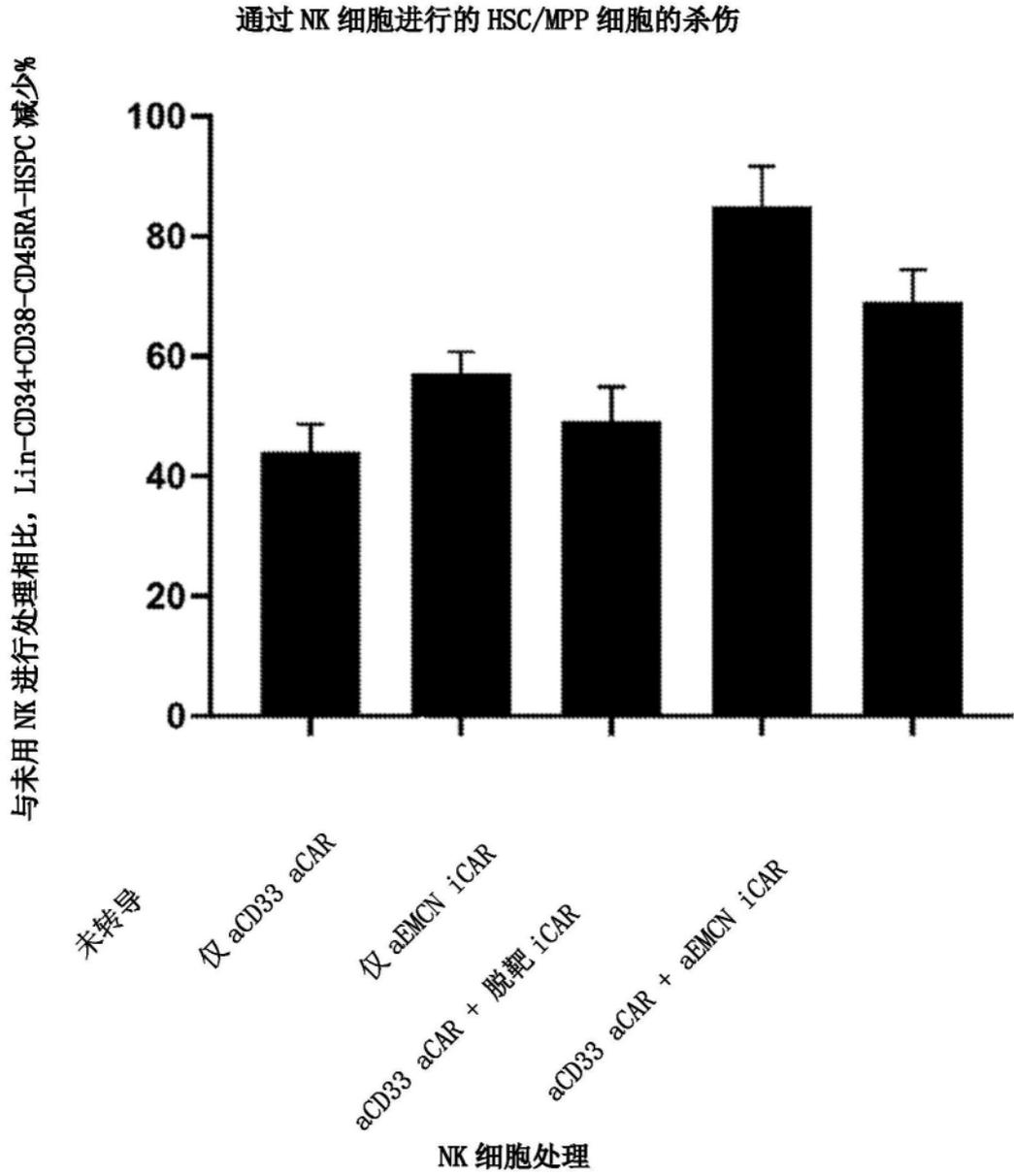


图10