



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111183156 A

(43)申请公布日 2020.05.19

(21)申请号 201880063737.4

(22)申请日 2018.07.31

(30)优先权数据

62/539,483 2017.07.31 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.03.30

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/044654 2018.07.31

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2019/028051 EN 2019.02.07

(71)申请人 莱蒂恩技术公司

地址 美国马里兰州

(72)发明人 里马斯·J·奥伦塔什

博罗·德罗普利奇 迪娜·施奈德

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 郑斌 尹玉峰

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

C07K 14/725(2006.01)

C07K 14/705(2006.01)

C07K 19/00(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

C12N 15/63(2006.01)

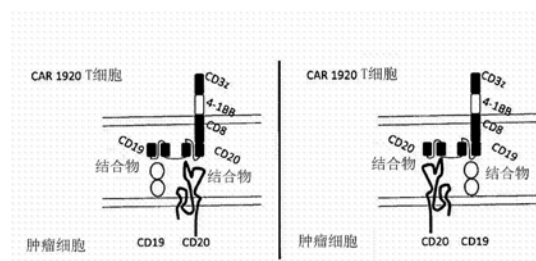
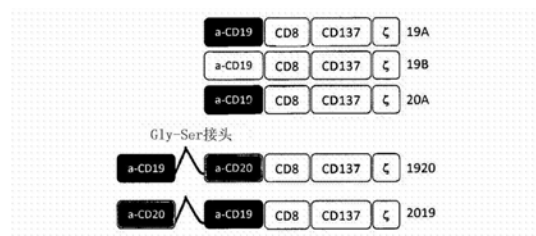
权利要求书3页 说明书62页  
序列表29页 附图16页

## (54)发明名称

用于用抗CD19/CD20免疫治疗来治疗癌症的组合物和方法

## (57)摘要

公开了包含CD19/CD20或CD20/CD19抗原结合结构域的嵌合抗原受体。还公开了涉及嵌合抗原受体的核酸、重组表达载体、宿主细胞、抗原结合片段和药物组合物。还公开了在对象中治疗或预防癌症的方法,和制备嵌合抗原受体T细胞的方法。



1. 编码CD19/CD20串联嵌合抗原受体 (CAR) 的分离的核酸分子,所述CD19/CD20串联嵌合抗原受体 (CAR) 包含至少一个细胞外抗原结合结构域、至少一个跨膜结构域和至少一个细胞内信号传导结构域,所述至少一个细胞外抗原结合结构域包含CD19/CD20抗原结合结构域,其中所述CD19/CD20串联嵌合抗原受体 (CAR) 由包含SEQ ID NO.1或3的核苷酸序列编码。

2. 权利要求1所述的分离的核酸分子,其中所编码的至少一个CD19/CD20抗原结合结构域包含与CD19/CD20结合的抗体的至少一个单链可变片段。

3. 权利要求1所述的分离的核酸分子,其中所编码的至少一个CD19/CD20抗原结合结构域包含与CD19/CD20结合的抗体的至少一个重链可变区。

4. 权利要求1所述的分离的核酸分子,其中所编码的至少一个CD19/CD20抗原结合结构域、所述至少一个细胞内信号传导结构域或二者通过接头或间隔区结构域与所述跨膜结构域连接。

5. 权利要求4所述的分离的核酸分子,其中所编码的接头或间隔区结构域来源于CD8或CD28的细胞外结构域,并且与跨膜结构域连接。

6. 权利要求1所述的分离的核酸分子,其中在所编码的细胞外CD19/CD20抗原结合结构域之前是编码前导肽的前导核苷酸序列。

7. 权利要求6所述的分离的核酸分子,其中所述前导核苷酸序列包含含有SEQ ID NO:11的核苷酸序列,其编码SEQ ID NO:12的前导氨基酸序列。

8. 权利要求1所述的分离的核酸分子,其中所述跨膜结构域包含含有以下的蛋白质的跨膜结构域:T细胞受体的 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\zeta$ 链,CD8,CD28,CD3 $\epsilon$ ,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD83,CD86,CD134,CD137,CD154和TNFRSF19,或其任意组合。

9. 权利要求1所述的分离的核酸分子,其中编码所述CD19/CD20串联嵌合抗原受体 (CAR) 的核酸序列由包含SEQ ID NO.1或3的核苷酸序列或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列编码。

10. 权利要求1所述的分离的核酸分子,其中所编码的至少一个细胞内信号传导结构域还包含CD3 $\zeta$ 细胞内结构域。

11. 权利要求10所述的分离的核酸分子,其中所编码的至少一个细胞内信号传导结构域相对于所述CD3 $\zeta$ 细胞内结构域布置在C端侧。

12. 权利要求1所述的分离的核酸分子,其中所编码的至少一个细胞内信号传导结构域包含共刺激结构域、初级信号传导结构域,或其任意组合。

13. 权利要求12所述的分离的核酸分子,其中所编码的至少一个共刺激结构域包含以下的功能性信号传导结构域:OX40、CD70、CD27、CD28、CD5、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278)、DAP10、DAP12和4-1BB (CD137),或其任意组合。

14. 嵌合抗原受体 (CAR),其由权利要求1所述的分离的核酸分子编码。

15. 权利要求14所述的CAR,其包含至少一个细胞外抗原结合结构域、至少一个跨膜结构域和至少一个细胞内信号传导结构域,所述至少一个细胞外抗原结合结构域包含含有SEQ ID NO.6、8或10的氨基酸序列的CD19/CD20抗原结合结构域。

16. 权利要求15所述的CAR,其中所述CD19/CD20抗原结合结构域包含与CD19/CD20结合的抗体的至少一个单链可变片段。

17. 权利要求15所述的CAR,其中所述CD19/CD20抗原结合结构域包含与CD19/CD20结合的抗体的至少一个重链可变区。

18. 权利要求15所述的CAR,其中所述跨膜结构域包含含有以下的蛋白质的跨膜结构域:T细胞受体的 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\zeta$ 链,CD8,CD28,CD3 $\epsilon$ ,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD86,CD134,CD137,CD154和TNFRSF19,或其任意组合。

19. 权利要求18所述的CAR,其中所述CD8跨膜结构域包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列或与SEQ ID NO:28的氨基酸序列具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

20. 权利要求15所述的CAR,其中所述至少一个细胞外抗原结合结构域和所述至少一个细胞内信号传导结构域或二者通过接头或间隔区结构域与所述跨膜结构域连接,所述至少一个细胞外抗原结合结构域包含含有SEQ ID NO.6、8、10的氨基酸序列的CD19/CD20抗原结合结构域。

21. 权利要求20所述的CAR,其中所述接头或间隔区结构域来源于CD8或CD28的细胞外结构域,并且与跨膜结构域连接。

22. 权利要求17所述的CAR,其中所述至少一个细胞内信号传导结构域包含共刺激结构域和初级信号传导结构域。

23. 权利要求22所述的CAR,其中所述至少一个细胞内信号传导结构域包含共刺激结构域,所述共刺激结构域包含选自以下的蛋白质的功能性信号传导结构域:OX40、CD70、CD27、CD28、CD5、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278)、DAP10、DAP12和4-1BB (CD137),或其组合。

24. 载体,其包含权利要求1所述的核酸分子。

25. 权利要求24所述的载体,其中所述载体选自:DNA载体、RNA载体、质粒载体、黏粒载体、疱疹病毒载体、麻疹病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体或逆转录病毒载体,或其组合。

26. 权利要求24所述的载体,其还包含启动子。

27. 权利要求26所述的载体,其中所述启动子是诱导型启动子、组成型启动子、组织特异性启动子、自杀型启动子,或其任意组合。

28. 细胞,其包含权利要求24所述的载体。

29. 权利要求28所述的细胞,其中所述细胞是T细胞。

30. 权利要求28所述的细胞,其中所述T细胞是CD8<sup>+</sup>T细胞。

31. 权利要求28所述的细胞,其中所述细胞是人细胞。

32. 制备细胞的方法,其包括用权利要求24所述的载体转导T细胞。

33. 产生RNA经改造细胞群的方法,其包括将体外转录的RNA或合成RNA引入细胞中,其中所述RNA包含权利要求1所述的核酸分子。

34. 在哺乳动物中提供抗肿瘤免疫的方法,其包括向所述哺乳动物施用有效量的权利要求28所述的细胞。

35. 在哺乳动物中治疗或预防癌症的方法,其包括以在所述哺乳动物中有效地治疗或预防癌症的量向所述哺乳动物施用权利要求15所述的CAR。

36. 药物组合物,其包含抗肿瘤有效量的人T细胞群,其中所述T细胞包含编码嵌合抗原受体(CAR)的核酸序列,其中所述CAR包含至少一个细胞外抗原结合结构域、至少一个接头

结构域、至少一个跨膜结构域、至少一个细胞内信号传导结构域,所述至少一个细胞外抗原结合结构域包含含有SEQ ID NO.2或4的氨基酸序列的CD19/CD20抗原结合结构域,并且其中所述T细胞是患有癌症的人的T细胞。

37. 权利要求36所述的药物组合物,其中所述至少一个跨膜结构域包含含有以下的蛋白质的跨膜结构域:T细胞受体的 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\zeta$ 链,CD8,CD28,CD3 $\epsilon$ ,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD86,CD134,CD137,CD154和TNFRSF19,或其任意组合。

38. 权利要求36所述的药物组合物,其中所述T细胞是患有血液学癌症的人的T细胞。

39. 权利要求38所述的药物组合物,其中所述血液学癌症是白血病或淋巴瘤。

40. 权利要求39所述的药物组合物,其中所述白血病是慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、急性淋巴细胞白血病 (ALL) 或慢性髓性白血病 (CML)。

41. 权利要求39所述的药物组合物,其中所述淋巴瘤是套细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤或霍奇金淋巴瘤。

42. 权利要求38所述的药物组合物,其中所述血液学癌症是多发性骨髓瘤。

43. 权利要求36所述的药物组合物,其中所述人癌症包括成体癌,其包括口腔和咽癌(舌、口、咽、头和颈)、消化系统癌症(食管、胃、小肠、结肠、直肠、肛门、肝、肝内胆管、胆囊、胰腺)、呼吸系统癌症(喉、肺和支气管)、骨和关节癌、软组织癌、皮肤癌(黑素瘤、基底细胞癌和鳞状细胞癌)、儿科肿瘤(神经母细胞瘤、横纹肌肉瘤、骨肉瘤、尤因肉瘤)、中枢神经系统的肿瘤(脑、星形细胞瘤、胶质母细胞瘤、胶质瘤),以及乳腺、生殖系统(子宫颈、子宫体、卵巢、外阴、阴道、前列腺、睾丸、阴茎、子宫内膜)、泌尿系统(膀胱、肾和肾盂、输尿管)、眼和眼眶、内分泌系统(甲状腺),以及脑和其他神经系统的癌症,或其任意组合。

44. 治疗患有与肿瘤抗原的表达升高相关的疾病、障碍或病症的哺乳动物的方法,所述方法包括向所述对象施用包含抗肿瘤有效量的T细胞群的药物组合物,其中所述T细胞包含编码嵌合抗原受体 (CAR) 的核酸序列,其中所述CAR包含至少一个细胞外抗原结合结构域、至少一个接头或间隔区结构域、至少一个跨膜结构域、至少一个细胞内信号传导结构域,所述至少一个细胞外抗原结合结构域包含含有SEQ ID NO.2或4的氨基酸序列的CD19/CD20抗原结合结构域,其中所述T细胞是患有癌症的对象的T细胞。

45. 在有此需要的对象中治疗癌症的方法,所述方法包括向所述对象施用包含抗肿瘤有效量的T细胞群的药物组合物,其中所述T细胞包含编码嵌合抗原受体 (CAR) 的核酸序列,其中所述CAR包含至少一个细胞外抗原结合结构域、至少一个接头或间隔区结构域、至少一个跨膜结构域、至少一个细胞内信号传导结构域,所述至少一个细胞外抗原结合结构域包含含有SEQ ID NO.2或4的氨基酸序列的CD19/CD20抗原结合结构域,其中所述T细胞是患有癌症的对象的T细胞。

46. 权利要求44或45所述的方法,其中所述至少一个跨膜结构域包含含有以下的蛋白质的跨膜结构域:T细胞受体的 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\zeta$ 链,CD8,CD28,CD3 $\epsilon$ ,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD86,CD134,CD137和CD154,或其任意组合。

47. 用于产生表达嵌合抗原受体的细胞的方法,所述方法包括向细胞中引入权利要求1所述的分离的核酸。

48. 根据权利要求47所述的用于产生表达嵌合抗原受体的细胞的方法,其中所述细胞是T细胞或包含T细胞的细胞群。

## 用于用抗CD19/CD20免疫治疗来治疗癌症的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35 U.S.C. 第119(e) 节要求于2017年7月31日提交的美国临时专利申请No. 62/539,483的优先权权益,其全部内容通过引用并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含已经以ASCII格式电子提交并且在此通过引用整体并入的序列表。所述ASCII拷贝创建于2018年7月31日,被命名为Sequence\_Listing.txt并且大小为64千字节。

### 技术领域

[0005] 本申请涉及癌症领域,特别地涉及CD19/CD20抗原结合结构域和包含这样的CD19/CD20抗原结合结构域的嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor,CAR)及其使用方法。

### 背景技术

[0006] 癌症是对人健康最致命的威胁之一。仅在美国,每年癌症影响接近130万例新患者,并且其是继心血管疾病之后第二位的主要死亡原因,其引起大约四分之一的死亡。实体瘤是这些死亡中大多数的原因。尽管在某些癌症的医学治疗方面已取得显著进展,但是在过去的20年内所有癌症的总体5年存活率仅提高约10%。癌症或恶性肿瘤转移并且以不受控制的方式迅速生长,使得治疗极其困难。

[0007] CD19是85kDa至95kDa跨膜细胞表面糖蛋白受体。CD19是蛋白质的免疫球蛋白(immunoglobulin,Ig)超家族的成员,并且包含两个细胞外Ig样结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域(Tedder TF, Isaacs, CM, 1989, J Immunol 143:712-171)。CD19修饰B细胞受体信号传导,降低B细胞受体对于抗原的触发阈值(Carter, RH, 和Fearon, DT, 1992, Science, 256:105-107),并与CD81和CD21进行协调以调节这种必需的B细胞信号传导复合物(Bradbury, LE, Kansas GS, Levy S, Evans RL, Tedder TF, 1992, J Immunol, 149:2841-50)。在B细胞个体发育期间,CD19能够在pro-B、pre-pre-B细胞、pre-B、早期B细胞阶段独立于抗原受体信号传导,并且与Src家族蛋白质酪氨酸激酶相关,被酪氨酸磷酸化,从而诱导细胞内钙调动和肌醇磷脂信号传导(Uckun FM, Burkhardt AL, Jarvis L, Jun X, Stealy B, Dibirdik I, Myers DE, Tuel-Ahlgren L, Bolen JB, 1983, J Biol Chem 268:21172-84)。与B细胞恶性肿瘤治疗相关的关键点是CD19在正常B细胞(限于在IgH基因重排阶段的早期B细胞前体)、成熟B细胞上以被严格调控的方式表达,但在造血干细胞或成熟浆细胞上不表达(Anderson, KC, Bates, MP, Slaughenout BL, Pinkus GS, Schlossman SF, Nadler LM, 1984, Blood 63:1424-1433)。

[0008] CD20(也称为LEU-16, MS4A1)是跨膜的4A家族蛋白,在pro-B阶段至成熟B细胞阶段的B细胞表面上表达,并在B细胞发育和分化中发挥作用。CD20抗原还在多种血液学肿瘤上表达,并且多年来,多种单克隆抗CD20抗体已用于治疗CD20阳性恶性肿瘤(在Lim, Sean H. et al. "Anti-CD20 Monoclonal Antibodies: Historical and Future Perspectives."

Haematologica 95.1 (2010):135-143.PMC.Web.2017年7月31日中进行综述。)抗CD20单克隆抗体利妥昔单抗 (**Rituxan®**) 被广泛用于治疗B细胞淋巴瘤,例如滤泡性淋巴瘤 (follicular lymphoma,FL) 和弥漫性大B细胞淋巴瘤 (diffuse large B cell lymphoma, DLBCL) 和慢性淋巴细胞白血病 (chronic lymphocytic leukemia,CLL) (Rituxan处方信息)。

[0009] B谱系白血病和淋巴瘤的传统治疗方法可包括化学治疗、放射治疗和干细胞移植 (参见万维网mayclinic.org)。与这些治疗相关的高毒性以及并发症 (例如复发、继发性恶性肿瘤或GVHD) 的风险,促使寻求更好的治疗选择。CD19在成人和儿童 (pre-B-ALL) B细胞恶性肿瘤二者上的表达已导致利用该靶标用于基于抗体和嵌合抗原受体 (CAR)-T细胞二者的治疗 (Kochenderfer JN,Wilson WH,Janik JE,Dudley ME,Stetler-Stevenson M,Feldman SA,Maric I,Raffeld M,Nathan DA,Lanier BJ,Morgan RA,Rosenberg SA,2010,Blood 116:4099-102;Lee DW,Kochenderfer JN,Stetler-Stevenson M,Cui YK,Delbrook C,Feldman SA,Orentas R,Sabatino M,Shah NN,Steinberg SM,Stroncek D,Tschernia N,Yuan C,Zhang H,Zhang L,Rosenberg SA,Wayne AS,Mackall CL,2015,Lancet 385:517-28)。此外,淋巴瘤 (DLBCL,FL) 和白血病 (CLL) 上CD20抗原的存在使它成为有效肿瘤清除和预防肿瘤抗原逃逸的吸引人的另外的靶标。

[0010] B谱系白血病的当前护理标准可由通过高剂量化学治疗或辐射进行缓解诱导治疗然后进行巩固组成,并且可以以干细胞移植和根据需要进行另外化学治疗疗程为特征 (参见万维网cancer.gov)。与这些治疗相关的高毒性以及并发症 (例如复发、继发性恶性肿瘤或GVHD) 的风险,促使寻求更好的治疗选择。CD19在成人和儿童 (pre-B-ALL) B细胞恶性肿瘤二者上的表达已导致利用该靶标用于基于抗体和嵌合抗原受体 (CAR)-T细胞二者的治疗 (Kochenderfer JN,Wilson WH,Janik JE,Dudley ME,Stetler-Stevenson M,Feldman SA,Maric I,Raffeld M,Nathan DA,Lanier BJ,Morgan RA,Rosenberg SA,2010,Blood 116:4099-102;Lee DW,Kochenderfer JN,Stetler-Stevenson M,Cui YK,Delbrook C,Feldman SA,Orentas R,Sabatino M,Shah NN,Steinberg SM,Stroncek D,Tschernia N,Yuan C,Zhang H,Zhang L,Rosenberg SA,Wayne AS,Mackall CL,2015,Lancet 385:517-28)。

[0011] 已开发出许多治疗B细胞白血病和淋巴瘤的新方法,包括将抗CD19或抗CD20结合基序与T细胞结合基序连接的双特异性抗体 (即旨在用于治疗费城染色体阴性复发性或难治性B细胞前体急性淋巴细胞白血病 (acute lymphoblastic leukemia,ALL) 的博纳吐单抗 (Blinatumomab), **Blincyto®**)。迄今为止,CAR构建体中所使用的CD19或CD20的许多结合部分都利用来源于鼠抗体的结构域。目前正在考虑批准这些产品中的许多,包括Novartis和Kite Pharmaceuticals开发的那些。在2017年4月,Novartis宣布CTL019 (tisagenlecleucel) 获得FDA的突破性指定,用于治疗两次或更多次先前治疗均失败的患有难治性或复发性 (refractory or recurrent,r/r) DLBCL (弥漫性大B细胞淋巴瘤) 的成年患者,并将该指定添加到r/r B细胞急性淋巴细胞白血病 (ALL) 的那些中。这些适应证分别基于II期JULIET研究 (NCT02445248) 和ELIANA研究 (NCT02435849)。JULIET试验显示,在三个月时,总响应率 (overall response rate,ORR) 为45%,其中完全响应 (complete response,CR) 为37%,并且部分响应 (partial response,PR) 为8%。在ELIANA研究中,输注

了产品的患者中有82%实现CR或在不完全计数恢复情况下的CR,并且在6个月时的无复发存活为60%。来自Kite Pharmaceuticals的CAR-T产品(KTE-C19, axicabtagene ciloleucel)获得了突破性的指定,用于弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLCL)、转化的滤泡性淋巴瘤(transformed follicular lymphoma, TFL)和原发性纵隔B细胞淋巴瘤(primary mediastinal B-cell lymphoma, PMBCL)。在r/r ALL中,在KTE-C19的Kite ZUMA-3II期试验中,报道了73%的CR(在2个月时或更长时间时)。无论是否利用CAR-T抗体治疗,仍然有这些治疗无法帮助的大量患者,并且有相当大的空间来改善治疗方法。

[0012] 嵌合抗原受体(CAR)是包含以下三个基本单元的杂合分子:(1)细胞外抗原结合基序、(2)连接/跨膜基序,和(3)细胞内T细胞信号传导基序(Long AH, Haso WM, Orentas RJ. Lessons learned from a highly-active CD22-specific chimeric antigen receptor. *Oncoimmunology*. 2013; 2(4):e23621)。CAR的抗原结合基序通常由单链可变片段(single chain Fragment variable, scFv)(免疫球蛋白(Ig)分子的最小结合结构域)形成。还已改造了可替代的抗原结合基序,例如受体配体(即,已将IL-13改造成结合肿瘤表达的IL-13受体)、完整免疫受体、文库来源肽和先天免疫系统效应分子(例如NKG2D)。用于CAR表达的可替代细胞靶标(例如NK或 $\gamma$ - $\delta$ T细胞)也在开发之中(Brown CE et al *Clin Cancer Res*. 2012; 18(8):2199-209; Lehner M et al. *PLoS One*. 2012; 7(2):e31210)。关于限定最活跃的T细胞群以用CAR载体进行传导、确定最佳的培养和扩增技术,以及限定CAR蛋白结构本身的分子细节仍然是需要完成的重要的工作。

[0013] CAR的连接基序可以是相对稳定的结构域(例如IgG的恒定结构域)或被设计成延伸的柔性接头。结构基序(例如来源于IgG恒定结构域的那些)可用于将scFv结合结构域延伸远离T细胞质膜表面。这对于一些其中结合结构域与肿瘤细胞表面膜特别接近的肿瘤靶标而言可以是重要的(例如对于二唾液酸神经节苷脂GD2而言; Orentas et al., 未发表的观察结果)。迄今为止,用于CAR的信号传导基序通常包含CD3- $\zeta$ 链,因为该核心基序是T细胞活化的关键信号。首次报道的第二代CAR以CD28信号传导结构域和CD28跨膜序列为特征。该基序还用于包含CD137(4-1BB)信号传导基序的第三代CAR(Zhao Y et al *J Immunol*. 2009; 183(9):5563-74)。随着新技术的出现,使用与抗CD3和抗CD28抗体连接的珠活化T细胞,且来自CD28的典型“信号2”的存在不再需要由CAR自身编码。通过使用珠活化,发现在体外测定中第三代载体并不优于第二代载体,并且在白血病的小鼠模型中其相对于第二代载体并未提供明显的益处(Haso W, Lee DW, Shah NN, Stetler-Stevenson M, Yuan CM, Pastan IH, Dimitrov DS, Morgan RA, FitzGerald DJ, Barrett DM, Wayne AS, Mackall CL, Orentas RJ. Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B cell precursor acute lymphoblastic leukemia, *Blood*. 2013; 121(7):1165-74; Kochenderfer JN et al. *Blood*. 2012; 119(12):2709-20)。这通过为第二代CD28/CD3- $\zeta$ (Lee DW et al. American Society of Hematology Annual Meeting. New Orleans, LA; 2013年12月7日至12月10日)和CD137/CD3- $\zeta$ 信号传导形式(Porter DL et al. *N Engl J Med*. 2011; 365(8):725-33)中的CD19特异性CAR的临床成功得到证实。除CD137之外,其他肿瘤坏死因子受体超家族成员(例如OX40)也能够在CAR转导的T细胞中提供重要的持续信号(Yvon E et al. *Clin Cancer Res*. 2009; 15(18):5852-60)。同样重要的是培养CAR T细胞群的培养条件,例如包含细胞因子IL-2、IL-7和/或IL-15(Kaiser AD et al. *Cancer Gene Ther*. 2015; 22(2):72-78)。

[0014] 用于癌症的CAR治疗的更广泛且有效的适应中的目前的挑战与有力靶标的缺乏相关。建立细胞表面抗原的结合物现今是可容易实现的,但是发现对肿瘤具有特异性同时不伤害正常组织的细胞表面抗原仍然是艰巨的挑战。赋予CAR表达T细胞以更大靶细胞特异性的一种潜在方式是使用组合的CAR方法。在一种系统中,将CD3- $\zeta$ 和CD28信号单元分离在同一细胞内表达的两种不同CAR构建体中;在另一种系统中,在同一T细胞中表达两种CAR,但是一种具有较低的亲和力并且因此需要另一种CAR首先进行衔接(engage)以使第二者具有完全活性(Lanitis E et al.Cancer Immunol Res.2013;1(1):43-53;Kloss CC et al.Nat Biotechnol.2013;31(1):71-5)。产生基于单scFv的CAR作为免疫治疗剂的第二挑战是肿瘤细胞异质性。至少一个团队已经开发了用于胶质母细胞瘤的CAR策略,其中效应细胞群同时靶向多种抗原(HER2、IL-13Ra、EphA2),希望避免靶抗原阴性群的结果(Hegde M et al.Mol Ther.2013;21(11):2087-101)。

[0015] 基于T细胞的免疫治疗已经成为合成生物学中的新前沿;预见多种启动子和基因产物将这些高度有效的细胞引导到肿瘤微环境,在此T细胞不但可以避免负调节信号而且还可以介导有效的肿瘤杀伤。通过用基于化学品的二聚体(例如AP1903)进行诱导型胱天蛋白酶9构建体的药物诱导二聚化来消除不期望的T细胞表明其中可以在药理学上开启可以控制T细胞群的强大开关的一种方式(Di Stasi A et al.N Engl J Med.2011;365(18):1673-83)。通过诱饵受体的表达产生对转化生长因子 $\beta$ 的负调节效应具有免疫的效应T细胞群进一步表明针对最佳抗肿瘤活性可以对效应T细胞进行改造的程度(Foster AE et al.J Immunother.2008;31(5):500-5)。因此,虽然看起来CAR可以以类似于内源性T细胞受体的方式触发T细胞活化,但是该技术的临床应用的主要障碍迄今为止受限于CAR+T细胞的体内扩增、输注之后细胞的迅速消失和令人失望的临床活性。这可部分归因于所采用的一些CAR序列的鼠源。

[0016] 对于接受该治疗的重症患者,使用博纳吐单抗(双特异性抗CD19和抗CD3抗体)已显示出令人印象深刻的结果。不过,持久的缓解率小于40%,并且造血干细胞移植(hematopoietic stem cell transplant,HSCT)最多可挽救仅50%的响应者(参见,Gore et al.,2014,NCT01471782和Von Stackelberg,et al.,2014,NCT01471782,总结于Benjamin,JE,Stein AS,2016,Therapeutic Advances in Hematology 7:142-156中)。接受双特异性抗体或CAR-T治疗的患者随后经历HSCT以维持持久响应的需求仍然是争论的热点。尽管报道了CD19 CAR-T试验的高的响应(一些甚至大于90%),但如果将试验重新改动为“意向性治疗(intent to treat)”试验,则该数目可更接近70%(Davis KL,Mackall CL,2016,Blood Advances 1:265-268)。所报道的CAR19治疗之后12个月时的最佳结果显示,在宾夕法尼亚大学(the University of Pennsylvania)能够接受T细胞产品的患者中,RFS为55%,并且OS为79%(Maude SL,Teachey DT,Rheingold SR,Shaw PA,Aplenc R,Barrett DM,Barker CS,Callahan C,Frey NV,Farzana N,Lacey SF,Zheng A,Levine B,Melenhorst JJ,Motley L,Prter DL,June CH,Grupp SA,2016,J Clin Oncol 34,no15\_suppl(2016年5月)3011-3011)。

[0017] 因此,在本领域中迫切且长期地需要找到用于使用可表现出特异和有效抗肿瘤作用而没有前述缺点的方法来治疗B-ALL和其他表达CD19和/或CD20的B细胞恶性肿瘤的新的组合物和方法。



[0018] 本发明通过提供可以用于治疗癌症和其他疾病和/或病症的CAR组合物 and 治疗方法而解决这些需求。特别地,如本文中所公开和描述的本发明提供了这样的CAR:其可用于治疗与CD19和/或CD20表达失调相关的疾病、障碍或病症,并且所述CAR包含串联CD19/CD20抗原结合结构域,其在转导T细胞上表现出高表面表达、表现出表达CD19的细胞的高度细胞裂解,并且在其中转导的T细胞表现出体内扩增和持续性。

[0019] 发明概述

[0020] 本文中提供了:新的串联CD19和CD20靶向抗体或其抗原结合结构域,其中在氨基酸序列中CD19靶向部分位于CD20靶向部分之前或之后(下文中称为CD19/CD20);和包含这样的CD19和/或CD20抗原结合结构域的嵌合抗原受体(串联CDR);以及表达所述受体的宿主细胞(例如,T细胞),和编码所述受体的核酸分子。CAR在转导的T细胞上表现出高表面表达,具有高度的细胞裂解,并且在体内具有转导的T细胞扩增和持续性。还提供了使用所公开的CAR、宿主细胞和核酸分子的方法,例如以在对象中治疗癌症。

[0021] 在一个方面中,提供了编码串联CD19/CD20嵌合抗原受体(CAR)的分离的核酸分子,所述串联CD19/CD20嵌合抗原受体(CAR)从N端到C端包含至少一个CD19/CD20抗原结合结构域、至少一个跨膜结构域和至少一个细胞内信号传导结构域,其中串联CD19/CD20 CAR包含选自SEQ ID NO:1和3的核酸序列。

[0022] 在一个方面中,提供了编码串联CD19/CD20嵌合抗原受体(CAR)的分离的核酸分子,所述串联CD19/CD20嵌合抗原受体(CAR)从N端到C端包含至少一个CD19/CD20抗原结合结构域、至少一个跨膜结构域和至少一个细胞内信号传导结构域,其中由选自SEQ ID NO:1和3的核酸序列编码的所述串联CD19/CD20 CAR编码包含选自SEQ ID NO.2和4的氨基酸序列的串联CD19/CD20 CAR。

[0023] 在一个实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其中所编码的细胞外CD19/CD20抗原结合结构域包含与CD19/CD20结合的抗体的至少一个单链可变片段。

[0024] 在另一个实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其中所编码的细胞外CD19/CD20抗原结合结构域包含与CD19/CD20结合的抗体的至少一个重链可变区。

[0025] 在另一个实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其中所编码的CAR细胞外CD19/CD20抗原结合结构域还包含与CD19/CD20结合的至少一个基于脂质运载蛋白(lipocalin)的抗原结合抗原(抗运载蛋白(anticalin))。

[0026] 在一个实施方案中,提供了分离的核酸分子,其中所编码的细胞外CD19/CD20抗原结合结构域通过接头结构域与跨膜结构域连接。

[0027] 在另一个实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其中在所编码的CD19/CD20细胞外抗原结合结构域之前是编码前导肽或信号肽的序列。

[0028] 在另一个实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,所述CAR包含至少一个CD19/CD20抗原结合结构域,所述至少一个CD19/CD20抗原结合结构域由包含分别被包含在SEQ ID No:1和3中的CD19/CD20核苷酸序列的核苷酸序列编码,并且其中CAR另外编码靶向包括但不限于以下抗原的细胞外抗原结合结构域:CD22、ROR1、间皮素、CD33、CD38、CD123(IL3RA)、CD138、BCMA(CD269)、GPC2、GPC3、FGFR4、c-Met、PSMA、糖脂F77、EGFRvIII、GD-2、TSLPR、NY-ESO-1TCR、MAGE A3 TCR,或其任意组合。

[0029] 在某些实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其中另外编码的细胞外抗

原结合结构域包含抗CD22 ScFv抗原结合结构域、抗ROR1 ScFv抗原结合结构域、抗间皮素 ScFv抗原结合结构域、抗CD33 ScFv抗原结合结构域、抗CD38 ScFv抗原结合结构域、抗CD123 (IL3RA) ScFv抗原结合结构域、抗CD138 ScFv抗原结合结构域、抗BCMA (CD269) ScFv抗原结合结构域、抗GPC2 ScFv抗原结合结构域、抗GPC3 ScFv抗原结合结构域、抗FGFR4 ScFv抗原结合结构域、抗TSLPR ScFv抗原结合结构域、抗c-Met ScFv抗原结合结构域、抗PMSA ScFv抗原结合结构域、抗糖脂F77 ScFv抗原结合结构域、抗EGFRvIII ScFv抗原结合结构域、抗GD-2 ScFv抗原结合结构域、抗NY-ESO-1 TCR ScFv抗原结合结构域、抗MAGE A3 TCR ScFv抗原结合结构域,或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列,或其任意组合。

[0030] 在一个方面中,本文中提供的CAR还包含接头或间隔区结构域。

[0031] 在一个实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其中所述细胞外CD19/20抗原结合结构域、所述细胞内信号传导结构域或二者通过接头或间隔区结构域与所述跨膜结构域连接。

[0032] 在一个实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其中所编码的接头结构域来源于CD8或CD28的细胞外结构域,并且与跨膜结构域连接。

[0033] 在另一个实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其中所编码的CAR还包含跨膜结构域,所述跨膜结构域包含选自以下的蛋白质的跨膜结构域:T细胞受体的 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\zeta$ 链、CD28、CD3 $\epsilon$ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD83、CD86、CD134、CD137和CD154,或其组合。

[0034] 在另一个实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其中所编码的细胞内信号传导结构域还包含CD3 $\zeta$ 细胞内结构域。

[0035] 在一个实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其中所编码的细胞内信号传导结构域相对于CD3 $\zeta$ 细胞内结构域布置在C端侧。

[0036] 在另一个实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其中所编码的至少一个细胞内信号传导结构域包含共刺激结构域、初级信号传导结构域,或其组合。

[0037] 在另一些实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其中所编码的至少一个共刺激结构域包含以下的功能性信号传导结构域:OX40、CD70、CD27、CD28、CD5、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278)、DAP10、DAP12和4-1BB (CD137),或其组合。

[0038] 在一个实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其还包含前导序列或信号肽,其中前导或信号肽核苷酸序列包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列。

[0039] 在另一个实施方案中,提供了编码CAR的分离的核酸分子,其中所编码的前导序列包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

[0040] 在一个方面中,本文中提供了嵌合抗原受体 (CAR),其从N端到C端包含至少一个CD19/20抗原结合结构域、至少一个跨膜结构域和至少一个细胞内信号传导结构域。

[0041] 在一个实施方案中,提供了CAR,其中所述细胞外CD19/20抗原结合结构域包含与抗原结合的抗体的至少一个单链可变片段、或与抗原结合的抗体的至少一个重链可变区,或其组合。

[0042] 在另一个实施方案中,提供了CAR,其中所述至少一个跨膜结构域包含选自以下的蛋白质的跨膜结构域:T细胞受体的 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\zeta$ 链,CD28,CD3 $\gamma$ ,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,

CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, TNFRSF19, 或其组合。

[0043] 在一些实施方案中, 提供了CAR, 其中CAR另外编码包含以下的细胞外抗原结合结构域: CD22、ROR1、间皮素、CD33、CD38、CD123 (IL3RA)、CD138、BCMA (CD269)、GPC2、GPC3、FGFR4、TSLPR、c-Met、PSMA、糖脂F77、EGFRvIII、GD-2、TSLPR、NY-ESO-1 TCR、MAGE A3 TCR, 或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列, 或其任意组合。

[0044] 在一个实施方案中, 提供了CAR, 其中所述细胞外抗原结合结构域包含抗CD22 ScFv抗原结合结构域、抗ROR1 ScFv抗原结合结构域、抗间皮素ScFv抗原结合结构域、抗CD33 ScFv抗原结合结构域、抗CD38 ScFv抗原结合结构域、抗CD123 (IL3RA) ScFv抗原结合结构域、抗CD138 ScFv抗原结合结构域、抗BCMA (CD269) ScFv抗原结合结构域、抗GPC2 ScFv抗原结合结构域、抗GPC3 ScFv抗原结合结构域、抗FGFR4 ScFv抗原结合结构域、抗TSLPR ScFv抗原结合结构域、抗c-Met ScFv抗原结合结构域、抗PMSA ScFv抗原结合结构域、抗糖脂F77 ScFv抗原结合结构域、抗EGFRvIII ScFv抗原结合结构域、抗GD-2 ScFv抗原结合结构域、抗NY-ESO-1 TCR ScFv抗原结合结构域、抗MAGE A3 TCR ScFv抗原结合结构域, 或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列, 或其任意组合。

[0045] 在另一个实施方案中, 提供了CAR, 其中至少一个细胞内信号传导结构域包含共刺激结构域和初级信号传导结构域。

[0046] 在另一个实施方案中, 提供了CAR, 其中至少一个细胞内信号传导结构域包含共刺激结构域, 所述共刺激结构域包含选自以下的蛋白质的功能性信号传导结构域: OX40、CD70、CD27、CD28、CD5、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278)、DAP10、DAP12和4-1BB (CD137), 或其组合。

[0047] 在一个实施方案中, 编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:1的核酸序列(前导序列-CD19 VL-惠特洛接头(Whitlow linker)CD19 VH(GGGGS)-5 CD20 VH(GGGGS)-3 CD20 VL CD8铰链+TM-4-1BB-CD3z(构建体1920)的核苷酸序列(图10A))。在一个实施方案中, 核酸序列编码包含SEQ ID NO:2前导序列-CD19 VL-惠特洛接头CD19 VH(GGGGS)-5 CD20 VH(GGGGS)-3 CD20 VL CD8铰链+TM-4-1BB-CD3z(构建体1920)的氨基酸序列((图10A))的CAR。

[0048] 在另一个实施方案中, 编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:3的核酸序列(前导序列-CD20 VH(GGGGS)3-CD20 VL-(GGGGS)5-CD19 VL-惠特洛接头-CD19 VH CD8铰链+TM-4-1BB-CD3z(构建体2019)的核苷酸序列(图10B))。在一个实施方案中, 核酸序列编码包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列(前导序列-CD20 VH(GGGGS)<sub>3</sub>-CD20 VL-(GGGGS)<sub>5</sub>-CD19 VL-惠特洛接头-CD19 VH CD8铰链+TM-4-1BB-CD3z CAR氨基酸序列(图10B))的CAR。

[0049] 在一个方面中, 本文中所公开的CAR被修饰以表达或包含可检测标志物以用于诊断、监测和/或预测治疗结果(例如癌症患者的无进展存活)或用于监测这样的治疗的进展。

[0050] 在一个实施方案中, 编码所公开CAR的核酸分子可以包含在载体, 例如病毒载体中。载体是DNA载体、RNA载体、质粒载体、黏粒载体、疱疹病毒载体、麻疹病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体或逆转录病毒载体, 或其组合。

[0051] 在某些实施方案中, 载体还包含启动子, 其中所述启动子是诱导型启动子、组织特异性启动子、组成型启动子、自杀型启动子(suicide promoter), 或其任意组合。

[0052] 在另一个实施方案中, 表达CAR的载体还可以被修饰以包含一个或多个控制CAR

T细胞表达或借助自杀开关来消除CAR-T细胞的操纵元件。自杀开关可以包括例如凋亡诱导性信号传导级联反应或诱导细胞死亡的药物。在一个优选的实施方式中,表达CAR的载体还可以被修饰以表达酶,例如胸苷激酶(thymidine kinase,TK)或胞嘧啶脱氨酶(cytosine deaminase,CD)。

[0053] 在另一方面中,还提供了包含编码CAR的核酸分子的宿主细胞。在一些实施方式中,宿主细胞是T细胞,例如从对象获得的原代T细胞。在一个实施方式中,宿主细胞是CD8<sup>+</sup>T细胞。

[0054] 在另一方面中,提供了包含抗肿瘤有效量的人T细胞群的药物组合物,其中所述T细胞包含编码包含SEQ ID NO.2和4的氨基酸序列的嵌合抗原受体(CAR)的核酸序列,其中所述CAR包含至少一个细胞外抗原结合结构域、至少一个接头结构域、至少一个跨膜结构域和至少一个细胞内信号传导结构域,所述至少一个细胞外抗原结合结构域包含CD19/CD20抗原结合结构域,其中所述T细胞是患有癌症的人的T细胞。所述癌症尤其包括血液学癌症(hematological cancer),例如白血病(例如,慢性淋巴细胞白血病(CLL)、急性淋巴细胞白血病(acute lymphocytic leukemia,ALL)或慢性髓性白血病(chronic myelogenous leukemia,CML))、淋巴瘤(例如套细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)或霍奇金淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma))或多发性骨髓瘤,或其组合。

[0055] 在一个实施方式中,提供了药物组合物,其中CAR的至少一个跨膜结构域包含选自以下的蛋白质的跨膜结构域:T细胞受体的 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\zeta$ 链、CD28,CD3 $\epsilon$ ,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,间皮素,CD33,CD37,CD64,CD80,CD83,CD86,CD134,CD137,CD154,TNFRSF19,或其组合。

[0056] 在另一个实施方式中,提供了药物组合物,其中人癌症包括成体癌(adult carcinoma),其包括:口腔和咽癌(舌、口、咽、头和颈)、消化系统癌症(食管、胃、小肠、结肠、直肠、肛门、肝、肝内胆管、胆囊、胰腺)、呼吸系统癌症(喉、肺和支气管)、骨和关节癌、软组织癌、皮肤癌(黑素瘤、基底细胞癌和鳞状细胞癌)、儿科肿瘤(神经母细胞瘤、横纹肌肉瘤、骨肉瘤、尤因肉瘤(Ewing's sarcoma))、中枢神经系统的肿瘤(脑、星形细胞瘤、胶质母细胞瘤、胶质瘤),以及乳腺、生殖系统(子宫颈、子宫体、卵巢、外阴、阴道、前列腺、睾丸、阴茎、子宫内膜)、泌尿系统(膀胱、肾和肾盂、输尿管)、眼和眼眶、内分泌系统(甲状腺),以及脑和其他神经系统的癌症,或其任意组合。

[0057] 在另一个实施方式中,提供了包含抗肿瘤有效量的患有癌症之人的人T细胞群的药物组合物,其中所述癌症是对一种或更多种化学治疗剂不具有响应性的难治性癌症。所述癌症包括造血性癌症(hematopoietic cancer),骨髓增生异常综合征,胰腺癌,头颈癌,皮肤肿瘤,以下中的微小残留病(minimal residual disease,MRD):急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓性白血病(acute myeloid leukemia,AML)、成体B细胞恶性肿瘤(包括CLL(慢性淋巴细胞白血病)、CML(慢性髓性白血病)、非霍奇金淋巴瘤(NHL))、儿科B细胞恶性肿瘤(包括B谱系ALL(急性淋巴细胞白血病))、多发性骨髓瘤、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、结肠癌、黑素瘤或其他血液学癌症和实体瘤,或其任意组合。

[0058] 在另一方面中,提供了制备包含CAR的T细胞(下文中“CAR-T细胞”)的方法。所述方法包括用编码特异性结合CD19和/或CD20的所公开CAR的载体或核酸分子转导T细胞,从而制备CAR-T细胞。

[0059] 在另一方面中,提供了产生RNA经改造细胞群的方法,其包括将编码所公开CAR的核酸分子的体外转录RNA或合成RNA引入对象的细胞内,从而产生CAR细胞。

[0060] 在一个实施方案中,与CD19表达相关的疾病、障碍或病症是癌症,其包括造血性癌症,骨髓增生异常综合征,胰腺癌,头颈癌,皮肤肿瘤,以下中的微小残留病(MRD):急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)、成体B细胞恶性肿瘤(包括CLL(慢性淋巴细胞白血病)、CML(慢性髓性白血病)、非霍奇金淋巴瘤(NHL))、儿科B细胞恶性肿瘤(包括B谱系ALL(急性淋巴细胞白血病))、多发性骨髓瘤、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、结肠癌、黑素瘤或其他血液学癌症和实体瘤,或其任意组合。

[0061] 在另一个实施方案中,提供了阻断由表达CD19和/或CD20的细胞介导的T细胞抑制和改变肿瘤微环境以抑制哺乳动物中的肿瘤生长的方法,其包括向哺乳动物施用有效量的包含CAR的组合物,其中所述CAR包含选自SEQ ID NO:2和4的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述细胞选自:表达CD19和/或CD20的肿瘤细胞、肿瘤相关巨噬细胞,及其任意组合。

[0062] 在另一个实施方案中,提供了抑制、阻止或预防哺乳动物中抗肿瘤或抗癌免疫应答的免疫抑制的方法,其包括向哺乳动物施用有效量的包含选自SEQ ID NO:2和4的CAR的组合物。在一个实施方案中,所述CAR抑制第一细胞与T细胞之间的相互作用,其中所述第一细胞选自:表达CD19和/或CD20的肿瘤细胞、肿瘤相关巨噬细胞,及其任意组合。

[0063] 在另一方面中,提供了用于在哺乳动物中诱导抗肿瘤免疫的方法,其包括向哺乳动物施用治疗有效量的经编码所公开CAR的载体或核酸分子转导的T细胞。

[0064] 在另一个实施方案中,提供了在哺乳动物中治疗或预防癌症的方法,其包括以在哺乳动物中有效治疗或预防癌症的量向哺乳动物施用一种或更多种所公开的CAR。所述方法包括在以下条件下向对象施用治疗有效量的表达特异性结合CD19和/或CD20和/或前述一种或更多种抗原的所公开CAR的宿主细胞,所述条件足以在所述对象中形成CAR上的抗原结合结构域与CD19和/或CD20和/或前述一种或更多种抗原的细胞外结构域的免疫复合物。

[0065] 在另一个实施方案中,提供了用于治疗患有与肿瘤抗原表达升高相关的疾病、障碍或病症的哺乳动物的方法,所述方法包括向对象施用包含抗肿瘤有效量的T细胞群的药物组合物,其中所述T细胞包含编码嵌合抗原受体(CAR)的核酸序列,其中所述CAR包含至少一个细胞外CD19和/或CD20抗原结合结构域或其任意组合、至少一个接头或间隔区结构域、至少一个跨膜结构域、至少一个细胞内信号传导结构域,并且其中所述T细胞是患有癌症的对象的T细胞。

[0066] 在另一个实施方案中,提供了用于在有此需要的对象中治疗癌症的方法,其包括向所述对象施用包含抗肿瘤有效量的T细胞群的药物组合物,其中所述T细胞包含编码嵌合抗原受体(CAR)的核酸序列,其中所述CAR包含SEQ ID NO.2和4的氨基酸序列或其任意组合、至少一个接头或间隔区结构域、至少一个跨膜结构域、至少一个细胞内信号传导结构域,其中所述T细胞是患有癌症的对象的T细胞。在前述方法的一些实施方案中,所述至少一个跨膜结构域包含以下的跨膜结构域:T细胞受体的 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\zeta$ 链,CD28,CD3 $\epsilon$ ,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD19,CD22,间皮素,CD33,CD37,CD64,CD80,CD83,CD86,CD134,CD137,CD154,TNFRSF16,TNFRSF19,或其组合。

[0067] 在另一个实施方案中,提供了用于在被诊断患有癌症的人中产生持续性经遗传改造T细胞群的方法。在一个实施方案中,所述方法包括向人施用被遗传改造以表达CAR的T细

胞,其中所述CAR包含SEQ ID NO.2和4的氨基酸序列或其任意组合、至少一个跨膜结构域和至少一个细胞内信号传导结构域,其中在施用之后,所述持续性经遗传改造T细胞群或所述T细胞的后代群在人中持续存在至少1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、2年或3年。

[0068] 在一个实施方案中,人中的后代T细胞包含记忆T细胞。在另一个实施方案中,所述T细胞是自体T细胞。

[0069] 在本文中所述的方法的所有方面和实施方案中,与肿瘤抗原表达升高相关的任何前述癌症、疾病、障碍或病症都可使用本文中所公开的一种或更多种CAR来治疗或预防或改善。

[0070] 在另一方面中,提供了用于制备如上所述的嵌合抗原受体T细胞或用于如上所述在对象中预防、治疗或改善任何与肿瘤抗原表达升高相关的癌症、疾病、障碍或病症的药盒(kit),其包含容器和用于使用所述药盒的说明书,所述容器包含上文所公开的核酸分子、载体、宿主细胞或组合物的任一种,或其任意组合。

[0071] 应理解,CAR、宿主细胞、核酸和方法在本文中详细描述的具体方面和实施方案之外也是可用的。本公开内容的前述特征和优点将从以下详细描述变得更明显,该详细描述通过参照附图来进行。

[0072] 附图简述

[0073] 下面的图1A和1B描述了靶向CD19和CD20的CAR的结构。图1A:通过在框架中将Leu-16 (CD20) 的单克隆抗体FMC-63 (CD19) 的单链片段可变区连接至CD8铰链和跨膜结构域、4-1BB (CD137) 信号传导结构域和CD3 $\zeta$ 信号传导结构域,产生了抗CD19和抗CD20的单一靶向CAR构建体。构建体19A和19B仅在连接FMC63的重链和轻链的接头序列上不同。串联靶向构建体2019和1920以与单一靶向的构建体相似的方式产生,不同的是CD20和CD19的单链片段可变区通过柔性接头依次彼此连接,随后是CD8、4-1BB和CD3 $\zeta$ 结构域。图1B:靶向CD19和CD20肿瘤抗原的串联CAR T细胞的示意图。串联CAR 1920 (左) 和2019 (右) 由以下构成:在框架中与CD8来源的铰链和跨膜结构域、随后是4-1BB共刺激结构域和CD3 $\zeta$ 活化结构域连接的串联细胞外靶向结构域。每个CAR T构建体均能够通过CD19或CD20肿瘤抗原或二者结合而活化。

[0074] 图2A:单一和串联CAR T构建体在人原代T细胞上的表面表达。通过流式细胞术确定CAR T表达。如在材料和方法中所描述的,T细胞在IL-2的存在下用Miltenyi Biotec TransAct™ CD3 CD28试剂活化,并用LV转导。在培养的第10天,使用三种染色试剂之一测定活的转导T细胞(7-AAD阴性)的CAR表面表达:蛋白L (第1列)、CD19 Fc随后是抗Fc-AF647 (第2列)、或CD20生物素随后是链霉亲和素-PE染色 (第3列)。转导中使用的LV列在每行的左侧。CAR T阳性群相对于未转导T细胞对照的百分比示于每个直方图的右上角。GFP转导的细胞用作另外的阴性对照。示出了三个独立供体的代表性数据。图2B:通过每个串联CAR结合的CD19和CD20抗原的比表示为通过CD20生物素结合的细胞百分比相对于通过CD19 Fc结合的细胞百分比的比。示出了使用三个供体的三个独立实验的平均值+SD,\*\*p<0.01。

[0075] 下面的图3A和3B描述了体外CAR T细胞毒性。使用用萤光素酶稳定转导的K562、K562 CD19+或K562 CD20+细胞系 (图3A) 或白血病或淋巴瘤细胞系 (Raji、NALM6、REH;图3B) 进行基于萤光素酶的细胞毒性测定。将CAR T细胞和靶肿瘤细胞在列出的效应物与靶标 (E:

T)比(x轴)下共孵育过夜。组之间的差异使用单向ANOVA随后通过Dunnett's事后检验(post-hoc test)来确定。平均值+SD,\*\*\*\*p<0.0001,\*\*p<0.01,相对于来自同一供体的未转导对照(N.T.)。

[0076] 图4. 响应于白血病细胞系的CAR T细胞因子释放。使用基于流的珠阵列测量了与Raji白血病系以10:1的E:T比共培养过夜之后,通过列于x轴的CAR-T进行的细胞因子产生。条表示重复样品的平均值+SD。数据代表用来自三个不同供体的CAR T细胞进行的三个独立实验。

[0077] 图5A和5B描述了CAR T构建体的体内活性。图5A描绘了基于小鼠全身生物发光的肿瘤生长的时间过程。研究了10只小鼠/CAR T处理组,和5只小鼠/对照组。图5B是描绘了每只小鼠的平均信号±SD的图。使用双向ANOVA,随后是Dunnett's多重比较检验相对于无处理组示出了25天(无处理对照组中的对象仍然存活的时间点)的统计分析。平均值+SD,\*\*\*P<0.001

[0078] 图6A、6B和6C描绘了强烈选择Raji肿瘤逃避变体的单一CAR19构建体。图6A:用于肿瘤逃逸实验的实验设计的图。Raji和CAR T细胞以1:1的E:T比共培养过夜或4天。过夜孵育之后以及在第4天,收获培养物,并通过流式细胞术检测活的Raji细胞的CD19、CD20和CD22表面表达。图6B:在第1列中示出了用于分析来自共培养物的活的Raji细胞(7AAD-和CD3-)的流式细胞术分析的设门策略,其针对代表性处理组示出。第2、3和4列分别示出了当Raji细胞不与T细胞共培养(第1行)、与19A CAR共培养(第2行)或与2019 CAR共培养(第3行)时CD19、CD20和CD22的表达水平。图6C:与CAR T细胞(如x轴所示)共培养过夜或共培养四天之后,如通过流式细胞术所确定的存活的Raji和NALM-6细胞中CD19、CD20和CD22表面表达(分别为实心、空心、灰色)的图。条表示组均值+SD。统计分析是通过单向ANOVA随后是Dunnett's多重比较检验相对于来自同一供体的N.T.(未转导的T细胞)对照进行的,\*p<0.05。T.A.-肿瘤单独对照组。

[0079] 图7.Raji表面上CD19、CD20和CD22的下调需要与CAR T细胞直接接触。在本实验中使用具有transwell插入物的多孔板。在每个孔的底部,将各 $5 \times 10^5$ 个Raji和CAR T细胞组合,并且在transwell上部,在不存在T细胞的情况下培养 $2.5 \times 10^5$ 个Raji细胞。过夜孵育之后,收获来自上部transwell区室和底部区室的细胞,并通过流式细胞术检查活的Raji细胞的CD19、CD20和CD22表面表达(分别为黑色、浅灰色和深灰色条)。示出了每个标志物相对于下部区室(x轴)中包含的特定CAR T的表面表达。条描述了使用源自三个不同供体的CAR T细胞进行的三个独立实验的平均值+SD。单向ANOVA,Dunnett's多重比较检验\*p<0.05。

[0080] 下面的图8A、8B和8C描述了CAR19构建体对CD19全长蛋白和CD19剪接变体的下调。Raji细胞与CAR T细胞以1:1E:T比共孵育。过夜孵育之后,使用磁珠从共孵育的细胞群中除去T细胞。通过流式细胞术和Western印迹研究经纯化的Raji群上的CD19表达。图8A:Raji细胞样品用抗CD19抗体染色并通过流式细胞术采集。示出了代表每个处理组的Raji细胞的中值荧光强度。条描述了使用源自三个不同供体的CAR T细胞进行的三个独立实验的平均值±SD。单向ANOVA,Dunnett's多重比较检验\*p<0.05。图8B:将来自每个共孵育组的经纯化Raji细胞的裂解物(每行上方列出CAR-T特征)溶解在如在材料和方法中所描述的4%至12%SDS聚丙烯酰胺凝胶上,并用靶向CD19分子C端或β-肌动蛋白(加载对照)的抗体探测。图8C:使用Image Studio软件(LI-COR Biosciences)对代表全长CD19蛋白(FL CD19)和外

显子2剪接的CD19变体 ( $\Delta$  2CD19) 的特异性免疫反应条带的强度进行了定量。将CD19条带的相对条带强度计算为信号CD19/信号 $\beta$ 肌动蛋白。

[0081] 图9A和9B示出了在高肿瘤负荷模型中CAR T细胞的体内活性。在第0天用Raji荧光素酶细胞i.v.注射NSG小鼠(n=6),并且如图中所示,在第12天用CAR T细胞进行处理。图9A:疾病负荷绘制为平均生物发光信号(平均辐射度[p/s/cm<sup>2</sup>/sr]) $\pm$ SEM。少于一半的小鼠存活到第25天的组被绘制为虚线。存活多于一半的组被绘制为实线。图9B:示出了在肿瘤植入之后第25天,如上图中所示用单一和串联CAR T构建体处理的小鼠中肿瘤负荷的生物发光图像。红色X表示未存活到研究第25天的小鼠。

[0082] 图10A和10B描绘了CAR T构建体的核酸序列和所编码的氨基酸序列。图10A描绘了表达CAR前导序列-CD19 VL-惠特洛接头CD19 VH(GGGGS)-5CD20 VH(GGGGS)-3CD20 VL CD8较链+TM-4-1BB-CD3z(CD1920 CAR构建体)核酸序列的慢病毒载体和所编码的氨基酸序列。图10B描述了表达CAR的慢病毒载体和所编码的氨基酸序列,所述CAR包含前导序列-CD20 VH(GGGGS)3-CD20 VL-(GGGGS)5-CD19 VL-惠特洛接头-CD19 VH CD8较链+TM-4-1BB-CD3z(CD2019 CAR构建体)核酸序列。

[0083] 图11A和11B描绘了编码CD19\_20(图11A)和CD20\_19(图11B)串联CAR的串联CAR慢病毒载体(lentiviral vector,LV)的质粒图。使用慢病毒骨架质粒表达CD19\_20和CD20\_19串联CAR,所述慢病毒骨架质粒以与CD8、41BB和CD3 $\zeta$ 信号传导结构域连接的以下序列为特征:来自FMC63和Leu 16抗体的人EF-1 $\alpha$ 内部启动子(EF1 $\alpha$ )、前导序列(leader)、VH和VL序列(分别为CD19VL、CD19VH、CD20 VL、CD20VH),链间接头序列和scFv内序列。

[0084] 发明详述

[0085] 定义

[0086] 除非上下文明确另外指出,否则本文中所述的没有数量词修饰的名词是指一个/种或更多个/种。例如,术语“抗原”包括一种或更多种抗原,并且可以被认为等同于短语“至少一种抗原”。本文中所述的术语“包含”意指“包括”。由此,“包含抗原”意指“包括抗原”而不排除另外的要素。短语“和/或”意指“和”或者“或”。还应理解,除非另外指出,否则针对核酸或多肽给出的任何和所有碱基尺寸或氨基酸尺寸,以及所有的分子重量或分子质量值都是近似的,并且是为了描述性目的而提供的。虽然可以使用许多与本文中所述的方法和材料类似或等同的方法和材料,但是具体的合适方法和材料在下文进行描述。在冲突的情况下,将以本说明书(包括术语的解释)为准。另外,材料、方法和实例仅是举例说明性的并非意图进行限制。为便于多种实施方案的综述,提供了以下术语解释:

[0087] 术语“约”当指可测量值(例如量、持续时间等)时意指涵盖与特定值的 $\pm$ 20%、或在一些情况下 $\pm$ 10%、或在一些情况下 $\pm$ 5%、或在一些情况下 $\pm$ 1%、或在一些情况下 $\pm$ 0.1%的变化,因为这样的变化适合于进行所公开的方法。

[0088] 除非另外指出,否则本文中的技术术语是根据常规用法使用的。分子生物学中常用术语的定义可见于Benjamin Lewin,Genes VII,Oxford University Press出版,1999;Kendrew et al.(编辑),The Encyclopedia of Molecular Biology,Blackwell Science Ltd出版,1994;和Robert A.Meyers(编辑),Molecular Biology and Biotechnology:a Comprehensive Desk Reference,VCH Publishers,Inc出版,1995;以及其他类似参考文献。



[0089] 本公开内容提供了CD19/CD20抗体或其片段以及具有这样的CD19/CD20抗原结合结构域的嵌合抗原受体 (CAR)。CAR的功能活性增强与表达CAR的T细胞的功能活性增强直接相关。作为这些修饰中一种或更多种的结果, CAR表现出高度的细胞因子诱导的裂解和转导T细胞上的细胞表面表达二者, 以及提高的体内T细胞扩增水平和转导的表达CAR的T细胞的持续性。本公开内容的CAR的优点在于一种CART慢病毒产品可用于治疗多种患者群体(即, CD19+、CD20+或双重CD19+CD20+癌症患者), 这在资源有限的情况下提供了灵活性。

[0090] 将来源于不同蛋白质结构域的功能性部分组合的独特能力是嵌合抗原受体 (CAR) 的关键创新特征。这些蛋白质结构域中每一个的选择是关键设计特征, 其特异性组合的方式也如此。每个设计结构域都是可以在不同CAR平台之间使用以改造淋巴细胞的功能的必需组分。例如, 细胞外结合结构域的选择可以使在其他情况下无效的CAR变得有效。

[0091] 用于建立CAR的细胞外抗原结合结构域的免疫球蛋白来源蛋白质序列的恒定构架组分可以是完全中性的或其可以自缔合并驱使T细胞达到代谢衰竭的状态, 由此使表达该CAR的治疗性T细胞的效果远远更低。这独立于该CAR结构域的抗原结合功能而发生。此外, 细胞内信号传导结构域的选择也可以控制用于免疫治疗的治疗性淋巴细胞群的活性和持久性。尽管分别通过这些细胞外和细胞内结构域结合靶抗原的能力和向T细胞传递活化信号的能力是重要的CAR设计方面, 但是还变得明显的是, 细胞外抗原结合片段来源的选择可以对CAR的效力具有显著影响, 并且从而对CAR的功能和临床效用具有限定作用。

[0092] 本文中所公开的CAR在细胞中以高水平表达。表达CAR的细胞具有高体内增殖速率, 产生大量细胞因子, 并且对表面上具有与CAR结合之CD19/CD20抗原的细胞具有高细胞毒活性。细胞外CD19/CD20抗原结合结构域的使用导致产生在体内更好地起作用的CAR, 同时避免在宿主免疫应答中诱导抗CAR免疫和杀伤CAR T细胞群。表达细胞外CD19/CD20ScFv抗原结合结构域的CAR表现出优异的活性/特性, 其包括i) 防止如利用小鼠来源的结合序列所见的差的CAR T持久性和功能; ii) 使缺乏CAR的区域(即胸膜内) 递送有效; 和iii) 基于对CD19/CD20具有高亲和力和低亲和力二者的结合物产生CAR T细胞设计的能力。后一种特性允许研究者更好地调节CAR T产品的效力与毒性, 和/或组织特异性, 因为与正常组织相比, 较低亲和力的结合物可对肿瘤具有更高的特异性, 因为肿瘤上CD19/CD20的表达高于正常组织, 其可以防止脱靶肿瘤毒性(on-target off tumor toxicity) 和旁观者细胞杀伤。

[0093] 以下是对本发明CAR的详细描述, 包括对其细胞外CD19/CD20抗原结合结构域、跨膜结构域和细胞内结构域的描述, 以及对CAR、抗体及其抗原结合片段、缀合物、核苷酸、表达、载体以及宿主细胞、治疗方法、组合物和使用所公开CAR的药盒的附加描述。

[0094] A. 嵌合抗原受体 (CAR)

[0095] 本文中所公开的CAR包含至少一个能够与CD19/CD20结合的CD19/CD20抗原结合结构域、至少一个跨膜结构域和至少一个细胞内结构域。

[0096] 嵌合抗原受体 (CAR) 是包含经由跨膜结构域与T细胞信号传导结构域连接的抗体之抗原结合结构域(例如单链可变片段(scFv))的人工构建杂合蛋白或多肽。CAR的特征包括其以非MHC限制性方式将T细胞特异性和反应性针对选定靶标重定向的能力, 和利用单克隆抗体的抗原结合特性。非MHC限制性抗原识别赋予表达CAR的T细胞以独立于抗原加工识别抗原的能力, 由此绕过肿瘤逃逸的主要机制。此外, 当在T细胞中表达时, CAR有利地不与内源性T细胞受体 (TCR)  $\alpha$ 和 $\beta$ 链二聚化。

[0097] 如本文中所公开的, CAR的细胞内T细胞信号传导结构域可以包含例如T细胞受体信号传导结构域、T细胞共刺激信号传导结构域或二者。T细胞受体信号传导结构域是指CAR中包含T细胞受体的细胞内结构域的部分, 例如但不限于CD3 $\zeta$ 蛋白的细胞内部分。共刺激信号传导结构域是指CAR中包含共刺激分子的细胞内结构域的部分, 所述共刺激分子是淋巴细胞对抗原的有效响应所需的除抗原受体或其配体之外的细胞表面分子。

#### [0098] 1. 细胞外结构域

[0099] 在一个实施方案中, CAR包含靶标特异性结合元件, 其还被称为抗原结合结构域或部分。结构域的选择取决于限定靶细胞的表面的配体的类型和数量。例如, 可以选择抗原结合结构域以识别充当靶细胞上与特定疾病状态相关的细胞表面标志物的配体。因此, 可充当CAR中抗原结合结构域的配体的细胞表面标志物的一些实例包括与病毒性、细菌性和寄生虫感染、自身免疫病和癌细胞相关的那些。

[0100] 在一个实施方案中, 可以通过改造与肿瘤细胞上抗原特异性结合的期望抗原结合结构域来将CAR改造成靶向目的肿瘤抗原。肿瘤抗原是由肿瘤细胞产生的引发免疫应答, 特别是T细胞介导的免疫应答的蛋白质。抗原结合结构域的选择将取决于待治疗癌症的特定类型。肿瘤抗原包括例如胶质瘤相关抗原、癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA)、 $\beta$ -人绒毛膜促性腺激素、甲胎蛋白 (alphafetoprotein, AFP)、凝集素反应性AFP、甲状腺球蛋白、RAGE-1、MN-CA IX、人端粒酶逆转录酶、RU1、RU2 (AS)、肠羧基酯酶、mut hsp70-2、M-CSF、前列腺酶、前列腺特异性抗原 (prostate-specific antigen, PSA)、PAP、NY-ESO-1、LAGE-1a、p53、prostein、PSMA、Her2/neu、存活素和端粒酶、前列腺癌肿瘤抗原-I (prostate-carcinoma tumor antigen-I, PCTA-I)、MAGE、ELF2M、中性粒细胞弹性蛋白酶、ephrinB2、CD22、胰岛素生长因子 (insulin growth factor, IGF)-I、IGF-II、IGF-I受体和CD19/CD20。本文中所公开的肿瘤抗原仅仅通过示例的方式包括在内。该列表并不意味着是排他性的并且另一些实例对本领域技术人员而言将是明显的。

[0101] 在一个实施方案中, 肿瘤抗原包含一个或更多个与恶性肿瘤相关的抗原性癌症表位。恶性肿瘤表达多种可以作为用于免疫攻击的靶抗原的蛋白质。这些分子包括但不限于组织特异性抗原, 例如黑素瘤中的MART-1、酪氨酸酶和GP 100, 以及前列腺癌中的前列腺酸性磷酸酶 (prostatic acid phosphatase, PAP) 和前列腺特异性抗原 (PSA)。另一些靶分子属于转化相关分子组, 例如癌基因HER-2/Neu/ErbB-2。另一组靶抗原是癌-胚胎抗原, 例如癌胚抗原 (CEA)。在B细胞淋巴瘤中, 肿瘤特异性独特型免疫球蛋白构成个体肿瘤特有的真正肿瘤特异性的免疫球蛋白抗原。B细胞分化抗原 (例如CD19、CD20、CD22、BCMA、ROR1和CD37) 是B细胞淋巴瘤中靶抗原的另一些候选物。这些抗原中的一些 (CEA、HER-2、CD19、CD20、独特型) 已经用作使用单克隆抗体的被动免疫治疗的靶标, 但成功有限。

[0102] 在一个优选的实施方案中, 肿瘤抗原是CD19/CD20, 并且与CD19/CD20表达相关的肿瘤包括表达高水平的细胞外蛋白CD19/CD20的肺间皮瘤、卵巢癌和胰腺癌, 或其任意组合。

[0103] 肿瘤抗原的类型还可以是肿瘤特异性抗原 (tumor-specific antigen, TSA) 或肿瘤相关抗原 (tumor-associated antigen, TAA)。TSA对肿瘤细胞而言是独特的并且不会出现在体内的其他细胞上。TAA对肿瘤细胞而言不是独特的并且作为替代还在不能诱导针对抗原的免疫耐受状态的条件下在正常细胞上表达。抗原在肿瘤上的表达可在使免疫系统能

够对抗原作出响应的条件下发生。TAA可以是在胎儿发育期间在正常细胞上表达的抗原,此时免疫系统是未成熟的并且不能作出响应,或者TAA可以是在正常情况下以极低水平存在于正常细胞上但在肿瘤细胞上以高得多水平表达的抗原。

[0104] TSA或TAA的一些非限制性实例包括以下:分化抗原,例如MART-1/MelanA (MART-1)、gp100 (Pmel 17)、酪氨酸酶、TRP-1、TRP-2,和肿瘤特异性多谱系抗原,例如MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15;过表达的胚胎抗原例如CEA;过表达的癌基因和突变的肿瘤抑制基因,例如p53、Ras、HER-2/neu;由染色体易位产生的独特肿瘤抗原,例如BCR-ABL、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR;以及病毒抗原,例如EB病毒 (Epstein Barr virus) 抗原EBVA以及人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 抗原E6和E7。其他基于蛋白质的大抗原包括TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、RAGE、NY-ESO、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、PSA、TAG-72、CA 19-9、CA72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、 $\beta$ -联蛋白、CDK4、Mum-1、p 15、p 16、43-9F、5T4、791Tgp72、甲胎蛋白、 $\beta$ -HCG、BCA225、BTAA、CA 125、CA 15-3、CA 27.29、BCAA、CA 195、CA 242、CA-50、CAM43、CD68、PI、CO-029、FGF-5、G250、Ga733、EpCAM、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB/70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90、Mac-2结合蛋白、亲环蛋白C相关蛋白、TAAL6、TAG72、TLP和TPS。

[0105] 在一个实施方案中, CAR的抗原结合结构域部分靶向包括但不限于以下的抗原: CD19、CD20、CD22、ROR1、CD33、CD38、CD123、CD138、BCMA、c-Met、PSMA、糖脂F77、EGFRvIII、GD-2、FGFR4、TSLPR、NY-ESO-1 TCR、MAGE A3 TCR等。

[0106] 在一个优选的实施方案中, CAR的抗原结合结构域部分靶向细胞外CD19/CD20抗原。

[0107] 在本文中所公开的CD19/CD20特异性CAR的多种实施方案中, 一般方案在图1A和1B中示出, 并且从N端到C端包括信号肽或前导肽、抗CD19/CD20 ScFv、细胞外接头、CD8跨膜、4-1BB、CD3 $\zeta$ 。

[0108] 在一个实施方案中, 编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:1的核酸序列(前导序列-CD19 VL-惠特洛接头CD19 VH(GGGGS)-5CD20 VH(GGGGS)-3CD20 VL CD8铰链+TM-4-1BB-CD3 $\zeta$ (构建体1920)), 并且编码包含如SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列(前导序列-CD19 VL-惠特洛接头CD19 VH(GGGGS)-5 CD20 VH(GGGGS)-3 CD20 VL CD8铰链+TM-4-1BB-CD3 $\zeta$ (构建体1920)氨基酸序列(如图10A中所示))的CAR。

[0109] 在一个实施方案中, 编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:1的核酸序列, 或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列, 并且编码包含如SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列(前导序列-CD19 VL-惠特洛接头CD19 VH(GGGGS)-5 CD20 VH(GGGGS)-3 CD20 VL CD8铰链+TM-4-1BB-CD3 $\zeta$ (构建体1920)氨基酸序列(如图10A中所示))的CAR。

[0110] 在另一个实施方案中, 编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:3的核酸序列(前导序列-CD20 VH(GGGGS)3-CD20 VL-(GGGGS)5-CD19 VL-惠特洛接头-CD19 VH CD8铰链+TM-4-1BB-CD3 $\zeta$ (构建体2019)(图2B)), 并且编码包含SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列[前导序列-CD20 VH(GGGGS)3-CD20 VL-(GGGGS)5-CD19 VL-惠特洛接头-CD19 VH CD8铰链+TM-4-1BB-CD3 $\zeta$  CAR氨基酸序列(如图10B中所示)]的CAR。

[0111] 在另一个实施方案中, 编码CAR的核酸序列包含SEQ ID NO:3的核酸序列或与其具

有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列,并且编码包含SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列或与其具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列[前导序列-CD20 VH(GGGGS)3-CD20 VL-(GGGGS)5-CD19 VL-惠特洛接头-CD19 VH CD8铰链+TM-4-1BB-CD3z CAR氨基酸序列(如图10B中所示)]的CAR。

[0112] 并入与CD19/CD20抗原反应的单链片段可变(ScFv)序列的抗CD19/CD20 CAR的表面表达在下文的实施例1中示出。使用三种检测方法之一,通过流式细胞术分析来自健康供体的LV转导的T细胞来确定每种含ScFv的CAR的表达水平:i)蛋白L-生物素,随后是链霉亲和素PE;ii) CD19Fc重组蛋白,随后是抗Fc AF647(APC);iii) 重组CD20生物素缀合物,随后是链霉亲和素PE。与未转导的T细胞对照(未设门的细胞群)相比,在人原代T细胞中,基于ScFv的抗CD19/CD20 CAR构建体LTG1920和LTG 2019高度表达(如通过设门的群体所示的)。

[0113] 如实施例1以及图3A和3B中所示的,证明了CD19/CD20 CAR的高细胞裂解活性。将人原代T细胞用编码LV的CAR构建体(19A、19B、20A、1920、2019,参见方法)转导,随后与用萤火虫萤光素酶稳定转导的Raji、NALM-6、REH、K562或293T细胞系一起孵育18小时,用于基于发光的体外杀伤测定。测试的所有白血病系在其表面上均表达CD19,而阴性对照K562和293T则不如此。CD20表达在肿瘤系之间变化。Raji系是CD20阳性的,而REH是CD20阴性的,对照系K562和293T也是如此。NALM-6系具有弱但可检测的CD20表达。作为另外的对照,创建了表达CD19(K562-19+)或CD20(K562-20+)的K562系。

[0114] K562-19+被CAR 19A和19B构建体、串联CAR构建体1920和2019裂解,但不被单一20A CAR裂解,图3A。除单一CAR19构建体之外,所有CART构建体均裂解K562-CD20+,证明了靶抗原限制性杀伤。在测试的其他白血病细胞系的情况下也观察到了相似的结果。靶向CD19的单一和串联CAR T构建体裂解Raji、NALM-6和REH;但不裂解293T(图3B)或K562(图3A)。值得注意的是,单一靶向20A的CAR构建体对CD20阴性REH系没有特异性杀伤活性,但确实示出了对NALM-6的杀伤,NALM-6具有低但可检测的CD20表面表达水平。此外,通过流式细胞术,看起来显示出与CD19-Fc相比与CD20肽更低地结合的串联CAR1920也具有针对K562-19+和K562-20+的较低的细胞毒性,但没有针对CD19+CD20-REH的细胞毒性。这可表明对于一些肿瘤靶标,1920串联CAR劣于2019串联CAR。

[0115] 然后评价抗CD19/CD20 CAR T细胞分泌细胞因子的能力。将肿瘤细胞与CAR T细胞或对照T细胞以10:1的效应物与靶标的比共孵育过夜,并通过ELISA分析培养上清液的IFN $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 、IL-2和GM-CSF(参见,图4)。所有CAR T组均响应于肿瘤细胞而诱导细胞因子,而阴性对照(未转导的,N.T.)和GFP未产生明显的细胞因子诱导。在五个CAR T组中,单一CAR T 20A产生最高水平的细胞因子,而19A和19B CAR T具有最低水平的细胞因子诱导。值得注意的是,串联CAR T表达细胞LTG1920和/或LTG2019显示出中等水平的IFN $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 、IL-2和GM-CSF,这可在临床安全性和避免细胞因子释放综合征的背景下证明是有用的。

[0116] 在不旨在限制任何特定的作用机制的情况下,认为与本发明的示例性CAR相关的增强的治疗性功能的可能原因包括,例如但不限于:a)改善了质膜内的横向运动从而允许更有效的信号转导,b)在质膜微结构域(例如脂筏)内的优异位置,以及与T细胞活化相关的跨膜信号传导级联相互作用的更大能力,c)通过优先移动远离抑制性(dampening)或下调性的相互作用(例如与磷酸酶(例如CD45)的接近性或相互作用较低)而在质膜内的优异位置,以及d)优异组装成T细胞受体信号传导复合物(即免疫突触),或其任意组合。

[0117] 虽然已经用示例性的仅细胞外CD19/CD20可变重链和ScFv抗原结合结构域举例说明了本公开内容,但是可使用仅CD19/CD20可变重链和ScFv抗原结合结构域内的其他核苷酸和/或氨基酸变体可以用于得到用于本文中所述的CAR中的CD19/CD20抗原结合结构域。

[0118] 根据待靶向的期望抗原,CAR可以被另外改造成包含对期望抗原靶标具有特异性的合适抗原结合结构域。例如,如果CD19/CD20是待靶向的期望抗原,则可将针对CD19/CD20的抗体用作并入CAR中的抗原结合结构域。

[0119] 在一个示例性的实施方案中,CAR的抗原结合结构域部分另外靶向CD33。优选地,CAR中的抗原结合结构域是抗CD33 ScFv,其中抗CD33ScFv的核酸序列包含SEQ ID NO:46中所示的序列。在一个实施方案中,抗CD33 ScFv包含核酸序列,其编码SEQ ID NO:46的氨基酸序列。在另一个实施方案中,CAR的抗CD19/CD20 ScFv部分包含SEQ ID NO:47中所示的氨基酸序列。

[0120] 在一个示例性的实施方案中,CAR的抗原结合结构域部分另外靶向间皮素。优选地,CAR中的抗原结合结构域是抗间皮素ScFv,其中抗间皮素ScFv的核酸序列包含SEQ ID NO:48中所示的序列。在一个实施方案中,抗间皮素ScFv包含核酸序列,其编码SEQ ID NO:48的氨基酸序列。在另一个实施方案中,CAR的抗间皮素ScFv部分包含SEQ ID NO:49中所示的氨基酸序列。

[0121] 在本发明的一个方面中,提供了能够与非TSA或非TAA结合的CAR,所述非TSA或非TAA包括例如但不限于来源于以下的抗原:逆转录病毒科(例如人免疫缺陷病毒(例如HIV-1和HIV-LP))、小核糖核酸病毒科(例如脊髓灰质炎病毒、甲型肝炎病毒、肠病毒、人柯萨奇病毒、鼻病毒和艾柯病毒)、风疹病毒、冠状病毒、水疱性口炎病毒、狂犬病病毒、埃博拉病毒、副流感病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、呼吸道合胞体病毒、流感病毒、乙型肝炎病毒、细小病毒、腺病毒科、疱疹病毒科[例如1型和2型单纯疱疹病毒(herpes simplex virus,HSV)、水痘-带状疱疹病毒、巨细胞病毒(cytomegalovirus,CMV)和疱疹病毒]、痘病毒科(例如天花病毒、痘苗病毒和痘病毒)或丙型肝炎病毒,或其任意组合。

[0122] 在本发明的另一方面中,提供了能够与来源于以下细菌菌株的抗原结合的CAR:葡萄球菌属(*Staphylococci*)、链球菌属(*Streptococcus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)或沙门氏菌属(*Salmonella*)。特别地,提供了能够与来源于例如以下感染性细菌的抗原结合的CAR:幽门螺杆菌(*Helicobacter pyloris*)、嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)、分枝杆菌属(*Mycobacteria sp.*)的细菌菌株(例如结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)、鸟分枝杆菌(*M. avium*)、胞内分枝杆菌(*M. intracellulare*)、堪萨斯分枝杆菌(*M. kansasii*)或戈登分枝杆菌(*M. goodii*))、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitidis*)、单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、A组链球菌(Group A *Streptococcus*)、B组链球菌(Group B *Streptococcus*) (无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*))、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)或破伤风梭菌(*Clostridium tetani*),或其组合。

[0123] 2. 跨膜结构域

[0124] 关于跨膜结构域,CAR包含一个或更多个与CAR的细胞外CD19/CD20抗原结合结构域融合的跨膜结构域。

[0125] 跨膜结构域可来源于天然来源或合成来源。在来源是天然的情况下,结构域可来源于任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。

[0126] 在本文中所述的CAR中特别使用的跨膜区可来源于以下(即至少包含以下的跨膜区):T细胞受体的 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\zeta$ 链,CD28,CD3 $\epsilon$ ,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,间皮素,CD33,CD37,CD64,CD80,CD83,CD86,CD134,CD137,CD154,TNFRSF16或TNFRSF19。或者,跨膜结构域可以是合成的,在这种情况下,其将主要包含疏水性残基(例如亮氨酸和缬氨酸)。优选地,苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体将存在于合成跨膜结构域的每个末端。任选地,短的寡肽接头或多肽接头(优选地长度为2至10个氨基酸)可在CAR的跨膜结构域和胞质信号传导结构域之间形成连接。甘氨酸-丝氨酸二联体提供特别合适的接头。

[0127] 在一个实施方案中,除了上述跨膜结构域之外,还使用天然与CAR中结构域之一缔合的跨膜结构域。

[0128] 在一些情况下,可以对跨膜结构域进行选择或通过氨基酸替换以避免这样的结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合从而使与受体复合物中其他成员的相互作用最小化。

[0129] 在一个实施方案中,本发明的CAR中的跨膜结构域是CD8跨膜结构域。在一个实施方案中,CD8跨膜结构域包含SEQ ID NO:35的核酸序列。在一个实施方案中,CD8跨膜结构域包含编码SEQ ID NO:36的氨基酸序列的核酸序列。在另一个实施方案中,CD8跨膜结构域包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列。

[0130] 在一个实施方案中,编码的跨膜结构域包含具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的至少一个、两个或三个修饰(例如,取代)但不超过20、10或5个修饰(例如,取代)的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:28的氨基酸序列具有95%至99%同一性的序列。

[0131] 在一些情况下,CAR的跨膜结构域包含CD8 $\alpha$ 铰链结构域。在一个实施方案中,CD8铰链结构域包含SEQ ID NO:37的核酸序列。在一个实施方案中,CD8铰链结构域包含编码SEQ ID NO:38的氨基酸序列的核酸序列。在另一个实施方案中,CD8铰链结构域包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列,或与其具有95%至99%同一性的序列。

[0132] 在一个实施方案中,提供了分离的核酸分子,其中所编码的接头结构域来源于CD8的细胞外结构域,并且与跨膜CD8结构域、跨膜CD28结构域,或其组合连接。

[0133] 3. 间隔区结构域

[0134] 在CAR中,间隔区结构域可以布置在细胞外结构域和跨膜结构域之间,或布置在细胞内结构域和跨膜结构域之间。间隔区结构域意指用于连接跨膜结构域与细胞外结构域和/或跨膜结构域与细胞内结构域的任何寡肽或多肽。间隔区结构域包含多至300个氨基酸,优选10至100个氨基酸,并且最优选25至50个氨基酸。

[0135] 在一些实施方案中,接头可以包含间隔区元件,其当存在时增大接头的尺寸使得效应分子或可检测标志物与抗体或抗原结合片段之间的距离增大。示例性的间隔区是普通技术人员已知的,并且包括以下中列举的那些:美国专利No.7,964,566、7,498,298、6,884,869、6,323,315、6,239,104、6,034,065、5,780,588、5,665,860、5,663,149、5,635,483、5,599,902、5,554,725、5,530,097、5,521,284、5,504,191、5,410,024、5,138,036、5,076,973、4,986,988、4,978,744、4,879,278、4,816,444和4,486,414,以及美国专利公开No.20110212088和20110070248,其各自通过引用整体并入本文。

[0136] 间隔区结构域优选具有促进CAR与抗原结合并增强信号传导到细胞内的序列。预期促进结合的氨基酸的一些实例包括半胱氨酸、带电荷氨基酸以及在潜在糖基化位点中的丝氨酸和苏氨酸,并且这些氨基酸可以被用作构成间隔区结构域的氨基酸。

[0137] 作为间隔区结构域,可以使用为CD8 $\alpha$ 之铰链区的第137至206号氨基酸(SEQ ID NO:39)(NCBI RefSeq:NP.sub.--001759.3)、CD8 $\beta$ 的第135至195号氨基酸(GenBank:AAA35664.1)、CD4的第315至396号氨基酸(NCBI RefSeq:NP.sub.--000607.1)或CD28的第137至152号氨基酸(NCBI RefSeq:NP.sub.--006130.1)的全部或部分。另外,作为间隔区结构域,可以使用抗体H链或L链的恒定区的一部分。另外,间隔区结构域可以是人工合成序列。

[0138] 另外,在CAR中,信号肽序列可以与N端连接。信号肽序列存在于许多分泌蛋白和膜蛋白的N端,并且长度为15至30个氨基酸。由于上文作为细胞内结构域提及的很多蛋白质分子都具有信号肽序列,因此这些信号肽可以用作用于CAR的信号肽。在一个实施方案中,信号肽包含SEQ ID NO:18中所示的氨基酸序列。

#### [0139] 4. 细胞内结构域

[0140] CAR的胞质结构域或另外的细胞内信号传导结构域负责激活其中已放置CAR的免疫细胞的至少一种正常效应功能。术语“效应功能”是指细胞的特化功能。例如,T细胞的效应功能可以是细胞裂解活性或辅助活性,包括分泌细胞因子。因此,术语“细胞内信号传导结构域”是指转导效应功能信号并指导细胞进行特化功能的蛋白质部分。虽然通常可以使用整个细胞内信号传导结构域,但是在许多情况下不需要使用整个链。就使用细胞内信号传导结构域的截短部分来说,这样的截短部分可用于代替完整链,只要其转导效应功能信号即可。术语细胞内信号传导结构域因此意味着包括细胞内信号传导结构域的足以转导效应功能信号的任何截短部分。

[0141] 用于CAR中的细胞内信号传导结构域的一些优选实例包括T细胞受体(TCR)和协同作用以在抗原受体衔接后起始信号转导的共受体的胞质序列,以及具有相同功能能力的这些序列的任何衍生物或变体和任何合成序列。

[0142] 已知通过单独TCR产生的信号不足以完全活化T细胞并且还需要次级或共刺激信号。因此,T细胞活化可以被认为由两种不同种类的胞质信号传导序列介导:通过TCR起始抗原依赖性初级激活的那些(初级胞质信号传导序列)和以抗原独立性方式作用以提供次级或共刺激信号的那些(次级胞质信号传导序列)。

[0143] 初级胞质信号传导序列以刺激性方式或以抑制性方式调节TCR复合物的初级激活。以刺激性方式起作用的初级胞质信号传导序列可包含被称为免疫受体酪氨酸基激活基序或ITAM的信号传导基序。

[0144] 特别用于本文中所公开CAR的包含ITAM的初级胞质信号传导序列的一些实例包括来源于TCR $\zeta$ (CD3 $\zeta$ )、FcR $\gamma$ 、FcR $\beta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的那些。ITAM的具体非限制性实例包括具有以下序列的肽:CD3 $\zeta$ 的第51至164号氨基酸(NCBI RefSeq:NP.sub.--932170.1)、FcgRI $\gamma$ 的第45至86号氨基酸(NCBI RefSeq:NP.sub.--004097.1)、FcgRI $\beta$ 的第201至244号氨基酸(NCBI RefSeq:NP.sub.--0001.30.1)、CD3 $\gamma$ 的第139至182号氨基酸(NCBI RefSeq:NP.sub.--000064.1)、CD3 $\delta$ 的第128至171号氨基酸(NCBI RefSeq:NP.sub.--000723.1)、CD3 $\epsilon$ 的第153至207号氨基酸(NCBI RefSeq:

NP.sub.--000724.1)、CD5的第402至495号氨基酸(NCBI RefSeq:NP.sub.--055022.2)、0022的第707至847号氨基酸(NCBI RefSeq:NP.sub.--001762.2)、CD79a的第166至226号氨基酸(NCBI RefSeq:NP.sub.--001774.1)、CD79b的第182至229号氨基酸(NCBI RefSeq:NP.sub.--000617.1)和CD66d的第177至252号氨基酸(NCBI RefSeq:NP.sub.--001806.2),以及其与这些肽具有相同功能的变体。本文中所述的基于NCBI RefSeq ID或GenBank的氨基酸序列信息的氨基酸编号是基于每种蛋白质的前体(包含信号肽序列等)的全长进行编号的。在一个实施方案中,CAR中的胞质信号传导分子包含来源于CD3的胞质信号传导序列。

[0145] 在一个优选的实施方案中,CAR的细胞内结构域可以被设计成包含单独或与任何其他可用于CAR背景的期望胞质结构域组合的CD3- $\zeta$ 信号传导结构域。例如,CAR的细胞内结构域可以包含CD3链部分和共刺激信号传导区。共刺激信号传导区是指CAR中包含共刺激分子的细胞内结构域的部分。共刺激分子是淋巴细胞对抗原的有效响应所需的除抗原受体或其配体之外的细胞表面分子。这样的共刺激分子的一些实例包括CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3,和与CD83特异性结合的配体等。这样的共刺激分子的具体非限制性实例包括具有以下序列的肽:CD2的第236至351号氨基酸(NCBI RefSeq:NP.sub.--001758.2)、CD4的第421至458号氨基酸(NCBI RefSeq:NP.sub.--000607.1)、CD5的第402至495号氨基酸(NCBI RefSeq:NP.sub.--055022.2)、CD8 $\alpha$ 的第207至235号氨基酸(NCBI RefSeq:NP.sub.--001759.3)、CD83的第196至210号氨基酸(GenBank:AAA35664.1)、CD28的第181至220号氨基酸(NCBI RefSeq:NP.sub.--006130.1)、CD137的第214至255号氨基酸(4-1BB, NCBI RefSeq:NP.sub.--001552.2)、CD134的第241至277号氨基酸(OX40, NCBI RefSeq:NP.sub.--003318.1)和ICOS的第166至199号氨基酸(NCBI RefSeq:NP.sub.--036224.1),以及其与这些肽具有相同功能的变体。因此,尽管本文的公开内容主要用4-1BB作为共刺激信号传导元件来举例说明,但是其他共刺激元件也在本公开内容的范围内。

[0146] CAR的胞质信号传导部分内的胞质信号传导序列可以以随机或特定顺序彼此连接。任选地,短的寡肽接头或多肽接头(优选长度为2至10个氨基酸)可形成连接。甘氨酸-丝氨酸二联体提供特别合适的接头。

[0147] 在一个实施方案中,细胞内结构域被设计成包含CD3- $\zeta$ 的信号传导结构域和CD28的信号传导结构域。在另一个实施方案中,细胞内结构域被设计成包含CD3- $\zeta$ 的信号传导结构域和4-1BB的信号传导结构域。在另一个实施方案中,细胞内结构域被设计成包含CD3- $\zeta$ 的信号传导结构域以及CD28和4-1BB的信号传导结构域。

[0148] 在一个实施方案中,CAR中的细胞内结构域被设计成包含4-1BB的信号传导结构域和CD3- $\zeta$ 的信号传导结构域,其中4-1BB的信号传导结构域包含SEQ ID NO:40中所示的核酸序列并且CD3- $\zeta$ 的信号传导结构域包含SEQ ID NO:42中所示的核酸序列。

[0149] 在一个实施方案中,CAR中的细胞内结构域被设计成包含4-1BB的信号传导结构域和CD3- $\zeta$ 的信号传导结构域,其中4-1BB的信号传导结构域包含编码SEQ ID NO:41的氨基酸序列的核酸序列并且CD3- $\zeta$ 的信号传导结构域包含编码SEQ ID NO:43的氨基酸序列的核酸序列。

[0150] 在一个实施方案中,CAR中的细胞内结构域被设计成包含4-1BB的信号传导结构域和CD3- $\zeta$ 的信号传导结构域,其中4-1BB的信号传导结构域包含SEQ ID NO:41中所示的氨基



酸序列并且CD3- $\zeta$ 的信号传导结构域包含SEQ ID NO:43中所示的氨基酸序列。

[0151] 5. CAR的附加描述

[0152] 还明确地包括在本发明的范围内的是本文中所公开的CAR的功能性部分。当参考CAR使用时,术语“功能性部分”是指本文中所公开的一种或更多种CAR的以下任何部分或片段,所述部分或片段保留CAR(所述部分或片段为其一部分)(亲本CAR)的生物活性。功能性部分涵盖例如CAR的以下那些部分,其与亲本CAR相比在类似程度上、在相同程度上或在更高程度上保留识别靶细胞或者检测、治疗或预防疾病的能力。参考亲本CAR,功能性部分可以包含例如亲本CAR的约10%、25%、30%、50%、68%、80%、90%、95%或更多。

[0153] 功能性部分可以在该部分的氨基或羧基末端或在两端包含另外的氨基酸,所述另外的氨基酸在亲本CAR的氨基酸序列中不存在。期望地,另外的氨基酸不干扰功能性部分的生物功能,例如识别靶细胞、检测癌症、治疗或预防癌症等。更期望地,与亲本CAR的生物活性相比,另外的氨基酸增强生物活性。

[0154] 包括在本公开内容的范围内的是本文中所公开CAR的功能性变体。本文中所用的术语“功能性变体”是指与亲本CAR具有明显或显著序列同一性或相似性的CAR、多肽或蛋白质,所述功能性变体保留CAR(所述功能性变体为其变体)的生物活性。功能性变体涵盖例如本文中所述CAR(亲本CAR)的以下那些变体,其与亲本CAR相比在类似程度上、在相同程度上或在更高程度上保留识别靶细胞的能力。参考亲本CAR,功能性变体可以例如与亲本CAR在氨基酸序列方面具有至少约30%、50%、75%、80%、90%、98%或更高同一性。

[0155] 功能性变体可以例如包含具有至少一个保守性氨基酸替换的亲本CAR的氨基酸序列。作为替选或补充,功能性变体可以包含具有至少一个非保守性氨基酸替换的亲本CAR的氨基酸序列。在这种情况下,非保守性氨基酸替换优选不干扰或抑制功能性变体的生物活性。非保守性氨基酸替换可增强功能性变体的生物活性,使得与亲本CAR相比,功能性变体的生物活性提高。

[0156] CAR的氨基酸替换优选是保守性氨基酸替换。保守性氨基酸替换是本领域已知的,并且包括其中将一个具有特定物理和/或化学特性的氨基酸交换为另一个具有相同或相似化学或物理特性的氨基酸的氨基酸替换。例如,保守性氨基酸替换可以是酸性/带负电荷的极性氨基酸替换另一个酸性/带负电荷的极性氨基酸(例如,Asp或Glu)、具有非极性侧链的氨基酸替换另一个具有非极性侧链的氨基酸(例如,Ala、Gly、Val、He、Leu、Met、Phe、Pro、Trp、Cys、Val等)、碱性/带正电荷的极性氨基酸替换另一个碱性/带正电荷的极性氨基酸(例如,Lys、His、Arg等)、具有极性侧链的不带电荷氨基酸替换另一个具有极性侧链的不带电荷的氨基酸(例如,Asn、Gin、Ser、Thr、Tyr等)、具有 $\beta$ 支化侧链的氨基酸替换另一个具有 $\beta$ 支化侧链的氨基酸(例如,He、Thr和Val)、具有芳香族侧链的氨基酸替换另一个具有芳香族侧链的氨基酸(例如,His、Phe、Trp和Tyr),等。

[0157] CAR可以基本上由本文中所述的一个或更多个特定氨基酸序列组成,使得其他组分(例如,其他氨基酸)不会实质上改变功能性变体的生物活性。

[0158] CAR(包括功能性部分和功能性变体)可以具有任意长度,即可以包含任意数目的氨基酸,只要CAR(或其功能性部分或功能性变体)保留其生物活性,例如与抗原特异性结合、在哺乳动物中检测患病细胞或在哺乳动物中治疗或预防疾病等的的能力即可。例如,CAR可以为约50至约5000个氨基酸长,例如长度为50、70、75、100、125、150、175、200、300、400、

500、600、700、800、900、1000或更多个氨基酸。

[0159] CAR(包括本发明的功能性部分和功能性变体)可以包含取代一个或更多个天然存在氨基酸的合成氨基酸。这样的合成氨基酸是本领域已知的,并且包括例如氨基环己烷羧酸、正亮氨酸、-氨基正癸酸、高丝氨酸、S-乙酰氨基甲基-半胱氨酸、反式-3-羟脯氨酸和反式-4-羟脯氨酸、4-氨基苯丙氨酸、4-硝基苯丙氨酸、4-氯苯丙氨酸、4-羧基苯丙氨酸、 $\beta$ -苯基丝氨酸、 $\beta$ -羟基苯丙氨酸、苯基甘氨酸、 $\alpha$ -萘基丙氨酸、环己基丙氨酸、环己基甘氨酸、二氢吡啶-2-羧酸、1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸、氨基丙二酸、氨基丙二酸一酰胺、N'-苄基-N'-甲基-赖氨酸、N',N'-二苄基-赖氨酸、6-羟赖氨酸、鸟氨酸、-氨基环戊烷羧酸、 $\alpha$ -氨基环己烷羧酸、 $\alpha$ -氨基环庚烷羧酸、 $\alpha$ -(2-氨基-2-降冰片烷)-羧酸、 $\gamma$ -二氨基丁酸、 $\beta$ -二氨基丙氨酸、高苯丙氨酸和 $\alpha$ -叔丁基甘氨酸。

[0160] CAR(包括功能性部分和功能性变体)可以被糖基化、酰胺化、羧化、磷酸化、酯化、N-酰化、环化(通过例如二硫桥)或转化成酸加成盐和/或任选地二聚或多聚的,或缀合的。

[0161] CAR(包括其功能性部分和功能性变体)可以通过本领域已知的方法获得。CAR可通过任何制备多肽或蛋白质的合适方法来制备。从头合成多肽和蛋白质的合适方法在例如以下的参考文献中描述:Chan et al.,*Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*,Oxford University Press,Oxford,United Kingdom,2000;*Peptide and Protein Drug Analysis*,编辑.Reid,R.,Marcel Dekker,Inc.,2000;*Epitope Mapping*,编辑.Westwood et al.,Oxford University Press,Oxford,United Kingdom,2001;以及美国专利5,449,752。另外,可以使用本文中所述的核酸使用标准重组方法重组产生多肽和蛋白质。参见例如Sambrook et al.,*Molecular Cloning:A Laboratory Manual*,3rd ed.,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,NY 2001;和Ausubel et al.,*Current Protocols in Molecular Biology*,Greene Publishing Associates and John Wiley&Sons,NY,1994。另外,一些CAR(包括其功能性部分和功能性变体)可以从例如植物、细菌、昆虫、哺乳动物(例如,大鼠、人等)的来源分离和/或纯化。分离和纯化的方法是本领域公知的。或者,本文中所述的CAR(包括其功能性部分和功能性变体)可以由公司商业化合成。在这方面,CAR可以是合成的、重组的、分离的和/或经纯化的。

[0162] B. 抗体和抗原结合片段

[0163] 一个实施方案还提供了与本文中所公开的一种或更多种抗原特异性结合的CAR、表达CAR的T细胞、抗体或其抗原结合结构域或部分。本文中所用的“表达CAR的T细胞”或“CAR T细胞”意指表达CAR的T细胞,并且具有由例如CAR的抗体来源靶向结构域决定的抗原特异性。

[0164] 本文中所用的“抗原结合结构域”可以包括抗体及其抗原结合片段。术语“抗体”在本文中以最广义含义使用并且涵盖多种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体),及其抗原结合片段,只要其展现出所期望的抗原结合活性即可。抗体的非限制性实例包括例如完整的免疫球蛋白及其本领域已知的保留对抗原的结合亲和力的变体和片段。

[0165] “单克隆抗体”是从基本上均一的抗体的群中获得的抗体,即除可能少量存在的可能天然存在突变之外,构成该群的单独抗体是相同的。单克隆抗体是高特异性的,定向针对单一抗原表位。修饰语“单克隆的”表示抗体从基本上均一的抗体群获得的特征,并且不被

解释为要求通过任何特定方法产生抗体。在一些实例中,单克隆抗体是由B淋巴细胞的单克隆或由其中已转染编码单一抗体的抗体轻链可变区和重链可变区(或其抗原结合片段)的核酸的细胞或其后代产生的抗体。在一些实例中,单克隆抗体从对象分离。单克隆抗体可以具有基本上对抗原结合或其他免疫球蛋白功能没有影响的保守性氨基酸替换。产生单克隆抗体的示例性方法是已知的,例如参见Harlow&Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Publications, New York (2013)。

[0166] 通常,免疫球蛋白具有通过二硫键互相连接的重(H)链和轻(L)链。免疫球蛋白基因包括 $\kappa$ 、 $\lambda$ 、 $\alpha$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 和 $\mu$ 恒定区基因,以及无数免疫球蛋白可变结构域基因。存在两种轻链类型: $\lambda$ 和 $\kappa$ 。存在五种主要的决定抗体分子的功能活性的重链种类(或同种型):IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。

[0167] 每条重链和轻链都包含恒定区(或恒定结构域)和可变区(或可变结构域;参见例如Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., 第91页(2007) )。在一些实施方案中,重链和轻链可变区组合以特异性结合抗原。在另一些实施方案中,仅需要重链可变区。例如,由仅重链组成的天然存在骆驼科抗体在不存在轻链的情况下具有功能性且稳定(参见例如Hamers-Casterman等, *Nature*, 363:446-448, 1993; Sheriff等, *Nat. Struct. Biol.*, 3:733-736, 1996)。对“VH”的提及或“VH”是指抗体重链的可变区,包括例如Fv、ScFv、dsFv或Fab的抗原结合片段的可变区。对“VL”的提及或“VL”是指抗体轻链的可变结构域,包括Fv、ScFv、dsFv或Fab的可变结构域。

[0168] 轻链和重链可变区包含被三个还被称作“互补性决定区”或“CDR”的高变区中断的“框架”区(参见例如Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services, 1991)。不同轻链或重链的框架区的序列在物种内相对保守。抗体的框架区(即组成轻链和重链的组合框架区)用于在三维空间中定位和排列CDR。

[0169] CDR主要负责与抗原表位的结合。给定CDR的氨基酸序列边界可以使用许多公知方案中的任一种来容易地确定,所述方案包括由以下描述的那些:Kabat et al. (“Sequences of Proteins of Immunological Interest,” 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991; “Kabat”编号方案), Al-Lazikani et al., (*JMB* 273, 927-948, 1997; “Chothia”编号方案)和Lefranc et al. (“IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains,” *Dev. Comp. Immunol.*, 27:55-77, 2003; “IMGT”编号方案)。每条链的CDR通常是指CDR1、CDR2和CDR3(从N端到C端),并且还通常由特定CDR所在的链鉴定。因此,VH CDR3是来自发现其的抗体的重链可变结构域的CDR3,而VL CDR1是来自发现其的抗体的轻链可变结构域的CDR1。轻链CDR有时被称为LCDR1、LCDR2和LCDR3。重链CDR有时被称为LCDR1、LCDR2和LCDR3。

[0170] “抗原结合片段”是全长抗体中保留特异性识别同源抗原的能力的部分,以及这样的部分的多种组合。抗原结合片段的非限制性实例包括Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>; 双抗体; 线性抗体; 单链抗体分子(例如scFv); 和由抗体片段形成的多特异性抗体。抗体片段包括通过整个抗体的修饰产生的抗原结合片段或使用重组DNA方法从头合成的那些(参见例如Kontermann和Dubel(编辑), *Antibody Engineering*, Vols. 1-2, 2nd Ed., Springer

Press,2010)。

[0171] 单链抗体(scFv)是包含通过合适多肽接头连接为遗传融合单链分子的一种或更多种抗体的VH和VL结构域的经遗传改造分子(参见例如Bird et al.,*Science*,242:423426,1988;Huston et al.,*Proc.Natl.Acad.Sci.*,85:5879-5883,1988;Ahmad et al.,*Clin.Dev.Immunol.*,2012,doi:10.1155/2012/980250;Marbry,*IDrugs*,13:543-549,2010)。scFv中VH结构域和VL结构域的分子内定向对于scFv通常不是决定性的。因此,可使用具有两种可能布置的scFv(VH结构域-接头结构域-VL结构域;VL结构域-接头结构域-VH结构域)。

[0172] 在dsFv中,重链和轻链可变链已经被突变以引入二硫键从而使链的缔合稳定。还包括双抗体,其是以下二价双特异性抗体,其中VH和VL结构域在单个多肽链上表达,但使用太短以致不能允许在同一链上的两个结构域之间进行配对的接头,从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点(参见例如Holliger et al.,*Proc.Natl.Acad.Sci.*,90:64446448,1993;Poljak et al.,*Structure*,2:1121-1123,1994)。

[0173] 抗体还包括经遗传改造形式例如嵌合抗体(例如人源化鼠抗体)和异缀合抗体(例如双特异性抗体)。还参见Pierce Catalog and Handbook,1994-1995(Pierce Chemical Co.,Rockford,IL);Kuby,J.,*Immunology*,3rd Ed.,W.H.Freeman&Co.,New York,1997。

[0174] 非天然存在抗体可以使用固相肽合成来构建,可以重组产生,或者可以例如通过筛选由可变重链和可变轻链组成的组合文库来获得,如Huse et al.,*Science* 246:1275-1281(1989)所述,其通过引用并入本文。这些和其他制备例如嵌合抗体、人源化抗体、CDR接枝抗体、单链抗体和双功能性抗体的方法是本领域技术人员公知的(Winter和Harris,*Immunol.Today* 14:243-246(1993);Ward et al.,*Nature* 341:544-546(1989);Harlow和Lane,同上,1988;Hilyard et al.,*Protein Engineering:A practical approach*(IRL Press 1992);Borrabeck,*Antibody Engineering*,2d ed.(Oxford University Press 1995);其各自通过引用并入本文)。

[0175] 与参考抗体“结合相同表位的抗体”是指在竞争测定中使参考抗体与其抗原的结合阻断50%或更多的抗体,反之亦然,参考抗体在竞争测定中使该抗体与其抗原的结合阻断50%或更多。抗体竞争测定是已知的,并且本文中提供了示例性的竞争测定。

[0176] “人源化”抗体或抗原结合片段包含人框架区和来自非人(例如小鼠、大鼠或合成的)抗体或抗原结合片段的一个或更多个CDR。提供CDR的非人抗体或抗原结合片段被称作“供体”,并且提供框架的人抗体或抗原结合片段被称作“接受者”。在一个实施方案中,在人源化免疫球蛋白中所有CDR都来自供体免疫球蛋白。恒定区不需要存在,但如果其存在的话,其可以基本上与人免疫球蛋白恒定区相同,例如同源性为至少约85%至90%,例如约95%或更高。因此,人源化抗体或抗原结合片段的所有部分(除可能地CDR之外)都基本上与天然人抗体序列的对应部分相同。

[0177] “嵌合抗体”是包含来源于两种不同抗体的序列的抗体,所述两种不同抗体通常是不同物种的。在一些实例中,嵌合抗体包含一个或更多个来自一种人抗体的CDR和/或框架区和来自另一种人抗体的CDR和/或框架区。

[0178] “完全人抗体”或“人抗体”是包含来自(或来源于)人基因组的序列,并且不包含来

自另一物种的序列的抗体。在一些实施方案中,人抗体包含来自(或来源于)人基因组的CDR、框架区,和(如果存在的话)Fc区。人抗体可以使用基于来源于人基因组的序列产生抗体的技术,例如通过噬菌体展示或使用转基因动物来鉴定和分离(参见例如Barbas et al. Phage display: A Laboratory Manual. 1st Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004. 印刷; Lonberg, Nat. Biotech., 23: 1117-1125, 2005; Lonenberg, Curr. Opin. Immunol., 20: 450-459, 2008)。

[0179] 抗体可具有一个或更多个结合位点。如果存在多于一个结合位点,则结合位点可彼此相同或可以是不同的。例如,天然存在的免疫球蛋白具有两个相同的结合位点,单链抗体或Fab片段具有一个结合位点,而双特异性或双功能性抗体具有两个不同的结合位点。

[0180] 测试抗体与CAR的任何功能性部分结合的能力的方法是本领域已知的并且包括任何抗体-抗原结合测定,例如如放射免疫测定(radioimmunoassay, RIA)、ELISA、Western印迹、免疫沉淀和竞争性抑制测定(参见例如, Janeway et al., 同下, 美国专利申请出版物No. 2002/0197266 A1和美国专利No. 7,338,929)。

[0181] 另外,CAR、表达CAR的T细胞、抗体或其抗原结合部分可以被修饰以包含可检测标记,例如放射性同位素、荧光团(例如,异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)、藻红蛋白(phycoerythrin, PE)、酶(例如,碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶)和元素颗粒(例如,金颗粒)。

[0182] C. 缀合物

[0183] 对本文中公开的一种或更多种抗原具有特异性的CAR、表达CAR的T细胞,或者单克隆抗体或其抗原结合片段可以使用本领域技术人员已知的任意数量方法与例如效应分子或可检测标志物的试剂缀合。共价和非共价连接方法二者都可以使用。缀合物包括但不限于其中效应分子或可检测标志物与抗体或抗原结合片段共价连接的分子,所述抗体或抗原结合片段与本文中所公开的一种或更多种抗原特异性结合。本领域技术人员将理解可以使用多种效应分子和可检测标志物,包括(但不限于)化学治疗剂、抗血管生成剂、毒素、放射性试剂(例如<sup>125</sup>I、<sup>32</sup>P、<sup>14</sup>C、<sup>3</sup>H和<sup>35</sup>S)以及其他标记、靶部分和配体等。

[0184] 特定效应分子或可检测标志物的选择取决于特定靶分子或细胞,以及期望的生物作用。因此,例如效应分子可以是用于致使特定靶细胞(例如肿瘤细胞)死亡的细胞毒素。

[0185] 用于使效应分子或可检测标志物与抗体或抗原结合片段连接的操作根据效应物的化学结构而改变。多肽通常包含多种可用于与抗体上的合适官能团反应以使效应分子或可检测标志物结合的官能团,例如羧酸基团(COOH)、游离胺基(-NH<sub>2</sub>)或巯基(-SH)。或者,抗体或抗原结合片段是衍生化的以暴露或连接另外的反应性官能团。衍生化可涉及连接多种已知接头分子例如可从Pierce Chemical Company, Rockford, IL获得的那些中的任一种。接头可以是用于将抗体或抗原结合片段与效应分子或可检测标志物连接的任何分子。接头能够与抗体或抗原结合片段并且与效应分子或可检测标志物形成共价键。合适的接头是本领域技术人员公知的并且包括但不限于直链或支链碳接头、杂环碳接头或肽接头。当抗体或抗原结合片段和效应分子或可检测标志物是多肽时,接头可通过其侧基(例如通过与半胱氨酸的二硫键)与组成氨基酸连接或者与末端氨基酸的α碳氨基和羧基基团连接。

[0186] 在数个实施方案中,接头可以包含间隔区元件,其当存在时增大接头的尺寸使得效应分子或可检测标志物与抗体或抗原结合片段之间的距离增大。示例性的间隔区是普通

技术人员已知的,并且包括以下中列举的那些:美国专利No.7,964,566、7,498,298、6,884,869、6,323,315、6,239,104、6,034,065、5,780,588、5,665,860、5,663,149、5,635,483、5,599,902、5,554,725、5,530,097、5,521,284、5,504,191、5,410,024、5,138,036、5,076,973、4,986,988、4,978,744、4,879,278、4,816,444和4,486,414,以及美国专利公开No.20110212088和20110070248,其各自通过引用整体并入本文。

[0187] 在一些实施方案中,接头在细胞内条件下是可切割的,使得在细胞内环境中接头的切割从抗体或抗原结合片段释放效应分子或可检测标志物。在另一些实施方案中,接头是不可切割的并且效应分子或可检测标志物例如通过抗体降解来释放。在一些实施方案中,接头可被存在于细胞内环境(例如在溶酶体或内体或小窝(caveolea)内)的切割剂切割。接头可以是例如被细胞内肽酶或蛋白酶(包括但不限于溶酶体或内体蛋白酶)切割的肽接头。在一些实施方案中,肽接头为至少2个氨基酸长或至少3个氨基酸长。然而,接头可以为4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸长,例如1至2、1至3、2至5、3至10、3至15、1至5、1至10、1至15个氨基酸长。蛋白酶可以包括组织蛋白酶B和组织蛋白酶D以及纤溶酶,已知其所有都水解二肽药物衍生物使得活性药物在靶细胞内释放(参见例如Dubowchik和Walker,1999,Pharm.Therapeutics83:67-123)。例如,可以使用可被巯基依赖性蛋白酶组织蛋白酶-B切割的肽接头(例如,苯丙氨酸-亮氨酸或甘氨酸-苯丙氨酸-亮氨酸-甘氨酸接头)。这样的接头的另一些实例在例如美国专利No.6,214,345中描述,其通过引用并入本文。在一个具体的实施方案中,可被细胞内蛋白酶切割的肽接头是缬氨酸-瓜氨酸接头或苯丙氨酸-赖氨酸接头(参见例如美国专利No.6,214,345,其描述了使用缬氨酸-瓜氨酸接头的多柔比星合成)。

[0188] 在另一些实施方案中,可切割接头是pH敏感性的,即在特定pH值下对水解敏感。通常,pH敏感性接头在酸性条件下是可水解的。例如,可以使用在溶酶体中可水解的酸不稳定性接头(例如,脞、缩氨基脲、缩氨基硫脲、顺乌头酰胺、原酸酯、缩醛、缩酮等)。(参见例如美国专利No.5,122,368;5,824,805;5,622,929;Dubowchik和Walker,1999,Pharm.Therapeutics 83:67-123;Neville et al.,1989,Biol.Chem.264:14653-14661.) 这样的接头在中性pH条件(例如血液中的那些)下是相对稳定的,但在低于pH 5.5或pH 5.0(溶酶体的近似pH)下不稳定。在某些实施方案中,可水解的接头是硫醚接头(例如经由酰脞键与治疗剂连接的硫醚)(参见例如美国专利No.5,622,929)。

[0189] 在另一些实施方案中,接头在还原条件下是可切割的(例如二硫化物接头)。多种二硫化物接头是本领域已知的,其包括例如可以使用以下形成的那些:SATA(N-琥珀酰亚胺-S-乙酰硫代乙酸酯)、SPDP(N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯)、SPDB(N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯)和SMPT(N-琥珀酰亚胺-氧基羰基- $\alpha$ -甲基- $\alpha$ -(2-吡啶基-二硫代)甲苯)-、SPDB和SMPT。(参见例如,Thorpe et al.,1987,Cancer Res.47:5924-5931;Wawrzynczak et al.,In Immunoconjugates:Antibody Conjugates in Radioimagery and Therapy of Cancer(C.W.Vogel编辑,Oxford U.Press,1987);Phillips et al.,Cancer Res.68:92809290,2008)。还参见美国专利No.4,880,935)。

[0190] 在另一些具体的实施方案中,接头是丙二酸酯接头(Johnson et al.,1995,Anticancer Res.15:1387-93)、马来酰亚胺基苯甲酰基接头(Lau et al.,1995,Bioorg-Med-Chem.3(10):1299-1304)或3'-N-酰胺类似物(Lau et al.,1995,Bioorg-Med-Chem.3

(10):1305-12)。

[0191] 在另一些实施方案中,接头是不可切割的并且效应分子或可检测标志物通过抗体降解而释放。(参见美国公开No.2005/0238649,其通过引用整体并入本文)。

[0192] 在数个实施方案中,接头在细胞外环境中对切割具有抗性。例如,当缀合物存在于细胞外环境中(例如在血浆中)时,缀合物样品中不多于约20%、不多于约15%、不多于约10%、不多于约5%、不多于约3%、或不多于约1%的接头被切割。接头在细胞外环境中是否对切割具有抗性可以例如通过以下确定:将包含目的接头的缀合物与血浆孵育预定时间段(例如,2小时、4小时、8小时、16小时或24小时),然后量化存在于血浆中的游离效应分子或可检测标志物的量。可以用于缀合物的不同示例性接头在WO 2004-010957、美国公开No.2006/0074008、美国公开No.20050238649和美国公开No.2006/0024317中描述,其各自通过引用整体并入本文。

[0193] 在数个实施方案中,提供了CAR、表达CAR的T细胞、抗体或其抗原结合部分与一种或更多种小分子毒素的缀合物,所述小分子毒素例如加利车霉素(calicheamicin)、美登木素生物碱、多拉司他汀类、奥瑞斯他汀类、单端孢霉烯和CC1065,以及这些毒素的具有毒素活性的衍生物。

[0194] 适合用作美登木素生物碱毒素部分的美登素化合物是本领域公知的,并且可以根据已知方法从天然来源分离,可以使用遗传工程技术产生(参见Yu et al (2002) PNAS 99:7968-7973),或者可以是根据已知方法合成制备的美登醇和美登醇类似物。美登木素生物碱是通过抑制微管蛋白聚合来起作用的有丝分裂抑制剂。美登素首次从东非灌木齿叶美登木(Maytenus serrata)分离(美国专利No.3,896,111)。随后,发现某些微生物也产生美登木素生物碱,例如美登醇和C-3美登醇酯(美国专利No.4,151,042)。合成的美登醇及其衍生物和类似物在例如以下中公开:美国专利No.4,137,230;4,248,870;4,256,746;4,260,608;4,265,814;4,294,757;4,307,016;4,308,268;4,308,269;4,309,428;4,313,946;4,315,929;4,317,821;4,322,348;4,331,598;4,361,650;4,364,866;4,424,219;4,450,254;4,362,663和4,371,533,其各自通过引用并入本文。包含美登木素生物碱的缀合物、其制备方法以及其治疗用途在例如美国专利No.5,208,020;5,416,064;6,441,163和欧洲专利EP 0 425 235 B1中公开,其公开内容在此明确地通过引用并入。

[0195] 另外的毒素可以与CAR、表达CAR的T细胞、抗体或其抗原结合部分一起使用。示例性毒素包括假单胞菌外毒素(PE)、蓖麻毒素、相思豆毒素、白喉毒素及其亚基、核毒素(ribotoxin)、核糖核酸酶、皂草素和加利车霉素,以及肉毒杆菌毒素A至F。这些毒素是本领域公知的并且许多可以容易地从商业来源获得(例如,Sigma Chemical Company, St.Louis,MO)。预期的毒素还包括毒素的变体(参见例如参见美国专利No.5,079,163和4,689,401)。

[0196] 皂草素是来源于肥皂草(Saponaria officinalis)的毒素,其通过使核糖体复合物的60S部分失活来破坏蛋白质合成(Stirpe et al.,Bio/Technology,10:405-412,1992)。然而,该毒素不具有特异性进入细胞内的机理,并且因此需要与被内化的识别细胞表面蛋白的抗体或抗原结合片段缀合以被细胞有效地摄取。

[0197] 白喉毒素从白喉棒状杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)分离。通常,用于免疫毒素的白喉毒素是突变的以降低或消除非特异性毒性。具有完全酶活性但显著降低的非特

异性毒性的被称为CRM107的突变体自20世纪70年代以来就为人所知(Laird和Groman, J.Virol.19:220,1976),并且一直用于人临床试验。参见美国专利No.5,792,458和美国专利No.5,208,021。

[0198] 蓖麻毒素是来自蓖麻(*Ricinus communis*) (蓖麻子(Castor bean))的凝集素RCA60。对于蓖麻毒素的一些实例,参见美国专利No.5,079,163和美国专利No.4,689,401。蓖麻凝集素(*Ricinus communis agglutinin*,RCA)以两种形式存在,其根据其大约65kD和120kD的分子量分别表示为RCA<sub>60</sub>和RCA<sub>120</sub>(Nicholson&Blaustein, J.Biochim.Biophys.Acta 266:543,1972)。A链负责使蛋白质合成失活和杀伤细胞。B链使蓖麻毒素与细胞表面半乳糖残基结合和促进A链转运到细胞溶质内(Olsnes et al.,Nature 249:627-631,1974和美国专利No.3,060,165)。

[0199] 还曾使核糖核酸酶与靶向分子缀合以用作免疫毒素(参见Suzuki et al., Nat.Biotech.17:265-70,1999)。示例性的核毒素例如 $\alpha$ -帚曲毒素( $\alpha$ -sarcin)和局限曲菌素在例如Rathore et al.,Gene 190:3J-5,1997;以及Goyal和Batra,Biochem.345 Pt 2: 247-54,2000中讨论。加利车霉素首次从棘孢小单孢菌(*Micromonospora echinospora*)分离并且是导致凋亡的引起DNA中双链断裂的烯二炔抗肿瘤抗生素家族的成员(参见,例如Lee et al.,J.Antibiot.42:1070-87,1989)。该药物是临床试验中免疫毒素的毒性部分(参见例如,Gillespie et al.,Ann.Oncol.11:735-41,2000)。

[0200] 相思豆毒素包括来自相思子(*Abrus precatorius*)的毒性凝集素。毒性成分相思豆毒素a、b、c和d的分子量为约63kD至67kD并且由两条二硫化物连接的多肽链A和B构成。A链抑制蛋白质合成;B链(相思豆毒素-b)与D-半乳糖残基结合(参见,Funatsu et al., Agr.Biol.Chem.52:1095,1988;和Olsnes,Methods Enzymol.50:330-335,1978)。

[0201] 对本文中所公开的一种或更多种抗原具有特异性的CAR、表达CAR的T细胞、单克隆抗体、其抗原结合片段还可以与可检测标志物缀合;例如,能够通过以下进行检测的可检测标志物:ELISA、分光光度法、流式细胞术、显微术或诊断成像技术(例如计算机断层摄影术(CT)、计算机轴向断层摄影术(CAT)扫描、磁共振成像(MRI)、核磁共振成像NMRI)、磁共振断层摄影术(MTR)、超声、纤维光学检查和腹腔镜检查。可检测标志物的具体非限制性实例包括荧光团、化学发光剂、酶连接物、放射性同位素和重金属或化合物(例如用于通过MRI检测的超顺磁性铁氧化物纳米晶体)。例如,可用的可检测标志物包括荧光化合物,包括荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、5-二甲胺-1-萘磺酰氯、藻红蛋白、镧系元素磷光体等。还使用生物发光标志物,例如萤光素酶、绿色荧光蛋白(GFP)、黄色荧光蛋白(YFP)。CAR、表达CAR的T细胞、抗体或其抗原结合部分还可以与可用于检测的酶缀合,例如辣根过氧化物酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、萤光素酶、碱性磷酸酶、葡糖氧化酶等。当CAR、表达CAR的T细胞、抗体或其抗原结合部分与可检测酶缀合时,其可以通过添加被该酶用于产生可以辨别的反应产物的另外的试剂来检测。例如,当存在试剂辣根过氧化物酶时,过氧化氢和二氨基联苯胺的添加产生在视觉上可检测的有色反应产物。CAR、表达CAR的T细胞、抗体或其抗原结合部分还可以与生物素缀合,并且通过间接测量抗生物素蛋白或链霉亲和素结合来检测。应注意的是,抗生物素蛋白本身可以与酶或荧光标记缀合。

[0202] CAR、表达CAR的T细胞、抗体或其抗原结合部分可与顺磁性试剂(例如钆)缀合。顺磁性试剂(例如超顺磁性铁氧化物)也用作标记。抗体还可以与镧系元素(例如铈和镨)和锰



缀合。抗体或抗原结合片段还可用被第二报道子识别的预定多肽表位(例如亮氨酸拉链对序列、第二抗体的结合位点、金属结合结构域、表位标签)标记。

[0203] CAR、表达CAR的T细胞、抗体或其抗原结合部分还可以与放射性标记的氨基酸缀合。放射性标记可用于诊断和治疗目的二者,例如,放射性标记可以用于通过x射线、发射谱或其他诊断技术来检测本文中所公开的一种或更多种抗原和抗原表达细胞。另外,放射性标记可在治疗上用作在对象中治疗肿瘤的毒素,例如用于治疗神经母细胞瘤。用于多肽的标记的一些实例包括但不限于以下放射性同位素或放射性核苷酸:<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>15</sup>N、<sup>35</sup>S、<sup>90</sup>Y、<sup>99</sup>Tc、<sup>111</sup>In、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I。

[0204] 检测这样的可检测标志物的方法是本领域技术人员公知的。因此,例如放射性标记可使用胶片或闪烁计数器来检测,荧光标志物可使用光检测器检测发射的光照进行检测。酶标记通常通过向酶提供底物并检测通过酶在底物上作用产生的反应产物来检测,并且比色标记通过简单地可视化着色标记来检测。

[0205] D. 核苷酸、表达、载体和宿主细胞

[0206] 本发明的一个实施方案还提供了包含编码本文中所述的任何CAR、抗体或其抗原结合部分(包括其功能性部分和功能性变体)的核苷酸序列的核酸。本发明的核酸可包含编码本文中所述的任何前导序列、抗原结合结构域、跨膜结构域和/或细胞内T细胞信号传导结构域的核苷酸序列。

[0207] 在一些实施方案中,核苷酸序列可以是经密码子修饰的。不受特定理论束缚,认为核苷酸序列的密码子优化提高mRNA转录物的翻译效率。核苷酸序列的密码子优化可涉及用另一个密码子替代天然密码子,所述另一个密码子编码相同的氨基酸但可以被更容易在细胞内获得的tRNA翻译,由此提高翻译效率。核苷酸序列的优化还可减少可能干扰翻译的次级mRNA结构,由此提高翻译效率。

[0208] 在本发明的一个实施方案中,核酸可包含编码本发明CAR的抗原结合结构域是经密码子修饰的核苷酸序列。在本发明的另一个实施方案中,核酸可包含编码本文中所述的任何CAR(包括其功能性部分和功能性变体)的经密码子修饰的核苷酸序列。

[0209] 本文中所用的“核酸”包括“多核苷酸”、“寡核苷酸”和“核酸分子”,并且通常意指DNA或RNA聚合物,其可以是单链的或双链的、合成的或从天然来源获得的(例如分离的和/或纯化的);其可以包含天然的、非天然的或被改变的核苷酸;并且其可以包含天然的、非天然的或被改变的核苷酸间连接,例如氨基磷酸酯连接或硫代磷酸酯连接,代替在未经修饰寡核苷酸的核苷酸之间存在的磷酸二酯。在一些实施方案中,核酸不包含任何插入、缺失、倒位和/或替换。然而,如本文中所讨论的,在一些情况下对核酸而言,包含一个或更多个插入、缺失、倒位和/或替换可以是合适的。

[0210] 重组核酸可以是具有非天然存在的序列或具有通过人工组合两个在其他情况下分离的序列片段制备的序列的核酸。这种人工组合通常通过化学合成或更常见地通过人工操作分离的核酸片段,例如通过遗传工程技术,例如Sambrook et al. (同上)中所述的那些来实现。核酸可以使用本领域已知的操作基于化学合成和/或酶促连接反应来构建。参见例如Sambrook et al. (同上)和Ausubel et al. (同上)。例如,核酸可以使用天然存在核苷酸或被设计成提高分子的生物稳定性或提高在杂交后形成的二联体的物理稳定性的经多种修饰核苷酸(例如硫代磷酸酯衍生物和吡啶取代的核苷酸)来化学合成。可用于产生核酸的

经修饰核苷酸的一些实例包括但不限于5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、4-乙酰胞嘧啶、5-(羧基羟甲基)尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-2-硫代尿苷、5-羧甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、 $\beta$ -D-半乳糖基腺苷(queosine)、肌苷、N6-异戊烯基腺嘌呤、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N6-取代的腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、 $\beta$ -D-甘露糖基腺苷、5'-甲氧基羧甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲硫基-N6-异戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶-5-羟乙酸(v)、怀丁氧苷(wybutoxosine)、假尿嘧啶、腺苷、2-硫胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧基乙酸甲酯、3-(3-氨基-3-N-2-羧丙基)尿嘧啶和2,6-二氨基嘌呤。或者,本发明的一种或更多种核酸可以从公司,例如Integrated DNA Technologies(Coralville,IA,USA)购买。

[0211] 核酸可以包含编码任何CAR或其功能性部分或功能性变体的任何分离或经纯化的核苷酸序列。或者,核苷酸序列可以包含任何序列的简并核苷酸序列或简并序列的组合。

[0212] 一个实施方案还提供了分离或经纯化的核酸,其包含与本文中所述任何核酸的核苷酸序列互补的核苷酸序列或在严格条件下与本文中所述任何核酸的核苷酸序列杂交的核苷酸序列。

[0213] 在严格条件下杂交的核苷酸序列可在高严格性条件下杂交。“高严格性条件”意指核苷酸序列以可检测地强于非特异性杂交的量与靶序列(本文中所述的任何核酸的核苷酸序列)特异性杂交。高严格性条件包括可以使具有精确互补序列的多核苷酸或仅包含少数分散错配的多核苷酸与偶然具有一些与核苷酸序列匹配的小区域(例如3至10个碱基)的随机序列区分开的条件。与具有14至17个碱基或更多碱基的全长互补物相比,这样的小互补性区域更容易解链,并且高严格性杂交使其容易可区分。相对高严格性条件可以包括例如低盐和/或高温条件,例如由在约50°C至70°C的温度下约0.02M至0.1M NaCl或等同物提供的。这样的高严格性条件容许核苷酸序列与模板链或靶标链之间的错配很少(如果有的话),并且特别地适合于检测任何本发明CAR的表达。通常可以理解的是,通过添加递增量的甲酰胺可以使条件更加严格。

[0214] 还提供了包含以下核苷酸序列的核酸,所述核苷酸序列与本文中所述的任何核酸具有至少约70%或更高,例如约80%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%的同一性。

[0215] 在一个实施方案中,核酸可以并入到重组表达载体中。在这点上,一个实施方案提供了包含任何核酸的重组表达载体。出于本文中的目的,术语“重组表达载体”意指以下经遗传修饰的寡核苷酸或多核苷酸构建体,其当该构建体包含编码mRNA、蛋白质、多肽或肽的核苷酸序列并且使载体与细胞在足以使mRNA、蛋白质、多肽或肽在细胞内表达的条件下接触时允许宿主细胞表达该mRNA、蛋白质、多肽或肽。载体整体上不是天然存在的。

[0216] 然而,载体的部分可以是天然存在的。重组表达载体可以包含任何类型的核苷酸,包括但不限于DNA和RNA,其可以是单链的或双链的、合成的或部分从天然来源获得的,并且其可以包含天然的、非天然的或被改变的核苷酸。重组表达载体可以包含天然存在或非天然存在的核苷酸间连接,或两种类型的连接。优选地,非天然存在或被改变的核苷酸或核苷酸间连接不阻碍载体的转录或复制。

[0217] 在一个实施方案中,重组表达载体可以是任何合适的重组表达载体,并且可以用于转化或转染任何合适的宿主细胞。合适的载体包括针对增殖和扩增或针对表达或二者而设计的那些,例如质粒和病毒。载体可以选自pUC系列(Fermentas Life Sciences,Glen Burnie,MD)、pBluescript系列(Stratagene,LaJolla,CA)、pET系列(Novagen,Madison,WI)、pGEX系列(Pharmacia Biotech,Uppsala,Sweden)和pEX系列(Clontech,Palo Alto,CA)。

[0218] 还可以使用噬菌体载体例如 $\lambda$ UT10、 $\lambda$ UT1 1、 $\lambda$ ZapII(Stratagene)、EMBL4和 $\lambda$ NMI 149。植物表达载体的一些实例包括pBI01、pBI101.2、pBH01.3、pBI121和pBIN19(Clontech)。动物表达载体的一些实例包括pEUK-C1、pMAM和pMAMneo(Clontech)。重组表达载体可以是病毒载体,例如逆转录病毒载体或慢病毒载体。慢病毒载体是来源于慢病毒基因组的至少一部分的载体,尤其包括自我失活慢病毒载体,如Milone et al.,Mol.Ther.17(8):1453-1464(2009)中提供的。可用于临床的慢病毒载体的另一些实例包括例如但不限于来自Oxford BioMedica plc的LENTIVECTOR.RTM.基因递送技术、来自Lentigen的LENTIMAX.TM.载体系统等。慢病毒载体的非临床类型也是可用的并且是本领域技术人员已知的。

[0219] 多种转染技术是本领域公知的(参见例如,Graham et al.,Virology,52:456-467(1973);Sambrook et al.(同上);Davis et al.,Basic Methods in Molecular Biology,Elsevier(1986);以及Chu et al.,Gene,13:97(1981))。

[0220] 转染方法包括磷酸钙共沉淀(参见例如,Graham et al.,同上)、直接微注射到培养的细胞内(参见例如,Capecci,Cell,22:479-488(1980))、电穿孔(参见例如,Shigekawa et al.,BioTechniques,6:742-751(1988))、脂质体介导的基因转移(参见例如,Mannino et al.,BioTechniques,6:682-690(1988))、脂质介导的转导(参见例如,Feigner et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,84:7413-7417(1987))和使用高速微型射弹的核酸递送(参见例如,Klein et al.,Nature,327:70-73(1987))。

[0221] 在一个实施方案中,重组表达载体可以使用例如Sambrook et al.(同上)和Ausubel et al.(同上)中描述的标准重组DNA技术来制备。环形或线性的表达载体构建体可以制备成包含在原核或真核宿主细胞中具有功能性的复制系统。复制系统可以来源于例如ColE1、2 $\mu$ 质粒、 $\lambda$ 、SV40、牛乳头瘤病毒等。

[0222] 重组表达载体可包含调节序列,例如转录和翻译起始和终止密码子,所述调节序列对需向其中引入载体的宿主细胞的类型(例如,细菌、真菌、植物或动物)具有特异性,这视情况而定并且考虑载体是基于DNA还是基于RNA。重组表达载体可包含限制性位点以有利于克隆。

[0223] 重组表达载体可以包含一个或更多个允许选择转化或转染的宿主细胞的标记基因。标记基因包括杀生物剂抗性,例如抗生素、重金属抗性等;营养缺陷型宿主中提供原养型的互补等。用于本发明表达载体的合适的标记基因包括例如新霉素/G418抗性基因、潮霉素抗性基因、组氨酸抗性基因、四环素抗性基因和氨苄西林抗性基因。

[0224] 重组表达载体可以包含与编码CAR(包括其功能性部分和功能性变体)的核苷酸序列或与与编码CAR之核苷酸序列互补或杂交的核苷酸序列可操作连接的天然或非天然启动子。启动子的选择(例如,强的、弱的、诱导型的、组织特异性的和发育特异性的)在技术人员

的普通技术之内。类似地,核苷酸序列与启动子的组合也在技术人员的技术之内。启动子可以是非病毒启动子或病毒启动子,例如巨细胞病毒(CMV)启动子、SV40启动子、RSV启动子,或在鼠干细胞病毒的长末端重复中发现的启动子。

[0225] 重组表达载体可以被设计用于瞬时表达、用于稳定表达或用于二者。另外,重组表达载体可以被制成用于组成型表达或用于诱导型表达。

[0226] 另外,重组表达载体可以被制备成包含自杀基因。本文中所述的术语“自杀基因”是指引起表达该自杀基因的细胞死亡的基因。自杀基因可以是以下基因:其赋予其中表达该基因的细胞以针对试剂(例如药物)的敏感性,并且当使细胞与试剂接触或暴露于试剂时引起细胞死亡。自杀基因是本领域已知的(参见例如,Suicide Gene Therapy:Methods and Reviews, Springer, Caroline J. (Cancer Research UK Centre for Cancer Therapeutics at the Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey, UK), Humana Press, 2004) 并且包括例如单纯疱疹病毒(HSV)胸苷激酶(TK)基因、胞嘧啶脱氨酶、嘌呤核苷磷酸化酶和硝基还原酶。

[0227] 一个实施方案还提供了包含本文中所述的任何重组表达载体的宿主细胞。本文中所述的术语“宿主细胞”是指可以包含本发明的重组表达载体的任何类型的细胞。宿主细胞可以是真核细胞,例如植物、动物、真菌或藻类,或者可以是原核细胞,例如细菌或原生动物。宿主细胞可以是培养的细胞或原代细胞,即直接从生物体(例如人)分离。宿主细胞可以是黏附细胞或悬浮细胞,即悬浮生长的细胞。合适的宿主细胞是本领域已知的并且包括例如DH5a大肠杆菌(*E. coli*)细胞、中国仓鼠卵巢细胞、猴VERO细胞、COS细胞、HEK293细胞等。出于扩增或复制重组表达载体的目的,宿主细胞可以是原核细胞,例如DH5a细胞。出于产生重组CAR的目的,宿主细胞可以是哺乳动物细胞。宿主细胞可以是人细胞。当宿主细胞可以是任何细胞类型,可以来源于任何类型的组织,并且可以在任何发育阶段时,宿主细胞可以是外周血淋巴细胞(peripheral blood lymphocyte, PBL)或外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。宿主细胞可以是T细胞。

[0228] 出于本文中的目的,T细胞可以是任何T细胞,例如培养的T细胞,例如原代T细胞,或来自培养的T细胞系的T细胞,例如Jurkat、SupT1等,或从哺乳动物获得的T细胞。如果从哺乳动物获得,则T细胞可以从许多来源获得,包括但不限于血液、骨髓、淋巴结、胸腺或其他组织或流体。T细胞还可以是经富集或纯化的。T细胞可以是人T细胞。T细胞是从人分离的T细胞。T细胞可以是任何类型的T细胞并且可以在任何发育阶段,包括但不限于CD4+/CD8+双阳性T细胞、CD4+辅助性T细胞(例如Th1和Th2细胞)、CD8+T细胞(例如细胞毒性T细胞)、肿瘤浸润细胞、记忆T细胞、记忆干细胞(即Tscm)、幼稚T细胞等。T细胞可以是CD8+T细胞或CD4+T细胞。

[0229] 在一个实施方案中,本文中所述的CAR可以用于合适的非T细胞。这样的细胞是具有免疫效应功能的那些,例如NK细胞和由多能干细胞产生的T样细胞。

[0230] 一个实施方案还提供了包含至少一种本文中所述的宿主细胞的细胞群。细胞群可以是异质的群体,其包含含有所述任何重组表达载体的宿主细胞以及至少一种其他细胞,例如不包含任何重组表达载体的宿主细胞(例如T细胞)或不同于T细胞的细胞,例如B细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、红细胞、肝细胞、内皮细胞、上皮细胞、肌细胞、脑细胞等。或者,细胞群可以是基本上同质的群体,其中该群体主要包含含有重组表达载体的宿主细胞(例如

基本上由其组成)。该群体还可以是克隆细胞群,其中该群体中的所有细胞都是包含重组表达载体的单宿主细胞的克隆,使得该群体中的所有细胞都包含重组表达载体。在本发明的一个实施方案中,细胞群如本文中所述是包含含有重组表达载体的宿主细胞的克隆群。

[0231] CAR(包括其功能性部分和变体)、核酸、重组表达载体、宿主细胞(包括其群体)和抗体(包括其抗原结合部分)可以是分离和/或经纯化的。例如,经纯化的(或分离的)宿主细胞制备物是其中宿主细胞比在其体内天然环境中的细胞纯度更高的宿主细胞制备物。这样的宿主细胞可以例如通过标准纯化技术来产生。在一些实施方案中,宿主细胞的制备物被纯化使得宿主细胞代表制备物的总细胞含量的至少约50%,例如至少约70%。例如,纯度可以为至少约50%,可以大于约60%、约70%或约80%,或者可以为约100%。

[0232] E. 治疗方法

[0233] 预期本文中所公开的CAR可以用于在哺乳动物中治疗或预防疾病的方法。在这点上,一个实施方案提供了在哺乳动物中治疗或预防癌症的方法,其包括以有效地在该哺乳动物中治疗或预防癌症的量向该哺乳动物施用CAR、核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群、抗体和/或其抗原结合部分,和/或药物组合物。

[0234] 一个实施方案还包括在施用本文中所公开的CAR之前对哺乳动物进行淋巴细胞清除(lymphodeplete)。淋巴细胞清除的一些实例包括但可不限于非骨髓性淋巴细胞清除化学治疗、骨髓性淋巴细胞清除化学治疗、全身照射等。

[0235] 出于其中施用宿主细胞或细胞群的方法的目的,细胞可以是哺乳动物同种异体或自体的细胞。优选地,细胞是哺乳动物自体的。如本文中所用的,同种异体意指以下任何材料,其与该材料被引入的个体来源于相同物种的不同动物。当一个或多个基因座的基因不相同,两个或多个个体被认为彼此是同种异体的。在一些方面,来自相同物种的个体的同种异体材料可以在遗传上充分不相似以在抗原性上相互作用。本文中所用的“自体的”意指以下任何材料,其来源于与该材料稍后被重新引入到的个体中的同一个体。

[0236] 本文中提及的哺乳动物可以是任何哺乳动物。本文中所用的术语“哺乳动物”是指任何哺乳动物,包括但不限于啮齿目的哺乳动物,例如小鼠和仓鼠;和兔形目的哺乳动物,例如兔。哺乳动物可来自食肉目,包括猫科(猫)和犬科(犬)。哺乳动物可来自偶蹄目,包括牛科(牛)和猪科(猪);或者是奇蹄目,包括马科(马)。哺乳动物可以是灵长目、Ceboid目或Simoid目(猴);或者是类人猿目(人和猿)。优选地,哺乳动物是人。

[0237] 关于方法,癌症可以是任何癌症,包括以下中的任一种:急性淋巴细胞癌症、急性髓性白血病、腺泡状横纹肌肉瘤、膀胱癌症(例如,膀胱癌)、骨癌、脑癌(例如,髓母细胞瘤)、乳腺癌,肛门癌、肛管癌或肛门直肠癌,眼癌、肝内胆管癌、关节癌,颈癌、胆囊癌或胸膜癌,鼻癌、鼻腔癌或中耳癌,口腔癌、外阴癌、慢性淋巴细胞白血病、慢性骨髓癌、结肠癌、食管癌、宫颈癌、纤维肉瘤、胃肠类癌肿瘤、头颈癌(例如,头颈鳞状细胞癌)、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、肾癌、喉癌、白血病、液体肿瘤、肝癌、肺癌(例如,非小细胞肺癌和肺腺癌)、淋巴瘤、间皮瘤、肥大细胞瘤、黑素瘤、多发性骨髓瘤、鼻咽癌、非霍奇金淋巴瘤、B-慢性淋巴细胞白血病、多毛细胞白血病、急性淋巴细胞白血病(ALL)和伯基特淋巴瘤、卵巢癌、胰腺癌、腹膜癌、网膜癌和肠系膜癌、咽癌、前列腺癌、直肠癌、肾癌、皮肤癌、小肠癌、软组织癌、实体瘤、滑膜肉瘤、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌和输尿管癌。

[0238] 本文中所用的术语“治疗”和“预防”以及来源于其的词语并不一定意指100%或完

全的治疗或预防。相反,存在本领域普通技术人员视为具有潜在益处或治疗效果的不同程度的治疗或预防。在这一方面,所述方法可以在哺乳动物中提供任何量或任何水平的癌症治疗或预防。

[0239] 此外,由所述方法提供的治疗或预防可以包括治疗或预防被治疗或预防的疾病(例如,癌症)的一种或更多种状况或症状。另外,出于本文中的目的,“预防”可以涵盖延迟疾病或其症状或状况的发作。

[0240] 另一个实施方案提供了在哺乳动物中检测癌症的存在的方法,其包括:(a)使包含来自哺乳动物的一种或更多种细胞的样品与CAR、核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群、抗体和/或其抗原结合部分,或药物组合物接触,从而形成复合物;(b)以及检测复合物,其中复合物的检出指示哺乳动物中癌症的存在。

[0241] 样品可通过任何合适的方法(例如,活检或尸体剖检)获得。活检是从个体中移出组织和/或细胞。这样的移出可以是为了从个体中收集组织和/或细胞以对所移出的组织和/或细胞进行实验。该实验可包括确定个体是否已患有和/或患有特定病症或疾病状态的实验。该病症或疾病可以是例如癌症。

[0242] 对于在哺乳动物中检测增生性病症(例如,癌症)的存在的方法的一个实施方案,包含哺乳动物的细胞的样品可以是包含全细胞、全细胞裂解物或全细胞裂解物的级分(例如细胞核或细胞质级分、全蛋白质级分或核酸级分)的样品。如果样品包含全细胞,则细胞可以是哺乳动物的任何细胞,例如任何器官或组织的细胞,包括血细胞或内皮细胞。

[0243] 对于哺乳动物,接触可以发生在体外或体内。优选地,接触是在体外。

[0244] 另外,复合物的检测可以通过本领域已知的任意数量的方式进行。例如,本文中所述的本文中所公开CAR、多肽、蛋白质、核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群,或者抗体或其抗原结合部分可以用可检测标记进行标记,所述可检测标记例如如上文所公开的放射性同位素、荧光团(例如,异硫氰酸荧光素(FITC)、藻红蛋白(PE))、酶(例如,碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶)和元素颗粒(例如,金颗粒)。

[0245] 测试CAR识别靶细胞的能力和抗原特异性的方法是本领域已知的。例如,Clay et al., J. Immunol, 163:507-513 (1999) 教导了测量细胞因子(例如干扰素- $\gamma$ 、粒细胞/单核细胞集落刺激因子(GM-CSF)、肿瘤坏死因子a (TNF-a) 或白介素2 (IL-2)) 的释放的方法。另外, CAR功能可以通过测量细胞的细胞毒性来评价,如Zhao et al., J. Immunol, 174:4415-4423 (2005) 中所述。

[0246] 另一个实施方案提供了本发明的CAR、核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群、抗体或其抗原结合部分,和/或药物组合物用于在哺乳动物中治疗或预防增生性病症(例如癌症)的用途。癌症可以是本文中所述的任何癌症。

[0247] 任何施用方法都可以用于公开的治疗剂,包括局部和系统施用。例如,可以使用表面、经口、血管内(例如静脉内)、肌内、腹膜内、鼻内、皮内、鞘内和皮下施用。具体的施用模式和剂量方案将由主治临床医师考虑病例的具体情况(例如对象、疾病、涉及的疾病状态和治疗是否是预防性的)来选择。在其中施用多于一种药剂或组合物的情况下,可使用一种或更多种施用途径;例如化学治疗剂可经口施用并且抗体或抗原结合片段或缀合物或组合物可静脉内施用。施用方法包括注射,在此情况下,在例如以下的无毒可药用载体中提供CAR、CAR T细胞、缀合物、抗体、抗原结合片段或组合物:水、盐水、林格溶液、右旋糖溶液、5%人

血清白蛋白、不挥发油 (fixed oil)、油酸乙酯或脂质体。在一些实施方案中,可以使用所公开化合物的局部施用,例如通过将抗体或抗原结合片段施加到已从中除去肿瘤的组织区域,或被怀疑倾向于肿瘤发生的区域。在一些实施方案中,包含治疗有效量抗体或抗原结合片段的药物制剂的持续瘤内(或肿瘤附近)释放可以是有益的。在另一些实例中,缀合物作为滴眼剂表面施加到角膜,或玻璃体内施加到眼中。

[0248] 所公开的治疗剂可以被配制成适合于精确剂量的单次施用的单位剂量形式。另外,所公开的治疗剂可以以恒剂量或以多剂量方案来施用。多剂量方案是以下方案:其中初级治疗过程可具有多于一个单独剂量,例如1至10个剂量,然后以后续时间间隔根据需要给予其他剂量以维持或加强组合物作用。治疗可以涉及在数天至数月或甚至数年的时期内的化合物的日剂量或多个日剂量。因此,剂量方案还将至少部分地基于待治疗对象的特定需求来确定并且将取决于施用医师的判断。

[0249] 抗体或缀合物的通常剂量可以为约0.01mg/kg至约30mg/kg,例如约0.1mg/kg至约10mg/kg。

[0250] 在一些具体实例中,基于多次每日给药方案(例如至少连续2天、连续10天等)向对象施用包含一种或更多种缀合物、抗体、组合物、CAR、CAR T细胞或另外的药剂的治疗性组合物例如数周、数月或数年的时间。在一个实例中,向对象施用缀合物、抗体、组合物或另外的药剂至少30天,例如至少2个月、至少4个月、至少6个月、至少12个月、至少24个月或至少36个月的时间。

[0251] 在一些实施方案中,所公开的方法包括与所公开的抗体、抗原结合片段、缀合物、CAR或表达CAR的T细胞组合(例如依次地、基本上同时或同时)向对象提供外科手术、放射治疗和/或化学治疗。这样的药剂和治疗的方法和治疗剂量是本领域技术人员已知的,并且可以由熟练的临床医师来确定。用于另外的药剂的制备和给药方案可根据制造商的说明来使用或如由技术人员凭经验确定的。用于这样的化学治疗的制剂和给药方案还在Chemotherapy Service, (1992) 编辑, M.C.Perry, Williams&Wilkins, Baltimore, Md中描述。

[0252] 在一些实施方案中,组合治疗可以包括向对象施用治疗有效量的另外的癌症抑制剂。可以用于组合治疗的另外的治疗剂的非限制性实例包括微管结合剂、DNA嵌入剂或交联剂、DNA合成抑制剂、DNA和RNA转录抑制剂、抗体、酶、酶抑制剂、基因调节剂和血管生成抑制剂。这些药剂(其以治疗有效量施用)和治疗可以单独或组合使用。例如,任何合适的抗癌剂或抗血管生成剂都可以与本文中所公开的CAR、CAR-T细胞、抗体、抗原结合片段或缀合物组合施用。这样的药剂的方法和治疗剂量是本领域技术人员已知的,并且可以由熟练的临床医师来确定。

[0253] 另外的化学治疗剂包括但不限于烷化剂,例如氮芥(nitrogen mustard)(例如,苯丁酸氮芥、氯甲胺(chlormethine)、环磷酰胺、异环磷酰胺和美法仑)、亚硝基脲(例如,卡莫司汀、福莫司汀、洛莫司汀和链佐星)、铂化合物(例如,卡铂、顺铂、奥沙利铂和BBR3464)、白消安、达卡巴嗪、二氯甲二乙胺、丙卡巴肼、替莫唑胺、噻替派和尿嘧啶氮芥;抗代谢物,例如叶酸(例如,氨甲蝶呤、培美曲塞和雷替曲塞)、嘌呤(例如克拉屈滨、氯法拉滨、氟达拉滨、巯基嘌呤和硫鸟嘌呤(tioguanine))、嘧啶(例如,卡培他滨)、阿糖胞苷、氟尿嘧啶和吉西他滨;植物生物碱,例如鬼臼(podophyllum)(例如,依托泊苷和替尼泊苷)、紫杉烷类(例如,多

西他赛和紫杉醇)、长春花类(例如,长春花碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨);细胞毒性/抗肿瘤抗生素,例如蒽环类家族成员(例如,柔红霉素、多柔比星、表柔比星、伊达比星、米托蒽醌和戊柔比星)、博来霉素、利福平、羟基脲(hydroxyurea)和丝裂霉素;拓扑异构酶抑制剂,例如拓扑替康和伊立替康;单克隆抗体,例如阿仑单抗、贝伐珠单抗、西妥昔单抗、吉姆单抗、利妥昔单抗、帕尼单抗、帕妥珠单抗和曲妥珠单抗;光敏剂,例如氨基乙酰丙酸、氨基乙酰丙酸甲酯、卟吩姆钠和维替泊芬;以及其他药剂,例如阿利维A酸、六甲蜜胺、安吡啶、阿那格雷、三氧化二砷、天冬酰胺酶、阿西替尼、贝沙罗汀、贝伐珠单抗、硼替佐米、塞来昔布、地尼白介素(denileukin diftitox)、厄洛替尼、雌莫司汀、吉非替尼、羟基脲(hydroxycarbamide)、伊马替尼、拉帕替尼、帕唑帕尼、喷司他丁、马索丙考、米托坦、培门冬酶、他莫昔芬、索拉非尼、舒尼替尼、维罗非尼(vemurafinib)、凡德他尼和维甲酸(tretinoin)。这样的药剂的选择和治疗剂量是本领域技术人员已知的,并且可以由熟练的临床医师来确定。

[0254] 组合治疗可提供协同作用并且证明具有协同性,即当活性成分一起使用时达到的效果大于由单独使用化合物产生的效果的总和。当活性成分:(1)在组合的单位剂量制剂中共配制并同时施用或递送;(2)以单独制剂交替或并行递送;或(3)通过另一些方案进行时,可获得协同作用。当交替递送时,当化合物依次施用或递送,例如在单独的注射器中通过不同的注射剂依次施用或递送时,可获得协同作用。通常来说,在交替期间,每种活性成分的有效剂量依次施用,即先后施用,然而在组合治疗中,两种或更多种活性成分的有效剂量一起施用。

[0255] 在一个实施方案中,在抗癌治疗后向患有肿瘤的对象施用有效量的与一种或更多种本文中公开抗原特异性结合的抗体或抗原结合片段或其缀合物。在已经过足够时间量以允许施用的抗体或抗原结合片段或缀合物与在对应癌细胞上表达的抗原形成免疫复合物之后,检测免疫复合物。免疫复合物的存在(或不存在)指示治疗的有效性。例如,与在治疗前获取的对照相比免疫复合物增加指示该治疗是无效的,然而与在治疗前获取的对照相比免疫复合物减少指示该治疗是有效的。

#### [0256] F. 生物药物组合物

[0257] 本文中提供了用于基因治疗、免疫治疗和/或细胞治疗的生物药物组合物或生物制剂组合物(在下文中“组合物”),其包括在载体(例如可药用载体)中的与一种或更多种本文中公开抗原特异性结合的一种或更多种所公开CAR、或表达CAR的T细胞、抗体、抗原结合片段、缀合物、CAR、或表达CAR的T细胞。组合物可以以单位剂量形式制备用于向对象施用。施用的量和时机由治疗临床医师决定以达到期望结果。组合物可以被配制成用于系统(例如静脉内)或局部(例如瘤内)施用。在一个实例中,所公开的CAR、或表达CAR的T细胞、抗体、抗原结合片段、缀合物被配制成用于肠胃外施用,例如静脉内施用。包含本文中公开CAR、或表达CAR的T细胞、缀合物、抗体或抗原结合片段的组合物用于例如肿瘤的治疗和检测,所述肿瘤例如但不限于神经母细胞瘤。在一些实例中,组合物可用于癌的治疗或检测。包含如本文中公开CAR、或表达CAR的T细胞、缀合物、抗体或抗原结合片段的组合物还用于例如病理性血管生成的检测。

[0258] 用于施用的组合物可以包括溶解在可药用载体(例如水性载体)中的CAR、或表达CAR的T细胞、缀合物、抗体或抗原结合片段的溶液。可以使用多种水性载体,例如缓冲盐水



等。这些溶液是无菌的并且通常不含不期望的物质。这些组合物可通过常规的公知灭菌技术来灭菌。这些组合物可根据需要包含可药用的辅助物质以接近生理条件,例如pH调节剂和缓冲剂、毒性调节剂、辅助剂等,例如乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠等。这些制剂中CAR、或表达CAR的T细胞、抗体或抗原结合片段或缀合物的浓度可以广泛地变化,并且根据所选具体施用模式和对象需求将主要基于流体体积、黏度、体重等来选择。制备这样的剂型用于基因治疗、免疫治疗和/或细胞治疗的实际方法对于本领域技术人员是已知的或将是明显的。

[0259] 用于静脉内施用的典型组合物包含约0.01mg/kg至约30mg/kg的抗体或抗原结合片段或缀合物/对象/天(或对应剂量的包含抗体或抗原结合片段的CAR、或表达CAR的T细胞、缀合物)。用于制备可施用组合物的实际方法对本领域技术人员将是已知或明显的并且在例如Remington's Pharmaceutical Science, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1995)的出版物中更详细地描述。

[0260] CAR、或表达CAR的T细胞、抗体、抗原结合片段或缀合物可以以冻干形式提供并且在施用之前用无菌水再水化,但是其也以已知浓度的无菌溶液提供。然后将CAR、或表达CAR的T细胞、抗体或抗原结合片段或缀合物溶液添加到包含0.9%氯化钠(USP)的输注袋中,并且在一些情况下以0.5mg/kg至15mg/kg体重的剂量施用。本领域中在抗体或抗原结合片段和缀合物药物的施用方面有相当多的经验可供使用;例如自1997年Rituxan®获批以来,抗体药物一直在美国销售。CAR、或表达CAR的T细胞、抗体、抗原结合片段及其缀合物可以通过缓慢输注而不是以静脉内推注或浓注来施用。在一个实例中,施用较高的负荷剂量,随后以较低水平施用维持剂量。例如,可以在大约90分钟的时间内输注4mg/kg抗体或抗原结合片段的初始负荷剂量(或包含抗体或抗原结合片段的缀合物的对应剂量),随后如果在前剂量耐受良好,则在30分钟时间内输注2mg/kg的每周维持剂量进行4至8周。

[0261] 受控释放肠胃外制剂可以被制备成植入物、油性注射剂,或制备成颗粒系统。对于蛋白质递送系统的概述,参见Banga, A.J., Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, PA, (1995)。颗粒系统包括微球体、微粒、微胶囊剂、纳米胶囊剂、纳米球体和纳米粒。微胶囊剂包含治疗性蛋白质(例如细胞毒素或药物)作为中心核。在微球体中,治疗剂分散在整个颗粒中。小于约1 $\mu$ m的颗粒、微球体和微胶囊剂通常分别是指纳米粒、纳米球体和纳米胶囊剂。毛细管的直径为约5 $\mu$ m使得只有纳米粒静脉内施用。微粒的直径通常为约100 $\mu$ m并且皮下或肌内施用。参见例如, Kreuter, J., Colloidal Drug Delivery Systems, J. Kreuter, 编辑, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, pp. 219-342 (1994); 和 Tice & Tabibi, Treatise on Controlled Drug Delivery, A. Kydonieus, 编辑, Marcel Dekker, Inc. New York, NY, pp. 315-339, (1992)。

[0262] 聚合物可以用于本文中所公开的CAR、或表达CAR的T细胞、抗体或抗原结合片段或缀合物组合物的离子控制释放。用于受控药物递送的多种可降解和不可降解的聚合物基质是本领域已知的(Langer, Accounts Chem. Res. 26:537-542, 1993)。例如,嵌段共聚物泊洛沙姆407在低温下作为黏性但是可活动的液体存在,但在体温下形成半固体凝胶。已经表明,其是用于重组白介素-2和脲酶的配制和持续递送的有效载剂(Johnston et al., Pharm. Res. 9:425-434, 1992; 和 Pec et al., J. Parent. Sci. Tech. 44(2):58-65, 1990)。或

者,羟基磷灰石已经作为微载体用于蛋白质的受控释放(Ijntema et al., Int.J.Pharm.112:215-224,1994)。在另一方面中,脂质体被用于脂质包封的药物的受控释放以及药物靶向(Betageri et al.,Liposome Drug Delivery Systems,Technomic Publishing Co.,Inc.,Lancaster,PA(1993))。许多用于治疗性蛋白质的受控递送的另外的系统是已知的(参见美国专利No.5,055,303;美国专利No.5,188,837;美国专利No.4,235,871;美国专利No.4,501,728;美国专利No.4,837,028;美国专利No.4,957,735;美国专利No.5,019,369;美国专利No.5,055,303;美国专利No.5,514,670;美国专利No.5,413,797;美国专利No.5,268,164;美国专利No.5,004,697;美国专利No.4,902,505;美国专利No.5,506,206;美国专利No.5,271,961;美国专利No.5,254,342和美国专利No.5,534,496)。

#### [0263] G. 药盒

[0264] 在一个方面中,还提供了使用本文中所公开的CAR的药盒。例如,药盒用于在对象中治疗肿瘤,或用于制备表达本文中所公开的一种或更多种CAR的CAR T细胞。如本文中所公开的,药盒将通常包含所公开的抗体、抗原结合片段、缀合物、核酸分子、CAR或表达CAR的T细胞。药盒中可以包含多于一种所公开的抗体、抗原结合片段、缀合物、核酸分子、CAR或表达CAR的T细胞。

[0265] 药盒可以包含容器和在容器上或附在容器的标记或包装插入物。合适的容器包括例如瓶、小瓶、注射器等。容器可以由多种材料(例如玻璃或塑料)形成。容器通常容纳包含一种或更多种所公开的抗体、抗原结合片段、缀合物、核酸分子、CAR或表达CAR的T细胞的组合物。在一些实施方案中,容器可具有无菌入口(例如容器可以是静脉内溶液袋或具有可通过皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。标记或包装插入物指示该组合物用于治疗特定病症。

[0266] 标记或包装插入物通常还会包括例如在治疗或预防肿瘤或制备CAR T细胞的方法中使用所公开的抗体、抗原结合片段、缀合物、核酸分子、CAR或表达CAR的T细胞的说明书。包装插入物通常包括在治疗性产品的商业包装中通常包括的说明书,其包含关于与使用这样的治疗性产品相关的适应证、用法、剂量、施用、禁忌和/或警告的信息。说明性材料可以以电子形式(例如计算机磁盘或压缩光盘)书写或可以是可视化的(例如视频文件)。药盒还可包含有利于该药盒被设计用于的特定应用的另外的组分。因此,例如,药盒可另外地包含检测标记的工具(例如用于酶标记的酶底物、检测荧光标记的滤光器装置、合适的第二标记(例如第二抗体)等)。药盒可另外地包含通常用于特定方法的实践的缓冲剂和其他试剂。这样的药盒和合适的内容物是本领域技术人员公知的。

### 实施例

[0267] 通过以下实施例对本发明进行进一步举例说明,这些实施例不应以任何方式解释为对本发明范围施加限制。相反,应清楚地理解,可寻求多个其他实施方案、其修改方案和等同方案,其在本领域技术人员阅读本文中的说明之后可以是明显的而不脱离本发明的精神和/或所附权利要求书的范围。

#### [0268] 实施例1

[0269] 串联CD19/CD20 CAR慢病毒载体驱动白血病细胞系中的靶向和脱靶(Off-Target)抗原调节

[0270] 在许多中心中目前正在评价用经遗传改造的自体人T细胞进行的针对癌症的过继免疫治疗。建立过继免疫治疗细胞群的一种常用方法是通过单采术 (apheresis) 从患者分离T细胞,并用整合到宿主基因组中并表达嵌合抗原受体 (CAR) 的逆转录病毒载体或慢病毒载体离体转导这些细胞,在[1]中综述。嵌合抗原受体是通过连接来自免疫活性蛋白不同亚基的功能性序列结构域而产生的。例如,可以将由抗CD19或抗CD20抗体的VH和VL结构域创建的scFv结构域与来源于CD28或CD8的跨膜序列连接,并随后与来源于CD3- $\zeta$ 链和CD28或CD137的细胞内信号传导结构域连接[2,3]。因此,CAR在单个跨膜蛋白中赋予了来源于scFv的结合结构域和所连接的信号传导结构域二者,从而激活了载体转导的T细胞。这种转导的T细胞群 (CAR-T) 现在可以功能性地靶向带有同源抗原的细胞,用于通过主动细胞裂解以及通过细胞因子 (例如干扰素- $\gamma$  (IFN  $\gamma$ )、白介素-2 (IL-2) 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF $\alpha$ )) 的产生而形成 (marshaled) 的间接免疫效应机制进行破坏。已证明,用特异性靶向CD19的嵌合抗原受体修饰的T细胞进行的过继免疫治疗有效对抗儿科pre-B ALL [4,5]。在成人血液学恶性肿瘤中,CAR修饰的T细胞的有效性更加不同。

[0271] 虽然在宾夕法尼亚大学对3名CLL患者进行抗CD19 CAR-T治疗的经验似乎表明普遍的阳性响应,但NCI的外科 (Surgery Branch) 报道了在8名患有成体B细胞恶性肿瘤的患者的不同集合中的部分响应、疾病稳定和一个完全响应的混合体 [6,7]。因此,抗CD19 CAR不是普遍有效的,并且可以受益于其抗肿瘤靶向潜力的进一步增强。Thomas-Tikhonenko的实验室已经很好地描述了在抗CD19 CAR-T治疗期间B-ALL所采用的逃逸机制,其包括CD19的可变剪接、移码突变和错义突变 [8]。CAR-T产品的拓宽的靶标范围以及以更大的效果靶向恶性肿瘤的一种方法是在单一CAR结构中包含两个结合结构域。串联的表达CD19和CD20的恶性肿瘤包括慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、毛细胞白血病 (hairy cell leukemia, HCL)、套细胞淋巴瘤 (mantle cell lymphoma, MCL)、幼淋巴细胞白血病 (prolymphocytic leukemia, PLL) 和伴绒毛淋巴细胞脾淋巴瘤 (splenic lymphoma with villous lymphocyte, SLVL) [9]。靶向这两种抗原的单一CAR载体将靶向更广泛多种的血液学恶性肿瘤,并且可更有效地靶向它们。

[0272] 在该实施例中,通过在与一系列单一特异性和串联特异性CAR-T构建体二者共培养后测试CD19+CD20+Raji细胞系上这两种靶抗原的表达来模拟串联CAR构建体的提高的有效性。在这种白血病细胞系中证明了存在迅速的CD19靶抗原下调机制。令人惊讶地,靶抗原下调也包括非靶向B细胞受体分子,包括CD22,其未被任何载体构建体靶向。用我们的串联靶向载体更快地丧失靶细胞数目表明存在更强的抗白血病免疫压力。通过白血病细胞系逃脱免疫压力的动力学,特别是当使用单一特异性CAR时,表明抗原调节是白血病细胞的既有特性,而不是取决于对基因逃逸突变体的选择的靶抗原调节或丢失机制。

[0273] 材料和方法

[0274] 细胞系 (PBMC和靶标)

[0275] 除非另有说明,否则所有细胞系和试剂均购自美国组织培养物保藏中心 (American Tissue Culture Collection) (ATCC, Manassas, VA)。在补充有10%热灭活的胎牛血清 (FBS, Hyclone, Logan, UT) 和2mM L-Glutamax (Thermo Fisher Scientific, Grand Island, NY) 的RPMI-1640的培养基中培养Burkitt淋巴瘤细胞系Raji、急性淋巴细胞白血病细胞系REH和NALM-6 (ACC-128 DSMZ, Leibniz Institute DSMZ, Braunschweig, Germany) 以

及慢性髓性白血病系K562。人胚胎肾细胞系293T在补充有10%热灭活的FBS的Dulbecco改良的Eagle培养基中繁殖。

[0276] 通过用编码萤火虫萤光素酶的慢病毒载体 (Lentigen Technology, Inc., Gaithersburg, MD) 稳定转导的野生型肿瘤系产生表达萤光素酶的细胞系的单细胞克隆, 然后克隆和选择萤光素酶阳性克隆。通过将稳定表达萤火虫萤光素酶的Raji克隆移植到NSG小鼠 (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ, The Jackson Laboratory Sacramento, CA) 中来产生小鼠适应的Raji-luc系, 通过阳性选择 (CD19微珠, 人, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) 或阴性选择 (小鼠细胞耗竭试剂盒, Miltenyi Biotec) 从小鼠脾分离移植的Raji-luc肿瘤细胞, 在培养物中扩增, 然后重新克隆以促进具有萤火虫萤光素酶高表达的克隆的选择, 如先前针对NALM6细胞系所描述的 [10]。

[0277] 在捐赠者的书面同意的情况下, 从Oklahoma血液研究所 (Oklahoma Blood Institute, OBI) 处的健康志愿者中收集全血。加工的血沉棕黄层 (buffy coat) 购自OBI (Oklahoma City, OK)。使用CD4微珠和CD8微珠 (Miltenyi Biotec) 的1:1混合物, 根据制造商的方案, 通过阳性选择从血沉棕黄层中纯化CD4阳性和CD8阳性的人T细胞。

[0278] 表达嵌合抗原受体 (CAR) 的载体的创建

[0279] CAR抗原结合结构域, scFv, 序列来源于小鼠杂交瘤FMC-63 (对于CD19) (FMC-63: AA 1-267, GenBank ID: HM852952.1) 和Leu-16 (对于CD20) [15] 整个VL和VH序列, 如在另外的文件部分中所描述的。

[0280] 通过将框架内的每种抗体的scFv连接至CD8铰链和跨膜结构域 (AA 123-191, 参考序列ID NP\_001759.3)、4-1BB (CD137, AA 214-255, UniProt序列ID Q07011) 反式激活结构域和CD3 $\zeta$ 信号传导结构域 (CD247, AA 52-163, 参考序列ID: NP\_000725.1.) 来产生CAR19A、CAR19B和CAR20A。构建体19A和19B是相同的, 除了连接scFv结合结构域的可变H和L链的柔性接头之外, 19A中采用惠特洛接头 [11] 并且19B中采用 (GGGS)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 13) 接头。串联靶向构建体CAR1920和CAR2019以类似方式产生。19A和20A的scFv区通过柔性链间接头 (GGGS)<sub>5</sub> (SEQ ID NO: 14), 随后是CD8、4-1BB和CD3 $\zeta$ 结构域依次连接。如 [12] 中所描述的, 在所有构建体中均包含人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子受体 $\alpha$ 亚基的前导序列。对CAR构建体序列进行密码子优化 (DNA2.0, Newark, CA), 并在人EF-1 $\alpha$ 启动子的调控下将其克隆到第三代慢病毒质粒骨架 (Lentigen Technology Inc., Gaithersburg, MD) 中。如先前 [13] 中所描述的, 通过瞬时转染HEK 293T细胞产生含有慢病毒载体 (LV) 的上清液。将收获的沉淀的慢病毒上清液储存在-80°C下。

[0281] 原代T细胞转导

[0282] 从正常供体中选择的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>人原代T细胞在补充有40IU/ml IL-2的TexMACS培养基 (无血清) 中以 $0.3 \times 10^6$ 至 $2 \times 10^6$ 个细胞/ml的密度培养, 用CD3/CD28 **MACS**<sup>®</sup> GMP TransAct<sup>™</sup>试剂 (Miltenyi Biotec) 活化, 并在第3天用编码CAR构建体的慢病毒载体在10ug/ml硫酸鱼精蛋白 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 的存在下转导过夜, 并在第4天交换培养基。在第5天, 将培养物转移至补充有200IU/ml IL-2的TexMACS培养基, 并繁殖直到在第10至13天收获。

[0283] 免疫效应物测定 (CTL和细胞因子)

[0284] 为了确定细胞介导的细胞毒性 (CTL测定), 将萤火虫萤光素酶稳定转导的5,000个

靶细胞与CAR T细胞以多种效应物与靶标的比组合,并孵育过夜。将SteadyGlo试剂(Promega, Madison WI)添加到每个孔,并在EnSpire读板仪(Perkin Elmer, Shelton, Connecticut)上分析所得的发光,并将其记录为每秒计数(样品CPS)。仅目标孔(最大CPS)和仅目标孔加1% Tween-20(最小CPS)用于确定测定范围。特异性裂解的百分比计算为: $(1 - (\text{样品CPS} - \text{最小CPS}) / (\text{最大CPS} - \text{最小CPS}))$ 。对于细胞因子释放测定,将效应物与靶细胞以10:1的比组合,并孵育过夜。使用MACSplex人12细胞因子珠阵列试剂盒(Miltenyi Biotec)按照制造商的说明书分析收获的上清液中所分泌的细胞因子。在CAR T治疗组中检测到强烈的IFN  $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 、IL-2和GM-CSF诱导。无法检测到以下细胞因子:IL-4、IL-5、IL-6、IL-12p70、IL-17A、IL-10、IFN $\alpha$ 。在一些样品中以的低水平检测到IL-9,但未报道。所有样品均是一式两份或一式三份的。除非另有说明,否则示出的所有数据均代表三个或更多个独立实验。

#### [0285] Western印迹

[0286] 将200万个CAR T细胞在冷PBS(Lonza, Walkersville, MD)中洗涤两次,然后在含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物(cocktail)(Thermo-Fisher Scientific, Grand Island, NY)的100ul冷RIPA缓冲液(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)中裂解。将裂解物在4°C下孵育20分钟,在台式(table top)离心机中在4°C下以13000RPM沉淀10分钟,并收集上清液并在-20°C下冷冻。将样品在还原负载缓冲液(Invitrogen)中于70°C下变性10分钟,并在还原条件下在MOPS缓冲液(Thermo-Fisher Scientific, Grand Island, NY)中根据制造商的方案于4%至12%梯度SDS-PAGE凝胶上分辨。将蛋白质转移至0.45微米的硝酸纤维素转移膜(BioRad, Hercules, CA),并用针对pan-CD3 $\zeta$ 的抗体(克隆ab40804, Abcam, Cambridge, MA)进行探测。使用Vectastain ABC-AMP试剂盒(Vector Laboratories, Burlingame, CA)根据制造商的方案显色条带,并用Image Studio lite软件(LI-COR, Lincoln, Nebraska)在Odyssey成像系统上对条带进行可视化和定量。针对CD19的Western印迹在Raji肿瘤细胞上进行。简而言之,在Raji细胞与CAR T细胞过夜孵育之后,使用CD3磁珠(Miltenyi Biotec)按照制造商的方案通过LD柱消耗CD3阳性细胞,并如上所述处理所回收的Raji细胞。使用针对CD19 C端(sc-69735, Santa Cruz, CA)和 $\beta$ -肌动蛋白(8457, Cell Signaling Technology, Danvers, MA)的抗体检测特异性条带。条带强度通过Image Studio软件(LI-COR, Lincoln, Nebraska)定量。全长CD19和 $\Delta$ 外显子2 CD19异形体的相对条带强度计算为信号CD19/信号 $\beta$ 肌动蛋白。

#### [0287] 流式细胞术分析

[0288] 除非另有说明,否则用于流式细胞术的所有细胞染色试剂均来自Miltenyi Biotec。从培养物中收获一百万个CAR T转导的细胞,在冷染色缓冲液(具有0.5%牛血清白蛋白的AutoMACS溶液)中洗涤两次,并在4°C下以350 $\times$ g沉淀5分钟。

[0289] 转导的T细胞上的CAR表面表达通过以下来检测:在4°C下用蛋白L-生物素缀合物(储液1mg/ml, 1:1000稀释, GenScript, Piscataway, NJ)染色30分钟,然后洗涤两次并在4°C下用链霉亲和素-PE缀合物染色30分钟(储液:1.0ml, 1:200稀释, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)。未转导的细胞和仅用链霉亲和素-PE染色的转导的细胞用作阴性对照。抗CD4抗体用于确定CAR T阳性群的CD4与CD8的比,并在第二个孵育步骤期间添加。通过7AAD染色(BD Biosciences, San Jose, CA)排除死细胞。将细胞洗涤两次并重悬

于200ul染色缓冲液中,然后通过流式细胞术进行定量分析。

[0290] 通过在4℃下用细胞孵育15分钟然后在4℃下用抗Fc-AF647 F(ab')<sub>2</sub>片段孵育15分钟(Jackson Immuno Research,1:200),用Fc-标记的-CD19肽(如下所述,以1μg/ml)进行特异性CAR T染色,并在APC通道中检测。同时将生物素化的CD20肽(Bachem,Torrance,CA)和链霉亲和素PE(均为1μg/ml)添加至细胞,并在室温下避光孵育10分钟。流式细胞术分析在MACSQuant®10分析仪(Miltenyi Biotec)上进行。使用CD19-FITC、CD20 VioBlue和CD22-APC抗体对目标肿瘤系和萤光素酶阳性亚克隆进行表征。通过7AAD染色(BD Biosciences, San Jose, CA)从分析中排出死细胞。

[0291] Fc-标记的-CD19肽的产生

[0292] 为了产生重组人CD19肽,将细胞外结构域(氨基酸20至291,Uniprot P15391)与人IgG1 Fc融合(CD19-Fc),并通过在CMV驱动的哺乳动物表达载体中在HEK293细胞中转导而表达。将转染的细胞在DMEM、5%FBS中培养,并在HYPERFlask®细胞培养容器(Corning)中孵育10至20天之后,收获含有CD19-Fc的细胞培养上清液。离心去除细胞碎片并进行0.22μm无菌过滤之后,通过蛋白A色谱法(HiTrap MabSelect,GE Healthcare)纯化CD19-Fc,并在4℃下在PBS中储存。如通过SDS-PAGE和考马斯亮蓝染色所确定的,纯度>97%。在胰蛋白酶消化(Miltenyi Biotec,Bergisch Gladbach,Germany)之后,通过完整的质谱和肽质量指纹分析确认了CD19-Fc的特征。

[0293] CAR-T活性的体内分析

[0294] 所有动物研究均由Jackson实验室动物护理和使用委员会(Jackson Laboratory Animal Care and Use Committee)(Sacramento,CA)批准。将五十万只小鼠适应的Raji-luc细胞注射到NSG(NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ)小鼠的尾静脉中。在Raji-luc注射之后的第6天,通过i.p.注射150mg/kg的萤光素并在40秒之后在Xenogen IVIS-200仪器(Caliper Biosciences,现为Perkin Elmer,Shelton,Connecticut)上成像10分钟来测量肿瘤植入。使用4.1版Living Image软件(Perkin Elmer)对图像进行分析,并且每只小鼠的生物发光信号通量表示为平均辐射度(average radiance)(光子每秒每cm<sup>2</sup>每球面度)。在第7天通过尾静脉注射向小鼠施用CAR T细胞。在注射之后第4、6、11、14、18、25、32、46天进行成像,以建立通过CAR T细胞的肿瘤生长和消除的动力学。

[0295] 对于高肿瘤负荷体内研究,在第0天用Raji-萤光素酶细胞i.v.注射NSG小鼠。在第11天,基于肿瘤负荷将小鼠平均分配至研究组。然后在研究第12天I.V施用串联CAR 2019的CAR T细胞制剂或以相等的CART+细胞数目混合的两种单一CAR T制剂的组合(19A+20A、19B+20A)。所有CAR T制剂均以5×10<sup>6</sup>个总CAR T细胞/小鼠进行测试。来自同一供体的未转导的T细胞(N.T.)和仅肿瘤的组用作对照。在研究的第18和25天,基于小鼠的全身平均辐射度评估了肿瘤生长。N=6/组。

[0296] 白血病免疫逃逸的体外分析

[0297] 为了分析Raji肿瘤逃逸变体,将CAR T和Raji细胞在体外以1:2:1的效应物与靶标的比组合。对于存活的Raji细胞,在过夜孵育之后和在共培养的第4天,通过流式细胞术确定CD19、CD20和C22的表面表达。收获培养物,洗涤并用对CD3-PE、CD19-FITC、CD20-VioBlue、CD22-APC(Miltenyi Biotec)和7AAD具有特异性的抗体染色。为了便于分析每种

Raji:T细胞共培养物中存活的Raji细胞,我们对CD3阴性7AAD阴性(即活的Raji)细胞群进行了设门,并随后分析该群的CD19、CD20和CD22的剩余表面表达。

[0298] 在transwell共培养测定中,将各 $5 \times 10^5$ 个CAR T和Raji细胞接种在24-transwell板(Costar, REF 3470, 0.4 $\mu$ M孔膜)的底部区室中,在1ml TexMACS培养基中。在不存在T细胞的情况下,将 $2.5 \times 10^5$ 个Raji细胞接种在TexMACS培养基中的上部transwell区室中。过夜孵育之后,如上所述通过流式细胞术分析来自上部和下部区室的细胞。测量每组Raji细胞上CD19、CD20和CD22的表达百分比。呈现的数据示出了来自三个不同供体,来自三个独立实验的平均值+SD。统计分析是通过单向ANOVA然后是Dunnett's多重比较检验相对于Raji单独对照进行的,\* $p < 0.01$ 。

[0299] 统计分析

[0300] 使用GraphPad Prism 7.01软件进行统计分析。在体外杀伤测定中,重复测定的组均值通过双向方差分析(ANOVA)然后是Dunnett's多重比较检验进行比较,以识别独立的治疗组与未转导对照之间的差异。在第一个体内研究中,在实验第25天(所有组均具有活的小鼠的最后一个测量日),通过双向ANOVA然后是Dunnett's多重比较检验相对于无治疗组对IVIS辐射度数据进行了分析。在与CAR T细胞共培养过夜和4天之后,Raji和NALM-6细胞中CD19、CD20和CD22的表达的分析通过单向ANOVA然后是Dunnett's多重比较检验相对于N.T(来自同一供体的未转导T细胞)对照进行。通过学生t检验进行了串联CAR中CD20/CD19的结合率的分析。

[0301] 结果

[0302] 为了研究串联CD19和CD20靶向CAR的有效性,将编码来自鼠抗体FMC63和Leu16的抗原结合结构域的序列与(GGGGS)5(SEQ ID NO:14)序列连接。对于本研究中的所有构建体,连接结构域、跨膜结构域和信号传导结构域都是相同的,其各自编码人CD8来源的铰链和跨膜结构域、CD137信号传导结构域和CD3 $\zeta$ 来源的信号传导结构域,如先前所报道的[12],图1A。FMC63的重链和轻链连接在一起,成为如最初公布的scFv结构(GenBank ID HM852952.1, AA 130-148,称为惠特洛接头)[11],而Leu16的重链和轻链通过(GGGGS)3(SEQ ID NO:13)序列连接。同样地,通过将单转录物中FMC63来源的和Leu16来源的重链和轻链序列与多GGGGS(SEQ ID NO:15)序列连接来创建串联CAR。与它们的单特异性对应物(counterpart)不同,串联CAR可以通过遇到表达CD19或CD20的靶细胞来诱导表达CAR的T细胞的活化。

[0303] 用抗CD3/CD28纳米基质在40IU/ml IL-2中活化原代人T细胞,并在3天之后用编码CAR的慢病毒载体转导,然后在200IU/ml IL-2中扩增,在整个培养过程中保持200IU/ml IL-2。使用生物素化的蛋白L通过流式细胞术,然后用链霉亲和素-PE染色,在转导的T细胞表面上测量CAR表达,图2A。转导的T细胞表面上CAR的表达为61%至93%。为了验证这两个scFv结合结构域是完整的,我们还将CAR T细胞用CD19-Fc融合蛋白或用生物素化的CD20-肽共孵育(参见方法)。在串联特异性构建体中,这两个结构域均保留了结合靶抗原的能力。对于CAR2019,蛋白L染色产生89%的表达,并且CD19-Fc表达为80%,并且CD20肽表达为85%。对于CAR 1920,蛋白L染色产生85%的CAR表达,CD19-Fc染色产生80%,并且CD20肽为68%。在从三个单独的供体产生的CAR T细胞中再现了这种观察结果。

[0304] 为了比较抗原结合的差异,计算了CAR T CD20/CD19结合率。该比率被定义为在同

一样品中用CD20可溶性肽阳性染色的串联CAR T细胞的百分比除以通过CD19-Fc肽阳性染色的CAR T细胞的百分比。三个独立的供体T细胞转导的平均CD20/CD19结合率对于CAR1920为 $0.74 \pm 0.06$ ，并且对于CAR 2019为 $1.05 \pm 0.02$  (图2B)。因此，尽管在CAR T构建体2019中，可溶性CD19和CD20肽的结合与蛋白L结合相似并且相当，CAR 1920构建体中的CD20结合可部分地在空间上受阻。

[0305] 为了验证流动谱是由于单一、较大的转录物，在还原条件下通过Western印迹验证了CAR蛋白的分子量(数据未示出)。对于单一(54kDa) CAR和串联(81kDa) CAR，检测到了预期尺寸的特定条带。为了确定相对表达水平，通过计算CAR相关的 $\zeta$ 链信号与内源性CD3 $\zeta$ 的比来比较条带强度。将CAR 19B单链载体中的CAR表达水平归一化为1(任意单位)，则19A、20A、1920和2019的表达分别为1.8、1.5、0.9和1.2。因此，串联CAR的表达水平落在单一CAR表达载体的情况下所见的变异性之内。考虑到创建表达串联CAR的LV的能力，以及现在已经证明了表达两个功能性scFv的T细胞表面上全长CAR蛋白的表达，串联CAR构建体的抗白血病活性随后在体外测定中评价。

[0306] 将人原代T细胞用编码LV的CAR构建体(19A、19B、20A、1920、2019，参见方法)转导，随后与用萤火虫萤光素酶稳定转导的Raji、NALM-6、REH、K562或293T细胞系一起孵育18小时，用于基于发光的体外杀伤测定。测试的所有白血病系在其表面上均表达CD19，而阴性对照K562和293T则不如此。CD20表达在肿瘤系之间变化。Raji系是CD20阳性的，而REH是CD20阴性的，对照系K562和293T也是如此。NALM-6系具有弱但可检测的CD20表达。作为另外的对照，创建了表达CD19(K562-19+)或CD20(K562-20+)的K562系。

[0307] K562-19+被CAR 19A和19B构建体、串联CAR构建体1920和2019裂解，但不被单一20A CAR裂解，图3A。除单一CAR19构建体之外，所有CART构建体均裂解K562-CD20+，证明了靶抗原限制性杀伤。在测试的其他白血病细胞系的情况下也观察到了相似的结果。靶向CD19的单一和串联CAR T构建体裂解Raji、NALM-6和REH；但不裂解293T(图3B)或K562(图3A)。值得注意的是，单一靶向20A的CAR构建体对CD20阴性REH系没有特异性杀伤活性，但确实示出了对NALM-6的杀伤，NALM-6具有低但可检测的CD20表面表达水平。此外，通过流式细胞术，看起来显示出与CD19-Fc相比与CD20肽更低结合的串联CAR 1920也具有针对K562-19+和K562-20+的较低的细胞毒性，但没有针对CD19+CD20-REH的细胞毒性。这可表明对于一些肿瘤靶标，1920串联CAR劣于2019串联CAR。

[0308] 然后检查了肿瘤活化的CAR T细胞的细胞因子分泌。在CAR-T效应物和Raji细胞系以10:1的比过夜孵育之后，收集共培养基上清液，并通过MACSplex细胞因子特异性珠阵列进行分析，其可同时检测12种不同的细胞因子，图4。与未转导的T细胞相比，所产生的所有CAR T构建体在与Raji细胞共培养时提高IFN $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 、IL-2和GM-CSF的细胞因子水平，而阴性对照组N.T.和GFP中的细胞因子水平不可检测。值得注意的是，20A CAR一直是IL-2、IFN $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 和GM-CSF的最高生产者。这不是由于CD4+T细胞群的优先扩增，因为所观察到的CD4/CD8比的小变化(上升或下降)不一致，下文补充表1。

[0309] 补充表1: CART转导的细胞制剂的CD4/CD8比

[0310]

	供体1	供体2	供体3
CART	CD4/CD8	CD4/CD8	CD4/CD8
N.T.	4.4	7.4	3.2



GFP	2.6	6.3	2.4
19A	4.6	11.4	2.5
20A	3.2	12.4	2.9
19B	5.9	13.3	2.4
1920	5.2	6.2	2.2
2019	4.7	8.1	2.1

[0311] 关于补充表1,通过流式细胞术确定来自三个独立供体的CAR T细胞制剂中的CD4/CD8比。从血沉棕黄层中共纯化CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞,在IL-2的存在下用TransAct CD3 CD28试剂活化细胞,如材料和方法中所描述地用LV进行转导,并在培养第10天当测定免疫功能时测定CD4/CD8组合物。对于三个供体中的每一个,CD4/CD8细胞的比在列中标出,并且CAR T组在行中标出。

[0312] 两种串联构建体CAR 1920和CAR 2019在存在肿瘤靶标的情况下均产生强的细胞因子诱导,其大小相似,并且相对于与未转导的对照显著不同。在我们的样品中未检测到显著水平的也在MACSPlex细胞因子阵列中被探测到的细胞因子IFN- $\alpha$ 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-12p70、IL-17A。

[0313] 为了评价CAR修饰的人T细胞的体内活性,在第0天将 $0.5 \times 10^6$ 个Raji-Luc细胞i.v.注射到NSG小鼠中。在第6天通过成像验证了植入的白血病的存在,并将小鼠随机分为实验组。在第7天,i.v.注射用CAR构建体转导的 $10 \times 10^6$ 个人T细胞,并通过IVIS成像监测疾病。代表性图像示出了每组中疾病的进展或消退,图5A。在用20A单一CAR或者串联CAR1920或2019给药的动物中,肿瘤负荷在第11天达到峰值,并且到第18天消退至低于治疗前水平。相比之下,单一CAR19组中的肿瘤清除更慢。有趣的是,其中ScFv重链和轻链通过Gly-Ser接头连接的CAR 19B的性能优于具有惠特洛接头的CAR 19A,图5B。总体而言,在该模型系统中,CAR 1920和CAR2019串联CAR构建体二者均表明体内活性优于单一CAR19的体内活性。此外,该数据突出表明,NSG小鼠系统中的细胞毒性、细胞因子产生和体内活性均很重要,但是必须将这些数据一起解释以理解转导的T细胞群的生物学。

[0314] 已经建立了一组单特异性和双特异性CAR,它们的活性被进一步利用。为了探索串联CAR构建体体外的比较性功效,特别是根据最近对白血病逃逸机制的描述,我们使用了Raji细胞系(其表达CD19、CD20和CD22)和NALM-6细胞系(其表达CD19、CD20和低水平的CD22)以探索白血病细胞系逃逸CAR-T强效应物活性的能力,图6A。为了模拟在CAR T免疫压力下的白血病细胞逃逸,将CAR-T与白血病细胞以1:1的低效应物与靶标(E:T)的比共孵育。当E:T更高时,所有白血病细胞均被消除。在短期(过夜)或长期(四天)共培养之后,通过流式细胞术分析白血病细胞系表面上三种B细胞标志物的表达(图6B、6C)。CD22是令人感兴趣的,因为它不是我们的CAR-T细胞特异性靶向的,并且它的丢失可指示更普遍的免疫逃逸程序的开始,从而产生多种抗原损失变体。

[0315] 当Raji与CAR19-T细胞共培养过夜时,CD19抗原从细胞表面迅速下调,图6B、6C。CD20是相对恒定的,并且在CD22中开始出现少数抗原阴性细胞群。当串联构建体2019与Raji共培养时,CD19被下调,CD20也被适度地下调,并且CD22表达的近一半也损失了。当在第4天检查时,所有B细胞抗原均大大减少,图6C。仅靶向CD19(构建体19A和19B)对CD19表达有最大的影响。串联构建体2019具有比可替代的1920构建体更大的影响,表明2019介导了

更强的免疫压力。无论是短期还是长期共培养,CD20更不能够从幸免于免疫压力的细胞丢失。与单一靶向CD20的构建体20A相比,串联构建体2019产生了更多的CD19表位损失,但似乎对其他靶向抗原CD20和非靶向抗原CD22施加了相似的组合压力。

[0316] 当将NALM-6白血病细胞系用作靶标时,除了使用靶向CD20的CAR20A时,对CD20表达的影响很小(图6C)。这可再次反映出对改变白血病细胞系表面上CD20表达的更大抗性。在过夜共培养物中,CD19表达再次具有高度可塑性,其中容易地证明了存活细胞群的抗原性损失。在第4天,几乎没有NALM-6细胞可供研究。这可能是由于NALM-6对间接细胞因子介导的杀伤作用和直接细胞介导的杀伤作用二者高得多的敏感性。值得注意的是,没有检测到仅CD22阳性的细胞,表明该系对免疫效应机制的总体敏感性,即非选择性细胞损失。

[0317] 先前已经描述了慢性淋巴细胞白血病中促炎性细胞因子对肿瘤表面分子表达的调节[30]。如图4中所示,由于CAR T细胞在暴露于肿瘤细胞时产生高水平的促炎性细胞因子,因此寻求与CAR T细胞共孵育之后确定Raji细胞上的CD19、CD22或CD20是否下调是CAR T肿瘤细胞接触的直接作用,或归因于CAR T细胞释放到培养基的可溶性因子。Raji和CAR T细胞在Transwell板的底部以1:1的效应物与靶标(E:T)的比组合。在上部区室中,我们仅放置了Raji细胞。过夜孵育之后,收获来自transwell区室以及来自孔底部的细胞,并通过流式细胞术分析活的Raji细胞上CD19、CD20和CD22的细胞表面表达(图7)。与我们先前的结果一致,与CAR T细胞共孵育的Raji细胞显示通过CAR 19A和19B的CD19表面表达的急剧降低,以及CD20和CD22的更适中但显著的降低。相比之下,从上部transwell区室回收的Raji细胞,保留了CD19、CD20和CD22的完整表达,并且与阴性对照组:N.T.、GFP和仅Raji没有区别。因此,CAR T细胞19A和19B对CD19 Raji表达的下调是肿瘤:CAR T接触的直接作用。

[0318] 最近报道了,荷有CD19的肿瘤可通过优先表达缺失外显子2的剪接变体来逃避CAR19的清除,其去除CD19细胞外结构域的包含FMC63的结合表位的部分[8]。为了探索在Raji白血病细胞系上的CD19可塑性,进行了共培养实验。Raji细胞与CAR T共培养过夜,然后通过流式细胞术进行分析以测定CD19表达。在19A和19B实验组中均测量到CD19 MFI的显著降低(图8A)。然后使用免疫磁珠耗尽共培养物,并通过Western印迹分析纯化的Raji细胞(图8B、C)。

[0319] 为了评价外显子2的剪接是否可导致全长CAR 19蛋白的表达减少,如先前所描述的[8],进行了Western印迹分析。Raji细胞在标准培养物(仅Raji组)中表达了全长和 $\Delta 2$ 剪接的CD19异形体二者(图8B)。分析了Western印迹条带的强度,以量化全长CD19的表达与其 $\Delta 2$ 剪接变体之间的关系(图8C)。与我们的流式细胞术结果一致,在用CAR19构建体19A和19B处理的组中发生了全长CD19异形体的降低的表达。相反,无论CAR T处理如何, $\Delta 2$ 剪接的CD19的表达均保持相对稳定(图8C)。当CAR T从共培养物中移出并纯化单独孵育的Raji时,所有处理组在第4天均以未处理的水平(98%及以上,未示出)重新表达靶抗原CD19、CD20和CD22。这证明了细胞表面蛋白表达的非常动态的调节。

[0320] 为了进一步探索单一和串联CAR之间在肿瘤清除方面的差异,进行了另外的研究,在所述研究中,在CAR T施用之前,Raji肿瘤生长到第12天,而不是第7天,图9A和9B。第12天,荷瘤小鼠接受转导的T细胞产物,其中对于单一CAR或串联2019CAR每只小鼠具有 $5 \times 10^6$ 个CAR T+细胞。同时共同施用两种T细胞产物,其包含CD19A+20A或CD19B+20A CAR的独立的转导。对于每个构建体,给予总共 $2.5 \times 10^6$ 个CAR T细胞(总计 $5 \times 10^6$ 个)。串联CAR2019在没

有死亡率的情况下实现了肿瘤负荷的大幅降低,而组合处理19A+20A和19B+20A是有效的,但毒性很高,每组六只小鼠中只有二只存活至第25天。对于单一CAR 19A和19B组,肿瘤负荷仍然相对较高,并且每组六只小鼠中只有五只存活至第25天。在单一20A组中,肿瘤得到了有效清除,但是六只小鼠中只有两只得以存活。令人惊讶的是,该研究强调了CAR施用的毒性,该毒性在单一20A组中或当20A与19A或19B CAR T细胞组合时最大。

#### [0321] 讨论

[0322] 将抗CD19和抗Her2结构域连接成单一串联CAR (作者称为TanCAR) 降低以实践许多已提出的理论,即双特异性嵌合抗原受体 (CAR) 的产生是可能的[14]。在为血液学恶性肿瘤的过继免疫治疗创建改进的CAR的过程中,将基于抗CD19和基于抗CD20的结合基序连接到单个跨膜糖蛋白中,以创建一组串联CAR。这些CAR构建体能够通过结合CD19或CD20肿瘤分子来激活,如图1A和1B中所示的,并且在体外和体内对模型白血病细胞系均有效。标准动物模型没有显示出明显的优势或者在CAR结构本身内建立CD19和CD20 scFv的优先顺序。尽管如此,2019CAR构建体通过流式细胞术显示出CD20肽染色试剂的更好的结合,并改善了体外对一些肿瘤细胞系的杀伤,图2A、2B、3A和3B。此外,在过夜和4天共培养实验中对免疫压力的分析表明,2019CAR可以对靶白血病细胞系施加更强的免疫压力,图6A至6C和8A至8C。

[0323] 关于CAR蛋白的多肽序列,注意到了将VH和VL结构域二者与聚甘氨酸接头 (GGGS; SEQ ID NO:15) 连接以及将串联CAR结构中的两个独立scFv连接的有效性。这很重要,因为已显示VH和VL连接序列的长度及其氨基酸组成决定了双抗体 (diabody) 的形成和scFv结构域的正确折叠[15]。我们的数据也支持Zah et al的发现,他们能够使用 (GGGS; SEQ ID NO:15) 序列连接独立的CD19和CD20 scFv结构域[16]。如Western印迹分析所证明的,天然CD3- $\zeta$ 链条带的强度表明,在LV系统中使用EF-1- $\alpha$ 驱动的CAR有效负载进行的CAR转录不会压倒 (overwhelm) 或取代TCR相关转录物 (如 $\zeta$ 链) 的转录或翻译 (通过引用整体并入本文的Schneider et al. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* (2017) 5:42的图3)。

[0324] 使用由CD19和CD20的重组片段的表达产生的一组独特工具,证明了由CAR和串联CAR载体编码的scFv结合靶蛋白的能力,图2A和2B。先前的报道已经使用结合 $\kappa$ 轻链序列的蛋白L以针对细胞表面CAR表达进行染色[12]。对于针对CD19具有特异性的基于FMC63的两种scFv CAR (构建体19A、19B),蛋白L结合良好,尽管原始的惠特洛接头具有更亮的MFI。对于用重组CD19片段进行的染色也是如此,但是差异不太明显。对于基于Leu16的抗CD20 CAR (构建体20A),蛋白L和重组CD20肽给出了非常相似的结果。在串联CAR中,蛋白L染色相当强。靶肽的抗CD19scFv结合在串联和单一CAR中基本相同,但与2019相比,构建体1920中基于CD20-生物素的染色信号降低了 (图2B),这可表明在该构建体中,与CD20结合的空间位阻。在CD20阴性白血病细胞系中,与CAR 2019串联载体相反,我们观察到CAR 1920的稍微更低的裂解水平。这种功能性差异的一种可能解释是,在串联CAR中,必须将CD19结合物靠近T细胞膜放置,以匹配CD19表位与肿瘤细胞表面的距离。ROR1 CAR的实例支持了这一见解,其中细胞外间隔区的长度对于确定CAR肿瘤的认识是决定性的[17]。有趣的是,对于目前正在开发的另一种串联CAR (CD22\_CD19 CAR) 的最佳功能,还需要将CD19结合物置于T细胞膜附近 (W. Haso, 未公布的观察结果)。假设2019CAR更好的抗原结合可反映出CD20结合物需要未栓系 (untethered) 羧基末端用于正确的VH至VL折叠或在1920构建体中CD20结合位点被相邻的接头-CD19结构域遮盖。

[0325] 体外细胞因子释放活性也显示了串联CAR的活性,图4。但是,在产生以下Th-1样细胞因子中,CD20特异性CAR 20A优于串联和单一CD19 CAR构建体:IFN- $\gamma$ 、IL-2、TNF- $\alpha$ 和GM-CSF。这两种串联CAR在细胞因子产生方面相似,并且大于单一19A和19B构建体。串联CAR构建体1920和2019产生的细胞因子水平可主要受CD20识别驱动,并反映了另一个串联CAR优势,即保留每种结合物的最佳特征以获得更好的潜在治疗效果。

[0326] 体内CAR 19B的性能优于CAR 19A,图5A和5B。这可部分是由于19B在NSG小鼠模型中产生IL-2并因此维持T细胞活性的优越能力,我们并未通过添加人细胞因子对其进行补充。这些数据一起表明,细胞因子的产生对于预测NSG小鼠系统中抗白血病CAR的体内活性是重要的。

[0327] 然后测试了CAR介导的免疫压力调节白血病表型的能力。为此,发现尽管效应物与靶标的比为5:1以及以上有效消除CTL测定中的白血病细胞,但当使用较低的1:1效应物与靶标的比时,我们仍可收获存活的白血病细胞并分析其表面抗原表达。流式细胞术允许操作员对排除T细胞的活细胞进行设门,并量化抗原表达,图6A、6B。与19A和19B CAR孵育过夜之后,发现CD19强烈下调。串联CAR诱导较少的抗原损失,但剩余少得多的细胞。CD20表达较少的调节。有趣的是,还检测到一些CD22下调。这可表明在所分析的Raji细胞群中,逃逸的抗原特异性和非抗原特异性机制二者均是可能的。然后用Raji和NALM-6细胞系进行过夜和四天的CAR共孵育二者,图6C。NALM-6对活化的淋巴细胞的更一般的敏感性限制了NALM-6的分析。即使在低的1:1E:T比下,在第4天,几乎没有来自共培养物的NALM-6白血病细胞可用于分析。在过夜孵育之后,观察到CD19表达的强烈下调,其中CAR 19A和19B LV转导的T细胞具有最大的作用。串联CAR和令人惊讶的20A CD20 CAR均对CD19具有可测量的作用(图6C)。还要注意的,CD22表达降低了15%至20%,表明非靶向B细胞分化抗原也受到了影响。使用Raji细胞系,更容易观察到CAR介导的免疫压力对CD20的作用。在CAR-T共培养实验中,就表面抗原表达的损失而言,CD20的可变性比非靶向抗原CD22小。与NALM-6一样,CD19下调是迅速的,并发生在绝大多数细胞中。在Raji细胞受到免疫压力4天之后,由于所有三种B细胞抗原均被适度下调,因此串联CAR 2019和1920表现出保持免疫压力。CD19表达仍然强烈下调,尤其是CD19单特异性载体。过夜和在第4天,20ACAR免疫压力均显示出较小的选择逃避突变体的能力,这表明Raji细胞分配或改变其表达的能力可能较小。

[0328] 在慢性淋巴细胞白血病中,已经记录了炎性细胞产生的可溶性细胞因子对肿瘤抗原表面表达的下调[30]。然后,研究了在transwell共培养测定中共培养的CAR T和肿瘤细胞培养基中存在的可溶性因子是否导致Raji细胞上CD19、CD20和CD22的下调。我们发现Raji肿瘤细胞和CAR T细胞之间的直接接触对于下调CD19、CD20和CD22的Raji表面表达是必要的。

[0329] 为了通过流式细胞术探测关于抗体染色的CD19丢失的机制,Thomas-Tikhonenko实验室的发现用于研究暴露于CAR T的Raji细胞中CD19异形体的患病率[8]。为此,将Raji细胞与CAR-T共培养,然后在过夜孵育结束时通过流式细胞术分析它们,以证明CD19表达降低。随后,我们使用免疫磁珠来耗尽T细胞的共培养。通过Western印迹分析分离的Raji细胞。令人惊讶地,发现全长CD19异形体的减少主要导致所观察到的CD19染色降低,并且无论处理如何, $\Delta 2$  CD19异形体的水平保持相对稳定。

[0330] 鉴于B细胞表面抗原表达的差异如此之大,我们想研究其相对持久性。换句话说,

这是真正的突变效应,还是表型调节?为了解决这个问题,将分离出CAR T的Raji细胞恢复培养,并随后在第4天再次通过流式细胞术进行分析。所有肿瘤群均显示完全恢复,其中CD19、CD20和CD22表达大于98%。

[0331] 肿瘤抗原逃逸是当今过继细胞治疗领域面临的主要挑战之一。尽管使用CAR19在治疗复发性或难治性ALL中取得了重大进展,但已经报道了通过下调肿瘤细胞上CD19表位进行的肿瘤逃逸[5, 18, 19],并且这是疾病复发的重要原因。变得明显的是,对于在血液学恶性肿瘤,特别是在比儿科pre-B-ALL更具治疗挑战性的疾病类型(例如NHL)中,克服肿瘤逃逸必需的是组合方法,在[20]中综述。此外,如白血病的CAR19治疗所证明的,以及如在PSCA和MUC1阳性肿瘤的体内模型中所示出的[21],当使用单一CAR T治疗时,异质靶抗原表达可导致肿瘤逃避变体。因此,用单一CAR T治疗产品靶向多种肿瘤抗原可以减轻肿瘤抗原逃逸。

[0332] Sotillo及其同事[8]证明了通过多种机制,包括CD19阴性变体的突变和扩增二者,以及产生外显子2缺陷的CD19变体的可变剪接,在CAR19压力下在原发疾病以及白血病和淋巴瘤细胞系中发生的CD19丢失。最近的研究已表明,在对CD19抗原施加长期CAR-T免疫压力之后,肿瘤也可通过恢复为CD19阴性髓样表型而逃脱检测[22, 23]。在所使用的实验模型中,在存在CD19CAR构建体19A和19B的情况下,Raji白血病上的CD19下调是迅速的,其中刚好与CAR T过夜共培养之后,发生检测到的CD19表达的显著损失。CD19表达的损失在从培养物中除去CAR T细胞之后4天内完全恢复。鉴于所测量的变化的迅速,并且考虑到Raji细胞约每20小时复制一次,在我们的模型中不太可能因实际的CD19缺失突变和CD19阴性淋巴瘤克隆的优先扩增而使CD19下调。此外,已确定在存在单一CAR19构建体19A和19B的情况下,Raji全细胞裂解物中全长CD19蛋白的量减少,这与通过流式细胞术所探测到的CD19染色减少一致,而无论使用哪种CAR T类型,外显子2剪接的CD19的量均保持相对稳定。因此,CAR19介导的全长CD19的下调不改变CD19外显子2的可变剪接。

[0333] CD19是B细胞共受体,并且其在早期和晚期B细胞发育中发挥成熟、增殖和存活的正向调节物的作用[24, 25]。CD19与B细胞受体一起在其与配体衔接之后被内化。类似地,CD19可以在被特异性抗体结合之后被内化,这一事实已在抗体缀合物(antibody-conjugate, ADC)治疗中得到利用。已知使用治疗性抗体利妥昔单抗之后,还会发生B细胞表面CD20的内化[26]。可以推测,CAR19压力还将引起CD19的内化。但是,在我们的系统中,仅CD19的内化不能解释如Western印迹所示出的19A和19B治疗之后全长CD19蛋白水平降低的事实。因此,CD19蛋白的下调必须发生在转录或翻译水平上,或者通过在CAR驱动内化之后CD19蛋白的降解。这种影响是非常动态的,并且在除去CAR19压力之后不久就被逆转。

[0334] 通过暴露于CAR T治疗而降低CD19表达的意义对于肿瘤生长仍有待充分阐明。从机理上讲,CD19通过促进B细胞受体-抗原微簇的形成并启动一些下游信号传导途径来降低B细胞活化阈值[27]。CD19通常被认为是淋巴瘤发生的启动子,并已显示出通过具有MYC癌蛋白的正反馈环驱动B细胞增殖[28, 29]。然而,CD19在一些类型的B细胞白血病包括CLL、B-PLL、SLVL和MCL中被下调[9]。因此,可能在一些情况下,例如当通过靶向CD19的CART细胞施加选择压力时,CD19的丢失可赋予肿瘤生长优势。白血病细胞中证明的CD19的可塑性可是正常B细胞生物学所保留的特征,现在为恶性肿瘤提供了另外的存活优势。

[0335] 最后,在更晚期的疾病环境中,以更高的肿瘤负荷测试了串联CAR相对于单一CAR的活性。还比较了简化的方法,其中将各自表达单一CD19-或CD20-CAR的两种CAR产品组合为一个效应物群,图9A和9B。CD2019 CAR是能够控制所有对象均存活到研究第25天的肿瘤的唯一处理组。单一CAR 19A和19B本身没有那么强的抗疾病作用,并且从每个组丢失一只小鼠。单独使用20A CAR或与CD19 CAR组合使用20A CAR均可以明显清除疾病小鼠,但是六只小鼠中有四只未存活至第25天。这可能是由于肿瘤细胞激活串联2019CAR的更大可能性,以及其与20A CAR相比更适度的细胞因子生成谱,图4。在该研究中,我们无法区分是晚期疾病或CAR相关毒性导致的死亡。但是,怀疑与20A CAR相关的毒性可能发挥了作用,因为存活小鼠的疾病完全清除。尽管同种异体反应可在我们所有的研究中发挥作用,但是由于我们使用的是模型肿瘤细胞系,因此在所采用的任何测定中缺乏GFP或N.T.对照的活性证明了这不是主要作用。

#### [0336] 结论

[0337] 本文中所述的研究本身并未证明CAR T免疫压力产生持久的逃逸突变体,但迄今为止的临床经验表明CD19阴性复发并非罕见事件[8,18,19]。此外,数据表明CD19抗原调节是非常迅速的事件,并且同时靶向两种抗原可以是解决此问题的合理方法。高肿瘤负荷研究强调了一种有趣的新生物学,其可归因于串联CAR T产品,并且可为转化研究指明一种优越的CAR设计形式。或者,在该研究中,有效的体外活性,尤其是细胞因子的产生和杀伤活性之间达到了独特的平衡,这需要通过考虑效应细胞表达的CAR和总的疾病负荷二者来确定最佳的体内活性。

#### [0338] 缩写

[0339] AA-氨基酸,7AAD-七-放线菌素D,AF-alexa fluor,ALL-急性淋巴细胞白血病,ANOVA-方差分析,APC-别藻蓝蛋白,CART-嵌合抗原受体T细胞,CD-分化簇,CLL-慢性淋巴细胞白血病,CPS-每秒计数,CTL-细胞毒性T淋巴细胞,ELISA-酶联免疫吸附测定,FBS-胎牛血清,Fc-片段可结晶区,FITC-异硫氰酸荧光素,GFP-绿色荧光蛋白,GM-CSF-粒细胞巨噬细胞集落刺激因子,GMP-良好生产规范,HCL-毛细胞白血病,HEK-人胚胎肾细胞,Her2-人表皮生长因子受体2,IFN $\gamma$ -干扰素 $\gamma$ ,IL-2-白介素2,IU-国际单位,LV-慢病毒载体,Luc-萤火虫萤光素酶,MCL-套细胞淋巴瘤,MOPS-三(N-吗啉代)丙烷磺酸,NSG-NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ,N.T.-来自同一供体的未转导的T细胞对照,OBI-Oklahoma血液研究所,PE-藻红蛋白,PLL-幼淋巴细胞白血病,ROR1-受体酪氨酸激酶样孤儿受体1,RPM-每分钟转数,scFv-单链可变片段,SDS-PAGE-十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳,SLVL-伴绒毛淋巴细胞脾淋巴瘤,T.A.-单独肿瘤对照组,TNF $\alpha$ -肿瘤坏死因子 $\alpha$ ,VH-重链可变结构域,VL-轻链可变结构域。

#### [0340] 实施例1的参考文献

[0341] 1.Lee,D.W.,et al.,The future is now:chimeric antigen receptors as new targeted therapies for childhood cancer.Clinical Cancer Research,2012.18(10): p.2780-2790.

[0342] 2.Kochenderfer,J.N.,et al.,Construction and pre-clinical evaluation of an anti-CD19 chimeric antigen receptor.Journal of immunotherapy (Hagerstown,Md.:1997),2009.32(7):p.689.

- [0343] 3.Jensen,M.,et al.,CD20 is a molecular target for scFvFc:zeta receptor redirected T cells:implications for cellular immunotherapy of CD20+ malignancy.Biology of Blood and Marrow Transplantation,1998.4(2):p.75-83.
- [0344] 4.Lee,D.W.,et al.,T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults:a phase 1 dose-escalation trial.The Lancet,2015.385(9967):p.517-528.
- [0345] 5.Grupp,S.A.,et al.,Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia.New England Journal of Medicine,2013.368(16):p.1509-1518.
- [0346] 6.Porter,D.L.,et al.,Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia.New England Journal of Medicine,2011.365(8):p.725-733.
- [0347] 7.Kochenderfer,J.N.,et al.,B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells.Blood,2012.119(12):p.2709-2720.
- [0348] 8.Sotillo,E.,et al.,Convergence of acquired mutations and alternative splicing of CD19 enables resistance to CART-19 immunotherapy.Cancer discovery,2015.5(12):p.1282-1295.
- [0349] 9.Ginaldi,L.,et al.,Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias.Journal of clinical pathology,1998.51(5):p.364-369.
- [0350] 10.Barrett,D.M.,et al.,Noninvasive bioluminescent imaging of primary patient acute lymphoblastic leukemia:a strategy for preclinical modeling.Blood,2011.118(15):p.e112-e117.
- [0351] 11.Whitlow,M.,et al.,An improved linker for single-chain Fv with reduced aggregation and enhanced proteolytic stability.Protein engineering,1993.6(8):p.989-995.
- [0352] 12.Haso,W.,et al.,Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia.Blood,2013.121(7):p.1165-1174.
- [0353] 13.Kuroda,H.,et al.,Simplified lentivirus vector production in protein-free media using polyethylenimine-mediated transfection.Journal of virological methods,2009.157(2):p.113-121.
- [0354] 14.Grada,Z.,et al.,TanCAR:a novel bispecific chimeric antigen receptor for cancer immunotherapy.Molecular Therapy-Nucleic Acids,2013.2(7):p.e105.
- [0355] 15.Wu,A.M.,et al.,Multimerization of a chimeric anti-CD20 single-chain Fv-Fc fusion protein is mediated through variable domain exchange.Protein engineering,2001.14(12):p.1025-1033.
- [0356] 16.Zah,E.,et al.,T cells expressing CD19/CD20 bi-specific chimeric

antigen receptors prevent antigen escape by malignant B cells. *Cancer immunology research*, 2016.

[0357] 17. Hudecek, M., et al., Receptor affinity and extracellular domain modifications affect tumor recognition by ROR1-specific chimeric antigen receptor T cells. *Clinical cancer research*, 2013. 19(12): p. 3153-3164.

[0358] 18. Grupp, S.A., et al., Durable remissions in children with relapsed/refractory ALL treated with T cells engineered with a CD19-targeted chimeric antigen receptor (CTL019). *Blood*, 2015. 126(23): p. 671-681.

[0359] 19. Ruella, M., et al., Dual CD19 and CD123 targeting prevents antigen-loss relapses after CD19-directed immunotherapies. *The Journal of Clinical Investigation*, 2016. 126(10).

[0360] 20. O'neal, A.S. and A.R. Jazirehi, CD19 chimeric antigen receptor (CD19 CAR)-redirected adoptive T-cell immunotherapy for the treatment of relapsed or refractory B-cell Non-Hodgkin's Lymphomas. *American journal of cancer research*, 2016. 6(2): p. 403.

[0361] 21. Usanarat Anurathapan, R.C.C., Hakeem F Hindi, Roopa Mucharla, Pradip Bajgain, Brendan C Hayes, William E Fisher, Helen E Heslop, Cliona M Rooney, Malcolm K Brenner, Ann M Leen, and Juan F Vera, Kinetics of Tumor Destruction by Chimeric Antigen Receptor-modified T Cells. *Molecular Therapy*, 2014. 22(3): p. 623-633.

[0362] 22. Jacoby, E., et al., CD19 CAR immune pressure induces B-precursor acute lymphoblastic leukaemia lineage switch exposing inherent leukaemic plasticity. *Nature Communications*, 2016. 7.

[0363] 23. Gardner, R., et al., Acquisition of a CD19-negative myeloid phenotype allows immune escape of MLL-rearranged B-ALL from CD19 CAR-T-cell therapy. *Blood*, 2016. 127(20): p. 2406-2410.

[0364] 24. Otero, D.C. and R.C. Rickert, CD19 function in early and late B cell development. II. CD19 facilitates the pro-B/pre-B transition. *The Journal of Immunology*, 2003. 171(11): p. 5921-5930.

[0365] 25. Otero, D.C., A.N. Anzelon, and R.C. Rickert, CD19 function in early and late B cell development: I. Maintenance of follicular and marginal zone B cells requires CD19-dependent survival signals. *The Journal of Immunology*, 2003. 170(1): p. 73-83.

[0366] 26. Beers, S.A., et al., Antigenic modulation limits the efficacy of anti-CD20 antibodies: implications for antibody selection. *Blood*, 2010. 115(25): p. 5191-5201.

[0367] 27. Depoil, D., et al., CD19 is essential for B cell activation by promoting B cell receptor-antigen microcluster formation in response to membrane-bound ligand. *Nature immunology*, 2008. 9(1): p. 63-72.



[0368] 28.Chung,E.Y.,et al.,CD19 is a major B cell receptor-independent activator of MYC-driven B-lymphomagenesis.The Journal of clinical investigation,2012.122(6):p.2257-2266.

[0369] 29.Poe,J.C.,et al.,A c-Myc and surface CD19 signaling amplification loop promotes B cell lymphoma development and progression in mice.The Journal of Immunology,2012.189(5):p.2318-2325.

[0370] 30.Vilpo J,et al.,Surface membrane antigen expression changes induced in vitro by exogenous growth factors in chronic lymphocytic leukemia cells.Leukemia,2002(16),1691-1698.

[0371] 等同方案

[0372] 在本文中引用的每一篇申请和专利,以及在每一篇所述申请和专利中引用的每一篇文献或参考文献(包括在每一篇授权专利的审查期间;“申请引用文献”),以及与这些申请和专利中任一个相对应和/或要求其优先权的每一篇PCT和外国申请或专利,以及每一篇申请引用文献中引用或参考的每一篇文献均在此通过引用明确地并入本文,并且可以用于实施本发明。更通常地,本文中引用了文献或参考文献,不管是在权利要求书之前的参考文献列表中还是在正文本身;并且,这些文献或参考文献(“本文引用参考文献”)中的每一篇以及在每一篇本文引用参考文献中引用的每一篇文献或参考文献(包括任何制造商说明书、指南等)均在此通过引用明确地并入本文。

[0373] 对一些具体实施方案的前述描述提供了充分的信息使得其他人员可以通过应用目前知识针对不同应用容易地对这样的具体实施方案进行修改或调整而不脱离一般概念,并且因此这样的调整和修改应当且旨在包含在所公开实施方案的等同方案的含义和范围内。应理解的是,本文所使用的短语或术语是出于描述而非限制的目的。在附图和说明书中已经公开了一些示例性实施方案,并且尽管可能已经使用特定的术语,但是除非另作声明,否则其仅以一般性的描述性含义使用,而非出于限制目的,权利要求书的范围因此并不局限于此。此外,本领域技术人员将理解,本文所讨论方法的某些步骤可以以可替换顺序来排序或步骤可以进行组合。因此,这意味着所附权利要求书并不限于本文所公开的具体实施方案。本领域技术人员将认识到或能够仅使用常规实验就可确定本文所述的本发明实施方案的许多等同方案。这样的等同方案涵盖在以下权利要求书中。

[0374] 本公开内容的序列

[0375] 如37 C.F.R.1.822中所限定的,使用核苷酸碱基的标准字母缩写和氨基酸的三字母代码来显示下文所列的核酸和氨基酸序列。仅显示每个核酸序列的一条链,但互补链被理解为通过对所示链的任何参考而被包括在内。在所附序列表中:

[0376] SEQ ID NO:1前导序列-CD19 VL-惠特洛接头CD19 VH(GGGGS)-5CD20 VH(GGGGS)-3CD20 VL CD8铰链+TM-4-1BB-CD3z(构建体CAR 1920)的核苷酸序列

[0377] ATGCTCCTTCTCGTGACCTCCCTGCTTCTCTGCGAACTGCCCCATCTGCCTTCTGCTG

[0378] ATTCCCGACATTGATGACTCAGACCACCTCCTCCCTGTCCGCTCCCTGGGCGACCGC

[0379] GTGACCATCTCATGCCGCGCCAGCCAGGACATCTCGAAGTACCTCAACTGGTACCAGCAG

[0380] AAGCCCGACGGAACCGTGAAGCTCCTGATCTACCACACCTCCCGGCTGCACAGCGGAGTG

[0381] CCGTCTAGATTCTCGGGTTCGGGGTCGGGAACTGACTACTCCCTTACTATTTCCAACCTG

[0382] GAGCAGGAGGATATTGCCACCTACTTCTGCCAACAAAGGAAACACCCTGCCGTACACTTTT  
[0383] GGCGGGGAACCAAGCTGGAAATCACTGGCAGCACATCCGGTCCGGGAAGCCCGGCTCC  
[0384] GGAGAGGGCAGCACCAAGGGGGAAGTCAAGCTGCAGGAATCAGGACCTGGCCTGGTGGCC  
[0385] CCGAGCCAGTCACTGTCCGTGACTTGTACTGTGTCCGGAGTGTGCTCCCGGATTACGGA  
[0386] GTGTCTGGATCAGGCAGCCACCTCGGAAAGGATTGGAATGGCTCGGAGTCATCTGGGGT  
[0387] TCCGAAACCACCTATTACAACCTCGGCACTGAAATCCAGGCTCACCATTATCAAGGATAAC  
[0388] TCCAAGTCACAAGTGTTCCTGAAGATGAATAGCCTGCAGACTGACGACACGGCGATCTAC  
[0389] TATTGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGGATCCTACGCTATGGACTACTGGGGCCAGGGG  
[0390] ACCAGCGTGACCGTGTTCATCCGGAGGCGGCGGAGCGGGGGAGGGTCCGGAGGGGGT  
[0391] GGTTCCTGGTGGAGGAGGATCGGGAGGCGGTGGCAGCGAGGTGCAGTTGCAACAGTCAGGA  
[0392] GCTGAACTGGTCAAGCCAGGAGCCAGCGTGAAGATGAGCTGCAAGGCTCCGGTTACACC  
[0393] TTCACCTCCTACAACATGCACTGGGTGAAACAGACCCCGGACAAGGGCTCGAATGGATT  
[0394] GGCGCCATCTACCCCGGAATGGCGATACTTCGTACAACCAGAAGTTCAAGGGAAAGGCC  
[0395] ACCCTGACCGCCGACAAGAGCTCCTCCACCGCGTATATGCAGTTGAGCTCCCTGACCTCC  
[0396] GAGGACTCCGCCACTACTACTGCGCACGGTCCAACACTACTATGGAAGCTCGTACTGGTTC  
[0397] TTCGATGTCTGGGGGGCCGGCACCCTGTGACCGTCAGCTCCGGGGGCGGAGGATCCGGT  
[0398] GGAGGCGGAAGCGGGGTGGAGGATCCGACATTGTGCTGACTCAGTCCCCGGCAATCCTG.  
[0399] TCGGCCTCACCGGGCGAAAAGGTCACGATGACTTGTAGAGCGTCGTCCAGCGTGAACCTAC  
[0400] ATGGATTGGTACCAAAAAGAAGCCTGGATCGTCACCCAAGCCTTGGATCTACGCTACATCT  
[0401] AACCTGGCCTCCGGCGTGCCAGCGCGGTTTCCAGCGGGTCCGGCTCGGGCACCTCATACTCG  
[0402] CTGACCATCTCCCGCGTGGAGGCTGAGGACGCCCGGACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCC  
[0403] TTCAACCCGCCGACTTTTGGAGGCGGTACTAAGCTGGAGATCAAAGCGGCCGCAACTACC  
[0404] ACCCCTGCCCCTCGGCCCGGACTCCGGCCCCAACCATCGCAAGCCAACCCCTCTCCTTG  
[0405] CGCCCCGAAGCTTGCCGCCCGGCGGGTGGAGCCGTGCATACCCGGGGGCTGGACTTT  
[0406] GCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCGCTGGCCGGCACTTGCGGCGTGTCTCTGTGTG  
[0407] CTGGTCATCACCTTTACTGCAAGAGGGGCCGGAAGAAGCTGCTTTACATCTTCAAGCAG  
[0408] CCGTTCATGCGGCCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGCAGATTCCT  
[0409] GAGGAGGAAGAGGGGGGATGCGAACTGCGCGTCAAGTTCTCACGGTCCGCCGACGCCCC  
[0410] GCATATCAACAGGGCCAGAATCAGCTCTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGGAGAGAGGAG  
[0411] TACGACGTGCTGGACAAGCGACGCGGACGCGACCCGGAGATGGGGGGAAACCACGGCGG  
[0412] AAAAACCTCAGGAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTAC  
[0413] TCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGGGGAAAGGGTACGACGGGCTGTACCAG  
[0414] GGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACCTACGATGCCTTGCATATGCAAGCACTCCCACCC  
[0415] CGG  
[0416] SEQ ID NO:2前导序列-CD19 VL-惠特洛接头CD19 VH(GGGGS)-5CD20 VH(GGGGS)-  
3CD20 VL CD8铰链+TM-4-1BB-CD3z(构建体CAR 1920)的氨基酸序列  
[0417] MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLWYQQKPDGTVKL  
LIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGS  
TKGEVKLQESGPLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKLEWLGVWGETTYNSALKSRLTI IKDN

SKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQL  
QQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAY  
MQLSSLTSEDSADYYCARSNYGSSYWFDFVWGAGTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKV  
TMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPP  
TFGGGKLEIKAAATTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLS  
LVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRfPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLG  
RREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDLGLSTATKDTYDAL  
HMQUALPPR

[0418] SEQ ID NO:3前导序列-CD20 VH (GGGS) 3-CD20 VL- (GGGS) 5-CD19VL-惠特洛接头-CD19 VH CD8铰链+TM-4-1BB-CD3z (构建体2019) 的核苷酸序列

[0419] ATGCTCCTTCTCGTGACCTCCCTGCTTCTCTGCGAACTGCCCATCTGCCTTCTGCTG  
[0420] ATTCCCGAGGTGCAGTTGCAACAGTCAGGAGCTGAACTGGTCAAGCCAGGAGCCAGCGTG  
[0421] AAGATGAGCTGCAAGGCCTCCGGTTACACCTTACCTCCTACAACATGCACTGGGTGAAA  
[0422] CAGACCCCGGACAAGGGCTCGAATGGATTGGCGCCATCTACCCCGGAATGGCGATACT  
[0423] TCGTACAACCAGAAGTTCAAGGGAAAGGCCACCCTGACCGCCGACAAGAGCTCCTCCACC  
[0424] GCGTATATGCAGTTGAGCTCCCTGACCTCCGAGGACTCCGCCGACTACTACTGCGCACGG  
[0425] TCCAATACTATGGAAGCTCGTACTGGTCTTTCGATGTCTGGGGGGCCGGCACCCTGTG  
[0426] ACCGTCAGCTCCGGGGCGGAGGATCCGGTGGAGGCGGAAGCGGGGTGGAGGATCCGAC  
[0427] ATTGTGCTGACTCAGTCCCCGCAATCCTGTCCGCCTCACCGGGCGAAAAGGTACAGATG  
[0428] ACTTGTAGAGCGTCGTCCAGCGTGAATAACATGGATTGGTACCAAAAAGAAGCCTGGATCG  
[0429] TCACCCAAGCCTTGGATCTACGCTACATCTAACCTGGCCTCCGGCGTGCCAGCGCGGTTT  
[0430] AGCGGGTCCGGCTCGGGCACCTCATACTCGCTGACCATCTCCCGCGTGAGGCTGAGGAC  
[0431] GCCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCCTTCAACCCGCCGACTTTTGGAGGCGGTTACT  
[0432] AAGCTGGAGATCAAAGGAGGCGGCGCAGCGCGGGGAGGGTCCGGAGGGGTGGTTCT  
[0433] GGTGGAGGAGGATCGGGAGGCGGTGGCAGCGACATTCAGATGACTCAGACCACCTCCTCC  
[0434] CTGTCCGCTCCCTGGGCGACCGGTGACCATCTCATGCCGCGCCAGCCAGGACATCTCG  
[0435] AAGTACCTCAACTGGTACCAGCAGAAGCCCGACGGAACCGTGAAGCTCCTGATCTACCAC  
[0436] ACCTCCCGGCTGCACAGCGGAGTGCCGTCTAGATTCTCGGGTTCGGGGTCGGGAACTGAC  
[0437] TACTCCCTTACTATTTCCAACCTGGAGCAGGAGGATATTGCCACCTACTTCTGCCAACAA  
[0438] GGAAACACCCTGCCGTACACTTTTGGCGGGGGAACCAAGCTGGAAATCACTGGCAGCACA  
[0439] TCCGGTTCGGGAAGCCCGCTCCGGAGAGGGCAGCACCAAGGGGGAAGTCAAGCTGCAG  
[0440] GAATCAGGACCTGGCCTGGTGGCCCCGAGCCAGTCACTGTCCGTGACTTGTACTGTGTCC  
[0441] GGAGTGTGCTCCCGGATTACGGAGTGTCTGGATCAGGCAGCCACCTCGGAAAGGATTG  
[0442] GAATGGCTCGGAGTCATCTGGGGTTCGAAACCACTATTACAACCTCGGCACTGAAATCC  
[0443] AGGCTCACCATTATCAAGGATAACTCCAAGTCACAAGTGTCTCTGAAGATGAATAGCCTG  
[0444] CAGACTGACGACACGGCGATCTACTATTGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGGATCCTAC  
[0445] GCTATGGACTACTGGGGCCAGGGACCAGCGTGACCGTGTATCCCGGCCGCAACTACC  
[0446] ACCCCTGCCCTCGGCCCGGACTCCGGCCCCAACCATCGCAAGCCAACCCCTCTCCTTG  
[0447] CGCCCCGAAGCTTGCCGCCCGGCGGGTGGAGCCGTGCATACCCGGGGGCTGGACTTT

- [0448] GCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCGCTGGCCGGCACTTGC GGCGTGCTCCTGCTGTCG
- [0449] CTGGTCATCACCCCTTrACTGCAAGAGGGGCCGAAGAAGCTGCTTTACATCTTCAAGCAG
- [0450] CCGTTCATGCGGCCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGCAGATTCCCT
- [0451] GAGGAGGAAGAGGGGGGATGCGAACTGCGCGTCAAGTTCTCACGGTCCGCCGACGCCCC
- [0452] GCATATCAACAGGGCCAGAATCAGCTCTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGGAGAGAGGAG
- [0453] TACGACGTGCTGGACAAGCGACGCGGACGCGACCCGGAGATGGGGGGAAACCACGGCGG
- [0454] AAAAACCCCTCAGGAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTAC
- [0455] TCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGGGGAAAGGGTCACGACGGGCTGTACCAG
- [0456] GGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACCTACGATGCCTTGCATATGCAAGCACTCCCACCC
- [0457] CGG
- [0458] SEQ ID NO:4前导序列-CD20 VH (GGGS) 3-CD20 VL- (GGGS) 5-CD19 VL-惠特洛接头-CD19 VH CD8铰链+TM-4-1BB-CD3 $\zeta$ 氨基酸序列 (构建体CAR 2019)
- [0459] MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYFTFSYNMHWVKQTPGQGLEW  
IGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSSGG  
GGSGGGSGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGS  
GSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPTFGGGTKLEIKGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQTSS  
LSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTRLSHGVPSRFSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYF  
CQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQ  
PPRKGLEWLGVWGETTYNSALKSRLTI IKDNSKSVFLKMNSLQDDTAIYYCAKHYGGSYAMDYWGQTSV  
TVSSAAATTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIITLYCK  
RGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLV  
KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
- [0460] SEQ ID NO:5CD19 LG1494 (CAR 19A) 的核苷酸序列
- [0461] ATGGTCATGCTTCTCCTGGTCACCTCCCTGCTCCTCTGCGAACTGCCTCACCCCTGCCTTC
- [0462] CTTCTGATTCTCCTGACACTGACATTGAGATGACTCAGACCACCTCTTCCCTGTCCGCGTCA
- [0463] CTGGGAGACAGAGTGACCATCTCGTGTGCGCAAGCCAGGATATCTCCAAGTACCTGAAC
- [0464] TGGTACCAACAGAAGCCCGACGGACTGTGAAGCTGCTGATCTACCACACCTCACGCCTG
- [0465] CACAGCGGAGTGCCAAGCAGATTCTCCGGCTCCGGCTCGGGAACCGATTACTCGCTTACC
- [0466] ATTAGCAACCTCGAGCAGGAGGACATCGCTACCTACTTCTGCCAGCAAGGAAATACCCTG
- [0467] CCCTACACCTTCGGCGGAGGAACCAAATTGGAAATCACCGGCTCCACGAGCGGCTCCGGG
- [0468] AAGCCTGGTTCCGGGGAAGGCTCCACTAAGGGTGAAGTGAAGCTCCAGGAGTCCGGCCCC
- [0469] GGCCTGGTGGCGCCGTCGCAATCACTCTCTGTGACCTGTACCGTGTGCGGAGTGTCCCTG
- [0470] CCTGATTACGGCGTGAGCTGGATTCCGCAGCCGCCCGGAAGGGCCTGGAATGGCTGGGT
- [0471] GTCATCTGGGGATCCGAGACTACCTACTACAACCTCGGCCCTGAAGTCCCGCCTGACTATC
- [0472] ATCAAAGACAACCTCGAAGTCCCAGGTCTTTCTGAAGATGAACTCCCTGCAAACCTGACGAC
- [0473] ACCGCCATCTATTACTGTGCTAAGCACTACTACTACGGTGAAGCTATGCTATGGACTAC
- [0474] TGGGGCCAGGGGACATCCGTGACAGTCAGCTCCGCGGCCGCAACTACCACCCCTGCCCT
- [0475] CGGCCCGGACTCCGGCCCCAACCATCGCAAGCCAACCCCTCTCCTTGCGCCCCGAAGCT
- [0476] TGCCGCCCGGCCGCGGGTGGAGCCGTGCATACCCGGGGGCTGGACTTTGCTGCGATATC

[0477] TACATTTGGGCCCCGCTGGCCGGCACTTGC GGCGTGCTCCTGCTGTCGCTGGTCATCACC  
[0478] CTTTACTGCAAGAGGGGCGGAAGAAGCTGCTTTACATCTTCAAGCAGCCGTTTCATGCGG  
[0479] CCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGCAGATTCCCTGAGGAGGAAGAG  
[0480] GGGGGATGCGAACTGCGCGTCAAGTTCTCACGGTCCGCCGACGCCCCCGCATATCAACAG  
[0481] GGCCAGAATCAGCTCTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTG  
[0482] GACAAGCGACGCGGACGCGACCCGGAGATGGGGGGGAAAACCACGGCGGAAAAACCCTCAG  
[0483] GAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTACTCAGAAATCGGG  
[0484] ATGAAGGGAGAGCGGAGGAGGGGAAAAGGGTCACGACGGGCTGTACCAGGGACTGAGCACC  
[0485] GCCACTAAGGATACCTACGATGCCTTG CATATGCAAGCACTCCCACCCCGG  
[0486] SEQ ID NO:6CD19 LTG1494 (CAR 19A) 蛋白质的氨基酸序列  
[0487] MVMLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDTDI QMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLN  
[0488] WYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSEFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTL  
[0489] PYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPLVAPSQSLSVTCTVSGVSL  
[0490] PDYGVSWIRQPPRKLEWLGVWSETTYNSALKSRLTI IKDNSKSQVFLKMNSLQTD  
[0491] TAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSAAATTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA  
[0492] CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR  
[0493] PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL  
[0494] DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRGKGHGDLQGLST  
[0495] ATKDITYDALHMQALPPR  
[0496] SEQ ID NO:7CD19 LTG1538 (CAR 19B) DNA的核苷酸序列  
[0497] ATGCTTCTCCTGGTCACCTCCCTGCTCCTCTGCGAACTGCCTCACCTGCCTTCCTTCTG  
[0498] ATTCCTGACATTCAGATGACTCAGACCACCTCTTCCTTGCCGCGTCACTGGGAGACAGA  
[0499] GTGACCATCTCGTGTGCGCAAGCCAGGATATCTCCAAGTACCTGAACTGGTACCAACAG  
[0500] AAGCCCGACGGGACTGTGAAGCTGCTGATCTACCACACCTCACGCCTGCACAGCGGAGTG  
[0501] CCAAGCAGATTCTCCGGCTCCGGCTCGGGAACCGATTACTCGCTTACCATTAGCAACCTC  
[0502] GAGCAGGAGGACATCGCTACCTACTTCTGCCAGCAAGGAAATACCCTGCCCTACACCTTC  
[0503] GGCGGAGGAACCAAATTGGAATCACCGGCGGAGGAGCTCCGGGGGAGGAGGTCCGGG  
[0504] GGCGGGGGTTCCGAAGTGAAGCTCCAGGAGTCCGGCCCCGGCCTGGTGGCGCCGTCGCAA  
[0505] TCACTCTCTGTGACCTGTACCGTGTGCGGAGTGTCCCTGCCTGATTACGGCGTGAGCTGG  
[0506] ATTCGGCAGCCGCCGCGGAAGGGCCTGGAATGGCTGGGTGTCATCTGGGGATCCGAGACT  
[0507] ACCTACTACAACCTCGGCCCTGAAGTCCCGCCTGACTATCATCAAAGACAACCTCGAAGTCC  
[0508] CAGGTCTTTCTGAAGATGAACTCCCTGCAAACCTGACGACACCGCCATCTATTACTGTGCT  
[0509] AAGCACTACTACTACGGTGAAGCTATGCTATGGACTACTGGGGGCAAGGCACTTCGGTG  
[0510] ACTGTGTCAAGCGCGGCCGCAACTACCACCCTGCCCTCGGCCGCCGACTCCGGCCCCA  
[0511] ACCATCGCAAGCCAACCCCTCTCCTTGCGCCCCGAAGCTTGCCGCCCGCCGCGGGTGA  
[0512] GCCGTGCATAACCGGGGGCTGGACTTTGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCCGCTGGCC  
[0513] GGCACCTGCGGCGTGCTCCTGCTGTGCTGGTCATCACCTTTACTGCAAGAGGGGCCGG  
[0514] AAGAAGCTGCTTTACATCTTCAAGCAGCGTTCATGCGGCCCGTGCAGACGACTCAGGAA  
[0515] GAGGACGGATGCTCGTGCAGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGATGCGAACTGCGCGTC

- [0516] AAGTTCTCACGGTCCGCCGACCCCCGCATATCAACAGGGCCAGAATCAGCTCTACAAC  
[0517] GAGCTGAACCTGGGAAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGACGCGGACGCGAC  
[0518] CCGGAGATGGGGGGGAAACCACGGCGGAAAAACCCTCAGGAAGGACTGTACAACGAACTC  
[0519] CAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTACTCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGG  
[0520] GGAAAGGGTACGACGGGCTGTACCAGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACCTACGAT  
[0521] GCCTTGCATATGCAAGCACTCCCACCCCGG  
[0522] SEQ ID NO:8CD19 LTG1538 (CAR 19B) 的氨基酸序列  
[0523] MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQ  
[0524] KPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTF  
[0525] GGGTKLEITGGGGSGGGSGGGGSEVKLQESGPLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSW  
[0526] IRQPPRKLEWLGIWVSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQDDTAIYYCA  
[0527] KHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSAAATTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG  
[0528] AVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQE  
[0529] EDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD  
[0530] PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE1GMKGERRRRGKGDGLYQGLSTATKDTYD  
[0531] ALHMQALPP  
[0532] SEQ ID NO:9CD20A LTG1495 (CAR 20A) 的核苷酸序列  
[0533] ATGCTCCTTCTCGTGACCTCCCTGCTTCTCTGCGAACTGCCCCATCCTGCCTTCTGCTG  
[0534] ATCCCGAGGTGCAGTTGCAACAGTCAGGAGCTGAACTGGTCAAGCCAGGAGCCAGCGTG  
[0535] AAGATGAGCTGCAAGGCCTCCGGTTACACCTTACCTCCTACAACATGCACTGGGTGAAA  
[0536] CAGACCCCGGACAAGGGCTCGAATGGATTGGCGCCATCTACCCCGGGAATGGCGATACT  
[0537] TCGTACAACCAGAAGTTCAAGGGAAAGGCCACCCTGACCGCCGACAAGAGCTCCTCCACC  
[0538] GCGTATATGCAGTTGAGCTCCCTGACCTCCGAGGACTCCGCCGACTACTACTGCGCACGG  
[0539] TCCAATACTATGGAAGCTCGTACTGGTTCTTCGATGTCTGGGGGGCCGGCACCCTGTG  
[0540] ACCGTGACTCCGGGGGCGGAGGATCCGGTGGAGGCGGAAGCGGGGTGGAGGATCCGAC  
[0541] ATTGTGCTGACTCAGTCCCCGGAATCCTGTCGGCCTCACCGGGCGAAAAGGTCACGATG  
[0542] ACTTGTAGAGCGTCGTCCAGCGTGAACCTACATGGATTGGTACCAAAAAGAAGCCTGGATCG  
[0543] TCACCCAAGCCTTGGATCTACGCTACATCTAACCTGGCCTCCGGCGTGCCAGCGCGGTTT  
[0544] AGCGGGTCCGGCTCGGGCACCTCATACTCGCTGACCATCTCCCGCGTGGAGGCTGAGGAC  
[0545] GCCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCCTTCAACCCGCGGACTTTTGAGAGCGGTACT  
[0546] AAGCTGGAGATCAAAGCGGCCGCAACTACCACCCTGCCCTCGGCCGCGGACTCCGGCC  
[0547] CCAACCATCGCAAGCCAACCCCTCTCCTTGGCCCCGAAGCTTGCCGCCCGGCGGGGT  
[0548] GGAGCCGTGCATAACCGGGGGCTGGACTTTGCTGCGATATCTACATTTGGGCCCGCTG  
[0549] GCCGCACTTGCGCGTGTCTCCTGCTGTCGCTGGTCATCACCCCTTACTGCAAGAGGGGG  
[0550] CGGAAGAAGCTGCTTTACATCTTCAAGCAGCCGTTTATGCGGCCCGTGCAGACGACTCAG  
[0551] GAAGAGGACGGATGCTCGTGCAGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGGATGCGAACTGCGC  
[0552] GTCAAGTTCTCACGGTCCGCCGACGCCCCGCATATCAACAGGGCCAGAATCAGCTCTAC  
[0553] AACGAGCTGAACCTGGGAAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGACGCGGACGC  
[0554] GACCCGGAGATGGGGGGGAAACCACGGCGGAAAAACCCTCAGGAAGGACTGTACAACGAA







Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr  
Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala  
Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

[0595] SEQ ID NO:46抗CD33 CAR (LTG1936)的核苷酸序列

[0596] ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTTTCTGCTGATTCCGCAG  
GTGCAGCTGGTGAATCTGGGGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAGGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATT  
CAGTTTTCCACCTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTATC  
CTGGTGA CTCTGATAACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACC  
GCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGACTAGTTGGAGATGGCTA  
CAATACGGGGGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAGGAGGTGGCGGGTCTGGTGGTG  
GCGGTAGCGGTGGTGGCGGATCCGATATTGTGATGACCCACACTCCACTCTCTGTCCGTCACCCCTGGACAGCCG  
GCCTCCATCTCCTGCAAGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTAATGAAAAGACCTATTTGTATTGGTACCTGCAGAA  
GCCAGGCCAGCCTCCACAGCTCCTGATCTATGGAGCTTCCAACCGTTCTCTGGAGTGCCAGACAGTTTCACTGGCA  
GCGGGTCAGGGACAGATTTCACTGAAAATCAGCCGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAA  
AGTATACAGCTTCTATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAGCGGCCGCAACTACCACCCCTGCCCC  
TCGGCCCGGACTCCGGCCCCAACCATCGCAAGCCAACCCCTCTCCTTGCGCCCGAAGCTTGCCGCCCGGCCGCGG  
GTGGAGCCGTGCATACCCGGGGGCTGGACTTTGCTGCGATATCTACATTTGGGCCCGCTGGCCGGCACTTGCGGC  
GTGCTCCTGCTGTGCTGGTCATCACCTTTACTGCAAGAGGGGCCGAAGAAGCTGCTTTACATCTTCAAGCAGCC  
GTTTCATGCGCCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGCAGATTCCTGAGGAGGAAGAGGGGGAT  
GCGAACTGCGCGTCAAGTTCTCACGGTCCGCCGACGCCCCGCATATCAACAGGGCCAGAATCAGCTCTACAACGAG  
CTGAACCTGGGAAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGACGCGGACCCGAGATGGGGGGGAAACC  
ACGGCGGAAAAACCTCAGGAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTACTCAGAAATCG  
GGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGGGGAAAGGGTCACGACGGGCTGTACCAGGACTGAGCACCCGCACTAAGGATAACC  
TACGATGCCTTGCATATGCAAGCACTCCCACCCCGG

[0597] SEQ ID NO:47抗CD33 CAR (LTG1936)的氨基酸序列MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPQVQ  
LVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGFSFPTYWIGWVRQMPGKGLEWMI IYPGDSDRYSPSFQGVVTSADKSI  
STAYLQWSSLKASDTAMY YCARLVGDGYNTGAFDIWQGTMTVTVSSGGGSGGGGSDIVMHTPLSLSVTPGQ  
PASISCKSSQSLLSHNGKTYLYWYLQKPGQPPQLLIYGASNRFSVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGVVYCM  
QSIQLPITFGQGRLEIKAAATTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTC  
GVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGNQLYN  
ELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKD  
TYDALHMQALPP

[0598] SEQ ID NO:48抗间皮素CAR (LTG1904)的核苷酸序列

[0599] ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTTTCTGCTGATTCCGGAG  
GTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT  
CACCTTTGATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTT  
GGAATAGTGGTAGCATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCC  
CTGTATCTGCAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGAAAAGATTTATCGTCAGTGGC  
TGGACCCTTTAACTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTCTCCTCAGGAGGTGGCGGGTCTGGTGGAGGCGGTA

GCGGCGGTGGCGGATCCTCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGGATC  
ACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGCTATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCTGTACTTGT  
CATCTATGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAACACAGCTTCTC  
TGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAGGATGAGGCTGACTATTACTGTAACCTCCCGGGACAGCAGTGGTAACCATCTG  
GTATTCGGCGGAGGCACCCAGCTGACCGTCCCTCGGTGCGGCCGCAACTACCACCCCTGCCCTCGGCCGCCGACTCC  
GGCCCAACCATCGCAAGCCAACCCCTCTCCTTGCGCCCCGAAGCTTGCCGCCCGCCGCGGGTGGAGCCGTGCATA  
CCCGGGGGTGGACTTTGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCGCTGGCCGGCACTTGCGGCGTGTCTCTGTGTG  
CTGGTCATCACCCTTTACTGCAAGAGGGGCCGAAGAAGCTGCTTTACATCTTCAAGCAGCCGTTTCATGCGGCCCGT  
GCAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGCAGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGGATGCGAACTGCGCGTCA  
AGTTCTCACGGTCCGCCGACGCCCCGCATATCAACAGGGCCAGAATCAGCTCTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGG  
AGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGACGCGGACGCGACCCGGAGATGGGGGGAAACCACGGCGAAAAACCC  
TCAGGAAGGACTGTACAACGAACCTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTACTCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGC  
GGAGGAGGGAAAGGGTACGACGGGCTGTACCAGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACCTACGATGCCTTGCAT  
ATGCAAGCACTCCCACCCCGG

[0600] SEQ ID NO:49抗间皮素CAR (LTG1904)的氨基酸序列

[0601] MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEW  
VSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDLSSVAGPFNYWQGTLVTVSSGGGG  
SGGGSGGGSSSELTDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLIYGKNNRPSGIPDRFSGSS  
GNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNHLVFGGGTQLTVLGAATTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA  
GGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGG  
CELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI  
GMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

## 序列表

- <110> Lentigen Technology, Inc.  
 <120> 用于用抗CD19/CD20免疫治疗来治疗癌症的组合物和方法  
 <130> 42449-0015W01  
 <150> US 62/539,483  
 <151> 2017-07-31  
 <160> 49  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 2283  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 前导序列-CD19 VL-惠特洛接头CD19 VH (GGGS)-5 CD20 VH (GGGS)-3  
 CD20 VL CD8 铰链+TM-4-1BB- CD3z (构建体CAR 1920)

<400> 1  
 atgctccttc tcgtgacctc cctgcttctc tgcgaactgc cccatcctgc cttcctgctg 60  
 attcccgaca ttcagatgac tcagaccacc tcttcctgt ccgcctccct gggcgaccgc 120  
 gtgaccatct catgccgcgc cagccaggac atctcgaagt acctcaactg gtaccagcag 180  
 aagcccgacg gaaccgtgaa gctcctgatc taccacacct cccggctgca cagcggagtg 240  
 ccgtctagat tctcgggttc ggggtcggga actgactact cccttactat ttccaacctg 300  
 gagcaggagg atattgccac ctacttctgc caacaaggaa acaccctgcc gtacactttt 360  
 ggcgggggaa ccaagctgga aatcactggc agcacatccg gttccgggaa gcccggctcc 420  
 ggagagggca gcaccaaggg ggaagtcaag ctgcaggaat caggacctgg cctggtggcc 480  
 ccgagccagt cactgtccgt gacttgact gtgtccggag tgctgctccc ggattacgga 540  
 gtgtcctgga tcaggcagcc acctcggaaa ggattggaat ggctcggagt catctggggt 600  
 tccgaaacca cctattacaa ctcggcactg aaatccaggc tcaccattat caaggataac 660  
 tccaagtcac aagtgttctt gaagatgaat agcctgcaga ctgacgacac ggcgatctac 720  
 tattgcgcca agcactacta ctacggcgga tctacgcta tggactactg gggccagggg 780  
 accagcgtga ccgtgtcctc cggaggcggc ggcagcggcg ggggagggtc cggagggggt 840  
 ggttctggtg gaggaggatc gggaggcggg ggcagcaggg tcagttgca acagtcagga 900  
 gctgaactgg tcaagccagg agccagcgtg aagatgagct gcaaggctc cggttacacc 960  
 ttcacctcct acaacatgca ctgggtgaaa cagaccccg gacaagggtc cgaatggatt 1020  
 ggcgccatct accccgggaa tggcgatact tcgtacaacc agaagttcaa gggaaaggcc 1080  
 accctgaccg ccgacaagag ctctccacc gcgtatatgc agttgagctc cctgacctcc 1140  
 gaggactccg ccgactacta ctgcgcacgg tccaactact atggaagctc gtactggttc 1200  
 ttcgatgtct ggggggcccgg caccactgtg accgtcagct ccgggggccc aggatccggt 1260  
 ggaggcggaa gcgggggtgg aggatccgac attgtgctga ctcagtcccc ggcaatcctg 1320



Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
 115 120 125  
 Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser  
 130 135 140  
 Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala  
 145 150 155 160  
 Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu  
 165 170 175  
 Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu  
 180 185 190  
 Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser  
 195 200 205  
 Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln  
 210 215 220  
 Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr  
 225 230 235 240  
 Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr  
 245 250 255  
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 260 265 270  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 275 280 285  
 Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val  
 290 295 300  
 Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr  
 305 310 315 320  
 Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly  
 325 330 335  
 Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr  
 340 345 350  
 Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser  
 355 360 365  
 Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala  
 370 375 380  
 Asp Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Phe  
 385 390 395 400  
 Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly  
 405 410 415  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val

	420		425		430
Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile	Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val				
	435		440		445
Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met Asp Trp Tyr					
	450		455		460
Gln Lys Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser					
465		470		475	480
Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly					
	485		490		495
Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala					
	500		505		510
Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly					
	515		520		525
Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala Ala Ala Thr Thr Thr Pro Ala Pro					
	530		535		540
Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu					
545		550		555	560
Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg					
	565		570		575
Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly					
	580		585		590
Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys					
	595		600		605
Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg					
	610		615		620
Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro					
625		630		635	640
Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser					
	645		650		655
Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu					
	660		665		670
Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg					
	675		680		685
Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln					
	690		695		700
Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr					
705		710		715	720
Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp					
	725		730		735

Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala  
 740 745 750  
 Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 755 760

<210> 3

<211> 2283

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 前导序列-CD20 VH (GGGGS) 3 - CD20 VL -(GGGGS) 5 -CD19 VL-惠特洛  
 接头- CD19 VH CD8 铰链+TM-4-1BB- CD3z (构建体2019)

<400> 3

```

atgctccttc tcgtgacctc cctgettetc tgcgaaactgc cccatcctgc cttcctgctg      60
attcccaggg tgcagttgca acagtcagga gctgaactgg tcaagccagg agccagcgtg      120
aagatgagct gcaaggcctc cggttacacc ttcacctctt acaacatgca ctgggtgaaa      180
cagaccccgg gacaagggct cgaatggatt ggcgccatct accccgggaa tggcgatact      240
tcgtacaacc agaagttaa gggaaaggcc accctgaccg ccgacaagag ctctccacc      300
gcgtatatgc agttgagctc cctgacctcc gaggactccg ccgactacta ctgcgcacgg      360
tccaactact atggaagctc gtactggttc ttcgatgtct ggggggccgg caccactgtg      420
accgtcagct ccggggggcg aggatccggt ggaggcggaa gcgggggtgg aggatccgac      480
attgtgctga ctcagtcccc ggcaatcctg tcggcctcac cgggcgaaaa ggtcacgatg      540
actttagtag cgctgtccag cgtgaactac atggattggt accaaaagaa gcctggatcg      600
tcaccaaacg cttggatcta cgctacatct aacctggcct ccggcgtgcc agcgcggttc      660
agcgggtccg gctcgggcac ctcatctcgt ctgaccatct cccgcgtgga ggctgaggac      720
gccgcgacct actactgccg gcagtggtcc ttcaaccgcg cgacttttgg aggcgggtact      780
aagctggaga tcaaaggagg cggcggcagc ggccgggggag ggtccggagg ggtggttctt      840
ggtggaggag gatcgggagg cggtggcagc gacattcaga tgactcagac cacctcctcc      900
ctgtccgcct ccctgggcga ccgcgtgacc atctcatgcc gcgccagcca ggacatctcg      960
aagtacctca actggtacca gcagaagccc gacggaaccg tgaagctcct gatctaccac      1020
acctcccggc tgcacagcgg agtgccgtct agattctcgg gttcggggtc gggaactgac      1080
tactccctta ctatttcaa cctggagcag gaggatattg ccacctactt ctgccaacaa      1140
ggaaacaccc tgccgtacac ttttgccggg ggaaccaagc tggaaatcac tggcagcaca      1200
tccggttccg ggaagcccgg ctccggagag ggcagacca agggggaagt caagctgcag      1260
gaatcaggac ctggcctggt ggccccgagc cagtcactgt ccgtgacttg tactgtgtcc      1320
ggagtgtcgc tcccggatta cggagtgtcc tggatcaggc agccacctcg gaaaggattg      1380
gaatggctcg gagtcatctg gggttccgaa accacctatt acaactcggc actgaaatcc      1440
aggctcacca ttatcaagga taactccaag tcacaagtgt tctgaagat gaatagcctg      1500
cagactgacg acacggcgat ctactattgc gccaaact actactacgg cggatcctac      1560
gctatggact actggggcca ggggaccagc gtgaccgtgt catccgcggc cgcaactacc      1620

```

acccctgccc ctcggccgcc gactccggcc ccaaccatcg caagccaacc cctctccttg 1680  
 cgccccgaag cttgccgccc ggccgcggtt ggagccgtgc ataccgggg gctggacttt 1740  
 gcctgcgata tctacatttg ggccccgctg gccggcactt gcggcgtgct cctgctgtcg 1800  
 ctggatcatca ccctttactg caagaggggc cggaagaagc tgctttacat cttcaagcag 1860  
 ccgttcatgc ggcccgtgca gacgactcag gaagaggacg gatgctcgtg cagattccct 1920  
 gaggaggaag aggggggatg cgaactgcgc gtcaagttct cacggtccgc cgacgcccc 1980  
 gcatatcaac agggccagaa tcagctctac aacgagctga acctgggaag gagagaggag 2040  
 tacgacgtgc tggacaagcg acgcggacgc gaccgggaga tgggggggaa accacggcgg 2100  
 aaaaaccctc aggaaggact gtacaacgaa ctccagaaag acaagatggc ggaagcctac 2160  
 tcagaaatcg ggatgaaggg agagcggagg aggggaaagg gtcacgacgg gctgtaccag 2220  
 ggactgagca ccgccactaa ggatacctac gatgccttgc atatgcaagc actcccaccc 2280  
 cgg 2283

<210> 4

<211> 764

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 前导序列-CD20 VH (GGGS)3 - CD20 VL -(GGGS)5 -CD19 VL-惠特洛  
 接头- CD19 VH CD8 铰链+TM-4-1BB- CD3z 氨基酸序列  
 (构建体CAR 2019)

<400> 4

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro  
 1                   5                   10                   15  
 Ala Phe Leu Leu Ile Pro Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu  
                   20                   25                   30  
 Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly  
                   35                   40                   45  
 Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly  
                   50                   55                   60  
 Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr  
 65                   70                   75                   80  
 Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys  
                   85                   90                   95  
 Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp  
                   100                   105                   110  
 Ser Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr  
                   115                   120                   125  
 Trp Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
                   130                   135                   140



Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp  
 145 150 155 160  
 Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu  
 165 170 175  
 Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met Asp  
 180 185 190  
 Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala  
 195 200 205  
 Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly  
 210 215 220  
 Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp  
 225 230 235 240  
 Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe  
 245 250 255  
 Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 260 265 270  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 275 280 285  
 Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser  
 290 295 300  
 Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser  
 305 310 315 320  
 Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu  
 325 330 335  
 Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe  
 340 345 350  
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu  
 355 360 365  
 Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu  
 370 375 380  
 Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Ser Thr  
 385 390 395 400  
 Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Glu  
 405 410 415  
 Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser  
 420 425 430  
 Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly  
 435 440 445  
 Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly



<210>	5					
<211>	1491					
<212>	DNA					
<213>	人工序列					
<220>						
<223>	CD19 LTG1494 (CAR 19A) 的核苷酸序列					
<400>	5					
atggtcatgc	ttctcctggt	cacctcctg	ctctctgcg	aactgcctca	ccctgccttc	60
cttctgattc	ctgacactga	cattcagatg	actcagacca	cctcttcctt	gtccgcgtca	120
ctgggagaca	gagtgacat	ctcgtgtcgc	gcaagccagg	atatctccaa	gtacctgaac	180
tggtaccaac	agaagcccga	cgggactgtg	aagctgctga	tctaccacac	ctcacgcctg	240
cacagcggag	tgccaagcag	attctccggc	tccggctcgg	gaaccgatta	ctcgcttacc	300
attagcaacc	tcgagcagga	ggacatcgt	acctaattct	gccagcaagg	aaataacctg	360
ccctacacct	tcggcggagg	aaccaaattg	gaaatcaccg	gctccacgag	cggtccggg	420
aagcctgggt	ccggggaagg	ctccactaag	ggtgaagtga	agctccagga	gtccggcccc	480
ggcctgggtg	cgccgtcga	atcactctct	gtgacctgta	ccgtgtcggg	agtgtccctg	540
cctgattacg	gcgtgagctg	gattcggcag	ccgccgcgga	agggcctgga	atggctgggt	600
gtcatctggg	gatccgagac	tacctactac	aactcggccc	tgaagtcccg	cctgactatc	660
atcaaagaca	actcgaagtc	ccaggtcttt	ctgaagatga	actccctgca	aactgacgac	720
accgccatct	attactgtgc	taagcactac	tactacggtg	gaagctatgc	tatggactac	780
tggggccagg	ggacatccgt	gacagtcagc	tccgcggccc	caactaccac	ccctgccctt	840
cggccgccga	ctccggcccc	aaccatcgca	agccaacccc	tctccttgcg	ccccgaagct	900
tgccgcccgg	ccgcgggtgg	agccgtgcat	accggggggc	tggactttgc	ctgcgatatc	960
tacatttggg	ccccgctggc	cggcacttgc	ggcgtgctcc	tgctgtcgct	ggtcatcacc	1020
ctttactgca	agaggggccc	gaagaagctg	ctttacatct	tcaagcagcc	gttcatgcgg	1080
cccgtgcaga	cgactcagga	agaggacgga	tgctcgtgca	gattccctga	ggaggaagag	1140
gggggatgcg	aactgcgcgt	caagttctca	cggctccgcc	acgccccgc	atatcaacag	1200
ggccagaatc	agctctacaa	cgagctgaac	ctgggaagga	gagaggagta	cgacgtgctg	1260
gacaagcgac	gcgacgcga	cccggagatg	gggggaaac	cacggcggaa	aaacctcag	1320
gaaggactgt	acaacgaact	ccagaaagac	aagatggcgg	aagcctactc	agaaatcggg	1380
atgaagggag	agcggaggag	gggaaagggt	cacgacgggc	tgtaccaggg	actgagcacc	1440
gccactaagg	atacctacga	tgcttgcgt	atgcaagcac	tcccacccc	g	1491
<210>	6					
<211>	496					
<212>	PRT					
<213>	人工序列					
<220>						
<223>	CD19 LTG1494 (CAR 19A) 的氨基酸序列					
<400>	6					

Met Val Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro  
 1                   5                   10                   15  
 His Pro Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln  
                   20                   25                   30  
 Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser  
           35                   40                   45  
 Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln  
       50                   55                   60  
 Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu  
 65                   70                   75                   80  
 His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
                   85                   90                   95  
 Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr  
           100                   105                   110  
 Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr  
       115                   120                   125  
 Lys Leu Glu Ile Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser  
       130                   135                   140  
 Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro  
 145                   150                   155                   160  
 Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser  
                   165                   170                   175  
 Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro  
           180                   185                   190  
 Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr  
           195                   200                   205  
 Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn  
       210                   215                   220  
 Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp  
 225                   230                   235                   240  
 Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr  
                   245                   250                   255  
 Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala  
           260                   265                   270  
 Ala Ala Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr  
           275                   280                   285  
 Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala  
       290                   295                   300  
 Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile

305	310	315	320
Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser			
	325	330	335
Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr			
	340	345	350
Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu			
	355	360	365
Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu			
	370	375	380
Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln			
385	390	395	400
Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu			
	405	410	415
Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly			
	420	425	430
Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln			
	435	440	445
Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu			
	450	455	460
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala			
465	470	475	480
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
	485	490	495

<210> 7

<211> 1470

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CD19 LTG1538 (CAR 19B) 的核苷酸序列

<400> 7

atgcttctcc tggtcacctc cctgctctc tgcgaactgc ctcacctgc cttccttctg	60
attcctgaca ttcagatgac tcagaccacc tcttcttgt ccgctcact gggagacaga	120
gtgaccatct cgtgtcgcgc aagccaggat atctccaagt acctgaactg gtaccaacag	180
aagcccgaag ggactgtgaa getgetgatc taccacacct cacgctgca cagcggagtg	240
ccaagcagat tctccgctc cggetcggga accgattact cgcttaccat tagcaacctc	300
gagcaggagg acatcgttac ctactttctgc cagcaaggaa ataccctgcc ctacacctc	360
ggcggaggaa ccaaattgga aatcaccggc ggaggaggct ccgggggagg aggttccggg	420
ggcgggggtt ccgaagtgaa gctccaggag tccggccccg gcctggtggc gccgtcgaa	480
tcactctctg tgacctgtac cgtgtcggga gtgtccctgc ctgattacgg cgtgagctgg	540

attcggcagc cgccgcggaa gggcctggaa tggctgggtg tcatctgggg atccgagact 600  
 acctactaca actcggcct gaagtcccgc ctgactatca tcaaagacaa ctcgaagtcc 660  
 caggtctttc tgaagatgaa ctccctgcaa actgacgaca ccgcatcta ttactgtgct 720  
 aagcactact actacggtgg aagctatgct atggactact gggggcaagg cacttcggtg 780  
 actgtgtcaa gcgcggccgc aactaccacc cctgcccctc ggccgcccac tccggcccca 840  
 accatcgcaa gccaaccct ctccctgccc cccgaagctt gccgcccggc cgcgggtgga 900  
 gccgtgcata cccgggggct ggactttgcc tgcgatatct acatttgggc cccgctggcc 960  
 ggcacttgcg gcgtgctcct gctgtcgtg gtcatcacc tttactgcaa gaggggcccg 1020  
 aagaagctgc ttacatctt caagcagccg ttcatgcggc ccgtgcagac gactcaggaa 1080  
 gaggacggat gctcgtgcag attccctgag gaggaagagg ggggatgca actgcgcgtc 1140  
 aagttctcac ggtccgccga cgccccgca tataacagg gccagaatca gctctacaac 1200  
 gagctgaacc tgggaaggag agaggagtac gacgtgctgg acaagcgac cggacgcgac 1260  
 ccggagatgg gggggaaacc acggcgaaa aaccctcagg aaggactgta caacgaacte 1320  
 cagaaagaca agatggcgga agcctactca gaaatcgga tgaaggaga gcggaggagg 1380  
 ggaaagggtc acgacgggt gtaccaggga ctgagaccg ccactaagga tacctacgat 1440  
 gccttgcata tgcaagcact cccaccccgg 1470

<210> 8

<211> 489

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD19 LTG1538 (CAR 19B)的氨基酸序列

<400> 8

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro  
 1                   5                   10                   15  
 Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser  
                   20                   25                   30  
 Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser  
                   35                   40                   45  
 Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly  
                   50                   55                   60  
 Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val  
 65                   70                   75                   80  
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr  
                   85                   90                   95  
 Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln  
                   100                   105                   110  
 Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
                   115                   120                   125

Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser																		
130						135								140				
Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln																		
145						150								155				160
Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr																		
						165								170				175
Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu																		
						180								185				190
Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys																		
						195								200				205
Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu																		
						210								215				220
Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala																		
225						230								235				240
Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln																		
						245								250				255
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Thr Thr Thr Pro Ala																		
						260								265				270
Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser																		
						275								280				285
Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr																		
						290								295				300
Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala																		
305						310								315				320
Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys																		
						325								330				335
Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met																		
						340								345				350
Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe																		
						355								360				365
Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg																		
						370								375				380
Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn																		
385						390								395				400
Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg																		
						405								410				415
Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro																		
						420								425				430
Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala																		

	435	440	445				
	Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His						
	450	455	460				
	Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp						
	465	470	475	480			
	Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro						
	485						
<210>	9						
<211>	1473						
<212>	DNA						
<213>	人工序列						
<220>							
<223>	CD20A LTG1495 (CAR 20A) 的核苷酸序列						
<400>	9						
	atgctccttc	tcgtgacctc	cctgcttctc	tgcgaaactgc	cccatcctgc	cttctctgctg	60
	attcccgagg	tgcaagttca	acagtcagga	gctgaactgg	tcaagccagg	agccagcgtg	120
	aagatgagct	gcaaggcctc	cggttacacc	ttcacctcct	acaacatgca	ctgggtgaaa	180
	cagaccccgg	gacaagggct	cgaatggatt	ggcgccatct	accccgggaa	tggcgatact	240
	tcgtacaacc	agaagttaa	gggaaaggcc	acctgaccg	ccgacaagag	ctcctccacc	300
	gcgtatatgc	agttgagctc	cctgacctcc	gaggactccg	ccgactacta	ctgcgcacgg	360
	tccaactact	atggaagctc	gtactggttc	ttcgaatgct	ggggggccgg	caccactgtg	420
	accgtcagct	ccgggggagg	aggatccggt	ggaggcggaa	gcgggggtgg	aggatccgac	480
	attgtgctga	ctcagtcacc	ggcaatcctg	tcggcctcac	cgggcgaaaa	ggtcacgatg	540
	actttagtag	cgctgtccag	cgtaactac	atggattggt	acaaaagaa	gcctggatcg	600
	tcaccaaacg	cttgatctca	cgctacatct	aacctggcct	ccggcgtgcc	agcgcggttc	660
	agcgggtccg	gctcgggcac	ctcactactc	ctgaccatct	cccgcgtgga	ggctgaggac	720
	gccgcgacct	actactgcca	gcagtggtcc	ttcaaccgc	cgacttttgg	aggcgggtact	780
	aagctggaga	tcaaagcggc	cgcaactacc	accctgccc	ctcggccgcc	gactccggcc	840
	ccaaccatcg	caagccaacc	cctctccttg	cgccccgaag	cttgccgccc	ggccgcgggt	900
	ggagccgtgc	atacccgggg	gctggacttt	gcttgcgata	tctacatttg	ggccccgctg	960
	gccggcactt	gcggcgtgct	cctgctgtcg	ctggctcatc	ccctttactg	caagaggggc	1020
	cggaagaagc	tgttttacat	cttcaagcag	ccgttcatgc	ggcccgtgca	gacgactcag	1080
	gaagaggacg	gatgctcgtg	cagattcctc	gaggaggaag	aggggggatg	cgaactgcgc	1140
	gtcaagttct	cacggctccg	cgacgcccc	gcataatcac	agggccagaa	tcagctctac	1200
	aacgagctga	acctgggaag	gagagaggag	tacgacgtgc	tggacaagcg	acgcggacgc	1260
	gacccggaga	tgggggggaa	accacggcgg	aaaaaccctc	aggaaggact	gtacaacgaa	1320
	ctccagaaag	acaagatggc	ggaagcctac	tcagaaatcg	ggatgaaggg	agagcggagg	1380
	aggggaaagg	gtcacgacgg	gctgtaccag	ggactgagca	ccgccactaa	ggatacctac	1440
	gatgccttgc	atatgcaagc	actcccacc	cgg			1473



<210> 10  
 <211> 491  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> CD20A 1495 (CAR 20A) 的氨基酸序列  
 <400> 10  
 Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro  
 1 5 10 15  
 Ala Phe Leu Leu Ile Pro Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu  
 20 25 30  
 Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly  
 35 40 45  
 Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly  
 50 55 60  
 Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr  
 65 70 75 80  
 Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys  
 85 90 95  
 Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp  
 100 105 110  
 Ser Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr  
 115 120 125  
 Trp Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 130 135 140  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp  
 145 150 155 160  
 Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu  
 165 170 175  
 Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met Asp  
 180 185 190  
 Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala  
 195 200 205  
 Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly  
 210 215 220  
 Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp  
 225 230 235 240  
 Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe  
 245 250 255

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala Ala Ala Thr Thr Thr Pro  
 260 265 270  
 Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu  
 275 280 285  
 Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His  
 290 295 300  
 Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu  
 305 310 315 320  
 Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr  
 325 330 335  
 Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe  
 340 345 350  
 Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg  
 355 360 365  
 Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser  
 370 375 380  
 Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr  
 385 390 395 400  
 Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys  
 405 410 415  
 Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn  
 420 425 430  
 Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu  
 435 440 445  
 Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly  
 450 455 460  
 His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr  
 465 470 475 480  
 Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 485 490

<210> 11

<211> 66

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 前导/信号肽序列 (LP) 的核苷酸序列

<400> 11

atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgcgaactgc cgcacccggc gtttctgctg  
 attccg

60

66

<210> 12

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 前导/信号肽序列 (LP) 的核苷酸序列

<400> 12

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1                    5                    10                    15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro

20

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> (GGGGS)3 接头

<400> 13

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1                    5                    10                    15

<210> 14

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> (GGGGS)5 接头

<400> 14

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1                    5                    10                    15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20

25

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GGGGS 接头

<400> 15

Gly Gly Gly Gly Ser

1	5
<210> 16	
<400> 16	
000	
<210> 17	
<400> 17	
000	
<210> 18	
<400> 18	
000	
<210> 19	
<400> 19	
000	
<210> 20	
<400> 20	
000	
<210> 21	
<400> 21	
000	
<210> 22	
<400> 22	
000	
<210> 23	
<400> 23	
000	
<210> 24	
<400> 24	
000	
<210> 25	
<400> 25	
000	
<210> 26	
<400> 26	
000	
<210> 27	
<400> 27	
000	
<210> 28	
<400> 28	

000		
<210>	29	
<400>	29	
000		
<210>	30	
<400>	30	
000		
<210>	31	
<400>	31	
000		
<210>	32	
<400>	32	
000		
<210>	33	
<400>	33	
000		
<210>	34	
<400>	34	
000		
<210>	35	
<211>	66	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	DNA CD8 跨膜结构域的核苷酸序列	
<400>	35	
	at ttggggccc cgctggccgg cacttgccgc gtgctcctgc tgcgctggt catcacctt	60
	tactgc	66
<210>	36	
<211>	22	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	CD8 跨膜结构域的氨基酸序列	
<400>	36	
	Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu	
	1                    5                                    10                                    15	
	Val Ile Thr Leu Tyr Cys	
	20	

<210>	37	
<211>	141	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	DNA CD8 铰链结构域的核苷酸序列	
<400>	37	
	actaccaccc ctgccctcg gccgccgact cgggcccaaa ccatcgcaag ccaaccctc	60
	tccttgcgcc ccgaagcttg ccgccggcc ggggtggag ccgtgcatac ccgggggctg	120
	gactttgcct gcgatatcta c	141
<210>	38	
<211>	47	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	CD8 铰链结构域的氨基酸序列	
<400>	38	
	Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala	
	1                    5                    10                    15	
	Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly	
	20                    25                    30	
	Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr	
	35                    40                    45	
<210>	39	
<211>	69	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	CD8.α.的 第137至206号氨基酸铰链和 跨膜区的氨基酸序列 (NCBI RefSeq: NP.sub.--001759.3)	
<400>	39	
	Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala	
	1                    5                    10                    15	
	Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly	
	20                    25                    30	
	Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile	
	35                    40                    45	
	Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val	

50	55	60	
Ile Thr Leu Tyr Cys			
65			
<210> 40			
<211> 126			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 4-1BB的DNA 信号传导结构域的核苷酸序列			
<400> 40			
aagaggggcc ggaagaagct gctttacatc ttcaagcagc cgttcatgcg gcccgatgcag			60
acgactcagg aagaggacgg atgctcgtgc agattcctg aggaggaaga ggggggatgc			120
gaactg			126
<210> 41			
<211> 42			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 4-1BB的信号传导结构域的氨基酸序列			
<400> 41			
Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met			
1                    5                    10                    15			
Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe			
20                    25                    30			
Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu			
35                    40			
<210> 42			
<211> 336			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> CD3-ζ的DNA信号传导结构域的核苷酸序列			
<400> 42			
cgcgtcaagt tctcacggtc cgccgacgcc cccgatatc aacaggcca gaatcagctc			60
tacaacgagc tgaacctggg aaggagagag gactacgacg tgctggaaa gcgacgcgga			120
cgcgaccgg agatgggggg gaaaccacgg cggaaaacc ctcaggaagg actgtacaac			180
gaactccaga aagacaagat ggcggaagcc tactcagaaa tcgggatgaa gggagagcgg			240
aggaggggaa agggtcacga cgggctgtac caggactga gcaccgccac taaggatacc			300
tacgatgcct tgcatatgca agcactccca ccccgg			336

<210> 43  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> CD3 $\zeta$ 的氨基酸序列  
 <400> 43  
 Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr  
                   20                   25                   30  
 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys  
                   35                   40                   45  
 Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys  
                   50                   55                   60  
 Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg  
 65                   70                   75                   80  
 Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala  
                   85                   90                   95  
 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
                   100                   105                   110

<210> 44  
 <211> 726  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> ScFv CD19 (FMC63)的核苷酸序列  
 <400> 44  
 gacattcaga tgactcagac cacctcttcc ttgtccgct cactgggaga cagagtgacc 60  
 atctcgtgtc gcgcaagcca ggatatctcc aagtacctga actggtacca acagaagccc 120  
 gacgggactg tgaagctgct gatctaccac acctcagcc tgcacagcgg agtgccaagc 180  
 agattctccg gctccggtc gggaaccgat tactegetta ccattagcaa cctcgagcag 240  
 gaggacatcg ctacctactt ctgccagcaa ggaaataccc tgcctacac ctteggcgga 300  
 ggaaccaa at tggaaatcac cggcggagga ggctccgggg gaggaggttc cgggggcggg 360  
 ggttccgaag tgaagctcca ggagtccggc cccggcctgg tggcgcctc gcaatcactc 420  
 tctgtgacct gtaccgtgtc gggagtgtcc ctgctgatt acggcgtgag ctggattcgg 480  
 cagccgccgc ggaagggcct ggaatggctg ggtgtcatct ggggatccga gactacctac 540  
 tacaactcgg ccctgaagtc ccgctgact atcatcaaag acaactcgaa gtcccagtc 600  
 tttctgaaga tgaactccct gcaaactgac gacaccgcca tctattactg tgctaagcac 660





Ser Ser

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 1491

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 抗CD33 CAR (LTG1936)的核苷酸序列

&lt;400&gt; 46

```

atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgcgaactgc cgcattccggc gtttctgctg      60
attccgcagg tgcagctggt gcaatctggg gcagaggtga aaaagcccgg ggagtctctg      120
aggatctcct gtaagggttc tggattcagt tttcccacct actggatcgg ctgggtgcgc      180
cagatgcccc gaaaaggcct ggagtggatg gggatcatct atcctgggtga ctctgatacc      240
agatacagcc cgtccttcca aggccaggtc accatctcag ccgacaagtc catcagcacc      300
gcctacctgc agtggagcag cctgaaggcc tcggacaccg ccatgtatta ctgtgcgaga      360
ctagtggag atggctacaa tacgggggct tttgatatct ggggccaagg gacaatggtc      420
accgtctctt caggaggtgg cgggtctggt ggtggcggtg gcggtggtgg cggatccgat      480
attgtgatga cccacactcc actctctctg tccgtcacc ctggacagcc ggcctccatc      540
tctgcaagt ctagtcagag cctcctgcat agtaatggaa agacctattt gtattggtac      600
ctgcagaagc caggccagcc tccacagctc ctgatctatg gagcttcaa ccggttctct      660
ggagtgccag acaggttcag tggcagcggg tcagggacag atttcacact gaaaatcagc      720
cgggtggagg ctgaggatgt tggggtttat tactgcatgc aaagtataca gcttcctatc      780
accttcggcc aaggacacg actggagatt aaagcggccg caactaccac ccctgccctt      840
cggccgccga ctccggcccc aaccatcgca agccaacccc tctccttgcg ccccgaagct      900
tgccgcccgg ccgcgggtgg agccgtgcat acccgggggc tggactttgc ctgcatatc      960
tacatttggg ccccgctggc cggcacttgc ggcgtgctcc tgctgtcgct ggtcatcacc     1020
ctttactgca agaggggccc gaagaagctg ctttacctct tcaagcagcc gttcatgcgg     1080
cccgtgcaga cgactcagga agaggacgga tgctcgtgca gattccctga ggaggaagag     1140
gggggatgcg aactgcgct caagttctca cggctccggc acgccccgc atatcaacag     1200
ggccagaatc agctctacaa cgagctgaac ctgggaagga gagaggagta cgacgtgctg     1260
gacaagcgac gcggacgcga cccggagatg ggggggaaac cacggcggaa aaaccctcag     1320
gaaggactgt acaacgaact ccagaaagac aagatggcgg aagcctactc agaaatcggg     1380
atgaagggag agcggaggag gggaaagggt cacgacgggc tgtaccaggg actgagcacc     1440
gccactaagg atacctacga tgccttgcatt atgcaagcac tcccaccccg g              1491

```

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 496

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 抗CD33 CAR (LTG1936)的氨基酸序列

&lt;400&gt; 47

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro  
 1                   5                   10                   15  
 Ala Phe Leu Leu Ile Pro Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu  
                   20                   25                   30  
 Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly  
                   35                   40                   45  
 Phe Ser Phe Pro Thr Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly  
                   50                   55                   60  
 Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr  
 65                   70                   75                   80  
 Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys  
                   85                   90                   95  
 Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp  
                   100                   105                   110  
 Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Val Gly Asp Gly Tyr Asn Thr  
                   115                   120                   125  
 Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
                   130                   135                   140  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp  
 145                   150                   155                   160  
 Ile Val Met Thr His Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly Gln  
                   165                   170                   175  
 Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn  
                   180                   185                   190  
 Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
                   195                   200                   205  
 Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp  
                   210                   215                   220  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser  
 225                   230                   235                   240  
 Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser Ile  
                   245                   250                   255  
 Gln Leu Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Ala  
                   260                   265                   270  
 Ala Ala Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr  
                   275                   280                   285  
 Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala  
                   290                   295                   300

Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile  
 305 310 315 320  
 Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser  
 325 330 335  
 Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr  
 340 345 350  
 Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu  
 355 360 365  
 Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu  
 370 375 380  
 Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln  
 385 390 395 400  
 Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu  
 405 410 415  
 Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly  
 420 425 430  
 Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln  
 435 440 445  
 Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu  
 450 455 460  
 Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr  
 465 470 475 480  
 Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro  
 485 490 495

<210> 48

<211> 1476

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗间皮素CAR (LTG1904) 的核苷酸序列

<400> 48

atgctgctgc tggtagaccag cctgctgctg tgcaactgc cgcacccggc gtttctgctg 60  
 attccggagg tccagctggt acagtctggg ggaggcttgg tacagcctgg ggggtccctg 120  
 agactctcct gtgcagcctc tggattcacc tttgatgatt atgcatgca ctgggtccgg 180  
 caagctccag ggaagggcct ggagtgggtc tcaggtatta gttggaatag tggtagcata 240  
 ggctatgcgg actctgtgaa gggccgattc accatctcca gagacaacgc caagaactcc 300  
 ctgtatctgc aaatgaacag tctgagagct gaggacacgg ccttgtatta ctgtgcaaaa 360  
 gatttatcgt cagtggtggt accctttaac tactggggcc agggcacct ggtcacctgc 420  
 tcctcaggag gtggcgggtc tggtaggaggc gtagcggcg gtggcggatc ctcttctgag 480

ctgactcagg accctgctgt gtctgtggcc ttgggacaga cagtcaggat cacatgccaa 540  
 ggagacagcc tcagaagcta ttatgcaagc tggtaccagc agaagccagg acaggcccct 600  
 gtacttgtca tctatggtaa aaacaaccgg ccctcaggga tcccagaccg attctctggc 660  
 tccagctcag gaaacacagc ttccttgacc atcactgggg ctcaggcgga ggatgaggct 720  
 gactattact gtaactcccc ggacagcagt ggtaaccatc tggtattcgg cggaggcacc 780  
 cagctgaccg tcctcgggtgc ggccgcaact accaccctg cccctcggcc gccgactccg 840  
 gccccaaacca tcgcaagcca acccctctcc ttgcgccccg aagcttgccg cccggcccg 900  
 ggtggagccg tgcataccgg ggggctggac tttgctgcg atactctacat ttgggccccg 960  
 ctggccggca cttgcggcgt gctctgctg tcgctggtea tcacccttta ctgcaagagg 1020  
 ggccggaaga agctgcttta catcttcaag cagecgttea tgcggcccgt gcagacgact 1080  
 caggaagagg acggatgctc gtgcagattc cctgaggagg aagagggggg atgcgaactg 1140  
 cgcgtcaagt tctcacggtc cgccgacgcc cccgcatac aacagggcca gaatcagctc 1200  
 tacaacgagc tgaacctggg aaggagagag gactacgacg tgctggacaa gcgacgcgga 1260  
 cgcgaccggg agatgggggg gaaaccacgg cggaaaaacc ctcaggaagg actgtacaac 1320  
 gaactccaga aagacaagat ggcggaagcc tactcagaaa tcgggatgaa gggagagcgg 1380  
 aggaggggaa agggtcacga cgggctgtac cagggactga gcaccgccac taaggatacc 1440  
 tacgatgcct tgcatatgca agcactccca ccccgg 1476

<210> 49

<211> 492

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗间皮素CAR (LTG1904) 的氨基酸序列

<400> 49

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

115	120	125
Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly		
130	135	140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser Glu		
145	150	155
Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg		
165	170	175
Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr		
180	185	190
Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Gly Lys Asn		
195	200	205
Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly		
210	215	220
Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala		
225	230	235
Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His Leu Val Phe		
245	250	255
Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Thr Thr Thr		
260	265	270
Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro		
275	280	285
Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val		
290	295	300
His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro		
305	310	315
Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu		
325	330	335
Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro		
340	345	350
Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys		
355	360	365
Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe		
370	375	380
Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu		
385	390	395
Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp		
405	410	415
Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys		
420	425	430

---

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

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

Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr  
465 470 475 480

Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
485 490

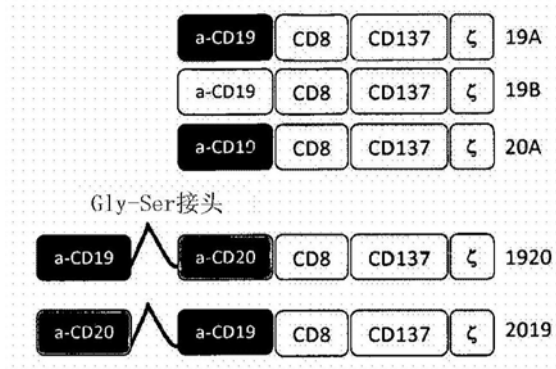


图1A

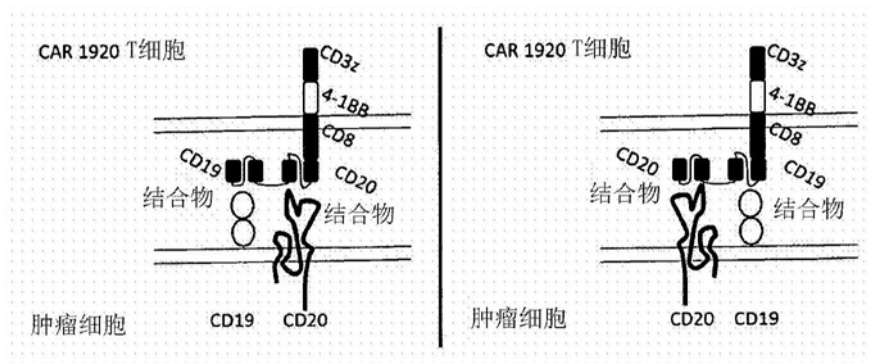


图1B

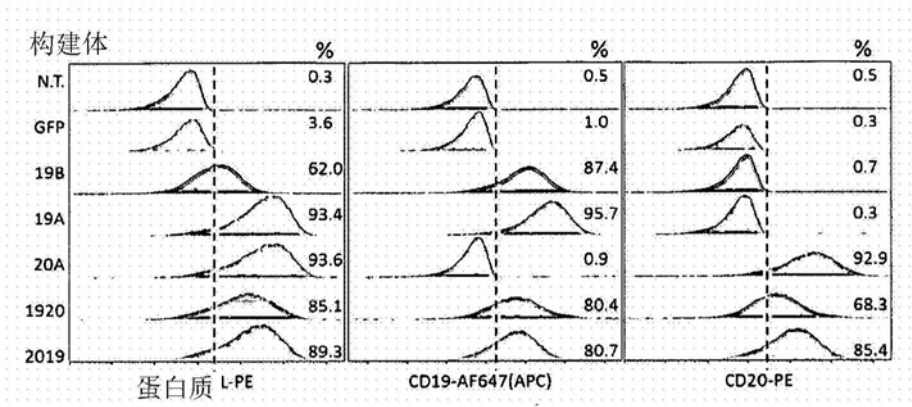


图2A



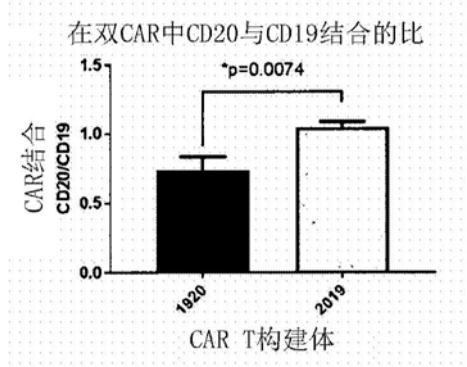


图2B

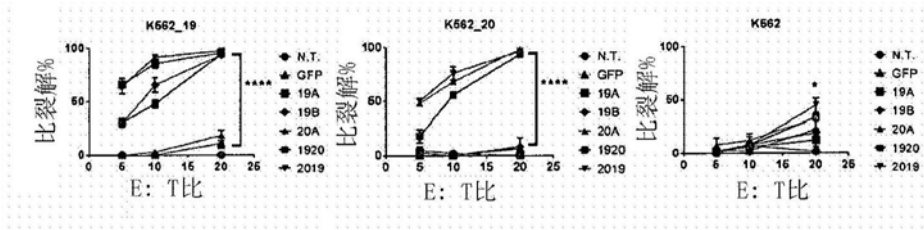


图3A

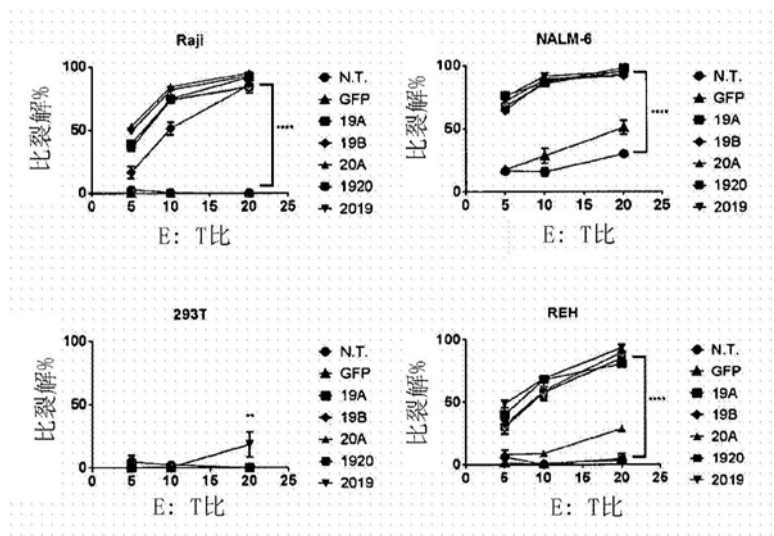


图3B

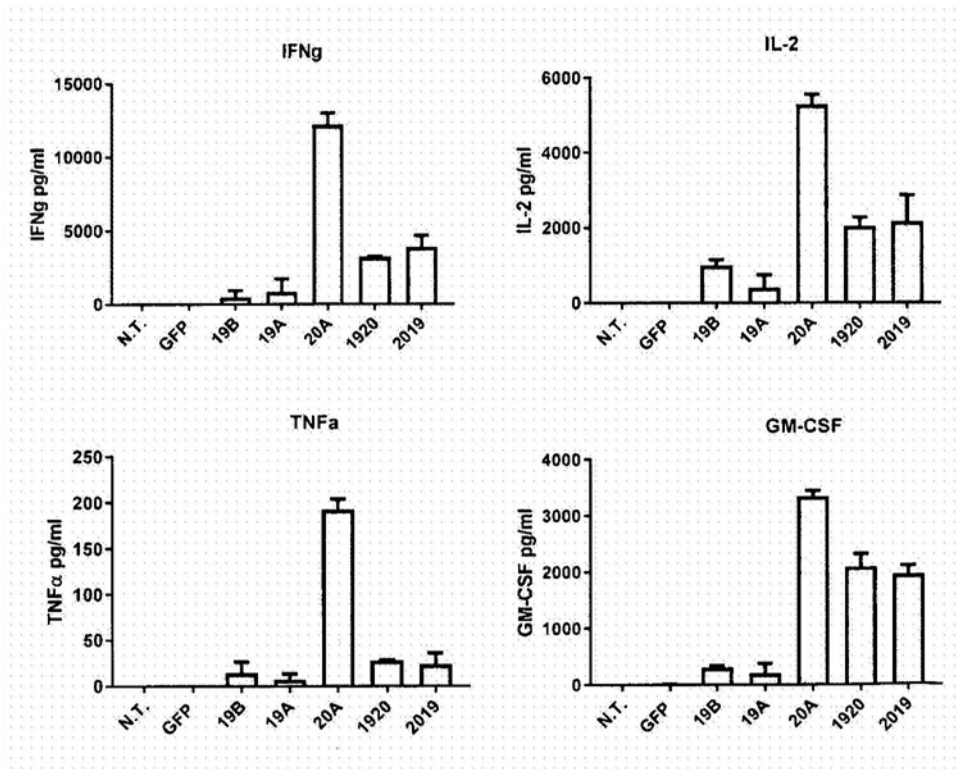


图4

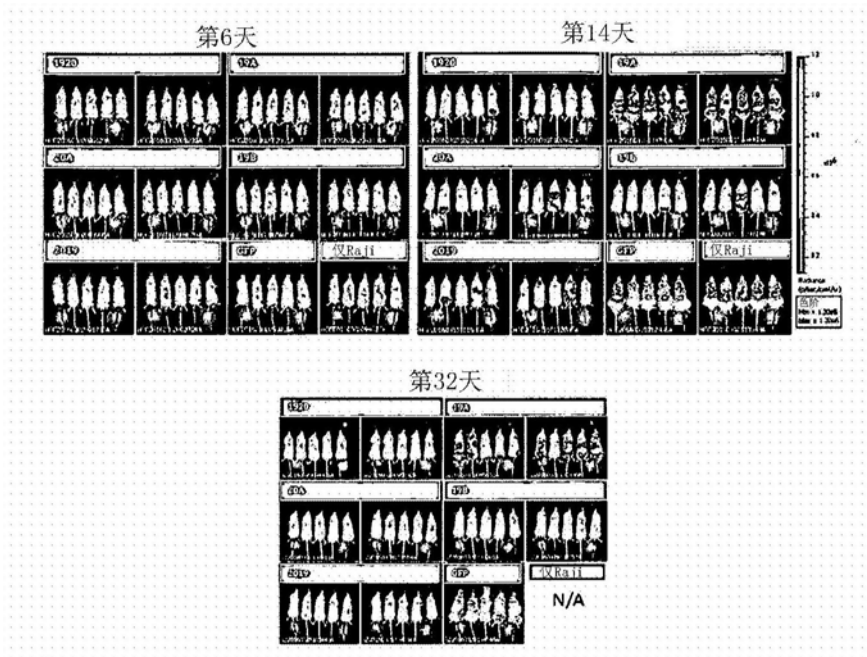


图5A

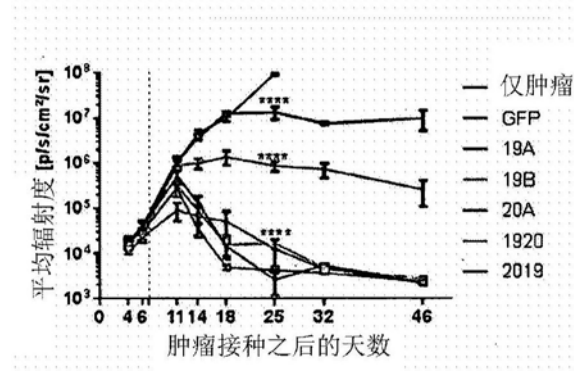


图5B

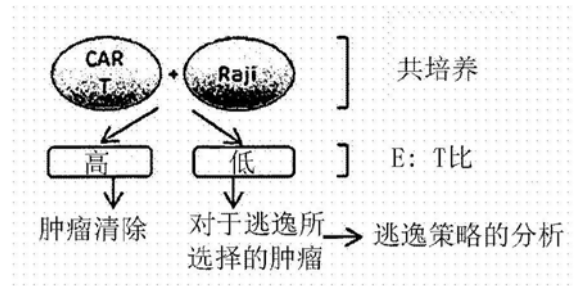


图6A

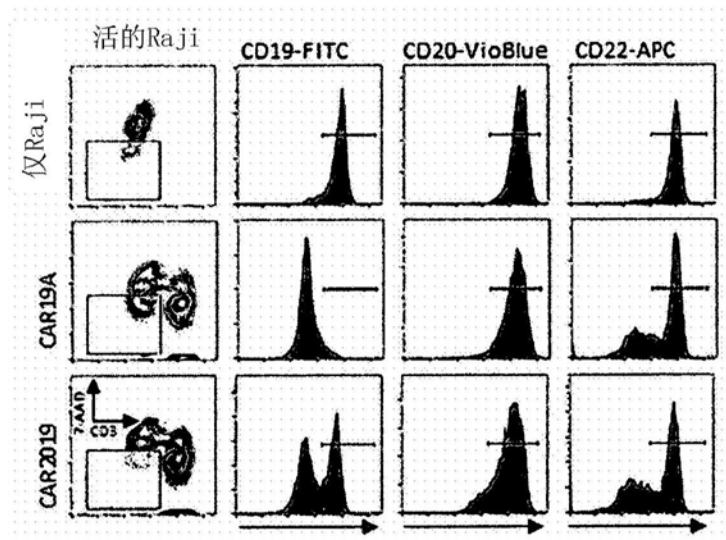


图6B

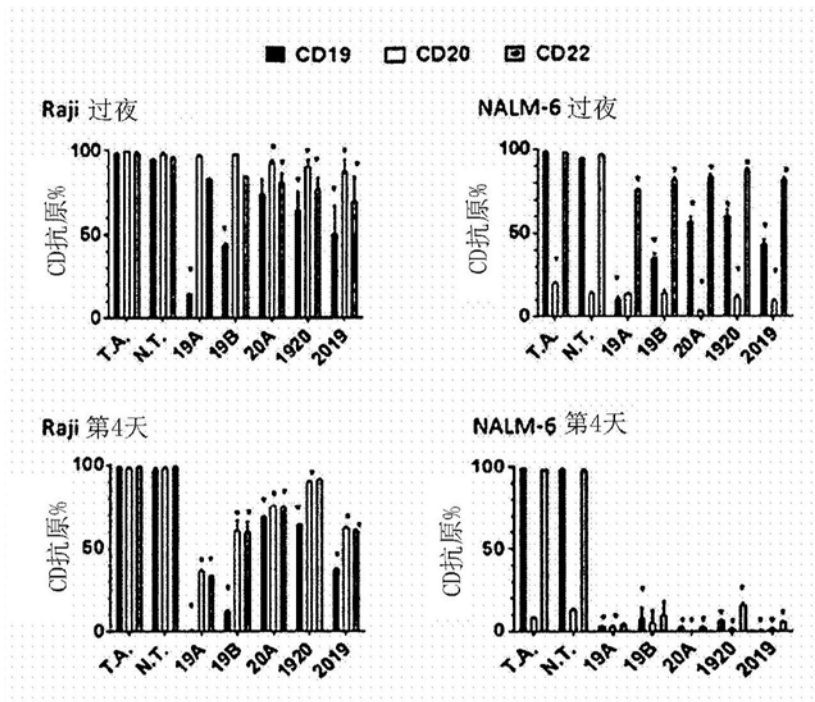


图6C

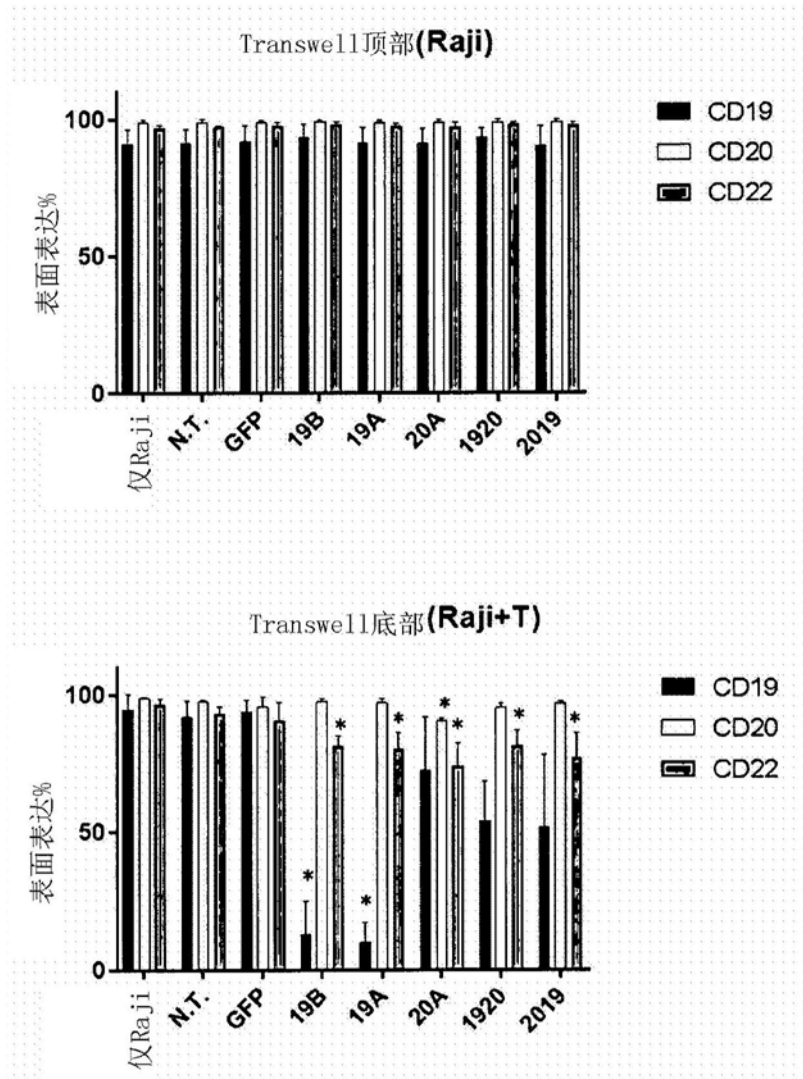


图7

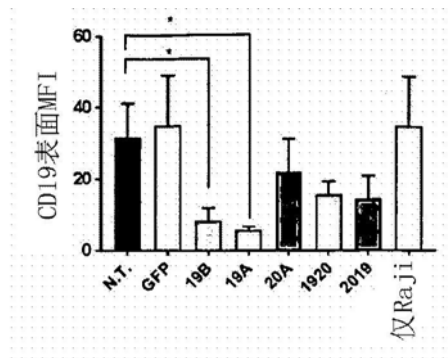


图8A

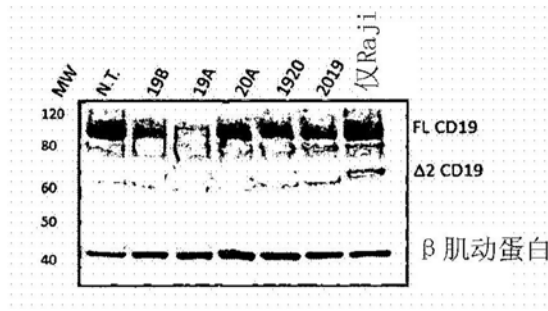


图8B

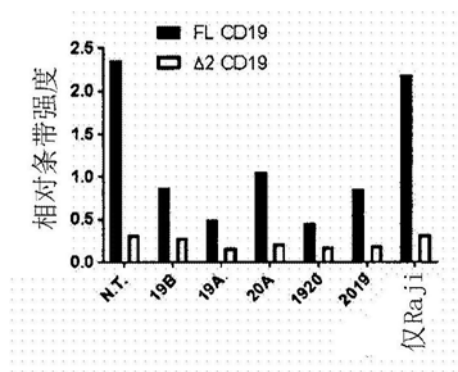


图8C

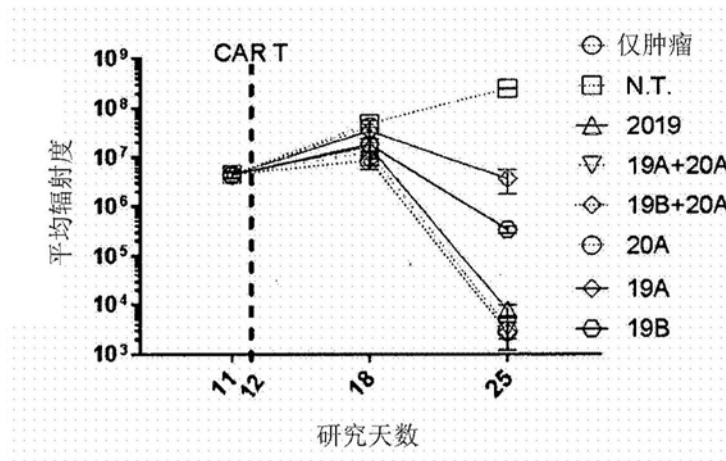


图9A

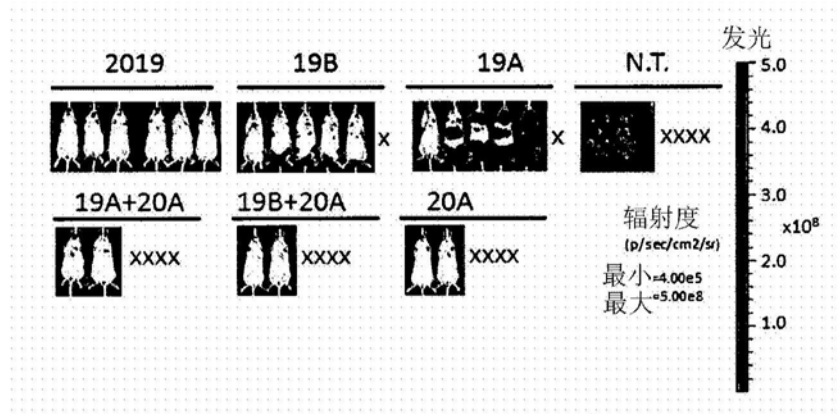


图9B

前导序列-CD19 VL-惠特洛接头CD19 VH (GGGS)-5 CD20 VH (GGGS)-3 CD20 VL CD8  
铰链+TM-4-1BB- CD3z (构建体1920)核酸序列(SEQ ID NO: 1)

ATGCTCCTTCTCGTGACCTCCCTGCTTCTCTGCGAACTGCCCCATCCTGCCT  
TCCTGCTG

ATTCCCGACATTCAGATGACTCAGACCACCTCCTCCCTGTCCGCCTCCCTG  
GGCGACCGC

GTGACCATCTCATGCCGCGCCAGCCAGGACATCTCGAAGTACCTCAACTG  
GTACCAGCAG

AAGCCCGACGGAACCGTGAAGCTCCTGATCTACCACACCTCCCGGCTGCA  
CAGCGGAGTG

CCGTCTAGATTCTCGGGTTCGGGGTCGGGAACTGACTACTCCCTTACTATT  
TCCAACCTG

GAGCAGGAGGATATTGCCACCTACTTCTGCCAACAAGGAAAACACCCTGCC  
GTACACTTTT

GGCGGGGGAACCAAGCTGGAAATCACTGGCAGCACATCCGGTTCGGGA  
AGCCCGGCTCC

GGAGAGGGCAGCACCAAGGGGGAAGTCAAGCTGCAGGAATCAGGACCTG  
GCCTGGTGGCC

CCGAGCCAGTCACTGTCCGTGACTTGTACTGTGTCCGGAGTGTGCTCCCG  
GATTACGGA

GTGTCCTGGATCAGGCAGCCACCTCGGAAAGGATTGGAATGGCTCGGAGT  
CATCTGGGGT

TCCGAAACCACCTATTACAACCTCGGCACTGAAATCCAGGCTCACCATTAT  
CAAGGATAAC

TCCAAGTCACAAGTGTTCTGAAGATGAATAGCCTGCAGACTGACGACAC  
GGCGATCTAC

TATTGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGGATCCTACGCTATGGACTACTG  
GGGCCAGGGG

ACCAGCGTGACCGTGTTCATCCGGAGGCGGCGGCAGCGCGGGGGAGGGT  
CCGGAGGGGGT

图10A



```
GGTTCTGGTGGAGGAGGATCGGGAGGCGGTGGCAGCGAGGTGCAGTTGC  
AACAGTCAGGA  
GCTGAACTGGTCAAGCCAGGAGCCAGCGTGAAGATGAGCTGCAAGGCCT  
CCGGTTACACC  
TTCACCTCCTACAACATGCACTGGGTGAAACAGACCCCGGGACAAGGGCT  
CGAATGGATT  
GGCGCCATCTACCCCGGAATGGCGATACTTCGTACAACCAGAAGTTCAA  
GGGAAAGGCC  
ACCCTGACCGCCGACAAGAGCTCCTCCACCGCGTATATGCAGTTGAGCTC  
CCTGACCTCC  
GAGGACTCCGCCGACTACTACTGCGCACGGTCCAACACTACTATGGAAGCTC  
GTACTGGTTC  
TTCGATGTCTGGGGGGCCGGCACCCTGTGACCGTCAGCTCCGGGGGGCGG  
AGGATCCGGT  
GGAGGCGGAAGCGGGGGTGGAGGATCCGACATTGTGCTGACTCAGTCCCC  
GGCAATCCTG  
TCGGCCTACCGGGCGAAAAGGTCACGATGACTTGTAGAGCGTCGTCCAG  
CGTGAACTAC  
ATGGATTGGTACCAAAAGAAGCCTGGATCGTCACCCAAGCCTTGGATCTA  
CGCTACATCT  
AACCTGGCCTCCGGCGTGCCAGCGCGGTTACGCGGGTCCGGCTCGGGCAC  
CTCATACTCG  
CTGACCATCTCCCGCGTGGAGGCTGAGGACGCCGCGACCTACTACTGCCA  
GCAGTGGTCC  
TTCAACCCGCCGACITTTGGAGGCGGTAAGCTGGAGATCAAAGCGGC  
CGCAACTACC  
ACCCCTGCCCTCGGCCCGGACTCCGGCCCCAACCATCGCAAGCCAACC  
CCTCTCCTTG
```

图10A(续)

```

CGCCCCGAAGCTTGCCGCCCCGGCCGCGGGTGGAGCCGTGCATACCCGGGG
GCTGGACTTT
GCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCCGCTGGCCGGCACTTGCGGCGTGCTC
CTGCTGTCG
CTGGTCATCACCCTTTACTGCAAGAGGGGCCGGAAGAAGCTGCTTTACAT
CTTCAAGCAG
CCGTTTCATGCGCCCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTG
CAGATTCCCT
GAGGAGGAAGAGGGGGGATGCGAACTGCGCGTCAAGTTCTCACGGTCCG
CCGACGCCCC
GCATATCAACAGGGCCAGAATCAGCTCTACAACGAGCTGAACCTGGGAA
GGAGAGAGGAG
TACGACGTGCTGGACAAGCGACGCGGACGCGACCCGGAGATGGGGGGGA
AACCACGGCGG
AAAAACCCTCAGGAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAAGATGG
CGGAAGCCTAC
TCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGGGGAAAGGGTCACGAC
GGGCTGTACCAG
GGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACCTACGATGCCTTGCATATGCAAGC
ACTCCCACCC
CGG

```

图10A (续)

前导序列-CD19 VL-惠特洛接头CD19 VH (GGGS)-5 CD20 VH (GGGS)-3 CD20 VL CD8  
 铰链+TM-4-1BB- CD3z (构建体CAR 1920)的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 2)

```

MLLVTSLLLCELPHPAFLLPDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNW
YQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPY
TFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDY
GVSWIRQPPRKGLEWLGVWGETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDBAI
YYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQ
LQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPNGDTSYN
QKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVT
VSSGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPGS
SPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSSTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPTFGGGTK
LEIKAAATTPAPRPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGT
CGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFS
RSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ
KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDLVQLSTATKDTYDALHMQALPPR

```

图10A (续)

前导序列-CD20 VH (GGGS)3-CD20 VL -(GGGS)5 -CD19 VL-惠特洛接头-CD19 VH CD8  
铰链+TM-4-1BB- CD3z (构建体2019)核酸序列 (SEQ ID NO: 3)

ATGCTCCTTCTCGTGACCTCCCTGCTTCTCTGCGAACTGCCCATCCTGCCT  
TCCTGCTG

ATTCCCAGGTGCAGTTGCAACAGTCAGGAGCTGAACTGGTCAAGCCAGG  
AGCCAGCGTG

AAGATGAGCTGCAAGGCCTCCGGTTACACCTTCACCTCCTACAACATGCA  
CTGGGTGAAA

CAGACCCCGGGACAAGGGCTCGAATGGATTGGCGCCATCTACCCCGGGAA  
TGGCGATACT

TCGTACAACCAGAAGTTCAAGGAAAGGCCACCCTGACCGCCGACAAGA  
GCTCCTCCACC

GCGTATATGCAGTTGAGCTCCCTGACCTCCGAGGACTCCGCCGACTACTA  
CTGCGCACGG

TCCAATACTATGGAAGCTCGTACTGGTTCTTCGATGTCTGGGGGGCCGGC  
ACCACTGTG

ACCGTCAGCTCCGGGGGCGGAGGATCCGGTGGAGGCGGAAGCGGGGGTG  
GAGGATCCGAC

ATTGTGCTGACTCAGTCCCGGCAATCCTGTCCGCCTCACCGGGCGAAAA  
GGTCACGATG

ACTTGTAGAGCGTCCGTCAGCGTGAACCTACATGGATTGGTACCAAAAGAA  
GCCTGGATCG

TCACCCAAGCCTTGGATCTACGCTACATCTAACCTGGCCTCCGGCGTGCCA  
GCGCGGTTT

AGCGGGTCCGGCTCGGGCACCTCATACTCGCTGACCATCTCCCGCGTGGA  
GGCTGAGGAC

GCCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCCTTCAACCCGCCGACTTTTGA  
GGCGGTACT

图10B

```
AAGCTGGAGATCAAAGGAGGCGGCGGCAGCGGCGGGGAGGGTCCGGAG
GGGGTGGTTCT
GGTGGAGGAGGATCGGGAGGCGGTGGCAGCGACATTCAGATGACTCAGA
CCACCTCCTCC
CTGTCCGCCTCCCTGGGCGACCGCGTGACCATCTCATGCCGCGCCAGCCA
GGACATCTCG
AAGTACCTCAACTGGTACCAGCAGAAGCCCGACGGAACCGTGAAGTCCT
GATCTACCAC
ACCTCCCGGCTGCACAGCGGAGTGCCGTCTAGATTCTCGGGTTCGGGGTC
GGGAACTGAC
TACTCCCTTACTATTTCCAACCTGGAGCAGGAGGATATTGCCACCTACTTC
TGCCAACAA
GGAAACACCCTGCCGTACACTTTTGGCGGGGGAACCAAGCTGGAAATCAC
TGGCAGCACA
TCCGGTTCGGGAAGCCCGGCTCCGGAGAGGGCAGCACCAAGGGGGAAG
TCAAGCTGCAG
GAATCAGGACCTGGCCTGGTGGCCCCGAGCCAGTCACTGTCCGTGACTTG
TACTGTGTCC
GGAGTGTGCTCCCGGATTACGGAGTGTCTGGATCAGGCAGCCACCTCG
GAAAGGATTG
GAATGGCTCGGAGTCATCTGGGGTTCGAAACCACCTATTACAACCTCGGC
ACTGAAATCC
AGGCTCACCATTATCAAGGATAACTCCAAGTCACAAGTGTTCTGAAGAT
GAATAGCCTG
CAGACTGACGACACGGCGATCTACTATTGCGCCAAGCACTACTACTACGG
CGGATCCTAC
GCTATGGACTACTGGGGCCAGGGGACCAGCGTGACCGTGTTCATCCGCGGC
CGCAACTACC
ACCCCTGCCCTCGGCCCGGACTCCGGCCCCAACCATCGCAAGCCAACC
CCTCTCCTTG
```

图10B (续)

```
CGCCCCGAAGCTTGCCGCCCGGCCGCGGGTGGAGCCGTGCATACCCGGGG  
GCTGGACTTT  
GCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCCGCTGGCCGGCACTTGCGGCGTGCTC  
CTGCTGTCTG  
CTGGTCATCACCCCTTTACTGCAAGAGGGGGCCGGAAGAAGCTGCTTTACAT  
CTTCAAGCAG  
CCGTTCATGCGGCCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTG  
CAGATTCCCT  
GAGGAGGAAGAGGGGGGATGCGAACTGCGCGTCAAGTTCTCACGGTCCG  
CCGACGCCCC  
GCATATCAACAGGGCCAGAATCAGCTCTACAACGAGCTGAACCTGGGAA  
GGAGAGAGGAG  
TACGACGTGCTGGACAAGCGACGCGGACGCGACCCGGAGATGGGGGGGA  
AACCACGGCGG  
AAAAACCCTCAGGAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAAGATGG  
CGGAAGCCTAC  
TCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGGGGAAAGGGTCACGAC  
GGGCTGTACCAG  
GGA CTGAGCACCGCCACTAAGGATACCTACGATGCCTTGCATATGCAAGC  
ACTCCCACCC  
CGG
```

图10B (续)

前导序列-CD20 VH (GGGS)3- CD20 VL -(GGGS)5 -CD19 VL-惠特洛接头-CD19 VH CD8  
铰链+TM-4-1BB- CD3z氨基酸序列(构建体CAR 2019) (SEQ ID NO: 4)

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTS  
YNMHVVKQTPQGQLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYM  
QLSSLTSEDSADYYCARSNYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSSGGGSGGGGS  
GGGSDIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKWI  
YATSNLASGVPARFSGSGSSTYSLSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPTFGGG  
TKLEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQTSSLSASLGDRVTIS  
CRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTI  
SNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVK  
LQESGGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSET  
TYYNSALKSRLTIKDNSKSVFLKMNSLQTDDAIYYCAKHYYYGGSYAMD  
YWGQGTSVTVSSAAATTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR  
GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTT  
QEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY  
DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR  
KKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

图10B (续)

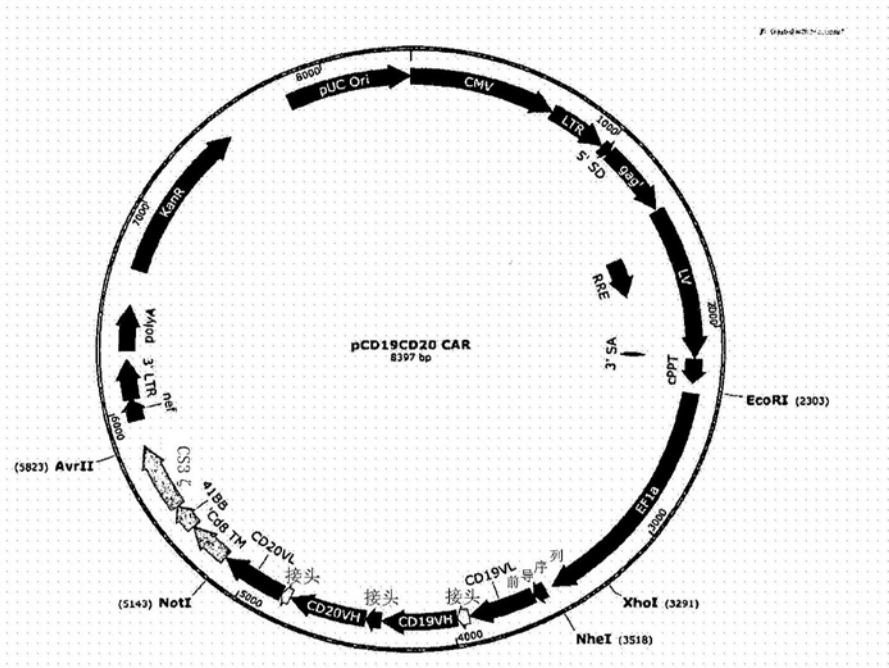


图11A

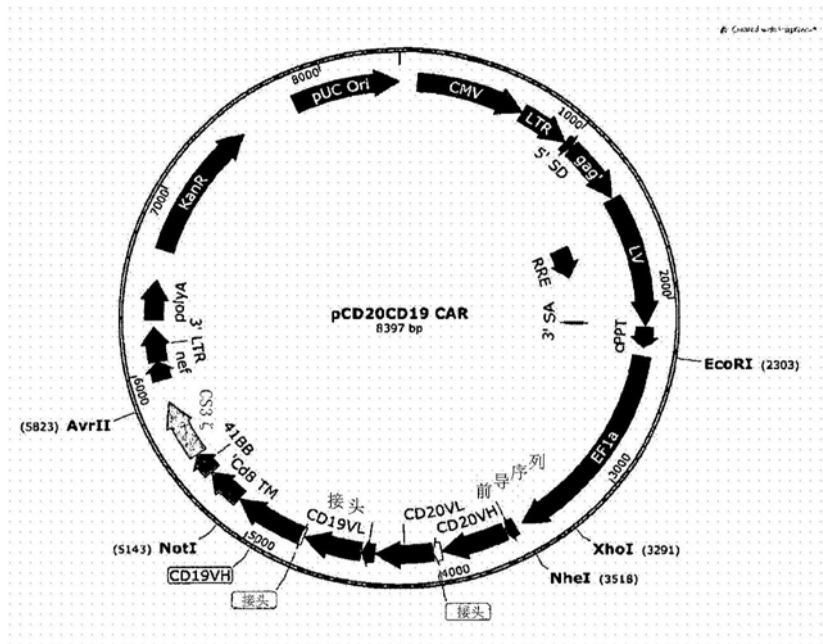


图11B