



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107533051 B

(45)授权公告日 2020.11.13

(21)申请号 201680024710.5

(22)申请日 2016.03.25

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 107533051 A

(43)申请公布日 2018.01.02

(30)优先权数据  
62/139,617 2015.03.27 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2017.10.27

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2016/024361 2016.03.25

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02016/160622 EN 2016.10.06

(73)专利权人 南加利福尼亚大学

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 艾伦·L·爱泼斯坦 培生·胡

(74)专利代理机构 广州文冠倪律知识产权代理  
事务所(普通合伙) 44348  
代理人 倪小敏 何锦标

(51)Int.Cl.  
G01N 33/53(2006.01)  
G01N 33/537(2006.01)  
G01N 33/543(2006.01)

审查员 张婷

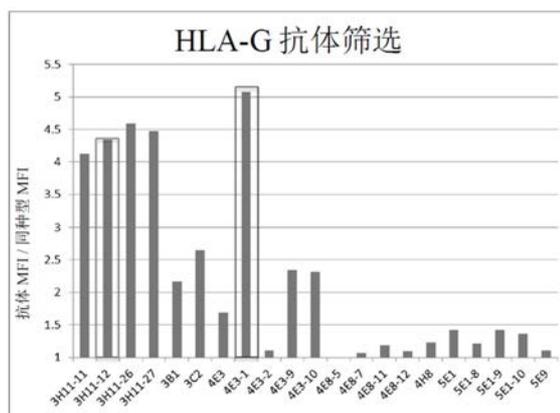
权利要求书4页 说明书43页 附图8页

## (54)发明名称

HLA-G作为CAR T细胞免疫疗法的新靶标

## (57)摘要

本发明描述了作为癌症治疗的新方法的靶向人HLA-G的CAR细胞和抗体。HLA-G CAR细胞被认为对患者是安全有效的,并可被用于治疗表达HLA-G的人体肿瘤。



1. 一种分离的抗体,其包含重链免疫球蛋白可变域序列和轻链免疫球蛋白可变域序列,其中所述抗体结合至HLA-G的表位,其中重链包含

- (a) 重链CDRH1,其氨基酸序列为GFNIKDTY (SEQ ID NO:1);
- (b) 重链CDRH2,其氨基酸序列为IDPANGNT (SEQ ID NO:3);和
- (c) 重链CDRH3,其氨基酸序列为ARSYYGGFAY (SEQ ID NO:5);

并且轻链包含

- (a) 轻链CDRL1,其氨基酸序列为KSVSTSGYSY (SEQ ID NO:11);
- (b) 轻链CDRL2,其氨基酸序列为LVS (SEQ ID NO:13);和
- (c) 轻链CDRL3,其氨基酸序列为QHSRELPRT (SEQ ID NO:15);

或者其中重链包含

- (a) 重链CDRH1,其氨基酸序列为GFTFNTYA (SEQ ID NO: 2);
- (b) 重链CDRH2,其氨基酸序列为IRSKSNNYAT (SEQ ID NO: 4);和
- (c) 重链CDRH3,其氨基酸序列为VRGGYWSFDV (SEQ ID NO: 6);

并且轻链包含

- (a) 轻链CDRL1,其氨基酸序列为KSLLSHNGNTY (SEQ ID NO: 12);
- (b) 轻链CDRL2,其氨基酸序列为RMS (SEQ ID NO: 14);和
- (c) 轻链CDRL3,其氨基酸序列为MQHLEYPYT (SEQ ID NO: 16)。

2. 根据权利要求1所述的抗体,其中重链免疫球蛋白可变域序列包含氨基酸序列SEQ ID NO: 8,并且轻链免疫球蛋白可变域序列包含氨基酸序列SEQ ID NO: 18。

3. 根据权利要求1所述的抗体,其中重链免疫球蛋白可变域序列包含氨基酸序列SEQ ID NO: 10,并且轻链免疫球蛋白可变域序列包含氨基酸序列SEQ ID NO: 20。

4. 根据权利要求1至3的任一项所述的抗体,其中所述抗体选自:单克隆抗体、嵌合抗体或人源化抗体。

5. 一种权利要求1至4的任一项所述的抗体的抗原结合片段,其中所述抗原结合片段选自Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、scF<sub>v</sub>和F<sub>v</sub>。

6. 一种分离的间接体内复合物,包含权利要求1至4的任一项所述的抗体或权利要求5所述的抗原结合片段,并且任选地包含可检测标记物。

7. 一种分离的间接体内细胞,包含权利要求6所述的复合物。

8. 权利要求1至4的任一项所述的抗体或权利要求5所述的抗原结合片段在制备用于检测生物样品中HLA-G的试剂中的应用,其中将该样品与权利要求1至4的任一项所述的抗体或权利要求5所述的抗原结合片段接触,以及检测由所述抗体或抗原结合片段与HLA-G结合而形成的复合物。

9. 根据权利要求8所述的应用,其中所述样品包含细胞样品或组织样品。

10. 根据权利要求8所述的应用,其中所述样品来自于被诊断为患有、怀疑患有或有风险患癌症的对象。

11. 根据权利要求10所述的应用,其中所述癌症选自前列腺癌或卵巢癌。

12. 根据权利要求8所述的应用,其中所述检测包括免疫组化、Western杂交、流式细胞术或ELISA中的一个或多个。

13. 权利要求1-4的任一项所述的抗体或权利要求5所述的抗原结合片段在制备用于检

测从对象分离的样品中的病变细胞的试剂中的应用,其中

(a) 通过检测由权利要求1至4的任一项所述的抗体或权利要求5所述的抗原结合片段与样品中的HLA-G结合而形成的复合物,来检测生物样品中HLA-G的水平;以及

(b) 将步骤(a)中观察到的HLA-G的水平与对照生物样品中观察到的HLA-G的水平相比较;

其中,当HLA-G水平与对照生物样品的HLA-G水平相比升高时,检测出该病变细胞;当HLA-G水平与对照生物样品观察到的相比未升高时,不检测出该病变细胞。

14. 根据权利要求13所述的应用,其中所述对象的所述生物样品包括分离自前列腺或卵巢的一种或多种样品。

15. 根据权利要求13所述的应用,其中所述检测包括免疫组化、Western杂交、流式细胞术或ELISA中的一个或多个。

16. 根据权利要求13至15的任一项所述的应用,其中所述应用包括从所述对象分离所述生物样品。

17. 根据权利要求16所述的应用,其中所述对象是哺乳动物。

18. 根据权利要求17所述的应用,其中所述哺乳动物选自鼠科动物、猫科动物、犬科动物、羊、牛科动物、猴和人。

19. 一种HLA-G特异性抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段具有与权利要求1至4的任一项所述的抗体相同的表位特异性。

20. 一种检测HLA-G的试剂盒,其包含权利要求1至4的任一项所述的抗体或权利要求5所述的抗原结合片段,以及使用说明。

21. 权利要求1-4的任一项所述的抗体或权利要求5所述的抗原结合片段在制备用于检测肿瘤样品中HLA-G的试剂中的应用,其中:

(a) 将该样品与权利要求1-4的任一项所述的抗体或权利要求5所述的抗原结合片段接触,

(b) 检测由所述抗体或抗原结合片段与HLA-G结合而形成的复合物。

22. 一种嵌合抗原受体,其包含:(a) 权利要求1-4的任一项所述的抗体或权利要求5所述的抗原结合片段的抗原结合域,其中重链可变区和轻链可变区包含所述抗体或所述抗原结合片段的抗原结合域;(b) CD8  $\alpha$  铰链结构域;(c) CD8  $\alpha$  跨膜结构域;(d) CD28共刺激信号传导区和/或4-1BB共刺激信号传导区;以及(e) CD3 $\zeta$ 信号传导结构域。

23. 根据权利要求22所述的嵌合抗原受体,其中所述CD8  $\alpha$  铰链结构域包含SEQ. ID NO: 31。

24. 根据权利要求22所述的嵌合抗原受体,其进一步包含位于重链可变区和轻链可变区之间的连接多肽。

25. 根据权利要求24所述的嵌合抗原受体,其中所述连接多肽是甘氨酸-丝氨酸连接多肽。

26. 根据权利要求23所述的嵌合抗原受体,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO: 8或10。

27. 根据权利要求23或24所述的嵌合抗原受体,其中所述CD8  $\alpha$  跨膜结构域包含SEQ ID NO: 34。

28. 根据权利要求23或24所述的嵌合抗原受体,其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO: 18或20。

29. 根据权利要求23至26的任一项所述的嵌合抗原受体,其中所述重链可变区和轻链可变区通过甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸-丝氨酸接头连接。

30. 根据权利要求22-26的任一项所述的嵌合抗原受体,其进一步包含可检测标记物或纯化标记物。

31. 一种分离的核酸序列,其编码权利要求1-4的任一项所述的抗体、权利要求5所述的抗原结合片段、权利要求22至30的任一项所述的嵌合抗原受体,或该核酸序列的互补序列。

32. 根据权利要求31所述的分离的核酸序列,其进一步包含位于所述抗HLA-G抗体或HLA-G配体的抗原结合域的上游的Kozak共有序列。

33. 根据权利要求31或32所述的分离的核酸序列,其进一步包含抗生素抗性多核苷酸。

34. 包含权利要求31至33的任一项所述的分离的核酸序列的载体。

35. 根据权利要求34所述的载体,其中所述载体是质粒。

36. 根据权利要求34所述的载体,其中载体是慢病毒载体。

37. 一种分离的细胞,其包含权利要求22至30的任一项所述的嵌合抗原受体;和/或权利要求31至33的任一项所述的分离的核酸序列;和/或权利要求34至36的任一项所述的载体。

38. 根据权利要求37所述的分离的细胞,其中所述细胞是T细胞。

39. 根据权利要求37所述的分离的细胞,其中所述细胞是NK细胞。

40. 一种组合物,其包含载体以及以下的一种或多种:包含权利要求22至30的任一项所述的嵌合抗原受体的分离的细胞;和/或权利要求31至33的任一项所述的分离的核酸序列;和/或权利要求34至36的任一项所述的载体;和/或权利要求37至39或7的任一项所述的分离的细胞;和/或权利要求1至4的任一项所述的抗体;和/或权利要求5所述的抗原结合片段;和/或权利要求6所述的复合物。

41. 一种生产表达HLA-G 嵌合抗原受体的细胞的方法,包括:

(i) 使用编码权利要求22至30的任一项所述的嵌合抗原受体的核酸序列转导分离的细胞的群体;和

(ii) 筛选出用步骤(i)中所述的核酸序列成功转导的所述分离的细胞的亚群,从而生产表达HLA-G 嵌合抗原受体的细胞。

42. 根据权利要求41所述的方法,其中所述分离的细胞选自T细胞和NK细胞。

43. 权利要求37-39的任一项所述的分离的细胞在制备用于抑制有需要的对象体内肿瘤生长的药物中的应用。

44. 根据权利要求43所述的应用,其中所述分离的细胞是正被治疗的所述对象自体同源的。

45. 根据权利要求43所述的应用,其中所述肿瘤是实体肿瘤,任选地是甲状腺肿瘤、卵巢肿瘤或前列腺癌肿瘤。

46. 根据权利要求43至45的任一项所述的应用,其中所述肿瘤是实体肿瘤。

47. 根据权利要求43至45的任一项所述的应用,其中肿瘤细胞表达或过表达HLA-G。

48. 权利要求37-39的任一项所述的分离的细胞在制备用于治疗有此需要的对象的癌

症的药物中的应用。

49. 根据权利要求48所述的应用,其中所述分离的细胞是正被治疗的所述对象自体同源的。

50. 根据权利要求48所述的应用,其中所述癌症是甲状腺癌、卵巢癌或前列腺癌。

51. 根据权利要求48至50的任一项所述的应用,其中癌细胞表达或过表达HLA-G。

52. 根据权利要求48至50的任一项所述的应用,其中所述对象是人类患者。

53. 权利要求1-4中的任一项所述的抗体或权利要求5所述的抗原结合片段在制备用于确定患者是否可能或不太可能对HLA-G 嵌合抗原受体疗法有响应的试剂中的应用,其中将分离自该患者的肿瘤样品与有效量的抗HLA-G抗体接触,并检测是否有任何结合至该肿瘤样品的抗体存在,其中存在结合至该肿瘤样品的抗体表示该患者可能对HLA-G 嵌合抗原受体疗法有响应,而不存在结合至该肿瘤样品的抗体表示该患者不太可能对HLA-G 嵌合抗原受体疗法有响应。

54. 根据权利要求53所述的应用,其中向被确定可能对HLA-G 嵌合抗原受体疗法有响应的患者进一步施用有效量的HLA-G 嵌合抗原受体疗法。

## HLA-G作为CAR T细胞免疫疗法的新靶标

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35 U.S.C. § 119(e) 要求2015年3月27日提交的美国临时申请62/139,617号的优先权,其所有内容通过引用并入本文中。

### 技术领域

[0003] 本发明总体上涉及人免疫学领域,具体涉及癌症免疫疗法。

### 背景技术

[0004] 以下关于本发明背景技术的描述仅用于辅助读者理解本发明,并非承认描述或构成本发明的现有技术。

[0005] HLA-G非典型MHC I类分子,主要作用在于抑制细胞毒性免疫细胞功能,特别是作为抑制性NK细胞受体的配体。

### 发明内容

[0006] 本发明提供的是新的抗HLA-G抗体及其在诊断和治疗中的应用方法。因此,本发明提供一种分离的抗体,其包含重链(HC)免疫球蛋白可变域序列和轻链(LC)免疫球蛋白可变域序列,其中所述抗体结合至包含以下氨基酸序列的人HLA-G表位:

[0007] GSHSMRYFSA AVSRPGRGEP RFIAMGYVDD TQFVRFSDSDS ACPRMEPRAP WVEQEGPEYW EEETRNTKAH AQTDRMNLQT LRGYYNQSEA SSHTLQWMIG CDLGSDGRLL RGYEQYAYDG KDYLALNEDL RSWTAADTAA QISKRKCEAA NVAEQRRAYL EGTCVEWHLA-G YLENGKEMLQ RADPPKTHVT HHPVFDYEAT LRCWALGFYP AEIILTQRD GEDQTQDVEL VETRPAGDGT FQKWAADVVP SGEEQRYTCH VQHEGLPEPL MLRWKQSSLP TIPIMGI VAGLVVLA AV VTGA AVAVL WRKKSSD (SEQ ID NO: 30)或其等效物。在一个方面,所述抗体具有至少 $10^{-6}$  M的特异性结合亲和性。在某些方面,抗体的亲和力为至少约 $10^{-7}$  M,优选为 $10^{-8}$  M、 $10^{-9}$  M、 $10^{-10}$  M、 $10^{-11}$  M或 $10^{-12}$  M。

[0008] 在本发明的某些实施方式中,该抗体包含重链(HC)免疫球蛋白可变域序列和轻链(LC)免疫球蛋白可变域序列,其中所述抗体结合至包含氨基酸序列、或实质上由该氨基酸序列组成、或由该氨基酸序列组成的人HLA-G,其中该HC包含以下序列中的任何一个:包含氨基酸序列GFNIKDTY (SEQ ID NO: 1)或GFTFNTYA (SEQ ID NO: 2)的HC CDRH1或它们每一个的等效物;和/或包含氨基酸序列IDPANGT (SEQ ID NO: 3)或IRSKSNNYAT (SEQ ID NO: 4)的HC CDRH2或它们每一个的等效物;和/或包含氨基酸序列ARSYYGGFAY (SEQ ID NO: 5)或VRGGYWSFDV (SEQ ID NO: 6)的HC CDRH3或它们每一个的等效物。

[0009] 在本发明的某些实施方式中,所述抗体包含重链(HC)免疫球蛋白可变域序列和轻链(LC)免疫球蛋白可变域序列,其中该抗体结合至包含氨基酸序列、或实质上由该氨基酸序列组成、或由该氨基酸序列组成的人HLA-G,其中该LC包含以下序列中的任何一个:包含氨基酸序列KSVSTSGYSY (SEQ ID NO: 11)或KSLLSNGNTY (SEQ ID NO: 12)或它们每一个的等效物;和/或包含氨基酸序列LVS (SEQ ID NO: 13)或RMS (SEQ ID NO: 14)的LC

CDRL2或它们每一个的等效物；和/或包含氨基酸序列QHSRELPRT (SEQ ID NO: 15) 或MQHLEYPYT (SEQ ID NO: 16)的LC CDRL3或它们每一个的等效物。

[0010] 本发明的一些方面涉及包含对HLA-G特异的抗原结合域(例如抗HLA-G抗体的抗原结合域)的嵌合抗原受体(CAR)、其编码核酸以及其生产和使用方法。

[0011] 本发明的其他方面涉及嵌合抗原受体(CAR),其包含:(a)HLA-G抗体的抗原结合域;(b)铰链结构域;(c)跨膜结构域;和(d)胞内结构域。本发明的其他方面还涉及嵌合抗原受体(CAR),其包含:(a)HLA-G抗体的抗原结合域;(b)铰链结构域;(c)CD28跨膜结构域;(d)选自CD28共刺激信号传导区、4-1BB共刺激信号传导区、ICOS共刺激信号传导区和OX40共刺激区的一个或多个共刺激区;和(e)CD3 zeta信号传导结构域或其等效物或替代物。

[0012] 在另一个方面,本发明提供一种嵌合抗原受体(CAR),其包含:(a)抗HLA-G抗体的抗原结合结构域,(b)CD8 $\alpha$ 铰链结构域;(c)CD8 $\alpha$ 跨膜结构域;(d)CD28共刺激信号传导区和/或4-1BB共刺激信号传导区;和(e)CD3 zeta信号传导结构域,或其等效物或替代物。

[0013] 在另一个方面,本发明提供一种嵌合抗原受体(CAR),其包含:(a)抗HLA-G抗体的抗原结合结构域,(b)CD8 $\alpha$ 铰链结构域;(c)CD8 $\alpha$ 跨膜结构域;(d)4-1BB共刺激信号传导区;和(e)CD3 zeta信号传导结构域,或其等效物或替代物。

[0014] 本发明的其他方面涉及编码这些抗体的分离的核酸序列,包含该核酸序列的载体和宿主细胞。

[0015] 本发明的其他方面还涉及包含HLA-G CAR的分离的细胞以及产生这些细胞的方法。本发明的方法方面还涉及抑制肿瘤生长以及治疗癌症患者的方法,包括施用有效量的所述分离的细胞。

[0016] 本发明的其他方面还涉及用于通过HLA-G抗体和/或HLA-G CAR细胞来确定患者是否可能或不太可能响应HLA-G CAR疗法的方法和试剂盒。

[0017] 本发明的其他方面还涉及包含载体以及本发明实施方式中描述的一种或多种产物的组合物。在一些方面,本发明提供包含载体以及一种或多种以下产物的组合物:HLA-G抗体;和/或HLA-G CAR;和/或编码HLA-G抗体或HLA-G CAR的分离的核酸;和/或包含编码HLA-G抗体或HLA-G CAR的分离的核酸序列的载体;和/或包含HLA-G CAR的分离的细胞。

## 附图说明

[0018] 图1显示抗人HLA-G的新生成的单克隆抗体的流式细胞术筛选数据。阳性杂交瘤(3H11-12和4E3-1)的亚克隆被选择用来基于这些结果产生CAR T细胞。

[0019] 图2A-2D显示HLA-G在甲状腺乳头状癌和正常甲状腺组织中反应性的免疫组织化学(使用HLA-ABC对照染色)。图2A显示使用抗体4E3-1的HLA-G阳性乳头状甲状腺癌切片的低放大倍数图(100X)。图2B显示HLA-G阳性的另一乳头状甲状腺癌的更高放大倍数图(250X)。图2C显示正常甲状腺组织对HLA-G的阴性反应性(250X),图2D显示正常甲状腺组织对HLA-ABC的阳性反应(100X)。

[0020] 图3显示质膜内第三代抗HLA-G CAR的DNA序列和理论结构的示意图。

[0021] 图4显示如在图1中所描述的另外的抗体筛选。

[0022] 图5图示了基因转移载体及该转基因的示意图。该基因转移载体的骨架是来源于HIV的双顺反子慢病毒载体pLVX-IRES-ZsGreen,其包含HIV-1 5'和3'长末端重复序列

(LTR)、包装信号( $\Psi$ )、EF1 $\alpha$ 启动子、内部核糖体进入位点(IRES)、ZsGreen、绿色荧光蛋白、土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)和猿猴病毒40复制起点(SV40)。EF-1 $\alpha$ 启动子的存在保证了该转基因的组成型表达,该转基因包含对HLA-G特异的scFv、CD8铰链和跨膜区以及CD28、4-1BB和CD3 $\zeta$ 信号传导结构域。IRES区进行检测蛋白ZsGreen的表达。载体的整合可通过荧光显微镜分析细胞中是否存在ZsGreen来确认。

[0023] 图6显示HLA-G CAR T细胞的细胞毒性。使用方法部分描述的LDH细胞毒性试剂盒测定表达HLA-G CAR的T细胞的细胞毒性。试验前,使用 $\alpha$ CD3/CD8小珠(Stem Cell Technologies, 30  $\mu$ l加入2 ml培养基)活化T细胞。HLA-G慢病毒颗粒转导活化的T细胞,此后用 $\alpha$ CD3/CD8小珠活化T细胞。未转导的活化T细胞和TLBR-2 T淋巴细胞系被用作对照。每孔种植3,000 SKOV3或TLBR-2细胞。HLA-G转导的T细胞以20:1、10:1、5:1和1:1 (60,000 - 3000个细胞)的比率加入孔内。每个数据点代表三次实验的平均值。

[0024] 图7显示HLA-G CAR的蛋白表达。HLA-G CAR慢病毒颗粒转导的T细胞表达HLA-G CAR蛋白。CAR蛋白的尺寸预计为60kDa。使用CD3 $\zeta$ 抗体检测该蛋白。使用50 $\mu$ g蛋白用于Western杂交。使用 $\beta$ -肌动蛋白作为上样内参。

[0025] 发明详述

[0026] 要理解的是,本发明不限于所描述的特定方面,因为特定的方面肯定会改变。还应理解,此处所使用的术语仅用于描述特定方面,并且不意味着限制,本发明的范围由所附权利要求限定。

[0027] 除非另有定义,否则此处所使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解的相同含义。虽然与本文所述的任何方法和材料类似或等价的方法和材料可被用于实践或测试本技术,但现在要描述的是目前优选的方法、装置和材料。此处引用的所有技术和专利出版物均通过引用纳入本文中。本文的任何部分不应被解释为承认本技术不早于这些公开内容。

[0028] 除非另有说明,否则本发明的实施将使用组织培养、免疫学、分子生物学、微生物学、细胞生物学和重组DNA的常规技术,这些都是本领域技术范围内。参见例如 Sambrook and Russell eds. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第3版; 系列书 Ausubel et al. eds. (2007) *Current Protocols in Molecular Biology*; 系列书 *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); MacPherson et al. (1991) *PCR 1: A Practical Approach* (IRL Press at Oxford University Press); MacPherson et al. (1995) *PCR 2: A Practical Approach*; Harlow and Lane eds. (1999) *Antibodies, A Laboratory Manual*; Freshney (2005) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 5th edition; Gait ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; U.S.专利号4,683,195; Hames and Higgins eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Anderson (1999) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames and Higgins eds. (1984) *Transcription and Translation; Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press (1986)); Perbal (1984) *A Practical Guide to Molecular Cloning*; Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides ed. (2003) *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*; Mayer and Walker eds. (1987) *Immunochemical*

*Methods in Cell and Molecular Biology* (Academic Press, London); 以及 Herzenberg *et al.* eds (1996) *Weir's Handbook of Experimental Immunology*.

[0029] 所有数值(包括范围值),例如pH、温度、时间、浓度和分子量,都是近似值,适当时可上下浮动1.0或0.1,或浮动 $\pm 15\%$ 、或10%、或5%、或2%。要理解的是,虽然不会总是明确表述,但所有数值前都有术语“约”。还要理解的是,虽然不会总是明确表述,但本文所述的试剂仅仅是示例性的,这些试剂的等效物在本领域是已知的。

[0030] 不需明确指出,除非另有说明,否则推定当本发明涉及多肽、蛋白质、多核苷酸或抗体时,它们的等效物或生物等效物也预期在本发明的范围内。

[0031] 定义

[0032] 如在本文和在权利要求中使用的,单数形式“一个”、“一种”、以及“所述”包括复数指代,除非文中另外明确规定。例如,术语“一个细胞”包括多个细胞,包括其混合物。

[0033] 如本文所用的,术语“动物”表示活的多细胞脊椎动物生物,是包括例如哺乳动物和鸟类的类别。术语“哺乳动物”包括人类哺乳动物和非人类哺乳动物。

[0034] 术语“对象”、“宿主”、“个体”和“患者”在此被可交换地使用,表示人类和兽医对象,例如人类、动物、非人灵长类动物、狗、猫、羊、鼠、马和牛。在一些实施方式中,所述对象是人类。

[0035] 如本文使用的,术语“抗体”统一指免疫球蛋白或免疫球蛋白样分子,包括例如且不限于IgA、IgD、IgE、IgG和IgM及其组合,以及在任何脊椎动物中在免疫反应期间产生的类似分子,所述脊椎动物例如是哺乳动物(例如人类、山羊、兔和鼠)以及非哺乳动物物种(例如鲨鱼免疫球蛋白)。除非另有具体说明,否则术语“抗体”包括特异性地结合至感兴趣的分子(或感兴趣的高度相似的分子的群组)至实质性排除结合至其他分子的完整的免疫球蛋白和“抗体片段”或“抗原结合片段”(例如,在生物样品中与对其他分子的结合常数相比,对感兴趣的分子的结合常数大至少 $10^3 M^{-1}$ 、至少 $10^4 M^{-1}$ 或至少 $10^5 M^{-1}$ 的抗体和抗体片段)。术语“抗体”还包括遗传工程形式,例如嵌合抗体(例如人源化鼠抗体)、异源偶联抗体(例如双特异性抗体)。还请参见Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.); Kuby, J., *Immunology*, 3<sup>rd</sup> Ed., W.H. Freeman & Co., New York, 1997。

[0036] 如本文使用的,术语“抗原”是指可以被特异性的体液或细胞免疫的产品(例如抗体分子或T细胞受体)特异性地结合的化合物、组合物或物质。抗原可以是任何类型的分子,包括例如半抗原、简单中间代谢物、糖(例如寡糖)、脂质和激素以及大分子(例如复合碳水化合物(例如多糖))、磷脂和蛋白质。常见的抗原的类别包括但不限于病毒抗原、细菌抗原、真菌抗原、原生动物和其他寄生虫抗原、肿瘤抗原、涉及自身免疫性疾病的抗原、过敏和移植物排斥、毒素和其他杂项抗原。

[0037] 就抗体结构而言,免疫球蛋白具有通过二硫键互相连接的重(H)链和轻(L)链。存在两种类型的轻链: $\lambda$ 和 $\kappa$ 。存在决定抗体分子的功能活性的五种主要的重链类型(或同种型):IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。每个重链和轻链都包括恒定区域和可变区域(所述区域也被称为“结构域”)。结合起来,重链和轻链可变区域特异性地结合抗原。重链和轻链可变区域包括被三个高度可变区域打断的“框架”区域,所述高度可变区域也被称为“互补决定区域”或“CDR”。框架区域和CDR的范围已经被确定(参见Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins*

of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991, 其以引用的方式合并入本文中)。Kabat数据库现在在线维护。不同的轻链或重链的框架区域的序列在物种之内是相对保守的。抗体的框架区域,即组成的轻链和重链的结合的框架区域,主要采用 $\beta$ 折叠构象,而CDR形成环,该环连接所述 $\beta$ 折叠结构或者在一些情况中形成所述 $\beta$ 折叠的一部分。因此,框架区域作用来形成支架,其用来通过互链、非共价相互作用将CDR定位在正确的朝向中。

[0038] CDR主要负责结合至抗原的表位。每个链的CDR通常被称为CDR1、CDR2和CDR3,这是从N末端开始依次进行编号,并且也通常由该特定的CDR所位于的链而确定。因此, $V_H$  CDR3位于发现其的抗体的重链的可变结构域,而 $V_L$  CDR1是来自发现其的抗体的轻链的可变结构域的CDR1。结合LHR的抗体将具有特异性的 $V_H$ 区域和 $V_L$ 区域序列,并因此具有特异性的CDR序列。具有不同的特异性(即对不同抗原的不同结合位点)的抗体具有不同的CDR。虽然抗体与抗体之间不同的是CDR,但是在CDR之内只有数量有限的氨基酸位置直接涉及抗原结合。在CDR之内的这些位置被称为特异性决定残基(SDR)。

[0039] 如本文使用的,术语“抗原结合结构域”是指能够特异性地结合至抗原靶标的任何蛋白或多肽结构域。

[0040] 如本文使用的,术语“嵌合抗原受体”(CAR)是指这样的融合蛋白,其包括能够结合至抗原的细胞外结构域、衍生自与该细胞外结构域衍生自的多肽不同的多肽的跨膜结构域、以及至少一个细胞内结构域。“嵌合抗原受体(CAR)”有时被称为“嵌合受体”、“T-体(T-body)”或“嵌合免疫受体(CIR)”。“能够结合至抗原的细胞外结构域”是指能够结合至某个抗原的任何寡肽或多肽。“细胞内结构域”是指已知用作发送信号来引起细胞内的生物过程的激活或抑制的结构域的任何寡肽或多肽。“跨膜结构域”是指已知跨越细胞膜并且能够作用来连接细胞外结构域和信号传导结构域的任何寡肽或多肽。嵌合抗原受体可以任选地包括“铰链(hinge)结构域”,其用作细胞外结构域和跨膜结构域之间的接头。在本文中公开了编码每个结构域的组分的非限制性的示例性多核苷酸序列,例如:

[0041] 铰链结构域:IgG1重链铰链序列,SEQ. ID NO: 38:

[0042] CTCGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCG

[0043] 跨膜结构域:CD28跨膜区域,SEQ. ID NO: 39:

[0044] TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATT  
ATTTTCTGGGTG

[0045] 细胞内结构域:4-1BB共刺激信号传导区域,SEQ. ID NO: 40:

[0046] AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAA  
GAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG

[0047] 细胞内结构域:CD28共刺激信号传导区域,SEQ. ID NO: 41:

[0048] AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCCACC  
CGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC

[0049] 细胞内结构域:CD3 $\zeta$ 信号传导区域,SEQ. ID NO: 42:

[0050] AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAG  
CTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCC  
GAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTG

GGATGAAAGGCGAGCGCCGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACC  
TACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA

[0051] 每个示例性结构域组分的进一步的实施方式包括与由上述核酸序列编码的蛋白具有至少70%、或替代地至少80%氨基酸序列同一性、优选90%序列同一性、更优选至少95%序列同一性的具有类似的生物功能的其他蛋白。进一步地,在本文中提供了这样的结构域的非限制性例子。

[0052] “组合物”通常是指活性剂(例如化合物或组合物)和天然存在或非天然存在的载体的组合,所述载体是惰性的,例如可检测试剂或标签,或者是活性的,例如佐剂、稀释剂、粘合剂、稳定剂、缓冲剂、盐、亲脂性溶剂、防腐剂、佐剂等,并且包括药学上可接受的载体。载体还包括药物赋形剂和添加剂蛋白质、肽、氨基酸、脂质和碳水化合物(例如糖,包括单糖、二寡糖、三寡糖、四寡糖和寡糖;衍生的糖,例如糖醇、醛糖酸、酯化糖等;以及多糖或糖聚合物),其可以单独地或组合地存在,以重量或体积计单独地或组合地包括1-99.99%。示例性的蛋白赋形剂包括血清白蛋白(例如人血清白蛋白(HSA)、重组人白蛋白(rHA))、明胶、酪蛋白等。还具有缓冲能力的代表性的氨基酸/抗体组分包括丙氨酸、精氨酸、甘氨酸、精氨酸、甜菜碱、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、阿斯巴甜等。碳水化合物赋形剂也旨在位于本技术的范围之内,其例子包括但不限于:单糖,例如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖等;二糖,例如乳糖、蔗糖、海藻糖、纤维二糖等;多糖,例如棉子糖、松三糖、麦芽糖糊精、葡聚糖、淀粉等;以及糖醇,例如甘露糖醇、木糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、木糖醇山梨醇(葡萄糖醇)和肌醇。

[0053] 如本文使用的,术语“共有序列(consensus sequence)”是指这样的氨基酸或核苷酸序列,其通过对齐一系列的多个序列而确定,并且定义了代表在所述多个序列的每个对应位置处的氨基酸或碱基的主要选择的理想化序列。根据该系列的多个序列的序列,该系列的共有序列可以与这些序列的每一个有零个、一个、几个、或更多个取代基的不同。并且,根据该系列的多个序列的序列,可以对该系列确定一个以上的共有序列。已经对共有序列的生成进行过深入的数学分析。可以使用各种软件程序来确定共有序列。

[0054] 如本文所使用的,术语“HLA-G”(也称为B2微球蛋白或MHC-G)是指与此名称相关的具体分子以及与HLA-G具有至少80%氨基酸序列同一性、优选90%序列同一性、更优选至少95%序列同一性且具有类似生物学功能的任何其他分子,包括但不限于其几个同种型中的任何一个,包括但不限于膜结合同种型(例如HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4)、可溶性同种型(例如HLA-G5、HLA-G6、HLA-G7)和由膜结合同种型的蛋白水解裂解产生的可溶性形式(例如sHLA-G1)。HLA-G序列的例子在本文中提供。此外,与以下GenBank Accession No有关的蛋白序列是示例性的:NM\_002127.5 XM\_006715080.1 XM\_006725041.1 XM\_006725700.1 XM\_006725909.1。一个例子是 NM\_002127.5 序列: MVVMAPRTLFLLLSGALTLTETWAGSHSMRYFSAA  
VSRPGRGEPRIAMGYVDDTQFVRFSDSACPRMEPRAPWVEQEGPEYWEETRNTKAHAQTDRMNLQTLRGYYNQS  
EASSHTLQWMIGCDLGS DGRLLRGYEQYAYDGKDY LALNEDLRSWTAADTAAQISKRKCEANVAEQRRAYLEGTCV  
EWLHRYLENGKEMLRADPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAE I I L TWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTFO  
KWA AVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWKQSSLPTIPIMGIVAGLVVLA AVVTGA AVAVLWRKKSSD

[0055] 与以上列出的GenBank Accession No.有关的序列通过引用并入本文中。

[0056] 如本文使用的,术语“CD8  $\alpha$  铰链结构域”是指与该名称相关的特定的蛋白片段,以

及与本文所示的CD8  $\alpha$  铰链结构域序列具有至少70%、或替代地至少80%氨基酸序列同一性、优选90%序列同一性、更优选至少95%序列同一性的具有类似的生物功能的任何其他分子。在Pinto, R.D. et al. (2006) Vet. Immunol. Immunopathol. 110:169-177中提供了人类、小鼠和其他物种的CD8  $\alpha$  铰链结构域的示例性序列。其非限制性的例子包括：

[0057] 人类CD8  $\alpha$  铰链结构域,SEQ. ID NO: 31: PAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACR PAAGGAVHTRGLDFACDIY 小鼠CD8  $\alpha$  铰链结构域,SEQ. ID NO: 32: KVNSTTTKPVLRTPSPVHPT GTSQPQRPEDCRPRGSVKG TGLDFACDIY 猫CD8  $\alpha$  铰链结构域,SEQ. ID NO: 33: PVKPTTTPAPRP PTQAPITTSQRVSLRPGTCQPSAGSTVEASGLDLSCDIY

[0058] 如本文使用的,术语“CD8  $\alpha$  跨膜结构域”是指与该名称相关的特定的蛋白片段,以及与本文所示的CD8  $\alpha$  跨膜结构域序列具有至少70%、或替代地至少80%氨基酸序列同一性、优选90%序列同一性、更优选至少95%序列同一性的具有类似的生物功能的任何其他分子。与人类T细胞表面糖蛋白CD8 $\alpha$ 链的183至203位氨基酸(NCBI参考序列:NP\_001759.3)、或者小鼠T细胞表面糖蛋白CD8 $\alpha$ 链的197至217位氨基酸(NCBI参考序列:NP\_001074579.1)、以及大鼠T细胞表面糖蛋白CD8 $\alpha$ 链的190至210位氨基酸(NCBI参考序列:NP\_113726.1)相关的片段序列,提供了CD8  $\alpha$  跨膜结构域的其他示例性序列。与列出的NCBI的每一个相关的序列提供如下:

[0059] 人类CD8  $\alpha$  跨膜结构域,SEQ. ID NO: 34: IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT 小鼠CD8  $\alpha$  跨膜结构域,SEQ. ID NO: 35: IWAPLAGICVALLLSLIITLI 大鼠CD8  $\alpha$  跨膜结构域,SEQ. ID NO: 36: IWAPLAGICAVLLLSLVITLI

[0060] 如本文使用的,术语“CD28跨膜结构域”是指与该名称相关的特定的蛋白片段,以及与本文所示的CD28跨膜结构域序列具有至少70%、或替代地至少80%氨基酸序列同一性、优选90%序列同一性、更优选至少95%序列同一性的具有类似的生物功能的任何其他分子。与GenBank登录号XM\_006712862.2和XM\_009444056.1相关的片段序列,提供了CD28跨膜结构域的其他非限制性的示例性序列。与列出的登录号的每一个相关的序列提供如下:由SEQ ID NO: 41编码的序列。

[0061] 如本文使用的,术语“4-1BB共刺激信号传导区域(signaling region)”是指与该名称相关的特定的蛋白片段,以及与本文所示的4-1BB共刺激信号传导区域序列具有至少70%、或替代地至少80%氨基酸序列同一性、优选90%序列同一性、更优选至少95%序列同一性的具有类似的生物功能的任何其他分子。在美国申请号US 13/826,258中提供了4-1BB共刺激信号传导区域的示例性序列。与美国申请号US 13/826,258相关的4-1BB共刺激信号传导区域的序列提供如下:

[0062] 4-1BB共刺激信号传导区域,SEQ. ID NO: 37: KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCEL

[0063] 如本文使用的,术语“CD28共刺激信号传导区域”是指与该名称相关的特定的蛋白片段,以及与本文所示的CD28共刺激信号传导区域序列具有至少70%、或替代地至少80%氨基酸序列同一性、优选90%序列同一性、更优选至少95%序列同一性的具有类似的生物功能的任何其他分子。在美国专利号5,686,281;Geiger, T. L. et al., Blood 98: 2364-2371 (2001);Hombach, A. et al., J Immunol 167: 6123-6131 (2001);Maher, J. et al. Nat Biotechnol 20: 70-75 (2002);Haynes, N. M. et al., J Immunol 169:

5780-5786 (2002); Haynes, N. M. et al., Blood 100: 3155-3163 (2002)中提供了示例性的CD28共刺激信号传导区域。非限制性的例子包括以下CD28序列的114-220残基: MLRLLALNL FPSIQVTGNK ILVKQSPMLV AYDNAVNLSK KYSYNLFSRE FRASLHKGLDSAVEVCVVYGY NYSQQLQVYS KTGFNCDGKL GNESVTFYLLQ NLYVNQTDIY FCKIEVMYPPPYLDNEKSNG TIIHVKGKHL CPSPLFPGPS KPFWVLVVVG GVLACYSLLVTVAFIIFWVR SKRSRLLHSD YMNMPRRPG PTRKHYQPYA PPRDFAAYRS (SEQ ID NO:38); 及其等效物。

[0064] 如本文使用的,术语“ICOS共刺激信号传导区域”是指与该名称相关的特定的蛋白片段,以及与本文所示的ICOS共刺激信号传导区域序列具有至少70%、或替代地至少80%氨基酸序列同一性、优选90%序列同一性、更优选至少95%序列同一性的具有类似的生物功能的任何其他分子。在美国公开号2015/0017141A1中提供了ICOS共刺激信号传导区域的非限制性的示例性序列。示例性的多核苷酸序列提供如下:

[0065] ICOS共刺激信号传导区域,SEQ ID NO: 43:

[0066] acaaaaaaga agtattcatc cagtgtgcac gaccctaacg gtgaatacat gttcatgaga gcagtgaaca cagccaaaaa atccagactc acagatgtga cccta

[0067] 如本文使用的,术语“OX40共刺激信号传导区域”是指与该名称相关的特定的蛋白片段,以及与本文所示的OX40共刺激信号传导区域序列具有至少70%、或替代地至少80%氨基酸序列同一性、优选90%序列同一性、更优选至少95%序列同一性的具有类似的生物功能的任何其他分子。在美国公开号2012/20148552A1中公开了OX40共刺激信号传导区域的非限制性的示例性序列,其包括以下提供的示例性序列。

[0068] OX40共刺激信号传导区域,SEQ ID NO: 44:

[0069] AGGGACCAG AGGCTGCCCC CCGATGCCCA CAAGCCCCCT GGGGGAGGCA GTTCCGGAC CCCCATCCAA GAGGAGCAGG CCGACGCCCA CTCCACCCTG GCCAAGATC

[0070] 如本文使用的,术语“CD3 $\zeta$ 信号传导结构域”是指与该名称相关的特定的蛋白片段,以及与本文所示的CD3 $\zeta$ 信号传导结构域序列具有至少70%、或替代地至少80%氨基酸序列同一性、优选90%序列同一性、更优选至少95%序列同一性的具有类似的生物功能的任何其他分子。在美国申请号US 13/826,258中提供了CD3 $\zeta$ 信号传导结构域的示例性序列。与CD3 $\zeta$ 信号传导结构域相关的序列列出如下:RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

[0071] 如本文使用的,术语“B细胞”是指在适应性免疫系统的体液免疫中的一类淋巴细胞。B细胞主要作用来制造抗体、用作抗原呈递细胞、释放细胞因子、以及在抗原相互作用引起的刺激之后开发记忆B细胞。B细胞与其他淋巴细胞(例如T细胞)的不同点在于细胞表面上存在B细胞受体。B细胞可以是被分离的,也可以从商业上可获得的来源得到。商业上可获得的B细胞系的非限制性例子包括AHH-1 (ATCC<sup>®</sup> CRL-8146<sup>™</sup>)、BC-1 (ATCC<sup>®</sup> CRL-2230<sup>™</sup>)、BC-2 (ATCC<sup>®</sup> CRL-2231<sup>™</sup>)、BC-3 (ATCC<sup>®</sup> CRL-2277<sup>™</sup>)、CA46 (ATCC<sup>®</sup> CRL-1648<sup>™</sup>)、DG-75 [D.G.-75] (ATCC<sup>®</sup> CRL-2625<sup>™</sup>)、DS-1 (ATCC<sup>®</sup> CRL-11102<sup>™</sup>)、EB-3 [EB3] (ATCC<sup>®</sup> CCL-85<sup>™</sup>)、Z-138 (ATCC #CRL-3001)、DB (ATCC CRL-2289)、Toledo (ATCC CRL-2631)、Pfiffer (ATCC CRL-2632)、SR (ATCC CRL-2262)、JM-1 (ATCC CRL-10421)、NFS-5 C-1 (ATCC CRL-1693)、NFS-70 C10 (ATCC CRL-1694)、NFS-25 C-3 (ATCC CRL-1695)、和SUP-B15 (ATCC CRL-1929)细胞系。进一步的例子包括但不限于衍生自间变性和

大细胞淋巴瘤的细胞系,例如DEL、DL-40、FE-PD、JB6, Karpas 299、Ki-JK、Mac-2A Ply1、SR-786、SU-DHL-1、-2、-4、-5、-6、-7、-8、-9、-10和-16、DOHH-2、NU-DHL-1、U-937、Granda 519、USC-DHL-1、RL;霍奇金淋巴瘤,例如DEV、HD-70、HDLM-2、HD-MyZ、HKB-1、KM-H2、L 428、L 540、L1236、SBH-1、SUP-HD1、SU/RH-HD-1。这样的商业上可获得的细胞系的非限制性示例性来源包括美国模式培养物保藏所(American Type Culture Collection)或称ATCC ([www.atcc.org/](http://www.atcc.org/)) 以及德国微生物和细胞培养物保藏所(German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) (<https://www.dsmz.de/>)。

[0072] 如本文使用的,术语“T细胞”是指在胸腺中成熟的一类淋巴细胞。T细胞在细胞介导的免疫中起重要作用,并且与其他淋巴细胞(例如B细胞)的不同点在于细胞表面上存在T细胞受体。T细胞可以是分离的,也可以从商业上可获得的来源得到。“T细胞”包括表达CD3的所有类型的免疫细胞,包括T辅助细胞(CD4+细胞)、细胞毒性T细胞(CD8+细胞)、自然杀伤T细胞、T调节细胞(Treg)和 $\gamma$ - $\delta$ T细胞。“细胞毒性细胞”包括CD8+ T细胞、自然杀伤(NK)细胞和嗜中性粒细胞,这些细胞能够介导细胞毒性反应。商业上可获得的T细胞系的非限制性例子包括BCL2 (AAA) Jurkat (ATCC® CRL-2902™)、BCL2 (S70A) Jurkat (ATCC® CRL-2900™)、BCL2 (S87A) Jurkat (ATCC® CRL-2901™)、BCL2 Jurkat (ATCC® CRL-2899™)、Neo Jurkat (ATCC® CRL-2898™)、TALL-104细胞毒性人类T细胞系(ATCC # CRL-11386) 细胞系。进一步的例子包括但不限于成熟的T细胞系,例如Deglis、EBT-8、HPB-MLp-W、HUT 78、HUT 102、Karpas 384、Ki 225、My-La、Se-Ax、SKW-3、SMZ-1和T34;以及未成熟的T细胞系,例如ALL-SIL、Be13、CCRF-CEM、CML-T1、DND-41、DU.528、EU-9、HD-Mar、HPB-ALL、H-SB2、HT-1、JK-T1、Jurkat、Karpas 45、KE-37、KOPT-K1、K-T1、L-KAW、Loucy、MAT、MOLT-1、MOLT 3、MOLT-4、MOLT 13、MOLT-16、MT-1、MT-ALL、P12/Ichikawa、Peer、PER0117、PER-255、PF-382、PFI-285、RPMI-8402、ST-4、SUP-T1至T14、TALL-1、TALL-101、TALL-103/2、TALL-104、TALL-105、TALL-106、TALL-107、TALL-197、TK-6、TLBR-1、-2、-3和-4、CCRF-HSB-2 (CCL-120.1)、J.RT3-T3.5 (ATCC TIB-153)、J45.01 (ATCC CRL-1990)、J.CaM1.6 (ATCC CRL-2063)、RS4;11 (ATCC CRL-1873)、CCRF-CEM (ATCC CRM-CCL-119);以及皮肤T细胞淋巴瘤细胞系,例如HuT78 (ATCC CRM-TIB-161)、MJ[G11] (ATCC CRL-8294)、HuT102 (ATCC TIB-162)。无白血病(Null leukemia)细胞系,包括但不限于REH、NALL-1、KM-3、L92-221,是免疫细胞的另一种商业上可获得的来源,同样的是衍生自其他白血病和淋巴瘤的细胞系,例如K562红白血病、THP-1单核细胞白血病、U937淋巴瘤、HEL红白血病、HL60白血病、HMC-1白血病、KG-1白血病、U266骨髓瘤。这样的商业上可获得的细胞系的非限制性示例性来源包括美国模式培养物保藏所(American Type Culture Collection)或称ATCC ([www.atcc.org/](http://www.atcc.org/)) 以及德国微生物和细胞培养物保藏所(German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) (<https://www.dsmz.de/>)。

[0073] 如本文使用的,术语“NK细胞”(也被称为自然杀伤细胞)是指起源于骨髓并且在先天免疫系统中起重要作用的一类淋巴细胞。NK细胞提供针对病毒感染的细胞、肿瘤细胞或其他应激细胞的快速免疫反应,即使是细胞表面上不存在抗体和主要组织相容性复合体。NK细胞可以是分离的,也可以从商业上可获得的来源得到。商业性的NK细胞系的非限制性例子包括NK-92 (ATCC® CRL-2407™)、NK-92MI (ATCC® CRL-2408™) 细胞系。进一步的例子包括但不限于HANK1、KHYG-1、NKL、NK-YS、NOI-90和YT NK细胞系。这样的商业上可获

得的细胞系的非限制性示例性来源包括美国模式培养物保藏所(American Type Culture Collection)或称ATCC([www.atcc.org/](http://www.atcc.org/)) 以及德国微生物和细胞培养物保藏所(German Collection of Microorganisms and Cell Cultures )(<https://www.dsmz.de/>)。

[0074] 如本文使用的,术语“核酸序列”和“多核苷酸”被可互换地使用来指任何长度的核苷酸的聚合形式,核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸。因此,该术语包括但不限于单链、双链或多链DNA或RNA、DNA基因组、cDNA、DNA-RNA杂交体、或包含嘌呤和嘧啶碱基或其他天然的、化学的或生物化学修饰的、非天然的或衍生的核苷酸碱基的聚合物。

[0075] 术语“编码”在被应用至核酸序列时是指,被陈述来“编码”多肽的多核苷酸,以其天然状态或者在通过本领域技术人员熟知的方法操纵时,可以被转录和/或翻译来产生用于该多肽和/或其片段的mRNA。反义链是这样的核酸的补体,并且编码序列可以由此导出。

[0076] 如本文使用的,术语“载体”是指被设计来用于在不同的宿主之间传送的核酸构建体,其包括但不限于质粒、病毒、粘粒、噬菌体、BAC、YAC等。在一些实施方式中,可以从商业上可获得的载体制备质粒载体。在其他实施方式中,可以根据本领域已知的技术从杆状病毒、逆转录病毒、腺病毒、AAV等制造病毒载体。在一个实施方式中,所述病毒载体是慢病毒载体。

[0077] 如本文使用的,术语“启动子”是指调节编码序列(例如基因)的表达的任何序列。启动子可以例如是组成型的、可诱导的、可抑制的或组织特异性的。“启动子”是这样的控制序列,它是多核苷酸序列的一个区域,在此控制转录的起始和速率。它可以包括遗传性元件,在此调节蛋白和分子可以结合例如RNA聚合酶和其他转录因子。

[0078] 如本文使用的,术语“分离的细胞”通常是指细胞基本上和组织的其他细胞分离。“免疫细胞”包括例如衍生自在骨髓中产生的造血干细胞(HSC)的白血细胞(白细胞)、淋巴细胞(T细胞、B细胞、自然杀伤(NK)细胞)和骨髓来源的细胞(嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞)。“T细胞”包括表达CD3的所有类型的免疫细胞,包括T辅助细胞(CD4+细胞)、细胞毒性T细胞(CD8+细胞)、自然杀伤T细胞、T调节细胞(Treg)和 $\gamma$ - $\delta$ T细胞。“细胞毒性细胞”包括CD8+ T细胞、自然杀伤(NK)细胞和嗜中性粒细胞,这些细胞能够介导细胞毒性反应。

[0079] 术语“转导”在其被应用至生产嵌合抗原受体细胞时是指,外来核酸序列被引入细胞中的过程。在一些实施方式中,该转导是通过载体完成的。

[0080] 如本文使用的,术语“自体同源的(autologous)”在涉及细胞时是指,被分离并且被灌注回相同的对象(受体或宿主)的细胞。“同种异体的”是指非自体同源的细胞。

[0081] “有效量”是指该量的试剂或合并的量的两种或多种试剂在被施用来治疗哺乳动物或其他个体时,足以影响对疾病的这种治疗。“有效量”将会根据试剂、疾病及其严重程度和要被治疗的对象的年龄、体重等而发生变化。

[0082] “实体肿瘤”是通常不包括囊肿或液体区域的异常的组织块。不同类型的实体肿瘤以形成它们的细胞的类型命名。实体肿瘤的例子包括肉瘤、癌和淋巴瘤。

[0083] 术语“卵巢癌”是指这样的一类型癌症,它在卵巢的组织中形成,并且经历了恶性转化,该恶性转化使得癌症之内的细胞对宿主生物体有病态作用并且具有入侵或扩散至身体的其他部分的能力。本文的卵巢癌包括组织学分级低的I型癌症和组织学分级更高的II型癌症。特别地,卵巢癌包括但不限于上皮癌、浆液性癌、透明细胞癌、性索间质瘤、生殖细

胞瘤、无性细胞瘤、混合肿瘤、继发性卵巢癌、低恶性潜在肿瘤。

[0084] 术语“前列腺癌”是指在男性生殖系统中的腺体前列腺中发展的一类型癌症。本文的前列腺癌包括但不限于腺癌、肉瘤、小细胞癌、神经内分泌肿瘤、移行细胞癌。

[0085] 术语“甲状腺癌”是指在甲状腺肿发展出的一类癌症。

[0086] 如本文使用的,术语“包括”旨在表示组合物和方法包括所述的元素但不排除其他元素。“基本上由……组成”当被用来定义组合物和方法时,应该表示排除对于预期用途的组合来说具有任何实质性作用的其他元素。例如,如本文定义的基本上由该元素组成的组合物,将不会从分离和纯化方法和药学上可接受的载体(例如磷酸盐缓冲盐水、防腐剂等)中排除微量污染物。“由……组成”应该表示排除多于微量元素的其他成分和用于施用本文公开的组合物的实质性方法步骤。通过这些过渡性术语的每一个进行定义的方面都在本发明的范围之内。

[0087] 如本文使用的,术语“可检测的标记物”是指能够直接或间接制造可检测的信号的一个或多个标记物。该标记物的非穷举性的列表包括酶,其例如通过比色、荧光、发光制造可检测的信号,例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、发色团(例如荧光剂、发光染料)、带有通过电子显微镜或通过其电性质(例如电导率、电流分析、伏安法、阻抗)检测的电子密度的基团、可检测的基团,例如其分子具有足够的大小来诱导其物理和/或化学性质上的可检测的修饰,这样的检测可以通过任选的方法完成,例如衍射、表面等离子体共振、表面变化、接触角变化或物理方法(例如原子力谱、隧道效应)、或放射性分子(例如  $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$  或  $^{125}\text{I}$ )。

[0088] 如本发明使用的,术语“纯化标记物”是指可用于纯化或鉴定的至少一个标记物。该标记物的非穷举性的列表包括His、lacZ、GST、麦芽糖结合蛋白、NusA、BCCP、c-myc、CaM、FLAG、GFP、YFP、樱桃、硫氧还蛋白、聚(NANP)、V5、Snap、HA、几丁质结合蛋白、Softag 1、Softag 3、Strep或S蛋白。合适的直接或间接荧光标记物包括FLAG、GFP、YFP、RFP、dTomato、樱桃、Cy3、Cy 5、Cy 5.5、Cy 7、DNP、AMCA、生物素、地高辛、Tamra、得克萨斯红、罗丹明、Alexa荧光、FITC、TRITC或任何其他荧光染料或半抗原。

[0089] 如本文使用的,术语“表达”是指多核苷酸被转录成mRNA的过程和/或被转录的mRNA随后被翻译成肽、多肽或蛋白的过程。如果多核苷酸衍生自基因组DNA,则表达可以包括mRNA在真核细胞中的剪接。可以通过测量细胞或组织样品中mRNA或蛋白的量确定基因的表达水平。在一个方面,来自一个样品的基因的表达水平可以直接与来自对照或参照样品的基因的表达水平进行比较。在另一个方面,来自一个样品的基因的表达水平可以在施用化合物之后直接与来自同一样品的该基因的表达水平进行比较。

[0090] 如本文使用的,当被用在两个或更多个核酸或多肽序列的内容中时,“同源性”或“相同的”、“同一性”或“相似性”百分比是指,两个或更多个序列或子序列是相同的,或者在特定的区域(例如编码本文所述的抗体的核苷酸序列或本文所述的抗体的氨基酸序列)上特定百分比的核苷酸或氨基酸残基是相同的,例如至少60%同一性、优选地至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的同一性。可以通过比较为了进行比较而被对齐的每个序列中的位置,确定同源性。当被比较的序列中的位置被相同的碱基或氨基酸占据时,则这些分子在该位置是同源的。序列之间的同源性的程度是这些序列享有的匹配的或同源的位置的数目的函数。可以使用本领域已知的软件程序来确

定对齐和同源性或序列同一性百分比,例如在Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1987) Supplement 30, section 7.7.18, Table 7.7.1中描述的软件程序。优选地,使用默认参数进行对齐。优选的对齐程序是BLAST,使用默认参数。特别地,优选的程序是BLASTN和BLASTP,使用以下默认参数:遗传密码=标准;筛选=无;链=两个;截点=60;预期=10;矩阵=BLOSUM62;描述=50个序列;排序= HIGH SCORE;数据库=不重复的,GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + SwissProtein + SPupdate + PIR。这些程序的详情可以在以下网址找到:ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST。术语“同源性”或“相同的”、“同一性”或“相似性”百分比还表示、或者可以被应用至测试序列的补体。所述术语还包括具有缺失和/或添加、以及具有取代基的序列。如本文描述的,优选的算法可以解释间隙等。优选地,在长度至少为约25个氨基酸或核苷酸的区域上、或者更优选地在长度至少为50-100个氨基酸或核苷酸的区域上存在同一性。“不相关的”或“非同源的”序列与本文公开的序列中的一个享有少于40%的同一性、或者替代地少于25%的同一性。

[0091] 短语“一线”或“二线”或“三线”是指患者接受的治疗的顺序。一线治疗方案是首先给出的治疗,而二线或三线疗法是分别在一线疗法之后或在二线疗法之后给出的。美国国家癌症研究所将一线疗法定义为“用于疾病或病症的第一治疗”。在患有癌症的患者中,主要的治疗可以是手术、化疗、放射治疗或这些疗法的组合。一线疗法还被本领域技术人员称为“主要疗法和主要治疗”。参见美国国家癌症研究所的网站www.cancer.gov,最后一次访问是在2008年5月1日。通常,患者被给予后续的化疗方案,因为患者对一线疗法没有显示出阳性的临床或亚临床反应,或者一线疗法已经停止。

[0092] 在一个方面,术语抗体的“等效物”或“生物等效物”表示抗体如通过ELISA或其他合适的方法测定地选择性地结合其表位蛋白或其片段的能力。生物等效的抗体包括但不限于与参照抗体结合至相同的表位的抗体、肽、抗体片段、抗体变体、抗体衍生物和抗体模拟物。

[0093] 在没有明确描述的情况下应该推断、并且除非另有说明,否则当本技术涉及多肽、蛋白、多核苷酸或抗体时,这样的等效物或生物等效物旨在落入本技术的范围之内。如本文使用的,在指示蛋白、抗体、多肽或核苷酸时,术语“其生物等效物”旨在与“其等效物”是同义的,是指具有最小的同源性,同时仍然保持期望的结构或功能。除非本文具体说明,否则可以预期的是,本文提及的任何多核苷酸、多肽或蛋白还包括其等效物。例如,等效物是指与参照蛋白、多肽或核苷酸具有至少约70%同源性或同一性、或至少80%同源性或同一性和替代地、或至少约85%、或替代地至少约90%、或替代地至少约95%、或替代地98%百分比同源性或同一性并且表现出基本上等效的生物活性。替代地,当指示多核苷酸时,其等效物是在严格条件下与参照多核苷酸或其补体(complement)杂交的多核苷酸。

[0094] 多核苷酸或多核苷酸区域(或多肽或多肽区域)与另一个序列具有一定百分比(例如80%、85%、90%或95%)的“序列同一性”是指,当被对齐时,该百分比的碱基(或氨基酸)在两个序列的比较中是相同的。可以使用本领域已知的软件程序来确定对齐和同源性或序列同一性百分比,例如在Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1987) Supplement 30, section 7.7.18, Table 7.7.1中描述的软件程序。优选地,使用默认参数进行对齐。优选的对齐程序是BLAST,使用默认参数。特别地,优选的程序是BLASTN

和BLASTP,使用以下默认参数:遗传密码=标准;筛选=无;链=两个;截点=60;预期=10;矩阵=BLOSUM62;描述=50个序列;排序= HIGH SCORE;数据库=不重复的,GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + SwissProtein + SPupdate + PIR。这些程序的详情可以在以下网址找到:[ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST](http://ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST)。

[0095] “杂交”是指其中一个或多个多核苷酸反应来形成复合物,并且该复合物通过核苷酸残基的碱基之间的氢键结合而被稳定的反应。可以通过Watson-Crick碱基配对、Hoogsteen结合或通过任何其他序列特异性的方式来发生氢键结合。所述复合物可以包括形成双螺旋结构的两条链、形成多链复合物的三条或更多条链、单一的自我杂交的链、或这些的任何组合。杂交反应可以由在更广泛的过程中的步骤组成,例如PCR过程的起始步骤、或者通过核酶进行的多核苷酸的酶裂解步骤。

[0096] 严格杂交条件的例子包括:约25°C至约37°C的孵育温度;约6x SSC至约10x SSC的杂交缓冲液浓度;约0%至约25%的甲酰胺浓度;以及约4x SSC至约8x SSC的洗涤溶液。中度杂交条件的例子包括:约40°C至约50°C的孵育温度;约9x SSC至约2x SSC的缓冲液浓度;约30%至约50%的甲酰胺浓度;以及约5x SSC至约2x SSC的洗涤溶液。高严格杂交条件的例子包括:约55°C至约68°C的孵育温度;约1x SSC至约0.1x SSC的缓冲液浓度;约55%至约75%的甲酰胺浓度;以及约1x SSC至约0.1x SSC的洗涤溶液、或去离子水。一般来说,杂交孵育时间为5分钟至24小时,具有1、2、或更多个洗涤步骤,并且洗涤孵育时间为约1、2或15分钟。SSC是0.15 M NaCl和15 mM柠檬酸缓冲液。应该理解的是,可以采用使用其他缓冲系统的SSC的等效物。

[0097] “与肿瘤组织类型对应的正常细胞”是指来自与肿瘤组织相同的组织类型的正常细胞。非限制性例子是来自患有肺肿瘤患者的正常肺细胞、或者来自患有结肠肿瘤患者的正常结肠细胞。

[0098] 如本文使用的,术语“分离的”是指,分子或生物体或细胞材料基本上不含其他材料。在一个方面,术语“分离的”是指,核酸(例如DNA或RNA)或蛋白或多肽(例如抗体或其衍生物)或细胞或细胞器、或组织或器官与存在于自然来源中的其他DNA或RNA、或蛋白或多肽、或细胞或细胞器、或组织或器官分离。术语“分离的”还指,核酸或肽基本上不含细胞材料、病毒材料、或培养基(当通过重组DNA技术生产时)、或化学前体或其他化学品(当化学合成时)。再者,“分离的核酸”旨在包括天然地不形成片段并且不会在天然状态下发现的核酸片段。术语“分离的”在本文中还被用来指从其他细胞蛋白分离的多肽,并且旨在包括纯化的和重组的多肽。术语“分离的”在本文中还被用来指从其他细胞分离的细胞或组织,并且旨在包括培养的和工程化的细胞或组织。

[0099] 如本文使用的,术语“单克隆抗体”是指,通过B淋巴细胞的单一克隆制造的抗体,或者通过其中已经转染了单一抗体的轻链和重链基因的细胞制造的抗体。单克隆抗体是通过本领域技术人员已知的方法制造的,例如通过由骨髓瘤细胞与免疫脾细胞的融合而制造杂交抗体形成细胞。单克隆抗体包括人源化单克隆抗体。

[0100] 术语“蛋白”、“肽”和“多肽”被可互换地使用,并且以其最广泛的意义上指两个或更多个氨基酸、氨基酸类似物或肽模拟物子单元的化合物。所述子单元可以通过肽键而被连接。在另一个方面,所述子单元可以通过其他键(例如酯键、醚键等)而被连接。蛋白或肽必须包括至少两个氨基酸,并且对于可以组成蛋白或肽的序列的氨基酸的最大数目没有限

制。如本文使用的,术语“氨基酸”是指天然的和/或非天然的或合成的氨基酸,包括甘氨酸以及D和L光学异构体、氨基酸类似物和肽模拟物。

[0101] 术语“多核苷酸”和“寡核苷酸”被可互换地使用,并且是指任何长度的核苷酸的聚合形式,是脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其类似物。多核苷酸可以具有任意的三维结构并且可以进行已知或未知的任何作用。以下是多核苷酸的非限制性例子:基因或基因片段(例如探针、引物、EST或SAGE标签)、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转移RNA、核糖体RNA、RNAi、核酶、cDNA、重组多核苷酸、支链多核苷酸、质粒、载体、分离的任何序列的DNA、分离的任何序列的RNA、核酸探针和引物。多核苷酸可以包括经修饰的核苷酸,例如甲基化核苷酸和核苷酸类似物。如果存在,则对核苷酸结构的修饰可以被施加在多核苷酸的组装之前或之前。核苷酸的序列可以被非核苷酸组分打断。多核苷酸可以在聚合之后被进一步修饰,例如与标签组分偶联。该术语还指双链分子和单链分子。除非另有说明或者需要,否则本技术的涉及多核苷酸任何方面都包括双链形式以及已知或预测形成双链形式的两个互补的单链形式中的每一个。

[0102] 如本文使用的,术语“纯化的”不要求绝对的纯度;相反,它旨在作为相对性的的术语。因此,例如,纯化的核酸、肽、蛋白、生物复合物或其他活性化合物是整体地或部分地与蛋白或其他污染物分离的。通常,用于在本发明中使用的基本上纯化的肽、蛋白、生物复合物或其他活性化合物,在该肽、蛋白、生物复合物或其他活性化合物与药物载体、赋形剂、缓冲剂、吸收促进剂、稳定剂、防腐剂、佐剂或其它辅助成分在用于治疗性给药的完整的药物制剂中混合或制备之前,包括多于80%的存在于制剂中的所有大分子物种。更一般地,在与其他制剂成分混合之前,所述肽、蛋白、生物复合物或其他活性化合物被纯化,以代表大于90%、通常大于95%的存在于纯化制剂中的所有大分子物种。在其他情况中,纯化制剂可以是基本上均质的,其中其他大分子物种不能通过常规技术而被检测到。

[0103] 如本文使用的,术语“特异性结合”是指抗体和抗原之间的接触具有的结合亲和力为至少 $10^{-6}$  M。在一些方面,抗体结合具有的亲和力为至少约 $10^{-7}$  M,并且优选 $10^{-8}$  M、 $10^{-9}$  M、 $10^{-10}$  M、 $10^{-11}$  M或 $10^{-12}$  M。

[0104] 如本文使用的,术语“重组蛋白”是指通过重组DNA技术制造的多肽,其中通常编码该多肽的DNA被插入进合适的表达载体,该表达载体被用来转化宿主细胞以产生异源蛋白。

[0105] 如本文使用的,“治疗”在对象中的疾病是指(1)防止症状或疾病在预先有倾向的或尚未显示疾病症状的对象中发生;(2)抑制疾病或阻止其发展;或者(3)改善或消退疾病或疾病的症状。如本领域中理解的,“治疗”是用于获得有益的或期望的结果(包括临床结果)的方法。对于本技术的目的,有益的或期望的结果可以包括但不限于以下中的一种或多种:一个或多个症状的缓解或改善,病症(包括疾病)的程度的降低,病症(包括疾病)的稳定化(即不恶化)状态,病症(包括疾病)的延迟或减缓,病症(包括疾病)、状态和缓解(无论是部分还是全部)的进展、改善或缓解,无论是可检测的还是不可检测的。

[0106] 如本文使用的,术语“过度表达”是指细胞、组织、或器官表达蛋白的量大于在对照细胞、对照组织、或器官中生产的量。过度表达的蛋白可以对于宿主细胞来说是内源性的或者对于宿主细胞来说是外源性的。

[0107] 如本文使用的,术语“接头序列”是指任何这样的氨基酸序列,其包括可以被重复1至10、或替代地至约8、或替代地至约6、或替代地约5、或4或替代地3、或替代地2次的1至10

个、或替代地8个氨基酸、或替代地6个氨基酸、或替代地5个氨基酸。例如,接头可以包括由重复三次的五肽组成的多达15个氨基酸残基。在一个方面,接头序列是包括gly-gly-gly-gly-ser的三个拷贝的(Glycine4Serine)<sub>3</sub>柔性多肽接头。

[0108] 如本文使用的,术语“增强子”是指不管其相对于要被表达的氨基酸序列的位置和朝向,都增强、改善或改良氨基酸序列的转录的序列元件。增强子可以增强来自单个启动子的转录,或者同时增强来自一个以上的启动子的转录。只要保留或基本上保留该改善转录的功能(例如至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的野生型活性,即全长序列的活性),则野生型增强子序列的任何截断的、突变的或修饰的变体都同样在上述定义之内。

[0109] 如本文使用的,术语“WPRE”或“土拨鼠肝炎病毒(WHP)转录后调控元件”是指与该名称相关的特定的核苷酸片段,以及与本文所示的WPRE序列具有至少70%、或替代地至少80%氨基酸序列同一性、优选90%序列同一性、更优选至少95%序列同一性的具有类似的生物功能的任何其他分子。例如,WPRE是指在土拨鼠肝炎病毒基因组序列(GenBank登录号J04514)中出现的类似于人类乙型肝炎病毒转录后调控元件(HBVPRE)的区域,并且该基因组序列的1093位至1684位的592个核苷酸对应于转录后调控区域(*Journal of Virology*, Vol. 72, p.5085-5092, 1998)。使用逆转录病毒载体的分析显示,被插入至感兴趣的基因的3'末端未翻译区域的WPRE提高了产生的蛋白的量5至8倍。还被报道的是,WPRE的引入抑制了mRNA降解(*Journal of Virology*, Vol. 73, p.2886-2892, 1999)。在广义上,例如WPRE的通过使mRNA稳定而提高氨基酸翻译的效率的元件也被认为是增强子。

[0110] 缩写列表

[0111] CAR:嵌合抗原受体

[0112] HLA:组织相容性淋巴细胞抗原

[0113] Ip:腹膜内

[0114] IRES:内部核糖体进入位点

[0115] MFI:平均荧光强度

[0116] MOI:感染复数

[0117] PBMC:外周血单核细胞

[0118] PBS:磷酸盐缓冲盐水

[0119] scFv:单链可变片段

[0120] WPRE:土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件。

[0121] 与以上列出的GenBank登录号、UniProt参照号、和参考文件中的每一个相关的序列都以引用的方式被合并入本文中。

[0122] 用于实施本发明的方式

[0123] 由于最近在B细胞淋巴瘤和白血病中利用基因工程嵌合抗原受体(CAR)T细胞进行自体治疗而获得了前所未有的结果(Maude, S.L. et al. (2014) *New Engl. J. Med.* 371:1507-1517; Porter, D.L. et al. (2011) *New Engl. J. Med.* 365:725-733),许多实验室已经开始将这种方法应用于实体肿瘤,包括卵巢癌、前列腺癌和胰腺肿瘤。CAR修饰的T细胞将单克隆抗体的HLA非依赖性靶向特异性与活化的T细胞的细胞毒活性、增殖性及归巢特性相结合,但对检查站抑制不响应。由于其直接杀死抗原表达靶点的能力,CAR T细胞对任何抗原阳性细胞或组织都具有很高的毒性,因此有必要利用高度肿瘤特异性的抗体

来构建CAR。到目前为止,已构建出了应用至人体实体肿瘤靶向 $\alpha$ -叶酸受体、间皮素和MUC-CD、PSMA及其他靶标的CAR修饰的T细胞,但大多数在正常组织中具有偏离靶标的抗原表达。这些构建体在患者中没有显示出同样的超常结果,所以需要进行更多的研究,以确定可用于抗实体肿瘤的CAR T细胞构建体的新靶点和方法。

[0124] 因此,本发明提供对HLA-G特异的抗体(或“抗HLA-G抗体”和涉及该抗体的用途和生产的方法及组合物。此外,本发明提供一种嵌合抗原受体(CAR),其包含对HLA-G特异的抗原结合域(在某些情况下是该抗HLA-G抗体的抗原结合域),及其应用和生产相关的方法和组合物。

[0125] 抗体及其应用

[0126] I. 组合物

[0127] 抗体的大体结构在本领域中是已知的,在此仅将进行简要的概述。免疫球蛋白单体包括通过二硫键连接的两条重链和两条轻链。每条重链都和轻链中的一个配对,它们通过二硫键被直接结合。每条重链包括恒定区域(其根据抗体的同种型而变化)和可变区域。可变区域包括三个高度可变区域(或互补决定区域),其被命名为CDRH1、CDRH2和CDRH3并且被支撑在框架区域之内。每条轻链包括恒定区域和可变区域,可变区域包括三个高度可变区域(命名为CDRL1、CDRL2和CDRL3),其以与重链的可变区域类似的方式被支撑在框架区域中。

[0128] 每对重链和轻链的高度可变区域相互配合来提供能够结合靶标抗原的抗原结合位点。每对重链和轻链的结合特异性由重链和轻链的CDR1、CDR2和CDR3的序列来界定。因此,一旦确定了引起特定的结合特异性的一组CDR序列(即重链和轻链的CDR1、CDR2和CDR3的序列),则原则上该组CDR序列能够被插入进通过任何抗体恒定区域来连接的任何其他抗体的框架之内的适当位置,从而提供具有相同的抗原结合特异性的不同的抗体。

[0129] 在一个方面,本发明提供了一种分离的抗体,其包括重链(HC)免疫球蛋白可变结构域序列和轻链(LC)免疫球蛋白可变结构域序列,其中重链和轻链免疫球蛋白可变结构域序列共同构成结合至人HLA-G的表位的抗原结合位点。

[0130] 在一些实施方式中,所述重链可变区包含CDRH1序列,该CDRH1序列包含氨基酸序列,或者基本上由该氨基酸序列组成,或由该氨基酸序列组成,所述氨基酸序列以下述序列中的任一个开始:(i) GFNIKDTY (SEQ ID NO: 1)、(ii) GFTFNTYA (SEQ ID NO: 2)或它们中每一个的等效物,并且随后为在羧基末端的另外50个氨基酸、或约40个氨基酸、或约30个氨基酸、或约20个氨基酸、或约10个氨基酸、或约5个氨基酸、或约4、或3、或2或1个氨基酸。

[0131] 在一些实施方式中,所述重链可变区包含CDRH2序列,该CDRH2序列包含氨基酸序列,或者基本上由该氨基酸序列组成,或由该氨基酸序列组成,所述氨基酸序列以下述序列中的任一个开始:(i) IDPANGNT (SEQ ID NO: 3), (ii) IRSKSNYAT (SEQ ID NO: 4)或它们中每一个的等效物,并且随后为在羧基末端的另外50个氨基酸、或约40个氨基酸、或约30个氨基酸、或约20个氨基酸、或约10个氨基酸、或约5个氨基酸、或约4、或3、或2或1个氨基酸。

[0132] 在一些实施方式中,所述重链可变区包含CDRH3序列,该CDRH3序列包含氨基酸序列,或者基本上由该氨基酸序列组成,或由该氨基酸序列组成,所述氨基酸序列以下述序列中的任一个开始:(i) ARSYGGFAY (SEQ ID NO: 5), (ii) VRGGYWSFDV (SEQ ID NO: 6)

或它们中每一个的等效物,并且随后为在羧基末端的另外50个氨基酸、或约40个氨基酸、或约30个氨基酸、或约20个氨基酸、或约10个氨基酸、或约5个氨基酸、或约4、或3、或2或1个氨基酸。

[0133] 在一些实施方式中,所述重链可变区包含多肽,或者基本上由该多肽组成,或由该多肽组成,所述多肽由下述多核苷酸序列编码:

[0134] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCAGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGCCTCAGTCAAGTTGCTCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAGACACCTATATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAATGGTAATACTAAATATGACCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAACAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCTAGGAGTTACTACGGGGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO: 7) 或其抗原结合片段或它们中每一个的等效物。

[0135] 在一些实施方式中,所述重链可变区包含下述氨基酸序列,或者基本上由该氨基酸序列组成,或由该氨基酸序列组成:QVQLQESGAEVLKPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHVWVKRPEQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDVAVYYCARSYYGGFAYWGQGLVTVSA (SEQ ID NO: 8) 或其抗原结合片段或它们中每一个的等效物。

[0136] 在一些实施方式中,所述重链可变区包含多肽,或者基本上由该多肽组成,或由该多肽组成,所述多肽由下述多核苷酸序列编码:GAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGTGGAGGATTGGTGCAGCCTAAAGGATCATTGAACTCTCATGTGCCGCTTTGGTTTACCTTCAATACCTATGCCATGCACTGGGTCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTGAATGGGTTGCTCGATAAGAAGTAAAAGTAATAATTATGCAACATATTATGCCGATTCAAGTAAAGACAGATTCACCATCTCCAGAGATGATTCACAAAGCATGCTCTCTCTGCAAATGAACAACCTGAAACTGAGGACACAGCCATTTACTGTGTGAGAGGGGTTACTGGAGCTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCAACGCTCTCTCA (SEQ ID NO: 9) 或其抗原结合片段或它们中每一个的等效物。

[0137] 在一些实施方式中,所述重链可变区包含下述氨基酸序列,或者基本上由该氨基酸序列组成,或由该氨基酸序列组成:EVQLQESGGGLVQPKGSLKLSCAAFGFTFNTYAMHWVRQAPGKGLEWVARIRSKSNYYATYYADSVKDRFTISRDDSQMSLSLQMNKLTEDTAIYYCVRGGYWSFDVWGAGTTVTVSS (SEQ ID NO: 10) 或其抗原结合片段或它们中每一个的等效物。

[0138] 在一些实施方式中,所述轻链可变区包含CDRL1序列,该CDRL1序列包含氨基酸序列,或者基本上由该氨基酸序列组成,或由该氨基酸序列组成,所述氨基酸序列以下述序列中的任一个开始:(i) KSVSTSGYSY (SEQ ID NO: 11), (ii) KSLLSHNGNTY (SEQ ID NO: 12) 或它们中每一个的等效物,并且随后为在羧基末端的另外50个氨基酸、或约40个氨基酸、或约30个氨基酸、或约20个氨基酸、或约10个氨基酸、或约5个氨基酸、或约4、或3、或2或1个氨基酸。

[0139] 在一些实施方式中,所述轻链可变区包含CDRL2序列,该CDRL2序列包含氨基酸序列,或者基本上由该氨基酸序列组成,或由该氨基酸序列组成,所述氨基酸序列以LVS (SEQ ID NO: 13) 或其等效物开始,并且随后为在羧基末端的另外50个氨基酸、或约40个氨基酸、或约30个氨基酸、或约20个氨基酸、或约10个氨基酸、或约5个氨基酸、或约4、或3、或2或1个氨基酸。

[0140] 在一些实施方式中,所述轻链可变区包含CDRL2序列,该CDRL2序列包含氨基酸序列,或者基本上由该氨基酸序列组成,或由该氨基酸序列组成,所述氨基酸序列以RMS (SEQ

ID NO: 14) 或其等效物开始, 并且随后为在羧基末端的另外50个氨基酸、或约40个氨基酸、或约30个氨基酸、或约20个氨基酸、或约10个氨基酸、或约5个氨基酸、或约4、或3、或2或1个氨基酸。

[0141] 在一些实施方式中, 所述轻链可变区包含CDRL3序列, 该CDRL3序列包含氨基酸序列, 或者基本上由该氨基酸序列组成, 或由该氨基酸序列组成, 所述氨基酸序列以下述序列中的任一个开始: (i) QHSRELPRT (SEQ ID NO: 15), (ii) MQHLEYPYT (SEQ ID NO: 16) 或它们中每一个的等效物, 并且随后为在羧基末端的另外50个氨基酸、或约40个氨基酸、或约30个氨基酸、或约20个氨基酸、或约10个氨基酸、或约5个氨基酸、或约4、或3、或2或1个氨基酸。

[0142] 在一些实施方式中, 所述轻链可变区包含多肽, 或者基本上由该多肽组成, 或由该多肽组成, 所述多肽由下述多核苷酸序列编码: GATATTGTGCTCACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGC TGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCATGCAGGGCCAGCAAAAGTGCAGTACATCTGGCTATAGTTATATG CACTGGTACCAACAGAAAACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTATCTTGTATCCAACCTAGAATCTGGGGTCC CTGCCAGGTTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGC AACCTATTACTGTCAGCACAGTAGGGAGCTTCTCGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA (SEQ ID NO: 17) 或其抗原结合片段或它们中每一个的等效物。

[0143] 在一些实施方式中, 所述轻链可变区包含下述氨基酸序列, 或者基本上由该氨基酸序列组成, 或由该氨基酸序列组成: DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHWYQQK PGQPPKLLIYLVSNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPRTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 18) 或其抗原结合片段或它们中每一个的等效物。

[0144] 在一些实施方式中, 所述轻链可变区包含多肽, 或者基本上由该多肽组成, 或由该多肽组成, 所述多肽由下述多核苷酸序列编码: GATATTGTGATCACACAGACTACACCCTCTGTACC TGTCACTCCTGGAGAGTCAGTATCCATCTCCTGTAGGTCTAGTAAGAGTCTCCTGCATAGTAATGGCAACACTTAC TTGTATTGGTTCCTGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCTCCTGATATCTCGGATGTCCAGCCTGCCTCAGGAG TCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTTCAGGAAGTCTTTCACACTGAGAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGT GGGTGTATTACTGTATGCAACATCTAGAATATCCGTATACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 19) 或其抗原结合片段或它们中每一个的等效物。

[0145] 在一些实施方式中, 所述轻链可变区包含下述氨基酸序列, 或者基本上由该氨基酸序列组成, 或由该氨基酸序列组成: DIVITQTTPSVPVTPGESVSISCRSSKSLHNSGNTYLYWFLQR PGQSPQLLISRMSLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 20) 或其抗原结合片段或它们中每一个的等效物。

[0146] 在本发明的另一方面, 分离的抗体包括一个或多个以下特征:

[0147] (a) 轻链免疫球蛋白可变结构域序列包括与公开的轻链序列中的任一个的轻链可变结构域的CDR至少85%相同的一个或多个CDR;

[0148] (b) 重链免疫球蛋白可变结构域序列包括与公开的重链序列中的任一个的重链可变结构域的CDR至少85%相同的一个或多个CDR;

[0149] (c) 轻链免疫球蛋白可变结构域序列与公开的轻链序列中的任一个的轻链可变结构域至少85%相同;

[0150] (d) HC免疫球蛋白可变结构域序列与公开的重链序列中的任一个的重链可变结构

域至少85%相同;以及

[0151] (e)所述抗体结合的表位与由公开的序列中的任一个结合的表位有重叠。

[0152] 包含所公开的CDR序列以及重链和轻链可变区序列的示例性抗体分别见表1和表2。

[0153] 表1:

抗体	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3
3H11	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:15
HLA-G 4E3	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:16

[0155] 表2:

抗体	重链可变区	轻链可变区
3H11	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 18
HLA-G 4E3	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 20

[0157] 在一个方面,本发明提供一种分离的抗体,其与选自3H11和HLA-G 4E3的抗体至少85%相同。

[0158] 在一个方面,本发明提供一种分离的抗体,其包含3H11的CDR。在一个方面,本发明提供一种分离的抗体,其与3H11至少85%相同。

[0159] 在一个方面,本发明提供一种分离的抗体,其包含HLA-G 4E3的CDR。在一个方面,本发明提供一种分离的抗体,其与HLA-G 4E3至少85%相同。

[0160] 在本发明提供的抗体的一些方面,HC可变结构域序列包含3H11的可变结构域序列,LC可变结构域序列包含3H11的可变结构域序列。

[0161] 在本发明提供的抗体的一些方面,HC可变结构域序列包含HLA-G 4E3的可变结构域序列,LC可变结构域序列包含HLA-G 4E3的可变结构域序列。

[0162] 在本文提供的抗体的一些方面,所述抗体结合人HLA-G的解离常数( $K_D$ )为小于 $10^{-4}$  M、 $10^{-5}$  M、 $10^{-6}$  M、 $10^{-7}$  M、 $10^{-8}$  M、 $10^{-9}$  M、 $10^{-10}$  M、 $10^{-11}$  M或 $10^{-12}$  M。在本文提供的抗体的一些方面,所述抗原结合位点特异性地结合至人HLA-G。

[0163] 在本文提供的抗体的一些方面,所述抗体是可溶性Fab。

[0164] 在本文提供的抗体的一些方面,所述HC和LC可变结构域序列是相同的多肽链的部件。在本文提供的抗体的一些方面,所述HC和LC可变结构域序列是不同的多肽链的部件。

[0165] 在本文提供的抗体的一些方面,所述抗体是全长抗体。

[0166] 在本文提供的抗体的一些方面,所述抗体是单克隆抗体。

[0167] 在本文提供的抗体的一些方面,所述抗体是嵌合的或人源化的。

[0168] 在本文提供的抗体的一些方面,所述抗体片段选自Fab、F(ab)'<sub>2</sub>、Fab'、scF<sub>v</sub>和F<sub>v</sub>。

[0169] 在本文提供的抗体的一些方面,该抗体包含Fc结构域。在本文提供的抗体的一些方面,该抗体是兔抗体。在本文提供的抗体的一些方面,该抗体是人抗体或人源化抗体或是在人体内是无致免疫性的。

[0170] 在本文提供的抗体的一些方面,该抗体包含人抗体框架区。

[0171] 在其他方面,在本文提供的抗体的CDR中的一个或多个氨基酸残基被另一个氨基酸取代。所述取代可以是“保守的”,意思是在相同家族的氨基酸之内的取代。天然存在的氨基酸可以被分为以下四个家族并且保守性取代将在这些家族之内发生:

[0172] 1) 具有碱性侧链的氨基酸:赖氨酸、精氨酸、组氨酸;

[0173] 2) 具有酸性侧链的氨基酸:天冬氨酸、谷氨酸;

[0174] 3) 具有不带电极性侧链的氨基酸:天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸;

[0175] 4) 具有非极性侧链的氨基酸:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸、半胱氨酸。

[0176] 在另一个方面,一个或多个氨基酸残基被添加至抗体的一个或多个CDR或者被从中删除。这样的添加或删除(缺失)发生在CDR的N或C末端或者在CDR之内的位置处。

[0177] 通过氨基酸的添加、缺失或取代而改变抗体的CDR的氨基酸序列,可以得到各种效果,例如提高对靶标抗原的结合亲和力。

[0178] 应该理解的是,包括这样的被改变的CDR序列的本发明的抗体仍然通过与被公开的抗体相似的特异性和灵敏度而结合HLA-G。这可以通过结合测试来进行检测。

[0179] 抗体的恒定区也可以被改变。例如,抗体可以设有任何同种型的Fc区:IgA (IgA1、IgA2)、IgD、IgE、IgG (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4) 或IgM。恒定区序列的非限制性例子包括:

[0180] 人类IgD恒定区,Uniprot: P01880 SEQ ID NO: 21 APTKAPDVFPIISGCRHPKDNSPV  
VLAACLITGYHPTSVTVTWYMGTSQSQPQRTFPEIQRRDSYMTSSQLSTPLQQWRQGEYKCVVQHTASKSKKEIFRWP  
ESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQ  
DLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPS  
LPPQRLMALREPAAPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGST  
TFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSIVTDHGPMPK

[0181] 人类IgG1恒定区,Uniprot: P01857 SEQ ID NO: 22 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA  
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEVPE  
KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0182] 人类IgG2恒定区,Uniprot: P01859 SEQ ID NO: 23 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA  
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVR  
KCCVECPPEPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS  
TFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS  
DISVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0183] 人类IgG3恒定区,Uniprot: P01860 SEQ ID NO: 24 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTA  
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVEL  
KTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPELLGGPSVFLFPPK  
KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV  
SNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPMLDSD  
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

[0184] 人类IgM恒定区,Uniprot: P01871 SEQ ID NO: 25 GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSV  
AVGCLAQDFLPDSITLSWKYKNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHVCKVQHPNGNKEKNV  
PLPVIAELPPKVSFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSRQIQVSWLREGKQVGSVTTDQVQAEAKESGPTTYKV  
TSTLTIKESDWLGQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCPDQDTAIRVFAIPPSFASIFLTKSTKLTCLVTDLTTYDSV

TISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWNSGERFTCTVTHTDLPSPKQTI SRPKGVALHRPDVY  
LLPPAREQLNLRRESATITCLVTGFSPADVFVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEEWNTGE  
TYTCAHEALPNRV TERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY

[0185] 人类IgG4恒定区,Uniprot: P01861 SEQ ID NO: 26 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA  
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES  
KYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN  
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYF  
SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

[0186] 人类IgA1恒定区,Uniprot: P01876 SEQ ID NO: 27 ASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNV  
IACLVQGFPPQEPLSVTWSESGQV TARNFPPSQDASGDLYTTSSQLTLPATQCLAGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVP  
CPVPSTPPTPSPSTPPTPSPSCCHPRLSLHRPALEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGVFTWTPSSGKSAVQGP  
DLGCGYSVSSVLPGCAEPWNHGKFTTCTAAYPESKTPLTATLSKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARG  
FSPKDVLRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTFFAVTSILRVA AEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDR  
LAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY

[0187] 人类IgA2恒定区,Uniprot: P01877 SEQ ID NO: 28 ASPTSPKVFPLSLDSTPQDGNV  
VACLVQGFPPQEPLSVTWSESGQV TARNFPPSQDASGDLYTTSSQLTLPATQCPDGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVP  
CPVPPPPCCHPRLSLHRPALEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGATFTWTPSSGKSAVQGP PERDLGCGYSVSSVLP  
GCAQPWNHGETFTCTAAHPELKTPLTANITKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSPKDVLRWLQ  
SQELPREKYLTWASRQEPSQGTTFFAVTSILRVA AEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRMAGKPTHVNVSVV  
MAEVDGTCY

[0188] 人类Igκ恒定区,Uniprot: P01834 SEQ ID NO: 29 TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV  
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF  
NRGEC

[0189] 在一些方面,所述抗体包含与SEQ ID NO:7至10中任何一个至少80%相同的重链恒  
定区,或其等效物。

[0190] 在一些方面,所述抗体包含与SEQ ID NO:17至20中任何一个至少80%相同的轻链  
恒定区,或其等效物。

[0191] 在本文提供的抗体的一些方面,所述抗体结合至由3H11和HLA-G 4E3抗体结合的  
表位。

[0192] 在本文提供的抗体的一些方面,HLA-G特异性抗体与3H11和HLA-G 4E3竞争结合人  
HLA-G。

[0193] 在本文提供的抗体的一些方面,所述抗体包括结构性的修饰,以促进快速结合和  
细胞摄取和/或缓慢释放。在一些方面,HLA-G抗体包括在抗体的CH2重链恒定区中的缺失,  
以促进快速结合和细胞摄取和/或缓慢释放。在一些方面,Fab片段被使用来促进快速结合  
和细胞摄取和/或缓慢释放。在一些方面,F(ab)'2片段被使用来促进快速结合和细胞摄取  
和/或缓慢释放。

[0194] 所述抗体、片段及其等效物可以与载体(例如药学上可接受的载体或其他试剂)结  
合,以提供用于使用和/或储存的制剂。

[0195] 进一步提供的是一种分离的多肽,其包括可用来产生结合至HLA-G的抗体的HLA-G

的氨基酸序列或其片段、或替代地基本上由其组成、或进一步地由其组成,以及编码它们的分离的多核苷酸。在一个方面,所述分离的多肽或多核苷酸进一步包括标记和/或连续的多肽序列(例如匙孔血蓝蛋白(KLH)载体蛋白),或者在多核苷酸的情况下,包括可操作地结合至多肽或多核苷酸的编码该序列的多核苷酸。所述多肽或多核苷酸可以与各种载体(例如磷酸盐缓冲盐水)结合。进一步提供了宿主细胞,例如原核或真核细胞,例如细菌、酵母、哺乳动物(大鼠、类人猿、仓鼠、或人类),其包括所述分离的多肽或多核苷酸。所述宿主细胞可以与载体结合。

[0196] 用于制备组合物的方法

[0197] 抗体、它们的制造和用途是广为人知的并且被公开于例如Harlow, E. and Lane, D., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999。可以使用本领域已知的标准方法来生产抗体。抗体的例子包括(但不限于)单克隆、单链、和抗体的功能性片段。

[0198] 可以在一定范围的宿主(例如山羊、兔、大鼠、小鼠、人类等)内制造抗体。可以通过使用具有免疫原性特性的靶标抗原或其片段或寡肽(例如HLA-G的C末端片段或分离的多肽)进行的注射来使它们免疫。根据宿主种类,可以加入和使用各种佐剂,以提高免疫反应。这样的佐剂包括但不限于弗氏(Freund's)试剂、矿物凝胶(例如氢氧化铝)、以及表面活性物质,例如溶血卵磷脂、普流尼克(pluronic)多元醇、聚阴离子、肽、油乳液、匙孔血蓝蛋白、以及二硝基苯酚。在用于人类的佐剂中,BCG(卡介苗)和小棒杆菌(*Corynebacterium parvum*)是特别有用的。本发明还提供了分离的多肽和佐剂。

[0199] 在一些方面,本发明的抗体是多克隆抗体,即具有不同的氨基酸序列的多个类型的抗HLA-G抗体的混合物。在一个方面,所述多克隆抗体包括具有不同的CDR的多个类型的抗HLA-G抗体的混合物。因此,培养制造不同的抗体的细胞的混合物,并且可以使用从得到的培养物纯化的抗体(参见WO 2004/061104)。

[0200] 单克隆抗体生产。可以使用能够通过培养物中的连续细胞系来生产抗体分子的任何技术来制备HLA-G的单克隆抗体。这样的技术包括但不限于杂交瘤技术(Kohler & Milstein, *Nature* 256: 495-497 (1975));三肿瘤技术;人类B细胞杂交瘤技术(参见例如Kozbor, *et al.*, *Immunol. Today* 4: 72 (1983))以及EBV杂交瘤技术以产生人单克隆抗体(参见例如Cole, *et al.*, in: *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985))。人单克隆抗体可以被用在本技术的实践中,并且可以使用人类杂交瘤(参见例如Cote, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 2026-2030 (1983))或者通过用Epstein Barr病毒体外转染人类B细胞(参见例如Cole, *et al.*, in: *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985))来生产。例如,可以分离编码抗体的区域的核酸的群体。使用采用衍生自编码抗体的保守区域的序列的引物的PCR,来扩增抗体的来自该群体的部分的序列,然后重建编码来自该被扩增的序列的抗体或其片段(例如可变结构域)的DNA。这样的被扩增的序列也可以被融合至编码其他蛋白(例如噬菌体外壳、或细菌细胞表面蛋白)的DNA,用于表达和展示噬菌体或细菌上的融合多肽。然后可以根据例如被表达的抗体或其片段对于存在于HLA-G多肽上的抗原或表位的亲和力,表达和进一步选择或分离被扩增的序列。替代地,可以通过例如使用包括HLA-G的氨基酸序列或其片段、或替代地基本上由其组成、或进一步地由其组成

的分离的多肽,使对象免疫,然后使用常规方法来从所述对象的脾分离杂交瘤,来制备表达杂交瘤的抗HLA-G单克隆抗体。参见例如Milstein *et al.*, (Galfre and Milstein, *Methods Enzymol* 73: 3-46 (1981))。使用标准方法来筛选杂交瘤将制造不同特异性(即对不同表位的特异性)和亲和力的单克隆抗体。具有期望的特性(例如HLA-G结合)的选择的单克隆抗体可以(i)被用作通过杂交瘤来表达,(ii)被结合至例如聚乙二醇(PEG)的分子以改变其特性,或(iii)可以通过各种方法来分离、序列化和操纵编码所述单克隆抗体的cDNA。在一个方面,通过杂交瘤来生产抗HLA-G单克隆抗体,该杂交瘤包括从转基因非人动物(例如转基因小鼠)获得的B细胞,其中该转基因非人动物具有包括被融合至永生化细胞的人类重链转基因和轻链转基因的基因组。杂交瘤技术包括本领域已知的技术,以及在Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 349 (1988); Hammerling *et al.*, *Monoclonal Antibodies And T-Cell Hybridomas*, 563-681 (1981)中教导的技术。

[0201] 噬菌体展示技术。如上所述,可以通过应用重组DNA和噬菌体展示技术来生产本发明的抗体。例如,可以使用本领域已知的各种噬菌体展示方法来制备抗HLA-G抗体。在噬菌体展示方法中,功能性抗体结构域被展示在携带编码它们的多核苷酸序列的噬菌体颗粒的表面。通过直接使用抗原进行选择,通常是被结合或者被捕获至固体表面或珠粒的抗原,从全部的或组合的抗体文库(例如人类或鼠类)中选择具有期望的结合特性的噬菌体。在这些方法中使用的噬菌体通常是丝状噬菌体,包括具有Fab、F<sub>v</sub>的fd和M13,或者二硫化稳定化的F<sub>v</sub>抗体结构域被重组地融合至噬菌体基因III或基因VIII蛋白。此外,方法可以适用于构建Fab表达文库(参见例如Huse, *et al.*, *Science* 246: 1275-1281, 1989),以允许具有HLA-G多肽(例如多肽或其衍生物、片段、类似物或同系物)的所需的特异性的单克隆Fab片段的快速和有效的识别。可以被用来制造本发明的分离的抗体的噬菌体展示方法的其他例子包括在以下文献中公开的方法:Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85: 5879-5883 (1988); Chaudhary *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87: 1066-1070 (1990); Brinkman *et al.*, *J. Immunol. Methods* 182: 41-50 (1995); Ames *et al.*, *J. Immunol. Methods* 184: 177-186 (1995); Kettleborough *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 24: 952-958 (1994); Persic *et al.*, *Gene* 187: 9-18 (1997); Burton *et al.*, *Advances in Immunology* 57: 191-280 (1994); PCT/GB91/01134; WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; WO 96/06213; WO 92/01047 (Medical Research Council *et al.*); WO 97/08320 (Morphosys); WO 92/01047 (CAT/MRC); WO 91/17271 (Affymax); 以及美国专利号5,698,426, 5,223,409, 5,403,484, 5,580,717, 5,427,908, 5,750,753, 5,821,047, 5,571,698, 5,427,908, 5,516,637, 5,780,225, 5,658,727和5,733,743。

[0202] 洛宁的美国专利号6,753,136已经描述了可用于通过经由二硫键来连接多肽而在噬菌体颗粒的表面上显示多肽的方法。如在以上参考文献中描述的,在噬菌体选择之后,编码来自噬菌体的区域的抗体可以被分离并且被用来产生整个抗体(包括人类抗体、或任何其他期望的抗原结合片段),并且被表达在任何期望的宿主(包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母和细菌)中。例如,还可以使用本领域中已知的方法来采用重组地产生Fab、Fab'和F(ab')<sub>2</sub>片段的技术,例如在WO 92/22324; Mullinax *et al.*, *BioTechniques* 12:

864-869 (1992); Sawai *et al.*, *AJRI* 34: 26-34 (1995); 以及 Better *et al.*, *Science* 240: 1041-1043 (1988) 中公开的。

[0203] 通常, 可以针对合适的抗体来选择被克隆进显示载体的杂交抗体或杂交抗体片段, 从而识别维持了良好的结合活性的变体, 因为所述抗体或抗体片段将会被呈现在噬菌体或噬菌粒颗粒的表面。参见例如 Barbas III *et al.*, *Phage Display, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001)。但是, 其他载体形式可以被用于该方法, 例如将抗体片段文库克隆进溶解性噬菌体载体(被修饰的 T7 或 Lambda Zap 系统) 以用于选择和/或筛选。

[0204] 抗体生产的替代性方法。还可以通过诱导淋巴细胞群体中的体内产生, 或者通过筛选高度特异性结合试剂的重组免疫球蛋白文库或面板, 来产生抗体 (Orlandi *et al.*, *PNAS* 86: 3833-3837 (1989); Winter, G. *et al.*, *Nature*, 349: 293-299 (1991))。

[0205] 替代地, 可以使用用于生产单链抗体的技术。单链抗体 (scFv) 包括通过接头肽 (通常长度为 5 至 25 个氨基酸) 连接的重链可变区域和轻链可变区域。在 scFv 中, 重链和轻链的可变区域可以衍生自相同的抗体或不同的抗体。可以使用重组技术来合成 scFv, 例如通过编码该 scFv 的载体在宿主生物 (例如 *E. coli*) 中的表达。可以通过以下方法获得编码 scFv 的 DNA: 使用部分 DNA 作为模板进行扩增, 其中该部分 DNA 编码选自编码上述抗体的重链或重链的可变区域的 DNA 和编码其轻链或轻链的可变区域的 DNA 的 DNA 的整个或所需的氨基酸序列, 通过使用定义其两个末端的引物对的 PCR, 并且进一步结合编码多肽接头部分的 DNA 和定义其两个末端的引物对来进行扩增, 从而将接头的两个末端分别连接至重链和轻链。可以根据本领域已知的常规方法来获得含有编码 scFv 的 DNA 的表达载体和由该表达载体转化的宿主。

[0206] 还可以产生抗原结合片段, 例如 F(ab')<sub>2</sub> 片段可以通过抗体分子的胃蛋白酶消化来产生, 而 Fab 片段可以通过减少 F(ab')<sub>2</sub> 片段的二硫键而产生。替代地, 可以构建 Fab 表达文库来进行具有期望的特异性的单克隆 Fab 片段的快速和简单的识别 (Huse *et al.*, *Science*, 256: 1275-1281 (1989))。

[0207] 抗体修饰。本发明的抗体可以被多聚化来提高对抗原的亲合力。要被多聚化的抗体可以是一种抗体或识别相同抗原的多个表位的多种抗体。作为抗体的多聚化的方法, 例如可以是 IgG CH3 结构域结合至两个 scFv 分子、结合至链霉亲和素、引入螺旋-转角-螺旋基序等。

[0208] 本文公开的抗体组合物可以是在这些抗体中的任一个和另一个试剂 (免疫偶联物) 之间形成的偶联物的形式。在一个方面, 本文公开的抗体被偶联至放射性物质。在另一个方面, 本文公开的抗体可以被结合至多种分子, 例如聚乙二醇 (PEG)。

[0209] 抗体筛选。可以使用多种免疫测试来进行筛选, 以识别具有期望的特异性的抗体。使用具有已建立的特异性的多克隆或单克隆抗体进行竞争性结合或免疫放射测试的许多程序在本领域中是已知的。这些免疫测试通常涉及测量在 HLA-G、或其任何片段或寡肽和其特异性抗体之间的复合物形成。可以使用采用对两个非干扰的 HLA-G 表位特异的单克隆抗体进行的双位点、基于单克隆的免疫测试, 但是也可以采用竞争性结合测试 (Maddox *et al.*, *J. Exp. Med.*, 158: 1211-1216 (1983))。

[0210] 抗体纯化。可以将本文公开的抗体纯化至同质化。可以采用常规的蛋白分离和纯

化方法,进行抗体的分离和纯化。

[0211] 仅仅作作为例子,可以通过色谱柱、过滤器、超滤、盐析、透析、制备性聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电聚焦电泳等的适当选择和组合使用,分离和纯化抗体。*Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual*, Daniel R. Marshak *et al.* eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); *Antibodies: A Laboratory Manual*. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)。

[0212] 色谱法的例子包括亲和色谱、离子交换色谱、疏水色谱、凝胶过滤色谱、反相色谱、以及吸附色谱。在一个方面,可以采用液体色谱(例如HPLC或FPLC)进行色谱。

[0213] 在一个方面,在亲和色谱中可以使用Protein A柱或Protein G。其他示例性的柱包括Protein A柱、Hyper D、POROS、Sephacryl S-4B (Pharmacia)等。

[0214] 使用方法

[0215] 概述。本文公开的抗体可用于本领域中涉及HLA-G多肽的定位和/或定量的方法(例如用于测量在适当的生理样品之内的HLA-G多肽的水平、用于诊断方法、用于使多肽成像等)。本文公开的抗体可用于通过标准技术(例如亲和色谱或免疫沉淀)分离HLA-G多肽。本文公开的HLA-G抗体可以促进来自生物样品(例如哺乳动物血清或细胞)的天然HLA-G多肽以及在宿主系统中表达的重组地制造的HLA-G多肽的纯化。再者,可以使用HLA-G抗体来检测HLA-G多肽(例如在血浆、细胞裂解物或细胞上清液中),从而评估多肽的表达的丰度和模式。可以诊断性地使用本文公开的HLA-G多肽,以作为临床测试过程的一部分来监控组织中的HLA-G水平,例如从而确定给定的治疗方案的功效。可以通过将本文公开的HLA-G抗体结合(即物理地连接)至可检测的物质,以促进检测。

[0216] 在另一个方面,本文提供了一种组合物,其包括结合至肽的本文公开的抗体或抗原结合片段,所述肽包括例如人HLA-G蛋白或其片段。在一个方面,所述肽与细胞相关。例如,所述组合物可以包括采用本文公开的抗体或抗体片段进行标记的被分解的细胞样品,该组合物可用于例如用于分离细胞的亲和色谱方法或基于流式细胞术的细胞分析或细胞分选。作为另一个例子,所述组合物可以包括采用本文公开的抗体或抗体片段进行标记的固定的组织样品或细胞涂片,该组合物可用于例如免疫组织化学或细胞学分析。在另一个方面,所述抗体或抗体片段被结合至固体支撑物,其可用于例如:ELISA;亲和色谱法或免疫沉淀法,用于分离HLA-G蛋白或其片段、HLA-G阳性细胞、或含有HLA-G和其他细胞组分的复合物。在另一个方面,所述肽被结合至固体支撑物。例如,所述肽可以通过对该肽特异的二级抗体而被结合至固体支撑物,其可用于例如夹心ELISA。作为另一个例子,所述肽可以被结合至色谱柱,其可用于例如根据本技术的抗体的分离或纯化。在另一个方面,所述肽被置于溶液中,例如裂解溶液或含有被分馏的细胞的亚细胞组分的溶液,其可用于例如ELISA和亲和色谱法或免疫沉淀法,用于分离HLA-G蛋白或其片段、或含有HLA-G和其他细胞组分的复合物。在另一个方面,所述肽与基质相关,例如凝胶电泳凝胶或通常被用于蛋白免疫印迹的基质(例如由硝化纤维素或聚偏二氟乙烯制成的膜),该组合物可用于电泳和/或免疫印迹技术,例如蛋白免疫印迹。

[0217] *HLA-G多肽的检测*。用于检测生物样品中的HLA-G多肽的水平的示例性方法涉及从对象获得生物样品,并且将所述生物样品与能够检测HLA-G多肽的本文公开的HLA-G抗体相

接触。

[0218] 在一个方面,所述HLA-G抗体3H11或HLA-G 4E3或它们的片段被可检测地标记。关于抗体的术语“标记”旨在包括抗体的直接标记和抗体的间接标记,前者通过将可检测的物质结合(即物理地连接)至抗体,而后者通过与被直接地标记的另一种化合物的反应性。间接标记的非限制性例子包括使用荧光标记的二级抗体进行的初级抗体的检测,以及使用生物素进行的DNA探针的末端标记,使得它能够通过荧光标记的链霉亲和素而被检测。

[0219] 本发明的检测方法可以被用来体外及体内检测生物样品中的HLA-G多肽的表达水平。用于HLA-G多肽的检测的体外技术包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、蛋白免疫印迹、流式细胞术、免疫沉淀、放射免疫测定和免疫荧光(例如IHC)。进一步地,用于HLA-G多肽的检测的体内技术包括将被标记的抗HLA-G抗体引入对象中。仅仅作为例子,可以使用放射性标记物来标记所述抗体,可以通过标准的成像技术来检测该标记物在对象中的存在和位置。在一个方面,所述生物样品包括来自测试对象的多肽分子。

[0220] **免疫测试和成像。**本文公开的HLA-G抗体可以被用来使用基于抗体的技术测试生物样品(例如人类血浆)中的HLA-G多肽水平。例如,可以使用经典的免疫组织化学(IHC)染色方法来研究组织中的蛋白表达。Jalkanen, M. *et al.*, *J. Cell. Biol.* 101: 976-985 (1985); Jalkanen, M. *et al.*, *J. Cell. Biol.* 105: 3087-3096 (1987)。可用于检测蛋白基因表达的其他基于抗体的方法包括免疫测试,例如酶联免疫吸附测定(ELISA)和放射免疫测定(RIA)。合适的抗体测试标签在本领域中是已知的并且包括:酶标签,例如葡萄糖氧化酶;以及放射性同位素或其他放射剂,例如碘( $^{125}\text{I}$ 、 $^{121}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ )、碳( $^{14}\text{C}$ )、硫( $^{35}\text{S}$ )、氚( $^3\text{H}$ )、铟( $^{112}\text{In}$ )、和锝( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ );以及荧光标签,例如荧光素和罗丹明、以及生物素。

[0221] 除了在生物样品中测试HLA-G多肽水平之外,还可以通过成像而在体内检测HLA-G多肽水平。可以与抗HLA-G抗体结合以用于HLA-G多肽水平的体内成像的标签包括能够通过X射线照相、NMR或ESR检测的标签。对于X射线照相,适当的标签包括放射性同位素(例如钷或铯),其发射可检测的辐射但不对对象显著有害。用于NMR和ESR的适当的标记物包括具有可检测的特性螺旋的标记物(例如氘),其可以通过对于相关的scFv克隆的营养素的标记而被结合进HLA-G抗体。

[0222] 已经标记有合适的可检测的成像部分(例如放射性同位素(例如 $^{131}\text{I}$ 、 $^{112}\text{In}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ )、不透射线的物质或可通过核磁共振检测的材料)的HLA-G抗体,被引入(例如肠胃外、皮下或腹膜内)进所述对象。在本领域中理解的是,对象的大小和使用的成像系统将确定产生诊断图像所需的成像部分的量。在放射性同位素部分的情况中,对于人类对象,注射的放射性的量将通常为约5至20毫居里 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 。被标记的HLA-G抗体然后将会优先地积累在含有特异性靶标多肽的细胞的位置。例如,在S. W. Burchiel *et al.*, *Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer* 13 (1982)中描述了体内肿瘤成像。

[0223] 在一些方面,含有促进快速结合和细胞摄取和/或缓慢释放的结构性修饰的HLA-G抗体可用于体内成像检测方法。在一些方面,HLA-G抗体包括在抗体的CH2恒定重链区域中的缺失,以促进快速结合和细胞摄取和/或缓慢释放。在一些方面,Fab片段被使用来促进快速结合和细胞摄取和/或缓慢释放。在一些方面,F(ab)'2片段被使用来促进快速结合和细胞摄取和/或缓慢释放。

[0224] **HLA-G抗体的诊断性使用。**本文公开的HLA-G抗体组合物可用于诊断和预后方法。

因此,本发明提供了用于在对象中的HLA-G相关的医疗状况的诊断中使用本文公开的抗体的方法。可以选择本文公开的抗体,使得它们具有对HLA-G多肽的高水平的表位结合特异性和高的结合亲和力。一般来说,抗体的结合亲和力越高,则在免疫测试中可以进行的洗涤条件越严格,以在不移除靶标多肽的情况下移除非特异性结合的材料。相应地,可用于诊断性测试的本技术的HLA-G抗体通常的结合亲和力为至少 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-10}$ 、 $10^{-11}$ 或 $10^{-12}$  M。在一些方面,被用作诊断试剂的HLA-G抗体具有足够的动力学上的速率(kinetic on-rate),以在至少12小时、至少5小时、至少1小时、或至少30分钟在标准条件下达到平衡。

[0225] 本技术的一些方法采用抗HLA-G抗体的多克隆制剂和多克隆的抗HLA-G抗体组合物作为诊断试剂,而其他方法采用单克隆分离物。在采用根据上述方法而制备的多克隆人类抗HLA-G抗体的方法中,制剂通常包括HLA-G抗体的混合物,例如具有对靶标多肽的不同的表位特异性的抗体。本发明的单克隆抗HLA-G抗体可用于在存在或可能存在紧密相关的抗原的情况下检测单一的抗原。

[0226] 本发明的HLA-G抗体可以被用作对于任何类型的生物样品的诊断试剂。在一个方面,本文公开的HLA-G抗体可用作对于人类生物样品的诊断试剂。HLA-G抗体可以被用来在多种标准测试方式中检测HLA-G多肽。这样的方式包括免疫沉淀、蛋白免疫印迹、ELISA、放射免疫测定、流式细胞术、IHC和免疫测定。参见Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Publications, New York, 1988);美国专利号3,791,932;3,839,153;3,850,752;3,879,262;4,034,074;3,791,932;3,817,837;3,839,153;3,850,752;3,850,578;3,853,987;3,867,517;3,879,262;3,901,654;3,935,074;3,984,533;3,996,345;4,034,074;和4,098,876。可以从对象的任何组织(包括活组织检查)、细胞或体液中获得生物样品。

[0227] *HLA-G抗体的预后使用*。本发明还提供了预后(或预测)测试,用于确定对象是否有风险发展与提高的HLA-G多肽表达或活性(例如癌前细胞的检测)相关的医学疾病或病症。这样的测试可以被用于预后或预测目的,从而因此在以HLA-G多肽表达为特征或与其相关的医学疾病或病症的发作之前,预防性地治疗个体。

[0228] 本发明的另一个方面提供了用于确定对象中的HLA-G表达的方法,从而为该对象选择合适的治疗或预防化合物。

[0229] 替代地,所述预后测试可以被用来识别具有或者有风险发展前列腺癌和卵巢癌的对象。因此,本发明提供了一种识别与提高的HLA-G多肽表达水平相关的疾病或病症的方法,其中从对象获得测试样品并且检测HLA-G多肽,其中与对照样品相比HLA-G多肽的提高的水平存在,是对象具有或者有风险发展与提高的HLA-G多肽表达水平相关的疾病或病症的预示。在一些方面,与提高的HLA-G多肽表达水平相关的疾病或病症选自癌症和/或实体肿瘤。

[0230] 在另一个方面,本发明提供了用于确定是否能够使用化合物有效地治疗对象的与提高的HLA-G多肽表达水平相关的疾病或病症的方法,其中从该对象获得生物样品并且使用所述HLA-G抗体检测HLA-G多肽。确定在从该对象获得的生物样品中HLA-G多肽的表达水平,并且与在从不患该疾病的对象获得的生物样品中发现的HLA-G表达水平相比较。与从健康对象获得的样品相比,在从怀疑患有该疾病或病症的对象获得的样品中的HLA-G多肽水平的提高,是被测试的该对象中HLA-G相关的疾病或病症的指示。

[0231] 有许多疾病状态其中提高的HLA-G多肽的表达水平被已知指示患有该疾病的对象是否可能响应于对特定类别的疗法或治疗。因此,检测生物样品中的HLA-G多肽的方法可以被用作预后的方法,例如从而评估该对象将会响应于疗法或治疗的可能性。确定来自对象的合适的组织或体液样品中的HLA-G多肽的水平,并将其与合适的对照进行比较,所述对照例如是患有相同的疾病但是有利地响应该治疗的对象中的水平。

[0232] 在一个方面,本发明提供了监控试剂(例如药物、化合物或小分子)对HLA-G多肽的表达的影响的方法。这样的测试可以被应用在基础药物筛选和临床试验中。例如,可以在显示出提高的HLA-G的表达的对象(例如被诊断有癌症的对象)的临床试验中,监控试剂降低HLA-G多肽水平的效力。可以通过施用试剂并观察反应,识别影响HLA-G多肽的表达的试剂。通过这种方式,HLA-G多肽的表达模式可以作为标记物,其是对象对试剂的生理反应的指示。相应地,可以在使用该试剂的对象的治疗之前、以及在期间的各种时间点,确定该反应状态。

[0233] 本发明的进一步的方面涉及用于确定患者是可能响应还是不可能响应HLA-G CAR疗法的方法。在特定的实施方式中,该方法包括将从所述患者分离的肿瘤样品与有效量的HLA-G抗体接触,以及检测结合至所述肿瘤样品的任何抗体的存在。在进一步的实施方式中,结合至所述肿瘤样品的抗体的存在表明所述患者可能响应所述HLA-G CAR疗法,而结合至所述肿瘤样品的抗体的不存在表明所述患者不可能响应HLA-G疗法。在一些实施方式中,所述方法包括额外的步骤,其中向被确定可能响应HLA-GCAR疗法的患者施用有效量的HLA-G CAR疗法。

#### [0234] 试剂盒

[0235] 如本文所述,本发明提供了用于确定HLA-G的表达水平的诊断方法。在一个特定的方面,本发明提供了用于执行这些方法的试剂盒,以及用于进行本发明的方法的说明,例如收集组织和/或进行筛选、和/或分析结果。

[0236] 所述试剂盒包括本文公开的HLA-G抗体组合物(例如单克隆抗体)以及使用说明、或替代地基本上由其组成、或进一步地由其组成。所述试剂盒可用于检测生物样品中HLA-G多肽的存在,所述生物样品例如是任何体液,包括但不限于例如痰液、血清、血浆、淋巴、囊液、尿液、粪便、脑脊液、腹水或血液并且包括身体组织的活检样品。测试样品也可以是肿瘤细胞、肿瘤附近的正常细胞、对应于肿瘤组织类型的正常细胞、血细胞、外周血淋巴细胞、或其组合。根据测试形式、测试方法的特性和被用作被测试的样品的组织、细胞或提取物,在上述方法中使用的测试样品将会发生改变。用于制备蛋白提取物或细胞的膜提取物的方法在本领域中是已知的,并且可以被容易地适应,从而获得能够与采用的系统兼容的样品。

[0237] 在一些方面,试剂盒可包括:能够结合生物样品中的HLA-G多肽的一种或多种HLA-G抗体(例如具有HLA-G抗体3H11或HLA-G 4E3的相同的抗原结合特异性的抗体或其抗原结合片段);用于确定样品中的HLA-G多肽的量的装置;以及用于将所述样品中的HLA-G多肽的量与标准进行比较的装置。所述HLA-G多肽中的一种或多种可以被标记。所述试剂盒组件(例如试剂)可以被包装在合适的容器中。所述试剂盒可以进一步包括使用该试剂盒来检测HLA-G多肽的说明。在一些方面,所述试剂盒包括:第一抗体,例如被连接至固体支撑物,其结合至HLA-G多肽;以及任选地2)第二、不同的抗体,其结合至所述HLA-G多肽或所述第一抗体,并且被偶联至可检测的标签。

[0238] 所述试剂盒还可以包括例如缓冲剂、防腐剂或蛋白质稳定剂。所述试剂盒可以进一步包括检测所述可标记的标签(例如酶或底物)必要的组件。所述试剂盒还可以包括对照样品或一系列的对照样品,其可以被检测并且与测试样品相比较。所述试剂盒的每个组件都可以被包裹在单个容器之内,并且所有的各种容器可以与用于解读使用该试剂盒进行的测试的结果的说明一起,处于单一的包装之内。本发明的试剂盒可以包括在所述试剂盒容器之上或之内的书面产品。所述书面产品描述了如何使用被包含在试剂盒之内的试剂。

[0239] 经得起考验的是,可以以本领域技术人员习惯使用的方式来包装这些建议的试剂盒组件。例如,这些建议的试剂盒组件可以被提供于溶液中或者作为液体分散体等。

[0240] 载体

[0241] 所述抗体还可以被结合至许多不同的载体。因此,本发明还提供了含有所述抗体和活性或惰性的另一种物质的组合物。熟知的载体的例子包括玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖、尼龙、淀粉酶、天然和改性纤维素、聚丙烯酰胺、琼脂和磁铁矿。所述载体的性质可以是可溶的或不可溶的以用于本发明。本领域技术人员将会知晓用于结合抗体的其他合适的载体、或者将会能够使用常规实验来确定这些载体。

[0242] 嵌合抗原受体及其用途

[0243] I. 组合物

[0244] 本发明提供结合至HLA-G 的嵌合抗原受体(CAR),其包含细胞激活部分、或基本上由细胞激活部分组成,该细胞激活部分包含细胞外、跨膜和细胞内结构域。细胞外结构域包含靶标特异性结合元件(或称抗原结合域)。细胞内结构域或细胞质结构域包含共刺激信号传导区和 $\zeta$ 链部分。所述CAR可任选地进一步包含多达300个氨基酸、优选地10至100个氨基酸、更优选地25至50个氨基酸的隔离结构域。

[0245] 抗原结合结构域。在一些方面,本发明提供了一种CAR,其包括对HLA-G特异的抗原结合结构域、或基本上由该抗原结合结构域组成、或由该抗原结合结构域组成。在一些实施方式中,所述抗原结合结构域包括抗HLA-G抗体的抗原结合结构域、或基本上由该抗原结合结构域组成、或由该抗原结合结构域组成。在进一步的实施方式中,抗HLA-G抗体的重链可变区域和轻链可变区域包括抗HLA-G抗体的抗原结合结构域、或基本上由该抗原结合结构域组成、或由该抗原结合结构域组成。

[0246] 在一些实施方式中,所述抗体的重链可变区包含SEQ ID NO:7至10或它们中每一个的等效物、或基本上由这些序列组成、或由这些序列组成,和/或包含一个或多个CDR区,这些CDR区包含SEQ ID NO:1至6或它们中每一个的等效物。在一些实施方式中,所述抗体的轻链可变区包含SEQ ID NO:17至20或它们中每一个的等效物、或基本上由这些序列组成、或由这些序列组成,和/或包含一个或多个CDR区,这些CDR区包含SEQ ID NO:11至16或它们中每一个的等效物。

[0247] 跨膜结构域。跨膜结构域可以衍生自天然的或合成的来源。在所述来源是天然的情况下,所述结构域可以衍生自任何膜结合或者跨膜蛋白。具有在本发明中的特定用途的跨膜区域可以衍生自CD8、CD28、CD3、CD45、CD4、CD5、CDS、CD9、CD 16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD 134、CD137、CD 154、TCR。替代地所述跨膜结构域可以是合成的,在该情况中它将主要包括疏水残基,例如亮氨酸和缬氨酸。优选地,在合成的跨膜结构域的每个末端将会发现苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体。任选地,短的寡肽或多肽接头(优选长

度为2至10个氨基酸)可以形成CAR的跨膜结构域和细胞质信号传导结构域之间的连接。甘氨酸-丝氨酸二联体提供了特别合适的接头。

[0248] **细胞质结构域**。CAR的细胞质结构域(胞质域)或细胞内信号传导结构域负责在其中置有CAR的免疫细胞的传统效应器功能中的至少一个的激活。细胞内信号传导结构域是指蛋白的转导效应器功能信号并引导免疫细胞来进行其特异性功能的一部分。可以使用整个信号传导结构域或其截断的部分,只要该截断的部分足够来转导效应器功能信号。TCR和共受体的细胞质序列以及其衍生物或变体能够作用为细胞内信号传导结构域以在CAR中使用。具有在本发明中的特定用途的细胞内信号传导结构域可以衍生自FcR、TCR、CD3、CDS、CD22、CD79a、CD79b、CD66d。因为通过TCR产生的信号单独不足以进行T细胞的完全激活,所以还可能需二级或共刺激信号。因此,共刺激信号传导分子的细胞内区域包括但不限于CD27、CD28、4-1BB (CD 137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关的抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、或特异性地与CD83结合的配体也可以被包括在CAR的细胞质结构域中。

[0249] 在一些实施方式中,嵌合抗原受体的细胞激活部分是T细胞信号传导结构域,其包括以下中的一个或多个蛋白或其片段、或替代地基本上由其组成、或进一步地由其组成:CD8蛋白、CD28蛋白、4-1BB蛋白和CD3- $\zeta$ 蛋白。

[0250] 在具体的实施方式中,所述CAR包括、或替代地基本上由其组成、或进一步地由其组成:抗HLA-G抗体的抗原结合结构域、CD8  $\alpha$  较链结构域、CD8  $\alpha$  跨膜结构域、共刺激信号传导区域、以及CD3 $\zeta$ 信号传导结构域。在进一步的实施方式中,所述共刺激信号传导区域包括CD28共刺激信号传导区域和4-1BB共刺激信号传导区域中的一个或两个。

[0251] 在一些实施方式中,所述CAR可以进一步包括可检测的标记物或纯化标记物。

#### [0252] II. 用于制备CAR的方法

[0253] 本发明还提供一种生产HLA-G CAR表达细胞的方法,该方法包括以下步骤、或基本上由以下步骤组成、或由以下步骤组成:(i)使用编码所述CAR的核酸序列转导分离的细胞群,和(ii)选择已经使用步骤(i)所述核酸序列成功转导的细胞的亚群,从而产生HLA-G CAR表达细胞。在一个方面,所述分离的细胞选自T细胞和NK细胞。

[0254] 本发明的方面还涉及包含HLA-G CAR的分离的细胞以及这种细胞的生产方法。该细胞是原核细胞或真核细胞。在一个方面,该细胞是T细胞或NK细胞。真核细胞可来源于任何优选的物种,例如动物细胞、哺乳动物细胞(如人细胞、猫细胞或狗细胞)。

[0255] 在具体的实施方式中,所述分离的细胞包含外源CAR、或基本上由外源CAR组成、或由外源CAR组成,所述CAR包含以下部分、或基本上由以下部分组成、或由以下部分组成:抗HLA-G抗体的抗原结合结构域、CD8  $\alpha$  较链结构域、CD8  $\alpha$  跨膜结构域、CD28共刺激信号传导区域和/或4-1BB共刺激信号传导区域、以及CD3 $\zeta$ 信号传导结构域。在一些实施方式中,所述分离的细胞是T细胞,例如动物T细胞、哺乳动物T细胞、猫T细胞、犬T细胞或人T细胞。在一些实施方式中,所述分离的细胞是NK细胞,例如动物NK细胞、哺乳动物NK细胞、猫NK细胞、犬NK细胞或人NK细胞。

[0256] 在一些实施方式中,公开了生产表达HLA-G CAR的细胞的方法,所述方法包括以下步骤、或基本上由以下步骤组成:(i)使用编码HLA-G CAR的核酸序列转导分离的细胞群,和(ii)选择已经使用步骤(i)的所述核酸序列成功转导的细胞的亚群。在一些实施方式中,所

述分离的细胞是T细胞,例如动物T细胞、哺乳动物T细胞、猫T细胞、犬T细胞或人T细胞,从而生产HLA-G CAR T细胞。在一些实施方式中,所述分离的细胞是NK细胞,例如动物NK细胞、哺乳动物NK细胞、猫NK细胞、犬NK细胞或人NK细胞,从而生产HLA-G CAR NK细胞。

[0257] *T细胞或NK细胞的来源*。在本发明的细胞在扩增和遗传修饰之前,可以从对象(例如在涉及自体疗法的实施方式中)或商业培养物中获得细胞。

[0258] 细胞可以获得自对象中的许多来源,包括外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、来自感染位点的组织、腹水、胸腔积液、脾组织和肿瘤。

[0259] 分离相关细胞的方法在本领域中是熟知的并且可以容易地适用至本申请;在以下例子中描述了示例性的方法。用于与本发明相关的用途的分离方法包括但不限于Life Technologies Dynabeads®系统;STEMcell Technologies EasySep™、RoboSep™、RosetteSep™、SepMate™;Miltenyi Biotec MACS™细胞分离试剂盒、以及其他商业上可获得的细胞分离和分隔试剂盒。可以通过使用在对独特的细胞表面标记物特异的这样的试剂盒中可用的珠粒或其他结合试剂,分离免疫细胞的特定的亚群体。例如,MACS™ CD4+和CD8+ MicroBeads可以被用来分离CD4+和CD8+ T细胞。

[0260] 替代地,细胞可以通过商业上可用的细胞培养物而获得,其包括但不限于:对T细胞,BCL2 (AAA) Jurkat (ATCC® CRL-2902™)、BCL2 (S70A) Jurkat (ATCC® CRL-2900™)、BCL2 (S87A) Jurkat (ATCC® CRL-2901™)、BCL2 Jurkat (ATCC® CRL-2899™)、Neo Jurkat (ATCC® CRL-2898™)细胞系;以及对于NK细胞,NK-92 (ATCC® CRL-2407™)、NK-92MI (ATCC® CRL-2408™)细胞系。

[0261] *载体*。可以使用载体制备CAR。本发明的一些方面涉及编码HLA-G CAR的分离的核酸序列以及载体,所述载体包含编码该CAR的分离的核酸或其互补序列或它们每一个的等效物,或所述载体基本上由这些序列或等效物组成,或所述载体由这些序列或等效物组成。

[0262] 在一些实施方式中,所述分离的核酸序列编码CAR,该CAR包含以下组分、或基本上由以下组分组成、或由以下组分组成:抗HLA-G抗体的抗原结合结构域、CD8 α较链结构域、CD8 α跨膜结构域、CD28共刺激信号传导区域和/或4-1BB共刺激信号传导区域、以及CD3ζ信号传导结构域。在具体的实施方式中,所述分离的核酸序列包括编码以下组分的序列、或基本上由该序列组成、或由该序列组成:(a)抗HLA-G抗体的抗原结合结构域、随后的(b)CD8 α较链结构域、(c)CD8 α跨膜结构域、随后的(d)CD28共刺激信号传导区域和/或4-1BB共刺激信号传导区域、随后的(e)CD3ζ信号传导结构域。

[0263] 在一些实施方式中,所述分离的核酸序列包括位于编码抗HLA-G抗体的抗原结合结构域的序列的上游的Kozak共有序列、或基本上由该共有序列组成、或由该共有序列组成。在一些实施方式中,所述分离的核酸包括赋予抗生素抗性的多核苷酸。

[0264] 在一些实施方式中,所述分离的核酸序列被包括在载体中。在一些实施方式中,所述载体是质粒。在其他实施方式中,所述载体是病毒载体。在具体的实施方式中,所述载体是慢病毒载体。

[0265] 以下例子中详细地讨论了示例性的载体的制备和使用所述载体来生产表达CAR的细胞。总的来说,通常通过将编码CAR多肽或其部分的核酸可操作地连接至启动子,并且将构建体结合进表达载体,实现编码CAR的天然的或合成的核酸的表达。所述载体可以适于复制和整合真核生物。用于生产包括载体和/或外源性核酸的细胞的方法在本领域中是熟知

的。参见例如Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)。

[0266] 在一个方面,术语“载体”是指这样的重组载体,其保留了感染和转导不分裂和/或缓慢分裂的细胞并整合到靶细胞的基因组中的能力。在一些方面,所述载体衍生自或者基于野生型病毒。在进一步的方面,所述载体衍生自或者基于野生型慢病毒。这样的例子包括但不限于人类免疫缺陷病毒(HIV)、马传染性贫血病毒(EIAV)、猿猴免疫缺陷病毒(SIV)和猫免疫缺陷病毒(FIV)。替代地,应该理解的是,其他逆转录病毒可以被用作载体骨架的基础,例如鼠白血病病毒(MLV)。很明显,根据本发明的病毒载体不必被局限于特定病毒的组件。所述病毒载体可以包括衍生自两种或更多种不同病毒的组件,并且还可以包括合成的组件。载体组件可以被操纵来获得所需的特性,例如靶细胞特异性。

[0267] 本发明的重组载体衍生自灵长类和非灵长类。灵长类慢病毒的例子包括人类免疫缺陷病毒(HIV)、人类获得性免疫缺陷综合征(AIDS)的致病因子、以及猿猴免疫缺陷病毒(SIV)。非灵长类慢病毒群组包括“慢病毒”原型visna/maedi病毒(VMV)、以及相关的山羊关节炎脑炎病毒(CAEV)、马传染性贫血病毒(EIAV)和更近期地被描述的猫免疫缺陷病毒(FIV)和牛免疫缺陷病毒(BIV)。现有技术的重组慢病毒载体在本领域中是已知的,例如参见美国专利号6,924,123;7,056,699;7,07,993;7,419,829和7,442,551,其以引用的方式合并入本文中。

[0268] 美国专利号6,924,123公开了某些逆转录病毒序列促进整合进靶细胞基因组。该专利教导了每个逆转录病毒包括被称为gag、pol和env的基因,其编码病毒粒子蛋白和酶。这些基因通过被称为长末端重复(LTR)的区域而被处于两个末端的侧翼。所述LTR负责前病毒整合和转录。它们也用作增强子-启动子序列。换句话说,LTR能够控制病毒基因的表达。逆转录病毒RNA的封装通过位于病毒基因组的5'末端的psi序列而发生。LTR自身是可以被分为三种元件的相同的序列,其被称为U3、R和U5。U3衍生自对RNA的3'末端独特的序列。R衍生自在RNA的两个末端重复的序列,而U5衍生自RNA的5'末端独特的序列。在不同的逆转录病毒之间这三种元件的尺寸可以发生较大的变化。对于病毒基因组,聚合(A)加成(终止)的位点是在LRT右手边的R和U5之间的边界处。U3含有前病毒的大多数转录控制元件,其包括启动子和多重增强子序列,它们响应细胞(在某些情况下为病毒)转录激活蛋白。

[0269] 关于结构基因gag、pol和env自身,gag编码病毒的内部结构蛋白。gag蛋白被蛋白水解地处理成成熟蛋白MA(基质)、CA(衣壳)和NC(核衣壳)。pol基因编码逆转录酶(RT),其包括DNA聚合酶、相关的RNA酶H和整合酶(IN),它们介导基因组的复制。

[0270] 对于病毒载体颗粒的生产,载体RNA基因组被表达自在宿主细胞中的编码它的DNA构建体。通过在宿主细胞中表达的其他核酸序列(“包装系统”,其通常包括gag/pol和env中的一个或两个),以反式的形式提供不被所述载体基因组编码的颗粒的部件。可以通过瞬时转染将生产病毒载体颗粒所需的一组序列引入宿主细胞,或者它们可以被整合进宿主细胞基因组、或者它们可以以混合物的方式而被提供。涉及的技术对于本领域技术人员来说是已知的。

[0271] 用于在本发明中使用的逆转录病毒载体包括但不限于:Invitrogen的pLenti系列版本4、6和6.2“ViraPower”系统,由Lentigen Corp.制造;pHIV-7-GFP,由City of Hope Research Institute实验室生成和使用;“Lenti-X”慢病毒载体,pLVX,由Clontech制造;

pLKO.1-puro,由Sigma-Aldrich制造;pLemiR,由Open Biosystems制造;以及pLV,由Virology (CBF), Berlin, Germany 的Charité Medical School, Institute实验室生成和使用。

[0272] 不管被用来将外源性核酸引入宿主细胞或将细胞暴露至本发明的抑制剂的方法如何,为了确认重组DNA序列在宿主细胞中的存在,可以进行多种测试。这样的测试包括:例如本领域技术人员熟知的“分子生物学”测定,例如Southern和Northern印迹、RT-PCR和PCR;“生物化学”测定,例如检测特定的肽是否存在,例如通过免疫学手段(ELISA和蛋白免疫印迹)或者通过本文描述的测试来识别落入本发明的范围之内的试剂。

[0273] 包装载体和细胞系。可以通过使用包装载体和细胞系,将CAR包装进逆转录病毒包装系统。包装质粒包括但不限于逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体和腺相关病毒载体。包装载体包括促进遗传物质递送进细胞的元件和序列。例如,逆转录病毒构建体是这样的包装质粒,其包括至少一种逆转录病毒辅助DNA序列,其衍生自复制缺陷型逆转录病毒基因组,其以反式的方式编码包装复制缺陷型逆转录病毒载体所需的所有病毒粒子蛋白,并且用于生产能够以高滴度包装复制缺陷型逆转录病毒载体而不会产生复制完整型辅助病毒的病毒粒子蛋白。逆转录病毒DNA序列缺少编码病毒的病毒性5' LTR的天然增强子和/或启动子的区域,并且缺少负责包装辅助基因组的psi功能序列和3' LTR,但是编码外来的聚腺苷酸化位点(例如SV40聚腺苷酸化位点)、以及引导其中需要病毒生产的细胞类型中的有效转录的外来增强子和/或启动子。所述逆转录病毒是白血病病毒,例如莫洛尼鼠白血病病毒(MMLV)、人类免疫缺陷病毒(HIV)、或长臂猿白血病病毒(GALV)。所述外来增强子和/或启动子可以是人类巨细胞病毒(HCMV)即刻早期(IE)增强子和启动子、莫洛尼鼠肉瘤病毒(MMSV)的增强子和启动子(U3区域)、Rous肉瘤病毒(RSV)的U3区域、脾病灶形成病毒(SFFV)的U3区域、或连接到天然莫洛尼鼠白血病病毒(MMLV)启动子的HCMV IE增强子。逆转录病毒包装质粒可以由两个逆转录病毒辅助DNA序列组成,它们由基于质粒的表达载体编码,例如其中第一辅助序列包括编码嗜亲性MMLV 或GALV 的gag和pol蛋白的cDNA,并且第二辅助序列包括编码env蛋白的cDNA。Env基因,其确定宿主范围,可以衍生自编码以下的基因:嗜异性的、双嗜性的、嗜亲性、多嗜性的(貂病灶形成)或10A1鼠白血病病毒env蛋白、或长臂猿白血病病毒(GALV) env蛋白、人类免疫缺陷病毒env(gp160)蛋白、水泡性口炎病毒(VSV)G蛋白、人类T细胞白血病(HTLV) I型和II型env基因产物,或嵌合包膜基因,其衍生自前述env基因或编码前述env基因产物的细胞质和跨膜结构域的嵌合包膜基因中的一个或多个以及针对在所需的靶细胞上的特异性表面分子的单克隆抗体的组合。

[0274] 在包装过程中,包装质粒和表达LHR的逆转录病毒载体被瞬时地共转染进能够产生病毒的哺乳动物细胞的第一群体中,该细胞例如是人类胚胎肾细胞,例如293细胞(ATCC No. CRL1573, ATCC, Rockville, Md.),从而生产高滴度的含有重组逆转录病毒的上清液。在本发明的另一种方法中,该细胞的瞬时转染的第一群体然后与哺乳动物靶细胞(例如人类淋巴细胞)共培养,从而以高效率转导具有外来基因的靶细胞。在本发明的另一种方法中,来自上述细胞的瞬时转染的第一群体的上清液与哺乳动物靶细胞(例如人类淋巴细胞或造血干细胞)一起孵育,从而以高效率转导具有外来基因的靶细胞。

[0275] 在另一个方面,在能够产生病毒的哺乳动物细胞(例如人类胚胎肾细胞,例如293细胞)的第一群体中稳定地表达包装质粒。通过使用可选择的标记物进行共转染或者使用

假型病毒进行感染,将逆转录病毒或慢病毒载体引入细胞中。在两种情况中,载体都发生整合。替代地,载体可以被引入游离基因地(episomally)维持的质粒中。生产了高滴度的含有重组逆转录病毒的上清液。

[0276] *T细胞的激活和扩增*。无论是在表达所需的CAR的T细胞的遗传修饰之前还是之后,都可以使用通常已知的方法来通常地激活和扩增T细胞,这些方法例如是在美国专利号6,352,694;6,534,055;6,905,680;6,692,964;5,858,358;6,887,466;6,905,681;7,144,575;7,067,318;7,172,869;7,232,566;7,175,843;5,883,223;6,905,874;6,797,514;6,867,041中描述的方法。使用HLA-G抗原离体刺激能够激活并扩增表达所选的CAR的细胞亚群体。替代地,可以通过与HLA-G抗原相互作用,体内激活T细胞。

[0277] 激活相关细胞的方法在本领域中是熟知的并且可以容易地适用至本申请;在以下例子中描述了示例性的方法。用于与本发明相关的用途的分离方法包括但不限于Life Technologies Dynabeads® 系统激活和扩增试剂盒;BD Biosciences Phosflow™ 激活试剂盒、Miltenyi Biotec MACS™ 激活/扩增试剂盒、以及对相关细胞的激活部分特异性的其他商业上可获得的细胞试剂盒。可以通过使用在这样的试剂盒中可用的珠粒或其他试剂,激活或扩增免疫细胞的特定的亚群体。例如, $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 Dynabeads® 可以被用来激活和扩增分离的T细胞的群体。

#### [0278] III. 使用方法

[0279] *治疗应用*。本发明的方法方面涉及用于在有需要的对象中抑制肿瘤的生长的方法、和/或用于治疗有需要的癌症患者的方法。在一些实施方式中,所述肿瘤是实体肿瘤。在一些实施方式中,所述肿瘤/癌症是甲状腺、乳腺、卵巢或前列腺肿瘤/癌症。在一些实施方式中,所述肿瘤或癌症表达或过度表达HLA-G。在一些实施方式中,这些方法包括向所述对象或患者施用有效量的所述分离的细胞、或基本上由该步骤组成、或由该步骤组成。在进一步的实施方式中,该分离的细胞包括HLA-G CAR。在更进一步的实施方式中,所述分离的细胞是T细胞或NK细胞。在一些实施方式中,所述分离的细胞对于被治疗的所述对象或患者来说是自体同源的。在进一步的方面,所述肿瘤表达HLA-G抗原,并且所述对象已经通过诊断(例如本文所述的一种)而被选择进行治疗。

[0280] 本文公开的CAR细胞可以被单独地施用,或者与稀释剂、已知的抗癌治疗剂、和/或与其他组分(例如细胞因子或免疫刺激性的其他细胞群体)一起施用。它们可以是一线、二线、三线、四线、或进一步的疗法。它们可以与其他疗法一起组合。这些的非限制性的例子包括化学疗法或生物制剂。合适的治疗方案将由治疗医师或兽医确定。

[0281] 可以以适于要被治疗或预防的疾病的方式,施用包括本发明的LHR CAR的药物组合物。虽然可以通过临床试验确定合适的剂量,但是施用的量和频率将由例如患者的情况、以及患者的疾病的种类和严重性等因素确定。

#### [0282] IV. 载体

[0283] 本发明的其他方面涉及组合物,其包括载体和在本文公开的实施方式中描述的产品中的一种或多种,例如包括HLA-G CAR的分离的细胞、分离的核酸、载体、任何抗-HLA-G抗体的分离的细胞或CAR细胞、抗-HLA-G。

[0284] 简单来说,包括但不限于本发明的组合物中的任何一种的本发明的药物组合物,可以包括本文所述的靶细胞群体、以及一种或多种药学上或生理上可接受的载体、稀释剂

或赋形剂。这样的组合物可以包括：缓冲液，例如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等；碳水化合物，例如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇；蛋白质；多肽或氨基酸，例如甘氨酸；抗氧化剂；螯合剂，例如EDTA或谷胱甘肽；佐剂（例如氢氧化铝）；以及防腐剂。本发明的组合物可以被配制用于口服、静脉内、局部、肠内和/或肠胃外给药。在一些实施方式中，本发明的组合物被配制用于静脉给药。

[0285] 在治疗过程中，细胞或组合可以单个剂量形式连续或间断给药。本领域技术人员已知确定最有效的给药途径和给药剂量的方法，并且这会根据用于疗法、疗法目的和病患的情况而改变。可以根据治疗医师选择的剂量水平和模式来进行单次或多次给药。合适的制剂和给药方法在本领域是已知的。在另一个方面，本发明的细胞和组合物可与其他治疗联合进行。

[0286] 细胞和细胞群通过本领域已知的方法给药至宿主，这些方法例如描述于PCT/US2011/064191。本发明的细胞或组合物的给药可用来产生用于实验或筛选分析的具有期望疾病、病症或适应症的动物模型。

[0287] 以下实施例是可被用在各种情况下来将本发明付诸实施的示例性程序。

[0288] 实施例1-鼠抗人HLA-G单克隆抗体的产生

[0289] 抗原

[0290] HLA I类组织相容性抗原( $\alpha$ 链G抗原)购自MybioSource.com (货号 MBS717410)。它是一种在细菌中制造的重组蛋白并具有HIS标签，分子量为50KD (90%纯度)，序列为：GSHSMRYFSA AVSRPGRGEP RFIAMGYVDD TQFVRFSDSDS ACPRMEPRAP WVEQEGPEYW EEETRNTKAH AQTDRMNLQT LRGYYNQSEA SHTLQWMIG CDLGS DGRL RGYEQYAYDG KDYLALNEDL RSWTAADTAA QISKRKCEAA NVAEQRRAYL EGTCVEWHLA-G YLENGKEMLQ RADPPKTHVT HHPVFDYEAT LRCWALGFYP AEIILTWQRD GEDQTQDVEL VETRPAGDGT FQKWA AVVVP SGEEQRYTCH VQHEGLPEPL MLRWKQSSLP TIPIMGI VAGLVVLA AV VTGA AVAAVL WRKKSSD (SEQ ID NO: 30)。

[0291] 免疫程序

[0292] 四周龄雌性BALB/c小鼠购自Harlan Laboratories，每两周用10 $\mu$ g以完全弗氏佐剂(第一和第二免疫)或不完全弗氏佐剂(第三和第四次免疫)乳化的抗原免疫四次。每次免疫，将一共25 $\mu$ g的抗原/佐剂分为三份，分别皮内注射到小鼠背部上的单独位点。最后一次免疫后十天，采集血样，在抗原涂布平板上用ELISA法滴定。表现出最高滴度的小鼠通过尾静脉注射进行第五次强化免疫，不添加佐剂，只将10 $\mu$ g溶解于100 $\mu$ l的无菌磷酸缓冲盐溶液中。

[0293] 杂交瘤的生成

[0294] 四天后，处死这些小鼠，取出脾脏进行杂交瘤程序。将脾细胞分散于含有Pen/Strep抗生素的RPMI-1640培养基中，使用PEG (Hybri MAX，分子量1450，Cat. No: p7181, Sigma)将脾细胞与鼠NS0细胞融合。随后使用HAT筛选使得仅有融合细胞生长。具有生长的杂交瘤细胞的孔中上清液首先用抗原涂布平板通过ELISA筛选，再通过流式细胞术在HLA-G阳性和阴性人肿瘤细胞系(JAR Trophoblastic Carcinoma)上进行筛选。表现出阳性和高平均荧光指示(MFI)的杂交瘤被筛选出来通过有限稀释法进行亚克隆。随后通过流式细胞术对亚克隆进行重新测试，并冷冻于液氮中，并在2L容器中扩大生产，再用Tandon蛋白A或G以及离子交换色谱法纯化抗体。纯化抗体随后被装入小瓶并存储在-20 $^{\circ}$ C直至使用。

[0295] 流式细胞术程序和数据

[0296] 使用流式细胞术的筛选方法使用通过ELISA发现对抗原涂布平板呈阳性的杂交瘤的上清液在HLA-G阳性(JEG-3滋养细胞瘤)和阴性(K562, Jurkat)细胞系上进行。这些产生高平均荧光指数(MFI)的杂交瘤随后被亚克隆并再次筛选出对HLA-G呈选择性阳性的细胞群。如图1所示,母杂交瘤3H11和4E3的亚克隆持续产生高MFI的表达HLA-G的JEG-3细胞系。根据这些数据,3H11-12和4E3-1被选择用来产生CAR-T细胞。

[0297] 用筛选的抗体进行免疫组化

[0298] 使用标准免疫组化方法和抗原修复法发现抗体4E3及其亚克隆能染色HLA-G阳性组织。如图2A-2D所示,在抗原阳性肿瘤(如甲状腺乳头状癌)的细胞质和细胞膜中均为HLA-G阳性(图2A、2B),但在正常甲状腺组织中呈阴性(图2C),正常甲状腺组织不表达HLA(图2D)。获得HLA-G免疫组化法的伴侣诊断抗体将能够在将来的临床试验中识别出有可能受益于HLA-G CAR T细胞疗法的患者。

[0299] 实施例2 - HLA-G CAR T细胞的产生

[0300] 单链HLA-G抗体基因的构建和合成

[0301] 2个高结合性抗HLA-G抗体(4E3-1和3H11-12,我们实验室产生)的DNA序列获得自MCLAB (South San Francisco, CA)。在下述试验中测试两个抗体以确定哪个能够产生最有效的CAR。如下所示,第二或第三(图3)代CAR载体被构建,其由以下串联基因组成:kozak共有序列;CD8信号肽;抗HLA-G重链可变区;(甘氨酸4丝氨酸)3柔性多肽接头;各抗HLA-G轻链可变区;CD8铰链和跨膜结构域;以及CD28、4-1BB和CD3 $\zeta$ 细胞内共刺激信号传导结构域。铰链、跨膜和信号传导结构域DNA序列通过Carl June的专利确定(参见US 20130287748 A1)。抗HLA-G CAR基因由Genewiz, Inc. (South Plainfield, NJ)在包含*bla*基因的pUC57载体骨架内合成,该*bla*基因为载体宿主赋予氨苄青霉素抗性。

[0302] 基因亚克隆进慢病毒质粒

[0303] 使用抗HLA-G质粒cDNA转化NovaBlue Singles™ 化学感受态的大肠杆菌细胞。在被转化的大肠杆菌细胞生长之后,纯化CAR质粒,并使用合适的限制酶进行消化,从而通过过夜T<sub>4</sub> DNA连接酶反应(New England Biosciences; Ipswich, MA)被插入进基于HIV-1的慢病毒载体,该载体包括HIV-1长末端重复(LTR)、包装信号( $\Psi$ )、EF1 $\alpha$ 启动子、内部核糖体进入位点(IRES)和土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)。然后使用得到的含有抗HLA-G的慢病毒质粒,转化NovaBlue Singles™ 化学感受态的大肠杆菌细胞。

[0304] 慢病毒颗粒的生产

[0305] 在转染之前,在10 mL完全-Tet-DMEM中在 $4.0 \times 10^6$ 个细胞/100 mm组织培养物处理过的板上接种HEK293T细胞,并且在加湿的5% CO<sub>2</sub>培养器中在37°C下过夜孵育。一旦80-90%融合,则使用CAR-基因慢病毒质粒和含有形成慢病毒包膜和衣壳组分所需的基因的慢病毒包装质粒,共转染HEK293T细胞,以促进结合HEK293T细胞的含有质粒的纳米颗粒的形成。在37°C下孵育被转染的HEK293T细胞培养物4小时之后,将转染培养基替换为10 mL新鲜的完全Tet DMEM。然后再孵育HEK293T细胞48小时,然后收获细胞上清液,并通过针对p24这一主要慢病毒衣壳蛋白的夹心ELISA测试慢病毒颗粒。将含有慢病毒的上清液进行等分,并储存在-80°C,直至用于靶标CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup> T细胞的转导。

[0306] 人类CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>外周血T细胞的纯化、活化和富集

[0307] 回收使用Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare; Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) 进行密度梯度离心而富集的外周血单核细胞(PBMC), 并通过离心进行洗涤, 该离心使用含有0.5%牛血清白蛋白(BSA)和2mM EDTA的PBS。可以使用MACS CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup> MicroBeads (Miltenyi Biotec; San Diego, CA) 试剂盒来分离这些人类T细胞亚群, 其中使用磁激活的LS柱来主动选择CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup> T细胞。然后从磁性MACS分离器中移除磁结合的T细胞, 从LS柱中冲刷, 并在新鲜的完全培养基中洗涤。通过使用Life Technologies Acoustic Attune<sup>®</sup> 细胞仪进行的流式细胞术评估CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup> T细胞的纯度, 并在有需要的情况下通过在USC的流式细胞术核心设施进行的荧光活化细胞分选而进行富集。在合适的细胞培养容器中补充有100 IU/mL IL-2的完全培养基中将CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup> T细胞维持 $1.0 \times 10^6$ 个细胞/mL的密度, 其中 $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28人类T细胞戴诺磁珠(Life Technologies; Carlsbad, CA) 被加入来激活被培养的T细胞。在5% CO<sub>2</sub>培养器中在37°C下孵育T细胞2天, 然后使用CAR慢病毒颗粒进行转导。

[0308] <sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup> T细胞的慢病毒转导

[0309] 收集活化的T细胞, 并通过Ficoll-Hypaque密度梯度离心或使用MACS死细胞移除试剂盒(Miltenyi Biotec; San Diego, CA), 移除死细胞。在6孔板中, 以 $1.0 \times 10^6$ 个细胞/mL完全培养基的密度将活化的T细胞进行铺板。对于各个孔, 以各种感染复数(MOI) (例如1、5、10和50) 将含有HLA-G CAR的慢病毒颗粒加入至细胞悬浮液。以4  $\mu$ g/mL的终浓度加入聚凝胺, 它是一种阳离子聚合物, 通过促进慢病毒颗粒和靶细胞表面之间的相互作用而辅助转导。在32°C下以 $800 \times g$ 将培养板离心1小时。在离心之后, 对含有慢病毒的培养基进行抽吸, 并将细胞丸粒重悬在具有100 IU/mL IL-2的新鲜完全培养基中。在37°C将细胞置于5% CO<sub>2</sub>加湿的培养器中过夜。在转导之后三天, 将细胞丸粒化并重悬在具有IL-2和400  $\mu$ g/mL遗传霉素(G418硫酸盐)(Life Technologies; Carlsbad, CA) 的新鲜完全培养基中。通过流式细胞术和southern印迹分析来评估HLA-G CAR修饰的T细胞, 以证明转导过程成功。在体外和体内测试之前, 使用FACS富集HLA-G CAR T细胞并1:1混合以进行体内研究。

[0310] 通过钙黄素释放细胞毒性测定进行CAR功效的体外评估

[0311] 收集HLA-G抗原阳性和阴性靶细胞, 洗涤, 并以 $1.0 \times 10^6$ 个细胞/mL的浓度重悬在完全培养基中。以15  $\mu$ M的浓度将钙荧光素乙酰氧(AM)加入至靶细胞样品, 然后在5% CO<sub>2</sub>加湿的培养器中在37°C下孵育30分钟。将被染色的阳性和阴性靶细胞洗涤两次, 并通过离心重悬在完全培养基中, 并以 $1.0 \times 10^4$ 个细胞/孔的密度将其加入至96孔板。以50:1、5:1和1:1的效应与靶细胞的比例, 将HLA-G CAR T细胞加入至完全培养基中的板。悬浮在完全培养基和具有2% triton X-100的完全培养基中的被染色的靶细胞分别作为自发对照和最大释放对照。在 $365 \times g$ 和20°C下将培养板离心2分钟, 然后放置回培养器中3小时。然后将板离心10分钟, 并将细胞上清液等分至黑色聚苯乙烯96孔板上的各个孔, 并分别在485/20 nm和528/20 nm的激发和发射波长在Bio-Tek<sup>®</sup> Synergy<sup>™</sup> HT酶标仪上评估荧光度。

[0312] 通过Luminex生物测定进行的人细胞因子的定量

[0313] 使用本领域中已知的标准程序, 测量HLA-G CAR修饰的T细胞和HLA-G阳性和阴性肿瘤细胞系的上清液的细胞因子分泌, 作为CAR T细胞激活的测量。将数据与单独的培养基进行比较, 并且与使用未激活的人类T细胞的培养物进行比较, 以识别背景活性。在孵育过程期间, 随着时间推移测量IL-2、IFN- $\gamma$ 、IL-12和其他相关细胞因子的浓度。

[0314] 在两个异种移植HLA-G阳性癌症模型中体内评估CAR T细胞功效

[0315] 利用两个不同的人肿瘤细胞系异种移植肿瘤模型来体内评价HLA-G CAR T细胞。通过注射 $5 \times 10^6$  HLA-G阳性或HLA-G阴性实体肿瘤细胞系,在6-8周龄雌性裸鼠皮下建立这两种实体肿瘤。当肿瘤直径达到0.5 cm时,使用1或 $3 \times 10^7$ 个人T细胞(作为阴性对照)或者使用根据体外研究结果从最具活性的HLA-G抗体构建的HLA-G CAR T细胞,静脉注射小鼠(n=5)。然后使用卡尺3X /周测量肿瘤体积,并生成体积增长曲线,以证明实验处理对对照的效果。

[0316] 实验发现HLA-G是CAR T细胞发育的优异靶标,以用来治疗丧失HLA-A/B/C表达以避免免疫识别的人类实体肿瘤。它在正常组织中具有最低的表达(孕期胎盘除外),因此在患者中应当具有非常有限的脱靶阳性和毒性。

[0317] 实施例3-抗HLA-G CAR T细胞

[0318] CAR慢病毒构建体的构建

[0319] CAR由特异性结合至HLA-G的细胞外抗原结合部分或scFV构成。ScFV经CD8铰链区连接至细胞质信号传导结构域,该信号传导结构域由CD8跨膜区域、以及来自CD28、4-1BB和CD3z的信号传导结构域组成(图5)。包括信号传导结构域的scFV序列由Genewiz Gene Synthesis服务公司(Piscataway, NJ)通过合成方法来合成。纯化质粒,并使用合适的限制酶进行消化,从而通过过夜T<sub>4</sub> DNA连接酶反应(New England Biosciences; Ipswich, MA)被插入进基于HIV-1的双顺反子慢病毒载体(pLVX-IRES-ZsGreen, Clontech, Signal Hill, CA),该载体包括HIV-1 5' 和3' 长末端重复(LTR)、包装信号( $\Psi$ )、EF1 $\alpha$ 启动子、内部核糖体进入位点(IRES)、土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)、和猿病毒40起源(SV40)。然后使用得到的含有CAR的慢病毒质粒转化NovaBlue Singles™ 化学感受态的大肠杆菌细胞。

[0320] 慢病毒颗粒的生产

[0321] 在转染之前,在补充有10%透析过的FCS的20 mL DMEM中在 $4.0 \times 10^6$ 个细胞/150 cm<sup>2</sup>组织培养物处理过的烧瓶接种HEK 293T细胞,并且在加湿的5% CO<sub>2</sub>培养器中在37°C下过夜孵育。一旦80-90%融合,则在37°C加湿的5% CO<sub>2</sub>培养器中在补充有1%透析过的FCS的且不含青霉素/链霉素的20 mL DMEM中孵育HEK 293T细胞两小时。使用特异性的pLVX-B7-H4-CAR质粒和含有形成慢病毒包膜和衣壳组分所需的基因的慢病毒包装质粒,共转染HEK293T细胞。还加入了专有的反应缓冲液和聚合物,以促进结合HEK 293T细胞的含有质粒的纳米颗粒的形成。在37°C下孵育被转染的HEK 293T细胞培养物24小时之后,将转染培养基替换为20 mL新鲜的完全DMEM。每24小时收集慢病毒上清液至三天,并且在4°C以1,250 rpm将上清液离心5分钟,然后过滤灭菌并在4°C以20,000 g在超离心中离心2小时。将被浓缩的慢病毒重悬在含有7%海藻糖和1%BSA的PBS中,以作长期储存。将慢病毒进行等分,并储存在-80°C,直至用于靶标CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup> T细胞的转导。24小时之后收获细胞上清液,并通过针对p24这一主要慢病毒衣壳蛋白的夹心ELISA测试慢病毒颗粒。转染效率由蛋白标记物ZsGreen的表达确定,其通过在荧光显微镜下的可视化而被估算在30%-60%之间。

[0322] 人CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>外周血T细胞的纯化、活化和富集

[0323] 回收使用Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare; Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)进行密度梯度离心而富集的外周血单核细胞(PBMC),并通过离心进

行洗涤,该洗涤程序使用含有0.5%牛血清白蛋白(BSA)和2mM EDTA的PBS。使用T细胞富集试剂盒(Stem Cell Technologies)来磁性地分离这些人类T细胞亚群,其中对于CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞使用阴性选择。通过使用Life Technologies Acoustic Attune<sup>®</sup>细胞仪进行的流式细胞术评估CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞的纯度,并且通过荧光活化细胞分选而进行富集。在合适的细胞培养容器中在补充有100 IU/mL IL-2的完全50% Click's培养基/50% RPMI-1640培养基中将1:1混合的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞维持 $1.0 \times 10^6$ 个细胞/mL的密度,其中 $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28人类T细胞激活珠粒(Stem Cell Technologies)被加入来激活被培养的T细胞。在5% CO<sub>2</sub>培养器中在37°C下孵育T细胞2天,然后使用CAR慢病毒颗粒进行转导。

[0324] <sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞的慢病毒转导

[0325] 收集活化的T细胞,并通过Ficoll-Hypaque密度梯度离心或使用MACS死细胞移除试剂盒(Miltenyi Biotec; San Diego, CA),移除死细胞。在6孔板中,以 $1.0 \times 10^6$ 个细胞/mL完全培养基的密度将活化的T细胞进行铺板。使用补充有Lentiblast(一种细胞转染辅助试剂)(Oz Biosciences, San Diego, CA)的慢病毒颗粒转导细胞。在加湿的5% CO<sub>2</sub>培养器中在37°C下孵育被转导的细胞24小时。然后离心细胞,更换培养基,加入T细胞激活珠粒(Stem Cell Technologies, San Diego, CA)。

[0326] 细胞毒性试验

[0327] 使用乳酸脱氢酶(LDH)细胞毒性试剂盒(Thermo Scientific, Carlsbad, CA)测定CAR T细胞的细胞毒性。收集被激活的T细胞,并使用上述HLA-G CAR慢病毒构建体来转导 $1 \times 10^6$ 个细胞。使用T细胞激活珠粒(Stem Cell Technologies, San Diego, CA)来激活细胞两天,然后进行细胞毒性试验。根据厂家的说明书来确定靶细胞的最佳数目。为了测试,在5% CO<sub>2</sub>培养器中在37°C下在96孔板中一式三份地将合适的靶细胞进行铺板24小时,然后以20:1、10:1、5:1和1:1的比率加入被激活的CAR T细胞,并在5% CO<sub>2</sub>培养器中在37°C下孵育24小时。然后在37°C下裂解细胞45分钟,并以1,250 rpm离心5分钟。将上清液转移至新的96孔板,然后加入反应混合物30分钟。使用停止溶液来停止反应,并在450nm对培养板进行读数,使用在650 nm的吸光度来修正读数。

[0328] 杂交

[0329] 使用RIPA缓冲液裂解表达HLA-CAR的T细胞。通过Bradford方法估算蛋白浓度。50微克的蛋白裂解液在12%的还原性聚丙烯酰胺凝胶上电泳,随后转移至硝酸纤维素膜。膜在使用补充有0.05%吐温的含5%无脂肪牛奶的TBS中封闭1小时。膜随后在4°C用CD3 $\zeta$ 特异性抗体(1:250)孵育过夜。洗涤三次后,膜在二抗中孵育,使用化学发光法检测条带。将膜分离并再次检测 $\beta$ 肌动蛋白。

[0330] 体内肿瘤消退测试

[0331] 使用SKOV3注射Foxn1缺陷小鼠,它是表达LHR的卵巢癌细胞系。使用0.2 mL接种器将在200 $\mu$ l的磷酸盐缓冲盐水中的 $2 \times 10^6$ 个细胞注射进小鼠的左侧腹部。使用 $\alpha$ CD3/CD28激活复合物(Stem Cell Technologies, San Diego, CA)激活T细胞2天。然后使用HLA-G CAR慢病毒颗粒转导被激活的T细胞,并用 $\alpha$ CD3/CD28激活复合物再激活2天。在肿瘤接种之后第7天,将 $2.5 \times 10^6$ 个被激活的表达HLA-G CAR的T细胞注射至小鼠。使用Vernier卡尺每周两次评估肿瘤尺寸,并计算体积。

[0332] 细胞的细胞毒性

[0333] 使用SKOV3卵巢癌细胞系检验HLA-G CAR-T细胞的细胞毒活性(图6)。FACS 分析显示SKOV3表达HLA-G。以20:1、10:1、5:1和1:1的效应细胞:靶细胞比率,将HLA-G CAR T细胞加入SKOV3。在10:1的比率时,HLA-G CAR T细胞显示出对靶细胞SKOV3裂解提高,裂解率为42%。相比之下,未被转导的T细胞在所测试的任何比率下都未裂解SKOV3细胞。。

[0334] 的蛋白表达

[0335] 用HLA-G CAR转导的T细胞表达CAR蛋白,如Western杂交所示(图7)。CAR的大小预估为60 kDa。 $\beta$ 肌动蛋白作为上样内参。靶向用于CAR的信号传导结构域的CD3 $\zeta$ 抗体被用来检测CAR蛋白。

[0336] 等效物

[0337] 除非另有定义,否则本文所用的所有的技术和科学的术语都具有如本发明的所属领域中的普通技术人员中的一个通常所理解的相同的含义。

[0338] 可以在缺少在本文没有具体公开的任何元素或限制的情况下,适当地实施本文说明性地描述的本技术。因此,例如,术语“包括”、“包含”、“含有”等应该被广泛且没有限制地理解。此外,本文采用的术语和表达已经被用作描述而非限制,在这些术语和表达的使用中,没有意图排除所示和所述特征或其部分的任何等效物,但是应该认识到,在本发明技术的范围之内各种变化都是可能的。

[0339] 因此,应该理解的是,在此提供的材料、方法和例子是优选的方面的代表,是示例性的,并且不旨在作为对本技术的范围的限制。

[0340] 本文广泛地和一般地描述了本技术。落入一般性描述之内的较窄的种类和亚属分组中的每一个也都形成本技术的一部分。这包括了具有从该属中移除任何主题的附带条件或负面限制的本技术的一般性描述,无论被删除的材料是否在本文中被具体描述。

[0341] 此外,在以马库什组描述本技术的特征或方面的情况中,本领域技术人员将认识到,还借此以该马库什组中的任何单独成员或成员的亚组描述了本技术。

[0342] 在本文中提及的所有公开文献、专利申请、专利和其他参考文献,其整体都以引用的方式明确地合并入本文中,至如同每个都单独地以引用的方式合并的相同程度。如发生冲突,以本说明书(包括定义)为准。

[0343] 在以下权利要求中阐述了其他方面。

[0344] HLA-G 序列

[0345] CDRH1

[0346] GFNIKDTY (SEQ ID NO: 1)

[0347] GFTFNTYA (SEQ ID NO: 2)

[0348] CDRH2

[0349] IDPANGNT (SEQ ID NO: 3)

[0350] IRSKSNNYAT (SEQ ID NO: 4)

[0351] CDRH3

[0352] ARSYYGGFAY (SEQ ID NO: 5)

[0353] VRGGYWSFDV (SEQ ID NO: 6)

[0354] HC1

[0355] AGGTGCAGCTGCAGGAGTCAGGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGCACA

GCTTCTGGCTTCAACATTAAGACACCTATATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTG  
GAAGGATTGATCCTGCGAATGGTAATACTAAATATGACCCGAAGTTCAGGGCAAGGCCACTATAACAGCAGACAC  
ATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCTAGGAGT  
TACTACGGGGGGTTTGTCTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO: 7)

[0356] QVQLQESGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHVVKQRPEQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFGKA  
TITADTSSNTAYLQLSSLTSEDYAVYYCARSYYGGFAYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 8 )

[0357] HC2

[0358] GAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGTGGAGGATTGGTGCAGCCTAAAGGATCATTGAAACTCTCATGTGC  
CGCCTTTGGTTTACCTTCAATACCTATGCCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTGAATGGGTT  
GCTCGCATAAGAAGTAAAAGTAATAATTATGCAACATATTATGCCGATTCAGTGAAAGACAGATTCACCATCTCCA  
GAGATGATTCACAAAGCATGCTCTCTCTGCAAATGAACAACCTGAAAACCTGAGGACACAGCCATTTATTACTGTGT  
GAGAGGGGGTTACTGGAGCTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 9)

[0359] EVQLQESGGGLVQPKGSLKLSCAAFGFTFTNYAMHWVRQAPGKGLEWVARIRKSNNYATYYADSVKD  
RFTISRDDSQMSLSLQMNKLTEDTAIYYCVRGGYWSFDVWGAGTTVTVSS (SEQ ID NO: 10)

[0360] CDRL1

[0361] KSVSTSGYSY (SEQ ID NO: 11)

[0362] KSLLSHNGNTY (SEQ ID NO: 12)

[0363] CDRL2

[0364] LVS (SEQ ID NO: 13)

[0365] RMS (SEQ ID NO: 14)

[0366] CDRL3

[0367] QHSRELPR (SEQ ID NO: 15)

[0368] MQHLEYPY (SEQ ID NO: 16)

[0369] LC 1

[0370] GATATTGTGCTCACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCATG  
CAGGGCCAGCAAAAGTGCAGTACATCTGGCTATAGTTATATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCC  
AAACTCCTCATCTATCTTGATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAG  
ACTTACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACAGTAGGGAGCTTCC  
TCGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA (SEQ ID NO: 17)

[0371] DIVLQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHVYQKPGQPPKLLIYLVSNLESGVPARFSG  
SGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPRTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 18)

[0372] LC2

[0373] GATATTGTGATCACACAGACTACACCCTCTGTACCTGTCACTCCTGGAGAGTCAGTATCCATCTCCTG  
TAGGTCTAGTAAGAGTCTCCTGCATAGTAATGGCAACACTTACTTGTATTGGTTCCTGCAGAGGCCAGGCCAGTCT  
CCTCAGCTCCTGATATCTCGGATGTCCAGCCTTGCTCAGGAGTCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTTCAGGAA  
CTGCTTTACACTGAGAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGTGTTTATTACTGTATGCAACATCTAGAATA  
TCCGTATACGTTCCGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 19)

[0374] DIVITQTTSPVPTPGESVSISCRSSKSLLSHNGNTYLYWFLQRPQSPQLLISRMSLASGVPRFS  
GSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 20)

[0375] Ig

[0376] 人IgD恒定区, Uniprot: P01880 SEQ ID NO: 21 APTKAPDVFPIISGCRHPKDNSPVV  
LACLITGYHPTSVTVTWYMGTSQPQRTFPEIQRRDSYMTSSQLSTPLQQWRQGEYKCVVQHTASKSKKEIFRWPE  
SPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSTHTQPLGVYLLTPAVQD  
LWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSL  
PPQRLMALREPAQAQPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTT  
FWAWSVLRVPAPPSPQATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSIVTDHGPMPK

[0377] 人IgG1恒定区, Uniprot: P01857 SEQ ID NO: 22 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA  
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEVEPK  
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF  
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0378] 人IgG2恒定区, Uniprot: P01859 SEQ ID NO: 23 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA  
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERK  
CCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST  
FRVVSIVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD  
ISVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0379] 人IgG3恒定区, Uniprot: P01860 SEQ ID NO: 24 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAA  
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELK  
TPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPK  
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSIVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN  
KALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPMLDSDG  
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

[0380] 人IgM恒定区, Uniprot: P01871 SEQ ID NO: 25 GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVA  
VGCLAQDFLPDSITLSWKYKNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHVCKVQHPNGNKEKNVP  
LPVIAELPPKVSFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSRQIQVSWLREGKQVSGVTTDQVQAEAKESGPTTYKVT  
STLTIKESDWLGQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFLTKSTKLTCLVTDLTTYDSVT  
ISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWSNGERFTCTVHTDLPSPKQTI SRPKGVALHRPDVYL  
LPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPADVQVWQMRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEEWNTGET  
YTCVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDAGTCY

[0381] 人IgG4恒定区, Uniprot: P01861 SEQ ID NO: 26 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA  
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK  
YGPCCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN  
TYRVVSIVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS  
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGLK

[0382] 人IgA1恒定区, Uniprot: P01876 SEQ ID NO: 27 ASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNVVI  
ACLVQGFPPQEPVSVTWSSESGQGVARNFPPSQDASGDLYTSSQLTLPATQCLAGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPC  
PVPSTPPTSPSTPPTSPSCCHPRLSLHRPALEDLLGSEANLTCTLTGLRDASGVFTWTPSSGKSAVQGPPEP  
LCGCYSVSSVLPGCAEPWNHGKFTCTAAYPESKTPLTATLSKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGF

SPKDVLRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTFVAVTSILRVAEDWKKGDTFSCMGHEALPLAFTQKTIDRL  
AGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY

[0383] 人IgA2恒定区, Uniprot: P01877 SEQ ID NO: 28 ASPTSPKVFPLSLDSTPQDGNVVV  
ACLVQGGFFPQEPLSVTWSESGQNVNTARNFPPSQDASGDLYTTSSQLTLPATQCPDGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPC  
PVPPPPPCCHPRLSLHRPALEDLLLSEANLCTLTGLRDASGATFTWTPSSGKSAVQPPERDLGCYSVSSVLP  
CAQPWNHGETFTCTAAHPELKTPLTANITKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSPKDVLRWLQGS  
QELPREKYLTWASRQEPSQGTTFVAVTSILRVAEDWKKGDTFSCMGHEALPLAFTQKTIDRMAGKPTHVNVSVV  
MAEVDGTCY

[0384] 人Ig κ恒定区, Uniprot: P01834 SEQ ID NO: 29 TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV  
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF  
NRGEC

[0385] HLA-G

[0386] GSHSMRYFSA AVSRPGRGEP RFIAMGYVDD TQFVRFSDS ACPRMEPRAP WVEQEGPEYW  
EEETRNTKAH AQTDRMNLQT LRGYYNQSEA SSHTLQWMIG CDLGSDGRLL RGYEQYAYDG KDYLALNEDL  
RSWTAADTAA QISKRKCEAA NVAEQRRAYL EGTCVEWHLA-G YLENGKEMLQ RADPPKTHVT  
HHPVFDYEAT LRCWALGFYP AEIILTQWRD GEDQTQDVEL VETRPAGDGT FQKWAAVVVP SGEEQRYTCH  
VQHEGLPEPL MLRWKQSSLP TIPIMGI VAGLVVLA AV VTGA AVAVL WRKKSSD (SEQ ID NO: 30)

[0387] CAR成分

[0388] 人CD8α铰链结构域, SEQ. ID NO: 31: PAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA  
AGGAVHTRGLDFACDIY

[0389] 小鼠CD8α铰链结构域, SEQ. ID NO: 32: KVNSTTTKPVLRTPSPVHPTGTSQPQRPEDCR  
PRGSVKGTGLDFACDIY

[0390] 猫CD8α铰链结构域, SEQ. ID NO: 33: PVKPTTTPAPRPPTQAPITTSQRVSLRPGTCQPS  
AGSTVEASGLDLSCDIY

[0391] 人CD8α跨膜结构域, SEQ. ID NO: 34: IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT

[0392] 小鼠CD8α跨膜结构域, SEQ. ID NO: 35: IWAPLAGICVALLSLIITLI

[0393] 兔CD8α跨膜结构域, SEQ. ID NO: 36: IWAPLAGICAVLLLSLVITLI

[0394] 4-1BB共刺激信号传导区, SEQ. ID NO: 37: KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS  
CRFPEEEEGGCEL

[0395] CD3ζ信号传导结构域, SEQ. ID NO: 38: RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY  
DVLDKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUAL  
PPR

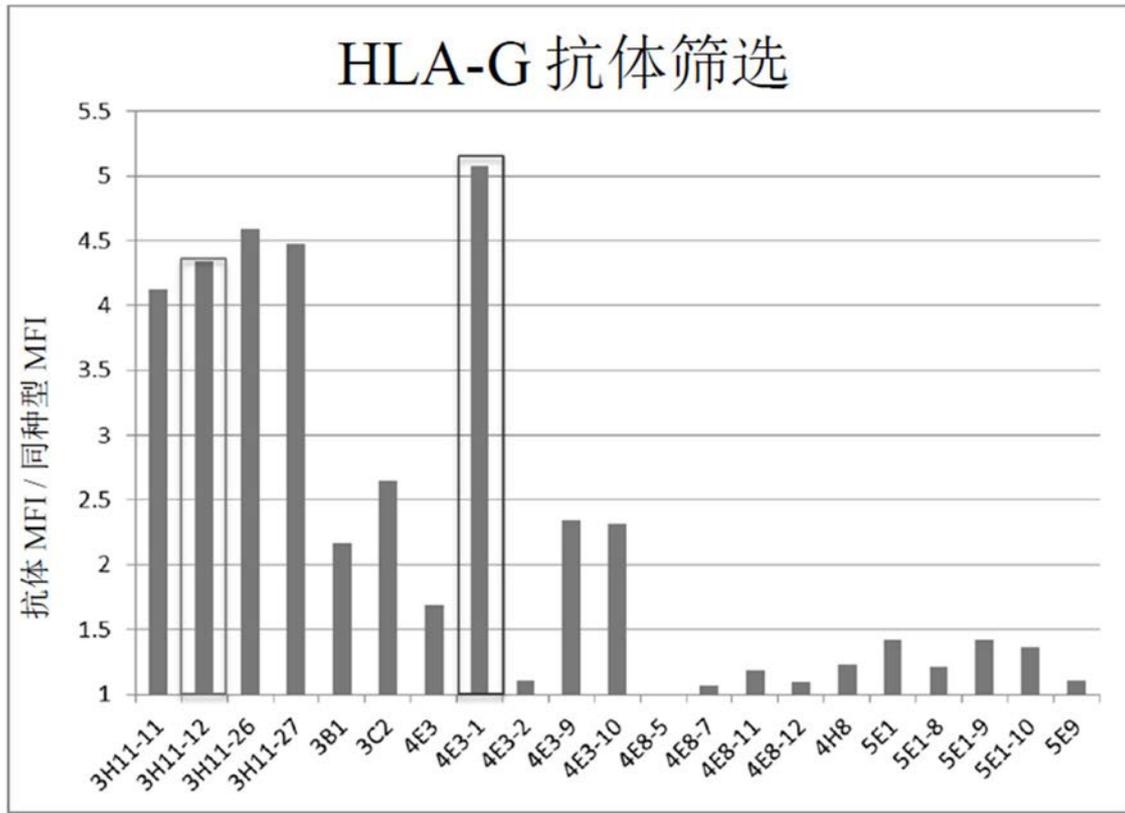


图1

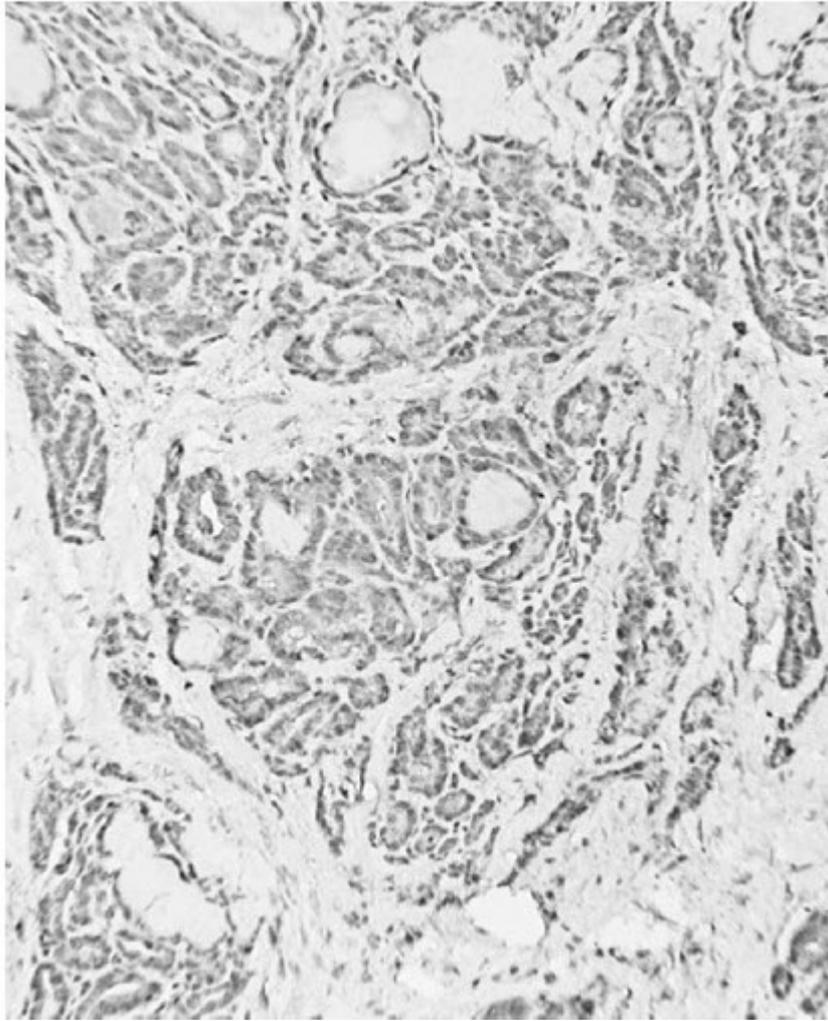


图2A

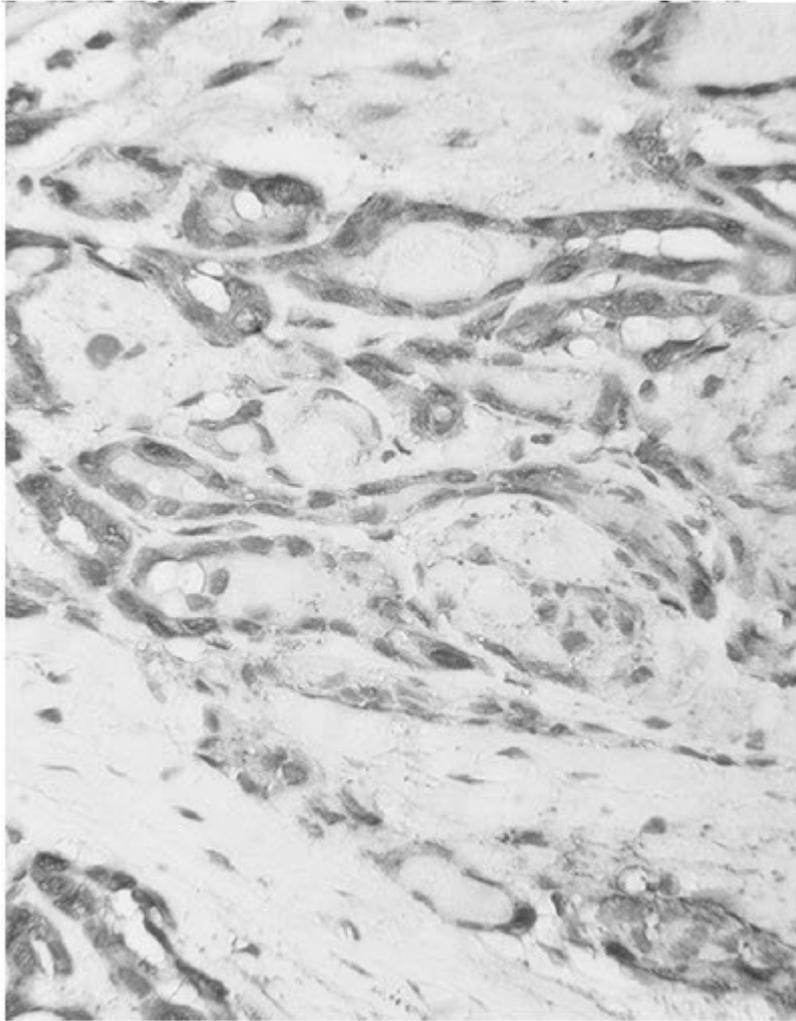


图2B

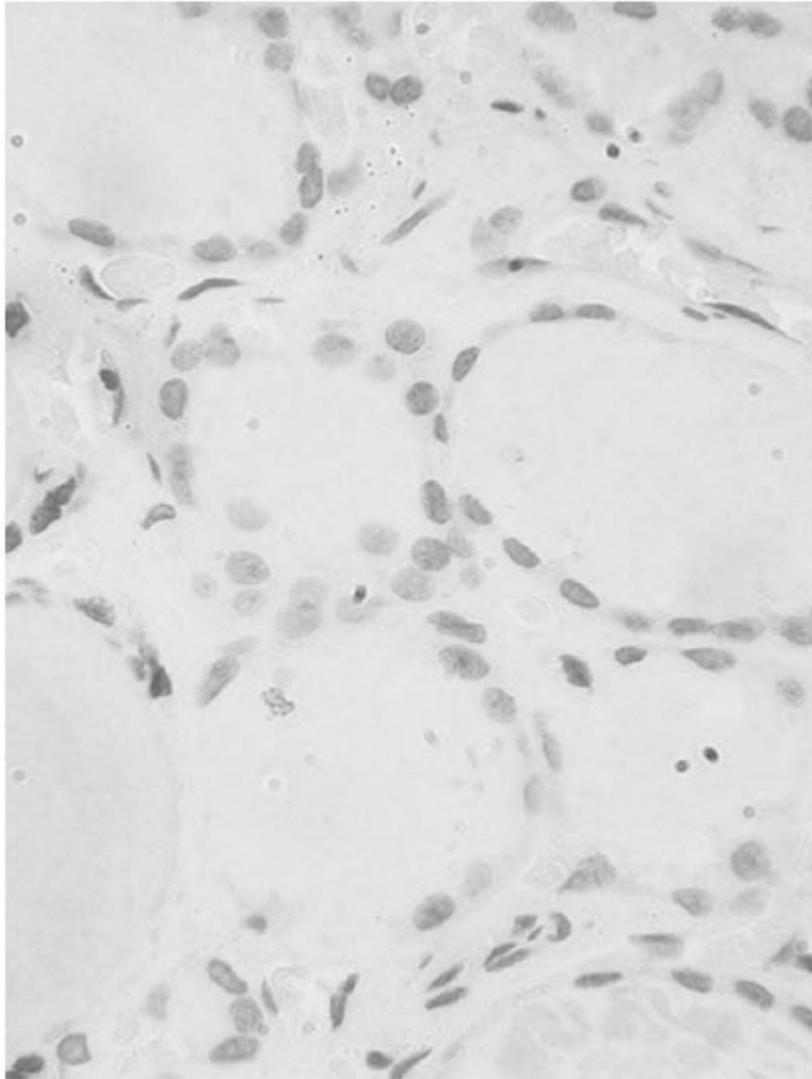


图2C

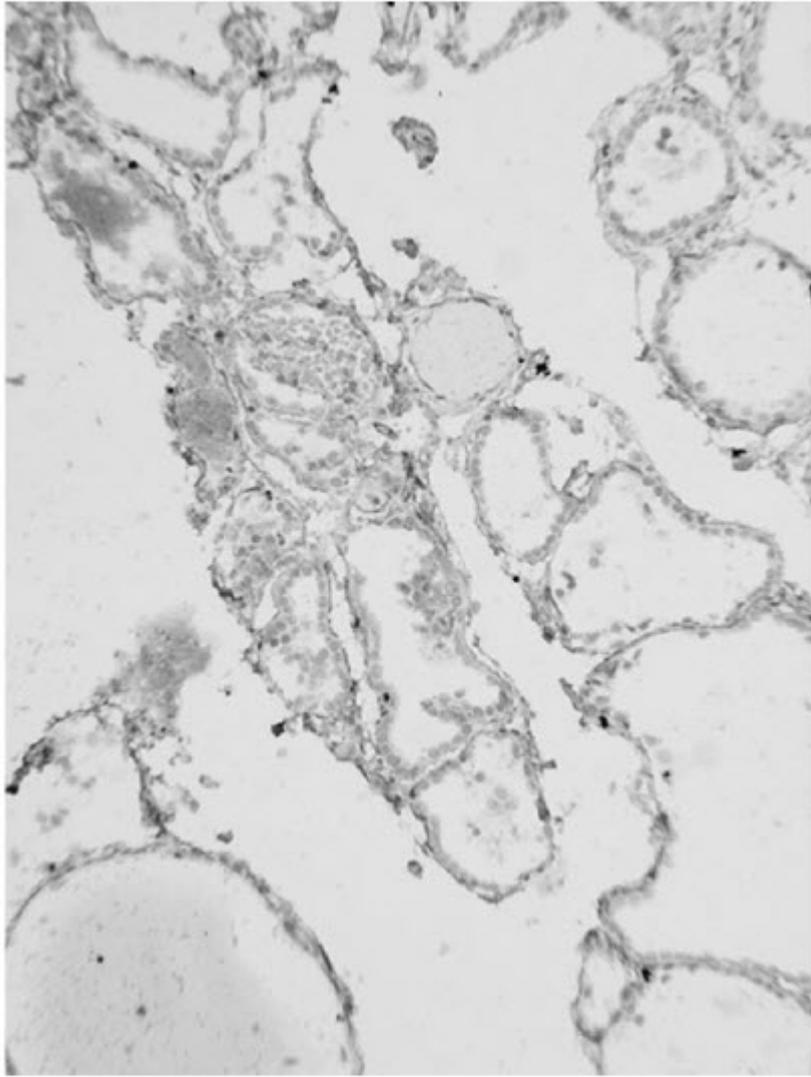


图2D

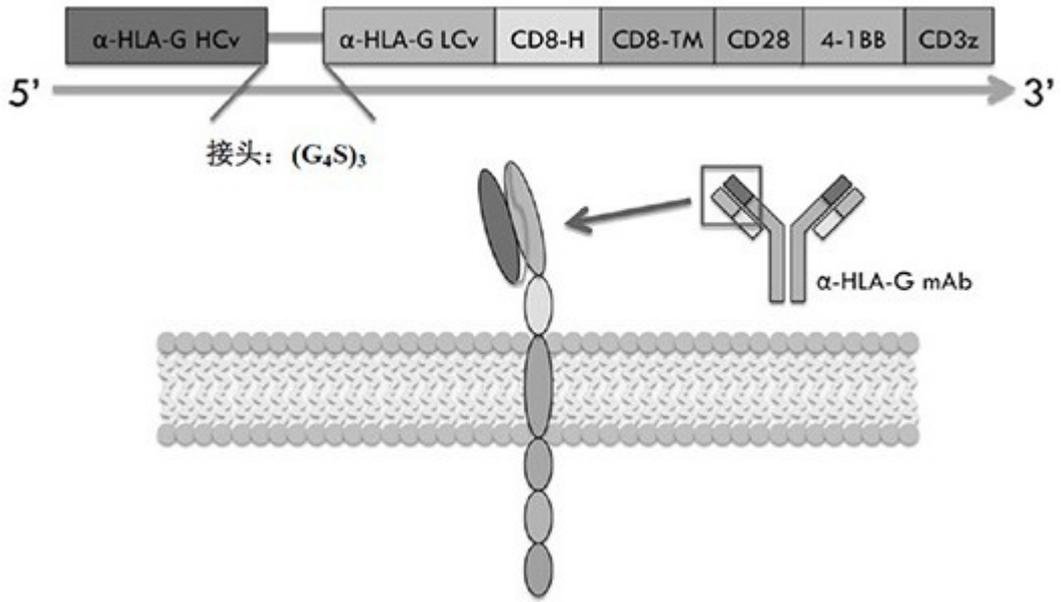


图3

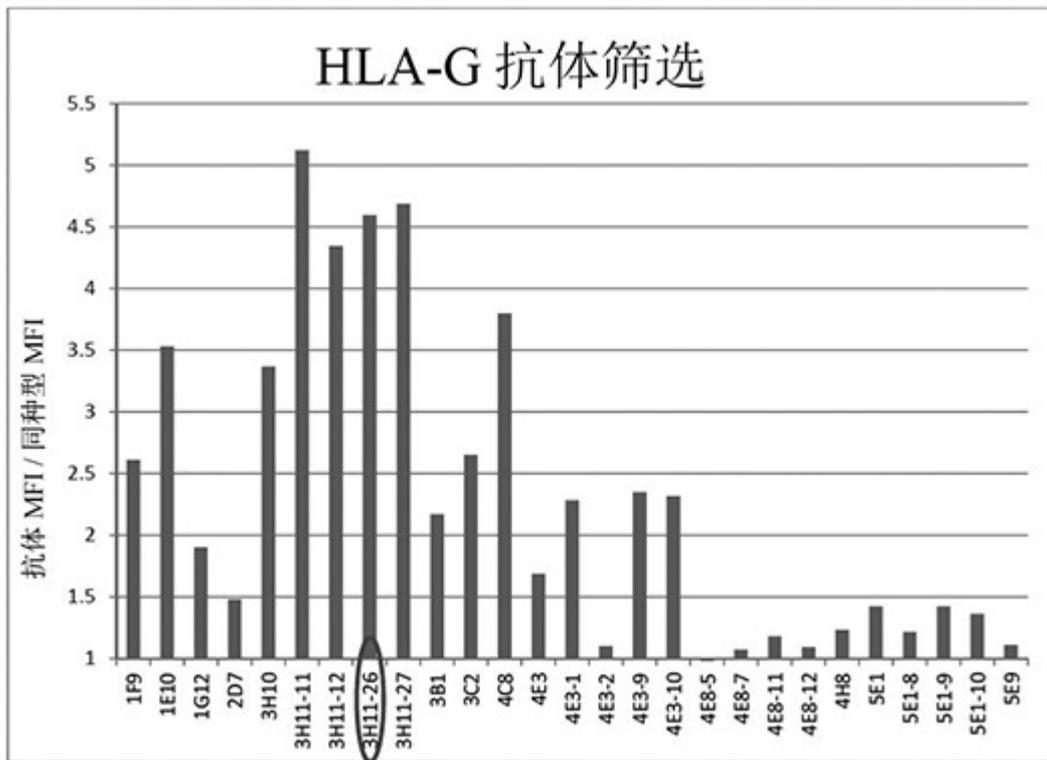


图4

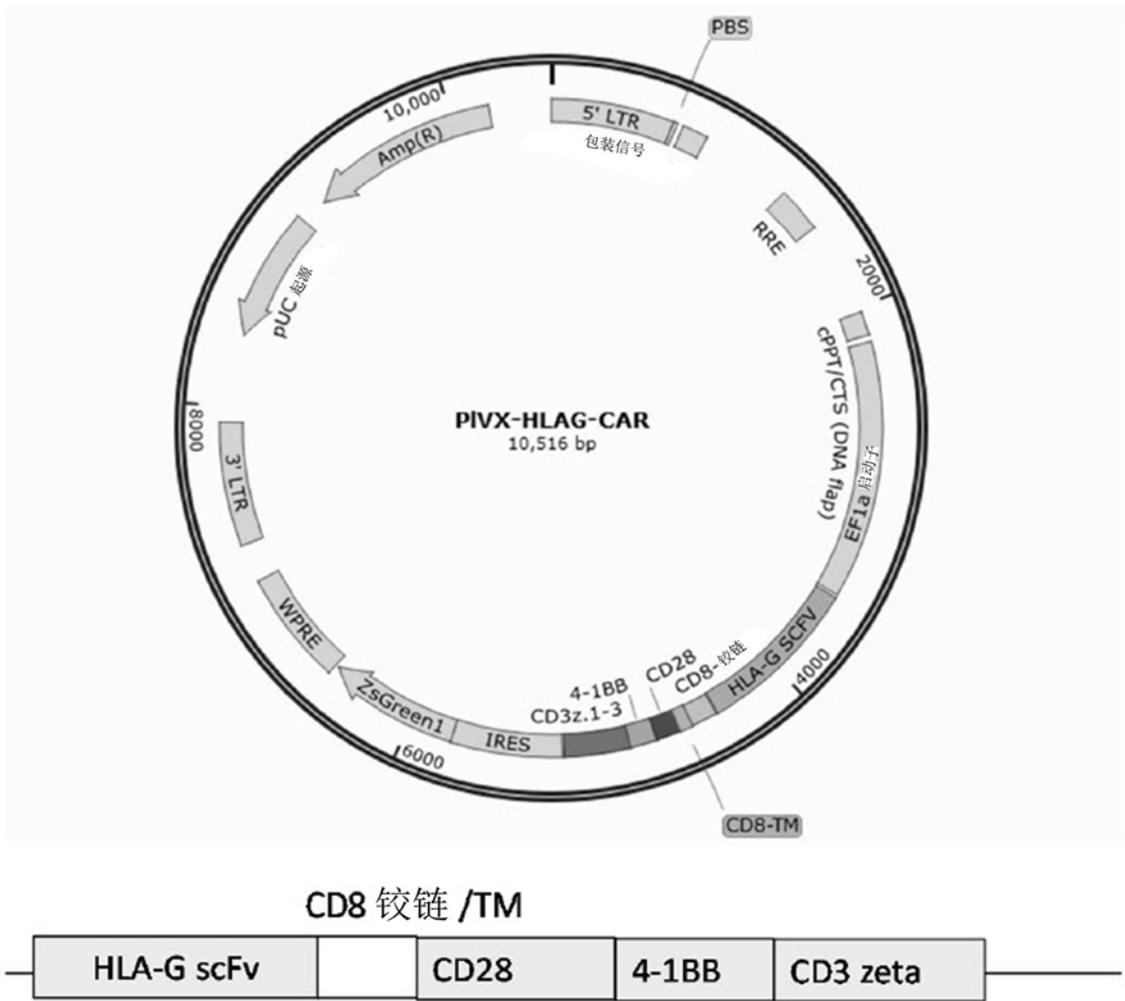


图5

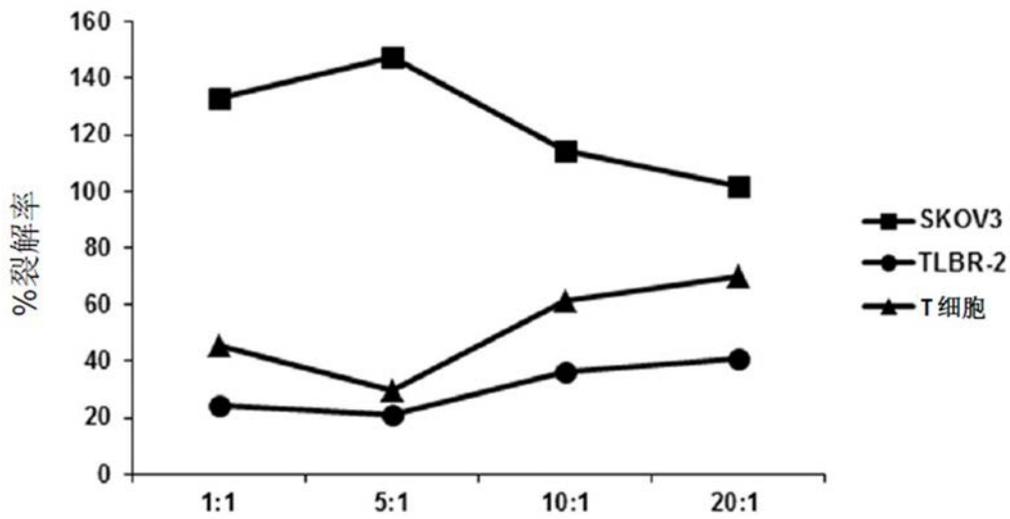


图6

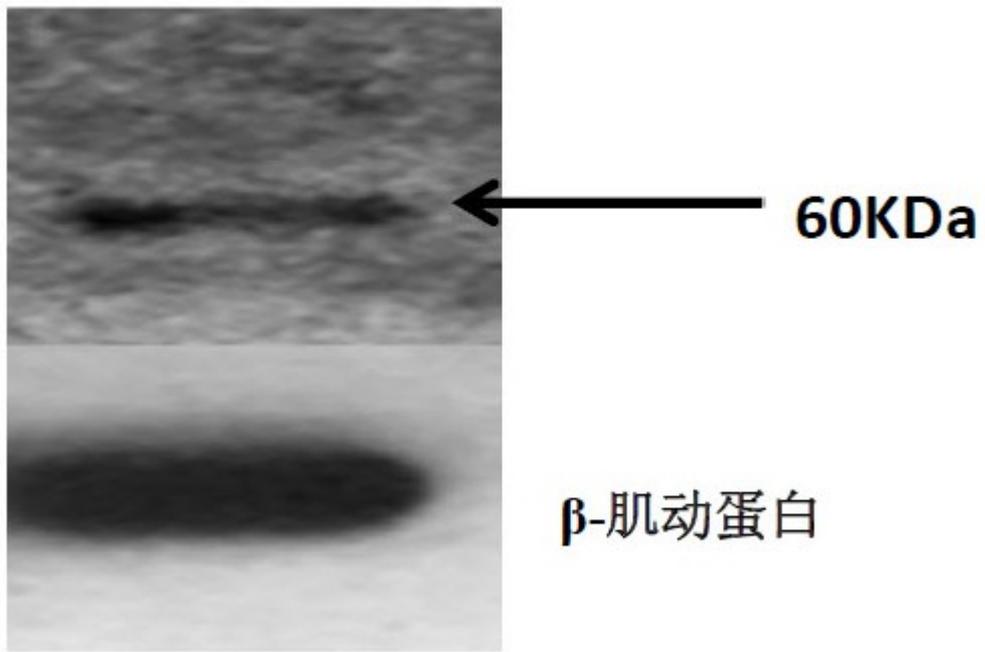


图7