(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109121413 A
(43)申请公布日 2019.01.01

(21)申请号 201780023532.9

(22)申请日 2017.04.14

(30)优先权数据
62/322,581 2016.04.14 US
62/442,890 2017.01.05 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.10.12

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2017/027767 2017.04.14

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/181110 EN 2017.10.19

(71)申请人 弗莱德哈钦森癌症研究中心
地址 美国华盛顿州

(72)发明人 M·斯特凡 H·F·莫菲特

(74)专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限责任公司 11287
代理人 林彦

(51)Int.Cl.
C07K 14/705(2006.01)
C07K 14/725(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
C12N 15/62(2006.01)

权利要求书8页 说明书51页 附图32页

(54)发明名称

使用靶向核酸纳米载体编程治疗性细胞的组合物和方法

(57)摘要

描述了通过提供核酸的瞬时表达来快速且选择性地修饰造血干细胞(或由其衍生的细胞)以实现治疗目的的组合物和方法。瞬时表达导致修饰细胞中的永久性治疗变化,在本文中称为“打了就跑”效应。

CN 109121413 A

1.一种制备选择的造血来源细胞群以用于向受试者施用的方法,其包括:

从所述受试者获得样品,其中所述样品包含细胞的异质混合物,所述细胞的异质混合物包括选择的造血来源的细胞群;

将所述样品暴露于合成纳米载体,所述纳米载体包含

(i)包封在带正电荷的载体内的合成核酸,其中所述合成核酸编码基因编辑剂或表型改变蛋白;

(ii)所述载体外表面上的中性或带负电荷的包衣;和

(iii)从所述包衣表面延伸的选择的细胞靶向配体;

其中所述暴露导致所述纳米载体选择性递送至选择的细胞群,从而导致所述选择的细胞群内细胞的修饰;并且扩增所述样品内的细胞;

从而制备所述选择的细胞群以用于向所述受试者施用。

2.如权利要求1所述的方法,其中所述选择的细胞靶向配体选择性结合异质细胞群内的淋巴细胞并引发受体诱导的胞吞作用。

3.如权利要求1所述的方法,其中所述样品内的扩增细胞包括所述选择的细胞群的修饰细胞。

4.如权利要求1所述的方法,其还包括将所述制备的选择的细胞群配制成基于细胞的组合物。

5.如权利要求4所述的方法,其还包括将所述基于细胞的组合物向所述受试者施用。

6.如权利要求1所述的方法,其中在所述暴露之前,不采取分离步骤或仅采取有限的分离步骤以增加所述细胞异质混合物中所述选择的细胞群的百分比。

7.如权利要求1所述的方法,其中所述合成核酸编码选自转录活化因子样效应核酸酶(TALEN);megaTAL;和/或锌指核酸酶的基因编辑剂。

8.如权利要求7所述的方法,其中所述合成核酸编码SEQ ID NO:1的megaTAL。

9.如权利要求1所述的方法,其中所述基因编辑剂破坏编码Shp-1磷酸酶、PD1受体、T细胞受体(TCR)、CCR5和/或CXCR4的内源基因。

10.如权利要求1所述的方法,其中所述基因编辑剂破坏编码TCRα链的内源基因。

11.如权利要求1所述的方法,其中所述合成核酸编码选自转录因子、激酶和/或细胞表面受体的表型改变蛋白。

12.如权利要求10所述的方法,其中所述表型改变蛋白选自FOXO1、LKB1、TCF7、EOMES、ID2、TERT、CCR2b和/或CCR4。

13.如权利要求1所述的方法,其中所述选择的细胞靶向配体选择性结合异质细胞群内的淋巴细胞并引发受体诱导的胞吞作用。

14.如权利要求13所述的方法,其中所述异质细胞群是离体细胞培养物。

15.如权利要求13所述的方法,其中所述异质细胞群是体内的。

16.如权利要求1所述的方法,其中所述选择的细胞靶向配体选择性结合T细胞、NK细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、B细胞、造血干细胞或其组合。

17.如权利要求1所述的方法,其中所述选择的细胞靶向配体包含选自淋巴细胞受体配体、淋巴细胞受体抗体、淋巴细胞受体肽适体、淋巴细胞受体核酸适体、淋巴细胞受体Spiegelmer或其组合的结合结构域。

18.如权利要求1所述的方法，其中所述选择的细胞靶向配体选择性结合T细胞受体基序；T细胞α链；T细胞β链；T细胞γ链；T细胞δ链；CCR7；CD1a；CD1b；CD1c；CD1d；CD3；CD4；CD5；CD7；CD8；CD11b；CD11c；CD16；CD19；CD20；CD21；CD22；CD25；CD28；CD34；CD35；CD39；CD40；CD45RA；CD45RO；CD46，CD52；CD56；CD62L；CD68；CD69；CD80；CD86；CD95；CD101；CD117；CD127；CD133；CD137(4-1BB)；CD148；CD163；CD209；DEC-205；F4/80；IL-4Rα；Sca-1；CTLA-4；GITR；GARP；LAP；颗粒酶B；LFA-1；或转铁蛋白受体。

19.如权利要求1所述的方法，其中所述选择的细胞靶向配体选择性结合CD1a；CD1b；CD1c；CD1d；CCR7；CD3；CD4；CD5；CD8；CD16；CD19；CD20；CD21；CD22；CD25；CD28；CD35；CD40；CD45RA；CD45RO；CD46；CD52；CD69；CD62L；CD80；CD95；CD127；CD137；CD209；或DEC-205。

20.如权利要求1所述的方法，其中所述选择的细胞靶向配体包含选自以下的结合结构域：T细胞α链抗体；T细胞β链抗体；T细胞γ链抗体；T细胞δ链抗体；CCR7抗体；CD1a抗体；CD1b抗体；CD1c抗体；CD1d抗体；CD3抗体；CD4抗体；CD5抗体；CD7抗体；CD8抗体；CD11b抗体；CD11c抗体；CD16抗体；CD19抗体；CD20抗体；CD21抗体；CD22抗体；CD25抗体；CD28抗体；CD34抗体；CD35抗体；CD39抗体；CD40抗体；CD45RA抗体；CD45RO抗体；CD46抗体；CD52抗体；CD56抗体；CD62L抗体；CD68抗体；CD69抗体；CD80抗体；CD86抗体；CD95抗体；CD101抗体；CD117抗体；CD127抗体；CD133抗体；CD137(4-1BB)抗体；CD148抗体；CD163抗体；CD209抗体；DEC-205抗体；F4/80抗体；IL-4Rα抗体；Sca-1抗体；CTLA-4抗体；GITR抗体；GARP抗体；LAP抗体；颗粒酶B抗体；LFA-1抗体；或转铁蛋白受体抗体。

21.如权利要求1所述的方法，其中所述结合结构域由以下各项的scFv片段组成或基本上由其组成：T细胞α链抗体；T细胞β链抗体；T细胞γ链抗体；T细胞δ链抗体；CCR7抗体；CD1a抗体；CD1b抗体；CD1c抗体；CD1d抗体；CD3抗体；CD4抗体；CD5抗体；CD7抗体；CD8抗体；CD11b抗体；CD11c抗体；CD16抗体；CD19抗体；CD20抗体；CD21抗体；CD22抗体；CD25抗体；CD28抗体；CD34抗体；CD35抗体；CD39抗体；CD40抗体；CD45RA抗体；CD45RO抗体；CD46抗体；CD52抗体；CD56抗体；CD62L抗体；CD68抗体；CD69抗体；CD80抗体；CD86抗体CD95抗体；CD101抗体；CD117抗体；CD127抗体；CD133抗体；CD137(4-1BB)抗体；CD148抗体；CD163抗体；CD209抗体；DEC-205抗体；F4/80抗体；IL-4Rα抗体；Sca-1抗体；CTLA-4抗体；GITR抗体；GARP抗体；LAP抗体；颗粒酶B抗体；LFA-1抗体；或转铁蛋白受体抗体。

22.如权利要求1所述的方法，其中所述合成核酸是合成mRNA。

23.如权利要求1所述的方法，其中所述载体包含带正电荷的脂质或聚合物。

24.如权利要求22所述的方法，其中所述带正电荷的聚合物包括聚(β-氨基酯、聚(L-赖氨酸)、聚(乙烯亚胺)(PEI)、聚(酰氨基胺)树枝状分子(PAMAM)、聚(氨基-共-酯)、聚(甲基丙烯酸二甲氨基乙酯)(PDMAEMA)、壳聚糖、聚-(L-丙交酯-共-L-赖氨酸)、聚[α-(4-氨基丁基)-L-乙醇酸](PAGA)或聚(4-羟基-L-脯氨酸酯)(PHP)。

25.如权利要求1所述的方法，其中所述包衣包含中性或带负电荷的脂质或聚合物。

26.如权利要求24所述的方法，其中所述中性或带负电荷的包衣包含聚谷氨酸(PGA)、聚(丙烯酸)、藻酸或半琥珀酸胆甾醇酯/1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺。

27.如权利要求24所述的方法，其中所述中性或带负电荷的包衣包含两性离子聚合物。

28.如权利要求24所述的方法，其中所述中性或带负电荷的包衣包含脂质体。

29.如权利要求27所述的方法，其中所述脂质体包含1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷

(DOTAP)、1,2-二-O-十八烯基-3-三甲基铵丙烷(DOTMA)、3β-[N-(N′,N′-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基]胆固醇(DC-Chol)、二十八烷基-氨基甘氨酰精胺(DOGS)、胆固醇,1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE)或1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DOPC)。

30.如权利要求1所述的方法,其中所述选择的细胞靶向配体选择性结合CD4和/或CD8。

31.如权利要求1所述的方法,其中所述选择的细胞靶向配体包含选自CD4抗体和/或CD8抗体的结合结构域。

32.如权利要求1所述的方法,其中所述选择的细胞靶向配体包含选自CD4抗体和/或CD8抗体的scFv片段的结合结构域。

33.如权利要求1所述的方法,其中所述载体包含聚(β-氨基酯)。

34.如权利要求1所述的方法,其中所述包衣包含聚谷氨酸(PGA)。

35.如权利要求1所述的方法,其中所述选择的细胞靶向配体包含选自CD4抗体和/或CD8抗体的结合结构域;所述载体包含聚(β-氨基酯);并且所述包衣包含聚谷氨酸(PGA)。

36.一种用于制备细胞以治疗受试者的方法,其包括:

从受试者获得淋巴细胞;

将所述淋巴细胞与合成纳米载体合并,所述合成纳米载体包含

(i)包封在带正电荷的载体内的合成核酸,其中所述合成核酸编码基因编辑剂或表型改变蛋白;

(ii)所述载体外表面上的中性或带负电荷的包衣;和

(iii)从所述包衣表面延伸的选择的细胞靶向配体;

其中在所述合并后,将所述纳米载体选择性地掺入所述淋巴细胞中,使得所述淋巴细胞瞬时表达所述核酸。

37.如权利要求35所述的方法,其还包括扩增所述淋巴细胞。

38.如权利要求35所述的方法,其还包括将所述淋巴细胞配制成基于细胞的组合物。

39.如权利要求35所述的方法,其中在所述暴露之前,不采取分离步骤或仅采取有限的分离步骤以增加所述细胞异质混合物中所述选择的细胞群的百分比。

40.如权利要求35所述的方法,其中所述合成核酸编码选自转录活化因子样效应核酸酶(TALEN);megaTAL;和/或锌指核酸酶的基因编辑剂。

41.如权利要求35所述的方法,其中所述合成核酸编码SEQ ID NO:1的megaTAL。

42.如权利要求35所述的方法,其中所述基因编辑剂破坏编码Shp-1磷酸酶、PD1受体、T细胞受体(TCR)、CCR5和/或CXCR4的内源基因。

43.如权利要求35所述的方法,其中所述基因编辑剂破坏编码TCRα链的内源基因。

44.如权利要求35所述的方法,其中所述合成核酸编码选自转录因子、激酶和/或细胞表面受体的表型改变蛋白。

45.如权利要求35所述的方法,其中所述表型改变蛋白选自FOXO1、LKB1、TCF7、EOMES、ID2、TERT、CCR2b和/或CCR4。

46.如权利要求35所述的方法,其中所述选择的细胞靶向配体选择性结合异质细胞群内的淋巴细胞。

47.如权利要求45所述的方法,其中所述异质细胞群是离体细胞培养物。

48.如权利要求45所述的方法,其中所述异质细胞群是体内的。

49.如权利要求35所述的方法，其中所述选择的细胞靶向配体选择性结合T细胞、NK细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、B细胞、造血干细胞或其组合。

50.如权利要求35所述的方法，其中所述选择的细胞靶向配体包含选自淋巴细胞受体配体、淋巴细胞受体抗体、淋巴细胞受体肽适体、淋巴细胞受体核酸适体、淋巴细胞受体Spiegelmer或其组合的结合结构域。

51.如权利要求35所述的方法，其中所述选择的细胞靶向配体选择性结合T细胞受体基序;T细胞α链;T细胞β链;T细胞γ链;T细胞δ链;CCR7;CD1a;CD1b;CD1c;CD1d;CD3;CD4;CD5;CD7;CD8;CD11b;CD11c;CD16;CD19;CD20;CD21;CD22;CD25;CD28;CD34;CD35;CD39;CD40;CD45RA;CD45RO;CD46,CD52;CD56;CD62L;CD68;CD69;CD80;CD86;CD95;CD101;CD117;CD127;CD133;CD137(4-1BB);CD148;CD163;CD209;DEC-205;F4/80;IL-4Rα;Sca-1;CTLA-4;GITR;GARP;LAP;颗粒酶B;LFA-1;或转铁蛋白受体。

52.如权利要求35所述的方法，其中所述选择的细胞靶向配体选择性结合CD1a;CD1b;CD1c;CD1d;CCR7;CD3;CD4;CD5;CD8;CD16;CD19;CD20;CD21;CD22;CD25;CD28;CD35;CD40;CD45RA;CD45RO;CD46;CD52;CD62L;CD69;CD80;CD95;CD127;CD137;CD209;或DEC-205。

53.如权利要求35所述的方法，其中所述选择的细胞靶向配体包含选自以下的结合结构域:T细胞α链抗体;T细胞β链抗体;T细胞γ链抗体;T细胞δ链抗体;CCR7抗体;CD1a抗体;CD1b抗体;CD1c抗体;CD1d抗体;CD3抗体;CD4抗体;CD5抗体;CD7抗体;CD8抗体;CD11b抗体;CD11c抗体;CD16抗体;CD19抗体;CD20抗体;CD21抗体;CD22抗体;CD25抗体;CD28抗体;CD34抗体;CD35抗体;CD39抗体;CD40抗体;CD45RA抗体;CD45RO抗体;CD46抗体;CD52抗体;CD56抗体;CD62L抗体;CD68抗体;CD69抗体;CD80抗体;CD86抗体;CD95抗体;CD101抗体;CD117抗体;CD127抗体;CD133抗体;CD137(4-1BB)抗体;CD148抗体;CD163抗体;CD209抗体;DEC-205抗体;F4/80抗体;IL-4Rα抗体;Sca-1抗体;CTLA-4抗体;GITR抗体;GARP抗体;LAP抗体;颗粒酶B抗体;LFA-1抗体;或转铁蛋白受体抗体。

54.如权利要求35所述的方法，其中所述结合结构域由以下各项的scFv片段组成或基本上由其组成:T细胞α链抗体;T细胞β链抗体;T细胞γ链抗体;T细胞δ链抗体;CCR7抗体;CD1a抗体;CD1b抗体;CD1c抗体;CD1d抗体;CD3抗体;CD4抗体;CD5抗体;CD7抗体;CD8抗体;CD11b抗体;CD11c抗体;CD16抗体;CD19抗体;CD20抗体;CD21抗体;CD22抗体;CD25抗体;CD28抗体;CD34抗体;CD35抗体;CD39抗体;CD40抗体;CD45RA抗体;CD45RO抗体;CD46抗体;CD52抗体;CD56抗体;CD62L抗体;CD68抗体;CD69抗体;CD80抗体;CD86抗体CD95抗体;CD101抗体;CD117抗体;CD127抗体;CD133抗体;CD137(4-1BB)抗体;CD148抗体;CD163抗体;CD209抗体;DEC-205抗体;F4/80抗体;IL-4Rα抗体;Sca-1抗体;CTLA-4抗体;GITR抗体;GARP抗体;LAP抗体;颗粒酶B抗体;LFA-1抗体;或转铁蛋白受体抗体。

55.如权利要求35所述的方法，其中所述合成核酸是合成mRNA。

56.如权利要求35所述的方法，其中所述载体包含带正电荷的脂质或聚合物。

57.如权利要求55所述的方法，其中所述带正电荷的脂质或聚合物包括聚(β-氨基酯、聚(L-赖氨酸)、聚(乙烯亚胺)(PEI)、聚(酰氨基胺)树枝状分子(PAMAM)、聚(氨基-共-酯)，聚(甲基丙烯酸二甲氨基乙酯)(PDMAEMA)、壳聚糖、聚-(L-丙交酯-共-L-赖氨酸)、聚[α-(4-氨基丁基)-L-乙醇酸](PAGA)或聚(4-羟基-L-脯氨酸酯)(PHP)。

58.如权利要求55所述的方法，其中所述包衣包含中性或带负电荷的脂质或聚合物。

59.如权利要求57所述的方法，其中所述中性或带负电荷的包衣包含聚谷氨酸(PGA)、聚(丙烯酸)、藻酸或半琥珀酸胆甾醇酯/1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺。

60.如权利要求57所述的方法，其中所述中性或带负电荷的包衣包含两性离子聚合物。

61.如权利要求57所述的方法，其中所述中性或带负电荷的包衣包含脂质体。

62.如权利要求60所述的方法，其中所述脂质体包含1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)、1,2-二-O-十八烯基-3-三甲基铵丙烷(DOTMA)、3β-[N-(N′,N′-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基]胆固醇(DC-Chol)、二十八烷基-氨基甘氨酰精胺(DOGS)、胆固醇，1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE)或1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DOPC)。

63.如权利要求35所述的方法，其中所述选择的细胞靶向配体选择性结合CD4和/或CD8。

64.如权利要求35所述的方法，其中所述选择的细胞靶向配体包含选自CD4抗体和/或CD8抗体的结合结构域。

65.如权利要求35所述的方法，其中所述选择的细胞靶向配体包含选自CD4抗体和/或CD8抗体的scFv片段的结合结构域。

66.如权利要求35所述的方法，其中所述载体包含聚(β-氨基酯)。

67.如权利要求35所述的方法，其中所述包衣包含聚谷氨酸(PGA)。

68.如权利要求35所述的方法，其中所述选择的细胞靶向配体包含选自CD4抗体和/或CD8抗体的结合结构域;所述载体包含聚(β-氨基酯);并且所述包衣包含聚谷氨酸(PGA)。

69.一种用于治疗有需要的受试者的方法，其包括施用治疗有效量的细胞，所述细胞通过由纳米载体选择性递送至所述细胞的核酸的瞬时表达来修饰，所述纳米载体包含：

(i)包封在带正电荷的载体内的所述核酸，其中所述合成核酸编码基因编辑剂或表型改变蛋白；

(ii)所述载体外表面上的中性或带负电荷的包衣;和

(iii)从所述包衣表面延伸的选择的细胞靶向配体；

其中在所述合并后，将所述纳米载体选择性地掺入所述淋巴细胞中，使得所述淋巴细胞瞬时表达所述核酸

从而治疗所述有需要的受试者。

70.一种制备选择的细胞群以用于向受试者施用的方法，其包括：

从所述受试者获得样品，其中所述样品包含细胞的异质混合物，所述细胞的异质混合物包括选择的细胞群；

将所述样品暴露于合成纳米载体，所述纳米载体包含

(i)包封在带正电荷的载体内的合成核酸，其中所述合成核酸编码基因编辑剂或表型改变蛋白；

(ii)所述载体外表面上的中性或带负电荷的包衣;和

(iii)从所述包衣表面延伸的选择的细胞靶向配体；

其中所述暴露导致所述纳米载体选择性递送至所述选择的细胞群，从而导致所述选择的细胞群内细胞的修饰;并且

扩增所述样品内的细胞；

从而制备所述选择的细胞群以用于向所述受试者施用。

71.一种合成纳米载体,其包含

(i)包封在带正电荷的载体内的核酸,其中所述核酸编码基因编辑剂或表型改变蛋白;

(ii)所述载体外表面上的中性或带负电荷的包衣;和

(iii)从所述包衣表面延伸的选择的细胞靶向配体;

72.如权利要求70所述的合成纳米载体,其中所述合成核酸编码选自转录活化因子样效应核酸酶(TALEN);megaTAL;和/或锌指核酸酶的基因编辑剂。

73.如权利要求70所述的合成纳米载体,其中所述合成核酸编码SEQ ID NO:1的megaTAL。

74.如权利要求70所述的合成纳米载体,其中所述基因编辑剂破坏编码Shp-1磷酸酶、PD1受体、T细胞受体(TCR)、CCR5和/或CXCR4的内源基因。

75.如权利要求70所述的合成纳米载体,其中所述基因编辑剂破坏编码TCRα链的内源基因。

76.如权利要求70所述的合成纳米载体,其中所述合成核酸编码选自转录因子、激酶和/或细胞表面受体的表型改变蛋白。

77.如权利要求70所述的合成纳米载体,其中所述表型改变蛋白选自FOXO1、LKB1、TCF7、EOMES、ID2、TERT、CCR2b和/或CCR4。

78.如权利要求70所述的合成纳米载体,其中所述选择的细胞靶向配体选择性结合异质细胞群内的淋巴细胞。

79.如权利要求77所述的合成纳米载体,其中所述异质细胞群是离体细胞培养物。

80.如权利要求77所述的合成纳米载体,其中所述异质细胞群是体内的。

81.如权利要求70所述的合成纳米载体,其中所述选择的细胞靶向配体选择性结合T细胞、NK细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、B细胞、造血干细胞或其组合。

82.如权利要求70所述的合成纳米载体,其中所述选择的细胞靶向配体包含选自淋巴细胞受体配体、淋巴细胞受体抗体、淋巴细胞受体肽适体、淋巴细胞受体核酸适体、淋巴细胞受体Spiegelmer或其组合的结合结构域。

83.如权利要求70所述的合成纳米载体,其中所述选择的细胞靶向配体选择性结合T细胞受体基序;T细胞α链;T细胞β链;T细胞γ链;T细胞δ链;CCR7;CD1a;CD1b;CD1c;CD1d;CD3;CD4;CD5;CD7;CD8;CD11b;CD11c;CD16;CD19;CD20;CD21;CD22;CD25;CD28;CD34;CD35;CD39;CD40;CD45RA;CD45RO;CD46,CD52;CD56;CD62L;CD68;CD69;CD80;CD86;CD95;CD101;CD117;CD127;CD133;CD137(4-1BB);CD148;CD163;CD209;DEC-205;F4/80;IL-4Rα;Sca-1;CTLA-4;GITR;GARP;LAP;颗粒酶B;LFA-1;或转铁蛋白受体。

84.如权利要求70所述的合成纳米载体,其中所述选择的细胞靶向配体选择性结合CD1a;CD1b;CD1c;CD1d;CCR7;CD3;CD4;CD5;CD8;CD16;CD19;CD20;CD21;CD22;CD25;CD28;CD35;CD40;CD45RA;CD45RO;CD46;CD52;CD62L;CD69;CD80;CD95;CD127;CD137,CD209或DEC-205。

85.如权利要求70所述的合成纳米载体,其中所述选择的细胞靶向配体包含选自以下的结合结构域:T细胞α链抗体;T细胞β链抗体;T细胞γ链抗体;T细胞δ链抗体;CCR7抗体;CD1a抗体;CD1b抗体;CD1c抗体;CD1d抗体;CD3抗体;CD4抗体;CD5抗体;CD7抗体;CD8抗体;CD11b抗体;CD11c抗体;CD16抗体;CD19抗体;CD20抗体;CD21抗体;CD22抗体;CD25抗体;

CD28抗体;CD34抗体;CD35抗体;CD39抗体;CD40抗体;CD45RA抗体;CD45RO抗体;CD46抗体;CD52抗体;CD56抗体;CD62L抗体;CD68抗体;CD69抗体;CD80抗体;CD86抗体;CD95抗体;CD101抗体;CD117抗体;CD127抗体;CD133抗体;CD137(4-1BB)抗体;CD148抗体;CD163抗体;CD209抗体;DEC-205抗体;F4/80抗体;IL-4Rα抗体;Sca-1抗体;CTLA-4抗体;GITR抗体;GARP抗体;LAP抗体;颗粒酶B抗体;LFA-1抗体;或转铁蛋白受体抗体。

86.如权利要求70所述的合成纳米载体,其中所述结合结构域由以下各项的scFv片段组成或基本上由其组成:T细胞α链抗体;T细胞β链抗体;T细胞γ链抗体;T细胞δ链抗体;CCR7抗体;CD1a抗体;CD1b抗体;CD1c抗体;CD1d抗体;CD3抗体;CD4抗体;CD5抗体;CD7抗体;CD8抗体;CD11b抗体;CD11c抗体;CD16抗体;CD19抗体;CD20抗体;CD21抗体;CD22抗体;CD25抗体;CD28抗体;CD34抗体;CD35抗体;CD39抗体;CD40抗体;CD45RA抗体;CD45RO抗体;CD46抗体;CD52抗体;CD56抗体;CD62L抗体;CD68抗体;CD69抗体;CD80抗体;CD86抗体;CD95抗体;CD101抗体;CD117抗体;CD127抗体;CD133抗体;CD137(4-1BB)抗体;CD148抗体;CD163抗体;CD209抗体;DEC-205抗体;F4/80抗体;IL-4Rα抗体;Sca-1抗体;CTLA-4抗体;GITR抗体;GARP抗体;LAP抗体;颗粒酶B抗体;LFA-1抗体;或转铁蛋白受体抗体。

87.如权利要求70所述的合成纳米载体,其中所述合成核酸是合成mRNA。

88.如权利要求70所述的合成纳米载体,其中所述载体包含带正电荷的脂质或聚合物。

89.如权利要求87所述的合成纳米载体,其中所述带正电荷的脂质或聚合物包括聚(β-氨基酯、聚(L-赖氨酸)、聚(乙烯亚胺)(PEI)、聚(酰氨基胺)树枝状分子(PAMAM)、聚(氨基-共-酯)、聚(甲基丙烯酸二甲氨基乙酯)(PDMAEMA)、壳聚糖、聚-(L-丙交酯-共-L-赖氨酸)、聚[α-(4-氨基丁基)-L-乙醇酸](PAGA)或聚(4-羟基-L-脯氨酸酯)(PHP)。

90.如权利要求70所述的合成纳米载体,其中所述包衣包含中性或带负电荷的脂质或聚合物。

91.如权利要求89所述的合成纳米载体,其中所述中性或带负电荷的包衣包含聚谷氨酸(PGA)、聚(丙烯酸)、藻酸或半琥珀酸胆甾醇酯/1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺。

92.如权利要求89所述的合成纳米载体,其中所述中性或带负电荷的包衣包含两性离子聚合物。

93.如权利要求89所述的合成纳米载体,其中所述中性或带负电荷的包衣包含脂质体。

94.如权利要求92所述的合成纳米载体,其中所述脂质体包含1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)、1,2-二-O-十八烯基-3-三甲基铵丙烷(DOTMA)、3β-[N-(N′,N′-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基]胆固醇(DC-Chol)、二十八烷基-氨基甘氨酰精胺(DOGS)、胆固醇,1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE)或1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DOPC)。

95.如权利要求70所述的合成纳米载体,其中所述选择的细胞靶向配体选择性结合CD4和/或CD8。

96.如权利要求70所述的合成纳米载体,其中所述选择的细胞靶向配体包含选自CD4抗体和/或CD8抗体的结合结构域。

97.如权利要求70所述的合成纳米载体,其中所述选择的细胞靶向配体包含选自CD4抗体和/或CD8抗体的scFv片段的结合结构域。

98.如权利要求70所述的合成纳米载体，其中所述载体包含聚(β-氨基酯)。

99.如权利要求70所述的合成纳米载体，其中所述包衣包含聚谷氨酸(PGA)。

100.如权利要求70所述的合成纳米载体，其中所述选择的细胞靶向配体包含选自CD4抗体和/或CD8抗体的结合结构域；所述载体包含聚(β-氨基酯)；并且所述包衣包含聚谷氨酸(PGA)。

101.一种组合物，其包含如权利要求70所述的合成纳米载体。

102.一种治疗有需要的受试者的方法，其包括施用治疗有效量的如权利要求70所述的纳米载体或如权利要求100所述的组合物，从而治疗所述有需要的受试者。

使用靶向核酸纳米载体编程治疗性细胞的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求2017年1月5日提交的美国临时专利申请号62/442,890和2016年4月14日提交的美国临时专利申请号62/322,581的优先权,所述文献各自的全部内容以引用的方式并入本文。

发明领域

[0003] 本公开提供了通过提供核酸的瞬时表达来快速且选择性地修饰造血干细胞(或由其衍生的细胞)以实现治疗目的的组合物和方法。瞬时表达导致修饰细胞中的永久性治疗变化,在本文中称为“打了就跑(hit and run)”效应。所述方法可在培养的细胞中或原位实施。

[0004] 发明背景

[0005] 成功的遗传疗法依赖于成功地进入选择的感兴趣细胞中的基因递送机制。目前,病毒系统(诸如利用慢病毒载体的那些)是实现长效遗传疗法的最常用方式。这些遗传疗法依赖于具有治疗价值的蛋白质的持续细胞表达。虽然此类病毒系统可有效地递送用于遗传疗法的基因,但它们是非选择性的、昂贵的并且非广泛可得的。此外,由于随时间发生的细胞事件,持续的治疗性蛋白质表达可能随时间降低。

[0006] 电穿孔也已被开发为将基因递送至细胞中用于遗传疗法的机制。然而,电穿孔依赖于细胞膜的机械破坏和透化,由此损害细胞的存活力,使得它们不太适合于治疗用途。此外,类似基于病毒的方法,电穿孔不可选择性地将基因从异源库中递送至特定细胞类型,因此其必须在细胞选择和纯化过程之后进行。

发明内容

[0007] 本公开提供了通过提供核酸的瞬时表达来快速且选择性地修饰造血干细胞(或由其衍生的细胞)以实现治疗目的的组合物和方法。瞬时表达导致修饰细胞中的永久性治疗变化,在本文中称为“打了就跑”效应。因为仅需要瞬时表达来实现持久的治疗效果,因此克服了关于随时间降低的治疗性蛋白质表达的担忧。此外,因为组合物和方法选择性地修饰选择的细胞类型,因此在修饰之前不需要细胞选择或纯化过程。这加速了离体制造治疗性细胞,并且还允许体内进行细胞的靶向遗传修饰。

[0008] 通过利用导致基因编辑或瞬时表达永久改变细胞表型的蛋白质的核酸的瞬时表达,允许本文所述的打了就跑效应。导致基因编辑的核酸的实例包括TALEN、megaTALS、锌指核酸酶和CRISPR-Cas系统。表型改变蛋白的实例包括转录因子、激酶和细胞表面受体。

[0009] 本文公开的组合物和方法有许多应用。培养细胞中的实例包括用靶向核酸酶编辑造血细胞(包括造血干细胞)的基因组;通过瞬时表达限定的转录因子,在过继转移的细胞中印记治疗上所需的表型,通过表达端粒酶逆转录酶或抗凋亡基因减少过继转移细胞中的细胞衰老,或通过趋化因子受体的表达改变其固有的细胞向性。原位实例包括通过共注射负载核酸的载体来增加疫苗的效力,所述载体选择性地转染树突细胞以增强其呈递抗原的

能力;或转染疫苗引发的T细胞以诱导长寿记忆表型。

附图说明

[0010] 本文提交的许多附图在颜色上有更好的理解,这在提交时在专利申请公开中是不可得的。申请人将附图的颜色版本视为原始提交的一部分,并保留在之后程序中呈现附图的彩色图像的权利。

[0011] 图1A-1C。产生mRNA纳米载体以遗传编程治疗性T细胞。(图1A)示意性解释了可如何编程培养的T细胞以表达由聚合物纳米颗粒携带的治疗相关的转基因。这些颗粒涂有将其靶向特定细胞类型的配体,使它们能够引入其mRNA货物并使靶细胞表达选择的蛋白质(类似转录因子或基因组编辑剂)。(图1B)靶向携带mRNA的纳米颗粒的设计。插图示出代表性纳米颗粒的透射电子显微镜照片;比例尺,50nm。还描绘了包封在纳米颗粒中的合成mRNA。图1C。可用于本文公开的实施方案中的基因编辑剂、表型改变蛋白、靶基因及其用途的实例。

[0012] 图2。流式细胞术抗体。

[0013] 图3A-3C。负载mRNA的纳米颗粒的物理特性。(图3A)有限轨道长度调整单个颗粒的尺寸分布。(图3B)单个纳米颗粒(左,比例尺=100nm)和纳米颗粒群(右,比例尺=2μm)的透射电子显微术。(图3C)对照纳米颗粒(-PGA-Ab)与涂有结合抗体的PGA的那些纳米颗粒(+PGA-Ab)相比的ζ电位,在PBS pH 7.4(n=5)中将它们1:40稀释后测量。

[0014] 图4A-4D。mRNA纳米颗粒转染需要最小的细胞处理和编排由淋巴细胞表达稳健转基因而不影响它们的存活力。(图4A)将原代T细胞与携带Cy5标记的mRNA的CD3靶向聚合物纳米颗粒混合。共聚焦显微术确定这些颗粒从细胞表面快速内化。所述图像代表15个随机选择的字段。(图4B)用携带eGFP编码mRNA的CD3靶向纳米颗粒孵育24h后T细胞的流式细胞术。(图4C、图4D)电穿孔和纳米颗粒基因递送对细胞扩增的作用的比较。左图示出了用纳米颗粒(顶部)和电穿孔(底部)转染的工作流程。右图示出了来自在第0天和第12天用刺激珠处理的三个独立供体的PBMC培养物的倍数扩增。来自每个供体的匹配培养物未在第5天和第12天用CD3/CD28靶向纳米颗粒(图4C,右)或通过电穿孔(图4D,右)处理或转染。每条线代表一个供体,并且每个点反映了倍数T细胞扩增。使用学生t检验分析组间的成对差异;ns,不显著;*,显著,n=3)。

[0015] 图5A、5B。纳米颗粒转染是快速的并且不因冻干而劣化。(图5A)在未处理或在添加用抗CD3靶向的编码eGFP的NP后5h测量的10^6个活化T细胞中的eGFP表达。(图5B)NP的转染效率在冻干和再悬浮后被保持。用NP(通过抗CD3或抗CD8抗体靶向)转染每种条件下10^6个活化T细胞,所述NP是新鲜制备的或冻干、储存在-80℃下,并且然后悬浮至其原始体积。

[0016] 图6。纳米颗粒转染和电穿孔T细胞的相对存活力。每种条件下2×10^6个活化T细胞的样品未处理、用NP转染或如图2C所述进行电穿孔。在处理后18h,用荧光染料标记细胞以评估存活力。这里示出的结果代表三个独立的实验。

[0017] 图7A-7H携带编码靶向TCRα的megaTAL核酸酶的mRNA的纳米载体可敲除CAR编程的淋巴细胞中的T细胞受体。(图7A)将纳米颗粒转染整合到CAR-T细胞的正常制造中。在用抗CD3/CD28涂覆的珠刺激(第0天)后,在第1天和第2天引入CD8靶向的mRNA NP,然后在第3天用编码白血病特异性19-41BBζCAR的载体进行慢病毒转导。加入携带编码megaTAL核酸酶加

上eGFP的mRNA的NP，或仅负载有eGFP mRNA的对照颗粒。(图7B)NP转染效率的流式细胞术(基于eGFP信号)与NP处理后T细胞的TCR表面表达水平(基于CD3信号)相关。(图7C)总结图示出了在第14天(n＝5)如通过CD3表面表达的缺失测量的编辑效率。(图7D)Surveyor测定证实了TCRα链基因座破坏。(图7E)基因组编辑的T细胞相比于对照T细胞中的慢病毒转导的流式细胞术。(图7F)TCR+(对照)和TCR-(mTAL Np处理的)CAR-T细胞在经辐射的TM-LCL白血病细胞上共培养的增殖。(图7G)用于通过CAR-T细胞裂解CD19-K562靶细胞的细胞毒性测定。(图7H)用PMA和离子霉素(P/I)刺激后IL-2和IFN-γ的细胞内细胞因子表达。

[0018] 图8A-8F。具有编码Foxo13A转录因子的mRNA的纳米载体诱导CD8+中枢记忆T细胞特征性的表面标记物和转录模式。(图8A)通过细胞内标记在用CD3靶向对照(GFP+)或Foxo13A-GFP NP处理的Jurkat和原代T细胞中测量的总Foxo1蛋白的表达。(图8B)在细胞暴露于Foxo13A-eGFP NP后，随时间的相对Foxo13A mRNA表达的qPCR测量。CD8靶向的Foxo13A-GFP NP在颗粒处理24h后对CD62L表达的影响。(图8D)在引入颗粒后，在培养的第1、8和20天用CD8-靶向对照或Foxo13A/eGFP-编码的NP处理的分选CD8+eGFP+细胞中CD62L+细胞的百分比。这些结果来自3个独立供体。*P＜0.05;在由比率配对t检验计算的指示条件之间**P＜0.01。(图8E)治疗8天后TCM、原初和对照细胞中TCM标签基因表达的热图。(图8F)8天后Foxo13A NP处理的细胞中差异基因表达的火山图。指出了TCM标签基因和选择的记忆表型基因。通过GSEA测定Foxo13A与TCM标签基因集合之间重叠的P值(通过图9B中示出的分析)。

[0019] 图9A、9B。基因集合富集揭示了TCM与Foxo13A纳米颗粒处理的细胞之间的强相关性。(图9A)在治疗8天后，TCM、原初和对照细胞中TCM向下标签基因表达的热图。(图9B)在针对TCM-向上和TCM-向下标签基因集合测试的Foxo13A NP处理的细胞与对照NP处理的细胞中差异表达的基因的基因集合富集分析。

[0020] 图10A-10D。mRNA纳米载体能够特异性转染CD34+人造血干细胞，其对扩增或表型的影响最小。(图10A)靶向CD105能够特异性转染从动员的PBSC获得的HSC CD34+细胞。将这些细胞保持未处理，或在NP中用编码eGFP的mRNA转染，所述NP涂有偶联至非特异性对照抗体(对照Ab-eGFP NP)或抗CD105(α-CD105NP)的PGA。在NP暴露后24h通过流式细胞术测定转染效率。(图10B)来自3个独立供体的CD34+样品中的NP转染效率。(图10C)加入对照或CD105靶向的NP后，体外扩增CD34+HSC。如图10A中那样转染细胞，然后在颗粒暴露后第0、4和8天评估总细胞数。(图10D)在培养8天后，对未转染细胞(虚线)或用抗CD105mRNA(实线)处理的细胞中的HSC标记物CD34、CD133和CD49f进行流式细胞术分析。结果表明添加NP未改变关键干细胞标记物的表面表达。

[0021] 图11。示例性支持序列。

具体实施方式

[0022] 成功的遗传疗法依赖于成功地进入选择的感兴趣细胞中的基因递送机制。目前，病毒系统(诸如利用慢病毒载体的那些)是实现长效遗传疗法的最常用方式。这些遗传疗法依赖于具有治疗价值的蛋白质的持续细胞表达。虽然此类病毒系统可有效地递送用于遗传疗法的基因，但它们是非选择性的、昂贵的并且非广泛可得的。此外，由于随时间发生的细胞事件，持续的治疗性蛋白质表达可能随时间降低。

[0023] 电穿孔也已被开发为将基因递送至细胞中用于遗传疗法的机制。然而，电穿孔依赖于细胞膜的机械破坏和透化，由此损害细胞的存活力，使得它们不太适合于治疗用途。此外，类似基于病毒的方法，电穿孔不可选择性地将基因从异源库中递送至特定细胞类型，因此其必须在细胞选择和纯化过程之后进行。

[0024] 本公开提供了通过提供核酸的瞬时表达来快速且选择性地修饰细胞以实现治疗目的的组合物和方法。瞬时表达导致修饰细胞中的永久性治疗变化，在本文中称为“打了就跑”效应。因为仅需要瞬时表达来实现持久的治疗效果，因此克服了关于随时间降低的治疗性蛋白质表达的担忧。此外，因为组合物和方法选择性地修饰选择的细胞类型，因此在修饰之前不需要细胞选择或纯化过程。这加速了离体制造治疗性细胞，并且还允许体内进行细胞的靶向遗传修饰。

[0025] 通过利用导致基因编辑或瞬时表达永久改变细胞表型的蛋白质的核酸的瞬时表达，允许本文所述的打了就跑效应。导致基因编辑的核酸的实例包括TALEN、megaTALS、锌指核酸酶和CRISPR-Cas系统。永久改变细胞表型的蛋白质的实例包括转录因子、激酶和细胞表面受体。瞬时表达是指在核酸转移至细胞内后的短时间段内产生重组基因产物。在特定实施方案中，瞬时表达持续12小时至20天；18小时至18天；24小时至14天；或36小时至10天。细胞的表型是指其物理特征和/或其在体内的位置。

[0026] 本文公开的组合物和方法有许多应用。实例包括用靶向核酸酶编辑淋巴细胞(例如造血干细胞(HSC))的基因组；通过共注射负载核酸的载体来增加疫苗的效力，所述载体转染树突细胞以增强其呈递抗原的能力；以及转染疫苗引发的T细胞以诱导长寿记忆表型。

[0027] 特定实施方案包括纳米载体，其可靶向特定选择的细胞并简单地通过在体内将纳米载体与离体培养中的细胞或受试者内的细胞混合来完成核酸的剂量控制递送。在特定实施方案中，纳米载体包括：(1)选择的细胞靶向配体；(2)载体；和(3)载体内的核酸。特定实施方案包括纳米载体，其包括(1)选择的细胞靶向配体；(2)载体；(3)载体内的核酸；(4)包衣。

[0028] 在特定实施方案中，选择的细胞靶向配体可包括表面锚定的靶向配体，其选择性地将纳米载体结合至选择的细胞并引发快速受体诱导的胞吞作用以使其内化。如本文其它地方更详细公开的，选择的细胞靶向配体可包括抗体、scFv蛋白、DART分子、肽和/或适体。特定实施方案利用抗CD8抗体转染人T细胞，并利用识别CD34、CD133或CD46的抗体靶向HSC。

[0029] 在特定实施方案中，载体包括凝聚和保护核酸免于酶促降解的载体分子。如本文其它地方更详细公开的，载体可包括带正电荷的脂质和/或聚合物。特定实施方案使用聚(β-氨基酯)。

[0030] 在特定实施方案中，核酸被包封在载体内，并且在被选择的细胞细胞摄取后，表达永久改变细胞表型的基因编辑剂和/或蛋白质。如本文其它地方更详细公开的，核酸可包括表达megaTAL或转录因子的合成mRNA。特定实施方案利用体外转录的mRNA(参见例如，Grudzien-Nogalska等，Methods Mol.Biol.969，55-72(2013))，其表达(i)诱导记忆CD8 T细胞的转录因子FOXO1；或(ii)罕见裂解的megaTAL核酸酶(参见例如，Boissel和Scharenberg，Methods Mol.Biol.1239，171-196(2015))，以破坏淋巴细胞的T细胞受体表达。

[0031] 在特定实施方案中，本文公开的纳米载体包括屏蔽包封的核酸并减少或防止脱靶

结合的包衣。通过将纳米载体的表面电荷降低至中性或阴性来减少或防止脱靶结合。如本文其它地方更详细公开的，包衣可包括中性或带负电的基于聚合物和/或脂质体的包衣。特定实施方案利用聚谷氨酸(PGA)作为纳米载体包衣。当使用时，包衣不一定必须涂覆整个纳米载体，但必须足以减少纳米载体的脱靶结合。

[0032] 当将所公开的纳米载体加入到异质的细胞混合物(例如，离体细胞培养物或体内环境)中时，工程化的纳米载体结合至选择的细胞群并刺激受体介导的胞吞作用；此过程为它们携带的核酸(例如，合成mRNA)提供了进入，并且因此选择的细胞开始表达编码的分子(图1A)。由于不需要转基因的核转运和转录，因此该过程快速有效。如果需要，可以进行纳米载体的其它应用，直到实现所需的结果。在特定实施方案中，纳米载体是可生物降解的和生物相容的，并且在离体细胞制造中，在将它们输注到受试者中用于治疗之前，可通过离心容易地将修饰的细胞与未结合的纳米颗粒分离。

[0033] 在特定实施方案中，快速意指编码的核酸的表达在细胞的异质样品暴露于本文公开的纳米载体的24小时内或12小时内在选择的细胞类型内开始。该时间线可以利用核酸如mRNA，其几乎立即(例如，在几分钟内)开始转录到靶细胞的细胞质中。

[0034] 在特定实施方案中，有效意指基因转移至靶细胞(例如，原代人T细胞)中＞80％并且在至少80％的这些细胞、至少90％的这些细胞或100％的这些细胞中发生表型修饰。在特定实施方案中，有效意指基因转移至靶细胞中＞80％并且在至少25％的这些细胞、至少33％的这些细胞或至少50％的这些细胞中发生表型修饰。在特定实施方案中，表型修饰可在摄取纳米载体的1/3选择的细胞中发生，其中递送的核酸编码核酸酶。

[0035] 现在更详细地描述本公开的另外选项和实施方案。

[0036] 选择的细胞靶向配体.公开的纳米载体的选择的细胞靶向配体选择性结合异质细胞群内的感兴趣的免疫细胞。在特定实施方案中，感兴趣的免疫细胞是淋巴细胞。淋巴细胞包括T细胞、B细胞、自然杀伤(NK)细胞、单核细胞/巨噬细胞和HSC。

[0037] 已发现了几种不同的T细胞子集，每种亚细胞具有不同的功能。在特定实施方案中，选择的细胞靶向配体通过受体介导的胞吞作用实现对特定淋巴细胞群的选择性指导。例如，大多数T细胞具有作为几种蛋白质的复合物存在的T细胞受体(TCR)。实际的T细胞受体由两条单独的肽链组成，这些肽链由独立的T细胞受体α和β(TCRα和TCRβ)基因产生，并且称为α-TCR链和β-TCR链。本文公开的选择的细胞靶向配体可结合α-TCR链和/或β-TCR链，以实现核酸向这些T细胞的选择性递送。

[0038] γδT细胞代表在其表面上具有不同T细胞受体(TCR)的小子集的T细胞。在γδT细胞中，TCR由一个γ链和一个δ链组成。这组T细胞比αβT细胞少见得多(总T细胞的2％)。尽管如此，本文公开的选择的细胞靶向配体可结合γ-TCR链和/或δTCR链，以实现核酸向这些T细胞的选择性递送。

[0039] CD3在所有成熟T细胞上表达。因此，本文公开的选择的细胞靶向配体可结合CD3，以实现核酸向所有成熟T细胞的选择性递送。活化的T细胞表达4-1BB(CD137)、CD69和CD25。因此，本文公开的选择的细胞靶向配体可结合4-1BB、CD69或CD25，以实现核酸向活化的T细胞的选择性递送。CD5和转铁蛋白受体也在T细胞上表达，并可用于实现核酸向T细胞的选择性递送。

[0040] T细胞可进一步分为辅助细胞(CD4+ T细胞)和细胞毒性T细胞(CTL，CD8+ T细胞)，

其包括溶细胞性T细胞。T辅助细胞在免疫过程中帮助其它白细胞，包括B细胞成熟为浆细胞，以及细胞毒性T细胞和巨噬细胞的活化等功能。这些细胞也称为CD4+ T细胞，因为它们在其表面上表达CD4蛋白。当辅助T细胞通过在抗原呈递细胞(APC)的表面上表达的II类MHC分子呈递肽抗原时，它们被活化。一旦被活化，它们快速分裂并分泌称为细胞因子的小蛋白质，其调节或有助于活性免疫响应。本文公开的选择的细胞靶向配体可结合CD4，以实现核酸向T辅助细胞的选择性递送。

[0041] 细胞毒性T细胞破坏病毒感染的细胞和肿瘤细胞，并且还涉及移植排斥。这些细胞也称为CD8+ T细胞，因为它们在其表面上表达CD8糖蛋白。这些细胞通过结合至与I类MHC相关的抗原识别它们的靶标，I类MHC存在于几乎每个身体细胞的表面上。本文公开的选择的细胞靶向配体可结合CD8，以实现核酸向CTL的选择性递送。

[0042] 如本文所用的“中枢记忆”T细胞(或“TCM”)是指经历了抗原的CTL，其在表面上表达CD62L或CCR7和CD45RO，并且与原初细胞相比不表达CD45RA或具有减少的CD45RA表达。在特定实施方案中，中枢记忆细胞对CD62L、CCR7、CD25、CD127、CD45RO和CD95的表达是阳性的，并且与原初细胞相比具有减少的CD45RA表达。本文公开的选择的细胞靶向配体可结合CD62L、CCR7、CD25、CD127、CD45RO和/或CD95，以实现核酸向TCM的选择性递送。

[0043] 如本文所用的“效应记忆”T细胞(或“TEM”)是指经历了抗原的T细胞，其与中枢记忆细胞相比不在表面上表达CD62L或具有减少的CD62L表达，并且与原初细胞相比不表达CD45RA或具有减少的CD45RA表达。在特定实施方案中，与原初细胞或中枢记忆细胞相比，效应记忆细胞对CD62L和CCR7的表达是阴性的，并且具有CD28和CD45RA的可变表达。与记忆或原初T细胞相比，效应T细胞对颗粒酶B和穿孔素是阳性的。本文公开的选择的细胞靶向配体可结合颗粒酶B和/或穿孔素，以实现核酸向TEM的选择性递送。

[0044] 调节性T细胞(“TREG”)是T细胞的亚群，其调节免疫系统、维持对自身抗原的耐受性，并消除自身免疫疾病。TREG表达CD25、CTLA-4、GITR、GARP和LAP。本文公开的选择的细胞靶向配体可结合CD25、CTLA-4、GITR、GARP和/或LAP，以实现核酸向原初TREG的选择性递送。

[0045] 如本文所用的“原初”T细胞是指经历了非抗原的T细胞，其表达CD62L和CD45RA，并且与中枢或效应记忆细胞相比不表达CD45RO。在特定实施方案中，原初CD8+ T淋巴细胞的特征在于原初T细胞的表型标记物(包括CD62L、CCR7、CD28、CD127和CD45RA)的表达。本文公开的选择的细胞靶向配体可结合CD62L、CCR7、CD28、CD127和/或CD45RA，以实现核酸向原初T细胞的选择性递送。

[0046] 自然杀伤细胞(也称为NK细胞、K细胞和杀伤细胞)响应于干扰素或巨噬细胞衍生的细胞因子而被活化。它们用于抑制病毒感染，而适应性免疫响应产生可清除感染的抗原特异性细胞毒性T细胞。NK细胞表达CD8、CD16和CD56但不表达CD3。本文公开的选择的细胞靶向配体可结合CD8、CD16和/或CD56，以实现核酸向NK细胞的选择性递送。

[0047] 巨噬细胞(及其前体、单核细胞)存在于身体的每个组织中(在某些情况下为小胶质细胞、Kupffer细胞和破骨细胞)，在那里它们吞噬凋亡细胞、病原体和其它非自身组分。因为单核细胞/巨噬细胞吞噬非自身组分，所以本文所述的纳米载体上不需要特定的巨噬细胞或单核细胞导向剂用于这些细胞的选择性摄取。可替代地，本文公开的选择的细胞靶向配体可结合CD11b、F4/80;CD68;CD11c;IL-4Rα;和/或CD163，以实现核酸向单核细胞/巨噬细胞的选择性递送。

[0048] 未成熟的树突细胞(即,预活化)吞噬外周围的抗原和其它非自身组分,并且随后以活化形式迁移到淋巴组织的T细胞区域,在那里它们向T细胞提供抗原呈递。因此,类似巨噬细胞,树突细胞的靶向不需要依赖于选择的细胞靶向配体。当选择的细胞靶向配体用于选择性靶向树突细胞时,其可结合以下CD抗原:CD1a、CD1b、CD1c、CD1d、CD21、CD35、CD39、CD40、CD86、CD101、CD148、CD209和DEC-205。

[0049] 通过B细胞受体(BCR)的存在可将B细胞与其它淋巴细胞区分开。B细胞的主要功能是制造抗体。B细胞表达CD5、CD19、CD20、CD21、CD22、CD35、CD40、CD52和CD80。本文公开的选择的细胞靶向配体可结合CD5、CD19、CD20、CD21、CD22、CD35、CD40、CD52和/或CD80,以实现核酸向B细胞的选择性递送。靶向B细胞受体同种型恒定区的抗体(IgM、IgG、IgA、IgE)还可用于靶向B细胞亚型。

[0050] 淋巴细胞功能相关抗原1(LFA-1)由所有T细胞、B细胞和单核细胞/巨噬细胞表达。因此,本文公开的选择的细胞靶向配体可结合LFA-1,以实现核酸向T细胞、B细胞和单核细胞/巨噬细胞的选择性递送。

[0051] HSC也可被靶向用于选择性递送本文公开的纳米载体。HSC表达CD34、CD46、CD133、Sca-1和CD117。本文公开的选择的细胞靶向配体可结合CD34、CD46、CD133、Sca-1和/或CD117,以实现核酸向造血干细胞的选择性递送。

[0052] “选择性递送”意指核酸由一种或多种选择的淋巴细胞群递送和表达。在特定实施方案中,选择性递送仅限于选择的淋巴细胞群。在特定实施方案中,至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%的所施用核酸由选择的淋巴细胞群递送和/或表达。在特定实施方案中,选择性递送确保非淋巴细胞不表达递送的核酸。例如,当靶向剂是T细胞受体(TCR)基因时,确保了选择性,因为仅T细胞具有TCR表达所需的ζ链。选择性递送还可基于缺乏核酸摄取到未选择细胞中或基于核酸序列内特定启动子的存在。例如,瞬时表达的核酸可包括T细胞特异性CD3-δ启动子。可实现选择性递送的另外启动子包括:鼠干细胞病毒启动子或者用于T细胞或HSC的远端lck启动子;用于HSC的CD45启动子、WASP启动子或IFN-β启动子;用于B细胞的B29启动子;或者用于单核细胞/巨噬细胞的CD14启动子或CD11b启动子。

[0053] 如所指出的,选择的细胞靶向配体可包括用于淋巴细胞上发现的基序的结合结构域。选择的细胞靶向配体还可包括允许选择性摄取到淋巴细胞中的任何选择性结合机制。在特定实施方案中,选择的细胞靶向配体包括用于以下各项的结合结构域:T细胞受体基序;T细胞α链;T细胞β链;T细胞γ链;T细胞δ链;CCR7;CD1a;CD1b;CD1c;CD1d;CD3;CD4;CD5;CD7;CD8;CD11b;CD11c;CD16;CD19;CD20;CD21;CD22;CD25;CD28;CD34;CD35;CD39;CD40;CD45RA;CD45RO;CD46;CD52;CD56;CD62L;CD68;CD80;CD86;CD95;CD101;CD117;CD127;CD133;CD137(4-1BB);CD148;CD163;F4/80;IL-4Rα;Sca-1;CTLA-4;GITR;GARP;LAP;颗粒酶B;LFA-1;转铁蛋白受体;及其组合。

[0054] 在特定实施方案中,结合结构域包括细胞标记配体、受体配体、抗体、肽、肽适体、核酸、核酸适体、spiegelmer或其组合。在选择的细胞靶向配体的背景下,结合结构域包括结合至另一种物质以形成能够介导胞吞作用的复合物的任何物质。

[0055] “抗体”是结合结构域的一个实例,并且包括完整抗体或抗体的结合片段,例如Fv、Fab、Fab′、F(ab′)2、Fc和单链Fv片段(scFv)或免疫球蛋白的任何生物学有效片段,其特异性结合至由淋巴细胞表达的基序。抗体或抗原结合片段包括多克隆抗体、单克隆抗体、人抗

体、人源化抗体、合成抗体、嵌合抗体、双特异性抗体、小体和线性抗体中的全部或一部分。

[0056] 来自人来源的抗体或人源化抗体与非人抗体相比在人体中具有降低的免疫原性或没有免疫原性，并且具有较低数量的非免疫原性表位。通常将选择抗体及其片段以在人受试者中具有降低的水平或无抗原性。

[0057] 可使用获得单克隆抗体的方法、噬菌体展示方法、生成人或人源化抗体的方法，或者使用被工程化以产生如本领域普通技术人员已知的抗体的转基因动物或植物的方法制备特异性结合由淋巴细胞表达的基序的抗体(参见例如，美国专利号6,291,161和6,291,158)。部分或完全合成抗体的噬菌体展示文库是可得的，并且可筛选可结合至淋巴细胞基序的抗体或其片段。例如，可通过筛选Fab噬菌体文库以寻找特异性结合至感兴趣靶标的Fab片段来鉴定结合结构域(参见Hoet等，Nat.Biotechnol.23:344,2005)。人抗体的噬菌体展示文库也是可得的。另外，在方便系统(例如，小鼠、HuMAb mouse®、TC mouse™、KM-mouse®、美洲驼、鸡、大鼠、仓鼠、兔等)中使用感兴趣靶标作为免疫原的杂交瘤发育的传统策略可用于开发结合结构域。在特定实施方案中，抗体特异性结合至由选择的淋巴细胞表达的基序，并且不与非特异性组分或不相关靶标交叉反应。一旦鉴定，则可分离和/或确定编码抗体的氨基酸序列或核酸序列。

[0058] 在特定实施方案中，选择的细胞靶向配体的结合结构域包括T细胞受体基序抗体；T细胞α链抗体；T细胞β链抗体；T细胞γ链抗体；T细胞δ链抗体；CCR7抗体；CD1a抗体；CD1b抗体；CD1c抗体；CD1d抗体；CD3抗体；CD4抗体；CD5抗体；CD7抗体；CD8抗体；CD11b抗体；CD11c抗体；CD16抗体；CD19抗体；CD20抗体；CD21抗体；CD22抗体；CD25抗体；CD28抗体；CD34抗体；CD35抗体；CD39抗体；CD40抗体；CD45RA抗体；CD45RO抗体；CD46抗体；CD52抗体；CD56抗体；CD62L抗体；CD68抗体；CD80抗体；CD86抗体CD95抗体；CD101抗体；CD117抗体；CD127抗体；CD133抗体；CD137(4-1BB)抗体；CD148抗体；CD163抗体；F4/80抗体；IL-4Rα抗体；Sca-1抗体；CTLA-4抗体；GITR抗体；GARP抗体；LAP抗体；颗粒酶B抗体；LFA-1抗体；或转铁蛋白受体抗体。这些结合结构域还可由前述抗体的scFv片段组成。

[0059] 肽适体包括在两端处附接至蛋白质支架的肽环(其特异于靶蛋白)。这种双重结构约束将肽适体的结合亲和力大大增加至与抗体相当的水平。可变环长度通常为8至20个氨基酸(例如，8至12个氨基酸)，并且支架可以是任何稳定、可溶、小且无毒的蛋白质(例如，硫氧还蛋白-A、stefin A三突变体、绿色荧光蛋白、eglin C和细胞转录因子Spl)。肽适体选择可使用不同的系统进行，诸如酵母双杂交系统(例如Gal4酵母双杂交系统)或LexA相互作用捕集系统。

[0060] 核酸适体是单链核酸(DNA或RNA)配体，其通过折叠成特定的球状结构起作用，所述球状结构决定以高亲和力和特异性结合至靶蛋白或其它分子，如由Osborne等，Curr.Opin.Chem.Biol.1:5-9,1997；和Cerchia等，FEBS Letters 528:12-16,2002所述。在特定实施方案中，适体是小的(15KD；或15-80个核苷酸或20-50个核苷酸之间)。适体通常通过称为SELEX的程序从由10^{14}-10^{15}个随机寡核苷酸序列组成的文库中分离(指数富集的配体系统进化技术；参见例如，Tuerk等，Science，249:505-510,1990；Green等，Methods Enzymology.75-86,1991；和Gold等，Annu.Rev.Biochem.,64:763-797,1995)。生成适体的另外方法描述于，例如，美国专利号6,344,318；6,331,398；6,110,900；5,817,785；5,756,291；5,696,249；5,670,637；5,637,461；5,595,877；5,527,894；5,496,938；5,475,096；和

5,270,16中。Spiegelmer类似于核酸适体,除了至少一个β-核糖单元被β-D-脱氧核糖或选自例如β-D-核糖、α-D-核糖、β-L-核糖的修饰的糖单元替换。

[0061] 还可使用可促进淋巴细胞内化和/或转染淋巴细胞的其它试剂,诸如聚(乙烯亚胺)/DNA(PEI/DNA)复合物。

[0062] 载体.如所指出的,所公开的纳米载体的载体起到凝聚和保护核酸免于酶促降解的作用。用作载体的特别有用的材料包括带正电荷的脂质和/或聚合物,包括聚(β-氨基酯)。

[0063] 带正电荷的脂质的另外实例包括磷脂酸与氨基醇的酯,诸如二棕榈酰磷脂酸或二硬脂酰磷脂酸与羟乙基乙二胺的酯。带正电荷的脂质的更特定实例包括3β-[N-(N′,N′-二甲基氨基乙基)氨基甲酰基)胆固醇(DC-chol);N,N′-二甲基-N,N′-二辛基溴化铵(DDAB);N,N′-二甲基-N,N′-二辛基氯化铵(DDAC);1,2-二油酰氧基丙基-3-二甲基-羟乙基氯化铵(DORI);1,2-二油酰氧基-3-[三甲基铵]-丙烷(DOTAP);N-(1-(2,3-二油氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA);二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC);1,2-二十八烷氧基-3-[三甲基铵]-丙烷(DSTAP);和描述于例如Martin等,Current Pharmaceutical Design 2005,11,375-394中的阳离子脂质。

[0064] 可在本公开中用作载体的带正电荷的聚合物的实例包括聚胺;聚有机胺(例如聚乙烯亚胺(PEI)、聚乙烯亚胺纤维素);聚(酰氨基胺)(PAMAM);聚氨基酸(例如聚赖氨酸(PLL)、聚精氨酸);多糖(例如纤维素、葡聚糖、DEAE葡聚糖、淀粉);精胺、亚精胺、聚(乙烯基苄基三烷基铵)、聚(4-乙烯基-N-烷基-吡啶鎓)、聚(丙烯酰基-三烷基铵)和Tat蛋白质。

[0065] 还可使用为任何浓度和任何比率的脂质和聚合物的共混物。使用不同等级以不同比率共混不同聚合物类型可导致从每种有贡献的聚合物借用的特征。还可采用各种末端基团化学。

[0066] 在不限制前述内容的情况下,本文公开的特定实施方案还可利用由能够形成多孔网络的任何材料构建的多孔纳米颗粒。示例性材料包括金属、过渡金属和类金属。示例性金属、过渡金属和类金属包括锂、镁、锌、铝和二氧化硅。在特定实施方案中,多孔纳米载体包括二氧化硅。中孔二氧化硅的特别高的表面积(超过1,000m2/g)使得核酸负载能够处于超过常规DNA载体(诸如脂质体)的水平。

[0067] 载体可以各种不同的形状形成,包括球形、立方形、金字塔形、椭圆形、圆柱形、环形等。核酸可以多种方式包含在载体的孔中。例如,核酸可包封在多孔纳米载体中。在其它方面,核酸可与多孔纳米载体的表面相关联(例如,共价和/或非共价)或紧密接近多孔纳米载体表面的下面。在特定实施方案中,核酸可掺入多孔纳米载体中,例如,整合在多孔纳米载体的材料中。例如,核酸可掺入聚合物纳米载体的聚合物基质中。

[0068] 包衣。在特定实施方案中,本文公开的纳米载体包括屏蔽包封的核酸并减少或防止脱靶结合的包衣。通过将纳米载体的表面电荷降低至中性或带负电来减少或防止脱靶结合。如本文其它地方更详细公开的,包衣可包括中性或带负电荷的基于聚合物和/或脂质体的包衣。在特定实施方案中,包衣是亲水性和/或带中性电荷的亲水性聚合物的致密表面包衣,其足以防止包封的核酸在释放到选择的细胞中之前暴露于环境。在特定实施方案中,包衣覆盖纳米载体表面的至少80%或至少90%。在特定实施方案中,包衣包含聚谷氨酸(PGA)。

[0069] 可在本公开实施方案中用作包衣的带中性电荷的聚合物的实例包括聚乙二醇(PEG)；聚(丙二醇)；和聚环氧烷共聚物，(PLURONIC®,BASF Corp.,Mount Olive,NJ)。

[0070] 带中性电荷的聚合物还包括两性离子聚合物。两性离子是指总体电荷中性的特性，同时具有正电荷和负电荷。两性离子聚合物可表现得类似抵抗细胞和蛋白质粘附的细胞膜区域。

[0071] 两性离子聚合物包括两性离子结构单元，其包括具有两性离子基团的侧基(即，从聚合物主链侧挂的基团)。示例性两性离子侧基包括羧基甜菜碱基团(例如，-Ra-N+(Rb)(Rc)-Rd-CO2-，其中Ra是将聚合物主链与羧基甜菜碱基团的阳离子氮中心共价偶联的连接基团，Rb和Rc是氮取代基，并且Rd是将阳离子氮中心与羧基甜菜碱基团的羧基共价偶联的连接基团)。

[0072] 带负电荷的聚合物的实例包括海藻酸；羧酸多糖；羧甲基纤维素；羧甲基纤维素-半胱氨酸；角叉菜胶(例如，Gelcarin®209、Gelcarin®379)；硫酸软骨素；糖胺聚糖；粘多糖；带负电荷的多糖(例如硫酸葡聚糖)；聚(丙烯酸)；聚(D-天冬氨酸)；聚(L-天冬氨酸)；聚(L-天冬氨酸)钠盐；聚(D-谷氨酸)；聚(L-谷氨酸)；聚(L-谷氨酸)钠盐；聚(甲基丙烯酸)；海藻酸钠(例如，Protanal®LF 120M、Protanal®LF 200M、Protanal®LF 200D)；羧甲基纤维素钠(CMC)；硫酸多糖(肝素，琼脂胶)；果胶、明胶和透明质酸。

[0073] 在特定实施方案中，本文公开的聚合物可包括“星形聚合物”，其是指支化聚合物，其中两个或更多个聚合物支链从核心延伸。核心是具有两个或更多个官能团的原子组，支链可通过聚合而从其延伸。

[0074] 在特定实施方案中，支链是两性离子或带负电荷的聚合物支链。对于星形聚合物，支化前体可通过水解、紫外线辐照或加热转化成两性离子或带负电荷的聚合物。聚合物还可通过任何有效聚合不饱和单体的聚合方法获得，包括原子转移自由基聚合(ATRP)、可逆加成-断裂链转移聚合(RAFT)、光聚合、开环聚合(ROP)、缩合、迈克尔加成、分支生成/增长反应或其它反应。

[0075] 脂质体是包括至少一个同心脂质双层的微观囊泡。选择形成囊泡的脂质以实现最终复合物的特定程度的流动性或刚性。在特定实施方案中，脂质体提供脂质组合物，所述脂质组合物是围绕多孔纳米颗粒的外层。

[0076] 脂质体可以是中性的(胆固醇)或双极的，并且包括磷脂(诸如磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰肌醇(PI)和鞘磷脂(SM))和其它类型的双极脂质，包括二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)，具有14-22范围内的烃链长度，并且饱和或具有一个或多个双C＝C键。能够单独或与其它脂质组分组合产生稳定脂质体的脂质的实例是磷脂，诸如氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)、卵磷脂、磷脂酰乙醇胺、溶血卵磷脂、溶血磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、鞘磷脂、脑磷脂、心磷脂、磷脂酸、脑苷脂、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE)、二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰油酰磷脂酰乙醇胺(POPE)和二油酰磷脂酰乙醇胺4-(N-马来酰亚胺基-甲基)环己烷-1-羧酸酯(DOPE-mal)。可掺入脂质体中的另外不含磷的脂质包括硬脂胺、十二烷胺、十六烷胺、肉豆蔻酸异丙酯、十二烷基硫酸三乙醇胺、烷基芳基硫酸盐、乙酰基棕榈酸酯、甘油蓖麻醇酸酯、硬脂酸十六烷醇酯、两性丙烯酸聚合物、聚乙氧基化脂肪酸酰胺、DDAB、二十八烷基二甲基氯化铵(DODAC)、1,2-二-肉豆蔻酰基-3-三甲基铵丙烷(DMTAP)、DOTAP、DOTMA、DC-Chol、磷

脂酸(PA)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、二油酰磷脂酰甘油(DOPG)和磷酸二鲸蜡酯。在特定实施方案中,用于产生本文公开的脂质体的脂质包括胆固醇、氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)和衍生的形成囊泡的脂质PEG-DSPE。

[0077] 形成脂质体的方法描述于,例如,美国专利号4,229,360;4,224,179;4,241,046;4,737,323;4,078,052;4,235,871;4,501,728;和4,837,028,以及Szoka等,Ann.Rev.Biophys.Bioeng.9:467(1980)和Hope等,Chem.Phys.Lip.40:89(1986)中。

[0078] 核酸.本文公开的纳米载体内使用的核酸可瞬时表达调节细胞命运、分化、存活力和/或运输的基因编辑剂和/或表型改变蛋白(参见例如图1B、1C)。

[0079] 在特定实施方案中,核酸包括合成mRNA。在特定实施方案中,使用5′-加帽工程化合成mRNA以用于增加细胞内稳定性。多种不同的5′-帽结构可用于生成合成mRNA分子的5′-帽。例如,抗反转帽类似物(ARCA)帽含有5′-5′-三磷酸鸟嘌呤-鸟嘌呤键联,其中一个鸟嘌呤含有N7甲基以及3′-O-甲基。合成mRNA分子还可使用负责生成5′-帽结构的酶在转录后加帽。例如,重组牛痘病毒加帽酶和重组2′-O-甲基转移酶可在mRNA的5’最核苷酸与鸟嘌呤核苷酸之间形成规范的5′-5′-三磷酸酯键联,其中所述鸟嘌呤含有N7甲基化并且最终5′-核苷酸含有生成Cap1结构的2′-O-甲基。这导致帽具有更高的翻译能力和细胞稳定性以及减少的细胞促炎细胞因子的活化。

[0080] 合成mRNA或其它核酸还可以是环状的。可使合成mRNA环化或连环化(concatemerized),以生成有翻译能力的分子来帮助聚-A结合蛋白与5′-端结合蛋白之间的相互作用。环化或连环化的机制可通过至少3种不同的途径发生:1)化学,2)酶,以及3)核酶催化。新形成的5′-/3′-键联可以是分子内或分子间的。

[0081] 在第一途径中,核酸的5′-端和3′-端可含有当靠近时在分子的5′-端与3′-端之间形成新的共价键联的化学反应性基团。5′-端可含有NHS-酯反应性基团并且3′-端可含有3′-氨基封端的核苷酸,使得在有机溶剂中合成mRNA分子的3′-端上的3′-氨基封端的核苷酸将经历5′-NHS-酯部分上的亲核攻击,从而形成新的5′-/3′-酰胺键。

[0082] 在第二途径中,T4RNA连接酶可用于将5′-磷酸化的核酸分子酶连接至核酸的3′-羟基,从而形成新的磷酸二酯键联。在示例反应中,根据制造商的方案可将1μg核酸分子与1至10个单位的T4RNA连接酶(New England Biolabs,Ipswich,Mass.)在37℃下孵育1小时。连接反应可在存在能够与并列的5′-和3′-区两者碱基配对以帮助酶连接反应的分离寡核苷酸的情况下发生。

[0083] 在第三途径中,cDNA模板的5′-或3′-端编码连接酶核酶序列,使得在体外转录过程中,所得核酸分子可含有能够将核酸分子的5′-端连接至核酸分子的3′-端的活性核酶序列。连接酶核酶可源自I组内含子、I组内含子、丁型肝炎病毒、发夹状核酶或可通过SELEX(指数富集的配体系统进化技术)选择。核酶连接酶反应可在0℃与37℃之间的温度下进行1至24小时。

[0084] 在特定实施方案中,核酸包括质粒、cDNA或mRNA,其可包括例如用于表达基因编辑剂或表型改变蛋白的序列(例如,基因)。合适的质粒包括标准质粒载体和可用于将基因转移至淋巴细胞的小环质粒。核酸(例如,小环质粒)还可包括任何另外的序列信息以促进选择性修饰的细胞中的瞬时表达。例如,核酸可包括启动子,诸如通用启动子、组织特异性启动子、细胞特异性启动子和/或特异于细胞质的启动子。如所指出的,启动子和质粒(例如,

小环质粒)通常是本领域熟知的,并且可以使用常规技术制备。

[0085] 如本文所用,术语“基因”是指编码基因编辑剂或表型改变蛋白的核酸序列。此定义包括各种序列多态性、突变和/或序列变体,其中此类改变不影响基因编辑剂或表型改变蛋白的功能。术语“基因”不仅可包括编码序列,还可包括调控区,诸如启动子、增强子和终止区。所述术语还可包括从mRNA转录物剪接的所有内含子和其它DNA序列,连同由替代剪接位点产生的变体。编码基因编辑剂或表型改变蛋白的核酸序列可以是指导基因编辑剂或表型改变蛋白表达的RNA。这些核酸序列包括在特定实施方案中翻译成蛋白质的RNA序列。核酸序列包括全长核酸序列以及源自全长蛋白质的非全长序列两者。序列还可包括天然序列的简并密码子或可被引入以在特定淋巴细胞中提供密码子偏好的序列。编码本文公开的基因编辑剂或表型改变蛋白的基因序列在公开可得的数据库和出版物中可得。如本文所用,术语“编码”是指核酸(例如质粒、基因、cDNA、mRNA)的序列用作合成基因编辑剂或表型改变蛋白的模板的特性。

[0086] 基因编辑剂.如本文所用,基因编辑剂包括如本文所述的瞬时核酸表达的表达产物,其修饰或影响选择的细胞的内源基因组的特定序列。在特定实施方案中,所述修饰包括去除或破坏内源基因,使得内源基因编码的蛋白质不再表达、表达程度降低、表达为不完整蛋白质、不稳定蛋白质、错误折叠蛋白质和/或无功能蛋白质。在特定实施方案中,所述影响是通过干扰RNA型机制降低蛋白质的表达。因此,基因编辑剂可用于基因组编辑,例如基因破坏、通过同源重组的基因编辑,以及基因疗法以将治疗基因在具有人基因组的适当染色体靶位点处插入。

[0087] 特定实施方案利用转录活化因子样效应核酸酶(TALEN)作为基因编辑剂。TALEN是指融合蛋白,其包括转录活化因子样效应子(TALE)DNA结合蛋白和DNA切割结构域。TALEN用于通过在DNA中诱导双链断裂(DSB)来编辑基因和基因组,其诱导细胞中的修复机制。通常,两个TALEN必须结合并侧接靶DNA位点的每侧,以便DNA切割结构域二聚化并诱导DSB。通过非同源末端连接(NHEJ)或通过同源重组(HR)用外源双链供体DNA片段在细胞中修复DSB。

[0088] 如所指出的,已将TALEN工程化以结合例如内源基因组的靶序列,并在靶序列的位置处切割DNA。TALEN的TALE是由黄单胞菌属(Xanthomonas)细菌分泌的DNA结合蛋白。TALE的DNA结合结构域包括高度保守的33或34个氨基酸重复,在每个重复的第12和第13位置处具有不同的残基。这两个位置,称为重复变量指令(RVD),显示出与特定核苷酸识别的强相关性。因此,通过改变RVD中的氨基酸并掺入非常规RVD氨基酸,可改善靶向特异性。

[0089] 可用于TALEN融合体的DNA切割结构域的实例是野生型和变体FokI内切核酸酶。FokI结构域起二聚体的作用,需要两个具有独特DNA结合结构域的构建体用于靶序列上的位点。FokI切割结构域在五个或六个碱基对间隔序列内切割,将两个倒置的半位点分开。

[0090] 特定实施方案利用MegaTAL作为基因编辑剂。MegaTAL具有单链罕见裂解核酸酶结构,其中TALE与大范围核酸酶的DNA裂解结构域融合。大范围核酸酶,也称为归巢内切核酸酶,是在同一结构域中具有DNA识别和核酸酶功能两者的单肽链。与TALEN相反,megaTAL仅需要递送单个肽链用于功能活性。特异于TCRα的示例性megaTAL蛋白质作为图11中的SEQ ID NO:1被提供。

[0091] 特定实施方案利用锌指核酸酶(ZFN)作为基因编辑剂。ZFN是一类位点特异性核酸酶,其被工程化以在特定位置处结合和切割DNA。ZFN用于在DNA序列中的特定位点处引入

DSB,这使得ZFN能够靶向多种不同细胞中基因组内的独特序列。此外,在双链断裂之后,发生同源重组或非同源末端连接以修复DSB,由此实现基因组编辑。

[0092] 通过将锌指DNA结合结构域与DNA切割结构域融合来合成ZFN。DNA结合结构域包括三至六个为转录因子的锌指蛋白。DNA切割结构域包括例如FokI内切核酸酶的催化结构域。

[0093] 例如,指导RNA可与基因编辑剂诸如CRISPR-Cas系统一起使用。CRISPR-Cas系统包括CRISPR重复序列和一组CRISPR相关基因(Cas)。

[0094] CRISPR重复序列(成簇的规律间隔的短回文重复序列)包括由与重复序列大小相似的短变量序列的间隔物分隔的短同向重复序列簇。重复序列的大小范围为24至48个碱基对,并且具有一些二重对称性,这意味着形成二级结构(诸如发夹),尽管重复序列不是真正的回文结构。分隔重复序列的间隔物与原核病毒、质粒和转座子的序列完全匹配。Cas基因编码核酸酶、解旋酶、RNA结合蛋白以及解开且切割DNA的聚合酶。Cas1、Cas2和Cas9是Cas基因的实例。

[0095] CRISPR间隔物的来源表明CRISPR-Cas系统在细菌的适应性免疫中起作用。至少有三种类型的CRISPR-Cas免疫系统反应,并且Cas1和Cas2基因参与所有三种中的间隔物获取。间隔物获取涉及将入侵病毒DNA捕获且插入到CRISPR基因座中,这发生在适应性免疫的第一阶段。更特别地,间隔物获取开始于Cas1和Cas2识别入侵DNA并切割原型间隔物,其连接至与前导序列相邻的同向重复序列。随后,进行单链延伸修复并重复同向重复序列。

[0096] CRISPR相关适应性免疫的下一阶段涉及CRISPR RNA(crRNA)生物发生,其在每种类型的CRISPR-Cas系统中不同地发生。通常,在此阶段期间,CRISPR转录物被Cas基因切割以产生crRNA。在I型系统中,Cas6e/Cas6f切割转录物。II型系统采用反式活化(tracr)RNA以形成dsRNA,其被Cas9和RNase III切割。III型系统使用Cas6同源物进行切割。

[0097] 在CRISPR相关适应性免疫的最后阶段中,加工的crRNA与Cas蛋白缔合以形成干扰复合物。在I型和II型系统中,Cas蛋白与原型间隔物相邻基序(PAM)相互作用,所述基序是短的3-5bp DNA序列,用于降解入侵DNA,而III型系统不需要与PAM相互作用以降解。在III-B型系统中,crRNA碱基对与mRNA而不是靶DNA进行降解。

[0098] 因此,CRISPR-Cas系统在原核生物中起到RNAi样免疫系统的作用。CRISPR-Cas技术已被用于灭活人细胞系和细胞中的基因。例如,基于II型系统的CRISPR-Cas9系统已被用作基因组编辑的试剂。

[0099] II型系统需要三个组分:Cas9、crRNA和tracrRNA。通过将tracrRNA和crRNA组合成单一合成单指导RNA(sgRNA),可简化所述系统。

[0100] 已开发了至少三种不同的Cas9核酸酶用于基因组编辑。第一种是野生型Cas9,其在特定的DNA位点处引入DSB,从而导致活化DSB修复机制。DSB可通过NHEJ途径或通过同源定向修复(HDR)途径来修复。第二种是突变体Cas9,称为Cas9D10A,其仅具有切口酶活性,这意味着它仅裂解一条DNA链并且不活化NHEJ。因此,DNA修复仅通过HDR途径进行。第三种是核酸酶缺陷的Cas9(dCas9),其不具有切割活性但能够结合DNA。因此,dCas9能够在不切割的情况下靶向基因组的特定序列。通过将dCas9与各种效应子结构域融合,dCas9可用作基因沉默或活化工具。

[0101] 可靶向许多基因用于由本文公开的纳米载体选择性递送的基因编辑剂。特定实例包括靶向Shp1磷酸酶基因(例如,SEQ ID NO:2)、PD1受体基因(例如,SEQ ID NO:3)、TCRα基

因(例如,SEQ ID NO:4);CCR5基因(例如,SEQ ID NO:5)和/或CXCR4基因(例如,SEQ ID NO:6)。

[0102] Shp-1(src同源区2含有结构域的磷酸酶-1;也称为酪氨酸蛋白磷酸酶非受体6型(PTPN6))由人的PTPN6基因编码。Shp-1的N-末端部分含有两个Src同源物(SH2)结构域,其作为蛋白质磷酸-酪氨酸结合结构域与其它细胞组分相互作用以调节其与底物的相互作用。Shp-1作为参与造血的多种信号传导途径的调节剂起关键作用,并且与参与造血细胞信号传导的各种磷酸-蛋白相互作用。Shp-1通过蛋白质-酪氨酸磷酸化连接生长因子受体,诸如EPO、IL-3、GM-CSF和M-CSF的受体以及其它信号传导蛋白。Shp-1还介导由免疫球蛋白γFc结构域(Fc VRIIB1)、NK细胞抑制受体、T细胞受体(TCR)、B细胞受体(BCR)、CD22和CD72触发的抑制信号。存在PTPN6基因的替代剪接变体,其编码不同的同种型。编码哺乳动物Shp-1的示例性核酸序列可在以下GenBank登录号处找到:NM_080549、NM_053908.1和NM_013545。

[0103] 本文公开的特定实施方案包括靶向Shp1磷酸酶基因以改变T细胞信号传导。Shp1磷酸酶活性限制了高亲和力T细胞受体的功能活性,从而削弱了这些受体对靶向罕见或低亲和力肿瘤抗原的治疗用途。(Hebeisen M等,SHP-1 phosphatase activity counteracts increased T cell receptor affinity.JCI.2013)。此外,Shp1活性与实体瘤中T细胞治疗产物的抗肿瘤活性受损有关。(Moon EK等,Multifactorial T-cell Hypofunction That Is Reversible Can Limit the Efficacy of Chimeric Antigen Receptor-Transduced Human T cells in Solid Tumors,Clinical Cancer Research,2014)出于这些原因,Shp1的下调可增强T细胞和治疗性T细胞产物的特异性识别和功能活性。

[0104] PD1(程序性细胞死亡蛋白1;也称为分化簇279(CD279)),是属于免疫球蛋白超家族的细胞表面受体。其在活化的T细胞、B细胞和巨噬细胞的表面上表达,并由人体中的PDCD基因编码。在结构上,PD-1包括细胞外IgV结构域、跨膜区和细胞内尾部。细胞内尾部包括位于基于免疫受体-酪氨酸的抑制基序和基于免疫受体酪氨酸的开关基序中的两个磷酸化位点,这表明PD-1参与负调节TCR信号。PD-1是免疫检查点。其通过阻止T细胞的活化来负调节免疫系统,从而减少自身免疫并促进自身耐受性。PD-1通过促进淋巴结中抗原特异性T细胞的细胞凋亡同时减少调节性T细胞(抑制性T细胞)中的细胞凋亡来实现其功能。PD-1结合配体PD-L1和PD-L2。编码哺乳动物PD-1的示例性核酸序列可在以下Genbank登录号处找到:AY238517、NM_001106927和KJ865858。

[0105] 本文公开的特定实施方案包括靶向PD1受体基因。PD1抗体阻断已证明了强的治疗效率,但还可能导致影响胃肠道、肝脏和内分泌系统以及其它器官的免疫相关不良事件。(Postow MA,Managing Immune Checkpoint-Blocking Antibody Side Effects,ASCO,2015)。通过基因编辑选择性地去除或减少输注的治疗性T细胞产物上的PD1受体表达,可最小化脱靶炎症副作用,同时保持输注的T细胞的增强的体内活性。

[0106] 如前所述,T细胞受体(TCR)在T淋巴细胞的表面上表达,其在识别作为结合至主要组织相容性复合物(MHC)分子的肽的抗原片段中起作用。TCRα链基因可在以下GenBank登录号处找到:X04954、X72904.1和L21699.1。

[0107] 本文公开的特定实施方案包括靶向TCRα链基因。内源TCR的表达可干扰工程化T细胞受体的表达,并介导自身免疫或同种异体响应。靶向TCRα链基因可改善工程化T细胞受体的表达,并允许T细胞产物制造中的部分供体独立性。

[0108] CCR5(趋化因子受体5型;也称为CD195)在T细胞、巨噬细胞、树突细胞、嗜曙红细胞和小胶质细胞的表面上表达。其由人的CCR5基因编码。CCR5是G蛋白偶联的受体,属于整合蛋白的β趋化因子受体家族。

[0109] 许多形式的病毒(包括HIV)均使用CCR5作为共同受体以进入宿主细胞。CCR5被指定为共同受体,因为HIV进入需要其糖蛋白(gp120)结合至CD4和共同受体(CCR5)两者以进入宿主细胞。

[0110] 因此,一种干扰病毒感染的方式是阻断或减少CCR5的表达。已开发了几种CCR5受体拮抗剂来干扰CCR5与HIV的包膜糖蛋白g p120之间的相互作用。此类拮抗剂的实例包括PRO140(Progenics)、Vicriviroc(Schering Plough)、Aplaviroc(GlaxoSmithKline)和Mara viroc(Pfizer)。用于CCR5的配体的实例包括RANTES、MIP-1β和M IP-1α。这些配体能够在体外抑制HIV-1感染。编码哺乳动物CCR5的示例性核酸序列可在以下Genbank登录号处找到:U66285、FJ573195和AF022990。

[0111] 本文公开的特定实施方案包括靶向CCR5基因以减少病毒进入,诸如HIV进入细胞。

[0112] CXCR4(CXC趋化因子受体4型;也称为融合素或CD184)由人的CXCR4基因编码。类似CCR5,CXCR4是病毒进入细胞(包括HIV进入细胞)的共同受体。CXCR4还在许多类型的癌细胞中表达。CXCR4还是特异于基质衍生因子-1(SDF-1或CXCL12)的α-趋化因子受体,其是一种对淋巴细胞具有趋化活性的分子。SDF-1抑制T-tropic HIV-1分离株的复制。编码哺乳动物CCR4的示例性核酸序列可在以下Genbank登录号处找到:NM_001008540、NM_022205和NM_009911。

[0113] 本文公开的特定实施方案包括靶向CXCR4基因以减少病毒进入,诸如HIV进入细胞。

[0114] 如所指出的,本文公开的特定实施方案依赖于表型改变蛋白的表达。表型改变蛋白可调节,例如,细胞分化、存活力或运输。表型改变蛋白的实例包括例如FOXO1、LKB1、TERT、CCR2b和CCR4。

[0115] FOXO1(叉头框蛋白O1或横纹肌肉瘤中的叉头)是由人的FOXO1基因编码的转录因子(例如,SEQ ID NO:7)。FOXO1选择性地掺入遗传程序中,所述遗传程序调节记忆CD8+ T细胞对感染的响应(Kim等,Immunity,2013,39(2):286-97)。Kim等表明在活化的CD8+ T细胞中缺乏FOXO1的小鼠对单核细胞增多性李斯特菌感染具有缺陷的继发性但非原发性响应。同前。与短寿命效应T细胞相比,记忆前体T细胞表达更高量的FOXO1,这促进了记忆前体T细胞的生成和维持。同前。还显示转录因子Tcf7和趋化因子受体CCR7与FOXO1相互作用。同前。

[0116] FOXO1还在促进记忆CD4和CD8 T细胞的效应-至-记忆转换和功能成熟中发挥作用(Tejara等,J.of Immunology,2013,191(1):187-199)。尽管FOXO1不是效应细胞分化所必需的,但记忆CD8 T细胞在没有FOXO1的情况下展示出衰老的特征,这导致受损的回忆响应和差的保护性免疫。同前。编码哺乳动物FOXO1的示例性核酸序列可在以下GenBank登录号处找到:BC021981、NM_001191846和NM_019739。本文公开的特定实施方案包括FOXO1的表达。

[0117] LKB1(肝激酶B1,也称为肾癌抗原NY-REN-19或丝氨酸/苏氨酸激酶11(STK11))是由人的STK11基因编码的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。LKB1是T细胞发育、存活力、活化和新陈代谢的关键调节因子(MacIver,J.Immunol.2011,187(8):4187-4198)。缺乏LKB1的T细胞表

现出细胞增殖和存活力的缺陷，并且改变了糖酵解和脂质代谢。同前。LKB1还活化了一组激酶(包括AMPK和AMPK相关激酶)，所述激酶在能量营养素稀缺时抑制生长和增殖。AMPK、AMPK相关激酶和LKB1在维持细胞极性从而抑制肿瘤细胞生长中起重要作用。编码哺乳动物LKB1的示例性核酸序列可在以下GenBank登录号处找到:NM_000455、NM_001108069和AB015801。本文公开的特定实施方案包括LKB1的表达。示例性LKB1序列是SEQ ID NO:8。

[0118] 转录因子7，T细胞特异性(TCF7)是一种转录活化因子，其在淋巴细胞分化中起重要作用。此基因主要在T细胞中表达。编码的蛋白质可结合增强子元件并活化CD3E基因，并且其还可通过反馈机制抑制CTNNB1和TCF7L2基因。编码人TCF7的示例性核酸序列可在以下NCBI参考序列处找到:NC_000005.10。本文公开的特定实施方案包括TCF7的表达。

[0119] Eomesodermin(EOMES)是转录因子，其对于中胚层的胚胎发育和脊椎动物的中枢神经系统至关重要。其还参与效应CD8+ T细胞的分化。编码人EOMES的示例性核酸序列可在以下NCBI参考序列处找到:NC_000003.12和SEQ ID NO:9。本文公开的特定实施方案包括EOMES的表达。

[0120] DNA结合抑制剂2，HLH蛋白(ID2)是转录调节因子，其含有螺旋-环-螺旋(HLH)结构域但不含有碱性结构域。DNA结合家族抑制剂的成员通过凭借HLH结构域抑制其异源二聚化配偶体以显性阴性方式抑制碱性螺旋-环-螺旋转录因子的功能。ID2在负调节细胞分化中起作用。编码人ID2的示例性核酸序列可在以下NCBI参考序列处找到:NC_000002.12和SEQ ID NO:10。本文公开的特定实施方案包括ID2的表达。

[0121] 本文公开的特定实施方案包括通过转录因子和信号传导分子(诸如FOXO1、LKB1、TCF7、EOMES和/或ID2)的表达改变T细胞的分化，以便根据治疗效率的需要产生特定的细胞表型，诸如TEM、TCM或TREG细胞。TCM和TEM细胞已证明了在抗肿瘤模型中具有增强的治疗效率。

[0122] 端粒酶是RNA依赖性聚合酶，其延长DNA链中的端粒，从而允许衰老细胞潜在地变得永生而不是有丝分裂和凋亡。人端粒酶复合物包括两个人端粒酶逆转录酶(TERT)分子、端粒酶RNA(TR或TERC)和dyskerin(DKC1)。TERT与TERC一起催化TTAGGG序列中核苷酸添加到端粒的末端。添加重复DNA序列防止细胞分裂后通过有丝分裂降解染色体末端。因此，端粒酶修复并延长端粒使得衰老细胞分裂并超过50-70个细胞分裂之间的Hayflick极限。编码哺乳动物TERT的示例性核酸序列可在以下GenBank登录号处找到:NM_198253、NM_053423、NM_009354;和SEQ ID NO:11。

[0123] 正常的体细胞不具有可检测的端粒酶活性。本文公开的特定实施方案包括TERT的表达。研究显示，过继转移的T细胞的体内持久性和抗肿瘤功效可通过TERT mRNA的递送来增强(使用电穿孔(using electroporation)，Cell Discovery(2015)1,15040)。

[0124] 然而，已发现恶性肿瘤细胞具有增加的端粒酶活性。因此，如上所述的基因编辑工具可用于靶向恶性癌症中的TERT。

[0125] CCR2b(C-C趋化因子受体2型或CD192(分化簇192))是G蛋白偶联受体。在人中，CCR2由CCR2基因编码。此基因通过单个基因的替代剪接编码受体CCR2a和CCR2b的两种同种型。

[0126] CCR2b与MIP-1(RANTES受体)相关，并且是单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)的受体，其是介导单核细胞趋化性的趋化因子。CCR2还结合MCP-2、MCP-3和MCP-4，但亲和力较低。

CCR2a和CCR2b的C末端尾部不同。MCP-1是属于C-C趋化因子家族的小趋化因子。MCP-1参与将单核细胞、记忆T细胞和树突细胞募集到由组织损伤或感染产生的炎症部位。MCP-1参与炎性疾病(诸如牛皮癣、类风湿性关节炎、动脉粥样硬化以及针对肿瘤的炎性响应)中的单核细胞浸润。编码哺乳动物CCR2b的示例性核酸序列可在以下GenBank登录号处找到:NM_001123396和NM_009915,以及SEQ ID NO:12。

[0127] 本文公开的特定实施方案包括CCR2b的表达以增强治疗性T细胞的肿瘤运输(J.Immunother.2010年10月;33(8):780-8)。

[0128] CCR4(C-C趋化因子受体4或CD194(分化簇194))属于G蛋白偶联受体家族。在人中,其由CCR4基因编码。CCR4是MCP-1、MIP-1、RANTES、TARC和巨噬细胞衍生的趋化因子(其是CC趋化因子)的受体。CC趋化因子诱导单核细胞以及其它细胞(诸如NK细胞和树突细胞)的迁移。例如,MCP-1诱导单核细胞离开血流并进入周围组织以变成组织巨噬细胞。RANTES吸引T细胞、嗜曙红细胞和嗜碱性粒细胞。因此,CCR4及其配体CC趋化因子调节各种类型白细胞的细胞运输。编码哺乳动物CCR4的示例性核酸序列可在以下GenBank登录号处找到:NM_005508、NM_133532和NM_009916.2,以及SEQ ID NO:13。

[0129] 本文公开的特定实施方案包括CCR4的表达,以改善治疗性T细胞的肿瘤归巢和抗肿瘤活性(Blood.2009年6月18日;113(25):6392-402)。

[0130] 特定实施方案利用本文公开的纳米载体来递送核酸以用于选择的细胞表达,其中使用独立于打了就跑效应或者除打了就跑效应之外。在特定实施方案中,此类实施方案可增强选择的细胞的生长、存活、免疫功能和/或肿瘤细胞靶向。遗传修饰的实例包括允许嵌合抗原受体(CAR)、αβT细胞受体(或其修饰)和/或促炎细胞因子表达的那些。CAR修饰和/或αβT细胞受体修饰允许修饰的淋巴细胞特异性靶向细胞类型。

[0131] 在一个方面,遗传修饰的淋巴细胞可具有改善的肿瘤识别、触发增加的天然T细胞增殖和/或细胞因子产生。

[0132] “嵌合抗原受体”或“CAR”是指合成设计的受体,其至少包括结合结构域和效应子结构域和任选的间隔结构域和/或跨膜结构域。

[0133] 结合结构域尤其可包括特异性结合靶细胞上的标记物的任何肽。结合结构域的来源包括来自各种物种的抗体可变区(其可呈抗体、sFv、scFv、Fab、基于scFv的grababody或可溶性VH结构域或结构域抗体的形式)。这些抗体可仅使用重链可变区形成抗原结合区,即这些功能性抗体仅是重链的同二聚体(称为“重链抗体”)(Jespers等,Nat.Biotechnol.22:1161,2004;Cortez-Retamozo等,Cancer Res.64:2853,2004;Baral等,Nature Med.12:580,2006;以及Barthelemy等,J.Biol.Chem.283:3639,2008)。

[0134] 结合结构域的替代来源包括编码随机肽文库的序列或在替代非抗体支架的环区域中编码氨基酸的工程化多样性的序列,诸如scTCR(参见例如,Lake等,Int.Immunol.11:745,1999;Maynard等,J.Immunol.Methods 306:51,2005;美国专利号8,361,794)、纤维蛋白原结构域(参见例如,Weisel等,Science 230:1388,1985)、Kunitz结构域(参见例如,美国专利号6,423,498)、设计的锚蛋白重复蛋白(DARPin)(Binz等,J.Mol.Biol.332:489,2003和Binz等,Nat.Biotechnol.22:575,2004)、纤连蛋白结合结构域(adnectin或monobody)(Richards等,J.Mol.Biol.326:1475,2003;Parker等,Protein Eng.Des.Selec.18:435,2005以及Hackel等,(2008)J.Mol.Biol.381:1238-1252)、半胱氨

酸结小蛋白(Vita等,(1995)Proc.Nat′l.Acad.Sci.(USA)92:6404-6408;Martin等,(2002)Nat.Biotechnol.21:71,2002以及Huang等,(2005)Structure 13:755,2005)、三十四肽重复序列结构域(Main等,Structure 11:497,2003和Cortajarena等,ACS Chem.Biol.3:161,2008)、富含亮氨酸的重复序列结构域(Stumpp等,J.Mol.Biol.332:471,2003)、脂质运载蛋白结构域(参见例如,WO 2006/095164,Beste等,Proc.Nat′l.Acad.Sci.(USA)96:1898,1999以及Schönfeld等,Proc.Nat′l.Acad.Sci.(USA)106:8198,2009)、V样结构域(参见例如,美国专利申请公布号2007/0065431)、C型凝集素结构域(Zelensky和Gready,FEBS J.272:6179,2005;Beavil等,Proc.Nat′l.Acad.Sci.(USA)89:753,1992以及Sato等,Proc.Nat′l.Acad.Sci.(USA)100:7779,2003)、mAb^2或Fcab™(参见例如,美国专利申请公布号WO 2007/098934;WO 2006/072620)、犰狳重复蛋白质(参见例如,Madhurantakam等,Protein Sci.21:1015,2012;PCT专利申请公布号WO 2009/040338)、affilin(Ebersbach等,J.Mol.Biol.372:172,2007)、亲和体(affibody)、高亲和性多聚体(avimer)、knottin、fynomer、atrimer、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白-4(Weidle等,Cancer Gen.Proteo.10:155,2013)等(Nord等,Protein Eng.8:601,1995;Nord等,Nat.Biotechnol.15:772,1997;Nord等,Euro.J.Biochem.268:4269,2001;Binz等,Nat.Biotechnol.23:1257,2005;Boersma和Plückthun,Curr.Opin.Biotechnol.22:8492011)。

[0135] 在特定实施方案中,结合结构域是单链T细胞受体(scTCR),其包括$V_{\alpha/\beta}$和$C_{\alpha/\beta}$链(例如,V_α-C_α、V_β-C_β、V_α-V_β)或包括特异于感兴趣靶标(例如肽-MHC复合物)的V_α-C_α、V_β-C_β、V_α-V_β对。

[0136] 示例性CAR表达靶向例如间皮素、Her2,WT-1和/或EGRF的配体结合结构域。示例性T细胞受体修饰靶向黑素瘤相关抗原(MAGE)A3 TCR。

[0137] 通过在TCR或CAR的细胞外组分内包括结合相关细胞标记物的结合结构域,可靶向特定的以下癌症:

[0138]

靶向的癌症	细胞标记物
前列腺癌	PSMA、WT1、前列腺干细胞抗原(PSCA)、SV40 T
乳腺癌	HER2、ERBB2、ROR1
干细胞癌	CD133
卵巢癌	L1-CAM、MUC16的细胞外结构域(MUC-CD)、叶酸结合蛋白(叶酸受体)、Lewis Y、ROR1、间皮素、WT-1
间皮瘤	间皮素
肾细胞癌	羧酸酐酶-IX (CAIX);
黑素瘤	GD2
胰癌	间皮素、CEA、CD24、ROR1
肺癌	ROR1

[0139] 在不限制前述内容的情况下,细胞标记物还包括A33;BAGE;Bc1-2;β-连环蛋白;B7H4;BTLA;CA125;CA19-9;CD3;CD5;CD19;CD20;CD21;CD22;CD25;CD28;CD30;CD33;CD37;

CD40;CD52;CD44v6;CD45;CD56;CD79b;CD80;CD81;CD86;CD123;CD134;CD137;CD151;CD171;CD276;CEA;CEACAM6;c-Met;CS-1;CTLA-4;细胞周期蛋白B1;DAGE;EBNA;EGFR;EGFRvIII;肝配蛋白B2;ErbB2;ErbB3;ErbB4;EphA2;雌激素受体;FAP;铁蛋白;α-胎蛋白(AFP);FLT1;FLT4;叶酸结合蛋白;卷曲蛋白;GAGE;G250;GD-2;GHRHR;GHR;GITR;GM2;gp75;gp100(Pmel 17);gp130;HLA;HER-2/neu;HPV E6;HPV E7;hTERT;HVEM;IGF1R;IL6R;KDR;Ki-67;Lewis A;Lewis Y;LIFRβ;LRP;LRP5;LTβR;MAGE;MART;间皮素;MUC;MUC1;MUM-1-B;myc;NYESO-1;O-乙酰基GD-2;O-乙酰基GD3;OSMRβ;p53;PD1;PD-L1;PD-L2;PRAME;黄体酮受体;PSA;PSMA;PTCH1;RANK;ras;Robo1;ROR1;存活素;TCRα;TCRβ;腱生蛋白;TGFBR1;TGFBR2;TLR7;TLR9;TNFR1;TNFR2;TNFRSF4;TWEAK-R;TSTA酪氨酸酶;VEGF;和WT1。

[0140] 特定的癌细胞细胞标记物包括：

[0141]

癌抗原	序列
PSMA	MWNLLHETDSAVATARRPRWLCAGALVLAGGFFLLGFLF GWFIKSSNEATNITPKHNMKAFLDELKAENIKKFLYNFTQIP HLAGTEQNFQLAKQIQSQWKEFGLDSVELAHYDVLLSYPN KTHPNYISIINEDGNEIFNTSLFEPPPPGYENVSDIVPPFSAFS PQGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLERDMKINCSGKIVIARY GKVFRGNKVKNAQLAGAKGVILYSDPADYFAPGVKSYPD GWNLPGGGVQRGNILNLNGAGDPLTPGYPANEYAYRRGIA EAVGLPSIPVHPIGYYDAQKLLEKMGGSAPPDSSWRGSLKV PYNVGPGFTGNFSTQKVKMHIHSTNEVTRIYNVIGTLRGAV EPDRYVILGGHRDSWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRSFGTLKK EGWRPRRTILFASWDAEEFGLLGSTEWAEENSRLLQERGV AYINADSSIEGNYTLRVDCTPLMYSLVHNLTKELKSPDEGF EGKSLYESWTKKSPSPEFSGMPRISKLGSGNDFEVFFQRLGI ASGRARYTKNWETNKFSGYPLYHSVYETYELVEKFYDPMF KYHLTVAQVRGGMVFELANSIVLPFDCRDYAVVLRKYAD KIYSISMKHPQEMKTYSVSFDSLFSAVKNFTEIASKFSERLQ DFDKSNPIVLRMMNDQLMFLERAFIDPLGLPDRPFYRHVIY APSSHNKYAGESFPGIYDALFDIESKVDPSKAWGEVKRQIY VAAFTVQAAAETLSEVA (SEQ ID NO: 14)
PSCA	MKAVLLALLMAGLALQPGTALLCYSCKAQVSNEDCLQVE NCTQLGEQCWTARIRAVGLLTVISKGCSLNCVDDSQDYYV GKKNITCCDTDLCNASGAHALQPAAAILALLPALGLLLWG PGQL (SEQ ID NO: 15)

[0142]

间皮素	MALPTARPLLGSCGTPALGSLLFLLFSLGWVQPSRTLAGET GQEAAPLDGVLANPPNISSLSPRQLLGFPCAEVSGLSTERVR ELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPLDLLL FLNPDAFSGPQACTHFFSRITKANVDLLPRGAPERQRLLPA ALACWGVRGSLLSEADVRALGGLACDLPGRFVAESAEVLL PRLVSCPGPLDQDQQEAARAALQGGGPPYGPPSTWSVSTM DALRGLLPVLGQPIIRSIPQGIVAAWRQRSSRDPSWRQPERT ILRPRFRREVEKTACPSGKKAREIDESLIFYKKWELEACVDA ALLATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDELYPQGYPESVIQ HLGYLFLKMSPEDIRKWNVTSLETLKALLEVNKGHEMSPQ VATLIDRFVKGRGQLDKDTLDTLTAFYPGYLCSLSPEELSS VPPSSIWAVRPQDLDTCDPRQLDVLYPKARLAFQNMNGSE YFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRTDAV LPLTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDL DTLGLGLQGGIPNGYLVLDLSVQEALSGTPCLLGPGPVLTV LALLLASTLA (SEQ ID NO: 16)
CD19	MPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKG TSDGPTQQLTWSRESPLKPFLKLSLGLPGLGIHMRPLASWL FIFNVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGELF RWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAK DRPEIWEGEPPCVPPRDSLNQSLSQDLTMAPGSTLWLSCGV PPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKDDRPARDMWVM ETGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNLTMSFHLEITARPVLWH WLLRTGGWKVSAVTLAYLIFCLCSLVGILHLQRALVLRRK RKRMTDPTRRFFKVTPPPGSGPQNQYGNVLSLPTPTSGLGR AQRWAAGLGGTAPSYGNPSSDVQADGALGSRSPPGVGPEE EEGEGYEEPDSEEDSEFYENDSNLGQDQLSQDGSGYENPED EPLGPEDEDSFSNAESYENEDEELTQPVARTMDFLSPHGSA WDPSREATSLGSQSYEDMRGILYAAPQLRSIRGQPGPNHEE DADSYENMDNPDGPDPAWGGGGRMGTWSTR (SEQ ID NO: 17)
CD20	MTTPRNSVNGTFPAEPMKGPIAMQSGPKPLFRRMSSLVGPT QSFFMRESKTLGAVQIMNGLFHIALGGLLMIPAGIYAPICVT VWYPLWGGIMYIISGSLLAATEKNSRKCLVKGKMIMNSLS LFAAISGMILSIMDILNIKISHFLKMESLNFIRAHTPYINIYNC EPANPSEKNSPSTQYCYSIQSLFLGILSVMLIFAFFQELVIAGI VENEWKRTCSRPKSNIVLLSAEEKKEQTIEIKEEVVGLTETS SQPKNEEDIEIIPIQEEEEEETETNFPEPPQDQESSPIENDSSP (SEQ ID NO: 18)

[0143]

ROR1	MHRPRRRGTRPPLLALLAALLLAARGAAAQETELSVSAEL VPTSSWNISSELNKDSYLTLDEPMNNITTSLGQTAELHCKV SGNPPPTIRWFKNDAPVVQEPRRLSFRSTIYGSRLRIRNLDT TDTGYFQCVATNGKEVVSSTGVLFVKFGPPPTASPGYSDEY EEDGFCQPYRGIACARFIGNRTVYMESLHMQGEIENQITAA FTMIGTSSHLSDKCSQFAIPSLCHYAFPYCDETSSVPKPRDL CRDECEILENVLCQTEYIFARSNPMILMRLKLPNCEDLPQPE SPEAANCIRIGIPMADPINKNHKCYNSTGVDYRGTVSVTKS GRQCQPWNSQYPHTHTFTALRFPELNGGHSYCRNPGNQKE APWCFTLDENFKSDLCDIPACDSKDSKEKNKMEILYILVPS VAIPLAIALLFFFICVCRNNQKSSSAPVQRQPKHVRGQNVE MSMLNAYKPKSKAKELPLSAVRFMEELGECAFGKIYKGHL YLPGMDHAQLVAIKTLKDYNNPQQWTEFQQEASLMAELH HPNIVCLLGAVTQEQPVCMLFEYINQGDLHEFLIMRSPHSD VGCSSDEDGTVKSSLDHGDFLHIAIQIAAGMEYLSSHFFVH KDLAARNILIGEQLHVKISDLGLSREIYSADYYRVQSKSLLP IRWMPPEAIMYGKFSSDSDIWSFGVVLWEIFSFGLQPYYGF SNQEVIEMVRKRQLLPCSEDCPPRMYSLMTECWNEIPSRRP RFKDIHVRLRSWEGLSSHTSSTTPSGGNATTQTTSLSASPVS NLSNPRYPNYMFPSQGITPQGQIAGFIGPPIPQNQRFIPINGY PIPPGYAAFPAAHYQPTGPPRVIQHCPPPKSRSPSSASGSTST GHVTSLPSSGSNQEANIPLLPHMSIPNHPGGMGITVFGNKSQ KPYKIDSKQASLLGDANIHGHTESMISAEL (SEQ ID NO: 19)
WT1	MGHHHHHHHHHHSSGHIEGRHMRRVPGVAPTLVRSASETS EKRPFMCAYPGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTGEKPYQCDF KDCERRFFRSDQLKRHQRRHTGVKPFQCKTCQRKFSRSDH LKTHTRTHTGEKPFSCRWPSCQKKFARSDELVRHHNMHQR NMTKLQLAL (SEQ ID NO: 20)
CD33	DPNFWLQVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHPIPYYDKNSPVHG YWFREGAIISRDSPVATNKLDQEVQEETQGRFRLLGDPSRN NCSLSIVDARRRDNGSYFFRMERGSTKYSYKSPQLSVHVTD LTHRPKILIPGTLEPGHSKNLTCSVSWACEQGTPPIFSWLSA APTSLGPRTTHSSVLIITPRPQDHGTNLTCQVKFAGAGVTTE RTIQLNVTYVPQNPTTGIFPGDGSGKQETRAGVVHGAIGGA GVTALLALCLCLIFFIVKTHRRKAARTAVGRNDTHPTTGSA SPKHQKKSKLHGPTETSSCSGAAPTVEMDEELHYASLNFH GMNPSKDTSTEYSEVRTQ (SEQ ID NO: 21)

[0144] 在特定实施方案中，结合结构域可结合PSMA。特异于PSMA的许多抗体是本领域技术人员已知的，并且可容易地表征序列、表位结合和亲和力。在特定实施方案中，结合结构域可包括抗间皮素配体(与治疗卵巢癌、胰腺癌和间皮瘤相关)；抗WT-1(与治疗白血病和卵巢癌相关)；抗HIV-gag(与治疗HIV感染相关)；或抗巨细胞病毒(与治疗CMV疾病诸如疱疹病毒相关)。

[0145] 在特定实施方案中，结合结构域可结合CD19。在特定实施方案中，结合结构域是单链Fv片段(scFv)，其包括特异于CD19的VH和VL区。在特定实施方案中，V_H和V_L区是人。示例性V_H和V_L区包括抗-CD19特异性单克隆抗体FMC63的片段。在特定实施方案中，scFV是包括可变轻链的人或人源化scFV，所述可变轻链包括RASQDISKYLN的CDRL1序列(SEQ ID NO:22)、SRLHSGV的CDRL2序列(SEQ ID NO:23)和GNTLPYTFG的CDRL3序列(SEQ ID NO:24)。在特定实施方案中，scFV是包括可变重链的人或人源化scFV，所述可变重链包括DYGVS的CDRHI序列(SEQ ID NO:25)、VTWGSETTYYNSALKS的CDRH2序列(SEQ ID NO:26)和YAMDYWG的CDRH3序列(SEQ ID NO:27)。其它CD19靶向抗体(诸如SJ25C1和HD37)是已知的。(SJ25C1:Bejcek等，Cancer Res 2005,PMID 7538901;HD37:Pezutto等,JI 1987,PMID 2437199)。SEQ ID NO:28提供抗CD19 scFv(VH-VL)FMC63 DNA序列，并且SEQ ID NO:29提供抗CD19 scFv(VH-VL)FMC63氨基酸序列。

[0146] 在特定实施方案中，结合结构域可结合RORI。在特定实施方案中，scFV是包括可变轻链的人或人源化scFv，所述可变轻链包括ASGFDFSAYYM的CDRL1序列(SEQ ID NO:30)、TIYPSSG的CDRL2序列(SEQ ID NO:31)和ADRATYFCA的CDRL3序列(SEQ ID NO:32)。在特定实施方案中，scFV是包括可变重链的人或人源化scFv，所述可变重链包括DTIDWY的CDRH1序列(SEQ ID NO:33)、VQSDGSYTKRPGVPDR的CDRH2序列(SEQ ID NO:34)和YIGGYVFG的CDRH3序列(SEQ ID NO:35)。特异于RORI的许多抗体是本领域技术人员已知的，并且可容易地表征序列、表位结合和亲和力。

[0147] 在特定实施方案中，结合结构域包括与TCR Vα、Vβ、Cα或Cβ的氨基酸序列至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％、至少99.5％或100％相同的序列，其中每个CDR包括零个变化或至多一个、两个或三个来自特异性结合至感兴趣靶标的TCR或其片段或衍生物的变化。

[0148] 在特定实施方案中，结合结构域Vα、Vβ、Cα或Cβ区可源自或基于已知TCR(例如，高-亲和力TCR)的Vα、Vβ、Cα或Cβ并且当与已知TCR的Vα、Vβ、Cα或Cβ比较时，含有一个或多个(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10个)插入、一个或多个(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10个)缺失、一个或多个(例如，2、3、4、5、6、7、8、9、10个)氨基酸取代(例如，保守氨基酸取代或非保守氨基酸取代)，或上述变化的组合。插入、缺失或取代可在Vα、Vβ、Cα或Cβ区中的任何地方，包括在这些区域的氨基端或羧基端或两端处，条件是每个CDR包括零个变化或至多一个、两个或三个变化，并且提供含有修饰的Vα、Vβ、Cα或Cβ区的结合结构域仍可用与野生型相似的亲和力特异性结合其靶标。

[0149] 在特定实施方案中，本公开的结合结构域VH区可源自或基于已知单克隆抗体的VH，并且当与已知单克隆抗体的V_H比较时，可含有一个或多个(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10个)插入、一个或多个(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10个)缺失、一个或多个(例如，2、3、4、5、6、7、8、9、10个)氨基酸取代(例如，保守氨基酸取代或非保守氨基酸取代)，或上述变化的组合。插入、缺失或取代可在V_H区中的任何地方，包括在此区域的氨基端或羧基端或两端处，条件是每个CDR包括零个变化或至多一个、两个或三个变化，并且提供含有修饰的V_H区的结合结构域仍可用与野生型结合结构域相似的亲和力特异性结合其靶标。

[0150] 在特定实施方案中，本公开的结合结构域中的VL区源自或基于已知单克隆抗体的VL，并且当与已知单克隆抗体的VL比较时，含有一个或多个(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10个)

插入、一个或多个(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10个)缺失、一个或多个(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10个)氨基酸取代(例如,保守氨基酸取代),或上述变化的组合。插入、缺失或取代可在VL区中的任何地方,包括在此区域的氨基端或羧基端或两端处,条件是每个CDR包括零个变化或至多一个、两个或三个变化,并且提供含有修饰的VL区的结合结构域仍可用与野生型结合结构域相似的亲和力特异性结合其靶标。

[0151] 在特定实施方案中,结合结构域包括或是与轻链可变区(VL)或重链可变区(VH)或两者的氨基酸序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%相同的序列,其中每个CDR包括零个变化或至多一个、两个或三个来自特异性结合至感兴趣靶标的单克隆抗体或其片段或衍生物的变化。

[0152] 效应子结构域能够将功能信号传输至细胞。在特定实施方案中,效应子结构域将通过与直接促进细胞响应的一种或多种其它蛋白质关联来直接或间接地促进细胞响应。效应子结构域可在结合至靶细胞上表达的标记物后提供表达CAR的转导淋巴细胞的至少一种功能的活化。淋巴细胞的活化可包括增殖、分化、活化或其它效应子功能中的一种或多种。在特定实施方案中,递送的多核苷酸编码效应子结构域。

[0153] 效应子结构域可包括一个、两个、三个或更多个受体信号传导结构域、细胞内信号传导结构域、共刺激结构域或其组合。来自任何多种信号传导分子(例如,信号转导受体)的任何细胞内效应子结构域、共刺激结构域或两者均可用于本公开的CAR中。

[0154] 示例性效应子结构域包括来自4-1BB、CD3ε、CD3δ、CD3ζ、CD27、CD28(例如SEQ ID NO:36)、CD79A、CD79B、CARD11、DAP10、FcRα、FcRβ、FcRγ、Fyn、HVEM、ICOS、Lck、LAG3、LAT、LRP、NOTCH1、Wnt、NKG2D、OX40、ROR2、Ryk、SLAMF1、Slp76、pTα、TCRα、TCRβ、TRIM、Zap70、PTCH2或其任何组合的那些。

[0155] T细胞活化可以说是由两种不同种类的细胞质信号传导序列介导的:启动抗原依赖性初级活化并提供T细胞受体样信号的那些(原代细胞质信号传导序列)和以抗原非依赖性方式起作用以提供次级或共同刺激信号的那些(次级细胞质信号传导序列)。以刺激方式起作用的原代细胞质信号传导序列可含有信号传导基序,其被称为基于受体酪氨酸的活化基序或iTAM。含有原代细胞质信号传导序列的iTAM的实例包括源自CD3ζ、FeRγ、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的那些。

[0156] 在特定实施方案中,效应子结构域包括与细胞质信号传导蛋白关联的细胞质部分,其中细胞质信号传导蛋白是淋巴细胞受体或其信号传导结构域、包括多种ITAM的蛋白质、共刺激因子或其任何组合。

[0157] 细胞内信号传导结构域的实例包括CD3ζ链的细胞质序列,和/或共同起作用以在CAR接合后启动信号转导的共同受体,以及这些序列的任何衍生物或变体和具有相同功能能力的任何合成序列。在特定实施方案中,CAR的细胞内信号传导结构域可被设计成包括与任何其它所需细胞质结构域组合的细胞内信号传导结构域。例如,CAR的细胞内信号传导结构域可包括细胞内信号传导结构域和共刺激信号传导区。共刺激信号传导区是指包括共刺激分子的细胞内结构域的CAR的一部分。共刺激分子是除表达的标记配体之外的细胞表面分子,其是淋巴细胞对标记物的响应所需的。此类分子的实例包括CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、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。

[0158] 可针对靶标上的各个标记物定制间隔区以优化靶标识别。在特定实施方案中，可基于标记物表位的位置、抗体对表位的亲和力和/或表达CAR的淋巴细胞在体外和/或体内响应于标记物识别而增殖的能力来选择间隔物长度。

[0159] 通常在结合结构域与CAR的跨膜结构域之间发现间隔区。间隔区可提供结合结构域的灵活性，并允许在修饰的细胞中具有高表达水平。在特定实施方案中，间隔区可具有至少10至250个氨基酸、至少10至200个氨基酸、至少10至150个氨基酸、至少10至100个氨基酸、至少10至50个氨基酸或至少10至25个氨基酸，并且包括任何列出范围的端点之间的任何整数。在特定实施方案中，间隔区具有250个氨基酸或更少；200个氨基酸或更少；150个氨基酸或更少；100个氨基酸或更少；50个氨基酸或更少；40个氨基酸或更少；30个氨基酸或更少；20个氨基酸或更少；或10个氨基酸或更少。

[0160] 在特定实施方案中，间隔区可源自免疫球蛋白样分子的铰链区，例如来自人IgG1、人IgG2、人IgG3或人IgG4的全部或部分铰链区。可修饰铰链区以避免不希望的结构相互作用，诸如二聚化。在特定实施方案中，铰链区的全部或一部分可与免疫球蛋白恒定区的一个或多个结构域组合。例如，铰链区的一部分可与CH2或CH3结构域或其变体的全部或一部分组合。

[0161] 本文公开的CAR还可包括跨膜结构域。在特定实施方案中，CAR多核苷酸编码跨膜结构域。跨膜结构域提供CAR在淋巴细胞膜中的锚定。跨膜结构域可源自天然或合成来源。当来源是天然的时，结构域可源自任何膜结合或跨膜蛋白。跨膜区至少包括以下各项的跨膜区：T细胞受体的α、β或ζ链、CD28、CD3、CD45、CD4、CDS、CD9、CD16、CD22；CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CDI34、CDI37和CD154。在特定实施方案中，合成或变体跨膜结构域主要包括疏水残基，诸如亮氨酸和缬氨酸。

[0162] 在特定实施方案中，CAR包括P28z融合受体，其由特异于PSMA(J591)细胞外结构域的单链抗体(scFv)与CD28和CD3ζ细胞质信号传导结构域组成。在特定实施方案中，CAR包括SEQ ID NO:37的P28z CAR。SEQ ID NO:37包括鼠组分。氨基酸位置1-797包括抗PSMA scFv(J592)，而位置797-1477包括鼠CD8跨膜结构域、鼠CD28信号传导结构域和鼠CD3ζ信号传导结构域。任何P28z结构域均可用优化的结构域单独替换。在特定实施方案中，SEQ ID NO:37的位置797-1477内的跨膜结构域和信号传导结构域可特别地用优化用于人或其它动物的结构域替换。在特定实施方案中，结合结构域的任何整体或部分、效应子结构域的任何整体或部分、间隔结构域的任何整体或部分和/或跨膜结构域的任何整体或部分可被优化用于人或其它动物。在特定实施方案中，P28z CAR被优化用于人。当针对人进行优化时，P28z CAR与非人抗体相比在人体中具有降低的免疫原性并且具有较低数量的非免疫原性表位。

[0163] 在特定实施方案中，可使用2A2、R12和R11 mAh(ROR1)以及FMC63 mAb(CD19)的VL和VH链段构建ROR1特异性和CD19特异性CAR。R11和R12的可变区序列提供于Yang等，Plos One6(6)：e21018，2011年6月15日中。每个scFV可通过$(Gly_4Ser)_3$(SEQ ID NO:38)蛋白连接至源自包括'铰链-CH2-CH3'(229AA，SEQ ID NO:40)、'铰链-CH3'(119 AA，SEQ ID NO:41)或仅'铰链'(12AA，SEQ ID NO:42)序列的IgG4-Fc(UniProt数据库：P01861，SEQ ID NO:39)的间隔结构域。所有间隔物均可在位于天然IgG4-Fc蛋白的位置108处的'铰链'结构域内含有S→P取代，并且可连接至人CD28(SEQ ID NO:43，对于示例性全长CD28，参见UniProt：

P10747)的27 AA跨膜结构域,并可连接至效应子结构域信号传导模块,所述打了就跑信号传导模块包括(i)人CD28的41 AA细胞质结构域,其中LL→GG取代位于天然CD28蛋白(SEQ ID NO:44)的位置186-187处或(ii)人4-1BB(UniProt:Q07011,SEQ ID NO:45)的42AA细胞质结构域,其中每个均可连接至人CD3ζ(UniProt:P20963,SEQ ID NO:46)的同种型3的112AA细胞质结构域。所述构建体编码嵌合受体下游的T2A核糖体跳跃元件(SEQ ID NO:47)和tEGFR序列(SEQ ID NO:48)。tEGFR可用结合序列的标签盒(诸如STREPTAG® II(SEQ ID NO:49)、Myc标签(SEQ ID NO:50)、V5标签(SEQ ID NO:51)、FLAG®标签(SEQ ID NO:52)、His标签或本文公开的其它肽或分子)替换或补充。可合成编码每种转基因的密码子优化的基因序列(Life Technologies),并使用NheI和Not1限制性位点将其克隆到epHIV7慢病毒载体中。epHIV7慢病毒载体可通过用EF-1启动子替换pHIV7的巨细胞病毒启动子而源自pHIV7载体。可使用包装载体pCHGP-2、pCMV-Rev2和pCMV-G以及CALPHOS®转染试剂(Clontech)在293T细胞中产生ROR1-嵌合受体、CD19-嵌合受体、tEGFR或编码标签盒的慢病毒。

[0164] HER2特异性嵌合受体可使用识别HER2上的膜近端表位的HER2特异性mAb的VL和VH链段来构建,并且scFV可连接至IgG4铰链/CH2/CH3、IgG4铰链/CH3和仅IgG4铰链细胞外间隔结构域,并且连接至CD28跨膜结构域、4-1BB和CD3ζ信号传导结构域。

[0165] CD19嵌合受体可单独或串联地包括对应于CD19特异性mAb FMC63(scFv:VL-VH)的序列的单链可变片段、源自包括'铰链-CH2-CH3′结构域(229AA,长间隔物)或仅′铰链′结构域(12AA,短间隔物)的IgG4-Fc的间隔物,以及具有膜近端CD28或4-1BB共刺激结构域的CD3ζ的信号传导模块。转基因盒可包括嵌合受体基因下游的截短的EGFR(tEGFR),并且可被可切割T2A元件分开,以用作用于嵌合受体修饰的细胞的转导、选择和体内追踪的标签序列。tEGFR可用结合ExoCBM的标签盒(诸如STREPTAG® II(SEQ ID NO:49)、Myc标签(SEQ ID NO:50)、V5标签(SEQ ID NO:51)、FLAG®标签(SEQ ID NO:52)、His标签或本文公开的其它肽或分子)替换或补充。

[0166] 编码不同配体结合结构域、不同间隔区长度、不同细胞内结合结构域和/或不同跨膜结构域的不同潜在CAR核酸构建体可在体内(在动物模型中)和/或体外测试,以鉴定与比非遗传修饰的淋巴细胞和/或其它CAR相比具有改善功能的CAR。在特定实施方案中,CAR独立于本文所述的打了就跑效应或者除本文所述的打了就跑效应之外进行表达。

[0167] 本文公开的纳米载体的尺寸可在宽范围内变化,并且可以不同的方式测量。例如,本公开的纳米载体可具有100nm的最小尺寸。本公开的纳米载体还可具有等于或小于500nm、小于150nm、小于100nm、小于90nm、小于80nm、小于70nm、小于60nm、小于50nm、小于40nm、小于30nm、小于20nm或小于10nm的最小尺寸。在特定实施方案中,纳米载体可具有5nm与500nm之间、10nm与100nm之间、20nm与90nm之间、30nm与80nm之间、40nm与70nm之间以及40nm与60nm之间范围内的最小尺寸。在特定实施方案中,所述尺寸是纳米颗粒或涂覆的纳米颗粒的直径。在特定实施方案中,本公开的纳米载体群可具有等于或小于500nm、小于100nm、小于90nm、小于80nm、小于70nm、小于60nm、小于50nm、小于40nm、小于30nm、小于20nm或小于10nm的平均最小尺寸。在特定实施方案中,本公开组合物中的纳米载体群可具有5nm与500nm之间、10nm与100nm之间、20nm与90nm之间、30nm与80nm之间、40nm与70nm之间以及

40nm与60nm之间范围内的平均直径。纳米载体的尺寸可使用例如常规技术(诸如动态光散射和/或电子显微术)测定。

[0168] 离体使用方法.本文公开的纳米载体可用于离体细胞制造(参见例如,图1A和4C)。例如,所述方法可包括从受试者获得淋巴细胞。淋巴细胞可例如使用本领域公知的任何程序从受试者获得。

[0169] 淋巴细胞的来源包括脐带血、胎盘血和外周血。关于血液样品的收集、抗凝和加工等的方法是已知的。参见例如,Alsever等,1941,N.Y.St.J.Med.41:126;De Gowin等,1940,J.Am.Med.Ass.114:850;Smith等,1959,J.Thorac.Cardiovasc.Surg.38:573;Rous和Turner,1916,J.Exp.Med.23:219;以及and Hum,1968,Storage of Blood,Academic Press,New York,第26-160页。淋巴细胞的来源还包括来自年龄适当供体的骨髓(参见Kodo等,1984,J.Clin Invest.73:1377-1384)、胚胎细胞、主动脉-性腺-中肾细胞来源的细胞、淋巴、肝、胸腺和脾脏。可筛选所有收集的淋巴细胞样品的不需要组分,并根据当时公认的现行标准进行丢弃、处理或使用。

[0170] 在特定实施方案中,在将淋巴细胞暴露于本文公开的纳米载体之前,不需要进一步收集或分离淋巴细胞,因为纳米载体选择性靶向异质细胞群内的选择的细胞类型。

[0171] 在特定实施方案中,在暴露于本文公开的纳米载体之前进行一些进一步的细胞收集和分离可能是有益的。可使用任何适当的技术从样品中收集和分离淋巴细胞。适当的收集和分离程序包括磁性分离;荧光活化细胞分选(FACS;Williams等,1985,J.Immunol.135:1004;Lu等,1986,Blood 68(1):126-133);亲和色谱法;将药剂加入到单克隆抗体中或与单克隆抗体联合使用;用粘附至固体基质的抗体“淘选”(Broxmeyer等,1984,J.Clin.Invest.73:939-953);使用凝集素诸如大豆进行选择性凝集(Reisner等,1980,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.77:1164);等。特定实施方案可利用有限的分离。有限的分离是指例如,通过去除红细胞和/或粘附的吞噬细胞进行的粗细胞富集。

[0172] 在特定实施方案中,可使用直接或间接与磁性颗粒缀合的抗CD8或抗CD34抗体结合磁性细胞分离器,例如CliniMACS®细胞分离系统(Miltenyi Biotec,Bergisch Gladbach,Germany)处理受试者样品(例如血液样品)以选择/富集CD8+ T细胞或CD34+ HSPC。相似地,表达任何上述标记物(例如,T细胞α链;T细胞β链;T细胞γ链;T细胞δ链;CCR7;CD1a;CD1b;CD1c;CD1d;CD3;CD4;CD5;CD7;CD8;CD11b;CD11c;CD16;CD19;CD20;CD21;CD22;CD25;CD28;CD34;CD35;CD40;CD39;CD45RA;CD45RO;CD46;CD52;CD56;CD62L;CD68;CD69;CD80;CD86;CD95;CD101;CD117;CD127;CD133;CD137(4-1BB);CD148;CD163;CD209;DEC-205;F4/80;IL-4Rα;Sca-1;CTLA-4;GITR;GARP;LAP;颗粒酶B;LFA-1;转铁蛋白受体)的淋巴细胞可被分离和富集以用于使用抗体或其它结合结构域用于这些标记物。

[0173] 在特定实施方案中,纳米载体将在扩增程序之前或初期阶段与淋巴细胞结合。此方法将允许修饰较少数量的细胞,其中随着细胞扩增,所述修饰在整个细胞群中传播。在特定实施方案中,在暴露于本文公开的基于瞬时表达提供打了就跑效应的纳米载体后,可发生修饰的淋巴细胞的扩增。

[0174] 扩增可在一种或多种生长因子的存在下发生,诸如:血管生成素样蛋白(Angptl,例如Angptl2、Angptl3、AngptI7、Angpt15和Mfap4);促红细胞生成素;成纤维细胞生长因子-1(FGF-1);Flt-3配体(Flt-3L);粒细胞集落刺激因子(G-CSF);粒细胞-巨噬细胞集落刺

激因子(GM-CSF)；胰岛素生长因子-2(IFG-2)；白细胞介素-3(Il-3)；白细胞介素-6(Il-6)；白细胞介素-7(Il-7)；白细胞介素-11(IL-11)；干细胞因子(SCF；也称为c-kit配体或肥大细胞生长因子)；血小板生成素(TPO)；及其类似物(其中所述类似物包括具有天然存在生长因子的生物活性的生长因子的任何结构变体；参见例如，WO 2007/1145227和美国专利公布号2010/0183564)。

[0175] 在特定实施方案中，适于扩增淋巴细胞的生长因子的量或浓度是有效促进增殖的量或浓度。优选地扩增淋巴细胞群直至获得足够数量的细胞，以提供至少一次将通常约10^4个细胞/kg至10^9个细胞/kg输注到人受试者中。

[0176] 适于扩增淋巴细胞的生长因子的量或浓度取决于生长因子制剂的活性和生长因子与淋巴细胞之间的物种对应等。通常，当生长因子和淋巴细胞属于同一物种时，培养基中生长因子的总量范围为1ng/ml至5μg/ml、5ng/ml至1μg/ml或5ng/ml至250ng/ml。在特定实施方案中，生长因子的量可在5-1000或50-100ng/ml范围内。

[0177] 在特定实施方案中，生长因子以下列浓度存在于扩增培养条件下：25-300ng/ml SCF、25-300ng/ml Flt-3L、25-100ng/ml TPO、25-100ng/ml IL-6和10ng/ml IL-3。在特定实施方案中，可使用50、100或200ng/ml SCF；50、100或200ng/ml Flt-3L；50或100ng/ml TPO；50或100ng/ml IL-6；以及10ng/ml IL-3。

[0178] 淋巴细胞可在组织培养皿中扩增，其上结合细胞外基质蛋白，诸如纤连蛋白(FN)或其片段(例如，CH-296(Dao等，1998，Blood 92(12)：4612-21))或RetroNectin®(重组人纤连蛋白片段；(Clontech Laboratories，Inc.，Madison，WI)。

[0179] Notch激动剂对于扩增HSC特别有用。在特定实施方案中，HSC可通过将HSC暴露于以下来扩增：固定化Notch激动剂和50ng/ml或100ng/ml SCF；固定化Notch激动剂和50ng/ml或100ng/ml Flt-3L、IL-6、TPO和SCF中的每个；或固定化Notch激动剂和50ng/ml或100ng/ml Flt-3L、IL-6、TPO和SCF中的每个，以及10ng/ml IL-11或IL-3。

[0180] 如所指出的，淋巴细胞是从受试者获得的。在特定实施方案中，以治疗有效量将打了就跑修饰和扩增的淋巴细胞重新引入到从其得到原始样品的同一受试者中。在特定实施方案中，以治疗有效量向不同受试者施用打了就跑修饰和扩增的淋巴细胞。治疗有效量在本文其它地方更详细地描述。

[0181] 在这些实施方案中，可将打了就跑修饰和扩增的淋巴细胞配制成基于细胞的组合物用于向受试者施用。基于细胞的组合物是指用药学上可接受的载体制备的扩增细胞用于向受试者施用。在特定实施方案中，在完成扩增和施用制剂后，一旦合理地可能，将基于细胞的组合物向有需要的受试者施用。

[0182] 在特定实施方案中，冷冻保存细胞可能是必要的或有益的。术语“冷冻(frozen)/冷冻(freezing)”和“冷冻保存(cryopreserved)/冷冻保存(cryopreserving)”可互换使用。冷冻包括冷冻干燥。

[0183] 如本领域普通技术人员所理解的，细胞的冷冻可能是破坏性的(参见Mazur，P.，1977，Cryobiology 14：251-272)，但有许多程序可用于防止这种损坏。例如，可通过(a)使用冷冻保护剂，(b)控制冷冻速率，和/或(c)在足够低的温度下储存以使降解反应最小化来避免损坏。示例性冷冻保护剂包括二甲基亚砜(DMSO)(Lovelock和Bishop，1959，Nature 183：1394-1395；Ashwood-Smith，1961，Nature 190：1204-1205)、甘油、聚乙烯吡咯烷酮

(Rinfret,1960,Ann.N.Y.Acad.Sci.85:576)、聚乙二醇(Sloviter和Ravdin,1962,Nature 196:548)、白蛋白、葡聚糖、蔗糖、乙二醇、i-赤藓糖醇、D-核糖醇、D-甘露醇(Rowe等,1962,Fed.Proc.21:157)、D-山梨糖醇、i-肌醇、D-乳糖、氯化胆碱(Bender等,1960,J.Appl.Physiol.15:520)、氨基酸(Phan The Tran和Bender,1960,Exp.Cell Res.20:651)、甲醇、乙酰胺、单乙酸甘油酯(Lovelock,1954,Biochem.J.56:265)和无机盐(Phan The Tran和Bender,1960,Proc.Soc.Exp.Biol.Med.104:388;Phan The Tran和Bender,1961,in Radiobiology,Proceedings of the Third Australian Conference on Radiobiology,Ilbery编辑,Butterworth,London,第59页)。在特定实施方案中,可使用DMSO。添加血浆(例如,浓度为20%-25%)可增强DMSO的保护作用。加入DMSO后,可将细胞保持在0℃下直至冷冻,因为1%浓度的DMSO在高于4℃的温度下可能有毒。

[0184] 在细胞的冷冻保存中,缓慢控制的冷却速率可能是关键的,并且不同的冷冻保护剂(Rapatz等,1968,Cryobiology 5(1):18-25)和不同的细胞类型具有不同的最佳冷却速率(参见例如,Rowe和Rinfret,1962,Blood 20:636;Rowe,1966,Cryobiology 3(1):12-18;Lewis等,1967,Transfusion 7(1):17-32;以及Mazur,1970,Science 168:939-949for effects of cooling velocity on survival of stem cells and on their transplantation potential)。水变成冰的融化阶段的热量应是最小的。冷却程度可通过使用例如可编程冷冻装置或甲醇浴程序来进行。可编程冷冻设备允许确定最佳冷却速率并促进标准的可再现冷却。

[0185] 在特定实施方案中,可将DMSO处理的细胞在冰上预冷却并转移至含有冷甲醇的托盘中,继而将其置于-80℃下的机械冷冻机(例如,Harris或Revco)中。甲醇浴和样品的热电偶测量表明1℃至3℃/分钟的冷却速率可能是优选的。在至少两个小时后,样本可达到-80℃的温度并且可直接置于液氮(-196℃)中。

[0186] 在彻底冷冻后,可将细胞快速转移至长期低温储存容器中。在特定实施方案中,样品可低温储存在液氮(-196℃)或蒸气(-1℃)中。高效液氮冷冻机的可用性促进了这种储存。

[0187] 操作、冷冻保存和细胞长期储存的进一步考虑和程序,可见于以下示例性参考:美国专利号4,199,022;3,753,357;和4,559,298;Gorin,1986,Clinics In Haematology 15(1):19-48;Bone-Marrow Conservation,Culture and Transplantation,Proceedings of a Panel,Moscow,1968年7月22-26日,International Atomic Energy Agency,Vienna,第107-186页;Livesey和Linner,1987,Nature 327:255;Linner等,1986,J.Histochem.Cytochem.34(9):1123-1135;Simione,1992,J.Parenter.Sci.Technol.46(6):226-32)。

[0188] 在冷冻保存后,可解冻冷冻细胞用于根据本领域普通技术人员已知的方法进行使用。冷冻细胞优选地快速解冻并在解冻后立即冷藏。在特定实施方案中,含有冷冻细胞的小瓶可在温水浴中浸入高达其颈部;温和旋转将确保细胞悬浮液在解冻时混合,并增加从温水至内部冰块的热传递。一旦冰完全融化,可立即将小瓶置于冰上。

[0189] 在特定实施方案中,可使用方法来防止解冻期间的细胞团聚。示例性方法包括:在DNase冷冻之前和/或之后添加(Spitzer等,1980,Cancer 45:3075-3085)低分子量葡聚糖和柠檬酸盐、羟乙基淀粉(Stiff等,1983,Cryobiology 20:17-24)等。

[0190] 如本领域普通技术人员所理解的，如果使用了对人有毒的冷冻保护剂，则应在治疗用途之前将其去除。DMSO没有严重的毒性。

[0191] 细胞的示例性载体和施用模式描述于美国专利公布号2010/0183564的第14-15页中。另外的药用载体描述于Remington:The Science and Practice of Pharmacy,21st Edition,David B.Troy编,Lippicott Williams&Wilkins(2005)中。

[0192] 在特定实施方案中，可从培养基中收获细胞，并且将其以治疗有效量洗涤并浓缩到载体中。示例性载体包括盐水、缓冲盐水、生理盐水、水、汉克斯溶液(Hanks′solution)、林格氏溶液(Ringer′s solution)、Nonnosol-R(Abbott Labs)、Plasma-Lyte A® (Baxter Laboratories,Inc.,Morton Grove,IL)、甘油、乙醇及其组合。

[0193] 在特定实施方案中，载体可补充有人血清白蛋白(HSA)或其它人血清组分或胎牛血清。在特定实施方案中，用于输注的载体包括含有5％HAS或右旋糖的缓冲盐水。另外的等渗剂包括多元糖醇，其包括三元或更高级糖醇，诸如甘油、赤藓糖醇、阿糖醇、木糖醇、山梨糖醇或甘露糖醇。

[0194] 载体可包括缓冲剂，诸如柠檬酸盐缓冲剂、琥珀酸盐缓冲剂、酒石酸盐缓冲剂、富马酸盐缓冲剂、葡糖酸盐缓冲剂、草酸盐缓冲剂、乳酸盐缓冲剂、乙酸盐缓冲剂、磷酸盐缓冲剂、组氨酸缓冲剂和/或三甲胺盐。

[0195] 稳定剂是指广泛类别的功能范围从增量剂至添加剂的赋形剂，其有助于防止细胞粘附至容器壁。典型的稳定剂可包括多元糖醇;氨基酸，诸如精氨酸、赖氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、丙氨酸、鸟氨酸、L-亮氨酸、2-苯丙氨酸、谷氨酸和苏氨酸;有机糖或糖醇，诸如乳糖、海藻糖、水苏糖、甘露醇、山梨糖醇、木糖醇、核糖醇、肌醇(myoinisitol)、半乳糖醇、甘油和环醇，诸如肌醇(inositol);PEG;氨基酸聚合物;含硫还原剂，诸如尿素、谷胱甘肽、硫辛酸、硫代乙酸钠、硫代甘油、α-硫代甘油和硫代硫酸钠;低分子量多肽(即＜10个残基);蛋白质诸如HSA、牛血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物诸如聚乙烯吡咯烷酮;单糖诸如木糖、甘露糖、果糖和葡萄糖;二糖诸如乳糖、麦芽糖和蔗糖;三糖诸如棉子糖，以及多糖诸如葡聚糖。

[0196] 在必要或有益的情况下，基于细胞的组合物可包括局部麻醉剂，诸如利多卡因，以缓解注射部位处的疼痛。

[0197] 示例性防腐剂包括苯酚、苯甲醇、间甲酚、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、十八烷基二甲基苄基氯化铵、苯扎卤铵、氯化六甲双铵、对羟基苯甲酸烷基酯诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯、儿茶酚、间苯二酚、环己醇和3-戊醇。

[0198] 基于细胞的组合物内的治疗有效量的细胞可大于10^2个细胞、大于10^3个细胞、大于10^4个细胞、大于10^5个细胞、大于10^6个细胞、大于10^7个细胞、大于10^8个细胞、大于10^9个细胞、大于10^{10}个细胞或大于10^{11}个。

[0199] 在本文公开的基于细胞的组合物中，细胞通常为1升或更少、500mL或更少、250mL或更少或者100mL或更少的体积。因此，施用细胞的密度通常为大于10^4个细胞/mL、10^7个’细胞/mL或10^8个细胞/mL。

[0200] 本文公开的基于细胞的组合物可被制备用于通过例如注射、输注、灌注或灌洗来施用。基于细胞的组合物可进一步被配制用于骨髓、静脉内、皮内、动脉内、结节内、淋巴管内、腹膜内、病灶内、前列腺内、阴道内、直肠内、局部、鞘内、肿瘤内、肌肉内、囊内和/或皮下

注射。

[0201] 用于体内使用方法的组合物.本文公开的纳米载体还可被配制成用于直接向受试者施用的组合物,其中选择性靶向以及打了就跑修饰在体内发生(如本领域普通技术人员所理解的,本文所述的离体和体内方法不是互相排斥的并且可组合实施)。这些组合物在本文中称为基于纳米载体的组合物。

[0202] 在特定实施方案中,纳米载体作为基于纳米载体的组合物的一部分提供,所述基于纳米载体的组合物可包括至少0.1%w/v或w/w的纳米载体;至少1%w/v或w/w/的纳米载体;至少10%w/v或w/w/的纳米载体;至少20%w/v或w/w/的纳米载体;至少30%w/v或w/w/的纳米载体;至少40%w/v或w/w/的纳米载体;至少50%w/v或w/w/的纳米载体;至少60%w/v或w/w/的纳米载体;至少70%w/v或w/w/的纳米载体;至少80%w/v或w/w/的纳米载体;至少90%w/v或w/w/的纳米载体;至少95%w/v或w/w/的纳米载体;或者至少99%w/v或w/w/的纳米载体。

[0203] 本文公开的基于纳米载体的组合物可被配制用于通过注射、吸入、输注、灌注、灌洗或摄取来施用。本文公开的基于纳米载体的组合物可进一步被配制用于静脉内、皮内、动脉内、结节内、淋巴管内、腹膜内、病灶内、前列腺内,阴道内,直肠内、局部、鞘内、肿瘤内、肌肉内、囊内、口腔和/或皮下施用,并且更特别地通过静脉内、皮内、动脉内、结节内、淋巴管内、腹膜内、病灶内、前列腺内,阴道内,直肠内、局部、鞘内、肿瘤内、肌肉内、囊内、口腔和/或皮下注射。

[0204] 对于注射,基于纳米载体的组合物可被配制成诸如在包括汉克斯溶液、林格氏溶液或生理盐水的缓冲液中的水性溶液。水性溶液可含有配制剂,诸如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。可替代地,制剂可呈冻干的和/或粉末形式用于在使用之前用适合的媒介物(例如,无菌的无热原水)构成。

[0205] 对于口服施用,基于纳米载体的组合物可被配制成片剂、丸剂、糖衣丸、胶囊、液体、凝胶、糖浆、浆液、混悬液等。对于口服固体制剂,例如像粉末、胶囊和片剂,合适的赋形剂包括粘合剂(黄蓍胶、阿拉伯树胶、玉米淀粉、明胶)、填充剂诸如糖(例如乳糖、蔗糖、甘露醇和山梨糖醇);磷酸二钙、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁;纤维素制剂,诸如玉米淀粉、小麦淀粉、大米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄蓍胶、甲基纤维素、羟丙基甲基-纤维素、羧甲基纤维素钠-甲基纤维素和/或聚乙烯吡咯烷酮(PVP);成粒剂;以及粘合剂。如果需要,可添加崩解剂,诸如玉米淀粉、马铃薯淀粉、藻酸、交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或藻酸或其盐,诸如藻酸钠。如果需要,可使用标准技术将固体剂型糖包衣或肠溶包衣。还可使用调味剂,诸如胡椒薄荷、冬青油、樱桃调味剂、橙子调味剂等。

[0206] 对于通过吸入施用,基于纳米载体的组合物可被配制成来自加压包装或喷雾器的气溶胶喷雾,其中使用适合的推进剂(例如,二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它合适气体)。在加压气雾剂的情况下,可通过提供阀门以便递送计量的量来确定剂量单位。可配制含有治疗剂与合适粉末基质(诸如乳糖或淀粉)的粉末混合物的用于在吸入器或吹入器中使用的明胶的胶囊和药筒。

[0207] 本文公开的任何基于纳米载体的组合物制剂可有利地包括任何其它药学上可接受的载体,其包括不产生超过施用益处的显著不利、过敏或其它不良反应的那些,无论是用于研究、预防和/或治疗性治疗。示例性药学上可接受的载体和制剂公开于Remington′s

Pharmaceutical Sciences,第18版Mack Printing Company,1990中。此外,可制备制剂以满足美国FDA生物标准办公室和/或其它相关外国管理机构所要求的无菌、致热性、一般安全性和纯度标准。

[0208] 示例性通常使用的药学上可接受的载体包括任何和所有增量剂或填充剂、溶剂或共溶剂、分散介质、包衣、表面活性剂、抗氧化剂(例如抗坏血酸、蛋氨酸、维生素E)、防腐剂、等渗剂、吸收延迟剂、盐、稳定剂、缓冲剂、螯合剂(例如EDTA)、凝胶、粘合剂、崩解剂和/或润滑剂。

[0209] 示例性缓冲剂包括柠檬酸盐缓冲剂、琥珀酸盐缓冲剂、酒石酸盐缓冲剂、富马酸盐缓冲剂、葡糖酸盐缓冲剂、草酸盐缓冲剂、乳酸盐缓冲剂、乙酸盐缓冲剂、磷酸盐缓冲剂、组氨酸缓冲剂和/或三甲胺盐。

[0210] 示例性防腐剂包括苯酚、苯甲醇、间甲酚、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、十八烷基二甲基苄基氯化铵、苯扎卤铵、氯化六甲双铵、对羟基苯甲酸烷基酯诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯、儿茶酚、间苯二酚、环己醇和3-戊醇。

[0211] 示例性等渗剂包括多元糖醇,其包括三元或更高级糖醇,诸如甘油、赤藓糖醇、阿糖醇、木糖醇、山梨糖醇或甘露糖醇。

[0212] 示例性稳定剂包括有机糖、多元糖醇、聚乙二醇;含硫还原剂、氨基酸、低分子量多肽、蛋白质、免疫球蛋白、亲水聚合物或多糖。

[0213] 基于纳米载体的组合物还可被配制成贮库型制剂。贮库型制剂可用合适的聚合或疏水材料(例如,配制为在可接受的油中的乳剂)或离子交换树脂配制,或配制为微溶性衍生物,例如配制为微溶性盐。

[0214] 另外,基于纳米载体的组合物可被配制成利用含有至少一种活性成分的固体聚合物的半透性基质的持续释放系统。已建立了各种持续释放材料,并且这些材料是本领域普通技术人员所熟知的。根据其化学性质,持续释放系统可在施用数周后释放活性成分直至超过100天。

[0215] 使用方法.本文公开的方法包括用本文公开的基于细胞的组合物和基于纳米载体的组合物治疗受试者(人、兽医动物、家畜和研究动物)。如所指出的,所述组合物可治疗范围从癌症至感染性疾病的多种不同病状。所述组合物还可用作疫苗佐剂。

[0216] 治疗受试者包括递送治疗有效量。治疗有效量可提供有效量、预防性治疗和/或治疗性治疗。

[0217] “有效量”是在受试者中产生所需生理变化所必需的化合物的量。有效量经常用于研究目的。本文公开的有效量改变细胞的表型,作为基因编辑或表型改变蛋白表达的效果。

[0218] “预防性治疗”包括向未展示出疾病或病状的体征或症状或者仅展示出疾病或病状的早期体征或症状的受试者施用的治疗,这样使得施用治疗以用于减少、预防或降低进一步发展疾病或病状的风险的目的。因此,预防性治疗作为针对疾病或病症的预防性治疗起作用。疫苗是预防性治疗的一个实例。

[0219] 在特定实施方案中,施用预防性治疗以治疗病毒感染,诸如HIV。例如,组合物可预防性地施用于处于发展病毒感染风险下的受试者或已暴露于病毒的受试者中,以预防、减少或延迟病毒感染或疾病的发展。例如,组合物可施用至可能已暴露于病毒(例如HIV)的受试者或处于暴露于病毒的高风险下的受试者。

[0220] “治疗性治疗”包括向展示出疾病或病状的症状或体征的受试者施用的治疗，并且出于减少或消除疾病或病状的这些体征或症状而向受试者施用。

[0221] 预防性和治疗性治疗不需要完全预防或治愈疾病或病状，还可提供部分益处。

[0222] 在癌症的背景下，治疗有效量可减少肿瘤细胞的数量、减少转移的数量、减小肿瘤体积、增加预期寿命、诱导癌细胞的凋亡、诱导癌细胞死亡、诱导癌细胞中的化学或放射敏感性、抑制癌细胞附近的血管生成、抑制癌细胞增殖、抑制肿瘤生长、预防转移、延长受试者的生命、减少癌症相关疼痛、减少转移数量和/或减少治疗后癌症的复发或再发生。

[0223] 在病毒的情况下，治疗有效量可减少病毒感染细胞的数量，并减少与病毒感染相关的一种或多种症状，诸如发烧、发冷、呕吐、关节疼痛等。

[0224] 在HIV的情况下，治疗有效量可减少HIV感染细胞的数量、增加受试者的T细胞数量，降低感染的发生率、频率或严重程度，增加预期寿命、延长受试者的寿命和/或减少与HIV相关的疼痛或认知损害。

[0225] 在疫苗佐剂的背景下，疫苗增加受试者对特定疾病的免疫力，并且疫苗佐剂增强和/或延长这种增加。技术人员将理解，免疫系统通常能够产生先天性免疫响应和适应性免疫响应。先天性免疫响应通常可表征为基本上不是抗原特异性和/或不产生免疫记忆。适应性免疫响应可表征为基本上抗原特异性、随时间成熟(例如，增加抗原的亲和力和/或亲合力)，并且通常可产生免疫记忆。尽管可辨别先天性免疫与适应性免疫之间的这些和其它功能区别，但技术人员将理解，先天性和适应性免疫系统可整合，并且因此可协同作用。

[0226] 对于施用，可基于体外测定和/或动物模型研究的结果初始估计治疗有效量(在本文中也称为剂量)。此类信息可用于更准确地测定感兴趣受试者中的有用剂量。

[0227] 向特定受试者施用的实际剂量可由医生、兽医或研究人员考虑以下参数来确定：诸如受试者的物理和生理因素，包括靶标、体重、病状严重程度、疾病类型、先前或同时的治疗干预、特发性，以及施用途径。

[0228] 本文在其它地方提供了基于细胞的组合物的有用剂量。基于纳米载体的组合物的有用剂量可包括0.1至5μg/kg或0.5至1μg/kg。在其它实例中，基于纳米载体的组合物剂量可包括例如，1μg/kg、10μg/kg、20μg/kg、30μg/kg、40μg/kg、50μg/kg、60μg/kg、70μg/kg、80μg/kg、90μg/kg、100μg/kg、150μg/kg、200μg/kg、250μg/kg、350μg/kg、400μg/kg、450μg/kg、500μg/kg、550μg/kg、600μg/kg、650μg/kg、700μg/kg、750μg/kg、800μg/kg、850μg/kg、900μg/kg、950μg/kg、1000μg/kg、0.1至5mg/kg或0.5至1mg/kg。在其它非限制性实例中，剂量可包括1mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、30mg/kg、40mg/kg、50mg/kg、60mg/kg、70mg/kg、80mg/kg、90mg/kg、100mg/kg、150mg/kg、200mg/kg、250mg/kg、350mg/kg、400mg/kg、450mg/kg、500mg/kg、550mg/kg、600mg/kg、650mg/kg、700mg/kg、750mg/kg、800mg/kg、850mg/kg、900mg/kg、950mg/kg、1000mg/kg或更多。

[0229] 治疗有效量可通过在治疗方案过程中施用单剂量或多剂量来实现(例如，每天、每隔一天、每3天、每4天、每5天、每6天、每周、每2周、每3周、每月、每2个月、每3个月、每4个月、每5个月、每6个月、每7个月、每8个月、每9个月、每10个月、每11个月或每年一次。

[0230] 除非另外指示，否则本公开的实践可采用免疫学、分子生物学、微生物学、细胞生物学和重组DNA的常规技术。这些方法描述于以下出版物中。参见例如，Sambrook等，Molecular Cloning:A Laboratory Manual,2nd Edition(1989);F.M.Ausubel等eds.,

Current Protocols in Molecular Biology,(1987);the series Methods IN Enzymology(Academic Press,Inc.);M.MacPherson等,PCR:A Practical Approach,IRL Press at Oxford University Press(1991);MacPherson等,eds.PCR 2:Practical Approach,(1995);Harlow and Lane,eds.Antibodies,A Laboratory Manual,(1988);和R.I.Freshney编Animal Cell Culture(1987)。

[0231] 由公共数据库提供的序列信息可用于鉴定如本文所公开的待靶向的基因序列和编码表型改变蛋白的核酸序列。示例性序列提供于图11中。

[0232] 还包括本文公开和引用的序列的变体。蛋白质的变体可包括具有一个或多个保守氨基酸取代的那些蛋白质。如本文所用,“保守取代”涉及在以下保守替代组中的一种中发现的取代:第1组:丙氨酸(Ala)、甘氨酸(Gly)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr);第2组:天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu);第3组:天冬酰胺(Asn)、谷氨酰胺(Gln);第4组:精氨酸(Arg)、赖氨酸(Lys)、组氨酸(His);第5组:异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、甲硫氨酸(Met)、缬氨酸(Val);以及第6组:苯丙氨酸(Phe)、酪氨酸(Tyr)、色氨酸(Trp)。

[0233] 另外,氨基酸可通过类似的功能或化学结构或组成(例如,酸性、碱性、脂族、芳香族、含硫的)来分组为保守取代组。例如,出于取代的目的,脂族组可包括Gly、Ala、Val、Leu和Ile。含有被认为是保守取代的氨基酸的其它组包括:含硫的:Met和半胱氨酸(Cys);酸性:Asp、Glu、Asn和Gln;小的脂族非极性或轻微极性的残基:Ala、Ser、Thr、Pro和Gly;极性、带负电荷的残基及其酰胺:Asp、Asn、Glu和Gln;极性、带正电的残基:His、Arg和Lys;大的脂族非极性残基:Met、Leu、Ile、Val和Cys;以及大的芳香族残基:Phe、Tyr和Trp。另外的信息见于Creighton(1984)Proteins,W.H.Freeman and Company。

[0234] 如其它地方所指出的,基因序列的变体可包括密码子优化的变体、序列多态性、剪接变体和/或突变,其不在统计学上显著程度地影响编码产物的功能。

[0235] 本文公开的蛋白质、核酸和基因序列的变体还包括与本文公开的蛋白质、核酸或基因序列具有至少70%序列同一性、80%序列同一性、85%序列、90%序列同一性、95%序列同一性、96%序列同一性、97%序列同一性、98%序列同一性、或99%序列同一性的序列。

[0236] “序列同一性%”是指如通过比较序列所确定的两种或更多种序列之间的关系。在本领域中,“同一性”还意指如通过此类序列串之间的匹配所确定的蛋白质、核酸或基因序列之间的序列相关性程度。“同一性”(经常称为“相似性”)可通过已知方法来容易地计算,所述方法包括(但不限于)在以下中描述的那些:Computational Molecular Biology(Lesk,A.M.编)Oxford University Press,NY(1988);Biocomputing:Informatics and Genome Projects(Smith,D.W.编)Academic Press,NY(1994);Computer Analysis of Sequence Data,Part I(Griffin,A.M.,and Griffin,H.G.编)Humana Press,NJ(1994);Sequence Analysis in Molecular Biology(Von Heijne,G.编)Academic Press(1987);以及Sequence Analysis Primer(Gribskov,M.and Devereux,J.编)Oxford University Press,NY(1992)。确定同一性的优选方法经设计以得到所测试序列之间的最佳匹配。确定同一性和相似性的方法编写于公开可得的计算机程序中。序列比对和同一性百分比计算可使用LASERGENE生物信息学计算套件(DNASTAR,Inc.,Madison,Wisconsin)的Megalign程序来执行。序列的多重比对还可使用Clustal比对方法(Higgins和Sharp CABIOS,5,151-153(1989)以默认参数(缺口罚分=10,缺口长度罚分=10)来执行。相关程序还包括GCG程序套

件(Wisconsin Package第9.0版,Genetics Computer Group(GCG),Madison,Wisconsin);BLASTP、BLASTN、BLASTX(Altschul等,J.Mol.Biol.215:403-410(1990);DNASTAR(DNASTAR,Inc.,Madison,Wisconsin);以及并入Smith-Waterman算法的FASTA程序(Pearson,Comput.Methods Genome Res.,[Proc.Int.Symp.](1994),会议日期1992,111-20.编者:Suhai,Sandor.出版者:Plenum,New York,N.Y.。在本公开的上下文内,将理解在将序列分析软件用于分析的情况下,分析的结果是基于所引用的程序的"默认值"。如本文所用,"默认值"将意指在首次初始化时用软件最初加载的值或参数的任何集合。

[0237] 示例性实施方案

[0238] 1.一种制备选择的造血来源细胞群以用于向受试者施用的方法,其包括:

[0239] 从所述受试者获得样品,其中所述样品包括细胞的异质混合物,所述细胞的异质混合物包括选择的造血来源的细胞群;

[0240] 将所述样品暴露于合成纳米载体,所述纳米载体包括

[0241] (i)包封在带正电荷的载体内的合成核酸,其中所述合成核酸编码基因编辑剂或表型改变蛋白;

[0242] (ii)所述载体外表面上的中性或带负电荷的包衣;和

[0243] (iii)从所述包衣表面延伸的选择的细胞靶向配体;

[0244] 其中所述暴露导致所述纳米载体选择性递送至选择的细胞群,从而导致选择的细胞群内细胞的修饰;并且扩增所述样品内的细胞;

[0245] 从而制备所述选择的细胞群以用于向所述受试者施用。

[0246] 2.如实施方案1所述的方法,其中所述样品内的扩增细胞包括所述选择的细胞群的修饰细胞。

[0247] 3.如实施方案1或2所述的方法,其还包括将所述制备的选择的细胞群配制成基于细胞的组合物。

[0248] 4.如实施方案3所述的方法,其还包括将所述基于细胞的组合物向所述受试者施用。

[0249] 5.如实施方案1-4中任一项所述的方法,其中在所述暴露之前,不采取分离步骤或仅采取有限的分离步骤以增加所述细胞异质混合物中所述选择的细胞群的百分比。

[0250] 6.如实施方案1-5中任一项所述的方法,其中所述合成核酸编码选自转录活化因子样效应核酸酶(TALEN);megaTAL;和/或锌指核酸酶的基因编辑剂。

[0251] 7.如实施方案6所述的方法,其中所述合成核酸编码SEQ ID NO:1的megaTAL。

[0252] 8.如实施方案1-7中任一项所述的方法,其中所述基因编辑剂破坏编码Shp-1磷酸酶、PD1受体、T细胞受体(TCR)、CCR5和/或CXCR4的内源基因。

[0253] 9.如实施方案1-8中任一项所述的方法,其中所述基因编辑剂破坏编码TCRα链的内源基因。

[0254] 10.如实施方案1-9中任一项所述的方法,其中所述合成核酸编码选自转录因子、激酶和/或细胞表面受体的表型改变蛋白。

[0255] 11.如实施方案10所述的方法,其中所述表型改变蛋白选自FOXO1、LKB1、TCF7、EOMES、ID2、TERT、CCR2b和/或CCR4。

[0256] 12.如实施方案1-11中任一项所述的方法,其中所述选择的细胞靶向配体选择性

结合异质细胞群内的淋巴细胞。

[0257] 13.如实施方案12所述的方法,其中所述异质细胞群是离体细胞培养物。

[0258] 14.如实施方案12所述的方法,其中所述异质细胞群是体内的。

[0259] 15.如实施方案1-14中任一项所述的方法,其中所述选择的细胞靶向配体选择性结合T细胞、NK细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、B细胞、造血干细胞或其组合。

[0260] 16.如实施方案1-15中任一项所述的方法,其中所述选择的细胞靶向配体包括选自淋巴细胞受体配体、淋巴细胞受体抗体、淋巴细胞受体肽适体、淋巴细胞受体核酸适体、淋巴细胞受体Spiegelmer或其组合的结合结构域。

[0261] 17.如实施方案1-16中任一项所述的方法,其中所述选择的细胞靶向配体选择性结合T细胞受体基序;T细胞α链;T细胞β链;T细胞γ链;T细胞δ链;CCR7;CD1a;CD1b;CD1c;CD1d;CD3;CD4;CD5;CD7;CD8;CD11b;CD11c;CD16;CD19;CD20;CD21;CD22;CD25;CD28;CD34;CD35;CD39;CD40;CD45RA;CD45RO;CD46,CD52;CD56;CD62L;CD68;CD69;CD80;CD86;CD95;CD101;CD117;CD127;CD133;CD137(4-1BB);CD148;CD163;CD209;DEC-205;F4/80;IL-4Rα;Sca-1;CTLA-4;GITR;GARP;LAP;颗粒酶B;LFA-1;或转铁蛋白受体。

[0262] 18.如实施方案1-17中任一项所述的方法,其中所述选择的细胞靶向配体选择性结合CD1a;CD1b;CD1c;CD1d;CCR7;CD3;CD4;CD5;CD8;CD16;CD19;CD20;CD21;CD22;CD25;CD28;CD35;CD40;CD45RA;CD45RO;CD46;CD52;CD69;CD62L;CD80;CD95;CD127;CD137;CD209;或DEC-205。

[0263] 19.如实施方案1-18中任一项所述的方法,其中所述选择的细胞靶向配体包括选自以下的结合结构域:T细胞α链抗体;T细胞β链抗体;T细胞γ链抗体;T细胞δ链抗体;CCR7抗体;CD1a抗体;CD1b抗体;CD1c抗体;CD1d抗体;CD3抗体;CD4抗体;CD5抗体;CD7抗体;CD8抗体;CD11b抗体;CD11c抗体;CD16抗体;CD19抗体;CD20抗体;CD21抗体;CD22抗体;CD25抗体;CD28抗体;CD34抗体;CD35抗体;CD39抗体;CD40抗体;CD45RA抗体;CD45RO抗体;CD46抗体;CD52抗体;CD56抗体;CD62L抗体;CD68抗体;CD69抗体;CD80抗体;CD86抗体;CD95抗体;CD101抗体;CD1 17抗体;CD127抗体;CD133抗体;CD137(4-1BB)抗体;CD148抗体;CD163抗体;CD209抗体;DEC-205抗体;F4/80抗体;IL-4Rα抗体;Sca-1抗体;CTLA-4抗体;GITR抗体;GARP抗体;LAP抗体;颗粒酶B抗体;LFA-1抗体;或转铁蛋白受体抗体。

[0264] 20.如实施方案1-19中任一项所述的方法,其中所述结合结构域由以下各项的scFv片段组成或基本上由其组成:T细胞α链抗体;T细胞β链抗体;T细胞γ链抗体;T细胞δ链抗体;CCR7抗体;CD1a抗体;CD1b抗体;CD1c抗体;CD1d抗体;CD3抗体;CD4抗体;CD5抗体;CD7抗体;CD8抗体;CD11b抗体;CD11c抗体;CD16抗体;CD19抗体;CD20抗体;CD21抗体;CD22抗体;CD25抗体;CD28抗体;CD34抗体;CD35抗体;CD39抗体;CD40抗体;CD45RA抗体;CD45RO抗体;CD46抗体;CD52抗体;CD56抗体;CD62L抗体;CD68抗体;CD69抗体;CD80抗体;CD86抗体;CD95抗体;CD101抗体;CD117抗体;CD127抗体;CD133抗体;CD137(4-1BB)抗体;CD148抗体;CD163抗体;CD209抗体;DEC-205抗体;F4/80抗体;IL-4Rα抗体;Sca-1抗体;CTLA-4抗体;GITR抗体;GARP抗体;LAP抗体;颗粒酶B抗体;LFA-1抗体;或转铁蛋白受体抗体。

[0265] 21.如实施方案1-20中任一项所述的方法,其中所述合成核酸是合成mRNA。

[0266] 22.如实施方案1-21中任一项所述的方法,其中所述载体包括带正电荷的脂质或聚合物。

[0267] 23.如实施方案22所述的方法,其中所述带正电荷的聚合物包括聚(β-氨基酯、聚(L-赖氨酸)、聚(乙烯亚胺)(PEI)、聚(酰氨基胺)树枝状分子(PAMAM)、聚(氨基-共-酯),聚(甲基丙烯酸二甲氨基乙酯)(PDMAEMA)、壳聚糖、聚-(L-丙交酯-共-L-赖氨酸)、聚[α-(4-氨基丁基)-L-乙醇酸](PAGA)或聚(4-羟基-L-脯氨酸酯)(PHP)。

[0268] 24.如实施方案1-23中任一项所述的方法,其中所述包衣包含中性或带负电荷的脂质或聚合物。

[0269] 25.如实施方案24所述的方法,其中所述中性或带负电荷的包衣包含聚谷氨酸(PGA)、聚(丙烯酸)、藻酸或半琥珀酸胆甾醇酯/1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺。

[0270] 26.如实施方案24或25所述的方法,其中所述中性或带负电荷的包衣包含两性离子聚合物。

[0271] 27.如实施方案24-26中任一项所述的方法,其中所述中性或带负电荷的包衣包含脂质体。

[0272] 28.如实施方案27所述的方法,其中所述脂质体包括1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)、1,2-二-O-十八烯基-3-三甲基铵丙烷(DOTMA)、3β-[N-(N′,N′-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基]胆固醇(DC-Chol)、二十八烷基-氨基甘氨酰精胺(DOGS)、胆固醇,1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE)或1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DOPC)。

[0273] 29.如实施方案1-28中任一项所述的方法,其中所述选择的细胞靶向配体选择性结合CD4和/或CD8。

[0274] 30.如实施方案1-29中任一项所述的方法,其中所述选择的细胞靶向配体包括选自CD4抗体和/或CD8抗体的结合结构域。

[0275] 31.如实施方案1-30中任一项所述的方法,其中所述选择的细胞靶向配体包括选自CD4抗体和/或CD8抗体的scFv片段的结合结构域。

[0276] 32.如实施方案1-31中任一项所述的方法,其中所述载体包含聚(β-氨基酯)。

[0277] 33.如实施方案1-32中任一项所述的方法,其中所述包衣包含聚谷氨酸(PGA)。

[0278] 34.如实施方案1-33中任一项所述的方法,其中所述选择的细胞靶向配体包括选自CD4抗体和/或CD8抗体的结合结构域;所述载体包括聚(β-氨基酯);并且所述包衣包含聚谷氨酸(PGA)。

[0279] 35.一种用于制备细胞以治疗受试者的方法,其包括:

[0280] 从受试者获得淋巴细胞;

[0281] 将所述淋巴细胞与合成纳米载体合并,所述合成纳米载体包括

[0282] (i)包封在带正电荷的载体内的合成核酸,其中所述合成核酸编码基因编辑剂或表型改变蛋白;

[0283] (ii)所述载体外表面上的中性或带负电荷的包衣;和

[0284] (iii)从所述包衣表面延伸的选择的细胞靶向配体;

[0285] 其中在所述合并后,将所述纳米载体选择性地掺入所述淋巴细胞中,使得所述淋巴细胞瞬时表达所述核酸。

[0286] 36.如实施方案35所述的方法,其还包括扩增所述淋巴细胞。

[0287] 37.如实施方案35或36所述的方法,其还包括将所述淋巴细胞配制成基于细胞的组合物。

[0288] 38.如实施方案35-37中任一项所述的方法，其中在所述暴露之前，不采取分离步骤或仅采取有限的分离步骤以增加所述细胞异质混合物中所述选择的细胞群的百分比。

[0289] 39.如实施方案35-38中任一项所述的方法，其中所述合成核酸编码选自转录活化因子样效应核酸酶(TALEN)；megaTAL；和/或锌指核酸酶的基因编辑剂。

[0290] 40.如实施方案35-39中任一项所述的方法，其中所述合成核酸编码SEQ ID NO:1的megaTAL。

[0291] 41.如实施方案35-40中任一项所述的方法，其中所述基因编辑剂破坏编码Shp-1磷酸酶、PD1受体、T细胞受体(TCR)、CCR5和/或CXCR4的内源基因。

[0292] 42.如实施方案35-41中任一项所述的方法，其中所述基因编辑剂破坏编码TCRα链的内源基因。

[0293] 43.如实施方案35-42中任一项所述的方法，其中所述合成核酸编码选自转录因子、激酶和/或细胞表面受体的表型改变蛋白。

[0294] 44.如实施方案43所述的方法，其中所述表型改变蛋白选自FOXO1、LKB1、TCF7、EOMES、ID2、TERT、CCR2b和/或CCR4。

[0295] 45.如实施方案35-44中任一项所述的方法，其中所述选择的细胞靶向配体选择性结合异质细胞群内的淋巴细胞。

[0296] 46.如实施方案45所述的方法，其中所述异质细胞群是离体细胞培养物。

[0297] 47.如实施方案45所述的方法，其中所述异质细胞群是体内的。

[0298] 48.如实施方案35-47中任一项所述的方法，其中所述选择的细胞靶向配体选择性结合T细胞、NK细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、B细胞、造血干细胞或其组合。

[0299] 49.如实施方案35-48中任一项所述的方法，其中所述选择的细胞靶向配体包括选自淋巴细胞受体配体、淋巴细胞受体抗体、淋巴细胞受体肽适体、淋巴细胞受体核酸适体、淋巴细胞受体Spiegelmer或其组合的结合结构域。

[0300] 50.如实施方案35-49中任一项所述的方法，其中所述选择的细胞靶向配体选择性结合T细胞受体基序；T细胞α链；T细胞β链；T细胞γ链；T细胞δ链；CCR7；CD1a；CD1b；CD1c；CD1d；CD3；CD4；CD5；CD7；CD8；CD11b；CD11c；CD16；CD19；CD20；CD21；CD22；CD25；CD28；CD34；CD35；CD39；CD40；CD45RA；CD45RO；CD46，CD52；CD56；CD62L；CD68；CD69；CD80；CD86；CD95；CD101；CD117；CD127；CD133；CD137(4-1BB)；CD148；CD163；CD209；DEC-205；F4/80；IL-4Rα；Sca-1；CTLA-4；GITR；GARP；LAP；颗粒酶B；LFA-1；或转铁蛋白受体。

[0301] 51.如实施方案35-50中任一项所述的方法，其中所述选择的细胞靶向配体选择性结合CD1a；CD1b；CD1c；CD1d；CCR7；CD3；CD4；CD5；CD8；CD16；CD19；CD20；CD21；CD22；CD25；CD28；CD35；CD40；CD45RA；CD45RO；CD46；CD52；CD62L；CD69；CD80；CD95；CD127；CD137；CD209；或DEC-205。

[0302] 52.如实施方案35-51中任一项所述的方法，其中所述选择的细胞靶向配体包括选自以下的结合结构域：T细胞α链抗体；T细胞β链抗体；T细胞γ链抗体；T细胞δ链抗体；CCR7抗体；CD1a抗体；CD1b抗体；CD1c抗体；CD1d抗体；CD3抗体；CD4抗体；CD5抗体；CD7抗体；CD8抗体；CD11b抗体；CD11c抗体；CD16抗体；CD19抗体；CD20抗体；CD21抗体；CD22抗体；CD25抗体；CD28抗体；CD34抗体；CD35抗体；CD39抗体；CD40抗体；CD45RA抗体；CD45RO抗体；CD46抗体；CD52抗体；CD56抗体；CD62L抗体；CD68抗体；CD69抗体；CD80抗体；CD86抗体；CD95抗体；

CD101抗体;CD1 17抗体;CD127抗体;CD133抗体;CD137(4-1BB)抗体;CD148抗体;CD163抗体;CD209抗体;DEC-205抗体;F4/80抗体;IL-4Rα抗体;Sca-1抗体;CTLA-4抗体;GITR抗体;GARP抗体;LAP抗体;颗粒酶B抗体;LFA-1抗体;或转铁蛋白受体抗体。

[0303] 53.如实施方案35-52中任一项所述的方法,其中所述结合结构域由以下各项的scFv片段组成或基本上由其组成:T细胞α链抗体;T细胞β链抗体;T细胞γ链抗体;T细胞δ链抗体;CCR7抗体;CD1a抗体;CD1b抗体;CD1c抗体;CD1d抗体;CD3抗体;CD4抗体;CD5抗体;CD7抗体;CD8抗体;CD11b抗体;CD11c抗体;CD16抗体;CD19抗体;CD20抗体;CD21抗体;CD22抗体;CD25抗体;CD28抗体;CD34抗体;CD35抗体;CD39抗体;CD40抗体;CD45RA抗体;CD45RO抗体;CD46抗体;CD52抗体;CD56抗体;CD62L抗体;CD68抗体;CD69抗体;CD80抗体;CD86抗体;CD95抗体;CD101抗体;CD117抗体;CD127抗体;CD133抗体;CD137(4-1BB)抗体;CD148抗体;CD163抗体;CD209抗体;DEC-205抗体;F4/80抗体;IL-4Rα抗体;Sca-1抗体;CTLA-4抗体;GITR抗体;GARP抗体;LAP抗体;颗粒酶B抗体;LFA-1抗体;或转铁蛋白受体抗体。

[0304] 54.如实施方案35-53中任一项所述的方法,其中所述合成核酸是合成mRNA。

[0305] 55.如实施方案35-54中任一项所述的方法,其中所述载体包括带正电荷的脂质或聚合物。

[0306] 56.如实施方案55所述的方法,其中所述带正电荷的脂质或聚合物包括聚(β-氨基酯、聚(L-赖氨酸)、聚(乙烯亚胺)(PEI)、聚(酰氨基胺)树枝状分子(PAMAM)、聚(氨基-共-酯),聚(甲基丙烯酸二甲氨基乙酯)(PDMAEMA)、壳聚糖、聚-(L-丙交酯-共-L-赖氨酸)、聚[α-(4-氨基丁基)-L-乙醇酸](PAGA)或聚(4-羟基-L-脯氨酸酯)(PHP)。

[0307] 57.如实施方案35-56中任一项所述的方法,其中所述包衣包含中性或带负电荷的脂质或聚合物。

[0308] 58.如实施方案57所述的方法,其中所述中性或带负电荷的包衣包含聚谷氨酸(PGA)、聚(丙烯酸)、藻酸或半琥珀酸胆甾醇酯/1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺。

[0309] 59.如实施方案57或58所述的方法,其中所述中性或带负电荷的包衣包含两性离子聚合物。

[0310] 60.如实施方案57-59中任一项所述的方法,其中所述中性或带负电荷的包衣包含脂质体。

[0311] 61.如实施方案60所述的方法,其中所述脂质体包括1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)、1,2-二-O-十八烯基-3-三甲基铵丙烷(DOTMA)、3β-[N-(N′,N′-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基]胆固醇(DC-Chol)、二十八烷基-氨基甘氨酰精胺(DOGS)、胆固醇,1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE)或1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DOPC)。

[0312] 62.如实施方案35-61中任一项所述的方法,其中所述选择的细胞靶向配体选择性结合CD4和/或CD8。

[0313] 63.如实施方案35-62中任一项所述的方法,其中所述选择的细胞靶向配体包括选自CD4抗体和/或CD8抗体的结合结构域。

[0314] 64.如实施方案35-63中任一项所述的方法,其中所述选择的细胞靶向配体包括选自CD4抗体和/或CD8抗体的scFv片段的结合结构域。

[0315] 65.如实施方案35-64中任一项所述的方法,其中所述载体包含聚(β-氨基酯)。

[0316] 66.如实施方案35-65中任一项所述的方法,其中所述包衣包含聚谷氨酸(PGA)。

[0317] 67.如实施方案35-66中任一项所述的方法,其中所述选择的细胞靶向配体包括选自CD4抗体和/或CD8抗体的结合结构域;所述载体包含聚(β-氨基酯);并且所述包衣包含聚谷氨酸(PGA)。

[0318] 68.一种用于治疗有需要的受试者的方法,其包括施用治疗有效量的细胞,所述细胞通过由纳米载体选择性递送至所述细胞的核酸的瞬时表达来修饰,所述纳米载体包括:

[0319] (i)包封在带正电荷的载体内的所述核酸,其中所述合成核酸编码基因编辑剂或表型改变蛋白;

[0320] (ii)所述载体外表面上的中性或带负电荷的包衣;和

[0321] (iii)从所述包衣表面延伸的选择的细胞靶向配体;

[0322] 其中在所述合并后,将所述纳米载体选择性地掺入所述淋巴细胞中,使得所述淋巴细胞瞬时表达所述核酸

[0323] 从而治疗所述有需要的受试者。

[0324] 69.一种制备选择的细胞群以用于向受试者施用的方法,其包括:

[0325] 从所述受试者获得样品,其中所述样品包括细胞的异质混合物,所述细胞的异质混合物包括选择的细胞群;

[0326] 将所述样品暴露于合成纳米载体,所述纳米载体包括

[0327] (i)包封在带正电荷的载体内的合成核酸,其中所述合成核酸编码基因编辑剂或表型改变蛋白;

[0328] (ii)所述载体外表面上的中性或带负电荷的包衣;和

[0329] (iii)从所述包衣表面延伸的选择的细胞靶向配体;

[0330] 其中所述暴露导致所述纳米载体选择性递送至选择的细胞群,从而导致选择的细胞群内细胞的修饰;并且扩增所述样品内的细胞;并且

[0331] 扩增所述样品内的细胞;

[0332] 从而制备所述选择的细胞群以用于向所述受试者施用。

[0333] 70.一种合成纳米载体,其包括

[0334] (i)包封在带正电荷的载体内的合成核酸,其中所述核酸编码基因编辑剂或表型改变蛋白;

[0335] (ii)所述载体外表面上的中性或带负电荷的包衣;和

[0336] (iii)从所述包衣表面延伸的选择的细胞靶向配体;

[0337] 71.如实施方案70所述的合成纳米载体,其中所述合成核酸编码选自转录活化因子样效应核酸酶(TALEN);megaTAL;和/或锌指核酸酶的基因编辑剂。

[0338] 72.如实施方案70或71所述的合成纳米载体,其中所述合成核酸编码SEQ ID NO:1的megaTAL。

[0339] 73.如实施方案70-72中任一项所述的合成纳米载体,其中所述基因编辑剂破坏编码Shp-1磷酸酶、PD1受体、T细胞受体(TCR)、CCR5和/或CXCR4的内源基因。

[0340] 74.如实施方案70-73中任一项所述的合成纳米载体,其中所述基因编辑剂破坏编码TCRα链的内源基因。

[0341] 75.如实施方案70-74中任一项所述的合成纳米载体,其中所述合成核酸编码选自转录因子、激酶和/或细胞表面受体的表型改变蛋白。

[0342] 76.如实施方案75所述的合成纳米载体，其中所述表型改变蛋白选自FOXO1、LKB1、TCF7、EOMES、ID2、TERT、CCR2b和/或CCR4。

[0343] 77.如实施方案70-76中任一项所述的合成纳米载体，其中所述选择的细胞靶向配体选择性结合异质细胞群内的淋巴细胞。

[0344] 78.如实施方案77所述的合成纳米载体，其中所述异质细胞群是离体细胞培养物。

[0345] 79.如实施方案77所述的合成纳米载体，其中所述异质细胞群是体内的。

[0346] 80.如实施方案70-79中任一项所述的合成纳米载体，其中所述选择的细胞靶向配体选择性结合T细胞、NK细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、B细胞、造血干细胞或其组合。

[0347] 81.如实施方案70-80中任一项所述的合成纳米载体，其中所述选择的细胞靶向配体包括选自淋巴细胞受体配体、淋巴细胞受体抗体、淋巴细胞受体肽适体、淋巴细胞受体核酸适体、淋巴细胞受体Spiegelmer或其组合的结合结构域。

[0348] 82.如实施方案70-81中任一项所述的合成纳米载体，其中所述选择的细胞靶向配体选择性结合T细胞受体基序；T细胞α链；T细胞β链；T细胞γ链；T细胞δ链；CCR7；CD1a；CD1b；CD1c；CD1d；CD3；CD4；CD5；CD7；CD8；CD11b；CD11c；CD16；CD19；CD20；CD21；CD22；CD25；CD28；CD34；CD35；CD39；CD40；CD45RA；CD45RO；CD46，CD52；CD56；CD62L；CD68；CD69；CD80；CD86；CD95；CD101；CD117；CD127；CD133；CD137(4-1BB)；CD148；CD163；CD209；DEC-205；F4/80；IL-4Rα；Sca-1；CTLA-4；GITR；GARP；LAP；颗粒酶B；LFA-1；或转铁蛋白受体。

[0349] 83.如实施方案70-82中任一项所述的合成纳米载体，其中所述选择的细胞靶向配体选择性结合CD1a；CD1b；CD1c；CD1d；CCR7；CD3；CD4；CD5；CD8；CD16；CD19；CD20；CD21；CD22；CD25；CD28；CD35；CD40；CD45RA；CD45RO；CD46；CD52；CD62L；CD69；CD80；CD95；CD127；CD137；CD209；或DEC-205。

[0350] 84.如实施方案70-83中任一项所述的合成纳米载体，其中所述选择的细胞靶向配体包括选自以下的结合结构域：T细胞α链抗体；T细胞β链抗体；T细胞γ链抗体；T细胞δ链抗体；CCR7抗体；CD1a抗体；CD1b抗体；CD1c抗体；CD1d抗体；CD3抗体；CD4抗体；CD5抗体；CD7抗体；CD8抗体；CD11b抗体；CD11c抗体；CD16抗体；CD19抗体；CD20抗体；CD21抗体；CD22抗体；CD25抗体；CD28抗体；CD34抗体；CD35抗体；CD39抗体；CD40抗体；CD45RA抗体；CD45RO抗体；CD46抗体；CD52抗体；CD56抗体；CD62L抗体；CD68抗体；CD69抗体；CD80抗体；CD86抗体；CD95抗体；CD101抗体；CD117抗体；CD127抗体；CD133抗体；CD137(4-1BB)抗体；CD148抗体；CD163抗体；CD209抗体；DEC-205抗体；F4/80抗体；IL-4Rα抗体；Sca-1抗体；CTLA-4抗体；GITR抗体；GARP抗体；LAP抗体；颗粒酶B抗体；LFA-1抗体；或转铁蛋白受体抗体。

[0351] 85.如实施方案70-84中任一项所述的合成纳米载体，其中所述结合结构域由以下各项的scFv片段组成或基本上由其组成：T细胞α链抗体；T细胞β链抗体；T细胞γ链抗体；T细胞δ链抗体；CCR7抗体；CD1a抗体；CD1b抗体；CD1c抗体；CD1d抗体；CD3抗体；CD4抗体；CD5抗体；CD7抗体；CD8抗体；CD11b抗体；CD11c抗体；CD16抗体；CD19抗体；CD20抗体；CD21抗体；CD22抗体；CD25抗体；CD28抗体；CD34抗体；CD35抗体；CD39抗体；CD40抗体；CD45RA抗体；CD45RO抗体；CD46抗体；CD52抗体；CD56抗体；CD62L抗体；CD68抗体；CD69抗体；CD80抗体；CD86抗体；CD95抗体；CD101抗体；CD117抗体；CD127抗体；CD133抗体；CD137(4-1BB)抗体；CD148抗体；CD163抗体；CD209抗体；DEC-205抗体；F4/80抗体；IL-4Rα抗体；Sca-1抗体；CTLA-4抗体；GITR抗体；GARP抗体；LAP抗体；颗粒酶B抗体；LFA-1抗体；或转铁蛋白受体抗

体。

[0352] 86.如实施方案70-85中任一项所述的合成纳米载体，其中所述合成核酸是合成mRNA。

[0353] 87.如实施方案70-86中任一项所述的合成纳米载体，其中所述载体包括带正电荷的脂质或聚合物。

[0354] 88.如实施方案87所述的合成纳米载体，其中所述带正电荷的脂质或聚合物包括聚(β-氨基酯、聚(L-赖氨酸)、聚(乙烯亚胺)(PEI)、聚(酰氨基胺)树枝状分子(PAMAM)、聚(氨基-共-酯)，聚(甲基丙烯酸二甲氨基乙酯)(PDMAEMA)、壳聚糖、聚-(L-丙交酯-共-L-赖氨酸)、聚[α-(4-氨基丁基)-L-乙醇酸](PAGA)或聚(4-羟基-L-脯氨酸酯)(PHP)。

[0355] 89.如实施方案70-88中任一项所述的合成纳米载体，其中所述包衣包含中性或带负电荷的脂质或聚合物。

[0356] 90.如实施方案89所述的合成纳米载体，其中所述中性或带负电荷的包衣包含聚谷氨酸(PGA)、聚(丙烯酸)、藻酸或半琥珀酸胆甾醇酯/1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺。

[0357] 91.如实施方案89或90所述的合成纳米载体，其中所述中性或带负电荷的包衣包含两性离子聚合物。

[0358] 92.如实施方案89-91中任一项所述的合成纳米载体，其中所述中性或带负电荷的包衣包含脂质体。

[0359] 93.如实施方案92所述的合成纳米载体，其中所述脂质体包括1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)、1,2-二-O-十八烯基-3-三甲基铵丙烷(DOTMA)、3β-[N-(N′,N′-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基]胆固醇(DC-Chol)、二十八烷基-氨基甘氨酰精胺(DOGS)、胆固醇,1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE)或1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DOPC)。

[0360] 94.如实施方案70-93中任一项所述的合成纳米载体，其中所述选择的细胞靶向配体选择性结合CD4和/或CD8。

[0361] 95.如实施方案70-94中任一项所述的合成纳米载体，其中所述选择的细胞靶向配体包括选自CD4抗体和/或CD8抗体的结合结构域。

[0362] 96.如实施方案70-95中任一项所述的合成纳米载体，其中所述选择的细胞靶向配体包括选自CD4抗体和/或CD8抗体的scFv片段的结合结构域。

[0363] 97.如实施方案70-96中任一项所述的合成纳米载体，其中所述载体包含聚(β-氨基酯)。

[0364] 98.如实施方案70-97中任一项所述的合成纳米载体，其中所述包衣包含聚谷氨酸(PGA)。

[0365] 99.如实施方案70-98中任一项所述的合成纳米载体，其中所述选择的细胞靶向配体包括选自CD4抗体和/或CD8抗体的结合结构域;所述载体包含聚(β-氨基酯);并且所述包衣包含聚谷氨酸(PGA)。

[0366] 100.一种组合物，其包括如实施方案70-99中任一项所述的合成纳米载体。

[0367] 101.一种治疗有需要的受试者的方法，其包括施用治疗有效量的如实施方案70-99中任一项所述的纳米载体或如实施方案100所述的组合物，从而治疗所述有需要的受试

者。

[0368] 102.本文公开的纳米载体的用途，其用于选择性地将编码CAR或TCR的核酸递送至选择的细胞类型。

[0369] 实施例1。引言。通过使T细胞遗传工程化以表达嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)来指导对癌症的免疫响应是一种开始产生显著结果的疗法，并且重要的临床试验即将出现。将T细胞生物工程化为可增加数量、连续破坏肿瘤细胞并最终分化成长寿记忆T细胞的‘活体药物’的过程需要将受体转基因稳定整合到淋巴细胞的基因组中。尽管其生产所需的时间和成本，以及对它们可包装的基因的大小和数量的限制，病毒载体是目前用于编程具有肿瘤识别能力的这些细胞以便应用的最有效手段(Zhang等，Nat Commun 6，7639(2015)；Cribbs等，BMC Biotechnol 13，98(2013))。

[0370] 除这些慢性基因表达系统之外，还可以通过靶向‘打了就跑’机制的大分子的瞬时表达来诱导细胞中的表型变化。在这些瞬时应用的大多数中，治疗性转基因的永久表达是不希望的并且具有潜在危险性(Wurm等，Exp Hematol 42，114-125 e114(2014))；实例包括使用转录因子来控制细胞分化(Themeli等，Nat Biotechnol 31，928-933(2013)；Costa等，Development 142，1948-1959(2015))，以及使用序列特异性核酸酶的表达以工程化基因组(Cox等，Nat Med 21，121-131(2015))。

[0371] 尽管其中瞬时基因疗法可显著提高工程化T细胞的治愈潜力的应用越来越多，但目前可用的方法(类似上述的慢性表达方法，其主要基于病毒载体)由于进行转导所需的精细方案的费用而变得复杂(Nightingale等，Mol Ther 13，1121-1132(2006))。电穿孔是作为替代转染方法开发的，但质膜的机械透化损害了T细胞的存活力，这意味着这些方法不适合按比例放大应用。此外，类似基于病毒的方法，电穿孔不可从异源库中选择性转染特定细胞类型，因此其必须在细胞纯化过程之后进行。

[0372] 此实施例描述了在培养的T细胞中产生瞬时基因表达并且这么做未使用涉及的方案或复杂的辅助设备的纳米试剂。适当设计的mRNA纳米载体可简单地通过在体外将试剂与细胞混合来完成功能性大分子向淋巴细胞的剂量控制递送(图1A)。

[0373] 这些纳米颗粒(NP)可结合至靶向的细胞亚型并刺激受体介导的胞吞作用，这为它们携带的合成mRNA提供进入并使得淋巴细胞能够表达编码的分子。由于不需要转基因的核转运和转录，因此此过程是快速且有效的。可以如何实施这种新平台以制造用于临床使用的优质CAR-T细胞产物在至少两个实施例中说明。在第一应用中，将靶向的mRNA纳米载体用作T细胞的基因组编辑工具。递送编码罕见裂解的megaTAL核酸酶的mRNA(Boissel等，Methods MolBiol 1239，171-196(2015))可有效地破坏淋巴细胞的T细胞受体表达。在第二应用中，Foxo1，一种重新编程效应细胞分化成功能有效记忆细胞(functionally competent memory cell)的关键调节因子(Tejera等，J Immunol 191，187-199(2013)；Kim等，Immunity 39，286-297(2013))是瞬时表达的。结果表明，暴露于工程化纳米颗粒使T细胞偏向中枢记忆表型。

[0374] 所述系统最显著的益处是其在临床规模上实现治疗性细胞的遗传修饰的简单性：所需要的只是将适当的纳米颗粒试剂与淋巴细胞混合。所述方法与目前用于瞬时递送遗传物质的那些方法形成明显对比，目前用于瞬时递送遗传物质的那些方法的效率较低并且涉及许多限制其可用性的专门、昂贵和专有程序。超越T细胞疗法，瞬时基因递送平台可容易

地整合到用于其它治疗细胞类型(例如自然杀伤细胞、树突细胞、造血干细胞或间充质干细胞)的现有制造过程中,以显著提高其治愈潜力而不增加处理时间、风险或复杂性。

[0375] 材料和方法。研究设计。此项目的目的是开发一种纳米材料,用于体外靶向mRNA递送至原代T细胞。使用从个体供体获得的细胞进行试验性实验以优化纳米载体介导的递送以用于特定应用,随后使用来自多个供体的样品复制优化的方案。

[0376] PBAE 447合成。使用类似于由Mangraviti等描述的方法合成此聚合物(Mangraviti等,ACS Nano 9,1236-1249(2015))。以1.1:1的二丙烯酸酯与胺单体摩尔比将1,4-丁二醇二丙烯酸酯与4-氨基-1-丁醇合并。在搅拌下将混合物加热至90℃持续24h,以产生丙烯酸酯封端的聚(4-氨基-1-丁醇-共-1,4-丁二醇二丙烯酸酯)。将2.3g此聚合物溶于2ml四氢呋喃(THF)中。为了形成哌嗪加帽的447聚合物,将786mg溶于13ml THF中的1-(3-氨基丙基)-4-甲基哌嗪加入到聚合物/THF溶液中。将所得混合物在RT下搅拌2h,然后用5体积的二乙醚沉淀加帽的聚合物。在倾出溶剂后,用2体积的新鲜醚洗涤聚合物,然后在使用前将残余物在真空下干燥2天,以形成100mg/ml在DMSO中的原液,将其储存在-20℃下。

[0377] PGA-抗体缀合。将15kD聚谷氨酸(来自Alamanda Polymers)溶于水中以形成20mg/ml并超声处理10min。加入等体积在水中的4mg/ml 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(Thermo Fisher),并将溶液在RT下混合5min。然后以4:1摩尔比将所得活化的PGA与抗体在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中合并,并在RT下混合6h。为了去除未连接的PGA,将溶液穿过50,000NMWCO膜(Millipore)用PBS交换3次。使用NanoDrop 2000分光光度计(Thermo Scientific)测定抗体浓度。用于T细胞实验的抗体是抗CD3(克隆OKT3)、抗CD4(克隆OKT4)、抗CD8(克隆OKT8)和抗CD28(克隆9.3,全部来自BioXCell)。将克隆C1.18.4用作对照抗体。对于HSC转导,使用多克隆山羊抗小鼠IgG和多克隆山羊抗小鼠CD105抗体(Fisher)。

[0378] mRNA合成。通过TriLink Biotechnologies产生用修饰的核糖核苷酸假尿苷(Ψ)和5-甲基胞苷(m5C)完全取代并用ARCA加帽的eGFP、Foxo1、Trex2和TRAC-megaTAL的密码子优化的mRNA。我们将缀合了Ψ和m5C-修饰的eGFP mRNA与cy5(也来自TriLink)缀合以用于追踪这些转录物的递送。

[0379] 纳米颗粒制备。将mRNA原液在无菌、无核酸酶的25mM乙酸钠缓冲液(pH 5.2)(NaOAc)中稀释至100μg/ml。将在DMSO中的PBAE-447聚合物在NaOAc中稀释至6mg/ml,并以60:1(w:w)比率加入到mRNA中。以中速将所得混合物涡旋15sec后,将其在室温下孵育5min,这样可形成NP。为了向纳米颗粒中添加靶向元件,将PGA连接的抗体在NaOAc中稀释至250μg/ml,并以2.5:1(w:w)比率加入到mRNA中。以中速将所得混合物涡旋15sec,并且然后在室温下孵育5min以使PGA-Ab结合至NP。

[0380] 通过将冻干纳米颗粒与作为冷冻保护剂的60mg/ml D-蔗糖混合,并将它们在液氮中快速冷冻,然后在FreeZone 2.5L冷冻干燥系统(Labconco)中处理它们来冻干纳米颗粒。将冻干的NP储存在-80℃下直至使用。为了应用,将冻干的NP重新悬浮在一定体积的无菌水中以恢复其原始浓度。

[0381] 纳米颗粒表征。用Nanosite(Malvern)测量所产生颗粒的流体动力学半径,并使用用Zetapals仪器(Brookhaven Instrument Corporation)检测的动态光散射测定它们的ζ电位。将颗粒在PBS(pH 7.4)中1:400(v/v)稀释用于尺寸测量,并且1:40稀释用于ζ电位定量。对于透射电子显微术,将25-μl纳米颗粒样品各自施加至辉光放电活化的200目碳/弗姆

瓦(formvar)涂覆的铜网格。在30sec后,使网格依序接触一滴1/2卡尔诺夫斯基氏固定剂(Kamovsky's fixative)、一滴0.1M二甲胂酸盐缓冲液、8滴dH2O,并且然后滴加1%(w/v)过滤的乙酸双氧铀。使用JEOL JEM-1400透射电子显微镜(JEOL USA)检查这些样品。

[0382] 细胞系和培养基。K562-CD19和对照K562细胞由Stanley Riddell博士(Fred Hutchinson Cancer Research Center)提供。TM-LCL是CD19+ EBV转化的类淋巴母细胞细胞系,其已被优化用作T细胞扩增的饲养细胞(36)。Jurkat-E6 T细胞系可从美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)获得。将这些细胞系在T细胞培养基(TCM)中培养:RPMI-1640,其含有10%胎牛血清、0.8mM L-谷氨酰胺、25mM HEPES缓冲液和1%青霉素-链霉素。

[0383] 如所指出的,将原代人外周血单核细胞(PBMC)和T细胞在补充有50IU IL-2/ml(Preprotech)的TCM中培养,或在ImmunoCult-XF T细胞扩增培养基(XFSFM)(Stemcell)中培养。

[0384] T细胞的mRNA转染。通过逐滴加入温热的TCM解冻来自正常供体的冷冻保存的PBMC,随后离心。在指出的情况下,通过阴性选择(Stemcell)分离CD8 T细胞。将细胞以10^6个细胞/ml在TCM+IL-2中培养,并以1:1珠:细胞比率用CD3/CD28珠(Dynabeads,Life Technologies)刺激。对于涉及CD3-靶向纳米颗粒转导的实验,在添加NP之前24h去除这些珠。

[0385] 对于NP介导的转染,将T细胞重悬于XFSFM中至浓度为2×10^6/ml。将含有2.5μg mRNA/10^6个细胞的抗体靶向的NP加入到此悬浮液中用于在37℃下暴露2h,然后用3体积的TCM+IL-2洗涤细胞。对照NP含有eGFP mRNA。编辑TCRα基因的NP以42:42:16w:w:w比率含有TRAC-megaTAL、Trex2和eGFP mRNA。$Foxo1_{3A}$ NP以84:16w:w比率含有$Foxo1_{3A}$和eGFP mRNA。

[0386] 对于电穿孔,将2×10^6个T细胞用含有0.5%牛血清白蛋白(BSA)的PBS洗涤两次,将其重悬于100μl含有3μg eGFP mRNA的T细胞电穿孔培养基(Lonza)中,转移至电穿孔杯中,并使用程序T-20在Nucleofector(Lonza)仪器中进行处理。将穿孔的细胞转移至含有2ml不含抗生素的TCM+IL-2的板中。

[0387] CD34+细胞的NP转导。由先前从正常供体动员的PBSC纯化的CD34+细胞从Fred Hutchinson癌症研究中心的造血细胞处理和储存库核心(Hematopoietic Cell Processing and Repository Core)获得。在解冻后,计数细胞,然后在HSC培养基中以10^6/ml的浓度培养过夜:StemSpan SFEMII无血清培养基,其补充有50ng/ml人干细胞因子(Scf)、50ng/ml鼠Flt3/Flk-2配体和25ng/ml人血小板生成素(Stemcell Technologies)]。第二天,将细胞收获、计数,并在96孔组织培养板(Costar)中以2.5×10^4个细胞/孔重悬于100μl不含细胞因子的HSC中。不处理细胞,或用每孔含有1μg eGFP mRNA的CD105靶向的或对照抗小鼠靶向的NP处理细胞。用NP处理细胞1h,然后用1ml不含细胞因子的HSC培养基洗涤两次。然后将洗涤的细胞转移至24孔组织培养板中的500μl完全HSC培养基中;48h后,将细胞针对CD34和CD105(BioLegend)标记以用于通过流式细胞术分析。

[0388] TCRα的PCR扩增和插入缺失(Indel)检测。根据制造商的说明,用Geneart Genomic Cleavage Detection Kit(Invitrogen)进行插入缺失检测。简而言之,裂解T细胞,并且使用这些引物通过PCR扩增侧接TCRαMegaTAL靶位点的基因组DNA:TRAC-正向CCCGTGTCATTCTCTGGACT(SEQ ID NO:53),和TRAC-反向ATCACGAGCAGCTGGTTTCT(SEQ ID NO:

54)。将PCR产物变性、再退火，并用检测酶处理，这样可通过比较种系相对于特异性切割条带的凝胶条带密度来评估插入缺失形成。

[0389] 使用19-41BBζCAR进行慢病毒转导和T细胞扩增。如所述(Liu等，Nat Biotechnol 34，430-434(2016))用单一StrepTag修饰含有41BB和CD3ζ信号传导结构域(19-41BB□)的人抗CD19 CAR构建体并转移至epHIV7慢病毒载体中。通过用epHIV7慢病毒载体及病毒包装质粒pCMVdR8.91和pMD2.G进行的Lenti-X 293T细胞(Clontech)的磷酸钙转染(Invitrogen)产生VSVG假型化慢病毒。对于慢病毒转导，以5:1的MOI将T细胞转移至具有8μg/ml聚凝胺和编码19-41BBζ-CAR的慢病毒的涂有纤连蛋白的板(Takara)，然后在34℃下以800×g旋转感染1h。为了选择性扩增19-41BBξ-转导的细胞，将淋巴细胞在TCM+Il-2中以1:7比率用辐照(7000拉德)的CD19+TM-LCL细胞刺激。

[0390] 细胞分选和流式细胞术。使用运行FACSDIVA软件的BD LSRFortessa或FacsCanto II细胞分析仪获取数据，在BD FACS ARIA-II上分选，并用FlowJo v10.1分析。流式细胞术中使用的抗体列于图2中。

[0391] 细胞内细胞因子染色。将细胞在TCM中用3μg/ml布雷菲德菌素A+/-20ng/ml PMA和1μg/ml离子霉素(Sigma-Aldrich)培养6h。在固定之前，使用抗CD8和抗CD3染色来鉴定TCR+CD8+和TCR-CD8+细胞子集。然后在用抗-IFN-γ和IL-2 mAb(BioLegend)标记之前，使细胞经受Fix和Perm试剂盒(BD Biosciences)。

[0392] Foxo1的细胞内染色。用含有3μg eGFP mRNA或2.5μg Foxo13A和0.5μg eGFP mRNA的抗CD3靶向的NP转染10^6个Jurkat T细胞。24h后，将细胞用PBS中的4％多聚甲醛固定，洗涤一次，并用90％冰冷的甲醇透化30min。在室温下用PBS中的0.5％BSA封闭这些样品，然后用兔抗Foxo1(克隆C29H4)或同种型(克隆DAE1)染色，随后用抗兔IgG F(aB′)2Alexa-647(Cell Signaling)染色。

[0393] CAR T细胞杀伤测定。通过流式细胞术测定CAR靶细胞的特异性细胞溶解。在37℃下将靶K562-CD19细胞用低(0.4μM)羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)，并且将对照K562用高(4.0μM)羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)标记15min。将两种样品在含有血清的完全培养基中洗涤，以1:1比率混合，然后以指定的效应子:靶比率与19-41BBζ共培养。为了评估特异性细胞溶解，将每种条件用抗CD8 mAb(BioLegend)染色以鉴定T细胞并用7AAD染色以排除死细胞，并通过流式细胞术分析。通过测量存活CD19+靶细胞(低CFSE)与对照CD19-K562细胞(高CFSE)的比率来评估特异性细胞杀伤。

[0394] 显微术。将400μl XFSFM中的10^6个T细胞用含有3μg cy5标记的eGFP mRNA的抗CD3靶向的NP在4℃下处理1h以进行表面结合，随后在37℃下孵育2-h以进行内化。在这些处理后，将细胞用冷PBS洗涤3次，并在4℃下负载到聚-L-赖氨酸(Sigma)涂覆的载玻片上30min。将样品固定在2％多聚甲醛中，固定在ProLong Gold Antifade试剂(Invitrogen)中，并用Zeiss LSM 780NLO激光扫描共聚焦显微镜成像。

[0395] RNA纯化、RT-PCR、测序和生物信息学分析。在Trizol试剂(Ambion)中裂解T细胞后，使用DirectZol试剂盒(Zymo)按照制造商的说明进行柱上DNA消化来分离总RNA。对于实时定量PCR(qPCR)，用高容量cDNA试剂盒(Applied Biosystems)制备cDNA。使用PrimeTime qPCR测定(整合DNA技术)和QuantStudio5机器(Applied Biosystems)测量内源FOXO1和密

码子优化的FOXO13A相对于持家基因B2M的表达水平。选择用于检测密码子优化的Foxo13A的引物以避免内源Foxo1mRNA的交叉检测：

[0396] Foxo13A正向:GGACAGCCTAGAAAGAGCAG (SEQ ID NO:55)

[0397] Foxo13A探针:AGGTCGGCGTAGCTCAGATTGC(SEQ ID NO:56)

[0398] Foxo13A反向:CTCTTGACCATCCACTCGTAG (SEQ ID NO:57)

[0399] 对于RNAseq分析,在3和8天后从体外培养的对照NP-和Foxo13A NP-处理的CD8+细胞中分离RNA样品,并与来自两个独立供体匹配的冷冻保存PBMC样品的分选参考原初(CD8+CD45RA+CD62L+CCR7+)和TCM(CD8+CD45RA-CD62L+CCR7+)细胞进行比较。使用TruSeq样品制备试剂盒(Illumina)根据制造商的说明制备RNASeq文库。使用HiSeq平台(Illumina)对文库进行50个循环(配对末端)的测序。使用TopHat v2.1.0将使Illumina的碱基调用和质量过滤器通过人hg38基因组的结果进行比对。以“交叉严格的”重叠模式实施,使用htseq-计数(v0.6.1p1)生成每个基因的计数。将edgeR中的GLM方法用于数据归一化和差异表达分析。TCM标签基因集合被定义为在统计学显著性上排名的前500个基因,其在第8天时在CD8+TCM相对于供体匹配的对照NP处理的CD8+ T细胞中的表达更高(TCM向上)或更低(TCM向下)。用GSEAPreranked软件使用基因列表分析基因集合富集,所述基因列表按符号:倍数变化×1/(p值)排名(37)。来自RNAseq分析的原始数据和处理数据已被保藏在NCBI的Gene Expression Omnibus,GEO系列登录号GSE89134中。(38)

[0400] 统计分析。除非另外说明,否则图表显示平均值±平均值的标准误差。用Prism软件(Graphpad)进行统计学分析。

[0401] 结果。设计mRNA纳米载体以在T细胞中编排稳健的转基因表达。为了产生可遗传修饰原代T淋巴细胞的试剂(众所周知,这对非病毒转染方法是难以控制的),生物工程化包括以下四种功能组分的聚合物纳米颗粒(图1B):(i)表面锚定的靶向配体,其选择性地将纳米颗粒结合至T细胞并引发快速受体诱导的胞吞作用以使其内化。在实验中,使用抗CD3和抗CD8抗体;(ii)带负电荷的包衣,其通过降低纳米颗粒的表面电荷来屏蔽纳米颗粒以使脱靶结合最小化。因为其已广泛用于药物递送平台,因此选择聚谷氨酸(PGA)来完成此目的;(iii)载体基质,当核酸在核内体中时,其凝聚并保护核酸免于酶促降解,但一旦颗粒被转运至细胞质中就释放它们,从而能够转录编码的蛋白质。为此,使用在水性条件下具有1至7小时半衰期的可生物降解的聚(β-氨基酯)(PBAE)聚合物制剂;以及(iv)核酸,其被包封在载体内并导致基因编辑或瞬时表达可永久改变T细胞表型的蛋白质。mRNA是瞬时治疗性蛋白质表达的理想平台,因为其不具有基因组整合的潜力,并且不需要用于表达的核定位。然而,未修饰的mRNA可活化细胞内钟样受体,从而限制蛋白质表达并导致毒性(Kariko等,Immunity 23,165-175(2005))。为了提高稳定性并降低递送的mRNA的免疫原性潜力,使用掺入修饰的核苷酸的合成版本。例如,用工程化碱假尿苷和5-甲基-胞苷取代尿苷和胞苷协同地通过先天模式识别受体阻断识别并增加mRNA翻译。

[0402] 利用两步电荷驱动的自组装工艺制造NP。首先,将合成mRNA与带正电荷的PBAE聚合物复合,其将mRNA凝聚成纳米级的复合物(图3A,3B)。此步骤之后加入抗体功能化PGA,其屏蔽PBAE-mRNA颗粒的正电荷并赋予淋巴细胞靶向。所得mRNA纳米载体的尺寸为109.6±26.6nm,并且几乎为中性表面电荷(1.1±5.3mVζ电位,图3C)。

[0403] mRNA纳米载体实现与电穿孔类似的T细胞转染效率,但不降低存活力。目标是简化

基于细胞的疗法的制造，因此首先测试简单地将靶向mRNA纳米载体加入到已建立的人淋巴细胞培养物中是否足以编排它们的稳健转染。当编码报道子(增强的绿色荧光蛋白，eGFP)的携带mRNA的CD3靶向的NP与这些细胞一起孵育时，它们不仅结合至所述细胞，而且还刺激受体介导的胞吞作用，从而为颗粒携带的基因提供进入(图4A)。在单次NP应用(NP:T细胞比率＝2×10^4:1)后，早在转染后5小时观察到转基因表达常规转染了85％的这些原代T细胞(图4B)(图5A)。因此，此过程快速且有效。重要的是，没有必要为每种应用新鲜制备mRNA NP，而是可以在其使用前将它们冻干，而不改变特性或功效(图5B)。

[0404] 接下来评估了靶向的携带mRNA的NP对T细胞扩增的影响。由于恶性肿瘤经常进展迅速，因此重要的是工程化的T细胞可快速扩展至临床相关规模。在临床实验室中多种多克隆淋巴细胞的一种广泛使用的方法是将它们与涂有针对TCR/CD3和共刺激性CD28受体的抗体的珠一起孵育。即使用CD3靶向的NP重复转染(NP:T细胞比率:2×10^4:1)也未干扰由这些涂覆的珠刺激的T细胞的扩增(图4C)。此结果与并列测试的T细胞电穿孔形成鲜明对比。电穿孔不仅增加了复杂的细胞处理步骤(诸如培养基交换和离心循环，图4D)，此方法还损害了淋巴细胞的存活力(图6)，这使T细胞的产量降低了60倍(图4D，右图)。

[0405] 纳米颗粒转染无缝整合进CAR-T细胞制造工作流程中，以实现有效的基因组编辑。通过将NP介导的mRNA转染并入白血病特异性19-41BBζCAR T细胞的制造中，在临床相关应用中测试所述方法(图7A)。CD19靶向的受体是目前研究最多的CAR-T细胞产品，在国际上有近30个正在进行的临床试验(Sadelain等，J Clin Invest 125，3392-3400(2015))。现在进行基因组工程化的能力提供了改善CAR-T细胞安全性和功效的潜力。例如，可消除内源TCR的表达以避免移植物抗宿主疾病。此外，可选择性地缺失免疫检查点基因以增强它们在抑制性肿瘤环境中的活性(Menger等，Cancer Res 76，2087-2093(2016)；Torikai等，Blood 119，5697-5705(2012))。然而，使用电穿孔将基因组编辑剂递送到细胞中对按比例放大T细胞制造造成实质性障碍。因此，通过制备携带mRNA编码megaTAL核酸酶的颗粒来测量NP递送基因编辑剂的能力，其靶向TCRα基因的恒定区(TRAC)。利用由NP制剂方法提供的灵活性的优点，包括编码DNA修复核酸内切酶TREX2的mRNA以及用于追踪转染的eGFP mRNA，以提高敲除效率。对照颗粒仅用eGFP mRNA负载。与eGFP转染(其不影响TCR表达；图7B，顶行)相反，向T细胞培养物中加入TCRα-megaTAL颗粒到第5天有效地破坏TCR表达，这是到第12天丢失mRNA后维持的效果(图7B，底行)。与对照相比，平均TCR水平为60.8％(±17.7％；图73C)，其对应于使用Surveyor测定确定的插入缺失频率的百分比(靶向效率的度量)(图7D)。重要的是，携带mRNA的纳米颗粒的存在不影响肿瘤特异性CAR的病毒介导的基因转移，因为在NP转染和未转染的T细胞中实现了与编码19-41BBζCAR的慢病毒载体的相等转导效率(图7E)。在NP介导的基因组编辑和慢病毒转导后，CAR编程的T细胞完全维持其增殖、分泌细胞因子和杀死白血病靶细胞的能力(图7F-7H)。总之，这些发现确定淋巴细胞靶向mRNA纳米载体可介导CAR-T细胞的有效基因组编辑而不损害其功能。

[0406] 编码转录因子Foxo1的NP-递送的mRNA印记记忆CAR-T细胞。接下来检查淋巴细胞靶向的mRNA NP是否可通过递送使其编程为有利表型的mRNA来改善CAR-T细胞的治疗活性。临床发现已确定源自CD62L+中枢记忆T细胞(TCM)的T细胞产物在动物模型中展示出改善的植入和功能，并且输注产品中CD62L+ TCM表型细胞的分数与成功的CAR疗法相关联(Louis等，Blood 118，6050-6056(2011)；Sommermeyer等，Leukemia 30，492-500(2016))。然而，为

了实现治疗相关的淋巴细胞数量,这些细胞必须经历多轮体外刺激/扩增-所述过程驱使细胞远离TCM谱系并进入终末分化和衰老(Wang等,Journal of immunotherapy 35,689-701(2012))。为了解决此问题,制造了负载有编码叉头家族转录因子Foxo1的mRNA的T细胞靶向的NP,其控制CD8 T细胞中的效应子至记忆转变(Tejera等,J Immunol 191,187-199(2013);Kim等,Immunity 39,286-297(2013)。在体外刺激/扩增期间,TCR和细胞因子信号传导活化AKT激酶。这种酶磷酸化Foxo1,导致其细胞质分离和转录活性的阻断。为了在培养的T细胞中维持Foxo1,使用所述因子的AKT不敏感变体,其中三个关键的磷酸化残基突变为丙氨酸(Foxo13A)。假设在离体扩增期间向T细胞培养基中加入含Foxo13A的NP将促进具有改善治疗潜力的CD62L+ TCM细胞的发育。转录因子对重编程的影响对其表达的量级和持续时间敏感。为了在Foxo13A-NP添加后确定这些值,测量纳米颗粒处理的细胞中的Foxo1蛋白和mRNA表达。在Jurkat T细胞系中,通过细胞内标记测量,Foxo1的内源表达低,并且Foxo13A NP处理导致所述因子的总表达的大量增加(图8A,左图)。在原代T细胞中,Foxo1蛋白的表达水平已很高,并且Foxo13A-NP仅导致适度增加。这表明NP处理可诱导活性Foxo13A转录因子的接近生理水平(图8A,右图)。为了确定NP转染活化的增殖T细胞后的mRNA动态,使用特异于工程化mRNA的实时定量PCR测量Foxo13A的表达。mRNA表达在第1天最大,并且在转染后8天接近基线(图8B)。在体外T细胞引发后用Foxo13A NP处理快速增加了CD62L的表达(图8C),其是区分TCM与效应和效应记忆群的主要表面标记物(Sallusto等,Nature 401,708-712(1999))。为了确定Foxo13A的瞬时表达是否可导致CD8+ T细胞分化的持续改变,将来自3个独立供体的细胞用CD8靶向的Foxo13A-eGFP NP处理、基于eGFP表达分选,并在体外维持。转染后24小时观察到CD62L+细胞的频率增加,并且即使在NP添加后8和20天也维持这种情况(图8D)。

[0407] 为了理解由Foxo13A诱导的遗传调节网络及其与TCM谱系的连接,在离体分离的原初CD8、TCM CD8和用Foxo13A-编码NP或对照颗粒处理的体外培养CD8T细胞上进行RNASeq。鉴定了由在TCM中相对于平均CD8 T细胞具有更高或更低表达的前500个基因组成的TCM标签(图8E和图9A)。这些基因中的大多数在原初CD8 T细胞中受到协调调节,这与原初与TCM之间的密切转录关系一致(Kaech和Cui,Immunol 12,749-761(2012))。Foxo13A-编码性NP处理导致大量基因的差异表达。如所预期,这些包括编码关键记忆转录效应子KLF2的那些,以及表面分子SELL(CD62L)、CD28和S1PR1,它们都是CD8 TCM运输和功能的关键中介物(图8F)(Skon等,Nature immunology 14,1285-1293(2013);Boesteanu等,Seminars in immunology 21,69-77(2009))。将TCM基因标签覆盖在Foxo13A火山图上显示出转录物的强一致性:TCM标签基因在Foxo13A编程的CD8细胞中上调。基因集合富集分析证实了Foxo13A调节的转录物与TCM相关基因表达之间的强联系(图9B)。总之,这些结果表明Foxo13A-编码性NP诱导表面标记物的持续改变,并且朝向TCM样表型转录编程。

[0408] 讨论。此实施例证明适当设计的mRNA纳米载体可瞬时编程原代淋巴细胞中的基因表达。作为实例,示出了记忆表型诱导和治疗性基因组编辑,证明了通过将生物工程化纳米颗粒简单地添加到T细胞培养物中可如何永久地重编程细胞功能和/或分化。该纳米技术平台不需要特殊的细胞处理,因此其可容易地整合到用于制造治疗性T细胞的已建立方案中,而无需改变工作流程或此过程中使用的设备。与目前是T细胞中打了就跑基因疗法的首选方法的RNA电穿孔相比,这可能是制造中的显著优点(Schumann等,Proc Natl Acad Sci U

S A 112,10437-10442(2015);Wang等,Nucleic Acids Res 44,e30(2016);Bai等,Cell Discovery,(2015))。如图2所示,除涉及昂贵的设备之外,电穿孔还需要许多培养基更换、离心步骤和洗涤循环。这些步骤中的每个均容易出错,从而增加了污染的风险并且损害了疾病对抗的淋巴细胞的输出。即使是最先进的流式电穿孔装置也会降低T细胞存活力,并且因此降低产品产量和质量(Koh等,Mol Ther Nucleic Acids 2,e114(2013);Liu等,Cancer Res 75,3596-3607(2015))。所述方法不依赖于细胞膜的机械透化来递送转基因。相反,工程化的纳米颗粒结合至T细胞并刺激受体介导的胞吞作用-一种生理过程,为其携带的RNA提供进入而不损害细胞存活力(图4C)。

[0409] 细胞穿透肽(CPP)是促进细胞摄取各种分子货物的小蛋白质,其还已被用于将治疗药物转运到原代T细胞中(Copolovici,ACS Nano 8,1972-1994(2014))。甚至可使用这种方法将含有CPP结构域的大蛋白质引入细胞质中。然而,不可能用CPP特异性靶向选择的细胞类型,并且蛋白质转移相对低效(Liu等,PLoS One 9,e85755(2014);Liu等,Mol Ther Nucleic Acids 4,e232(2015))。治疗影响的持续时间很大程度上还取决于转移蛋白质的半衰期。相比之下,用负载有合成mRNA的纳米载体靶向特定细胞,并且将每个递送的RNA分子用作多个蛋白质拷贝的翻译的模板。

[0410] 在这些实验中靶向的CD3和CD8分子仅是可用于选择性地将mRNA穿入淋巴细胞中的许多抗原中的两种。为了选择性地仅修饰定义的T细胞子集(诸如抗原经历的淋巴细胞),可靶向活化标记物(例如CD25、4-1BB、OX40或CD40L)。另外,核心聚合物和电荷消除包衣材料的选择是灵活的,并且将可能在临床环境中生产发生之前进行优化。就前者而言,测试了一组阳离子聚合物,包括超支化STAR聚合物、聚乙二醇接枝的聚乙烯亚胺和介孔二氧化硅纳米颗粒,并根据其在原代T细胞中的优异转染效率和低生物材料介导的细胞毒性选择PBAE 447。后者是该制剂的高生物降解性的结果,其在水性条件下具有1至7小时的半衰期(Mangraviti等,ACS Nano 9,1236-1249(2015))。该时间帧是基因疗法的理想选择,因为聚合物凝聚并有效地保护mRNA抵抗降解,同时其被包封在核内体中,但在转移至细胞质中后很快将其释放,因此能够转录编码的蛋白质。重要的是,在所有测试的纳米颗粒设计中,需要带负电荷的纳米颗粒包衣来屏蔽RNA/PBAE复合物的正电荷并防止脱靶结合。

[0411] 除T细胞疗法之外,已探索了使用所描述的方法使用靶向CD105的mRNA纳米载体来制造更有效的造血干细胞(HSC)产品(图10)。特别是,改善HSC的自我更新特性或调节其命运决定的策略具有重要的临床吸引力((Galeev等,Cell Rep 14,2988-3000(2016);Rentas等,Nature 532,508-511(2016))。类似过继性T细胞疗法的领域,其中药理化合物作为制造具有更长寿命和/或体内功效的淋巴细胞的补充剂进行测试,高通量筛选文库已鉴定出可改变干细胞扩增的小分子(Nikiforow和Ritz,Cell Stem Cell 18,10-12(2016)。然而,许多化学化合物仅可抑制蛋白质功能,并且它们对所需靶标的特异性经常是有争议的(Schenone等,Nat Chem Biol 9,232-240(2013)。此外,使用小分子不可控制各种类型的蛋白质。相比之下,靶向mRNA纳米载体可选择性地诱导几乎任何已知蛋白质(或蛋白质组合)的表达。此外,它们携带的核苷酸可容易地根据公布的序列来制成。

[0412] 总之,实施例1证明加入到白细胞培养物中的单个纳米颗粒试剂可使用‘打了就跑’基因修饰有效地重编程T细胞用于治疗目的。此平台不增加制造的复杂性,因为它不需要特殊设备或培训。因此,其可在临床规模上基本上简化基于遗传细胞的疗法的制造,这意

味着用遗传工程化T细胞治疗患者可降低成本并且更广泛地适用。

[0413] 如本领域普通技术人员将理解的，本文所公开的每个实施方案可包括以下项、基本上由或由以下项组成：其特别陈述的要素、步骤、成分或组分。如本文所用的过渡术语“包括/包含(comprise)”或“包括/包含(comprises)”意指包括但不限于，并且允许包括未指定的元件、步骤、成分或组分，甚至在较大的量时。过渡短语“由...组成”排除未指定的任何元件、步骤、成分或组分。过渡短语“基本上由...组成”将实施方案的范围限制为指定的元件、步骤、成分或组分以及并不实质地影响所述实施方案的那些。如本文所用，材料效应将导致本文公开的纳米载体在将选择的细胞类型暴露于所述纳米载体48小时后改变所述选择的细胞类型表型的能力统计学显著降低。

[0414] 除非另外指示，否则说明书和权利要求书中所用的表示成分的量，诸如分子量、反应条件的特性等的所有数字应理解为在所有情况下都由术语“约”修饰。因此，除非有相反的指示，否则说明书和所附权利要求书中所陈述的数值参数都是近似值，该值可根据本发明要寻求获得的所需性质而变化。在最低限度并且不试图限制对权利要求书范围的等效范围的原则的应用，每个数值参数均应当至少根据报道的有效数字的数值和通过应用普通四舍五入技术来解读。当需要进一步清楚时，术语“约”在与陈述的数值或范围结合使用时具有本领域技术人员合理地归于它的含义，即将稍微大于或稍微小于陈述值或范围表示为在以下范围内：陈述值的±20％；陈述值±19％；陈述值±18％；陈述值±17％；陈述值±16％；陈述值±15％；陈述值±14％；陈述值±13％；陈述值±12％；陈述值±11％；陈述值±10％；陈述值±9％；陈述值±8％；陈述值±7％；陈述值±6％；陈述值±5％；陈述值±4％；陈述值±3％；陈述值±2％；或陈述值±1％。

[0415] 尽管阐述本发明的宽泛范围的数值范围和参数是近似值，但在特定实例中所阐述的数值尽可能精确地加以报告。然而，任何数值固有地包含必然由它们各自测试测量值中发现的标准偏差所产生的某些误差。

[0416] 除非本文另外指示或者与上下文含义明显相悖，否则在描述本发明的上下文中(尤其在所附权利要求书的上下文中)使用的术语“一个/种”、“所述”以及类似的指代语应解读为涵盖单数和复数指代语。本文中所列举数值的范围仅意在作为一种对落在所述范围内的每个单独数值单独提及的简便方法。除非本文另外指示，否则每个单独数值都并入到本说明书中，如同本文中单独列举了每个单独数值一样。可按任何适合的顺序执行本文所描述的所有方法，除非本文另外指示或明显与上下文矛盾。本文提供的任何和所有实施例或示例性语言(例如，“诸如”)仅意在更好地说明本发明，而不对以其它方式要求保护的本发明的范围构成限制。本说明书中的语言不应解读为指示任何未要求保护的要素是实践本发明所必需的。

[0417] 本文所公开的本发明的替代性要素或实施方案的分组不应被理解为限制。每个组成员可单独或者以与组中的其它成员或本文发现的其它要素的任何组合被提及和要求保护。出于便利和/或可专利性的原因，预期组中的一个或多个成员可包括在组中或从组中删除。当出现任何这种包括或删除时，本说明书被认为包含所修改的组，因此满足所附权利要求书中使用的所有马库什组的书面说明。

[0418] 本文描述了本发明的某些实施方案，包括为本发明人所知用于实施本发明的最佳方式。当然，本领域技术人员在阅读前面的说明后将会明了这些所述实施方案的变型。本发

明人预期本领域的熟练技术人员会适时采用此类变型，而且本发明人预期能以除了本文具体描述的方式之外的方式来实施。因此，本发明包括在随附的适用法律允许的权利要求中叙述的主题的所有修改和等效物。此外，除非本文另外指示或与上下文明显矛盾，否则在所有可行变型中的上述要素的任何组合都涵盖在本发明内。

[0419] 此外，整个本说明书对专利和印刷的出版物做了很多引用。上文引用的各参考文献和印刷出版物均以引用的方式单独并入本文，用于其特定的引用教导。

[0420] 最后，应了解，本文公开的本发明的实施方案是对本发明原理的说明。可用的其它修改形式也在本发明的范围内。因此，例如，但不限于，可根据本文的教义利用本发明的替代性配置。因而，本发明不限于明确示出和描述的方案。

[0421] 本文示出的细节是作为实施例并且仅出于对本发明的优选实施方案的说明性讨论的目的，并且之所以呈现这些细节，是为了提供认为是本发明的各种实施方案的原理和概念方面的最有用和易理解的描述的内容。在这点上，除对于本发明的基本理解所必需的之外，没有企图更详细地示出本发明的结构细节，借助于附图和/或实施例所作的描述使得本领域技术人员明了如何可以在实践中实施本发明的若干形式。

[0422] 除非在以下实施例中明确并毫无疑问地修改或是当含义的应用使得任何构建无意义或基本上无意义，否则在本公开中使用的定义和解释意指并且旨在控制任何未来构建。在术语的构建将使它无意义或基本上无意义的情况下，定义应该从韦氏字典(Webster′s Dictionary)，第3版或本领域普通技术人员已知的字典诸如生物化学和分子生物学牛津字典(Anthony Smith编，Oxford University Press，Oxford，2004)中取得。

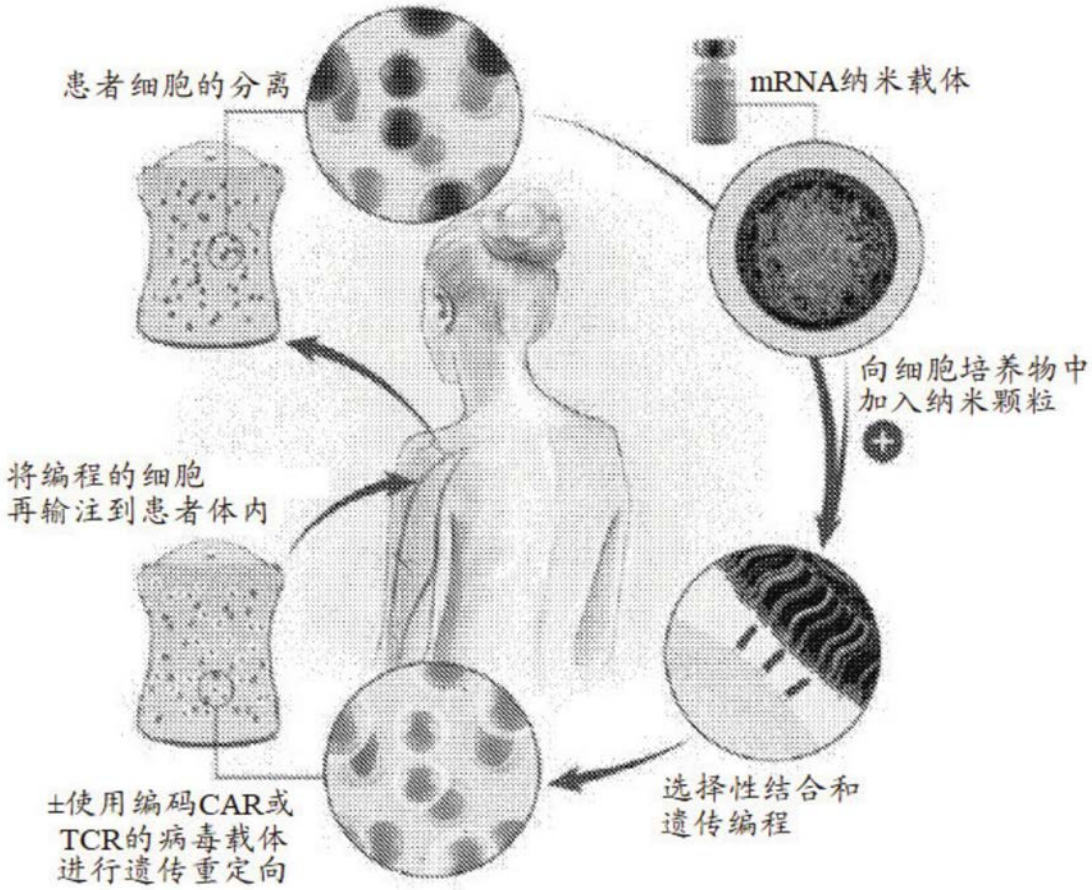

患者细胞的分离
mRNA纳米载体
向细胞培养物中
加入纳米颗粒
将编程的细胞
再输注到患者体内
±使用编码CAR或
TCR的病毒载体
进行遗传重定向
选择性结合和
遗传编程

图1A

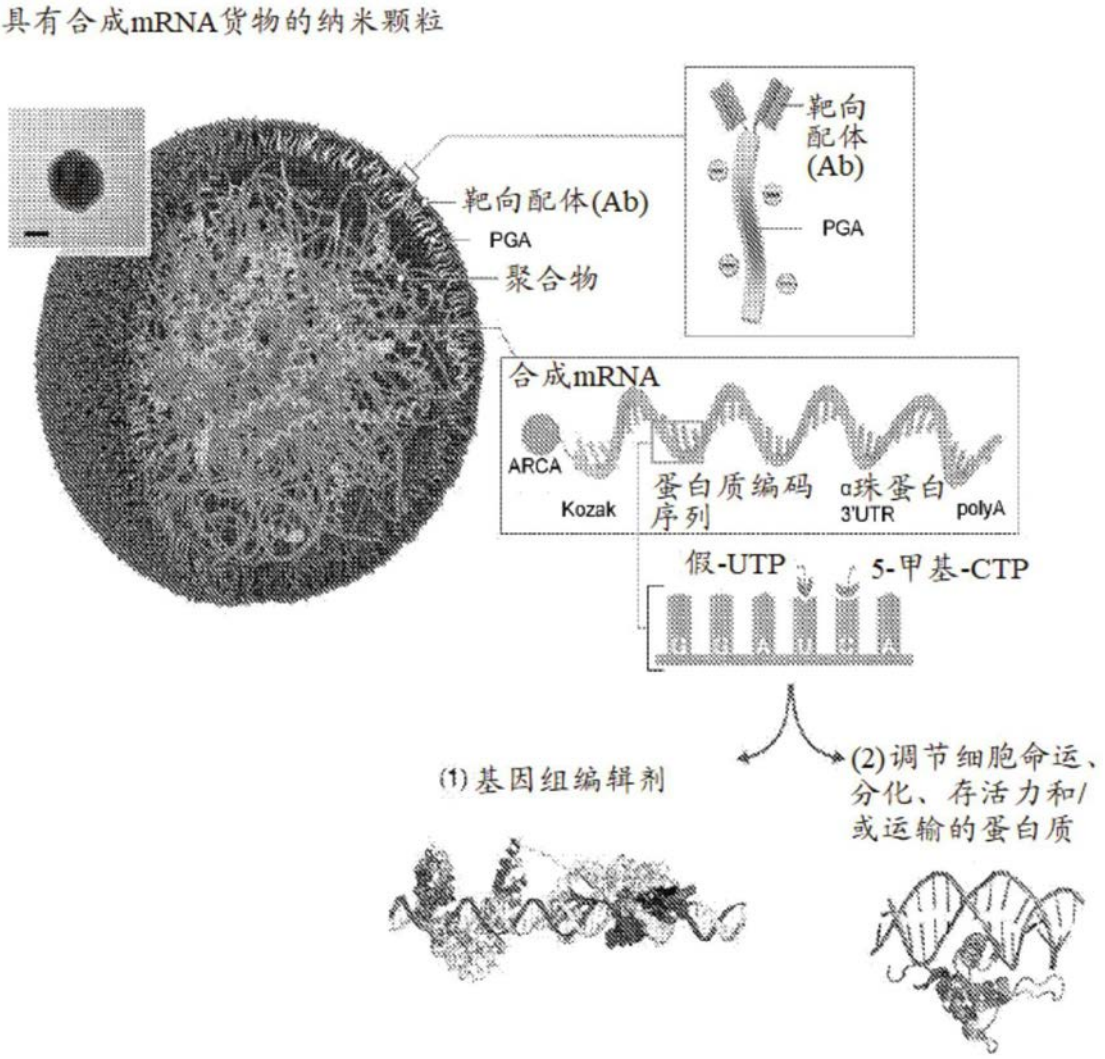
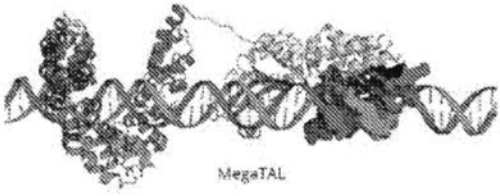

具有合成mRNA货物的纳米颗粒
靶向配体(Ab)
PGA
聚合物
靶向配体(Ab)
PGA
合成mRNA
ARCA
Kozak
蛋白质编码序列
α珠蛋白3'UTR
polyA
假-UTP
5-甲基-CTP
(1)基因组编辑剂
(2)调节细胞命运、分化、存活力和/或运输的蛋白质

图1B



治疗区	靶基因
T细胞信号传导	Shp1磷酸酶
免疫检查点	PD1受体
安全性	内源 TCRa
HIV抗性	CCR5和或CXCR4



治疗区	靶基因
T细胞记忆	FOXO1, LKB1
细胞衰老	TERT (防止端粒缩短)
细胞运输	趋化因子受体 CCR2b或CCR4

图1C

抗体特异性	染料	克隆	供应商
CD34	BV421	561	Biolegend
CD90	APC	5E10	Biolegend
CD105	PE-Cy7	43A3	Biolegend
CD49F	PE	GOH3	Biolegend
CD28	BV 510	CD28-2	Biolegend
CD62L	APC-CY7	DERG56	Biolegend
CD62L	PE-CY5	DERG56	Biolegend
CD45RA	ALEXA 700	HI1000	Biolegend
CCR7	PE	G043H7	Biolegend
CD3	APC	HIT3A	Biolegend
CD3	BV421	HIT3A	Biolegend
CD45R0	PERCP-CY5.5	UCHL1	Biolegend
CD8	BV421	SK1	Biolegend
IL2	BV421	MQ1-17H12	Biolegend
IFN-G	PE	B27	Biolegend
CD19	PE	H1B19	Biolegend
CD133	PE-Vio615	AC133	Miltenyi
Foxo1	--	C29H4	Cell Signal
抗兔IG FAB2	Alexa 647	--	Cell Signal
StrepTag II	生物素	--	--
链霉亲和素	APC	--	ebioscience
7AAD	--	--	ebioscience

图2

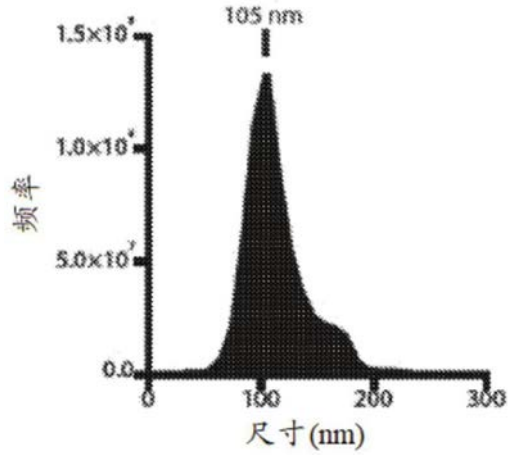

105 nm
1.5x10⁷
1.0x10⁷
5.0x10⁶
0.0
频率
0
100
200
300
尺寸(nm)

图3A

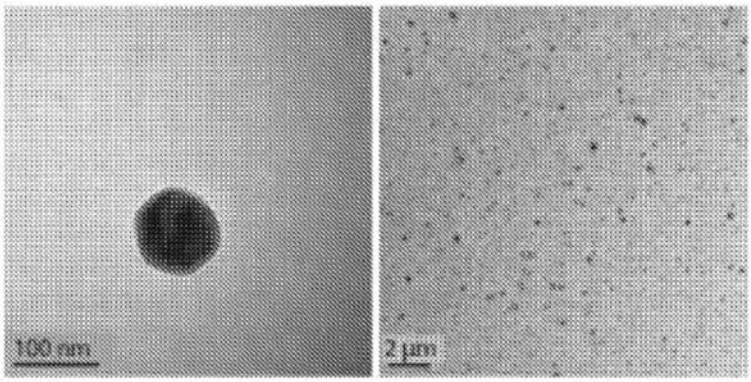

100 nm
2 μm

图3B

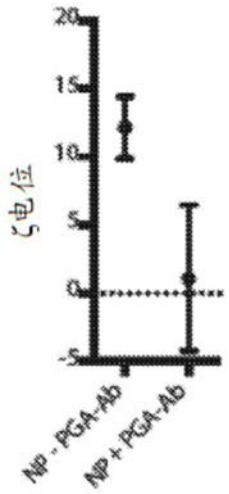

20
15
10
5
0
-5
ζ电位
NP - PGA-Ab
NP + PGA-Ab

图3C

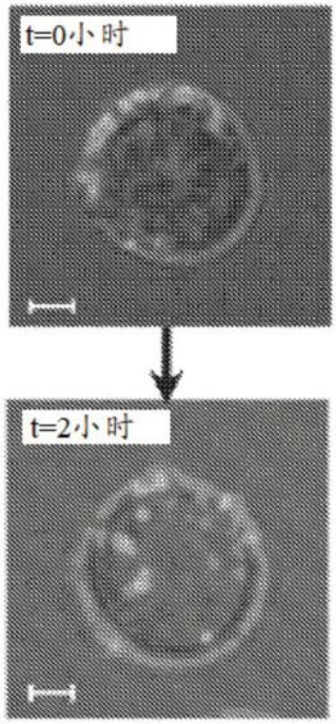


图4A

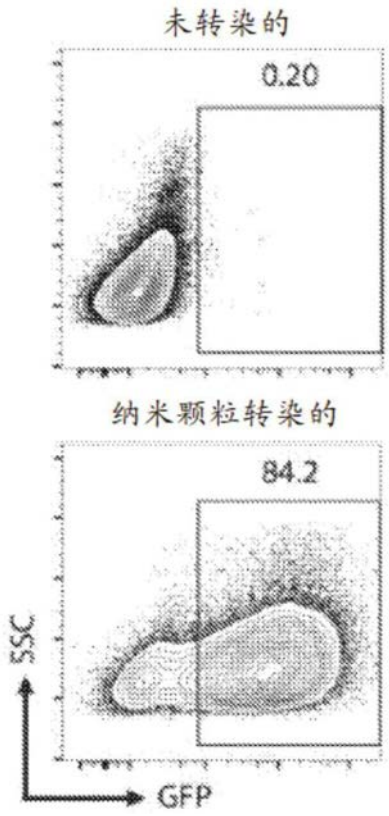


图4B

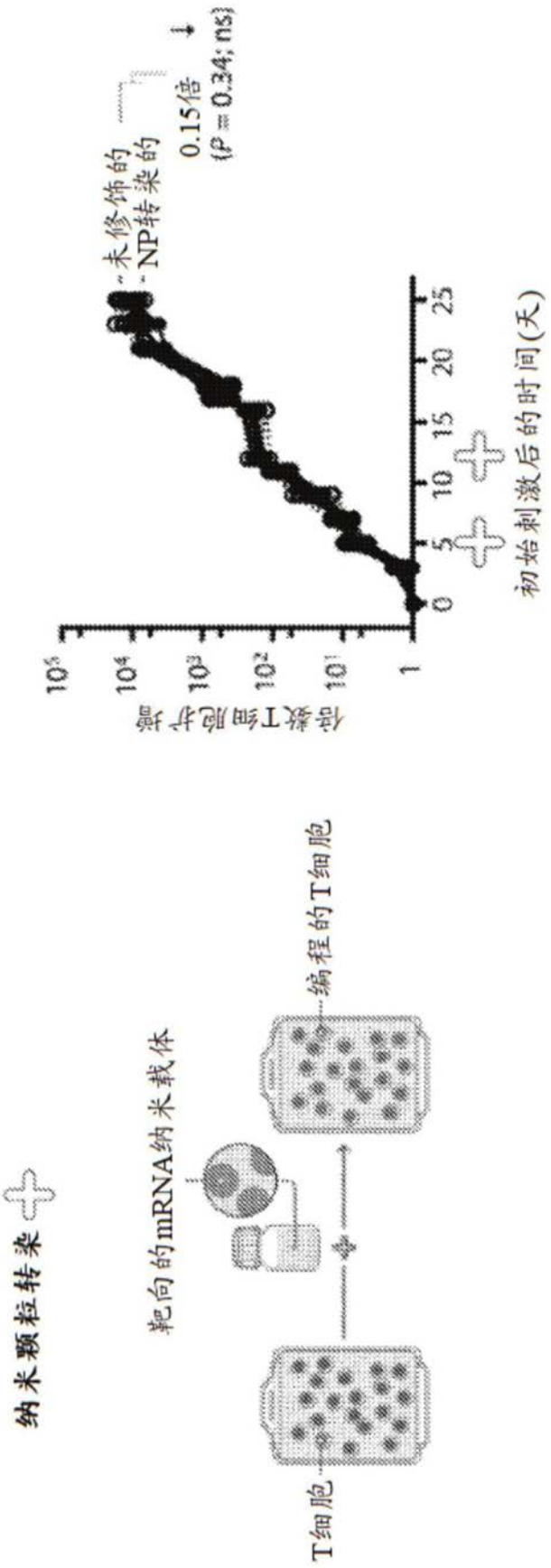

纳米颗粒转染
T细胞
靶向的mRNA纳米载体
编程的T细胞
未修饰的NP转染的
0.15倍
(P = 0.34; ns)
倍数T细胞扩增
初始刺激后的时间(天)

图4C

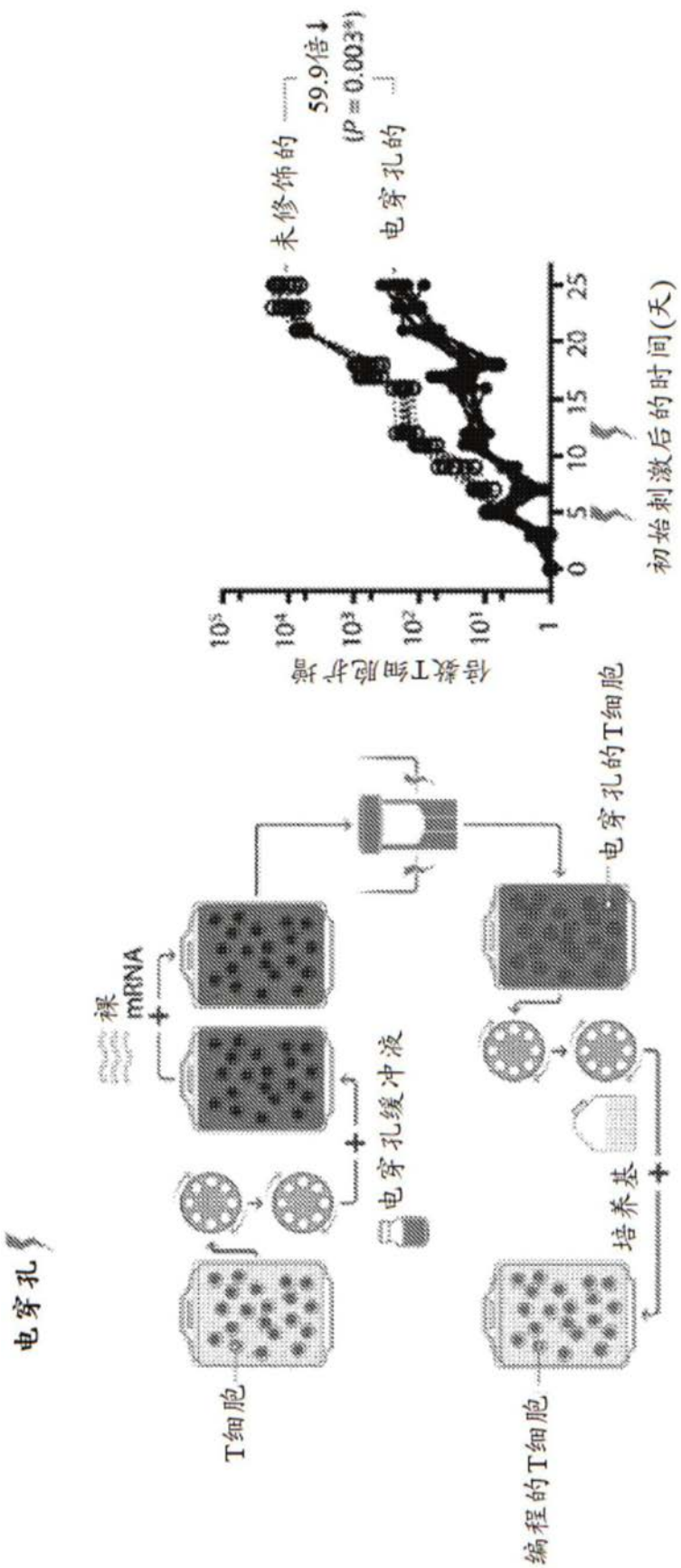

电穿孔
T细胞
裸mRNA
电穿孔缓冲液
培养基
编程的T细胞
电穿孔的T细胞
倍数T细胞扩增
初始刺激后的时间(天)
未修饰的
59.9倍↓
(P = 0.003**)
电穿孔的

图4D

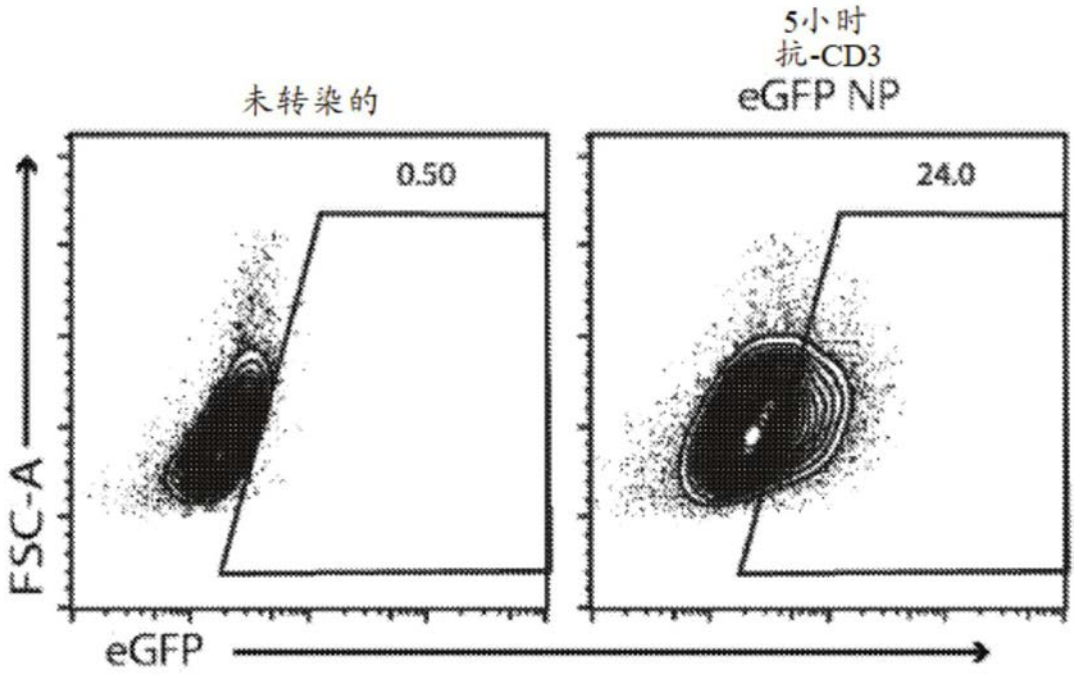


图5A

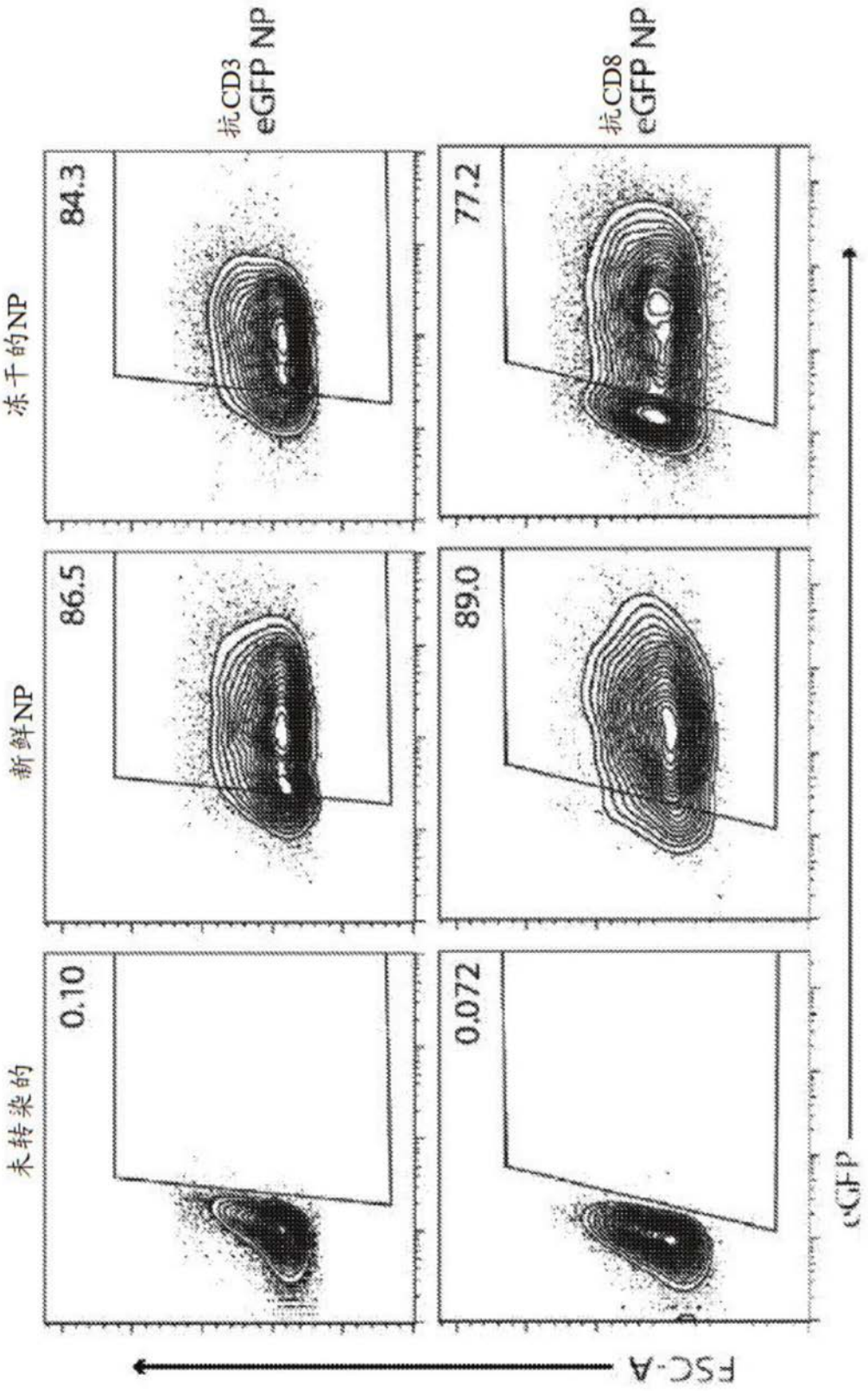

抗CD3 eGFP NP
抗CD8 eGFP NP
冻干的NP
新鲜NP
未转染的
84.3
77.2
86.5
89.0
0.10
0.072
FSC-A
eGFP

图5B

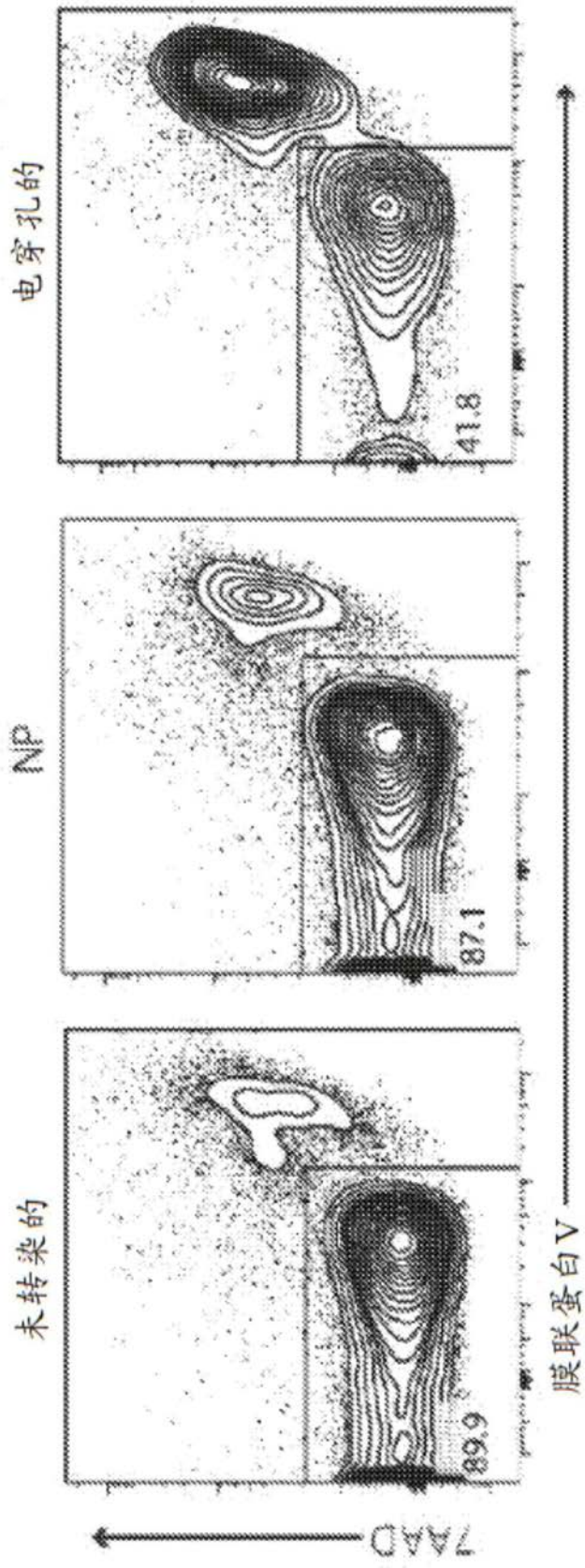


图6

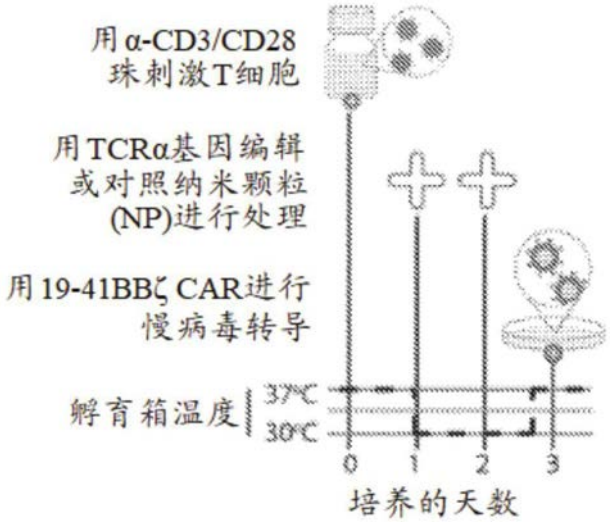

用α-CD3/CD28
珠刺激T细胞
用TCRα基因编辑
或对照纳米颗粒
(NP)进行处理
用19-41BBζ CAR进行
慢病毒转导
孵育箱温度
37℃
30℃
0
1
2
3
培养的天数

图7A

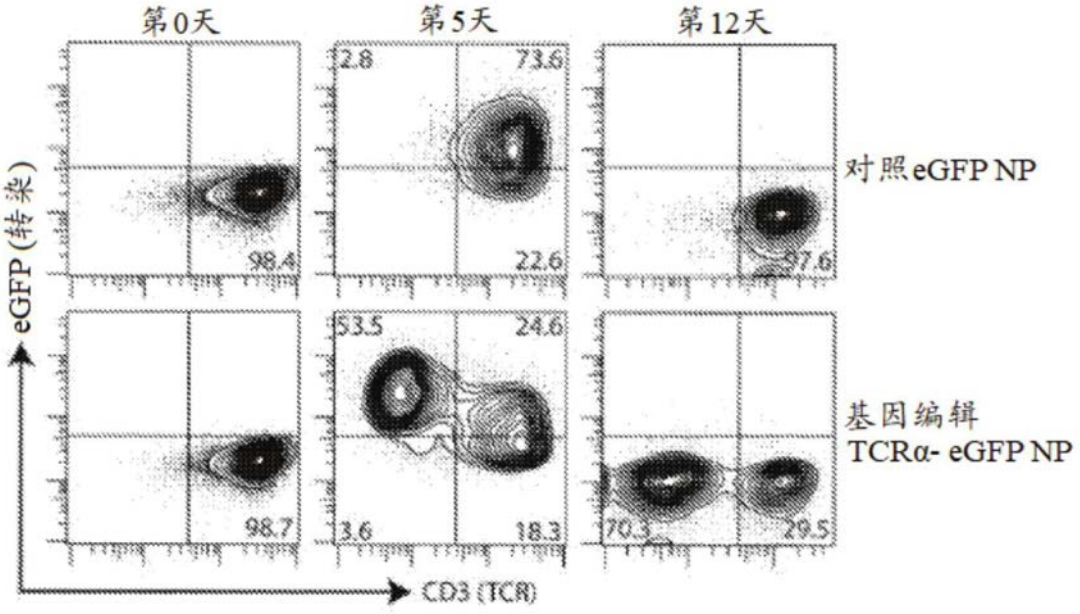

第0天
第5天
第12天
2.8
73.6
98.4
22.6
97.6
对照eGFP NP
53.5
24.6
98.7
3.6
18.3
70.3
29.5
基因编辑
TCRα- eGFP NP
eGFP (转染)
CD3 (TCR)

图7B

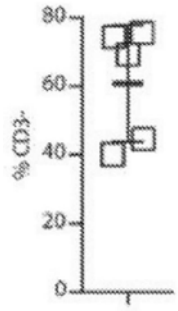

80
60
40
20
0
% CD3-

图7C

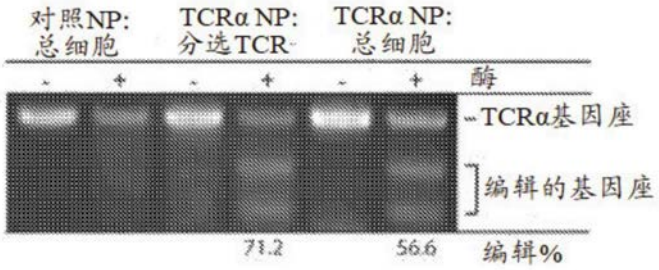

对照NP:
总细胞
TCRα NP:
分选TCR-
TCRα NP:
总细胞
-
+
-
+
-
+
酶
TCRα基因座
编辑的基因座
71.2
56.6
编辑%

图7D

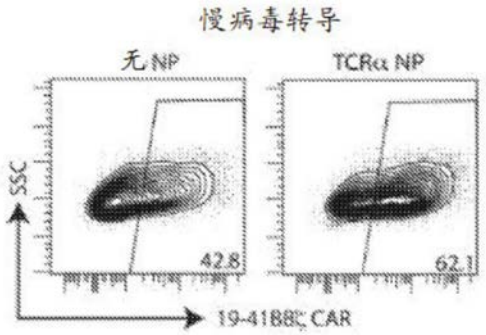

慢病毒转导
无NP
TCRα NP
SSC
42.8
62.1
19-4188ζ CAR

图7E

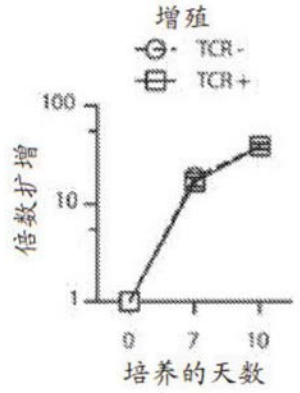

增殖
TCR-
TCR+
100
10
1
倍数扩增
0
7
10
培养的天数

图7F

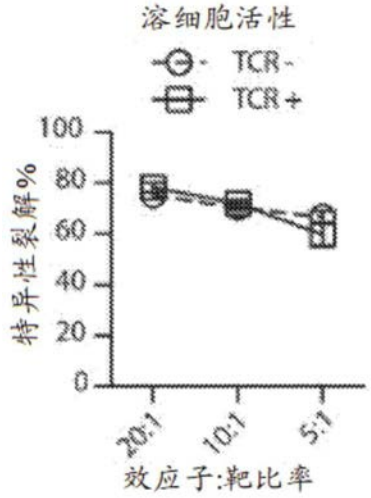

溶细胞活性
TCR-
TCR+
100
80
60
40
20
0
特异性裂解%
20:1
10:1
5:1
效应子:靶比率

图7G

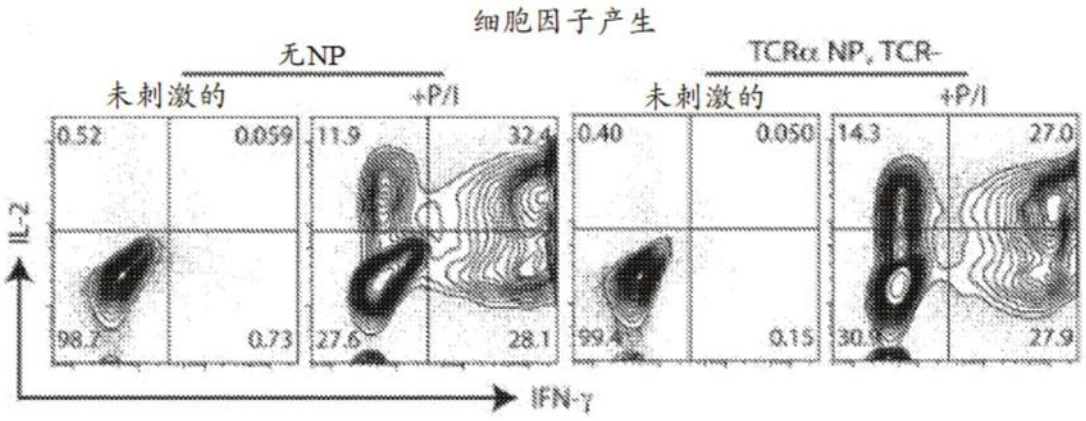

细胞因子产生
无NP
TCRα NP, TCR-
未刺激的
+P/I
未刺激的
+P/I
0.52
0.059
11.9
32.4
0.40
0.050
14.3
27.0
98.7
0.73
27.6
28.1
99.4
0.15
30.3
27.9
IL-2
IFN-γ

图7H

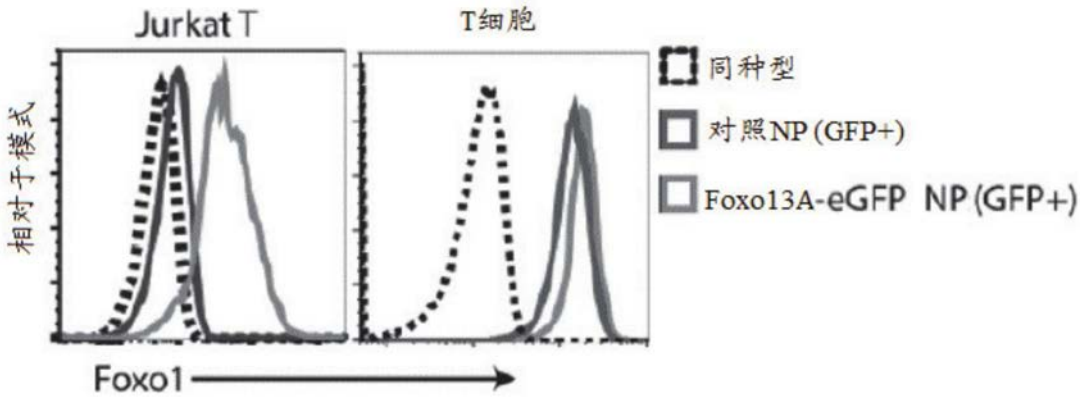

Jurkat T
T细胞
相对于模式
同种型
对照NP (GFP+)
Foxo13A-eGFP NP (GFP+)
Foxo1

图8A

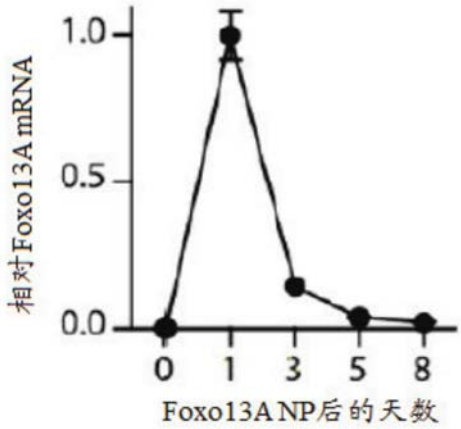

1.0
0.5
0.0
相对Foxo13A mRNA
0 1 3 5 8
Foxo13A NP后的天数

图8B

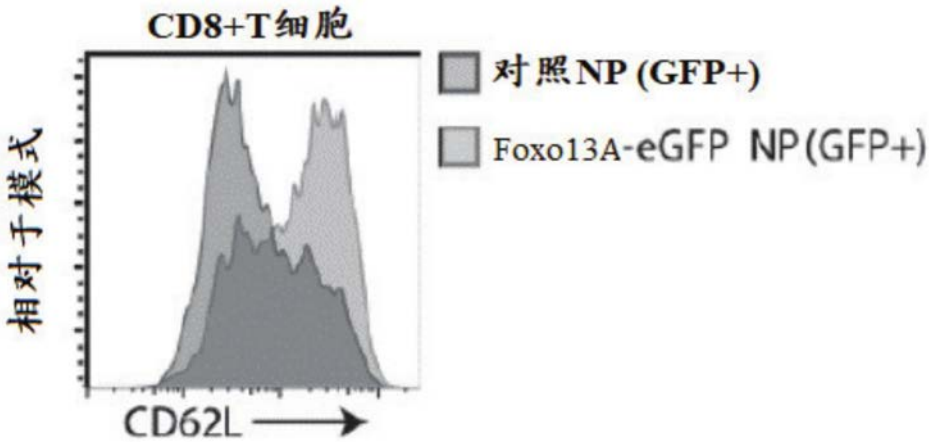

CD8+T细胞
对照NP (GFP+)
Foxo13A-eGFP NP (GFP+)
相对于模式
CD62L

图8C

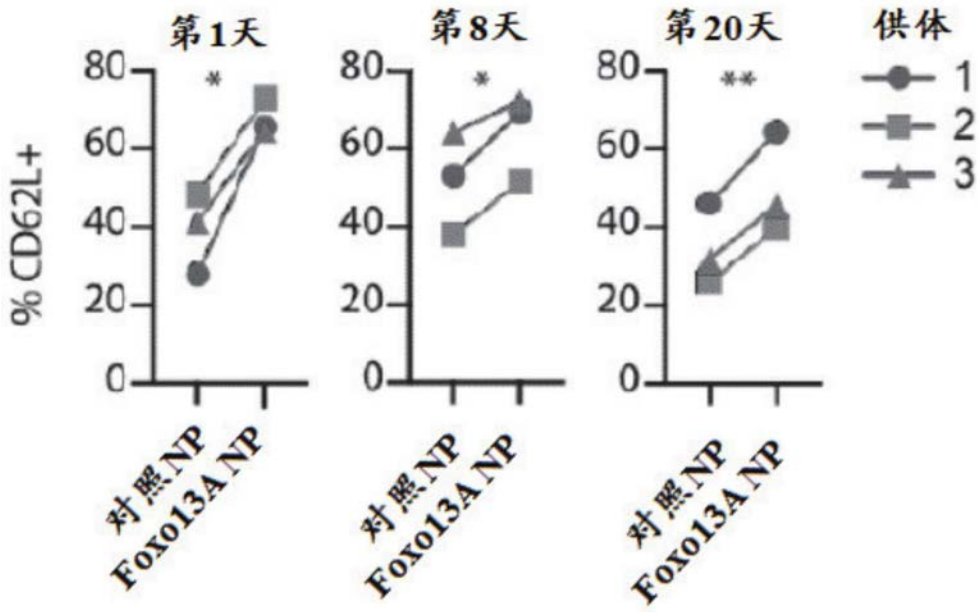

第1天
第8天
第20天
供体
1
2
3
% CD62L+
80
60
40
20
0
*
*
**
对照NP
Foxo13A NP

图8D

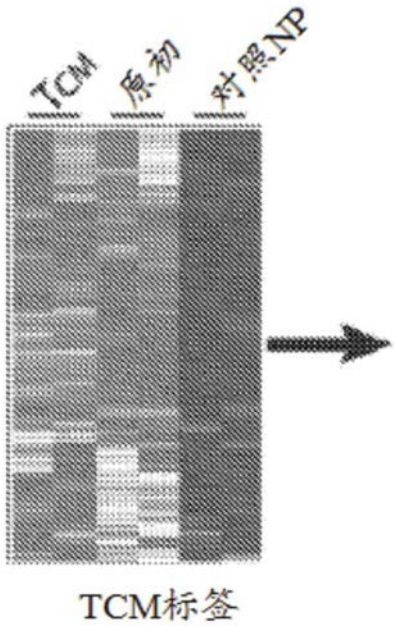

TCM
原初
对照NP
TCM标签

图8E

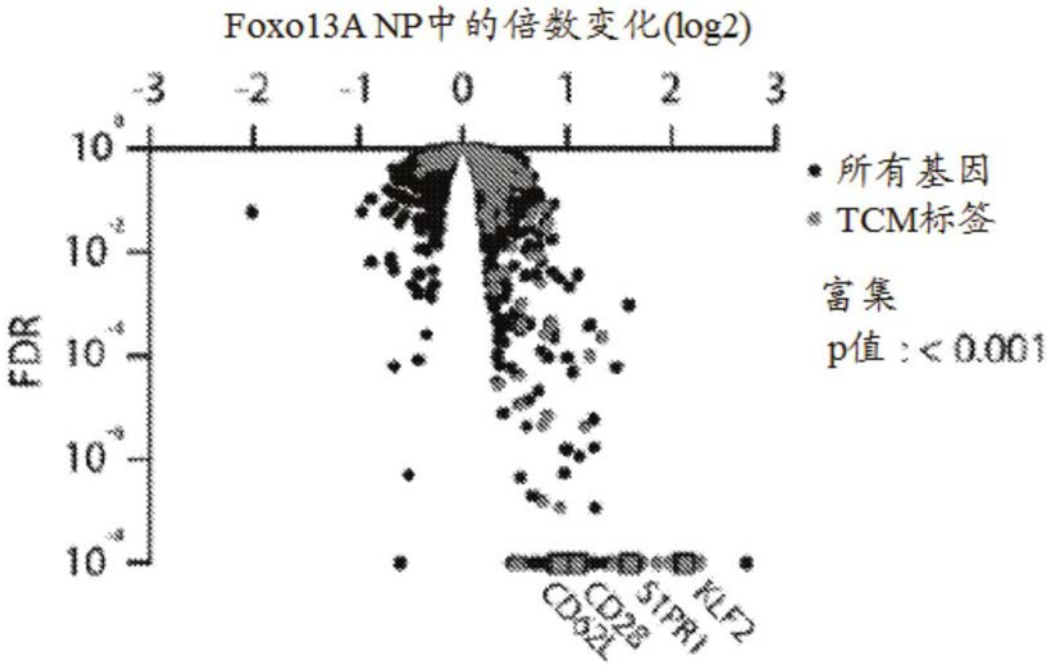

Foxo13A NP中的倍数变化(log2)
-3
-2
-1
0
1
2
3
FDR
所有基因
TCM标签
富集
p值 : < 0.001
CD62L
CD28
S1PR1
KLF2

图8F

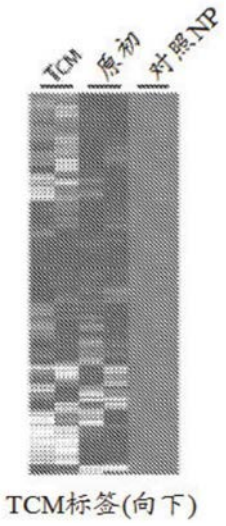

TCM
原初
对照NP
TCM标签(向下)

图9A

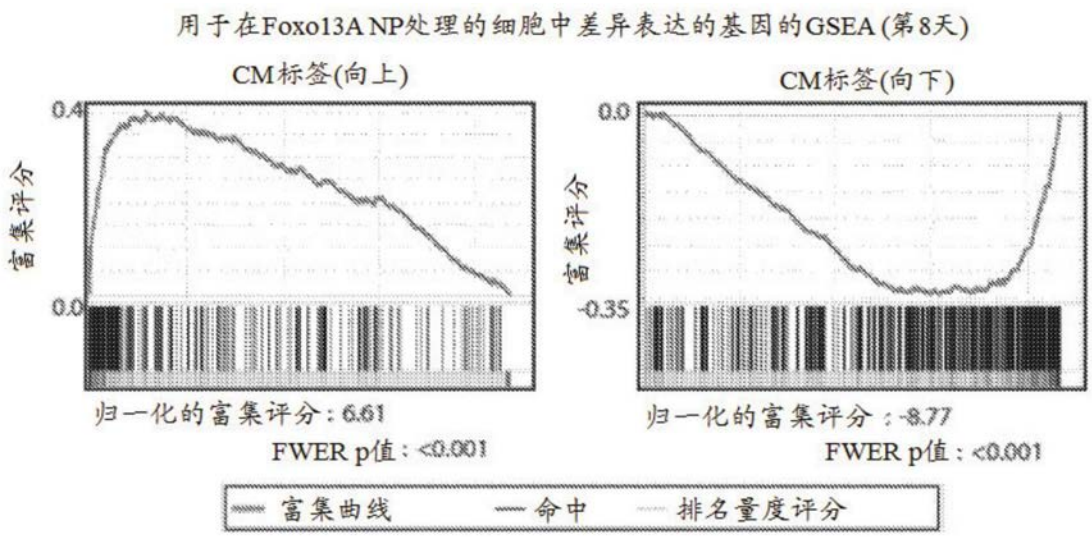

用于在Foxo13A NP处理的细胞中差异表达的基因的GSEA (第8天)
CM标签(向上)
CM标签(向下)
富集评分
0.4
0.0
-0.35
归一化的富集评分：6.61
归一化的富集评分：-8.77
FWER p值：<0.001
FWER p值：<0.001
富集曲线
命中
排名量度评分

图9B

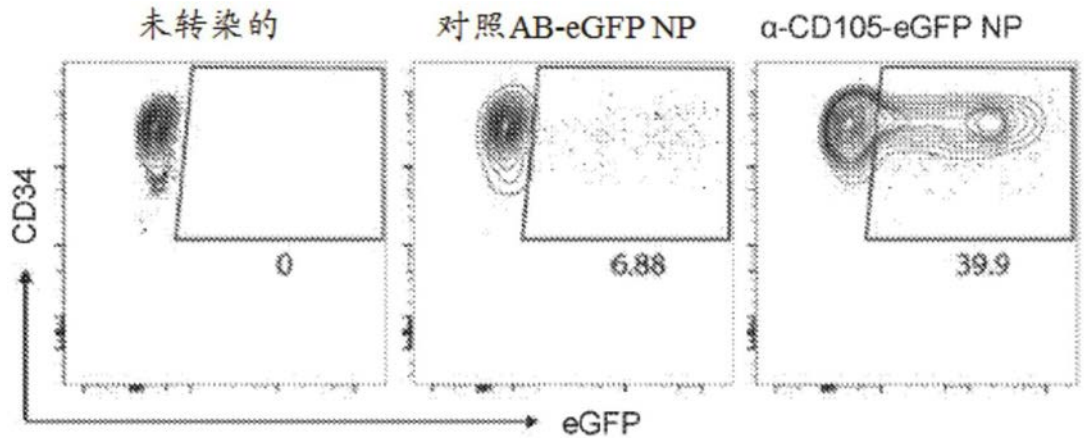

未转染的
对照AB-eGFP NP
α-CD105-eGFP NP
CD34
0
6.88
39.9
eGFP

图10A

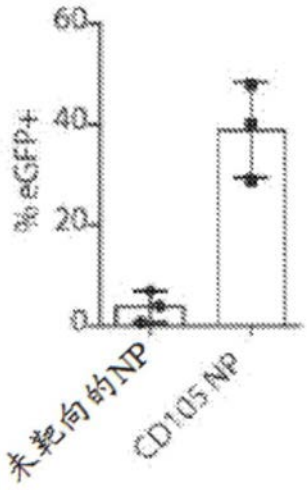


图10B

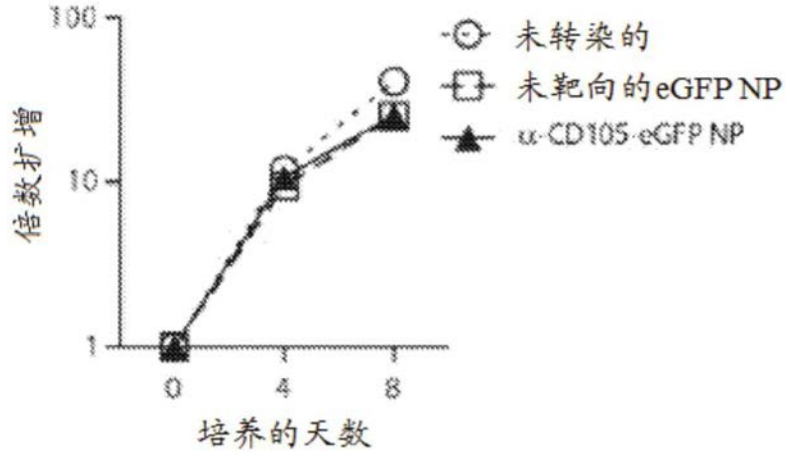


图10C

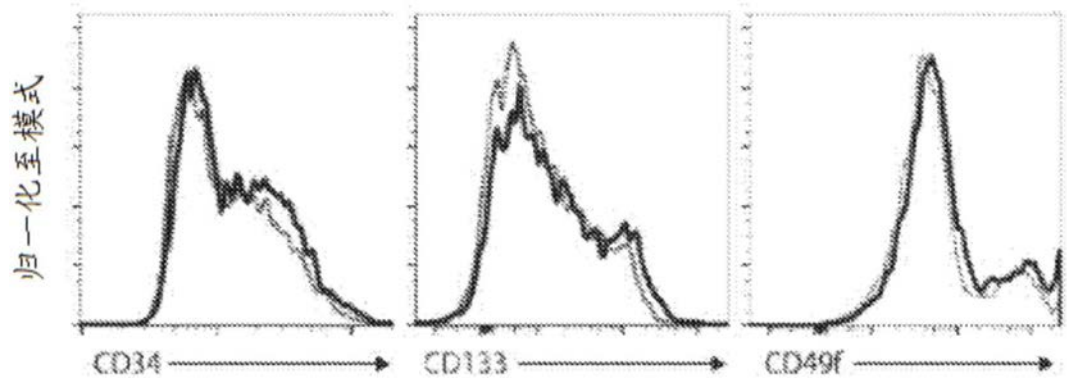


图10D

特异于TCRα的示例性megaTAL

MGSCRYPYDVPDYAPPKKKRKVVDLRTLGYSQQQQEKIKPKVRSTVAQHHEALVGHGFT
HAHIVALSQHPAALGTVAVTYQHIITALPEATHEDIVGVGKQWSGARALEALLTDAGELRGP
PLQLDTGQLVKIAKRGGVTAMEAVHASRNALTGAPLNLTPDQVVAIASNIGGKQALETVQR
LLPVLCQDHGLTPDQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPDQVVAIASNIGGKQA
LETVQRLLPVLCQDHGLTPDQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPDQVVAIAS
HDGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPDQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTP
DQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPDQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLC
QDHGLTPDQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPDQVVAIASNNGGKQALETV
QRLLPVLCQDHGLTPDQVVAIASNIGGKQALESIVAQLSRPDPALAALTNDHLVALACLGGR
PAMDAVKKGLPHAPELIRRVNRRIGERTSHRVAISRVGGSSRRESINPWILTGFADAEGSFI
LDIRNRNNESNRYRTSLRFQITLHNKDKSILENIQSTWKVGKITNSGDRAVMLRVTRFEDLK
VIIDHFEKYPLITQKLGDYKLFKQAFSVMENKEHLKENGIKELVRIKAKMNWGLTDELKKAFP
ENISKERPLINKNIPNFKWLAGFTSGDGYFGVNLKKVKGNAKVYVGLRFSISQHIRDKNLMN
SLITYLGCGSIWEKNKSEFSWLEFVVTKFSDINDKIIPVFQENTLIGVKLEDFEDWCKVAKLIE
EKKHLTESGLDEIKKIKLNMNKGRVF* (SEQ ID NO: 1)

图11

示例性Shp-1磷酸酶基因

登录号 NM_080549: 人

actctaaaacgagaagtacaagtgagttcccccaaggggtcggccgcgcctcttcctgtccccgccctgccggctgccccaggccagtgg
agtggcagccccagaactgggaccaccgggggtggtgaggcggcccggcactgggagctgcatctgaggcttagtccctgagctctctg
cctgcccagactagctgcacctcctcattccctgcgccccttcctctccggaagcccccaggatggtgaggtggtttcaccgagacctcagt
gggctggatgcagagaccctgctcaagggccgaggtgtccacggtagcttcctggctcggcccagtcgcaagaaccagggtgacttctcg
ctctccgtcagggtgggggatcaggtgacccatattcggatccagaactcaggggatttctatgacctgtatggaggggagaagtttgcgact
ctgacagagctggtggagtactacactcagcagcagggtgtcctgcaggaccgcgacggcaccatcatccacctcaagtacccgctgaa
ctgctccgatcccactagtgagaggtggtaccatggccacatgtctggcgggcaggcagagacgctgctgcaggccaagggcgagccct
ggacgtttcttgtgcgtgagagcctcagccagcctggagacttcgtgctttctgtgctcagtgaccagcccaaggctggcccaggctccccgc
tcagggtcacccacatcaaggtcatgtgcgagggtggacgctacacagtgggtggtttggagaccttcgacagcctcacggacctggtgga
gcatttcaagaagacggggattgaggaggcctcaggcgcctttgtctacctgcggcagccgtactatgccacgagggtgaatgcggctgac
attgagaaccgagtgttggaactgaacaagaagcaggagtccgaggatacagccaaggctggcttctgggaggagtttgagagtttgcag
aagcaggaggtgaagaacttgcaccagcgtctggaagggcagcggccagagaacaagggcaagaaccgctacaagaacattctccc
ctttgaccacagccgagtgatcctgcagggacgggacagtaacatccccgggtccgactacatcaatgccaactacatcaagaaccagct
gctaggccctgatgagaacgctaagacctacatcgccagccagggctgtctggaggccacggtcaatgacttctggcagatggcgtggca
ggagaacagccgtgtcatcgtcatgaccacccgagaggtggagaaaggccggaacaaatgcgtcccatactggcccgaggtgggcat
gcagcgtgcttatgggccctactctgtgaccaactgcggggagcatgacacaaccgaatacaaactccgtaccttacaggtctccccgctg
gacaatggagacctgattcgggagatctggcattaccagtacctgagctggcccgaccatggggtccccagtgagcctgggggtgtcctca
gcttcctggaccagatcaaccagcggcaggaaagtctgcctcacgcagggcccatcatcgtgcactgcagcgccggcatcggccgcac
aggcaccatcattgtcatcgacatgctcatggagaacatctccaccaagggcctggactgtgacattgacatccagaagaccatccagatg
gtgcgggcgcagcgctcgggcatggtgcagacggaggcgcagtacaagttcatctacgtggccatcgcccagttcattgaaaccactaag
aagaagctggaggtcctgcagtcgcagaagggccaggagtcggagtacgggaacatcacctatcccccagccatgaagaatgcccatg
ccaaggcctcccgcacctcgtccaagagcttggagtctagtgcagggaccgtggctgcgtcacctgtgagacggggtggccagagggga
ctgccagtgccgggtccccctgtgctgtctcctgacctgcaccaactgcctgtacttgccccccctgcacccggctgcagacacaaggaggat
gtgtatgagaacctgcacactaagaacaagagggaggagaaagtgaagaagcagcggtcagcagacaaggagaagagcaagggtt
ccctcaagaggaagtgagcggtgctgtcctcaggtggccatgcctcagccctgaccctgtggaagcatttcgcgatggacagactcacaac
ctgaacctaggagtgccccattcttttgtaatttaaatggctgcatcccccccacctctccctgaccctgtatatagcccagccaggccccagg
cagggccaacccttctcctcttgtaaataaagccctgggatcactgtgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa (SEQ ID NO: 2)

示例性PD1受体(PDCD1基因)

登录号 AY238517: 人

atgcagatcccacaggcgccctggccagtcgtctgggcggtgctacaactgggctggcggccaggatggttcttagactccccagaca
ggccctggaaccccccccaccttctccccagccctgctcgtggtgaccgaaggggacaacgccaccttcacctgcagcttctccaacac
atcggagagcttcgtgctaaactggtaccgcatgagccccagcaaccagacggacaagctggccgccttccccgaggaccgcagc
cagcccggccaggactgccgcttccgtgtcacacaactgcccaacgggcgtgacttccacatgagcgtggtcagggcccggcgcaat
gacagcggcacctacctctgtggggccatctccctggcccccaaggcgcagatcaaagagagcctgcgggcagagctcagggtga
cagagagaagggcagaagtgcccacagcccaccccagcccctcacccaggccagccggccagttccaaaccctggtggttggtgt
cgtgggcggcctgctgggcagcctggtgctgctagtctgggtcctggccgtcatctgctcccgggccgcacgagggacaataggagcc
aggcgcaccggccagcccctgaaggaggacccctcagccgtgcctgtgttctctgtggactatggggagctggatttccagtggcgag
agaagaccccggagccccccgtgccctgtgtccctgagcagacggagtatgccaccattgtctttcctagcggaatgggcacctcatcc
cccgcccgcaggggctcagctgacggccctcggagtgcccagccactgaggcctgaggatggacactgctcttggcccctctga
(SEQ ID NO: 3)

图11(续)

示例性TCRα基因

登录号 X04954: 人

atgacatccattcgagctgtatttatattcctgtggctgcagctggacttggtgaatggagagaatgtggagcagcatccttcaaccctgagtgtc
caggagggagacagcgctgttatcaagtgtacttattcagacagtgcctcaaactacttcccttggtataagcaagaacttggaaaaagacct
cagcttattatagacattcgttcaaatgtgggcgaaaagaaagaccaacgaattgctgttacattgaacaagacagccaaacatttctccctgc
acatcacagagacccaacctgaagactcggctgtctacttctgtgcagcaagtaggaaggactctgggggttaccagaaagttacctttgga
actggaacaaagctccaagtcatcccaaatatccagaaccctgac (SEQ ID NO: 4)

示例性CCR5基因

登录号 U66285: 人

ttggattatcaagtgtcaagtccaatctatgacatcaattattatacatcggagccctgccaaaaaatcaatgtgaagcaaatcgcagcccgcc
tcctgcctccgctctactcactggtgttcatctttggttttgtgggcaacatgctggtcatcctcatcctgataaactgcaaaaggctgaagagcatg
actgacatctacctgctcaacctggccatctctgacctgtttttccttcttactgtcccctctgggctcactatgctgccgcccagtgggactttgga
aatacaatgtgtcaactcttgacagggctctatttttataggcttcttctctggaatcttcttcatcatcctcctgacaatcgataggtacctggctgtcg
tccatgctgtgtttgctttaaaagccaggacggtcacctttggggtggtgacaagtgtgatcacttgggtggtggctgtgtttgcgtctctcccagg
aatcatctttaccagatctcaaaaagaaggtcttcattacacctgcagctctcattttccatacattaaagatagtcatcttggggctggtcctgcc
gctgcttgtcatggtcatctgctactcgggaatcctaaaaactctgcttcggtgtcgaaatgagaagaagaggcacagggctgtgaggcttatc
ttcaccatcatgattgtttattttctcttctgggctccctacaacattgtccttctcctgaacaccttccaggaattctttggcctgaataattgcagtagc
tctaacaggttggaccaagctatgcaggtgacagagactcttgggatgacgcactgctgcatcaaccccatcatctatgcctttgtcggggag
aagttcagaaactacctcttagtcttcttccaaaagcacattgccaaacgcttctgcaaatgctgttctattttccagcaagaggctcccgagcga
gcaagctcagtttacacccgatccactggggagcaggaaatatctgtgggcttgtga (SEQ ID NO: 5)

示例性CXCR4基因

登录号 NM_001008540: 人

ttttttttcttccctctagtgggcggggcagaggagttagccaagatgtgactttgaaaccctcagcgtctcagtgccctttgttctaaacaaagaa
ttttgtaattggttctaccaaagaaggatataatgaagtcactatgggaaaagatggggaggagagttgtaggattctacattaattctcttgtgc
ccttagcccactacttcagaatttcctgaagaaagcaagcctgaattggttttttaaattgctttaaaaatttttttttaactgggttaatgcttgctgaatt
ggaagtgaatgtccattcctttgcctcttttgcagatatacacttcagataactacaccgaggaaatgggctcaggggactatgactccatgaa
ggaaccctgtttccgtgaagaaaatgctaatttcaataaaatcttcctgcccaccatctactccatcatcttcttaactggcattgtgggcaatgga
ttggtcatcctggtcatgggttaccagaagaaactgagaagcatgacggacaagtacaggctgcacctgtcagtggccgacctcctctttgtc
atcacgcttcccttctgggcagttgatgccgtggcaaactggtactttgggaacttcctatgcaaggcagtccatgtcatctacacagtcaacctc
tacagcagtgtcctcatcctggccttcatcagtctggaccgctacctggccatcgtccacgccaccaacagtcagaggccaaggaagctgttg
gctgaaaaggtggtctatgttggcgtctggatccctgccctcctgctgactattcccgacttcatctttgccaacgtcagtgaggcagatgacag
atatatctgtgaccgcttctaccccaatgacttgtgggtggttgtgttccagtttcagcacatcatggttggccttatcctgcctggtattgtcatcctgt
cctgctattgcattatcatctccaagctgtcacactccaagggccaccagaagcgcaaggccctcaagaccacagtcatcctcatcctggcttt
cttcgcctgttggctgccttactacattgggatcagcatcgactccttcatcctcctggaaatcatcaagcaagggtgtgagtttgagaacactgt
gcacaagtggatttccatcaccgaggccctagctttcttccactgttgtctgaaccccatcctctatgctttccttggagccaaatttaaaacctctg
cccagcacgcactcacctctgtgagcagagggtccagcctcaagatcctctccaaaggaaagcgaggtggacattcatctgtttccactgag
tctgagtcttcaagttttcactccagctaacacagatgtaaaagacttttttttatacgataaataactttttttttaagttacacatttttcagatataaaa
gactgaccaatattgtacagttttattgcttgttggatttttgtcttgtgtttctttagttttgtgaagtttaattgacttatttatataaatttttttgtttcatattg
atgtgtgtctaggcaggacctgtggccaagttcttagttgctgtatgtctcgtggtaggactgtagaaaagggaactgaacattccagagcgtgt
agtgaatcacgtaaagctagaaatgatccccagctgtttatgcatagataatctctccattcccgtggaacgtttttcctgttcttaagacgtgatttt
gctgtagaagatggcacttataaccaaagcccaaagtggtatagaaatgctggtttttcagttttcaggagtgggttgatttcagcacctacagt
gtacagtcttgtattaagttgttaataaaagtacatgttaaacttaaaaaaaaaaaaaaaaaa (SEQ ID NO: 6)

图11(续)

示例性FOXO1基因

登录号 BC021981: 人

ttccgtccttccgtccgcggccctgtcagctggagcgcggcgcaggctctgccccggcccggcggctctggccggccgtccagtccgtgcgg
cggaccccgaggagcctcgatgtggatggccccgcgaagttaagttctgggctcgcgcttccactccgccgcgccttcctcccagtttccgtcc
gctcgccgcaccggcttcgttcccccaaatctcggaccgtcccttcgcgccccctccccgtccgccccagtgctgcgttctcccctcttggctc
tcctgcggctgggggagggcgggggtcaccatggccgaggcgcctcaggtggtggagatcgacccggacttcgagccgctgccccggc
cgcgctcgtgcacctggccgctgcccaggccggagtttagccagtccaactcggccacctccagcccggcgccgtcgggcagcgcggctg
ccaaccccgacgccgcggcgggcctgccctcggcctcggctgccgctgtcagcgccgacttcatgagcaacctgagcttgctggaggaga
gcgaggacttcccgcaggcgcccggctccgtggcggcggcggtggcggcggccgccgcggccgccaccgggggctgtgcgggg
acttccagggcccggaggcgggctgcctgcacccagcgccaccgcagcccccgccgcccgggccgctgtcgcagcacccgccggtgcc
ccccgccgccgctgggccgctcgcggggcagccgcgcaagagcagctcgtcccgccgcaacgcgtggggcaacctgtcctacgccgac
ctcatcaccaaggccatcgagagctcggcggagaagcggctcacgctgtcgcagatctacgagtggatggtcaagagcgtgccctacttca
aggataagggtgacagcaacagctcggcgggctggaagaattcaattcgtcataatctgtccctacacagcaagttcattcgtgtgcagaat
gaaggaactggaaaaagttcttggtggatgctcaatccagagggtggcaagagcgggaaatctcctaggagaagagctgcatccatgga
caacaacagtaaatttgctaagagccgaagccgagctgccaagaagaaagcatctctccagtctggccaggagggtgctggggacagcc
ctggatcacagttttccaaatggcctgcaagccctggctctcacagcaatgatgactttgataactggagtacatttcgccctcgaactagctca
aatgctagtactattagtgggagactctcacccattatgaccgaacaggatgatcttggagaaggggatgtgcattctatggtgtacccgccat
ctgccgcaaagatggcctctactttacccagtctgtctgagataagcaatcccgaaaacatggaaaatcttttggataatctcaaccttctctcat
caccaacatcattaactgtttcgacccagtcctcacctggcaccatgatgcagcagacgccgtgctactcgtttgcgccaccaaacaccagttt
gaattcacccagcccaaactaccaaaaatatacatatggccaatccagcatgagccctttgccccagatgcctatacaaacacttcaggac
aataagtcgagttatggaggtatgagtcagtataactgtgcgcctggactcttgaaggagttgctgacttctgactctcctccccataatgacatta
tgacaccagttgatcctggggtagcccagcccaacagccgggttctgggccagaacgtcatgatgggccctaattcggtcatgtcaacctatg
gcagccaggcatctcataacaaaatgatgaatcccagctcccatacccaccctggacatgctcagcagacatctgcagttaacgggcgtcc
cctgccccacacggtaagcaccatgccccacacctcgggtatgaaccgcctgacccaagtgaagacacctgtacaagtgcctctgcccca
ccccatgcagatgagtgccctgggggctactcctccgtgagcagctgcaatggctatggcagaatgggccttctccaccaggagaagctc
ccaagtgacttggatggcatgttcattgagcgcttagactgtgacatggaatccatcattcggaatgacctcatggatggagatacattggatttt
aactttgacaatgtgttgcccaaccaaagcttcccacacagtgtcaagacaacgacacatagctgggtgtcaggctgagggttagtgagcag
gttacacttaaaagtacttcagattgtctgacagcaggaactgagagaagcagtccaaagatgtctttcaccaactccctttagttttctcggtta
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa (SEQ ID NO: 7)

图11(续)

示例性LKB1基因

登录号 NM_000455: 人

gcgtgtcgggcgcggaaggggaggcggcccggggcgcccgcgagtgaggcgcggggcggcgaagggagcgcgggtggcg
gcacttgctgccgcggccttggatgggctgggccccctcgccgctccgcctcctccacacgcgcggcggccgcggcgaggggga
cgcgccgcccggggcccggcaccttcgggaacccccccggccccggagcctgcggcctgcgccgcctcggccgccgggagccccg
tggagcccccgccgccgcgccgcccccgcggaccggacgctgagggcactcggggcggggcgcgcgctcgggcagacgtttgcg
gggaggggggcgcctgccgggcccccggcgaccaccttgggggtcgcgggccggctcgggggggcgcccagtgcgggccctcgc
gggcgccgggcagcgaccagccctgagcggagctgttggccgcggcgggaggcctcccggacgcccccagccccccgaacgc
tcgcccgggccggcgggagtcggcgcccccccgggaggtccgctcggtcgtccgcggcggagcgtttgctcctgggacaggcggtg
ggaccggggcgtcgccggagacgcccccagcgaagttgggctctccaggtgtgggggtcccgggggggtagcgacgtcgcggacc
cggcctgtgggatgggcggcccggagaagactgcgctcggccgtgttcatacttgtccgtgggcctgaggtccccggaggatgacct
agcactgaaaagccccggccggcctccccagggtccccgaggacgaagttgaccctgaccgggccgtctcccagttctgaggccc
gggtcccactggaactcgcgtctgagccgccgtcccggaccccccggtgcccgccggtccgcagaccctgcaccgggcttggactcg
cagccgggactgacgtgtagaacaatcgtttctgttggaagaagggtttttccccttcctttggggttttgttgccttttttttttctttttctttgtaa
aattttggagaagggaagtcggaacacaaggaaggaccgctcacccgcggactcagggctggcggcgggactccaggaccctg
ggtccagcatggaggtggtggacccgcagcagctgggcatgttcacggagggcgagctgatgtcggtgggtatggacacgttcatcc
accgcatcgactccaccgaggtcatctaccagccgcgccgcaagcgggccaagctcatcggcaagtacctgatgggggacctgct
gggggaaggctcttacggcaaggtgaaggaggtgctggactcggagacgctgtgcaggagggccgtcaagatcctcaagaagaa
gaagttgcgaaggatccccaacggggaggccaacgtgaagaaggaaattcaactactgaggaggttacggcacaaaaatgtcat
ccagctggtggatgtgttatacaacgaagagaagcagaaaatgtatatggtgatggagtactgcgtgtgtggcatgcaggaaatgctg
gacagcgtgccggagaagcgtttcccagtgtgccaggcccacgggtacttctgtcagctgattgacggcctggagtacctgcatagcc
agggcattgtgcacaaggacatcaagccggggaacctgctgctcaccaccggtggcaccctcaaaatctccgacctgggcgtggc
cgaggcactgcacccgttcgcggcggacgacacctgccggaccagccagggctccccggctttccagccgcccgagattgccaac
ggcctggacaccttctccggcttcaaggtggacatctggtcggctggggtcaccctctacaacatcaccacgggtctgtacccttcga
aggggacaacatctacaagttgtttgagaacatcgggaaggggagctacgccatcccgggcgactgtggcccccccgctctctgacct
gctgaaagggatgcttgagtacgaaccggccaagaggttctccatccggcagatccggcagcacagctggttccggaagaaacat
cctccggctgaagcaccagtgcccatcccaccgagcccagacaccaaggaccggtggcgcagcatgactgtggtgccgtacttgg
aggacctgcacggcgcggacgaggacgaggacctcttcgacatcgaggatgacatcatctacactcaggacttcacggtgcccgg
acaggtcccagaagaggaggccagtcacaatggacagcgccggggcctccccaaggccgtgtgtatgaacggcacagaggcg
gcgcagctgagcaccaaatccagggcggagggccgggcccccaaccctgcccgcaaggcctgctccgccagcagcaagatcc
gccggctgtcggcctgcaagcagcagtgaggctggccgcctgcagcccgtgtccaggagccccgccaggtgcccgcgccaggcc
ctcagtcttcctgccggttccgcccgccctcccggagaggtggccgccatgcttctgtgccgaccacgccccaggacctccggagcg
ccctgcagggccgggcaggggacagcagggaccgggcgcagccctccccctcggccgcccggcagtgcacgcggcttgttg
acttcgcagccccgggcggagccttcccgggcgggcgtgggaggagggaggcggcctccatgcactttatgtggagactactggcc
ccgcccgtggcctcgtgctccgcagggcgcccagcgccgtccggcggcccgccgcagaccagctggcgggtgtggagaccag
gctcctgaccccgccatgcatgcagcgccacctggaagccgcgcggccgctttggttttttgtttggttggttccatttttcttttttttcttttttttttt
aagaaaaaataaaaggtggatttgagctgtggctgtgaggggtgtttgggagctgctgggtggcaggggggctgtggggtcgggctc
acgtcgcggccgcctttgcgctctcgggtcaccctgctttggcggcccggccggagggcaggaccctcacctctccccaaggccac
tgcgctcttgggaccccagagaaaaccccggagcaagcaggagtgtgcggtcaatatttatatcatccagaaaagaaaaacacgag
aaacgccatcgcgggatggtgcagacgcggcggggactcggagggtgccgtgcgggcgaggccgcccaaatttggcaataaata
aagcttgggaagcttggacctgaaaaaaaaaa (SEQ ID NO: 8)

图11(续)

示例性EOMES基因

NCBI参考序列：NC_000003.12 人

aagtttccaagtggtcaacttgaccgatgctttggcaattgaaaaagggcagaaaggcgcgggctagtgggtggatggggacaaagat
ctaagtcaccttcttccagcgtgtgagcctgggaggagggtgggggtcctgaggagcaagaggtacgaggaaggaaaaggagaggg
cttctgggttagtttccacctcctgctttccaactcacggcgctttccttccggaaaggacgctggattcagggcgcgccagtacgcgcagta
gcggcccgcgagtcggcaggtgggtagccccggcgcgggaggaaggggaagttaccttcccctcggaagagggcgctggctccccc
atcctgcctttataataaggccaccggaggagaggaagcagccagctgccgtctgcgctttgcaaagcatgcagttaggggagcagctc
ttggtgagctcagtgaacctgcctggcgcgcacttctacccgctggagagtgcgcgaggcggcagcggcgggagcgctggccacctcc
ccagcgcggccccctctcctcagaagttggacttagacaaagcgtccaagaagttttccggcagtctctcctgcgaggcggtgagcggg
gagcccgcagccgccagcgcaggggccccgcggccatgcttagtgacaccgacgccggggacgcatttgccagcgctgcggcagt
ggccaagccggggccccggacggccgcaagggctccccctgcggggaggaggagctgccctccgccgctgcagccgccgccgc
cgccgccgccgcggctgcggccactgcgcgctactccatggacagcctgagctccgagcggtactacctccagtccccggtcctcag
gggtcggagctggctgcgccctgctcactcttcccgtaccaggcggcggctggggcgccccacggacctgtgtacccggctcctaacgg
ggcgcgctacccctacggctccatgctgccccccggcggcttccccgcggctgtgtgcccacccgggagggcgcagttcggcccagga
gccggtgcgggcagtggcgcgggcggtagcagcggcgggggcggcggcccgggcacctatcagtacagccaggggctccgctct
acgggccgtaccctggagccgcagcggcgggatcttgcggaggactgggggcctgggggttccaggttctggcttccgtgcccacgtc
tacctgtgcaaccggcctctgtggctcaaattccaccgccaccaaactgagatgatcattacgaaacagggcaggtgagcgcagcgtg
gaggggcccctgggttcggggataaagggtgacgtgtggtcctggggaaggtccgggatgagggagctgaacccagttgttccgcgcg
gtgcttagagtgtttcaccgcgcgcaataaatctccgtagacaccgcatctccaatgcggtgtccctctgtgtcagtgccccggcggctcttg
cagggtgccaatgttacggctgtacaccgcttttccctcccatcatcctcacctgaacagacctggaggaggcggaaatggaaattaggg
catgtccacaagctggattcgttagatcctcctgctcggcggtatgcttgtgcatgcctgcatgccggcaaggagccacggatagggaag
gctcaagagctggccacctgagcgcagtagatgggctcccgcagttttaggcgccagggtctccacggggcgtctccgggaggtgggc
atgaaggctagagcgccggcctcggaagctcggtcggagtaggtggttagatctgccctggagccagacctggctcgggttcggtgcgc
gagaaagttctgatatacatccaactgctaacactggctacttctggggaaagggaggggtgggtgctgagagaggggcactcaaagg
ggacttttagcctaaagttttaatatatatttttaacaagaataacctaatattgttctctggtacttttcaaaatggtgcatttaaaaattagtagtttt
taacattctaggagaaaaattttaagagcgtctgaaagggccgagaatatgagccttcggaagcacgcgcgaatttggaatataccgat
gttggggcaagctttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttgaaaagacggaaaggttccaagagttgccaactcaaaaatattttacatagtttc
agaccacttgatctaccagcattctgttcactgcaaacttttaaatgtgttccgaccctatcccaggtgtctggggaacccgctggggcctgg
gcctgttctaggacatcccaattaaaatcgatttttctgattctattcccttgcacaggcgcatgtttccttttcttgagcttcaacataaacggactc
aatcccactgcccactacaatgtgttcgtagaggtggtgctggcggaccccaaccactggcgcttccaggggggcaaatgggtgacctgt
ggcaaagccgacaataacatgcagggtgagcagagaagaggctcgggccggggaggaacgggcgggaagaaatcgtaaccctc
gactcacacaactcacatttaaatgtagcacttttttttcccctccattctgaggcctagaggtgttagtatgagtgtctttgagttgcttgtttgac
ggagaggagagtttgctaagtcagatttcttgtctgccaatatgtagatatttagaaccttaactaagacatcaccccaccccccaatccct
acgtttaacaaatcagtagtcataagctctccaggtgggaagggctcctgggattctaatgttcacttgagaaagcccagccaaagtttagt
tcacccataaatatccaactgtcttccatcggatgttgcccttacagctttagaaggccccaaattgaccttcaagagtcatctcttgttagctc
cgtttctaaattctgaaatgccattcaggggagtccctagtgcaaggaaggttggaagcacaggggcctgggagggatatggatgtagtc
ctgctggtctccactggcctctttaagcaacttttactgggagaccaactgtaagtctagctcttatatcttgctcatagctaagagacatccctc
cgctttctccatttgtaaacagccctatatgcttgggttttgtgttttgtttcattttctcttaggcaacaaaatgtatgttcacccagagtctcctaata
ctggttcccactggatgagacaggagatttcattcgggaaattaaaactcaccaataacaaaggcgcaaataacaacaacacccaggt
agagtgacagagcaggaggggatatcttctggctttgactataaggctttttctaataagagtccctactcttttcactgtatttataatatttgca
tttgtgacctgtttgctcgcctatttctaaccatttttgttcttttgacctttctcatcttcacttttcttattggatttcgataacagtgagttgactattaaga
acagaaatagcgaagtattttgggaatttaggaaaccaagaggaaagcatatctatcacaaccacatacccagctatgatttaaatttcaa
aaaaaaagTgggggggcaataatgagacctttaaacttgcaataaacaaagctgttagtgaggagcatttagaagtccaataccaaa
atacataatttgtcaaaatctaattttgttgaaccactaagaggcttttagatttagcaatttttttctgtactctttccagatgatagtcttacaatcc
ttacacaaataccaaccccgactgcatattgttgaagttacagaggatggcgtggaggacttgaatgagccctcaaagacccagacttta
ccttctcagaaacgcaattcattgcagtgactgcctaccaaaacaccgatgtgagtgtcccagacatctcaagaatctctaaagctaaggt
ccagcatgataaatcactcaatgactgtttttctcccctatctagattactcaactaaagattgatcataaccccttgcaaaaggcttcagag
acaactatgattc

图11(续)

gtaagtgcagcttttatccacacttgcctgatcatctctgagcaggacatacatcaacaggcactttgctgataatgtattttaggaagagctt
ttacctttgggatttttacatatttttctttttccaaaatttttttcctttactaatcttgctttagatttttctcagaaaggttgtgttaatttctgaagaaatgtt
aaggacttaaaaatgaagaggtttttttagcatttgagtgaagatttgaaatttaagaatctgcatttatatataccttttcttttcatttgatccatttt
tttatcctcccaagagcagatattattactctcccccacccccactttttttttaacataagaaaaaactgaaactaagaggatgtaatttcac
aacacgaaatagcaaggccctgctcttttaaaatctgagttttctaccgccacagccagtgtttttccatcacattgacaaaggaggtttga
tctgagtttttcgtgttctaggactagtaaaggtagattttctatagtttaaatacttgatgcctaggaggaaacttttcttgcatggtgggaaattt
ttcccaataagccaagagtccagctaaaatgggccagtgcatctcctgcctctgttctttcagcccaacagaccagcactttcggtgtagat
aaccaacacaagccttttcatttctgggaggtggtttgtttggggacaacattagggttttttttttttttaagtgtttctctttatattgtagcatgtac
accgcttcagaaaatgacaggttaactccatctcccacggattctcctagatcccatcagattgtccctggaggtcggtacggcgttcaatc
cttcttcccggagcccttgtcaacactttacctcaagcccgctattataatggcgagagaaccgtgccacagaccaacggcctcctttcac
cccaacagagcgaagaggtggccaaccctccccagcggtggcttgtcacgcctgtccagcaacctgggaccaacaaactagacatc
agttcctatgaatctgaatatacttctagcacattgctcccatatggcattaaatccttgccccttcagacatcccatgccctggggtattaccc
agacccaacctttcctgcaatggcagggtggggaggtcgaggttcttaccagaggaagatggcagctggactaccatggacctccaga
acaagccccactgtgttctctgaagatcagctctccaaggagaaagtgaaagaggaaattggctcttcttggatagagacacccccttcc
atcaaatctctagattccaatgattcaggagtatacaccagtgcttgtaagcgaaggcggctgtctcctagcaactccagtaatgaaaatt
caccctccataaagtgtgaggacattaatgctgaagagtatagtaaagacacctcaaaaggcatgggagggtattatgctttttacacaa
ctccctaaagagttattttaacctcaaaaattagctaacttttgcagatggacttggtggtgttttttgttgtcttctttgcctaggttgccaaaaag
atgtttgccttccaccttgatgcatcctgttttgtgcaattctctaaaagaaggtgccaaagctttttgattgctgcaggtaactgaaacaaacct
agcatttttaaaaaataagattaatggaagactttaaggtattttaaaattcgaagggtatccaaggttctgtatttatttattggggagacact
aacccttcaaagaagcaggctgtgaacattgggtgcccagtgctatcagatgagttaaaaccttgattctcatttctatttgtaaattcttaag
caaatagaagccgagtgttaaggtgttttgcttctgaaagagggctgtgccttccgtttcagaaggagacattttgctgttacattctgccagg
ggcaaaagatactaggcccaggagtcaagaaaagcttttgtgaaagtgatagtttcacctgactttgattccttaacccccggcttttggaa
caagccatgtttgccctagtccaggattgcctcacttgagacttgctaggcctctgctgtgtgctggggtggccagtgggactcaggagag
agcaagctaaggagtcaccaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaggggagaatttaaaagtgtacagttgtgtgtttagatacactatagaat
aatgtggtatatattgtacaaatagtctacataggtgtctgggataatgtaaaactggtgctttggctttgtaaagaatttgcaaatcacttaac
agctgcaggggcaaggggagagtttcatcatccccatgatatttgggaatattctgtttacttcttagatagttaagaatgtattcagctactat
gtactaacttgaaccgtgtttaaggaaaactcctatttcatcctcttcttgcgccatcccctctccctaacttggtaatgtgaagaaactaaaac
ctgataccacagctcctataggcattttagagatcttggatttttatgtacagtcttagtcatttttaataaatgtggttcagtaagggaacgga
(SEQ ID NO: 9)

图11(续)

示例性ID2基因

NCBI 参考序列：NC 000002.12 人

ggggacgaagggaagctccagcgtgtggccccggcgagtgcggataaaagccgccccgccgggctcgggcttcattctgagccgag
cccggtgccaagcgcagctagctcagcaggcggcagcggcggcctgagcttcagggcagccagctccctcccggtctcgccttccctc
gcggtcagcatgaaagccttcagtcccgtgaggtccgttaggaaaaacagcctgtcggaccacagcctgggcatctcccggagcaaaa
cccctgtggacgacccgatgagcctgctatacaacatgaacgactgctactccaagctcaaggagctggtgcccagcatcccccagaa
caagaaggtgagcaagatggaaatcctgcagcacgtcatcgactacatcttggacctgcagatcgccctggactcgcatcccactattgt
cagcctgcatcaccagagacccgggcagaaccaggcgtccaggacgccgctgaccaccctcaacacggatatcagcatcctgtcctt
gcaggtaagacctgctccggggtccccgccccgccgccgcacactcccgcggtcgtctgggctgtcactaggagatccgtagcccaga
cggtgactttcgtatgagctatttaacttttattttcttcagaatctgctgtagattgagctgtgcgtgaaattgctagtaagttctgacatgttaatgc
gtctgtctttaaatctgaattgttaccataaacgtgtttaatggaacttgctggtctgtggactacaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaac
cctttctacttaacattgtcttaacctcgtactctttatcctctttctttccaggcttctgaattcccttctgagttaatgtcaaatgacagcaaagcac
tgtgtggctgaataagcggtgagtgtttgcttgtgccacccgtgggtaaactgcccctcggtgtgtgtgcgcgcgcgcgcatgtgtttttgcttgt
gtatctataaaatgtctgatttggtaaatgcatgcttacttcgcggtgttacccgtactacattgtctcactagacatgaaggagcttgtagctttg
ggtgctcgagatcacagaacatttccttttaaaaggaaatgatgccaataacttactacgaaggcggccgaggaacgtgtgtattggctttg
tagcaaatgtaatgccctggatcttcctacgagtcctctggtactatgaggtactaacctccactgtaattaatcttaccgccacaaattccata
gtgatcctccttccctaaaactatagtcctctgggattctctgggctagttgaggattgctaccctgtgccttcaaccctgtgatgtgggatccca
gacttccctatctgttaactaaagggctgttttcaatcaaataattgttacgagaagcagactggcgcctgtagcactgctgttggagatccaa
ataggagattgggttgggaagtttttcccttgagtctctgctattttaatgtttaatttgcgctgtcgaggcgagtgtgtgtgttgcatctggacgcc
agggtttgcccaatctttgagtgtttggttaaatgttcaaactgtggcttcctcccggcgccagtcgcccgcctctgcccttaggttacattctctt
aaacatgcctttctcccccactctttcgcaggtgttcatgatttcttttattctttgcacaacaacaacaacaacaaattcacggaatcttttaagt
gctgaacttatttttcaaccatttcacaaggaggacaagttgaatggacctttttaaaaagaaaaaaaaaatggaaggaaaactaagaat
gatcatcttcccagggtgttctcttacttggactgtgatattcgttatttatgaaaaagacttttaaatgccctttctgcagttggaaggttttctttata
tactattcccaccatggggagcgaaaacgttaaaatcacaaggaattgcccaatctaagcagactttgccttttttcaaaggtggagcgtga
ataccagaaggatccagtattcagtcacttaaatgaagtcttttggtcagaaattacctttttgacacaagcctactgaatgctgtgtatatattt
atatataaatatatctatttgagtgaaaccttgtgaactctttaattagagttttcttgtatagtggcagagatgtctatttctgcattcaaaagtgta
atgatgtacttattcatgctaaacttttataaaagtttagttgtaaacttaacccttttatacaaaataaatcaagtgtgtttattgaatggtgattgc
ctgctttatttcagaggaccagtgctttgatttttattatgctatgttataactgaacccaaataaatacaagttcaaatttatgtagactgtataag
attataataaaacatgtctgaagtcaa (SEQ ID NO: 10)

图11(续)

示例性TERT基因

登录号 NM_198253: 人

caggcagcgctgcgtcctgctgcgcacgtgggaagccctggccccggccaccccccgcgatgccgcgcgctccccgctgccgagccgt
gcgctccctgctgcgcagccactaccgcgaggtgctgccgctggccacgttcgtgcggcgcctggggccccagggctggcggctggtgc
agcgcggggacccggcggctttccgcgcgctggtggcccagtgcctggtgtgcgtgccctgggacgcacggccgcccccccgccgcccc
ctccttccgccaggtgtcctgcctgaaggagctggtggcccgagtgctgcagaggctgtgcgagcgcggcgcgaagaacgtgctggcctt
cggcttcgcgctgctggacggggcccgcgggggcccccccgaggccttcaccaccagcgtgcgcagctacctgcccaacacggtgac
cgacgcactgcgggggagcggggcgtgggggctgctgctgcgccgcgtgggcgacgacgtgctggttcacctgctggcacgctgcgcg
ctctttgtgctggtggctcccagctgcgcctaccaggtgtgcgggccgccgctgtaccagctcggcgctgccactcaggcccggccccgc
cacacgctagtggaccccgaaggcgtctgggatgcgaacgggcctggaaccatagcgtcagggaggccggggtcccctgggcctgc
cagccccgggtgcgaggaggcgcgggggcagtgccagccgaagtctgccgttgcccaagaggcccaggcgtggcgctgccctgag
ccggagcggacgcccgttgggcaggggtcctgggcccacccgggcaggacgcgtggaccgagtgaccgtggtttctgtgtggtgtcacc
tgccagacccgccgaagaagccacctctttggagggtgcgctctctggcacgcgccactcccacccatccgtgggccgccagcaccac
gcgggcccccatccacatcgcggccaccacgtccctgggacacgccttgtcccccggtgtacgccgagaccaagcacttcctctactcc
tcaggcgacaaggagcagctgcggccctccttcctactcagctctctgaggcccagcctgactggcgctcggaggctcgtggagaccatc
tttctgggttccaggccctggatgccagggactccccgcaggttgccccgcctgccccagcgctactggcaaatgcggcccctgtttctgga
gctgcttgggaaccacgcgcagtgcccctacggggtgctcctcaagacgcactgcccgctgcgagctgcggtcaccccagcagccggt
gtctgtgcccgggagaagccccagggctctgtggcggccccgaggaggaggacacagaccccgtcgcctggtgcagctgctccgc
cagcacagcagccccctggcaggtgtacggcttcgtgcgggcctgcctgcgccggctggtgccccaggcctctggggctccaggcaca
acgaacgccgcttcctcaggaacaccaagaagttcatctccctggggaagcatgccaagctctcgctgcaggagctgacgtggaagatg
agcgtgcgggactgcgcttggctgcgcaggagcccaggggttggctgtgttccggccgcagagcaccgtctgcgtgaggagatcctggc
caagttcctgcactggctgatgagtgtgtacgtcgtcgagctgctcaggtctttcttttatgtcacggagaccacgtttcaaaagaacaggctct
ttttctaccggaagagtgtctggagcaagttgcaaagcattggaatcagacagcacttgaagagggtgcagctgcgggagctgtcggaag
cagaggtcaggcagcatcgggaagccaggcccgccctgctgacgtccagactccgcttcatccccaagcctgacgggctgcggccgat
tgtgaacatggactacgtcgtgggagccagaacgttccgcagagaaaagagggccgagcgtctcacctcgagggtgaaggcactgttc
agcgtgctcaactacgagcgggcgcggcgccccggcctcctgggcgcctctgtgctgggcctggacgatatccacagggcctggcgca
ccttcgtgctgcgtgtgcgggcccaggacccgccgcctgagctgtactttgtcaaggtggatgtgacgggcgcgtacgacaccatccccca
ggacaggctcacggaggtcatcgccagcatcatcaaaccccagaacacgtactgcgtgcgtcggtatgccgtggtccagaaggccgcc
catgggcacgtccgcaaggccttcaagagccacgtctctaccttgacagacctccagccgtacatgcgacagttcgtggctcacctgcag
gagaccagcccgctgagggatgccgtcgtcatcgagcagagctcctccctgaatgaggccagcagtggcctcttcgacgtcttcctacgct
tcatgtgccaccacgccgtgcgcatcaggggcaagtcctacgtccagtgccaggggatcccgcagggctccatcctctccacgctgctct
gcagcctgtgctacggcgacatggagaacaagctgtttgcggggattcggcgggacgggctgctcctgcgtttggtggatgatttcttgttgg
tgacacctcacctcacccacgcgaaaaccttcctcaggaccctggtccgaggtgtccctgagtatggctgcgtggtgaacttgcggaaga
cagtggtgaacttccctgtagaagacgaggccctgggtggcacggcttttgttcagatgccggcccacggcctattcccctggtgcggcctg
ctgctggatacccggaccctggaggtgcagagcgactactccagctatgcccggacctccatcagagccagtctcaccttcaaccgcgg
cttcaaggctgggaggaacatgcgtcgcaaactctttggggtcttgcggctgaagtgtcacagcctgtttctggatttgcaggtgaacagcct
ccagacggtgtgcaccaacatctacaagatcctcctgctgcaggcgtacaggtttcacgcatgtgtgctgcagctcccatttcatcagcaag
tttggaagaaccccacatttttcctgcgcgtcatctctgacacggcctccctctgctactccatcctgaaagccaagaacgcagggatgtcgc
tgggggccaagggcgccgccggccctctgccctccgaggccgtgcagtggctgtgccaccaagcattcctgctcaagctgactcgacac
cgtgtcacctacgtgccactcctggggtcactcaggacagcccagacgcagctgagtcggaagctcccggggacgacgctgactgccct
ggaggccgcagccaacccggcactgccctcagacttcaagaccatcctggactgatggccacccgcccacagccaggccgagagca
gacaccagcagccctgtcacgccgggctctacgtcccagggagggaggggcggcccacacccaggcccgcaccgctgggagtctga
ggcctgagtgagtgtttggccgaggcctgcatgtccggctgaaggctgagtgtccggctgaggcctgagcgagtgtccagccaagggctg
agtgtccagcacacctgccgtcttcacttccccacaggctggcgctcggctccaccccagggccagcttttcctcaccaggagcccggctt
ccactccccacataggaatagtccatccccagattcgccattgttcacccctcgccctgccctcctttgccttccacccccaccatccaggtg
gagaccctgagaaggaccctgggagctctgggaatttggagtgaccaaaggtgtgccctgtacacaggcgaggaccctgcacctggat
gggggtccctgtgggtcaaattgggggggaggtgctgtgggagtaaaatactgaatatatgagtttttcagttttgaaaaaaa (SEQ ID
NO: 11)

图11(续)

示例性CCR2b基因

登录号 NM_001123396: 人

gttattctctggaacatgaaacattctgttgtgctcatatcatgcaaattatcactagtaggagagcagagagtggaaatgttccaggtataa
agacccacaagataaagaagctcagagtcgttagaaacaggagcagatgtacagggtttgcctgactcacactcaaggttgcataag
caagatttcaaaattaatcctattctggagacctcaacccaatgtacaatgttcctgactggaaaagaagaactatatttttctgatttttttttc
aaatctttaccattagttgccctgtatctccgccttcactttctgcaggaaactttatttcctacttctgcatgccaagtttctacctctagatctgttt
ggttcagttgctgagaagcctgacataccaggactgcctgagacaagccacaagctgaacagagaaagtggattgaacaaggacgc
atttccccagtacatccacaacatgctgtccacatctcgttctcggtttatcagaaataccaacgagagcggtgaagaagtcaccacctttt
tgattatgattacggtgctccctgtcataaatttgacgtgaagcaaattggggcccaactcctgcctccgctctactcgctggtgttcatctttg
gttttgtgggcaacatgctggtcgtcctcatcttaataaactgcaaaaagctgaagtgcttgactgacatttacctgctcaacctggccatctc
tgatctgcttttctattactctcccattgtgggctcactctgctgcaaatgagtgggtctttgggaatgcaatgtgcaaattattcacagggctgt
atcacatcggttattttggcggaatcttcttcatcatcctcctgacaatcgatagatacctggctattgtccatgctgtgtttgctttaaaagccag
gacggtcacctttggggtggtgacaagtgtgatcacctggttggtggctgtgtttgcttctgtcccaggaatcatctttactaaatgccagaaa
gaagattctgtttatgtctgtggcccttattttccacgaggatggaataatttccacacaataatgaggaacattttggggctggtcctgccgct
gctcatcatggtcatctgctactcgggaatcctgaaaaccctgcttcggtgtcgaaacgagaagaagaggcatagggcagtgagagtc
atcttcaccatcatgattgtttactttctcttctggactccctataatattgtcattctcctgaacaccttccaggaattcttcggcctgagtaactgt
gaaagcaccagtcaactggaccaagccacgcaggtgacagagactcttgggatgactcactgctgcatcaatcccatcatctatgccttt
cgttggggagaagttcagaaggtatctctcggtgttcttccgaaagcacatcaccaagcgcttctgcaaacaatgtccagttttctacaggg
agacagtggatggagtgacttcaacaaacacgccttccactggggagcaggaagtctcggctggtttataaaacgaggagcagtttgat
tgttgtttataaagggagataacaatctgtatataacaacaaacttcaagggtttgttgaacaatagaaacctgtaaagcaggtgcccagg
aacctcagggctgtgtgtactaatacagactatgtcacccaatgcatatccaacatgtgctcagggaataatccagaaaaactgtgggta
gagactttgactctccagaaagctcatctcagctcctgaaaaatgcctcattaccttgtgctaatcctctttttctagtcttcataatttcttcactc
aatctctgattctgtcaatgtcttgaaatcaagggccagctggaggtgaagaagagaatgtgacaggcacagatgaatgggagtgagg
gatagtggggtcagggctgagaggagaaggagggagacatgagcatggctgagcctggacaaagacaaaggtgagcaaagggc
tcacgcattcagccaggagatgatactggtccttagccccatctgccacgtgtatttaaccttgaagggttcaccaggtcagggagagtttg
ggaactgcaataacctgggagttttggtggagtccgatgattctcttttgcataagtgcatgacatatttttgctttattacagtttatctatggcac
ccatgcaccttacatttgaaatctatgaaatatcatgctccattgttcagatgcttcttaggccacatccccctgtctaaaaattcagaaaatttt
tgtttataaaaga (SEQ ID NO: 12)

图11(续)

示例性CCR4基因

登录号 NM_005508: 人

tctcacaggaagccacgcacccttgaaaggcaccgggtccttcttagcatcgtgcttcctgagcaagcctggcattgcctcacagaccttcctc
agagccgctttcagaaaagcaagctgcttctggttgggcccagacctgccttgaggagcctgtagagttaaaaaatgaaccccacggatata
gcagacaccaccctcgatgaaagcatatacagcaattactatctgtatgaaagtatccccaagccttgcaccaaagaaggcatcaaggcatt
tggggagctcttcctgccccccactgtattccttggtttttgtatttggtctgcttggaaattctgtggtggttctggtcctgttcaaatacaagcggctcag
gtccatgactgatgtgtacctgctcaaccttgccatctcggatctgctcttcgtgttttccctccctttttggggctactatgcagcagaccagtgggtttt
tgggctaggtctgtgcaagatgatttcctggatgtacttggtgggcttttacagtggcatattctttgtcatgctcatgagcattgatagatacctggca
attgtgcacgcggtgttttccttgagggcaaggaccttgacttatggggtcatcaccagtttggctacatggtcagtggctgtgttcgcctcccttcct
ggctttctgttcagcacttgttatactgagcgcaaccatacctactgcaaaaccaagtactctctcaactccacgacgtggaaggttctcagctcc
ctggaaatcaacattctcggattggtgatccccttagggatcatgctgttttgctactccatgatcatcaggaccttgcagcattgtaaaaatgaga
agaagaacaaggcggtgaagatgatctttgccgtggtggtcctcttccttgggttctggacaccttacaacatagtgctcttcctagagaccctgg
tggagctagaagtccttcaggactgcacctttgaaagatacttggactatgccatccaggccacagaaactctggcttttgttcactgctgccttaa
tcccatcatctacttttttctgggggagaaatttcgcaagtacatcctacagctcttcaaaacctgcagggccttttttgtgctctgccaatactgtgg
gctcctccaaatttactctgctgacaccccccagctcatcttacacgcagtccaccatggatcatgatctccatgatgctctgtagaaaaatgaaat
ggtgaaatgcagagtcaatgaactttccacattcagagcttacttaaaattgtattttagtaagagattcctgagccagtgtcaggaggaaggctt
acacccacagtggaaagacagcttctcatcctgcaggcagctttttctctcccactagacaagtccagcctggcaagggttcacctgggctga
ggcatccttcctcacaccaggcttgcctgcaggcatgagtcagtctgatgagaactctgagcagtgcttgaatgaagttgtaggtaatattgcaa
ggcaaagactattcccttctaacctgaactgatgggtttctccagagggaattgcagagtactggctgatggagtaaatcgctacctttttgctgtgg
caaatgggccctct (SEQ ID NO: 13)

图11(续)

抗CD19 scFv (VH-VL) FMC63

Cacatccagatgacccagaccacctccagcctgagcgccagcctgggcgaccgggtgaccatcagctgccgggccagccaggacat
cagcaagtacctgaactggtatcagcagaagcccgacggcaccgtcaagctgctgatctaccacaccagccggctgcacagcggcgt
gcccagccggtttagcggcagcggctccggcaccgactacagcctgaccatctccaacctggaacaggaagatatcgccacctacttttt
gccagcagggcaacacactgccctacacctttggcggcggaacaaagctggaaatcaccggcagcacctccggcagcggcaagcct
ggcagcggcgagggcagcaccaagggcgaggtgaagctgcaggaaagcggccctggcctggtggccccccagccagagcctgagc
gtgacctgcaccgtgagcggcgtgagcctgcccgactacggcgtgagctggatccggcagcccccccaggaagggcctggaatggctg
ggcgtgatctggggcagcgagaccacctactacaacagcgccctgaagagccggctgaccatcatcaaggacaacagcaagagcc
aggtgttcctgaagatgaacagcctgcagaccgacgacaccgccatctactactgcgccaagcactactactacggcggcagctacgc
catggactactggggccagggcaccagcgtgaccgtgagcag (SEQ ID NO: 28)

抗CD19 scFv (VH-VL) FMC63

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGS
GSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQ
ESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIK
DNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 29)

CD28效应子结构域

cggagcaagcggagcagaggcggccacagcgactacatgaacatgacccccagacggcctggccccacccggaagcactacc
agccctacgccccacccagggactttgccgcctacagaagc (SEQ ID NO: 36)

图11(续)

P28z CAR

Gtggcctcaccgttgacccgctttctgtcgctgaacctgctgctgctgggtgagtcgattatcctggggagtggagaagctgaggtgcag
ctgcagcagtcaggacctgaactggtgaagcctgggacttcagtgaggatatcctgcaagacttctggatacacattcactgaatatacc
atacactgggtgaagcagagccatggaaagagccttgagtggattggaaacatcaatcctaacaatggtggtaccacctacaatcag
aagttcgaggacaaggccacattgactgtagacaagtcctccagtacagcctacatggagctccgcagcctaacatctgaggattctg
cagtctattattgtgcagctggttggaactttgactactggggccaagggaccacggtcaccgtctcctcaggtggaggtggatcaggtg
gaggtggatctggtggaggtggatctgacattgtgatgacccagtctcacaaattcatgtccacatcagtaggagacagggtcagcatc
atctgtaaggccagtcaagatgtgggtactgctgtagactggtatcaacagaaaccaggacaatctcctaaactactgatttattgggcat
ccactcggcacactggagtccctgatcgcttcacaggcagtggatctgggacagacttcactctcaccattactaatgttcagtctgaaga
cttggcagattatttctgtcagcaatataacagctatccccctcacgttcggtgctgggaccatgctggacctgaaacgggcggccgcatct
actactaccaagccagtgctgcgaactccctcacctgtgcaccctaccgggacatctcagccccagagaccagaagattgtcggccc
cgtggctcagtgaaggggaccggattggacttcgcctgtgatatttacatctgggcaccttggccggaatctgcgtggcccttctgctgtc
cttgatcatcactctcatctgctacaatagtagaaggaacagactccttcaaagtgactacatgaacatgactccccggaggcctgggct
cactcgaaagccttaccagccctacgcccctgccagagactttgcagcgtaccgccccagagcaaaattcagcaggagtgcagaga
ctgctgccaacctgcaggaccccaaccagctctacaatgagctcaatctagggcgaagagaggaatatgacgtcttggagaagaag
cgggctcgggatccagagatgggaggcaaacagcagaggaggaggaaccccccaggaaggcgtatacaatgcactgcagaaag
acaagatggcagaagcctacagtgagatcggcacaaaaggcgagaggcggagaggcaaggggcacgatggcctttaccagggt
ctcagcactgccaccaaggacacctatgatgccctgcatatgcagaccctggcccctcgctaa (SEQ ID NO: 37)

图11(续)

IgG4-Fc
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 39)

铰链-CH2-CH3
ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 40)

铰链-CH3
ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
(SEQ ID NO: 41)

仅铰链
ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO: 42)

CD28跨膜结构域
MFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO: 43)

CD28细胞质结构域(LL至GG)
RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO: 44)

4-1BB细胞质结构域
KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO: 45)

CD3-ζ细胞质结构域
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE
LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:
46)

图11 (续)

T2A
LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR (SEQ ID NO: 47)

tEGFR
MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGD
SFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTQHGQFSLAVVSLNITS
LGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSP
EGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGR
GPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGC
PTNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM (SEQ ID NO: 48)

Strep标签II
WSHPQFEK (SEQ ID NO: 49)

Myc标签
EQKLISEEDL (SEQ ID NO: 50)

V5标签
GKPIPNPLLGLDST (SEQ ID NO: 51)

FLAG标签
DYKDDDDK (SEQ ID NO: 52)

图11(续)