



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113528581 A

(43) 申请公布日 2021.10.22

(21) 申请号 202110842538.7

(74) 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限

(22) 申请日 2015.04.08

公司 11243

### (30) 优先权数据

61/977,751 2014.04.10 US

代理人 钟海胜 宋琴芝

61/986,479 2014.04.30 US

(51) Int.Cl.

62/058,973 2014.10.02 US

C12N 15/867 (2006.01)

62/088,363 2014.12.05 US

C12N 15/113 (2010.01)

62/089,730 2014.12.09 US

C12N 15/62 (2006.01)

62/090,845 2014.12.11 US

C12N 5/10 (2006.01)

### (62) 分案原申请数据

A61K 39/00 (2006.01)

201580027077.0 2015.04.08

A61P 35/00 (2006.01)

(71) 申请人 西雅图儿童医院 (DBA西雅图儿童  
研究所)

A61P 35/02 (2006.01)

地址 美国华盛顿州

A61P 31/12 (2006.01)

(72) 发明人 迈克尔·C·延森

权利要求书2页 说明书88页

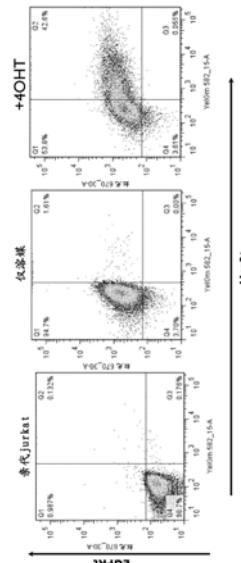
序列表34页 附图18页

### (54) 发明名称

多核苷酸的诱导型表达的系统、宿主细胞、  
方法和组合物

### (57) 摘要

本发明提供了用于多核苷酸的诱导型表达的系统、宿主细胞、方法和组合物。所述系统包括a)第一核酸，所述第一核酸包括诱导型第一启动子，其中，所述第一启动子可操作地连接于所述多核苷酸；b)第二核酸，所述第二核酸包括组成型第二启动子，所述组成型第二启动子可操作地连接于用于所述第一启动子的编码转录激活因子的核酸；c)激活刺激因子，所述激活刺激因子包括抗CD3抗体和/或抗CD28抗体；以及d)他莫昔芬、他莫昔芬的代谢物或他莫昔芬的类似物；其中所述第一启动子包含SEQ ID NO:41的核苷酸序列，或所述转录激活因子包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列。控制嵌合受体的表达提供了根据患者的状态使表达打开和关闭的能力。



1. 一种用于多核苷酸的诱导型表达的系统,包括:
  - a) 第一核酸,所述第一核酸包括诱导型第一启动子,其中,所述第一启动子可操作地连接于所述多核苷酸;
  - b) 第二核酸,所述第二核酸包括组成型第二启动子,所述组成型第二启动子可操作地连接于用于所述第一启动子的编码转录激活因子的核酸;
  - c) 激活刺激因子,所述激活刺激因子包括抗CD3抗体和/或抗CD28抗体;以及
  - d) 他莫昔芬、他莫昔芬的代谢物或他莫昔芬的类似物;其中所述第一启动子包含SEQ ID NO:41的核苷酸序列,或所述转录激活因子包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列。
2. 根据权利要求1所述的系统,其中,所述多核苷酸编码嵌合抗原受体(CAR)、细胞因子、趋化因子受体、调控细胞凋亡的多肽或调节检查点信号传导的多肽。
3. 根据权利要求1所述的系统,其中,所述转录激活因子包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列。
4. 根据权利要求1所述的系统,其中,所述第一启动子包含SEQ ID NO:41的核酸序列。
5. 根据权利要求1所述的系统,其中,所述第二启动子包含EF1 $\alpha$ 启动子。
6. 根据权利要求1所述的系统,其中,所述第一核酸进一步包括第一载体并且所述第二核酸进一步包括第二载体。
7. 根据权利要求6所述的系统,其中,所述第一载体和所述第二载体被包装在病毒载体中。
8. 根据权利要求7所述的系统,其中,所述病毒载体是慢病毒。
9. 根据权利要求1所述的系统,其中,所述第一核酸和所述第二核酸包括载体。
10. 根据权利要求1所述的系统,其中,所述第一核酸进一步包括编码选择性标记的核酸序列。
11. 根据权利要求1所述的系统,其中,所述第二核酸进一步包括编码选择性标记的核酸。
12. 根据权利要求1所述的系统,其中,所述第一启动子在所述第二启动子的相对取向。
13. 根据权利要求2所述的系统,其中,所述CAR能够特异性结合于肿瘤特异性分子,所述肿瘤特异性分子选自由CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2和MAGE A3 TCR组成的组。
14. 一种用于细胞免疫疗法的宿主细胞,包含根据权利要求1-13中任一项所述的系统。
15. 根据权利要求14所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是T细胞、前体T细胞或造血干细胞。
16. 根据权利要求14所述的宿主细胞,其中,所述宿主细胞是选自由初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和混合CD8+T细胞组成的组中的CD8+T细胞毒性淋巴细胞。
17. 根据权利要求14所述的宿主细胞,其中,所述宿主细胞是选自由初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和混合CD4+T细胞组成的组中的CD4+T辅助淋巴细胞。
18. 一种药物组合物,包含根据权利要求14所述的宿主细胞和药学上可接受的赋形剂。

19.一种制备用于细胞免疫疗法的细胞群的体外方法,所述方法包括:

- a) 提供根据权利要求1-13中任一项所述的系统;
- b) 将所述系统引入分离的T淋巴细胞群;
- c) 在体外扩增所述T淋巴细胞群;和

d) 在以下的存在下培养所述T淋巴细胞群使得所述T淋巴细胞群扩增充分以用作细胞输注物:(i)他莫昔芬、他莫昔芬的代谢物或他莫昔芬的类似物,(ii)激活刺激因子,和(iii)至少一种内稳态细胞因子。

20.根据权利要求19所述的方法,其中,所述T淋巴细胞群包括T细胞、前体T细胞或造血干细胞。

21.根据权利要求19所述的方法,其中,所述T淋巴细胞群包括CD8+T细胞或CD4+T细胞。

22.权利要求14所述的宿主细胞在制备用于治疗癌症或病毒感染的药物中的用途。

23.根据权利要求22所述的用途,其中,所述宿主细胞选自由以下组成的组:(i)选自由初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和混合CD8+T细胞组成的组中的CD8+细胞毒性T淋巴细胞;(ii)选自由初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和混合CD4+T细胞组成的组中的CD4+辅助T淋巴细胞;(iii)前体T细胞;以及(iv)造血干细胞。

24.根据权利要求22所述的用途,其中,所述癌症是实体瘤或恶性血液肿瘤。

25.根据权利要求22所述的用途,其中,所述癌症选自由乳腺癌、脑癌、肺癌、结肠癌、肾癌、胰腺癌、前列腺癌和卵巢癌组成的组。

## 多核苷酸的诱导型表达的系统、宿主细胞、方法和组合物

[0001] 本申请是申请日为2015年4月8日,国际申请号为PCT/US2015/024947,国家申请号为201580027077.0,发明名称为“药物相关的转基因表达”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2014年10月2日提交的美国临时专利申请号62/058,973、2014年4月10日提交的美国临时专利申请号61/977,751、2014年4月30日提交的美国临时专利申请号61/986,479、2014年12月9日提交的美国临时专利申请号62/089,730、2014年12月11日提交的美国临时专利申请号62/090845和2014年12月5日提交的美国临时专利申请号62/088,363的优先权的权益。上述申请的全部公开内容特别地通过引用全文并入。

[0004] 序列表、表格或计算机程序列表的引用

[0005] 本发明连同电子格式的序列表一起提交。序列表提供为2015年4月7日创建的大小为65kb的命名为SCRI-53W0\_SEQUENCE\_LISTING.TXT的文件。信息是电子格式的序列表通过引用全文并入本文。

### 背景技术

[0006] 通过转基因表达对表达于肿瘤细胞上的表面分子特异的嵌合抗原受体(CAR)工程化的人T淋巴细胞的过继转移具有有效地治疗癌症的潜能。嵌合受体是包括胞外配体结合域的合成受体,最常见的是连接于胞内信号传导组分的单克隆抗体的单链可变区片段(scFv),最常见的是单独的CD3ζ或CD3ζ与一个或多个共刺激域的组合。在设计嵌合受体中的许多研究集中于限定scFv和靶向于恶性细胞而对必要的正常组织没有导致严重毒性的其他配体结合元件,以及集中于限定胞内信号传导组件的优化组合以激活T细胞效应功能。

[0007] 虽然,证明了T细胞(CAR-T)过继治疗临床试验(表达嵌合抗原受体的T细胞)强有力地抗肿瘤活性,明显的是显著的毒性可以出现,例如,移植诱导的细胞因子风暴、肿瘤溶解综合征和持续的B细胞减少,其中的每一个可以归因于组成性表达的CAR的不受调控的功能性输出。这样的毒性在一些情况下可以威胁限制CAR-T细胞过继治疗的应用。使用转基因修饰的过继T细胞免疫治疗的临床试验仅测试了组成性表达转基因或一直处于“开”状态的T细胞,其大部分贡献了转基因关联的副作用。CAR-T细胞的自杀基因介导的清除可以减轻这样的毒性;然而,该方法有使抗肿瘤活性提早衰减的风险并显著影响治愈潜能。

[0008] 当前的小分子调控的转基因表达技术依赖于包括大环内酯类、蜕化素和雷帕霉素类似物多种药物输入。由于毒性脱靶效应、不利的生物分布和药效动力学谱、有限的输出动态范围和/或作为FDA批准的商业可得的药物的有限的可用性,这些系统的临床应用性是有限的。此外,许多这些系统使用嵌合的由异源基因组分建立的转录调控因子,因此当这些系统应用于人的治疗时,引入免疫原性的并发症。

[0009] 存在鉴别用于确定嵌合受体设计的元件的方法的需求,所述嵌合受体设计的元件对治疗活性和细胞群进行基因修饰和过继转移是重要的,所述过继转移会提供提高的存活和在体内的疗效,同时使不良的副作用最小化。还存在用于调节用于细胞治疗的细胞的表达系统和方法,如用于调节重组抗原受体如CAR和/或这样的细胞表达的其他分子的需求,

以例如改善治疗活性,提高存活和/或在体内的疗效,和/或使不利的副作用最小化。

## 发明内容

[0010] 本公开的一个方面包括在细胞中递送药物调控的转基因表达的遗传系统。在替代的实施方式中,调控的转基因表达靶向于细胞,如设计用于过继免疫治疗的淋巴细胞。该系统提供了归因于嵌合抗原受体(CAR)重新定向的过继免疫策略而不牺牲允许在体内对CAR表达实时临床医师控制的治愈性目的严格安全性。基于临床医师开的显示临幊上允许的药代动力学、组织分布和在淋巴细胞的胞外空间与细胞溶胶之间的分配的制药药物输入,通过工程化使药物能够响应性转录控制CAR表达的载体,CAR的活性和其他细胞介质可以在体内转换“开”和“关”。遗传系统提供药物调控的转基因表达以在药物不存在下执行功能性的“关”状态,以及在药物存在下执行功能性“开”状态的转基因表达。

[0011] 这样的药物的一种替代是他莫昔芬。他莫昔芬是一种雌激素拮抗剂/部分激动剂,是FDA批准并且商业可获得的药物。他莫昔芬是口服的并且可以在较长一段时间内每天施用。他莫昔芬具有经证实的安全性记录、有利的药代动力学谱、优秀的组织分布和胞外空间与细胞溶胶之间的低分配系数。可以基于安全性记录、有利的药代动力学谱、优秀的组织分布、胞外空间与细胞溶胶之间的低分配系数和/或低毒性选择其他药物。

[0012] 在一些供选择的方案中,在他莫昔芬的存在下系统采用合成的转录调控因子,结合转基因上游的合成启动子以诱导表达。他莫昔芬调控的转录因子(“TamR-tf”,也指“HEA3”)是由人亚单位组成的嵌合转录因子,所述人亚单位包括肝细胞核因子1- $\alpha$ (HNF-1 $\alpha$ )的N-末端DNA结合域,HNF-1 $\alpha$ 的N-末端DNA结合域框内融合(fused in frame)于雌激素受体配体结合域(ER-LBD)的突变的他莫昔芬特异性配体结合域,所述突变的他莫昔芬特异性配体结合域反过来融合于NF- $\kappa$ B(p65)的p65激活域。在表10中提供了示例性的氨基酸序列,并且鉴别为SEQ ID NO:40。雌激素受体配体结合域(ER-LBD)的突变的他莫昔芬特异性配体结合域在TamR-tf的第282-595位氨基酸处发现,并且在第521位具有突变。NF- $\kappa$ B(p65)的p65激活域在SEQ ID NO:40的第596-862位氨基酸处发现。对转录激活因子可以做出进一步的改变以增加转录因子的特性,包括但不限于在雌激素受体配体结合域中改变一个或多个氨基酸以增加用于雌激素类似物的因子的亲和性,以及在p65反式激活域中改变一个或多个氨基酸。

[0013] 在他莫昔芬不存在下,通过细胞溶胶的热休克蛋白90(HSP90)与他莫昔芬结合活性位点的结合将TamR-tf排除在细胞核外,并且转基因表达处于“关”状态。纳摩尔浓度的细胞溶胶他莫昔芬积极地与HSP90竞争ER-LBD结合,导致TamR-tf移位至细胞核。在细胞核移位时,TamR-tf可容易地用于结合其限制的合成启动子(如7xHBD/EF1 $\alpha$ p)。在他莫昔芬存在下,TamR-tf与7xHBD/EF1 $\alpha$ p启动子的结合诱导转基因表达的“开”状态。在一些供选择的方案中,可以修饰该转录调控因子以提供变化水平的转基因表达的控制。TamR-tf的LBD中的氨基酸置换允许对他莫昔芬和其代谢物选择性应答,其中4-羟基他莫昔芬(4-OHT)是关于TamR-tf活性的药理学上的活性代谢物,同时缺少与内源性雌激素的相互作用。

[0014] 一方面,本公开涉及给予和/或增强由细胞免疫治疗,如由过继转移肿瘤特异性的、遗传修饰的单独或组合的CD8+或CD4+T细胞亚集介导的免疫应答的方法和组合物。本公开提供了嵌合受体核酸,和包括这样的核酸的载体和宿主细胞。编码嵌合受体的核酸序列

与许多可以切除并用其他组分替换的模块化组分连接在一起以定制用于效应T细胞激活和识别特异性靶分子或在靶分子上的表位的嵌合受体，并提供如本文描述的调控的转录。

[0015] 在一些供选择的方案中，用于诱导型表达嵌合抗原受体的系统包括：第一核酸，包括可通过药物诱导的第一启动子，其中第一核酸可操作地连接于编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体结合域对配体是特异性的，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；编码跨膜域的多核苷酸；以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸；以及第二核酸，包括可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸的第二启动子。在一些供选择的方案中，所述药物是他莫昔芬和/或其代谢物。在一些供选择的方案中，针对与参比嵌合受体相比应答配体的T细胞增殖和/或细胞因子产生的增加，所述间隔区是优化的。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型或诱导型的。

[0016] 在一些供选择的方案中，用于诱导型表达嵌合抗原受体的系统包括：第一核酸，包括可通过药物诱导的第一启动子，其中第一核酸可操作地连接于编码细胞因子、趋化因子、调控细胞凋亡的多肽和/或调节检查点信号传导的多肽的多核苷酸；以及第二核酸，包括可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸的第二启动子。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型或诱导型。在示例性的供选择的实施方式中，第二核酸进一步包括在组成型启动子控制下编码嵌合抗原受体的多核苷酸。在一些供选择的方案中，药物是他莫昔芬和/或其代谢物。

[0017] 在另一方面，本公开提供给予和/或增强通过细胞免疫治疗，如通过过继转移肿瘤特异性的、亚集特异性基因修饰的CD4+T细胞介导的免疫应答的组合物，其中CD4+T细胞给予和/或增强CD8+T细胞保持抗肿瘤反应性以及提高肿瘤特异性增殖和/或使肿瘤特异性增殖最大化的能力。在一些供选择的方案中，基因修饰CD4+细胞以在如本文描述的调控的启动子的控制下表达嵌合受体核酸和/或嵌合受体多肽。

[0018] 在另一方面，本公开提供了给予和/或增强通过细胞免疫治疗，如通过过继转移肿瘤特异性的、亚集特异性基因修饰的T细胞介导的免疫应答的组合物。在一些供选择的实施方式中，细胞是前体T细胞。在一些供选择的实施方式中，细胞是造血干细胞。在一些供选择的实施方式中，细胞是CD8+T细胞。在一些供选择的实施方式中，CD8+T细胞在如本文描述的调控的启动子的控制下，表达嵌合受体核酸和/或嵌合受体多肽。

[0019] 一些供选择的实施方式涉及通过向受试者施用提供细胞免疫应答的基因修饰的T淋巴细胞制剂和施用在基因修饰的T淋巴细胞中诱导转基因的药物，在具有疾病或紊乱的受试者中进行细胞免疫治疗的方法。在一些供选择的方案中，基因修饰的T淋巴细胞制剂包括前体T细胞。在一些供选择的方案中，基因修饰的T淋巴细胞制剂包括造血干细胞。在一些供选择的实施方式中，联合施用基因修饰的CD8+细胞群和基因修饰的CD4+细胞群。在一些供选择的方案中，药物是他莫昔芬和/或其代谢物。在一些供选择的方案中，T细胞是自体的和同种异体的T细胞。上面的方法的不同修改是可能的。例如，通过CD4+细胞和CD8+细胞表达的嵌合受体可以是相同的和不同的。

[0020] 在一些供选择的方案中，提供了用于诱导型表达嵌合抗原受体的系统，其中所述系统包括：a) 第一核酸，包括可通过药物诱导的第一启动子，其中第一核酸可操作地连接于

编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体结合域对配体是特异性的，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；编码跨膜域的多核苷酸；以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸；以及b) 第二核酸，包括可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸的第二启动子。在一些供选择的方案中，药物是他莫昔芬和/或其代谢物。在一些供选择的方案中，第二启动子是诱导型的。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型的。在一些供选择的方案中，第一启动子包括SEQ ID NO:41的核酸序列。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型启动子。在一些供选择的方案中，第二启动子是EF1 $\alpha$ p。在一些供选择的方案中，转录激活因子包括SEQ ID NO:40的序列。在一些供选择的方案中，第一核酸进一步包括第一载体并且第二核酸进一步包括第二载体。在一些供选择的方案中，两种载体均包装在病毒载体中。在一些供选择的方案中，病毒载体是慢病毒。在一些供选择的方案中，第一和第二核酸包括载体。在一些供选择的方案中，第一核酸进一步包括编码选择性标记的核酸序列。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码选择性标记的核酸。在一些供选择的方案中，针对与参比嵌合受体相比应答配体的T细胞增殖和/或细胞因子产生的增加，所述间隔区是优化的。

[0021] 在一些供选择的方案中，提供了用于诱导型表达嵌合抗原受体的系统，其中系统包括：a) 第一核酸，包括可通过药物诱导的第一启动子，其中第一核酸可操作地连接于编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体结合域对配体是特异性的，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；编码跨膜域的多核苷酸；以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸；以及b) 第二核酸，包括可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸的第二启动子。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型或诱导型的。在一些供选择的方案中，药物是他莫昔芬和/或其代谢物。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体结合域对配体是特异性的，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中，药物是他莫昔芬和/或其代谢物。在一些供选择的方案中，第一启动子在第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中，配体结合域是抗体片段。在一些供选择的方案中，配体结合域是单链可变区片段。在一些供选择的方案中，肿瘤特异性分子是CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2或MAGE A3 TCR或其组合。在一些供选择的方案中，针对与参比嵌合受体相比应答配体的T细胞增殖和/或细胞因子产生的增加，所述间隔区是优化的。在一些供选择的方案中，第二启动子是诱导型的。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型的。

[0022] 在一些供选择的方案中，提供了嵌合受体多肽，其中通过系统编码嵌合受体多肽。在一些供选择的方案中，系统包括：a) 第一核酸，包括可通过药物诱导的第一启动子，其中第一核酸可操作地连接于编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体结合

域对配体是特异性的，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其间隔区是优化的；编码跨膜域的多核苷酸；以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸；以及b) 第二核酸，包括可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸的第二启动子。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型或诱导型的。在一些供选择的方案中，药物是他莫昔芬和/或其代谢物。在一些供选择的方案中，第一启动子包括SEQ ID NO:41的核酸序列。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型启动子。在一些供选择的方案中，第二启动子是EF1 $\alpha$ p。在一些供选择的方案中，转录激活因子包括SEQ ID NO:40的序列。在一些供选择的方案中，第一核酸进一步包括第一载体并且第二核酸进一步包括第二载体。在一些供选择的方案中，两种载体均包装在病毒载体中。在一些供选择的方案中，病毒载体是慢病毒。在一些供选择的方案中，第一和第二核酸包括载体。在一些供选择的方案中，第一核酸进一步包括编码选择性标记的核酸序列。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码选择性标记的核酸序列。在一些供选择的方案中，针对与参比嵌合受体相比应答配体的T细胞增殖和/或细胞因子产生的增加，所述间隔区是优化的。

[0023] 在一些供选择的方案中，提供了用于诱导型表达嵌合抗原受体的系统，其中系统包括：a) 第一核酸，包括可通过药物诱导的第一启动子，其中第一核酸可操作地连接于编码细胞因子、趋化因子受体、调控细胞凋亡的多肽或调节检查点信号传导的多肽的多核苷酸；以及b) 第二核酸，包括可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸的第二启动子。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型或诱导型。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体结合域对配体是特异性的，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其间隔区是优化的；以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中，第一启动子在第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中，配体结合域是抗体片段，优选是其结合域。在一些供选择的方案中，肿瘤特异性分子是CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2或MAGE A3 TCR 或其组合。在一些供选择的方案中，系统包括：a) 第一核酸，包括可通过药物诱导的第一启动子，其中第一核酸可操作地连接于编码细胞因子、趋化因子受体、调控细胞凋亡的多肽或调节检查点信号传导的多肽的多核苷酸；以及b) 第二核酸，包括第二启动子，所述第二启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型或诱导型。在一些供选择的方案中，药物是他莫昔芬和/或其代谢物。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其间隔区是优化的；编码跨膜域的多核苷酸；以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中，第一启动子在第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中，配体结合域是抗体片段，优选是其结合片段。在一些供选择的方案中，配体结合域是单链可变区片段。在一些供选择的方案中，肿瘤特异性分子是CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2或MAGE A3 TCR 或其组合。在

一些供选择的方案中,针对与参比嵌合受体相比应答配体的T细胞增殖和/或细胞因子产生的增加,间隔区是优化的。

[0024] 在一些供选择的方案中,提供了宿主细胞,其中宿主细胞包括系统。在一些供选择的方案中,系统包括:a) 第一核酸,包括可通过药物诱导的第一启动子,其中第一核酸可操作地连接于编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸,其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子,其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除;编码多肽间隔区的多核苷酸,其中间隔区是优化的;编码跨膜域的多核苷酸;以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸;以及b) 第二核酸,包括第二启动子,所述第二启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中,第二启动子是组成型或诱导型的。在一些供选择的方案中,药物是他莫昔芬和/或其代谢物。在一些供选择的方案中,第一启动子包括SEQ ID NO:41的核酸序列。在一些供选择的方案中,第二启动子是组成型启动子。在一些供选择的方案中,第二启动子是EF1 $\alpha$ p。在一些供选择的方案中,转录激活因子包括SEQ ID NO:40的序列。在一些供选择的方案中,第一核酸进一步包括第一载体并且第二核酸进一步包括第二载体。在一些供选择的方案中,两种载体均被包装在病毒载体内。在一些供选择的方案中,病毒载体是慢病毒。在一些供选择的方案中,第一和第二核酸包括载体。在一些供选择的方案中,第一核酸进一步包括编码选择性标记的核酸序列。在一些供选择的方案中,第二核酸进一步包括编码选择性标记的核酸。在一些供选择的方案中,第二核酸进一步包括编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸,其中配体结合域对配体是特异性的,其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子,其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除;编码多肽间隔区的多核苷酸,其中间隔区是优化的;以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中,第一启动子在第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中,配体结合域是抗体片段,优选是其结合片段。在一些供选择的方案中,肿瘤特异性分子是CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2或MAGE A3 TCR或其组合。在一些供选择的方案中,系统包括:a) 第一核酸,包括可通过药物诱导的第一启动子,其中第一核酸可操作地连接于编码细胞因子、趋化因子受体、调控细胞凋亡的多肽或调节检查点信号传导的多肽的多核苷酸;以及b) 第二核酸,包括第二启动子,所述第二启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中,第二启动子是组成型或诱导型。在一些供选择的方案中,第二核酸进一步包括编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸,其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子,其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除;编码多肽间隔区的多核苷酸,其中间隔区是优化的;以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中,第一启动子在第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中,配体结合域是抗体片段,优选是其结合片段。在一些供选择的方案中,配体结合域是单链可变区片段。在一些供选择的方案中,肿瘤特异性分子是CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2或MAGE A3 TCR或其组合。在一些供选择的方案中,宿主细胞是选自由初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和混合(bulk) CD8+T细胞组成的组的CD8+T细胞毒性淋巴细胞。在一些供选择的方案中,宿主细胞是选自由初始CD4+T细

胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和混合CD4+T细胞组成的组的CD4+T辅助淋巴细胞。在一些供选择的方案中,针对与参比嵌合受体相比应答配体的T细胞增殖和/或细胞因子产生的增加,间隔区是优化的。在一些供选择的方案中,宿主细胞是前体T细胞。在一些供选择的方案中,前体T细胞是造血干细胞。

[0025] 在一些供选择的方案中,提供了组合物,其中组合物包含在药学上可接受的赋形剂中的宿主细胞。在一些供选择的方案中,宿主细胞包括系统。在一些供选择的方案中,系统包括:a) 第一核酸,包括可通过药物诱导的第一启动子,其中第一核酸可操作地连接于编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸,其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子,其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除;编码多肽间隔区的多核苷酸,其中间隔区是优化的;编码跨膜域的多核苷酸;以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸;以及b) 第二核酸,包括第二启动子,所述第二启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中,第二启动子是组成型或诱导型。在一些供选择的方案中,药物是他莫昔芬和/或其代谢物。在一些供选择的方案中,第一启动子包括SEQ ID NO:41的核酸序列。在一些供选择的方案中,第二启动子是组成型启动子。在一些供选择的方案中,第二启动子是EF1 $\alpha$ p。在一些供选择的方案中,转录激活因子包括SEQ ID NO:40的序列。在一些供选择的方案中,第一核酸进一步包括第一载体并且第二核酸进一步包括第二载体。在一些供选择的方案中,两种载体均被包装在病毒载体内。在一些供选择的方案中,病毒载体是慢病毒。在一些供选择的方案中,第一和第二核酸包括载体。在一些供选择的方案中,第一核酸进一步包括编码选择性标记的核酸序列。在一些供选择的方案中,第二核酸进一步包括编码选择性标记的核酸。在一些供选择的方案中,第二核酸进一步包括编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸,其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子,其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除;编码多肽间隔区的多核苷酸,其中间隔区是优化的;编码跨膜域的多核苷酸;以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中,第一启动子在第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中,配体结合域是抗体片段。在一些供选择的方案中,肿瘤特异性分子是CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2或MAGE A3 TCR或其组合。在一些供选择的方案中,系统包括:a) 第一核酸,包括可通过药物诱导的第一启动子,其中第一核酸可操作地连接于编码细胞因子、趋化因子受体、调控细胞凋亡的多肽或调节检查点信号传导的多肽的多核苷酸;以及b) 第二核酸,包括第二启动子,所述第二启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中,第二启动子是组成型或诱导型。在一些供选择的方案中,第二核酸进一步包括编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸,其中配体结合域对配体是特异性的,其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子,其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除;编码多肽间隔区的多核苷酸,其中间隔区是优化的;以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中,第一启动子在第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中,配体结合域是抗体片段,优选是其结合片段。在一些供选择的方案中,配体结合域是单链可变区片段。在一些供选择的方案中,肿瘤特异性分子是CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-

2或MAGE A3 TCR或其组合。在一些供选择的方案中,宿主细胞是前体T细胞。在一些供选择的方案中,前体T细胞是造血干细胞。在一些供选择的方案中,宿主细胞是选自由初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和混合CD8+T细胞组成的组的CD8+T细胞毒性淋巴细胞。在一些供选择的方案中,宿主细胞是选自由初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和混合CD4+T细胞组成的组的CD4+T辅助淋巴细胞。在一些供选择的方案中,组合物包含宿主细胞,其中宿主细胞是选自由初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和混合CD8+T细胞组成的组的CD8+T细胞毒性淋巴细胞,并进一步包含其他宿主细胞,其中宿主细胞是选自由初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和混合CD4+T细胞组成的组的CD4+T辅助淋巴细胞。在一些供选择的方案中,宿主细胞是前体T细胞。在一些供选择的方案中,前体T细胞是造血干细胞。在一些供选择的方案中,针对与参比嵌合受体相比应答配体的T细胞增殖和/或细胞因子产生的增加,间隔区是优化的。在一些供选择的方案中,组合物包含宿主细胞,其中宿主细胞是选自由初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和混合CD8+T细胞组成的组的CD8+T细胞毒性淋巴细胞或宿主细胞是选自由初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和混合CD4+T细胞组成的组的CD4+T辅助淋巴细胞;和第二宿主细胞,其中第二宿主细胞是前体T细胞或造血干细胞。

[0026] 在一些供选择的方案中,提供了用于制备宿主细胞的体外方法,其中方法包括:a) 提供系统,以及b) 将系统引导入单独分离的T淋巴细胞群并在体外扩增每个T淋巴细胞群。在一些供选择的方案中,系统包括:a) 第一核酸,包括可通过药物诱导的第一启动子,其中第一核酸可操作地连接于编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸,其中配体结合域对配体是特异性的,其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子,其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除;编码多肽间隔区的多核苷酸,其中间隔区是优化的;编码跨膜域的多核苷酸;以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸;以及b) 第二核酸,包括第二启动子,所述第二启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中,第二启动子是组成型或诱导型。在一些供选择的方案中,药物是他莫昔芬和/或其代谢物。在一些供选择的方案中,第二启动子是组成型或诱导型。在一些供选择的方案中,第一启动子包括SEQ ID NO:41的核酸序列。在一些供选择的方案中,第二启动子是组成型启动子。在一些供选择的方案中,第二启动子是EF1 $\alpha$ p。在一些供选择的方案中,转录激活因子包括SEQ ID NO:40的序列。在一些供选择的方案中,第一核酸进一步包括第一载体并且第二核酸进一步包括第二载体。在一些供选择的方案中,两种载体均被包装在病毒载体内。在一些供选择的方案中,病毒载体是慢病毒。在一些供选择的方案中,第一和第二核酸包括载体。在一些供选择的方案中,第一核酸进一步包括编码选择性标记的核酸序列。在一些供选择的方案中,第二核酸进一步包括编码选择性标记的核酸。在一些供选择的方案中,第二核酸进一步包括编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸,其中配体结合域对配体是特异性的,其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子,其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除;编码多肽间隔区的多核苷酸,其中间隔区是优化的;编码跨膜域的多核苷酸;以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中,第一启动子在第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中,配体结合域是抗体片段,优

选是其结合片段。在一些供选择的方案中，肿瘤特异性分子是CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2或MAGE A3 TCR或其组合。在一些供选择的方案中，系统包括：a) 第一核酸，包括可通过药物诱导的第一启动子，其中第一核酸可操作地连接于编码细胞因子、趋化因子受体、调控细胞凋亡的多肽或调节检查点信号传导的多肽的多核苷酸；以及b) 第二核酸，包括第二启动子，所述第二启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型或诱导型。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；编码跨膜域的多核苷酸；以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中，第一启动子在第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中，配体结合域是抗体片段，优选是其结合片段。在一些供选择的方案中，配体结合域是单链可变区片段。在一些供选择的方案中，肿瘤特异性分子是CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2或MAGE A3 TCR或其组合。在一些供选择的方案中，其中T淋巴细胞是扩增的，方法进一步包括在抗CD3和/或抗CD28和至少一种体内稳态细胞因子的存在下培养细胞，直到细胞扩增充分用于用作细胞输注物。在一些供选择的方案中，淋巴细胞是CD8+或CD4+的淋巴细胞。在一些供选择的方案中，针对与参比嵌合受体相比应答配体的T细胞增殖和/或细胞因子产生的增加，间隔区是优化的。在一些供选择的方案中，宿主细胞是前体T细胞。在一些供选择的方案中，前体T细胞是造血干细胞。

[0027] 在一些供选择的方案中，提供了宿主细胞或组合物与诱导转基因在宿主细胞或组合物中的表达的药物组合用于治疗癌症或病毒感染的用途。在一些供选择的方案中，宿主细胞包括系统。在一些供选择的方案中，系统包括：a) 第一核酸，包括可通过药物诱导的第一启动子，其中第一核酸可操作地连接于编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体结合域对配体是特异性的，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；编码跨膜域的多核苷酸；以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸；以及b) 第二核酸，包括第二启动子，所述第二启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型或诱导型。在一些供选择的方案中，药物是他莫昔芬和/或其代谢物。在一些供选择的方案中，第一启动子包括SEQ ID NO:41的核酸序列。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型启动子。在一些供选择的方案中，第二启动子是EF1 $\alpha$ p。在一些供选择的方案中，转录激活因子包括SEQ ID NO:40的序列。在一些供选择的方案中，第一核酸进一步包括第一载体并且第二核酸进一步包括第二载体。在一些供选择的方案中，两种载体均被包装在病毒载体内。在一些供选择的方案中，病毒载体是慢病毒。在一些供选择的方案中，第一和第二核酸包括载体。在一些供选择的方案中，第一核酸进一步包括编码选择性标记的核酸序列。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码选择性标记的核酸。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体结合域对配体是特异性的，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达

于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中，第一启动子在第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中，配体结合域是抗体片段。在一些供选择的方案中，肿瘤特异性分子是CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2或MAGE A3 TCR或其组合。在一些供选择的方案中，系统包括：a) 第一核酸，包括可通过药物诱导的第一启动子，其中第一核酸可操作地连接于编码细胞因子、趋化因子受体、调控细胞凋亡的多肽或调节检查点信号传导的多肽的多核苷酸；以及b) 第二核酸，包括第二启动子，所述第二启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型或诱导型。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中，第一启动子在第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中，配体结合域是抗体片段，优选是其结合片段。在一些供选择的方案中，配体结合域是单链可变区片段。在一些供选择的方案中，肿瘤特异性分子是CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2或MAGE A3 TCR或其组合。在一些供选择的方案中，宿主细胞是选自由初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和混合CD8+T细胞组成的组的CD8+T细胞毒性淋巴细胞。在一些供选择的方案中，宿主细胞是选自由初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和混合CD4+T细胞组成的组的CD4+T辅助淋巴细胞。在一些供选择的方案中，细胞是前体T细胞。在一些供选择的方案中，细胞是造血干细胞。在一些供选择的方案中，组合物包含在药学上可接受的赋形剂中的宿主细胞。在一些供选择的方案中，宿主细胞包括系统。在一些供选择的方案中，系统包括：a) 第一核酸，包括可通过药物诱导的第一启动子，其中第一核酸可操作地连接于编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体结合域对配体是特异性的，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；以及b) 第二核酸，包括第二启动子，所述第二启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型或诱导型。在一些供选择的方案中，药物是他莫昔芬和/或其代谢物。在一些供选择的方案中，第一启动子包括SEQ ID NO:41的核酸序列。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型启动子。在一些供选择的方案中，第二启动子是EF1 $\alpha$ p。在一些供选择的方案中，转录激活因子包括SEQ ID NO:40的序列。在一些供选择的方案中，第一核酸进一步包括第一载体并且第二核酸进一步包括第二载体。在一些供选择的方案中，两种载体均被包装在病毒载体内。在一些供选择的方案中，病毒载体是慢病毒。在一些供选择的方案中，第一和第二核酸包括载体。在一些供选择的方案中，第一核酸进一步包括编码选择性标记的核酸序列。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码选择性标记的核酸。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体结合域对配体是特异性的，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中

配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中，第一启动子在第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中，配体结合域是抗体片段，优选是其结合片段。在一些供选择的方案中，肿瘤特异性分子是CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2或MAGE A3 TCR或其组合。在一些供选择的方案中，系统包括：a) 第一核酸，包括可通过药物诱导的第一启动子，其中第一核酸可操作地连接于编码细胞因子、趋化因子受体、调控细胞凋亡的多肽或调节检查点信号传导的多肽的多核苷酸；以及b) 第二核酸，包括第二启动子，所述第二启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型或诱导型。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中，第一启动子在第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中，配体结合域是抗体片段，优选是其结合片段。在一些供选择的方案中，配体结合域是单链可变区片段。在一些供选择的方案中，肿瘤特异性分子是CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2或MAGE A3 TCR或其组合。在一些供选择的方案中，宿主细胞是选自由初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和混合CD8+T细胞组成的组的CD8+T细胞毒性淋巴细胞。在一些供选择的方案中，宿主细胞是选自由初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和混合CD4+T细胞组成的组的CD4+T辅助淋巴细胞。在一些供选择的方案中，组合物包含宿主细胞，其中宿主细胞是选自由初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和混合CD8+T细胞组成的组的CD8+T细胞毒性淋巴细胞；和另一种宿主细胞，其中宿主细胞是选自由初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和混合CD4+T细胞组成的组的CD4+T辅助淋巴细胞。在一些供选择的方案中，癌症是实体瘤或恶性血液肿瘤。在一些供选择的方案中，实体瘤选自由乳腺癌、脑癌、肺癌、结肠癌、肾癌、胰腺癌、前列腺癌和卵巢癌组成的组。在一些供选择的方案中，针对与参比嵌合受体相比应答配体的T细胞增殖和/或细胞因子产生的增加，间隔区是优化的。在一些供选择的方案中，宿主细胞是前体T细胞。在一些供选择的方案中，前体T细胞是造血干细胞。在一些供选择的方案中，宿主细胞是前体T细胞。在一些供选择的方案中，前体T细胞是造血干细胞。在一些供选择的方案中，针对与参比嵌合受体相比应答配体的T细胞增殖和/或细胞因子产生的增加，间隔区是优化的。在一些供选择的方案中，组合物包含宿主细胞，其中宿主细胞是选自由初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和混合CD8+T细胞组成的组的CD8+T细胞毒性淋巴细胞或宿主细胞是选自由初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和混合CD4+T细胞组成的组的CD4+T辅助淋巴细胞；和第二宿主细胞，其中第二宿主细胞是前体T细胞或造血干细胞。

[0028] 在一些供选择的方案中，提供了在患有癌症或病毒感染的受试者中进行细胞免疫治疗的方法，其中方法包括：施用组合物或宿主细胞于受试者并施用在组合物或宿主细胞中诱导转基因表达的药物。在一些供选择的方案中，宿主细胞包括系统。在一些供选择的方案中，系统包括：a) 第一核酸，包括可通过药物诱导的第一启动子，其中第一核酸可操作地

连接于编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体结合域对配体是特异性的，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；编码跨膜域的多核苷酸；以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸；以及b) 第二核酸，包括第二启动子，所述第二启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型或诱导型。在一些供选择的方案中，药物是他莫昔芬和/或其代谢物。在一些供选择的方案中，第一启动子包括SEQ ID NO:41的核酸序列。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型启动子。在一些供选择的方案中，第二启动子是EF1 $\alpha$ p。在一些供选择的方案中，转录激活因子包括SEQ ID NO:40的序列。在一些供选择的方案中，第一核酸进一步包括第一载体并且第二核酸进一步包括第二载体。在一些供选择的方案中，两种载体均被包装在病毒载体内。在一些供选择的方案中，病毒载体是慢病毒。在一些供选择的方案中，第一和第二核酸包括载体。在一些供选择的方案中，第一核酸进一步包括编码选择性标记的核酸序列。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体结合域对配体是特异性的，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中，第一启动子在第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中，配体结合域是抗体片段，优选是其结合片段。在一些供选择的方案中，肿瘤特异性分子是CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2或MAGE A3 TCR或其组合。在一些供选择的方案中，系统包括：a) 第一核酸，包括可通过药物诱导的第一启动子，其中第一核酸可操作地连接于编码细胞因子、趋化因子受体、调控细胞凋亡的多肽或调节检查点信号传导的多肽的多核苷酸；以及b) 第二核酸，包括第二启动子，所述第二启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型或诱导型。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；编码跨膜域的多核苷酸；以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中，第一启动子在第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中，配体结合域是抗体片段，优选是其结合片段。在一些供选择的方案中，配体结合域是单链可变区片段。在一些供选择的方案中，肿瘤特异性分子是CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2或MAGE A3 TCR或其组合。在一些供选择的方案中，宿主细胞是选自由初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和混合CD8+T细胞组成的组的CD8+T细胞毒性淋巴细胞。在一些供选择的方案中，宿主细胞是选自由初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和混合CD4+T细胞组成的组的CD4+T辅助淋巴细胞。在一些供选择的方案中，组合物包含在药学上可接受的赋形剂中的宿主细胞。在一些供选择的方案中，宿主细胞包括系统。在一些供选择的方案中，系统包括：a) 第一核酸，包括可通过药物诱导的第一启动子，其中第一核酸可操

作地连接于编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体结合域对配体是特异性的，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；以及b) 第二核酸，包括第二启动子，所述第二启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型或诱导型。在一些供选择的方案中，药物是他莫昔芬和/或其代谢物。在一些供选择的方案中，第一启动子包括SEQ ID NO:41的核酸序列。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型启动子。在一些供选择的方案中，第二启动子是EF1 $\alpha$ p。在一些供选择的方案中，转录激活因子包括SEQ ID NO:40的序列。在一些供选择的方案中，第一核酸进一步包括第一载体并且第二核酸进一步包括第二载体。在一些供选择的方案中，两种载体均被包装在病毒载体内。在一些供选择的方案中，病毒载体是慢病毒。在一些供选择的方案中，第一和第二核酸包括载体。在一些供选择的方案中，第一核酸进一步包括编码选择性标记的核酸序列。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码选择性标记的核酸。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体结合域对配体是特异性的，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中，第一启动子在第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中，配体结合域是抗体片段，优选是其结合片段。在一些供选择的方案中，肿瘤特异性分子是CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2或MAGE A3 TCR或其组合。在一些供选择的方案中，系统包括：a) 第一核酸，包括可通过药物诱导的第一启动子，其中第一核酸可操作地连接于编码细胞因子、趋化因子受体、调控细胞凋亡的多肽或调节检查点信号传导的多肽的多核苷酸；以及b) 第二核酸，包括第二启动子，所述第二启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型或诱导型。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中，第一启动子在第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中，配体结合域是抗体片段，优选是其结合片段。在一些供选择的方案中，配体结合域是单链可变区片段。在一些供选择的方案中，肿瘤特异性分子是CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2或MAGE A3 TCR或其组合。在一些供选择的方案中，宿主细胞是选自由初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和混合CD8+T细胞组成的组的CD8+T细胞毒性淋巴细胞。在一些供选择的方案中，宿主细胞是选自由初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和混合CD4+T细胞组成的组的CD4+T辅助淋巴细胞。在一些供选择的方案中，组合物包含宿主细胞，其中宿主细胞是选自由初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和混合CD8+T细胞组成的组的CD8+T细胞毒性淋巴细胞；和另一种宿主细胞，其中宿主细胞是选自由初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和混合CD4+T细胞组成的组的

CD4+T辅助淋巴细胞。在一些供选择的方案中,宿主细胞是前体T细胞。在一些供选择的方案中,前体T细胞是造血干细胞。在一些供选择的方案中,针对与参比嵌合受体相比应答配体的T细胞增殖和/或细胞因子产生的增加,间隔区是优化的。在一些供选择的方案中,组合物包含宿主细胞,其中宿主细胞是选自由初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和混合CD8+T细胞组成的组的CD8+T细胞毒性淋巴细胞或宿主细胞是选自由初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和混合CD4+T细胞组成的组的CD4+T辅助淋巴细胞;和第二宿主细胞,其中第二宿主细胞是前体T细胞或造血干细胞。在一些供选择的方案中,癌症选自实体瘤或恶性血液肿瘤。在一些供选择的方案中,实体瘤选自由乳腺癌、脑癌、肺癌、结肠癌、肾癌、胰腺癌、前列腺癌和卵巢癌组成的组。在一些供选择的方案中,针对与参比嵌合受体相比应答配体的T细胞增殖和/或细胞因子产生的增加,间隔区是优化的。在一些供选择的方案中,宿主细胞是前体T细胞。在一些供选择的方案中,前体T细胞是造血干细胞。在一些供选择的方案中,分离的T淋巴细胞群包括前体T细胞。在一些供选择的方案中,前体T细胞是造血干细胞。在一些供选择的方案中,施用药物在施用组合物或宿主细胞之后进行,其中施用进行1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、2周、4周或2个月,或列出的时间的任意两个值之间的任意时间。

## 附图说明

[0029] 图1A显示了在4-羟基他莫昔芬(4-OHT)存在或不存在下,在转导了包括构建体A和B的双质粒慢病毒构建体的Jurkat细胞中,通过流式细胞术确定的ZsGreen和EGFRt的表达。结果显示在4-OHT存在或不存在下EGFRt表达,表明细胞携带构建体A。结果也显示当在4-OHT存在下诱导ZsGreen表达时,细胞携带构建体B。图1B显示了构建体A,其包括组成型启动子EF1 $\alpha$ p,组成型启动子EF1 $\alpha$ p连接于TamR-tf (HEA3), TamR-tf (HEA3)连接于EGFRt;以及构建体B,其包括连接于编码ZsGreen的多核苷酸的合成启动子7xHBD/mE1b。

[0030] 图2显示了ZsGreen在与不同剂量的4-OHT(从50至1000nM)接触的转导的Jurkat细胞中的表达。

[0031] 图3显示了ZsGreen在用4-OHT进行单次48小时处理,然后冲洗的转导的Jurkat细胞(○),和用4-OHT进行24小时处理,然后洗涤,然后用4-OHT在第15天重刺激的转导的Jurkat细胞(■)中的表达的间歇速率动力学(on and off rate kinetics)。

[0032] 图4A-图4D显示了ZsGreen在用双包装的慢病毒构建体A和B转导的CD4中枢记忆细胞中的表达。将细胞分为3个处理组,单独4-OHT(图4A),4-OHT与CD3/CD28珠组合共处理(图4B)或单独4-OHT处理48小时后添加CD3/CD28珠(图4C)。在96小时内监测ZsGreen的表达。图4D显示了构建体A,其包括组成型启动子EF1 $\alpha$ p,该组成型启动子EF1 $\alpha$ p连接于TamR-tf (HEA3),该TamR-tf (HEA3)连接于EGFRt;以及构建体B,其包括连接于编码ZsGreen的多核苷酸的合成启动子7xHBD/mE1b。

[0033] 图5A-图5C显示了ZsGreen在用如图4A-图4D所示的双包装慢病毒构建体A和B转导的CD8中枢记忆细胞中的表达。将细胞分为3个处理组,单独的4OHT(图5A),4OHT与CD3/CD28珠组合共处理(图5B)或单独4OHT处理48小时,然后添加CD3/CD28珠(图5C)。在72个小时内监测ZsGreen的表达。

[0034] 图6A显示了EGFRt和Her2t在用如图6C中所示的构建体A和B转导的人Jurkat T细

胞中的表达。在4OHT存在或不存在下,监测EGFRt和Her2t的表达。用EGFRt-APC抗体和赫赛汀-生物素,然后用SA-PE将样品染色。图6B显示了用识别CD19 CAR上的胞内CD3 $\zeta$ 链(约48kDA)的小鼠抗CD247染色的亲代Jurkat细胞和转导的CD19CAR转导细胞的蛋白免疫印迹,内源CD3 $\zeta$ 链在23kDA处具有迁移。在所有细胞中检测到内源CD3 $\zeta$ 。仅在暴露于4-OHT的转导的Jurkat细胞中检测到CD19 CAR CD3 $\zeta$ 链。图6C显示了构建体A,其包括组成型启动子EF1 $\alpha$ p,该组成型启动子EF1 $\alpha$ p连接于TamR-tf (HEA3),该TamR-tf (HEA3)连接于EGFRt;和构建体B,其包括合成启动子7xHBD/mE1b,该合成启动子7xHBD/mE1b连接于编码CD19CAR的多核苷酸;该编码CD19CAR的多核苷酸连接于编码Her2t的多核苷酸。

[0035] 图7A显示了在4OHT的存在或不存在下,在用包括另外的选择性标记DHFRdm的TamR CD19CAR LV转导的人Jurkat T细胞中EGFRt和Her2t的表达。在4OHT存在或不存在下监测EGFRt和Her2t的表达。用EGFRt-APC抗体和赫赛汀-生物素,然后用SA-PE将样品染色。图7B显示了用识别CD19CAR上的胞内CD3 $\zeta$ 链(约48kDA)的小鼠抗CD247染色的亲代Jurkat细胞和转导的CD19CAR转导细胞的蛋白免疫印迹,内源CD3 $\zeta$ 链在23kDA处具有迁移。在所有细胞中检测到内源CD3 $\zeta$ 。仅在暴露于4-OHT的转导的Jurkat细胞中检测到CD19 CAR CD3 $\zeta$ 链。图7C显示了构建体A,其包括组成型启动子EF1 $\alpha$ p,该组成型启动子EF1 $\alpha$ p连接于TamR-tf (HEA3),该TamR-tf (HEA3)连接于EGFRt;和构建体B,其包括合成启动子7xHBD/mE1b,该合成启动子7xHBD/mE1b连接于编码CD19CAR的多核苷酸;该编码CD19CAR的多核苷酸连接于编码Her2t的多核苷酸;该编码Her2t的多核苷酸连接于编码DHFRdm的多核苷酸。

[0036] 图8A显示了在4OHT和抗CD3/CD28珠存在或不存在下,在用包括另外的选择性标记DHFRdm的TamR CD19CAR LV转导的人CD4中枢记忆T细胞中EGFRt和Her2t的表达。在4OHT存在或不存在下和在抗CD3/CD28珠存在或不存在下,监测EGFRt和Her2t的表达。用EGFRt-APC抗体和赫赛汀-生物素,然后用SA-PE将样品染色。图8B显示了构建体A,其包括组成型启动子EF1 $\alpha$ p,该组成型启动子EF1 $\alpha$ p连接于TamR-tf (HEA3);该TamR-tf (HEA3)连接于EGFRt;和构建体B,其包括合成启动子7xHBD/mE1b,该合成启动子7xHBD/mE1b连接于编码CD19CAR的多核苷酸,该编码CD19CAR的多核苷酸连接于编码Her2t的多核苷酸;该编码Her2t的多核苷酸连接于编码DHFRdm的多核苷酸。

## 具体实施方式

[0037] 定义

[0038] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的技术人员通常理解的相同的意义。

[0039] 如本文使用的“大约”当指可测值时,意思是涵盖给定值的±20%或±10%,更优选±5%,甚至更优选±1%,以及进一步更优选±0.1%的变化。

[0040] 如本文使用的“抗原”或“Ag”指引起免疫应答的分子。该免疫应答可以涉及抗体产生或特异性免疫活性细胞的激活,或上述两者。显而易见的是抗原可以是合成产生的,重组产生的或可以来源于生物样品。这样的生物样品可以包括但不限于组织样品、肿瘤样品、细胞或生物流体,例如血液、血浆或腹水。

[0041] 如本文描述的“抗肿瘤作用”指可以通过肿瘤体积的减小、肿瘤细胞数量的减少、转移数目的减少、预期寿命的增加或与癌症病症相关的各种生理症状的减少证明的生物作

用。“抗肿瘤作用”也可以通过复发减少或复发前时间的增加证明。

[0042] 如本文描述的“嵌合受体”指合成设计的受体或其他受体如共刺激域，所示合成设计的受体包括抗体或其他蛋白序列的配体结合域，所示其他蛋白序列结合于疾病或紊乱相关的分子，并且通过间隔域连接于T细胞的一个或多个胞内信号传导域。嵌合受体也可以指人工T细胞受体、嵌合T细胞受体、嵌合免疫受体和嵌合抗原受体(CAR)。这些CAR是工程化的受体，该工程化的受体可以将任意的特异性移植于免疫受体细胞上。一些研究者也认为术语嵌合抗原受体或“CAR”包括抗体或抗原片段、间隔区、信号传导域和跨膜区。然而，因为修饰本文描述的CAR的不同组件或域如表位结合区(例如，抗体片段，scFv或其部分)、间隔区、跨膜域和/或信号传导域的惊人作用，贯穿该公开，CAR的组件频繁地依据独立元件区分。CAR的不同元件的变化例如可以导致对特异性表位或抗原更强的结合亲和性。如本文使用的术语“共刺激域”指向T细胞提供信号的信号部分，所述信号除例如TCR/CD3复合物的CD3 $\zeta$ 链提供的初级信号以外，介导T细胞应答，包括但不限于激活、增殖、分化、细胞因子分泌等。共刺激域可以包括但不限于CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴功能相关抗原1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、或与CD83特异性结合的配体中的全部或一部分。在一些供选择的方案中，共刺激域是与其他胞内介质相互作用以介导包括激活、增殖、分化和细胞因子分泌等的细胞应答的胞内信号传导域。本文使用的“编码”指在如基因、cDNA或mRNA的多核苷酸中核苷酸的作为模板用于合成其他大分子如定义的氨基酸序列的特异性序列的性质。因此，如果对应于基因的mRNA的转录和翻译在细胞或其他生物系统中产生蛋白质，则该基因编码蛋白质。“编码多肽的核酸序列”包括所有彼此的简并形式和编码相同氨基酸序列的核苷酸序列。

[0043] 本文使用的“条件型的”或“诱导型的”指包括在诱导物存在下提供基因表达，并且在诱导物不存在下基本上不提供基因表达的启动子的核酸构建体。

[0044] 本文使用的“组成型的”指包括提供连续产生的多肽表达的组成型启动子的核酸构建体。

[0045] “特异性的”或“特异性”可以指用于结合配偶体的配体的特征，或可替换地用于配体的结合配偶体的特征，并且可以包括用于结合的互补形状、电荷和疏水特异性。结合的特异性可以包括立体特异性、区域选择性和化学选择性。在一些供选择的方案中，提供制备编码嵌合抗原受体的核酸的方法以便产生编码嵌合抗原受体的核酸。

[0046] 如本文描述的“调控”或“调节”指控制生物过程的行为，或指运用对生物过程或细胞过程或途径的修饰或控制影响。在一些供选择的方案中，提供了用于嵌合抗原受体的诱导型表达的系统，其中系统包括：a) 第一核酸，包括可通过药物诱导的第一启动子，其中第一核酸可操作地连接于编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体结合域对配体是特异性的，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除，编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的，编码跨膜域的多核苷酸，和d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸，以及b) 第二核酸，包括第二启动子，所述第二启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中，调节包括细胞分化和凋亡的调节。在一些供选择的方案中，调节包括通过调控蛋白质的活性调节细胞增殖。在一些供选择的方案中，蛋白质是细胞周期调控因子和转录因子。在一些供选择的方案中，细胞周期调控

因子是细胞周期蛋白D1、p21、p27和/或cdc25A。在一些供选择的方案中,转录因子是c-Myc。  
[0047] 如本文使用的“细胞毒性T淋巴细胞”(CTL)指在其表面上表达CD8的T淋巴细胞(例如CD8<sup>+</sup>T细胞)。在一些供选择的方案中,这样的细胞优选是抗原刺激过的(antigen-experienced)“记忆”T细胞(T<sub>M</sub>细胞)。

[0048] 如本文使用的“中枢记忆”T细胞(或“T<sub>CM</sub>”)指与初始细胞相比,在其表面上表达CD62L、CCR-7和/或CD45R0,并且不表达或减少表达CD45RA的抗原刺激过的CTL。在一些供选择的方案中,中枢记忆细胞与初始细胞相比,对CD62L、CCR7、CD28、CD127、CD45R0和/或CD95表达呈阳性,并且可以具有减少的CD54RA表达。如本文使用的“效应记忆”T细胞(或“T<sub>EM</sub>”)指与中枢记忆细胞相比,在其表面上不表达或减少表达CD62L,并且与初始细胞相比,不表达或具有减少的CD45RA表达的抗原刺激过的T细胞。在一些供选择的方案中,效应记忆细胞对与初始细胞或中枢记忆细胞相比,CD62L和/或CCR7表达呈阴性,以及可以具有CD28和/或CD45RA的可变表达。

[0049] 如本文使用的“初始”T细胞指与中枢记忆细胞或效应记忆细胞相比,表达CD62L和/或CD45RA,并且不表达CD45R0-的非抗原刺激过的T淋巴细胞。在一些供选择的方案中,初始CD8+T淋巴细胞被表征为初始T细胞的包括CD62L、CCR7、CD28、CD127和/或CD45RA的表型标记物的表达。

[0050] 如本文使用的“效应”T<sub>E</sub>细胞指与中枢记忆T细胞或初始T细胞相比,不表达或减少表达CD62L、CCR7和/或CD28的抗原刺激过的细胞毒性T淋巴细胞,并且对颗粒酶和/或穿孔素呈阳性。

[0051] 如本文使用的以描述混合物中细胞类型的量的“富集的”和“贫化的”指使细胞的混合物经历方法或步骤,导致“富集的”型细胞的目的增加,以及“贫化的”细胞的数目减少。因此,根据经历富集方法的细胞的原始群的来源,混合物或组合物可含有60、70、80、90、95%或99%或更多(数目或计数上)的“富集的”细胞和/或40、30、20、10、5%或1%或更少(数目或计数上)的“贫化的”细胞。

[0052] 如本文使用的“表位”指被包括抗体、T细胞和/或B细胞的免疫系统识别的抗原或分子的一部分。表位通常具有至少7个氨基酸,并且可以是线性的或构象的。

[0053] 当“分离的”用于描述本文公开的不同的多肽时,意思是已经从其自然环境的组分中鉴别和分开和/或回收的多肽或核酸。优选地,分离的多肽或核酸不与所有与其自然关联的组分关联。其自然环境的污染组分是将典型地干扰多肽或核酸的诊断或治疗用途并且可以包括酶、激素和其他蛋白质的或非蛋白质的溶质的物质。

[0054] 如本文使用的“胞内信号传导域”指提供淋巴细胞的激活的分子(这里是嵌合受体分子)的一个或多个域的全部或部分。这样的分子的胞内域通过与胞内介质相互作用介导信号,导致增殖、分化、激活和其他效应功能。在一些供选择的方案中,这样的分子包括CD28、CD3或4-1BB的全部或部分或其组合。

[0055] 如本文使用的“配体”指特异性结合另一种物质以形成复合物的物质。配体的例子包括抗原上的表位,结合于受体、底物、抑制剂、激素和/或激活剂的分子。如本文使用的“配体结合域”指结合于配体的物质或物质的一部分。配体结合域的例子包括抗体的抗原结合部分、受体的胞外域和/或酶的活性位点。如本文使用的“可操作地连接”指调控序列和异源核酸序列间的功能性连接导致后者的表达。例如,当第一核酸序列与第二核酸序列以功能

性关系放置时，则第一核酸序列与第二核酸序列可操作地连接。比如，如果启动子影响编码序列的转录或表达，则启动子可操作地连接于编码序列。一般地，可操作地连接的DNA是连续的，并且，必要时在相同的读码框内连接两个蛋白编码区。

[0056] 关于本文鉴别的嵌合受体多肽序列的“百分比(%)氨基酸序列一致性”被定义为在比对序列，并如需要引入空缺以获得最大百分比序列一致性，并不考虑任意保守置換作为序列一致性的一部分之后，在与配体结合域、间隔区、跨膜域和/或淋巴细胞激活域中的每一个的参考序列中的氨基酸残基一致的候选序列中氨基酸残基的百分比。以确定百分比氨基酸序列一致性的目的的比对，可以以多种本领域技术中的方法完成比对，比如，使用公开可获得的电脑软件如BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2或Megalign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可以确定用于测量比对的合适的参数，包括用于获得对要比较的序列的全长的最大对比需要的任意算法。例如，使用WU-BLAST-2计算机程序 [Altschul等人, Methods in Enzymology, 266:460-480 (1996) ] 产生的%氨基酸序列一致性值使用数个搜索参数，其中大多数设置为缺省值。不设置为缺省值的那些值(即可调参数)设置为以下值：重叠跨距=1，重叠分数=0.125，词阈值(T)=11以及打分矩阵=BLOSUM62。通过将(a)表2中提供的参考嵌合受体序列的每个或所有多肽氨基酸序列与通过WU-BLAST-2测量的感兴趣的对比氨基酸序列之间的匹配一致的氨基酸残基的数目除以(a)感兴趣的多肽的氨基酸残基总数来确定%氨基酸序列一致性值。在一些供选择的方案中，通过计算机软件确定氨基酸或核酸的百分比序列一致性

[0057] 如本文使用的“嵌合受体变体多肽”或“嵌合受体变体核酸序列”指如下定义的编码多肽的核酸分子，即该核酸分子与表1所示的多核苷酸序列或特异地衍生的其片段，如编码抗原结合域的多核苷酸、编码间隔区的多核苷酸、编码跨膜域的多核苷酸和/或编码淋巴细胞刺激域的多核苷酸具有至少80%、85%、90%或95%核酸序列一致性(或通过任意两个上述的百分比定义的范围内的百分比核酸序列一致性)。通常，多肽或其片段的嵌合受体变体与如表中所示的核酸序列或衍生的其片段具有至少80%的核酸序列一致性，更优选至少81%的核酸序列一致性，更优选至少82%的核酸序列一致性，更优选至少83%的核酸序列一致性，更优选至少84%的核酸序列一致性，更优选至少85%的核酸序列一致性，更优选至少86%的核酸序列一致性，更优选至少87%的核酸序列一致性，更优选至少88%的核酸序列一致性，更优选至少89%的核酸序列一致性，更优选至少90%的核酸序列一致性，更优选至少91%的核酸序列一致性，更优选至少92%的核酸序列一致性，更优选至少93%的核酸序列一致性，更优选至少94%的核酸序列一致性，更优选至少95%的核酸序列一致性，更优选至少96%的核酸序列一致性，更优选至少97%的核酸序列一致性，更优选至少98%的核酸序列一致性以及又更优选至少99%的核酸序列一致性。变体不涵盖天然的核苷酸序列。就这一点而言，因为遗传密码的简并性，本领域技术人员会立刻认识到大量与表1的核苷酸序列具有至少80%的核酸序列一致性的嵌合受体变体多核苷酸会编码具有与表2的氨基酸序列一致的氨基酸序列的多肽。

[0058] “基本上纯化的”指具有10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%或更少的其他分子类型或其他细胞类型的分子。基本上纯化的细胞也指已经从在其处于天然存在状态时与其通常相关的其他细胞类型中单独细胞。在某些情况下，基本上纯化的细胞群指细胞的同源群体。

[0059] 当“大体上没有发现”用于参比中时,在正常细胞上的肿瘤抗原或其他分子的存在指具有抗原或分子的正常细胞类型的百分比和/或在细胞上的抗原的密度。在一些供选择的方案中,大体上没有发现的意思是与在肿瘤细胞或其他疾病细胞上发现的细胞的量或抗原的量相比,抗原或分子在少于50%的正常细胞类型上发现,和/或少于50%的密度。

[0060] 如本文使用的“T细胞”或“T淋巴细胞”可以来自任意哺乳动物物种,优选灵长类动物物种,包括猴子、狗和人。在一些供选择的方案中,T细胞是同种异体的(来自同物种但不同供体)作为受体受试者;在一些供选择的方案中,T细胞是自体的(供体和受体相同);在一些供选择的方案中,T细胞是同源的(供体和受体不同但是同卵双胞胎)。

[0061] “载体”或“构建体”是用于将异源核酸引入具有调控元件的细胞以提供异源核酸在该细胞中的表达的核酸。载体包括但不限于质粒、小环、酵母和病毒基因组。在一些供选择的方案中,载体是质粒、小环、酵母和病毒基因组。

[0062] 如本文描述的“凋亡”指可以发生在多细胞有机体中的程序性细胞死亡(PCD)的过程。生物化学事件导致特征性细胞改变(形态学)和死亡。这些改变包括出泡、细胞皱缩、核片段化、染色质凝聚和染色体DNA片段化。在凋亡中,细胞应答启动胞内凋亡信号,这可以引起细胞自杀。通过糖皮质激素、加热、辐射、营养物丧失、病毒感染、缺氧和增加的细胞内钙浓度(例如通过膜损伤)的核受体的结合,均可以触发由损伤的细胞释放胞内凋亡信号。大量细胞组分,如聚ADP核糖聚合酶,也可帮助调控凋亡。

[0063] 在酶促成细胞死亡的实际过程之前,凋亡信号必须引起调控蛋白启动凋亡途径。该步骤允许凋亡信号引起细胞死亡,或者停止细胞不再需要死亡的过程。涉及数种蛋白质,但是已经鉴别了两个主要的调控方法:以线粒体功能为靶标,或直接通过接头蛋白转导信号至凋亡机制。另一个在数种毒素研究中被鉴别的用于启动的外在途径是药物活性引起的细胞内的钙浓度的增加,其也可以通过钙结合蛋白酶钙蛋白酶而引起凋亡。

[0064] 通过许多因子可以调控凋亡。这些因子可以包括但不限于可以表达IL-2、IL-15、趋化因子受体、Bc12、CA-Akt、dn-TGFbetaRIII、dn-SHP1/2和/或PD-1CD28嵌合体的基因。IL-15调控T细胞和天然杀伤细胞的激活和增殖。在啮齿动物淋巴细胞中,IL15显示通过诱导凋亡抑制剂BCL2L1/BCL-X(L)防止凋亡。在患乳糜泻的人中,IL-15相似地在T淋巴细胞中通过诱导Bcl-2和/或BCL-xL抑制凋亡。由BCL2基因在人体内编码的Bcl-2(B细胞淋巴瘤-2)是通过诱导(促凋亡)它或抑制它(抗凋亡)调控细胞死亡(凋亡)的调控蛋白的Bcl-2家族的原始成员。Bcl-2被特别地认为是重要的抗凋亡蛋白并且因此被分类为癌基因。蛋白激酶B(PKB)也称为Akt,是在多样的细胞过程如葡萄糖代谢、凋亡、细胞增殖、转录和细胞迁移中起关键作用的丝氨酸/苏氨酸特异性蛋白激酶。在一些供选择的方案中,提供了用于嵌合抗原受体的诱导型表达的系统,其中,系统包括:a) 第一核酸,包括可通过药物诱导的第一启动子,其中第一核酸可操作地连接于编码细胞因子、趋化因子受体、调控细胞凋亡的多肽或调节检查点信号传导的多肽的多核苷酸,以及b) 第二核酸,包括第二组成型或诱导型启动子,所述第二组成型或诱导型启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中,调控凋亡或调节检查点信号传导的多肽包括IL-2、IL-15、趋化因子受体、Bc12、CA-Akt、dn-TGFbetaRIII、dn-SHP1/2或PD-1CD28嵌合体。

[0065] 如本文描述的“检查点信号传导”在特定的转换点,检查点阻断细胞周期以确保细胞周期事件按照正确顺序发生。检查点信号传导也可以被激活。通过例子但不限制的方式,

检查点信号传导可以通过损伤DNA发生,使得细胞周期必须在损伤被修复才继续进行。“细胞周期检查点”是确保细胞适当分裂的真核细胞中的控制机制。每个检查点在细胞周期中起到潜在的停止点的作用,在该细胞周期期间评估细胞的条件,当满足有利的条件时,通过细胞周期的不同时期继续进行。通常,存在三个已知的检查点:G1检查点,也称为限制检查点或开始检查点;G2/M检查点;以及中期检查点,也称为纺锤体检查点。应激后限制细胞周期转换和/或诱导细胞死亡的生物化学途径被称为细胞周期检查点。这些检查点保持DNA复制、修复和分裂的精确。可以调控检查点信号传导的多肽可以包括但不限于p53、p107、p130和转录抑制剂Rb。

[0066] 如本文描述的“负检查点调控因子”指可以限制T细胞应答有效攻击肿瘤的能力的因子。它们也被称为负检查点信号传导。在一些供选择的方案中,提供了用于嵌合抗原受体的诱导型表达的系统,其中系统包括:a) 第一核酸,包括可通过药物诱导的第一启动子,其中第一核酸可操作地连接于编码细胞因子、趋化因子受体、抑制调控细胞凋亡的多肽或调节检查点信号传导的多肽的多核苷酸,以及b) 第二核酸,包括第二组成型或诱导型启动子,所述第二组成型或诱导型启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中,调节检查点信号传导的多肽抑制负检查点调控因子。在一些供选择的方案中,负检查点调控因子包括VISTA、LAG-3和/或TIM3。

[0067] 在另一例子中,介导上游信号传导途径的生长抑制信号的细胞周期抑制剂,Cip/Kip家族p21Cip1、p27Kip1和p57Kip2的细胞周期蛋白-CDK抑制剂作为具有超越细胞周期调控功能的多种蛋白质出现。除了调控细胞周期,Cip/Kip蛋白也可以在凋亡、转录调控、细胞命运确定、细胞迁移和细胞支架力学中起重要作用。复合物磷酸化网络通过改变Cip/Kip蛋白功能的亚细胞定位、蛋白-蛋白相互作用和稳定性调节Cip/Kip蛋白的功能。这些功能对在从胚胎发育至肿瘤抑制的过程中保持正常细胞和组织的内稳态是必须的。在一些供选择的方案中,提供了用于嵌合抗原受体的诱导型表达的系统,其中系统包括:a) 第一核酸,包括可通过药物诱导的第一启动子,其中第一核酸可操作地连接于编码细胞因子、趋化因子受体、调控细胞凋亡的多肽或调节检查点信号传导的多肽的多核苷酸,以及b) 第二核酸,包括第二组成型或诱导型启动子,所述第二组成型或诱导型启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中,多肽调节检查点信号传导。在一些供选择的方案中,调节检查点信号传导的多肽抑制负检查点调控因子。在一些供选择的方案中,负检查点调控因子包括VISTA、LAG-3和/或TIM3。

[0068] 如本文描述的“T细胞前体”指可以迁移至胸腺并成为不表达T细胞受体的T细胞前体的淋巴样前体细胞。所有T细胞来源于骨髓中的造血干细胞。来自造血干细胞的造血祖细胞(淋巴样祖细胞)位于胸腺并通过细胞分裂扩增产生一大群不成熟的胸腺细胞。最早的胸腺细胞既不表达CD4也不表达CD8,并且因此被分类为双阴性( $CD4^-CD8^-$ )细胞。随着它们通过发育发展,它们成为双阳性胸腺细胞( $CD4^+CD8^+$ ),并且最终成熟为单阳性( $CD4^+CD8^-$ 或 $CD4^-CD8^+$ )胸腺细胞,然后从胸腺释放至外周组织。

[0069] 大约98%的胸腺细胞在胸腺中的发育过程中通过阳性选择或阴性选择失败而死亡,而其他2%胸腺细胞存活并离开胸腺成为成熟的免疫活性T细胞。

[0070] 前体T细胞的双阴性(DN)阶段集中于产生功能性β-链,而双阳性(DP)阶段集中于产生功能性α-链,最终产生功能性αβT细胞受体。随着发育中的胸腺细胞发展经过4个DN阶

段(DN1、DN2、DN3和DN4),T细胞表达不变的 $\alpha$ -链但是重排 $\beta$ -链基因座。如果重排的 $\beta$ -链成功地与不变的 $\alpha$ -链配对,产生停止 $\beta$ -链的重排(并沉默交互等位基因),并且导致细胞增殖的信号。虽然这些信号需要在细胞表面处的这种前-TCR,但是他们依赖于结合于前-TCR的配体。这些胸腺细胞然后会表达CD4和CD8两者并发展至发生 $\alpha$ -链选择的双阳性(DP)阶段。如果重排的 $\beta$ -链没有导致任意信号传导(例如由于不能与不变的 $\alpha$ -链配对),细胞可能由于被忽略而死亡(缺少信号传导)。

[0071] 如本文描述的“造血干细胞”或“HSC”,是可以引起骨髓样细胞的前体细胞,所述骨髓系细胞例如巨噬细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、红细胞、巨核细胞/血小板、树突状细胞和淋巴系(例如T细胞、B细胞、NK细胞)。HSC具有异源群体,其中存在三类干细胞,通过他们在血液中淋巴系与骨髓系后代的比例(L/M)区分他们。

[0072] 本公开提供了具有用于转基因表达的诱导型组件和用于转基因表达的组成型组件的系统。系统可以被裁剪以提供一种或多种转基因的调控表达,以在转导细胞中提供功能性特征。

[0073] 在一些供选择的方案中,在诱导型启动子的控制下的转基因是嵌合抗原受体(CAR)。当在以后的时间提供细胞重激活时(例如在复发的情况下),诱导型启动子提供使在细胞中的CAR表达终止的能力。此外,因为T细胞受体的长期刺激,通过开和关时期的CAR T细胞的循环可以最小化耗竭和无效。

[0074] 载体的设计也提供了可以增强转导细胞的一种或多种功能特性的额外的转基因,比如增强的转导细胞的肿瘤潜能、存活和增殖。在一些供选择的方案中,这些转基因在诱导型启动子的控制下。这样的转基因包括但不限于促进存活和增殖的基因、防止凋亡的基因和调控检查点信号传导的基因。这样的基因包括编码IL-2、IL-15、趋化因子受体、Bc12、CA-Akt、dn-TGFbetaRIII、dn-SHP1/2和/或PD-1CD28嵌合体的基因。在一些供选择的方案中,转基因是编码IL-2、IL-15、趋化因子受体、Bc12、CA-Akt、dn-TGFbetaRIII、dn-SHP1/2和/或PD-1CD28嵌合体的基因。在一些供选择的方案中,调节检查点信号传导的基因编码抑制负检查点调控因子的多肽。在一些供选择的方案中,负检查点调控因子包括VISTA、LAG-3和/或TIM3。

[0075] 本公开提供了包括第一和第二核酸的系统,以及包括这样的核酸的载体和宿主细胞。第一核酸和第二核酸中的每一个包括大量的可以切离和用其他组件置换以定制用于特定靶细胞的系统的模块组件。在一些供选择的方案中,第一核酸包括用于控制在根据需要以开和关方式的基因(例如编码嵌合抗原受体的多核苷酸)表达的诱导型启动子。在其他供选择的方案中,第二核酸包括提供转录激活因子表达的组成型启动子。在一些供选择的方案中,基因编码嵌合抗原受体。

#### [0076] 诱导型系统

[0077] 本公开提供了用于提供转基因在细胞中的调控表达的系统。这样的转基因包括但不限于T细胞受体、亲和性成熟的T细胞受体、嵌合抗原受体、趋化因子受体、细胞因子、抑制凋亡的基因和/或调节检查点信号传导的基因。在一些供选择的方案中,调节检查点信号传导的多肽抑制负检查点调控因子。在一些供选择的方案中,负检查点调控因子包括VISTA、LAG-3和/或TIM3。在一些供选择的方案中,系统含有提供核酸元件的容易置换的大量模块

组件。在系统的一些供选择的方案中,系统提供了转基因在细胞中的表达的调控。在一些供选择的方案中,转基因编码T细胞受体、亲和性成熟的T细胞受体、嵌合抗原受体、趋化因子受体、细胞因子、抑制凋亡的基因和/或调节检查点信号传导的基因。在一些供选择的方案中,调节检查点信号传导的基因编码抑制负检查点调控因子的多肽。在一些供选择的方案中,负检查点调控因子包括VISTA、LAG-3和/或TIM3。

[0078] 在一些供选择的方案中,用于嵌合抗原受体的诱导型表达的系统包括:第一核酸,包括可通过药物诱导的第一启动子,其中第一核酸可操作地连接于编码嵌合抗原受体的多核苷酸,嵌合抗原受体包括配体结合域,其中配体结合域对配体是特异性的,其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子,其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除;编码多肽间隔区的多核苷酸,其中间隔区是优化的;以及d)编码胞内信号传导域的多核苷酸;以及第二核酸,包括第二启动子,所述第二启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录调节因子的核酸。

[0079] 在一些供选择的方案中,编码嵌合抗原受体的多核苷酸包括编码配体结合域的多核苷酸,其中靶分子是肿瘤特异性抗原,编码多肽间隔区的多核苷酸,其中间隔区是优化的;编码跨膜域的多核苷酸;以及编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中,表达载体包括如本文描述的第一核酸和/或第二核酸。本文也包括由全部或部分嵌合受体核酸编码的多肽。

[0080] 在其他供选择的方案中,第一核酸包括可通过药物诱导的第一启动子,其中第一核酸可操作地连接于编码促进细胞存活和增殖的基因、调控凋亡的基因和/或调节检查点信号传导的基因的多核苷酸。这样的基因包括编码IL-2、IL-15、趋化因子受体、Bcl2、CA-Akt、dn-TGFbetaRIII、dn-SHP1/2和/或PD-1CD28嵌合体的基因。在一些供选择的方案中,调节检查点信号传导的基因编码抑制负检查点调控因子的多肽。在一些供选择的方案中,负检查点调控因子包括VISTA、LAG-3和/或TIM3。

#### [0081] 诱导型启动子

[0082] 系统包括第一核酸,所述第一核酸包括可通过药物诱导的第一启动子。通过利用诱导型启动子,转基因表达可以打开和关闭以避免毒性副作用和/或允许细胞在缓解过程中休息。虽然数种诱导型启动子系统是已知的,但是由于毒性的脱靶效应、不利的生物分布和药效动力学谱、有限的输出动态范围和/或作为FDA批准的商业可获得的药物的有限的可用性,这些系统的临床应用性是有限的。此外,这些系统中的许多使用由异种组件建立的嵌合转录调控因子,因此当将这些系统应用于人的治疗时,引入免疫原性的并发症。

[0083] 在一些供选择的方案中,第一启动子可通过药物诱导。基于安全性记录、有利的药代动力学谱、组织分布、胞外间隔区和细胞溶胶间的低分配系数、低免疫原性、低毒性和/或在淋巴细胞中高表达选择药物。在特别的供选择的方案中,选择经FDA批准的药物,提供在淋巴细胞中的转基因表达,不激活其他不希望的基因表达,并且诱导不含任意异种组件的启动子。在一些供选择的方案中,通过与药物相互作用的转录激活因子激活诱导型启动子。转录激活因子是激活的,或者能够在药物存在下结合于并激活诱导型启动子。

[0084] 药物的特别的供选择的方案是结合于转录激活因子的雌激素受体配体结合域的药物。在一些供选择的方案中,药物包括他莫昔芬、其代谢物、类似物以及其药学上可接受的盐和/或其水合物或溶剂合物。

[0085] 他莫昔芬,CAS RN:10540-29-1,也称为2-((1Z)-1,2-二苯基-1-丁烯基)苯氧基)-N,N-二甲基-乙胺或(Z)-2-(对-(1,2-二苯基-1-丁烯基)苯氧基)-N,N-二甲基胺(IUPAC),并且具有分子式C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>NO,M.W.371.52。他莫昔芬是具有组织特异性活性的选择性雌激素受体调节剂。他莫昔芬在乳腺组织中起到抗雌激素(抑制剂)的作用,但是在胆固醇代谢、骨密度和子宫内膜中的细胞增殖中起雌激素(刺激剂)的作用。他莫昔芬作为药学上可接受的盐频繁地口服施用。例如,他莫昔芬柠檬酸盐(RN 54965-24-1,M.W.563.643)适用于转移性乳腺癌的治疗并且,作为辅药用于进行乳房切除并腋淋巴结清扫和乳腺照射之后的女性乳腺癌的治疗。他莫昔芬柠檬酸盐也适用于减少乳腺癌高风险女性的乳腺癌的发生率。

[0086] 他莫昔芬在大鼠、小鼠和人乳腺癌患者中的代谢物包括主要代谢物N-去甲基他莫昔芬(RN 31750-48-8,M.W.357.494)和4-羟基他莫昔芬(4-OHT)(RN 68392-35-8,M.W.387.52,阿非昔芬),所述代谢物在Robinson等人,与乳腺癌患者相比在大鼠和小鼠中他莫昔芬的代谢物、药效学和药代动力学(Metabolites, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of tamoxifen in rats and mice compared to the breast cancer patient). Drug Metab Dispos January 1991 19:36-43中公开,其通过引用全文并入本文。另外的细胞色素P-450代谢物在Crewe等人,2002中公开,包括顺式-4-羟基他莫昔芬(RN 174592,M.W.387.52;阿非昔芬,E-异构体)以及4'-羟基他莫昔芬((Z)-4-(1-(4-(2-(二甲基氨基)乙氧基)苯基)-1-苯基丁-1-烯-2-基)苯酚)。见Crewe等人,2002,他莫昔芬通过重组人细胞色素P-450酶的代谢:4-羟基代谢物、4'-羟基代谢物和N-去甲基代谢物的形成以及反式-4-羟基他莫昔芬的异构化(Metabolism of Tamoxifen by recombinant human cytochrome P-450 enzymes:Formation of the 4-hydroxy,4'-hydroxy and N-desmethyl metabolites and isomerization of trans-4-hydroxytamoxifen),Drug Metab Dispos, 30 (8):869-874,图1,其通过引用的方式并入本文。

[0087] 具有与他莫昔芬结构相似性的化合物包括但不限于顺式-他莫昔芬(RN 13002-65-8,M.W.371.521)、4-甲基他莫昔芬(RN 73717-95-5,M.W.385.548)、N-去甲基他莫昔芬(RN 31750-48-8,M.W.357.494)、(Z)-去乙基甲基他莫昔芬(RN 15917-50-7,M.W.357.494)、(E)-去乙基甲基他莫昔芬(RN 31750-45-5,M.W.357.494)、反式-4-羟基他莫昔芬(RN 68047-06-3,M.W.387.52)、阿非昔芬(RN 68392-35-8,M.W.387.52,4-羟基他莫昔芬)、阿非昔芬、E-异构体(RN 174592-47-3,M.W.387.52)、4-氯代他莫昔芬(RN 77588-46-6,M.W.405.966)、4-氟代他莫昔芬(RN 73617-96-6,M.W.389.511)、托瑞米芬(RN 89778-26-7,M.W.405.966)、去乙基他莫昔芬(RN 19957-51-8,M.W.343.47)、(E)-去乙基他莫昔芬(RN 97151-10-5,M.W.343.47)、(Z)-去乙基他莫昔芬(RN 97151-11-6,M.W.343.47)、米普昔芬(RN 129612-87-9,M.W.429.6)、2-(p-(β-乙基-α-苯基苯乙烯基)苯氧基)三乙胺(RN 749-86-0,M.W.399.575)、屈洛昔芬(RN 82413-20-5,M.W.387.52)、4-碘代-他莫昔芬(RN 116057-68-2,M.W.497.413)、二氢他莫昔芬(RN 109640-20-2,M.W.373.537)、(E)-N,N-二甲基-2-(4-(1-(2-甲基苯基)-2-苯基-1-丁烯基)苯氧基)乙胺(RN 97150-96-4,M.W.385.548)或4-羟基托瑞米芬(RN 110503-62-3,M.W.421.965);和/或其药学上可接受的盐和/或其水合物或溶剂合物。

[0088] 例如,他莫昔芬的柠檬酸盐或具有与他莫昔芬结构相似性的化合物的柠檬酸盐包

括但不限于他莫昔芬柠檬酸盐 (RN 54965-24-1, M.W. 563.64)、2-(p-(1,2-二苯基-1-丁烯基) 苯氧基)-N,N-二甲基乙胺柠檬酸盐 (RN 7244-97-5, 563.64)、(E)-他莫昔芬柠檬酸盐 (RN 76487-65-5, M.W. 563.64), 托瑞米芬柠檬酸盐 (RN 89778-27-8, M.W. 598.088)、屈洛昔芬柠檬酸盐 (RN 97752-20-0, M.W. 579.64)、2-(p-(1,2-双(p-甲氧基苯基)-1-丁烯基) 苯氧基) 三乙胺柠檬酸盐 (RN 42920-39-8, M.W. 651.748)、2-(4-(1,2-二苯基乙烯基) 苯氧基)-N,N-二乙基-乙胺2-羟基-1,2,3-丙烷三羧酸盐 (RN 40297-42-5, M.W. 563.643)、2-(p-( $\alpha$ -苯基苯乙烯基) 苯氧基) 三乙胺柠檬酸盐 (RN 102433-95-4, M.W. 563.64)、2-(p-(2-(p-甲氧基苯基)-1-苯基-1-丁烯基) 苯氧基) 三乙胺柠檬酸盐 (1:1) (RN 42824-34-0, M.W. 637.72)、2-(p-(1-(p-甲氧基苯基)-2-苯基丙烯基) 苯氧基) 三乙胺柠檬酸盐 (RN 13554-24-0, M.W. 607.696)、2-(p-( $\alpha$ -(p-甲氧基苯基) 苯乙烯基) 苯氧基) 三乙胺柠檬酸盐一水合物 (RN 13542-71-7, M.W. 593.669)、2-(p-(p-甲氧基- $\alpha$ -苯基苯乙基) 苯氧基) 三乙胺柠檬酸盐 (RN 16421-72-0, M.W. 595.685)、 $\alpha$ -(p-(2-(二乙基氨基) 乙氧基) 苯基)- $\beta$ -乙基-p-甲氧基- $\alpha$ -苯基苯乙醇柠檬酸盐 (1:1) (RN 35263-93-5, M.W. 639.737)、1-(p-(2-(二乙基氨基) 乙氧基) 苟基)-2-(p-甲氧基苯基)-1-苯基乙醇柠檬酸盐 (M.W. 611.68)、 $\alpha$ -p-(2-(二乙基氨基) 乙氧基) 苟基)- $\beta$ -乙基- $\alpha$ -(p-羟基苯基)-p-甲氧基苯乙醇柠檬酸盐 (RN 35263-96-8, M.W. 655.737) 和/或2-(p-(p-甲氧基- $\alpha$ -甲基苯乙基) 苟基)-三乙胺柠檬酸盐 (RN 15624-34-7, M.W. 533.614)。

[0089] 在一些供选择的方案中, 用于诱导表达的药物的有效量是提供转基因表达增加超过未诱导的和/或基础水平的表达的量。在一些供选择的方案中, 该量可以使用已知的药物的剂量和药代动力学谱容易地确定。

[0090] 在一些供选择的方案中, 诱导型启动子具有低水平的基础活性。当使用慢病毒载体时, 与当诱导细胞以表达基因相比, 在未诱导的细胞中基础活性的水平是20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%或更低。可以通过使用流式细胞术测量在诱导物(例如药物)不存在下转基因(例如标记基因)的表达量确定基础活性的水平。

[0091] 在一些供选择的方案中, 与未诱导的或基础活性相比, 诱导型启动子提供高水平的诱导活性。在一些供选择的方案中, 诱导状态下的活性的水平是未诱导状态下的活性水平的2、4、6、8或10倍或更高。在一些供选择的方案中, 在诱导型启动子控制下的转基因表达在反式激活剂不存在下, 在少于10、8、6、4、2或1天内(不包括0天)关闭。

[0092] 在一些供选择的方案中, 可以设计和/或修饰诱导型启动子以提供低水平的基础活性、高水平的可诱导性和/或短时间的可逆性。在一些供选择的方案中, 诱导型启动子是7xHBD/mE1b启动子。所述启动子的示例性序列在表12 (SEQ ID N0:41) 中找到。例如, 在7xHBD/mE1b启动子中, 可以制造突变以提高转录激活因子的结合。

[0093] 在一些供选择的方案中, 系统采用合成转录激活因子, 在药物(例如他莫昔芬)存在下, 该合成转录激活因子结合转基因上游的合成启动子以诱导表达。在一些供选择的方案中, 转录激活因子是TamR-tf (HEA3)。他莫昔芬调控的转录因子(“TamR-tf”, 也指“HEA3”)是由人亚单位组成的嵌合转录因子, 所述人亚单位包括肝细胞核因子1- $\alpha$  (HNF-1 $\alpha$ ) (例如SEQ ID N0:40的第1-281位氨基酸) 的N-末端DNA结合域, HNF-1 $\alpha$ 的N-末端DNA结合域框内融合于雌激素受体配体结合域(ER-LBD)的突变的他莫昔芬特异性配体结合域, 所述突变的他莫昔芬特异性配体结合域反过来融合于NF- $\kappa$ B (p65)的p65激活域。示例性的氨基酸序列提

供于表10中，并且被视为SEQ ID NO:40。雌激素受体配体结合域(ER-LBD)的突变的他莫昔芬特异性配体结合域在TamR-tf的第282-595位氨基酸处发现并且在第521位处具有突变。NF- $\kappa$ B(p65或TAD)的p65激活域在第596至862位氨基酸处发现。

[0094] 在一些供选择的方案中，提供了用于嵌合抗原受体的诱导型表达的系统，其中系统包括：a) 第一核酸，包括可通过药物诱导的第一启动子，其中第一核酸可操作地连接于编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体结合域对配体是特异性的，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；编码跨膜域的多核苷酸；以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸；以及b) 第二核酸，包括第二启动子，所述第二启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中，药物是他莫昔芬和/或其代谢物。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型或诱导型。在一些供选择的方案中，第一启动子包括SEQ ID NO:41的核酸序列。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型启动子。在一些供选择的方案中，第二启动子是EF1 $\alpha$ p。在一些供选择的方案中，转录激活因子包括SEQ ID NO:40的序列。在一些供选择的方案中，第一核酸进一步包括第一载体并且第二核酸进一步包括第二载体。在一些供选择的方案中，两种载体均被包装在病毒载体内。在一些供选择的方案中，病毒载体是慢病毒。在一些供选择的方案中，第一和第二核酸包括载体。在一些供选择的方案中，第一核酸进一步包括编码选择性标记的核酸序列。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码选择性标记的核酸。在一些供选择的方案中，提供了用于嵌合抗原受体的诱导型表达的系统，其中系统包括：a) 第一核酸，包括可通过药物诱导的第一启动子，所述第一核酸可操作地连接于编码细胞因子、趋化因子受体、调控凋亡的多肽或调节检查点信号传导的多肽的多核苷酸；以及b) 第二核酸，包括第二启动子，所述第二启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中，调节检查点信号传导的多肽抑制负检查点调控因子。在一些供选择的方案中，负检查点调控因子包括VISTA、LAG-3和/或TIM3。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型或诱导型。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体结合域对配体是特异性的，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中，第一启动子在第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中，配体结合域是抗体片段，优选是其结合片段。在一些供选择的方案中，配体结合域是单链可变区片段。在一些供选择的方案中，肿瘤特异性分子是CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2或MAGE A3 TCR或其组合。在一些供选择的方案中，系统采用合成转录激活因子，在药物存在下，合成转录激活因子结合转基因上游的合成启动予以诱导表达。在一些供选择的方案中，转录激活因子是TamR-tf (HEA3)。在一些供选择的方案中，药物是他莫昔芬。

[0095] 可对转录激活因子进行另外的改变以增加转录因子的性能，转录因子的性能包括但不限于改变雌激素受体配体结合域中的一个或多个氨基酸和/或改变p65反式激活域中的一个或多个氨基酸。改变雌激素受体结合域中的氨基酸能提供药物与转录激活因子的更

特异性的结合。ER-LBD中具有改变的氨基酸序列的转录激活因子的例子显示于表11 (SEQ ID NO:43) 中。在SEQ ID NO:40的第400、543和544位氨基酸处进行突变。具有改变的序列的转录激活因子增加了对他莫昔芬或4-OHT的亲和性。在p65反式激活域中改变氨基酸可以在不存在转导细胞激活下提供转基因的增加的表达。

[0096] 在不存在他莫昔芬下,通过细胞溶胶热休克蛋白90 (HSP90) 与他莫昔芬结合活性位点的结合将TamR-tf排除在核外,并且转基因表达在“关”状态。纳摩尔浓度的细胞溶胶他莫昔芬积极地胜过HSP90,与ER-LBD结合,导致TamR-tf迁移至核。在核迁移时,TamR-tf容易地可用于结合其限制性合成的启动子。在他莫昔芬存在下,TamR-tf与7xHBD/EF1 $\alpha$ p启动子的结合诱导转基因表达的“开”状态。在一些供选择的方案中,可以修饰该转录调控因子以提供变化水平的转基因表达的控制。TamR-tf (HEA-3) 的LBD中的氨基酸置换允许对他莫昔芬和其代谢物选择性应答,其中4-羟基他莫昔芬 (4-OHT) 是关于TamR-tf (HEA-3) 活性的药理学上最有效的代谢物,同时缺少与内源性雌激素的相互作用。

[0097] 在一些供选择的方案中,诱导型启动子在慢病毒构建体和/或在淋巴细胞中起作用。

#### [0098] 嵌合抗原受体

[0099] 用于表达嵌合抗原受体的系统包括:第一核酸,包括可通过药物诱导的第一启动子,其中第一核酸可操作地连接于编码嵌合抗原受体的多核苷酸,嵌合抗原受体包括配体结合域,其中配体结合域对配体是特异性的,其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子,其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除;编码多肽间隔区的多核苷酸,其中间隔区是优化的;编码跨膜域的多核苷酸;以及d)编码胞内信号传导域的多核苷酸。在其他供选择的方案中,编码嵌合抗原受体的另一种多核苷酸在组成型启动子的控制下。在一些供选择的方案中,药物是他莫昔芬。

#### [0100] 配体结合域

[0101] 在一些供选择的方案中,嵌合受体核酸包括编码配体结合域的多核苷酸。在一些供选择的方案中,配体结合域特异性结合于肿瘤或病毒特异性抗原,并且所述配体结合域可以是人源化的。在一些供选择的方案中,配体结合域包括但不限于受体或其部分、小肽、模拟肽、底物、细胞因子等。在一些供选择的方案中,配体结合域是抗体或其片段,优选是其结合片段,其中的任意一种可以是人源化的。可以容易地确定抗体或抗体片段的核酸序列。在具体的供选择的方案中,多核苷酸编码特异性结合CD19的单链Fv。在其他具体的供选择的方案中,多核苷酸编码特异性结合HER2、CE7、hB7H3或EGFR的单链Fv,并且任选地,所述多核苷酸编码其人源化形式。这些抗体和其结合域的序列对本领域技术人员是已知的,并且可以容易地被本领域技术人员确定。

[0102] 肿瘤抗原是通过引起免疫应答的肿瘤细胞产生的蛋白质。本发明的配体结合域的选择取决于要治疗的癌症的类型,并且可以靶向于肿瘤抗原或其他肿瘤细胞表面分子。来自受试者的肿瘤样本可以通过某些生物标记物或细胞表面标记物的存在来表征。例如,来自受试者的乳腺癌细胞对Her2Neu、雌激素受体和/或黄体酮受体中的每一个可以是阳性或阴性的。选取在个体受试者的肿瘤细胞上可以发现的肿瘤抗原或细胞表面分子。肿瘤抗原和细胞表面分子是本领域中熟知的,并且包括例如癌胚抗原 (CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、Her2/neu、雌激素受体、黄体酮受体、ephrinB2、CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、

CE7、hB7H3、ROR1、间皮素、c-Met、GD-2和/或MAGE A3TCR。在一些供选择的方案中，靶分子是在肿瘤细胞上发现的细胞表面分子，并且基本上在正常组织上没有发现或其表达限于不重要的正常组织。

[0103] 在一种供选择的方案中，肿瘤上的靶分子包括与恶性肿瘤相关的一个或多个表位。恶性肿瘤表达可以充当用于T细胞受体或嵌合受体介导的识别的靶抗原的大量蛋白质。其他靶分子属于细胞转化相关分子如癌基因HER-2/Neu/ErbB2的组。在一些供选择的方案中，与相同组织类型的对照细胞相比，在肿瘤细胞上选择性地表达或过表达肿瘤抗原。在其他供选择的方案中，肿瘤抗原是细胞表面多肽。

[0104] 一旦鉴别可以用嵌合受体靶向的肿瘤细胞表面分子，选择和表征靶分子的表位。可以使用获得单克隆抗体的方法、噬菌体展示的方法、产生人或人源化抗体的方法或使用工程化以产生人抗体的转基因动物或植物的方法制备特异性结合肿瘤细胞表面分子的抗体。部分或全部的合成抗体的噬菌体展示文库是可用的并且可以筛选用于可以结合靶分子的抗体或其片段。人抗体的噬菌体展示文库也是可用的。在一些供选择的方案中，抗体特异性结合于肿瘤细胞表面分子并且不与如牛血清白蛋白或其他不相关的抗原的非特异性组分交叉反应。一旦鉴别，可以分离和/或确定编码抗体的氨基酸序列或多核苷酸序列。

[0105] 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、微体和线性抗体中的全部或部分。“抗体片段”包括完整抗体的一部分，优选完整抗体的抗原结合区或可变区，并且可以被容易地制备。抗体片段的例子包括Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>和Fv片段；双价抗体；线性抗体；单链抗体分子；以及从抗体片段形成的多特异性抗体。在一些供选择的方案中，抗体片段是Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>和Fv片段；双价抗体；线性抗体；单链抗体分子；以及从抗体片段形成的多特异性抗体。任意这样的上述抗体或抗体片段可以是人源化的并与本文描述的组合物和方法使用。

[0106] 在一些供选择的方案中，可以分离和表征大量结合于具体肿瘤细胞表面分子的不同抗体。在一些供选择的方案中，基于靶分子的表位特异性表征抗体。另外，在某些情况下，可以基于抗体对表位的亲和性选择结合于相同表位的抗体。在一些供选择的方案中，抗体具有至少1mM以及优选<50nM的亲和性。在一些供选择的方案中，抗体具有50nM、100nM、200nM、300nM、400nM、500nM、1μM、100μM、200μM、300μM、400μM、500μM、600μM、700μM、800μM、900μM或1mM的亲和性或通过任意两个上述值定义的范围内的亲和性。在一些供选择的方案中，选择与其他抗体相比对表位具有更大亲和性的抗体。在一些供选择的方案中，选择亲和性为结合于相同表位的参比抗体的至少2倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍、至少30倍、至少40倍或至少50倍，或亲和性大于任意两个上述值定义的范围内的参比抗体的亲和性的抗体。

[0107] 在一些供选择的方案中，靶分子是CD19、CD20、CD22、CD23、CE7、hB7H3、EGFR、CD123、CS-1、ROR1、间皮素、Her2、c-Met、PSMA、GD-2或MAGE A3 TCR或其组合。在一些供选择的方案中，对这些靶分子特异性的抗体或其结合片段是人源化的。

[0108] 在具体的供选择的方案中，靶抗原是CD19。大量对CD19特异性的抗体对本领域技术人员是已知的，并且可以容易地表征序列、表位结合和亲和性。在具体的供选择的方案中，嵌合受体构建体包括来自FMC63抗体的scFV序列。在其他供选择的方案中，scFV是包括含有可变区轻链的人或人源化ScFv，所述可变区轻链包括RASQDISKYLN (SEQ ID NO:88) 的

CDRL1序列、SRLHSGV (SEQ ID NO:89) 的CDRL2序列和GNTLPYTFG (SEQ ID NO:90) 的CDRL3序列。在其他供选择的方案中, scFv是包括含有可变区重链的人或人源化ScFv, 所述可变区重链包括DYGVS (SEQ ID NO:91) 的CDRH1序列, VIWGSETYYNSALKS (SEQ ID NO:92) 的CDRH2序列和YAMDYWG (SEQ ID NO:93) 的CDRH3序列。本公开也考虑与FMC63的scFv具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列一致性, 以及对CD19至少具有相同亲和性的可变区。

[0109] 在一些供选择的方案中, 在如Kabat编号的如下的抗体区域内发现CDR区: 对轻链, CDRL1第24-34位氨基酸、CDRL2第50-56位氨基酸、CDRL3在第89-97位氨基酸; 对于重链, CDRH1在第31-35位氨基酸、CDRH2在第50-65位氨基酸、以及CDRH3在第95-102位氨基酸。可以容易地确定抗体中的CDR区。

[0110] 在具体的供选择的方案中, 靶抗原是Her2。大量对Her2特异性的抗体对本领域技术人员是已知的, 并可以容易地表征序列、表位结合和亲和性。在具体的供选择的方案中, 嵌合受体构建体包括来自赫赛汀抗体的scFv序列。在其他供选择的方案中, scFv是包括可变区轻链的人或人源化ScFv, 所述可变区轻链包括赫赛汀抗体的CDRL1序列、CDRL2序列和CDRL3。在其他供选择的方案中, scFv是包括可变区重链的人或人源化ScFv, 所述可变区重链包括赫赛汀抗体的CDRH1序列、CDRH2序列和CDRH3序列。可以从赫赛汀的氨基酸序列容易地确定CDR序列。本公开也考虑与赫赛汀的scFv具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列一致性, 以及对Her2至少具有相同亲和性的可变区。

[0111] 如本文描述的“人源化抗体”指来自的抗体, 该非人物种的蛋白质序列已经被修饰以增加其与在人体中天然产生的抗体变体的相似性。“人源化”的过程可以应用于开发的用于施用于人的单克隆抗体(例如, 开发的用作抗癌症药物的抗体)。当开发特异性抗体的过程涉及利用非人免疫系统时(如在小鼠中), 人源化可以是希望的。以这种方式产生的抗体的蛋白质序列是部分区别于人体中天然存在的同源抗体, 并且因此当施用于人类患者时潜在地是免疫原性的。人源化抗体区别于嵌合抗体之处在于, 与人源化抗体具有更相似的蛋白质序列但可携带更大段的非人蛋白。人源化抗体的衍生物可以指源自人源化抗体的抗体或序列的部分。在一些供选择的方案中, 配体结合域包括人源化抗体或其部分。在一些供选择的方案中, 配体结合域包括scFv。在一些供选择的方案中, scFv是人源化scFv。

[0112] 在一些供选择的方案中, 对于减少源自异种来源例如啮齿动物的单克隆抗体的免疫原性, 人源化是希望的。在一些供选择的方案中, 人源化也是希望的以便改善抗体或其片段与人免疫系统的相互作用。由于杂交瘤技术的发展, 大量的异种抗体在人体内是高免疫原性的, 该高度免疫原性可以最终限制所述异种抗体的临床应用, 尤其是当需要重复施用时。此外, 他们可以被迅速地从循环中移除并且还可以导致全身性炎性效应。因此在一些供选择的方案中, 人源化策略是希望的以规避这种情况。用于抗体人源化的技术对本领域技术人员是已知的。

[0113] 在一些供选择的方案中, 编码配体结合域的多核苷酸可操作地连接至编码间隔区的多核苷酸。在一些供选择的方案中, 编码配体结合域的多核苷酸也可以在编码序列的5' 和/或3' 端具有一个或多个限制性酶切位点, 以用编码不同抗原的或具有不同结合特征的、编码配体结合域的另一个多核苷酸提供该多核苷酸的容易的切除和替换。例如, 在前导序

列的上游编码限制性酶切位点NheI；以及位于铰链区内的3' RsrII使得将任何希望的scFv亚克隆至嵌合受体载体。在一些供选择的方案中，针对在哺乳动物细胞中的表达密码子优化多核苷酸。

[0114] 在一些供选择的方案中，编码配体结合域的多核苷酸可操作地连接于信号肽。在一些供选择的方案中，信号肽是用于粒细胞集落刺激因子的信号肽。可以利用编码其他信号肽如CD8 $\alpha$ 的多核苷酸。在一些供选择的方案中，多核苷酸编码CD8 $\alpha$ 。

[0115] 一些供选择的方案中，编码配体结合域的多核苷酸可操作地连接于启动子。选择提供在哺乳动物细胞中表达嵌合抗原受体的启动子。在具体的供选择的方案中，启动子是诱导型启动子。

[0116] 编码配体结合域的多核苷酸的具体的供选择的方案作为来自特异性结合CD19如FMC63的抗体的scFv示于表1中。编码包括氨基酸GSTSGSGKPGSSEGSTKG (SEQ ID NO:94) 的柔性连接体的多核苷酸分离scFV的VH和VL链。包括连接体的scFv的氨基酸序列示于表2 (SEQ ID NO:11)。其他靶向CD19的抗体如SJ25C1和HD37是已知的 (SJ25C1:Bejcek等人.Cancer Res 2005, PMID 7538901; HD37:Pezutto等人.JI 1987, PMID 2437199)。

#### [0117] 间隔区

[0118] 在一些供选择的方案中，嵌合受体核酸包括编码间隔区的多核苷酸。典型地，在嵌合受体的配体结合域和跨膜域之间发现间隔区。在一些供选择的方案中，间隔区提供配体结合域的柔性并使得在淋巴细胞中高表达。具有229个氨基酸的间隔区的CD19特异性嵌合受体具有比具有仅由修饰的IgG4铰链组成的短间隔区的CD19特异性嵌合受体低的抗肿瘤活性。在一些供选择的方案中，针对与参比嵌合受体相比应答配体的T细胞增殖和/或细胞因子产生的增加间隔区是优化的。

[0119] 在一些供选择的方案中，间隔区具有至少10至229个氨基酸、10至200个氨基酸、10至175个氨基酸、10至150个氨基酸、10至125个氨基酸、10至100个氨基酸、10至75个氨基酸、10至50个氨基酸、10至40个氨基酸、10至30个氨基酸、10至20个氨基酸或10至15个氨基酸，或通过任意两个上述的长度定义的范围内的长度。在一些供选择的方案中，间隔区具有12个氨基酸或更少、119个氨基酸或更少或229个氨基酸或更少，但多于1或2个氨基酸。在一些供选择的方案中，针对与参比嵌合受体相比应答配体的T细胞增殖和/或细胞因子产生的增加间隔区是优化的。

[0120] 在一些供选择的方案中，间隔区源自免疫球蛋白样分子的铰链区。在一些供选择的方案中，间隔区包括来自人IgG1、人IgG2、人IgG3或人IgG4的铰链区的全部或部分，并且可以含有一个或多个氨基酸置换。在表8中提供了铰链区的示例性序列。在一些供选择的方案中，铰链区的部分包括在可变区重链和核心之间发现的上部铰链氨基酸和包括聚脯氨酸区的核心铰链氨基酸。在一些供选择的方案中，针对与参比嵌合受体相比应答配体的T细胞增殖和/或细胞因子产生的增加间隔区是优化的。

[0121] 在一些供选择的方案中，可以用一个或多个氨基酸修饰铰链区序列以避免不希望的结构性相互作用如二聚化。在具体的供选择的方案中，间隔区包括来自IgG4的修饰的人铰链区的部分，例如如表2或表8 (SEQ ID NO:21) 所示。在表1 (SEQ ID NO:4) 中提供了编码修饰的IgG4铰链区的部分的多核苷酸的代表。在一些供选择的方案中，铰链区可以与表2或表8中鉴别的铰链区氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、

98%或99%序列一致性,或列出的任意两个百分比序列一致性之间的任意其他百分比序列一致性。在具体的供选择的方案中,来自IgG4的人铰链区的部分在从CPSP至CPPC的核心氨基酸中具有氨基酸置换。

[0122] 在一些供选择的方案中,铰链区的全部或部分与免疫球蛋白的恒定区的一个或多个域结合。例如铰链区的部分可以与CH2或CH3域或其变体结合。在一些供选择的方案中,间隔区不包括来自CD8 $\alpha$ 的第47-48位氨基酸的铰链区序列或由CD28分子的胞外部分组成的间隔区。

[0123] 在一些供选择的方案中,短间隔区具有12个氨基酸或更少,并包括IgG4铰链区序列或其变体的全部或部分,中等间隔区具有119个氨基酸或更少,并包括IgG4铰链区序列和CH3区或其变体的全部或部分,以及长间隔区具有229个氨基酸或更少,并包括IgG4铰链区序列、CH2区和CH3区或其变体的全部或部分。在一些供选择的方案中,短间隔区具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个氨基酸或通过任意两个上述氨基酸长度定义的范围内的大小。在一些供选择的方案中,中等间隔区具有13、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110或119个氨基酸或通过任意两个上述氨基酸长度定义的范围内的大小。在一些供选择的方案中,间隔区具有120、130、140、150、160、170、180、190、200、210或219个氨基酸或通过任意两个上述氨基酸长度定义的范围内的大小。

[0124] 可以容易地通过合成或重组方法由氨基酸序列制备编码间隔区的多核苷酸。在一些供选择的方案中,编码间隔区的多核苷酸可操作地连接于编码跨膜区的多核苷酸。在一些供选择的方案中,编码间隔区的多核苷酸也可以在编码序列的5' 和/或3' 端具有一个或多个限制性酶切位点,以用另一个编码不同间隔区的多核苷酸提供该多核苷酸的容易的切除和替换。在一些供选择的方案中,针对在哺乳动物细胞中的表达优密码子化编码间隔区的多核苷酸。

[0125] 在供选择的方案中,间隔区是来自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4或其部分的铰链区序列,来自与CH2区或其变体的全部或部分组合的IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的铰链区序列,来自与CH3区或其变体的全部或部分组合的IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的铰链区序列和来自与CH2区或其变体和/或CH3区或其变体的全部或部分组合的IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的铰链区序列。在一些供选择的方案中,短间隔区是具有12个氨基酸或更少但大于1个或2个氨基酸的修饰的IgG4铰链序列(SEQ ID N0:4),中等间隔区是具有119个氨基酸或更少但大于1个或2个氨基酸的具有CH3序列的修饰的IgG4铰链序列(SEQ ID N0:62);或具有229个氨基酸或更少但大于1个或2个氨基酸的具有CH2和CH3区的IgG4铰链序列(SEQ ID N0:50)。

#### [0126] 跨膜域

[0127] 在一些供选择的方案中,嵌合受体核酸包括编码跨膜域的多核苷酸。跨膜域提供嵌合受体在膜中的锚定。

[0128] 在供选择的方案中,使用与嵌合受体中的域中的一个天然相关的跨膜域。在一些情况下,可以通过氨基酸置换选择或修饰跨膜域以避免这样的域与相同或不同的表面膜蛋白的跨膜域结合以使与受体复合物的其他膜的相互作用最小化。

[0129] 跨膜域可以源自天然来源或合成来源。当来源是天然的,域可以源自任意膜结合蛋白或跨膜蛋白。

[0130] 跨膜区至少包括T细胞受体CD28、CD3、CD45、CD4、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、

CD64、CD80、CD86、CD134、CD137和/或CD154的 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\zeta$ 链的跨膜区。在具体的供选择的方案中，跨膜域包括如表2所示的CD28跨膜域的氨基酸序列。编码CD28跨膜域的代表性多核苷酸序列显示于表1 (SEQ ID NO:5) 中。

[0131] 跨膜域可以是合成的或天然存在的跨膜域的变体。在一些供选择的方案中，合成跨膜域或变体跨膜域主要包括疏水残基如亮氨酸和缬氨酸。在一些供选择的方案中，跨膜域与如表2或表6所示的跨膜域可以具有至少80%、85%、90%、95%或100%氨基酸序列一致性或通过任意两个上述值定义的范围内的氨基酸序列一致性。变体跨膜域优选具有如由Kyte Doolittle计算的至少50的疏水分数。

[0132] 可以通过合成或重组方法制备编码跨膜域的多核苷酸。在一些供选择的方案中，编码跨膜域的多核苷酸可操作地连接于编码胞内信号传导区的多核苷酸。在一些供选择的方案中，编码跨膜域的多核苷酸也可以在编码序列的5' 和/或3' 端具有一个或多个限制性酶切位点，以用另一种编码不同跨膜域的多核苷酸提供编码跨膜域的多核苷酸的容易的切除和替换。在一些供选择的方案中，针对在哺乳动物细胞中的表达密码子优化编码跨膜域的多核苷酸。在一些供选择的方案中，哺乳动物细胞是人细胞。

[0133] 胞内信号传导域

[0134] 在一些供选择的方案中，嵌合受体核酸包括编码胞内信号传导域的多核苷酸。胞内信号传导域提供在结合于肿瘤细胞上表达的配体时，激活表达嵌合受体的转导细胞的一个功能。在一些供选择的方案中，胞内信号传导域含有一个或多个胞内信号传导域。在一些供选择的方案中，胞内信号传导域是提供激活转导细胞的至少一个功能的胞内信号传导域的部分和/或变体。

[0135] 用于本公开的嵌合受体的胞内信号传导域的例子包括CD3 $\zeta$ 链的胞浆序列，和/或共同起作用以在嵌合受体衔接后起始信号转导的共受体，以及这些序列的任意衍生物或变体和具有相同功能能力的任意合成序列。T细胞激活可以被认为通过两个不同类别的胞浆信号传导序列介导的：起始抗原依赖性初级激活并提供T细胞受体样信号的那些胞浆信号传导序列(初级胞浆信号传导序列)和以抗原依赖性方式起作用以提供二级或共刺激信号的那些胞浆信号传导序列(二级胞浆信号传导序列)。以刺激方式起作用的一级胞浆信号传导序列可以含有被称为受体酪氨酸基激活基序或ITAM的信号传导基序。含有初级胞浆信号传导序列的ITAM的例子包括源自CD3 $\zeta$ 、FcR $\gamma$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和/或CD66d的那些ITAM。在一些供选择的方案中，初级信号传导胞内域与具有表2中所提供的序列的CD3 $\zeta$ 可以具有至少80%、85%、90%或95%的序列一致性，或至少在通过列出的任意两个百分比序列一致性定义的范围内的百分比序列一致性。在变体的，CD3 $\zeta$ 的一些供选择的方案中，保持如表7所示的至少1个、2个、3个或全部的ITAM区。

[0136] 在优选的供选择的方案中，嵌合受体的胞内信号传导域可以设计为包括单独的CD3- $\zeta$ 信号传导域或与任意其他希望的胞浆域组合的CD3- $\zeta$ 信号传导域。例如，嵌合受体的胞内信号传导域可以包括CD3 $\zeta$ 链和共刺激信号传导区。

[0137] 共刺激信号传导区指包括共刺激分子的胞内域的嵌合受体的部分。共刺激分子是不同于淋巴细胞对抗原应答需要的抗原受体或其配体的细胞表面分子。这样的分子的例子包括CD27、CD28、4-1BB (CD 137)、OX40、CD30、CD40、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、 $\zeta$ 链相关蛋白激酶 (ZAP70) 和/或与CD83特异性结合的配体。在一

些供选择的方案中,共刺激信号传导域与如表5所示的CD28的胞内域或与具有表2中提供的序列的4-1BB可以具有至少80%、85%、90%或95%的氨基酸序列一致性或通过列出的任意两个百分比序列一致性的范围内的序列一致性。在供选择的方案中,CD28胞内域的变体包括在第186-187位的氨基酸置换,其中用GG置换LL。

[0138] 嵌合受体的胞内信号传导序列可以以随机或特定的顺序相互连接。在一些供选择的方案中,短的寡肽或多肽连接体,优选长度为2至10个氨基酸,可以形成连接。在一种供选择的方案中,胞内信号传导域包括CD3- $\zeta$ 或其变体的信号传导域的全部或部分和CD28或其变体的信号传导域的全部或部分。在另一供选择的方案中,胞内信号传导域包括CD3- $\zeta$ 或其变体的信号传导域的全部或部分和4-1BB或其变体的信号传导域的全部或部分。在又一种供选择的方案中,胞内信号传导域包括CD3- $\zeta$ 或其变体的信号传导域的全部或部分、CD28或其变体的信号传导域的全部或部分和4-1BB或其变体的信号传导域的全部或部分。在具体的供选择的方案中,包括CD3 $\zeta$ 的变体和4-1BB胞内信号传导域的部分的胞内信号传导域的氨基酸序列提供于表2中。在表1中提供了代表性的核酸序列(SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:7)。在一些供选择的方案中。核酸序列包括SEQ ID NO:6中列出的序列。在一些供选择的方案中,核酸序列包括SEQ ID NO:7中列出的序列。

[0139] 在供选择的方案中,编码胞内信号传导域的多核苷酸包括连接于CD3 $\zeta$ 域的一部分的4-1BB胞内域。在其他供选择的方案中,4-1BB胞内域和CD28胞内域连接于CD3 $\zeta$ 域的一部分。

[0140] 可以通过合成或重组方法从氨基酸序列容易地制备编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中,编码胞内信号传导域的多核苷酸也可以在编码序列的5' 和/或3' 端具有一个或多个限制性酶切位点,以用另一种编码不同胞内信号传导域的多核苷酸提供编码胞内信号传导域的多核苷酸的容易的切除和替换。在一些供选择的方案中,在哺乳动物细胞中的表达密码子优化编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中,哺乳动物细胞是人细胞。

[0141] 标记序列

[0142] 在一些供选择的方案中,系统进一步包括在诱导型启动子的控制下的一个或多个标记序列。标记序列可以提供转导细胞的选择和/或转导细胞的鉴别。在一些供选择的方案中,标记序列用于转导细胞的选择和/或转导细胞的鉴别。在一些供选择的方案中,标记序列可操作地连接于编码连接体序列的多核苷酸序列。在一些供选择的方案中,连接体序列是可切割的连接体序列。在一些供选择的方案中,连接体是可切割的T2A连接体。

[0143] 可以采用大量不同的标记序列。典型地,标记序列具有允许选择转导细胞和/或检测转导细胞的功能性特征。在一些供选择的方案中,标记序列与人淋巴细胞的转导相容。在一些供选择的方案中,标记序列允许选择转导细胞和/或检测转导细胞。

[0144] 阳性的选择性标记可以是,该基因在引入宿主细胞时表达允许对携带该基因的细胞的阳性选择的显性表型。该类型的基因是本领域已知的,并且包括尤其是给予潮霉素B抗性的潮霉素B磷酸转移酶基因(hph)、来自Tn5的编码抗生素G418抗性的氨基糖苷磷酸转移酶基因(neo或aph)、提供甲氨蝶呤抗性的二氢叶酸还原酶(DHFR)基因、DHFR dm(表14中的示例性多核苷酸和氨基酸序列,SEQ ID NO:46和SEQ ID NO:47)、提供嘌呤霉素抗性的pac基因、使博来霉素失活的Sh ble基因、腺苷脱氨酶基因(ADA)和多药抗性(MDR)基因。在这些

药剂存在下培养的转导细胞会存活并被选择。

[0145] 在供选择的方案中,第一核酸进一步包括编码标记序列的多核苷酸。在供选择的方案中,标记序列是如表2所示的截短的表皮生长因子受体。在供选择的方案中,截短的表皮生长因子受体的示例性多核苷酸示于表1中(SEQ ID NO:9)。在一些供选择的方案中,标记序列是截短的Her2序列。截短的Her2序列的示例性多核苷酸和氨基酸示于表13中并分别以SEQ ID NO:44和SEQ ID NO:45提供。

[0146] 在一些供选择的方案中,编码标记序列的多核苷酸可操作地连接于编码连接体序列的多核苷酸。在具体的供选择的方案中,连接体序列是可切割的连接体序列T2A,如表2所示。在表1中提供了编码T2A连接体的示例性多核苷酸序列(SEQ ID NO:8)。

[0147] 可以通过合成或重组方法从氨基酸序列容易地制备编码标记序列的多核苷酸。在一些供选择的方案中,编码标记序列的多核苷酸可操作地连接于编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中,编码标记序列的多核苷酸序列也可以在编码序列的5' 和/或3' 端具有一个或多个限制性酶切位点,以用另一种编码不同标记序列的多核苷酸提供编码标记序列的多核苷酸的容易的切除和替换。在一些供选择的方案中,针对在哺乳动物细胞中,优选人细胞中的表达密码子优化编码标记序列的多核苷酸。

[0148] 在一些供选择的方案中,可以采用两个或更多个标记序列。在一些供选择的方案中,第一标记序列在组成型启动子的控制下,并提供转导细胞表达转基因的指示。在其他供选择的方案中,第二标记序列在诱导型启动子的控制下,并提供已经诱导转基因的表达的指示。在一些供选择的方案中,在诱导型启动子控制下的标记可以用于通过选择在诱导型启动子控制下的具有更低的标记序列表达,选择其中非诱导或基础表达远远低于在其他细胞中表达的细胞并将这些细胞扩增用于进一步的应用。

[0149] 在诱导型启动子的控制下的其他遗传组件

[0150] 在一些供选择的方案中,第一核酸包括编码在诱导启动子的控制下促进存活和增殖的基因、防止凋亡的基因和/或抑制负检查点信号传导的多核苷酸序列。这样的基因包括编码IL-2、IL-15、趋化因子受体、Bc12、CA-Akt、dn-TGF $\beta$ RIII、dn-SHP1/2和/或PD-1CD28嵌合体的基因。这些基因也位于如本文描述的诱导型启动子的控制下。在一些供选择的方案中,基因编码IL-2、IL-15、趋化因子受体、Bc12、CA-Akt、dn-TGF $\beta$ RIII、dn-SHP1/2和/或PD-1CD28嵌合体。在一些供选择的方案中,调节检查点信号传导的基因编码抑制负检查点调控因子的多肽。在一些供选择的方案中,负检查点调控因子包括VISTA、LAG-3和/或TIM3。

[0151] 在一些供选择的方案中,第一核酸包括连接于编码细胞因子或趋化因子受体的多核苷酸的第一诱导型启动子。趋化因子,也称为趋化细胞因子,是一组调控淋巴细胞的细胞运输的结构相关蛋白。在一些供选择的方案中,趋化因子是体内稳态或炎性的。趋化因子受体包括CCR2、CCR7或CCR15。细胞因子包括白介素如IL2、IL-12、IL-7和/或IL-15,干扰素如干扰素 $\gamma$ ,肿瘤坏死因子和TLR4激动剂。在一些供选择的方案中,趋化因子受体包括CCR2、CCR7和/或CCR15。在一些供选择的方案中,趋化因子受体包括CCR2、CCR7或CCR15。在一些供选择的方案中,细胞因子包括白介素,其中白介素是IL2、IL-12、IL-7和/或IL-15,或干扰素,其中干扰素包括干扰素 $\gamma$ ,肿瘤坏死因子或TLR4激动剂。

[0152] 在一些供选择的方案中,第一核酸包括第一诱导型启动子,所述第一诱导型启动子连接于编码调控凋亡的多肽的多核苷酸。在一些供选择的方案中,抑制凋亡的基因包括

例如Bcl2和/或CA-Akt。在一些供选择的方案中，多肽包括Bcl2或CA-Akt。

[0153] 在一些供选择的方案中，第一核酸包括第一诱导型启动子，所述第一诱导型启动子连接于编码调节检查点信号传导的多肽的多核苷酸。这样的基因包括dn-TGF $\beta$ RIII、dn-SHP1/2和/或PD-1CD28嵌合体。在一些供选择的方案中，多肽是dn-TGF $\beta$ RIII、dn-SHP1/2和/或PD-1CD28嵌合体。在一些供选择的方案中，调节检查点信号传导的多肽抑制负检查点调控因子。在一些供选择的方案中，负检查点调控因子包括VISTA、LAG-3和/或TIM3。

[0154] 编码这些基因的多肽的示例性序列在下表找到：

基因	A.A.	A.A.	N.A.	N.A.
	登录号	gI	登录号	gI
CCR2	P41597	1168965	NM_001123041	183979979
CCR7	P32248	1352335	NM_001838	299473754
IL-2	AAH70338	47682793	BC070338	47682792
IL-12	AAD16432	4323579	AF101062	4323578
IL-7	AAC63047	386824	NM_000880	315467865
IL-15	CAG46804	49456967	CR542007	49456966
IFN-g	EAW97180	119617586	EAW97180	119617586
TNF	NP_000585	25952111	NM_000594	395132451
Bcl2	AAH27258	20072668	BC027258	20072667
CA-Akt	NP_001014432	62241015	NM_001014432	62241014
TGF $\beta$ 受体	Q03167	311033535	NM_003243	307574689

III				
SHP1	NP_002822	18104989	NM_002831	166064064
SHP2	Q06124	84028248	NM_002834	33356176
PD-1	NP_001129245	209413749	NM_001135773	209413748
CD28	AAA51945	180092	NM_006139	340545506

[0157] 任何数目的核酸可以位于在诱导型启动子的控制下，所述核酸包括编码嵌合抗原受体、标记序列、细胞因子、趋化因子、凋亡抑制剂和/或负检查点信号传导抑制剂的那些核酸。在一些供选择的方案中，可以利用一个或多个诱导型启动子提供每个核酸的充足的表达水平。在一些供选择的方案中，可以用在诱导型启动子控制下的基因如细胞因子和在组成型启动子的控制下的包括嵌合抗原受体的构建体制备构建体。这样的构建体对提供转导细胞(例如表达嵌合抗原受体的淋巴细胞)的细胞存活和增殖是有用的。

[0158] 组成型启动子系统

[0159] 在其他供选择的方案中，系统包括第二核酸，所述第二核酸包括连接于转录激活因子的组成型启动子或第二诱导型启动子。在其他供选择的方案中，系统包括第二核酸，所

述第二核酸包括连接于转录激活因子的启动子。在一些供选择的方案中，启动子是组成型启动子或诱导型启动子。在一些供选择的方案中，组成型启动子包括EF1 $\alpha$ 启动子、肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、血红蛋白启动子和肌酸激酶启动子。在一些供选择的方案中，排除病毒启动子如CMV启动子。在一些供选择的方案中，组成型启动子可以连接于编码如本文描述的标记或嵌合抗原受体的多核苷酸中的一个或多个。

[0160] 组成型启动子

[0161] 组成型启动子提供在启动子控制下的基因的持续基因表达。在一些供选择的方案中，组成型启动子是提供在慢病毒构建体和/或淋巴细胞中的基因表达的启动子。在一些供选择的方案中，启动子不源自异种来源如植物或病毒。

[0162] 在具体的供选择的方案中，组成型启动子包括EF1 $\alpha$ 启动子、肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、血红蛋白启动子和/或肌酸激酶启动子。在一些供选择的方案中，排除病毒启动子如CMV启动子。

[0163] 转录激活因子

[0164] 在一些供选择的方案中，组成型启动子可操作地连接于转录激活因子。在一些供选择的方案中，在诱导剂(例如药物)存在下转录激活因子激活诱导型启动子。

[0165] 在一些供选择的方案中，在转录激活因子存在下诱导诱导型启动子。在一些供选择的方案中，在药物存在下转录激活因子优先结合于启动子。在一些供选择的方案中，转录激活因子是TamR-tf (HEA3)。可以在可以影响激活剂结合于药物、启动子或两者的能力的氨基酸序列中进行转录激活因子的修饰。例如，在ER配体结合域中的结合会影响药物与转录激活因子的结合。

[0166] 在一些供选择的方案中，在药物存在下(例如他莫昔芬)，系统采用合成转录激活因子，所述转录激活因子结合转基因上游的合成启动子以诱导表达。在一些供选择的方案中，转录激活因子是TamR-tf (HEA3)。他莫昔芬调控的转录因子(“TamR-tf”，也指“HEA3”)是由人亚单位组成的嵌合转录因子，所述人亚单位包括肝细胞核因子1- $\alpha$  (HNF-1 $\alpha$ ) (例如SEQ ID NO:40的第1-281位氨基酸) 的N-末端DNA结合域，HNF-1 $\alpha$ 的N-末端DNA结合域框内融合于雌激素受体配体结合域(ER-LBD)的突变的他莫昔芬特异性配体结合域，所述突变的他莫昔芬特异性配体结合域反过来融合于NF- $\kappa$ B (p65) 的p65激活域。在表10中提供了示例性的氨基酸序列，并且鉴别为SEQ ID NO:40。雌激素受体配体结合域(ER-LBD)的突变的他莫昔芬特异性配体结合域在TamR-tf的第282-595位氨基酸处发现，并且在第521位具有突变。NF- $\kappa$ B (p65或TAD) 的p65激活域在第596-862位氨基酸处发现。

[0167] 对转录激活因子可以做出另外的改变以增加转录因子特性，包括但不限于在雌激素受体配体结合域改变一个或更多氨基酸和/或在p65反式激活域改变一个或多个氨基酸。改变雌激素受体结合域中的氨基酸可以提供药物与转录激活因子的更加特异性的结合。在ER-LBD中具有改变的序列的转录激活因子的例子示于表11中 (SEQ ID NO:43)。突变在SEQ ID NO:40的第400、543和544位氨基酸处进行。具有改变的序列的转录激活因子增加了对他莫昔芬或4-OHT的亲和性。在转导细胞的激活不存在下，在p65反式激活域中改变氨基酸可以提供转基因的增加的表达。

[0168] 标记

[0169] 在一些供选择的方案中，组成型启动子可操作地连接于编码标记多肽的多核苷

酸。这样的标记多肽本文描述，并且包括EGFRt、Her2t和/或DHFRdm。

[0170] 嵌合抗原受体

[0171] 在一些供选择的方案中，组成型启动子可操作地连接于编码嵌合抗原受体的多核苷酸。在一些供选择的方案中，嵌合抗原受体包括配体结合域，其中配体结合域对配体是特异性的，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；编码跨膜域的多核苷酸；以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中，间隔区是优化的以提供与参比嵌合受体相比应答配体的增加的T细胞增殖和/或细胞因子产生。本文描述了嵌合抗原受体的例子。

[0172] 载体

[0173] 可以构建各种载体组合以提供转导和转基因表达的效率。在一些供选择的方案中，载体是双包装的或单独的（所有在一个中）病毒载体。在其他供选择的方案中，载体可以包括病毒载体和质粒载体的组合。其他病毒载体包括泡沫病毒、腺病毒载体、反转录病毒载体和慢病毒载体。在一些供选择的方案中，载体是慢病毒载体。在一些供选择的方案中，载体是泡沫病毒、腺病毒载体、反转录病毒载体或慢病毒载体。

[0174] 在一些供选择的方案中，质粒载体或病毒载体包括第一核酸，所述第一核酸包括连接于编码嵌合抗原受体的多核苷酸的诱导型启动子。在一些供选择的方案中，质粒载体或病毒载体包括第一核酸，所述第一核酸包括编码提高细胞存活或增殖的基因、调控凋亡的基因和/或调节检查点信号传导的基因的多核苷酸。在一些供选择的方案中，检查点信号传导的调节抑制负检查点调控因子。在一些供选择的方案中，负检查点调控因子包括VISTA、LAG-3和/或TIM3。这样的多核苷酸编码细胞因子或趋化因子受体。在一些供选择的方案中，质粒载体或病毒载体包括第一核酸，所述第一核酸包括连接于编码标记序列的多核苷酸的诱导型启动子。本文描述了标记序列。在一些供选择的方案中，标记序列与人淋巴细胞的转导相容。在一些供选择的方案中，标记序列允许转导细胞的选择和/或转导细胞的检测。在一些供选择的方案中，标记是基因，所述基因可以包括尤其是给予潮霉素B抗性的潮霉素B磷酸转移酶基因(hph)、来自Tn5的编码抗生素G418抗性的氨基糖苷磷酸转移酶基因(neo或aph)、提供甲氨蝶呤抗性的二氢叶酸还原酶(DHFR)基因、DHFR dm(表14中的示例性核苷酸和氨基酸序列, SEQ ID NO:46和SEQ ID NO:47)、提供嘌呤霉素抗性的pac基因、使博来霉素失活的Sh ble基因、腺苷脱氨酶基因(ADA)和/或多药抗性(MDR)基因。第一核酸可以包括均在诱导型启动子控制下的多个不同的多核苷酸序列。例如，编码嵌合抗原受体的多核苷酸序列可以连接于编码标记多肽的多核苷酸和/或编码细胞因子或趋化因子受体的多核苷酸。

[0175] 在一些供选择的方案中，慢病毒载体包括第二核酸，所述第二核酸包括组成型启动子，所述组成型启动子连接于编码结合于药物并激活诱导型启动子表达的转录激活因子的核酸序列。在一些供选择的方案中，带有组成型启动子的慢病毒载体也可以包括含有标记基因、piggyback转座酶和/或编码嵌合抗原受体的多核苷酸的核酸序列。核酸的每个原件可以用序列如T2A自切割序列相互分开。在一些供选择的方案中，核酸的元件可以用序列自切割序列相互分开。在一些供选择的方案中，自切割序列是T2A。

[0176] 在其他供选择的方案中，异种(对载体异种的，例如慢病毒载体)核酸序列被另外

的可以包装在载体中的遗传组件的量限制。在一些供选择的方案中，构建体含有至少两个对病毒载体异种的基因。在一些供选择的方案中，构建体含有不多于4个对病毒载体异种的基因。对可以包装在载体中的病毒载体异种的基因的数目可以通过检测一个或多个转基因的表达以及选择提供转导至少10%的细胞和/或转基因在至少10%细胞中的可检测的表达水平的载体构建体来确定。

[0177] 在一些供选择的方案中，慢病毒是双包装病毒。双包装病毒含有至少一个条件型构建体，所述条件型构建体包括可操作地连接于编码嵌合抗原受体的多核苷酸的诱导型启动子。任选地，条件型构建体包括标记基因、用于细胞因子的核酸、用于趋化因子受体的核酸。在一些供选择的方案中，双包装慢病毒含有包括组成型启动子的组成型构建体。在供选择的方案中，组成型构建体包括连接于用于诱导型启动子的转录激活因子的组成型启动子。在一些供选择的方案中，组成型构建体也包括标记基因和/或编码细胞因子或趋化因子的多核苷酸。在具有两个构建体的系统的一些供选择的方案中，每个构建体可以被包装于分离的病毒载体中并且病毒载体可以混合在一起用于在细胞群中转导。

[0178] 当组成型和条件型构建体均含有标记基因时，在每个构建体上的标记基因彼此相同或不同。在一些供选择的方案中，当组成型和条件型构建体均含有编码嵌合抗原受体的多核苷酸时，嵌合抗原受体可以靶向于相同的抗原但具有不同的配体结合域，可以靶向于相同的抗原但是不同的表位或可以靶向于不同的抗原。

[0179] 在一些供选择的方案中，载体是微环。微环是作为没有任何细菌质粒DNA骨架的环状表达盒产生的附加体DNA载体。微环的更小的分子大小使得能够更有效的转染，并且与仅工作几天的标准质粒载体相比提供了在几周的时间内的持续表达。在一些供选择的方案中，微环含有连接于编码嵌合抗原受体的多核苷酸的药物诱导型启动子。在一些供选择的方案中，诱导型启动子可以连接于趋化因子受体、标记基因和/或细胞因子。可以采用一个或多个微环。在一些供选择的方案中，微环包括连接于编码第一嵌合抗原受体的多核苷酸的诱导型启动子，另一种微环包括连接于编码第二且不同的嵌合抗原受体的多核苷酸的诱导型启动子和/或微环包括连接于编码趋化因子受体、嵌合抗原受体和标记基因的多核苷酸的诱导型启动子。构建体的每个元件被核酸，如编码自切割T2A序列的核酸分开。在一些供选择的方案中，构建体的每个元件被核酸，如编码自切割T2A序列的核酸分开。在一些供选择的方案中，每个微环在嵌合抗原受体方面相互区别开，区别包括但不限于间隔区长度和序列、胞内信号传导域和/或标记序列。微环载体可以与编码用于诱导型启动子的转录激活因子的组成型慢病毒载体使用。在一些供选择的方案中，微环载体与编码用于诱导型启动子的转录激活因子的组成型慢病毒载体使用。

[0180] 在一些供选择的方案中，载体是piggy bac转座子。PiggyBac (PB) 转座子是通过“剪切和粘贴”机制有效地在载体和染色体间转座的可移动遗传元件。在转座期间，PB转座酶识别位于转座子载体两个末端的转座子特异性反向末端重复序列 (ITRs)，并有效地从原始位点移动内容物并有效将所述内容物整合到TTAA染色体位点。PiggyBac转座子系统的强大活性使在PB载体中的两个ITR之间的感兴趣的基因能够容易地移入靶基因组。

[0181] 在一些供选择的方案中，PB含有连接于编码嵌合抗原受体的多核苷酸的药物诱导型启动子。在一些供选择的方案中，诱导型启动子可以连接于趋化因子受体、标记基因和/或细胞因子。可以采用一个或多个PB转座子。在一些供选择的方案中，PB包括连接于编码第

一嵌合抗原受体的多核苷酸的诱导型启动子,另一种PB包括连接于编码第二且不同的嵌合抗原受体的多核苷酸的诱导型启动子和/或PB包括连接于编码趋化因子受体、嵌合抗原受体和标记基因的诱导型启动子。构建体的每个元件被核酸,如编码自切割T2A序列的核酸分开。在一些供选择的方案中,每个PB在嵌合抗原受体方面相互区别开,区别包括但不限于间隔区长度和序列、胞内信号传导域和/或标记序列。PB载体可以与编码用于诱导型启动子的转录激活因子的组成型慢病毒载体以及包括连接于组成型启动子的piggyback转座酶的组成型载体使用。

[0182] 在一些供选择的方案中,第一核酸,包括可通过药物诱导的第一启动子,其中第一核酸可操作地连接于编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸,其中配体结合域对配体是特异性的,其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子,其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除;编码多肽间隔区的多核苷酸,其中间隔区是优化的;以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸;以及第二核酸,包括第二组成型或诱导型启动子,所述第二组成型或诱导型启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中,第一和第二核酸在单独的慢病毒载体中。在一些供选择的方案中,针对与参比嵌合受体相比应答配体的T细胞增殖和/或细胞因子产生的增加间隔区是优化的。

[0183] 在一些供选择的方案中,第一核酸进一步包括标记基因。在一些供选择的方案中,第二核酸进一步包括编码第二且不同的嵌合抗原受体的多核苷酸。第一和第二嵌合抗原受体可以相互区别开,区别在于配体结合域、靶抗原、靶抗原的表位、间隔区的长度和序列(短中或长)和胞内信号传导域。

[0184] 在一些供选择的方案中,在单个的慢病毒构建体中,第一和第二核酸可以通过基因组绝缘子核酸如海胆绝缘子核染色质域分开。在其他供选择的方案中,第一核酸的诱导型启动子和第二核酸的组成型启动子是相对取向的。

[0185] 这些载体中的一个或多个可以相互连接用于转导靶细胞并提供嵌合抗原受体的诱导型表达。

[0186] 宿主细胞和组合物:T淋巴细胞群

[0187] 本文描述的组合物提供具有如本文描述的载体和/或构建体的基因修饰的宿主细胞。在一些供选择的方案中,宿主细胞是CD4+和/或CD8+T淋巴细胞。

[0188] 可以根据已知的技术收集T淋巴细胞,并且通过已知的技术如亲和结合于抗体如流式细胞术和/或免疫磁珠选择富集或消耗T淋巴细胞。富集和/或消耗步骤之后,可以根据对本领域技术人员来说显而易见的已知的技术或其改变进行体外扩增希望的T淋巴细胞。在一些供选择的方案中,T细胞是获得自患者的自体T细胞。

[0189] 例如,可以通过以下方法扩增希望的T细胞群或亚群,在体外将初始T淋巴细胞群添加至培养基中,然后添加至培养基饲养细胞如不分裂的外周血单核细胞(PBMC),(例如,这样使得产生的细胞群对要扩增的初始群中的每个T淋巴细胞含有至少5、10、20或40或更多个PBMC饲养细胞);以及温育培养物(例如,温育充足的时间以扩增T细胞的数目)。不分裂的饲养细胞可以包括 $\gamma$ -辐射的PBMC饲养细胞。在一些供选择的方案中,用 $\gamma$ 射线以3000至3600拉德的范围辐射PBMC以防止细胞分裂。在一些供选择的方案中,用 $\gamma$ 射线以3000、3100、3200、3300、3400、3500或3600拉德,或任意列出值的任意两个端点之间的任意拉德值

辐射PBMC以防止细胞分裂。如需要,T细胞和饲养细胞添加至培养基的顺序可以颠倒。可以典型地在适于T淋巴细胞生长的温度等的条件下温育培养物。例如对人T淋巴细胞的生长,温度一般会在至少25°C,优选至少30°C,更优选37°C。在一些供选择的方案中,人T淋巴细胞的生长的温度是22、24、26、28、30、32、34、36、37°C或任意列出值的任意两个端点之间的任意其他温度。

[0190] 扩增的T淋巴细胞包括可对人肿瘤或病原体上存在的抗原特异性的CD8<sup>+</sup>细胞毒性T淋巴细胞(CTL)和CD4<sup>+</sup>辅助T淋巴细胞。在一些供选择的方案中,细胞包括前体T细胞。在一些供选择的方案中,细胞是造血干细胞。

[0191] 在一些供选择的方案中,扩增方法可以进一步包括添加不分裂的EBV转化的淋巴样干细胞(LCL)作为饲养细胞。可以用γ射线以6000至10,000拉德辐射LCL。在一些供选择的方案中,用γ射线以6000、6500、7000、7500、8000、8500、9000、9500或10,000拉德,或任意列出值的两个端点之间的任意量的拉德辐射LCL。可以以任何适当的量提供LCL饲养细胞,如LCL饲养细胞与初始T淋巴细胞比为至少10:1。

[0192] 在一些供选择的方案中,扩增方法可以进一步包括将抗CD3和/或抗CD28抗体添加至培养基(例如,浓度为至少0.5ng/ml)。在一些供选择的方案中,扩增方法可以进一步包括将IL-2和/或IL-15添加至培养基(例如,其中IL-2的浓度为至少10个单位/ml)。

[0193] 在分离T淋巴细胞后,无论在扩增前或扩增后均可以将细胞毒性T淋巴细胞和辅助T淋巴细胞两者分选为初始T细胞、记忆T细胞和效应T细胞亚群。

[0194] 可以通过使用标准方法获得CD8+细胞。在一些供选择的方案中,通过鉴别与CD8+细胞的那些类型中的每一个相关的细胞表面抗原将CD8+细胞进一步分选为初始细胞、中枢记忆细胞和效应记忆细胞。在一些供选择的方案中,记忆T细胞存在于CD8+外周血淋巴细胞的CD62L<sup>+</sup>和CD62L<sup>-</sup>两个亚集中。在用抗CD8和抗CD62L抗体染色后,将PBMC分选为CD62L-CD8<sup>+</sup>和CD62L<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>部分。在一些供选择的方案中,中枢记忆T<sub>CM</sub>的表型标记的表达包括CD45R0、CD62L、CCR7、CD28、CD3和/或CD127,并且对颗粒酶B呈阳性或是低的。在一些供选择的方案中,中枢记忆T细胞是CD45R0<sup>+</sup>、CD62L<sup>+</sup>和/或CD8<sup>+</sup>T细胞。在一些供选择的方案中,效应T<sub>E</sub>对CD62L、CCR7、CD28和/或CD127呈阴性,并且对颗粒酶B和/或穿孔素呈阳性。在一些供选择的方案中,初始CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞被表征为初始T细胞的包括CD62L、CCR7、CD28、CD3、CD127和/或CD45RA的表型标记的表达。

[0195] 通过鉴别具有细胞表面抗原的细胞群将CD4<sup>+</sup>T辅助细胞分选为初始细胞、中枢记忆细胞和效应细胞。可以通过标准方法获得CD4<sup>+</sup>淋巴细胞。在一些供选择的方案中,初始CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞是CD45R0<sup>-</sup>、CD45RA<sup>+</sup>、CD62L<sup>+</sup>和/或CD4<sup>+</sup>T细胞。在一些供选择的方案中,中枢记忆CD4<sup>+</sup>细胞是CD62L<sup>+</sup>和/或CD45R0<sup>+</sup>。在一些供选择的方案中,效应CD4<sup>+</sup>细胞是CD62L<sup>-</sup>和/或CD45R0<sup>-</sup>。

[0196] 可以通过使用对表面标记特异的抗体和同种型匹配对照抗体染色的流式细胞术确定细胞或细胞群对具体的细胞表面标记是否是阳性。对标记呈阴性的细胞群指用特异性抗体不存在高于同种型对照的细胞群的显著染色,阳性指细胞群的均一染色高于同种型对照。在一些供选择的方案中,一个或多个标记的表达的减少指平均荧光强度损失1log10和/或显示标记的细胞的百分比与参比细胞群相比减少至少20%的细胞、25%的细胞、30%的细胞、35%的细胞、40%的细胞、45%的细胞、50%的细胞、55%的细胞、60%的细胞、65%的

细胞、70%的细胞、75%的细胞、80%的细胞、85%的细胞、90%的细胞、95%的细胞和100%的细胞或20至100%之间任何%。在一些供选择的方案中,对一个或标记呈阳性的细胞群指显示标记的细胞的百分比与参比细胞群相比为至少50%的细胞、55%的细胞、60%的细胞、65%的细胞、70%的细胞、75%的细胞、80%的细胞、85%的细胞、90%的细胞、95%的细胞或100%的细胞或50至100%之间任何%。

[0197] 可以通过使用对表面标记特异的抗体和同种型匹配对照抗体的流式细胞术确定细胞或细胞群对具体的细胞表面标记是否是阳性。对标记呈阴性的细胞群指用特异性抗体不存在高于同种型对照的细胞群的显著染色,阳性指细胞群的均一染色高于同种型对照。在一些供选择的方案中,一个或标记的表达的减少指平均荧光强度损失 $\log_{10}$ 和/或显示标记的细胞的百分比与参比细胞群相比减少至少20%的细胞、25%的细胞、30%的细胞、35%的细胞、40%的细胞、45%的细胞、50%的细胞、55%的细胞、60%的细胞、65%的细胞、70%的细胞、75%的细胞、80%的细胞、85%的细胞、90%的细胞、95%的细胞和100%的细胞或20至100%之间任何%。在一些供选择的方案中,增加指平均荧光强度的增加和/或对一个或给定标记呈阳性的细胞群中细胞数量的增加,如以下细胞群,其中细胞群指显示标记的细胞的百分比如当与参比细胞群相比时,为至少50%的细胞、55%的细胞、60%的细胞、65%的细胞、70%的细胞、75%的细胞、80%的细胞、85%的细胞、90%的细胞、95%的细胞或100%的细胞或50至100%之间任何%。

[0198] 在一些供选择的方案中,可以通过用抗原刺激初始T淋巴细胞或抗原特异性T淋巴细胞获得抗原特异性的CD4+和CD8+群。例如,通过从感染的受试者分离T细胞和在体外用相同抗原刺激细胞可以使抗原特异性T细胞系或克隆产生巨细胞病毒抗原。也可以使用初始T细胞。可以利用来自肿瘤细胞的任意数目的抗原作为引发T细胞应答的靶标。在一些供选择的方案中,过继细胞免疫治疗组合物在对包括实体瘤、恶性血液肿瘤、乳腺癌或黑色素瘤的疾病或紊乱治疗中是有用的。

#### [0199] T淋巴细胞群的修饰

[0200] 在一些供选择的方案中,根据本发明将功能性基因引入待用于免疫治疗的T细胞可以是希望的。例如,引入的基因或多个基因可以通过促进转移的T细胞的生存能力和/或功能改善治疗的疗效;或所述功能性基因可以提供遗传标记以及允许在体内存活或迁移的选择和/或评价;或所述功能性基因可以合并改善免疫治疗的安全性的功能,例如通过使细胞易受转基因的控制表达的影响。这可以使用基于本发明对本领域技术人员来说显而易见的已知技术进行。

[0201] 在一些供选择的方案中,用编码如本文描述的药物诱导型嵌合受体的载体修饰T细胞。在一些供选择的方案中,用包括在诱导型启动子的控制下编码嵌合抗原受体的多核苷酸的载体修饰细胞。在其他供选择的方案中,用包括在诱导型启动子的控制下编码细胞因子、趋化因子受体、调控凋亡的基因或调节检查点信号传导的基因的多核苷酸的载体修饰细胞。在一些供选择的方案中,T细胞获得自要治疗的受试者,在其他供选择的方案中,淋巴细胞获得自同种异体的人供体,优选健康的人供体。在一些供选择的方案中,检查点信号传导的调节抑制负检查点调控因子。在一些供选择的方案中,负检查点调控因子包括VISTA、LAG-3和/或TIM3。

[0202] 通过利用例如抗体分子的抗原结合片段或抗体可变域可以构建对任意细胞表面

标记具有特异性的嵌合受体。抗原结合分子可以连接于一个或多个细胞信号传导组件。在一些供选择的方案中，细胞信号传导组件包括CD3跨膜域、CD3胞内信号传导域和/或CD28跨膜域。在一些供选择的方案中，胞内信号传导域包括连接于CD3胞内域的CD28跨膜域和信号传导域。在一些供选择的方案中，嵌合受体也可以包括转导标记如tEGFR。

[0203] 在一些供选择的方案中，可以将相同或不同的嵌合受体引入CD4+和/或CD8+T淋巴细胞的每个群中。在一些供选择的方案中，在这些群中的每一个中嵌合受体具有特异性结合于在肿瘤细胞或感染的细胞上的相同配体或不同抗原或表位的配体结合域。细胞信号传导组件可以不同。在一些供选择的方案中，CD8+细胞毒性T细胞的胞内信号传导域与CD4+辅助T细胞的胞内信号传导域相同。在其他供选择的方案中，CD8+细胞毒性T细胞的胞内信号传导域与CD4+辅助T细胞的胞内信号传导域不同。

[0204] 在一些供选择的方案中，在如本文描述的在转导之前可以将CD4或CD8 T淋巴细胞中的每一个分选为初始细胞、中枢记忆细胞、效应记忆细胞或效应细胞。在一些供选择的方案中，在转导之后可以将CD4或CD8 T淋巴细胞中的每一个分选为初始细胞、中枢记忆细胞、效应记忆细胞或效应细胞。

[0205] 如本文描述的，在一些供选择的方案中，初始CD4+细胞是CD45R0-、CD45RA+、CD62L+和/或CD4+阳性T细胞。在一些供选择的方案中，中枢记忆CD4+细胞是CD62L阳性和/或CD45R0阳性的。在一些供选择的方案中，效应CD4+细胞是CD62L阴性和/或CD45R0阳性的。可以用嵌合受体独立地修饰这些群中的每一个。

[0206] 如描述的，在一些供选择的方案中，记忆T细胞存在于CD8+外周血淋巴细胞的CD62L+和CD62L-两个亚集中。在用抗CD8和抗CD62L抗体染色后，将PBMC分选为CD62L-CD8+和CD62L+CD8+部分。在一些供选择的方案中，中枢记忆T细胞 (TCM) 的表型标记的表达包括CD62L、CCR7、CD28、CD3和/或CD127，并且对颗粒酶B呈阳性或是低的。在一些供选择的方案中，中枢记忆T细胞是CD45R0+、CD62L+和/或CD8+T细胞。在一些供选择的方案中，效应细胞 ( $T_E$ ) 对CD62L、CCR7、CD28和/或CD127呈阴性，并且对颗粒酶B和/或穿孔素呈阳性。在一些供选择的方案中，初始CD8+T淋巴细胞被表征为CD8+、CD62L+、CD45R0+、CCR7+、CD28+CD127+和/或CD45R0+。可以用嵌合受体独立地修饰这些群中的每一个。

[0207] 已经发展了各种转导技术，所述转导技术利用用于基因递送的重组感染病毒颗粒。这代表当前优选的转导本发明的T淋巴细胞的方法。已经用于该方法的病毒载体包括源自猿猴病毒40、腺病毒、腺伴随病毒 (AAV)、慢病毒载体和/或反转录病毒的病毒载体。因此，基因转移和表达方法是很多的但是在哺乳动物细胞中引入和表达遗传物质的基本功能。数种上述的技术已经用于转导造血细胞或淋巴样细胞，所述技术包括磷酸钙转染；原生质体融合；电穿孔；和用重组腺病毒、腺伴随病毒和反转录病毒载体感染。通过电穿孔和通过反转录病毒或慢病毒感染已经成功转导了原代T淋巴细胞。

[0208] 反转录病毒和慢病毒载体提供了用于将基因转移入真核细胞的高效的方法。此外，反转录病毒或慢病毒的整合以控制的方式发生，并导致每个细胞中新的遗传信息中的一个或少许拷贝的稳定整合。

[0209] 预期刺激因子(例如淋巴因子或细胞因子)的过表达可以是对治疗的个体有毒性的。因此，包括导致本发明的T细胞在体内对阴性选择敏感的基因节段在本发明的范围内。所谓“阴性选择”的意思是由于个体的体内条件的改变，可以消除输注的细胞。阴性选择性

表型可以由提供对施用药物例如化合物的敏感性的基因的插入造成。阴性选择性基因在本领域是已知的，并且包括，尤其是以下：提供更昔洛韦敏感性的单纯性疱疹病毒I胸苷激酶(HSV-I TK)基因；细胞次黄嘌呤磷酸核糖转移酶(HPRT)基因、细胞腺嘌呤磷酸核糖转移酶(APRT)基因以及细菌胞嘧啶脱氨酶。

[0210] 在一些供选择的方案中，在T细胞中包括使在体外选择阴性选择性表型的细胞成为可能的阳性标记可能是有用的。阳性选择性标记可以是基因，该基因在引入宿主细胞时，表达允许对携带该基因的细胞阳性选择的显性表型。该类型的基因是本领域已知的，并且包括尤其是给予潮霉素B抗性的潮霉素B磷酸转移酶基因(hph)、来自Tn5的编码抗生素G418抗性的氨基糖苷磷酸转移酶基因(neo或aph)、二氢叶酸还原酶(DHFR)基因、腺苷脱氨酶基因(ADA)和多药抗性(MDR)基因。

[0211] 可以采用如本领域熟知的各种方法转导T淋巴细胞。在一些供选择的方案中，使用慢病毒载体进行转导。

[0212] 在一些供选择的方案中，CD4+和CD8+细胞各自可以分别用编码嵌合受体的表达载体修饰以形成定义的群。在一些供选择的方案中，细胞可以分别用包括在组成型启动子控制下的多核苷酸的载体和在诱导型启动子控制下编码细胞因子或趋化因子受体的多核苷酸的载体修饰。

[0213] 在一些供选择的方案中，然后通过分选对那些细胞群中的每一个独特的细胞表面抗原，将这些细胞分选为如上文描述的初始细胞、中枢记忆细胞和效应细胞的亚群。另外，可以通过CD4+或CD8+细胞群的细胞因子谱或增殖活性选择CD4+或CD8+细胞群。例如，可以选择当用抗原刺激时，与假转导细胞或转导CD8+细胞相比细胞因子如IL-2、IL-4、IL-10、TNF $\alpha$ 和/或IFN $\gamma$ 的产生提高的CD4+T淋巴细胞。在其他供选择的方案中，选择IL-2和/或TNF $\alpha$ 的产生提高的初始或中枢记忆CD4+T细胞。同样地，选择与假转导CD8+细胞相比IFN $\gamma$ 产生提高的CD8+细胞。

[0214] 在一些供选择的方案中，选择对承载抗原的细胞有细胞毒性的CD4+和CD8+细胞。在一些供选择的方案中，预期与CD8+细胞相比CD4+是弱细胞毒性的。在优选的供选择的方案中，使用针对特定类型的癌症建立的动物模型选择在体内提供杀伤肿瘤细胞的转导淋巴细胞如CD8+中枢记忆细胞。

[0215] 在又一种供选择的方案中，使用针对特定类型的癌症建立的动物模型选择能在体内存留的表达转导的嵌合受体的T细胞。在一些供选择的方案中，带有短间隔区的转导的嵌合受体CD8+中枢记忆细胞显示在引入动物体内3天或更多、10天或更多、20天或更多、30天或更多、40天或更多或50天或更多后在体内存留。

[0216] 本公开预期将在组合物中使用CD4+和CD8+T细胞的组合。在一种供选择的方案中，可以将嵌合受体转导的CD4+细胞的组合物与相同配体特异性的嵌合受体转导的CD8+细胞组合，或与对有区别的肿瘤配体特异性的嵌合受体转导的CD8+T细胞组合。在其他供选择的方案中，将嵌合受体转导的CD8+细胞与对表达于肿瘤上的不同配体特异性的嵌合受体转导的CD4+细胞组合。在又一种供选择的方案中，将嵌合受体修饰的CD4+和CD8+细胞组合。在一些供选择的方案中，可以以不同的比组合CD8+和CD4+细胞，例如CD8+与CD4+的比为1:1，CD8+与CD4+的比为10:1或CD8+与CD4+的比为100:1或CD8+与CD4+的比在任意的列出比之间的任意其他比。在一些供选择的方案中，在体外和/或在体内测试组合的群的细胞增殖并且选

择提供细胞增殖的细胞的比。

[0217] 在对承载嵌合受体的细胞转导和/或选择后,细胞群优选在体外扩增直到获得足够数目的细胞以提供至少对人受试者的一次输注典型地为约 $10^4$ 个细胞/kg至 $10^9$ 个细胞/kg。在一些供选择的方案中,在抗原承载细胞、抗CD3、抗CD28、和IL 2、IL-7、IL 15或IL-21或其组合存在下培养转导细胞。

[0218] 在一些供选择的方案中,选择在体外或在体内应答细胞因子刺激、抗原或肿瘤靶标而增殖的CD4+和CD8+细胞。例如,选择当用抗CD3和/或抗CD28刺激时迅猛增殖的CD4+或CD8+转导细胞。在一些供选择的方案中,在诱导型启动子的控制下的那些转基因的诱导剂(例如药物)存在下,转导细胞的刺激提供提高的转基因表达。

[0219] 可以将CD4+和CD8+细胞的亚群中的每一个与另一个组合。在具体的供选择的方案中,将修饰的初始或中枢记忆CD4+细胞与修饰的中枢记忆CD8+T细胞组合以在抗原承载细胞如肿瘤细胞上提供协同的细胞毒性作用。

#### [0220] 组合物

[0221] 本公开提供了过继细胞免疫治疗组合物,该组合物包含如本文描述的遗传修饰的T淋巴细胞细胞制剂。在一些供选择的方案中,T淋巴细胞制剂包括具有嵌合受体的CD4+T细胞,所述嵌合受体包括在如本文描述的药物诱导型启动子的控制下的对与疾病或紊乱相关的配体特异的胞外抗体可变域、间隔区、跨膜域和T细胞受体或其他受体的胞内信号传导域。在其他供选择的方案中,过继细胞免疫治疗组合物进一步包含提供细胞免疫应答的嵌合受体修饰的肿瘤特异性CD8+细胞毒性T淋巴细胞细胞制剂,其中细胞毒性T淋巴细胞细胞制剂包括具有嵌合受体的CD4+T细胞,所述嵌合受体包括在如本文描述的药物诱导型启动子的控制下的对与疾病或紊乱相关的配体特异的胞外单链抗体、间隔区、跨膜域和T细胞受体的胞内信号传导域。在一些供选择的方案中,本公开的嵌合受体修饰的T细胞群可以在体内存留3天或更久。在供选择的方案中,可以将这些群中的每一个与另一个组合或与其他细胞类型组合以提供组合物。

[0222] 在一些供选择的方案中,CD4+T辅助淋巴细胞是初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞或混合CD4+T细胞。在一些供选择的方案中,CD4+辅助淋巴细胞是初始CD4+T细胞,其中初始CD4+T细胞包括CD45R0-、CD45RA+和/或是CD62L+CD4+T细胞。

[0223] 在一些供选择的方案中,CD8+T细胞毒性淋巴细胞是初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和/或混合CD8+T细胞。在一些供选择的方案中,CD8+细胞毒性T淋巴细胞是中枢记忆T细胞,其中中枢记忆T细胞包括CD45R0+、CD62L+和/或CD8+T细胞。在其他的供选择的方案中,CD8+细胞毒性T淋巴细胞是中枢记忆T细胞,以及CD4+辅助T淋巴细胞是初始或中枢记忆CD4+T细胞。

[0224] 在一些供选择的方案中,组合物包含T细胞前体。在一些供选择的方案中,组合物包含造血干细胞。在一些供选择的方案中,组合物包含:宿主细胞,其中宿主细胞是选自由初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和混合CD8+T细胞组成的组的CD8+T细胞毒性淋巴细胞,或选自由初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和混合CD4+T细胞组成的组的CD4+T辅助淋巴细胞;以及第二宿主细胞,其中第二宿主细胞是前体T细胞。在一些供选择的方案中,前体T细胞是造血干细胞。

#### [0225] 方法

[0226] 本公开提供制备过继免疫治疗组合物的方法和使用这些组合物以对患有疾病或紊乱的受试者进行细胞免疫治疗的用途或方法。在一些供选择的方案中,制备组合物的方法包括:获得修饰的初始或中枢记忆CD4+T辅助细胞,其中修饰的辅助T淋巴细胞细胞制剂包括具有嵌合受体的CD4+T细胞,所述嵌合受体包括在如本文描述的诱导型启动子的控制下的对肿瘤细胞表面分子特异的配体结合域、间隔区、跨膜域和胞内信号传导域。在其他供选择的方案中,CD4+细胞具有在诱导型启动子的控制下的细胞因子或趋化因子受体。

[0227] 在另一种供选择的方案中,方法进一步包括获得修饰的CD8+中枢记忆T细胞,其中修饰的中枢记忆CD8 T淋巴细胞细胞制剂包括具有嵌合受体的CD4+T细胞,所述嵌合受体包括在如本文描述的诱导型启动子的控制下的配体结合域、间隔区区域、跨膜域和胞内信号传导域,其中配体结合域对配体是特异性的,其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子,其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除。在其他供选择的方案中,CD4+细胞具有在诱导型启动子的控制下的细胞因子或趋化因子受体。

[0228] 在修饰的CD4+T细胞和修饰的CD8+细胞毒性T细胞两者中的药物诱导型启动子可以是相同的或不同的。在一些供选择的方案中,在一个细胞群中,连接于嵌合抗原受体的启动子是组成型启动子,以及在其他群中所述启动子是诱导型启动子。例如,修饰的CD4+T细胞具有嵌合受体,所述嵌合受体包括在组成型启动子的控制下的对肿瘤细胞表面分子特异的配体结合域、间隔区、跨膜域和胞内信号传导域,而CD8+细胞毒性T细胞包括具有嵌合受体的CD8+细胞,所述嵌合受体包括在诱导型启动子的控制下的对肿瘤细胞表面分子特异的配体结合域、间隔区、跨膜域和胞内信号传导域。

[0229] 在一些供选择的方案中,多核苷酸可以编码在CD4+与CD8+细胞群上不同的嵌合抗原受体。两个构建体之间的差异可以包括配体结合域对抗原或表位的特异性或亲和性、间隔区的长度和序列以及胞内信号组件。

[0230] 贯穿本公开描述了用嵌合受体修饰的CD4+和CD8+细胞的制剂。抗原特异性T淋巴细胞可以获得自患有疾病或紊乱的患者,或可以通过在体外在抗原存在下刺激T淋巴细胞制备。未选择用于抗原特异性的CD4+和/或CD8+T淋巴细胞亚群也可以如本文描述被分离并且在制备方法中组合。

[0231] 在一些供选择的方案中,通过至少两代可以评价细胞群的组合的细胞表面标记的一致性、增殖能力以具有一致的细胞分化状态。通过将表达靶配体的细胞系与嵌合受体修饰的T细胞和诱导嵌合抗原受体表达的药物共培养进行质量控制,以在本领域已知的诱导剂的存在下,使用细胞毒性、增殖或细胞因子产生测定来确定嵌合受体修饰的T细胞是否识别细胞系。可以通过流式细胞术确定嵌合受体修饰的T细胞上的细胞分化状态和细胞表面标记。在一些供选择的方案中,CD8+细胞上的标记和细胞分化状态包括CD3、CD8、CD62L、CD28、CD27、CD69、CD25、PD-1、CTLA-4、CD45RO和/或CD45RA。在一些供选择的方案中,CD4+细胞上的标记和细胞分化状态包括CD3、CD4、CD62L、CD28、CD27、CD69、CD25、PD-1、CTLA-4CD45RO和/或CD45RA。

[0232] 在一些供选择的方案中,如本文描述的嵌合受体修饰的T细胞能够在体内存留至少3天或至少10天。在一些供选择的方案中,如本文描述的嵌合受体修饰的T细胞可以在体内增殖经过至少2代或至少3代,如通过CFSE染料稀释所确定。通过使用疾病或紊乱的动物

模型和施用细胞并确定转移的细胞的增殖和/或存留能力可以确定嵌合受体修饰的T细胞的增殖和存留。在其他供选择的方案中,通过经历用抗原承载细胞进行多循环激活可以在体外测试增殖和激活。

[0233] 本公开也提供在患有疾病或紊乱的受试者中进行细胞免疫治疗的方法,其包括:施用在如本文描述的在诱导型启动子的控制下表达嵌合受体的淋巴细胞的组合物并施用药物。

[0234] 在一些供选择的方案中,药物是如本文描述的他莫昔芬、其变体、其衍生物、其药用盐、其溶剂合物和其水合物。在一些供选择的方案中,在施用组合物之前或在施用组合物时递送药物,或在组合物已经施用之后的时间点后递送药物。

[0235] 在一些供选择的方案中,与组合物一起施用药物,并且如果观察到组合物的毒性作用,取消药物直至毒性作用减小。在毒性症状减弱后,再次施用药物。在一些供选择的方案中,一旦毒性症状减弱,就可以再次施用药物。

[0236] 在一些供选择的方案中,与组合物一起施用药物,但是一旦肿瘤负荷或癌细胞减少,取消药物一段时间以使修饰的细胞休息,并且如果修饰的细胞没有活性,则不需要修饰的细胞,因为癌症已缓解。

[0237] 在其他供选择的方案中,方法包括:向受试者施用提供细胞免疫应答的遗传修饰的细胞毒性T淋巴细胞细胞制剂,其中细胞毒性T淋巴细胞细胞制剂包括具有嵌合受体的CD8+T细胞,所述嵌合受体包括在如本文描述的诱导型启动子的控制下的配体结合域、间隔区、跨膜域和胞内信号传导域,其中配体结合域对配体是特异性的,其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子,其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除;和/或向受试者施用遗传修饰的辅助T淋巴细胞细胞制剂,所述遗传修饰的辅助T淋巴细胞细胞制剂引起直接肿瘤识别和增强遗传修饰的细胞毒性T淋巴细胞细胞制剂介导细胞免疫应答的能力,其中辅助T淋巴细胞细胞制剂包括具有嵌合受体的CD4+T细胞,所述嵌合受体包括在如本文描述的组成型启动子或药物诱导型启动子的控制下的配体结合域、间隔区、跨膜域和胞内信号传导域,其中配体结合域对配体是特异性的,其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子,其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除;以及施用诱导诱导型启动子的药物。在一些供选择的方案中,施用药物在施用组合物或宿主细胞之后进行,其中施用进行1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、2周、4周或2个月,或列出的任意两个时间值之间的任意时间。

[0238] 在其他供选择的方案中,方法包括:向受试者施用提供细胞免疫应答的遗传修饰的细胞毒性T淋巴细胞细胞制剂,其中细胞毒性T淋巴细胞细胞制剂包括具有嵌合受体的CD8+T细胞,所述嵌合受体包括在如本文描述的组成型启动子的控制下的对肿瘤细胞表面分子特异的配体结合域、间隔区、跨膜域和胞内信号传导域;和/或向受试者施用遗传修饰的辅助T淋巴细胞细胞制剂,所述遗传修饰的辅助T淋巴细胞细胞制剂引起直接肿瘤识别和增强遗传修饰的细胞毒性T淋巴细胞细胞制剂介导细胞免疫应答的能力,其中辅助T淋巴细胞细胞制剂包括具有嵌合受体的CD4+T细胞,所述嵌合受体包括在如本文描述的组成型启动子或药物诱导型启动子的控制下的对肿瘤细胞表面分子特异的配体结合域、间隔区、跨膜域和胞内信号传导域;以及施用诱导诱导型启动子的药物。在一些供选择的方案中,肿瘤

特异性分子是肿瘤表面分子。

[0239] 在其他供选择的方案中,方法包括:向受试者施用提供细胞免疫应答的遗传修饰的细胞毒性T淋巴细胞细胞制剂,其中细胞毒性T淋巴细胞细胞制剂包括CD8+T细胞,所述CD8+T细胞在如本文描述的诱导型启动子的控制下表达细胞因子、趋化因子受体、调控凋亡的多肽和/或调节检查点信号传导的多肽;和/或遗传修饰的辅助T淋巴细胞细胞制剂,所述遗传修饰的辅助T淋巴细胞细胞制剂引起直接肿瘤识别和增强遗传修饰的细胞毒性T淋巴细胞细胞制剂介导细胞免疫应答的能力,其中辅助T淋巴细胞细胞制剂包括CD4+T细胞,所述CD4+T细胞在如本文描述的组成型启动子或药物诱导型启动子的控制下表达细胞因子、趋化因子受体、调控凋亡的多肽和/或调节检查点信号传导的多肽;以及施用诱导诱导型启动子的药物。在一些供选择的方案中,一个或多个细胞群在组成型启动子的控制下表达嵌合抗原受体。在一些供选择的方案中,检查点信号传导的调节抑制负检查点调控因子。在一些供选择的方案中,负检查点调控因子包括VISTA、LAG-3和/或TIM3。

[0240] 用于诱导的药物的有效量是在至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少100%或任意列出的百分比值之间的任意数目的转导细胞中提供诱导嵌合抗原受体的药物的量。

[0241] 另一种供选择的方案描述了对患有疾病或紊乱的受试者进行细胞免疫治疗的方法,所述方法包括:分析受试者的生物样品的与疾病或紊乱相关的靶分子存在,施用本文描述的过继免疫治疗组合物,以及施用诱导诱导型启动子的药物,其中嵌合受体特异性结合于靶分子。

[0242] 可以通过本发明治疗的受试者一般是人和其他灵长类受试者,如用于兽医学目的的猴子和猿类。受试者可以是雄性或雌性,并且可以是任何适当的年龄,包括婴幼儿、少年、青少年、成年和老年受试者。

[0243] 在治疗或抑制例如恶性血液肿瘤、黑色素瘤、乳腺癌、脑癌和其他上皮恶性肿瘤或实体瘤中,该方法是有用的。在一些供选择的方案中,与疾病或紊乱相关的分子是孤独酪氨酸激酶受体ROR1、Her2、EGFR、CE7、hB7H3、CD19、CD20、CD22、间皮素、CEA或乙型肝炎表面抗原。

[0244] 可以使用本文描述的方法处理的受试者包括鉴别或选择为具有癌症的受试者,所述癌症包括但不限于结肠癌、肺癌、肝癌、乳腺癌、肾癌、前列腺癌、卵巢癌、皮肤癌(包括黑色素瘤)、骨癌和脑癌等。可以通过临床评价或诊断评价进行这样的鉴别和/或选择。在一些供选择的方案中,肿瘤相关抗原或分子是已知的,如黑色素瘤、乳腺癌、脑癌、鳞状细胞癌、结肠癌、白血病、骨髓瘤和/或前列腺癌。在其他供选择的方案中,肿瘤相关分子可以被表达工程化嵌合受体的遗传修饰的T细胞靶向。例子包括但不限于B细胞淋巴瘤、乳腺癌、脑癌、前列腺癌和/或白血病。

[0245] 可以根据基于本公开对本领域技术人员来说显而易见的已知的技术或其变体在用于过继免疫治疗的方法和组合物中利用如上文制备的细胞。

[0246] 在一些供选择的方案中,通过以下方式配制细胞,即首先从细胞培养基中收获细胞,然后洗涤并在适于以治疗有效量施用的介质和容器系统(“药学上可接受的”载体)中浓缩细胞。适当的输注介质可以是等渗介质制剂,典型为生理盐水、Normosol R (Abbott) 或勃脉力A(Plasma-Lyte A) (Baxter),而且也可以利用5%葡萄糖的水溶液或乳酸林格氏液。可

以用人血清白蛋白、胎牛血清或其他人血清组分补充输注介质。

[0247] 在一些供选择的方案中,组合物中的细胞的治疗或抑制有效的量是转导的CD4或CD8细胞或至少2个细胞亚集(例如1个CD8+中枢记忆T细胞亚集和1个CD4+辅助T细胞亚集)或是更典型地大于 $10^2$ 个细胞以及高达 $10^6$ ,高达以及包括 $10^8$ 或 $10^9$ 个细胞,以及可以大于 $10^{10}$ 个细胞。细胞的数目如同组合物中包括的细胞的类型一样,将取决于组合物预期的最终用途。例如,如果对具体抗原特异的细胞是希望的,那么群体将含有大于70%,一般大于80%、85%和90-95%的这样的细胞。对本文提供的用途,细胞一般是以升或更少的体积计,可以是500ml或更少,甚至250ml或100ml或更少,或在任意两个列出的体积值之间的体积。因此希望的细胞的密度典型地大于 $10^4$ 个细胞/ml,以及一般为大于 $10^7$ 个细胞/ml,一般地 $10^8$ 个细胞/ml或更大。可以将临床相关数量的免疫细胞分配至多次输注物中,所述输注物累积地等于或超过 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$ 或 $10^{11}$ 个细胞或任意列出的值的任意两个端点之间定义的任意量的细胞。

[0248] 在一些供选择的方案中,本发明的淋巴细胞可用于对个体提供免疫。“免疫”的意思是与对病原体导致的感染或对淋巴细胞应答针对的肿瘤的应答相关的一个或多个身体症状的减少。施用的细胞的量通常在存在于对病原体具有免疫性的正常个体的范围内。因此,通常通过输注施用细胞,每次输注在2个细胞、高达 $10^6$ 至 $3 \times 10^{10}$ 个细胞的范围内,优选在至少 $10^7$ 至 $10^9$ 个细胞的范围内。通过单次输注或通过在一段时间内的多次输注施用T细胞。然而,因为预计不同个体在应答能力上的变化,输注的细胞的类型和量,以及多次输注给出的输注的数目和时间范围由主治医师确定并可以由常规检查确定。使用如本文例示的本发明的快速扩增方法容易获得充足水平的T淋巴细胞(包括细胞毒性T淋巴细胞和/或辅助T淋巴细胞)的代次。

[0249] 在一些供选择的方案中,将如本文描述的组合物经静脉内、腹腔内、瘤内、骨髓内、淋巴结内和/或脑脊髓液内施用于鉴别的或选择的受试者,如鉴别的或选择的患有黑色素瘤、乳腺癌、脑癌、鳞状细胞癌、结肠癌、白血病、骨髓瘤和/或前列腺癌的受试者。在一些供选择的方案中,将嵌合受体工程化的组合物递送至肿瘤部位。可供选择地,如本文描述的组合物可以与将细胞靶向至肿瘤或免疫系统隔室(immune system compartments)并避免如肺的部位的化合物组合。

[0250] 在一些供选择的方案中,将如本文描述的组合物与化学治疗剂和/或免疫抑制剂施用。在供选择的方案中,首先向患者施用抑制或破坏其他免疫细胞的化学治疗剂,随后施用本文描述的组合物。在一些情况下,可以完全避免化学治疗。

[0251] 在一些供选择的方案中,方法包括:与诱导剂(例如诱导性药物)组合施用如本文描述的修饰的T细胞,直到肿瘤负荷减小。一旦肿瘤负荷减少,可以取消诱导剂药物以便关闭嵌合抗原受体的表达并减少表达受体的T细胞的数目。在其他供选择的方案中,可以在不同的时间施用诱导剂药物,以便在肿瘤生长复发或增加的事件中,打开嵌合抗原受体的表达。

[0252] 在其他供选择的方案中,可以在数天、数周或数月内给予诱导剂药物,然后取消数天、数周或数月,随后在数天、数周或数月内重新施用诱导剂药物以使嵌合受体的表达循环以避免由于细胞的慢性刺激导致的无效性和无应答性。

[0253] 双包装慢病毒的载体构建和制备

[0254] 构建了编码7xHBD/mE1b-CD19t-her2t-T2A-epHIV7)的诱导型慢病毒载体。使用以下构建了CD19t特异性嵌合受体: (1) CD19特异性mAb FMC63的VL和VH链片段 (SEQ ID NO: 3), 其由(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>连接体 (SEQ ID NO:12) 肽 (VL-连接体-VH) 连接; (2) 仅源自IgG4-Fc铰链 (由 (SEQ ID NO:4) 编码的12个AA) 的间隔区。间隔区含有在位于天然IgG4-Fc蛋白的第108位的铰链域内的S→P置换; 人CD28的27个AA的跨膜域 (Uniprot数据库:P10747, (SEQ ID NO: 14)); (4) 信号传导组件, 包括 (i) 具有位于天然CD28蛋白的第186-187位的LL→GG置换的人CD28的41个AA的胞浆域 (SEQ ID NO:14); 和/或 (ii) 人4-1BB的42个AA的胞浆域 (Uniprot数据库:Q07011, (SEQ ID NO:15)); 连接于 (iii) 人CD3ζ的同种型3的112个AA的胞浆域 (Uniprot数据库:P20963, (SEQ ID NO:16))。

[0255] 编码CD19t的核酸序列与编码Her2t (SEQ ID NO:44) 的序列; 以及自切割T2A序列 (SEQ ID NO:8) 连接。

[0256] 构建了编码7xHBD/mEF1ap-ZsGreen-epHIV7的条件型慢病毒载体。合成启动子7xHBD/mEF1ap通过组合7个从人白蛋白启动子和huEF1α启动子TATA盒克隆的最小肝细胞核家族-1 (HNF1) 结合位点构建, 并具有序列 (SEQ ID NO:41)。以这种方法, 仅在他莫昔芬存在下HEA-3与7xHBD/EF1mp启动子的结合诱导转基因表达的“开”状态。

[0257] 构建了编码7xHBD/mEF1ap-CD19t--T2A-DHFRdm\_epHIV7的条件型慢病毒载体。构建CD19t特异性嵌合受体, 使用:

[0258] 构建了编码7xHBD/mE1b-CD19t-her2t-T2A-epHIV7)的条件型慢病毒载体。使用以下构建了CD19t特异性嵌合受体: (1) CD19特异性mAb FMC63的VL和VH链片段 (SEQ ID NO: 3), 其由(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>连接体 (SEQ ID NO:12) 肽 (VL-连接体-VH) 连接; (2) 仅源自IgG4-Fc铰链 (由 (SEQ ID NO:4) 编码的12个AA) 的间隔区。间隔区含有在位于天然IgG4-Fc蛋白的第108位的铰链域内的S→P置换; 人CD28的27个AA的跨膜域 (Uniprot数据库:P10747, (SEQ ID NO: 14)); (4) 信号传导组件, 包括 (i) 具有位于天然CD28蛋白的第186-187位的LL→GG置换的人CD28的41个AA的胞浆域 (SEQ ID NO:14); 和/或 (ii) 人4-1BB的42个AA的胞浆域 (Uniprot数据库:Q07011, (SEQ ID NO:15)); 连接于 (iii) 人CD3ζ的同种型3的112个AA的胞浆域 (Uniprot数据库:P20963, (SEQ ID NO:16))。

[0259] 编码CD19t的核酸序列与编码自切割T2A序列 (SEQ ID NO:8); 以及DHFRdm (SEQ ID NO:46) 连接。

[0260] 转录调控因子HEA-3是由人亚单位组成的嵌合转录因子, 所述人亚单位包括肝细胞核因子1-α (HNF-1α) 的N-末端DNA结合域, HNF-1α的N-末端DNA结合域框内融合 (fused in frame) 于雌激素受体配体结合域 (ER-LBD) 的突变的他莫昔芬特异性配体结合域, 所述突变的他莫昔芬特异性配体结合域反过来融合于NF-κB (p65) 的p65激活域。在他莫昔芬不存在下, 通过细胞溶胶热休克蛋白90 (HSP90) 与他莫昔芬结合活性位点的结合将HEA-3从核排除, 并且转基因表达处于“关”状态。纳摩尔浓度的细胞溶胶他莫昔芬积极地胜过HSP90, 与ER-LBD结合, 导致HEA-3迁移至核。在核迁移时, HEA-3可容易地用于结合其限制性合成的启动子。当将转基因放置在HEA-3应答合成启动子 (7xHBD/EF1mp) 后面时, 在他莫昔芬存在下获得对HEA-3的转录应答性。

[0261] 用连接于编码转录激活因子HEA3 (SEQ ID NO:39) 的多核苷酸和标记序列EGFRt (SEQ ID NO:9) 的组成型启动子EF-1α构建组成型构建体。

[0262] 合成编码每个转基因的人密码子优化的核苷酸序列(LifeTechnologies,卡尔斯巴德,CA)并使用NheI和Not1限制性位点克隆至epHIV7慢病毒载体中。epHIV7慢病毒载体通过用EF-1启动子替换pHIV7的巨细胞病毒启动子由pHIV7载体获得。

[0263] 使用Calphos转染试剂(Clontech)在用慢病毒载体和包装载体pCHGP-2、pCMV-Rev2和pCMV-G共转染的293T细胞中产生编码诱导型CD19嵌合受体的和组成型的慢病毒。转染16小时后更换培养基,24、48和72小时后收集慢病毒。

[0264] 当用他莫昔芬诱导时产生表达CD19嵌合受体和ZsGreen的Jurkat T细胞系

[0265] 在通过在32°C下在2,100rpm下离心45分钟激活后的第3天,用补充了1μg/mL聚凝胺(Millipore)的慢病毒上清(MOI=3)转导Jurkat细胞。在RPM1,10%人血清,2mM L-谷氨酰胺和1%青霉素-链霉素(CTL培养基)中扩增T细胞,每48小时补充重组人(rh)IL-2至终浓度为50U/mL。

[0266] 另外的供选择的方案

[0267] 在一些供选择的方案中,提供了用于诱导型表达嵌合抗原受体的系统,其中系统包括:a)第一核酸,包括可通过药物诱导的第一启动子,其中第一核酸可操作地连接于编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸,其中配体结合域对配体是特异性的,其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子,其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除;编码多肽间隔区的多核苷酸,其中间隔区是优化的编码跨膜域的多核苷酸;以及d)编码胞内信号传导域的多核苷酸;以及b)第二核酸,包括第二启动子,所述第二启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中,针对与参比嵌合受体相比应答配体的T细胞增殖和/或细胞因子产生的增加,间隔区是优化的。在一些供选择的方案中,药物是他莫昔芬和/或其代谢物。在一些供选择的方案中,第一启动子包括SEQ ID NO:41的核酸序列。在一些供选择的方案中,第二启动子是组成型启动子。在一些供选择的方案中,第二启动子是EF1αp。在一些供选择的方案中,转录激活因子包括SEQ ID NO:40的序列。在一些供选择的方案中,第一核酸进一步包括第一载体并且第二核酸进一步包括第二载体。在一些供选择的方案中,两种载体均被包装在病毒载体内。在一些供选择的方案中,病毒载体是慢病毒。在一些供选择的方案中,第一和第二核酸包括载体。在一些供选择的方案中,第一核酸进一步包括编码选择性标记的核酸序列。在一些供选择的方案中,第二核酸进一步包括编码选择性标记的核酸序列。

[0268] 在一些供选择的方案中,用于嵌合抗原受体的诱导型表达的系统包括:第一核酸,包括可通过药物诱导的第一启动子,其中第一核酸可操作地连接于编码细胞因子、趋化因子、调控凋亡的多肽和/或调节检查点信号传导的多肽的多核苷酸;以及第二核酸,包括第二启动子,所述第二启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中,第二启动子是组成型或诱导型。在示例性的供选择的方案中,第二核酸进一步包括在组成型启动子的控制下编码嵌合抗原受体的多核苷酸。

[0269] 在另一方面中,本公开提供了组合物以给予和/或提高细胞免疫治疗介导的免疫应答,如通过过继转移肿瘤特异性的、亚集特异性的遗传修饰的CD4+T细胞,其中CD4+T细胞给予和/或提高CD8+T细胞保持抗肿瘤反应性和提高肿瘤特异性增殖和/或使肿瘤特异性增殖最大化的能力。在一些供选择的方案中,CD4+细胞是遗传修饰的以在如本文描述的调控

启动子的控制下表达嵌合受体核酸和/或嵌合受体多肽。

[0270] 在另一方面中，本公开提供了组合物以给予和/或提高细胞免疫治疗介导的免疫应答，如通过过继转移肿瘤特异性的、亚集特异性的遗传修饰的CD8+T细胞。在一些供选择的方案中，CD8+T细胞在如本文描述的调控启动子的控制下表达嵌合受体核酸和/或嵌合受体多肽。

[0271] 在一种供选择的方案中，本发明提供了以下的方法：通过向受试者施用提供细胞免疫应答的遗传修饰的T淋巴细胞细胞制剂并施用诱导遗传修饰的T淋巴细胞中的转基因的药物，对患有疾病或紊乱的受试者进行细胞免疫治疗。

[0272] 在一些供选择的方案中，联合施用遗传修饰的CD8+和遗传修饰的CD4+细胞群。在一些供选择的方案中，T细胞是自体的或同种异体的T细胞。上文方法中的各种修饰是可能的。例如，由CD4+T细胞和CD8+T细胞表达的嵌合受体可以是相同的或不同的。

[0273] 在一些供选择的方案中，提供了用于嵌合抗原受体的诱导型表达的系统，其中系统包括：a) 第一核酸，包括可通过药物诱导的第一启动子，其中第一核酸可操作地连接于编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体结合域对配体是特异性的，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；编码跨膜域的多核苷酸；以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸；以及b) 第二核酸，包括第二启动子，所述第二启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型或诱导型。在一些供选择的方案中，药物是他莫昔芬和/或其代谢物。在一些供选择的方案中，第一启动子包括SEQ ID NO: 41的核酸序列。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型启动子。在一些供选择的方案中，第二启动子是EF1 $\alpha$ p。在一些供选择的方案中，转录激活因子包括SEQ ID NO: 40的序列。在一些供选择的方案中，第一核酸进一步包括第一载体并且第二核酸进一步包括第二载体。在一些供选择的方案中，两种载体均被包装在病毒载体内。在一些供选择的方案中，病毒载体是慢病毒。在一些供选择的方案中，第一和第二核酸包括载体。在一些供选择的方案中，第一核酸进一步包括编码选择性标记的核酸序列。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码选择性标记的核酸序列。在一些供选择的方案中，针对与参比嵌合受体相比应答配体的T细胞增殖和/或细胞因子产生的增加，间隔区是优化的。

[0274] 在一些供选择的方案中，提供了用于嵌合抗原受体的诱导型表达的系统，其中系统包括：a) 第一核酸，包括可通过药物诱导的第一启动子，其中第一核酸可操作地连接于编码细胞因子、趋化因子受体、调控细胞凋亡的多肽或调节检查点信号传导的多肽的多核苷酸；以及b) 第二核酸，包括第二启动子，所述第二启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中，调节检查点信号传导的多肽抑制负检查点调控因子。在一些供选择的方案中，负检查点调控因子包括VISTA、LAG-3和/或TIM3。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中，针对与参比嵌合受体相比应答配体的T细胞增殖和/或细胞因子产生的增加，间隔区是优化的；

编码跨膜域的多核苷酸。在一些供选择的方案中，第一启动子在第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中，配体结合域是抗体片段。在一些供选择的方案中，配体结合域是单链可变区片段。在一些供选择的方案中，肿瘤特异性分子是CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2或MAGE A3 TCR或其组合。在一些供选择的方案中，第二启动子是诱导型启动子或组成型启动子。

[0275] 在一些供选择的方案中，提供了嵌合受体多肽，其中通过系统编码嵌合受体多肽。在一些供选择的方案中，系统包括：a) 第一核酸，包括可通过药物诱导的第一启动子，其中第一核酸可操作地连接于编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体结合域对配体是特异性的，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除，编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；编码跨膜域的多核苷酸，以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸；以及b) 第二核酸，包括第二启动子，所述第二启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中，药物是他莫昔芬和/或其代谢物。在一些供选择的方案中，第一启动子包括SEQ ID N0:41的核酸序列。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型启动子。在一些供选择的方案中，第二启动子是EF1 $\alpha$ p。在一些供选择的方案中，转录激活因子包括SEQ ID N0:40的序列。在一些供选择的方案中，第一核酸进一步包括第一载体并且第二核酸进一步包括第二载体。在一些供选择的方案中，两种载体均被包装在病毒载体内。在一些供选择的方案中，病毒载体是慢病毒。在一些供选择的方案中，第一和第二核酸包括载体。在一些供选择的方案中，第一核酸进一步包括编码选择性标记的核酸序列。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码选择性标记的核酸序列。在一些供选择的方案中，系统包括：a) 第一核酸，包括可通过药物诱导的第一启动子，其中第一核酸可操作地连接于编码细胞因子、趋化因子受体、调控细胞凋亡的多肽或调节检查点信号传导的多肽的多核苷酸；以及b) 第二核酸，包括第二启动子，所述第二启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中，调节检查点信号传导的多肽抑制负检查点调控因子。在一些供选择的方案中，负检查点调控因子包括VISTA、LAG-3和/或TIM3。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；编码跨膜域的多核苷酸；以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中，针对与参比嵌合受体相比应答配体的T细胞增殖和/或细胞因子产生的增加，间隔区是优化的。在一些供选择的方案中，第一启动子在第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中，配体结合域是抗体片段。在一些供选择的方案中，肿瘤特异性分子选自由CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2和MAGE A3 TCR或其组合组成的组。在一些供选择的方案中，系统包括：a) 第一核酸，包括可通过药物诱导的第一启动子，其中第一核酸可操作地连接于编码细胞因子、趋化因子受体、调控细胞凋亡的多肽或调节检查点信号传导的多肽的多核苷酸；以及b) 第二核酸，包括第二组成型或诱导型启动子，所述第二组成型或诱导型启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中，调节检查点信号传导的多肽抑制负检查点调控因子。在一些供选择的方案

中，负检查点调控因子包括VISTA、LAG-3和/或TIM3。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中，针对与参比嵌合受体相比应答配体的T细胞增殖和/或细胞因子产生的增加，间隔区是优化的；编码跨膜域的多核苷酸。在一些供选择的方案中，第一启动子在第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中，配体结合域是抗体片段。在一些供选择的方案中，配体结合域是单链可变区片段。在一些供选择的方案中，肿瘤特异性分子选自由CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2和MAGE A3 TCR或其组合组成的组。在一些供选择的方案中，针对与参比嵌合受体相比应答配体的T细胞增殖和/或细胞因子产生的增加，间隔区是优化的。在一些供选择的方案中，第二启动子是诱导型启动子。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型启动子。

[0276] 在一些供选择的方案中，提供了宿主细胞，其中宿主细胞包括系统。在一些供选择的方案中，系统包括：a) 第一核酸，包括可通过药物诱导的第一启动子，其中第一核酸可操作地连接于编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体结合域对配体是特异性的，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除，编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；编码跨膜域的多核苷酸，以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸；以及b) 第二核酸，包括第二启动子，所述第二启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中，药物是他莫昔芬和/或其代谢物。在一些供选择的方案中，第一启动子包括SEQ ID NO:41的核酸序列。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型启动子。在一些供选择的方案中，第二启动子是EF1 $\alpha$ p。在一些供选择的方案中，转录激活因子包括SEQ ID NO:40的序列。在一些供选择的方案中，第一核酸进一步包括第一载体并且第二核酸进一步包括第二载体。在一些供选择的方案中，两种载体均被包装在病毒载体内。在一些供选择的方案中，病毒载体是慢病毒。在一些供选择的方案中，第一和第二核酸包括载体。在一些供选择的方案中，第一核酸进一步包括编码选择性标记的核酸序列。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码选择性标记的核酸。在一些供选择的方案中，系统包括：a) 第一核酸，包括可通过药物诱导的第一启动子，其中第一核酸可操作地连接于编码细胞因子、趋化因子受体、调控细胞凋亡的多肽或调节检查点信号传导的多肽的多核苷酸；以及b) 第二核酸，包括第二启动子，所述第二启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中，调节检查点信号传导的多肽抑制负检查点调控因子。在一些供选择的方案中，负检查点调控因子包括VISTA、LAG-3和/或TIM3。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；编码跨膜域的多核苷酸；以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中，针对与参比嵌合受体相比应答配体的T细胞增殖和/或细胞因子产生的增加，间隔区是优化的。在一些供选择的方案中，第一启动子在

第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中，配体结合域是抗体片段。在一些供选择的方案中，肿瘤特异性分子选自由CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2和MAGE A3 TCR或其组合组成的组。在一些供选择的方案中，系统包括：a) 第一核酸，包括可通过药物诱导的第一启动子，其中第一核酸可操作地连接于编码细胞因子、趋化因子受体、调控细胞凋亡的多肽或调节检查点信号传导的多肽的多核苷酸；以及b) 第二核酸，包括第二组成型或诱导型启动子，所述第二组成型或诱导型启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中，调节检查点信号传导的多肽抑制负检查点调控因子。在一些供选择的方案中，负检查点调控因子包括VISTA、LAG-3和/或TIM3。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中，针对与参比嵌合受体相比应答配体的T细胞增殖和/或细胞因子产生的增加，间隔区是优化的；编码跨膜域的多核苷酸。在一些供选择的方案中，第一启动子在第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中，配体结合域是抗体片段。在一些供选择的方案中，配体结合域是单链可变区片段。在一些供选择的方案中，肿瘤特异性分子选自由CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2和MAGE A3 TCR或其组合组成的组。在一些供选择的方案中，针对与参比嵌合受体相比应答配体的T细胞增殖和/或细胞因子产生的增加，间隔区是优化的。在一些供选择的方案中，第二启动子是诱导型启动子。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型启动子。在一些供选择的方案中，肿瘤特异性分子选自由CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2和MAGE A3 TCR或其组合组成的组。在一些供选择的方案中，宿主细胞是选自由初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和混合CD8+T细胞组成的组的CD8+T细胞毒性淋巴细胞。在一些供选择的方案中，宿主细胞是选自由初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和混合CD4+T细胞组成的组的CD4+T辅助淋巴细胞。在一些供选择的方案中，针对与参比嵌合受体相比应答配体的T细胞增殖和/或细胞因子产生的增加，间隔区是优化的。在一些供选择的方案中，宿主细胞是前体T细胞。在一些供选择的方案中，前体T细胞是造血干细胞。

[0277] 在一些供选择的方案中，提供了组合物，其中组合物包含在药学上可接受的赋形剂中的宿主细胞。在一些供选择的方案中，宿主细胞包括系统。在一些供选择的方案中，系统包括：a) 第一核酸，包括可通过药物诱导的第一启动子，其中第一核酸可操作地连接于编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体结合域对配体是特异性的，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除，编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；编码跨膜域的多核苷酸，以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸；以及b) 第二核酸，包括第二启动子，所述第二启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中，药物是他莫昔芬和/或其代谢物。在一些供选择的方案中，第一启动子包括SEQ ID NO:41的核酸序列。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型启动子。在一些供选择的方案中，第二启动子是EF1ap。在一些供选择的方案中，转录激

活因子包括SEQ ID NO:40的序列。在一些供选择的方案中，第一核酸进一步包括第一载体并且第二核酸进一步包括第二载体。在一些供选择的方案中，两种载体均被包装在病毒载体内。在一些供选择的方案中，病毒载体是慢病毒。在一些供选择的方案中，第一和第二核酸包括载体。在一些供选择的方案中，第一核酸进一步包括编码选择性标记的核酸序列。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码选择性标记的核酸序列。在一些供选择的方案中，系统包括：a) 第一核酸，包括可通过药物诱导的第一启动子，其中第一核酸可操作地连接于编码细胞因子、趋化因子受体、调控细胞凋亡的多肽或调节检查点信号传导的多肽的多核苷酸；以及b) 第二核酸，包括第二启动子，所述第二启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中，调节检查点信号传导的多肽抑制负检查点调控因子。在一些供选择的方案中，负检查点调控因子包括VISTA、LAG-3和/或TIM3。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；编码跨膜域的多核苷酸；以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中，针对与参比嵌合受体相比应答配体的T细胞增殖和/或细胞因子产生的增加，间隔区是优化的。在一些供选择的方案中，第一启动子在第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中，配体结合域是抗体片段。在一些供选择的方案中，肿瘤特异性分子选自由CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2和MAGE A3 TCR或其组合组成的组。在一些供选择的方案中，系统包括：a) 第一核酸，包括可通过药物诱导的第一启动子，其中第一核酸可操作地连接于编码细胞因子、趋化因子受体、调控细胞凋亡的多肽或调节检查点信号传导的多肽的多核苷酸；以及b) 第二核酸，包括第二组成型或诱导型启动子，所述第二组成型或诱导型启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中，调节检查点信号传导的多肽抑制负检查点调控因子。在一些供选择的方案中，负检查点调控因子包括VISTA、LAG-3和/或TIM3。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中，针对与参比嵌合受体相比应答配体的T细胞增殖和/或细胞因子产生的增加，间隔区是优化的；编码跨膜域的多核苷酸。在一些供选择的方案中，第一启动子在第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中，配体结合域是抗体片段。在一些供选择的方案中，配体结合域是单链可变区片段。在一些供选择的方案中，肿瘤特异性分子选自由CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2和MAGE A3 TCR或其组合组成的组。在一些供选择的方案中，针对与参比嵌合受体相比应答配体的T细胞增殖和/或细胞因子产生的增加，间隔区是优化的。在一些供选择的方案中，第二启动子是诱导型启动子。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型启动子。在一些供选择的方案中，宿主细胞是选自由初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和混合CD8+T细胞组成的组的CD8+T细胞毒性淋巴细胞。在一些供选择的方案中，宿主细胞是选自由初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和混合

CD4+T细胞组成的组的CD4+T辅助淋巴细胞。在一些供选择的方案中,组合物包含宿主细胞,其中宿主细胞是选自由初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和混合CD8+T细胞组成的组的CD8+T细胞毒性淋巴细胞;并进一步包括其他宿主细胞,其中宿主细胞是选自由初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和混合CD4+T细胞组成的组的CD4+T辅助淋巴细胞。在一些供选择的方案中,组合物包含宿主细胞,其中宿主细胞是选自由初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和混合CD8+T细胞组成的组的CD8+T细胞毒性淋巴细胞,或选自由初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和混合CD4+T细胞组成的组的CD4+T辅助淋巴细胞;以及第二宿主细胞,其中第二宿主细胞是前体T细胞。在一些供选择的方案中,前体T细胞是造血干细胞。

[0278] 在一些供选择的方案中,提供了用于制备宿主细胞的体外方法,其中方法包括:a) 提供系统以及b) 将系统引入单独分离的T淋巴细胞群并在体外扩增每个T淋巴细胞群。在一些供选择的方案中,系统包括:a) 第一核酸,包括可通过药物诱导的第一启动子,其中第一核酸可操作地连接于编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸,其中配体结合域对配体是特异性的,其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子,其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除;编码多肽间隔区的多核苷酸,其中间隔区是优化的;编码跨膜域的多核苷酸;以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸;以及b) 第二核酸,包括第二启动子,所述第二启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中,药物是他莫昔芬和/或其代谢物。在一些供选择的方案中,第一启动子包括SEQ ID NO:41的核酸序列。在一些供选择的方案中,第二启动子是组成型启动子。在一些供选择的方案中,第二启动子是EF1 $\alpha$ p。在一些供选择的方案中,转录激活因子包括SEQ ID NO:40的序列。在一些供选择的方案中,第一核酸进一步包括第一载体并且第二核酸进一步包括第二载体。在一些供选择的方案中,两种载体均被包装在病毒载体内。在一些供选择的方案中,病毒载体是慢病毒。在一些供选择的方案中,第一和第二核酸包括载体。在一些供选择的方案中,第一核酸进一步包括编码选择性标记的核酸序列。在一些供选择的方案中,第二核酸进一步包括编码选择性标记的核酸序列。在一些供选择的方案中,系统包括:a) 第一核酸,包括可通过药物诱导的第一启动子,其中第一核酸可操作地连接于编码细胞因子、趋化因子受体、调控细胞凋亡的多肽或调节检查点信号传导的多肽的多核苷酸;以及b) 第二核酸,包括第二启动子,所述第二启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中,调节检查点信号传导的多肽抑制负检查点调控因子。在一些供选择的方案中,负检查点调控因子包括VISTA、LAG-3和/或TIM3。在一些供选择的方案中,第二核酸进一步包括编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸,其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子,其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除;编码多肽间隔区的多核苷酸,其中间隔区是优化的;编码跨膜域的多核苷酸;以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中,针对与参比嵌合受体相比应答配体的T细胞增殖和/或细胞因子产生的增加,间隔区是优化的。在一些供选择的方案中,第一启动子在第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中,配体结合域是抗体片段。在一些供选择的方案中,肿瘤特异性分子选自由CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2和MAGE A3 TCR或其组合组成的组。在一些供

选择的方案中,系统包括:a) 第一核酸,包括可通过药物诱导的第一启动子,其中第一核酸可操作地连接于编码细胞因子、趋化因子受体、调控细胞凋亡的多肽或调节检查点信号传导的多肽的多核苷酸;以及b) 第二核酸,包括第二组成型或诱导型启动子,所述第二组成型或诱导型启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中,调节检查点信号传导的多肽抑制负检查点调控因子。在一些供选择的方案中,负检查点调控因子包括VISTA、LAG-3和/或TIM3。在一些供选择的方案中,第二核酸进一步包括编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸,其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子,其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除;编码多肽间隔区的多核苷酸,其中间隔区是优化的;以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中,针对与参比嵌合受体相比应答配体的T细胞增殖和/或细胞因子产生的增加,间隔区是优化的;编码跨膜域的多核苷酸。在一些供选择的方案中,第一启动子在第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中,配体结合域是抗体片段。在一些供选择的方案中,配体结合域是单链可变区片段。在一些供选择的方案中,肿瘤特异性分子选自由CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2和MAGE A3 TCR或其组合组成的组。在一些供选择的方案中,针对与参比嵌合受体相比应答配体的T细胞增殖和/或细胞因子产生的增加,间隔区是优化的。在一些供选择的方案中,第二启动子是诱导型启动子。在一些供选择的方案中,第二启动子是组成型启动子。在一些供选择的方案中,其中T淋巴细胞是扩增的,方法进一步包括:在抗CD3和/或抗CD28和至少一种体内稳态细胞因子的存在下培养细胞,直到细胞扩增充分以用于用作细胞输注物。在一些供选择的方案中,淋巴细胞是CD8+或CD4+的淋巴细胞。在一些供选择的方案中,细胞是前体T细胞。在一些供选择的方案中,细胞是造血干细胞。在一些供选择的方案中,组合物包含宿主细胞,其中宿主细胞是选自由初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和混合CD8+T细胞组成的组的CD8+T细胞毒性淋巴细胞,或选自由初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和混合CD4+T细胞组成的组的CD4+T辅助淋巴细胞;以及第二宿主细胞,其中第二宿主细胞是前体T细胞。在一些供选择的方案中,前体T细胞是造血干细胞。

[0279] 在一些供选择的方案中,提供了宿主细胞或组合物与诱导转基因在宿主细胞或组合物中的表达的药物组合用于治疗癌症或病毒感染的用途。在一些供选择的方案中,宿主细胞包括系统。在一些供选择的方案中,系统包括:a) 第一核酸,包括可通过药物诱导的第一启动子,其中第一核酸可操作地连接于编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸,其中配体结合域对配体是特异性的,其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子,其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除,码多肽间隔区的多核苷酸,其中间隔区是优化的;编码跨膜域的多核苷酸;以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸;以及b) 第二核酸,包括第二启动子,所述第二启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中,药物是他莫昔芬和/或其代谢物。在一些供选择的方案中,第一启动子包括SEQ ID NO:41的核酸序列。在一些供选择的方案中,第二启动子是组成型启动子。在一些供选择的方案中,第二启动子是EF1 $\alpha$ p。在一些供选择的方案中,转录激活因子包括SEQ ID NO:40的序列。在一些供选择的方案中,第一核酸进一步包括第一载体并且第二核酸进一步包括第二载体。在一些

供选择的方案中，两种载体均被包装在病毒载体内。在一些供选择的方案中，病毒载体是慢病毒。在一些供选择的方案中，第一和第二核酸包括载体。在一些供选择的方案中，第一核酸进一步包括编码选择性标记的核酸序列。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码选择性标记的核酸序列。在一些供选择的方案中，系统包括：a) 第一核酸，包括可通过药物诱导的第一启动子，其中第一核酸可操作地连接于编码细胞因子、趋化因子受体、调控细胞凋亡的多肽或调节检查点信号传导的多肽的多核苷酸；以及b) 第二核酸，包括第二组成型或诱导型启动子，所述第二组成型或诱导型启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中，调节检查点信号传导的多肽抑制负检查点调控因子。在一些供选择的方案中，负检查点调控因子包括VISTA、LAG-3和/或TIM3。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；编码跨膜域的多核苷酸；以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中，针对与参比嵌合受体相比应答配体的T细胞增殖和/或细胞因子产生的增加，间隔区是优化的。在一些供选择的方案中，第一启动子在第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中，配体结合域是抗体片段。在一些供选择的方案中，肿瘤特异性分子选自由CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2和MAGE A3 TCR或其组合组成的组。在一些供选择的方案中，系统包括：a) 第一核酸，包括可通过药物诱导的第一启动子，其中第一核酸可操作地连接于编码细胞因子、趋化因子受体、调控细胞凋亡的多肽或调节检查点信号传导的多肽的多核苷酸；以及b) 第二核酸，包括第二组成型或诱导型启动子，所述第二组成型或诱导型启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中，调节检查点信号传导的多肽抑制负检查点调控因子。在一些供选择的方案中，负检查点调控因子包括VISTA、LAG-3和/或TIM3。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中，针对与参比嵌合受体相比应答配体的T细胞增殖和/或细胞因子产生的增加，间隔区是优化的；编码跨膜域的多核苷酸。在一些供选择的方案中，第一启动子在第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中，配体结合域是抗体片段。在一些供选择的方案中，配体结合域是单链可变区片段。在一些供选择的方案中，肿瘤特异性分子选自由CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2和MAGE A3 TCR或其组合组成的组。在一些供选择的方案中，针对与参比嵌合受体相比应答配体的T细胞增殖和/或细胞因子产生的增加，间隔区是优化的。在一些供选择的方案中，第二启动子是诱导型启动子。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型启动子。在一些供选择的方案中，宿主细胞是选自由初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和混合CD8+T细胞组成的组的CD8+T细胞毒性淋巴细胞。在一些供选择的方案中，宿主细胞是选自由初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和混合CD4+T细胞组成的组的CD4+T辅助淋巴细胞。在一些供选择的方案中，组合物包含在药学上可接受的赋形剂

中的宿主细胞。在一些供选择的方案中，宿主细胞包括系统。在一些供选择的方案中，系统包括：a) 第一核酸，包括可通过药物诱导的第一启动子，其中第一核酸可操作地连接于编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体结合域对配体是特异性的，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；编码跨膜域的多核苷酸；以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸；以及b) 第二核酸，包括第二启动子，所述第二启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型或诱导型。在一些供选择的方案中，药物是他莫昔芬和/或其代谢物。在一些供选择的方案中，第一启动子包括SEQ ID NO: 41的核酸序列。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型启动子。在一些供选择的方案中，第二启动子是EF1 $\alpha$ p。在一些供选择的方案中，转录激活因子包括SEQ ID NO: 40的序列。在一些供选择的方案中，第一核酸进一步包括第一载体并且第二核酸进一步包括第二载体。在一些供选择的方案中，两种载体均被包装在病毒载体内。在一些供选择的方案中，病毒载体是慢病毒。在一些供选择的方案中，第一和第二核酸包括载体。在一些供选择的方案中，第一核酸进一步包括编码选择性标记的核酸序列。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体结合域对配体是特异性的，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；编码跨膜域的多核苷酸；以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中，第一启动子在第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中，配体结合域是抗体片段。在一些供选择的方案中，肿瘤特异性分子选自由CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2和MAGE A3 TCR或其组合组成的组。在一些供选择的方案中，系统包括：a) 第一核酸，包括可通过药物诱导的第一启动子，其中第一核酸可操作地连接于编码细胞因子、趋化因子受体、调控细胞凋亡的多肽或调节检查点信号传导的多肽的多核苷酸；以及b) 第二核酸，包括第二启动子，所述第二启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型或诱导型。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体结合域对配体是特异性的，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；编码跨膜域的多核苷酸；以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中，第一启动子在第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中，配体结合域是抗体片段。在一些供选择的方案中，配体结合域是单链可变区片段。在一些供选择的方案中，肿瘤特异性分子选自由CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2和MAGE A3 TCR或其组合组成的组。在一些供选择的方案中，宿主细胞是前体T细胞。在一些供选择的方案中，前体T细胞是造血干细胞。在一些供选择的方案中，分离的T淋巴细胞群包括前体T细胞。在一些供选择的方案中，前体T细胞是造血干细胞。在一些供选择的方案中，宿主细胞是选自由初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和

混合CD8+T细胞组成的组的CD8+T细胞毒性淋巴细胞。在一些供选择的方案中，宿主细胞是选自由初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和混合CD4+T细胞组成的组的CD4+T辅助淋巴细胞。在一些供选择的方案中，组合物包含宿主细胞，其中宿主细胞是选自由初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和混合CD8+T细胞组成的组的CD8+T细胞毒性淋巴细胞；和另一种宿主细胞，其中，宿主细胞是选自由初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和混合CD4+T细胞组成的组的CD4+T辅助淋巴细胞。在一些供选择的方案中，癌症是实体瘤或恶性血液肿瘤。在一些供选择的方案中，实体瘤选自由乳腺癌、脑癌、肺癌、结肠癌、肾癌、胰腺癌、前列腺癌和卵巢癌组成的组。在一些供选择的方案中，组合物包含宿主细胞，其中宿主细胞是选自由初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和混合CD8+T细胞组成的组的CD8+T细胞毒性淋巴细胞，或选自由初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和混合CD4+T细胞组成的组的CD4+T辅助淋巴细胞；以及第二宿主细胞，其中第二宿主细胞是前体T细胞。在一些供选择的方案中，前体T细胞是造血干细胞。

[0280] 在一些供选择的方案中，提供了对患有癌症和病毒感染的受试者进行细胞免疫治疗的方法，其中方法包括：将组合物或宿主细胞施用于受试者并施用诱导转基因在组合物或宿主细胞中表达的药物。在一些供选择的方案中，宿主细胞包括系统。在一些供选择的方案中，系统包括：a) 第一核酸，包括可通过药物诱导的第一启动子，其中第一核酸可操作地连接于编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体结合域对配体是特异性的，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除，编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；编码跨膜域的多核苷酸；以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸；以及b) 第二核酸包括第二启动子，所述第二启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中，药物是他莫昔芬和/或其代谢物。在一些供选择的方案中，第一启动子包括SEQ ID NO:41的核酸序列。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型启动子。在一些供选择的方案中，第二启动子是EF1 $\alpha$ p。在一些供选择的方案中，转录激活因子包括SEQ ID NO:40的序列。在一些供选择的方案中，第一核酸进一步包括第一载体并且第二核酸进一步包括第二载体。在一些供选择的方案中，两种载体均被包装在病毒载体内。在一些供选择的方案中，病毒载体是慢病毒。在一些供选择的方案中，第一和第二核酸包括载体。在一些供选择的方案中，第一核酸进一步包括编码选择性标记的核酸序列。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码选择性标记的核酸序列。在一些供选择的方案中，系统包括：a) 第一核酸，包括可通过药物诱导的第一启动子，其中第一核酸可操作地连接于编码细胞因子、趋化因子受体、调控细胞凋亡的多肽或调节检查点信号传导的多肽的多核苷酸；以及b) 第二核酸，包括第二启动子，所述第二启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中，调节检查点信号传导的多肽抑制负检查点调控因子。在一些供选择的方案中，负检查点调控因子包括VISTA、LAG-3和/或TIM3。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；编码跨膜域的多核苷酸；以及d) 编码胞内信号传导

域的多核苷酸。在一些供选择的方案中,针对与参比嵌合受体相比应答配体的T细胞增殖和/或细胞因子产生的增加,间隔区是优化的。在一些供选择的方案中,第一启动子在第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中,配体结合域是抗体片段。在一些供选择的方案中,肿瘤特异性分子选自由CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2和MAGE A3 TCR或其组合组成的组。在一些供选择的方案中,系统包括:a) 第一核酸,包括可通过药物诱导的第一启动子,其中第一核酸可操作地连接于编码细胞因子、趋化因子受体、调控细胞凋亡的多肽或调节检查点信号传导的多肽的多核苷酸;以及b) 第二核酸,包括第二组成型或诱导型启动子,所述第二组成型或诱导型启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中,调节检查点信号传导的多肽抑制负检查点调控因子。在一些供选择的方案中,负检查点调控因子包括VISTA、LAG-3和/或TIM3。在一些供选择的方案中,第二核酸进一步包括编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸,其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子,其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除;编码多肽间隔区的多核苷酸,其中间隔区是优化的;以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中,针对与参比嵌合受体相比应答配体的T细胞增殖和/或细胞因子产生的增加,间隔区是优化的;编码跨膜域的多核苷酸。在一些供选择的方案中,第一启动子在第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中,配体结合域是抗体片段。在一些供选择的方案中,配体结合域是单链可变区片段。在一些供选择的方案中,肿瘤特异性分子选自由CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2和MAGE A3 TCR或其组合组成的组。在一些供选择的方案中,针对与参比嵌合受体相比应答配体的T细胞增殖和/或细胞因子产生的增加,间隔区是优化的。在一些供选择的方案中,第二启动子是诱导型启动子。在一些供选择的方案中,第二启动子是组成型启动子。在一些供选择的方案中,宿主细胞是前体T细胞。在一些供选择的方案中,宿主细胞是造血干细胞。在一些供选择的方案中,宿主细胞是选自由初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和混合CD8+T细胞组成的组的CD8+T细胞毒性淋巴细胞。在一些供选择的方案中,宿主细胞是选自由初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和混合CD4+T细胞组成的组的CD4+T辅助淋巴细胞。在一些供选择的方案中,组合物包含在药学上可接受的赋形剂中的宿主细胞。在一些供选择的方案中,宿主细胞包括系统。在一些供选择的方案中,系统包括:a) 第一核酸,包括可通过药物诱导的第一启动子,其中第一核酸可操作地连接于编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸,其中配体结合域对配体是特异性的,其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子,其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除;编码多肽间隔区的多核苷酸,其中间隔区是优化的;编码跨膜域的多核苷酸;以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸;以及b) 第二核酸,包括第二启动子,所述第二启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中,第二启动子是组成型或诱导型。在一些供选择的方案中,药物是他莫昔芬和/或其代谢物。在一些供选择的方案中,第一启动子包括SEQ ID NO:41的核酸序列。在一些供选择的方案中,第二启动子是组成型启动子。在一些供选择的方案中,第二启动子是EF1 $\alpha$ p。在一些供选择的方案中,转录激活因子包括SEQ ID NO:40的序列。在一些供选择的方案中,第一核酸进一步包括第一载体并且第二核

酸进一步包括第二载体。在一些供选择的方案中，两种载体均被包装在病毒载体内。在一些供选择的方案中，病毒载体是慢病毒。在一些供选择的方案中，第一和第二核酸包括载体。在一些供选择的方案中，第一核酸进一步包括编码选择性标记的核酸序列。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码选择性标记的核酸序列。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体结合域对配体是特异性的，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；编码跨膜域的多核苷酸；以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中，第一启动子在第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中，配体结合域是抗体片段。在一些供选择的方案中，肿瘤特异性分子选自由CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2和MAGE A3 TCR或其组合组成的组。在一些供选择的方案中，系统包括：a) 第一核酸，包括可通过药物诱导的第一启动子，其中第一核酸可操作地连接于编码细胞因子、趋化因子受体、调控细胞凋亡的多肽或调节检查点信号传导的多肽的多核苷酸；以及b) 第二核酸，包括第二启动子，所述第二启动子可操作地连接于编码用于诱导型启动子的转录激活因子的核酸。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型或诱导型。在一些供选择的方案中，调节检查点信号传导的多肽抑制负检查点调控因子。在一些供选择的方案中，负检查点调控因子包括VISTA、LAG-3和/或TIM3。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码包括配体结合域的嵌合抗原受体的多核苷酸，其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或任意其他表达于靶细胞群上的分子，其中配体可以引起由淋巴细胞进行的识别、调节、抑制和/或消除；编码多肽间隔区的多核苷酸，其中间隔区是优化的；编码跨膜域的多核苷酸；以及d) 编码胞内信号传导域的多核苷酸。在一些供选择的方案中，第一启动子在第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中，配体结合域是抗体片段。在一些供选择的方案中，配体结合域是单链可变区片段。在一些供选择的方案中，肿瘤特异性分子选自由CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2和MAGE A3 TCR或其组合组成的组。在一些供选择的方案中，宿主细胞是前体T细胞。在一些供选择的方案中，宿主细胞是造血干细胞。在一些供选择的方案中，宿主细胞是选自由初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和混合CD8+T细胞组成的组的CD8+T细胞毒性淋巴细胞。在一些供选择的方案中，宿主细胞是选自由初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和混合CD4+T细胞组成的组的CD4+T辅助淋巴细胞。在一些供选择的方案中，组合物包含宿主细胞，其中宿主细胞是选自由初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和混合CD8+T细胞组成的组的CD8+T细胞毒性淋巴细胞；以及另一种宿主细胞，其中宿主细胞是选自由初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和混合CD4+T细胞组成的组的CD4+T辅助淋巴细胞。在一些供选择的方案中，癌症选自实体瘤或恶性血液肿瘤。在一些供选择的方案中，实体瘤选自由乳腺癌、脑癌、肺癌、结肠癌、肾癌、胰腺癌、前列腺癌和卵巢癌组成的组。在一些供选择的方案中，宿主细胞是前体T细胞。在一些供选择的方案中，前体T细胞是造血干细胞。在一些供选择的方案中，分离的T淋巴细胞群包括前体T细胞。在一些供选择的方案中，前体T细胞是造血干细胞。在一些供选择的方案中，组合物包含宿主细胞，其中宿主细胞是选自由初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和

混合CD8+T细胞组成的组的CD8+T细胞毒性淋巴细胞,或选自由初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和混合CD4+T细胞组成的组的CD4+T辅助淋巴细胞;以及第二宿主细胞,其中第二宿主细胞是前体T细胞。在一些供选择的方案中,前体T细胞是造血干细胞。

[0281] 更多供选择的方案

[0282] 在一些供选择的方案中,提供了用于嵌合抗原受体的诱导型表达的系统,其中系统包括:a)第一核酸,包括第一启动子,所述第一启动子是可操作地连接于编码嵌合抗原受体的多核苷酸的诱导型启动子;以及b)第二核酸,包括第二启动子,所述第二启动子可操作地连接于编码转录激活因子的多核苷酸,所述转录激活因子能够在药物或其代谢物存在下从第一启动子激活转录。在一些供选择的方案中,提供了用于诱导型表达的系统,其中系统包括:a)诱导型启动子,b)编码嵌合抗原受体的多核苷酸和c)编码转录激活因子的多核苷酸,所述转录激活因子能够在药物或其代谢物存在下从诱导型启动子激活转录。在一些供选择的方案中,编码嵌合受体的多核苷酸可操作地连接于诱导型启动子。在一些供选择的方案中,系统进一步包括编码重组蛋白的多核苷酸,所述多核苷酸可操作地连接于诱导型启动子。在一些供选择的方案中,药物或其代谢物包括:(i)当每天一次或每周一次施用于人受试者时耐受的药物或其代谢物;(ii)特异性结合于人受体,任选为雌激素受体的分子,或其代谢物;和/或(iii)他莫昔芬和/或他莫昔芬的代谢物或类似物。在一些供选择的方案中,转录激活因子包括:(a)DNA结合域;(b)特异性结合于药物或其代谢物的配体结合域;和(c)反式激活域,其任选地以该顺序连接和/或融合。在系统的一些供选择的方案中,(a)DNA结合域包括在淋巴细胞中天然表达的蛋白中不存在或在T细胞中天然表达的蛋白中不存在的DNA结合位点;和/或(b)药物或代谢物是特异性结合于任选地是雌激素受体的人受体的分子或其代谢物,并且药物或代谢物与配体结合域之间的结合对配体结合域有超越人受体的选择性,从而由配体结合域与药物或代谢物的结合更强大,任选地是人受体的结合的至少1.5、2、3或4倍;和/或(c)反式激活域包括p65反式激活域或其功能性变体;和/或(d)第一启动子包括DNA结合域的一个或多个结合位点。在一些供选择的方案中,第一启动子不包括除了存在于转录激活因子中的DNA结合域或多个DNA结合域以外的任意人DNA结合域的另一个结合位点;和/或其中第一启动子是合成嵌合启动子和/或转录激活因子是合成嵌合转录激活因子;和/或其中DNA结合域包括存在于任选为HNF1- $\alpha$ 或HNF1- $\beta$ 的肝细胞核因子中的DNA结合域。在系统的一些供选择的方案中,第一启动子包括SEQ ID NO:41的核酸序列。在一些供选择的方案中,第二启动子是组成型启动子。在一些供选择的方案中,第二启动子是或包括EF1 $\alpha$ 启动子或其功能性部分。在一些供选择的方案中,转录激活因子包括具有SEQ ID NO:40的序列的多肽。在一些供选择的方案中,第一核酸被包括于第一载体中,第一载体进一步被系统包括,以及第二核酸被包括于第二载体中,第二载体进一步被系统包括。在一些供选择的方案中,第一核酸和第二核酸或第一启动子、编码嵌合抗原受体的多核苷酸、第二启动子和编码反式激活剂的多核苷酸被包括于载体中,载体进一步被系统包括。在系统的一些供选择的方案中,系统被包括在单个病毒包装载体中。在一些供选择的方案中,病毒载体是慢病毒载体。在一些供选择的方案中,第一核酸进一步包括编码选择性标记的核酸序列或其中系统进一步包括选择性标记,所述选择性标记可操作地连接于第一启动子。在一些供选择的方案中,第二核酸进一步包括编码选择性标记的核酸或其中系统进一步包括

选择性标记,所述选择性标记可操作地连接于第二启动子。

[0283] 在一些供选择的方案中,提供了用于诱导型表达的系统,其中系统包括:a) 第一核酸,包括第一启动子,所述第一启动子是诱导型启动子并可操作地连接于编码细胞因子、趋化因子受体、抑制凋亡的多肽或抑制负检查点信号传导的多肽的多核苷酸;以及b) 第二核酸,包括第二启动子,所述第二启动子是组成型或诱导型启动子,该第二启动子可操作地连接于编码转录激活因子的多核苷酸,所述转录激活因子能够在药物或其代谢物或类似物的存在下诱导从第一启动子转录。在一些供选择的方案中,第二核酸进一步包括编码任选地是嵌合抗原受体的重组抗原受体的多核苷酸。在一些供选择的方案中,嵌合抗原受体包括:a) 配体结合域,其结合于任选地是肿瘤特异性分子、病毒分子或表达于靶细胞群上的任意其他分子的配体,所述靶细胞群适合于介导由淋巴细胞进行的识别和消除,b) 多肽间隔区,其中间隔区任选地提供与参照嵌合受体相比增加的应答配体的T细胞增殖/细胞因子产生,c) 跨膜域以及d) 胞内信号传导域。在一些供选择的方案中,第一启动子在第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中,配体结合域是抗体片段。在一些供选择的方案中,配体结合域是单链可变区片段。在一些供选择的方案中,肿瘤特异性分子选自由CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2、MAGE A3 TCR和其组合组成的组。

[0284] 在一些供选择的方案中,提供了由系统编码的多肽。在一些供选择的方案中,系统包括:a) 第一核酸,包括第一启动子,所述第一启动子是可操作地连接于编码嵌合抗原受体的多核苷酸的诱导型启动子;以及b) 第二核酸,包括第二启动子,所述第二启动子可操作地连接于编码转录激活因子的多核苷酸,所述转录激活因子能够在药物或其代谢物的存在下从第一启动子激活转录。在一些供选择的方案中,提供了用于诱导型表达的系统,其中系统包括:a) 诱导型启动子,b) 编码嵌合抗原受体的多核苷酸,以及c) 编码转录激活因子的多核苷酸,所述转录激活因子能够在药物或其代谢物的存在下从诱导型启动子激活转录。在一些供选择的方案中,编码嵌合受体的多核苷酸可操作地连接于诱导型启动子。在一些供选择的方案中,系统进一步包括编码重组蛋白的多核苷酸,所述多核苷酸可操作地连接于诱导型启动子。在一些供选择的方案中,药物或其代谢物包括:(i) 当每天一次或每周一次施用于人受试者时耐受的药物或其代谢物;(ii) 特异性结合于人受体,任选为雌激素受体的分子,或其代谢物;和/或(iii) 他莫昔芬和/或他莫昔芬的代谢物或类似物。在一些供选择的方案中,转录激活因子包括:(a) DNA结合域;(b) 特异性结合于药物或其代谢物的配体结合域;和(c) 反式激活域,其任选地以该顺序连接和/或融合。在系统的一些供选择的方案中,(a) DNA结合域包括在淋巴细胞中天然表达的蛋白中不存在或在T细胞中天然表达的蛋白中不存在的DNA结合位点;和/或(b) 药物或代谢物是特异性结合于任选地是雌激素受体的人受体的分子或其代谢物,并且药物或代谢物与配体结合域之间的结合对配体结合域有超越人受体的选择性,从而由配体结合域与药物或代谢物的结合更强大,任选地是人受体的结合的至少1.5、2、3或4倍;和/或(c) 反式激活域包括p65反式激活域或其功能性变体;和/或(d) 第一启动子包括DNA结合域的一个或多个结合位点。在一些供选择的方案中,第一启动子不包括除了存在于转录激活因子中的DNA结合域或多个DNA结合域以外的任一人DNA结合域的另一个结合位点;和/或其中第一启动子是合成嵌合启动子和/或转录激活因子是合成嵌合转录激活因子;和/或其中DNA结合域包括存在于任选为HNF1- $\alpha$ 或HNF1- $\beta$ 的肝细胞

核因子中的DNA结合域。根据本发明的一种实施方式中的系统，其中第一启动子包括SEQ ID NO:41的核酸序列。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型启动子。在一些供选择的方案中，第二启动子是或包括EF1 $\alpha$ 启动子或其功能性部分。在一些供选择的方案中，转录激活因子包括具有SEQ ID NO:40的序列的多肽。在一些供选择的方案中，第一核酸被包括于第一载体中，第一载体进一步被系统包括，以及第二核酸被包括于第二载体中，第二载体进一步被系统包括。在一些供选择的方案中，第一核酸和第二核酸或第一启动子、编码嵌合抗原受体的多核苷酸、第二启动子和编码反式激活剂的多核苷酸被包括于载体中，载体进一步被系统包括。在系统的一些供选择的方案中，系统被包括在单个病毒包装载体中。在一些供选择的方案中，病毒载体是慢病毒载体。在一些供选择的方案中，第一核酸进一步包括编码选择性标记的核酸序列或其中系统进一步包括选择性标记，所述选择性标记可操作地连接于第一启动子。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码选择性标记的核酸或其中系统进一步包括选择性标记，所述选择性标记可操作地连接于第二启动子。在一些供选择的方案中，系统包括：a) 第一核酸，包括第一启动子，所述第一启动子是诱导型启动子并可操作地连接于编码细胞因子、趋化因子受体、抑制凋亡的多肽或抑制负检查点信号传导的多肽的多核苷酸；以及b) 第二核酸，包括第二启动子，所述第二启动子是组成型或诱导型启动子，该第二启动子可操作地连接于编码转录激活因子的多核苷酸，所述转录激活因子能够在药物或其代谢物或类似物的存在下诱导从第一启动子转录。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码任选地是嵌合抗原受体的重组抗原受体的多核苷酸。在一些供选择的方案中，嵌合抗原受体包括：a) 配体结合域，其结合于任选地是肿瘤特异性分子、病毒分子或表达于靶细胞群上的任意其他分子的配体，所述靶细胞群适合于介导由淋巴细胞进行的识别和消除，b) 多肽间隔区，其中间隔区任选地提供与参照嵌合受体相比增加的应答配体的T细胞增殖/细胞因子产生，c) 跨膜域以及d) 胞内信号传导域。在一些供选择的方案中，第一启动子在第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中，配体结合域是抗体片段。在一些供选择的方案中，配体结合域是单链可变区片段。在一些供选择的方案中，肿瘤特异性分子选自由CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2和MAGE A3 TCR和其组合组成的组。

[0285] 在一些供选择的方案中，提供了包括系统或病毒包装载体的宿主细胞。在一些供选择的方案中，系统包括：a) 第一核酸，包括第一启动子，所述第一启动子是可操作地连接于编码嵌合抗原受体的多核苷酸的诱导型启动子；以及b) 第二核酸，包括第二启动子，所述第二启动子可操作地连接于编码转录激活因子的多核苷酸，所述转录激活因子能够在药物或其代谢物的存在下从第一启动子激活转录。在一些供选择的方案中，提供了用于诱导型表达的系统，其中系统包括：a) 诱导型启动子，b) 编码嵌合抗原受体的多核苷酸，和c) 编码转录激活因子的多核苷酸，所述转录激活因子能够在药物或其代谢物的存在下从诱导型启动子激活转录。在一些供选择的方案中，编码嵌合受体的多核苷酸可操作地连接于诱导型启动子。在一些供选择的方案中，系统进一步包括编码重组蛋白的多核苷酸，所述多核苷酸可操作地连接于诱导型启动子。在一些供选择的方案中，药物或其代谢物包括：(i) 当每天一次或每周一次施用于人受试者时耐受的药物或其代谢物；(ii) 特异性结合于人受体，任选为雌激素受体的分子，或其代谢物；和/或(iii) 他莫昔芬和/或他莫昔芬的代谢物或类似物。在一些供选择的方案中，转录激活因子包括：(a) DNA结合域；(b) 特异性结合于药物或其

代谢物的配体结合域;和(c)反式激活域,其任选地以该顺序连接和/或融合。在系统的一些供选择的方案中,(a)DNA结合域包括在淋巴细胞中天然表达的蛋白中不存在或在T细胞中天然表达的蛋白中不存在的DNA结合位点;和/或(b)药物或代谢物是特异性结合于任选地是雌激素受体的人受体的分子或其代谢物,并且药物或代谢物与配体结合域之间的结合对配体结合域有超越人受体的选择性,从而由配体结合域与药物或代谢物的结合更强大,任选地是人受体的结合的至少1.5、2、3或4倍;和/或(c)反式激活域包括p65反式激活域或其功能性变体;和/或(d)第一启动子包括DNA结合域的一个或多个结合位点。在一些供选择的方案中,第一启动子不包括除了存在于转录激活因子中的DNA结合域或多个DNA结合域以外的任意人DNA结合域的另一个结合位点;和/或其中第一启动子是合成嵌合启动子和/或转录激活因子是合成嵌合转录激活因子;和/或其中DNA结合域包括存在于任选为HNF1- $\alpha$ 或HNF1- $\beta$ 的肝细胞核因子中的DNA结合域。在一些供选择的方案中,第一启动子包括SEQ ID NO:41的核酸序列。在一些供选择的方案中,第二启动子是组成型启动子。在一些供选择的方案中,第二启动子是或包括EF1 $\alpha$ 启动子或其功能性部分。在一些供选择的方案中,转录激活因子包括具有SEQ ID NO:40的序列的多肽。在一些供选择的方案中,第一核酸被包括于第一载体中,第一载体进一步被系统包括,以及第二核酸被包括于第二载体中,第二载体进一步被系统包括。在一些供选择的方案中,第一核酸和第二核酸或第一启动子、编码嵌合抗原受体的多核苷酸、第二启动子和编码反式激活剂的多核苷酸被包括于载体中,载体进一步被系统包括。在一些供选择的方案中,上文描述的系统被包括于单个病毒包装载体中。在一些这样的供选择的方案中,病毒载体是慢病毒载体。在一些供选择的方案中,第一核酸进一步包括编码选择性标记的核酸序列或其中系统进一步包括选择性标记,所述选择性标记可操作地连接于第一启动子。在一些供选择的方案中,第二核酸进一步包括编码选择性标记的核酸或其中系统进一步包括选择性标记,所述选择性标记可操作地连接于第二启动子。在一些供选择的方案中,系统包括:a)第一核酸,包括第一启动子,所述第一启动子是诱导型启动子并可操作地连接于编码细胞因子、趋化因子受体、抑制凋亡的多肽或抑制负检查点信号传导的多肽的多核苷酸;以及b)第二核酸,包括第二启动子,所述第二启动子是组成型或诱导型启动子,该第二启动子可操作地连接于编码转录激活因子的多核苷酸,所述转录激活因子能够在药物或其代谢物或类似物的存在下诱导从第一启动子转录。在一些供选择的方案中,第二核酸进一步包括编码任选地是嵌合抗原受体的重组抗原受体的多核苷酸。在一些供选择的方案中,嵌合抗原受体包括:a)配体结合域,其结合于任选地是肿瘤特异性分子、病毒分子或表达于靶细胞群上的任意其他分子的配体,适合于介导由淋巴细胞进行的识别和消除,b)多肽间隔区,其中间隔区任选地提供与参照嵌合受体相比增加的应答配体的T细胞增殖/细胞因子产生,c)跨膜域和d)胞内信号传导域。在一些供选择的方案中,第一启动子在第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中,配体结合域是抗体片段。在一些供选择的方案中,配体结合域是单链可变区片段。在一些供选择的方案中,肿瘤特异性分子选自由CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2和MAGE A3 TCR和其组合组成的组。

[0286] 在一些供选择的方案中,提供了宿主细胞,其中宿主细胞是原代人淋巴细胞,其中宿主细胞包括:a)核酸,包括第一启动子,所述第一启动子是含有原代人淋巴细胞中不天然存在的DNA结合域的结合位点的诱导型合成启动子,以及b)编码转录激活因子的多核苷酸,

转录激活因子包括：i) DNA结合域，其中DNA结合域不特异性结合于原代人淋巴细胞中不天然存在的DNA序列；ii) 特异性结合于药物或其代谢物并且不结合于或不以大程度的亲和性结合于原代人淋巴细胞中天然存在的任意分子的域；以及iii) 反式激活域，其中转录激活因子能够在药物或其代谢物存在下和/或在药物或其代谢物与(i)中的域结合时诱导从第一启动子转录。在一些供选择的方案中，细胞进一步包括编码嵌合抗原受体的多核苷酸，所述多核苷酸任选地可操作地连接于第一启动子。在一些供选择的方案中，细胞进一步包括可操作地连接于编码转录激活因子的多核苷酸的第二启动子，其中第二启动子任选地是组成型的。在一些供选择的方案中，宿主细胞是选自由初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和混合CD8+T细胞组成的组的CD8+T细胞毒性淋巴细胞。在一些供选择的方案中，宿主细胞是选自由初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和混合CD4+T细胞组成的组的CD4+T辅助淋巴细胞。

[0287] 在一些供选择的方案中，提供了组合物，其中组合物包含在药学上可接受的赋形剂中的宿主细胞。在一些供选择的方案中，宿主细胞是原代人淋巴细胞，其中宿主细胞包括：a) 核酸，包括第一启动子，所述第一启动子是含有原代人淋巴细胞中不天然存在的DNA结合域的结合位点的诱导型合成启动子，以及b) 编码转录激活因子的多核苷酸，转录激活因子包括：i) DNA结合域，其中DNA结合域不特异性结合于原代人淋巴细胞中不天然存在的DNA序列；ii) 特异性结合于药物或其代谢物并且不结合于或不以大程度的亲和性结合于原代人淋巴细胞中天然存在的任意分子的域；以及iii) 反式激活域，其中转录激活因子能够在药物或其代谢物存在下和/或在药物或其代谢物与(i)中的域结合时诱导从第一启动子转录。在一些供选择的方案中，细胞进一步包括编码嵌合抗原受体的多核苷酸，所述多核苷酸任选地可操作地连接于第一启动子。在一些供选择的方案中，细胞进一步包括可操作地连接于编码转录激活因子的多核苷酸的第二启动子，其中第二启动子任选地是组成型的。在一些供选择的方案中，宿主细胞是选自由初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和混合CD8+T细胞组成的组的CD8+T细胞毒性淋巴细胞。在一些供选择的方案中，宿主细胞是选自由初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和混合CD4+T细胞组成的组的CD4+T辅助淋巴细胞。在一些供选择的方案中，组合物包含选自由初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和混合CD8+T细胞组成的组的CD8+T细胞毒性淋巴细胞，以及选自由初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和混合CD4+T细胞组成的组的CD4+T辅助淋巴细胞。

[0288] 在一些供选择的方案中，提供了制备宿主细胞的体外方法，并且所述方法包括：在体外将系统引入单独分离的T淋巴细胞群和扩增每个T淋巴细胞群。在一些供选择的方案中，宿主细胞是原代人淋巴细胞，其中宿主细胞包括：a) 核酸，包括第一启动子，所述第一启动子是含有原代人淋巴细胞中不天然存在的DNA结合域的结合位点的诱导型合成启动子，以及b) 编码转录激活因子的多核苷酸，转录激活因子包括：i) DNA结合域，其中DNA结合域不特异性结合于原代人淋巴细胞中存在的DNA序列；ii) 特异性结合于药物或其代谢物并且不结合于或不以大程度的亲和性结合于原代人淋巴细胞中天然存在的任意分子的域；以及iii) 反式激活域，其中转录激活因子能够在药物或其代谢物存在下和/或在药物或其代谢物与(i)中的域结合时诱导从第一启动子转录。在一些供选择的方案中，细胞进一步包括编码嵌合抗原受体的多核苷酸，该多核苷酸任选地可操作地连接于第一启动子。在一些供

选择的方案中，细胞进一步包括可操作地连接于编码转录激活因子的多核苷酸的第二启动子，其中第二启动子任选地是组成型的。在一些供选择的方案中，宿主细胞是选自由初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和混合CD8+T细胞组成的组的CD8+T细胞毒性淋巴细胞。在一些供选择的方案中，宿主细胞是选自由初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和混合CD4+T细胞组成的组的CD4+T辅助淋巴细胞。在一些供选择的方案中，系统包括：a) 第一核酸，包括第一启动子，所述第一启动子是可操作地连接于编码嵌合抗原受体的多核苷酸的诱导型启动子；以及b) 第二核酸，包括第二启动子，所述第二启动子可操作地连接于编码转录激活因子的多核苷酸，所述转录激活因子能够在药物或其代谢物存在下从第一启动子激活转录。在一些供选择的方案中，提供了用于诱导型表达的系统，其中系统包括：a) 诱导型启动子，b) 编码嵌合抗原受体的多核苷酸以及c) 编码转录激活因子的多核苷酸，所述转录激活因子能够在药物或其代谢物的存在下从诱导型启动子激活转录。在一些供选择的方案中，编码嵌合受体的多核苷酸可操作地连接于诱导型启动子。在一些供选择的方案中，系统进一步包括可操作地连接于诱导型启动子的编码重组蛋白的多核苷酸。在一些供选择的方案中，药物或其代谢物包括：(i) 当每天一次或每周一次施用于人受试者时耐受的药物或其代谢物；(ii) 特异性结合于人受体，任选为雌激素受体的分子，或其代谢物；和/或(iii) 他莫昔芬和/或他莫昔芬的代谢物或类似物。在一些供选择的方案中，转录激活因子包括：(a) DNA结合域；(b) 特异性结合于药物或其代谢物的配体结合域；和(c) 反式激活域，其任选地以该顺序连接和/或融合。在系统的一些供选择的方案中，(a) DNA结合域包括在淋巴细胞中天然表达的蛋白中不存在的或在T细胞中天然表达的蛋白中不存在的DNA结合位点；和/或(b) 药物或代谢物是特异性结合于任选地是雌激素受体的人受体的分子或其代谢物，并且药物或代谢物与配体结合域之间的结合对配体结合域有超越人受体的选择性，从而由配体结合域与药物或代谢物的结合更强大，任选地是人受体的结合的至少1.5、2、3或4倍；和/或(c) 反式激活域包括p65反式激活域或其功能性变体；和/或(d) 第一启动子包括DNA结合域的一个或多个结合位点。在一些供选择的方案中，第一启动子不包括除了存在于转录激活因子中的DNA结合域或多个DNA结合域以外的任意人DNA结合域的另一个结合位点；和/或其中第一启动子是合成嵌合启动子和/或转录激活因子是合成嵌合转录激活因子；和/或其中DNA结合域包括存在于任选为HNF1- $\alpha$ 或HNF1- $\beta$ 的肝细胞核因子中的DNA结合域。在一些供选择的方案中，第一启动子包括SEQ ID NO:41的核酸序列。在一些供选择的方案中，第二启动子是组成型启动子。在一些供选择的方案中，第二启动子是或包括EF1 $\alpha$ 启动子或其功能性部分。在一些供选择的方案中，转录激活因子包括具有SEQ ID NO:40的序列的多肽。在一些供选择的方案中，第一核酸被包括于第一载体中，第一载体进一步被系统包括，以及第二核酸被包括于第二载体中，第二载体进一步被系统包括。在一些供选择的方案中，第一核酸和第二核酸或第一启动子、编码嵌合抗原受体的多核苷酸、第二启动子和编码反式激活剂的多核苷酸被包括于载体中，载体进一步被系统包括。在一些供选择的方案中，系统被包括在单个病毒包装载体中。在一些供选择的方案中，病毒载体是慢病毒载体。在一些供选择的方案中，第一核酸进一步包括编码选择性标记的核酸序列或其中系统进一步包括选择性标记，所述选择性标记可操作地连接于第一启动子。在一些供选择的方案中，第二核酸进一步包括编码选择性标记的核酸或其中系统进一步包括选择性标记，所述选择性标记可操作地连接于第二启动子。在一些供选择的方案中，系统包

括:a) 第一核酸,包括第一启动子,所述第一启动子是诱导型启动子并可操作地连接于编码细胞因子、趋化因子受体、抑制凋亡的多肽或抑制负检查点信号传导的多肽的多核苷酸,以及b) 第二核酸,包括第二启动子,所述第二启动子是组成型或诱导型启动子,该第二启动子可操作地连接于编码转录激活因子的多核苷酸,该转录激活因子能够在药物或其代谢物或类似物的存在下诱导从第一启动子转录。在一些供选择的方案中,第二核酸进一步包括编码任选地是嵌合抗原受体的重组抗原受体的多核苷酸。在一些供选择的方案中,嵌合抗原受体包括:a) 配体结合域,其结合于任选地是肿瘤特异性分子、病毒分子或表达于靶细胞群上的任意其他分子的配体,所述靶细胞群适合于介导由淋巴细胞进行的识别和消除b) 多肽间隔区,其中间隔区任选地提供与参照嵌合受体相比增加的应答配体的T细胞增殖/细胞因子产生,c) 跨膜域以及d) 胞内信号传导域。在一些供选择的方案中,第一启动子在第二启动子的相对取向。在一些供选择的方案中,配体结合域是抗体片段。在一些供选择的方案中,配体结合域是单链可变区片段。在一些供选择的方案中,肿瘤特异性分子选自由CD19、CD20、CD22、CD23、CD123、CS-1、ROR1、CE7、EGFR、hB7H3、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2、MAGE A3 TCR和其组合组成的组。在一些供选择的方案中,扩增群体中的T淋巴细胞,并且其中方法进一步包括在抗CD3和/或抗CD28和至少一种体内稳态细胞因子的存在下培养细胞,直到细胞扩增足够用于用作细胞输注物。在一些供选择的方案中,在抗CD3和/或抗CD28和至少一种体内稳态细胞因子的存在下的培养可以在系统引入之前或之后进行。

[0289] 在一些供选择的方案中,提供了宿主细胞或组合物与药物或其代谢物组合用于治疗癌症或病毒感染的用途。在一些供选择的方案中,宿主细胞是原代人淋巴细胞,其中宿主细胞包括a) 核酸,包括第一启动子,所述第一启动子是含有在原代人淋巴细胞中不天然存在的DNA结合域的结合位点的诱导型合成启动子,以及b) 编码转录激活因子的多核苷酸,转录激活因子包括:i) DNA结合域,其中DNA结合域不特异性结合于在原代人淋巴细胞中天然存在的DNA序列;ii) 特异性结合于药物或其代谢物并且不结合或不以大程度的亲和性结合于在原代人淋巴细胞中天然存在的任意分子的域;以及iii) 反式激活域,其中转录激活因子能够在药物或其代谢物存在下和/或在药物或其代谢物与(ii)中的域结合时诱导从第一启动子转录。在一些供选择的方案中,细胞进一步包括编码嵌合抗原受体的多核苷酸,该多核苷酸任选地可操作地连接于第一启动子。在一些供选择的方案中,细胞进一步包括可操作地连接于编码转录激活因子的多核苷酸的第二启动子,其中第二启动子任选地是组成型的。在一些供选择的方案中,宿主细胞是选自由初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和混合CD8+T细胞组成的组的CD8+T细胞毒性淋巴细胞。在一些供选择的方案中,宿主细胞是选自由初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和混合CD4+T细胞组成的组的CD4+T辅助淋巴细胞。在一些供选择的方案中,组合物包含在药学上可接受的赋形剂中的宿主细胞。在一些供选择的方案中,宿主细胞宿主细胞是原代人淋巴细胞,其中宿主细胞包括a) 核酸,包括第一启动子,所述第一启动子是含有在原代人淋巴细胞中不天然存在的DNA结合域的结合位点的诱导型合成启动子以及b) 编码转录激活因子的多核苷酸,转录激活因子包括:i) DNA结合域,其中DNA结合域不特异性结合于原代人淋巴细胞中不天然存在的DNA序列;ii) 特异性结合于药物或其代谢物并且不结合或不以大程度的亲和性结合于原代人淋巴细胞中天然存在的任意分子的域;以及iii) 反式激活域,其中转录激活因子能够在药物或其代谢物存在下和/或在药物或其代谢物与(ii)中的域结合时诱

导从第一启动子转录。在一些供选择的方案中，细胞进一步包括编码嵌合抗原受体的多核苷酸，该多核苷酸任选地可操作地连接于第一启动子。在一些供选择的方案中，细胞进一步包括可操作地连接于编码转录激活因子的多核苷酸的第二启动子，其中第二启动子任选地是组成型的。在一些供选择的方案中，宿主细胞是选自由初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和混合CD8+T细胞组成的组的CD8+T细胞毒性淋巴细胞。在一些供选择的方案中，宿主细胞是选自由初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和混合CD4+T细胞组成的组的CD4+T辅助淋巴细胞。在一些供选择的方案中，组合物包含选自由初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和混合CD8+T细胞组成的组的CD8+T细胞毒性淋巴细胞和选自由初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和混合CD4+T细胞组成的组的CD4+T辅助淋巴细胞。

[0290] 在一些供选择的方案中，提供了用于治疗或抑制癌症或病毒感染的细胞和药物，其中细胞包括：(a) 编码嵌合抗原受体的多核苷酸，所述嵌合抗原受体特异性结合于与癌症或病毒感染相关的抗原，(b) 诱导型合成启动子，以及(c) 转录激活因子，该转录激活因子含有特异性结合于合成启动子的DNA结合域和特异性结合于药物或其代谢物并能够在药物或其代谢物存在下诱导从合成启动子转录的域。在一些供选择的方案中，癌症是实体瘤或恶性血液肿瘤。在一些供选择的方案中，实体瘤选自由乳腺癌、肺癌、结肠癌、肾癌、胰腺癌、前列腺癌和卵巢癌组成的组。

[0291] 在一些供选择的方案中，提供了对患有癌症或病毒感染的受试者进行细胞免疫治疗的方法，其中方法包括：将组合物或宿主细胞施用于受试者，并施用药物或其代谢物，从而诱导从启动子表达。在一些供选择的方案中，宿主细胞是原代人淋巴细胞，其中宿主细胞包括：a) 核酸，包括第一启动子，所述第一启动子是含有在原代人淋巴细胞中不天然存在的DNA结合域的结合位点的诱导型合成启动子以及b) 编码转录激活因子的多核苷酸，转录激活因子包括：i) DNA结合域，其中DNA结合域不特异性结合于原代人淋巴细胞中不天然存在的DNA序列；ii) 特异性结合于药物或其代谢物并且不结合或不以大程度的亲和性结合于原代人淋巴细胞中天然存在的任意分子的域；以及iii) 反式激活域，其中转录激活因子能够在药物或其代谢物存在下和/或在药物或其代谢物与(ii)中的域结合时诱导从第一启动子转录。在一些供选择的方案中，细胞进一步包括编码嵌合抗原受体的多核苷酸，该核苷酸任选地可操作地连接于第一启动子。在一些供选择的方案中，细胞进一步包括可操作地连接于编码转录激活因子的多核苷酸的第二启动子，其中第二启动子任选地是组成型的。在一些供选择的方案中，宿主细胞是选自由初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和混合CD8+T细胞组成的组的CD8+T细胞毒性淋巴细胞。在一些供选择的方案中，宿主细胞是选自由初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和混合CD4+T细胞组成的组的CD4+T辅助淋巴细胞。在一些供选择的方案中，组合物包含在药学上可接受的赋形剂中的宿主细胞。在一些供选择的方案中，宿主细胞是原代人淋巴细胞，其中宿主细胞包括：a) 核酸，包括第一启动子，所述第一启动子是含有原代人淋巴细胞中不天然存在的DNA结合域的结合位点的诱导型合成启动子以及b) 编码转录激活因子的多核苷酸，转录激活因子包括：i) DNA结合域，其中DNA结合域不特异性结合于原代人淋巴细胞中天然存在的DNA序列；ii) 特异性结合于药物或其代谢物并且不结合或不以大程度的亲和性结合于原代人淋巴细胞中天然存在的任意分子的域；和iii) 反式激活域，其中转录激活因子能够在药物或

其代谢物存在下和/或在药物或其代谢物与 (ii) 中的域结合时诱导从第一启动子转录。在一些供选择的方案中,细胞进一步包括编码嵌合抗原受体的多核苷酸,该多核苷酸任选地可操作地连接于第一启动子。在一些供选择的方案中,细胞进一步包括可操作地连接于编码转录激活因子的多核苷酸的第二启动子,其中第二启动子任选地是组成型的。在一些供选择的方案中,宿主细胞是选自由初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和混合CD8+T细胞组成的组的CD8+T细胞毒性淋巴细胞。在一些供选择的方案中,宿主细胞是选自由初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和混合CD4+T细胞组成的组的CD4+T辅助淋巴细胞。在一些供选择的方案中,组合物包含选自由初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和混合CD8+T细胞组成的组的CD8+T细胞毒性淋巴细胞和选自由初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和混合CD4+T细胞组成的组的CD4+T辅助淋巴细胞。在一些供选择的方案中,癌症选自实体瘤或恶性血液肿瘤。实体瘤选自由乳腺癌、肺癌、结肠癌、肾癌、胰腺癌、前列腺癌和卵巢癌组成的组。

[0292] 本公开的另一方面包括在细胞中递送药物调控的转基因表达的遗传系统,如重组蛋白如重组抗原受体和/或由表达重组抗原受体的细胞表达的分子的药物调控的表达。在供选择的方案中,调控的转基因表达被工程化于和/或包含于细胞中,如淋巴细胞,例如用于过继细胞治疗,如过继免疫治疗。归因于细胞疗法(如嵌合抗原受体(CAR)过继治疗策略),这样的系统提供严格的安全性,而一般不牺牲治愈性目的。在某些方面,这样的特征允许在体内重组蛋白表达(如CAR表达)的实时临床医师控制。基于临床医师开的显示临实际上允许的药代动力学、组织分布和在淋巴细胞的胞外空间与细胞溶胶之间的分配的制药药物输入,通过工程化使药物能够响应性转录控制重组基因表达,如CAR表达的载体,重组基因如CAR的活性和其他细胞介质可以在体内“开”和“关”。遗传系统提供药物调控的转基因表达以在药物不存在下执行功能性的“关”状态,以及在药物存在下执行功能性“开”状态的转基因表达。

[0293] 这样的药物的一个供选择的方案是他莫昔芬。他莫昔芬是雌激素拮抗剂/部分激动剂,是FDA批准并且商业可获得的药物。他莫昔芬是口服的并且可以在较长的一段时间内每天施用1次。他莫昔芬具有经证实的安全性记录、有利的药代动力学谱、优秀的组织分布和胞外空间与细胞溶胶之间的低分配系数。也可以使用他莫昔芬的功能性类似物。可以选择其他药物,例如,基于安全性记录、有利的药代动力学谱、优秀的组织分布、胞外空间与细胞溶胶之间的低分配系数和/或低毒性。

[0294] 在一些供选择的方案中,系统采用合成转录调控因子(例如合成转录激活因子),在他莫昔芬存在下,该合成转录调控因子可以被诱导与可操作地连接于转基因的例如上游的合成启动子结合以诱导从例如转基因的启动子的表达。在本文提供的一些供选择的方案中,转录激活因子被药物或其代谢物调控,如他莫昔芬调控转录激活因子或转录因子可以被他莫昔芬或其类似物或代谢物调控(例如诱导)。示例性他莫昔芬调控的转录因子是嵌合转录因子,如包括对系统的合成启动子特异的DNA结合域、以例如高于域对如雌激素的天然分子的亲和性特异性结合他莫昔芬和/或其代谢物的域,以及如强反式激活域的反式激活域的那些嵌合转录因子。一种他莫昔芬调控的转录因子(“TamR-tf”,也称“HEA3”)是由人亚单位组成的嵌合转录因子,所述人亚单位包括肝细胞核因子1- $\alpha$ (HNF-1 $\alpha$ )的N-末端DNA结合域,HNF-1 $\alpha$ 的N-末端DNA结合域框内融合于突变的(G521R)他莫昔芬特异性形式的雌激素受

体配体结合域(ER-LBD),所述ER-LBD以与雌激素相比高的亲和性结合于他莫昔芬代谢物,所述他莫昔芬代谢物反过来融合于NF- $\kappa$ B(p65)的p65激活域。在表10中提供了TamR-tf的示例性的氨基酸序列,并且鉴别为SEQ ID NO:40。在该序列中,雌激素受体配体结合域(ER-LBD)的突变的他莫昔芬特异性形式的配体结合域在TamR-tf的第282-595位氨基酸处发现,并且与野生型雌激素受体配体结合域相比在第521位具有突变。NF- $\kappa$ B(p65)的p65激活域在SEQ ID NO:40的第596-862位氨基酸处发现。对转录激活因子可以做出改变,例如以增加转录因子的特性,包括但不限于在雌激素受体配体结合域改变一个或更多氨基酸以增加因子对雌激素类似物的亲和性,以及在p65反式激活域改变一个或多个氨基酸。在一些供选择的方案中,对转录激活因子做出改变,导致改变的转录因子保持或基本上保持一个或多个tamR-tf功能,如他莫昔芬特异性结合和/或与任意天然分子相比对他莫昔芬或代谢物的相同的或基本上相同的或至少相同的特异性、至少相同的或大约相同的特异性DNA结合功能和/或相同或至少相同程度的反式激活活性。

[0295] 在他莫昔芬不存在下,一般地通过使细胞溶胶热休克蛋白90(HSP90)与他莫昔芬结合活性位点结合将转录激活因子(例如TamR-tf)从核排除,导致可操作地连接于tamR-tf-诱导型启动子的转基因的表达处于“关”状态。纳摩尔浓度的细胞溶胶积极地与HSP90竞争并胜过HSP90与ER-LBD结合,导致TamR-tf迁移至核。在核迁移时,TamR-tf可容易地用于结合于其限制性合成的启动子(如7xHBD/EF1 $\alpha$ p)。在他莫昔芬存在下,TamR-tf与合成启动子(例如7xHBD/EF1 $\alpha$ p启动子)的结合诱导可操作地连接于合成启动子的转基因的表达的“开”状态。在一些供选择的方案中,可以修饰该转录调控因子以提供变化水平的转基因表达的控制。TamR-tf的LBD中的氨基酸置换允许对他莫昔芬和其代谢物选择性应答,其中4-羟基他莫昔芬(4-OHT)是关于TamR-tf活性的药理学上最有效的代谢物,然而缺少与内源雌激素的相互作用。在一些供选择的方案中,提供了用于嵌合抗原受体的诱导型表达的系统,其中系统包括:第一核酸,包括可通过药物诱导的第一启动子,该第一启动子可操作地连接于多核苷酸,如编码嵌合抗原受体的多核苷酸,所述嵌合抗原受体任选地包括配体结合域,其中配体结合域结合于配体,其中配体是肿瘤特异性分子、病毒分子或表达于靶细胞群上的任意其他分子,所述靶细胞群适合于介导由淋巴细胞进行的识别和消除;多肽间隔区,其间隔区任选地提供与参比嵌合抗原受体相比增加的应答配体的T细胞增殖/细胞因子产生;跨膜域以及胞内信号传导域。在一些供选择的方案中,系统进一步包括编码诱导型启动子的转录调节因子的第二核酸,所述诱导型启动子能够如在药物或其代谢物的存在下调节(例如激活)从第一启动子转录;典型地,系统包括可操作地连接于编码转录调节因子的核酸的第二组成型或诱导型启动子。

[0296] 在诱导型系统的一些供选择的方案中,第一启动子可操作地连接于编码促进细胞存活和增殖的基因、防止凋亡的基因和/或抑制负检查点信号传导的基因的多核苷酸。这样的基因包括编码IL-2、IL-15、趋化因子受体、Bcl2、CA-Akt、dn-TGF $\beta$ RIII、dn-SHP1/2和/或PD-1CD28嵌合体的基因。

[0297] 在一些供选择的方案中,系统采用合成转录激活因子,在药物(例如他莫昔芬)或其代谢物存在下,如在施用药物之后,所述合成转录激活因子被诱导结合转基因的合成启动子上游以诱导表达。在一些供选择的方案中,转录激活因子是TamR-tf(HEA3)或其他具有类似域的他莫昔芬诱导型转录激活因子。他莫昔芬调控的转录因子(“TamR-tf”,也称

“HEA3”)是由人亚单位组成的嵌合转录因子,所述人亚单位包括肝细胞核因子1- $\alpha$  (HNF-1 $\alpha$ ) (例如SEQ ID NO:40的第1-281位氨基酸) 的N-末端DNA结合域, HNF-1 $\alpha$ 的N-末端DNA结合域框内融合于雌激素受体配体结合域(ER-LBD)的突变的他莫昔芬特异配体结合域,所述突变的他莫昔芬特异配体结合域反过来融合于NF- $\kappa$ B (p65) 的p65激活域。

[0298] 在本文的组合物的一些供选择的方案中,CD4+T辅助淋巴细胞是初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞或混合CD4+T细胞。在一些供选择的方案中,CD4+辅助淋巴细胞是初始CD4+T细胞,其中初始CD4+T细胞包括CD45R0-, CD45RA+和/或是CD62L+ CD4+T细胞。在一些供选择的方案中,组合物中的至少20、30、40、50、60、70、80、90、95、99或100%的细胞是CD4+的细胞;在一些供选择的方案中,组合物中至少20、30、40、50、60、70、80、90、95、99或100%的细胞或组合物中的CD4+细胞是初始CD4+T细胞,中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞或混合CD4+T细胞。

[0299] 在本文的组合物的一些供选择的方案中,CD8+T细胞毒性淋巴细胞是初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和/或混合CD8+T细胞。在一些供选择的方案中,CD8+细胞毒性T淋巴细胞是中枢记忆T细胞,其中中枢记忆T细胞包括CD45R0+、CD62L+ 和/或CD8+T细胞。在再一种供选择的方案中,CD8+细胞毒性T淋巴细胞是中枢记忆T细胞并且CD4+辅助T淋巴细胞是初始或中枢记忆CD4+T细胞。在一些供选择的方案中,组合物中至少20、30、40、50、60、70、80、90、95、99或100%的细胞是CD8+细胞;在一些供选择的方案中,组合物中至少20、30、40、50、60、70、80、90、95、99或100%的细胞或组合物中的CD8+细胞是初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞或混合CD8+T细胞。在某些实施方式中,组合物中至少20、30、40、50、60、70、80、90、95、99或100%的细胞和/或CD4+细胞和/或CD8+细胞表达转基因或重组分子如CAR和/或含有表达系统。

[0300] 另外提供了制备组合物(包括过继免疫治疗组合物,如含有系统的组合物)的方法,以及使用这些组合物如对患有疾病或紊乱的受试者进行细胞免疫治疗的用途和方法。

[0301] 在一些供选择的方案中,制备组合物的方法包括:获得产生修饰的初始或初始来源的CD4+T辅助细胞或中枢记忆或中枢记忆来源的CD4+T辅助细胞或包括上述细胞的细胞群,其中修饰的辅助T淋巴细胞细胞制剂包括具有嵌合受体的CD4+T细胞,如包含在如本文描述的诱导型启动子的控制下的对肿瘤细胞表面分子特异的配体结合域、间隔区、跨膜域以及胞内信号传导域的嵌合受体。在其他某些供选择的方案中,CD4+细胞具有在诱导型启动子的控制下的细胞因子或趋化因子受体。

[0302] 在本文描述的方法的一些供选择的方案中,T细胞与不表达CAR的其他T细胞施用和/或产生Tam诱导型蛋白。在一些供选择的方案中,CAR的转录激活因子包括DNA结合域、他莫昔芬/代谢物结合域或反式激活域。在一些供选择的方案中,来自合成转录激活因子的一个或多个,一般地全部的域源自人蛋白,如人域或基本上是人域。这样的特征可减少例如在细胞治疗中施用于人受试者时的构建体的免疫原性。

[0303] JurkaT细胞中的表达

[0304] 研究了表达TamR ZsGreen的Jurkat T细胞细胞的“开”和“关”状态。

[0305] 构建体

[0306] 在一些供选择的方案中,该系统涉及两种组件:1)通过T2A跳跃连接体域连接于单个转基因或转基因集合的HEA-3的组成型表达和2)在HEA-3限制性合成启动子7xHBD/

mEF1ap的控制下的转基因的条件性表达,从而应答他莫昔芬,诱导转基因发生。根据TamRLV遗传控制的希望的使用,可以使用递送系统和载体组合物的组合。上文描述了构建体的构建。

[0307] TamR-LV系统的供选择的方案使得ZsGreen或嵌合抗原受体的组成型HEA3表达和诱导型表达,允许通过他莫昔芬存在或不存在以“开”和“关”方式控制的动力学分析和生物学作用。对此,使用两种构建体:1) HEA-3由人EF1a启动子驱动并通过T2A跳跃连接体序列连接于构建的截短的EGFR(EGFRt)跨膜标记蛋白并克隆至第三代epHIV7自失活慢病毒包装质粒(构建体A)内。(见表10;SEQ ID NO:39;表1:SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9);和2) 7xHBD/mEF1ap控制克隆至pcDNA3.1(-)内的ZsGreen的他莫昔芬依赖性表达,所述pcDNA3.1(-)工程化为缺少商用的CMV启动子(构建体B)(见表12;SEQ ID NO:41)。ZsGreen1是人密码子优化的ZsGreen变体,该变体编码最亮的商业可获得的绿色荧光蛋白(可得自Clontech)。

#### [0308] 方法

[0309] 用上文描述的慢病毒包装构建体以MOI为5转导JurkaT细胞,其中在双包装方法中,在慢病毒产生期间将每种质粒共转染至293T细胞。该构建体利用构建体A比构建体B为1:2的摩尔比。构建体A编码通过核糖体自切割序列T2A连接于追踪和选择标记EGFRt的嵌合转录因子HEA3。构建体B编码合成的HEA3应答性启动子7xHBD/mE1b,该启动子调控短半衰期绿色荧光报告基因,转基因ZsGreen-DR1的表达。

[0310] 转导后,在培养物中扩增细胞,对于EGFRt表达利用Miltenyi磁珠选择富集用于细胞至纯度>99%。在进一步在培养物中扩增后,收获细胞并用乙醇(溶媒)处理细胞作为阴性对照,或用500nM 4-羟基他莫昔芬(4OHT)处理细胞24小时,然后收获细胞,用爱必妥-生物素染色接着用SA-APC染色,然后通过流式细胞术分析APC表达和ZsGreen表达。结果示于图1A-图1B中。

#### [0311] 剂量响应

[0312] 收获细胞,然后如指示的使细胞经受浓度为0nM-1000nM的4OHT处理。将样品收获、洗涤并用EGFRt-生物素接着用链酶亲和素-APC染色,然后通过流式细胞术分析ZsGreen表达。结果示于图2中。

#### [0313] 开关速率动力学

[0314] 使群体经受500nM 4OHT刺激48小时,然后利用FACS分选ZsGreen+细胞,分选后立即分析收获>99%的ZsGreen+群。随后在培养物中扩增3周,然后准备用于动力学研究。将细胞分为3个处理组:(1)无4OHT(2)200nM4OHT(每48小时添加)(3)24小时200nM 4OHT,然后用1×PBS洗掉,在无4OHT培养基中培养14天,用200nm 4OHT重刺激,然后在1×PBS中洗涤。在每个时间点,收获样品并通过流式细胞术分析样品的ZsGreen表达。结果示于图3中,并表示为%ZsGreen+。

#### [0315] 结果

[0316] 图1A-图1B中的结果显示在4-羟基他莫昔芬(4-OHT)的存在下,约50%的细胞表达ZsGreen,表明这些细胞具有构建体A和B两者以及4-OHT诱导构建体B的表达。剂量响应曲线的结果显示200nM或更大浓度的4-OHT对诱导转基因在转导的细胞中的表达是有效的(图2)。图3中的结果显示由于4-OHT从培养物中洗掉,Zs Green表达在5天内下降至少于最大Zs Green活性的10%。当添加回4-OHT,Zs Green活性在2天内回到100%最大活性。

[0317] 讨论

[0318] 这些实验显示可以用具有组成型组件和诱导型组件的双包装的慢病毒转导人T JurkaT细胞。以剂量响应方式在4-OHT的存在下诱导ZsGreen基因的表达。另外,从细胞培养物中洗掉4-OHT导致ZsGreen的表达减少,这可以通过将4-OHT添加回细胞中重刺激。

[0319] 原代CD4中枢记忆细胞和CD8中枢记忆细胞中的表达

[0320] 研究了表达TamR ZsGreen的CD4和CD8中枢记忆T细胞的“开”和“关”状态。

[0321] 构建体

[0322] 在一些供选择的方案中,该系统涉及两种组件:1)通过T2A跳跃连接体域连接于单个转基因或转基因集合的HEA-3的组成型表达(构建体A)(见表10;SEQ ID NO:39;表1SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9);和2)在HEA-3限制性合成启动子7xHBD/mEF1ap的控制下的转基因的条件性表达从而应答他莫昔芬,诱导转基因发生(构建体B)(见表12;SEQ ID NO:41)。根据TamRLV遗传控制的希望的使用,可以使用递送系统和载体组合物的组合。如上所述制备了构建体。

[0323] 方法

[0324] CD4中枢记忆细胞,通过流式细胞术选择标记CD4、CD62L和CD45RO为阴性的细胞从外周血获得。细胞与抗CD3/抗CD28磁珠培养3天。

[0325] CD8中枢记忆细胞,通过流式细胞术选择标记CD8、CD62L和CD45RO为阴性的细胞从外周血获得。细胞与抗CD3/抗CD28磁珠培养3天。

[0326] 用上文描述的慢病毒包装构建体以MOI为5转导CD4或CD8中枢记忆细胞,其中在双包装方法中,在慢病毒产生期间将每种质粒共转染至293T细胞。该构建体利用构建体A比构建体B为1:2的摩尔比。构建体A编码通过核糖体自切割序列T2A连接于追踪和选择标记EGFRt的嵌合转录因子HEA3。构建体B编码合成的HEA3应答性启动子7xHBD/mE1b,该启动子调控短半衰期绿色荧光报告基因,转基因ZsGreen-DR1的表达。

[0327] 在转导后第21天,对于EGFRt富集细胞,并随后用饲养细胞、IL2和IL15扩增细胞。扩增后,将细胞分为3个处理组,单独4OHT(A),4OHT与CD3/CD28珠组合共处理(B)或单独4OHT处理48小时,然后添加CD3/CD28珠(C)。还获得无4OHT的相应样品用于比较。在4OHT处理之后,在指示的时间点收集所有样品,用EGFRt-生物素抗体染色,随后用SA-APC染色,然后用流式细胞术分析。结果示于图4A-图4D(CD4中枢记忆)和图5A-图5C(CD8中枢记忆)中。

[0328] 结果

[0329] 结果显示用双质粒载体转导的CD4细胞需要激活刺激的存在以甚至在他莫昔芬存在下表达ZsGreen。见图4B。在他莫昔芬和抗CD3/抗CD28珠的存在下,约70%的原代转导的CD4细胞表达ZsGreen。在用他莫昔芬处理48小时后当激活发生时观察到基因表达。见图4C。

[0330] 结果显示用双质粒载体转导的CD8细胞也需要激活刺激的存在以甚至在他莫昔芬存在下表达ZsGreen。见图5B。在他莫昔芬和抗CD3/抗CD28珠的存在下,约37%的原代转导CD8细胞表达ZsGreen。在用他莫昔芬处理48小时后当激活发生时观察到基因表达。见图5C。

[0331] 这些结果显示用诱导型构建体转导的原代中枢记忆T细胞可以在用抗CD3/CD28细胞激活时在诱导剂的存在下表达转基因。然而,使用免疫磁性或流式细胞术分选可以容易地分离表达转基因的未激活的细胞。

[0332] TamR---CD19CAR LV的构建

[0333] 通过如上文描述的双包装包覆转移质粒的构建体以1:1的质粒摩尔比完成载体的构建(见图6C和图7C)。组成型EF-1 $\alpha$ 启动子下的构建体A编码通过核糖体切割序列T2A连接于追踪和选择标记EGFRt的TamR-tf (HEA3) (见表10; SEQ ID NO:39, 表1:SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9)。构建体B含有7xHBD/mE1b启动子,该启动子具有包括通过2a切割序列连接于追踪和选择标记Her2的CD19CAR的下游转基因cDNA (见表12; SEQ ID NO:41; 表2SEQ ID NO:10; 表13; SEQ ID NO:44)。添加另外的选择标记DHFRdm构建另一个构建体(见表14; SEQ ID NO:46)。

[0334] 以MOI为2转导人JurkaT细胞,然后在培养物中扩增细胞,并通过磁珠选择来选择EGFRt+细胞。在进一步扩增后,用溶媒(EtOH)单独处理细胞或用500nM 4OHT处理细胞,然后收获细胞用于流式细胞术。用EGFRt-APC抗体和赫赛汀-生物素染色,随后用SA PE染色样品。还制备样品用于蛋白印迹,使用的一抗是识别CD19CAR(约48kDa)上的胞内CD3 $\zeta$ 链的抗CD247小鼠mAb。内源CD3 $\zeta$ 迁移至约23kDa处。结果示于图6A-图6C。

[0335] 用TamR CD19CAR LV转导的Jurkat T细胞含有选择标记

[0336] 通过双包装构建体A和B完成TamR CD19CAR LV的构建。构建体A含有通过核糖体切割序列T2A连接于追踪和选择标记EGFRt的HEA3。构建体B含有7xHBD/mE1b启动子,该启动子具有由通过2a切割序列连接于追踪和选择标记Her2t,通过另一个2a切割序列(P2A)连接于甲氨蝶呤选择基因DHFRdm的CD19CAR组成的下游基因。

[0337] 用TamR CD19CAR LV以MOI为1转导细胞,然后在培养物中扩增细胞,并通过磁珠选择来选择EGFRt+细胞。在进一步扩增后,用溶媒(EtOH)单独处理细胞或用500nM 4OHT处理细胞,然后收获细胞用于流式细胞术,图7A。用EGFRt-APC抗体和赫赛汀-生物素染色,随后用SA-PE染色。显示亲本(未转导的Jurkat)用于比较。还制备样品用于蛋白印迹,使用的一抗是识别CD19CAR(约48kDa)上的胞内CD3 $\zeta$ 链的抗CD247小鼠mAb。内源CD3 $\zeta$ 迁移至约23kDa处。

[0338] 结果

[0339] 结果显示在用不包括另外的选择标记DHFRdm的构建体转导的94.6%的细胞中检测到EGFRt。见图6B。图6C显示了在他莫昔芬存在下,用不包括DHFRdm的构建体转导的约42.6%的细胞表达EGFRt和Her2t两者。表达两种标记的细胞作为CAR构建体的部分(48kDa)的CD3 $\zeta$ 链,如蛋白印迹所检测到的。见图6B。

[0340] 图7A-图7C显示在他莫昔芬不存在下,用包括另一种2a切割序列(P2A)连接于DHFRdm的构建体转导的85.9%的JurkaT细胞表达EGFRt。在他莫昔芬存在下,约7.5%的细胞表达EGFRt和Her2t两者。表达两种标记的细胞表达作为CAR构建体的部分的CD3 $\zeta$ 链(48kDa),如蛋白印迹所检测到的。见图7B。

[0341] 在转导的JurkaT细胞中显示CD19 CAR的诱导型表达。通过使用蛋白印迹检测标记Her2t以及检测CD19CAR的表达来确定诱导。添加另外的选择性标记DHFRdm至诱导型构建体不会改善诱导型基因的表达。

[0342] TamR CD19CAR LV转导的人CD4 TCM T细胞

[0343] 通过流式细胞术选择标记CD4、CD62L和CD45RO为阴性的细胞从外周血获得CD4中枢记忆细胞。细胞与抗CD3/抗CD28磁珠培养3天。3天后,用包装构建体A和B的慢病毒以MOI为5转导CD4中枢记忆细胞(图8B)。构建体编码通过核糖体切割序列T2A连接于追踪和选择

标记EGFRt的嵌合转录因子HEA3。(见表10;SEQ ID NO:39;表1;SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9)。构建体B编码合成的HEA3应答的启动子7xHBD/mE1b,该启动子调控通过T2A连接于Her2t以追踪和选择,和通过第二2a序列P2A连接于甲氨蝶呤选择基因DHFRdm的转基因CD19CAR的表达。(见表12;SEQ ID NO:41;表2SEQ ID NO:10;表13;SEQ ID NO:44;表14;SEQ ID NO:46)。

[0344] 在转导后第21天,利用磁珠选择,对EGFRt富集细胞,并随后用辐射的饲养细胞、IL2和IL15扩增细胞。扩增后2周,冷冻保存细胞。在上文描述的实验中,将模拟转导的CD4+CEM细胞,或CD4+TamR CD19CAR LV解冻,置于具有CD3/CD28珠IL-2、IL-15的培养物中。将CD4+TamRCD19CAR LV用500nM 40HT处理24小时或不处理。将所有样品收获、洗涤,然后用EGFRt-APC抗体和Her2t-生物素染色,接着用SA-PE染色,通过流式细胞术分析。结果示于图8A-图8B。

[0345] 结果

[0346] 图8A-图8B中的结果显示在他莫昔芬不存在下,75.6%的转导的原代CD4中枢记忆细胞表达EGFRt,表明了构建体A的组成型表达。在他莫昔芬和激活刺激(抗CD3/抗CD28珠)存在下,约14.7的原代细胞表达EGFRt和Her2t两者。

[0347] 在诱导剂和激活刺激的存在下用诱导型载体转导的原代CD4细胞在诱导型启动子的控制下表达转基因,如通过标记基因Her2t的表达所检测到的。然而,可以使用免疫磁性或流式细胞术分选容易地分离表达转基因的未激活细胞。这些细胞的进一步表征会涉及检测CD19CAR的表达。

[0348] 上文是对本发明的说明,并且不能被解释为限制本发明。本发明通过下面的权利要求限定,所述权利要求的等同物被包括在本发明中。本文引用的所有参考和文献通过引用并入本文。

[0349] 表1

[0350] 抗CD19短间隔区嵌合受体的序列

[0351] GMCSFRss-CD19scFv-IgG4铰链-CD28tm-41BB-Zeta-T2A-EGFRt

Atgctgtgtggtgaccagcctgtgtcgagctgccccacccgccttctgtatcccc (GMCSFRss) (SEQ ID NO:2)

Gacatccagatgacccagaccacccatccagcctgagcgcagccagcctggcgaccatcagctgccggccagecaggaca  
tcagcaagtacctgtactggatcagcagaagcccgacggcaccgtcaagctgtgtatctaccacaccagccggcigcacagccggc  
tgccccagccggtttagccggcagccgtccggcaccgactacagcctgaccatctccaaccttggaaacaggaagatacgccacactt  
ttggccagcagggcaacacactgccttacacccatggcgccgaaacaaagctggaaatcaccggcagcacctccggcagccggcaagc  
ctggcagccggcagggcagcacaaggcgaggtaagctgcaggaaagccggctggccggccagccagagcetga  
gcgtgacctgcaccgtgagccgtgaggctggcactacggcgtgagctggatccggcagcccccaggaaggccctgaaatg  
gctggccgtatctggggcagcagaccacactacaacagcgcctgaagagccggctgaccatcatcaaggacaacagaaga  
gcaggtgttctgaagatgaacagcctgcagaccgacaccgcctactactgcgccaagcactactacggccggcagcta  
cgccatggactactggggccagggcaccagcgtgaccgtgaccgt (CD19scFv) (SEQ ID NO:3)

Gaatctaagtacggaccgcctggccct (IgG4 铰链)(SEQ ID NO:4)

Atgttctgggtgtgggtggcgaggcgctggcctgtacagcctgtgtaccgtggccctcatcatctttgggtg  
(CD28tm-)(SEQ ID NO:5)

Aaacggggcagaaagaaactcctgtatattcaaacaaccattatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgttagctg  
ccgatttccagaagaagaaggaggatgtgaactg (41BB) (SEQ ID NO:6)

Cgggtgaagttcagcagaagcgcgcacgcctgcctaccagcagggcagaatcagctgtacaacgcgtgaaacctggcagaa  
ggaagagtacgacgtctggataagcggagaggccggaccctgagatggcgcaagcctggcggagaacccccaggaag  
gcctgtataacgaactgcagaagacaagatggccgaggcctacagcggagatcggcatgaagggcgagcggaggccggcaagg  
gcacgcacgcctgtatcaggccctgtccaccgcaccaaggataacctacgacgcctgcacatgcaggccctggcccaagg  
(CD3Zeta)- (SEQ ID NO:7)

Ctcgagggcggcggagagggcagaggaagtcttctaacatgcggtgacgtggaggagaatccggccctagg (T2A) (SEQ  
ID NO:8)

Atgcttctctgtgacaagcctctgtgtgaggtaaccacacccagcattctctgtatcccacgcggaaatgtgtacggaaataggta  
ttggtaattaaagactcactctccataaatgtacgaatattaaacacttcaaaaactgcacccatcgtggcgatctccacatctgc  
cggtggcatttaggggtgactcttccacacatactctctgtggatccacaggactggatattctgaaaacgtaaaggaaatcacag  
gtttttgtgttgcaggctggctgaaaacaggacggacccatgccttggatccatgcggcaggaccaagcaa  
catggtcagtttctgtcagtcgtcagccatgcataacatacatcttggattacgcctcccaaggagataagtgtatggagatgtgataatt  
tcagggaaacaaaatttgtctatgcaaatataactggaaaaactgtttggacccatccggcagggatggggccggagccagg  
actgcgtcttgcggaaatgtcagccggaggcaggaaatgcgtggacaatgcacccatgcgttggatggggccggagccagg  
gaactctgagtgcatacgtgcacccagagtgcctgcctcaggccatgaacatcacctgcacaggacggggaccagacaactgtatc  
cagtgtgcccactacattgacggcccccactgcgtcaagacactgcacccatgcgtggatggggccaggatgtgaaaggctgt  
tacgcagacgcggccatgtgtccacccatgcgtcaagacactgcacccatgcgtggatggggccaggatgtgaaaggctgt  
atgggcctaagatccgtccatgcctactggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatggatgg  
ga (EGFR) (SEQ ID NO:9)

[0354] 表2

**GMCSFRss**

DNA: ATGCTGCTGGTGACCGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCAACCCGCC  
 AA: M L L V T S L L C E L P H P A

**CD19scFv**

DNA: TTTCTGCTGATCCCC:GACATCCAGATGACCCAGACCACCTCCAGCCTGAGC  
 AA: F L L I P D I Q M T Q T T S S L S

DNA: GCCAGCCTGGCGACCGGGTGACCATCAGCTGCCGGCCAGCCAGGACATC  
 AA: A S L G D R V T I S C R A S Q D I

DNA: AGCAAGTACCTGAACACTGGTATCAGCAGAAGCCCGACGGCACCGTCAAGCTG  
 AA: S K Y L N W Y Q Q K P D G T V K L

DNA: CTGATCTACCACACCAGCCGGCTGCACAGCCGGTGCAGCCGGTTAGC  
 AA: L I Y H T S R L H S G V P S R F S

DNA: CGCAGCGGCTCCGGCACCGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAACAG  
 AA: G S G S G T D Y S L T I S N L E Q

DNA: GAAGATATCGCCACCTACTTTGCCAGCAGGGCAACACACTGCCCTACACC  
 AA: E D I A T Y F C Q Q G N T L P Y T

[0355]

DNA: TTTGGCGCGGAACAAAGCTGGAAATCACCGGCAGCACCTCCGGCAGCGGC  
 AA: F G G G T K L E I T G S T S G S G

DNA: AAGCCTGGCAGCGCGAGGGCAGCACCAAGGGCGAGGTGAAGCTGCAGGAA  
 AA: K P G S G E G S T K G E V K L Q E

DNA: AGCGGCCCTGGCCTGGTGGCCCCCAGCCAGAGCCTGAGCGTGACCTGCACC  
 AA: S G P G L V A P S Q S L S V T C T

DNA: GTGAGCGCGGTGAGCCTGCCGACTACGGCGTGAGCTGGATCCGGCAGCCC  
 AA: V S G V S L P D Y G V S W I R Q P

DNA: CCCAGGAAGGGCTGGAATGGCTGGCGTGATCTGGGCAGCGAGACCACC  
 AA: P R K G L E W L G V I W G S E T T

DNA: TACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACAGC  
 AA: Y Y N S A L K S R L T I I K D N S

DNA: AAGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCC  
 AA: K S Q V F L K M N S L Q T D D T A

DNA: ATCTACTACTGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGGCAGCTACGCCATGGAC  
 AA: I Y Y C A K H Y Y Y G G S Y A M D

**IgG4 铰链**

DNA: TACTGGGCCAGGGCACCAAGCGTACCGTGAGCAGC:GAGAGCAAGTACGGA  
 AA: Y W G Q G T S V T V S S E S K Y G

**CD28tm**

DNA: CCGCCCTGCCCGCCCTTGCCCT:ATGTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTCGGAGGC  
 AA: P P C P P C P M F W V L V V V G G

DNA: GTGCTGGCTGCTACAGCCTGCTGGTCACCGTGGCCTTCATCATCTTTGG  
 AA: V L A C Y S L L V T V A F I I F W

**41BB**

DNA: GTG:AAACGGGGCAGAAAGAAAATCCTGTATATATTCAAACAACCATTATG  
 AA: V K R G R K K L L Y I F K Q P F M

DNA: AGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTCCA  
 AA: R P V Q T T Q E E D G C S C R F P

**CD3 $\zeta$** 

DNA: GAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAAGTGCAGGGTGAAG:TTCAGCAGAACGCC  
 AA: E E E E G G C E L R V K F S R S A

DNA: GACGCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAACAGCTGTACAACGAGCTGAAC  
 AA: D A P A Y Q Q G Q N Q L Y N E L N

[0356]

DNA: CTGGCAGAAGGAAGAGTACGACGTCCTGGATAAGCGGAGAGGCCGGAC  
 AA: L G R R E E Y D V L D K R R G R D

DNA: CCTGAGATGGCGGCAAGCCTCGGCGGAAGAACCCCCAGGAAGGCCTGTAT  
 AA: P E M G G K P R R K N P Q E G L Y

DNA: AACGAACCTGCAGAAAGACAAGATGGCGAGGCCTACAGCGAGATGGCATG  
 AA: N E L Q K D K M A E A Y S E I G M

DNA: AAGGGCGAGCGGAGGCAGGGCAAGGCCACGACGCCCTGTATCAGGCCCTG  
 AA: K G E R R R G K G H D G L Y Q G L

DNA: TCCACCGCCACCAAGGATAACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCC  
 AA: S T A T K D T Y D A L H M Q A L P

**T2A**

DNA: CCAAGG:CTCGAGGGCGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATCGGGT  
 AA: P R L E G G E G R G S L L T C G

**EGFRt**

DNA: GACGTGGAGGAGAATCCCGCCCTAGG:ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTT  
 AA: D V E E N P G P R M L L L V T S L

DNA: CTGCTCTGTGAGTTACCAACCCCAGCATTCCCTGATCCCACGCAAAGTG  
 AA: L L C E L P H P A F L L I P R K V

DNA: **TGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTAAAGACTCACTCTCCATAAATGCT**

AA: C N G I G I G E F K D S L S I N A

DNA: **ACGAATATTAAACACTTCACAAACTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCAC**

AA: T N I K H F K N C T S I S G D L H

DNA: **ATCCTGCCGGTGGCATTTAGGGTGACTCCTCACACATACTCCTCCTCTG**

AA: I L P V A F R G D S F T H T P P L

DNA: **GATCCACAGGAACGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTT**

AA: D P Q E L D I L K T V K E I T G F

DNA: **TTGCTGATTCAAGGCTTGGCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCTTGAG**

AA: L L I Q A W P E N R T D L H A F E

DNA: **AACCTAGAAATCATACGGCAGGACCAAGAACATGGTCAGTTCTCTT**

AA: N L E I I R G R T K Q H G Q F S L

DNA: **GCAGTCGTCAGCCTGAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAG**

AA: A V V S L N I T S L G L R S L K E

DNA: **ATAAGTGATGGAGATGTGATAATTCAGGAAACAAAAATTGTGCTATGCA**

AA: I S D G D V I I S G N K N L C Y A

DNA: **AATAACAATAAACTGGAAAAAACTGTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAA**

AA: N T I N W K K L F G T S G Q K T K

[0357]

DNA: **ATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCTGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGC**

AA: I I S N R G E N S C K A T G Q V C

DNA: **CATGCCCTTGCTCCCCGGAGGGCTGCTGGGGCCGGAGGCCAGGGACTGC**

AA: H A L C S P E G C W G P E P R D C

DNA: **GTCTCTTGGCCGAATGTCAGCCGAGGCAGGGATGCGTGACAAGTGCAC**

AA: V S C R N V S R G R E C V D K C N

DNA: **CTTCTGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTGTGGAGAACTCTGAGTGCATACAG**

AA: L L E G E P R E F V E N S E C I Q

DNA: **TGCCACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGG**

AA: C H P E C L P Q A M N I T C T G R

DNA: **GGACCAGACAACGTATCCAGTGTGCCACTACATTGACGGCCCCACTGC**

AA: G P D N C I Q C A H Y I D G P H C

DNA: **GTCAAGACCTGCCGGCAGGAGTCATGGGAGAAAACAACACCCCTGGCTGG**

AA: V K T C P A G V M G E N N T L V W

DNA: **AAGTACGCAGACGCCGGCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAAACTGCACC**

AA: K Y A D A G H V C H L C H P N C T

DNA: **TACGGATGCACTGGGCCAGGTCTTGAAGGCTGCCAACGAATGGGCCTAAG**

AA: Y G C T G P G L E G C P T N G P K

DNA: **ATCCCGTCCATGCCACTGGGATGGTGGGGCCCTCCTCTGCTGCTGGTG**

AA: I P S I A T G M V G A L L L L V

DNA: **GTGCCCTGGGATCGGCCTTTCATGTGA** (SEQ ID NO:10)

AA: V A L G I G L F M \* (SEQ ID NO:11)

[0358] 表3

- [0359] ZXR-014核苷酸和氨基酸序列(部分的分布图)  
 [0360] GMCSFRss:nt2084-2149 (SEQ ID NO:50)  
 [0361] CD19scFv:nt2150-2884 (SEQ ID NO:51)  
 [0362] Igg4铰链:nt2885-2920 (SEQ ID NO:52)  
 [0363] CD28tm:nt2921-3004 (SEQ ID NO:53)  
 [0364] 41BB:nt3005-3130 (SEQ ID NO:54)  
 [0365] ζ:nt3131-3466 (SEQ ID NO:55)  
 [0366] T2A:nt3467-3538 (SEQ ID NO:56)  
 [0367] EGFRt:nt3539-4612 (SEQ ID NO:57)  
 [0368] 测序引物:

	<u>寡核苷酸名称</u>	<u>序列</u>	<u>区域</u>
	oJ02649	ATCAAAAGAACATGACCGAGATAGGGT	pre-U5(SEQ ID NO:22)
	oJ02648	CCGTACCTTAAGACCAATGACTTAC	delU3(SEQ ID NO:23)
	oJ02650	TTGAGAGTTTCGCCCG	mid-Ampr(SEQ ID NO:24)
	oJ02651	AATAGACAGATCGCTGAGATAGGT	post-Ampr(SEQ ID NO:25)
	oJ02652	CAGGTATCCGGTAAGCGG	CoE1 ori(SEQ ID NO:26)
	oJ02653	CGACCAGCAACCATAAGTCC	SV40(SEQ ID NO:27)
[0369]	oJ02654	TAGCGGTTTGACTCACGG	CMV(SEQ ID NO:28)
	oJ02655	GCAGGGAGCTAGAACGATT	psi(SEQ ID NO:29)
	oJ02656	ATTGTCTGGTATAGTGCAGCAG	RRE(SEQ ID NO:30)
	oJ02657	TCGCAACGGGTTTGCC	EF1p(SEQ ID NO:31)
	oJ02658	AGGAAGATATGCCACCTACT	CD19Rop(SEQ ID NO:32)
	oJ02601	CGGGTGAAGTTCAGCAGAAC	Zeta(SEQ ID NO:33)
	oJ02735	ACTGTGTTGCTGACGCAAC	WPRE(SEQ ID NO:34)
	oJ02715	ATGCTTCTCCTGGTGACAAG	EGFRt(SEQ ID NO:35)
[0370]	表4 Uniprot P0861 IgG4-Fc (SEQ ID NO:13)		

10      20      30      40      50      60  
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLOSS

70            80            90            100            110            120  
GLYSISSLWVTPRSSLIGTKTYTCNVVDHKPSNTKVDKRVESSYKGGPRCBSCPAPPEFLGGPSV

130      140      150      160      170      180  
ELERBKKEKLT LMISBTBVEYT GVVVDVSOED BEVOENWYD GVEVNNAKTK BREFOENSTY

[0371]

190      200      210      220      230      240

250 260 270 280 290 300  
NOVSLITLXK CEXPSDLINE KESNCODENN XZTTPNLLDS DCCSEPLXSPJ TXWDZCSDWPC

310                  320

- [0372] 1-98 CH1 (SEQ ID NO:59)
  - [0373] 99-110铰链 (SEQ ID NO:60)
  - [0374] 111-220 CH2 (SEQ ID NO:61)
  - [0375] 221-327 CH3 (SEQ ID NO:62)
  - [0376] 第108位S→P (SEQ ID NO:63)
  - [0377] 表5 Uniprot P10747 CD28 (SEQ ID NO:14)

10      20      30      40      50      60  
MIRJALAINI ERSILOVTCNKJ LUKOSPEL V. AYDNAVNLSG KYSYNLESPRE ERASLUHKGL

70      80      90      100      110      120

[0379]

130 140 150 160 170 180

190      200      210      220

- [0379] 1-18信号肽 (SEQ ID NO:64)
  - [0380] 19-152胞外域 (SEQ ID NO:65)
  - [0381] 153-179跨膜域 (SEQ ID NO:66)
  - [0382] 180-220胞内域 (SEQ ID NO:67)
  - [0383] 第186-187位LL→GG (SEQ ID NO:68)
  - [0384] 表6 Uniprot Q07011 4-1BB (SEQ ID NO:15)

10 20 30 40 50 60  
 MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDP-CSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR

70 80 90 100 110 120  
 TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC

[0385] 130 140 150 160 170 180  
 CGFTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE  
 190 200 210 220 230 240  
 PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG

250

CSCRFPEEEE GGCEL

- [0386] 1-23信号肽 (SEQ ID NO:69)
- [0387] 24-186胞外域 (SEQ ID NO:70)
- [0388] 187-213跨膜域 (SEQ ID NO:71)
- [0389] 214-255胞内域 (SEQ ID NO:72)
- [0390] 表7 Uniprot P20963人CD3 $\zeta$ 同种型3 (SEQ ID NO:16)

10 20 30 40 50 60  
 MKWKALFTA IIQQAQLPITE AQSFGLLDPK LCYLLDGILF IYGVILTALF LRVKFSRSAD

[0391] 70 80 90 100 110 120  
 APAYQQGQNQ LYNEINLGRR EYDVLKD RR GRDPEMGGKF QRRKNPQEGI YNELQKDKMA

130 140 150 160

EAYSEIGMKG ERRRGKGHDG LYQGLSTATK DTYDALHMQA LPPR

- [0392] 1-21信号肽 (SEQ ID NO:73)
- [0393] 22-30胞外 (SEQ ID NO:74)
- [0394] 31-51跨膜 (SEQ ID NO:75)
- [0395] 52-164胞内域 (SEQ ID NO:76)
- [0396] 61-89 ITAM1 (SEQ ID NO:77)
- [0397] 100-128 ITAM2 (SEQ ID NO:78)
- [0398] 131-159 ITAM3 (SEQ ID NO:79)
- [0399] 表8示例性铰链区序列
- [0400] 人IgG1 EPKSCDKTHCPPCP (SEQ ID NO:17)
- [0401] 人IgG2 ERKCCVECPCCP (SEQ ID NO:18)
- [0402] 人IgG3 ELKTPLGDTHTCP-<sub>3</sub>PRCP (EPKSCDTPPP-<sub>3</sub>PRCP) (SEQ ID NO:19)
- [0403] 人IgG4 ESKYGPPCPSCP (SEQ ID NO:20)
- [0404] 修饰的人IgG4 ESKYGPPCPSCP (SEQ ID NO:21)
- [0405] 修饰的人IgG4 YGPPCPSCP (SEQ ID NO:36)
- [0406] 修饰的人IgG4 KYGPPCPSCP (SEQ ID NO:37)

- [0407] 修饰的人IgG4 EVVKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:38)  
 [0408] 表9 Her 2构建体-短间隔区 (SEQ ID NO:1)  
 [0409] GMCSFss-Her2scFv-IgG4铰链-CD28tm-41BB- $\zeta$ -T2A-EGFRt  
 [0410] 前导序列  
Atgcttcctcgtgacaaggccatcgactgtgagttaccacacccagcattcctctgatcca (SEQ ID NO: 80)

**Her2scFV**

Gatatccagatgacccagtccccgagctccctgtccgcctgtggcgataggcaccatcacctgccgtgccagtcaggatgt  
 gaatactgttgtacgcctgttatcaacagaaaccaggaaaagctccgaaactactgtattactcggtatccctctactctggatcc  
 [0411] ctctcgcttcgttgccagatctggacggattcacttgaccatcagcagtctgcagccggaaagacttcgcaacttattactgtca  
 gcaacattatactactctccacgttcggacagggtaccaagggtggagatcaaaggcagtaactgcggcggtggctccgggggc  
 ggatccgggtggggccggcagcagcggaggltcagcgggtggctggctggcgggtggctccgggggcacacccgggtttgt  
 cctgtgcagcttcgttgccatcaacattaaagacacctataactgggtgcgtcaggccccggtaagggcctggaatgggttgcaa  
 ggatttactacgaatggttacttagatgcgcgatgcgtcaaggccggttactataagcgcagacacatccaaaaacacagc  
 etacactgeagatgaacageetgcgtgtgaggacactggctattattgtttagatggggagggacggctctatgtatggact  
 actgggtcaaggaacctggtcaccgtctcgagt (SEQ ID NO: 81)

- [0412] 铰链间隔区  
 Gagagcaagtacggaccgcctgcceccctgcct (SEQ ID NO: 82)

**CD28tm**

Atgttctgggtgctgggtggcgtggaggcgtgtggctgtacagcctgtggcaccgtggcttcatcatctttgggtg  
 [0413] (SEQ ID NO: 83)

**4-1BB**

Aaacggggcagaaagaaactccgttatattcaaacaaccattatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtag  
 ctgcgcattccagaagaagaaggaggatgtgaactg (SEQ ID NO:84)

- [0414] CD3 $\zeta$

Cgggtgaagttcagcagaagcgccgacgcctgcctaccaggcagggccagaatcagctgtacaacgagctgaacctggcgaa  
aagggaaagactacgacgtctggataagcgagagggccggaccctgagatggcgcaagccctggcgaaagaacccccc  
gaaggccgtataacgactgcagaaagacaagatggcgagggctacagcgagatggcatgaaggcgagcggaggcg  
gcaagggccacgacggcctgtatcagggcctgtccaccgcaccaaggatacctacgacgcctgcacatgcaggccctgcccc  
caagg (SEQ ID NO: 85)

**T2A**

Ctcgagggcggcgagagggcagaggaagtcttctaacatgcggtgacgtggaggagaatccggccctagg (SEQ ID  
NO: 86)

**tEGFR**

atgettctctggtacaaggccctgtctgttagttaccacacccageatctctgtatcccacgcacaaagtgtgtaaacggaaatagg  
tatttgtgaatttaaagactcaactctccataaatgtctacaatattaaacacttcaaaaactgcacccatcatgtggcatctccacatc  
ctgcccgggtggcatttaggggtgactcttcacacatactctctgtccatcaggaaactggatattctgtaaaaccgtaaaggaaat  
cacagggttttgtgtgttttcgttgcagtcgtcagcgtcaacataacatccttggattacgcgtccctaaggagataagtgtggag  
atgtataatttcaggaaacaaaaatttgtgttatgcaaataactggaaaaactgtttggacactccggcagaaaacc  
attataaggcaacagaggtaaaaacagctgtcaaggccacaggccaggtgtccatgcctgtgtccatccccggggctgtggggcc  
cgagcccaggactgcgtcttgcggaaatgtcagccggcaggaaatgcgtggacaatgtcaacacttctggaggggtgagc  
caaggagtttgtggagaactctgtgactgtccatcaggccatgtgtccatgcgtcaagacccatgcgtcaggcatgacactgcacaggacgg  
ggaccagacaactgttccatgtgtccatcaggccatgtgtccatgcgtcaagacccatgcgtcaggcatgacactgcactggcc  
aggtcttgaaggcgtgtccaaacgatggccatcggcatggatgtggggccctcttgcgtggatgtgg  
ggccctgggatggcetcttcatgtga (SEQ ID NO: 87)

[0415] [0416] 表10 TamR-tf (HEA3) 核酸 (SEQ ID NO:39)

[0417] HEA3核苷酸 (SEQ ID NO:39) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO:40)

M V S K I L S Q L Q T E L I A A L L E S G L S K E A L I Q A .  
ATGGTG TCCAAAGCTGT CCACACCTCA GACAGAACTG CTGGCAGCAC TCCIGGAAG CGCCTGAGC AAAGAGGCC TGATTCAGGC  
TACCRAC AGGTTCGACA GGGTGTGGGT CTCCTTGTAC GACGGTGCGTG AGGACCTTTG GCGGACTCG TTTCCTGGG ACTAAGTCCG  
· L G E F G P Y L L A G E G P L D K G E S C G G G G R G E L A E L P N  
ACTCGGGGAA CCTCGGAACTT ATCTGCTCGC TGGGAAAGC CCTCTGGATA AGGGGGAGC CTGCGGGGA GGAAGAGGAG AGCTGGCGGA GCTGGCTAAC  
TGAGCCCGTT GGAGCTGGAA TAGAGGAGG AGGGCTTCCS GGAGAGCTAT TCCGGCTCTG GACACCGGCT GTTCTGCTC TOGACCGGCT CGAGGGATTC  
G L G E T R G S E D E T D D D G E D F T P P I L K E L E N D S P E E  
GGCCTGGGGG AGACAGAGGG CAGGGAGGAC GAGAGAGAGC AGGAGGGGA GGACTTCACO CCCCCATCC TGAAGAGGT GGAAAACCTG AGCCCCGGAGG  
CGGGACCGG TGTTCTCGC GTCGCTCCG CTCTGCTGC TCGTGCCTG CTGAAAGTGG GGGGGTAGG ACTTTCTCGA CCTTITGGAC TOGGGGCTCC  
· A A H Q K A V V E T L L Q R A D P W R V A K M V K S Y L Q Q H N I P .  
AAGGCGCCA CCAGAAAGCC GTGGTGGAGA CACTCTCA CGAGAGATCC TGGGGGTCG CCAAGATGGT CAAGAGCTAC CTGAGGAGG ACACACATCC  
TGGGGGGGT GTCTTTCG CACACCTCTG GTGAGAGCTT CCTCTAGGG ACCCCCCAGC GTTCTACCA GTTCTCGATG GAGGTGCTG TGTGTAGGG  
· Q R B V V D T T G L E Q S H L S Q E L H K G T P M K T Q K E A A L  
CCAGCGGGAG GTGGGGAGCA CCACGGGCTG GAAACAGAGC CACCTGAGC AGCACCTGA CAGGGGACCC CGCATGAAA CGCAGAAGAG AGCCCGCTTG  
GGTGCCTCG CACACCTCTG GTGGGGGGTA CTTGGCTCG GTGGACTCG TCGTGGACTT GTTCCTGG GGGTACTTTT GGGTCTTCTC TOGGGGGAC  
Y T W Y V R K Q R E V A Q Q F T H A G Q G G L I E E P T G D E L P T  
TACACTGGT AGGTGGGGAA CGAGAGAGG GGGCGCGGC AGTTTACACA CGGGGGCCAG GGGGGCTGA TGGGGAAACG TACCGGGAGC GAGCTGGCCA  
ATGGAUAUCA TGCAACGCTT CGTCTCTCTG CACCGGGCTG TCAATAGTGT GGGGGGGTGT CGGCGGAGCT AGCTCTTGG ATGGGGGTG CTCGACGGGT  
· K K G R R N R F K W G P A S Q Q I L F Q A Y R R Q K N F S K E R R .  
CCAGAAAGGG CAGACGGAAC CGGTTAAAGT GGGCGCTGC ATCTCASCAG ATCTCTTCC AGGCTACGA CGGCGAGAAG AACCCAGCA AGAGGAAGC  
GTCTCTCCC GTCTCTCTG CGACATTCA CGGGGGAGC TAGAGTCTG TACGAGAAGG TCGGAGATGC CGGCTCTTC TGGGGTGT TCTCTCTG

# 说 明 书

CN 113528581 A

86/88 页

```

· B T L V E E C N R A E C I C R G V S P S Q A Q G L G S N L V T E V
GGAGACATG GTGGAGAGT GCACCCGGC CGAGTCATC CAGAGGGCG TGAGGCCTTE TCAGGCTAG GCACCTGGCA GCAACTGGT CACOGAAGTG
CCTCTGTAC CACCTCTCA CCTGGCCS CTCACTAG CTCTCTCGC ACTCGGAAAG ACTCGAACTC CGAGACCGT CCTACACCA CGGGCTTCAC

· R V Y N W F A N R R K E E A F A H K L S A G D M R A A N L W P S P L
CGGGTGTACA ATTGGITCGC CAACCGGGG AAAGAGGAAG CCTCCCGCA CAAGCTGTCT GCTGGCGATA TGAGGCGCG GCACCTGGG CCCAGCCCC
GCCACATGT TAACCAAGG GTGGCCGCC TTCTCTCTC GGAGGGCGT GTTGACAGA CGACGCTAT ACTCTGGCG GTGGACACC GGGTGGGGGG

· M I K R S K K N S L A L S L T A D Q M V S A L L D A E P P I L Y S
TGATGATCAA CGGGAGCAAG ARGAACACGG TGGCCCTGAG CCIGACCGC GATCAGATGG TGTCGCTCT GCTGGACGCC GAGCCCCCTA TCCCTAGAG
ACTACTAGIT CGCCCGTTC TTCTGTGGG ACCGGGACTC GGACTGGGG CTAGCTAAC ACAGGOGASA CGACCTGGCG CTGGGGGGAT AGGACATGTC

· E Y D P T R P F S E A S M H G L L T N L A D R E L V H M I N W A K
CGAGTACGAC CGCACAGAC CCTCTCGOJA GGCGACCATG ATGGCCCTGC TGACCAACCT GGCAGACCGG GAGCTGGTGC ACATGATCAA CTGGGGCAAG
GCTCATGCTG GGGTGGTCTG GGAGCTGTG CGGTGCTAC TACCCGGACG ACTGGTTGG CCGGCTGGCC CTGACCCACG TGACTAGTT GACCCGGTTC

· R V P G F V D L T L H D Q V H L L E C A W L E I L M I G L V W R S M
CGGGTGCCTG GCTCTGTGA CCTGACCTG CAGGACAGG TCCACCTGCT GGAATGTGC TGCGTGGAA TCTGTATGAT CGGCTCTGTG TGAGGAGAGA
GCCACACGGC CGAACGACCT CGACTGGGCAG TGCTGGTCC AGGTGGACG CCTTACACGG ACCGACCTTT AGGACTACTA GCGGACCCAC ACCTCTCTG

· E H P G K L L F A P N L L L D R N Q G K C V E G M V E I F D M L L
TGAACACCCC CGCACAGCTG CTGTCGCC CCAACCTCT CCTGGACCGG AACCAAGGAA ACTGGCTGG ACGCATGGTG GAGACTCTCG ACATGCTGCT
ACCTTGTTGGG CGCGTGGACG GACAAGCGG GGTGGACGA GGACCTGGCC TTGGCCCTT TCACCCACCT CGCGIACAC CTCTAGAACG TGACAGACGA

· A T S S R F R M M N L Q G E E F V C C L K S I I L L S G V Y T F L
GGCACACCTCC AGCGGTTCC SGATGATGAA CCTCAGGGC GAGGAATG TGCTGGTGA GTCCATCATC CTGCTGAAC CGGGCTGTG CACCTCTG
CGGGTGGAGG TGCGCCAAGG CCTACTACTT GGACGCTCCG CTCTTAAGC ACAOGGACTT CAGGTAGTAG GACGACTTGT CGCGCACAT GTGGAGGAG

· S S T L K S L E E K D H I H R V L D K I T D T L I H L M A K A G L T
TCATCCACCC TGAAGTCCCT GGAGAGAGA GACACATCC ACCGGGTCTG GGACAAAGATC ACCGACACCC TGATCCACCT GATGGCCAG GCTGGCTGA
AGTGGGGGG ACTTCAGGGG CCTCTCTCTC CTGGTGTAGG TGGCCACGA CCTGTTCTAG TGCGTGTGGG ACTAGGTGGA CTACGGGTC CGACGGACT

· L Q Q Q H Q R L A Q L L L I L S H I R H M S N K R M E H L Y S M K .
CACTCCAGG CGACGACCG AGCTGGGCC AGCTGCTCT GATCTGAGC CACATCCGGC ACATGAGCA CMAGGGATG GAACACCTGT ACAGCATGAA
GTGGAGCTGT CGTCGTGGTC TCTGACCGCA CTAGGACTCG TGTTAGGCG TGTACTCGT GTCCCTACCT CTGCTGGACA TGCTGTACTT

[0419] · C K N V V P L Y D L L E M L D A H R L H A P T S R G G A S V E E
GTGAGAGAAC GTGGTGCCTG TGAGGACTT GCTGCTGAG ATGCTGGATG CCTACAGACT GCACCCCGT ACAACAGAG GCGGAGGCCAG CGGGGGGAA
CAGCTCTTG CACCAOGGGG ACATGCTGA CGACGAGCTC TACGACCTAC GGGTGTCTG CGTGGGGGA TTGCTGTCTC CGCCTCGTC GCACCTCTT

· T D Q S H L A T A G S T S S H S L Q K Y Y I T G R A E G F P A T V E
ACCGACCACT CTCACCTGGC CACCGCGGCC AGCACAGCA GCCACAGCT GCAGAAGTAC TACATCAGG GCGAGGCGGA GGGATTCCCT GCCACCGTGG
TGCTGGTCA GAGTGGACCG GTGGGGGCCG TCGTGTCTG CGTCTCTAG ATGTAAGTGC CGCTCCCGCT CCUTAAGGG CGGTGGCACC

· F Q Y L P D T D D R H R I E E K R K R T Y E T F K S I M K K S P F .
AGTCCAGTA CCTGGCGAC ACCGACGACG GGCAACGGAT CGAGGAAAAG CGGAAGGGG CCTAGAGAC ATTCAAGAGC ATCTGAGA AGTCCCCCTT
TCAAGGTCTG GGGGGCTG TGCTGCTG CGCTCTCTC GCTCTCCCT GGATGCTCTG TAAGTCTCG TAGTACTCTC TGAGGGGAA

· S G P T D P R P P P R R T A V P S R S S A S V P K P A P Q P Y P F
CAGGGGCC ACCGATCCA GACCCCCCCC TAGAGAATC GCGCTGCCA CGAGACTAG CGGCAACGCTG CCTACCCCTG CGCCCTCGCC CTACCTCTC
GTGCGGGGG TGCTGCTGGT TGCTGGGGGG ATCTCTTAG CGGCAACGGG CGTCTAGATC GGGTGGCAC GGGTGGAC GGGGGGGGG GATGGGAGA

· T S S L S T I N Y D E F F T M V F P S G Q I S Q A S A L A P A P P O
ACCAAGCAGCC TGAGCACCAT CAATACAGC GAGTCCCTA CCATGGTTT CCCCAGGGC CAGATCTCTC AGGCTCTGC TCTGGCACCT GCTCCACCTC
TGCTGCTGGG ACTCTGTTA GTTGATGCTG CTCAAGGGAT GGTACCAACAA GGGGTOGCC GCTAGAGAG TCCGGAGAG AGACCGTGG CGAGGTGGAG

· V L P Q A P A P A M V S A L A Q A P A P V V P V L A P G F P .
AGGTGCTGCC TCAGGCCCTG GCTCCAGGCC CAGGCCCTGC CATGGTGTCT GCAGTGGGCC AGGCTCCAGC TCTGTGCTG TGCTGGGCC CTGGACCTCC
TCACCGACGG AGTCGGGGGA CGAGGTGGGG GTCTGGGGAGC GTACACAGA CGTACGGGGG TCCAGGCTG AGGACACGG ACGACCGGG GACCTGGAG

· Q A V A P P A P K P T Q A G E G T L S E A L L Q L Q F D D E D L G
TCAGGCTGTG GCGCCCTCTG CCCTAAACC TACCCAGGGC GGGGAGGGAA CACTGTCTG GCGCTCTGTG CAGCTCCAGT TCGACGACGA GGATGTTGG
AGTCGACAC CGGGAGGAC GGGGATTGG ATGGTCCGG CCCCTCCCTT GTGACAGACT CGGGGACGAC TCGAGGTCAGT CCTAGACCC

· A L L G N S T D P A V F T D L A S V D N S E F Q Q L L N Q G I P V A
GCAGTGGCTGG GCAATAGCAC CGACCCCGCC GTGGTTACCG ACCTGGCTCT CGTGGACAC AGCGAGTCC AGCAGCTCT CACCCAGGC ATCCCTGTG
CGTACGACCC CGTTATCGTG GCTGGGGGGG CACAAATGGC TGGACGGAG GCACCTGTG TCGCTCAAGG TCGTCGAGGA GTGGTCCCG TAGGGACAGC

· P H T T E P M L M E Y F E A I T R L V T G A Q R P P D P A P A P L .
CCCCACACAC CACCGAGGCC ATGCTGATGG AATACCCCGA GGCACATCACC AGACTGGTCA CAGGGCCCA GAGGCTCTCA GATCCAGCAC CAGCTCCACT
GGGGTGTGTG GTGGCTGGGG TAGGACTTACCC TATGGGGCT CGGGTAGTGG TCTGAGGAGT GTCGGGGGGT CTGGGGAGGT CTAGGCTGTG GTGGAGGAG

· G A P G L P N G L L S G D E D F S S I A D M D F S A L L S Q I S S
GGGAGCCCCC GCGCTGCCA ATGGGCTGCT GTCTGGCGAC GAGGACTCT CCACGATTC CGACATGGC TTCAGGCC TGCTGTCTCA GATCAGCAGC
CCCTGGGGGA CGGGACGGAT TACCGACCGA CAGACCGCTG CTCTGAAGA GGTGCTAACG GCTGACCTG AAGTCGCGGG AGACAGGGT CTAGTGTG

```

[0420] 表11 TamR-tf (HEA4) 核酸 (SEQ ID NO:42) 氨基酸序列 (SEQ ID NO:43)

[0421] HEA3核苷酸 (SEQ ID NO: 和氨基酸序列

M V S K L S Q L Q T E L L A A L L E S G L S K E A L I Q A ·  
ATGGTG TCCAAGCTGT CCCAGCTGCA GACAGACTG CTGGCAGCAC TGCTGGAANG CGGCCCTGAGC AAAGAGGCC TGATTCAAGGC  
TACAC AGTTCTGACA GGGTCTGACT CTGTCTGAC GACCGTGTG ACACCTTC GCGGACTCG TTTCCTCCGG ACTAAGTCGG  
· L G E P G P Y L L A G E G P L D K G E S C G G G R G E L A E L P N ·  
ACTCGCGAA CCTGGACCTT ATCTGCTGC TGCGAGGGC CCTCTGGATA AGGGCGAGAG CTGTCGGGA CGAACAGGAG AGCTGGCGA GCTGCCTAAC  
TGAGCCGCTT GGACCTGGAA TAGACGAGOG ACCGCTTCG GGAGACCTAT TCCCCTCTC GACACCGCT CTTCTCTC TCGACCGCT CGACGATTG  
· G L G E T R G S E D E T D D D G E D F T P P I L K E L E N L S P E E ·  
GGCGCTGGGG AGACAAAGAGG CACCGAGGGC GAGACAGACG ACAGCGCGA GGACTTCACC CCCCCCATCC TGAAGAGCT GGAAAACCTG AGCCCGAGG  
CGGACCGCG CTCGTTCTCC GTGCGCTCTG CTCTCTCG TGCTGCCGT CCTGAAAGTGG GGGGGTAGG ACTTTCTGA CCTTTGGAC CGGGCGCTC  
· A A H Q K A V V E T L L Q E D P W R V A K M V K S Y L Q Q H N I P ·  
AACAGCGCCA CCAGAAAGCA GTGGTGGAGA CACTGCTGCA GGAGATCCC TGCGGGGTG CGAGAGCTT CAAGAGCTAC CTGCGCAGC ACAACATCCC  
TTCCGGGGGT GGCTTTCCG CACCCACTCT GTGACGAGCT CCTCTAGGG ACCGCGGAGC GGTTCTACCA GTTCTCTG GACOTCTCG TGTTGTAGG  
· Q R E V V D T T G L N Q S H L S Q H L N K G T P M K T Q K R A A L ·  
CCAGCGGGAG GTGGTGACCA CCACCGCCCT GAACAGAGC CACCTGAGC AGCACCTGA CAAGGGCACC COCATGAAAA CCCAGAAGAG AGCCCGCTG  
GGTCGCCCTC CACCCACTGT GTGCGCGGA CTGGTCTCG TGCGACTCG TGCTGACTT GTTCCCTGG GGGTACTTT GGGCTCTC TCGCGGAGC  
Y T W Y V R K Q R E V A Q Q F T H A G Q G G L I E E P T G D E L P T ·  
TACACTTGTT ACCTGCGAA GCAGAGAGG TGCGCCAGC AGTTACACA CGCCGGCCAG GGCGGCTGA TGAGGAACC TACCGGGAC GAGCTGCCA  
ATGTAACCA TGACGCTT CGTCTCTCTC CACCCGGTGC TCAAATGTT GTGGCGACT TGCTGACTT GTTCCCTGG GGGTACTTT GGGCTCTC TCGACGGGT  
· K K G R R R N F R K W G P A S Q I L Q K A Y E R Q K N P S K E E R ·  
CAAGAAGGG CAGACGGAA CGGTTAAAGT GGGGCTGC ATCTAGCG ATCTGTTCC AGGCTACGA GGGGAGAG AACCCAGCA AAAGAGAAC  
GGTTCTCCC GTCTGCTTG GCAAATTCA CCCCCGGAGC TAGAGTCG TGAGACAGG TCCGGATGCT CGCGCTCTC TTGGGGTGT TTCTCTTC  
· E T L V E E C N R A E C I Q R G V S P S Q A Q G L G S N L V T E V ·  
GGAGACACTG GTGGAAGAGT GCAACCGGGC CGAGTCGATC CAGAGAGGG TGAGCCCTC TCAGGCTAG GGCGCTGGCA GCAACTGGT CACCGAAGTG  
CCTCTGTGAC CACCTCTCA CGTGGCCCG GTCACGAG TGCTCTCGC ACTCGGGAG AGTCGAGTC CGGGAGCGT CGTAGACCA GTGCGCTTC  
R V Y N W F A N R R K E E A F R H K L S A G D M R A A N L W P S P L ·  
CGGGTGTACA ATTGGTTCG CACCGGGG AAAGAGGAAG CCTCCGCGA CAAGCTGTCT GTGCGGATA TGAGCGCGC CAACCTGGG CCCAGCCCC  
CGGACACATGTA TAACCAAGG GTTGGCGCC TTCTCTCTC GGAAGCGCT GTGGACAGA CGACCGCTAT ACTCTGGG GTTGGACACC GGGTGGGGG  
[0422]  
· M I K R S K K N S L A L S L T A D Q M V S A L L D A E P P I L Y S ·  
TGATGATCAA CGGAGGAAG AAGAACAGCC TGCGCCGTAG CCTGACGCC GATCAGATGG TGCGGCTCT GTGCGACGC GAGCCCTTA TCCGTGACAG  
ACTACTAGTT CGCGCTGTC TTCTGTGCGG ACCGGGACTC GGACTGGCGG CTAGTCTACC ACAGGGAGA CGACCTGCGG CTCGGGGAT AGGACATGTC  
· E Y D P T R P F S E A S M M G L L T N L A D R E L V H M I N W A K ·  
CGAGTACGAC CCCACCAAGAC CCTCAGCGA GGCGACGATG ATGGGCCTGC TGACCAACTT GGCGACCGG GAGCTGGTG ACATGATCAA CTGGCCAAG  
GCTCATGCTG GGGTGGCTG GGAAGTCGCT CGGACGATC TACCGGGAGC ACTGGTGGGA CGCGCTGGCC CTGACACAGC TGACTAGTT GACCGGGTTC  
R V P G F V D L T L H D Q V H L L E C A W L E I L M I G L V W R S M ·  
CGGGTCCCC CCTCTGGG CTGACCGTG CAGGACCGG CCTACCTGCT GGAGTGTGG TGCGGAAAGA TCTGATGAT CGCGCTCGTG TGGAGAGGA  
GCCACGGGG CGAAGCACCT GGACTGGAC GTGCGGTGAG CCTTACACGG ACCGACCTTT AGGACTACTA GCGAGGACAC ACCTCTGGT  
· E H P V K L L F A P N L L L D R N Q G K C V E G M V E I F D M L L ·  
TGGACACCC CGTGAAGCTG CTGTCGCCCC CCAACCTGCT CCTGGACGGG ACCCAGGGAA AGTGGTGGA GGGCATGGTG GAGATCTCG ACATGCTGCT  
ACCTTGAGG GCACTTCGAC GACAAGGGG GTTGGACGA GGACCTGGCC TTGGTCCCTT TCAACGACCT CGCGTACAC CTCTAGAACG TGACGAGCA  
· A T S S R F R M M N L Q G E E F V C L K S I I L L H S G V Y T F L ·  
GGCCACCTCC AGCGGTTCC GGATGATGAA CCTGCGGGC GAGGAATTCG TGTCGCTGAA GTCCATCATC CTGCTGAACA GGGCGTGTG CACCTCTCG  
CGCGTGGAGG TCGGCAAGG CCTACTACTT GGACTGGCC CGTCTTAAGC ACAGGGACTT CAGGTAGTAG GACGACTTGT CGCGCACAT GTGGAGGAC  
S S T L K S L E E K D H I H R V L D K I T D T L I H L M A K A G L L ·  
TCATCACCC TGAGAGAGG GACCAACCC ACCGGGCTCT GGACAGATC ACCGACACCC TGATCCACCT GATGCGCAAG GCTGGCTGA  
AGTAGGTGGG ACTTCAGGGG CCTCTCTTC CTGGTGTAGG TGGCCACAGA CCTGTTCTAG TGCGTGTGG ACTAGGTGGA CTACCGGTC CGACGGACT  
· L Q Q Q H Q R L A Q L L L I L S H I R H M S N K G M E H L Y S M K ·  
CACTCCAGCA CGACGACAG AGACTGGCCC AGCTGCTGCT GATCCGAGC CACATCGGC ACATGACCA CAAGGAAATG AACACCTGT ACAGCATGAA  
GIGAGGTGTG CTCGACGGG TGACGACGA CTAGGACTCG GTGAGGGCG TGACTCTGTT GTTCCCTAC CTGACGGACA TGTCGACTT  
· C K N V V P L Y D L L L E A A D A H R L H A P T S R G G A S V E E ·  
GTGCAAGAAC GTGGTGGCCCC TGACGACCT GCTGCTGAG GCTCGCGATG CCTACAGACT GCAAGGCCCT ACAAGCAGAG GGGAGGCCAG CGTGGAGGAA  
CACTTCTTG CACCAAGGGG ACATGCTGGA CGACGAGCTC CGACGGCIAC GGGTGTCTGA CGTGGGGGA TGTTGCTC CGCGTGGTC GCACTCTC  
· T D Q S H L A T A G S T S S H S L Q K Y Y I T G B E A E G F P A T V E ·  
ACCGACAGT CTACCTGGC CACCGGGGG AGCACAGACCA GCCACAGCT GCAGAGACTAC TACATCACCG GCGAGGGCGA GGGATCTCT GCGACCGTGG  
TGGCTGGTCA GAGTGGACCG GTGGGGCGC TOGTGTTGTT CGGTCTCATG ATGAGTGGC CGCTCOGGCT CCTAAGGGG CGGTGGCACC  
· F Q Y L P D T D D R H R I E E K R K R T Y E T F K S I M K K S P F ·  
AGTCCAGTA CCTGCGGAC ACCGACGACG GGCACGGGAT CGAGGAAAG CGGAAGGGGA CCTACGAGAC ATTCAAGAGC ATCATGAAGA AGTCCCCCTT  
TCAAGGTCA CGACGGGCTG TGGCTGCTG CGTGGCTCTA GCTCTCTTC GCGTCTGGCT GGATGCTCTG TAAGTCTCG TAGTACTTCT TCAGGGGAA  
· S G P T D P R P P P R R I A V P S R S S A S V P K R A P Q P Y P F ·  
CAGGGGCC ACCGATCCCA GACCCCCCCC TAGAGAACATC GCGCGGCCA CGAGATCTAG CGCCAGGGTG CCCAAGCTG CCCCCCAGCC CTACCTCTTC  
GTCCCCGGGG TGGCTAGGGT CTGGGGGGGG ATCTCTCTAG CGGCAACGGT CGTCTAGATC CGCGTGGAC GGGTGGCG GATGGGGAA  
T S S L S T I N Y D E F P T M V F P S G Q I S Q A S A L A P A P P Q ·  
ACACGAGCC TGAGCACCAT CAACTACGAC GAGTTCTTA CGATGGTGTG CCCCCAGGGC CAGATCTCTC AGGCTCTGC TCTGGACCT GCTCACCTC  
TGGTCGTOGG ACTGTGGTA GTGATGCTG CTCAGGGAT GGTAACACAA GGGTGGCG GTCAGAGAG CGGGAGACG AGACCGTGGA CGAGGGAG

· V L P Q A P A P A P A M V S A L A Q A P A P V V P V L A F G P P ·  
AGGTGCTGCC TCAGGCCCCCT GCTCCAGGCC CAGCCOTCGC CATGGTGTCT GCACCTGGCCC AGGCCTCCAGC TCCCTGTGCC GTGCTGGCCC CTGGACCTCC  
TCCACGACGG AGTCGGGGGA CGAGGTCGGG GTCGGGGAGC GTACCCAGA CGTGACOGGG TCCGAGGTGC AGGACACGG ACGACCGGG GACCTGGAGG

· Q A V A P P A P K P T Q A G E G T L S E A L L Q L Q F D D E D L G  
TCAGGTGTG CCCCCCTCTG CCCCTAAACC TACCCAGGCC GGGGAGGGAA CACTGCTGGA GGCCCTGCTG CAGCTCCAGT TGACGACAGA GGATCTGGGA  
AGTCGACAC CGGGGAGGAC GGGGATTGG ATGGTCCGG CCCCCCTCTG GTGACAGACT CGGGGACGAC GTCGAGGTCA AGCTGCTGCT CCTAGACCC

[0423] · A L L G N S T D P A V F T D L A S V D N S E F Q Q L L N Q G I P V A  
GCACGTCTGG GCATAGCAC CGACCCCGCC GTGTTTACCG ACCTGGCCTC CGTGACAC ACAGGAGTCC AGCNGCTCT CAACCAAGGGC ATCCCCTGCG  
CGTGACGACCG CTTTATCGTG GTGGGGGGG CACAAATGGC TGGACCCGGAG GCACCTGTT TGCGCTAAGG TGTGAGGA GTTGTCCCG TAGGACAGC

· P H T T E P M L M E Y P E A I T R L V T G A Q R P P D P A P A P L ·  
CCCCACACAC CACCGAGCC ATGCTGATGG AATAACCGGA GGCCATCACC AGACTGGTCA CAGGGCCCA GATCCAGCAC CAGCTCCACT  
GGGGTGTG TGCGCTCGGG TAGGACTTCTTATGGGCT CCGTAGTGG TCTGACAGCT CGCCGCGGTG CTGCGAGGT CTAGTCGCG GTCGAGGTGA

· G A P G L P N G L L S G D E D F S S T A D M D F S A L L S Q I S S  
GGGAGCCCCCT GGCCTGCTTA ATGGGCTGCT GTCTGGCAC GAGGACTCT CCACGATTCG CGACATGGAC TTGAGGGCCC TGCTGTCCA GATCAGCAGC  
CCCCGGGGGA CGGACGGAT TACCCGACCA CAGACCCCTG CTCTGAAGA GGTGTAACCG GCTGTACCTG AAGTGGGGGG ACGACAGGGT CTAGTCGCG

[0424] 表12 7xHBD/mEF1 $\alpha$ 核酸序列 (SEQ ID NO:41)

Tagttaataatctacaatagttaataatctacaatagttataatctacaatagttataatctacaatagttataatctacaatagttataatctacaat  
aggtaataatctacaat

[0425] 表13 Her2t核酸 (SEQ ID NO:44) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO:45)

[0426] Her2t (CHP) 核苷酸和氨基酸序列

M L L L V T S L L L C E L P H  
ATGCT TCTCCCTGGC ACAAGCTTC TGCTCTGTGA GTTACCAAC  
TACGA AGAGGACAC TGTTGGAG ACAGAACACT CAATGGTGT  
  
P A F L L I P C H P E C Q P Q N G S V T C F G P E A D Q C V A C A H  
CCAGCATTC TCCGTATCCC ATGCCACCTT GAGTGTCAAGC CCCAGAAATGG CTCAGTACCC TGTTTGAC CGGGAGCTGA CGAGTGTGTG GCCCTGTGCC  
GGTGTAGG AGGACTAGGG TACCGTGGGA CTACAGTGC GGTTCTTACG GAGTCACTGG ACAAAACCTG GCCTCCACT GGTACACAC CGGACACGGG  
  
Y K D P P F C V A R C P S G V K P D L S Y M P I W K F P D E E G A ·  
ACTATAAGGA CCCTCCCTTC TGCGGGCCC GCTGGCCCCAG CGGTGTGAAA CCTGACCTCT CCTACATGCC CATCTGGAG TTTCAGATG AGGAGGGCGC  
TGATATTCTT GGGGGGAGG AGCAGACGGG CGACGGGGTCG GCCACACTTT GGACTGGAGA GGATGTACGG GTAGACCTTC AAAGGTCTAC TCCCTCCCGC  
  
C Q P C P I N C T H S C V D D D D K G C P A E Q R A S P L T S I I  
ATGCCAGCCT TGCCCCATCA ACTGCACCCA CTCCGTGTG GACCTGGATG ACAAGGGCTG CCCCGCGAG CAGAGAGCCA GCUCTGTAC GTCCATCATC  
TACGGTCGGA ACGGGTAGT TGACGGGGT GAGGACACAC CTGGACCTAC TGTTCCCGAC GGCGGGCTC TGCTCTGGT CGGGAGACTG CAGGTAGTAG  
  
S A V V G I L L V V V L G V V F G I L I \*  
TCIGCGGTGG TTGGCATCT GCTGGTGTG TGCTGGGGG TGCTCTTGG GATCTCATC TGA  
AGACGCCACC AACGCTAAGA CGACCGACAC CAGAACCC ACCAGAAAC CTAGGAGTAG ACT

[0427] 表14 DHFRdm核酸 (SEQ ID NO:46) 和氨基酸 (SEQ ID NO:47)

[0428] DHFRdm核苷酸和氨基酸序列

M V G S L N ·  
ATGGTTG GTTOGCTAA  
TACCAAC CAAGCGATT  
  
C I V A V S Q N M G I G K N G D F P W P P L R N E S R Y F Q R M T  
CTGCATCGTC GCTGTGTGCC AGAACATGGG CATCGCAAG AACGGGACT TCCCTGGCC ACACGTCAGG AATGAATCCA GATATTTCCA GAGAATGACC  
GACGTAGCG CGACACAGGG TCTTGTACCC GTAGCGGTC TIGCCCTGA AGGGGACCGG TGGCGAGTCC TTACTTAGGT CTATAAAGGT CTCTTACITGG  
  
T T S S V E G K Q N L V I M G K K T W F S I P E K K N R P L K G R I N  
ACAACCTCTT CAGTAGAAGG TAAACAGAAT CTGGTGTAA TGCGTGTGAA GACCTGGTT TCCATCTCTG AGAAGAATGG ACCTTTAAG GGTAGAATTA  
TGTTGGAGAA GTCATCTTC ATTGTCTTA GACCATTAAT ACCCATCTT CTGGACCAAAG AGGTAAAGGAC TCTCTCTAG TGGAATTTT CCATCTTAAT  
  
L V L S R E L K E P P Q G A H F L S R S L D D A L K L T E Q P E L ·  
ATTAGTTCT CAGCAGAGAA CTCAAGAAC CTCCACAAAGG AGCTCATTT CTTCCTGAGA GTCTAGATGA TGCTTAAAAA CTTACTGAC ACCAGAATT  
TAAATCAAGA GTCGCTCTT GAGTCCTTG GAGGTGTCC TOGAGTAAA GAAAGGTCTT CAGATCTACT ACAGGAATTAA GAATGACTTG TTGGCTTAA  
  
A N K V D M V W I V G G S S V Y K E A M N H P G H L K L F V T R I  
ACCAAAATAA GTAGACATGG TCTGGATAGT TGGTGGCAGT TCTGTTTATA AGGAACCCAT GATACACCA GGCCTCTTA AACTATITGT GACAGGATC  
TGTTTATTCTT CATCTGTAC AGACCTATCA ACCACCGTCA AGACAAATAT TCCCTCGGTAA CTAGTGGGT CGGGAGAAT TTGATTAACA CTGTTCTTC  
  
M Q D F E S D T F F P E I D L E K Y K L L P E Y P G V L S D V Q E E  
ATGCAAGACT TTGAAAGTGA CACGTTTTT CCAGAAATTG ATTTGGAGAA ATATAAACTT CTGCGAGAT ACCCAGGTGT TCTCTCTGAT GTCCAGGAGG  
TAGGTCTGA AACTTCTACT GTGCAAAAAA GTCTTTAAC TAACCTCTT TATATTGAA GACGGTCTTA TGGGTCACA AGAGAGACTA CAGGTCTCC  
  
K G I K Y K F E V Y E K N D  
AGAAAGGCAT TAAGTACAA TTGAAAGTAT ATGAGAAGAA TGAT  
TCTTCCGTA ATTGATGTTT AAACCTCTA TACTCTCTT ACTA

## 序列表

<110> 西雅图儿童医院 (DBA西雅图儿童研究所)

<120> 多核苷酸的诱导型表达的系统、宿主细胞、方法和组合物

<130> OIUS2111465-E

<150> 62/058, 973

<151> 2014-10-02

<150> 61/977, 751

<151> 2014-04-10

<150> 61/986, 479

<151> 2014-04-30

<150> 62/089, 730

<151> 2014-12-09

<150> 62/090, 845

<151> 2014-12-11

<150> 62/088, 363

<151> 2014-12-05

[0001] <160> 94

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 2528

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> GMCSFss-Her2scFv-IgG4铰链-CD28tm-41BB- $\zeta$ -T2A-EG  
FRt

<400> 1

atgctgctgc tggtaaccag cctgctgtc tgcgagctgc cccacccgc ctttctgctg 60  
atccccata tccagatgac ccagtccccc agctccctgt cccctctgt gggcgatagg 120  
gtcaccatca cctgccgtgc cagtcaggat gtgaatactg ctgttagcctg gtatcaacag 180  
aaaccaggaa aagctccgaa actactgatt tactcggcat ctttcctcta ctctggagtc 240  
ccttctcgct tctctgggtc cagatctggg acggattca ctctgaccat cagcagtctg 300  
cagccggaag acttcgcaac ttattactgt cagcaacatt atactactcc tcccacgttc 360  
ggacagggtta ccaagggtgga gatcaaaggc agtactagcg ggggtggctc cggggcgga 420  
tcgggtgggg gcggcagcag cgagggttcag ctgggtggagt ctggcggtgg cctgggtgcag 480  
ccagggggct cactccgttt gtcctgtgca gcttctggct tcaacattaa agacacctat 540  
atacactggg tgcgtcaggc cccgggttaag ggcctggaaat gggttgcaag gatttatcct 600  
acgaatgggtt atactagata tggcgatagc gtcaaggggcc gtttcaactat aagcgac 660  
acatccaaaa acacagccta cctgcagatg aacagcctgc gtgctgagga cactggcgtc 720  
tattattgtt ctagatgggg aggggacggc ttctatgcta tggactactg gggtaagga 780  
accctggta cctgtcgtcag gaatctaagt acggaccggcc ctggcccccct tggcctatgt 840  
tctgggtgct ggtgggtgct ggaggcgtgc tggcctgcta cagcctgctg gtcaccgtgg 900

ccttcatcat cttttgggtg aaacggggca gaagaaaact cctgttatata ttcaaacaac 960  
 catttatgag accagtacaa actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgattccag 1020  
 aagaagaaga aggaggatgt gaactgcggg tgaagttcag cagaagcgcc gacgcccctg 1080  
 cctaccagca gggccagaat cagcttaca acgagctaa cctgggcaga agggaaagagt 1140  
 acgacgtct ggataagcgg agaggccggg accctgagat gggccggcaag ctcggcgga 1200  
 agaaccggca ggaaggcctg tataacgaac tgcaaaaaa caagatggcc gaggcctaca 1260  
 gcgagatcgg catgaaggcc gagcggaggc gggcaaggcc acacgacggc ctgtatcagg 1320  
 gcctgtccac cgccaccaag gatacctacg acgcccctgca catgcaggcc ctgccccaa 1380  
 ggctcgaggc cggccggagag ggcagaggaa gtcttctaact atgcggtgac gtggaggaga 1440  
 atccccggcc taggatgctt ctccctggta caagccttct gctctgttag ttaccacacc 1500  
 cagcatttctt cctgatcca cgcggaaatgtgt gtaacgaaat aggtatttgtt gaatttaaag 1560  
 actcaacttc cataaatgtt acgaatatta aacacttcaa aaactgcacc tccatcagt 1620  
 gcgatctcca catcctccgg gtggcattta ggggtgactc ctccacacat actcctcctc 1680  
 tgatccaca ggaactggat attctgaaaaa cctgtaaagga aatcacaggg tttttgtga 1740  
 ttcaggcttgc ctgtggaaac agacggacc tccatgcctt tgagaaccta gaaatcatac 1800  
 gccggcaggac caagcaacat ggtcagttt ctcttgcagt cgtcaggctg aacataaact 1860  
 ccttgggatt acgctccctc aaggagataa gtgtggaga tgtgataatt tcaggaaaca 1920  
 aaaatttgtt ctatgcaat acaataaact ggaaaaaaact gtttgggacc tccggcgtaga 1980  
 aaaccaaaat tataagcaac agaggtgaaa acagctgca ggcacaggc caggtctgcc 2040  
 atgccttgc ctccccccggag ggctgctggg gcccggagcc caggactgc gtctttgcc 2100  
 ggaatgtcag ccggccggag gaatgcgtgg acaagtgcac ccttgcggag ggtgagccaa 2160  
 gggagtttgtt ggagaactct gatgcatac agtgcaccc agagtgcctg cctcaggcc 2220  
 tgaacatcac ctgcacagga cggggaccag acaactgtat ccagtgtgcc cactacattt 2280  
 acggcccccctt ctgcgtcaag acctggccgg caggactcat gggagaaaac aacaccctgg 2340  
 tctggaaatgtt cgcagacgccc gcccattgtt gccacctgtt ccatccaaac tgcacctacg 2400  
 gatgcactgg gccaggctt gaaggctgtc caacgaatgg gcctaagatc ccgtccatcg 2460  
 ccactgggat ggtggggcc ctccctttgc tgctgggtt gcccctggg atcggcctct 2520  
 tcatgtga 2528

[0002]

<210> 2  
 <211> 66  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>  
 <223> GMCSFRss

<400> 2  
 atgcgtgc tggtgaccag cctgctgtc tgcgagctgc cccacccgc ctttctgtc 60  
 atcccc 66

<210> 3  
 <211> 735  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>  
 <223> CD19scFv DNA

<400> 3  
 gacatccaga tgacccagac cacctccagg ctgagcgcca gcctggcga cgggtgacc 60  
 atcagctgcc gggccagcca ggacatcagc aagtacctga actggtatca gcagaagccc 120  
 gacggcaccgc tcaagctgtt gatctaccac accagccggc tgacagcgg cgtccccagc 180  
 cggttagcg gcagcggctc cggcaccgac tacagctga ccatctccaa cctggaaacag 240  
 gaagatatcg ccacctactt ttgcccggc ggcacacac tgccctacac ctttggccgc 300  
 ggaacaaatgc tggaaatcac cggcggccacc tccggcggc gcaaggctgg cagcggcgg 360  
 ggcagccacca agggcggaggta gaagctgcgg gaaagcggcc ctggcctgtt gggcccccagc 420  
 cagagcctga gcgtgacactt caccgtggc ggcgtgagcc tgcccgacta cggcgtgagc 480

tggatccggc agccccccag gaagggcctg gaatggctgg gcgtgatctg gggcagcgag	540
accacctact acaacacgcgc cctgaagagc cggctgacca tcatcaagga caacagcaag	600
agccaggtgt tcctgaagat gaacagcctg cagaccgacg acaccgccat ctactactgc	660
gccaaggcact actactacgg cgccagctac gccatggact actggggcca gggcaccagc	720
gtgaccgtga gcagc	735
<210> 4	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial sequence)	
<220>	
<223> IgG4铰链	
<400> 4	
aatctaagt acggaccgcctt ctgcggccctt tgccct	36
<210> 5	
<211> 84	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial sequence)	
<220>	
<223> CD28跨膜域	
<400> 5	
atgttctggg tgctgggtgt ggtcggaggc gtgctggcct gctacagcct gctggtcacc	60
gtggccttca tcatcttttg ggtg	84
[0003]	
<210> 6	
<211> 126	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial sequence)	
<220>	
<223> 编码41BB域的DNA	
<400> 6	
aaacggggca gaaagaaaact cctgttatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa	60
actactcaag aggaagatgg ctgttagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt	120
gaacttg	126
<210> 7	
<211> 336	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial sequence)	
<220>	
<223> 编码CD3 ζ 域的DNA	
<400> 7	
cgggtgaagt tcagcagaag cgccgacgccc cctgcctacc agcaggccca gaatcagctg	60
tacaacgcgc tgaacctggg cagaaggaa gagtacgacg tcctggataa gcggagaggc	120
cgggaccctg agatggcgg caagcctcgcc cgaaagaacc cccaggaagg cctgtataac	180
gaactgcaga aagacaagat gcccggaggcc tacagcgaga tcggcatgaa gggcggcgg	240
aggcggggca agggccacga cgccctgtat cagggcctgt ccaccgccac caaggataacc	300
tacgacgccc tgcacatgca ggcctgccc ccaagg	336

<210> 8  
 <211> 72  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>  
 <223> 自切割T2A

<400> 8  
 ctcgaggcg gcggagaggg cagaggaagt cttctaacat gcggtgacgt ggaggagaat 60  
 cccggcccta gg 72

<210> 9  
 <211> 1074  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>  
 <223> EGFRt

<400> 9  
 atgcttctcc tggtgacaag cttctgctc tgtgagttac cacacccagc attcctcctg 60  
 atccccacgca aagtgtgtaa cgaaataggt attggtaat ttaaagactc actctccata 120  
 aatgctacga atattaaaca ctcaaaaac tgcaccca tcagtggcga tctccacatc 180  
 ctgccggtgg cattttaggg tgactccttc acacatactc ctcctctgga tccacaggaa 240  
 ctggatattc tgaaaaccgt aaaggaaatc acagggttt tgctgattca ggcttggcct 300  
 gaaaacagga cggaccccca tgccttttag aacctagaaa tcatacgccc caggaccaag 360  
 caacatggtc agtttctct tgcagtcgtc agcctgaaca taacatcctt gggattacgc 420  
 tccctcaagg agataagtga tggagatgtg ataatttcg gaaacaaaaaa ttgtgttat 480  
 gcaaatacaa taaactggaa aaaactgttt gggaccccg gtcaaaaaac caaaaattata 540  
 agcaacagag gtggaaaacag ctgcaaggcc acaggccagg tctgcatgc cttgtgtcc 600  
 cccgagggct gctggggccc ggagccagg gactgcgtct cttggccgaa tgtcagccga 660  
 ggcaggaaat gcgtggacaa gtcaacacctt ctggagggtg agccaaggaa gtttgtggag 720  
 aactctgagt gcatacagtgc ccacccagag tgcctgcctc agggcatgaa catcacctgc 780  
 acaggacggg gaccagacaa ctgtatccag tgtgccact acattgacgg cccccactgc 840  
 gtcagacact gcccggcagg agtcatggaa gaaaacaaca ccctggcttg gaagtaacga 900  
 gacggccggcc atgtgtgccca cctgtgccat ccaaactgca cctacggatg cactggccca 960  
 ggtcttgaag gctgtccaac gaatggcct aagatcccgt ccatgcccac tggatggtg 1020  
 gggccctcc tcttgctgct ggtggatggcc ctggggatcg gccttccat gtga 1074

[0004]

<210> 10  
 <211> 2529  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>  
 <223> 具有如GMCSFRss - CD19scFv - IgG4铰链 - CD28tm - 41BB - CD3 ζ - T2A - EGFRt这样连接的域的蛋白

<400> 10  
 atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgcgagctgc cccaccccgcc tttctgctg 60  
 atccccgaca tccagatgac ccagaccacc tccagctga gcggcagccct gggcgaccgg 120  
 gtgaccatca gctgccggc cagccaggac atcagcaagt acctgaactg gtatcagcag 180  
 aagcccgacg gcaccgtcaa gctgctgate taccacacca gccggctgca cagcggcgtg 240  
 cccagccggc tttagcggcag cgctccggc accgactaca gcctgaccat ctccaacctg 300  
 gaacaggaag atatcggccac ctactttgc cagcaggca acacactgccc ctacacctt 360  
 ggcggccggaa caaagctgga aatcaccggc agcaccctcg gcagcggcaa gcctggcagc 420  
 ggcgagggca gcaccaaggg cgaggtgaag ctgcagaaaa gggccctgg cctggggcc 480

[0005]

cccagccaga gcctgagcgt gacctgcacc gtgagcggcg tgaggctgcc cgactacggc 540  
 gtgagctgga tccggcagcc ccccaggaag ggcctgaaat ggctggcggt gatctgggc 600  
 agcgagagcca cctactacaa cagcgcctg aagagccgc tgaccatcat caaggacaac 660  
 agcaagagcc aggtttctt gaagatgaac agcctgcaga ccgacgacac cgccatctac 720  
 tactgcgcctt agcactacta ctacggcgcc agctacgcca tggactactg gggccaggc 780  
 accagcgtga ccgtgagcag cgagagcaag tacggacgc cctgcccccc ttgccttatg 840  
 ttctgggtgc tgggtgggt cgaggcgctg ctggcctgct acgcctgct ggtcaccgtg 900  
 gccttcatca tctttgggt gaaacggggc agaaaagaac tcctgtatat attcaaaca 960  
 ccatttatga gaccagtaca aactactcaa gaggaagatg gctgttagctg ccgatttcca 1020  
 gaagaagaag aaggaggatg tgaactgcgg gtgaaggta gcagaagcgc cgacgcctt 1080  
 gcctaccaggc agggccagaa tcagctgtac aacgagctga acctggcag aagggaaagag 1140  
 tacgacgtcc tggataagcg gagagggccg gaccctgaga tggcggccaa gcctcggcgg 1200  
 aagaaccccc aggaaggcct gtataacgaa ctgcagaaag acaagatggc cgaggctac 1260  
 agcgagatcg gcatgaaggg cgagcggagg cggggcaagg gccacgacgg cctgtatcag 1320  
 ggcctgtcca ccgcaccaa ggatacctac gacgcctgc acatgcaggc cctgccccca 1380  
 aggctcgagg gcccggaga gggcagagga agtcttctaa catgcgtga cgtggaggag 1440  
 aatcccggcc ctaggatgtc ttcctgttg acaagcttc tgctctgtga gttaccacac 1500  
 ccagcattcc tcctgateccc acgcaaaatg tctaaccggaa taggtattgg tgaatttaaa 1560  
 gactcaactc ccataaatgc tacgaatatt aaacacttca aaaactgcac ctccatcagt 1620  
 ggcgatctcc acatcctgccc ggtggcattt aggggtgact cttcacaca tactcctcct 1680  
 ctggatccac aggaactgga tattctgaaa accgtaaagg aaatcacagg gttttgctg 1740  
 attcaggctt ggcctgaaaa caggacggac ctccatgcct ttgagaacct agaaatcata 1800  
 cgcggcagga ccaagcaaca tggtcagttt tctttgcag tgcgcgcctt gaacataaca 1860  
 tccttggat tacgctccct caaggagata agtgtatggg atgtgataat tttaggaaac 1920  
 aaaaatttgt gctatgcaaa tacaataaac tggaaaaaac tggggggac ctccggcag 1980  
 aaaaacaaaa ttataagcaa cagaggtgaa aacagctgca aggcacagg ccaggtctgc 2040  
 catgccttgc gtcggggcggc ggcctgctgg ggccggggc ccaggactg cgtctttgc 2100  
 cggaatgtca gccgaggcag ggaatgcgtg gacaagtgc accttctgga gggtagcc 2160  
 agggagttt tggagaactc tgagtgcata cagtgccacc cagagtgcct gcctcaggcc 2220  
 atgaacatca cctgcacagg acggggacca gacaactgta tccagtgtc ccactacatt 2280  
 gacggcccccc actgcgtcaa gacctgcctg gcaggagtca tgggagaaaa caacaccctg 2340  
 gtcggaaagt acgcagacgc cgccatgtg tgccacctgt gcatccaaa ctgcacctac 2400  
 ggtgcactg ggcctggct tgaaggctgt ccaacgaatg ggcttaagat cccgtccatc 2460  
 gccactggga tggggggc ctcctcttg ctgctgttg tggccctgg gatcggcctc 2520  
 ttcatgtga 2529

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 842

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列 (Artificial sequence)

&lt;220&gt;

<223> GMCSFRss - CD19scFv - IgG4铰链 - CD28tm - 41BB  
- CD3 ζ - T2A - EGFRt

&lt;400&gt; 11

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

Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln  
 100 105 110  
 Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
 115 120 125  
 Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser  
 130 135 140  
 Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala  
 145 150 155 160  
 Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu  
 165 170 175  
 Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu  
 180 185 190  
 Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser  
 195 200 205  
 Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln  
 210 215 220  
 Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr  
 225 230 235 240  
 Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr  
 245 250 255  
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Glu Ser Lys Tyr Gly  
 260 265 270  
 Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Met Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly  
 275 280 285  
 Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile  
 290 295 300  
 Phe Trp Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln  
 305 310 315 320  
 [0006] Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser  
 325 330 335  
 Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys  
 340 345 350  
 Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln  
 355 360 365  
 Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu  
 370 375 380  
 Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg  
 385 390 395 400  
 Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met  
 405 410 415  
 Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Gly  
 420 425 430  
 Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp  
 435 440 445  
 Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Leu Glu Gly  
 450 455 460  
 Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu  
 465 470 475 480  
 Asn Pro Gly Pro Arg Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys  
 485 490 495  
 Glu Leu Pro His Pro Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn  
 500 505 510  
 Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr  
 515 520 525  
 Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His  
 530 535 540  
 Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro  
 545 550 555 560

Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr  
                   565                      570                      575  
 Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His  
                   580                      585                      590  
 Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly  
                   595                      600                      605  
 Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu  
                   610                      615                      620  
 Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn  
                   625                      630                      635                      640  
 Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly  
                   645                      650                      655  
 Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser  
                   660                      665                      670  
 Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly  
                   675                      680                      685  
 Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser  
                   690                      695                      700  
 Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro  
                   705                      710                      715                      720  
 Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys  
                   725                      730                      735  
 Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn  
                   740                      745                      750  
 Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr  
                   755                      760                      765  
 Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr  
                   770                      775                      780  
 Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr  
                   785                      790                      795                      800  
 Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys  
                   805                      810                      815  
 Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu  
                   820                      825                      830  
 Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met  
                   835                      840

<210> 12  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>  
 <223> (G4S)3连接体

<400> 12  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
     1                      5                      10                      15

<210> 13  
 <211> 327  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>  
 <223> Uniprot P0861 IgG4-Fc

<400> 13  
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
 65 70 75 80  
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110  
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 115 120 125  
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 130 135 140  
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 145 150 155 160  
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
 165 170 175  
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 180 185 190  
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu  
 195 200 205  
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
 210 215 220  
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys  
 225 230 235 240  
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 245 250 255  
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
 260 265 270  
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 275 280 285  
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser  
 290 295 300  
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
 305 310 315 320  
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 325

<210> 14  
 <211> 220  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>  
 <223> CD28跨膜域

<400> 14  
 Met Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Leu Phe Pro Ser Ile Gln Val  
 1 5 10 15  
 Thr Gly Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr

	20	25	30
Asp Asn Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser			
35	40	45	
Arg Glu Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu			
50	55	60	
Val Cys Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser			
65	70	75	80
Lys Thr Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr			
85	90	95	
Phe Tyr Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys			
100	105	110	
Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser			
115	120	125	
Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro			
130	135	140	
Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly			
145	150	155	160
Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile			
165	170	175	
Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met			
180	185	190	
Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro			
195	200	205	
Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser			
210	215	220	

[0009]     
 <210> 15  
 <211> 240  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>  
 <223> 4-1BB域

	<400> 15		
Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Val Leu			
1	5	10	15
Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro			
20	25	30	
Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys			
35	40	45	
Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile			
50	55	60	
Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser			
65	70	75	80
Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly			
85	90	95	
Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu			
100	105	110	
Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln			
115	120	125	
Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys			
130	135	140	
Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro			
145	150	155	160
Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala			
165	170	175	

Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu  
                   180                  185                  190  
 Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu  
                   195                  200                  205  
 Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe  
                   210                  215                  220  
 Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly  
                   225                  230                  235                  240

<210> 16  
 <211> 164  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>  
 <223> 人CD3 ζ 同种型3

<400> 16  
 Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu  
     1                      5                  10                  15  
 Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys  
     20                  25                  30  
 Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala  
     35                  40                  45  
 Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr  
     50                  55                  60  
 Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg  
 [0010]     65                  70                  75                  80  
 Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met  
     85                  90                  95  
 Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn  
     100                  105                  110  
 Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met  
     115                  120                  125  
 Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly  
     130                  135                  140  
 Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala  
     145                  150                  155                  160  
 Leu Pro Pro Arg

<210> 17  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>  
 <223> 人IgG1

<400> 17  
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
     1                  5                  10                  15

<210> 18  
 <211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 人IgG2

<400> 18

Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
1					5					10	

<210> 19

<211> 61

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 人IgG3

<400> 19

Glu	Leu	Lys	Thr	Pro	Leu	Gly	Asp	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Arg	Cys	Pro
1					5				10				15		
Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Cys	Pro	Arg	Cys	Pro	Glu
	20					25						30			
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Cys	Pro	Arg	Cys	Pro	Glu	Pro
	35				40						45				
Lys	Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Cys	Pro	Arg	Cys	Pro	Glu	Pro	
	50					55					60				

[0011]

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 人IgG4

<400> 20

Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro
1					5				10		

<210> 21

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 修饰的人IgG4

<400> 21

Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
1					5				10		

<210> 22

<211> 26

<212> DNA		
<213> 人工序列 (Artificial sequence)		
<220>		
<223> oJ02649		
<400> 22		26
atcaaaaagaa tagaccgaga tagggt		
<210> 23		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> 人工序列 (Artificial sequence)		
<220>		
<223> oJ02648		
<400> 23		26
ccgttaccttt aagaccaatg acttac		
<210> 24		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> 人工序列 (Artificial sequence)		
<220>		
<223> oJ02650		
[0012] <400> 24		18
ttgagagttt tcgccccg		
<210> 25		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> 人工序列 (Artificial sequence)		
<220>		
<223> oJ02651		
<400> 25		24
aatagacaga tcgctgagat aggt		
<210> 26		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> 人工序列 (Artificial sequence)		
<220>		
<223> oJ02652		
<400> 26		18
caggatatccg gtaagcgg		
<210> 27		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> 人工序列 (Artificial sequence)		

<220>		
<223>	oJ02653	
<400>	27	
cgaccagcaa ccatagtcc		19
<210>	28	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial sequence)	
<220>		
<223>	oJ02654	
<400>	28	
tagcggttg actcacgg		18
<210>	29	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial sequence)	
<220>		
<223>	oJ02655	
<400>	29	
gcagggagct agaacgattc		20
[0013]	<210>	30
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial sequence)	
<220>		
<223>	oJ02656	
<400>	30	
attgtctggat atagtgcagc ag		22
<210>	31	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial sequence)	
<220>		
<223>	oJ02657	
<400>	31	
tcgcaacggg tttgcc		16
<210>	32	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Artificial sequence)	
<220>		
<223>	oJ02658	

<400> 32		
aggaagatat cgccacctac t		21
<210> 33		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工序列 (Artificial sequence)		
<220>		
<223> oJ02601		
<400> 33		
cgggtgaagt tcagcagaag		20
<210> 34		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工序列 (Artificial sequence)		
<220>		
<223> oJ02735		
<400> 34		
actgtgtttg ctgacgcAAC		20
<210> 35		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工序列 (Artificial sequence)		
[0014]		
<220>		
<223> oJ02715		
<400> 35		
atgcttctcc tggtgacaAG		20
<210> 36		
<211> 9		
<212> PRT		
<213> 人工序列 (Artificial sequence)		
<220>		
<223> 修饰的人IgG4连接体		
<400> 36		
Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro		
1 5		
<210> 37		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> 人工序列 (Artificial sequence)		
<220>		
<223> 修饰的人IgG4		
<400> 37		

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro  
1 5 10

<210> 38  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>  
<223> 修饰的人IgG4

<400> 38  
Glu Val Val Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro  
1 5 10

<210> 39  
<211> 2586  
<212> DNA  
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>  
<223> TamR-tf(HEA3)

<400> 39  
atggtgtcca agctgtccca gctgcagaca gaactgctgg cagcactgct ggaaaggcg 60  
ctgagcaaag aggccctgat tcagggactc ggcgaacctg gaccttatct gctcgctggc 120  
gaaggccctc tggataaggg cgagagctgt ggcggaggaa gaggagagct ggccgagctg 180  
cctaacggcc tggcgagac aagaggcagc gaggacgaga cagacgacga cggcgaggac 240  
ttcaccccccc ccatacctgaa agagctggaa aacctgagcc ccgaggaagc cgccccaccag 300  
aaagccgtgg tggagacact gctgcaggaa gatccctggc gggtcgc当地 gatggtaag 360  
agctacactgc agcagcaca catccccag cgggaggtgg tggacaccac cgccctgaac 420  
cagagccacc tgagccagca cctgaacaag ggcaccccca tggaaaaccca gaagagagcc 480  
gccctgtaca cttggtagt gggaaagcag agagaggtgg cccagcagtt tacacacgccc 540  
ggccaggcg gcctgatcga ggaacactacc ggcgacgagc tgcccaccaa gaaggcgaga 600  
cgccacccggg ttaagtgggg ccctgcattc cagcagatcc tggccaggc ctacgagcgg 660  
cagaagaacc ccagcaaaga ggaacggggag acactggtgg aagagtgc当地 ccggcccgag 720  
tgcattccaga gaggcgttag cccttctcag gctcaggcc tcggcagcaa tctggtaacc 780  
gaagtgcggg tgtacaattt gttgc当地 ac cggcgaaaag aggaaggctt ccggcacaag 840  
ctgtctctg gcatatgag agccgc当地 ac ctgtggccca gccccctgat gatcaagcgg 900  
accaagaaga acagcctggc cctgagcctg accggccgatc agatgggtgc cgctctgctg 960  
gacgccc当地 cccctatcct gtacagcag tacgacccca ccagaccctt cagcgaggcc 1020  
agcatgatgg gcctgctgac caacctggcc gaccgggagc tggc当地 gatcaactgg 1080  
gccaaggcggg tgcccgctt cttggacactg accctgc当地 accaggctt cctgctggaa 1140  
tgtgc当地 ggcc tggaaatcct gatgatggc ctcgtgtgg aagcatggg acaccccgcc 1200  
aagctgctgt tcgccccca cctgctctg gaccgggacc agggaaaatg cgtggaggcc 1260  
atggtgagaa ttctcgacat gctgctggcc acctccagcc gttccggat gatgaacactg 1320  
caggcgagg aattcgtagt cctgaagttt atcatctgc tgaacagcgg cgtgtacacc 1380  
ttccctgtcat ccaccctgaa gttccctggaa gagaaggacc acatccaccc ggtgctggac 1440  
aagatcaccg acaccctgat ccacctgat gccaaggctg gcctgacact ccagcagcag 1500  
caccagagac tggcccgact gctgctgatc ctgagccaca tccggc当地 gagcaacaag 1560  
cgatggaaac acctgtacag catgaagttc aagaacgtgg tgccctgtt cgaccctgctg 1620  
ctcgagatgc tggatggccca cagactgc当地 gccc当地 acca gcaaggccgg agccagcgtg 1680  
gaggaaaccg accagtttca cttggccacc gccc当地 gagcaacaag cagccctgctg 1740  
aagtactaca tcaccggcga gggcgggaa ttccctgtt ccgtggagtt ccagtacactg 1800  
cccgacaccg acgacccggca ccggatcag gaaaaggcga agcggaccta cgagacattc 1860  
aagagcatca tgaagaagtc cccttctgat gggccaccgg atcccaaccgg cccccc当地 1920

agaatcgccg tgcccagcag atctagcgcc agcgtgccca agcctgcccc ccagccctac 1980  
 ccttcacca gcagccttag caccatcaac tacgacgagt tccctaccat ggtttcccc 2040  
 agccggccaga tctctcaggc ctctgcctg gcacctgcac cacctcaggt gtcgcctcag 2100  
 gcccctgtc cagccccaggc cccatgcatg gtgtctgcac tgcccaggc tccagctcct 2160  
 gtgcctgtc tggccctgg acctcctcgactgtgtggcc ctccgtcccc taaacctacc 2220  
 caggccgggg aggaaacact gtctgaggc ctgctgcag tccagttcga cgacgaggat 2280  
 ctgggagcac tgctggcaa tagcaccgc cccgcgtgt ttaccgaccc ggcctccgtg 2340  
 gacaacagcg agttccagca gtcctcaac cagggcatcc ctgtcgcccc acacaccacc 2400  
 gagcccatgc tcatggata ccccgaggcc atcaccagac tggcacagg cgcccgagg 2460  
 cctccagatc cagcaccaggc tccactggc gccctggcc tgcctaattgg gtcgtgtct 2520  
 ggcgacgagg acttctccag cattgccac atggacttca ggcctgtct gtcccgatc 2580  
 agcagc 2586

<210> 40  
 <211> 828  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)  
 <220>  
 <223> TamR-tf (HEA3)

<400> 40  
 Met Val Ser Lys Leu Ser Gln Leu Gln Thr Glu Leu Leu Ala Ala Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Glu Ser Gly Leu Ser Lys Glu Ala Leu Ile Gln Ala Leu Gly Glu  
 20 25 30  
 Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Ala Gly Glu Gly Pro Leu Asp Lys Gly Glu  
 35 40 45  
 Ser Cys Gly Gly Arg Gly Glu Leu Ala Glu Leu Pro Asn Gly Leu  
 50 55 60  
 Gly Glu Thr Arg Gly Ser Glu Asp Glu Thr Asp Asp Asp Gly Glu Asp  
 65 70 75 80  
 Phe Thr Pro Pro Ile Leu Lys Glu Leu Glu Asn Leu Ser Pro Glu Glu  
 85 90 95  
 Ala Ala His Gln Ala Val Val Glu Thr Leu Leu Gln Glu Asp Pro  
 100 105 110  
 Trp Arg Val Ala Lys Met Val Lys Ser Tyr Leu Gln Gln His Asn Ile  
 115 120 125  
 Pro Gln Arg Glu Val Val Asp Thr Thr Gly Leu Asn Gln Ser His Leu  
 130 135 140  
 Ser Gln His Leu Asn Lys Gly Thr Pro Met Lys Thr Gln Lys Arg Ala  
 145 150 155 160  
 Ala Leu Tyr Thr Trp Tyr Val Arg Lys Gln Arg Glu Val Ala Gln Gln  
 165 170 175  
 Phe Thr His Ala Gly Gln Gly Gly Leu Ile Glu Glu Pro Thr Gly Asp  
 180 185 190  
 Glu Leu Pro Thr Lys Lys Gly Arg Arg Asn Arg Phe Lys Trp Gly Pro  
 195 200 205  
 Ala Ser Gln Gln Ile Leu Phe Gln Ala Tyr Glu Arg Gln Lys Asn Pro  
 210 215 220  
 Ser Lys Glu Glu Arg Glu Thr Leu Val Glu Glu Cys Asn Arg Ala Glu  
 225 230 235 240  
 Cys Ile Gln Arg Gly Val Ser Pro Ser Gln Ala Gln Gly Leu Gly Ser  
 245 250 255  
 Asn Leu Val Thr Glu Val Arg Val Tyr Asn Trp Phe Ala Asn Arg Arg  
 260 265 270  
 Lys Glu Glu Ala Phe Arg His Lys Leu Ser Ala Gly Asp Met Arg Ala  
 275 280 285

Ala Asn Leu Trp Pro Ser Pro Leu Met Ile Lys Arg Ser Lys Lys Asn  
 290 295 300  
 Ser Leu Ala Leu Ser Leu Thr Ala Asp Gln Met Val Ser Ala Leu Leu  
 305 310 315 320  
 Asp Ala Glu Pro Pro Ile Leu Tyr Ser Glu Tyr Asp Pro Thr Arg Pro  
 325 330 335  
 Phe Ser Glu Ala Ser Met Met Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asp Arg  
 340 345 350  
 Glu Leu Val His Met Ile Asn Trp Ala Lys Arg Val Pro Gly Phe Val  
 355 360 365  
 Asp Leu Thr Leu His Asp Gln Val His Leu Leu Glu Cys Ala Trp Leu  
 370 375 380  
 Glu Ile Leu Met Ile Gly Leu Val Trp Arg Ser Met Glu His Pro Gly  
 385 390 395 400  
 Lys Leu Leu Phe Ala Pro Asn Leu Leu Leu Asp Arg Asn Gln Gly Lys  
 405 410 415  
 Cys Val Glu Gly Met Val Glu Ile Phe Asp Met Leu Leu Ala Thr Ser  
 420 425 430  
 Ser Arg Phe Arg Met Met Asn Leu Gln Gly Glu Glu Phe Val Cys Leu  
 435 440 445  
 Lys Ser Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly Val Tyr Thr Phe Leu Ser Ser  
 450 455 460  
 Thr Leu Lys Ser Leu Glu Glu Lys Asp His Ile His Arg Val Leu Asp  
 465 470 475 480  
 Lys Ile Thr Asp Thr Leu Ile His Leu Met Ala Lys Ala Gly Leu Thr  
 485 490 495  
 Leu Gln Gln Gln His Gln Arg Leu Ala Gln Leu Leu Leu Ile Leu Ser  
 500 505 510  
 His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Arg Met Glu His Leu Tyr Ser Met  
 515 520 525  
 Lys Cys Lys Asn Val Val Pro Leu Tyr Asp Leu Leu Glu Met Leu  
 530 535 540  
 Asp Ala His Arg Leu His Ala Pro Thr Ser Arg Gly Gly Ala Ser Val  
 545 550 555 560  
 Glu Glu Phe Gln Tyr Leu Pro Asp Thr Asp Asp Arg His Arg Ile Glu  
 565 570 575  
 Glu Lys Arg Lys Arg Thr Tyr Glu Thr Phe Lys Ser Ile Met Lys Lys  
 580 585 590  
 Ser Pro Phe Ser Gly Pro Thr Asp Pro Arg Pro Pro Pro Arg Arg Ile  
 595 600 605  
 Ala Val Pro Ser Arg Ser Ser Ala Ser Val Pro Lys Pro Ala Pro Gln  
 610 615 620  
 Pro Tyr Pro Phe Thr Ser Ser Leu Ser Thr Ile Asn Tyr Asp Glu Phe  
 625 630 635 640  
 Pro Thr Met Val Phe Pro Ser Gly Gln Ile Ser Gln Ala Ser Ala Leu  
 645 650 655  
 Ala Pro Ala Pro Pro Gln Val Leu Pro Gln Ala Pro Ala Pro Ala Pro  
 660 665 670  
 Ala Pro Ala Met Val Ser Ala Leu Ala Gln Ala Pro Ala Pro Val Pro  
 675 680 685  
 Val Leu Ala Pro Gly Pro Pro Gln Ala Val Ala Pro Pro Ala Pro Lys  
 690 695 700  
 Pro Thr Gln Ala Gly Glu Gly Thr Leu Ser Glu Ala Leu Leu Gln Leu  
 705 710 715 720  
 Gln Phe Asp Asp Glu Asp Leu Gly Ala Leu Leu Gly Asn Ser Thr Asp  
 725 730 735  
 Pro Ala Val Phe Thr Asp Leu Ala Ser Val Asp Asn Ser Glu Phe Gln  
 740 745 750

Gln Leu Leu Asn Gln Gly Ile Pro Val Ala Pro His Thr Thr Glu Pro  
 755 760 765  
 Met Leu Met Glu Tyr Pro Glu Ala Ile Thr Arg Leu Val Thr Gly Ala  
 770 775 780  
 Gln Arg Pro Pro Asp Pro Ala Pro Ala Pro Leu Gly Ala Pro Gly Leu  
 785 790 795 800  
 Pro Asn Gly Leu Leu Ser Gly Asp Glu Asp Phe Ser Ser Ile Ala Asp  
 805 810 815  
 Met Asp Phe Ser Ala Leu Leu Ser Gln Ile Ser Ser  
 820 825

<210> 41  
 <211> 119  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>  
 <223> 7xHBD/mEF1- $\alpha$

<400> 41  
 tagttaataa tctacaatag ttaataatct acaatagtta ataatctaca atagttataa 60  
 atctacaata gttataatac tacaatagtta aataatctac aatagttaat aatctacaa 119

<210> 42  
 <211> 2586  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

[0018]

<220>  
 <223> TamR-tf (HEA4)

<400> 42  
 atgggttcca agctgtccca gctgcagaca gaactgctgg cagcactgct ggaaaggccc 60  
 ctgagcaaag aggccctgtat tcagggactc ggcgaacctg gaccttatct gctgctggc 120  
 gaaggccctc tggataaggg cgagagctgt ggcggaggaa gaggagagct ggccgagctg 180  
 cctaacggcc tggcgagac aagaggcagc gaggacgaga cagacgacga cggcgaggac 240  
 ttcccccccc ccatcctgaa agagctggaa aacctgagcc ccgaggaagc cgccaccac 300  
 aaagccgtgg tggagacact gctgcaggaa gatccctggc ggtcgccaa gatggtaag 360  
 agctacactgc agcagcacaa catccccag cgggaggtgg tggacaccac cggcctgaac 420  
 cagagccacc tgagccagca cctgaacaag ggcacccca tggaaaaccca gaagagagcc 480  
 gccctgtaca cttggtagt gggaaagcag agagaggtgg cccagcagtt tacacacgcc 540  
 gcccaggggcg gcctgatcga ggaaccttacc ggcgacgagc tggccaccaa gaaggcaga 600  
 cggAACCGGT ttaagtgggg ccctgcattt cagcagatcc tttccaggc ctacgagcgg 660  
 cagaagaacc ccagcaaaga ggaacgggag acactggtgg aagagtgcac ccggcccgag 720  
 tgcattccaga gaggcgttag ccatttcctag gctcaggcc tcggcagca tctggtcacc 780  
 gaagtgcggg tgtacaattt gttgcacac cggcggaaag aggaagcattt ccggcacaag 840  
 ctgtctgtgt gcgatatacg agccgcacac ctgtggccca gccccctgtat gatcaagcgg 900  
 agcaagaaga acagectggc cctgagctg accggccatc agatgggttc cgctctgt 960  
 gacggccgagc cccctatctt gtacagcgg tacgacccca ccagaccctt cagcgaggcc 1020  
 agcatgtgg gcctgatcga caacctggcc gaccggagc tggcagat gatcaactgg 1080  
 gccaaggcggg tgcccggtt cgtggacctg accctgcacg accaggtcca cctgctggaa 1140  
 tgtgcctggc tggaaatctt gatgatcggc ctcgtgtgg aagcatggc acacccctgt 1200  
 aagctgctgt tcgccccca cctgctctg gaccggaaacc agggaaagtg cgtggaggcc 1260  
 atgggtggaga tcttcgacat gctgctggcc acctccagcc gttccggat gatgaacctg 1320  
 cagggcggagg aatcgtgtg cctgaagtc atcatctgc tgaacagcgg cgtgtacacc 1380  
 ttccctgtcat ccaccctgaa gttccctggaa gagaaggacc acatccaccg ggtgctggac 1440  
 aagatcacccg acaccctgtat ccacctgat gccaaggctg gcctgacact ccagcagcag 1500

caccagagac tggcccagct gctgctgate ctgagccaca tccggcacat gagcaacaag 1560  
 ggaatggAAC acctgtacAG catgaagtgc acgaacgtgg tgccccgtGA cgaccgtcTG 1620  
 ctcgaggCTG ccgatGCCA cagactgcAC gcccctacAA gcagaggCGG agccagcGT 1680  
 gagggaaACG accagtCTCA cctggCCACC gcccgcAGCA caagcAGCCa cagcctGCAG 1740  
 aagtactACA tcaccGGCA gcccggAGGA ttccctGCcA ccgtggAGTT ccagtacCTG 1800  
 cccgacacCG acgacGGCA cggatcgAG gaaaAGCGGA agcggaccta cgagacattC 1860  
 aagagcatCA tgaagaAGTC ccccttCAGC ggccccACCG atccccAGACc cccccCTAGA 1920  
 agaatcgCCG tgcccAGCAG atctagcGCC AGCGTGCcCA AGCCTGCCc CCAGCCtAC 1980  
 ccttCACCA gcagcCTGAG caccatCAAC tacgacGAGT tcCCTACCAT ggtgttCCC 2040  
 agcggccAGA tctctcAGGC ctctgctcTG gcacctGCTC cacctcAGGT gctgcctcAG 2100  
 gcccctGTC cagccccAGC ccctGCCATG gtgtctGCAC tggcccAGGC tccagctcT 2160  
 gtgcctGTc tggcccCTGG acctcCTAG GCTGTGCCCC ctccTGCcCC taaacCTAcc 2220  
 caggccGGGG aggaaCAct gtctgAGGcC ctgctGCAGc tccagttcGA cgacgaggat 2280  
 ctgggagcac tgctggcaa tagcaccGAC cccgcgtgt ttaccgacCT ggcctccGT 2340  
 gacaacAGCG agttccAGCA gtcctcaAC cagggatCC ctgtcGCCc ACACACCACc 2400  
 gagcccATGC tGATGGAATA ccccGAGGcC atcaccAGAC tggtcacAGG CGCCcAGG 2460  
 cctccAGATC cagcaccAGC tccactGGGA gcccctGGcC tgcctaAtGG gctgctGTc 2520  
 ggcgacGAGG acttctCCAG cattGCCGAC atggacttCA ggcctcGT gtcCcAGAc 2580  
 agcAGC 2586

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 862

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列 (Artificial sequence)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; TamR-tf (HEA4)

&lt;400&gt; 43

[0019] Met Val Ser Lys Leu Ser Gln Leu Gln Thr Glu Leu Leu Ala Ala Leu  
   1               5               10               15  
 Leu Glu Ser Gly Leu Ser Lys Glu Ala Leu Ile Gln Ala Leu Gly Glu  
   20               25               30  
 Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Ala Gly Glu Gly Pro Leu Asp Lys Gly Glu  
   35               40               45  
 Ser Cys Gly Gly Arg Gly Glu Leu Ala Glu Leu Pro Asn Gly Leu  
   50               55               60  
 Gly Glu Thr Arg Gly Ser Glu Asp Glu Thr Asp Asp Asp Gly Glu Asp  
   65               70               75               80  
 Phe Thr Pro Pro Ile Leu Lys Glu Leu Glu Asn Leu Ser Pro Glu Glu  
   85               90               95  
 Ala Ala His Gln Lys Ala Val Val Glu Thr Leu Leu Gln Glu Asp Pro  
   100              105              110  
 Trp Arg Val Ala Lys Met Val Lys Ser Tyr Leu Gln Gln His Asn Ile  
   115              120              125  
 Pro Gln Arg Glu Val Val Asp Thr Thr Gly Leu Asn Gln Ser His Leu  
   130              135              140  
 Ser Gln His Leu Asn Lys Gly Thr Pro Met Lys Thr Gln Lys Arg Ala  
   145              150              155              160  
 Ala Leu Tyr Thr Trp Tyr Val Arg Lys Gln Arg Glu Val Ala Gln Gln  
   165              170              175  
 Phe Thr His Ala Gln Gly Gly Leu Ile Glu Glu Pro Thr Gly Asp  
   180              185              190  
 Glu Leu Pro Thr Lys Lys Gly Arg Arg Asn Arg Phe Lys Trp Gly Pro  
   195              200              205  
 Ala Ser Gln Gln Ile Leu Phe Gln Ala Tyr Glu Arg Gln Lys Asn Pro  
   210              215              220  
 Ser Lys Glu Glu Arg Glu Thr Leu Val Glu Glu Cys Asn Arg Ala Glu

225	230	235	240
Cys Ile Gln Arg Gly Val Ser Pro Ser Gln Ala Gln Gly Leu Gly Ser			
245	250	255	
Asn Leu Val Thr Glu Val Arg Val Tyr Asn Trp Phe Ala Asn Arg Arg			
260	265	270	
Lys Glu Ala Phe Arg His Lys Leu Ser Ala Gly Asp Met Arg Ala			
275	280	285	
Ala Asn Leu Trp Pro Ser Pro Leu Met Ile Lys Arg Ser Lys Lys Asn			
290	295	300	
Ser Leu Ala Leu Ser Leu Thr Ala Asp Gln Met Val Ser Ala Leu Leu			
305	310	315	320
Asp Ala Glu Pro Pro Ile Leu Tyr Ser Glu Tyr Asp Pro Thr Arg Pro			
325	330	335	
Phe Ser Glu Ala Ser Met Met Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asp Arg			
340	345	350	
Glu Leu Val His Met Ile Asn Trp Ala Lys Arg Val Pro Gly Phe Val			
355	360	365	
Asp Leu Thr Leu His Asp Gln Val His Leu Leu Glu Cys Ala Trp Leu			
370	375	380	
Glu Ile Leu Met Ile Gly Leu Val Trp Arg Ser Met Glu His Pro Val			
385	390	395	400
Lys Leu Leu Phe Ala Pro Asn Leu Leu Leu Asp Arg Asn Gln Gly Lys			
405	410	415	
Cys Val Glu Gly Met Val Glu Ile Phe Asp Met Leu Leu Ala Thr Ser			
420	425	430	
Ser Arg Phe Arg Met Met Asn Leu Gln Gly Glu Glu Phe Val Cys Leu			
435	440	445	
Lys Ser Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly Val Tyr Thr Phe Leu Ser Ser			
450	455	460	
Thr Leu Lys Ser Leu Glu Glu Lys Asp His Ile His Arg Val Leu Asp			
465	470	475	480
Lys Ile Thr Asp Thr Leu Ile His Leu Met Ala Lys Ala Gly Leu Thr			
485	490	495	
Leu Gln Gln Gln His Gln Arg Leu Ala Gln Leu Leu Leu Ile Leu Ser			
500	505	510	
His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Gly Met Glu His Leu Tyr Ser Met			
515	520	525	
Lys Cys Lys Asn Val Val Pro Leu Tyr Asp Leu Leu Glu Ala Ala			
530	535	540	
Asp Ala His Arg Leu His Ala Pro Thr Ser Arg Gly Gly Ala Ser Val			
545	550	555	560
Glu Glu Thr Asp Gln Ser His Leu Ala Thr Ala Gly Ser Thr Ser Ser			
565	570	575	
His Ser Leu Gln Lys Tyr Tyr Ile Thr Gly Glu Ala Glu Gly Phe Pro			
580	585	590	
Ala Thr Val Glu Phe Gln Tyr Leu Pro Asp Thr Asp Asp Arg His Arg			
595	600	605	
Ile Glu Glu Lys Arg Lys Arg Thr Tyr Glu Thr Phe Lys Ser Ile Met			
610	615	620	
Lys Lys Ser Pro Phe Ser Gly Pro Thr Asp Pro Arg Pro Pro Pro Arg			
625	630	635	640
Arg Ile Ala Val Pro Ser Arg Ser Ser Ala Ser Val Pro Lys Pro Ala			
645	650	655	
Pro Gln Pro Tyr Pro Phe Thr Ser Ser Leu Ser Thr Ile Asn Tyr Asp			
660	665	670	
Glu Phe Pro Thr Met Val Phe Pro Ser Gly Gln Ile Ser Gln Ala Ser			
675	680	685	
Ala Leu Ala Pro Ala Pro Pro Gln Val Leu Pro Gln Ala Pro Ala Pro			

690	695	700
Ala Pro Ala Pro Ala Met Val Ser Ala Leu Ala Gln Ala Pro Ala Pro		
705	710	715
Val Pro Val Leu Ala Pro Gly Pro Pro Gln Ala Val Ala Pro Pro Ala		720
725	730	735
Pro Lys Pro Thr Gln Ala Gly Glu Gly Thr Leu Ser Glu Ala Leu Leu		
740	745	750
Gln Leu Gln Phe Asp Asp Glu Asp Leu Gly Ala Leu Leu Gly Asn Ser		
755	760	765
Thr Asp Pro Ala Val Phe Thr Asp Leu Ala Ser Val Asp Asn Ser Glu		
770	775	780
Phe Gln Gln Leu Leu Asn Gln Gly Ile Pro Val Ala Pro His Thr Thr		
785	790	795
Glu Pro Met Leu Met Glu Tyr Pro Glu Ala Ile Thr Arg Leu Val Thr		800
805	810	815
Gly Ala Gln Arg Pro Pro Asp Pro Ala Pro Ala Pro Leu Gly Ala Pro		
820	825	830
Gly Leu Pro Asn Gly Leu Leu Ser Gly Asp Glu Asp Phe Ser Ser Ile		
835	840	845
Ala Asp Met Asp Phe Ser Ala Leu Leu Ser Gln Ile Ser Ser		
850	855	860

<210> 44  
 <211> 408  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

[0021] <220>  
 <223> Her2t

<400> 44  
 atgtttctcc tggtgacaaag ccttctgctc tgtgagttac cacacccagc attcctcctg 60  
 atccccatgcc accctgagtg tcagccccag aatggctca gtagctgttt tggaccggag 120  
 gctgaccagt gtgtggcctg tgccccactat aaggaccctc cttctgcgtt ggcccgctgc 180  
 cccagcgggtg tgaaacctga cctctcctac atgcccattt ggaagttcc agatgaggag 240  
 ggcgcattgcc acccttgccc catcaactgc acccacttctt gtgtggaccc ttatgacaag 300  
 ggctgcccccg ccgagcagag agccagccct ctgacgtcca tcatctctgc ggtgggtggc 360  
 attctgctgg tcgtggctt gggggatcc tttggatcc tcatctga 408

<210> 45  
 <211> 135  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>  
 <223> Her2t

<400> 45  
 Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro  
 1 5 10 15  
 Ala Phe Leu Leu Ile Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly  
 20 25 30  
 Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala  
 35 40 45  
 His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val  
 50 55 60  
 Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu

65	70	75	80
Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp			
85	90	95	
Leu Asp Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr			
100	105	110	
Ser Ile Ile Ser Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly			
115	120	125	
Val Val Phe Gly Ile Leu Ile			
130	135		

<210> 46  
 <211> 561  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>  
 <223> DHFRdm

<400> 46  
 atggttgggt cgctaaactg catcgtcgct gtgtccaga acatggcat cggcaagaac 60  
 ggggacttcc cctggccacc gtcaggaat gaatccagat atttccagag aatgaccaca 120  
 acctcttcag tagaaggtaa acagaatctg gtgattatgg gtaagaagac ctgggtctcc 180  
 attcctgaga agaatcgacc tttaaagggt agaattaatt tagttcttag cagagaactc 240  
 aaggaacctc cacaaggagc tcattttctt tccagaagtc tagatgtgc cttaaaaactt 300  
 actgaacaac cagaatttagc aaataaaagta gacatggct ggatagttgg tggcagttct 360  
 gtttataagg aagccatgaa tcacccaggc catcttaaac tatttgtac aaggatcatg 420  
 caagactttg aaagtgacac gtttttcca gaaatttgatt tgagaaaaata taaaacttctg 480  
 ccagaataacc caggtgttct ctctgatgtc caggaggaga aaggcattaa gtacaaattt 540  
 [0022] gaagtatatg agaagaatga t 561

<210> 47  
 <211> 187  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>  
 <223> DHFRdm

<400> 47  
 Met Val Gly Ser Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln Asn Met Gly  
 1 5 10 15  
 Ile Gly Lys Asn Gly Asp Phe Pro Trp Pro Pro Leu Arg Asn Glu Ser  
 20 25 30  
 Arg Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Ser Ser Val Glu Gly Lys Gln  
 35 40 45  
 Asn Leu Val Ile Met Gly Lys Lys Thr Trp Phe Ser Ile Pro Glu Lys  
 50 55 60  
 Asn Arg Pro Leu Lys Gly Arg Ile Asn Leu Val Leu Ser Arg Glu Leu  
 65 70 75 80  
 Lys Glu Pro Pro Gln Gly Ala His Phe Leu Ser Arg Ser Leu Asp Asp  
 85 90 95  
 Ala Leu Lys Leu Thr Glu Gln Pro Glu Leu Ala Asn Lys Val Asp Met  
 100 105 110  
 Val Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val Tyr Lys Glu Ala Met Asn His  
 115 120 125  
 Pro Gly His Leu Lys Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln Asp Phe Glu  
 130 135 140

Ser Asp Thr Phe Pro Glu Ile Asp Leu Glu Lys Tyr Lys Leu Leu  
145 150 155 160  
Pro Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Asp Val Gln Glu Glu Lys Gly Ile  
165 170 175  
Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Asn Asp  
180 185

<210> 48

<400> 48  
000

<210> 49

<400> 49  
000

<210> 50

<400> 50  
000

<210> 51

<400> 51  
000

[0023] <210> 52

<400> 52  
000

<210> 53

<400> 53  
000

<210> 54

<400> 54  
000

<210> 55

<400> 55  
000

<210> 56

<400> 56  
000

<210> 57

<400> 57  
000

<210> 58

<400> 58  
000

<210> 59

<211> 98

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> CH3域

<400> 59

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

[0024]

<210> 60

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 铰链域

<400> 60

Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro
1					5			10			

<210> 61

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> CH2域

<400> 61

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

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

<210> 62  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>  
 <223> CH3蛋白域

<400> 62  
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu  
 1 5 10 15  
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
 20 25 30  
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
 35 40 45  
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
 50 55 60  
 Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly  
 65 70 75 80  
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr  
 85 90 95  
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 100 105

[0025]

<210> 63

<400> 63  
 000

<210> 64  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>  
 <223> 信号肽

<400> 64  
 Met Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Leu Phe Pro  
 1 5 10

<210> 65  
 <211> 134  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 胞外域

&lt;400&gt; 65

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

&lt;210&gt; 66

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; PRT

[0026] &lt;213&gt; 人工序列 (Artificial sequence)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 跨膜域

&lt;400&gt; 66

Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu
1				5				10					15	
Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val				
					20			25						

&lt;210&gt; 67

&lt;211&gt; 50

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列 (Artificial sequence)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 胞内域

&lt;400&gt; 67

Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe	Trp	Val	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu
1				5				10					15		
Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met	Thr	Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr
					20			25					30		
Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Ala	Pro	Pro	Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr
					35			40					45		
Arg	Ser														
					50										

<210> 68

<220>

<223> 信号肽

<400> 68

000

<210> 69

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 信号肽

<400> 69

Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu

1

5

10

15

Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser

20

<210> 70

<211> 166

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

[0027] <220>

<223> 胞外域

<400> 70

Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe

1

5

10

15

Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser

20

25

30

Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys

35

40

45

Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala

50

55

60

Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser

65

70

75

80

Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly

85

90

95

Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile

100

105

110

Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val

115

120

125

Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp

130

135

140

Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu

145

150

155

160

Pro Gly His Ser Pro Gln

165

<210> 71

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 跨膜域

<400> 71

Ile	Ile	Ser	Phe	Phe	Leu	Ala	Leu	Thr	Ser	Thr	Ala	Leu	Leu	Phe	Leu
1				5					10					15	
Leu	Phe	Phe	Leu	Thr	Leu	Arg	Phe	Ser	Val	Val					
				20				25							

<210> 72

<211> 42

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 胞内域

<400> 72

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

[0028]

<210> 73

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 信号肽

<400> 73

Met	Lys	Trp	Lys	Ala	Leu	Phe	Thr	Ala	Ala	Ile	Leu	Gln	Ala	Gln	Leu
1				5						10				15	
Pro	Ile	Thr	Glu	Ala											
				20											

<210> 74

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 胞外域

<400> 74

Gln	Ser	Phe	Gly	Leu	Leu	Asp	Pro	Lys
1				5				

<210> 75  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>  
 <223> 跨膜域

<400> 75  
 Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu  
 1 5 10 15  
 Thr Ala Leu Phe Leu  
 20

<210> 76  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>  
 <223> 胞内域

<400> 76  
 Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr  
 20 25 30  
 [0029] Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Lys  
 35 40 45  
 Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln  
 50 55 60  
 Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu  
 65 70 75 80  
 Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr  
 85 90 95  
 Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro  
 100 105 110  
 Arg

<210> 77  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>  
 <223> ITAM I

<400> 77  
 Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn  
 1 5 10 15  
 Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg  
 20 25

<210> 78

<211> 29  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>  
 <223> ITAM 2

<400> 78  
 Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met  
 20 25

<210> 79  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>  
 <223> ITAM 3

<400> 79  
 Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser  
 1 5 10 15  
 Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln  
 20 25

[0030] <210> 80  
 <211> 66  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>  
 <223> 前导序列

<400> 80  
 atgcttctcc tggtgacaag ccttctgctc tgtgagttac cacacccagc attcctcctg 60  
 atcccc 66

<210> 81  
 <211> 734  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>  
 <223> Her2scFV

<400> 81  
 gatatccaga tgaccaggc cccgagctcc ctgtccgcct ctgtggcgta tagggtcacc 60  
 atcacctgcc gtgccagtca ggatgtgaat actgctgttag cctggtatca acagaaaccca 120  
 ggaaaagctc cgaaaactact gatttactcg gcataccttcc tctactctgg agtcccttct 180  
 cgcttctctg gttccagatc tgggacggat ttcaactctga ccatcagcag tctgcagccg 240  
 gaagacttcg caacttattta ctgtcagcaa cattatacta ctcccccac gttcgacag 300  
 ggtaccaagg tggagatcaa aggcaacttactt agcggcggtg gctccggggg cggatccggt 360  
 gggggcggca gcagcggaggt tcagctgggt gagtctggcg gtggcctgggt gcagccaggg 420  
 ggctcactcc gtttgcctc tgccatcttctt ggcttcaaca tttaagacac ctatatacac 480

tgggtgcgtc	aggccccggg	taagggcctg	aatgggttgc	caaggattta	tcctacgaat	540
ggttatacta	gatatgccga	tagcgtcaag	ggccgtttca	ctataagcgc	agacacatcc	600
aaaaacacag	cctacctgca	gatgaacagc	ctgcgtgctg	aggacactgc	cgtctattat	660
tgttcttagat	ggggagggga	cggcttctat	gctatggact	actggggtca	aggaaccctg	720
gtcaccgtct	cgag					734
<210>	82					
<211>	36					
<212>	DNA					
<213>	人工序列 (Artificial sequence)					
<220>						
<223>	铰链间隔区					
<400>	82					
gagagcaagt	acggaccgc	ctgccccct	tgccct			36
<210>	83					
<211>	84					
<212>	DNA					
<213>	人工序列 (Artificial sequence)					
<220>						
<223>	CD28tm					
<400>	83					
atgttctggg	tgctgggtgt	ggtcggaggc	gtgctggcct	gctacagcct	gctggtcacc	60
gtggccttca	tcatctttg	ggtg				84
[0031]						
<210>	84					
<211>	126					
<212>	DNA					
<213>	人工序列 (Artificial sequence)					
<220>						
<223>	4-1BB					
<400>	84					
aaacggggca	gaaagaaaact	cctgttatata	ttcaaacaac	catttatgag	accagtacaa	60
actactcaag	aggaagatgg	ctgtagctgc	cgatttccag	aagaagaaga	aggaggatgt	120
gaacttg						126
<210>	85					
<211>	336					
<212>	DNA					
<213>	人工序列 (Artificial sequence)					
<220>						
<223>	CD3 ζ					
<400>	85					
cgggtgaagt	tcagcagaag	cggccacgccc	cctgcctacc	agcaggccca	aatcagctg	60
tacaacgagc	tgaacctggg	cagaaggaa	gagtacgacg	tcctggataa	gcggagggc	120
cgggaccctg	agatggcgg	caagcctcg	cggaagaacc	cccaggaagg	cctgtataac	180
gaactgcaga	aagacaagat	ggccgaggcc	tacagcgaga	tcggcatgaa	gggcgagcgg	240
aggcggggca	agggccacga	cggcctgtat	cagggctgt	ccaccgcccac	caaggatacc	300
tacgacgccc	tgcacatgca	ggccctgccc	ccaagg			336

<210>	86
<211>	72
<212>	DNA
<213>	人工序列 (Artificial sequence)
<220>	
<223>	T2A
<400>	86
ctcgaggcg gcggagagg cagaggaagt cttctaacat gcggtgacgt ggaggagaat	60
cccgcccta gg	72
<210>	87
<211>	1074
<212>	DNA
<213>	人工序列 (Artificial sequence)
<220>	
<223>	tEGFR
<400>	87
atgcttctcc tggtgacaag ccttctgctc tgtgagttac cacaccgcg attcctcctg	60
atccccacgca aagtgtgtaa cgaaataggt attggtaat ttaaagactc actctccata	120
aatgctacga atattaaaca cttcaaaaaac tgcacctcca tcagtggcga tctccacatc	180
ctgccgggtgg cattttaggg tgactccttc acacataactc ctccctggta tccacaggaa	240
ctggatattc taaaaaccgt aaaggaaatc acagggttt tgctgattca ggcttggcct	300
gaaaacagga cggacctcca tgcctttag aacctagaaa tcatacgcgg caggaccaag	360
caacatggc agttttctc tgcatcgctc agcctgaaca taacatcctt gggattacgc	420
tccctcaagg agataagtga tggagatgtg ataattcag gaaacaaaaaaa ttttgtctat	480
gcaaatacaa taaaactggaa aaaactgttt gggacctccg gtcagaaaaac caaaattata	540
agcaacagag gtgaaaacag ctgcaaggcc acaggccagg tctgccatgc cttgtgctcc	600
cccgagggct gctggggccc ggagccagg gactgcgtct cttgccggaa tgtcagccga	660
ggcaggaaat gctggacaa gtcaacacctt ctggagggtg agccaaggaa gtttggag	720
aactctgagt gcatacagtg ccacccagag tgcctgcctc aggccatgaa catcacctgc	780
acaggacggg gaccagacaa ctgtatccag tgtgccact acattgacgg ccccaactgc	840
gtcaagacct gcccgccagg agtcatggaa gaaaacaaca ccctggctg gaagtacgca	900
gacgcccggcc atgtgtgcca cctgtgccat ccaaactgca cctacggatg cactggcca	960
ggtcttgaag gctgtccaac gaatgggcct aagatcccgt ccatcgccac tggatggtg	1020
ggggccctcc tettgtctgct ggtggtgcc ctgggatcg gcctttcat gtga	1074
[0032]	
<210>	88
<211>	11
<212>	PRT
<213>	人工序列 (Artificial sequence)
<220>	
<223>	包括含有CDRL1序列的可变区轻链的人源化ScFv
<400>	88
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn	
1	5
<210>	89
<211>	7
<212>	PRT
<213>	人工序列 (Artificial sequence)

<220>  
<223> CDRL2

<400> 89  
Ser Arg Leu His Ser Gly Val  
1 5

<210> 90  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>  
<223> CDRL3

<400> 90  
Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly  
1 5

<210> 91  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>  
<223> CDRH1

[0033] <400> 91  
Asp Tyr Gly Val Ser  
1 5

<210> 92  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>  
<223> CDRH2

<400> 92  
Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser  
1 5 10 15

<210> 93  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>  
<223> CDRH3

<400> 93  
Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
1 5

<210> 94  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> 人工序列 (Artificial sequence)

[0034] <220>  
<223> scFv中的VH和VL之间的柔性连接体

<400> 94  
Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr  
1 5 10 15  
Lys Gly

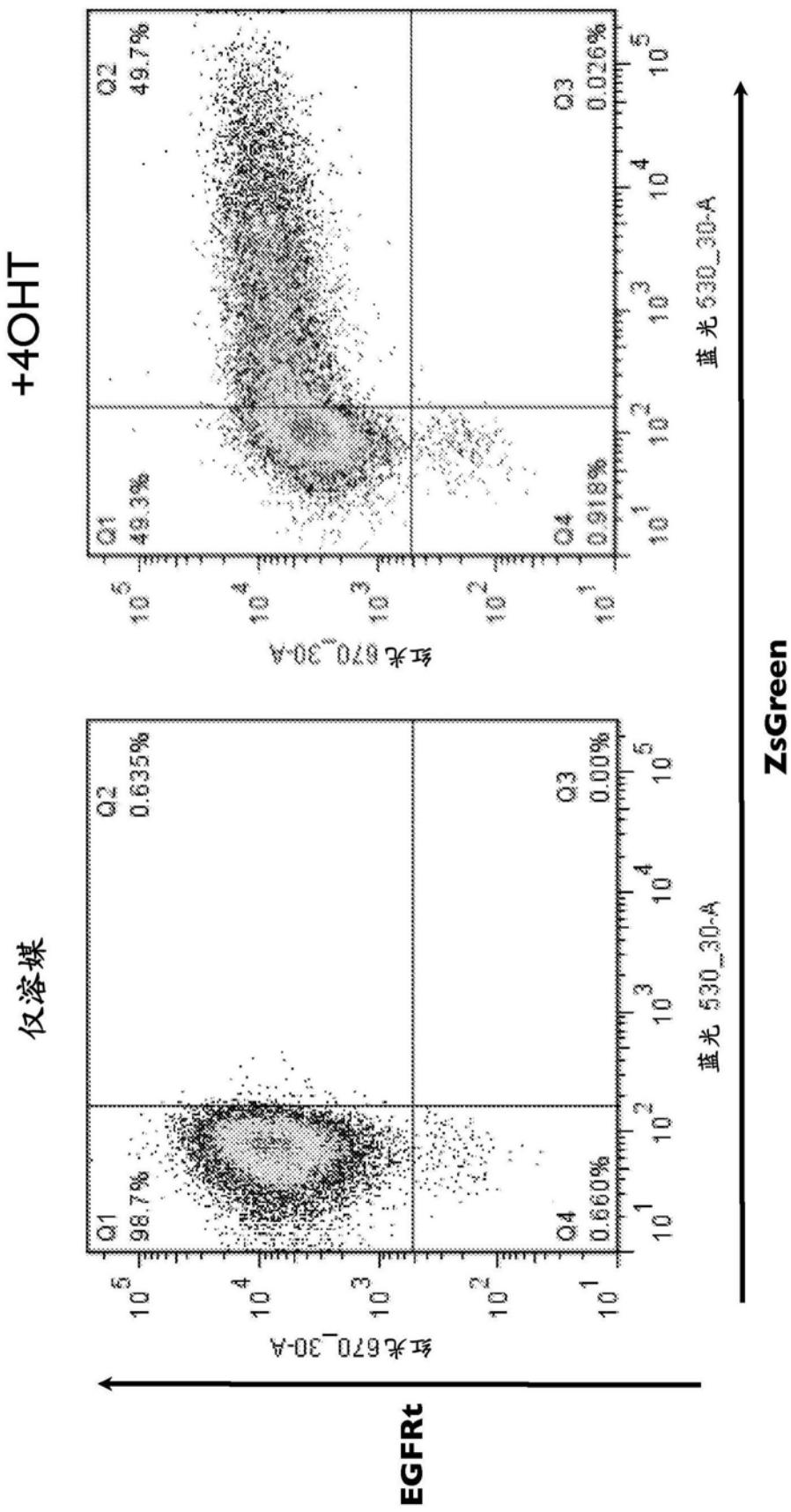


图1A

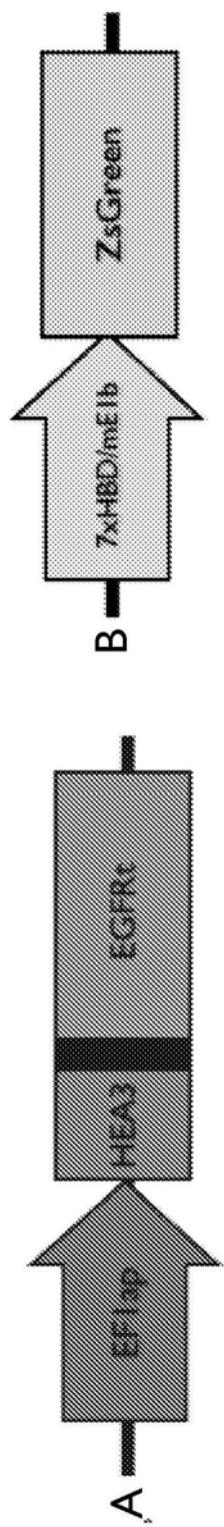


图1B

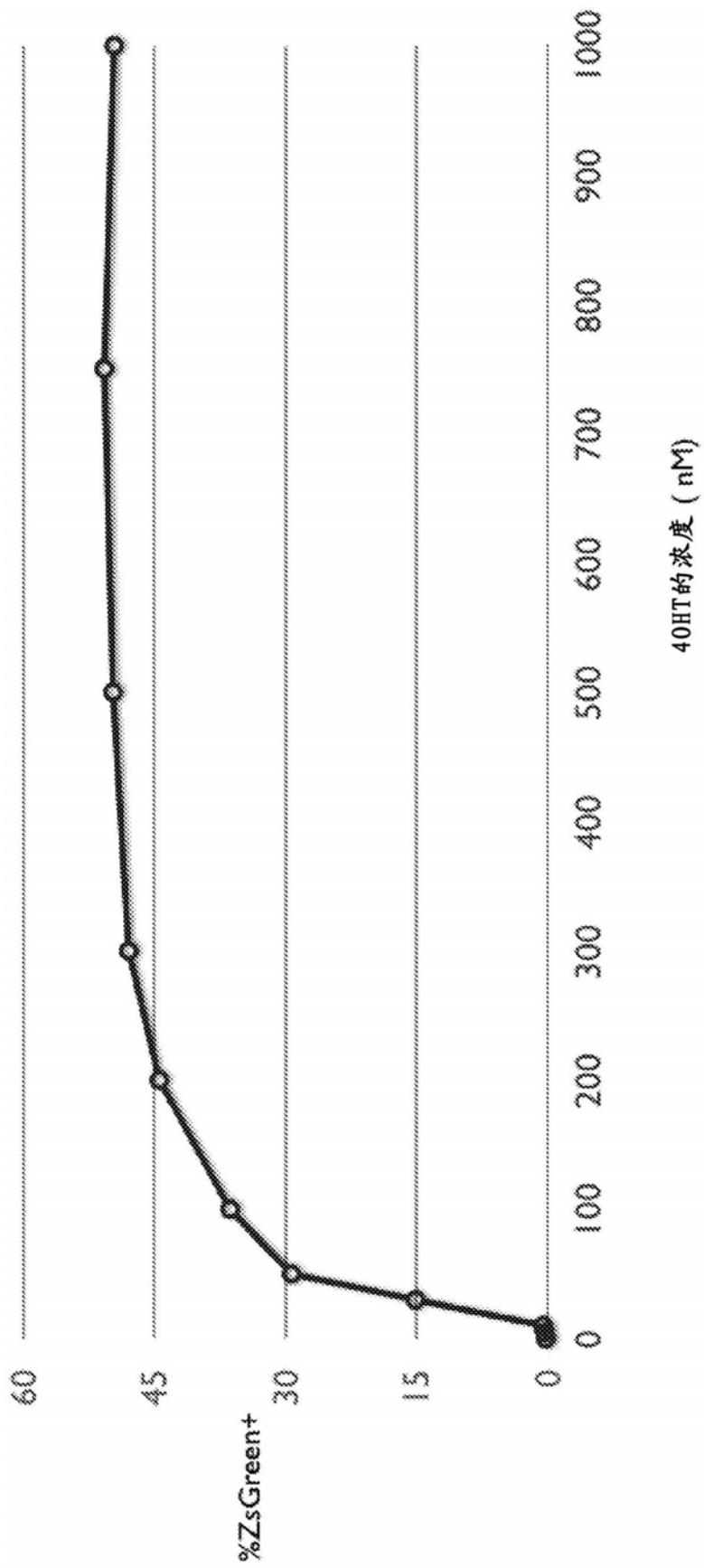


图2

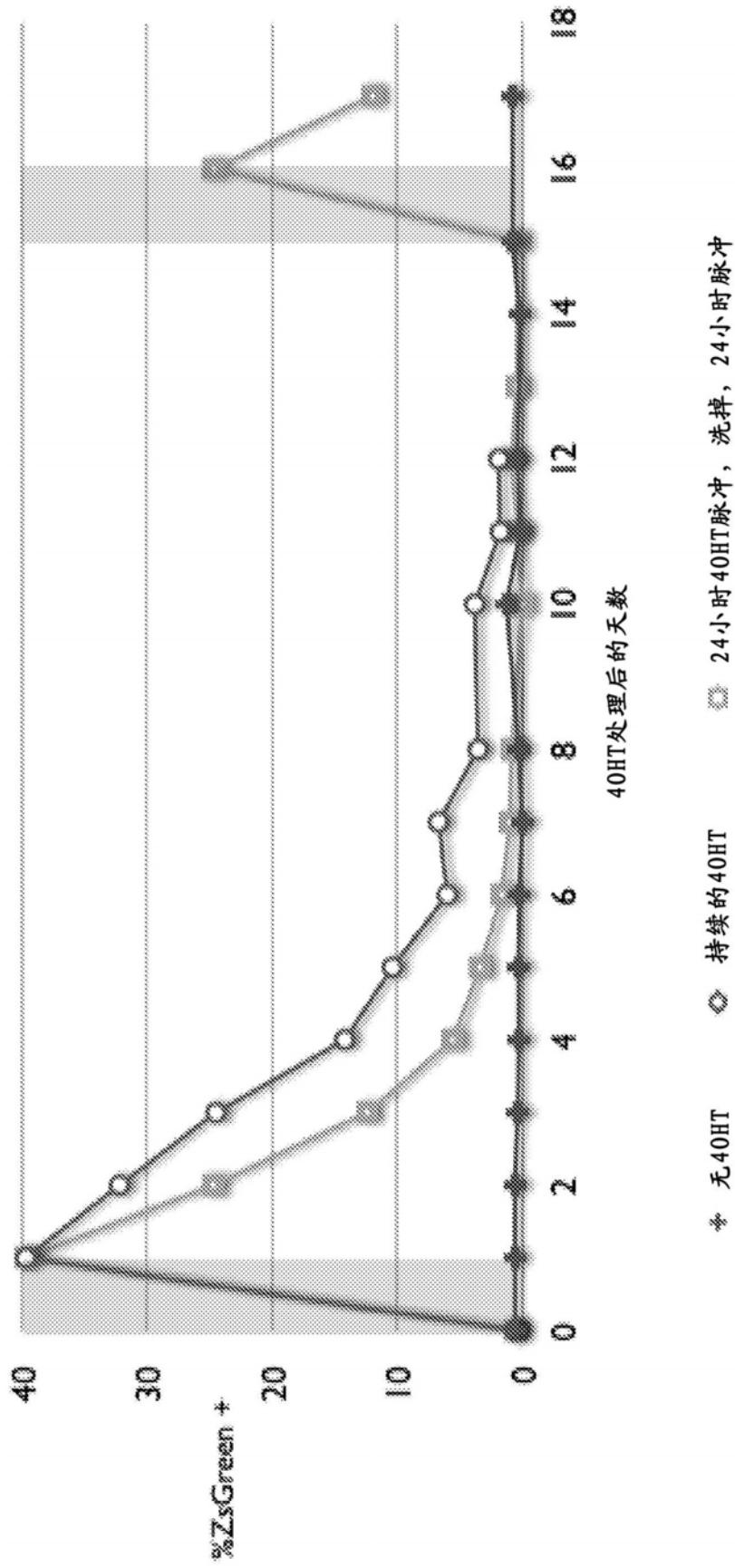


图3

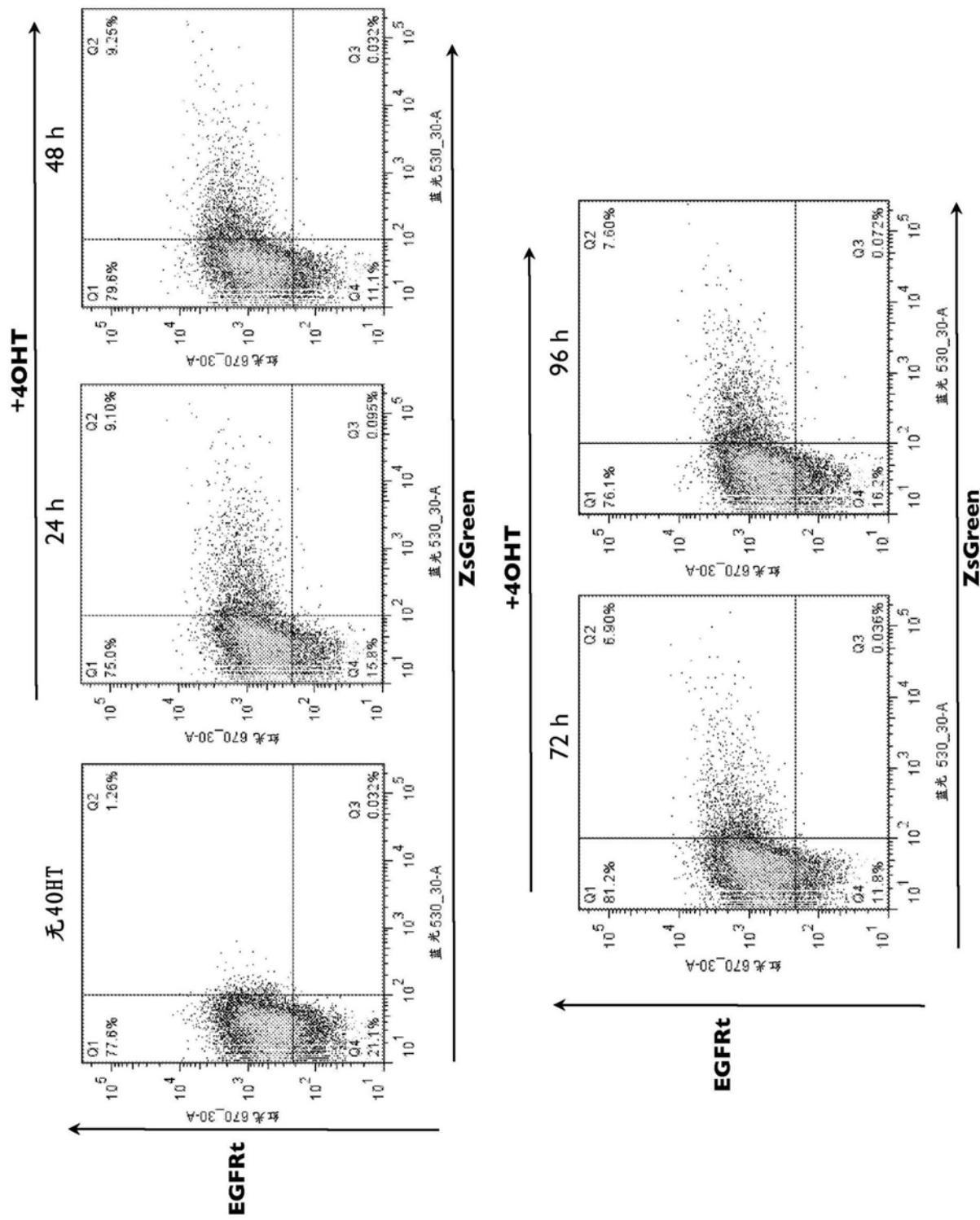


图4A

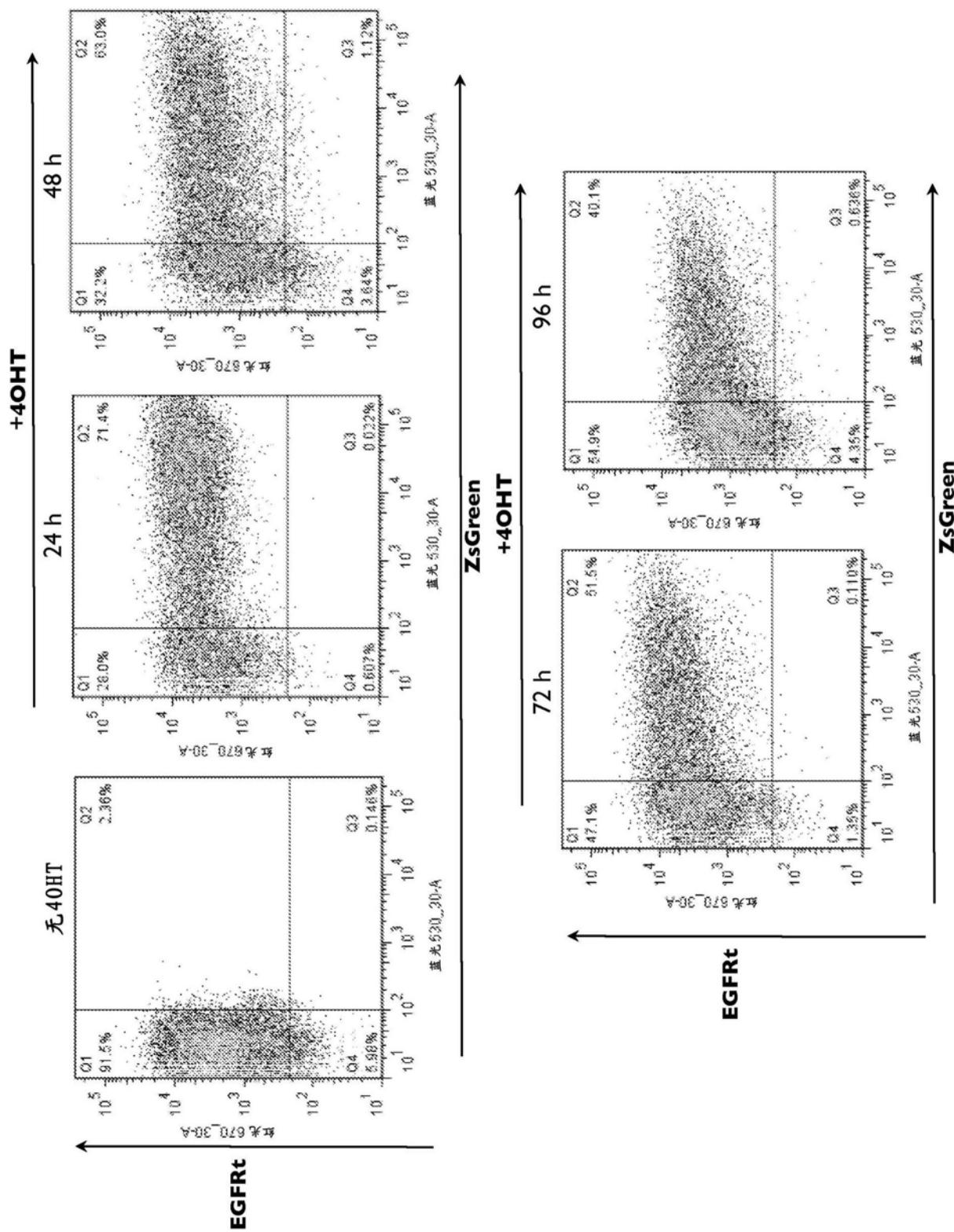


图4B

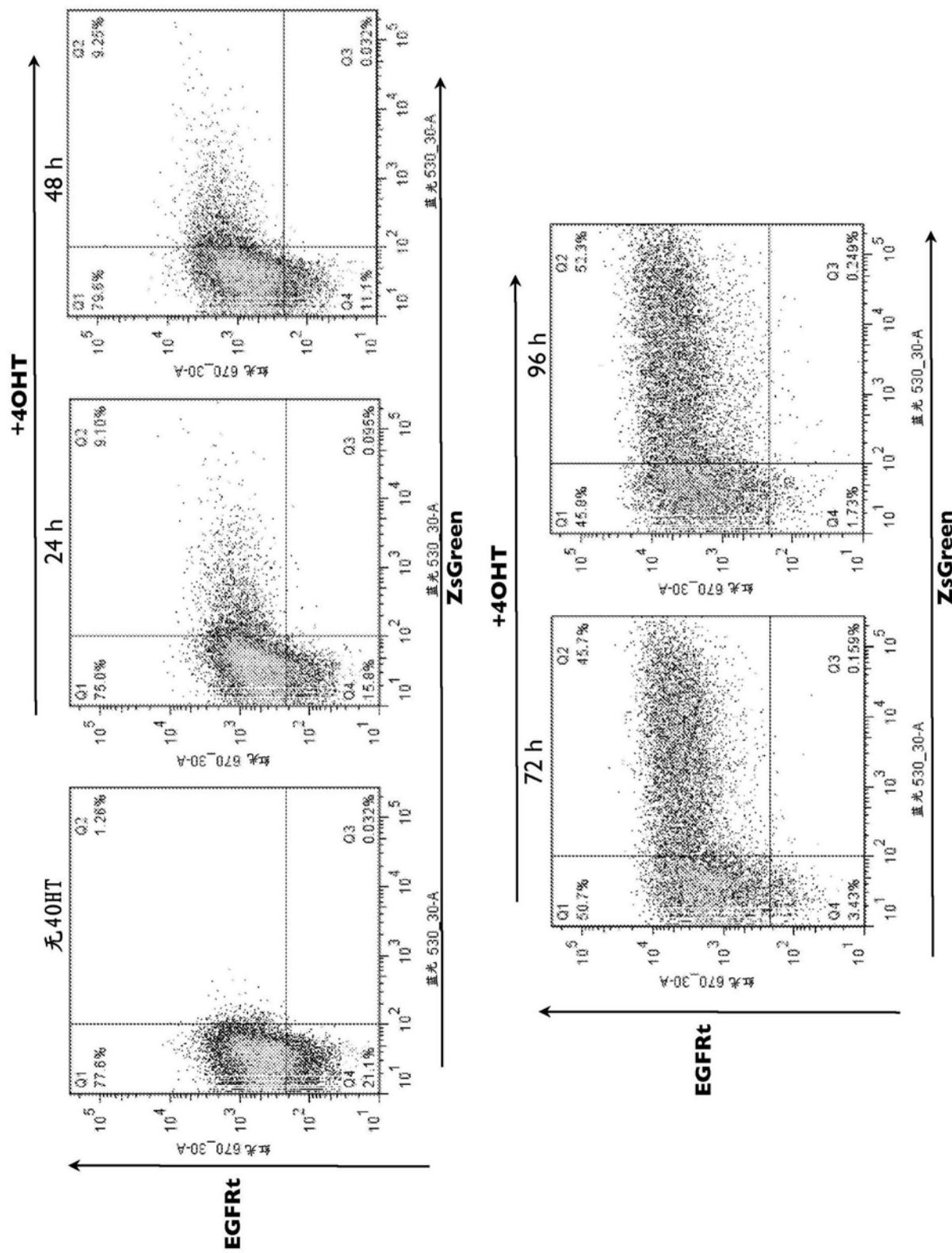


图4C

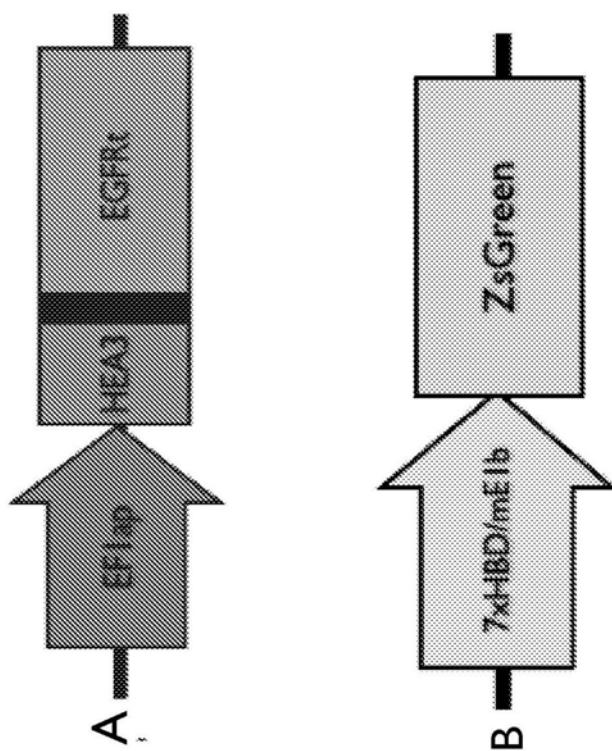


图4D

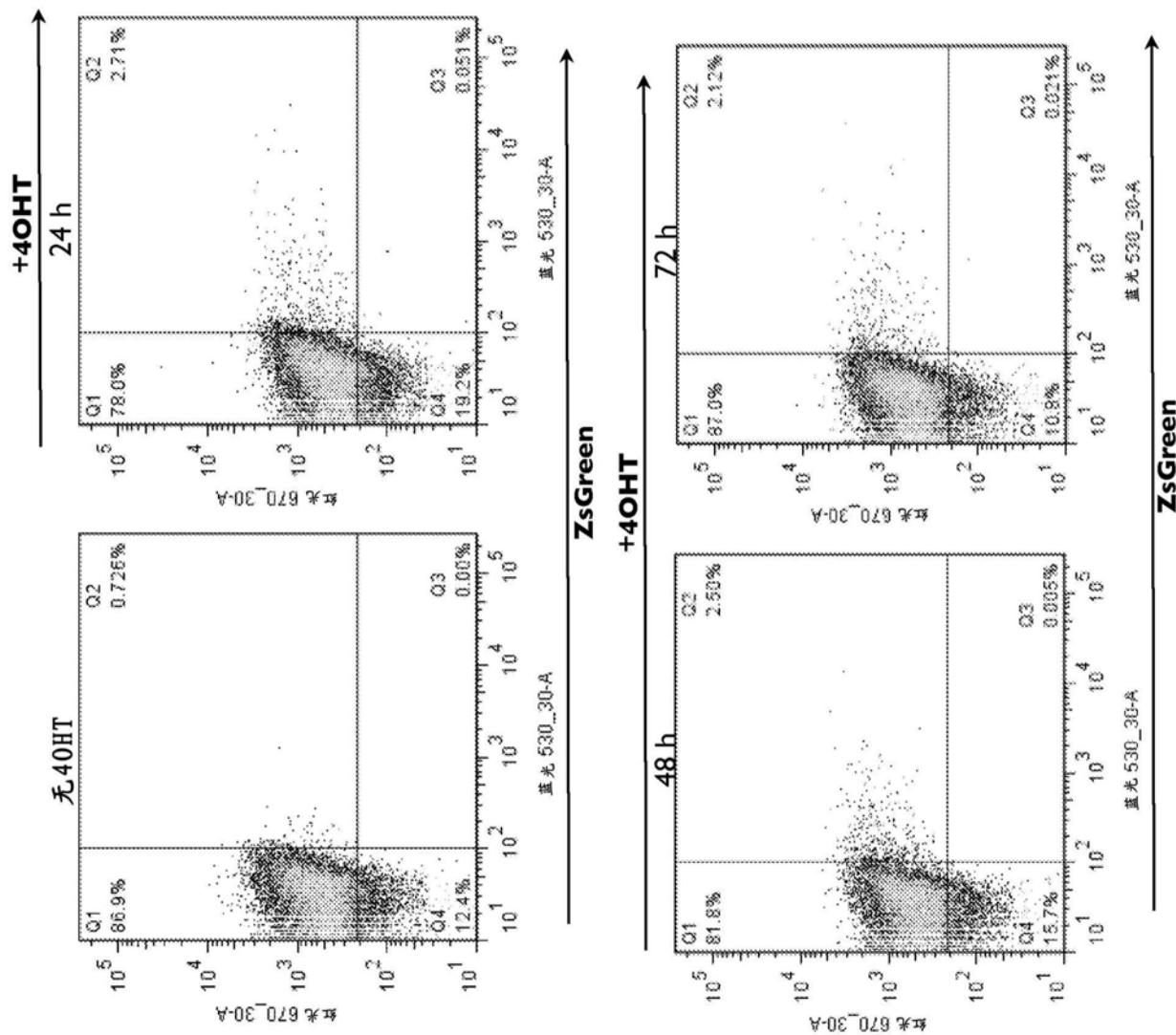


图5A

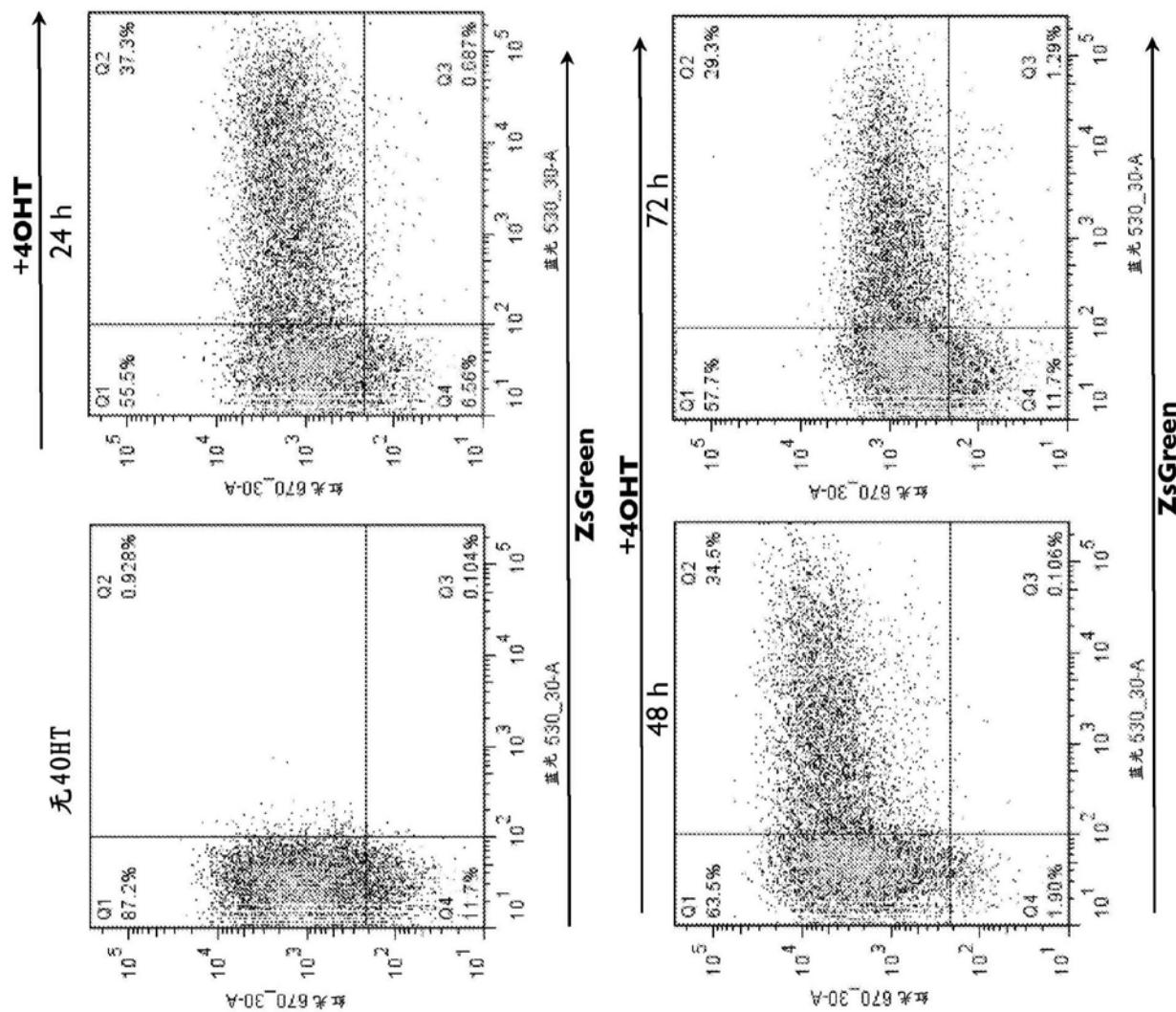


图5B

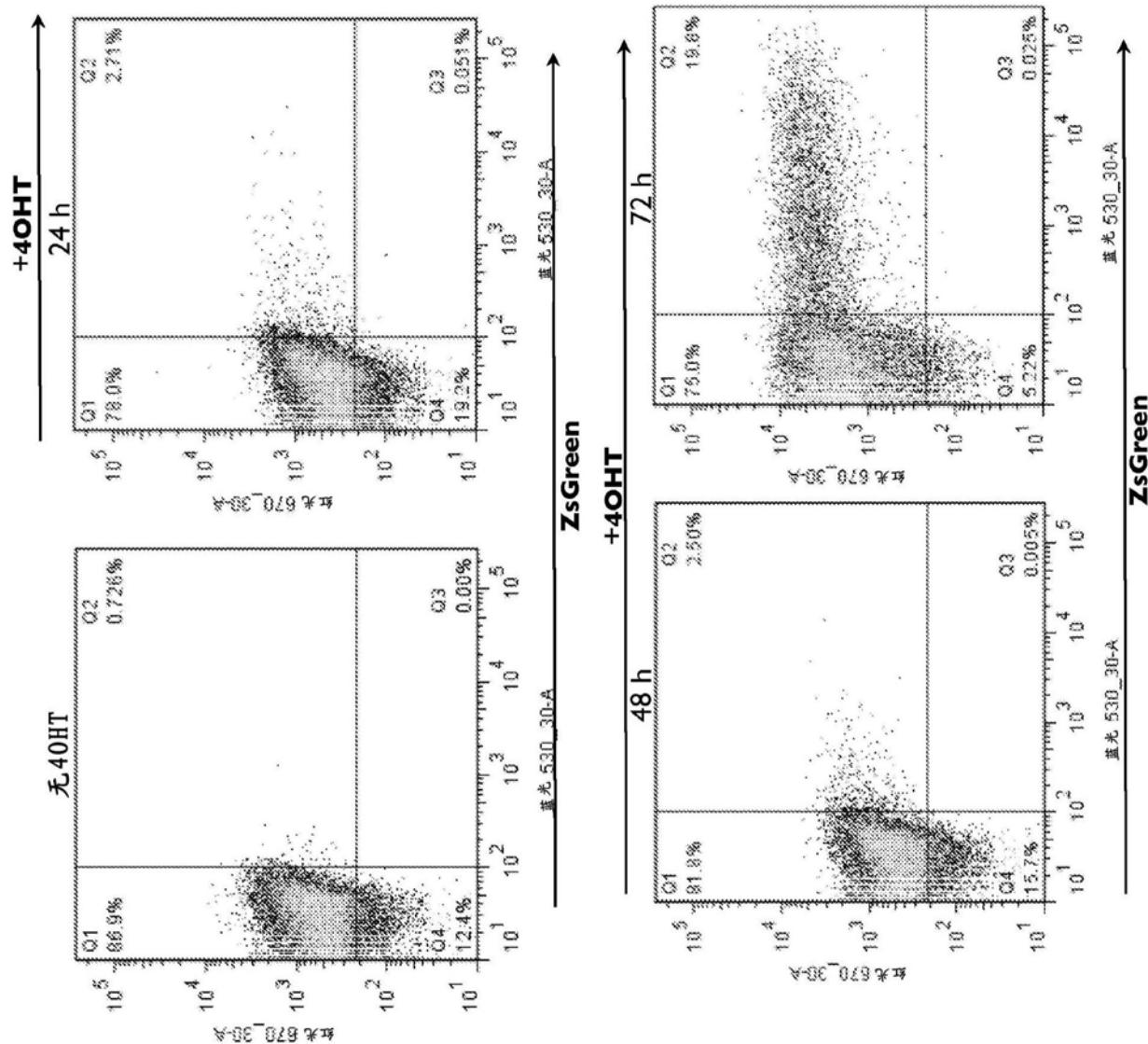


图5C

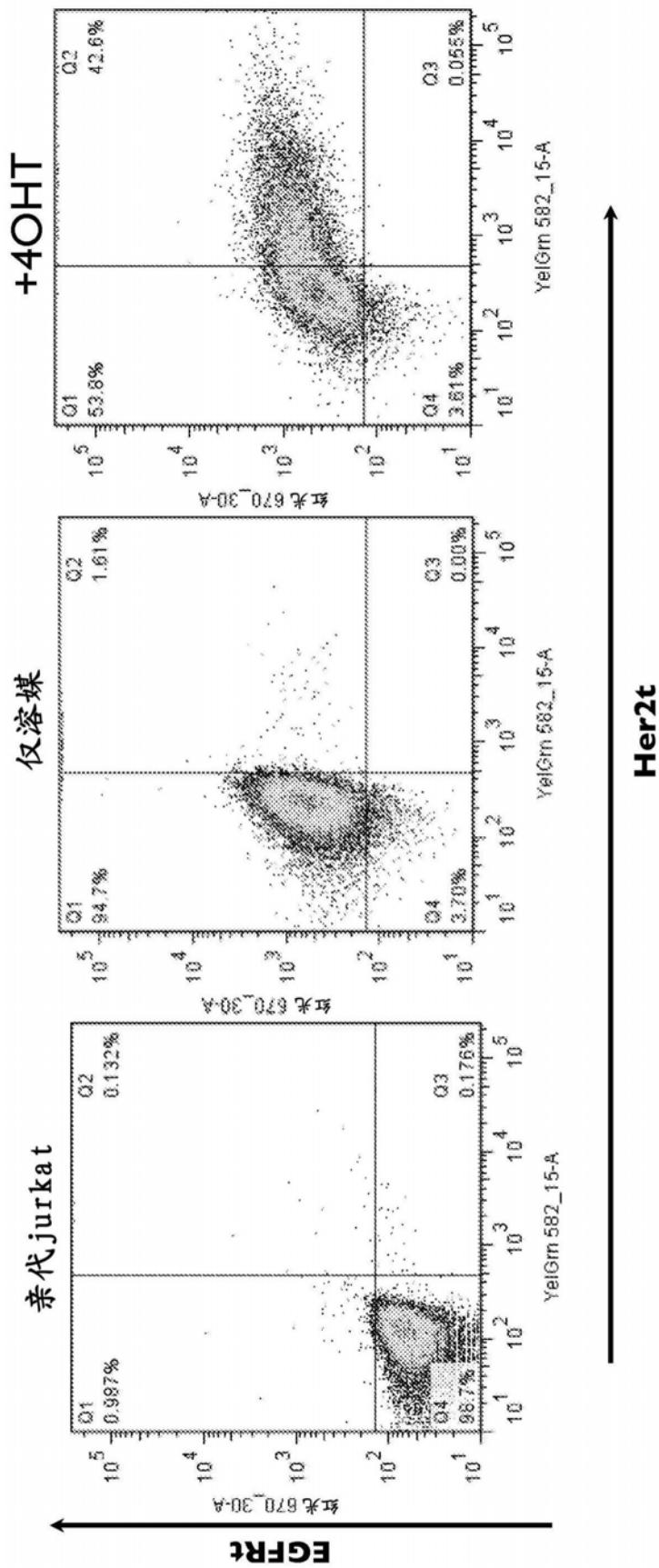


图6A

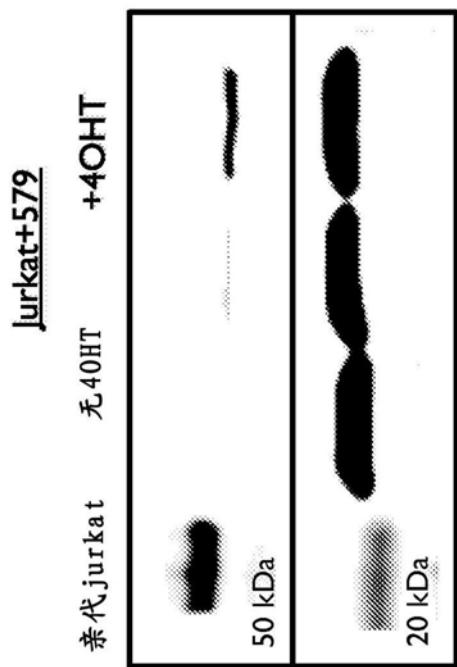


图6B

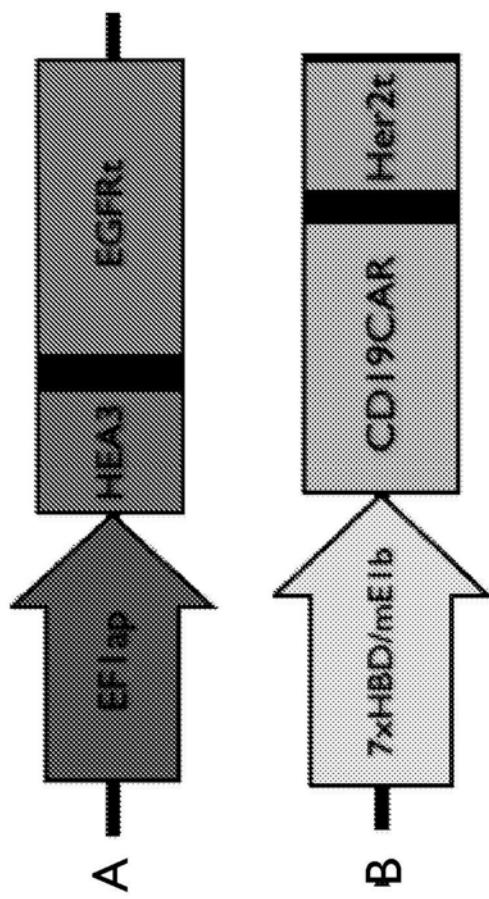


图6C

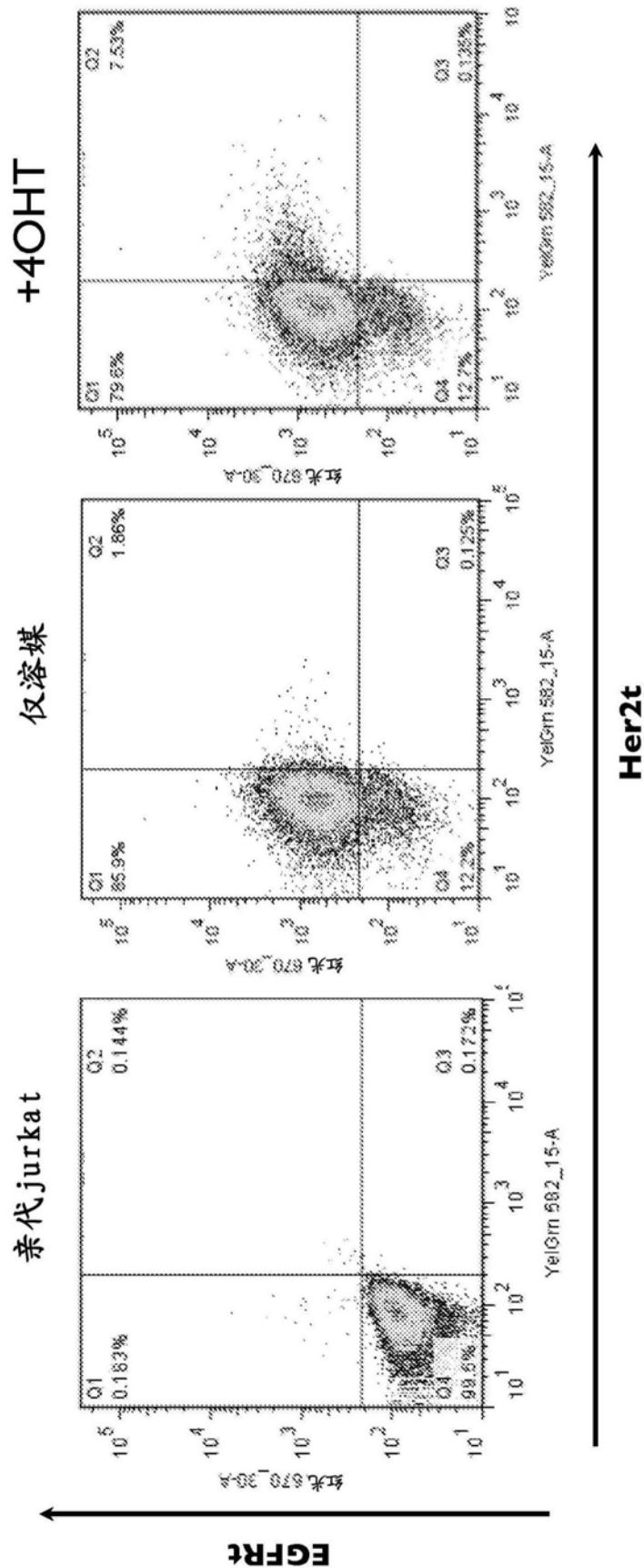


图7A

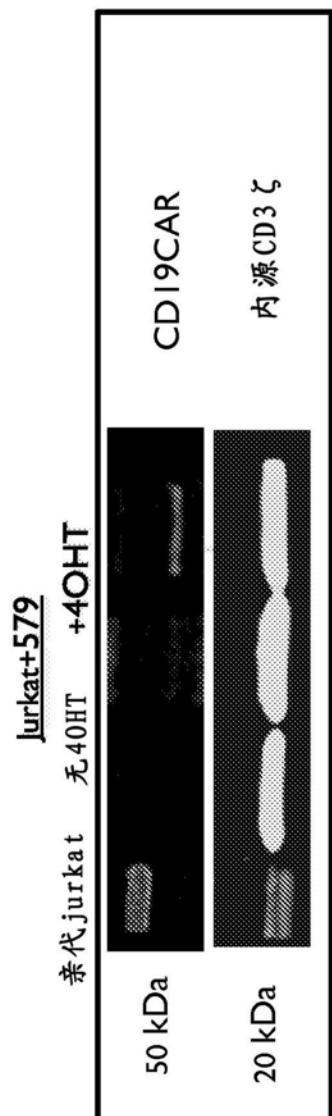


图7B

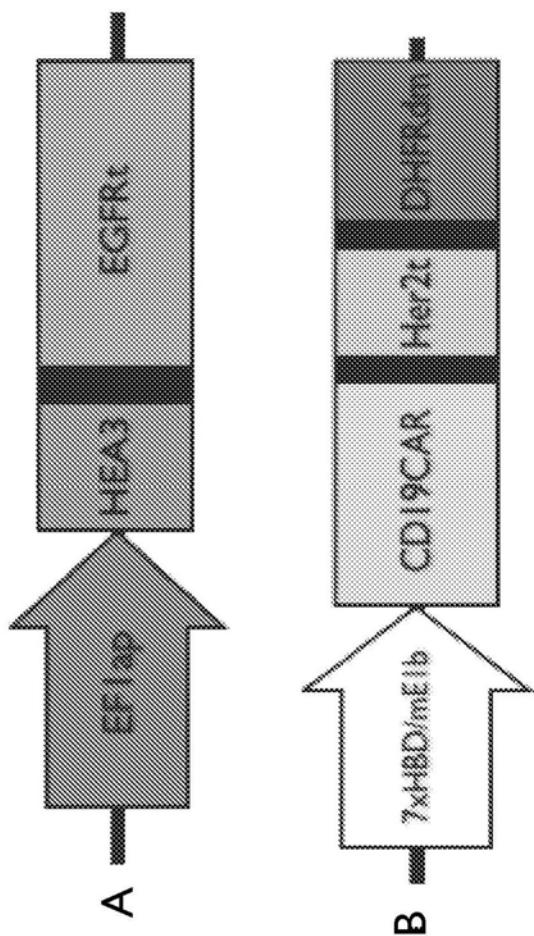


图7C

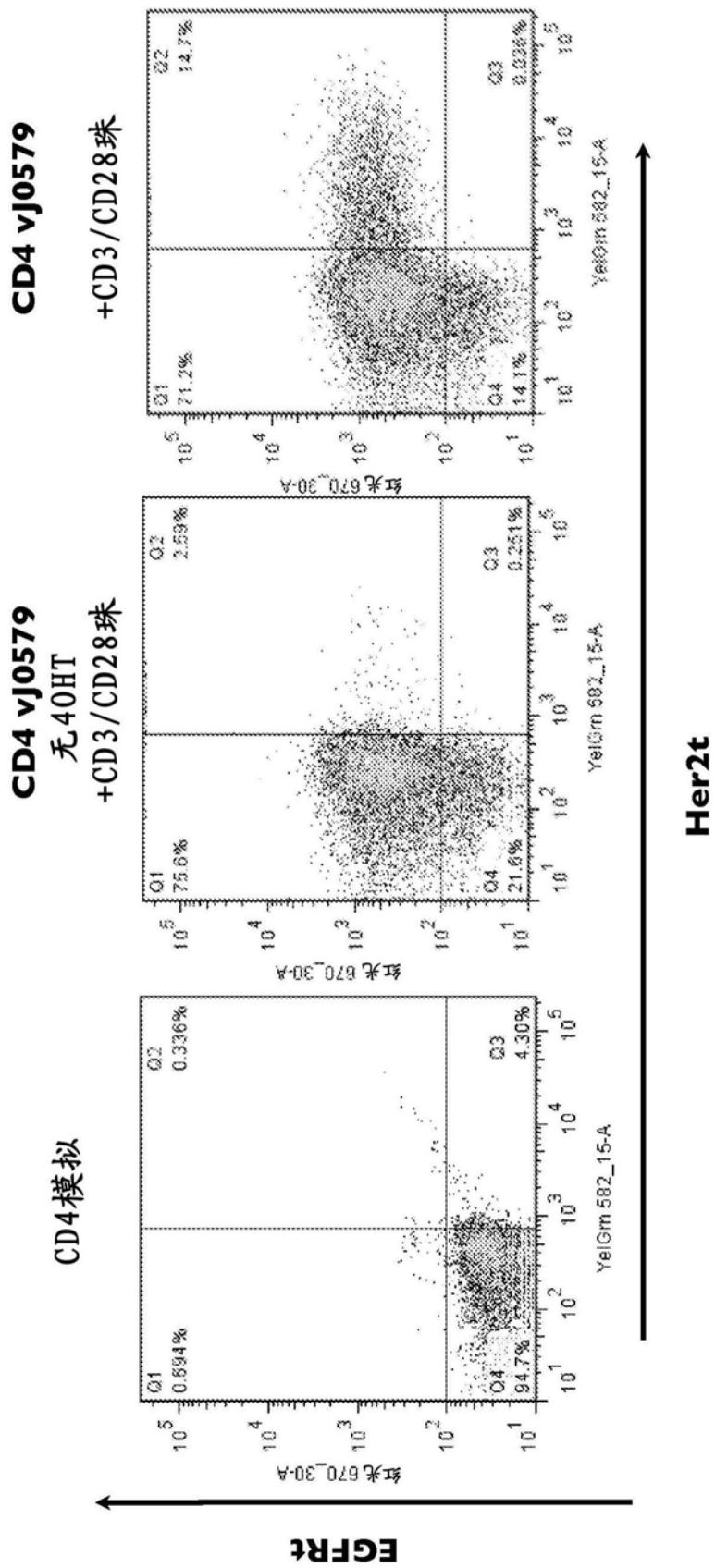


图8A

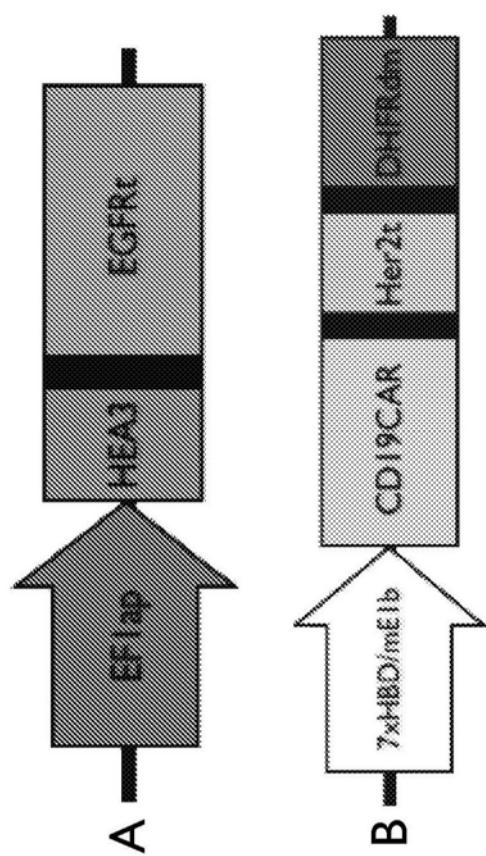


图8B