



(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

(22) 申请日 2015.04.08

(30) 优先权数据

61/977,751 2014.04.10 US

61/986,479 2014.04.30 US

62/058,973 2014.10.02 US

62/088,363 2014.12.05 US

62/089,730 2014.12.09 US

62/090,845 2014.12.11 US

(62) 分案原申请数据

201580027077.0 2015.04.08

(71) 申请人 西雅图儿童医院 (DBA西雅图儿童  
研究所)

地址 美国华盛顿州

(72) 发明人 迈克尔·C·延森

(74) 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司 11243

代理人 钟海胜 宋琴芝

(51) Int.Cl.

C12N 15/867 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

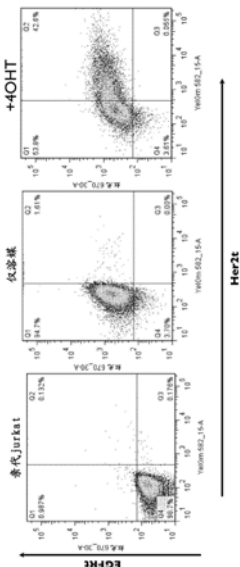
权利要求书2页 说明书88页  
序列表34页 附图18页

(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列表一起提交。序列列表提供为2015年4月7日创建的大小为65kb的命名为SCRI-53WO\_SEQUENCE\_LISTING.TXT的文件。信息是电子格式的序列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CD3 $\zeta$ 或CD3 $\zeta$ 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)强有力的抗肿瘤活性,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床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<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>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,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,宿主细胞是选自自由初始CD4+T细

胞、中枢记忆CD4<sup>+</sup>T细胞、效应记忆CD4<sup>+</sup>T细胞和混合CD4<sup>+</sup>T细胞组成的组的CD4<sup>+</sup>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<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>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;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 $\pm 20\%$ 或 $\pm 10\%$ ,更优选 $\pm 5\%$ ,甚至更优选 $\pm 1\%$ ,以及进一步更优选 $\pm 0.1\%$ 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,或可替换地用于配偶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CD45RO,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、CD45RO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CD45RO-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<sup>+</sup>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>”T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”型细胞的数目的增加,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换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比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为目的的比对,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中提供的参比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,细胞应答应激启动胞内凋亡信号,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,或者停止细胞应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、Bcl2、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、Bcl2、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动力学中起重要作用。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<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>)细胞。随着它们通过发育发展,它们成为双阳性胸腺细胞(CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>),并且最终成熟为单阳性(CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>或CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>)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 $\beta$ -链,而双阳性(DP)阶段集中于产生功能性 $\alpha$ -链,最终产生功能性 $\alpha\beta$ T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、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,转基因是编码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。

[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-(4-((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 $C_{26}H_{29}NO$ , 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)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-450enzymes: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)苯基)-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)苯基)- $\beta$ -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)苯氧基)-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 NO: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 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。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)。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的亲合性。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入源化形式。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, VIWGSETTYNSALKS (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。此外, 他们可以被迅速地循环中移除并且还可以导致全身性炎症效应。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GSTSGSGKPGSGEGSTKG (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 NO: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 NO: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 NO: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定义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、Bcl2、CA-Akt、dn-TGFβRIII、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、Bcl2、CA-Akt、dn-TGFβRIII、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I1-15,干扰素如干扰素δ,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I1-15,或干扰素,其中干扰素包括干扰素δ,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-TGFβRIII、dn-SHP1/2和/或PD-1CD28嵌合体。在一些供选择的方案中,多肽是dn-TGFβRIII、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
[0155] IL-7	AAC63047	386824	NM_000880	315467865
IL-15	CAG46804	49456967	CR542007	49456966
IFN-γ	EAH97180	119617586	EAH97180	119617586
TNF	NP_000585	25952111	NM_000594	395132451
Bcl2	AAH27258	20072668	BC027258	20072667
CA-Akt	NP_001014432	62241015	NM_001014432	62241014
TGFβ 受体	Q03167	311033535	NM_003243	307574689

III				
SHP1	NP_002822	18104989	NM_002831	166064064
[0156] 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的亲合性。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<sup>+</sup>和/或CD8<sup>+</sup>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℃，优选至少30℃，更优选37℃。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℃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<sup>+</sup>细胞。在一些供选择的方案中，通过鉴别与CD8<sup>+</sup>细胞的那些类型中的每一个相关的细胞表面抗原将CD8<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>-</sup>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CD45RO<sup>-</sup>、CD62L<sup>+</sup>、CCR7<sup>+</sup>、CD28<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>和/或CD127<sup>+</sup>，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CD45RO<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<sup>+</sup>、CCR7<sup>+</sup>、CD28<sup>+</sup>和/或CD127<sup>+</sup>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<sup>+</sup>、CCR7<sup>+</sup>、CD28<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>、CD127<sup>+</sup>和/或CD45RA<sup>+</sup>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CD45RO<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CD45RO<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CD45RO<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 $1\log_{10}$ 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例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<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>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 $\zeta$ 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<sup>+</sup>和/或CD8<sup>+</sup>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<sup>+</sup>细胞毒性T细胞的胞内信号传导域与CD4<sup>+</sup>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<sup>+</sup>细胞毒性T细胞的胞内信号传导域与CD4<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>细胞是CD45RO<sup>-</sup>、CD45RA<sup>+</sup>、CD62L<sup>+</sup>和/或CD4<sup>+</sup>阳性T细胞。在一些供选择的方案中,中枢记忆CD4<sup>+</sup>细胞是CD62L阳性和/或CD45RO阳性的。在一些供选择的方案中,效应CD4<sup>+</sup>细胞是CD62L阴性和/或CD45RO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<sup>+</sup>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<sup>-</sup>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CD45RO<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细胞(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CD8<sup>+</sup>、CD62L<sup>+</sup>、CD45RO<sup>+</sup>、CCR7<sup>+</sup>、CD28<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>和/或CD45RO<sup>+</sup>。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剂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基酶。

[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<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>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<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>细胞群的细胞因子谱或增殖活性选择CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>T细胞。同样地,选择与假转导CD8<sup>+</sup>细胞相比IFN  $\gamma$ 产生提高的CD8<sup>+</sup>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<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>细胞。在一些供选择的方案中,预期与CD8<sup>+</sup>细胞相比CD4<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>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<sup>+</sup>细胞的组合物与相同配体特异性的嵌合受体转导的CD8<sup>+</sup>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<sup>+</sup>T细胞组合。在其他供选择的方案中,将嵌合受体转导的CD8<sup>+</sup>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<sup>+</sup>细胞组合。在又一种供选择的方案中,将嵌合受体修饰的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>细胞组合。在一些供选择的方案中,可以以不同的比组合CD8<sup>+</sup>和CD4<sup>+</sup>细胞,例如CD8<sup>+</sup>与CD4<sup>+</sup>的比为1:1,CD8<sup>+</sup>与CD4<sup>+</sup>的比为10:1或CD8<sup>+</sup>与CD4<sup>+</sup>的比为100:1或CD8<sup>+</sup>与CD4<sup>+</sup>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CD45RO<sup>-</sup>、CD45RA<sup>+</sup>和/或是CD62L<sup>+</sup>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CD45RO<sup>+</sup>、CD62L<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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、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-4、CD45RO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、成人和老年受试者。

[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 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$ 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 $(G_4S)_3$ 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CD3 $\zeta$ 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huEF1 $\alpha$ 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 $(G_4S)_3$ 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CD3 $\zeta$ 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- $\alpha$ (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-1 $\alpha$ 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NotI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℃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RPMI, 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 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<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>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<sup>+</sup>T细胞、中枢记忆CD8<sup>+</sup>T细胞、效应记忆CD8<sup>+</sup>T细胞和混合CD8<sup>+</sup>T细胞组成的组的CD8<sup>+</sup>T细胞毒性淋巴细胞,或选自由初始CD4<sup>+</sup>T细胞、中枢记忆CD4<sup>+</sup>T细胞、效应记忆CD4<sup>+</sup>T细胞和混合CD4<sup>+</sup>T细胞组成的组的CD4<sup>+</sup>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<sup>+</sup>T细胞、中枢记忆CD8<sup>+</sup>T细胞、效应记忆CD8<sup>+</sup>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。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(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，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，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(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,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,组合物包含在药理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启动子,其中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床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其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,其中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CD45RO<sup>-</sup>,CD45RA<sup>+</sup>和/或是CD62L<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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CD45RO<sup>+</sup>、CD62L<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>细胞和/或CD8<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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-生物素接着用链霉亲和素-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切割序列连接于跟踪和选择标记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 40HT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 40HT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

Atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgcgagctgccccacccgcctttctgctgatcccc (GMCSFRss) (SEQ ID NO:2)

[0352] Gacatccagatgaccagaccacctccagcctgagcgcagcctggcgaccgggtgaccatcagctgccgggcccagccaggaca  
tcagcaagtlacctgaactggtatcagcagaagcccgacggcaccgtcaagctgctgatctaccacaccagccggctgcacagcggcg  
tgccagccgggttttagcggcagcggctccggcaccgactacagcctgacctctccaacctggaacaggaagatatgccacctactt  
ttgccagcagggcaacacactgccttacacctttggcgcggaacaaagctggaaatcaccggcagcacctccggcagcggcaagc  
ctggcagcggcgagggcagcaccagggcgaggtgaagctgcaggaaagcggccctggcctggtggccccagccagagcctga  
gcgtgacctgcaccgtgagcggcgtgagcctgcccgactacggcgtgagctggatccggcagccccccagggaagggcctggaatg  
gctggcgctgatctggggcagcagaccacctactacaacagcggcctgaagagccggctgacctcatcaaggacaacagcaaga  
gccaggtgttctgaagatgaacagcctgcagaccgacgacaccgccatctactactgcgccaagcactactactacggcgagcta  
cgccatggactactggggccagggcaccagcgtgacctgagcagc (CD19scFv) (SEQ ID NO:3)

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

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

Aaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctg  
ccgatttcagaaagaagaaggaggtgtgaactg (41BB) (SEQ ID NO:6)

Cgggtgaagttcagcagaagcggcagccccctgcctaccagcagggccagaatcagctgtacaacgagctgaacctgggcagaa  
gggaagagtacgacgtcctggataagcggagaggcgggaccctgagatggcgggcaagcctggcggaagaacccccaggaag  
gcctgtataacgaactgcagaaagacaagatggccgaggcctacagcgagatcgcatgaaggcgagcggaggcggggcaagg  
gccacgacggcctgtatcaggcctgtccaccgccaccaaggatacctacgacgcctgcacatgcaggcctgcccccaagg  
(CD3Zeta)- (SEQ ID NO:7)

Ctcgagggcggggagagggcagaggaagtcttctaactgcgggtgacgtggaggagaatccccggccctagg (T2A) (SEQ ID NO:8)

[0353] Atgcttctcctgggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacaccagcattcctctgatcccacgcaaagtgtgaacggaatagga  
ttggtgaatttaagactcactctccataaatgtacgaatattaacacttcaaaaactgcacctccatcagtgggcagctccacatcctgc  
cgggtggcatltaggggtgactccttcacacatactcctccttgatccacaggaactggatattctgaaaaccgtaaaggaaatcacag  
ggtttttctgattcaggcttggcctgaaaacaggacggacctccatgcctttgagaacctagaaatcatacgcggcaggaccaagcaa  
catggtcagttttcttgcagtcgtcagcctgaacataacatccttgggattacgtccctcaaggagataagtgtgagatgtgataatt  
tcaggaaacaaaaatttgtctatgcaatacaataaactggaaaaaactgtttgggacctccggtcagaaaacaaaattataagcaac  
agaggtgaaaacagctgcaaggccacaggccaggttgccatgccttgctcctcccgagggtgctggggcccgagccagggg  
actgcgtctcttgcggaatgtcagccgaggcagggatgcgtggacaagtgcacaccttctggagggtgagccaaggagtttggga  
gaactctgagtgatacagtgccaccagagtgccctgagccatgaacatcacctgcacaggacggggaccagacaactgtatc  
cagtggtcccactacattgacggccccactgcgtcaagacctgcccggcaggagtcattgggagaaaacaacacctgggtctggaag  
tacgcagacggcgccatgtgtccacctgtgccatcaaacgtcacctacggatgcactgggccaggtcttgaaggctgtccaacga  
atgggcctaagatcccgtccatcggcactgggatgggtgggggcccctccttctgctgctggtggtggccctggggatcgcccttcatg/  
ga (EGFRt) (SEQ ID NO:9)

[0354] 表2

**GMCSFRss**

DNA: ATGCTGCTGCTGGTGACCGAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCCACCCCGCC  
AA: M L L L V T S L 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: GCCAGCCTGGGCGACCGGTGACCATCAGCTGCCGGGCCAGCCAGGACATC  
AA: A S L G D R V T I S C R A S Q D I

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

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

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

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

[0355]

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

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

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

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

DNA: CCCAGGAAGGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGAGACCACC  
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: AAGAGCCAGGTGTTTCCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCC  
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: TACTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACCGTGAGCAGC:GAGAGCAAGTACGGA  
AA: Y W G Q G T S V T V S S E S K Y G

**CD28tm**

DNA: CCGCCCTGCCCCCTTGCCCT:ATGTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTTCGGAGGC  
AA: P P C P P C P M F W V L V V V G G

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

**41BB**

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

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

**CD3 $\zeta$** 

DNA: GAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGCGGGTGAAG:TTCAGCAGAAGCGCC  
AA: E E E E G G C E L R V K F S R S A

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

[0356]

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

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

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

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

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

**T2A**

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

**EGFRt**

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

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

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

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

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

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

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

DNA: **AACCTAGAAATCATACGCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTT**  
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: **ATAAGTGATGGAGATGTGATAATTTAGGAAACAAAAATTTGTGCTATGCA**  
AA: I S D G D V I I S G N K N L C Y A

DNA: **AATACAATAAACTGGAAAAAACTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAA**  
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: **CATGCCTTGTGCTCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCGGAGCCCAGGGACTGC**  
AA: H A L C S P E G C W G P E P R D C

DNA: **GTCTCTTGCCGAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGTGGACAAGTGCAAC**  
AA: V S C R N V S R G R E C V D K C N

DNA: **CTTCTGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCATACAG**  
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: **GGACCAGACAACTGTATCCAGTGTGCCCCTACATTGACGGCCCCCACTGC**  
AA: G P D N C I Q C A H Y I D G P H C

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

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

DNA: **TACGGATGCACTGGGCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCAACGAATGGGCCTAAG**  
AA: Y G C T G P G L E G C P T N G P K

DNA: **ATCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTG**  
AA: I P S I A T G M V G A L L L L L V

DNA: **GTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCATGTGA** (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:

	寡核苷酸名称	序列	区域
	oJ02649	ATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGT	pre-U5(SEQ ID NO:22)
	oJ02648	CCGTACCTTTAAGACCAATGACTTAC	delU3(SEQ ID NO:23)
	oJ02650	TTGAGAGTTTTCGCCCCG	mid-Ampr(SEQ ID NO:24)
	oJ02651	AATAGACAGATCGCTGAGATAGGT	post-Ampr(SEQ ID NO:25)
	oJ02652	CAGGTATCCGGTAAGCGG	CoE1 ori(SEQ ID NO:26)
	oJ02653	CGACCAGCAACCATAGTCC	SV40(SEQ ID NO:27)
[0369]	oJ02654	TAGCGGTTTGACTCACGG	CMV(SEQ ID NO:28)
	oJ02655	GCAGGGAGCTAGAACGATTC	psi(SEQ ID NO:29)
	oJ02656	ATTGTCTGGTATAGTGCAGCAG	RRE(SEQ ID NO:30)
	oJ02657	TCGCAACGGGTTTGCC	EF1p(SEQ ID NO:31)
	oJ02658	AGGAAGATATCGCCACCTACT	CD19Rop(SEQ ID NO:32)
	oJ02601	CGGGTGAAGTTCAGCAGAAG	Zeta(SEQ ID NO:33)
	oJ02735	ACTGTGTTTGCTGACGCAAC	WPRE(SEQ ID NO:34)
	oJ02715	ATGCTTCTCCTGGTGACAAG	EGFRt(SEQ ID NO:35)
[0370]	表4 Uniprot P0861 IgG4-Fc (SEQ ID NO:13)		

[0371]

```

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

    70      80      90     100     110     120
GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPSCP APEFLGGPSV

    130     140     150     160     170     180
FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY

    190     200     210     220     230     240
RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK

    250     260     270     280     290     300
NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDL DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG

    310     320
NVFSCSVMHE ALHNYHQKS LSLSLGK

```

- [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)

[0378]

```

    10      20      30      40      50      60
MLRLLLALNL FPSIQVTGNK ILVKQSPMLV AYDNAVNLSK KYSYNLFSRE FRASLHKGLD

    70      80      90     100     110     120
SAVEVCVVYG NYSQQLQVYS KTGFNCDGKL GNESTVFYLO NLYVNQTDIY FCKIEVMYPP

    130     140     150     160     170     180
PYLDNEKSNG TIIHVKGKHL CPSPLFPGPS KPFWVLVVVG GVLACYSLLV TVAFIIFWVR

    190     200     210     220
SKRSRLLHSD YMNMTPRRPG PTRKHYQPYA PPRDFAAYRS

```

- [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)



[0385]

```

      10      20      30      40      50      60
MGNSCYNIVA TLLLVNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR

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

      130     140     150     160     170     180
CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE

      190     200     210     220     230     240
PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTIRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEDG

      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)

[0391]

```

      10      20      30      40      50      60
MKWKALFTAA ILQAQLPITE AQSFGLLDPK LCYLLDGILF IYGVILTALF LRVKFSRSAD

      70      80      90     100     110     120
APAYQQGQNQ LYNELNLGRR EYDVLDKRR GRDPFMGGKP QRRKNPQEGY YNELQKDKMA

      130     140     150     160
EAYSEIGMKG ERRRGKGGHDG 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 EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:17)  
 [0401] 人IgG2 ERKCCVECP (SEQ ID NO:18)  
 [0402] 人IgG3 ELKTPLGDTHTCP (EPKSCDTPPCP)<sub>3</sub> (SEQ ID NO:19)  
 [0403] 人IgG4 ESKYGPPCP (SEQ ID NO:20)  
 [0404] 修饰的人IgG4 ESKYGPPCP (SEQ ID NO:21)  
 [0405] 修饰的人IgG4 YGPPCP (SEQ ID NO:36)  
 [0406] 修饰的人IgG4 KYGPPCP (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-ζ-T2A-EGFRt

[0410] 前导序列

Atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacaccagcattctctctgatccca (SEQ ID NO: 80)

**Her2scFV**

[0411] Gatatccagatgacccagtcctccgagctccctgtccgctctgtgggcgatagggtcaccatcacctgccgtgccagtcaggatgt  
gaatactgctgtagcctggatcaacagaaaccaggaaaagctccgaaactactgatttactcggcatccttctctactctggagtcc  
cttctcgttctctggttcagatctgggacggatttcactctgaccatcagcagctctgcagccggaagacttcgcaacttattactgtca  
gcaacattactactctctccacgttcggacaggggtaccaaggtggagatcaaggcagtagcggcggtggctccgggggc  
ggatccggtggggggcggcagcagcgaggttcagctgggtggagtcggcggtggcctggtgcagccagggggctcactccgtttgt  
cctgtgcagcttctggttcaacattaaagacacctatatacactgggtgcgtcagggcccggttaagggcctggaatgggtgcaa  
ggatttatctacgaatggttatactagatatgccgatagcgtcaagggccgtttactataagcgcagacacatcaaaaacacagc  
ctacctgcagatgaacagcctgcgtgctgaggacactgccgtctattattgttctagatggggaggggacggcttctatgctatggact  
actgggggtcaaggaaacctggtcaccgtctcgagt (SEQ ID NO: 81)

[0412] 铰链间隔区

Gagagcaagtacggaccgccctgcccccttgcct (SEQ ID NO: 82)

**CD28tm**

[0413] Atgttctgggtgctggtggtggtcggaggcgtgctggcctgctacagcctgctggtcaccgtggccttcatcatcttttgggtg  
(SEQ ID NO: 83)

**4-1BB**

Aaacggggcagaaagaaactcctgtatataatcaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtag  
ctgccgattccagaagaagaagaaggaggatgtgaactg (SEQ ID NO:84)

[0414] CD3ζ

Cgggtgaagttcagcagaagcggcgacgccctgcctaccagcaggccagaatcagctgfacaacgagctgaacctgggcag  
aagggaagagtacgacgtcctggataagcggagaggccgggacctgagatggcggaagcctcggcggaagaacccccag  
gaaggcctgtataacgaactgcagaagacaagatggccgaggcctacagcgagatcgccatgaaggcgagcggaggcggg  
gcaaggccacgacggcctgtatcaggcctgtccaccgccaccaaggatacctacgacgccctgcacatgcaggccctcccc  
caagg (SEQ ID NO: 85)

## T2A

Ctcgagggcgggcgagaggcgaggaagtcttctaactgcggtgacgtggaggagaatcccgccctagg (SEQ ID  
NO: 86)

## tEGFR

[0415]

atgtcttctcgtgacaagccttctgtctgtgagttaccacaccagcattcctcctgatccacgcaaagtgtgtaacggaatagg  
tattggtgaatttaagactcactctccataaatgtacgaatattaacacitcaaaaactgcacctccatcagtggcgatctccacatc  
ctgccggtggcatttaggggtgactccttcacacatactcctccttgatccacaggaactggatattctgaaaaccgtaaaggaaat  
cacagggttttctgattcaggcttggcctgaaaacaggacggacctccatgcccttgagaacctagaaatcatacgcggcaggac  
caagcaacatggcagtttctcttcagtcgtcagcctgaacataacatccttgggattacgctccctcaaggagataagtgtatggag  
atgtgataatttcaggaaacaaaatttgtctatgcaaatacaataaactggaaaaaactgtttgggacctccggctcagaaaacaaa  
attataagcaacagaggtgaaaacagctgcaaggccacaggccaggcttgcctatgccttgtgtctccccgagggctgtctggggcc  
cggagcccagggaactgcgtctcttgcgggaatgtcagccgaggcagggaatgcgtggacaagtgaaccttctggagggtgagc  
caaggaggtttgtggagaactctgagtgcatcacagtccaccagagtgccctgcctcaggccatgaacatcacctgcacaggacgg  
ggaccagacaactgtatccagtgtgcccaclacattgacggccccactgcgtcaagacctgcccgaggagtcattgggagaaa  
acaacaccttggtctggaagtacgcagacgccggccatgtgtgccacctgtgccatccaaactgcacctacggatgcactgggccc  
aggtcttgaaggctgtccaacgaatgggcctaagatcccgctccatcgccactgggatgggtgggggcccctcctcttctgtctggtggt  
ggccctggggatcgccctcttcatgtga (SEQ ID NO: 87)

[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)

[0418]

```

      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 .
ATGTTG TOCAAGCTGT CCGAGCTGCA GACAGAAGTG CTGGCAGCAC TGCTGGAAAG CGCCTTGAGC AAGAGGDECC TGATTCAGGC
TACCAC AGGTTCGACA GGGTCGACGT CTCTCTTGAC GACCGTCGTG AGGACCTTTC GCGGACTCG TTTCTCGGG ACTAAGTCCG

· L G E F P G P Y L L A G E G F L D K G E S C G G G R G E L A E L P N
ATCGCGGAA CCGGAGCTT ATCTCTCTCG TGGGAAAGC CTTCTGATA AGGGGAGAG CTGTGGCGGA GGAAGAGAG AGCTGGCGGA GTCGCTAAC
TGAGCCCTTT GGACCTGGA TAGACGAGG AGCGCTTCC GGAGACCTAT TCCCGCTCT GACACGCGCT CTTTCTCTC TCGACCGGT CGAGGGATTG

G L G E T R G S E D E T D D D G E D F T F P I L K E L E N L S P E E
GGCCTGGGG AGACAGAGG CAGCGAGGAC GAGACAGAG ACGAGGCGGA GGACTTCACG CCCCCATCG TGAAGAGCT GGAAACCTG AGCCCCGAGG
CGGACCCCG TGTCTCTCG GTGCTCTG CTCTGCTG TGCTGCGGT CTTGAAGTG GGGGGTAGG ACTTCTCGA CTTTITGAG TCGGGCTCG

· 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 .
AAGCGCGCA CCGAAGAGC GTGGTGAGA CACTCTGCA GGAAGATCG TGGGGGTG CCAAGATGT CAAGAGTAC CTGCAGCAG ACAACATGCC
TTCGCGGGT GTCTTTTCG CACCACTCT GTACGACGT CCTCTAGG ACCGCCAGC GTTCTACCA GTTCTGATG GAGTCCTCG TTTGTAGG

· Q R E V V D T T G L N Q S H L S Q K L N K G T P M K T Q K K A A L
CCAGGGGAG GTGGGGAGA CCACGGGCT GAACAGAGC CACTGAGCC AGCACCISAA CAGGGGACC CCAATGAAA CCGAGAAGAG AGCGCCCTG
GGTCGCCTC CACCACTGT GTGGCGGA CTGGTCTG GTGACTCG TCGTGAAT GTTCGGTG GGTACTTTT GGTCTTCT TCGCGGGAC

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 F T
TACACTTGT AGTGCGGAA GCAGAGAGG GTGGCCGAG AGTTACACA CGCGCGGAG GCGGCGTGA TCGAGGAGC TACCGGAGC GAGCTGCCA
ATGTGAUCA TGCAGGCTT CTTCTCTC CACGGGTC TCAATGTG GCGCGGGTC CCGCGGACT AGCTCTGG ATGGCGGTG CTGACGGT

· K K G R E N R F K W G P A S Q Q I L F Q A Y R R Q K N P S K E E R .
CCAAGAAGG CAGAGGAAC CGTTTAAGT GGGCGCTGC ATCTCAGAG ATCTGTCTC AGGCTACGA GCGGAGAG AAGCCAGCA AAGAGGAAG
GGTCTCTCC GTGCGCTG GCGAATTA CCGCGGAGC TAGAGTGT TAGGAGAAG TCGGATGT CCGCTCTTC TTGGGTGT TTTCTCTC

```

· 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 GTGGAAGAT GCAACCGGCG CGATGTCATC CAGAGAGGCG TGAGCCCTTE TCAGGCTCAG GGCTCGGCA GCAATCTGCT CACCGAAGTG  
CCTCTGTGAC CACCTTCTCA GTTGGGCGCG GTTCACTAG GTCTCTGCGC ACTGCGGAG AGTCTGAGTC CCGGAGCGCT GTTATAGCCA GTGGCTTCAC

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  
CGGGTGATCA ATTGGTTCGC CAACCGGCGG AAAGAGGAGG CCTTCGCGCA CAGCTGTCTT GTTGGGATA TGAGAGCGCG CAACCTGTGG CCGAGCCCCC  
GCUACATGTT TAACAGAGCG GTTGGGCGCG TTCTCTCTTC GGAGGCGCT GTTCTGACAGA CAGCGGCTAT ACTCTCGGCG GTTGGAGACC GGGTGGGCGG

· 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 R P P I L Y S  
TGATGATCAA GCGGAGCAAG AAGAACAGCC TGGCCCTGAG CCTGACGCGG GATCAGATGG TGTCCGCTCT GCTGGACGCG GAGCCCCCTA TCCTGTAGAG  
ACTACTAGTT CCGCTCGTTC TTCTGTGCG ACCCGGACTC GGACTGGCGG CTAGTCTACC ACAGGCGAGA CGACCTGCGG CTGCGGCGAT AGGAGATGTC

· 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  
CGATGACGAC CCGACGAGAC CCTTCAGGGA GGCCAGCATG ATGGGCTGCT TGACCACTCT GGCGAGCGG GAGCTGGTGC ACATGATCAA CTGGGCGAG  
GCTCATGTG GGGTGGTCTG GGAAGTGGCT TACCGCTGAC TACCGCGAGC ACTGGTTGGA CCGGCTGGCC CTCGACCAAG TGTACTAGTT 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  
CGGGTGGCG GTTCTGTGGA CCGTACGCTG CAGACGAGG TCGACCTGCT GGAATGTGCC TGGCTGGAAA TCTGTATGAT CCGCTCGTG TGGAGAGCA  
GCGGACGCG CCAAGCACTT GACTGGGAC GTGCTGTGTC AGGTGGAGCA CCTTACACGG ACCGACCTTT AGGACTACTA CCGGAGCAGC ACCTCTTGCT

· E H P 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  
TGGAAACACC CCGCAAGCTG CTGTTCGCGC CCAACCTGCT CCTGGACGCG AACGAGGAA AGTGGTGGGA GGGCTGGTG GAGATCTTGC ACATGCTGCT  
ACCTTGTGGG GCGGTGCGAC GACAAGCGGG GGTGGAGCA GGACCTGGCC TTGGTCCCTT TCAAGCACT CCGTACCAAG CTCGAGAGC TGTAGAGCA

· A T S S R F R M M H L Q G E E F V C L K S I I L L N S G V Y T F L  
GGCCACCTCC AGCGGTTCC GATGATGAA CCGTACGAGG GAGGAACTV TGTGCTGAA GTCCATCATC CTGCTGAGCA GCGGCGTGA CACCTTCTG  
GCGTGTGAGG TCGGCAAGG CTACTACTT GGAAGTCCCG TCCTTAAGC ACAGGACTTT CAGGTAGTAG GAOGACTTGT GCGGCGACAT 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 T  
TCATCCACCC TGAGTCCCTT GGAAGAGAG GACCACTCC ACCGGTGTGT GGACAGATC ACGACACCC TGATCCAGCT GATGCGCAG GCTGGCTGA  
AGTAGGTGGG ACTTCAGGA CTTCTCTTC CTGGTGTAGG TGGCCACAGA CTTGTCTAG TGGCTGTGG ACTAGGTGA CTACCGTTC CAGCGGACT

· 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  
CACTCCAGCA CAGACAGAG AGACTGGCG AGCTGTGCT GATCCTGAGC CACATCGGC ACATGAGCAA CAGCGGATG GAACACCTGT ACAGCATGAA  
GTAGGTGCT CTTGTGTGTC TCTGACCGGG TCGACGACGA CTAGGACTCG GTTAGGCGG TGTACTGCT GTTCCCTAC CTTGTGACA TGTGTACTT

· C K N V V P L Y D L L L E M L D A H R L H A P T S R G G A S V E E  
GTGCAAGAAC GTGTGCGCC TGTAGACCT GCTGCTCGAG ATGCTGATG CCGCAGACT GCAAGCCCT ACAAGCAGG GCGGAGCAG CCGTGGAGAA  
CAGTGTCTTG CCGCAAGGG ACATGCTGGA TAGCAGCTAC TAGGTGCTGA CGTGTGCTGA CGTGTGCTG TGTGTGCTG CCGCTCGGTC GACCTCTCT

T D Q S H L A T A G S T S S H S L Q K Y Y I T G E A R G F P A T V E  
ACGACCACT CTCACTGCG CACCGCGCG AGCACAAGCA GCCACAGCT GCAGAGTAC TACATCACCG GCGAGGCGGA GGGATTCCT GCCACGCTG  
TGGCTGTCA GAGTGCAGC GTGGGCGCG TGTGTGCT CCGTGTGGA GTCTTCATG ATGTAGTGC CCGTCCGCT CCGTAAGGA CCGTGGCAC

· 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  
AGTTCAGTA CTTGCGGAC ACGACGAGC GGCACCGAT CGAGGAAAAG CGGAAGGGA CCTAAGAGC ATTCAAGAG ATCATGAGA AGTCCCCCTT  
TCAAGTCTAT GACCGGCTG TGGTGTCTG CCGTGGCTA GCTCTTTTC GCTTGGCTT GATGCTCTG TAAGTCTCG TAGTACTCT TCAGGGGGA

· 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 P A P Q P Y E F  
CAGCGGCGCC ACGATCCCA GACCGCGCC TAGAGAATC GCGTGGCA CAGATCTAG CCGCAGCGT CCGAGCGCT CCGCCAGCC CTACCTTTC  
GTGCGCGGG TGGTAGGT CTGGGGGGG ATCTTCTTAG CCGCAGGCT CCGTCTAGAT GCGGTGCGAC GGGTTCGAC GGGGGTGG GATGGGAG

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  
ACGACGAGC TGAGCACTT CACTACGAC GAGTTCCTA CCACTGTGTT CCGCAGCGC CAGATCTCT AGGCTCTGC TGTGGACCT GCTCCACCT  
TGGTGTGG ACTGTGTA GTGATGCT CTAAGGAT GGTACCAAA GGGTGGCG GTCTAGAG TCGGAGAG AGACCTGGA CAGGTGGAG

· V L P Q A P A P A P A P A M V S A L A Q A P A P V P V L A P G P P  
AGGTGTGCT TCAGGCGGCT GCTCCAGCC CAGCGGCTG CATGGTGTCT GCACTGGCC AGGCTCCAG TCTGTGCTGT GTGCTGCCC CTGACCTCC  
TCCAGAGCG AGTCCGGGA CAGGTGCGG GTCCGGGAG GTACCAAGA CCGTACCGG TCGAGGTG AGGACACGA CAGACCGG 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  
TCAGGCTGT GCGCTCTGT CCGCTAAAC TACCGAGCG GGGGAGGAA CACTGTCTGA GCGCTGCTG CAGCTCCAG TCGACGAGCA GGATCTGGGA  
AGTCCGAC CCGGAGGAG GGGATTGG ATGGGTGCG CCGCTCCCT GTGACAGCT CCGGAGCAG GTCGAGTCA AGTGTGCT CTAAGACCT

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  
GCACTGTG GCAATAGCAC GACCCCGCC GTGTTTACG ACCTGGGCT CCGTGGACA AGCGAGTTC AGCAGTCTT CAACAGGCG ATCCCTGTG  
CGTAGACACC GTTATCTGT GCTGGGGCG CACAAATGG TGGACCGG GCACTGTG TCGCTCAAG TCGTGGAGGA GTTGTCCG TAGGGACAG

· 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  
CCCCACAC CACGAGGCC ATGCTGATG AATACCGGA GGCCATCAC AGACTGGTCA CAGGCGCCA GAGGCTCCA GATCCAGAC CAGCTCCAGT  
GGGTGTGT GTGGCTGGG TAGACTACC TTATGGGCT CCGTAGTGG TCTGACAGT GTCGCGGGT CTCGGAGGT CTAGGTCTGT GTCGAGGTGA

· 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  
GGGAGCCCT GCGCTGCTA ATGGGCTGT GTCTGGGAG GAGGACTCT CCAGCATTC CGACATGAC TTCAGCGCC TGTGTGCTA GATCAGCAG  
CCCTCGGGA CCGGAGGAT TACCGAGCA CAGACGCTG CTCCTAGA GGTGTAAG GCTGTACTG AGTGGCGG ACAGAGGCT 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

[0422]

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 GACAGAATG CTGGCAGCAC TGCTGGAAAG CGGCCTGAGC AAAGAGGCCG TGATTGAGCG  
TACCAC AGGTTCGACA GGTTCGACGT CTGTCTTGAC GACCGTCTGT ACAGCTCTTC GCCGAGCTCG TTCTCCGGG ACTAAGTCCG

· 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  
ACTCGGCGAA CCTGGACCTT ATCTGCTGCG TGGCGAAGGC CCTCTGGATA AGGCGAGAG CTGTGGCGGA GGAAGAGAG AGCTGGCCGA GCTGCCTAAC  
TGAGCCGCTT GGACCTGGAA TAGACGAGCG ACCGCTTCGG GGAGACCTAT TCCCGCTCTC GACACCGCCT CTTCTCTCTC TCGACCGGCT CGACGGATTG

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  
GGCTGGGG AGACAAGAG CAGCGAGGAC GAGACAGAG ACGACGGCGA GGACTTCACC CCCCCATCC TGAAGAGCT GGAAGACCT AGCCCCGAGG  
CCGACCCGCG TCTGTCTCTC GTGCTCTCTG CTCTGTCTGC TGCTGCGGCT CCGAAGTG GGGGGTAGG ACTTCTCGA CTTTGTGAC TCGGGGCTCC

· 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 ·  
AAGCCGCCA CCAGAAAGCC GTGTGGAGC CACTGCTGCA GGAAGATCCC TGGCGGGTGC CCAAGATGGT CAAGAGCTAC CTGCAGCAGC ACAACATCCC  
TTCGGCGGGT GGTCTTTTGG CACCACCTCT GTGACGACGT CTTCTAGAG AGCGCCAGC GGTCTACCA GACGTCTGTG TGTGTAGGG

· 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 GTGTGGAGA CCACCGGCT GAACAGAGC CACCTGAGCC AGCACCTGAA CAAGGCGACC CCCATGAAA CCCAGAGAG AGCGCCCTCG  
GGTCCGCTCT CACCACCTGT GGTGGCCGGA CTGTGTCTCG GTGGACTCGG TGTGTGACTT GTTCCCGTGG GGTACTTTT GGGTCTTCTC TCGCGGGAGC

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 F T G D E L P T  
TACACTTGGT ACGTGGCGAA GCAGAGAGAG GTGGCCGAG AGTTTACACA CGCCGGCCAG GCGGCGCTGA TCGAGGAACC TACCGGCGAC GAGCTGCCA  
ATGTGAACCA TGACGCGCTT CGTCTCTCTC CACCGGGTGC TCAATGTGT GCGCGCGTC CCGCGGACT AGCTCTTGG ATGCGCGCTG CTGACGGGT

· K K G R R N R F K W G P A S Q Q I L F Q A Y E R Q K N P S K E E R ·  
CCAAGAGGG CAGACGGAAC CGTTTAAGT GGGGCCCTGC ATCTCAGCAG ATCTCTTCC AGGCCTACGA GCGCGAGAA AACCCAGCA AAGAGGAAG  
GGTCTTCCG GTCTGCTTGG GCCAAATCA CCGCGGAGC TAGATCTGTC TAGGCAAGG TCGGATGCT CGCGCTTCTC TCGGCTTCTC

· 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 CGAGTGCATC CAGAGAGGGG TGAGCCCTTC TCAGGCTCAG GGCTCGGCA GCAATCTGGT CACCGAAGTG  
CCTCTGTGAC CACCTTCTCA CGTGGCCCG GCTCACTAG GTCTCTCGC ACTCGGGAAG AGTCCGAGTC CCGGAGCGGT CGTTAGACCA GTGGCTTAC

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  
CGGTYTACA ATTGGTTGAC CAACCGGGG AAGAGGAAG CCTTCGCGTC CAAGCTGTCT GCTGGCGATA TGAGAGCGGC CAACCTGTG CCCAGCCCC  
GCCACATGT TAACCAAGCG GTTGGCCGCG TTTCTCTTC GGAAGGCCGT GTTCGACAGA CGACCGCTAT ACTCTCGCG GTTGACACCC GGTGGCGGG

· 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 ·  
TGATAGTCA GCGGAGCAAG AAGAAGAGC TGGCCCTGAG CTTGACCGCC GATCAGATGT TGTCGCTCT GCTGGAGCC GAGCCCCCTA TCTGTATAG  
ACTACTAGTT CGCTCGTTC TTCTGTGCG ACCGGGACTC GGACTGCGCG CTAGCTTACC ACAGGCGAGA CGACCTCGGG CTGCGGGGCT 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 CCCACGAGC CTTTCAGCGA GGCAGCATG ATGGGCTGCT TGACCAACCT GCGCGACCGG GAGCTGTGTC ACATGATCAA CTGGGCCAAG  
GCTCATGTG GGTGGTCTG GGAAGTGTG CGGTGTGAT TACCGGAGC ACTGGTTGGA CCGGCTGGC CTGACCCAG TGTACTAGTT GACCGGTTT

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  
CGGTTGCCG GTTCTGTGA CTTGACCTG CAGCAGCAGG TCCACCTGT GGAATGTGCG TGCTGGAAA TCTGTATGAT CGGCTCTGTG TGGAGAGCA  
CGCCAGCGGC CGAAGCACT GACTTGGGAC GTGCTGTGTC AGGTGGACGA CTTTACAGG ACCGACCTT AGACTACTA CGCGAGGAC ACCTCTTGT

· E H P V K L L F A P N L L L D R N Q G K C V E G H V E I F D M L L ·  
TGGACACCC CTTGAGCTG CTGTTCGCGC CCACCTGTCT CTTGACCGG AACCGGGAA AGTGGGTGGA GGGCATGTG GAGATCTTGC ACATGCTGCT  
ACCTGTGGG GCACTTGCAC GACAAGCGGG GGTGGACGA GGAAGTGGC TTGTTCCCT TCAAGCACT CCGGTACAC CTCTAGAGC TGTAGACGA

· 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 N S G V Y T F L  
GGCACCTCC AGCGGTTCC GGATGATGAA CTTGAGGCG GAGGAATTCG TTGCTGTA GTCCATCATC CTGCTGAACA GCGGCTGTA CACCTCTCTG  
CGGTGGAGG TCGGCCAAG CTTACTACTT GGAGTCCCG CTCCTTAGC ACAGGACTT CAGGTAGTAG GAGACTTGT GCGCGACAT GTGGAAGGAC

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  
TATCCACCC TGAAGTCCCT GGAAGAGAAG GACCACATCC ACCGGGTGCT GGACAAGATC ACCGACACCC TGATCCACCT GATGGCCAG GCTGGCCTGA  
AGTAGTGGG ACTTCAGGA CTTCTCTTC CTGGTGTAGG TGGCCACGA CTTGTTCTAG TGCTGTGGG ACTAGGTGGA CTACCGGTC CAGCCGAGT

· 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 CGAGCAGCAG AGACTGGCCC AGCTGTGCT GATCTGAGC CACATCCGC ACATGAGCAA CAAGGAATG GAACACCTGT ACAGCATGAA  
GTGAGGTGT CTTGTGTGTC TGTACCGGG TCGACGACGA CTAGGACTCG GTGTAGGCG TGTACTGCT GTTCCCTTAC CTTGTGACA TGTGACTT

· 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 GTGGTGGCC GTGAGACCT GTGTCTGAG GCTGCGATG CCGCAGACT GCAAGCCCT ACAGGAGAG GCGGAGCCAG CTTGTAGGAA  
CACTGTCTT CACCACGGG ACATGCTGGA CGACGAGCTC CGACGCTAC GGTGTCTGA GTTGGGGGA TGTGTCTCTC GGTCTGCTC 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 E A E G F P A T V E  
ACCGACAGT CTCACCTGCG CACCGCGCGC AGCACAAGCA GCCACAGCT CGACAAGTAC TACATCACCG GCGAGGCGGA GGGATTCCCT GCCACCGTGG  
TGGCTGTTCA GAGTGGACCG GTGGCGCGG TGTGTGCTG CGGTGTGGA GTCTTCTAT ATGTAGTGC CGCTCGGCT CCGTAGGGA 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 ·  
AGTTCAGTA CTTGCCGAC ACCGACGAG GGCACCGGAT CGAGGAAAG CGGAAGCGGA CCTACGAGAC ATTCAAGAGC ATCATGAAGA AGTCCCCCT  
TCAAGTCTAT GGAAGGGCTG TGGTGTGCT CCGTGGCTTA GCTCTTTT CCGTTCGCT GATGTCTCT TAAGTCTCT TAGTACTTCT TCAGGGGGAA

· 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 E A P Q P Y P F  
CAGCGGCCC ACCGATCCCA GACCCGCCG TAGAAGAATC GCGTGCCCA CGACACTAG CGCCAGCGT CCGAGCGCT CCGCCAGCTG CCGCCAGCTT  
GTGCGCGGG TGGTAGGGT CTGGGGGGG ATCTCTTAG CGGACCGGT GGTCTAGATC GCGGTGCGAC GGGTGGAC GGGGTGGG GGGGTGGG

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  
ACCAGAGCC TGAGCACTAT CACTACGAC GAGTTCCTTA CCATGGTGT CCGCAGCGC CAGATCTCT AGGCTCTGC TCTGGCACT GCTCCACCTC  
TGTGTGCG ACTGTGTA GTGTGTGT CTAAGGAT GGTACCAAA GGGGTGCGG GTCTAGAG TCGGAGAGC AGACCTGGA CGAGGTGAG

[0423] 

```
• V L P Q A P A P A P A P A M V S A L A Q A P A P V P V L A P G P P •  
AGGTGCTGCC TCAGGCCCT GTCACAGCCC GAGCCCTGTC CATGGTGTCT GCACTGGCCC AGGCTCCAGC TCCTGTGCTT GTGCTGGCCC CTGGACCTCC  
TCCACGACGG AGTCGGGGA GAGGTGCGG GTGCGGGAGC GTACACAGA CGTGACCGGG TCCGAGGTGC AGGACACGGA CACGACCGGG 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  
TCAGGCTGTG GCGCTCCTG CCGCTAAACC TACCCAGGCC GGGGAGGAA CACTGTCTGA GCGCTGCTG CAGCTCCAGT TCGACGAGA GGATCTGGGA  
AGTCCGACAC CGGGAGGAC GGGGATTGG ATGGGTCCGG CCGCTCCCTT GTGACAGACT CCGGAGCAGC GTCGAGGTCA AGCTGCTGCT CTTAGACCTT  
  
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  
GCAGTGCTGG GCAATAGCAC CGACCCCGCG GTGTTTACCG ACCTGGCTTC CGTGACAAAC AGCGAGTTC AGCAGCTCT CAACCAGGGC ATCCCTGTCTG  
CGTGACGACC CTTATCTGTG GCTGGGGGG CACAAATGGC TGGACCGGAG GCACCTGTTC TCCTCAAGG TGTGTGAGGA GTTGTCTCCG 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 •  
CCCCACAC CACCGAGGCC ATGCTGATGG AATACCCGGA GGCCATCACC AGACTGGTCA CAGGCGCCCA GAGGCTCCA GATCCAGCAC CAGCTCCACT  
GGGGTGTGTG GTGGCTCGGG TACGACTACC TTATGGGGCT CCGGTAGTGT TCTGACAGT GTCCGCGGT CTCCGAGGT CTAGTCTGTG GTCGAGGTGA  
  
• 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  
GGGAGCCCT GCGCTGCTA ATGGCTGTCT GTCTGGGAG GAGGACTCT CCGACATTC CGACATGGAC TTCAGCGGCC TGTCTGTCCA GATCAGGAGC  
CCCTCGGGA CCGGACGGAT TACCGACGA CAGACCGCTG CTCCTGAAGA GGTCTGAAC GCTGTACCTG AAGTGGCGGG ACGACAGGT CTAGTCTGTG
```

[0424] 表12 7xHBD/mEF1α核酸序列 (SEQ ID NO:41)

[0425] **Tagttaataatctacaatagttaataatctacaatagttaataatctacaatagttaataatctacaatagttaataatctacaat**  
**agttaataatctacaa**

[0426] 表13 Her2t核酸 (SEQ ID NO:44) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO:45)

[0427] 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 TCTCTGTG ACAAGCTTC TGCTCTGTGA GTTACACAC  
TACGA AGAGGACCAC TGTTCCGAAG ACGAGACACT CATGTGTGTG  
  
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  
CCAGCATCC TCCTGATCC ATGCCACCT GAGTGTCAG CCCAGAAAG CTAAGTACC TGTTTGGAC CGGAGGCTGA CCACTGTGTG GCCTGTGCC  
GGTCTAAGG AGGACTAGG TACGTTGGGA CTCACAGTC GGTCTTACC GAGTCACTG ACAAACCTG GCCTCCGACT GGTACACAC CGGACAGGG  
  
• 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 CCGTCCCTTC TGCTGGGCG GTCGCCGAG CGGTGTGAAA CCGTACCTCT CCACTATGCC CATCTGGAAG TTTCCAGATG AGGAGGGCG  
TGATATTCTT GGGAGGGGAG ACGCACCGGG CGACGGGGTC GCCACATT TTGACTGGAGA GGATGTACGG GTAGACCTTC AAAGGTCTAC TCCTCCGCG  
  
• C Q P C P I N C T H S C V D L D D K G C P A E Q R A S P L T S I I  
ATGCCAGCT TGCCCCATCA ACTGCACCA CTCCTGTGTG GACCTGGATG ACAAGGGCTG CCGCGCGAG CAGAGAGCCA GCGCTCTGAC GTCCATCATC  
TACGTCGGA ACGGGGTAGT TGACGTGGGT GAGGACACAC CTGACCTAC TGTTCCGAC GGGGCGGCTC GTCTCTCGGT CGGGAGACTG CAGGTAGTAG  
  
S A V V G I L L V V V L G V V F G I L I *  
TCGCGGTGG TTGGCTTCT GTCTGGGTG GTCTTGGGG TGTCTTGG GATCCTCATC TGA  
AGACCCACC AACCTAAGA CGACCGCAC CAGAACCCC ACCAGAAAC CTAGGAGTAG ACT
```

[0429] 表14 DHFRdm核酸 (SEQ ID NO:46) 和氨基酸 (SEQ ID NO:47)

[0430] DHFRdm核苷酸和氨基酸序列

```
• N V G S L N •  
ATGGTTG GTTGCTAAA  
TACCAAC CAAGGATTT  
  
• 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  
CTGCATGTC GCTGTGCTCC AGAACATGG CATCGGCAAG AACGGGACT TCCCTGGCC ACGCTCAGG AATGAATCCA GATATTTCCA GAGATGACC  
GACGTAGCAG CGACACAGG TCTGTACCC GTAGCCGTT TGGCCCTGA AGGGACCGG TGGGAGTCC TTACTTAGGT CTATAAGGT CTCITACTG  
  
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 N R P L K G R I N  
ACAACCTCT CAGTAGAAG TAAACAGAA CTGGTGATTA TGGGTAGAA GACCTGGTC TCCTTCTCTG AGAAGATCG ACCTTAAAG GGTAGAATTA  
TGTTGGAGAA GTCATCTTC ATTTGCTTA GACCACTAT ACCATTCTT CTGACCAAG AGGTAAAGAC TCTTCTAGC TGGAAATTC 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 •  
ATTAGTCTCT CAGCAGAGAA CTCAGGAAC CTCACAGG AGCTCATTTT CTTCCAGAA GTCTAGATGA TGCTTAAAA CTTACTGAAC AACCAGAAIT  
TAAATCAGA GTGCTCTCT GAGTCTCTT GAGGTGTTC TOGAGTAAA GAAAGGTCT CAGATCTACT ACGAAATTT 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  
AGCAATATA GTAGACATG TCTGATAGT TGGTGGCAGT TCCTGTTATA AGGAAGCAT GAATACCCA GGCCATCTTA AACTATTGT GACAGGATC  
TGTTTATTT CATCTGTACC AGACCTATCA ACCACGTC AAGCAATAT TCCTCGSTA CTTAGTGGGT CCGTAGAAT TTGATAACA CTGTCCTAG  
  
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 CAGCTTTTT CCAGAAATTG ATTTGGAGAA ATATAAACT CTGCGAGAA ACCGAGGTG TCTCTCTGAT GTCCAGGAGG  
TACGTTCTGA AACTTCACT GTGCAAAAAA GTCTTTAAG TAAACCTCT TATATTGAA GAGGTCTTA TGGTCCACA AGAGAGACTA CAGGTCTCTC  
  
• K G I K Y K F E V Y E K N D  
AGAAAGCAT TAAGTACAAA TTTGAAGTAT ATGAGAAGAA TGAT  
TCTTCCGTA ATTGATGTTT AAACCTGATA TACTCTCT 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- ζ -T2A-EGFRt

<400> 1

```

atgctgctgc tggtagaccag cctgctgctg tgcgagctgc cccaccccg ctttctgctg 60
atccccgata tccagatgac ccagtcctcg agctccctgt ccgcctctgt gggcgatagg 120
gtcaccatca cctgccgtgc cagtcaggat gtgaatactg ctgtagcctg gtatcaacag 180
aaaccaggaa aagctccgaa actactgatt tactcgccat ccttcctcta ctctggagtc 240
ccttctcgtc tctctggttc cagatctggg acggatttca ctctgacct cagcagctctg 300
cagccggaag acttcgcaac ttattactgt cagcaacatt atactactcc tcccacgttc 360
ggacagggtg ccaaggtgga gatcaaagc agtactagcg gcggtggctc cggggcgga 420
tccggtgggg gcgagcagc cgaggttcag ctggtggagt ctggcggtgg cctggtgcag 480
ccagggggct cactccgttt gtctgtgca gcttctggct tcaacattaa agacacctat 540
ataactggg tgcgtcaggc cccgggtaag ggcctggaat ggggtgcaag gatttatcct 600
acgaatggtt atactagata tgccgatagc gtcaagggcc gtttactat aagcgcagac 660
acatccaaaa acacagccta cctgcagatg aacagcctgc gtgctgagga cactgccgtc 720
tattattggt ctatagtgagg aggggacggc ttctatgcta tggactactg gggcaagga 780
accctggtca ccgtctcgag gaatctaagt acggaccgcc ctgccccct tgccctatgt 840
tctgggtgct ggtggtggtc ggaggcgtgc tggcctgcta cagcctgctg gtcaccgtgg 900

```



```

ccttcacatc cttttgggtg aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac 960
catttatgag accagtacaa actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag 1020
aagaagaaga aggagatgt gaactgcggg tgaagttag cagaagcgcc gacgcccctg 1080
cctaccagca gggccagaat cagctgtaca acgagctgaa cctgggcaga agggaagagt 1140
acgacgtcct ggataagcgg agaggccggg accctgagat gggcggcaag cctcggcgga 1200
agaaccccc ggaaggcctg tataacgaac tgcagaaaga caagatggcc gaggcctaca 1260
gcgagatcgg catgaagggc gagcggaggc ggggcaaggg ccacgacggc ctgtatcagg 1320
gcctgtccac cgccaccaag gatacctacg acgccctgca catgcaggcc ctgccccaa 1380
ggctcgaggg cggcggagag ggagaggaa gtcttctaac atgcggtgac gtggaggaga 1440
atcccggccc taggatgctt ctctggtga caagccttct gctctgtgag ttaccacacc 1500
cagcattcct cctgatccca cgaaaagtgt gtaacggaat aggtattggt gaatttaaag 1560
actcactctc cataaatgct acgaatatta aacacttcaa aaactgcacc tccatcagt 1620
gcatctcca catcctgcc gtggcattta ggggtgactc cttcacacat actcctctc 1680
tgatccaca ggaactggat attctgaaaa ccgtaaagga aatcacaggg tttttgctga 1740
ttcaggcttg gcctgaaaac aggacggacc tccatgcctt tgagaacct a gaaatcatac 1800
gcggcaggac caagcaacat ggtcagttt ctcttgcatg cgtcagcctg aacataacat 1860
ccttgggatt acgtccctc aaggagataa gtgatggaga tgtataatt tcaggaaaca 1920
aaaatttgtg ctatgcaaat acaataaact ggaaaaaact gtttgggacc tccggtcaga 1980
aaacaaaaat tataagcaac agaggtgaaa acagctgcaa ggccacaggc caggtctgcc 2040
atgccttgtg ctcccccgag ggctgctggg gcccgagacc cagggactgc gtctcttgc 2100
ggaatgtcag ccgaggcagg gaatgcgtgg acaagtgcaa ccttctggag ggtgagccaa 2160
gggagtttgt ggagaactct gattgcatac agtgccacc agagtgcctg cctcaggcca 2220
tgaacatcac ctgcacagga cgggaccag acaactgtat ccagtgtgcc cactacattg 2280
acggccccc ctgcgtcaag acctgcccgg caggagtcac gggagaaaac aacaccctgg 2340
tctggaagta cgcagacgcc ggccatgtgt gccacctgtg ccatccaaac tgcacctacg 2400
gatgcactgg gccaggctct gaaggctgtc caacgaatgg gcctaagatc ccgtccatcg 2460
ccactgggat ggtgggggcc ctctcttgc tgcgtgtggt ggccctgggg atcggcctct 2520
tcatgtga 2528

```

[0002]

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

<220>  
 <223> GMCSFRss

```

<400> 2
atgctgctgc tggtagaccag cctgctgctg tgcgagctgc cccaccccgc ctttctgctg 60
atcccc 66

```

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

<220>  
 <223> CD19scFv DNA

```

<400> 3
gacatccaga tgaccagac cacctccagc ctgagcgcca gcctgggcca cgggtgacc 60
atcagctgcc gggccagcca ggacatcagc aagtacctga actggtatca gcagaagccc 120
gacggcaccg tcaagctgct gatctaccac accagccggc tgcacagcgg cgtgcccagc 180
cggtttagcg gcagcggctc cggcaccgac tacagcctga ccatctccaa cctggaacag 240
gaagatatcg ccacctactt ttgccagcag ggcaacacac tgccctacac ctttggcggc 300
ggaacaaagc tggaaatcac cggcagcacc tccggcagcg gcaagcctgg cagcggcgag 360
ggcagcacca agggcgaggt gaagctgcag gaaagcggcc ctggcctggt ggccccagc 420
cagagcctga gcgtgacctg caccgtgagc ggctgagcc tgcccgacta cggcgtgagc 480

```

	tggatccggc agccccccag gaagggcctg gaatggctgg gcgtgatctg gggcagcgag	540
	accacctact acaacagcgc cctgaagagc cggctgacca tcatcaagga caacagcaag	600
	agccaggtgt tcctgaagat gaacagcctg cagaccgacg acaccgccat ctactactgc	660
	gccaaagcact actactacgg cggcagctac 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	
	gaatctaagt acggaccgcc ctgccccct tgccct	36
	<210> 5	
	<211> 84	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial sequence)	
	<220>	
	<223> CD28跨膜域	
	<400> 5	
	atgttctggg tgctggtggt ggteggagge 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 gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa	60
	actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttcag aagaagaaga aggaggatgt	120
	gaactg	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 cgccgacgcc cctgcctacc agcagggcca gaatcagctg	60
	tacaacgagc tgaacctggg cagaagggaa gactacgacg tcctggataa gcggagaggc	120
	cgggaccctg agatgggcgg caagcctcgg cggaagaacc cccaggaagg cctgtataac	180
	gaactgcaga aagacaagat ggccgaggcc tacagcgaga tcggcatgaa gggcgagcgg	240
	aggcggggca agggccacga cggcctgtat cagggcctgt ccaccgccac caaggatacc	300
	tacgacgccc tgcacatgca ggccctgccc ccaagg	336

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

<220>  
 <223> 自切割T2A

<400> 8  
 ctcgagggcg 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

[0004] <400> 9  
 atgtttctcc tggtgacaag ctttctgctc tgtgagttac cacaccacgc attcctcctg 60  
 atcccacgca aagtgtgtaa cggaataggt attggtgaat ttaaagactc actctccata 120  
 aatgctacga atattaaaca cttcaaaaac tgcacctcca tcagtggcga tctccacatc 180  
 ctgccggtgg cathtagggg tgactccttc acacatactc ctctcttga tccacaggaa 240  
 ctggatatcc tgaaaaccgt aaaggaaatc acagggtttt tgctgattca ggcttggcct 300  
 gaaaacagga cggacctcca tgcctttgag aacctagaaa tcatacgcgg caggaccaag 360  
 caacatggtc agttttctct tgcagtcgtc agcctgaaca taacatcctt gggattacgc 420  
 tccctcaagg agataagtga tggagatgtg ataatttcag gaaacaaaaa tttgtgctat 480  
 gcaaatacaa taaactggaa aaaactgttt gggacctccg gtcagaaaac caaaattata 540  
 agcaacagag gtgaaaacag ctgcaaggcc acaggccagg tctgccatgc cttgtgctcc 600  
 cccgagggct gctggggccc ggagcccagg gactgcgtct cttgccgaa tgtcagccga 660  
 ggcagggagt gcgtggacaa gtgcaacctt ctggagggtg agccaaggga gtttgtggag 720  
 aactctgagt gcatacagtg ccacctagag tgcctgcctc aggccatgaa catcacctgc 780  
 acaggacggg gaccagacaa ctgtatccag tgtgcccact acattgacgg cccccactgc 840  
 gtcaagacct gcccggcagg agtcatggga gaaaacaaca ccctggtctg gaagtacgca 900  
 gacgccggcc atgtgtgcca cctgtgccat ccaaactgca cctacggatg cactgggcca 960  
 ggtcttgaag gctgtccaac gaatgggcct aagatcccgt ccatgccac tgggatggtg 1020  
 ggggccctcc tcttctgct ggtggtggcc ctggggatcg gcctcttcat gtga 1074

<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  
 atgtctgctgc tggtgaccag cctgtctgctg tgcgagctgc cccaccccg ctttctgctg 60  
 atccccgaca tccagatgac ccagaccacc tccagcctga gcgccagcct gggcgaccgg 120  
 gtgaccatca gctgccgggc cagccaggac atcagcaagt acctgaactg gtatcagcag 180  
 aagccccgac gcaccgtcaa gctgtgctat taccacacca gccggctgca cagcggcgtg 240  
 cccagccggt ttagcggcag cggctccggc accgactaca gcctgacct ctccaacctg 300  
 gaacaggaag atatcgccac ctacttttgc cagcagggca acacactgcc ctacaccttt 360  
 ggcgccggaa caaagctgga aatcaccggc agcacctccg gcagcgga gacctggcagc 420  
 ggcgagggca gcaccaagg cgaggtgaag ctgcaggaaa gcggccctgg cctggtggcc 480

cccagccaga gcctgagcgt gacctgcacc gtgagcggcg ttagcctgcc cgactacggc 540  
 gtgagctgga tccggcagcc cccaggaag ggcttgggaat ggctgggctg gatctggggc 600  
 agcgagacca cctactacaa cagcgccctg aagagccggc tgaccatcat caaggacaac 660  
 agcaagagcc aggtgttcct gaagatgaac agcctgcaga ccgacgacac cgccatctac 720  
 tactgcgcca agcactacta ctacggcggc agctacgcca tggactactg gggccagggc 780  
 accagcgtga ccgtgagcag cgagagcaag tacggaccgc cctgcccccc ttgccctatg 840  
 ttctgggtgc tgggtgtgtt cggaggcgtg ctggcctgct acagcctgct ggtaaccgtg 900  
 gccttcattca tcttttgggt gaaacggggc agaaagaaac tcctgtatat attcaaacaa 960  
 ccatttatga gaccagtaca aactactcaa gaggaagatg gctgtagctg ccgattttcca 1020  
 gaagaagaag aaggaggatg tgaactgcgg gtgaagtcca gcagaagcgc cgacgcccct 1080  
 gcctaccagc agggccagaa tcagctgtac aacgagctga acctgggcag aagggaagag 1140  
 tacgacgtcc tggataagcg gagaggccgg gaccctgaga tgggcccga gcctcggcgg 1200  
 aagaaccccc aggaaggcct gtataacgaa ctgcagaaag acaagatggc cgaggcctac 1260  
 agcgagatcg gcatgaaggg cgagcggagg cggggcaagg gccacgacgg cctgtatcag 1320  
 ggctgttcca ccgccaccaa ggatacctac gacgccctgc acatgcaggc cctgccccca 1380  
 aggtctgagg gcggcggaga gggcagagga agtcttctaa catgcgtga cgtggaggag 1440  
 aatccccggc ctaggatgct tctcctggtt acaagccttc tgctctgtga gttaccacac 1500  
 ccagcattcc tctgatccc acgcaaagtg tgaacggaa taggtattg tgaatttaaa 1560  
 gactcactct ccataaatgc tacgaatatt aaacacttca aaaactgcac ctccatcagt 1620  
 ggcatctcc acatcctgcc ggtggcattt aggggtgact ccttcacaca tactcctcct 1680  
 ctggatccac aggaactgga tattctgaaa accgtaaagg aaatcacagg gtttttctg 1740  
 attcaggctt ggctgaaaa caggacggac ctccatgcct ttgagaacct agaaatcata 1800  
 cgcgccagga ccaagcaaca tggctcagttt tctcttgag tcgtcagcct gaacataaca 1860  
 tccttgggat tacgtccct caaggagata agtgatggag atgtgataat ttcaggaaac 1920  
 aaaaatttgt gctatgcaaa tacaataaac tggaaaaaac tgtttgggac ctccggctcag 1980  
 aaaacaaaa ttataagcaa cagaggtgaa aacagctgca aggccacagg ccaggtctgc 2040  
 catgccttgt gctccccga gggctgctgg ggcccggagc ccagggactg cgtctcttgc 2100  
 cggaatgtca gccgaggcag ggaatgcgtg gacaagtga accttctgga gggtagacca 2160  
 [0005] agggagtttg tggagaactc tgagtgcata cagtgcacc cagagtgcct gcctcaggcc 2220  
 atgaacatca cctgcacagg acggggacca gacaactgta tccagtgtgc cactacatt 2280  
 gacggcccc actgcgtcaa gacctgcccg gcaggagtca tgggagaaaa caacacctg 2340  
 gtctggaagt acgcagacgc cggccatgtg tgccacctgt gccatccaaa ctgcacctac 2400  
 ggatgcactg ggccaggctt tgaaggctgt ccaacgaatg ggccaaagat cccgtccatc 2460  
 gccactggga tgggtggggc cctcctcttg ctgctgggtg tggccctggg gatcggcctc 2520  
 ttcatgtga 2529

<210> 11

<211> 842

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> GMCSFRss - CD19scFv - IgG4铰链 - CD28tm - 41BB  
- CD3  $\zeta$  - T2A - EGFRt

<400> 11

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

[0006]

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
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	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	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  
 [0007] 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 Gly Ser Gly 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

[0008]

<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	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	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  $\zeta$  同种型3

[0010] <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  
 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  
 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	
	atcaaaagaa tagaccgaga tagggt	26
	<210> 23	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial sequence)	
	<220>	
	<223> oJ02648	
	<400> 23	
	ccgtaccttt aagaccaatg acttac	26
	<210> 24	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial sequence)	
	<220>	
	<223> oJ02650	
[0012]	<400> 24	
	ttgagagttt tcgccccg	18
	<210> 25	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial sequence)	
	<220>	
	<223> oJ02651	
	<400> 25	
	aatagacaga tcgctgagat aggt	24
	<210> 26	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (Artificial sequence)	
	<220>	
	<223> oJ02652	
	<400> 26	
	caggtatccg gtaagcgg	18
	<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		
	tagcggtttg 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		
	attgtctggt 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		

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

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

[0015]

```

atggtgtcca agctgtccca gctgcagaca gaactgctgg cagcactgct ggaaagcggc 60
ctgagcaaag aggccctgat tcaggcactc ggcgaaacct gacctatct gctcgctggc 120
gaaggccctc tggataaggg cgagagctgt ggccgaggaa gaggagagct ggccgagctg 180
cctaaccggc tgggcgagac aagaggcagc gaggacgaga cagacgacga cggcgaggac 240
ttaccccccc ccatcctgaa agagctggaa aacctgagcc ccgaggaagc cgcccaccag 300
aaagccgtgg tggagacact gctgcaggaa gatccctggc gggtcgccaa gatggtcaag 360
agctaccctg agcagcacia catccccag cgggaggtgg tggacaccac cggcctgaac 420
cagagccacc tgagccagca cctgaacaag ggcaacccca tgaaaacca gaagagagcc 480
gccctgtaca cttggtacgt gcggaagcag agagaggtgg ccagcagtt tacacacgcc 540
ggccaggggc gcctgatcga ggaacctacc ggcgacgagc tgcccaccaa gaagggcaga 600
cggacccggt ttaagtgggg ccctgcatct cagcagatcc tgttccaggc ctacgagcgg 660
cagaagaacc ccagcaaaga ggaacgggag aacttggtgg aagagtcaa ccgggcccag 720
tgcattccaga gaggcgtgag cccttctcag gctcagggcc tcggcagcaa tctggtcacc 780
gaagtgcggg tgtacaattg gttcgccaac cggcggaaag aggaagcctt ccggcacaag 840
ctgtctgctg gcgatatgag agccgccaac ctgtggccca gcccctgat gatcaagcgg 900
agcaagaaga acagcctggc cctgagcctg accgccgatc agatggtgtc cgctctgctg 960
gacgccgagc cccctatcct gtacagcgag tacgacccca ccagaccctt cagcgaggcc 1020
agcatgatgg gcctgctgac caacctggcc gaccgggagc tgggtcacat gatcaactgg 1080
gccaagcggg tgcccggcct cgtggacctg accctgcacg accaggtcca cctgctggaa 1140
tgtgcctggc tggaaatcct gatgatcggc ctcgtgtgga gaagcatgga acaccccggc 1200
aagctgctgt tcgcccccaa cctgctcctg gaccggaacc agggaaagtg cgtggagggc 1260
atggtggaga tcttcgacat gctgctggcc accctcagcc ggttcggat gatgaacctg 1320
cagggcgagg aattcgtgtg cctgaagtcc atcatcctgc tgaacagcgg cgtgtacacc 1380
ttcctgtcat ccaccctgaa gtccctggaa gagaaggacc acatccaccg ggtgctggac 1440
aagatcaccg acaccctgat ccacctgatg gccaaggttg gcctgacact ccagcagcag 1500
caccagagac tggcccagct gctgctgac ctgagccaca tccggcacat gagcaacaag 1560
cggatggaac acctgtacag catgaagtgc aagaacgtgg tgcccctgta cgacctgctg 1620
ctcgagatgc tggatgcccc cagactgcac gccctacaa gcagaggcgg agccagcgtg 1680
gaggaaaccg accagtctca cctggccacc gccggcagca caagcagcca cagcctgcag 1740
aagtactaca tcaccggcga ggccgaggga ttccctgcca ccgtggagtt ccagtacctg 1800
cccgacaccg acgaccggca ccggatcgag gaaaagcggg agcggacctt cgagacattc 1860
aagagcatca tgaagaagtc ccccttcagc ggccccaccg atcccagacc ccccctaga 1920

```



```

agaatcgccg tgcccagcag atctagcgcc agcgtgcccga agcctgcccc ccagccctac 1980
cctttcacca gcagcctgag caccatcaac tacgacgagt tccctaccat ggtgttcccc 2040
agcggccaga tctctcaggc ctctgctctg gcacctgctc cacctcaggt gctgcctcag 2100
gcccctgctc cagccccagc ccttgccatg gtgtctgcac tggcccaggc tccagctcct 2160
gtgcctgtgc tggcccctgg acctctcag gctgtgcccc ctctgcccc taaacctacc 2220
caggccgggg aggaacact gtctgaggcc ctgctgcagc tccagttcga cgacaggat 2280
ctgggagcac tgctgggcaa tagcaccgac cccgccgtgt ttaccgacct ggctccctg 2340
gacaacagcg agttccagca gctctcaac cagggcaccc ctgtcgcccc acacaccacc 2400
gagcccatgc tgatggaata ccccaggcc atcaccagac tggtcacagg cgcccagagg 2460
cctccagatc cagcaccagc tccactggga gcccctggcc tgcctaattg gctgctgtct 2520
ggcgacgagg acttctccag cattgccgac atggacttca gcgccctgct gtcccagatc 2580
agcagc 2586

```

<210> 40

<211> 828

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> TamR-tf (HEA3)

<400> 40

[0016]

```

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 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 Gly Gln Gly Gly Leu Ile Glu Glu Pro Thr Gly Asp
180         185         190
Glu Leu Pro Thr Lys Lys Gly 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

```

[0017]

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 atagttaata 60  
 atctacaata gttaataatc tacaatagtt 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  
 atggtgtcca agctgtccca gctgcagaca gaactgctgg cagcactgct ggaaagcggc 60  
 ctgagcaaag aggccctgat tcaggcactc ggcgaaactg gaccttatct gctcgctggc 120  
 gaaggccctc tggataaggc cgagagctgt ggcgaggaga gaggagagct ggccgagctg 180  
 cctaaccggc tgggcgagac aagaggcagc gaggacgaga cagacgacga cggcgaggac 240  
 ttcaccccc ccatcctgaa agagctggaa aacctgagcc ccgaggaagc cgcccaccag 300  
 aaagccgtgg tggagacact gctgcaggaa gatccctggc gggtcgcca gatggtcaag 360  
 agctacctgc agcagcaca catccccag cgggaggtgg tggacaccac cggcctgaac 420  
 cagagccacc tgagccagca cctgaacaag ggcaccccca tgaaaacca gaagagagcc 480  
 gccctgtaca ctgggtacgt gcggaagcag agagaggtgg ccagcagatt tacacacgcc 540  
 ggccaggggc gcctgatcga ggaacctacc ggcgacgagc tgcccacca gaagggcaga 600  
 cggaaccggc ttaagtgggg cctgcactc cagcagatcc tgttcaggc ctacgagcgg 660  
 cagaagaacc ccagcaaaga ggaacgggag aacttggtgg aagagtcaa ccgggcccag 720  
 tgcattccaga gaggcgtgag cctttctcag gctcagggcc tcggcagcaa tctggtcacc 780  
 gaagtgcggg tgtacaattg gttcgccaac cggcggaag aggaagcctt ccggcacaag 840  
 ctgtctgctg gcgatatgag agccgccaac ctgtggccca gccccctgat gatcaagcgg 900  
 agcaagaaga acagcctggc cctgagcctg accgcccgatc agatggtgtc cgctctgctg 960  
 gacgccgagc cccctatcct gtacagcgag tacgaccca ccagaccctt cagcgaggcc 1020  
 agcatgatgg gcctgctgac caacctggcc gaccgggagc tgggtcacat gatcaactgg 1080  
 gccaaagcgg tgcccggctt cgtggacctg accctgcacg accaggtcca cctgctggaa 1140  
 tgtgcctggc tggaaatcct gatgatcggc ctgctgtgga gaagcatgga acaccccgtg 1200  
 aagctgctgt tcgccccaa cctgctcctg gaccggaacc agggaaagt cgtggagggc 1260  
 atggtggaga tcttcgacat gctgctggcc acctccagcc ggttcggat gatgaacctg 1320  
 cagggcgagg aattcgtgtg cctgaagtcc atcatcctgc tgaacagcgg cgtgtacacc 1380  
 ttcctgtcat ccaccctgaa gtccctggaa gagaaggacc acatccaccg ggtgctggac 1440  
 aagatcaccg acaccctgat ccacctgat gccaaggctg gcctgacact ccagcagcag 1500

```

caccagagac tggcccagct gctgctgata ctgagccaca tccggcacat gagcaacaag 1560
ggaatggaac acctgtacag catgaagtgc acgaacgtgg tgcccctgta cgacctgctg 1620
ctcgaggctg ccgatgcccc cagactgcac gcccctacaa gcagaggcgg agccagcgtg 1680
gaggaaaccg accagtctca cctggccacc gccggcagca caagcagcca cagcctgcag 1740
aagtactaca tcaccggcga ggccgaggga ttccctgcca ccgtggagtt ccagtacctg 1800
cccacaccg acgaccggca ccgatcgag gaaaagcggg agcggacctc cgagacattc 1860
aagagcatca tgaagaagtc ccccttcagc ggccccaccg atcccagacc cccccctaga 1920
agaatcgccg tgcccagcag atctagcgcc agcgtgcccc agcctgcccc ccagccctac 1980
cctttcacca gcagcctgag caccatcaac tacgacgagt tccctaccat ggtgttcccc 2040
agcggccaga ttctcaggc ctctgctctg gcacctgctc cacctcaggt gctgcctcag 2100
gcccctgctc cagccccagc ccctgccatg gtgtctgcac tggcccaggc tccagctcct 2160
gtgcctgtgc tggcccctgg acctcctcag gctgtggccc ctctgcccc taaacctacc 2220
caggccgggg agggaaact gtctgaggcc ctgctgcagc tccagttcga cgacaggat 2280
ctgggagcac tgctgggcaa tagcaccgac cccgccgtgt ttaccgacct ggctcctgtg 2340
gacaacagcg agttccagca gctcctcaac cagggcattc ctgtcgcctc acacaccacc 2400
gagcccatgc tgatggaata ccccagggcc atcaccagac tggtcacagg cgcccagagg 2460
cctccagatc cagcaccagc tccactggga gcccttgccc tgccctaatgg gctgctgtct 2520
ggcgacagag acttctccag cattgccgac atggacttca gcgccctgct gtcccagatc 2580
agcagc

```

<210> 43

<211> 862

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> TamR-tf (HEA4)

<400> 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 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 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

```

[0020]	225	Cys	Ile	Gln	Arg	Gly	Val	Ser	Pro	Ser	Gln	Ala	Gln	Gly	Leu	Gly	Ser	240
						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															320	
		Asp	Ala	Glu	Pro	Pro	Ile	Leu	Tyr	Ser	Glu	Tyr	Asp	Pro	Thr	Arg	Pro	
						325											335	
		Phe	Ser	Glu	Ala	Ser	Met	Met	Gly	Leu	Leu	Thr	Asn	Leu	Ala	Asp	Arg	
					340												350	
		Glu	Leu	Val	His	Met	Ile	Asn	Trp	Ala	Lys	Arg	Val	Pro	Gly	Phe	Val	
					355												365	
		Asp	Leu	Thr	Leu	His	Asp	Gln	Val	His	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Trp	Leu	
		370															380	
		Glu	Ile	Leu	Met	Ile	Gly	Leu	Val	Trp	Arg	Ser	Met	Glu	His	Pro	Val	
		385															400	
		Lys	Leu	Leu	Phe	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Leu	Asp	Arg	Asn	Gln	Gly	Lys	
						405											415	
		Cys	Val	Glu	Gly	Met	Val	Glu	Ile	Phe	Asp	Met	Leu	Leu	Ala	Thr	Ser	
					420												430	
		Ser	Arg	Phe	Arg	Met	Met	Asn	Leu	Gln	Gly	Glu	Glu	Phe	Val	Cys	Leu	
					435												445	
		Lys	Ser	Ile	Ile	Leu	Leu	Asn	Ser	Gly	Val	Tyr	Thr	Phe	Leu	Ser	Ser	
		450															460	
		Thr	Leu	Lys	Ser	Leu	Glu	Glu	Lys	Asp	His	Ile	His	Arg	Val	Leu	Asp	
		465															480	
		Lys	Ile	Thr	Asp	Thr	Leu	Ile	His	Leu	Met	Ala	Lys	Ala	Gly	Leu	Thr	
						485											495	
		Leu	Gln	Gln	Gln	His	Gln	Arg	Leu	Ala	Gln	Leu	Leu	Leu	Ile	Leu	Ser	
						500											510	
		His	Ile	Arg	His	Met	Ser	Asn	Lys	Gly	Met	Glu	His	Leu	Tyr	Ser	Met	
						515											525	
		Lys	Cys	Lys	Asn	Val	Val	Pro	Leu	Tyr	Asp	Leu	Leu	Leu	Glu	Ala	Ala	
						530											540	
		Asp	Ala	His	Arg	Leu	His	Ala	Pro	Thr	Ser	Arg	Gly	Gly	Ala	Ser	Val	
		545															560	
		Glu	Glu	Thr	Asp	Gln	Ser	His	Leu	Ala	Thr	Ala	Gly	Ser	Thr	Ser	Ser	
						565											575	
		His	Ser	Leu	Gln	Lys	Tyr	Tyr	Ile	Thr	Gly	Glu	Ala	Glu	Gly	Phe	Pro	
						580											590	
		Ala	Thr	Val	Glu	Phe	Gln	Tyr	Leu	Pro	Asp	Thr	Asp	Asp	Arg	His	Arg	
						595											605	
		Ile	Glu	Glu	Lys	Arg	Lys	Arg	Thr	Tyr	Glu	Thr	Phe	Lys	Ser	Ile	Met	
						610											620	
		Lys	Lys	Ser	Pro	Phe	Ser	Gly	Pro	Thr	Asp	Pro	Arg	Pro	Pro	Pro	Arg	
		625															640	
		Arg	Ile	Ala	Val	Pro	Ser	Arg	Ser	Ser	Ala	Ser	Val	Pro	Lys	Pro	Ala	
						645											655	
		Pro	Gln	Pro	Tyr	Pro	Phe	Thr	Ser	Ser	Leu	Ser	Thr	Ile	Asn	Tyr	Asp	
						660											670	
		Glu	Phe	Pro	Thr	Met	Val	Phe	Pro	Ser	Gly	Gln	Ile	Ser	Gln	Ala	Ser	
						675											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		
	725	730
Pro Lys Pro Thr Gln Ala Gly Glu Gly Thr Leu Ser Glu Ala Leu Leu		
	740	745
Gln Leu Gln Phe Asp Asp Glu Asp Leu Gly Ala Leu Leu Gly Asn Ser		
	755	760
Thr Asp Pro Ala Val Phe Thr Asp Leu Ala Ser Val Asp Asn Ser Glu		
	770	775
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		
	805	810
Gly Ala Gln Arg Pro Pro Asp Pro Ala Pro Ala Pro Leu Gly Ala Pro		
	820	825
Gly Leu Pro Asn Gly Leu Leu Ser Gly Asp Glu Asp Phe Ser Ser Ile		
	835	840
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 tgggtgacaag ctttctgctc tgtgagttac cacaccagc attcctcctg 60  
 atcccatgcc accctgagtg tcagccccag aatggctcag tgacctgttt tggaccggag 120  
 gctgaccagt gtgtggcctg tgcccactat aaggaccctc ctttctgcgt ggcccgtgc 180  
 cccagcgggtg tgaaacctga cctctectac atgccatct ggaagtttc agatgaggag 240  
 ggcgcatgcc agccttgccc catcaactgc acccactcct gtgtggacct ggatgacaag 300  
 ggctgccccg ccgagcagag agccagccct ctgacgtcca tcattctctgc ggtggttggc 360  
 attctgctgg tcgtggtctt ggggggtggtc tttgggatcc tcattctga 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  
 atggttggtt cgctaaactg catcgctcgt gtgtcccaga acatgggcat cggcaagaac 60  
 ggggacttcc cctggccacc gctcaggaat gaatccagat atttccagag aatgaccaca 120  
 acctcttcag tagaaggtaa acagaatctg gtgattatgg gtaagaagac ctggttctcc 180  
 attcctgaga agaatcgacc tttaaagggt agaattaatt tagttctcag cagagaactc 240  
 aaggaacctc cacaaggagc tcattttctt tccagaagtc tagatgatgc cttaaaactt 300  
 actgaacaac cagaattagc aaataaagta gacatgggtc ggatagtgg tggcagttct 360  
 gtttataagg aagccatgaa tcacccaggc catcttaaac tatttgtgac aaggatcatg 420  
 caagactttg aaagtgcac gttttttcca gaaattgatt tggagaaata taaacttctg 480  
 ccagaatacc caggtgttct ctctgatgtc caggaggaga aaggcattaa gtacaaattt 540  
 gaagtatatg agaagaatga t 561

[0022]

<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 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	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							

&lt;210&gt; 48

<400> 48  
000

&lt;210&gt; 49

<400> 49  
000

&lt;210&gt; 50

<400> 50  
000

&lt;210&gt; 51

<400> 51  
000

[0023] &lt;210&gt; 52

<400> 52  
000

&lt;210&gt; 53

<400> 53  
000

&lt;210&gt; 54

<400> 54  
000

&lt;210&gt; 55

<400> 55  
000

&lt;210&gt; 56

<400> 56  
000

&lt;210&gt; 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	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 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

&lt;212&gt; PRT

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

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 跨膜域

&lt;400&gt; 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							

&lt;210&gt; 72

&lt;211&gt; 42

&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; 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	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu						
			35				40								

[0028]

&lt;210&gt; 73

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; PRT

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

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 信号肽

&lt;400&gt; 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												

&lt;210&gt; 74

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

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

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 胞外域

&lt;400&gt; 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

[0029] <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  
 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly 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 ctttctgctc tgtgagttac cacaccagc attcctcctg 60  
 atccca 66

<210> 81  
 <211> 734  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)  
  
 <220>  
 <223> Her2scFV

<400> 81  
 gatataccaga tgaccagtc cccgagctcc ctgtccgcct ctgtgggcga tagggtcacc 60  
 atcacctgcc gtgccagtca ggatgtgaat actgctgtag cctggtatca acagaaacca 120  
 ggaaaagctc cgaaactact gatttactcg gcaccccttc tctactctgg agtcccttct 180  
 cgcttctctg gttccagatc tgggacggat ttactcttga ccatcagcag tctgcagccg 240  
 gaagacttcg caacttatta ctgtcagcaa cattatacta ctctccccc gttcggacag 300  
 ggtaccaagg tggagatcaa aggcagtact agcggcggtg gtcgggggg cgatccggt 360  
 gggggcgcca gcagcgaggt tcagctggtg gagtctggcg gtggcctggt gcagccaggg 420  
 ggctcactcc gtttgtcctg tgcagcttct ggcttcaaca ttaaagacac ctatatacac 480

```

tgggtgcgtc agggcccgagg taagggcctg gaatgggttg caaggattta tcctacgaat 540
ggttatacta gatatgccga tagcgtcaag ggccgtttca ctataagcgc agacacatcc 600
aaaaacacag cctacctgca gatgaacagc ctgcgtgctg aggacactgc cgtctattat 660
tgttctagat ggggagggga cggcttctat gctatggact actgggggtca 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 acggaccgcc ctgccccct tgccct 36

<210> 83  
 <211> 84  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>  
 <223> CD28tm

<400> 83  
 atgttctggg tgctgggtgg ggctggaggc gtgctggcct gctacagcct gctggtcacc 60  
 gtggccttca tcacttttg ggtg 84

[0031]

<210> 84  
 <211> 126  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>  
 <223> 4-1BB

<400> 84  
 aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa 60  
 actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttcag aagaagaaga aggaggatgt 120  
 gaactg 126

<210> 85  
 <211> 336  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>  
 <223> CD3 ζ

<400> 85  
 cgggtgaagt tcagcagaag cgccgacgcc cctgcctacc agcagggcca gaatcagctg 60  
 tacaacgagc tgaacctggg cagaagggaa gactacgacg tcctggataa gcggagaggc 120  
 cgggaccctg agatgggagg caagcctcgg cggaagaacc cccaggaagg cctgtataac 180  
 gaactgcaga aagacaagat ggccgaggcc tacagcgaga tcggcatgaa gggcgagcgg 240  
 aggcggggca agggccacga cggcctgtat cagggcctgt ccaccgccac 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  
 ctcgagggcg gcgagaggg cagaggaagt cttctaacat gcggtgacgt ggaggagaat 60  
 cccggcccta gg 72

<210> 87  
 <211> 1074  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>  
 <223> tEGFR

[0032] <400> 87  
 atgcttctcc tggtgacaag ctttctgctc tgtgagttac cacaccacgc attcctcctg 60  
 atcccacgca aagtgtgtaa cggaataggt attggtgaat ttaaagactc actctccata 120  
 aatgctacga atattaaaca cttcaaaaac tgcacctcca tcagtggcga tctccacatc 180  
 ctgccggtgg catttagggg tgactccttc acacatactc ctctcttgga tccacaggaa 240  
 ctggatatct tgaaaaccgt aaaggaaatc acagggtttt tgctgattca ggcttggcct 300  
 gaaaacagga cggacctcca tgcctttgag aacctagaaa tcatacgagg caggaccaag 360  
 caacatggtc agttttctct tgcagtcgtc agcctgaaca taacatcctt gggattacgc 420  
 tccctcaagg agataagtga tggagatgtg ataatttcag gaaacaaaaa tttgtgctat 480  
 gcaaatataa taaactggaa aaaactgttt gggacctccg gtcagaaaac caaaattata 540  
 agcaacagag gtgaaaacag ctgcaaggcc acaggccagg tctgccatgc cttgtgctcc 600  
 cccgagggct gctggggccc ggagcccagg gactgcgtct cttgccggaa tgtcagccga 660  
 ggcaggggat gctgggacaa gtgcaacctt ctggagggtg agccaaggga gtttgtggag 720  
 aactctgagt gcatacagt ccacctagag tgcctgcctc aggccatgaa catcacctgc 780  
 acaggacggg gaccagacaa ctgtatccag tgtgccact acattgacgg cccccactgc 840  
 gtcaagacct gcccggcagg agtcatggga gaaaacaaca ccctgggtctg gaagtacgca 900  
 gacgccggcc atgtgtgcca cctgtgccat ccaaactgca cctacggatg cactgggcca 960  
 ggtcttgaag gctgtccaac gaatgggcct aagatcccgt ccatcgccac tgggatggtg 1020  
 ggggccctcc tcttgetgct ggtggtggcc ctggggatcg gcctcttcat gtga 1074

<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 10

<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

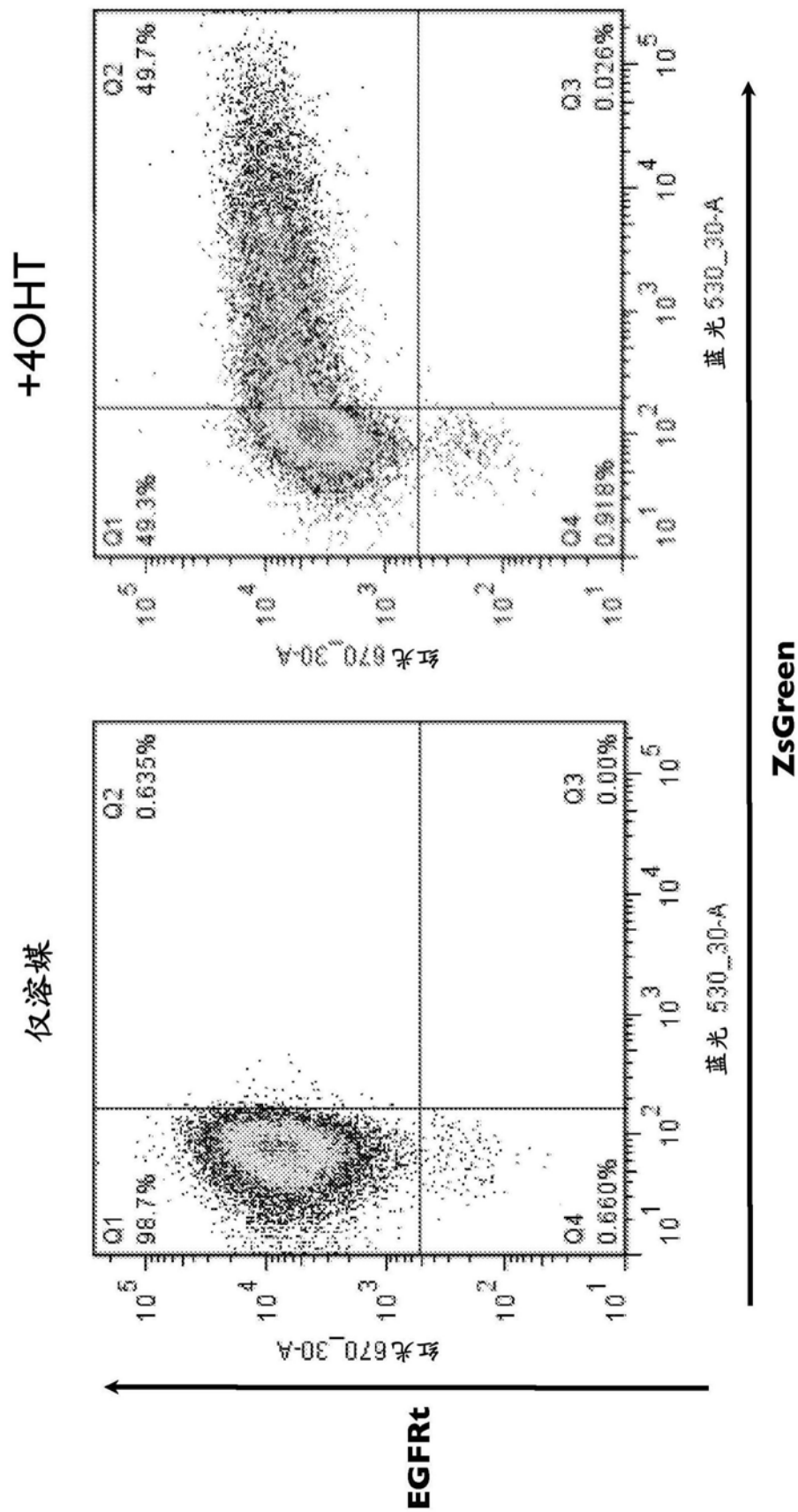


图1A

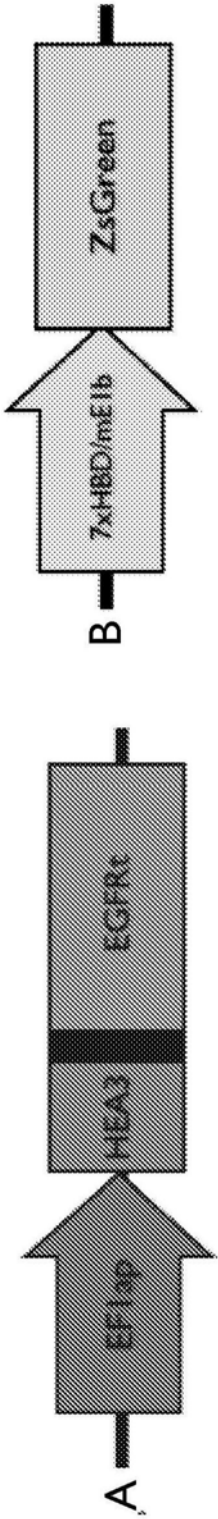


图1B

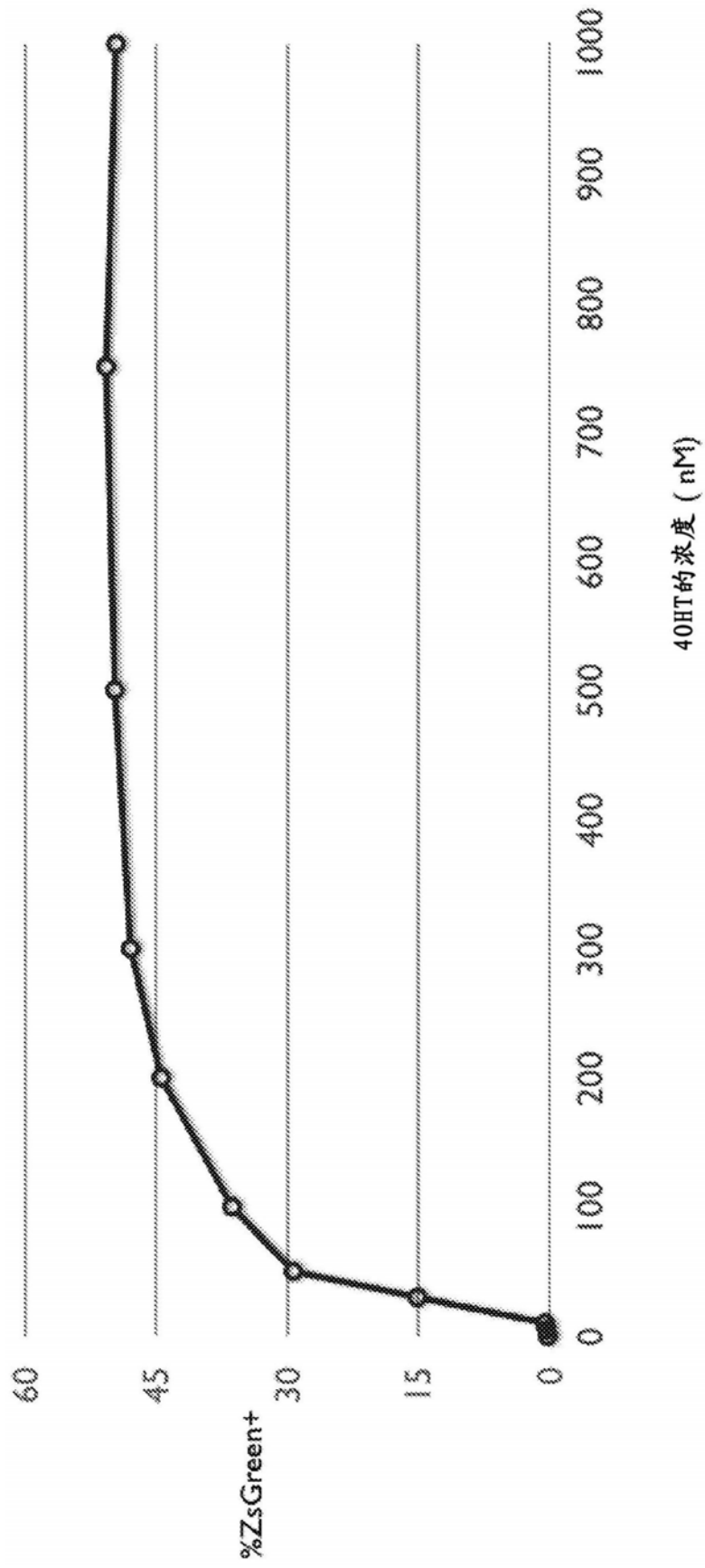


图2



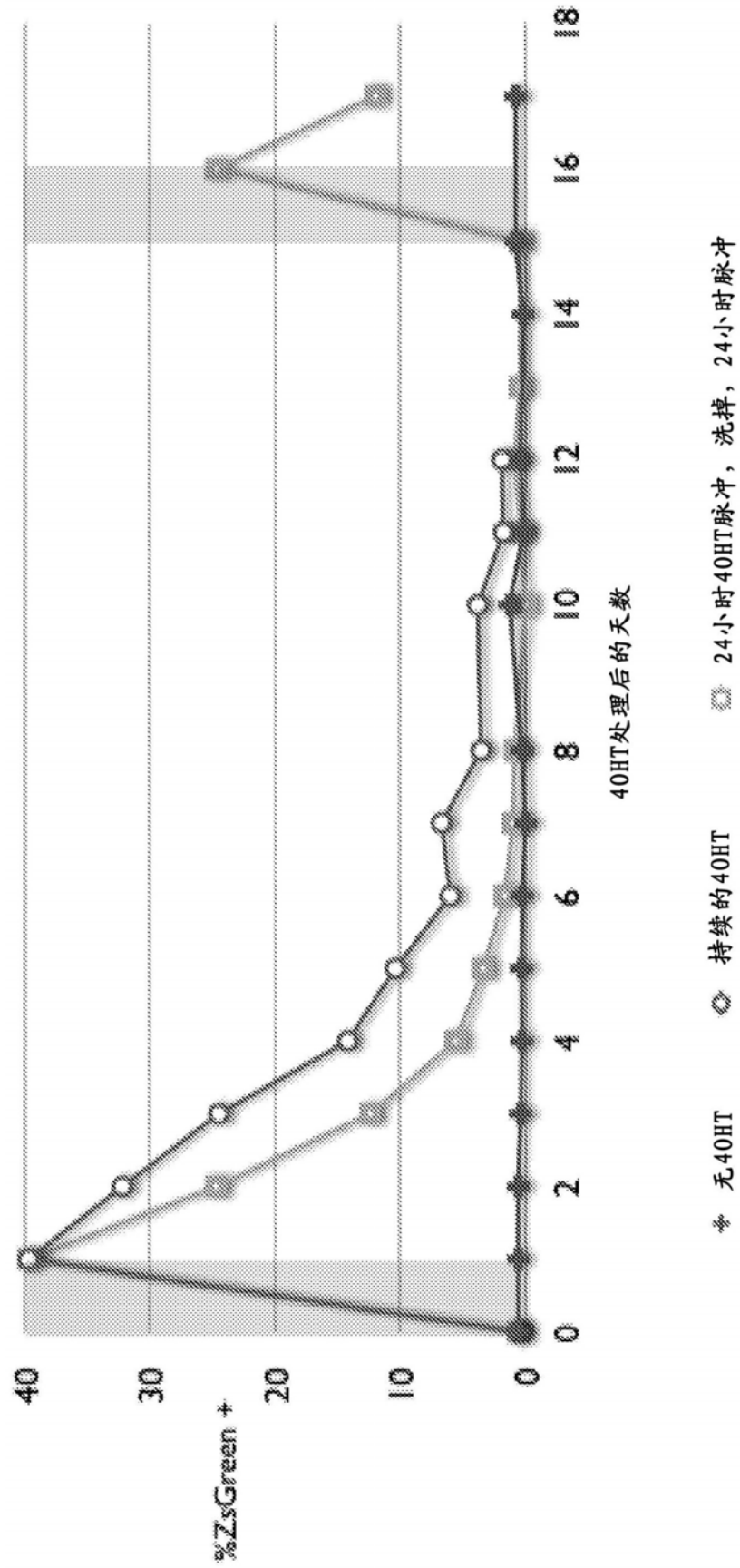


图3

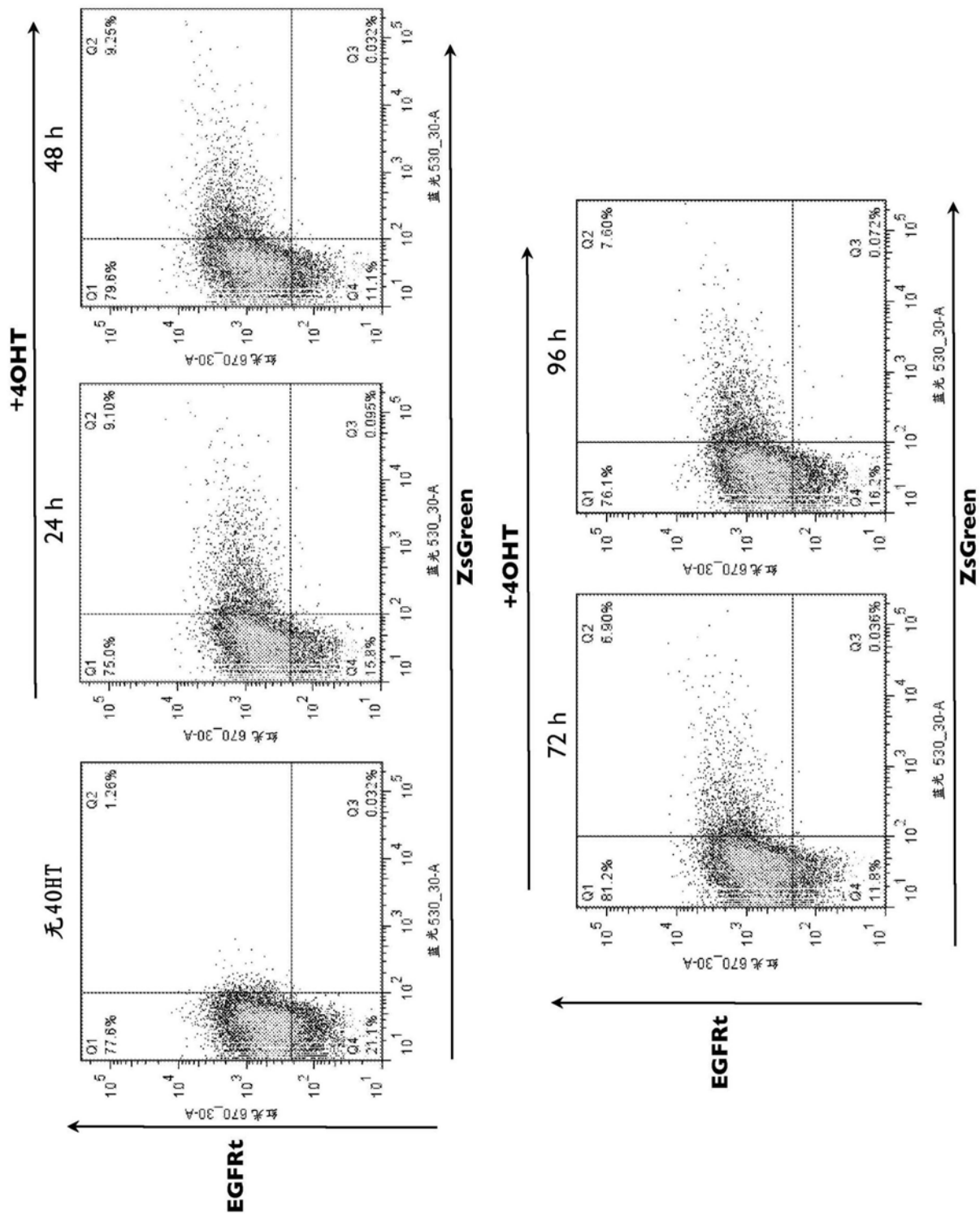


图4A

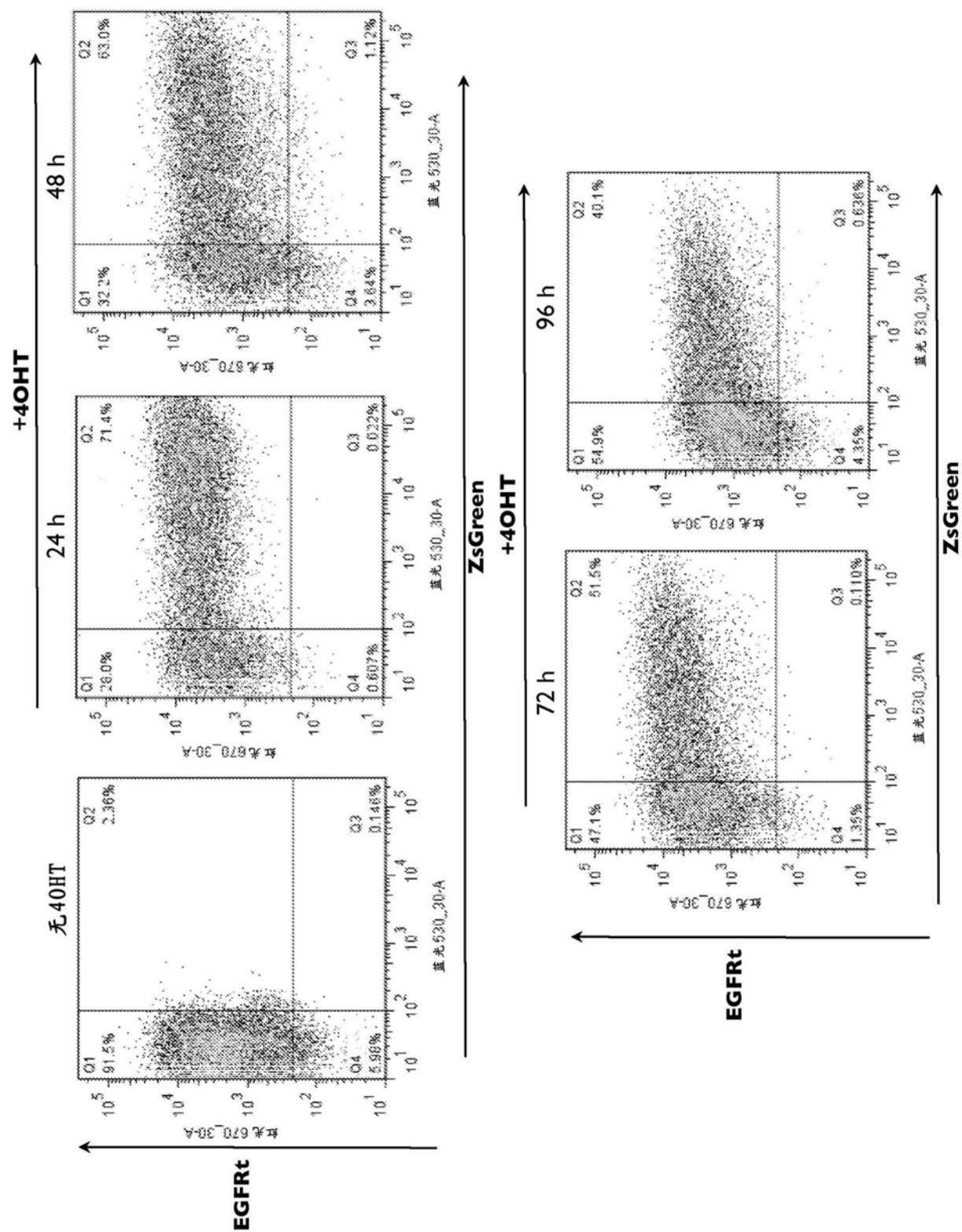


图4B

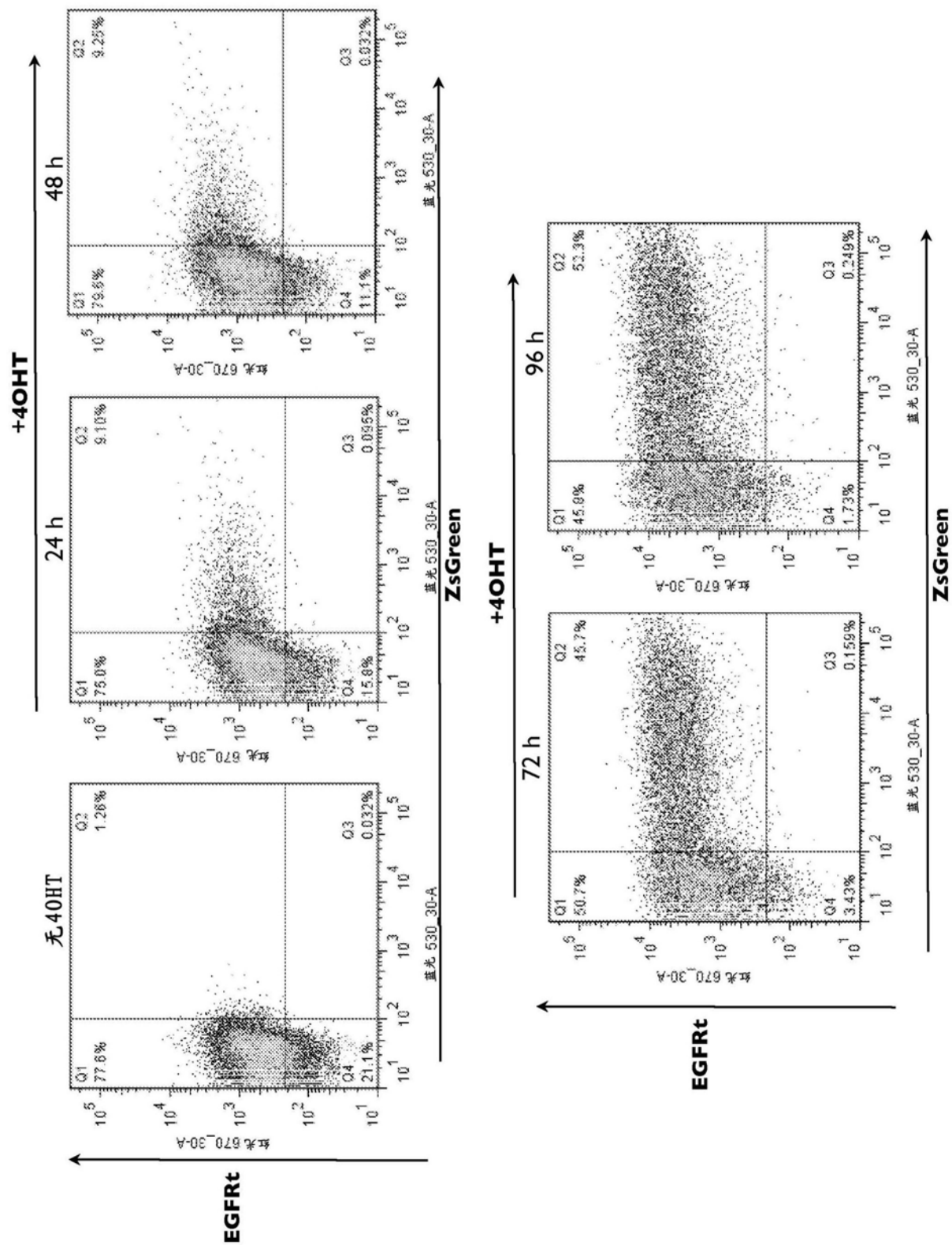


图4C

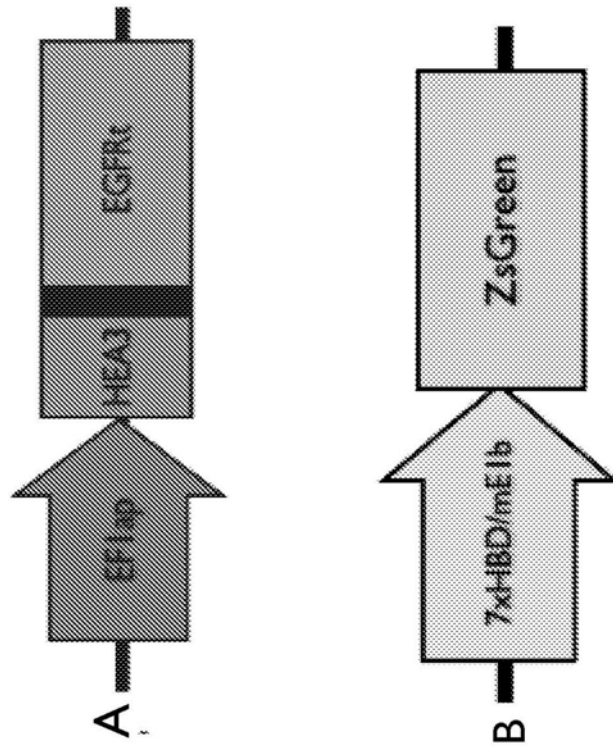


图4D

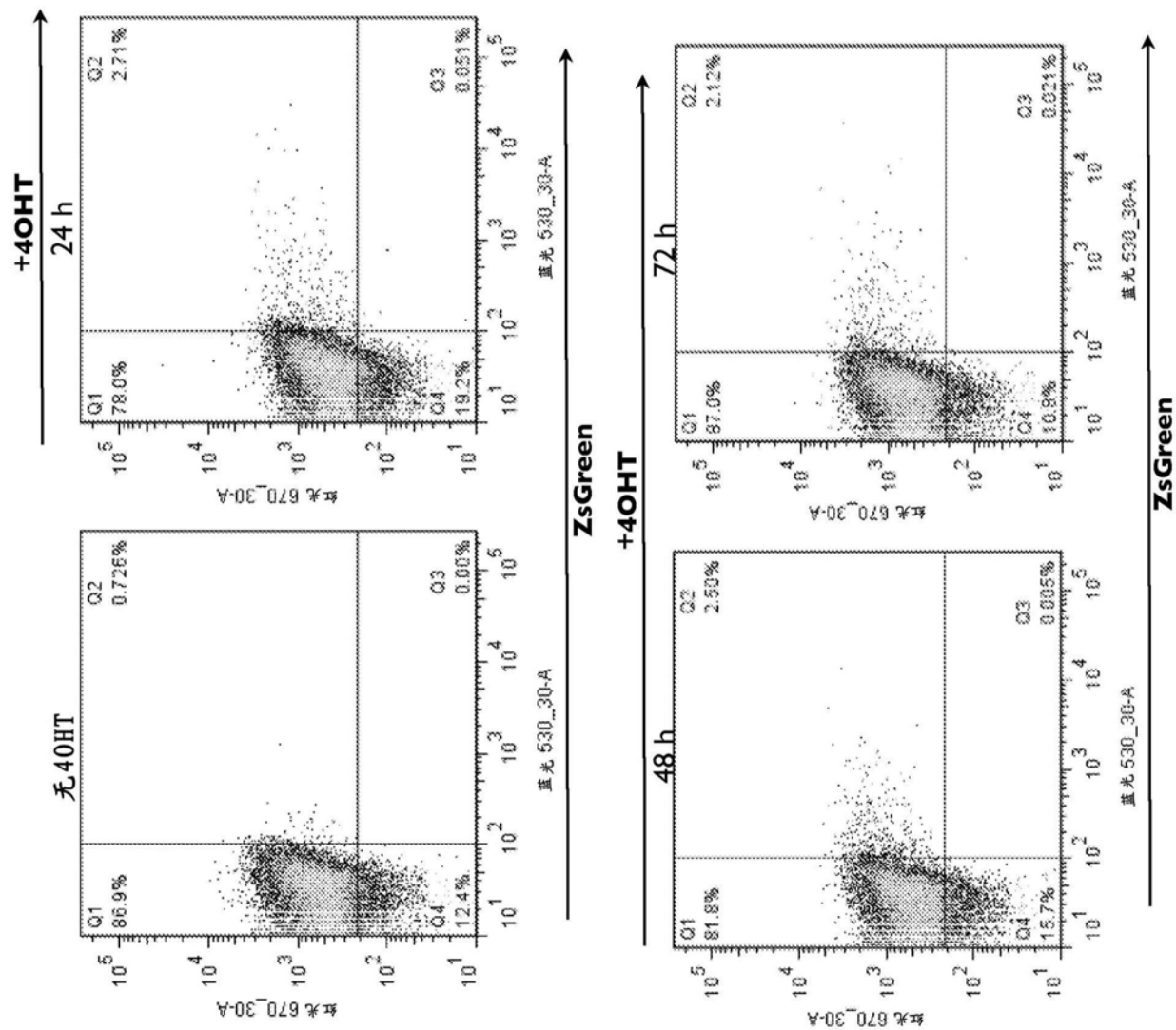


图5A

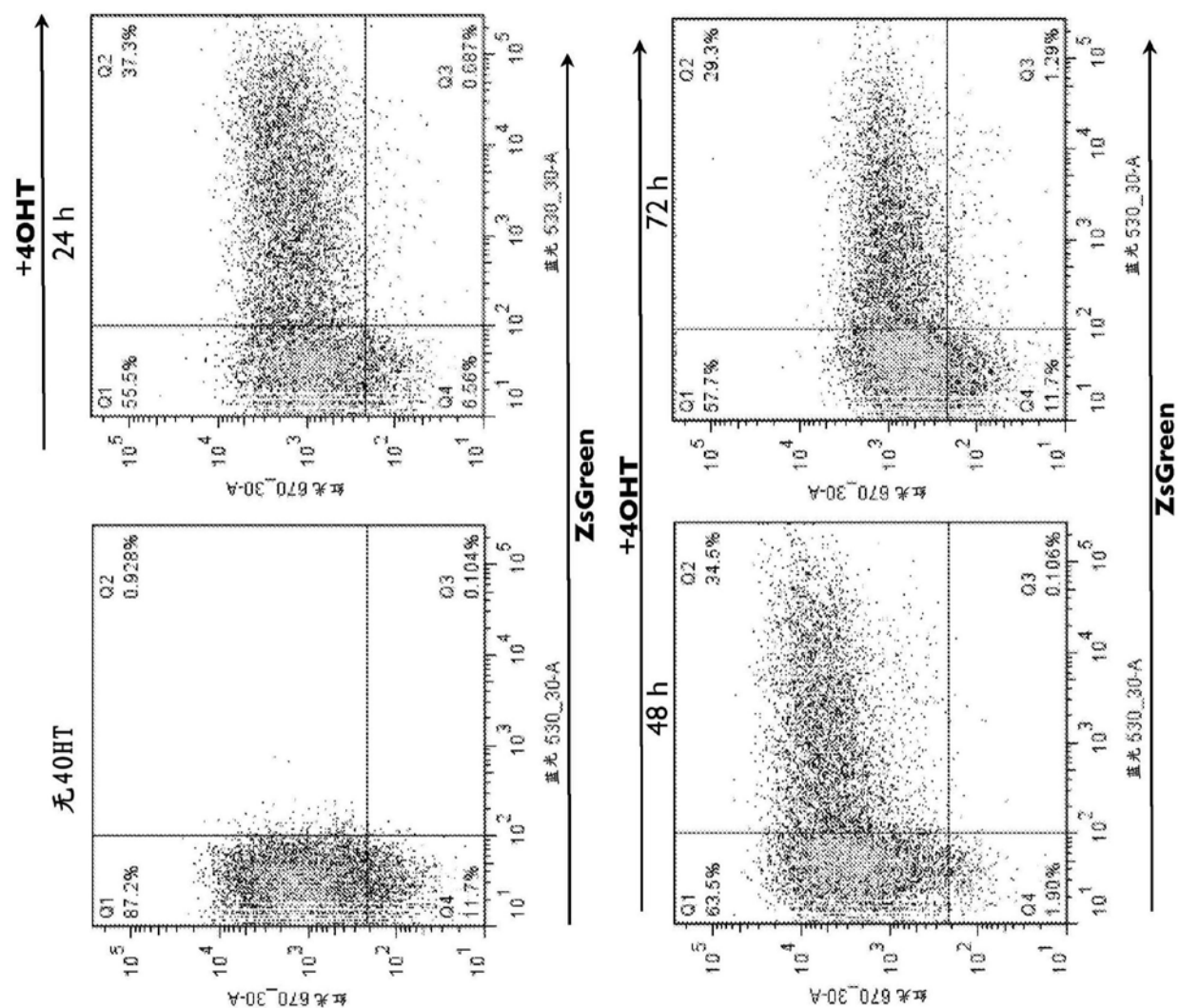


图5B

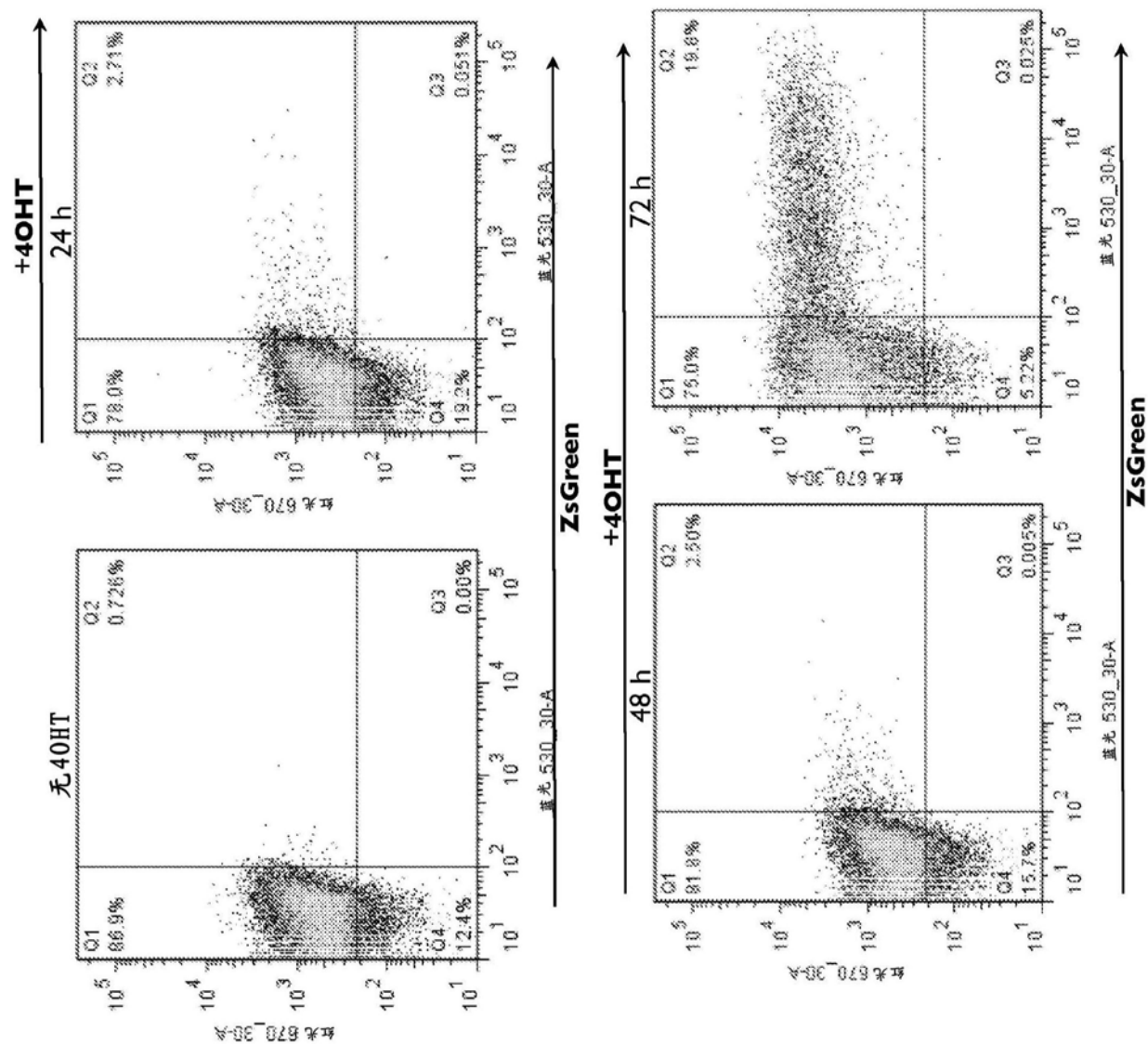


图5C



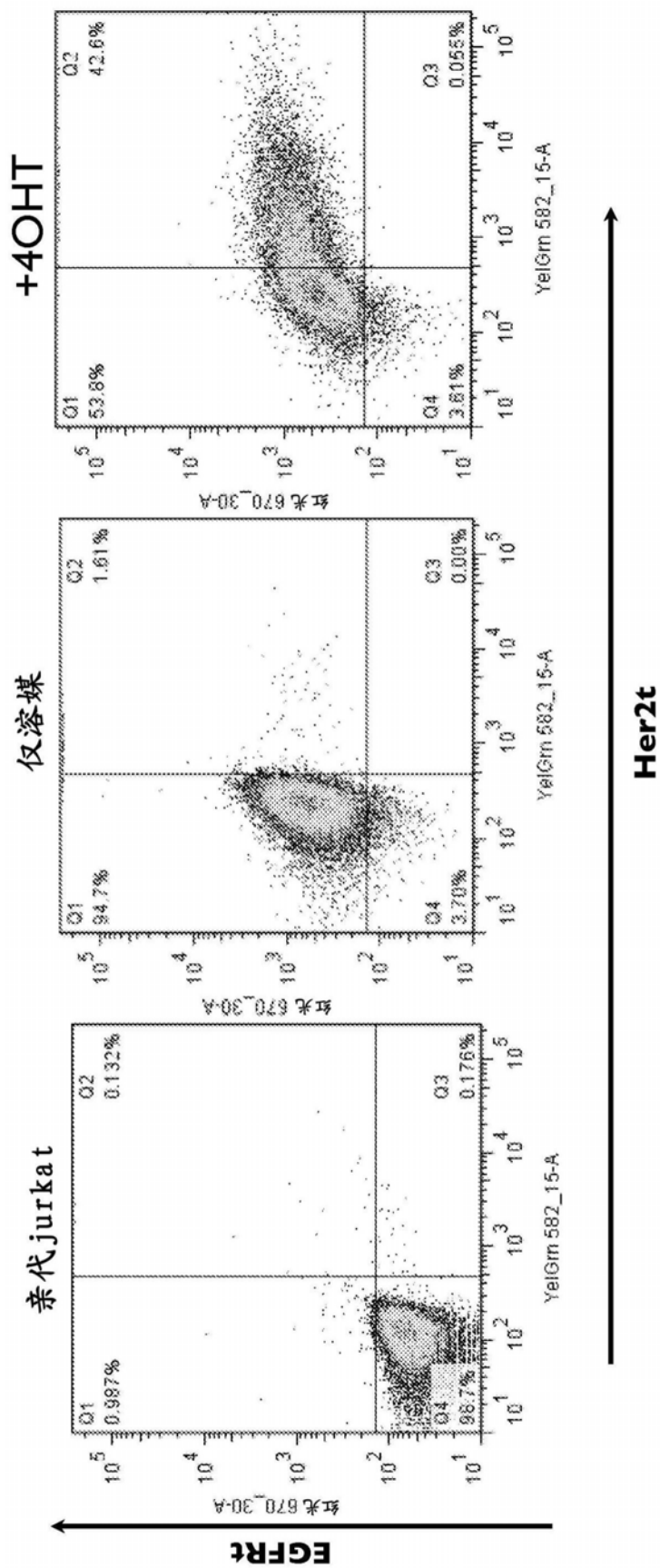


图6A



图6B

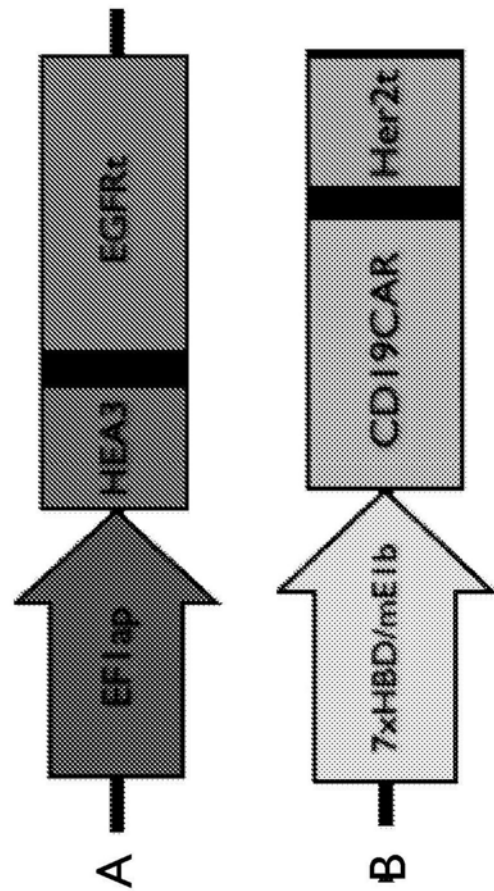


图6C

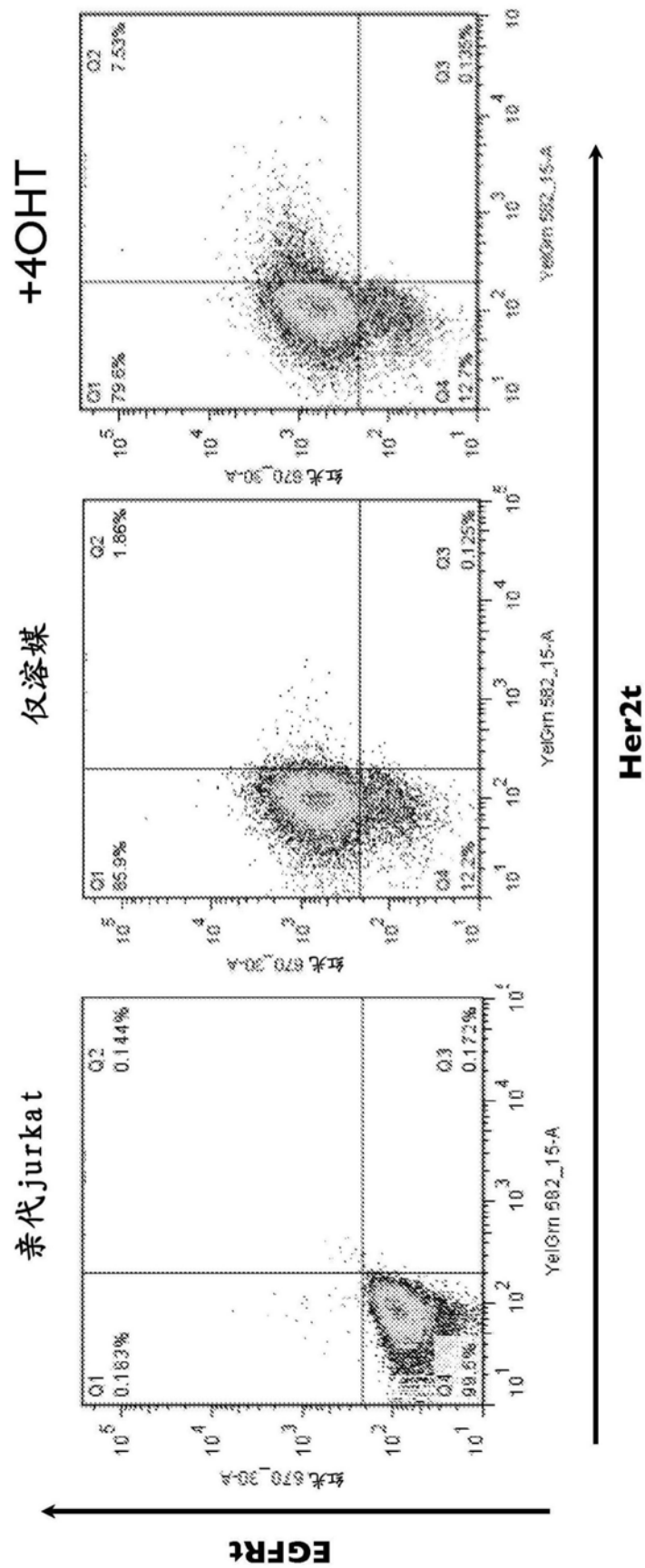


图7A

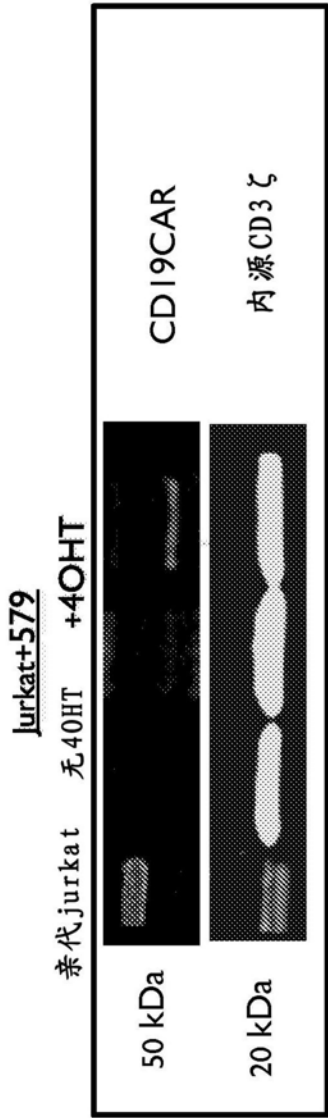


图7B

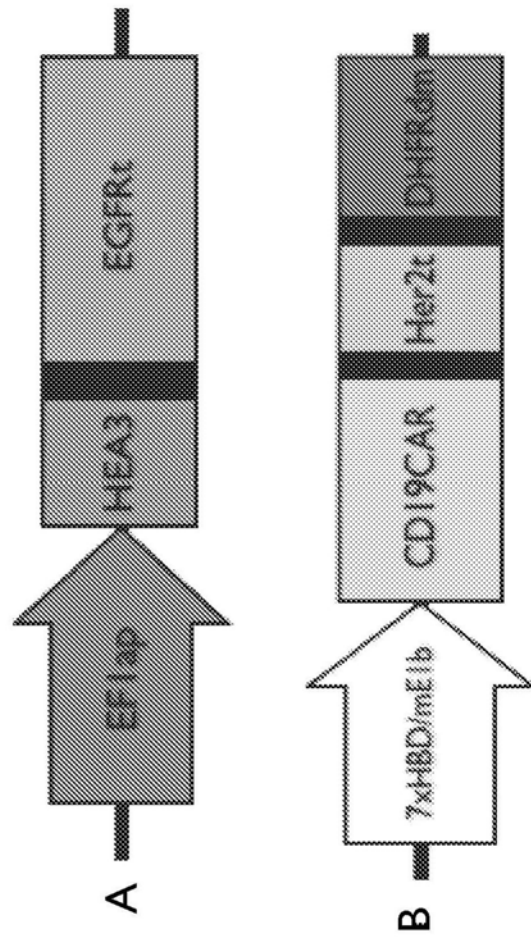


图7C

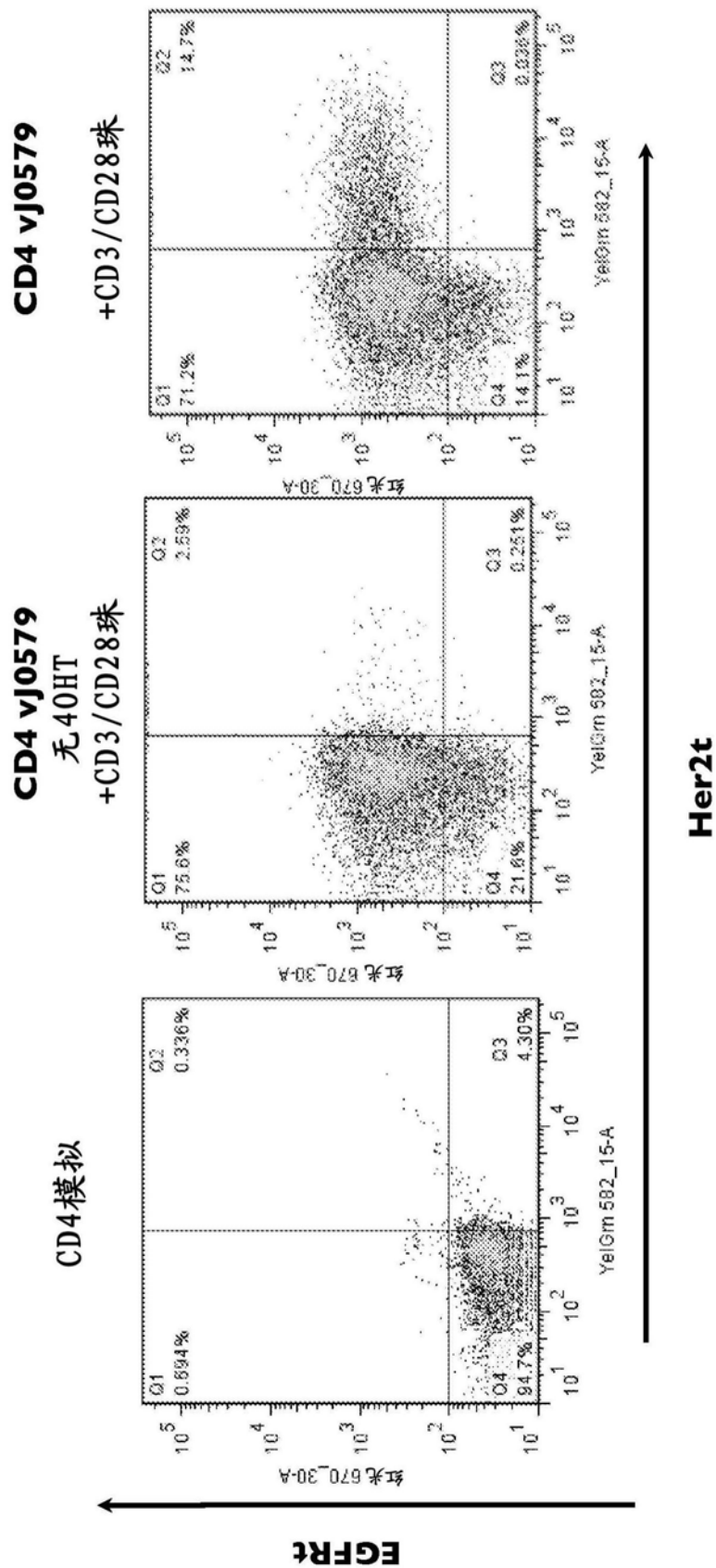


图8A

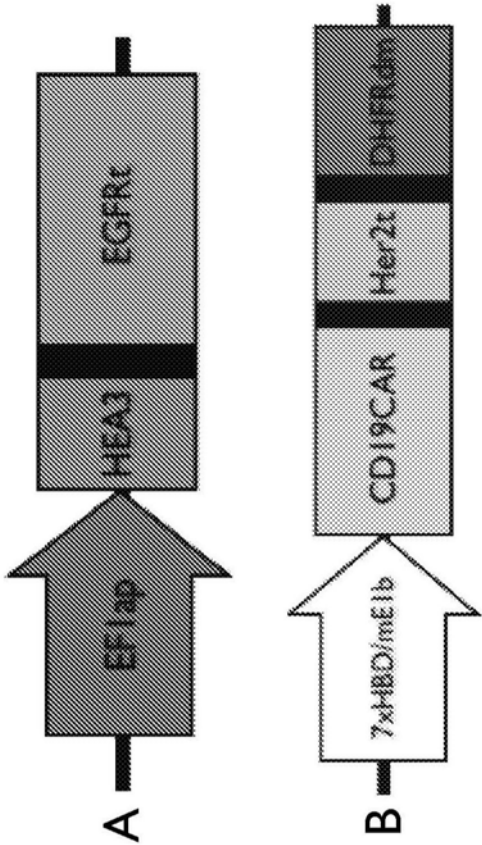


图8B