



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110831961 B

(45) 授权公告日 2024. 01. 02

(21) 申请号 201880025103.X

(22) 申请日 2018.03.02

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110831961 A

(43) 申请公布日 2020.02.21

(30) 优先权数据
62/466,601 2017.03.03 US
62/484,052 2017.04.11 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.10.14

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/020741 2018.03.02

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/161017 EN 2018.09.07

(73) 专利权人 黑曜石疗法公司
地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 V·苏瑞 M·J·布里斯金
B·多林斯克 K·G·埃尔佩克

D·J·李 S·F·海勒
M·L·奥尔斯 D·孙 N·科米德
A·库尔卡尼 V·巴拉克里什南
T·埃塞尔

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.
C07K 14/505 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 105873585 A, 2016.08.17
CN 105408473 A, 2016.03.16
WO 2013172926 A1, 2013.11.21
WO 2014152932 A1, 2014.09.25
Mari Iwamoto et al.. A General
Chemical Method to Regulate Protein
Stability in the Mammalian Central
Nervous System. Chemistry & Biology. 2010,
第17卷981-988.

审查员 徐乐

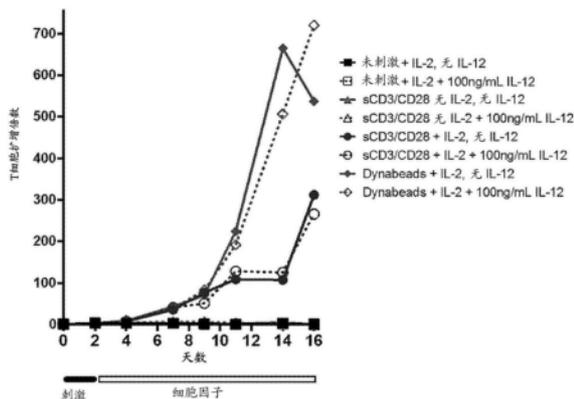
权利要求书3页 说明书214页 附图56页

(54) 发明名称

用于免疫疗法的CD19组合物和方法

(57) 摘要

本发明提供用于癌症免疫疗法的生物回路系统、效应模块和组合物。还提供了用于在受试者中诱导抗癌免疫应答的方法。



1. 一种编码效应模块的多核苷酸,所述效应模块包含可操作地连接至至少一个有效载荷的刺激物应答元件(SRE),其中所述SRE包含去稳定结构域(DD),所述DD包含SEQ ID NO.2中所示的具有氨基酸2至187的人二氢叶酸还原酶,且还包含在SEQ ID NO.2的位置122处的氨基酸的Y122I突变。

2. 如权利要求1所述的多核苷酸,其中所述DD进一步包含:

(i) 在SEQ ID NO.2的位置36处的氨基酸的Q36K突变;

(ii) 在SEQ ID NO.2的位置125处的氨基酸的A125F突变;或(iii) 在SEQ ID NO.2的位置65处的氨基酸的N65F突变和在SEQ ID NO.2的氨基酸位置36处的F或K的取代。

3. 如权利要求1或2所述的多核苷酸,其中所述SRE对至少一种刺激物有应答。

4. 如权利要求3所述的多核苷酸,其中所述刺激物选自由甲氧苄啶(TMP)和甲氨蝶呤(MTX)组成的组。

5. 如权利要求1或2所述的多核苷酸,其中所述至少一个有效载荷是免疫治疗剂,并且其中所述DD以1或更大的稳定化比使所述免疫治疗剂稳定,其中所述稳定化比包括在存在所述刺激物的情况下所述免疫治疗剂的表达、功能或水平与在不存在所述刺激物的情况下所述免疫治疗剂的表达、功能或水平的比率。

6. 如权利要求1或2所述的多核苷酸,其中所述至少一个有效载荷是免疫治疗剂,并且其中所述DD以在0与0.09之间的去稳定化比使所述免疫治疗剂去稳定,其中所述去稳定化比包括在不存在特异于所述SRE的所述刺激物的情况下所述免疫治疗剂的表达、功能或水平与组成型地表达且在不存在特异于所述SRE的所述刺激物情况下所述免疫治疗剂的表达、功能或水平的比率。

7. 如权利要求1或2所述的多核苷酸,其中所述至少一个有效载荷是免疫治疗剂。

8. 如权利要求7所述的多核苷酸,其中所述免疫治疗剂选自嵌合抗原受体(CAR)、细胞因子和细胞因子-细胞因子受体融合多肽。

9. 如权利要求8所述的多核苷酸,其中所述免疫治疗剂是嵌合抗原受体(CAR),其包含(a) 细胞外靶向部分;(b) 跨膜结构域;(c) 细胞内信号传导结构域;和(d) 任选地,一个或多个共刺激结构域。

10. 如权利要求8或9所述的多核苷酸,其中所述CAR是CD19CAR。

11. 如权利要求8所述的多核苷酸,其中所述细胞因子是IL12或IL15。

12. 如权利要求8所述的多核苷酸,其中所述细胞因子-细胞因子受体融合多肽是IL15-IL15Ra融合多肽。

13. 如权利要求1或2所述的多核苷酸,其中所述效应模块还包含信号肽、调控序列、接头、蛋白标签和/或蛋白裂解位点。

14. 如权利要求1或2所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸为DNA分子或RNA分子。

15. 如权利要求14所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸为RNA分子,并且所述RNA分子为信使RNA。

16. 如权利要求14所述的多核苷酸,其是化学修饰的。

17. 如权利要求14所述的多核苷酸,其还包含或编码启动子、接头、信号肽、标签、裂解位点和/或靶向肽。

18. 一种载体,其包含如权利要求1-17中任一项所述的多核苷酸。

19. 如权利要求18所述的载体,其中所述载体为病毒载体或质粒。

20. 如权利要求19所述的载体,其为病毒载体,并且其中所述病毒载体为逆转录病毒载体、慢病毒载体、重组AAV载体、腺病毒载体或溶瘤病毒载体。

21. 如权利要求20所述的载体,其为逆转录病毒载体或慢病毒载体。

22. 一种细胞,其包含如权利要求1-17中任一项所述的多核苷酸,或用如权利要求18-21中任一项所述的载体感染或转染。

23. 如权利要求22所述的细胞,其中所述细胞是用于过继性细胞转移(ACT)的免疫细胞。

24. 如权利要求22所述的细胞,其中所述细胞为CD8+T细胞、CD4+T细胞、辅助T细胞、自然杀伤(NK)细胞、NKT细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、记忆T细胞、调控T(Treg)细胞、细胞因子诱导的杀伤(CIK)细胞、树突状细胞、人胚胎干细胞、间充质干细胞、造血干细胞或其混合物。

25. 如权利要求22所述的细胞,其中所述细胞是经修饰以表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞。

26. 一种药物组合物,其包含:

(i) 如权利要求1-17中任一项所述的多核苷酸;

(ii) 如权利要求18-21中任一项所述的载体;或

(iii) 如权利要求22-25中任一项所述的细胞;和

药学上可接受的赋形剂。

27. 一种产生修饰的细胞的方法,所述方法包括将权利要求1-17中任一项所述的多核苷酸引入细胞中。

28. 如权利要求1-17中任一项所述的多核苷酸、如权利要求18-21中任一项所述的载体、如权利要求22-25中任一项所述的细胞或如权利要求26中所述的药物组合物在制备用于在有需要的受试者中诱导免疫反应或治疗癌症的药物中的用途,其中所述组合物、多核苷酸、载体或细胞与刺激物组合使用,

其中所述刺激物应答元件(SRE)对所述刺激物有应答;其中所述刺激物是与所述SRE结合以在翻译后调控蛋白水平的小分子;并且其中所述有效载荷的表达应答于所述刺激物而被调节,由此诱导免疫应答或治疗癌症。

29. 根据权利要求28所述的用途,其中所述刺激物选自甲氧苄啶(TMP)和甲氨蝶呤(MTX)。

30. 如权利要求1-17中任一项所述的多核苷酸、如权利要求18-21中任一项所述的载体、如权利要求22-25中任一项所述的细胞或如权利要求26中所述的药物组合物在制备用于诱导受试者中的免疫应答的药物中的用途。

31. 如权利要求1-17中任一项所述的多核苷酸、如权利要求18-21中任一项所述的载体、如权利要求22-25中任一项所述的细胞或如权利要求26中所述的药物组合物在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

32. 一种调节如权利要求22-25中任一项所述的细胞中的有效载荷的表达、功能和/或水平的体外方法,所述方法包括向所述细胞施用刺激物,其中所述刺激物应答元件(SRE)对所述刺激物有应答;其中所述刺激物是与所述SRE结合以在翻译后调控蛋白水平的小分子;

并且其中所述有效载荷的表达、功能和/或水平应答于所述刺激物而被调节。

33. 根据权利要求20所述的载体,其中所述病毒载体是 γ 逆转录病毒载体。

用于免疫疗法的CD19组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求提交于2017年3月3日名称为Compositions and Methods for Immunotherapy的美国临时专利申请号62/466,601和提交于2017年4月11日名称为Anti CD19 compositions and methods for immunotherapy的美国临时专利申请号62/484,052的优先权,每个专利的内容以全文引用的方式并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请连同序列表一起以电子格式提交。序列表提供为创建于2018年3月2日名称为2095_1201PCT_SL.txt的文件,所述文件的大小为2,116,001字节。电子格式的序列表中的信息以全文引用的方式并入本文。

技术领域

[0005] 本发明涉及用于免疫疗法的组合物和方法。本发明中所提供的包括在癌症免疫疗法中使用的生物回路系统、效应模块(effector module)、刺激物应答元件(SRE)和免疫治疗剂的多肽、编码所述多肽的多核苷酸、含有所述多肽和/或多核苷酸的载体和细胞。在一个实施方案中,组合物包含调整蛋白稳定性的去稳定结构域(DD)。

背景技术

[0006] 癌症免疫疗法的目的在于通过复原肿瘤反应性免疫细胞(主要是T细胞)的杀肿瘤功能来消灭癌细胞。癌症免疫疗法的策略,包括最近的检查点阻断、过继性细胞转移(ACT)和可以增加抗肿瘤免疫效应细胞的癌症疫苗的开发,已经在若干肿瘤中产生了显著的结果。

[0007] 宿主抗肿瘤免疫和癌症免疫疗法的影响受到三个主要障碍的阻碍:1)由克隆删除(clonal deletion)所致的肿瘤抗原特异性T细胞数少;2)肿瘤微环境中固有免疫细胞的活化不良和致耐受性抗原呈递细胞的积累;以及3)免疫抑制性肿瘤微环境的形成。特别地,由于在免疫抑制性肿瘤微环境中缺乏有效的抗肿瘤应答,所以在实体瘤中免疫治疗方案的治疗功效仍不令人满意。肿瘤细胞常常诱导免疫耐受或抑制,并且获得此类耐受是因为即使真正的外来肿瘤抗原也将变得耐受。此类耐受同样是活跃的并且显性的,因为癌症疫苗以及预活化的免疫效应细胞(例如,T细胞)的过继性转移受到肿瘤微环境(TME)中抑制因子的抑制。

[0008] 此外,施用工程化的T细胞可导致在靶/脱靶毒性以及细胞因子释放综合征(由Tey Clin.Transl.Immunol.,2014,3:e17 10.1038综述)。

[0009] 在不良事件的情况下,需要开发可以打开或关闭转基因免疫治疗剂表达的可调开关。例如,过继性细胞疗法可具有非常长并且无限期的半衰期。由于毒性可以是渐进的,所以需要安全开关来消除输注的细胞。可以以高灵活性调整转基因蛋白水平和表达窗的系统和方法可以增强治疗益处,并减少潜在的副作用。

[0010] 为了开发可针对疾病疗法、特别是癌症免疫疗法调控治疗剂,本发明提供了控制

免疫治疗剂的表达的生物回路系统。所述生物回路系统包含刺激物和至少一个对刺激物有应答的效应模块。效应模块可包括结合刺激物并对刺激物有应答的刺激物应答元件 (SRE) 和可操作地连接至SRE的免疫治疗剂。在一个示例中, SRE是去稳定结构域 (DD), 其在不存在其特异性配体的情况下去稳定并且可通过结合至其特异性配体而稳定。

发明内容

[0011] 本发明提供用于免疫疗法的组合物和方法。所述组合物涉及在细胞中或在受试者中诱导抗癌免疫应答的可调系统和剂。可调系统和剂可以是包含至少一个对至少一种刺激物有应答的效应模块的生物回路系统。生物回路系统可以是但不限于去稳定结构域 (DD) 生物回路系统、二聚生物回路系统、受体生物回路系统和细胞生物回路系统。这些系统进一步教导于共同拥有的提交于2016年4月11日的美国临时专利申请号62/320,864、提交于2017年3月3日的美国临时专利申请号62/466,596以及国际公布W02017/180587 (每个专利的内容以全文引用的方式并入本文)。

[0012] 在一些实施方案中, 用于诱导免疫应答的组合物可包含效应模块。在一些实施方案中, 效应模块可包含可操作地连接至至少一个有效载荷的刺激物应答元件 (SRE)。在一个方面中, 有效载荷可为免疫治疗剂。

[0013] 在一些实施方案中, 免疫治疗剂可选自但不限于嵌合抗原受体 (CAR) 和抗体。

[0014] 在一个方面中, 组合物的SRE可对至少一种刺激物有应答或与至少一种刺激物相互作用。

[0015] 在一些实施方案中, SRE可包含去稳定结构域 (DD)。DD可来源于亲本蛋白或来源于与亲本蛋白相比具有一个、两个、三个或更多个氨基酸突变的突变蛋白。在一些实施方案中, 亲本蛋白可选自但不限于: 人蛋白FKBP, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO.3; 人DHFR (hDHFR), 其包含氨基酸序列SEQ ID NO.2; 大肠杆菌DHFR, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO.1; PDE5, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO.4; PPAR γ , 其包含氨基酸序列SEQ ID NO.5; CA2, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO.6; 或NQ02, 其包含氨基酸序列SEQ ID NO.7。

[0016] 在一个方面中, 亲本蛋白为hDHFR, 并且DD包含突变蛋白。突变蛋白可包含单突变并且可选自但不限于: hDHFR (I17V)、hDHFR (F59S)、hDHFR (N65D)、hDHFR (K81R)、hDHFR (A107V)、hDHFR (Y122I)、hDHFR (N127Y)、hDHFR (M140I)、hDHFR (K185E)、hDHFR (N186D) 和 hDHFR (M140I)、hDHFR (WT的氨基酸2-187; N127Y)、hDHFR (WT的氨基酸2-187; I17V)、hDHFR (WT的氨基酸2-187; Y122I) 和hDHFR (WT的氨基酸2-187; K185E)。在一些实施方案中, 突变蛋白可包含两个突变并且可选自但不限于: hDHFR (C7R、Y163C)、hDHFR (A10V、H88Y)、hDHFR (Q36K、Y122I)、hDHFR (M53T、R138I)、hDHFR (T57A、I72A)、hDHFR (E63G、I176F)、hDHFR (G21T、Y122I)、hDHFR (L74N、Y122I)、hDHFR (V75F、Y122I)、hDHFR (L94A、T147A)、DHFR (V121A、Y22I)、hDHFR (Y122I、A125F)、hDHFR (H131R、E144G)、hDHFR (T137R、F143L)、hDHFR (Y178H、E181G) 和hDHFR (Y183H、K185E)、hDHFR (E162G、I176F)、hDHFR (WT的氨基酸2-187; I17V、Y122I)、hDHFR (WT的氨基酸2-187; Y122I、M140I)、hDHFR (WT的氨基酸2-187; N127Y、Y122I)、hDHFR (WT的氨基酸2-187; E162G、I176F) 和hDHFR (WT的氨基酸2-187; H131R、E144G) 和hDHFR (WT的氨基酸2-187; Y122I、A125F)。在一些实施方案中, 突变体可包含三个突变, 并且突变体可选自: hDHFR (V9A、S93R、P150L)、hDHFR (I8V、K133E、Y163C)、hDHFR (L23S、V121A、

Y157C)、hDHFR(K19E、F89L、E181G)、hDHFR(Q36F、N65F、Y122I)、hDHFR(G54R、M140V、S168C)、hDHFR(V110A、V136M、K177R)、hDHFR(Q36F、Y122I、A125F)、hDHFR(N49D、F59S、D153G)和hDHFR(G21E、I72V、I176T)、hDHFR(WT的氨基酸2-187;Q36F、Y122I、A125F)、hDHFR(WT的氨基酸2-187;Y122I、H131R、E144G)、hDHFR(WT的氨基酸2-187;E31D、F32M、V116I)和hDHFR(WT的氨基酸2-187;Q36F、N65F、Y122I)。在一些实施方案中,突变体可包含四个或更多个突变,并且突变体可选自:hDHFR(V2A、R33G、Q36R、L100P、K185R)、hDHFR(WT的氨基酸2-187;D22S、F32M、R33S、Q36S、N65S)、hDHFR(I17N、L98S、K99R、M112T、E151G、E162G、E172G)、hDHFR(G16S、I17V、F89L、D96G、K123E、M140V、D146G、K156R)、hDHFR(K81R、K99R、L100P、E102G、N108D、K123R、H128R、D142G、F180L、K185E)、hDHFR(R138G、D142G、F143S、K156R、K158E、E162G、V166A、K177E、Y178C、K185E、N186S)、hDHFR(N14S、P24S、F35L、M53T、K56E、R92G、S93G、N127S、H128Y、F135L、F143S、L159P、L160P、E173A、F180L)、hDHFR(F35L、R37G、N65A、L68S、K69E、R71G、L80P、K99G、G117D、L132P、I139V、M140I、D142G、D146G、E173G、D187G)、hDHFR(L28P、N30H、M38V、V44A、L68S、N73G、R78G、A97T、K99R、A107T、K109R、D111N、L134P、F135V、T147A、I152V、K158R、E172G、V182A、E184R)、hDHFR(V2A、I17V、N30D、E31G、Q36R、F59S、K69E、I72T、H88Y、F89L、N108D、K109E、V110A、I115V、Y122D、L132P、F135S、M140V、E144G、T147A、Y157C、V170A、K174R、N186S)、hDHFR(L100P、E102G、Q103R、P104S、E105G、N108D、V113A、W114R、Y122C、M126I、N127R、H128Y、L132P、F135P、I139T、F148S、F149L、I152V、D153A、D169G、V170A、I176A、K177R、V182A、K185R、N186S)和hDHFR(A10T、Q13R、N14S、N20D、P24S、N30S、M38T、T40A、K47R、N49S、K56R、I61T、K64R、K69R、I72A、R78G、E82G、F89L、D96G、N108D、M112V、W114R、Y122D、K123E、I139V、Q141R、D142G、F148L、E151G、E155G、Y157R、Q171R、Y183C、E184G、K185del、D187N)。

[0017] 在一个方面中,SRE的刺激物可为甲氧苄啶或甲氨蝶呤。

[0018] 在一些实施方案中,效应模块的免疫治疗剂为嵌合抗原受体(CAR)。嵌合抗原可包含细胞外靶部分、跨膜结构域、细胞内信号传导结构域和任选地一个或多个共刺激结构域。

[0019] 在一个方面中,CAR可选自但不限于:标准CAR、分裂CAR(split CAR)、关闭开关CAR(off-switch CAR)、打开开关CAR(on-switch CAR)、第一代CAR、第二代CAR、第三代CAR或第四代CAR。

[0020] 在一些实施方案中,CAR的细胞外靶部分可选自但不限于:Ig NAR、Fab片段、Fab'片段、F(ab)'₂片段、F(ab)'₃片段、Fv、单链可变片段(scFv)、双-scFv、(scFv)₂、微抗体(minibody)、双功能抗体(diabody)、三功能抗体(triabody)、四功能抗体(tetrabody)、内抗体(intrabody)、二硫键稳定的Fv蛋白(dsFv)、单抗体(unibody)、纳米抗体和来源于可特异性结合至感兴趣的蛋白、配体、受体、受体片段或肽适配体中任一者的抗体的抗原结合区。

[0021] 在一个方面中,细胞外靶部分可为来源于抗体的scFv。在一个方面中,scFv可特异性结合至CD19抗原。

[0022] 在一个方面中,CAR的scFv可为CD19 scFv。在一些实施方案中,CD19 scFv可包含具有独立地选自由SEQ ID NO:49-80组成的组的氨基酸序列的重链可变区以及具有独立地选自由SEQ ID NO:81-122中任一者组成的组的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中,CD19 scFv可包含选自由SEQ ID NO:123-267和624中任一者组成的组的氨基酸序列。

[0023] 在一些实施方案中, CAR的细胞内信号传导结构域可为来源于T细胞受体CD3 ζ 的信号传导结构域。在一些实施方案中, 细胞内信号传导结构域可选自细胞表面分子, 所述细胞表面分子选自由以下组成的组: FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d。在一个方面中, CAR可包括共刺激结构域。在一些实施方案中, 共刺激结构域可选自自由以下组成的组: 2B4、HVEM、ICOS、LAG3、DAP10、DAP12、CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40 (CD134)、CD30、CD40、ICOS (CD278)、糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体 (GITR)、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C和B7-H3。

[0024] (b) 所述共刺激结构域是存在的并且选自由以下组成的组: 2B4、HVEM、ICOS、LAG3、DAP10、DAP12、CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40 (CD134)、CD30、CD40、ICOS (CD278)、糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体 (GITR)、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C和B7-H3。

[0025] 在一些实施方案中, CAR的细胞内信号传导结构域可为T细胞受体CD3 ζ 信号传导结构域, 其可包含氨基酸序列SEQ ID NO: 339。

[0026] 在一些实施方案中, CAR的T细胞受体CD3 ζ 信号传导结构域, 包含氨基酸序列SEQ ID NO: 626, 可还包含至少一个共刺激结构域。共刺激结构域可包含氨基酸序列SEQ ID NO: 268-374。

[0027] 在一个实施方案中, CAR的跨膜结构域可来源于T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链的跨膜区。在一个方面中, 跨膜结构域可来源于T细胞受体的CD3 ϵ 链。在一个实施方案中, 跨膜结构域可来源于选自以下的分子: CD4、CD5、CD8、CD8 α 、CD9、CD16、CD22、CD33、CD28、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD148、DAP10、EpoRI、GITR、LAG3、ICOS、Her2、OX40 (CD134)、4-1BB (CD137)、CD152、CD154、PD-1或CTLA-4。在另一个实施方案中, 跨膜结构域可来源于选自IgG1、IgD、IgG4和IgG4 Fc区的免疫球蛋白。在一个方面中, 跨膜结构域可包含选自由SEQ ID NO: 375-425和897-907中任一者组成的组的氨基酸序列。

[0028] 在一些实施方案中, 效应模块的CAR可还包含接近跨膜结构域的铰链区。在一个方面中, 铰链区可包含选自由SEQ ID NO: 426-504中任一者组成的组的氨基酸序列。

[0029] 在一些实施方案中, 免疫治疗剂可为对选自肿瘤特异性抗原 (TSA)、肿瘤相关抗原 (TAA) 或抗原表位的抗原有特异性免疫反应性的抗体。

[0030] 在一个方面中, 抗原可为抗原表位。在一些实施方案中, 抗原表位可为CD19。

[0031] 在一些实施方案中, 抗体可包含具有独立地选自由SEQ ID NO: 49-80中任一者组成的组的氨基酸序列的重链可变区以及具有独立地选自由SEQ ID NO: 81-122中任一者组成的组的氨基酸序列的轻链可变区。在一个方面中, 抗体可包含选自由SEQ ID NO: 123-267和624中任一者组成的组的氨基酸序列。

[0032] 在一个方面中, 第一效应模块可包含SEQ ID NO: 635-649、1005-1010、1015-1018和1215-1231中任一者的氨基酸序列。

[0033] 在一些实施方案中, 效应模块的第一SRE可以以1或更大的稳定化比使免疫治疗剂稳定, 其中稳定化比可包括在存在刺激物的情况下免疫治疗剂的表达、功能或水平与不存在刺激物的情况下免疫治疗剂的表达、功能或水平的比率。

[0034] 在一些实施方案中, SRE可以以在0与0.09之间的去稳定化比使免疫治疗剂去稳定, 其中去稳定化比可包括在不存在特异于SRE的刺激物的情况下免疫治疗剂的表达、功能

或水平与组成型地表达且在不存在特异于SRE的刺激物的情况下免疫治疗剂的表达、功能或水平的比率。

[0035] 本发明还提供包含本发明的组合物的多核苷酸。

[0036] 在一个方面中,多核苷酸可为DNA或RNA分子。在一个方面中,多核苷酸可包含时空选择密码子。在一个方面中,本发明的多核苷酸可为DNA分子。在一些实施方案中,多核苷酸可为RNA分子。在一个方面中,RNA分子可为信使分子。在一些实施方案中,RNA分子可为化学修饰的。

[0037] 在一些实施方案中,多核苷酸可还包含至少一个选自但不限于以下额外特征部:启动子、接头、信号肽、标签、裂解位点和靶向肽。

[0038] 本发明还提供包含本文所述的多核苷酸的载体。在一个方面中,载体可为病毒载体。在一些实施方案中,病毒载体可为逆转录病毒载体、慢病毒载体、 γ 逆转录病毒载体、重组AAV载体、腺病毒载体和溶瘤病毒载体。

[0039] 本发明还提供用于过继性细胞转移 (ACT) 的免疫细胞,其可表达本文的组合物,即本文所述的多核苷酸。在一个方面中,免疫细胞可用本文所述的载体感染或转染。用于ACT的免疫细胞可选自但不限于:CD8+ T细胞、CD4+ T细胞、辅助T细胞、自然杀伤(NK)细胞、NKT细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、记忆T细胞、调控T(Treg)细胞、细胞因子诱导的杀伤(CIK)细胞、树突状细胞、人胚胎干细胞、间充质干细胞、造血干细胞或其混合物。

[0040] 在一些实施方案中,免疫细胞可相对于特定个别受试者为自体、同种异基因、同基因或异种的。

[0041] 在一些实施方案中,免疫细胞可进一步表达包含第二效应模块的组合物,所述第二效应模块包含连接至第二免疫治疗剂的第二SRE。在一个方面中,第二免疫治疗剂可选自细胞因子和细胞因子-细胞因子受体融合物。

[0042] 在一个方面中,第二免疫治疗剂可为细胞因子。在一个方面中,细胞因子可为IL12或IL15。

[0043] 在一个方面中,第二免疫治疗剂可为细胞因子-细胞因子受体融合多肽。

[0044] 在一些实施方案中,细胞因子-细胞因子受体融合多肽可选自但不限于IL12-IL12受体融合多肽、IL15-IL15受体融合多肽和IL15-IL15受体sushi结构域融合多肽。

[0045] 本发明提供用于在受试者中减小肿瘤体积或负荷的方法,其包括将受试者与本发明的免疫细胞接触。本文还提供一种用于在受试者中减小抗肿瘤免疫应答的方法,其包括向受试者施用系统的免疫细胞。

[0046] 本发明还提供用于增强免疫细胞的扩增和/或存活的方法,其包括将免疫细胞与本发明的组合物、本发明的多核苷酸和/或本发明的载体接触。

[0047] 本文还提供一种用于在受试者中诱导免疫应答的方法,其包括向受试者施用本发明的组合物、本发明的多核苷酸和/或本发明的免疫细胞。

[0048] 本发明还提供一种鉴别CD19抗原的将不结合FMC63抗体的结构域(FMC63不同的CD19结合结构域)的方法。所述方法可包括:(a) 制备包含CD19抗原的组合物;(b) 将(a)中的组合物与饱和水平的FMC63抗体接触;(c) 将步骤(b)的组合物与潜在的CD19结合因子文库的一个或多个选定成员接触;以及(d) 基于与FMC63的结合相比CD19结合因子文库的选定成

员的差别结合,鉴别CD19抗原上的结合结构域。在一些实施方案中,文库的结合结构域可使用噬菌体展示技术以CD19抗原作为种子序列生成。在一个方面中,结合结构域可选自:Fab片段、Fab'片段、F(ab)'₂片段、F(ab)'₃片段、Fv、单链可变片段(scFv)、双-scFv、(scFv)₂、微抗体、双功能抗体、三功能抗体、四功能抗体、二硫键稳定的Fv蛋白(dsFv)、单抗体、纳米抗体或抗体的抗原结合区和抗体片段。在一个方面中,CD19抗原可选自人CD19抗原的整体或一部分以及恒河猴CD19抗原的整体或一部分。

[0049] 本发明还提供嵌合抗原受体,其可包含根据本文所述的方法获得的FMC63不同的CD19结合结构域。另外,本文提供一种可操作地连接至嵌合抗原受体的刺激物应答元件(SRE),所述嵌合抗原受体包括FMC63不同的CD19结合结构域。

[0050] 在一些实施方案中,效应模块包含刺激物应答元件(SRE)和至少一个包含感兴趣的蛋白(POI)的有效载荷。

[0051] 在一些实施方案中,SRE可为去稳定结构域(DD)。在一些示例中,DD为来源于诸如以下蛋白的突变结构域:FKBP(FK506结合蛋白)、大肠杆菌DHFR(二氢叶酸还原酶)(ecDHFR)、人DHFR(hDHFR)或任何感兴趣的蛋白。在此背景下,生物回路系统为DD生物回路系统。

[0052] 有效载荷可为用于癌症免疫疗法的任何免疫治疗剂,诸如嵌合抗原受体(CAR)(诸如靶向肿瘤细胞的任何分子的CD19 CAR)、抗体、抗原结合结构域或抗原结合结构域的组合、细胞因子(诸如IL12、IL15或IL15/IL15Ra融合物)或可诱导免疫应答的任何剂。SRE和有效载荷可以通过一个或多个接头可操作地连接,并且组分的位置可在效应模块内变化。

[0053] 在一些实施方案中,效应模块可还包含一个或多个额外特征部,诸如接头序列(具有具体的序列和长度)、裂解位点、调控元件(其调控感兴趣的蛋白诸如微RNA靶向位点的表达)、将效应模块引导至具体细胞或亚细胞定位的信号序列、穿透序列或用于跟踪效应模块的标签和生物标志物。

[0054] 在一些实施方案中,DD可在存在刺激物的情况下以至少1的稳定化比使免疫治疗剂稳定。根据本发明,DD可在不存在配体的情况下以在0与0.99之间的去稳定化比使免疫治疗剂去稳定。

[0055] 本发明提供分离的生物回路多肽、效应模块、刺激物应答元件(SRE)和有效载荷,以及编码前述任一者的多核苷酸;包含本发明的多核苷酸的载体;以及表达本发明的多肽、多核苷酸和载体的细胞。所述多肽、多核苷酸、病毒载体和细胞可用于在受试者中诱导抗肿瘤免疫应答。

[0056] 在一些实施方案中,本发明的载体为病毒载体。病毒载体可包括但不限于逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体或慢病毒载体。

[0057] 在一些实施方案中,本发明的载体可为非病毒载体,诸如纳米粒子和脂质体。

[0058] 本发明还提供被工程化成包括一种或多种本发明的多肽、多核苷酸或载体的免疫细胞。细胞可为免疫效应细胞,包括T细胞诸如细胞毒性T细胞、辅助T细胞、记忆T细胞、调控T细胞、自然杀伤(NK)细胞、NK T细胞、细胞因子诱导的杀伤(CIK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)和肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。工程化的细胞可用于过继性细胞转移以便治疗疾病(例如,癌症)。

[0059] 本发明还提供用于使用本发明的组合物在受试者中诱导免疫应答的方法。还提供

用于使用本发明的组合物在受试者中减小肿瘤负荷的方法。

[0060] 本文还提供用于鉴别FMC63不同的结合结构域并且使用其中FMC63结合表位被掩蔽或不存在的CD19抗原的方法。在一些实施方案中,FMC63结合结构域可包括在本发明的有效载荷和效应模块中。

附图说明

[0061] 图1示出本发明的生物回路系统的概况图。生物回路包含刺激物和至少一个对刺激物有应答的效应模块,其中对刺激物的应答产生信号或结果。效应模块包含至少一个刺激物应答元件(SRE)和一个有效载荷。

[0062] 图2示出携带一个有效载荷的代表性效应模块。信号序列(SS)、SRE和有效载荷可以在没有(A至F)或有(G至Z和AA至DD)裂解位点的情况下以各种布置进行定位或安置。任选的接头可插入在效应模块的每个组分之间。

[0063] 图3示出在没有裂解位点的情况下携带两个有效载荷的代表性效应模块。两个有效载荷可彼此直接连接或分开。

[0064] 图4示出在有裂解位点的情况下携带两个有效载荷的代表性效应模块。在一个实施方案中,SS安置于构建体的N末端,而其他组分SRE、两个有效载荷和裂解位点可定位于不同位置(A至L)。在另一个实施方案中,裂解位点安置于构建体的N末端(M至X)。任选的接头可插入在效应模块的每个组分之间。

[0065] 图5示出携带两个有效载荷的本发明的效应模块,其中SRE安置于构建体的N末端(A至L),而SS、两个有效载荷和裂解位点可为任何配置。任选的接头可插入在效应模块的每个组分之间。

[0066] 图6示出携带两个有效载荷的本发明的效应模块,其中两个有效载荷(A至F)或两个有效载荷之一(G至X)安置于构建体的N末端(A至L),而SS、SRE和裂解位点可为任何配置。任选的接头可插入在效应模块的每个组分之间。

[0067] 图7描绘在生物回路系统内刺激物和效应模块的代表性配置。跨膜效应模块由游离刺激物(图7A)或结合至SRE的膜结合刺激物(图7B)活化。对刺激物的应答导致细胞内信号/有效载荷的裂解,从而活化下游效应物/有效载荷。

[0068] 图8描绘双刺激物-双呈递物生物回路系统,其中两个不同呈递物(例如,不同细胞)的两个结合的刺激物(A和B)同时结合至单个接收者(例如,另一个单细胞)中的两个不同效应模块并且产生至下游有效载荷的双信号。

[0069] 图9描绘双刺激物-单呈递物生物回路系统,其中同一呈递物(例如,单细胞)的两个结合刺激物(A和B)同时结合至另一个单细胞中的两个不同效应模块并且产生双信号。

[0070] 图10描绘单刺激物桥联接接收者生物回路系统。在此配置中,结合的刺激物(A)结合至桥细胞中的效应模块并产生信号以活化有效载荷,所述有效载荷为最终接收者(例如,另一个细胞)中另一个效应模块的刺激物(B)。

[0071] 图11描绘单刺激物-单接收者生物回路系统,其中单接收者含有两个效应模块,它们被单刺激物顺序地活化。

[0072] 图12描绘需要双活化的生物回路系统。在此实施方案中,一个刺激物必须首先结合跨膜效应模块以准备使接收细胞被另一个刺激物活化。接收者仅当它感知到两个刺激物

(B)时活化。

[0073] 图13描绘嵌合抗原受体 (CAR) 系统的标准效应模块,其包含作为SRE的抗原结合结构域和作为有效载荷的一个或多个信号传导结构域。

[0074] 图14描绘可调控CAR系统的结构设计,其中跨膜效应模块包含感测抗原的抗原结合结构域和第一开关结构域,并且细胞内模块包含第二开关结构域和信号传导结构域。刺激物(例如,二聚小分子)可以将第一开关结构域和第二开关域二聚并且组装活化的CAR系统。

[0075] 图15示出CAR系统的示意图,其具有一个(A)或两个(B和C)并入效应模块中的SRE。

[0076] 图16描绘通过双刺激物(例如,抗原和小分子)控制T细胞活化的分裂CAR设计。图16A示出正常T细胞活化,其需要TCR和共刺激受体的双重活化。例行CAR设计(图16B)在单分子中将抗原识别结构域与TCR信号传导和共刺激基序组合。分裂CAR系统将例行CAR组分分成两个单独的效应模块,它们当存在异二聚小分子(刺激物)时可被组装。

[0077] 图17描绘CAR工程化T细胞活化的正调控和负调控。不存在或存在第二刺激物可以负面(A)或正面(B)地控制T细胞活化。

[0078] 图18示出CAR工程化T细胞的门控活化的示意图。如果正常细胞没有刺激物(例如,抗原)(图18A)或可结合至跨膜效应模块的抗原(图18B),或者仅具有活化跨膜效应模块并引发效应T细胞表达第二效应子的抗原(图18C),那么接收者T细胞保持非活性。当结合跨膜效应模块和引发的效应子的两个刺激物(例如,两种抗原)均存在于呈递物细胞(例如,癌细胞)时,T细胞是活化的(图18D)。

[0079] 图19A为来源于表达DD-IL12的细胞的培养基的各种稀释液中IL12水平的柱状图。图19B为描绘DD-IL12的Shield-1剂量应答诱导的柱状图。图19C描绘植入有SKOV3细胞的小鼠中的血浆IL12水平。图19D描绘小鼠中应答于不同Shield-1给药方案的血浆IL12水平。

[0080] 图20A为293个细胞中IL15蛋白水平的蛋白质印迹。图20B和图20C为描绘IL15和IL15Ra的表面表达的直方图。图20D为HCT116细胞中IL15和hDHFR的蛋白质印迹。

[0081] 图21A和图21B为描绘DD-CD19 CAR构建体的CD3 ζ 和肌动蛋白的蛋白水平的蛋白质印迹。图21C示出使用4-1BB抗体的蛋白质印迹中CD19嵌合抗原受体的表达。图21D为描绘CD19 CAR的表面表达的柱状图。

[0082] 图22表示IFN γ 阳性T细胞的频率。

[0083] 图23A描绘T细胞中IFN γ 的产生。图23B描绘在IL15/IL15Ra处理的情况下的T细胞扩增。图23C为描绘体内细胞转移之后人细胞百分比的点图。图23D为描绘CD4⁺/CD8⁺ T细胞的散点图。

[0084] 图24A描绘表达CD19 CAR的T细胞亚群。图28B描绘由CD19 CAR表达T细胞引起的细胞死亡。

[0085] 图25A为描绘在24小时TMP处理的情况下的IL15Ra阳性细胞的柱状图。图25B为描绘在48小时TMP处理的情况下的IL15Ra阳性细胞的柱状图。图25C为描绘应答于不同浓度TMP的IL15Ra阳性细胞的柱状图。

[0086] 图26为HCT116细胞中IL15Ra蛋白水平的蛋白质印迹。

[0087] 图27A表示人T细胞血液相对于小鼠T细胞的百分比。图27B表示血液中的T细胞数。图27C表示血液中CD4与CD8细胞的比率。图27D表示血液中IL15Ra阳性CD4和CD8 T细胞的百

分比。

[0088] 图28A描绘T细胞应答于细胞因子处理的扩增。图28B、图28C和图28D描绘在IL12处理的情况下的IFN γ 阳性细胞的频率。

[0089] 图29为表示启动子对转基因表达的影响的柱状图。

[0090] 图30A显示亲本K562细胞和K562-CD19细胞中的CD19表达。图30B示出在存在或不存在配体的情况下与表达DD调控CAR构建体的T细胞共培养的K562细胞的增殖。图30C示出在存在配体的情况下被表达DD调控CAR构建体的T细胞杀伤的靶细胞的面积。

[0091] 图31A示出IFN γ 浓度。图31B示出IL2浓度。

[0092] 图32A提供所测试的四组中每组的最终IL12浓度。图32B示出在肾脏中可检测到IL12,并且图32C示出在肿瘤中可检测到IL12。

[0093] 图33A示出在24小时内IL12的调控。图33B示出血浆中的调控,并且图33C示出肾脏中flexi-IL12的检测。

[0094] 图34A示出刺激增加了IL12的表达。图34B和图34C示出配体增加了IL12的产生。

[0095] 图35A示出原代人T细胞的IL12分泌的浓度依赖性诱导。图35B示出原代人T细胞的IL12分泌的时程诱导。

[0096] 图36A示出体内Aquashield诱导DD-IL12调控的剂量应答。图36B示出移植有IL12转导T细胞的动物中IL12的血浆水平仍然很高。

[0097] 图37A和图37B示出在7天体内IL12的表达。图37C和图37D示出在11天体内IL12的表达。图37E示出在CD8⁺ T细胞中7天之后颗粒酶B (GrB) 的几何MFI (GeoMFI)。图37F示出在CD8⁺ T细胞中第7天穿孔素的GeoMFI。

[0098] 图38A示出用PGK和EF1a启动子以及FKBP结构域的IL12的调控。图38B示出IL12的相对表达。

[0099] 图39描绘在TMP处理之后CD4⁺ T细胞上IL15Ra表面表达的动力学。

[0100] 图40表示在异种移植测定中用TMP处理17天的小鼠的HCT116肿瘤中IL15-IL15Ra肿瘤的蛋白质印迹。

[0101] 图41为HEK293细胞中IL15蛋白水平的MSD测定结果的图。

[0102] 图42A提供示出在TMP的剂量应答研究之后膜结合IL15表达的FACS图。图42B为两个示出体外TMP的剂量和暴露时间影响膜结合IL15表达。

[0103] 图43A至图43C示出使用IL15 (图43A)、IL15Ra (图43B) 或IL15/IL15Ra双++染色 (图43C) 的膜结合IL15的调控。图43D示出IL15表达的FACS图。图43E为血液中IL15的调控的图,并且图43F为血浆TMP水平的图。

[0104] 图44表示在PO或IP给药TMP的情况下膜结合IL15的调控。

具体实施方式

[0105] 本发明的一个或多个实施方案的细节在下文的随附描述中进行阐述。虽然在实践或测试本发明时可使用与本文中所述类似或等同的任何材料和方法,但优选的材料和方法是目前所述的。本发明的其他特征、目标和优势将根据描述显而易见。除非上下文另外明确规定,否则在描述中单数形式也包括复数。除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语均具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解相同的含义。在冲突的情况下,

以本发明的描述为准。

[0106] I. 引言

[0107] 癌症免疫疗法的目的在于诱导或恢复免疫系统对癌症的反应性。免疫疗法研究中的重大进展已导致了各种策略的发展,这些策略可大致分为主动免疫疗法和被动免疫疗法。一般来讲,这些策略可用于直接杀伤癌细胞或抵抗免疫抑制性肿瘤微环境。主动免疫疗法的目的在于诱导内源性、持久的肿瘤-抗原特异性免疫应答。应答可以通过免疫应答调节因子诸如细胞因子的非特异性刺激进一步增强。相比之下,被动免疫疗法包括向宿主施用免疫效应分子诸如肿瘤-抗原特异性细胞毒性T细胞或抗体的方法。这种方法是短暂的并且需要多次应用。

[0108] 尽管取得了重大进展,但目前的免疫疗法策略的功效受到相关毒性的限制。这些常常涉及与免疫疗法相关的窄治疗窗,其部分地源自于将治疗剂量推至潜在致命毒性的边界以得到在临床上有意义的治疗效果的需要。另外,剂量由于过继性转移的免疫细胞在患者体内继续增殖而在体内扩大,这常常是不可预测的。

[0109] 免疫疗法中涉及的主要风险是在靶但肿瘤外 (on-target but off tumor) 副作用,其由应答于肿瘤相关抗原 (TAA) 的正常组织表达的T细胞活化引起。利用表达针对具体TAA的T细胞受体的T细胞进行的临床试验报告了应答于免疫疗法的皮疹、结肠炎和听力损失。

[0110] 免疫疗法也可产生当肿瘤细胞应答于免疫疗法被杀伤时所产生的在靶肿瘤上毒性。不良效果包括肿瘤溶解综合征、细胞因子释放综合征和相关的巨噬细胞活化综合征。重要的是,这些不良效果可在肿瘤的破坏期间发生,并且因此即使是成功的肿瘤上免疫疗法也可导致毒性。因此,可调控地控制免疫疗法的方法是高度期望的,因为它们有可能降低毒性和最大化功效。

[0111] 本发明提供用于癌症免疫疗法的系统、组合物、免疫治疗剂和方法。这些组合物在免疫疗法中提供基因表达和功能的可调的调控。本发明还提供生物回路系统、效应模块、刺激物应答元件 (SRE) 和有效载荷,以及编码前述中任一者的多核苷酸。在一个方面中,本发明的系统、组合物、免疫治疗剂和其他组分可通过分开添加的刺激物控制,所述刺激物提供显著的调控癌症免疫疗法的灵活性。另外,本发明的系统、组合物和方法还可与治疗剂诸如化学治疗剂、小分子、基因疗法和抗体组合。

[0112] 本发明的系统和组合物的可调实质有可能改进免疫疗法的功效和持续时间。使用本发明的组合物可逆地沉默过继性转移的细胞的生物活性允许最大化细胞疗法的潜力而无不可挽回地杀伤和终止疗法。

[0113] 本发明提供用于在向患者施用之后对免疫疗法进行微调的方法。这继而改进免疫疗法的安全性和功效并增加可能受益于免疫疗法的受试者群体。

[0114] II. 本发明的组合物

[0115] 根据本发明,提供了生物回路系统,其在它们的核心处包含至少一个效应模块系统。此类效应模块系统包含至少一个效应模块,其与一个或多个刺激物应答元件 (SRE) 相关或与之成为一体。本发明的生物回路系统的总体架构示出于图1中。一般来讲,刺激物应答元件 (SRE) 可以可操作地连接至有效载荷构建体以形成效应模块,所述有效载荷构建体可为任何感兴趣的蛋白 (POI) (例如,免疫治疗剂)。当被特定刺激物 (例如,小分子) 活化时,

SRE可产生信号或结果,以通过保持稳定信号或去稳定信号或者任何其他类型的调控来上调或下调连接的有效载荷的转录和/或蛋白水平。生物回路系统的详细描述可见于提交于2016年4月11日的美国临时专利申请号62/320,864或提交于2017年3月3日的美国临时申请号62/466,596以及国际公布W02017/180587(每个专利的内容以全文引用的方式并入本文)。根据本发明,提供调整用于免疫疗法的任何剂的表达水平和活性的生物回路系统、效应模块、SRE和组分。

[0116] 如本文所用,“生物回路”或“生物回路系统”定义为在生物系统内或可用于生物系统的回路,其包含刺激物和至少一个对刺激物有应答的效应模块,其中对刺激物的应答产生至少一个在生物系统内、在生物系统之间、作为生物系统的指示物或在生物系统上的信号或结果。生物系统一般理解为任何细胞、组织、器官、器官系统或生物体,不管是动物、植物、真菌、细胞还是病毒。还应理解,生物回路可以是人造回路,其采用本发明所教导的刺激物或效应分子并且用诸如诊断、报告系统、装置、测定或试剂盒影响无细胞环境中的信号或结果。人造回路可以与一个或多个电子、磁性或放射性组分或部分相结合。

[0117] 根据本发明,生物回路系统可为去稳定结构域(DD)生物回路系统、二聚生物回路系统、受体生物回路系统和细胞生物回路系统。这些系统中的任一者均可充当到这些生物回路系统中任何其他系统的信号。

[0118] 用于免疫疗法的效应模块和SRE

[0119] 根据本发明,提供调整用于免疫疗法的任何剂的表达水平和活性的生物回路系统、效应模块、SRE和组分。作为非限制性示例,免疫治疗剂可为抗体及其片段和变体、癌症特异性T细胞受体(TCR)及其变体、抗肿瘤特异性嵌合抗原受体(CAR)、嵌合开关受体、共抑制受体或配体的抑制剂、共刺激受体和配体的激动剂、趋化因子、细胞因子受体、趋化因子受体、可溶性生长因子、代谢因子、自杀基因、归巢受体或者可在细胞和受试者中诱导免疫应答的任何剂。

[0120] 如所说明,本发明的生物回路包括至少一个效应模块作为效应模块系统的组分。如本文所用,“效应模块”为包含至少一个或多个刺激物应答元件的单组分或多组分构建体或复合物(即,感兴趣的蛋白(POI))。如本文所用,“刺激物应答元件(SRE)”为效应模块的与效应模块的一个或多个有效载荷接合、附接、连接或结合并且在一些情况下导致效应模块对一种或多种刺激物的应答实质的组分。如本文所用,SRE对刺激物的“应答”实质的特征可在于共价或非共价相互作用、直接或间接结合或者与刺激物的结构或化学反应。此外,任何SRE对刺激物的应答可能是程度或种类的问题。应答可以是部分应答。应答可以是可逆应答。应答可最终得到调控的信号或输出。此类输出信号可具有与刺激物有关的实质,例如产生在1%与100%之间的调节效果或诸如2倍、3倍、4倍、5倍、10倍或更多的成倍增加或减少。

[0121] 在一些实施方案中,本发明提供用于调节蛋白表达、功能或水平的方法。在一些方面,调节蛋白表达、功能或水平是指调节表达、功能或水平至少约20%,诸如至少约30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%和100%或者至少20-30%、20-40%、20-50%、20-60%、20-70%、20-80%、20-90%、20-95%、20-100%、30-40%、30-50%、30-60%、30-70%、30-80%、30-90%、30-95%、30-100%、40-50%、40-60%、40-70%、40-80%、40-90%、40-95%、40-100%、50-60%、50-70%、50-80%、50-90%、50-95%、50-100%、60-70%、60-80%、60-90%、60-95%、60-100%、70-80%、70-90%、70-95%、70-

100%、80-90%、80-95%、80-100%、90-95%、90-100%或95-100%。

[0122] 在一些实施方案中,本发明提供用于通过测量稳定化比和去稳定化比来调节蛋白表达、功能或水平的方法。如本文所用,稳定化比可定义为感兴趣的蛋白应答于刺激物的表达、功能或水平与在不存在特异于SRE的刺激物的情况下感兴趣的蛋白的表达、功能或水平的比率。在一些方面,稳定化比为至少1,诸如至少1-10、1-20、1-30、1-40、1-50、1-60、1-70、1-80、1-90、1-100、20-30、20-40、20-50、20-60、20-70、20-80、20-90、20-95、20-100、30-40、30-50、30-60、30-70、30-80、30-90、30-95、30-100、40-50、40-60、40-70、40-80、40-90、40-95、40-100、50-60、50-70、50-80、50-90、50-95、50-100、60-70、60-80、60-90、60-95、60-100、70-80、70-90、70-95、70-100、80-90、80-95、80-100、90-95、90-100或95-100。如本文所用,去稳定化比可定义为在不存在特异于效应模块的刺激物的情况下感兴趣的蛋白的表达、功能或水平与组成型地表达且在不存在特异于SRE的刺激物的情况下感兴趣的蛋白的表达、功能或水平的比率。如本文所用,“组成型”是指不连接至SRE并且因此在存在和不存在刺激物的情况下均表达的感兴趣的蛋白的表达、功能或水平。在一些方面,去稳定化比为至少0,诸如至少0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9或者至少0-0.1、0-0.2、0-0.3、0-0.4、0-0.5、0-0.6、0-0.7、0-0.8、0-0.9、0.1-0.2、0.1-0.3、0.1-0.4、0.1-0.5、0.1-0.6、0.1-0.7、0.1-0.8、0.1-0.9、0.2-0.3、0.2-0.4、0.2-0.5、0.2-0.6、0.2-0.7、0.2-0.8、0.2-0.9、0.3-0.4、0.3-0.5、0.3-0.6、0.3-0.7、0.3-0.8、0.3-0.9、0.4-0.5、0.4-0.6、0.4-0.7、0.4-0.8、0.4-0.9、0.5-0.6、0.5-0.7、0.5-0.8、0.5-0.9、0.6-0.7、0.6-0.8、0.6-0.9、0.7-0.8、0.7-0.9或0.8-0.9。

[0123] 在一些实施方案中,本发明的刺激物可为超声刺激。在一些实施方案中,本发明的SRE可来源于机械力敏感蛋白。在一个实施方案中,本发明的SRE可为机械敏感性离子通道Piezo 1。

[0124] 在此类情况下感兴趣的有效载荷的表达是通过提供聚焦超声刺激来调整的。在其他实施方案中,本发明的SRE可来源于钙生物传感器,并且本发明的刺激物可为钙。钙可通过机械力敏感离子通道的超声诱导机械刺激生成。离子通道的超声活化导致钙内流,从而生成刺激物。在一个实施方案中,机械力敏感离子通道为Piezo 1。机械传感器可能有利于使用,因为它们为体内的具体定位提供空间控制。

[0125] 效应模块的SRE可以选自但不限于肽、肽复合物、肽-蛋白复合物、蛋白、融合蛋白、蛋白复合物、蛋白-蛋白复合物。SRE可包含一个或多个来源于任何天然或突变的蛋白或者抗体的区。在这个方面中,SRE为当应答于刺激物时可调整有效载荷的细胞内定位、分子内活化和/或降解的元件。

[0126] 在一些实施方案中,本发明的效应模块可包含促进效应模块的表达和调节的额外特征部,诸如一个或多个信号序列(SS)、一个或多个裂解和/或加工位点、一种或多种靶向和/或穿透肽、一个或多个标签和/或一个或多个接头。另外,本发明的效应模块可以还包含其他调整部分,诸如诱导型启动子、增强子序列、微RNA位点和/或微RNA靶向位点。每个方面或调整的模式可以为效应模块或生物回路带来差别调整的特征。例如,SRE可以代表去稳定结构域,而蛋白有效载荷中的突变可以改变其裂解位点或二聚特性或半衰期,并且包含一个或多个微RNA或微RNA结合位点可以赋予细胞去靶向或运输特征。因此,本发明涵盖可维持性是多因素的生物回路。此类生物回路可被工程化成包含一个、两个、三个、四个或更多

个调整的特征部。

[0127] 在一些实施方案中,本发明的效应模块可包括一个或多个调整表达的降解决定子。如本文所用,“降解决定子”是指在蛋白内足够由蛋白水解系统识别和降解的最小序列。降解决定子的重要特性在于它们是可转移的,即将降解决定子附加到序列赋予序列上的降解。在一些实施方案中,降解决定子可附加于去稳定结构域、有效载荷或两者。在本发明的效应模块内并入降解决定子为效应模块赋予额外的蛋白不稳定性并且可用于最小化基础表达。在一些实施方案中,降解决定子可为N-降解决定子、磷降解决定子、热诱导型降解决定子、光敏降解决定子、氧依赖降解决定子。作为非限制性示例,降解决定子可为如Takeuchi等所述的鸟氨酸脱羧酶降解决定子(Takeuchi J等(2008).Biochem J.2008 Mar 1;410(2):401-7;其内容以全文引用的方式并入)。可用于本发明的降解决定子的其他示例包括国际专利公布号W02017004022、W02016210343和W02011062962中所述的降解决定子;每个专利的内容以全文引用的方式并入。

[0128] 如图2中所示,示出了包含一个有效载荷(即一种免疫治疗剂)的代表性效应模块实施方案。效应模块的每个组分可以在没有(A至F)或有(G至Z和AA至DD)裂解位点的情况下以各种布置进行定位或安置。任选的接头可插入在效应模块的每个组分之间。

[0129] 图3至图6示出包含两个有效载荷(即两种免疫治疗剂)的代表性效应模块实施方案。在一些方面,在相同SRE(例如,相同DD)的调控下,效应模块中可包括多于两种免疫治疗剂(有效载荷)。所述两种或更多种剂可彼此直接连接或分开(图3)。SRE可安置于构建体的N末端、或构建体的C末端、或者在内部定位中。

[0130] 在一些方面,两种或更多种免疫治疗剂可为相同类型诸如两种抗体,或者不同类型诸如CAR构建体和细胞因子IL12。利用此类效应分子的生物回路和组分给出图7至图12中。

[0131] 在一些实施方案中,本发明的生物回路可被修饰成降低它们的免疫原性。免疫原性是对被感知为外来物的物质的一系列复杂应答的结果,并且可包括产生中和抗体和非中和抗体、形成免疫复合物、补体活化、肥大活化、发炎、超敏反应和过敏反应。若干因素可促成蛋白免疫原性,包括但不限于蛋白序列、施用途径和频率以及患者群体。在优选的实施方案中,蛋白工程化可用于降低本发明组合物的免疫原性。在一些实施方案中,降低免疫原性的修饰可包括降低来源于亲本序列的加工肽与MHC蛋白的结合的修饰。例如,可以对氨基酸修饰进行工程化,使得不存在或存在最少量的被预测为以高亲和力结合至任何常见的MHC等位基因的免疫表位。鉴别已知蛋白序列的MHC结合表位的若干方法是本领域中已知的并且可用于对本发明的组合物中的表位进行评分。此类方法公开于美国专利公布号US 20020119492、US20040230380和US 20060148009中;每个专利的内容以全文引用的方式并入。

[0132] 可以应用表位鉴别和随后的序列修饰以降低免疫原性。免疫原性表位的鉴别可以以物理或计算方式实现。表位鉴别的物理方法可包括例如质谱法和组织培养/细胞技术。还可以利用计算方法,其利用在抗原加工、负载和展示上获得的信息、针对鉴别可能导致抗原加工且有可能在MHC的沟槽中有良好的结合特征的非自体肽的结构和/或蛋白质组学数据。可以将一个或多个突变引入指引蛋白的表达的本发明的生物回路中,以维持其功能同时使鉴别的表位较少或不具有免疫原性。

[0133] 在一些实施方案中,工程化到本发明的组合物的结构中以干扰抗原加工和肽负载的蛋白修饰诸如糖基化和聚乙二醇化也可用于本发明。本发明的组合物还可工程化成包括非经典氨基酸侧链以设计免疫原性较小的组合物。国际专利申请号W02005051975中所讨论的用于降低免疫原性的任何方法均可用于本发明(所述专利的内容以全文引用的方式并入)。

[0134] 在一个实施方案中,患者还可以根据他们的免疫细胞所呈递的免疫原性肽进行分级并且可用作确定针对本发明的组合物可能在治疗上有益的合适患者队列的参数。

[0135] 在一些实施方案中,降低的免疫原性可通过限制免疫蛋白酶体加工来实现。蛋白酶体为重要的细胞蛋白酶,其以两种形式存在:组成型蛋白酶体,其在所有细胞型中表达且含有活性例如催化亚单位;和免疫蛋白酶体,其在造血谱系的细胞中表达且含有不同的活性亚单位,称为低分子量蛋白(LMP),即LMP-2、LMP-7和LMP-10。免疫蛋白酶体表现出改变的肽酶活性和裂解位点偏好,从而导致许多MHC I类表位的更有效的释放。免疫蛋白酶体的良好描述的功能是生成具有疏水性C末端的肽,其可被加工成适配MHC I类分子的沟槽。Deo1 P等已示出,免疫蛋白酶体可以导致具体肽键的频繁裂解,并由此导致抗原呈递细胞表面上的某种肽较快出现;以及肽量增加(Deo1 P等(2007) *J Immunol* 178(12) 7557-7562;其内容以全文引用的方式并入本文)。此研究指示,免疫蛋白酶体加工减少可伴随着免疫原性降低。在一些实施方案中,通过修饰编码本发明的组合物的序列以防止免疫蛋白酶体加工,可以降低本发明的组合物的免疫原性。本发明的生物回路还可以与免疫蛋白酶体选择性抑制剂组合以实现相同的效果。可用于本发明的抑制剂的示例包括UK-101 (B1i选择性化合物)、IPSI-001、ONX 0914 (PR-957) 和PR-924 (IPSI)。

[0136] 1. 去稳定结构域(DD)

[0137] 在一些实施方案中,本发明的生物回路系统、效应模块和组合物涉及免疫治疗剂的蛋白质(有效载荷)功能抗肿瘤免疫应答的翻译后调控。在一个实施方案中,SRE为稳定/去稳定结构域(DD)。与DD结合或相互作用的小分子配体是否存在或量可以在此类结合或相互作用时调节一个或两个有效载荷的稳定性,并且因此调节有效载荷的功能。根据结合和/或相互作用的程度,有效载荷的改变的功能可以变化,因此提供有效载荷功能的“调整”。

[0138] 在一些实施方案中,本文所述或本领域中已知的去稳定结构域可与本文所教导的任一免疫治疗剂(有效载荷)相结合用作本发明的生物回路系统中的SRE。去稳定结构域(DD)为可附加到感兴趣的靶蛋白的小蛋白结构域。在不存在DD结合配体的情况下,DD使附接的感兴趣的蛋白不稳定,从而使得蛋白被细胞的泛素-蛋白酶体系统快速降解(Stankunas, K.等, *Mol. Cell*, 2003, 12: 1615-1624; Banaszynski等, *Cell*; 2006, 126(5): 995-1004, 综述于Banaszynski, L.A.; 以及Wandless, T.J. *Chem. Biol.*; 2006, 13: 11-21和Rakhit R等, *Chem Biol.* 2014; 21(9): 1238-1252)。然而,当具体的小分子配体结合其预期的DD作为配体结合配偶体时,不稳定性被逆转并且蛋白质功能得以恢复。DD稳定性的条件实质允许从稳定蛋白到不稳定底物的快速且无干扰的转换以便降解。此外,它对其配体浓度的依赖性进一步提供了降解速率的可调控制。

[0139] 在一些实施方案中,DD的期望特征可包括但不限于在不存在DD的配体的情况下的蛋白水平低(即基础稳定性低)、动态范围大、剂量-应答行为稳健且可预测以及降解动力学快速。结合至期望配体但不结合至内源性分子的DD可为优选的。

[0140] 已鉴别了若干具有去稳定特性的蛋白结构域及其配对的小分子,并且用于控制蛋白表达,包括FKBP/shield-1系统(Egeler等,J Biol.Chem.2011,286(36):32328-31336;其内容以全文引用的方式并入本文)、ecDHFR及其配体甲氧苄啶(TMP);雌激素受体结构域,其可通过若干雌激素受体拮抗剂调控(Miyazaki等,J Am Chem.Soc.,2012,134(9):3942-3945;其内容以全文引用的方式并入本文);和荧光去稳定结构域(FDD),其来源于胆红素诱导型荧光蛋白、UnaG及其同源配体胆红素(BR)(Navarro等,ACS Chem Biol.,2016年6月6日;其内容以全文引用的方式并入本文)。

[0141] 已知的DD还包括美国专利号8,173,792和美国专利号8,530,636中所述的那些,每个专利的内容以全文引用的方式并入本文。

[0142] 在一些实施方案中,本发明的DD可来源于已被批准能够对蛋白进行翻译后调控的一些已知序列。例如,Xiong等已说明,当与 β -葡萄糖醛酸酶(GUS)报告因子融合时,拟南芥属(Arabidopsis)中ACS7(1-氨基环丙烷-1-羧酸合酶)的非催化N-末端结构域(54个残基)可显著减少GUS融合蛋白的累积(Xiong等.,J.Exp.Bot.,2014,65(15):4397-4408)。Xiong等进一步说明,外源性1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)处理和盐均可挽救ACS N末端和GUS融合蛋白的累积水平。ACS N末端通过泛素-26S蛋白酶体途径介导ACS7稳定性的调控。

[0143] 另一个非限制性示例为原肌球蛋白(Tm)的稳定性控制区(SCR,残基97-118),其控制蛋白稳定性。去稳定突变L110A和稳定突变A109L显著影响原肌球蛋白动力学(Kirwan和Hodges,J.Biol.Chem.,2014,289:4356-4366)。可以筛选此类序列的结合它们的配体并调控它们的稳定性。鉴别的序列和配体对可用作本发明的组分。

[0144] 在一些实施方案中,本发明的DD可开发自己知蛋白。野生型蛋白的区、或部分、或结构域可以整体或部分地用作SRE/DD。它们可以组合或重排以产生新的肽、蛋白、区或结构域,其中任一者均可用作SRE/DD或用于设计其他SRE和/或DD的起始点。

[0145] 可以测试熟知结合候选蛋白的配体诸如小分子在蛋白应答方面的调控。小分子可在临床上被批准为安全的并且具有适当的药物动力学和分布。在一些实施方案中,刺激物为去稳定结构域(DD)的配体,例如,结合去稳定结构域并稳定与去稳定结构域融合的POI的小分子。在一些实施方案中,本发明的配体、DD和SRE包括但不限于提交于2016年4月11日的共同未决的共同拥有的美国临时专利申请号62/320,864的表2至表4、或提交于2017年3月3日的美国临时申请号62/466,596、和国际公布W02017/180587中所教导的任一者,每个专利的内容以全文引用的方式并入本文。可用于开发DD及其配体的蛋白的一些示例列出于表1。

[0146] 表1:蛋白和它们的结合配体

[0147]

蛋白	蛋白序列	蛋白 SEQ ID NO.:	配体
大肠杆菌二氢叶酸还原酶 (ecDHFR)(Uniprot ID: P0ABQ4)	MISLIAALAVDRVIGMENAMPWN LPADLAWFKRNTLNKPVIMGRHT WESIGRPLPGRKNILSSQPGTDDR VTWVKSVDIAAACGDVPEIMVIG GGRVYEQFLPKAQKLYLTHIDAEV EGDTHFPDYEPDDWESVFSEFHDA DAQNSHSYCFEILERR	1	甲氨蝶呤 (MTX) 甲氧苄啶 (TMP)
人二氢叶酸还原酶 (hDHFR)(Uniprot ID: P00374)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDL PWPLRNEFRYFQRM TTTSSVEGK QNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGR INLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDD ALKLTEQPELANKVD MVWIVGGS SVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQD FESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVL SDVQEEKGIKYKFEVYEKND	2	甲氨蝶呤 (MTX) 甲氧苄啶 (TMP)
FK506 结合蛋白 (FKBP)(Uniprot ID: P62942)	GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVV HYTGMLEDGKKFDSSDRNKPFK FMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQ RAKLTISPDIAYGATGHPGIIPPHA TLVFDVELLKE	3	Shield-1
磷酸二酯酶 5(PDE5), 配体结合结构域(Uniprot ID: Uniprot ID O76074)	MEETRELQSLAAAVVPSAQLKIT DFSFSDFELSDLETALCTIRMFTDL NLVQNFQMKHEVLCRWILSVKKN YRKNVAYHNWRHAFNTAQCMFA ALKAGKIQNKLTDLLEILALLIAALS HDLDRHGVNNSYIQRSEHPLAQLY CHSIMEHHHFDQCLMILNSPGNQI LSGLSIEEYKTTLKIKQAILATDLA LYIKRRGEFFELIRKNQFNLEDPHQ KELFLAMLMTACDLSAITKPWPIQ QRIAEVATEFFDQGDREKELNIE PTDLMNREKKNKIPSMQVGFIDAI CLQLYEALTHVSEDCFPLLDGCRK NRQKWQALAEQQ	4	西地那非 (Sildenafil); 伐地那非 (Vardenafil); 他达拉非 (Tadalafil)
PPAR γ , 配体结合结构域 (Uniprot ID: P37231; 氨基酸 317-505)	SVEAVQEITEYAKSIPGFVNLDLND QVTLLKYGVHEIITMLASLMNKD GVLISEGQGFMTREFLKSRLKPF DFMEPKFEFAVKFNALELDDSDLA IFIAVIILSGDRPGLLNKPIEDIQD NLLQALELQLKLNHPESQLFAKL LQKMTDLRQIVTEHVQLLQVIKKT ETDMSLHPLLQEIKDLY	5	泊格列酮 (Posiglitazone) 吡格列酮 (Pioglitazone)
碳酸酐酶	MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPI	6	塞来昔布

[0148]	II(CA2)(Uniprot ID: P00918)	AKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKP LSVSYDQATSLRILNNGHAFNVEF DDSQDKAVLKGGLDGTYRLIQFH FWGSLDGQGSEHTVDKKKYAAE LHLVHWNTKYGDFGKAVQQPDG LAVLGIFLKVGSAPGLQKVVDVL DSIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESL DYWTYPGSLTTPPLLECVTWIVLK EPISVSSEQVLKFRKLNFNGEPEPE ELMVDNWRPAQPLKNRQIKASFK		(Celecoxib) 乙酰唑胺
	NRH: 醌氧化还原酶 2(NQO2)(Uniprot ID: P16083)	MAGKKVLIVYAHQEPKSFNGSLK NVAVDELSRQGCTVTVSDLYAMN LEPRATDKDITGTLNPEVFNYGV ETHEAYKQRSLASDITDEQKKVRE ADLVIFQFPLYWFSVPAILKGWMD RVLCQGFAFDIPGFYDSGLLQGKL ALLSVTTGGTAEMYTKTG VNGDS RYFLWPLQHGT LHFCGFKVLAPQI SFAPEIASEEERKGMVAAWSQRLQ TIWKEEPIPCTAHWHFGQ	7	伊马替尼 (Imatinib) 褪黑激素 (Melatonin)

[0149] 在一些实施方案中,本发明的DD可为FKBP DD或ecDHFR DD诸如表2中所列的那些。表2中列出的突变氨基酸的位置,ecDHFR DD是相对于SEQ ID NO.1的ecDHFR (Uniprot ID: POABQ4),并且FKBP DD是相对于SEQ ID NO.3的FKBP (Uniprot ID:P62942)。

[0150] 表2:ecDHFR DD和FKBP DD

	DD	序列	SEQ ID NO:
[0151]	ecDHFR (R12Y、Y100I)	MISLIAALAVDYVIGMENAMPWNLPADLAW FKRNTLNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRKNIIL SSQPGTDDRVTWVKSVD E A I A A C G D V P E I M V I G G G R V I E Q F L P K A Q K L Y L T H I D A E V E G D T H F P D Y E P D D W E S V F S E F H D A D A Q N S H S Y C F E I L E R R	8
	ecDHFR(W T 的氨基酸 2-159)(R12 Y、Y100I)	ISLIAALAVDYVIGMENAMPWNLPADLAWF KRNTLNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRKNIILS SQPGTDDRVTWVKSVD E A I A A C G D V P E I M V I G G G R V I E Q F L P K A Q K L Y L T H I D A E V E G D T H F P D Y E P D D W E S V F S E F H D A D A Q N S H S Y C F E I L E R R	9
	ecDHFR(W T 的氨基酸 2-159)(R12	ISLIAALAVD H V I G M E N A M P W N L P A D L A W F KRNTLNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRKNIILS SQPGTDDRVTWVKSVD E A I A A C G D V P E I M V I	10

	H、E129K)	GGGRVYEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTH FPDYKPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERR	
[0152]	FKBP(F36 V、L106P)	GVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGML EDGKKVDSSRDRNKPFKFM LGKQEVIRGWE EGVAQMSV GQRAKLTISP DYAYGATGHPGII PPHATLVFDV ELLKPE	11
	FKBP(E31 G、F36V、 R71G、 K105E)	GVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGML GDGKKVDSSRDRNKPFKFM LGKQEVIRGWE EGVAQMSV GQAKLTISP DYAYGATGHPGII PPHATLVFDV ELLLELE	12

[0153] 本发明的发明人已测试并且鉴别了若干可用于开发去稳定结构域的候选人蛋白。如表2所示,这些候选物包括人DHFR (hDHFR)、PDE5 (磷酸二酯酶5)、PPAR γ (过氧化物酶体增殖物活化受体 γ)、CA2 (碳酸酐酶II) 和NQO2 (NRH: 醌氧化还原酶2)。从这些蛋白的蛋白结构域所鉴别的候选去稳定结构域(作为模板)可以突变以基于模板候选结构域序列生成突变体文库。用于生成DD文库的诱变策略可包括:定点诱变,例如通过使用结构引导信息;或随机诱变,例如使用错误倾向PCR;或两者的组合。在一些实施方案中,使用随机诱变所鉴别的去稳定结构域可用于鉴别去稳定化所需的候选DD的结构特性,其然后可用于使用定点诱变进一步生成突变文库。

[0154] 在一些实施方案中,来源于大肠杆菌DHFR (ecDHFR) 的新颖DD可包含野生型ecDHFR序列的氨基酸2-159。这可称为M1del突变。

[0155] 在一些实施方案中,来源于ecDHFR的新颖DD可包含野生型ecDHFR序列的氨基酸2-159(还称为M1del突变),并且可包括一个、两个、三个、四个、五个或更多个突变,包括但不限于M1del、R12Y、R12H、Y100I和E129K。

[0156] 在一些实施方案中,来源于FKBP的新颖DD可包含野生型FKBP序列的氨基酸2-107。这可称为M1del突变。

[0157] 在一些实施方案中,来源于FKBP的新颖DD可包含野生型FKBP序列的氨基酸2-107(还称为M1del突变),并且可包括一个、两个、三个、四个、五个或更多个突变,包括但不限于M1del、E31G、F36V、R71G、K105E和L106P。

[0158] 在一些实施方案中,与野生型蛋白相比,可以筛选出DD突变体文库的与配体的结合亲和力改变、优选较高的突变。还可以使用两种或更多种配体对DD文库进行筛选,并且可以优先选择通过一些配体而不是其他配体来稳定的DD突变。还可以选择与天然存在的蛋白相比优先结合至配体的DD突变。此类方法可用于优化DD的配体选择和配体结合亲和力。另外,此类方法可用于最小化由脱靶配体结合所致的有害效果。

[0159] 在一些实施方案中,可以通过使用条形码筛选突变体文库来鉴别出合适的DD。此类方法可用于检测、鉴别和定量异源突变体文库内的个别突变体克隆。文库内的每个DD突变体可具有不同的条形码序列(相对于彼此)。在其他情况下,多核苷酸还可具有相对于2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个核酸碱基的不同条形码序列。文库内的每个DD突变体也可包含多个条形码序列。当使用多个时,可以使用使得每个条形码对于任何其他条形码是独特的。可替代地,所使用的每个条形码可能不是独特的,但所使用的条形码的组合可以产生可以被单独跟踪的独特序列。条形码序列可以放置于SRE的上游、SRE的下游或者在一些情况下

可以放置在SRE内。DD突变体可以通过条形码使用测序方法诸如Sanger测序和下一代测序来鉴别,但也可以通过聚合酶链反应和定量聚合酶链反应来鉴别。在一些实施方案中,针对每个条形码扩增不同大小的产物的聚合酶链反应引物可用于鉴别琼脂糖凝胶上的每个条形码。在其他情况下,每个条形码可以具有独特的定量聚合酶链反应探针序列,其实现每个条形码的靶向扩增。

[0160] 在一些实施方案中,本发明的DD可以来源于人二氢叶酸还原酶(hDHFR)。hDHFR为小的(18kDa)酶,其可催化二氢叶酸的还原并在多种合成代谢途径中发挥重要作用。二氢叶酸还原酶(DHFR)为在存在烟酰胺腺嘌呤二氢磷酸盐(NADPH)的情况下将7,8-二氢叶酸(DHF)转化为5,6,7,8-四氢叶酸(THF)的必需酶。抗叶酸药物诸如甲氨蝶呤(MTX)(叶酸的结 构类似物),比天然底物DHF更强地与DHFR结合,主要通过抑制二氢叶酸还原酶干扰叶酸代谢,导致嘌呤和嘧啶前体合成的抑制。其他hDHFR抑制剂诸如叶酸、TQD、甲氧苄啶(TMP)、表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)和ECG(表儿茶素没食子酸酯)也可与hDHFR突变体结合并调控其稳定性。在本发明的一个方面中,本发明的DD可为hDHFR突变体,包括:单突变hDHFR(Y122I)、hDHFR(K81R)、hDHFR(F59S)、hDHFR(I17V)、hDHFR(N65D)、hDHFR(A107V)、hDHFR(N127Y)、hDHFR(K185E)、hDHFR(N186D)和hDHFR(M140I);双突变hDHFR(M53T、R138I)、hDHFR(V75F、Y122I)、hDHFR(A125F、Y122I)、hDHFR(L74N、Y122I)、hDHFR(L94A、T147A)、hDHFR(G21T、Y122I)、hDHFR(V121A、Y122I)、hDHFR(Q36K、Y122I)、hDHFR(C7R、Y163C)、hDHFR(Y178H、E181G)、hDHFR(A10V、H88Y)、hDHFR(T137R、F143L)、hDHFR(E63G、I176F)、hDHFR(T57A、I72A)、hDHFR(H131R、E144G)和hDHFR(Y183H、K185E);以及三突变hDHFR(Q36F、N65F、Y122I)、hDHFR(G21E、I72V、I176T)、hDHFR(I8V、K133E、Y163C)、hDHFR(V9A、S93R、P150L)、hDHFR(K19E、F89L、E181G)、hDHFR(G54R、M140V、S168C)、hDHFR(L23S、V121A、Y157C)、hDHFR(V110A、V136M、K177R)和hDHFR(N49D、F59S、D153G)。

[0161] 在一个实施方案中,刺激物为与SRE结合以在翻译后调控蛋白水平的小分子。在一个方面中,DHFR配体甲氧苄啶(TMP)和甲氨蝶呤(MTX)用于稳定化hDHFR突变体。基于hDHFR的去稳定结构域列出于表3中。就人DHFR而言,表3中列出的突变氨基酸的位置是相对于SEQ ID NO.2的人DHFR(Uniprot ID:P00374)。在表3中,“del”意指突变为在那个位置处相对于野生型序列的氨基酸的缺失。

[0162] 表3:人DHFR突变体和新颖去稳定结构域

突变体	氨基酸序列	SEQ ID NO
hDHFR(I17V)	MVGS LNCIVAVSQNMGVGKNGDLPWPPLR NEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTW FSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHF LSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGG SSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTF FPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY KFEVYEKND	13
hDHFR(F59S)	MVGS LNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLR NEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTW SSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHF LSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGG SSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTF FPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY KFEVYEKND	14
hDHFR(N65D)	MVGS LNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLR NEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTW FSIPEKDRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHF LSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGG SSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTF FPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY KFEVYEKND	15
hDHFR(K81R)	MVGS LNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLR NEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTW FSIPEKNRPLKGRINLVLSRELREPPQGAHF LSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGG SSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTF FPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY KFEVYEKND	16
hDHFR(A107V)	MVGS LNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLR NEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTW FSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHF LSRSLDDALKLTEQPELVNKVDMVWIVGG SSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTF FPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY KFEVYEKND	17
hDHFR(Y122I)	MVGS LNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLR NEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTW FSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHF LSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGG SSVIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTF FPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY KFEVYEKND	18
hDHFR(N127Y)	MVGS LNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLR NEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTW FSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHF LSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGG SSVYKEAMYHPGHLKLFVTRIMQDFESDTF FPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY	19

[0163]

[0164]

	KFEVYEKND	
hDHFR(M140I)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLR NEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTW FSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHF LSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGG SSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIIQDFESDTFF PEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYK FEVYEKND	20
hDHFR(K185E)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLR NEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTW FSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHF LSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGG SSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTF FPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY KFEVYEEND	21
hDHFR(N186D)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLR NEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTW FSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHF LSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGG SSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTF FPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY KFEVYEKDD	22
hDHFR(C7R、 Y163C)	MVGSLNRIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLR NEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTW FSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHF LSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGG SSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTF FPEIDLEKYKLLPECPGVLSDVQEEKGIKYK FEVYEKND	23
hDHFR(A10V、 H88Y)	MVGSLNCIVVVSQNMGIGKNGDLPWPPLR NEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTW FSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAYFL SRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGG SVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFF PEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYK FEVYEKND	24
hDHFR(Q36K、 Y122I)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLR NEFRYFKRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTW FSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHF LSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGG SSVIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTF FPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY KFEVYEKND	25
hDHFR(M53T、 R138I)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLR NEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVITGKKTWF SIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFL SRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGG SVYKEAMNHPGHLKLFVTIIMQDFESDTFF PEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYK FEVYEKND	26

[0165]

hDHFR(T57A、I72A)	MVGS LNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLR NEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKA WFSIPEKNRPLKGRANLVLSRELKEPPQGAHF LSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGG SSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTF FPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY KFEVYEKND	27
hDHFR(E63G、I176F)	MVGS LNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLR NEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTW FSIPGKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHF LSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGG SSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTF FPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGFKY KFEVYEKND	28
hDHFR(G21T、Y122I)	MVGS LNCIVAVSQNMGIGKNTDLPWPPLR NEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTW FSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHF LSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGG SSVIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTF FPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY KFEVYEKND	29
hDHFR(L74N、Y122I)	MVGS LNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLR NEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTW FSIPEKNRPLKGRINNVLSRELKEPPQGAHF LSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGG SSVIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTF FPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY KFEVYEKND	30
hDHFR(V75F、Y122I)	MVGS LNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLR NEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTW FSIPEKNRPLKGRINLFLSRELKEPPQGAHF LSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGG SSVIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTF FPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY KFEVYEKND	31
hDHFR(L94A、T147A)	MVGS LNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLR NEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTW FSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHF LSRSADDALKLTEQPELANKVDMVWIVGG SSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDA FFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY KFEVYEKND	32
DHFR(V121A、Y22I)	MVGS LNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLR NEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTW FSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHF LSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGG SSAIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTF FPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY KFEVYEKND	33
hDHFR(Y122I、	MVGS LNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLR	34

[0166]

A125F)	NEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTW FSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHF LSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGG SSVIKEFMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFF PEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYK FEVYEKND	
hDHFR(H131R、 E144G)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLR NEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTW FSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHF LSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGG SSVYKEAMNHPGRLKLFVTRIMQDFGSDT FFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY KFEVYEKND	35
hDHFR(T137R、 F143L)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLR NEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTW FSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHF LSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGG SSVYKEAMNHPGHLKLFVRRIMQDLES DT FFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY KFEVYEKND	36
hDHFR(Y178H、 E181G)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLR NEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTW FSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHF LSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGG SSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTF FPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKH KFGVYEKND	37
hDHFR(Y183H、 K185E)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLR NEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTW FSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHF LSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGG SSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTF FPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY KFEVHEEND	38
hDHFR(V9A、 S93R、P150L)	MVGSLNCIAAVSQNMGIGKNGDLPWPPLR NEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTW FSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHF LSRRLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGG SSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTF FLEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY KFEVYEKND	39
hDHFR(I8V、 K133E、Y163C)	MVGSLNCVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLR NEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTW FSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHF LSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGG SSVYKEAMNHPGHLELFVTRIMQDFESDTF FPEIDLEKYKLLPEC PGVLSDVQEEKGIKYK FEVYEKND	40
hDHFR(L23S、	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDSPWPPLR NEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTW	41

[0167]

V121A、Y157C)	FSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHF LSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGG SSAYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTF FPEIDLEKCKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYK FEVYEKND	
hDHFR(K19E、 F89L、E181G)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGENGDLWPPLR NEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTW FSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHL LSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGG SSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTF FPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY KFGVYEKND	42
hDHFR(Q36F、 N65F、Y122I)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLWPPLR NEFRYFFRMTTTSSVEGKQNLVIMGKKTW FSIPEKFRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFL SRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGG SVIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFF PEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYK FEVYEKND	43
hDHFR(G54R、 M140V、S168C)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLWPPLR NEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMRKKTW FSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHF LSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGG SSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIVQDFESDTF FPEIDLEKYKLLPEYPGVLCVQEEKGIKY KFEVYEKND	44
hDHFR(V110A、 V136M、K177R)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLWPPLR NEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTW FSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHF LSRSLDDALKLTEQPELANKADMVWIVGG SSVYKEAMNHPGHLKLFMTRIMQDFESDT FFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIRY KFEVYEKND	45
hDHFR(WT 的氨 基酸 2-187； Q36F、Y122I、 A125F)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLWPPLRNE FRYFFRMTTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSI PEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSR SLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVI KEFMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEI DLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEV YEKND	46
hDHFR(N49D、 F59S、D153G)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLWPPLR NEFRYFQRM TTTSSVEGKQDLVIMGKKTW SSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHF LSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGG SSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTF FPEIGLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY KFEVYEKND	47
hDHFR(G21E、 I72V、I176T)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNEDLPWPPLR NEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTW FSIPEKNRPLKGRVNLVLSRELKEPPQGAHF	48

[0168]

	LSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGG SSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTF FPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGTKY KFEVYEKND	
hDHFR(L100P、 E102G、Q103R、 P104S、E105G、 N108D、V113A、 W114R、Y122C、 M126I、N127R、 H128Y、L132P、 F135P、I139T、 F148S、F149L、 I152V、D153A、 D169G、V170A、 I176A、K177R、 V182A、K185R、 N186S)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLR NEFRYFQRMTTSSVEGKQNLVIMGKKTW FSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHF LSRSLDDALKPTGRSGLADKVDMARIVGG SSVCKEAIRYPGHPKLPVTRTMQDFESDTS LPEVALEKYKLLPEYPGVLSGAQEEKGARY KFEAYERSD	871
hDHFR(V2A、 R33G、Q36R、 L100P、K185R)	MAGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLR NEFGYFRMTTSSVEGKQNLVIMGKKTW FSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHF LSRSLDDALKPTEQPELANKVDMVWIVGG SSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTF FPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKY KFEVYERND	872
hDHFR(G16S、 I17V、F89L、 D96G、K123E、 M140V、D146G、 K156R)	MVGSLNCIVAVSQNMSVGKNGDLPWPPLR NEFRYFQRMTTSSVEGKQNLVIMGKKTW FSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHL LSRSLDGALKLTEQPELANKVDMVWIVGG SSVYEEAMNHPGHLKLFVTRIVQDFESGTF FPEIDLERYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYK FEVYEKND	873
hDHFR(F35L、 R37G、N65A、 L68S、K69E、 R71G、L80P、 K99G、G117D、 L132P、I139V、 M140I、D142G、 D146G、E173G、 D187G)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLR NEFRYLQGM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTW FSIPEKARPSEGGINLVLSREPKEPPQGAHFL SRSLDDALGLTEQPELANKVDMVWIVDGS SVYKEAMNHPGHPKLFVTRVIQGFESGTF PEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEGKGIKYK FEVYEKNG	874
hDHFR(I17N、 L98S、K99R、 M112T、E151G、 E162G、E172G)	MVGSLNCIVAVSQNMGNKGKNGDLPWPPLR NEFRYFQRMTTSSVEGKQNLVIMGKKTW FSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHF LSRSLDDASRLTEQPELANKVDTVWIVGGS SVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFF PGIDLEKYKLLPGYPGVLSDVQGEKGIKYK	875

	FEVYEKND		
	hDHFR(R138G、D142G、F143S、K156R、K158E、E162G、V166A、K177E、Y178C、K185E、N186S)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLR NEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTW FSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHF LSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGG SSVYKEAMNHPGHLKLFVTGIMQGS EDT FFPEIDLERYELLPGYPGALS DVQEEKGIEC KFEVYEESD	876
	hDHFR(K81R、K99R、L100P、E102G、N108D、K123R、H128R、D142G、F180L、K185E)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLR NEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTW FSIPEKNRPLKGRINLVLSRELREPPQGAHF LSRSLDDALRPTGQPELADK VDMVWIVGG SSVYREAMNRP GHLKLFVTRIMQGFESDTF FPEIDLEKYKLLPEYPGVLS DVQEEKGIKY KLEVYEEND	877
	hDHFR(N14S、P24S、F35L、M53T、K56E、R92G、S93G、N127S、H128Y、F135L、F143S、L159P、L160P、E173A、F180L)	MVGSLNCIVAVSQSMGIGKNGDLSWPPLRN EFRYLQRM TTTSSVEGKQNLVITGKETWFS IPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHF LS GGLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSS VYKEAMSYPGHLKLLVTRIMQDSESDTFFP EIDLEKYKPPPEYPGVLS DVQEAKGIKYKL EVYEKND	878
[0169]	hDHFR(V2A、I17V、N30D、E31G、Q36R、F59S、K69E、I72T、H88Y、F89L、N108D、K109E、V110A、I115V、Y122D、L132P、F135S、M140V、E144G、T147A、Y157C、V170A、K174R、N186S)	MAGSLNCIVAVSQNMGVGKNGDLPWPPLR DGFYFRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTW SSIPEKNRPLEGR TNLVLSRELKEPPQGAFL LSRSLDDALKLTEQPELADEAGMVWVVG SSVDKEAMNHPGHPKLSVTRIVQDFGSDAF FPEIDLEKCKLLPEYPGVLS DAQEERGIKYK FEVYEKSD	879
	hDHFR(L28P、N30H、M38V、V44A、L68S、N73G、R78G、A97T、K99R、A107T、K109R、D111N、L134P、F135V、T147A、I152V、K158R、E172G、V182A、	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPR HEFRYFQRV TTTSSAEGKQNLVIMGKKTWF SIPEKNRPSKGRIGLVLSGELKEPPQGAHFL SRSLDDTLRLTEQPELTNRVNMVWIVGGSS VYKEAMNHPGHLRPVVTRIMQDFESDAFF PEVDLEKYRLLPEYPGVLS DVQGEKGIKYK FEAYRKND	880

[0170]

E184R)		
hDHFR(A10T、Q13R、N14S、N20D、P24S、N30S、M38T、T40A、K47R、N49S、K56R、I61T、K64R、K69R、I72A、R78G、E82G、F89L、D96G、N108D、M112V、W114R、Y122D、K123E、I139V、Q141R、D142G、F148L、E151G、E155G、Y157R、Q171R、Y183C、E184G、K185del、D187N)	MVGS LNCIVTVSRSMGIGKDGDLSPPLRS EFRYFQRTTATSSVEGRQSLVIMGKRTWFST PERNRPLRGRANLVLSGELKGGPPQGAHLLS RSLDGALKLTEQPELADKVDVVRIVGGSSV DEEAMNHPGHLKLFVTRVMRGFESDTLFP GIDLGKRKLLPEYPGVLSDVREEKGIKYKL EVCGNN	881
hDHFR(WT 的氨基酸 2-187; I17V、Y122I)	VGSLNCIVAVSQNMGVGKNGDLPWPPLRN EFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWF SIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFL SRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGS SVIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFF PEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYK FEVYEKND	882
hDHFR(WT 的氨基酸 2-187; Y122I、M140I)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNE FRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSI PEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSR SLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVI KEAMNHPGHLKLFVTRIIQDFESDTFFPEID LEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVY EKND	883
hDHFR(WT 的氨基酸 2-187; N127Y、Y122I)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNE FRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSI PEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSR SLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVI KEAMYHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEI DLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEV YEKND	884
hDHFR(WT 的氨基酸 2-187; Y122I、H131R、E144G)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNE FRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSI PEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSR SLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVI KEAMNHPGRLKLFVTRIMQDFGSDTFFPEI DLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEV YEKND	885

[0171]

hDHFR(WT 的氨基酸 2-187; D22S、F32M、 R33S、Q36S、 N65S)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGSLPWPLRNE MSYFSRMTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSI PEKSRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSR SLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSV YKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPE IDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFE VYEKND	886
hDHFR(WT 的氨基酸 2-187; E31D、F32M、 V116I)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRND MRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFS IPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLS RSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIIGSSV YKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPE IDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFE VYEKND	887
hDHFR(WT 的氨基酸 2-187; E162G、I176F)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNE FRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSI PEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSR SLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSV YKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPE IDLEKYKLLPGYPGVLSDVQEEKGFKYKFE VYEKND	888
hDHFR(WT 的氨基酸 2-187; K185E)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNE FRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSI PEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSR SLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSV YKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPE IDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFE VYEEND	889
hDHFR(WT 的氨基酸 2-187; Y122I、A125F)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNE FRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSI PEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSR SLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVI KEFMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEI DLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEV YEKND	890
hDHFR(WT 的氨基酸 2-187; Q36F、N65F、 Y122I)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNE FRYFFRMTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSI PEKFRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSR SLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVI KEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEI DLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEV YEKND	891
hDHFR(WT 的氨基酸 2-187; N127Y)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNE FRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSI PEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSR SLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSV YKEAMYHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPE IDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFE VYEKND	892
hDHFR(WT 的氨基酸 2-187; N127Y)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNE	893

基酸 2-187; H131R、E144G)	FRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSI PEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSR SLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSV YKEAMNHPGRLKLFVTRIMQDFGSDTFFPE IDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFE VYEKND	
hDHFR(WT 的氨 基酸 2-187;I17V)	VGSLNCIVAVSQNMGVGKNGDLPWPPLRN EFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWF SIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFL SRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSS SVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFF PEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYK FEVYEKND	894
hDHFR(WT 的氨 基酸 2-187; Y122I)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNE FRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSI PEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSR SLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVI KEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEI DLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEV YEKND	895
hDHFR(E162G、 I176F)	MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLR NEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTW FSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHF LSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGG SSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTF FPEIDLEKYKLLPGYPGVLSDVQEEKGFY KFEVYEKND	896
hDHFR(WT 的氨 基酸 2-187; Q36K、Y122I)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNE FRYFKRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSI PEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSR SLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVI KEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEI DLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEV YEKND	981

[0173] 在一些实施方案中,不抑制配体结合的DD突变可为优先选择的。在一些实施方案中,配体结合可通过DHFR中残基的突变来改进。选择用于突变的氨基酸位置包括:在SEQ ID NO.2的位置22处的天冬氨酸;在SEQ ID NO.2的位置31处的谷氨酸;在SEQ ID NO.2的位置32处的苯基丙氨酸;在SEQ ID NO.2的位置33处的精氨酸;在SEQ ID NO.2的位置36处的谷氨酰胺;在SEQ ID NO.2的位置65处的天冬酰胺;以及在SEQ ID NO.2的位置115处的缬氨酸。在一些实施方案中,可以在本发明的DD中利用一个或多个以下突变来改进TMP结合,包括但不限于D22S、E31D、F32M、R33S、Q36S、N65S和V116I。突变氨基酸的位置是相对于SEQ ID NO.2的野生型人DHFR(Uniprot ID:P00374)。

[0174] 在一些实施方案中,来源于人DHFR的新颖DD可包括一个、两个、三个、四个、五个或更多个突变,包括但不限于M1de1、V2A、C7R、I8V、V9A、A10T、A10V、Q13R、N14S、G16S、I17N、I17V、K19E、N20D、G21T、G21E、D22S、L23S、P24S、L28P、N30D、N30H、N30S、E31G、E31D、F32M、R33G、R33S、F35L、Q36R、Q36S、Q36K、Q36F、R37G、M38V、M38T、T40A、V44A、K47R、N49S、N49D、M53T、G54R、K56E、K56R、T57A、F59S、I61T、K64R、N65A、N65S、N65D、N65F、L68S、K69E、K69R、R71G、I72T、I72A、I72V、N73G、L74N、V75F、R78G、L80P、K81R、E82G、H88Y、F89L、R92G、S93G、

S93R、L94A、D96G、A97T、L98S、K99G、K99R、L100P、E102G、Q103R、P104S、E105G、A107T、A107V、N108D、K109E、K109R、V110A、D111N、M112T、M112V、V113A、W114R、I115V、I115L、V116I、G117D、V121A、Y122C、Y122D、Y122I、K123R、K123E、A125F、M126I、N127R、N127S、N127Y、H128R、H128Y、H131R、L132P、K133E、L134P、F135P、F135L、F135S、F135V、V136M、T137R、R138G、R138I、I139T、I139V、M140I、M140V、Q141R、D142G、F143S、F143L、E144G、D146G、T147A、F148S、F148L、F149L、P150L、E151G、I152V、D153A、D153G、E155G、K156R、Y157R、Y157C、K158E、K158R、L159P、L160P、E162G、Y163C、V166A、S168C、D169G、V170A、Q171R、E172G、E173G、E173A、K174R、I176A、I176F、I176T、K177E、K177R、Y178C、Y178H、F180L、E181G、V182A、Y183C、Y183H、E184R、E184G、K185R、K185del、K185E、N186S、N186D、D187G和D187N。

[0175] 在一些实施方案中,来源于人DHFR的新颖DD可包含野生型人DHFR序列的氨基酸2-187。这可称为M1del突变。

[0176] 在一些实施方案中,来源于人DHFR的新颖DD可包含野生型人DHFR序列的氨基酸2-187(还称为M1del突变),并且可包括一个、两个、三个、四个、五个或更多个突变,包括但不限于M1del、V2A、C7R、I8V、V9A、A10T、A10V、Q13R、N14S、G16S、I17N、I17V、K19E、N20D、G21T、G21E、D22S、L23S、P24S、L28P、N30D、N30H、N30S、E31G、E31D、F32M、R33G、R33S、F35L、Q36R、Q36S、Q36K、Q36F、R37G、M38V、M38T、T40A、V44A、K47R、N49S、N49D、M53T、G54R、K56E、K56R、T57A、F59S、I61T、K64R、N65A、N65S、N65D、N65F、L68S、K69E、K69R、R71G、I72T、I72A、I72V、N73G、L74N、V75F、R78G、L80P、K81R、E82G、H88Y、F89L、R92G、S93G、S93R、L94A、D96G、A97T、L98S、K99G、K99R、L100P、E102G、Q103R、P104S、E105G、A107T、A107V、N108D、K109E、K109R、V110A、D111N、M112T、M112V、V113A、W114R、I115V、I115L、V116I、G117D、V121A、Y122C、Y122D、Y122I、K123R、K123E、A125F、M126I、N127R、N127S、N127Y、H128R、H128Y、H131R、L132P、K133E、L134P、F135P、F135L、F135S、F135V、V136M、T137R、R138G、R138I、I139T、I139V、M140I、M140V、Q141R、D142G、F143S、F143L、E144G、D146G、T147A、F148S、F148L、F149L、P150L、E151G、I152V、D153A、D153G、E155G、K156R、Y157R、Y157C、K158E、K158R、L159P、L160P、E162G、Y163C、V166A、S168C、D169G、V170A、Q171R、E172G、E173G、E173A、K174R、I176A、I176F、I176T、K177E、K177R、Y178C、Y178H、F180L、E181G、V182A、Y183C、Y183H、E184R、E184G、K185R、K185del、K185E、N186S、N186D、D187G和D187N。

[0177] 2.有效载荷:免疫治疗剂

[0178] 在一些实施方案中,本发明的有效载荷可为在生物体中诱导免疫应答的免疫治疗剂。免疫治疗剂可为但不限于抗体及其片段和变体、嵌合抗原受体(CAR)、嵌合开关受体、细胞因子、趋化因子、细胞因子受体、趋化因子受体、细胞因子-细胞因子受体融合多肽或诱导免疫应答的任何剂。在一个实施方案中,免疫治疗剂在细胞或受试者中诱导抗癌免疫应答。

[0179] 抗体

[0180] 在一些实施方案中,抗体、其片段和变体为本发明的有效载荷。

[0181] 在一些实施方案中,本发明的抗体包括但不限于提交于2016年4月11日的共同未决的共同拥有的美国临时专利申请号62/320,864的表5、或提交于2017年3月3日的美国临时申请号62/466,596、和国际公布W02017/180587中所教导的任一者,每个专利的内容以全文引用的方式并入本文。

[0182] 抗体片段和变体

[0183] 在一些实施方案中,抗体片段和变体可包含完整抗体的抗原结合区。抗体片段和变体的示例可包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段;双功能抗体;线性抗体;单链抗体分子,诸如单链可变片段(scFv);和由抗体片段形成的多特异性抗体。抗体的木瓜蛋白酶消化产生两个相同的抗原结合片段,称为“Fab”片段,其各自具有单一抗原结合位点。还产生了残余的“Fc”片段,其名称反映了其易于结晶的能力。胃蛋白酶处理产生F(ab')₂片段,其具有两个抗原结合位点且仍能够与抗原交联。本发明的药物组合物、生物回路、生物回路组分、效应模块包括其SRE或有效载荷可包含这些片段中的一种或多种。

[0184] 出于本文的目的,“抗体”可包含重链和轻链可变结构域以及Fc区。如本文所用,术语“天然抗体”通常是指约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白,由两条相同的轻(L)链和两条相同的重(H)链组成。编码抗体重链和轻链的基因是已知的且构成每个的区段已被充分表征和描述(Matsuda等,The Journal of Experimental Medicine.1998,188(11):2151-62以及Li等,Blood,2004,103(12):4602-4609;每个参考文献的内容以全文引用的方式并入本文)。每条轻链均通过一个共价二硫键连接到重链,而不同免疫球蛋白同种型的重链中二硫化物键联的数量不同。各重链和轻链还具有规律间隔的链内二硫桥。各重链在一端具有可变结构域(VH),继而为多个恒定结构域。各轻链在一端具有可变域(VL)且在它的另一端具有恒定域;轻链的恒定域与重链的第一恒定域对准,且轻链可变域与重链的可变域对准。

[0185] 如本文所用,术语“可变结构域”是指存在于抗体重链和轻链上的特异性抗体结构域,其在抗体之间序列广泛不同并且用于每种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。可变结构域包含高变区。如本文所用,术语“高变区”是指可变结构域内包含负责抗原结合的氨基酸残基的区。高变区内存在的氨基酸决定互补决定区(CDR)的结构,互补决定区(CDR)为抗体的抗原结合位点的一部分。如本文所用,术语“CDR”是指抗体的包含与其靶抗原或表位互补的结构区。可变结构域的不与抗原相互作用的其他部分称为框架(FW)区。抗原结合位点(也称为抗原组合位点或互补位)包含与特定抗原相互作用所必需的氨基酸残基。构成抗原结合位点的确切残基通常通过与结合抗原的共结晶学来阐明,但是也可以使用基于与其他抗体的比较的计算评估(Stroh1,W.R.Therapeutic Antibody Engineering.Woodhead Publishing,Philadelphia PA.2012.第3章,第47-54页,所述参考文献的内容以全文引用的方式并入本文)。确定构成CDR的残基可包括使用编号方案,包括但不限于以下所教导的那些:Kabat(Wu等,JEM,1970,132(2):211-250以及Johnson等,Nucleic Acids Res.2000,28(1):214-218,其各自的内容以全文引用的方式并入本文);Chothia(Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.1987,196,901,Chothia等,Nature,1989,342,877,以及Al-Lazikani等,J.Mol.Biol.1997,273(4):927-948,其各自的内容以全文引用的方式并入本文);Lefranc(Lefranc等,Immunome Res.2005,1:3);和Honegger(Honegger和Pluckthun,J.Mol.Biol.2001,309(3):657-70,其内容以全文引用的方式并入本文)。

[0186] VH和VL结构域各自具有三个CDR。当沿着可变结构域多肽从N末端移动到C末端时,VL CDR在本文中称为CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。当沿着可变结构域多肽从N末端移动到C末端时,VH CDR在本文中称为CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。除了CDR-H3之外,每个CDR都具有占优势的规范结构,其包含在抗体之间可能在序列和长度上高度可变的氨基酸序列,导致抗原结合结构域中的多种三维结构(Nikoloudis等,PeerJ.2014,2:e456)。在一些情况下,可以

在一组相关抗体中分析CDR-H3以评估抗体多样性。确定CDR序列的各种方法是本领域中已知的并且可以应用于已知的抗体序列 (Strohl, W. R. *Therapeutic Antibody Engineering*. Woodhead Publishing, Philadelphia PA. 2012. 第3章, 第47-54页, 其内容以全文引用的方式并入本文)。

[0187] 如本文所用, 术语“Fv”是指包含抗体上形成完整抗原结合位点所需的最小片段的抗体片段。这些区由以紧密、非共价缔合的形式的一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域的二聚体组成。Fv片段可以通过蛋白水解裂解产生, 但很大程度上是不稳定的。用于生成稳定的Fv片段的重组方法是本领域中已知的, 通常是通过在轻链可变结构域与重链可变结构域之间插入柔性接头 (以形成单链Fv (scFv)) 或通过重链可变域与轻链可变域之间引入二硫桥 (Strohl, W. R. *Therapeutic Antibody Engineering*. Woodhead Publishing, Philadelphia PA. 2012. 第3章, 第46-47页, 其内筒以全文引用的方式并入本文)。

[0188] 如本文所用, 术语“轻链”是指来自任何脊椎动物物种的抗体的、被指定为两种明显不同类型 (基于恒定结构域的氨基酸序列称为 κ 和 λ) 之一的组分。根据重链的恒定结构域的氨基酸序列, 抗体可被指定为不同的类别。存在五种主要类别的完整抗体: IgA、IgD、IgE、IgG和IgM, 并且这些类别中的几种可进一步划分成亚类 (同种型), 例如, IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA和IgA2。

[0189] 如本文所用, 术语“单链Fv”或“scFv”是指VH和VL抗体结构域的融合蛋白, 其中这些结构域通过柔性肽接头连接在一起形成单多肽链。在一些实施方案中, Fv多肽接头使scFv能够期望的结构以便抗原结合。在一些实施方案中, scFv与噬菌体展示、酵母展示或其他展示方法结合使用, 其中它们可以与表面成员 (例如噬菌体外壳蛋白) 结合表达并用于鉴别给定抗原的高亲和力肽。

[0190] 使用分子遗传学, 两个scFv可以串联工程化成单个多肽, 由接头结构域分开, 称为“串联scFv” (tascFv)。构建具有两种不同scFv的基因的tascFv得到“双特异性单链可变片段” (双-scFv)。商业公司在临床上仅开发了两种tascFv; 两者均为Micromet针对肿瘤适应症的活跃早期开发中的双特异性剂且被描述为“双特异性T细胞衔接器 (Bispecific T-cell Engager, BiTE)”。博纳吐单抗为抗CD19/抗CD3双特异性tascFv, 其在第2期中加强T细胞对B细胞非霍奇金淋巴瘤的应答。MT110为抗EP-CAM/抗CD3双特异性tascFv, 其在第1期中加强T细胞对实体肿瘤的应答。Affimed也正在研究双特异性四价“TandAb” (Nelson, A. L., *MAbs.*, 2010, 1月-2月; 2(1): 77-83)。还可包括打抗体 (与IgG的Fc的氨基末端 (CH2-CH3结构域) 融合的二价scFv)。

[0191] 如本文所用, 术语“双特异性抗体”是指能够结合两种不同抗原的抗体。此类抗体通常包含来自至少两种不同抗体的区。双特异性抗体可包括Riethmuller, G. *Cancer Immunity*. 2012, 12: 12-18、Marvin等, 2005. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2005, 26(6): 649-658以及Schaefer等, *PNAS*. 2011, 108(27): 11187-11192中所述的那些中的任一种, 每个参考文献的内容以全文引用的方式并入本文。

[0192] 如本文所用, 术语“双抗体”是指具有两个抗原结合位点的小抗体片段。双功能抗体为功能性双特异性单链抗体 (bscAb)。双功能抗体包含与同一多肽链中的轻链可变结构域VL连接的重链可变结构域VH。通过使用太短而不允许在相同链上的两个结构域之间配对的接头, 迫使所述结构域与另一链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点。双功能抗

体更充分地描述于例如EP 404,097、WO 93/11161以及Hollinger等(Hollinger,P.等,“Diabodies”:Small bivalent and bispecific antibody fragments.PNAS,1993.90:6444-6448),每个参考文献的内容以全文引用的方式并入本文。

[0193] 术语“内抗体”是指不从产生它的细胞分泌,而是靶向一种或多种细胞内蛋白的抗体形式。内抗体可用于影响多种细胞过程,包括但不限于细胞内运输、转录、翻译、代谢过程、增殖信号传导和细胞分裂。在一些实施方案中,本发明的方法可包括基于内抗体的疗法。在一些此类实施方案中,本文所公开的可变结构域序列和/或CDR序列可并入一种或多种构建体以用于基于内抗体的疗法。

[0194] 如本文所用,术语“单克隆抗体”是指由实质上均质细胞(或克隆)的群体获得的抗体,即除可在产生单克隆抗体期间出现的可能变体(所述变体一般以少量存在)之外,构成所述群体的个别抗体相同和/或结合相同表位。与通常包括针对不同决定子(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂不同,各单克隆抗体针对抗原上的单一决定子。

[0195] 修饰语“单克隆”表明,抗体的特性是获自抗体的基本同质群体,而并不应当被解释为需要通过任何特定方法来生产抗体。本文的单克隆抗体包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白),其中重链和/或轻链的一部分与源自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的对应序列相同或同源,而所述链的剩余部分与源自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体以及这类抗体的片段中的对应序列相同或同源。

[0196] 如本文所用,术语“人源化抗体”是指包含来自一种或多种非人(例如,鼠)抗体源的最小部分,其余部分来源于一种或多种人免疫球蛋白源的嵌合抗体。人源化抗体大部分是人免疫球蛋白(接受者抗体),其中来自接受者抗体的高变区的残基被来自如小鼠、大鼠、兔或非人类灵长类动物的非人类物种抗体(供体抗体)的高变区的具有所需特异性、亲和力和/或能力的残基替换。在一个实施方案中,抗体可以是人源化全长抗体。作为非限制性示例,抗体可以使用美国专利公布号US20130303399中所教导的方法进行人源化,其内容以全文引用的方式并入本文。

[0197] 如本文所用,术语“抗体变体”是指修饰抗体(相对于天然或起始抗体)或结构和/或功能类似于天然或起始抗体的生物分子(例如,抗体模拟物)。与天然抗体相比,抗体变体的氨基酸序列、组成或结构可以改变。抗体变体可包括但不限于具有改变的同种型的抗体(例如,IgA、IgD、IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或IgM)、人源化变体、优化的变体、多特异性抗体变体(例如,双特异性变体)和抗体片段。

[0198] 在一些实施方案中,本发明的药物组合物、生物回路、生物回路组分、效应模块包括其SRE或有效载荷可以是抗体模拟物。如本文所用,术语“抗体模拟物”是指模拟抗体的功能或作用并且特异性地且以高亲和力结合至其分子靶标的任何分子。在一些实施方案中,抗体模拟物可以是单体,其设计成并入III型纤连蛋白结构域(Fn3)作为蛋白质支架(US 6,673,901;US 6,348,584)。在一些实施方案中,抗体模拟物可以是本领域中已知的那些,包括但不限于亲和体(affibody)分子、affilin、affitin、anticalin、avimer、Centyrin、DARPINSTM、Fynomer和Kunitz以及结构域肽。在其他实施方案中,抗体模拟物可包括一个或多个非肽区。

[0199] 在一个实施方案中,抗体可包含修饰的Fc区。作为非限制性示例,修饰的Fc区可以通过所述方法制备或者可以是美国专利公布号US20150065690中所述的任何区,其内容以

全文以引用的方式并入本文。

[0200] 在一些实施方案中,本发明的有效载荷可以编码结合多于一个表位的多特异性抗体。如本文所用,术语“多体”或“多特异性抗体”是指其中两个或更多个可变区与不同表位结合的抗体。表位可以在相同或不同的靶标上。在一个实施方案中,多特异性抗体可以通过国际专利公布号W02011109726和美国专利公布号US20150252119中所述的方法生成和优化,每个专利的内容以全文引用的方式并入本文。这些抗体能够以高特异性和高亲和力结合多种抗原。

[0201] 在某些实施方案中,多特异性抗体为识别同一或不同抗原上的两个不同表位的“双特异性抗体”。在一个方面中,双特异性抗体能够结合两种不同的抗原。此类抗体通常包含来自至少两种不同抗体的抗原结合区。例如,双特异性单克隆抗体(BsMAb、BsAb)为由两种不同的单克隆抗体的片段构成的人工蛋白质,因此允许BsAb与两种不同类型的抗原结合。双特异性抗体框架可包括Riethmuller,G.,2012.Cancer Immunity,2012,12:12-18、Marvin等,Acta Pharmacologica Sinica.2005,26(6):649-658以及Schaefer等,PNAS.2011,108(27):11187-11192中所述的那些中的任一种,每个参考文献的内容以全文引用的方式并入本文。已开发出新一代BsMAb,称为“三功能双特异性”抗体。它们由两条重链和两条轻链组成,每条链来自两种不同的抗体,其中两个Fab区(臂)针对两种抗原,并且Fc区(足)包含两条重链并形成第三结合位点。

[0202] 在一些实施方案中,有效载荷可以编码包含单个抗原结合结构域的抗体。这些分子非常小,分子量为针对全尺寸mAb所观察到的分子量的约十分之一。其他抗体可包括来源于骆驼和美洲驼中存在的重链抗体的抗原结合可变重链区(VHH)的“纳米抗体”,其缺乏轻链(Nelson,A.L.,MAbs.2010.1月-2月;2(1):77-83)。

[0203] 在一些实施方案中,抗体可以“小型化”。mAb小型化的最佳示例为来自Trubion Pharmaceuticals的小模块免疫药物(SMIP)。这些分子可以是单价或二价的,是含有一个VL、一个VH抗原结合结构域和一个或两个恒定“效应子”结构域(所有这些都通过接头结构域连接)的重组单链分子。据推测,这种分子可能提供片段所要求的组织或肿瘤穿透增加的优点,同时保留了由恒定结构域赋予的免疫效应功能。至少有三个“小型化”SMIP已进入临床开发。TRU-015为与Wyeth合作开发的抗CD20 SMIP,是最先进的项目,已进展为类风湿性关节炎(RA)的第2期。系统性红斑狼疮(SLE)和B细胞淋巴瘤的早期尝试最终被中断。Trubion和Facet Biotechnology正合作开发TRU-016,其为抗CD37 SMIP,用于治疗CLL和其他淋巴瘤,这个项目已达到第2期。Wyeth已许可抗CD20 SMIP SBI-087用于治疗自身免疫疾病,包括RA、SLE和可能的多发性硬化症,但是这些项目仍处于临床试验的早期阶段。(Nelson,A.L.,MAbs,2010.1月-2月;2(1):77-83)。

[0204] 小型化抗体的一个示例被称为“单抗体”,在单抗体中铰链区已从IgG4分子中除去。虽然IgG4分子不稳定并且可彼此交换轻-重链异二聚体,但铰链区的缺失完全阻止重链-重链配对,留下高度特异性的单价轻/重异二聚体,同时保留了Fc区以确保体内稳定性和半衰期。这种配置可以最小化免疫活化或致癌生长的风险,因为IgG4与FcR的相互作用不佳,并且单价单抗体不促进细胞内信号传导复合物形成(参见例如,Nelson,A.L.,MAbs,2010.1月-2月;2(1):77-83)。

[0205] 在一些实施方案中,本发明的有效载荷可以编码单结构域抗体(sdAb或纳米抗

体),其为由单个单体可变抗体结构域组成的抗体片段。与完整抗体类似,它能够选择性结合至特异性抗原。在一个方面中,sdAb可以是“骆驼Ig”或“羊驼VHH”。如本文所用,术语“骆驼Ig”是指重链抗体的最小已知抗原结合单位(Koch-No lte等,FASEB J.,2007,21:3490-3498)。“重链抗体”或“羊驼抗体”是指含有两个VH结构域并且不含轻链的抗体(Riechmann L.等,J. Immunol. Methods,1999,231:25-38;国际专利公布号W01994/04678和W01994/025591;以及美国专利号6,005,079)。在另一方面,sdAb可为“免疫球蛋白新抗原受体”(IgNAR)。如本文所用,术语“免疫球蛋白新抗原受体”是指来自鲨鱼免疫组库的由一个可变新抗原受体(VNAR)结构域和五个恒定新抗原受体(CNAR)结构域的同二聚体组成的抗体的类别。IgNAR代表一些已知的最小的基于免疫球蛋白的蛋白支架并且并且是高度稳定的且具有有效的结合特征。固有稳定性可归因于(i)基础的Ig支架,与鼠抗体中存在的常规抗体VH和VL结构域相比,其呈现相当数量的带电和亲水性表面暴露的残基;以及(ii)互补决定区(CDR)环中的稳定结构特征部包括环内二硫桥和环内氢键的模式。

[0206] 在一些实施方案中,本发明的有效载荷可编码内抗体。内抗体为不从产生它的细胞分泌,而是靶向一种或多种细胞内蛋白的抗体形式。内抗体在细胞内表达且起作用,并且可用于影响多种细胞过程,包括但不限于细胞内运输、转录、翻译、代谢过程、增殖信号传导和细胞分裂。在一些实施方案中,本文所述的方法包括基于内抗体的疗法。在一些此类实施方案中,本文所公开的可变结构域序列和/或CDR序列并入了一种或多种构建体以用于基于内抗体的疗法。例如,内抗体可靶向一种或多种糖化的细胞内蛋白,或者可以调节一种或多种糖化的细胞内蛋白与替代蛋白质之间的相互作用。

[0207] 哺乳动物细胞的不同区室内抗体的细胞内表达允许阻断或调节内源分子的功能(Biocca等,EMBO J.1990,9:101-108;Colby等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.2004,101:17616-17621)。内抗体可以改变蛋白折叠,蛋白-蛋白、蛋白-DNA、蛋白-RNA相互作用和蛋白修饰。它们可以诱导表型敲除并通过直接结合靶抗原、通过转移其细胞内运输或通过抑制其与结合配偶体的结合而起到中和剂的作用。以对靶抗原的高特异性和亲和力,内抗体有利于阻断特定靶分子的某些结合相互作用,同时保留其他靶分子。

[0208] 来自供体抗体的序列可用于开发内抗体。内抗体常常重组表达为单结构域片段诸如分离的VH和VL结构域或表达为细胞内的单链可变片段(scFv)抗体。例如,内抗体常常表达为单多肽以形成单链抗体,其包含通过柔性接头多肽接合的重链和轻链的可变结构域。内抗体通常缺乏二硫键并且能够通过其特异性结合活性调节靶基因的表达或活性。单链内抗体常常由重组核酸分子表达并且被工程化成保留在细胞内(例如,保留在细胞质、内质网或周质中)。内抗体可以使用本领域中已知的方法产生,诸如在以下中公开和综述的那些:(Marasco等,PNAS,1993,90:7889-7893;Chen等,Hum.Gene Ther.1994,5:595-601;Chen等,1994,PNAS,91:5932-5936;Maciejewski等,1995,Nature Med.,1:667-673;Marasco,1995,Immunotech,1:1-19;Mhashilkar,等,1995,EMBO J.14:1542-51;Chen等,1996,Hum.Gene Therap.,7:1515-1525;Marasco,Gene Ther.4:11-15,1997;Rondon和Marasco,1997,Annu.Rev.Microbiol.51:257-283;Cohen,等,1998,Oncogene 17:2445-56;Proba等,1998,J.Mol.Biol.275:245-253;Cohen等,1998,Oncogene 17:2445-2456;Hassanzadeh,等,1998,FEBS Lett.437:81-6;Richardson等,1998,Gene Ther.5:635-44;Ohage和Steipe,1999,J.Mol.Biol.291:1119-1128;Ohage等,1999,J.Mol.Biol.291:1129-1134;Wirtz和

Steipe,1999,Protein Sci.8:2245-2250;Zhu等,1999,J.Immunol.Methods 231:207-222;Arafat等,2000,Cancer Gene Ther.7:1250-6;der Maur等,2002,J.Biol.Chem.277:45075-85;Mhashilkar等,2002,Gene Ther.9:307-19;以及Wheeler等,2003,FASEB J.17:1733-5;以及其中所引用的参考文献)。

[0209] 在一些方面,本发明的有效载荷可编码如美国专利号5,091,513中所述的生物合成抗体,其内容以全文引用的方式并入本文。此类抗体可包括构成表现为生物合成抗体结合位点(BABS)的区的氨基酸的一个或多个序列。位点包含:1)非共价缔合或二硫键键合的合成VH和VL二聚体;2)VH-VL或VL-VH单链,其中VH和VL通过多肽接头附接;或3)个体VH或VL结构域。结合结构域包含连接的CDR和FR区,其可来源于单独的免疫球蛋白。生物合成抗体还可以包括其他多肽序列,其例如充当酶、毒素、结合位点或与固定培养基或放射性原子的附接位点。公开了用于产生生物合成抗体、用于设计具有可通过体内抗体生成引起的任何特异性的BABS以及用于产生其类似物的方法。

[0210] 在一些实施方案中,有效载荷可以编码美国专利号8,399,625中教导的具有抗体受体框架的抗体。此类抗体受体框架可特别适合接受来自感兴趣的抗体的CDR。

[0211] 在一个实施方案中,抗体可以是条件活性的生物蛋白。抗体可用于生成在野生型正常生理条件下可逆或不可逆地失活的条件活性生物学蛋白以及此类条件活性生物学蛋白,并且提供了此类条件活性生物学蛋白的用途。此类方法和条件活性蛋白教导于例如国际公布号W02015175375和W02016036916以及美国专利公布号US20140378660,每个专利的内容以全文引用的方式并入本文。

[0212] 抗体制备

[0213] 抗体的制备,无论是单克隆抗体还是多克隆抗体,均为本领域中已知的。用于产生抗体的技术是本领域中熟知的并且描述于例如:Harlow和Lane“Antibodies,A Laboratory Manual”,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1988;Harlow和Lane“Using Antibodies:A Laboratory Manual”Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999以及“Therapeutic Antibody Engineering:Current and Future Advances Driving the Strongest Growth Area in the Pharmaceutical Industry”Woodhead Publishing,2012。

[0214] 可以使用重组多核苷酸产生如本文所述的抗体及其片段和变体。在一个实施方案中,多核苷酸具有编码抗体、其片段或变体中至少一者的模块化设计。作为非限制性示例,多核苷酸构建体可编码以下设计中的任一者:(1)抗体重链;(2)抗体轻链;(3)抗体重链和轻链;(4)通过接头分开的重链和轻链;(5)VH1、CH1、CH2、CH3结构域、接头和轻链;或(6)VH1、CH1、CH2、CH3结构域、VL区和轻链。这些设计中的任一者还可包含在任何结构域和/或区之间的任意的接头。本发明的多核苷酸可以工程化为使用本文所述的抗体或其组分部分作为起始分子产生任何标准类别的免疫球蛋白。

[0215] 重组抗体片段还可以使用本领域中熟知并且描述于例如Clackson等,1991,Nature 352:624-628;Marks等,1991,J.Mol.Biol.222:581-597中的技术从噬菌体抗体文库中分离。重组抗体片段可以来源于通过细菌中的重组生成的大噬菌体抗体文库(Sblattero和Bradbury,2000,Nature Biotechnology 18:75-80;其内容以全文引用的方式并入本文)。

[0216] 用于免疫疗法的抗体

[0217] 在一些实施方案中,本发明的有效载荷可以是特异于肿瘤特异性抗原(TSA)和肿瘤相关抗原(TAA)的抗体、其片段和变体。抗体在整个体内循环,直到它们发现并附接到TSA/TAA。一旦附接,它们便募集免疫系统的其他部分,增加ADCC(抗体依赖性细胞介导的细胞毒性)和ADCP(抗体依赖性细胞介导的吞噬作用)以破坏肿瘤细胞。如本文所用,术语“肿瘤特异性抗原(TSA)”是指在肿瘤细胞中产生的抗原物质,其可以在宿主生物体中引发抗肿瘤免疫应答。在一个实施方案中,TSA可为肿瘤新抗原。肿瘤抗原特异性抗体介导针对表达相同抗原的肿瘤细胞的补体依赖性细胞毒性应答。

[0218] 在一些实施方案中,肿瘤特异性抗原(TSA)、肿瘤相关抗原(TAA)、病原体相关抗原或其片段可以表达为肽或完整蛋白或其部分。完整蛋白或其部分可以是天然或诱变的。如本文所述的与癌症或病毒诱导的癌症相关的抗原是本领域中熟知的。此类TSA或TAA可先前与癌症相关,或者可以通过本领域中已知的任何方法鉴别。

[0219] 在一个实施方案中,抗原为CD19,其为在整个B细胞发展中表达的B细胞表面蛋白。CD19是熟知的B细胞表面分子,其在B细胞受体活化后增强B细胞抗原受体诱导的B细胞群的信号传导和扩增。CD19在正常和肿瘤B细胞中广泛表达。来源于B细胞的恶性肿瘤诸如慢性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病和许多非霍奇金淋巴瘤常常保留CD19表达。针对单细胞谱系的这种近乎普遍的表达和特异性使得CD19成为免疫疗法的有吸引力的靶标。人CD19具有14个外显子,其中外显子1-4编码CD19的细胞外部分,外显子5编码CD19的跨膜部分,并且外显子6-14编码细胞质尾。

[0220] 在一个实施方案中,本发明的有效载荷可以是特异于CD19抗原的抗体、其片段和变体。

[0221] 在一个实施方案中,本发明的有效载荷可以是FMC63抗体、抗体片段或变体。FMC63为特异于CD19抗原的IgG2a小鼠单克隆抗体克隆,其与B细胞谱系的细胞上的CD19抗原反应。由FMC63抗体识别的CD19的表位在外显子2中(Sotillo等(2015)Cancer Discov;5(12):1282-95;其内容以全文引用的方式并入本文)。在一些实施方案中,本发明的有效载荷可以是其他CD19单克隆抗体克隆,包括但不限于4G7、SJ25C1、CVID3/429、CVID3/155、HIB19和J3-119。

[0222] 在一些实施方案中,本发明的有效载荷可包括可变重链和可变轻链,其包含选自表4中的氨基酸序列。

[0223] 表4:可变重链和轻链序列

靶标	抗体链	SEQ ID NO	来源
CD19	VH	49	WO2016168773A3 中的 SEQ ID NO: 28
CD19	VH	50	WO2016168773A3 中的 SEQ ID NO: 29
CD19	VH	51	WO2016168773A3 中的 SEQ ID NO: 32
CD19	VH	52	WO2016168773A3 中的 SEQ ID NO: 33
CD19	VH	53	WO2016168773A3 中的 SEQ ID NO: 34
CD19	VH	54	WO2016168773A3 中的 SEQ ID NO: 35
CD19	VH	55	WO2016187349A1 中的 SEQ ID NO: 51

[0224]

[0225]

CD19	VH	56	US20160039942 中的 SEQ ID NO: 20
CD19	VH	57	WO2014184143 中的 SEQ ID NO. 1
CD19	VH	58	US20160145337A1 中的 SEQ ID NO. 5
CD19	VH	59	US20160319020 中的 SEQ ID NO: 15
CD19	VH	60	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 166
CD19	VH	61	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 167
CD19	VH	62	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 168
CD19	VH	63	EP3057991A1 中的 SEQ ID NO: 17
CD19	VH	64	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 172
CD19	VH	65	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 176
CD19	VH	66	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 177
CD19	VH	67	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 181
CD19	VH	68	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 183
CD19	VH	69	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 184
CD19	VH	70	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 185
CD19	VH	71	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 62
CD19	VH	72	WO2016097231 中的 SEQ ID NO: 62
CD19	VH	73	WO2016134284 中的 SEQ ID NO. 12
CD19	VH	74	US20160333114A1 中的 SEQ ID NO: 111
CD19	VH	75	US20160333114A1 中的 SEQ ID NO: 113
CD19	VH	76	EP3057994A1 中的 SEQ ID NO: 33
CD19	VH	77	EP3057994A1 中的 SEQ ID NO: 34
CD19	VH	78	EP3057994A1 中的 SEQ ID NO: 35
CD19	VH	79	WO2016120216 中的 SEQ ID NO. 53
CD19	VH	80	WO2016120216 中的 SEQ ID NO. 55
CD19	VK	81	US20160319020 中的 SEQ ID NO: 13
CD19	VK	82	US20160319020 中的 SEQ ID NO: 6
CD19	VL	83	WO2016168773A3 中的 SEQ ID NO: 27
CD19	VL	84	WO2016168773A3 中的 SEQ ID NO: 31
CD19	VL	85	WO2016187349A1 中的 SEQ ID NO: 49
CD19	VL	86	WO2016134284 中的 SEQ ID NO. 11
CD19	VL	87	US20140134142A1 中的 SEQ ID NO. 194
CD19	VL	88	WO2016120216 中的 SEQ ID NO. 54
CD19	VL	89	WO2016120216 中的 SEQ ID NO. 56
CD19	VL	90	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 13
CD19	VL	91	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 14
CD19	VL	92	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 15
CD19	VL	93	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 16
CD19	VL	94	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 17
CD19	VL	95	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 186
CD19	VL	96	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 187
CD19	VL	97	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 188
CD19	VL	98	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 189

[0226]	CD19	VL	99	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 192
	CD19	VL	100	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 196
	CD19	VL	101	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 197
	CD19	VL	102	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 198
	CD19	VL	103	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 199
	CD19	VL	104	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 200
	CD19	VL	105	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 201
	CD19	VL	106	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 202
	CD19	VL	107	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 203
	CD19	VL	108	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 204
	CD19	VL	109	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 205
	CD19	VL	110	US20160039942 中的 SEQ ID NO: 22
	CD19	VL	111	WO2016097231 中的 SEQ ID NO: 63
	CD19	VL	112	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 64
	CD19	VL	113	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 66
	CD19	VL	114	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 67
	CD19	VL	115	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 68
	CD19	VL	116	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 69
	CD19	VL	117	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 70
	CD19	VL	118	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 71
	CD19	VL	119	US20160152723 中的 SEQ ID NO: 91
	CD19	VL	120	US20160145337A1 中的 SEQ ID NO. 3
CD19	VL	121	US20160333114A1 中的 SEQ ID NO: 112	
CD19	VL	122	US20160333114A1 中的 SEQ ID NO: 114	

[0227] 肿瘤特异性抗原 (TSA) 可为肿瘤新抗原。新抗原为由于转录中改变蛋白编码序列的基因突变或改变而仅由肿瘤细胞表达的突变抗原,因此产生新颖的外来抗原。遗传变化是天然同源蛋白(即在正常细胞中表达的分子)的遗传取代、插入、缺失或任何其他遗传变化所引起。在CD19的背景下,已描述了新抗原,诸如缺乏外显子2或缺乏外显子5-6或两者的CD19的转录物变体(参见国际专利公布号W02016061368;其内容以全文引用的方式并入本文)。因为FMC63结合表位在外显子2中,所以缺乏外显子2的CD19新抗原不被FMC63抗体识别。因此,在一些实施方案中,本发明的有效载荷可包括FMC63不同的抗体或其片段。如本文所用,“FMC63不同的”是指在免疫学上具有特异性并且结合至不同或不类似于FMC63所结合的CD19抗原表位的CD19抗原表位的抗体或其片段。在一些情况下,本发明的抗体可包括识别CD19新抗原包括缺乏外显子2的CD19新抗原的CD19抗体、抗体片段或变体。在一个实施方案中,抗体或其片段在免疫学上特异于由外显子1、3和/或4编码的CD19。在一个示例中,抗体或其片段特异于桥接由外显子1编码的CD19的一部分和由外显子3编码的CD19的一部分的表位。

[0228] 嵌合抗原受体 (CAR)

[0229] 在一些实施方案中,本发明的有效载荷可为嵌合抗原受体 (CAR),当转导至免疫细胞(例如,T细胞和NK细胞)时,其可使免疫细胞重新指向表达由CAR的细胞外靶部分所识别的分子的靶标(例如,肿瘤细胞)。

[0230] 如本文所用,术语“嵌合抗原受体 (CAR)”是指在T细胞表面上模拟TCR的合成受体。

通常, CAR由细胞外靶向结构域、跨膜结构域/区和细胞内信号传导/活化结构域构成。在标准CAR受体中, 组分即细胞外靶向结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导/活化结构域线性构建为单融合蛋白。细胞外区包含识别特异性肿瘤抗原或其他肿瘤细胞表面分子的靶向结构域/部分(例如, scFv)。细胞内区可含有TCR复合物的信号传导结构域(例如, CD3 ζ 的信号区)和/或一个或多个共刺激信号传导结构域诸如CD28、4-1BB(CD137)和OX-40(CD134)的那些。例如, “第一代CAR”仅具有CD3 ζ 信号传导结构域。为了增强T细胞持久性和增殖, 加入共刺激细胞内结构域, 生成具有CD3 ζ 信号结构域加上一个共刺激信号传导结构域的第二代CAR以及具有CD3 ζ 信号结构域加上两个或更多个共刺激信号传导结构域第三代CAR。当由T细胞表达时, CAR使T细胞具有由CAR的细胞外靶向部分确定的抗原特异性。最近, 还需要加入一个或多个元件诸如归巢和自杀基因以开发更有能力并且更安全的CAR架构, 即所谓的第四代CAR。

[0231] 在一些实施方案中, 细胞外靶向结构域通过铰链(还称为空间结构域或间隔区)和跨膜区接合到细胞内信号传导结构域。铰链将细胞外靶向结构域连接到跨膜结构域, 跨膜结构域横穿细胞膜并连接到细胞内信号传导结构域。由于靶向部分结合的靶蛋白的大小以及靶向结构域本身的大小和亲和力, 可能需要改变铰链以优化CAR转化细胞对癌细胞的效力。在识别和靶向部分与靶细胞结合时, 细胞内信号传导结构域产生至CAR T细胞的活化信号, 其通过来自一个或多个细胞内共刺激结构域的“第二信号”被进一步放大。CAR T细胞一旦被活化, 就可破坏靶细胞。

[0232] 在一些实施方案中, 本发明的CAR可分裂成两个部分, 每个部分连接二聚化结构域连接, 使得引发二聚化的输入促进完整功能性受体的组装。Wu和Lim最近报道了分裂CAR, 在分裂CAR中细胞外CD19结合结构域和细胞内信号传导元件被分开并且连接到存在雷帕霉素类似物AP21967的情况下异二聚化的FKBP结构域和FRB*(FKBP-雷帕霉素结合的T2089L突变体)结构域。分裂受体在存在AP21967的情况下组装并且连同特异性抗原结合一起活化T细胞(Wu等, *Science*, 2015, 625(6258): aab4077)。

[0233] 在一些实施方案中, 本发明的CAR可被设计为诱导型CAR。Sakemura等最近报道了将Tet-On诱导型系统并入CD19 CAR构建体中。CD19 CAR仅在存在强力霉素(Dox)的情况下被活化。Sakemura报道了, 与常规CD19CAR T细胞相比, 在存在Dox的情况下Tet-CD19CAR T细胞对CD19⁺细胞系具有相等的细胞毒性并且在CD19刺激时具有相等的细胞因子产生和增殖(Sakemura等, *Cancer Immuno. Res.*, 2016年6月21日, 印刷版之前的电子版)。在一个示例中, 这种Tet-CAR可为在本发明的SRE(例如, DD)的控制下的效应模块的有效载荷。双系统为转导T细胞中CAR表达的开启和关闭提供了较大的灵活性。

[0234] 根据本发明, 本发明的有效载荷可为第一代CAR、或第二代CAR、或第三代CAR、或第四代CAR。包含CAR构建体的代表性效应模块实施方案示出于图13至图18中。在一些实施方案中, 本发明的有效载荷可为由细胞外结构域、铰链和跨膜结构域以及细胞内信号传导区构成的完整CAR构建体。在其他实施方案中, 本发明的有效载荷可以是完整CAR构建体的组分, 包括细胞外靶向部分、铰链区、跨膜结构域、细胞内信号传导结构域、一个或多个共刺激结构域以及改进CAR架构和功能性的其他额外元件包括但不限于前导序列、归巢元件和安全开关或此类组分的组合。

[0235] 由本发明的生物回路和组合物调控的CAR是可调的, 并由此提供若干优点。可逆的

通断开关机制实现由过量CAR-T细胞扩增引起的极性毒性的管理。使用本发明的SRE的脉冲CAR表达可以通过循环配体水平来实现。配体赋予的CAR调控可有效抵消由抗原损失诱导的肿瘤逃逸、避免由慢性抗原暴露所致的滋养信号传导引起的功能性衰竭并改进体内CAR表达细胞的持久性。

[0236] 在一些实施方案中,本发明的生物回路和组合物可用于下调CAR表达以限制由肿瘤溶解综合征引起的在靶组织上毒性。在抗肿瘤功效之后下调本发明的CAR的表达可以防止(1)由正常组织中抗原表达引起的在靶肿瘤外毒性,(2)体内抗原非依赖性活化。

[0237] 在一个实施方案中,选择具有较低亲和力的CAR可提供较多T细胞信号传导和较少毒性。

[0238] 细胞外靶向结构域/部分

[0239] 根据本发明,CAR的细胞外靶部分可为识别并且以高特异性核亲和力结合至给定靶分子例如肿瘤细胞上的新抗原的任何剂。靶部分可为特异性结合至肿瘤细胞上的靶分子的抗体及其变体、或基于与肿瘤细胞上的靶分子结合的能力选自随机序列池的肽适体、或可结合至肿瘤细胞行的靶分子的其变体或片段、或来自天然T细胞受体(TCR)的抗原识别结构域(例如,识别HIV感染细胞的CD4细胞外结构域)、或外来识别组分诸如导致携带细胞因子受体的靶细胞的识别的连接细胞因子、或受体的天然配体。

[0240] 在一些实施方案中,CAR的靶向结构域可为Ig NAR、Fab片段、Fab'片段、F(ab)'2片段、F(ab)'3片段、Fv、单链可变片段(scFv)、双-scFv、(scFv)₂、微抗体、双功能抗体、三功能抗体、四功能抗体、二硫键稳定的Fv蛋白(dsFv)、单抗体、纳米抗体或来源于特异性识别靶分子例如肿瘤特异性抗原(TSA)的抗原结合区。在一个实施方案中,靶向部分为scFv抗体。当在CAR T细胞表面上表达并随后与癌细胞上的靶蛋白结合时,scFv结构域能够将CAR T细胞维持在癌细胞附近并引发T细胞的活化。scFv可以使用例行的重组DNA科学技术生成,并在本发明中进行讨论。

[0241] 在一个实施方案中,CAR的靶向部分可识别CD19。CD19是熟知的B细胞表面分子,其在B细胞受体活化后增强B细胞抗原受体诱导的B细胞群的信号传导和扩增。CD19在正常和肿瘤B细胞中广泛表达。来源于B细胞的恶性肿瘤诸如慢性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病和许多非霍奇金淋巴瘤常常保留CD19表达。针对单细胞谱系的这种近乎普遍的表达和特异性使得CD19成为免疫疗法的有吸引力的靶标。人CD19具有14个外显子,其中外显子1-4编码CD19的细胞外部分,外显子5编码CD19的跨膜部分,并且外显子6-14编码细胞质尾。在一个实施方案中,靶向部分可包含来源于FMC63抗体可变区的scFv。FMC63为特异性于CD19抗原的IgG2a小鼠单克隆抗体克隆,其与B谱系的细胞上的CD19抗原反应。由FMC63抗体识别的CD19的表位在外显子2中(Sotillo等(2015)Cancer Discov;5(12):1282-95;其内容以全文引用的方式并入本文)。在一些实施方案中,CAR的靶向部分可来源于其他CD19单克隆抗体克隆的可变区,包括但不限于4G7、SJ25C1、CVID3/429、CVID3/155、HIB19和J3-119。

[0242] 在一些实施方案中,CAR的靶向部分可识别肿瘤特异性抗原(TSA),例如仅由肿瘤细胞表达的癌症新抗原,因为转录中的基因突变或改变改变了蛋白编码序列,因此产生新颖外来抗原。遗传变化是天然同源蛋白(即在正常细胞中表达的分子)的遗传取代、插入、缺失或任何其他遗传变化所引起。在CD19的背景下,TSA包括缺乏外显子2或缺乏外显子5-6或两者的人CD19的转录物变体(参见国际专利公布号W02016061368;其内容以全文引用的方

式并入本文)。因为FMC63结合表位在外显子2中,所以缺乏外显子2的CD19不被FMC63抗体识别。因此,在一些实施方案中,CAR的靶向部分可为FMC63不同的scFv。如本文所用,“FMC63不同的”是指在免疫学上具有特异性并且结合至不同或不类似于FMC63所结合的CD19抗原表位的CD19抗原表位的抗体、scFv或其片段。在一些情况下,靶向部分可识别缺乏外显子2的CD19抗原。在一个实施方案中,靶向部分识别由外显子1、3和/或4编码的CD19片段。在一个示例中,靶向部分识别桥接由外显子1编码的CD19的一部分和由外显子3编码的CD19的一部分的表位。

[0243] 在一些实施方案中,本发明的靶向部分可为包含表5中的氨基酸序列的scFv。

[0244] 表5:scFv序列

靶标	描述	SEQ ID NO	来源
CD19	scFv	123	EP3083671A1 中的 SEQ ID NO. 53
CD19	scFv	124	EP3083671A1 中的 SEQ ID NO. 54
CD19	scFv	125	WO2015157252 中的 SEQ ID NO. 1
[0245] CD19	scFv	126	WO2015157252 中的 SEQ ID NO. 10
CD19	scFv	127	WO2016033570 中的 SEQ ID NO. 10
CD19	scFv	128	WO2015157252 中的 SEQ ID NO. 11
CD19	scFv	129	WO2015157252 中的 SEQ ID NO. 12
CD19	scFv	130	WO2015157252 中的 SEQ ID

[0246]

			NO. 2
CD19	scFv	131	WO2016033570 中的 SEQ ID NO. 2
CD19	scFv	132	WO2016033570 中的 SEQ ID NO. 206
CD19	scFv	133	WO2016033570 中的 SEQ ID NO. 207
CD19	scFv	134	WO2016033570 中的 SEQ ID NO. 208
CD19	scFv	135	WO2016033570 中的 SEQ ID NO. 209
CD19	scFv	136	WO2016033570 中的 SEQ ID NO. 210
CD19	scFv	137	WO2016033570 中的 SEQ ID NO. 211
CD19	scFv	138	WO2016033570 中的 SEQ ID NO. 213
CD19	scFv	139	WO2016033570 中的 SEQ ID NO. 214
CD19	scFv	140	WO2016033570 中的 SEQ ID NO. 215
CD19	scFv	141	WO2016033570 中的 SEQ ID NO. 216
CD19	scFv	142	WO2016033570 中的 SEQ ID NO. 217
CD19	scFv	143	WO2016033570 中的 SEQ ID NO. 218
CD19	scFv	144	WO2016033570 中的 SEQ ID NO. 219
CD19	scFv	145	WO2016033570 中的 SEQ ID NO. 220
CD19	scFv	146	WO2016033570 中的 SEQ ID NO. 221
CD19	scFv	147	WO2016033570 中的 SEQ ID NO. 222
CD19	scFv	148	WO2016033570 中的 SEQ ID NO. 223
CD19	scFv	149	WO2016033570 中的 SEQ ID NO. 224
CD19	scFv	150	WO2016033570 中的 SEQ ID NO. 225
CD19	scFv	151	WO2015157252 中的 SEQ ID NO. 3
CD19	scFv	152	WO2015157252 中的 SEQ ID NO. 4
CD19	scFv	153	WO2016033570 中的 SEQ ID

[0247]

			NO. 4
CD19	scFv	154	WO2016033570 中的 SEQ ID NO. 45
CD19	scFv	155	WO2016033570 中的 SEQ ID NO. 47
CD19	scFv	156	WO2016033570 中的 SEQ ID NO. 49
CD19	scFv	157	WO2015155341A1 中的 SEQ ID NO. 5
CD19	scFv	158	WO2015157252 中的 SEQ ID NO. 5
CD19	scFv	159	WO2016033570 中的 SEQ ID NO. 51
CD19	scFv	160	WO2016033570 中的 SEQ ID NO. 53
CD19	scFv	161	WO2016033570 中的 SEQ ID NO. 55
CD19	scFv	162	WO2016033570 中的 SEQ ID NO. 57
CD19	scFv	163	WO2015157252 中的 SEQ ID NO. 59
CD19	scFv	164	WO2016033570 中的 SEQ ID NO. 59
CD19	scFv	165	WO2015157252 中的 SEQ ID NO. 6
CD19	scFv	166	WO2016033570 中的 SEQ ID NO. 6
CD19	scFv	167	WO2014184143 中的 SEQ ID NO. 7
CD19	scFv	168	WO2015157252 中的 SEQ ID NO. 7
CD19	scFv	169	WO2015157252 中的 SEQ ID NO. 8
CD19	scFv	170	WO2016033570 中的 SEQ ID NO. 8
CD19	scFv	171	WO2016033570 中的 SEQ ID NO. 87
CD19	scFv	172	WO2015157252 中的 SEQ ID NO. 9
CD19	scFv	173	WO2016139487 中的 SEQ ID NO.9
CD19	scFv	174	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 10
CD19	scFv	175	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 2
CD19	scFv	176	US20160152723 中的 SEQ ID

[0248]

			NO. 206
CD19	scFv	177	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 207
CD19	scFv	178	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 208
CD19	scFv	179	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 209
CD19	scFv	180	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 210
CD19	scFv	181	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 211
CD19	scFv	182	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 212
CD19	scFv	183	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 213
CD19	scFv	184	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 214
CD19	scFv	185	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 215
CD19	scFv	186	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 216
CD19	scFv	187	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 217
CD19	scFv	188	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 218
CD19	scFv	189	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 219
CD19	scFv	190	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 220
CD19	scFv	191	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 221
CD19	scFv	192	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 222
CD19	scFv	193	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 223
CD19	scFv	194	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 224
CD19	scFv	195	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 225
CD19	scFv	196	EP3083691A2 中的 SEQ ID NO. 32
CD19	scFv	197	EP3083691A2 中的 SEQ ID NO. 35
CD19	scFv	198	EP3083691A2 中的 SEQ ID NO. 38
CD19	scFv	199	US20160152723 中的 SEQ ID

[0249]

			NO. 4
CD19	scFv	200	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 45
CD19	scFv	201	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 47
CD19	scFv	202	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 49
CD19	scFv	203	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 51
CD19	scFv	204	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 53
CD19	scFv	205	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 55
CD19	scFv	206	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 57
CD19	scFv	207	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 59
CD19	scFv	208	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 6
CD19	scFv	209	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 8
CD19	scFv	210	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 87
CD19	scFv	211	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 89
CD19	scFv	212	WO2016109410 中的 SEQ ID NO. 39
CD19	scFv	213	EP3083671A1 中的 SEQ ID NO. 37
CD19	scFv	214	WO2016115482 中的 SEQ ID NO. 174
CD19	scFv	215	WO2012079000 中的 SEQ ID NO. 20
CD19	scFv	216	WO2015092024 中的 SEQ ID NO. 32
CD19	scFv	217	WO2015092024A2 中的 SEQ ID NO. 33
CD19	scFv	218	WO2015092024A2 中的 SEQ ID NO. 35
CD19	scFv	219	WO2015092024A2 中的 SEQ ID NO. 38
CD19	scFv	220	WO2016109410 中的 SEQ ID NO. 40
CD19	scFv	221	WO2016109410 中的 SEQ ID NO. 41
CD19	scFv	222	WO2016109410 中的 SEQ ID

[0250]

			NO. 42
CD19	scFv	223	WO2016109410 中的 SEQ ID NO. 43
CD19	scFv	224	WO2016109410 中的 SEQ ID NO. 44
CD19	scFv	225	WO2016109410 中的 SEQ ID NO. 45
CD19	scFv	226	WO2016109410 中的 SEQ ID NO. 46
CD19	scFv	227	WO2016109410 中的 SEQ ID NO. 47
CD19	scFv	228	WO2016109410 中的 SEQ ID NO. 48
CD19	scFv	229	WO2016109410 中的 SEQ ID NO. 49
CD19	scFv	230	WO2015155341A1 中的 SEQ ID NO. 5
CD19	scFv	231	WO2016109410 中的 SEQ ID NO. 50
CD19	scFv	232	WO2016109410 中的 SEQ ID NO. 51
CD19	scFv	233	US20160145337A1 中的 SEQ ID NO. 7
CD19	scFv	234	US20160145337A1 中的 SEQ ID NO. 9
CD19	scFv	235	US9499629B2 中的 SEQ ID NO.20
CD19	scFv	236	WO2015155341A1 中的 SEQ ID NO.6
CD19	scFv	237	WO2016164580 中的 SEQ ID NO.73
CD19	scFv	238	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 10
CD19	scFv	239	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 2
CD19	scFv	240	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 206
CD19	scFv	241	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 207
CD19	scFv	242	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 209
CD19	scFv	243	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 210
CD19	scFv	244	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 212
CD19	scFv	245	US20160152723 中的 SEQ ID

			NO. 216
CD19	scFv	246	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 218
CD19	scFv	247	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 219
CD19	scFv	248	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 220
CD19	scFv	249	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 221
CD19	scFv	250	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 222
CD19	scFv	251	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 223
CD19	scFv	252	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 224
CD19	scFv	253	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 225
CD19	scFv	254	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 4
CD19	scFv	255	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 45
[0251] CD19	scFv	256	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 47
CD19	scFv	257	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 49
CD19	scFv	258	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 51
CD19	scFv	259	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 53
CD19	scFv	260	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 55
CD19	scFv	261	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 57
CD19	scFv	262	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 59
CD19	scFv	263	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 6
CD19	scFv	264	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 8
CD19	scFv	265	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 87
CD19	scFv	266	US20160152723 中的 SEQ ID NO. 89
CD19	scFv	267	WO2016055551 中的 SEQ ID NO. 5

[0252] 细胞内信号传导结构域

[0253] 在结合至靶分子之后, CAR融合多肽的细胞内结构域将信号传输至免疫效应包, 活化免疫效应细胞的至少一种正常效应功能, 包括细胞溶解活性 (例如, 细胞因子分泌) 或辅

助活性。因此,细胞内结构域包含T细胞受体 (TCR) 的“细胞内信号传导结构域”。

[0254] 在一些方面,可采用整个细胞内信号传导结构域。在其他方面,可以使用细胞内信号传导结构域的截短部分代替完整链,只要其转导效应功能信号即可。

[0255] 在一些实施方案中,本发明的细胞内信号传导结构域可含有信号传导基序,其被称为基于免疫受体酪氨酸的活化基序 (ITAM)。含有细胞质信号传导序列的ITAM的示例包括来源于TCR CD3 ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的那些。在一个示例中,细胞内信号传导结构域为CD3 ζ 信号传导结构域。

[0256] 在一些实施方案中,本发明的细胞内区还包含一个或多个共刺激信号传导结构域,其向免疫效应细胞提供额外信号。这些共刺激信号传导结构域与信号传导结构域组合可以进一步改进CAR工程化免疫细胞(例如,CAR T细胞)的扩增、活化、记忆、持久性和肿瘤消灭效率。在一些情况下,共刺激信号传导区含有一个或多个细胞内信号传导和/或共刺激分子的1、2、3或4个细胞质结构域。共刺激信号传导结构域可以是共刺激分子的细胞内/细胞质结构域,包括但不限于CD2、CD7、CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40 (CD134)、CD30、CD40、ICOS (CD278)、GITR (糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体)、LFA-1 (淋巴细胞功能相关抗原-1)、LIGHT、NKG2C、B7-H3。在一个示例中,共刺激信号传导结构域来源于CD28的细胞质结构域。在另一个示例中,共刺激信号传导结构域来源于4-1BB (CD137) 的细胞质结构域。在另一个示例中,共刺激信号传导结构域可为GITR的细胞内结构域,如美国专利号9,175,308中所教导;其内容以全文引用的方式并入本文。

[0257] 在一些实施方案中,本发明的细胞内区可包含选自由以下组成的组的蛋白的功能性信号传导结构域:MHC I类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白样蛋白、细胞因子受体、整联蛋白、信号传导淋巴细胞活化蛋白 (SLAM) 诸如CD48、CD229、2B4、CD84、NTB-A、CRACC、BLAME、CD2F-10、SLAMF6、SLAMF7、活化NK细胞受体、BTLA、To11配体受体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、4-1BB (CD137)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS (CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM (LIGHTR)、SLAMF7、NKp80 (KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、IL15Ra、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、NKD2C SLP76、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELP76 (CD162)、LTBR、LAT、CD270 (HVEM)、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、与CD83特异性结合的配体、DAP 10、TRIM、ZAP70、杀伤免疫球蛋白受体 (KIRs) 诸如KIR2DL1、KIR2DL2/L3、KIR2DL4、KIR2DL5A、KIR2DL5B、KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DS3、KIR2DS4、KIR2DS5、KIR3DL1/S1、KIR3DL2、KIR3DL3和KIR2DP1;凝集素相关NK细胞受体诸如Ly49、Ly49A和Ly49C。

[0258] 在一些实施方案中,本发明的细胞内信号传导结构域可含有来源于JAK-STAT的信号传导结构域。在其他实施方案中,本发明的细胞内信号传导结构域可含有来源于DAP-12 (死亡相关蛋白12) 的信号传导结构域 (Topfer等, Immunol., 2015, 194: 3201-3212; 以及 Wang等, Cancer Immunol., 2015, 3: 815-826)。DAP-12为NK细胞中关键的信号转导受体。由DAP-12介导的活化信号在引发针对某些肿瘤细胞和病毒感染细胞的NK细胞细胞毒性应答

中起重要作用。DAP12的细胞质结构域含有基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)。因此,含有DAP12来源信号传导结构域的CAR可用于NK细胞的过继性转移。

[0259] 在一些实施方案中,用两种或更多种并入不同共刺激结构域的CAR工程化并且由不同DD调控的T细胞可用于提供下游信号传导的动力学控制。

[0260] 在一些实施方案中,本发明的细胞内结构域可包含表6的氨基酸序列。

[0261] 表6:细胞内信号传导和共刺激结构域

描述	氨基酸序列	氨基酸 SEQ ID
2B4 共刺激结构域	WRRKRKEKQSETSPKEFLTIYEDVKDLKTRRNH EQEQTFPGGGSTIYSMIQSQSSAPTSQEPAYTLYS LIQPSRKSGSRKRNRHSPSFNSTIYEVIGKSQPKAQ NPARLSRKELENFDVYS	268
CD27 共刺激结构域	HQRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTI PIQEDYRKPEPACSP	269
[0262] CD272(BTLA1)共刺激结构域	RRHQGKQNELSDTAGREINLVD AHLKSEQTEAS TRQNSQVLLSETGIYDNDPDL CFRMQEGSEVYS NPCLEENKPGVYASLNH SVIGPNSRLARNVKEA PTEYASICVRS	270
CD272(BTLA1)共刺激结构域	CCLRRHQGKQNELSDTAGREINLVD AHLKSEQT EASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDL CFRMQEGSE VYSNPCLEENKPGIVYASLNH SVIGPNSRLARNV KEAPTEYASICVRS	271
CD28 共刺激	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIHFWV	272
CD28 共刺激结构域	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF EEEEGGCEL	273

[0263]

CD28 共刺激结构域	FWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	274
CD28 共刺激结构域	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	275
CD28 共刺激结构域	RSKRSRGGHSDYIVINMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	276
CD28 共刺激信号传导区	MLRLLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDN AVNLSCKYSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCV VYGNYSQQLQVYSKTGFNC DGKLGNESVTFYL QNLVYNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNEKSNGTII HVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLVVGGVLAC YSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRR PGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	277
CD30 共刺激结构域	RRACRKRIRQKLHLCPVQTSQPKLELVDSRPR RSSTQLRSGASVTEPVAEERGLMSQPLMETCHS VGAAYLESPLQDASPAGGPSSPRDLPEPRVSTE HTNNKIEKIYIMKADTVIVGTVKAELPEGRGLA GPAEPELEEELEADHTPHYPEQETEPPLGSCSDV MLSVEEEGKEDPLPTAASGK	278
CD30 共刺激结构域	RRACRKRIRQKLHLCPVQTSQPKLELVDSRPR RSSTQLRSGASVTEPVAEERGLMSQPLMETCHS VGAAYLESPLQDASPAGGPSSPRDLPEPRVSTE HTNNKIEKIYIMKADTVIVGTVKAELPEGRGLA GPAEPELEEELEADHTPHYPEQETEPPLGSCSDV MLSVEEEGKEDPLPTAASGK	279
GITR 共刺激结构域	HIWQLRSQCMWPRETQLLLEVPSTEDARSCQF PEEERGERSAEEKGRLGDLWV	280
HVEM 共刺激结构域	CVKRRKPRGDVVKVIVSVQRKRQEAEGEATVIE ALQAPPDVTTVAVEETIPSFTGRSPNH	281
ICOS 共刺激结构域	TKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTD VTL	282
ICOS 共刺激信号传导结构域	CWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTD VTL	283
LAG-3 共刺激区	HLWRRQWRPRRFSALEQGIHPPQAQSKIEEELQ EPEPEPEPEPEPEPEPEPEPEQL	284
OX40 共刺激结构域	ALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQA DAHSTLAKI	285
OX40 共刺激结构域	RRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHST LAKI	286
4-1BB 细胞内结构域	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTIQEEDGCSCRFP EEEGGCEL	287
4-1BB 信号传导结构域	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGYEL	288
4-1BB-CD3 ζ 细胞内结构域	TGTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVTIL YCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR	289

[0264]

	FPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYN ELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	
4-1BB-Z 内结 构域融合物	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL NLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	290
CD127 细胞内 结构域	KRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKNLNVSF NPESFLDCQIHRVDDIQARDEVEGFLODTFPQQL EESKQRLGGDVQSPNCPSEDVVITPESFGRDSS LTCLAGNVSACDAPILSSSRSLDCRESGKNGPHV YQDLLLSLGTNSTLPPPFLQSGILTLPVAQG QPILTSLGSNQEAYVTMSSFYQNNQ	291
CD137 细胞内 结构域	RFSVVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPPEEEGGCEL	292
CD148 细胞内 结构域	RKKRKDAKNNEVSFSQIKPKKSKLIRVENFEAYF KKQQADSNCGFAEEYEDLKLVGISQPKYAAELA ENRGKNRYNNVLPYDISRVKLSVQTHSTDDYIN ANYMPGYHKKDFIATQGPLNTLKDFFWRMV WEKNVYAIIMLTKEVEQGRTKCEEYWPSKQAQ DYGDITVAMTSEIVLPEWTIRDFTVKNIQTSESH PLRQFHFTSWPDHGVPTDLDLLINFRYLVRDYM KQSPPEPILVHCSAGVGRGTGTFIAIDRLIYQIENE NTVDVYGIVYDLRMHRPLMVQTEDQYVFLNQ CVLDIVRSQKDSKVDLIYQNTTAMTIYENLAPV TTFGKTNGYIA	293
CD27 细胞内 结构域	QRRKYRSNKGESPVPAEPCHYSCPREEEGSTIPI QEDYRKPEPACSP	294
CD28 细胞内 结构域	FAAYRS	295
CD28 信号传 导链	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSR LLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAA YRS	296
CD28 信号传 导结构域	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP RDFAAAYS	297
CD28 信号传 导结构域	SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP RDFAAAYS	298
CD28 信号传 导结构域	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFP GPSKPFVVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWRS KRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP RDFAAAYS	299
CD28、4-1BB 和/或 CD3 ζ 信 号传导结构域	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP RDFAAAYRSRFSVVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQ TTQEEDGCSCRFPPEEEGGCELRVKFSRSADAPA YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM	300

[0265]

	KGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	
CD28/CD3C	AAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFGPSKPFWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFW VRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYA PPRDFAAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQ EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	301
CD28-0XZ 细 胞内结构域	RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPR DFAAYRSRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQA DAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL NLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	302
CD28-4-1BB 细胞内结构域	MFWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGR KLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCEL	303
CD28-4-1BB 细胞内结构域	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVK RGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE EEEGGCEL	304
CD28-CD3 ζ 细 胞内结构域	RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP RDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN LGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGL YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	305
CD28-CD3 ζ 细 胞内结构域	KRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPR DFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN LGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGL YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	306
CD3 δ 链细胞内 信号传导结构 域	MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDRV FVNCNTSITWVEGTGTLSDITRLDLGKRILDP RGYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVEL DPA TVAGIIVTDVIATLLLALGVFCFAGHET GRLSGA ADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQY SHLGGNWARNK	307
CD3 δ 链细胞内 信号传导结构 域	MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDRV FVNCNTSITWVEGTGTLSDITRLDLGKRILDP RGYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRTADTQALL RNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK	308
CD3 δ 链细胞内 信号传导结构 域	DQVYQPLRDRDDAQYSHLGGN	309
CD3 δ 细胞内结 构域	MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDRV FVNCNTSITWVEGTGTLSDITRLDLGKRILDP RGYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVEL DPA TVAGIIVTDVIATLLLALGVFCFAGHET GRLSGA	310

[0266]

	ADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNW ARNK	
CD3 δ 细胞内结构域	MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDRLFV NCNTSITWVEGTVGTLLSDITRLDLGKRILDRG IYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRTADTQALLRND QVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK	311
CD3 δ 细胞内结构域	DQVYQPLRDRDDAQYSHLGGN	312
CD3 ϵ 细胞内结构域	MQSGTHWRVVLGLCLLSVGVWGDGNEEMGGI TQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNI GGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCY PRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVA TIVIVDICITGGLLLVYYWSKNRKAKAKPVTR GAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPYRKGQR DLYSGLNQRRI	313
CD3 ϵ 细胞内结构域	NPDYEPYRKGQRDLYSGLNQR	314
CD3 γ 细胞内结构域	MEQGKGLAVLILAILLQGTLAQSIKGNHLVKVY DYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDGMIGFLTE DKKKWNLGSAKDPGRMYQCKGSQNKSKPLQ VYYRMCQNCIELNAATISGFLFAEIVSIFVLAVG VYFIAGQDGVQRASDKQTLLPNDQLYQPLK DREDDQYSHLQGNQLRRN,	315
CD3 γ 细胞内结构域	DQLYQPLKDREDDQYSHLQGN	316
CD3 γ 细胞内结构域	DQLYQPLKDREDDQYSHLQGN	317
CD3 γ 细胞内结构域	MEQGKGLAVLILAILLQGTLAQSIKGNHLVKVY DYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDGMIGFLTE DKKKWNLGSAKDPGRMYQCKGSQNKSKPLQ VYYRMCQNCIELNAATISGFLFAEIVSIFVLAVG VYFIAGQDGVQRASDKQTLLPNDQLYQPLK DREDDQYSHLQGNQLRRN	318
CD3 ζ 细胞内结构域	MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCY LLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQ NQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	319
CD3 ζ 细胞内结构域	MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCY LLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQ NQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKP QRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	320
CD3 ζ 细胞内结构域	MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCY LLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQ NQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKP QRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	321

[0267]

CD3 ζ 细胞内结构域	NQLYNELNLGRREEYDVLDKR	322
CD3 ζ 结构域 2(NM_000734. 3)	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQUALPPR	323
CD3 ζ 细胞内结构域	DGLYQGLSTATKDTYDALHMQ	324
CD3 ζ 细胞内结构域	RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD KMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQUALPPR	325
CD3 ζ 细胞内结构域	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPPEMGGKQRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQUALPPR	326
CD3 ζ 细胞内结构域	RSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQUALPPR	327
CD3 ζ 细胞内结构域	RVKFSRSADAPAYQQGEYDVLDKRRGRDPPEM GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUAL PPR	328
CD3 ζ 细胞内结构域	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEV DVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQUALPPR	329
CD3 ζ 细胞内结构域	MIPAVVLLLLLLVEQAAALGEPQLCYILDAILFL VGIVLTLVLCRLKIQRKAAITSYEKSRVKFSRS ADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA VSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQUALPPR	330
CD3 ζ 细胞内结构域	LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQUALPPR	331
CD3 ζ 细胞内结构域	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPPEMGGKQRRKNPQEGLY	332
CD3 ζ 细胞内结构域	LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPPEMGGKQRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQUALPPR	333
CD3 ζ 细胞内结构域	RRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQUALPPR	334
CD3 ζ 细胞内结构域	NQLYNELNLGRREEYDVLDKR	335

[0268]

构域		
CD3 ζ 细胞内结构域	EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK	336
CD3 ζ 细胞内结构域	DGLYQGLSTATKDTYDALHMQ	337
CD3 ζ 细胞内结构域	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQUALPPR	338
CD3 ζ 细胞内结构域	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQUALPPR	339
CD3 ζ 细胞内结构域	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQUALP	340
CD3 ζ 细胞内结构域	DPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSADAP AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPR	341
CD3 ζ 细胞内结构域	MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFLLDPKLCY LLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQ NQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	342
CD40 细胞内结构域	RSRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHST LAKI	343
CD79A 细胞内结构域	MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQAL WMHKVPASLMVSLGEDAHFQCPHNSSNNANV TWWRVLHGNYTWPPEFLGPGEDPNGTLIIQNV NKSHGGIYVCRVQEGNESYQQSCGTYLRVRQPP PRPFLDMGEGTKNRIITAEGIILLFCVVPGTLLL FRKRWQNEKLGLDAGDEYEDENLYEGLNLDDC SMYEDISRGLQGTYQDVGSLNIGDVQLEKP	344
CD79A 细胞内结构域	MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQAL WMHKVPASLMVSLGEDAHFQCPHNSSNNANV TWWRVLHGNYTWPPEFLGPGEDPNEPPRPFLD MGEGTKNRIITAEGIILLFCVVPGTLLLFRKRW QNEKLGLDAGDEYEDENLYEGLNLDDCSMYED ISRGLQGTYQDVGSLNIGDVQLEKP	345
CD79A 细胞内结构域	MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQAL WMHKVPASLMVSLGEDAHFQCPHNSSNNANV TWWRVLHGNYTWPPEFLGPGEDPNGTLIIQNV NKSHGGIYVCRVQEGNESYQQSCGTYLRVRQPP PRPFLDMGEGTKNRIITAEGIILLFCVVPGTLLL FRKRWQNEKLGLDAGDEYEDENLYEGLNLDDC SMYEDISRGLQGTYQDVGSLNIGDVQLEKP	346

[0269]

CD79A 细胞内结构域	ENLYEGLNLDDCSMYEDISRG	347
CD8 细胞内结构域	FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVL LLSLVITLYCNHRNR	348
CD8 细胞内结构域	FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVL LLSLVITLYCNHRNR	349
CD8a 细胞内结构域	PTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDI	350
CTLA4 细胞内结构域	AVSLSKMLKKRSPLTTGVFVKMAPTEAECEKQF QPYFIPIN	351
CTLA4 细胞内结构域	AVSLSKMLKKRSPLTTGVYMNMTPRRPECEKQ FQPYAPPRDFAAYS	352
DAP10 细胞内结构域	RPRRSPAQDGKVYINMPGRG	353
DAP12 细胞内结构域	MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDC SCSTVSPGVLGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRL VPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSD VYSDLNTQRPYYK	354
DAP12 细胞内结构域	MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDC SCSTVSPGVLGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRL VPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDV YSDLNTQRPYYK	355
DAP12 细胞内结构域	MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLG IVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAA TRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPY YK	356
DAP12 细胞内结构域	MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLG IVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAT RKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYY K	357
DAP12 细胞内结构域	MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDC SCSTVSPGVLGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRL VPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSD VYSDLNTQRPYYK	358
DAP12 细胞内结构域	MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDC SCSTVSPGVLGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRL VPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDV YSDLNTQRPYYK;	359
DAP12 细胞内结构域	MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLG IVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAA TRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPY YK	360
DAP12 细胞内结构域	MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLG IVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAT RKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYY K	361

DAPI2 细胞内结构域	ESPYQELQGQRSDVYSDLNTQ	362
DAPI2 细胞内结构域	ESPYQELQGQRSDVYSDLNTQ	363
GITR 细胞内结构域	RSQCMWPRETQLLLEVPSTEDARSCQFPEEER GERSAEEKGRLGDLWV	364
ICOS 细胞内结构域	TKKKYSSSVHDPNGEFMFMRAVNTAKKSRLTD VTL	365
IL15Ra 细胞内结构域	KSRQTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDL ENCSHHL	366
OX40-CD3 ζ 细胞内结构域	RRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHST LAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQG LSTATKDTYDALHMQUALPPR	367
ZAP70 细胞内结构域	MPDPA AHL PFFYGSISR AEAE EHLKLAGMADGL FLLRQCL RSLGGYVLSLVHDVRFHHPPIERQLN GTYAIAGGKAHCGPAELCEFYSRDPDGLPCNLR KPCNRPSGLEPQPGVFDCLRDAMVRDYVRQTW KLEGEALEQAIISQAPQVEKLIATTAHERMPWY HSSLTREEAERKLYSGAQT DGKFLLRPRKEQGT YALSLIYGKTVYHYLISQDKAGKYCIPEGTKFDT LWQLVEYLK LKADGLIYCLKEACPNSSASNASG AAAPTLP AHPSTLTHPQRRIDTLNSDGYTPEPARI TSPDKPRPMPMDTSVYESPYSDPEELKDKKFL KRDNLLIADIELGCGNFGSVRQGVYRMRKKQID VAIKVLKQGTEKADTEEMMREAQIMHQLDNPY IVRLIGVCQAEALMLVMEMAGGGPLHKFLVGK REEIPVSNVAELLHQVSMGMKYLEEKNFVHRD LAARNVLLVNRHYAKISDFGLSKALGADDSYYT ARSAGKWPLK WYAPECINFRKFSSRSVDWWSYG VTMWEALSYGQKPYKKMKGPEVMAFIEQGKR MECPPECPPELYALMSDCWIYKWEDRPDFTVE QRM RACYYSLASKVEGPPGSTQKAEAAACA	368
CD28 细胞内结构域	MLRLLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDN AVNLSCKYSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCV VYGNYSQQLQVYSKTGFNCDGKLGNESVTFYL QONLYVNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNEKSNGTII HVKGKHLCPSP LFPGPSKPFWVLVVGGVLAC YSLLVTVAFIIFWVR	369
4-1BB 细胞内结构域	MGNSCYNIVATLLLVLFERTRSLQDPCSNCPAG TFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQC KGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSM CEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGIC RPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLS PGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFL LFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQ EEDG	370

[0270]

[0271]	Fcε 受体 Iγ 链 细胞内结构域	MIPAVVLLLLLLVEQAAALGEPQLCYILDAILFL YGIVLTLLYCRLKIQRKAAITSYEKSDGVYTGL STRNQETYETLKHEKPPQ	371
	Fcε 受体 Iγ 链 细胞内结构域	DGVYTGLSTRNQETYETLKHE	372
	Fcε 受体 Iγ 链 细胞内结构域	DPKLCYILDAILFLYGIVLTLLYCRLKIQRKAAI TSYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQ	373
	Fcε 受体 Iγ 链 细胞内结构域	DGVYTGLSTRNQETYETLKHE	374

[0272] 跨膜结构域

[0273] 在一些实施方案中,本发明的CAR可包含跨膜结构域。如本文所用,术语“跨膜结构域(TM)”广泛地指跨越质膜的长度约15个残基的氨基酸序列。更优选地,跨膜结构域包括至少20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44或45个氨基酸残基并跨越质膜。在一些实施方案中,本发明的跨膜结构域可以来源于天然来源或合成来源。CAR的跨膜结构域可来源于任何天然膜结合或跨膜蛋白。例如,跨膜区可来源于T细胞受体的α、β或ζ链、CD3ε、CD4、CD5、CD8、CD8α、CD9、CD16、CD22、CD33、CD28、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD152或CD154(即,至少包括前述的一个或多个跨膜区)。

[0274] 可替代地,本发明的跨膜结构域可以是合成的。在一些方面,合成序列可主要包含疏水性残基诸如亮氨酸和缬氨酸。

[0275] 在一些实施方案中,本发明的跨膜结构域可选自由以下组成的组:CD8α跨膜结构域、CD4跨膜结构域、CD28跨膜结构域、CTLA-4跨膜结构域、PD-1跨膜结构域和人Ig_{G4} Fc区。作为非限制性示例,跨膜结构域可为:CTLA-4跨膜结构域,其包含国际专利公布号W02014/100385的氨基酸序列SEQ ID NO.:1-5;以及PD-1跨膜结构域,其包含国际专利公布号W02014100385的氨基酸序列SEQ ID NO.:6-8;每个专利的内容以引用的方式并入本文。

[0276] 在一些实施方案中,本发明的CAR可包含任选的铰链区(也称为间隔区)。铰链序列为短氨基酸序列,其有利于细胞外靶向结构域的柔性,从而将靶结合结构域远离效应细胞表面移动以实现正确的细胞/细胞接触、靶结合和效应细胞活化(Patel等, Gene Therapy, 1999;6:412-419)。铰链序列可安置于靶向部分与跨膜结构域之间。铰链序列可为来源于或获自任何合适分子的任何合适序列。铰链序列可来源于全部或部分免疫球蛋白(例如, IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)铰链区,即落在免疫球蛋白的CH1与CH2结构域之间的序列,例如 IgG4 Fc铰链,1型膜蛋白诸如CD8αCD4、CD28和CD7的细胞外区,其可为野生型序列或衍生物。一些铰链区包括免疫球蛋白CH3结构域或者CH3结构域和CH2结构域两者。在某些实施方案中,铰链区可以从IgG1、IgG2、IgG3或IgG4修饰,其包括一个或多个氨基酸残基例如1、2、3、4或5个残基,用不同于未修饰铰链中存在的氨基酸进行取代。表7提供了可用于本文所述CAR的各种跨膜区。

[0277] 表7:跨膜结构域

跨膜结构域	氨基酸序列	SEQ ID NO.
CD8 跨膜结构域	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDI	375
2B4 跨膜结构域	FLVIIVILSALFLGLTACFCV	424
4-1BB 跨膜结构域	IISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGR	376
4-1BB 跨膜结构域	IISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVV	377
CD134(OX40)跨膜结构域	VAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLL	378
[0278] CD148 跨膜和胞内结构域	AVFGCIFGALVIVTVGGFIFWRKKRKA KNEVSFSQIKPKKSKLIRVENFEAYFKKQ QADSNCGFAEEYEDLKLVGISQPKYAA ELAENRGKNRYNNVLPYDISRVKLSVQ THSTDDYINANYMPGYHKKDFIATQGP LPNTLKDFWRMVWEKNVYAIIMLTKCVE QGRTKCEEYWPSKQAQDYGDITVAMTSE IVLPEVVTIRDFTVKNIQTSESHPLRQ FHFTSWPDHGVDPDITDLLINFRYLVRD YMKQSPPEPILVHCSAGVGRGTGFIAID RLIYQIENENTVDVYGIVYDLRMHRPLM VQTEDQYVFLNQCVLDIVRSQKDSKVDL IYQNTTAMTIYENLAPVTTFGKTNGYIA	379

[0279]

CD148 跨膜结构域	AVFGCIFGALVIVTVGGFIFW	380
CD2 跨膜结构域	KEITNALETWGALGQDINLDIPSFQMSDDIDDI KWEKTSDDKKIAQFRKEKETFKDKDYKLFK NGTLKIKHLKTDDQDIYKVSIDYDTKGKNVLE KIFDLKIQERVSQPKISWTCINTTTLCEVMNGT DPELNLYQDGKHLKLSQRVITHKWTTSLSAKF KCTAGNKVSKESSVEPVSCPEKGLD	381
CD28 跨膜和细胞内结构域	IEVMYPPPYLDNEKSNGTITHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFVVLVVVGGVLAACYSLLVTVAFI FWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAYRS	382
CD28 跨膜结构域	FWVLVVVGGVLAACYSLLVTVAFIIFWV	383
CD28 跨膜结构域	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFVVLVVVGGVLAACYSLLVTVAF IIFWV	384
CD28 跨膜结构域	IFWVLVVVGGVLAACYSLLVTVAFIIFWV RSKR	385
CD28 跨膜结构域	FWVLVVVGGVLAACYSLLVTVAFIIFWV RSKRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYP YAPPRDFAAYRS	386
CD28 跨膜结构域	MFWVLVVVGGVLAACYSLLVTVAFIIFWV	387
CD28 跨膜结构域	FWVLVVVGGVLAACYSLLVTVAFHFVW	388
CD28 跨膜结构域	FWVLVVVGGVLAACYSLLVTVAFIIFWV RSKRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKH YQAYAAARDFAYRS	425
CD28 跨膜结构域	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFVVLVWGGVLAACYSLLVTVAF IIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTR KHYPYAPPRDFAAYRS	897
CD28 跨膜结构域	MFWVLVVVGGVLAACYSGGVTVAFIIFWV	389
CD28 跨膜结构域	WVLVVVGGVLAACYSLLVTVAFIIFWV	390
CD28 跨膜结构域	FWVLVVVGGVLAACYSLLVTVAFIIFWV R	898
CD28 跨膜结构域	PFWVLVVVGGVLAACYSLLVTVAFIIFWV RSKRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAYRS	391
CD28 跨膜结构域以及 CD28 和 CD3 ζ 细胞内结构域	FWVLVVVGGVLAACYSLLVTVAFIIFWV RSKRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAY QQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR	392
CD28 跨膜结构域以及 CD28、OX40 和 CD3 ζ 细胞内结构域	FWVLVVVGGVLAACYSLLVTVAFIIFWV RSKRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAYRSRDQRLPPDA HKPPGGGSRFTPIQEEQADAHST LAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQL YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA EAYSEIGMKGERRRG	393

	KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	
CD28 跨膜结构域 和 CD3 ζ 细胞内结构域	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRRVKF SRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD KMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQALPPR	394
CD28 跨膜-CD3 ζ 信号传导结构域 ("28z")	AAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP SPLFPGSKPFVWLVVVGGVLACYSLLVTVAF IIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHY QPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQN QLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL PPR	395
CD3 ζ 跨膜结构域	LCYLLDGILFIYGVILTALFLRV	396
CD3 ζ 跨膜结构域	MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLC YLLDGILFIYGVILTALFL	397
CD3 ζ 跨膜结构域	LCYLLDGILFIYGVILTALFL	398
CD4 跨膜结构域	ALIVLGGVAGLLLFIGLGIFFCVRC	399
CD4 跨膜结构域	MALIVLGGVAGLLLFIGLGIFF	400
CD45 跨膜和细胞 内结构域	ALIAFLAFLIIVTSIALLVVLYKIYDLHKKRSCN LDEQQELVERDDEKQLMNVPIHADILLETYK RKIADEGRLFLAEFQSIPRVFSKFPIKEARKPFN QKNRYVDILPYDYNRVELSEINGDAGSNYIN ASYIDGFKEPRKYIAAQGPRDETVDDFWRMI WEQKATVIVMVTRCEEGRNKNCAEYWPSME EGTRAFGDVVVKINQHKRCPDYIIQKLNIVNK KEKATGREVTHIQFTSWPDHGVPEDPHLLLKL RRRVNAFSNFFSGPIWHCSAGVGRGTGYIGID AMLEGLEAENKVDVYGYVVKLRRQRCLMV QVEAQYILIHQALVEYNQFGETEVNLSELHPY LHNMKKRDPPSEPSPLAEFQRLPSYRSWRTQ HIGNQEENKSKNRNSNVIPYDYNRVPLKHELE MSKESEHDSDESSDDSDSEEPSKYINASFIMS YWKPEVMIAAQGPLKETIGDFWQMIFQRKVK VIVMLTELKHGDQEICAQYWGEKQTYGDIE VDLKDSDKSSTYTLRVFELRHSKRKDSRTVY QYQYTNWSVEQLPAEPKELISMIQWKQLPQ KNSSEGKHHKSTPLLIHCRDGSQQTGIFCAL LNLLESAETEEWDIFQWKALRKARPGMVSTF EQYQFLYDVIASSTYPAQNGQVKKNNHQEDKI EFDNEVDKVKQDANCVNPLGAPEKLPEAKEQ AEGSEPTSGTEGPEHSVNGPASPALNQGS	401
CD62L 跨膜结构 域	PLFIPVAVMVTAFSGLAFIIWLA	402
CD7 跨膜结构域	ALPAALAVISFLLGLGLGVACVLA	403
CD8 跨膜结构域	MALPVTALLLPLALLHAARP	404
CD8 跨膜结构域	AAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS	405

[0280]

[0281]

和 CD28 信号传导结构域	LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRFSVVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS CRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	
CD8 跨膜结构域-CD137(4-1BB)信号传导结构域和 CD3 ζ 信号传导结构域(“BBz”)	AAATTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	406
CD8a 跨膜结构域	FVPVFLPAKPTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN	407
CD8a 跨膜结构域	IWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	408
CD8a 跨膜结构域	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	409
CD8a 跨膜结构域	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCR	410
CD8a 跨膜结构域	PTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCN	411
CD8a 跨膜结构域	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLVCR	412
CD8a 跨膜结构域	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT	413
CD8a 跨膜结构域	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY	414
CD8a 跨膜结构域(NP 001139345.1)	TPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRR	899
CD8b 跨膜结构域	LGLLVAGVLVLLVSLGVVAIHLCC	900
DAP10 跨膜结构域	ILLAGLVAADAVASLLIVGAVFLCARR	901
EpoR 跨膜结构域	APVGLVARLADESGHVVLRLWLPPEPMTSHIRYEVDSAGNGAGSVQRVEILEGRTECVLSNLRGRTRYTFAVRARMAEPSFGGFWSAWSEPVSLLTPSD	415
FcERI a 跨膜结构域	FFIPLLVLFAVDTGLFISTQQQVTFLLKIKRTRKGFRLLNPHPKPNPKNN	416
FcERI a-跨膜结构域	MAPAMESPTLLCVALLFFAPDGVLA VPQKPKVSLNPPWNRIFKGENVTLCNGNFFEVSSTKWFHNGSLSEETNSSLNIVNAKFEDSGEYKQHQQVNESEPVYLEVFSDWLLLQASAEVVMEGQPLFLRCHGWRNWDVYKVIYYKDGEALKYWYENHNISITNATVEDSGTYCTGK VWQLDYESEPLNITVIKAPREKYWLQFFIPLLVLFAVDTGLFISTQQQVTFLLKIKRTRKGFRLLNPHPKPNPK	417

	NN	
FcERI b-跨膜区	MDTESNRRANLALPQEPSSVPAFEVLEISPQEV SSGRLKLSASSPPLHTWLTVLKKEQEFLGVTQ ILTAMICLCFGTVVCSVLDISHIEGDIFSSFKAG YPFWGAIFFSISGMLSIISERRNATYLVRGSLG ANTASSIAGGTGITILIINLKKSLAYIHIHSCQKF FETKCFMASFSTEIVVMMLFLTILGLGSAVSLT ICGAGEELKGNKVPEDRVYEELNIYSATYSEL EDPGEMSPPIDL	418
FcERI g-跨膜区	MIPAVVLLLLLLVEQAAALGEPQLCYILDAILF LYGIVLTLLYCRKLIQVRKAAITSYEKSDGVYT GLSTRNQETYETLKHEKPPQ	419
FceRI a 跨膜结构域	DIFIPLLVVILFAVDTGLFISTQQQVTFLLKIKRT RKGFRLLNPHPKPNPKNNR	420
GITR 跨膜结构域	PLGWLTVVLLAVAACVLLLLTSAQLGLHIWQL	421
Her2 跨膜结构域	SIISAVVGILLVVVLGVVFGILII	422
[0282] Her2 跨膜结构域	CHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDP PFCVARCPSGVKPDLSYMPIWKFPDEEGACQP CPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTSIISAV VGILLVVVLGVVFGILI	423
ICOS 跨膜结构域	FWLPIGCAAFVVVCILGCILI	902
IgG1 跨膜结构域	EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKD TLMIAARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGKKD	903
LAG-3 跨膜结构域	LLFLILGVLSLLLLVTGAFGF	904
OX40 跨膜结构域	VAILGLGLVLGLLGPLAILL	905
PD-1 跨膜结构域	VGWGGLLGLSVLLVWVLAVI	906
跨膜结构域	FWALVVVAGVLFYGLLVTVALCVIWT	907

[0283] 可用于本发明的铰链区序列提供于表8A中。

[0284] 表8A:铰链区

铰链结构域	氨基酸序列	SEQ ID NO.
[0285] 铰链	DKTHT	426
铰链	CPPC	427
铰链	CPEPKSCDTPPPCPR	428
铰链	ELKTPLGDTTHT	429

[0286]

铰链	KSCDKTHTCP	430
铰链	KCCVDCP	431
铰链	KYGPPCP	432
C233P 铰链	VEPKSPDKTHTCPPCP	433
C233S 铰链	LDPKSSDKTHTCPPCP	434
CD28 铰链	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLP GPSKP	435
CD8a 铰链	GGAVHTRGLDFA	436
CD8a 铰链	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACD	437
CD8a 铰链	AKPTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG GAVHTRGLDFACD	438
CD8a 铰链	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACD	439
CD8a 铰链	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACD	440
CD8a 铰链	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSV FLFPPKPKDT	441
CD8a 铰链	PAKPTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA GGAVHTRGLDFACDIY	442
CD8a 铰链	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	443
CD8a 铰链	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACD	444
CD8a 铰链	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIY	445
$\delta 5$ 铰链	LDKTHTCPPCP	446
EpoR 铰链	APVGLVARLADESGHVVLRLWLPPEPMTSHIR YEVDVSAGNGAGSVQRVEILEGRTECVLSNLRG RTRYTFAVRARMAEPSFGGFWSAWSEPVSLLTPS D	447
FCRII α 铰链	GLAVSTISSFFPPGYQ	448
Fc γ RIII α 铰链	GLAVSTISSFFPPGYQ	449
铰链	RWPESPKAQASSVPTAQQAEGSLAKATTAPATT RNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHT QPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLK DAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQ HSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSSLPPQRLMA LREPAAQAPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEV SGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPG STTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRT LLNASRSLEVSyvTDH	450
铰链	YVTVSSQDPAEPKSPDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF	451

[0287]

	YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPK	
铰链	KPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA	452
铰链	LEPKSCDKTHTCPPCP	453
铰链	KPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD	454
铰链	EPKSCDKTHTCPPCP	455
铰链	ELKTPLGDTHTCPRCP	456
铰链	EPKSCDTPPPCPRCP	457
铰链	ESKYGPPCPSPC	458
铰链	ERKCCVECPCP	459
铰链 (CH2-CH3)	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	460
铰链(CH3)	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLGK	461
IgD 铰链	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATT RNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHT QPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLK DAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQ HSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMA LREPAAQAPVKLSLNLLASSDPPEAASWLLCEV SGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPG STTFWAWSVLRVPAPPSQPATYTCVVSHEDSRT LLNASRSLEVSyvTDH	462
IgD 铰链	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATT RNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHT QPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLK DAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQ HSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALR EPAAQAPVKLSLNLLASSDPPEAASWLLCEVSG FSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGST TFWAWSVLRVPAPPSQPATYTCVVSHEDSRTLL NASRSLEVSyvTDH	463
IgD 铰链	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATT RNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHT QPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLK DAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQ HSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMA LREPAAQAPVKLSLNLLASSDPPEAASWLLCEV SGFSPPNILLMVVLEDQREVNTSGFAPARPPPQP	464

[0288]

	GSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSR TLLNASRSLEVSyvTDH	
IgD 铰链	ESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNT GRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTP	465
IgD 铰链	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATT RNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHT QPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLK DAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQ HSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMA LREPAAQAPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEV SGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPG STTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRT TLLNASRSLEVSyvTDH	466
IgD 铰链	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATT RNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHT QPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLK DAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQ HSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMA LREPAAQAPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEV SGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPG STTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRT TLLNASRSLEVSyvTDH	467
IgD 铰链	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATT RNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHT QPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLK DAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQ HSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMA LREPAAQAPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEV SGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPG STTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRT TLLNASRSLEVSyvTDH	468
IgD 铰链	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATT RNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHT QPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLK DAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQ HSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMA LREPAAQAPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEV SGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPG STTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRT TLLNASRSLEVSyvTDH	469
IgG1(CH2CH 3)铰链结构域	AEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDT LMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVUTV LHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK KD	470
IgG1(CH2CH 3)铰链结构域	AEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDT LMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV	471

[0289]

	EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK KD	
IgG1 铰链	AEPKSPDKTHTCPPCPKDPK	472
IgG1 铰链	EPKSCDKTHTCPPCP	473
IgG1 铰链	EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEVKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKK D	474
IgG1 铰链	SVFLFPPKPKDTL	475
IgG1 铰链	EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	476
IgG1 铰链	EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKK DPK	477
IgG1 铰链	VECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	478
IgG1 铰链 (CH2CH3 结 构域)	DPAEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPK DTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGKK	479
IgG2 铰链	ERKCCVECPCP	480
IgG3 铰链	ELKTPLGDTTHTCPRCP	481

[0290]

IgG3 铰链	ELKTPLGDTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKS CDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP	482
IgG4(CH2 和 CH3)	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGKM	483
IgG4(CH2 和 CH3)	ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGKM	484
IgG4 铰链	SPNMVPHAHAHQ	485
IgG4 铰链	GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQK LSLSLGLGK	486
IgG4 铰链	ESKYGPPCPPCPGGSSGGSSGGGQPREPQVYTL PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	487
IgG4 铰链	ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVH QAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFVPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	488
IgG4 铰链	ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVH QAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFVPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	489
IgG4 铰链	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGKM	490
IgG4 铰链	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTG CCCT	491
IgG4 铰链	ESKYGPPCPPCP	492

[0291]

IgG4 铰链	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLGK	493
IgG4 铰链	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	494
IgG4 铰链	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	495
IgG4 铰链	ESKYGPPCPPCP	496
IgG4 铰链	YGPPCPPCP	497
IgG4 铰链	KYGPPCPPCP	498
IgG4 铰链	EVVKYGPPCPPCP	499
IgG4 铰链	ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDLRSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	500
IgG4 铰链和 接头	ESKYGPPCPPCPGGGSSGGSG	501
IgG1 铰链	EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTIPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	502
IgG1 铰链	EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTIPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	503
IgG1 铰链	EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQV	504

[0292]	YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
--------	--

[0293] 可用于本发明的铰链和跨膜区序列提供于表8B中。

[0294] 表8B:铰链和跨膜区

铰链结构域	氨基酸序列	SEQ ID NO.
CD8a 跨膜和铰链	TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH TRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	505
CD8a 跨膜和铰链	DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDHINNWLA WYQQKPGNAPRLLISGATSLETGVPSRFSGSGSG KDYTLSITSLQTEDVATYYCQQYWSTPFTFGSGT KLEIKGGGSGGGGSGGGGSQVQLKESGPGLVA PSQLSITSTVSGFSLSRYSVHWVRQPPGKGLEW LGMWGGGSTDYNALKSRLSISKDNSKSQVFL KMNSLQTDDTAMYCCARNEGDTTAGTWFAYW GQGLTVTVSS	506
CD8a 跨膜和铰链	ALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTI ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD	507
CD8a 跨膜和铰链	TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLY	508
CD8a 跨膜和铰链	KPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITL Y	509

[0296] 在一些实施方案中,本发明的CAR可包含在CAR的任一结构域之间的一个或多个接头。接头的长度可在1-30个氨基酸之间。就这一点而言,接头的长度可为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸。在其他实施方案中,接头可为柔性的。

[0297] 在一些实施方案中,包括本发明的靶向部分、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域的组分可以在单融合多肽中构建。融合多肽可为本发明的效应模块的有效载荷。在一些实施方案中,效应模块中可包括多于一个CAR融合多肽,例如在单SRE(例如DD)的控制下,效应模块中可包含包括两个、三个或更多个CAR。包含CAR有效载荷的代表性效应模块示出在图2至图6中。

[0298] 在一些实施方案中,CAR序列可选自表9。

[0299] 表9:CAR序列

[0300]

描述	SEQ ID NO	来源
CD19 CAR	510	US9499629B2 中的 SEQ ID NO: 12
CD19 CAR	511	US20160333108A1 中的 SEQ ID NO: 24
CD19 CAR	512	US20160333108A1 中的 SEQ ID NO: 25
CD19 CAR	513	US20160333108A1 中的 SEQ ID NO: 26
CD19 CAR	514	US20160333108A1 中的 SEQ ID NO: 27
CD19 CAR	515	EP2997134A4 中的 SEQ ID NO: 1
CD19 CAR	516	EP3071687A1 中的 SEQ ID NO: 19
CD19 CAR	517	EP3071687A1 中的 SEQ ID NO: 20
CD19 CAR	518	WO2016168773A3 中的 SEQ ID NO: 181
CD19 CAR	519	WO2015157399A9 中的 SEQ ID NO: 2
CD19 CAR	520	WO2016174409A1 中的 SEQ ID NO: 56
CD19 CAR	521	WO2016174409A1 中的 SEQ ID NO: 62
CD19 CAR	522	WO2016179319A1 中的 SEQ ID NO: 145
CD19 CAR	523	US20160311907A1 中的 SEQ ID NO: 293
CD19 CAR	524	US20160311907A1 中的 SEQ ID NO: 294
CD19 CAR	525	US20160311907A1 中的 SEQ ID NO: 295
CD19 CAR	526	US20160311907A1 中的 SEQ ID NO: 296
CD19 CAR	527	US20160311907A1 中的 SEQ ID NO: 297
CD19 CAR	528	US20160311907A1 中的 SEQ ID NO: 298
CD19 CAR	529	WO2013176915A1 中的 SEQ ID NO. 73
CD19 CAR	530	WO2013176916A1 中的 SEQ ID NO. 73
CD19 CAR	531	US20130315884A1 中的 SEQ ID NO. 73
CD19 CAR	532	US20140134142A1 中的 SEQ ID NO. 73
CD19 CAR	533	US20150017136A1 中的 SEQ ID NO. 73
CD19 CAR	534	US20150203817A1 中的 SEQ ID NO. 73
CD19 CAR	535	US20160120905A1 中的 SEQ ID NO. 73
CD19 CAR	536	US20160120906A1 中的 SEQ ID NO. 73
CD19 CAR	537	WO2015124715 中的 SEQ ID NO. 8
CD19 CAR	538	WO2015124715 中的 SEQ ID NO. 5
CD19 CAR	539	WO2014184744 中的 SEQ ID NO. 73
CD19 CAR	540	WO2014184741 中的 SEQ ID NO. 73
CD19 CAR	541	US20160145337A1 中的 SEQ ID NO. 14
CD19 CAR	542	US20160145337A1 中的 SEQ ID NO. 15

[0301]

CD19 CAR	543	WO2014184143 中的 SEQ ID NO. 14
CD19 CAR	544	WO2014184143 中的 SEQ ID NO. 15
CD19 CAR	545	WO2015075175 中的 SEQ ID NO. 15
CD19 CAR	546	WO2015075175 中的 SEQ ID NO. 16
CD19 CAR	547	US20160145337A1 中的 SEQ ID NO. 16
CD19 CAR	548	WO2014184143 中的 SEQ ID NO. 16
CD19 CAR	549	WO2012079000 中的 SEQ ID NO. 12
CD19 CAR	550	WO2016164580 中的 SEQ ID NO.31
CD19 CAR	551	WO2016164580 中的 SEQ ID NO.32
CD19 CAR	552	WO2016164580 中的 SEQ ID NO.33
CD19 CAR	553	WO2016164580 中的 SEQ ID NO.34
CD19 CAR	554	WO2016164580 中的 SEQ ID NO.35
CD19 CAR	555	WO2016164580 中的 SEQ ID NO.36
CD19 CAR	556	WO2016164580 中的 SEQ ID NO.37
CD19 CAR	557	WO2016164580 中的 SEQ ID NO.38
CD19 CAR	558	WO2016164580 中的 SEQ ID NO.39
CD19 CAR	559	WO2016164580 中的 SEQ ID NO.40
CD19 CAR	560	WO2016164580 中的 SEQ ID NO.41
CD19 CAR	561	WO2016164580 中的 SEQ ID NO.42
CD19 CAR	562	WO2016164580 中的 SEQ ID NO.58
CD19 CAR	563	US20160296563A1 中的 SEQ ID NO: 14
CD19 CAR	564	US20160296563A1 中的 SEQ ID NO: 15
CD19 CAR	565	WO2015157252 中的 SEQ ID NO.31
CD19 CAR	566	WO2015157252 中的 SEQ ID NO.32
CD19 CAR	567	WO2015157252 中的 SEQ ID NO.33
CD19 CAR	568	WO2015157252 中的 SEQ ID NO.34
CD19 CAR	569	WO2015157252 中的 SEQ ID NO.35
CD19 CAR	570	WO2015157252 中的 SEQ ID NO.36
CD19 CAR	571	WO2015157252 中的 SEQ ID NO.37
CD19 CAR	572	WO2015157252 中的 SEQ ID NO.38
CD19 CAR	573	WO2015157252 中的 SEQ ID NO.39
CD19 CAR	574	WO2015157252 中的 SEQ ID NO.40
CD19 CAR	575	WO2015157252 中的 SEQ ID NO.41
CD19 CAR	576	WO2015157252 中的 SEQ ID NO.42
CD19 CAR	577	WO2016139487 中的 SEQ ID NO. 14
CD19 CAR	578	WO2016139487 中的 SEQ ID NO.15
CD19 CAR	579	US20160250258A1 中的 SEQ ID NO: 53
CD19 CAR	580	US20160250258A1 中的 SEQ ID NO: 54
CD19 CAR	581	US20160250258A1 中的 SEQ ID NO: 55
CD19 CAR	582	US20160250258A1 中的 SEQ ID NO: 56
CD19 CAR	583	US20160250258A1 中的 SEQ ID NO: 57
CD19 CAR	584	US20160250258A1 中的 SEQ ID NO: 58
CD19 CAR	585	WO2015187528 中的 SEQ ID NO. 1

	CD19 CAR	586	WO2015187528 中的 SEQ ID NO. 2
	CD19 CAR	587	WO2015187528 中的 SEQ ID NO. 3
	CD19 CAR	588	WO2015187528 中的 SEQ ID NO. 4
	CD19 CAR	589	WO2015187528 中的 SEQ ID NO. 5
	CD19 CAR	590	WO2015187528 中的 SEQ ID NO. 6
	CD19 CAR	591	WO2015187528 中的 SEQ ID NO. 7
	CD19 CAR	592	WO2015187528 中的 SEQ ID NO. 8
	CD19 CAR	593	WO2015187528 中的 SEQ ID NO. 9
	CD19 CAR	594	WO2015187528 中的 SEQ ID NO. 10
	CD19 CAR	595	WO2015187528 中的 SEQ ID NO. 11
	CD19 CAR	596	WO2015187528 中的 SEQ ID NO. 12
	CD19 CAR	597	WO2015187528 中的 SEQ ID NO. 13
	CD19 CAR	598	WO2015157252 中的 SEQ ID. NO. 31
	CD19 CAR	599	WO2015157252 中的 SEQ ID. NO. 32
	CD19 CAR	600	WO2015157252 中的 SEQ ID. NO. 33
	CD19 CAR	601	WO2015157252 中的 SEQ ID. NO. 34
	CD19 CAR	602	WO2015157252 中的 SEQ ID. NO. 35
	CD19 CAR	603	WO2015157252 中的 SEQ ID. NO. 36
[0302]	CD19 CAR	604	WO2015157252 中的 SEQ ID. NO. 37
	CD19 CAR	605	WO2015157252 中的 SEQ ID. NO. 38
	CD19 CAR	606	WO2015157252 中的 SEQ ID. NO. 39
	CD19 CAR	607	WO2015157252 中的 SEQ ID. NO. 40
	CD19 CAR	608	WO2015157252 中的 SEQ ID. NO. 41
	CD19 CAR	609	WO2015157252 中的 SEQ ID. NO. 42
	CD19 CAR	610	WO2015157252 中的 SEQ ID. NO. 58
	CD19 CAR	611	WO2014153270 中的 SEQ ID NO. 31
	CD19 CAR	612	WO2014153270 中的 SEQ ID NO. 32
	CD19 CAR	613	WO2014153270 中的 SEQ ID NO. 33
	CD19 CAR	614	WO2014153270 中的 SEQ ID NO. 34
	CD19 CAR	615	WO2014153270 中的 SEQ ID NO. 35
	CD19 CAR	616	WO2014153270 中的 SEQ ID NO. 36
	CD19 CAR	617	WO2014153270 中的 SEQ ID NO. 37
	CD19 CAR	618	WO2014153270 中的 SEQ ID NO. 38
	CD19 CAR	619	WO2014153270 中的 SEQ ID NO. 39
	CD19 CAR	620	WO2014153270 中的 SEQ ID NO. 40
	CD19 CAR	621	WO2014153270 中的 SEQ ID NO. 41
	CD19 CAR	622	WO2014153270 中的 SEQ ID NO. 42
	CD19 CAR(第三代)	623	WO2016139487 中的 SEQ ID NO.13

[0303] 在本发明的一个实施方案中,本发明的有效载荷为靶向不同B细胞的CD19特异性CAR。在本发明的上下文中,效应模块可包含可操作地连接至CD19 CAR融合构建体的hDHFR DD、ecDHFR DD或FKBP DD。在一些情况下,用于驱动载体中效应模块的表达的启动子可为CMV启动子或EF1a。可以比较启动子在驱动相同构建体的表达中的效率。例如,可以比较仅启动子CMV(在OT-CD19N-001中)或EF1a启动子(在OT-CD19N-017中)不同的两种构建体。CD19 CAR构建体及其组分的氨基酸序列呈现于表10a和表10b中。表10a和/或表10b中的氨

核酸序列可包含终止密码子,其在表中在氨基酸序列末端用“*”表示。

[0304] 表10a:CD19 CAR的组分的序列

描述	氨基酸序列	氨基酸 SEQ ID NO	核酸 SEQ ID NO
CD19 scFv	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDI SKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHS GVPSRFGSGSGTDYSLTISNLEQEDIAT YFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGG GGGGSGGGSEVKLQESGGLVAPSQS LSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGL EWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDN SKSQVFLKMNSLQTDDETAIYYCAKHYY YGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS	624	626、 650-654
CD8 α 铰链 --TM	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP AAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTC GVLLLSLVITLYC	625	627、655、 982-984
CD8 α 铰链	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP AAGGAVHTRGLDFACD	440	656-660
[0305] CD3 ζ 信号 传导结构 域	RVKFSRSADAPAYKQGQNLNELNLG RREYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKN PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR	339	661-665、 986
4-1BB(41B B)细胞内 信号传导 结构域	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEEGGCEL	273	666-670、 985
CD8 α 跨膜 结构域	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	409	990、992
CD8 α 前导 序列	MALPVTALLLPLALLLHAARP	628	671-675
p40 信号序 列	MCHQQLVISWFLVFLASPLVA	719	736-744
p40	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVL	723	632-634、

[0306]

	TCDTPEEDGITWTLDSSEVLGSGKTLT IQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLL LHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFRLC EAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSS RGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKE YEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDA VHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQL KPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFS LTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSAT VICRKNASISVRAQDRYSSSWSEWAS VPCS		752-761
p35	RNLPVATPDPGMFPC LHHSQNLLRAVS NMLQKARQTLEFYPTSEEIDHEDITKD KTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFIT NGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKM YQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNM LAVIDELMQALNFNSETVPQSSLEEPD FYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYL NAS	724	762-771、 1012
IL15	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTE SDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGD ASIHDTVENLILANNSLSSNGNVTESGC KECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS	785	794-797、 1001
IL15Ra	ITCPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYI CNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAH WTPSLKCIRD PALVHQRPA PPTVTTA GVTPQPELSPSGKEPAASSPSSNNTAAT TAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESS HGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYP QGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLAC YLKSRQTPPLASVEMEAMEALPVTWGT SSRDELENC SHHL	803	812-813、 1003
mCherry(M1L)	LSKGEEDNMAIIEFMRFKVHMEGSVN GHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTK GGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPA DIPDYKLSFPEGFKWERVMNFEDGGV VTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPD GPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALK GEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAK KPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVE QYERAEGRHSTGGMDELYK	1029	1030
IRES	-	-	999
接头 (GGSGG)	GGSGG	629	676-680
接头(SG)	SG	-	AGTGG A
接头 ((G4S)3)	GGGGSGGGGSGGGGS	720	910-915
接头	GGSG	822	823

[0307]

(GGSG)			
接头	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP	1031	1032
接头 (SG3-(SG4))-SG3-SL Q)	SGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQ	802	811、 916-920、 1002
修饰的弗 林蛋白酶	ESRRVRRNKRSK	630	681-683
BamHI	-	-	GGATCC
间隔区	-	-	1000
HA 标签	YPYDVPDYA	1024	1025-102 7
FKBP(F36 V、L106P)	GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYT GMLEDGKKVDSSRDRNKPFKMLGKQ EVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDY AYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKPE	11	684-686、 987、989
FKBP(E31 G、F36V、 R71G、 K105E)	GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYT GMLGDGKKVDSSRDRNKPFKMLGKQ EVIRGWEEGVAQMSVGGAKLTISPDY AYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLELE	12	688-691、 994、 1013、 1028
ecDHFR(WT 的氨基 酸 2-159)(R12 Y、Y100I)	ISLIAALAVDYVIGMENAMPWNLPADL AWFKRNTLNKPVIMGRHTWESIGRPLP GRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDIAIA ACGDVPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQKLY LTHIDAEVEGDTHFPDYEPDDWESVFSE FHDADAQNSHSYCFEILERR	9	692、772、 814、687、 988、991
ecDHFR(WT 的氨基 酸 2-159)(R12 H、E129K)	ISLIAALAVDHVIGMENAMPWNLPADL AWFKRNTLNKPVIMGRHTWESIGRPLP GRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDIAIA ACGDVPEIMVIGGGRVYEQFLPKAQKL YLTHIDAEVEGDTHFPDYKPDWESVF SEFHDADAQNSHSYCFEILERR	10	798、815、 993
hDHFR(W T 的氨基 酸 2-187； Y122I)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPL RNEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGK KTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPP QGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVD MWWIVGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVTR IMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVL SDVQEEKGIKYKFEVYEKND	895	694、995
hDHFR(W T 的氨基 酸 2-187； Y122I、 A125F)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPL RNEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGK KTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPP QGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVD MWWIVGGSSVIKEFMNHPGHLKLFVTRI MQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVL SDVQEEKGIKYKFEVYEKND	890	696、973、 974、996
hDHFR(W T 的氨基	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPL RNEFRYFKRM TTTSSVEGKQNLVIMGK KTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPP	981	698、997

[0308]

酸 2-187; Q36K、 Y122I)	QGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVD MVWIVGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVTR IMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVL SDVQEEKGIKYKFEVYEKND		
hDHFR(Q 36F、 N65F、 Y122I)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPL RNEFRYFFRMTTSSVEGKQNLVIMGK KTWFSIPEKFRPLKGRINLVLSRELKEPP QGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVD MVWIVGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVTR IMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVL SDVQEEKGIKYKFEVYEKND	891	700、975、 976、998
描述	氨基酸序列	氨基酸 SEQ ID NO	核酸 SEQ ID NO
CD19 scFv	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDI SKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIAT YFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGS GGGGSGGGGSEVKLQESG PGLVAPSQS LSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGL EWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDN SKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYY YGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS	624	626、 650-654
CD8 α 铰链 --TM	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP AAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTC GVLLLSLVITLYC	625	627、655、 982-984
CD8 α 铰链	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP AAGGAVHTRGLDFACD	440	656-660
CD3 ζ 信号 传导结构 域	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLG RREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR	339	661-665、 986
4-1BB(41B B)细胞内 信号传导 结构域	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEEGGCEL	273	666-670、 985
CD8 α 跨膜 结构域	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	409	990、992
CD8 α 前导 序列	MALPVTALLLPLALLLHAARP	628	671-675
p40 信号序 列	MCHQQLVISWFSVLVFLASPLVA	719	736-744
p40	IWELK KD VYVVELDWYPDAPGEMVVL TCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLT IQVKEFGDAGQYTCHKGG EVL SHSLLL LHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNK TFLRC EAKNYSGRFTCWLLTISTDLTFSVKSS	723	632-634、 752-761

[0309]

	RGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKE YEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDA VHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQL KPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFS LTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSAT VICRKNASISVRAQDRYSSSWSEWAS VPCS		
p35	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVS NMLQKARQTLEFYPTSEEIDHEDITKD KTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFIT NGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKM YQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNM LAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPD FYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYL NAS	724	762-771、 1012
IL15	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTE SDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGD ASIHDTVENLILANNSLSSNGNVTESGC KECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS	785	794-797、 1001
IL15Ra	ITCPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYI CNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAH WTTPLKCIKDPALVHQRPAAPPSTVTTA GVTPQPELSPSGKEPAASSPSSNNTAAT TAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHES HGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYP QGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLAC YLKSRQTPPLASVEMEAMEALPVTWGT SSRDELENCSHHL	803	812-813、 1003
mCherry(M1L)	LSKGEEDNMAIIEKFMRFKVHMEGSVN GHEFEIEGEGEGRPYEGTQAKLKVK GGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPA DIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGV VTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPD GPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALK GEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAK KPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVE QYERAEGRHSTGGMDELYK	1029	1030
IRES	-	-	999
接头 (GGSGG)	GGSGG	629	676-680
接头(SG)	SG	-	AGTGG A
接头 ((G4S)3)	GGGGSGGGSGGGGS	720	910-915
接头 (GGSG)	GGSG	822	823
接头	MLLVTSLLLCELPHPAFLIP	1031	1032
接头 (SG3-(SG4	SGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSLQ	802	811、 916-920、

[0310]

)3-SG3-SL Q)			1002
修饰的弗林蛋白酶	ESRRVRRNKRSK	630	681-683
BamHI	-	-	GGATCC
间隔区	-	-	1000
HA 标签	YPYDVPDYA	1024	1025-1027
FKBP(F36V、L106P)	GVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYT GMLLEDGKKVDSSRDRNKPFKMLGKQ EVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDY AYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKPE	11	684-686、 987、989
FKBP(E31G、F36V、R71G、K105E)	GVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYT GMLGDGKKVDSSRDRNKPFKMLGKQ EVIRGWEEGVAQMSVGQAKLTISPDY AYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLELE	12	688-691、 994、 1013、 1028
ecDHFR(WT 的氨基酸 2-159)(R12Y、Y100I)	ISLIAALAVDYGIGMENAMPWNLPADL AWFKRNTLNKPVIMGRHTWESIGRPLP GRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDIAIA ACGDVPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQKLY LTHIDAEVEGDTHFPDYEPDDWESVFSE FHDADAQNSHSYCFEILERR	9	692、772、 814、687、 988、991
ecDHFR(WT 的氨基酸 2-159)(R12H、E129K)	ISLIAALAVDHYGIGMENAMPWNLPADL AWFKRNTLNKPVIMGRHTWESIGRPLP GRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVDIAIA ACGDVPEIMVIGGGRVYEQFLPKAQKL YLTHIDAEVEGDTHFPDYKPDWESVF SEFHDADAQNSHSYCFEILERR	10	798、815、 993
hDHFR(WT 的氨基酸 2-187; Y122I)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPL RNEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGK KTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPP QGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVD MVWIVGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVTR IMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVL SDVQEEKGIKYKFEVYEKND	895	694、995
hDHFR(WT 的氨基酸 2-187; Y122I、A125F)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPL RNEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGK KTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPP QGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVD MVWIVGGSSVIKEFMNHPGHLKLFVTRI MQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVL SDVQEEKGIKYKFEVYEKND	890	696、973、 974、996
hDHFR(WT 的氨基酸 2-187; Q36K、Y122I)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPL RNEFRYFKRM TTTSSVEGKQNLVIMGK KTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPP QGAHFLSRSLDDALKLTEQP ELANKVD MVWIVGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVTR IMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVL SDVQEEKGIKYKFEVYEKND	981	698、997

[0311]	hDHFR(Q36F、N65F、Y122I)	VGS LNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPL RNEFRYFFRMTTSSVEGKQNLVIMGK KTWFSIPEKFRPLKGRINLVLSRELKEPP QGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVD MVWIVGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVTR IMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVL SDVQEEKGIKYKFEVYEKND	891	700、975、 976、998
--------	------------------------	--	-----	---------------------

[0312] 表10b:CD19 CAR的序列

描述	氨基酸序列	氨基酸 SEQ ID NO	核酸 SEQ ID NO
[0313] OT-CD19 CAR-001(OT-CD19c-001) (CD8a 前导序列-CD19 scFV-CD8a-Tm-41BB-CD3 ζ -终止序列)	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQT TSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYNWY QQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGS GSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTL PYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGS EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSL PDYGVSWIRQPPRKLEWLGVIWGSETT YYNSALKSRLTIHKDNSKSQVFLKMNSL QTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWG QGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIW APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQUALPPR*	635	701
OT-CD19 CAR-002(OT-CD19c-002) (CD8a 前导序列-CD19 scFV-FKBP(F36V、L106P)-CD8a-Tm-41BB-CD3 ζ -终止序列)	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQT TSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYNWY QQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGS GSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTL PYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGS EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSL PDYGVSWIRQPPRKLEWLGVIWGSETT YYNSALKSRLTIHKDNSKSQVFLKMNSL QTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWG QGTSVTVSSGVQVETISPGDGRTFPKRG QTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPF KFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRA KLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVE LLKPETTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLA GTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQ PFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE	636	702

[0314]

	LRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*		
OT-CD19 CAR-003(OT-CD19c-003) (CD8a 前导序列-CD19 scFV-ccDHF R-CD8a-Tm-41BB-CD3ζ-终止序列)	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQT TSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLWY QQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGS GSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTL PYTFGGGKLEITGGGGSGGGSGGGGS EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSL PDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETT YYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSL QTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWG QGTSVTVSSISLIAALAVDYVIGMENAM PWNLPADLAWFKRNTLNKPVIMGRHTW ESIGRPLPGRKNILSSQP GTDDRVTWVK SVDEAIAACGDVPEIMVIGGGRVIEQFLP KAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPDYEPDDW ESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERRTTT PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLL SLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQT TQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSA DAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGL YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*	637	703
OT-CD19 CAR-004(OT-CD19c-004) (CD8a 前导序列-CD19 scFV-CD8a 铰链 -FKBP(F36V、L106P)-CD8a 跨膜结构域 -41BB-CD3ζ-终止序列)	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQT TSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLWY QQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGS GSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTL PYTFGGGKLEITGGGGSGGGSGGGGS EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSL PDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETT YYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSL QTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWG QGTSVTVSSITTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDGVQ VETISPGDGRTPKRGQTCVVHYTGMLE DGKKVDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRG WEEGVAQMSV GQRAKLTISPDIYAYGATG HPGIIPPHATLVFDVELLKPEIYIWAPLAG TCGVLLL SLVITLYCKRGRKLLYIFKQ FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL PPR*	638	704

[0315]

OT-CD19 CAR-005(OT -CD19c-005) (CD8a 前导 序列-CD19 scFV-CD8a 铰链 -ecDHFR(W T 的氨基酸 2-159)(R12Y 、 Y100I)-CD8a 跨膜结构域 -41BB-CD3 ζ - 终止序列)	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQT TSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWY QQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGS GSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTL PYTFGGGKLEITGGGGSGGGSGGGGS EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSL PDYGVSWIRQPPRKLEWLGVIWGSETT YYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSL QTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWG QGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDISLIA ALAVDYVIGMENAMPWNLPADLAWFKR NTLNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRKNIL SSQPGTDDRVTWVKSVDIAAACGDVPE IMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLTHIDAEV EGDTHFPDYEPDDWESVFSEFHDADAQ NSHSYCFEILERRIYIWAPLAGTCGVLLL SLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQT TQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSA DAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGL YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*	639	705
OT-CD19c-0 06(CD8a 前 导序列 -CD19 scFV-CD8a-T m-41BB-CD 3 ζ -接头 (GSGG)-ec DHFR(WT 的氨基酸 2-159)(R12H 、E129K)-终 止序列)	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQT TSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWY QQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGS GSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTL PYTFGGGKLEITGGGGSGGGSGGGGS EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSL PDYGVSWIRQPPRKLEWLGVIWGSETT YYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSL QTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWG QGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIW APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPRGGSGGISLIAALAVDHVIGM ENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPVIMG RHTWESIGRPLPGRKNILSSQPGTDDR VWVKSVDIAAACGDVPEIMVIGGGRVY EQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPDY KPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEIL ERR*	640	706
OT-CD19c-0 07(CD8a 前 导序列)	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQT TSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWY QQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGS	641	707

[0316]

<p>-CD19 scFV-CD8a-T m-41BB-CD 3ζ-接头 (GGSGG)-F KBP(E31G、 F36V、 R71G、 K105E)-终止 序列)</p>	<p>GSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTL PYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSGGGGS EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSL PDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETT YYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSL QTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWG QGTSVTVSSTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIW APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEE GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDAL HMQUALPPRGGSGGGVQVETISPGDGRTF PKRGQTCVVHYTGMLGDGKKVDSSRD RNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSV GQGAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLV FDVELLELE*</p>		
<p>OT-CD19c-0 08(CD8a 前 导序列 -CD19 scFV-CD8a-T m-41BB-CD 3ζ-接头 (GGSGG)-h DHFR(WT 的氨基酸 2-187; Y122I)-终止 序列)</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQT TSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLWY QQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGS GSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTL PYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSGGGGS EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSL PDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETT YYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSL QTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWG QGTSVTVSSTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIW APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEE GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDAL HMQUALPPRGGSGGVGSLNCIVAVSQNM GIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRM TTTSS VEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGR INLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKL TEQPELANKVDMVWIVGGSSVIKEAMN HPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYE KND*</p>	<p>642</p>	<p>708</p>
<p>OT-CD19c-0 09(CD8a 前 导序列 -CD19 scFV-CD8a-T m-41BB-CD</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQT TSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLWY QQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGS GSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTL PYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSGGGGS EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSL</p>	<p>643</p>	<p>709</p>

[0317]

<p>3ζ-接头 (GGSGG)-h DHFR(WT 的氨基酸 2-187; Y122I、 A125F)-终止 序列)</p>	<p>PDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETT Y YNSALKSRLTIKDNSKSKVFLKMNSL QTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWG QGTSVTVSSTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIW APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEE GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPRGGSGGVGSLNCIVAVSQNM GIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRM TTTSS VEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGR INLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKL TEQPELANKVDMVWIVGGSSVIKEFMN HPGHLKLVTRIMQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYE KND*</p>		
<p>OT-CD19c-0 10(CD8a 前 导序列 -CD19 scFV-CD8a-T m-41BB-CD 3ζ-接头 (GGSGG)-h DHFR(WT 的氨基酸 2-187; Q36K、 Y122I)-终止 序列)</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQT TSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYL N WY QQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGS GSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTL PYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSGGGGS EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSL PDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETT Y YNSALKSRLTIKDNSKSKVFLKMNSL QTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWG QGTSVTVSSTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIW APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEE GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPRGGSGGVGSLNCIVAVSQNM GIGKNGDLPWPPLRNEFRYFKRM TTTSS VEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGR INLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKL TEQPELANKVDMVWIVGGSSVIKEAMN HPGHLKLVTRIMQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYE KND*</p>	644	710
<p>OT-CD19c-0 11(CD8a 前 导序列 -CD19 scFV-CD8a-T m-41BB-CD</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQT TSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYL N WY QQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGS GSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTL PYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSGGGGS EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSL</p>	645	711

[0318]

<p>3ζ-接头 (GGSGG)-h DHFR(WT 的氨基酸 2-187; Q36K、 N65F、 Y122I)-终止 序列)</p>	<p>PDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETT YYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSL QTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWG QGTSVTVSSTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIW APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPRGGSGGVGSLNCIVAVSQNM GIGKNGDLPWPPLRNEFRYFFRMTTSS VEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKFRPLKGRI NLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLT EQPELANKVDMVWIVGGSSVIKEAMNH PGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKY KLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEK ND*</p>		
<p>OT-CD19n-0 12(CD8a 前 导序列-接头 (SG)-FKBP(F36V、 L106P)-弗林 蛋白酶位点 -CD19 scFV-CD8a-T m-41BB-CD 3ζ-终止序列)</p>	<p>MALPVTALLLPLALLHAARPSGGVQVE TISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDG KKVDSSRDRNPKFKMLGKQEVIRGWE EGVAQMSVGRRAKLTISPDIYAYGATGHP GIIPPHATLVFDVELLKPEESRRVRRNKRS KDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQD ISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATY FCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGG GGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSV TCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWL GVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQ VFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGG YAMDYWGQGTSVTVSSTTTTPAPRPPTPA PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD FACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCK RGRKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS CRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQ GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTAT KDTYDALHMQALPPR*</p>	<p>646</p>	<p>712</p>
<p>OT-CD19n-0 13(CD8a 前 导序列-接头 (SG)-ecDHF R(WT 的氨 基酸 2-159)(R12Y 、Y100I)-弗</p>	<p>MALPVTALLLPLALLHAARPSGISLIAA LAVDYVIGMENAMPWNLPADLAWFKRN TLNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRKNIILS SQPGTDDRVTWVKSVDIAACGDVPEI MVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLTHIDAEVE GDTHFPDYEPDDWESVFSEFHDADAQN SHSYCFEILERRESRRVRRNKRSKDIQMT QTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLN WYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRF</p>	<p>647</p>	<p>713</p>

[0319]

<p>林蛋白酶位点-CD19 scFV-CD8a-T m-41BB-CD 3ζ-终止序列)</p>	<p>SGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQG NTPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSGG GGSEVKLQESGGLVAPSQSLSVTCTVSG VSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGS ETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMN SLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYW GQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPL SLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLL LYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE EGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYN ELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGK RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDA LHMQUALPPR*</p>		
<p>OT-CD19n-0 14(CD8a 前 导序列-接头 (SG)-hDHFR (WT 的氨基 酸 2-187; Y122I、 A125F)-弗林 蛋白酶位点 -CD19 scFV-CD8a-T m-41BB-CD 3ζ-终止序列)</p>	<p>MALPVTALLLPLALLHAARPSGVGSLN CIVAVSQNMIGKNGDLPWPPLRNEFRY FQRMTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIP EKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLS RSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGG SSVIKEFMNHPGHLKLFVTRIMQDFESD TFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKG IKYKFEVYEKNDERRVRRNRKSKDIQM TQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYL NWXQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSR FSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQ GNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSGG GGSEVKLQESGGLVAPSQSLSVTCTVSG GVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGS GSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLK MNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMD YWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIAS QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRK KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE EEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQL YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENGG KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQUALPPR*</p>	<p>648</p>	<p>714</p>
<p>OT-CD19n-0 15(CD8a 前 导序列-接头 (SG)-hDHFR (WT 的氨基 酸 2-187; Q36K、 Y122I)-弗林 蛋白酶位点</p>	<p>MALPVTALLLPLALLHAARPSGVGSLN CIVAVSQNMIGKNGDLPWPPLRNEFRY FKRMTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIP EKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLS RSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGG SSVIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESD TFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKG IKYKFEVYEKNDERRVRRNRKSKDIQM TQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYL NWXQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSR</p>	<p>649</p>	<p>715</p>

[0320]

<p>-CD19 scFV-CD8a-T m-41BB-CD 3ζ-终止序列)</p>	<p>FSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQ GNTLPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSG GGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVS GVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIW GSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLK MNSLQTD DTAIYYCAKHYYYGGSYAMD YWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIA QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD IYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRK KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE EEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQL YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGG KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQUALPPR*</p>		
<p>OT-CD19-05 6(CD8a 前导 序列-CD19 scFV-CD8a-T m-41BB-CD 3ζ-接头 (GGSGG)-h DHFR(WT 的氨基酸 2-187; Y122I)-终止 序列)</p>	<p>MALPVTALLPLALLHAARPDIQMTQT TSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLWY QQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGS GSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTL PYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSGGGGS EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSL PDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETT YNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSL QTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWG QGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIA SQPL LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYW APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPRGGSGGVGSLNCIVAVSQNM GIGKNGDLPWPPLRNEFRYFORMTTTSS VEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGR INLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKL TEQPELANKVDMVWIVGGSSVIKEAMN HPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYE KND*</p>	<p>1005</p>	<p>1022</p>
<p>OT-CD19-05 7(CD8a 前导 序列-CD19 scFV-CD8a-T m-41BB-CD 3ζ-BamHI(G S)-终止序列)</p>	<p>MALPVTALLPLALLHAARPDIQMTQT TSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLWY QQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGS GSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTL PYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSGGGGS EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSL PDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETT YNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSL QTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWG QGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIA SQPL</p>	<p>1006</p>	<p>1023</p>

[0321]

	LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIW APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPRGS*		
OT-CD19-05 8(CD8a 前导 序列-CD19 scFV-CD8a-T m-41BB-CD 3ζ-p2A-Bam HI(GS)-终止 序列)	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQT TSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLWY QQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGS GSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTL PYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSGGGGS EVKLQESGGLVAPSQSLSVTCTVSGVSL PDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETT YYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSL QTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWG QGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIW APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPRGATNFSLLKQAGDVEENPGP GS*	1007	1033
OT-CD19-05 9(CD8a 前导 序列-HA 标 签-CD19 scFV-CD8a-T m-41BB-CD 3ζ-BamHI(G S)-终止序列)	MALPVTALLLPLALLLHAARPYPYDVPD YADIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQ DISKYLWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLH SGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIAT YFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGGGGSG GGGSGGGGSEVKLQESGGLVAPSQSLS VTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEW LGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKS QVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGG SYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTP APTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQ GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTAT KDTYDALHMQALPPRGS*	1008	1034
OT-CD19-06 0(CD8a 前导 序列-CD19 scFV-CD8a-T m-41BB-CD	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQT TSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLWY QQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGS GSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTL PYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSGGGGS	1009	1035

[0322]

<p>3ζ-接头(SG)- 弗林蛋白酶 -BamHI(GS)- 终止序列)</p>	<p>EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSL PDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETT YYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSL QTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWG QGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYW APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEE GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPRSGESRRVRRNKRSKGS*</p>		
<p>OT-CD19-06 3(CD8a 前导 序列-CD19 scFV-CD8a-T m-41BB-CD 3ζ-终止序列)</p>	<p>MALPVTALLLPLALLHAARPDIQMTQT TSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYNWY QQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGS GSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTL PYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSGGGGS EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSL PDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETT YYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSL QTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWG QGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYW APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEE GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR*</p>	<p>1010</p>	<p>1036</p>
<p>OT-CD19-06 4(CD8a 前导 序列-CD19 scFV-CD8a-T m-41BB-CD 3ζ-接头 (TR)-HA 标 签 -FKBP(E31G 、F36V、 R71G、 K105E)-终止 序列 -IRES-mCher ry)</p>	<p>MALPVTALLLPLALLHAARPDIQMTQT TSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYNWY QQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGS GSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTL PYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSGGGGS EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSL PDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETT YYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSL QTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWG QGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYW APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEE GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPRTRYPYDVPDYAGVQVETISP GDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLGDGKK</p>	<p>1215-1 231</p>	<p>1037</p>

[0323]

	<p>VDSSDRNKPFFKMLGKQEVIRGWEEG VAQMSVGQGAKLTISPDYAYGATGHPII PPHATLVFDVELLELE*MHRSAAAAT*IP PPPPLSLPPP*RYWPKPLGIRPVCVCLYVI FHIIAVFWQCEGPETWPCLLDEHS*GSFP SRQRNARSVECREGSSSSSGSFLKTNNVC SDPLQAAEPPTWRQVPLRPKATCIRYTC KGGTTPVPRCELDSCGKSQMALLKRIQQ GAEGCPEGTPLYGI*SGASVHMLYMCLV EVKKTSRPPEPRGRGFPLKNTMIIWQP* *ARARRITWPSSRSSCASRCTWRAP*TAT SRSRARARAAPTRAPRPPS*R*PRVAPCP SPGTSCPLSSCTAPRPT*STPPTSPTT*SCP SPRASSGSA**TSRTAAW*P*PRTPPCRTA SSSTR*SCAAPTSPPTAP*CRRRPWAGRPP PSGCTPRTAP*RARSSRG*S*RTAATTLR SRPPTRPRSPCSCPAPTTSTSSWTSPPTTR TTPSWNSTNAPRAATPPAAWTSCTS*</p>		
<p>OT-CD19-06 6(CD8a 前导 序列-CD19 scFV-CD8a-T m-41BB-CD 3ζ-接头 (GS)-P2A 肽 -mCherry(M1 L)-终止序列)</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQT TSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLWY QQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGS GSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTL PYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGS EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSL PDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETT YYNSALKSRLTIHKDNSKSQVFLKMNSL QTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWG QGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIW APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENP GPLSKGEEDNMAIIEFMRFKVHMEGSV NGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTK GGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPAD IPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVT VTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGP VMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGE IKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAKKPV QLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYER AEGRHSTGGMDELYK*</p>	1015	1039
<p>OT-CAR19-I L15-001(CD 8a 前导序列 -CD19 scFV-CD8a-T</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQT TSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLWY QQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGS GSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTL PYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGS</p>	1016	1040

[0324]

<p>m-41BB-CD 3ζ-接头 (GS)-P2A-IL 15-接头 (SG3-(SG4)3 -SG3-SLQ)-I L15Ra-终止 序列)</p>	<p>EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSL PDYGVSWIRQPPRKLEWLGVIWGSETT YYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSL QTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWG QGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIW APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPRGSATNFSLLKQAGDVEENP GPNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYT ESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESG DASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESG CKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINT SSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQI TCPPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICN SGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTT PSLKCIRDPALVHQRAPPSTVTTAGVTP QPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAIV PGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESHGTPSQ TTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTT VAISTSTVLLCGLSAVSLACYLKSRQTP PLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDLE NCSHHL*</p>		
<p>OT-CAR19-I L15-002(CD 8a 前导序列 -CD19 scFV-CD8a-T m-41BB-CD 3ζ-接头 (GS)-P2A-接 头 (MLLVTSLL LCELPHPA FLLIP)(SEQ ID NO: 1031)-IL15- 接头 (SG3-(SG4)3 -SG3-SLQ)-I L15Ra-终止 序列)</p>	<p>MALPVTALLPLALLHAARPDIQMTQT TSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLWY QQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFGS GSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTL PYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSGGGGS EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSL PDYGVSWIRQPPRKLEWLGVIWGSETT YYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSL QTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWG QGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIW APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPRGSATNFSLLKQAGDVEENP GPMLLVTSLLCELPHPAFLLIPNWNV ISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPS KVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVE NLILANNSLSSNGNVTESGCKECELEE KNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGG</p>	<p>1017</p>	<p>1041</p>

	<p>GSGGGGSGGGGSGGGSLQITCPPPMSVE HADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAG TSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPA ALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSG KEPAASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPS KSPSTGTTEISSHESHGTPSQTTAKNWE LTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTV LLCGLSAVSLACYLKSRQTPPLASVEM EAMEALPVTWGTSSRDEDLENC SHHL*</p>		
<p>[0325] OT-CD19-IL 15-006(CD8a 前导序列 -CD19 scFV-CD8a-T m-41BB-CD 3ζ-接头 (GS)-P2A-Ig E 前导序列 -IL15-接头 (SG3-(SG4)3 -SG3-SLQ)-I L15Ra-终止 序列)</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQT TSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLWY QQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFGS GSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTL PYTFGGGKLEITGGGGSGGGGSGGGGS EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSL PDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETT YYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSL QTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWG QGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIW APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDRRGRDPGEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENP GPMDWTWILFLVAAATRVHSNWVNVIS DLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCK VTAMKCFLELQVISLESGDASIHTVEN LILANNSLSSNGNVTEGCKECEEELEEK NIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGSLQITCPPPMSVEH ADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGT SSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPA LVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGK EPAASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPSK SPSTGTTEISSHESHGTPSQTTAKNWE LTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLL LLCGLSAVSLACYLKSRQTPPLASVEMEA MEALPVTWGTSSRDEDLENC SHHL*</p>	<p>1018</p>	<p>1042</p>

[0326] 表10中公开的由CMV启动子转录控制的构建体在一些情况下可以置于不同启动子的转录控制下,以测试启动子在CD19 CAR表达中的作用。在一个实施方案中,CMV启动子可以被EF1a启动子替换。在一个实施方案中,OT-CD19-001构建体的CMV启动子可用EF1a启动子替换以生成OT-CD19N-017构建体。在另一个实施方案中,CD19 CAR OT-CD19 CAR-002构建体的CMV启动子可用EF1a启动子替换以生成OT-CD19N-018构建体。在另一个实施方案中,CD19 CAR OT-CD19 CAR-003构建体的CMV启动子可用EF1a启动子替换以生成OT-CD19N-019构建体。在另一个实施方案中,CD19CAR OT-CD19 CAR-004构建体的CMV启动子可用EF1a启动子替换以生成OT-CD19N-020构建体。在另一个实施方案中,CD19 CAR OT-CD19 CAR-005构建体的CMV启动子可用EF1a启动子替换以生成OT-CD19N-021构建体。在另一个实施方案

中,CD19 CAR OT-CD19 CAR-006构建体的CMV启动子可用EF1a启动子替换以生成OT-CD19N-022构建体。在另一个实施方案中,CD19 CAR OT-CD19 CAR-007构建体的CMV启动子可用EF1a启动子替换以生成OT-CD19N-023构建体。在另一个实施方案中,CD19 CAR OT-CD19 CAR-008构建体的CMV启动子可用EF1a启动子替换以生成OT-CD19N-024构建体。在另一个实施方案中,CD19 CAR OT-CD19 CAR-009构建体的CMV启动子可用EF1a启动子替换以生成OT-CD19N-025构建体。

[0327] 在一个实施方案中,CAR构建体包含CD19 scFV(例如,CAT13.1E10或FMC63)、CD8 α 间隔区或跨膜结构域以及4-1BB和CD3 ζ 内结构域。与具有FMC63的构建体相比,这些具有CAT13.1E10的构建体可具有在体外刺激之后增加的增殖、增加的对CD19+靶标的细胞毒性以及增加的效应物和靶标相互作用。

[0328] 在一些实施方案中,本发明的有效载荷可使用E3泛素连接酶的催化结构域调整。E3连接酶的催化结构域可与抗体或抗体片段融合。有效载荷与融合至E3连接酶催化结构域的抗体或抗体片段所识别的抗原融合。可用于本发明的E3连接酶包括但不限于Ring E3连接酶、HECT E3连接酶和RBR E3连接酶。Kanner SA等(2017) eLife;6:e29744教导的任一方法均可用于本发明(其内容以全文引用的方式并入)。

[0329] 在一些实施方案中,本文所述的有效载荷可通过E3泛素连接酶构建体调控。E3连接酶构建体可包含与SRE和抗体或抗体片段融合的E3连接酶的催化结构域。有效载荷与抗体或抗体片段所识别的抗原融合,其附接于E3连接酶的催化结构域。在不存在对应于SRE的刺激物的情况下,E3泛素连接酶构建体去稳定,其继而实现与抗原融合的有效载荷的表达。在存在对应于SRE的配体的情况下,E3泛素连接酶构建体稳定并且可用于与融合至有效载荷的抗原结合。E3连接酶构建体与抗原的结合靶向降解的蛋白质。E3泛素连接酶构建体可用于调控本文所述的任何有效载荷,条件是有效载荷与E3泛素连接酶构建体中的抗体或抗体片段所识别的抗原融合。在一些实施方案中,有效载荷为嵌合抗原受体。E3泛素连接酶构建体可用于设计逻辑门。在一个实施方案中,E3泛素连接酶构建体可用于生成NOT门,其中一个配体诱导有效载荷的表达,而另一个配体抑制有效载荷的表达。在一些实施方案中,NOT门可使用E3泛素连接酶构建体并通过将有效载荷-抗原融合蛋白与第二SRE融合来生成,所述SRE不同于E3泛素连接酶构建体中的SRE。

[0330] 在一些实施方案中,本发明的有效载荷可以是本文所述的任何共刺激分子和/或细胞内结构域。在一些实施方案中,在不同SRE的控制下的一个或多个共刺激分子可用于本发明。SRE调控的共刺激分子也可以结合第一代CAR、第二代CAR、第三代CAR、第四代或本文所述的任何其他CAR表达。

[0331] 串联CAR(TanCAR)

[0332] 在一些实施方案中,本发明的CAR可为串联嵌合抗原受体(TanCAR),其能够靶向两种、三种、四种或更多种肿瘤特异性抗原。在一些方面,CAR为双特异性TanCAR,其包括两个识别肿瘤细胞上两个不同TSA的靶向结构域。双特异性CAR可进一步定义为包含有包含特异于第一肿瘤抗原的靶向结构域(例如,抗原识别结构域)和特异于第二肿瘤抗原的靶向结构域(例如,抗原识别结构域)的细胞外区。在其他方面,CAR为多特异性TanCAR,其包括以串联排列配置的三个或更多个靶向结构域。TanCAR中靶向结构域之间的间隔区的长度可在约5与约30个氨基酸之间,例如6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、

25、26、27、28、29和30个氨基酸。

[0333] 分裂CAR

[0334] 在一些实施方案中,可将包括本发明的靶向部分、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域的组分分裂成两个或更多个部分,使得其依赖于多个促进完整功能性受体的组装的输入。在一个实施方案中,可构建分裂合成CAR系统,其中活化CAR受体的组装依赖于配体与SRE(例如,小分子)以及特异性抗原与靶向部分的结合。作为非限制性示例,分裂CAR由两个以小分子依赖性方式组装的部分组成;受体的一个部分的特征为细胞外抗原结合结构域(例如,scFv)并且另一个部分具有细胞内信号传导结构域,诸如CD3 ζ 细胞内结构域。

[0335] 在其他方面,可进一步修饰CAR系统的分裂部分以增加信号。在一个示例中,细胞质片段的第二部分可通过将跨膜结构域(例如,CD8 α 跨膜结构域)并入构建体中来锚定至质膜。还可以将额外细胞外结构域添加至CAR系统的第二部分,例如介导同二聚的细胞外结构域。这些修饰可增加受体输出活性,即T细胞活化。

[0336] 在一些方面,分裂CAR系统的两个部分含有异二聚结构域,其在进行异二聚小分子的结合时有条件地相互作用。如此,在存在小分子的情况下组装受体组分以形成完整系统,其可通过抗原接合来活化。可将任何已知的异二聚组分并入分裂CAR系统中。还可以使用其他小分子依赖性异二聚结构域,包括但不限于赤霉素诱导的二聚系统(GID1-GAI)、甲氧苄啶-SLF诱导ecDHFR和FKBP二聚(Czlapinski等,J Am Chem Soc.,2008,130(40):13186-13187)以及PP2C和PYL结构域的ABA(脱落酸)诱导二聚(Cutler等,Annu Rev Plant Biol.2010,61:651-679)。使用诱导型组件双调控(例如,配体依赖性二聚)以及降解(例如,去稳定结构域诱导CAR降解)分裂CAR系统可提供更大的灵活性以控制CAR修饰T细胞的活性。

[0337] 可切换CAR

[0338] 在一些实施方案中,本发明的CAR可为可切换CAR。Juillerat等(Juillerat等,Sci.Rep.,2016,6:18950;其内容以全文引用的方式并入本文)最近报告了可以应答于刺激物(例如,小分子)而瞬时接通的可控制的CAR。在这种CAR设计中,系统直接整合在铰链结构域中,将CAR中的scFv结构域与细胞膜结构域分开。此类系统有可能分裂或组合CAR的不同关键功能诸如在受体复合物的不同链内的活化和共刺激,模仿TCR天然架构的复杂性。这种整合的系统可以在通过存在/不存在刺激物来控制的开/关状态之间切换scFv和抗原相互作用。

[0339] 可逆CAR

[0340] 在其他实施方案中,本发明的CAR可为可逆CAR系统。在这种CAR架构中,将LID结构域(配体诱导降解)并入CAR系统中。可以通过添加LID结构域的配体来暂时下调CAR。LID和DD介导的调控的组合提供连续活化CAR T细胞的可调控制,从而减少CAR介导的组织毒性。

[0341] 活化条件性CAR

[0342] 在一些实施方案中,本发明的有效载荷可为仅在活化的免疫细胞中表达的活化条件性嵌合抗原受体。CAR的表达可以与活化条件性控制区偶联,活化条件性控制区是指一个或多个诱导序列例如CAR在它的控制下转录和/或表达的核酸序列。此列活化条件性控制区可为在免疫效应细胞的活化期间上调的基因的启动子例如IL2启动子或NFAT结合位点。在一些实施方案中,免疫细胞的活化可以通过组成型表达的CAR来实现(国际公布号

W02016126608;其内容以全文引用的方式并入本文)。

[0343] 细胞因子、趋化因子和其他可溶性因子

[0344] 根据本发明,本发明的CAR可连同本发明的其他有效载荷一起利用,所述有效载荷可为由免疫细胞、癌细胞和其他细胞型产生的细胞因子、趋化因子、生长因子和可溶性蛋白,它们充当体内细胞与组织之间的化学通讯物质。这些蛋白质介导广泛的生理功能,从对细胞生长、分化、迁移和存活的影响到多种效应子活性。例如,活化T细胞产生多种针对消除肿瘤细胞的细胞毒性功能的细胞因子。

[0345] 在一些实施方案中,本发明的有效载荷可为细胞因子及其片段、变体、类似物和衍生物,包括但不限于白介素、肿瘤坏死因子(TNF)、干扰素(IFN)、TGF β 和趋化因子。在一些实施方案中,本发明的有效载荷可为刺激免疫应答的细胞因子。在其他实施方案中,本发明的有效载荷可为负影响抗癌免疫应答的细胞因子拮抗剂。

[0346] 在一些实施方案中,本发明的有效载荷可为细胞因子受体、重组受体、其变体、类似物和衍生物;或细胞因子的信号组分。

[0347] 在一些实施方案中,本发明的细胞因子可用于改进免疫细胞诸如用于免疫疗法的CD8+T_{EM}、自然杀伤细胞和肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的扩增、存活、持久性和效力。在其他实施方案中,用两种或多种DD调控细胞因子工程化的T细胞用于提供T细胞活化和肿瘤微环境重建的动力学控制。在一个方面,本发明提供使与细胞因子疗法有关的毒性最小的生物回路和组合物。尽管它在减轻肿瘤负荷方面取得了成功,但全身性细胞因子疗法常常导致严重的剂量限制性副作用的发展。两个因素促成观察到的毒性:(a)多效性,其中细胞因子影响不同细胞型并且有时根据情况对相同细胞产生相反的作用;(b)细胞因子具有短的血清半衰期,并且因此需要在高剂量下施用以实现治疗效果,这加剧了多效性效果。在一个方面,如果发生不利影响,本发明的细胞因子可用于调节细胞因子表达。在一些实施方案中,本发明的细胞因子可被设计成寿命延长或特异性增强以使毒性最小。

[0348] 在一些实施方案中,本发明的有效载荷可为白介素(IL)细胞因子。白介素(IL)为白细胞所产生的用于调控免疫应答一类糖蛋白。如本文所用,术语“白介素(IL)”是指来自任何物种或来源的白介素多肽,并且包括全长蛋白以及蛋白的片段或部分。在一些方面,白介素有效载荷选自IL1、IL1 α (还称为红细胞生成素-1)、IL1 β (异化产物)、IL1 δ 、IL1 ϵ 、IL1 η 、IL1 ζ 、白介素-1家族成员1至11(IL1F1至IL1F11)、白介素-1同系物1至4(IL1H1至IL1H4)、IL1相关蛋白1至3(IL1RP1至IL1RP3)、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL10C、IL10D、IL11、IL11a、IL11b、IL12、IL13、IL14、IL15、IL16、IL17、IL17A、IL17B、IL17C、IL17E、IL17F、IL18、IL19、IL20、IL20样(IL20L)、IL21、IL22、IL23、IL23A、IL23-p19、IL23-p40、IL24、IL25、IL26、IL27、IL28A、IL28B、IL29、IL30、IL31、IL32、IL33、IL34、IL35、IL36 α 、IL36 β 、IL36 γ 、IL36RN、IL37、IL37a、IL37b、IL37c、IL37d、IL37e和IL38。在其他方面,本发明的有效载荷可为选自以下的白介素受体:CD121a、CDw121b、IL2R α /CD25、IL2R β /CD122、IL2R γ /CD132、CDw131、CD124、CD131、CDw125、CD126、CD130、CD127、CDw210、IL8RA、IL11R α 、CD212、CD213 α 1、CD213 α 2、IL14R、IL15R α 、CDw217、IL18R α 、IL18R β 、IL20R α 和IL20R β 。

[0349] 在一个实施方案中,本发明的有效载荷可包含IL12。IL12为由抗原呈递细胞(诸如巨噬细胞和树突状细胞)所分泌的具有两种亚基(p35、p40)的异二聚蛋白。IL12为1型细胞因子,其通过STAT4途径作用于自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、CD8⁺细胞毒性T细胞和CD4⁺T

辅助细胞以在这些效应免疫细胞中诱导IFN- γ 产生(综述于Trinchieri G, Nat Rev Immunol. 2003; 3 (2) : 133-146)。IL12可促进NK细胞和CD8⁺ T细胞的细胞毒活性,因此具有抗肿瘤功能。静脉内注射重组IL12在少数具有晚期黑素瘤和肾细胞癌的患者中表现出适度的临床功效(Gollob等, Clin. Cancer Res. 2000; 6 (5) : 1678-1692)。IL12已被用作使用黑素瘤抗原疫苗或使用肽冲击外周血单核细胞增强细胞毒性免疫的佐剂;并且用于在用曲妥珠单抗治疗的乳癌中促进NK细胞活性。在若干肿瘤模型中,将IL12局部递送至肿瘤微环境促进肿瘤消退。这些研究全部指示局部增加的IL12水平可促进抗肿瘤免疫。重组IL12蛋白(或通过溶瘤病毒载体)的全身或局部施用的一个主要障碍为当IL12在高水平下呈递时有严重的副作用。开发严格控制IL12水平的系统可提供IL12在癌症治疗中的安全使用。

[0350] 在本领域中应理解,同一基因或蛋白的某一基因和/或蛋白命名可包括或不包括标点诸如破折号“-”或符号诸如希腊字母。如本领域中技术人员应理解,不论本文中是包括还是不包括这些,所述含义都不意味是改变的。例如,IL2和IL 2是指相同白介素。同样,TNF α 、TNF- α 和TNF α 全部指相同蛋白。

[0351] 在一个方面中,本发明的效应模块可为DD-IL12融合多肽。这种可调控的DD-IL12融合多肽可直接用作免疫治疗剂或可转导至免疫效应细胞(T细胞和TIL细胞)中以生成针对过继性细胞转移具有较大体内扩增和存活能力的修饰T细胞。使用调控的IL12可使当前过继细胞疗法中对苛刻的预处理方案的需求最小。DD-IL12可用于修饰肿瘤微环境并且在目前肿瘤抗原靶向疗法难以治疗的实体肿瘤中增加持久性。在一些实施方案中,CAR表达细胞可武装有DD调控IL12以减轻免疫抑制而无全身毒性。

[0352] 在一些实施方案中,IL12可为Flexi IL12,其中p35和p40亚基均由产生单链多肽的单cDNA编码。单链多肽可以通过将p35亚基置于单链多肽的N末端或C末端来生成。类似地,p40亚基可以在单链多肽的N末端或C末端。在一些实施方案中,本发明的IL12构建体可以置于以下的转录控制下:CMV启动子(SEQ ID NO.716)、EF1a启动子(SEQ ID NO.717、SEQ ID NO.908)或PGK启动子(SEQ ID NO.718)。IL12的保留全长或成熟IL12的一种或多种功能的任何部分均可用于本发明。在一些方面,DD-IL12包含表11中所列出的氨基酸序列。表11中的氨基酸序列可包含终止密码子,其在表中在氨基酸序列末端用“*”表示。

[0353] 表11:DD-IL12构建体

[0354]

描述	启动子	氨基酸序列	氨基酸 SEQ ID NO	核酸 SEQ ID NO
p40 信号序列	-	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVA	719	736-744
接头	-	GGSGG	629	679-680
接头	-	GGGGSGGGGSGGGGS	720	910-915
接头		GS	-	GGA TCC
间隔区		ATNFSLKQAGDVEENPGP	745	746
弗林蛋白酶裂解位点	-	SARNRQKRS	721	750
弗林蛋白酶裂解位点	-	ARNRQKRS	722	751
修饰的弗林蛋白酶	-	ESRRVRRNKRSK	630	681-683
P2A 可裂解肽	-	GATNFSLKQAGDVEENPGP	925	926
p40	-	IWELK KD VYVVELDWYPDAPGEMV VLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLS HLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPK NKTFLRCEAKNYSGRFTCWWTIST DLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSA ERVRGDNKEYEYSVEQCEDSACPAAE ESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWE YPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKR EKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRA QDRYSSSWSEWASVPCS	723	752-761、 632-634

[0355]

p40(K217N)	-	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMV VLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSG KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLS HSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPK NKTFLRCEAKNYSGRFTCWWTIST DLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSA ERVRGDNKEYEYSVEQCEDSACPAAE ESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPNQLKPLKNSRQVEVSWE YPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKR EKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRA QDRYSSSWSEWASVPCS	747	748
p35	-	RNLPVATPDPGMFPCLLHHSQNLLRAV SNMLQKARQTLEFYPTSEEIDHEDIT KDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRET SFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYE DLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIF LDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQK SSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVT IDRVMSYLNAS	724	762-7 71、 1012
ecDHF R(WT 的氨基 酸 2-159)(R12Y、 Y100I)	-	ISLIAALAVDYVIGMENAMPWNLPA LAWFKRNTLNKPVIMGRHTWESIGRP LPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKSVD EAIAACGDVPEIMVIGGGRVIEQFLPK AQKLYLTHIDAEVEGDTHFPDYEPDD WESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILER R	9	692、 772、 814、 687、 988、 991
FKBP(F36V、 L106P)	-	GVQVETISPGDGRTPKRGQTCVVHY TGMLLEDGKKVDSSRDRNKPFKMLG KQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTIS PDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELL KPE	11	684-6 86、 987、 989
FKBP(F36V、 E31G、 R71G、 K105E)	-	GVQVETISPGDGRTPKRGQTCVVHY TGMLGDGKKVDSSRDRNKPFKMLG KQEVIRGWEEGVAQMSVGQGAKLTIS PDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELL LE	12	688-6 91、 994、 1013、 1028
hDHF R(WT 的氨基 酸 2-187; Q36F、 Y122I、 A125F)	-	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPP LRNEFRYFFRMTTSSVEGKQNLVIM GKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSREL KEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPEL ANKVDMVWIVGGSSVIKEFMNHPGH LKLFTVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYK LLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYE KND	46	773
hDHF R(WT 的氨基 酸 2-187)(-	VGSLNCIVAVSQNMGVGKNGDLPWP PLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVI MGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSR ELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPE	894	979

I17V)		LANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHP GHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEK YKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEV YEKND		
hDHFR (WT 的 氨基酸 2-187)(Y122I)	-	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPP LRNEFRYFQRM TTTSSVEGKQNLVIM GKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSREL KEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPEL ANKVDMVWIVGGSSVIKEAMNHPGH LKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYK LLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYE KND	895	694、 995
OT-IL1 2-001(p 40 信号 序列 -FKBP(F36V、 L106P) -接头 (GGSG G)-p40 -接头 2(G4S) 3-p35- 终止序 列)	CMV	MCHQQLVISWFLVFLASPLVAGVQV ETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGML EDGKKVDSSRDRNKPFFKMLGKQEV RGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDIYAY GATGHPGIIPPHATLVFDVELLKPEGG SGGIWELKKDVYVVELDWYDPAPGE MVLVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLG SGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEV LSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEP KNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTIS TDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLS AERVRGDNKEYEYSVEQCEDSACPA EESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSFFI RDIKPDPPKNLQKPLKNSRQVEVS WEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKS KREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISV RAQDRYSSSWSEWASVPCSGGGGS GGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCL HHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPC TSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELT KNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSF MMALCLSSIEDLKMYQVEFKTMNA KLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQA LNFNSETVPQKSSLEEDFYKTKIKLCI LLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS*	727	774
OT-IL1 2-002(Met-F KBP(F 36V、 L106P) -接头 (GGSG G)-p40 信号序 列-p40- 接头	CMV	MGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVH YTGMLDGGKVDSSRDRNKPFFKML GKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLT SPDIYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELL KPEGGSGGMCHQQLVISWFLVFLAS PLVAIWELKKDVYVVELDWYDPAPG EMVLVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVL GSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGE VLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQK EPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAA TLAERVRGDNKEYEYSVEQCEDSAC PAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTS	728	775

[0356]

[0357]

((G4S) 3)-p35- 终止序 列)		SFFIRDIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVE VSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQG KSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASI SVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGG GSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFP CLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEF YPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPL ELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRK TSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKT MNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDEL MQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKI KLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS*		
OT-IL1 2-003(p 40 信号 序列 -FKBP(F36V、 L106P) -弗林 蛋白酶 (SARN RQKR S)-p40- 接头 ((G4S) 3)-p35- 终止序 列)	CMV	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAGVQV ETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGML EDGKKVDSSRDNRNPKFKMLGKQEVI RGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDIYAY GATGHPGIIPPHATLVFDVELLKPE SAR NRQKR SIWELKKDVYVVELDWYPDA PGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSE VLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKG GEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKD QKEPKNKTF LRC EAKNYSGRFTCWW LTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVT CG AATLSAERVRGDNKEYEYSVE CQEDS ACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENY TSSFFIRDIKPDPPKNLQLKPLKNSRQ VEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQV QGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKN ASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSG GGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPG MFPC LHHSQNLLRAVSNMLQKARQT LEFY PCTSEEIDHEDITKDKTSTVEAC LPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLAS RKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFK TMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDE LMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKT KIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS *	729	776
OT-IL1 2-004(p 40 信号 序列 -p40-接 头 ((G4S) 3)-p35- 弗林蛋 白酶 (ARNR	CMV	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELK KD VYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQV KEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLH KKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTF LRC EAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVK SSRGSSDPQGVT CGAATLSAERVRGD NKEYEYSVE CQEDSACPAAEESLPIEV MDAVHKLKYENY TSSFFIRDIKPD PKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTW STPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDR VFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYY	730	777

[0358]

<p>QKRS) -FKBP(E31G、 F36V、 R71G、 K105E) -终止 序列)</p>		<p>SSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGG GGSRNLPVATPDPGMFPC LHHSQNL RAVSNMLQKARQTLEFY PCTSEEIDH EDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLN SRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLS SIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPK RQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRI RAVTIDRVMSYLNASARNRQKRSGVQ VETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGM LGDGKKVDSSRDRNKPFK FMLGKQE VIRGWEEGVAQMSVGQAKLTISPDY AYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLELE*</p>		
<p>OT-IL1 2-005(p 40 信号 序列 -p40-接 头 -((G4S) 3)-p35- 接头 (GGSG)-FKBP (E31G、 F36V、 R71G、 K105E) -终止 序列)</p>	<p>CMV</p>	<p>MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELK KDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTC DT PEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQV KEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLH KKEDGIWSTDILKDQKEPKNK TFLRC EAKNYSGRFTCWWT TISTDLTFSVK SSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGD NKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEV MVD AVHKLKYENY TSSFFIRDI IKPDP PKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTW STPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDR VFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYY SSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGG GGSRNLPVATPDPGMFPC LHHSQNL RAVSNMLQKARQTLEFY PCTSEEIDH EDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLN SRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLS SIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPK RQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRI RAVTIDRVMSYLNASGGSGGVQVETI SPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLGD GKKVDSSRDRNKPFK FMLGKQEVIRG WEEGVAQMSVGQAKLTISPDYAYGA TGHPGIIPPHATLVFDVELLELE*</p>	<p>731</p>	<p>778</p>
<p>OT-IL1 2-006(p 40 信号 序列 -p40-接 头 ((G4S) 3)-p35- 终止序 列)</p>	<p>CMV</p>	<p>MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELK KDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTC DT PEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQV KEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLH KKEDGIWSTDILKDQKEPKNK TFLRC EAKNYSGRFTCWWT TISTDLTFSVK SSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGD NKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEV MVD AVHKLKYENY TSSFFIRDI IKPDP PKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTW STPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDR VFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYY</p>	<p>732</p>	<p>779</p>

[0359]

		SSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGG GGSRNLPVATPDPGMFPC LHHSQNLL RAVSNMLQKARQTLEFY PCTSEEIDH EDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLN SRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLS SIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPK RQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRI RAVTIDRVMSYLNAS*		
OT-IL1 2-007(p 40 信号 序列; ecDHF R(WT 的氨基 酸 2-159)(R12Y、 100I)- 弗林蛋 白酶位 点 (ESRR VRRN KRSK) -p40-接 头 (G4S) 3)-p35)	CMV	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAISLIAA LAVDYVIGMENAMPWNL PADLAWFK RNTLNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRK NIILSSQPGTDDRVTWVKS VDEAIAAC GDVPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYL THIDAEVEGDTHFPDYEPDDWESVFS EFHDADAQNSHSYCFEILERRESRRVR RNKRSKIWELKKDVYVVELDWYPDA PGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSE VLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKG GEVLSHLLLLLHKKEDGIWSTDILKD QKEPKNK TFLRCEAKNYSGRFTCWW LTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCG AATLSAERV RGDNKEYEYSVEQCEDS ACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENY TSSFFIRDIIKPDPPKNLQKPLKNSRQ VEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQV QGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKN ASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSG GGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPG MFPC LHHSQNLLRAVSNMLQKARQT LEFY PCTSEEIDHEDITKDKTSTVEAC LPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLAS RKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFK TMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDE LMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKT KIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	733	780
OT-IL1 2-008(p 40 信号 序列; hDHF (WT 的 氨基酸 2-187)(Q36K、 Y122I、 A125F) -弗林 蛋白酶	CMV	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAVGSLN CIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEF RYFFRMTTSSVEGKQNLVIMGKKT WFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPP QGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKV DMVWIVGGSSVIKEFMNHPGHLKLF VTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPE YPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKNDE SRRVRRNKRSKIWELKKDVYVVELD WYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWT LDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQ YTCHKGGEVLSHLLLLLHKKEDGIWS TDILKDQKEPKNK TFLRCEAKNYSGR FTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQ	734	781

[0360]

位点 (ESRR VRRN KRSK) -p40-接 头 (G4S 3)-p35)		GVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVE CQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKL KYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQKPL KNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT FCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATV ICRKNASISVRAQDRYSSSSWSEWAS VPCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVAT PDPGMFPC LHHSQNLLRAVSNMLQK ARQTLEFYPTSEEIDHEDITKDKTST VEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNG SCLASRKTSFMMALCLSSIEDLKMY QVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNM LAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEP DFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMS YLNAS		
OT-IL1 2-009(p 40 信号 序列 -p40-接 头 (G4S 3)-p35- 弗林蛋 白酶 (ESRR VRRN KRSK) -FKBP(E31G、 F36V、 R71G、 K105E) -终止 序列)	CMV	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELK KD VYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQV KEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLH KKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTF LRC EAKNYSGRFTCWLLTTISTDLTFSVK SSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGD NKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEV M VDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPD PKNLQKPLKNSRQVEVSWEYPDTW STPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDR VFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRY SSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGG GGSRNLPVATPDPGMFPC LHHSQNLL RAVSNMLQKARQTLEFYPTSEEIDH EDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLN SRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLS SIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPK RQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRI RAVTIDRVMSYLNASESRRVRRNKRS KGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVH YTGMLGDGKKVDSSRDRNPKFKFML GKQEVIRGWEEGVAQMSVGQGAKLT ISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVEL LELE*	735	782
OT-IL1 2-019(p 40 信号 序列 -p40-接 头 (G4S 3)-p35-	PGK	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELK KD VYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQV KEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLH KKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTF LRC EAKNYSGRFTCWLLTTISTDLTFSVK SSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGD NKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEV M VDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPD P	732	779

终止序列)		PKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTW STPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDR VFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYY SSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGG GGSRNLPVATPDPGMFPC LHHSQNLL RAVSNMLQKARQTFEYFCTSEEIDH EDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLN SRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLS SIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPK RQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRI RAVTIDRVMSYLNAS*		
OT-IL1 2-020(p 40 信号 序列 -p40-接 头 ((G4S) 3)-p35- 终止 区)	EF1a	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELK KDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDSSEVLGSGKTLTIQV KEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLH KKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFRLC EAKNYSGRFTCWLLTTISTDLTFSVK SSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGD NKEYEYSVEQEDSACPAAEESLPIEV MVDVHKLKYENYTSSFFIRDIKPD PKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTW STPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDR VFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYY SSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGG GGSRNLPVATPDPGMFPC LHHSQNLL RAVSNMLQKARQTFEYFCTSEEIDH EDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLN SRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLS SIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPK RQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRI RAVTIDRVMSYLNAS*	732	779
OT-IL1 2-021(p 40 信号 序列 -p40-接 头 ((G4S) 3)-p35- 终止 区)	无启 动子	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELK KDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDSSEVLGSGKTLTIQV KEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLH KKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFRLC EAKNYSGRFTCWLLTTISTDLTFSVK SSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGD NKEYEYSVEQEDSACPAAEESLPIEV MVDVHKLKYENYTSSFFIRDIKPD PKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTW STPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDR VFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYY SSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGG GGSRNLPVATPDPGMFPC LHHSQNLL RAVSNMLQKARQTFEYFCTSEEIDH EDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLN SRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLS	732	779

[0361]

[0362]

		SIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPK RQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRI RAVTIDRVMSYLNAS*		
OT-IL1 2-022(p 40 信号 序列 -p40-接 头 -((G4S) 3)-p35- 接头 (GGSG)-FKBP (E31G、 F36V、 R71G、 K105E) -终止 序列)	PGK	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELK KD VYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDSSEVLGSGKTLTIQV KEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLH KKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFRLC EAKNYSGRFTCWLLTTISTDLTFSVK SSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGD NKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEV MVD AVHKLKYENY TSSFFIRDIK PDP PKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTW STPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDR VFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYY SSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGG GGSRNLPVATPDPGMFPC LHHSQNLL RAVSNMLQKARQTFEYFCTSEEIDH EDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLN SRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLS SIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPK RQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRI RAVTIDRVMSYLNASGGSGGVQVETI SPGDGRTPKRGQTCVVHYTGMLGD GKKVDSSRDRNKPFKMLGKQEVIRG WEEGVAQMSVGGQAKLTISPDIYAYGA TGHPGIIPPHATLVFDVELLELE*	731	778
OT-IL1 2-023(p 40 信号 序列 -p40-接 头 -((G4S) 3)-p35- 接头 (GGSG)-FKBP (E31G、 F36V、 R71G、 K105E) -终止 序列)	EF1a	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELK KD VYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDSSEVLGSGKTLTIQV KEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLH KKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFRLC EAKNYSGRFTCWLLTTISTDLTFSVK SSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGD NKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEV MVD AVHKLKYENY TSSFFIRDIK PDP PKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTW STPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDR VFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYY SSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGG GGSRNLPVATPDPGMFPC LHHSQNLL RAVSNMLQKARQTFEYFCTSEEIDH EDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLN SRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLS SIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPK RQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRI RAVTIDRVMSYLNASGGSGGVQVETI	731	778

[0363]

		SPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLGD GKKVDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRG WEEGVAQMSVGQGAKLTISPDYAYGA TGHPGIIPPHATLVFDVELLELE*		
OT-IL1 2-024(p 40 信号 序列 -p40-接 头 -((G4S) 3)-p35- 接头 (GGSG)-FKBP (E31G、 F36V、 R71G、 K105E) -终止 序列)	无启 动子	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELK KDYYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDSSEVLGSGKTLTIQV KEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLH KKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFRLC EAKNYSGRFTCWLLTTISTDLTFSVK SSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGD NKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEV MVDVHKLKYENYTSFFIRDIIKPD PKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTW STPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDR VFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYY SSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGG GGSRNLPVATPDPGMFPC LHHSQNLL RAVSNMLQKARQTLFYPCTSEEIDH EDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLN SRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLS SIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPK RQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRI RAVTIDRVMSYLNASGGSGGVQVETI SPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLGD GKKVDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRG WEEGVAQMSVGQGAKLTISPDYAYGA TGHPGIIPPHATLVFDVELLELE*	731	778
OT-IL1 2-025(p 40 信号 序列 -p40-接 头 -((G4S) 3)-p35- 接头 (GGSG)-FKBP (E31G、 F36V、 R71G、 K105E) -终止 序列)	PGK	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELK KDYYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDSSEVLGSGKTLTIQV KEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLH KKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFRLC EAKNYSGRFTCWLLTTISTDLTFSVK SSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGD NKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEV MVDVHKLKYENYTSFFIRDIIKPD PKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTW STPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDR VFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYY SSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGG GGSRNLPVATPDPGMFPC LHHSQNLL RAVSNMLQKARQTLFYPCTSEEIDH EDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLN SRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLS SIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPK RQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRI RAVTIDRVMSYLNASGGSGGVQVETI	731	778

		SPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLGD GKKVDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRG WEEGVAQMSVGQGAKLTISPDYAYGA TGHPGIIPPHATLVFDVELLELE*		
OT-IL1 2-026(p 40 信号 序列 -p40-接 头 -((G4S) 3)-p35- 接头 (GGSG)-FKBP (E31G、 F36V、 R71G、 K105E) -终止 序列)	EF1a	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELK KDYYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDSSEVLGSGKTLTIQV KEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLH KKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFRLC EAKNYSGRFTCWLLTTISTDLTFSVK SSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGD NKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEV MVDVHKLKYENYTSFFIRDIKPD PKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTW STPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDR VFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYY SSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGG GGSRNLPVATPDPMFPC LHHSQNLL RAVSNMLQKARQTLFYPCTSEEIDH EDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLN SRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLS SIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPK RQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRI RAVTIDRVMSYLNASGGSGGVQVETI SPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLGD GKKVDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRG WEEGVAQMSVGQGAKLTISPDYAYGA TGHPGIIPPHATLVFDVELLELE*	731	778
OT-IL1 2-027(p 40 信号 序列 -p40-接 头 -((G4S) 3)-p35- 接头 (GGSG)-FKBP (E31G、 F36V、 R71G、 K105E) -终止 序列)	无启 动子	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELK KDYYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDSSEVLGSGKTLTIQV KEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLH KKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFRLC EAKNYSGRFTCWLLTTISTDLTFSVK SSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGD NKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEV MVDVHKLKYENYTSFFIRDIKPD PKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTW STPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDR VFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYY SSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGG GGSRNLPVATPDPMFPC LHHSQNLL RAVSNMLQKARQTLFYPCTSEEIDH EDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLN SRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLS SIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPK RQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRI RAVTIDRVMSYLNASGGSGGVQVETI	731	778

[0364]

[0365]

		SPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLGD GKKVDSSRDRNKPFKMLGKQEVIRG WEEGVAQMSVGGQAKLTISPDYAYGA TGHPGIIPPHATLVFDVELLELE*		
OT-IL1 2-028(p 40 信号 序列 -p40-接 头 (G4S) 3)-p35- 弗林蛋 白酶 (ARNR QKRS) -FKBP(E31G、 F36V、 R71G、 K105E) -终止 序列)	PGK	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELK KDYYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDSSEVLGSGKTLTIQV KEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLH KKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFRLC EAKNYSGRFTCWLLTTISTDLTFSVK SSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGD NKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEV MVDVHKLKYENYTSFFIRDIKPD PKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTW STPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDR VFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYY SSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGG GGSRNLPVATPDPGMFPC LHHSQNLL RAVSNMLQKARQTFYPTSEEIDH EDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLN SRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLS SIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPK RQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRI RAVTIDRVMSYLNASARNRQKRSGVQ VETISPGDGRTPKRGQTCVVHYTGM LGDGKKVDSSRDRNKPFKMLGKQE VIRGWEEGVAQMSVGGQAKLTISPDY AYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLELE*	730	777
OT-IL1 2-029(p 40 信号 序列 -p40-接 头 (G4S) 3)-p35- 弗林蛋 白酶 (ESRR VRRN KRSK) -FKBP(E31G、 F36V、 R71G、 K105E) -终止 序列)	EF1a	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELK KDYYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDSSEVLGSGKTLTIQV KEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLH KKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFRLC EAKNYSGRFTCWLLTTISTDLTFSVK SSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGD NKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEV MVDVHKLKYENYTSFFIRDIKPD PKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTW STPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDR VFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYY SSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGG GGSRNLPVATPDPGMFPC LHHSQNLL RAVSNMLQKARQTFYPTSEEIDH EDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLN SRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLS SIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPK RQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRI RAVTIDRVMSYLNASESRRVRRNKRS	735	782

[0366]

		<p> KGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVH YTGMLGDGKKVDSSRDRNKPFKFML GKQEVIRGWEEGVAQMSVGGGAKLT ISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVEL LELE* </p>		
<p> OT-IL1 2-030(p 40 信号 序列 -p40-接 头 ((G4S) 3)-p35- 弗林蛋 白酶 (ESRR VRRN KRSK) -FKBP(E31G、 F36V、 R71G、 K105E) -终止 序列) </p>	<p>无启 动子</p>	<p> MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELK KDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDSSEVLGSGKTLTIQV KEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLH KKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRC EAKNYSGRFTCWWLTISTDLTFSVK SSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGD NKEYEYSVEQEDSACPAAEESLPIEV MDAVHKLKYENYTSSFFIRDIKPD PKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTW STPHSYFSLTFCVQVQGGKSKREKKDR VFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYY SSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGG GGSRNLPVATPDPGMFPCLLHHSQNL RAVSNMLQKARQTLEFYPTSEEIDH EDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLN SRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLS SIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPK RQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET VPQSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRI RAVTIDRVMSYLNASESRRVRRNKRS KGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVH YTGMLGDGKKVDSSRDRNKPFKFML GKQEVIRGWEEGVAQMSVGGGAKLT ISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVEL LELE* </p>	735	782
<p> OT-IL1 2-046(p 40 信号 序列 -FKBP(F36V、 L106P) -接头 (GGSG G)-p40- 接头 ((G4S) 3)-p35- 终止序 列) </p>	<p>EF1a</p>	<p> MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAGVQV ETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGML EDGKKVDSSRDRNKPFKFMLGKQEVI RGWEEGVAQMSVQRAKLTISPDYAY GATGHPGIIPPHATLVFDVELLKPEGGS GGIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEM VVLTCDTPEEDGITWTLDSSEVLGSG KTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLS HSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPK NKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTIST DLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSA ERVRGDNKEYEYSVEQEDSACPAAE ESLPIEVMDAVHKLKYENYTSSFFIR DIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWE YPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGGKSKR EKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRA QDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGG GGSGGGSRNLPVATPDPGMFPCLLH SQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPTS </p>	727	774

[0367]		EEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKN ESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMM ALCLSSIIYEDLKMYQVEFKTMNAKLL MDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNF NSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLH AFRIRAVTIDRVMSYLNAS*		
--------	--	---	--	--

[0368] 在一个实施方案中,本发明的有效载荷可包含IL15。白介素15为有效的免疫刺激细胞因子,并且是T细胞和天然杀伤细胞的基本存活因子。对IL2和IL15进行比较的临床前研究已显示,IL15的毒性低于IL2。在一些实施方案中,本发明的效应模块可为DD-IL15融合多肽。还可以修饰IL15多肽以增加其对IL15受体的结合亲和力。例如,IL15的位置72的天冬酰胺可被天冬氨酸替换(美国专利公布US20140134128A1的SEQ ID NO.2;其内容以全文引用的方式并入本文)。在一些实施方案中,本发明的IL15构建体可以置于以下的转录控制下:CMV启动子(SEQ ID NO.716)、EF1a启动子(SEQ ID NO.717、SEQ ID NO.908)或PGK启动子(SEQ ID NO.718)。在一些方面,DD-IL15包含表12中所列出的氨基酸序列。表12中的氨基酸序列可包含终止密码子,其在表中在氨基酸序列末端用“*”表示。

[0369] 表12:DD IL15构建体

描述/构建体 ID	启动子	氨基酸序列	氨基酸 SEQ ID NO	核酸 SEQ ID NO
IL2 信号序列	-	MYRMQLLSCIALSLALVTNS	783	788-791
IgE 前导序列	-	MDWTWILFLVAAATRVHS	801	810、930、931
接头	-	EFSTEF	784	792-793
接头	-	GGSGG	629	676-680
HA 标签	-	YPYDVPDYA	1024	1025-1027
BamHI	-	GS	-	GGATCC
P2A 可裂解肽	-	GATNFSLLKQAGDVEENPGP	925	926
mCherry(M1L)	-	LSKGEEDNMAIIKEFMRFKVH MEGSVNGHEFEIEGEGEGRPY EGTQTAKLKVTKGGPLPFAW	1029	1030

[0371]

		DILSPQFMYGSKAYVKHPADI PDYLKLSFPEGFKWERVMNF EDGGVVTVTQDSSLQDGEFIY KVKLRGTNFPDGPVMQKKT MGWEASSERMYPEDGALKG EIKQRLKLDGGHYDAEVKT TYKAKKPVQLPGAYNVNIK DITSHNEDYTIVEQYERAAGR HSTGGMDELYK		
IL15	-	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHI DATLYTESDVHPSCKVTAMK CFLLELQVISLESGDASIHDTV ENLILANNSLSSNGNVTESGC KECEELEEKNIKEFLQSFVHIV QMFINTS*	785	794-797 、1001
ecDHFR(W T 的氨基酸 2-159)(R12 Y、Y100I)	-	ISLIAALAVDYVIGMENAMP WNLPADLAWFKRNTLNKPV MGRHTWESIGRPLPGRKNIIL SQPGTDDRVTWVKSVD ACGDVPEIMVIGGGRVIEQFL PKAQKLYLTHIDAEVEGDTHF PDYEPDDWESVFSEFHDADA QNSHSYCFEILERR*	9	692、 772、 814、 687、 988、991
hDHFR(W T 的氨基酸 2-187)(Y12 2I)	-	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNG DLPWPPLRNEFRYFQRM TTS SVEGKQNLVIMGKKTWFSIPE KNRPLKGRINLVLSRELKEPP QGAHFLSRSLDDALKLTEQPE LANKVDMVWIVGGSSVIKEA MNHPGHLKLFVTRIMQDFES DTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVL SDVQEEKGIKYKFEVYEKND	895	694、995
OT-IL15-00 1(IL2 信号 序列-IL15- 终止序列)	CMV	MYRMQLLSCIALSLALVTNSN WVNVISDLKKIEDLIQSMHID ATLYTESDVHPSCKVTAMKC FLLELQVISLESGDASIHDTVE NLILANNSLSSNGNVTESGCK ECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQ MFINTS*	786	799
OT-IL15-00 2(IL2 信号 序列-接头 [EFSTEF]-e cDHFR(WT 的氨基酸 2-159、 R12Y、 100I)-接头 [GGSGG]-I	CMV	MYRMQLLSCIALSLALVTNSE FSTEFISLIAALAVDYVIGMEN AMPWNLPADLAWFKRNTLN KPVIMGRHTWESIGRPLPGRK NIILSSQPGTDDRVTWVKSVD EAIACGDVPEIMVIGGGRVI EQFLPKAQKLYLTHIDAEVEG DTHFPDYEPDDWESVFSEFHD ADAQNSHSYCFEILERRGGSG GNWVNVISDLKKIEDLIQSMH IDATLYTESDVHPSCKVTAMK	787	800

L15-终止序列)		CFLLELQVISLES GDASIHDTV ENLILANNSLSSNGNVTESGC KECEELEEKNIKEFLQSFVHIV QMFINTS*		
OT-IL15-06 2(IgE 前导 序列-HA 标 签 -IL15-Bam HI(GS)-终 止序列)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSYP YDVPDYANWVNVISDLKKIE DLIQSMHIDATLYTESDVHPS CKVTAMKCFLLELQVISLESG DASIHDTVENLILANNSLSSN GNVTESGCKECEELEEKNIKE FLQSFVHIVQMFINTSGS*	631	749
OT-IL15-13 2(IgE 前导 序列 -IL15-Bam HI(GS)-P2 A 可裂解肽 -mCherry(M1L)-终止 序列)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHNS WVNVISDLKKIEDLIQSMHID ATLYTESDVHPSCKVTAMKC FLLELQVISLES GDASIHDTVE NLILANNSLSSNGNVTESGCK ECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQ MFINTSGSGATNFSLKQAGD VEENPGPLSKGEEDNMAIIE FMRFKVHMEGSVNGHEFEIE GEGEGRPYEGTQTAKLKVK GGPLPFAWDILSPQFMYGSKA YVKHPADIPDYLKLSFPEGFK WERVMNFEDGGVVTVTQDSS LQDGEFIYKVKLRGTNFPDSDG PVMQKKTMGWEASSERMYP EDGALKGEIKQRLKLDGGH YDAEVKTTYKAKKPVQLPGA YNVNIKLDITSHNEDYTIVEQ YERAEGRHSTGGMDELYK*	725	1055
OT-IL15-13 4(IgE 前导 序列-IL15- 接头 (GS)-hDHF R(WT 2-187、 Y122I)-Ba mHI(GS)-P 2A 可裂解 肽 -mCherry(M1L)-终止 序列)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHNS WVNVISDLKKIEDLIQSMHID ATLYTESDVHPSCKVTAMKC FLLELQVISLES GDASIHDTVE NLILANNSLSSNGNVTESGCK ECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQ MFINTSGSVGSLNCIVAVSQN MGIGKNGDLPWPPLRNEFRY FQRMTTSSVEGKQNLVIMG KKTWFSIPEKNRPLKGRINLV LSRELKEPPQGAHFLSRSLDD ALKLTEQPELANKVDMMVWIV GGSSVIKEAMNHPGHLKLFVT RIMQDFESDTFFPEIDLEKYKL LPEYPGVLSDVQEEKGIKYKF EVYEKNDGSGATNFSLKQA GDVEENPGPLSKGEEDNMAI KEFMRFKVHMEGSVNGHEFE IEGEGEGRPYEGTQTAKLKVT	726	1056

[0372]

[0373]

		KGGPLPFAWDILSPQFMYGSK AYVKHPADIPDYLKLSFPEGF KWERVMNFEDGGVVTVTQD SSLQDGEFIYKVKLRGTNFPS DGPVMQKKTMGWEASSERM YPEDGALKGEIKQRLKLDG GHYDAEVKTTYKAKKPVQLP GAYNVNIKLDITSHNEDYTIV EQYERAEGRHSTGGMDELYK *		
描述/构建 体 ID	启动子	氨基酸序列	氨基酸 SEQ ID NO	核酸 SEQ ID NO
IL2 信号序 列	-	MYRMQLLSCIALSLALVTNS	783	788-791
IgE 前导序 列	-	MDWTWILFLVAAATRVHS	801	810、 930、931
接头	-	EFSTEF	784	792-793
接头	-	GGSGG	629	676-680
HA 标签	-	YPYDVPDYA	1024	1025-10 27
BamHI	-	GS	-	GGATC C
P2A 可裂解 肽	-	GATNFSLLKQAGDVEENPGP	925	926
mCherry(M 1L)	-	LSKGEEDNMAIIEFMRFKVH MEGSVNGHEFEIEGEGEGRPY EGTQTAKLKVTKGGPLPFAW DILSPQFMYGSKAYVKHPADI PDYKLSFPEGFKWERVMNF EDGGVVTVTQDSSLQDGEFIY KVKLRGTNFPSDGPVMQKKT MGWEASSERMYPEDGALKG EIKQRLKLDGGHYDAEVKT TYKAKKPVQLPGAYNVNIKL DITSHNEDYTIVEQYERAEGR HSTGGMDELYK	1029	1030
IL15	-	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHI DATLYTESDVHPSCKVTAMK CFLLELQVISLESGDASIHDTV ENLILANNSLSSNGNVTESGC KECEELEEKNIKEFLQSFVHIV QMFINTS*	785	794-797 、1001
ecDHFR(W T 的氨基酸 2-159)(R12 Y、Y100I)	-	ISLIAALAVDYVIGMENAMP WNLPADLAWFKRNTLNKPI MGRHTWESIGRPLPGRKNIILS SQPGTDDRVTWVKSVDIAIA ACGDVPEIMVIGGGRVIEQFL	9	692、 772、 814、 687、 988、991

[0374]

		PKAQKLYLTHIDAEVEGDTHF PDYEPDDWESVFSEFHDADA QNSHSYCFEILERR*		
hDHFR(W T 的氨基酸 2-187)(Y12 2I)	-	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNG DLPWPPLRNEFRYFQRMTTTS SVEGKQNLVIMGKKTWFSIPE KNRPLKGRINLVLSRELKEPP QGAHFLSRSLDDALKLTEQPE LANKVDMVWVIVGGSSVIKEA MNHPGHLKLFVTRIMQDFES DTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVL SDVQEEKGIKYKFEVYEKND	895	694、995
OT-IL15-00 1(IL2 信号 序列-IL15- 终止序列)	CMV	MYRMQLLSCIALSLALVTNSN WVNVISDLKKIEDLIQSMHID ATLYTESDVHPSCKVTAMKC FLLELQVISLESGDASIHDTVE NLIILANNSLSSNGNVTESGCK ECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQ MFINTS*	786	799
OT-IL15-00 2(IL2 信号 序列-接头 [EFSTEF]-e cDHFR(WT 的氨基酸 2-159、 R12Y、 100I)-接头 [GGSGG]-I L15-终止序 列)	CMV	MYRMQLLSCIALSLALVTNSE FSTEFISLIAALAVDYVIGMEN AMPWNLPADLAWFKRNTLN KPVIMGRHTWESIGRPLPGRK NIISSQPGTDDRVTWVKSVD EAIAACGDVPEIMVIGGGRVI EQFLPKAQKLYLTHIDAEVEG DTHFPDYEPDDWESVFSEFHD ADAQNSHSYCFEILERRGGSG GNWVNVISDLKKIEDLIQSMH IDATLYTESDVHPSCKVTAMK CFLELQVISLESGDASIHDTV ENLIILANNSLSSNGNVTESGC KECEEELEEKNIKEFLQSFVHIV QMFINTS*	787	800
OT-IL15-06 2(IgE 前导 序列-HA 标 签 -IL15-Bam HI(GS)-终 止序列)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSYP YDVPDYANWVNVISDLKKIE DLIQSMHIDATLYTESDVHPS CKVTAMKCFLELQVISLESG DASIHDTVENLIILANNSLSSN GNVTESGCKECEEELEEKNIKE FLQSFVHIVQMFINTSGS*	631	749
OT-IL15-13 2(IgE 前导 序列 -IL15-Bam HI(GS)-P2 A 可裂解肽 -mCherry(MIL)-终止	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSN WVNVISDLKKIEDLIQSMHID ATLYTESDVHPSCKVTAMKC FLLELQVISLESGDASIHDTVE NLIILANNSLSSNGNVTESGCK ECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQ MFINTSGSGATNFSLLKQAGD VEENPGPLSKGEEDNMAIIE	725	1055

序列)		FMRFKVHMEGSVNGHEFEIE GEGEGRPYEGTQTAKLKVT GGPLPFAWDILSPQFMYGSKA YVKHPADIPDYLKLSFPEGFK WERVMNFEDGGVVTVTQDSS LQDGEFIYKVKLRGTNFPSDG PVMQKKTMGWEASSERMYP EDGALKGEIKQRLKLDGGH YDAEVKTTYKAKKPVQLPGA YNVNIKLDITSHNEDYTIVEQ YERAEGRHSTGGMDELYK*		
[0375] OT-IL15-13 4(IgE 前导 序列-IL15- 接头 (GS)-hDHF R(WT 2-187、 Y122I)-Ba mHI(GS)-P 2A 可裂解 肽 -mCherry(MIL)-终止 序列)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHNS WVNVISDLKKIEDLIQSMHID ATLYTESDVHPSCKVTAMKC FLLELQVISLESGDASIHDTVE NLIILANNSLSSNGNVTESGCK ECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQ MFINTSGSVGSLNCIVAVSQN MGIGKNGDLPWPPLRNEFRY FQRMTTSSVEGKQNLVIMG KKTWFSIPEKNRPLKGRINLV LSRELKEPPQGAHFLSRSLDD ALKLTEQPELANKVDMVWIV GGSSVIKEAMNHPGHLKLFVT RIMQDFESDTFFPEIDLEKYKL LPEYPGVLSDVQEEKGIKYKF EVYEKNDGSGATNFSLKQA GDVEENPGPLSKGEEDNMAII KEFMRFKVHMEGSVNGHEFE IEGEGEGRPYEGTQTAKLKVT KGGPLPFAWDILSPQFMYGSK AYVKHPADIPDYLKLSFPEGF KWERVMNFEDGGVVTVTQD SSLQDGEFIYKVKLRGTNFPS DGPVMQKKTMGWEASSERM YPEDGALKGEIKQRLKLDG GHYDAEVKTTYKAKKPVQLP GAYNVNIKLDITSHNEDYTIV EQYERAEGRHSTGGMDELYK *	726	1056

[0376] IL15介导活化的独特特征为反式呈递 (trans-presentation) 机制,其中IL15被呈递为与在相同细胞或不同细胞上结合并活化膜结合IL15 β/γ 受体的IL15受体 α 亚基(IL15Ra)的复合物。IL15/IL15Ra复合物比IL15本身更有效活化IL15信号传导。因此,在一些实施方案中,本发明的效应模块可包括DD-IL15/IL15Ra融合多肽。在一个实施方案中,有效载荷可为美国专利公布号:US20160158285A1(其内容以全文引用的方式并入本文)中所述的IL15/IL15Ra融合多肽。IL15受体 α 包含称为sushi结构域的细胞外结构域,其含有结合IL15所必需的大多数结构元件。因此,在一些实施方案中,有效载荷可为美国专利公布号US20090238791A1(其内容以全文引用的方式并入本文)中所述的IL15/IL15Ra sushi结构域融合多肽。

[0377] 调控IL15/IL15Ra可用于促进CD8T_{EM}细胞群的扩增、存活和效力,而不影响调控性T细胞、NK细胞和TIL细胞。在一个实施方案中,DD-IL15/IL15Ra可用于增强B细胞白血病和淋巴瘤中的CD19定向T细胞疗法。在一个方面,IL15/IL15Ra可用作本发明的有效载荷,以减少当前CAR-T治疗范例中对预处理方案的需求。

[0378] 含有DD-IL15、DD-IL15/IL15Ra和/或DD-IL15/IL15Ra sushi结构域的效应模块可被设计成分泌的(例如使用IL2信号序列)或膜结合的(例如使用IgE或CD8a信号序列)。

[0379] 在一些方面,DD-IL15/IL15Ra包含表13a、13b和13c中所提供的氨基酸序列。表13a、13b和13c中的氨基酸序列可包含终止密码子,其在表中在氨基酸序列末端用“*”表示。

[0380] 表13a:DD-IL15/IL15Ra构建体序列

描述/构建体 ID	氨基酸序列	氨基酸 SEQ ID NO	核酸 SEQ ID NO
IgE 前导序列	MDWTWILFLVAAATRVHS	801	810、930、931
IL15RA 前导序列	MAPRRARGCRTLGLPALLLLL LRPPATRG	932	933
[0381] 接头 (SG3-(SG4) ₃ -SG3-SLQ)	SGGGSGGGSGGGSGGGGSG GGS LQ	802	811、916-920、1002
接头(SG3S)	SGGGS	827	828、844、909
接头 (SG3(SG4) ₅)	SGGGSGGGSGGGSGGGGSG GGS LQ	921	923

[0382]

SG3S)			
接头	SGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	922	924
接头	GS	-	GGTTCC
接头	SG	-	AGCGGC
接头	GSG	-	GGATCCG GA 或 GGATCCG GT
间隔区	-	-	927-929、 1000、 TCGCGAA TG、 TCGCA
IL15	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHID ATLYTESDVHPSCKVTAMKCFL LELQVISLESGDASIHDTVENLII LANNLSNNGNVTESGCKECE LEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINT S*	785	794-797、 1001
IL15Ra	ITCPPMSVEHADIWVKSYSLY SRERYICNSGFKRKAGTSSLTE CVLNKATNVAHWTTPSLKCIR DPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTP QPESLSPSGKEPAASSPSSNNTA ATTAAIVPGSQLMPSKSPSTGTT EISSHESHGTPSQTAKNWELT ASASHQPPGVYPQGHSDTTVAI STSTVLLCGLSAVSLACYLKS RQTPPLASVEMEAMEALPVTW GTSSRDELENC SHHL*	803	812-813、 1003
IL15Ra(Unip rot ID: Q13261.1 的 31-205)	ITCPPMSVEHADIWVKSYSLY SRERYICNSGFKRKAGTSSLTE CVLNKATNVAHWTTPSLKCIR DPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTP QPESLSPSGKEPAASSPSSNNTA ATTAAIVPGSQLMPSKSPSTGTT EISSHESHGTPSQTAKNWELT ASASHQPPGVYPQGHSDTT	1057	1058
mCherry	MSKGEEDNMAIIEFMRFKVH MEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYE GTQTAKLKVTKGGPLPFAWDIL SPQFMYGSKAYVKHPADIPDYL KLSFPEGFKWERVMNFEDGGV VTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRG TNFPSDGPVMQKKTMGWEASS ERMYPEDGALKGEIKQRLKLLK DGGHYDAEVKTTYKAKKPVQ LPGAYNVNIKLDITSHNEDYTI VEQYERAEGRHSTGGMDELYK	1059	1060

	*		
mCherry(M1 L)	LSKGEEDNMAIIKEFMRFKVH MEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYE GTQTAKLKVTKGGPLPFAWDIL SPQFMYGSKAYVKHPADIPDYL KLSFPEGFKWERVMNFEDGGV VTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRG TNFPSDGPVMQKKTMGWEASS ERMYPEDGALKGEIKQRLKLLK DGGHYDAEVKTTYKAKKPVQ LPGAYNVNIKLDITSHNEDYTI VEQYERAEGRHSTGGMDELYK	1029	1030
HA 标签	YPYDVDPDYA	1024	1025-1027
Flag	DYKDDDDDK	1232	-
BamHI	GS	-	GGATCC
P2A 可裂解肽	GATNFSLLKQAGDVEENPGP	925	926
ecDHFR(WT 的氨基酸 2-159 R12Y、Y100I)	ISLIAALAVDYVIGMENAMPW NLPADLAWFKRNTLNKPVIMG RHTWESIGRPLPGRKNILSSQP GTDDRVTWVKSVEAIAACGD VPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQK LYLTHIDAEVEGDTHFPDYEPD DWESVFSEFHDADAQNSHSYC FEILERR*	9	692、772、 814、687、 988、991
ecDHFR(WT 的氨基酸 2-159 R12H、E129K)	ISLIAALAVDHVIGMENAMPW NLPADLAWFKRNTLNKPVIMG RHTWESIGRPLPGRKNILSSQP GTDDRVTWVKSVEAIAACGD VPEIMVIGGGRVYEQFLPKAQK LYLTHIDAEVEGDTHFPDYKPD DWESVFSEFHDADAQNSHSYC FEILERR*	10	798、815、 993
FKBP(E31G、F36V、R71G、K105E)	GVQVETISPGDGRTPKRGQTC VVHYTGMLGDGKKVDSSRDR NKPFKFM LGKQEVIRGWEEGV AQMSVGQGA KLTISP DYAYGA TGHPGIIPPHATLVFDVELLELE *	12	688-691、 994、1013、 1028
hDHFR(WT 的氨基酸 2-187; Y122I、A125F)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGD LPWPPLRNEFRYFQRMTTSSV EGKQNLVIMGKKTWFSIPEKN RPLKGRINLVLSRELKEPPQGA HFLSRSLDDALKLTEQPELANK VDMVWIVGGSSVIKEFMNHPG HLKLFVTRIMQDFESDTFFPEID LEKYKLLPEYPGVLSDVQEEK GIKYKFEVYEKND*	890	696、973、 974、996
hDHFR(WT)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGD	891	700、975、

[0383]

[0384]

的氨基酸 2-187; Q36F、N65F、 Y122I)	LPWPPLRNEFRYFFRMTTSSV EGKQNLVIMGKKTWFSIPEKFR PLKGRINLVLSRELKEPPQGAH FLSRSLDDALKLTEQPELANKV DMVWIVGGSSVIKEAMNHPGH LKL FVTRIMQDFESDTFFPEIDL EKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGI KYKFEVYEKND		976、998
hDHFR(WT 的氨基酸 2-187; K185E)	VGSLNCIVAVSQNMIGKNGD LPWPPLRNEFRYFQRMTTSSV EGKQNLVIMGKKTWFSIPEKN RPLKGRINLVLSRELKEPPQGA HFLSRSLDDALKLTEQPELANK VDMVWIVGGSSVYKEAMNHP GHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEI DLEKYKLLPEYPGVLSDVQEE KGIKYKFEVYEEND*	889	972
hDHFR(WT 的氨基酸 2-187; E162G、 I176F)	VGSLNCIVAVSQNMIGKNGD LPWPPLRNEFRYFQRMTTSSV EGKQNLVIMGKKTWFSIPEKN RPLKGRINLVLSRELKEPPQGA HFLSRSLDDALKLTEQPELANK VDMVWIVGGSSVYKEAMNHP GHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEI DLEKYKLLPGYPGVLSDVQEE KGFKYKFEVYEKND*	888	970-972
hDHFR(WT 的氨基酸 2-187; N127Y)	VGSLNCIVAVSQNMIGKNGD LPWPPLRNEFRYFQRMTTSSV EGKQNLVIMGKKTWFSIPEKN RPLKGRINLVLSRELKEPPQGA HFLSRSLDDALKLTEQPELANK VDMVWIVGGSSVYKEAMYHP GHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEI DLEKYKLLPEYPGVLSDVQEE KGIKYKFEVYEKND	892	977
hDHFR(WT 的氨基酸 2-187; I17V)	VGSLNCIVAVSQNMIGVGNKNGD LPWPPLRNEFRYFQRMTTSSV EGKQNLVIMGKKTWFSIPEKN RPLKGRINLVLSRELKEPPQGA HFLSRSLDDALKLTEQPELANK VDMVWIVGGSSVYKEAMNHP GHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEI DLEKYKLLPEYPGVLSDVQEE KGIKYKFEVYEKND	894	979
hDHFR(WT 的氨基酸 2-187; I17V、 Y122I)	VGSLNCIVAVSQNMIGVGNKNGD LPWPPLRNEFRYFQRMTTSSV EGKQNLVIMGKKTWFSIPEKN RPLKGRINLVLSRELKEPPQGA HFLSRSLDDALKLTEQPELANK VDMVWIVGGSSVIKEAMNHPG	882	969

	HLKLVTRIMQDFESDTFFPEID LEKYKLLPEYPGVLSDVQEEK GIKYKFEVYEKND		
[0385] hDHFR(WT 的氨基酸 2-187; H131R、 E144G)	VGSLNCIVAVSQNMGIGKNGD LPWPPLRNEFRYFQRM TTTSSV EGKQNLVIMGKKTWFSIPEKN RPLKGRINLVLSRELKEPPQGA HFLSRSLDDALKLTEQPELANK VDMVWIVGGSSVYKEAMNHP GRLKLVTRIMQDFGSDTFFPEI DLEKYKLLPEYPGVLSDVQEE KGIKYKFEVYEKND	893	978

[0386] 表13b:DD-IL15/IL15Ra构建体

描述	启动子	氨基酸序列	氨基酸 SEQ ID NO	核酸 SEQ ID NO
[0387] OT-IL15- 006(IgE 信号序 列; IL15; 接 头 1(SG3-(S G4)5-SG 3); IL15Ra; 接头 2(GGSG G); ecDHFR(R12H、 E129K))	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVISD LKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC KVTAMKCFLELQVISLESGDASIHT VENLILANNSLSSNGNVTESGCKECE ELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITC PPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICN SGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW TTPSLKCI RDPALVHQRAPPSTVTTAG VTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAAT TAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHES SHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGV YPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSL LACYLKSQRTPPLASVEMEAMEALPV TWGTSSRDELENC SHHLSGISLIAAL AVDHVIGMENAMPWNLPADLAWFKR NTLNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRKNI ILSSQPGTDDRVTWVKSVD E AIAACG DVPEIMVIGGGRVYEQLPKAQKLYLT HIDAEVEGDTHFPDYKPDDWESVFSE FHDADAQNSHSYC FEILERR*	804	816
OT-IL15- 007(IgE 信号序 列; IL15; 接 头 1(SG3-(S	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVISD LKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC KVTAMKCFLELQVISLESGDASIHT VENLILANNSLSSNGNVTESGCKECE ELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITC PPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICN SGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW	805	817

[0388]

G4)5-SG3); IL15Ra; 接头 2(GGSGG); FKBP(E31G、 F36V、 R71G、 K105E))		TTPSLKCIRDPALVHQRPAAPPSTVTTAG VTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAAT TAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHES SHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGV YPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSL LACYLKSRQTPPLASVEMEAMEALPV TWGTSSRDELENC SHHLSGGVQVET ISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLGD GKKVDSSRDRNKPFFKMLGKQEVIRG WEEGVAQMSVGQGAKLTISPDYAYGA TGHPGIIPPHATLVFDVELLELE*		
OT-IL15-008(IgE 信号序列-IL15- 接头 (SG3-(S G4)3-SG 3-SLQ)-I L15Ra- 终止序列)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVNVID LKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC KVTAMKCFLELQVISLESGDASIHT VENLILANNSLSSNGNVTESGCKECE ELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITC PPPMSVEHADIWVKSYSLYRERYICN SGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW TTPSLKCIRDPALVHQRPAAPPSTVTTAG VTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAAT TAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHES SHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGV YPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSL LACYLKSRQTPPLASVEMEAMEALPV TWGTSSRDELENC SHHL*	806	818
OT-IL15-009(IgE 信号序列-IL15- 接头 (SG3-(S G4)3-SG 3-SLQ)-I L15Ra- 接头 (SG)-ccD HFR(WT 的氨基 酸 2-159; R12Y、 Y100I)- 终止序列)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVNVID LKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC KVTAMKCFLELQVISLESGDASIHT VENLILANNSLSSNGNVTESGCKECE ELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITC PPPMSVEHADIWVKSYSLYRERYICN SGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW TTPSLKCIRDPALVHQRPAAPPSTVTTAG VTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAAT TAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHES SHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGV YPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSL LACYLKSRQTPPLASVEMEAMEALPV TWGTSSRDELENC SHHLSGISLIAAL AVDYVIGMENAMPWNL PADLAWFKR NTLNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRKNI ILSSQPGTDDRVTWVKSVD E AIAACG DVPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLT HIDAEVEGDTHFPDYEPDDWESVFSE FHDADAQNSHSYCFEILERR*	807	819
OT-IL15-010(IgE	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVNVID LKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC	808	820

[0389]

信号序列-IL15-接头 (SG3-(S G4)3-SG 3-SLQ)-I L15Ra-接头 (SG)-hD HFR(Y1 22I、A125F)-终止序列)		KVTAMKCFLELQVISLESGDASIHT VENLILANNSLSSNGNVTESGCKECE ELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITC PPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICN SGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW TTPSLKCIRDPALVHQRPAAPPSTVTTAG VTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAAT TAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHES SHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGV YPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSL LACYLKSRQTPPLASVEMEAMEALPV TWGTSSRDELENC SHHLSGVGSLNC IVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFR YFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWF SIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGA HFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMV WIVGGSSVIKEFMNHPGHLKLFVTRI MQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGV LSDVQEEKGIKYKFEVYEKND*		
OT-IL15-011(IgE 信号序列-IL15-接头 (SG3-(S G4)3-SG 3-SLQ)-I L15Ra; 接头 (SG)-hD HFR(WT 的氨基酸 2-187; Q36F、N65F、Y122I)-终止序列)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVNVID LKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC KVTAMKCFLELQVISLESGDASIHT VENLILANNSLSSNGNVTESGCKECE ELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITC PPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICN SGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW TTPSLKCIRDPALVHQRPAAPPSTVTTAG VTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAAT TAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHES SHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGV YPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSL LACYLKSRQTPPLASVEMEAMEALPV TWGTSSRDELENC SHHLSGVGSLNC IVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFR YFFRMTTTSSVEGKQNLVIMGKKTWF SIPEKFRPLKGRINLVLSRELKEPPQGA HFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMV WIVGGSSVIKEAMNHPGHLKLFVTRI MQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGV LSDVQEEKGIKYKFEVYEKND*	809	821
OT-IL15-017(IgE 信号序列-IL15-接头 (SG3-(S G4)3-SG 3-SLQ)-I	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVNVID LKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC KVTAMKCFLELQVISLESGDASIHT VENLILANNSLSSNGNVTESGCKECE ELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITC PPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICN SGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW	1061	1086

[0390]

L15Ra-接头 (SG)-hD HFR(WT)的氨基酸 2-187; K185E)-终止序列)		TTPSLKCIRDPALVHQRPAAPPSTVTTAG VTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAAT TAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHES SHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGV YPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSL LACYLKSQRQTPPLASVEMEAMEALPV TWGTSSRDELENC SHHLSGVGSLNC IVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFR YFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWF SIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGA HFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMV WIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRI MQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGV LSDVQEEKGIKYKFEVYEEND*		
OT-IL15-018(IgE 信号序列-IL15-接头 (SG3-(S G4)3-SG 3-SLQ)-I L15Ra-接头 (SG)-hD HFR(WT)的氨基酸 2-187; E162G、I176F)-终止序列)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVNVID LKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC KVTAMKCFLELQVISLESGDASIHT VENLILANNSLSSNGNVTESGCKECE ELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITC PPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICN SGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW TTPSLKCIRDPALVHQRPAAPPSTVTTAG VTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAAT TAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHES SHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGV YPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSL LACYLKSQRQTPPLASVEMEAMEALPV TWGTSSRDELENC SHHLSGVGSLNC IVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFR YFQRM TTTSSVEGKQNLVIMGKKTWF SIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGA HFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMV WIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRI MQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPGYPGV LSDVQEEKGFKYKFEVYEKND*	1062	1087
OT-IL15-038(IgE 前导序列-IL15-接头 (SG3-(S G4)3-SG 3-SLQ)-I L15Ra-接头 (SG)-hD HFR(WT)的氨基	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVNVID LKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC KVTAMKCFLELQVISLESGDASIHT VENLILANNSLSSNGNVTESGCKECE ELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITC PPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICN SGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW TTPSLKCIRDPALVHQRPAAPPSTVTTAG VTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAAT TAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHES SHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGV YPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSL LACYLKSQRQTPPLASVEMEAMEALPV	1063	1088

[0391]

酸 2-187; N127Y)- 终止序 列)		TWGTSSRDELENC SHHLSGVGSLNC IVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFR YFQRMTTSSVEGKQNLVIMGKKTWF SIPKRNRLKGRINLVLSRELKEPPQGA HFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMV WIVGGSSVYKEAMYHPGHLKLFVTRI MQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGV LSDVQEEKGIKYKFEVYEKND*		
OT-IL15- 051(IgE 前导序 列-IL15- 接头 (SG3-(S G4)3-SG 3-SLQ)- HA 标签 -IL15Ra- 终止序 列)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVNVID LKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC KVTAMKCFLELQVISLESGDASIHT VENLILANNSLSSNGNVTESGCKECE ELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQYP YDVPDYAITCPPPMSVEHADIWVKS SYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECV LNKATNVAHWTTPSLKCIRD PALVHQ RPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPA ASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPSKSP STGTTEISSHESSHGTPSQT TAKNWELT ASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTV LLCGLSAVSL LACYLKSRQTPPLASVE MEAMEALPVTWGTSSRDELENC SH HL*	1064	1089
OT-IL15- 053(IgE 前导序 列-IL15- 接头 (SG3(SG 4)5SG3S)-IL15Ra -终止序 列)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVNVID LKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC KVTAMKCFLELQVISLESGDASIHT VENLILANNSLSSNGNVTESGCKECE ELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGSITCPPPMSVEHADIWVKS SYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLN KATNVAHWTTPSLKCIRD PALVHQ RPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPA ASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPSKSP STGTTEISSHESSHGTPSQT TAKN WELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVA ISTSTVLLCGLSAVSL LACYLKSRQTP PLASVE MEAMEALPVTWGTSSRDE LENC SHHL*	1066	1091
OT-IL15- 054(IgE 前导序 列-IL15- 接头 (SG3(SG 4)3S)-H A 标签- 接头	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVNVID LKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC KVTAMKCFLELQVISLESGDASIHT VENLILANNSLSSNGNVTESGCKECE ELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGSITCPPPMSVEHADIWVKS SYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLN KATNVAHWTTPSLKCIRD PALVHQ RPAAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPA ASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPSKSP STGTTEISSHESSHGTPSQT TAKN WELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVA ISTSTVLLCGLSAVSL LACYLKSRQTP PLASVE MEAMEALPVTWGTSSRDE LENC SHHL*	1067	1092

[0392]

(SG3S)-I L15Ra- 终止序 列)		PSSNNTAATTAIVPGSQLMPSKSPST GTTEISSHESHGTPSQTTAKNWELTA SASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVL LCGLSAVSLACYLKSRQTPPLASVE MEAMEALPVTWGTSSRDEDLENC SHL*		
OT-IL15- 055(IgE 前导序 列-IL15- 接头 (SG)-IL1 5Ra-终 止序列)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVN VISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESD VHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGD ASIHDTVENLILANNSLSSNGNVTE SGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQ MFINTSSGITCPPPMSVEHADIWVK SYSLSYRERYICNSGFKRKAGTSSL TECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRD PALVHQRAPPSTVTTAGVTPQPE SLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTA IVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSH ESHGTPSQTTAKNWELTASASHQ PPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLC GLSAVSLACYLKSRQTPPLASVEM EAMEALPVTWGTSSRDEDLENC SHHL*	1068	1093
OT-IL15- 060(IL15 Ra 信号 肽-IL15- 接头 (SG3-(S G4)3-SG 3-SLQ)-I L15Ra- 终止序 列)	EF1a	MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLL LRPPATRGNWNVNVISDLKKIEDLI QSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAM KCFLELQVISLESGDASIHDTVEN LILANNSLSSNGNVTESGCKECE LEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSS GGGGSGGGGGSGGGGGSGGGG SLQITCPPPMSVEHADIWVKSY LSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTE CVLNKATNVAHWTTPSLKCIRD PALVHQRAPPSTVTTAGVTPQPE SLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTA IVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSH ESHGTPSQTTAKNWELTASASHQ PPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLC GLSAVSLACYLKSRQTPPLASVEM EAMEALPVTWGTSSRDEDLENC SHHL*	1069	1094
OT-IL15- 063(IgE 前导序 列-IL15- 接头 (SG3-(S G4)3-SG 3-SLQ)-I L15Ra-B amHI(GS)-终止序 列)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVN VISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESD VHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGD ASIHDTVENLILANNSLSSNGNVTE SGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQ MFINTSSGGGGSGGGGGSGGGG SLQITCPPPMSVEHADIWVKSY LSYRERYICNSGFKRKAGTSSLTE CVLNKATNVAHWTTPSLKCIRD PALVHQRAPPSTVTTAGVTPQPE SLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTA IVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSH ESHGTPSQTTAKNWELTASASHQ PPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLC GLSAVSLACYLKSRQTPPLASVEM EAMEALPV	1070	1095

[0393]

		TWGTSSRDEDLENC SHH LGS*		
OT-IL15-064 和 OT-IL15-071(IgE 前导序列-IL15-接头 (SG3-(S G4)3-SG 3-SLQ)-I L15Ra-终止序列)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVNVISD LKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC KVTAMKCFLELQVISLESGDASIHT VENLILANNSLSSNGNVTESGCKECE ELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITC PPPMSVEHADIWVKSYSLYRERYICN SGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW TTPSLKCIRD PALVHQR PAPPSTVTTAG VTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAAT TAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHES SHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGV YPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSL LACYLKS RQTPPLASVEMEAMEALPV TWGTSSRDEDLENC SHH L*	806	818
OT-IL15-066(IgE 前导序列-IL15-接头 (SG3-(S G4)3-SG 3-SLQ)-I L15Ra-接头 (SG)ecD HFR(WT 的氨基酸 2-159、R12Y、Y100I)-终止序列)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVNVISD LKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC KVTAMKCFLELQVISLESGDASIHT VENLILANNSLSSNGNVTESGCKECE ELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITC PPPMSVEHADIWVKSYSLYRERYICN SGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW TTPSLKCIRD PALVHQR PAPPSTVTTAG VTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAAT TAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHES SHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGV YPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSL LACYLKS RQTPPLASVEMEAMEALPV TWGTSSRDEDLENC SHH LSGISLIAAL AVDYVIGMENAMPWNLPADLAWFKR NTLNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRKNI ILSSQPGTDDRVTWVKSVD EAIACG DVPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLT HIDAEVEGDTHFPDYEPDDWESVFSE FHDADAQNSHSYCFEILERR*	807	819
OT-IL15-067(IgE 前导序列-IL15-接头 (SG3-(S G4)3-SG 3-SLQ)-I L15Ra-接头 (SG)-ecD HFR(WT	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVNVISD LKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC KVTAMKCFLELQVISLESGDASIHT VENLILANNSLSSNGNVTESGCKECE ELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITC PPPMSVEHADIWVKSYSLYRERYICN SGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW TTPSLKCIRD PALVHQR PAPPSTVTTAG VTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAAT TAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHES SHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGV YPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSL	1071	1098

的氨基酸 2-159、 R12Y、 Y100I)- 终止序 列)		LACYLKSQRTPPLASVEMEAMEALPV TWGTSSRDEDLNCSHHLSGISLIAAL AVDYVIGMENAMPWNLPADLAWFKR NTLNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRKNI ILSSQPGTDDRVTWVKSVDIAACG DVPEIMVIGGGRVIEQFLPKAQKLYLT HIDAEVEGDTHFPDYEPDDWESVFSE FHDADAQNSHSYCFEILERR*			
OT-IL15- 070(IL15 Ra 信号 肽-IL15- 接头 (SG3-(S G4)3-SG 3-SLQ)-I L15Ra- 终止序 列)	EF1a	MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLLRPPA TRGNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDAT LYTESDVHPSCVTAMKCFLELQVIS LESGDASIHDTVENLILANNSLSSNGN VTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHI VQMFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGSLQITCPPPMSVEHADIWVKS YSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTEC VLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVH QRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEP AASSPSSNNTAATTAIVPGSQLMPSK SPSTGTTEISSHESHGTPSQTAKNW ELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAIST STVLLCGLSAVSLACYLKSQRTPPLA SVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDLN CSHHL*	1072	1101	
[0394]	OT-IL15- 072(IgE 前导序 列-IL15- 接头 (SG3-(S G4)3-SG 3-SLQ)-I L15Ra- 终止序 列)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVISD LKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC KVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDT VENLILANNSLSSNGNVTESGCKECE ELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITC PPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICN SGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW TTPSLKCIRDPALVHQRAPPSTVTTAG VTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAAT TAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHES SHGTPSQTAKNWELTASASHQPPGV YPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSL LACYLKSQRTPPLASVEMEAMEALPV TWGTSSRDEDLNCSHHL*	806	1096
OT-IL15- 089(IgE 前导序 列 -FLAG-I L15-接 头 (SG3-(S G4)3-SG 3-SLQ)-	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSDYKDDDD KNWNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLY TESDVHPSCVTAMKCFLELQVISLE SGDASIHDTVENLILANNSLSSNGNV TESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIV QMFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGSLQYPYDVPDYAITCPPPMSVEH ADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKA GTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR DPALVHQRAPPSTVTTAGVTPQPES LSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPG	1074	1102	

[0395]

HA 标签 -IL15Ra- 接头 (GSG)-ec DHFR(WT 的氨 基酸 2-159、 R12Y、 Y100I)- 终止序 列)		SQLMPSKSPSTGTTEISSHESHGTPSQ TTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSD TTVAISTSTVLLCGLSAVLLACYLKSR QTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRD EDLENCSHHLGSGISLIAALAVDYVIG MENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPV IMGRHTWESIGRPLPGRKNILSSQPGT DDRVTWVKSVDIAAACGDVPEIMVI GGGRVIEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEG DTHFPDYEPDDWESVFSEFHDADAQN SHSYCFEILERR*		
OT-IL15- 109(IgE 前导序 列-IL15- 接头 (SG3-(S G4)3-SG 3-SLQ)-I L15Ra-B amHI(GS)-终止序 列)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVISD LKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC KVTAMKCFLELQVISLESGDASIHTD VENLILANNSLSSNGNVTESGCKECE ELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITC PPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICN SGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW TTPSLKCI RDPALVHQR PAPPSTVTTAG VTPQPELSPSGKEPAASSPSSNNTAAT TAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHES SHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGV YPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSL LACYLKSRQTPPLASVEMEAMEALPV TWGTSSRDELENC SHHLGS*	1070	1095
OT-IL15- 110(IgE 前导序 列 -FLAG-I L15-接 头 (SG3-(S G4)3-SG 3-SLQ)- HA 标签 -IL15Ra- BamHI(GS)-终 止序列)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSDYKDDDD KNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLY TESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLE SGDASIHTDVENLILANNSLSSNGNV TESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIV QMFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGSLQYPYDVPDYAITCPPPMSVEH ADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKA GTSSLTECVLNKATNVAHWTTTPSLKCI RDPALVHQR PAPPSTVTTAGVTPQPE LSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPG SQLMPSKSPSTGTTEISSHESHGTPSQ TTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSD TTVAISTSTVLLCGLSAVLLACYLKSR QTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRD EDLENC SHHLGS*	1075	1103
OT-IL15- 114(IgE 前导序 列 -FLAG-I	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSDYKDDDD KNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLY TESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLE SGDASIHTDVENLILANNSLSSNGNV TESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIV QMFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGG	1076	1104

[0396]

L15-接头 (SG3-(S G4)3-SG 3-SLQ)- HA 标签 -IL15Ra- 接头 (GSG)-h DHFR(WT 的氨 基酸 2-187; K185E)- 终止序 列)		SGGGSLQYPYDVPDYAITCPPPMSVEH ADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKA GTSSLTECVLNKATNVAHWTTTPSLKCI RDPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPES LSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPG SQLMPSKSPSTGTTEISSHESHGTPSQ TTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSD TTVAISTSTVLLCGLSAVSLACYLKSR QTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRD EDLENCSHHLGSGVGLNCIVAVSQN MGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTT TSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRP LKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSL DDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGS SVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFES DTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQE EKGIKYKFEVYEEND*		
OT-IL15- 115(IgE 前导序 列 -FLAG-I L15-接 头 (SG3-(S G4)3-SG 3-SLQ)- HA 标签 -IL15Ra- 接头 (GSG)-h DHFR(WT 的氨 基酸 2-187; E162G、 I176F)- 终止序 列)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSDYKDDDD KNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLY TESDVHPCKVTAMKCFLELQVISLE SGDASIHDTVENLILANNSLSSNGNV TESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIV QMFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGSLQYPYDVPDYAITCPPPMSVEH ADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKA GTSSLTECVLNKATNVAHWTTTPSLKCI RDPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPES LSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPG SQLMPSKSPSTGTTEISSHESHGTPSQ TTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSD TTVAISTSTVLLCGLSAVSLACYLKSR QTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRD EDLENCSHHLGSGVGLNCIVAVSQN MGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTT TSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRP LKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSL DDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGS SVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFES DTFFPEIDLEKYKLLPGYPGVLSDVQE EKGFKYKFEVYEKND*	1077	1105
OT-IL15- 116(IgE 前导序 列 -FLAG-I L15-接 头 (SG3-(S G4)3-SG	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSDYKDDDD KNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLY TESDVHPCKVTAMKCFLELQVISLE SGDASIHDTVENLILANNSLSSNGNV TESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIV QMFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGSLQYPYDVPDYAITCPPPMSVEH ADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKA GTSSLTECVLNKATNVAHWTTTPSLKCI	1078	1106

[0397]

<p>3-SLQ)- HA 标签 -IL15Ra- 接头 (GSG)-h DHFR(WT 的氨 基酸 2-187; H131R、 E144G)- 终止序 列)</p>		<p>RDPALVHQRAPPSTVTTAGVTPQPES LSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPG SQLMPSKSPSTGTTEISSHESHGTPSQ TTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSD TTVAISTSTVLLCGLSAVLLACYLKSR QTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRD EDLENCSHHLGSGVGLNCIVAVSQN MGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTT TSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRP LKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSL DDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGS SVYKEAMNHPGRLKLFVTRIMQDFGS DTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQE EKGIKYKFEVYEKND*</p>		
<p>OT-IL15- 117(IgE 前导序 列 -FLAG-I L15-接 头 (SG3-(S G4)3-SG 3-SLQ)- HA 标签 -IL15Ra- 接头 (GSG)-h DHFR(WT 的氨 基酸 2-187; I17V)-终 止序列)</p>	<p>EF1a</p>	<p>MDWTWILFLVAAATRVHSDYKDDDD KNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLY TESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLE SGDASIHTVENLILANNSLSSNGNV TESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIV QMFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGSLQYPYDVPDYAITCPPPMSVEH ADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKA GTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCI RDPALVHQRAPPSTVTTAGVTPQPES LSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPG SQLMPSKSPSTGTTEISSHESHGTPSQ TTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSD TTVAISTSTVLLCGLSAVLLACYLKSR QTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRD EDLENCSHHLGSGVGLNCIVAVSQN MGVKGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMT TTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNR PLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRS LDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGG SSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFE SDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQ EEKGIKYKFEVYEKND*</p>	<p>1079</p>	<p>1107</p>
<p>OT-IL15- 118(IgE 前导序 列 -FLAG-I L15-接 头 (SG3-(S G4)3-SG 3-SLQ)- HA 标签 -IL15Ra-</p>	<p>EF1a</p>	<p>MDWTWILFLVAAATRVHSDYKDDDD KNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLY TESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLE SGDASIHTVENLILANNSLSSNGNV TESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIV QMFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGSLQYPYDVPDYAITCPPPMSVEH ADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKA GTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCI RDPALVHQRAPPSTVTTAGVTPQPES LSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPG SQLMPSKSPSTGTTEISSHESHGTPSQ TTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSD</p>	<p>1080</p>	<p>1108</p>

接头 (GSG)-h DHFR(WT 的氨 基酸 2-187、 N127Y)- 终止序 列)		TTVAISTSTVLLCGLSAVSLACYLKSR QTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRD EDLENC SHHLGSGVGS LNCIVAVSQN MGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTT TSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRP LKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSL DDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGS SVYKEAMYHPGHLKLFVTRIMQDFES DTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQE EKGIKYKFEVYEKND*		
OT-IL15- 119(IgE 前导序 列 -FLAG-I L15-接 头 (SG3-(S G4)3-SG 3-SLQ)- HA 标签 -IL15Ra- 接头 (GSG)-h DHFR(WT 的氨 基酸 2-187、 I17V、 Y122I)- 终止序 列)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSDYKDDDD KNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLY TESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLE SGDASIHTVENLILANNSLSSNGNV TESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIV QMFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGSLQYPYDVPDYAITCPPPMSVEH ADIWVKSYSLSYRERYICNSGFKRKA GTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCI RDPALVHQRPAAPPSTVTTAGVTPQPES LSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPG SQLMPSKSPSTGTTEISSHESHGTPSQ TTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSD TTVAISTSTVLLCGLSAVSLACYLKSR QTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRD EDLENC SHHLGSGVGS LNCIVAVSQN MGVKGNGDLPWPPLRNEFRYFQRMT TTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNR PLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRS LDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGG SSVIKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFES DTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQE EKGIKYKFEVYEKND*	1081	1109
OT-IL15- 128(IgE 前导序 列-IL15- 接头 (SG3-(S G4)3-SG 3-SLQ)-I L15Ra- 间隔区 -Flagx3- 间隔区 -BamHI(GS)-P2A 可裂解 肽	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVISD LKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC KVTAMKCFLELQVISLESGDASIHT VENLILANNSLSSNGNVTESGCKECE ELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITC PPPMSVEHADIWVKSYSLSYRERYICN SGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW TTPSLKCI RDPALVHQRPAAPPSTVTTAG VTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAAT TAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHES SHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGV YPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSL LACYLKSRQTPPLASVEMEAMEALPV TWGTSSRDELENC SHHL SRMDYKD DDDKDYKDDDDKDYKDDDDKSRGS	1082	1110

[0398]

[0399]	-mCherry (MIL)-终止序列)		GATNFSLLKQAGDVEENPGPLSKGEE DNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFE IEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPL PFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPD YLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVT VTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSD GPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGA LKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTY KAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNED YTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYK*		
	OT-IL15-129(IgE前导序列-IL15-接头 (SG3-(S G4)3-SG 3-SLQ)-I L15Ra-B amHI(GS)-P2A 可裂解肽 -mCherry (MIL)-终止序列)	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVHSNWNVISD LKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC KVTAMKCFLELQVISLESGDASIHT VENLILANNSLSSNGNVTESGCKECE ELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQITC PPPMSVEHADIWVKSYSLSRERYICN SGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHW TTPSLKCIRDPALVHQRAPPSTVTTAG VTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAAT TAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHES SHGTPSQTAKNWELTASASHQPPGV YPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSL LACYLKSQRTPPLASVEMEAMEALPV TWGTSSRDEDLENCSHHLGSGATNFS LLKQAGDVEENPGPLSKGEEDNMAII KEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGE GRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDI LSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYLKLSF PEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSS LQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPVMQK KTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQ RLKLDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQ LPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYE RAEGRHSTGGMDELYK*	1083	1111

[0400] 表13c: IL15/IL15Ra构建体

构建体描述	序列表描述	启动子	氨基酸序列	氨基酸 SEQ ID NO	核酸 SEQ ID NO/序列
[0401] OT-IL15-122(IgE前导序列-IL15-接头	Full 构建体	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVH SNWVNVISDLKKIEDLIQ SMHIDATLYTESDVHPSC KVTAMKCFLELQVISLE SGDASIHTVENLILAN NSLSSNGNVTESGCKEC	1114、 1126- 1140	1120

[0402]

(GS)-hDH FR(WT 的 氨基酸 2-187、 Y122I)-终 止序列-间 隔区 -IRES-间 隔区 -mCherry- 终止序列)			EELEEKNIKEFLQSFVHI VQMFINTSGSVGSLNCIV AVSQNMGIGKNGDLPWP PLRNEFRYFQRM TTTSSV EGKQNLVIMGKKTWFSI PEKNRPLKGRINLVLSRE LKEPPQGAHFLSRSLDD ALKLTEQPELANKVDMV WIVGGSSVIKEAMNHPG HLKLFVTRIMQDFESDTF FPEIDLEKYKLLPEYPGV LSDVQEEKGIKYKFEVY EKND*SR*YDSLEIPPLSL PPP*RYWPKPLGIRPVCV CLYVIFHHIAVFWQCEGP ETWPCLLDEHS*GSFPSR QRNARSVECREGSSSSGS FLKTNNVCSDPLQAAEP PTWRQVPLRPKATCIRYT CKGGTTPVPRCELDSCG KSQMALLKRIQQGAEGC PEGTPLYGI*SGASVHML YMCLVEVKKTSRPPEPR GRGFPLKNTMIIWPQP** ARARRITWPSSRSSCASR CTWRAP*TATSSRSRARA RAAPTRAPRPPS*R*PRV APCPSPGTSCPLSSCTAP RPT*STPPTSPTT*SCPSP RASSGSA**TSRTAAW*P *PRTPPCRTASSSTR*SCA APTSPPTAP*CRRRPWAG RPPPSGCTPRTAP*RARSS RG*S*RTAATTTLSRPPT RPRSPCSCPAPTTSTSSW TSPPTTRITPSWNSTNAP RAATPPAAWTSCTS		
IgE 前 导序 列 -IL15- 接头 (GS)-h DhFR (WT 的氨 基酸 2-187、 Y122I	-		MDWTWILFLVAAATRVH SNWVNVISDLKKIEDLIQ SMHIDATLYTESDVHPSC KVTAMKCFLELQVISLE SGDASIHDVTENLILAN NSLSSNGNVTESGCKEC EELEEKNIKEFLQSFVHI VQMFINTSGSVGSLNCIV AVSQNMGIGKNGDLPWP PLRNEFRYFQRM TTTSSV EGKQNLVIMGKKTWFSI PEKNRPLKGRINLVLSRE LKEPPQGAHFLSRSLDD	1115	1121

[0403]

)-终止序列		ALKLTEQPELANKVDMV WIVGGSSVIKEAMNHPG HLKLFVTRIMQDFESDTF FPEIDLEKYKLLPEYPGV LSDVQEEKGIKYKFEVY EKND*			
	mCherry-终止序列	-	MSKGEEDNMAIIEFMR FKVHMEGSVNGHEFEIE GEGEGRPYEGTQTAKLK VTKGGPLPFAWDILSPQF MYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNF EDGGVVTVTQDSSLQDG EFIYKVKLRGTNFPDGP VMQKKTMGWEASSERM YPEDGALKGEIKQRLKL KDGGHYDAEVKTTYKA KKPVQLPGAYNVNIKLD ITSHNEDYTIVEQYERAE GRHSTGGMDELYK*	1116	1122	
	OT-IL15-123 和 OT-IL15-127(IgE 前导序列 -IL15-BamHI(GS)-终止序列-间隔区 -IRES-间隔区 -mCherry-终止序列)	Full 构建体	EF1a	MDWTWILFLVAAATRVH SNWVNVISDLKKIEDLIQ SMHIDATLYTESDVHPSC KVTAMKCFLELQVISLE SGDASIHDTVENLILAN NSLSSNGNVTESGCKEC EELEEKNIKEFLQSFVHI VQMFINTSGS*NLDNTT H*RSRPSPPPPNVTGRS RLE*GRCAFVYMLFSTIL PSFGNVRARKPGPVFLTS IPRGLSPLAKGMQGLLN VVKEAVPLEAS*RQTTSV ATLCRQRNPPPGDRCLC GQKPRV*DTPAKAAQPQ CHVVSWIVVERVKWLSS SVFNKGLKDAQKVPHC MGSDLGPRCTCFTCV*S RLKKRLGPPNHGDVVFL *KTR**YGHNHDEQGRG G*HGHHQGVHALQGAH GGLRERPRVRDRGRGRG PPLRGHPDRQAEGDQG WPPALRLGHPVPSVHVR LQGLREAPRRHPRLLEA VLPRGLQVGARDELGR RRGDRDPGLLPAGRRVH LQGEAARHQLPLRRPRN AEEDHGLGLLRADVPR GRRPEGRDQAEAEAEGR	1117、1141-1149	1123

			RPLRR*GQDHLQGQEAR AAARRLQRQHVGHHL PQRGLHHRGTVRTRRGP PLHRRHGRAVQV		
[0404]	IgE 前 导序 列 -IL15- BamH I(GS)- 终止 序列	-	MDWTWILFLVAAATRVH SNWVNVISDLKKIEDLIQ SMHIDATLYTESDVHPSC KVTAMKCFLELQVISLE SGDASIHDTVENLIILAN NSLSSNGNVTESGCKEC EELEEKNIKEFLQSFVHI VQMFINTSGS*	1118	1124
	mCher ry-终 止序 列	-	MSKGEEDNMAIIEFMR FKVHMEGSVNGHEFEIE GEGEGRPYEGTQTAKLK VTKGGPLPFAWDILSPQF MYGSKAYVKHPADIPDY LKLSFPEGFKWERVMNF EDGGVVTVTQDSSLQDG EFIYKVKLRGTNFPDGP VMQKKTMGWEASSERM YPEDGALKGEIKQRLKL KDGGHYDAEVKTTYKA KKPVQLPGAYNVNIKLD ITSHNEDYTIVEQYERAE GRHSTGGMDELYK*	1119	1125

[0405] 在一个实施方案中,本发明的有效载荷可包含IL18。IL18为促进T细胞和NK细胞产生IFN- γ 的促炎性并且免疫调控性细胞因子。IL18属于IL1家族。分泌的IL18结合由IL18R α 和 β 链组成的异二聚体受体复合物,并起始信号转导。IL18与其他细胞因子协调起作用以调节免疫系统功能,包括诱导IFN- γ 产生、Th1应答和应答于病原体产物的NK细胞活化。IL18在若干肿瘤中显示出抗癌作用。重组IL18蛋白或IL18转基因的施用通过CD4⁺ T和/或NK细胞介导的应答诱导黑素瘤或肉瘤消退(综述于Srivastava等,Curr.Med.Chem.,2010,17:3353-3357)。IL18与其他细胞因子(诸如IL12或共刺激分子(例如,CD80))的组合增加IL18抗肿瘤作用。例如,IL18和IL12A/B或CD80基因已成功整合在溶瘤病毒的基因组中,目的为协同引发T细胞介导的抗肿瘤免疫应答(Choi等,Gene Ther.,2011,18:898-909)。IL2/IL18融合蛋白还在临床前模型中展示出相对于任一单独细胞因子增强的抗肿瘤特性和低毒性(Acres等,Cancer Res.,2005,65:9536-9546)。

[0406] 单独IL18或与IL12和IL15组合均活化NK细胞。临床前研究表明,过继性转移IL12、IL15和IL18预活化NK细胞展示出针对体内已建立的肿瘤增强的效应功能(Ni等,J Exp Med.2012,209:2351-2365;以及Romee等,Blood.2012,120:4751-4760)。人IL12/IL15/IL18活化NK细胞还展示出记忆样特征并且应答于细胞因子(例如,低浓度的IL2)分泌更多的IFN- γ 。在一个实施方案中,本发明的效应模块可为DD-IL18融合多肽。

[0407] 在一个实施方案中,本发明的有效载荷可包含IL21。IL21为另一种多效I型细胞因子,其主要由T细胞和自然杀T(NKT)细胞产生。IL21对多种细胞型具有不同的作用,包括但不限于CD4⁺和CD8⁺ T细胞、B细胞、巨噬细胞、单核细胞和树突状细胞(DC)。IL21的功能性受

体由IL21受体(IL21R)和共同的细胞因子受体 γ 链组成,后者还为IL2、IL4、IL7、IL9和IL15受体的亚基。研究提供了令人信服的证据,IL21为癌症免疫疗法的有希望的免疫治疗剂。IL21促进成熟,增强细胞毒性并诱导NK细胞产生IFN- γ 和穿孔素。这些效应功能抑制B16黑素瘤的生长(Kasaian等,Immunity.2002,16(4):559-569;以及Brady等,J Immunol.2004,172(4):2048-2058)。IL21连同IL15一起扩大了抗原特异性CD8⁺T细胞数及其效应功能,导致肿瘤消退(Zeng等,J Exp Med.2005,201(1):139-148)。IL21还可用于使肿瘤微环境中的多个免疫效应细胞恢复活力。IL21还可以通过活化STAT3或STAT1信号途径直接诱导某些类型的淋巴瘤(诸如弥漫性大B细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤和慢性淋巴细胞性白血病细胞)的凋亡。IL21单独或与抗CD20 mAb(利妥昔单抗)组合均可活化NK细胞依赖性细胞毒性作用。有趣的是,IL21免疫抑制作用的发现表明,这种细胞因子为“双刃剑”,IL21刺激可导致免疫应答的诱导或抑制。当使用IL21相关免疫治疗剂时,必须考虑IL21的刺激作用和抑制作用。IL21的水平需要通过调控元件严格控制。在一个方面,本发明的效应模块可为DD-IL21融合多肽。

[0408] 在一些实施方案中,本发明的有效载荷可包含I型干扰素。I型干扰素(IFN-I)为对于抵抗人体内的病毒感染来说重要的可溶性蛋白。IFN-I包括IFN- α 亚型(IFN- α 1、IFN- α 1b、IFN- α 1c)、IFN- β 、IFN- δ 亚型(IFN- δ 1、IFN- δ 2、IFN- δ 8)、IFN- γ 、IFN- κ 和IFN- ϵ 、IFN- λ 、IFN- ω 、IFN- τ 和IFN- ζ 。IFN- α 和IFN- β 为免疫应答中主要的IFN-I亚型。IFN-I的所有亚型均通过独特的异二聚受体干扰素 α 受体(IFNAR)进行信号传导,所述受体由2个亚基IFNAR1和IFNAR2构成。IFNR活化调控宿主对病毒感染的应答并且在适应性免疫中进行调控。IFNR可活化多种信号传导级联,包括Janus活化激酶-信号转导子和转录活化(JAK-STAT)途径、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)途径、磷酸肌醇3-激酶(PI3K)途径、v-crk肉瘤病毒CT10癌基因同源(禽)样(CRKL)途径和NF- κ B级联。早已确定,I型IFN直接抑制肿瘤细胞和病毒感染细胞的增殖并且增加MHC I类表达,增强抗原识别。IFN-I也已被证明参与免疫系统调节。IFN可通过干扰素受体(IFNR)直接地或通过诱导趋化因子和细胞因子间接地调控免疫系统。I型IFN增强NK细胞功能并促进NK细胞的存活。I型IFN还影响单核细胞,支持单核细胞分化为具有高抗原呈递能力的DC,并刺激巨噬细胞功能和分化。若干研究还表明,IFN-I可促进CD8⁺T细胞存活和功能。在一些情况下,可能希望使用本发明的生物回路调整I型IFN的表达,以避免由长期用IFN治疗所致的免疫抑制。

[0409] 正在开发使用重组I型IFN蛋白、I型IFN转基因、I型IFN编码载体和I型IFN表达细胞的新抗癌免疫疗法。例如,IFN- α 已获批用于治疗多种肿瘤性疾病诸如黑素瘤、RCC和多发性骨髓瘤。尽管I型IFN为直接和间接调节免疫系统功能的强大工具,但全身性长期治疗的副作用以及缺乏足够高的疗效削弱了IFN- α 对于肿瘤学中临床使用的价值。据信,如果严格控制恶性组织的IFN水平,那么I型IFN可能更有效。根据观察结果提出了间歇性递送的方法,以最佳速度的间歇可帮助避免应答免疫细胞中IFN-I所诱导的(即,因为SOCS1诱导)信号传导脱敏机制(负反馈机制)。根据本发明,效应模块可包含DD-IFN融合多肽。DD及其配体控制IFN的表达,以诱导抗病毒和抗肿瘤免疫应答,并且同时将由IFN的长期暴露引起的副作用降至最少。

[0410] 在一些实施方案中,本发明的有效载荷可包含肿瘤坏死因子(TNF)超家族成员。如本文所用,术语“TNF超家族”是指可以诱导细胞凋亡的一组细胞因子。TNF家族的成员包括

TNF- α 、TNF- β (还称为淋巴毒素- α (LT- α))、淋巴毒素- β (LT- β)、CD40L (CD154)、CD27L (CD70)、CD30L (CD153)、FASL (CD178)、4-1BBL (CD137L)、OX40L、TRAIL、(TNF-相关凋亡诱导配体)、APRIL (增殖诱导配体)、TWEAK、TRANCE、TALL-1、GITRL、LIGHT和TNFSF1至TNFSF20 (TNF配体超级家族成员1至20)。在一个实施方案中,本发明的有效载荷可为TNF- α 。TNF- α 可导致肿瘤细胞的细胞溶解并且同样诱导细胞增殖分化。在一个方面,本发明的效应模块可包含DD-TNF α 融合多肽。

[0411] 在一些实施方案中,本发明的有效载荷可包含封闭抑制性细胞因子的抑制性分子。抑制剂可为特异于抑制性细胞因子的封闭抗体和针对抑制性细胞因子的拮抗剂等等。

[0412] 在一些方面,本发明的有效载荷可包含次级细胞因子IL35抑制剂。IL35属于白介素-12 (IL12) 细胞因子家族,并且为由IL27 β 链Ebi3和IL12 α 链p35构成的异二聚体。仅描述了叉头框蛋白3 (Foxp3)⁺调控性T细胞 (Treg) (静止和活化Treg) 中的生物活性IL35的分泌。与家族中的其他膜不同,IL35似乎通过抑制效应T细胞增殖和其他可能的参数而仅以抗炎的方式起作用 (Collison等, Nature, 2007, 450 (7169): 566-569)。

[0413] 在一些实施方案中,本发明的有效载荷可包含封闭转化生长因子 β (TGF- β) 亚型 (TGF- β 1、TGF- β 2和TGF- β 3) 的抑制剂。TGF- β 由许多细胞型 (包括巨噬细胞) 分泌,并且常常与两种蛋白LTBP和LAP复合。血清蛋白酶 (诸如纤溶酶) 可催化复合物的活性TGF- β 从活化巨噬细胞中释放出来。已经显示,TGF- β 表达的增加与许多癌症的恶性肿瘤相关。TGF- β 在肿瘤微环境中的免疫抑制活性促成肿瘤发生。

[0414] 在一些实施方案中,本发明的有效载荷可包含IDO酶抑制剂。

[0415] 在一些实施方案中,本发明的有效载荷可包含趋化因子和趋化因子受体。趋化因子为分泌小细胞因子家族或诱导附近应答性细胞中的定向趋化的信号传导蛋白。趋化因子可为: SCY (小细胞因子), 其选自由SCYA1-28 (CCL1-28)、SCYB1-16 (CXCL1-16)、SCYC1-2 (XCL1-2)、SCYD-1和SCYE-1组成的组; 或C趋化因子, 其选自XCL1和XCL2; 或CC趋化因子, 其选自CCL1、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9、CCL10、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27和CCL28; 或CXC趋化因子, 其选自CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16和CXCL17; 或CX3C趋化因子CX3CL1。在一些方面,趋化因子受体可为C趋化因子的受体, 包括XCR1; 或CC趋化因子的受体, 包括CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9和CCR10; 或CXC趋化因子的受体, 包括CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4和CXCR5; 或CX3C趋化因子受体CX3CR1。

[0416] 在一些实施方案中,本发明的有效载荷可包含在免疫疗法中起关键作用的其他免疫调节剂, 诸如GM-CSF (粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子)、促红细胞生成素 (EPO)、MIP3a、单核细胞趋化蛋白 (MCP)-1、细胞内粘附分子 (ICAM)、巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF)、白介素-1受体活化激酶 (iRAK-1)、乳运铁蛋白和粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)。

[0417] 在一些实施方案中,本发明的有效载荷可以包含双调蛋白。双调蛋白 (AREG) 为EGF样生长因子, 其与EGFR受体结合并增强CD4⁺调控T细胞 (Treg) 功能。AREG促进肿瘤环境中的免疫抑制。因此, 在一些实施方案中,本发明的有效载荷可包含双调蛋白以削弱免疫疗法期间的免疫应答。

[0418] 在一些实施方案中,本发明的有效载荷可包含融合蛋白, 其中细胞因子、趋化因子

和/或其他可溶性因子可与其他生物分子诸如受体的抗体和/或配体融合。此类融合分子可增加细胞因子的半衰期,降低全身毒性并增加肿瘤部位细胞因子的局部浓度。包含两种或更多种细胞因子、趋化因子和/或其他可溶性因子的融合蛋白可用于获得协同治疗益处。在一个实施方案中,有效载荷可为GM-CSF/IL2融合蛋白。

[0419] 3. 额外效应模块特征部

[0420] 本发明的效应模块可还包含:信号序列,其调控感兴趣的有效载荷的分布;裂解和/或加工特征部,其有利于有效载荷从效应模块构造裂解;靶向和/或穿透信号,其可调控效应模块的细胞定位;标签;和/或一个或多个接头序列,其连接效应模块的不同组分。

[0421] 信号序列

[0422] 除SRE(例如,DD)和有效载荷区之外,本发明的效应模块还可包含一个或多个信号序列。信号序列(有时称为信号肽、靶向信号、靶肽、定位序列、转运肽、前导序列或前导肽)将蛋白(例如,本发明的效应模块)引导至其指定的细胞和/或细胞外定位。蛋白信号序列在几乎所有分泌的蛋白和许多整合膜蛋白的靶向和易位中起着核心作用。

[0423] 信号序列为存在于预定到达特定定位的大多数新合成蛋白的N末端的短(长5-30个氨基酸)肽。信号序列可被信号识别粒子(SRP)识别并使用I型和II型信号肽酶裂解。可将来源于人蛋白的信号序列作为效应模块的调控性模块并入,以将效应模块引导至特定细胞和/或细胞外定位。这些信号序列被以实验方式验证并且可被裂解(Zhang等,Protein Sci.2004,13:2819-2824)。

[0424] 在一些实施方案中,信号序列可(但不是必要地)位于效应模块的N末端或C末端,并且可(但不是必要地)从所需的效应模块裂解出,以得到“成熟”有效载荷,即如本文所讨论的免疫治疗剂。

[0425] 在一些示例中,信号序列可为来源于天然分泌的蛋白的分泌的信号序列及其变体。在一些情况下,分泌的信号序列可为细胞因子信号序列,诸如但不限于:包含氨基酸SEQ ID NO:783的IL2信号序列,其由核苷酸SEQ ID NO:788-791编码;和/或包含氨基酸序列SEQ ID NO:719的p40信号序列,其由核苷酸SEQ ID NO:736-744编码。

[0426] 在一些情况下,可以使用将感兴趣的有效载荷引导至靶细胞表面膜的信号序列。有效载荷在靶细胞表面上的表达可用于限制有效载荷向非靶体内环境的扩散,从而潜在地改进有效载荷的安全特性。另外,有效载荷的膜呈递可实现生理上并且性质上的信号传导以及有效载荷的稳定和再循环持续较长半衰期。膜序列可为感兴趣的的有效载荷的N末端组分的内源性信号序列。任选地,可能希望将这种序列交换为不同的信号序列。信号序列可以基于其与感兴趣的细胞型的分泌途径的相容性进行选择,使得有效载荷呈递在T细胞表面上。在一些实施方案中,信号序列可为:IgE信号序列,其包含氨基酸SEQ ID NO:801和核苷酸序列SEQ ID NO:810、930或931;CD8a信号序列(还称为CD8a前导序列),其包含氨基酸SEQ ID NO:628和核苷酸序列SEQ ID NO:671-675;或IL15Ra信号序列(还称为IL15Ra前导序列),其包含氨基酸SEQ ID NO:932和核苷酸序列SEQ ID NO:933。

[0427] 信号序列的其他示例包括,变体可为美国专利号8,148,494、8,258,102、9,133,265、9,279,007、和美国专利申请公布号20070141666、以及国际专利申请公布号W01993018181中所讨论的修饰的信号传导序列,每个专利的内容以全文引用的方式并入本文。

[0428] 在其他示例中,信号序列可为其他生物体诸如病毒、酵母和细菌的异源信号序列,其可将效应模块引导至特定细胞位点,诸如核(例如,EP 1209450)。其他示例可包括:来自木霉属(*Trichoderma*)的天冬氨酸蛋白酶(NSP24),其可增加融合的蛋白诸如酶的分泌(例如,Cervin和Kim的美国专利号8,093,016);细菌脂蛋白信号序列(例如,Lau和Rioux的PCT申请公布号W0199109952);大肠杆菌肠毒素II信号肽(例如,Kwon等的美国专利号6,605,697);大肠杆菌分泌信号序列(例如,Malley的美国专利公布号US2016090404);来自甲基营养型酵母的脂肪酶信号序列(例如,美国专利号8,975,041);和来源于棒状杆菌(*Coryneform bacteria*)的DNA酶的信号肽(例如,美国专利号4,965,197);每个专利的内容以全文引用的方式并入本文。

[0429] 信号序列还可包括核定位信号(NLS)、核输出信号(NES)、极化的细胞管-泡结构定位信号(参见美国专利号8,993,742;Cour等,*Nucleic Acids Res.*2003,31(1):393-396;每个参考文献的内容以全文引用的方式并入本文)、细胞外定位信号、亚细胞定位(例如,溶酶体、内质网、高尔基体、线粒体、质膜和过氧化物酶体等)的信号(参见例如,美国专利号7,396,811;以及Negi等,*Database*,2015,1-7;每个参考文献的内容以全文引用的方式并入本文)。

[0430] 在一些实施方案中,本发明的信号序列包括但不限于提交于2016年4月11日的共同未决的共同拥有的美国临时专利申请号62/320,864的表6、或提交于2017年3月3日的美国临时申请号62/466,596、和国际公布W02017/180587中所教导的任一者,每个专利的内容以全文引用的方式并入本文。

[0431] 裂解位点

[0432] 在一些实施方案中,效应模块包含裂解和/或加工特征部。本发明的效应模块可包括至少一个蛋白裂解信号/位点。蛋白裂解信号/位点可位于N末端、C末端、在N末端与C末端之间的任何空间处(诸如但不限于在N末端与C末端之间的中间)、在N末端与中间点之间、在中间点与C末端之间以及其组合。

[0433] 效应模块可包括任何蛋白酶的一个或多个裂解信号/位点。蛋白酶可为丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、肽链内切酶、二肽酶、金属蛋白酶、谷氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶。在一些方面,裂解位点可为以下的信号序列:弗林蛋白酶、猕猴桃蛋白酶(actinidain)、钙蛋白酶-1(calpain-1)、羧基肽酶A、羧基肽酶P、羧基肽酶Y、半胱天冬酶-1(caspase-1)、半胱天冬酶-2、半胱天冬酶-3、半胱天冬酶-4、半胱天冬酶-5、半胱天冬酶-6、半胱天冬酶-7、半胱天冬酶-8、半胱天冬酶-9、半胱天冬酶-10、组织蛋白酶B(cathepsin B)、组织蛋白酶C、组织蛋白酶G、组织蛋白酶H、组织蛋白酶K、组织蛋白酶L、组织蛋白酶S、组织蛋白酶V、梭菌蛋白酶、糜酶(chymase)、糜蛋白酶、弹性蛋白酶(elastase)、内蛋白酶、肠激酶、因子Xa、甲酸、颗粒酶B、基质金属肽酶-2、基质金属肽酶-3、胃蛋白酶、蛋白酶K、SUMO蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、TEV蛋白酶、嗜热菌蛋白酶(thermolysin)、凝血酶、胰蛋白酶和TAGzyme。

[0434] 在一个实施方案中,裂解位点为:包含氨基酸序列SARNRQKRS(SEQ ID NO:721)的弗林蛋白酶裂解位点,其由核苷酸序列SEQ ID NO:750编码;或包含氨基酸序列ARNRQKRS(SEQ ID NO:722)的修正弗林蛋白酶裂解位点,其由核苷酸序列SEQ ID NO:751编码;或包含氨基酸序列ESRRVRRNKRSK(SEQ ID NO:630)的修饰的弗林蛋白酶位点,其由核苷酸序列

SEQ ID NO:681-683编码。

[0435] 在一些实施方案中,本发明的裂解位点包括但不限于提交于2016年4月11日的共同未决的共同拥有的美国临时专利申请号62/320,864的表7、或提交于2017年3月3日的美国临时申请号62/466,596、和国际公布W02017/180587中所教导的任一者,每个专利的内容以全文引用的方式并入本文。

[0436] 蛋白标签

[0437] 在一些实施方案中,本发明的效应模块可包含蛋白标签。蛋白标签可以用于检测和监测效应模块的过程。效应模块可包括一个或多个标签,诸如表位标签(例如,FLAG或血凝素(HA)标签)。大量的蛋白标签可以用于本发明效应模块。它们包括但不限于自我标记多肽标签(例如,卤代烷烃脱卤酶(halotag2或halotag7)、ACP标签、clip标签、MCP标签、snap标签)、表位标签(例如,FLAG、HA、His和Myc)、荧光标签(例如,绿荧光蛋白(GFP)、红荧光蛋白(RFP)、黄荧光蛋白(YFP)及其变体)、生物发光标签(例如,荧光素酶及其变体)、亲和力标签(例如,麦芽糖-结合蛋白(MBP)标签、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)标签)、免疫原性亲和力标签(例如,蛋白A/G、IRS、AU1、AU5、glu-glu、KT3、S-标签、HSV、VSV-G、Xpress和V5)以及其他标签(例如,生物素(小分子)、StrepTag (StrepII)、SBP、生物素羧基载体蛋白(BCCP)、eXact、CBP、CYD、HPC、CBD内蛋白(intein)-几丁质结合结构域、Trx、NorpA和NusA。

[0438] 在其他实施方案中,标签还可选自以下中所公开的那些:美国专利号8,999,897、8,357,511、7,094,568、5,011,912、4,851,341和4,703,004;美国专利申请公布号US2013115635和US2013012687;以及国际申请公布号W02013091661,每个专利的内容以全文引用的方式并入本文。

[0439] 在一些方面,可以使用多个蛋白标签,相同标签或不同标签;每个标签可位于相同的N末端或C末端,而在其他情况下,这些标签可位于每个末端。

[0440] 在一些实施方案中,本发明的蛋白标签包括但不限于提交于2016年4月11日的共同未决的共同拥有的美国临时专利申请号62/320,864的表8、或提交于2017年3月3日的美国临时申请号62/466,596、和国际公布W02017/180587中所教导的任一者,每个专利的内容以全文引用的方式并入本文。

[0441] 靶向肽

[0442] 在一些实施方案中,本发明的效应模块可还包含靶向和/或穿透肽。选择性识别细胞表面标志物(例如,受体、跨膜蛋白和细胞外基质分子)的小靶向和/或穿透肽可用于将效应模块靶向所需的器官、组织或细胞。可以将体外合成的短肽(5-50个氨基酸残基)和天然存在的肽或其类似物、变体、衍生物并入效应模块中,以便使效应模块归巢到所需的器官、组织和细胞和/或细胞内的亚细胞定位。

[0443] 在一些实施方案中,靶向序列和/或穿透肽可包括在效应模块中,以将效应模块驱动至靶器官、组织或细胞(例如,癌细胞)。在其他实施方案中,靶向和/或穿透肽可将效应模块引导至细胞内的特定亚细胞定位。

[0444] 靶向肽具有约6至约30(包括端值)的任何数目的氨基酸。肽可具有6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸。一般来讲,靶向肽可具有25个或更少氨基酸,例如20个或更少、例如15个或更少。

[0445] 例示性靶向肽可包括但不限于以下中所公开的那些,例如美国专利号9,206,231、

9,110,059、8,706,219和8,772,449;以及美国申请公布号2016089447、2016060296、2016060314、2016060312、2016060311、2016009772、2016002613、2015314011和2015166621;以及国际申请公布号W02015179691和W02015183044,每个专利的内容以全文引用的方式并入本文。

[0446] 在一些实施方案中,本发明的靶向肽包括但不限于提交于2016年4月11日的共同未决的共同拥有的美国临时专利申请号62/320,864的表9、或提交于2017年3月3日的美国临时申请号62/466,596、和国际公布W02017/180587中所教导的任一者,每个专利的内容以全文引用的方式并入本文。

[0447] 接头

[0448] 在一些实施方案中,本发明的效应模块可还包含接头序列。接头区主要用作效应子块内两个或多个多肽之间的间隔区。如本文所用,“接头”或“间隔区”是指连接两个分子或者分子的两个部分诸如重组蛋白的两个结构域的分子或分子组。

[0449] 在一些实施方案中,如本文所用,“接头”(L)、或“接头结构域”、或“接头区”、或“接头模块”、或“肽接头”是指长度为约1至100个氨基酸的寡肽或多肽区,其将效应模块的任一结构域/区连接在一起(也称为肽接头)。肽接头可长度为1-40个氨基酸、或长度为2-30个氨基酸、或长度为20-80氨基酸、或长度为50-100个氨基酸。接头长度还可根据所利用的有效载荷的类型并且基于有效载荷的晶体结构进行最优化。在一些情况下,可优选地选择较短的接头长度。在一些方面,肽接头由通过肽键连接在一起的氨基酸、优选地1至20个通过肽键连接的氨基酸组成,其中氨基酸选自20种天然存在的氨基酸:甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、缬氨酸(V)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、丝氨酸(S)、半胱氨酸(C)、苏氨酸(T)、甲硫氨酸(M)、脯氨酸(P)、苯基丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)、组氨酸(H)、赖氨酸(K)、精氨酸(R)、天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)、天冬酰胺(N)和谷氨酰胺(Q)。如本领域中技术人员所理解,这些氨基酸中的一种或多种可以是糖基化的。在一些方面,肽接头的氨基酸可选自丙氨酸(A)、甘氨酸(G)、脯氨酸(P)、天冬酰胺(R)、丝氨酸(S)、谷氨酰胺(Q)和赖氨酸(K)。

[0450] 在一个示例中,人工设计的肽接头可优选得由柔性残基如甘氨酸(G)和丝氨酸(S)的聚合物构成,使得相邻蛋白结构域相对于彼此自由移动。当希望确保两个相邻结构域彼此不干扰时,可使用较长接头。特定接头序列的选择可能关于其是否影响融合构建体的生物活性、稳定性、折叠、靶向和/或药代动力学特征。肽接头的示例包括但不限于:MH;SG;GGSG(SEQ ID NO:822;其由核苷酸序列SEQ ID NO:823编码);GGSGG(SEQ ID NO:629;其由核苷酸序列SEQ ID NO:676-680中的任一者编码);GGSGGG(SEQ ID NO:824;其由核苷酸序列SEQ ID NO:825-826中的任一者编码);SGGGS(SEQ ID NO:827;其由核苷酸序列SEQ ID NO:828、844、909编码);GGSGGSGG(SEQ ID NO:829;其由核苷酸序列SEQ ID NO:830编码);GGGGG(SEQ ID NO:831);GGGGS(SEQ ID NO:832)或(GGGGS)_n(n=1(SEQ ID NO:832)、2(SEQ ID NO:833)、3(SEQ ID NO:720,其由核苷酸序列SEQ ID NO:910-915编码)、4(SEQ ID NO:834)、5(SEQ ID NO:835)或6(SEQ ID NO:836));SSSSG(SEQ ID NO:837)或(SSSSG)_n(n=1(SEQ ID NO:837)、2(SEQ ID NO:838)、3(SEQ ID NO:839)、4(SEQ ID NO:840)、5(SEQ ID NO:841)或6(SEQ ID NO:842));SGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSLQ(SEQ ID NO:802;其由核苷酸序列SEQ ID NO:811、916-920、1002编码);EFSTEF(SEQ ID NO:784;其由核苷酸序列SEQ ID NO:792-793中的任一者编码);GKSSGSGSESKS(SEQ ID NO:845);GGSTSGSGKSSEKKG(SEQ

型鼻炎病毒(ERAV) 2A (E2A)、猪捷申病毒-12A (P2A) 和Thoseaasigna病毒2A (T2A)。在一些实施方案中,可用于本发明的2A肽序列选自国际专利公开W02010042490的SEQ ID NO.8-11,其内容以全文引用的方式并入。

[0455] 作为非限制性示例,P2A可裂解肽可为GATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO:925;其由SEQ ID NO:926编码)。

[0456] 本发明的接头还可为非肽接头。例如,可以使用烷基接头,诸如-NH-(CH₂)_a-C(O)-,其中a=2-20。这些烷基接头可进一步被任何非空间位阻基团取代,诸如低级烷基(例如,C₁-C₆)、低级酰基、卤素(例如,Cl、Br)、CN、NH₂、苯基等。

[0457] 在一些方面,接头可为美国专利号4,946,778、5,525,491、5,856,456以及国际专利公布号W02012/083424的人工接头,每个专利的内容以全文引用的方式并入本文。

[0458] 在一些实施方案中,本发明的接头包括但不限于提交于2016年4月11日的共同未决的共同拥有的美国临时专利申请号62/320,864的表11、或提交于2017年3月3日的美国临时申请号62/466,596、和国际公布W02017/180587中所教导的任一者,每个专利的内容以全文引用的方式并入本文。

[0459] 在一个实施方案中,接头可为一个或多个核苷酸的间隔区。间隔区的非限制性示例为TCTAGATAATACGACTCACTAGAGATCC (SEQ ID NO:927)、TATGGCCACAACCATG (SEQ ID NO:928)、AATCTAGATAATACGACTCACTAGAGATCC (SEQ ID NO:929)、GCTTGCCACAACCCACAAGGAGACGACCTTCC (SEQ ID NO:1000)、TCGCGAATG或TCGCGA。

[0460] 在一个实施方案中,接头可为BamHI位点。作为非限制性示例,BamHI位点具有氨基酸序列GS和/或DNA序列GGATCC。

[0461] 嵌入的刺激物、信号和其他调控特征部

[0462] 在一些实施方案中,本发明的效应模块可还包含一个或多个微RNA、微RNA结合位点、启动子和可调元件。在一个实施方案中,微RNA可用于支持可调生物回路的产生。每个方面或调整的模式可以为效应模块或生物回路带来差别调整的特征。例如,去稳定结构域可改变有效载荷的裂解位点或二聚特性或半衰期,并且包含一个或多个微RNA或微RNA结合位点可以赋予细胞去靶向或运输特征。因此,本发明涵盖可维持性是多因素的生物回路。此类生物回路和效应模块可被工程化成包含一个、两个、三个、四个或更多个调整的特征部。

[0463] 在一些实施方案中,本发明的微RNA序列包括但不限于提交于2016年4月11日的共同未决的共同拥有的美国临时专利申请号62/320,864的表13、或提交于2017年3月3日的美国临时申请号62/466,596、和国际公布W02017/180587中所教导的任一者,每个专利的内容以全文引用的方式并入本文。

[0464] 在一些实施方案中,本发明的组合物可包括任选的蛋白酶体衔接子。如本文所用,术语“蛋白酶体衔接子”是指靶向所附的有效载荷的降解的任何核苷酸/氨基酸序列。在一些方面,衔接子直接靶向有效载荷的降解,从而避免了泛素化反应的需要。蛋白酶体衔接子可与去稳定域结合使用,以减少有效载荷的基础表达。例示性蛋白酶体衔接子包括Rad23或hHR23b的UbL结构域HPV E7,其以高亲和力与靶蛋白Rb和蛋白酶体的S4亚基结合,从而实现直接的蛋白酶体靶向,绕过泛素化机制;蛋白gankyrin与Rb和蛋白酶体亚基S6结合。

[0465] 多核苷酸

[0466] 术语“多核苷酸”或“核酸分子”在其广义上包括任何包含核苷酸聚合物例如连接

的核苷的化合物和/或物质。这些聚合物常常被称为多核苷酸。本发明的例示性核酸或多核苷酸包括但不限于,核糖核酸(RNA)、脱氧核糖核酸(DNA)、苏糖核酸(TNA)、乙二醇核酸(GNA)、肽核酸(PNA)、锁核酸(LNA,包括具有 β -D-核糖构型的LNA、具有 α -L-核糖构型的 α -LNA(LNA的非对映体)、具有2'-氨基官能化的2'-氨基-LNA以及具有2'-氨基官能化的2'-氨基- α -LNA)或其杂合体。

[0467] 在一些实施方案中,本发明的多核苷酸可为信使RNA(mRNA)或任何核酸分子,并且可以是或不是化学修饰的。在一个方面中,核酸分子为mRNA。如本文所用,术语“信使RNA”(mRNA)是指编码目标多肽并且能够被翻译以在体外、体内、原位或离体产生编码的目标多肽的任何多核苷酸。

[0468] 传统上,mRNA分子的基本组分至少包括编码区、5'UTR、3'UTR、5'帽以及聚-A尾。基于这种野生型模块结构,本发明通过提供有效载荷构建体扩展了传统mRNA分子的功能性的范围,所述有效载荷构建体维持模块组织但包含一种或多种结构和/或化学修饰或改变,所述修饰或改变赋予所述多核苷酸有用的特性,例如功能的可维持性。如本文所用,“结构”特征或修饰是其中两个或更多个连接的核苷在多核苷酸中插入、缺失、复制、反转或随机化而无对所述核苷本身的显著化学修饰的修饰。因为要实现结构修饰就必须使化学键断裂并重新形成,所以结构修饰具有化学性质并因此是化学修饰。然而,结构修饰将产生不同的核苷酸序列。例如,多核苷酸“ATCG”可化学修饰成“AT-5meC-G”。同一多核苷酸可从“ATCG”结构修饰成“ATCCCG”。在此,已插入二核苷酸“CC”,从而产生对多核苷酸的结构修饰。

[0469] 在一些实施方案中,本发明的多核苷酸可带有在翻译起始中起作用的5'UTR序列。5'UTR序列可包括诸如Kozak序列的特征部,这些特征部通常已知参与核糖体起始基因翻译的过程,Kozak序列具有共有的XCCR(A/G)CCAUG,其中X为是嘌呤(腺嘌呤或鸟嘌呤)、起始密码子(AUG)上游的三个碱基,并且X为任何核苷酸。在一个实施方案中,Kozak序列为ACCGCC。通过工程化通常在靶细胞或组织的大量表达基因中发现的特征部,可以增强本发明的多核苷酸的稳定性和蛋白产生。

[0470] 还提供了多核苷酸,其可含有内部核糖体进入位点(IRES),在多核苷酸中不存在5'帽结构的情况下,所述位点在起始蛋白合成时起重要作用。IRES可充当唯一的核糖体结合位点,或者可充当多个结合位点之一。本发明的含有多于一个功能性核糖体结合位点的多核苷酸可编码独立地通过核糖体翻译的若干肽或多肽,生成双顺反子和/或多顺反子核酸分子。

[0471] 在一些实施方案中,编码感兴趣的生物回路、效应模块、SRE和效应模块的多核苷酸诸如免疫治疗剂可包括约30至约100,000个核苷酸(例如,30至50、30至100、30至250、30至500、30至1,000、30至1,500、30至3,000、30至5,000、30至7,000、30至10,000、30至25,000、30至50,000、30至70,000、100至250、100至500、100至1,000、100至1,500、100至3,000、100至5,000、100至7,000、100至10,000、100至25,000、100至50,000、100至70,000、100至100,000、500至1,000、500至1,500、500至2,000、500至3,000、500至5,000、500至7,000、500至10,000、500至25,000、500至50,000、500至70,000、500至100,000、1,000至1,500、1,000至2,000、1,000至3,000、1,000至5,000、1,000至7,000、1,000至10,000、1,000至25,000、1,000至50,000、1,000至70,000、1,000至100,000、1,500至3,000、1,500至5,000、1,500至7,000、1,500至10,000、1,500至25,000、1,500至50,000、1,500至70,000、1,500至100,000、2,

000至3,000、2,000至5,000、2,000至7,000、2,000至10,000、2,000至25,000、2,000至50,000、2,000至70,000和2,000至100,000个核苷酸)。在一些方面,本发明的多核苷酸可包括多于10,000个核苷酸。

[0472] 编码某些特征部诸如裂解位点、接头、运输信号、标签或其他特征部的多核苷酸的区的长度可独立在10-1,000个核苷酸的范围(例如,大于20、30、40、45、50、55、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800和900个核苷酸或至少10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900和1,000个核苷酸)。

[0473] 在一些实施方案中,本发明的多核苷酸可还包含嵌入的调控部分,诸如在核酸分子的3'UTR内的微RNA结合位点,当与微RNA分子结合时,其通过降低核酸分子稳定性或通过抑制翻译来下调基因表达。相反地,出于本发明的多核苷酸的目的,可将微RNA结合位点从它们天然存在的序列中工程化出来(即,去除)以便增加特定组织中的蛋白表达。例如,可将miR-142和miR-146结合位点去除以便改进免疫细胞中的蛋白表达。在一些实施方案中,任一编码的有效载荷均可通过SRE调控,然后与一个或多个调控序列组合以生成双重或多重调整的效应模块或生物回路系统。

[0474] 在一些实施方案中,本发明的多核苷酸可编码本发明的多肽的片段、变体、衍生物。在一些方面,变体序列可以保持相同或相似的活性。可替代地,变体可具有相对于起始序列改变的活性(例如,增加或减少)。通常,本发明的特定多核苷酸或多肽的变体将与所述特定参考多核苷酸或多肽具有至少约40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%但小于100%的序列同一性,如通过本文所描述的和本领域技术人员已知的序列比对程序和参数确定的。此类对齐工具包括BLAST套件的那些(Stephen等,Gapped BLAST and PSI-BLAST:a new generation of protein database search programs,Nucleic Acids Res.,1997,25:3389-3402)。

[0475] 在一些实施方案中,本发明的多核苷酸可为修饰的。如本文所用,术语“修饰的”或适当时“修饰”是指相对于A、G、U(DNA中的T)或C核苷酸的化学修饰。修饰可以在包含多核苷酸的核苷的核苷碱基和/或糖部分上。在一些实施方案中,在修饰的核酸中或在一个或多个单独的核苷或核苷酸中包括多个修饰。例如,对核苷的修饰可以包括对核苷碱基和糖的一个或多个修饰。对本发明的多核苷酸的修饰可以包括例如国际公布号W02013052523中教导的任何修饰,其内容以全文引用的方式并入本文。

[0476] 如本文所述,“核苷”被定义为含有糖分子(例如,戊糖或核糖)或其衍生物与有机碱基(例如,嘌呤或嘧啶)或其衍生物(本文还被称为“核苷碱基”)的组的化合物。如本文所述,“核苷酸”被定义为包含磷酸酯基的核苷。

[0477] 在一些实施方案中,修饰可以在核苷间键(例如,磷酸酯主链)上。在本文多核苷酸主链的背景下,短语“磷酸酯”和“磷酸二酯”可互换使用。主链磷酸酯基团可通过用不同的取代基替换一个或多个氧原子来修饰。此外,修饰核苷和核苷酸可包括用另一种核苷间键全部替换未修饰的磷酸酯部分。修饰的磷酸酯基团的实例包括但不限于,硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、硼烷磷酸酯(boranophosphate)、硼烷磷酸酯(boranophosphate ester)、氢磷酸酯、氨基磷酸酯、二氨基磷酸酯、烷基或芳基磷酸酯以及磷酸三酯。二硫代磷酸酯具有的两个非连接的氧均被硫替换。磷酸酯接头还可以通过用氮(桥联氨基磷酸酯)、硫(桥联硫代磷

酸酯)和碳(桥联亚甲基-磷酸酯)替换连接的氧来修饰。可以使用的其他修饰教导于例如国际申请号W02013052523,其内容以全文引用的方式并入本文。

[0478] 可用于本发明的本发明的多核苷酸的核苷酸或核碱基的化学修饰和/或取代包括本领域中已知的任何修饰取代基,例如(±)1-(2-羟丙基)假尿苷TP、(2R)-1-(2-羟丙基)假尿苷TP、1-(4-甲氧基-苯基)假-UTP、2'-0-二甲基腺苷、1,2'-0-二甲基鸟苷、1,2'-0-二甲基肌苷、1-己基-假-UTP、1-高烯丙基假尿苷TP、1-羟甲基假尿苷TP、1-异丙基-假-UTP、1-Me-2-硫代-假-UTP、1-Me-4-硫代-假-UTP、1-Me- α -硫代-假-UTP、1-Me-GTP、2'-氨基-2'-脱氧-ATP、2'-氨基-2'-脱氧-CTP、2'-氨基-2'-脱氧-GTP、2'-氨基-2'-脱氧-UTP、2'-叠氨基-2'-脱氧-ATP、杀结合菌素、欠修饰羟基怀丁苷、尿苷5-羟乙酸、尿苷5-羟乙酸甲酯、怀丁苷、 γ 苷、黄嘌呤、黄苷-5'-TP、木糖-腺苷(xylo-adenosine)、泽布拉林(zebularine)、 α -硫代-腺苷、 α -硫代-胞苷、 α -硫代-鸟苷和/或 α -硫代-尿苷。

[0479] 本发明的多核苷酸可包含本文教导的一个或多个修饰。不同的糖修饰、碱基修饰、核苷酸修饰和/或核苷间键(例如,主链结构)可存在于本发明的多核苷酸中的不同位置处。本领域的普通技术人员将了解,核苷酸类似物或其他一个或多个修饰可位于多核苷酸的任何位置处,使得多核苷酸的功能大致上不被减少。修饰还可为5'或3'末端修饰。多核苷酸可包含约1%至约100%的修饰核苷酸(相对于总体核苷酸含量或相对于一种或多种类型的核苷酸,即,A、G、U或C中的任何一种或多种)或任何中间百分比(例如,1%至20%、1%至25%、1%至50%、1%至60%、1%至70%、1%至80%、1%至90%、1%至95%、10%至20%、10%至25%、10%至50%、10%至60%、10%至70%、10%至80%、10%至90%、10%至95%、10%至100%、20%至25%、20%至50%、20%至60%、20%至70%、20%至80%、20%至90%、20%至95%、20%至100%、50%至60%、50%至70%、50%至80%、50%至90%、50%至95%、50%至100%、70%至80%、70%至90%、70%至95%、70%至100%、80%至90%、80%至95%、80%至100%、90%至95%、90%至100%以及95%至100%)。

[0480] 在一些实施方案中,通过称为密码子选择的过程,本发明的多核苷酸的一个或多个密码子可用其他编码天然氨基酸序列的密码子替换以调整SRE的表达。因为mRNA密码子以及tRNA反密码子库倾向于在生物体、细胞类、亚细胞位置之间并且随时间推移发生变化,所以本文所述的密码子选择为时空(ST)密码子选择。

[0481] 在本发明的一些实施方案中,某些多核苷酸特征部可为密码子优化的。密码子优化是指在宿主细胞中通过用所述宿主细胞的基因中最频繁使用的密码子替换至少1、2、3、4、5、10、15、20、25、50或更多个密码子来修饰核酸序列以实现表达增强同时维持天然氨基酸序列的过程。密码子使用可使用测量编码核苷酸序列自参考基因的组的偏差的密码子适应指数(CAI)进行测量。密码子使用表可在密码子使用数据库(<http://www.kazusa.or.jp/codon/>)获得,并且CAI可通过EMBOSS CAI程序(<http://emboss.sourceforge.net/>)计算。密码子优化方法是本领域中已知的并且可适用于实现几个目标中的一个或多个的工作中。这些目标包括匹配靶标和宿主生物体中的密码子频率以确保正确折叠;偏置核苷酸含量以改变稳定性或减少二级结构;最小化可能损害基因构建或表达的串联重复密码子或碱基运行,定制转录和翻译控制区域,插入或删除蛋白信号传导序列,在编码的蛋白质中去除/添加翻译后修饰位点(例如糖基化位点),添加、去除或改组蛋白质结构域,插入或缺失限制性位点,修饰核糖体结合位点和降解位点,以便调整翻译速率从而允许蛋白质的不同结构域

正确地折叠,或以便减少或消除多核苷酸内的问题二级结构。密码子优化工具、算法和服务是本领域中已知的,并且非限制性示例包括来自GeneArt (Life Technologies)的服务、DNA2.0 (Menlo Park CA)、OptimumGene (GenScript, Piscataway, NJ)、诸如但不限于DNAWorks v3.2.3的算法和/或专有方法。在一个实施方案中,使用优化算法对多核苷酸序列或其部分进行密码子优化。每个氨基酸的密码子选择是本领域中熟知的,如同用于优化所述特定物种中的表达的各种物种表。

[0482] 在本发明的一些实施方案中,某些多核苷酸特征部可为密码子优化的。例如,用于密码子优化的优选区可在编码多肽的区的上游(5')或下游(3')。这些区可在编码区或开放阅读框(ORF)的有效载荷的密码子优化之前和/或之后并入多核苷酸中。

[0483] 在优化(如果需要)之后,多核苷酸组分进行重构并且转化到载体诸如但不限于质粒、病毒、粘粒和人工染色体中。

[0484] 时空密码子选择可能影响本发明的多核苷酸的表达,因为密码子组成决定了mRNA种类的翻译速率及其稳定性。例如,优化密码子的tRNA反密码子是丰富的,并且因此翻译可被增强。相比之下,较不常见密码子的tRNA反密码子较少,并且因此翻译可能以较慢速率进行。Presnyak等已显示,mRNA种类的稳定性取决于密码子含量,并且通过利用优化密码子可以实现较高稳定性,并且因此可以实现较高蛋白表达(Presnyak等(2015)Cell 160,1111-1124;其内容以全文引用的方式并入本文)。因此,在一些实施方案中,ST密码子选择可包括选择优化密码子以增强本发明的SRE、效应模块和生物回路的表达。在其他实施方案中,时空密码子选择可涉及选择在宿主细胞的基因中较不常使用的密码子以减少本发明的组合物的表达。优化密码子与宿主细胞的基因中较不常使用的密码子的比率也可以改变以调整表达。

[0485] 在一些实施方案中,多核苷酸的某些区可能对于密码子选择而言是优选的。例如,用于密码子选择的优选区可在编码多肽的区的上游(5')或下游(3')。这些区可在编码区或开放阅读框(ORF)的有效载荷的密码子选择之前和/或之后并入多核苷酸中。

[0486] 本发明的多核苷酸的终止密码子可被修饰成包括改变本发明的SRE、有效载荷和效应模块的表达水平的序列和基序。可并入此类序列以诱导终止密码子通读(readthrough),其中终止密码子可指定氨基酸,例如硒代半胱氨酸或吡咯赖氨酸。在其他情况下,终止密码子可被全部跳过以通过替代的开放阅读框恢复翻译。终止密码子通读可用于以具体比率(例如,如终止密码子背景所决定)调整效应模块的组分的表达。优选的终止密码子基序的示例包括UGAN、UAAN和UAGN,其中N为C或U。多核苷酸修饰和操纵可通过本领域中已知的方法来实现,诸如但不限于定点诱变和重组技术。然后可使用体外或体内测定(如本文所描述的那些)或本领域中已知的任何其他合适的筛选测定来测试所得到的修饰分子的活性。

[0487] 在一些实施方案中,本发明的多核苷酸可包含两个或更多个效应模块序列,或两个或更多个感兴趣的有效载荷序列,其以诸如ABABAB、或AABBAABBAABB、或ABCABCABC或其重复一次、两次或多于三次的变体的样式。在这些模式中,每个字母A、B或C表示不同的效应模块组分。

[0488] 在又一个实施方案中,本发明的多核苷酸可包含两个或更多个效应模块组分序列,每个组分具有一个或多个SRE序列(DD序列)或两个或更多个有效载荷序列。作为非限制

性示例,序列可以诸如ABABAB、或AABBAABBAABB、或ABCABCABC或其在每个区中重复一次、两次或多于三次的变体的样式。作为另一非限制性示例,序列可以诸如ABABAB、或AABBAABBAABB、或ABCABCABC或其在整个多核苷酸中重复一次、两次或多于三次的变体的样式。在这些模式中,每个字母A、B或C表示不同的序列或组分。

[0489] 根据本发明,可以将编码不同的生物回路、效应模块、SRE和有效载荷构建体的多核苷酸通过3'末端使用在3'末端修饰的核苷酸连接在一起。化学缀合可用于控制递送至细胞中的化学计量学。多核苷酸可被设计成与以下缀合:其他多核苷酸、染料、嵌入剂(intercalating agent)(例如吡啶)、交联剂(例如补骨脂素(psoralene)、丝裂霉素C)、卟啉类(TPPC4、德克萨卟啉(texaphyrin)、噻啉(sapphyrin))、多环芳香烃(例如吩嗪、二氢吩嗪)、人工内切核酸酶(例如EDTA)、烷化剂、磷酸酯、氨基、巯基、PEG(例如PEG-40K)、MPEG、(MPEG)₂、聚氨基、烷基、取代的烷基、放射性标记的标志物、酶、半抗原(例如生物素)、转运/吸收促进剂(例如阿司匹林、维生素E、叶酸)、合成核糖核酸酶、蛋白质(例如糖蛋白)或肽(例如具有针对共配体的特异性亲和力的分子)或抗体(例如结合指定细胞类型如癌细胞、内皮细胞或骨细胞的抗体)、激素和激素受体,非肽物种如脂质、凝集素、碳水化合物、维生素、辅因子或药物。作为非限制性示例,它们可为与其他免疫缀合物的缀合物。

[0490] 在一些实施方案中,本发明的多核苷酸的组合物可通过使用Gibson组装方法组合效应模块的各种组分而生成。Gibson组装反应由三个等温反应组成,每个反应均依赖于不同的酶活性,包括生成长突出端的5'外切核酸酶、填充退火单链区间隙的聚合酶和封闭退火且填满间隙的切口的DNA连接酶。聚合酶链反应在Gibson组装之前进行,可用于生成具有重叠序列的PCR产物。这些方法可顺序地重复以组装越来越大的分子。例如,所述方法可包括重复如上方法以将第二组的两个或更多个感兴趣的DNA分子彼此结合,然后再次重复所述方法以将第一和第二组感兴趣的DNA分子结合等。在这些多轮组装过程中的任何阶段,组装的DNA可通过将其转化到合适的微生物中来扩增,或者它可以体外(例如,用PCR)扩增。

[0491] 在一些实施方案中,本发明的多核苷酸可编码包含去稳定结构域(DD)和至少一种本文所教导的免疫治疗剂的融合多肽。DD结构域可为:由核苷酸序列SEQ ID NO:684-686、688-691、987-989、994、1013和/或1028编码的FKBP突变体;由核苷酸序列SEQ ID NO:687、692、772、798、814-815、988、991和/或993编码的ecDHFR突变体;由核苷酸序列SEQ ID NO:693-700、773、852-857和/或934-980和/或995-998编码的hDHFR突变体。

[0492] 在一些实施方案中,本发明的多核苷酸可编码以下效应模块,所述效应模块包含:CD19 CAR作为有效载荷,其包含核苷酸序列SEQ ID NO:701-715和/或1019-1042;或IL12作为有效载荷,其包含核苷酸序列SEQ ID NO.774-782;或IL15作为有效载荷,其包含核苷酸序列SEQ ID NO:749、799-800和/或1055-1056;或IL15/IL15Ra融合多肽作为有效载荷,其包含核苷酸序列SEQ ID NO:816-821、1086-1089、1091-1095、1098-1111、1120和/或1123。

[0493] 细胞

[0494] 根据本发明,提供了被基因修饰以表达至少一个本发明的生物回路、SRE(例如,DD)、效应模块和免疫治疗剂的细胞。本发明的细胞可以包括但不限于免疫细胞、干细胞和肿瘤细胞。在一些实施方案中,免疫细胞为免疫效应细胞包括但不限于T细胞,诸如CD8⁺T细胞和CD4⁺T细胞(例如,Th1、Th2、Th17、Foxp3⁺细胞)、记忆T细胞(诸如T记忆干细胞、中央T记忆细胞和效应记忆T细胞)、终末分化效应T细胞、自然杀伤(NK)细胞、NK T细胞、肿瘤浸润

淋巴细胞 (TIL)、细胞毒性T淋巴细胞 (CTL)、调控T细胞 (Treg) 和树突状细胞 (DC)、可引发效应功能的其他免疫细胞或其混合物。T细胞可为T $\alpha\beta$ 细胞和T $\gamma\delta$ 细胞。在一些实施方案中,干细胞可来自人胚胎干细胞、间充质干细胞和神经干细胞。在一些实施方案中,T细胞可为耗尽的内源性T细胞受体(参见美国专利号9,273,283、9,181,527和9,028,812,每个专利的内容以全文引用的方式并入本文)。

[0495] 在一些实施方案中,本发明的细胞可相对于特定个别受试者为自体、同种异基因、同基因或异种的。

[0496] 在一些实施方案中,本发明的细胞可为哺乳动物细胞,特别是人细胞。本发明的细胞可为原代细胞或永生化细胞系。

[0497] 在一些实施方案中,本发明的细胞可包括扩增因子作为有效载荷以触发细胞的增殖和扩增。例示性有效载荷包括:RAS,诸如KRAS、NRAS、RRAS、RRAS2、MRAS、ERAS和HRAS;DIRAS,诸如DIRAS1、DIRAS2和DIRAS3;NKIRAS,诸如NKIRAS1和NKIRAS2;RAL,诸如RALA和RALB;RAP,诸如RAP1A、RAP1B、RAP2A、RAP2B和RAP2C;RASD,诸如RASD1和RASD2;RASL,诸如RASL10A、RASL10B、RASL11A、RASL11B和RASL12;REM,诸如REM1和REM2;GEM;REMG;REGL;和RRAD。

[0498] 工程化免疫细胞可通过用感兴趣的生物回路、效应模块、SRE和/或有效载荷(即,免疫治疗剂)的多肽、或编码所述多肽的多核苷酸、或包含所述多核苷酸的载体转导细胞来完成。载体可为病毒载体,诸如慢病毒载体、 γ -逆转录病毒载体、重组AAV、腺病毒载体和溶瘤病毒载体。在其他方面,还可使用非病毒载体,例如纳米粒子和脂质体。在一些实施方案中,本发明的免疫细胞被基因修饰成表达至少一种可使用刺激物调整的本发明的免疫治疗剂。在一些示例中,将在同一生物回路和效应模块中构件的两种、三种或更多种免疫治疗剂引入细胞中。在其他示例中,可将两个、三个或更多个生物回路、效应模块(其每个都包含免疫治疗剂)引入细胞中。

[0499] 在一些实施方案中,本发明的免疫细胞可为被修饰成表达抗原特异性T细胞受体(TCR)的T细胞或表达本文教导的抗原特异性嵌合抗原受体(CAR)的T细胞(称为CAR T细胞)。因此,将至少一个编码本文所述的CAR系统(或TCR)的多核苷酸或包含所述多核苷酸的载体引入T细胞。表达CAR或TCR的T细胞通过CAR或TCR的细胞外靶向部分与具体抗原结合,从而通过一个或多个细胞内信号传导结构域将信号传递到T细胞中,并且因此将T细胞活化。活化的CAR T细胞的行为有所改变,包括释放细胞毒性细胞因子(例如肿瘤坏死因子和淋巴毒素等)、细胞增殖率改进、细胞表面分子改变等。此类改变导致表达CAR或TCR所识别的抗原的靶细胞的破坏。另外,细胞因子的释放或细胞表面分子的改变刺激其他免疫细胞,例如B细胞、树突状细胞、NK细胞和巨噬细胞。

[0500] 诱导至细胞中的CAR可为:第一代CAR,其仅包括TCR CD3 ζ 的细胞内信号传导结构域;或第二代CAR,其包括TCR CD3 ζ 的细胞内信号传导结构域和共刺激信号传导结构域;或第三代CAR,其包括TCR CD3 ζ 的细胞内信号传导结构域和两个或更多个共刺激信号传导结构域;或分裂CAR系统;或通/断开关CAR系统。在一个示例中,在本发明的效应模块中,CAR或TCR的表达由去稳定结构域(DD)诸如hDHFR突变体控制。hDHFR结合配体(诸如TMP)的存在或不存在可用于调整转导的T细胞或NK细胞中的CAR或TCR表达。

[0501] 在一些实施方案中,本发明的CAR T细胞可被进一步修饰成表达另外一种、两种、

三种或更多种免疫治疗剂。免疫治疗剂可为：另一特异于不同靶分子的CAR或TCR；细胞因子，诸如IL2、IL12、IL15和IL18，或细胞因子受体，诸如IL15Ra；嵌合开关受体，其将抑制信号转化成刺激信号；归巢受体，其将过继转移的细胞引导至靶部位，诸如肿瘤组织；优化免疫细胞代谢的剂；或在过继细胞转移之后观察到严重事件时或不再需要转移免疫细胞时杀伤活化T细胞的安全开关基因（例，如自杀基因）。这些分子可包括在同一效应模块中或在单独的效应模块中。

[0502] 在一个实施方案中，本发明的CAR T细胞（包括TCR T细胞）可为“武装”CAR T细胞，其用包含CAR的效应模块和包含细胞因子的效应模块转化。诱导型或组成型分泌活性细胞因子进一步将CAR T细胞武装以改进功效和持久性。在这种情况下，此类CAR T细胞还称为“武装CAR T细胞”。可基于肿瘤微环境以及先天和适应性免疫系统的其他元件来选择“武装”分子。在一些实施方案中，分子可为刺激因子诸如IL2、IL12、IL15、IL18、I型IFN、CD40L和4-1BBL，其已显示通过不同机制进一步增强CAR T细胞面对敌对的肿瘤微环境的功效和持久性（Yeku等，*Biochem Soc Trans.*, 2016, 44(2):412-418）。

[0503] 在一些方面，本发明的武装CAR T细胞被修饰成表达CD19 CAR和IL12。在肿瘤中CAR介导的活化之后，此类T细胞释放诱导型IL12，其加强T细胞活化并且吸引并活化先天免疫细胞以消除CD19阴性癌细胞。

[0504] 在一个实施方案中，本发明的T细胞可被修饰成表达包含CAR的效应模块和包含自杀基因的效应模块。

[0505] 在一个实施方案中，本发明的CAR T细胞（包括TCR T细胞）可用包含细胞因子和安全开关基因（例如，自杀基因）的效应模块转化。自杀基因可为诱导型半胱天冬酶，诸如半胱天冬酶9，当被生物回路系统的细胞外刺激物活化时，其诱导凋亡。此类诱导的凋亡根据需要消除转移的细胞，以降低直接毒性和不受控制的细胞增殖的风险。

[0506] 在一些实施方案中，本发明的免疫细胞可为被修饰成表达抗原特异性T细胞受体（TCR）的NK细胞或表达本文教导的抗原特异性嵌合抗原受体（CAR）的NK细胞。

[0507] 自然杀伤（NK）细胞为先天淋巴样细胞家族成员，并且在人体内的特征在于在不存在CD3（T细胞共受体）的情况下表达表型标志物CD56（神经细胞粘附分子）。NK细胞为先天免疫系统的有效的效应细胞，其介导细胞毒性攻击而无需事先抗原引发，形成抵御疾病包括癌症恶性肿瘤和病毒感染的第一道防线。

[0508] 若干临床前和临床试验证明，NK细胞的过继性转移为针对癌症诸如急性骨髓性白血病的有前景的治疗方法（Ruggeri等，*Science*; 2002, 295:2097-2100；以及Geller等，*Immunotherapy*, 2011, 3:1445-1459）。表达CAR（诸如基于DAP12的活化CAR）的NK细胞的过继转移显示肿瘤细胞的根除改进（Topfer等，*J Immunol.* 2015; 194:3201-3212）。工程化成表达CS-1特异性CAR的NK细胞还展示在多发性骨髓瘤中细胞溶解和干扰素- γ （IFN- γ ）产生增强（Chu等，*Leukemia*, 2014, 28(4):917-927）。

[0509] NK细胞活化的特征在于一系列具有活化和抑制功能的受体。NK细胞上重要的活化受体包括CD94/NKG2C和NKG2D（C型凝集素样受体）以及天然细胞毒性受体（NCR）NKp30、NKp44和NKp46，它们识别肿瘤细胞或病毒感染细胞上的配体。NK细胞抑制基本上是通过多态抑制性杀伤细胞免疫球蛋白样受体（KIR）与它们的同源人白细胞抗原（HLA）配体通过HLA分子的 α -1螺旋的相互作用来介导的。由活化受体和抑制受体生成的信号之间的平衡主要

决定了即时细胞毒性活化。

[0510] NK细胞可从外周血单核细胞(PBMC)中分离,或来源于人胚胎干(ES)细胞和诱导的多能干细胞(iPSC)。从PBMC中分离的原代NK细胞可进一步扩大以用于过继免疫疗法。可用于NK细胞的扩增的策略和方案可包括白介素2(IL2)刺激以及使用自体饲养细胞或使用基因修饰的同种异基因饲养细胞。在一些方面,NK细胞可用刺激配体包括IL15、IL21、IL2、41BBL、IL12、IL18、MICA、2B4、LFA-1和BCM1/SLAMF2的组合进行选择性的扩增(例如,美国专利公布号US20150190471)。

[0511] 表达包含CAR和/或其他免疫治疗剂的效应模块的免疫细胞可用作癌症免疫疗法。免疫疗法包含表达CAR和/或其他免疫治疗剂作为活性成分的细胞,并且可以还包含合适的赋形剂。赋形剂的示例可包括前述药学上可接受的赋形剂,包括各种细胞培养基和等渗氯化钠。

[0512] 在一些实施方案中,本发明的细胞可为被基因修饰成表达本发明的组合物的树突状细胞。此类细胞可用作癌症疫苗。

[0513] CD19抗体开发和表征的方法

[0514] 在一些实施方案中,本发明提供了产生CD19抗体、抗体片段或变体的方法。此类方法可包括以下步骤:(1)制备具有CD19的组合物;(2)将抗体或抗体片段或变体的文库与组合物接触;以及(3)鉴别一种或多种CD19抗体。另外,本文提供了鉴别FMC63不同的CD19抗体、抗体片段或变体的方法。

[0515] 在一些实施方案中,本发明提供了鉴别CD19 scFv的方法。此类方法可涉及筛选噬菌粒文库的CD19 scFv。表达与细菌或噬菌体表面结合的重组scFv的噬菌粒文库可用于本发明。噬菌粒文库可通过PCR扩增编码免疫球蛋白IgM的重链和 κ 轻链的多核苷酸并且用含有PCR产物的载体在高感染复数(MOI)下感染Cre重组酶阳性细菌来生成。高MOI得到含有多个噬菌粒的细菌,每个噬菌粒编码不同的VH和VL基因,这些基因可通过Cre重组酶进行重组。可通过重组生成的所得文库约为 10^8 个独特scFv。在一些情况下,可对格式化成嵌合抗原受体构建体的CD19 scFv的文库进行筛选以鉴别出可用于本发明的CD19 scFv。

[0516] 在一些实施方案中,免疫学上特异于CD19的scFv可使用异位表达全长CD19、CD19的片段或CD19的一部分的细胞进行鉴别。可以选择具有低内源性CD19表达的细胞系进行异位表达。在一些实施方案中,CD19可为人CD19的天然存在的同种型。

[0517] 在一些实施方案中,包含与人IgG1的Fc区融合的CD19的细胞外结构域(即外显子1-外显子4)的融合蛋白(CD19sIg)用于鉴别CD19特异性scFv。此类融合蛋白由Oliveira等(2013)Journal of Translational Medicine 11:23描述,其内容以全文引用的方式并入本文。

[0518] 另外,本文提供了鉴别FMC63不同的scFv的方法,所述FMC63不同的scFv包括免疫学上特异于CD19抗原并与其表位结合的scFv,所述CD19抗原的表位与由FMC63结合的CD19抗原的表位不同或不相似。在一些实施方案中,FMC63不同的scFv是通过用由结合至FMC63的人CD19组成的复合物筛选scFv文库来鉴别的。本文的恒河猴(Rhesus macaque/Macaca mulatta)的CD19被称为与人CD19有88%同源性的恒河猴CD19。尽管有高度的同源性,但恒河猴CD19不被FMC63识别,指示FMC63表位在人CD19的与恒河猴CD19不同源的区中。因此,在一些实施方案中,恒河猴CD19可用于筛选scFv文库的FMC63不同的scFv。恒河猴CD19的与

人CD19不同源的区中的突变先前已用于鉴别人CD19的赋予与FMC63结合的残基 (Sommermeyer等 (2017) Leukemia Feb 16.doi:10.1038/leu.2017.57)。在一些实施方案中,Sommermeyer等所述的突变分析可用于设计不能结合FMC63的人CD19突变体。此类突变体可包括人CD19(H218R、A237D、M243V、E244D、P250T) 和人CD19(H218R、A237D),并且可用于筛选scFv文库的FMC63不同的scFv。Sotillo等已鉴别出癌症患者中缺乏外显子2的人CD19的剪接变体 (Sotillo等 (2015) Cancer Discov.2015Dec;5(12):1282-95)。缺乏外显子2的剪接变体不被FMC63识别,并且也可用于筛选scFv文库的FMC63不同的scFv。

[0519] 通过将人IgG1的Fc区与人CD19完整的细胞外结构域(即,外显子1-4 (CD19sIgG1-4))或缺乏外显子2的细胞外结构域(即,外显子1、3和4 (CD19sIgG1))融合生成的CD19 IgG融合分子也可用于筛选scFv文库的FMC63不同的scFv。

[0520] 可用于本发明的CD19蛋白、变体和突变体提供于表14中。

[0521] 表14:CD19蛋白、变体和突变体

描述	序列	SEQ ID NO
[0522] 人 CD19, 同种型 1(NCBI 参考号 NP_00117 1569.1)	MPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNA VLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKPFLKLSLGL PGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYLCQPGPP SEKAWQPGWTVNVEGSGELFRWNVSDLGGLGC GLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIW EGEPPCLPPRDSL NQSLSQDLTMAPGSTLWLSCG VPPDSVSRGPLSWTHVHPKGP KSLLSLELKDDRP ARDMWVMETGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNL TMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWKVSAVTLAY LIFCLCSLVGILHLQRALVLRKRKRMTDPTRRF FKVTTPPGSGPQNQYGNVLSLPTPTSGLGRAQR WAAGLGGTAPSYGNPSSDVQADGALGSRSPPG VGPEEEEEGEGYEEDSEEDSEFYENDSNLGQDQ LSQDGSYENPEDEPLGPEDEDSFSNAESYENED EELTQPVARTMDFLSPHGS AWDP SREATSLAGSQ SYEDMRGILYAAPQLRSIRGQPGPNHEEDADSYE NMDNPDGPDPAWGGGGRMGTWSTR	858
人 CD19, 同种型 2(NCBI 参考号 NP_00176 1.3)	MPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNA VLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKPFLKLSLGL PGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYLCQPGPP SEKAWQPGWTVNVEGSGELFRWNVSDLGGLGC GLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIW EGEPPCLPPRDSL NQSLSQDLTMAPGSTLWLSCG VPPDSVSRGPLSWTHVHPKGP KSLLSLELKDDRP ARDMWVMETGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNL TMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWKVSAVTLAY LIFCLCSLVGILHLQRALVLRKRKRMTDPTRRF FKVTTPPGSGPQNQYGNVLSLPTPTSGLGRAQR WAAGLGGTAPSYGNPSSDVQADGALGSRSPPG VGPEEEEEGEGYEEDSEEDSEFYENDSNLGQDQ LSQDGSYENPEDEPLGPEDEDSFSNAESYENED	859

[0523]

	EELTQPVARTMDFLSPHGSAWDPSREATSLGSQS YEDMRGILYAAPQLRSIRGQPGPNHEEDADSYE NMDNPDGPDPAWGGGGRMGTWSTR	
恒河猴 CD19 (Uniprot ID: F7F486)	MPPPCLLFFLLFLTPMEVRPQEPLVVKVEEGDNA VLQCLEGTS DGPTQQLVWCRDSPFEPFLNLSLGL PGMGIRMGPLGIWLLIFNVS NQTGGFYLCQPGL PSEKAWQPGWTVSVEGSGELFRWNVSDLGGLG CGLKNRSSEGPSSPSGKLNSSQLYVWAKDRPEM WEGEPVCGPPRDSL NQSLSQDLTMAPGSTLWLS CGVPPDSVSRGPLSWTHVRPKGPKSLLSLELK DDRPDRDMWVVDTG LLLTRATAQDAGKYYCH RGNWTKSFYLEITARPALWHWLLRIGGWKVP AVTLTYLIFCLCSLVGILQLQRALVLRKRKRMTDP TRRFFKVT PPPGSGPQNQYGNVLSLPTPTSGLGR AQRWAAGLGGTAPSYGNPSSDVQVDGAVGSR PPGAGPEEEEEGEGYE EEPDSEEGSEFYENDSNFGQ DQLSQDGSYENPEDEPLGPEDEDSFSNAESYE NEDEELTQPVARTMDFLSPHGSAWDPSREATSLG S QS YEDMRGLLYAAPQLRTIRGQPGPNHEEDAD SYENMDNPDGPDPAWGGGGRMGTWSAR	860
人 CD19(H21 8R、 A237D、 M243V、 E244D、 P250T)	MPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNA VLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKPFLLKLSLGL PGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYLCQPGPP SEKAWQPGWTVNVEGSGELFRWNVSDLGGLGC GLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIW EGEPPCLPPRDSL NQSLSQDLTMAPGSTLWLS CGVPPDSVSRGPLSWTHVRPKGPKSLLSLELKDDR PDRDMWVVDTG LLLTRATAQDAGKYYCHRG NLTMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWKVSAV TLAYLIFCLCSLVGILHLQRALVLRKRKRMTDP PTRRFKVT PPPGSGPQNQYGNVLSLPTPTSGL GRAQRWAAGLGGTAPSYGNPSSDVQADGALG SRSPPGVGPEEEEEGEGYE EEPDSEEDSEFY ENDSNLGQDQLSQDGSYENPEDEPLGPEDEDS FSNAESYENED EELTQPVARTMDFLSPHGSA WDPSREATSLAGSQSYEDMRGILYAAPQLRS IRGQPGPNHEEDADSYENMDNPDGPDPAWGG GGGRMGTWSTR	861
人 CD19(H21 8R、 A237D)	MPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNA VLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKPFLLKLSLGL PGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYLCQPGPP SEKAWQPGWTVNVEGSGELFRWNVSDLGGLGC GLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIW EGEPPCLPPRDSL NQSLSQDLTMAPGSTLWLS CGVPPDSVSRGPLSWTHVRPKGPKSLLSLELKDDR PDRDMWVMETG LLLPRATAQDAGKYYCHRG NLTMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWKVSAV TLAYLIFCLCSLVGILHLQRALVLRKRKRMTDP PTRRFFKVT PPPGSGPQNQYGNVLSLPTPTS GLGRAQRWAAGLGGTAPSYGNPSSDVQADGAL GSRSPPGVGPEEEEEGEGYE EEPDSEEDSE FYENDSNLGQDQ	862

	LSQDGSQYENPEDEPLGPEDEDSFSNAESYENED EELTQPVARTMDFLSPHGSAWDPSREATSLAGSQ SYEDMRGILYAAPQLRSIRGQPGPNHEEDADSYE NMDNPDGPDPAWGGGGRMGWSTR	
[0524] 人 CD19(δ 外显子 2)	MPPRLLFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEGELFR WNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKL YVWAKDRPEIWEGEPPCLPPRDSL NQSLSQDLT MAPGSTLWLSGCVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGP KSLLSLELKDDRPARDMWV METGLLLPRATAQ DAGKYYCHRGNL TMSFHLEITARPVLWHWLLR TGGWKVSAVTLAYLIFCLCSLVGILHLQRALVLR RKRKRMTDPTRRFKVT PPPGSGPQNQYGNVLS LPTPTSGLGRAQRWAAGLGGTAPSYGNPSSDVQ ADGALGSRSPPGVGP EEEEEGEGYEEP DSEEDSEF YENDSNLGQDQLSQDGSQYENPEDEPLGPEDED SFSNAESYENEDEELTQPVARTMDFLSPHGSAW DPSREATSLGSSQSYEDMRGILYAAPQLRSIRGQ GPNHEEDADSYENMDNPDGPDPAWGGGGRMG TWSTR	863
人 CD19(外 显子 1-4)	MPPRLLFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNA VLQCLKGTS DGPTQQLTWSRESPLK PFLKLSLGL PGLGIHMRPLAIWLFIFNV SQMGGFYLCQPGPP SEKAWQPGWTVNVEGSGELFRWNVSDLGGLGC GLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIW EGEPPCLPPRDSL NQSLSQDLTMAPGSTLWLSG VPPDSVSRGPLSWTHVHPKGP KSLLSLELKDDRP ARDMWV METGLLLPRATAQ DAGKYYCHRGNL TMSFHLEITARP	864
人 CD19(外 显子 1、3、 4)	MPPRLLFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEGELFR WNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKL YVWAKDRPEIWEGEPPCLPPRDSL NQSLSQDLT MAPGSTLWLSGCVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGP KSLLSLELKDDRPARDMWV METGLLLPRATAQ DAGKYYCHRGNL TMSFHLEITARP	865

[0525] III. 药物组合物和制剂

[0526] 本发明进一步提供了药物组合物,其包含一个或多个本发明的生物回路、效应模块、SRE(例如,DD)、刺激物和感兴趣的有效载荷(即,免疫治疗剂)、载体、细胞和其他组分,以及任选地至少一种药学上可接受的赋形剂或惰性成分。

[0527] 如本文所用,术语“药物组合物”是指本文所述的生物回路、SRE、刺激物和感兴趣的有效载荷(即,免疫治疗剂)、其他组分、载体、细胞,或其药学上可接受的盐,任选地与其他化学组分诸如生理上合适的载剂和赋形剂的制剂。本发明的药物组合物包含有效量的一种或多种本发明的活性组合物。含有至少一种本发明的组合物和/或额外活性成分药物组合物的制备应为本领域的技术人员按照本公开已知的,如Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版Mack Printing Company,1990中所例示,其以引用的方式并入本文。

[0528] 术语“赋形剂”或“惰性成分”是指添加到药物组合物和制剂中以进一步有利于活性成分的施用的非活性物质。出于本公开的目的,短语“活性成分”一般是指如本文所述递送的任何一个或多个生物回路、效应模块、SRE、刺激物和感兴趣的有效载荷(即,免疫治疗剂)、其他组分、载体和细胞。短语“药学上可接受的”是指当适当地施用于动物(诸如人)

时不产生不利、过敏或其他不良反应的分子实体和组合物。

[0529] 在一些实施方案中,药物组合物和制剂被施用于人、人患者或受试者。虽然本文提供的药物组合物的描述主要涉及适用于向人施用的药物组合物,但是熟练的业内人士将理解此类组合物通常适用于向任何其他动物例如向非人动物(例如非人哺乳动物)施用。预期施用药物组合物的受试者包括但不限于非人动物,包括农业动物(诸如牛、马、鸡和猪)、家畜(诸如猫、狗)或研究动物(诸如小鼠、大鼠、兔子、狗和非人灵长类动物)。应当理解,用于人施用,制剂应该符合由FDA生物制品标准办公室(FDA Office of Biological Standards)的所要求的无菌、热原、一般安全性和纯度标准。

[0530] 根据本发明的药物组合物和制剂可以单一单位剂量和/或以多个单一单位剂量大批量制备、包装和/或销售。如本文所使用,“单位剂量”为包含预先确定的量的活性成分的药物组合物的个别量。活性成分的量一般等于将要向受试者施用的活性成分的剂量和/或这种剂量的合宜分数,例如像这种剂量的一半或三分之一。

[0531] 本发明的组合物可以任何合适于递送的方式配制。制剂可为但不限于纳米粒子、聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)微球、类脂质、脂质复合物、脂质体、聚合物、碳水化合物(包括单糖)、阳离子脂质及其组合。

[0532] 在一个实施方案中,制剂为可包含至少一种脂质的纳米粒子。脂质可选自但不限于DLin-DMA、DLin-K-DMA、98N12-5、C12-200、DLin-MC3-DMA、DLin-KC2-DMA、DODMA、PLGA、PEG、PEG-DMG和PEG话脂质。在另一方面,脂质可为阳离子脂质,如但不限于DLin-DMA、DLin-D-DMA、DLin-MC3-DMA、DLin-KC2-DMA和DODMA。

[0533] 对于本发明的多核苷酸来说,制剂可以选自例如国际申请PCT/US2012/069610中教导的任何制剂,其内容以全文引用的方式并入本文。

[0534] 根据本发明的药物组合物中的活性成分、药学上可接受的赋形剂或惰性成分和/或任何额外成分的相对量将取决于所治疗的受试者的身份、尺寸和/或病状并且进一步取决于待施用组合物的途径而改变。以举例的方式,组合物可包含0.1与100之间,例如0.5与50之间、1-30之间、5-80之间、至少80(w/w)的活性成分。

[0535] 疾病的治疗或减轻的功效可例如通过测量疾病进展、疾病缓解、症状严重程度、疼痛减轻、生活品质、维持治疗效果所需的药物剂量、疾病标志物的水平或者适合于治疗或以预防为目的的给定疾病的任何其他可测量的参数。通过测量此类参数中任何一个或参数的任何组合来监测治疗或预防的功效,这在本领域技术人员的能力范围之内。结合本发明的组合物的施用,对例如癌症“有效”指示,以临床上适当的方式的施用对于至少统计学显著分数的患者产生有益效果,诸如症状改善、治愈、疾病负荷减少、肿瘤团块或细胞数减少、生命延长、生活品质改善或者通常通过熟悉治疗特定癌症类型的医生认为是积极的其他效果。

[0536] 当存在疾病状态的一个或多个参数的统计学上显著的改善时,或者到无法加重或发展原本可预料到的症状时,治疗或预防效果是明显的。例如,可测量的疾病参数中至少10、优选至少20、30、40、50或更多的有利变化可指示有效治疗。如本领域中已知,还可以使用针对给定疾病的实验动物模型来判断本发明的给定组合物或制剂的功效。当使用实验动物模型时,当观察到统计学上显著的变化时,治疗功效得以证明。

[0537] IV. 应用

[0538] 在本发明的一方面,提供了减少肿瘤体积或负荷的方法。所述方法包括向患有肿瘤的受试者施用药学上有效量的药物组合物,所述药物组合物包含至少一个生物回路系统、效应模块、DD和/或感兴趣的有效载荷(即,免疫治疗剂)、至少一个载体或细胞。具有如本文所述的任何免疫治疗剂的生物回路系统和效应模块的形式可为多肽、或多核苷酸(诸如mRNA)、或病毒载体(其包含多核苷酸)或者被修饰成表达生物回路、效应模块、DD和感兴趣的有效载荷(即,免疫治疗剂)的细胞。

[0539] 在本发明的另一方面,提供了用于在受试者中诱导抗肿瘤免疫应答的方法。所述方法包括向患有肿瘤的受试者施用药学上有效量的药物组合物,所述药物组合物包含至少一个生物回路系统、效应模块、DD和/或感兴趣的有效载荷(即,免疫治疗剂)、至少一个载体或细胞。具有如本文所述的任何免疫治疗剂的生物回路和效应模块的形式可为多肽、或多核苷酸(诸如mRNA)、或病毒载体(其包含多核苷酸)或者被修饰成表达生物回路、效应模块、DD和感兴趣的有效载荷(即,免疫治疗剂)的细胞。

[0540] 根据本发明,所述方法可为使用基因工程化细胞诸如本发明的免疫效应细胞;包含本发明的生物回路系统、效应模块、DD、感兴趣的有效载荷(即,免疫治疗剂)的癌症疫苗;或操纵肿瘤免疫抑制微环境的组合物;或其组合进行的过继性细胞转移(ACT)。这些治疗可进一步与其他癌症治疗如化学疗法和放射疗法一起使用。

[0541] 1. 过继性细胞转移(过继性免疫疗法)

[0542] 在一些实施方案中,被基因修饰成表达至少一个生物回路系统、效应模块、DD和/或感兴趣的有效载荷(免疫治疗剂)的细胞可用于过继性细胞疗法(ACT)。如本文所用,过继性细胞转移是指施用具有直接抗癌活性的(来自自体、同种异体或基因修饰的宿主的)免疫细胞。ACT在针对恶性和感染性疾病的临床应用中显示出前景。例如,被基因工程化成识别CD19的T细胞已被用于治疗滤泡性B细胞淋巴瘤(Kochenderfer等,Blood,2010,116:4099-4102;以及Kochenderfer等Rosenberg,Nat Rev Clin Oncol.,2013,10(5):267-276),并且使用被基因修饰成表达抗肿瘤T细胞受体的自体淋巴细胞的ACT已被用于治疗转移性黑色素瘤(Rosenberg和Dudley,Curr.Opin.Immunol.2009,21:233-240)。

[0543] 根据本发明,生物回路和系统可用于细胞疗法诸如过继性细胞疗法的开发和实施。可用于细胞疗法的某些效应模块给出于图7至图12中。生物回路、它们的组分、效应模块和它们的SRE以及有效载荷可用于:细胞疗法以实现CAR疗法;TIL的操纵或调控;同种异基因细胞疗法;与其他治疗线(例如,放射、细胞因子)的组合T细胞疗法;编码工程化TCR或修饰TCR;或者除TCR之外增强T细胞(例如,通过引入细胞因子基因,检查点抑制剂PD1、CTLA4的基因)。

[0544] 本文提供了用于过继性细胞疗法的方法。所述方法涉及:预处理有需要的受试者;用本发明的SRE、生物回路和组合物调节免疫细胞;向受试者施用表达本发明的组合物的工程化免疫细胞;以及将工程化细胞成功植入受试者内。

[0545] 在一些实施方案中,本发明的SRE、生物回路和组合物可用于最小化与过继性细胞疗法有关的预处理方案。如本文所用,“预处理”是指向受试者施用以改进过继性细胞疗法结果的任何治疗方案。预处理策略包括但不限于全身照射和/或淋巴细胞清除性化学疗法。没有预处理的过继性疗法临床试验未能证明任何临床益处,指示其在ACT中的重要性。然而,预处理与明显的毒性相关,并限制了适合ACT的受试者队列。在一些情况下,ACT的免疫

细胞可施用本发明的SRE工程化成表达细胞因子诸如IL12和IL15以减少对预处理的需要(Pengram等(2012)Blood 119(18):4133-41,其内容以全文引用的方式并入)。

[0546] 在一些实施方案中,ACT的免疫细胞可为树突状细胞、T细胞诸如CD8⁺ T细胞和CD4⁺ T细胞、自然杀伤(NK)细胞、NK T细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、淋巴因子活化的杀伤(LAK)细胞、记忆T细胞、调控T细胞(Treg)、辅助T细胞、细胞因子诱导的杀伤(CIK)细胞以及其任何组合。在其他实施方案中,ACT的免疫刺激细胞可由胚胎干细胞(ESC)和诱导的多能干细胞(iPSC)生成。在一些实施方案中,自体或同种异基因免疫细胞用于ACT。

[0547] 在一些实施方案中,用于ACT的T细胞可为被工程化成表达CAR的T细胞,所述CAR包含特异于感兴趣的肿瘤细胞上的抗原的抗原结合结构域。在其他实施方案中,用于ACT的NK细胞可为被工程化成表达CAR的T细胞,所述CAR包含特异于感兴趣的肿瘤细胞上的抗原的抗原结合结构域。除基因修饰的T细胞(例如,CAR T细胞)的过继性转移用于免疫疗法之外,单独或与CAR T细胞组合使用的替代类型的表达CAR的白细胞也可用于过继免疫疗法。在一个示例中,T细胞和NK细胞的混合物可用于ACT。根据本发明,通过与可操作地连接至效应模块中的CAR的DD结合的小分子来调整和控制CAR在T细胞和NK细胞中的表达水平。

[0548] 在一些实施方案中,可以将本发明的CAR置于T细胞中T细胞受体 α 恒定(TRAC)基因座的转录控制下,以实现均匀的CAR表达,同时增强T细胞效力可使用CRISPR/Cas 9、锌指核酸酶(ZFN)、TALEN破坏TRAC基因座,然后插入CAR构建体。涉及TRAC基因座的工程化CAR构建体的方法描述于Eyquem J.等(2017)Nature.543(7643):113-117(其内容以全文引用的方式并入本文)。

[0549] 在一些实施方案中,被工程化成表达本发明组合物的NK细胞可以用于ACT。NK细胞活化诱导靶细胞中的穿孔素/颗粒酶依赖性细胞凋亡。NK细胞活化还诱导细胞因子分泌,诸如IFN- γ 、TNF- α 和GM-CSF。这些细胞因子增强巨噬细胞的吞噬功能和它们的抗微生物活性,并通过抗原呈递细胞(诸如树突状细胞(DC))上调抗原呈递而增强适应性免疫应答(Reviewed by Vivier等,Nat.Immunol.,2008,9(5):503-510)。

[0550] 基因修饰的其他示例可以包括引入嵌合抗原受体(CAR)和下调抑制性NK细胞受体诸如NKG2A。

[0551] NK细胞也可被基因重编程,以在与肿瘤细胞相互作用时避开NK细胞抑制性信号。例如,使用CRISPR、ZFN或TALEN对NK细胞进行基因修饰以沉默它们的抑制性受体可增强NK细胞的抗肿瘤能力。

[0552] 免疫细胞可使用本领域中已知的多种方法进行分离和离体扩增。例如,分离和扩增细胞毒性T细胞的方法描述于美国专利号6,805,861和6,531,451、美国专利公布号US20160348072A1以及国际专利公布号W02016168595A1,每个专利的内容以全文引用的方式并入本文。NK细胞的分离和扩增描述于美国专利公布号US20150152387A1、美国专利号7,435,596和Oyer,J.L.(2016).Cytotherapy.18(5):653-63,每个参考文献的内容均以全文引用的方式并入本文。具体来说,人原代NK细胞可在存在饲养细胞的情况下扩增,例如被基因修饰成表达膜结合IL15、IL21、IL12和4-1BBL的骨髓性细胞系。

[0553] 在一些情况下,免疫细胞亚群可富集ACT。免疫细胞富集的方法教导于国际专利公布号W02015039100A1。在另一个示例中,对B和T淋巴细胞弱化标志物(BTLA)呈阳性的T细胞

可用于富集具有抗癌反应性的T细胞,如美国专利号9,512,401中所述(每个专利的内容均以全文引用的方式并入本文)。

[0554] 在一些实施方案中,可耗尽用于ACT的免疫细胞的选定亚群以增强T细胞扩增。例如,可使用美国专利公布号US 20160298081A1中所教导的方法耗尽免疫细胞的Foxp3⁺ T淋巴细胞以最小化抗肿瘤免疫应答,其内容以全文引用的方式并入本文。

[0555] 在一些实施方案中,用于ACT的T细胞的活化和扩增实现了细胞表面上瞬时表达嵌合抗原受体(CAR)的抗原刺激。此类活化方法教导于国际专利号W02017015427,其内容以全文引用的方式并入本文。

[0556] 在一些实施方案中,免疫细胞可被与抗原呈递细胞(APC)相关的抗原活化。在一些实施方案中,APC可为抗原特异性或非特异性的树突状细胞、巨噬细胞或B细胞。APC在器官中可为自体的或同源的。在一些实施方案中,APC可为人工抗原呈递细胞(aAPC),诸如基于细胞的aAPC或无细胞aAPC。基于细胞的aAPC可选自基因修饰的同种异基因细胞诸如人红白血病细胞或者异种细胞诸如鼠成纤维细胞和果蝇细胞。可替代地,APC可为无细胞的,其中抗原或共刺激结构域呈现于合成表面上,诸如乳胶珠、聚苯乙烯珠、脂质囊泡或外泌体。

[0557] 在一些实施方案中,可以使用人工细胞平台扩增本发明的细胞,特别是T细胞。在一个实施方案中,成熟T细胞可使用Seet CS等2017.Nat Methods.14,521-530(其内容以全文引用的方式并入本文)所述的人工胸腺类器官(artificial thymic organoid,ATO)生成。ATO基于表达delta样典型notch配体(DLL1)的基质细胞系。在这种方法中,基质细胞通过离心与造血干细胞和祖细胞聚集在一起,并在空气-流体界面的细胞培养插件上展开,以生成类器官培养物。ATO来源的T细胞表现出天然表型、多样化的T细胞受体(TCR)库和TCR依赖性功能。

[0558] 在一些实施方案中,过继性细胞疗法通过自体转移进行,其中所述细胞来源于需要治疗的受试者,并且在分离和加工之后向同一受试者施用细胞。在其他情况下,ACT可涉及同种异体转移,其中从除最终接受细胞疗法的接受受试者以外的给予受试者分离和/或制备细胞。给予和接受受试者可以是基因上相同或类似的,或者可表达相同HLA类或亚型。

[0559] 在一些实施方案中,引入用于ACT的免疫细胞(例如,T细胞和NK细胞)中的多种免疫治疗剂可由同一生物回路系统控制。在一个示例中,将细胞因子诸如IL12和CAR构建体诸如CD19 CAR连接至同一hDHFR去稳定结构域。同时使用TMP调整IL12和CD19 CAR的表达。在其他实施方案中,引入用于ACT的免疫细胞(例如,T细胞和NK细胞)中的多种免疫治疗剂可由不同生物回路系统控制。在一个示例中,将细胞因子诸如IL12和CAR构建体诸如CD19 CAR连接至两个单独效应模块中的不同DD,从而可使用不同的刺激物分开进行调整。在另一个示例中,自杀基因和CAR构建体可连接至两个单独的效应模块。

[0560] 在使用本发明的SRE、生物回路和组合物进行基因调节之后,向有需要的受试者施用细胞。施用用于过继性细胞疗法的细胞的方法为已知的,并且可与所提供的方法和组合物结合使用。例如,过继性T细胞疗法方法描述于例如Gruenberg等的美国专利申请公布号2003/0170238;Rosenberg的美国专利号4,690,915;Rosenberg(2011)Nat Rev Clin Oncol.8(10):577-85)。参见例如,Themeli等(2013)Nat Biotechnol.31(10):928-933;Tsukahara等(2013)Biochem Biophys Res Commun 438(1):84-9;Davila等(2013)PLoS ONE 8(4):e61338,每个参考文献的内容均以全文引用的方式并入本文。

[0561] 在一些实施方案中,用于ACT的免疫细胞可被修饰成表达一种或多种有利于免疫细胞活化、浸润、表达、存活和抗肿瘤功能的免疫治疗剂。免疫治疗剂可为:特异于不同靶分子的第二CAR或TCR;细胞因子或细胞因子受体;嵌合开关受体,其将抑制信号转化成刺激信号;归巢受体,其将过继转移的细胞引导至靶部位,诸如肿瘤组织;优化免疫细胞代谢的剂;或在过继细胞转移之后观察到严重事件时或不再需要转移免疫细胞时杀伤活化T细胞的安全开关基因(例,如自杀基因)。

[0562] 在一些实施方案中,可对用于过继性细胞专利的免疫细胞进行基因操作以改进它们的持久性、细胞毒性、肿瘤靶向能力以及归巢至体内疾病部位的能力,总体目标为进一步改进它们在癌症患者中杀伤肿瘤的能力。一个示例为将包含细胞因子诸如 γ -细胞因子(IL2和IL15)的本发明的效应模块进入到免疫细胞中以促进免疫细胞增殖和存活。将细胞因子基因(例如, γ -细胞因子IL2和IL15)转导至细胞中能够使免疫细胞增殖而无需添加外源细胞因子,并且细胞因子表达NK细胞具有增强的肿瘤细胞毒性。

[0563] 在一些实施方案中,生物回路、它们的组分、SRE或效应模块可用于防止T细胞耗竭。如本文所用,“T细胞耗竭”是指由慢性T细胞活化引起的T细胞功能的逐步和渐进丧失。T细胞耗竭为限制抗病毒和抗肿瘤免疫疗法功效的主要因素。耗竭T细胞具有较低的增殖和细胞因子产生能力,同时具有高细胞凋亡率和多种抑制性受体的高表面表达。导致耗竭的T细胞活化可存在或不存在抗原的情况下发生。

[0564] 在一些实施方案中,在嵌合抗原受体-T细胞疗法(CAR-T)的情况下,生物回路和它们的组分可用于防止T细胞耗竭。在这种情况下,在一些情况下,耗竭可由CAR的scFv在细胞表面上的寡聚,导致CAR细胞内结构域的持续活化所引起。作为非限制性示例,本发明的CAR可包括不能寡聚的scFv。作为另一个非限制性示例,还可选择在抗原暴露之后快速内化并且重新表达的CAR,以防止细胞表面上的慢性scFv寡聚。在一个实施方案中,可修饰scFv的框架区以防止组成型CAR信号传导(Long等2014.Cancer Research.74(19)S1,其内容以全文引用的方式并入本文)。本发明的可调生物回路系统还可用于调控T细胞表面上CAR的表面表达,以防止慢性T细胞活化。本发明的CAR还可被工程化成使耗竭最小。作为非限制性实例,可将41-BB信号传导结构域并入CAR设计中以减轻T细胞耗竭。在一些实施方案中,Long H A等所公开的任何策略均可用于防止耗竭(Long A H等(2015)Nature Medicine 21,581-590,其内容以全文引用的方式并入本文)。

[0565] 在一些实施方案中,本发明的生物回路的可调实质可用于逆转在滋养CAR信号传导的情况下观察到的人T细胞衰竭。使用本发明的组合物可逆地沉默过继性转移的细胞的生物学活性可以用于逆转滋养信号传导,继而可以使T细胞恢复活力。耗竭的逆转可通过下调与耗竭相关的多种抑制性受体来测量。

[0566] 在一些实施方案中,可以修饰T细胞代谢途径以削弱T细胞对耗竭的易感性。代谢途径可包括但不限于糖酵解、尿素循环、柠檬酸循环、 β 氧化、脂肪酸生物合成、磷酸戊糖途径、核苷酸生物合成和糖原代谢途径。作为非限制性示例,降低糖酵解速率的有效载荷可用于限制或防止T细胞衰竭(Long等Journal for Immunotherapy of Cancer 2013,1(Suppl 1):P21,其内容以全文引用的方式并入)。在一个实施方案中,本发明的T细胞可以与糖酵解抑制剂诸如2-脱氧葡萄糖和雷帕霉素组合使用。

[0567] 在一些实施方案中,可用于免疫疗法的本发明的效应模块可置于T细胞中T细胞受

体 α 基因座恒定 (TRAC) 基因座的转录控制下。Eyquem等已显示,从TRAC基因座表达CAR可防止T细胞耗竭以及由过度T细胞活化引起的T细胞加速分化 (Eyquem J.等 (2017) Nature. 543 (7643):113-117,其内容以全文引用的方式并入本文)。

[0568] 在一些实施方案中,本发明的有效载荷可与靶向与T细胞耗竭相关的T细胞表面标志物的抗体或片段结合使用。可以使用的与T细胞耗竭有关的T细胞表面标志物包括但不限于CTLA-1、PD-1、TGIT、LAG-3、2B4、BTLA、TIM3、VISTA和CD96。

[0569] 在一个实施方案中,本发明的有效载荷可为CD276 CAR (具有CD28、4-1BB和CD3 ζ 细胞内结构域),其不显示与早期T细胞耗竭相关的标志物的上调 (参见国际专利申请号W02017044699,其内容以全文引用的方式并入)。

[0570] 在一些实施方案中,本发明的组合物可用于改变受试者中的TIL (肿瘤浸润淋巴细胞) 群体。在一个实施方案中,本文所述的任一有效载荷均可用于改变CD4阳性细胞与CD8阳性群体的比率。在一些实施方案中,TIL可被离体分选并工程化成表达本文所述的任何细胞因子。本发明的有效载荷可用于扩增TIL的CD4和/或CD8群体以增强TIL介导的免疫应答。

[0571] 2. 癌症疫苗

[0572] 在一些实施方案中,本发明的生物回路、效应模块、感兴趣的有效载荷 (免疫治疗剂)、载体、细胞和组合物可与癌症疫苗结合使用。

[0573] 在一些实施方案中,癌症疫苗可包含来源于肿瘤相关抗原 (TAA) 的肽和/或蛋白。此类策略可用于在受试者中唤起免疫应答,所述免疫应答在一些情况下可为细胞毒性T淋巴细胞 (CTL) 应答。用于癌症疫苗的肽也可被修饰成匹配受试者的突变谱 (mutation profile)。例如,具有与需要治疗的受试者中存现的突变匹配的突变的EGFR衍生肽已成功用于具有肺癌的患者 (Li F等 (2016) Oncoimmunology. Oct 7;5(12):e1238539,其内容以全文引用的方式并入本文)。

[0574] 在一个实施方案中,本发明的癌症疫苗可为来源于TAA的超级激动剂改变的肽配体 (APL)。这些为与天然肽序列有一个或多个氨基酸的偏差的突变肽配体,与天然表位相比,它们更有效地活化具体CTL克隆。这些改变可使肽更好地结合限制性I类MHC分子或更有利地与给定肿瘤特异性CTL亚组的TCR相互作用。可使用美国专利公布号US20160317633A1中教导的方法选择APL,其内容以全文引用的方式并入本文。

[0575] 3. 组合治疗

[0576] 在一些实施方案中,期望组合本发明的组合物、载体和细胞以用于向受试者施用。包含不同免疫治疗剂的本发明的组合物可以组合方式使用以便增强免疫疗法。

[0577] 在一些实施方案中,期望将本发明的组合物与佐剂组合,这样可增强抗原特异性免疫应答的效力和寿命。在组合疗法中用作免疫刺激剂的佐剂包括生物分子或递送抗原的递送载体。作为非限制性示例,本发明的组合物可以与生物佐剂诸如细胞因子、Toll样受体、细菌毒素和/或皂苷组合。在其他实施方案中,本发明的组合物可与递送载体组合。例示性递送载体包括聚合物微球、免疫刺激复合物、乳液 (水包油或油包水)、铝盐、脂质体或病毒体。

[0578] 在一些实施方案中,可将修饰成表达本发明的生物回路、效应模块、DD和有效载荷的免疫效应细胞与本文所述的生物佐剂组合。双重调控CAR和细胞因子及配体以将靶标介导的活化的动力学控制与内在细胞T细胞扩增分开。此类双重调控还使患者体内对预处理

方案的需要最小化。作为非限制性示例,DD调控CAR例如CD19CAR可与细胞因子例如IL12组合以增强CAR的抗肿瘤功效(Pegram H.J.等Tumor-targeted T cells modified to secrete IL12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning.Blood.2012;119:4133-41,每个参考文献的内容均以全文引用的方式并入本文)。作为另一个非限制性示例,Merchant等将基于树突状细胞的疫苗接种与重组人IL7组合以改进高风险儿科肉瘤患者中的结果(Merchant,M.S等Adjuvant immunotherapy to Improve Outcome in High-Risk Pediatric Sarcomas.Clin Cancer Res.2016.22(13):3182-91,每个参考文献的内容均以全文引用的方式并入本文)。

[0579] 在一些实施方案中,被修饰成表达一种或多种抗原特异性TCR或CAR的免疫效应细胞可与本发明的组合物组合,所述组合物包含转化免疫抑制性肿瘤微环境的免疫治疗剂。

[0580] 在一个方面,可组合被修饰成表达特异于同一细胞上的不同靶分子的CAR的效应免疫细胞。在另一个方面,被修饰成表达相同CAR构建体的不同免疫细胞诸如NK细胞和T细胞可与肿瘤治疗组合使用,被修饰成表达CD19 CAR的T细胞可与被修饰成表达相同CD19 CAR的NK细胞组合使用以治疗B细胞恶性肿瘤。

[0581] 在其他实施方案中,被修饰成表达CAR的免疫细胞可与检查点阻断剂组合使用。

[0582] 在一些实施方案中,被修饰成表达本发明的生物回路、效应模块、DD和有效载荷的免疫效应细胞可与本发明的癌症疫苗组合。

[0583] 在一些实施方案中,本发明的方法可包括将本发明的组合物与在治疗癌症、感染疾病和其他免疫缺陷性疾病方面有效的其他剂诸如抗癌剂组合。如本文所用,术语“抗癌剂”是指能够在受试者中例如通过促进癌细胞的杀伤、诱导癌细胞的凋亡、降低癌细胞的生长速率、减少转移的发生或数量、减小肿瘤尺寸、抑制肿瘤生长、减少肿瘤或癌细胞的血液供应、促进针对癌细胞或肿瘤的免疫应答、预防或抑制癌症的进展或延长患有癌症的受试者的寿命而对癌症产生负面影响的任何剂。

[0584] 在一些实施方案中,抗癌剂或疗法可为化学治疗剂、或放射疗法、免疫治疗剂、手术或与本发明组合改进治疗的治疗功效的任何其他治疗剂。

[0585] 在一个实施方案中,包含CD19 CAR的效应模块可使用国际专利申请号W02016164580中所教导的方法与氨基嘧啶衍生物诸如伯基特氏酪氨酸受体激酶(BTK)抑制剂组合使用,所述专利的内容以全文引用的方式并入本文。

[0586] 在一些实施方案中,本发明的组合物可与除本文所述的发明疗法之外的免疫治疗剂组合使用,诸如特异于肿瘤细胞表面上的一些靶分子的抗体。

[0587] 例示性治疗剂包括但不限于阿西维辛(Acivicin);阿克拉霉素(Aclarubicin);盐酸阿考达唑(Acodazole hydrochloride);阿克罗宁(Acronine);阿多来新(Adozelesin);阿地白介素(Aldesleukin);六甲蜜胺(Altretamine);安波霉素(Ambomycin);乙酸阿美蒽醌(Ametantrone acetate);安吡啶(Amsacrine);阿那曲唑(Anastrozole);氨茴霉素(Anthramycin);天冬酰胺酶(Asparaginase);Asperrin、舒林酸(Sulindac)、姜黄素、烷基化剂包括:氮芥,诸如双氯乙基甲胺、环磷酰胺、异环磷酰胺、米尔法兰(melphalan)和苯丁酸氮芥(chlorambucil);亚硝基脲,诸如卡莫司汀(carmustine)(BC U)、洛莫司汀(lomustine)(CCNU)和司莫司汀(semustine)(甲基-CC U);thylenimine/甲基密胺,诸如三亚乙基密胺(TEM)、三乙烯、三亚乙基硫代磷酰胺(thiophosphoramidate)(噻替派

(thiotepa))、六甲基密胺(HMM、六甲蜜胺(altretamine));烷基磺酸酯,诸如白消安(busulfan);三嗪,诸如达卡巴嗪(dacarbazine)(DTIC);抗代谢物,包括叶酸类似物诸如甲氨蝶呤和三甲曲沙(trimetrexate)、吡咯烷类似物诸如5-氟尿嘧啶、氟脱氧尿苷、吉西他滨(gemcitabine)、阿糖胞苷(cytosine arabinoside、AraC、cytarabine)、5-阿扎胞苷、2,2'-二氟脱氧胞苷、嘌呤类似物诸如6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、硫唑嘌呤(azathioprine)、2'-脱氧肋间型霉素(2'-deoxycoformycin)(喷司他丁(pentostatin))、赤羟基壬基腺嘌呤(erythrohydroxynonyladenine, EHNA)、磷酸氟达拉滨(fludarabine phosphate)和2-氯脱氧腺苷(克拉屈滨(cladribine)、2-CdA);天然产物,包括抗有丝分裂药诸如紫杉醇、长春花生物碱包括长春碱(VLB)、长春新碱和长春瑞滨(vinorelbine),泰索帝(taxotere)、雌莫司汀(estramustine)和磷酸雌莫司汀;表鬼臼毒素(epipodophylotoxin)诸如依托泊苷(etoposide)和替尼泊苷(teniposide);抗生素,诸如放线菌素D、道诺霉素(红比霉素)、多柔比星(doxorubicin)、米托蒽醌(mitoxantrone)、伊达比星(idarubicin)、博来霉素(bleomycin)、普卡霉素(plicamycin)(光辉霉素(mithramycin))、丝裂霉素C和放线菌素;酶诸如L-天冬酰胺酶、细胞因子诸如干扰素(IFN)- γ 、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、TNF- β 和GM-CSF、抗血管生成因子诸如血管他丁(angiostatin)和内皮他丁(endostatin)、FGF或VEGF抑制剂诸如血管生成因子受体的可溶形式,包括可溶性VGF/VEGF受体;铂配位复合物诸如顺铂和卡铂;蒽二酮诸如米托蒽醌、取代的脲诸如羟基脲、甲基胍衍生物包括N-甲基胍(MIFf)和丙卡巴胍(procabazine);肾上腺皮质抑制剂诸如米托坦(mitotane)(α, ρ' -DDD)和氨鲁米特(aminoglutethimide);激素和拮抗剂包括肾上腺皮质类固醇拮抗剂诸如强的松(prednisone)和等效物、地塞米松(dexamethasone)和氨鲁米特;孕激素诸如己酸羟孕酮、乙酸甲羟孕酮和乙酸甲地孕酮诸如己烯雌酚(diethylstilbestrol)和炔雌醇(ethinyl estradiol)等效物;抗雌激素药诸如它莫西芬(tamoxifen);雄激素包括丙酸睾丸酮(testosterone propionate)和氟甲睾酮(flouxymesterone)/等效物;抗雄激素诸如氟他胺(flutamide)、促性腺激素释放激素类似物和亮丙瑞林(leuprolide);非甾族抗雄激素诸如氟他胺;激酶抑制剂、组蛋白去乙酰化酶抑制剂、甲基化抑制剂、蛋白酶体抑制剂、单克隆抗体、氧化剂、抗氧化剂、端粒酶抑制剂、BH3模拟物、泛素连接酶抑制剂、stat抑制剂和受体酪氨酸激酶抑制剂诸如甲磺酸伊马替尼(以Gleevac或Glivac进行销售)和厄洛替尼(erlotinib, EGF受体抑制剂)(现以Tarveca进行销售);抗病毒药诸如磷酸奥司他韦(oseltamivir phosphate)、两性霉素B和帕利珠单抗(palivizumab);Sdi 1模拟物;司莫司汀(Semustine);衰老衍生抑制剂1;麟门冬酸(Sparfosic acid);Spicamycin D;螺莫司汀(Spiromustine);脾脏五肽(Splenopentin);海绵他汀1;角鲨胺(Squalamine);斯提酰胺(Stipiamide);溶基质素抑制剂;索菲欣(Sulfinosine);超活性血管活性肠肽拮抗剂;维拉雷琐(Velaresol);藜芦明(Veramine);维尔啉(Verdins);维替泊芬(Verteporfin);长春瑞滨;维夏汀(Vinxaltine);维他辛(Vitaxin);伏氯唑(Vorozole);扎诺特隆(Zanoterone);折尼铂(Zeniplatin);亚苾维C(Zilascorb);和净司他丁替马拉美(Zinostatin stimalamer);PI3K β 小分子抑制剂、GSK2636771;pan-PI3K抑制剂(BKM120);BRAF抑制剂。威罗菲尼(Vemurafenib, Zelboraf)和达拉菲尼(dabrafenib, Tafinlar);或前述的任一类似物或其衍生物和变体。

[0588] 放射治疗剂和因子包括诱导DNA损伤的辐射和波,例如 γ 辐照、X射线、UV辐照、微

波、电子发射、放射性同位素等。可通过用上述形式的辐射来照射局部肿瘤部位来实现疗法。所有这些因素最有可能对DNA、DNA的前体、DNA的复制和修复以及染色体的组装和维持造成大范围的损伤。X射线的剂量范围在从延长时间段(3至4周)内50至200伦琴的每日剂量至2000至6000伦琴的单剂量的范围内。放射性同位素的剂量范围广泛变化,并且取决于同位素的半衰期、所发射的放射的强度和类型以及赘生性细胞的摄取。

[0589] 在一些实施方案中,化学治疗剂可为免疫调节剂,诸如来那度胺(lenalidomide, LEN)。最近的研究表明,来那度胺可增强CAR修饰T细胞的抗肿瘤功能(Otahal等, *Oncoimmunology*, 2015, 5(4):e1115940)。抗肿瘤抗体的一些示例包括托珠单抗(tocilizumab)、司妥昔单抗(siltuximab)。

[0590] 可与本发明的组合物组合使用的其他剂还包括但不限于影响细胞表面受体及其配体诸如Fas/Fas配体的上调的剂、DR4或DR5/TRAIL和GAP连接点、细胞抑制和分化剂、细胞粘附抑制剂诸如局部粘附激酶(FAK)抑制剂和洛伐他汀(Lovastatin)或者增加高度增殖细胞对细胞凋亡诱导剂诸如抗体C225的敏感性的剂。

[0591] 组合可包括同时或分开地施用本发明的组合物和其他剂。可替代地,本发明免疫疗法可在其他剂/疗法之前或之后,间隔在数分钟、数天、数周至数月的范围内。

[0592] 4. 疾病

[0593] 本发明提供了一种在有需要的受试者中减少肿瘤体积或负荷的方法,所述方法包括向受试者中引入本发明的组合物。

[0594] 本发明还提供了用于在治疗受试者中治疗癌症的方法,其包括向受试者施用有效量的被基因修饰成表达至少一个本发明的效应模块的免疫效应细胞。

[0595] 癌症

[0596] 各种癌症可均可用本发明的药物组合物、生物回路、生物回路组分、效应模块包括其SRE或有效载荷进行治疗。如本文所用,术语“癌症”是指特征在于趋于侵袭周围组织并转移至新的身体部位的间变性细胞的增殖的各种恶性赘瘤中的任一种,并且还指特征在于此类恶性赘瘤生长的病理病状。癌症可为肿瘤或血液恶性肿瘤,并且包括但不限于所有类型的淋巴瘤/白血病、癌和肉瘤,诸如在以下中存在的那些癌症或肿瘤:肛门、膀胱、胆管、骨、脑、乳房、子宫颈、结肠/直肠、子宫内膜、食道、眼睛、胆囊、头颈部、肝、肾、喉部、肺、纵隔(胸腔)、嘴部、卵巢、胰腺、阴茎、前列腺、皮肤、小肠、胃、脊髓、尾骨、睾丸、甲状腺和子宫。

[0597] 可用本发明的组合物治疗的癌类型包括但不限于乳头瘤/癌、绒毛膜癌、内胚窦瘤、畸胎瘤、腺瘤/腺癌、黑素瘤、纤维瘤、脂肪瘤、平滑肌瘤、横纹肌瘤、间皮瘤、血管瘤、骨肉瘤、软骨瘤、神经胶质瘤、淋巴瘤/白血病、鳞状细胞癌、小细胞癌、大细胞未分化癌、基底细胞癌和鼻腔鼻窦未分化癌。

[0598] 可用本发明的组合物治疗的癌类型包括但不限于软组织肉瘤诸如泡状软部肉瘤、血管肉瘤、皮肤纤维肉瘤、硬纤维瘤、促纤维组织增生性小圆细胞肿瘤、骨外软骨肉瘤、骨外骨肉瘤、纤维肉瘤、血管外皮细胞瘤、血管内皮瘤、卡波西氏肉瘤、平滑肌肉瘤、脂肪肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、神经纤维肉瘤、横纹肌肉瘤、滑膜肉瘤以及阿斯金氏肿瘤、尤文氏肉瘤(原始神经外胚层肿瘤)、恶性血管内皮瘤、恶性神经鞘瘤、骨肉瘤和软骨肉瘤。

[0599] 作为非限制性示例,可治疗的癌可为急性粒细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血

病、急性骨髓性白血病、腺癌、腺肉瘤、副肾癌、肾上腺皮质癌、肛门癌、间变性星形细胞瘤、血管肉瘤、阑尾癌、星形细胞瘤、基底细胞癌、B细胞淋巴瘤)、胆管癌、膀胱癌、骨癌、肠癌、脑癌、脑干神经胶质瘤、脑肿瘤、乳癌、类癌瘤、子宫颈癌、胆管癌、软骨肉瘤、慢性淋巴细胞白血病、慢性骨髓性白血病、结肠癌、结肠直肠癌、颅咽管瘤、皮肤淋巴瘤、皮肤黑素瘤、弥漫性星形细胞瘤、导管原位癌、子宫内膜癌、室管膜瘤、上皮样肉瘤、食管癌、尤文氏肉瘤、肝外胆管癌、眼癌、输卵管癌、纤维肉瘤、胆囊癌、胃癌、胃肠癌、胃肠类癌瘤、胃肠间质瘤、普通生殖细胞肿瘤、多形性胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、毛细胞白血病、头颈癌、血管内皮瘤、霍奇金淋巴瘤、霍奇金氏病、霍奇金氏淋巴瘤、下咽癌、浸润性导管癌、浸润性小叶癌、炎性乳癌、肠癌、肝内胆管癌、侵袭性/浸润性乳癌、胰岛细胞癌、颌癌、卡波西肉瘤、肾癌、喉癌、平滑肌肉瘤、柔脑膜转移、白血病、唇癌、脂肪肉瘤、肝癌、小叶原位癌、低级别星形细胞瘤、肺癌、淋巴结癌、淋巴瘤、男性乳癌、髓样癌、髓母细胞瘤、黑素瘤、脑膜瘤、Merkel细胞癌、间充质软骨肉瘤、间叶瘤 (Mesenchymous)、间皮瘤、转移性乳癌、转移性黑素瘤、转移性鳞状颈癌、混合性神经胶质瘤、嘴癌、粘液癌、粘膜黑素瘤、多发性骨髓瘤、鼻腔癌、鼻咽癌、颈癌、经母细胞瘤、神经内分泌肿瘤、非霍奇淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、非小细胞肺癌、燕麦细胞癌、眼部癌、眼部黑素瘤、少突神经胶质瘤、口癌、口腔癌、口咽癌、骨原性肉瘤、骨肉瘤、卵巢癌、卵巢上皮癌、卵巢生殖细胞肿瘤、卵巢原发性腹膜癌、卵巢性索间质肿瘤、佩吉特氏病、胰腺癌、乳头状癌、副鼻窦癌、副甲状腺癌、骨盆癌、阴茎癌、外周神经癌、腹膜癌、咽癌、嗜铬细胞瘤、毛细胞型星形细胞瘤、松果体区肿瘤、成松果体细胞瘤、垂体腺癌、原发性中枢神经系统淋巴瘤、前列腺癌、直肠癌、直肠细胞癌、肾盂癌、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、肉瘤、肉瘤、骨肉瘤、软组织肉瘤、子宫癌、窦癌、皮肤癌、小细胞肺癌、小肠癌、软组织肉瘤、脊柱癌、脊椎癌、骨髓癌、脊柱肿瘤、鳞状细胞癌、胃癌、滑膜肉瘤、T细胞淋巴瘤)、睾丸癌、咽喉癌、胸腺瘤/胸腺癌、甲状腺癌、舌癌、扁桃体癌、移行细胞癌、移行细胞癌、移行细胞癌、三阴性乳癌、输卵管癌、管状癌、输尿管癌、输尿管癌、尿道癌、子宫腺癌、子宫癌、子宫肉瘤、阴道癌和外阴癌。

[0600] 感染性疾病

[0601] 在一些实施方案中,本发明的生物回路可用于治疗感染性疾病。本发明的生物回路可引入到适于过继性细胞转移的细胞中,诸如巨噬细胞、树突状细胞、天然杀伤细胞和/或T细胞。通过本发明的生物回路治疗的感染性疾病可为由病毒、细菌、真菌和/或寄生虫引起的疾病。本发明的IL15-IL15Ra有效载荷可用于增加免疫细胞增殖和/或可用于治疗感染性疾病的免疫细胞的持久性。

[0602] 本文的“感染疾病”是指由任何感染哺乳动物细胞、优选人细胞并引起疾病病状的病原体或剂引起的疾病。其示例包括细菌、酵母、真菌、原生动物、支原体、病毒、阮病毒和寄生虫。示例包括涉及以下的那些:(a) 病毒病,诸如像由腺病毒、疱疹病毒(例如,HSV-I、HSV-II、CMV或VZV)、痘病毒(例如,正痘病毒诸如天花或牛痘或者传染性软疣(molluscum contagiosum))、小核糖核酸病毒(例如,鼻病毒或肠病毒)、正粘病毒(例如,流感病毒)、副粘病毒(例如,副流感病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒和呼吸道合胞病毒(RSV))、冠状病毒(例如,SARS)、乳多空病毒(例如,乳头瘤病毒,诸如引起生殖器疣、寻常疣或足底疣的那些)、嗜肝DNA病毒(例如,乙型肝炎病毒)、黄病毒(例如,丙型肝炎病毒或登革病毒)或逆转录病毒(例如,慢病毒诸如HIV)感染引起的疾病;(b) 细菌病,诸如像例如埃希氏菌属、肠杆菌属、沙门氏菌属、葡萄球菌属、志贺氏菌属、李斯特菌属、气杆菌属、螺杆菌属、克雷伯氏菌属、变形

杆菌属、假单胞菌属、链球菌属、衣原体属、支原体属、肺炎球菌属、奈瑟氏菌属、梭状芽孢杆菌属、芽胞杆菌属、棒状杆菌属、分枝杆菌属、弯曲杆菌属、弧菌属、沙雷氏菌属、普罗威登斯菌属、色素杆菌属、布鲁氏菌属、耶尔森氏菌属、嗜血杆菌属或包特菌属感染引起的疾病；(c) 其他感染性疾病, 诸如, 衣原体、真菌疾病 (包括但不限于念珠菌症、曲霉病、组织胞浆菌病、隐球菌脑膜炎)、寄生虫病 (包括但不限于疟疾、卡氏肺囊虫肺炎 (*Pneumocystis carinii* pneumonia)、利什曼病、隐孢子虫病、弓形体病和锥虫感染) 以及引起人疾病诸如克雅氏病 (Creutzfeldt-Jakob Disease, CJD)、变种克雅氏病 (vCJD)、吉斯特曼-施特劳斯综合征 (Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome)、致死性家族性失眠症 (Fatal Familial Insomnia) 和库鲁病 (kuru) 的朊病毒。

[0603] 5. 微生物组

[0604] 微生物组组成的改变可影响抗癌疗法的作用。共生、共栖和病原微生物的各种不同的群落存在于体内所有环境暴露的部位中, 并且在本文称为“微生物组”。可存在微生物组的人体环境暴露部位包括皮肤、鼻咽、口腔、呼吸道、胃肠道和生殖道。

[0605] 在一些实施方案中, 天然的或用免疫治疗剂工程化的微生物组可用于改进抗癌免疫疗法的功效。Sivan等已经描述了使用微生物组改进对免疫治疗剂的应答的方法 (Sivan A. 等 *Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy*. *Science* 2015; 350:1084-9, 其内容以全文引用的方式并入本文)。在一个实施方案中, 来源于微生物组的蛋白、RNA和/或其他生物分子可用作有效载荷, 以影响抗癌免疫疗法的功效。

[0606] 6. 用于制备治疗剂的工具和剂

[0607] 本发明提供了可用于生成免疫治疗剂以便在有需要的受试者中减少肿瘤体积或负荷的工具和剂。产生治疗剂涉及相当多的变量, 诸如有效载荷的结构、细胞类、基因转移方法、离体扩增的方法和时间、预处理以及受试者中肿瘤负荷的量和类型。此类参数可使用本文所述的工具和剂进行优化。

[0608] 细胞系

[0609] 本公开提供了一种已经用本发明的组合物基因修饰的哺乳动物细胞。适合的哺乳动物细胞包括原代细胞和永生化细胞系。合适的哺乳动物细胞系包括但不限于人胚胎肾细胞系293、成纤维细胞细胞系NIH 3T3、人结肠直肠癌细胞系HCT116、卵巢癌细胞系SKOV-3、永生化T细胞系 (例如Jurkat细胞和SupT1细胞)、淋巴瘤细胞系Raji细胞、NALM-6细胞、K562细胞、HeLa细胞、PC12细胞、HL-60细胞、NK细胞系 (例如NKL、NK92、NK962和YTS) 等。在一些情况下, 细胞不为永生化细胞系, 而是获自个体的细胞, 并且在本文称为原代细胞。例如, 细胞为获自个体的T淋巴细胞。其他示例包括但不限于获自个体的细胞毒性细胞、干细胞、外周血单核细胞或祖细胞。

[0610] 跟踪SRE、生物回路和细胞系

[0611] 在一些实施方案中, 可能希望跟踪本发明的组合物或被本发明的组合物修饰的细胞。跟踪可通过使用报告部分来实现, 如本文所用, 报告部分是指能够应答于输入而产生可检测信号的任何蛋白。示例包括碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、 β -葡萄糖苷酸酶、过氧化物酶、 β -内酰胺酶、催化抗体、生物发光蛋白例如荧光素酶以及荧光蛋白例如绿荧光蛋白 (GFP)。

[0612] 当添加对应于DD的配体时,报告部分可用于监测DD的应答。在其他情况下,报告部分可用于跟踪细胞存活、持久性、细胞生长和/或体外、体内或离体定位。

[0613] 在一些实施方案中,优选的报告部分可为荧光素酶蛋白。在一个实施方案中,报告部分为海肾荧光素酶(SEQ ID NO.866,其由核酸序列SEQ ID NO.867编码)或萤火虫荧光素酶(SEQ ID NO.868,其由核酸序列SEQ ID NO.869编码)。

[0614] 动物模型

[0615] 可以在体内动物模型、优选小鼠模型中测试本发明的组合物的实用性和功效。过去的小鼠模型可为同基因小鼠模型,其中小鼠细胞用本发明的组合物修饰并在具有相同基因背景的小鼠中进行测试。示例包括pMEL-1和4T1小鼠模型。可替代地,此类研究中还可利用将诸如肿瘤细胞和免疫细胞的人细胞引入到免疫缺陷小鼠中的异种移植模型。所使用的免疫缺陷小鼠可为CByJ.Cg-Foxn1^{nu}/J、B6;12 9S7-Rag1^{tm1Mom}/J、B6.129S7-Rag1^{tm1Mom}/J、B6.CB17-Prkdc^{scid}/SzJ、NOD.129S7(B6)-Rag1^{tm1Mom}/J、NOD.Cg-Rag1^{tm1Mom}Prf1^{tm1Sd}/SzJ、NOD.CB17-Prkdc^{scid}/SzJ、NOD.Cg-Prkdc^{scid}B2m^{tm1Unc}/J、NOD-scid IL2Rg^{null}、裸(nu)小鼠、SCID小鼠、NOD小鼠、RAG1/RAG2小鼠、NOD-Scid小鼠、IL2rgnull小鼠、b2mnull小鼠、NOD-scid IL2r γ null小鼠、NOD-scid-B2mnull小鼠、beige小鼠和HLA转基因小鼠。

[0616] 细胞测定

[0617] 在一些实施方案中,可使用细胞测定评估本发明的组合物作为免疫治疗剂的有效性。可根据本领域中已知用于鉴别蛋白和/或定量蛋白水平的任何方法来确定本发明的组合物的表达水平和/或同一性。在一些实施方案中,此类方法可包括蛋白质印迹、流式细胞术和免疫测定。

[0618] 本文提供了用于功能表征表达本发明的SRE、生物回路和组合物的细胞的方法。在一些实施方案中,功能表征是在原代免疫细胞或永生化免疫细胞系中进行的,并且可通过细胞表面标志物的表达来确定。T细胞的细胞表面标志物的示例包括但不限于CD3、CD4、CD8、CD14、CD20、CD11b、CD16、CD45和HLA-DR、CD69、CD28、CD44、IFN γ 。T细胞耗竭的标志物包括PD1、TIM3、BTLA、CD160、2B4、CD39和LAG3。抗原呈递细胞的细胞表面标志物的示例包括但不限于I类MHC、II类MHC、CD40、CD45、B7-1、B7-2、IFN- γ 受体和IL2受体、ICAM-1和/或Fc γ 受体。树突状细胞的细胞表面标志物的示例包括但不限于I类MHC、II类MHC、B7-2、CD18、CD29、CD31、CD43、CD44、CD45、CD54、CD58、CD83、CD86、CMRF-44、CMRF-56、DCIR和/或Dectin-1等;同时在一些情况下还不存在CD2、CD3、CD4、CD8、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD56和/或CD57。NK细胞的细胞表面标志物的示例包括但不限于CCL3、CCL4、CCL5、CCR4、CXCR4、CXCR3、NKG2D、CD71、CD69、CCR5、磷酸JAK/STAT、磷酸ERK、磷酸p38/MAPK、磷酸AKT、磷酸STAT3、颗粒溶素、颗粒酶B、颗粒酶K、IL10、IL22、IFN γ 、LAP、穿孔素和TNF α 。

[0619] V. 递送方式和/或载体

[0620] 载体

[0621] 本发明还提供了包装本发明的多核苷酸的载体,所述多核苷酸编码生物回路、效应模块、SRE(DD)和有效载荷构建体及其组合。本发明的载体还可用于将包装的多核苷酸递送至细胞、局部组织部位或受试者。这些载体可为任何种类,包括DNA载体、RNA载体、质粒、病毒载体和粒子。病毒载体技术为熟知的并且描述于Sambrook等中(2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)。可用作载

体的病毒包括但不限于慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒 (AAV) 载体、单纯疱疹病毒载体、逆转录病毒载体、溶瘤病毒等。

[0622] 一般来讲,载体还有在至少一种生物体中起作用的复制起点、启动子序列和便利的限制核酸内切酶位点、以及一个或多个可选择标记物例如耐药基因。

[0623] 如本文所用,启动子被定义为引发本发明的多核苷酸序列的特异性转录所需的、由细胞的转录机制所识别的DNA序列。载体可包含可操作地连接至本发明的多核苷酸的天然或非天然启动子。选择的启动子可为强的、弱的、组成型的、诱导型的、组织特异性的、发育阶段特异性的和/或生物体特异性的。合适的启动子的一个示例为即刻早期巨细胞病毒 (CMV) 启动子序列。这种启动子序列为强组成型启动子序列,其能够驱动与其可操作地连接的多核苷酸序列的高水平表达。优选的启动子的另一示例为延伸生长因子-1.α (EF-1.α)。还可以使用其他组成型启动子,包括但不限于猿猴病毒40 (SV40)、小鼠乳腺肿瘤病毒 (MMTV)、人免疫缺陷病毒 (HIV)、长末端重复序列 (LTR) 启动子、禽白血病病毒启动子、爱泼斯坦-巴尔 (Epstein-Barr) 病毒即刻早期启动子、劳氏 (Rous) 肉瘤病毒启动子以及人基因启动子包括但不限于磷酸甘油酸激酶 (PGK) 启动子、肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、血红蛋白启动子、泛素C (Ubc) 启动子、人U6小核蛋白启动子和肌酸激酶启动子。在一些情况下,可使用诱导型启动子,诸如但不限于金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素启动子。在一些实施方案中,启动子可选自SEQ ID NO.:716-718。

[0624] 在一些实施方案中,可基于在不存在配体的情况下实现本发明的SRE和有效载荷的最小表达的能力以及在存在配体的情况下的可检测的表达来选择最佳启动子。

[0625] 额外的启动子元件例如增强子可用于调控转录起始的频率。此类区可位于起始位点上游或下游的10-100个碱基对。在一些情况下,两个或更多个启动子元件可用于协同或独立地活化转录。

[0626] 在一些实施方案中,重组表达载体可包含调控序列,诸如转录和翻译起始密码子和终止密码子,其特异于待引入载体的宿主细胞型。

[0627] 1. 慢病毒载体

[0628] 在一些实施方案中,慢病毒载体/粒子可用作载体和递送方式。慢病毒为逆转录病毒科的亚组,如此命名是因为在整合到宿主基因组中之前需要将病毒RNA基因组逆转录为DNA。因此,慢病毒媒介物/粒子的最重要特征为它们的遗传物质向靶/宿主细胞基因组中的整合。慢病毒的一些示例包括人免疫缺陷病毒HIV-1和HIV-2、猴免疫缺陷病毒 (SIV)、猫免疫缺陷病毒 (FIV)、牛免疫缺陷病毒 (BIV)、Jembrana病病毒 (JDV)、马传染性贫血病毒 (EIAV)、马传染性贫血病毒、梅迪-维斯纳 (visna-maedi) 病毒和山羊关节炎-脑炎病毒 (CAEV)。

[0629] 通常,构成基因递送媒介物的慢病毒粒子自身具有复制缺陷(也称为“自我灭活”)。慢病毒能够借助于通过完整宿主核包膜的进入机制感染分裂细胞和非分裂细胞 (Naldini L等,Curr.Opin.Biotechnol,1998,9:457-463)。重组慢病毒媒介物/粒子已通过以多种方式弱化HIV毒力基因而生成,例如删除基因Env、Vif、Vpr、Vpu、Nef和Tat使载体在生物学上安全。对应地,来源于例如HIV-1/HIV-2的慢病毒媒介物可介导向非分裂细胞中的转基因的有效递送、整合和长期表达。如本文所用,术语“重组”是指载体或另一核酸含有慢病毒序列和非慢病毒逆转录病毒序列。

[0630] 慢病毒粒子可通过在生产细胞诸如人HEK293T细胞中共表达病毒包装元件和载体基因组本身来生成。这些元件通常以三个(在第二代慢病毒系统中)或四个单独的质粒(在第三代慢病毒系统中)的形式提供。将生产细胞共转染有编码慢病毒组分(包括病毒的核(即,结构蛋白)和酶组分)和包膜蛋白(称为包装系统)的质粒以及编码待转移到靶细胞(媒介物自身,也称为转移载体)的基因组(包括外来转基因)的质粒。一般来讲,质粒或载体包括在生产细胞系中。质粒/载体是通过转染、转导或感染到生产细胞系中来引入的。转染、转导或感染的方法是本领域的技术人员所熟知的。作为非限制性示例,包装和转移构建体可通常连同显性可选择标志物诸如neo、DHFR、Gln合成酶或ADA一起通过磷酸钙转染、脂转染(lipofection)或电穿孔引入生产细胞系中,接着在适当药物存在下进行选择和克隆分离。

[0631] 生产细胞产生还有外来基因例如本发明的效应模块的重组病毒粒子。从培养基中回收重组病毒粒子,并且通过本领域的技术人员所使用的标准方法进行滴定。重组慢病毒媒介物可用于感染靶细胞。

[0632] 可用于产生高滴度慢病毒粒子的细胞可包括但不限于HEK293T细胞、293G细胞、STAR细胞(Relander等,Mol. Ther., 2005, 11:452-459)、FreeStyle™ 293表达系统(ThermoFisher, Waltham, MA)和其他基于HEK293T的生产细胞系(例如,Stewart等,Hum Gene Ther. 2011, 22(3):357-369; Lee等,Biotechnol Bioeng, 2012, 10996):1551-1560; Throm等,Blood. 2009, 113(21):5104-5110,每个参考文献的内容均以全文引用的方式并入本文)。

[0633] 在一些方面,包膜蛋白可为来自其他病毒的异源包膜蛋白,例如水泡性口炎病毒的G蛋白(VSV G)或杆状病毒gp64包膜蛋白。VSV-G糖蛋白尤其可选自归类在水泡性病毒属中的物种:卡拉加斯病毒(Carajas virus, CJSV)、金迪普拉病毒(Chandipura virus, CHPV)、科卡尔病毒(Cocal virus, COCV)、伊斯法罕病毒(Isfahan virus, ISFV)、马拉巴病毒(Maraba virus, MARAV)、皮理病毒(Piry virus, PIRYV)、水泡性口炎阿拉戈斯病毒(Vesicular stomatitis Alagoas virus, VSAV)、水泡性口炎印第安纳病毒(Vesicular stomatitis Indiana virus, VSIV)和水泡性口炎新泽西病毒(Vesicular stomatitis New Jersey virus, VSNJV)和/或暂时归类在泡性病毒属中的菌株如草鱼弹状病毒(Grass carp rhabdovirus)、BeAn 157575病毒(BeAn 157575)、博特克病毒(Boteke virus, BTKV)、卡尔查基病毒(Calchaqui virus, CQIV)、美洲鳗病毒(Eel virus American, EVA)、格雷洛奇病毒(Gray Lodge virus, GLOV)、朱罗纳病毒(Jurona virus, JURY)、克拉马斯病毒(Klamath virus, KLAV)、克瓦塔病毒(Kwatta virus, KWAV)、拉霍亚病毒(La Joya virus, LJV)、马尔佩斯泉病毒(Malpais Spring virus, MSPV)、埃尔岗蝙蝠病毒(Mount Elgon bat virus, MEBV)、佩里内特病毒(Perinet virus, PERV)、梭子鱼鱼苗弹状病毒(Pike fry rhabdovirus, PFRV)、波登病毒(Porton virus, PORV)、拉迪病毒(Radi virus, RADIV)、鲤春病毒血症病毒(Spring viremia of carp virus, SVCV)、图帕伊阿病毒(Tupaia virus, TUPV)、溃疡病弹状病毒(Ulcerative disease rhabdovirus, UDRV)和尤格波格丹诺夫奇病毒(Yug Bogdanovac virus, YBV)。gp64或其他杆状病毒包膜蛋白可来源于苜蓿夜蛾核型多角体病毒(Autographa californica nucleopolyhedrovirus, AcMNPV)、芹菜夜蛾核型多角体病毒(Anagrapha falcifera nuclear polyhedrosis virus)、家蚕核型多角体病毒(Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus)、云杉卷叶蛾核型多角体病毒

(Choristoneura fumiferana nucleopolyhedrovirus)、黄杉毒蛾单衣壳核型多角体病毒 (Orgyia pseudotsugata single capsid nuclear polyhedrosis virus)、苹果褐卷蛾核型多角体病毒 (Epiphyas postvittana nucleopolyhedrovirus)、美国白蛾核型多角体病毒 (Hyphantria cunea nucleopolyhedrovirus)、大蜡螟核型多角体病毒 (Galleria mellonella nuclear polyhedrosis virus)、多里病毒 (Dhori virus)、托高土病毒 (Thogoto virus)、柞蚕核型多角体病毒 (Antheraea pemyi nucleopolyhedrovirus) 或巴特肯病毒 (Batken virus)。

[0634] 慢病毒粒子中提供的其他元件可包括在5'或3'末端的逆转录病毒LTR(长末端重复序列)、逆转录病毒输出元件、任选地慢病毒逆应答元件(reverse response element, RRE)、启动子或其活性部分以及基因座控制区(LCR)或其活性部分。其他元件包括改进非分裂细胞中的转导效率的中央多聚嘌呤区(central polypurine tract, cPPT)序列,土拨鼠肝炎病毒(Woodchuck Hepatitis Virus, WHP)转录后调控元件(WPRE),其增强转基因的表达并增加滴度。效应模块连接载体。

[0635] 用于生成重组慢病毒粒子的方法在本领域中有所讨论,例如美国专利8,846,385、7,745,179、7,629,153、7,575,924、7,179,903和6,808,905,每个专利的内容均以全文引用的方式并入本文。

[0636] 所使用的慢病毒载体选自但不限于pLVX、pLenti、pLenti6、pLJM1、FUGW、pWPXL、pWPI、pLenti CMV puro DEST、pLJM1-EGFP、pULTRA、pInducer20、pHIV-EGFP、pCW57.1、pTRPE、pELPS、pRRL和pLionII。

[0637] 还可使用本领域中已知的慢病毒媒介物(参见美国专利号9,260,725、9,068,199、9,023,646、8,900,858、8,748,169、8,709,799、8,420,104、8,329,462、8,076,106、6,013,516和5,994,136;国际专利申请号W02012079000,每个专利的内容均以全文引用的方式并入本文)。

[0638] 2. 逆转录病毒载体(γ -逆转录病毒载体)

[0639] 在一些实施方案中,逆转录病毒载体可以用于包装和递送本发明的生物回路、生物回路组分、效应模块、SRE或有效载荷构建体。逆转录病毒载体(RV)实现转基因在靶细胞中的永久整合。除基于复合HIV-1/2的慢病毒载体之外,基于简单 γ -逆转录病毒的逆转录病毒载体已广泛用于递送治疗剂并且临床上被证明为能够转导广泛范围的细胞型的更有效且强大的基因递送系统之一。 γ 逆转录病毒的示例性物种包括鼠白血病病毒(MLV)和猫白血病病毒(FeLV)。

[0640] 在一些实施方案中,来源于哺乳动物 γ -逆转录病毒诸如鼠白血病病毒(MLV)的 γ -逆转录病毒载体为重组的。 γ 逆转录病毒的MLV家族包括嗜亲性(ecotropic)、兼嗜性(amphotropic)、异嗜性(xenotropic)和多嗜性(polytropic)亚家族。嗜亲性病毒能够使用mCAT-1受体仅感染鼠细胞。嗜亲性病毒的示例为莫洛尼MLV和AKV。兼嗜性病毒通过Pit-2受体感染鼠、人和其他物种。兼嗜性病毒的一个示例为4070A病毒。异嗜性病毒和多嗜性病毒利用相同的(Xpr1)受体,但它们的物种嗜性不同。异嗜性病毒(诸如NZB-9-1)感染人和其他物种,但不感染鼠物种,而多嗜性病毒(诸如病灶形成病毒(MCF))则感染鼠、人和其他物种。

[0641] 可通过用若干质粒共转染细胞来在包装细胞中产生 γ -逆转录病毒载体,所述质粒包括编码逆转录病毒结构和酶(gag-pol)多蛋白的质粒、编码包膜(env)蛋白的质粒和编

码包含多核苷酸的载体mRNA的质粒,所述多核苷酸编码待包装在新形成的病毒粒子中的本发明的组合物。

[0642] 在一些方面,重组 γ -逆转录病毒载体用其他病毒的包膜蛋白假型化。将包膜糖蛋白并入病毒粒子的外脂质层中,这样可增加/改变细胞嗜性。例示性包膜蛋白包括长臂猿白血病毒包膜蛋白(GALV)或水泡性口炎病毒G蛋白(VSV-G)、或猴内源性逆转录病毒包膜蛋白、或麻疹病毒H和F蛋白、或人免疫缺陷病毒gp120包膜蛋白、或科卡尔水泡性病毒包膜蛋白(参见例如,美国申请公布号2012/164118,其内容以全文引用的方式并入本文)。在其他方面,包膜糖蛋白可被基因修饰成将靶向/结合配体并入到 γ -逆转录病毒中,结合配体包括但不限于肽配体、单链抗体和生长因子(Waehler等,Nat.Rev.Genet.2007,8(8):573-587,其内容以全文引用的方式并入本文)。这些工程化的糖蛋白可将载体重新靶向表达其对应靶部分的细胞。在其他方面,可引入“分子桥”以将载体引导至具体细胞。分子桥具有双重特异性:一端可识别病毒糖蛋白,并且另一端可结合至靶细胞上的分子决定簇。此类分子桥(例如配体-受体、抗生物素蛋白-生物素和化学缀合)、单克隆抗体和工程化的融合蛋白可引导病毒载体与靶细胞的附接以实现转导(Yang等,Biotechnol.Bioeng.,2008,101(2):357-368;以及Maetzig等,Viruses,2011,3,677-713,每个参考文献的内容均以全文引用的方式并入本文)。

[0643] 在一些实施方案中,重组 γ -逆转录病毒载体为自我灭活(SIN) γ 逆转录病毒载体。载体是非复制型的(replication incompetent)。SIN载体可在最初包含启动子/增强子活性的3' U3区内有缺失。此外,5' U3区可用来源于巨细胞病毒或RSV的强启动子(在包装细胞系中需要)、或选择的内部启动子、和/或增强子元件替换。内部启动子的选择可根据本发明特定目的所需的基因表达的具体要求来进行。

[0644] 在一些实施方案中,在重组病毒基因组内插入编码生物回路、生物回路组分、效应模块、SRE的多核苷酸插。重组 γ -逆转录病毒载体的病毒mRNA的其他组分可通过插入或删除天然存在的序列来修饰(例如,插入IRES、插入编码感兴趣的多肽或抑制性核酸分子的异源多核苷酸、改组不同逆转录病毒或病毒的更有效启动子代替野生型启动子等)。在一些示例中,重组 γ -逆转录病毒载体可包含修饰的包装信号、和/或引物结合位点(PBS)、和/或在5'-长末端重复序列(LTR)的U3区中的5'-增强子/启动子元件、和/或在3'-LTR的U3区中的3'-SIN元件。这些修饰可增加滴度和感染能力。

[0645] 适用于递送本发明的生物回路组分、效应模块、SRE或有效载荷构建体的 γ 逆转录病毒载体可选自美国专利8,828,718、7,585,676、7,351,585;美国申请公布号2007/048285;PCT申请公布号W02010/113037、W02014/121005、W02015/056014;以及欧洲专利号EP1757702、EP1757703中公开的那些(每个专利的内容均以全文引用的方式并入本文)。

[0646] 3.腺相关病毒载体(AAV)

[0647] 在一些实施方案中,可将本发明的多核苷酸包装到重组腺相关病毒(rAAV)载体中。此类载体或病毒粒子可被设计成利用任何已知血清型衣壳或血清型衣壳的组合。血清型衣壳可包括任何鉴别的AAV血清型及其变体的衣壳,例如AAV1、AAV2、AAV2G9、AAV3、AAV4、AAV4-4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12和AAVrh10。

[0648] 在一个实施方案中,AAV血清型可为或具有如美国公布号US20030138772(其以全文引用的方式并入本文)中所述的序列,诸如但不限于AAV1(US20030138772的SEQ ID NO:6

和64)、AAV2(US20030138772的SEQ ID NO:7和70)、AAV3(US20030138772的SEQ ID NO:8和71)、AAV4(US20030138772的SEQ ID NO:63)、AAV5(US20030138772的SEQ ID NO:114)、AAV6(US20030138772的SEQ ID NO:65)、AAV7(US20030138772的SEQ ID NO:1-3)、AAV8(US20030138772的SEQ ID NO:4和95)、AAV9(US20030138772的SEQ ID NO:5和100)、AAV10(US20030138772的SEQ ID NO:117)、AAV11(US20030138772的SEQ ID NO:118)、AAV12(US20030138772的SEQ ID NO:119)、AAVrh10(US20030138772的SEQ ID NO:81的氨基酸1至738)或其变体。变体的非限制性示例包括US20030138772的SEQ ID NO:9、27-45、47-62、66-69、73-81、84-94、96、97、99、101-113,所述专利的内容以全文引用的方式并入本文。

[0649] 在一个实施方案中,AAV血清型可具有如Pulicherla等(Molecular Therapy, 2011, 19(6):1070-1078);美国专利号6,156,303、7,198,951;美国专利公布号US2015/0159173和US2014/0359799;以及国际专利公布号W01998/011244、W02005/033321和W02014/14422中所述的序列,每个参考文献的内容均以全文引用的方式并入本文。

[0650] AAV载体不仅包括单链载体,还包括自我互补AAV载体(scAAV)。scAAV载体含有在一起退火以形成双链载体基因组的DNA。通过跳过第二链合成,scAAV实现细胞中的快速表达。

[0651] rAAV载体可通过本领域中的标准方法诸如通过三重转染在sf9昆虫细胞中或在人细胞诸如HEK293细胞的悬浮细胞培养物中操作。

[0652] 生物回路、生物回路组分、效应模块、SRE或有效载荷构建体可在一个或多个病毒基因组中编码以包装在本文教导的AAV衣壳中。

[0653] 除至少一个或两个ITR(反向末端重复序列)之外,此类载体或病毒基因组还可包括某些从载体或病毒基因组表达所必须的调控元件。此类调控元件为本领域中熟知的,并且包括例如启动子、内含子、间隔区、填充序列等。

[0654] 在一些实施方案中,在病毒基因组中可编码多于一个效应子模块或SRE(例如DD)。

[0655] 4. 溶瘤病毒载体

[0656] 在一些实施方案中,可将本发明的多核苷酸包装到溶瘤病毒例如疫苗病毒中。溶瘤疫苗病毒可包括足以在肿瘤中诱导细胞的溶瘤的胸苷激酶(TK)缺陷、表达粒细胞巨噬细胞(GM)集落刺激因子(CSF)、复制型牛痘病毒载体的病毒粒子(例如,美国专利号9,226,977)。

[0657] 5. 信使RNA(mRNA)

[0658] 在一些实施方案中,本发明的效应模块可设计为信使RNA(mRNA)。如本文所用,术语“信使RNA”(mRNA)是指编码感兴趣的多肽并且能够被翻译以在体外、体内、原位或离体产生编码的感兴趣的多肽的任何多核苷酸。此类mRNA分子可具有国际申请号PCT/US2013/030062中教导的任一者的结构组分或特征,所述专利的内容以全文引用的方式并入本文。

[0659] 本发明的多核苷酸还可如以下所教导进行设计:例如Ribostem Limited于2003年7月9日提交(现已放弃)的英国专利申请序号0316089.2、2004年7月9日提交的公布为W02005005622的PCT申请号PCT/GB2004/002981、2006年6月8日提交的公布为US20060247195(现已放弃)的美国专利申请国家阶段进入序号10/563,897、以及2004年7月9日提交的公布为EP1646714(现已撤回)的欧洲专利申请国家阶段进入序号EP2004743322中;Novozymes, Inc.于2007年12月19日提交的公布为W02008140615的PCT申请号PCT/

US2007/88060、2009年7月2日提交的公布为US20100028943的美国专利申请国家阶段进入序号12/520,072、以及2009年7月7日提交的公布为EP2104739的欧洲专利申请国家阶段进入序号EP2007874376中;罗彻斯特大学(University of Rochester)于2006年12月4日提交的公布为W02007064952的PCT申请号PCT/US2006/46120和2006年12月1日提交的公布为US20070141030的美国专利申请序号11/606,995中;BioNTech AG在2007年12月14日提交(现已放弃)的欧洲专利申请序号EP2007024312、2008年12月12日提交的公布为W02009077134的PCT申请号PCT/EP2008/01059、2010年6月2日提交的公布为EP2240572的欧洲专利申请国家阶段进入序号EP2008861423、2010年11月24日提交的公布为US20110065103的美国专利申请国家阶段进入序号12/,735,060、2005年9月28日提交的德国专利申请序号DE 10 2005 046 490、2006年9月28日提交的公布为W02007036366的PCT申请PCT/EP2006/0448、2012年3月21日公布的国家阶段欧洲专利EP1934345和2009年8月14日提交的公布为20100129877的国家阶段美国专利申请序号11/992,638;免疫疾病研究所有限公司(Immune Disease Institute Inc.)于2011年4月15日提交的公布为US20120046346的美国专利申请序号13/088,009和2011年4月15日提交的公布为W020110130624的PCT申请PCT/US2011/32679;Shire Human Genetic Therapeutics于2010年11月20日提交的公布为US20110244026的美国专利申请序号12/957,340中;Sequitur Inc.于1998年9月18日提交的公布为W01999014346的PCT申请PCT/US1998/019492中;The Scripps Research Institute于2010年2月24日提交的公布为W02010098861的PCT申请号PCT/US2010/00567和2011年11月3日提交的公布为US20120053333的美国专利申请国家阶段进入序号13/203,229中;Ludwig-Maximillians University于2010年7月30日提交的公布为W02011012316的PCT申请号PCT/EP2010/004681中;Cellscript Inc.于2008年6月30日提交并且2011年10月18日授权的美国专利号8,039,214、美国专利申请序号2010年12月7日提交的公布为US20110143436的12/962,498、2010年12月7日提交的公布为US20110143397的12/962,468、2011年9月20日提交的公布为US20120009649的13/237,451以及PCT申请2010年12月7日提交的公布为W02011071931的PCT/US2010/59305和2010年12月7日提交的公布为W02011071936的PCT/US2010/59317中;The Trustees of the University of Pennsylvania于2006年8月21日提交的公布为W02007024708的PCT申请号PCT/US2006/32372和2009年3月27日提交的公布为US20090286852的美国专利申请国家阶段进入序号11/990,646中;Curevac GMBH于德国专利申请序号2001年6月5日提交的DE10 2001 027 283.9、2001年12月19日提交的DE10 2001 062 480.8以及2006年10月31日提交的DE 20 2006 051 516(都已放弃)、欧洲专利号2005年3月30日授权的EP1392341和2008年1月2日授权的EP1458410、PCT申请号2002年6月5日提交的公布为W02002098443的PCT/EP2002/06180、2002年12月19日提交的公布为W02003051401的PCT/EP2002/14577、2007年12月31日提交的公布为W02008052770的PCT/EP2007/09469、2008年4月16日提交的公布为W02009127230的PCT/EP2008/03033、2005年5月19日提交的公布为W02006122828的PCT/EP2006/004784、2007年1月9日提交的公布为W02008083949的PCT/EP2008/00081、以及美国专利申请序号2003年12月5日提交的公布为US20050032730的10/729,830、2004年6月18日提交的公布为US20050059624的10/870,110、2008年7月7日提交的公布为US20080267873的11/914,945、2009年10月27日提交的公布为US2010047261(现已放弃)的12/446,912、2010

年1月4日提交的公布为US20100189729的12/522,214、2010年5月26日提交的公布为US20110077287的12/787,566、2010年5月26日提交的公布为US20100239608的12/787,755、2011年7月18日提交的公布为US20110269950的13/185,119以及2011年5月12日提交的公布为US20110311472的13/106,548中,所述专利都以全文引用的方式并入本文。

[0660] 在一些实施方案中,效应模块可被设计为自我扩增RNA。如本文所用,“自我扩增RNA”是指可以在宿主中复制从而导致RNA和由RNA编码的蛋白的量增加的RNA分子。此类自我扩增RNA可具有国际专利申请公布号W02011005799(其内容以全文引用的方式并入本文)中教导的任一者的结构特征或组分。

[0661] VI. 给药、递送和施用

[0662] 本发明的组合物可通过一种或多种途径和方式向细胞或受试者递送。含有一个或多个本文所述的效应模块、SRE、免疫治疗剂和其他组分的病毒载体可用于将它们递送至细胞和/或受试者。还可以使用其他方式,例如mRNA、质粒和重组蛋白。

[0663] 1. 向细胞的递送

[0664] 在本发明的另一方面,可将编码本发明的生物回路、效应模块、SRE(例如,DD)、感兴趣的有效载荷(免疫治疗剂)和组合物的多核苷酸以及包含所述多核苷酸的载体引入到细胞诸如免疫效应细胞中。

[0665] 在本发明的一方面,可以将编码本发明的生物回路、效应模块、SRE(例如DD)、感兴趣的有效载荷(免疫治疗剂)和组合物的多核苷酸包装到病毒载体中或整合到病毒基因组中,实现多核苷酸的瞬时或稳定表达。优选的病毒载体为逆转录病毒载体,包括慢病毒载体。为了构建逆转录病毒载体,将编码生物回路、效应模块、DD或感兴趣的有效载荷(即免疫治疗剂)的多核苷酸分子插入到病毒基因组中代替某些病毒序列,以产生复制缺陷的病毒。然后将重组病毒载体引入到包装细胞系中,所述细胞系含有gag、pol和env基因,但没有LTR和包装组分。重组逆转录病毒粒子被分泌到培养基中,然后将其收集,任选地浓缩并用于基因转移。慢病毒载体是特别优选的,因为它们能够感染分裂细胞和非分裂细胞。

[0666] 载体还可通过非病毒方法,通过物理方法诸如针、电穿孔、声穿孔(sonoporation)、水穿孔(hyrdoporation);化学载剂诸如无机粒子(例如磷酸钙、二氧化硅、金)和/或化学方法来转移到细胞。在一些实施方案中,合成或天然可生物降解的剂可用于递送,诸如阳离子脂质、脂质纳米乳液、纳米粒子、基于肽的载体或基于聚合物的载体。

[0667] 在一些实施方案中,本发明的多肽可直接递送至细胞。在一个实施方案中,本发明的多肽可使用包含与细胞穿透结构域(CLD)融合的内体泄漏结构域(ELD)的合成肽来递送。本发明的多肽与ELD-CLD合成肽被共引入到细胞中。ELD有利于捕获在内体中的蛋白逃逸到胞质溶胶中。此类结构域为微生物和病毒来源的衍生蛋白,并且本领域中已有所描述。CPD允许蛋白跨质膜运输,并且本领域中已有所描述。当与单独与任一结构域共转导相比较时,ELD-CLD融合蛋白协同地增加转导效率。在一些实施方案中,可任选地将组氨酸富集结构域添加到穿梭构建体,作为另一允许货物(cargo)从内体逃逸到胞质溶胶中的方法。穿梭物还可在N或C末端包括半胱氨酸残基以生成融合肽的多聚体。当与单融合肽构建体相比较时,通过向肽的末端添加半胱氨酸残基所生成的ELD-CLD融合肽的多聚体显示甚至较高的转导效率。本发明的多肽还可附加到适当的定位信号上,以将货物引导到适当的亚细胞定位例如核。在一些实施方案中,国际专利公布W02016161516和W02017175072中所教导的ELD、CLD

或融合ELD-CLD合成肽中的任一者均可用于本发明(每个专利的内容均以全文引用的方式并入本文)。

[0668] 2. 给药

[0669] 本发明提供包括向有需要的受试者施用任何一个或多个用于免疫疗法的组合物的方法。这些可以使用有效预防或治疗临床病症诸如癌症、感染疾病和其他免疫缺陷疾病的任何量和任何施用途径来向受试者施用。

[0670] 根据本发明的组合物通常配制成便于施用和剂量均匀的剂量单位形式。然而,将理解的是,本发明的组合物的总每日用量可由主治医师在合理医学判断范围内决定。任何具体患者的具体治疗有效或预防有效的剂量水平将取决于各种因素,所述因素包括所治疗的病症和病症的严重性;所采用的具体化合物的活性;所采用的具体组合物;患者年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食;所采用的具体化合物的施用时间、施用途径、先前或同时治疗干预和排泄速率;治疗持续时间;与所采用的具体化合物组合或同时使用的药物;以及医学领域中熟知的类似因素。

[0671] 本发明的组合物可以不同剂量使用以避免T细胞能量,预防细胞因子释放综合征并使与免疫疗法有关的毒性最小。例如,低剂量的本发明的组合物可用于初始治疗具有高肿瘤负荷的患者,而具有低肿瘤负荷的患者可用高剂量和重复剂量的本发明的组合物治疗以确保识别最小的肿瘤抗原负荷。在另一情况下,本发明的组合物可以脉冲式方式递送,以减少滋养T细胞信号传导并增强体内持久性。在一些方面,可通过初始使用低剂量的本发明的组合物,之后施用高剂量来使毒性最小。如果血清标志物如铁蛋白、血清C反应性蛋白、IL6、IFN- γ 和TNF- α 升高,那么可修改给药。

[0672] 在一些实施方案中,神经毒性可与CAR或TIL疗法有关。此类神经毒性可与CD19-CAR有关。毒性可能是由于过量T细胞浸润到脑中。在一些实施方案中,可通过防止T细胞通过血脑屏障来减轻神经毒性。这可通过内源性 α -4整联蛋白抑制剂的靶向基因缺失来实现,诸如tysabri/那他珠单抗(natalizumab)也可用于本发明。

[0673] 3. 施用

[0674] 在一些实施方案中,用于免疫疗法的组合物可以离体施用于细胞,并且随后施用于受试者。免疫细胞可使用本领域中已知的多种方法进行分离和离体扩增。例如,分离毒性T细胞的方法描述于美国专利号6,805,861和6,531,451中,每个专利的内容均以全文引用的方式并入本文。NK细胞的分离描述于美国专利号7,435,596,其内容以全文引用的方式并入本文。

[0675] 在一些实施方案中,本发明的组合物可通过以下教导的任一施用方法来施用:提交于2016年4月11日的共同未决的共同拥有的美国临时专利申请号62/320,864、或提交于2017年3月3日的美国临时申请号62/466,596、和国际公布W02017/180587,每个专利的内容均以全文引用的方式并入本文。

[0676] 在一些实施方案中,根据细胞的实质,可以多种方式包括通过注射、输血、输注、局部滴注或植入来将细胞引入到宿主生物体例如哺乳动物中。在一些方面,可在肿瘤部位引入本发明的细胞。所用细胞的数目将取决于许多情况:引入目的、细胞寿命、待使用的方案例如施用数目、细胞增殖的能力等。细胞可在生理上可接受的培养基中。

[0677] 在一些实施方案中,本发明的细胞可以多个剂量向患有疾病或病状的受试者施

用。施用一般影响癌症或临床病状的一种或多种症状改进和/或治疗或预防癌症、或临床病状、或其症状。

[0678] 在一些实施方案中,用于免疫疗法的组合物可为体内施用的。在一些实施方案中,包含本发明的生物回路、效应模块、SRE、感兴趣的有效载荷(免疫治疗剂)和组合物的本发明的多肽可在体内向受试者递送。免疫治疗剂的体内递送在本领域中已充分描述。例如,递送细胞因子的方法描述于例如欧洲专利号EP0930892A1中,其内容以全文引用的方式并入本文。

[0679] 在一个实施方案中,本发明的有效载荷可结合与SHP-1和/或SHP-2的抑制剂施用。酪氨酸-蛋白磷酸酶SHP1(还称为PTPN6)和SHP2(还称为PTPN11)参与程序性细胞死亡(PD1)抑制性信号传导途径。PD1的细胞内结构域还有基于免疫受体酪氨酸的抑制性基序(ITIM)和基于免疫受体酪氨酸的开关基序(ITSM)。已显示ITSM募集SHP-1和SHP-2。这生成负性共刺激微簇,所述负性共刺激微簇诱导近侧TCR信号传导分子的去磷酸化,从而导致T细胞活化的抑制,可导致T细胞耗竭。在一个实施方案中,SHP-1和SHP-2的抑制剂可包括T细胞、TIL或其他细胞型中蛋白的表达显阴性版本以减轻耗竭。此类突变体可结合至内源性的催化活性蛋白,并抑制其功能。在一个实施方案中,SHP-1和/或SHP-2的显阴性突变体缺乏催化活性所需的磷酸酶结构域。在一些实施方案中,Bergeron S等(2011). *Endocrinology*. 2011Dec;152(12):4581-8;Dustin JB等(1999) *J Immunol*. Mar 1;162(5):2717-24;Berchtold S(1998) *Mol Endocrinol*. Apr;12(4):556-67;以及Schram等(2012) *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1;302(1):H231-43教导的显阴性SHP-1突变体中的任一个均可用于本发明(所述参考文献的内容均以全文引用的方式并入)。

[0680] 递送途径

[0681] 本发明的药物组合物、生物回路、生物回路组分、效应模块包括它们的SRE(例如,DD)、有效载荷(即,免疫治疗剂)、载体和细胞可通过任何途径施用以实现治疗有效的结果。

[0682] 这些包括但不限于肠内(进入肠中)、胃肠、硬膜外(硬膜外)(进入硬脑膜中)、口服(通过口腔)、经皮、硬膜外(硬膜外)、大脑内(进入大脑)、脑室内(进入脑室)、表皮(施加在皮肤上)、皮内(进入皮肤本身)、皮下(在皮肤之下)、经鼻施用(通过鼻)、静脉内(进入静脉)、静脉内推注、静脉内滴注、动脉内(进入动脉)、肌内(进入肌肉)、心脏内(进入心脏)、骨内输注(进入骨髓)、鞘内(进入椎管内)、腹膜内(输注或注射至腹膜中)、窦内输注、玻璃体内(通过眼睛)、静脉内注射(进入病理性腔)、腔内(进入阴茎根部)、阴道内施用、子宫内、羊膜腔外施用、经皮(通过完整皮肤扩散以用于全身分布)、经粘膜(通过粘膜扩散)、经阴道、吹入(鼻吸)、舌下、唇下、灌肠、滴眼剂(到结膜上)、滴耳液、耳(耳中或通过耳)、颊(针对脸颊)、结膜、皮肤、牙(至一个或多个牙齿或牙齿)、电渗透、子宫颈内、窦内、气管内、体外、血液透析、浸润、间质、腹内、羊膜内、关节内、胆囊内、支气管内、囊内、软骨内(在软骨内)、尾部内(在马尾内)、脑池内(在小脑延髓池内)、角膜内(在角膜内)、牙冠内、冠状动脉内(在冠状动脉内)、海绵体内(在阴茎的阴茎海绵体的可膨胀空间内)、椎间盘内(在椎间盘内)、管内(在腺管内)、十二指肠内(在十二指肠内)、硬膜内(在硬膜内或下)、表皮内(至表皮)、食管内(至食管)、胃内(在胃内)、齿龈内(在齿龈内)、回肠内(在小肠的远端部分内)、病灶内(在局部病变内或直接引入至局部病变)、管腔内(在管的内腔内)、淋巴管内(在淋巴内)、髓内(在骨的骨髓腔内)、脑膜内(在脑膜内)、心肌内(在心肌内)、眼内(在眼睛内)、卵巢内(在

卵巢内)、心包内(在心包内)、胸膜内(在胸膜内)、前列腺内(在前列腺内)、肺内(在肺或其支气管内)、窦内(在鼻或眶周窦内)、脊柱内(在脊柱内)、滑膜内(在关节的滑液腔内)、腱内(在腱内)、睾丸内(在睾丸内)、鞘内(在脑脊髓轴的任何水平下的脑脊液内)、胸内(在胸部内)、小管内(在器官的小管内)、肿瘤内(在肿瘤内)、鼓室内(在中耳(aurus media)内)、血管内(在一个或多个血管内)、心室内(在心室内)、离子电渗(通过电流,其中可溶性盐的离子迁移至身体组织中)、冲洗(用于浸洗或冲洗开放性伤口或体腔)、喉(直接在喉上)、鼻饲(通过鼻且进入胃)、封闭敷料技术(局部途径施用,其然后被封闭区域的敷料覆盖)、眼(至外眼)、口咽(直接至口腔和咽)、胃肠外、经皮、关节周围、硬膜外、神经周、牙周、直肠、呼吸道(在呼吸道内通过口或鼻吸入以用于局部或全身作用)、眼球后(脑桥后或眼球后)、心肌内(进入心肌)、软组织、蛛网膜下、结膜下、粘膜下、局部、经胎盘(通过或穿过胎盘)、经气管(通过气管壁)、经鼓室(穿过或通过鼓室)、输尿管(至输尿管)、尿道(至尿道)、阴道、骶管阻滞、诊断、神经阻滞、胆道灌注、心脏灌注、光分离置换法或脊柱。

[0683] VII. 定义

[0684] 在本说明书的各个地方,以组或范围公开了本公开的组合物特征或功能。确切意图为本公开包括此类组和范围的成员的每种和每个单独子组合。以下为术语定义的非限制性列表。

[0685] 活性:如本文所用,术语“活性”是指事物正发生或将进行的条件。本发明的组合物可具有活性,并且这种活性可涉及一个或多个生物学事件。在一些实施方案中,生物学事件可包括信号传导事件。在一些实施方案中,生物学事件可包括细胞信号传导事件相关蛋白与一种或多种对应蛋白、受体、小分子或本文所述的任一生物回路组分的相互作用。

[0686] 过继性细胞疗法(ACT):如本文所用,术语“过继性细胞疗法”或“过继细胞转移”是指涉及将细胞转移到患者体内的细胞疗法,其中细胞可来源于患者或另一个体并且被工程化(更改),然后再转移回到患者体内。治疗性细胞可来源于免疫系统,诸如免疫效应细胞CD4+T细胞、CD8+ T细胞、自然杀伤细胞(NK细胞)和B细胞以及来源于切除肿瘤的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。离体扩增或操纵后,最常见转移的细胞是自体抗肿瘤T细胞。例如,自体外周血淋巴细胞可被基因工程化成通过表达T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)来识别特异性肿瘤抗原。

[0687] 剂:如本文所用,术语“剂”是指生物学、药物或化学化合物。非限制性示例包括简单或复杂的有机或无机分子、肽、蛋白、寡核苷酸、抗体、抗体衍生物、抗体片段、受体和可溶性因子。

[0688] 激动剂:如本文所用,术语“激动剂”是指与受体组合可产生细胞应答的化合物。激动剂可为直接结合至受体的配体。可替代地,激动剂可通过以下来间接地与受体组合,例如(a)与直接结合至受体的另一分子形成复合物,或(b)以其他方式导致另一化合物的修饰使得另一化合物直接结合至受体。激动剂可被称为特定受体或受体家族的激动剂,例如共刺激受体的激动剂。

[0689] 拮抗剂:如本文所用,术语“拮抗剂”是指抑制或降低其结合的靶标的生物学活性的任何剂。

[0690] 抗原:如本文所用,术语“抗原”被定义为当被引入到受试者中或由受试者产生时引起免疫应答的分子,诸如由癌症发展本身产生的肿瘤抗原。这种免疫应答可涉及抗体产

生,或者具体的免疫感受态细胞诸如细胞毒性T淋巴细胞和T辅助细胞的活化,或两者。抗原可来源于生物体、蛋白/抗原的亚基、杀伤或失活的全细胞或溶解物。在本发明的上下文中,术语“感兴趣的抗原”或“期望的抗原”是指本文所提供的与本发明的抗体和/或本文所述的片段、突变体、变体和/或其变化免疫特异性结合或相互作用的蛋白和/或其他生物分子。在一些实施方案中,感兴趣的抗原可包含本文所述的任何多肽或有效载荷或蛋白,或者其片段或部分。

[0691] 近似:如本文所使用,当应用于一个或多个感兴趣的值时,术语“近似”或“约”是指值类似于所说明的参考值。在某些实施方案中,术语“近似”或“约”是指在所说明的参考值的任一方向上的(大于或小于)25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1或更小范围内的值范围,除非另外说明或以另外的方式从上下文显而易见(除了在这样的数值超过可能值的100的情况下)。

[0692] 缔合:如本文所使用,在关于两个或更多个部分使用时,术语“缔合”、“缀合”、“连接”、“附着”和“栓系”意味着所述部分直接或经充当连接剂的一个或多个另外的部分彼此物理缔合或连接以形成足够稳定的结构,从而使得在使用所述结构的条件例如生理条件下所述部分保持物理缔合。“缔合”不需要是严格地通过直接共价化学结合。还可表明离子键合或氢键合或基于杂交的连接足够稳定以使得“缔合的”实体保持物理缔合。

[0693] 自体的:如本文所用,术语“自体的”是指来源于同一个体且后来又再引入到所述个体中的任何材料。

[0694] 条形码:如本文所用,术语“条形码”是指将一种多核苷酸或氨基酸与另一种区别的多核苷酸或氨基酸序列。

[0695] 癌症:如本文所用,术语“癌症”是指特征在于体内异常细胞不受控制地生长的各种各样的疾病。不受调控的细胞分裂和生长导致恶性肿瘤的形成,所述恶性肿瘤侵入邻近组织,最终通过淋巴系统或血液转移到身体的远侧部分。

[0696] 共刺激分子:如本文所用,根据其在免疫T细胞活化中的含义,是指这样的一组免疫细胞表面受体/配体,它们在T细胞与APC之间接合并且在T细胞中生成刺激性信号,所述信号与T细胞中由APC上抗原/MHC复合物(pMHC)的T细胞受体(TCR)识别所得到的共刺激信号组合。

[0697] 细胞因子:如本文所用,术语“细胞因子”是指由许多小细胞型产生的具有多效功能的小可溶性因子家族,它们可影响并且调控免疫系统的功能。

[0698] 递送:如本文所使用,术语“递送”是指递送化合物、物质、实体、部分、货物或有效载荷的动作或方式。“递送剂”是指至少部分地有利于一种或多种物质(包括但不限于本发明的化合物和/或组合物)向细胞、受试者或其他生物系统细胞的体内递送的任何剂。

[0699] 去稳定:如本文所使用,术语“不稳定的”、“去稳定化”、“去稳定区”或“去稳定结构域”意指比相同区或分子的起始、参考、野生型或天然形式的稳定性差的区或分子。

[0700] 工程化的:如本文所使用,本发明的实施方案在它们被设计来具有不同于起始点野生型或天然分子的无论结构或化学上的特征或特性时为“工程化的”。

[0701] 表达:如本文所使用,核酸序列的“表达”是指以下事件中的一个或多个:(1)从DNA序列产生RNA模板(例如,通过转录);(2)加工RNA转录物(例如,通过剪接、编辑、5'帽形成和/或3'端加工);(3)RNA翻译成多肽或蛋白;(4)多肽或蛋白的折叠;以及(5)多肽或蛋白质

的翻译后修饰。

[0702] 特征:如本文所使用,“特征”是指特点、特性或独特要素。

[0703] 制剂:如本文所使用,“制剂”至少包括本发明的化合物和/或组合物以及递送剂。

[0704] 片段:如本文所用,“片段”是指部分。例如,蛋白片段可包含通过消化全长蛋白获得的多肽。在一些实施方案中,蛋白片段包括至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250或更多个氨基酸。在一些实施方案中,抗体片段包括抗体的部分。

[0705] 功能性:如本文所用,“功能性”生物分子为具有的结构和所呈形式其借以表现出可进行表征的特性和/或活性的生物实体。

[0706] 免疫细胞:如本文所用,术语“免疫细胞”是指来源于骨髓中的造血干细胞的免疫系统的任何细胞,造血干细胞产生两种主要谱系,髓系祖细胞(其产生髓系细胞诸如单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞、巨核细胞和粒细胞)和淋巴样祖细胞(其产生淋巴样细胞诸如T细胞、B细胞和自然杀伤(NK)细胞)。例示性免疫系统细胞包括CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞、CD4⁻CD8⁻双阴性T细胞、T γ δ 细胞、T $\alpha\beta$ 细胞、调控T细胞、自然杀伤细胞和树突状细胞。巨噬细胞和树突状细胞可称为“抗原呈递细胞”或“APC”,它们是当APC表面上与肽复合的主要组织相容性复合物(MHC)受体与T细胞表面的TCR相互作用时可活化T细胞的特化细胞。

[0707] 免疫疗法:如本文所用,术语“免疫疗法”是指通过诱导或恢复免疫系统对疾病的反应性来治疗疾病的类型。

[0708] 免疫治疗剂:如本文所用,术语“免疫治疗剂”是指通过利用生物学、药物或化学化合物诱导或恢复免疫系统对疾病的反应性来治疗疾病。

[0709] 体外:如本文所用,术语“体外”是指事件发生在人工环境中,例如在试管或反应容器中、在细胞培养物中、在皮氏培养皿(Petri dish)中等,而非在生物体(例如,动物、植物或微生物)内。

[0710] 体内:如本文所使用,术语“体内”是指发生在生物体(例如,动物、植物或微生物或其细胞或组织)内的事件。

[0711] 接头:如本文所用,接头是指连接两个或更多个结构域、部分或实体的部分。在一实施方案中,接头可包含10个或更多个原子。在另一个实施方案中,接头可包含一组原子,例如10^{-1,000}个原子,并且可包含原子或基团诸如但不限于碳、氨基、烷基氨基、氧、硫、亚砷、磺酰基、羰基和亚胺。在一些实施方案中,接头可包含一个或多个包含一个或多个核苷酸的核酸。在一些实施方案中,接头可包含氨基酸、肽、多肽或蛋白。在一些实施方案中,由接头结合的部分可包括但不限于原子、化学基团、核苷、核苷酸、核碱基、糖、核酸、氨基酸、肽、多肽、蛋白、蛋白复合物、有效载荷(例如,治疗剂)或标志物(包括但不限于化学、荧光、放射性或生物发光标志物)。如本文所述,接头可用于任何有用的目的,诸如形成多聚体或缀合物,以及施用有效载荷。可并入到接头中的化学基团的示例包括但不限于烷基、烯基、炔基、酰氨基、氨基、醚、硫醚、酯、亚烷基、杂亚烷基、芳基或杂环基,其各自均可如本文所述任选取代的。接头的示例包括但不限于不饱和烷烃、聚乙二醇(例如,乙烯或丙二醇单元,例如,二乙二醇、二丙二醇、三乙二醇、三丙二醇、四乙二醇或四乙二醇)和右旋糖酐聚合物。其他示例包括但不限于接头内的可裂解部分,诸如像二硫键(-S-S-)或偶氮键(-N=N-),其可使用还原剂或光解作用裂解。选择性可裂解的键的非限制性实例包括可例如通过

使用三(2-羧乙基)膦(TCEP)或其他还原剂和/或光分解裂解的酰胺键,以及可例如通过酸性或碱性水解裂解的酯键。

[0712] 检查点/因子:如本文所用,检查点因子为功能在过程的连接点处起作用的任何部分或分子。例如,检查点蛋白、配体或受体可起到使细胞周期失速或加速的作用。

[0713] 代谢物:代谢物为通过细胞内天然存在的酶催化的代谢反应的中间产物。这个术语通常用于描述小分子、较大生物分子的片段或加工的产物。

[0714] 修饰的:如本文所用,术语“修饰的”是指分子或实体与亲本或参考分子或实体相比的变化状态或结构。可以许多方式包括化学上、结构上和功能上的方式修饰分子。在一些实施方案中,本发明的化合物和/或组合物是通过引入非天然氨基酸来修饰的。

[0715] 突变:如本文所用,术语“突变”是指变化和/或改变。在一些实施方案中,突变可为蛋白(包括肽和多肽)和/或核酸(包括多核苷酸)的变化和/或改变。在一些实施方案中,突变包括蛋白和/或核酸序列的变化和/或改变。此类变化和/或改变可包括一个或多个氨基酸(在蛋白和/或肽的情况下)和/或核苷酸(在核酸和/或多聚核酸例如多核苷酸的情况下)的添加、取代和/或缺失。在突变包括氨基酸和/或核苷酸的添加和/或取代的一些实施方案中,此类添加和/或取代可包括一个或多个氨基酸和/或核苷酸残基并且可包括修饰的氨基酸和/或核苷酸。突变、变化或改变的所得构建体、分子或序列可在本文称为突变体。

[0716] 新抗原:如本文所用,术语“新抗原”是指存在于肿瘤细胞中但不存在于正常细胞中并且诱导胸腺中同源抗原特异性T细胞的缺失(即,中枢耐受)的肿瘤抗原。这些肿瘤新抗原可提供类似于病原体的“外来”信号以诱导癌症免疫疗法所需的有效免疫应答。新抗原可限于具体肿瘤。新抗原为具有错义突变的肽/蛋白,或具有来自新开放阅读框(neoORF)的长的、全新的氨基酸段的新肽。neoORF可在一些肿瘤中通过框外插入或缺失(由于DNA错配修复的缺陷导致微卫星不稳定)、基因融合、终止密码子的通读突变或不当剪接RNA的翻译而生成(例如,Saeterdal等,Proc Natl Acad Sci USA,2001,98:13255-13260)。

[0717] 脱靶:如本文所用,“脱靶”是指对任何一个或多个靶标、基因、细胞转录物、细胞和/或组织的任何非预期作用。

[0718] 可操作地连接:如本文所使用,短语“可操作地连接”是指两个或更多个分子、构建体、转录物、实体、部分等之间的功能连接。

[0719] 有效载荷或感兴趣的有效载荷(POI):如本文所用,术语“有效载荷”和“感兴趣的有效载荷(POI)”可互换使用。感兴趣的有效载荷(POI)是指功能待改变的任何蛋白或化合物。在本发明的上下文中,POI为免疫系统中的组分,包括先天和适应性免疫系统。感兴趣的有效载荷可为蛋白、编码融合蛋白的融合构建体或非编码基因或者其变体和片段。当机遇氨基酸时,感兴趣的有效载荷可称为感兴趣的蛋白。

[0720] 药学上可接受的赋形剂:如本文所用,术语“药学上可接受的赋形剂”是指除药物组合物中存在的活性剂(例如,如本文所述)之外并且具有在受试者中大致上无毒且无炎性的特性的任何成分。在一些实施方案中,药学上可接受的赋形剂为能够悬浮和/或溶解活性剂的媒介物。赋形剂可包括例如:抗粘剂、抗氧化剂、粘合剂、包衣、压缩助剂、崩解剂、染料(颜料)、软化剂、乳化剂、填充剂(稀释剂)、成膜剂或包衣、调味剂、香料、助流剂(流动增强剂)、润滑剂、防腐剂、印刷油墨、吸附剂、悬浮剂或分散剂、甜味剂以及水合作用的水。例示性赋形剂包括但不限于:丁羟甲苯(BHT)、碳酸钙、磷酸钙(二碱的)、硬脂酸钙、交联羧甲纤

纤维素、交联聚乙烯吡咯烷酮、柠檬酸、交聚维酮、半胱氨酸、乙基纤维素、明胶、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、乳糖、硬脂酸镁、麦芽糖醇、甘露醇、甲硫氨酸、甲基纤维素、对羟基苯甲酸甲酯、微晶纤维素、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚维酮、预胶凝淀粉、对羟基苯甲酸丙酯、棕榈酸视黄酯、虫胶、二氧化硅、羧甲基纤维素钠、柠檬酸钠、淀粉羟基乙酸钠、山梨糖醇、淀粉(玉米)、硬脂酸、蔗糖、滑石、二氧化钛、维生素A、维生素E、维生素C以及木糖醇。

[0721] 药学上可接受的盐:本文所述的化合物的药学上可接受的盐为所公开化合物的形式,其中酸或碱部分为其盐形式(例如,如通过将游离碱基团与合适的有机酸反应所生成)。药学上可接受的盐的实例包括(但不限于)碱性残基(如胺)的无机酸或有机酸盐;酸性残基(如羧酸)的碱盐或有机盐;等。代表性酸加成盐包括乙酸盐、己二酸盐、海藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢溴酸盐、盐酸盐、氢碘酸盐、2-羟基-乙磺酸盐、乳糖酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐、十一酸盐、戊酸盐等。代表性碱金属盐或碱土金属盐包括钠、锂、钾、钙、镁等以及无毒的铵、季铵和胺阳离子,包括但不限于铵、四甲铵、四乙铵、甲胺、二甲胺、三甲胺、三乙胺、乙胺等。药学上可接受的盐包括例如来自无毒无机酸或有机酸的常规无毒盐。在一些实施方案中,药学上可接受的盐是由含有碱性或酸性部分的母体化合物通过常规的化学方法制备的。通常,可通过使游离酸或游离碱形式的这些化合物与化学计量的量的适当碱或酸在水或在有机溶剂中或者在水与有机溶剂的混合物中反应来制备此类盐;通常,像乙醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈的非水性介质为优选的。合适的盐的列表见于 Remington's Pharmaceutical Sciences,第17版,Mack Publishing Company,Easton, Pa.,1985,第1418页,Pharmaceutical Salts:Properties,Selection,and Use,P.H.Stahl 和C.G.Wermuth(编),Wiley-VCH,2008和Berge等人,Journal of Pharmaceutical Science,66,1-19(1977),所述参考文献各自以引用的方式整体并入本文。药学上可接受的溶剂化物:如本文所用,术语“药学上可接受的溶剂化物”是指合适溶剂的分子并入晶格中的化合物的结晶形式。例如,可通过从包括有机溶剂、水或其混合物的溶液中结晶、重结晶或沉淀来制备溶剂化物。合适溶剂的示例为乙醇、水(例如,一水合物、二水合物和三水合物)、N-甲基吡咯烷酮(NMP)、二甲亚砜(DMSO)、N,N'-二甲基甲酰胺(DMF)、N,N'-二甲基乙酰胺(DMAC)、1,3-二甲基-2-咪唑啉酮(DMEU)、1,3-二甲基-3,4,5,6-四氢-2-(1H)-嘧啶酮(DMPU)、乙腈(ACN)、丙二醇、乙酸乙酯、苯甲醇、2-吡咯烷酮、苯甲酸苄酯等。当水为溶剂时,溶剂化物称为“水合物”。在一些实施方案中,并入溶剂化物中的溶剂具有施用溶剂化物(例如,以药物组合物的单位剂型)的生物体生理上可耐受的类型或水平。

[0722] 稳定的:如本文所使用“稳定的”是指化合物或实体足够稳固以经受从反应混合物中分离成有用的纯度并且优选能够配制成有效治疗剂。

[0723] 稳定:如本文所使用,术语“稳定化”、“稳定的”、“稳定区”意指使之稳定或变为稳定的。在一些实施方案中,稳定性是相对于绝对值测量的。在一些实施方案中,稳定性是相对于次要情形或状态或相对于参考化合物或实体测量的。

[0724] 标准CAR:如本文所用,术语“标准CAR”是指嵌合抗原受体的标准设计。CAR融合蛋白的组分,包括细胞外scFv片段、跨膜结构域和一个或多个细胞内结构域,被线性构建为单融合蛋白。

[0725] 刺激物应答元件(SRE):如本文所用,“刺激物应答元件(SRE)”为效应模块的与效应模块的一个或多个有效载荷接合、附接、连接或结合并且在一些情况下导致效应模块对一种或多种刺激物的应答实质的组分。如本文所用,SRE对刺激物的“应答”实质的特征可在于共价或非共价相互作用、直接或间接结合或者与刺激物的结构或化学反应。此外,任何SRE对刺激物的应答可能是程度或种类的问题。应答可以是部分应答。应答可以是可逆应答。应答可最终得到调控的信号或输出。此类输出信号可具有与刺激物有关的实质,例如产生在1与100之间的调节效果或诸如2倍、3倍、4倍、5倍、10倍或更多的成倍增加或减少。SRE的一个非限制性示例为去稳定结构域(DD)。

[0726] 受试者:如本文所使用,术语“受试者”或“患者”是指例如出于实验、诊断、预防和/或治疗目的可向其施用根据本发明的组合物的任何生物体。典型受试者包括动物(例如,哺乳动物如小鼠、大鼠、兔、非人灵长类动物和人)和/或植物。

[0727] T细胞:T细胞为产生T细胞受体(TCR)的免疫细胞。T细胞可为初始的(未暴露于抗原;与 T_{CM} 相比,CD62L、CCR7、CD28、CD3、CD127和CD45RA的表达增加并且CD45RO的表达减少)、记忆T细胞(T_M) (经历过抗原且长期)和效应细胞(经历过抗原、细胞毒性)。 T_M 可被进一步分为中央记忆T细胞(T_{CM} ,与初始T细胞相比,CD62L、CCR7、CD28、CD127、CD45RO和CD95的表达增加并且CD54RA的表达减少)和效应记忆T细胞(T_{EM} ,与初始T细胞或 T_{CM} 相比,CD62L、CCR7、CD28、CD45RA的表达减少并且CD127的表达增加)的亚组。效应T细胞(T_E)是指经历过抗原的CD8+细胞毒性T淋巴细胞,其与 T_{CM} 相比,CD62L、CCR7、CD28的表达减少并且对颗粒酶和穿孔素呈阳性。其他示例性T细胞包括调控T细胞诸如CD4+CD25+ (Foxp3+) 调控T细胞和Treg17细胞,以及Tr1、Th3、CD8+CD28-和Qa-1限制性T细胞。

[0728] T细胞受体:T细胞受体(TCR)是指具有可变抗原结合结构域、恒定结构域、跨膜区和短胞质尾的免疫球蛋白超级家族成员,其能够特异性结合与MHC受体结合的抗原肽。TCR可以可溶性形式存在于细胞表面上并且通常包含具有 α 和 β 链(还分别称为TCR α 和TCR β)或 γ 和 δ 链(还分别称为TCR γ 和TCR δ)的异二聚体。TCR链(例如, α 链、 β 链)的细胞外部分含有两个免疫球蛋白结构域、在N末端的可变结构域(例如, α 链可变结构域或 V_α 、 β 链可变结构域或 V_β)和相邻于细胞膜的一个恒定结构域(例如, α 链恒定结构域或 C_α 以及 β 链恒定结构域或 C_β)。与免疫球蛋白类似,可变结构域含有被框架区(FR)分开的互补决定区(CDR)。TCR通常与CD3复合物缔合以形成TCR复合物。如本文所用,术语“TCR复合物”是指通过CD3与TCR的缔合形成的复合物。例如,TCR复合物可由CD3 γ 链、CD3 δ 链、两条CD3 ϵ 链、CD3 ζ 链的同二聚体、TCR α 链和TCR β 链构成。可替代地,TCR复合物可由CD3 γ 链、CD3 δ 链、两条CD3 ϵ 链、CD3 ζ 链的同二聚体、TCR γ 链和TCR δ 链构成。如本文所用,“TCR复合物的组分”是指TCR链(即,TCR α 、TCR β 、TCR γ 或TCR δ)、CD3链(即,CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 或CD3 ζ)或由两个或更多个TCR链或CD3链形成的复合物(例如,TCR α 和TCR β 的复合物、TCR γ 和TCR δ 的复合物、CD3 ϵ 和CD3 δ 的复合物、CD3 γ 和CD3 ϵ 的复合物或者TCR α 、TCR β 、CD3 γ 、CD3 δ 和两个CD3 ϵ 链的亚TCR复合物)。

[0729] 治疗有效量:如本文所使用,术语“治疗有效量”意指在向遭受或易感感染、疾病、病症和/或病状的受试者施用时足以实现感染、疾病、病症和/或病状的治疗、症状改善、诊

断、预防和/或发作延迟的待递送药剂(例如,核酸、药物、治疗剂、诊断剂、预防剂等)的量。在一些实施方案中,治疗有效量是以单剂量提供的。在一些实施方案中,治疗有效量是以包括多个剂量的剂量方案施用的。本领域的技术人员将理解,在一些实施方案中,如果单位剂型包含当作为剂量方案的一部分施用时有有效的量,那么可以认为所述其包含治疗有效量的特定剂或实体。

[0730] 治疗:如本文所用,术语“治疗”表示用于获得有益或期望结果的方法,所述有益或期望结果包括并且优选为有益或期望的临床结果。此类有益或期望的临床结果包括但不限于以下中的一个或多个:减少癌细胞或其他患病细胞的增殖(或对其进行破坏);减少癌症中存在的癌细胞的转移;缩小肿瘤的大小;减少由疾病引起的症状;增加罹患疾病的人的生活品质;减少治疗疾病所需的其他药物的剂量;延缓疾病的进程和/或延长个体的存活。

[0731] 调整:如本文所用,术语“调整”意指应答于刺激物或针对特定结果调节、平衡或调适一事物。在一个非限制性示例中,本发明的SRE和/或DD应答于特定的刺激物和/或环境来调节、平衡或适应其附接、连接或缔合的组合物的功能或结构。

[0732] 等效物和范围

[0733] 本领域的技术人员将认识到,或仅使用常规实验就能够确定本文描述的根据本发明的具体实施方案的许多等效物。本发明的范围并不打算限于以上描述,而是如所附权利要求书所阐述。

[0734] 在权利要求中,除非相反指示或另外从上下文明显看出,否则冠词诸如“一个(a)”、“一种(an)”以及“所述(the)”可意指一个或多于一个。除非相反指示或另外从上下文明显看出,否则如果一个、多于一个或所有组成员出现于、被用于或以其他方式关联于给定的产品或过程,那么认为包括在组的一个或多个成员之间的“或”的权利要求或描述得到了满足。本发明包括其中恰有组中的一个成员出现于、被用于或以其他方式关联于给定的产品或过程的实施方案。本发明包括其中多于一个或全部的组成员存在于、被用于或以其他方式关联于给定的产品或过程的实施方案。

[0735] 还应该注意术语“包含”旨在为开放的并且容许但并非要求包括另外的要素或步骤。当本文中使用时,因此还涵盖并且公开术语“由……组成”。

[0736] 在给出范围时,端点被包括在内。此外,应该理解,除非另外指出或另外从上下文和本领域普通技术人员的理解显而易见,否则在本发明的不同实施方案中,表述为范围的值可假定为任何特定值或所述范围内的子范围,到所述范围的下限的单位的十分之一,除非在上下文中另有明确规定。

[0737] 另外,应该理解,在现有技术内的本发明的任何具体实施方案可从任何一个或多个权利要求中明确排除。因为认为此类实施方案为本领域普通技术人员所已知的,即使本文没有明确阐述排除,也可排除它们。本发明的组合物的任何具体实施方案(例如,任何抗生素、治疗性或活性成分;任何生产方法;任何使用等方法)可出于无论是否与现有技术存在相关的任何原因而从任何一个或多个权利要求中排除。

[0738] 应理解,已使用的措辞为描述性措辞,而不是限制性措辞,并且可在随附权利要求的范围内做出改变,而不脱离在本发明的更宽的方面内的本发明的真实范围和精神。

[0739] 实施例

[0740] 实施例1.通过诱变筛选生成新型配体应答性SRE或DD

[0741] 研究设计

[0742] 为了工程化展示出配体依赖性稳定性的构建体,选择了候选配体结合结构域(LBD),并且设计了使用黄荧光蛋白(YFP)作为蛋白稳定性的报告因子的基于细胞的筛选以鉴别出候选LBD的具有去稳定结构域的期望特征的突变体:在不存在LBD的配体的情况下蛋白水平低(即,基础稳定性低)、动态范围大、剂量-应答行为稳健且可预测以及降解动力学快速(Banaszynski等,(2006)Cell;126(5):995-1004)。候选LBD结合期望的配体,但不结合内源性信号传导分子。

[0743] 首先使用核酸类似物右边和易错PCR的组合使候选LBD序列(作为模板)突变,以生成基于模板候选结构域序列的突变体文库。将生成的文库框内克隆在YFP基因的5'或3'末端,并且使用逆转录病毒表达系统以稳定地将YFP融合物的文库转导至NIH3T3成纤维细胞中。

[0744] 使用荧光活化细胞分选(FACS)对转导的NIH3T3细胞进行三到四轮分选,以筛选出候选DD的文库。在不存在配体结合结构域(LBD)的高亲和力配体的情况下培养转导的NIH3T3细胞,并且通过FACS选择表现出低水平YFP表达的细胞。

[0745] 筛选策略I

[0746] 在存在配体结合结构域的高亲和力配体的情况下培养选定的细胞群一段时间(例如,24小时),此时通过FACS再次分选细胞。通过FACS选择表现出高水平YFP表达的细胞,并且将选定的细胞群分成两组并在不同浓度下再次用配体结合结构域的高亲和力配体进行处理;一组用较低浓度的配体处理,并且另一组用高浓度的配体处理,持续一段时间(例如,24小时),此时通过FACS再次分选细胞。分离表达对较低浓度的配体有应答的突变体的细胞。

[0747] 再次用配体处理分离的对较低浓度的配体有应答的细胞,并且在将配体从培养基除去之后4小时,收集表现出低荧光水平的细胞。设计这种第四次分选以富集表现出快速降解动力学的细胞(Iwamoto等,Chem Biol.2010Sep 24;17(9):981-988)。

[0748] 筛选策略II

[0749] 在不存在LBD的高亲和力配体的情况下,通过FACS对选定的细胞群再进行一次或多次分选,并且选择表现出低水平的YFP表达的细胞以用于进一步分析。用配体结合结构域的高亲和力配体处理细胞一段时间(例如24小时),并且通过FACS再次分选。通过FACS选择表达高水平的YFP的细胞。用配体再次处理具有高YFP表达的细胞,并且在将配体从培养基除去之后4小时,收集表现出低荧光水平的细胞,以富集表现快速降解动力学的细胞。可重复任何分选步骤以鉴别出具有配体依赖性稳定性的DD。

[0750] 分选之后回收细胞。收获鉴别的候选细胞,并且提取基因组DNA。将候选DD通过PCR进行扩增并且分离。对候选DD进行测序,并且与LBD模板进行比较,以鉴别候选DD中的突变。

[0751] 实施例2. DD调控的重组IL12表达

[0752] 将FKBP(DD)-IL12和DHFR(DD)-IL12构建体包装到具有CMV、EF1a或PGK启动子或不具有启动子的pLVX IRES-Puro慢病毒载体中。IL12由两个被接头分开的亚单位p40和p35组成。将p40信号序列插入在DD或IL12旁边。在几种构建体中,包括弗林蛋白酶蛋白酶裂解位点或修饰的弗林蛋白酶位点。

[0753] 用200ng或1 μ g的FKBP-IL12质粒(OT-IL12-001至OT-IL12-005)瞬时转染HEK293T

细胞,并且随后用10 μ M Shield-1或媒介物对照处理6小时。从转染的细胞收集培养基,并进行1:50稀释以使用p40 ELISA测量IL12水平。稳定化比定义为与用具有相同构建体的DMSO进行的处理(即,在不存在配体的情况下)相比,在配体处理的情况下IL12表达的倍数变化。期望稳定化比大于1。表15中呈现了平均IL12 ELISA读数和稳定化比。

[0754] 表15:配体依赖性IL12诱导

构建体 ID	媒介物	10 μ M Shield-1	稳定化比
OT-IL12-001	1289.61	1748.95	1.36
OT-IL12-002	18.01	50.73	2.82
OT-IL12-003	1762.55	2138.25	1.21
OT-IL12-004	385.95	1567.62	4.06
OT-IL12-005	1188.42	2670.80	2.25
HEK293T	-12.921	-22.015	

[0756] OT-IL12-002和OT-IL12-004显示,当与HEK 293T亲本细胞中的IL12水平相比时,在不存在配体的情况下IL12表达的水平低。用Shield-1进行处理导致OT-IL12-002、OT-IL12-004和OT-IL12-005构建体中的IL12水平增加并且稳定化比在2与4之间。这些数据显示,OT-IL12-002和OT-IL12-004在不存在这些构建体的情况下不稳定并且被Shield-1稳定化。

[0757] 在稳定转导之后,测量细胞中的IL12表达。将500,000个用OT-IL12-004稳定转导的细胞铺板于12孔板中,并且在生长培养基中孵育过夜,所述生长培养基由杜氏改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle medium, DMEM)和10%胎牛血清(FBS)组成。第二天,用1 μ M Shield-1或媒介物对照处理细胞6或24小时。用Shield-1处理之后,从细胞收集生长培养基并稀释10、40、160或640倍,并使用IL12-p40 ELISA定量IL12水平。稳定化比定义为与用具有相同构建体的DMSO进行的处理(即,在不存在配体的情况下)相比,在配体处理的情况下IL12表达的倍数变化。期望稳定化比大于1。表16中呈现了6小时的平均IL12 ELISA读数和稳定化比。

[0758] 表16:配体依赖性IL12诱导(6小时)

培养基稀释(倍)	6 小时		
	媒介物	Shield-1	稳定化比
10	0.17	0.58	3.35
40	0.10	0.26	2.62
160	0.08	0.12	1.41
640	0.09	0.08	0.93

[0760] 在10、40和160倍稀释的培养基中观察到IL12稳定化比大于1,指示IL12通过在这些稀释度、6小时下的Shield-1处理是稳定化的。

[0761] 表17中呈现了24小时的平均IL12 ELISA读数和稳定化比。

[0762] 表17:配体依赖性IL12诱导(24小时)

培养基 稀释 (倍)	24 小时		
	媒介物	Shield-1	稳定化比
[0763] 10	0.28	1.33	4.69
40	0.12	0.79	6.39
160	0.09	0.30	3.44
640	0.08	0.12	1.46

[0764] 在所有测试的培养基稀释液中,IL12稳定化比大于1,并且在40倍稀释的培养基、24小时下观察到最高稳定化比,表明配体依赖性稳定化。

[0765] 为了评估随时间推移的Shield-1依赖性FKBP-IL12诱导,将200万个细胞铺板于生长培养基中,并在存在1 μ M Shield-1或媒介物对照的情况下下孵育过夜。然后将细胞与配体一起孵育2、4、6、8、24、48或72小时,并在所有时间点收集细胞的生长培养基。将生长培养基稀释400倍,并使用IL12 p40 ELISA测量IL12水平。稳定化比定义为与用具有相同构建体的DMSO进行的处理(即,在不存在配体的情况下)相比,在配体处理的情况下IL12表达的倍数变化。期望稳定化比大于1。表18中呈现了平均IL12 ELISA读数和稳定化比。

[0766] 表18:随时间推移的IL12诱导

时间 (小时)	媒介物	Shield-1	稳定化 比
2	0.13	0.18	1.41
4	0.14	0.26	1.89
[0767] 6	0.13	0.29	2.30
8	0.14	0.28	1.99
24	0.18	0.99	5.47
48	0.23	1.79	7.71
72	0.26	1.63	6.28

[0768] 稳定化比随时间推移而增加并在48小时达到峰值,表明IL12随着配体处理的时间增加而被Shield-1稳定化。

[0769] 为了评估FKBP-IL12产生对Shield-1剂量水平的依赖性,将0T-IL12-004转导的HEK293T细胞以不同密度(每孔40,000个细胞、20,000个细胞、10,000个细胞或5,000个细胞)铺板于96孔板上。过夜孵育之后,用含有0至10 μ M Shield-1的生长培养基处理细胞24小时。然后收集培养基,稀释400倍,并且使用IL12-p40 ELISA测量FKBP-IL12水平。表19中呈现了平均IL12 ELISA读数。

[0770] 表19:剂量和细胞数依赖性IL12诱导

Shield-1 (μM)	40000 个 细胞/孔	20000 个 细胞/孔	10000 个 细胞/孔	5000 个 细胞/孔
10	623.77	656.70	214.11	193.62
3.333333	670.64	618.10	273.74	207.55
1.111111	677.27	872.24	322.56	203.71
[0771] 0.37037	368.17	582.71	250.49	172.50
0.123457	197.29	343.34	156.98	95.92
0.041152	171.50	205.68	63.79	48.89
0.013717	117.25	103.56	13.30	-2.35
0.004572	66.34	60.58	2.11	-8.53
0.001524	100.43	39.55	-13.58	-21.76
0	83.49	7.92	-21.76	-26.97

[0772] 在所有测试的细胞数下均观察到剂量依赖性IL12诱导。IL12诱导随着Shield-1高达 $1\mu\text{M}$ 的剂量而增加;之后IL12诱导达到平台。值得注意的是,在2000和4000个细胞/孔下观察到较大IL12诱导。

[0773] 实施例3. HEK293T细胞中DD调控的重组IL12介导的功能

[0774] 利用HEK-Blue传感细胞 (InvivoGen, San Diego, CA) 评估DD调控的IL12是否能够调控IL12下游的信号传导。在这些细胞中, IL12受体、STAT4和下游转录元件与报道基因连接, 使得可以监测IL12信号传导。使用Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), 用200ng OT-IL12-003质粒转染一百万个HEK 293T。转染之后48小时, 用含有 $10\mu\text{M}$ Shield-1的生长培养基处理细胞, 再孵育24小时, 然后收集培养基。将50,000个HEK 293Blue传感细胞铺板于96孔板上, 并与来自Shield-1处理的OT-IL12-003表达HEK293T细胞的培养基(以不同的稀释度)孵育过夜。孵育过夜之后, 从每个孔中移出 $20\mu\text{l}$ 培养基, 并与 $180\mu\text{l}$ Quanti-Blue试剂 (InvivoGen, San Diego, CA) 一起在 37°C 下孵育30分钟。使用分光光度计在620nm处测量吸收。为了生成标准曲线, 将 $180\mu\text{l}$ Quanti-Blue试剂与 $20\mu\text{l}$ 以下浓度的重组IL12混合: 500、250、125、62.5、31.25、15.62、7.8和3.9pg/ml。通过将每个样品的光密度与IL12标准曲线进行比较来确定功能性IL12浓度。在640倍稀释的含有IL12的生长培养基的情况下达到功能性IL12的可测量水平, 并且在较高的培养基浓度下进一步达到平台(图19A)。

[0775] 测量了功能性IL12产生对使用的Shield-1剂量的依赖性。将10,000个用OT-IL12-004稳定转导的HEK293T细胞铺板于96孔板上, 并用含有10、3.33、1.11、0.37、0.12、0.04、0.01、0.005、0.002或 $0\mu\text{M}$ Shield-1的生长培养基处理24小时。Shield-1处理之后, 将来自细胞的培养基稀释200倍, 并且将 $20\mu\text{l}$ 稀释培养基添加到HEK Blue传感细胞中。孵育过夜之后, 从每个孔中移出 $20\mu\text{l}$ 培养基, 并与 $180\mu\text{l}$ Quanti-Blue试剂 (InvivoGen, San Diego, CA) 一起在 37°C 下孵育30分钟。使用分光光度计在620nm处测量吸收。为了生成标准曲线, 将 $180\mu\text{l}$ Quanti-Blue试剂与 $20\mu\text{l}$ 以下浓度的重组IL12混合: 500、250、125、62.5、31.25、15.62、7.8和3.9pg/ml。通过将每个样品的光密度与IL12标准曲线进行比较来确定功能性IL12浓度。观察到功能性IL12水平的剂量依赖性水平增加(图19B)。

[0776] 实施例4. DD调控的体内重组IL12表达

[0777] 将表达FBP调控的IL12 (#OT-IL12-009) 的SKOV3肿瘤细胞或亲本细胞植入SCID Beige小鼠中(第0天)。在第2天和第7天, 将植入有FKBP IL12的小鼠腹膜内给药Shield-1

(10mg/kg) 或媒介物对照,同时不处理亲本细胞。在Shield-1给药之后0、2、4、6、8和24小时收集血液样本,并使用ELISA测量血浆人IL12水平。血浆IL12的平均调节浓度呈现于图19C中。在第2天,Shield-1处理组中的IL12水平增加,并且在4、6、8和24小时的水平高于媒介物对照。在处理之后8小时,在Shield-1处理的小鼠中检测到最大IL12水平。相比之下,在第7天,IL12水平非常低,并且几乎与亲本SKOV3细胞中的IL12水平相当。

[0778] 植入SKOV3肿瘤细胞之后28天,重复实验。将小鼠分为三组,所述组接受1、2或3个剂量的配体或媒介物对照。小鼠以两小时间隔接受多个剂量。就在第一剂量之前(0小时)以及第一次给药之后6小时和24小时收集血液样本。测量血浆IL12水平,并且平均IL12浓度显示在图19D中。当与媒介物处理的样本相比时,两剂量并且三次给药方案得到较高的血浆IL12水平。在用所有给药方案进行shield-1处理之后6小时,检测到峰值血浆IL12水平,并且在三剂量方案的情况下检测到最高IL12血浆水平。这证明了体内IL12的配体依赖性稳定化。

[0779] 实施例5. DD调控的IL15

[0780] 为了测试配体依赖性IL15产生,将100万个HEK-293T细胞铺板于6孔板中的含有DMEM和10%FBS的生长培养基中,并在37°C、5%CO₂下孵育过夜。然后使用Lipofectamine 2000用100ng OT-IL15-001(组成型)或OT-IL15-002(ecDHFR-IL15)转染细胞,并孵育48小时。孵育之后,将培养基换成具有10μM甲氧苄啶或媒介物对照的生长培养基,并进一步孵育24小时。收集培养基,并且使用人IL15 ELISA测试未稀释的样本或4、16、256、1024、4096或16384倍稀释的样本。稳定化比定义为与用具有相同构建体的DMSO进行的处理(即,在不存在配体的情况下)相比,在配体处理的情况下IL15表达的倍数变化。期望稳定化比大于1。表20中呈现了平均IL15 ELISA读数和稳定化比。

[0781] 表20: DD-IL15诱导

培养基稀释 (倍)	媒介物	10 μM TMP	稳定化比
1	0.396	0.820	2.073
4	0.154	0.287	1.867
16	0.074	0.116	1.567
64	0.056	0.073	1.301
256	0.053	0.057	1.075
1024	0.053	0.048	0.910
4096	0.049	0.049	0.995
16384	0.050	0.049	0.994

[0782] 16倍、4倍稀释和未稀释的培养基样本显示稳定化比大于1.5,表明在这些稀释度下IL15的甲氧苄啶依赖性稳定化。

[0784] 实施例6. DD调控的IL15-IL15Ra融合分子的表达

[0785] 通过融合膜结合的IL15、IL15受体α亚单位(IL15Ra)和DD诸如ecDHFR(DD)、FKBP(DD)或人DHFR(DD)来生成融合分子。将这些融合分子克隆到pLVX-EF1a-IRES-Puro载体中。

[0786] 为了测试配体依赖性IL15-IL15Ra产生,将100万个HEK-293T细胞铺板于6孔板中的含有DMEM和10%FBS的生长培养基中,并在37°C、5%CO₂下孵育过夜。然后使用Lipofectamine 2000用100ng组成型IL15-IL15Ra(OT-IL15-008)或DD连接的IL15-IL15Ra

(OT-IL15-006、OT-IL15-007、OT-IL15-009、OT-IL15-010、OT-IL15-011) 转染细胞,并孵育24小时。孵育之后,将培养基换成具有或不具有10 μ M甲氧苄啶或1 μ M Shield-1的生长培养基,并进一步孵育24小时。收获细胞,并且使用人IL15抗体(Abcam,Cambridge,UK)通过蛋白质印迹分析IL15水平。OT-IL15-009显示出IL15的强配体(甲氧苄啶)依赖性稳定化,而OT-IL15-006和OT-IL15-007显示出IL15的中等配体依赖性稳定化(图20A)。

[0787] 使用抗IL15和抗IL15Ra抗体通过FACS确定膜结合的IL15-IL15Ra构建体(OT-IL15-006、OT-IL15-007、OT-IL15-008、OT-IL15-009、OT-IL15-010、OT-IL15-011)的表面表达。用IL15-IL15Ra构建体转染HEK293T细胞,然后用合适的配体(Shield-1或甲氧苄啶)处理。转染之后48小时,使用FACS分析细胞。如所预期的,组成型IL15-IL15Ra构建体OT-IL15-008在存在和不存在配体的情况下均显示IL15和IL15Ra的高表面表达。与蛋白质印迹的结果一致,OT-IL15-009显示IL15和IL15Ra的强配体(甲氧苄啶)依赖性表面表达(图20B、图20C)。

[0788] 将膜结合的IL15-IL15Ra构建体(OT-IL15-008至OT-IL15-011)转导至人结直肠癌细胞系HCT-116中,并且用2 μ g嘌呤霉素选择稳定的整合体。然后将稳定整合的细胞在存在或不存在10 μ M甲氧苄啶或1 μ M甲氨蝶呤的情况下孵育24小时。

[0789] 通过用PE缀合IL15Ra抗体(目录号330207,Biolegend,San Diego,CA)染色来检查IL15-IL15Ra融合构建体的表面表达。表21中呈现了在存在或不存在对应配体的情况下用不同构建体获得的中值荧光强度。

[0790] 表21:IL15-IL15Ra融合构建体的表面表达

构建体	中值荧光强度		
	DMSO	10 μ M TMP	1 μ M MTX
[0791] HCT-116 细胞(对照)	273		
OT-IL15-008(组成型)	5315	7019	
OT-IL15-006(ecDHFR(R12Y、E129K))	764	2978	
[0792] OT-IL15-010(hDHFR(Y122I、A125F))	2657	5775	15864
OT-IL15-011(hDHFR(Q36F、N65F、Y122I))	1560	4010	14509

[0793] 稳定化比计算为与用具有相同构建体的DMSO进行的处理(即,在不存在配体的情况下)相比,在配体处理样本中GFP强度的倍数变化。去稳定化比计算为与在不存在配体的情况下的组成型构建体(OT-IL15-008)相比,DD调控的构建体中GFP强度的倍数变化。DD中期望去稳定化比小于1并且稳定化比大于1。这些比率呈现于表22中。

[0794] 表22:IL15-IL15Ra去稳定化合稳定化比

构建体	去稳定化比	稳定化比	
		TMP	MTX
OT-IL15-008(组成型)	19.47	1.32	
[0795] OT-IL15-006(ecDHFR(R12Y、E129K))	0.14	3.90	-
OT-IL15-010(hDHFR(Y122I、A125F))	3.48	2.17	5.97
OT-IL15-011(hDHFR(Q36F、N65F、Y122I))	0.59	2.57	9.30

[0796] 在OT-IL15-006(ecDHFR(R12H、E129K))和OT-IL15-011(hDHFR(Q36F、N65F、Y122I))的情况下观察到去稳定化比小于1,指示在不存在配体的情况下的强去稳定化。在用TMP处理以及用OT-IL15-010和11与MTX处理的所有构建体的情况下均观察到稳定化比大于1。这些数据显示,OT-IL15-006和OT-IL15-011在不存在配体的情况下均为强去稳定化的,并且在存在配体的情况下为强稳定化的。

[0797] 在HCT-116中测量IL15-IL15Ra构建体(OT-IL15-008至OT-IL15-011)的表达和配体依赖性稳定化。将细胞与10 μ M甲氧苄啶或1 μ M氨甲蝶呤或DMSO一起孵育24小时。孵育之后,收获细胞并制备细胞提取物。将细胞提取物进行SDS-PAGE上电泳并且用抗IL15抗体(目录号7213,Abcam,Cambridge,UK)进行蛋白质印迹。如图20D所示,IL15/IL15Ra组成型构建体(OT-IL15-008)显示出非配体依赖性IL15表达,同时DD调控的构建体(OT-IL15-009至OT-IL15-011)显示出配体依赖性IL15表达。通过用抗人DHFR抗体(目录号117705,Genetex,Irvine,CA)进行免疫印迹也证实了IL15条带的身份。如图20D所示,两种IL15-IL15Ra融合构建体(OT-IL15-010和011)均显示DHFR表达的配体依赖性表达。

[0798] 为了评估配体诱导稳定化的剂量依赖性,将IL15-IL15Ra融合构建体即OT-IL15-009(ecDHFR(R12Y、Y100I))、OT-IL15-010(hDHFR(Y122I、A125F))和OT-IL15-011(hDHFR(Q36F、N65F、Y122I))稳定转导至HCT-116细胞中,并与递增浓度的甲氧苄啶一起孵育24小时。使用IL15Ra-PE抗体通过FACS定量IL15-IL15Ra融合构建体的表面表达。表23中呈现了在递增剂量的TMP的情况下的中值荧光强度。

[0799] 表23: IL15-IL15Ra的表面表达

剂量 (μM)	中值荧光强度		
	ecDHFR(R12Y、 100I)	hDHFR(Y122I、 A125F)	hDHFR(Q36F、 N65F、Y122I)
DMSO	1260	3034	2357
0.01	1384	2791	2291
0.02	1492	2833	2216
0.05	1947	2924	2054
0.14	2741	2740	2150
0.41	3360	2817	2400
1.23	4014	2890	2251
3.7	4265	3117	2494
11.11	4267	3473	2841
33.33	4485	4019	3409
100	4633	5227	4592

[0800] 如表23所示,所有三种构建体均显示出中值荧光强度的剂量依赖性增加,指示添加DD稳定化配体之后IL15-IL15Ra融合体的表面表达的剂量依赖性增加。

[0802] 在HCT-116细胞中测量了IL15-IL15Ra融合构建体的配体依赖性稳定化的时程。将细胞用OT-IL15-009(ecDHFR(R12Y、Y100I)构建体转导并且与 $10\mu\text{M}$ 甲氧苄啶一起孵育0、12、16、24、48或72小时。孵育之后,使用IL15Ra-PE抗体通过FACS定量IL15-IL15Ra融合构建体的表面表达,并与未转染的亲本细胞进行比较。表24中呈现了随时间推移的中值荧光强度(MFI)。

[0803] 表24:IL15-IL15Ra表面表达的时程

时间 (小时)	MFI
亲本	3054
0	4004
12	7054
16	9390
24	14056
48	28644
72	35303

[0804] 如表24所示,OT-IL15-009(ecDHFR(R12Y、Y100I)显示中值荧光强度的时间依赖性增加,指示IL15-IL15Ra融合体的表面表达随着用DD稳定化配体进行处理的时间增加而增加。

[0805] 实施例7.DD调控的CD19 CAR表达

[0806] 将CD19 CAR融合多肽连接至FKBP-DD、ecDHFR-DD或人DHFR-DD,并将构建体克隆到pLVX-IRES-Puro载体中。

[0807] 将FKBP、ecDHFR和hDHFR DD安置在CD19 scFv与CD8 α 铰链(OT-CD19C-002、OT-CD19C-003)之间、在CD8 α 铰链与跨膜结构域(OT-CD19C-004、OT-CD19C-005)之间或者在构建体的C末端(OT-CD19C-007、OT-CD19C-008、OT-CD19C-009、OT-CD19C-010、OT-CD19C-011)。在一些情况下,在DD与CD19 scFv之间添加弗林蛋白酶裂解位点。将组成型表达的CAR构建体OT-CD19C-001用作阳性对照。

[0809] 为了测试DD-CD19 CAR构建体的配体依赖性表达,将100万个HEK 293T细胞培养在含有DMEM和10%FBS的生长培养基中,并使用Lipofectamine 2000用CAR构建体转染。转染之后48小时,将细胞用1 μ M或10 μ M Shield-1、10 μ M甲氧苄啶、1 μ M甲氨蝶呤或媒介物对照处理,并孵育24小时。收获细胞,溶解并且使用抗CD247(BD Pharmingen, Franklin Lanes, NJ)和Alexa 555缀合的山羊抗小鼠抗体(红色)(Li-Cor, Lincoln, NE)针对CD3 ζ (CAR的组分)进行免疫印迹。还用Alexa 488缀合的二级抗体(绿色)针对肌动蛋白对溶解物进行免疫印迹,以确认所有样本中均匀的蛋白负载。与未处理的对照相比,OT-CD19C-002和OT-CD19C-003显示分别在存在配体Shield-1和TMP的情况下CD3 ζ 的水平增加,指示CD19 CAR的稳定化(图21A)。如图21B所示,OT-CD19C-008和OT-CD19C-010构建体显示在存在甲氨蝶呤的情况下CD3 ζ 水平的强增加并且在不存在配体的情况下水平低,指示CD19 CAR的强配体依赖性稳定化。OT-CD19C-007和OT-CD19C-009显示分别在存在Shield-1和甲氨蝶呤的情况下CD3 ζ 水平的中等增加,指示CD19 CAR的中等配体依赖性稳定化。如所预期的,以构建体方式表达的OT-CD19C-001显示在不存在配体处理的情况下CD19 CAR的强表达。

[0810] 还针对4-1-BB(CAR的组分)对表达CD19 CAR构建体的细胞的溶解物进行免疫印迹。如图21C所示,OT-CD19C-008、OT-CD19C-009、OT-CD19C-010和OT-CD19C-011显示在不存在配体的情况下4-1BB的水平低并且在存在配体甲氨蝶呤的情况下4-1BB的水平高,指示使用这些构建体的CD19 CAR的强配体依赖性稳定化。OT-CD19C-003、OT-CD19C-006和OT-CD19C-007显示在对应配体TMP和Shield-1的处理的情况下4-1BB表达水平的中等增加,指示CD19 CAR的中等配体依赖性稳定化。含有弗林蛋白酶裂解位点的构建体OT-CD19N-014和OT-CD19N-015在用MTX处理之后显示另一较小的4-1BB大小的蛋白产物。这种大小较小的4-1BB蛋白条带仅在添加配体后的情况下才能看到,并且其分子量与OT-CD19-001中CD19 CAR的大小一致。这些数据指示弗林蛋白酶裂解仅在配体处理的情况下发生。

[0811] HEK 293T细胞中DD-CD19 CAR构建体的表面表达是使用荧光活化细胞分选(FACS)以结合到CAR的 κ 轻链的蛋白L-生物素-链霉亲和素-别藻蓝蛋白(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA)进行测量的。用1 μ M Shield-1、1 μ M甲氨蝶呤、10 μ M甲氧苄啶或媒介物对照处理细胞24小时,并且进行FACS分析。如图21D所示,具有FKBP-DD的OT-CD19C-002的表面表达仅在存在Shield-1的情况下才检测到,而仅在存在甲氧苄啶的情况下具有ecDHFR-DD的OT-CD19C-003才显示表面表达。如所预期的,组成型表达的构建体OT-C19C-001在配体和对照媒介物处理的细胞中均显示出高表达。在单独的实验中,通过FACS用蛋白L-生物素-链霉亲和素-别藻蓝蛋白分析其他构建体。表25中呈现了在存在或不存在配体的情况下每种构建体获得的GFP阳性细胞的百分比。在表25中,N/A表示不适用。

[0812] 表25:GFP阳性细胞百分比

构建体	配体	GFP 阳性细胞百分比	
		无配体	配体
OT-CD19C-001	N/A	46.8	45.4
OT-CD19C-006	TMP	46.6	43.6
OT-CD19C-007	Shield-1	28.9	34
OT-CD19C-008	MTX	15.8	31.3
[0813] OT-CD19C-009	MTX	16.5	34.2
OT-CD19C-010	MTX	14.8	33
OT-CD19C-011	MTX	14.5	32.9
OT-CD19C-012	TMP	19.1	18.7
OT-CD19C-013	Shield-1	0.91	0.4
OT-CD19C-014	MTX	4.68	16.2
OT-CD19C-015	MTX	3.04	18.2

[0814] 在OT-CD19C-007、OT-CD19C-008、OT-CD19C-009、OT-CD19C-010、OT-CD19C-011、OT-CD19C-014和OT-CD19C-015的情况下观察到GFP阳性细胞百分比的增加。在OT-CD19C-014和OT-CD19C-015构建体的情况下观察到GFP阳性细胞百分比的增加最高。

[0815] 表26中呈现平均荧光强度示。在表26中,MFI代表平均荧光强度。稳定化比计算为与用具有相同构建体的DMSO进行的处理(即,在不存在配体的情况下)相比,在配体处理样本中GFP强度的倍数变化。去稳定化比计算为与在不存在配体的情况下的组成型构建体(OT-CD19C-001)相比,DD调控的构建体中GFP强度的倍数变化。期望去稳定化比小于1并且稳定化比大于1。

[0816] 表26:CD19 CAR表面表达

构建体	配体	MFI		去稳定化比	稳定化比
		无配体	配体		
OT-CD19C-001	N/A	453	407		0.90
OT-CD19C-006	TMP	425	325	0.94	0.76
OT-CD19C-007	Shield-1	132	123	0.29	0.93
[0817] OT-CD19C-008	MTX	89.4	148	0.20	1.66
OT-CD19C-009	MTX	93.3	200	0.21	2.14
OT-CD19C-010	MTX	85.6	160	0.19	1.87
OT-CD19C-011	MTX	83.3	172	0.18	2.06
OT-CD19C-012	TMP	112	105	0.25	0.94
OT-CD19C-013	Shield-1	61	49.5	0.13	0.81
OT-CD19C-014	MTX	78.6	124	0.17	1.58
OT-CD19C-015	MTX	73.3	143	0.16	1.95

[0818] 在所有构建体的情况下均观察到去稳定化比小于1,指示所有DD调控的构建体在

不存在配体的情况下均是去稳定化的。在OT-CD19C-008、OT-CD19C-009、OT-CD19C-010、OT-CD19C-011、OT-CD19C-014和OT-CD19C-015的情况下观察到稳定化比大于1。值得注意的是,这些构建体在不存在配体的情况下也是去稳定化的,并且因此代表合适的CD19-DD构建体。

[0819] 实施例8. 体外T细胞测定开发

[0820] 研究的目的是确定T细胞刺激方案以及在体外最大化T细胞持久性和T细胞分化所需的IL12剂量。研究再现了过继性细胞疗法方案的设计,其中最初将T细胞在体外暴露于抗原,从而导致活化,接着进行静止期,并且最终进行体内转移,此时T细胞再次遇到抗原。在第0天,用CD3/CD28珠粒或可溶性CD3/CD28刺激T细胞,并且在48小时结束时洗去CD3/CD28刺激物。用剂量在0.01-1000ng/mL范围内的IL12处理细胞。在第9天,通过检查IFN γ 阳性CD4⁺细胞和CD8⁺细胞的频率来评估细胞的Th1表型。在第14天,将细胞分为两组:一组接受第二次CD3/CD28刺激,并且第二组未进行刺激。在第16天,使用FACS评估两组中的Th1表型。第16天的结果呈现于图22。与未接受第二次刺激的细胞相比,在第14天接受CD3/CD28重新刺激的细胞中的IFN γ 表达较高。这指示抗原再刺激和IL12暴露均为Th1表型所需的。此外,低至0.1ng/mL的IL12能够引起体外T细胞的Th1-偏移和IFN γ 产生,并且较高剂量的IL12进一步改进了这种效果。

[0821] 实施例9. 测量体外和体内人T细胞应答

[0822] IL12促进初始T细胞分化为Th1细胞,从而导致IFN γ 从T细胞分泌。用IL12处理人T细胞或不进行处理,并且通过流式细胞术分析IFN γ 和T细胞标志物CD3的表达。用IL12进行处理导致T细胞的分化,如通过IFN γ 阳性T细胞的百分比从0.21增加到22.3所测量(参见图23A的插图)。

[0823] 为了测试膜结合的IL15/IL15Ra融合蛋白(OT-IL15-008)是否可诱导人T细胞扩增,用所述构建体转导人T细胞。通过使用流式细胞术评估T细胞群的前向和侧向散射来测量T细胞增殖。与对照未转染的细胞(37.8)相比,用膜结合的IL15/IL15Ra融合构建体进行转导导致人T细胞的扩增(58.9)(图23B)。

[0824] 跟踪过继转移之后的T细胞对于确定它们在宿主中不同部位的分布、它们身份和随时间推移的持久性来说是关键的。用CD3/CD28珠粒刺激人T细胞,并与50U/ml的IL2一起孵育。将细胞体外扩增7天,在第3天和第5天补充IL2。在第5天,除去CD3/CD28珠粒,并将细胞培养两天。在第7天,清洗细胞以除去IL2,并将500万人T细胞静脉内注射到免疫受损的NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ小鼠中。在细胞转移之后4、24、120和168小时获得血液样本。细胞转移之后168小时对小鼠实施安乐死,并收获骨髓和脾。从所有样本分离出免疫细胞,并使用CD3和CD45细胞表面标志物分析人T细胞的存在。如图23C所示,在注射有人T细胞的动物中,血液中CD3阳性CD45阳性人T细胞的百分比较高,尤其是在120和168小时的时候。在注射有人T细胞的动物的脾和骨髓中也检测到CD3阳性CD45阳性人T细胞。如所预期的,在未注射有人T细胞的对照动物中未检测到CD3阳性CD45阳性人T细胞。

[0825] 为了确定过继性转移之后T细胞的身份,注射之后48小时从小鼠收集血液样本。分析CD4和CD8 T细胞的CD45RA和CD62L的表面表达。两种标志物均在初始T细胞中是高表达的,但随着T细胞变成抗原暴露而丧失。如图23D所示,人CD4和CD8 T细胞在注射到小鼠之前均显示两种标志物的高表面表达,但是在体内细胞转移之后48小时丧失,指示人T细胞在体内暴露于抗原。

[0826] 实施例10.DD调控的IL12介导的功能

[0827] 通过评估表达这些构建体的肿瘤细胞建立肿瘤并且在对应合成配体例如Shield-1、甲氧苄啶或甲氨蝶呤的治疗下增殖的能力来体内表征DD-IL12功能。将200万至1千万个用所述构建体稳定转导的HCT-116细胞用50matrigel皮下异种移植到能够产生功能性B细胞和NK细胞的小鼠中。注射之后近似两周,当肿瘤达到近似300立方毫米的大小时,将小鼠在不同浓度下每两天给药对应的稳定化配体例如Shield-1、甲氧苄啶或甲氨蝶呤。Shield-1与由10二甲基乙酰胺、10Solutol HS15和80盐水组成的载剂一起注射。每周两次监测肿瘤体积和体重,并且一旦肿瘤达到1000立方毫米,就终止实验。在最后一个剂量的配体之后8小时收集血浆和肿瘤样本,并且测量IL12以及配体水平。

[0828] 为了评估IL12表达细胞形成肿瘤的能力,用对应的稳定化配体Shield-1、甲氧苄啶或甲氨蝶呤预处理用DD-IL12构建体稳定转导的HCT-116细胞,并且随后异种移植到小鼠中。与未处理的对照相比在配体治疗的小鼠中肿瘤生长减少以及IL12水平同时增加指示体内IL12的条件性调控。

[0829] 实施例11.T细胞中DD调控的重组IL12介导的功能

[0830] 在原代人T细胞中并且在人细胞系/转化的造血细胞系例如Raji细胞中评估对DD-IL12的功能性应答。通过使用CD4⁺ T细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotec,Germany)进行阴性选择,从外周血单核细胞(PBMC)中纯化出人T细胞。用来自表达DD-IL12构建体的HEK293T细胞的生长培养基处理T细胞5天。然后用与CD3/CD28珠粒缀合的珠粒(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA)以每个T细胞3个珠的比率活化细胞,并培养3天。通过在用配体或媒介物对照处理之后,使用流式细胞术测量CD3阳性细胞中的干扰素 γ 来确定对DD-IL12的功能性应答。IL12促进初始T细胞分化为Th1细胞,从而导致IFN γ 从T细胞分泌。

[0831] 为了评估IL12诱导的STAT4(信号转导子和转录活化因子4)的磷酸化,从PBMC中分离出人T细胞并用植物血凝素(PHA,2 μ g/ml)进行活化,持续3天,接着用50IU/ml白介素2(IL2)处理24小时。然后洗涤细胞,重新悬浮于新鲜培养基中,并在存在配体或媒介物对照的情况下静置4小时。将来自DD-IL12表达HEK293T细胞的上清液添加到原代细胞中,接着孵育30分钟。然后收获细胞,并使用STAT4抗体(Cell Signaling Technology,Danvers,MA)分析STAT4磷酸化。

[0832] 实施例12.DD调控的IL15-IL15Ra融合分子的功能性分析

[0833] 通过IL15的活化可通过赋予存活优势来维持T细胞持久性。此外,已经显示IL15/IL15Ra融合分子在T细胞上赋予记忆表型并增加NK细胞的增殖(Hurton(2016),PNAS,113:E7788-7797,其内容以全文引用的方式并入本文)。

[0834] 为了评估通过DD调控的IL15-IL15Ra融合构建体的信号传导,将NK-92细胞与表达DD调控的IL15-IL15Ra融合构建体的HCT-116细胞一起孵育。预期通过IL15/IL15Ra的反式信号转导增加NK92中的STAT5磷酸化,通过蛋白质印迹和FACS进行测量。还测量了NK92细胞的增殖。

[0835] 为了评估DD调控的IL15-IL15Ra融合构建体对原代T细胞的作用,用融合构建体转导细胞。测量在不存在外源性IL15补充的情况下的T细胞增殖。通过FACS定量CD62L表达来测量T细胞记忆表型。

[0836] 为了评估DD-IL15/IL15R表达T细胞是否在体内维持延长的持久性,将DD修饰的T

细胞注射到小鼠中。用荧光素酶报告因子标记构建体以实现在小鼠中的体内跟踪。根据所用的构建体,用媒介物对照或对应的配体Shield-1、甲氧苄啶或甲氨蝶呤处理小鼠,并使用生物发光成像(PerkinElmer,Massachusetts)在40-50天的时间内进行监测。预期用配体处理的小鼠保留表达DD-IL15/IL15Ra的T细胞,而预期在媒介物对照处理的动物中T细胞不持续存在。

[0837] 实施例13.T细胞中DD调控的CD19 CAR的表达和功能

[0838] 在原代人T细胞中并且在永生化/转型的造血细胞系例如Raji细胞、Jurkat细胞和K562细胞中评估DD-CD19 CAR构建体的配体依赖性表达。通过使用CD4⁺ T细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotec,Germany)进行阴性选择,从外周血单核细胞(PBMC)中纯化出人T细胞。用DD-CD19 CAR构建体稳定转导原代T细胞和造血细胞系。用10 μ M Shield-1、10 μ M甲氧苄啶、1 μ M甲氨蝶呤或媒介物对照处理细胞,并使用抗CD247抗体针对CD3 ζ 进行免疫印迹。

[0839] 在原代人T细胞或人细胞系(NALM6、K562、Jurkat和Raji细胞)中分析功能性DD-CD19 CAR的产生。在存在DD稳定化配体Shield-1、TMP或MTX的情况下,将细胞与CD19表达抗原呈递细胞或CD19/Fc融合蛋白一起孵育。孵育之后,用荧光标记的抗CD69抗体将细胞染色,并通过流式细胞术进行分析。具有高CD69表达的细胞被认为具有功能性DD-CD19 CAR。还通过使用ELISA测量干扰素 γ 水平来确定对DD-CD19 CAR的功能性应答。预期在存在配体的情况下,DD-CD19 CAR表达细胞显示出高于未处理的细胞的干扰素 γ 水平。

[0840] 使用Chromium-51释放测定评估了原代人T细胞或人细胞系(例如NALM6、K562和Raji)中DD-CD19 CAR表达细胞的细胞溶解潜能。将靶细胞负载有Na₂⁵¹CrO₄,洗涤两次并重新悬浮于无酚红的生长培养基中。将未处理或配体处理的DD-CD19 CAR和模拟转导的细胞与CD19表达靶细胞一起以不同的效应子:靶细胞比率共孵育,并且使用液体闪烁计数器测量到上清液中的铬释放。预期具有DD-CD19 CAR的细胞仅在存在配体的情况下,才显示出特异性细胞溶解。预期在不存在配体或模拟转染的细胞的情况下,具有DD-CD19 CAR的细胞显示出最小的细胞溶解活性。

[0841] 还评估了DD-CD19 CAR的体内抗肿瘤功效。将免疫受损的小鼠注射有荧光素酶表达人白血病细胞系(NALM-6)。随后,通过尾静脉注射将小鼠注射有DD-CD19 CAR T细胞。将小鼠再分为处理组,并用一定范围的配体剂量进行处理。所述研究还包括两个对照组:一个对照组不接受任何配体,并且另一组不接受任何T细胞。使用生物发光成像随时间推移监测如通过荧光素酶活性所测量的肿瘤负荷。与对照动物相比,预期用DD-CD19 CAR T细胞和配体处理的小鼠的肿瘤负荷降低。

[0842] 实施例14.同基因小鼠模型中DD调控的有效载荷的抗肿瘤应答的评估

[0843] 使用同基因小鼠模型例如pMEL-1和4T1小鼠模型品谷具有完整免疫细胞的生物体中癌症免疫疗法的功效。从同基因小鼠中分离出免疫细胞诸如T细胞和NK细胞,并用DD调控的有效载荷诸如DD-IL12、DD-IL15、DDIL15-IL15Ra和DD-CD19 CAR进行转导。然后将细胞注射到携带皮下同基因肿瘤的小鼠中,并根据所用的DD用不同浓度的配体Shield-1、甲氧苄啶或甲氨蝶呤处理。当与对照动物相比时,预期用DD调控的有效载荷转导的免疫细胞处理的小鼠的肿瘤负荷降低。

[0844] 实施例15.DD调控的免疫治疗剂的发现的优化 workflow

[0845] 为了鉴别出适用于免疫疗法的DD-CD19 CAR构建体,将构建体引入到细胞系例如

HEK293T细胞和Jurkat细胞中。测试了在存在或不存在对应的配体的情况下构建体的表达。选择不存在配体的情况下显示低基础表达和稳健的配体-剂量应答性表达的构建体以用于进一步分析。如果没有DD-CD19 CAR构建体显示依赖配体表达,那么重新设计构建体并重复实验直至鉴别出可调控的构建体。接着,在原代T细胞中体外测试DD-CD19 CAR构建体的配体依赖性调控。如果构建体显示在不存在配体的情况下的低基础表达以及配体剂量应答性表达,那么对其进行体内PK/PD概念验证实验。否则,重新设计构建体,并对新构建体进行类似的分析。将组成型表达CD19 CAR构建体转导到T细胞中,并与调控的构建体平行地测量CD19 CAR表达。如果在体外未检测到表达,那么将精力重新集中于测试T细胞中的体外DD-CD19 CAR构建体。相比之下,如果组成型构建体显示表达,那么在体内测量CD19 CAR的表达。

[0846] 为了测试体内PK/PD,将小鼠注射表达DD-CD19 CAR构建体的T细胞,并且将测试组给药对应于DD的配体,同时将对照组给药适当的媒介物对照。选择展示出CD19 CAR的配体依赖性表达的构建体以用于体内功能性概念验证实验。还使用组成型CD19 CAR构建体进行了平行实验。如果在体内检测到组成型CD19 CAR表达,那么选择所述构建以用于功能性实验。如果在体内未检测到表达,那么重新设计构建体。

[0847] 通过测试组成型和DD调控的CD19 CAR表达T细胞是否分别以组成型或配体依赖性方式展示出抗肿瘤活性,进行了体内功能性分析。如果是以组成型或配体依赖性方式展示出抗肿瘤活性,那么实现体内概念验证并且鉴别出合适用于免疫疗法的构建体。如果DD调控的构建体均没有显示出抗肿瘤活性,那么探索另选的给药方案。如果组成型CD19 CAR构建体未显示出抗肿瘤活性,那么将精力集中于鉴别出显示在T细胞中的体内表达的DD-CD19 CAR构建体。

[0848] 实施例16.DD调控的有效载荷的共表达

[0849] 可通过使用CAR-T细胞将白介素递送到靶组织来避开与全身施用白介素相关的毒性。与单独的白介素和CAR疗法相比,这种组合方法还具较大的抗肿瘤活性。用CD19 CAR(组成型或DD调控的)和DD-白介素例如DD-IL12、DD-IL15和DD-IL15/IL15Ra构建体共转染细胞。根据所用的DD,用稳定化配体处理转染的细胞。通过针对CD3 ζ 进行免疫印迹,评估CD19 CAR表达。通过ELISA测量培养基中的DD-IL12、DD-IL15和DD-IL15/IL15Ra表达。

[0850] 实施例17.T细胞中的CAR表达和功能性

[0851] 用CD19 CAR构建体转导原代T细胞。CD19 CAR构建体的表面表达是使用荧光活化细胞分选(FACS)以结合到CAR的 κ 轻链的蛋白L-生物素-链霉亲和素-别藻蓝蛋白(ThermoFisher Scientific,Waltham,MA)进行测量的。为了确定CAR T细胞的CD4和CD8亚群的百分比,通过抗CD4、抗CD8抗体和蛋白L分析细胞。如图24A所示,67.3%获得的CAR阳性细胞是CD4阳性的,而仅14.2%细胞是CD8阳性的。

[0852] 为了测试CD19 CAR细胞杀伤靶细胞的能力,将用OT-CD19N-001或OT-CD19N-017转导的原代T细胞群与表达CD19的K562细胞(靶细胞)以5:1的比率共培养。还建立了T细胞和靶细胞的其他对照组合。这些包括与K562细胞共培养的CAR表达T细胞、与表达CD19的K562细胞共培养的T细胞和无T细胞共培养的表达CD19的K562细胞。用NucLight Red对K562细胞进行荧光标记,并与T细胞共培养30小时。通过用膜联蛋白V标记细胞来监测细胞死亡,并且通过评估NucLight Red阳性细胞中的膜联蛋白V染色来测量K562靶细胞死亡。计算每个靶

细胞区域的膜联蛋白V染色的比率。如图24B所示,OT-CD19N-001或OT-CD19N-017表达T细胞有效杀伤表达CD19的靶K562细胞。当将未转导的T细胞与CD19表达靶细胞共培养时,观察到低水平的靶细胞杀伤。如所预期的,在OT-CD19N-001表达T细胞和K562细胞(无CD19表达)的共培养物中,细胞死亡最少。这些数据显示,CD19 CAR细胞有效杀伤它们对应的靶细胞。

[0853] 实施例18. T细胞中IL15-IL15Ra的调控表达

[0854] 将DD调控的IL15-IL15Ra构建体诸如OT-IL15-009或组成型表达的构建体诸如OT-IL15-008转导至T细胞诸如原代T细胞或SupT1细胞中。使用Lentiboost™ (Sirion Biotech, Germany),在两种不同的慢病毒浓度5 μ l和20 μ l下对DD调控的构建体进行转导。转导之后4天,用10 μ M TMP或DMSO对照处理细胞24小时和48小时。使用FACS用抗IL15Ra抗体分析样本。FACS分析中包括其他对照样品,诸如仅用Lentiboost处理的细胞、用DMSO或TMP处理的未转导的细胞以及同种型对照。TMP处理24小时的FACS结果描绘于图25A中,并且TMP处理48小时的结果描绘于图25B中。在两个图中,DMSO-A和TMP-A指示用5 μ l慢病毒处理的细胞,并且DMSO-B和TMP-B表指示用20 μ l慢病毒处理的细胞。在所使用的两个剂量的慢病毒的情况下,用TMP处理表达OT-IL15-009的T细胞24小时导致T细胞中IL15Ra的表达增加。另外,在相同条件下的DMSO处理样本中以及在未转导的T细胞中均检测到水平非常低的IL15Ra。如所预期的,组成型表达的构建体OT-IL15-008显示IL15Ra的高表达。在SupT1细胞中未观察到OT-IL15-009的TMP依赖性表达(图25A)。在48小时的时候,对于T细胞和SupT1细胞均观察到了相似的结果(图25B)。这些结果显示,可在原代T细胞中实现IL15-IL15Ra构建体的严格调控。

[0855] 测量了OT-IL15-008和OT-IL15-009的IL15和IL15Ra的表面表达。表27中呈现了细胞表面上表达IL15、IL15Ra或两者的细胞百分比。

[0856] 表27: IL15和IL15Ra的表面表达

	阳性细胞%	
	OT-IL15-008	OT-IL15-009
[0857] IL15 和 IL15Ra 阳性	2.03	0.51
IL15Ra 阳性	13.0	15.8
IL15 阳性	0.29	0.60

[0858] 如表27中所示,在两种构建体的情况下,具有可检测的IL15和IL15Ra的表面表达的细胞的百分比均小于5%。此外,具有IL15Ra的表面表达的细胞的百分比远高于具有可检测的IL15的表面表达的细胞的百分比。

[0859] 使用OT-IL15-009构建体测量了递增剂量的TMP对T细胞中IL15Ra表达的影响。用剂量在0.156 μ M至160 μ M的范围内的TMP处理T细胞24小时。使用FACS测量IL15Ra表达。如图25C所示,即使在最低的TMP浓度下也检测到具有OT-IL15-009细胞的IL15Ra表达T细胞的百分比,并且在最低TMP浓度下IL15Ra阳性细胞的百分比高于未处理的对照。IL15Ra细胞的百分比随着TMP剂量的增加而增加。

[0860] 实施例19. IL15-IL15Ra的TMP剂量应答性表达

[0861] 使IL15-IL15Ra融合构建体OT-IL15-008、OT-IL15-009和OT-IL15-010在用在10 μ M、33 μ M和100 μ M TMP的范围内的递增剂量的TMP处理的HCT116细胞中稳定表达24小时。用抗IL15Ra抗体对细胞溶解物进行免疫印迹。如图26所示,在不存在TMP的情况下,实际上无法

检测到OT-IL15-009的IL15Ra表达,并且添加递增剂量的TMP导致IL15Ra水平增加。在添加TMP的情况下,用OT-IL15-010构建体观察到中等的IL15Ra表达的增加。如所预期的,组成型构建体OT-IL15-008在存在和不存在配体的情况下均显示强的IL15Ra表达。

[0862] 实施例20. IL15-IL15Ra对T细胞持久性和T细胞记忆表型的影响

[0863] 在NSG小鼠中测量组成型表达的IL15-IL15Ra融合构建体OT-IL15-008对T细胞持久性的影响。用OT-IL15-008转导T细胞,并将400万个细胞T细胞静脉内注射到NSG小鼠中(小鼠数=3)。作为对照,将另外的小鼠注射未转导的T细胞。在注射之后2、3、4、5和6周从小鼠获得血液样本,并通过FACS分析表达IL15和IL15Ra的CD8和/或CD4阳性人T细胞的存在。血液中人T细胞的百分比被计算为总T细胞即人T细胞(使用抗人CD45抗体测量)和小鼠T细胞以及内皮细胞(使用抗小鼠CD45抗体测量)的百分比。如图27A所示,与注射有未转导的T细胞的对照小鼠相比,注射有用OT-IL15-008转导的T细胞的小鼠在2周时血液中T细胞的百分比比较高。在T细胞中观察到的这种增加在3、4和5周内下降,并且这两个队列之间的T细胞的百分比相当。在6周时,注射有OT-IL15-008转导T细胞的小鼠中的一只显示血液中较高百分比的人T细胞。因此,在2周时,在注射有OT-IL15-008转导T细胞的小鼠的血液中,血液中人T细胞的频率增加。

[0864] 通过使用抗人CD45抗体作为人T细胞的标志物并且使用抗鼠CD3抗体作为鼠内皮细胞标志物,比较50uL小鼠血液中的人T细胞数来测量血液中的T细胞数。如图27B所示,与注射有未转导的T细胞的小鼠相比,注射有OT-IL15-008转导T细胞的小鼠在2周时血液中的T细胞数增加。两个队列之间的差异在3周和4周时减小。在6周时,注射有OT-IL15-008转导T细胞的小鼠中的一只显示血液中较高数目的人T细胞。因此,在2周时,在注射有OT-IL15-008转导T细胞的小鼠的血液中,血液中T细胞的频率和数目增加。这些数据支持IL15-IL15Ra融合蛋白在T细胞持久性中的作用。6周时在一只小鼠中观察到T细胞频率和数目增加可能是由于移植物抗宿主病。

[0865] 在注射到小鼠中之前(第0周)和注射之后2周,测量了OT-IL15-008表达对T细胞的CD4和CD8亚组的影响。如图27C所示,在注射到小鼠中之前,CD4和CD8细胞的比率为1:1。然而,在2周时,在转导的细胞中CD4阳性细胞的比例远高于CD8阳性细胞,指示OT-IL15-008导致CD4阳性细胞的优先扩增。使用抗IL15Ra抗体测量在CD4和CD8亚组中OT-IL15-008构建体的表达。如图27D所示,在注射之前,25%的OT-IL15-008转导CD4T细胞和CD8T细胞表达IL15Ra。在第2周,IL15Ra阳性CD4和CD8 T细胞的百分比增加至80%,指示用OT-IL15-008转导的T细胞优先扩增。如所预期的,未转导的对照T细胞对于IL15Ra表达呈阴性。

[0866] 实施例21. IL12依赖性、非重新刺激依赖性的Th1标志物

[0867] T细胞需要在体内T细胞受体重新刺激或体外用CD3/CD28刺激以产生IFN γ 。为了研究在不存在重新刺激的情况下IL12活性对T细胞的影响,探索了几种T细胞标志物。使用以下4中扩增策略之一对T细胞进行扩增:(i)第10天细胞因子从IL2切换至IL12,第0天至第10天CD3/CD28刺激,无重新刺激;(ii)第10天细胞因子从IL2切换至IL12,第0天至第10天CD3/CD28刺激,并且第12天至第14天用CD3/CD28重新刺激;(iii)第10天细胞因子从IL2切换至IL12,第0天至第3天CD3/CD28刺激,无重新刺激;(iv)第10天细胞因子从IL2切换至IL12,第0天至第3天CD3/CD28刺激,并且第12天至第14天用CD3/CD28重新刺激。测试的标志物包括CD69、IFN γ 、穿孔素、CXCR3、颗粒酶B、CCR5、CXCR6、Ki-67和T-bet。IFN γ 似乎是人T细

胞上IL12活性的最稳健和最一致的标志物,但需要重新刺激T细胞以诱导产生。在不存在重新刺激和IL2(可能是体内条件)的情况下应答于IL12而增加的Th1标志物包括Ki-67、T-bet、穿孔素、CXCR3和CCR5。

[0868] 实施例22. 细胞因子对NK细胞增殖和活化的影响

[0869] 免疫细胞诸如自然杀伤细胞的增殖和存活依赖于诸如IL15的细胞因子。对细胞因子的这种依赖性可用于测试DD调控或组成型表达的细胞因子和细胞因子融合蛋白的功能性。

[0870] 测试了就活化而言NK-92细胞对细胞因子的依赖性。初始用IL2培养细胞3天,然后洗涤细胞两次,并在无IL2的培养基中培养7小时。在存在IL12(10ng/ml)或不同浓度IL15(100ng/ml、20ng/ml、4ng/ml、0.8ng/ml、0.16ng/ml、0.032ng/ml、0.0064ng/ml和0.00128ng/ml)的情况下将细胞培养18小时。使用表达增加与NK细胞活化有关的一组标志物,通过FACS分析评估应答于IL15和IL12处理的NK-92细胞活化。这些标志物包括NKG2D、CD71、CD69、趋化因子受体(诸如CCR5、CXCR4和CXCR3)、穿孔素、颗粒酶B和干扰素 γ (IFN γ)。在IFN γ 的FACS分析之前,用布雷菲德菌素A培养细胞4小时。NK细胞通过蛋白质JAK/STAT、ERK和p38/MAPK途径的磷酸化对外部刺激物诸如它们环境中的细胞因子有应答,所述途径对于细胞活化、信号传导和分化途径来说是重要的。通过FACS测量应答于细胞因子添加的AKT、STAT3和STAT5的磷酸化。由于磷酸化事件是瞬时的,所以在分析之前,用细胞因子处理NK-92细胞15或60分钟。IL15处理与未处理相比的平均荧光强度的倍数变化呈现于表28。

[0871] 表28: IL15诱导标志物

[0872]

IL15 剂量 (ng/ml)	CD69	CXCR4	穿孔素	颗粒 酶 B	pSTAT5 (15 min)	pSTAT5 (60 min)	IFN γ
100	1.91	3.87	1.67	1.48	1.98	2.34	9.00
20	2.10	3.62	1.57	1.40	1.96	2.35	5.55
4	1.59	3.03	1.28	1.16	1.81	2.35	2.76
0.8	1.18	2.10	1.16	1.09	1.76	2.17	1.92
0.16	0.99	1.41	1.04	1.03	1.44	2.08	2.41
0.032	1.05	1.14	0.92	0.92	1.23	1.67	0.95
0.0064	1.11	1.19	0.79	0.78	1.03	1.26	0.85
0.00128	1.07	1.15	0.85	0.88	0.99	1.04	1.19

[0873] 用IL15处理导致CD69、CXCR4、穿孔素、颗粒酶B和IFN γ 的表达增加。IL15对这些标志物的作用是剂量依赖性的,较高剂量的IL15的导致对应的标志物的上调。在添加IL2或IL15之后15和60分钟,STAT5的磷酸化均增加。综上所述,这些结果显示细胞因子可活化NK细胞。

[0874] 在IL12处理的情况下观察到的活化标志物的倍数变化显示于表29。

[0875] 表29: IL12诱导标志物

[0876]

标志物	倍数变化
CCR5	1.60
穿孔素	1.67
颗粒酶	1.87
IFN γ	1.74

IFN γ (上清液)	666.15
--------------------	--------

[0877] 用IL12处理导致标志物CD69、CCR5、穿孔素、颗粒酶B和IFN γ 的表达增加。此外,在用IL12处理之后,NK-92细胞分泌到培养基中的IFN γ 水平高于未处理的对照。用IL2处理导致CXCR4、穿孔素、颗粒酶B和IFN γ 的表达增加。此外,在用IL2处理之后,NK-92细胞分泌到上清液中的IFN γ 水平高于未处理的对照。

[0878] 实施例23. 细胞因子对T细胞扩增和活化的影响

[0879] 为了测试T细胞扩增和活化对IL2和IL12的需求,用可溶性CD3/CD28、CD3/CD28 Dynabeads刺激T细胞或不进行刺激,持续两天。这些组中的每一个都被进一步分为两个子组。一个子组用IL2和100ng/ml的IL12处理,并且第二子组仅用IL2处理,持续刺激的持续时间。对于可溶性CD3/CD28刺激的细胞,还包括仅用100ng/ml处理的第三子组。测量了在14天的过程中的T细胞扩增,并且T细胞扩增的倍数变化显示于图28A。具有或不具有IL12的CD3/CD28 dynabeads加IL2对T细胞扩增的影响最深,其次是用具有或不具有IL12的可溶性CD3/CD28加IL2处理的T细胞。接受IL2处理的微刺激细胞和用可溶性CD3/CD28细胞处理的细胞在试验过程中不能扩增。这些结果显示,IL2是T细胞扩增所需的,而IL12可能不是必需的。

[0880] 通过测定IFN γ 阳性CD4⁺和CD8⁺ T细胞的频率来测量IL12对T细胞活化的作用。IFN γ 由活化的T细胞产生。使用了三种不同的刺激方案。在第一种方案中,用CD3/CD28 dynabeads刺激细胞2天,然后洗去珠粒,并用不同浓度的IL12处理细胞7天(从第2天至第9天)。在第9天,用可溶性CD3/CD28再刺激细胞,并通过FACS确定IFN γ 阳性细胞的频率。结果在图28B中以细胞百分比呈现。在第二种方案中,在2天CD3/CD28 dynabeads刺激之后,将T细胞在培养物中保持14天的较长时间,即从第2天到第16天。在第16天,用可溶性CD3/CD28再刺激细胞。在第16天,测量IFN γ 阳性细胞的频率。结果在图28C中以细胞百分比呈现。在第三方案中,初始用CD3/CD28 dynabeads和IL2刺激T细胞2天,然后仅用IL2处理9天(即从第2天到第11天),然后用IL12处理2至5天。在实验的最后两天,还用可溶性CD3/CD28重新刺激细胞。使用FACS对IFN γ 阳性CD4和CD8细胞进行测量。第三种方案模拟在体外转导和T细胞扩增以及体内过程中在过继细胞疗法中呈现给T细胞的环境。结果在图28D中以细胞百分比呈现。在分别显示于图28B和图28C中的用IL12进行的7天处理以及用IL12进行的14天处理,在实验结束时用CD3/CD28细胞刺激增加了IFN γ 阳性细胞的百分比。对于CD8细胞,在第一种方案中观察到的IL12的半数最大有效浓度(EC50)为50pg/ml。在第二种方案的情况下观察到的IL12的EC50,CD4细胞为12pg/ml,并且CD8细胞为65pg/ml。用CD3/CD28长期培养进一步增加了IFN γ 产生对重新刺激和IL12的依赖性。

[0881] 用第三种刺激方案获得的结果显示在图28D中。用IL12处理持续最后5天以及CD3/CD28刺激的免疫细胞显示IFN γ 阳性细胞的百分比最高(CD4细胞的EC50=24pg/ml,并且CD8细胞的EC50=40pg/ml),其次是接受IL12持续2天的细胞。因此,体外扩增的T细胞可随后应答于IL12而分化,但是IFN γ 产生可能需要重新刺激。

[0882] 总而言之,这些结果指示,当用CD3/CD28重新刺激时,IL12可以刺激T细胞中的IFN γ 产生。

[0883] 实施例24. T细胞中SRE表达的启动子选择

[0884] 载体中SRE的表达可通过逆转录病毒长末端重复序列(LTR)或通过定位于SRE上游的细胞或病毒启动子驱动。启动子的活性可能随细胞型而变化,并且因此必须针对每种细

胞型优化启动子选择。为了鉴别出最佳启动子,将AcGFP(SEQ ID NO.870)克隆到pLVX中。具有CMV或EF1a启动子的IRES Puro构建体。用所述构建体转导来源于患者的T细胞和Sup T1细胞,并在转导后第3天和第5天使用FACS测量GFP表达。如图29所示,CMV启动子和EF1a均可驱动SupT1细胞和T细胞中的GFP表达。在转导后3天和6天,相较于EF1a启动子,当通过CMV启动子驱动GFP表达时,GFP阳性T细胞的百分比比较高。相比之下,当与CMV启动子相比时,当通过EF1a启动子驱动GFP表达时,GFP阳性细胞的百分比高得多。因此,适合表达的最佳启动子基于细胞型而不同。

[0885] 实施例25. 配体对T细胞增殖的作用

[0886] 测量了特异于本发明的SRE的配体对免疫细胞增殖的影响,以鉴别不抑制T细胞生长或存活的配体浓度。用CD3/CD28刺激来自两种不同供体的T细胞,并用剂量在0.04 μ M至160 μ M范围内的配体TMP或DMSO进行处理。使用FACS测量T细胞的CD4和CD8群体中分裂细胞的百分比。浓度在0.04 μ M至40 μ M的范围内的TMP显示对CD8和CD4群体中分裂细胞百分比没有影响,而浓度为160 μ M的TMP导致分裂细胞的百分比降低70-90%。因此,确定基于T细胞的实验的TMP的最佳浓度小于160 μ M。

[0887] 实施例26. DD调控的CD19 CAR对滋养信号传导的作用

[0888] 慢性抗原活化可导致T细胞耗竭。为了测试DD调控的CD19CAR构建体是否诱导滋补信号传导,将照射过的表达CD19的K562细胞铺板到培养板中,12小时之后添加表达DD调控的CD19 CAR构建体的T细胞与白介素2。每两天对细胞进行计数,并更换培养基。对于重复刺激,24小时(两次刺激)之后或每12小时(四次刺激),将细胞转移到具有K562-CD19细胞的新板中。对于每种条件,每12小时对T细胞进行计数并且通过FACS并针对CAR、表型和耗竭标志物进行分析。在存在或不存在配体的情况下分析DD调控的构建体。分析的标志物包括:针对活化状态的CD25和CD69;针对记忆状态的CD62和CD45RA;以及耗竭标志物PD1、TIM3和LAG3。预期DD调控的CD19 CAR构建体诱导较低百分比的对所有三种耗竭标志物(即PD1、TIM3和LAG3)呈阳性的细胞,以及较高百分比的CD45A+/CD62L+的细胞,指示T细胞分化程度较低。组成型表达的CD19CAR构建体可诱导所有三种耗竭标志物的表达,并且可具有分化程度较高的表型,其中CD45-/CD62L-和CD45+/CD62L-细胞的比例较高。

[0889] 实施例27. DD调控的CD19 CAR的功能性分析

[0890] 为了测试DD调控的CD19 CAR细胞杀伤靶细胞的能力,在存在或不存在特异于DD的配体(例如Shield-1、TMP或MTX)的情况下,将用DD调控的CD19 CAR构建体转导的原代T细胞群与表达CD19的K562细胞(靶细胞)以5:1的比率共培养。还建立了T细胞和靶细胞的其他对照组合。这些包括:与K562细胞共培养的DD调控CAR表达T细胞(在存在或不存在配体的情况下)、与表达CD19的K562细胞共培养的T细胞;以及无T细胞共培养的表达CD19的K562细胞。用NucLight Red对K562细胞进行荧光标记,并与T细胞共培养30小时。通过用膜联蛋白V标记细胞来监测细胞死亡,并通过评估对膜联蛋白V和NucLight Red呈阳性的细胞来监测靶K562细胞中的细胞死亡。计算每个靶细胞区域的膜联蛋白V染色的比率。预期DD-CD19CAR表达T细胞进在存在特异于DD的配体的情况下有效杀伤表达CD19的靶K562细胞。当将未转导的T细胞与CD19表达靶细胞以及与DD-CAR T细胞(有或没有配体处理)加K562细胞(没有CD19表达)时,预期发生最小限度的靶细胞死亡。

[0891] 实施例28. 使用大型噬菌体抗体文库的CD19scFv的生成

[0892] 一级噬菌粒文库的构建

[0893] 从40种不同的人外周血淋巴细胞样本制备总RNA,并使用随机引物合成cDNA。使用IgM 3'引物和5'VH引物扩增IgM可变区。汇集的引物还用于扩增Vk和VL。添加了额外的PCR步骤以包括限制性位点,以及引入含有scFv loxP接头的重叠区。通过将等摩尔量的VH和VL基因混合并进行组装来获得scFv。然后将scFv克隆到pDAN5载体中,以获得近似 10^8 的一级文库。

[0894] 二级文库的重组和二级

[0895] 为了诱导重组,在20:1的MOI下用一级噬菌粒文库感染细菌菌株BS1365(其组成型表达Cre重组酶)。这得到含有多个噬菌粒的细菌,每个噬菌粒编码不同的VH和VL基因,这些基因可通过Cre重组酶进行重组。由于噬菌粒来自含有许多不同scFv的细菌,所以表型和基因型不偶联。使用来源于细菌的噬菌粒以 ≤ 0.1 的低MOI感染不表达Cre的细菌(例如DH5a)以将基因型与表型偶联。

[0896] CD9表达构建体和细胞系

[0897] 将表14中所述的人CD19同种型克隆到适当载体中,并转染到具有低内源性CD19表达的细胞系中,诸如K562和3T3细胞系。将CD19表达系即K562-CD19或3T3-CD19细胞用于正选择噬菌体展示文库中的scFv。将亲本K562和3T3用于负选择。

[0898] 细胞表面上识别CD19的抗体的选择

[0899] 通过用亲代细胞筛选以除去非特异性结合噬菌体来预先明确二级噬菌体展示文库。将预先明确的噬菌体与K562-CD19或3T3-CD19细胞一起孵育,并且回收结合的噬菌体并进行扩增,以用于下一轮选择。进行三轮选择以富集CD19结合因子。在平行选择过程中通过用过量的FMC63抗体封闭FMC63表位来选择FMC63不同的scFv,即结合与FMC63不同的表位的scFv。

[0900] scFv对CD19的亲合力是确定抗体在药代动力学和免疫应答测定中的性能的关键方面。使用诸如ELISA和表面等离子体共振的技术进行96种scFv克隆的亲合力测量,得到缔合速率(K_a)、解离速率(K_d)和亲合力常数(KD)。

[0901] 对具有期望的解离速率的scFv克隆进行Sanger测序,以鉴别出结合CD19表达细胞但不结合亲本细胞的独特克隆。然后使用竞争性免疫测定法对鉴别的克隆进行表位建仓(epitope binning),所述竞争性免疫测定法用于表征scFv文库并针对靶蛋白例如CD19对其进行分选。以成对方式,针对从文库中鉴别出的所有其他CD19 scFv测试针对CD19的scFv,以鉴别可防止其他scFv与CD19抗原的表位结合的scFv。在为每个CD19 scFv创建简档(profile)之后,为每个scFv相对于其他scFv创建竞争性阻断简档。密切相关的建仓简档指示,具有相同或密切相关表位的抗体被建仓在一起。

[0902] 对在选择过程的每个步骤中获得的scFv进行深度测序方法诸如Ion Torrent/MiSeq。使用Abmining ToolBox (D'Angelo S等(2014)MAbs.6(1):160-172)鉴别出重链CDR3,包括不结合FMC63的那些,并且鉴别出排名在前的HCDR3。然后使用从排名在前的序列的DNA序列设计的HCDR3特异性引物以通过反向PCR对scFv克隆进行扩增,并且将PCR产物克隆到表达载体中。

[0903] 实施例29. CD19 scFv亲合力

[0904] scFv对CD19抗原的亲合力是确定抗体在药代动力学和免疫应答测定中的性能的

关键方面。使用诸如ELISA和表面等离子体共振的技术进行亲和力测量,得到缔合速率(Ka)、解离速率(Kd)和亲和力常数(KD)。

[0905] 使用具有高或低CD19异位表达的细胞鉴别具有不同亲和力的抗体。使用CD19抗体例如FMC63,通过FACS对具有低CD19表达的K562-CD19细胞和亲本K562细胞进行分选,以确定CD19的表面表达。将细胞分选为底部5% (即低CD19表达细胞)、顶部5% (高CD19表达细胞),并且其余的细胞群被分类为中间CD19表达细胞。

[0906] 实施例30. 鉴别FMC63不同的CD19 scFv的筛选策略

[0907] CD19/Fc融合蛋白

[0908] FMC63在外显子2编码的区中与人CD19结合。为了鉴别FMC63不同的CD19 scFv,将人CD19 (外显子1-4) 或人CD19 (外显子1、3、4) 与IgG融合以分别生成CD19-IgG融合蛋白、CD19sIgG1-4和CD19sIgG1,3,4。将CD19-IgG融合蛋白用于抗体筛选。用捕获抗体涂布96孔板,并与CD19sIgG1-4或CD19sIgG1,3,4融合蛋白一起孵育。将板洗涤,并与实施例28中所鉴别的候选CD19 scFv一起孵育。再次将板洗涤,并且再次与报告因子 (例如碱性磷酸酶) 缀合的检测抗体一起孵育,并使用与报告因子相容的检测方法进行检测。捕获抗体可为抗人IgG Fc抗体或FMC63抗体 (作为对照)。检测抗体可为抗人IgM抗体。预期FMC63不同的CD19 scFv结合 (CD19sIgG1,3,4) 和 (CD19sIgG1-4)。相比之下,预期结合与FMC63的表位相同或重叠的表位的候选CD19 scFv仅结合 (CD19sIgG1-4)。

[0909] 竞争测定

[0910] 将CD19表达K562细胞与纳摩尔浓度的标记的候选CD19 scFv (例如在实施例28中鉴别的) 和固定浓度的标记的FMC63 scFv一起孵育以用于竞争结合测定。洗涤细胞并用对应于候选CD19 scFv中所用的标签的二级抗体染色。使用流式细胞术测量平均荧光强度。作为阴性对照,将CD19 K562表达细胞与不同浓度的单独的标记候选CD19 scFv或单独的FMC63一起孵育。对于与FMC63不同的CD19 scFv,预期在候选CD19 scFv与FMC63之间不存在竞争结合CD19。因此,预期标记的候选CD19 scFv的平均荧光强度随候选CD19 scFv浓度的增加而增加,而预期标记的FMC63抗体的平均荧光强度不随候选CD19 scFv浓度的增加而降低。这指示,FMC63未通过添加候选CD19 scFv而从其表位上置换,表明存在不同的结合表位。对于结合与FMC63相同的表位的候选CD19 scFv,预期FMC63的荧光强度随着候选CD19 scFv浓度的增加而降低。

[0911] 实施例31. FMC63不同的CD19 CAR构建体的功能性分析

[0912] FMC63不同的CD19 scFvs被工程化成具有表1以及表6、7、8A或8B中所述的去稳定结构域、接头、跨膜和细胞内结构域的FMC63不同的CD19 CAR构建体。在Jurkat细胞中,将FMC63不同的CD19 CAR诱导细胞活化、细胞毒性和增殖的能力与基于FMC63-CD19的CAR构建体相比较。还分析了构建体诱导耗竭标志物PD1、TIM3和LAG3上调的能力,并且分析不包括对多种耗尽标志物呈阳性的构建体。将可诱导Jurkat细胞活化和细胞毒性但不为耗竭标志物的构建体转导至T细胞中,并将其功效与组成型表达的基于FMC63的CD19 CAR构建体相比较。预期,与FMC63 CD19 CAR构建体相比,DD调控的FMC63不同的CD19 CAR构建体将显示出优异的细胞毒性能力,滋补信号传导最小。

[0913] 实施例32. DD调控的CD19 CAR诱导的配体依赖性靶细胞死亡

[0914] 为了测试通过被工程化成表达组成型或含DD的CAR构建体的T细胞的细胞杀伤的

抗原特异性,使CD19在抗原阴性K562细胞系中异位表达。使用缀合藻红蛋白(PE)的抗CD19抗体测量CD19表达。图30A显示亲本K562细胞和K562-CD19细胞中的CD19表达,其中CD19是异位表达的。

[0915] 为了测试DD调控的CD19 CAR细胞杀伤靶细胞的能力,用DD调控的CD19 CAR构建体具有人DHFR DD和EF1a启动子的OT-CD19-024转导原代T细胞群。在存在或不存在TMP(100 μ M)的情况下,将转导的T细胞与表达CD19的K562细胞(靶细胞)以5:1的比率共培养。还建立了T细胞和靶细胞的其他对照组合。这些包括:与抗原阴性K562细胞共培养的DD调控CAR表达T细胞(在存在或不存在配体的情况下)、与表达CD19的K562细胞共培养的未转导T细胞;以及无T细胞共培养的表达CD19的K562细胞。将用于这项实验的T细胞用OT-CD19-024构建体转导(或不进行转导),并使用先前实施例中所所述的方案扩增11天,冷冻,解冻并与靶细胞共培养。用丝裂霉素C处理靶细胞以防止其增殖。将稳定表达荧光蛋白NucLight Red的K562或K562-CD19靶细胞与T细胞共培养300小时。通过用膜联蛋白V标记细胞来监测细胞死亡,并通过使用IncuCyte®活细胞分析系统(Essen Biosciences, Ann Arbor, MI)评估对膜联蛋白V和NucLight Red呈阳性的细胞来监测靶K562和K562-CD19细胞中的细胞死亡。结果呈现于图30B中,其中在y轴上表示的杀伤靶细胞是基于对NucLight Red和膜联蛋白V呈阳性的靶细胞。图30C显示如在第5天以(μ M/孔)为单位测量的杀伤靶标大小。仅在T细胞和异位表达CD19的K562靶细胞的TMP处理共培养物中观察到在OT-CD19-024构建体的情况下的靶细胞杀伤。在相同共培养设置的未处理对照中以及当在存在或不存在配体的情况下将T细胞与不表达CD19的亲本K562细胞共培养时,未观察到细胞杀伤。这些数据显示,调控的CAR展示出配体和靶标依赖性细胞杀伤作用,且基础关闭状态最小。

[0916] 实施例33. 体外CAR-T细胞功能性分析

[0917] 评估了表达DD调控CD19 CAR构建体的T细胞在靶细胞功能性相互作用方面的功效。为了与CD19CAR T细胞相互作用,选择的靶细胞天然或异位表达CD19。在这种情况下,具有高内源性CD19表达的靶细胞诸如Nalm6、Raji、Reh、Sem、Kopn8和Daudi细胞。可替代地,可通过在具有低内源性表达CD19的细胞系诸如K562中异位表达CD19来工程化靶细胞系。多种测定用于测量功能性。在共培养之前,任选地在存在丝裂霉素C的情况下培养靶细胞以防止靶细胞增殖。这确保了靶细胞生长不与T细胞生长竞争。细胞毒性测定用于测量T细胞诱导靶细胞死亡的能力。将靶细胞工程化成表达海肾或萤火虫荧光素酶,并在存在与DD相关的配体或媒介物对照的情况下与表达DD调控CD19 CAR构建体的T细胞共培养18至24小时。共培养结束时,将细胞溶解,并使用适当的底物测量荧光素酶活性。预期当在存在配体的情况下将DD调控CD19 CAR表达T细胞与CD19表达靶细胞共培养时,荧光素酶活性增加。预期在媒介物对照细胞中或当使用不表达CD19的靶细胞时,没有细胞毒性。

[0918] 将CD19 CAR与CD19抗原接合导致T细胞活化,在CAR表达T细胞和靶细胞的共培养之后24小时进行测量。通过测量IFN γ 、IL2和CD69的水平来评估T细胞的活化。通过用羧基荧光素琥珀酰亚胺酯标记T细胞来测量应答于抗原介导的T细胞活化的T细胞增殖,羧基荧光素琥珀酰亚胺酯用于跨多代追踪细胞。将标记的T细胞与丝裂霉素处理的靶细胞一起培养,并在3到5天的时间内跟踪细胞增殖。预期当在存在配体的情况下将DD调控CD19 CAR表达T细胞与CD19表达靶细胞共培养时,T细胞增殖和活性增加。预期在媒介物对照细胞中或当使用不表达CD19的靶细胞时,两种参数均不存在。

[0919] T细胞的活化导致脱颗粒,这是细胞毒性T细胞释放实现靶细胞杀伤的分子如穿孔素和颗粒酶的细胞外过程。通过FACS分析培养基的胞吐指标例如CD107并且通过使用免疫测定分析脱颗粒标志物诸如穿孔素和颗粒酶来测量脱颗粒。

[0920] 实施例34. DD调控的CD19 CAR诱导的配体依赖性靶细胞死亡

[0921] 为了测试DD调控的CD19 CAR细胞杀伤靶细胞的能力,在存在或不存在特异于DD的配体(例如Shield-1 (1 μ M)、TMP (100 μ M)或MTX)的情况下,将用DD调控的CD19 CAR构建体转导的原代T细胞群与表达CD19的K562细胞(靶细胞)以5:1的比率共培养。可以利用具有FKBP、ecDHFR或人DHFR DD的构建体。还可以使用具有CMV、EF1a或PGK启动子的构建体。建立了T细胞和靶细胞的多个组合。这些包括:与K562细胞共培养的DD调控CAR表达T细胞(在存在或不存在配体的情况下)、与表达CD19的K562细胞共培养的T细胞;以及无T细胞共培养的表达CD19的K562细胞。其他对照组包括:仅靶细胞;未转导T细胞;用空载体转导的T细胞。使用先前实施例中所述的方案,将用于这项实验的T细胞扩增11天,冷冻,解冻并用CD19 CAR构建体转导。用丝裂霉素C处理靶细胞以防止其增殖。用NucLight Red对K562细胞进行荧光标记,并与T细胞共培养300小时。通过用膜联蛋白V标记细胞来监测细胞死亡,并通过使用IncuCyte[®]活细胞分析系统(Essen Biosciences, Ann Arbor, MI)评估对膜联蛋白V和NucLight Red呈阳性的细胞来监测靶K562细胞中的细胞死亡。预期仅在存在配体的情况下并且当利用异位表达CD19的K562靶细胞时,在DD调控CAR构建体的情况下有靶细胞杀伤。预期在相同共培养设置的未处理对照中以及当在存在或不存在配体的情况下将T细胞与不表达CD19的亲本K562细胞共培养时没有细胞杀伤。预测组成型构建体在存在配体的情况下均显示出细胞杀伤。还预期在与未转导T细胞、用空载体转导的T细胞的共培养物以及仅靶细胞的培养物中没有细胞杀伤。

[0922] 实施例35. 配体对细胞因子表达的作用

[0923] 为了研究配体对调控的CD19 CAR构建体中细胞因子表达的影响,用空载体、OT-CD19-017、OT-CD19-023、OT-CD19-024或OT-CD19-025转导T细胞群。在存在或不存在TMP或Shield-1的情况下,以5:1的E:T(效应细胞与靶细胞)比率将 5×10^4 个转导的T细胞共培养48小时。用50 μ g/ml丝裂霉素C处理靶细胞以防止其增殖。使用MSD V-PLEX Proinflammatory Panel 1 Human试剂盒确定每种构建体的培养基上清液中IFN γ 和IL2的细胞因子浓度。使用MESO QuickPlex SQ120获得读数。如图31A所示,在添加OT-CD19-024的配体的情况下观察到IFN γ 浓度增加了6倍,并且在通过添加OT-CD19-025的配体的情况下观察到IFN γ 浓度增加了2倍。如图31B所示,针对OT-CD19-024添加配体观察到IL2增加了6倍,并且针对OT-CD19-025添加TMP观察到增加了9倍。

[0924] 实施例36. 小鼠中IL12水平的体内时程研究

[0925] 根据以下表30中的研究设计,将HCT116亲本细胞或转导有IL12构建体(OT-IL12-020、OT-IL12-026或OT-IL12-029)的细胞注射到免疫受损的CD1裸小鼠(每组n=4)中。

[0926] 表30. 研究设计

HCT116 细胞	第 15 天剂量	浓度	第 15 天剂量的途径
[0927] OT-IL12-0 26	媒介物	n/a	腹膜内
	Shield-1 (1x)	10 mg/kg	腹膜内
	Shield-1 (3x, 间隔 2 h)	10 mg/kg	腹膜内
OT-IL12-0 29	媒介物	n/a	腹膜内
	Shield-1 (1x)	10 mg/kg	腹膜内
	Shield-1 (3x, 间隔 2 h)	10 mg/kg	腹膜内
OT-IL12-0 20	媒介物	n/a	腹膜内
	Shield-1 (1x)	10 mg/kg	腹膜内
亲本	媒介物	n/a	腹膜内
	Shield-1 (1x)	10 mg/kg	腹膜内

[0928] 在皮下注射 5×10^6 个细胞(第0天)之后第14天以及第15天给药后6、10和24小时,对小鼠放血(获得血液的血浆PK和IL 12 MSD)。在研究结束时,用剃刀在500u1 PBS中切碎肿瘤和肾,离心沉淀并且分离上清液以用于IL12中尺度诊断(MSD)分析。

[0929] 如图32A所示,DD构建体的基础血浆IL12水平高,但OT-IL12-026和OT-IL12-029构建体仍比组成型(OT-IL12-020)构建体低100倍。当图32A显示为与给药前血浆的倍数变化时,OT-IL12-026显示在6小时和10小时的调控。图32B和32C显示,在肾(图32B)和肿瘤(图32C)中均可检测到IL12,并且所述水平与血浆水平相配。

[0930] 实施例37. 小鼠中IL12水平的体内时程研究

[0931] 根据以下表31中的研究设计,将HCT116亲本细胞或用IL12构建体(OT-IL12-020、OT-IL12-026)转导的细胞皮下注射到磁性NSG小鼠的Matrigel胶塞中(以 1×10^7 个细胞植入200u1 matrigel胶塞)(n=4)。

[0932] 表31. 研究设计

HCT116 细	剂量	收获胶塞	高于 EC50 的覆
----------	----	------	------------

胞			盖率
[0934] OT-IL12-026	媒介物(1x)	第1次给药 之后8小时	-
	媒介物(1x)	第1次给药 之后24小时	-
	AquaShield-100 mg/kg (1x)	第1次给药 之后8小时	4小时
	AquaShield-100 mg/kg (2x, 两次给药之间相隔4小时)	第1次给药 之后8小时	8小时
	AquaShield-100 mg/kg (1x)	第1次给药 之后24小时	4小时
	AquaShield-100 mg/kg (2x, 两次给药之间相隔4小时)	第1次给药 之后24小时	8小时
	AquaShield-100 mg/kg (3x, 两次给药之间相隔4小时)	第1次给药 之后24小时	12小时
OT-IL12-020	媒介物(1x)	第1次给药 之后24小时	-
亲本	媒介物(1x)	第1次给药 之后24小时	-

[0935] 最终收集血浆(用于IL12 MSD), 堵住上清液并且收集肾。如图33A所示, 用高剂量的Aquashield在体内实现了IL12的调控。在血浆中观察到较少调控(图33B), 并且在肾中检测到一些flexi-IL12(图33C)。

[0936] 实施例38. Shield-1可通过用IL12-026构建体转导的原代人T细胞诱导IL12产生增加约40-50x

[0937] 在第0天, 用Dynabeads (T扩增仪CD3/CD28) 以3:1的珠粒:细胞比率刺激原代人T细胞。接下来的一天, 在存在LentiBOOST和5% FBS的情况下, 以感染复数(MOI) 10添加慢病毒(空载体(pLVX-EF1a-IRES-Puro)、OT-IL12-020(组成型)或OT-IL12-026(调控的))。在第2天, 洗涤细胞以除去LentiBOOST, 并将珠粒:细胞比率降至1:3, 并添加新鲜的10%培养基和IL2。在第6、9和13天, 对细胞计数以进行相等细胞数铺板, 更换培养基, 添加配体, 并且不对细胞进行刺激或者用可溶性ImmunoCult™人CD3/CD28 T细胞活化剂(StemCell Technologies)对细胞进行重新刺激。过夜孵育之后(在第7、10和14天), 收集上清液以用于IL12p40和p70 MSD测定, 并通过FACS分析转导效率。在第7天发现OT-IL12-026 T细胞为7%转导的, 并且OT-IL12-020(组成型) T细胞为13%转导的。重新刺激显示IL12表达增加(图34A)。配体使通过扩增10天的OT-IL12-026表达T细胞产生的IL12增加了40-50倍(图34B和图34C)。

[0938] 实施例39. Shield-1对转导T细胞的剂量应答

[0939] 用CD3/CD28 Dynabeads (Life Technologies) 活化人T细胞1天,之后用慢病毒(OT-IL12-026或载体对照)转导,接着在培养物中扩增12-13天。将用不同量的病毒(4-40MOI)转导的T细胞暴露于任一Shield-1剂量应答持续24小时(左图)。用1 μ M Shield-1或媒介物对照处理以14的MOI转导的T细胞持续递增量的时间(右图)。使用人IL12p40 MSD V-plex测定试剂盒(Meso Scale Discovery)测量上清液(每200 μ L培养基100,000个细胞)中积累的IL12水平。

[0940] 根据分析显示,表达OT-IL12-026的T细胞的IL12产生的增加对配体Shield-1具有剂量应答性(图35A),并且随时间推移而累积(图35B)。

[0941] 实施例40. 体内剂量应答,以及具有表达OT-IL12-026的转移T细胞的NSG小鼠中AquaShield的重复给药

[0942] 用Dynabeads (T扩增仪CD3/CD28)以3:1的珠粒:细胞比率刺激原代人T细胞。接下来的一天,在存在LentiBOOST和5%FBS的情况下,以感染复数(MOI)10添加慢病毒(OT-IL12-020(组成型)、OT-IL12-026(调控的)或载体对照)。之后一天,洗涤细胞以除去LentiBOOST,并将珠粒:细胞比率降至1:3,并添加新鲜的10%培养基和IL2。将T细胞扩增共计10天,然后将25 \times 10⁶个载体对照或OT-IL12-026转导T细胞或10 \times 10⁶个组成型OT-IL12-020转导T细胞转移至NSG小鼠中(研究第0天)。细胞转移之后三天,将动物给药媒介物或AquaShield(10、50或100mg/kg)。对血液取样,以用于在给药后0、4、8和24小时通过MSD测定进行IL12p70的血浆分析(图36A)。观察到血浆IL12的明显的剂量应答性增加。

[0943] T细胞转移之后第5天,将动物第二次给药AquaShield(图36B)。在用AquaShield重复给药之后,观察到血浆IL12的第二次增加。

[0944] 实施例41. T细胞中表达的DD-12的体内调控

[0945] 为了确定配体是否可以在顺序给药AquaShield之后在体内稳定DD-IL12,用DD-IL12表达构建体(OT-IL12-020或OT-IL12-026)转导T细胞,并且植入到小鼠中(每组n=4)(第0天),如以下研究设计所概述。

[0946] 表32. 研究设计

组	描述
A	空载体, 第3-6天: 每天口服媒介物持续4天
B	OT-IL12-020, 第3-6天: 每天口服媒介物持续4天
C	OT-IL12-026, 第3-6天: 每天口服媒介物持续4天
D	OT-IL12-026, 第3-6天: 每天口服 AquaShield 50 mg/kg 持续4天
[0947] E	OT-IL12-026, 第4天和第6天: 口服 AquaShield 50 mg/kg
F	空载体, 第5天和第10天: 口服媒介物
G	OT-IL12-020, 第5天和第10天: 口服媒介物
H	OT-IL12-026, 第5天和第10天: 口服媒介物
I	OT-IL12-026, 第5天和第10天: 口服 AquaShield 50 mg/kg
J	OT-IL12-026, 第10天: 口服 AquaShield 50 mg/kg

[0948] 对于每组,收集采血前(pre-bleed)样本以及每次给药之后4小时和24小时的样本。在研究结束时,收集组织和器官样本。进行FACS分析以确定细胞数和Th1标志物。

[0949] 在第0天,用Dynabeads (T扩增仪CD3/CD28)以3:1的珠粒:细胞比率刺激原代人T细胞。接下来的一天,在存在LentiB00ST和5%FBS的情况下,以感染复数(MOI)10添加慢病毒(空载体(pLVX-EF1a-IRES-Puro)、OT-IL12-020(组成型)或OT-IL12-026(调控的))。在第2天,洗涤细胞以除去LentiB00ST,并将珠粒:细胞比率降至1:3,并添加新鲜的10%培养基和IL2。

[0950] 这些细胞的体外评估显示在图37A-37C下。

[0951] 扩增10天之后,将T细胞注射至NSG小鼠中(注射 12×10^6 个细胞,通过FACS显示细胞为15%(组成型)和7.5%(调控的)IL12阳性)。对于每组,收集采血前样本以及每次给药之后4小时和24小时的血浆样本。在研究结束时,收集组织和器官样本。进行FACS分析以确定血液中的T细胞数并评估Th1表型标志物。

[0952] 如图37A所示,与媒介物处理的对照组相比,具有表达OT-IL12-026的T细胞的小鼠的血浆中,应答于配体的顺序脉冲给药(在第4天和第6天口服施用50mg/kg Aquashield (50mpk Aquashield q48hr))的IL12表达升高。表达空载体对照的T细胞不产生IL12。用OT-IL12-020(IL12-020)(组成型对照)转导的T细胞在整个时程中均产生IL12。

[0953] 在图37B中,与媒介物处理的对照组相比,在携带OT-IL12-026表达T细胞的小鼠中看到应答于配体的顺序脉冲给药(口服施用50mg/kg Aquashield 4天(第3-6天)(50mpk Aquashield QDx4))的血浆IL12表达升高。用OT-IL12-020(IL12-020)(组成型对照)转导的细胞在整个时程中均产生IL12。

[0954] 图37C显示在11天内组成型构建体OT-IL12-020(IL12-020)的IL12表达。在第5天和第10天口服施用50mg/kg Aquashield (50mpk Aquashield d5/10)来处理的小鼠中看到从构建体OT-IL12-026表达DD-IL12的T细胞的IL12的配体调控表达。表达空载体对照的T细胞不产生IL12。

[0955] 图37D显示当在第10天用50mg/kg Aquashield口服处理小鼠(50mpk Aquashield d10)时从构建体OT-IL12-026表达DD-IL12的T细胞的血浆IL12表达的配体诱导调控。单配体脉冲增加了血浆IL12水平,高于携带OT-IL12-026表达T细胞的媒介物处理对照小鼠中检测到的血浆IL12水平。

[0956] 图37A至图37D中所示的所有构建体的IL12调控均不影响IFN γ 水平,相反,IFN γ 水平随时间推移而逐渐升高。这可能是由于在体外扩增阶段期间T细胞暴露于培养物中的IL12。然而,在体内T细胞转移之后第7天,IL12的配体诱导的调控增加了体内CD8⁺ T细胞的颗粒酶B(GrB)(图37E)和穿孔素表达(图29F)。

[0957] 实施例42. PGK启动子和N末端FKBP的作用

[0958] 用Lipofectamine 3000和2 μ g质粒DNA瞬时转染HEK293T细胞,每个质粒DNA有:OT-IL12-019(PGK启动子)、OT-IL12-020(EF1 α 启动子)、OT-IL12-025(PGK启动子,C末端FKBP结构域)、OT-IL12-026(EF1 α 启动子,C末端FKBP结构域)、OT-IL12-046(N末端FKBP)。转染后一天添加配体(1 μ M Shield-1),并将细胞再培养2天。通过IL12p40 MSD测定来定量向上清液中的IL12分泌。从细胞纯化基因组DNA(gDNA)和信使RNA(mRNA)。使用特异于相应构建体内的WPRE元件和IL12的引物,通过qPCR定量整合到细胞基因组中的构建体DNA水平和IL12 mRNA表达水平。

[0959] gDNA qPCR分析说明,含FKBP DD的构建体已整合在细胞基因组内达到类似水平,

并且如所预期的PGK启动子生成的IL12 mRNA表达低于EF1 α 启动子(图38A)。

[0960] 由于由PGK启动子诱导的mRNA转录的水平较低,所以IL12p40 MSD测定还说明,与使用EF1 α 启动子的构建体相比,PGK启动子降低了基础和峰值IL12分泌水平。与具有EF1 α 启动子的构建体相比,PGK启动子下游较低基础水平的IL12产生导致配体诱导的IL12调控改进约2倍(图38B)。更具体地,随着从EF1 α 改变到PGK启动子,IL12表达的配体诱导调控分别从6倍增加到13倍。

[0961] 在IL12的N末端或C末端含有FKBP的构建体类似地整合到细胞基因组中并生成相似水平的mRNA(图38A)。然而,尽管C末端含有FKBP的构建体调控IL12表达,但是N末端含有FKBP的构建体未能调控IL12表达(图38B)。

[0962] 实施例43. DD-IL15-IL15Ra的配体依赖性稳定化的动力学

[0963] 在CD4阳性T细胞中测量DD-IL15-IL15Ra的配体依赖性稳定化的开/关动力学。在24孔板中以3:1的珠粒与T细胞的比率用CD3/CD28珠粒活化T细胞。在存在LentiBoost试剂的情况下向孔中添加慢病毒,并且再孵育细胞24小时并洗涤。将细胞重新悬浮于新鲜培养基中,并且每2-3天添加培养基以使细胞扩增并维持在 $0.5-1 \times 10^6$ /ml。扩增7天之后,用100 μ M ecDHFR配体甲氧苄啶(TMP)或媒介物对照DMSO处理用ecDHFR DD-IL15-IL15Ra融合构建体(OT-IL15-009)转导的T细胞。在TMP处理之后的多个时间点(即,1、2、4、6、8、15、22和24小时),收集转导的T细胞并使用抗IL15Ra抗体通过流式细胞术分析IL15Ra表面表达。未转导的T细胞用作阴性对照。将T细胞分选为CD4阳性和CD8阳性群体,并分析IL15Ra阳性CD4阳性T细胞的百分比。图39显示了在TMP处理之后CD4 T细胞上IL15Ra的表面表达的动力学。在用OT-IL15-009构建体转导的CD4阳性T细胞中,具有IL15Ra的表面表达的细胞的比例保持类似于TMP处理和DMSO处理的细胞,直到TMP处理之后2小时,并且与未转导的细胞相当。然而,从TMP处理之后4小时开始,用OT-IL15-009构建体转导并用TMP处理的细胞表现出具有IL15Ra表面表达的细胞的比例增加。直到TMP处理之后22小时才观察到这种趋势。具有表面表达IL15Ra细胞的CD4阳性T细胞构成未转导细胞的约1%,指示表达内源性IL15Ra的细胞的比例很低。

[0964] 实施例44. 体内DD-IL15-IL15Ra融合分子的配体依赖性稳定化

[0965] 为了检查配体处理是否在体内诱导DD-IL15-IL15Ra融合分子的稳定化,将用OT-IL15-009构建体转导的HCT116细胞皮下植入BALB/c裸小鼠并用TMP处理。在植入之后,以100mg/kg的剂量向小鼠口服施用TMP每天两次,接着以300mg/kg的剂量施用TMP每天两次,持续6天。作为阴性对照,用媒介物处理单独的植入有用OT-IL15-009构建体转导的HCT116细胞的小鼠每天两次,持续17天。在最后一次给药TMP或媒介物对照之后4小时,从小鼠收获肿瘤,并且通过蛋白质印迹分析IL15-IL15Ra融合分子的水平。如图40所示,与用媒介物处理的肿瘤相比,从用TMP处理的小鼠收获的HCT116肿瘤表现出IL15-IL15Ra表达的水平升高。分析GAPDH水平作为负载对照。这些数据显示,配体的施用实现体内DD-IL15-IL15Ra融合分子的稳定化。

[0966] 与体内TMP依赖性IL15-IL15Ra稳定化的功效一致,在从用TMP处理17天的小鼠收获的HCT116肿瘤中观察到TMP的水平升高(399.38ng/g肿瘤)。在第3天(15.67ng/ml血浆)和第17天(99.5ng/ml血浆),与HCT116肿瘤有关的TMP水平显著高于小鼠血浆中观察到的水平,指示口服施用的TMP被成功递送至植入于小鼠中的HCT116肿瘤并累积。

[0967] 实施例45. 抗脱落IL15-IL15Ra构建体

[0968] 为了维持经由IL15-IL15Ra融合分子反式呈递IL15的效率,需要防止IL15-IL15Ra脱落。为此,通过对IL15-IL15Ra融合分子进行多种修饰,设计了新的DD-IL15-IL15Ra和组成型IL15-IL15Ra构建体。例如,将IL15分子或IL15Ra分子截短或突变以去除可能存在的裂解位点。IL15Ra在紧邻受体跨膜结构域远侧的细胞外结构域中具有裂解位点(PQGHSDDT, SEQ ID NO.803的168位至175位),如Bergamaschi C等(2008). J Biol Chem;283(7):4189-99;Anthony SM等(2015). PLoS One.10(3):e0120274)以及国际专利申请公布号W02014066527和W02009002562所述(每个参考文献的内容均以全文引用的方式并入本文)。肿瘤坏死因子- α 转化酶(TACE/ADAM17)被暗示为在甘氨酸(在SEQ ID NO.803的170位)与组氨酸(在SEQ ID NO.803的171位)之间裂解并且生成IL15Ra的天然存在的可溶性形式的蛋白酶。IL15-IL15Ra脱落可能是由相同机制引起。因此,将IL15Ra的裂解位点突变,使得防止了内源性蛋白酶的裂解。通过氨基酸残基的取代、插入或缺失来引入裂解位点的突变。还修饰了IL15-IL15Ra融合分子,使得全长或截短的IL15-IL15Ra融合分子与异源性铰链结构域和/或异源性跨膜结构域融合。作为非限制性示例,可以利用IL15Ra的变体。另外,对连接IL15和IL15Ra的接头的长度和序列进行修饰。

[0969] 为了确认IL15-IL15Ra融合分子上的修饰防止脱落,将新的DD-IL15-IL15Ra或组成型IL15-IL15Ra构建体引入到HCT-116细胞中。使用抗IL15和IL15Ra抗体通过流式细胞术检查HCT-116细胞上IL15和IL15Ra的表面表达,以评估表面IL15-IL15Ra脱落。还通过MSD测定分析了细胞培养上清液中IL15的存在或不存在。作为基于肿瘤上清液中脱落IL15的NK细胞活化的敏感性的功能性分析,使用转导有新DD-IL15-IL15Ra或组成型IL15-IL15Ra表达构建体的HCT-116细胞以及NK细胞进行transwell测定。选择在存在配体的情况下不诱导NK细胞活化的新DD-IL15-IL15Ra表达构建体和不诱导NK细胞活化的新组成型IL15-IL15Ra表达构建体以用于将来的实验。

[0970] 实施例46. 具有C末端DD的IL15-IL15Ra融合分子的调控表达

[0971] 通过融合膜结合的IL15、IL15受体 α 亚单位(IL15Ra)和人DHFR(DD)来生成融合分子。将这些融合分子克隆到pLVX-EF1a-IRES-Puro载体中。

[0972] 为了测试配体依赖性IL15-IL15Ra产生,将100万个HEK-293T细胞铺板于6孔板中的含有DMEM和10%FBS的生长培养基中,并在37℃、5%CO₂下孵育过夜。然后使用Lipofectamine 2000用100ng组成型IL15-IL15Ra(OT-IL15-008)或DD连接的IL15-IL15Ra(OT-IL15-037或OT-IL15-040)转染细胞,并孵育24小时。孵育之后,将培养基换成具有或不具有50 μ M甲氧苄啶(TMP)的生长培养基,并进一步孵育48小时。收获细胞,并且使用人IL15抗体(Abcam,Cambridge,UK)通过蛋白质印迹分析IL15水平。OT-IL15-037和OT-IL15-040中IL15Ra的分子量似乎与OT-IL15-008相同。

[0973] 为了测试IL15是否脱落培养基中,对来自表达IL15-IL15Ra融合构建体的HEK293细胞的上清液进行免疫测定诸如MSD(Rockville,Maryland)。转染之后48小时,对细胞进行分析,并且如所预期的,组成型IL15-IL15Ra构建体OT-IL15-008在存在和不存在配体的情况下均显示IL15的高表面表达。OT-IL15-037和OT-IL15-040显示IL15和IL15Ra的配体(甲氧苄啶)依赖性表面表达(图41)。在上清液中膜结合的IL15-IL15Ra融合构建体的检测表明,IL15构建体可能从细胞表面脱落。

[0974] 实施例47. 体外暴露于TMP对膜结合IL15表达的影响

[0975] 为了确定体外暴露于TMP的剂量和时间是否影响膜结合IL15的表达,用表达OT-IL15-073的T细胞进行了体外剂量应答研究。为此,在24孔板中以3:1的珠粒与T细胞的比率用CD3/CD28珠粒活化T细胞。向孔中添加慢病毒。24小时之后,每2-3天添加新鲜培养基以扩增细胞,同时将细胞维持在 $0.5-1 \times 10^6/\text{ml}$ 。在扩增的第11天。用以100uM开始、10x并且9个点的TMP处理T细胞,并且在培养2小时(添加TMP之后洗涤3x,添加不具有TMP的新鲜培养基持续22小时)、培养6小时或培养24小时时候进行分析,并且结果显示于图42A中。如图42B和表33所示,这项研究显示,TMP配体调控膜结合IL15表达,并且体外暴露于TMP的剂量和时间影响膜结合IL15表达。

[0976] 表33. 膜结合IL15表达

TMP 处理	EC50, uM(IL15+IL15Ra+%)	EC90, uM(IL15+IL15Ra+%)	EC50, uM(总IL15 MFI)	EC90, uM(总IL15 MFI)
24 小时	0.035	0.255	0.063	0.75
[0977] 24 小时(在 2 小时的时候洗涤)	11.5	59.6	11.1	66.9
6 小时	0.021	0.81	0.030	0.88

[0978] 实施例48. 体内调控的膜结合IL15表达

[0979] 为了评估体内膜结合IL15的调控,选择了两种构建体用于体内评估。将四组T细胞用于这项研究,并概述于表34。在表31中,“N”表示每组中的小鼠数。

[0980] 表34. T细胞组

组	N	T 细胞	处理
1	4	未转导	-
2	4	OT-IL15-071(pELNS 载体, EF1a 启动子, OT-IL15-008 的膜结合 IL15 序列)	-
[0981] 3	4	OT-IL15-073(pELNS 载体, EF1a 启动子, OT-IL15-009 的膜结合 IL15 序列)	媒介物
4	4	OT-IL15-073(pELNS 载体, EF1a 启动子, OT-IL15-009 的膜结合 IL15 序列)	TMP

[0982] 转导之后6天、植入当天(转导之后9天)和转导之后13天,评估了待用作体内研究的一部分的T细胞,并且第2-4组中的细胞显示了构建体的表达。

[0983] 通过静脉内施用向小鼠施用表31中所概述的T细胞(每只小鼠植入 3.9×10^6 个细胞)。在第3天,将小鼠给药500mg/kg的TMP 3次(两次给药之间间隔4小时)并且在每次给药之后2小时放血。在第4天,在第一次TMP给药之后24小时再次将小鼠放血。

[0984] 图43A至图43C使用IL15染色(图43A)、IL15Ra染色(图43B)和IL15/IL15Ra双++染色(图43C)显示了在第一次TMP给药之后2、6、10和24小时膜结合IL15的表达。图43D为第一次TMP给药之后10小时每只小鼠的FACS图。图43E显示在第一次TMP给药之后2、6、10和24小时血液中膜结合IL15的表达,并且图43F显示在第一次TMP给药之后2、6、10和24小时的血浆TMP水平。

[0985] 实施例49.长期腹膜内 (IP) 或口服 (PO) TMP给药对T细胞功能的影响

[0986] 在这项研究中,向小鼠静脉内施用用OT-IL15-071或OT-IL15-073(无lentiBoost)转导的T细胞(每只小鼠 15×10^6 个)。这项研究评估了6个研究组:(1)未转导;(2)OT-IL15-071 T细胞;(3)OT-IL15-073 PO媒介物;(4)OT-IL15-073 PO TMP 500mg/kg;(5)OT-IL15-073 IP媒介物;和(6)OT-IL15-073 IP TMP 300mg/kg。研究设计在表35中示出。PO给药为0.1M柠檬酸盐中的500mg/kg TMP,并且IP给药是水中的300mg/kg TMP乳酸盐。

[0987] 表35.研究设计

时间点	剂量	样本收集
第-3天	通过IV施用注射T细胞	-
第0天	PO 1x 或 IP 1x	-
4小时	PO 1x	-
[0988] 6小时	-	放血(存活)
24小时	PO 2x 或 IP 1x	放血(存活)
第2天	PO 1x 或 IP 1x	-
第3天	PO 1x 或 IP 1x	-
第4天	PO 2x 或 IP 1x	-
120小时	PO 2x 或 IP 1x	放血(存活)
[0989] 126小时	-	放血(存活)
第6天	PO 2x 或 IP 1x	-
第7天	PO 2x 或 IP 1x	-
第8天	-	放血(存活)
第19天	-	放血(存活)
第25天	-	放血(终止)

[0990] 在第一次给药之后6小时和24小时,以及在第五次给药之后6小时,分析血液中的调控表达。

[0991] OT-IL15-071显示膜结合IL15的表达,并且未转导的对照未显示任何表达。

[0992] 重复PO和IP给药观察到膜结合IL15的调控。如图44所示,在第0天第一次给药之后6小时和在第5天给药之后第6小时(126小时)用PO和IP给药都检测到了膜结合IL15的调控表达。用媒介物处理的小鼠中的表达没有增加。

[0993] 虽然已关于若干所描述的实施方案相当详细并相当具体地描述了本发明,但是并不预期本发明应限于任何所述细节或实施方案或任何具体实施方案,而是参考随附权利要求进行说明,以便考虑到现有技术提供所述权利要求的最广泛的可能解释,并且因此有效地涵盖本发明的预期范围。

[0994] 本文提到的所有出版物、专利申请、专利以及其他参考文献以引用的方式整体并入。当发生冲突时,以本说明书(包括定义)为准。另外,章节标题、材料、方法和实施例仅为示例性的并且不旨在具有限制性。

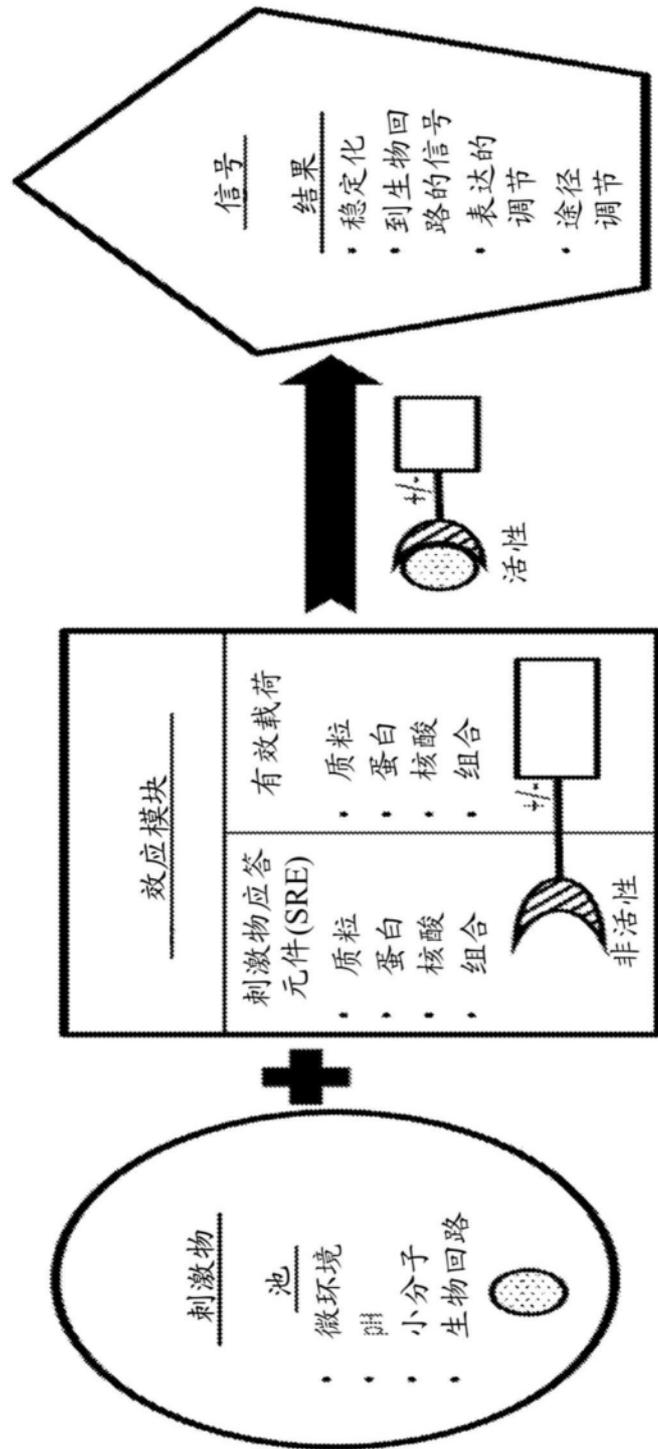


图1

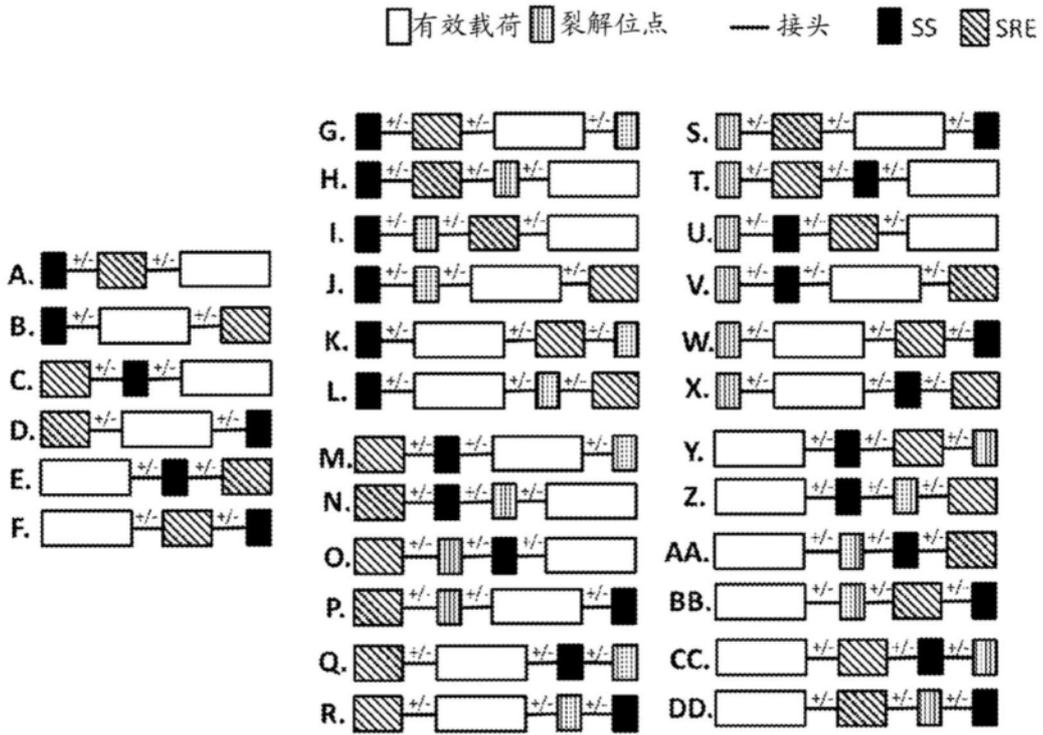


图2

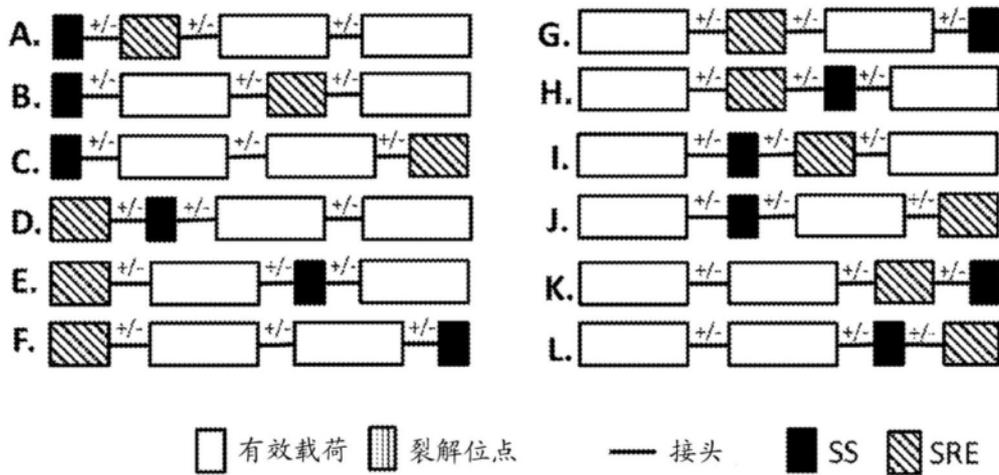


图3

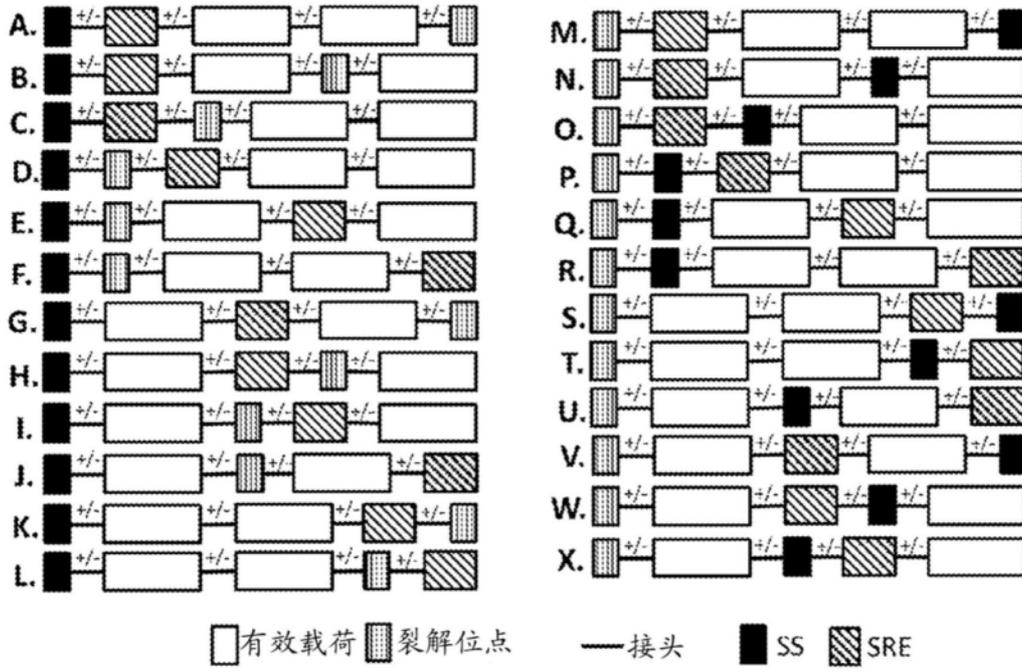


图4

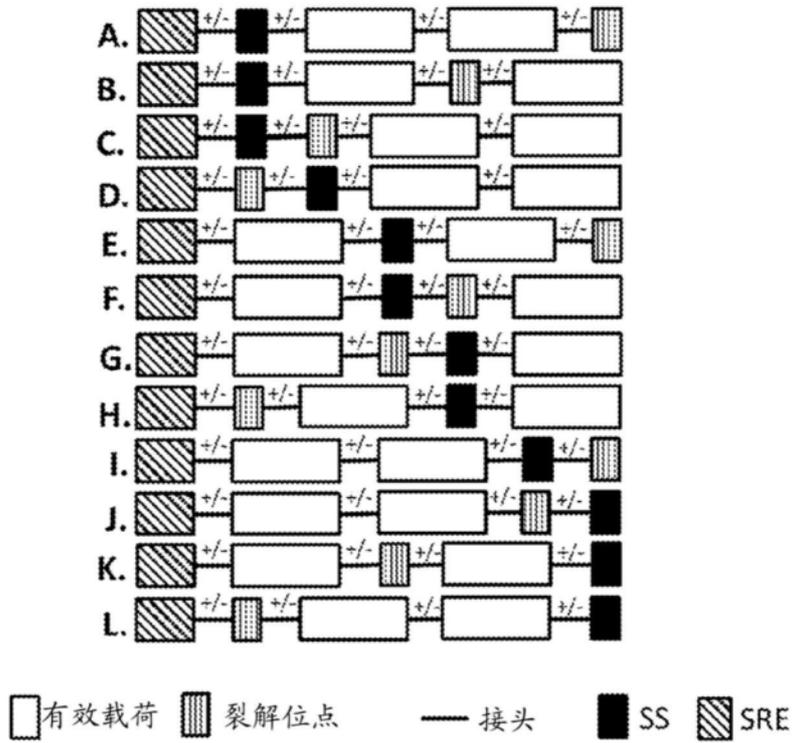


图5

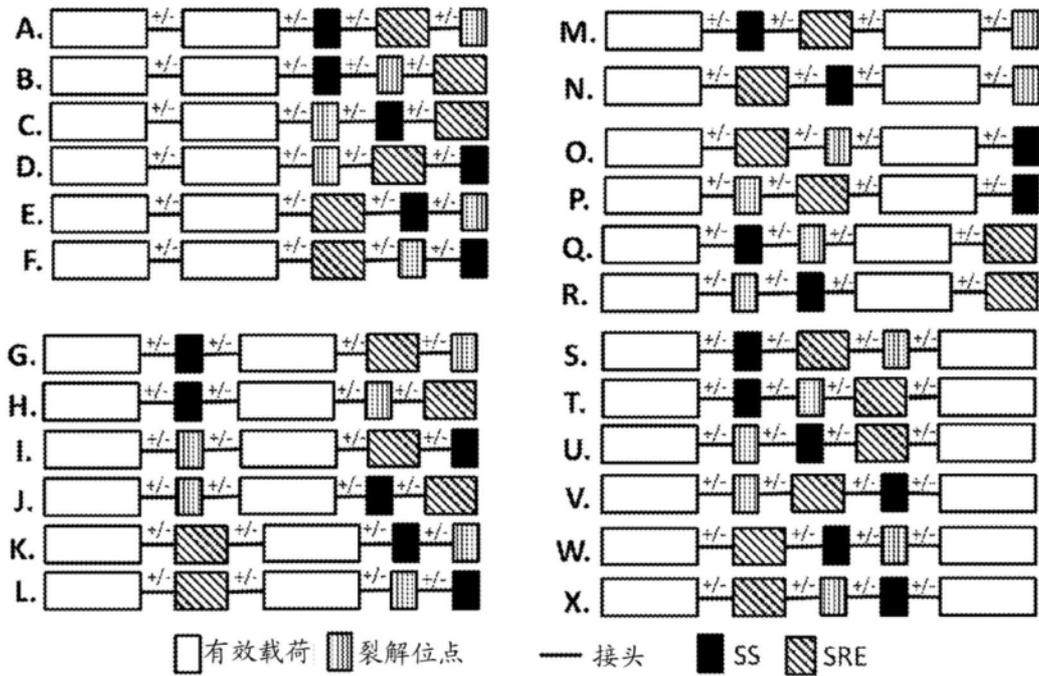


图6

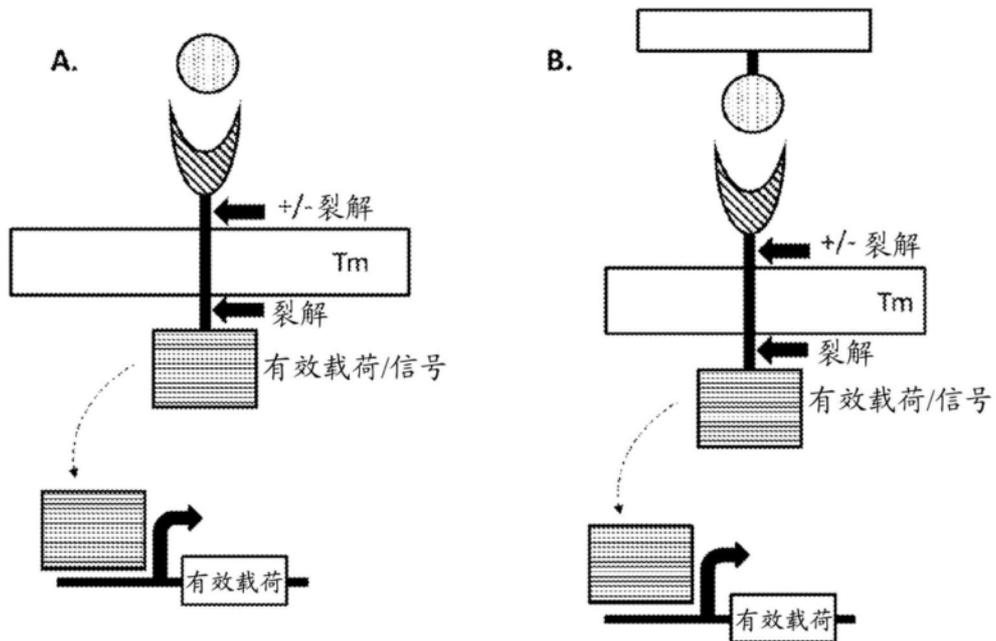


图7

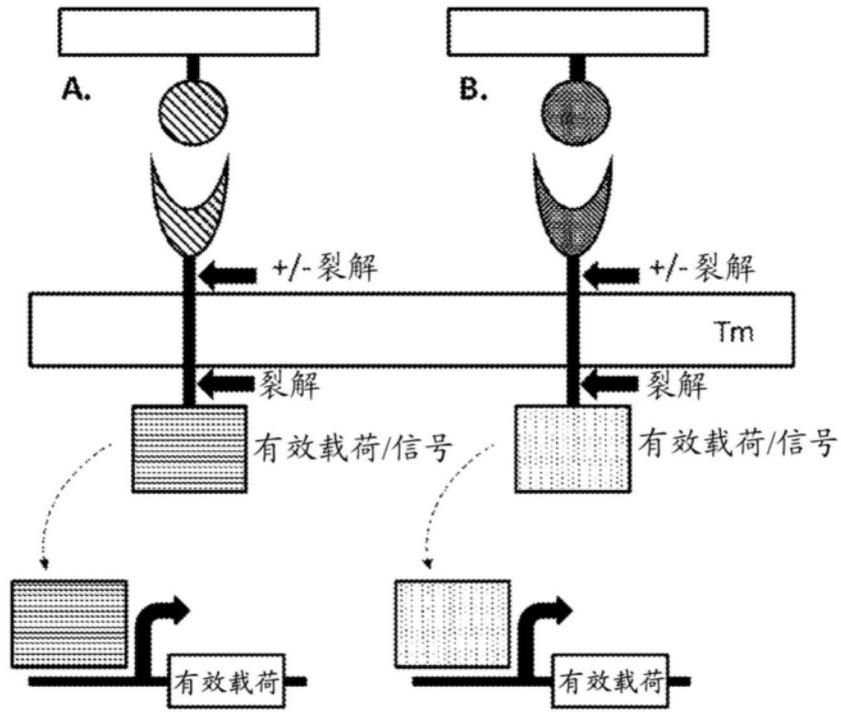


图8

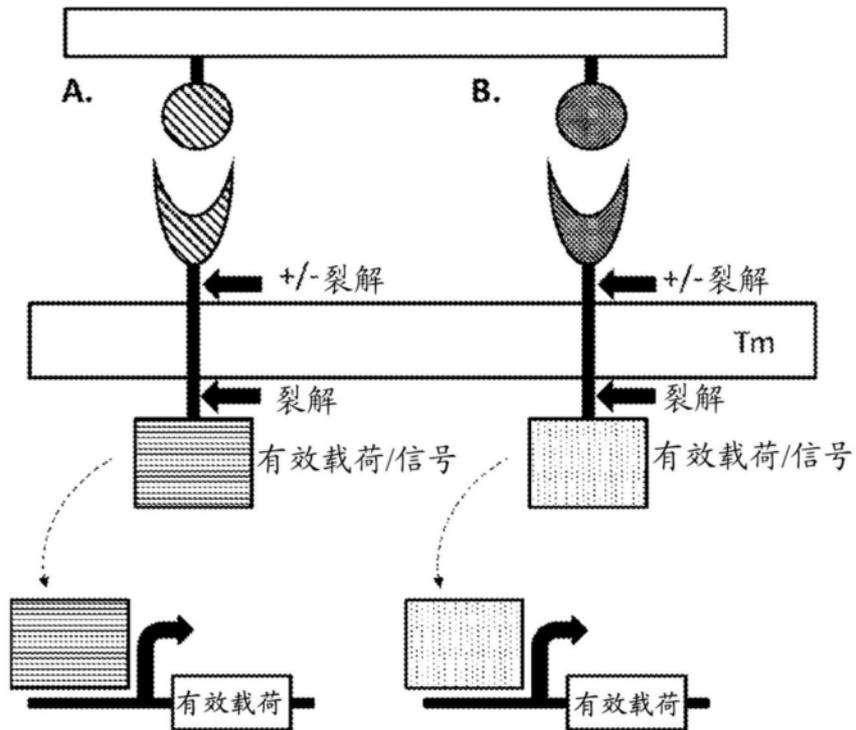


图9

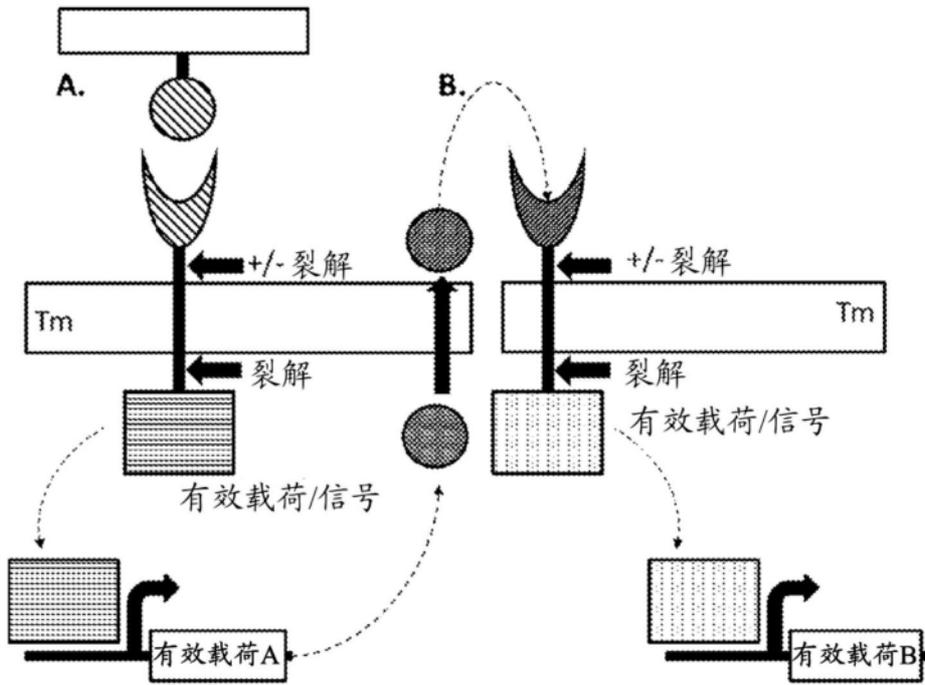


图10

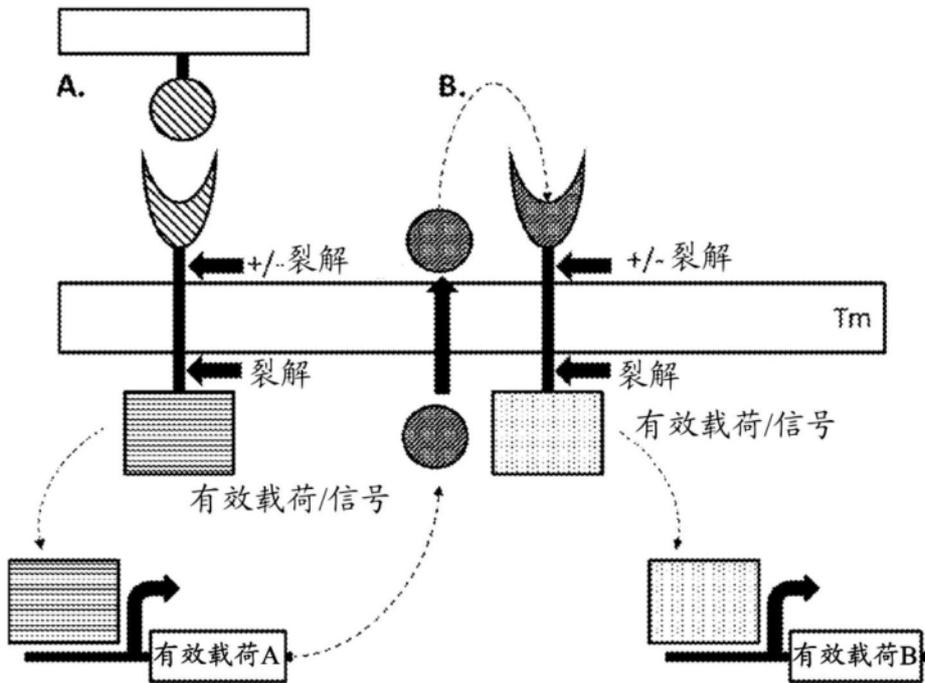


图11

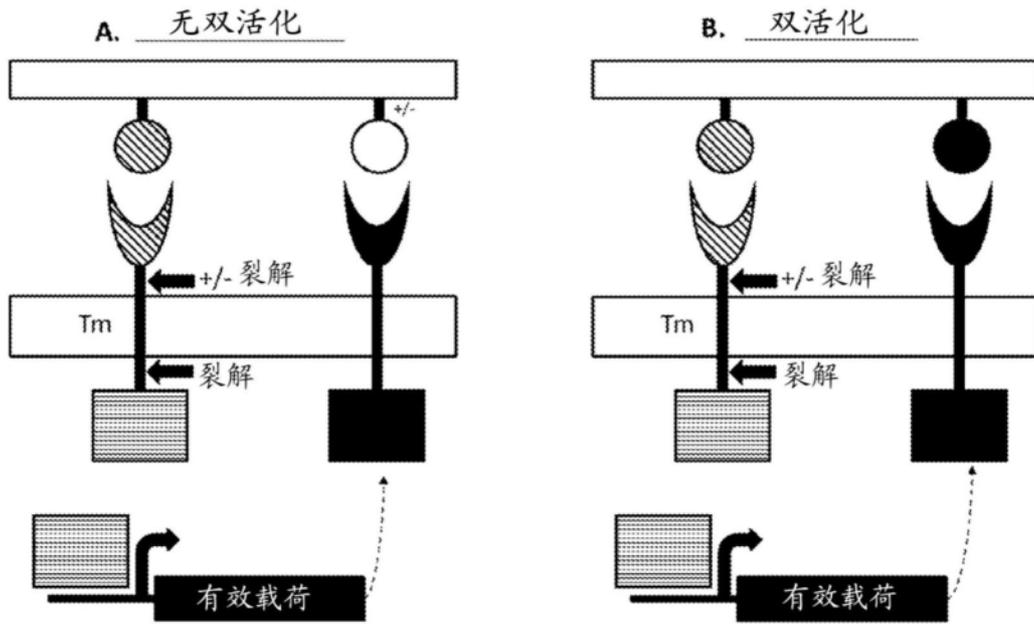


图12

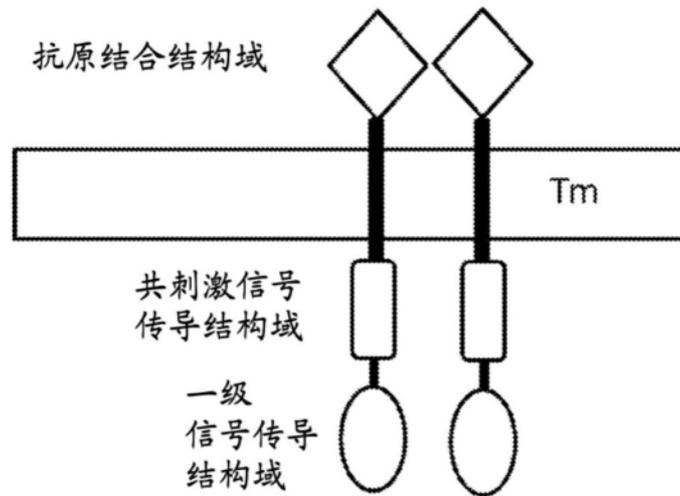


图13

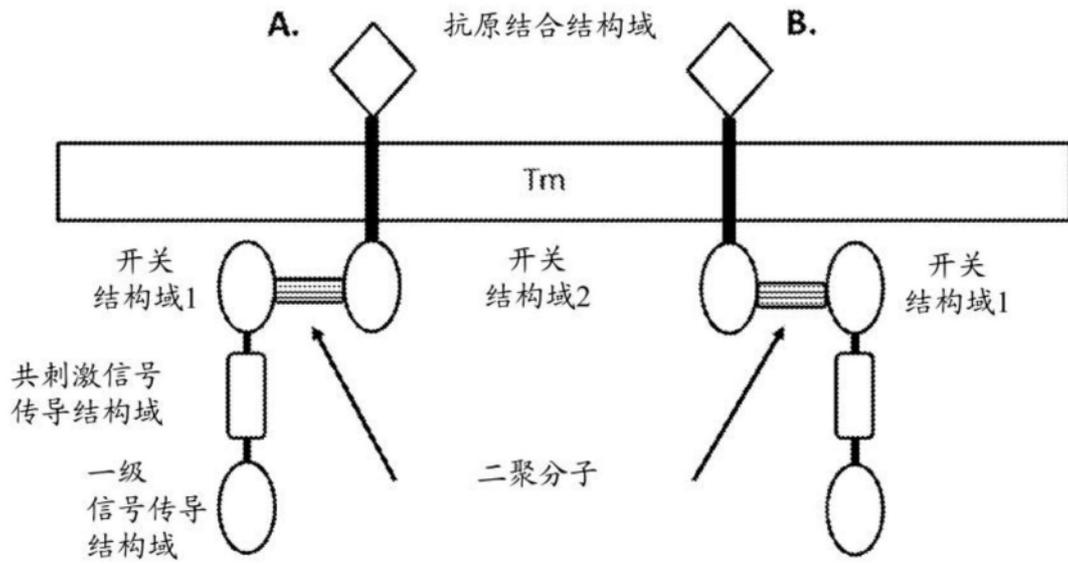


图14

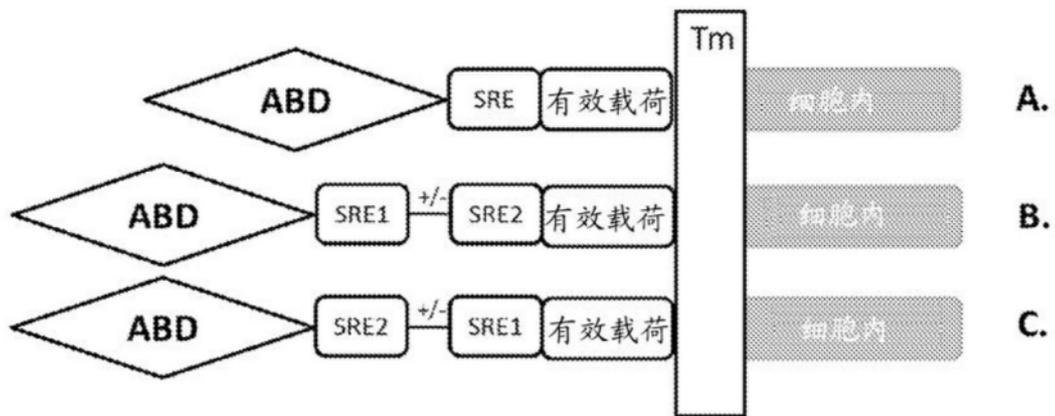


图15

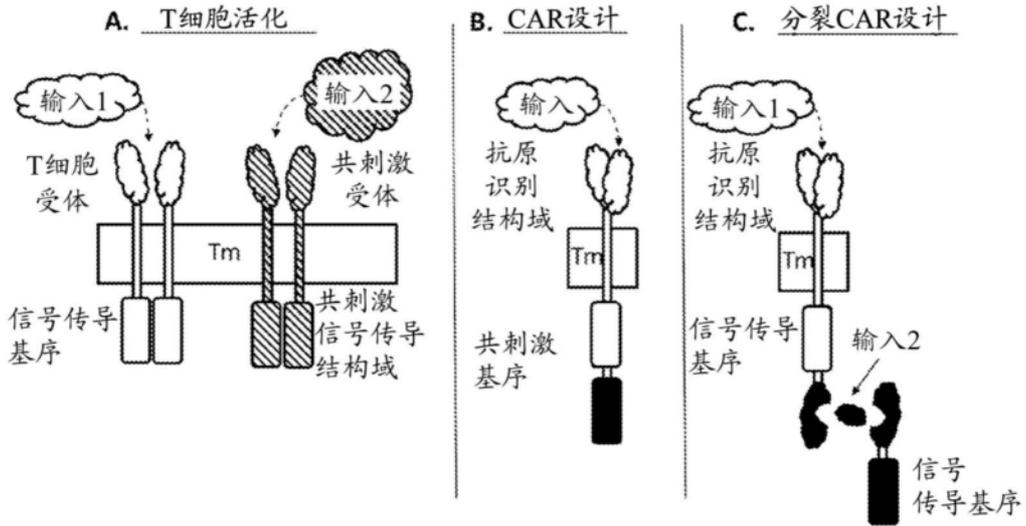


图16

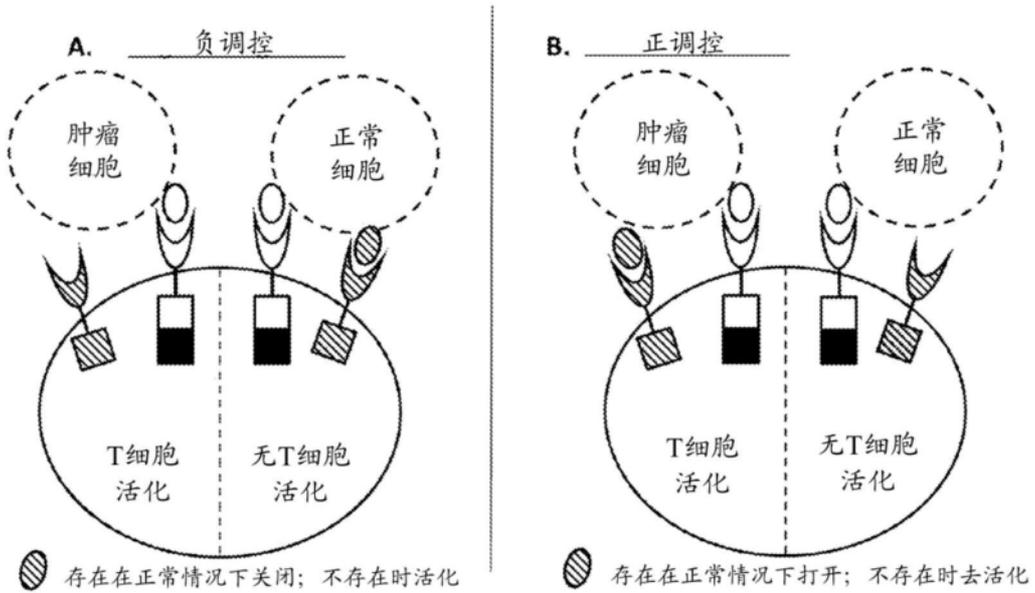


图17

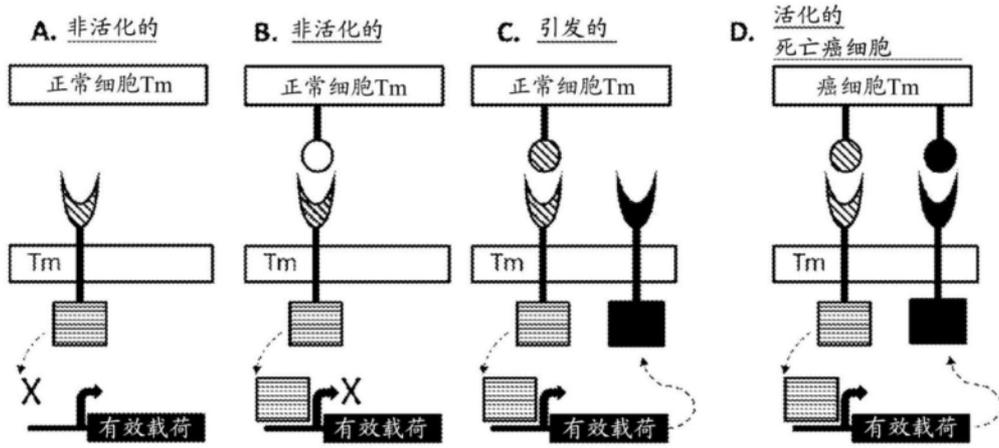


图18

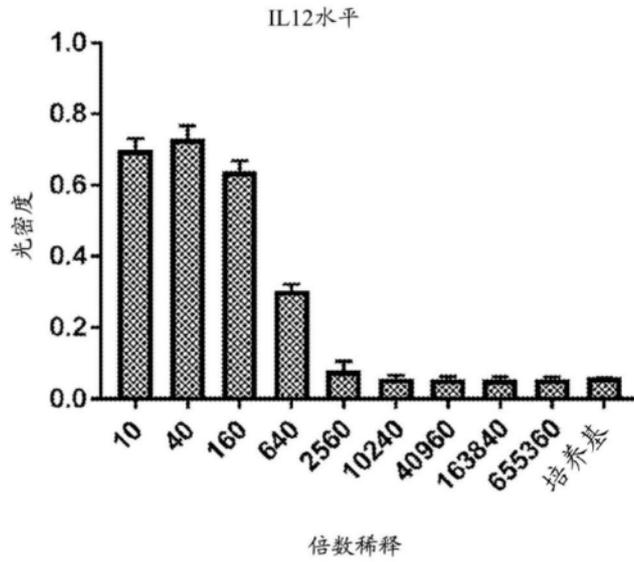


图19A

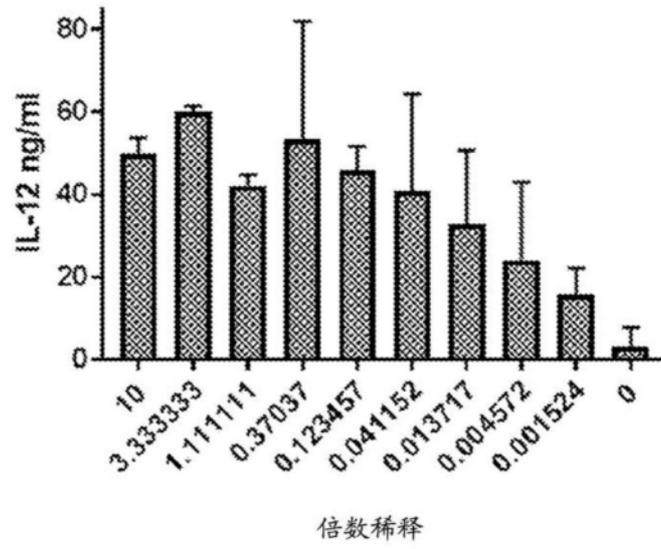


图19B

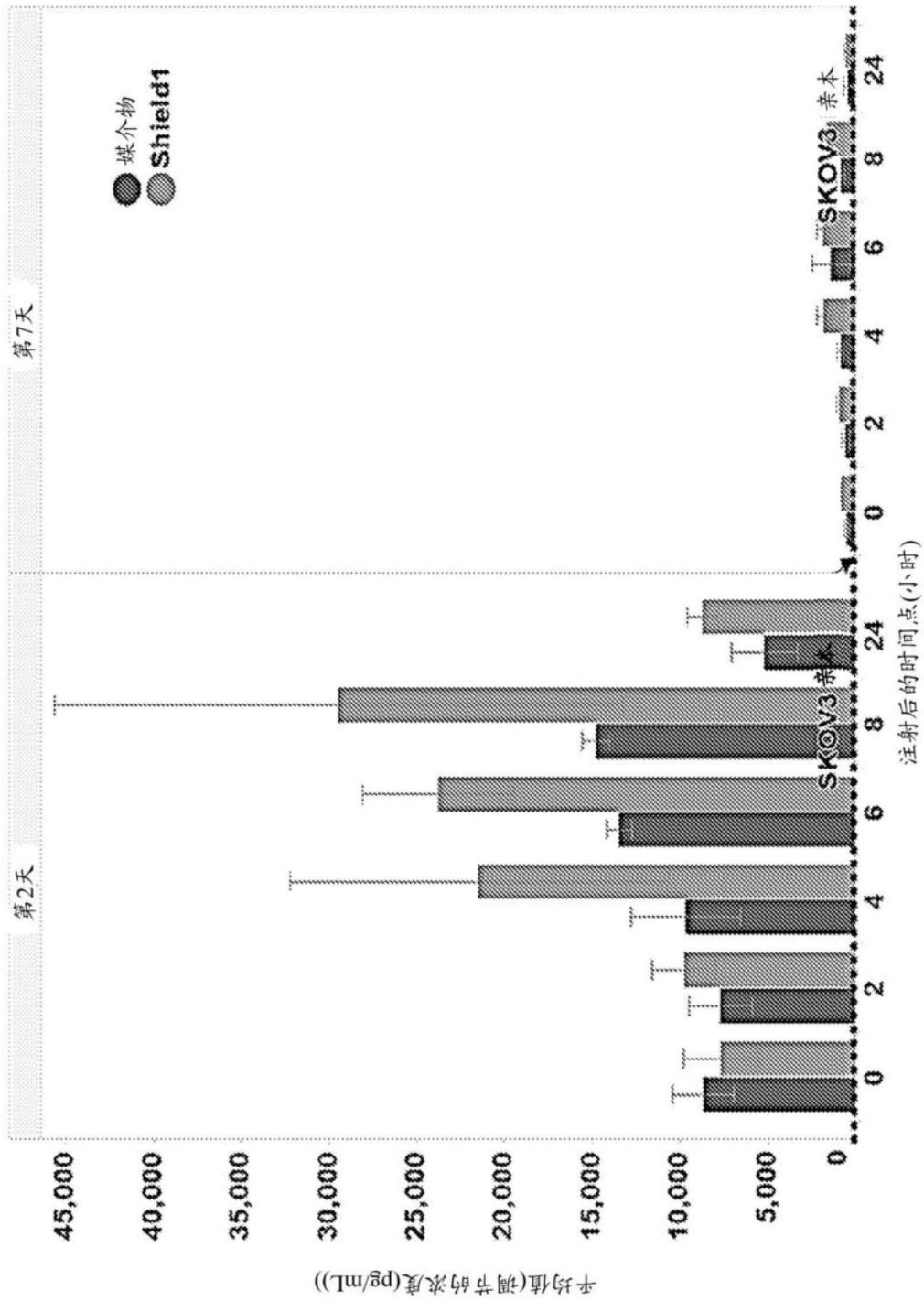


图19C

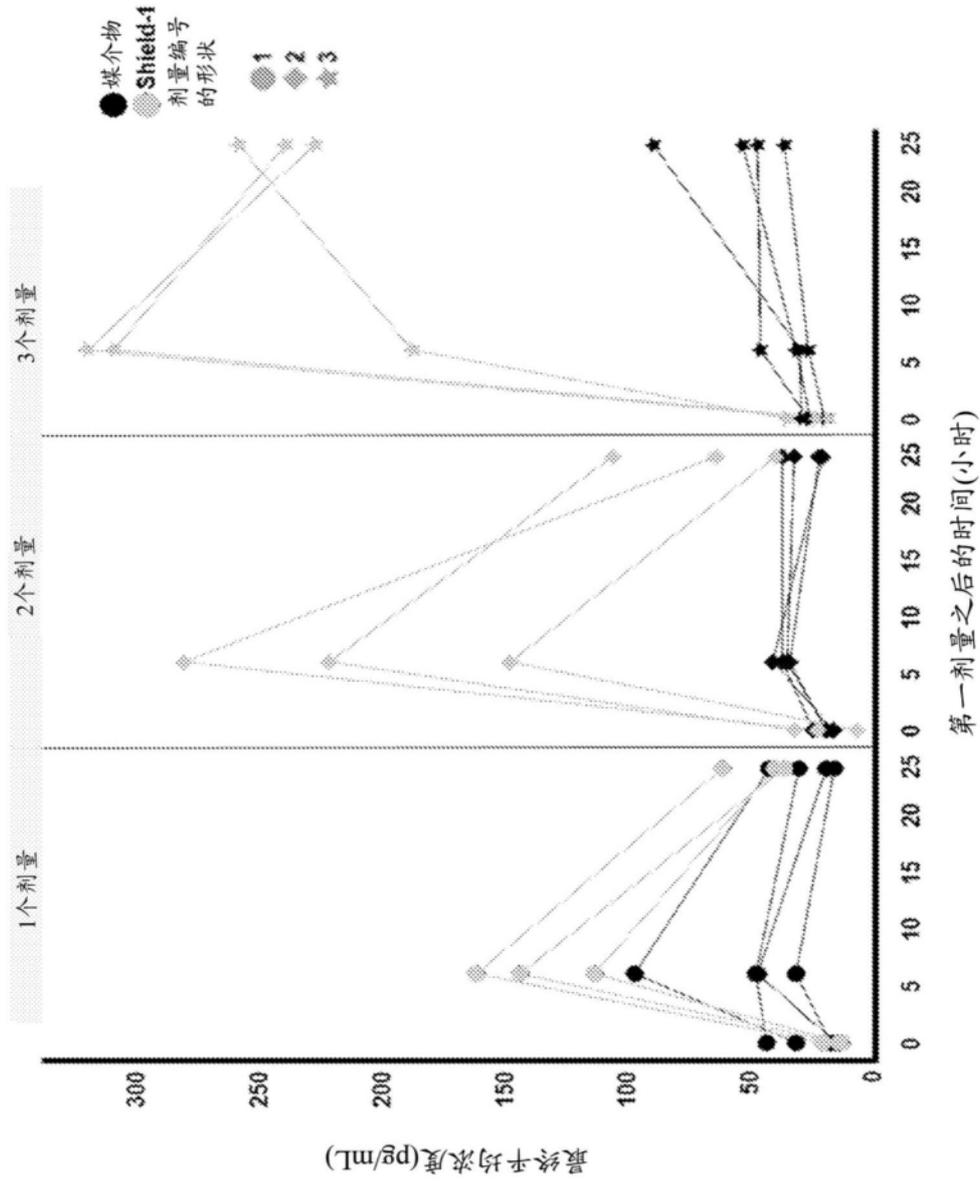


图19D

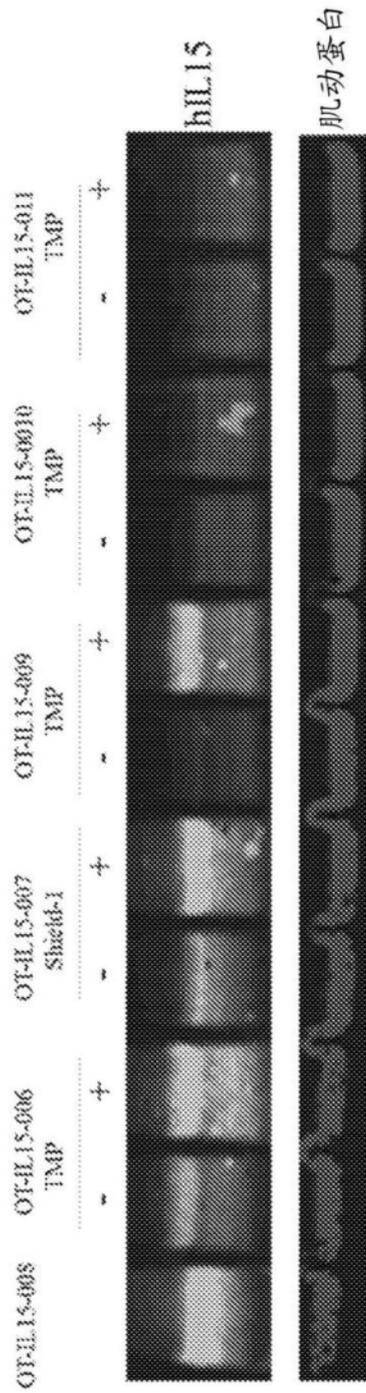


图20A

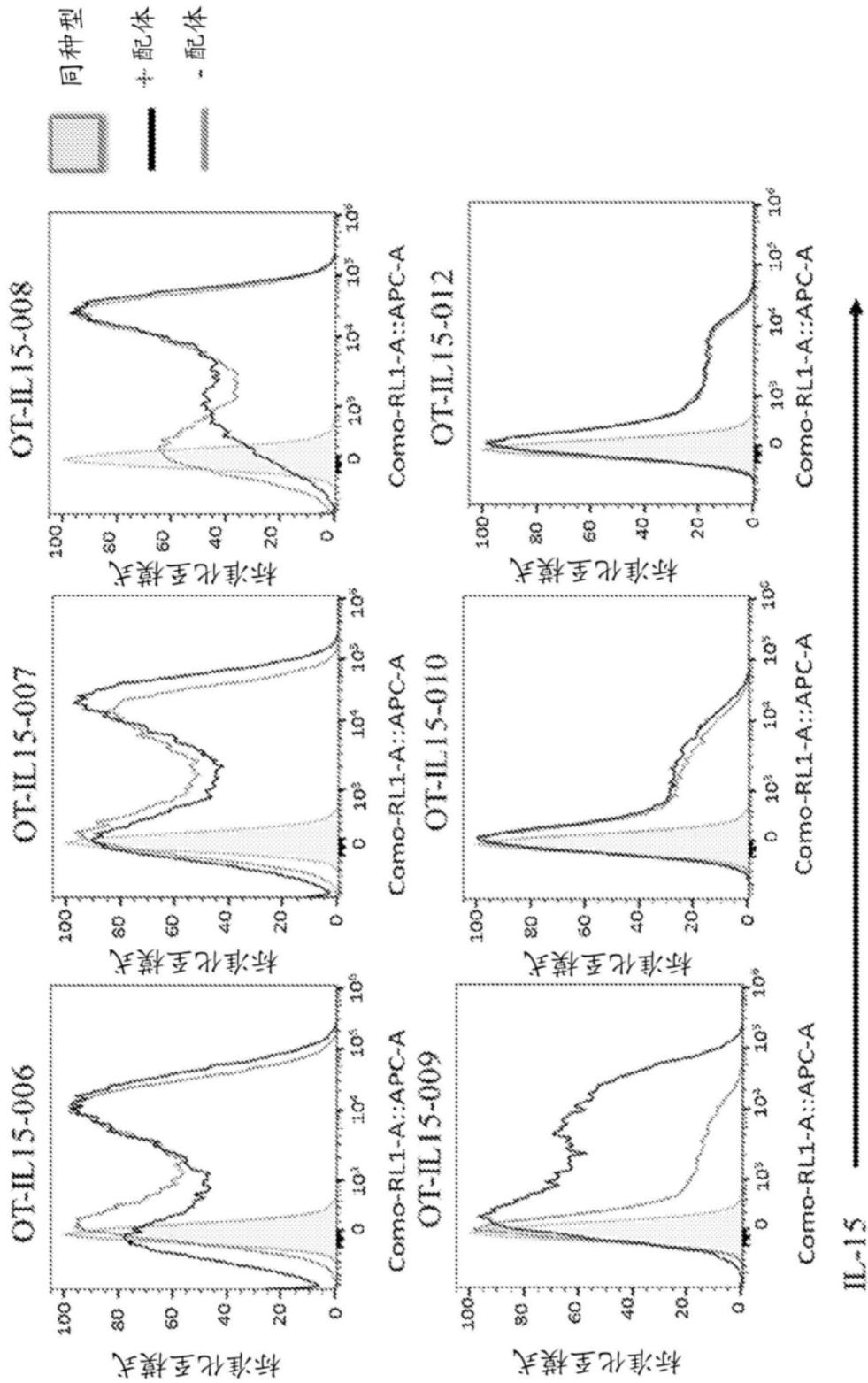


图20B

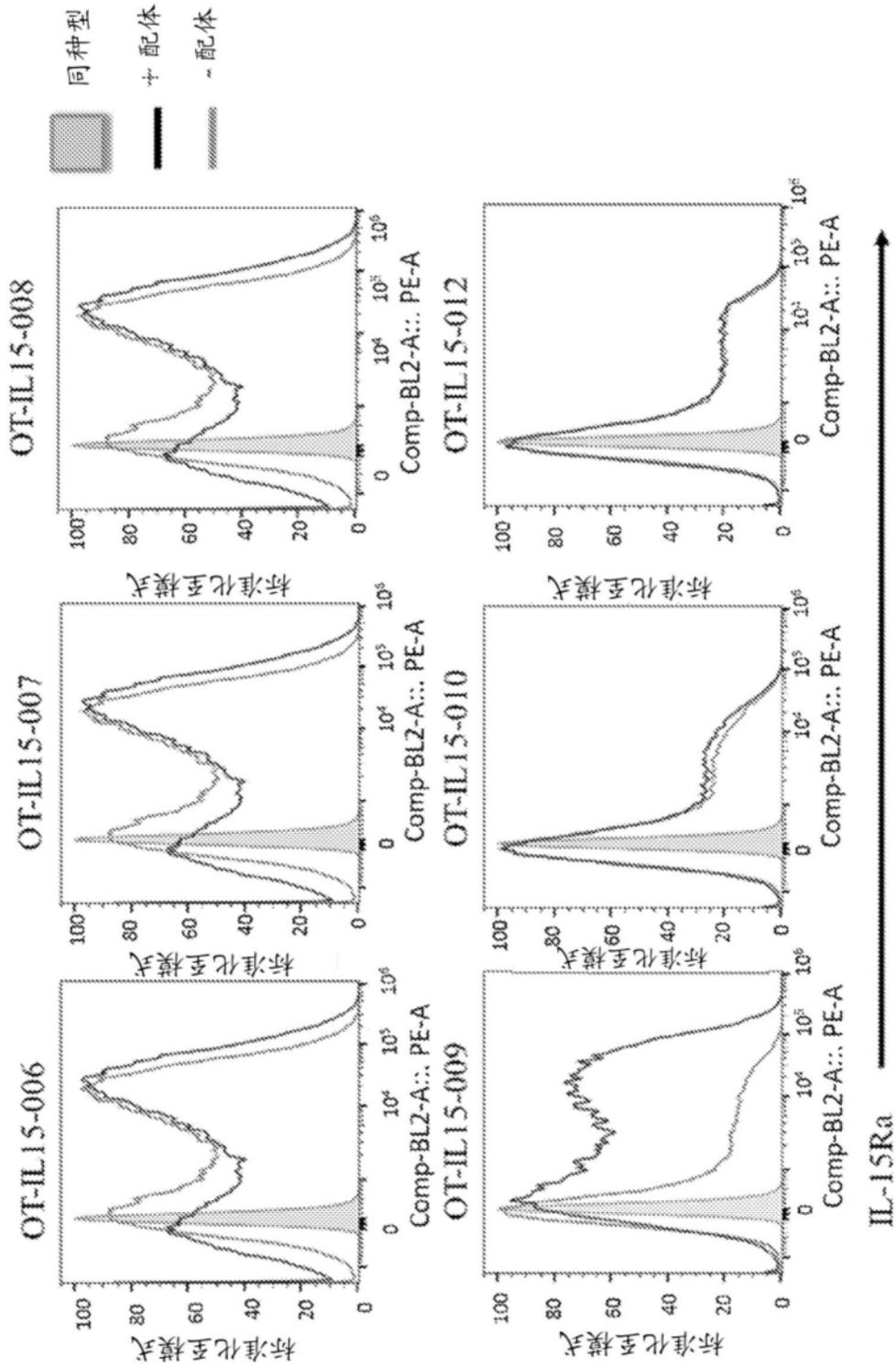


图20C

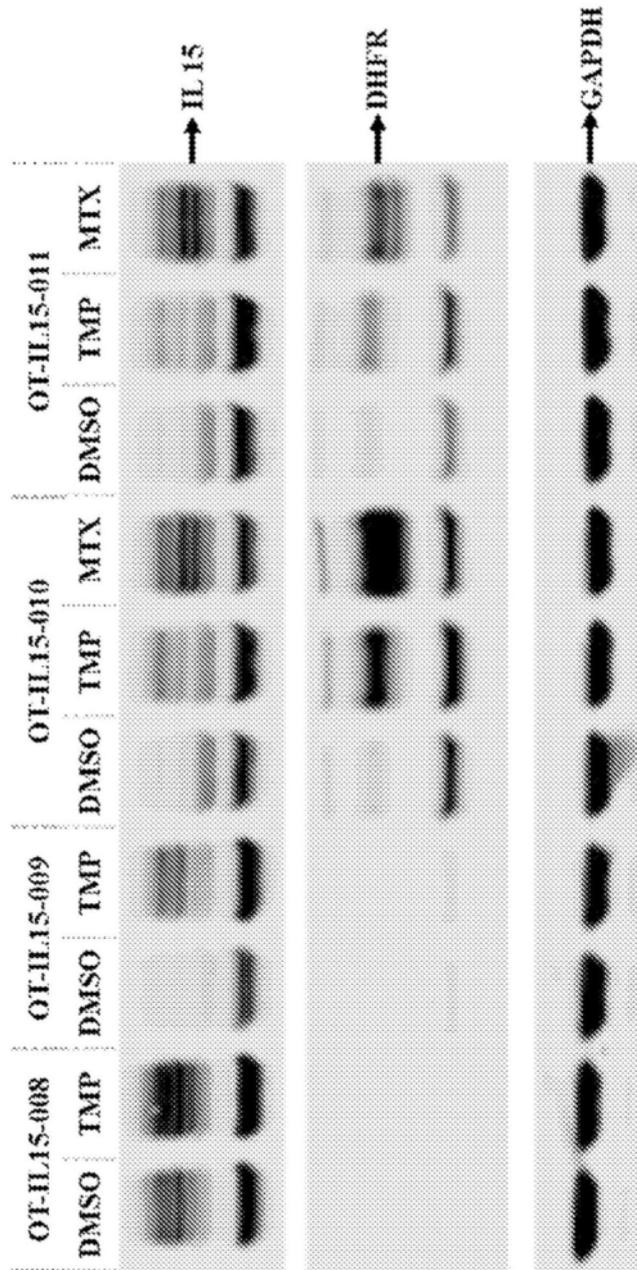


图20D

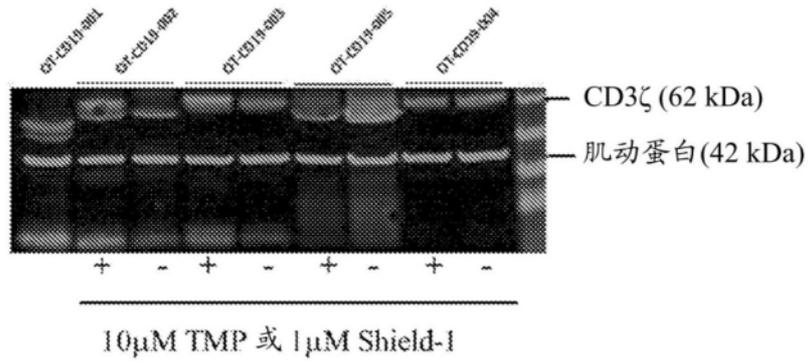


图21A

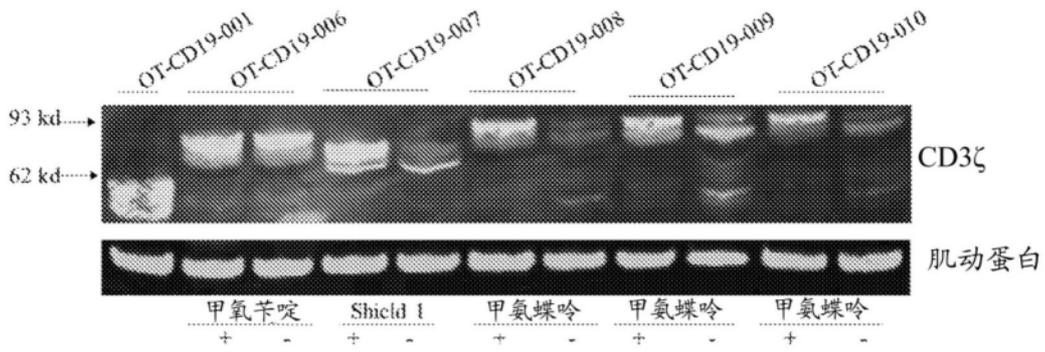


图21B

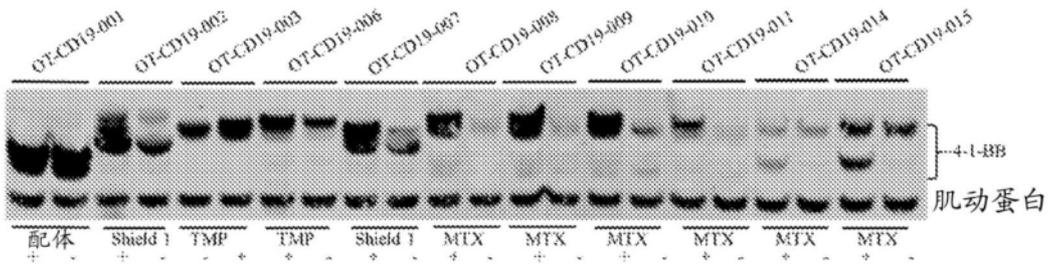


图21C

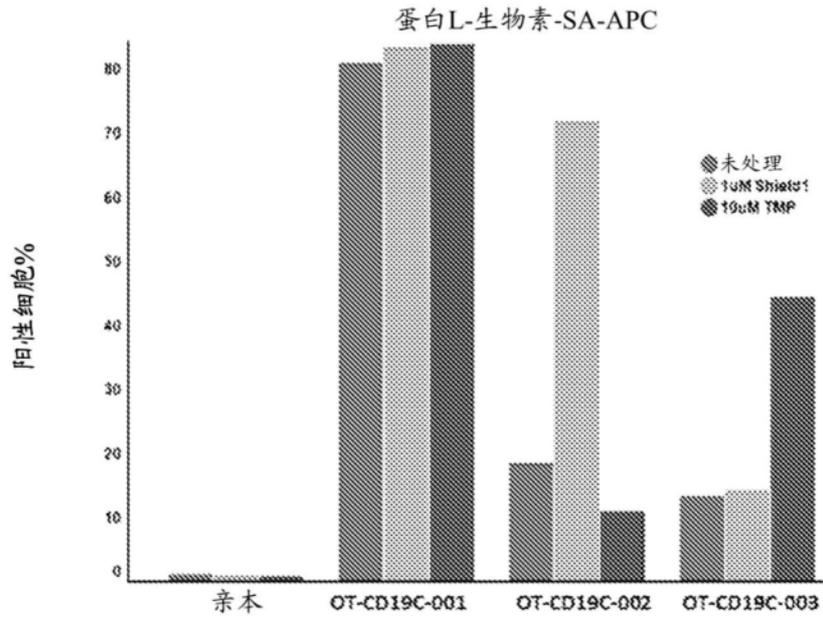


图21D

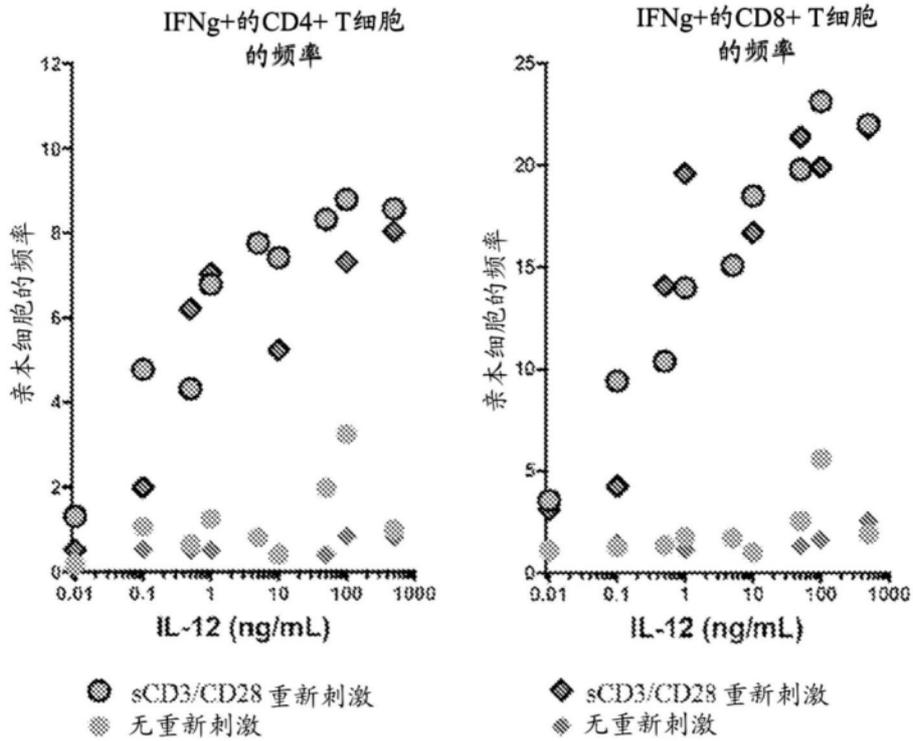


图22

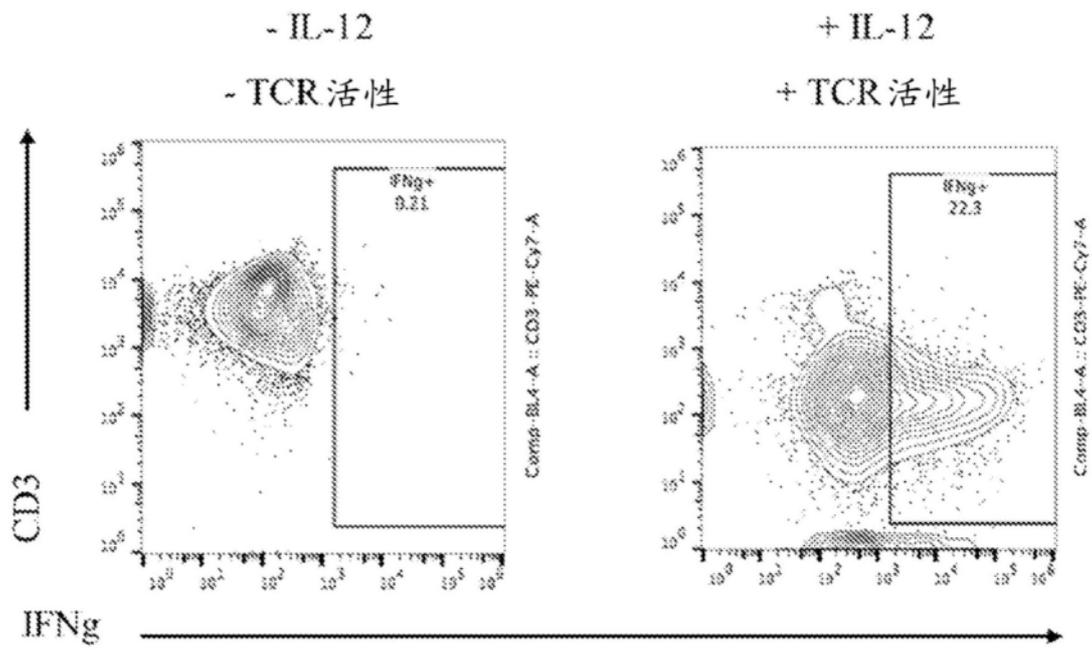


图23A

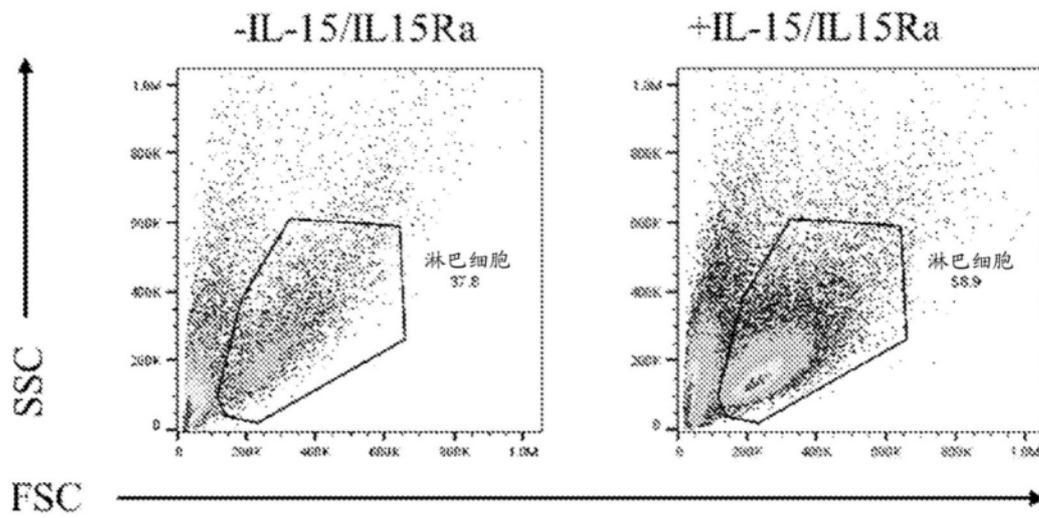


图23B

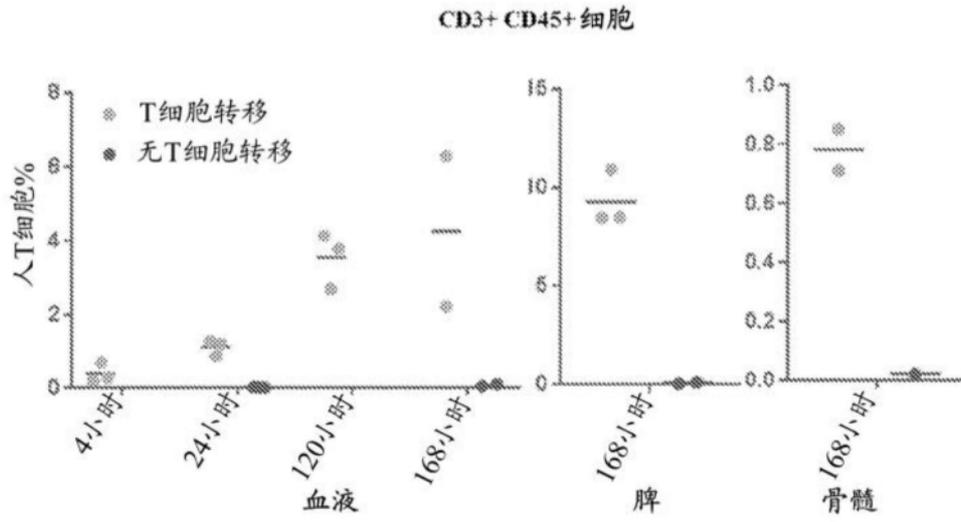


图23C

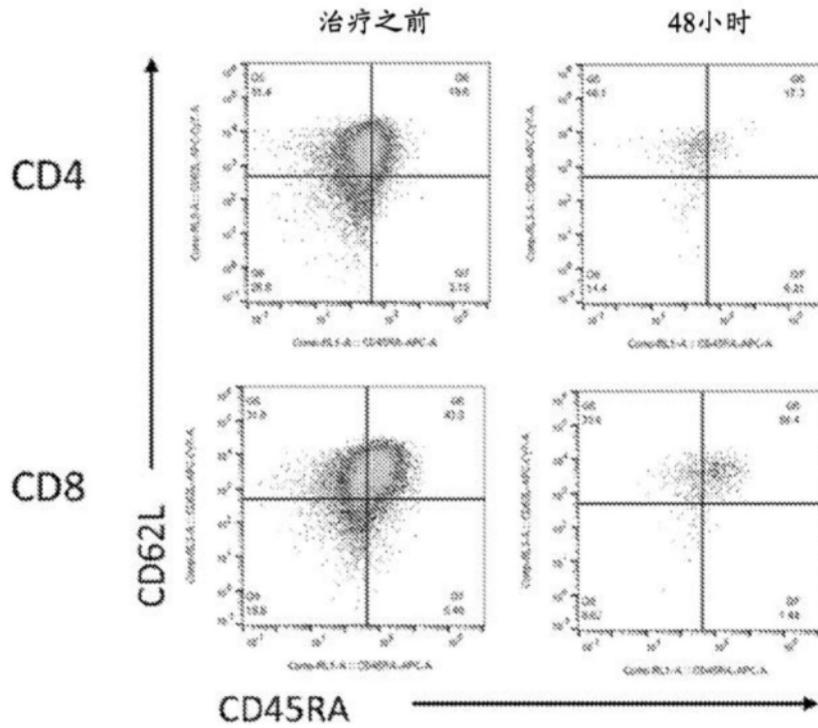


图23D

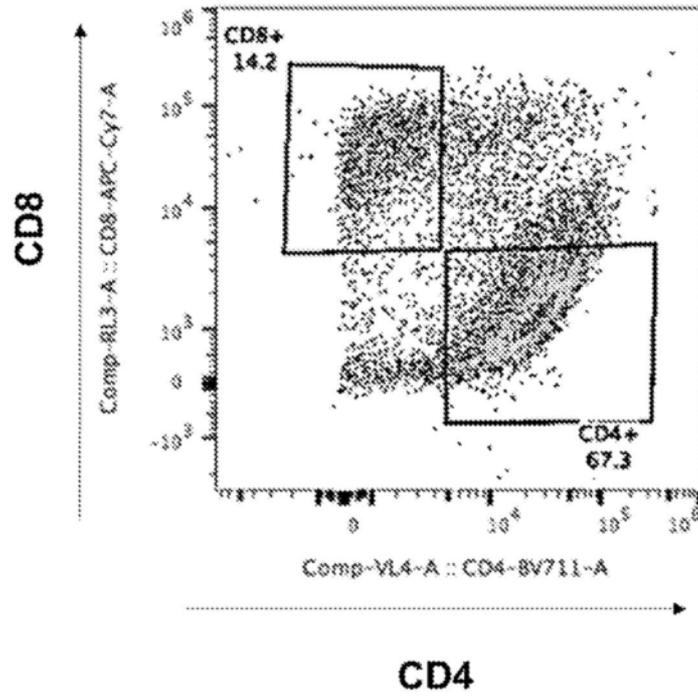


图24A

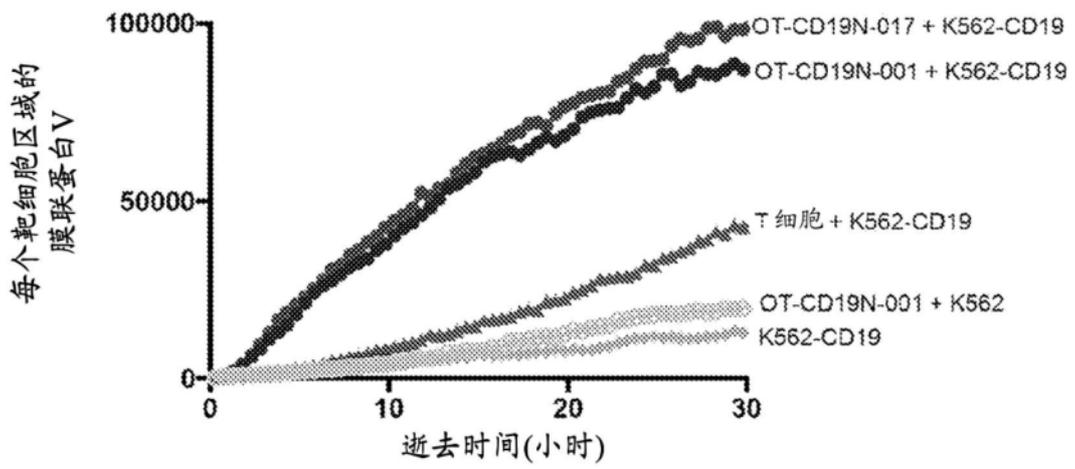


图24B

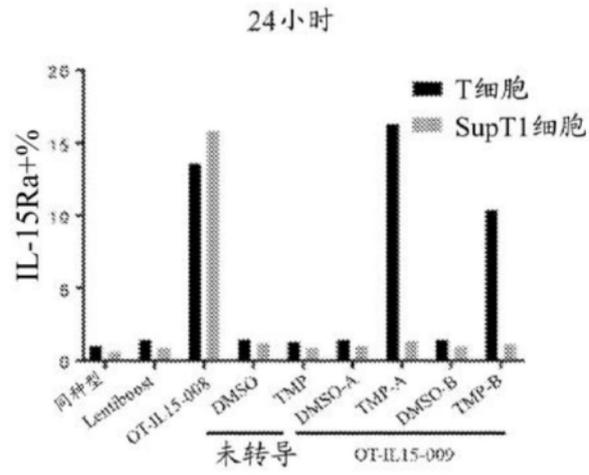


图25A

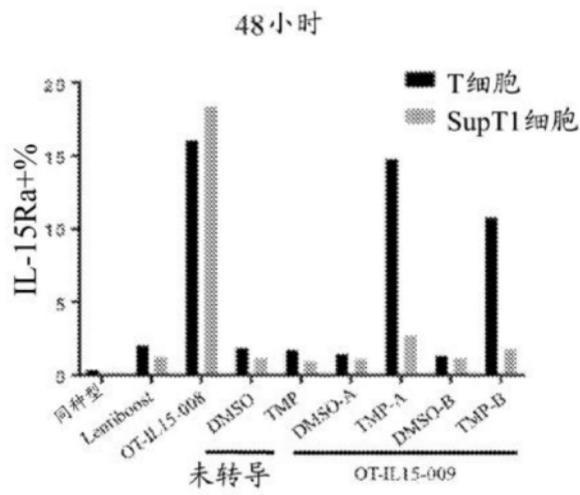


图25B

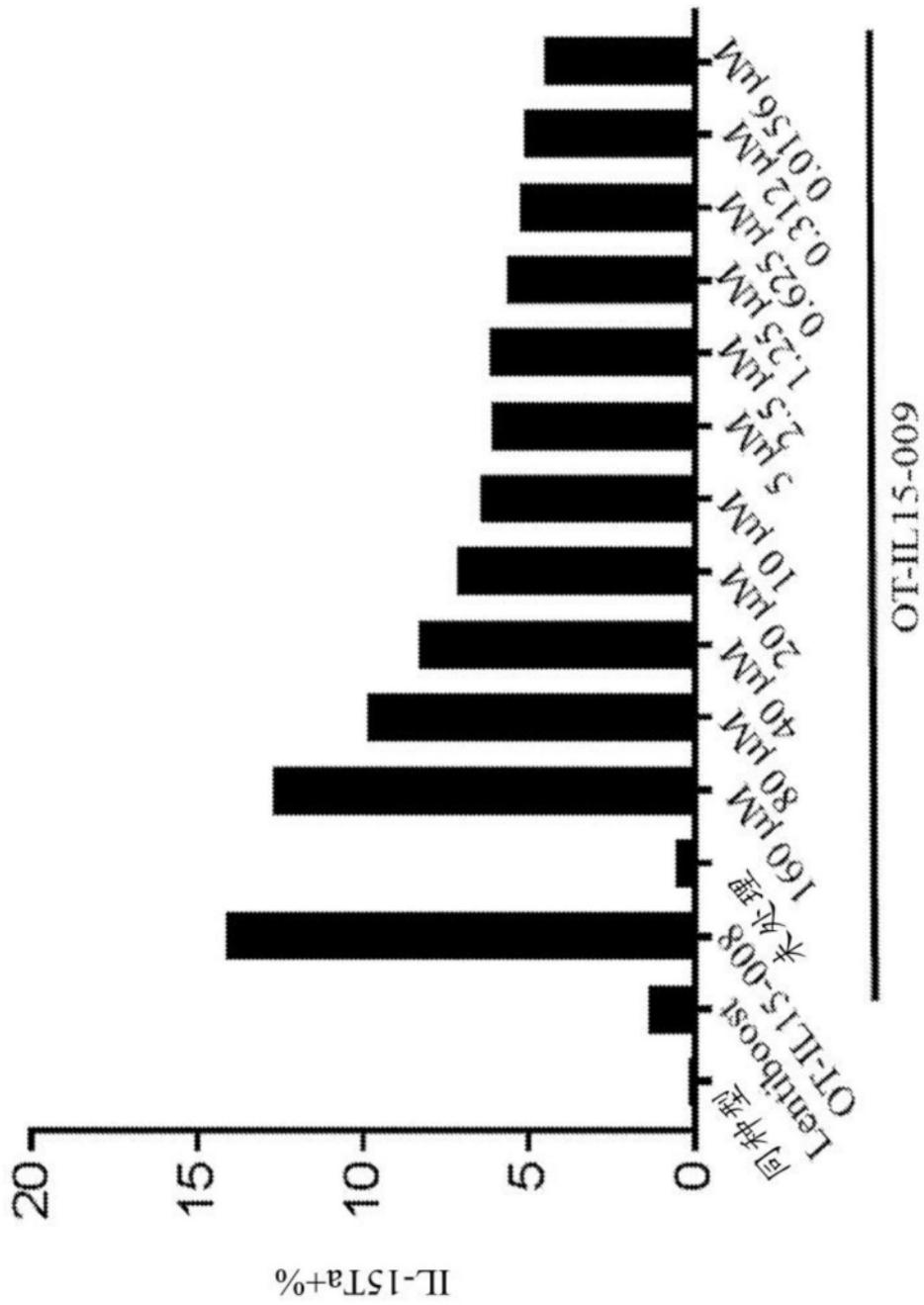


图25C

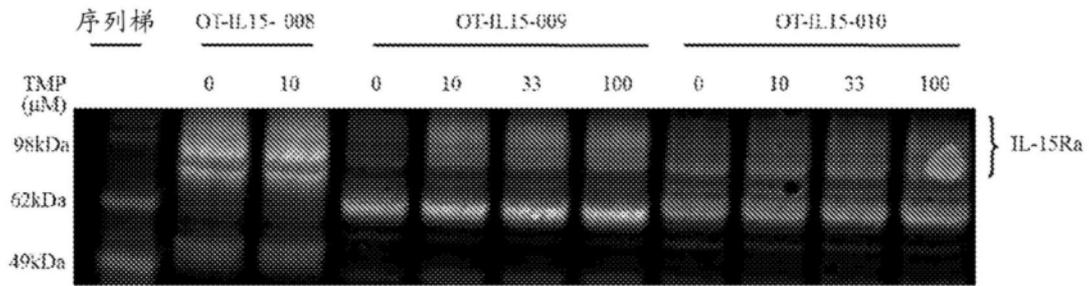


图26

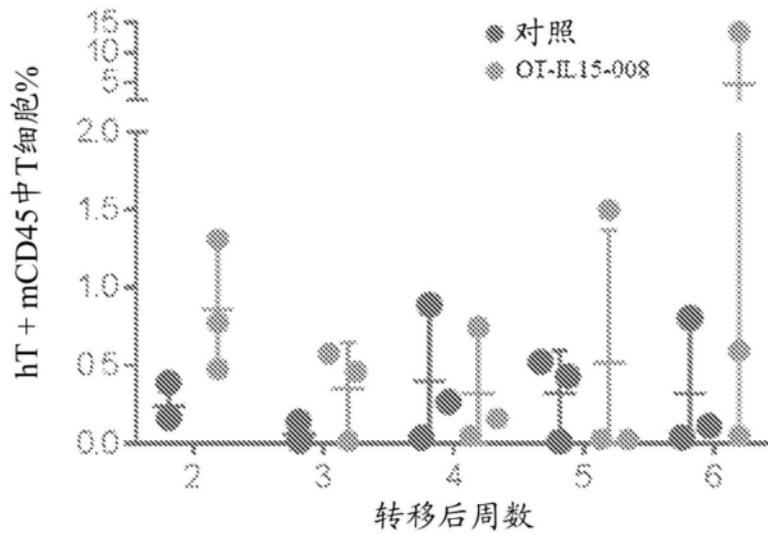


图27A

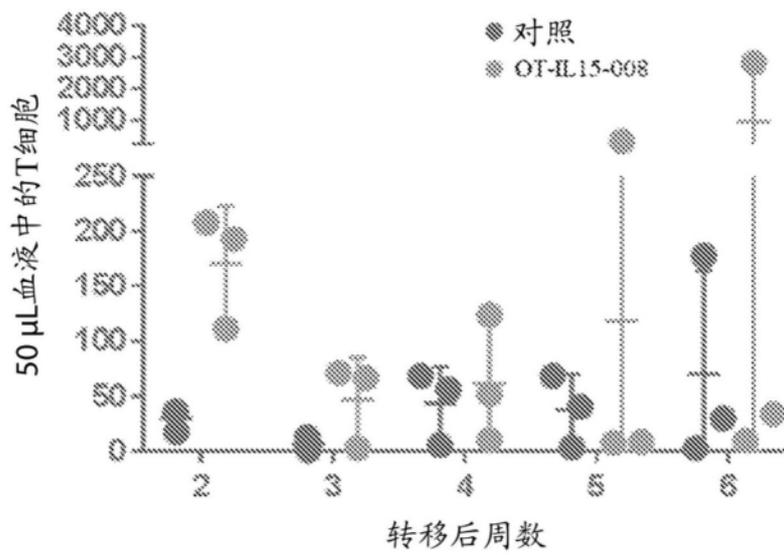


图27B

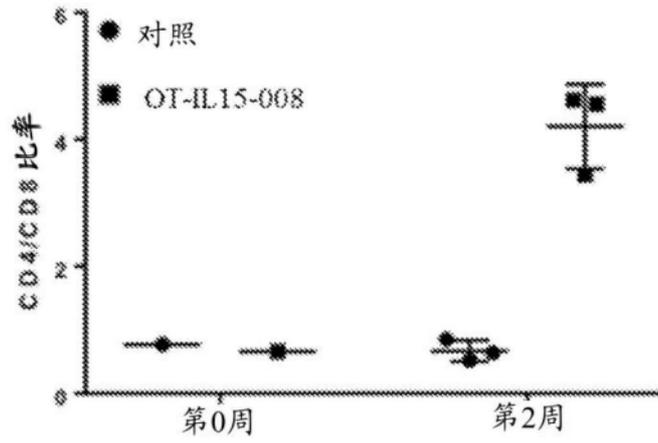


图27C

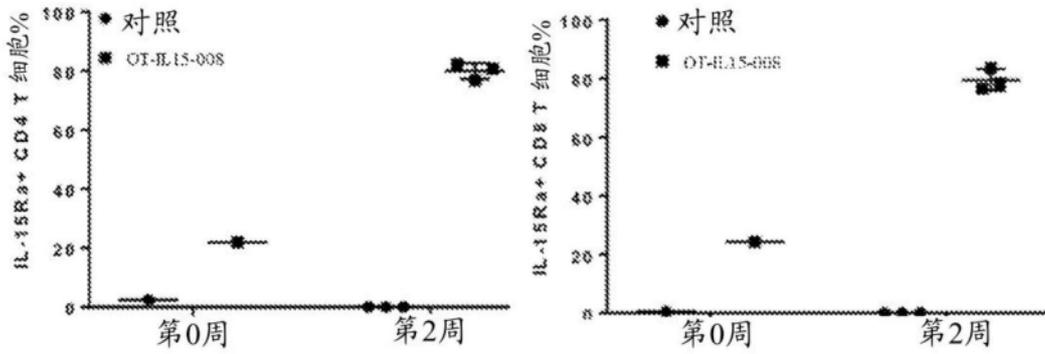


图27D

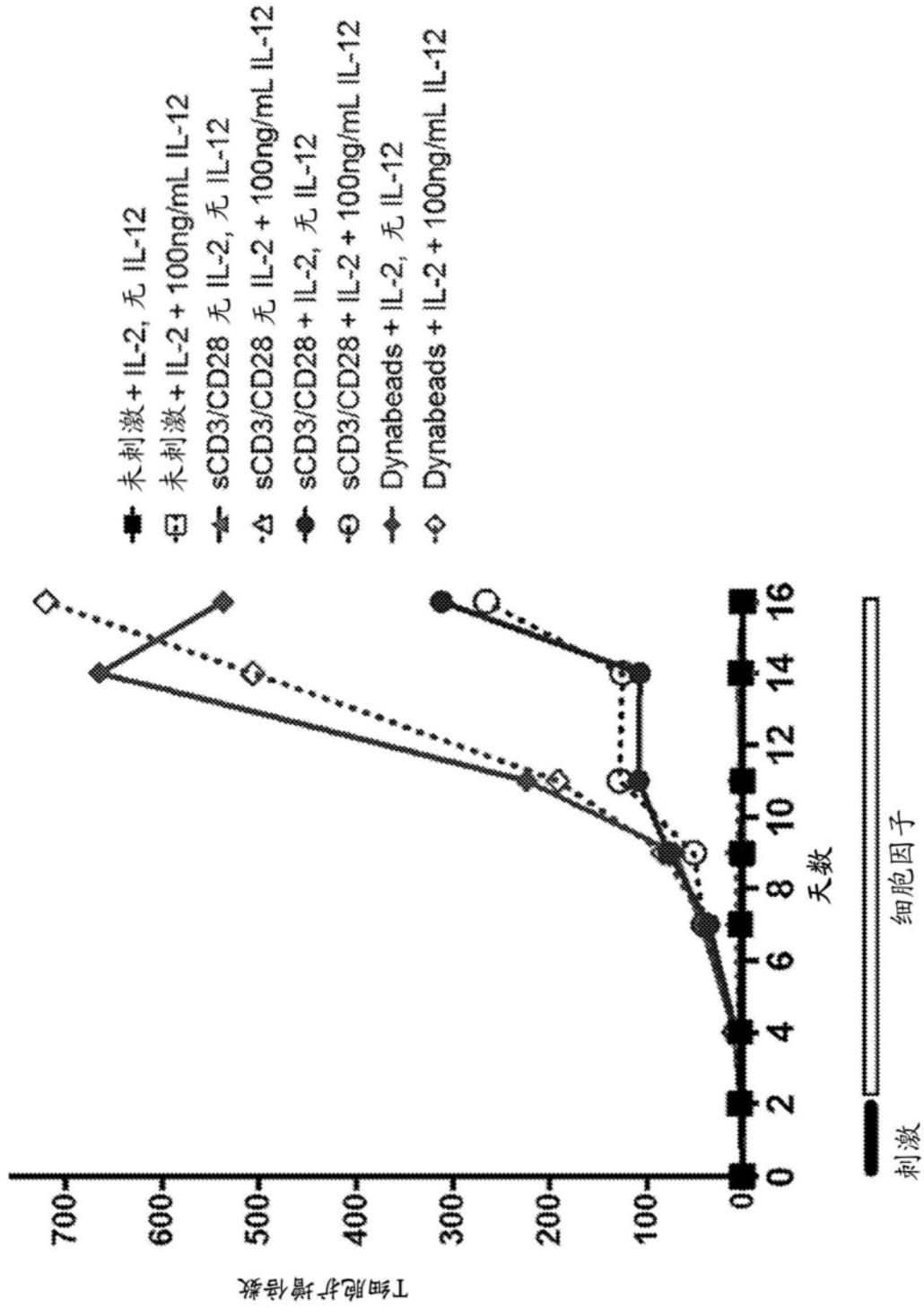


图28A

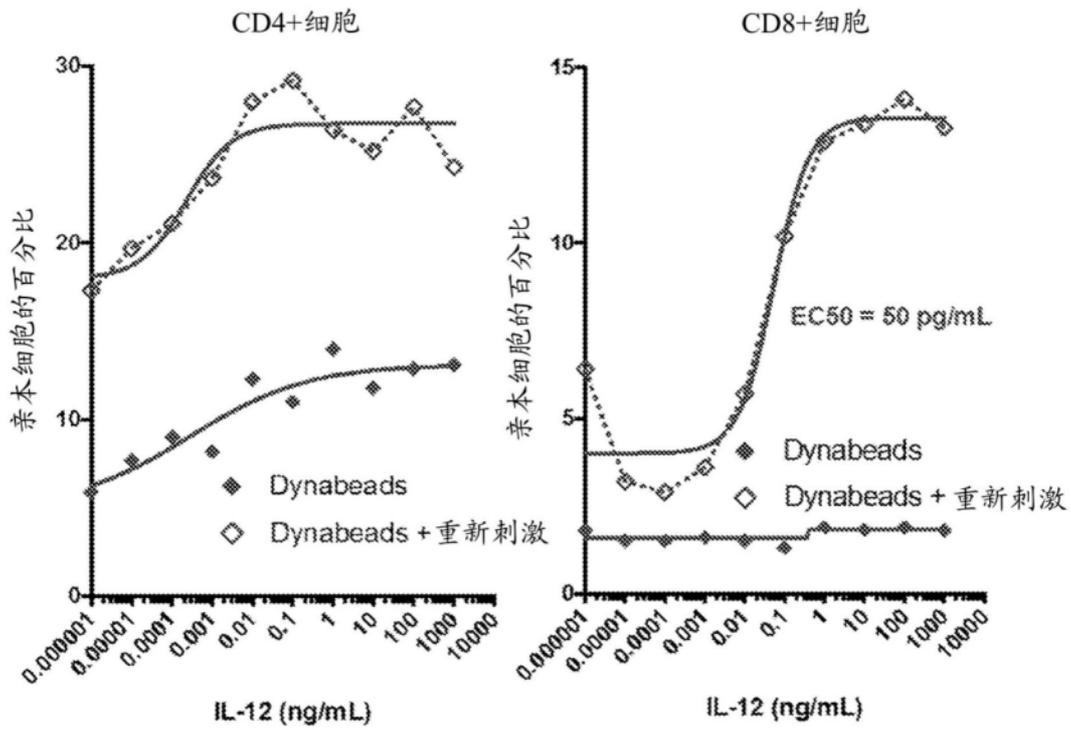


图28B

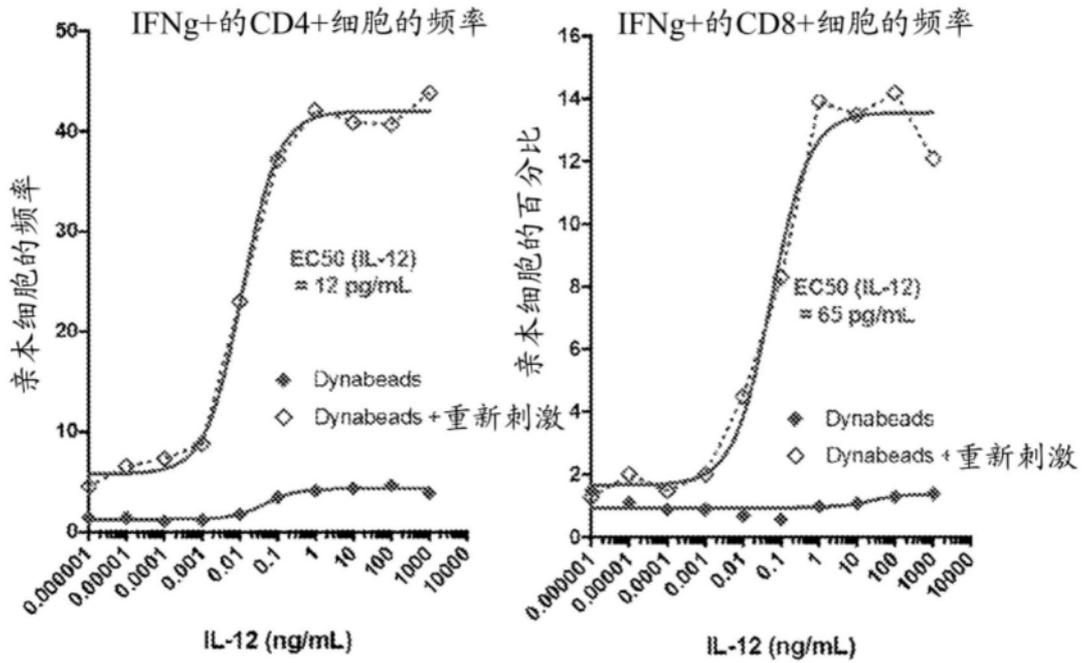


图28C

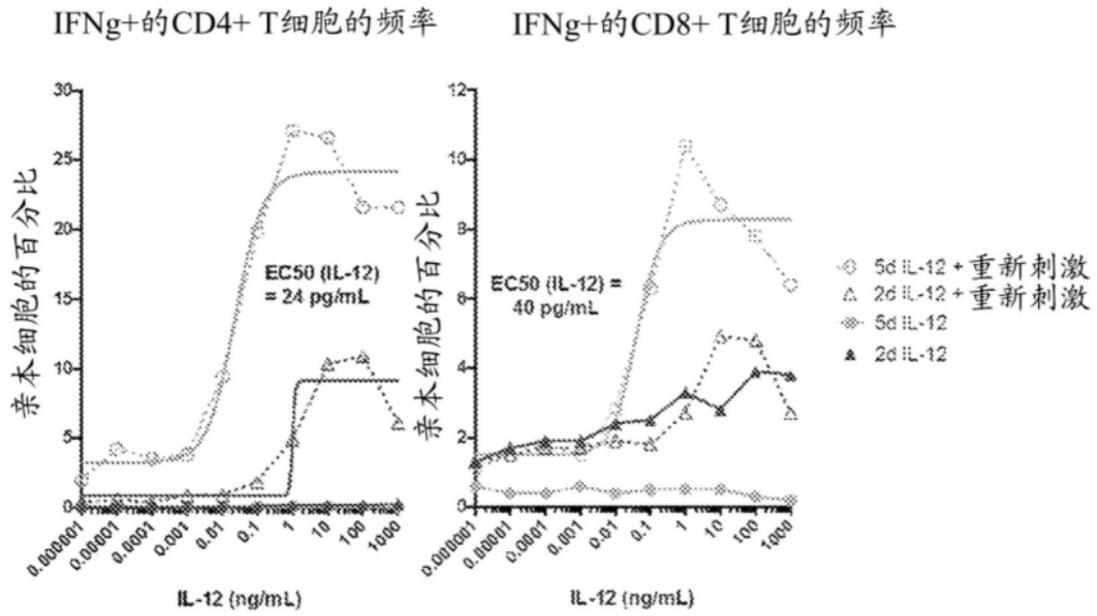


图28D

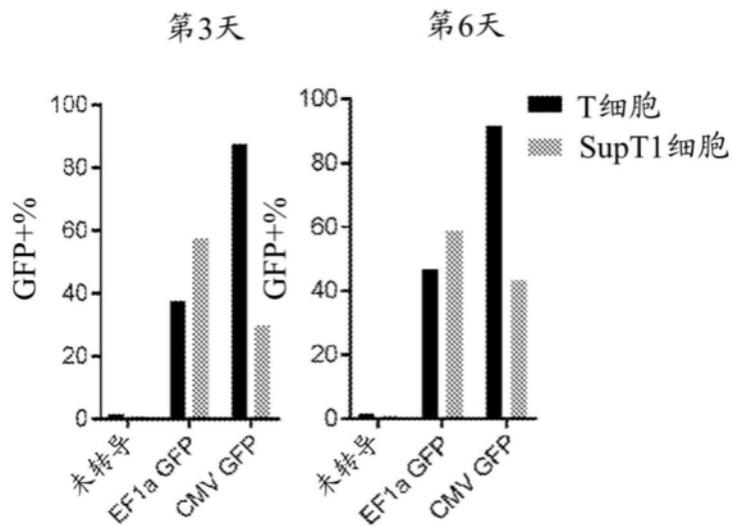


图29

CD19表达细胞

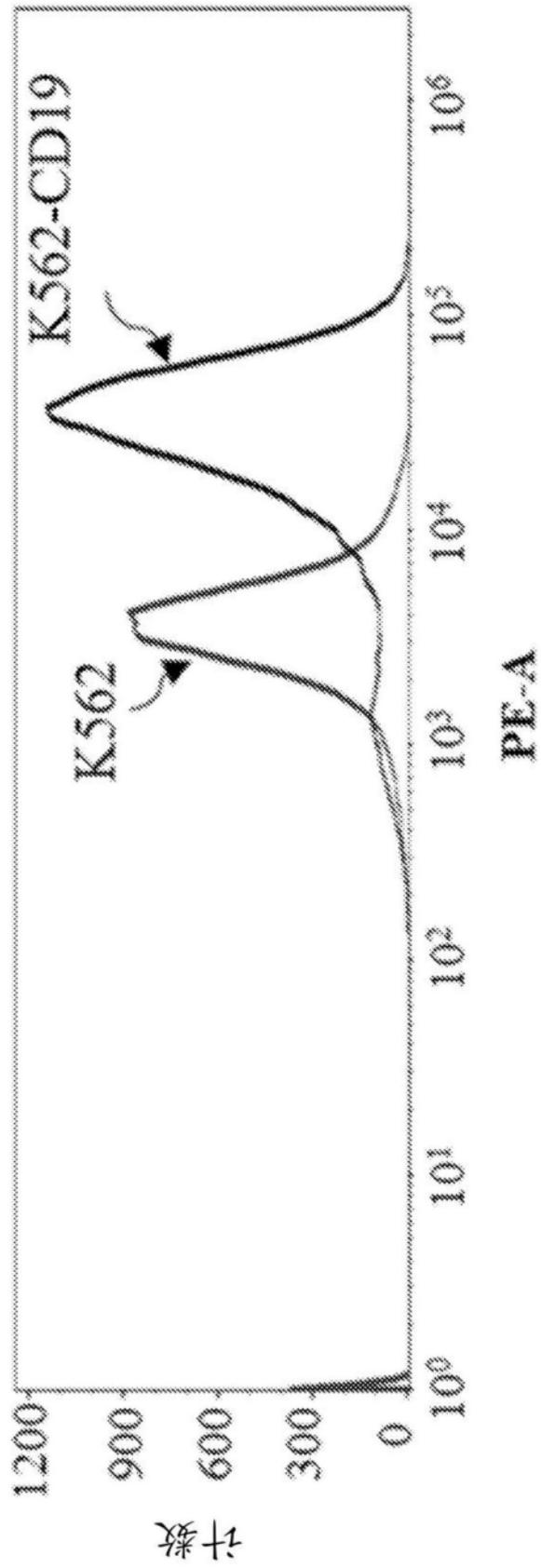


图30A

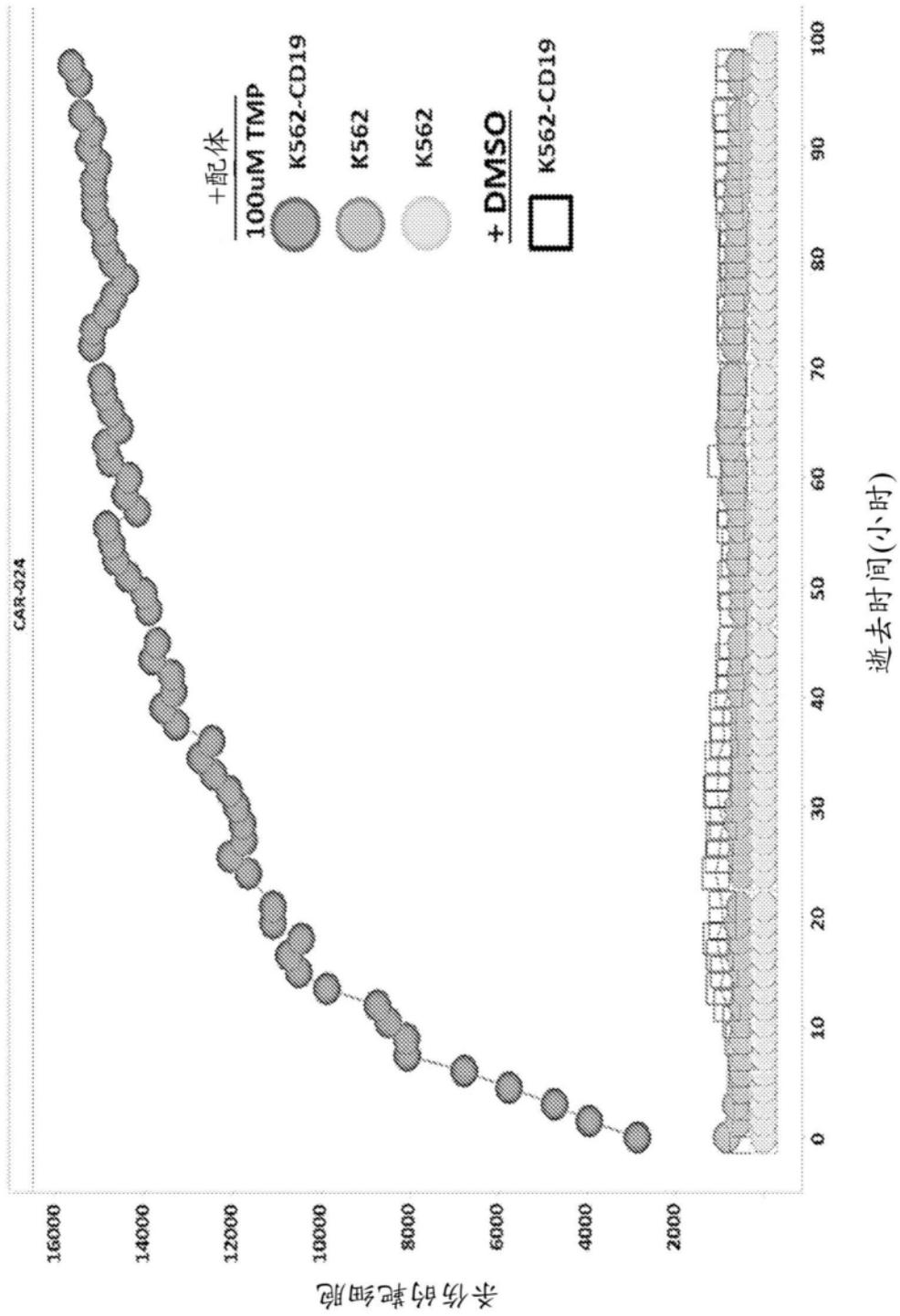


图30B

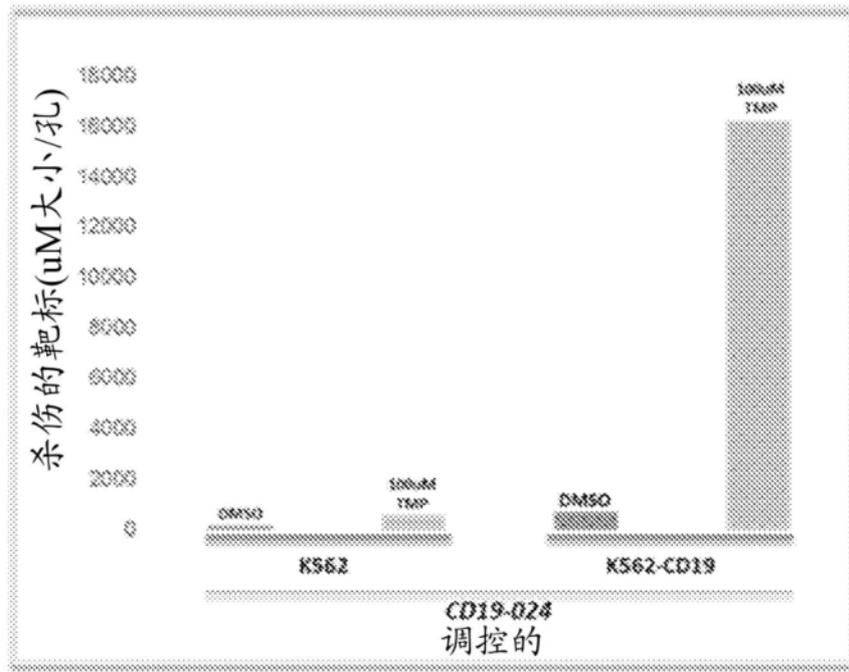


图30C

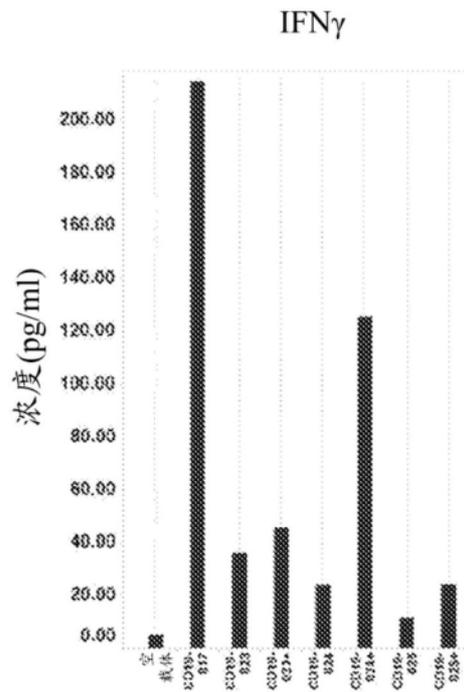


图31A

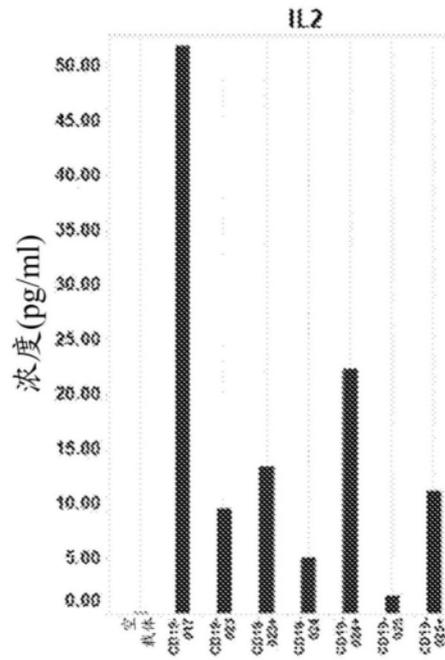


图31B

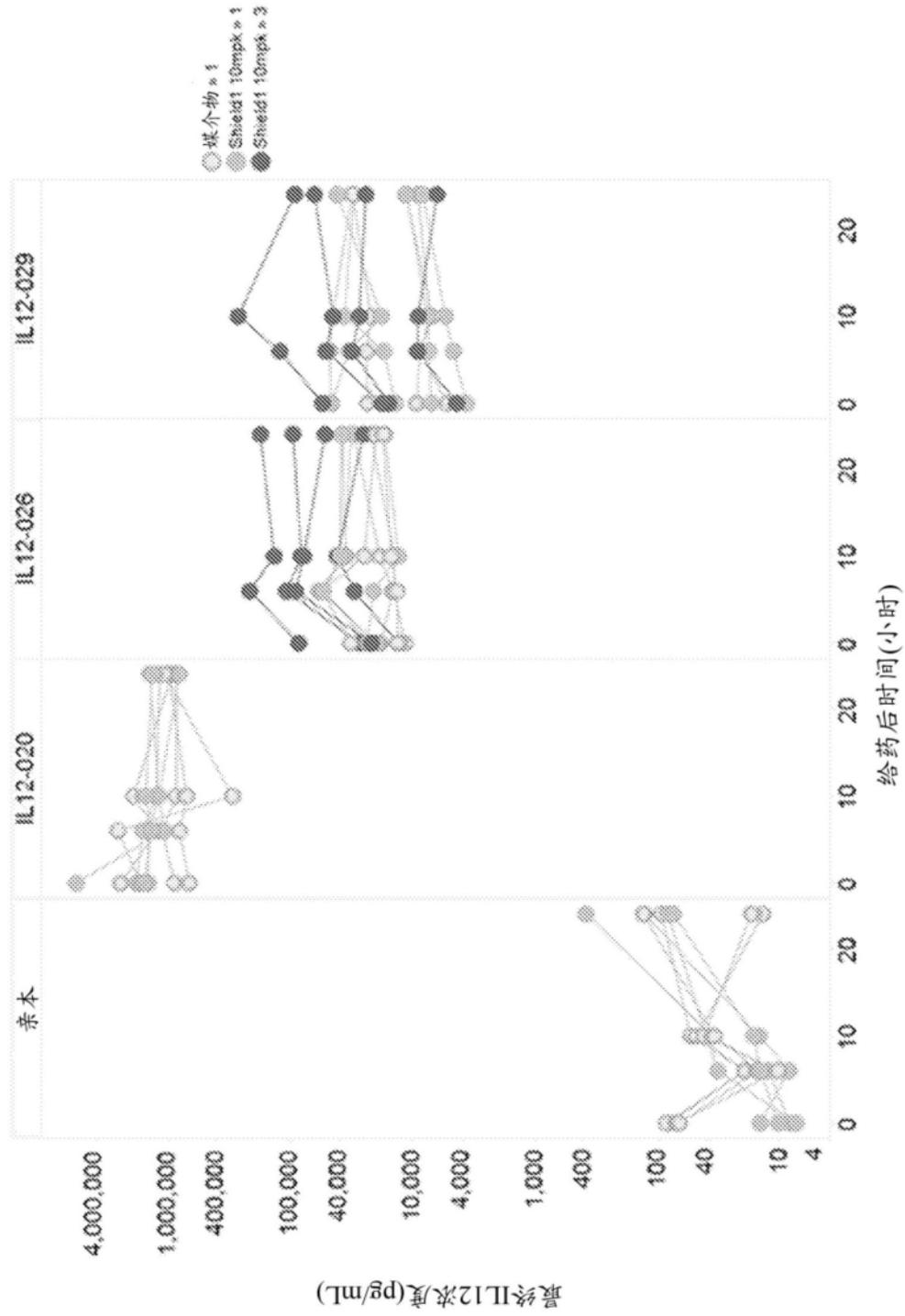


图32A

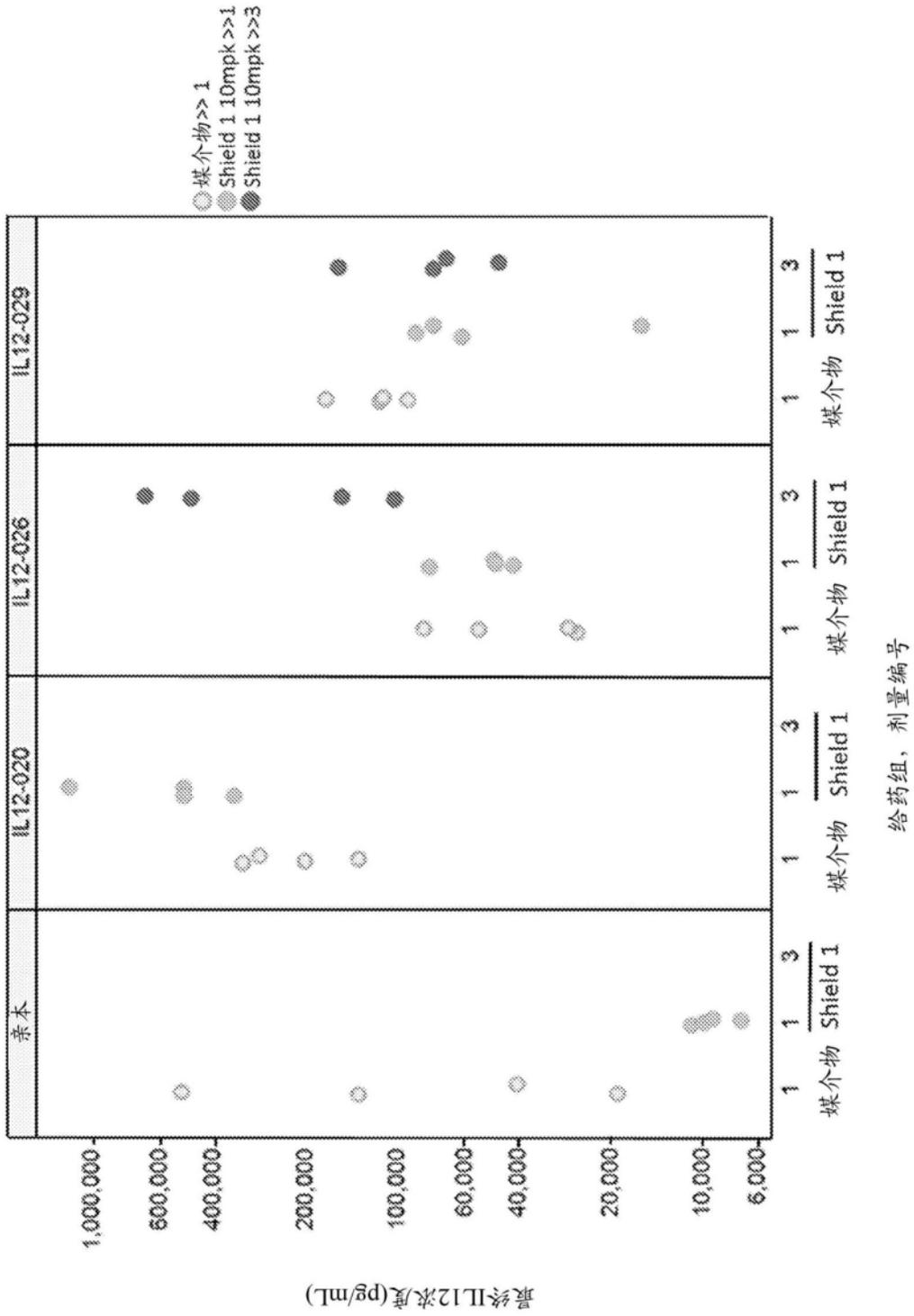


图32B

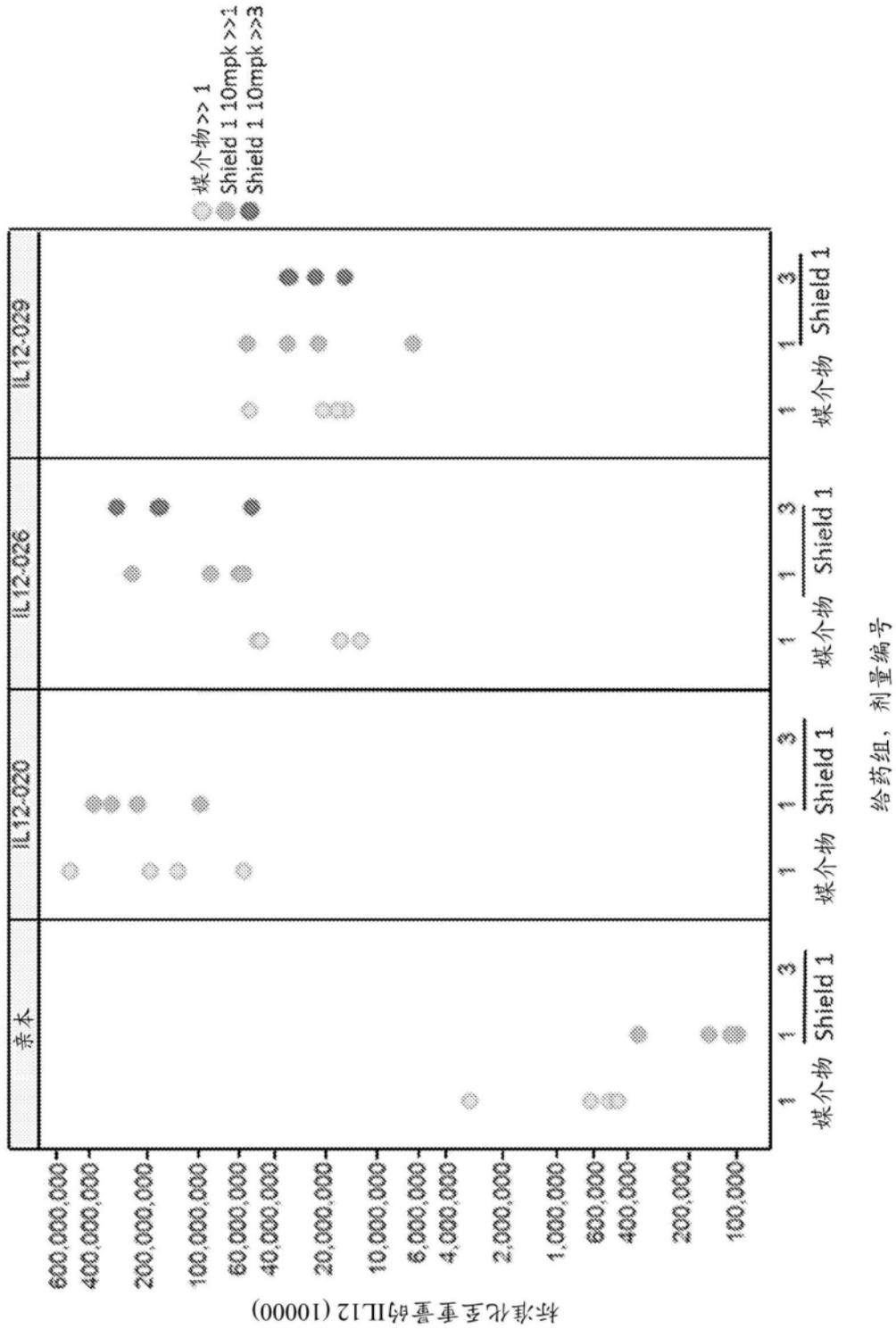


图32C

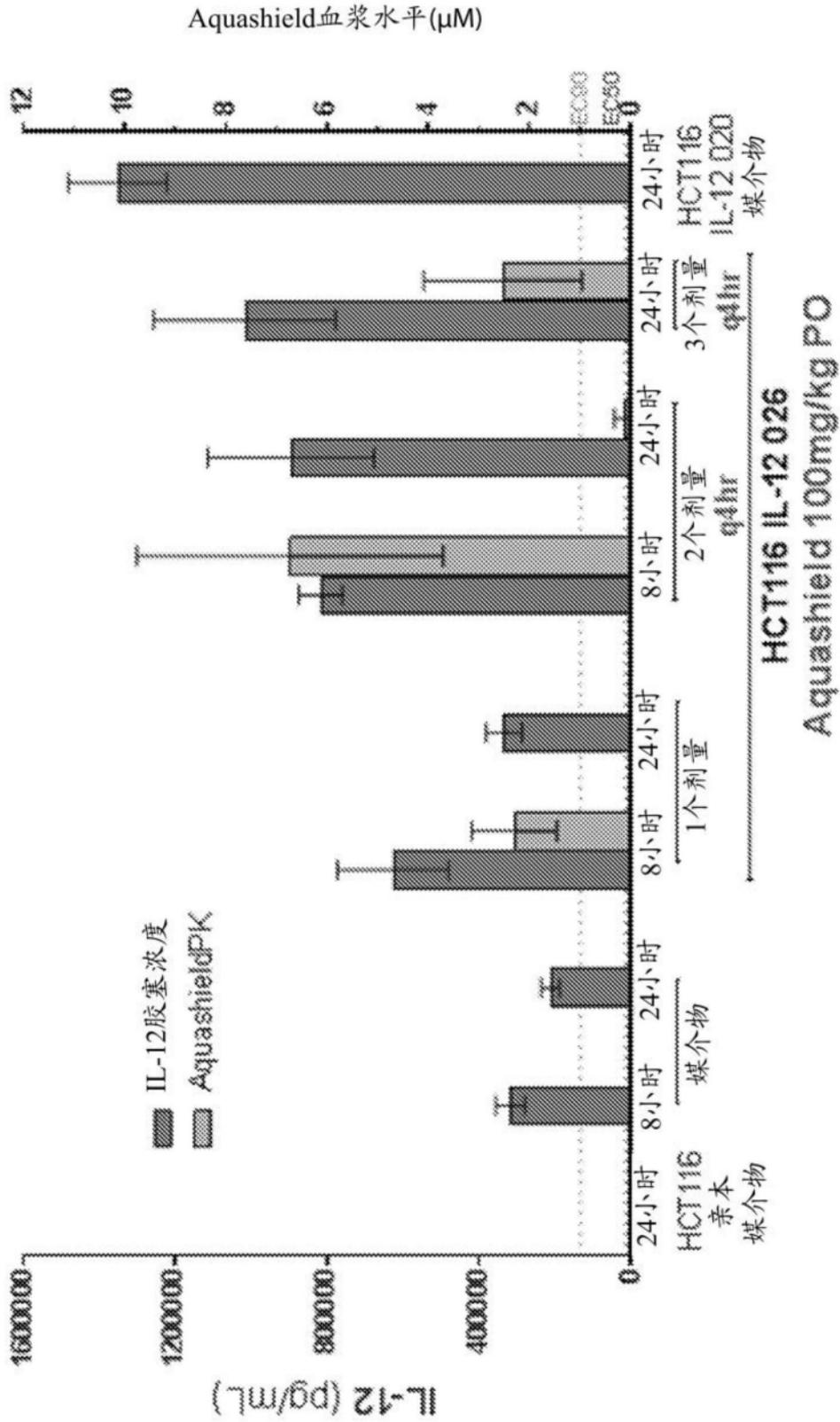


图33A

HCT116 DD IL-12 EF1 α Matrigel胶塞中1、2或3个剂量的Aquashield 100 mg/kg PO之后血浆中的IL-12

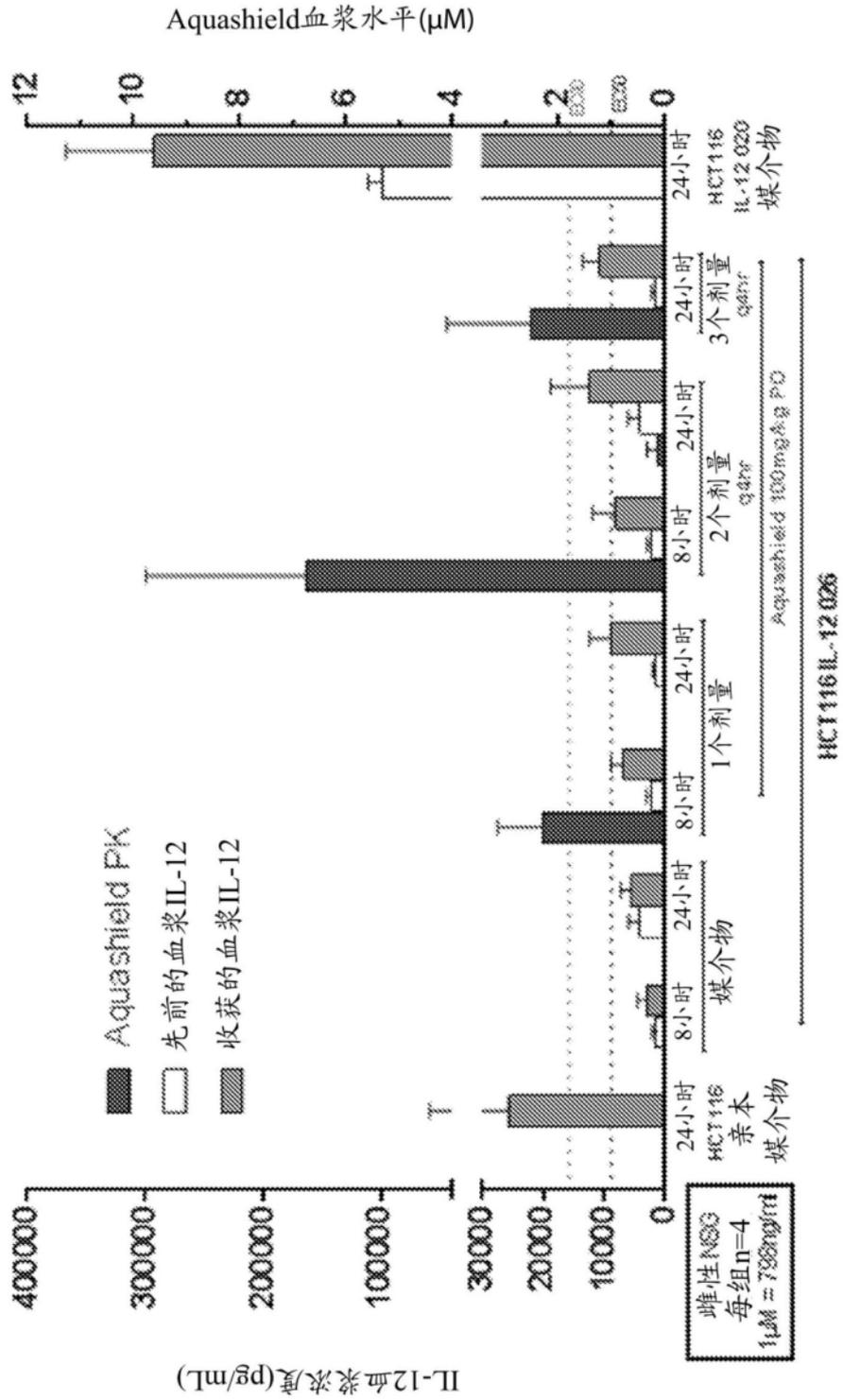


图33B

HCT116 DD IL-12 EF1 α Matrigel胶塞中1、2或3个剂量的Aquashield 100 mg/kg PO之后肾中的IL-12

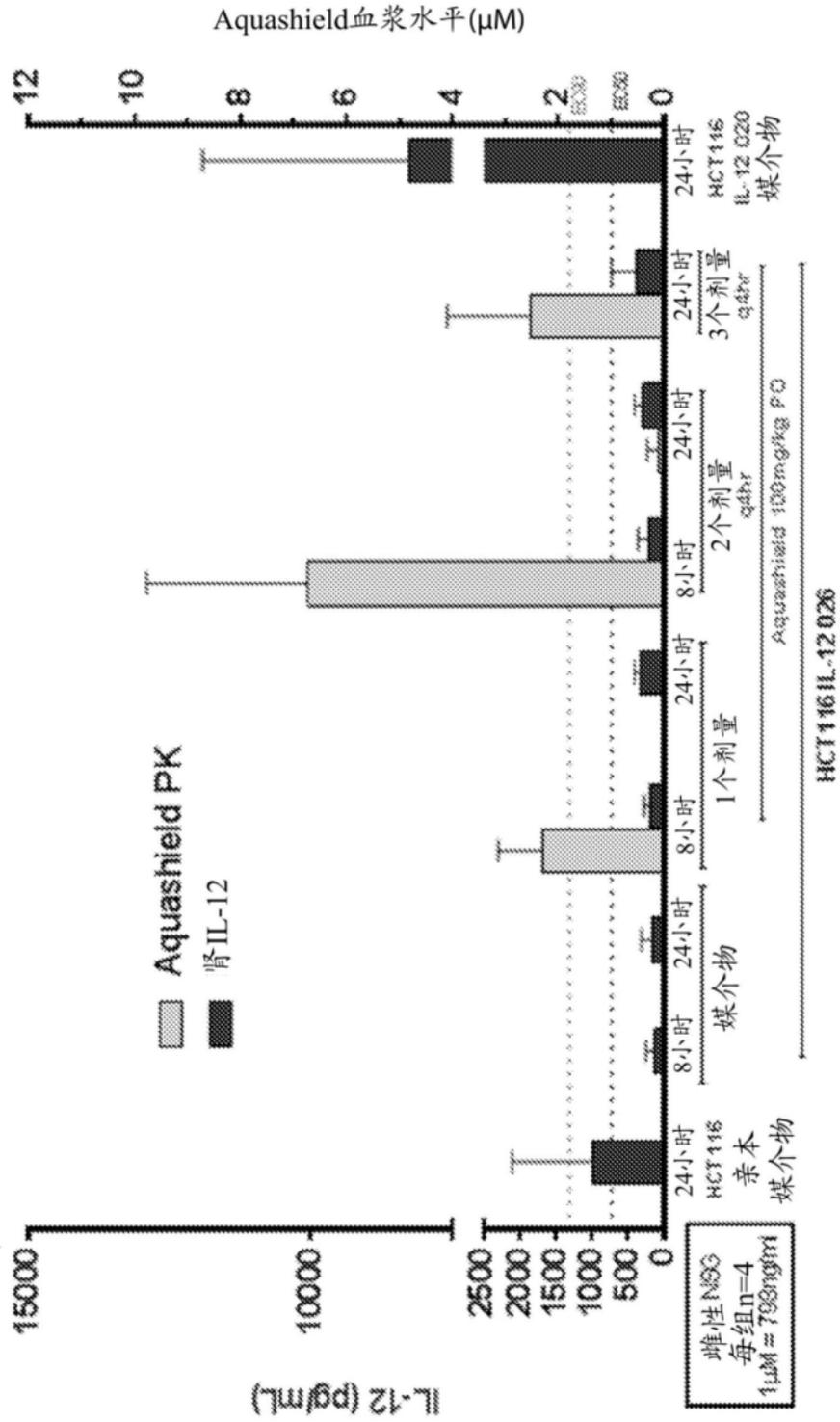


图33C

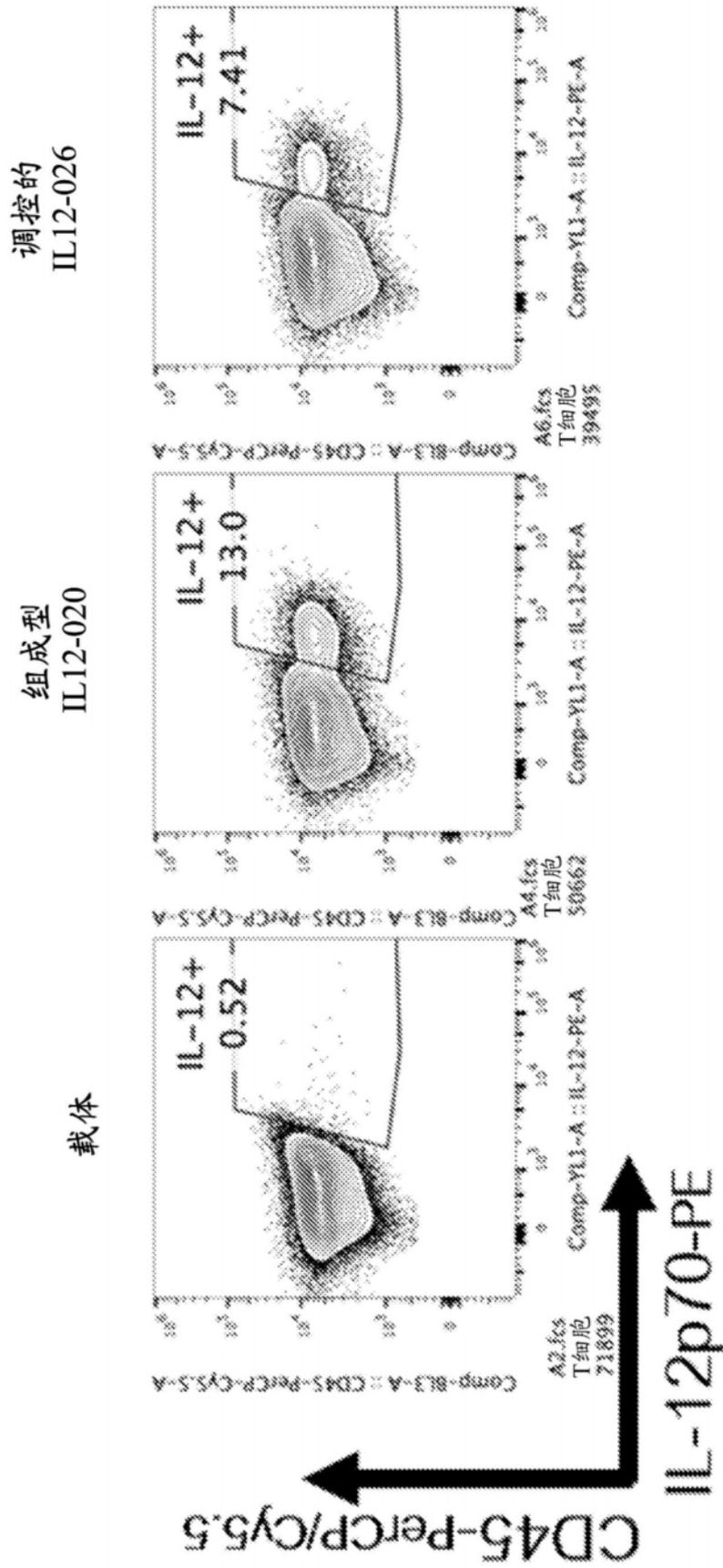


图34A

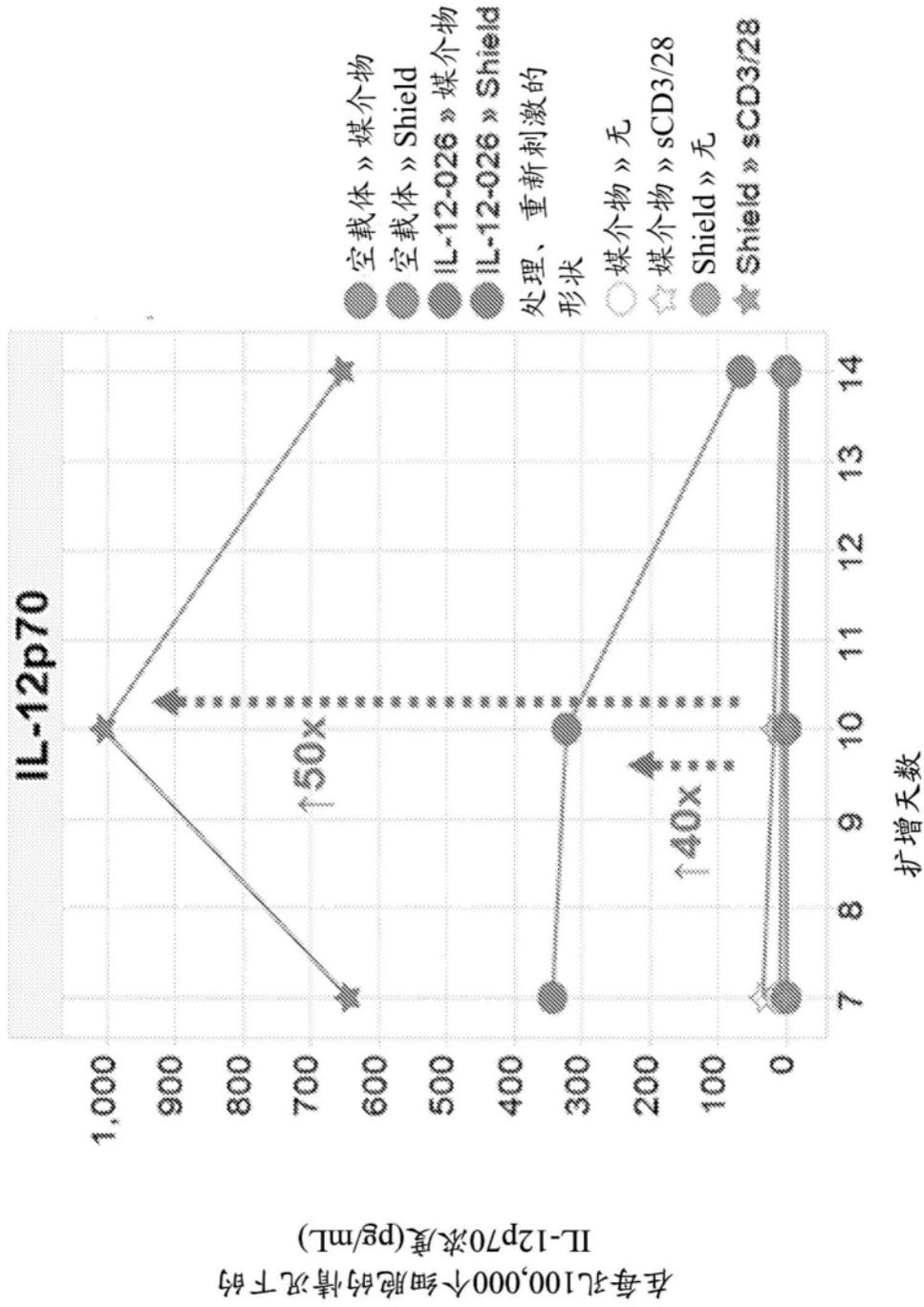


图34B

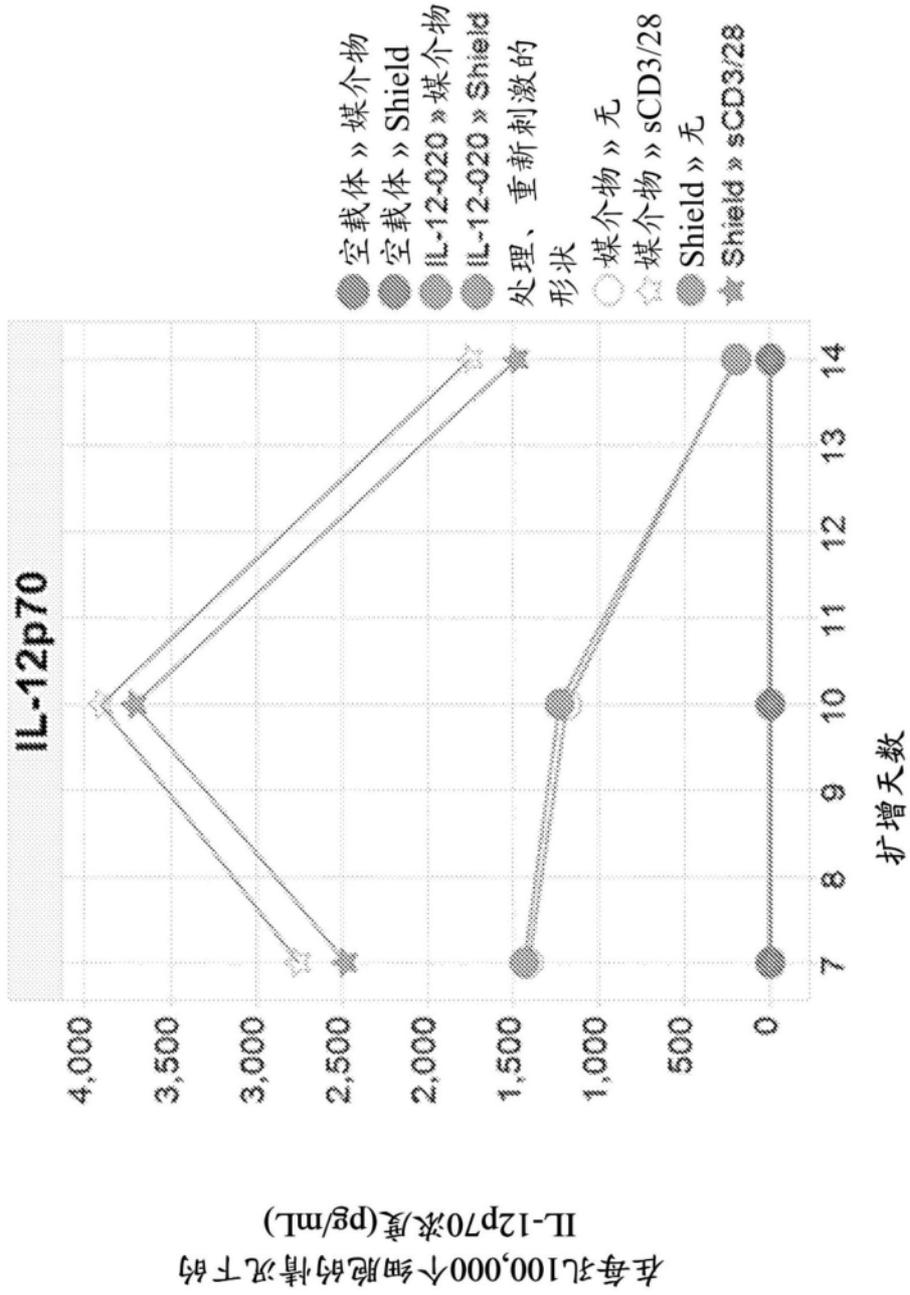


图34C

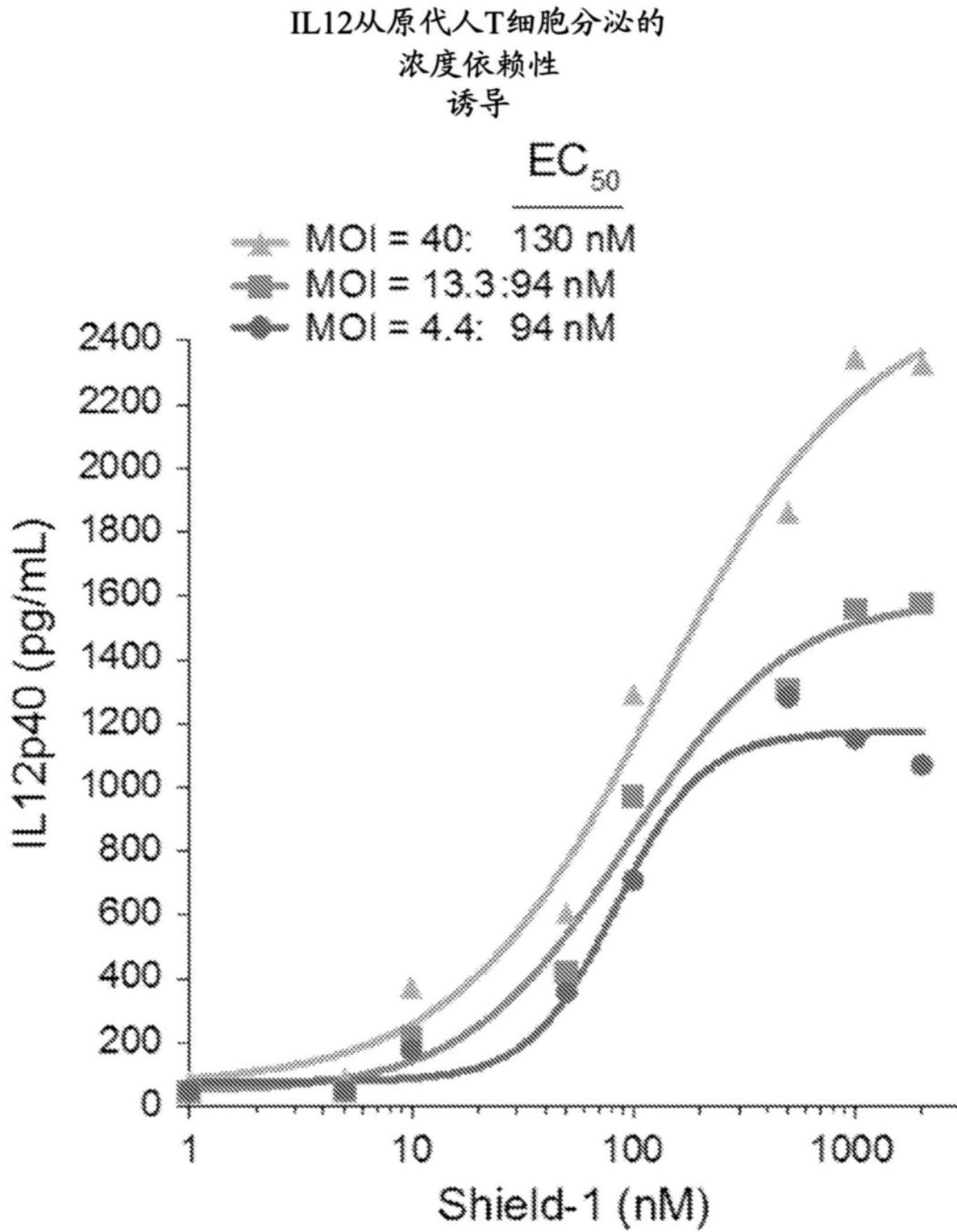


图35A

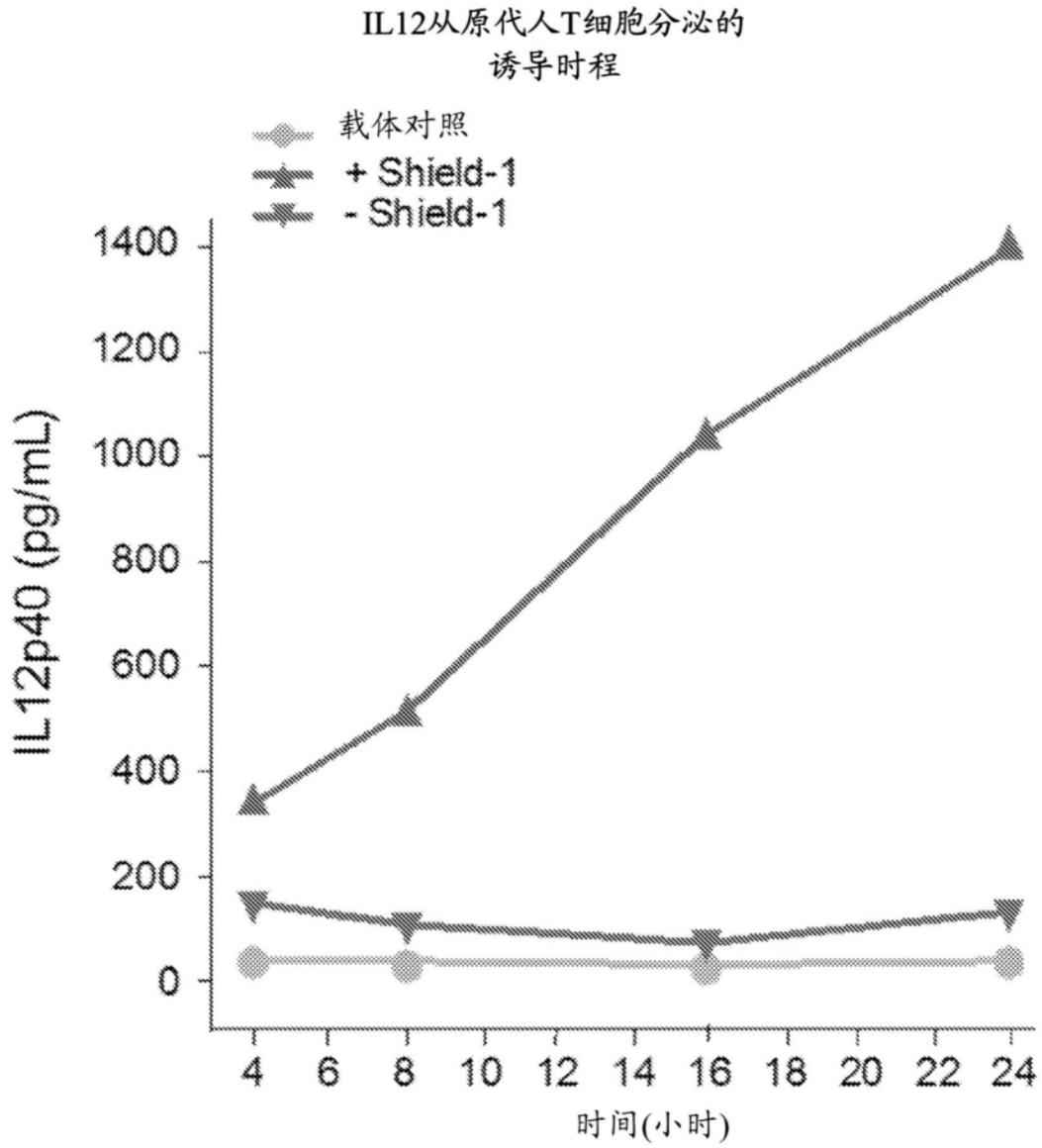


图35B

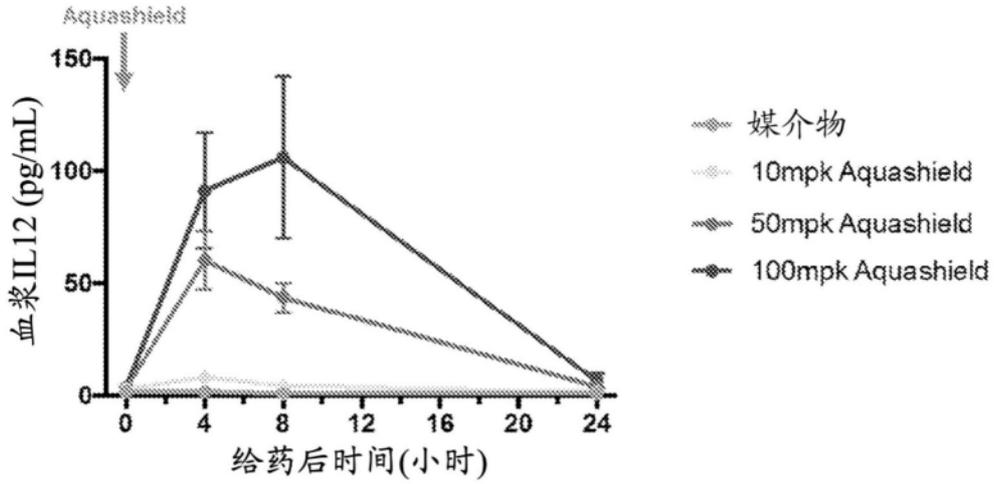


图36A

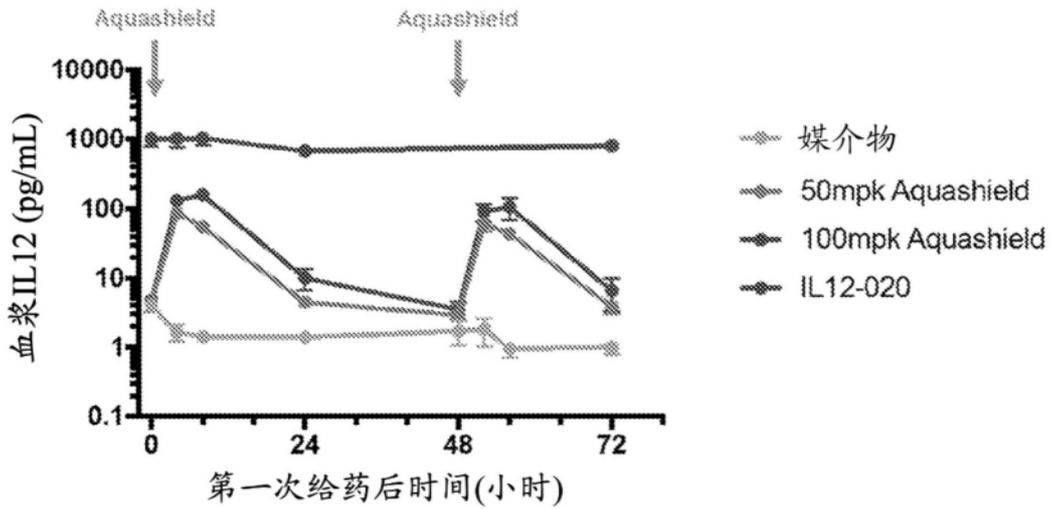


图36B

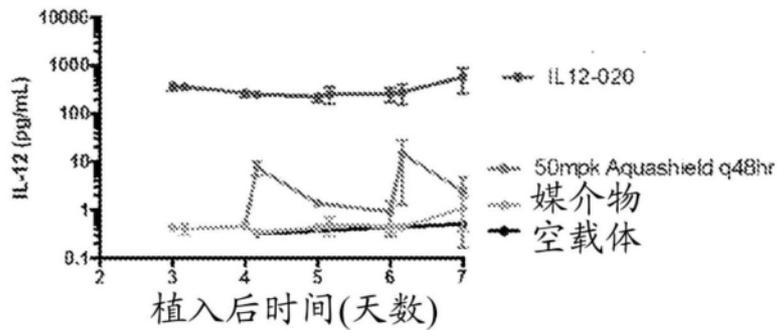


图37A

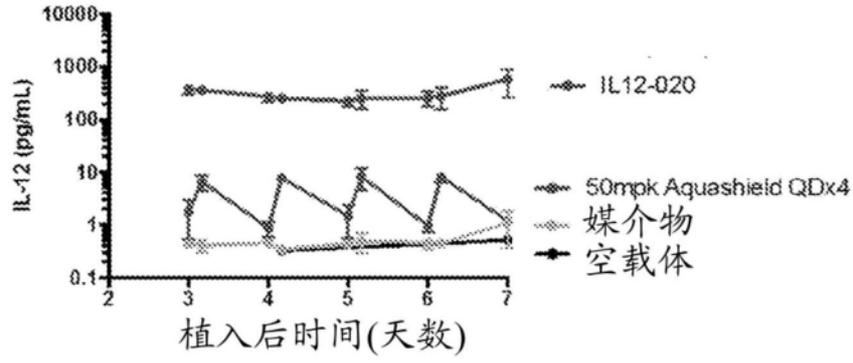


图37B

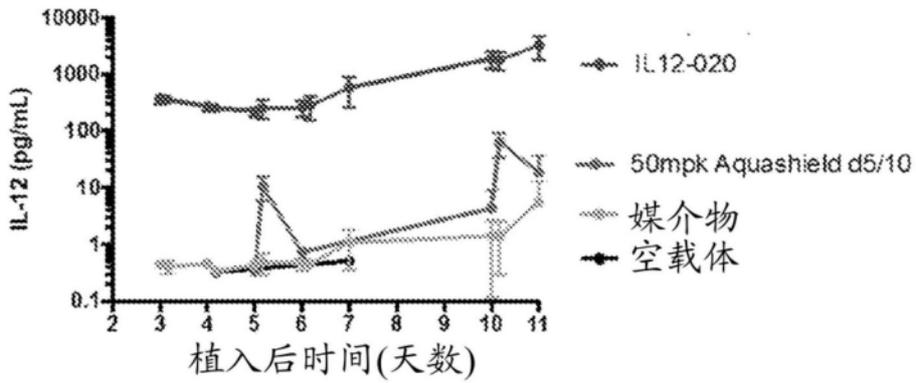


图37C

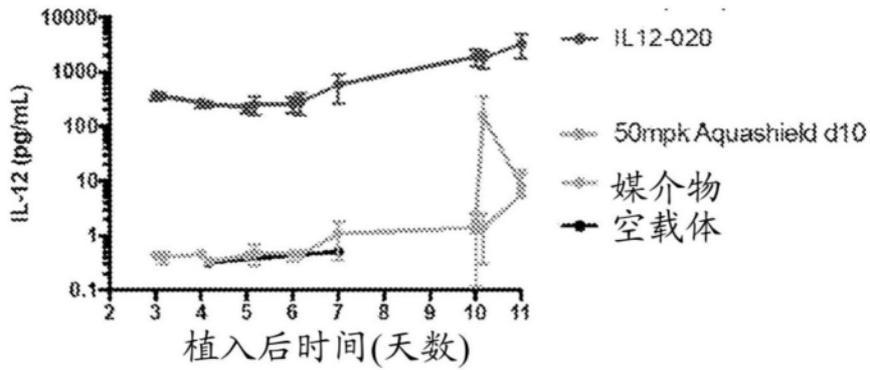


图37D

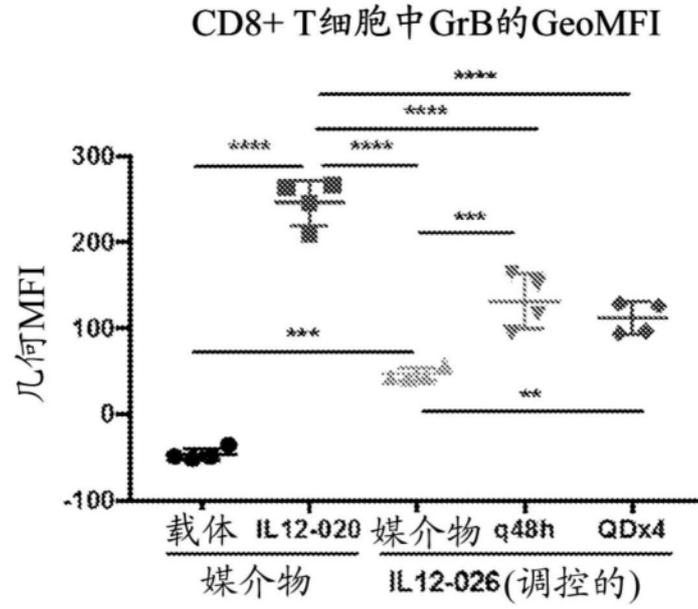


图37E

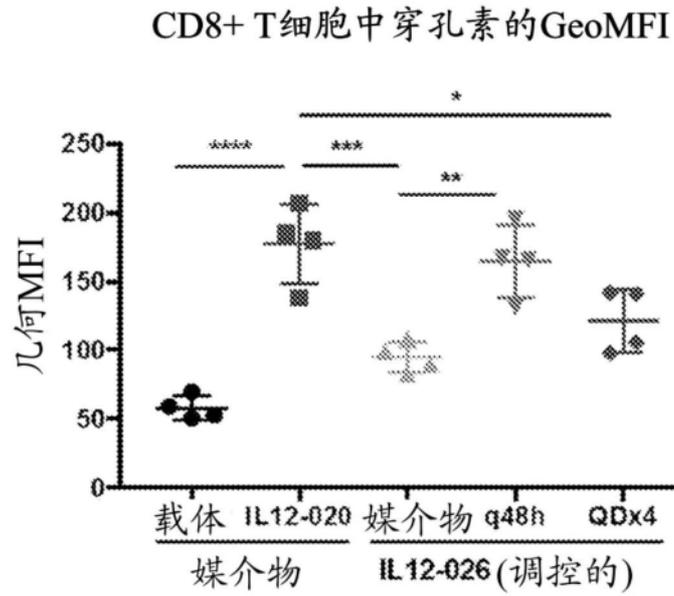


图37F

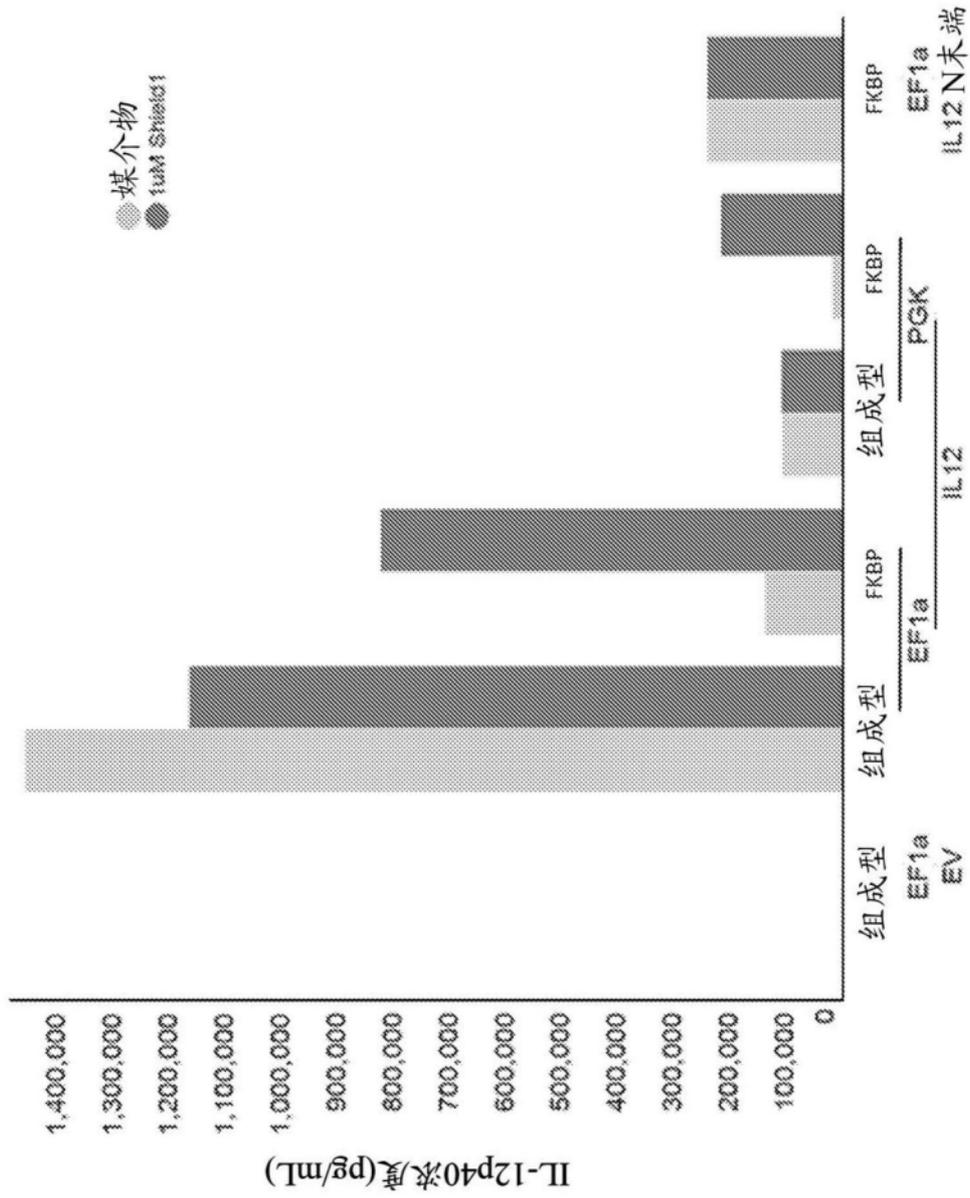


图38A

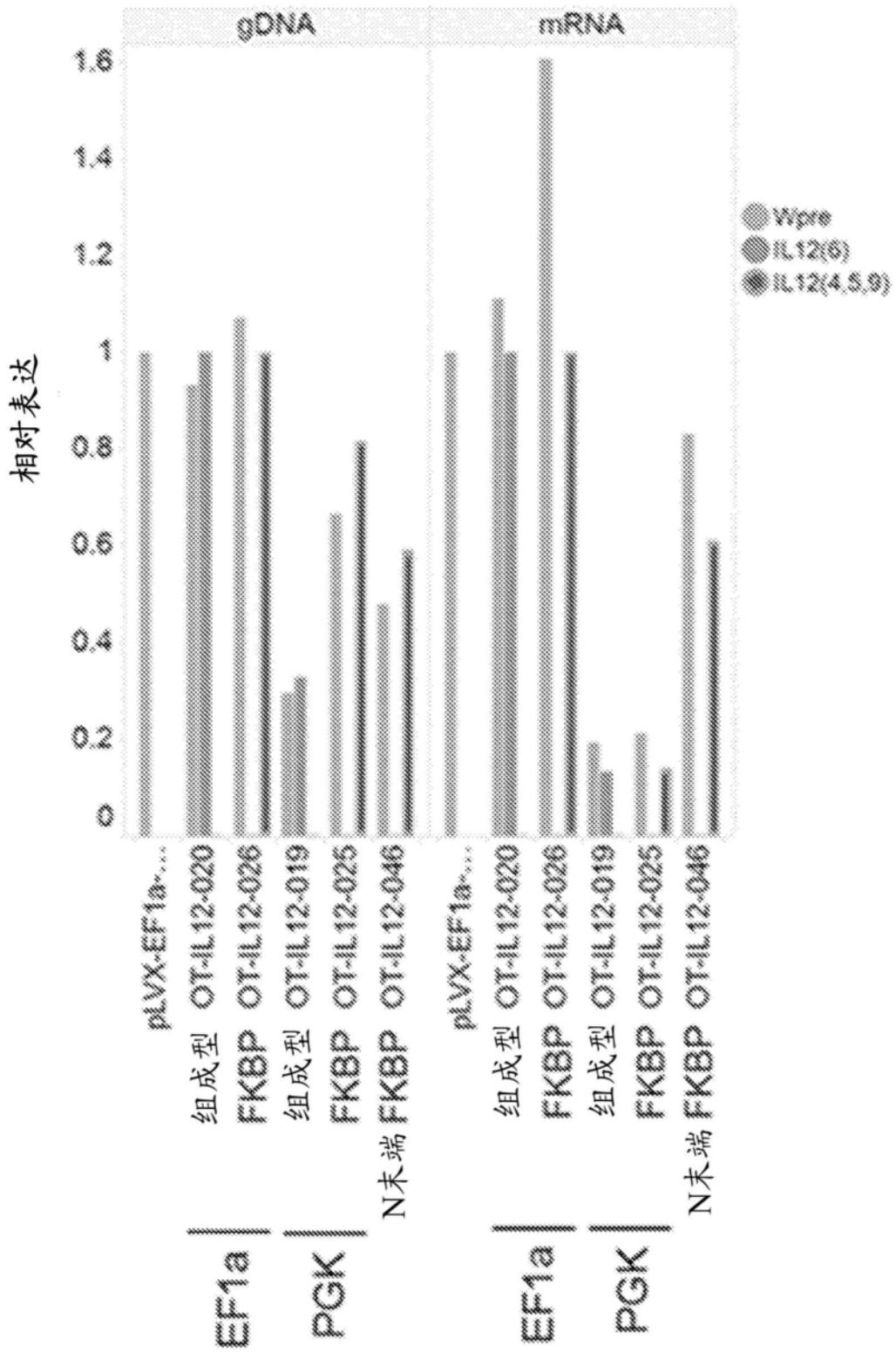


图38B

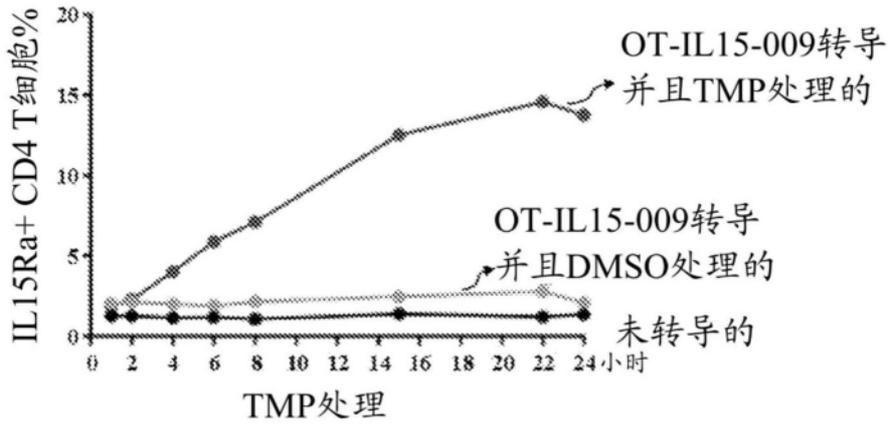


图39

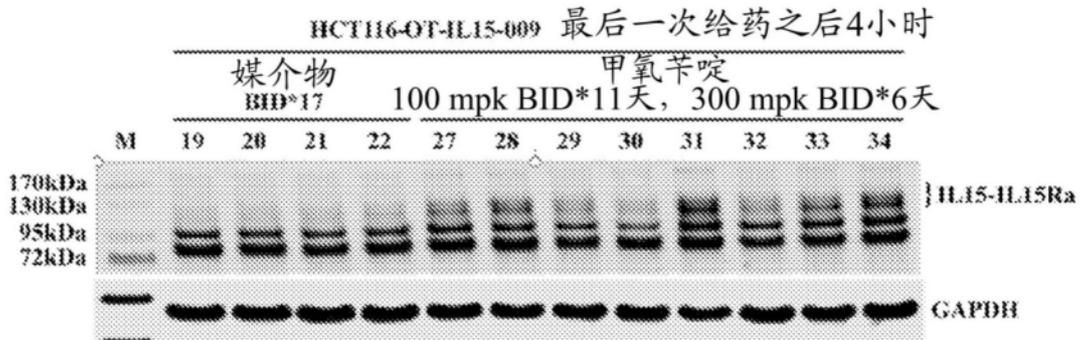


图40

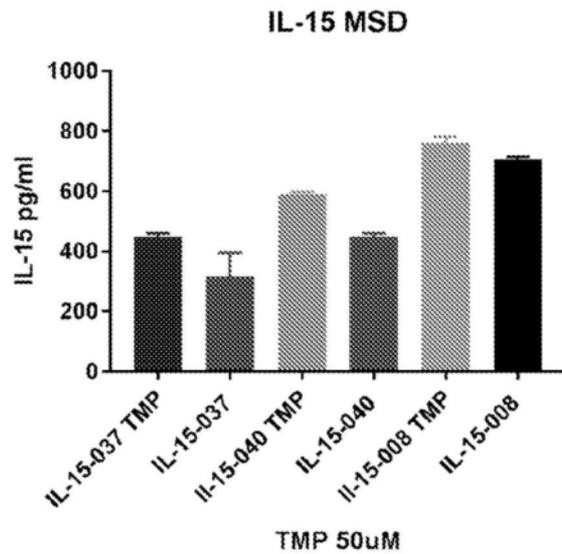


图41

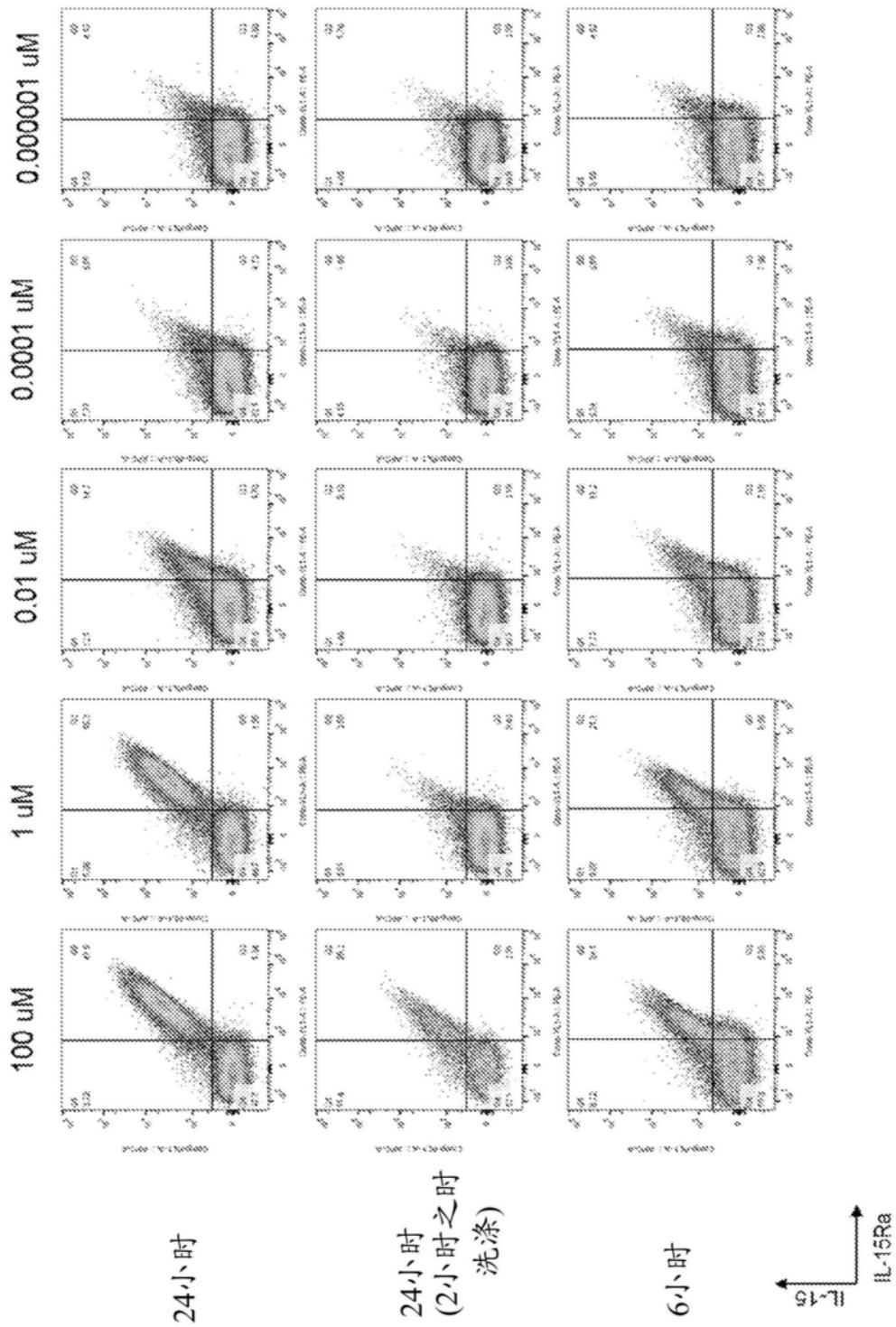


图42A

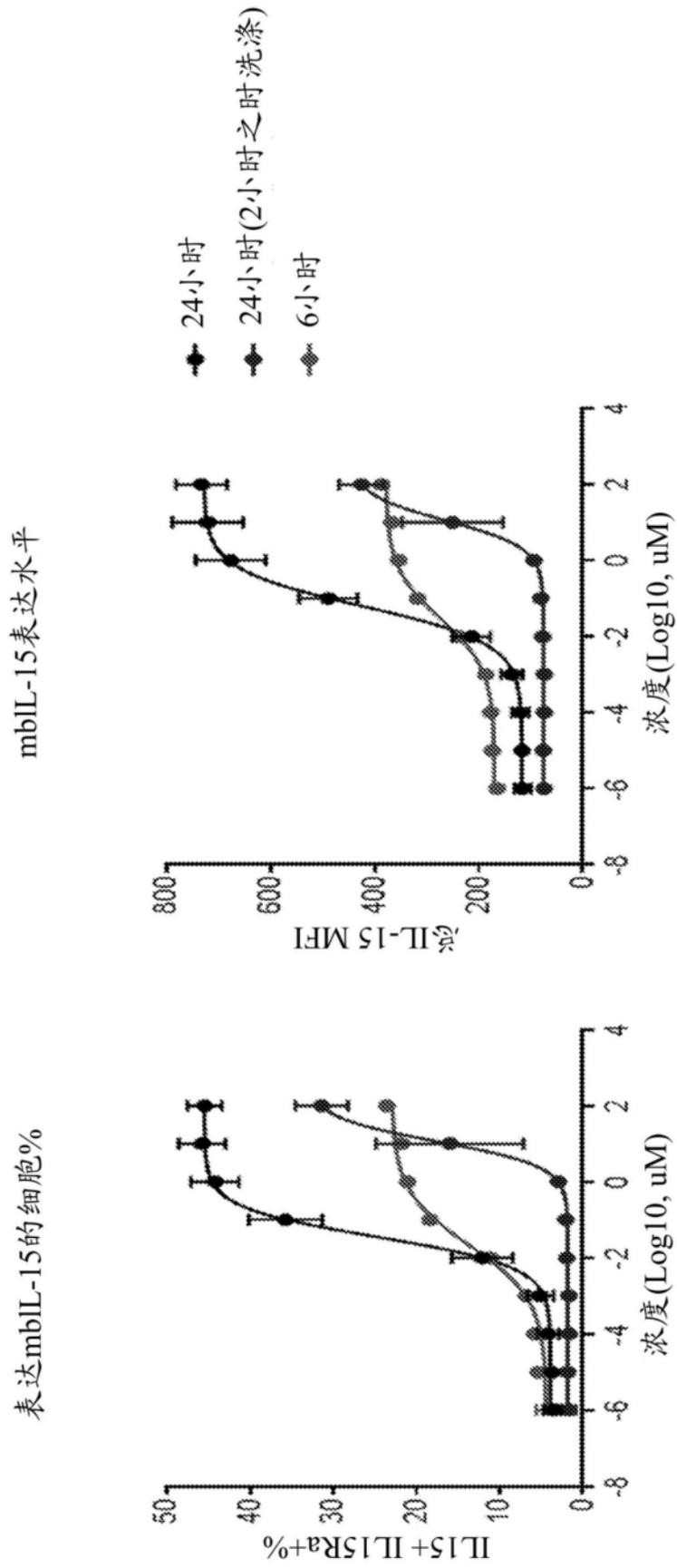


图42B

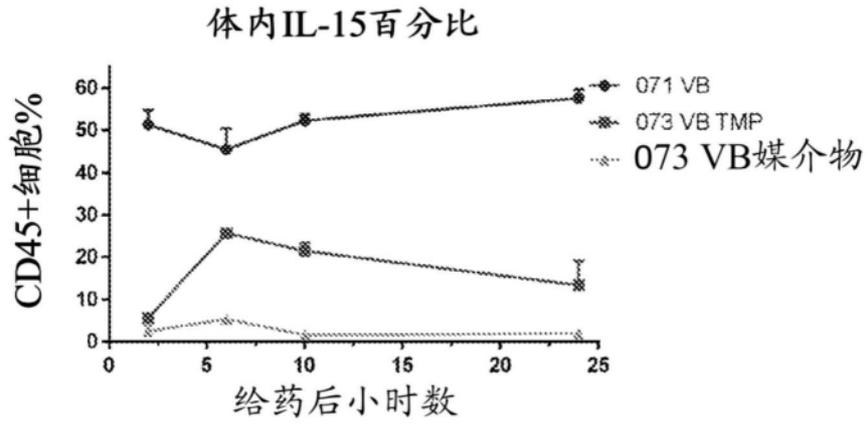


图43A

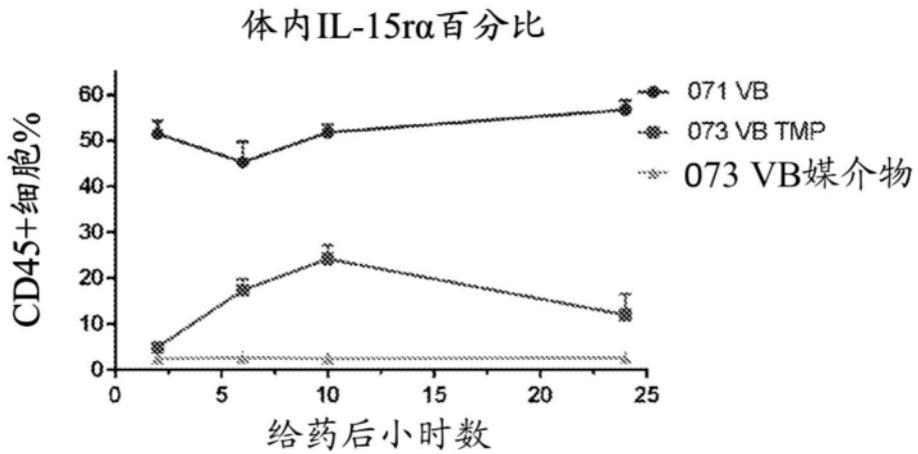


图43B

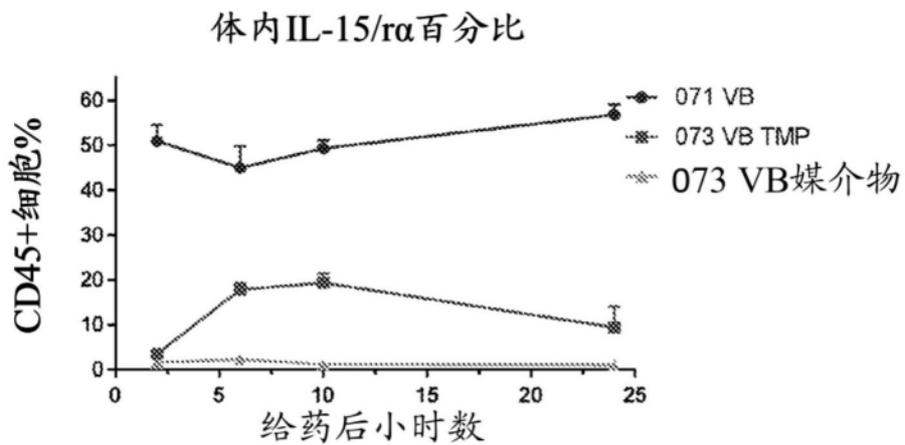


图43C

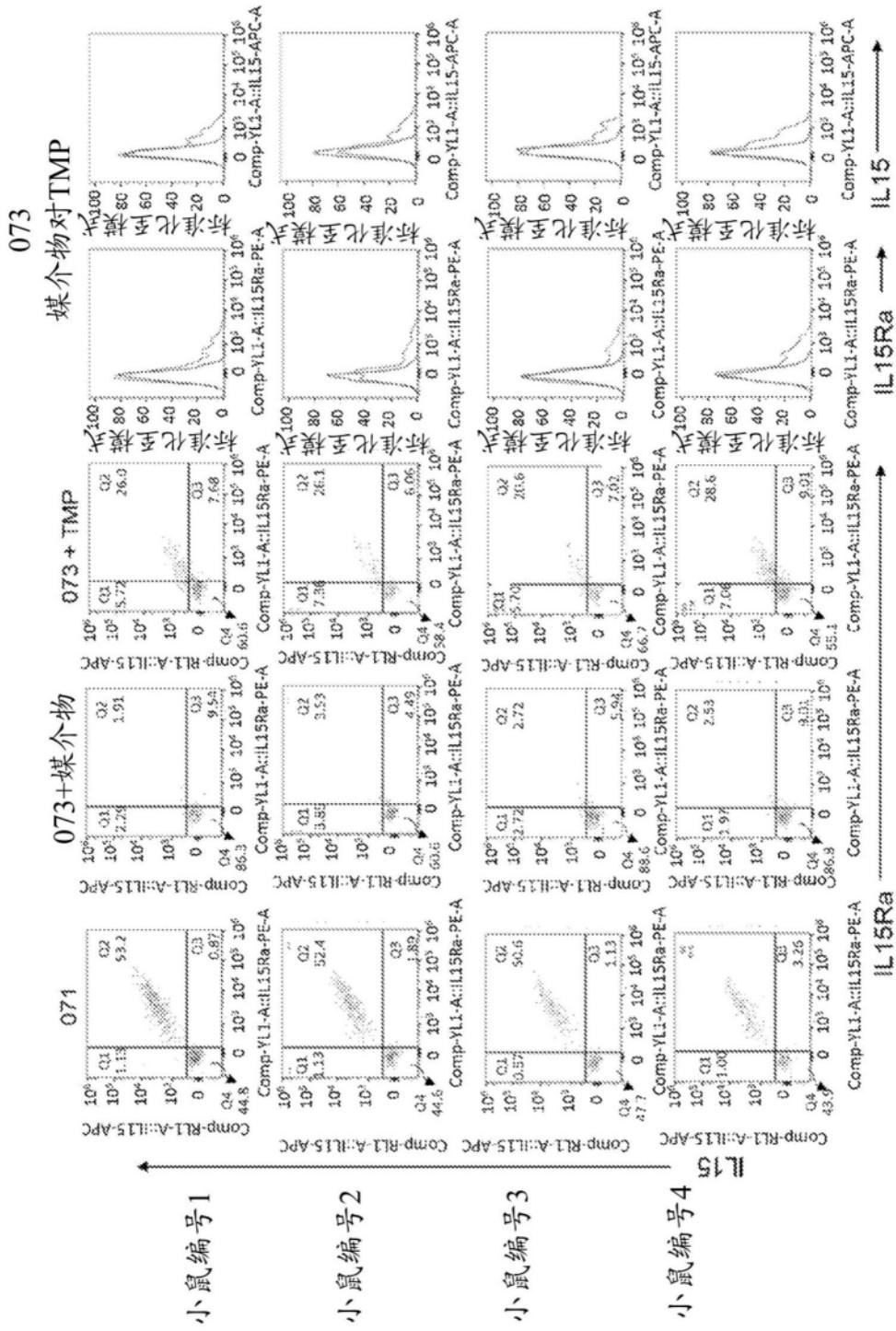


图43D

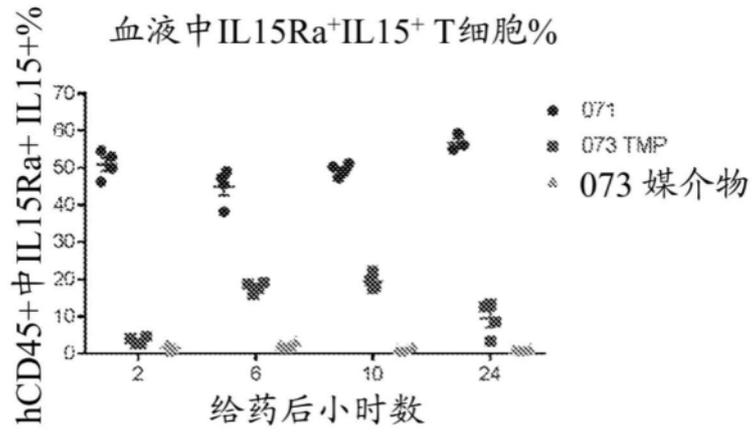


图43E

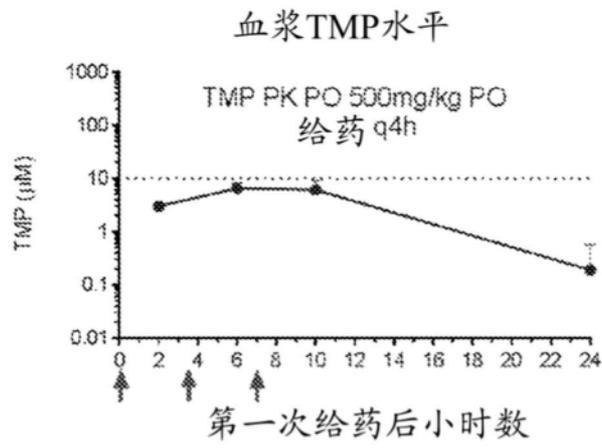


图43F

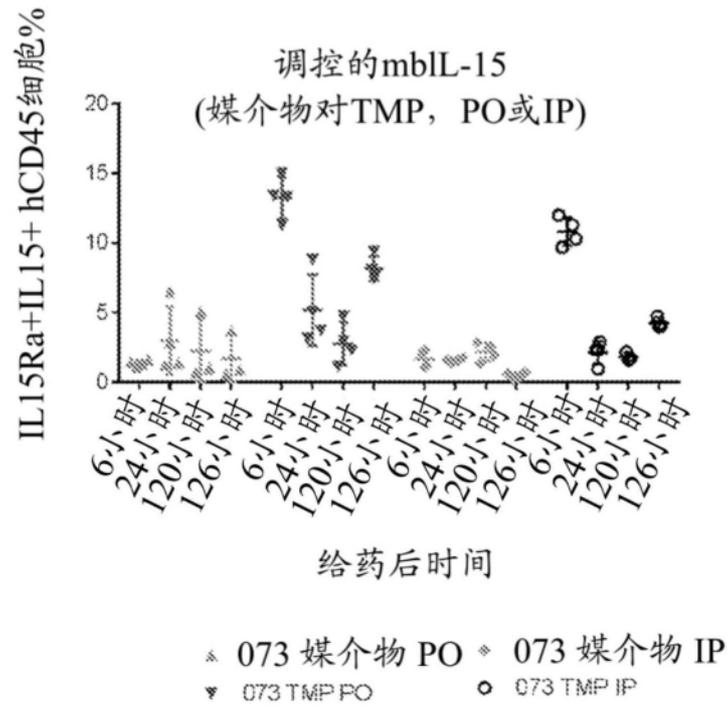


图44