



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119156398 A

(43) 申请公布日 2024. 12. 17

(21) 申请号 202380038696.4

(22) 申请日 2023.04.20

(30) 优先权数据

63/333,076 2022.04.20 US

63/369,656 2022.07.27 US

63/376,499 2022.09.21 US

63/376,531 2022.09.21 US

63/384,600 2022.11.21 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.11.05

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/065998 2023.04.20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/205724 EN 2023.10.26

(71) 申请人 阿森纳生物科学公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 A·库珀 J·乔伊

S·基里亚佐普鲁·帕纳吉奥托普鲁

M·桑多瓦尔 G·沙维

S·桑特罗 L·卡瑟罗 B·徐

J·哈尔 N·贝兹曼 T·加德纳

姚安之

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

专利代理师 陈文平 袁泉

(51) Int.Cl.

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

权利要求书5页 说明书124页

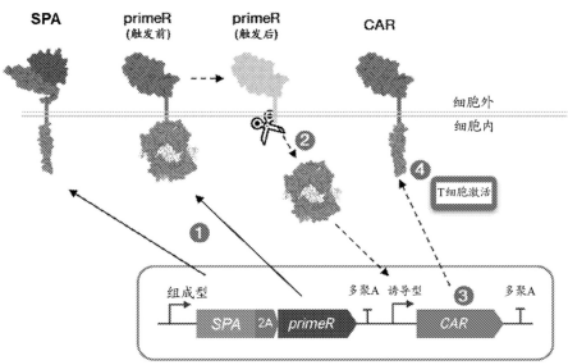
序列表(电子公布) 附图45页

(54) 发明名称

包含基因表达阻遏因子和/或合成途径激活因子和/或诱导型有效载荷的细胞

(57) 摘要

本文提供了包含细胞因子和/或合成途径激活因子之一或两者的系统。本文还提供了包含细胞因子和/或合成途径激活因子之一或两者和一种或多种基因表达阻遏因子的系统。还提供了如下的系统:结合ALPG和/或ALPP的嵌合启动受体、结合MSLN的嵌合抗原受体,以及细胞因子和/或合成途径激活因子之一或两者和/或一种或多种基因表达阻遏因子中的至少一者;表达所述系统的细胞;以及它们的使用方法。



1. 一种系统,所述系统包含:
 - a. 包含启动受体的第一嵌合多肽;
 - b. 包含嵌合抗原受体 (CAR) 的第二嵌合多肽;和
 - c. 包含合成途径激活因子 (SPA) 的第三嵌合多肽。
2. 一种系统,所述系统包含:
 - a. 包含启动受体的第一嵌合多肽;
 - b. 包含嵌合抗原受体 (CAR) 的第二嵌合多肽;
 - c. 包含合成途径激活因子 (SPA) 的第三嵌合多肽;和
 - d. 细胞因子。
3. 一种系统,所述系统包含:
 - a. 包含启动受体的第一嵌合多肽;
 - b. 包含嵌合抗原受体 (CAR) 的第二嵌合多肽;和
 - c. 细胞因子。
4. 一种系统,所述系统包含:
 - a. 包含启动受体的第一嵌合多肽;
 - b. 包含嵌合抗原受体 (CAR) 的第二嵌合多肽;
 - c. 基因表达阻遏因子,和
 - d. 以下之一或两者:
 - i. 包含合成途径激活因子 (SPA) 的第三嵌合多肽;和/或
 - ii. 细胞因子。
5. 如权利要求1-4所述的系统,其中所述启动受体从N末端至C末端包含:
 - a. 第一细胞外抗原结合结构域;
 - b. 包含一个或多个配体诱导型蛋白水解裂解位点的第一跨膜结构域;和
 - c. 包含人或人源化转录效应物的细胞内结构域。
6. 如权利要求5所述的系统,其中所述第一细胞外抗原结合结构域特异性地结合至生殖细胞碱性磷酸酶 (ALPG/P)。
7. 如权利要求5或6所述的系统,其中所述第一细胞外抗原结合结构域包含可变重 (VH) 链序列和可变轻 (VL) 链序列,所述可变重 (VH) 链序列包含三个重链CDR序列CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述可变轻 (VL) 链序列包含三个轻链CDR序列CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,其中:
 - a. CDR-H1包含SEQ ID NO:1、39、40、41或42所示的序列,
 - b. CDR-H2包含SEQ ID NO:2、43、44、45或46所示的序列,
 - c. CDR-H3包含SEQ ID NO:3、47或48所示的序列,
 - d. CDR-L1包含SEQ ID NO:4、49或50所示的序列,
 - e. CDR-L2包含SEQ ID NO:5或51所示的序列;并且
 - f. CDR-L3包含SEQ ID NO:6或53所示的序列。
8. 如权利要求1-6中任一项所述的系统,其中所述CAR从N末端至C末端包含:
 - a. 第二细胞外抗原结合结构域;
 - b. 第二跨膜结构域;
 - c. 细胞内共刺激结构域;和

d. 细胞内激活结构域。

9. 如权利要求8所述的系统,其中所述第二细胞外抗原结合结构域特异性地结合至间皮素(MSLN),其中所述第二细胞外抗原结合结构域包含可变重(VH)链序列和可变轻(VL)链序列,所述可变重(VH)链序列包含三个重链CDR序列CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述可变轻(VL)链序列包含三个轻链CDR序列CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,其中:

- a. CDR-H1包含SEQ ID NO: 10、54、55、56或57所示的序列,
- b. CDR-H2包含SEQ ID NO: 11、58、59、60或61所示的序列,
- c. CDR-H3包含SEQ ID NO: 12、62或63所示的序列,
- d. CDR-L1包含SEQ ID NO: 14、64、65、66或67所示的序列,
- e. CDR-L2包含SEQ ID NO: 15、68、69或70所示的序列,并且
- f. CDR-L3包含SEQ ID NO: 16、72或73所示的序列。

10. 如权利要求171、2或4-9中任一项所述的系统,其中所述SPA包括亮氨酸拉链-gp130(L-gp130)。

11. 如权利要求171、2或4-9中任一项所述的系统,其中所述SPA包括膜结合的白细胞介素15(mbIL-15)。

12. 如权利要求171、2或4-9中任一项所述的系统,其中所述SPA包括CD34-白细胞介素7受体(C7R)。

13. 如权利要求2-12中任一项所述的系统,其中所述细胞因子是分泌的细胞因子或膜结合的细胞因子。

14. 如权利要求2-13中任一项所述的系统,其中所述细胞因子包括白细胞介素(IL)-2、Super-2、IL-12、IL-12/23p40、IL-7、IL-15、IL-21和IL-18中的至少一者。

15. 如权利要求4-14中任一项所述的系统,其中所述基因表达阻遏因子是sgRNA或shRNA。

16. 如权利要求15所述的系统,其中所述sgRNA阻遏选自以下的基因的表达:PTPN2、RASA2、SOCS1、ZC3H12A和CISH。

17. 如权利要求15所述的系统,其中所述shRNA阻遏选自以下的基因的表达:RASA2、SOCS1、ZC3H12A、TGFB1和CISH。

18. 一种或多种重组核酸,所述重组核酸包含至少一个核酸片段,所述至少一个核酸片段包含编码权利要求1-17中任一项所述的系统的核苷酸序列。

19. 一种或多种重组核酸,所述重组核酸包含至少一个核酸片段,所述至少一个核酸片段包含:

- a. 编码包含第一细胞外抗原结合结构域的启动受体的核苷酸序列;
- b. 编码包含第二细胞外抗原结合结构域的嵌合抗原受体的核苷酸序列;和
- c. 编码细胞因子的核苷酸序列。

20. 一种或多种重组核酸,所述重组核酸包含至少一个核酸片段,所述至少一个核酸片段包含:

- a. 编码包含第一细胞外抗原结合结构域的启动受体的核苷酸序列;
- b. 编码包含第二细胞外抗原结合结构域的嵌合抗原受体的核苷酸序列;和
- c. 编码合成途径激活因子的核苷酸序列。

21. 一种或多种重组核酸,所述重组核酸包含至少一个核酸片段,所述至少一个核酸片段包含:

- a. 编码包含第一细胞外抗原结合结构域的启动受体的核苷酸序列;
- b. 编码包含第二细胞外抗原结合结构域的嵌合抗原受体的核苷酸序列;
- c. 编码合成途径激活因子的核苷酸序列;和
- d. 编码细胞因子的核苷酸序列。

22. 一种或多种重组核酸,所述重组核酸包含至少一个核酸片段,所述至少一个核酸片段包含:

- a. 编码包含第一细胞外抗原结合结构域的启动受体的核苷酸序列;
- b. 编码包含第二细胞外抗原结合结构域的嵌合抗原受体的核苷酸序列;和
- c. 基因表达阻遏因子的核苷酸序列;和
- d. 以下之一或两者:
 - i. 编码合成途径激活因子的核苷酸序列;和/或
 - ii. 编码细胞因子的核苷酸序列。

23. 一种表达载体,所述表达载体包含权利要求18-22中任一项所述的重组核酸。

24. 一种免疫细胞,所述免疫细胞包含:

- a. 权利要求1-17中任一项所述的系统;
- b. 至少一种权利要求18-22中任一项所述的重组核酸;和/或
- c. 权利要求23所述的载体。

25. 一种原代免疫细胞,所述原代免疫细胞包含至少一种重组核酸,所述重组核酸包含:

- a. 编码包含第一细胞外抗原结合结构域的启动受体的核酸序列;
- b. 编码包含第二细胞外抗原结合结构域的嵌合抗原受体的核酸序列;和
- c. 编码合成途径激活因子的核酸序列和/或编码细胞因子的核酸序列;

其中所述重组核酸插入所述原代免疫细胞的基因组的靶区中,其中所述原代免疫细胞不包含用于将所述重组核酸引入所述原代免疫细胞中的病毒载体。

26. 一种活的无病毒的原代细胞,所述活的无病毒的原代细胞包含核糖核蛋白复合物(RNP)-重组核酸复合物,其中所述RNP包含核酸酶结构域和指导RNA,其中重组核酸包含:

- a. 编码包含第一细胞外抗原结合结构域的启动受体的核酸序列;
- b. 编码包含第二细胞外抗原结合结构域的嵌合抗原受体的核酸序列;和
- c. 编码组成型激活细胞因子信号传导的合成途径激活因子的核酸序列和/或编码细胞因子的核酸序列;

其中所述重组核酸的5'端和3'端包含与所述原代细胞的基因组中的插入位点侧翼的基因组序列同源的核苷酸序列。

27. 一种活的无病毒的原代细胞,所述活的无病毒的原代细胞包含核糖核蛋白复合物(RNP)-重组核酸复合物,其中所述RNP包含核酸酶结构域和指导RNA,其中重组核酸包含:

- a. 编码包含特异性地结合至ALPG/P的第一细胞外抗原结合结构域的启动受体的核酸序列;
- b. 编码包含特异性地结合至MSLN的第二细胞外抗原结合结构域的嵌合抗原受体的核

酸序列;和

c. 编码组成型激活细胞因子信号传导的合成途径激活因子的核酸序列和/或编码细胞因子的核酸序列;

其中所述重组核酸的5'端和3'端包含与所述原代细胞的基因组中的插入位点侧翼的基因组序列同源的核苷酸序列。

28. 一种细胞群体,所述细胞群体包含多个权利要求24所述的免疫细胞或权利要求25-27中任一项所述的原代细胞。

29. 一种药物组合物,所述药物组合物包含权利要求24所述的免疫细胞、权利要求25-27中任一项所述的原代细胞或权利要求28所述的细胞群体,以及药学上可接受的赋形剂。

30. 一种药物组合物,所述药物组合物包含权利要求18-22中任一项所述的重组核酸或权利要求23所述的载体,以及药学上可接受的赋形剂。

31. 一种编辑免疫细胞的方法,所述方法包括:

a. 提供核糖核蛋白复合物(RNP)-重组核酸复合物,其中所述RNP包含核酸酶结构域和指导RNA,其中所述重组核酸包含权利要求18-22中任一项所述的重组核酸,并且其中所述重组核酸的5'端和3'端包含与所述免疫细胞的基因组中的插入位点侧翼的基因组序列同源的核苷酸序列;

b. 以非病毒方式将所述RNP-重组核酸复合物引入所述免疫细胞中,其中所述指导RNA与所述原代免疫细胞的基因组的靶区特异性地杂交,并且其中所述核酸酶结构域使所述靶区裂解以产生在所述免疫细胞的基因组中的所述插入位点;以及

c. 通过将权利要求18-22中任一项所述的重组核酸插入所述免疫细胞的基因组中的所述插入位点中来编辑所述免疫细胞。

32. 一种治疗受试者的疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用权利要求24所述的免疫细胞、权利要求25-27中任一项所述的原代细胞,或权利要求28所述的细胞群体,或权利要求30或30所述的药物组合物。

33. 一种抑制受试者中的靶细胞的方法,所述方法包括向所述受试者施用权利要求24所述的免疫细胞、权利要求25-27中任一项所述的原代细胞,或权利要求28所述的细胞群体,其中所述免疫细胞抑制所述靶细胞。

34. 一种调节免疫细胞的活性的方法,所述方法包括:

a. 获得免疫细胞,所述免疫细胞包含

i. 权利要求1-17中任一项所述的系统;

ii. 权利要求18-22中任一项所述的重组核酸;和/或

iii. 权利要求23所述的载体;以及

b. 使所述免疫细胞与表达启动受体抗原和CAR抗原的靶细胞接触,其中所述启动受体与所述靶细胞上的所述启动受体抗原的结合诱导所述启动受体的激活和所述嵌合抗原受体的表达,其中所述嵌合抗原受体与所述靶细胞上的所述CAR抗原的结合调节所述免疫细胞的活性,并且其中所述合成途径激活因子和/或所述细胞因子也调节所述免疫细胞的活性。

35. 一种调节免疫细胞的活性的方法,所述方法包括:

a. 获得免疫细胞,所述免疫细胞包含

- i. 权利要求1-17中任一项所述的系统;
 - ii. 权利要求18-22中任一项所述的重组核酸;和/或
 - iii. 权利要求23所述的载体;以及
- b. 使所述免疫细胞与表达ALPG/P和MSLN的靶细胞接触,其中所述启动受体与所述靶细胞上的ALPG/P的结合诱导所述启动受体的激活和所述嵌合抗原受体的表达,其中所述嵌合抗原受体与所述靶细胞上的MSLN的结合调节所述免疫细胞的活性,并且其中所述合成途径激活因子和/或所述细胞因子也调节所述免疫细胞的活性。

包含基因表达阻遏因子和/或合成途径激活因子和/或诱导型有效载荷的细胞

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2022年4月20日提交的美国临时申请第63/333,076号、2022年7月27日提交的美国临时申请第63/369,656号、2022年9月21日提交的美国临时申请第63/376,531号、2022年9月21日提交的美国临时申请第63/376,499号和2022年11月21日提交的美国临时申请第63/384,600号的权益,所述申请各自据此以引用的方式整体并入。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有已通过Patent Center提交并且据此以引用的方式整体并入的序列表。所述副本于2023年4月20日创建,名为ANB-214W0_SL.xml,并且大小为358,271字节。

背景技术

[0005] 癌症是一种以细胞不受控制的生长为特征的疾病。已经尝试了许多治疗癌症的方法,包括药物和放射疗法。最近的癌症治疗试图利用人体自身的免疫细胞来攻击癌细胞。一种有前景的方法是使用从患者身上提取的T细胞,并通过对T细胞进行基因工程化来产生嵌合抗原受体或CAR,这种受体蛋白赋予T细胞新的靶向特定蛋白质的能力。这些受体是嵌合的,因为它们将抗原结合与T细胞激活功能结合到单个受体中。

[0006] 使用CAR-T细胞的免疫疗法是很有前景的,因为修饰的T细胞有可能识别癌细胞,以便更有效地靶向和摧毁它们。

[0007] 在利用CAR对T细胞进行工程化后,将所得CAR-T细胞引入患者体内以攻击肿瘤细胞。CAR-T细胞可以源自患者自身血液中的T细胞(自体)或来自另一健康供体的T细胞(同种异体)。CAR-T细胞一旦注入患者体内,它们就会与细胞上的靶向抗原接触。CAR-T细胞与抗原结合并被激活。抗原结合后,CAR T细胞可以呈指数增殖,启动肿瘤细胞因子的产生以及靶肿瘤细胞的杀伤。

[0008] 然而,基于CAR T细胞的免疫疗法仍然存在一些问题和局限性。一些CAR T细胞可能与表达低水平靶抗原的正常细胞接合,导致脱靶毒性。因此,需要另外的疗法来降低脱靶毒性。

发明内容

[0009] 本公开总体上涉及增强表达CAR的免疫细胞的功能的系统和方法(例如,通过使用包含CAR和启动受体以及通过诱导组成型细胞因子信号传导来增强免疫细胞刺激的合成途径激活因子(SPA)的逻辑门)。总之,本文公开的系统和方法提供了改进的功效和对CAR免疫细胞的抗原特异性靶向。

[0010] 在各种实施方案中,本文公开了一种系统,所述系统包含:包含启动受体的第一嵌合多肽;包含嵌合抗原受体(CAR)的第二嵌合多肽;和细胞因子。

[0011] 在各种实施方案中,本文公开了一种系统,所述系统包含:包含启动受体的第一嵌合多肽;包含嵌合抗原受体(CAR)的第二嵌合多肽;和包含合成途径激活因子(SPA)的第三

嵌合多肽。

[0012] 在各种实施方案中,本文公开了一种系统,所述系统包含:包含启动受体的第一嵌合多肽;包含嵌合抗原受体(CAR)的第二嵌合多肽;包含合成途径激活因子(SPA)的第三嵌合多肽;和细胞因子。

[0013] 在各种实施方案中,本文公开了一种系统,所述系统包含:(a)包含启动受体的第一嵌合多肽,(b)包含嵌合抗原受体(CAR)的第二嵌合多肽,(c)基因表达阻遏因子,和(d)(i)包含合成途径激活因子(SPA)的第三嵌合多肽和/或(ii)细胞因子之一或两者。在一些实施方案中,启动受体从N末端至C末端包含:第一细胞外抗原结合结构域;包含一个或多个配体诱导型蛋白水解裂解位点的第一跨膜结构域;和包含人或人源化转录效应物的细胞内结构域。

[0014] 在一些实施方案中,第一细胞外抗原结合结构域特异性地结合至生殖细胞碱性磷酸酶(ALPG/P)。在一些实施方案中,第一细胞外抗原结合结构域包含可变重(VH)链序列和可变轻(VL)链序列,所述可变重(VH)链序列包含三个重链CDR序列CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述可变轻(VL)链序列包含三个轻链CDR序列CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,其中:CDR-H1包含SEQ ID NO:1、39、40、41或42所示的序列,CDR-H2包含2、43、44、45或46所示的序列,CDR-H3包含SEQ ID NO:3、47或48所示的序列,CDR-L1包含SEQ ID NO:4、49或50所示的序列,CDR-L2包含SEQ ID NO:5或51所示的序列,并且CDR-L3包含SEQ ID NO:6或53所示的序列。在一些实施方案中,VH链序列包含SEQ ID NO:7所示的序列。在一些实施方案中,VL链序列包含SEQ ID NO:8所示的序列。在一些实施方案中,第一细胞外抗原结合结构域包含SEQ ID NO:9所示的序列。在一些实施方案中,ALPG/P与第一细胞外抗原结合结构域的结合导致细胞内结构域内的一个或多个配体诱导型蛋白水解裂解位点处的裂解。

[0015] 在一些实施方案中,启动受体还包含定位于第一细胞外抗原结合结构域与第一跨膜结构域之间的第一铰链结构域。在一些实施方案中,第一铰链结构域包含CD8 α 或截短的CD8 α 铰链结构域。在一些实施方案中,第一铰链包含如SEQ ID NO:18所示的序列。

[0016] 在一些实施方案中,第一跨膜结构域包含Notch1跨膜结构域。在一些实施方案中,第一跨膜结构域包含如SEQ ID NO:19所示的序列。

[0017] 在一些实施方案中,细胞内结构域包含HNF1a/p65结构域或Gal4/VP64结构域。在一些实施方案中,细胞内结构域包含SEQ ID NO:23所示的序列。

[0018] 在一些实施方案中,启动受体还包含在第一跨膜结构域与细胞内结构域之间的终止转移序列。在一些实施方案中,终止转移序列包含如SEQ ID NO:20所示的序列。在一些实施方案中,启动受体包含如SEQ ID NO:24所示的序列。

[0019] 在一些实施方案中,CAR从N末端到C末端包含:(a)第二细胞外抗原结合结构域;(b)第二跨膜结构域;(c)细胞内共刺激结构域;和(d)细胞内激活结构域。

[0020] 在一些实施方案中,第二细胞外抗原结合结构域特异性地结合至间皮素(MSLN),并且第二细胞外抗原结合结构域包含可变重(VH)链序列和可变轻(VL)链序列,所述可变重(VH)链序列包含三个重链CDR序列CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述可变轻(VL)链序列包含三个轻链CDR序列CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,其中:(a)CDR-H1包含SEQ ID NO:10、54、56、57或71所示的序列,(b)CDR-H2包含SEQ ID NO:11、58、59、60、61或308所示的序列,(c)CDR-H3包含SEQ ID NO:12、62或63所示的序列,(d)CDR-L1包含SEQ ID NO:14、64、65、66或67所示的

序列, (e) CDR-L2包含SEQ ID NO:15、68、69或70所示的序列, 并且(f) CDR-L3包含SEQ ID NO:16或72所示的序列。在一些实施方案中, VH链序列包含SEQ ID NO:13所示的序列。在一些实施方案中, VL链序列包含SEQ ID NO:17所示的序列。在一些实施方案中, 第二细胞外抗原结合结构域包含SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列。

[0021] 在一些实施方案中, CAR包含第二铰链结构域。在一些实施方案中, 第二铰链结构域包含CD8 α 或截短的CD8 α 铰链结构域。在一些实施方案中, 第二跨膜结构域包含CD8 α 跨膜结构域。在一些实施方案中, 细胞内共刺激结构域包含4-1BB结构域。在一些实施方案中, 细胞内激活结构域包含CD3 ζ 结构域。在一些实施方案中, CAR包含如SEQ ID NO:31或32所示的序列。

[0022] 在一些实施方案中, SPA是STAT磷酸化、任选地STAT1、STAT3和/或STAT5磷酸化的激活因子。在一些实施方案中, SPA包含连接至细胞内信号传导结构域的细胞外结构域。在一些实施方案中, 细胞内信号传导结构域包含源自细胞因子受体的细胞内信号传导区。在一些实施方案中, 细胞内信号传导结构域包含源自白细胞介素受体的多肽序列。

[0023] 在一些实施方案中, 细胞因子受体包含白细胞介素6信号转导子(IL6ST)。在一些实施方案中, 细胞外结构域将组成型活性传递至细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中, 细胞外结构域包含二聚化区, 任选地其中二聚化区包含半胱氨酸残基和亮氨酸拉链中的至少一者。在一些实施方案中, 二聚化区形成同源二聚体。

[0024] 在一些实施方案中, SPA包括亮氨酸拉链-gp130(L-gp130)。在一些实施方案中, SPA包含与SEQ ID NO:74所示的序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的氨基酸序列。在一些实施方案中, SPA包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列。在一些实施方案中, SPA包含与SEQ ID NO:75所示的序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的氨基酸序列。在一些实施方案中, SPA包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列。

[0025] 在一些实施方案中, 细胞外结构域包含源自细胞因子的多肽并且模拟受体激动作用。在一些实施方案中, SPA包括膜结合的白细胞介素15(mbIL-15)。在一些实施方案中, SPA包含与SEQ ID NO:76所示的序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的氨基酸序列。在一些实施方案中, SPA包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列。

[0026] 在一些实施方案中, SPA包括CD34-白细胞介素7受体(C7R)。在一些实施方案中, SPA包含与SEQ ID NO:77所示的序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的氨基酸序列。在一些实施方案中, SPA包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列。在一些实施方案中, SPA包含与SEQ ID NO:78所示的序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的氨基酸序列。在一些实施方案中, SPA包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列。

[0027] 在一些实施方案中, 细胞因子是分泌的细胞因子。在一些实施方案中, 细胞因子是白细胞介素。在一些实施方案中, 细胞因子包括白细胞介素(IL)-2、Super-2、IL-12、IL-12/23p40、IL-7、IL-15、IL-21和IL-18中的至少一者。在一些实施方案中, 细胞因子是IL-2。在

一些实施方案中,细胞因子是Super-2。在一些实施方案中,细胞因子是IL-12。在一些实施方案中,细胞因子是IL-12/23p40。在一些实施方案中,细胞因子是IL-7。在一些实施方案中,细胞因子是IL-15。在一些实施方案中,细胞因子是IL-21。在一些实施方案中,细胞因子是IL-18。

[0028] 在一些实施方案中,细胞因子包含非天然信号肽。在一些实施方案中,非天然信号肽包括来自以下至少一者的信号肽:CD44、CD3E、CD5、IGTAL、IL-2、GMCSF、胰凝乳蛋白酶原、胰蛋白酶原、IgK、IgKVIII、IgE、OSM、IgG2H、BM40、secrecon和tPA。在一些实施方案中,非天然信号肽包含SEQ ID NO:100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128或130所示的氨基酸序列或由其组成。在一些实施方案中,细胞因子包含SEQ ID NO:86、88、90、92、94、96、98或132所示的氨基酸序列。

[0029] 在一些实施方案中,基因表达阻遏因子是sgRNA或shRNA。在一些实施方案中,基因表达阻遏因子是sgRNA。在一些实施方案中,sgRNA阻遏选自以下的基因的表达:PTPN2、RASA2、SOCS1、ZC3H12A和CISH。在一些实施方案中,sgRNA阻遏PTPN2的表达。在一些实施方案中,sgRNA阻遏RASA2的表达。在一些实施方案中,sgRNA阻遏SOCS1的表达。在一些实施方案中,sgRNA阻遏ZC3H12A的表达。在一些实施方案中,sgRNA阻遏CISH的表达。在一些实施方案中,sgRNA包含SEQ ID NO:160-164中任一者所示的核酸序列。

[0030] 在一些实施方案中,基因表达阻遏因子是shRNA。在一些实施方案中,shRNA阻遏选自以下的基因的表达:RASA2、SOCS1、ZC3H12A、TGFB1和CISH。在一些实施方案中,shRNA阻遏RASA2的表达。在一些实施方案中,shRNA阻遏SOCS1的表达。在一些实施方案中,shRNA阻遏ZC3H12A的表达。在一些实施方案中,shRNA阻遏TGFB1的表达。在一些实施方案中,shRNA阻遏CISH的表达。在一些实施方案中,shRNA包含SEQ ID NO:165-172中任一者所示的核酸序列。

[0031] 在一些实施方案中,系统包含两种或更多种基因表达阻遏因子。在一些实施方案中,系统包含阻遏TNFRSF6 (Fas) 表达的shRNA和另外的基因表达阻遏因子。在一些实施方案中,系统包含阻遏TNFRSF6 (Fas) 表达的shRNA、阻遏TGFB2表达的shRNA和另外的基因表达阻遏因子。在一些实施方案中,系统包含阻遏TNFRSF6 (Fas) 表达的shRNA、阻遏PTPN2表达的shRNA和另外的基因表达阻遏因子。

[0032] 在一些实施方案中,系统包含阻遏CISH表达的sgRNA以及为IL-2的细胞因子。在一些实施方案中,系统包含阻遏PTPN2表达的sgRNA以及为IL-2的细胞因子。在一些实施方案中,系统包含阻遏RASA2表达的sgRNA以及为IL-2的细胞因子。在一些实施方案中,系统包含阻遏SOCS1表达的sgRNA以及为IL-2的细胞因子。在一些实施方案中,系统包含阻遏ZC3H12A表达的sgRNA以及为IL-2的细胞因子。在一些实施方案中,系统包含阻遏RASA2表达的shRNA以及为IL-2的细胞因子。在一些实施方案中,系统包含阻遏PTPN2表达的sgRNA以及为IL-21的细胞因子。在一些实施方案中,系统包含阻遏ZC3H12A表达的sgRNA以及为IL-21的细胞因子。在一些实施方案中,系统包含阻遏CISH表达的sgRNA以及为C7R的SPA。在一些实施方案中,系统包含阻遏PTPN2表达的sgRNA以及为C7R的SPA。在一些实施方案中,系统包含阻遏RASA2表达的sgRNA以及为C7R的SPA。在一些实施方案中,系统包含阻遏SOCS1表达的sgRNA以及为C7R的SPA。在一些实施方案中,系统包含阻遏ZC3H12A表达的sgRNA以及为C7R的SPA。在一些实施方案中,系统包含阻遏CISH表达的sgRNA以及为L-gp130的SPA。在一些实施方案

中,系统包含阻遏RASA2表达的sgRNA以及为L-gp130的SPA。在一些实施方案中,系统包含阻遏ZC3H12A表达的sgRNA以及为L-gp130的SPA。在一些实施方案中,系统包含阻遏RASA2表达的shRNA、为IL-2的细胞因子以及为L-gp130的SPA。在一些实施方案中,系统包含阻遏RASA2表达的sgRNA、为IL-2的细胞因子以及为L-gp130的SPA。在一些实施方案中,系统包含阻遏RASA2表达的shRNA、为IL-15的细胞因子以及为L-gp130的SPA。在一些实施方案中,系统包含阻遏RASA2表达的sgRNA、为IL-15的细胞因子以及为L-gp130的SPA。

[0033] 在一些实施方案中,启动受体和CAR能够结合至相同的靶细胞。在一些实施方案中,靶细胞是人细胞。在一些实施方案中,靶细胞是癌细胞。在一些实施方案中,癌细胞是固体癌细胞或液体癌细胞。在一些实施方案中,癌细胞是卵巢癌、输卵管癌、原发性腹膜癌、子宫癌、间皮瘤、宫颈癌或胰腺癌。

[0034] 在各种实施方案中,本文还公开了一种或多种重组核酸,所述重组核酸包含至少一个核酸片段,所述至少一个核酸片段包含编码本文公开的系统的核苷酸序列。

[0035] 在各种实施方案中,本文还公开了一种或多种重组核酸,所述重组核酸包含至少一个核酸片段,所述至少一个核酸片段包含:编码包含第一细胞外抗原结合结构域的启动受体的核苷酸序列;编码包含第二细胞外抗原结合结构域的嵌合抗原受体的核苷酸序列;和编码细胞因子的核苷酸序列。

[0036] 在各种实施方案中,本文还公开了一种或多种重组核酸,所述重组核酸包含至少一个核酸片段,所述至少一个核酸片段包含:编码包含第一细胞外抗原结合结构域的启动受体的核苷酸序列;编码包含第二细胞外抗原结合结构域的嵌合抗原受体的核苷酸序列;和编码合成途径激活因子的核苷酸序列。

[0037] 在各种实施方案中,本文还公开了一种或多种重组核酸,所述重组核酸包含至少一个核酸片段,所述至少一个核酸片段包含:编码包含第一细胞外抗原结合结构域的启动受体的核苷酸序列;编码包含第二细胞外抗原结合结构域的嵌合抗原受体的核苷酸序列;编码合成途径激活因子的核苷酸序列;和编码细胞因子的核苷酸序列。

[0038] 在各种实施方案中,本文还公开了一种或多种重组核酸,所述重组核酸包含至少一个核酸片段,所述至少一个核酸片段包含:编码包含第一细胞外抗原结合结构域的启动受体的核苷酸序列;编码包含第二细胞外抗原结合结构域的嵌合抗原受体的核苷酸序列;基因表达阻遏因子的核苷酸序列;和以下之一或两者:编码合成途径激活因子的核苷酸序列和/或编码细胞因子的核苷酸序列。在一些实施方案中,第一细胞外抗原结合结构域特异性地结合至ALPG/P。在一些实施方案中,第二细胞外抗原结合结构域特异性地结合至MSLN。在一些实施方案中,重组核酸包含两个或更多个核酸片段。

[0039] 在一些实施方案中,重组核酸还包含可操作地连接至编码CAR的核苷酸序列的诱导型启动子。在一些实施方案中,重组核酸还包含可操作地连接至编码启动受体的核苷酸序列的组成型启动子。在一些实施方案中,重组核酸还包含可操作地连接至编码合成途径激活因子的核苷酸序列的组成型启动子。在一些实施方案中,启动受体和合成途径激活因子在相同组成型启动子的控制之下。在一些实施方案中,重组核酸还包含可操作地连接至编码嵌合抗原受体的核苷酸序列的诱导型启动子以及可操作地连接至编码启动受体的核苷酸序列和编码合成途径激活因子的核苷酸序列的组成型启动子。

[0040] 在一些实施方案中,核酸在5'至3'方向上包含:组成型启动子;编码合成途径激活

因子的核苷酸序列;编码启动受体的核苷酸序列;诱导型启动子;和编码嵌合抗原受体的核苷酸序列。在一些实施方案中,核酸在5'至3'方向上包含:诱导型启动子;编码嵌合抗原受体的核苷酸序列;组成型启动子;编码启动受体的核苷酸序列;和编码合成途径激活因子的核苷酸序列。

[0041] 在一些实施方案中,重组核酸还包含可操作地连接至编码细胞因子的核苷酸序列的诱导型启动子。

[0042] 在一些实施方案中,重组核酸还包含:(a)可操作地连接至编码嵌合抗原受体的核苷酸序列和编码细胞因子的核苷酸序列的诱导型启动子;以及(b)可操作地连接至编码启动受体的核苷酸序列的组成型启动子。

[0043] 在一些实施方案中,核酸在5'至3'方向上包含:(a)组成型启动子;(b)编码启动受体的核苷酸序列;(c)诱导型启动子;(d)编码嵌合抗原受体的核苷酸序列;和(e)编码细胞因子的核苷酸序列。

[0044] 在一些实施方案中,核酸在5'至3'方向上包含:(a)组成型启动子;(b)编码启动受体的核苷酸序列;(c)诱导型启动子;(d)编码细胞因子的核苷酸序列;和(e)编码嵌合抗原受体的核苷酸序列。

[0045] 在一些实施方案中,核酸在5'至3'方向上包含:(a)诱导型启动子;(b)编码嵌合抗原受体的核苷酸序列;(c)编码细胞因子的核苷酸序列;(d)组成型启动子;和(e)编码启动受体的核苷酸序列。

[0046] 在一些实施方案中,核酸在5'至3'方向上包含:(a)诱导型启动子;(b)编码细胞因子的核苷酸序列;(c)编码嵌合抗原受体的核苷酸序列;(d)组成型启动子;和(e)编码启动受体的核苷酸序列。

[0047] 在一些实施方案中,重组核酸还包含:(a)可操作地连接至编码嵌合抗原受体的核苷酸序列的第一诱导型启动子;(b)可操作地连接至编码细胞因子的核苷酸序列的第二诱导型启动子;以及(c)可操作地连接至编码启动受体的核苷酸序列的组成型启动子。

[0048] 在一些实施方案中,核酸在5'至3'方向上包含:(a)组成型启动子;(b)编码启动受体的核苷酸序列;(c)第一诱导型启动子;(d)编码嵌合抗原受体的核苷酸序列;(e)第二诱导型启动子;和(f)编码细胞因子的核苷酸序列。

[0049] 在一些实施方案中,核酸在5'至3'方向上包含:(a)组成型启动子;(b)编码启动受体的核苷酸序列;(c)第二诱导型启动子;(c)编码细胞因子的核苷酸序列;(d)第一诱导型启动子;和(e)编码嵌合抗原受体的核苷酸序列。

[0050] 在一些实施方案中,核酸在5'至3'方向上包含:(a)第一诱导型启动子;(b)编码嵌合抗原受体的核苷酸序列;(c)第二诱导型启动子;(d)编码细胞因子的核苷酸序列;(e)组成型启动子;和(f)编码启动受体的核苷酸序列。

[0051] 在一些实施方案中,核酸在5'至3'方向上包含:(a)第一诱导型启动子;(b)编码嵌合抗原受体的核苷酸序列;(c)组成型启动子;(d)编码启动受体的核苷酸序列;(e)第二诱导型启动子;和(f)编码细胞因子的核苷酸序列。

[0052] 在一些实施方案中,核酸在5'至3'方向上包含:(a)第二诱导型启动子;(b)编码细胞因子的核苷酸序列;(c)第一诱导型启动子;(d)编码嵌合抗原受体的核苷酸序列;(e)组成型启动子;和(f)编码启动受体的核苷酸序列。

[0053] 在一些实施方案中,核酸在5'至3'方向上包含:(a)第二诱导型启动子;(b)编码细胞因子的核酸序列;(c)组成型启动子;(d)编码启动受体的核苷酸序列;(e)第一诱导型启动子;和(f)编码嵌合抗原受体的核苷酸序列。

[0054] 在一些实施方案中,第一诱导型启动子和第二诱导型启动子是相同的。

[0055] 在一些实施方案中,编码启动受体的核苷酸序列包含SEQ ID NO:35所示的序列。在一些实施方案中,编码嵌合抗原受体的核苷酸序列包含SEQ ID NO:36所示的序列。在一些实施方案中,编码合成途径激活因子的核苷酸序列包含SEQ ID NO:79、80、81、82或83所示的序列。在一些实施方案中,编码细胞因子的核苷酸序列包含SEQ ID NO:87、89、91、93、95、97或99所示的序列。在一些实施方案中,基因表达阻遏因子包含SEQ ID NO:160-172中任一者所示的核酸序列。

[0056] 在一些实施方案中,核酸在一些实施方案中,重组核酸还包含与宿主细胞染色体中的插入位点互补的5'同源定向修复臂和3'同源定向修复臂。在一些实施方案中,重组核酸还包含编码自切除2A肽(P2A)的核苷酸序列。在一些实施方案中,P2A处于编码嵌合抗原受体的核苷酸序列的3'端。在一些实施方案中,P2A处于编码启动受体的核苷酸序列的3'端。

[0057] 在一些实施方案中,重组核酸还包含土拨鼠肝炎病毒翻译后调控元件(WPRE)。在一些实施方案中,WPRE处于编码嵌合抗原受体的核苷酸序列的3'端和编码启动受体的核苷酸序列的5'端,或者其中所述WPRE处于编码启动受体的核苷酸序列的3'端和编码嵌合抗原受体的核苷酸序列的5'端。在一些实施方案中,重组核酸还包含SV40多聚A元件。

[0058] 在一些实施方案中,将核酸并入表达盒或表达载体中。在一些实施方案中,表达载体是非病毒载体。

[0059] 在各种实施方案中,本文还公开了包含本文公开的重组核酸的表达载体。在一些实施方案中,重组核酸的5'端和3'端包含与原代细胞基因组中插入位点侧翼的基因组序列同源的核苷酸序列。在一些实施方案中,插入位点位于T细胞受体 α 恒定(TRAC)基因座或基因组安全港(GSH)基因座。

[0060] 在各种实施方案中,本文还公开了一种免疫细胞,所述免疫细胞包含:本文公开的系统;至少一种本文公开的重组核酸;和/或本文公开的载体。在一些实施方案中,所述免疫细胞是原代人免疫细胞。在一些实施方案中,免疫细胞是同种异体免疫细胞。在一些实施方案中,免疫细胞是自体免疫细胞。在一些实施方案中,所述原代免疫细胞是自然杀伤(NK)细胞、T细胞、CD8+T细胞、CD4+T细胞、原代T细胞或T细胞祖细胞。在一些实施方案中,所述原代免疫细胞是原代T细胞。在一些实施方案中,所述原代免疫细胞是原代人T细胞。在一些实施方案中,所述原代免疫细胞是无病毒的。

[0061] 在各种实施方案中,本文还公开了一种原代免疫细胞,所述原代免疫细胞包含至少一种重组核酸,所述重组核酸包含:编码包含第一细胞外抗原结合结构域的启动受体的核酸序列;编码包含第二细胞外抗原结合结构域的嵌合抗原受体的核酸序列;编码细胞因子和/或合成途径激活因子的核酸序列;其中所述重组核酸插入原代免疫细胞的基因组的靶区中,其中所述原代免疫细胞不包含用于将重组核酸引入原代免疫细胞中的病毒载体。在一些实施方案中,第一细胞外抗原结合结构域特异性地结合至ALPG/P。在一些实施方案中,第二细胞外抗原结合结构域特异性地结合至MSLN。

[0062] 在各种实施方案中,本文还公开了包含核糖核蛋白复合物(RNP)-重组核酸复合物的活的无病毒的原代细胞,其中所述RNP包含核酸酶结构域和指导RNA,其中重组核酸包含:编码包含特异性地结合至ALPG/P的第一细胞外抗原结合结构域的启动受体的核酸序列;编码包含特异性地结合至MSL的第二细胞外抗原结合结构域的嵌合抗原受体的核酸序列;编码细胞因子和/或组成型激活细胞因子信号传导的合成途径激活因子的核酸序列;其中重组核酸的5'端和3'端包含与原代细胞的基因组中的插入位点侧翼的基因组序列同源的核苷酸序列。在一些实施方案中,第一细胞外抗原结合结构域特异性地结合至ALPG/P。在一些实施方案中,第二细胞外抗原结合结构域特异性地结合至MSLN。

[0063] 在各种实施方案中,本文还公开了包含多个本文公开的免疫细胞的细胞群体。

[0064] 在各种实施方案中,本文还公开了一种药物组合物,所述药物组合物包含本文公开的免疫细胞或本文公开的细胞群体,以及药学上可接受的赋形剂。

[0065] 在各种实施方案中,本文还公开了一种药物组合物,所述药物组合物包含本文公开的重组核酸或本文公开的载体,以及药学上可接受的赋形剂。

[0066] 在各种实施方案中,本文还公开了一种编辑免疫细胞的方法,所述方法包括:提供核糖核蛋白(RNP)-重组核酸复合物,其中所述RNP包含核酸酶结构域和指导RNA,其中所述重组核酸包含本文公开的重组核酸,并且其中所述重组核酸的5'端和3'端包含与免疫细胞基因组中插入位点侧翼的基因组序列同源的核苷酸序列;以非病毒方式将RNP-重组核酸复合物引入免疫细胞中,其中所述指导RNA与原代免疫细胞基因组的靶区特异性地杂交,并且其中核酸酶结构域使靶区裂解以产生在免疫细胞基因组中的插入位点;以及通过将如本文所公开的重组核酸插入免疫细胞基因组中的插入位点中来编辑免疫细胞。在一些实施方案中,以非病毒方式引入包括电穿孔。

[0067] 在一些实施方案中,所述核酸酶结构域包含CRISPR相关核酸内切酶(Cas),任选地是Cas9核酸酶。在一些实施方案中,所述细胞的基因组的所述靶区是T细胞受体 α 恒定(TRAC)基因座或基因组安全港(GSH)基因座。在一些实施方案中,重组核酸是双链重组核酸或单链重组核酸。在一些实施方案中,重组核酸是线状重组核酸或环状重组核酸,任选地其中所述环状重组核酸是质粒。

[0068] 在一些实施方案中,所述免疫细胞是原代人免疫细胞。在一些实施方案中,免疫细胞是自体免疫细胞。在一些实施方案中,免疫细胞是同种异体免疫细胞。在一些实施方案中,所述免疫细胞是自然杀伤(NK)细胞、T细胞、CD8+T细胞、CD4+T细胞、原代T细胞或T细胞祖细胞。在一些实施方案中,免疫细胞是原代T细胞。在一些实施方案中,免疫细胞是原代人T细胞。在一些实施方案中,免疫细胞是无病毒的。在一些实施方案中,所述方法还包括从患者获得免疫细胞以及在体外引入重组核酸。

[0069] 在各种实施方案中,本文还公开了一种治疗受试者的疾病的方法,所述方法包括向受试者施用本文公开的免疫细胞或本文公开的原代细胞或本文公开的药物组合物。在一些实施方案中,所述疾病是癌症。在一些实施方案中,癌症是实体癌或液体癌。在一些实施方案中,癌症是卵巢癌、输卵管癌、原发性腹膜癌、子宫癌、间皮瘤、宫颈癌或胰腺癌。

[0070] 在一些实施方案中,施用免疫细胞增强受试者的免疫应答。在一些实施方案中,增强的免疫应答是适应性免疫应答。在一些实施方案中,增强的免疫应答是先天免疫应答。在一些实施方案中,增强的免疫应答是增加的至少一种细胞因子或趋化因子的表达。在一些

实施方案中,所述至少一种细胞因子或趋化因子是IL-2或IFN γ 。在一些实施方案中,增强的免疫应答是增加的靶细胞溶解。在一些实施方案中,所述方法还包括与免疫细胞同时或在免疫细胞之后向所述受试者施用免疫疗法。

[0071] 在各种实施方案中,本文还公开了一种调节免疫细胞活性的方法,所述方法包括:获得包含本文公开的系统、本文公开的重组核酸和/或本文公开的载体的免疫细胞;以及使免疫细胞与表达ALPG/P和MSLN的靶细胞接触,其中启动受体与靶细胞上的ALPG/P的结合诱导启动受体的激活和嵌合抗原受体的表达,其中嵌合抗原受体与靶细胞上的MSLN的结合调节免疫细胞的活性,并且其中细胞因子和/或合成途径激活因子也调节免疫细胞的活性。

[0072] 在一些实施方案中,免疫细胞活性的调节包括增强免疫应答。在一些实施方案中,增强的免疫应答是适应性免疫应答。在一些实施方案中,增强的免疫应答是先天免疫应答。在一些实施方案中,免疫细胞活性是增加的至少一种细胞因子或趋化因子的表达。在一些实施方案中,所述至少一种细胞因子或趋化因子是IL-2或IFN γ 。在一些实施方案中,免疫细胞活性是靶细胞溶解。

[0073] 在各种实施方案中,本文还公开了一种系统,所述系统包含:(a)CAR、SPA和细胞因子中的至少一者;(b)RASA2表达的阻遏因子。在一些实施方案中,SPA包括亮氨酸拉链-gp130(L-gp130)。在一些实施方案中,SPA包含与SEQ ID NO:74所示的序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的氨基酸序列。在一些实施方案中,SPA包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列。在一些实施方案中,SPA包含与SEQ ID NO:75所示的序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的氨基酸序列。在一些实施方案中,SPA包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列。

[0074] 在一些实施方案中,细胞因子是IL-2。在一些实施方案中,细胞因子包含SEQ ID NO:86所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,细胞因子是IL-15。在一些实施方案中,细胞因子包含SEQ ID NO:96所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,RASA2表达的阻遏因子是shRNA或sgRNA。在一些实施方案中,RASA2表达的阻遏因子是shRNA。在一些实施方案中,shRNA包含SEQ ID NO:165的核酸序列。在一些实施方案中,RASA2表达的阻遏因子是sgRNA。在一些实施方案中,sgRNA包含SEQ ID NO:161的核酸序列。

[0075] 在一些实施方案中,系统还包含阻遏TNFRSF6(Fas)表达的shRNA。在一些实施方案中,系统还包含阻遏TGFB2表达的shRNA。在一些实施方案中,系统还包含阻遏PTPN2表达的shRNA。

[0076] 在各种实施方案中,本文还公开了一种或多种重组核酸,所述重组核酸包含至少一个核酸片段,所述至少一个核酸片段包含编码本文公开的系统的核苷酸序列。

[0077] 在各种实施方案中,本文还公开了包含本文提供的重组核酸序列的表达载体。

[0078] 在各种实施方案中,本文还公开了一种工程化免疫细胞,所述工程化免疫细胞包含:本文公开的系统;本文公开的重组核酸序列;或本文公开的表达载体。

[0079] 在工程化免疫细胞的多个实施方案中,本文还公开了一种改善方案,其包含:(a)CAR、SPA和细胞因子中的至少一者;(b)RASA2表达的阻遏因子。在一些实施方案中,SPA包括亮氨酸拉链-gp130(L-gp130)。在一些实施方案中,SPA包含与SEQ ID NO:74所示的序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少

98%或至少99%同一的氨基酸序列。在一些实施方案中,SPA包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列。在一些实施方案中,SPA包含与SEQ ID NO:75所示的序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的氨基酸序列。在一些实施方案中,SPA包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列。

[0080] 在一些实施方案中,细胞因子是IL-2。在一些实施方案中,细胞因子包含SEQ ID NO:86所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,RASA2表达的阻遏因子是shRNA或sgRNA。在一些实施方案中,RASA2表达的阻遏因子是shRNA。在一些实施方案中,shRNA包含SEQ ID NO:165的核酸序列。在一些实施方案中,RASA2表达的阻遏因子是sgRNA。在一些实施方案中,sgRNA包含SEQ ID NO:161的核酸序列。

[0081] 在一些实施方案中,工程化免疫细胞还包含阻遏TNFRSF6 (Fas) 表达的shRNA。在一些实施方案中,工程化免疫细胞还包含阻遏TGFR2表达的shRNA。在一些实施方案中,工程化免疫细胞还包含阻遏PTPN2表达的shRNA。

[0082] 在一些实施方案中,所述工程化免疫细胞是原代人免疫细胞。在一些实施方案中,工程化免疫细胞是同种异体免疫细胞。在一些实施方案中,工程化免疫细胞是自体免疫细胞。在一些实施方案中,所述原代免疫细胞是自然杀伤(NK) 细胞、T细胞、CD8+T细胞、CD4+T细胞、原代T细胞或T细胞祖细胞。在一些实施方案中,所述原代免疫细胞是原代T细胞。在一些实施方案中,其中所述原代免疫细胞是原代人T细胞。在一些实施方案中,所述原代免疫细胞是无病毒的。

[0083] 在各种实施方案中,本文还公开了包含多个本文公开的工程化免疫细胞的细胞群体。

[0084] 在各种实施方案中,本文还公开了一种药物组合物,所述药物组合物包含本文公开的工程化免疫细胞或本文公开的群体,以及药学上可接受的赋形剂。

[0085] 在各种实施方案中,本文还公开了一种治疗受试者的疾病的方法,所述方法包括向受试者施用本文公开的工程化免疫细胞或本文公开的药物组合物。在一些实施方案中,所述疾病是癌症。在一些实施方案中,癌症是实体癌或液体癌。在一些实施方案中,癌症是卵巢癌、输卵管癌、原发性腹膜癌、子宫癌、间皮瘤、宫颈癌或胰腺癌。在一些实施方案中,施用工程化免疫细胞增强受试者的免疫应答。在一些实施方案中,增强的免疫应答是适应性免疫应答。在一些实施方案中,增强的免疫应答是先天免疫应答。在一些实施方案中,增强的免疫应答是增加的至少一种细胞因子或趋化因子的表达。在一些实施方案中,所述至少一种细胞因子或趋化因子是IL-2或IFN γ 。在一些实施方案中,增强的免疫应答是增加的靶细胞溶解。在一些实施方案中,所述方法还包括与工程化免疫细胞同时或在工程化免疫细胞之后向所述受试者施用免疫疗法。

[0086] 在各种实施方案中,本文还公开了一种抑制受试者中的靶细胞的方法,所述方法包括向受试者施用本文公开的工程化免疫细胞或本文公开的药物组合物,其中工程化免疫细胞抑制靶细胞。在一些实施方案中,靶细胞是癌细胞。

附图说明

[0087] 参考以下描述和附图将更好地理解本发明的这些和其他特征、方面和优点,在附图中:

- [0088] 图1示出了采用合成途径激活因子 (SPA) 的示例性逻辑门蛋白表达系统的示意图。
- [0089] 图2A示出了在无细胞因子培养基中培养6天期间表达各种促存活受体的T细胞的倍数变化。培养物中表达逻辑门的T细胞 (LG T细胞) 的百分比由在primeR上表达Myc标签的细胞数目定义。图2B示出了图2A中的细胞的绝对细胞计数,以相对于培养第一天的倍数变化表示。
- [0090] 图3示出了在非刺激条件下与在表面表达惰性截短EGFR分子 (EGFRt) 的T细胞相比,表达两种类型的合成途径激活因子的T细胞中STAT1、STAT3和STAT5蛋白的磷酸化。
- [0091] 图4A示出了表达各种类型的合成途径激活因子或组成型分泌的细胞因子分子的LG T的基线pSTAT1水平的比较。图4B示出了表达各种类型的合成途径激活因子或组成型分泌的细胞因子分子的LG T的基线pSTAT3水平的比较。图4C示出了表达各种类型的合成途径激活因子或组成型分泌的细胞因子分子的LG T的基线pSTAT5水平的比较。
- [0092] 图5A示出了单独培养或与抗原阴性肿瘤细胞一起培养的表达指示蛋白的T细胞中的primeR表面表达。图5B示出了单独培养或与抗原阴性肿瘤细胞一起培养的表达指示蛋白的T细胞中的催化CAR表面表达。
- [0093] 图6A示出了当与抗原阳性细胞共培养时表达促存活模块或惰性EGFRt分子的LG T的细胞毒活性。图6B示出了当与抗原阴性细胞共培养时表达促存活模块或惰性EGFRt分子的LG T的细胞毒活性。
- [0094] 图7A示出了4种不同效应物:靶标比率的表达促存活分子的LG T的肿瘤细胞杀伤的72小时期间内的连续分析。图7B示出了在与抗原阳性肿瘤细胞以4种不同效应物:靶标比率共培养期间T细胞扩增的72小时期间内的连续分析。
- [0095] 图8A示出了10天期间内与表达ALPG/MSLN的RPMI细胞一起培养的表达指示促存活受体的逻辑门T细胞的细胞计数。图8B示出了在第10天表达截短的EGFR的逻辑门T细胞的代表性孔图像。图8C示出了在第10天表达基于gp130的SPA的逻辑门T细胞的代表性孔图像。
- [0096] 图9示出了表达各种促存活分子的攻击前LG T上各种T细胞表型标志物的流式细胞术染色的定量。
- [0097] 图10示出了整个15天重复刺激测定中的细胞毒性和T细胞扩增,其中每2-3天用K562肿瘤细胞攻击LG T。
- [0098] 图11A示出了描绘整个31天重复刺激测定(在存在或不补充IL-2的培养基的情况下)中的总肿瘤细胞扩增的汇总指标,其中示出了来自两例供体的数据(左图和右图)。图11B示出了描绘整个31天重复刺激测定(在存在或不补充IL-2的培养基的情况下)中的总T细胞扩增的汇总指标,其中示出了来自两例供体的数据(左图和右图)。
- [0099] 图12示出了在连续6轮肿瘤攻击后6天期间内在无细胞因子培养基中培养的表达指示促存活受体的T细胞的细胞活力。
- [0100] 图13A示出了在不补充IL-2的培养基的情况下在6轮肿瘤攻击后ICT上各种T细胞表型标志物的流式细胞术染色的定量。图13B示出了在补充IL-2的培养基的情况下在6轮肿瘤攻击后ICT上各种T细胞表型标志物的流式细胞术染色的定量。
- [0101] 图14A示出了在不补充IL-2的情况下用肿瘤细胞刺激的ICT中的细胞表型的比较。图14B示出了在补充IL-2的情况下用肿瘤细胞刺激的ICT中的细胞表型的比较。
- [0102] 图15A示出了在不补充IL-2的情况下用肿瘤细胞刺激的表达截短EGFR的T细胞中

细胞表型随时间变化的比较。图15B示出了在存在IL-2的情况下用肿瘤细胞刺激的表达截短EGFR的T细胞中细胞表型随时间变化的比较。图15C示出了在不存在IL-2的情况下用肿瘤细胞刺激的表达基于gp130的SPA的T细胞中细胞表型随时间变化的比较。图15D示出了在存在IL-2的情况下用肿瘤细胞刺激的表达基于gp130的SPA的T细胞中细胞表型随时间变化的比较。

[0103] 图16A至图16B示出了在敲低或不敲低FAS和PTPN2的情况下在非刺激条件下在表达L-gp130的T细胞中STAT3 (图16A) 和STAT1 (图16B) 蛋白的磷酸化。表达EGFRt的T细胞用作对照。

[0104] 图17A示出了在敲低或不敲低FAS/PTPN2的情况下与表达EGFRt或L-gp130的LG T细胞一起孵育后靶细胞的相对扩增。图17B示出了如通过流式细胞术测量的表达指示表面标志物的表达SPA的LG T细胞的相对计数。

[0105] 图18A是重复刺激测定攻击之前和之后表达SPA的LG T细胞中差异基因表达的热图。图18B是重复刺激测定攻击之前和之后LG T细胞中选定的T细胞耗竭标志物的差异表达的热图。

[0106] 图19描绘了重复刺激测定攻击之前和之后如通过ATAC-seq测量的LG T细胞中选定的T细胞耗竭标志物 (TIGIT和TOX) 的基因座的可及性。

[0107] 图20图解了使用表达指示SPA的CAR/primeR逻辑门T细胞在小鼠中进行的SPA探查测定设计。

[0108] 图21图解了使用表达指示SPA的CAR/primeR逻辑门T细胞在小鼠中进行的SPA探查测定设计。

[0109] 图22A示出了用表达指示SPA的CAR/primeR LG T细胞治疗的小鼠的肿瘤负荷。图22B示出了用表达指示SPA的CAR/primeR逻辑门T细胞治疗的小鼠的LG T细胞水平。图22C示出了实验终点时表达指示SPA的LG T细胞的细胞计数。细胞计数以EGFRt对照作归一化。

[0110] 图23A示出了用表达指示SPA的CAR/primeR逻辑门T细胞治疗的小鼠的肿瘤负荷。图23B示出了用表达指示SPA的CAR/primeR逻辑门T细胞治疗的小鼠的逻辑门T细胞水平。

[0111] 图24A至图24C描绘了表达SPA的LG T细胞在鼠肾细胞癌异种移植模型中的作用。图24A图解了实验设计。图24B描绘了移植有表达指示SPA的LG T细胞的小鼠的肿瘤负荷。图24C描绘了LG T细胞移植后指示时间点全血中表达SPA的LG T细胞的总计数。

[0112] 图25A图解了测试响应于逻辑门激活的诱导型细胞因子分泌的测定。图25B示出了响应于逻辑门激活的诱导型IL-2分泌的激活。

[0113] 图26A图解了在有或没有诱导型细胞因子表达的情况下测试响应于逻辑门激活的CAR-T细胞介导的细胞毒性的测定。图26B示出了在不存在抗原刺激的情况下指示效应物：靶标 (E:T) 比率下的CAR-T细胞介导的细胞毒性。图26C示出了在存在启动抗原和溶细胞抗原刺激的情况下一定E:T比率下的CAR-T细胞介导的细胞毒性。

[0114] 图27A图解了未刺激的LG T细胞中逻辑门的漏性的流式细胞术分析。图27B示出了在不存在抗原刺激的情况下LG T细胞中的primeR和CAR表达,其中编码细胞因子“有效载荷”的核酸位于编码CAR的核酸的上游。图27C示出了在不存在抗原刺激的情况下LG T细胞中的primeR和CAR表达,其中编码细胞因子“有效载荷”的核酸位于编码CAR的核酸的下游。

[0115] 图28示出了在存在指示细胞因子的情况下表达逻辑门的T细胞的扩增。

[0116] 图29示出了在存在指示细胞因子的情况下表达逻辑门的T细胞的扩增。

[0117] 图30示出了与用PrimeR和CAR抗原刺激的Logic Gate T细胞中的对照相比指示诱导型细胞因子的分泌。

[0118] 图31示出了表达逻辑门加上指示诱导型细胞因子的T细胞的扩增。

[0119] 图32A详述了具有非天然信号肽的诱导型细胞因子的构建,以实现可调的分泌。图32B示出了具有指示信号肽的逻辑门T细胞中的IL-7分泌水平。

[0120] 图33A示出了用表达指示辅助分子的逻辑门T细胞治疗的小鼠随时间变化的肿瘤体积。图33B示出了在肿瘤注射后指示时间点表达指示辅助分子的逻辑门T细胞的滴度。图33C示出了在肿瘤注射后15天表达指示辅助分子的逻辑门T细胞的滴度。

[0121] 图34A至图34C是详述合成途径激活因子 (SPA) 和细胞因子的组合的高通量筛选的工作流程的示意图。图34A详述了用于产生表达SPA和细胞因子组合的LG T细胞的细胞编辑过程。图34B详述了对经编辑的细胞进行归一化以便筛选的过程。图34C详述了用于筛选经编辑的T细胞对靶细胞杀伤和T细胞增殖的影响的连续刺激测定。

[0122] 图35A至图35C示出了基于靶细胞计数减少 (较低的数字表示靶细胞杀伤增加) 表达指示SPA和细胞因子组合的LG T细胞的筛选结果。图35A示出了方框颜色是基于所表达的SPA的各组合的结果。图35B示出了方框颜色是基于所表达的细胞因子的各组合的结果。图35C示出了与指示阳性对照相比所测试的前20佳组合的结果。

[0123] 图36A和图36B示出了详述表现优于单模块LG T细胞的组合的图。图36A示出了基于减少的靶细胞计数表现优于单模块LG T细胞的组合。图36B示出了基于增加的T细胞扩增表现优于单模块LG T细胞的组合。

[0124] 图37A和图37B示出了详述相对于单模块LG T细胞未显示加和效应的组合的图。图37A示出了详述与单独的L-gp130或sgRNA的效应相比,L-gp130与靶向PTPN2的sgRNA的组合对T细胞扩增的效应的图。图37B示出了详述与单独的C7R或sgRNA的效应相比,C7R与靶向CISH的sgRNA的组合对靶细胞计数的效应的图。

[0125] 图37C示出了不同背景下LG T细胞中L-gp130和IL-2的组合的ANOVA分析。图37D示出了不同背景下LG T细胞中L-gp130和IL-12的组合的ANOVA分析。

[0126] 图38是示出了在存在指示细胞因子的情况下培养的表达式指示细胞因子和sgRNA/核糖核蛋白的LG T细胞的连续刺激测定筛选结果的图。

[0127] 图39A至图39C详述了在存在或不存在TGF- β 的情况下培养的表达式各种shRNA、诱导型细胞因子有效载荷、sgRNA和SPA的LG T细胞的连续刺激测定筛选。图39A详述了测试的组合。图39B示出了包括诱导型IL-2表达的指示组合的结果。图39C示出了包括诱导型IL-12表达的指示组合的结果。

[0128] 图40A至图40C详述了表达式各种shRNA、诱导型细胞因子有效载荷、sgRNA和SPA的LG-T细胞的连续刺激测定筛选。图40A示出了在不存在TGF- β 的情况下LG T细胞的筛选结果 (左图) 以及指示组合的选定结果 (右图)。图40B示出了在存在TGF- β 的情况下LG T细胞的筛选结果 (左图) 以及指示组合的选定结果 (右图)。图40C示出了表现最佳的细胞因子、SPA和sgRNA组合 (左图) 或具有对照诱导型有效载荷的SPA和sgRNA组合 (右图)。

[0129] 图41A示出了用指示ICT细胞治疗后小鼠的平均肿瘤体积。图41B示出了T细胞注射后7、14、21和42天的总T细胞。

[0130] 图42示出了体内注射指示ICT细胞后第14、21和42天的IL2和IFN γ 的血清水平。

[0131] 图43A示出了T细胞与外源IL-2或IL-15孵育或延迟添加外源IL-2或IL-15后的TCR扩增和肿瘤溶解百分比。图43B示出了与指示细胞因子一起孵育后的TCR靶细胞生长百分比。

[0132] 图44示出了向表达L-gp130 (SPA.I) 的ICT细胞添加IL-15表达导致T细胞杀伤增加。

具体实施方式

[0133] 定义

[0134] 除非另外规定,否则权利要求和说明书中所用的术语是如下文所陈述加以定义。

[0135] 关于抗体与靶分子的结合,术语“结合”、“特异性地结合”、“特异性地结合至”、“特异性地结合至”、“特异于”、“选择性地结合”和“选择性针对”特定抗原(例如,多肽靶标)或特定抗原上的表位是指与非特异性或非选择性相互作用(例如,与非靶分子)具有可测量差异的结合。例如,“选择性地结合”或“特异性地结合”抗原的抗体是以高亲和力结合抗原并且不显著结合其他无关抗原的抗原结合部分。例如,可以通过测量与靶分子的结合并将其同与非靶分子的结合进行比较来测量特异性结合。特异性结合还可通过与模拟在靶标分子上识别的表位的对照分子的竞争来测定。在这种情况下,如果抗体与靶分子的结合被对照分子竞争性抑制,则指示特异性结合。在一些实施方案中,细胞外抗原结合结构域特异性地结合至生殖细胞型碱性磷酸酶(ALPG)。在一些实施方案中,细胞外结构域包括结合至胎盘碱性磷酸酶(ALPP)的抗原结合部分。

[0136] “亲和力”是指分子(例如,抗体)的单一结合位点与它的结合配偶体(例如,抗原或表位)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另外指示,否则如本文所用,“亲和力”是指反映结合对的成员(例如抗体和抗原或表位)之间的1:1相互作用的固有结合亲和力。分子X对它的配偶体Y的亲和力可由解离平衡常数(KD)表示。以下更详细描述促成解离平衡常数的动力学分量。亲和力可以通过本领域中已知的常用方法来测量,所述方法包括但不限于表面等离子体共振(SPR)技术(例如, **BIACORE®**)或生物层干涉测量术(例如, **FORTEBIO®**)。

[0137] 如本文所用的术语“高变区”或“HVR”是指抗体可变结构域的在序列方面高度可变和/或形成结构确定的环(“高变环”)的区域中的每一者。通常,天然四链抗体包含六个HVR;三个在VH中(H1、H2、H3),并且三个在VL中(L1、L2、L3)。HVR通常包含来自高变环和/或来自互补决定区(CDR)的氨基酸残基,所述互补决定区具有最高序列可变性和/或涉及于抗原识别中。除VH中的CDR1之外,CDR通常包含形成高变环的氨基酸残基。高变区(HVR)也被称为“互补决定区”(CDR),并且这些术语关于可变区的形成抗原结合区的部分在本文中可互换使用。这个特定区域已由Kabat等人,U.S.Dept.of Health and Human Services, Sequences of Proteins of Immunological Interest(1983)以及由Chothia等人,J Mol Biol 196:901-917(1987)描述,其中当相对于彼此加以比较时,定义包括氨基酸残基的重叠或子组。然而,将任一定义应用来指代抗体或其变体的CDR意图在如本文所定义和所用的所述术语的范围内。涵盖特定CDR的确切残基数目将视CDR的序列和大小而变化。鉴于抗体的可变区氨基酸序列,本领域技术人员可以常规方式确定哪些残基构成特定CDR。

[0138] CDR的氨基酸序列边界可由本领域技术人员使用许多已知编号方案中的任一者来确定,所述编号方案包括由Kabat等人(上文) (“Kabat”编号方案);Al-Lazikani等人,1997, J.Mol.Biol.,273:927-948 (“Chothia”编号方案);MacCallum等人,1996, J.Mol.Biol.262:732-745 (“Contact”编号方案);Lefranc等人,Dev.Comp.Immunol.,2003,27:55-77 (“IMGT”编号方案);以及Honegge和Plückthun, J.Mol.Biol.,2001,309:657-70 (“Aho”编号方案)描述的那些;所述文献中的每一者以引用的方式整体并入本文。

[0139] 表A提供如通过Kabat流程和Chothia流程鉴定的CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3的位置。对于CDR-H1,提供了使用Kabat编号方案与Chothia编号方案两者的残基编号。

[0140] CDR可例如使用抗体编号软件诸如可在bioinf.org.uk/abs/abnum/处获得,并且描述于以引用的方式整体并入本文的Abhinandan和Martin, Immunology, 2008, 45:3832-3839中的Abnum加以指定。

[0141] 表A.CDR中的根据Kabat编号方案和Chothia编号方案的残基。

[0142]

CDR	Kabat	Chothia
L1	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97
H1 (Kabat编号)	H31-H35B	H26-H32或H34*
H1 (Chothia编号)	H31-H35	H26-H32
H2	H50-H65	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102

[0143] *当使用Kabat编号惯例加以编号时,视CDR的长度而定,CDR-H1的C末端在H32与H34之间变化。

[0144] 当提及抗体重链恒定区中的残基时,通常使用“EU编号方案”(例如如Kabat等人(上文)中所报道)。除非另外陈述,否则EU编号流程用于提及本文所述的抗体重链恒定区中的残基。

[0145] 如本文所用,术语“单链”是指包含由肽键线性连接的氨基酸单体的分子。在一特定所述实施方案中,在单链Fab分子中,Fab轻链的C末端连接于Fab重链的N末端。如本文更详细所述,scFv具有轻链的可变结构域(VL)从它的C末端由多肽链连接于重链的可变结构域(VH)的N末端。或者,scFv包含其中VH的C末端由多肽链连接于VL的N末端的多肽链。

[0146] “Fab片段”(也被称为抗原结合片段)含有轻链的恒定结构域(CL)和重链的第一恒定结构域(CH1)以及分别在轻链和重链上的可变结构域VL和VH。可变结构域包含抗原结合中涉及的互补决定环(CDR,也被称为高变区)。Fab'片段与Fab片段由于在重链CH1结构域的羧基末端添加有少许残基而不同,所述残基包括一个或多个来自抗体铰链区的半胱氨酸。

[0147] “F(ab')₂”片段含有两个在铰链区附近由二硫键接合的Fab'片段。F(ab')₂片段可例如通过重组方法或通过胃蛋白酶消化完整抗体来产生。F(ab')片段可例如通过用β-巯基乙醇处理来解离。

[0148] “Fv”片段包含一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域的非共价连接二聚体。

[0149] “单链Fv”或“scFv”包括抗体的VH结构域和VL结构域,其中这些结构域存在于单一

多肽链中。在一个实施方案中,Fv多肽还包含在VH结构域与VL结构域之间的使得scFv能够形成成为抗原结合所需的结构的多肽接头。对于scFv的综述,参见Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 第113卷, Rosenburg和Moore编, Springer-Verlag, New York, 第269-315页 (1994)。HER2抗体scFv片段描述于W093/16185;美国专利第5,571,894号;和美国专利第5,587,458号中。

[0150] 术语“单结构域抗体”或“sdAb”是指其中抗体的一个可变结构域在不存在另一可变结构域下特异性地结合至抗原的分子。单结构域抗体及其片段描述于Arabi Ghahroudi等人, *FEBS Letters*, 1998, 414:521-526以及Muyldermans等人, *Trends in Biochem.Sci.*, 2001, 26:230-245中,其各自以引用的方式整体并入。单结构域抗体也被称为sdAb或纳米抗体。Sdab十分稳定,并且易于作为融合配偶体与抗体的Fc链一起表达 (Harmsen MM, De Haard HJ (2007). “Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments”. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 77(1):13-22)。

[0151] 如本文所用,术语“基因”是指遗传的基本单位,由沿染色体排列的DNA区段组成,其编码特定蛋白质或蛋白质区段。基因通常包括启动子、5'非翻译区、一个或多个编码序列(外显子)、任选的内含子和3'非翻译区。基因还可包含终止子、增强子和/或沉默子。

[0152] 如本文所用,术语“基因座”是指基因或遗传标志物所在的染色体上特定的、固定的物理位置。

[0153] 术语“安全港基因座”是指基因或遗传元件可以在不破坏相邻基因的表达或调控的情况下被并入的基因座。这些安全港基因座也称为安全港位点(SHS)。如本文所用,安全港基因座是指“整合位点”或“敲入位点”,在该位点上可以插入编码如本文所定义的转基因的序列。在一些实施方案中,插入发生伴随着位于整合位点的序列的置换。在一些实施方案中,插入发生不伴随位于整合位点的序列的置换。设想的整合位点的实例提供于表D中。

[0154] 如本文所用,术语“插入物”是指整合(插入)到靶基因座或安全港位点处的核苷酸序列。插入物可用于指使用例如同源定向修复(HDR)CRISPR/Cas9基因组编辑或本领域普通技术人员已知的将核苷酸序列插入基因组区域中的其他方法被并入靶基因座或安全港位点的基因或遗传元件。

[0155] 术语“插入”是指操纵核苷酸序列以引入非天然序列。这是例如通过使用限制酶和连接酶来完成的,由此可以通过以下方式将通常编码目标基因的目标DNA序列并入另一核酸分子中:用适当的限制酶消化这两个分子以便产生相容的重叠,然后使用连接酶将这些分子接合在一起。本领域的技术人员非常熟悉此类操纵,实例可见于Sambrook等人 (Sambrook, Fritsch和Maniatis, “*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*”, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, 1989), 其据此以引用的方式整体并入,包括任何附图、图形和表格。

[0156] “CRISPR/Cas”系统是指一类广泛用于防御外来核酸的细菌系统。CRISPR/Cas系统广泛存在于真细菌和古细菌生物体中。CRISPR/Cas系统包括I型、II型和III型亚型。野生型II型CRISPR/Cas系统利用RNA介导的核酸酶Cas9与指导和激活RNA的复合物来识别和裂解外来核酸。具有指导RNA和激活RNA两者的活性的指导RNA在本领域中也是已知的。在一些情况下,这种双重活性指导RNA被称为小指导RNA(sgRNA)。

[0157] Cas9同系物存在于多种真细菌中,包括但不限于以下分类群的细菌:放线菌门

(Actinobacteria)、产水菌门(Aquificae)、拟杆菌门-绿菌门(Bacteroidetes-Chlorobi)、衣原体-疣微菌门(Chlamydiae-Verrucomicrobia)、绿弯菌门(Chloroflexi)、蓝藻门(Cyanobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)、螺旋体门(Spirochaetes)和热袍菌门(Thermotogae)。示例性的Cas9蛋白是化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)Cas9蛋白。另外的Cas9蛋白及其同系物描述于例如Chylinski等人, RNA Biol. 2013年5月1日; 10(5): 726-737; Nat. Rev. Microbiol. 2011年6月; 9(6): 467-477; Hou等人, Proc Natl Acad Sci U S A. 2013年9月24日; 110(39): 15644-9; Sampson等人, Nature. 2013年5月9日; 497(7448): 254-7; 以及Jinek等人, Science. 2012年8月17日; 337(6096): 816-21。可以优化Cas9核酸酶结构域以提高宿主细胞中的活性或增强稳定性。

[0158] 如本文所用, 术语“Cas9”是指RNA介导的核酸酶(例如, 细菌或古细菌来源的, 或源自它们的)。示例性的RNA介导的核酸酶包括上述Cas9蛋白及其同系物, 并且包括但不限于CPF1(参见, 例如, Zetsche等人, Cell, 第163卷, 第3期, p759-771, 2015年10月22日)。类似地, 如本文所用, 术语“Cas9核糖核蛋白”复合物等是指Cas9蛋白与crRNA(例如, 指导RNA或小指导RNA)之间的复合物、Cas9蛋白与反式激活性crRNA(tracrRNA)之间的复合物、Cas9蛋白与小指导RNA之间的复合物或它们的组合(例如, 含有Cas9蛋白、tracrRNA和crRNA指导RNA的复合物)。

[0159] 如本文所用, 短语“免疫细胞”包括可以产生免疫细胞的所有细胞类型, 包括造血细胞, 诸如造血干细胞、多能干细胞和诱导性多能干细胞(iPSC)。在一些实施方案中, 免疫细胞是B细胞、巨噬细胞、自然杀伤(NK)细胞、诱导型多能干细胞(iPSC)、人多能干细胞(HSPC)、T细胞或T细胞祖细胞或树突细胞。在一些实施方案中, 细胞是先天免疫细胞。

[0160] 如本文所用, 在原代细胞或原代干细胞的上下文中的术语“原代”是指尚未转化或永生化的细胞。此类原代细胞可以经过培养、继代培养或传代有限次数(例如, 培养0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20次)。在一些情况下, 原代细胞适应体外培养条件。在一些情况下, 原代细胞从生物体、系统、器官或组织中分离出来, 任选地经分选和利用, 例如不经培养或继代培养而直接使用。在一些情况下, 原代细胞经刺激、激活或分化。例如, 可以通过接触(例如, 培养时存在)CD3、CD28激动剂、IL-2、IFN- γ 或它们的组合来激活原代T细胞。

[0161] 如本文所用, 术语“T淋巴细胞”和“T细胞”可互换使用, 并且是指在胸腺中已完成成熟并识别体内某些外来抗原的细胞。这些术语还指在免疫系统中具有各种作用, 包括其他免疫细胞的激活和失活的主要白细胞类型。T细胞可以是任何T细胞, 诸如培养的T细胞, 例如原代T细胞, 或源自培养的T细胞系的T细胞, 例如Jurkat、SupT1等, 或获自哺乳动物的T细胞。T细胞包括但不限于幼稚T细胞、刺激T细胞、原代T细胞(例如, 未培养的)、培养的T细胞、永生化T细胞、辅助性T细胞、细胞毒性T细胞、记忆T细胞、调节性T细胞、自然杀伤T细胞、它们的组合或它们的亚群。T细胞可以是CD3⁺细胞。T细胞可以是CD4⁺、CD8⁺或CD4⁺和CD8⁺。T细胞可以是任何类型的T细胞、CD4⁺/CD8⁺双阳性T细胞、CD4⁺辅助性T细胞(例如Th1和Th2细胞)、CD8⁺T细胞(例如细胞毒性T细胞), 外周(包括但不限于)血单核细胞(PBMC)、外周血白细胞(PBL)、肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)、记忆T细胞、幼稚T细胞、调节性T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞等。其可以是任何发育阶段的任何T细胞。其他类型的辅助性T细胞包括Th3(Treg)细胞、Th17细

胞、Th9细胞或Tfh细胞。其他类型的记忆T细胞包括诸如中央记忆T细胞(Tcm细胞)、效应记忆T细胞(Tem细胞和TEMRA细胞)的细胞。T细胞还可以指代基因修饰的T细胞,诸如经修饰以表达T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)的T细胞。T细胞也可以从干细胞或祖细胞分化而来。

[0162] “CD4+T细胞”是指在其表面上表达CD4并与细胞免疫应答相关的T细胞亚群。CD4+T细胞的特征在于刺激后分泌特性,可包括分泌细胞因子,诸如IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-4和IL-10。“CD4”是一种55kD的糖蛋白,最初被定义为T淋巴细胞上的分化抗原,但也存在于包括单核细胞/巨噬细胞在内的其他细胞上。CD4抗原是免疫球蛋白超家族的成员,并被认为是MHC(主要组织相容性复合物)II类限制性免疫应答中的关联识别元件。在T淋巴细胞上,CD4抗原限定了辅助/诱导子亚群。

[0163] “CD8+T细胞”是指在其表面上表达CD8的T细胞亚群,受MHC I类限制,并作为细胞毒性T细胞发挥作用。“CD8”分子是存在于胸腺细胞以及细胞毒性和抑制性T淋巴细胞上的分化抗原。CD8抗原是免疫球蛋白超家族的成员,并且是主要组织相容性复合物I类限制性相互作用中的关联识别元件。

[0164] 如本文所用,短语“造血干细胞”是指一种可以产生血细胞的干细胞。造血干细胞可以产生骨髓或淋巴谱系或其组合的细胞。造血干细胞主要存在于骨髓中,但是它们可以从外周血或其部分中分离出来。各种细胞表面标志物可用于鉴定、分选或纯化造血干细胞。在一些情况下,造血干细胞被鉴定为c-kit⁺和lin⁻。在一些情况下,人造造血干细胞被鉴定为CD34⁺、CD59⁺、Thy1/CD90⁺、CD38^{10/-}、C-kit/CD117⁺、lin⁻。在一些情况下,人造造血干细胞被鉴定为CD34⁻、CD59⁺、Thy1/CD90⁺、CD38^{10/-}、C-kit/CD117⁺、lin⁻。在一些情况下,人造造血干细胞被鉴定为CD133⁺、CD59⁺、Thy1/CD90⁺、CD38^{10/-}、C-kit/CD117⁺、lin⁻。在一些情况下,小鼠造血干细胞被鉴定为CD34^{10/-}、SCA-1⁺、Thy1^{+/10}、CD38⁺、C-kit⁺、lin⁻。在一些情况下,造血干细胞为CD150⁺CD48⁻CD244⁻。

[0165] 如本文所用,短语“造血细胞”是指源自造血干细胞的细胞。造血细胞可通过从生物体、系统、器官或组织(例如,血液或其部分)中分离而获得或提供。或者,可以分离造血干细胞并通过分化干细胞来获得或提供造血细胞。造血细胞包括分化成其他细胞类型潜能有限的细胞。此类造血细胞包括但不限于多能祖细胞、谱系限制性祖细胞、普通骨髓祖细胞、粒细胞-巨噬细胞祖细胞或巨核细胞-红系细胞祖细胞。造血细胞包括淋巴和骨髓谱系的细胞,诸如淋巴细胞、红细胞、粒细胞、单核细胞和血小板。

[0166] 如本文所用,术语“构建体”是指分子(包括大分子或多核苷酸)的复合物。

[0167] 如本文所用,术语“整合”是指将构建体的一个或多个核苷酸稳定插入细胞基因组中,例如,共价连接至细胞染色体DNA中的核酸序列的过程。其也可以指整合位点处的核苷酸缺失。在插入位点处存在缺失的情况下,“整合”还可包括用一个或多个插入的核苷酸取代缺失的内源序列或核苷酸。

[0168] 如本文所用,术语“外源”是指已引入宿主细胞中且不是该细胞原生的分子或活性。例如,可以通过将编码核酸引入宿主遗传物质中,如通过整合到宿主染色体中,或作为非染色体遗传物质诸如质粒,来引入分子。因此,当与编码核酸的表达结合使用时,该术语是指将编码核酸以可表达的形式引入细胞中。术语“内源”是指在自然、未经编辑的条件下存在于宿主细胞中的分子或活性。类似地,当与编码核酸的表达结合使用时,该术语是指包

含在细胞内而不是外源地引入的编码核酸。

[0169] 术语“异源”指非侧翼序列原生的核酸或多肽序列或结构域,例如,其中未发现异源序列天然偶联至在一端或两端出现的核酸或多肽序列。

[0170] 术语“同源”指侧翼序列原生的核酸或多肽序列或结构域,例如,其中发现同源序列天然偶联至在一端或两端出现的核酸或多肽序列。

[0171] 如本文所用,“多核苷酸供体构建体”是指遗传地插入多核苷酸中并且对该多核苷酸而言是外源的核苷酸序列(例如DNA序列)。多核苷酸供体构建体被转录成RNA并任选地被翻译成多肽。多核苷酸供体构建体可包括原核序列、来自真核mRNA的cDNA、来自真核(例如,哺乳动物)DNA的基因组DNA序列,和合成DNA序列。例如,多核苷酸供体构建体可以是miRNA、shRNA、天然多肽(例如,天然存在的多肽)或其片段,或变体多肽(例如,与天然多肽具有小于100%序列同一性的天然多肽)或其片段。

[0172] 如本文所用,术语“互补的”或“互补性”是指核苷酸或核酸之间的特定碱基配对。互补核苷酸一般是A和T(或A和U)以及G和C。本文所述的指导RNA可以包含序列,例如与细胞中的基因组序列完美互补或实质上互补(例如,具有1-4个错配)的DNA靶向序列。

[0173] 如本文所用,术语“转基因”是指已自然转移或通过多种基因工程化技术中的任何一种从一种生物体转移到另一种生物体的多核苷酸。其任选地被翻译成多肽。其任选地被翻译成重组蛋白。“重组蛋白”是一种由基因编码的蛋白质——重组DNA——已在支持基因表达和信使RNA翻译的系统中克隆(参见表达系统)。重组蛋白可以是治疗剂,例如治疗本文公开的疾病或病症的蛋白质。如所用,转基因可以指代编码多肽的多核苷酸。

[0174] 术语“蛋白质”、“多肽”和“肽”在本文中可互换使用。

[0175] 如本文所用,术语“可操作地连接”或“操作性地连接”是指核酸序列与单个核酸片段结合,使得一种功能受另一种功能影响。例如,如果启动子能够影响编码序列或功能性RNA的表达(例如,编码序列或功能性RNA在启动子的转录控制下),则启动子与其可操作地连接。编码序列可以在有义和反义方向上可操作地连接至控制序列。

[0176] 如本文所用,术语“发育细胞状态”是指,例如,细胞所处的非活性、活性表达、分化、衰老等状态。发育细胞状态还可以指处于前体状态的细胞(例如,T细胞前体)。

[0177] 如所用,术语“编码”是指编码目标蛋白质或多肽的核酸序列。核酸序列可以是DNA分子或RNA分子。在优选实施方案中,分子是DNA分子。在其他优选实施方案中,分子是RNA分子。当作为RNA分子存在时,其将包含引导宿主细胞的核糖体开始翻译的序列(例如,起始密码子,ATG)和引导核糖体结束翻译的序列(例如,终止密码子)。在起始密码子与终止密码子之间是开放阅读框(ORF)。此类术语是本领域普通技术人员已知的。

[0178] 如本文所用,术语“受试者”是指哺乳动物受试者。示例性受试者包括人、猴子、狗、猫、小鼠、大鼠、牛、马、骆驼、山羊、兔子、猪和绵羊。在某些实施方案中,受试者为人。在一些实施方案中,受试者患有可用本文提供的工程化细胞或其群体治疗的疾病或疾患。在一些方面,疾病或疾患为癌症。

[0179] 如本文所用,术语“启动子”是指能够控制编码序列或功能性RNA的表达的核苷酸序列(例如DNA序列)。启动子序列由近端和更远端的上游元件组成,后者元件通常称为增强子。启动子可以完整地源自天然基因,可以由来自天然存在的不同启动子的不同元件组成,并且/或者可包含合成的DNA区段。如本文所设想的,启动子对于目标细胞而言可以是内源

的或者对于目标细胞而言是外源的。本领域技术人员理解不同的启动子可以在不同的组织或细胞类型中,或在不同的发育阶段,或响应于不同的环境条件诱导基因表达。如本领域已知的,可以根据启动子的强度和/或启动子具有活性的条件来选择启动子,例如,组成型启动子、强启动子、弱启动子、诱导型/抑制型启动子、组织特异性或发育调控启动子、细胞周期依赖性启动子等。

[0180] 启动子可以是诱导型启动子(例如,热休克启动子、四环素调控启动子、类固醇调控启动子、金属调控启动子、雌激素受体调控启动子等)。启动子可以是组成型启动子(例如,CMV启动子、UBC启动子)。在一些实施方案中,启动子可以是空间限制和/或时间限制的启动子(例如,组织特异性启动子、细胞类型特异性启动子等)。参见例如美国公布20180127786,其公开内容以引用的方式整体并入本文。

[0181] 如本文所设想的,基因编辑可以涉及基因(或核苷酸序列)敲入或敲除。如本文所用,术语“敲入”是指将DNA序列或其片段添加到基因组中。此类待敲入的DNA序列可包括一个或多个完整基因,可包括与基因或前述基因的任何部分或片段相关的调控序列。例如,可将编码重组蛋白的多核苷酸供体构建体插入携带突变基因的细胞的基因组中。在一些实施方案中,敲入策略涉及用提供的序列取代现有序列,例如用野生型拷贝取代突变等位基因。另一方面,术语“敲除”是指基因或基因表达的消除。例如,可以通过缺失或添加导致阅读框破坏的核苷酸序列来敲除基因。再如,可通过用不相关的(例如,非编码的)序列置换基因的一部分来敲除基因。

[0182] 如本文所用,术语“非同源末端接合”或NHEJ是指DNA链的切割或切口末端直接接合而不需要同源模板核酸的细胞过程。NHEJ可以导致修复位点处一个或多个核苷酸的添加、缺失、取代或它们的组合。

[0183] 如本文所用,术语“同源定向修复”或HDR是指通过从同源模板核酸聚合来修复DNA链的切割或缺口末端的细胞过程。因此,原始序列被模板的序列置换。同源模板核酸可以由基因组中其他位置的同源序列(姐妹染色单体、同源染色体,或相同或不同染色体上的重复区域)提供。或者,可以引入外源模板核酸以获得靶位点处特定HDR诱导的序列的变化。通过这种方式,可以在切割位点引入特定的突变。

[0184] 如本文所用,单链DNA模板或双链DNA模板是指可被细胞用作HDR的模板的DNA寡核苷酸。一般来说,单链DNA模板或双链DNA模板具有至少一个与靶位点同源的区域。在一些情况下,单链DNA模板或双链DNA模板具有两个同源区域,位于包含待插入靶切割位点处的异源序列的区域的两侧。

[0185] 术语“载体”和“质粒”可互换使用,并且如本文所用是指可用于将遗传物质引入细胞中的多核苷酸媒介物。载体可以是线状的或环状的。载体可以整合到宿主细胞的靶基因组中或者在宿主细胞中独立复制。载体可以包含例如复制起点、多克隆位点和/或选择性标志物。表达载体通常包含表达盒。载体和质粒包括但不限于整合载体、原核质粒、真核质粒、植物合成染色体、附加体、粘粒和人工染色体。

[0186] 如本文所用,在引入核酸或包含核酸的复合物例如RNP-DNA模板复合物的上下文中的短语“引入”是指核酸序列或RNP-DNA模板复合物从细胞外到细胞内的易位。在一些情况下,引入是指核酸或复合物从细胞外到细胞核内的易位。设想了这种易位的各种方法,包括但不限于电穿孔、与纳米线或纳米管接触、受体介导的内化、通过细胞穿透肽的易位、脂

质体介导的易位等。

[0187] 如本文所用,术语“表达盒”是以重组或合成方式产生的多核苷酸构建体,其包含可操作地连接至所选多核苷酸以促进该所选多核苷酸在宿主细胞中的表达的调控序列。例如,调控序列可以促进所选多核苷酸在宿主细胞中的转录,或所选多核苷酸在宿主细胞中的转录和翻译。表达盒可以例如整合到宿主细胞的基因组中或存在于表达载体中。

[0188] 如本文所用,短语“有需要的受试者”是指表现出和/或被诊断具有如本文所述的疾病或病症的一种或多种症状或体征的受试者。

[0189] “化学治疗剂”是指可用于治疗癌症的化学化合物。化学治疗剂包括用于调节、减少、阻断或抑制可促进癌症生长的激素的影响的“抗激素剂”或“内分泌治疗剂”。

[0190] 术语“组合物”是指含有例如本文所设想的工程化细胞或蛋白质的混合物。在一些实施方案中,组合物可含有另外的组分,诸如佐剂、稳定剂、赋形剂等。术语“组合物”或“药物组合物”是指呈允许包含在其中的活性成分的生物活性对治疗受试者有效的形式的制剂,并且在药物组合物中提供的量中,其不含有对受试者具有不可接受的毒性的其它组分。

[0191] 术语“原位”是指在活细胞中发生的与活生物体分开生长的过程,例如,在组织培养物中生长。

[0192] 术语“体内”是指在活生物体中发生的过程。

[0193] 如本文所用,术语“离体”一般包括在活组织中或活组织上进行的实验或测量,优选地是在生物体外的人工环境中,优选地是与自然条件的差异极小。

[0194] 如本文所用,术语“哺乳动物”包括人和非人,并且包括但不限于人、非人灵长类动物、犬科动物、猫科动物、鼠类、牛、马和猪。

[0195] 在两个或更多个核酸或多肽序列的上下文中,术语“同一性”百分比是指当针对最大对应而进行比较和比对时具有指定百分比的为相同的核苷酸或氨基酸残基的两个或更多个序列或子序列,如使用下文描述的序列比较算法之一(例如,BLASTP和BLASTN或其他技术人员可用的算法)或通过视觉检查来测量。根据应用,“同一性”百分比可以存在于所比较的序列的区上,例如,存在于功能性结构域上,或者可替代地存在于待比较的两个序列的全长上。

[0196] 对于序列比较,通常一个序列充当与测试序列进行比较的参考序列。当使用序列比较算法时,将测试序列和参考序列输入计算机中,指定子序列坐标(如果需要的话),并且指定序列算法程序参数。然后序列比较算法基于指定的程序参数计算一个或多个测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。

[0197] 可以例如通过Smith&Waterman,Adv. Appl. Math. 2:482(1981)的局部同源性算法;通过Needleman&Wunsch,J. Mol. Biol. 48:443(1970)的同源性比对算法;通过Pearson&Lipman,Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444(1988)的相似性搜索方法;通过这些算法的计算机化实施(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis. 中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA);或通过目视检查(一般参见Ausubel等人,下文)来进行。

[0198] 适用于确定序列同一性和序列相似性百分比的算法的一个实例是Altschul等人,J. Mol. Biol. 215:403-410(1990)中描述的BLAST算法。用于进行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心(www.ncbi.nlm.nih.gov/)公开获得。

[0199] 术语“足够的量”意指足以产生所需效果的量,例如足以调节细胞内蛋白质聚集的量。

[0200] 术语“治疗有效量”是有效改善疾病症状的量。

[0201] 术语“改善”是指在治疗疾病状态(例如,癌症疾病状态)时的任何治疗方面有益的结果,疾病状态的严重性或进展减轻、缓解或治愈。

[0202] 如本文所用,术语“有效量”是指化合物(例如,本文所述的组合物、本文所述的细胞)足以实现有益或所需结果的量。有效量可以按一次或多次施用、应用或剂量施用,并且不意图限于特定的制剂或施用途径。

[0203] 如本文所用,术语“治疗”包括导致疾患、疾病、病症等的改善或改善其症状的任何作用,例如减轻、减少、调节、改善或消除。

[0204] 术语“调节(modulate/modulation)”是指降低或抑制,或替代地,激活或增加所叙述变量。

[0205] 术语“增加”和“激活”是指所叙述变量增加10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%,增加至2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍或更大。

[0206] 术语“降低”和“抑制”是指所叙述变量降低10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%,降低至1/2、1/3、1/4、1/5、1/10、1/20、1/50、1/100,或降低更多。

[0207] 必须注意的是,除非上下文另外明确规定,否则如说明书和随附权利要求中所用,单数形式“一个/种(a/an)”和“所述(the)”包括复数个指示物。

[0208] 逻辑门系统

[0209] 如本文所用,“逻辑门”、“回路”、“回路受体”、“系统”或“系统受体”是指包含启动受体和嵌合抗原受体的两部分蛋白质表达系统。该系统可以在插入细胞中的至少一个核酸上编码,其中启动受体在细胞中表达。当启动受体与其靶抗原结合时,启动受体的细胞内结构域从跨膜结构域裂解。然后,细胞内结构域能够易位至细胞核中,在细胞核中诱导嵌合抗原受体的表达。合成途径激活因子也可用于增强表达逻辑门的T细胞(LG T细胞)的扩增和活性。

[0210] 采用合成路径激活因子的示例性逻辑门系统的概览示于图1中。在各种实施方案中,系统包括导致T细胞激活的4个步骤:(1)合成途径激活因子(SPA)和启动受体(primeR)组成型表达;(2)primeR被触发,导致细胞内结构域裂解;(3)裂解的primeR细胞内结构域诱导CAR的表达;(4)CAR被激活,导致T细胞激活。

[0211] 在一方面,本文提供了包含结合至ALPG/P的启动受体、结合至MSLN的嵌合抗原受体以及细胞因子和/或激活细胞因子信号传导的合成途径激活因子的系统,其中启动受体的细胞内结构域的转录因子能够诱导CAR的表达。此类系统可替代地称为“逻辑门”或“回路”。在一些方面,该系统由插入免疫细胞中的核酸转基因编码。该系统可以在包含两个转基因的单个核酸插入物或片段上编码,或者可以在单独编码系统转基因的两个核酸上编码。系统的启动受体、SPA和CAR可以以任何顺序放置在单个核酸上。例如,启动受体可以在5'端,SPA可以紧接在启动受体的SPA之后,并且CAR可以在3'端;或者SPA可以在5'端,启动受体可以紧接在SPA之后,并且CAR可以在3'端;或者CAR可以在5'端,并且SPA可以在CAR之

后并且启动受体可以在3'端;或者CAR可以在5'端,并且启动受体可以在CAR之后并且SPA可以在3'端。

[0212] 组成型启动子可以可操作地连接至编码启动受体和/或SPA的核苷酸序列。编码SPA和启动受体的核酸可以在单个启动子的控制之下。诱导型启动子还可以可操作地连接至编码CAR的核苷酸序列。编码CAR和SPA的核酸可以在单独的诱导型启动子(例如,第一诱导型启动子和第二诱导型启动子)的控制之下。第一诱导型启动子和第二诱导型启动子可以相同或不同。在一些实施方案中,当系统在包含两个转基因的单个核酸插入物或片段上编码时,核酸可以在5'至3'方向上包含:组成型启动子;编码启动受体的核苷酸序列;诱导型启动子;和我编码嵌合抗原受体的核苷酸序列。或者,核酸可在5'至3'方向包含:诱导型启动子;编码嵌合抗原受体的核苷酸序列;组成型启动子;和编码启动受体的核苷酸序列。SPA可以存在于启动受体和/或CAR的上游或下游。

[0213] 启动受体

[0214] 本文提供了启动受体,其包含特异性地结合以下的细胞外抗原结合结构域:胎盘/生殖细胞碱性磷酸酶(ALPG/P);ALPP:NCBI Entrez基因:250,UniProtKB/Swiss-Prot:P05187,SEQ ID NO:176;ALPG:NCBI Entrez基因:251,UniProtKB/Swiss-Prot:P10696,SEQ ID NO:177)。在一些实施方案中,启动受体包含特异性地结合胎盘碱性磷酸酶(ALPP)的细胞外抗原结合结构域。在一些实施方案中,启动受体包含特异性地结合生殖细胞碱性磷酸酶(ALPG)的细胞外抗原结合结构域。如本文所用,“胎盘/生殖细胞碱性磷酸酶(ALPG/P)”是指胎盘碱性磷酸酶(ALPP)和生殖细胞碱性磷酸酶(ALPG)两者。特异性地结合ALPG/P的抗原结合结构域能够特异性地结合ALPG和/或ALPP。

[0215] 在一些实施方案中,启动受体包含如SEQ ID NO:24所示的序列。在一些实施方案中,启动受体包含如SEQ ID NO:25所示的序列。

[0216] 在本公开的某些方面,启动受体是基于Notch蛋白的合成受体。天然Notch受体与同源配体(诸如来自Delta蛋白家族的配体)的结合会导致膜内蛋白水解,从而使Notch蛋白的细胞内片段裂解。该细胞内片段是转录调节因子,仅在从Notch上裂解下来后才起作用。裂解可通过ADAM金属蛋白酶和 γ 分泌酶复合物的顺序蛋白水解而发生。该细胞内片段进入细胞核并激活细胞-细胞信号传导基因。与天然Notch蛋白相比,合成Notch启动受体用导致编码所选蛋白质(诸如CAR)的基因在细胞内片段从启动受体释放时被转录的片段取代天然Notch细胞内片段。

[0217] Notch受体具有模块化结构域组织。Notch受体的胞外域由一系列负责配体结合的N末端表皮生长因子(EGF)样重复序列组成。在合成的Notch受体或启动受体中,Notch配体结合结构域被结合所选靶配体或抗原的配体结合结构域置换。EGF重复序列之后是三个LIN-12/Notch重复序列(LNR)模块,这些模块是Notch受体所特有的,被广泛报道参与防止受体过早激活。Notch1的异源二聚化(HD)结构域经弗林蛋白酶裂解而分开,使得其N末端部分终止细胞外亚基,而其C末端半部分构成跨膜亚基的起点。在细胞外区域之后,受体具有跨膜区段和细胞内结构域(ICD),细胞内结构域包括转录调节因子。

[0218] 多种形式的启动受体可用于如本文所述的方法、细胞和核酸。设想用于本文的方法和细胞中的一类启动受体包含异源细胞外配体结合结构域、与包括NRR的Notch受体具有实质序列同一性的连接多肽、TMD和ICD。“Fn Notch”受体包含异源细胞外配体结合结构域、

与Robo受体(诸如哺乳动物Robo1、Robo2、Robo3或Robo4)具有实质序列同一性的连接多肽,随后是1、2或3个纤连蛋白重复序列(“Fn”)、TMD和ICD。“Mini Notch”受体包含异源细胞外配体结合结构域、与Notch受体(缺乏NRR)具有实质序列同一性的连接多肽、TMD和ICD。“Minimal Linker Notch”受体包含异源细胞外配体结合结构域、与Notch受体(例如,合成(GGS)_n多肽序列)缺乏实质序列同一性的连接多肽、TMD和ICD。“Hinge Notch”受体包含异源细胞外配体结合结构域、包含寡聚化结构域(例如,促进与合成受体和/或现有宿主受体的二聚化、三聚化或更高级多聚化的结构域)的铰链序列、TMD和ICD。所有这些受体类别都是合成的、重组的,并且不天然存在。在一些实施方案中,本文公开的非天然存在的受体结合靶细胞表面展示的配体,其触发受体的蛋白水解裂解以及调节细胞中的定制转录程序的转录调节因子的释放。在一些实施方案中,启动受体不包括Notch受体的LIN-12-Notch重复序列(LNR)和/或异源二聚化结构域(HD)。

[0219] 启动受体细胞外结构域

[0220] 本文公开的启动受体包含特异性地结合胎盘/生殖细胞碱性磷酸酶(ALPG/P)的细胞外结构域。在一些实施方案中,细胞外结构域包括受体的配体结合部分。在一些实施方案中,细胞外结构域包括结合至一种或多种靶抗原的抗原结合部分。在一些实施方案中,抗原结合部分包括抗体或其功能性抗原结合片段的一个或多个抗原结合决定簇。在一些实施方案中,抗原结合部分选自抗体、纳米抗体、双抗体、三抗体或微型抗体、F(ab')₂片段、Fab片段、单链可变片段(scFv)和单结构域抗体(sdAb)或其功能性片段。在一些实施方案中,抗原结合部分包含scFv。抗原结合部分可以包括天然存在的氨基酸序列或者可经工程化、设计或修饰以提供所需的和/或改进的特性,例如增加的结合亲和力。

[0221] 启动受体CDR、VH、VL结构域

[0222] 在一些方面,启动受体细胞外抗原结合结构域包含可变重(VH)链序列和可变轻(VL)链序列,所述可变重(VH)链序列包含三个重链CDR序列CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述可变轻(VL)链序列包含三个轻链CDR序列CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,其中:CDR-H1包含SEQ ID NO:1、39、40、41或42所示的序列,CDR-H2包含SEQ ID NO:2、43、44、45或46所示的序列,CDR-H3包含SEQ ID NO:3、47或48所示的序列,CDR-L1包含SEQ ID NO:4、49或50所示的序列,CDR-L2包含SEQ ID NO:5或51所示的序列,并且CDR-L3包含SEQ ID NO:6或53所示的序列。在一些实施方案中,VH链序列包含SEQ ID NO:7所示的序列。在一些实施方案中,VL包含SEQ ID NO:8所示的序列。在一些实施方案中,细胞外结构域包含SEQ ID NO:9所示的序列。

[0223] 在一些实施方案中,启动受体细胞外抗原结合结构域CDR-H3与SEQ ID NO:3、47或48的CDR-H3具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性,CDR-H2与SEQ ID NO:2、43、44、45或46的CDR-H2具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性,CDR-H1与SEQ ID NO:1、39、40、41或42的CDR-H1具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性,CDR-L3与SEQ ID NO:6或53的CDR-L3具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性,CDR-L2与SEQ ID NO:5或51的CDR-L2具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性,并且CDR-L1与SEQ ID NO:4的CDR-L1具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性。在一些实施方案中,CDR-H3是具有多达1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个或8个氨基酸取代的SEQ ID NO:3、47或48的CDR-H3;CDR-H2是具有多达1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个或8个氨基酸取代的SEQ ID NO:2、43、44、45或46的CDR-H2;CDR-H1是具有多达1个、2

个、3个、4个或5个氨基酸取代的SEQ ID NO:1、39、40、41或42的CDR-H1;CDR-L3是具有多达1个、2个、3个、4个或5个氨基酸取代的SEQ ID NO:6或53的CDR-L3;CDR-L2是具有多达1个、2个、3个或4个氨基酸取代的SEQ ID NO:5或51的CDR-L2;并且CDR-L1是具有多达1个、2个、3个、4个、5个或6个氨基酸取代的SEQ ID NO:4的CDR-L1。

[0224] 在一些实施方案中,本文提供的启动受体细胞外抗原结合结构域包含如SEQ ID NO:7所示的VH结构域的一个至三个CDR。在一些实施方案中,本文提供的抗原结合结构域包含如SEQ ID NO:7所示的VH结构域的两个至三个CDR。在一些实施方案中,本文提供的抗原结合结构域包含如SEQ ID NO:7所示的VH结构域的三个CDR。在一些方面,CDR为Kabat CDR。在一些方面,CDR为Chothia CDR。在一些方面,CDR为AbM CDR。在一些方面,CDR为Contact CDR。在一些方面,CDR为IMGT CDR。

[0225] 在一些实施方案中,本文提供的启动受体细胞外抗原结合结构域包含与SEQ ID NO:7所示VH序列具有至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%同一性的VH序列。在一些实施方案中,本文提供的抗原结合结构域包含具有多达1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个或25个氨基酸取代的SEQ ID NO:7所提供的VH序列。在一些方面,氨基酸取代是保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,本段中描述的抗原结合结构域在本文中称为“变体”。在一些实施方案中,此类变体例如通过亲和力成熟、定点诱变、随机诱变或本领域中已知或本文所述的任何其他方法来由本文提供的序列获得。在一些实施方案中,此类变体不由本文提供的序列获得,并且可例如根据本文提供的用于获得抗体或抗原结合结构域的方法来重新分离。

[0226] 在一些实施方案中,本文提供的启动受体细胞外抗原结合结构域包含如SEQ ID NO:8所示的VL结构域的一个至三个CDR。在一些实施方案中,本文提供的抗原结合结构域包含如SEQ ID NO:8所示的VL结构域的两个至三个CDR。在一些实施方案中,本文提供的抗原结合结构域包含如SEQ ID NO:8所示的VL结构域的三个CDR。在一些方面,CDR为Kabat CDR。在一些方面,Kabat VH CDR以SEQ ID NO:40、44和3所示的序列提供,并且Kabat VL CDR以SEQ ID NO:4、5和6所示的序列提供。在一些方面,CDR是Chothia CDR。在一些方面,Chothia VH CDR以SEQ ID NO:1、2所示的序列提供,并且Chothia VL CDR以SEQ ID NO:4、5和6所示的序列提供。在一些方面,CDR为AbM CDR。在一些方面,AbM VH CDR以SEQ ID NO:39、43和3所示的序列提供,并且AbM VL CDR以SEQ ID NO:4、5和6所示的序列提供。在一些方面,CDR为Contact CDR。在一些方面,Contact VH CDR以SEQ ID NO:41、45和47所示的序列提供,并且Contact VL CDR以SEQ ID NO:49、51和53所示的序列提供。在一些方面,CDR为IMGT CDR。在一些方面,IMGT VH CDR以SEQ ID NO:42、46和48所示的序列提供,并且IMGT VL CDR以SEQ ID NO:50、52和6所示的序列提供。

[0227] 在一些实施方案中,本文提供的启动受体细胞外抗原结合结构域包含与SEQ ID NO:8所示VL序列具有至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%同一性的VL序列。在一些实施方案中,本文提供的抗原结合结构域包含具有多达1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个或25个氨基酸取代的SEQ ID NO:8所提供的VL序列。在一些方面,氨基酸取代是保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,本段中描述的抗体在本文中称为“变体”。在一些实

施方案中,此类变体例如通过亲和力成熟、定点诱变、随机诱变或本领域中已知或本文所述的任何其他方法来由本文提供的序列获得。在一些实施方案中,此类变体不由本文提供的序列获得,并且可例如根据本文提供的用于获得抗体或抗原结合结构域的方法来重新分离。

[0228] 表B提供了根据指示编号方案的例示性ALPG/P抗原结合结构域的VH和VL的CDR序列。

表 B			
SEQ ID NO	名称	编号方案	序列
1	CDR-H1	Chothia	GFSLTSY---
39		AbM	GFSLTSYGVS
40		Kabat	-----SYGVS
41		Contact	----TSYGVS
42		IMGT	GFSLTSYG--
2	CDR-H2	Chothia	-----WEDGS-----
43		AbM	---VIWEDGSTN-----
44		Kabat	---VIWEDGSTNYHSALIS
45		Contact	WIGVIWEDGSTN-----
46		IMGT	----IWEDGST-----
3	CDR-H3	Chothia	--PHYGSSYVGAMEY
3		AbM	--PHYGSSYVGAMEY
3		Kabat	--PHYGSSYVGAMEY
47		Contact	ARPHYGSSYVGAME-
48		IMGT	ARPHYGSSYVGAMEY
4	CDR-L1	Chothia	RASENIYSYVA--
4		AbM	RASENIYSYVA--
4		Kabat	RASENIYSYVA--
49		Contact	-----YSYVAWY
50		IMGT	---ENIYSY----
5	CDR-L2	Chothia	----NAKSLAS
5		AbM	----NAKSLAS
5		Kabat	----NAKSLAS
51		Contact	LLIYNAKSLA-
52		IMGT	----NA-----
6	CDR-L3	Chothia	QHHYVSPWT
6		AbM	QHHYVSPWT
6		Kabat	QHHYVSPWT
53		Contact	QHHYVSPW-
6		IMGT	QHHYVSPWT

[0231] 跨膜结构域

[0232] 如上文所述,启动受体包括包含一个或多个配体诱导型蛋白水解裂解位点的跨膜结构域(TMD)。

[0233] 在一些实施方案中,TMD包含Notch1跨膜结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域包含如SEQ ID NO:19所示的序列。

[0234] 一般来说,适用于本文公开的嵌合受体的TMD可以是1型跨膜受体的包括至少一个 γ 分泌酶裂解位点的任何跨膜结构域。 γ 分泌酶复合物及其底物蛋白(包括淀粉样前体蛋白(APP)和Notch)的结构和功能的详细描述可以例如在Zhang等人最近在Frontiers Cell Neurosci (2014)中发表的一篇综述中找到。来自1型跨膜受体的非限制性适合TMD包括来自CLSTN1、CLSTN2、APLP1、APLP2、LRP8、APP、BTC、TGBR3、SPN、CD44、CSF1R、CXCL16、CX3CL1、DCC、DLL1、DSG2、DAG1、CDH1、EPCAM、EPHA4、EPHB2、EFNB1、EFNB2、ErbB4、GHR、HLA-A和IFNAR2的TMD,其中TMD包括至少一个 γ 分泌酶裂解位点。适用于本文所述的组合物和方法的另外TMD包括但不限于来自1型跨膜受体IL1R1、IL1R2、IL6R、INSR、ERN1、ERN2、JAG2、KCNE1、KCNE2、KCNE3、KCNE4、KL、CHL1、PTPRF、SCN1B、SCN3B、NPR3、NGFR、PLXDC2、PAM、AGER、ROBO1、SORCS3、SORCS1、SORL1、SDC1、SDC2、SPN、TYR、TYRP1、DCT、YASN、FLT1、CDH5、PKHD1、NECTIN1、PCDHGC3、NRG1、LRP1B、CDH2、NRG2、PTPRK、SCN2B、Nradd和PTPRM的跨膜结构域。在一些实施方案中,本公开的嵌合多肽或Notch受体的TMD是源自钙同线蛋白(calsyntenin)家族成员(诸如alcaidein α 和alcaidein γ)的TMD。在一些实施方案中,本发明的嵌合多肽或Notch受体的TMD是已知用于Notch受体的TMD。在一些实施方案中,本发明的嵌合多肽或Notch受体的TMD是源自不同Notch受体的TMD。例如,在基于人Notch1的Mini Notch中,Notch1 TMD可以用Notch2 TMD、Notch3 TMD、Notch4 TMD或来自非人动物(诸如斑马鱼、黑腹果蝇、非洲爪蟾或原鸡)的Notch TMD取代。

[0235] 在一些实施方案中,启动受体包含Notch裂解位点,诸如S2或S3。适用于本文公开的组合物和方法的另外蛋白水解裂解位点包括但不限于ADAM10、选自以下的MMP的金属蛋白酶裂解位点:胶原酶1、2和3(MMP-1、-8和-13)、明胶酶A和B(MMP-2和-9)、溶基质素1、2和3(MMP-3、-10和-11)、基质溶解素(MMP-7)和膜金属蛋白酶(MT1-MMP和MT2-MMP)。适合蛋白酶裂解位点的另一实例是纤溶酶原激活物裂解位点,例如尿激酶纤溶酶原激活因子(uPA)或组织纤溶酶原激活因子(tPA)裂解位点。适合蛋白酶裂解位点的另一实例是催乳素裂解位点。uPA和tPA的裂解序列的具体实例包括包含Val-Gly-Arg的序列。可包含在蛋白水解可裂解接头中的蛋白酶裂解位点的另一实例是烟草蚀刻病毒(TEV)蛋白酶裂解位点,例如Glu-Asn-Leu-Tyr-Thr-Gln-Ser(SEQ ID NO:182),其中蛋白酶在谷氨酰胺与丝氨酸之间裂解。可包含在蛋白水解可裂解接头中的蛋白酶裂解位点的另一实例是肠激酶裂解位点,例如Asp-Asp-Asp-Asp-Lys(SEQ ID NO:183),其中裂解发生在赖氨酸残基之后。可包含在蛋白水解可裂解接头中的蛋白酶裂解位点的另一实例是凝血酶裂解位点,例如Leu-Val-Pro-Arg(SEQ ID NO:184)。包含蛋白酶裂解位点的另外的适合接头包括可被以下蛋白酶裂解的序列:PreScissionTM蛋白酶(包含人鼻病毒3C蛋白酶和谷胱甘肽-S-转移酶的融合蛋白)、凝血酶、组织蛋白酶B、爱泼斯坦-巴尔病毒蛋白酶、MMP-3(溶基质素)、MMP-7(基质溶解素)、MMP-9;类嗜热菌蛋白酶MMP、基质金属蛋白酶2(MMP-2)、组织蛋白酶L;组织蛋白酶D、基质金属蛋白酶1(MMP-1)、尿激酶型纤溶酶原激活因子、膜1型基质金属蛋白酶(MT-MMP)、溶基质素3(或MMP-11)、嗜热溶素、成纤维细胞胶原酶和溶基质素1、基质金属蛋白酶13(胶原酶3)、

组织型纤溶酶原激活因子 (tPA)、人前列腺特异性抗原、激肽释放酶 (hK3)、中性粒细胞弹性蛋白酶和钙蛋白酶 (钙激活中性蛋白酶)。非表达受体的宿主细胞原生的蛋白酶 (例如, TEV) 可用作进一步的调控机制, 其中受体的激活减少, 直至蛋白酶被表达或以其他方式提供。另外, 蛋白酶可能与肿瘤相关或与疾病相关 (表达程度显著高于正常组织中的程度), 并充当独立的调控机制。例如, 一些基质金属蛋白酶在某些癌症类型中高度表达。

[0236] 在一些实施方案中, TMD内的氨基酸取代包括TMD的“GV”基序内的一个或多个取代。在一些实施方案中, 此类取代中的至少一种包括对丙氨酸的取代。另外的序列和取代描述于W02021061872中, 其据此以引用的方式整体并入。

[0237] 细胞内结构域

[0238] 在一些实施方案中, 启动受体包含来自或源自转录调节因子和/或DNA结合结构域的一个或多个细胞内结构域。在一些实施方案中, 细胞内结构域包含Gal4/VP64结构域。在一些实施方案中, 细胞内结构域包含SEQ ID NO:23所示的序列。

[0239] 转录调节因子激活或抑制同源启动子的转录。转录激活因子通常在转录启动子附近与其结合并募集RNA聚合酶以直接起始转录。转录抑制因子与转录启动子结合并在空间上阻碍RNA聚合酶的转录起始。其他转录调节因子根据其结合位置和细胞条件充当激活因子或抑制因子。因此, 如本文所用, “转录激活结构域”是指与转录控制元件和/或转录调节蛋白 (例如, 转录因子、RNA聚合酶等) 相互作用以增加和/或激活一个或多个基因的转录的转录因子的结构域。转录激活结构域的非限制性实例包括: 单纯疱疹病毒VP16激活结构域、VP64 (其为VP16的四聚体衍生物)、HIV TAT、NFkB p65激活结构域、p53激活结构域1和2、CREB (cAMP应答元件结合蛋白) 激活结构域、E2A激活结构域、NFAT (活化T细胞核因子) 激活结构域、酵母Gal4、酵母GCN4、酵母HAP1、MLL、RTG3、GLN3、OAF1、PIP2、PDR1、PDR3、PHO4、LEU3糖皮质激素受体转录激活结构域、B细胞POU同源结构域蛋白Oct2、植物Ap2或本领域技术人员或普通技术人员已知的任何其他结构域。在一些实施方案中, 转录调节因子选自Gal4-VP16、Gal4-VP64、tetR-VP64、ZFHD1-YP64、Gal4-KRAB和HAP1-VP16。在一些实施方案中, 转录调节因子是Gal4-VP64。转录激活结构域可以包含野生型或天然存在的序列, 或者它可以是原始转录激活结构域的修饰、突变或衍生型式, 具有所需的增加和/或激活一个或多个基因的转录的能力。在一些实施方案中, 转录调节因子还可包括核定位信号。

[0240] 在一些实施方案中, 启动受体包含一个或多个细胞内“DNA结合结构域” (或“DB结构域”)。此类“DNA结合结构域”是指结合特定DNA序列元件的序列特异性DNA结合结构域。因此, 如本文所用, “序列特异性DNA结合结构域”是指具有选择性地结合具有特定预定序列的DNA的能力的蛋白质结构域部分。序列特异性DNA结合结构域可以包含野生型或天然存在的序列, 或者它可以是原始结构域的具有结合所需序列的所需能力的修饰、突变或衍生型式。在一些实施方案中, 序列特异性DNA结合结构域经工程化以结合所需序列。可用于本文所述的合成蛋白质中的具有序列特异性DNA结合结构域的蛋白质的非限制性实例包括HNF1a、Gal4、GCN4、反向四环素受体、THY1、SYN1、NSE/RU5'、AGRP、CALB2、CAMK2A、CCK、CHAT、DLX6A、EMX1、锌指蛋白或其结构域、CRISPR/Cas蛋白, 诸如Cas9、Cas3、Cas4、Cas5、Cas5e (or CasD)、CasH、Cas6e、Cas6f、Cas7、Cas8a1、Cas8a2、Cas8b、Cas8c、Cas10、Cas10d、CasF、CasG、CasH、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1 (or CasA)、Cse2 (or CasB)、Cse3 (或CasE)、Cse4 (or CasC)、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、

Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csz1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4,和Cu196,以及TALES。

[0241] 在使用CRISPR/Cas样蛋白的那些实施方案中,CRISPR/Cas样蛋白可以是野生型CRISPR/Cas蛋白、修饰的CRISPR/Cas蛋白,或野生型或修饰的CRISPR/Cas蛋白的片段。CRISPR/Cas样蛋白可经修饰以增加核酸结合亲和力和/或特异性,改变酶活性,并且/或者改变蛋白质的另一特性。例如,CRISPR/Cas样蛋白的核酸酶(例如,DNase、RNase)结构域可以被修饰、缺失或失活。或者,CRISPR/Cas样蛋白可被截短以去除对本文所述系统的功能而言不是必需的结构域。例如,用作DNA结合蛋白或其结构域的CRISPR酶可以相对于相应的野生型酶发生突变,使得突变的CRISPR或其结构域缺乏裂解含有DNA结合结构域靶位点的核酸序列的能力。例如,D10A突变可以与H840A、N854A或N863A突变中的一个或多个组合以产生实质上缺乏所有DNA裂解活性的Cas9酶。

[0242] 近膜结构域

[0243] ECD和TMD,或TMD和ICD,可以用连接多肽诸如近膜结构域彼此连接。“SynNotch”或合成Notch受体包含异源细胞外配体结合结构域、与Notch受体JMD(包括NRR)具有实质序列同一性的连接多肽、TMD和ICD。“Fn Notch”受体包含异源细胞外配体结合结构域、与Robo受体(诸如哺乳动物Robo1、Robo2、Robo3或Robo4)具有实质序列同一性的连接多肽,随后是1、2或3个纤连蛋白重复序列(“Fn”)、TMD和ICD。“Mini Notch”受体包含异源细胞外配体结合结构域、与Notch受体JMD(但缺乏NRR(LIN-12-Notch重复序列(LNR)模块))具有实质序列同一性的连接多肽、TMD和ICD。“Minimal Linker Notch”受体包含异源细胞外配体结合结构域、与Notch受体(例如但不限于,具有合成(GGS)_n多肽序列)缺乏实质序列同一性的连接多肽、TMD和ICD。“Hinge Notch”受体包含异源细胞外配体结合结构域、包含寡聚化结构域(例如,促进与合成受体和/或现有宿主受体的二聚化、三聚化或更高级多聚化的结构域)的铰链序列、TMD和ICD。

[0244] 在一些实施方案中,启动受体包含介于细胞外结构域与跨膜结构域之间的近膜结构域(JMD)肽。在一些实施方案中,启动受体包含介于跨膜结构域与细胞内结构域之间的近膜结构域(JMD)肽。在一些实施方案中,JMD肽包含LWF基序。LWF基序在受体构建体中的用途描述于美国专利第10,858,443号中,该专利据此以引用的方式整体并入。在一些实施方案中,JMD肽与Notch1、Notch2、Notch3和/或Notch4的JMD具有实质序列同一性。在一些实施方案中,JMD肽与Notch1、Notch2、Notch3和/或Notch4 JMD具有实质序列同一性,但不包括Notch受体的LIN-12-Notch重复序列(LNR)和/或异源二聚化结构域(HD)。在一些实施方案中,JMD肽与Notch1、Notch2、Notch3和/或Notch4 JMD不具有实质序列同一性。在一些实施方案中,JMD肽包括促进受体的二聚体、三聚体或更高级组合的形成的寡聚化结构域。此类JMD肽描述于W02021061872中,其据此以引用的方式整体并入。

[0245] 在Mini Notch受体中,连接多肽源自NRR和HD结构域缺失后的Notch JMD序列。Notch JMD序列可以是来自Notch1、Notch2、Notch3或Notch4的序列,并且可以源自非人同系物,诸如来自果蝇属、原鸡属、鱼丹属等的那些。剩余的Notch序列的4至50个氨基酸残基可用作多肽接头。在一些实施方案中,改变接头多肽序列的长度和氨基酸组成以改变ECD和TMD相对于彼此的方向和/或接近度,从而实现嵌合多肽的所需活性,诸如诱导配体或不存在配体时的信号转导水平。

[0246] 在Minimal Linker Notch受体中,连接多肽与Notch JMD序列(包括来自Notch1、Notch2、Notch3或Notch4的Notch JMD序列,或其非人同系物)不具有实质序列同一性。4至50个氨基酸残基可用作多肽接头。在一些实施方案中,改变接头多肽序列的长度和氨基酸组成以改变ECD和TMD相对于彼此的方向和/或接近度,从而实现本公开的嵌合多肽的所需活性。Minimal Linker序列可以被设计为包括或省略蛋白酶裂解位点,并且可以包括或省略糖基化位点或用于其他类型的翻译后修饰的位点。在一些实施方案中,Minimal Linker不包含蛋白酶裂解位点或糖基化位点。

[0247] 在一些实施方案中,启动受体还包含铰链。可用于启动受体中的铰链接头可以包括含有一个或多个通过分子间二硫键键合促进嵌合多肽的寡聚体形成的多肽基序的寡聚化结构域(例如,铰链结构域)。在这些情形下,在本文公开的嵌合受体内,铰链结构域一般包括设置于ECD与TMD之间的柔性多肽连接区。因此,铰链结构域提供了ECD与TMD之间的柔性,并且还提供了供两个或更多个嵌合多肽单体之间的分子间二硫键键合以形成寡聚复合物的位点。在一些实施方案中,铰链结构域包括促进本文公开的嵌合多肽的二聚体形成的基序。在一些实施方案中,铰链结构域包括促进本文公开的嵌合多肽的三聚体形成的基序(例如,源自OX40的铰链结构域)。适用于本公开的组合物和方法的铰链多肽序列可以是天然存在的铰链多肽序列(例如,来自天然存在的免疫球蛋白的那些序列)或者可以经工程化、设计或修饰以提供所需的和/或改进的特性,例如,调节转录。适合铰链多肽序列包括但不限于源自IgA、IgD和IgG亚类的那些,诸如IgG1铰链结构域、IgG2铰链结构域、IgG3铰链结构域和IgG4铰链结构域,或它们的功能性变体。在一些实施方案中,铰链多肽序列含有一个或多个CXXC基序。在一些实施方案中,铰链多肽序列含有一个或多个CPPC基序(SEQ ID NO: 185)。

[0248] 铰链多肽序列还可源自CD8 α 铰链结构域、CD28铰链结构域、CD152铰链结构域、PD-1铰链结构域、CTLA4铰链结构域、OX40铰链结构域,以及它们的功能性变体。在一些实施方案中,铰链结构域包括源自CD8 α 铰链结构域或其功能性变体的铰链多肽序列。在一些实施方案中,铰链结构域包括源自CD28铰链结构域或其功能性变体的铰链多肽序列。在一些实施方案中,铰链结构域包括源自OX40铰链结构域或其功能性变体的铰链多肽序列。在一些实施方案中,铰链结构域包括源自IgG4铰链结构域或其功能性变体的铰链多肽序列。

[0249] Fn Notch连接多肽源自Robo1 JMD,其含有纤连蛋白重复序列(Fn)结构域,在Fn重复序列与TMD之间有短多肽序列。Fn Notch连接多肽不含Notch负调控区(NRR)或Notch HD结构域。Fn连接多肽可以含有1、2、3、4或5个Fn重复序列。在一些实施方案中,嵌合受体包含具有约1至约5个Fn重复序列、约1至约3个Fn重复序列或约2至约3个Fn重复序列的Fn连接多肽。Fn重复序列与TMD之间的短多肽序列可以为约2至约30个氨基酸残基。在一些实施方案中,短多肽序列可以介于任何序列的约5与约20个氨基酸之间。在一些实施方案中,短多肽序列可以介于任何序列的约5与约20个天然存在的氨基酸之间。在一些实施方案中,短多肽序列可以介于任何序列的约5与约20个氨基酸之间但不具有超过一个脯氨酸。在一些实施方案中,短多肽序列可以介于约5与约20个氨基酸之间,并且约50%或更多的氨基酸是甘氨酸。在一些实施方案中,短多肽序列可以介于约5与约20个氨基酸之间,其中氨基酸选自甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸和丙氨酸。在一些实施方案中,可以改变Fn连接多肽序列的长度和氨基酸组成以改变ECD和TMD相对于彼此的方向和/或接近度,从而实现本公开的嵌合多肽的

所需活性。

[0250] 终止转移序列

[0251] 在一些实施方案中,启动受体还包含在跨膜结构域与细胞内结构域之间的终止转移序列(STS)。STS包含带电荷的疏脂序列。不受任何理论的束缚,STS用作膜锚,并且被认为阻止细胞内结构域进入质膜。STS结构域在启动受体中的用途描述于W02021061872中,其据此以引用的方式整体并入。非限制性示例性STS序列包括APLP1、APLP2、APP、TGBR3、CSF1R、CXCL16、CX3CL1、DAG1、DCC、DNER、DSG2、CDH1、GHR、HLA-A、IFNAR2、IGF1R、IL1R1、ERN2、KCNE1、KCNE2、CHL1、LRP1、LRP2、LRP18、PTPRF、SCN1B、SCN3B、NPR3、NGFR、PLXDC2、PAM、AGER、ROBO1、SORCS3、SORCS1、SORL1、SDC1、SDC2、SPN、TYR、TYRP1、DCT、VASN、FLT1、CDH5、PKTFD1、NECTIN1、KL、IL6R、EFNB1、CD44、CLSTN1、LRP8、PCDHGC3、NRG1、LRP1B、JAG2、EFNB2、DLL1、CLSTN2、EPCAM、ErbB4、KCNE3、CDH2、NRG2、PTPRK、BTC、EPHA4、IL1R2、KCNE4、SCN2B、Nradd、PTPRM、Notch1、Notch2、Notch3和Notch4 STS序列。在一些实施方案中,STS与跨膜域异源。在一些实施方案中,STS与跨膜域同源。STS序列描述于W02021061872中,其据此以引用的方式整体并入。

[0252] 在一些实施方案中,终止转移序列包含如SEQ ID NO:20所示的序列。

[0253] 嵌合抗原受体

[0254] 在另一方面,本文提供了包含特异性地结合至间皮素(MSLN;NCBI Entrez基因:10232;UniProtKB/Swiss-Prot:Q13421,SEQ ID NO:178)的细胞外抗原结合结构域的嵌合抗原受体。CAR可以是包含完全人序列(例如,天然人序列)的人CAR。

[0255] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体包括包含抗原结合结构域的细胞外部分。受体(诸如CAR)的抗原识别结构域可以连接至一种或多种细胞内信号传导组分,诸如在CAR的情况下模拟通过抗原受体复合物(诸如TCR复合物)激活的信号传导组分,和/或通过另一细胞表面受体进行信号传导。因此,在一些实施方案中,细胞外结合组分(例如,配体结合或抗原结合结构域)连接至一个或多个跨膜和细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域与细胞外结构域融合。在一个实施方案中,使用天然与受体(例如,CAR)中的结构域之一相缔合的跨膜结构域。在一些情况下,通过氨基酸取代选择或修饰跨膜结构域,以避免此类结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合,从而最大限度地减少与受体复合物的其他成员的相互作用。

[0256] 在一些方面,嵌合抗原受体包括包含本文所述的抗原结合结构域的细胞外部分和细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,抗体或片段包括scFv、VH或单结构域VH抗体并且细胞内结构域含有ITAM。在一些方面,细胞内信号传导结构域包括CD3 ζ (CD3)链的 ζ 链的信号传导结构域。在一些实施方案中,嵌合抗原受体包括连接细胞外结构域和细胞内信号传导结构域的跨膜结构域。

[0257] 在一些方面,跨膜结构域含有CD8a或CD28的跨膜部分。细胞外结构域和跨膜可以直接或间接连接。在一些实施方案中,细胞外结构域和跨膜通过间隔区,诸如本文所述的任何间隔区连接。在一些实施方案中,嵌合抗原受体含有T细胞共刺激分子的胞内结构域,诸如在跨膜结构域和细胞内信号传导结构域之间。在一些方面,T细胞共刺激分子是CD28或41BB。

[0258] 嵌合抗原受体CDR、VH、VL结构域

[0259] 在一些方面,启动受体细胞外抗原结合结构域包含可变重(VH)链序列和可变轻(VL)链序列,所述可变重(VH)链序列包含三个重链CDR序列CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述可变轻(VL)链序列包含三个轻链CDR序列CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,其中:CDR-H1包含SEQ ID NO:10、54、56、57或71所示的序列,CDR-H2包含SEQ ID NO:11、58、59、60、61或308所示的序列,CDR-H3包含SEQ ID NO:12、62或63所示的序列,CDR-L1包含SEQ ID NO:14、64、65、66或67所示的序列,CDR-L2包含SEQ ID NO:15所示的序列,并且CDR-L3包含SEQ ID NO:16或72所示的序列。在一些实施方案中,VH链序列包含SEQ ID NO:13所示的序列。在一些实施方案中,VL包含SEQ ID NO:17所示的序列。在一些实施方案中,抗原结合结构域包含SEQ ID NO:30所示的序列。

[0260] 在一些实施方案中,启动受体细胞外抗原结合结构域CDR-H3与SEQ ID NO:12、62、或63的CDR-H3具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性,CDR-H2与SEQ ID NO:11、58、59、60、61或308的CDR-H2具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性,CDR-H1与SEQ ID NO:10、54、56、57或71的CDR-H1具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性,CDR-L3与SEQ ID NO:16或72的CDR-L3具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性,CDR-L2与SEQ ID NO:15、68、69或70的CDR-L2具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性,并且CDR-L1与SEQ ID NO:14、65、66或67的CDR-L1具有至少约50%、75%、80%、85%、90%或95%同一性。在一些实施方案中,CDR-H3是具有多达1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个或8个氨基酸取代的SEQ ID NO:12、62或63的CDR-H3;CDR-H2是具有多达1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个或8个氨基酸取代的SEQ ID NO:11、58、59、60、61或308的CDR-H2;CDR-H1是具有多达1个、2个、3个、4个或5个氨基酸取代的SEQ ID NO:10、54、56、57或71的CDR-H1;CDR-L3是具有多达1个、2个、3个、4个或5个氨基酸取代的SEQ ID NO:16或72的CDR-L3;CDR-L2是具有多达1个、2个、3个或4个氨基酸取代的SEQ ID NO:15、68、69或70的CDR-L2;并且CDR-L1是具有多达1个、2个、3个、4个、5个或6个氨基酸取代的SEQ ID NO:14、65、66或67的CDR-L1。

[0261] 在一些实施方案中,本文提供的启动受体细胞外抗原结合结构域包含如SEQ ID NO:13所示的VH结构域的一个至三个CDR。在一些实施方案中,本文提供的抗原结合结构域包含如SEQ ID NO:13所示的VH结构域的两个至三个CDR。在一些实施方案中,本文提供的抗原结合结构域包含如SEQ ID NO:13所示的VH结构域的三个CDR。在一些方面,CDR为Kabat CDR。在一些方面,CDR为Chothia CDR。在一些方面,CDR为AbM CDR。在一些方面,CDR为Contact CDR。在一些方面,CDR为IMGT CDR。

[0262] 在一些实施方案中,本文提供的启动受体细胞外抗原结合结构域包含与SEQ ID NO:13所示的VH序列具有至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%同一性的VH序列。在一些实施方案中,本文提供的抗原结合结构域包含具有多达1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个或25个氨基酸取代的SEQ ID NO:13所提供的VH序列。在一些方面,氨基酸取代是保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,本段中描述的抗原结合结构域在本文中称为“变体”。在一些实施方案中,此类变体例如通过亲和力成熟、定点诱变、随机诱变或本领域中已知或本文所述的任何其他方法来由本文提供的序列获得。在一些实施方案中,此类变体不由本文提供的序列获得,并且可例如根据本文提供的用于获得抗体或抗原结合结构域的方

法来重新分离。

[0263] 在一些实施方案中,本文提供的启动受体细胞外抗原结合结构域包含如SEQ ID NO:17所示的VL结构域的一个至三个CDR。在一些实施方案中,本文提供的抗原结合结构域包含如SEQ ID NO:17所示的VL结构域的两个至三个CDR。在一些实施方案中,本文提供的抗原结合结构域包含如SEQ ID NO:17所示的VL结构域的三个CDR。在一些方面,CDR为Kabat CDR。在一些方面,Kabat VH CDR以SEQ ID NO:10、11和12所示的序列提供,并且Kabat VL CDR以SEQ ID NO:14、69和16所示的序列提供。在一些方面,CDR为Chothia CDR。在一些方面,Chothia VH CDR以SEQ ID NO:71、308和12所示的序列提供,并且Chothia VL CDR以SEQ ID NO:14、15和16所示的序列提供。在一些方面,CDR为AbM CDR。在一些方面,AbM VH CDR以SEQ ID NO:54、58和12所示的序列提供,并且AbM VL CDR以SEQ ID NO:14、68和16所示的序列提供。在一些方面,CDR为Contact CDR。在一些方面,Contact VH CDR以SEQ ID NO:56、60和62所示的序列提供,并且Contact VL CDR以SEQ ID NO:66、70和72所示的序列提供。在一些方面,CDR为IMGT CDR。在一些方面,IMGT VH CDR以SEQ ID NO:57、61和63所示的序列提供,并且IMGT VL CDR以SEQ ID NO:67、DT和16所示的序列提供。

[0264] 在一些实施方案中,本文提供的启动受体细胞外抗原结合结构域包含与SEQ ID NO:17所示的VL序列具有至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%同一性的VL序列。在一些实施方案中,本文提供的抗原结合结构域包含具有多达1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个或25个氨基酸取代的SEQ ID NO:17所提供的VL序列。在一些方面,氨基酸取代是保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,本段中描述的抗体在本文中称为“变体”。在一些实施方案中,此类变体例如通过亲和力成熟、定点诱变、随机诱变或本领域中已知或本文所述的任何其他方法来由本文提供的序列获得。在一些实施方案中,此类变体不由本文提供的序列获得,并且可例如根据本文提供的用于获得抗体或抗原结合结构域的方法来重新分离。

[0265] 表C提供了根据指示编号方案的SEQ ID NO:13的VH和SEQ ID NO:17的VL的例示性MSLN抗原结合结构域CDR序列。

[0266]

表 C			
SEQ ID NO	名称	编号方案	序列
71	CDR-H1	Chothia	GYSFTGY
54		AbM	GYSFTGYTMN
10		Kabat	GYTMN
56		Contact	TGYTMN
57		IMGT	GYSFTGYT
308	CDR-H2	Chothia	TPYNGA
58		AbM	LITPYNGASS
11		Kabat	LITPYNGASSYNQKFRG
60		Contact	WIGLITPYNGASS
61		IMGT	ITPYNGAS
12	CDR-H3	Chothia	GGYDGRGFDY
12		AbM	GGYDGRGFDY
12		Kabat	GGYDGRGFDY
62		Contact	ARGGYDGRGFD
63		IMGT	ARGGYDGRGFDY
14	CDR-L1	Chothia	SASSSVSYMH
14		AbM	SASSSVSYMH
14		Kabat	SASSSVSYMH
66		Contact	SYMHWY
67		IMGT	SSVSY
15	CDR-L2	Chothia	DTSKLAS
68		AbM	DTSKLAS
69		Kabat	DTSKLAS
70		Contact	RWIYDTSKLA
-		IMGT	DT
16	CDR-L3	Chothia	QQWSGYPLT
16		AbM	QQWSGYPLT
16		Kabat	QQWSGYPLT
72		Contact	QQWSGYPL-
16		IMGT	QQWSGYPLT

[0267] CAR跨膜结构域

[0268] 在一些实施方案中,跨膜结构域源自天然来源或合成来源。在来源是天然的情况下,在一些方面结构域源自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。跨膜区包括源自(例如,至少包含以下的跨膜区)T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链,CD28,CD3 ϵ ,CD45,CD4,CD5,CDS,CD9,CD16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD86,CD 134,CD137和/或CD154的跨膜区。或者,在一些实施方案中,跨膜结构域是合成的。在一些方面,合成的跨膜结构域主要包含疏水性残基,诸如亮氨酸和缬氨酸。在一些方面,苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体将存在于合成的跨膜结构域

的每一端。在一些实施方案中,连接是通过接头、间隔区和/或跨膜结构域完成的。

[0269] 在一些实施方案中,受体(例如,CAR)的跨膜结构域是人CD28或其变体的跨膜结构域,例如人CD28(登录号:P10747.1)的27个氨基酸的跨膜结构域。

[0270] 在一些实施方案中,CAR包含CD8a TMD。在一些实施方案中,CD8a TMD包含SEQ ID NO:27所示的序列。

[0271] CAR铰链

[0272] 在一些实施方案中,CAR还包括间隔区,间隔区可以是或包括免疫球蛋白恒定区或其变体或修饰型式的至少一部分,诸如铰链区(例如,CD8a铰链、IgG4铰链区),和/或CH1/CL和/或Fc区。在一些实施方案中,恒定区或部分属于人IgG,诸如IgG4或IgG1。在一些方面,恒定区的部分用作抗原识别组分(例如,scFv)与跨膜结构域之间的间隔区。与不存在间隔区的情况相比,间隔区的长度可增加细胞在抗原结合后的应答性。在一些实例中,间隔区的长度为或约为12个氨基酸,或者长度不超过12个氨基酸。示例性间隔区包括具有至少约10至229个氨基酸、约10至200个氨基酸、约10至175个氨基酸、约10至150个氨基酸、约10至125个氨基酸、约10至100个氨基酸、约10至75个氨基酸、约10至50个氨基酸、约10至40个氨基酸、约10至30个氨基酸、约10至20个氨基酸,或约10至15个氨基酸(并且包括任何所列范围的端点之间的任何整数)的那些。在一些实施方案中,间隔区具有约12个或更少的氨基酸、约119个或更少的氨基酸,或约229个或更少的氨基酸。示例性间隔区包括CD8a铰链、单独的IgG4铰链、连接至CH2和CH3结构域的IgG4铰链,或连接至CH3结构域的IgG4铰链。示例性间隔区包括但不限于Hudecek等人(2013) Clin. Cancer Res., 19:3153或国际专利申请公布第W02014031687号中描述的间隔区。在一些实施方案中,CAR铰链包括CD8a铰链。在一些实施方案中,CD8a铰链包含SEQ ID NO:26所示的序列。

[0273] 在细胞内信号传导结构域中,有通过天然抗原受体模拟或近似信号、通过这种受体与共刺激受体的组合模拟或近似信号和/或通过单独的共刺激受体模拟或近似信号的那些。在一些实施方案中,存在短的寡肽或多肽接头,例如长度为2与10个氨基酸之间的接头,诸如含有甘氨酸和丝氨酸的接头,例如甘氨酸-丝氨酸双联体,并且所述接头在受体的跨膜结构域与细胞质信号传导结构域之间形成连接。

[0274] CAR细胞内结构域

[0275] 在一些实施方案中,在连结CAR后,受体的细胞质结构域或细胞内信号传导结构域激活免疫细胞(例如,经工程化以表达受体的T细胞)的至少一种正常效应功能或应答。例如,在一些情形下,受体诱导T细胞的功能,诸如细胞溶解活性或T辅助细胞活性,诸如分泌细胞因子或其他因子。在一些实施方案中,例如,如果抗原受体组分或共刺激分子的细胞内信号传导结构域的截短部分转导效应功能信号,则使用其替代完整的免疫刺激链。在一些实施方案中,一个或多个细胞内信号传导结构域包括T细胞受体(TCR)的细胞质序列,并且在一些方面还包括在自然环境中与所述受体协同作用以在抗原受体接合后起始信号转导的共受体的细胞质序列,和/或此类分子的任何衍生物或变体,和/或具有相同功能能力的任何合成序列。

[0276] 在一些方面,受体包括调控TCR复合物的初级激活的初级细胞质信号传导序列。以刺激方式起作用的初级细胞质信号传导序列可含有信号传导基序,该基序称为基于免疫受体酪氨酸的激活基序或ITAM。含有初级细胞质信号传导序列的ITAM的实例包括源自TCR或

CD3 ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CDS、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的那些。在一些实施方案中,CAR中的细胞质信号传导分子含有细胞质信号传导结构域、其部分或源自CD3 ζ 的序列。

[0277] 在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含人CD3 ζ 刺激性信号传导结构域或其功能性变体,诸如人CD3 ζ (登录号:P20963.2)的同种型3的112AA细胞质结构域或如美国专利第7,446,190号或美国专利第8,911,993号中描述的CD3 ζ 信号传导结构域。

[0278] 受体,例如CAR,可以包括至少一种细胞内信号传导组分。在一些实施方案中,受体包括TCR复合物的细胞内组分,诸如介导T细胞激活和细胞毒性的TCR CD3链,例如CD3 ζ 链。因此,在一些方面,细胞外结构域连接至一个或多个细胞信号传导模块。在一些实施方案中,细胞信号传导模块包括CD3跨膜结构域、CD3细胞内信号传导结构域和/或其他CD跨膜结构域。在一些实施方案中,受体,例如CAR,还包括一种或多种另外分子(诸如Fc受体 γ 、CD8、CD4、CD25或CD16)的一部分。例如,在一些方面,CAR包括在CD3 ζ 或Fc受体 γ 与CD8、CD4、CD25或CD16之间的嵌合分子。在一些实施方案中,CAR包含CD3 ζ 激活结构域,所述CD3 ζ 激活结构域包含SEQ ID NO:29所示的序列。

[0279] 在一些实施方案中,细胞内结构域包含41BB或其功能性变体或部分的细胞内共刺激信号传导结构域,诸如人4-1BB(登录号Q07011.1)或其功能性变体或部分的42个氨基酸的细胞质结构域。

[0280] 在一些实施方案中,受体在细胞质部分包含一个或多个,例如两个或更多个共刺激结构域和激活结构域,例如初级激活结构域。示例性受体包括CD3 ζ 、CD28和4-1BB的细胞内组分。在一些实施方案中,嵌合抗原受体含有T细胞共刺激分子的细胞内结构域。在一些方面,T细胞共刺激分子是4-1BB。

[0281] 在一些实施方案中,受体包括共刺激受体(诸如CD28、4-1BB、OX40、DAP10和ICOS)的信号传导结构域和/或跨膜部分。在一些方面,同一受体包括激活性组分和共刺激组分两者。

[0282] 在某些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含连接至CD3(例如,CD3 ζ)细胞内结构域的CD8a跨膜和信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含连接至CD3 ζ 细胞内结构域的4-1BB(CD137, TNFRSF9)共刺激结构域。在一些实施方案中,CAR包含4-1BB共刺激结构域。在一些实施方案中,4-1BB共刺激结构域包含SEQ ID NO:28所示的序列。

[0283] 在一些实施方案中,CAR包含如SEQ ID NO:30、31或32所示的序列。在一些实施方案中,CAR包含如SEQ ID NO:31所示的序列。

[0284] 在一些实施方案中,CAR或其他抗原受体还包括标志物,诸如细胞表面标志物,其可用于确认细胞的转导或工程化以表达受体,诸如细胞表面受体的截短型式,诸如截短的EGFR(tEGFR)。在一些方面,标志物包括CD34、神经生长因子受体(NGFR)或表皮生长因子受体(例如,tEGFR)的全部或部分(例如,截短形式)。在一些实施方案中,编码标志物的核酸可操作地连接至编码接头序列(诸如可裂解的接头序列或核糖体跳跃序列例如T2A)的多核苷酸。参见W02014031687。在一些实施方案中,引入编码由T2A核糖体开关分隔开的CAR和EGFRt的构建体可以表达来自同一构建体的两种蛋白质,使得EGFRt可以用作检测表达这种构建体的细胞的标志物。在一些实施方案中,标志物和任选的接头序列可以是如公布的专

利公布第W02014031687号中所公开的任何标志物和接头序列。例如,标志物可以是截短的EGFR(tEGFR),其任选地连接至接头序列,诸如T2A核糖体跳跃序列。

[0285] 在一些实施方案中,标志物是分子,例如细胞表面蛋白,非天然存在于T细胞上或非天然存在于T细胞表面上,或其部分。

[0286] 在一些实施方案中,分子是非自身分子,例如非自身蛋白质,即不被细胞将过继转移到其中的宿主的免疫系统识别为“自身”的分子。

[0287] 在一些实施方案中,标志物不提供治疗功能和/或不产生别的作用,除了用作基因工程化的标志物,例如,用于选择成功工程化的细胞。在其他实施方案中,标志物可以是治疗性分子或以其他方式发挥某些所需作用的分子,诸如在体内遇到的细胞的配体,诸如增强和/或阻抑细胞在过继转移和遇到配体后的应答的共刺激或免疫检查点分子。

[0288] CAR可包含一个或修饰的合成氨基酸来代替一个或多个天然存在的氨基酸。示例性的修饰的氨基酸包括但不限于氨基环己烷羧酸、正亮氨酸、 α -氨基正癸酸、高丝氨酸、S-乙酰氨基甲基半胱氨酸、反式-3-羟脯氨酸和反式-4-羟脯氨酸、4-氨基苯丙氨酸、4-硝基苯丙氨酸、4-氯苯丙氨酸、4-羧基苯丙氨酸、(3-苯基丝氨酸(3-羟基苯丙氨酸、苯基甘氨酸、 α -萘基丙氨酸、环己基丙氨酸、环己基甘氨酸、二氢吡啶-2-羧酸、1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸、氨基丙二酸、氨基丙二酸单酰胺、N'-苄基-N'-甲基-赖氨酸、N',N'-二苄基-赖氨酸、6-羟赖氨酸、鸟氨酸、 α -氨基环戊烷羧酸、 α -氨基环己烷羧酸、 α -氨基环庚烷羧酸、 α -(2-氨基-2-降冰片烷)-羧酸、 α , γ -二氨基丁酸、 α , γ -二氨基丙酸、高苯丙氨酸和 α -叔丁基甘氨酸。

[0289] 例如,在一些实施方案中,CAR包括抗体或其片段,包括本文所述的单链抗体(sdAb,例如仅含有VH区)、VH结构域和scFv;间隔区,诸如CD8a铰链;CD8a跨膜结构域;4-1BB细胞内信号传导结构域;和CD3 ζ 信号传导结构域。在一些实施方案中,CAR包括抗体或片段,包括本文所述的sdAb和scFv;间隔区,诸如CD8a铰链;CD8a跨膜结构域;4-1BB细胞内信号传导结构域;和CD3 ζ 信号传导结构域。

[0290] 可以使用例如位点特异性技术将表达启动受体和CAR系统的转基因引入细胞(诸如T细胞)中。通过转基因(例如启动受体和CAR)的位点特异性整合,转基因可以靶向安全性港基因座或TRAC。用于整合到安全港基因座中的位点特异性技术的实例包括但不限于使用核酸酶的同源依赖性工程化和使用Cas9的同源非依赖性靶向插入。

[0291] 工程化细胞可应用于免疫肿瘤学。例如,可以选择启动受体和CAR来靶向不同的特定肿瘤抗原。可以使用此类细胞有效靶向的癌症的实例是血癌或实体癌。在一些实施方案中,免疫细胞疗法可用于治疗实体瘤。

[0292] 合成途径激活因子

[0293] 在各个方面,本文公开的系统采用一种或多种“合成途径激活因子”(SPA)。表达CAR的免疫细胞可能会受到输注后体内扩增的必要性的限制。为了实现强劲的扩增,T细胞需要三个信号:抗原刺激、共刺激和细胞因子诱导的刺激。CAR的激活足以诱导前两个信号,但不能重现细胞因子信号传导。此外,肿瘤微环境通常是免疫阻遏的并且缺乏促炎细胞因子。SPA因此可用于刺激表达如本文所述的启动受体和/或CAR的T细胞的强劲体内扩增并增强其期望特性(例如,增加的存活率、持久性和效力)。

[0294] SPA结构

[0295] 在各种实施方案中,SPA模拟白细胞介素信号传导的激活。白细胞介素受体是通过

信号转导子和转录激活因子 (STAT) 转录因子 (例如, STAT3和STAT5) 传导信号的细胞因子受体。白细胞介素受体通常通过响应配体结合而二聚化从而发挥作用。一旦二聚化, 受体就可以结合 janus 相关激酶 (JAK), 诱导 JAK 交叉磷酸化和下游“JAK/STAT”信号传导。因此, 诱导的受体激动或受体的配体非依赖性二聚化可用于诱导组成型受体活性, 并因此诱导组成型细胞因子信号传导。

[0296] 在各种实施方案中, SPA 包括白细胞介素受体或其功能片段。在一些实施方案中, SPA 包括或源自白细胞介素受体细胞内信号传导结构域或其功能片段。在一些实施方案中, SPA 包括或源自白细胞介素 6 信号转导子 (IL6ST) 多肽或其功能片段。在一些实施方案中, SPA 包括或源自白细胞介素 7 受体 (IL-7R) 多肽或其功能片段。在一些实施方案中, SPA 包括或源自白细胞介素 15 (IL-15) 多肽或其功能片段。

[0297] 在各种实施方案中, 可以进行一种或多种结构改变以赋予 SPA 或其功能片段组成型活性。在一些实施方案中, 可以添加结构或突变以诱导 SPA 多聚化。在一些实施方案中, 一个或多个氨基酸可以突变为半胱氨酸以允许 (例如) 在两个受体单体之间形成一个或多个二硫键。在一些实施方案中, 一个或多个氨基酸可以插入野生型受体多肽中以例如通过形成一个或多个二硫键促进二聚化。

[0298] 在一些实施方案中, 外源多肽可操作地连接至细胞因子受体或其功能片段以引起它们的多聚化。在一些实施方案中, 亮氨酸拉链多肽可操作地连接至细胞因子受体或其功能片段。在一些实施方案中, 亮氨酸拉链多肽是 c-Jun 亮氨酸拉链。在一些实施方案中, 外源支架可操作地连接至细胞因子受体或其功能片段。在一些实施方案中, 外源支架是 CD34 胞外结构域。

[0299] 在一些实施方案中, SPA 可以包含允许 SPA 组成型激活的配体激动剂 (例如, 细胞因子, 例如白细胞介素)。在一些实施方案中, 细胞因子受体和可溶性激动剂同时表达。在一些实施方案中, 细胞因子受体和膜结合激动剂同时表达。

[0300] 在各种实施方案中, SPA 锚定至细胞膜。在一些实施方案中, SPA 包含细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中, SPA 包括白细胞介素受体的跨膜结构域。

[0301] 示例性 SPA

[0302] 在一些实施方案中, SPA 包括亮氨酸拉链-gp130 (本文可互换地称为“L-gp130”或“gp130”) 或 L-gp130 细胞内信号传导结构域。L-gp130 包含同源二聚体, 每个单体包含 (a) 细胞外结构域, 其包含与另一个单体形成二硫键的插入的半胱氨酸残基和 c-Jun 亮氨酸拉链; 和 (b) IL6ST 跨膜结构域和细胞内信号传导结构域。每个多肽上的半胱氨酸残基和亮氨酸拉链可以诱导模拟组成型 IL-6R 激活的稳定同源二聚体的形成。有关 L-gp130 构建的其他细节描述于 Stuhlmann-Laeisz 等人 Mol Biol Cell. 2006 年 7 月; 17 (7): 2986-95 和 W02020200325 中, 所述文献据此以引用的方式整体并入。

[0303] 在一些实施方案中, L-gp130 细胞内信号传导结构域包含与 SEQ ID NO: 74 所示的序列至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 同一的氨基酸序列。在一些实施方案中, L-gp130 细胞内信号传导结构域包含 SEQ ID NO: 74 所示的氨基酸序列。在一些实施方案中, L-gp130 包含

与SEQ ID NO:75所示的序列至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的氨基酸序列。在一些实施方案中,L-gp130包含SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列。

[0304] 在一些实施方案中,L-gp130细胞内信号传导结构域由与SEQ ID NO:79所示的序列至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的核酸序列编码。在一些实施方案中,L-gp130细胞内信号传导结构域由SEQ ID NO:79所示的核酸序列编码。在一些实施方案中,L-gp130由与SEQ ID NO:80所示的序列至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的核酸序列编码。在一些实施方案中,L-gp130由SEQ ID NO:80所示的核酸序列编码。

[0305] 在一些实施方案中,亮氨酸拉链结构域包含如Seq ID NO:179所示的序列。在一些实施方案中,亮氨酸拉链结构域包含与SEQ ID NO:179所示的序列至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的氨基酸序列。

[0306] 在一些实施方案中,L-gp130跨膜结构域包含gp130跨膜结构域。在一些实施方案中,L-gp130跨膜结构域包含如Seq ID NO:180所示的序列。在一些实施方案中,L-gp130跨膜结构域包含与SEQ ID NO:180所示的序列至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的氨基酸序列。

[0307] 在一些实施方案中,SPA包括膜结合的白细胞介素15(mbIL-15)。mbIL-15包含连接至IL15受体 α (IL15R α)的IL-15多肽,从而允许组成型受体激活。另参见例如美国专利第9,629,877号,其据此以引用的方式整体并入。

[0308] 在一些实施方案中,mbIL-15包含与SEQ ID NO:76所示的序列至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的氨基酸序列。在一些实施方案中,mbIL-15包含SEQ ID NO:76所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,mbIL-15由与SEQ ID NO:81所示的序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的核酸序列编码。在一些实施方案中,mbIL-15由SEQ ID NO:81所示的核酸序列编码。

[0309] 在一些实施方案中,SPA包括CD34-白细胞介素7受体(C7R)。C7R包含同源二聚体,每个单体包含(a)包含CD34胞外结构域的细胞外结构域,(b)包含与另一个单体形成二硫键的插入的半胱氨酸残基的跨膜结构域,和(c)IL-7R细胞内信号传导结构域。CD34胞外结构域和每个多肽上的插入的半胱氨酸残基允许形成模拟组成型IL-7R激活的稳定同源二聚体。有关C7R构建的其他细节描述于Shum等人Cancer Discov.2017年11月;7(11):1238-

1247和美国公布第20190183939号中,所述文献据此以引用的方式整体并入。

[0310] 在一些实施方案中,C7R细胞内信号传导结构域包含与SEQ ID NO:77所示的序列至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的氨基酸序列。在一些实施方案中,C7R细胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:77所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,C7R包含与SEQ ID NO:78所示的序列至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的氨基酸序列。在一些实施方案中,C7R包含SEQ ID NO:78所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,C7R细胞外结构域和跨膜结构域包含与SEQ ID NO:181所示的序列至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的氨基酸序列。在一些实施方案中,C7R细胞外结构域和跨膜结构域包含SEQ ID NO:181所示的氨基酸序列。

[0311] 在一些实施方案中,C7R细胞内信号传导结构域由与SEQ ID NO:82所示的序列至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的核酸序列编码。在一些实施方案中,C7R细胞内信号传导结构域由SEQ ID NO:82所示的核酸序列编码。在一些实施方案中,C7R由与SEQ ID NO:83所示的序列至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的核酸序列编码。在一些实施方案中,C7R由SEQ ID NO:83所示的核酸序列编码。

[0312] 细胞因子

[0313] 在各种实施方案中,本文公开的系统采用一种或多种细胞因子。表达CAR的免疫细胞可能会受到输注后体内扩增的必要性的限制。为了实现强劲的扩增,T细胞需要三个信号:抗原刺激、共刺激和细胞因子诱导的刺激。CAR的激活足以诱导前两个信号,但不能重现细胞因子信号传导。此外,肿瘤微环境通常是免疫阻遏的并且缺乏促炎细胞因子。细胞因子因此可用于刺激表达如本文所述的启动受体和/或CAR的T细胞的强劲体内扩增并增强其期望特性(例如,增加的存活率、持久性和效力)。

[0314] 在各种实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子可以是白细胞介素(IL)细胞因子家族的成员。白细胞介素激活通过信号转导子和转录激活因子(STAT)转录因子(例如,STAT1、STAT3和STAT5)传导信号的受体。一旦激活,白细胞介素受体可以二聚化并且结合janus相关激酶(JAK),诱导JAK交叉磷酸化和下游“JAK/STAT”信号传导。因此,诱导的细胞因子表达可用于诱导受体活性并因此诱导细胞因子信号传导。

[0315] 在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子在表达后被分泌到细胞外环境中。在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子是膜结合的。膜结合的(“mb”)细胞因子可包含非天然多肽,其在表达后将细胞因子系连至细胞膜。膜结合的细胞

因子可以改善细胞因子信号传导的激活,例如,通过增加细胞因子与其受体的接近度。

[0316] 示例性细胞因子

[0317] 赋予表达CAR的免疫细胞有利效应的任何细胞因子都可以用于本文公开的系统。在各种实施方案中,本文公开的系统中所采用的细胞因子可以促进记忆T细胞持久性和/或增殖(例如,IL-7、IL-15和IL-23)。在各种实施方案中,本文公开的系统中所采用的细胞因子可以促进效应细胞功能(例如,IL-2和IL-12)。在各种实施方案中,本文公开的系统中所采用的细胞因子可以减少免疫细胞耗竭(例如,IL-21和IL-23)。在各种实施方案中,本文公开的系统中所采用的细胞因子可以促进内源免疫的激活(例如,IL-18)。在各种实施方案中,本文公开的系统中所采用的细胞因子可以减少炎症应答(例如,IL-10和TGF- β)。在各种实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子选自IL-2、Super-2、IL-7、IL-21、IL-12、IL-12/23p40、IL-15、IL-18、IL-10和TGF- β 。

[0318] 在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子是IL-2。在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子包含与SEQ ID NO:86所示的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码本文公开的系统中所使用的细胞因子的核酸包含与SEQ ID NO:87所示的核酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的核酸序列。

[0319] 在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子是IL-7。在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子包含与SEQ ID NO:88所示的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码本文公开的系统中所使用的细胞因子的核酸包含与SEQ ID NO:89所示的核酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的核酸序列。

[0320] 在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子是IL-21。在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子包含与SEQ ID NO:90所示的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码本文公开的系统中所使用的细胞因子的核酸包含与SEQ ID NO:91所示的核酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的核酸序列。

[0321] 在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子是IL-12。在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子包含与SEQ ID NO:92所示的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码本文公开的系统中所使用的细胞因子的核酸包含与SEQ ID NO:93所示的核酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的核酸序列。

[0322] 在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子是IL-12/23p40。在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子包含与SEQ ID NO:94所示的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码本文公开的系统中所使用的细胞因子的核酸包含与SEQ ID NO:95所示的核酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的核酸序列。

[0323] 在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子是IL-15。在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子包含与SEQ ID NO:96所示的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码本文公开的系统中所使用的细胞因子的核酸包含与SEQ ID NO:97所示的核酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的核酸序列。

[0324] 在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子是IL-18。在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子包含与SEQ ID NO:98所示的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码本文公开的系统中所使用的细胞因子的核酸包含与SEQ ID NO:99所示的核酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的核酸序列。

[0325] 在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子是Super-2。有关Super-2的进一步细节在美国专利第10,150,802号中给出,所述专利据此以引用的方式整体并入。在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子包含与SEQ ID NO:132所示的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码本文公开的系统中所使用的细胞因子的核酸包含与SEQ ID NO:133所示的核酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的核酸序列。

[0326] 在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子是IL-10。在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子包含与SEQ ID NO:134所示的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码本文公开的系统中所使用的细胞因子的核酸包含与SEQ ID NO:135所示的核酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的核酸序列。

[0327] 在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子是TGF- β 。在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子包含与SEQ ID NO:136所示的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少

99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码本文公开的系统中所使用的细胞因子的核酸包含与SEQ ID NO:137所示的核酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的核酸序列。

[0328] 在一些实施方案中,一种或超过一种细胞因子在本文公开的系统中表达。在一些实施方案中,两种或更多种细胞因子在本文公开的系统中表达。在一些实施方案中,三种或更多种细胞因子在本文公开的系统中表达。在一些实施方案中,四种或更多种细胞因子在本文公开的系统中表达。在一些实施方案中,五种或更多种细胞因子在本文公开的系统中表达。在一些实施方案中,六种或更多种细胞因子在本文公开的系统中表达。在一些实施方案中,七种或更多种细胞因子在本文公开的系统中表达。

[0329] 信号肽

[0330] 在各种实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子可操作地连接至非天然信号肽。不同的信号肽可以导致表达蛋白(例如,细胞因子)的不同分泌水平。有关信号肽及其对蛋白质分泌的影响的进一步细节可见于Lumangtad LA,Bell TW.The signal peptide as a new target for drug design.Bioorg Med Chem Lett.2020年5月15日;30(10):127115,其据此以引用的方式整体并入。因此,选择特定的信号肽可以允许根据所需的下游信号传导水平变阻器调整(rheostat tuning)细胞因子分泌。例如,对于以低效率表达的细胞因子,可以选择产生高效分泌的信号肽来改善细胞因子信号传导的总体激活。在另一个实例中,对于高水平时有毒的细胞因子,可以选择产生降低的分泌效率的信号肽来降低细胞因子的毒性作用。

[0331] 在一些实施方案中,非天然信号肽包括来自以下至少一者的信号肽:CD44、CD3E、CD5、IGTAL、IL-2、GMCSF、胰凝乳蛋白酶原、胰蛋白酶原、IgK、IgKVIII、IgE、OSM、IgG2H、BM40、secrecon和tPA。

[0332] 在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子连接至CD44信号肽。在一些实施方案中,非天然信号肽包含与SEQ ID NO:100所示的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码非天然信号肽的核酸包含与SEQ ID NO:101所示的核酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的核酸序列。

[0333] 在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子连接至CD3E信号肽。在一些实施方案中,非天然信号肽包含与SEQ ID NO:102所示的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码非天然信号肽的核酸包含与SEQ ID NO:103所示的核酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的核酸序列。

[0334] 在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子连接至CD5信号肽。在一些实施方案中,非天然信号肽包含与SEQ ID NO:104所示的氨基酸序列具有至少75%、至少

80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码非天然信号肽的核酸包含与SEQ ID NO:105所示的核酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的核酸序列。

[0335] 在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子连接至IGTAL信号肽。在一些实施方案中,非天然信号肽包含与SEQ ID NO:106所示的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码非天然信号肽的核酸包含与SEQ ID NO:107所示的核酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的核酸序列。

[0336] 在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子连接至IL-2信号肽。在一些实施方案中,非天然信号肽包含与SEQ ID NO:108所示的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码非天然信号肽的核酸包含与SEQ ID NO:109所示的核酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的核酸序列。

[0337] 在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子连接至GMCSF信号肽。在一些实施方案中,非天然信号肽包含与SEQ ID NO:110所示的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码非天然信号肽的核酸包含与SEQ ID NO:111所示的核酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的核酸序列。

[0338] 在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子连接至胰凝乳蛋白酶原信号肽。在一些实施方案中,非天然信号肽包含与SEQ ID NO:112所示的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码非天然信号肽的核酸包含与SEQ ID NO:113所示的核酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的核酸序列。

[0339] 在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子连接至胰蛋白酶原信号肽。在一些实施方案中,非天然信号肽包含与SEQ ID NO:114所示的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码非天然信号肽的核酸包含与SEQ ID NO:115所示的核酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或

100%同一性的核酸序列。

[0340] 在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子连接至IgK信号肽。在一些实施方案中,非天然信号肽包含与SEQ ID NO:116所示的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码非天然信号肽的核酸包含与SEQ ID NO:117所示的核酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的核酸序列。

[0341] 在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子连接至IgKVIII信号肽。在一些实施方案中,非天然信号肽包含与SEQ ID NO:118所示的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码非天然信号肽的核酸包含与SEQ ID NO:119所示的核酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的核酸序列。

[0342] 在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子连接至IgE信号肽。在一些实施方案中,非天然信号肽包含与SEQ ID NO:120所示的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码非天然信号肽的核酸包含与SEQ ID NO:121所示的核酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的核酸序列。

[0343] 在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子连接至OSM信号肽。在一些实施方案中,非天然信号肽包含与SEQ ID NO:122所示的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码非天然信号肽的核酸包含与SEQ ID NO:123所示的核酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的核酸序列。

[0344] 在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子连接至IgG2H信号肽。在一些实施方案中,非天然信号肽包含与SEQ ID NO:124所示的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码非天然信号肽的核酸包含与SEQ ID NO:125所示的核酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的核酸序列。

[0345] 在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子连接至BM40信号肽。在一些实施方案中,非天然信号肽包含与SEQ ID NO:126所示的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少

99.5%、至少99.9%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码非天然信号肽的核酸包含与SEQ ID NO:127所示的核酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的核酸序列。

[0346] 在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子连接至Secrecon信号肽。在一些实施方案中,非天然信号肽包含与SEQ ID NO:128所示的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码非天然信号肽的核酸包含与SEQ ID NO:129所示的核酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的核酸序列。

[0347] 在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的细胞因子连接至tPA信号肽。在一些实施方案中,非天然信号肽包含与SEQ ID NO:130所示的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码非天然信号肽的核酸包含与SEQ ID NO:131所示的核酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或100%同一性的核酸序列。

[0348] 基因表达阻遏因子

[0349] 在各种实施方案中,一种或多种基因表达阻遏因子可以用于本文所述的系统中以对表达逻辑门的T细胞产生期望的作用。基因表达阻遏因子可用于例如阻遏对T细胞特性(诸如扩增或靶细胞杀伤)具有抑制作用的基因的活性。基因表达阻遏因子可以通过本领域中已知的任何机制发挥作用。基因表达阻遏因子可以通过例如基因组序列的敲除、基因转录的阻遏或蛋白质翻译的阻遏(“敲低”)来发挥作用。基因表达阻遏因子的实例包括但不限于sgRNA、shRNA、siRNA、TALEN和锌指核酸酶(ZFN)。

[0350] 在一些实施方案中,本文公开的系统中所使用的基因表达阻遏因子是sgRNA或shRNA。在一些实施方案中,基因表达阻遏因子是sgRNA。在一些实施方案中,sgRNA阻遏选自以下的基因的表达:PTPN2、RASA2、SOCS1、ZC3H12A和CISH。在一些实施方案中,sgRNA阻遏PTPN2的表达。在一些实施方案中,sgRNA阻遏RASA2的表达。在一些实施方案中,sgRNA阻遏SOCS1的表达。在一些实施方案中,sgRNA阻遏ZC3H12A的表达。在一些实施方案中,sgRNA阻遏CISH的表达。

[0351] 在一些实施方案中,sgRNA包含SEQ ID NO:160-164中任一者所示的核酸序列。在一些实施方案中,sgRNA包含SEQ ID NO:160所示的核酸序列。在一些实施方案中,sgRNA包含SEQ ID NO:161所示的核酸序列。在一些实施方案中,sgRNA包含SEQ ID NO:162所示的核酸序列。在一些实施方案中,sgRNA包含SEQ ID NO:163所示的核酸序列。在一些实施方案中,sgRNA包含SEQ ID NO:164所示的核酸序列。

[0352] 在一些实施方案中,基因表达阻遏因子是shRNA。在一些实施方案中,shRNA阻遏选自以下的基因的表达:RASA2、PTPN2、SOCS 1、ZC3H12A、CISH、TNFRSF6 (Fas)、TGFB1和TGFB2。在一些实施方案中,shRNA阻遏RASA2的表达。在一些实施方案中,shRNA阻遏PTPN2

的表达。在一些实施方案中,shRNA阻遏SOCS1的表达。在一些实施方案中,shRNA阻遏ZC3H12A的表达。在一些实施方案中,shRNA阻遏CISH的表达。在一些实施方案中,shRNA阻遏TNFRSF6 (Fas) 的表达。在一些实施方案中,shRNA阻遏TGFB1的表达。在一些实施方案中,shRNA阻遏TGFB1的表达。在一些实施方案中,shRNA包含SEQ ID NO:165-172中任一者所示的核酸序列。在一些实施方案中,shRNA包含SEQ ID NO:165所示的核酸序列。在一些实施方案中,shRNA包含SEQ ID NO:166所示的核酸序列。在一些实施方案中,shRNA包含SEQ ID NO:167所示的核酸序列。在一些实施方案中,shRNA包含SEQ ID NO:168所示的核酸序列。在一些实施方案中,shRNA包含SEQ ID NO:169所示的核酸序列。在一些实施方案中,shRNA包含SEQ ID NO:170所示的核酸序列。在一些实施方案中,shRNA包含SEQ ID NO:171所示的核酸序列。在一些实施方案中,shRNA包含SEQ ID NO:172所示的核酸序列。

[0353] 示例性组合

[0354] 基因表达阻遏因子与SPA和/或细胞因子的组合可用于本文所述的系统中以支持表达逻辑门的T细胞的激活。在一些实施方案中,SPA是L-gp130并且细胞因子是IL-2。在一些实施方案中,SPA是L-gp130并且细胞因子是mbIL-15。在一些实施方案中,SPA是C7R并且细胞因子是IL-2。在一些实施方案中,SPA是C7R并且细胞因子是mbIL-15。在一些实施方案中,系统包含阻遏CISH表达的sgRNA以及为IL-2的细胞因子。在一些实施方案中,系统包含阻遏PTPN2表达的sgRNA以及为IL-2的细胞因子。在一些实施方案中,系统包含阻遏RASA2表达的sgRNA以及为IL-2的细胞因子。在一些实施方案中,系统包含阻遏SOCS1表达的sgRNA以及为IL-2的细胞因子。在一些实施方案中,系统包含阻遏ZC3H12A表达的sgRNA以及为IL-2的细胞因子。在一些实施方案中,系统包含阻遏PTPN2表达的sgRNA以及为IL-21的细胞因子。在一些实施方案中,系统包含阻遏ZC3H12A表达的sgRNA以及为IL-21的细胞因子。在一些实施方案中,系统包含阻遏RASA2表达的sgRNA以及为IL-15的细胞因子。在一些实施方案中,系统包含阻遏RASA2表达的shRNA以及为IL-2的细胞因子。在一些实施方案中,系统包含阻遏RASA2表达的shRNA以及为IL-15的细胞因子。在一些实施方案中,系统包含阻遏CISH表达的sgRNA以及为C7R的SPA。在一些实施方案中,系统包含阻遏PTPN2表达的sgRNA以及为C7R的SPA。在一些实施方案中,系统包含阻遏RASA2表达的sgRNA以及为C7R的SPA。在一些实施方案中,系统包含阻遏SOCS1表达的sgRNA以及为C7R的SPA。在一些实施方案中,系统包含阻遏ZC3H12A表达的sgRNA以及为C7R的SPA。在一些实施方案中,系统包含阻遏CISH表达的sgRNA以及为L-gp130的SPA。在一些实施方案中,系统包含阻遏RASA2表达的sgRNA以及为L-gp130的SPA。在一些实施方案中,系统包含阻遏ZC3H12A表达的sgRNA以及为L-gp130的SPA。

[0355] 在一些实施方案中,系统包含阻遏TNFRSF6 (Fas) 表达的shRNA和另外的基因表达阻遏因子。在一些实施方案中,系统包含阻遏TNFRSF6 (Fas) 表达的shRNA、阻遏TGFB2表达的shRNA和另外的基因表达阻遏因子。在一些实施方案中,系统包含阻遏TNFRSF6 (Fas) 表达的shRNA、阻遏PTPN2表达的shRNA和另外的基因表达阻遏因子。

[0356] 重组核酸和载体

[0357] 在一些实施方案中,本公开考虑了包含编码如本文所述的启动受体、CAR、细胞因子或SPA的一个或多个转基因的重组核酸插入物。在一些实施方案中,核酸是重组核酸。在一些实施方案中,插入物编码启动受体转基因。在一些实施方案中,插入物编码嵌合抗原受体转基因。在一些实施方案中,插入物包含启动受体转基因和嵌合抗原受体转基因。在一些

实施方案中,插入物包含启动受体转基因和细胞因子转基因。在一些实施方案中,插入物包含细胞因子转基因和嵌合抗原受体转基因。在一些实施方案中,插入物包含启动受体转基因、细胞因子转基因和嵌合抗原受体转基因。在一些实施方案中,插入物包含启动受体转基因和SPA转基因。在一些实施方案中,插入物包含SPA转基因和嵌合抗原受体转基因。在一些实施方案中,插入物包含启动受体转基因、SPA转基因和嵌合抗原受体转基因。在一些实施方案中,插入物包含SPA、细胞因子转基因和嵌合抗原受体转基因。在一些实施方案中,插入物包含SPA、启动受体转基因、细胞因子转基因和嵌合抗原受体转基因。

[0358] 插入物还可以包含自裂解肽。自裂解肽的实例包括但不限于自裂解病毒2A肽,例如猪捷申病毒1 (P2A) 肽、明脉扁刺蛾病毒 (T2A) 肽、马鼻炎A病毒 (E2A) 肽或口蹄疫病毒 (F2A) 肽。自裂解2A肽允许从单个构建体表达多个基因产物。(参见,例如,Chang等人“Cleavage efficient 2A peptides for high level monoclonal antibody expression in CHO cells,”MAbs 7(2):403-412(2015))。

[0359] 插入物还可以包含WPPE元件。WPPE元件总体上描述于Higashimoto,T.等人,Gene Ther 14,1298-1304(2007);以及Zufferey,R.等人,J Virol.1999年4月;73(4):2886-92.,两者据此以引用的方式并入。

[0360] 重组细胞

[0361] 本文还提供了重组免疫细胞,所述重组免疫细胞包含至少一个以非病毒方式插入细胞的基因组的靶区中的DNA模板,其中DNA模板编码如本文所述的启动受体和CAR系统,任选地还编码细胞因子,任选地还编码SPA,任选地还编码基因表达阻遏分子。本文还提供了重组免疫细胞,所述重组免疫细胞包含特异性地结合胎盘/生殖细胞碱性磷酸酶 (ALPG/P) 的启动受体、特异性地结合MSLN的嵌合抗原受体以及细胞因子,和/或激活细胞因子信号传导的合成途径激活因子。本文还提供了工程化免疫细胞,所述工程化免疫细胞包含特异性地结合胎盘/生殖细胞碱性磷酸酶 (ALPG/P) 的启动受体、特异性地结合MSLN的嵌合抗原受体,以及细胞因子。细胞还可包含基因表达阻遏因子,诸如用于基于CRISPR的靶基因敲除的RNAi分子(例如,shRNA)或sgRNA。

[0362] 如本公开所述的在靶基因座或安全港位点处包含DNA模板插入物的细胞可称为工程化细胞。在一些实施方案中,免疫细胞是可以产生多能免疫细胞的任何细胞。在一些实施方案中,免疫细胞是原代免疫细胞。在一些实施方案中,免疫细胞可以是诱导型多能干细胞(iPSC)或人多能干细胞(HSPC)。在一些实施方案中,免疫细胞包括原代造血细胞或原代造血干细胞。在一些实施方案中,工程化细胞是干细胞、人细胞、原代细胞、造血细胞、适应性免疫细胞、先天免疫细胞、自然杀伤(NK)细胞、T细胞、CD8⁺细胞、CD4⁺细胞或T细胞祖细胞。在一些实施方案中,免疫细胞是T细胞。在一些实施方案中,T细胞是调节性T细胞、效应T细胞或幼稚T细胞。在一些实施方案中,T细胞是CD8⁺T细胞。在一些实施方案中,T细胞是CD4⁺T细胞。在一些实施方案中,T细胞是CD4⁺CD8⁺T细胞。

[0363] 在一些实施方案中,工程化细胞是干细胞、人细胞、原代细胞、造血细胞、造血干细胞、适应性免疫细胞、先天免疫细胞、T细胞或T细胞祖细胞。本公开中设想的免疫细胞的非限制性实例包括T细胞、B细胞、自然杀伤(NK)细胞、NKT/iNKT细胞、巨噬细胞、骨髓细胞和树突细胞。本公开中设想的干细胞的非限制性实例包括多能干细胞(PSC)、胚胎干细胞(ESC)、诱导型多能干细胞(iPSC)、通过核移植获得的胚胎来源的胚胎干细胞(ntES;核移植ES)、雄

性生殖系干细胞(GS细胞)、胚胎生殖细胞(EG细胞)、造血干细胞/祖细胞干细胞(HSPC)、体干细胞(成体干细胞)、成血管细胞、神经干细胞、间充质干细胞和其他细胞(包括骨细胞、软骨细胞、肌细胞、心肌细胞、神经元、肌腱细胞、脂肪细胞、胰腺细胞、肝细胞、肾细胞、滤泡细胞等)的干细胞。在一些实施方案中,工程化细胞是T细胞、NK细胞、iPSC和HSPC。在一些实施方案中,本公开中使用的工程化细胞是体外生长的人细胞系(例如,故意永生化的细胞系、癌细胞系等)。

[0364] 本文还提供了包含多个免疫细胞的细胞群体。在一些实施方案中,细胞的至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或更多的基因组包含如本文所述的启动受体和CAR系统以及任选的细胞因子、SPA和/或基因阻遏因子。

[0365] 治疗癌症的方法

[0366] 在另一方面,本发明提供了治疗个体的免疫相关疾患(例如,癌症)的方法,所述方法包括向个体施用有效量的包含系统的组合物,所述系统包含包含特异性地结合至ALPG/P的启动受体、特异性地结合至MSLN的嵌合抗原受体,以及任选的细胞因子和/或激活细胞因子信号传导的合成途径激活因子。系统还可包含基因表达阻遏因子,诸如用于基于CRISPR的靶基因敲除的RNAi分子(例如,shRNA)或sgRNA。在另一方面,本发明提供了增强个体的免疫应答的方法,所述方法包括向个体施用有效量的包含系统的组合物,所述系统包含特异性地结合至ALPG/P的启动受体、特异性地结合至MSLN的嵌合抗原受体,以及细胞因子和/或激活细胞因子信号传导的合成途径激活因子。

[0367] 在一些实施方案中,本文提供的方法可用于治疗个体的免疫相关病症。在一个实施方案中,个体是人。

[0368] 在一些实施方案中,本文提供的方法(诸如增强免疫应答的方法)可用于治疗癌症,因此接受本文所述的系统的个体患有癌症。在一些实施方案中,癌症是实体癌。在一些实施方案中,癌症是液体癌症。在一些实施方案中,癌症是免疫逃避性的。在一些实施方案中,癌症是免疫应答性的。在特定实施方案中,癌症是卵巢癌、输卵管癌、原发性腹膜癌、子宫癌、间皮瘤、宫颈癌或胰腺癌。在特定实施方案中,癌症是卵巢癌。

[0369] 在一些实施方案中,治疗导致癌症体积或大小的减小。在一些实施方案中,与施用抗体之前的癌症体积相比,治疗有效减小癌症体积。在一些实施方案中,治疗导致癌症生长速率降低。在一些实施方案中,与施用抗体之前的癌症生长速率相比,治疗有效降低癌症生长速率。在一些实施方案中,治疗有效消除癌症。

[0370] 在一些实施方案中,与非癌细胞相比,MSLN和ALPG或ALPP在癌症中以更高水平表达。MSLN、ALPG和ALPP的水平可以通过本领域中已知的任何技术来评估,所述技术包括但不限于蛋白质测定或核酸测定,诸如FACS、蛋白质印迹、ELISA、免疫沉淀、免疫组织化学、免疫荧光、放射免疫测定、斑点印迹、免疫检测方法、HPLC、表面等离子体共振、光谱法、质谱法、HPLC、qPCR、RT-qPCR、多重qPCR或RT-qPCR、RNA-seq、微阵列分析、SAGE、MassARRAY技术和FISH以及它们的组合。

[0371] 调节自身免疫性疾病的方法

[0372] 在另一方面,本文提供了治疗个体的免疫相关疾患(例如,移植物抗宿主)的方法,所述方法包括向个体施用有效量的包含系统的组合物,所述系统包含启动受体、嵌合抗原受体和细胞因子。在另一方面,本文提供了阻遏个体的免疫应答的方法,所述方法包括向个

体施用有效量的包含系统的组合物,所述系统包含启动受体、嵌合抗原受体和细胞因子。细胞因子可以是阻遏性细胞因子,诸如IL-10。

[0373] 在一些实施方案中,本文提供的方法可用于治疗个体的免疫相关病症。在一个实施方案中,个体是人。

[0374] 在一些实施方案中,本文提供的方法(诸如阻遏免疫应答的方法)可用于治疗自身免疫性疾病。在一些实施方案中,自身免疫性疾病是移植物抗宿主病。在一些实施方案中,自身免疫性疾病是移植排斥。在一些实施方案中,自身免疫性疾病是类风湿性关节炎。在一些实施方案中,自身免疫性疾病是炎症性肠病。在一些实施方案中,自身免疫性疾病是I型糖尿病。

[0375] 免疫调节方法

[0376] 施用包含如本文所述的系统的细胞的方法可导致免疫应答的调节,所述系统包含特异性地结合至ALPG/P的启动受体、特异性地结合至MSLN的嵌合抗原受体,以及细胞因子和/或激活细胞因子信号传导的合成途径激活因子。调节可以是免疫应答的增加或减少。在一些实施方案中,调节是免疫应答的增加。

[0377] 在一方面,施用包含如本文所述的系统的细胞可导致促炎分子(诸如细胞因子或趋化因子)的诱导,所述系统包含特异性地结合至ALPG/P的启动受体、特异性地结合至MSLN的嵌合抗原受体,以及细胞因子和/或激活细胞因子信号传导的合成途径激活因子。一般来说,诱导的促炎分子的存在水平高于同种型对照所达到的水平。此类促炎分子进而导致抗肿瘤免疫的激活,包括但不限于T细胞激活、T细胞增殖、T细胞分化、M1样巨噬细胞激活和NK细胞激活。因此,施用包含特异性地结合至ALPG/P的启动受体、特异性地结合至MSLN的嵌合抗原受体以及细胞因子和/或激活细胞因子信号传导的合成途径激活因子的系统可诱导导致肿瘤破坏的多种抗肿瘤免疫机制。

[0378] 在另一方面,本文提供了增加个体的免疫应答的方法,所述方法包括向个体施用有效量的包含系统的细胞,所述系统包含特异性地结合至ALPG/P的启动受体、特异性地结合至MSLN的嵌合抗原受体,以及细胞因子和/或激活细胞因子信号传导的合成途径激活因子。在一些实施方案中,增加受试者的免疫应答的方法包括向受试者施用包含系统的细胞,所述系统包含特异性地结合至ALPG/P的启动受体、特异性地结合至MSLN的嵌合抗原受体,以及细胞因子和/或激活细胞因子信号传导的合成途径激活因子。

[0379] 在一些实施方案中,细胞存在于还包含药学上可接受的赋形剂的药物组合物中。

[0380] 在如本文所述的增加免疫应答的任何和所有方面,特征或功能方面的任何增加或减少或改变是相较于不包含含有特异性地结合至ALPG/P的启动受体、特异性地结合至MSLN的嵌合抗原受体以及细胞因子和/或激活细胞因子信号传导的合成途径激活因子的系统的组合物的细胞而言的。

[0381] 增加免疫应答可以是增强免疫应答或诱导免疫应答。例如,增加免疫应答包括免疫应答的开始或起始,或者提高或放大正在进行的或现有的免疫应答。在一些实施方案中,治疗诱导免疫应答。在一些实施方案中,诱导的免疫应答是适应性免疫应答。在一些实施方案中,诱导的免疫应答是先天免疫应答。在一些实施方案中,治疗增强免疫应答。在一些实施方案中,增强的免疫应答是适应性免疫应答。在一些实施方案中,增强的免疫应答是先天免疫应答。在一些实施方案中,治疗增加免疫应答。在一些实施方案中,增加的免疫应答是

适应性免疫应答。在一些实施方案中,增加的免疫应答是先天免疫应答。在一些实施方案中,通过施用包含系统的细胞来开始或起始免疫应答,所述系统包含特异性地结合至ALPG/P的启动受体、特异性地结合至MSLN的嵌合抗原受体,以及细胞因子和/或激活细胞因子信号传导的合成途径激活因子。在一些实施方案中,通过施用包含系统的细胞来增强免疫应答,所述系统包含特异性地结合至ALPG/P的启动受体、特异性地结合至MSLN的嵌合抗原受体,以及细胞因子和/或激活细胞因子信号传导的合成途径激活因子。

[0382] 在另一方面,本申请提供了用包含特异性地结合至ALPG/P的启动受体、特异性地结合至MSLN的嵌合抗原受体以及细胞因子和/或激活细胞因子信号传导的合成途径激活因子的系统对细胞进行基因编辑的方法,从而调节细胞的免疫功能。所述调节可以增加免疫应答。在一些实施方案中,调节是免疫功能的增加。在一些实施方案中,功能的调节导致MSLN CAR的表达。在一些实施方案中,功能的调节导致包含该系统的细胞的激活。

[0383] 在一些实施方案中,所述细胞是自然杀伤(NK)细胞、T细胞、CD8+T细胞、CD4+T细胞、原代T细胞或T细胞祖细胞。

[0384] 在一些实施方案中,对包含如本文所述的启动受体和CAR系统的细胞的功能的调节导致细胞刺激天然和活化T细胞的能力增加,方式是例如增加表达启动受体和CAR系统的细胞的细胞因子或趋化因子分泌。在一些实施方案中,功能的调节增强或增加细胞产生细胞因子、趋化因子、CAR或共刺激或激活受体的能力。在一些实施方案中,所述调节增加表达启动受体和CAR系统的细胞的T细胞刺激功能,包括例如细胞触发T细胞受体(TCR)信号传导、T细胞增殖或T细胞细胞因子产生的能力。

[0385] 在一些实施方案中,增加的免疫应答是细胞因子和趋化因子的分泌。在一些实施方案中,与同种型对照细胞相比,启动受体和CAR系统诱导细胞中至少一种细胞因子或趋化因子的表达增加。在一些实施方案中,所述至少一种细胞因子或趋化因子选自以下组成的组:IL-2和IFN γ 。在一些实施方案中,细胞因子或趋化因子是IL-2。在一些实施方案中,细胞因子或趋化因子是IFN γ 。在一些实施方案中,与未处理的细胞或用同种型对照抗体处理的细胞相比,细胞因子或趋化因子分泌增加约1-100倍,1倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、1-10倍、10-20倍、20-30倍、30-40倍、40-50倍、50-60倍、60-70倍、70-80倍、80-90倍或90-100倍。在一些实施方案中,趋化因子是IL-2,并且与未处理的细胞或用同种型对照抗体处理的细胞相比,分泌增加约1-100倍,1倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、1-10倍、10-20倍、20-30倍、30-40倍、40-50倍、50-60倍、60-70倍、70-80倍、80-90倍或90-100倍。在一些实施方案中,细胞因子是IFN γ ,并且与未处理的细胞或用同种型对照抗体处理的细胞相比,分泌增加约1-100倍,1倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、1-10倍、10-20倍、20-30倍、30-40倍、40-50倍、50-60倍、60-70倍、70-80倍、80-90倍或90-100倍。

[0386] 在一些实施方案中,增加的免疫应答是抗肿瘤免疫细胞募集和激活。

[0387] 在一些实施方案中,与同种型对照细胞相比,表达启动受体和CAR系统的细胞诱导记忆免疫应答。一般来说,记忆免疫应答是免疫系统在随后暴露于先前遇到的病原体或抗原后产生的保护性免疫应答。示例性记忆免疫应答包括感染或用抗原接种疫苗后的免疫应答。一般来说,记忆免疫应答是由诸如T细胞或B细胞等淋巴细胞介导的。在一些实施方案中,记忆免疫应答是针对癌症的保护性免疫应答,包括癌细胞生长、增殖或转移。在一些实

施方案中,记忆免疫应答抑制、预防或减少癌细胞生长、增殖或转移。

[0388] 编辑细胞的方法

[0389] 如本文所用,术语“基因编辑”或“基因组编辑”是指使用人工操纵的核酸酶或“分子剪刀”从基因组中插入、置换或移除DNA的一种基因操纵。它是阐明序列特异性基因或蛋白质的功能和作用或改变细胞行为(例如用于治疗目的)的有用工具。

[0390] 目前可用的基因组编辑工具包括锌指核酸酶(ZFN)和转录激活因子样效应核酸酶(TALEN),以在安全港基因座(例如腺相关病毒整合位点1(AAVS1)安全港基因座)处插入基因。利用phiC31整合酶和Bxb1整合酶的DICE(双整合酶盒交换)系统是一种用于靶标整合的工具。另外,成簇规律间隔的短回文重复序列/Cas9(CRISPR/Cas9)技术可用于靶向基因插入。

[0391] 位点特异性基因编辑方法可以包括同源依赖性机制或同源非依赖性机制。

[0392] 在本文所述的方法中设想本领域已知的用于靶向插入基因序列的所有方法以在基因靶标或安全港基因座处插入构建体。

[0393] 本文提供了在不存在病毒载体的情况下将长度大于约5千碱基的核苷酸序列插入细胞基因组中的方法。在一些实施方案中,在不存在病毒载体的情况下,可以将长度大于约5千碱基的核苷酸序列插入原代免疫细胞的基因组中。

[0394] 将大核酸(例如,大小为大于5千碱基的核酸)整合到细胞中可能受到低整合效率、脱靶效应和/或细胞活力损失的限制。本文描述了用于实现将核苷酸序列(例如,大小为大于约5千碱基的核苷酸序列)整合到细胞的基因组中的方法和组合物。在一些方法中,整合效率增加,脱靶效应减少并且/或者细胞活力损失减少。

[0395] 利用核酸酶,诸如CRISPR相关系统(Cas)可以将质粒引入免疫细胞中。核酸酶可以按核糖核蛋白形式与靶向免疫细胞基因组上的特定定位点的指导RNA(gRNA)一起引入。核酸酶在该特定定位点处切割基因组DNA。该特定定位点可以是编码内源免疫细胞受体的基因组的一部分。因此,在该位点切割基因组将导致免疫细胞不再表达内源免疫细胞受体。

[0396] 质粒可包括与免疫细胞基因组上的特定定位点处的序列互补的5'和3'同源定向修复臂。互补序列位于被核酸酶切割的位点的两侧,这使得质粒可以并入免疫细胞基因组上的特定插入位点处。一旦并入质粒,细胞将表达启动受体。然而,正如所解释的,转基因盒的设计确保以病毒方式递送的回路系统受体在启动受体与其同源配体结合并释放可裂解的转录因子之前不表达CAR。

[0397] 最初,激活T细胞。T细胞可获自患者。因此,本公开提供了从患者收获免疫细胞诸如T细胞的方法。然后将编码CAR和启动受体的质粒引入T细胞中。有利地,可以使用电穿孔引入本公开的质粒。当通过电穿孔引入质粒时,也可以引入核酸酶。通过使用电穿孔,本公开的方法避免了使用病毒载体来引入转基因,这是免疫细胞工程化中的一个已知瓶颈。然后将T细胞扩增并共同培养,以产生足够数量的工程化免疫细胞,用作治疗性治疗。

[0398] 用于编辑细胞的基因组的方法可以包括:a)提供Cas9核糖核蛋白复合物(RNP)-DNA模板复合物,所述RNP-DNA模板复合物包含:(i)RNP,其中所述RNP包含Cas9核酸酶结构域和指导RNA,其中所述指导RNA与细胞的基因组的靶区特异性地杂交,并且其中所述Cas9核酸酶结构域使靶区裂解以在细胞的基因组中产生插入位点;和(ii)双链或单链DNA模板,其中所述DNA模板的大小为大于约200个核苷酸,其中所述DNA模板的5'端和3'端包含与插

入位点侧翼的基因组序列同源的核苷酸序列,并且其中所述复合物中RNP与DNA模板的摩尔比为约3:1至约100:1;以及b)将所述RNP-DNA模板复合物引入细胞中。

[0399] 在一些实施方案中,本文所述的方法提供至少约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%、99.5%、99%或更高的RNP-DNA模板复合物递送效率。在一些情况下,效率是相对于将RNP-DNA模板引入细胞中后存活的细胞来确定的。在一些情况下,效率是相对于将RNP-DNA模板引入细胞中的细胞(活细胞或非活细胞)的总数确定的。

[0400] 作为另一实例,可以通过定量细胞群体中经基因组编辑的细胞的数量来确定递送效率(与引入步骤后获得的总细胞数或总活细胞数相比较)。可以利用各种定量基因组编辑的方法。这些方法包括但不限于使用错配特异性核酸酶,诸如T7核酸内切酶I;对一个或多个靶基因座的测序(例如,通过对克隆的靶基因座扩增片段的桑格测序);以及高通量深度测序。

[0401] 在一些实施方案中,与将裸DNA引入细胞中或使用病毒载体将DNA引入细胞中后的细胞活力损失相比,细胞活力的损失减少。减少可以是减少至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或这些百分比之间的任何百分比。在一些实施方案中,与将裸DNA引入细胞中或使用病毒载体将DNA引入细胞中后的脱靶整合相比,脱靶整合效应减少。减少可以是减少至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或这些百分比之间的任何百分比。

[0402] 在一些情况下,本文所述的方法提供了已引入RNP-DNA模板的细胞的高细胞活力。在一些情况下,已引入RNP-DNA模板的细胞的活力为至少约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%、99.5%、99%或更高。在一些情况下,已引入RNP-DNA模板的细胞的活力为约20%至约99%、约30%至约90%、约35%至约85%或90%或更高、约40%至约85%或90%或更高、约50%至约85%或90%或更高、约50%至约85%或90%或更高、约60%至约85%或90%或更高,或约70%至约85%或90%或更高。

[0403] 在本文提供的方法中,RNP与DNA模板的摩尔比可为约3:1至约100:1。例如,摩尔比可为约5:1至10:1、约5:1至约15:1、5:1至约20:1、5:1至约25:1;约8:1至约12:1、约8:1至约15:1、约8:1至约20:1,或约8:1至约25:1。

[0404] 在一些实施方案中,DNA模板的浓度为约2.5pM至约25pM。例如,DNA模板的浓度可为约2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15、15.5、16、16.5、17、17.5、18、18.5、19、19.5、20、20.5、21、21.5、22、22.5、23、23.5、24、24.5、25pM或这些浓度之间的任何浓度。

[0405] 在一些实施方案中,DNA模板的大小或长度为大于约4.5kb、5.0kb、5.1kb、5.2kb、5.3kb、5.4kb、5.5kb、5.6kb、5.7kb、5.8kb、5.9kb、6.0kb、6.1kb、6.2kb、6.3kb、6.4kb、6.5kb、6.6kb、6.7kb、6.8kb、6.9kb、7.0kb、7.1kb、7.2kb、7.3kb、7.4kb、7.5kb、7.6kb、7.7kb、7.8kb、7.9kb、8.0kb、8.1kb、8.2kb、8.3kb、8.4kb、8.5kb、8.6kb、8.7kb、8.8kb、8.9kb、9.0kb、9.1kb、9.2kb、9.3kb、9.4kb、9.5kb、9.6kb、9.7kb、9.8kb、9.9kb或10kb或介于这些大小之间的任何DNA模板大小。例如,DNA模板的大小可为约4.5kb至约10kb、约5kb至约10kb、约5kb至约9kb、约5kb至约8kb、约5kb至约7kb、约5kb至约6kb、约kb 6至约10kb、约6kb

至约9kb、约6kb至约8kb、约6kb至约7kb、约7kb至约10kb、约7kb至约9kb、约7kb至约8kb、约8kb至约10kb、约8kb至约9kb,或约9kb至约10kb。

[0406] 在一些实施方案中,DNA模板的量约为约1 μ g至约10 μ g。例如,DNA模板的量可为约1 μ g至约2 μ g、约1 μ g至约3 μ g、约1 μ g至约4 μ g、约1 μ g至约5 μ g、约1 μ g至约6 μ g、约1 μ g至约7 μ g、约1 μ g至约8 μ g、约1 μ g至约9 μ g、约1 μ g至约10 μ g。在一些实施方案中,DNA模板的量约为约2 μ g至约3 μ g、约2 μ g至约4 μ g、约2 μ g至约5 μ g、约2 μ g至约6 μ g、约2 μ g至约7 μ g、约2 μ g至约8 μ g、约2 μ g至约9 μ g,或2 μ g至约10 μ g。在一些实施方案中,DNA模板的量约为约3 μ g至约4 μ g、约3 μ g至约5 μ g、约3 μ g至约6 μ g、约3 μ g至约7 μ g、约3 μ g至约8 μ g、约3 μ g至约9 μ g,或约3 μ g至约10 μ g。在一些实施方案中,DNA模板的量约为约4 μ g至约5 μ g、约4 μ g至约6 μ g、约4 μ g至约7 μ g、约4 μ g至约8 μ g、约4 μ g至约9 μ g,或约4 μ g至约10 μ g。在一些实施方案中,DNA模板的量约为约5 μ g至约6 μ g、约5 μ g至约7 μ g、约5 μ g至约8 μ g、约5 μ g至约9 μ g,或约5 μ g至约10 μ g。在一些实施方案中,DNA模板的量约为约6 μ g至约7 μ g、约6 μ g至约8 μ g、约6 μ g至约9 μ g,或约6 μ g至约10 μ g。在一些实施方案中,DNA模板的量约为约7 μ g至约8 μ g、约7 μ g至约9 μ g,或约7 μ g至约10 μ g。在一些实施方案中,DNA模板的量约为约8 μ g至约9 μ g,或约8 μ g至约10 μ g。在一些实施方案中,DNA模板的量约为约9 μ g至约10 μ g。

[0407] 在一些情况下,DNA模板的大小和数量足够大,足以作为裸DNA致死。在一些实施方案中,DNA模板编码异源蛋白质或其片段。在一些实施方案中,DNA模板编码至少一个基因。在一些实施方案中,DNA模板编码至少两个基因。在一些实施方案中,DNA模板编码一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个基因。

[0408] 在一些实施方案中,DNA模板包括调控序列,例如启动子序列和/或增强子序列,以在插入细胞基因组中后调控异源蛋白质或其片段的表达。

[0409] 在一些情况下,DNA模板是线状DNA模板。在一些情况下,DNA模板是单链DNA模板。在一些情况下,单链DNA模板是纯单链DNA模板。如本文所用,“纯单链DNA”是指实质上缺乏另一条或相反DNA链的单链DNA。“实质上缺乏”是指纯单链DNA中的一条链比另一条DNA链缺乏至少100倍。

[0410] 在一些情况下,RNP-DNA模板复合物是通过将RNP与DNA模板在约20°C至约25°C的温度下孵育少于约一分钟至约三十分钟而形成的。例如,可以将RNP与DNA模板在约20°C、21°C、22°C、23°C、24°C或25°C的温度下孵育约5秒、10秒、15秒、20秒、25秒、30秒、35秒、40秒、45秒、50秒、55秒、1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、11分钟、12分钟、13分钟、14分钟、15分钟、16分钟、17分钟、18分钟、19分钟、20分钟、21分钟、22分钟、23分钟、24分钟、25分钟、26分钟、27分钟、28分钟、29分钟或30分钟或这些时间之间的任何时间量。在另一实例中,可以将RNP与DNA模板在约20°C至约25°C的温度下孵育少于约一分钟至约一分钟、少于约一分钟至约5分钟、少于约1分钟至约10分钟、约5分钟至10分钟、约5分钟至15分钟、约10至约15分钟、约10分钟至约20分钟,或约10分钟至约30分钟。在一些实施方案中,在将RNP-DNA模板复合物引入细胞中之前将RNP-DNA模板复合物和细胞混合。

[0411] 在一些实施方案中,引入RNP-DNA模板复合物包括电穿孔。用于电穿孔细胞以引入RNP-DNA模板复合物的方法、组合物和装置可包括本文实施例中描述的那些。用于电穿孔细胞以引入RNP-DNA模板复合物的另外的或替代的方法、组合物和装置可包括WO/2006/001614或Kim,J.A.等人Biosens.Bioelectron.23,1353-1360(2008)中描述的那些。用于电

穿孔细胞以引入RNP-DNA模板复合物的另外的或替代的方法、组合物和装置可包括美国专利申请公布第2006/0094095号;第2005/0064596号;或第2006/0087522号中描述的那些。用于电穿孔细胞以引入RNP-DNA模板复合物的另外的或替代的方法、组合物和装置可包括Li, L.H.等人Cancer Res.Treat.1,341-350(2002);美国专利第6,773,669号;第7,186,559号;第7,771,984号;第7,991,559号;第6485961号;第7029916号;以及美国专利申请公布第2014/0017213号;和第2012/0088842号中描述的那些,所有这些参考文献据此以引用的方式并入。用于电穿孔细胞以引入RNP-DNA模板复合物的另外的或替代的方法、组合物和装置可包括Geng,T.等人J.Control Release 144,91-100(2010);以及Wang,J.等人Lab.Chip 10,2057-2061(2010)中描述的那些,所有这些参考文献据此以引用的方式并入。

[0412] 在一些实施方案中,Cas9蛋白可以呈活性核酸内切酶形式,使得当作为与指导RNA的复合物的一部分或作为与DNA模板的复合物的一部分与靶核酸结合时,将双链断裂引入靶核酸中。双链断裂可以通过NHEJ修复以引入随机突变,或通过HDR修复以引入特定突变。在本文所述的方法中可以利用多种Cas9核酸酶。例如,可以利用Cas9核酸酶,该酶需要紧邻指导RNA所靶向的区域的3'处的NGG原型间隔区相邻基序(PAM)。此类Cas9核酸酶可以靶向含有NGG序列的基因组的任何区域。作为另一实例,具有正交PAM基序要求的Cas9蛋白可用于靶向没有相邻NGG PAM序列的序列。具有正交PAM序列特异性的示例性Cas9蛋白包括但不限于CFP1;Nature Methods 10,1116-1121(2013)中描述的那些;以及Zetsche等人,Cell,第163卷,第3期,p759-771,2015年10月22日中描述的那些,两者据此以引用的方式并入。

[0413] 在一些情况下,Cas9蛋白是切口酶,使得当作为与指导RNA的复合物的一部分与靶核酸结合时,将单链断裂或切口引入靶核酸中。一对Cas9切口酶(每个切口酶都与结构不同的指导RNA结合)可以靶向靶基因组区域的两个近端位点,从而将一对近端单链断裂引入靶基因组区域中。切口酶对可以提供增强的特异性,因为脱靶效应可能导致单个切口,这些切口一般通过碱基切除修复机制修复而没有损伤。示例性的Cas9切口酶包括具有D10A或H840A突变的Cas9核酸酶。

[0414] 在一些实施方案中,RNP包含Cas9核酸酶。在一些实施方案中,RNP包含Cas9切口酶。在一些实施方案中,RNP-DNA模板复合物包含至少两个结构不同的RNP复合物。在一些实施方案中,所述至少两个结构不同的RNP复合物含有结构不同的Cas9核酸酶结构域。在一些实施方案中,所述至少两个结构不同的RNP复合物含有结构不同的指导RNA。在一些实施方案中,其中所述至少两个结构不同的RNP复合物含有结构不同的指导RNA,每个结构不同的RNP复合物包含Cas9切口酶,并且结构不同的指导RNA与靶区的相反链杂交。

[0415] 在一些情况下,将包含结构不同的核糖核蛋白复合物的多个RNP-DNA模板引入细胞中。例如,Cas9蛋白可以与多个(例如,2个、3个、4个、5个或更多,例如,2-10个、5-100个、20-100个)结构不同的指导RNA复合,以在多个结构不同的靶基因组区域处靶向插入DNA模板。

[0416] 在本文提供的方法和组合物中,细胞包括但不限于真核细胞、原核细胞、动物细胞、植物细胞、真菌细胞等。任选地,细胞是哺乳动物细胞,例如人细胞。细胞可以在体外,离体或在体内。细胞还可以是原代细胞、生殖细胞、干细胞或前体细胞。前体细胞可以是例如多能干细胞或造血干细胞。在一些实施方案中,细胞是原代造血细胞或原代造血干细胞。在一些实施方案中,原代造血细胞是免疫细胞。在一些实施方案中,免疫细胞是T细胞。在一些

实施方案中,T细胞是调节性T细胞、效应T细胞或幼稚T细胞。在一些实施方案中,T细胞是CD4+T细胞。在一些实施方案中,T细胞是CD8+T细胞。在一些实施方案中,T细胞是CD4+CD8+T细胞。在一些实施方案中,T细胞是CD4-CD8-T细胞。还提供了通过本文所述的任何方法修饰的任何细胞的群体。在一些实施方案中,所述方法还包括扩大修饰的细胞的群体。

[0417] 在一些情况下,将细胞从受试者中取出,使用本文所述的任何方法进行修饰并施用至患者。在其他情况下,本文所述的任何构建体递送至患者体内。参见,例如,美国专利第9737604号和Zhang等人“Lipid nanoparticle-mediated efficient delivery of CRISPR/Cas9 for tumor therapy,”NPG Asia Materials第9期,第e441页(2017),两者据此以引用的方式并入。

[0418] 在一些实施方案中,将RNP-DNA模板复合物引入约 1×10^5 至约 2×10^6 个细胞中。例如,可以将RNP-DNA模板复合物引入约 1×10^5 至约 5×10^5 个细胞、约 1×10^5 至约 1×10^6 个细胞、 1×10^5 至约 1.5×10^6 个细胞、 1×10^5 至约 2×10^6 个细胞、约 1×10^6 至约 1.5×10^6 个细胞或约 1×10^6 至约 2×10^6 个细胞中。

[0419] 在一些情况下,本文所述的方法和组合物可用于产生、修饰、使用或控制重组T细胞,诸如嵌合抗原受体T细胞(CAR T细胞)。此类CAR T细胞可用于治疗或预防受试者的癌症、传染病或自身免疫性疾病。例如,在一些实施方案中,将一个或多个基因产物插入或敲入T细胞以表达异源蛋白(例如,嵌合抗原受体(CAR)或启动受体)。

[0420] 插入位点

[0421] 用于编辑T细胞基因组的方法,具体地包括编辑人T细胞基因组的方法,包括将核酸序列或构建体插入人T细胞中的TCR- α 亚基(TRAC)基因的外显子1的靶区中。在一些实施方案中,靶区位于TRAC基因的恒定结构域的外显子1中。在其他实施方案中,靶区位于外显子1、外显子2或外显子3中,在编码TCR- α 跨膜结构域的序列开始之前。

[0422] 用于编辑T细胞基因组的方法还包括编辑人T细胞基因组的方法,包括将核酸序列或构建体插入人T细胞中的TCR- β 亚基(TRBC)基因的外显子1的靶区中。在一些实施方案中,靶区位于TRBC1或TRBC2基因的外显子1中。

[0423] 用于编辑T细胞基因组的方法,具体地包括编辑人T细胞基因组的方法,包括将核酸序列或构建体插入基因组安全港(GSH)的靶区中。

[0424] 基因编辑疗法包括,例如,载体整合和位点特异性整合。位点特异性整合是病毒载体随机整合的一种有前景的替代方法,因为它降低了插入诱变或插入瘤形成的风险(Ko1b等人Trends Biotechnol.200523:399-406;Porteus等人Nat Biotechnol.2005 23:967-973;Paques等人Curr Gen Ther.2007 7:49-66)。然而,位点特异性整合仍然面临着诸如低敲入效率、插入瘤形成风险、相邻基因或转基因的不稳定和/或异常表达、低可及性(例如相邻基因的20kB以内)等挑战。这些挑战可以部分地通过确定和使用安全港基因座或安全港位点(SHS)来解决,这些位点是可以在不破坏相邻基因的表达或调控的情况下整合基因或遗传元件的位点。

[0425] 最广泛使用的推定人安全港位点是染色体19q上的AAVS1位点,该位点最初被确定为用于复发性腺相关病毒插入的位点。已在同源性的基础上鉴定出其他潜在的SHS,这些位点首先是在其他物种(例如,允许的鼠Rosa26基因座的人同系物)或在越来越多的在某些情况下显得非必需的人基因中鉴定出来的。这种类型的一种推定的SHS是CCR5趋化因子受体

基因,该基因当被破坏时赋予对人免疫缺陷病毒感染的抵抗力。在病毒整合位点作图或基因陷阱分析的基础上,已在人和其他细胞类型中鉴定出其他潜在的基因组SHS,就像最初的小鼠Rosa26基因座一样。三个位居前位的SHS、AAVS1、CCR5和Rosa26与许多蛋白质编码基因和调控元件非常接近。(参见Sadelain,M.等人(2012).Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome.Nature reviews Cancer,12(1),51-58,其相关公开内容以引用的方式整体并入本文)。

[0426] 人19号染色体上的AAVS1(也称为PPP1R12C基因座)是一个已知的用于承载具有预期功能的转基因(例如,DNA转基因)的SHS。它处于位置19q13.42处。它具有开放的染色质结构并且具有转录能力。AAVS1的规范SHS基因座是chr19:55,625,241-55,629,351。参见Pellenz等人“New Human Chromosomal Sites with“Safe Harbor”Potential for Targeted Transgene Insertion.”Human gene therapy vol.30,7(2019):814-828,其相关公开内容以引用的方式并入本文。下文提供了示例性AAVS1靶gRNA和靶序列:

[0427] • AAVS1-gRNA序列:ggggccactagggacaggatGTTTTAGAGCTAG AAATAGCAAGTTAAAT AAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAA AGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTT(SEQ ID NO:186)

[0428] • AAVS1靶序列:ggggccactagggacaggat(SEQ ID NO:187)

[0429] CCR5位于3号染色体的位置3p21.31,编码HIV-1的主要共受体。CCR5基因中该位点的破坏有利于HIV/AIDS疗法,并促进了靶向其第三外显子的锌指核酸酶的开发。CCR5的规范SHS基因座是chr3:46,414,443-46,414,942。参见Pellenz等人“New Human Chromosomal Sites with“Safe Harbor”Potential for Targeted Transgene Insertion.”Human gene therapy vol.30,7(2019):814-828,其相关公开内容以引用的方式并入本文。

[0430] 小鼠Rosa26基因座对于基因修饰特别有用,因为它可以被高效靶向并在大多数测试细胞类型中表达。Irion等人2007(“Identification and targeting of the ROSA26 locus in human embryonic stem cells.”Nature biotechnology 25.12(2007):1477-1482,其相关公开内容以引用的方式并入本文)鉴定了3号染色体(位置3p25.3)中的人同系物,人ROSA26。人Rosa26(hRosa26)的规范SHS基因座是chr3:9,415,082-9,414,043。参见Pellenz等人“New Human Chromosomal Sites with“Safe Harbor”Potential for Targeted Transgene Insertion.”Human gene therapy vol.30,7(2019):814-828,其相关公开内容以引用的方式并入本文。

[0431] 安全港位点的另外实例提供于Pellenz等人“New Human Chromosomal Sites with“Safe Harbor”Potential for Targeted Transgene Insertion.”Human gene therapy vol.30,7(2019):814-828,其相关公开内容以引用的方式并入本文。另外的整合位点的实例提供于表D中。

[0432] 在一些实施方案中,安全港位点允许转基因高表达(足以实现转基因功能性或对目标疾病的治疗)和转基因在数天、数周或数月内的稳定表达。在一些实施方案中,安全港基因座处基因的敲除赋予细胞功能益处,或者安全港基因座处的基因在细胞内没有已知功能。在一些实施方案中,安全港基因座使得:在有或没有CD3/CD28刺激的情况下转基因在体外稳定表达,如通过iGuide-Seq或CRISPR-Seq所检测脱靶裂解可忽略不计,如通过iGuide-Seq或CRISPR-Seq所检测相对于其他基因座脱靶裂解减少,转基因非依赖性细胞毒性可忽略不计,转基因非依赖性细胞因子表达可忽略不计,转基因非依赖性嵌合抗原受体表达可

忽略不计,附近基因的失调或沉默可忽略不计,以及定位于癌相关基因之外。

[0433] 如所用,“附近基因”可以指代距离安全港基因座(整合位点)约100kB、约125kB、约150kB、约175kB、约200kB、约225kB、约250kB、约275kB、约300kB、约325kB、约350kB、约375kB、约400kB、约425kB、约450kB、约475kB、约500kB、约525kB、约550kB内的基因。

[0434] 在一些实施方案中,本公开设想包含一个或多个转基因的插入物。转基因可以编码治疗性蛋白、抗体、肽或任何其他目标基因。转基因整合可以导致例如增强的治疗特性。如本文所用,这些增强的治疗特性是指与相同正常细胞类型的典型免疫细胞相比,细胞的增强的治疗特性。例如,与典型的、未修饰的和/或天然存在的T细胞相比,具有“增强的治疗特性”的T细胞具有增强的、改善的和/或增加的治疗结果。免疫细胞的治疗特性可以包括但不限于细胞移植、运输、归巢、活力、自我更新、持久性、免疫应答控制和调控、存活和细胞毒性。免疫细胞的治疗特性还表现为:抗原靶向受体表达;HLA呈递或缺乏;对瘤内微环境的耐受性;旁观者免疫细胞的诱导和免疫调节;减量下靶特异性提高;对治疗诸如化学疗法的抗性。

[0435] 如本文所用,术语“插入物大小”是指整合(插入)到靶基因座或安全港位点处的核苷酸序列的长度。在一些实施方案中,插入物大小包括至少约4.5千碱基对(kb)至约10千碱基对(kb)。在一些实施方案中,插入物大小包括约5000个核苷酸或更多碱基对。在一些实施方案中,插入物大小包括多达4.5、4.8、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20kbp(千碱基对)或介于之间的大小。在一些实施方案中,插入物大小为大于4.5、4.8、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20kbp或介于之间的大小。在一些实施方案中,插入物大小在4.5-15kbp的范围内或者是该范围内的任何数字。在一些实施方案中,插入物大小在4.8-8.3kbp的范围内或者是该范围内的任何数字。在一些实施方案中,插入物大小在5-8.3kbp的范围内或者是该范围内的任何数字。在一些实施方案中,插入物大小在5-15kbp的范围内或者是该范围内的任何数字。在一些实施方案中,插入物大小在4.5-20kbp的范围内或者是该范围内的任何数字。在一些实施方案中,插入物大小为5-10kbp。在一些实施方案中,插入物大小为4.5-10、5-10、6-10、7-10、8-10、9-10kbp。在一些实施方案中,插入物大小为4.5-11、6-11、7-11、8-11、9-11或10-11kbp。在一些实施方案中,插入物大小为4.5-12、6-12、7-12、8-12、9-12、10-12或11-12kbp。在一些实施方案中,插入物大小为4.5-13、6-13、7-13、8-13、9-13、10-13、11-13或12-13kbp。在一些实施方案中,插入物大小为4.5-14、6-14、7-14、8-14、9-14、10-14、11-14、12-14或13-14kbp。在一些实施方案中,插入物大小为4.5-15、6-15、7-15、8-15、9-15、10-15、11-15、12-15、13-15或14-15kbp。在一些实施方案中,插入物大小为4.5-16、6-16、7-16、8-16、9-16、10-16、11-16、12-16、13-16、14-16或15-16kbp。在一些实施方案中,插入物大小为4.5-17、6-17、7-17、8-17、9-17、10-17、11-17、12-17、13-17或14-17、15-17或16-17kbp。在一些实施方案中,插入物大小为4.5-18、6-18、7-18、8-18、9-18、10-18、11-18、12-18、13-18、14-18、15-18、16-18或17-18kbp。在一些实施方案中,插入物大小为4.5-19、6-19、7-19、8-19、9-19、10-19、11-19、12-19、13-19、14-19、15-19、16-19、17-19或18-19kbp。在一些实施方案中,插入物大小为4.5-20、6-20、7-20、8-20、9-20、10-20、11-20、12-20、13-20、14-20、15-20、16-20、17-20、18-20或19-20kbp。

[0436] 本公开的插入物是指插入到靶基因座或安全港位点处的核酸分子或多核苷酸。在一些实施方案中,核苷酸序列是DNA分子例如基因组DNA,或者包含脱氧核糖核苷酸。在一些

实施方案中,插入物包含较小的DNA片段,诸如质体DNA、线粒体DNA,或以质粒、福斯质粒、粘粒、细菌人工染色体(BAC)、酵母人工染色体(YAC)和/或DNA的任何其他亚基因组区段形式分离的DNA。在一些实施方案中,插入物是RNA分子或者包含核糖核苷酸。插入物中的核苷酸被认为是天然存在的核苷酸、非天然存在的核苷酸和修饰的核苷酸。如本领域技术人员将容易理解的,核苷酸可进行化学或生物化学修饰,或者可含有非天然或衍生化的核苷酸碱基。此类修饰包括例如标记、甲基化、用类似物取代一个或多个天然存在的核苷酸、核苷酸间修饰。多核苷酸可以是任何拓扑构象,包括单链构象、双链构象、部分双链构象、三链构象、发夹式构象、环状象和本领域所设想的其他三维构象。

[0437] 插入物可以具有编码和/或非编码区。插入物可以包含非编码序列(例如,控制元件,例如启动子序列)。在一些实施方案中,插入物编码转录因子。在一些实施方案中,插入物编码抗原结合受体,诸如单一受体、T细胞受体(TCR)、启动受体、CAR、mAb等。在一些实施方案中,插入物是人序列。在一些实施方案中,插入物是模拟物。在一些实施方案中,插入物是多基因/多模块治疗性盒。多基因/多模块治疗性盒是指具有一种或超过一种受体(例如,合成受体)、其他外源蛋白编码序列、非编码RNA、转录调控元件和/或隔离子序列(insulator sequence)等的插入物或盒。

[0438] 在一些实施方案中,将核酸序列通过非病毒递送插入T细胞的基因组中。在非病毒递送方法中,核酸可以是裸DNA,或在非病毒质粒或载体中。如本文所述或本领域普通技术人员已知的,非病毒递送技术可以是位点特异性整合技术。用于整合到安全港基因座中的位点特异性技术的实例包括但不限于使用核酸酶的同源依赖性工程化和使用Cas9或其他CRISPR核酸内切酶的同源非依赖性靶向插入。

[0439] 在一些实施方案中,通过向工程化细胞中引入以下各项将插入物整合到安全港位点处:(a)使安全港位点中的靶区裂解而产生插入位点的靶向核酸酶;和(b)核酸序列(插入物),其中插入物通过例如HDR并入插入位点。可用于本公开的方法中的非病毒递送技术的实例提供于美国申请第16/568,116号和第16/622,843号中,其相关公开内容以引用的方式整体并入本文。

[0440] 设想的整合位点的实例提供于表D中。

[0441] 表D:sgRNA序列

[0442]

sgRNA ID	sgRNA 序列	sgRNA 起始坐标 GRCH38	sgRNA 靶基因座	整合位点	中位数(修饰%), 总结自 2 例供体, 2 个引物组
sgRNA_1	GCACCTGAATA CCACGCCTG(SEQ ID NO:188)	chr16:88811818	APRT	APRT	79.28
sgRNA_2	CGCCTGCGATG TAGTCGATG (SEQ ID NO:189)	chr16:88811551	APRT	APRT	78.60
sgRNA_3	CAGGACGGGCG AGATGTCCC (SEQ ID NO:190)	chr16:88811640	APRT	APRT	85.25
sgRNA_4	CTGAATCTTTG GAGTACCTG (SEQ ID NO:191)	chr15:44715425	B2M	B2M	78.51
sgRNA_5	GGCCACGGAGC GAGACATCT (SEQ ID NO:192)	chr15:44711550	B2M	B2M	94.75
sgRNA_6	AAGTCAACTTC AATGTCGGA (SEQ ID NO:193)	chr15:44715515	B2M	B2M	70.97
sgRNA_7	GCTTGAGGCC TGATCAGCG (SEQ ID NO:194)	chr19:36141111	CAPNS1	CAPNS1	89.34
sgRNA_8	CTTATCTCTTCG CAGCGAGG (SEQ ID NO:195)	chr19:36142301	CAPNS1	CAPNS1	91.09
sgRNA_9	CACACATTACT CCAACATTG (SEQ ID NO:196)	chr19:36142676	CAPNS1	CAPNS1	71.98
sgRNA_10	TTCCGCAAAAT AGAGCCCCA(SEQ ID NO:197)	chr3:105746019	CBLB	CBLB	91.55
sgRNA_11	TGCACAGAACT ATCGTACCA (SEQ ID NO:198)	chr3:105751622	CBLB	CBLB	91.43

[0443]

sgRNA _12	GCAATAAGACT CTTTAAAGA (SEQ ID NO:199)	chr3:105853470	CBLB	CBLB	76.18
sgRNA _13	CAAAGAGATTA CGAATGCCT (SEQ ID NO:200)	chr1:116754658	CD2	CD2	89.80
sgRNA _14	CAAGGCACCCC AGGTTTCCA (SEQ ID NO:201)	chr1:116754663	CD2	CD2	92.70
sgRNA _15	TTACGAATGCC TTGGAAACC (SEQ ID NO:202)	chr1:116754666	CD2	CD2	92.82
sgRNA _16	CAGAGACGCAT CTGACCCTC (SEQ ID NO:203)	chr11:118315540	CD3E	CD3E	90.96
sgRNA _17	CATGCAGTTCT CACACACTG (SEQ ID NO:204)	chr11:118313715	CD3E	CD3E	87.47
sgRNA _18	GTGTGAGAACT GCATGGAGA (SEQ ID NO:205)	chr11:118313715	CD3E	CD3E	86.65
sgRNA _19	TCTCATTTCAGG AAACCACT (SEQ ID NO:206)	chr11:118349748	CD3G	CD3G	87.24
sgRNA _20	AGTCATACACC TTAACCAAG (SEQ ID NO:207)	chr11:118349754	CD3G	CD3G	87.99
sgRNA _21	TTCAAGGAAAC CAGTTGAGG (SEQ ID NO:208)	chr11:118352458	CD3G	CD3G	86.55
sgRNA _22	GAGCCTTGCCT GGAAATCTG (SEQ ID NO:209)	chr11:61118177	CD5	CD5	84.03
sgRNA _23	AAGCGTCAAAA GTCTGCCAG (SEQ ID NO:210)	chr11:61118324	CD5	CD5	89.19
sgRNA _24	CGTTCCAATC GAAGTGCCA (SEQ ID NO:211)	chr11:61118121	CD5	CD5	83.11
sgRNA _25	GAGCGACTGGG ACACGGTGA (SEQ ID NO:212)	chr9:136866246	EDF1	EDF1	88.84
sgRNA _26	GCTGCGCAAGA AGGGCCCTA (SEQ ID NO:213)	chr9:136866211	EDF1	EDF1	91.04
sgRNA _27	TTGTTCTGGCC AGCAGCCCC (SEQ ID NO:214)	chr9:136863433	EDF1	EDF1	85.98
sgRNA _28	CTTCCAGAGCC ACATCATCG (SEQ ID NO:215)	chr19:48965791	FTL	FTL	93.10

[0444]

sgRNA _29	GGGACTCACCA GAGAGAGGT (SEQ ID NO:216)	chr19:48965601	FTL	FTL	88.86
sgRNA _30	CGGTCGAAATA GAAGCCCTA (SEQ ID NO:217)	chr19:48965770	FTL	FTL	93.14
sgRNA _31	AAAAGGATATT GTGCAACTG (SEQ ID NO:218)	chr10:87933015	PTEN	PTEN	92.37
sgRNA _32	TGTGCATATTTA TTACATCG (SEQ ID NO:219)	chr10:87933183	PTEN	PTEN	90.64
sgRNA _33	TTTGTGAAGAT CTTGACCAA (SEQ ID NO:220)	chr10:87933087	PTEN	PTEN	85.36
sgRNA _34	TGTCATGCTGA ACCGCATTG (SEQ ID NO:221)	chr18:12830972	PTPN2	PTPN2	87.94
sgRNA _35	CCACTCTATGA GGATAGTCA (SEQ ID NO:222)	chr18:12859219	PTPN2	PTPN2	92.45
sgRNA _36	TTGACATAGAA GAGGCACAA (SEQ ID NO:223)	chr18:12836828	PTPN2	PTPN2	93.96
sgRNA _37	GAGTACTACAC TCAGCAGCA (SEQ ID NO:224)	chr12:6952098	PTPN6	PTPN6	89.61
sgRNA _38	TCACGCACAAG AAACGTCCA (SEQ ID NO:225)	chr12:6954872	PTPN6	PTPN6	82.74
sgRNA _39	AGGTCTCGGTG AAACCACCT (SEQ ID NO:226)	chr12:6951610	PTPN6	PTPN6	91.27
sgRNA _40	AGCATTATCCA AAGAGTCCG (SEQ ID NO:227)	chr1:198696873	PTPRC	PTPRC	88.88
sgRNA _41	ATATTAATTCTT ACCAGTGG (SEQ ID NO:228)	chr1:198692370	PTPRC	PTPRC	88.95
sgRNA _42	AGCTTTAAATC AAGGTTTCAT (SEQ ID NO:229)	chr1:198756176	PTPRC	PTPRC	96.89
sgRNA _43	ATCCCGAGCCC TAAGGTGCA (SEQ ID NO:230)	chr11:67436325	PTPRCAP	PTPRCAP	84.08
sgRNA _44	GGCAGCGCGGA GGACAGCGT(SE Q ID NO:231)	chr11:67436285	PTPRCAP	PTPRCAP	97.74
sgRNA _45	CTCAGGGGGCT ACTACCACC (SEQ ID NO:232)	chr11:67436170	PTPRCAP	PTPRCAP	91.50

[0445]

sgRNA _46	GTCACCGACGA GACCAGAAG (SEQ ID NO:233)	chr5:82277810	RPS23	RPS23	79.40
sgRNA _47	GTCGTGGACTT CGTACTGCT (SEQ ID NO:234)	chr5:82277843	RPS23	RPS23	83.07
sgRNA _48	TAATTTTATAGC AAGTGTCG (SEQ ID NO:235)	chr5:82277860	RPS23	RPS23	61.94
sgRNA _49	TTAGCTGTTAG ACTTGAATA (SEQ ID NO:236)	chr14:51993810	RTRAF	RTRAF	85.50
sgRNA _50	CGAGAGCCGTC AACTTGCGT (SEQ ID NO:237)	chr14:51989652	RTRAF	RTRAF	85.64
sgRNA _51	CGGCTTCAACT GCAAAGGTG (SEQ ID NO:238)	chr14:51989700	RTRAF	RTRAF	88.77
sgRNA _52	TATGAAAAAGC AGAGCGACT(SEQ ID NO:239)	chr15:43793025	SERF2	SERF2	89.61
sgRNA _53	TCTGGCGGGCG AGCTCACGC (SEQ ID NO:240)	chr15:43792989	SERF2	SERF2	86.73
sgRNA _54	CTCACGCTGGT TACCGCCTA (SEQ ID NO:241)	chr15:43792977	SERF2	SERF2	80.57
sgRNA _55	AAAGATTACGA ACTTCCCTG (SEQ ID NO:242)	chr12:46207559	SLC38A1	SLC38A1	92.24
sgRNA _56	GTAAAAACAG ACATGCCTA (SEQ ID NO:243)	chr12:46229232	SLC38A1	SLC38A1	91.51
sgRNA _57	ATGCCTAAGGA GGTTGTACC (SEQ ID NO:244)	chr12:46229246	SLC38A1	SLC38A1	79.48
sgRNA _58	CTCCAGGTATC CCATCGAAA (SEQ ID NO:245)	chr18:47869418	SMAD2	SMAD2	79.53
sgRNA _59	CACCAAATACG ATAGATCAG (SEQ ID NO:246)	chr18:47870532	SMAD2	SMAD2	86.61
sgRNA _60	TGGCGGCGTGA ATGGCAAGA (SEQ ID NO:247)	chr18:47896729	SMAD2	SMAD2	82.91
sgRNA _61	TAGGATGGTAG CACACAACC (SEQ ID NO:248)	chr16:11255478	SOCS1	SOCS1	92.25
sgRNA _62	CAGCAGCAGAG CCCCGACGG (SEQ ID NO:249)	chr16:11255432	SOCS1	SOCS1	83.79

[0446]

sgRNA _63	CGGCGTGCGAA CGGAATGTG (SEQ ID NO:250)	chr16:11255296	SOCS1	SOCS1	84.24
sgRNA _64	TATAGACGCTG CCCGACGTC (SEQ ID NO:251)	chr15:40038895	SRP14	SRP14	95.12
sgRNA _65	TCCAAAGAAGG GTACTGTGG (SEQ ID NO:252)	chr15:40038368	SRP14	SRP14	92.14
sgRNA _66	ACAGTACCCTT CTTTGGAAT (SEQ ID NO:253)	chr15:40038358	SRP14	SRP14	65.82
sgRNA _67	GCGACGGGCGC ATCTACGTG (SEQ ID NO:254)	chr12:120469572	SRSF9	SRSF9	83.68
sgRNA _68	CCCGACCTCCA TAAGTCCTG (SEQ ID NO:255)	chr12:120465700	SRSF9	SRSF9	92.56
sgRNA _69	GGGGTCCTCGA AGCGCACGA (SEQ ID NO:256)	chr12:120469426	SRSF9	SRSF9	89.94
sgRNA _70	TGCTCTGTTTAG AAGATGAC (SEQ ID NO:257)	chr5:32591641	SUB1	SUB1	79.36
sgRNA _71	ATATTCTTTTCT AGTTAAAG(SEQ ID NO:258)	chr5:32591566	SUB1	SUB1	70.93
sgRNA _72	CCTGTAAAGAA ACAAAAGAC (SEQ ID NO:259)	chr5:32591614	SUB1	SUB1	93.66
sgRNA _73	TGGAGAAAGAC GTAACCTCG (SEQ ID NO:260)	chr4:105234315	TET2	TET2	83.53
sgRNA _74	TCTGCCCTGAG GTATGCGAT (SEQ ID NO:261)	chr4:105234747	TET2	TET2	90.97
sgRNA _75	ATTCCGCTTGGT GAAAACGA (SEQ ID NO:262)	chr4:105235656	TET2	TET2	89.62
sgRNA _76	CAGGCACAATA GAAACAACG (SEQ ID NO:263)	chr3:114295571	TIGIT	TIGIT	92.65
sgRNA _77	CCATTTGTAATG CTGACTTG (SEQ ID NO:264)	chr3:114295700	TIGIT	TIGIT	60.75
sgRNA _78	CTGGGTCACCT GTGCCGTGG (SEQ ID NO:265)	chr3:114295634	TIGIT	TIGIT	87.99
sgRNA _79	GTCAGGGTTCT GGATATCTG (SEQ ID NO:266)	chr14:22547508	TRAC	TRAC	98.20

[0447]

sgRNA _80	TGGATTAGAG TCTCTCAGC (SEQ ID NO:267)	chr14:22547541	TRAC	TRAC	88.15
sgRNA _81	CTGCGGCTGTG GTCCAGCTG (SEQ ID NO:268)	chr14:22550661	TRAC	TRAC	94.77
sgRNA _82	ACAAACTGTG CTAGACATG (SEQ ID NO:269)	chr14:22547658	TRAC	TRAC	87.86
sgRNA _83	TTCTTCCCCAG CCCAGGTAA (SEQ ID NO:270)	chr14:22547778	TRAC	TRAC	89.85
sgRNA _84	CGTCATGAGCA GATTAAACC (SEQ ID NO:271)	chr14:22550625	TRAC	TRAC	95.81
sgRNA _85	GAGAGCGCCTG CGACCCGAG (SEQ ID NO:272)	chr19:58544980	TRIM28	TRIM28	89.44
sgRNA _86	CCAGCGGGTGA AGTACACCA (SEQ ID NO:273)	chr19:58544869	TRIM28	TRIM28	94.79
sgRNA _87	GGAGCGCTTTT CGCCGCCAG (SEQ ID NO:274)	chr19:58544839	TRIM28	TRIM28	91.81
sgRNA _88	TGAGGCCTGGA CCTTATGCA (SEQ ID NO:275)	chr10:33134193	chr10:33130 000- 33140000	desert_1 (GS88)	69.44
sgRNA _89	CCTGGTGGAGT GAACCATGA (SEQ ID NO:276)	chr10:33132917	chr10:33130 000- 33140000	desert_1 (GS89)	95.25
sgRNA _90	CAAGCACTTAG GTTCCCCTG (SEQ ID NO:277)	chr10:33134633	chr10:33130 000- 33140000	desert_1 (GS90)	91.13
sgRNA _91	GGTCTCCCTAC AATTCAGCG (SEQ ID NO:278)	chr10:72294568	chr10:72290 000- 72300000	desert_2 (GS91)	92.02
sgRNA _92	CACAGCGCGTG ACTGCAATG (SEQ ID NO:279)	chr10:72298268	chr10:72290 000- 72300000	desert_2 (GS92)	90.22
sgRNA _93	TCTGGGGCACC AATTCTAGG (SEQ ID NO:280)	chr10:72292786	chr10:72290 000- 72300000	desert_2 (GS93)	86.35
sgRNA _94	GAGCCATGCTT GGCTTACGA (SEQ ID NO:281)	chr11:128342576	chr11:12834 0000- 128350000	desert_3 (GS94)	91.24
sgRNA _95	GTACAAGTACT TATCTCATG (SEQ ID NO:282)	chr11:128343592	chr11:12834 0000- 128350000	desert_3 (GS95)	89.02
sgRNA _96	GAGATAACAAC ATAACAACA (SEQ ID NO:283)	chr11:128347170	chr11:12834 0000- 128350000	desert_3 (GS96)	96.47

[0448]

sgRNA _97	CATATTCCATAG TCTTTGGG(SEQ ID NO:284)	chr11:65425000	chr11:65425 000- 65427000 (NEAT1)	desert_4 (GS97)	88.54
sgRNA _98	CTGCCCCTTAG CAACTTAGG (SEQ ID NO:285)	chr11:65425507	chr11:65425 000- 65427000 (NEAT1)	desert_4 (GS98)	92.76
sgRNA _99	TGTTTAAAAATA TGTTGACA (SEQ ID NO:286)	chr11:65426264	chr11:65425 000- 65427000 (NEAT1)	desert_4 (GS99)	90.76
sgRNA _100	CCAGGAATGGA AACTCACGC(SE Q ID NO:287)	chr15:92830315	chr15:92830 000- 92840000	desert_5 (GS100)	87.84
sgRNA _101	GAGGCCGCTGA ATTAACCCG(SE Q ID NO:288)	chr15:92831850	chr15:92830 000- 92840000	desert_5 (GS101)	85.32
sgRNA _102	ATACACGCACA CTTGCAGAA (SEQ ID NO:289)	chr15:92831131	chr15:92830 000- 92840000	desert_5 (GS102)	99.92
sgRNA _103	GAGCAGACAGA AACCCAGGG(SE Q ID NO:290)	chr16:11225670	chr16:11220 000- 11230000	desert_6 (GS103)	87.92
sgRNA _104	TGAGTCTCAA ACAGAACAG(S EQ ID NO:291)	chr16:11226284	chr16:11220 000- 11230000	desert_6 (GS104)	88.53
sgRNA _105	TAATATCACTGA CTTCACGG (SEQ ID NO:292)	chr16:11225029	chr16:11220 000- 11230000	desert_6 (GS105)	87.65
sgRNA _106	TACACACAATG TAAGCAGCA (SEQ ID NO:293)	chr2:87467461	chr2:874600 00- 87470000	desert_7 (GS106)	71.79
sgRNA _107	GGGAGCTCAAT TCGAAACCA (SEQ ID NO:294)	chr2:87468809	chr2:874600 00- 87470000	desert_7 (GS107)	65.89
sgRNA _108	TTGGACAGGTG AGACAGTCG (SEQ ID NO:295)	chr2:87467001	chr2:874600 00- 87470000	desert_7 (GS108)	72.64
sgRNA _109	AAGCTCACTCA GATAGTGTG (SEQ ID NO:296)	chr3:186511316	chr3:186510 000- 186520000	desert_8 (GS109)	76.89
sgRNA _110	CAGGAGAACCA CCTTACACG (SEQ ID NO:297)	chr3:186515260	chr3:186510 000- 186520000	desert_8 (GS110)	86.31
sgRNA _111	GGACAGACCCT GATTCACAA (SEQ ID NO:298)	chr3:186519655	chr3:186510 000- 186520000	desert_8 (GS111)	85.47
sgRNA _112	ACATGGCAGTC TATGAACAG (SEQ ID NO:299)	chr3:59451154	chr3:594500 00- 59460000	desert_9 (GS112)	87.77

[0449]

sgRNA _113	CCTATAGAGAG TACTACTTG (SEQ ID NO:300)	chr3:59456416	chr3:594500 00- 59460000	desert_9 (GS113)	79.33
sgRNA _114	CCAACCGGGTC TTCATTACG (SEQ ID NO:301)	chr3:59457029	chr3:594500 00- 59460000	desert_9 (GS114)	92.21
sgRNA _115	TCAAGCGTAGA GTTCCGAGT (SEQ ID NO:302)	chr8:127993006	chr8:127980 000- 128000000	desert_10 (GS115)	93.07
sgRNA _116	TCATGCAATTAT GGACCCAG (SEQ ID NO:303)	chr8:127994663	chr8:127980 000- 128000000	desert_10 (GS116)	89.40
sgRNA _117	CGGGAAAGTGA CTGGCCATG (SEQ ID NO:304)	chr8:127996766	chr8:127980 000- 128000000	desert_10 (GS117)	87.45
sgRNA _118	TGAGATTGAAA TCAAATCGG (SEQ ID NO:305)	chr9:7974159	chr9:797000 0-7980000	desert_11 (GS118)	84.84
sgRNA _119	TATGCAATATTC ATCACGCG (SEQ ID NO:306)	chr9:7977914	chr9:797000 0-7980000	desert_11 (GS119)	85.44
sgRNA _120	AATGTGTTAAAT CAAATGCA (SEQ ID NO:307)	chr9:7976895	chr9:797000 0-7980000	desert_11 (GS120)	83.48

[0450] CRISPR-Cas编辑

[0451] 基因编辑的一个有效实例是CRISPR-Cas方法(例如CRISPR-Cas9)。该方法结合使用指导多核苷酸(例如指导核糖核酸或gRNA)和Cas核酸内切酶(例如,Cas9核酸内切酶)。

[0452] 如本文所用,称为“Cas核酸内切酶”或具有“Cas核酸内切酶活性”的多肽是指由Cas基因编码的CRISPR相关(Cas)多肽,其中Cas多肽是当可操作地连接至一个或多个指导多核苷酸时可以被裂解的靶DNA序列(参见,例如,美国专利第8,697,359号)。该定义还包括保留指导多核苷酸依赖性核酸内切酶活性的Cas核酸内切酶的变体。在本文详述的供体DNA插入方法中使用的Cas核酸内切酶是将双链断裂引入DNA中的靶位点处(例如,靶基因座内或安全港位点处)的核酸内切酶。

[0453] 如本文所用,术语“指导多核苷酸”涉及能够与Cas核酸内切酶复合并允许Cas核酸内切酶识别并裂解DNA靶位点的多核苷酸序列。指导多核苷酸可以是单分子或双分子。指导多核苷酸序列可以是RNA序列、DNA序列或它们的组合(RNA-DNA组合序列)。仅包含核糖核酸的指导多核苷酸也称为“指导RNA”。在一些实施方案中,使用指导RNA(gRNA)与cas核酸内切酶(例如,Cas9核酸内切酶)的组合将多核苷酸供体构建体插入安全港基因座处。

[0454] 指导多核苷酸包括与靶DNA中的核苷酸序列互补的第一核苷酸序列结构域(也称为可变靶向结构域或VT结构域),以及与Cas核酸内切酶多肽相互作用的第二核苷酸。它可以是包含序列结构域(称为Cas核酸内切酶识别结构域或CER结构域)的双分子(也称为双链指导多核苷酸)。这种双分子指导多核苷酸的CER结构域包含两个沿着互补区杂交的独立分子。两个独立分子可以是RNA序列、DNA序列和/或RNA-DNA组合序列。

[0455] 使用CRISPR-Cas方法的基因组编辑依赖于由RNA指导的Cas核酸内切酶(例如Cas9核酸内切酶)诱导的位点特异性DNA双链断裂(DSB)的修复。对这些DSB的同源定向修复

(HDR)使得能够通过引入限定的基因组变化(包括碱基取代、序列插入和缺失)实现基因组的精确编辑。常规的基于HDR的CRISPR/Cas9基因组编辑涉及用Cas9、gRNA和含有与目标基因组基因座匹配的同源臂的供体DNA转染细胞。

[0456] HITI(同源非依赖性靶向插入)使用基于非同源末端接合(NHEJ)的同源非依赖性策略,并且该方法比HDR更有效。指导RNA(gRNA)靶向插入位点。对于HITI,供体质粒缺乏同源臂,并且DSB修复不会通过HDR途径发生。供体多核苷酸构建体可以经工程化以包括位于待插入基因或序列侧翼的Cas9裂解位点。这导致Cas9在供体质粒和基因组靶序列处裂解。靶标和供体都有平端,线状供体DNA质粒被NHEJ途径所用,导致整合到基因组DSB位点中。(参见,例如,Suzuki,K.等人(2016).In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration.Nature,540(7631),144-149,其相关公开内容整体并入本文)。

[0457] 使用CRISPR-Cas方法进行基因编辑的方法是本领域普通技术人员已知的。(参见,例如,美国申请第US16/312,676号、第US15/303,722号和第US15/628,533号,其公开内容以引用的方式整体并入本文)。另外,核酸内切酶用于将转基因插入安全港基因座中的用途描述于例如美国申请第13/036,343号中,其公开内容以引用的方式整体并入本文。

[0458] 编码核酸内切酶的指导RNA和/或mRNA(或DNA)可以化学连接至一个或多个增强寡核苷酸的活性、细胞分布或细胞摄取的部分或缀合物。此类部分的非限制性实例包括脂质部分(诸如胆固醇部分)、胆酸、硫醚、巯基胆固醇、脂族链(例如,十二烷二醇或十一烷基残基)、磷脂(例如二-十六烷基-外消旋-甘油或三乙基铵1,2-二-0-十六烷基-外消旋-甘油-3-H-磷酸酯)、聚胺或聚乙二醇链、金刚烷乙酸、棕榈基部分和十八胺或己基氨基-羧基-t-羟胆固醇部分。参见例如美国专利公布第20180127786号,其公开内容以引用的方式整体并入本文。

[0459] 治疗应用

[0460] 对于治疗应用,将工程化细胞、其群体或其组合物以有效量施用至受试者,一般是哺乳动物,一般是人。可通过输注(例如,在一段时间内连续输注)或本领域普通技术人员已知的其他施用方式将工程化细胞施用至受试者。

[0461] 本文提供的工程化细胞不仅可用于基因疗法,还可用于非药物用途,诸如例如动物模型的产生以及表达目标蛋白质的重组细胞系的产生。

[0462] 本公开的工程化细胞可以是已通过在本文所述的安全港基因座处整合转基因而经修饰的任何细胞,一般是哺乳动物细胞,一般是人细胞。重组细胞部分提供了示例性细胞。

[0463] 本公开的工程化细胞、组合物和方法可用于治疗应用,诸如CAR T细胞疗法和TCR T细胞疗法。在一些实施方案中,在安全港基因座内插入编码转基因的序列相对于没有插入时的情况保持TCR表达,并在保持TCR功能的同时实现转基因表达。

[0464] 在一些实施方案中,本公开提供了通过向需要治疗的受试者施用包含本文所述的任何工程化细胞的组合物来治疗受试者的方法。在一些实施方案中,工程化细胞组合物的施用导致所需药理和/或生理作用。该作用可以是疾病的部分或完全治愈和/或由疾病引起的副作用。在一些实施方案中,治疗涵盖对受试者(例如,哺乳动物,例如人)疾病的任何治疗。此外,治疗可以稳定或减少受试者(例如,患者)的不良临床症状。本文提供的细胞、其群

体或其组合物可在疾病发生期间或之后施用。

[0465] 在某些实施方案中,受试者患有可以通过细胞疗法治疗和/或改善的疾病、疾患和/或损伤。在一些实施方案中,需要细胞疗法的受试者是具有损伤、疾病或疾患的受试者,从而引起细胞疗法(例如,将细胞物质施用至受试者的疗法)。然而,设想有可能治疗、改善与损伤、疾病或疾患相关的至少一种症状和/或降低其严重性。

[0466] 施用方法

[0467] 可施用有效量的包含所述系统的免疫细胞来治疗癌症。包含所述系统的免疫细胞的适当剂量可基于待治疗的癌症类型、包含该系统的免疫细胞的类型、癌症的严重性和病程、个体的临床状况、个体的临床病史和对治疗的应答以及主治医生的判断来确定。

[0468] 药物组合物

[0469] 本文提供的工程化重组细胞可以作为药物组合物的一部分来施用。除重组细胞中的一者或多者以外,这些组合物还可包含药学上可接受的赋形剂、载体、缓冲剂、稳定剂或为本领域技术人员所熟知的其他物质。所述物质应是无毒的,并且不应干扰活性成分的功效。载体或其他物质的确切性质可取决于施用途径,例如口服、静脉内、经皮肤或皮下、经鼻、肌肉内、腹膜内途径。药物组合物可包含一种或多种药物赋形剂。可使用任何适合药物赋形剂,并且本领域普通技术人员能够选择适合药物赋形剂。因此,以下提供的药物赋形剂旨在说明而非限制。另外的药物赋形剂包括例如描述于以下中的那些:Handbook of Pharmaceutical Excipients,Rowe等人(编)第6版(2009),其以引用的方式整体并入。

[0470] 本文设想了施用另外治疗剂的各种模式。在一些实施方案中,通过任何适合施用模式施用另外的治疗剂。

[0471] 视待治疗的疾患而定,组合物可单独施用,或与其他治疗进行组合,同时或依序加以施用。

[0472] 药盒和制品

[0473] 本申请提供了包含本文所述的任何一种或多种系统或细胞组合物以及使用说明书的药盒。使用说明可以作为包装插页存在于药盒中,存在于药盒容器或其部件的标签中,或者可以呈数字形式(例如,在CD-ROM上,通过互联网上的链接)。药盒可以包括一种或多种基因组靶向核酸、编码基因组靶向核酸的多核苷酸、定点多肽和/或编码定点多肽的多核苷酸。还设想了药盒内的另外组分,例如缓冲液(诸如复原缓冲液、稳定缓冲液、稀释缓冲液)和/或一种或多种对照载体。

[0474] 在一些实施方案中,药盒还包含选自二抗、免疫组织化学分析试剂、药学上可接受的赋形剂和说明书中的任一者以及它们的任意组合的组成部分。在一个特定实施方案中,药盒包括包含本文所述的抗体组合物中的任一者或多者以及一种或多种药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0475] 本申请还提供了包括本文所述的抗体组合物或药盒中的任一者的制品。制品的实例包括小瓶(包括密封小瓶)。

[0476] 另外的实施方案

[0477] 实施方案1一种系统,所述系统包含:

[0478] a. 包含启动受体的第一嵌合多肽;

[0479] b. 包含嵌合抗原受体(CAR)的第二嵌合多肽;和

- [0480] c. 细胞因子。
- [0481] 实施方案2一种系统,所述系统包含:
- [0482] a. 包含启动受体的第一嵌合多肽;
- [0483] b. 包含嵌合抗原受体 (CAR) 的第二嵌合多肽;和
- [0484] c. 包含合成途径激活因子 (SPA) 的第三嵌合多肽。
- [0485] 实施方案3一种系统,所述系统包含:
- [0486] a. 包含启动受体的第一嵌合多肽;
- [0487] b. 包含嵌合抗原受体 (CAR) 的第二嵌合多肽;
- [0488] c. 包含合成途径激活因子 (SPA) 的第三嵌合多肽;和
- [0489] d. 细胞因子。
- [0490] 实施方案4一种系统,所述系统包含:
- [0491] a. 包含启动受体的第一嵌合多肽;
- [0492] b. 包含嵌合抗原受体 (CAR) 的第二嵌合多肽;
- [0493] c. 基因表达阻遏因子,和
- [0494] d. 以下之一或两者:
- [0495] i. 包含合成途径激活因子 (SPA) 的第三嵌合多肽;和/或
- [0496] ii. 细胞因子。
- [0497] 实施方案5如实施方案1-4所述的系统,其中所述启动受体从N末端至C末端包含:
- [0498] a. 第一细胞外抗原结合结构域;
- [0499] b. 包含一个或多个配体诱导型蛋白水解裂解位点的第一跨膜结构域;和
- [0500] c. 包含人或人源化转录效应物的细胞内结构域。
- [0501] 实施方案6如实施方案5所述的系统,其中所述第一细胞外抗原结合结构域特异性地结合至生殖细胞碱性磷酸酶 (ALPG/P)。
- [0502] 实施方案7如实施方案5或6所述的系统,其中所述第一细胞外抗原结合结构域包含可变重 (VH) 链序列和可变轻 (VL) 链序列,所述可变重 (VH) 链序列包含三个重链CDR序列 CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述可变轻 (VL) 链序列包含三个轻链CDR序列 CDR-L1、CDR-L2和 CDR-L3,其中:
- [0503] a. CDR-H1包含SEQ ID NO:1、39、40、41或42所示的序列,
- [0504] b. CDR-H2包含SEQ ID NO:2、43、44、45或46所示的序列,
- [0505] c. CDR-H3包含SEQ ID NO:3、47或48所示的序列,
- [0506] d. CDR-L1包含SEQ ID NO:4、49或50所示的序列,
- [0507] e. CDR-L2包含SEQ ID NO:5或51所示的序列,并且
- [0508] f. CDR-L3包含SEQ ID NO:6或53所示的序列。
- [0509] 实施方案8如实施方案7所述的系统,其中所述VH链序列包含SEQ ID NO:7所示的序列。
- [0510] 实施方案9如实施方案7或8所述的系统,其中所述VL链序列包含SEQ ID NO:8所示的序列。
- [0511] 实施方案10如实施方案5-9中任一项所述的系统,其中所述第一细胞外抗原结合结构域包含SEQ ID NO:9所示的序列。

[0512] 实施方案11如实施方案5-10中任一项所述的系统,其中所述第一细胞外抗原结合结构域与ALPG/P的结合导致细胞内结构域内的一个或多个配体诱导型蛋白水解裂解位点处的裂解。

[0513] 实施方案12如实施方案5-11中任一项所述的系统,其中所述启动受体还包含定位于所述第一细胞外抗原结合结构域与所述第一跨膜结构域之间的第一铰链结构域。

[0514] 实施方案13如实施方案12所述的系统,其中所述第一铰链结构域包含CD8 α 或截短的CD8 α 铰链结构域。

[0515] 实施方案14如实施方案13所述的系统,其中所述第一铰链包含如SEQ ID NO:18所示的序列。

[0516] 实施方案15如实施方案5-14中任一项所述的系统,其中所述第一跨膜结构域包含Notch1跨膜结构域。

[0517] 实施方案16如实施方案15所述的系统,其中所述第一跨膜结构域包含如SEQ ID NO:19所示的序列。

[0518] 实施方案17如实施方案5-16中任一项所述的系统,其中所述细胞内结构域包含HNF1a/p65结构域或Gal4/VP64结构域。

[0519] 实施方案18如实施方案17所述的系统,其中所述细胞内结构域包含如SEQ ID NO:23所示的序列。

[0520] 实施方案19如实施方案5-18中任一项所述的系统,其中所述启动受体还包含在所述第一跨膜结构域与所述细胞内结构域之间的终止转移序列。

[0521] 实施方案20如实施方案19所述的系统,其中所述终止转移序列包含如SEQ ID NO:20所示的序列。

[0522] 实施方案21如实施方案1-20中任一项所述的系统,其中所述启动受体包含如SEQ ID NO:24所示的序列。

[0523] 实施方案22如实施方案1-21中任一项所述的系统,其中所述CAR从N末端至C末端包含:

[0524] a. 第二细胞外抗原结合结构域;

[0525] b. 第二跨膜结构域;

[0526] c. 细胞内共刺激结构域;和

[0527] d. 细胞内激活结构域。

[0528] 实施方案23如实施方案22所述的系统,其中所述第二细胞外抗原结合结构域特异性地结合至间皮素(MSLN),其中所述第二细胞外抗原结合结构域包含可变重(VH)链序列和可变轻(VL)链序列,所述可变重(VH)链序列包含三个重链CDR序列CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述可变轻(VL)链序列包含三个轻链CDR序列CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,其中:

[0529] a. CDR-H1包含SEQ ID NO:10、54、56、57或71所示的序列,

[0530] b. CDR-H2包含SEQ ID NO:11、58、59、60或61所示的序列,

[0531] c. CDR-H3包含SEQ ID NO:12、62或63所示的序列,

[0532] d. CDR-L1包含SEQ ID NO:14、64、65、66或67所示的序列,

[0533] e. CDR-L2包含SEQ ID NO:15、68、69或70所示的序列,并且

[0534] f. CDR-L3包含SEQ ID NO:16、72或73所示的序列。

[0535] 实施方案24如实施方案23所述的系统,其中所述VH链序列包含SEQ ID NO:13所示的序列。

[0536] 实施方案25如实施方案23或24所述的系统,其中所述VL链序列包含SEQ ID NO:17所示的序列。

[0537] 实施方案26如实施方案23-25中任一项所述的系统,其中所述第二细胞外抗原结合结构域包含SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列。

[0538] 实施方案27如实施方案1-26中任一项所述的系统,其中所述CAR包含第二铰链结构域。

[0539] 实施方案28如实施方案27所述的系统,其中所述第二铰链结构域包含CD8 α 或截短的CD8 α 铰链结构域。

[0540] 实施方案29如实施方案22-28中任一项所述的系统,其中所述第二跨膜结构域包含CD8 α 跨膜结构域。

[0541] 实施方案30如实施方案22-29中任一项所述的系统,其中所述细胞内共刺激结构域包含4-1BB结构域。

[0542] 实施方案31如实施方案22-30中任一项所述的系统,其中所述细胞内激活结构域包含CD3 ζ 结构域。

[0543] 实施方案32如实施方案1-31中任一项所述的系统,其中所述CAR包含如SEQ ID NO:31或32所示的序列。

[0544] 实施方案33如实施方案2-32中任一项所述的系统,其中所述SPA是STAT磷酸化、任选地STAT1、STAT3和/或STAT5磷酸化的激活因子。

[0545] 实施方案34如实施方案2-33中任一项所述的系统,其中所述SPA包含连接至细胞内信号传导结构域的细胞外结构域。

[0546] 实施方案35如实施方案34所述的系统,其中所述细胞内信号传导结构域包含源自细胞因子受体的细胞内信号传导区。

[0547] 实施方案36如实施方案34或35所述的系统,其中所述细胞内信号传导结构域包含源自白细胞介素受体的多肽序列。

[0548] 实施方案37如实施方案34或35所述的系统,其中所述细胞因子受体包含白细胞介素6信号转导子(IL6ST)。

[0549] 实施方案38如实施方案34-37中任一项所述的系统,其中所述细胞外结构域将组成型活性传递至所述细胞内信号传导结构域。

[0550] 实施方案39如实施方案34-38中任一项所述的系统,其中所述细胞外结构域包含二聚化区,任选地其中所述二聚化区包含半胱氨酸残基和亮氨酸拉链中的至少一者。

[0551] 实施方案40如实施方案39所述的系统,其中所述二聚化区形成同源二聚体。

[0552] 实施方案41如实施方案2-40中任一项所述的系统,其中所述SPA包括亮氨酸拉链-gp130(L-gp130)。

[0553] 实施方案42如实施方案2-41中任一项所述的系统,其中所述SPA包含与SEQ ID NO:74所示的序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的氨基酸序列。

[0554] 实施方案43如实施方案2-42中任一项所述的系统,其中所述SPA包含SEQ ID NO:

74的氨基酸序列。

[0555] 实施方案44如实施方案2-43中任一项所述的系统,其中所述SPA包含与SEQ ID NO:75所示的序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的氨基酸序列。

[0556] 实施方案45如实施方案2-44中任一项所述的系统,其中所述SPA包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列。

[0557] 实施方案46如实施方案38所述的系统,其中所述细胞外结构域包含源自细胞因子的多肽并且模拟受体激动作用。

[0558] 实施方案47如实施方案2-36、38或46中任一项所述的系统,其中所述SPA包括膜结合的白细胞介素15(mbIL-15)。

[0559] 实施方案48如实施方案2-38、46或47中任一项所述的系统,其中所述SPA包含与SEQ ID NO:76所示的序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的氨基酸序列。

[0560] 实施方案49如实施方案2-36、38或46-48所述的系统,其中所述SPA包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列。

[0561] 实施方案50如实施方案2-36或38中任一项所述的系统,其中所述SPA包括CD34-白细胞介素7受体(C7R)。

[0562] 实施方案51如实施方案2-36、38或50所述的系统,其中所述SPA包含与SEQ ID NO:77所示的序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的氨基酸序列。

[0563] 实施方案52如实施方案2-36、38、50或51所述的系统,其中所述SPA包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列。

[0564] 实施方案53如实施方案2-36、38或50-52所述的系统,其中所述SPA包含与SEQ ID NO:78所示的序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的氨基酸序列。

[0565] 实施方案54如实施方案2-36、38或50-53所述的系统,其中所述SPA包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列。

[0566] 实施方案55如实施方案1-32中任一项所述的系统,其中所述细胞因子是分泌的细胞因子。

[0567] 实施方案56如实施方案1-32中任一项所述的系统,其中所述细胞因子是膜结合的细胞因子。

[0568] 实施方案57如实施方案1-32、55和56中任一项所述的系统,其中所述细胞因子是白细胞介素。

[0569] 实施方案58如实施方案1-32和55-57中任一项所述的系统,其中所述细胞因子包括白细胞介素(IL)-2、Super-2、IL-12、IL-12/23p40、IL-7、IL-15、IL-21和IL-18中的至少一者。

[0570] 实施方案59如实施方案1-32和55-58中任一项所述的系统,其中所述细胞因子是IL-2。

[0571] 实施方案60如实施方案1-32和55-58中任一项所述的系统,其中所述细胞因子是

Super-2。

[0572] 实施方案61如实施方案1-32和55-58中任一项所述的系统,其中所述细胞因子是IL-12。

[0573] 实施方案62如实施方案1-32和55-58中任一项所述的系统,其中所述细胞因子是IL-12/23p40。

[0574] 实施方案63如实施方案1-32和55-58中任一项所述的系统,其中所述细胞因子是IL-7。

[0575] 实施方案64如实施方案1-32和55-58中任一项所述的系统,其中所述细胞因子是IL-15。

[0576] 实施方案65如实施方案1-32和55-58中任一项所述的系统,其中所述细胞因子是IL-21。

[0577] 实施方案66如实施方案1-32和55-58中任一项所述的系统,其中所述细胞因子是IL-18。

[0578] 实施方案67如实施方案1-32和55-66中任一项所述的系统,其中所述细胞因子包含非天然信号肽。

[0579] 实施方案68如实施方案67所述的系统,其中所述非天然信号肽包括来自以下至少一者的信号肽:CD44、CD3E、CD5、IGTAL、IL-2、GMCSF、胰凝乳蛋白酶原、胰蛋白酶原、IgK、IgKVIII、IgE、OSM、IgG2H、BM40、secrecon和tPA。

[0580] 实施方案69如实施方案67或68所述的系统,其中所述非天然信号肽包含SEQ ID NO:100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128或130所示的氨基酸序列或由其组成。

[0581] 实施方案70如实施方案1-32和55-69中任一项所述的系统,其中所述细胞因子包含SEQ ID NO:86、88、90、92、94、96、98或132所示的氨基酸序列。

[0582] 实施方案71如实施方案3-32中任一项所述的系统,其中所述基因表达阻遏因子是sgRNA或shRNA。

[0583] 实施方案72如实施方案3-32和71中任一项所述的系统,其中所述基因表达阻遏因子是sgRNA。

[0584] 实施方案73如实施方案72所述的系统,其中所述sgRNA阻遏选自以下的基因的表达:PTPN2、RASA2、SOCS1、ZC3H12A和CISH。

[0585] 实施方案74如实施方案72或73所述的系统,其中所述sgRNA阻遏PTPN2的表达。

[0586] 实施方案75如实施方案72或73所述的系统,其中所述sgRNA阻遏RASA2的表达。

[0587] 实施方案76如实施方案72或73所述的系统,其中所述sgRNA阻遏SOCS1的表达。

[0588] 实施方案77如实施方案72或73所述的系统,其中所述sgRNA阻遏ZC3H12A的表达。

[0589] 实施方案78如实施方案72或73所述的系统,其中所述sgRNA阻遏CISH的表达。

[0590] 实施方案79如实施方案72或73所述的系统,其中所述sgRNA包含SEQ ID NO:160-164中任一者所示的核酸序列。

[0591] 实施方案80如实施方案3-32和71中任一项所述的系统,其中所述基因表达阻遏因子是shRNA。

[0592] 实施方案81如实施方案80所述的系统,其中所述shRNA阻遏选自以下的基因的表达

达: RASA2、SOCS1、ZC3H12A、TGFB1和CISH。

[0593] 实施方案82如实施方案80或81所述的系统,其中所述shRNA阻遏RASA2的表达。

[0594] 实施方案83如实施方案80或81所述的系统,其中所述shRNA阻遏SOCS1的表达。

[0595] 实施方案84如实施方案80或81所述的系统,其中所述shRNA阻遏ZC3H12A的表达。

[0596] 实施方案85如实施方案80或81所述的系统,其中所述shRNA阻遏TGFB1的表达。

[0597] 实施方案86如实施方案80或81所述的系统,其中所述shRNA阻遏CISH的表达。

[0598] 实施方案87如实施方案80或81所述的系统,其中所述shRNA包含SEQ ID NO:165-172中任一者所示的核酸序列。

[0599] 实施方案88如实施方案3-32中任一项所述的系统,其中所述系统包含两种或更多种基因表达阻遏因子。

[0600] 实施方案89如实施方案88所述的系统,其中所述系统包含阻遏TNFRSF6 (Fas) 表达的shRNA和另外的基因表达阻遏因子。

[0601] 实施方案90如实施方案88所述的系统,其中所述系统包含阻遏TNFRSF6 (Fas) 表达的shRNA、阻遏TGFB2表达的shRNA和另外的基因表达阻遏因子。

[0602] 实施方案91如实施方案88所述的系统,其中所述系统包含阻遏TNFRSF6 (Fas) 表达的shRNA、阻遏PTPN2表达的shRNA和另外的基因表达阻遏因子。

[0603] 实施方案92如实施方案3-32中任一项所述的系统,其中所述系统包含阻遏CISH表达的sgRNA以及为IL-2的细胞因子。

[0604] 实施方案93如实施方案3-32中任一项所述的系统,其中所述系统包含阻遏PTPN2表达的sgRNA以及为IL-2的细胞因子。

[0605] 实施方案94如实施方案3-32中任一项所述的系统,其中所述系统包含阻遏RASA2表达的sgRNA以及为IL-2的细胞因子。

[0606] 实施方案95如实施方案3-32中任一项所述的系统,其中所述系统包含阻遏SOCS1表达的sgRNA以及为IL-2的细胞因子。

[0607] 实施方案96如实施方案3-32中任一项所述的系统,其中所述系统包含阻遏ZC3H12A表达的sgRNA以及为IL-2的细胞因子。

[0608] 实施方案97如实施方案3-32中任一项所述的系统,其中所述系统包含阻遏PTPN2表达的sgRNA以及为IL-21的细胞因子。

[0609] 实施方案98如实施方案3-32中任一项所述的系统,其中所述系统包含阻遏ZC3H12A表达的sgRNA以及为IL-21的细胞因子。

[0610] 实施方案99如实施方案3-32中任一项所述的系统,其中所述系统包含阻遏RASA2表达的shRNA以及为IL-2的细胞因子。

[0611] 实施方案100如实施方案3-32中任一项所述的系统,其中所述系统包含阻遏CISH表达的sgRNA以及为C7R的SPA。

[0612] 实施方案101如实施方案3-32中任一项所述的系统,其中所述系统包含阻遏PTPN2表达的sgRNA以及为C7R的SPA。

[0613] 实施方案102如实施方案3-32中任一项所述的系统,其中所述系统包含阻遏RASA2表达的sgRNA以及为C7R的SPA。

[0614] 实施方案103如实施方案3-32中任一项所述的系统,其中所述系统包含阻遏SOCS1

表达的sgRNA以及为C7R的SPA。

[0615] 实施方案104如实施方案3-32中任一项所述的系统,其中所述系统包含阻遏ZC3H12A表达的sgRNA以及为C7R的SPA。

[0616] 实施方案105如实施方案3-32中任一项所述的系统,其中所述系统包含阻遏CISH表达的sgRNA以及为L-gp130的SPA。

[0617] 实施方案106如实施方案3-32中任一项所述的系统,其中所述系统包含阻遏RASA2表达的sgRNA以及为L-gp130的SPA。

[0618] 实施方案107如实施方案3-32中任一项所述的系统,其中所述系统包含阻遏ZC3H12A表达的sgRNA以及为L-gp130的SPA。

[0619] 实施方案108如实施方案3-32中任一项所述的系统,其中所述系统包含阻遏RASA2表达的shRNA、为IL-2的细胞因子以及为L-gp130的SPA。

[0620] 实施方案109如实施方案3-32中任一项所述的系统,其中所述系统包含阻遏RASA2表达的sgRNA、为IL-2的细胞因子以及为L-gp130的SPA。

[0621] 实施方案110如实施方案3-32中任一项所述的系统,其中所述系统包含阻遏RASA2表达的shRNA、为IL-15的细胞因子以及为L-gp130的SPA。

[0622] 实施方案111如实施方案3-32中任一项所述的系统,其中所述系统包含阻遏RASA2表达的sgRNA、为IL-15的细胞因子以及为L-gp130的SPA。

[0623] 实施方案112如实施方案3-112中任一项所述的系统,其中所述启动受体和所述CAR能够结合至同一靶细胞。

[0624] 实施方案113如实施方案112所述的系统,其中所述靶细胞是人细胞。

[0625] 实施方案114如实施方案112或113所述的系统,其中所述靶细胞是癌细胞。

[0626] 实施方案115如实施方案114所述的系统,其中所述癌细胞是固体癌细胞或液体癌细胞。

[0627] 实施方案116如实施方案114或115所述的系统,其中所述癌细胞是卵巢癌、输卵管癌、原发性腹膜癌、子宫癌、间皮瘤、宫颈癌或胰腺癌。

[0628] 实施方案117一种或多种重组核酸,所述重组核酸包含至少一个核酸片段,所述至少一个核酸片段包含编码实施方案1-116中任一项所述的系统的核苷酸序列。

[0629] 实施方案118一种或多种重组核酸,所述重组核酸包含至少一个核酸片段,所述至少一个核酸片段包含:

[0630] a. 编码包含第一细胞外抗原结合结构域的启动受体的核苷酸序列;

[0631] b. 编码包含第二细胞外抗原结合结构域的嵌合抗原受体的核苷酸序列;和

[0632] c. 编码细胞因子的核苷酸序列。

[0633] 实施方案119一种或多种重组核酸,所述重组核酸包含至少一个核酸片段,所述至少一个核酸片段包含:

[0634] a. 编码包含第一细胞外抗原结合结构域的启动受体的核苷酸序列;

[0635] b. 编码包含第二细胞外抗原结合结构域的嵌合抗原受体的核苷酸序列;和

[0636] c. 编码合成途径激活因子的核苷酸序列。

[0637] 实施方案120一种或多种重组核酸,所述重组核酸包含至少一个核酸片段,所述至少一个核酸片段包含:

- [0638] a. 编码包含第一细胞外抗原结合结构域的启动受体的核苷酸序列;
- [0639] b. 编码包含第二细胞外抗原结合结构域的嵌合抗原受体的核苷酸序列;
- [0640] c. 编码合成途径激活因子的核苷酸序列;和
- [0641] d. 编码细胞因子的核苷酸序列。
- [0642] 实施方案121一种或多种重组核酸,所述重组核酸包含至少一个核酸片段,所述至少一个核酸片段包含:
- [0643] a. 编码包含第一细胞外抗原结合结构域的启动受体的核苷酸序列;
- [0644] b. 编码包含第二细胞外抗原结合结构域的嵌合抗原受体的核苷酸序列;和
- [0645] c. 基因表达阻遏因子的核苷酸序列;和
- [0646] d. 以下之一或两者:
- [0647] i. 编码合成途径激活因子的核苷酸序列;和/或
- [0648] ii. 编码细胞因子的核苷酸序列。
- [0649] 实施方案122如实施方案118-121中任一项所述的重组核酸,其中所述第一细胞外抗原结合结构域特异性地结合至ALPG/P。
- [0650] 实施方案123如实施方案118-122中任一项所述的重组核酸,其中所述第二细胞外抗原结合结构域特异性地结合至MSLN。
- [0651] 实施方案124如实施方案117-123所述的重组核酸,其中所述重组核酸包含两个或更多个核酸片段。
- [0652] 实施方案125如实施方案117-124中任一项所述的重组核酸,其中所述重组核酸还包含可操作地连接至编码所述CAR的核苷酸序列的诱导型启动子。
- [0653] 实施方案126如实施方案117-125中任一项所述的重组核酸,其中所述重组核酸还包含可操作地连接至编码所述启动受体的核苷酸序列的诱导型启动子。
- [0654] 实施方案127如实施方案117-125中任一项所述的重组核酸,其中所述重组核酸还包含可操作地连接至编码所述启动受体的核苷酸序列的组成型启动子。
- [0655] 实施方案128如实施方案117-125中任一项所述的重组核酸,其中所述重组核酸还包含可操作地连接至编码所述合成途径激活因子的核苷酸序列的组成型启动子。
- [0656] 实施方案129如实施方案117-127中任一项所述的重组核酸,其中所述重组核酸还包含可操作地连接至编码所述合成途径激活因子的核苷酸序列的诱导型启动子。
- [0657] 实施方案130如实施方案127或128所述的重组核酸,其中所述启动受体和所述合成途径激活因子在相同组成型启动子的控制之下。
- [0658] 实施方案131如实施方案117-124中任一项所述的重组核酸,其中所述重组核酸还包含可操作地连接至编码所述嵌合抗原受体的核苷酸序列的诱导型启动子以及可操作地连接至编码所述启动受体的核苷酸序列和编码所述合成途径激活因子的核苷酸序列的组成型启动子。
- [0659] 实施方案132如实施方案131所述的重组核酸,其中所述核酸在5'至3'方向上包含:
- [0660] a. 所述组成型启动子;
- [0661] b. 编码所述合成途径激活因子的核苷酸序列;
- [0662] c. 编码启动受体的核苷酸序列;

- [0663] d.所述诱导型启动子;和
- [0664] e.编码嵌合抗原受体的核苷酸序列。
- [0665] 实施方案133如实施方案131中任一项所述的重组核酸,其中所述核酸在5'至3'方向上包含:
- [0666] a.所述诱导型启动子;
- [0667] b.编码嵌合抗原受体的核苷酸序列;
- [0668] c.所述组成型启动子;
- [0669] d.编码启动受体的核苷酸序列;和
- [0670] e.编码所述合成途径激活因子的核苷酸序列。
- [0671] 实施方案134如实施方案117-127中任一项所述的重组核酸,其中所述重组核酸还包含可操作地连接至编码所述细胞因子的核苷酸序列的诱导型启动子。
- [0672] 实施方案135如实施方案117-127和134中任一项所述的重组核酸,其中所述重组核酸还包含:
- [0673] a.可操作地连接至编码所述嵌合抗原受体的核苷酸序列和编码所述细胞因子的核苷酸序列的诱导型启动子;和
- [0674] b.可操作地连接至编码所述启动受体的核苷酸序列的组成型启动子。
- [0675] 实施方案136如实施方案135所述的重组核酸,其中所述核酸在5'至3'方向上包含:
- [0676] a.所述组成型启动子;
- [0677] b.编码所述启动受体的核苷酸序列;
- [0678] c.所述诱导型启动子;
- [0679] d.编码所述嵌合抗原受体的核苷酸序列;和
- [0680] e.编码所述细胞因子的核苷酸序列和/或编码合成途径激活因子的核苷酸序列。
- [0681] 实施方案137如实施方案135所述的重组核酸,其中所述核酸在5'至3'方向上包含:
- [0682] a.所述组成型启动子;
- [0683] b.编码所述启动受体的核苷酸序列;
- [0684] c.所述诱导型启动子;
- [0685] d.编码所述细胞因子的核苷酸序列和/或编码合成途径激活因子的核苷酸序列;和
- [0686] e.编码所述嵌合抗原受体的核苷酸序列。
- [0687] 实施方案138如实施方案135所述的重组核酸,其中所述核酸在5'至3'方向上包含:
- [0688] a.所述诱导型启动子;
- [0689] b.编码所述嵌合抗原受体的核苷酸序列;
- [0690] c.编码所述细胞因子的核苷酸序列和/或编码合成途径激活因子的核苷酸序列;
- [0691] d.所述组成型启动子;和
- [0692] e.编码所述启动受体的核苷酸序列。
- [0693] 实施方案139如实施方案135所述的重组核酸,其中所述核酸在5'至3'方向上包含:

- [0694] a.所述诱导型启动子;
- [0695] b.编码所述细胞因子的核苷酸序列和/或编码合成途径激活因子的核酸序列;
- [0696] c.编码所述嵌合抗原受体的核酸序列;
- [0697] d.所述组成型启动子;和
- [0698] e.编码所述启动受体的核苷酸序列。
- [0699] 实施方案140如实施方案117-127中任一项所述的重组核酸,其中所述重组核酸还包含:
 - [0700] a.可操作地连接至编码所述嵌合抗原受体的核苷酸序列的第一诱导型启动子;
 - [0701] b.可操作地连接至编码所述细胞因子或合成途径激活因子的核苷酸序列的第二诱导型启动子;和
 - [0702] c.可操作地连接至编码所述启动受体的核苷酸序列的组成型启动子。
- [0703] 实施方案141如实施方案140所述的重组核酸,其中所述核酸在5'至3'方向上包含:
 - [0704] a.所述组成型启动子;
 - [0705] b.编码所述启动受体的核苷酸序列;
 - [0706] c.所述第一诱导型启动子;
 - [0707] d.编码所述嵌合抗原受体的核苷酸序列;
 - [0708] e.所述第二诱导型启动子;和
 - [0709] f.编码所述细胞因子的核酸序列和/或编码合成途径激活因子的核酸序列。
- [0710] 实施方案142如实施方案140所述的重组核酸,其中所述核酸在5'至3'方向上包含:
 - [0711] a.所述组成型启动子;
 - [0712] b.编码所述启动受体的核苷酸序列;
 - [0713] c.所述第二诱导型启动子;
 - [0714] d.编码所述细胞因子的核酸序列和/或编码合成途径激活因子的核酸序列;
 - [0715] e.所述第一诱导型启动子;和
 - [0716] f.编码所述嵌合抗原受体的核苷酸序列。
- [0717] 实施方案143如实施方案140所述的重组核酸,其中所述核酸在5'至3'方向上包含:
 - [0718] a.所述第一诱导型启动子;
 - [0719] b.编码所述嵌合抗原受体的核苷酸序列;
 - [0720] c.所述第二诱导型启动子;
 - [0721] d.编码所述细胞因子的核酸序列和/或编码合成途径激活因子的核酸序列;
 - [0722] e.所述组成型启动子;和
 - [0723] f.编码所述启动受体的核苷酸序列。
- [0724] 实施方案144如实施方案140所述的重组核酸,其中所述核酸在5'至3'方向上包含:
 - [0725] a.所述第一诱导型启动子;
 - [0726] b.编码所述嵌合抗原受体的核苷酸序列;

- [0727] c.所述组成型启动子;
- [0728] d.编码所述启动受体的核苷酸序列;
- [0729] e.所述第二诱导型启动子;和
- [0730] f.编码所述细胞因子的核酸序列和/或编码合成途径激活因子的核酸序列。
- [0731] 实施方案145如实施方案140所述的重组核酸,其中所述核酸在5'至3'方向上包含:
- [0732] a.所述第二诱导型启动子;
- [0733] b.编码所述细胞因子和/或合成途径激活因子的核酸序列;
- [0734] c.所述第一诱导型启动子;
- [0735] d.编码所述嵌合抗原受体的核苷酸序列;
- [0736] e.所述组成型启动子;和
- [0737] f.编码所述启动受体的核苷酸序列。
- [0738] 实施方案146如实施方案140所述的重组核酸,其中所述核酸在5'至3'方向上包含:
- [0739] a.所述第二诱导型启动子;
- [0740] b.编码所述细胞因子的核酸序列和/或编码合成途径激活因子的核酸序列;
- [0741] c.所述组成型启动子;
- [0742] d.编码启动受体的核苷酸序列;
- [0743] e.所述第一诱导型启动子;和
- [0744] f.编码嵌合抗原受体的核苷酸序列。
- [0745] 实施方案147如实施方案117-146中任一项所述的重组核酸,其中编码所述启动受体的核苷酸序列包含SEQ ID NO:35所示的序列。
- [0746] 实施方案148如实施方案117-147中任一项所述的重组核酸,其中编码所述嵌合抗原受体的核苷酸序列包含SEQ ID NO:36所示的序列。
- [0747] 实施方案149如实施方案117-133、147和148中任一项所述的重组核酸,其中编码所述合成途径激活因子的核苷酸序列包含SEQ ID NO:79、80、81、82或83所示的序列。
- [0748] 实施方案150如实施方案117-127和134-148中任一项所述的重组核酸,其中编码所述细胞因子的核苷酸序列包含SEQ ID NO:87、89、91、93、95、97、99或133所示的序列。
- [0749] 实施方案151如实施方案117-150中任一项所述的重组核酸,其中所述基因表达阻遏因子包含SEQ ID NO:160-172中任一项所示的核酸序列。
- [0750] 实施方案152如实施方案117-151中任一项所述的重组核酸,其中所述核酸还包含与宿主细胞染色体中的插入位点互补的5'同源定向修复臂和/或3'同源定向修复臂。
- [0751] 实施方案153如实施方案117-152中任一项所述的重组核酸,其中所述重组核酸还包含编码自切除2A肽(P2A)的核苷酸序列。
- [0752] 实施方案154如实施方案153所述的重组核酸,其中所述P2A处于编码嵌合抗原受体的核苷酸序列的3'端。
- [0753] 实施方案155如实施方案153所述的重组核酸,其中所述P2A处于编码启动受体的核苷酸序列的3'端。
- [0754] 实施方案156如实施方案117-155中任一项所述的重组核酸,其中所述重组核酸还

包含土拨鼠肝炎病毒翻译后调控元件 (WPRE)。

[0755] 实施方案157如实施方案156所述的重组核酸,其中所述WPRE处于编码嵌合抗原受体的核苷酸序列的3'端和编码启动受体的核苷酸序列的5'端,或者其中所述WPRE处于编码启动受体的核苷酸序列的3'端和编码嵌合抗原受体的核苷酸序列的5'端。

[0756] 实施方案158如实施方案117-157中任一项所述的重组核酸,其中所述重组核酸还包含SV40多聚A元件。

[0757] 实施方案159如实施方案117至158中任一项所述的重组核酸,其中所述核酸并入表达盒或表达载体中。

[0758] 实施方案160如实施方案159所述的重组核酸,其中所述表达载体是非病毒载体。

[0759] 实施方案161一种表达载体,所述表达载体包含实施方案117-160中任一项所述的重组核酸。

[0760] 实施方案162如实施方案161所述的载体,其中所述重组核酸的5'端和3'端包含与原代细胞的基因组中的插入位点侧翼的基因组序列同源的核苷酸序列。

[0761] 实施方案163如实施方案162所述的载体,其中所述插入位点位于T细胞受体 α 恒定 (TRAC) 基因座或基因组安全港 (GSH) 基因座。

[0762] 实施方案164一种免疫细胞,所述免疫细胞包含:

[0763] a. 实施方案1-116中任一项所述的系统;

[0764] b. 至少一种实施方案117-160中任一项所述的重组核酸;和/或

[0765] c. 实施方案161-163中任一项所述的载体。

[0766] 实施方案165如实施方案164所述的免疫细胞,其中所述免疫细胞是原代人免疫细胞。

[0767] 实施方案166如实施方案164或165中任一项所述的免疫细胞,其中所述免疫细胞是同种异体免疫细胞。

[0768] 实施方案167如实施方案164或165中任一项所述的免疫细胞,其中所述免疫细胞是自体免疫细胞。

[0769] 实施方案168如实施方案165-167中任一项所述的免疫细胞,其中所述原代免疫细胞是自然杀伤 (NK) 细胞、T细胞、CD8+T细胞、CD4+T细胞、原代T细胞或T细胞祖细胞。

[0770] 实施方案169如实施方案165-168中任一项所述的免疫细胞,其中所述原代免疫细胞是原代T细胞。

[0771] 实施方案170如实施方案165-169中任一项所述的免疫细胞,其中所述原代免疫细胞是原代人T细胞。

[0772] 实施方案171如实施方案165-170中任一项所述的免疫细胞,其中所述原代免疫细胞是无病毒的。

[0773] 实施方案172一种原代免疫细胞,所述原代免疫细胞包含至少一种重组核酸,所述重组核酸包含:

[0774] a. 编码包含第一细胞外抗原结合结构域的启动受体的核酸序列;

[0775] b. 编码包含第二细胞外抗原结合结构域的嵌合抗原受体的核酸序列;和

[0776] c. 编码合成途径激活因子的核酸序列和/或编码细胞因子的核酸序列;

[0777] 其中所述重组核酸插入所述原代免疫细胞的基因组的靶区中,其中所述原代免疫

细胞不包含用于将所述重组核酸引入所述原代免疫细胞中的病毒载体。

[0778] 实施方案173如实施方案172所述的原代免疫细胞,其中所述第一细胞外抗原结合结构域特异性地结合至ALPG/P。

[0779] 实施方案174如实施方案172或173的原代免疫细胞,其中所述第二细胞外抗原结合结构域特异性地结合至MSLN。

[0780] 实施方案175一种活的无病毒的原代细胞,所述活的无病毒的原代细胞包含核糖核蛋白复合物(RNP)-重组核酸复合物,其中所述RNP包含核酸酶结构域和指导RNA,其中重组核酸包含:

[0781] a. 编码包含特异性地结合至ALPG/P的第一细胞外抗原结合结构域的启动受体的核酸序列;

[0782] b. 编码包含特异性地结合至MSLN的第二细胞外抗原结合结构域的嵌合抗原受体的核酸序列;和

[0783] c. 编码成型激活细胞因子信号传导的合成途径激活因子的核酸序列和/或编码细胞因子的核酸序列;

[0784] 其中所述重组核酸的5'端和3'端包含与所述原代细胞的基因组中的插入位点侧翼的基因组序列同源的核苷酸序列。

[0785] 实施方案176如实施方案175所述的原代细胞,其中所述第一细胞外抗原结合结构域特异性地结合至ALPG/P。

[0786] 实施方案177如实施方案175或176的原代细胞,其中所述第二细胞外抗原结合结构域特异性地结合至MSLN。

[0787] 实施方案178一种细胞群体,所述细胞群体包含多个实施方案164-171中任一项所述的免疫细胞或实施方案172-177中任一项所述的原代细胞。

[0788] 实施方案179一种药物组合物,所述药物组合物包含实施方案164至177中任一项所述的免疫细胞或实施方案178所述的细胞群体,以及药学上可接受的赋形剂。

[0789] 实施方案180一种药物组合物,所述药物组合物包含实施方案117-160中任一项所述的重组核酸或实施方案161-163中任一项所述的载体,以及药学上可接受的赋形剂。

[0790] 实施方案181一种编辑免疫细胞的方法,所述方法包括:

[0791] a. 提供核糖核蛋白(RNP)-重组核酸复合物,其中所述RNP包含核酸酶结构域和指导RNA,其中所述重组核酸包含实施方案117-160中任一项所述的重组核酸,并且其中所述重组核酸的5'端和3'端包含与所述免疫细胞的基因组中的插入位点侧翼的基因组序列同源的核苷酸序列;

[0792] b. 以非病毒方式将所述RNP-重组核酸复合物引入所述免疫细胞中,其中所述指导RNA与所述原代免疫细胞的基因组的靶区特异性地杂交,并且其中所述核酸酶结构域使所述靶区裂解以产生在所述免疫细胞的基因组中的所述插入位点;以及

[0793] c. 通过将实施方案117-160中任一项所述的重组核酸插入所述免疫细胞的基因组中的所述插入位点中来编辑所述免疫细胞。

[0794] 实施方案182如实施方案181所述的方法,其中以非病毒方式引入包括电穿孔。

[0795] 实施方案183如实施方案181或182所述的方法,其中所述核酸酶结构域包含CRISPR相关核酸内切酶(Cas),任选地是Cas9核酸酶。

[0796] 实施方案184如实施方案181-183中任一项所述的方法,其中所述细胞的基因组的所述靶区是T细胞受体 α 恒定 (TRAC) 基因座或基因组安全港 (GSH) 基因座。

[0797] 实施方案185如实施方案181-184中任一项所述的方法,其中所述重组核酸是双链重组核酸或单链重组核酸。

[0798] 实施方案186如实施方案181-185中任一项所述的方法,其中所述重组核酸是线状重组核酸或环状重组核酸,任选地其中所述环状重组核酸是质粒。

[0799] 实施方案187如实施方案181-186中任一项所述的方法,其中所述免疫细胞是原代人免疫细胞。

[0800] 实施方案188如实施方案181-187中任一项所述的方法,其中所述免疫细胞是自体免疫细胞。

[0801] 实施方案189如实施方案181-187中任一项所述的方法,其中所述免疫细胞是同种异体免疫细胞。

[0802] 实施方案190如实施方案181-189中任一项所述的方法,其中所述免疫细胞是自然杀伤 (NK) 细胞、T细胞、CD8+T细胞、CD4+T细胞、原代T细胞或T细胞祖细胞。

[0803] 实施方案191如实施方案181-190中任一项所述的方法,其中所述免疫细胞是原代T细胞。

[0804] 实施方案192如实施方案181-191中任一项所述的方法,其中所述免疫细胞是原代人T细胞。

[0805] 实施方案193如实施方案181-192中任一项所述的方法,其中所述免疫细胞是无病毒的。

[0806] 实施方案194如实施方案181-193中任一项所述的方法,所述方法还包括从患者获得所述免疫细胞以及在体外引入所述重组核酸。

[0807] 实施方案195一种治疗受试者的疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用实施方案164-171中任一项所述的免疫细胞或实施方案172-177中任一项所述的原代细胞或实施方案179或180所述的药物组合物。

[0808] 实施方案196如实施方案195所述的方法,其中所述疾病是癌症。

[0809] 实施方案197如实施方案196所述的方法,其中所述癌症是实体癌或液体癌。

[0810] 实施方案198如实施方案196或197所述的方法,其中所述癌症是卵巢癌、输卵管癌、原发性腹膜癌、子宫癌、间皮瘤、宫颈癌或胰腺癌。

[0811] 实施方案199如实施方案196-198中任一项所述的方法,其中所述免疫细胞的施用增强所述受试者中的免疫应答。

[0812] 实施方案200如实施方案199所述的方法,其中所述增强的免疫应答是适应性免疫应答。

[0813] 实施方案201如实施方案199所述的方法,其中所述增强的免疫应答是先天免疫应答。

[0814] 实施方案202如实施方案196-201中任一项所述的方法,其中所述增强的免疫应答是增加的至少一种细胞因子或趋化因子的表达。

[0815] 实施方案203如实施方案202所述的方法,其中所述至少一种细胞因子或趋化因子是IL-2或IFN γ 。

[0816] 实施方案204如实施方案196-201中任一项所述的方法,其中所述增强的免疫应答是与施用对照细胞相比增加的靶细胞溶解。

[0817] 实施方案205如实施方案195-198中任一项所述的方法,所述方法还包括与所述免疫细胞同时或在所述免疫细胞之后向所述受试者施用免疫疗法。

[0818] 实施方案206一种抑制受试者中的靶细胞的方法,所述方法包括向所述受试者施用实施方案164-171中任一项所述的免疫细胞或实施方案172-177中任一项所述的原代细胞,其中所述免疫细胞抑制所述靶细胞。

[0819] 实施方案207如实施方案206所述的方法,其中所述靶细胞表达ALPG/P和MSLN。

[0820] 实施方案208如实施方案206或207所述的方法,其中所述靶细胞是癌细胞。

[0821] 实施方案209一种调节免疫细胞的活性的方法,所述方法包括:

[0822] a. 获得免疫细胞,所述免疫细胞包含

[0823] i. 实施方案2-116中任一项所述的系统;

[0824] ii. 实施方案117-160中任一项所述的重组核酸;和/或

[0825] iii. 实施方案161-163中任一项所述的载体;以及

[0826] b. 使所述免疫细胞与表达启动受体抗原和CAR抗原的靶细胞接触,其中所述启动受体与所述靶细胞上的所述启动受体抗原的结合诱导所述启动受体的激活和所述嵌合抗原受体的表达,其中所述嵌合抗原受体与所述靶细胞上的所述CAR抗原的结合调节所述免疫细胞的活性,并且其中所述合成途径激活因子和/或所述细胞因子也调节所述免疫细胞的活性。

[0827] 实施方案210一种调节免疫细胞的活性的方法,所述方法包括:

[0828] a. 获得免疫细胞,所述免疫细胞包含

[0829] i. 实施方案2-116中任一项所述的系统;

[0830] ii. 实施方案117-160中任一项所述的重组核酸;和/或

[0831] iii. 实施方案161-163中任一项所述的载体;以及

[0832] b. 使所述免疫细胞与表达ALPG/P和MSLN的靶细胞接触,其中所述启动受体与所述靶细胞上的ALPG/P的结合诱导所述启动受体的激活和所述嵌合抗原受体的表达,其中所述嵌合抗原受体与所述靶细胞上的MSLN的结合调节所述免疫细胞的活性,并且其中所述合成途径激活因子和/或细胞因子也调节所述免疫细胞的活性。

[0833] 实施方案211如实施方案210所述的方法,其中所述免疫细胞活性的调节包括增强免疫应答。

[0834] 实施方案212如实施方案211所述的方法,其中所述增强的免疫应答是适应性免疫应答。

[0835] 实施方案213如实施方案211所述的方法,其中所述增强的免疫应答是先天免疫应答。

[0836] 实施方案214如实施方案210-213中任一项所述的方法,其中所述免疫细胞活性是增加的至少一种细胞因子或趋化因子的表达。

[0837] 实施方案215如实施方案214所述的方法,其中所述至少一种细胞因子或趋化因子是IL-2或IFN γ 。

[0838] 实施方案216如实施方案210-213中任一项所述的方法,其中所述免疫细胞活性是

靶细胞溶解。

[0839] 实施方案217一种系统,所述系统包含:

[0840] a.启动受体、CAR、SPA和细胞因子中的至少一者;和

[0841] b.RASA2表达阻遏因子。

[0842] 实施方案218如实施方案217所述的系统,其中所述SPA包括亮氨酸拉链-gp130(L-gp130)。

[0843] 实施方案219如实施方案217或218所述的系统,其中所述SPA包含与SEQ ID NO:74所示的序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的氨基酸序列。

[0844] 实施方案220如实施方案217-219中任一项所述的系统,其中所述SPA包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列。

[0845] 实施方案221如实施方案217-219中任一项所述的系统,其中所述SPA包含与SEQ ID NO:75所示的序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的氨基酸序列。

[0846] 实施方案222如实施方案217-221中任一项所述的系统,其中所述SPA包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列。

[0847] 实施方案223如实施方案217-222中任一项所述的系统,其中所述细胞因子是IL-2。

[0848] 实施方案224如实施方案217-223中任一项所述的系统,其中所述细胞因子包含SEQ ID NO:86所示的氨基酸序列。

[0849] 实施方案225如实施方案217-222中任一项所述的系统,其中所述细胞因子是IL-15。

[0850] 实施方案226如实施方案217-223中任一项所述的系统,其中所述细胞因子包含SEQ ID NO:96所示的氨基酸序列。

[0851] 实施方案227如实施方案217-224中任一项所述的系统,其中所述RASA2表达阻遏因子是shRNA或sgRNA。

[0852] 实施方案228如实施方案217-227中任一项所述的系统,其中RASA2表达的阻遏因子是shRNA。

[0853] 实施方案229如实施方案228所述的系统,其中所述shRNA包含SEQ ID NO:165的核酸序列。

[0854] 实施方案230如实施方案217-227中任一项所述的系统,其中RASA2表达的阻遏因子是sgRNA。

[0855] 实施方案231如实施方案230所述的系统,其中所述sgRNA包含SEQ ID NO:161的核酸序列。

[0856] 实施方案232如实施方案217-231中任一项所述的系统,所述系统还包含阻遏TNFRSF6(Fas)表达的shRNA。

[0857] 实施方案233如实施方案232所述的系统,所述系统还包含阻遏TGFB2表达的shRNA。

[0858] 实施方案234如实施方案232所述的系统,所述系统还包含阻遏PTPN2表达的

shRNA。

[0859] 实施方案235一种或多种重组核酸,所述重组核酸包含至少一个核酸片段,所述至少一个核酸片段包含编码实施方案217-234中任一项所述的系统的核苷酸序列。

[0860] 实施方案236一种表达载体,所述表达载体包含实施方案235所述的重组核酸序列。

[0861] 实施方案237一种工程化免疫细胞,所述工程化免疫细胞包含:

[0862] a. 实施方案217-234中任一项所述的系统;

[0863] b. 实施方案235所述的重组核酸序列;或

[0864] c. 实施方案236所述的表达载体。

[0865] 实施方案238在工程化免疫细胞中,改进方案包含:

[0866] a. 启动受体、CAR、SPA和细胞因子中的至少一者;和

[0867] b. RASA2表达阻遏因子。

[0868] 实施方案239如实施方案238所述的工程化免疫细胞,其中所述SPA包括亮氨酸拉链-gp130(L-gp130)。

[0869] 实施方案240如实施方案238或239所述的工程化免疫细胞,其中所述SPA包含与SEQ ID NO:74所示的序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的氨基酸序列。

[0870] 实施方案241如实施方案238-240中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述SPA包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列。

[0871] 实施方案242如实施方案238-240中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述SPA包含与SEQ ID NO:75所示的序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的氨基酸序列。

[0872] 实施方案243如实施方案238-242中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述SPA包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列。

[0873] 实施方案244如实施方案238-243中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述细胞因子是IL-2。

[0874] 实施方案245如实施方案238-244中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述细胞因子包含SEQ ID NO:86所示的氨基酸序列。

[0875] 实施方案246如实施方案238-245中任一项所述的工程化免疫细胞,其中RASA2表达的阻遏因子是shRNA或sgRNA。

[0876] 实施方案247如实施方案238-246中任一项所述的工程化免疫细胞,其中RASA2表达的阻遏因子是shRNA。

[0877] 实施方案248如实施方案247所述的工程化免疫细胞,其中所述shRNA包含SEQ ID NO:165的核酸序列。

[0878] 实施方案249如实施方案238-246中任一项所述的工程化免疫细胞,其中RASA2表达的阻遏因子是sgRNA。

[0879] 实施方案250如实施方案249所述的工程化免疫细胞,其中所述sgRNA包含SEQ ID NO:161的核酸序列。

[0880] 实施方案251如实施方案238-250中任一项所述的工程化免疫细胞,所述工程化免

疫细胞还包含阻遏TNFRSF6 (Fas) 表达的shRNA。

[0881] 实施方案252如实施方案251所述的工程化免疫细胞,所述工程化免疫细胞还包含阻遏TGFR2表达的shRNA。

[0882] 实施方案253如实施方案251所述的工程化免疫细胞,所述工程化免疫细胞还包含阻遏PTPN2表达的shRNA。

[0883] 实施方案254如实施方案237-253中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述工程化免疫细胞是原代人免疫细胞。

[0884] 实施方案255如实施方案237-254中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述工程化免疫细胞是同种异体免疫细胞。

[0885] 实施方案256如实施方案237-254中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述工程化免疫细胞是自体免疫细胞。

[0886] 实施方案257如实施方案254-256中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述原代免疫细胞是自然杀伤(NK)细胞、T细胞、CD8+T细胞、CD4+T细胞、原代T细胞或T细胞祖细胞。

[0887] 实施方案258如实施方案254-257中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述原代免疫细胞是原代T细胞。

[0888] 实施方案259如实施方案254-258中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述原代免疫细胞是原代人T细胞。

[0889] 实施方案260如实施方案254-259中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述原代免疫细胞是无病毒的。

[0890] 实施方案261一种细胞群体,所述细胞群体包含多个实施方案237-260中任一项所述的工程化免疫细胞。

[0891] 实施方案262一种药物组合物,所述药物组合物包含实施方案237-260中任一项所述的工程化免疫细胞或实施方案261所述的细胞群体,以及药学上可接受的赋形剂。

[0892] 实施方案263一种治疗受试者的疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用实施方案237-260中任一项所述的工程化免疫细胞或实施方案262所述的药物组合物。

[0893] 实施方案264如实施方案263所述的方法,其中所述疾病是癌症。

[0894] 实施方案265如实施方案264所述的方法,其中所述癌症是实体癌或液体癌。

[0895] 实施方案266如实施方案264或265所述的方法,其中所述癌症是卵巢癌、输卵管癌、原发性腹膜癌、子宫癌、间皮瘤、宫颈癌或胰腺癌。

[0896] 实施方案267如实施方案264-266中任一项所述的方法,其中所述工程化免疫细胞的施用增强所述受试者中的免疫应答。

[0897] 实施方案268如实施方案267所述的方法,其中所述增强的免疫应答是适应性免疫应答。

[0898] 实施方案269如实施方案267所述的方法,其中所述增强的免疫应答是先天免疫应答。

[0899] 实施方案270如实施方案264-269中任一项所述的方法,其中所述增强的免疫应答是增加的至少一种细胞因子或趋化因子的表达。

[0900] 实施方案271如实施方案270所述的方法,其中所述至少一种细胞因子或趋化因子是IL-2或IFN γ 。

[0901] 实施方案272如实施方案264-271中任一项所述的方法,其中所述增强的免疫应答是与施用对照细胞相比增加的靶细胞溶解。

[0902] 实施方案273如实施方案263-272中任一项所述的方法,所述方法还包括与所述工程化免疫细胞同时或在所述工程化免疫细胞之后向所述受试者施用免疫疗法。

[0903] 实施方案274一种抑制受试者中的靶细胞的方法,所述方法包括向所述受试者施用实施方案237-260中任一项所述的工程化免疫细胞或实施方案262所述的药物组合物,其中所述工程化免疫细胞抑制所述靶细胞。

[0904] 实施方案275如实施方案274所述的方法,其中所述靶细胞是癌细胞。

[0905] 实施例

[0906] 以下是用于进行本发明的特定实施方案的实施例。实施例仅出于说明性目的而提供,并且不意图以任何方式限制本发明的范围。已努力确保关于所用数值(例如,数量、温度等)的准确性,但当然应允许一些实验误差和偏差。

[0907] 除非另外指示,否则本发明的实施将采用属于本领域的技能的常规蛋白质化学、生物化学、重组DNA技术和药理学方法。此类技术充分说明于文献中。参见,例如, T.E.Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc., 本期新增); Sambrook等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版, 1989); Methods In Enzymology (S. Colowick和N. Kaplan编, Academic Press, Inc.); Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版 (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey和Sundberg Advanced Organic Chemistry第3版 (Plenum Press) 第A和B卷 (1992)。

[0908] 实施例1: 使用合成途径激活因子增强逻辑门T细胞存活

[0909] 材料和方法

[0910] 对T细胞进行工程化,使其表达包括APLG PrimeR和MSLN CAR的ALPG/MSLN逻辑门(LG T细胞)。对LG T细胞进行进一步工程化,使其表达以下三种合成途径激活因子(SPA)之一:亮氨酸拉链-gp130(L-gp130)(SEQ ID NO:75)、膜结合的IL-15(mbIL-15)(SEQ ID NO:76)、CD34-IL-7受体(C7R)(SEQ ID NO:78),或对照:截短的EGFR(EGFRt, SEQ ID NO:84)或c-Jun(SEQ ID NO:85)。

[0911] 无细胞因子存活

[0912] 使用CiTE制造工艺,对来自单例供体的T细胞进行工程化,使其表达含有编码SPA辅助蛋白的基因的ALPG/MSLN回路,并在初始激活后第9天进行冷冻和低温保存。在测定之前,将工程化T细胞解冻,并在包含12.5ng/mL人IL-7和IL-15的培养基中静置过夜。在测定当天,对T细胞进行计数、离心沉降、在无细胞因子的培养基中洗涤1次,然后重悬于无细胞因子的培养基中。然后将x个总T细胞铺板到96孔V形底板的每孔中的100 μ L不含IL-7和IL-15的培养基中。制备重复板。立即分析其中一个板的细胞计数和总编辑细胞百分比。将第二板置于细胞培养箱中6天,此时收集细胞计数和编辑%数据。

[0913] 通过将细胞以300 $\times$ g沉淀5min,然后重悬于含有1:50稀释的抗Myc PE抗体(用于检测表面PrimeR表达)和抗FLAG BV421(用于表面CAR表达)的FACS缓冲液中,来确定细胞计数和编辑%。在室温下染色20min后,将细胞离心沉降并用FACS缓冲液洗涤1次。在离心沉降

后,将细胞重悬于50 μ L FACS缓冲液中,然后在上面加入50 μ L CountBright Plus计数珠。在Attune NxT流式细胞仪上获取数据。使用FSC和SSC参数指定珠子与T细胞的门。绝对细胞计数使用以下公式得出:细胞/ μ L = (细胞计数/计数珠计数) $\times$ 瓶中计数珠浓度。经编辑T细胞数目的倍数变化和经编辑T细胞%通过以下公式确定:自D0的T细胞倍数变化 = (D6时的T细胞计数/D0时的T细胞计数)。

[0914] STAT磷酸化分析

[0915] 来自一例供体的T细胞经含有编码SPA辅助蛋白的基因的ALPG/MSLN回路进行CITE编辑,通过细胞内抗体染色来分析其STAT磷酸化状态。将冷冻保存的经CITE编辑的T细胞解冻并分别在含有12.5ng/mL IL-7和IL-15的培养基中静置20小时。在静息期后,将T细胞用无细胞因子的无血清的培养基洗涤,然后离心沉降,并重悬于无细胞因子的无血清的培养基中。在37 $^{\circ}$ C下20小时血清饥饿期后,将Zombie-Near Infrared染料以1:100稀释度添加到细胞培养基中。在孵育15min后,将等体积的BD Cytofix添加到细胞中,并将板在37 $^{\circ}$ C下孵育15min。在固定后,将细胞以400 $\times$ g离心沉降5min,重悬于200 μ L BD Perm Buffer III中,并在冰上孵育30min。然后将细胞用BD FACS缓冲液洗涤2次,并重悬于含有1:50抗Myc PE抗体(用于检测表达PrimeR的细胞)、1:10抗pSTAT5 A488和1:10抗pSTAT3 A647或抗pSTAT1 A647的FACS染色缓冲液中。在室温下孵育30min后,将细胞用200 μ L FACS缓冲液洗涤并重悬于100 μ L中。在Attune NxT流式细胞仪上获取数据。使用FSC和SSC参数指定T细胞的门。pSTAT数据按Myc+ (经编辑的) T细胞分层。

[0916] 结果

[0917] 为了分析SPA在无细胞因子条件下增强T细胞增殖的能力,将表达SPA或对照蛋白的LG T细胞在无细胞因子的培养基(例如,无外来抗原或细胞因子刺激)中培养。在第0天和第6天比较敲入水平和总经编辑T细胞计数。与EGFRt或cJun相比,表达SPA(L-gp130、mbIL-15或C7R)的LG T细胞表现出约3-6倍的富集(图2A和图2B)。所有细胞计数最终下降,表明没有发生转化,但相对于对照,表达SPA的LG T细胞在不存在抗原刺激的情况下持续时间更长。

[0918] 为了评估SPA在LG T细胞中驱动细胞因子信号传导的能力,将经编辑的细胞在没有抗原刺激或细胞因子支持的情况下饥饿24小时,然后固定并染色以确定pSTAT蛋白。相对于对照,表达SPA的LG T细胞在基线(非刺激)条件下表现出STAT1、STAT3和STAT5蛋白磷酸化增加(图3)。还示出了使用不同类型的SPA在相同条件下对STAT磷酸化的激活(图4A、图4B和图4C)。这些数据表明,可以通过使用不同的SPA分子来定制pSTAT活性。

[0919] 为了验证SPA表达不会改变逻辑门蛋白的表达,将LG T细胞与不表达同源抗原(GFP)、高浓度PrimeR抗原(ALPG-hi)或低浓度PrimeR抗原(ALPG-lo)的K562肿瘤细胞共培养。在孵育72小时后,通过PrimeR(Myc标签)和CAR(FLAG标签)表面表达测量逻辑门的激活。与肿瘤细胞共培养的L-gp130 LG T细胞表现出完整的溶细胞CAR逻辑门。单独培养或与抗原阴性肿瘤细胞(ALPG-GFP)一起培养的LG T细胞在表面表达primeR(图5A),但不表达溶细胞CAR(图5B)。当与表达同源PrimeR抗原(ALPG-hi或ALPG-lo)的肿瘤细胞共培养时,LG T细胞下调PrimeR(图5A),并上调溶细胞CAR(图5B)。这些结果表明,向回路中添加组成型辅助分子(在数据中以示例性SPA L-gp130和对照cJun表示)不会破坏逻辑门的灵敏度或完整性。

[0920] 实施例2:表达SPA的LG T细胞的体外评估

[0921] 材料和方法

[0922] 终点荧光素酶测定

[0923] 使用CiTE制造工艺,对来自两例供体的T细胞进行工程化,使其表达含有编码SPA辅助蛋白的基因的ALPG/MSLN逻辑门(LG),并在初始激活后第9天进行冷冻和低温保存。在测定之前,将来自同一供体的工程化T细胞和仅RNP对照T细胞解冻,并在包含12.5ng/mL人IL-7和IL-15的培养基中静置过夜。在测定当天,对工程化T细胞进行计数并分别使用抗Myc PE和抗FLAG BV421进行染色以确定PrimeR和CAR表达,并通过流式细胞术进行分析。对于每例供体,通过添加仅RNP细胞来稀释高于最低KI%的工程化细胞群体,将所有工程化T细胞群体以该供体内的最低KI%作归一化。在归一化后,将T细胞重悬于不含IL-7和IL-15的培养基中,并进行连续稀释,然后添加到96孔平底白壁测定板中。在以技术重复每孔添加1e4个靶细胞后,连续稀释T细胞产生以下共培养KI+效应物:靶标(E:T)比率:1:1、1:3和1:9。将每个T细胞群体与仅表达CAR抗原(K562-MSLN)或同时表达PrimeR和CAR抗原(ALPG/MSLN)的荧光素酶+K562肿瘤细胞系共培养。使用终点荧光素酶测定测量72小时共培养结束时的细胞毒性。在将荧光素酶底物直接添加到孔中后,在PHERAstar读板器中收集数据。通过将仅含有K562细胞的孔的发光设置为基线,并将荧光素酶的减少绘制为“溶解百分比”,将数据归一化。

[0924] Incucyte测定

[0925] 使用CiTE制造工艺,对来自两例供体的T细胞进行工程化,使其表达含有编码SPA辅助蛋白的基因的ALPG/MSLN回路,并在初始激活后第9天进行冷冻和低温保存。在测定之前,将来自同一供体的工程化T细胞和仅RNP对照T细胞解冻,并在包含12.5ng/mL人IL-7和IL-15的培养基中静置过夜。在测定当天,对工程化T细胞进行计数并分别使用抗Myc PE和抗FLAG BV421进行染色以确定PrimeR和CAR表达,并通过流式细胞术进行分析。对于每例供体,通过添加仅RNP细胞来稀释高于最低KI%的工程化细胞群体,将所有工程化T细胞群体以该供体内的最低KI%作归一化。在归一化后,将T细胞重悬于不含IL-7和IL-15的培养基中,并进行连续稀释,然后添加到96孔平底白壁测定板中。在以技术重复每孔添加1e4个靶细胞后,连续稀释T细胞产生以下共培养KI+效应物:靶标(E:T)比率:1:1、1:3、1:9和1:27。将每个T细胞群体与同时表达PrimeR和CAR抗原(ALPG/MSLN)的GFP+K562肿瘤细胞系共培养。在整个72小时期间内对GFP和AnnexinV共培养物进行成像,以得出活靶细胞和活T细胞数目。

[0926] 连续刺激测定

[0927] 使用CiTE制造工艺,对来自两例供体的T细胞进行工程化,使其表达ALPG/MSLN逻辑门(LG)以及编码SPA辅助蛋白的基因。在初始激活后的第9天,通过用ADAM10和 γ 分泌酶抑制剂预处理30分钟,随后与Fc缀合的重组ALPG蛋白在冰上孵育30min来分离经编辑的细胞。然后将细胞离心沉降,并重悬于含有ProteinG Dynabeads的PBS+BSA中。将细胞/珠混合物在室温下孵育15分钟,然后以400 $\times$ g离心沉降5min。将细胞/珠级分在PBS/BSA中洗涤1次,并重悬于包含12.5ng/mL人IL-7和IL-15的培养基中,并接种于24孔GREX板中。在24小时孵育期后,将细胞去珠并重悬于含有IL-7/15的T细胞培养基中。在24小时后,对T细胞进行计数并使用抗Myc PE抗体进行染色以确定PrimeR,并通过流式细胞术进行分析,以获得经

编辑细胞的最终百分比。然后将LG T细胞与同时表达PrimeR和CAR抗原 (ALPG/MSLN) 的RPMI细胞以1:100E:T比率共培养。将细胞在补充或不补充100IU/mL IL-2的情况下共培养。在初始共培养设置后,每2-3天更换培养基,用抗Myc PE抗体对细胞进行染色,并用CountBright珠通过流式细胞术进行测量,以获得每孔的T细胞和RPMI细胞总数。在获得细胞计数后,将细胞浓度以初始1:100比率作重新归一化。重复这个过程,直到所有T细胞都表现出失去肿瘤控制或研究终止。

[0928] 结果

[0929] 为了评估SPA表达对LG T细胞诱导的细胞毒性的影响,将表达SPA或对照的LG T细胞与同时表达PrimeR和CAR同源抗原 (ALPG/MSLN) 或仅表达CAR抗原 (MSLN) 的K562肿瘤细胞以三种不同的E:T比率共培养。在孵育72小时后,通过靶K562细胞的荧光素酶活性测量肿瘤细胞毒性。结果显示,表达SPA辅助分子的LG T细胞能够特异性地杀伤同时表达PrimeR和CAR同源抗原的肿瘤细胞(图6A和图6B)。

[0930] 为了评估表达SPA的LG T细胞在较长时间段内维持细胞毒性作用的能力,将表达SPA或对照蛋白的LG T细胞与同时表达PrimeR和CAR同源抗原 (ALPG/MSLN) 的K562肿瘤细胞以四种不同的E:T比率共培养。通过Incucyte在整个72小时期间内持续对共培养物进行成像,并得出T细胞和K562细胞计数。表达SPA辅助分子的LG T细胞在整个72小时期间内以与EGFRt对照回路相似的水平杀伤肿瘤细胞。(图7A)。表达SPA辅助分子的LG T细胞在整个72小时期间内表现出与EGFRt对照回路相似的T细胞扩增(图7B)。在另一项实验中,将L-gp130增强的LG T细胞与同时表达ALPG和MSLN的RPMI细胞以1:100E:T共培养。通过Incucyte在整个10天期间内持续对共培养物进行成像,并得出肿瘤细胞计数。与EGFRt LG T细胞相比,L-gp130 LG T细胞表现出极大改善的肿瘤控制,导致肿瘤完全清除(图8A)。示出了第10天的代表性孔图像(图8B和图8C)。

[0931] 连续刺激测定

[0932] 为了测量长期的靶向杀伤,对表达SPA的LG T细胞进行重复IL-2刺激。在不存在抗原刺激的情况下,用一组抗体对表达SPA或对照蛋白的经编辑的LG T细胞进行染色以表征其细胞分化状态,并通过流式细胞术进行分析。在基线水平(不存在刺激性抗原)下,与表达惰性EGFRt分子的LG T细胞相比,表达SPA的LG T细胞没有表现出改变的细胞分化状态(图9)。

[0933] 随后,在有或没有IL-2的情况下,在整个15天连续刺激测定中共培养LG T细胞和RPMI靶细胞。每2-3天将细胞以固定比率(1个肿瘤细胞:100个LG T)作重新归一化。在每次归一化之前,计算每个孔中肿瘤细胞和LG T细胞的数目并绘图。表达L-gp130的LG T细胞在整个测定期间内控制肿瘤细胞生长,而EGFRt对照LG T细胞失去控制(图10)。这些数据表明,与对照肿瘤细胞相比,L-gp130 LG T细胞不需要IL-2支持。整个31天重复刺激期间内的累积LG T细胞生长表明,L-gp130 LG T细胞控制肿瘤细胞生长的能力远远优于对照EGFRt LG T细胞。(图11A)。在存在IL-2的情况下,L-gp130 LG T细胞的扩增水平与对照EGFRt LG T细胞相似。在不存在IL-2的情况下,与测试的所有其他LG T细胞相比,表达L-gp130的LG T细胞中的LG T细胞扩增更优(图11B)。

[0934] 在15天的重复刺激后,将LG T细胞从培养物中取出,并在无细胞因子的培养基中孵育9天时间。在整个孵育期间测量LG T细胞计数。在不存在支持性细胞因子的情况下,先

前已被肿瘤抗原刺激的表达SPA的LG T细胞未能独立于支持性细胞因子或另外的抗原刺激而生长(图12)。在不存在或存在IL-2的情况下重复刺激15天后,通过流式细胞术评估T细胞分化表型。与表达EGFRt的LG T细胞相比,L-gp130 LG T细胞表现出更原初的表型(图13A和图13B)。表达L-gp130的LG T细胞的分化状态比对照LG T细胞对IL-2补充更敏感。(图14A和图14B)。IL-2驱动对照EGFRt LG T细胞的效应表型的分化,而L-gp130 LG T细胞则发展为分化程度较低的干记忆T细胞(Tscm)表型。L-gp130 LG T细胞的分化状态比对照LG T细胞对IL-2补充更敏感(图15A至图15D)。

[0935] 实施例3:通过FAS/PTPN2敲低调节SPA活性

[0936] 材料和方法

[0937] pSTAT信号传导

[0938] 来自多例供体的T细胞经含有编码SPA辅助蛋白的基因以及分别靶向FAS和PTPN2基因的shRNA模块的ALPG/MSLN回路进行CITE编辑,通过细胞内抗体染色来分析其STAT磷酸化状态。在电穿孔后第7天,洗涤细胞并在无细胞因子的无血清的培养基中培养。在37°C下20小时血清饥饿期后,将Zombie-Near Infrared染料以1:100稀释度添加到细胞培养基中。在孵育15min后,将等体积的BD Cytofix添加到细胞中,并将板在37°C下孵育15min。在固定后,将细胞以400×g离心沉降5min,重悬于200μL BD Perm Buffer III中,并在冰上孵育30min。然后将细胞用BD FACS缓冲液洗涤2次,并重悬于含有1:50抗Myc PE抗体(用于检测表达PrimeR的细胞)、1:10抗pSTAT5 A488和1:10抗pSTAT3 A647或抗pSTAT1 A647的FACS染色缓冲液中。在室温下孵育30min后,将细胞用200μL FACS缓冲液洗涤并重悬于100μL中。在Attune NxT流式细胞仪上获取数据。使用FSC和SSC参数指定T细胞的门。pSTAT数据按Myc+(经编辑的)T细胞分层。

[0939] 重复刺激测定

[0940] 使用CiTE制造工艺,对来自两例供体的T细胞进行工程化,使其表达ALPG/MSLN逻辑门以及编码SPA辅助蛋白的基因。在初始激活后的第9天,通过用ADAM10和γ分泌酶抑制剂预处理30分钟,随后与Fc缀合的重组ALPG蛋白在冰上孵育30min来分离经编辑的细胞。然后将细胞离心沉降,并重悬于含有ProteinG Dynabeads的PBS+BSA中。将细胞/珠混合物在室温下孵育15分钟,然后以400×g离心沉降5min。将细胞/珠级分在PBS/BSA中洗涤1次,并重悬于包含12.5ng/mL人IL-7和IL-15的培养基中,并接种于24孔GREX板中。在24小时孵育期后,将细胞去珠并重悬于含有IL-7/15的T细胞培养基中。在24小时后,对T细胞进行计数并使用抗Myc PE抗体进行染色以确定PrimeR,并通过流式细胞术进行分析,以获得经编辑细胞的最终百分比。然后将T细胞与同时表达PrimeR和CAR抗原(ALPG/MSLN)的K562细胞以1:1E:T比率共培养。在初始共培养设置后,每2-3天更换培养基,用抗Myc PE抗体对细胞进行染色,并用CountBright珠通过流式细胞术进行测量,以获得每孔的T细胞和RPMI细胞总数。在获得细胞计数后,将细胞浓度以初始1:1比率作重新归一化。将这一过程重复14天。

[0941] 结果

[0942] 表达SPA以及惰性双荧光素酶靶向性shRNA模块的经编辑的T细胞表现出高于编码编码截短的EGFRt的基因的T细胞的pSTAT水平(图16A至图16B)。同时表达SPA和FAS/PTPN shRNA模块的T细胞表现出pSTAT水平的额外增加。在驱动STAT3的SPA(L-gp130)和驱动STAT5的SPA(C7R)中均观察到加和效应。

[0943] 为了测量Fas/PTPN2模块与SPA的组合对长期靶向杀伤的影响,对具有shRNA模块的表达SPA的T细胞进行重复IL-2刺激。在存在IL-2的情况下,在整个14天重复刺激测定中,将表达SPA或对照蛋白的经编辑的T细胞与K562细胞以1:1比率共培养。每2-3天将细胞以固定比率作重新归一化。在每次归一化之前,计算每个孔中肿瘤细胞和T细胞的数目并绘图。表达L-gp130的T细胞在整个测定期间内控制肿瘤细胞生长,而EGFRt对照T细胞失去控制(图17A)。表达Fas/PTPN2模块的经编辑的T细胞在有和没有SPA的情况下都表现出增强的抗肿瘤活性。同时表达L-gp130 SPA和Fas/PTPN2shRNA模块的T细胞表现出最有效力的杀伤。在15天的重复刺激后,通过流式细胞术评估T细胞分化表型。与表达EGFRt的细胞相比,L-gp130 T细胞表现出更原初的表型,并且这种趋势在存在Fas/PTPN2 shRNA模块的情况下得以保留(图17B)。

[0944] 实施例4:表达SPA的LG T细胞的基因表达谱分析

[0945] 材料和方法

[0946] 重复刺激测定

[0947] 如上所述在重复刺激测定中对表达SPA(有或无FAS/PTPN2模块)的ICT(集成回路T细胞)进行攻击。在14天RSA后,通过流式细胞术使用PrimeR(Myc)和CAR(Flag)表面表达来区分ICT与靶标细胞,从而将ICT与靶K562细胞分离。

[0948] ATAC-Seq

[0949] 根据先前发表的报告(Corces等人Nature Methods 2017)进行ATAC-Seq(使用高通量测序的转座酶可及染色质测定,Assay for Transposase-Accessible Chromatin with high-throughput程序)。简单来说,将50,000个活细胞在4℃下以500RCF离心5min。为了分离细胞核,将细胞团块重悬于50μL含有0.1% NP40、0.1% Tween 20和0.01%洋地黄皂苷的冷ATAC重悬缓冲液(RSB)中,并在冰上孵育3分钟。然后,添加1mL仅含有0.1% Tween-20的冷ATAC-RSB。将分离的细胞核在4℃下以500RCF离心10min,并小心地去除上清液。为了实现可及染色质基因组区的转座,将细胞核团块重悬于25μL 2×TD缓冲液、100nM最终Tn5转座酶、16.5μL PBS、0.5μL 1%洋地黄皂苷、0.5μL 10% Tween-20中,并在37℃下以1000RPM振荡孵育30分钟。使用Zymo DNA Clean and Concentrator-5Kit净化转座反应物,并使用Illumina条形码化的Nextera引物对洗脱的转座DNA进行扩增,共5个循环。对首次PCR反应物的10%进行定量PCR(qPCR),以确定扩增条形码化文库的额外PCR循环而不达到饱和。进行额外的PCR循环以获得最终的ATAC-Seq文库。50,000个细胞的PCR循环数通常约为12个循环。然后在Agilent Tapestation D5000测定中对ATAC-Seq文库进行定量和定性,重点关注200bp-1000bp的大小范围。将ATAC-Seq文库汇集并在Illumina NovaSeq6000SP流动池(v1.5)上以双端150bp测序,双索引样本使用8bp的索引1和索引2。每个ATAC-Seq文库的测序目标为20-30M读段。fastq文件是使用bc12fastq脚本(v2.20.0.422)生成和解复用的。ATAC-seq读段首先使用cutadapt(v3.5)修剪掉衔接子序列,然后使用BWA(0.7.17)与GRCh38对齐。在下游分析之前使用Picard(v2.26.10)MarkDuplicates程序识别PCR重复序列并去除。使用ArchR(v1.0.1)计数整个基因组中ATAC-seq读段的堆积并生成ATAC峰图。

[0950] RNAseq

[0951] 对于大量RNA分离,使用RNEasy Plus Micro试剂盒按照制造商的方案分离RNA。使用Qubit RNA HS测定试剂盒对RNA进行定量,并使用带有RNA筛选带的Tape station仪器评

估RNA质量。使用TruSeq RNA文库制备试剂盒v2(Illumina)制备RNA文库。按照供应商的方案,使用100ng RNA样本,除非受样本浓度限制,在这种情况下使用全部RNA样本($\leq 50\mu\text{l}$)进行文库制备。将文库浓度以2nM作归一化并汇集。使用Novaseq 6000仪器采用100/200循环Novaseq SP试剂盒(Illumina)进行测序。使用STAR(v2.7.7a)将RNA-seq读段与GRCh38对齐。另外使用STAR定量基因表达。使用edgeR(3.28.1)进行归一化和差异表达检验,截止值为FDR <0.05 ,除了gp130存在/不存在以外,还增加了供体和采集日的模型系数。

[0952] 结果

[0953] 在14天重复刺激测定后,RNAseq分析鉴定出超过2000个基因相较于在对照EGFRt ICT中在gp130 ICT中差异表达(图18A)。差异调节的基因代表了各种类别,包括检查点分子、细胞表面受体、T细胞记忆和耗竭标记物,以及其他值得注意的T细胞转录因子(图18B)。数据中一个值得注意的趋势是,第14天的gp130 ICT比其他测试组更接近第0天的样本。

[0954] ATAC-seq分析揭示,与EGFRt或C7R ICT相比,gp130 ICT中不同基因座的染色质可及性存在差异(图19)。还通过ATAC-seq分析了表达L-gp130的逻辑门ICT,以评价第0天和在14天重复刺激测定后两种耗竭标志物TIGIT和TOX的染色质可及性变化。表达L-gp130的ICT显示关键耗竭标志物TIGIT和TOX的可及性受到限制(图19),表明L-gp130表达保留了干T细胞表型。一些具体实例包括TIGIT和TOX基因座的转录活性减弱,如这些基因座上的读段减少所表明。大量RNA seq分析中RNA水平上检测到的这些转录物的减少,证实了这一转录减少。

[0955] 实施例5:表达SPA的LGT细胞的体内表征

[0956] 材料和方法

[0957] 表达mbIL-15或C7R的LG T细胞的表征

[0958] 对表达SPA的LG T细胞的体内探查的细节详述于图20中。向NSG MHC-DKO小鼠(Jackson Laboratories,025216)皮下移植 1×10^6 个表达ALPG和MSLN抗原的MST0细胞。(n=6-10/臂)。当肿瘤达到 100mm^3 时,IV注射如上所详述制备的LG T细胞。每周用卡尺测量肿瘤3次,并且每周抽取一次外周血用于PK研究。将配有mbIL-15或C7R的LG T细胞与表达对照EGFRt的LG T细胞进行比较。用卡尺测量肿瘤体积并测量体重。如上文实施例3进行细胞计数。

[0959] 表达L-gp130或C7R的LGT细胞的表征

[0960] 对表达SPA的LG T细胞的体内探查的细节详述于图21中。向NSG MHC-DKO(Jackson Laboratories,025216)小鼠皮下移植 1×10^6 个表达ALPG和MSLN抗原的MST0-211H细胞。(n=10/臂)。当肿瘤达到 100mm^3 时,IV注射如上所详述制备的LG T细胞。每周用卡尺测量肿瘤3次,并且每周抽取一次外周血用于PK研究。将配有C7R或L-gp130的LG T细胞与表达对照EGFRt/NGFRt分子的LG T细胞进行比较。用卡尺测量肿瘤体积并测量体重。如上文实施例3进行细胞计数。

[0961] 肾细胞癌模型中表达L-gp130或C7R的LGT细胞的表征

[0962] 对表达SPA的LG T细胞的体内探查的细节详述于图24A中。为了评价ICT的治疗效果,在6-7周龄NSG MHC DKO雌性小鼠的右侧背侧腹皮下注射在50% Sigma-Aldrich细胞外基质E1270/PBS悬浮液中的 2×10^6 个786-O-EFG-CA9-ALPG/MSLN_MCB肿瘤细胞。在第10天检查小鼠有无可触及的肿瘤。从第32天开始,每周对小鼠进行两次测量,直至它们表现出平均肿

瘤体积大约为 300mm^3 。在肿瘤植入后第42天,小鼠的平均肿瘤体积达到 299mm^3 ,将小鼠随机分为10组,每组由7-8只小鼠组成。在随机化后,将T细胞解冻并静置过夜以进行静脉内注射(I.V.)。在第42天,收获T细胞并进行归一化以供I.V.注射。将T细胞以 $0.3\text{e}6$ 和 $0.05\text{e}6$ 的剂量悬浮于 $100\mu\text{L}$ PBS中。在治疗后,每周两次监测小鼠的肿瘤体积、体重和临床观察。各小鼠于治疗后第5、12、19、40天放血,并经由下颌下静脉采集 $100\mu\text{L}$ 血液。对血液进行处理以进行ICT的免疫表型分析,并对总T细胞和经编辑的T细胞进行定量。

[0963] 结果

[0964] 比较LG T细胞中的SPA与对照EGFRt。表达C7R的LG T细胞在100%的小鼠中实现完全应答(CR),这一比率比表达EGFRt的细胞(3/10)高约9倍。表达mbIL-15的LG T细胞在7/10小鼠中实现CR,这一比率比表达EGFRt的细胞高约5倍(图22A)。所有组的CR结果提供于表E中。抗肿瘤功效与血液中检测到的LG T细胞扩增相关,最终LG T细胞收缩(图22B)。在实验终点,分离脾脏LG T细胞并进行计数。绘制了经编辑细胞总计数,显示出SPA LG T细胞相较于EGFRt LG T细胞对照组的倍数增加(图22C)。

[0965] 表E示出了用表达指示SPA分子的LG T细胞或对照治疗的小鼠的CR结果

表 E	
组	CR
PBS	0/10
RNP	0/10
EGFRt	3/10
mbIL15	7/10
C7R	8/8

[0967] 表达L-gp130和C7R的LG T细胞比EGFRt LG T细胞更好地清除肿瘤,所有小鼠的CR为100%,而对照小鼠的CR为0%(图23A)。抗肿瘤功效与血液中检测到的LG T扩增相关(图23B)。

[0968] 用表达L-gp130 SPA的ICT治疗的786-0移植小鼠比用表达EGFRt的对照ICT治疗的小鼠更好地控制肿瘤,其中10/10的小鼠实现CR,而对照组为0/10(图24B)。血液PK证明表达gp130的T细胞增殖得到改善,在T细胞注射后19天观察到最大扩增,而对照组中检查的0/6小鼠在血液中有可检测的经编辑T细胞水平(图24C)。数据表明,在另一种癌症模型(肾细胞癌)中,配有SPA的ICT提高了肿瘤清除率。

[0969] 实施例6:具有诱导型细胞因子表达的LG T细胞的体外分析

[0970] 材料和方法

[0971] 细胞因子分泌分析

[0972] 对T细胞进行工程化,使其表达ALPG启动受体(primeR)(SEQ ID NO:24)和MSLN CAR(SEQ ID NO:31),并在primeR激活后具有IL-2(SEQ ID NO:74)的诱导型表达(“LG T细胞”)。将工程化T细胞与不表达抗原、仅表达primeR抗原(ALPG)或同时表达primeR和CAR抗原(MSLN/ALPG)的K562靶细胞共培养72小时。收集上清液,通过Milliplex MAP人高灵敏度T

细胞组预混合21重物(Milliplex MAP Human High Sensitivity T cell Panel Premixed 21-plex)进行细胞因子定量。

[0973] 终点荧光素酶测定

[0974] 对T细胞进行工程化,使其表达ALPG启动受体(primeR)(SEQ ID NO:24)和MSLN CAR(SEQ ID NO:31),并在primeR激活后具有IL-2(SEQ ID NO:86)的诱导型表达。将工程化T细胞、仅表达逻辑门的T细胞和仅RNP对照细胞与不表达抗原或同时表达ALPG和MSLN的K562靶细胞共培养72小时。将T细胞重悬于培养基中,并进行连续稀释,然后添加到96孔平底白壁测定板中。在以技术重复每孔添加 1×10^4 个靶细胞后,连续稀释T细胞产生以下共培养效应物:靶标(E:T)比率:1:1、1:3和1:9。将每个T细胞群体与不表达抗原或同时表达PrimeR和CAR抗原(ALPG/MSLN)的荧光素酶+K562肿瘤细胞系共培养。使用终点荧光素酶测定测量72小时共培养结束时的细胞毒性。在将荧光素酶底物直接添加到孔中后,在PHERAstar读板器中收集数据。通过将仅含有K562细胞的孔的发光设置为基线,并将荧光素酶的减少绘制为“溶解百分比”,将数据归一化。

[0975] 重复刺激测定

[0976] 将来自两例或三例供体的T细胞工程化,使其表达ALPG启动受体(primeR)(SEQ ID NO:24)和MSLN CAR(SEQ ID NO:31),并在primeR激活后具有IL-2(SEQ ID NO:86)的诱导型表达,在表达构建体中有两种不同的细胞因子放置取向:有效载荷-2A(自裂解肽)-CAR或CAR-2A-有效载荷。将LG T细胞在含有12.5ng/mL人IL-7和IL-15的培养基中共培养。在电穿孔7天后,分别使用抗myc PE和抗Flag APC对逻辑门CAR T细胞进行染色以确定PrimeR和CAR表达,并通过流式细胞术进行分析。漏性(Leakiness)(抗原非依赖性CAR表达)是通过将CAR阳性群体%除以总primeR+群体来计算的。

[0977] 重复刺激测定

[0978] 对T细胞进行工程化,使其表达ALPG启动受体(primeR)(SEQ ID NO:24)和MSLN CAR(SEQ ID NO:31),并在primeR激活后具有IL-2(SEQ ID NO:86)或Super-2(SEQ ID NO:132)的诱导型表达。将经编辑的细胞与表达PrimeR和CAR抗原(MSLN/ALPG)的K562靶细胞以1:1E:T比率共培养。将未经工程化而具有诱导型IL-2表达的对照细胞在含有外源IL-2的培养基或对照培养基中培养。在2-3天共培养期后,更换T细胞培养基,用抗Myc PE抗体对细胞进行染色,并用CountBright珠通过流式细胞术进行测量,以获得每孔的T细胞和RPMI细胞总数。在获得细胞计数后,将细胞浓度以初始1:1比率作重新归一化。在14天期间内重复这一过程。

[0979] 结果

[0980] 对LG T细胞进行工程化,使其在primeR刺激下具有诱导型IL-2表达。将工程化细胞与不表达抗原、表达primeR抗原(ALPG)或同时表达primeR和CAR抗原(ALPG/MSLN)的靶细胞以1:1E:T比率共培养(图25A)。在72小时共培养后,与启动抗原接合后IL-2分泌水平表明,细胞因子分泌是由primeR的激活诱导的。此外,与primeR和CAR抗原两者共培养增强了IL-2分泌(图25B)。这表明LG T细胞中的诱导型细胞因子表达可以提供一种向肿瘤微环境递送高水平细胞因子有效载荷的方法。

[0981] 为了评估诱导型细胞因子表达对表达逻辑门的T细胞的功能的影响,对LG T细胞进行工程化,使其在启动受体primeR或对照刺激后具有诱导型IL-2表达。将两组工程化T细

胞以及仅RNP对照细胞与不表达抗原或同时表达primeR和CAR抗原的靶细胞一起孵育72小时(图26A)。对于具有诱导型IL-2表达的LG1 T细胞、对照LG T细胞或仅RNP T细胞,未观察到不表达抗原的靶细胞的细胞毒性(图26B)。然而,对照LG T细胞和具有诱导型IL-2表达的LG T细胞均诱导同时表达primeR和CAR抗原的靶细胞的剂量依赖性细胞毒性(图26C)。这些结果表明,向LG T细胞加入诱导型细胞因子表达不会损害其抗肿瘤活性。

[0982] 为了评估细胞因子相对于CAR的取向的影响,将LG T细胞工程化为表达紧邻CAR上游或下游的细胞因子。在不启动抗原(ALPG)的情况下,所有T细胞应为未经编辑的(PrimeR-CAR-)或PrimeR+CAR-。漏性被定义为启动抗原非依赖性CAR+T细胞表达(图27A)。与有效载荷置于CAR下游的取向(CAR-2A-有效载荷)(图27C)相比,当有效载荷置于CAR上游时(有效载荷-2A-CAR),SS1逻辑门的漏性增加(图27B)。

[0983] 为了评估诱导型细胞因子表达是否可以增强LG T细胞的活性,对LG T细胞进行工程化,使其在primeR刺激后具有诱导型IL-2表达或控制。然后在14天期间内每2-3天用表达primeR和CAR抗原的靶细胞重复刺激LG T细胞,并连续进行细胞计数。还在存在外源IL-2或对照培养基的情况下孵育对照LG T细胞。具有诱导型IL-2表达的LG T细胞在14天刺激中显示出最高程度的扩增,与外源IL-2一起孵育的对照细胞在实验过程中也显示出扩增(图28)。相比之下,在不启动细胞因子的情况下刺激的LG T细胞在刺激过程中并未显著扩增。此外,在一项单独的实验中,“Super-2”(一种修饰的IL-2变体,其增强IL-2受体的激活)的诱导型表达显示出与野生型IL-2相似的对LG T细胞扩增的影响(图29)。这些结果表明,诱导型细胞因子表达增强了T细胞在持续抗原刺激下的持久性,这可能与肿瘤微环境中存在的条件相似。

[0984] 实施例7:诱导型细胞因子表达的可调性评估

[0985] 材料和方法

[0986] 细胞因子分泌分析

[0987] 对T细胞进行工程化,使其表达ALPG启动受体(primeR)(SEQ ID NO:24)和MSLN CAR(SEQ ID NO:31),并在primeR激活后具有IL-2(SEQ ID NO:86)、IL-12/23p40(SEQ ID NO:94)、IL-18(SEQ ID NO:98)或IL-21(SEQ ID NO:90)的诱导型表达。将工程化T细胞与不表达抗原、仅表达primeR抗原(ALPG)或同时表达PrimeR和CAR抗原(MSLN/ALPG)的K562靶细胞共培养72小时。收集上清液,通过Milliplex MAP人高灵敏度T细胞组预混合21重物进行细胞因子定量。

[0988] 重复刺激测定

[0989] 对T细胞进行工程化,使其表达ALPG启动受体(primeR)(SEQ ID NO:24)和MSLN CAR(SEQ ID NO:31),还具有IL-2(SEQ ID NO:86)、IL-12/23p40(SEQ ID NO:94)、IL-18(SEQ ID NO:98)或IL-21(SEQ ID NO:90)的诱导型表达。将经编辑的细胞与表达primeR和CAR抗原(MSLN/ALPG)的K562靶细胞以1:1E:T比率共培养。将未经工程化而具有诱导型IL-2表达的对照细胞在含有外源IL-2的培养基或对照培养基中培养。在2-3天共培养期后,更换T细胞培养基,用抗Myc PE抗体对细胞进行染色,并用CountBright珠通过流式细胞术进行测量,以获得每孔的T细胞和RPMI细胞总数。在获得细胞计数后,将细胞浓度以初始1:1比率作重新归一化。在14天期间内重复这一过程。

[0990] 信号肽对细胞因子分泌的影响的分析

[0991] 制备构建体以将IL-7 (SEQ ID NO:88)可操作地连接至来自以下的信号肽: IgKVIII (SEQ ID NO:118)、CD44 (SEQ ID NO:100)、tPA (SEQ ID NO:130)、胰蛋白酶原 (SEQ ID NO:114)、CD5 (SEQ ID NO:104)、IL-2 (SEQ ID NO:108)、secrecon (SEQ ID NO:128)、CD3E (SEQ ID NO:102)、IgE (SEQ ID NO:120)、OSM (SEQ ID NO:122)、ITGAL (SEQ ID NO:106)、GMCSF (SEQ ID NO:110)、糜蛋白酶原 (chymotrypsinogen) (SEQ ID NO:112)、IgK (SEQ ID NO:116)、IgG2H (SEQ ID NO:124) 或 BM40 (SEQ ID NO:126)。对LG1 T细胞进行工程化,使其在primeR激活后在各信号肽下具有IL-7的诱导型表达。将工程化T细胞与表达ALPG和MSLN的K562靶细胞共培养72小时。收集上清液,通过Milliplex MAP人高灵敏度T细胞组预混合21重物进行细胞因子定量。

[0992] 结果

[0993] 对LG T细胞进行工程化,使其在primeR激活后具有IL-2、IL-12/23p40、IL-18或IL-21的诱导型表达。将工程化细胞与同时表达primeR和CAR抗原的靶细胞共培养。与对照LG T细胞相比,观察到所有细胞因子的强诱导型分泌 (图30)。此外,与对照LG T细胞相比,具有这些细胞因子中每一者的诱导型表达的LG T细胞在14天重复刺激中显示出增强的扩增 (图31)。这些结果表明,多种细胞因子可以被LG T细胞诱导型表达,从而对T细胞产生多种期望的影响。

[0994] 为了进一步评估诱导型细胞因子表达的可调性,将IL-7工程化以连接至多种非天然信号肽 (图32A)。创建了表达这些构建体中每一者的LG T细胞,这些构建体在primeR刺激下具有诱导型表达。将表达这些构建体中每一者的工程化细胞与同时表达primeR和CAR抗原的靶细胞共培养。显示分泌的IL-7的水平根据所使用的具体信号肽而变化 (图32B)。来自IgKVIII和CD44的信号肽产生最低的IL-7相对分泌水平,而BM40和IgG2H产生最高的IL-7相对分泌水平。这些结果表明,可以通过选择特定的非天然信号肽来调节诱导型细胞因子分泌 (以及随后的信号传导激活)。

[0995] 实施例8:具有诱导型细胞因子表达的LG T细胞的体内表征

[0996] 材料和方法

[0997] 将50% Matrigel中的 1×10^6 个MST0-211H-MSLN-ALPG细胞皮下植入6至7周龄雌性NSG MHC I/IIIDKO小鼠 (Jax) 中。在肿瘤体积大约为80-150mm³时对小鼠进行分期。经由尾静脉注射 2×10^6 个表达ALPG启动受体 (primeR) (SEQ ID NO:24) 和MSLN CAR (SEQ ID NO:31) 并在primeR激活后具有EGFRt对照 (SEQ ID NO:84)、IL-2 (SEQ ID NO:86)、IL-7 (SEQ ID NO:88) 或IL-21 (SEQ ID NO:90) 的诱导型表达的T细胞。在研究过程中,通过卡尺测量肿瘤体积。在LG T细胞施用后7、14、21、28和42天通过眶后取血收集100μL小鼠全血,并通过流式细胞术测量T细胞滴度。

[0998] 结果

[0999] 评估用仅RNP对照T细胞、表达EGFRt对照的LG T细胞和具有IL-2、IL-7或IL-21诱导型表达的LG T细胞治疗的荷瘤小鼠的抗肿瘤应答。与未治疗对照相比,用诱导型表达任一细胞因子的LG T细胞治疗的小鼠显示出强劲的肿瘤生长阻遏,而用表达EGFRt对照的LG T细胞治疗的小鼠显示出相对更有限的肿瘤生长阻遏,并且用仅RNP T细胞治疗的小鼠未显示出肿瘤阻遏改善 (图33A)。另外,与对照T细胞相比,表达任一诱导型细胞因子的LG T细胞显示出增加的扩增 (图33B)。在治疗后15天观察到T细胞扩增峰值,其中诱导型表达IL-2、

IL-7或IL-21的LG T细胞的扩增分别比表达EGFRt对照的LG T细胞增加4.6倍、5.7倍和5.7倍。(图33C)。这些结果表明,将细胞因子的诱导型表达与primeR/CAR逻辑门相结合,相对于对照增强了LG T细胞的抗肿瘤活性。

[1000] 实施例9:表达包括基因表达阻遏因子和SPA和/或细胞因子的组合的LG T细胞的高通量筛选

[1001] 材料和方法

[1002] T细胞的编辑和归一化:

[1003] 为了生成T细胞文库以进行筛选,将来自2例供体的T细胞与编码CAR、PrimeR以及包括合成途径激活因子、细胞因子和用于基因沉默的sgRNA的组合的质粒一起在384孔板中孵育。经编辑细胞产生的图解示于图34A中。用Ki-67对经编辑的细胞进行染色以测量细胞计数。在开始连续刺激测定之前,对Ki-67数据进行处理,并对细胞的总计数和经编辑细胞分数进行归一化。归一化工作流程的详细示意图示于图34B中。

[1004] 连续刺激测定:

[1005] 为了评价工程化T细胞的溶细胞和增殖能力,进行了连续刺激测定。简单来说,将工程化T细胞和肿瘤细胞以1:100(250个经编辑的T细胞:25K个RPMI 8226靶细胞)接种于完全RPMI培养基(RPMI 1640+glutamax、10%胎牛血清、15ng/ul庆大霉素)。在每次共培养中,用RPMI培养基每周进行3次(每2-3天)培养基更换。在共培养的第12天进行分裂和再攻击。为了分裂共培养物,将每个孔混合以获得均匀混合物,获取25%的体积(50μl)并重新铺到新板中。为了再攻击细胞,将25K个肿瘤细胞引入含有分裂共培养细胞的新板中。在共培养14天时,测定结束,通过Incucyte使用制造商的方案测量靶细胞计数和T细胞计数。连续刺激测定设置和输出的详细示意图示于图34C中。

[1006] 结果

[1007] 连续刺激测定筛选的归一化结果示于图35A和图35B中。在各种测试组合中观察到范围广泛的RPMI对照细胞计数,表明不同的模块组合导致不同的功能输出。从L-gp130 SPA和IL-2模块的组合中一致观察到高性能。图35C示出了与阳性对照pS11732和pS8893相比较的前20佳组合,其中一些组合导致靶细胞计数阻遏增加超过8倍。总体而言,18%的组合在基于减少的靶细胞计数的LG T细胞活性增加方面表现优于单模块回路(图36A),并且25%的组合在LG T细胞计数增加方面表现优于单模块回路(图36B)。

[1008] 然而,并非所有组合都会产生加和效应。例如,与单独的L-gp130或sgRNA相比,L-gp130与靶向PTPN2的sgRNA的组合并未导致LG T细胞扩增的改善(图37A)。类似地,与单独的C7R或sgRNA相比,C7R与靶向CISH的sgRNA的组合并未导致靶细胞计数额外减少(图37B)。

[1009] 为了进一步评估L-gp13和IL-2的潜在超加和效应,使用固定CAR模块并在每个测试背景中进行了ANOVA分析。简单来说,ANOVA模型交互项系数的标称p值<0.05。系数>0表明RPMI比加和效应预期更多(更差),而系数<0表明RPMI比加和效应预期更少(更好)。分析表明,与基于加和效应的预期值相比,L-gp130和IL-2在LG T细胞中的共表达导致T细胞扩增增加195%且靶细胞计数减少27%,表明LG T细胞中两个模块之间存在相互作用(图37C)。

[1010] 筛选的另一个观察结果是发现L-gp130和IL-12之间存在冗余。如上所述使用固定CAR模块在每个测试sgRNA中进行的ANOVA分析表明,L-gp130和IL-12独立地增加LG T细胞活性(基于减少的靶细胞计数),当这两者组合时,这种效应几乎完全消失(图37D)。

[1011] 实施例10:表达包括一种或多种shRNA、另外的基因表达阻遏因子以及SPA和/或细胞因子的组合的LG T细胞的分析

[1012] 材料和方法

[1013] T细胞的编辑和归一化:

[1014] 为了生成T细胞文库以进行筛选,将来自2例供体的T细胞与编码CAR、PrimeR以及包括一种或多种shRNA、合成途径激活因子、细胞因子和用于基因沉默的sgRNA的组合的质粒一起在384孔板中孵育。用Ki-67对经编辑的细胞进行染色以测量细胞计数。在开始连续刺激测定之前,对Ki-67数据进行整理,并对细胞的总计数和经编辑细胞分数进行归一化。

[1015] 连续刺激测定:

[1016] 为了评价工程化T细胞的溶细胞和增殖能力,进行了连续刺激测定。简单来说,将工程化T细胞和肿瘤细胞以1:50 (500个经编辑的T细胞:25K个RPMI 8226靶细胞)接种于经或不经5ng/ml TGF- β 处理的完全RPMI培养基(RPMI 1640+glutamax、10%胎牛血清、15ng/u1庆大霉素)。在每次共培养中,用经或不经5ng/ml TGF- β 处理的RPMI培养基每周进行3次(每2-3天)培养基更换。在共培养的第9天和第12天进行分裂和再攻击。为了分裂共培养物,将每个孔混合以获得均匀混合物,获取25%的体积(50 μ l)并重新铺到新板中。为了再攻击细胞,将25K个肿瘤细胞引入含有分裂共培养细胞的新板中。在共培养14天时,测定结束,通过Incucyte使用制造商的方案测量靶细胞计数和T细胞计数。

[1017] 结果

[1018] 为了建立细胞因子背景,制备LG T细胞以表达靶向Fas (SEQ ID NO:171)和PTPN2 (SEQ ID NO:167)的shRNA、单独靶向Fas的shRNA,或靶向Fas和PTPN2的shRNA与靶向CISH (SEQ ID NO:164)、RASA2 (SEQ ID NO:161)、SOCS1 (SEQ ID NO:162)或ZC3H12A (SEQ ID NO:163)的sgRNA的组合。然后在对照培养基或补充有IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18或IL-21之一的培养基中对细胞进行连续刺激测定。结果显示,无论遗传背景如何,补充IL-2和IL-15都具有最佳的肿瘤控制和ICT扩增(图38)。补充IL-2和IL-15后,Fas敲低(KD)/CISH敲除(KO)、Fas KD/ZC3H12A KO和仅Fas KD显示出实验中测试的最强效力。未经细胞因子处理或在非IL-2/IL-15条件下,Fas KD/RASA2KO是实验中测试的最有效力的组合。

[1019] 为了筛选shRNA盒,用shRNA、诱导型有效载荷、sgRNA和SPA的组合来制备ICT细胞,如图39A中详述。表F详述了筛选中使用的构建体。

[1020] 表F

[1021]	构建体	SEQ ID NO
	荧光素酶 shRNA (对照)	173 和 174
	Fas shRNA	168
	<i>PTPN2</i> shRNA	166
	<i>TGFBR2</i> shRNA	171 和 172
	<i>TGFBR1</i> shRNA	169 和 170
	<i>RASA2</i> shRNA	165
	<i>CISH</i> shRNA	167
	NGFR 有效载荷(对照)	175
[1022]	IL-2	86
	IL-12	92
	非靶向对照 sgRNA	159
	靶向 <i>CISH</i> 的 sgRNA	164
	靶向 <i>RASA2</i> 的 sgRNA	161
	靶向 <i>SOCS1</i> 的 sgRNA	162
	靶向 <i>ZC3H12A</i> 的 sgRNA	163
	L-gp130 (SPA.I)	75

[1023] 然后在培养基中添加或不添加TGF- β 的情况下对工程化细胞进行连续刺激测定。结果显示,诱导型表达IL-2的所有测试条件均显示效力增加超过5倍(图39B)。结果还显示,诱导型IL-2提高了共表达SPA的ICT的效力,RASA2 KO进一步提高了这一效力。

[1024] 为了进一步评估诱导型IL-2表达和RASA2阻遏组合的效应,如上所述用另外的SPA和有效载荷制备ICT细胞,并在TGF- β 存在(图40A)或不存在(图40B)的情况下进行连续刺激测定。对有或没有细胞因子有效载荷表达的组分的分析表明,诱导型IL-2表达加上L-gp130表达与RASA2、CISH、PTPN2或NTC sgRNA是表现最佳的构建体,IL-2表达、L-gp130和RASA2敲除的组合显示出最强的肿瘤控制。(图40C)。另外,在有或没有IL-2有效载荷的情况下,C7R+RASA2、CISH或PTPN2 KO具有与L-gp130相当的性能。

[1025] 实施例11:表达合成途径激活因子和细胞因子有效载荷的LG T细胞的体内分析

[1026] 材料和方法

[1027] 为了确定L-gp130 SPA+IL-2组合模块的抗癌功效,利用了晚期MSTO-211H-EFG-ALPG^h/MSLN^h皮下异种移植模型。将50%matrigel中的1x10⁶个MSTO-211H-EFG-ALPG^h/MSLN^h接种到六至七周龄的雌性NSG MHC I/IIDKO小鼠的右背侧腹。在肿瘤接种后第28天,平均肿瘤体积达到300mm³,将荷瘤动物随机分为不同的治疗组,使得每组的平均肿瘤体积在总平

均值的10%以内。向小鼠静脉内注射单剂量0.05、0.1、0.3和 0.7×10^6 个含L-gp130或L-gp130+IL-2的ICT,并且以相当于L-gp130+IL2群组中施用的总T细胞的最高剂量施用阴性对照RNP T细胞。如上所述在治疗当天对小鼠进行固定体积(200 μ L)单独给药。每周两次监测肿瘤生长和体重。通过存活技术在第7、14、21、42、56和70天将全血样本采集到K₂EDTA管中,并进行处理以对总T细胞和受体阳性T细胞进行染色。在第1、3、7、14、21、42、56天将全血样本采集到血清分离管中,处理成血清并快速冷冻。按照制造商的方案通过Luminex 13-plex测定评估血清样本的人细胞因子浓度。在研究结束时或达到安乐死标准时,对动物进行尸检以检查肝脏、肺、脾脏、肾脏、心脏、脑和肿瘤。将组织快速冷冻或固定在10%中性缓冲福尔马林中24小时,并储存在70%试剂级乙醇中用于封固和切片

[1028] 结果

[1029] 与表达L-gp130和对照细胞因子NGFR的ICT细胞相比,评估了表达细胞因子IL-2有效载荷和L-gp130的ICT细胞的体内功效和效力。如图41A和图41B所示,在MST0(间皮瘤)体内模型中,与单独表达L-gp130(SPA.I)的ICT细胞相比,表达L-gp130(SPA.I)和IL2有效载荷的ICT细胞的效力增强了超过14倍。图41A示出了用指示ICT细胞治疗后小鼠的平均肿瘤体积。图41B示出了T细胞注射后7、14、21和42天的总T细胞。在控制肿瘤体积方面,0.05e6SPA.I加IL2 ICT细胞剂量优于0.7e6仅SPA.I T细胞剂量。因此,在晚期MST0肿瘤模型中,IL-2有效载荷模块显著提高了SPA.I ICT细胞效力。

[1030] 在0.7e6高剂量SPA.I加IL-2ICT细胞组中,仅在一只动物中检测到血清IL-2(图42)。在晚期MST0肿瘤模型中,除高剂量组(0.7e6个经编辑的T细胞/小鼠)的一只动物外,IL-2有效载荷模块在评估时间点(第1、3、7、14、21和42天)与小鼠血清中可检测到的人IL-2不对应(图42)。因此,IL-2有效载荷没有释放到体内循环中。

[1031] 纳入IL-2有效载荷模块确实与评估时间点小鼠血清中可检测到的人IFN- γ 的增加相对应。在给予0.7e6个、0.3e6个和0.1e6个L-gp130(SPA.I)加IL-2ICT细胞的动物中,在注射后第14、21和42天在小鼠血清中检测到IFN- γ (图42)。在给予最低剂量0.05e6个L-gp130(SPA.I)加IL-2ICT细胞的动物中,在注射后第42天在小鼠血清中也检测到IFN- γ (图42)。相比之下,仅表达L-gp130(SPA.I)的ICT细胞仅在较高细胞剂量(0.7e6和0.3e6)下在第14天和第21天诱导非常低水平的可检测IFN- γ 。

[1032] 实施例12:其他免疫细胞有效载荷增强的体外验证

[1033] 材料和方法

[1034] 如前所述,将冷冻保存的T细胞激活并进行培养,以准备进行DNA敲入。在激活2天后,从CD3/CD28珠中取出T细胞,并用靶向TRAC基因座的Cas9 RNP和编码NY-ESO TCR的DNA质粒进行电穿孔。在电穿孔后,将T细胞在IL-7和IL-15中再培养5天,然后通过流式细胞术评估是否成功敲除TRAC,并通过四聚体和TCR V β 13.1抗体染色评估是否敲入NY-ESO TCR。然后通过PE-TCR V β 13.1抗体、生物素化抗PE抗体和链霉亲和素珠来富集TCR敲入的T细胞。在富集后,将TCR敲入的T细胞以每孔10,000个TCR+T细胞接种于含有10,000个表达mCherry的A375靶细胞的96孔中。根据制造商的说明,在incucyte仪器中随时间推移通过荧光成像来评估肿瘤细胞杀伤。将培养物维持在RPMI1640培养基+10% FBS+/-1ng/ml IL-2或IL-15中。每3天,将每孔中的非贴壁细胞按1:1分开,其中一半用10,000个新鲜A375靶细胞重新接种,共进行4次靶细胞刺激。在各次刺激之间,用TCR V β 13.1抗体对其余一半的非贴壁细胞

进行染色,以定量TCR扩增。

[1035] 读出:“内源”T细胞功能、TCR敲入的T细胞的增殖、TCR靶细胞控制、非工程化T细胞的激活

[1036] 测定目的是确定这样的有效载荷设计,其增强内源T细胞抗肿瘤功能,并导致最小的Treg细胞激活和最小的细胞因子产生,从而在保持高溶细胞活性的同时降低CRS。

[1037] 结果

[1038] 外源IL-2或IL-15治疗改善TCR T细胞肿瘤控制和T细胞增殖(图43A和图43B)。图43A示出了T细胞与外源IL-2或IL-15孵育或延迟添加外源IL-2或IL-15后的TCR扩增和肿瘤溶解%。如图43A所示,与不添加细胞因子(TCR组)相比,添加IL-2或IL-15增加了TCR扩增和肿瘤溶解。如图43B所示,延迟添加外源IL2或IL-15仍然导致改善的TCR T细胞肿瘤控制。因此,外源IL-2或IL-15显著改善TCR T细胞肿瘤控制。即使在延迟添加IL-15后,IL-15在每14天四次靶细胞刺激中也显示出完全的肿瘤控制。

[1039] 实施例13:IL-15体外ICT溶细胞测定

[1040] 材料和方法

[1041] 连续刺激测定

[1042] 为了评价工程化T细胞的溶细胞和增殖能力,如实施例2和实施例10中那样对表达IL-15的ICT细胞进行连续刺激测定。简单来说,将工程化T细胞和肿瘤细胞以1:50(500个经编辑的T细胞:25K个RPMI 8226靶细胞)接种于完全RPMI培养基(RPMI 1640+glutamax、10%胎牛血清、15ng/ml庆大霉素、5ng/ml TGFb)。在每次共培养中,用上述RPMI培养基每周进行3次(每2-3天)培养基更换。在共培养7天时,测定结束,通过incucyte使用制造商的方案测量靶细胞计数和T细胞计数。

[1043] 结果

[1044] 向表达L-gp130 (SPA. I) 的ICT细胞添加IL-15表达导致T细胞杀伤增加,如靶标存活率降低所示(图44)。将靶细胞存活率以仅表达逻辑门的ICT细胞作归一化。

[1045] 尽管本发明已参考优选实施方案和各种替代性实施方案进行特定显示和描述,但相关领域技术人员将了解可在不脱离本发明的精神和范围下在其中进行各种形式和细节变化。

[1046] 在本说明书的主体内引用的所有参考文献、授权专利和专利申请都据此出于所有目的以引用的方式整体并入。

[1047] 非正式序列列表

[1048]

SEQ ID NO	名称	序列
1	ALPG/P CDR H1	GFSLTSY
2	ALPG/P CDR H2	WEDGS
3	ALPG/P CDR H3	PHYGSSYVGAMEY
4	ALPG/P CDR L1	RASENIYSYVA
5	ALPG/P CDR L2	NAKSLAS
6	ALPG/P CDR L3	QHHYVSPWT
7	ALPG/P VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYGVSWIRQPAGK GLEWIGVIWEDGSTNYHSALISRV TMSVDTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCARPHYGSSYVGAMEYWGAGTTVTVSS
8	ALPG/P VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYVAWYQQKPGK APKLLIYNAKSLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQH HYVSPWTFGGG TKLEIK
9	primeR APLG/P 全结合剂 ECD scFv	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYVAWYQQKPGK APKLLIYNAKSLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQH HYVSPWTFGGG TKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQL QESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYGVSWIRQPAGKGLE WIGVIWEDGSTNYHSALISRV TMSVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARPHYGSSYVGAMEYWGAGTTVTVSS
10	MSLN	GYTMN

[1049]

	CDR H1	
11	MSLN CDR H2	LITPYNGASSYNQKFRG
12	MSLN CDR H3	GGYDGRGFDY
13	MSLN VH	QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSTGYTMNWVKQSH GKSLEWIGLITPYNGASSYNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDL LSLTSEDSAVYFCARGGYDGRGFDYWGQGTTVTVSS
14	MSLN CDR L1	SASSSVSYMH
15	MSLN CDR L2	DTSKLAS
16	MSLN CDR L3	QQWSGYPLT
17	MSLN VL	DIELTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTS PKRWIYDTSKLASGVPGRFSGSGSGNSYSLTISSEVEAEDDATY YCQQWSGYPLTFGAGTKLEIK
18	primeR CD8α 铰 链	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC
19	primeR TMD	FMYVAAAAFVLLFFVGCGLLS
20	primeR STS	RKRRRQHGQLWFPEGFKVSEASKKKRREPLGEDSVGLKPLK NA
21	primeR Gal4 DBD	KLLSSIEQACDICRLKKLKCSKEKPKCAKCLKNNWECRYSPK TKRSPLTRAHLTEVESRLERLEQLFLLIFPREDLDMILKMDSL QDIKALLTGLFVQDNVNKDAVTDRLASVETDMPLTLRQHRIS ATSSSEESSNKGQRQLTVS
22	primeR VP64 结构 域	AAAGGSGSGGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDA LDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLG
23	primeR TAD	KLLSSIEQACDICRLKKLKCSKEKPKCAKCLKNNWECRYSPK TKRSPLTRAHLTEVESRLERLEQLFLLIFPREDLDMILKMDSL QDIKALLTGLFVQDNVNKDAVTDRLASVETDMPLTLRQHRIS ATSSSEESSNKGQRQLTVSAAAGGSGSGGSDALDDFDLDM LGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDM LG
24	ALPG primeR 蛋 白全序列	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASENIYSYVAWYQQKPGK APKLLIYNKSLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQHYYVSPWTFGGGKLEIKGGGSGGGGSGGGGSQVQL QESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYGVSQWIRQPAGKGL WIGVIWEDGSTNYHSALISRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARPHYGSSYVGAMEYWGAGTTVTVSS
25	具有 CD8 信号序列 的 ALPG primeR 蛋 白全序列	MALPVTALLPLALLHAARPEQKLISEEDLDIQMTQSPSSLS ASVGDRVITITCRASENIYSYVAWYQQKPGKAPKLLIYNKSL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHYYVSPWT FGGGKLEIKGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSET LSLTCTVSGFSLTSYGVSQWIRQPAGKGLWIGVIWEDGSTNY HSALISRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAAADTAVYYCARPHYG SSYVGAMEYWGAGTTVTVSS
26	MSLN 铰 链 CD8α	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA CD

[1050]

27	MSLN TMD CD8a	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
28	MSLN 共 刺激 4- 1BB	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL
29	MSLN 激 活 CD3z	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
30	MSLN scFv 蛋白 全序列	QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSH GKSLEWIGLITPYNGASSYNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDL LSLTSEDSAVYFCARGGYDGRGFDYWGQGTITVTVSSGGGGS GGGSGGGGSDIELTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYM HWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPGRFSGSGSGNSYSLT SSVEAEDDATYYCQQWSGYPLTFGAGTKLEIK
31	MSLN CAR 蛋白 全序列	QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSH GKSLEWIGLITPYNGASSYNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDL LSLTSEDSAVYFCARGGYDGRGFDYWGQGTITVTVSSGGGGS GGGSGGGGSDIELTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYM HWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPGRFSGSGSGNSYSLT SSVEAEDDATYYCQQWSGYPLTFGAGTKLEIKAAATTTTPAPR PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQE EDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL NLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR
32	具有信号 序列的 MSLN CAR 蛋白 全序列	MALPVTALLPLALLLHAARPDYKDDDDKQVQLQQSGPELE KPGASVKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKSLEWIGLITPY NGASSYNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYFC ARGGYDGRGFDYWGQGTITVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDI ELTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSGTSPK RWIYDTSKLASGVPGRFSGSGSGNSYSLTSSVEAEDDATYYC QQWSGYPLTFGAGTKLEIKAAATTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEE GGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
33	CD8a 信 号肽序列	MALPVTALLPLALLLHAARP
34	Myc 标签	EQKLISEEDL
35	ALPG primer 核 酸全序列	atggccttaccagtgaacgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgcgcagcctG AACAAAACTCATTAGCGAAGAGGATCTCGACATACAGAT GACACAGAGCCCTAGCAGTCTGAGCGCCAGTGTGGGCGAT AGAGTTACTATCACTTGTAGAGCATCCGAGAACATATACA GTTACGTGGCCTGGTATCAGCAAAAACCTGGCAAAGCTCC CAAGTTATTGATTTACAATGCTAAGAGCTTGGCCTCTGGGG TGCCATCGAGGTTAGCGGTAGCGGGAGCGGGACCGACTT CACTCTGACCATCTCGAGTCTCCAGCCGGAGGACTTTGCG ACATACTATTGTCAACACCATTACGTATCACCTGGACCTT CGGCGGCGGGACTAAGTTAGAGATCAAGGGTGGAGGAGG ATCAGGCGGCGGTGGATCAGGAGGAGGAGGGTCAACAAGT

[1051]

		GCAGTTACAGGAATCAGGGCCCGGCCTGGTGAAGCCAAGT GAAACCCCTGAGTCTGACGTGCACGGTTTCAGGATTTAGCC TCACTTCCTACGGTGTCTCTTGGATTTCGGCAGCCAGCCGGC AAAGGGCTCGAGTGGATTGGGGTGATCTGGGAAGATGGCT CAACAAACTATCATTCTGCACTAATCTCTCGCGTGACAATG TCGGTGGACACGTCCAAGAATCAATTTTCCCTTAAACTGTC CTCCGTGACCGCAGCCGATACAGCGGTATATTATTGCGCG CGACCTCACTACGGATCTAGCTATGTGCGGCGCGATGGAGT ATTGGGGCGCTGGCACAACCGTCACCGTTTCTTCC
36	MSLN CAR 核酸 全序列	ATGGCCCTGCCAGTAACGGCTCTGCTGCTGCCACTTGCTCT GCTCCTCCATGCAGCCAGGCCTGACTACAAAGACGATGAC GACAAGCAAGTCCAGCTCCAGCAGTCGGGCCCAGAGTTGG AGAAGCCTGGGGCGAGCGTGAAGATCTCATGCAAAGCCTC AGGCTACTCCTTTACTGGATACACGATGAATTGGGTGAAA CAGTCGCATGGAAAGTCACTGGAATGGATCGGTCTGATTA CGCCCTACAACGGCGCCTCCAGCTACAACCAGAAGTTCAG GGGAAAGGCGACCCCTTACTGTGACAAGTCGTCAAGCACC GCCTACATGGACCTCCTGTCCCTGACCTCCGAAGATAGCG CGGTCTACTTTTGTGCACGCGGAGGTTACGATGGACGGGG ATTCGACTACTGGGGCCAGGGAACCACTGTCAACCGTGTCTG AGCGGAGGCGGAGGGAGCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG GGAGGGTCGGATATCGAACTCACTCAGTCCCCAGCAATCA TGTCCGCTTCACCGGGAGAAAAGGTGACCATGACTTGCTC GGCCTCCTCGTCCGTGTATACATGCACTGGTACCAACAA AAATCGGGGACCTCCCCTAAGAGATGGATCTACGATACCA GCAAACCTGGCTTCAGGCGTGCCGGGACGCTTCTCGGGTTC GGGGAGCGGAAATTCTGATTCTGTTGACCATTTCTGTCGGTGG AAGCCGAGGACGACGCAACTTATTACTGCCAACAGTGGTC AGGCTACCCGCTCACTTTCGGAGCCGGCCTAAGCTGGAG ATCAAGGCGCGAGCAaccacgacgcccagcgcgcgaccaccaacaccggcgc ccaccatcgctcgcagCCActgTCActgcgcccGAAGcgtgccggccagcggcgg ggggcgcagtgacacgagggggcgtggacttcgctgtgatctacatctgggcgccttggc cgggaacttggtgggtccttctcctgtcactggttatcacccttactgcaaacggggcagaagaa actcctgtatatattcaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaagaggacggctgt agctcccatttcagaagaagaagaggaggtgtaactgAGAGTGAAGTTCA GCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGA ACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGA GTACGATGTTTTGGACAAGAGGcgtGGCCGGGACCTTGAGA TGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCC TGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTA CAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAA GGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACC AAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCC CTAGG
37	primeR TMD	FMYVAAAFAVLLFFVGCGLLS
74	L-gp130 细胞内信 号传导结 构域氨基 酸序列	NKRDLIKHIWPNVPDPSKSHIAQWSPHTPPRHNFNSKDQMY SDGNFTDVSVEIEANDKKPFEDLKSLLDLFKKEKINTEGHSS GIGGSSCMSSSRPSISSSDENESSQNTSSTVQYSTVHSGYRHQ VPSVQVFSRSESTQPLDSEERPDLQLVDHVDGGDGILPRQQ YFKQNCSEQHESSPDISHFERSKQVSSVNEEDFVRLKQQISDHIS QSCGSGQMKMFQEVSAADAFGPGTEGQVERFETVGMEAAT DEGMPKSYLPQTVRQGGYMPQ
75	L-gp130	MALPVTALLPLALLLHAARPDYKDDDDKELCGGRIARLEEK

[1052]

	氨基酸序列	VKTLKAQNSELASTANMLREQVAQLKQKVMNAQGEIEAIVV PVCLAFLLTTLGVLFCFNKRDLIKHHIWPNPDPSPKSHIAQW SPHTPPRHNFNFSKDQMYSDGNFTDVSVEIEANDKKFPEDL KSLDLFKKEKINTEGHSSGIGGSSCMSSSRPSISSSDENESSQN TSSTVQYSTVVHSGYRHQVPSVQVFSRSESTQPLLDSEERPED LQLVDHVDGGDGILPRQQYFKQNCQHESSPDISHFERSKQV SSVNEEDFVRLKQQISDHISQSCGSGQMCMFQEVSAADAFGP GTEGQVERFETVGMEEATDEGMPKSYLPQTVRQGGYMPQ
76	mbIL-15 氨基酸序列	MDWTWILFLVAAATRVHSGIHVFILGCFSAGLPKTEANWVN VISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPCKVTAMKCFLEEL QVISLESGDASHDTVENLILANNSLSSNGNVTESGCKECEEL EEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGSLQITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRK AGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPAHVHQRAPPS TVTTAGVTPQPELSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAIVPGSQ LMPSKSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTTAKNWLTAASHQPP GVYPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLACYLKSRQTPPLA SVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDLNCSHHL
77	C7R 细胞 内信号传 导结构域 氨基酸序 列	KKRIKPIVWPSLPDHKKTLLEHLCKKPRKNLNVSNPESFLDCQ IHRVDDIQARDEVEGFLQDTPPQQLEESEKQRLGGDVQSPNC PSEDVVITPESFGRDSSLTCLAGNVSAADAPILSSSRSLDCRES GKNGPHVYQDLLLLSLGTTNSTLPPPFSLQSGILTLNPVAQGP ILTSLGSNQEEAYVTMSSFYQNQ
78	C7R 氨基 酸序列	MLVRRGARAGPRMPRGWTALCLLSLLPSGFMSLDNNGTATP ELPTQGTFSNVSTNVSYQETTTPTSLGSTSLHPVSQHGNEATT NITETTVKFTSTSVITSVYGNTNSSVQSQTSVISTVFTTPANVS TPETTLKPSLSPGNVSDLSTTSTSLATSPTKPYTSSSPILSDIKA EIKCSGIREVKLTQGICLEQNKTSSCAEFKKDRGEGLARVLCG EEQADADAGAQCSCLLLAQSEVRPQCILLVLANRTEISSKLQ LMKKHQSDLKKGILDFTEQDVASHQSYSQKTPILLTCTPISIL SFFSVALLVILACVLWKKRIKPIVWPSLPDHKKTLLEHLCKKPR KNLNVSNPESFLDCQIHRVDDIQARDEVEGFLQDTPPQQLEE SEKQRLGGDVQSPNCPSEDVVITPESFGRDSSLTCLAGNVSA ADAPILSSSRSLDCRESGKNGPHVYQDLLLLSLGTTNSTLPPPFSL QSGILTLNPVAQGPILTSLGSNQEEAYVTMSSFYQNQ
79	L-gp130 细胞内信 号传导结 构域核酸 序列	AACAAGCGGGACCTTATCAAAAAGCACATCTGGCCCAACG TGCCAGATCCCAGCAAATCTCATATTGCTCAATGGAGTCC ACATACGCCACCACGACACAACCTCAATAGCAAGGACCAG ATGTACTCTGACGGGAATTTTACCGACGTGTCAGTAGTAG AGATCGAAGCCAATGACAAGAAGCCCTTCCCGGAGGACCT CAAGAGCCTAGATCTCTTCAAAAAGGAGAAAATTAACACG GAGGGACACAGCTCAGGAATTGGCGGTAGCTCCTGTATGT CAAGCTCAAGGCCGTCAATAAGCAGTAGTGATGAGAACGA GTCCTCCAGAACACCAGTTCAACAGTGCAGTACAGTACC GTCGTGCACAGTGGGTATAGGCATCAAGTTCCAGCGTGC AAGTGTTACAGCCGATCCGAAAGTACACAGCCATTATTGGA CTCCGAGGAGAGGCTGAGGACTTGCAGCTCGTGGACCAC GTGGACGGTGGGGATGGGATTCTGCCAAGACAACAATACT TTAAGCAAACTGCTCCAGCACGAGTCTAGCCCGGATAT ATCACATTTTCGAAAGATCTAAACAGGTCAGCTCGGTGAAT GAGGAAGATTTTGTTCGGCTGAAGCAGCAGATAAGTGACC ACATCAGTCAGAGTTGTGGTTTCAAGCCAGATGAAGATGTT TCAGGAGGTATCTGCTGCGGATGCCTTTGGCCCTGGCACA GAGGGTCAAGTTGAAAGGTTGAAACCGTCGGAATGGAAG

[1053]

		CTGCCACAGATGAGGGAATGCCTAAGTCTTATTTGCCACA AACTGTCCGGCAGGGCGGGTATATGCCTCAG
80	L-gp130 核酸序列	ATGGCCCTGCCAGTAACGGCTCTGCTGCTGCCACTTGCTCT GCTCCTCCATGCAGCCAGGCCTGACTACAAAGACGATGAC GACAAGGAACTGTGCGGAGGGCGAATCGCCCCGCTGGAA GAGAAAGTCAAAACCCTGAAAGCCCAAACTCTGAACTGG CATCAACTGCGAATATGCTCCGTGAGCAGGTCGCTCAGCT TAAGCAGAAAGTGATGAATGCACAAGGCGAAATCGAGGC CATAGTGGTTCCAGTTTGTGTTGGCATTCTCCTCACCCTCT GCTGGGCGTCCTTTTCTGCTTCAACAAGCGGGACCTTATCA AAAAGCACATCTGGCCCAACGTGCCAGATCCCAGCAAATC TCATATTGCTCAATGGAGTCCACATACGCCACCACGACAC AACTTCAATAGCAAGGACCAGATGTACTCTGACGGGAATT TTACCGACGTGTGAGTAGTAGAGATCGAAGCCAATGACAA GAAGCCCTTCCCGGAGGACCTCAAGAGCCTAGATCTCTTC AAAAAGGAGAAAATTAACACGGAGGGACACAGCTCAGGA ATTGGCGGTAGCTCCTGTATGTCAAGCTCAAGGCCGTCAA TAAGCAGTAGTGATGAGAACGAGTCCTCCCAGAACACCAG TTCAACAGTGCAGTACAGTACCGTCGTGCACAGTGGGTAT AGGCATCAAGTTCCCGAGCGTGCAAGTGTTTACGCCGATCCG AAAGTACACAGCCATTATTGGACTCCGAGGAGAGGCCTGA GGACTTGCAGCTCGTGGACCACGTGGACGGTGGGGATGGG ATTCTGCCAAGACAACAATACTTTAAGCAAACTGCTCCC AGCACGAGTCTAGCCCGGATATATCACATTTTCGAAAGATC TAAACAGGTCAGCTCGGTGAATGAGGAAGATTTTGTTCGG CTGAAGCAGCAGATAAGTGACCACATCAGTCAGAGTTGTG GTTTACAGCCAGATGAAGATGTTTCAGGAGGTATCTGCTGC GGATGCCTTTGGCCCTGGCACAGAGGGTCAAGTTGAAAGG TTCGAAACCGTCGGAATGGAAGCTGCCACAGATGAGGGAA TGCTTAAGTCTTATTTGCCACAACTGTCCGGCAGGGCGG GTATATGCCTCAG
81	mbIL-15 核酸序列	ATGGATTGGACTTGGATACTGTTTCTGGTGGCAGCCGCTAC CCGGGTACACAGTGGCATCCACGTGTTTATCCTGGGTTGCT TCTCTGCCGGCCTGCCCAAGACCGAAGCCAACCTGGGTCAA CGTAATCTCAGACCTCAAGAAGATCGAGGATTTGATTAG TCGATGCACATTGACGCCACTCTCTACACCGAGTCCGACGT CCATCCCTCCTGTAAAGTTACCGCGATGAAGTGTTTCTGCT TAGAGCTTCAAGTGATAAGCCTGGAGAGTGGCGACGCCCTC CATACACGATACCGTGGAGAATCTCATCATCCTGGCTAAC AACTCCCTAAGTTCCAATGGGAATGTCACCGAAAGCGGCT GTAAAGAGTGCGAGGAACTGGAGGAAAAGAACATCAAGG AGTTCCTCCAGTCTTTCTGTCACATCGTGCAGATGTTTATT AATACGTCATCAGGCGGCGGAAGTGGTGGAGGAGGATCTG GAGGAGGAGGGTCTGGTGGAGGCGGATCTGGCGGCGGGT CCTTACAGATCACCTGTCCACCACCAATGAGCGTGGAACA TGCAGACATTTGGGTGAAATCATATAGTCTGTACTACGA GAGCGATACATCTGTAACCTCTGGGTTTAAGAGAAAGGCTG GAACAAGTAGCCTGACCGAGTGCCTTCTGAACAAGGCTAC CAACGTAGCTCACTGGACAACACCCAGCCTTAAATGTATT AGAGATCCGGCCCTGGTCCATCAGCGTCTGACCTCCGTC TACAGTCACAACGGCTGGGGTGACACCACAGCCAGAATCC CTGTCACCCAGCGGTAAAGAACCCGCCGCTCCTCACCTA GTTCTAATAACACGGCTGCGACTACCGCCGCGATAGTGCC TGGGAGCCAGTTGATGCCCTCTAAATCGCCCTCAACTGGG

[1054]

		ACTACAGAAATTAGCAGTCACGAGTCCTCACACGGCACAC CTAGCCAGACCACCGCAAAAAATTGGGAATTAACAGCCAG CGCCTCCCATCAGCCTCCTGGGGTCTATCCACAAGGTCACA GCGATACTACGGTTGCAATTAGCACTAGCACTGTTCTGTTG TGCGGCCTGAGCGCAGTCAGTTTGCTCGCCTGCTATCTCAA GTCAAGGCAAACACCACCGTTAGCTAGTGTGGAAATGGAG GCAATGGAGGCCTTGCCCGTGACTTGGGGCACCAGCTCCC GCGACGAAGATCTCGAGAATTGCTCACATCATCTG
82	C7R 细胞 内信号传 导结构域 核酸序列	AAAAAACGTATCAAGCCCATTGTGTGGCCCTCTCTGCCCCG ACCACAAAAAGACCCTCGAACACCTCTGCAAGAAGCCACG GAAGAATCTTAATGTCTCCTTCAACCCTGAATCATTCTTAG ACTGCCAGATTTCATCGAGTTGACGACATTCAGGCTCGGGA CGAGGTGGAAGGGTTTCTCCAGGATACCTTCCCACAGCAA CTGGAGGAGAGCGAGAAACAGCGCCTGGGTGGGGACGTC CAGAGTCCAAATTGTCCCAGCGAGGATGTGGTTATCACTC CTGAATCGTTTGGAAGAGATTCCAGTCTGACCTGTCTGGCA GGCAACGTTTCAGCGTGTGACGCACCGATACTGTCCAGCT CTAGGTCCTTGGATTGTAGGGAGAGCGGCAAAAAATGGGCC ACACGTGTATCAAGATCTCCTGTAAAGTCTGGGAACAACA AACTCTACACTCCACCGCCATTTAGCCTGCAATCCGGAAT TTTAACACTTAACCCTGTAGCTCAAGGCCAGCCTATATTGA CCAGCCTTGGTAGCAACCAGGAAGAGGCCTACGTGACTAT GTCAAGTTTTTACCAGAACCAA
83	C7R 核酸 序列	ATGTTAGTACGGCGTGGGGCAAGGGCTGGACCAAGGATGC CACGCGGTGGACAGCCTTGTGCCTGCTGTCACTGCTTCCC TCGGGCTTTATGAGCCTCGACAATAACGGCACGGCAACAC CCGAGTTGCCTACTCAAGGGACCTTTTCCAACGTGTCCACC AATGTCAGTTATCAGGAGACAACACTCCCTCCACCCTGG GCTCTACGTCTTTGCATCCCGTCAGTCAACACGGTAACGAG GCTACCACGAACATCACGGAGACAACGGTCAAATTCATT CTACAAGCGTTATAACTAGCGTCTACGGCAATACTAACAG TTCAGTTCAGTCTCAGACCAGCGTGATCTCAACCGTATTTA CTACACCGGCGAACGTTTCAACACCTGAAACAACCCTTAA ACCGTCCCTGTCAACCGGGAATGTCTCCGACCTGAGCACA ACCTCCACTAGCTTGGCCACCTCTCCTACAAAGCCCTATAC CAGCAGCTCACCGATACTGAGCGACATTAAGGCGGAAATC AAGTGCTCGGGTATTCGAGAAGTGAACTCACCCAAGGAA TCTGTCTTGAACAGAACAAGACCAGTTCTGCGCTGAGTTC AAAAAGGACCGTGGGGAAGGCCTTGCAAGAGTGCTGTGTG GGGAGGAACAGGCCGACGCCGATGCCGGAGCCCAAGTGT GTAGTCTGCTATTAGCACAAATCCGAGGTGCGGCCACAGTG CCTGTTGCTCGTGCTGGCCAATCGAACCAGATCTCTTCTA AGCTCCAGTTGATGAAGAAGCACCAGTCCGATCTCAAAAA GCTAGGAATTTTAGATTTCAGTACAGGATGTGGCTTCAC ATCAGAGTACTCTCAGAAAACCCCCATCTTGTTAACTTGC CCTACGATCTCGATACTAAGTTTCTTCTCCGTGCGCCCTCCT GGTAATCTTGGCCTGCGTGCTGTGGAAAAAACGTATCAAG CCCATTTGTGTGGCCCTCTCTGCCCCACCACAAAAGACCCT CGAACACCTCTGCAAGAAGCCACGGAAGAATCTTAATGTC TCCTTCAACCCTGAATCATTCTAGACTGCCAGATTTCATCG AGTTGACGACATTCAGGCTCGGGACGAGGTGGAAGGGTTT CTCCAGGATACCTTCCCACAGCAACTGGAGGAGAGCGAGA AACAGCGCCTGGGTGGGGACGTCCAGAGTCCAAATTGTCC CAGCGAGGATGTGGTTATCACTCCTGAATCGTTTGGAAGA

[1055]

		GATTCCAGTCTGACCTGTCTGGCAGGCAACGTTTCAGCGTG TGACGCACCGATACTGTCCAGCTCTAGGTCCTTGGATTGTA GGGAGAGCGGCAAAAATGGGCCACACGTGTATCAAGATCT CCTGTTAAGTCTGGGAACAACAACTCTACACTCCCACCG CCATTTAGCCTGCAATCCGGAATTTTAACACTTAACCCTGT AGCTCAAGGCCAGCCTATATTGACCAGCCTTGGTAGCAAC CAGGAAGAGGCCTACGTGACTATGTCAAGTTTTTACCAGA ACCAA
84	截短的 EGFR (EGFRt) + IgE 信号 肽氨基酸 序列	MDWTWILFLVAAATRVHSRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIK HFKNCTISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVEI TGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLN ITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKT KIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNV RGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTG RGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADA GHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCTNGPKPSIATGMVGALL LLLVVALGIGLFM
85	cJun 氨基 酸序列	MTAKMETTFYDDALNASFLPSESGPYGYSNPKILKQSMTLNL ADPVGSLKPHLRAKNSDLLTSPDVGLLKLASPELERLIHQSSN GHITTTPTPTQFLCPKNVTDEQEGFAEGFVRALAEHSQNTLP SVTSAAQPVNGAGMVAPAVASVAGGSGSGGFSASLHSEPPV YANLSNFPNGALSSGGGAPSYGAAGLAFPAQPQQQQPPHH LPQQMPVQHPRQLALKEEPQTVPEMPGETPPLSPIDMESQERI KAERKMRNRNRIAASKCRKRKLERIARLEEKVKTLKAQNSELA STANMLREQVAQLKQKVMNHVNSGCQLMLTQQLQTF
86	IL-2 多肽 序列	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTF KFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSH STLT
87	IL-2 核酸 序列	GCACCAACGTCATCATCAACCAAAAAGACCCAGCTTCAGC TAGAGCATCTACTGCTGGACCTCCAAATGATTTTGAACGG GATCAACAACCTATAAGAATCCCAAACTAACAAGGATGCTG ACGTTCAAGTTTTACATGCCGAAAAAGGCAACCGAACTTA AACACCTCCAATGTTTAGAGGAGGAACTCAAACCTCTCGA GGAGGTATTGAATCTGGCGCAATCCAAGAATTTCCACCTG AGGCCACGCGATCTGATCAGCAACATCAATGTGATCGTGC TTGAATTGAAGGGAAGCGAAACGACTTTCATGTGCGAATA CGCCGATGAGACTGCCACAATCGTGGAGTTCCTTAATCGG TGGATAACCTTTTGTCTAGTCAATCATTTCTACACTGACC
88	IL-7 多肽 序列	DCDIEGKDQKQYESVLMVSIQQLDSMKEIGSNCLNNEFNFF KRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVS EGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKL NDLCFLKRLLEIKTCWNKILMGTKEH
89	IL-7 核酸 序列	GATTGTGACATTGAAGGGAAAGATGGGAAACAGTACGAGT CCGTCCTGATGGTATCTATAGACCAGTTACTCGATAGCATG AAGGAGATCGGCTCCAACTGCCTTAACAACGAGTTTAATT TCTTCAAACGCCATATTTGCGATGCCAATAAGGAAGGAAT GTTCTTATTCCGAGCTGCCCGGAAGCTGAGGCAGTTTCTGA AGATGAACAGCACTGGCGACTTTGACCTGCACCTCCTTAA GGTGTCTGAGGGCACCACAATTCTGCTGAATTGTACCGGC CAAGTGAAGGGACGAAAACCTGCTGCGCTAGGAGAAGCA CAACCCACAAAATCACTCGAGGAGAATAAGAGTCTTAAGG AACAGAAGAAGCTGAACGACCTCTGCTTTTTGAAGAGGCT GTTGCAAGAGATCAAAACCTGTTGGAATAAGATCTTGATG

[1056]

		GGGACCAAAGAACAC
90	IL-21 多肽 序列	QGGDRHMRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNC EWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIIKKLRKPPSTNAGR RQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSRTH GSEDS
91	IL-21 核酸 序列	CAAGGACAGGACCGACATATGATAAGGATGAGGCAATTA ATTGATATTGTGGACCAATTGAAAACTACGTCAATGACC TCGTGCCAGAGTTCTCTGCCCGCTCCCGAAGATGTAGAAAC GAATTGCGAATGGTCAGCCTTTAGCTGTTTCCAAAAGGCA CAGCTCAAAAGCGCGAATACCGGAAACAACGAGCGTATA ATTAACGTTTCAATCAAAAACTTAAGAGGAAGCCTCCTT CTACAAATGCCGGCAGGCGCCAGAAGCACCGCCTGACCTG CCCGTCTTGCGACAGTTATGAGAAGAAGCCACCCAAAGAA TTTCTCGAGAGATTCAAGTCTTTACTTCAGAAAATGATCCA TCAGCACCTGAGCAGCCGAACTCACGGGAGTGAAGATTCC
92	IL-12 多肽 序列	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL QSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLH KKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVGRDNKEYE YSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRD IHKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFC VQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYS SSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFP CLHHSQNLRLRAVSNMLQKARQTLEFYPTSEEIDHEDITKDK TSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSTFINGSCLASRKTSEFMA LCLSSIEDLKMVQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMALAVI DELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRA VTIDRVMSYLNAS
93	IL-12 核酸 序列	ATTTGGGAAGTGAAGAAAGACGTATATGTCGTGGAAGTGG ACTGGTATCCCGATGCCCCAGGGGAAATGGTGGTCCTTAC TTGCGACACCCCCGAAGAGGACGGCATTACATGGACCCTT GACCAGTCCAGTGAGGTCTCTCGGGAGTGGAAGACACTGA CAATTCAGGTTAAGGAGTTCGGCGATGCCGGTCAGTACAC CTGTCATAAAGGGGGAGAGGTTCTGTCCCATTCCTCCTGC TGCTGCACAAGAAGGAAGATGGTATCTGGTCCACGGACAT TTTGAAAGATCAAAAGGAGCCCAAGAACAAAACCTTCTCTG CGGTGTGAAGCCAAAAATTACAGCGGGCGATTTACTTGTT GGTGGCTCACCCTATTAGTACAGATCTCACCTTCAGCGTT AAGAGTTCTAGGGGCTCCAGTGATCCGCAGGGAGTGACGT GTGGCGCTGCGACCTGTCCGCTGAGCGAGTGAGGGGCGA TAATAAGGAGTATGAGTATAGTGTGGAGTGTGAGGAGGAT TCTGCTTGCCCTGCTGCCGAGGAGTCCCTTCCTATCGAAGT GATGGTCGATGCTGTACACAACTGAAATACGAGAATTAT ACTAGCTCCTTTTTCATAAGGGACATCATAAAGCCAGATCC CCCCAAGAACCTTCAGCTGAAACCGCTGAAAAATTCACGC CAGGTGGAGGTATCTTGGGAGTACCCAGACACATGGAGCA CACCTCATAGTTACTTCAGCCTGACCTTCTGTGTCCAGGTC CAGGGGAAGTCTAAAAGGGGAAAAAAGGACAGAGTTTTTC ACCGACAAGACATCCGCAACCGTAATCTGTAGGAAAAACG CCTCAATTTCCGTTAGAGCGCAAGATAGGTATTATTCCTCT TCCTGGTCTGAATGGGCCTCTGTACCCTGCAGCGGGGGTG GCGGTAGCGGTGGGGGAGGGAGCGGAGGTGGAGGCAGCC GAAACCTGCCTGTGGCCACACCTGATCCTGGGATGTTCCCT TGCTTGCAACACAGTCAGAATCTGCTCAGGGCCGTTAGCA

[1057]

		ACATGCTGCAGAAGGCGCGGCAGACACTTGAGTTCTACCC TTGCACAAGTGAAGAGATCGATCACGAAGATATCACAAAG GATAAAACGTCTACTGTGCGAGGCCTGCCTCCCCCTCGAACT CACAAAGAACGAGAGTTGCCTCAATTCGCGGAAACCAGC TTCATCACTAATGGGTCCTGCCTGGCAAGCAGAAAACTT CTTTCATGATGGCATTGTGTTTGAGTAGCATCTATGAGGAC CTCAAAATGTACCAAGTTGAATTTAAGACTATGAACGCTA AGCTCCTCATGGACCCTAAGCGGCAGATCTTCCTGGATCA GAACATGTTGGCTGTCATCGACGAACTCATGCAAGCCCTG AACTTTAATTCCGAAACAGTTCCCCAGAAGTCCAGTCTGG AGGAACCCGATTTCTACAAAACCAAAATTAAGCTGTGTAT CTTGCTGCATGCTTTCGGGATCAGGGCCGTTACGATCGATC GGGTAATGAGCTACCTGAATGCCAGT
94	IL- 12/23p40 多肽序列	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL QSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLH KKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVVRGDNKEYE YSVEQCEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSFFIRD IHKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFC VQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYS SSWSEWASVPCS
95	IL- 12/23p40 核酸序列	ATTTGGGAAC TCAAAAAGGACGTGTATGTAGTCGAGCTAG ATTGGTATCCCGATGCACCCGGTGAAATGGTCGTTCTGACC TGCGACACACCAGAAGAGGATGGAATCACCTGGACTCTGG ATCAAAGCTCCGAGGTGCTGGGGAGCGGCAAAACCCTGAC AATTCAGGTCAAAGAGTTCGGCGACGCGGGACAGTACACT TGCCATAAGGGTGGGGAGGTTCTGTACACTCTCTGCTACT GCTGCACAAAAAGGAGGACGGAATATGGTCAACGGACAT CCTGAAGGACCAGAAGGAGCCAAAAACAAGACCTTCCT GAGGTGCGAGGCCAAAACTACTCAGGCCGCTTTACTTGT TGGTGGCTGACAACAATCTCCACAGACCTCACCTTTAGTGT GAAGAGTAGTCGCGGATCTAGCGATCCTCAAGGCGTCACT TGCGGTGCCGCTACCCTGAGTGCTGAACGAGTGCGTGGGG ACAACAAGGAATACGAGTACAGTGTGGAATGCCAAGAGG ACAGCGCTTGCCCGGCAGCCGAGGAATCACTACCCATTGA AGTGATGGTCGATGCCGTCCATAAGTTAAAATACGAGAAT TACACGTCCTCTTTCTTCATCCGCGATATAATCAAGCCTGA CCCGCCAAAGAATTTGCAGTTGAAGCCCTTGAAAAACAGC CGGCAGGTTGAAGTGTCGTGGGAATATCCCGACACTTGGA GCACACCACATAGCTATTTCTCACTGACATTCTGTGTGCAA GTTACGGGAAAGTCAAAACGGGAGAAGAAGGATAGAGTA TTTACCGACAAAACGTCAGCGACAGTGATATGTCGAAAAA ATGCGTCGATTAGTGTGCGGGCACAGGATAGATACTATTC CAGTTCTTGGTCCGAGTGGGCTTCTGTACCTTGTTCA
96	IL-15 多肽 序列	GIHVFILGCF SAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATL YTESDVHP SCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHD TVENLIIL ANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFIN TS
97	IL-15 核酸 序列	GGCATCCACGTGTTTATCCTGGGTGCTTCTCTGCCGGCCT GCCCAAGACCGAAGCCAAC TGGGTCAACGTAATCTCAGAC CTCAAGAAGATCGAGGATTTGATT CAGTCGATGCACATTG ACGCCACTCTCTACACCGAGTCCGACGTCCATCCCTCCTGT AAAGTTACCGCGATGAAGTGTTTCTGCTAGAGCTTCAAGT GATAAGCCTGGAGAGTGGCGACGCCTCCATACACGATACC

[1058]

		GTGGAGAATCTCATCATCCTGGCTAACAACTCCCTAAGTTC CAATGGGAATGTACCGAAAGCGGCTGTAAAGAGTGCGA GGAAGTGGAGGAAAAGAACATCAAGGAGTTCCTCCAGTCT TTCGTGCACATCGTGCAGATGTTTATTAATACGTCA
98	IL-18 多肽 序列	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNA PRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMN PPDNIKDTKSDIIFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLACEKE RDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNE
99	IL-18 核酸 序列	TATTTTGGAAAACCTCGAATCAAAACTTTCTGTGATCCGGAA CCTCAACGACCAGGTTTTATTTCATCGACCAAGGGAATCGA CCGCTGTTTCGAGGACATGACAGATAGCGACTGTAGAGATA ATGCTCCCAGGACCATTTTTATAATCTCCATGTACAAAGAT AGCCAGCCTCGCGGGATGGCAGTGAATATTAGCGTGAAAT GCGAGAAAATCTCTACCCTGAGTTGCGAAAACAAAATAAT CTCCTTTAAGGAGATGAATCCACCAGACAACATTAAGGAC ACAAAGTCCGACATAATTTTCTTTCAACGAAGTGCCCTGG ACACGATAACAAAATGCAGTTCGAAAGTAGTAGTTACGAG GGTTATTTCTGCGCTGTGAGAAGGAGCGGGATCTGTTTAA GCTAATCCTTAAGAAGGAAGATGAATTGGGCGATAGATCG ATAATGTTACGGTCCAGAATGAGGAC
100	CD44 信 号肽序列	MDKFWWHAAWGLCLVPLSLA
101	CD44 信 号肽核酸 序列	ATGGACAAGTTTTTGGTGGCACGCAGCCTGGGGACTCTGCC TCGTGCCGCTGAGCCTGGCG
102	CD3E 信 号肽序列	MQSGTHWRVLGLCLLSVGWVGQ
103	CD3E 信 号肽核酸 序列	ATGCAGTCGGGCACTCACTGGAGAGTTCTGGGCCTCTGCC TCTTATCAGTTGGCGTTTGGGGGCAA
104	CD5 信号 肽序列	MPMGSLQPLATLYLLGMLVASCLG
105	CD5 信号 肽核酸序 列	ATGCCCATGGGGTCTCTGCAACCGCTGGCCACCTTGTAACCT GCTGGGGATGCTGGTCGCTTCTGCCTCGGA
106	IGTAL 信 号肽序列	MKDSCITVMAMALLSGFFFFAPASS
107	IGTAL 信 号肽核酸 序列	ATGAAGGATTCCTGCATCACTGTGATGGCCATGGCGCTGC TGTCTGGGTTCTTTTCTTCGCGCCGGCCTCGAGC
108	IL-2 信号 肽序列	MYRMQLLSICIALSLALVTNS
109	IL-2 信号 肽核酸序 列	ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCAATTGCACTAAGTCT TGCACTTGTCACAAACAGT
110	GMCSF 信号肽序 列	MWLQSLLLLGTVAC SIS
111	GMCSF 信号肽核	ATGTGGCTGCAGAGCCTGCTGCTCTTGGGCACTGTGGCCTG CAGCATCTCT

[1059]

	酸序列	
112	胰凝乳蛋白酶原信号肽序列	MAFLWLLSCWALLGTTFG
113	胰凝乳蛋白酶原信号肽核酸序列	ATGGCTTTCTCTGGCTCCTCTCCTGCTGGGCCCTCCTGGGTACCACCTTCGGC
114	胰蛋白酶原信号肽序列	MNLLLILTFVAAAVA
115	胰蛋白酶原信号肽核酸序列	ATGAATCTACTTCTGATCCTTACCTTTGTTGCAGCTGCTGTTGCT
116	IgK 信号肽序列	MDMRVLAQLLGLLLCFPGARC
117	IgK 信号肽核酸序列	ATGGACATGAGAGTCCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGTTTCCAGGTGCCAGATGT
118	IgKVIII 信号肽序列	MDMRVPAQLLGLLLWLRGARC
119	IgKVIII 信号肽核酸序列	ATGGACATGAGGGTCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGTACTCTGGCTCCGAGGTGCCAGATGT
120	IgE 信号肽序列	MDWTWILFLVAAATRVHS
121	IgE 信号肽核酸序列	ATGGACTGGACCTGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCACGCGAGTCCACTCC
122	OSM 信号肽序列	MGVLLTQRTL LSLVLALLFPSMASM
123	OSM 信号肽核酸序列	ATGGGGGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCAAGCATGGCGAGCATG
124	IgG2H 信号肽序列	MGWSCILFLVATATGVHS
125	IgG2H 信号肽核酸序列	ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCCACAGCCACCGGTGTCCATTCT
126	BM40 信号肽序列	MRAWIFLLCLAGRALA
127	BM40 信号肽核酸序列	ATGAGGGCCTGGATCTTCTTTCTCCTTTGCCTGGCCGGGAGGGCCTTGGCA
128	Secrecon 信号肽序列	MWWRLWWLLLLLLLLWPMVWA

[1060]

129	Secrecon 信号肽核 酸序列	ATGTGGTGGAGGCTTTGGTGGCTATTACTCCTGTTGCTCCT GCTGTGGCCTATGGTGTGGGCC
130	tPA 信号 肽序列	MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPS
131	tPA 信号 肽核酸序 列	ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGC TGTGTGGAGCAGTCTTCGTTTCGCCCAGC
132	Super-2 多 肽序列	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTF KFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHFDPRD VVSNNVVFVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQS IISTL
133	Super-2 核 酸序列	GCACCAACGTCATCATCAACCAAAAAGACCCAGCTTCAGC TAGAGCATCTACTGCTGGACCTCCAAATGATTTTGAACGG GATCAACAACCTATAAGAATCCCAAACTAACAAGGATGCTG ACGTTCAAGTTTTACATGCCGAAAAAGGCAACCGAACTTA AACACCTCCAATGTTTAGAGGAGGAACCTCAAACCTCTCGA GGAGGTATTGAATCTGGCGCAATCCAAGAATTTCCACTTTG ACCCACGCGATGTGGTTAGCAACATCAATGTGTTTGTGCTT GAATTGAAGGGAAGCGAAACGACTTTCATGTGCGAATACG CCGATGAGACTGCCACAATCGTGGAGTTCTTAATCGGTG GATAACCTTTTGTCTAGTCAATCATTTCTACACTGACC
134	IL-10 多肽 序列	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKD QLDNLLLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMQAENQ DPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVK NAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN
135	IL-10 核酸 序列	AGGCAACCTGCCTAACATGCTTCGAGATCTCCGAGATGCC TTCAGCAGAGTGAAGACTTTCTTTCAAATGAAGGATCAGC TGGACAACTTGTTGTTAAAGGAGTCCTTGCTGGAGGACTTT AAGGGTTACCTGGGTTGCCAAGCCTTGTCTGAGATGATCC AGTTTTACCTGGAGGAGGTGATGCCCCAAGCTGAGAACCA AGACCCAGACATCAAGGCGCATGTGAACTCCCTGGGGGAG AACCTGAAGACCCTCAGGCTGAGGCTACGGCGCTGTCATC GATTTCTTCCCTGTGAAAACAAGAGCAAGGCCGTGGAGCA GGTGAAGAATGCCTTTAATAAGCTCCAAGAGAAAGGCATC TACAAAGCCATGAGTGAGTTTGACATCTTCATCAACTACAT AGAAGCCTACATGACAATGAAGATACGAAAC
136	TGF- β 多 肽序列	LSTCKTIDMELVKRKRIEAIHQILSKLRLASPPSQGEVPPGPL PEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMV ETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRAELRL LRLKLKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSF DVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSDSRDNTLQVDINGFT TGRRGDLATHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDT NYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCL GPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPASAAAPCCVPQALEPLP IVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS
137	TGF- β 核 酸序列	CTATCCACCTGCAAGACTATCGACATGGAGCTGGTGAAGC GGAAGCGCATCGAGGCCATCCGCGGCCAGATCCTGTCCAA GCTGCGGCTCGCCAGCCCCCGAGCCAGGGGGAGGTGCCG CCCGGCCCGCTGCCCCAGGCCGTGCTCGCCCTGTACAACA GCACCCGCGACCGGGTGGCCGGGGAGAGTGCAGAACCGG AGCCCGAGCCTGAGGCCGACTACTACGCCAAGGAGGTAC CCGCGTGCTAATGGTGGAAACCCACAACGAAATCTATGAC

[1061]

		AAGTTCAAGCAGAGTACACACAGCATATATATGTTCTTCA ACACATCAGAGCTCCGAGAAGCGGTACCTGAACCCGTGTT GCTCTCCCGGGCAGAGCTGCGTCTGCTGAGGCTCAAGTTA AAAGTGGAGCAGCACGTGGAGCTGTACCAGAAATACAGC AACAAATTCCTGGCGATACCTCAGCAACCGGCTGCTGGCAC CCAGCGACTCGCCAGAGTGGTTATCTTTTGATGTCACCGGA GTTGTGCGGCAGTGGTTGAGCCGTGGAGGGGAAATTGAGG GCTTTCGCCTTAGCGCCCACTGCTCCTGTGACAGCAGGGAT AACACACTGCAAGTGGACATCAACGGGTTCACTACCGGCC GCCGAGGTGACCTGGCCACCATTTCATGGCATGAACCGGCC TTTCTGCTTCTCATGGCCACCCCGCTGGAGAGGGCCAGC ATCTGCAAAGCTCCCGGCACCGCCGAGCCCTGGACACCAA CTATTGCTTCAGCTCCACGGAGAAGAACTGCTGCGTGCGG CAGCTGTACATTGACTTCCGCAAGGACCTCGGCTGGAAGT GGATCCACGAGCCCAAGGGCTACCATGCCAACTTCTGCCT CGGGCCCTGCCCCTACATTTGGAGCCTGGACACGCAGTAC AGCAAGGTCCTGGCCCTGTACAACCAGCATAACCCGGGCG CCTCGGCGGCGCCGTGCTGCGTGCCGCAGGCGCTGGAGCC GCTGCCCATCGTGTACTACGTGGGCGCAAGCCCAAGGTG GAGCAGCTGTCCAACATGATCGTGCGCTCCTGCAAGTGCA GC
139	IL-2 前体 多肽序列	MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLDLQ MILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELK PLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEY ADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
140	IL-2 前体 核酸序列	ATGTATCGAATGCAACTGCTGTCGTGCATAGCACTATCACT GGCTCTGGTGACAAACAGTGCACCAACGTCATCATCAACC AAAAAGACCCAGCTTCAGCTAGAGCATCTACTGCTGGACC TCCAAATGATTTTGAACGGGATCAACAACATAAGAATCC CAAACATAACAAGGATGCTGACGTTCAAGTTTACATGCCG AAAAAGGCAACCGAACTTAAACACCTCCAATGTTTAGAGG AGGAACTCAAACCTCTCGAGGAGGTATTGAATCTGGCGCA ATCCAAGAATTTCCACCTGAGGCCACGCGATCTGATCAGC AACATCAATGTGATCGTGCTTGAATTGAAGGGAAGCGAAA CGACTTTCATGTGCGAATACGCCGATGAGACTGCCACAAT CGTGGAGTTCCTTAATCGGTGGATAACCTTTTGTCAGTCAA TCATTTCTACACTGACC
141	IL-7 前体 多肽序列	MFHVSFRYIFGLPPLILVLLPVASSDCDIEGKDGKQYESVLMV SIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAA RKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPA ALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNK ILMGTKEH
142	IL-7 前体 核酸序列	ATGTTCCATGTGTCGTTTCGATATATCTTCGGCCTCCCACC TCTGATTCTTGTGCTGTTGCCCGTTGCCTCCAGCGATTGTG ACATTGAAGGGAAAGATGGGAAACAGTACGAGTCCGTCCT GATGGTATCTATAGACCAGTTACTCGATAGCATGAAGGAG ATCGGCTCCAACCTGCCTTAACAACGAGTTTAATTTCTTCAA ACGCCATATTTGCGATGCCAATAAGGAAGGAATGTTCTTA TTCCGAGCTGCCCGGAAGCTGAGGCAGTTTCTGAAGATGA ACAGCACTGGCGACTTTGACCTGCACCTCCTTAAGGTGTCT GAGGGCACCACAATTCTGCTGAATTGTACCGGCCAAGTGA AGGGACGAAAACCTGCTGCGCTAGGAGAAGCACAAACCCA CAAAATCACTCGAGGAGAATAAGAGTCTTAAGGAACAGA AGAAGCTGAACGACCTCTGCTTTTTGAAGAGGCTGTTGCA

[1062]

		AGAGATCAAAACCTGTTGGAATAAGATCTTGATGGGGACC AAAGAACAC
143	IL-21 前体 多肽序列	MRSSPGNMERIVICLMVIFLGTLVHKSSSQGQDRHMIRMRLI DIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLK SANTGNNERIINVSIKLLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSY EKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSRTHGSEDS
144	IL-21 前体 核酸序列	ATGAGAAGCTCACCCGGGAACATGGAACGTATCGTTATCT GTCTTATGGTGATTTTTCTGGGTACTCTCGTACACAAGAGT AGTAGTCAAGGACAGGACCGACATATGATAAGGATGAGG CAATTAATTGATATTGTGGACCAATTGAAAACTACGTCA ATGACCTCGTGCCAGAGTTCCTGCCCCGCTCCCGAAGATGT AGAAACGAATTGCGAATGGTCAGCCTTTAGCTGTTTCCAA AAGGCACAGCTCAAAAGCGCGAATACCGGAAACAACGAG CGTATAATTAACGTTTCAATCAAAAACTTAAGAGGAAGC CTCCTTCTACAAATGCCGGCAGGCGCCAGAAGCACCGCCT GACCTGCCCCGTCTTGCGACAGTTATGAGAAGAAGCCACCC AAAGAATTTCTCGAGAGATTCAAGTCTTTACTTCAGAAAAT GATCCATCAGCACCTGAGCAGCCGAACCTCACGGGAGTGAA GATTCC
145	IL-12 多肽 序列	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDA PGEMVVLTCDTPEEDGITWLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFG DAGQYTCHKGGEVLSHLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKN KTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQG VTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIE VMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQV EVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDK TSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGG GGSGGGGSRNLPVATPDPMFPCLLHHSQNLLRAVSNMLQKA RQTLEFYPTCTSEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIEDLKMYQVEFKTM NAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSL EEDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
146	IL-12 前体 核酸序列	ATGTGTCATCAGCAACTGGTCATTAGCTGGTTTTCTTGGT GTTCTTGGCCTCACCTCTCGTTGCAATTTGGGAACCTGAAGA AAGACGTATATGTCGTGGAACCTGGACTGGTATCCCGATGC CCCAGGGGAAATGGTGGTCTTACTTGCGACACCCCCGAA GAGGACGGCATTACATGGACCCTTGACCAGTCCAGTGAGG TCCTCGGGAGTGGAAGACACTGACAATTCAGGTAAAGGA GTTTCGGCGATGCCGGTCAGTACACCTGTCATAAAGGGGGA GAGGTTCTGTCCCATTCACTCCTGCTGCTGCACAAGAAGG AAGATGGTATCTGGTCCACGGACATTTTGAAAGATCAAAA GGAGCCCAAGAACAAAACCTTCTCGCGGTGTGAAGCCAAA AATTACAGCGGGCGATTTACTTGTTGGTGGCTCACCCTAT TAGTACAGATCTCACCTTCAGCGTTAAGAGTTCTAGGGGCT CCAGTGATCCGCAGGGAGTGACGTGTGGCGCTGCGACCCT GTCCGCTGAGCGAGTGAGGGGCGATAATAAGGAGTATGAG TATAGTGTGGAGTGTGAGGAGGATTCTGCTTGCCCTGCTGC CGAGGAGTCCCTTCTATCGAAGTGATGGTCGATGCTGTA CACAACTGAAATACGAGAATTATACTAGCTCCTTTTTCAT AAGGGACATCATAAAGCCAGATCCCCCAAGAACCTTCAG CTGAAACCGCTGAAAAATTCACGCCAGGTGGAGGTATCTT GGGAGTACCCAGACACATGGAGCACACCTCATAGTTACTT CAGCCTGACCTTCTGTGTCCAGGTCCAGGGGAAGTCTAAA AGGGAAAAAAGGACAGAGTTTTACCGACAAGACATCC

[1063]

		GCAACCGTAATCTGTAGGAAAAACGCCTCAATTTCCGTTA GAGCGCAAGATAGGTATTATTCCTCTTCCTGGTCTGAATGG GCCTCTGTACCCTGCAGCGGGGGTGGCGGTAGCGGTGGGG GAGGGAGCGGAGGTGGAGGCAGCCGAAACCTGCCTGTGG CCACACCTGATCCTGGGATGTTCCCTTGCTTGCACCACAGT CAGAATCTGCTCAGGGCCGTTAGCAACATGCTGCAGAAGG CGCGGCAGACACTTGAGTTCTACCCTTGCACAAGTGAAGA GATCGATCACGAAGATATCACAAGGATAAAACGTCTACT GTCGAGGCCTGCCTCCCCCTCGAACTCACAAGAACGAGA GTTGCCTCAATTCCCGGGAACAGCTTCATCACTAATGG GTCCTGCCTGGCAAGCAGAAAACTTCTTTCATGATGGCA TTGTGTTTGAGTAGCATCTATGAGGACCTCAAAATGTACCA AGTTGAATTTAAGACTATGAACGCTAAGCTCCTCATGGAC CCTAAGCGGCAGATCTTCCTGGATCAGAACATGTTGGCTG TCATCGACGAACTCATGCAAGCCCTGAACTTTAATTCCGA AACAGTTCCCCAGAAAGTCCAGTCTGGAGGAACCCGATTT TACAAAACCAAAATTAAGCTGTGTATCTTGCTGCATGCTTT CCGGATCAGGGCCGTTACGATCGATCGGGTAATGAGCTAC CTGAATGCCAGT
147	IL- 12/23p40 前体多肽 序列	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDA PGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDSSEVLGSGKTLTIQVKEFG DAGQYTCHKGGEVLSHSLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKN KTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQG VTCGAATLSAERVVRGDNKEYEYSVEQEDSACPAEESLPIE VMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQV EVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDK TSATVICRKNASISVRAQDRYSSSWSEWASVPCS
148	IL- 12/23p40 前体核酸 序列	ATGTGTCACCAGCAACTCGTGATCTCATGGTTTTCACTCGT TTTTCTGGCAAGTCCGCTTGTGGCAATTTGGGAACCAAAA AGGACGTGTATGTAGTCGAGCTAGATTGGTATCCCGATGC ACCCGGTGAAATGGTCGTTCTGACCTGCGACACACCAGAA GAGGATGGAATCACCTGGACTCTGGATCAAAGCTCCGAGG TGCTGGGGAGCGGCAAAACCCTGACAATTCAGGTCAAAGA GTTTCGGCGACGCGGGACAGTACACTTGCCATAAGGGTGGG GAGGTTCTGTACACTCTCTGCTACTGCTGCACAAAAAGG AGGACGGAATATGGTCAACGGACATCCTGAAGGACCAGA AGGAGCCAAAAACAAGACCTTCCTGAGGTGCGAGGCCA AAAACACTACTCAGGCCGCTTTACTTGTTGGTGGCTGACAAC AATCTCCACAGACCTCACCTTTAGTGTGAAGAGTAGTCGC GGATCTAGCGATCCTCAAGGCGTCACTTGCGGTGCCGCTA CCCTGAGTGCTGAACGAGTGCGTGGGGACAACAAGGAATA CGAGTACAGTGTGGAATGCCAAGAGGACAGCGCTTGCCCG GCAGCCGAGGAATCACTACCCATTGAAGTGATGGTCGATG CCGTCCATAAGTTAAAATACGAGAATTACACGTCTCTTTC TTCATCCGCGATATAATCAAGCCTGACCCGCCAAAGAATT TGCAGTTGAAGCCCTTGAAAAACAGCCGGCAGGTTGAAGT GTCGTGGGAATATCCCGACACTTGGAGCACACCACATAGC TATTTCTCACTGACATTCTGTGTGCAAGTTCAGGGAAAGTC AAAACGGGAGAAGAAGGATAGAGTATTTACCGACAAAAC GTCAGCGACAGTGATATGTCGAAAAAATGCGTCGATTAGT GTGCGGGCACAGGATAGATACTATTCCAGTTCTTGGTCCG AGTGGGCTTCTGTACCTTGTTCA
149	IL-15 前体 多肽序列	MRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSA GLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTA

[1064]

		MKCFLEELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTES GCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS
150	IL-15 前体 核酸序列	ATGAGGATAAGTAAGCCTCATCTGAGATCAATCTCAATCC AATGTTATCTGTGCTTATTGCTGAACTCGCATTCTTGACG GAGGCGGGCATCCACGTGTTATCCTGGGTGCTTCTCTGC CGGCTGCCCCAAGACCGAAGCCAACTGGGTCAACGTAATC TCAGACCTCAAGAAGATCGAGGATTTGATTCAGTCGATGC ACATTGACGCCACTCTCTACACCGAGTCCGACGTCCATCCC TCCTGTAAAGTTACCGCGATGAAGTGTTTCCTGCTAGAGCT TCAAGTGATAAGCCTGGAGAGTGCGGACGCCTCCATACAC GATACCGTGGAGAATCTCATCATCCTGGCTAACAACCTCCCT AAGTTCCAATGGGAATGTCACCGAAAGCGGCTGTAAAGAG TGCGAGGAACTGGAGGAAAAGAACATCAAGGAGTTCCTCC AGTCTTTCGTGCACATCGTGCAGATGTTTATTAATACGTCA
151	IL-18 前体 多肽序列	MYRMQLLSICIALSLALVTNSYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFID QGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISV KCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFQRSVPGHDN KMQFESSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQ NED
152	IL-18 前体 核酸序列	ATGTATCGAATGCAACTGCTGTCGTGCATAGCACTATCACT GGCTCTGGTGACAAACAGTTATTTTGAAAACCTCGAATCA AACTTTCTGTGATCCGGAACCTCAACGACCAGGTTTTATT CATCGACCAAGGGAATCGACCGCTGTTGAGGACATGACA GATAGCGACTGTAGAGATAATGCTCCCAGGACCATTTTTAT AATCTCCATGTACAAAGATAGCCAGCCTCGCGGGATGGCA GTGACTATTAGCGTGAAATGCGAGAAAATCTCTACCCTGA GTTGCGAAAACAAAATAATCTCCTTTAAGGAGATGAATCC ACCAGACAACATTAAGGACACAAAAGTCCGACATAATTTTC TTTCAACGAAGTGTCCTGGACACGATAACAAAATGCAGT TCGAAAGTAGTAGTTACGAGGGTTATTTCTGCGCTGTGAG AAGGAGCGGGATCTGTTTAAGCTAATCCTTAAGAAGGAAG ATGAATTGGGCGATAGATCGATAATGTTACGGTCCAGAA TGAGGAC
153	Super-2 前 体多肽序 列	MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELK PLEEVLNLAQSKNFHFDPRDVVSNINVFVLELKGSETTFMCE YADETATIVEFLNRWITFCQSIISTL
154	Super-2 前 体核酸序 列	ATGTATCGAATGCAACTGCTGTCGTGCATAGCACTATCACT GGCTCTGGTGACAAACAGTGACCAACGTCATCATCAACC AAAAAGACCCAGCTTCAGCTAGAGCATCTACTGCTGGACC TCCAAATGATTTTGAACGGGATCAACAACTATAAGAATCC CAAATAACAAGGATGCTGACGTTCAAGTTTACATGCCG AAAAAGGCAACCGAACTTAAACACCTCCAATGTTTAGAGG AGGAACTCAAACCTCTCGAGGAGGTATTGAATCTGGCGCA ATCCAAGAATTTCCACTTTGACCCACGCGATGTGGTTAGCA ACATCAATGTGTTTGTGCTTGAATTGAAGGGAAGCGAAAC GACTTTCATGTGCGAATACGCCGATGAGACTGCCACAATC GTGGAGTTCCTTAATCGGTGGATAACCTTTTGTCAAGTCAAT CATTTCTACACTGACC
155	IL-10 前体 多肽序列	MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLR DLRDAFSRVKTFQMKDQLDNLKESLLEDFKGYLGQCQAL SEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKLRLRLRR CHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYI EAYMTMKIRN

[1065]

156	IL-10 前体 核酸序列	ATGCACTCATCAGCCTTGCTGTGCTGCCTCGTGTGCTGAC CGGCGTGCGGGCTTCTCCAGGTCAAGGCACACAGAGTGAA AATAGCTGTACTCATTITCCCGGAATCTGCCAAATATGCT CCGGGATCTGAGGGACGCATTTTCCAGAGTGAAGACATTT TTCCAAATGAAGGATCAGCTTGATAATCTCCTGCTGAAGG AATCTCTGCTAGAGGACTTTAAGGGCTATCTCGGGTGTGAG GCCCTTAGTGAGATGATCCAGTTCTATCTGGAGGAAGTAA TGCTCAAGCCGAAAATCAAGATCCTGACATCAAAGCTCA TGTTAACAGCCTTGGAGAAAATCTGAAAACGCTACGCTTA CGATTAAGACGCTGCCACAGGTTTTTGCCCTGTGAGAACA AATCCAAAGCTGTGGAGCAGGTCAAGAACGCATTCAACAA ACTCCAGGAGAAAGGAATTTACAAGGCGATGAGCGAGTTC GACATATTCATCAACTACATTGAGGCCTACATGACTATGA AGATTCGTAAC
157	TGF- β 前 体多肽序 列	MPPSGLRLLPLLWLLVLTTPGRPAAGLSTCKTIDMELVKR KRIEAIHQILSKRLASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTRDR VAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTH SIYMFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQ KYSNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGE IEGFRLSAHCSDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRP FLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDNYCFSSTEKNCCVRQL YIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKV LALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSN MIVRSCKCS
158	TGF- β 前 体核酸序 列	ATGCCACCGTCCGGACTGCGGTTGCTGCCTCTGCTCCTGCC TCTCCTCTGGCTGCTGGTTCTGACACCAGGGAGGCCTGCTG CGGGCCTGTCCACTTGCAAAACCATTGATATGGAAGTGGT GAAACGCAAGCGGATTGAGGCAATCCGCGGGCAGATCCTG TCCAAGCTACGCCTGGCCTCTCCACCCTCTCAAGGCGAAGT GCCTCCTGGTCTCTGCCTGAGGCAGTCTGGCACTCTATA ATAGCACTCGAGATCGCGTTGCTGGGGAGAGCGCCGAACC TGAACCCGAACCCGAGGCCGATTACTATGCTAAAGAGGTC ACGCGCGTACTGATGGTTGAAACTCACAAACGAGATCTACG ACAAGTTCAAGCAGAGCACCCACAGTATCTACATGTTCTTT AACACCTCTGAGCTGAGGGAGGCAGTACCAGAACCCGTCC TGCTGAGCAGGGCCGAGTTACGGCTTCTTCGGCTCAAGCT GAAGGTCGAGCAGCACGTTGAGCTTTACCAGAAGTATTCA AACAACTCCTGGCGATACTTGTTCCAACCGGCTTCTGGCGCC CAGCGACTCACCCGAGTGGCTCTCTTTTGACGTGACCGGA GTAGTCCGACAATGGCTCTCTCGCGGCGGCGAGATTGAAG GCTTTCGGTTGTCCGCCATTGTAGCTGCGATAGTAGGGAT AATACCCTCCAGGTGGACATTAATGGATTTACAACCGGAA GGCGTGGGGACCTTGCTACAATCCACGGCATGAACAGACC GTTTTTGCTCCTAATGGCCACTCCACTGGAGCGCGCTCAAC ATCTTCAGTCAAGCAGACACAGACGAGCCTTGACACAAA CTATTGCTTCAGTAGTACGGAGAAGAATTGTTGCGTGAGA CAGTTATATATCGACTTCCGTAAAGACTTAGGTTGGAAATG GATACACGAACCAAAGGGCTATCATGCAAATTTCTGTCTC GGACCCTGTCCATACATATGGAGTTTGATACACAGTACT CGAAAGTGCTGGCTCTATACAATCAGCATAATCCCGGCGC CTCAGCCGCGCCGTGTTGTGTGCCACAAGCCCTTGAACCTT TACCCATCGTGTACTATGTGGGCAGAAAACCCAAGGTGGA ACAGTTGTCTAACATGATTGTGCGTTCCTGCAAATGCTCA
159*	非靶向对	GGUUCUUGACUACCGUAAUU

[1066]

	照 sgRNA	
160*	靶向 <i>PTPN2</i> 的 sgRNA	UUGACAUAGAAGAGGCACAA
161*	靶向 <i>RASA2</i> 的 sgRNA	CUAGAGAAACUGUUGCAUAA
162*	靶向 <i>SOCS1</i> 的 sgRNA	GCGCCCGCGGCCGUGCCCCG
163*	靶向 <i>ZC3H12A</i> 的 sgRNA	CAGCUCCCUCUAGUCCCGCG
164*	靶向 <i>CISH</i> 的 sgRNA	GCGAAAGGUGCUGGACCCAG
165	靶向 <i>RASA2</i> 的 shRNA	TCTTTTATACATCTCACCTTCT
166	靶向 <i>PTPN2</i> 的 shRNA	TCTGACAAGAGCTTCACACTGA
167	靶向 <i>CISH</i> 的 shRNA	TTCATGAAGTCTTATCAGACGT
168	靶向 <i>TNFRSF6</i> (Fas)的 shRNA	TTAAGAATCTTTTCAAACACTA
169	靶向 <i>TGFBR1</i> 的 shRNA #1	TAGAATTACATTTTGATGCCTT
170	靶向 <i>TGFBR1</i> 的 shRNA #2	TTAGTAATAAGACATGTTTCAT
171	靶向 <i>TGFBR2</i> 的 shRNA #1	TAAAAATCAATCTCATTTCCTG
172	靶向 <i>TGFBR2</i> 的 shRNA #2	TTATGTAAAAGACAAACAATGC
173	靶向萤火虫 荧光素 酶的 shRNA	TAGATAAGCATTATAATTCCTA
174	靶向海肾 荧光素酶	TTAATCAGAGACTTCAGGCGGT

[1067]

	的 shRNA	
175	NGFR 多肽序列	KEACPTGLYTHSGECKACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLD SVTFSDVVSATEPCKPCTECVGLQSMSAPCVEADDAVCRCA YGYQQDETTGRCEACRVCEAGSGLVFSCQDKQNTVCEECPD GTYSDEANHVDPCLPCTVCEDTERQLRECTRWADAECEEIPG RWITRSTPPEGSDSTAPSTQEPEAPPEQDLIASTVAGVVTTVM GSSQPVVTRGTTDNLIPVYCSILAAVVVGLVAYIAFKRWNS
176	ALPP UniProt P05187	MLGPCMLLLLLLLGLRLQLSLGIIPVEEENPDFWNREAAEALG AAKKLQPAQTAAKNLIIFLDGDMGVSTVTAARILKGQKKDKL GPEIPLAMDRFPYVALSKTYNVDKHVPDSGATATAYLCGVKG NFQTIGLSAAARFNQCNTTRGNEVISVMNRAKKAGKSVG VTTTRVQHASPAGTYAHTVNRNWYSDADVPASARQEGCQDIA TQLISNMDIDVILGGGRKYMFRMGTPDPEYPDDYSQGGTRLD GKNLVQEWLAKRQGARYVWNRTELMQASLDPSVTHLMGLF EPGDMKYEIHRDSTLDPSLMEMTEAALRLLSRNPRGFFLFVE GGRIDHGHHSRAYRALTETIMFDDAIERAGQLTSEEDTSLV TADHSHVFSFGGYPLRGSSIFGLAPGKARDRKAYTVLLYGNG PGYVLKDGARPDVTESESGSPEYRQQSAVPLDEETHAGEDVA VFARGPQAHLVHGVQEQTFAHVMAFAACLEPYTACDLAPPA GTTDAAHPGRSVVPALLPLLAGTLLLLLETATAP
177	ALPG UniProt P10696	MQGPWVLLLLGLRLQLSLGIIPVEEENPDFWNRQAAEALGAA KKLQPAQTAAKNLIIFLDGDMGVSTVTAARILKGQKKDKLGP ETFLAMDRFPYVALSKTYSVDKHVPDSGATATAYLCGVKG NFQTIGLSAAARFNQCNTTRGNEVISVMNRAKKAGKSVG VTTTRVQHASPAGAYAHTVNRNWYSDADVPASARQEGCQDIA TQLISNMDIDVILGGGRKYMFRMGTPDPEYPDDYSQGGTRLD GKNLVQEWLAKHQGARYVWNRTELLQASLDPSVTHLMGLFEPG DMKYEIHRDSTLDPSLMEMTEAALLLSRNPRGFFLFVEGGRI DHGHHSRAYRALTETIMFDDAIERAGQLTSEEDTSLV TADHSHVFSFGGYPLRGSSIFGLAPGKARDRKAYTVLLYGNG PGYVLKDGARPDVTESESGSPEYRQQSAVPLDGETHAGEDVA VFARGPQAHLVHGVQEQTFAHVMAFAACLEPYTACDLAPRAGTT DAAHPGPSVVPALLPLLAGTLLLLGTATAP
178	MSLN UniProt Q13421	MALPTARPLLGSCGTPALGSLLFLLFSLGWVQPSRTLGETGQ EAAPLDGVLANPPNISSLSPRQLLGFPCEVSGLSTERVRELAV ALAQKNVKLSTEQLRCLAHLRLEPPEDLDALPLDLLFLNPD AFSGPQACTRFFSRITKANVDLLPRGAPERQRLPAALACWG VRGSLLEADVRLGGLACDLPGRFVAESA EVLLPRLVSCPGP LDQDQQAARAALQGGGPPYGPSTWSVSTMDALRGLLPVL GQPIRSIPQGIVA AWRQRSSRDPSWRQPRTLPRFRREVEK TACPSGKKAREIDESLIFYKKWELEACVDAALLATQMDRVNA IPFTYEQLDVLKHKLDELYPQGYVESVIQHLGYLFLKMSPEDI RKWNVTSLETALKALLEVNKGHEMSPQAPRRPLPQVATLIDRF VKGRGQLDKDLDLTAFYPGYLCSLSPEELSSVPPSSIWAVRP QDLDTCDPRQLDVLYPKARLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAP TEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRTDAVLPLTVAEVQKLLGPH VEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDDLTLGLGLQGGIPNGYL VLDLSMQEALSGTPCLLGPVLTVLALLLASTLA
179	亮氨酸拉 链结构域 L-gp130	MALPVTALLPLALLLHAARPDYKDDDDKELCGGRIARLEEK VKTLKAQNSELASTANMLREQVAQLKQKVMNAQGEIE
180	gp130 (IL6ST)跨	AIVVPVCLAFLTTLLGVLCF

[1068]		膜结构域	
	181	C7R 胞外 结构域和 TMD	MLVRRGARAGPRMPRGWTALCLLSLLPSGFMSLDNNGTATPE LPTQGTFSNVSTNVSYQETTPSTLGSTSLHPVSQHGNEATTNI TETTVKFTSTSVITSVYGNTNSSVQSQTSVISTVFTTPANVSTP ETTLKPSLSPGNVSDLSTTSTSLATSPTKPYTSSSPILSDIKAEIK CSGIREVKLTQGICLEQNKTSSCAEFKKDRGEGLARVLCGEEQ ADADAGAQVCSLLLAQSEVRPQCLLLVLNRTEISSKLQLMK KHQSDLKKLGILDFTEQDVASHQSYSQKTPILLTCPTISILSFFS VALLVILACVLW

[1069] *前3个核苷酸是2'-o-甲基类似物和3'-硫代磷酸酯核苷酸间键联。

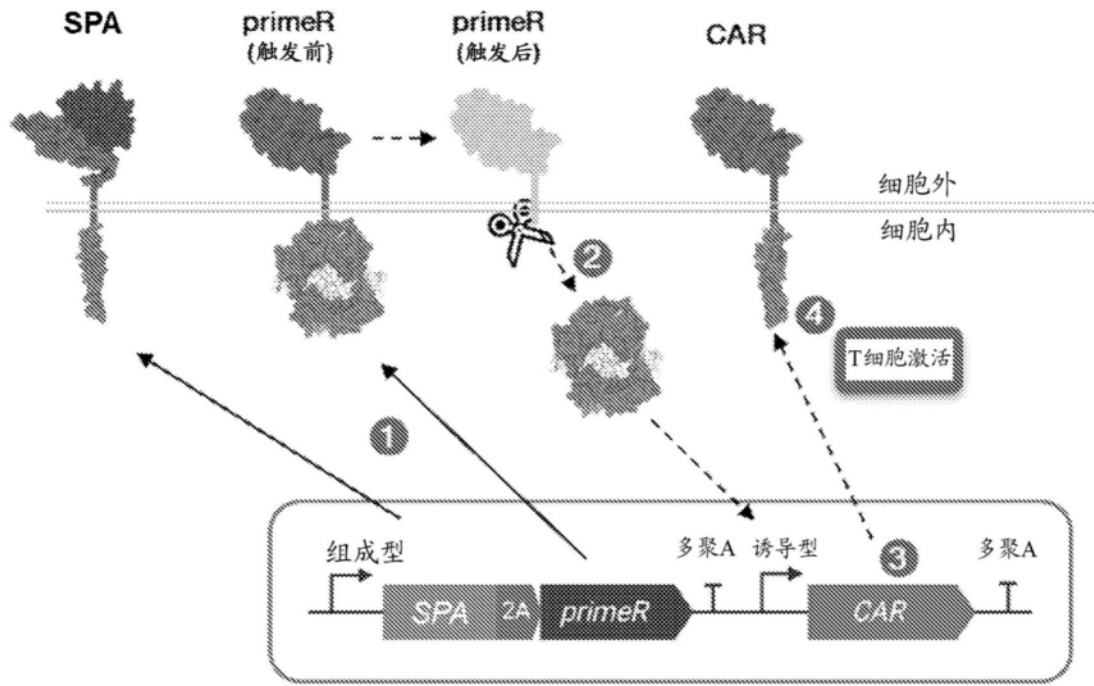


图1

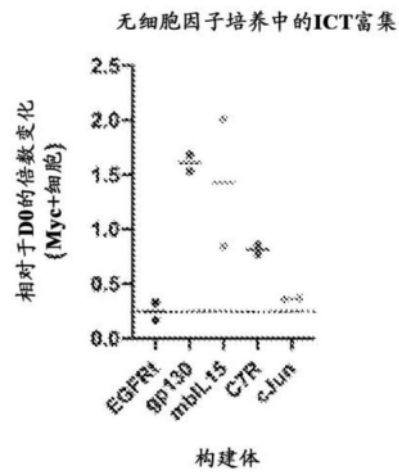


图2A

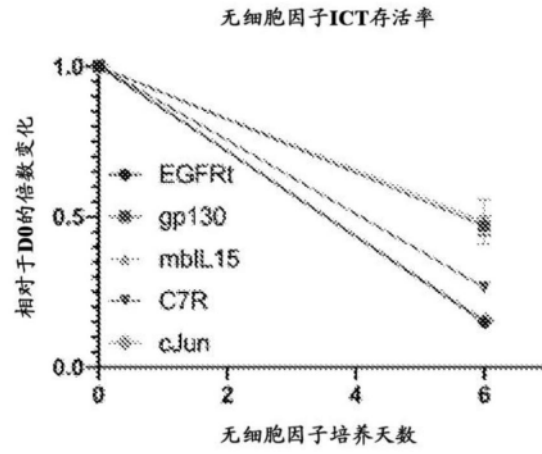


图2B

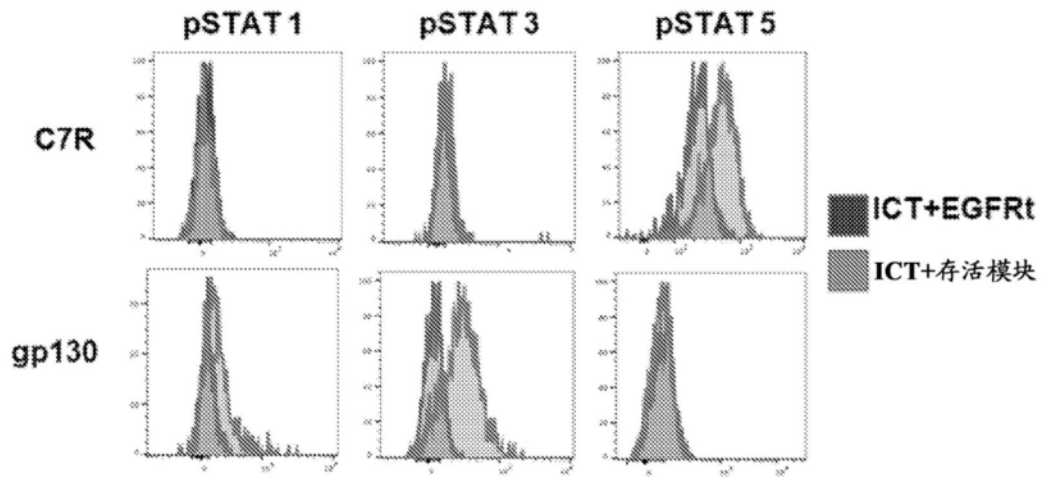


图3

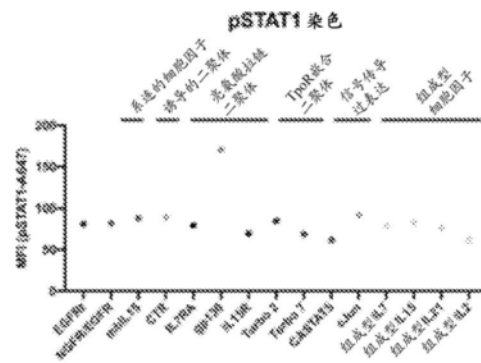


图4A

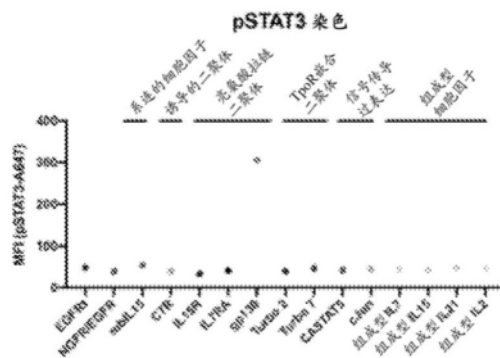


图4B

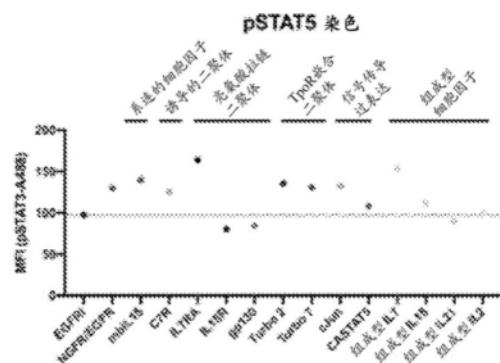


图4C

PrimeR表面表达(Myc标签)

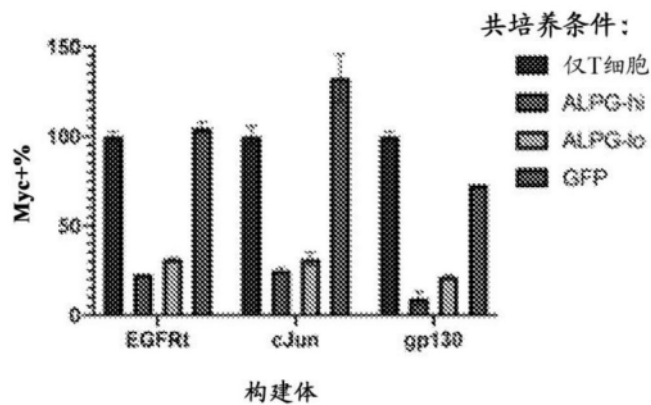


图5A

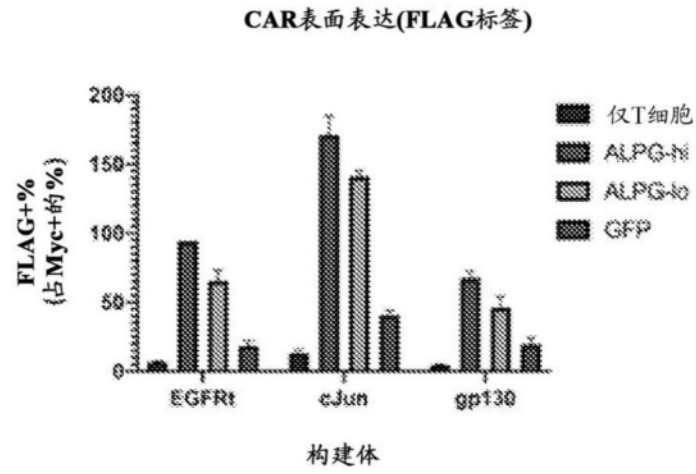


图5B

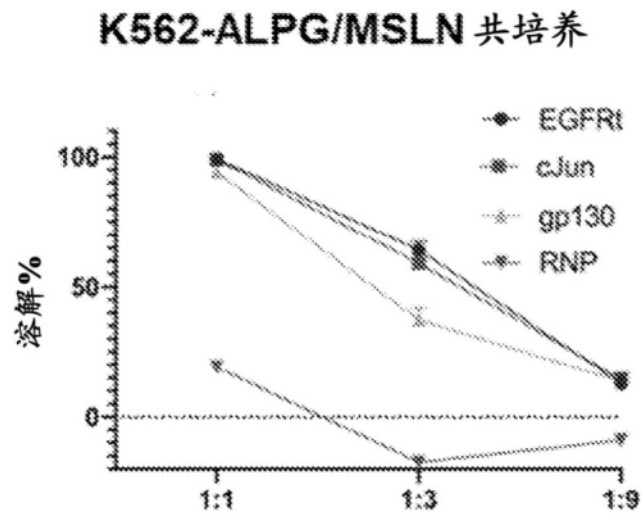


图6A

K562-MSLN 共培养

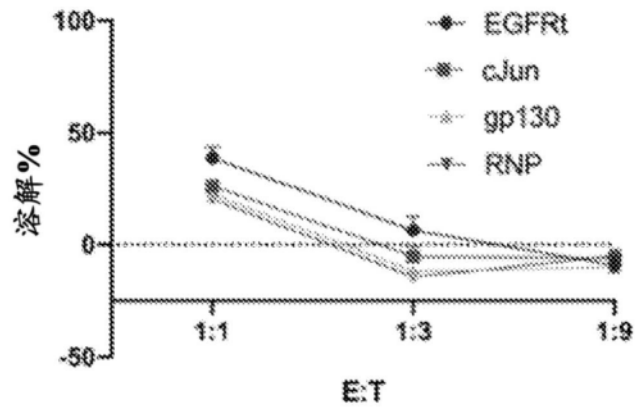


图6B

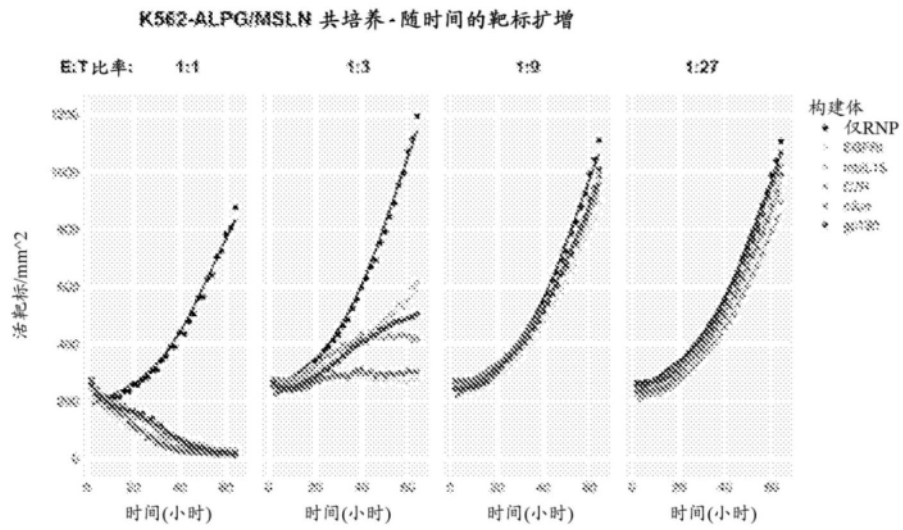


图7A

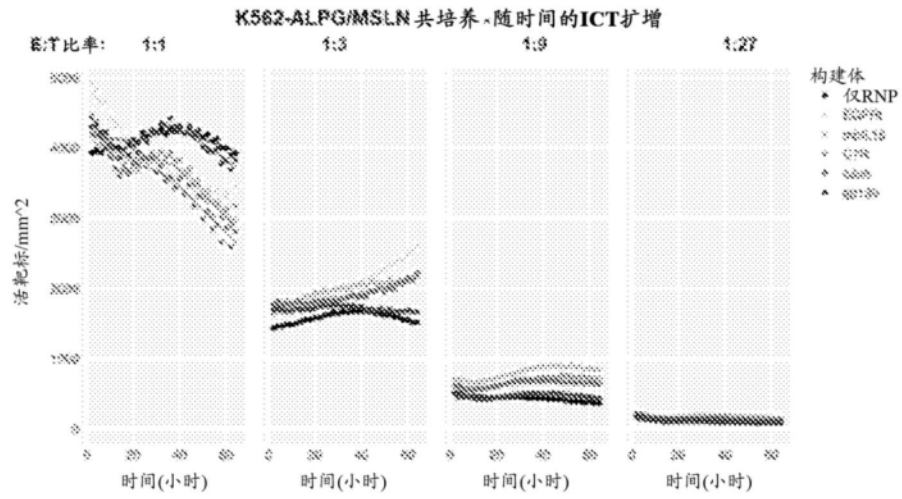


图7B

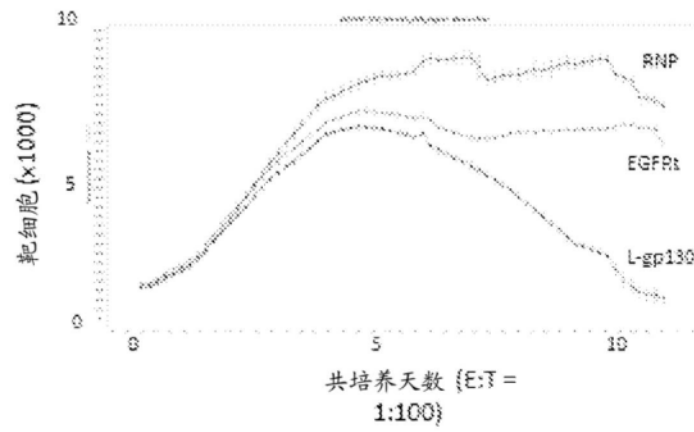


图8A

EGFRt

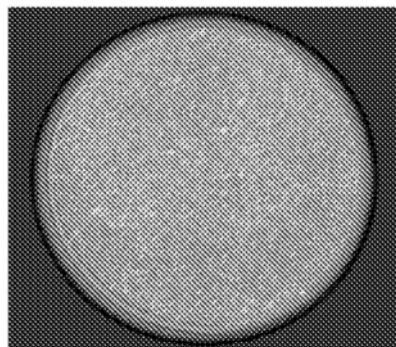


图8B

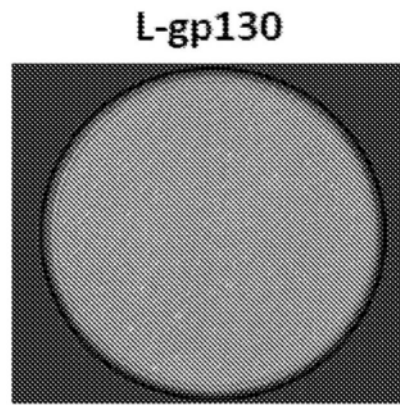


图8C

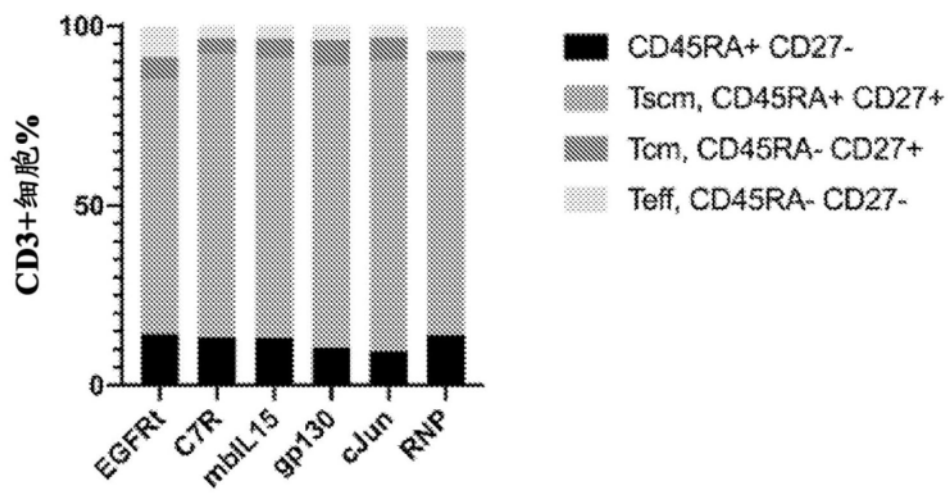


图9

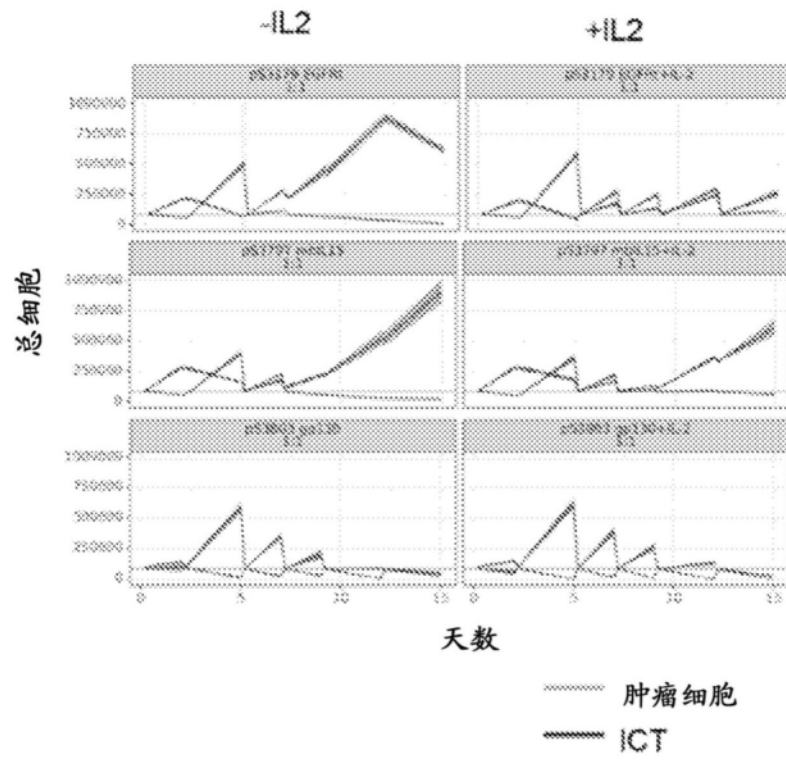


图10

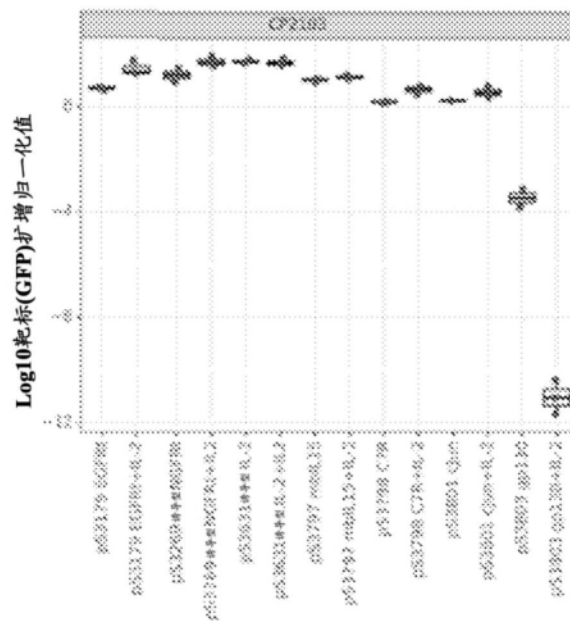


图11A

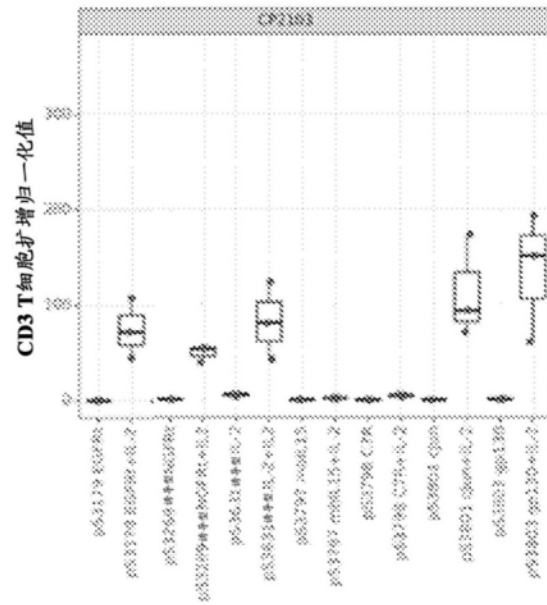


图11B

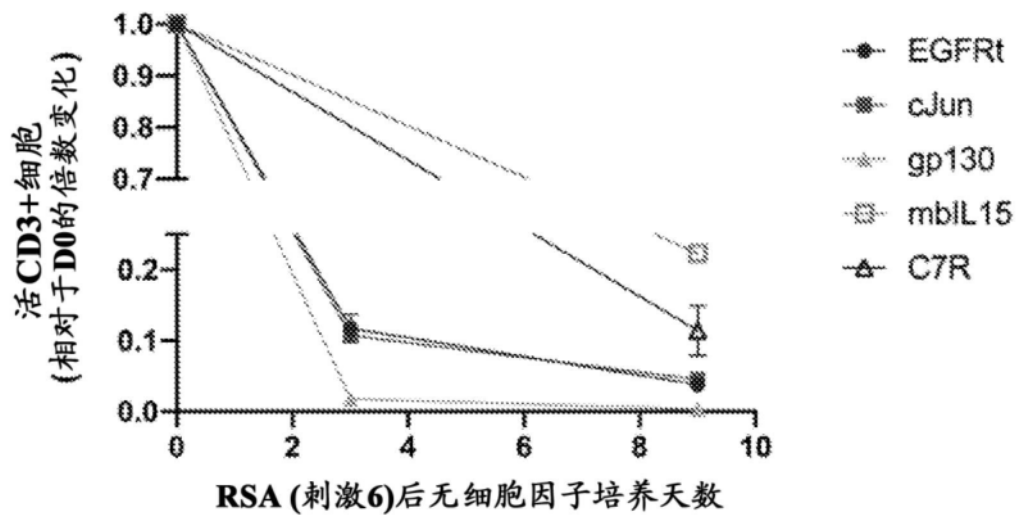


图12

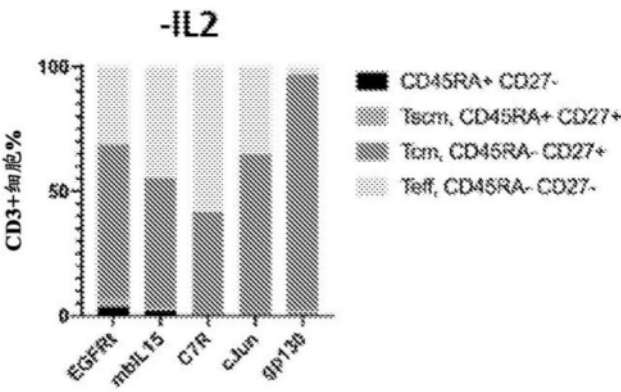


图13A

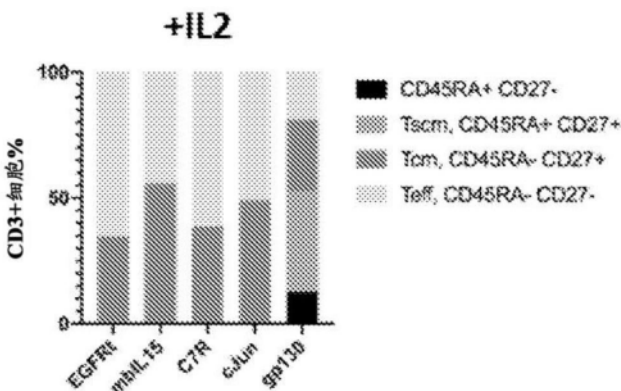


图13B

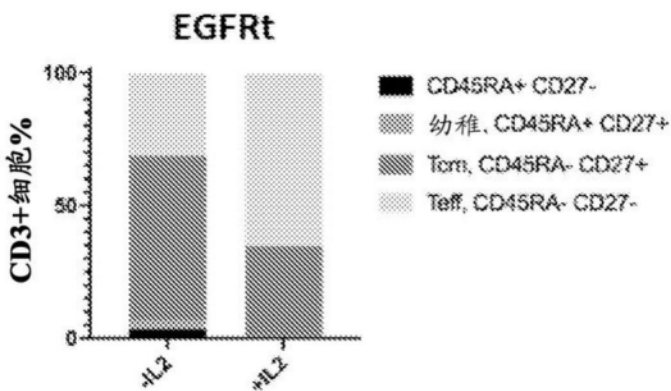


图14A

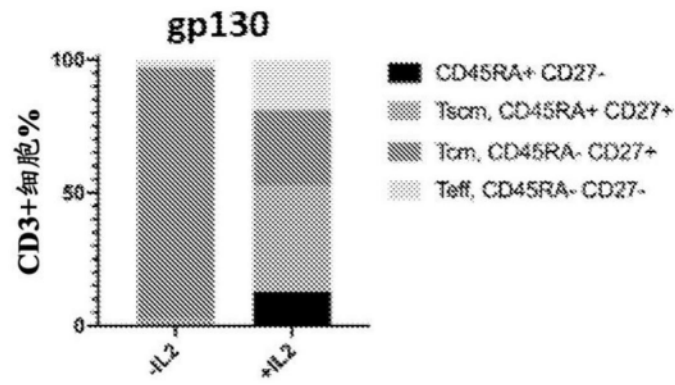


图14B

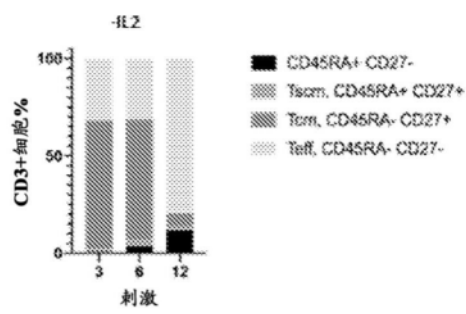


图15A

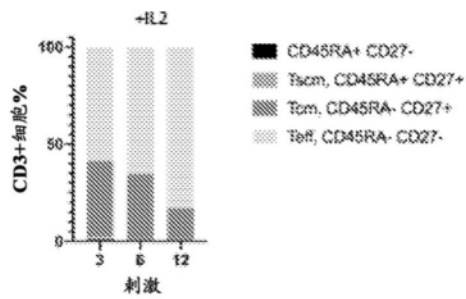


图15B

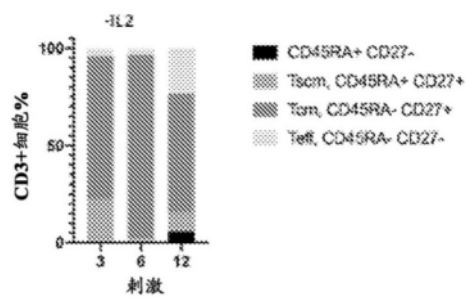


图15C

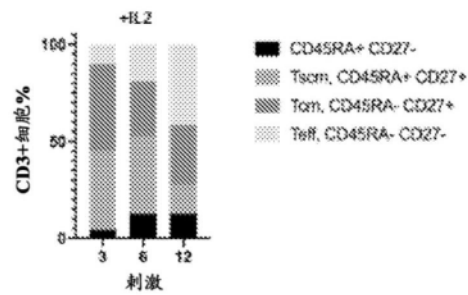


图15D

pSTAT3 染色

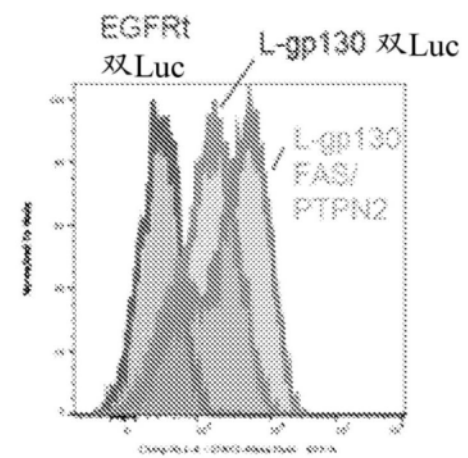


图16A

pSTAT1 染色

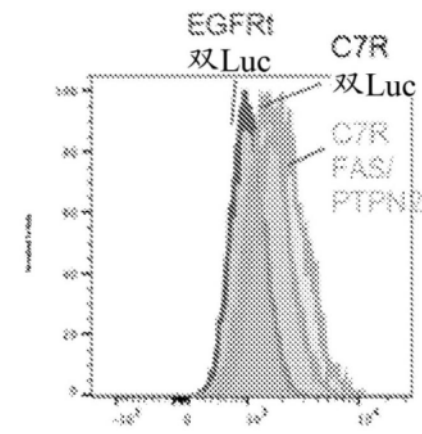


图16B

总肿瘤杀伤

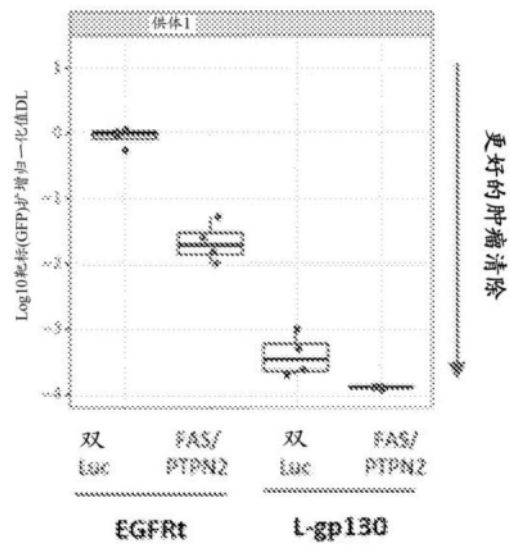


图17A

记忆表型分析

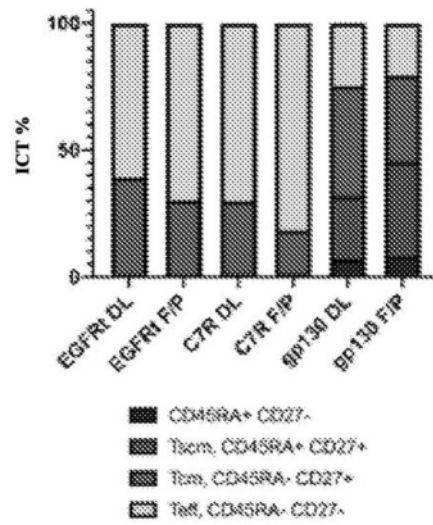


图17B

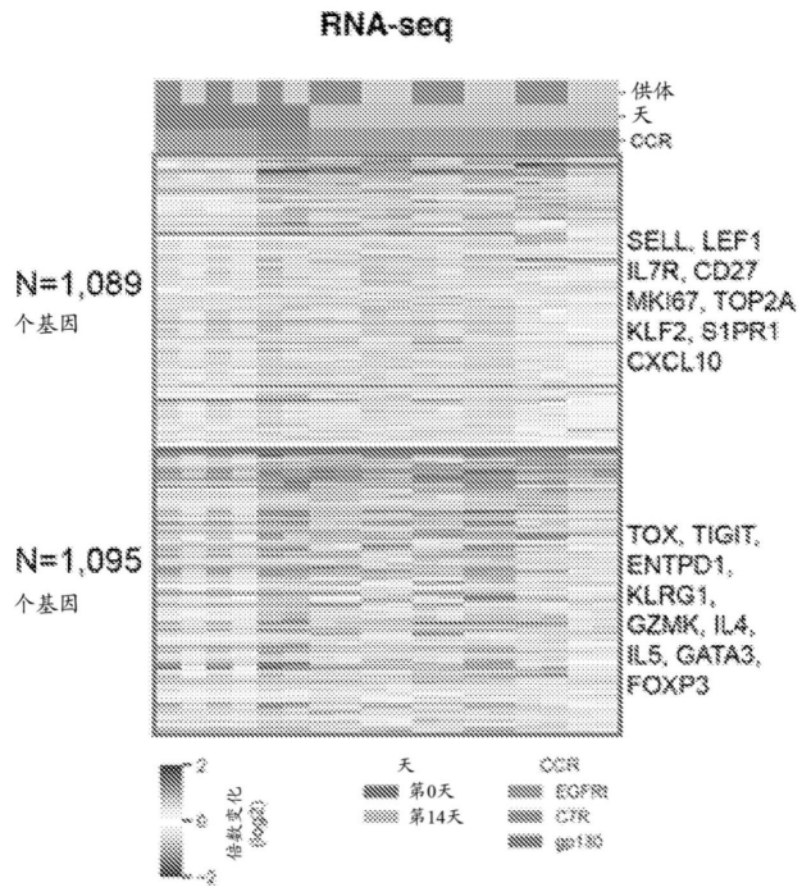


图18A

经RNA-seq测定的耗竭标志物
表达变化(减少)

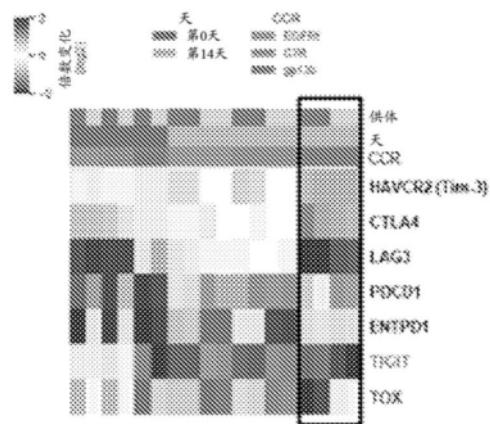


图18B

经ATAC-seq测定的耗竭标志物
可及性变化(减少)

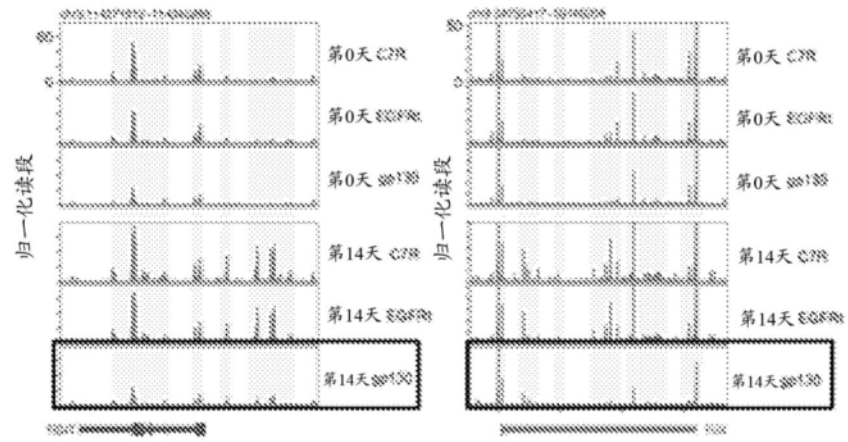


图19

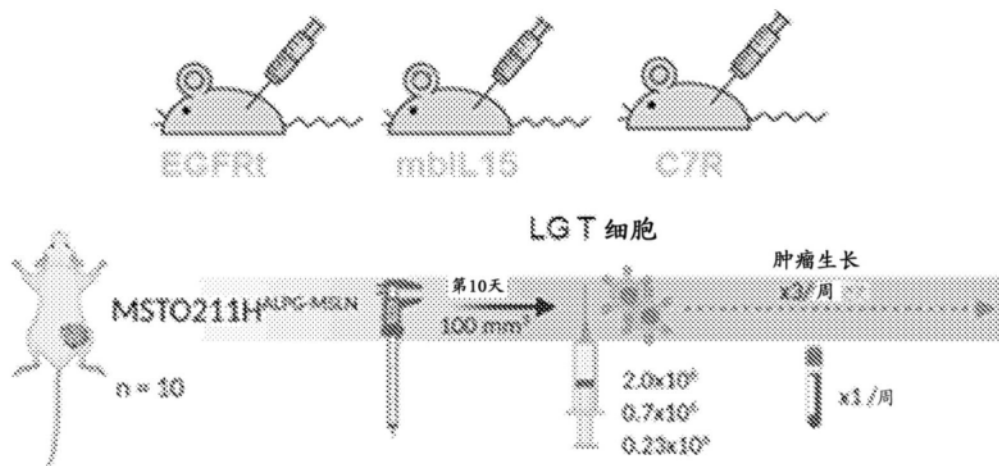


图20

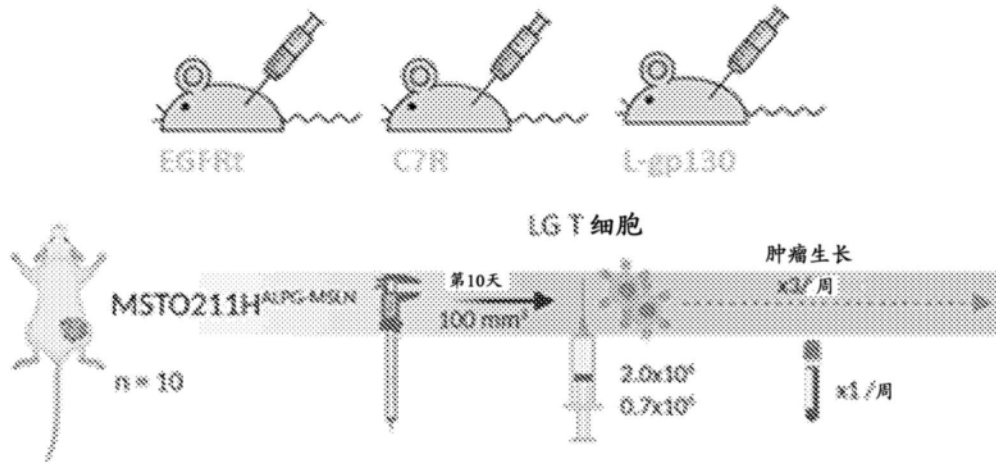


图21

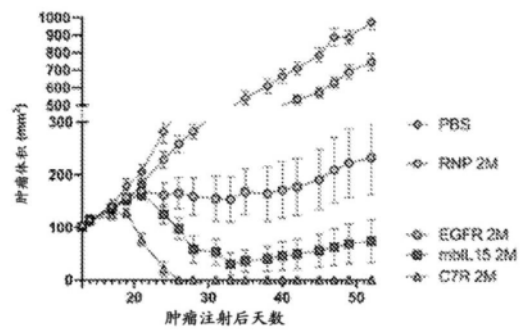


图22A

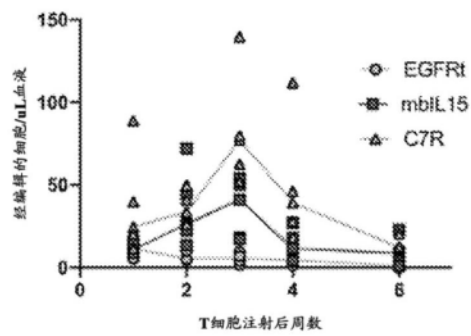


图22B

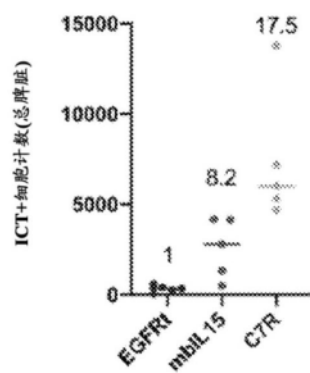


图22C

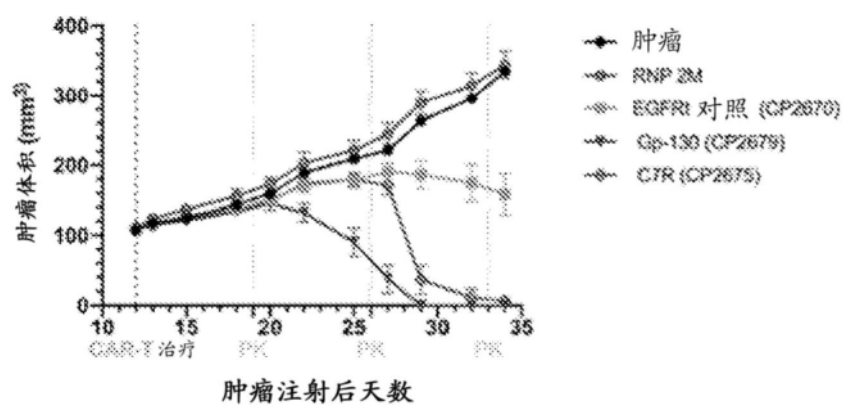


图23A

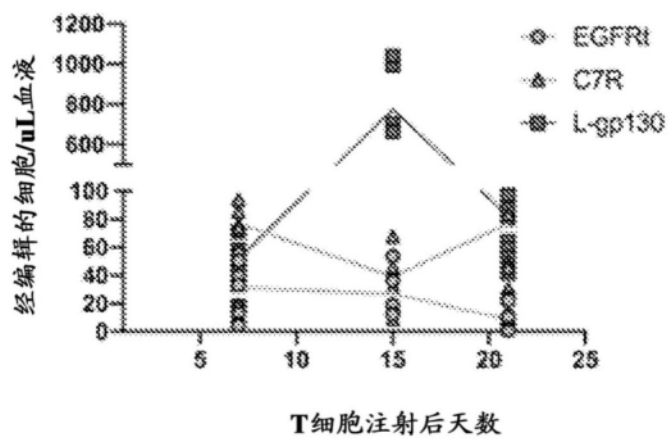


图23B

786-O (ccRCC 肿瘤)

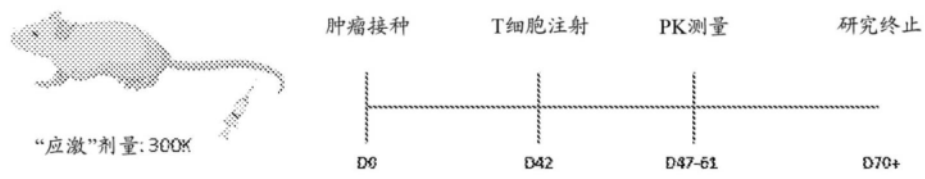


图24A

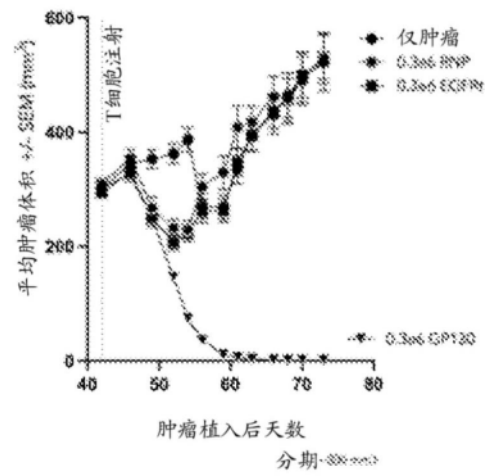


图24B

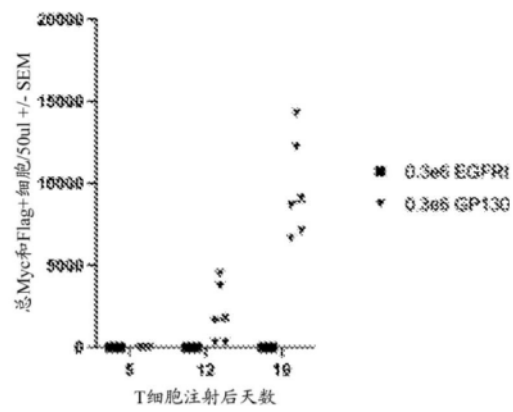


图24C

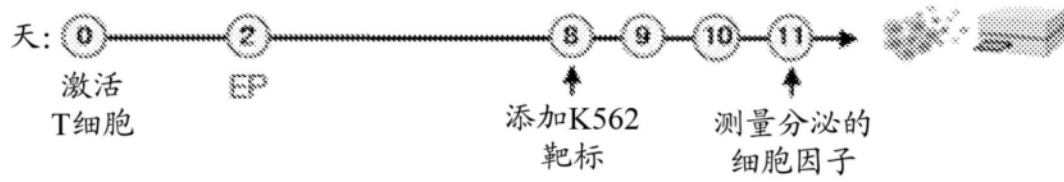


图25A

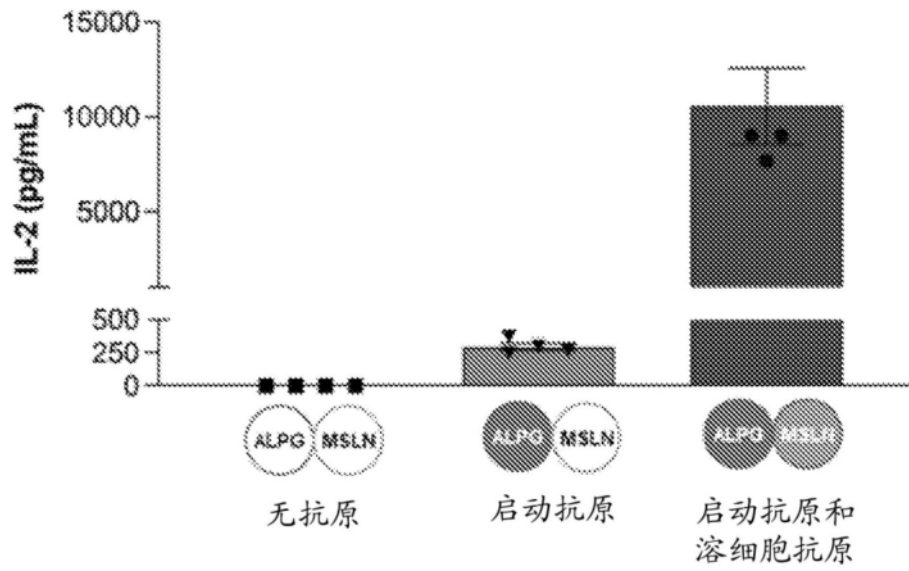


图25B

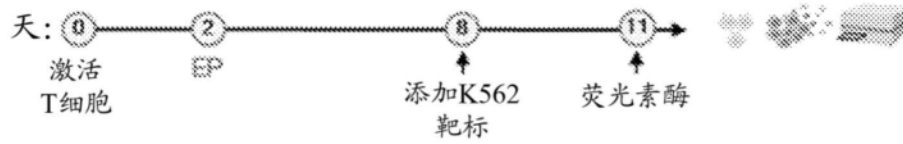


图26A

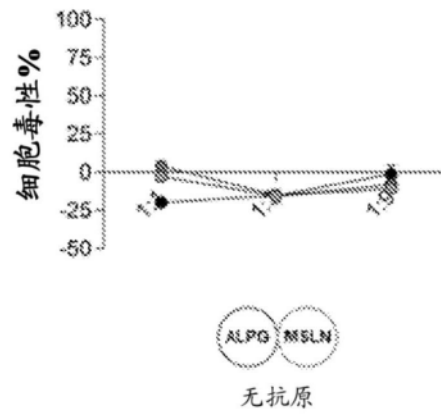


图26B

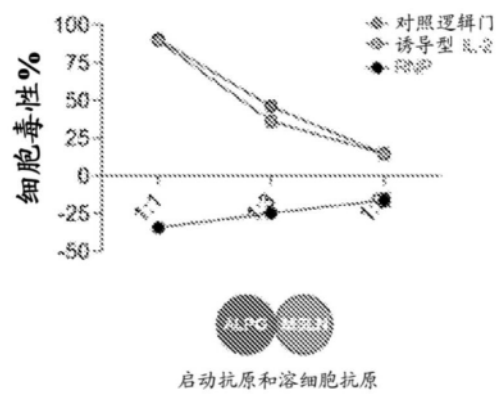


图26C

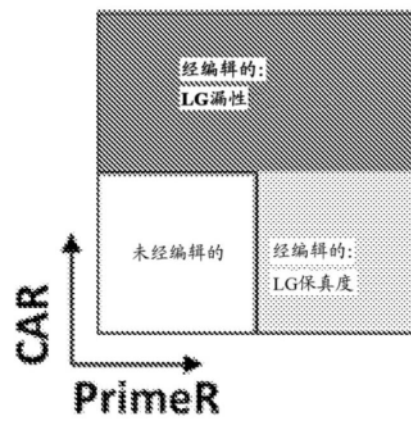


图27A

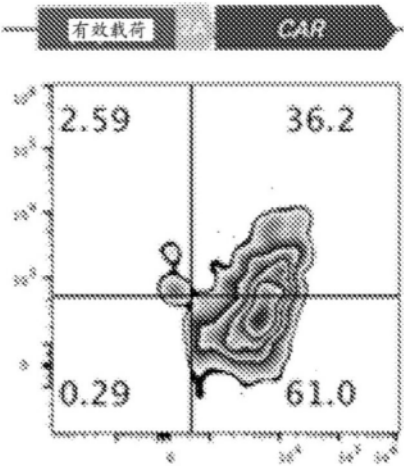


图27B

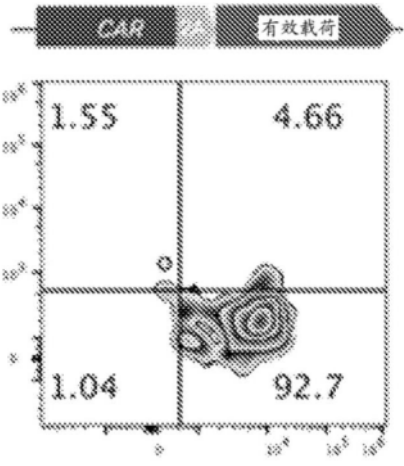


图27C

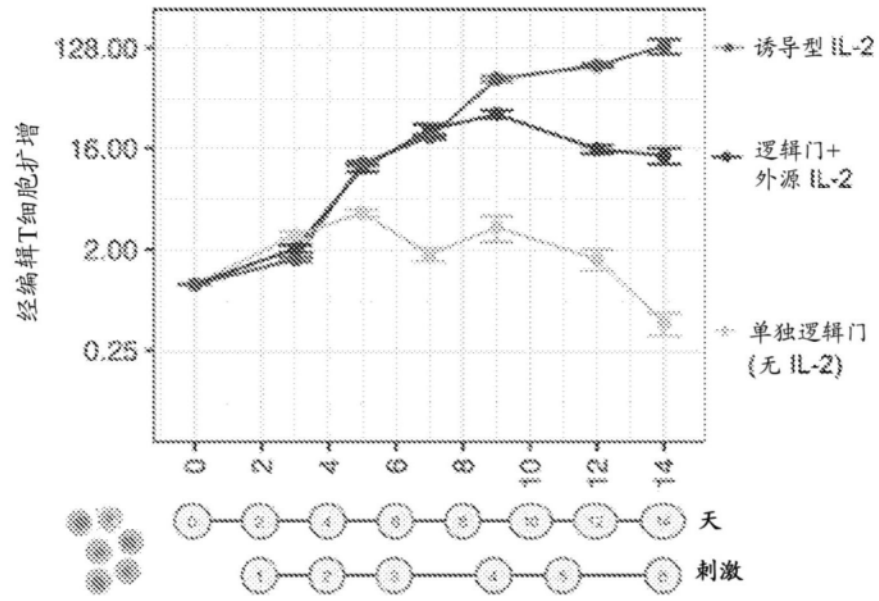


图28

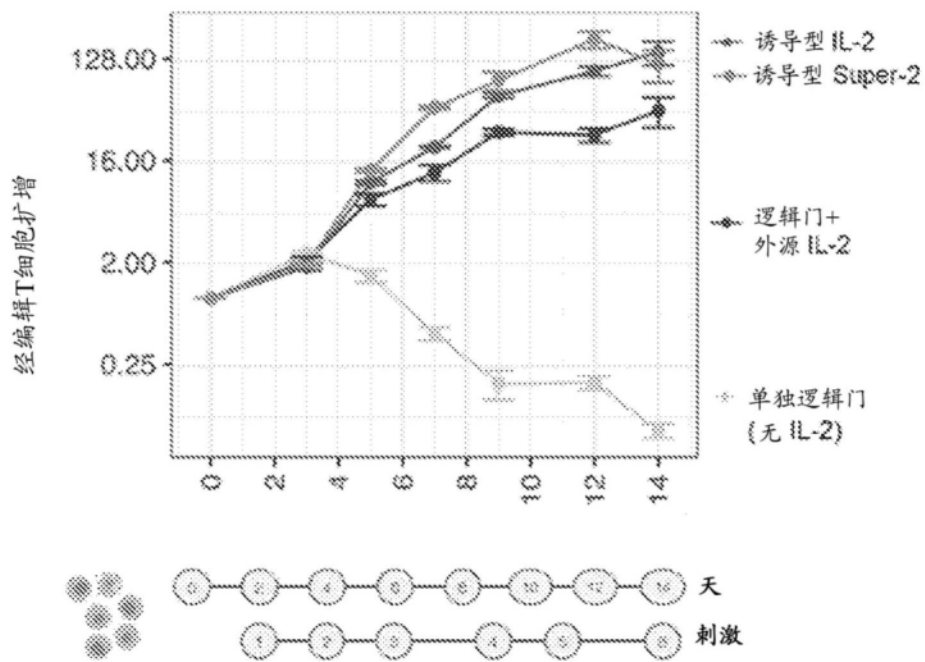


图29

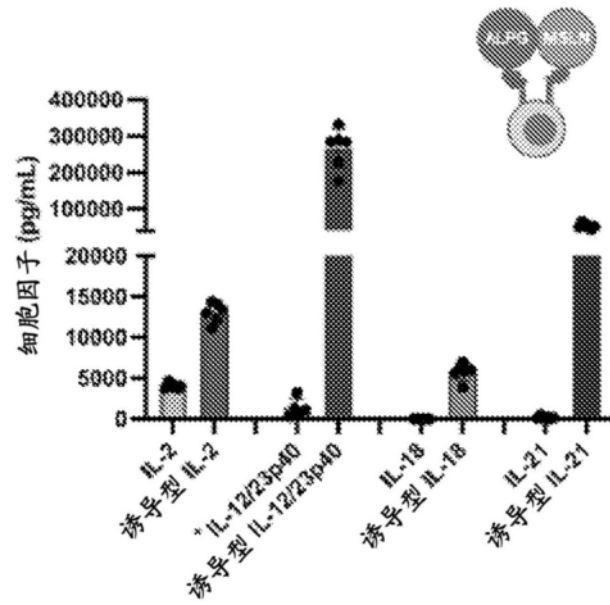


图30

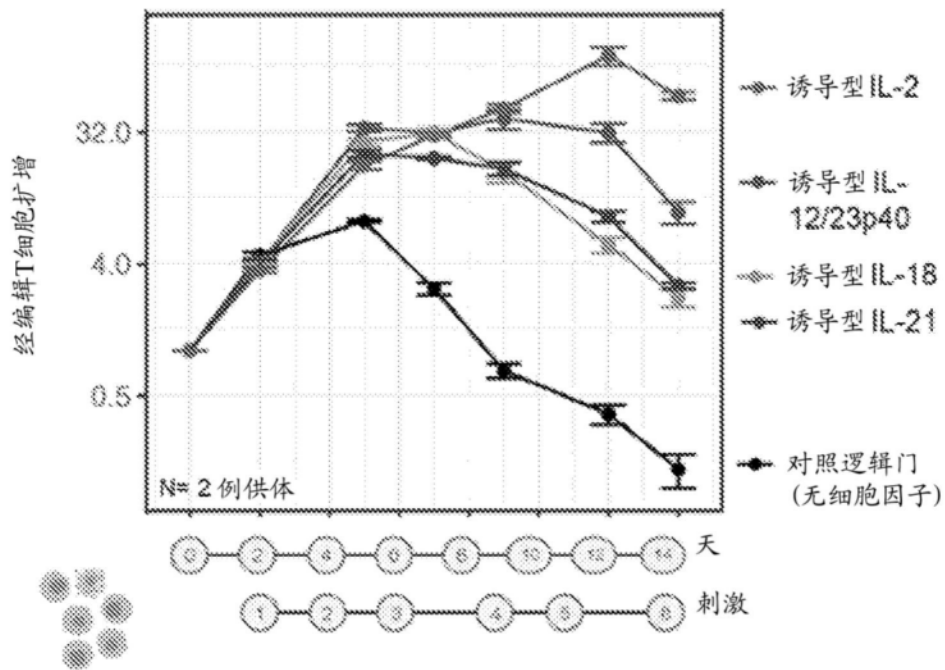


图31



图32A

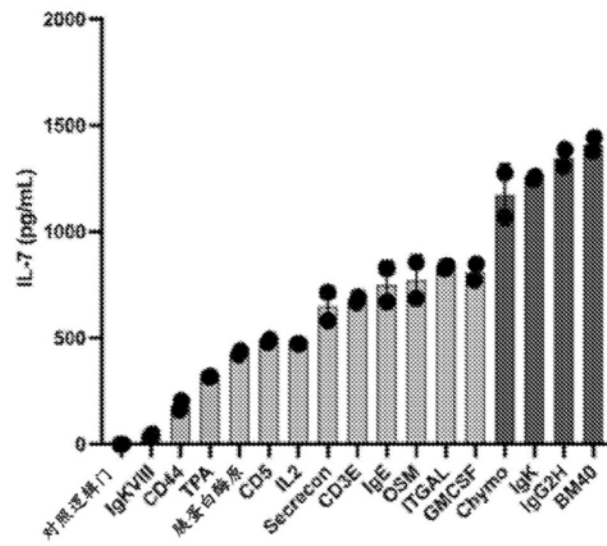


图32B

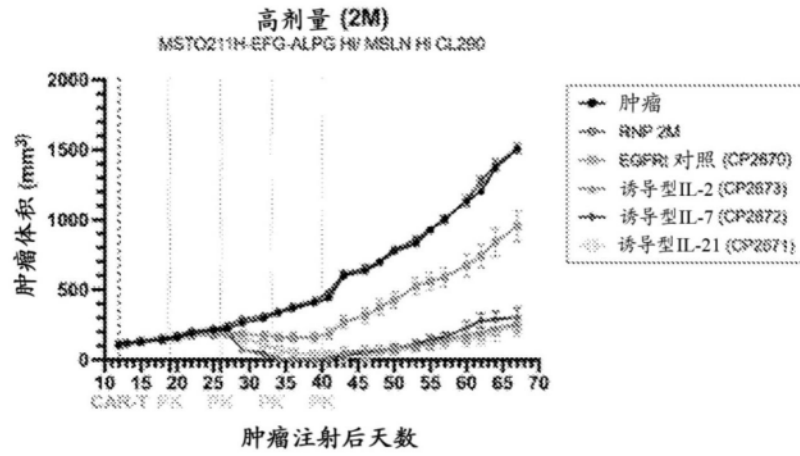


图33A

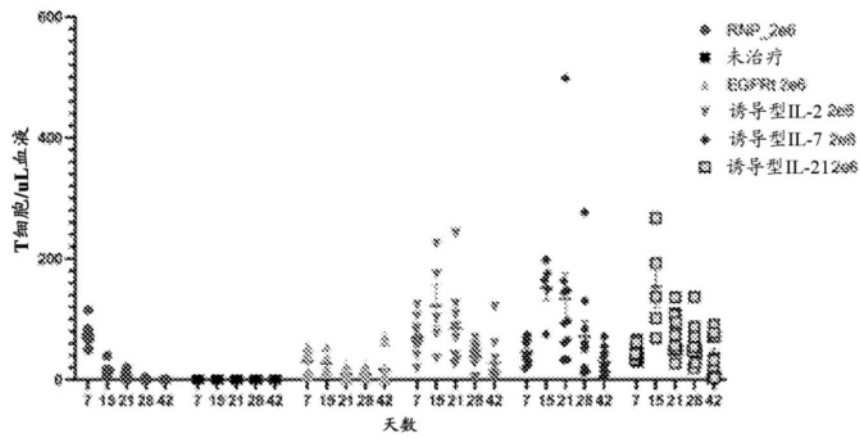


图33B

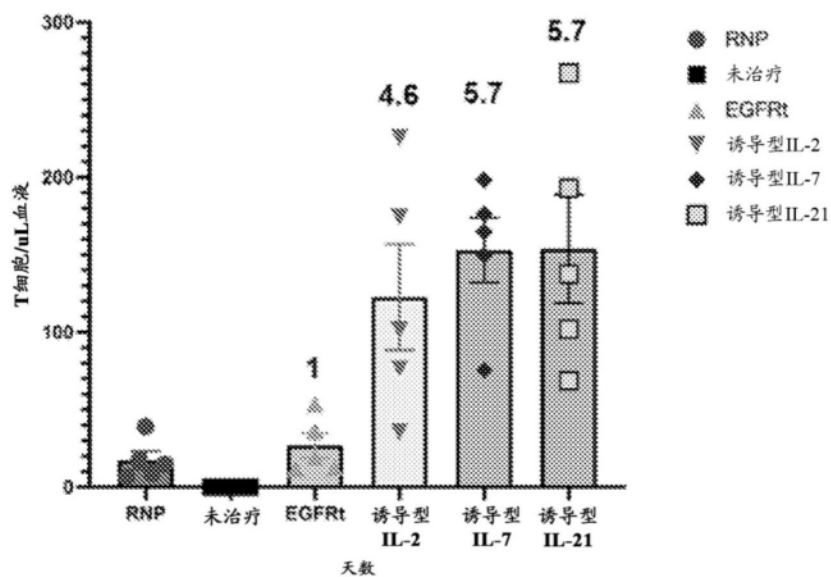


图33C

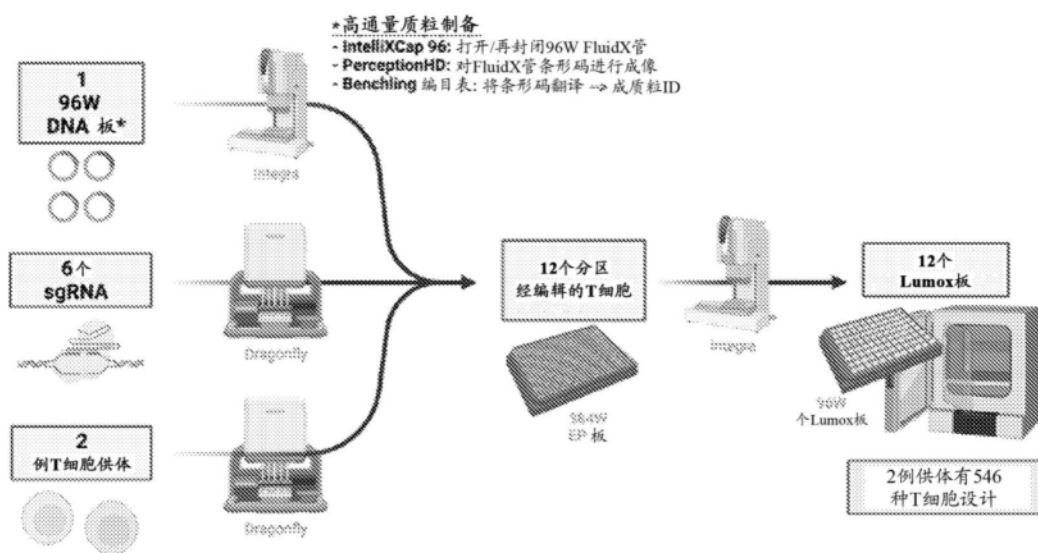


图34A

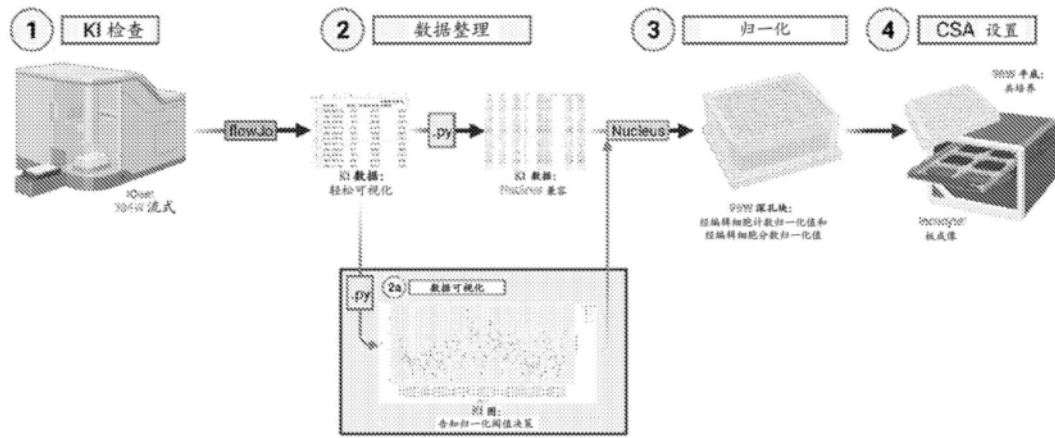


图34B

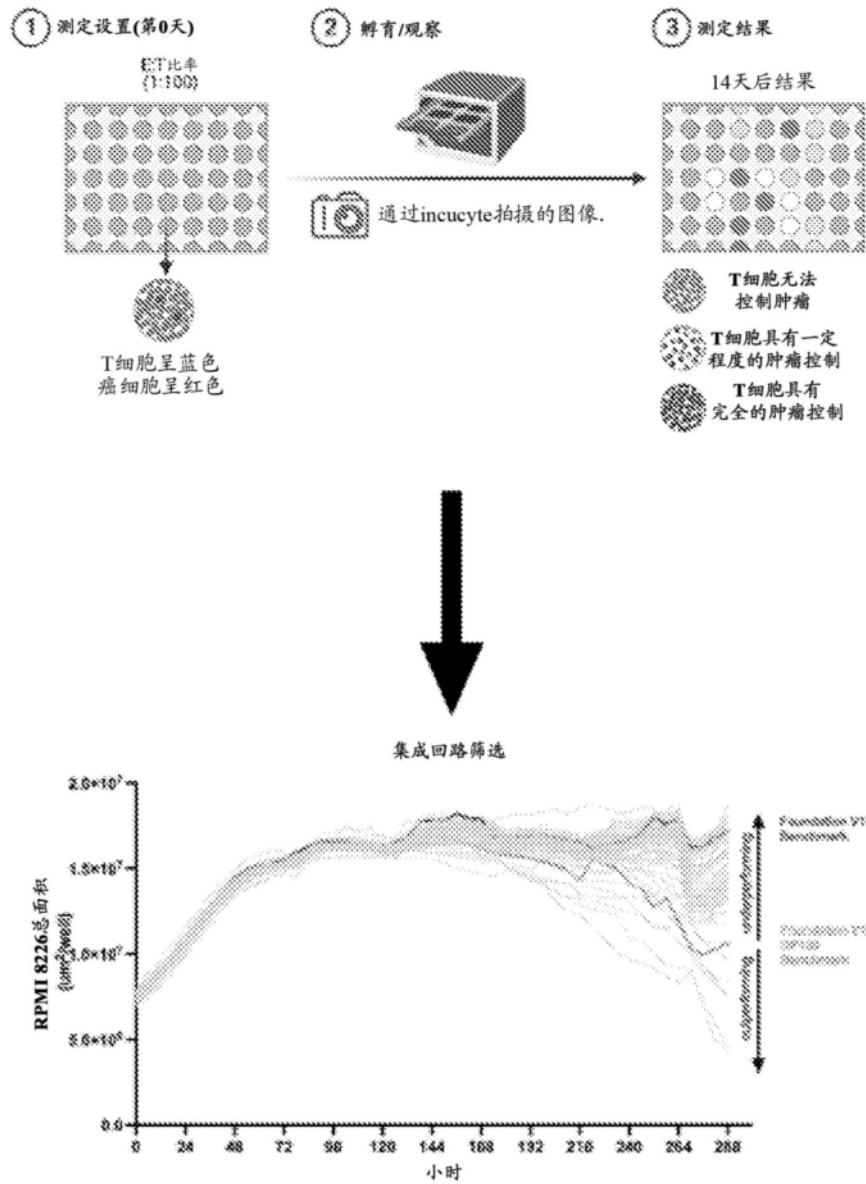


图34C

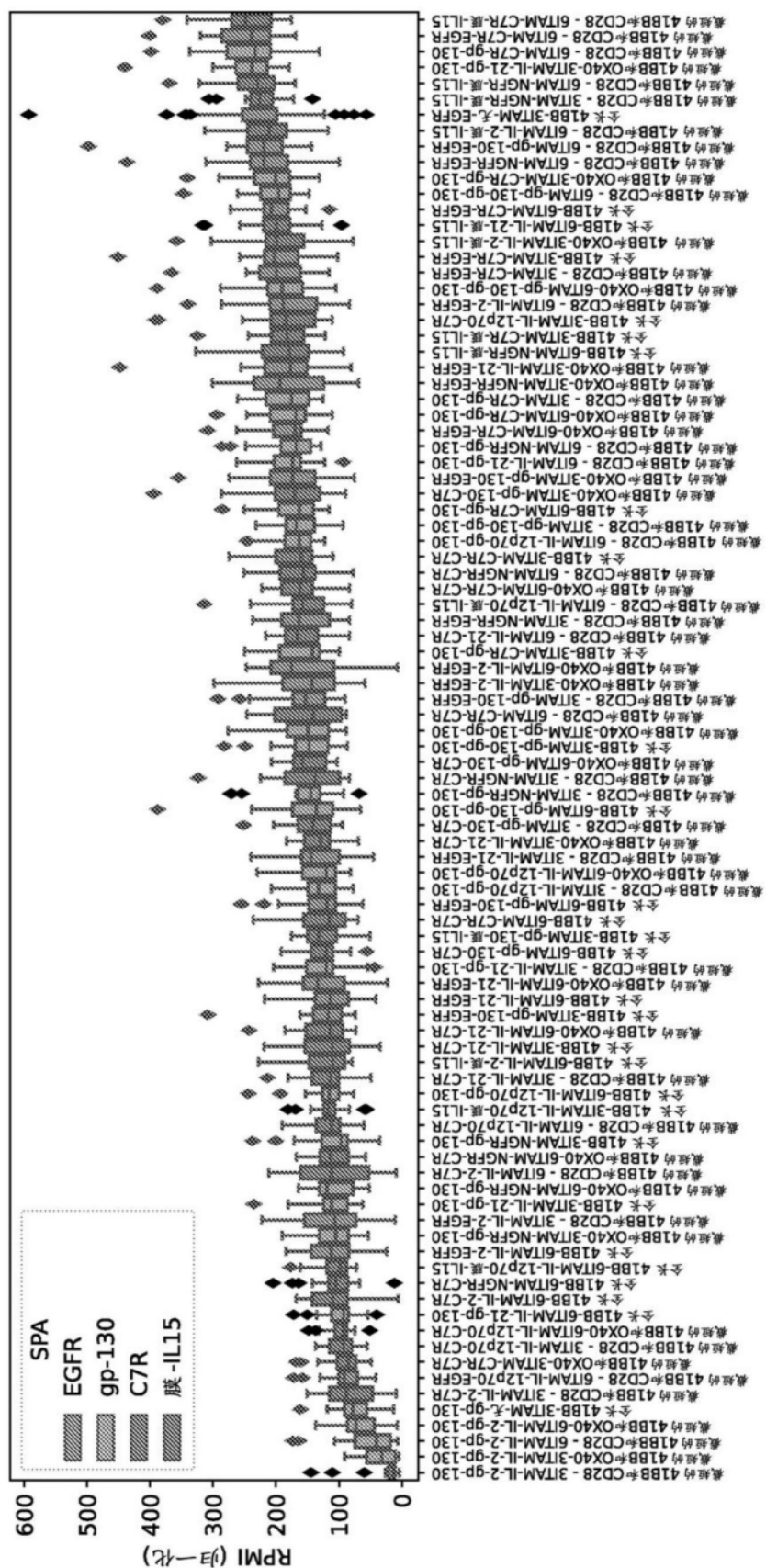


图35A

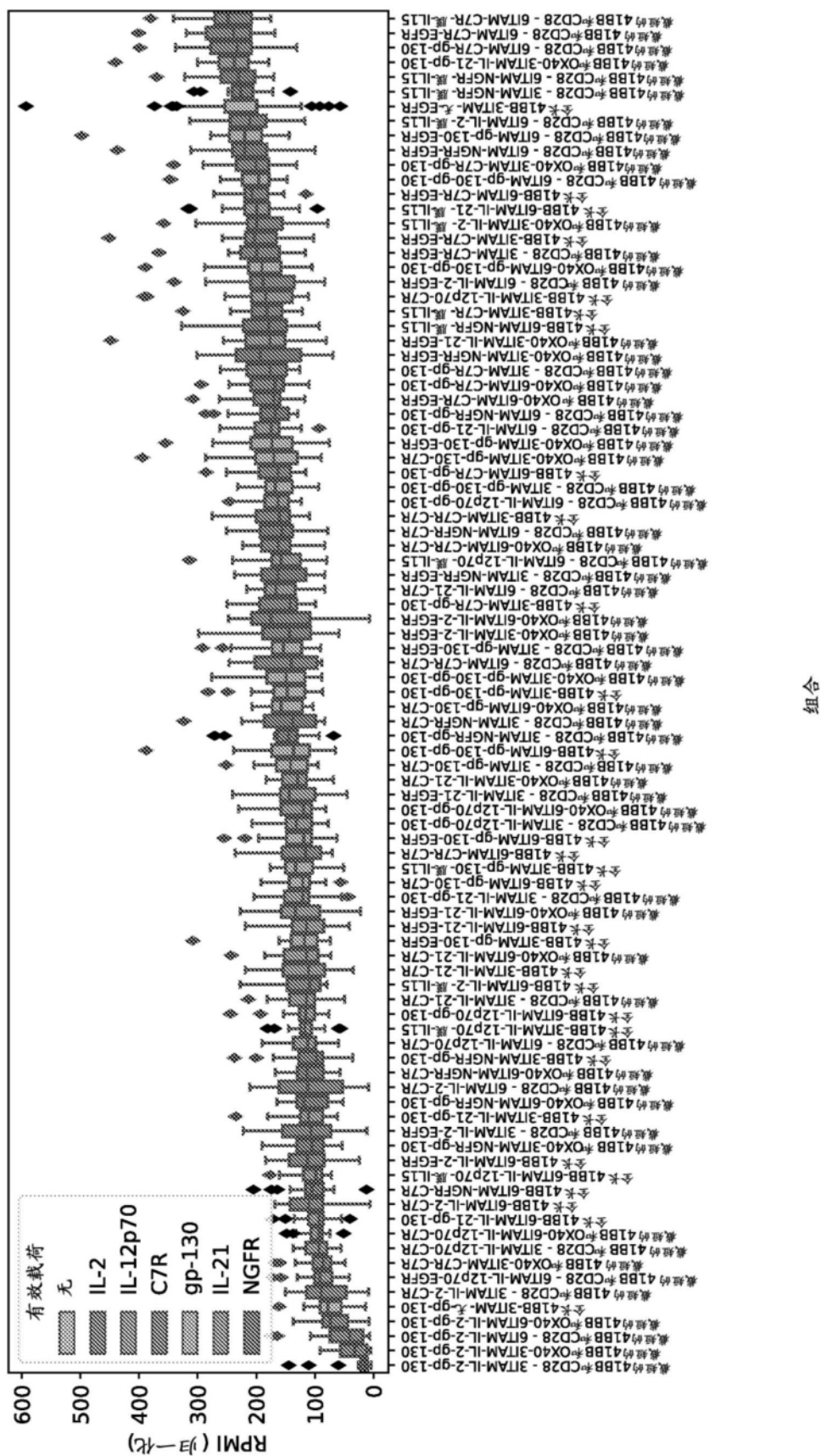


图35B

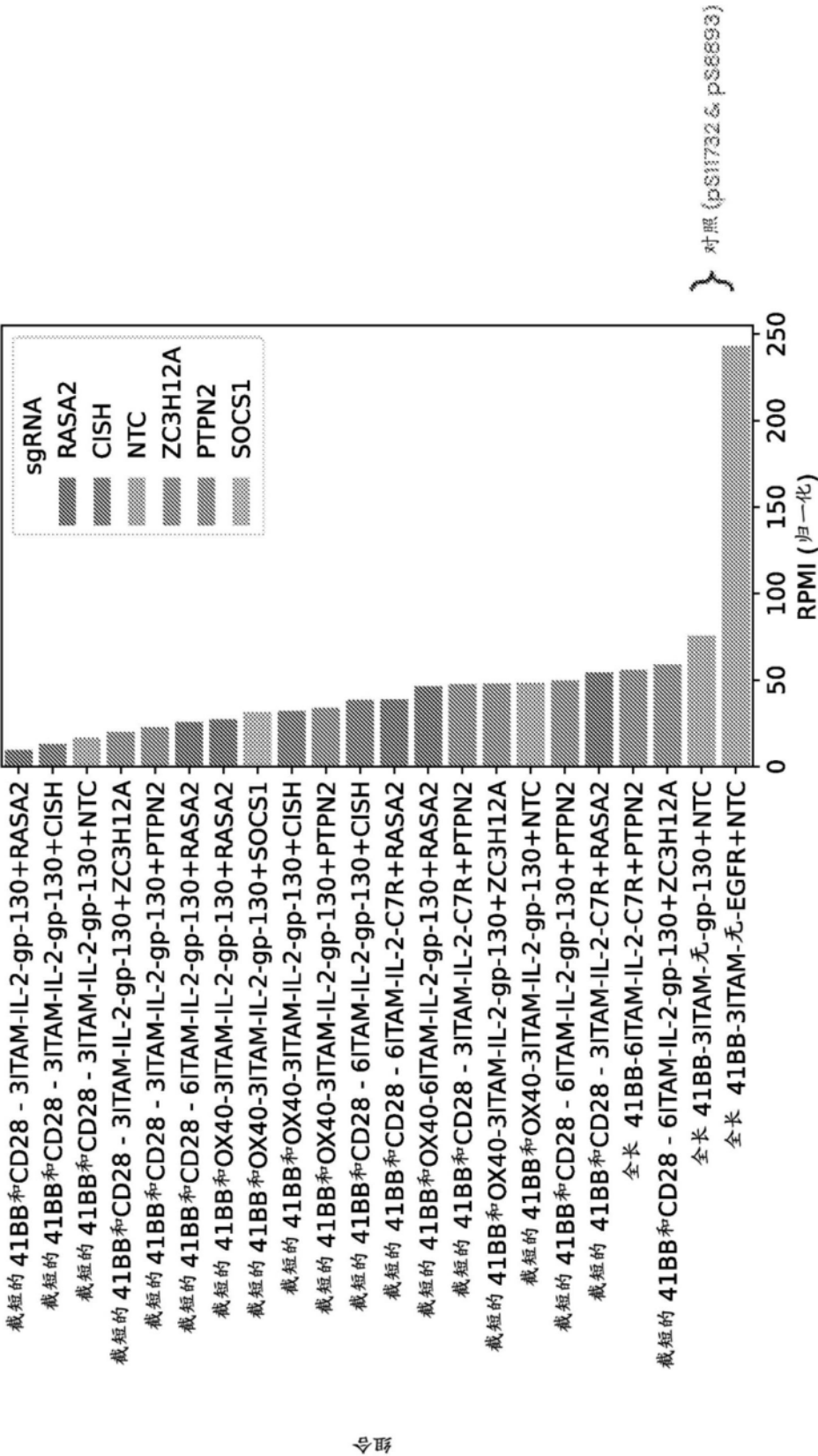


图35C

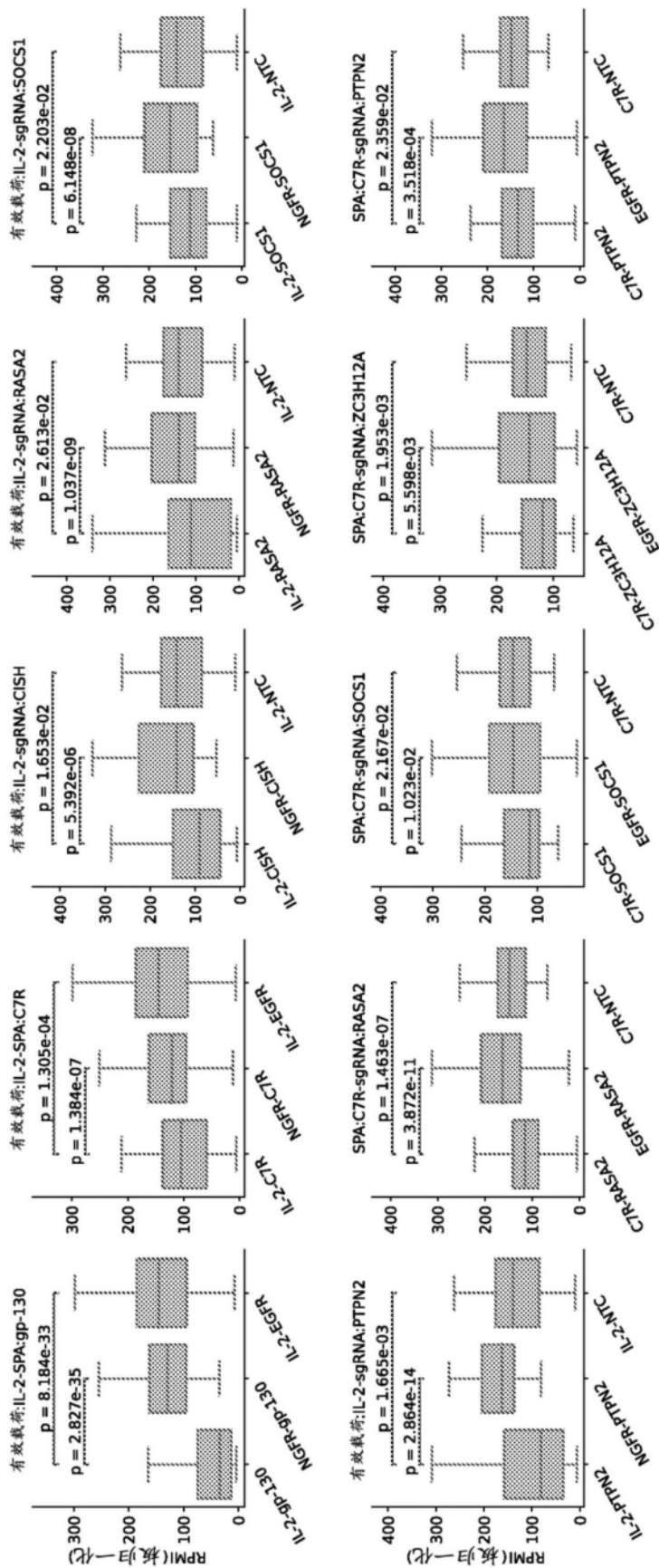


图36A

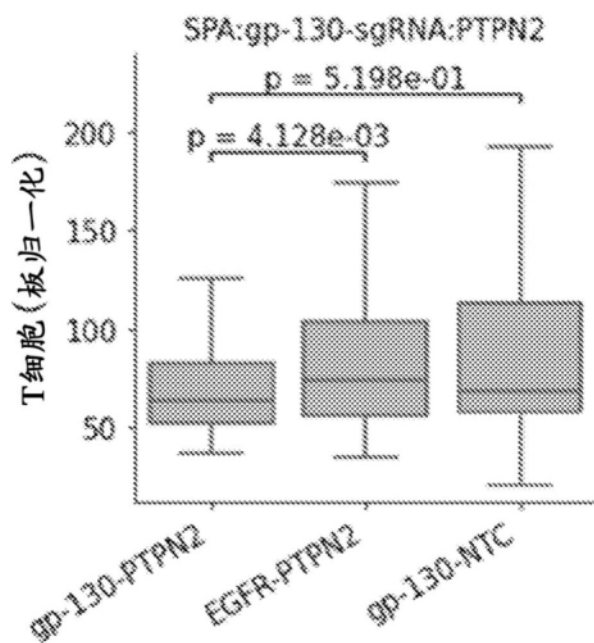


图37A

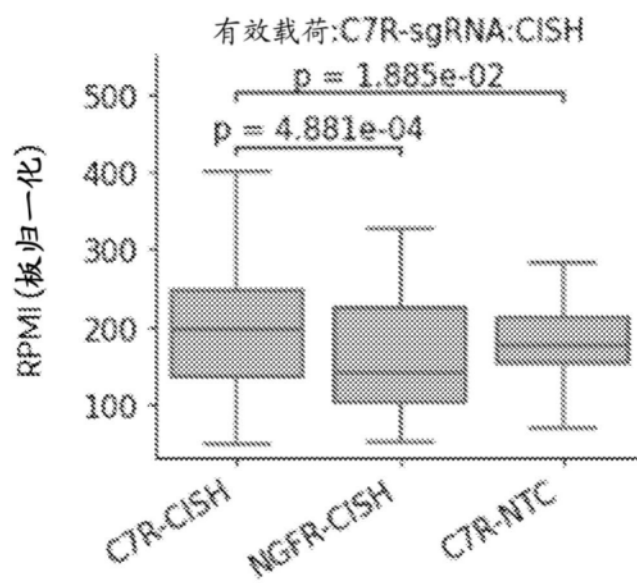


图37B

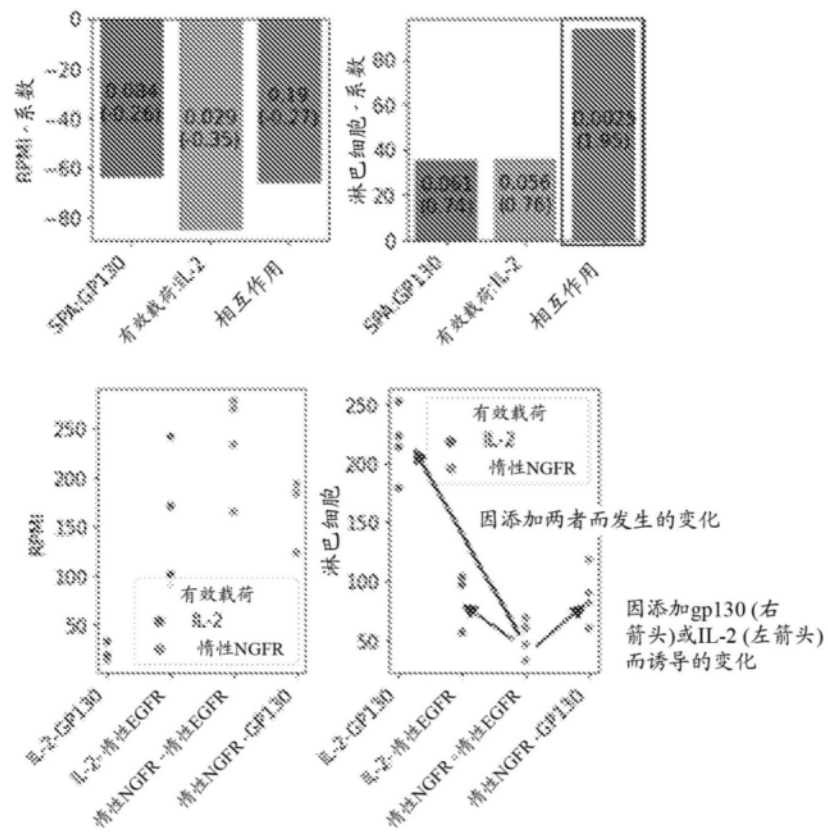


图37C

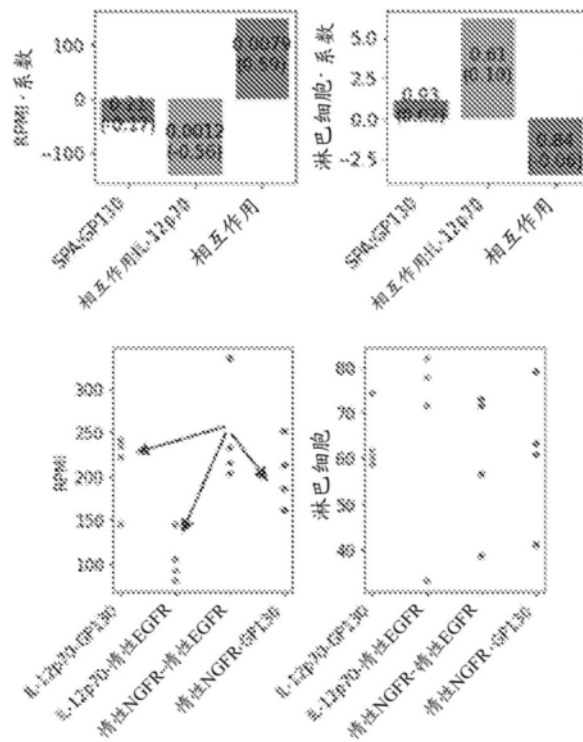


图37D

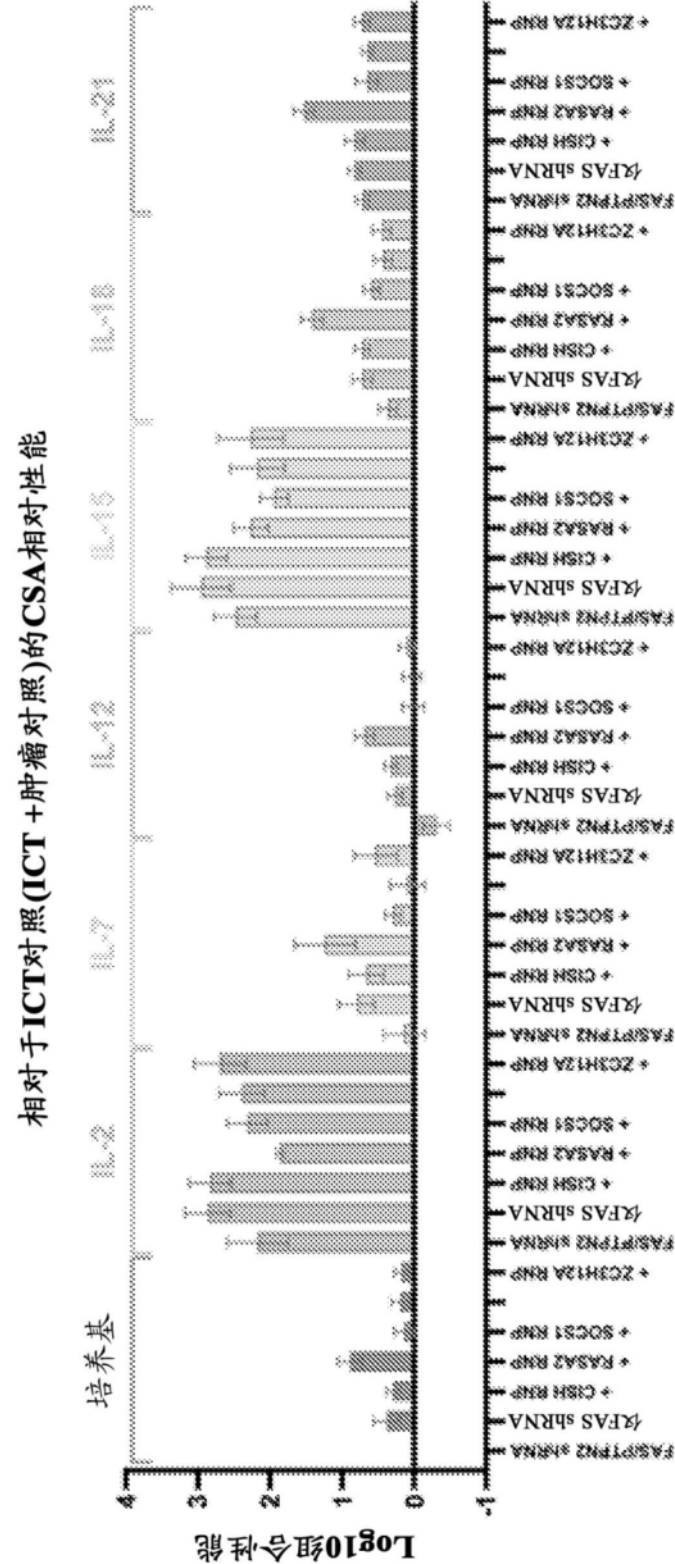


图38

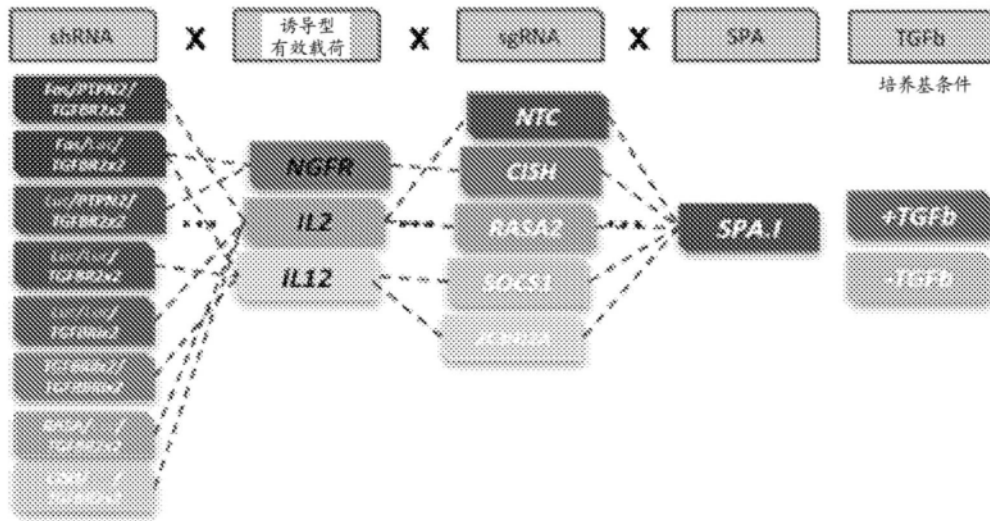


图39A

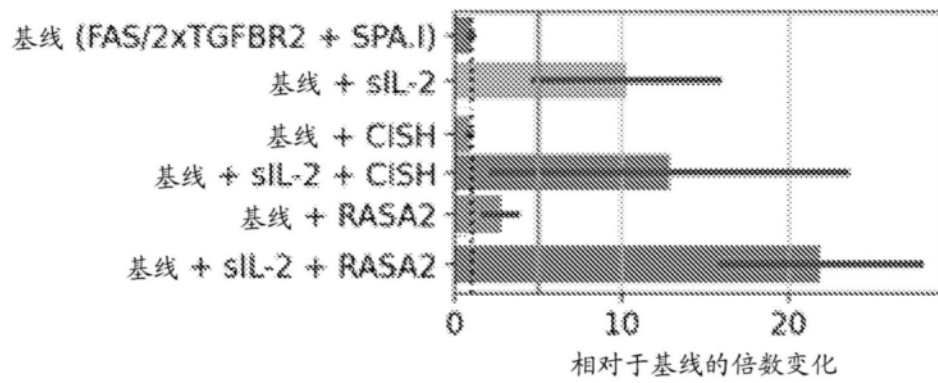


图39B

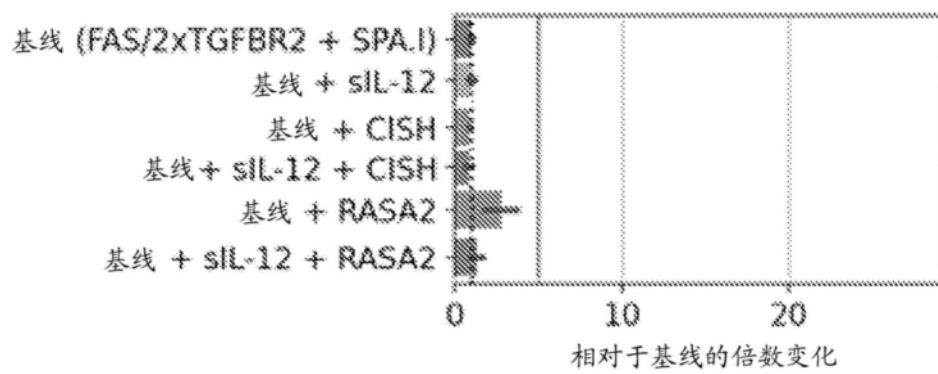


图39C

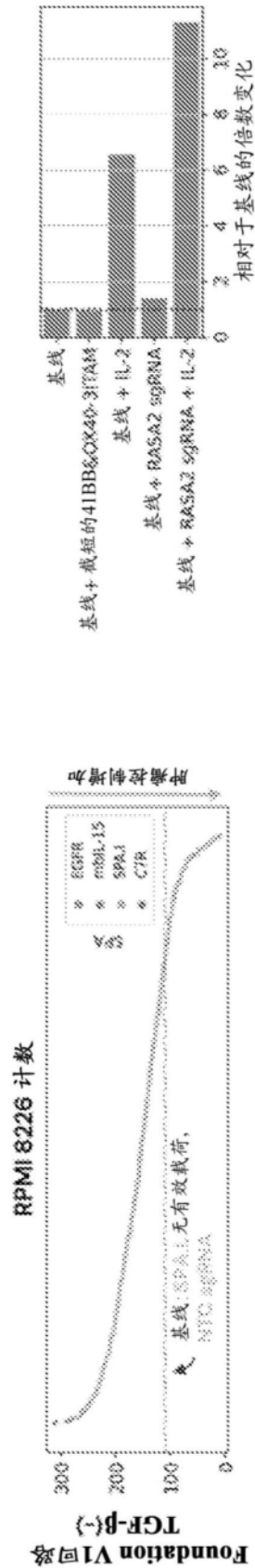
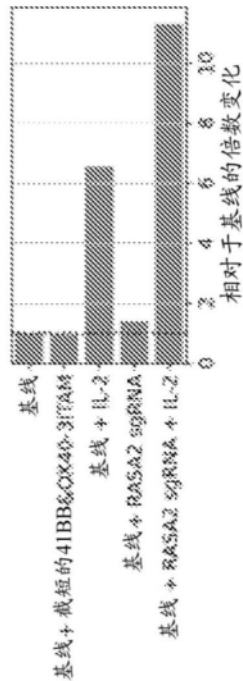


图40A



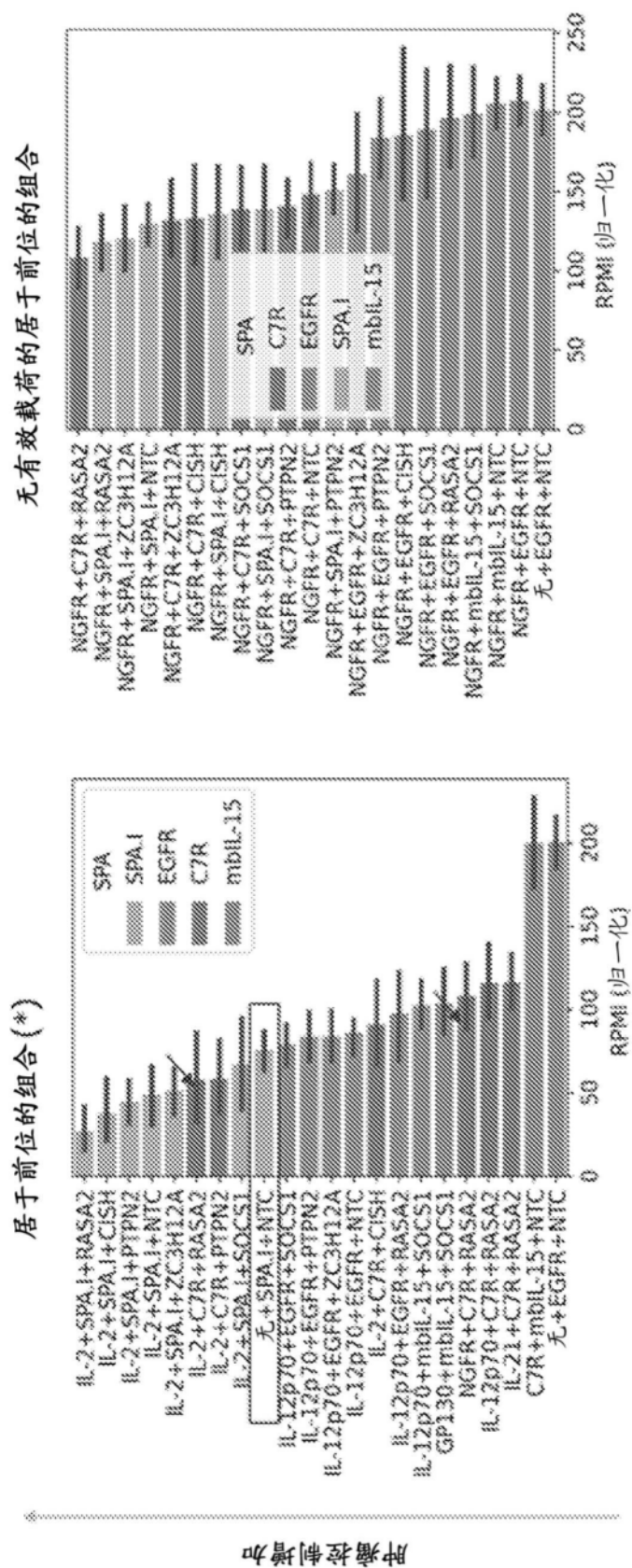


图40C

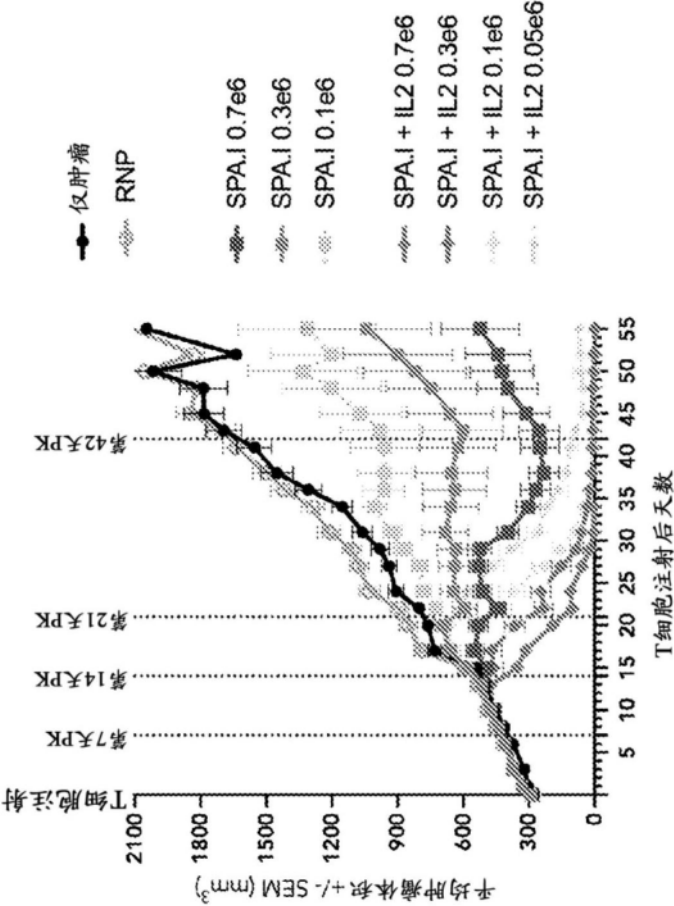


图41A

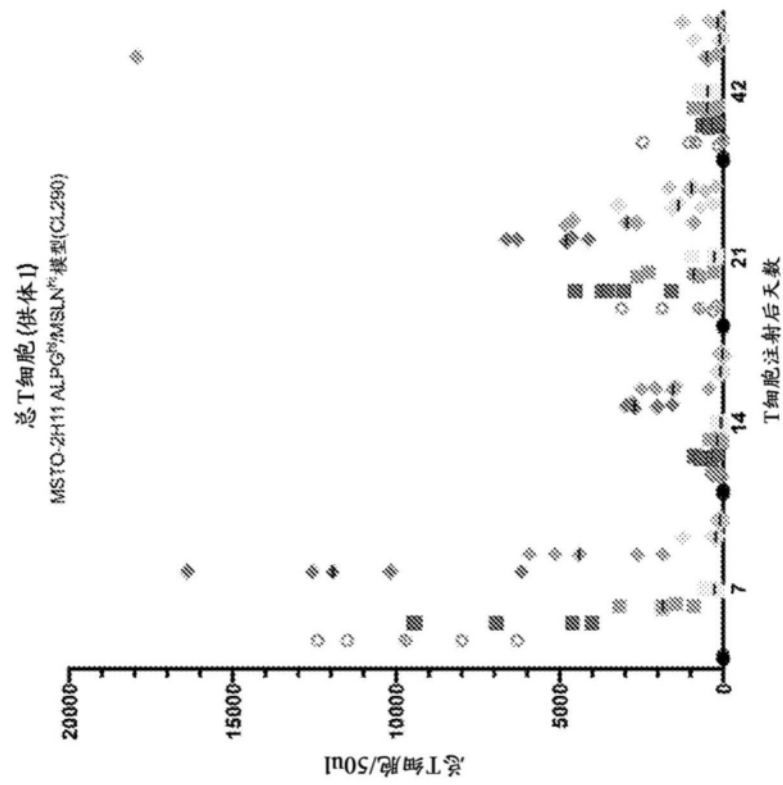


图41B

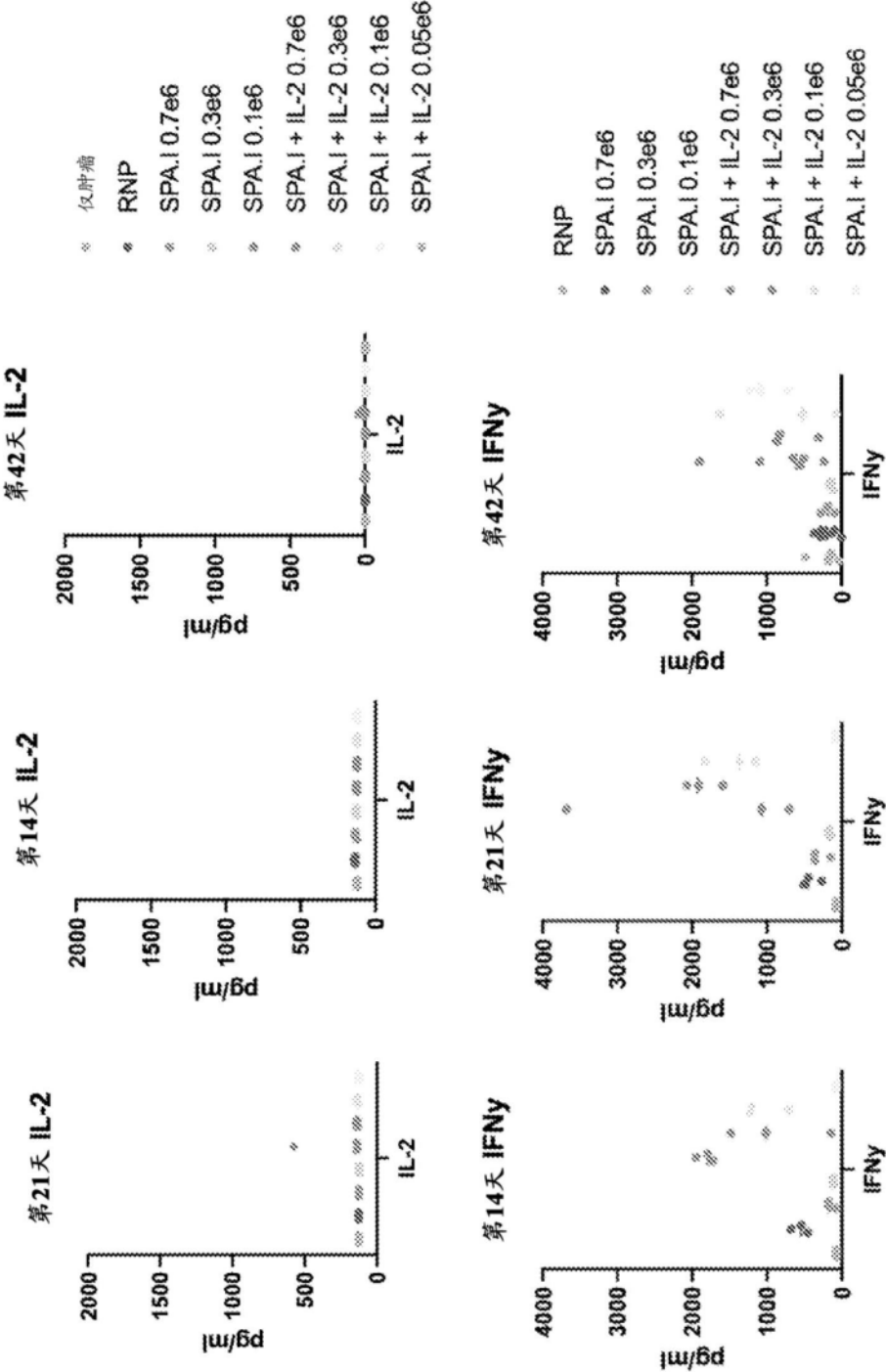


图42

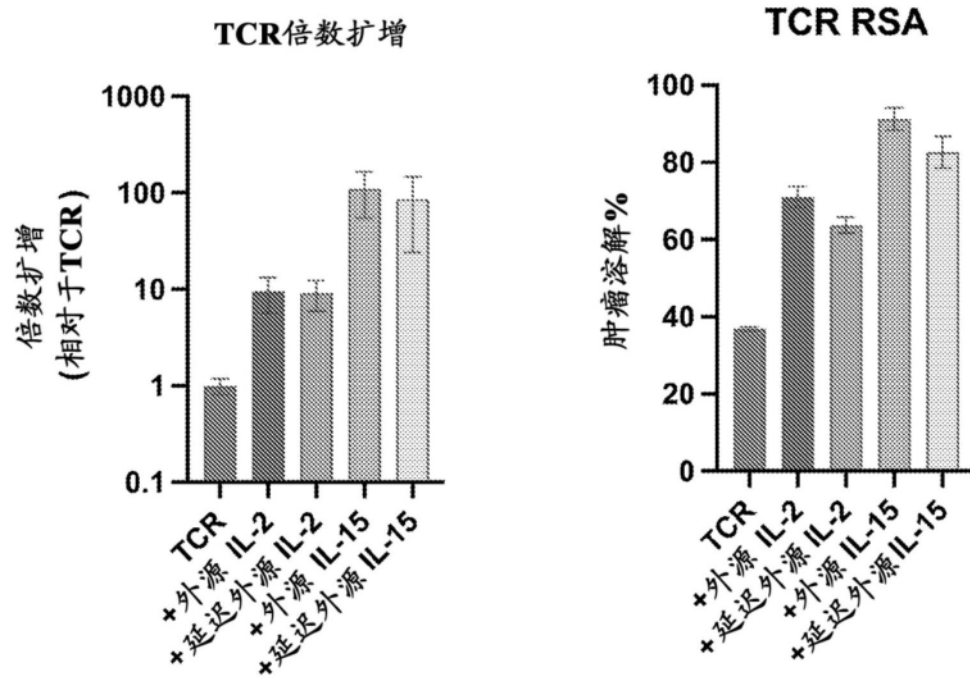


图43A

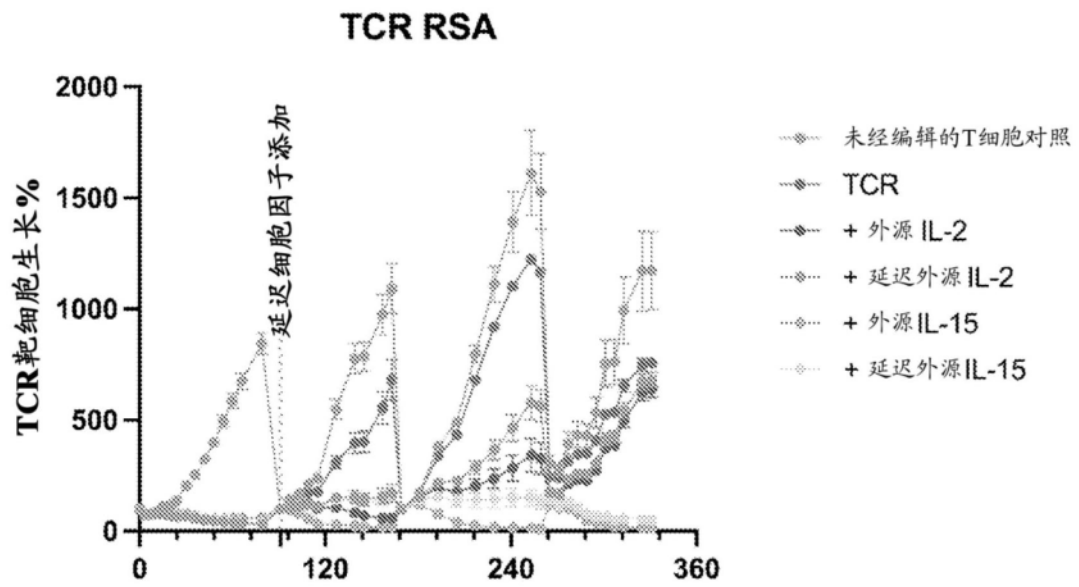


图43B

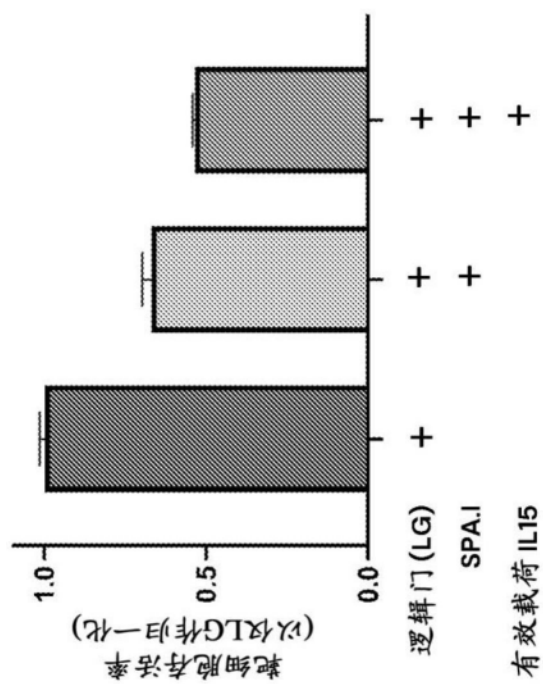


图44