



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109790517 B

(45) 授权公告日 2023.05.02

(21) 申请号 201780037351.1

朗索瓦·埃奎姆

(22) 申请日 2017.04.14

J·曼西利亚-索托

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109790517 A

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

专利代理师 贺淑东

(43) 申请公布日 2019.05.21

(51) Int.Cl.

(30) 优先权数据

C12N 5/0783 (2006.01)

62/323,623 2016.04.15 US

C07K 14/725 (2006.01)

62/323,675 2016.04.16 US

C12N 9/22 (2006.01)

62/461,677 2017.02.21 US

C12N 15/63 (2006.01)

62/462,243 2017.02.22 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2018.12.14

(56) 对比文件

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/027601 2017.04.14

US 2014271581 A1, 2014.09.18

US 2014271581 A1, 2014.09.18

WO 2014059173 A2, 2014.04.17

US 2011158957 A1, 2011.06.30

CA 2945393 A1, 2015.10.29

(续)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02017/180989 EN 2017.10.19

审查员 刘天

(73) 专利权人 纪念斯隆-凯特林癌症中心

地址 美国纽约州

(72) 发明人 迈克尔·W·J·塞德莱恩

贾斯廷·加布里埃尔·安德烈·弗

权利要求书3页 说明书95页

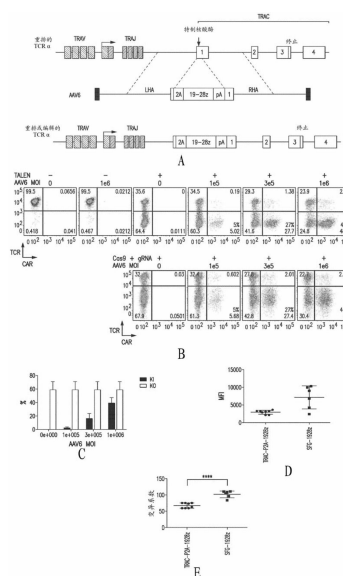
序列表35页 附图94页

## (54) 发明名称

转基因T细胞和嵌合抗原受体T细胞组合物和相关方法

## (57) 摘要

本发明提供其中一个或多个治疗性转基因在细胞基因组内的位点处整合使得转基因的表达在T细胞的内源启动子控制下的T细胞。本发明另外提供制备并使用这类细胞以T细胞疗法治疗对象的方法。本发明还提供其中编码嵌合抗原受体(CAR)的重组核酸序列在细胞基因组内的第一位点处整合使得CAR由细胞在细胞表面表达,且其中编码CAR的核酸在第一位点的整合降低或防止功能性T细胞受体(TCR)复合物在细胞表面表达的T细胞。本发明另外提供制备并使用这类细胞以CAR疗法治疗对象的方法。



[接上页]

**(56) 对比文件**

Nicholas et al..Targeted gene editing restores regulated CD40L function in X-linked hyper-IgM syndrome.《Blood》.2016,第127卷(第21期),摘要,第2513页左栏第1-2段,第2514页右栏第4段.

Hiroki et al..A foundation for universal T-cell based immunotherapy: T cells engineered to express a CD19-specific chimeric-antigen-receptor and eliminate expression of endogenous TCR.《Blood》.2012,第119卷(第24期),第5697-5705页.

1. 一种人T细胞,其中编码嵌合抗原受体(CAR)的重组核酸序列在T细胞基因组内的第一位点处整合使得CAR由T细胞在T细胞表面表达,所述第一位点是T细胞受体(TCR)  $\alpha$ 链恒定区的第一外显子,且其中编码CAR的核酸序列在所述第一位点处的整合防止功能性TCR复合物在T细胞表面表达,该整合的核酸序列在T细胞中的表达在内源TCR $\alpha$ 链启动子的控制下。

2. 权利要求1的人T细胞,其中该编码CAR的核酸序列在T细胞基因组内的单一位点处整合。

3. 权利要求1的人T细胞,其中该编码CAR的核酸序列在T细胞基因组内的两个位点处整合。

4. 权利要求1的人T细胞,其中该编码CAR的核酸序列通过靶向同源重组整合至所述第一位点。

5. 权利要求1的人T细胞,其中该编码CAR的核酸序列在T细胞基因组内的多个位点整合,使得该编码CAR的核酸序列在所述多个位点处的表达在不同内源启动子的控制下。

6. 权利要求1的人T细胞,其中该编码CAR的核酸序列还在T细胞基因组内的第二位点处整合使得CAR由细胞在T细胞表面表达。

7. 权利要求6的人T细胞,其中该编码CAR的核酸在所述第二位点处的整合还降低或防止功能性TCR复合物在T细胞表面表达,其中所述第一位点和所述第二位点在不同的基因上。

8. 权利要求1的人T细胞,进一步包括编码第二CAR的第二核酸序列,其中编码该第二CAR的该第二核酸序列在T细胞基因组内的第二位点处整合使得第二CAR由T细胞在T细胞表面表达,并使得该第二核酸序列的表达在所述第二位点的内源启动子的控制下,其中所述第一位点和所述第二位点在不同的基因上。

9. 一种人T细胞,其中编码嵌合抗原受体(CAR)的无启动子重组核酸序列在细胞基因组的位点处整合,所述位点为TCR $\alpha$ 链恒定区的第一外显子,使得CAR在内源TCR $\alpha$ 链启动子的控制下表达以在细胞表面产生所述CAR,且其中CAR在所述位点处的整合防止功能性TCR $\alpha$ 链的表达。

10. 权利要求9的人T细胞,其中该CAR与CD19结合。

11. 权利要求1的人T细胞,其中该CAR与癌抗原结合。

12. 权利要求11的人T细胞,其中该癌抗原是CD19。

13. 一种分离的T细胞群,其包含权利要求1-9任一项的人T细胞。

14. 一种药物组合物,其包含治疗有效量的权利要求1-9任一项的人T细胞;和药学上可接受的载体。

15. 一种药物组合物,其包含治疗有效量的T细胞群和药学上可接受的载体,所述T细胞群包含权利要求1-9任一项的人T细胞。

16. 权利要求14的药物组合物在制备用于治疗需要CAR细胞疗法的对象的药物中的用途。

17. 权利要求16的用途,其中该对象是人。

18. 权利要求14所述的药物组合物在制备用于治疗患有癌症的受试者的药物中的用途,其中所述CAR与所述癌症的癌抗原结合。

19. 权利要求18的用途,其中所述癌症选自肉瘤、白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、黑色

素瘤、脑瘤、脊髓肿瘤、生殖细胞肿瘤、神经内分泌肿瘤和类癌瘤。

20. 权利要求18的用途,其中所述癌症是血癌。

21. 权利要求20的用途,其中所述癌症是淋巴瘤或白血病。

22. 权利要求18的用途,其中所述受试者是人。

23. 权利要求14所述的药物组合物在制备用于治疗患有传染病的受试者的药物中的用途,其中所述CAR与所述传染病的病原体的抗原结合。

24. 权利要求23的用途,其中所述受试者是人。

25. 权利要求14所述的药物组合物在制备用于治疗患有自身免疫性疾病的受试者的药物中的用途,其中所述CAR与所述自身免疫性疾病的自身免疫抗原结合,并且其中所述人T细胞是调节性T细胞。

26. 权利要求25的用途,其中所述受试者是人。

27. 权利要求14所述的药物组合物在制备用于促进处于移植排斥风险的受试者中的移植耐受性的药物中的用途,其中所述CAR与所述受试者中的移植抗原结合,并且其中所述人T细胞是调节性T细胞。

28. 权利要求27的用途,其中所述受试者是人。

29. 一种产生表达嵌合抗原受体(CAR)并缺乏功能性人T细胞受体(TCR)复合物的T细胞的体外方法,所述方法包括将以下导入人T细胞:

(i) 编码CAR的核酸序列,和

(ii) 适于核酸序列在T细胞基因组内的位点处靶向整合的同源重组系统,该位点为T细胞受体(TCR)  $\alpha$ 链恒定区的第一外显子,使得核酸序列的表达在内源TCR $\alpha$ 链启动子的控制下,藉此同源重组系统使编码CAR的核酸序列在T细胞基因组内的所述位点处整合使得CAR在所述位点处的整合防止功能性TCR复合物在细胞表面表达,从而产生表达CAR并缺乏功能性TCR复合物的T细胞。

30. 一种产生表达嵌合抗原受体(CAR)且缺乏功能性T细胞受体(TCR)复合物的人T细胞的体外方法,所述方法包括将以下导入人T细胞:

(i) 编码CAR的无启动子的重组核酸序列,和

(ii) 一种同源重组系统,适用于将无启动子的重组核酸序列靶向整合到人T细胞基因组内的位点,所述位点是TCR $\alpha$ 链恒定区的第一外显子,使得无启动子的重组核酸序列的表达在内源性TCR $\alpha$ 链启动子的控制之下,由此同源重组系统将编码CAR的无启动子的重组核酸序列整合在人T细胞基因组内的所述位点中,使得在所述位点的CAR整合阻止功能性TCR $\alpha$ 链的表达,从而产生在细胞表面表达CAR并且缺乏功能性TCR复合物的人T细胞。

31. 一种由诱导的多能干细胞产生的人T细胞,其中编码嵌合抗原受体(CAR)的重组核酸序列在T细胞基因组内的第一位点处整合,该位点为T细胞受体(TCR)  $\alpha$ 链恒定区的第一外显子,使得CAR由T细胞在T细胞表面表达,其中编码CAR的核酸在所述第一位点处的整合防止功能性TCR复合物在细胞表面表达,且其中整合的核酸序列是在内源TCR $\alpha$ 链启动子的控制下在T细胞中表达。

32. 一种由诱导的多能干细胞产生的人T细胞,其中编码嵌合抗原受体(CAR)的无启动子重组核酸序列整合在人T细胞基因组内的第一位点,所述第一位点是T细胞受体(TCR)  $\alpha$ 链恒定区的第一外显子,使得CAR在内源性TCR $\alpha$ 链启动子的控制下表达,以在人T细胞表面产



生所述CAR,并且其中将编码CAR的无启动子的重组核酸整合在所述第一位点阻止功能性TCR $\alpha$ 链的表达。

## 转基因T细胞和嵌合抗原受体T细胞组合物和相关方法

### [0001] 1. 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2016年4月15日提交的美国临时申请号62/323,623、2016年4月16日提交的美国临时申请号62/323,675、2017年2月21日提交的美国临时申请号62/461,677和2017年2月22日提交的美国临时申请号62/462,243的权益,其每一个通过引用以其整体并入。

### [0003] 2. 电子版提交序列表的引用

[0004] 本申请通过引用作为ASCII文本文件的序列表与本申请合并,该文本文件于2017年4月7日创建,标题为“13542-043-228\_SL.txt”,大小为76,426字节。

## 3. 技术领域

[0005] 本发明总的来说涉及免疫疗法,更具体地说涉及使用工程改造的免疫细胞(例如T细胞)的免疫疗法。

## 4. 背景技术

[0006] 靶向免疫疗法依赖占用免疫细胞以治疗多种疾病(包括癌症、感染性和自身免疫性疾病)的免疫细胞或分子的应用(Miller&Sadelain,Cancer Cell.27(4):439-49(2015); Sabatos-Peyton et al.,Curr.Opin.Immunol.22(5):609-615(2010);McLeod&Anderton,Curr.Opin.Pharmacol.23:1-108(2015))。最近,表达靶向肿瘤抗原的嵌合抗原受体(CAR)的T细胞的遗传修饰可供成功消除人的白血病细胞(Brentjens et al.,Sci.Transl.Med.5(177):177ra38.doi:10.1126/scitranslmed.3005930(2013))。在后一方法中,通过有整合能力的 $\gamma$ -反转录病毒或慢病毒将编码CAR的互补DNA(cDNA)递送至T细胞。这些重组病毒载体需要病毒整合酶,该酶以半随机方式催化病毒DNA整合至人基因组(Schroder et al.,Cell 110(4):521-529(2002);Wu et al.,Science 300(5626):1749-1751(2003))。第三种方法利用DNA转座机制,其组分可被递送至细胞而无需病毒颗粒。在这种情况下,DNA转座酶同样以半随机方式进行DNA转座子(含有目标基因)至人基因组的整合(Yant et al.,Mol.Cell.Biol.25(6):2085-2094(2005))。所有上述基因递送方法产生因整合载体的不同基因组位置所致显示异源CAR表达的T细胞群。这种“混杂表达”限制了具有对于靶细胞相互作用和T细胞活化强度是最佳的CAR表达的细胞数目。另外,这种不受控制的DNA整合可能导致插入诱变,这种可能激活原癌基因或使肿瘤抑制基因失活。这些遗传修饰方法的另一个限制是T细胞仍然表达其抗原受体,称为TCR,其仍可参与抗原识别,因此激活CAR T细胞。这种潜在副作用限制了在自身免疫病患者中使用自体CAR T细胞或在任何接受者中使用同种异体CAR T细胞,其为其中T细胞可能攻击接受者组织的两种情况(在第一种情况下引起自身免疫,在后者引起移植物抗宿主病(GvHD))。

[0007] 细胞通过同源重组的遗传修饰允许外源DNA在所选的基因组位点精确整合(Cappechi et al.,Nat.Rev.Genet.6(6):507-512(2005))。最近描述了这类靶向递送,其中使含有启动子的CAR构建体靶向人原代T细胞中的CCR5基因座,这允许修饰的T细胞体外

杀死肿瘤细胞 (Sather et al., Sci. Transl. Med. 7 (307):307ra156.doi:10.1126/scitranslmed.aac5530 (2015))。虽然引人关注,但作者未表明被MND启动子驱动的CAR表达是否可在CCR5基因座中保持不变,更重要的是,他们未表明CAR表达的水平最适于体内消除肿瘤细胞。另外,CCR5破坏与对西尼罗病毒易感性提高有关 (Lim et al., Trends Immunol. 27 (7):308-312 (2006))。

[0008] 使用嵌合抗原受体 (CAR) 的过继免疫疗法在白血病治疗中显示出显著的临床效果,是治疗癌症的最有前景的新策略。现行临床方案利用通过血液成分单采术收集并用稳定表达CAR的反转录病毒载体改造的自体T细胞,所述CAR负责胞外肿瘤分子的识别和经改造的T细胞的活化。该方法需要患者特异性细胞制备,这不可避免地引起患者与患者间最终细胞产物的变化性。该方法的广泛实施将进一步要求细胞制备的自动化和小型化的发展以满足对CAR T细胞的需求。此外,现行方法利用随机整合性载体,包括 $\gamma$ -反转录病毒、慢病毒和转座子,这全都导致半随机整合和因转基因多样化所致的可变CAR表达。位置效应可导致异源T细胞功能、转基因沉默和潜在的插入肿瘤发生 (insertional oncogenesis)。因此,自体细胞来源和随机载体整合联合易产生不同功效的细胞产物。

[0009] 不同的特制核酸酶,包括CRISPR/Cas9系统、锌指核酸酶或TAL效应子核酸酶 (TALEN),之前用于多种人细胞包括原代T细胞中的基因破坏。在一些情况下,通过破坏T细胞受体 (TCR) 或HLA I类表达,这些核酸酶已被用来产生用于同种异体施用的所谓“通用T细胞”,但病毒载体或睡美人转座子被用来递送CAR cDNA,所有这些导致半随机转基因整合及其下游后果。

[0010] 为了克服TCR表达可能对CAR T细胞的同种异体反应性造成的负面影响,许多实验室设计了特异性靶向和切割TCR $\alpha$ 或 $\beta$ 链恒定区的5'端的特制核酸酶 (锌指核酸酶、TALE核酸酶和CRISPR/Cas9核酸酶) (Provasi et al., Nat. Med. 18 (5):807-815 (2012); Poirot et al., Cancer Res. 75 (18):3853-3864 (2015); Osborn et al., Mol. Ther. 24 (3):570-581 (2016))。在任一位置的切割导致通过称为非同源末端连接 (NHEJ) 的DNA修复机制整合的DNA修饰。突变区防止重排V(D)J基因与其各自的恒定区之间的正确剪接,因此阻止TCR复合物在细胞表面的正确装配。然后将这些无法引起GVHD的TCR阴性细胞用来表达用转座子或慢病毒递送的CAR (Torikai et al., Blood 119 (24):5697-5705 (2012); Poirot et al., Cancer Res. 75 (18):3853-3864 (2015))。虽然这些CAR T细胞具有不表达可能引起GVHD的TCR的优势,但它们仍存在因CAR基因的半随机整合所引起的上述缺陷 (混杂表达、插入诱变)。

[0011] 前述用于遗传工程改造细胞 (例如T细胞) 的方法,包括使用病毒载体内的诱导型启动子 (例如反转录病毒载体中的NFAT启动子或synNotch构建体),或使用控制转录或蛋白质聚集的小分子 (Ponomarev et al., Neoplasia 3 (6):480-488 (2001); Zhang et al., Mol. Ther. 19 (4):751-759 (2011); Roybal et al., Cell 167 (2):419-432, e16 (2016); Wu et al., Science 350 (6258):aab4077 (2015); Juillerat et al., Sci. report 18950 (2016))。这些方法对许多难题和障碍 (包括随机整合的转基因的混杂表达)、静脉内药物输注的必要性和这些药物的药效学限制、以及用于这些方法中的某些的蛋白质组分 (例如嵌合转录因子、免疫原性蛋白质结构域) 的免疫原性敏感。

[0012] 嵌合抗原受体 (CAR) 是使T细胞重定向和重编程以介导肿瘤排斥的合成受体

(Jensen et al., Curr. Opin. Immunol. 33:9-15 (2015))。迄今所用的最成功的CAR是靶向CD19的那些(Brentjens et al., Nat. Med. 9:279-286 (2003))，这为患有化疗不应性/复发性B细胞恶性肿瘤的患者提供了完全缓解的前景(Sadelain, J. Clin. Invest. 125:3392-3400 (2015))。通常使用 $\gamma$ -反转录病毒(Sadelain et al., Ninth International Immunology Congress, Budapest, 88:34 (1992))或其它随机整合性载体(Wang et al., Mol. Ther. Oncolytics 3:16015 (2016))将CAR导入患者T细胞中，这可导致克隆增殖、致癌性转化、混杂转基因表达和转录沉默(Ellis, Hum. Gene Ther. 16:1241-1246 (2005)；Riviere et al., Blood 119:1107-1116 (2012)；von Kalle et al., Hum. Gene Ther. 25:475-481 (2014))。基因组编辑中的最新进展使得在人细胞中高效的序列特异性干预成为可能(Wright et al., Cell 164:29-44 (2016)；Tsai et al., Nat. Rev. Genet. 17:300-312 (2016))，包括至CCR5和AAVS1基因座的靶定基因递送(Lombardo et al., Nat. Methods 8:861-869 (2011)；Sather et al., Sci. Transl. Med. 7:307ra156 (2015))。

[0013] 因此，存在对采用免疫疗法提供改进的治疗(例如癌症或其它疾病的治疗)的需要。本发明满足了这种需要。

## 5. 发明内容

[0014] 本发明反映在本文提供和如下所述的权利要求书。本发明涉及其中转基因在T细胞的基因组内整合使得转基因的表达在内源启动子控制下的T细胞，并涉及使用所述细胞的方法。

[0015] 一方面，本文提供其中转基因在T细胞基因组内的第一位点处整合使得转基因的表达在T细胞的内源启动子控制下的T细胞，其中转基因编码治疗性蛋白质或治疗性核酸。在某些实施方案中，转基因编码治疗性蛋白质。在某些实施方案中，转基因编码治疗性核酸。在某些实施方案中，转基因在基因组内的单一位点处整合。在某些实施方案中，转基因在细胞基因组内的两个位点处整合。在某些实施方案中，第一位点是在内源启动子控制下的内源基因的外显子。在一个具体实施方案中，第一位点在内源基因的第一外显子内。

[0016] 在其中转基因在上述T细胞基因组内的第一位点处整合的T细胞的某些实施方案中，内源启动子是组成型的。在某些实施方案中，作为组成型的内源启动子选自CD4启动子、CD8a启动子、CD8b启动子、TCRa启动子、TCRb启动子、CD3d启动子、CD3g启动子、CD3e启动子和CD3z启动子。

[0017] 在其中转基因在上述T细胞基因组内的第一位点处整合的T细胞的某些实施方案中，内源启动子在T细胞亚群中是有活性的。在某些实施方案中，在T细胞亚群中是有活性的内源启动子选自CD4启动子、CD8a启动子、CD8b启动子、TCRa启动子、TCRb启动子、CD3d启动子、CD3g启动子、CD3e启动子、CD3z启动子、肌动蛋白启动子、CD25启动子、IL2启动子、CD69启动子、GzmB启动子、T-bet启动子、IFN $\gamma$ 启动子、TIM3启动子、IL4启动子、GATA3启动子、IL5启动子、IL13启动子、IL10启动子、IL17A启动子、IL6启动子、IL21启动子、IL23R启动子、FoxP3启动子、CTLA4启动子、CD25启动子、PD1启动子、CD45RO启动子、CCR7启动子、CD28启动子、CD95启动子、CD28启动子、CD27启动子、CD127启动子、PD-1启动子、CD122启动子、CD132启动子、KLRG-1启动子、HLA-DR启动子、CD38启动子、CD69启动子、Ki-67启动子、CD11a启动子、CD58启动子、CD99启动子、CD62L启动子、CD103启动子、CCR4启动子、CCR5启动子、CCR6启

动子、CCR9启动子、CCR10启动子、CXCR3启动子、CXCR4启动子、CLA启动子、粒酶A启动子、粒酶B启动子、穿孔蛋白启动子、CD57启动子、CD161启动子、IL-18Ra启动子、c-Kit启动子和CD130启动子。

[0018] 在其中转基因在上述T细胞基因组内的第一位点处整合的T细胞的某些实施方案中,内源启动子是诱导型的。

[0019] 在某些实施方案中,作为诱导型的内源启动子被T细胞的活化诱导。在某些实施方案中,作为诱导型的内源启动子被由T细胞表达的嵌合抗原受体(CAR)、嵌合共刺激受体(CCR)、T细胞受体(TCR)、CD28、CD27或4-1BB与其各自的结合配偶体的结合诱导。在某些实施方案中,启动子被由T细胞表达的CAR、CCR或TCR与其各自的结合配偶体的结合诱导。在某些实施方案中,通过由T细胞表达的CAR、CCR或TCR与其各自的结合配偶体结合诱导的启动子选自活化T细胞(NFAT)启动子、程序性死亡1(PD-1)启动子、T细胞免疫球蛋白黏蛋白-3(TIM-3)启动子、细胞毒性T淋巴细胞抗原-4(CTLA4)启动子、淋巴细胞活化蛋白3(LAG-3)启动子、肿瘤坏死因子(TNF)相关细胞凋亡诱导性配体(TRAIL)启动子、B-和T-淋巴细胞弱化子(BTLA)启动子、CD25启动子、CD69启动子、Fas配体(FasL)启动子、TIGIT启动子和2B4启动子的核因子。

[0020] 在某些实施方案中,作为诱导型的内源启动子被配体与由T细胞表达的抑制性受体的结合诱导。在其中被配体与由T细胞表达的抑制性受体的结合诱导的某些实施方案中,抑制性受体选自PD-1、CTLA4、TRAIL、LAG-3、BTLA、TIM-3、Fas、TIGIT和2B4。在其中被配体与由T细胞表达的抑制性受体的结合诱导的某些实施方案中,启动子选自CPT1a启动子和ATGL启动子。

[0021] 在某些实施方案中,作为诱导型的内源启动子被细胞因子与由T细胞表达的细胞因子受体的结合诱导。在其中启动子被细胞因子与由T细胞表达的细胞因子受体的结合诱导的某些实施方案中,细胞因子选自白介素2(IL2)、白介素7(IL7)、白介素15(IL15)和白介素21(IL21)。在其中启动子被细胞因子与由T细胞表达的细胞因子受体的结合诱导的某些实施方案中,细胞因子选自白介素10(IL10)和转化生长因子 $\beta$ (TGF $\beta$ )。在其中启动子被细胞因子与由T细胞表达的细胞因子受体的结合诱导的某些实施方案中,启动子选自T-bet启动子、Eomes启动子、GATA3启动子和CD45RA启动子。

[0022] 在某些实施方案中,作为诱导型的内源启动子被细胞与核酸的接触诱导。在其中启动子被细胞与核酸的接触诱导的某些实施方案中,核酸选自病毒DNA、病毒RNA和胞内微小RNA。在某些实施方案中,其中启动子被与选自病毒DNA、病毒RNA和胞内微小RNA的核酸的接触诱导,启动子选自I型干扰素(IFN) $\alpha$ 、I型IFN $\beta$ 、IRF3、IRF7、NF $\kappa$ B、AP-1、TNF- $\alpha$ 、IL1和IL6。

[0023] 在某些实施方案中,作为诱导型的内源启动子被细胞与代谢物的接触诱导。在某些实施方案中,代谢物选自丙酮酸、谷氨酰胺和 $\beta$ -羟基丁酸。

[0024] 在某些实施方案中,作为诱导型的内源启动子被细胞中的代谢变化或细胞与引起细胞代谢变化的物质的接触诱导。在一个具体实施方案中,被细胞中的代谢变化或细胞与引起细胞代谢变化的物质的接触诱导的启动子是PKM2启动子。

[0025] 在某些实施方案中,作为诱导型的内源启动子被细胞中的特定离子浓度或细胞与特定离子浓度的接触诱导。在某些实施方案中,离子是钾或钙。在某些实施方案中,被细胞

中的特定离子浓度或细胞与特定离子浓度的接触诱导的启动子选自IL2启动子、TNF $\alpha$ 启动子和IFN $\gamma$ 启动子。

[0026] 在其中转基因在上述T细胞基因组内的第一位点处整合的T细胞的某些实施方案中,转基因编码选自以下的分子:CAR、CCR、细胞因子、显性负微环境调节剂(dominant negative,microenvironment modulator)、抗体、生物传感器、嵌合受体配体(CRL)、嵌合免疫受体配体(CIRL)、可溶性受体、溶质传递体(solute transporter)、酶、核酶、遗传回路(genetic circuit)、外遗传调节剂、转录激活物、转录阻遏物和非编码RNA。

[0027] 在某些实施方案中,转基因编码细胞因子。在一个实施方案中,任选细胞因子是免疫刺激的。在某些实施方案中,是免疫刺激的细胞因子选自IL2、IL12、IL15和IL18。在另一个实施方案中,任选细胞因子是免疫抑制的。在某些实施方案中,是免疫抑制的细胞因子选自TGF $\beta$ 和IL10。

[0028] 在某些实施方案中,转基因编码抗体。在某些实施方案中,任选抗体选自免疫球蛋白、双特异性T细胞衔接器(BiTE)、双抗体、双重亲和重新靶向(dual affinity re-targeting,DART)、Fab、F(ab')、单链可变片段(scFv)和纳米抗体(nanobody)。

[0029] 在某些实施方案中,转基因编码CAR。在一个具体实施方案中,CAR与癌抗原结合。

[0030] 在其中转基因在上述T细胞基因组内的第一位点处整合的T细胞的某些实施方案中,使T细胞对靶抗原敏感。

[0031] 在其中转基因在上述T细胞基因组内的第一位点处整合的T细胞的某些实施方案中,编码报道分子的转基因(下文称为“报道转基因”)在T细胞的基因组内整合使得报道转基因的表达在启动子的控制下,优选在T细胞的内源启动子的控制下。

[0032] 在其中转基因在上述T细胞基因组内的第一位点处整合的T细胞的某些实施方案中,T细胞来源于人。在来源于人的T细胞的某些实施方案中,T细胞是原代人T细胞、源自CD34造血干细胞的T细胞、源自胚干细胞的T细胞或源自诱导的多能干细胞的T细胞。

[0033] 在其中转基因在上述T细胞基因组内的第一位点处整合的T细胞的某些实施方案中,转基因通过靶向同源重组整合至第一位点。在某些实施方案中,靶向同源重组通过包括使用锌指核酸酶(ZFN)、转录激活物样效应子核酸酶(TALEN)、成簇有规间隔的短回文重复序列(clustered regularly-interspersed short palindromic repeat,CRISPR)相关蛋白9(Cas9)、Cpf1、致热原、Aureus、大范围核酸酶或Mega-Tal的方法进行。

[0034] 在其中转基因在上述T细胞基因组内的第一位点处整合的T细胞的某些实施方案中,转基因在T细胞基因组内的多个位点整合,使得转基因在多个位点的表达在不同内源启动子的控制下。

[0035] 另一方面,本文提供这样的T细胞,其中第一转基因在T细胞基因组内的第一位点处整合使得第一转基因的表达在T细胞的第一内源启动子的控制下,且其中第二转基因在T细胞的基因组的第二位点处整合,使得第二转基因的表达在第二内源启动子的控制下,其中第一和第二内源启动子是不同的启动子,且其中第一转基因编码第一治疗性蛋白质或第一治疗性核酸,第二转基因编码第二治疗性蛋白质或第二治疗性核酸,优选其中第一治疗性蛋白质或第一治疗性核酸分别不同于第二治疗性蛋白质或第二治疗性核酸。在某些实施方案中,第一转基因编码第一治疗性蛋白质。在某些实施方案中,第一转基因编码第一治疗性核酸。在某些实施方案中,第二转基因编码第二治疗性蛋白质。在某些实施方案中,第二

转基因编码第二治疗性核酸。

[0036] 在其中第一转基因在基因组的第一位点处整合和第二转基因在细胞基因组内的第二位点处整合的T细胞的某些实施方案中,第一内源启动子是组成型的,第二内源启动子是诱导型的。在某些实施方案中,组成型启动子选自CD4启动子、CD8a启动子、CD8b启动子、TCRa启动子、TCRb启动子、CD3d启动子、CD3g启动子、CD3e启动子和CD3z启动子。

[0037] 在其中第一转基因在基因组的第一位点处整合和第二转基因在细胞基因组内的第二位点处整合,且其中第一内源启动子是组成型的,第二内源启动子是诱导型的T细胞的某些实施方案中,第一内源启动子和/或第二内源启动子在T细胞亚群中是有活性的。在某些实施方案中,第一内源启动子和/或第二内源启动子独立选自CD4启动子、CD8a启动子、CD8b启动子、TCRa启动子、TCRb启动子、CD3d启动子、CD3g启动子、CD3e启动子、CD3z启动子、肌动蛋白启动子、CD25启动子、IL2启动子、CD69启动子、GzmB启动子、T-bet启动子、IFN $\gamma$ 启动子、TIM3启动子、IL4启动子、GATA3启动子、IL5启动子、IL13启动子、IL10启动子、IL17A启动子、IL6启动子、IL21启动子、IL23R启动子、FoxP3启动子、CTLA4启动子、CD25启动子、PD1启动子、CD45RO启动子、CCR7启动子、CD28启动子、CD95启动子、CD28启动子、CD27启动子、CD127启动子、PD-1启动子、CD122启动子、CD132启动子、KLRG-1启动子、HLA-DR启动子、CD38启动子、CD69启动子、Ki-67启动子、CD11a启动子、CD58启动子、CD99启动子、CD62L启动子、CD103启动子、CCR4启动子、CCR5启动子、CCR6启动子、CCR9启动子、CCR10启动子、CXCR3启动子、CXCR4启动子、CLA启动子、粒酶A启动子、粒酶B启动子、穿孔蛋白启动子、CD57启动子、CD161启动子、IL-18Ra启动子、c-Kit启动子和CD130启动子。

[0038] 在其中第一转基因在基因组的第一位点处整合和第二转基因在细胞基因组内的第二位点处整合,且其中第一内源启动子是组成型的,第二内源启动子是诱导型的T细胞的某些实施方案中,诱导型启动子被T细胞的活化诱导。

[0039] 在其中第一转基因在基因组的第一位点处整合和第二转基因在细胞基因组内的第二位点处整合,且其中第一内源启动子是组成型的,第二内源启动子是诱导型的T细胞的某些实施方案中,诱导型启动子被由T细胞表达的嵌合抗原受体(CAR)、嵌合共刺激受体(CCR)、T细胞受体(TCR)、CD28、CD27和4-1BB与其各自的结合配偶体的结合诱导。在某些实施方案中,诱导型启动子被由T细胞表达的CAR、CCR或TCR与其各自的结合配偶体的结合诱导。在其中诱导型启动子被由T细胞表达的CAR、CCR或TCR与其各自的结合配偶体的结合诱导的某些实施方案中,诱导型启动子选自以下的核因子:活化T细胞(NFAT)启动子、程序性死亡1(PD-1)启动子、T细胞免疫球蛋白黏蛋白-3(TIM-3)启动子、细胞毒性T淋巴细胞抗原-4(CTLA4)启动子、淋巴细胞活化蛋白3(LAG-3)启动子、肿瘤坏死因子(TNF)相关细胞凋亡诱导性配体(TRAIL)启动子、B-和T-淋巴细胞弱化子(BTLA)启动子、CD25启动子、CD69启动子、Fas配体(FasL)启动子、TIGIT启动子和2B4启动子。

[0040] 在其中第一转基因在基因组的第一位点处整合和第二转基因在细胞基因组内的第二位点处整合,且其中第一内源启动子是组成型的,第二内源启动子是诱导型的T细胞的某些实施方案中,诱导型启动子被配体与由T细胞表达的抑制性受体的结合诱导。在某些实施方案中,抑制性受体选自PD-1、CTLA4、TRAIL、LAG-3、BTLA、TIM-3、Fas、TIGIT和2B4。在某些实施方案中,诱导型启动子选自CPT1a启动子和ATGL启动子。

[0041] 在其中第一转基因在基因组的第一位点处整合和第二转基因在细胞基因组内的

第二位点处整合,且其中第一内源启动子是组成型的,第二内源启动子是诱导型的T细胞的某些实施方案中,诱导型启动子被细胞因子与由T细胞表达的细胞因子受体的结合诱导。在某些实施方案中,细胞因子选自白介素2(IL2)、白介素7(IL7)、白介素15(IL15)和白介素21(IL21)。在某些实施方案中,细胞因子选自白介素10(IL10)和转化生长因子 $\beta$ (TGF $\beta$ )。在某些实施方案中,诱导型启动子选自T-bet启动子、Eomes启动子、GATA3启动子和CD45RA启动子。

[0042] 在其中第一转基因在基因组的第一位点处整合和第二转基因在细胞基因组内的第二位点处整合,且其中第一内源启动子是组成型的,第二内源启动子是诱导型的T细胞的某些实施方案中,诱导型启动子被细胞与核酸的接触诱导。在某些实施方案中,核酸选自病毒DNA、病毒RNA和胞内微小RNA。在其中诱导型启动子被细胞与病毒DNA、病毒RNA或胞内微小RNA的接触诱导的某些实施方案中,诱导型启动子选自I型干扰素(IFN) $\alpha$ 、I型IFN $\beta$ 、IRF3、IRF7、NF $\kappa$ B、AP-1、TNF- $\alpha$ 、IL1和IL6。

[0043] 在其中第一转基因在基因组的第一位点处整合和第二转基因在细胞基因组内的第二位点处整合,且其中第一内源启动子是组成型的,第二内源启动子是诱导型的T细胞的某些实施方案中,诱导型启动子被细胞与代谢物的接触诱导。在某些实施方案中,代谢物选自丙酮酸、谷氨酰胺和 $\beta$ -羟基丁酸。

[0044] 在其中第一转基因在基因组的第一位点处整合和第二转基因在细胞基因组内的第二位点处整合,且其中第一内源启动子是组成型的,第二内源启动子是诱导型的T细胞的某些实施方案中,诱导型启动子被细胞中的代谢变化或细胞与引起细胞代谢变化的物质的接触诱导。在某些实施方案中,这类诱导型启动子是PKM2启动子。

[0045] 在其中第一转基因在基因组的第一位点处整合和第二转基因在细胞基因组内的第二位点处整合,且其中第一内源启动子是组成型的,第二内源启动子是诱导型的T细胞的某些实施方案中,诱导型启动子被细胞中的特定离子浓度或细胞与特定离子浓度的接触诱导。在某些实施方案中,离子是钾或钙。在其中诱导型启动子被细胞中的特定离子浓度或细胞与特定离子浓度的接触诱导的某些实施方案中,诱导型启动子选自IL2启动子、TNF $\alpha$ 启动子和IFN $\gamma$ 启动子。

[0046] 在如上所述其中第一转基因在基因组的第一位点处整合和第二转基因在细胞基因组内的第二位点处整合的T细胞的某些实施方案中,第一转基因和/或第二转基因各自编码独立选自以下的分子:CAR、CCR、细胞因子、显性负微环境调节剂、抗体、生物传感器、嵌合受体配体(CRL)、嵌合免疫受体配体(CIRL)、可溶性受体、溶质传递体、酶、核酶、遗传回路、外遗传调节剂、转录激活物、转录阻遏物和非编码RNA。

[0047] 在如上所述其中第一转基因在基因组的第一位点处整合和第二转基因在细胞基因组内的第二位点处整合的T细胞的某些实施方案中,第一转基因和/或第二转基因编码细胞因子。在其中第一和/或第二转基因编码细胞因子的某些实施方案中,细胞因子优选是免疫刺激的。在其中细胞因子是免疫刺激的某些实施方案中,细胞因子选自IL2、IL12、IL15和IL18。在其中第一转基因和/或第二转基因编码细胞因子的某些实施方案中,细胞因子优选是免疫抑制的。在其中细胞因子是免疫抑制的某些实施方案中,细胞因子选自TGF $\beta$ 和IL10。

[0048] 在如上所述其中第一转基因在基因组的第一位点处整合和第二转基因在细胞基因组内的第二位点处整合的T细胞的某些实施方案中,第一转基因和/或第二转基因编码抗



体。在某些实施方案中,抗体是免疫球蛋白、双特异性T细胞衔接器(BiTE)、双抗体、双重亲和重新靶向(DART)、Fab、F(ab')、单链可变片段(scFv)和纳米抗体。

[0049] 在如上所述其中第一转基因在基因组的第一位点处整合和第二转基因在细胞基因组内的第二位点处整合的T细胞的某些实施方案中,第一转基因和/或第二转基因编码CAR。在一个具体实施方案中,CAR与癌抗原结合。

[0050] 在如上所述其中第一转基因在基因组的第一位点处整合和第二转基因在细胞基因组内的第二位点处整合的T细胞的某些实施方案中,使T细胞对靶抗原敏感。

[0051] 在如上所述其中第一转基因在基因组的第一位点处整合和第二转基因在细胞基因组内的第二位点处整合的T细胞的某些实施方案中,编码报道分子的转基因(下文称为“报道转基因”)在T细胞的基因组内整合使得报道转基因的表达在启动子的控制下,优选在T细胞的内源启动子的控制下。

[0052] 在如上所述其中第一转基因在基因组的第一位点处整合和第二转基因在细胞基因组内的第二位点处整合的T细胞的某些实施方案中,T细胞来源于人。在来源于人的T细胞的某些实施方案中,T细胞是原代人T细胞、源自CD34造血干细胞的T细胞、源自胚干细胞的T细胞或源自诱导的多能干细胞的T细胞。

[0053] 在如上所述其中第一转基因在基因组的第一位点处整合和第二转基因在细胞基因组内的第二位点处整合的T细胞的某些实施方案中,第一转基因和/或第二转基因通过靶向同源重组整合至第一位点。在某些实施方案中,靶向同源重组通过包括使用锌指核酸酶(ZFN)、转录激活物样效应子核酸酶(TALEN)、成簇有规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)相关蛋白9(Cas9)、Cpf1、致热原、Aureus、大范围核酸酶或Mega-Tal的方法进行。

[0054] 在如上所述其中第一转基因在基因组的第一位点处整合和第二转基因在细胞基因组内的第二位点处整合的T细胞的某些实施方案中,第一治疗性蛋白质或第一治疗性核酸分别不同于所述第二治疗性蛋白质或第二治疗性核酸。

[0055] 在其中第一转基因在基因组的第一位点处整合和第二转基因在细胞基因组内的第二位点处整合,且其中第一内源启动子是组成型的,第二内源启动子是诱导型的T细胞的某些实施方案中,第二内源启动子被T细胞的活化诱导。

[0056] 在其中第一转基因在基因组的第一位点处整合和第二转基因在细胞基因组内的第二位点处整合,且其中第一内源启动子是组成型的,第二内源启动子是诱导型的T细胞的某些实施方案中,第一转基因编码CAR。在其中第一转基因编码CAR的一个具体实施方案中,第一内源启动子是T细胞受体启动子。在某些实施方案中,T细胞受体启动子选自T细胞受体 $\alpha$ 链启动子、T细胞受体 $\beta$ 链启动子、CD3 $\gamma$ 链启动子、CD3 $\delta$ 链启动子、CD3 $\epsilon$ 链启动子和CD3 $\zeta$ 链启动子。在一个具体实施方案中,启动子是T细胞受体 $\alpha$ 链启动子。

[0057] 在上述T细胞的某些实施方案中,除非前述实施方案涉及编码是免疫抑制的细胞因子(例如TGF $\beta$ 或IL10)的转基因,则T细胞是免疫刺激性T细胞。在其中T细胞是免疫抑制性T细胞的某些实施方案中,T细胞选自细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、CD4 $^{+}$ 亚型、CD8 $^{+}$ 亚型、中央记忆型T细胞(TCM)、干细胞记忆T细胞(stem memory T cell, TSCM)、效应记忆T细胞、效应T细胞、Th1细胞、Th2细胞、Th9细胞、Th17细胞、Th22细胞和Tfh(滤泡辅助性)细胞。在一个具体实施方案中,T细胞是CD4 $^{+}$ 。在一个具体实施方案中,T细胞是CD8 $^{+}$ 。

[0058] 在上述T细胞的某些实施方案中,除非前述实施方案涉及编码是免疫刺激的细胞

因子(例如选自IL2、IL12、IL15和IL18的细胞因子)的转基因,则T细胞是免疫抑制性T细胞。在一个具体实施方案中,T细胞是调节性T细胞。

[0059] 另一方面,本文提供分离的T细胞群,其包含上述实施方案的多种T细胞。在某些实施方案中,分离的T细胞群包含上述免疫刺激性T细胞。在某些实施方案中,分离的T细胞群包含上述免疫抑制性T细胞。

[0060] 另一方面,本文提供包含治疗有效量的上述实施方案的T细胞和药学上可接受的载体的药物组合物。另一方面,本文提供包含治疗有效量的T细胞群和药学上可接受的载体的药物组合物,所述群包含上述实施方案的多种T细胞。

[0061] 另一方面,本文提供包含治疗有效量的上述实施方案的T细胞和药学上可接受的载体的药物组合物,其中T细胞是上述免疫刺激性T细胞。另一方面,本文提供包含治疗有效量的T细胞群和药学上可接受的载体的药物组合物,所述群包含上述实施方案的多种T细胞,其中T细胞是上述免疫刺激性T细胞。

[0062] 另一方面,本文提供包含治疗有效量的上述实施方案的T细胞和药学上可接受的载体的药物组合物,其中T细胞是上述免疫抑制性细胞。另一方面,本文提供包含治疗有效量的T细胞群和药学上可接受的载体的药物组合物,所述群包含上述实施方案的多种T细胞,其中T细胞是上述免疫抑制性T细胞。

[0063] 另一方面,本文提供治疗需要T细胞疗法的对象的方法,所述方法包括给予对象治疗有效量的上述实施方案的T细胞。另一方面,本文还提供治疗需要T细胞疗法的对象的方法,所述方法包括给予对象治疗有效量的上述实施方案的T细胞群。又一方面,本文提供治疗需要T细胞疗法的对象的方法,所述方法包括给予对象上述实施方案的药物组合物。

[0064] 在上述本发明的方法的某些实施方案中,对象是人,而T细胞来源于人。在上述本发明的方法的某些实施方案中,T细胞是对于对象是自体的。在上述本发明的方法的某些实施方案中,T细胞对于对象是非自体的。

[0065] 另一方面,本文提供治疗需要T细胞疗法的对象的方法,其中对象需要刺激性免疫应答,所述方法包括给予对象治疗有效量的细胞或细胞群,其中细胞是T细胞,其中转基因在T细胞基因组内的第一位点处整合使得转基因的表达在T细胞的内源启动子控制下,其中转基因编码治疗性蛋白质或治疗性核酸。在某些实施方案中,将细胞或细胞群作为药物组合物给予对象。在某些实施方案中,转基因编码治疗性蛋白质。在某些实施方案中,转基因编码治疗性核酸。

[0066] 在治疗需要T细胞疗法的对象的方法的某些实施方案中,其中对象需要上述刺激性免疫应答,转基因在基因组内的单一位点处整合。在某些实施方案中,其中转基因在细胞基因组内的两个位点处整合。在某些实施方案中,其中第一位点是在内源启动子控制下的内源基因的外显子。在一个具体实施方案中,第一位点在内源基因的第一外显子内。

[0067] 在治疗需要T细胞疗法的对象的方法的某些实施方案中,其中对象需要上述刺激性免疫应答,内源启动子是组成型的。在某些实施方案中,组成型启动子选自CD4启动子、CD8a启动子、CD8b启动子、TCRa启动子、TCRb启动子、CD3d启动子、CD3g启动子、CD3e启动子和CD3z启动子。

[0068] 在治疗需要T细胞疗法的对象的方法的某些实施方案中,其中对象需要上述刺激性免疫应答,内源启动子在T细胞亚群中是有活性的。在其中内源启动子在T细胞亚群中是

有活性的某些实施方案中,内源启动子选自CD4启动子、CD8a启动子、CD8b启动子、TCRa启动子、TCRb启动子、CD3d启动子、CD3g启动子、CD3e启动子、CD3z启动子、肌动蛋白启动子、CD25启动子、IL2启动子、CD69启动子、GzmB启动子、T-bet启动子、IFN  $\gamma$  启动子、TIM3启动子、IL4启动子、GATA3启动子、IL5启动子、IL13启动子、IL10启动子、IL17A启动子、IL6启动子、IL21启动子、IL23R启动子、FoxP3启动子、CTLA4启动子、CD25启动子、PD1启动子、CD45RO启动子、CCR7启动子、CD28启动子、CD95启动子、CD28启动子、CD27启动子、CD127启动子、PD-1启动子、CD122启动子、CD132启动子、KLRG-1启动子、HLA-DR启动子、CD38启动子、CD69启动子、Ki-67启动子、CD11a启动子、CD58启动子、CD99启动子、CD62L启动子、CD103启动子、CCR4启动子、CCR5启动子、CCR6启动子、CCR9启动子、CCR10启动子、CXCR3启动子、CXCR4启动子、CLA启动子、粒酶A启动子、粒酶B启动子、穿孔蛋白启动子、CD57启动子、CD161启动子、IL-18Ra启动子、c-Kit启动子和CD130启动子。

[0069] 在治疗需要T细胞疗法的对象的方法的某些实施方案中,其中对象需要上述刺激性免疫应答,内源启动子是诱导型的。

[0070] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要刺激性免疫应答且内源启动子是诱导型的)的方法的某些实施方案中,内源启动子被T细胞的活化诱导。在其中内源启动子被T细胞的活化诱导的某些实施方案中,启动子被由T细胞表达的嵌合抗原受体(CAR)、嵌合共刺激受体(CCR)、T细胞受体(TCR)、CD28、CD27或4-1BB与其各自的结合配偶体的结合诱导。在某些实施方案中,启动子被由T细胞表达的CAR、CCR或TCR与其各自的结合配偶体的结合诱导。在其中启动子被由T细胞表达的CAR、CCR或TCR与其各自的结合配偶体的结合诱导的某些实施方案中,启动子选自以下的核因子:活化T细胞(NFAT)启动子、程序性死亡1(PD-1)启动子、T细胞免疫球蛋白黏蛋白-3(TIM-3)启动子、细胞毒性T淋巴细胞抗原-4(CTLA4)启动子、淋巴细胞活化蛋白3(LAG-3)启动子、肿瘤坏死因子(TNF)相关细胞凋亡诱导性配体(TRAIL)启动子、B-和T-淋巴细胞弱化子(BTLA)启动子、CD25启动子、CD69启动子、Fas配体(FasL)启动子、TIGIT启动子和2B4启动子。

[0071] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要刺激性免疫应答且内源启动子是诱导型的)的方法的某些实施方案中,启动子被配体与由T细胞表达的抑制性受体的结合诱导。在某些实施方案中,抑制性受体选自PD-1、CTLA4、TRAIL、LAG-3、BTLA、TIM-3、Fas、TIGIT和2B4。在其中被配体与由T细胞表达的抑制性受体的结合诱导的某些实施方案中,启动子选自CPT1a启动子和ATGL启动子。

[0072] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要刺激性免疫应答且内源启动子是诱导型的)的方法的某些实施方案中,启动子被细胞因子与由T细胞表达的细胞因子受体的结合诱导。在某些实施方案中,细胞因子选自白介素2(IL2)、白介素7(IL7)、白介素15(IL15)和白介素21(IL21)。在其中启动子被细胞因子与由T细胞表达的细胞因子受体的结合诱导的某些实施方案中,启动子选自T-bet启动子、Eomes启动子、GATA3启动子和CD45RA启动子。

[0073] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要刺激性免疫应答且内源启动子是诱导型的)的方法的某些实施方案中,启动子被细胞与核酸的接触诱导。在某些实施方案中,核酸选自病毒DNA、病毒RNA和胞内微小RNA。在其中启动子被细胞与选自病毒DNA、病毒RNA和胞内微小RNA的核酸的接触诱导的某些实施方案中,启动子选自I型干扰素(IFN)

$\alpha$ 、I型IFN $\beta$ 、IRF3、IRF7、NF $\kappa$ B、AP-1、TNF- $\alpha$ 、IL1和IL6。

[0074] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要刺激性免疫应答且内源启动子是诱导型的)的方法的某些实施方案中,启动子被细胞与代谢物的接触诱导。在某些实施方案中,代谢物选自丙酮酸、谷氨酰胺和 $\beta$ -羟基丁酸。

[0075] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要刺激性免疫应答且内源启动子是诱导型的)的方法的某些实施方案中,启动子被细胞中的代谢变化或细胞与引起细胞代谢变化的物质的接触诱导。在其中启动子被细胞中的代谢变化或细胞与引起细胞代谢变化的物质的接触诱导的一个具体实施方案中,启动子是PKM2启动子。

[0076] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要刺激性免疫应答且内源启动子是诱导型的)的方法的某些实施方案中,启动子被细胞中的特定离子浓度或细胞与特定离子浓度的接触诱导。在某些实施方案中,离子是钾或钙。在某些实施方案中启动子被细胞中的特定离子浓度或细胞与特定离子浓度的接触诱导,启动子选自IL2启动子、TNF $\alpha$ 启动子和IFN $\gamma$ 启动子。

[0077] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要刺激性免疫应答)的方法的某些实施方案中,转基因编码选自以下的分子:CAR、CCR、细胞因子、显性负微环境调节剂、抗体、生物传感器、嵌合受体配体(CRL)、嵌合免疫受体配体(CIRL)、可溶性受体、溶质传递体、酶、核酶、遗传回路、外遗传调节剂、转录激活物、转录阻遏物和非编码RNA。

[0078] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要刺激性免疫应答)的方法的某些实施方案中,转基因编码细胞因子。在某些实施方案中,任选细胞因子是免疫刺激的。在其中细胞因子是免疫刺激的某些实施方案中,细胞因子选自IL2、IL12、IL15和IL18。

[0079] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要刺激性免疫应答)的方法的某些实施方案中,转基因编码抗体。在某些实施方案中,任选抗体选自免疫球蛋白、双特异性T细胞衔接器(BiTE)、双抗体、双重亲和重新靶向(DART)、Fab、F(ab')、单链可变片段(scFv)和纳米抗体。

[0080] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要刺激性免疫应答)的方法的某些实施方案中,转基因编码CAR。在一个具体实施方案中,CAR与癌抗原结合。

[0081] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要刺激性免疫应答)的方法的某些实施方案中,使T细胞对靶抗原敏感。

[0082] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要刺激性免疫应答)的方法的某些实施方案中,编码报道分子的转基因(下文称为“报道转基因”)在T细胞的基因组内整合使得报道转基因的表达在启动子的控制下。优选,这类启动子是T细胞的内源启动子。

[0083] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要刺激性免疫应答)的方法的某些实施方案中,T细胞来源于人。在某些实施方案中,T细胞是原代人T细胞、源自CD34造血干细胞的T细胞、源自胚干细胞的T细胞或源自诱导的多能干细胞的T细胞。

[0084] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要刺激性免疫应答)的方法的某些实施方案中,转基因通过靶向同源重组整合至第一位点。在某些实施方案中,靶向同源重组通过包括使用锌指核酸酶(ZFN)、转录激活物样效应子核酸酶(TALEN)、成簇有规间隔的短回文重复序列(CRISPR)相关蛋白9(Cas9)、Cpf1、致热原、Aureus、大范围核酸酶或Mega-Tal1的方法进行。

[0085] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要刺激性免疫应答)的方法的某些实施方案中,转基因在T细胞基因组内的多个位点整合,使得转基因在多个位点的表达在不同内源启动子的控制下。

[0086] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要刺激性免疫应答)的方法的某些实施方案中,T细胞是免疫刺激性T细胞。在某些实施方案中,T细胞选自细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、CD4+亚型、CD8+亚型、中央记忆型T细胞(TCM)、干细胞记忆T细胞(TSCM)、效应记忆T细胞、效应T细胞、Th1细胞、Th2细胞、Th9细胞、Th17细胞、Th22细胞和Tfh(滤泡辅助性)细胞。在一个具体实施方案中,T细胞是CD4+。在另一个具体实施方案中,T细胞是CD8+。

[0087] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要刺激性免疫应答)的方法的某些实施方案中,对象患有癌症。在一个具体实施方案中,癌症是白血病。

[0088] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要刺激性免疫应答)的方法的某些实施方案中,对象患有肿瘤。

[0089] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要刺激性免疫应答)的方法的某些实施方案中,对象是人,且T细胞来源于人。

[0090] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要刺激性免疫应答)的方法的某些实施方案中,T细胞对于对象是自体的。在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要刺激性免疫应答)的方法的某些实施方案中,T细胞对于对象是非自体的。

[0091] 另一方面,本文提供治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要抑制性免疫应答)的方法,所述方法包括给予对象治疗有效量的细胞或细胞群,其中细胞是T细胞,其中转基因在T细胞基因组内的第一位点处整合使得转基因的表达在T细胞的内源启动子控制下,其中转基因编码治疗性蛋白质或治疗性核酸。在某些实施方案中,将细胞或细胞群作为药物组合物给药。在某些实施方案中,转基因编码治疗性蛋白质。在某些实施方案中,转基因编码治疗性核酸。

[0092] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要抑制性免疫应答)的方法的某些实施方案中,转基因在基因组内的单一位点处整合。在某些实施方案中,转基因在细胞基因组内的两个位点处整合。在某些实施方案中,第一位点是在内源启动子控制下的内源基因的外显子。在一个具体实施方案中,第一位点在内源基因的第一外显子内。

[0093] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要抑制性免疫应答)的方法的某些实施方案中,内源启动子是组成型的。在某些实施方案中,组成型启动子选自CD4启动子、CD8a启动子、CD8b启动子、TCRa启动子、TCRb启动子、CD3d启动子、CD3g启动子、CD3e启动子和CD3z启动子。

[0094] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要抑制性免疫应答)的方法的某些实施方案中,内源启动子在T细胞亚群中是有活性的。在某些实施方案中,在T细胞亚群中是有活性的内源启动子选自CD4启动子、CD8a启动子、CD8b启动子、TCRa启动子、TCRb启动子、CD3d启动子、CD3g启动子、CD3e启动子、CD3z启动子、肌动蛋白启动子、CD25启动子、IL2启动子、CD69启动子、GzmB启动子、T-bet启动子、IFN $\gamma$ 启动子、TIM3启动子、IL4启动子、GATA3启动子、IL5启动子、IL13启动子、IL10启动子、IL17A启动子、IL6启动子、IL21启动子、IL23R启动子、FoxP3启动子、CTLA4启动子、CD25启动子、PD1启动子、CD45RO启动子、CCR7启动子、CD28启动子、CD95启动子、CD28启动子、CD27启动子、CD127启动子、PD-1启动子、CD122

启动子、CD132启动子、KLRG-1启动子、HLA-DR启动子、CD38启动子、CD69启动子、Ki-67启动子、CD11a启动子、CD58启动子、CD99启动子、CD62L启动子、CD103启动子、CCR4启动子、CCR5启动子、CCR6启动子、CCR9启动子、CCR10启动子、CXCR3启动子、CXCR4启动子、CLA启动子、粒酶A启动子、粒酶B启动子、穿孔蛋白启动子、CD57启动子、CD161启动子、IL-18Ra启动子、c-Kit启动子和CD130启动子。

[0095] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要抑制性免疫应答)的方法的某些实施方案中,内源启动子是诱导型的。

[0096] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要抑制性免疫应答且内源启动子是诱导型的)的方法的某些实施方案中,内源启动子被T细胞的活化诱导。在其中内源启动子被T细胞的活化诱导的某些实施方案中,启动子被由T细胞表达的嵌合抗原受体(CAR)、嵌合共刺激受体(CCR)、T细胞受体(TCR)、CD28、CD27或4-1BB与其各自的结合配偶体的结合诱导。在某些实施方案中,启动子被由T细胞表达的CAR、CCR或TCR与其各自的结合配偶体的结合诱导。在其中启动子被由T细胞表达的CAR、CCR或TCR与其各自的结合配偶体的结合诱导的某些实施方案中,启动子选自以下的核因子:活化T细胞(NFAT)启动子、程序性死亡1(PD-1)启动子、T细胞免疫球蛋白黏蛋白-3(TIM-3)启动子、细胞毒性T淋巴细胞抗原-4(CTLA4)启动子、淋巴细胞活化蛋白3(LAG-3)启动子、肿瘤坏死因子(TNF)相关细胞凋亡诱导性配体(TRAIL)启动子、B-和T-淋巴细胞弱化子(BTLA)启动子、CD25启动子、CD69启动子、Fas配体(FasL)启动子、TIGIT启动子和2B4启动子。

[0097] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要抑制性免疫应答且内源启动子是诱导型的)的方法的某些实施方案中,启动子被配体与由T细胞表达的抑制性受体的结合诱导。在某些实施方案中,抑制性受体选自PD-1、CTLA4、TRAIL、LAG-3、BTLA、TIM-3、Fas、TIGIT和2B4。在其中被配体与由T细胞表达的抑制性受体的结合诱导的某些实施方案中,启动子选自CPT1a启动子和ATGL启动子。

[0098] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要抑制性免疫应答且内源启动子是诱导型的)的方法的某些实施方案中,启动子被细胞因子与由T细胞表达的细胞因子受体的结合诱导。在某些实施方案中,细胞因子选自白介素10(IL10)和转化生长因子 $\beta$ (TGF $\beta$ )。在其中启动子被细胞因子与由T细胞表达的细胞因子受体的结合诱导的某些实施方案中,启动子选自T-bet启动子、Eomes启动子、GATA3启动子和CD45RA启动子。

[0099] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要抑制性免疫应答且内源启动子是诱导型的)的方法的某些实施方案中,启动子被细胞与核酸的接触诱导。在某些实施方案中,核酸选自病毒DNA、病毒RNA和胞内微小RNA。在其中启动子被细胞与选自病毒DNA、病毒RNA和胞内微小RNA的核酸的接触诱导的某些实施方案中,启动子选自I型干扰素(IFN) $\alpha$ 、I型IFN $\beta$ 、IRF3、IRF7、NFkB、AP-1、TNF- $\alpha$ 、IL1和IL6。

[0100] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要抑制性免疫应答且内源启动子是诱导型的)的方法的某些实施方案中,启动子被细胞与代谢物的接触诱导。在某些实施方案中,代谢物选自丙酮酸、谷氨酰胺和 $\beta$ -羟基丁酸。

[0101] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要抑制性免疫应答且内源启动子是诱导型的)的方法的某些实施方案中,启动子被细胞中的代谢变化或细胞与引起细胞代谢变化的物质的接触诱导。在其中启动子被细胞中的代谢变化或细胞与引起细胞代谢

变化的物质的接触诱导的某些实施方案中,启动子是PKM2启动子。

[0102] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要抑制性免疫应答且内源启动子是诱导型的)的方法的某些实施方案中,启动子被细胞中的特定离子浓度或细胞与特定离子浓度的接触诱导。在某些实施方案中,离子是钾或钙。在某些实施方案中其中启动子被细胞中的特定离子浓度或细胞与特定离子浓度的接触诱导,启动子选自IL2启动子、TNF $\alpha$ 启动子和IFN $\gamma$ 启动子。

[0103] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要抑制性免疫应答)的方法的某些实施方案中,转基因编码分子选自CAR,CCR,细胞因子,显性负微环境调节剂,抗体,生物传感器,嵌合受体配体(CRL),嵌合免疫受体配体(CIRL),可溶性受体,溶质传递体,酶,核酶,遗传回路,外遗传调节剂,转录激活物,转录阻遏物和非编码RNA。

[0104] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要抑制性免疫应答)的方法的某些实施方案中,转基因编码细胞因子。在某些实施方案中,任选细胞因子是免疫抑制的。在某些实施方案中,是免疫抑制的细胞因子选自TGF $\beta$ 和IL10。

[0105] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要抑制性免疫应答)的方法的某些实施方案中,转基因编码抗体。在某些实施方案中,任选抗体选自免疫球蛋白、双特异性T细胞衔接器(BiTE)、双抗体、双重亲和重新靶向(DART)、Fab、F(ab')、单链可变片段(scFv)和纳米抗体。

[0106] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要抑制性免疫应答)的方法的某些实施方案中,转基因编码CAR。在一个具体实施方案中,CAR与癌抗原结合。

[0107] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要抑制性免疫应答)的方法的某些实施方案中,使T细胞对靶抗原敏感。

[0108] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要抑制性免疫应答)的方法的某些实施方案中,编码报道分子的转基因(下文称为“报道转基因”)在T细胞的基因组内整合使得报道转基因的表达在启动子的控制下。优选,报道分子在T细胞的内源启动子控制下。

[0109] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要抑制性免疫应答)的方法的某些实施方案中,T细胞来源于人。在某些实施方案中,T细胞是原代人T细胞、源自CD34造血干细胞的T细胞、源自胚干细胞的T细胞或源自诱导的多能干细胞的T细胞。

[0110] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要抑制性免疫应答)的方法的某些实施方案中,转基因通过靶向同源重组整合至第一位点。在某些实施方案中,靶向同源重组通过包括使用锌指核酸酶(ZFN)、转录激活物样效应子核酸酶(TALEN)、成簇有规间隔的短回文重复序列(CRISPR)相关蛋白9(Cas9)、Cpf1、致热原、Aureus、大范围核酸酶或Mega-Tal1的方法进行。

[0111] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要抑制性免疫应答)的方法的某些实施方案中,转基因在T细胞基因组内的多个位点整合,使得所述多个位点处的转基因的表达在不同内源启动子的控制下。

[0112] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要抑制性免疫应答)的方法的某些实施方案中,T细胞是免疫抑制性T细胞。在一个具体实施方案中,免疫抑制性T细胞是调节性T细胞。

[0113] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要抑制性免疫应答)的方法的某些实施方案中,对象是人,且T细胞来源于人。

[0114] 在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要抑制性免疫应答)的方法的某些实施方案中,细胞对于对象是自体的。在如上所述治疗需要T细胞疗法的对象(其中对象需要抑制性免疫应答)的方法的某些实施方案中,细胞对于对象是非自体的。

[0115] 另一方面,本文提供表达治疗性转基因的T细胞的方法,所述方法包括:将以下导入T细胞:(i)转基因,和(ii)适于转基因在细胞基因组内的位点处靶向整合的同源重组系统,藉此同源重组系统在细胞基因组内的位点处整合,且其中转基因的表达在内源启动子的控制下,其中转基因编码治疗性蛋白质或治疗性核酸。在某些实施方案中,转基因编码治疗性蛋白质。在某些实施方案中,转基因编码治疗性核酸。

[0116] 在如上所述产生表达治疗性转基因的T细胞的方法的某些实施方案中,内源启动子是组成型的。在某些实施方案中,内源组成型启动子选自CD4启动子、CD8a启动子、CD8b启动子、TCRa启动子、TCRb启动子、CD3d启动子、CD3g启动子、CD3e启动子和CD3z启动子。

[0117] 在如上所述产生表达治疗性转基因的T细胞的方法的某些实施方案中,内源启动子在T细胞亚群中是有活性的。在其中内源启动子在T细胞亚群中是有活性的某些实施方案中,内源启动子选自CD4启动子、CD8a启动子、CD8b启动子、TCRa启动子、TCRb启动子、CD3d启动子、CD3g启动子、CD3e启动子、CD3z启动子、肌动蛋白启动子、CD25启动子、IL2启动子、CD69启动子、GzmB启动子、T-bet启动子、IFN $\gamma$ 启动子、TIM3启动子、IL4启动子、GATA3启动子、IL5启动子、IL13启动子、IL10启动子、IL17A启动子、IL6启动子、IL21启动子、IL23R启动子、FoxP3启动子、CTLA4启动子、CD25启动子、PD1启动子、CD45RO启动子、CCR7启动子、CD28启动子、CD95启动子、CD28启动子、CD27启动子、CD127启动子、PD-1启动子、CD122启动子、CD132启动子、KLRG-1启动子、HLA-DR启动子、CD38启动子、CD69启动子、Ki-67启动子、CD11a启动子、CD58启动子、CD99启动子、CD62L启动子、CD103启动子、CCR4启动子、CCR5启动子、CCR6启动子、CCR9启动子、CCR10启动子、CXCR3启动子、CXCR4启动子、CLA启动子、粒酶A启动子、粒酶B启动子、穿孔蛋白启动子、CD57启动子、CD161启动子、IL-18Ra启动子、c-Kit启动子和CD130启动子。

[0118] 在如上所述产生表达治疗性转基因的T细胞的方法的某些实施方案中,内源启动子是诱导型的。

[0119] 在如上所述产生表达治疗性转基因且其中内源启动子是诱导型的T细胞的方法的某些实施方案中,内源启动子被T细胞的活化诱导。

[0120] 在如上所述产生表达治疗性转基因且其中内源启动子是诱导型的T细胞的方法的某些实施方案中,启动子被由T细胞表达的嵌合抗原受体(CAR)、嵌合共刺激受体(CCR)、T细胞受体(TCR)、CD28、CD27和4-1BB与其各自的结合配偶体的结合诱导。在某些实施方案中,启动子被由T细胞表达的CAR、CCR或TCR与其各自的结合配偶体的结合诱导。在其中启动子被由T细胞表达的CAR、CCR或TCR与其各自的结合配偶体的结合诱导的某些实施方案中,启动子选自以下的核因子:活化T细胞(NFAT)启动子、程序性死亡1(PD-1)启动子、T细胞免疫球蛋白黏蛋白-3(TIM-3)启动子、细胞毒性T淋巴细胞抗原-4(CTLA4)启动子、淋巴细胞活化蛋白3(LAG-3)启动子、肿瘤坏死因子(TNF)相关细胞凋亡诱导性配体(TRAIL)启动子、B-和T-淋巴细胞弱化子(BTLA)启动子、CD25启动子、CD69启动子、Fas配体(FasL)启动子、TIGIT



启动子和2B4启动子。

[0121] 在如上所述产生表达治疗性转基因且其中内源启动子是诱导型的T细胞的方法的某些实施方案中,启动子被配体与由T细胞表达的抑制性受体的结合诱导。在某些实施方案中,抑制性受体选自PD-1、CTLA4、TRAIL、LAG-3、BTLA、TIM-3、Fas、TIGIT和2B4。在其中被配体与由T细胞表达的抑制性受体的结合诱导的某些实施方案中,启动子选自CPT1a启动子和ATGL启动子。

[0122] 在如上所述产生表达治疗性转基因且其中内源启动子是诱导型的T细胞的方法的某些实施方案中,启动子被细胞因子与由T细胞表达的细胞因子受体的结合诱导。在其中启动子被细胞因子与由T细胞表达的细胞因子受体的结合诱导的某些实施方案中,细胞因子选自白介素2(IL2)、白介素7(IL7)、白介素15(IL15)和白介素21(IL21)。在其中启动子被细胞因子与由T细胞表达的细胞因子受体的结合诱导的某些实施方案中,细胞因子选自白介素10(IL10)和转化生长因子 $\beta$ (TGF $\beta$ )。在其中启动子被细胞因子与由T细胞表达的细胞因子受体的结合诱导的某些实施方案中,启动子选自T-bet启动子、Eomes启动子、GATA3启动子和CD45RA启动子。

[0123] 在如上所述产生表达治疗性转基因且其中内源启动子是诱导型的T细胞的方法的某些实施方案中,启动子被细胞与核酸的接触诱导。在某些实施方案中,核酸选自病毒DNA、病毒RNA和胞内微小RNA。在其中启动子被细胞与选自病毒DNA、病毒RNA和胞内微小RNA的核酸的接触诱导的某些实施方案中,启动子选自I型干扰素(IFN) $\alpha$ 、I型IFN $\beta$ 、IRF3、IRF7、NFkB、AP-1、TNF- $\alpha$ 、IL1和IL6。

[0124] 在如上所述产生表达治疗性转基因且其中内源启动子是诱导型的T细胞的方法的某些实施方案中,启动子被细胞与代谢物的接触诱导。在某些实施方案中,代谢物选自丙酮酸、谷氨酰胺和 $\beta$ -羟基丁酸。

[0125] 在如上所述产生表达治疗性转基因且其中内源启动子是诱导型的T细胞的方法的某些实施方案中,启动子被细胞中的代谢变化或细胞与引起细胞代谢变化的物质的接触诱导。在其中启动子被细胞中的代谢变化或细胞与引起细胞代谢变化的物质的接触诱导的某些实施方案中,启动子是PKM2启动子。

[0126] 在如上所述产生表达治疗性转基因且其中内源启动子是诱导型的T细胞的方法的某些实施方案中,启动子被细胞中的特定离子浓度或细胞与特定离子浓度的接触诱导。在某些实施方案中,离子是钾或钙。在某些实施方案中其中启动子被细胞中的特定离子浓度或细胞与特定离子浓度的接触诱导,启动子选自IL2启动子、TNF $\alpha$ 启动子和IFN $\gamma$ 启动子。

[0127] 在如上所述产生表达治疗性转基因的T细胞的方法的某些实施方案中,转基因编码选自以下的分子:CAR、CCR、细胞因子、显性负微环境调节剂、抗体、生物传感器、嵌合受体配体(CRL)、嵌合免疫受体配体(CIRL)、可溶性受体、溶质传递体、酶、核酶、遗传回路、外遗传调节剂、转录激活物、转录阻遏物和非编码RNA。

[0128] 在如上所述产生表达治疗性转基因的T细胞的方法的某些实施方案中,转基因编码细胞因子。在某些实施方案中,任选细胞因子是免疫刺激的。在某些实施方案中,免疫刺激性细胞因子选自IL2、IL12、IL15和IL18。在某些实施方案中,任选细胞因子是免疫抑制的。在某些实施方案中,免疫抑制性细胞因子选自TGF $\beta$ 和IL10。

[0129] 在如上所述产生表达治疗性转基因的T细胞的方法的某些实施方案中,转基因编

码抗体。在某些实施方案中,任选抗体选自免疫球蛋白、双特异性T细胞衔接器(BiTE)、双抗体、双重亲和重新靶向(DART)、Fab、F(ab')、单链可变片段(scFv)和纳米抗体。

[0130] 在如上所述产生表达治疗性转基因的T细胞的方法的某些实施方案中,转基因编码CAR。在一个具体实施方案中,CAR与癌抗原结合。

[0131] 在如上所述产生表达治疗性转基因的T细胞的方法的某些实施方案中,使T细胞对靶抗原敏感。

[0132] 在如上所述产生表达治疗性转基因的T细胞的方法的某些实施方案中,编码报道分子的转基因(下文称为“报道转基因”)在T细胞的基因组内整合使得报道转基因的表达在启动子的控制下,优选在T细胞的内源启动子的控制下。

[0133] 在如上所述产生表达治疗性转基因的T细胞的方法的某些实施方案中,T细胞来源于人。在某些实施方案中,T细胞是原代人T细胞、源自CD34造血干细胞的T细胞、源自胚干细胞的T细胞或源自诱导的多能干细胞的T细胞。

[0134] 在如上所述产生表达治疗性转基因的T细胞的方法的某些实施方案中,转基因通过靶向同源重组整合至第一位点。在某些实施方案中,靶向同源重组通过包括使用锌指核酸酶(ZFN)、转录激活物样效应子核酸酶(TALEN)、成簇有规间隔的短回文重复序列(CRISPR)相关蛋白9(Cas9)、Cpf1、致热原、Aureus、大范围核酸酶或Mega-Tal的方法进行。

[0135] 在如上所述产生表达治疗性转基因的T细胞的方法的某些实施方案中,转基因在T细胞基因组内的多个位点整合,使得所述多个位点处的转基因的表达在不同内源启动子的控制下。

[0136] 在如上所述产生表达治疗性转基因的T细胞的方法的某些实施方案中,被导入细胞中的转基因包含在靶向构建体中。在某些实施方案中,靶向构建体包含病毒核酸序列。在某些实施方案中,靶向构建体被包在天然或重组腺伴随病毒(AVV)病毒颗粒中。在一个具体实施方案中,AAV颗粒包含AAV6序列。在某些实施方案中,靶向构建体被包在非整合的 $\gamma$ -反转录病毒中。

[0137] 在如上所述产生表达治疗性转基因的T细胞的方法的某些实施方案中,靶向构建体中的转基因不与启动子有效连接。

[0138] 在如上所述产生表达治疗性转基因的T细胞的方法的某些实施方案中,所述方法进一步包括将第二转基因导入T细胞。在某些实施方案中,第一转基因在内源组成型启动子的控制下,第二转基因在内源诱导型启动子的控制下。在某些实施方案中,第一转基因是CAR。在其中转基因是CAR的某些实施方案中,内源组成型启动子是T细胞受体启动子。在其中启动子是T细胞受体启动子的某些实施方案中,启动子选自T细胞受体 $\alpha$ 链启动子、T细胞受体 $\beta$ 链启动子、CD3 $\gamma$ 链启动子、CD3 $\delta$ 链启动子、CD3 $\epsilon$ 链启动子和CD3 $\zeta$ 链启动子。在一个具体实施方案中,启动子是T细胞受体 $\alpha$ 链启动子。

[0139] 另一方面,本文提供包含非整合的 $\gamma$ -反转录病毒的载体。在某些实施方案中,非整合的 $\gamma$ -反转录病毒包含突变的整合酶。在某些实施方案中,突变的整合酶在DDE基序处突变。在某些实施方案中,突变的整合酶具有选自以下的突变:D124A、D124E、D124N、D124V、D183A、D183N、D124A和D183A、D124A和D183N、D124E和D183A、D124E和D183N、D124N和D183A、D124N和D183N、D124V和D183A及D124V和D183N。

[0140] 另一方面,本文提供T细胞,其中编码嵌合抗原受体(CAR)的重组核酸序列在细胞

基因组内的第一位点处整合使得CAR由细胞在细胞表面表达,且其中编码CAR的核酸在第一位点的整合降低或防止功能性T细胞受体(TCR)复合物在细胞表面表达。在某些实施方案中,编码CAR的核酸序列在基因组内的单一位点处整合。在某些实施方案中,编码CAR的核酸序列在细胞基因组的两个位点处整合。在某些实施方案中,第一位点是编码TCR复合物的蛋白质的基因的外显子。

[0141] 在如上所述其中编码CAR的重组核酸序列在细胞基因组内的第一位点处整合的T细胞的某些实施方案中,编码CAR的核酸序列在第一位点处的整合降低或防止自T细胞受体 $\alpha$ 链、T细胞受体 $\beta$ 链、CD3  $\gamma$  链、CD3 $\delta$ 链、CD3 $\epsilon$ 链和CD3 $\zeta$ 链的蛋白质表达。

[0142] 在如上所述其中编码CAR的重组核酸序列在细胞基因组内的第一位点处整合的T细胞的某些实施方案中,整合的核酸序列在T细胞中的表达在内源启动子的控制下。在某些实施方案中,内源启动子是T细胞受体复合物启动子。在某些实施方案中,内源启动子是编码T细胞受体 $\alpha$ 链、T细胞受体 $\beta$ 链、CD3  $\gamma$  链、CD3 $\delta$ 链、CD3 $\epsilon$ 链或CD3 $\zeta$ 链的基因的启动子。

[0143] 在如上所述其中编码CAR的重组核酸序列在细胞基因组内的第一位点处整合的T细胞的某些实施方案中,CAR与癌抗原结合。

[0144] 在如上所述其中编码CAR的重组核酸序列在细胞基因组内的第一位点处整合的T细胞的某些实施方案中,T细胞选自细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、CD4+亚型、CD8+亚型、中央记忆型T细胞(TCM)、干细胞记忆T细胞(TSCM)、效应记忆T细胞、效应T细胞、Th1细胞、Th2细胞、Th9细胞、Th17细胞、Th22细胞、Tfh(滤泡辅助性)细胞和调节T细胞。

[0145] 在如上所述其中编码CAR的重组核酸序列在细胞基因组内的第一位点处整合的T细胞的某些实施方案中,T细胞来源于人。在某些实施方案中,T细胞是原代人T细胞、源自CD34造血干细胞的T细胞、源自胚干细胞的T细胞或源自诱导的多能干细胞的T细胞。

[0146] 在如上所述其中编码CAR的重组核酸序列在细胞基因组内的第一位点处整合的T细胞的某些实施方案中,编码CAR的核酸序列通过靶向同源重组整合至第一位点。在某些实施方案中,靶向同源重组使用锌指核酸酶(ZFN)、转录激活物样效应子核酸酶(TALEN)、成簇有规间隔的短回文重复序列(CRISPR)相关蛋白9(Cas9)、Cpf1、大范围核酸酶或Mega-Tal1进行。

[0147] 在如上所述其中编码CAR的重组核酸序列在细胞基因组内的第一位点处整合的T细胞的某些实施方案中,编码CAR的核酸序列在细胞基因组内的多个位点处整合,使得所述多个位点处的编码CAR的核酸序列的表达在不同内源启动子的控制下。

[0148] 在如上所述其中编码CAR的重组核酸序列在细胞基因组内的第一位点处整合的T细胞的某些实施方案中,编码CAR的核酸序列还在细胞基因组内的第二位点处整合使得CAR由细胞在细胞表面表达。在某些实施方案中,编码CAR的核酸在第二位点处的整合还降低或防止功能性TCR复合物在细胞表面表达,其中第一位点和第二位点在不同的基因上。

[0149] 在如上所述其中编码CAR的重组核酸序列在细胞基因组内的第一位点处整合的T细胞的某些实施方案中,编码第二CAR的第二核酸序列在细胞基因组内的第二位点处整合使得第二CAR由细胞在细胞表面表达,并使得第二核酸序列的表达在第二位点处的内源启动子的控制下,其中第一位点和第二位点在不同的基因上。

[0150] 另一方面,本文提供人T细胞其中编码CAR的无启动子重组核酸序列在细胞基因组的位点处整合,该位点为TCR $\alpha$ 链的第一外显子,使得CAR在内源TCR $\alpha$ 链启动子的控制下表

达,以在细胞表面产生CAR,且其中CAR在该位点的整合降低或防止功能性TCR $\alpha$ 链的表达。在某些实施方案中,CAR与CD19结合。

[0151] 另一方面,本文提供分离的T细胞群,其包含其中编码CAR的重组核酸序列在细胞基因组内的第一位点处整合的上述多种细胞,或是其中编码CAR的无启动子重组核酸序列在细胞基因组的位点处整合的人T细胞的上述多种细胞。

[0152] 另一方面,本文提供药物组合物,其包含治疗有效量的其中编码CAR的重组核酸序列在细胞基因组内的第一位点处整合的上述细胞,或是其中编码CAR的无启动子重组核酸序列在细胞基因组的位点处整合的人T细胞的上述细胞;和药学上可接受的载体。

[0153] 另一方面,本文提供包含治疗有效量的T细胞群,所述群包含其中编码CAR的重组核酸序列在细胞基因组内的第一位点处整合的上述多种细胞,或是其中编码CAR的无启动子重组核酸序列在细胞基因组的位点处整合的人T细胞的上述细胞;和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0154] 另一方面,本文提供治疗需要CAR疗法的对象的方法,所述方法包括给予对象治疗有效量的其中编码CAR的重组核酸序列在细胞基因组内的第一位点处整合的上述细胞,或是其中编码CAR的无启动子重组核酸序列在细胞基因组的位点处整合的人T细胞的上述细胞。

[0155] 另一方面,本文提供治疗需要CAR疗法的对象的方法,所述方法包括给予对象上述药物组合物,其包含治疗有效量的其中编码CAR的重组核酸序列在细胞基因组内的第一位点处整合的上述细胞,或是其中编码CAR的无启动子重组核酸序列在细胞基因组的位点处整合的人T细胞的上述细胞。

[0156] 另一方面,本文提供治疗需要CAR疗法的对象的方法,所述方法包括给予对象治疗有效量的上述细胞群,其包含其中编码CAR的重组核酸序列在细胞基因组内的第一位点处整合的上述多种细胞,或是其中编码CAR的无启动子重组核酸序列在细胞基因组的位点处整合的人T细胞的上述多种细胞。

[0157] 另一方面,本文提供治疗需要CAR疗法的对象的方法,所述方法包括给予对象包含治疗有效量的T细胞群的上述药物组合物,所述群包含其中编码CAR的重组核酸序列在细胞基因组内的第一位点处整合的上述多种细胞,或是其中编码CAR的无启动子重组核酸序列在细胞基因组的位点处整合的人T细胞的上述细胞。

[0158] 在治疗需要CAR疗法的对象的上述方法的某些实施方案中,对象患有癌症,且CAR与癌症的癌抗原结合。在一个具体实施方案中,癌症是白血病。

[0159] 在治疗需要CAR疗法的对象的上述方法的某些实施方案中,对象患有肿瘤。

[0160] 在治疗需要CAR疗法的对象的上述方法的某些实施方案中,对象是人,细胞来源于人。

[0161] 在治疗需要CAR疗法的对象的上述方法的某些实施方案中,细胞对于对象是自体的。在治疗需要CAR疗法的对象的上述方法的某些实施方案中,细胞对于对象是非自体的。

[0162] 另一方面,本文提供产生表达嵌合抗原受体(CAR)并缺乏功能性T细胞受体(TCR)复合物的T细胞的方法,所述方法包括:将以下导入T细胞:(i) 编码CAR的核酸序列,和(ii) 适于核酸序列在细胞基因组内的位点处靶向整合的同源重组系统,藉此同源重组系统使编码CAR的核酸序列在细胞基因组内的位点处整合使得CAR在该位点的整合降低或防止功能

性T细胞受体复合物在细胞表面表达,从而产生表达CAR并缺乏功能性TCR复合物的T细胞。

[0163] 在如上所述产生表达CAR并缺乏功能性TCR复合物的T细胞的方法的某些实施方案中,CAR的表达在内源启动子的控制下。在某些实施方案中,内源启动子是编码T细胞受体 $\alpha$ 链、T细胞受体 $\beta$ 链、CD3 $\gamma$ 链、CD3 $\delta$ 链、CD3 $\epsilon$ 链或CD3 $\zeta$ 链的基因的启动子。

[0164] 在如上所述产生表达CAR并缺乏功能性TCR复合物的T细胞的方法的某些实施方案中,同源重组系统包含锌指核酸酶(ZFN)、转录激活物样效应子核酸酶(TALEN)、或成簇有间隔的短回文重复序列(CRISPR)相关蛋白9(Cas9)、Cpf1、大范围核酸酶或Mega-Tal。

[0165] 在如上所述产生表达CAR并缺乏功能性TCR复合物的T细胞的方法的某些实施方案中,被导入细胞中的编码CAR的核酸序列包含在靶向构建体中。在某些实施方案中,靶向构建体包含腺伴随病毒2(AAV2)序列。在某些实施方案中,靶向构建体被包在天然或重组腺伴随病毒(AVV)病毒颗粒中。在某些实施方案中,AAV颗粒包含AAV6序列。

[0166] 在如上所述产生表达CAR并缺乏功能性TCR复合物的T细胞的方法的某些实施方案中,靶向构建体中编码CAR的核酸序列不与启动子有效连接。

[0167] 在如上所述产生表达CAR并缺乏功能性TCR复合物的T细胞的方法的某些实施方案中,靶向构建体以5'-3'的顺序包含:第一病毒序列、左同源臂、编码自切割猪捷申病毒2A的核酸序列、编码CAR的核酸序列、多腺苷酸化序列、右同源臂和第二病毒序列。在某些实施方案中,第一或第二病毒序列来自腺伴随病毒(AAV)。在某些实施方案中,AAV是AAV2、AAV5或AAV6。

[0168] 另一方面,本文提供诱导的多能干细胞,其中编码嵌合抗原受体(CAR)的重组核酸序列在细胞基因组内的第一位点处整合使得CAR由细胞在细胞表面表达,且其中编码CAR的核酸在第一位点的整合降低或防止功能性T细胞受体(TCR)复合物在细胞表面表达。

## 6. 附图说明

[0169] 图1A-1E显示CAR靶向整合至TCR $\alpha$ 恒定(TRAC)基因座的分析。图1A显示特制核酸酶(TALEN或CRISPR/Cas9)诱导的靶向整合至TCR $\alpha$ 恒定(TRAC)基因座的示意图。靶向构建体(AAV6)含有两侧是同源序列(LHA和RHA)的CAR基因。一旦整合的CAR表达被内源TCR $\alpha$ 启动子驱动,期间TRAC基因座便被破坏。TRAV:TCR $\alpha$ 可变区。TRAJ:TCR $\alpha$ 连接区。2A:自切割猪捷申病毒2A序列。pA:牛生长激素PolyA序列。图1B显示在T细胞用TRAC TALEN mRNA转染并以标注的MOI(感染复数)加入AAV6后5天的代表性TCR/CAR流式细胞图(flow plot)。图1C显示取决于AAV6MOI的TCR破坏(KO:敲除)和靶向整合(KI:敲入)的百分比的柱状图。百分比通过FACS分析评价。图1D显示CAR载体化(vectorization)(选择表达CAR的改动载体,整合CAR编码至细胞)进入T细胞后5天的平均CAR表达平均荧光强度(MFI)(n=6-8个独立实验)。图1E显示衡量CAR表达中的离散的CAR+T细胞的变异系数(标准差与均值的比率)。TRAC-P2A-1928z:靶向整合至TRAC。SFG-1928z:使用SFG反转录病毒的半随机整合。\*\*\*P<0.0001(非配对T检验)。

[0170] 图2A-2E显示CAR靶向整合至TCR $\alpha$ 恒定(TRAC)基因座的分析。图2A显示表明CAR和TCR表达的流式细胞术分析。TRAC-P2A-1928z按图1产生;TALEN产生的TCR-细胞用SFG-1928z反转录病毒转导;TCR+细胞用SFG-1928z或SGF-P28z反转录病毒转导。图2B显示在用CD19+靶细胞每周刺激后所标示CAR T细胞的累积细胞计数。箭头标明刺激时间点。图2C显

示使用表达萤火虫萤光素酶 (FFL) 的NALM6作为靶细胞,采用18小时生物发光测定法的细胞毒活性。数据为均值 $\pm$ SD。图2D和2E显示携带FFL-NALM6的小鼠,其用 $2 \times 10^5$ 个CAR T细胞治疗。肿瘤负荷表示为在40日时间内每周每只动物定量测定的生物发光信号。定量测定是在所有指定时间点每只动物的腹部和背部采集的平均光子计数,并表示为发光。每条线表示一只小鼠。 $n=7$ 只小鼠/组。右下图是图2D和2E中小鼠存活率的Kaplan-Meier分析。

[0171] 图3A-3J显示TRAC-CAR T细胞因体内防止耗尽而胜过常规的CAR T细胞。图3A显示CRISPR/Cas9靶向的CAR基因整合至TRAC基因座。上,TRAC基因座;中,含有两侧是同源臂的CAR盒的rAAV6;下,编辑的TRAC基因座。图3B显示TRAC打靶后4天的代表性TCR/CAR流式图。图3C和3D显示CAR+T细胞的CAR平均荧光强度(MFI)(图3C)和CAR MFI变异系数(图3D)( $n=12$ 个独立实验,6个供体)。图3E显示小鼠存活率的Kaplan-Meier分析。图3F-3J显示携带NALM-6的小鼠用 $1 \times 10^5$ 个CAR T细胞治疗( $n=7$ 只/组;点=1只小鼠),在输注后第10和17天处以安乐死;对骨髓CAR T细胞和NALM-6细胞进行分析并通过FACS计数(TRAC-1928z,圆形;RV-1928z-TCR-,正方形;RV-1928z,三角形)。图3F显示CAR T细胞。图3G显示肿瘤(GFP+CD19+)细胞。图3H显示CAR T细胞/肿瘤比。图3I显示在第17天CAR T细胞中效应记忆(CD62L-CD45RA-)和效应(CD62L-CD45RA+)的百分比。图3J显示表达耗尽标志物的CAR T细胞的百分比;在第17天通过FACS测定(分别从内环到外环显示的抑制性受体表达TIM3、LAG3和PD1)。\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$ ,\*\*\*\* $P<0.0001$ (Welch两样本t检验(图3C和3D);log-rank Mantel-Cox检验(图3E);Mann-Whitney(图3F-3I))。全部数据为均值 $\pm$ s.d.。另见图7-10。

[0172] 图4A-4E显示TRAC-CAR T细胞显示组成型信号转导和抗原诱导的分化降低。图4A显示T细胞中活化、记忆和耗尽标志物的FACS分析(输注后第5天;3个供体的代表;CD62L/CD45RA表达的饼形图( $n=3$ ,3个供体)。图4B显示CAR表达和CD3 $\zeta$ ITAM磷酸化(3个供体的代表)。RV-19De1,缺乏信号转导结构域的反转录病毒表达的CD19特异性CAR。图4C显示CAR+群中的磷酸-CD3 $\zeta$ MFI( $n=3$ ,3个供体;\*\* $P<0.05$ Mann-Whitney检验)。图4D显示刺激1、2或4次的CAR T细胞中的CD62L/CD45RA表达。饼形图显示CAR+T细胞的表型( $n=3-5$ ,在不同的供体上)(A,CD45RA+CD62L+;B,CD45RA-CD62L+;C,CD45RA-CD62L-;D,CD45RA+CD62L-)。图4E显示如在图4D中收集的CAR T细胞T-bet、EOMES和GATA3表达的热图;1的倍数增加值代表TRAC-1928z,1次刺激( $n=2$ ,2个供体)。全部数据为均值 $\pm$ s.d.。另见图12。

[0173] 图5A-5G显示内源TRAC启动子体内优于其它基因座/启动子组合。图5A显示CRISPR/Cas9靶向的启动子-CAR整合至TRAC基因座的示意图。上:TRAC基因座;下:含有两侧是同源臂的启动子-CAR-polyA盒的rAAV6。图5B显示CRISPR/Cas9靶向的无启动子CAR整合至B2M基因座的示意图。上:B2M基因座;下:含有两侧是同源臂的无启动子CAR盒的rAAV6。图5C显示在T细胞载体化后4天的代表性B2M/CAR或TCR/CAR流式图。图5D显示在第4天的CAR平均荧光强度(MFI)( $n=4-7$ 个独立实验;4个供体)(从左到右分别为TRAC-LTR-1928z、B2M-1928z、TRAC-1928z和TRAC-EF1 $\alpha$ -1928z)。图5E显示CAR表达。左图:在第4天的CAR表达(代表性直方图)。右:在第5天的CAR T细胞的活化、记忆和耗尽标志物的FACS分析(3个供体的代表)。图5F显示对CD19+靶细胞刺激0、1、2或4次的CAR T细胞。饼形图显示CAR+T细胞的CD62L/CD45RA表型( $n=3-5$ 个独立实验,在不同的供体上)(A,CD45RA+CD62L+;B,CD45RA-CD62L+;C,CD45RA-CD62L-;D,CD45RA+CD62L-)。图5G显示用 $1 \times 10^5$ 个CAR T细胞治疗的携带NALM-6的小鼠的肿瘤负荷(平均发光)( $n=6$ ;线=1只小鼠)。采用生物发光成像(BLI)在50

日时间内每周定量测定肿瘤负荷。定量测定是在所有指定时间点每只动物的腹部和背部采集的平均光子计数。每条线表示一只小鼠。图5H显示小鼠存活率的Kaplan-Meier分析。(A): TRAC-EF1a-1928z CAR T细胞, (B): B2M-1928z CAR T细胞, (C): TRAC-LTR-1928z CAR T细胞, (D): TRAC-1928z CAR T细胞, TRAC-1928z按标示标记。 $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$ ,  $****P<0.0001$  (图5D的Welch两样本t检验); 图5G的Log-rank Mantel-Cox检验; 图5H的Mann-Whitney检验)。全部数据为均值 $\pm$ SD。另见图14和15。

[0174] 图6A-6F显示TRAC基因座提供细胞表面CAR表达的最佳调节。图6A显示在与CD19+靶细胞共培养之前和之后CAR表达的代表性直方图。图6B显示CAR-GFP融合基因的CRISPR/Cas9-靶向整合至TRAC基因座。图6C: 上, 在与CD19+靶细胞共培养之前和之后双顺反子CAR-P2A-LNGFR CAR T细胞的LNGFR/CAR表达。下, 靶向至TRAC基因座或与RV载体随机整合的CAR-GFP融合物的GFP/CAR表达 (3个独立实验的代表, 在3个供体上)。图6D显示CAR表达。左图: 载体化后5天CAR表达的代表性直方图。右图: 在1、2或4次刺激后CAR T细胞的相对CAR MFI (1=MFI, 在0小时) (用箭头标明;  $n=3-7$ 个独立实验, 在不同的供体上)。图6E显示载体化后5天的相对CAR RNA水平 (1=TRAC RNA水平)。图6F显示对CD19+靶细胞刺激1次的CAR T细胞中的CAR RNA水平的时程分析 (1=RNA水平, 在0小时) ( $n=3$ 个独立实验, 在3个供体上; 如图6D中的CAR T细胞, 上至下)。全部数据为均值 $\pm$ SD。 $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$  (ANOVA F检验兼Bonferroni校正 (图6D) 和Mann-Whitney检验 (图6E))。另见图16。下线表示TRAC-1928z CAR T细胞的CAR表面水平 (图6D) 或CAR RNA水平 (图6F)。

[0175] 图7A-7G显示CRISPR/Cas9介导的CAR基因靶向至TRAC基因座。图7A, 上, 具有TRAC第一外显子的5'端 (灰色) 即TRAC gRNA (TGT...GAC, 下链) 和相应的PAM序列 (GGG, 紧接TGT...GAC左边) 的TRAC基因座 (SEQ ID NO:41)。2个箭头标明预测的Cas9双链断裂。下, CRISPR/Cas9-靶向整合至TRAC基因座。靶向构建体 (AAV) 含有剪接受体 (SA)、接着P2A编码序列、1928z CAR基因和polyA序列, 两侧是与TRAC基因座同源的序列 (LHA和RHA, 左和右同源臂)。一旦整合, 内源TCR $\alpha$ 启动子驱动CAR表达, 同时TRAC基因座便被破坏。TRAV, TCR $\alpha$ 可变区; TRAJ, TCR $\alpha$ 连接区; 2A, 自切割猪捷申病毒2A序列。pA: 牛生长激素polyA序列。图7B显示CAR靶向至原代T细胞的时线。图7C显示在T细胞用Cas9mRNA和TRAC gRNA转染和以标示的感染复数加入AAV6后4天的代表性TCR/CAR流式图。图7D显示通过TCR表达的FACS分析测量的Cas9mRNA和TRAC gRNA转染后4天TCR破坏的百分比 ( $n=5$ )。图7E显示通过CAR表达的FACS分析测量的取决于AAV6感染复数的敲入百分比 ( $n=4$ )。图7F显示TCR-阴性群中CAR+细胞的百分比 ( $n=4$ )。图7G显示通过FACS分析的CAR+群中TCR-阳性 (下条形柱) 和TCR-阴性 (上条形柱) 的百分比 ( $n=4$ )。

[0176] 图8A-8E显示采用TLA技术的AAV6TRAC-1928z整合的全基因组作图。图8A显示TLA技术的图示 (de Vree et al., Nat. Biotechnol. 32:1019-1025 (2014))。为此研究, 使用了靶向CAR和左同源臂的两对引物。图8B显示用于TLA分析的TRAC-1928z CAR T细胞的TCR/CAR FACS图。CAR T细胞如图7B中处理并扩增2周。图8C显示使用1928z CAR特异性引物 (CD28特异性正向: 5'-ACAATGAGAAGAGCAATGGA-3' (SEQ ID NO:39) 和scFV特异性反向: 5'-GAGATTGTCCTGGTTTCTGT-3' (SEQ ID NO:40)) 的跨人基因组的TLA序列覆盖率。y轴上标示染色体, x轴上标示染色体位置。TRAC编码的CAR T细胞如图3中产生并扩增10天后处理用于分析。引物对用于各TLA扩增。PCR产物采用Illumina NexteraXT™方案纯化和文库制备, 并在

Illumina Miseq™测序仪中测序。读取应用作为Smith-Waterman比对工具的BWA-SW作图。这允许部分作图,这最适于鉴定断裂生成读取(break-spanning read)。人基因组hg19版用于作图。图8D显示AAV-TRAC-1928z序列(两侧是ITR的靶向序列)上比对的TLA序列覆盖率。上部的灰色竖条信号表示所示位置上的覆盖率。覆盖率显示单位为读取分数的AAV ITR的整合。TRAC同源臂基因座的5'和3'端之间ITR和CAR整合的覆盖率比较允许衡量图8E中所示的可靠或不可靠的同源重组。图8E显示TLA分析的最终结果。

[0177] 图9A-9C显示TRAC-CAR T细胞的体外细胞毒活性和增殖反应。图9A显示表明CAR和TCR表达的代表性流式细胞术分析。TRAC-1928z CAR T细胞按图3B中产生;CRISPR/Cas9产生的TCR-T细胞用RV-1928z反转录病毒载体转导;TCR+细胞用RV-1928z或RV-P28z (PSMA特异性CAR)转导。TCR-阴性T细胞纯化使用磁粉在柱上进行。图9B显示采用18小时生物发光测定法,使用萤火虫萤光素酶(FFL)-表达NALM-6作为靶细胞的细胞毒活性(n=3个独立实验,在3个健康供体上)。图9C显示在用CD19+靶细胞每周刺激时CAR T细胞的代表性累积细胞计数。箭头标明刺激时间点(n=3个独立实验,在3个健康供体上)。

[0178] 图10A-10I显示体内胜过常规CAR T细胞的TRAC-CAR T细胞。图10A显示携带NALM-6的小鼠用 $2 \times 10^5$ (左)、 $1 \times 10^5$ (中)或 $5 \times 10^4$ (右)CAR T细胞治疗。肿瘤负荷采用BLI在100日时间内每周定量测定。定量测定是在所有指定时间点每只动物的腹部和背部采集的平均光子计数。每条线表示一只小鼠。一些组自来自不同健康供体的2-3个独立实验合并,表示n=6-20只小鼠/组。下,小鼠存活率的Kaplan-Meier分析。图10B-10F显示携带NALM-6的小鼠用 $1 \times 10^5$ 个所标示CAR T细胞治疗。在CAR T细胞输注后10和17天,对7只小鼠/组处于安乐死,收集骨髓细胞。对CAR T细胞和NALM-6细胞进行分析,并用流式细胞术计数。图10B显示在第17天骨髓中肿瘤细胞(CD19+GFP+)的代表性FACS分析。图10C显示在第17天骨髓CAR T细胞中耗尽标志物PD1和TIM3的代表性FACS分析。图10D显示在第17天骨髓CAR T细胞中耗尽标志物PD1和LAG3的代表性FACS分析。图10E显示骨髓中CAR+细胞的CAR MFI(每点代表1只小鼠)。图10F显示衡量CAR+群的CAR表达中的离散的变异系数(标准差与均值的比率;每点代表1只小鼠)。图10G显示RV-1928z CAR设计通过使用自切割P2A序列允许CAR和LNGFR自相同LTR启动子共表达。LTR,长末端重复序列,SD,剪接供体位点;SA,剪接受体位点;2A,猪捷申病毒自切割2A序列。图10H显示体外或体内培养的(自骨髓提取)并标记以检测CAR和LNGFR表达的RV-1928z转导T细胞的代表性流式细胞图。图10I显示RV-1928z T细胞中的CAR MFI和肿瘤负荷(NALM-6计数)之间的比较。

[0179] 图11A-11J显示TRAC-19BBz CAR T细胞通过防止耗尽体内而胜过常规19BBz CAR T细胞。图11A和11B显示自获自3个独立转染或转导的CAR+T细胞的平均CAR MFI(图11A)和变异系数(图11B)汇编的结果。用于这3个实验的T细胞从3个不同健康供体的血液分离。图11C:左,在基因转移后5天通过流式细胞术分析的CAR T细胞的活化、记忆和耗尽标志物。右,示图表示在CAR载体化后5天通过CD62L和CD45RA表达的流式细胞术分析测量的CAR+T细胞的表型;A:CD45RA+CD62L+;B:CD45RA-CD62L+;C:CD45RA-CD62L-;D:CD45RA+CD62L-。图11D显示CAR T细胞在48小时时间内在CD19+靶细胞中被激活1、2或4次后的相对CAR MFI( $1 = \text{MFI}$ ,在0小时时)(n=3个独立实验,箭头标明刺激时间点)(TRAC-19bbz下线,RV-19bbz上线)。图11E显示将在48小时时间内在CD19+靶细胞中刺激1、2或4次的CAR T细胞通过流式细胞术分析。示图表示通过CD62L和CD45RA表达的流式细胞术分析测量的CAR+T细胞的表型(3



个独立实验的平均比例)。图11F显示携带FFL-NALM-6的小鼠用 $1 \times 10^5$ 个CAR T细胞治疗。肿瘤负荷表示为在21日时间内每周每只动物定量测定的生物发光信号。 $n=6$ 只小鼠/组。图11G-11J显示携带NALM-6的小鼠用 $1 \times 10^5$ 个CAR T细胞治疗。在CAR T细胞输注后10和17天,对7只小鼠/组处于安乐死,并收集骨髓细胞。对CAR T细胞和NALM-6细胞进行分析,并用流式细胞术计数。每点代表1只小鼠。图11G显示骨髓中的CAR T细胞计数( $n=7$ )。图11H显示骨髓中的肿瘤(CD19+GFP+NALM-6)细胞计数( $n=7$ )。图11I显示骨髓中的效应/肿瘤比( $n=7$ )。图11J显示来自在第17天收集和通过流式细胞术分析的骨髓T细胞的耗尽标志物分析(分别从内环到外环显示的抑制性受体表达TIM3、LAG3和PD1)。表示为表达规定标志物的细胞的平均百分比( $n=7$ )。\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$  (Mann-Whitney检验(图11A和11B),ANOVA F检验(图11D))。

[0180] 图12A-12D显示TRAC-CAR T细胞显示体外张力性信号转导(tonic signalling level)和抗原诱导的分化减弱。图12A显示在CAR基因转移后5天T细胞分化标志物的代表性FACS分析。图12B显示在CD19+靶细胞中刺激1、2或4次后CAR T细胞分化标志物的代表性FACS分析。图12C显示当在48小时时间内在CD19+靶细胞中刺激1、2或4次时的CAR T细胞增殖。在3种1928z CAR T细胞条件之间未发现增殖的明显差异。图12D显示在图4D中的方案结束时在胞内染色后具有IFN $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 或IL-2阳性表达的CAR T细胞的百分比( $n=2$ 个独立实验,对2个供体)(各组条形柱从左到右分别为TRAC-1928z、RV1928z和RV-P28z)。

[0181] 图13A-13F显示TRAC-CAR T细胞显示与低或高转导的RV-CAR T细胞相比体外抗原诱导的分化延迟。图13A显示在转导后5天反转录病毒上清液的不同体积( $\mu$ l)中的CAR表达的代表性直方图(3个独立实验的代表;总转导体积2ml)。图13B显示在转导后5天随通过FACS分析的反转录病毒上清液体积变化的CAR+T细胞的百分比( $n=3$ 个供体)。图13C显示在转导后5天随通过FACS分析的反转录病毒上清液体积变化的T细胞的CAR平均荧光强度(MFI)( $n=3$ 个供体)。图13D显示在转导后5天随通过FACS分析的反转录病毒上清液的体积变化的CAR变异系数( $n=3$ 个供体)。图13E显示在转导后5天CAR T细胞的平均CAR MFI( $n=3$ 个供体)。高= $1,000\mu$ l,低= $30\mu$ l。图13F显示将在48小时时间内在CD19+靶细胞中刺激1、2或4次的CAR T细胞通过流式细胞术分析。示图表示通过CD62L和CD45RA表达的流式细胞术分析测量的CAR-阳性T细胞的表型(3个独立实验的平均比例)(A,CD45RA+CD62L+;B,CD45RA-CD62L+;C,CD45RA-CD62L-;D,CD45RA+CD62L-)。

[0182] 图14A-14F使用不同基因座上的不同启动子的CAR基因表达体外影响张力性信号转导水平。图14A显示CRISPR/Cas9-靶向整合至TRAC基因座的图。靶向构建体(AAV)含有剪接受体(SA)、接着P2A编码序列、1928z CAR基因和polyA序列,两侧是与TRAC基因座同源的序列(LHA和RHA:左和右同源臂)。一旦整合,内源TCR $\alpha$ 启动子便驱动CAR表达,同时TRAC基因座被破坏。TRAV:TCR $\alpha$ 可变区。TRAJ:TCR $\alpha$ 连接区2A:自切割猪捷申病毒2A序列。图14B显示CRISPR/Cas9靶向的启动子整合至TRAC基因座的图。靶向构建体(AAV)含有呈相反取向在外源启动子控制下的1928z CAR编码序列、长形式的人延伸因子1 $\alpha$ 启动子(EF1 $\alpha$ )、来自图3和4中使用的 $\gamma$ 反转录病毒的增强子序列(Mo-MLV LTR在此称为LTR)或磷酸甘油酸激酶(PGK)启动子和polyA序列,两侧是与TRAC基因座同源的序列(LHA和RHA:左和右同源臂)。TRAV:TCR $\alpha$ 可变区。TRAJ:TCR $\alpha$ 连接区。图14C显示特制CRISPR/Cas9诱导的靶向整合至B $_2$ M基因座的示意图。靶向构建体(AAV)含有两侧是同源序列(LHA和RHA)的CAR基因。一旦整合,内源

B<sub>2</sub>M启动子驱动CAR表达。图14D显示CRISPR/Cas9靶向的启动子整合至B<sub>2</sub>M基因座的示意图。靶向构建体(AAV)含有呈相反取向在外源启动子控制下的1928z CAR基因、人延伸因子1 $\alpha$ 启动子(EF1 $\alpha$ )、磷酸甘油酸激酶(PGK)启动子或截短形式的PGK(PGK100)和polyA序列,两侧是与B<sub>2</sub>M基因座同源的序列(LHA和RHA:左和右同源臂)。图14E显示在转导后4天通过FACS分析的平均CAR平均荧光强度(MFI)(n=3-7个独立实验和4不同的供体)。pA:所有靶向构建体的牛生长激素polyA序列。图14F显示在载体化后5天CAR T细胞的分析。左图:在其载体化进入T细胞后5天CAR表达的代表性直方图。中图:在CAR载体化后5天通过流式细胞术分析的CAR T细胞的活化、记忆和耗尽标志物。右图:示图表示在CARe载体化后5天通过CD62L和CD45RA表达的流式细胞术分析测量的CAR阳性T细胞的表型(A,CD45RA+CD62L+;B,CD45RA-CD62L+;C,CD45RA-CD62L-;D,CD45RA+CD62L-)。

[0183] 图15A-15G显示使用不同基因座上的不同启动子的CAR基因表达体内影响抗原诱导的分化和耗尽。图15A显示在CD19+靶细胞中刺激1、2或4次后CAR T细胞分化标志物的代表性FACS分析。图15B显示当在48小时时间内CD19+靶细胞中刺激1、2或4次时CAR T细胞的增殖(点群从左到右分别为TRAC-LTR-1928z、B2M-1928z、TRAC-1928z和TRAC-EF1 $\alpha$ -1928z)。在4个1928z CAR T细胞条件之间未发现增殖的明显差异。图15C-15E显示携带NALM-6的小鼠用 $1 \times 10^5$ 个CAR T细胞治疗。在CAR T细胞输注后10和17天,将7只小鼠/组处于安乐死,收集骨髓细胞。对CAR T细胞和NALM-6细胞进行分析,并用流式细胞术计数。每点代表1只小鼠。图15F显示在第17天骨髓CAR T细胞效应记忆('Eff mem',CD62L-CD45RA-)和效应('Eff',CD62L-CD45RA+)的百分比(n=7只小鼠)。图15G显示在第17天收集和通过流式细胞术分析的骨髓T细胞的耗尽标志物分析。表示为表达规定标志物的细胞的平均百分比(n=7只小鼠)(分别从内环到外环显示的抑制性受体表达TIM3、LAG3和PD1)。

[0184] 图16A-16B显示在CAR T细胞活化时基因座-启动子配置控制CAR蛋白表达和转录反应。图16A:左图:在其载体化进入T细胞后5天CAR表达的代表性直方图。右图:在48小时时间内CAR T细胞在CD19+靶细胞中激活1、2或4次后的相对CAR MFI(1=MFI,在0小时时)。图16B显示刺激前CAR MFI和CAR RNA相对水平间的比较(n=3个独立实验,在3个供体上)。下线表示TRAC-1928z CAR T细胞中的CAR表面水平。

[0185] 图17显示基因表达谱与CD8+T细胞的活化和记忆形成有关。在感染期间不同时间点上定量测定相对于其在幼稚OT-I细胞中的表达在暴露于感染的OT-I细胞增量调节(Up)或减量调节(Down)的基因。显示通过K-均值聚类分析具有最多动态表达的10个簇,其表达的变化超过1.4倍。每条线代表单一探针;右下角的数值表示探针数;在图上方为各簇中的目标基因(摘自Best et al.,Nature Immunol.14:404-413(2013))。

[0186] 图18显示整合酶野生型(SEQ ID NO:1)和突变型D124A(SEQ ID NO:2)、D124E(SEQ ID NO:3)、D124N(SEQ ID NO:4)、D124V(SEQ ID NO:5)、D183A(SEQ ID NO:6)、D183N(SEQ ID NO:7)、D124A和D183A(SEQ ID NO:8)、D124A和D183N(SEQ ID NO:9)、D124E和D183A(SEQ ID NO:10)、D124E和D183N(SEQ ID NO:11)、D124N和D183A(SEQ ID NO:12)、D124N和D183N(SEQ ID NO:13)、D124V和D183A(SEQ ID NO:14)及D124V和D183N(SEQ ID NO:15)的莫洛尼鼠白血病病毒(MLV)氨基酸序列。

[0187] 在附图描述中提及颜色时,图像被转化成灰度。

## 具体实施方式

[0188] 本发明涉及免疫疗法,尤其涉及基于在所需条件下表达治疗性转基因的遗传改造的T细胞的靶定细胞疗法。本文描述了通过治疗性转基因靶向整合至T细胞基因组使得转基因被置于在内源启动子控制下产生用于免疫疗法的T细胞的方法。应了解提及本文所述转基因(呈单数)同样适用于一个或多个转基因(呈复数),除非文中另有说明。本发明提供T细胞疗法的策略,其利用基因组编辑将一个或几个治疗性转基因置于一个或多个内源启动子控制下以提供治疗性T细胞的受控制的时间-空间表达。本发明提供待工程改造以表达一个治疗性转基因或多个治疗性转基因的T细胞,其中通过使用相应提供表达的内源启动子,转基因的表达可根据T细胞的位置(例如转基因只在肿瘤附近表达),或在规定的时间点上(例如占据肿瘤细胞之前或之后)进行。本发明的细胞和方法因此可用来提高治疗性T细胞的功效和安全性。

[0189] 本发明涉及将治疗性转基因置于内源启动子下以在T细胞中实现所需的转基因表达特征。选择内源启动子以便调节转基因的表达特征,例如转基因表达的时限和/或转基因表达的水平。通过将转基因置于内源启动子的控制下调节转基因的表达排除了给予小分子药物以诱导转基因、免疫原性组分和编码内部启动子和转基因的病毒载体的表达的需要。通过使用内源启动子,对T细胞进行改造以自主调节转基因的表达使得转基因表达,例如在或当转基因表达被激活之处或之时,优选按依赖于T细胞对环境信号(例如在靶抗原、细胞因子和/或共刺激配体附近)的协调内源反应的规定程序进行。因此,在一个具体实施方案中,对T细胞进行改造使得使用这样的内源启动子,其对微环境信号起反应,导致由内源启动子支配的空间和时间上可预测的转基因表达。

[0190] 在一个具体实施方案中,治疗性转基因编码治疗性蛋白质。在另一个具体实施方案中,治疗性转基因编码治疗性RNA。

[0191] 在一个优选的实施方案中,本发明涉及免疫疗法并特别涉及基于用编码重编程T细胞特异性和功能的CAR的序列遗传置换T细胞受体(TCR)复合物的组分的靶向细胞疗法。如本文通过举例所公开的,应用基因编辑产生具有稳定和均质的CAR表达的组织相容性T细胞产物。另外,基因编辑方法导致编码TCR复合物的组分的靶定基因的破坏,这通过降低可能通过TCR复合物介导的移植物抗宿主反应性来提高CAR-T细胞的功能。还可用于通常不包括在临床试验中的患者自身免疫疾病。使他们的TCR失活可用来提供这些患者的安全性。

[0192] 在一个具体实施方案中,本文描述了通过使CAR基因盒(优选无启动子)靶向整合至编码T细胞受体(TCR)复合物功能性表达所需要的多肽的基因的一步产生通用CAR T细胞的方法。术语“通用”表示T细胞不限于自体使用,而且还可非自体地使用。在一个实施方案中,该方法可利用TCR复合物的组分的调节表达以驱动细胞中CAR的表达。另外,CAR盒的整合例如通过防止TCR复合物在细胞表面的适当装配,产生TCR阴性细胞,破坏或降低功能性TCR复合物所需的多肽的表达。该方法与通常使用的以下基因组编辑平台相配:例如锌指核酸酶(ZFN)、转录激活物样效应子核酸酶(TALEN)、成簇有规间隔的短回文重复序列(CRISPR)相关蛋白9(Cas9)、Cpf1、大范围核酸酶或Mega-Tal,并导致细胞基因组的靶位点上的同源重组。如本文公开的,情况是确定的,产生多至50%的在单一步骤中结合靶基因破坏和CAR靶向插入的通用CAR T细胞。本文公开的结果显示使用内源TCR启动子的方法提供单一整合以及一致的和可预测的表达的益处。另外,该方法提供T细胞功能和持久性改进的

预料不到的益处。最重要的是,表达来自TCR基因座的CAR的T细胞显示较高的体外和体内肿瘤裂解活性、与反转录病毒转导的CAR T细胞相比增殖和持久性提高,同时排除了其移植抗宿主病可能性。此外,这种新方法开启了产生自体CAR T细胞用于患有自身免疫病症的患者的可能性。本文所述方法,其结合了通用T细胞生产的可伸缩性与靶向CAR基因整合的一致性和安全性,可用于CAR疗法和成品CAR疗法的开发。

#### [0193] 7.1 T细胞

[0194] 在一个实施方案中,本发明提供T细胞,其中治疗性转基因在细胞基因组内的位点处整合使得转基因的表达在T细胞的内源启动子控制下。在一个优选的实施方案中,本发明提供T细胞,其中编码嵌合抗原受体(CAR)的重组核酸序列在细胞基因组内的位点处整合使得CAR由细胞在细胞表面表达,且其中编码CAR的核酸在该位点处的整合降低或防止功能性T细胞受体(TCR)复合物在细胞表面表达。在一个优选的实施方案中,重组细胞可用来提高或提供针对所需靶标的免疫应答。在另一个实施方案中,重组细胞可用来抑制不期望的免疫应答。优选细胞来源于人(在进行重组前具有人类来源)(人源细胞对于在本发明的治疗方法给予人是特别优选的)。

[0195] 在一个具体实施方案中,本发明涉及无启动子表达盒靶向整合至T细胞(优选人T细胞)的染色体转录单位,以利用内源启动子使转基因表达优化并提高经改造的T细胞的功能,其中转基因是CAR或其它治疗性转基因。在一个优选的实施方案中,通过如此改造T细胞,获得稳定和均质的CAR表达,且相对于CAR疗法的先前方法,T细胞功能和持久性提高。根据盒设计,该方法可用来破坏,或不破坏内源基因的表达。在内源基因表达被破坏的情况下,内源基因是非必需基因,即对于细胞活力或细胞增殖不是必需的基因。在一个具体实施方案中,治疗性转基因是CAR。在一个优选的实施方案中,CAR-编码核酸序列的整合破坏编码功能性T细胞受体复合物所需的蛋白质的内源基因的表达。该方法可适用于具有稳定的、空间和/或时间调节的表达的任何基因。在一个具体实施方案中,靶向自仅一个等位基因表达的基因,例如TCR $\alpha$ 、TCR $\beta$ 、Y或X染色体特异性基因,可用来确保每个细胞仅一个转基因拷贝表达。各T细胞表达产生于一个重组的TCR $\alpha$ 和一个重组的TCR $\beta$ 链缔合的独特T细胞受体。产生TCR多样性的过程发生在胸腺中的淋巴组织生成期间,其中TCR $\alpha$ 和 $\beta$ 基因两者重组(分别为VJ和VDJ重组),且各基因仅一个等位基因通过称为等位基因排斥的过程表达(Honey, Nat.Rev.Immunol.5,95doi:10.1038/nri1560(2005))。在靶向重组TCR $\alpha$ 或 $\beta$ 链的情况下,该过程供仅一拷贝的整合的CAR可表达。其它等位基因可被靶定,但将不导致CAR表达。

[0196] 本发明的T细胞是淋巴系的免疫细胞。T细胞表达T细胞受体(TCR),其大多数细胞表达 $\alpha$ 和 $\beta$ 链,较少群表达 $\gamma$ 和 $\delta$ 链。可用作本发明的免疫细胞的T细胞可以是CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>,可包括但不限于T辅助细胞(CD4<sup>+</sup>);细胞毒性T细胞(亦称为细胞毒性T淋巴细胞,CTL;CD8<sup>+</sup>T细胞);和记忆T细胞,包括中央记忆型T细胞(TCM)、干细胞记忆T细胞(TSCM)、干细胞样记忆T细胞(或干样记忆T细胞);和效应记忆T细胞,例如T<sub>EM</sub>细胞和T<sub>EMRA</sub>(CD45RA<sup>+</sup>)细胞、效应T细胞、Th1细胞、Th2细胞、Th9细胞、Th17细胞、Th22细胞、Tfh(滤泡辅助性)细胞、调节T细胞、天然杀伤T细胞、粘膜相关不变T细胞(MAIT)和 $\gamma\delta$ T细胞。主要T细胞亚型包括T<sub>N</sub>(幼稚)、T<sub>SCM</sub>(干细胞记忆)、T<sub>CM</sub>(中央记忆)、T<sub>TM</sub>(过渡记忆)、T<sub>EM</sub>(效应记忆)和T<sub>TE</sub>(终末效应)。在一个实施方案中,本发明的T细胞是免疫刺激性细胞,即介导免疫应答的细胞。是免疫刺激性的示例性T细胞包括但不限于T辅助细胞(CD4<sup>+</sup>);细胞毒性T细胞(亦称为细胞毒性T淋巴细胞,CTL;

CD8<sup>+</sup>T细胞);和记忆T细胞,包括中央记忆型T细胞(TCM)、干细胞记忆T细胞(TSCM)、干细胞样记忆T细胞(或干样记忆T细胞);和效应记忆T细胞,例如T<sub>EM</sub>细胞和T<sub>EMRA</sub>(CD45RA<sup>+</sup>)细胞、效应T细胞、Th1细胞、Th2细胞、Th9细胞、Th17细胞、Th22细胞、Tfh(滤泡辅助性)细胞、天然杀伤T细胞、粘膜相关不变T细胞(MAIT),和 $\gamma\delta$ T细胞。在另一个实施方案中,本发明的T细胞是免疫抑制性细胞,即抑制免疫应答的细胞。是免疫抑制性的示例性T细胞包括调节性T细胞(T调节细胞,Treg)和滤泡调节性T细胞(Tfh)细胞。T细胞可任选从胚干细胞或诱导的多能干细胞(iPSC)产生(参见例如Themeli et al.,Nat.Biotechnol.31(10):928-933(2013))。任选可使用的T细胞的前体细胞(其重组表达转基因,优选CAR)举例来说为造血干细胞和/或祖细胞。通过本领域已知方法,造血干和/或祖细胞来源于骨髓、脐带血、在细胞因子动员后的成人外周血等,然后经遗传工程改造以重组表达转基因,优选CAR。特别有用的前体细胞是可分化成淋巴系的那些,例如可分化成T细胞的淋巴系的造血干细胞或祖细胞。在另一个实施方案中,iPSC可用作表达转基因的细胞。在一个优选的实施方案中,iPSC可用作表达CAR的细胞,其中将编码CAR的重组核酸整合至细胞基因组的位点使得CAR由细胞在细胞表面表达,且其中编码CAR的核酸在该位点处的整合降低或防止功能性T细胞受体复合物在细胞表面表达。在另一个实施方案中,本文公开的T细胞,优选CAR T细胞可用来产生iPSC。要了解,在文中允许时,涉及T细胞的本文公开的实施方案应视为可适用于iPSC或干细胞。iPSC可用来产生本发明的T细胞,且iPSC还可源自其中。

[0197] 所选择的表达转基因的T细胞的类型应考虑是否需要刺激免疫应答或抑制免疫应答。例如,调节性T细胞(CD4+CD25高Foxp3<sup>+</sup>)可用于治疗需要抑制性免疫应答的对象例如患有自身免疫疾病的某些人,举例来说,T细胞可表达编码免疫抑制性细胞因子的转基因,而CD4<sup>+</sup>(Treg除外)/CD8<sup>+</sup>T细胞用来治疗需要刺激性免疫应答的对象,例如患有癌症的对象,举例来说,T细胞可表达免疫刺激性细胞因子。

[0198] T细胞可通过本领域众所周知的方法分离,包括市购可获得的分离方法(参见例如Rowland-Jones et al.,Lymphocytes:A Practical Approach,Oxford University Press,New York(1999))。T细胞的来源包括但不限于外周血、脐带血、骨髓或造血细胞的其它来源。可应用各种技术分离细胞以分出或富集所需的免疫细胞例如T细胞。例如,阴性选择方法可用来除去不是所需要的免疫细胞的细胞。另外,阳性选择方法可用来分出或富集所需的T细胞,或可采用阳性和阴性选择方法的组合。单克隆抗体(MAb)特别可用于鉴定与针对阳性或阴性选择两者的特殊细胞谱系和/或分化阶段有关的标志物。如果要分离T细胞的特定类型,则不同的细胞表面标志物或标志物的组合,包括但不限于CD3、CD4、CD8、CD34(对于造血干和祖细胞)等,可用来分离细胞,正如本领域众所周知的(参见Kearse,T Cell Protocols:Development and Activation,Humana Press,Totowa NJ(2000);De Libero,T Cell Protocols,Vol.514 of Methods in Molecular Biology,Humana Press,Totowa NJ(2009))。

[0199] 分离和扩增调节性T细胞的方法是本领域众所周知的(参见例如Su et al.,Methods Mol.Biol.806:287-299(2012);Bluestone et al.,Sci.Transl.Med.7(315)(doi:10.1126/scitranslmed.aad4134)(2015);Miyara et al.,Nat.Rev.Rheumatol.10:543-551(2014);Liu et al.,J.Exp.Med.203:1701-1711(2006);Seddiki et al.,J.Exp.Med.203:1693-1700(2006);Ukena et al.,Exp.Hematol.39:1152-1160(2011);

Chen et al., J. Immunol. 183:4094-4102 (2009); Putnam et al., Diabetes 58:652-662 (2009); Putnam et al., Am. J. Transplant. 13:3010-3020 (2013); Lee et al., Cancer Res. 71:2871-2881 (2011); MacDonald et al., J. Clin. Invest. 126:1413-1424 (2016)). In vitro generation of regulatory T cells (iTregs) has also been described (see, for example, Lan et al., J. Mol. Cell. Biol. 4:22-28 (2012); Yamagiwa et al., J. Immunol. 166:7282-7289 (2001); Zheng et al., J. Immunol. 169:4183-4189 (2002)). 还描述了调节性T细胞 (iTreg) 的体外产生 (参见例如 Lan et al., J. Mol. Cell. Biol. 4:22-28 (2012); Yamagiwa et al., J. Immunol. 166:7282-7289 (2001); Zheng et al., J. Immunol. 169:4183-4189 (2002)). 一般而言, 本发明的调节性T细胞是  $CD4^+$ , 例如  $CD4^+CD25^+$ , 特别是  $CD4^+CD127^{lo/-}CD25^+$ . 这类调节性T细胞表达 Foxp3 (分叉端框P3 (forkhead box P3)), 其在转录因子的分叉端/翼状螺旋家族 (Bluestone et al., J. Clin. Invest. 125:2250-2260 (2015); Riley et al., Immunity 30:656-665 (2009)). 是本发明的免疫抑制性细胞的调节性T细胞还可以是  $CD8^+$  调节性T细胞 (Guillonnet et al., Curr. Opin. Organ Transplant. 15:751-756 (2010)). 分离和扩增调节性T细胞的方法也是市购可获得的 (参见例如 BD Biosciences, San Jose, CA; STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, Canada; eBioscience, San Diego, CA; Invitrogen, Carlsbad, CA). 本发明的免疫抑制性T细胞还可以是滤泡调节性T细胞 (T(FR)) (Sage et al., Nat. Immunol. 14:152-161 (2013)). 在一个具体实施方案中, 本发明的滤泡调节性T细胞是  $CD4^+CXCR5^+$  并表达 Foxp3 (Sage et al., 同上, 2013)。

[0200] 分离细胞的方法包括但不限于密度梯度离心、与改变细胞密度的颗粒偶联、用抗体包覆磁珠的磁分离、亲和层析法、与单克隆抗体 (mAb) 连接或联用的细胞毒性剂, 包括但不限于补体和细胞毒素、用固体基质 (例如板或芯片) 连接的抗体淘洗、淘析、流式细胞术或任何其它方便的技术 (参见例如 Recktenwald et al., Cell Separation Methods and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York (1998))。

[0201] T细胞对于向其给予本发明的治疗方法的对象可为自体的或非自体的。自体细胞自要向其给予经改造的T细胞的对象中分离。在一个优选的实施方案中, 自体细胞自要向其给予重组表达CAR的工程改造细胞的对象分离。任选, 细胞可通过白细胞除去法获得, 其中白细胞从抽出的血液中选择性地去除, 进行重组, 然后再回输给供体。或者, 可使用来自不是对象的非自体供体的同种异体细胞。在非自体供体的情况下, 对细胞分型并与人白细胞抗原 (HLA) 匹配以确定相容性的合适水平, 正如本领域众所周知的。对于自体和非自体细胞两者, 可采用本领域众所周知的方法任选将细胞冷藏保存以备用于遗传操作和/或给予对象。

[0202] 之前已描述了分离可用于重组表达CAR的T细胞的各种方法, 可采用的方法包括但不限于使用外周供体淋巴细胞 (Sadelain et al., Nat. Rev. Cancer 3:35-45 (2003); Morgan et al., Science 314:126-129 (2006)、使用来源于肿瘤活检样品中的肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 的淋巴细胞培养物 (Panelli et al., J. Immunol. 164:495-504 (2000); Panelli et al., J. Immunol. 164:4382-4392 (2000)) 和选择性使用采用人工抗原呈递细胞 (AAPC) 或树突细胞的体外扩增的抗原特异性外周血白细胞 (Dupont et al., Cancer Res. 65:5417-5427 (2005); Papanicolaou et al., Blood 102:2498-2505 (2003))。在使用

干细胞的情况下,细胞可通过本领域众所周知的方法分离(参见例如Klug et al., Hematopoietic Stem Cell Protocols, Humana Press, New Jersey (2002); Freshney et al., Culture of Human Stem Cells, John Wiley & Sons (2007))。

[0203] 在一个具体实施方案中,分离的T细胞经离体遗传改造用于转基因的重组表达。在一个优选的实施方案中,分离的T细胞经离体遗传改造用于CAR的重组表达。细胞可通过本领域众所周知的方法进行遗传改造用于重组表达。

[0204] 在另一个实施方案中,本发明提供识别且对靶抗原敏感的、然后经遗传改造用于转基因的重组表达的T细胞。这类T细胞可以但不一定表达与靶抗原结合的CAR,因为细胞已经是靶抗原特异性的,使得其免疫应答(例如细胞毒性)被所述靶抗原特异性地刺激。识别并对靶抗原敏感的这类T细胞可通过已知方法获得,举例来说,使用幼稚T细胞(参见例如 Wolf1 et al., Nat. Protocols 9:950-966 (2014))或造血祖细胞(参见van Lent et al., J. Immunol. 179:4959-4968 (2007))的体外敏化方法;或可获自暴露于并正在增加针对靶抗原的免疫应答的对象(即体内敏化的T细胞)。从对象分离抗原特异性T细胞的方法是本领域众所周知的。所述方法包括但不限于细胞因子俘获系统或细胞因子分泌测定法,其基于细胞因子从可用来鉴定和分离抗原特异性细胞的抗原刺激的T细胞中的分泌和体外细胞增殖(参见Assenmacher et al., Cytometric Cytokine Secretion Assay, in Analyzing T Cell Responses: How to Analyze Cellular Immune Responses Against Tumor Associated Antigens, Nagorsen et al., eds., Chapter 10, pp.183-195, Springer, The Netherlands (2005); Haney et al., J. Immunol. Methods 369:33-41 (2011); Bunos et al., Vox Sanguinis DOI:10.1111/vox.12291 (2015); Montes et al., Clin. Exp. Immunol. 142:292-302 (2005); Adusumilli et al., Sci Transl Med. 6:261ra151 (2014))。所述细胞因子包括但不限于干扰素- $\gamma$  和肿瘤坏死因子- $\alpha$ 。从对象分离抗原特异性调节性T细胞的方法是本领域众所周知的(参见例如Noyan et al., Eur. J. Immunol. 44:2592-2602 (2014); Brusko et al., PLoS One 5(7)e11726 (doi:10.1371) (2010); Bacher et al., Mucosal Immunol. 7:916-928 (2014); Koenen et al., J. Immunol. 174:7573-7583 (2005))。抗原特异性T细胞可采用上述用于分离T细胞的众所周知的技术分离,其包括但不限于流式细胞术、磁珠、固相淘洗等。抗原特异性T细胞分离技术也是市购可获得的,其可用于或适用于临床应用(参见例如Miltenyi Biotec, Cambridge, MA; Proimmune, Oxford, UK; 等)。

[0205] 可将T细胞置于有利于细胞维持或增殖的条件下(参见Kearse, T Cell Protocols: Development and Activation, Humana Press, Totowa NJ (2000); De Libero, T Cell Protocols, Vol. 514 of Methods in Molecular Biology, Humana Press, Totowa NJ (2009); Parente-Pereira et al., J. Biol. Methods 1(2)e7 (doi:10.14440/jbm.2014.30) (2014); Movassagh et al., Hum. Gene Ther. 11:1189-1200 (2000); Rettig et al., Mol. Ther. 8:29-41 (2003); Agarwal et al., J. Virol. 72:3720-3728 (1998); Pollok et al., Hum. Gene Ther. 10:2221-2236 (1999); Quinn et al., Hum. Gene Ther. 9:1457-1467 (1998); Su et al., Methods Mol. Biol. 806:287-299 (2012); Bluestone et al., Sci. Transl. Med. 7(315) (doi:10.1126/scitranslmed.aad4134) (2015); Miyara et al., Nat. Rev. Rheumatol. 10:543-551 (2014); Liu et al., J. Exp. Med. 203:1701-1711 (2006);

Seddiki et al., J. Exp. Med. 203:1693-1700 (2006); Ukena et al., Exp. Hematol. 39: 1152-1160 (2011); Chen et al., J. Immunol. 183:4094-4102 (2009); Putnam et al., Diabetes 58:652-662 (2009); Putnam et al., Am. J. Transplant. 13:3010-3020 (2013); Lee et al., Cancer Res. 71:2871-2881 (2011); MacDonald et al., J. Clin. Invest. 126:1413-1424 (2016); 另见市购可获得的方法例如 Dynabeads™ 人T细胞激活物产品, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)。细胞可任选在离体遗传工程改造之前或之后扩增。细胞的增殖特别可用于增加给予对象的细胞数目。用于免疫细胞例如T细胞增殖的这类方法是本领域众所周知的(参见Kaiser et al., Cancer Gene Therapy 22:72-78 (2015); Wolf1 et al., Nat. Protocols 9:950-966 (2014))。此外,细胞可任选在分离和/或遗传工程改造和/或遗传工程改造细胞增殖之后冷藏保存(参见Kaiser et al., 同上, 2015))。用于冷藏保存细胞的方法是本领域众所周知的(参见例如 Freshney, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques, 4th ed., Wiley-Liss, New York (2000); Harrison and Rae, General Techniques of Cell Culture, Cambridge University Press (1997))。

#### [0206] 7.2 靶向整合方法

[0207] 至于产生重组表达在内源T细胞启动子控制下的转基因的细胞,将转基因导入T细胞的基因组。在一个优选的实施方案中,至于产生重组表达CAR的细胞,将编码CAR的核酸导入T细胞。传统上,所述方法使用合适的表达载体,在此情况下将T细胞用转基因(例如编码CAR的核酸)转导。在本发明中,转基因被克隆至靶向构建体,这提供了转基因在基因组的位点内靶向整合。在一个优选的实施方案中,编码CAR的核酸被克隆至靶向构建体,这提供了编码CAR的核酸序列在基因组的位点(在一个具体实施方案中,破坏编码细胞中功能性TCR复合物表达所需的蛋白质的基因表达的位点)内靶向整合。例如,可采用众所周知的分子生物学技术,使本发明的转基因(例如编码CAR的多核苷酸)克隆至合适的靶向构建体或合适的载体例如反转录病毒载体,并导入T细胞(参见 Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999))。

[0208] 可使用适于在本发明的细胞(尤其人T细胞)表达的任何合适的靶向构建体。在一个具体实施方案中,靶向构建体可与适于核酸序列(转基因)在细胞基因组内的位点处靶向整合的同源重组系统并存使用。示例性同源重组系统是本领域众所周知的,包括但不限于使用以下核酸酶的技术:例如转录激活物样效应子核酸酶(TALEN)、锌指核酸酶(ZFN)、成簇有规间隔短回文重复序列(CRISPR)系统和CRISPR相关蛋白9(Cas9)和Cpf1和/或大范围核酸酶或Mega-Tal (Tal结构域和大范围核酸酶的融合物)等,这提供了例如细胞基因组内所需靶位点的同源重组(参见实施例;另见美国专利号8,697,359;US publication 20140068797;Gaj et al., Trends Biotechnol. 31:397-405 (2013); Gersbach et al., Nucl. Acids Res. 39:7868-7878 (2011); Vasileva, et al. Cell Death Dis. 6:e1831. (Jul 23 2015); Sontheimer, Hum. Gene Ther. 26 (7):413-424 (2015); Osborn et al., Mol. Ther. 24 (3):570-581 (2016))。所述方法是本领域众所周知的和市购可获得的(ThermoFisher, Carlsbad, CA; GenScript, Piscataway, NJ; Clontech, Mountain View, CA)。其它CRISPR型系统包括致热原和Aureus。所述方法可用来实施或促进同源重组。

#### [0209] 7.3 载体和靶向构建体

[0210] 合适的靶向构建体可包含与本发明中所用的同源重组系统相容的任何核酸序列。



在一个实施方案中,靶向构建体包含腺伴随病毒(AAV)序列。靶向构建体可具有来自一个或多个AAV血清型的核酸序列。例如,靶向构建体可包含AAV2序列或其它血清型序列例如AAV5。用作靶向构建体的一部分的AAV核酸序列可包封在几个天然或重组AAV衣壳或颗粒中。在一个具体实施方案中,AAV颗粒是AAV6。在一个具体实施方案中,使用AAV6病毒颗粒将AAV2型靶向构建体递送至靶细胞。在一个具体实施方案中,AAV序列是AAV2、AAV5或AAV6序列。在一个具体实施方案中,AAV序列来自AAV2。在另一个具体实施方案中,AAV序列来自AAV6。在另一个具体实施方案中,靶向构建体以5'-3'的顺序包含:第一病毒序列、左同源臂、编码自切割猪捷申病毒2A的核酸序列、转基因、多腺苷酸化序列、右同源臂和第二病毒序列。在一个优选的实施方案中,靶向构建体以5'-3'的顺序包含:第一病毒序列、左同源臂、编码自切割猪捷申病毒2A的核酸序列、编码CAR的核酸序列、多腺苷酸化序列、右同源臂和第二病毒序列。另一个合适的靶向构建体可包含来自整合缺陷型慢病毒的序列(参见例如Wanisch et al., Mol. Ther. 17 (8):1316-1332(2009))。在一个具体实施方案中,病毒核酸序列包含整合缺陷型慢病毒的序列。要了解,可使用与所用同源重组系统相容的任何合适的靶向构建。

[0211] 可包括在靶构建体的病毒载体序列包括但不限于反转录病毒、腺病毒、慢病毒和腺伴随病毒载体、牛痘病毒、牛乳头状瘤病毒衍生载体和疱疹病毒载体,例如Epstein-Barr病毒(参见例如Miller, Hum. Gene Ther. 1 (1):5-14(1990); Friedman, Science 244:1275-1281(1989); Eglitis et al., BioTechniques 6:608-614(1988); Tolstoshev et al., Current Opin. Biotechnol. 1:55-61(1990); Sharp, Lancet 337:1277-1278(1991); Cornetta et al., Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 36:311-322(1989); Anderson, Science 226:401-409(1984); Moen, Blood Cells 17:407-416(1991); Miller et al., Biotechnology 7:980-990(1989); Le Gal La Salle et al., Science 259:988-990(1993); 以及Johnson, Chest 107:77S-83S(1995); Rosenberg et al., N. Engl. J. Med. 323:370(1990); Anderson et al., 美国专利号5,399,346; Scholler et al., Sci. Transl. Med. 4:132-153(2012); Parente-Pereira et al., J. Biol. Methods 1(2):e7(1-9)(2014); Lamers et al., Blood 117(1):72-82(2011); Reviere et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6733-6737(1995); Wang et al., Gene Therapy 15:1454-1459(2008))。

[0212] 用于产生为同源重组介导的打靶提供转基因载体化的靶构建体的特别有用的载体包括但不限于重组腺伴随病毒(rAAV)、重组非整合型慢病毒(rNILV)、重组非整合型 $\gamma$ -反转录病毒(rNIgRV)、单链DNA(线性或环状)等。通过制备上述靶构建体,可将这类载体用来将转基因导入本发明的T细胞。

[0213] 在一个实施方案中,载体是重组非整合型 $\gamma$ -反转录病毒(rNIgRV)。在一个实施方案中,通过使用在DDE基序中突变(这消除了整合酶活性)的 $\gamma$ -反转录病毒整合酶获得rNIgRV。因此,通过使整合酶失活使 $\gamma$ -反转录病毒转化为非整合型 $\gamma$ -反转录病毒(参见实施例4和图18)。在一个具体实施方案中,整合酶包含选自以下的DDE突变:D164A、D164E、D164N、D164V、D183A、D183N、D164A和D168A、D164A和D183N、D164N和D183A、D164N和D183N、D164V和D168A、D164V和D183N、D164V和D183A及D164V和D183N。这类rNIgRV载体是有利的,因为与传统使用的载体相比,更容易且较便宜地产生。

[0214] 应容易了解的是,可使用rNIgRV载体将任何所需的DNA导入任何细胞中。因此,可使用rNIgRV将任何类型的所需DNA导入载体在其中起作用的任何类型的细胞中。

[0215] 在利用控制在细胞基因组的位点内整合的转基因的表达的内源启动子的本发明方法中,靶向构建体优选是无启动子的。在利用控制编码在细胞基因组的位点内整合的CAR的核酸序列表达的内源启动子的本发明方法的一个优选的实施方案中,靶向构建体优选是无启动子的。这类构建体允许转基因(例如编码CAR的核酸序列)基因组内的位点处整合使得整合的核酸序列(转基因)在内源启动子的控制下。在一个实施方案中,内源启动子是TCR启动子。在一个具体实施方案中,内源启动子是编码T细胞受体 $\alpha$ 链、T细胞受体 $\beta$ 链、CD3  $\gamma$ 链、CD3 $\delta$ 链、CD3 $\epsilon$ 链或CD3 $\zeta$ 链的基因的启动子。在一个具体实施方案中,编码CAR的核酸序列被整合。

[0216] 虽然本发明的方法优选利用内源启动子控制重组转基因(例如编码CAR的核酸序列)的表达,但要了解,可以使用利用合适的启动子用于在特定宿主细胞中表达的载体,例如掺入内源启动子例如TCR启动子的载体。这类载体可以类似于内源启动子(例如TCR启动子)提供的方式提供表达。例如,如果整合的位点不提供有效的转基因的表达,或如果受内源启动子控制的内源基因的破坏对T细胞有害或可导致其在T细胞疗法中的疗效降低,则这类载体可能是有用的。在一个优选的实施方案中,例如,如果整合的位点不提供编码CAR的核酸序列的有效表达,则这类载体可能是有用的。启动子可以是诱导型启动子或组成型启动子。核酸序列在内源或载体相关启动子控制下的表达发生在细胞表达核酸的合适条件下,例如生长条件,或在具有诱导型启动子的诱导物存在下等。这类条件为本领域技术人员所熟知。

[0217] 靶向构建体可任选设计成包括紧接编码转基因的核酸序列上游的P2A序列。在一个优选的实施方案中,靶向构建体可任选设计成包括紧接编码CAR的核酸序列上游的P2A序列。P2A是自切割肽序列,其可用于蛋白质序列的双顺反子或多顺反子表达(参见Szymczak et al., Expert Opin. Biol. Therapy 5(5):627-638(2005))。如有需要,靶向构建体可任选设计成包括报道分子,例如提供鉴定转导细胞的报道蛋白质。示例性报道蛋白质包括但不限于荧光蛋白,例如mCherry;绿色荧光蛋白(GFP);蓝色荧光蛋白,例如EBFP、EBFP2、Azurite和mKalama1;青色荧光蛋白,例如ECFP、Cerulean和CyPet;以及黄色荧光蛋白,例如YFP、Citrine、Venus和YPet。

[0218] 优选,靶向构建体包含转基因的多腺苷酸化(poly A)序列3'。在一个优选的实施方案中,靶向构建体包含编码CAR的核酸序列的多腺苷酸化(poly A)序列3'。

[0219] 如本文公开的,在一个具体实施方案中,编码CAR的核酸在细胞基因组内的位点处整合使得CAR可在细胞中表达并在细胞表面产生。整合的位点降低或防止功能性T细胞受体(TCR)复合物在细胞表面表达。细胞因此可变成TCR阴性细胞。这类TCR阴性细胞可能是有用的,例如,在利用非自体T细胞用以降低接受者的移植物抗宿主病(GVHD)的情况下。产生TCR阴性细胞还可用来用自体细胞治疗患有自身免疫疾病的对象,因为可通过降低或防止靶向自身抗原的功能性TCR复合物的表达,降低对象自身T细胞提供的自身免疫反应。

[0220] T细胞受体(TCR)是TCR- $\alpha$ 和TCR- $\beta$ 链的异二聚体。TCR复合物由TCR和CD3gamma( $\gamma$ )、CD3delta( $\delta$ )、CD3epsilon( $\epsilon$ )和CD3zeta( $\zeta$ )形成(参见例如Call et al., Cell 111:967-979(2002))。T细胞受体 $\alpha$ 链、T细胞受体 $\beta$ 链、CD3  $\gamma$ 链、CD3 $\delta$ 链、CD3 $\epsilon$ 链或CD3 $\zeta$ 链的一个

或多个的表达的破坏或降低可用来降低或防止功能性T细胞受体(TCR)复合物的形成。通过降低或防止功能性TCR复合物的形成,T细胞不再通过其TCR复合物介导免疫应答。在一个实施方案中,编码CAR的核酸在基因组的位点内整合,从而破坏或降低T细胞受体 $\alpha$ 链、T细胞受体 $\beta$ 链、CD3  $\gamma$  链、CD3 $\delta$ 链、CD3 $\epsilon$ 链或CD3 $\zeta$ 链的表达。虽然TCR复合物蛋白质之一减少便足够,但要了解,如有需要可减少不止一种TCR复合物的组分。

[0221] 要了解,细胞基因组中的整合位点被靶定以将转基因置于内源启动子控制下。整合可以是例如但不限于整合至外显子、整合至内含子或在基因5'端整合。在一个实施方案中,转基因的整合导致内源基因在整合位点处遭破坏。在一个优选的实施方案中,要了解,细胞基因组中的整合位点被靶定以降低或破坏TCR复合物的组分(例如T细胞受体 $\alpha$ 链、T细胞受体 $\beta$ 链、CD3  $\gamma$  链、CD3 $\delta$ 链、CD3 $\epsilon$ 链或CD3 $\zeta$ 链)的表达。本领域的技术人员可容易地确定编码T细胞受体 $\alpha$ 链、T细胞受体 $\beta$ 链、CD3  $\gamma$  链、CD3 $\delta$ 链、CD3 $\epsilon$ 链或CD3 $\zeta$ 链的基因整合CAR编码核酸以降低或破坏T细胞受体 $\alpha$ 链、T细胞受体 $\beta$ 链、CD3  $\gamma$  链、CD3 $\delta$ 链、CD3 $\epsilon$ 链或CD3 $\zeta$ 链的表达的合适位置。所述方法是本领域众所周知的,可包括但不限于整合至外显子、整合至内含子、在基因5'端整合等。要了解,基因的任何内含子或外显子可支持靶向构建体。本领域的技术人员可容易地确定转基因的靶向整合的合适位点,如有需要可降低或破坏在整合位点处在内源启动子控制下的内源基因的表达。在一个具体实施方案中,整合的位点在第一外显子内。要了解,在选择转基因整合的位点时,整合位点发生在非必需基因(即对细胞活力或细胞增殖不是必需的基因)中,特别在其中内源基因的表达将被破坏的情况下。在一个优选的实施方案中,本领域的技术人员可容易地确定可降低或破坏TCR复合物蛋白质(例如T细胞受体 $\alpha$ 链、T细胞受体 $\beta$ 链、CD3  $\gamma$  链、CD3 $\delta$ 链、CD3 $\epsilon$ 链或CD3 $\zeta$ 链)的表达的CAR编码核酸序列的靶向整合的合适位点,和/或将CAR编码核酸序列置于编码TCR复合物组分的各个基因的内源启动子控制下。在一个实施方案中,整合的位点在第一外显子内(参见实施例)。在一个具体实施方案中,整合的位点在TCR $\alpha$ 恒定链(TRAC)的第一外显子内。在一个优选的实施方案中,将转基因(例如编码CAR的核酸)置于内源TCR启动子的控制下。其详情描述于2016年4月15日提交的临时申请号62/323,623和2106年4月16日提交的62/323,675,其通过引用以其整体并入本文。

[0222] 如有需要,整合位点和靶向构建体可被设计成转基因与内源基因符合读框的整合,导致转基因和内源基因的融合蛋白表达(另见US20130280222)。在一个优选的实施方案中,整合位点和靶向构建体可被设计成与内源基因符合读框的整合,导致CAR和TCR复合物蛋白质的融合蛋白表达。任选,这类构建体可含有紧接转基因5'的P2A,允许转基因在细胞中的所需位置表达而不与内源基因的基因产物融合。这类构建体提供转基因和内源基因两者在整合位点表达,且如果内源基因破坏对T细胞有害或可导致其在T细胞疗法中的疗效降低,则可使用这类构建体。在一个优选的实施方案中,这类构建体可含有紧接编码CAR的核酸序列5'的P2A,允许CAR在细胞表面表达而不与TCR复合物蛋白质融合。要进一步了解,另一个基因也可整合至基因组,例如编码第二CAR的基因,或安全开关(safety switch)(例如诱导型胱天蛋白酶9(iCasp9)或单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSVtk),参见Tey, Clin.Transl.Immunology 3(6):e17),或免疫调节分子等。在一个实施方案中,相同或不同基因(转基因)的整合分别发生在不同的靶基因上。在具体方面,不同的基因(转基因)分别不同的整合位点处整合。

[0223] 采用本领域众所周知的方法设计同源重组系统以靶向本领域已知的基因组的所需位点,例如编码T细胞受体 $\alpha$ 链(染色体14,NC\_000014.9(22547506..22552132))、T细胞受体 $\beta$ 链(染色体7,NC\_000007.14(142299011..142813287))、CD3 $\gamma$ 链(染色体11,NC\_000011.10(118344316..118353782))、CD3 $\delta$ 链(染色体11,NC\_000011.10(118339074..118342744))、CD3 $\epsilon$ 链(染色体11,NC\_000011.10(118304580..118316175))或CD3 $\zeta$ 链(染色体1,NC\_000001.11(167430640..167518616))的基因内的位点(染色体位置编号与最新汇编:GRCh38.p2一致)。

[0224] 如本文所述,在一个实施方案中,整合位点可靶向只从一个等位基因(例如TCR $\alpha$ 、TCR $\beta$ 、Y或X染色体特异性基因)表达的基因。在此情况下,足够将转基因在基因组内的单一位点处整合。在其中转基因编码CAR的一个优选的实施方案中,在此情况下,足够将编码CAR的核酸在基因组内的单一位点处整合。该策略可用来确保每个细胞仅一个转基因拷贝表达。任选,在其中待整合的基因存在于两个等位基因上的情况下,靶向同源重组可发生在两个等位基因上。在此情况下,靶向整合可发生在一个基因座或两个基因座上。

[0225] 采用常规分子生物学技术,可采用测定法测定转基因(优选编码CAR的转基因)的转导效率。基因转移效率可通过荧光激活细胞分选术(FACS)分析监测以定量测定转导T细胞的分数,和/或通过定量PCR监测。使用成熟的共培养系统(Gade et al.,Cancer Res.65:9080-9088(2005);Gong et al.,Neoplasia 1:123-127(1999);Latouche et al.,Nat.Biotechnol.18:405-409(2000)),可测定表达癌抗原的成纤维细胞AAPC(与对照)是否指导细胞因子从表达CAR的转导T细胞释放(用于IL-2、IL-4、IL-10、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 和GM-CSF的细胞上清液LUMINEX(Austin TX)测定法)、T细胞增殖(通过羧基荧光素琥珀酰亚胺基酯(CFSE)标记)和T细胞存活(通过膜联蛋白V染色)。可将表达CAR的T细胞暴露于经由靶抗原阳性细胞的反复刺激,并可测定T细胞增殖和细胞因子反应是保持相似还是随反复刺激降低。在一个优选的实施方案中,可将表达CAR的T细胞暴露于经由癌抗原阳性靶细胞的反复刺激,并可测定T细胞增殖和细胞因子反应是保持相似还是随反复刺激降低。有多重E:T比率的细胞毒性测定法可采用铬释放测定法进行。

#### [0226] 7.4内源T细胞启动子

[0227] 本发明涉及通过使转基因在T细胞基因组内的位点处整合使得将转基因置于T细胞的内源启动子的控制下在T细胞中表达治疗性转基因。通过利用内源启动子,T细胞被工程改造以表达治疗性转基因,或在不同内源启动子控制下的多个治疗性转基因。在一个具体实施方案中,转基因的表达依赖于T细胞的微环境。例如,可通过使用当T细胞在特定位置处被诱导的内源启动子(例如当T细胞在肿瘤的位置处并且被与肿瘤抗原的结合激活,从而诱导内源启动子),根据T细胞位置(例如转基因只在肿瘤附近表达),或可以在规定的时间点(例如通过使用在规定时间点被诱导的内源启动子,例如通过在遇到肿瘤细胞时激活T细胞)进行治疗性转基因的表达。根据例如在T细胞与抗原相遇后多久启动子被激活或抑制、表达有多强和持续多久来选择启动子。选择启动子以适应启动子调节其表达的转基因的药理学(例如一些转基因在低水平下更有效,其它转基因在较高表达水平下更有效等)。应了解本公开内容中有关使用控制转基因在T细胞中表达的内源启动子(单数)的描述将同样适用使用一个以上的内源启动子,各个在T细胞中控制转基因(可与其它转基因相同或不同)的表达,除非文中另有说明。本领域技术人员可容易地选择合适的内源启动子以提供一个

或多个转基因的所需表达和/或调节以提高用于T细胞疗法的T细胞的疗效。

[0228] 内源T细胞启动子可以是组成型或诱导型的。在一个具体实施方案中,内源启动子对T细胞亚群有特异性。在其中一个以上转基因在T细胞中表达的情况下,可分别将转基因(其可以彼此不同)置于组成型和诱导型启动子的组合的控制下,所述启动子的一个或多个可以是例如对T细胞亚群有特异性。

[0229] 本文所述实施方案的一个方面,内源启动子不是白介素4(IL4)启动子。

[0230] 在一个实施方案中,内源T细胞启动子是组成型的。在另一个实施方案中,内源T细胞启动子是诱导型的。在一个具体实施方案中,内源T细胞启动子在T细胞亚群中是有活性的。在一个实施方案中,两个或更多个转基因被整合至T细胞的基因组,使得各转基因的表达在T细胞的不同内源启动子的控制下。在一个具体实施方案中,2个转基因因此被整合。在一个具体实施方案中,2个转基因每个的表达在是组成型的不同内源启动子的控制下。在另一个具体实施方案中,2个转基因每个的表达在是诱导型的不同内源启动子的控制下。在另一个具体实施方案中,第一转基因的表达在组成型内源启动子的控制下,第二转基因的表达在诱导型内源启动子的控制下。在另一个具体实施方案中,3个转基因被整合至T细胞的基因组,使得各转基因的表达在T细胞的不同内源启动子的控制下,其中第一转基因的表达在组成型内源启动子的控制下,第二和第三转基因的表达分别在两种不同的诱导型内源启动子的控制下。要了解,根据将在T细胞中表达的转基因,可选择启动子以提供合适的表达水平、表达的时间、当T细胞处于特定微环境下的表达等。例如,转基因1的表达可在组成型启动子的控制下,转基因2的表达可在与被T细胞识别的抗原接触后不久被激活的诱导型启动子的控制下,转基因3的表达可在与转基因2相比较晚时间或以不同水平被激活的不同诱导型启动子的控制下。在这个具体实例中,转基因1组成型地表达,转基因2和3在具有不同性质的诱导型启动子的控制下。

[0231] 工程改造本发明的T细胞以从内源T细胞启动子表达转基因提供通过T细胞对转基因表达的自主调节。因此,T细胞的微环境可用来协调多个转基因的表达以提供转基因T细胞的最优活性,特别当至少一个基因在诱导型启动子的控制下。例如,T细胞疗法可伴以给予T细胞刺激性细胞因子(参见Sadelain et al.,Cancer Disc.3:388-398(2013))。在一个实施方案中,本发明的T细胞可经工程改造以共表达CAR和第二转基因,例如T细胞激活性细胞因子。例如,可将CAR置于组成型启动子的控制下,可将第二转基因例如T细胞激活性细胞因子(例如白介素12(IL12))置于诱导型启动子的控制下使得当T细胞在被例如肿瘤上的CAR识别的抗原附近时,例如当T细胞通过与CAR结合占据靶肿瘤抗原时,发生控制第二转基因的诱导型启动子的活化。在该实例中,这类构建体避免了全身或局部给予T细胞激活性细胞因子(这可能产生毒性)的需要。另外,在其中对T细胞进行改造以表达可通过给予药物调节的在诱导型启动子控制下的T细胞活化细胞因子的情况下,这类构建体避免了给予药物的需要。在此情况下,代替需要给予药物以诱导转基因的表达的是,转基因表达的调节在内源启动子的控制下,这提供了转基因的表达。相反地,T细胞自身,在被靶抗原占用后,激活T细胞激活性细胞因子的表达,提供了细胞因子的局部表达,因此转基因表达的时空调节使得用于免疫疗法的T细胞的疗效最优化。

[0232] 在另一个实例中,表达CAR的T细胞有时可显示毒性。在一个具体实施方案中,为了降低这种毒性,因此可将编码CAR的转基因置于诱导型启动子的控制下,使得启动子不被诱

导,且CAR的表达不发生,直到T细胞用被CAR识别的靶标(例如靶肿瘤)占用。在又一个实施方案中,T细胞可经工程改造以对特定靶标具有较高选择性。例如,在某些情况下,肿瘤上靶抗原可能不只在肿瘤上表达。因此,使T细胞靶向靶抗原可导致针对表达同一抗原的非靶细胞或组织的免疫应答。因此,在一个实施方案中,本发明的T细胞经工程改造以识别靶肿瘤上的两种抗原,这提供针对靶肿瘤的较高选择性。例如,T细胞可经工程改造以表达对两种不同肿瘤抗原有特异性的两种CAR。在这种情况下,T细胞与携带两种靶抗原的靶标的选择性结合可与在诱导型内源启动子控制下的第三转基因(例如上述T细胞激活性细胞因子)偶联,因而只有在被靶标选择性占据时刺激含细胞因子的T细胞的活化。本领域技术人员易了解,待在合适的内源T细胞启动子(或组成型、对T细胞亚型有特异性、诱导型或其组合)的控制下表达的合适治疗性转基因的选择,可用来产生转基因的自主调节性表达以提供更有效的T细胞疗法。在一个实施方案中,代替使用靶向一种抗原的完全合适的CAR的是,对于完全抗肿瘤反应靶向两种不同抗原的两种亚最适CAR必需被占据。如果健康组织表达一种或另一种抗原,其健康组织将不会完全参与CAR T细胞反应。如果肿瘤表达两种抗原,则它将引发完全的CAR T细胞活性。

[0233] 本发明涉及任选使用组成型和诱导型启动子两者,因为T细胞可经工程改造以对特定分子信号起特异性反应,在所选择的位置和时间产生新的治疗性分子。例如,编码抗原特异性细胞表面受体的转基因可自组成型启动子表达,并且只有在与该特定抗原相互作用时发出信号。然后,这种相互作用诱导控制治疗性分子表达的特异启动子的活化。这种特定的经改造的T细胞的治疗益处取决于组成型和诱导型启动子两者的功能。在一个具体实施方案中,CAR可在组成型启动子(例如TRAC、CD3、B2M...)的控制下。在一个具体实施方案中,另一个治疗性转基因(单克隆抗体(限制点抑制剂等)或细胞因子(例如IL12、IL18等)在被CAR占用激活的启动子(例如IL2、IFN $\gamma$ 、CD69...)的控制下。在此情况下,转基因可在CAR活化时表达,并在肿瘤中特异性表达。

[0234] 在一个实施方案中,本发明涉及表达3种转基因以上。例如,转基因1可以是组成型的,转基因2可在与抗原接触后不久出现,而转基因3比转基因2较晚或以不同水平出现。在该实例中,转基因1的表达在内源组成型启动子的控制下,转基因2的表达由于受由抗原占用诱导的内源启动子控制而在与抗原接触后不久开始,而转基因3的表达由于受比调节转基因2的内源启动子较晚诱导的内源启动子控制或提供不同的表达水平而比转基因2较晚或以不同的水平开始。在该实例中,转基因1是组成型的,转基因2和3是诱导型的(各自具有不同的动力学特征)。在一个具体实施方案中,转基因1编码对例如肿瘤细胞上的抗原A有特异性的CAR,其中转基因1组成型地表达。在与抗原A结合后,转基因2表达,其编码对抗原B有特异性的另一种CAR(例如也在肿瘤细胞或在肿瘤微环境中的其它细胞上表达)。转基因3可以是例如第三CAR;该第三CAR可识别例如也在肿瘤细胞或在肿瘤微环境中的其它细胞上的抗原C。该实例呈利用经相同T细胞时序/顺序表达不同CAR的“组合靶向”的形式。在另一个具体实施方案中,转基因1编码对抗原A有特异性的CAR(或TCR);转基因B编码细胞因子,而转基因3编码另一种细胞因子或共刺激配体或scFv,例如识别表达抗原A的相同细胞(例如肿瘤细胞)或相同微环境中的细胞上的抗原。这是设计成通过将基因表达局限在微环境(例如肿瘤微环境)中提高T细胞效能和安全性的顺序基因活化的实例。因此,本领域技术人员可选择用于置换所需转基因以提供所需转基因的表达特征的内源T细胞启动子。

[0235] 要进一步了解,某些转基因(例如免疫刺激性转基因--在表达时提供免疫刺激性作用的那些)需要在是免疫刺激性的T细胞中表达,而其它转基因(例如免疫抑制性转基因--在表达时提供免疫抑制性作用的那些)需要在是免疫抑制性的T细胞中表达。要了解,技术人员可根据是需要刺激还是抑制免疫应答,容易地确定在T细胞中表达的合适转基因。正如将是显然的是,在优选的实施方案中,免疫刺激性转基因在免疫刺激性T细胞中表达以刺激向其给予T细胞的对象免疫应答,而免疫抑制性转基因在免疫抑制性T细胞中表达以抑制向其给予T细胞的对象免疫应答。

[0236] 组成型启动子。在一个实施方案中,治疗性转基因在T细胞基因组内的位点处整合使得转基因的表达被置于是组成型的内源启动子的控制下。组成型启动子可用来表达转基因(例如CAR或CCR)以激活免疫应答。如果控制含有PD1和/或cTLA4胞内域等的抑制性CAR(iCAR)的表达,组成型启动子还可用来抑制免疫应答。

[0237] 在一个实施方案中,组成型启动子是TCR启动子,即T细胞受体复合物(TCR)的蛋白质的启动子(参见实施例)。在一个具体实施方案中,内源启动子是编码T细胞受体 $\alpha$ 链、T细胞受体 $\beta$ 链、CD3 $\gamma$ 链、CD3 $\delta$ 链、CD3 $\epsilon$ 链或CD3 $\zeta$ 链的基因的启动子。

[0238] 在另一个实施方案中,组成型启动子可以是但不限于以下启动子:例如CD4启动子、CD8a启动子、CD8b启动子、TCRa启动子、TCRb启动子、CD3d启动子、CD3g启动子、CD3e启动子和CD3z启动子等(另见表1,标示为组成型的启动子)。

[0239] 表1. 示例性组成型和诱导型启动子和相应的诱导物。

[0240]

T 细胞亚群	启动子	诱导物	免疫反应	参考文献
CD4	CD4	组成型	活化/抑制	
CD8	CD8a	组成型	活化/抑制	
	CD8b	组成型	活化/抑制	
CD3	TCRa	组成型	活化/抑制	
	TCRb	组成型	活化/抑制	
	CD3d	组成型	活化/抑制	
	CD3g	组成型	活化/抑制	
	CD3e	组成型	活化/抑制	
	CD3z	组成型		
CD3	肌动蛋白	NFAT/AP1/NFkb 激活的(Ca2+依赖型- CAR/TCR + CD28)		
	CD25	NFAT/AP1/NFkb 激活的(Ca2+依赖型- CAR/TCR + CD28)		
	IL2	NFAT/AP1/NFkb 激活的(Ca2+依赖型- CAR/TCR + CD28)		1
	CD69	NFAT/AP1/NFkb 激活的(Ca2+依赖型- CAR/TCR + CD28)		2
	GzmB	NFAT/AP1/NFkb 激活的(Ca2+依赖型- CAR/TCR + CD28)		
Th1	T-bet	IFNg-IFNg-R - (STAT1) + TCR 活化(NFAT, AP-1, NFkb)		3
	IFNg	T-bet + IL2 (STAT5)		
	TIM3	T-bet		4
Th2	IL4	IL4-IL4R (STAT6) + TCR 活化(NFAT, AP-1, NFkb) + Th2 定型(GATA-3, c-MAF)		5
	GATA3	IL4-IL4R (STAT6)		
	IL5	Th2 定型(GATA-3, c-MAF) + NFAT1		
	IL13	Th2 定型(GATA-3, c-MAF) + NFAT1		
	IL10	NFAT + IRF4		6
		IL27 (STAT 1/3) - IL6 (STAT3)		7
Th17	IL17A	IL6-IL6R (STAT3 - ROR) + IL23-IL23R + TGFB-TGFB-R		
	IL6	IL6-IL6R (STAT3 - ROR) - TCR 活		8



[0241]		化(NFAT, AP-1, NFkb)		
	IL21	IL6-IL6R (STAT3 - ROR) - TCR 活化 (NFAT , AP-1 , NFkb) - IL21-IL21R		9
	IL23R	IL21-IL21R - IL23-IL23R - TGFB-TGFBR		10
	iTreg	TGFB-TGFBR (SMAD) , IL2/15 (STAT5)+低亲和力抗原 TCR 活化 (NFAT 但无 AP1)		11
	CTLA4	NFAT + FoxP3		12
	CD25	NFAT + FoxP3		
	PD1	NFAT/API/NFkb 激活的(Ca <sup>2+</sup> 依赖型- CAR/TCR + CD28)		13

[0242] 1.Jain,J.,C.Loh,and A.Rao.1995.Transcriptional regulation of the IL-2 gene.Curr.Opin.Immunol.7:333-342.+Kim HP,Leonard WJ.The basis for TCR-mediated regulation of the IL-2 receptor alpha chain gene:role of widely separated regulatory elements.EMBO J 2002;21:3051-3059.

[0243] 2.Ziegler SF,Ramsdell F,Alderson MR(1994)The activation antigen CD69.Stem Cells 12:456-465.

[0244] 3.Afkarian M,Sedy JR,Yang J,et al.T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+T cells.Nat Immunol 2002;3:549-557

[0245] 4.Anderson AC1, Lord GM, Dardalhon V, Lee DH, Sabatos-Peyton CA, Glimcher LH, Kuchroo VK..2010.Th1 transcription factor T-bet regulates the expression of Tim-3.Eur J Immunol.2010 Mar;40(3):859-66.doi:10.1002/eji.200939842.

[0246] 5.Chuvpilo S,Schomberg C, Gerwig R,et al.Multiple closely-linked NFAT/octamer and HMG I(Y) binding sites are part of the interleukin-4 promoter.Nucleic Acids Res 1993;21:5694-5704.

[0247] 6.Lee CG,Kang KH,So JS,et al.A distal cis-regulatory element,CNS-9, controls NFAT1 and IRF4-mediated IL-10 gene activation in T helper cells.Mol Immunol 2009;46:613-621

[0248] 7.Iyer SS,Cheng G.2012.Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease-Crit Rev Immunol.2012;32(1):23-63.

[0249] 8.Macian F.NFAT proteins:key regulators of T-cell development and function.Nat Rev Immunol 2005;5:472-484.

[0250] 9.Mehta DS,Wurster AL,Weinmann AS,Grusby MJ.NFATc2 and T-bet contribute to T-helper-cell-subset-specific regulation of IL-21 expression.Proc Natl Acad Sci U S A 2005

[0251] 10.Zhou L,Lopes JE,Chong MM,et al.TGFβinduced Foxp3 inhibits Th17 cell differentiation by antagonizing RORγ function.Nature 2008;453:236-240.

[0252] 11.Fantini MC,Becker C,Monteleone G,Pallone F,Galle PR,Neurath MF.Cutting edge:TGFbeta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25-T cells through Foxp3induction and down-regulationof Smad7.J Immunol 2004;172:5149-5153.

[0253] 12.Wu Y,Borde M,Heissmeyer V,et al.Foxp3controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT.Cell 2006;126:375-387.

[0254] 13.Oestreich KJ,Yoon H,Ahmed R,Boss JM.2008.NFATc1Regulates PD-1Expression upon T Cell Activation1.J Immunol.;181(7):4832-9.

[0255] T细胞亚群特异性启动子。在一个实施方案中,治疗性转基因在T细胞基因组内的位点处整合使得将转基因的表达置于在T细胞亚群中是有活性的内源启动子的控制下。要了解,在T细胞亚群中是有活性的这类启动子在其它T细胞中是无活性的或有低的活性。在T细胞亚群有活性的示例性启动子包括但不限于启动子例如CD4启动子、CD8a启动子、CD8b启动子、TCRa启动子、TCRb启动子、CD3d启动子、CD3g启动子、CD3e启动子、CD3z启动子、肌动蛋白启动子、CD25启动子、IL2启动子、CD69启动子、GzmB启动子、T-bet启动子、IFN $\gamma$ 启动子、TIM3启动子、IL4启动子、GATA3启动子、IL5启动子、IL13启动子、IL10启动子、IL17A启动子、IL6启动子、IL21启动子、IL23R启动子、FoxP3启动子、CTLA4启动子、CD25启动子、PD1启动子、CD45RO启动子、CCR7启动子、CD28启动子、CD95启动子、CD28启动子、CD27启动子、CD127启动子、PD-1启动子、CD122启动子、CD132启动子、KLRG-1启动子、HLA-DR启动子、CD38启动子、CD69启动子、Ki-67启动子、CD11a启动子、CD58启动子、CD99启动子、CD62L启动子、CD103启动子、CCR4启动子、CCR5启动子、CCR6启动子、CCR9启动子、CCR10启动子、CXCR3启动子、CXCR4启动子、CLA启动子、粒酶A启动子、粒酶B启动子、穿孔蛋白启动子、CD57启动子、CD161启动子、IL-18Ra启动子、c-Kit启动子和CD130启动子(参见表1和2)。

[0256] 在表2中,将表达水平与不同的T细胞分化亚群中的幼稚T细胞的相比,如Mahnke et al.,Eur.J.Immunol.43(11):2797-809.doi:10.1002/eji.201343751(2013)所报道的。在通过TCR或CAR活化之后,T细胞进行分化,特定基因被激活或抑制。诱导物是通过TCR或CAR的初始活化,但信号转导也继续将影响T细胞分化的共刺激(另见Mahnke et al.,Eur.J.Immunol.43(11):2797-809.doi:10.1002/eji.201343751(2013))。

[0257] 表2. 对T细胞亚群有特异性的示例性启动子(参见Mahnke et al.,Eur.J.Immunol.43(11):2797-809.doi:10.1002/eji.201343751(2013))。

[0258]			幼稚	干细胞记忆	中央记忆	过渡记忆	效应记忆	时间效应
	CD45RO		-	-	+	+	+	-
	CCR7		+	+	+	-	-	-

[0259]

CD28		+	+	+	+	-	-
CD95		-	+	+	+	+	+
CD28		+	++	++	++	-	-
CD27		++	+	+	+	-/+	-
CD127		++	+++	+++	++	-/+	-
PD-1		-	-/+	+	++	+	+
CD122		-	+	++	+++	+++	+++
CD132		+	+	+	+	+	+
KLRG-1		-	ND	-/+	+	++	+++
HLA-DR		-	-	-/+	-/+	+	-
CD38		+	-/+	-	-	-	-
CD69		-	-	-	-	-	-
Ki-67		-	-	-/+	-/+	-/+	-
CD11a		+	++	++	+++	+++	+++
CD58		-	+	++	+++	+++	+++
CD99		-/+	+	++	++	++	++
CD62L		+	+	+	-	-	-
CD103		-	-	-	-	+	-
CCR4		-/+	+	++	+++	+++	-/+
CCR5		-	-	+	++	+++	++
CCR6		-	-	++	+++	+++	-
CCR9	CD4	-	ND	+	-	-	-
	CD8	-	ND	+	++	++	-
CCR10		-	-	+	ND	++	-
CXCR3	CD4	-	-/+	+	++	+++	+++
	CD8	++	+++	+++	++	+	+
CXCR4		+	++	+++	+++	++	++
CLA		-	ND	+	ND	++	ND
粒酶 A	CD4	-	-	-	-	-/+	+
	CD8	-	-	-/+	++	+++	+++
粒酶 B	CD4	-	-	-	-	-/+	-/+
	CD8	-	-	-	+	++	+++
穿孔蛋白	CD4	-	-	-	-	-/+	-/+
	CD8	-	-	-/+	+	++	+++
CD57		-	-	-	-/+	++	+++
CD161		-	-	-/+	+	+++	+++
IL-18Ra		-	-/+	+	++	+++	+++
c-Kit		-	-	-	ND	+++	ND
CD130		++	+	-/+	-	-	-

[0260] 一般来说,通常不是针对单一启动子的单一诱导物,而是导致启动子活化的信号途径占用和活化/抑制环。这些信号转导途径被多种诱导物引发,导致T细胞向亚群或表型的定型。然而,某些基因表达模式对亚群和表型极有特异性;且其启动子可被靶定,例如Th1中的T-bet和INF  $\gamma$ ; Th2中的GATA3、IL4和IL10; Th17中的IL6; Treg中的FoxP3。因此,可针对转基因的整合选择内源启动子以提供转基因在特定T细胞亚群中的表达。

[0261] 诱导型启动子。在一个实施方案中,治疗性转基因在T细胞基因组内的位点处整合使得转基因的表达被置于在是诱导型的内源启动子的控制下。诱导型启动子是对将信号传送到核、导致诱导型启动子活化的诱导物起反应的启动子(参见例如表1)。一般来说,诱导物是由T细胞表达的分子的结合配偶体。例如,在受体的情况下,结合配偶体可以是其关联配偶体,或在CAR、CCR或TCR的情况下,结合配偶体可以是靶抗原。

[0262] 在一个实施方案中,内源诱导型启动子被T细胞的活化诱导。在一个实施方案中,内源诱导型启动子例如在与其相应抗原相互作用时,被由T细胞表达的嵌合抗原受体(CAR)或嵌合共刺激受体(CCR)与其各自的结合配偶体结合诱导。在下面描述治疗性转基因一节中提供CAR和CCR的更详细的描述。简单地说,CAR和CCR两者含有胞内信号转导结构域。在CAR的情况下,胞内信号转导结构域激活T细胞,且任选含有共刺激结构域(在第二和第三代CAR的情况下)(参见Sadelain et al.,*Cancer Discov.*3(4):388-398(2013))。在CCR的情况下,它含有共刺激信号但没有T细胞活化信号(Sadelain et al.,同上,2013)。相应抗原与CAR或CCR的结合导致T细胞信号转导结构域和/或共刺激结构域的活化。这些信号转导结构域的活化导致信号传送到核和T细胞中某些内源启动子的活化。CAR或CCR的胞内信号转导结构域包括但不限于CD28、4-1BB、CD27、ICOS、CD3 $\zeta$ 等的胞内结构域,以及本文公开的其它胞内信号转导结构域。信号转导还可随这些结构域的突变(例如突变ITAM)、截短或融合的形式发生。

[0263] 在另一个实施方案中,内源诱导型启动子被由T细胞表达的T细胞受体(TCR)、CD28、CD27、4-1BB等与其各自的结合配偶体的结合诱导。这些分子含有胞内信号转导结构域。在活化时,信号转导结构域导致信号传送到核和T细胞中某些内源启动子的活化。在另一个实施方案中,内源诱导型启动子被iCAR(具有抑制性胞内域的CAR例如PD1、CTLA4)或截短CAR(无胞内域)的结合诱导。在一个实施方案中,iCAR在靶标遇到CTLA4或PD1胞内结构域的信号转导时起T细胞活化的“中断”的作用。因此被PD1或CTLA4调节的启动子被可用于在iCAR与抗原相遇时表达转基因。转基因可以是例如免疫抑制性分子以进一步控制T细胞活化。

[0264] 我们认为截短CAR可允许T细胞寻址于其靶标在其中表达的具体位置。我们还认为,CAR T细胞和靶细胞之间建立的接触可最终调节启动子,因此可针对转基因表达而被靶定。

[0265] 在一个具体实施方案中,被CAR、CCR或TCR诱导的启动子选自以下的核因子:活化T细胞(NFAT)启动子、PD-1启动子、TIM-3启动子、CTLA4启动子、LAG3启动子、TRAIL启动子、BTLA启动子、CD25启动子、CD69启动子、FasL启动子、TIGIT启动子和2B4启动子。在一个具体实施方案中,CAR和TCR均可调节位于CD3ITAM磷酸化信号途径中的启动子并被Ca<sup>2+</sup>-依赖型转录因子(例如NFAT、NF $\kappa$ B、AP1或CREB调节的基因例如IL2)调节。这类启动子导致在从途径发出信号时表达增加。对于CAR和CCR,在抗原相遇时分别取决于CAR和CCR的结构域被调节的基因包括,例如CD28共刺激结构域诱导被PI3K途径激活的启动子,而41BB共刺激结构域活化诱导被TRAF途径激活的启动子。在响应例如TCR/CD28(以及由CD28和CD3 $\zeta$ 组成的CAR)活化时启动子的适时调节,可用来调节转基因表达的时机(参见图17;Best et al.,*Nat. Immunol.*14:404-413(2013))。例如,在CD8<sup>+</sup>T细胞的活化和记忆形成时,聚簇1(12-24小时)中的启动子包括例如CTLA4启动子、IFN $\gamma$ 启动子、Gzmb启动子、IL2ra启动子、IL2启动子等;聚簇2(12-48小时)中的启动子包括例如CD69启动子和Pkm2启动子等;聚簇3(24小时-几日)中的启动子包括例如Id2启动子、KLRg1启动子、Cxcr3启动子、Cxcr3r1启动子、Itgam启动子等(有关其它示例性启动子另见图17和Best et al.,同上,2013)。示例性诱导型启动子是4-1BB启动子。另一个示例性诱导型启动子是参与对缺氧的代谢反应的HIF1 $\alpha$ 。

[0266] 在另一个实施方案中,内源诱导型启动子受配体与T细胞上表达的抑制性受体的

结合诱导。示例性抑制性受体包括但不限于受体程序性死亡1 (PD-1)、细胞毒性T淋巴细胞抗原-4 (CTLA-4)、B-和T-淋巴细胞弱活化子 (BTLA)、T细胞免疫球蛋白黏蛋白-3 (TIM-3)、淋巴细胞活化蛋白3 (LAG-3)、肿瘤坏死因子 (TNF) 相关细胞凋亡诱导性配体 (TRAIL、受体1和2)、Fas、具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体 (TIGIT) 和2B4 (CD244)。这些抑制性受体的相应配体包括例如PD-L1 (对于PD-1); PD-L2 (对于PD-1); CD80, CD86 (对于CTLA-4); HVEM (对于BTLA); Galectin-9, HMGB1 (对于TIM-3); MHC II (对于LAG-3); TRAIL (对于TRAIL受体1和TRAIL受体2); Fas配体 (FasL) (对于Fas) 等 (参见Chen et al., Nat.Rev.Immunol.13 (4): 227-242 (2013); Tollefson et al., J.Virol.75:8875-8887 (2001); Waring et al., Immunol.Cell Biol.77:312-317 (1999))。

[0267] 在一个具体实施方案中, 被配体与抑制性受体的结合诱导的启动子选自CPT1a启动子和ATGL启动子。

[0268] 在另一个实施方案中, 内源诱导型启动子被细胞因子与由T细胞表达的细胞因子受体的结合诱导。在一个实施方案中, 细胞因子是选自白介素2 (IL2)、白介素7 (IL7)、白介素15 (IL15) 和白介素21 (IL21) 的免疫刺激性细胞因子。在另一个实施方案中, 细胞因子是免疫抑制性细胞因子, 例如白介素10 (IL10)、转化生长因子- $\beta$  (TGF $\beta$ ); IL4、IL9或胸腺基质淋巴细胞生成素 (TSLP)。

[0269] 在一个具体实施方案中, 启动子被选自T-bet启动子、Eomes启动子、GATA3启动子和CD45RA启动子的细胞因子诱导。

[0270] 在另一个实施方案中, 内源诱导型启动子被细胞与核酸的接触诱导。在一个具体实施方案中, 核酸选自病毒DNA、病毒RNA和胞内微小RNA。被细胞与核酸的接触诱导的示例性启动子包括但不限于I型干扰素 (IFNs) ( $\alpha$ 和 $\beta$ )、IRF3和IRF7转录因子、NF $\kappa$ B和AP-1转录因子、促炎细胞因子 (TNF- $\alpha$ 、IL1、IL6) 的启动子等。

[0271] 在另一个实施方案中, 内源诱导型启动子被代谢物诱导。在一个具体实施方案中, 代谢物选自丙酮酸、谷氨酰胺、 $\beta$ -羟基丁酸、乳酸和丝氨酸。这些代谢物在T细胞活化期间产生或摄取, 其在T细胞中转化成代谢变化。被代谢物诱导的示例性启动子为以下的那些: c-Myc、HIF-1 $\alpha$ 、ERR $\alpha$ 、CD98、SLC1A5、Psat1、Phgdh、psph、Mthfd2、Mthfd1、Mat2a、Mtrr、Mtr、Shmt1、Shmt2 (参见Wang et al., Immunity 35:871-882 (2011); Chang et al., Nat.Immunol.17:364-368 (2016); Ma et al., Cell Metab.25:345-357 (2017))。

[0272] 在另一个实施方案中, 内源诱导型启动子被代谢变化诱导。这是指细胞的代谢状态。例如, 当幼稚T细胞依赖氧化磷酸化产生能量时, 以及当它们被激活且分化成效应T细胞时, 它们转换成糖酵解以产生能量。缺氧和低pH也诱导代谢变化 (Chang et al., Nat.Immunol 17:364-368 (2016); McNamee et al., Immunol.Res.55:58-70 (2013))。

[0273] 在一个具体实施方案中, 被代谢变化诱导的启动子是PKM2启动子。PKM2启动子与PKM1的相同。当细胞多氧化磷酸化转换成糖酵解时, PKM2通过可变剪接产生。

[0274] 在另一个实施方案中, 内源诱导型启动子被离子 (例如特定的离子浓度) 诱导。在一个实施方案中, 离子是钾或钙。被离子诱导的示例性启动子包括但不限于IL2、TNF $\alpha$ 和IFN  $\gamma$  的启动子, 其以NFAT-依赖型方式激活。NFAT被胞内钙水平提高激活。

[0275] 7.5治疗性转基因

[0276] 本发明涉及通过使转基因在T细胞基因组内的位点处整合使得转基因的表达在T

细胞内源启动子的控制下在T细胞中表达治疗性转基因。治疗性转基因是编码治疗性蛋白质的核苷酸(例如DNA或其修饰形式)序列或治疗性核酸。治疗性蛋白质或治疗性核酸当由T细胞表达时用于治疗人或兽医疾病或病症。治疗性核酸优选为治疗性RNA。治疗性蛋白质可以是肽或多肽。

[0277] 本文所述实施方案的一个方面,治疗性转基因不编码白介素4(IL4)的膜结合形式。

[0278] 治疗性转基因包括但不限于编码CAR、嵌合共刺激受体(CCR)、TRC、细胞因子、显性负微环境调节剂、抗体、生物传感器、嵌合受体配体(CRL)、嵌合免疫受体配体(CIRL)、可溶性受体、酶、核酶、遗传回路、报道分子、外遗传调节剂、转录激活物或阻遏物、非编码RNA的那些等。

[0279] 要了解,转基因可编码例如cDNA、基因、miRNA或lncRNA等。另外,转基因可以是多顺反子信息,即阵列化cDNA或阵列化miRNA。一个示例性多顺反子转基因是TCR链。多顺反子信息可被工程改造以在T细胞表达在相同内源启动子控制下的多个转基因。因此,通过在3个所选的基因座中敲出3个双顺反子转基因,可在经改造的T细胞中表达6种基因产物。因此,多个转基因可在T细胞中表达(按所需1、2、3、4、5、6等等,按需要),每个在各自的内源启动子的控制下,或一些转基因(即多顺反子转基因)在同一内源启动子的控制下。可将多个转基因独立地置于组成型或诱导型启动子的控制下。因此,组成型和/或诱导型启动子的组合可用于T细胞中以在相同细胞中表达多个转基因。

[0280] 在一个具体实施方案中,转基因是多顺反子的,例如双顺反子的。在一个具体实施方案中,转基因是多顺反子的,编码不止一种治疗性蛋白质或治疗性RNA,其中两者的表达在T细胞的相同内源启动子的控制下。在一个具体实施方案中,转基因是双顺反子的,编码两种治疗性蛋白质(例如scFv),其中scFv的表达均在T细胞的相同内源启动子的控制下。

[0281] 在一个实施方案中,治疗性转基因编码TCR。在编码不止一种多肽链的转基因的情况下,转基因可从不只一种多核苷酸表达,即,两种编码核酸(例如cDNA)在T细胞中表达。因此,在需要表达多亚基蛋白质时,不同的多肽亚基可从不同的转基因表达,即,两个编码核苷酸序列(例如cDNA序列)在T细胞中从被不同内源T细胞启动子调节的不同转基因共表达。在一个实施方案中,表达TCR的a和b链。

[0282] 嵌合抗原受体(CAR)。嵌合抗原受体(CAR)是由本发明的治疗性转基因编码的示例性产物。由本发明的细胞重组表达的CAR具有与抗原结合的抗原结合结构域。抗原与对象中存在的疾病或病症有关或向其给予T细胞的对象物的预防所需要的。

[0283] 在具体的实施方案中,CAR可以是“第一代”、“第二代”或“第三代”CAR(参见例如 Sadelain et al.,Cancer Discov.3(4):388-398(2013);Jensen et al.,Immunol.Rev.257:127-133(2014);Sharpe et al.,Dis.Model Mech.8(4):337-350(2015);Brentjens et al.,Clin.Cancer Res.13:5426-5435(2007);Gade et al.,Cancer Res.65:9080-9088(2005);Maher et al.,Nat.Biotechnol.20:70-75(2002);Kershaw et al.,J.Immunol.173:2143-2150(2004);Sadelain et al.,Curr.Opin.Immunol.(2009);Hollyman et al.,J.Immunother.32:169-180(2009))。

[0284] “第一代”CAR通常由与跨膜结构域融合的胞外抗原结合结构域(例如单链可变片段(scFv))组成,所述跨膜结构域与T细胞受体链的胞质/胞内域融合。“第一代”CAR通常具

有来自CD3 $\zeta$ -链的胞内域,其是来自内源T细胞受体(TCR)的信号的主要递质(参见图1A中的示例性第一代CAR)。独立于HLA介导的抗原呈递,“第一代”CAR可提供新生抗原识别并通过其在单一融合分子中的CD3 $\zeta$ 链信号转导结构域CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞两者活化。用于本发明的“第二代”CAR包含与能够激活T细胞的胞内信号转导结构域融合的抗原结合结构域和设计成提高T细胞效能和持久性的共刺激结构域(Sadelain et al.,Cancer Discov.3:388-398(2013))。CAR设计因此可将抗原识别与信号转导联合,为因两种单独的复合物(TCR异二聚体和CD3复合物)而是生理源性的两种功能。“第二代”CAR包括在CAR的胞质尾区中的来自不同共刺激分子(例如CD28、4-1BB、ICOS、OX40等)的胞内域以向细胞提供额外的信号(参见图1A中的示例性第二代CAR)。“第二代”CAR提供例如通过CD28或4-1BB结构域的共刺激和例如通过CD3 $\zeta$ 信号转导结构域的活化两者。临床前研究表明“第二代”CAR可提高T细胞的抗肿瘤活性。例如,在靶向患有慢性淋巴细胞白血病(CLL)和急性淋巴细胞白血病(ALL)的患者中的CD19分子的临床试验中显示了“第二代”CAR修饰的T细胞的稳健功效(Davila et al.,Oncoimmunol.1(9):1577-1583(2012))。“第三代”CAR提供例如通过包含CD28和4-1BB结构域两者的多重共刺激和例如通过包含CD3 $\zeta$ 活化结构域的活化。

[0285] 在本文公开的实施方案中,CAR通常包含如上所述的胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内域,其中胞外抗原结合结构域与目标抗原结合,例如癌抗原或感染性病原体的抗原或自身免疫病症的抗原或移植组织的抗原。在一个具体的非限制性实施方案中,胞外抗原结合结构域是scFv。

[0286] 如本文公开的,本发明的方法包括给予经工程改造表达CAR的细胞。CAR的胞外抗原结合结构域通常来源于单克隆抗体(mAb)或受体或其配体。

[0287] CAR的设计是本领域众所周知的(参见例如Sadelain et al.,Cancer Discov.3(4):388-398(2013);Jensen et al.,Immunol.Rev.257:127-133(2014);Sharpe et al.,Dis.Model Mech.8(4):337-350(2015)的综述和其中引用的参考文献)。导向所需抗原的CAR可采用用于设计CAR的众所周知的方法包括本文所述方法产生。可通过使靶抗原结合活性(例如癌抗原结合活性,例如导向抗原的scFv抗体)与免疫细胞信号转导结构域(例如T细胞受体胞质/胞内域)融合容易地设计CAR,不论第一、第二还是第三代CAR。如上所述,CAR通常具有与跨膜结构域融合的具有抗原结合活性(例如scFv,如至少一部分胞外结构域)的细胞表面受体的结构,所述跨膜结构域在T细胞中与具有细胞信号转导活性的胞内域融合。CAR可包括本文所述的共刺激分子。本领域技术人员可容易地选择如本文描述和本领域已知的合适的跨膜结构域和胞内结构域以在T细胞中提供所需的信号转导能力。

[0288] 用于本发明的CAR包含包括与抗原结合的抗原结合结构域的胞外结构域。在一个具体实施方案中,抗原结合结构域与靶癌细胞或组织上的抗原结合。这类抗原结合结构域一般来源于抗体。在一个实施方案中,抗原结合结构域可以是scFv或Fab,或抗体的任何合适的抗原结合片段(参见Sadelain et al.,Cancer Discov.3:38-398(2013))。许多抗体或来源于与抗原(例如癌抗原)结合的抗体的抗原结合结构域是本领域已知的。或者,这类抗体或抗原结合结构域可通过常规方法产生。产生抗体的方法是本领域众所周知的,包括产生单克隆抗体或筛选文库以获得抗原结合多肽的方法,包括筛选人Fab的文库(Winter and Harris,Immunol.Today 14:243-246(1993);Ward et al.,Nature 341:544-546(1989);Harlow and Lane,Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory

Press(1988);Hilyard et al.,Protein Engineering:A practical approach(IRL Press 1992);Borrabeck,Antibody Engineering,2nd ed.(Oxford University Press 1995);Huse et al.,Science 246:1275-1281(1989))。对于CAR,来源于抗体的抗原结合结构域按需要可为人、人源化、嵌合、CDR移植的等。例如,如果小鼠单克隆抗体是产生CAR的抗原结合结构域的源抗体,则可通过将小鼠抗体的CDR移植到人构架中使这类抗体人源化(参见Borrabeck,同上,1995),这对于将CAR给予人类对象是有益的。在一个优选的实施方案中,抗原结合结构域是scFv。scFv的产生是本领域众所周知的(参见例如Huston,et al.,Proc.Nat.Acad.Sci.USA 85:5879-5883(1988);Ahmad et al.,Clin.Dev.Immunol.2012:ID980250(2012);美国专利号5,091,513、5,132,405和4,956,778;以及美国专利申请号20050196754和20050196754))。

[0289] 至于获取抗原结合活性,如本文公开的,采用产生和筛选与所需抗原结合的抗体,包括在CAR中是特别有用的与抗原结合的scFv的产生的任何众所周知的方法,本领域技术人员可容易地获得合适的抗原结合活性,例如抗体。另外,许多抗原抗体,特别是单克隆抗体,例如癌抗原或其它抗原是市购可获得的,并也用作抗原结合活性(例如scFv)以产生CAR的来源。

[0290] 或者对于来源于抗体的抗原结合结构域,CAR胞外结构域可包含配体或受体的胞外配体结合结构域(参见Sadelain et al.,Cancer Discov.3:388-398(2013);Sharpe et al.,Dis.Model Mech.8:337-350(2015))。在这种情况下,配体或受体的胞外配体结合结构域向CAR提供将表达CAR的细胞靶向相应受体或配体的能力。在一个具体实施方案中,选择配体或胞外配体结合结构域使得表达CAR的细胞靶向癌细胞或肿瘤(参见Sadelain et al.,Cancer Discov.3:388-398(2013);Sharpe et al.,Dis.Model Mech.8:337-350(2015)和其中引用的参考文献)。在本发明的一个实施方案中,选择配体或胞外配体结合结构域与是相应的受体或配体的抗原结合(参见Sadelain et al,Cancer Discov.3:388-398(2013))。

[0291] 对于导向靶抗原的CAR,选择CAR的抗原结合结构域与靶抗原(在靶细胞上表达的抗原)结合。这类靶抗原可以只在靶细胞上表达,或相对于非靶细胞或组织靶抗原在靶细胞上过量表达。选择被CAR结合的靶抗原以提供超过非靶细胞或组织地靶向表达CAR的细胞。在一个优选的实施方案中,对于导向癌抗原的CAR,选择CAR的抗原结合结构域与在癌细胞上表达的抗原结合。这类癌抗原可以只在癌细胞上表达,或相对于非癌细胞或组织癌抗原可在癌细胞中过量表达。选择被CAR结合的癌抗原以提供超过非癌细胞或组织地靶向表达CAR的细胞。在治疗癌症的本发明方法的一个实施方案中,T细胞被设计成通过在细胞中表达与本文所述患者癌症的合适癌抗原结合的CAR来治疗癌症患者。同样,当CAR用于靶向感染性疾病病原体或自身免疫病症或移植组织的抗原时,抗原可以只在靶标上或在靶位点上表达,或相对于非靶组织或非靶位点过量表达。

[0292] 癌抗原可以是肿瘤抗原。任何合适的癌抗原可根据接受治疗的对象(癌症患者)所显示的癌症类型选择。要了解,使所选的癌抗原以使癌抗原容易被CAR结合的方式表达。一般而言,被表达CAR的细胞靶定的癌抗原在癌细胞的细胞表面表达。然而,要了解,容易与CAR结合的任何癌抗原适于使CAR表达细胞靶向癌细胞。下表3提供示例性癌抗原和示例性癌症。



[0293] 表3. 靶定的癌抗原和相应的癌症靶标。

[0294]	<b>靶定的癌抗原</b>	<b>所研究的肿瘤</b>	<b>参考文献</b>
	<b>B7-H3</b> <i>CD276</i>	肉瘤和成神经细胞瘤	(1)
	<b>B7-H6</b> <i>Nkp30</i>	卵巢癌和几种实体癌	(2-4)
	<b>CAIX</b> <i>碳酸酐酶 IX</i>	肾细胞癌	(5)
	<b>CEA</b> <i>癌胚抗原</i>	结肠癌的肝转移、结肠癌、胰腺癌、胃癌和肺癌	(6-20)

[0295]

<b>CSPG4</b> 硫酸软骨素蛋白聚糖-4	黑素瘤、间皮瘤、成胶质细胞瘤、骨肉瘤、 乳腺癌、头颈癌	(21-24)
<b>DNAM-1</b> DNAX 辅助分子	黑素瘤	(25)
<b>EpHA2</b> 肝配蛋白 A 型受体 2	成胶质细胞瘤和肺癌症	(26, 27)
<b>EpCAM</b> 上皮细胞粘附分子	前列腺癌	(28, 29)
<b>ERBB 家族</b>	头颈癌和乳腺癌	(30, 31)
<b>ERBB2</b>	前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌和胰腺癌、成 胶质细胞瘤、成神经管细胞瘤、骨肉瘤、 尤因肉瘤、神经外胚层瘤、促结缔组织增 生性小圆细胞肿瘤和纤维肉瘤	(32-48)
<b>EGFRvIII</b> 表皮生长因子受体 vIII	神经胶质瘤/成胶质细胞瘤	(49-56)
<b>FAP</b> 成纤维细胞相关蛋白	肺癌中的肿瘤相关成纤维细胞、间皮瘤、 乳腺癌和胰腺癌	(27, 57-59)
<b>FR<math>\alpha</math> 和 <math>\beta</math></b> 叶酸受体	卵巢癌	(60-64)
<b>GD2</b> 二唾液酸神经节苷脂	成神经细胞瘤、尤因肉瘤、黑素瘤	(65-71)
<b>GD3</b>	黑素瘤和其它神经外胚层瘤	(72, 73)
<b>Gp100/HLA-A2</b>	黑素瘤	(74, 75)
<b>GPC3</b> 磷脂酰肌醇聚糖 3	肝细胞癌	(76)
<b>HERK-V</b>	黑素瘤	(77)
<b>MAGE-1/HLA-A1</b> 黑素瘤抗原 E	黑素瘤	(78, 79)
<b>IL-11R<math>\alpha</math></b>	骨肉瘤	(80)
<b>IL-13R<math>\alpha</math>2</b>	神经胶质瘤/成胶质细胞瘤 成神经管细胞瘤	(81-87)
<b>Lewis-Y</b>	卵巢	(88) (89, 90)
<b>LMP1</b> 潜在膜蛋白 1	鼻咽癌	(91)
<b>L1-CAM</b> CD271 L1 细胞粘附分子	成胶质细胞瘤、成神经细胞瘤、卵巢癌、 肺癌和肾癌	(92, 93)
<b>Muc-1</b> 黏蛋白-1	前列腺癌和乳腺癌	(43, 94-96)
<b>Muc-16</b> 黏蛋白-16	卵巢癌	(97, 98)
<b>MSLN</b> 间皮素	卵巢、间皮瘤、肺癌	(99-107)

[0296]	<b>N-cam</b> <b>CD56 神经细胞-粘附分子 1</b>	成神经细胞瘤	(108)
	<b>NKG2DL</b> <i>NKG2D 配体</i>	卵巢	(109, 110)
	<b>PSCA</b> <i>前列腺干细胞抗原</i>	前列腺癌	(111-113)
	<b>PSMA</b> <i>前列腺特异性膜抗原</i>	前列腺	(114-117)
	<b>ROR1</b> <i>受体酪氨酸激酶样孤儿受体</i>	上皮实体瘤	(117, 118)
	<b>TAG72</b> <i>肿瘤相关糖蛋白 72</i>	胃肠癌、结肠癌和乳腺癌	(119-122)
	<b>TRAIL R</b> <i>Trail 受体</i>	不同类型的癌症	(123)
	<b>VEGFR2</b> <i>血管内皮生长因子受体-2</i>	肿瘤相关血管系统	(124-127)
[0297]	<b>CD166</b> <b>CCR4</b> <b>Lewis A</b> <b>NYESO</b> <b>CD19</b>	肺癌 (Teicher, Biochemical Pharmacology, 2014); T regs (Sugiyama et al. PNAS 2014); 胰腺癌 (Tempero et al. Cancer Research, 1987); 多种癌症 (Nicholaou et al. Imm & Cell Biol 2006); 白血病 CD166 (Teicher B.A., Biochemical Pharmacology, 87(2):211-9 (2014)); CCR (Sugiyama D., Proc Natl Acad Sci U.S.A., 110(44):17945-50 (2013)); Lewis A (Tempero M.A., Cancer Res, 47(20):5501-3 (1987)); NY-ESO-1 (Nicholaou et al., Immunol Cell Biol., 84: 303-17 (2006)); CD19 (Sadelain M., J Clin Invest., 125:3392-400 (2015))	

[0297] 1.Cheung et al.,Hybrid Hybridomics,22:209-18(2003);2.Zhang et al.,J Immunol.,189:2290-9(2012);3.Wu et al.,Gene Ther.,22:675-684(2015);4.Wu et al.,J Immunol.,194:5305-11(2015);5.Lamers et al.,Mol Ther.,21:904-12(2013);6.Darcy et al.,Eur J Immunol.,28:1663-72(1998);7.Nolan et al.,Clin Cancer Res.,5:3928-41(1999);8.Darcy et al.,J Immunol.,164:3705-12(2000);9.Hombach et al.,Gene Ther.,6:300-4(1999);10.Haynes et al.,J Immunol.,166:182-7(2001);11.Haynes et al.,J Immunol.,169:5780-6(2002);12.Schirrmann et al.,Cancer Gene Ther.,9:390-8(2002);13.Arakawa et al.,Anticancer Res.2002;22:4285-9.14.Gyobu et al.,Cancer Res.,64:1490-5(2004);15.Shibaguchi et al.,Anticancer Res.,26:4067-72(2006);16.Emtage et al.,Clin Cancer Res.14:8112-22(2008);17.Chmielewski et al.,Gastroenterology,143:1095-107 e2(2012);18.Chmielewski et al.,Gene Ther.,20:177-86(2013);19.Burga et al.,Cancer Immunol Immunother.,64:817-29(2015);20.Katz et al.Clin Cancer Res.,21:3149-59(2015);21.Beard et al.,J Immunother Cancer,2:25(2014);22.Burns et al.,Cancer Res.,70:3027-33

(2010);23.Geldres et al.,Clin Cancer Res.,20:962-71(2014);24.Schmidt et al.,Proc Natl Acad Sci U S A,108:2474-9(2011);25.Wu et al.,Cancer Immunol Immunother.,64:409-18(2015);26.Chow et al.,Mol Ther.,21:629-37(2013);27.Kakarla et al.,Mol Ther.,21:1611-20(2013);28.Shirasu et al.,J Biomed Biotechnol.,2012:853879(2012);29.Deng et al.,BMC Immunol.,16:1(2015);30.Davies et al.,Mol Med.,18:565-76(2012);31.Papa et al.,Methods Mol Biol.,1317:365-82(2015);32.Stancovski et al.,J Immunol.,151:6577-82(1993);33.Moritz et al.,Proc Natl Acad Sci U S A,91:4318-22(1994);34.Haynes et al.,Cancer Immunol Immunother.,47:278-86(1999);35.Pinthus et al.,Cancer Res.,63:2470-6(2003);36.Ahmed et al.,Cancer Res.,67:5957-64(2007);37.Li et al.,Cancer Gene Ther.,15:382-92(2008);38.Wang et al.,Clin Cancer Res.,15:943-50(2009);39.Ahmed et al.,Mol Ther.,17:1779-87(2009);40.Zhao et al.,J Immunol.,183:5563-74(2009);41.Ahmed et al.,Clin Cancer Res.,16:474-85(2010);42.Duong et al.,Immunotherapy,3:33-48(2011);43.Wilkie et al.,J Clin Immunol.,32:1059-70(2012);44.Lanitis et al.,PLoS One,7:e49829(2012);45.Maliar et al.,Gastroenterology,143:1375-84e1-5(2012);46.Rainusso et al.,Cancer Gene Ther.,19:212-7(2012);47.Sun et al.,Breast Cancer Res.,16:R61(2014);48.Ahmed et al.,J Clin Oncol.,33:1688-96(2015);49.Ohno et al.,Cancer Sci.,101:2518-24(2010);50.Morgan et al.,Hum Gene Ther.,23:1043-53(2012);51.Choi et al.,J Clin Neurosci.,21:189-90(2014);52.Ohno et al.,J Immunother Cancer,1:21(2013);53.Shen et al.,J Hematol Oncol.,6:33(2013);54.Sampson et al.,Clin Cancer Res.,20:972-84(2014);55.Miao et al.,PLoS One,9:e94281(2014);56.Johnson et al.,Sci Transl Med.,7:275ra22(2015);57.Petrausch et al.,BMC Cancer,12:615(2012);58.Schuberth et al.,J Transl Med.,11:187(2013);59.Wang et al.,Cancer Immunol Res.,2:154-66(2014);60.Parker et al.,Hum Gene Ther.,11:2377-87(2000);61.Kershaw et al.,Clin Cancer Res.,12:6106-15(2006);62.Song et al.,Cancer Res.,71:4617-27(2011);63.Kandalaf et al.,J Transl Med.,10:157(2012);64.Song et al.,Oncotarget,(2015);65.Krause et al.,J Exp Med.,188:619-26(1998);66.Rossig et al.,Int J Cancer,94:228-36(2001);67.Pule et al.,Nat Med.,14:1264-70(2008);68.Yvon et al.,Clin Cancer Res.,15:5852-60(2009);69.Louis et al.,Blood,118:6050-6(2011);70.Kailayangiri et al.,Br J Cancer,106:1123-33(2012);71.Singh et al.,Cancer Immunol Res.,2:1059-70(2014);72.Yun et al.,Neoplasia,2:449-59(2000);73.Lo et al.,Clin Cancer Res.,16:2769-80(2010);74.Zhang et al.,Immunol Cell Biol.,91:615-24(2013);75.Zhang et al.,Sci Rep.,4:3571(2014);76.Gao et al.,Clin Cancer Res.,20:6418-28(2014);77.Krishnamurthy et al.,Clin Cancer Res.,21:3241-51(2015);78.Willemsen et al.,Gene Ther.,8:1601-8(2001);79.Willemsen et al.,J Immunol.,174:7853-8(2005);80.Huang et al.,Cancer Res.,72:271-81(2012);81.Stastny et al.,J Pediatr Hematol Oncol.,29:669-77(2007);82.Chang et al.,Cytotherapy,9:771-84(2007);83.Lazovic et al.,

Clin Cancer Res.,14:3832-9(2008);84.Kong et al.,Clin Cancer Res.,18:5949-60 (2012);85.Hegde et al.,Mol Ther.,21:2087-101(2013);86.Krebs et al., Cytotherapy,16:1121-31(2014);87.Brown et al.,Clin Cancer Res.,(2015); 88.Westwood et al.,Proc Natl Acad Sci U S A,102:19051-6(2005);89.Westwood et al.,J Immunother.,32:292-301(2009);90.Neeson et al.,Gene Ther.,17:1105-16 (2010);91.Tang et al.,J Biomed Res.,28:468-75(2014);92.Park et al.,Mol Ther., 15:825-33(2007);93.Hong et al.,J Immunother.,37:93-104(2014);94.Wilkie et al.,J Immunol.,180:4901-9(2008);95.Bakhtiari et al.,Hybridoma(Larchmt),28: 85-92(2009);96.Sanchez et al.,Prostate Cancer Prostatic Dis.,16:123-31,S1 (2013);97.Chekmasova et al.,Discov Med.,9:62-70(2010);98.Koneru et al., Oncoimmunology,4:e994446(2015);99.Carpenito et al.,Proc Natl Acad Sci U S A, 106:3360-5(2009);100.Zhao et al.,Cancer Res.,70:9053-61(2010);101.Lanitis et al.,Mol Ther.,20:633-43(2012);102.Riese et al.,Cancer Res.,73:3566-77(2013); 103.Moon et al.,Clin Cancer Res.,20:4262-73(2014);104.Guedan et al.,Blood, 124:1070-80(2014);105.Beatty,Oncoimmunology,3:e28327(2014);106.Adusumilli et al.,Sci Transl Med.,6:261ra151(2014);107.Wang et al.,Cancer Immunol Res.,3: 815-26(2015);108.Gilham et al.,J Immunother.,25:139-51(2002);109.Barber et al.,J Immunol.,183:6939-47(2009);110.Song et al.,Hum Gene Ther.,24:295-305 (2013);111.Morgenroth et al.,Prostate,67:1121-31(2007);112.Hillerdal et al., BMC Cancer,14:30(2014);113.Abate-Daga et al.,Hum Gene Ther.,25:1003-12(2014); 114.Maher et al.,Nat Biotechnol.,20:70-5(2002);115.Ma et al.,Prostate,61:12- 25(2004);116.Gade et al.,Cancer Res.,65:9080-8(2005);117.Hudecek et al.,Clin Cancer Res.,19:3153-64(2013);118.Deniger et al.,PLoS One,10:e0128151(2015); 119.Hombach et al.,Gastroenterology,113:1163-70(1997);120.McGuinness et al., Hum Gene Ther.,10:165-73(1999);121.Patel et al.,Cancer Gene Ther.7:1127-34 (2000);122.Sharifzadeh et al.,Cancer Lett.,334:237-44(2013);123.Kobayashi et al.,Biochem Biophys Res Commun.453:798-803(2014);124.Chinnasamy et al.,Clin Cancer Res.,18:1672-83(2012);125.Kanagawa et al.,Cancer Gene Ther.,20:57-64 (2013);126.Chinnasamy et al.,Cancer Res.,73:3371-80(2013);127.Wang et al., Gene Ther.,20:970-8(2013);128.Ordonez,Am J Surg Pathol.,27:1418-28(2003); 129.Dennis et al.,Clin Cancer Res.,11:3766-72(2005);130.Alvarez et al., Nanomedicine,4:295-301(2008);131.Rizk et al.,Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.,21:482-6(2012);132.Ordonez,Mod Pathol.,16:192-7(2003);133.Frierson et al.,Hum Pathol.,34:605-9(2003);134.Tchou et al.,Breast Cancer Res Treat.,33: 799-804(2012);135.Parinyanitikul et al.,Clin Breast Cancer,13:378-84(2013); 136.Wang et al.,J Int Med Res.,40:909-16(2012);137.Li et al.,Breast Cancer Res Treat.,147:675-84(2014);138.Ordonez et al.,Hum Pathol.,45:1529-40(2014); 139.Tozbikian et al.,PLoS One,9:e114900(2014);140.Bayoglu et al.,Biomed Pharmacother.,70:190-5(2015);141.Einama et al.,Br J Cancer,107:137-42(2012);

142.Baba et al., J Surg Oncol., 105:195-9(2012); 143.Ito et al., Oncol Rep., 31: 27-33(2014); 144.Hassan et al., Am J Clin Pathol., 124:838-45(2005); 145.Yu et al., J Cancer, 1:141-9(2010); 146.Kawamata et al., Int J Oncol., 41:2109-18(2012); 147.Nomura et al., Int Surg., 98:164-9(2013); 148.Argani Pedram et al., Clin Cancer Res., 7:3862-8(2001); 149.Swierczynski et al., Hum Pathol. 35:357-66(2004); 150.Inami et al., Oncol Rep., 20:1375-80(2008); 151.Frank et al., Am J Clin Pathol., 142:313-9(2014); 152.Scales et al., Mol Cancer Ther., 13:2630-40(2014); 153.Liebig et al., Cancer Lett., 223:159-67(2005); 154.Kawamata et al., J Gastroenterol., 49:81-92(2014); 155.Miettinen et al., Am J Surg Pathol., 27:150-8(2003); 156.Ordóñez, Am J Surg Pathol., 27:1031-51(2003); 157.Ordóñez, Mod Pathol. 19:417-28(2006); 158.Kushitani et al., Pathol Int., 57:190-9(2007); 159.Pu et al., Diagn Cytopathol., 36:20-5(2008); 160.Kachala et al., Clin Cancer Res., 20:1020-8(2014); 161.Anish et al., Oncotarget, (2015); 162.Pan et al., Hum Pathol., 34:1155-62(2003); 163.Yuanbin et al., 2014 ASCO Annual Meeting, (2014); 164.Ordóñez, Hum Pathol., 35:697-710(2004); 165.Galloway et al., Histopathology, 48:767-9(2006); 166.Roe et al., Lung Cancer, 61:235-43(2008); 167.Tan et al., Hum Pathol., 41:1330-8(2010); 168.Servais et al., Clin Cancer Res., 18:2478-89(2012); 169.Drapkin et al., Hum Pathol., 35:1014-21(2004); 170.Rosen et al., Gynecol Oncol. 99:267-77(2005); 171.Hassan et al., Appl Immunohistochem Mol Morphol. 13: 243-7(2005); 172.Cao et al., Int J Gynecol Pathol., 24:67-72(2005); 173.Yen et al., Clin Cancer Res., 12:827-31(2006); 174.Dainty et al., Gynecol Oncol., 105: 563-70(2007); 175.Obulhasim et al., Eur J Gynaecol Oncol., 31:63-71(2010)。

[0298] 合适的癌抗原包括但不限于间皮素 (MSLN)、前列腺特异性膜抗原 (PSMA)、前列腺干细胞抗原 (PCSA)、碳酸酐酶 IX (CAIX)、癌胚抗原 (CEA)、CD5、CD7、CD10、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD49f、CD56、CD74、CD123、CD133、CD138、上皮糖蛋白 2 (EGP 2)、上皮糖蛋白-40 (EGP-40)、上皮细胞粘附分子 (EpCAM)、叶酸-结合蛋白质 (FBP)、胎儿乙酰胆碱受体 (AChR)、叶酸受体- $\alpha$  和  $\beta$  (FR $\alpha$  和  $\beta$ )、神经节苷脂 G2 (GD2)、神经节苷脂 G3 (GD3)、人表皮生长因子受体 2 (HER-2/ERB2)、表皮生长因子受体 vIII (EGFRvIII)、ERB3、ERB4、人端粒酶反转录酶 (hTERT)、白介素-13 受体亚基  $\alpha$ -2 (IL-13R $\alpha$ 2)、 $\kappa$ -轻链、激酶插入结构域受体 (KDR)、Lewis A (CA19.9)、Lewis Y (LeY)、L1 细胞粘附分子 (L1CAM)、黑素瘤相关抗原 1 (黑素瘤抗原家族 A1、MAGE-A1)、黏蛋白 16 (Muc-16)、黏蛋白 1 (Muc-1)、NKG2D 配体、癌症-睾丸抗原 NY-ESO-1、癌胚抗原 (h5T4)、肿瘤相关糖蛋白 72 (TAG-72)、血管内皮生长因子 R2 (VEGF-R2)、维尔姆斯瘤蛋白质 (WT-1)、1 型酪氨酸-蛋白质激酶跨膜受体 (ROR1)、B7-H3 (CD276)、B7-H6 (Nkp30)、硫酸软骨素蛋白聚糖-4 (CSPG4)、DNAX 辅助分子 (DNAM-1)、肝配蛋白 A 型受体 2 (EpHA2)、成纤维细胞相关蛋白 (FAP)、Gp100/HLA-A2、磷脂酰肌醇聚糖 3 (GPC3)、HA-1H、HERK-V、IL-11R $\alpha$ 、潜在膜蛋白 1 (LMP1)、神经细胞-粘附分子 (N-CAM/CD56) 和 Trail 受体 (TRAIL R)。要了解, 这些或其它癌抗原可被用于通过癌抗原 CAR 打靶。

[0299] 如上所述, CAR 还含有在表达 CAR 的 T 细胞中起作用的信号转导结构域。这类信号转导结构域例如可来源于 CD $\zeta$  或 Fc 受体  $\gamma$  (参见 Sadelain et al., Cancer Discov. 3:288-298

(2013)。一般来说,信号转导结构域可在转导T细胞或其前体细胞中诱导持久性、运输和/或效应功能(Sharpe et al., Dis. Model Mech. 8:337-350 (2015); Finney et al., J. Immunol. 161:2791-2797 (1998); Krause et al., J. Exp. Med. 188:619-626 (1998))。在CD $\zeta$ 或Fc受体 $\gamma$ 的情况下,信号转导结构域相当于各个多肽的胞内域或对信号转导中足够的胞内域的片段。下面更详细地描述了示例性信号转导结构域。

[0300] 本文参考GenBank编号、GI编号和/或SEQ ID NO描述了示例性多肽。要了解,本领域技术人员可参考序列来源,包括但不限于GenBank(ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)和EMBL(embl.org/),容易地鉴定同源序列。

[0301] CD3 $\zeta$ . 在一个非限制性实施方案中,CAR可包含来源于CD3 $\zeta$ 多肽的信号转导结构域,例如来源于CD3 $\zeta$ 的胞内域的信号转导结构域,其可激活或刺激T细胞。CD3 $\zeta$ 包含3个免疫-受体-酪氨酸-型-活化-基序(ITAM),并在抗原被结合后将活化信号过程传送至细胞,例如淋巴系的细胞例如T细胞。CD3 $\zeta$ 多肽可具有相当于GenBank No. NP\_932170(GI:37595565; 见下)的序列的氨基酸序列或其片段。在一个实施方案中,CD3 $\zeta$ 多肽具下文提供的CD3 $\zeta$ 多肽序列的52-164氨基酸的氨基酸序列或其对信号转导活性是足够的片段。提及CD3 $\zeta$ 内的结构域,例如信号肽,氨基酸1-21;胞外结构域,氨基酸22-30;跨膜结构域,氨基酸31-51;胞内域,氨基酸52-164,参见GenBank NP\_932170。要了解,“CD3 $\zeta$ 核酸分子”是指编码CD3 $\zeta$ 多肽的多核苷酸。

```
1 MKWKALFTAA ILQAQLPITE AQSFGLLDPK LCYLLDGILF IYGVILTALF LRVKFSRSAD
[0302] 61 APAYQQGQNG LYNELNLGRR EEYDVLDRR GRDPEMGGKP QRRKNPQEG LYNELQKDKMA
121 EAYSEIGMKG ERRRGKGHDG LYQGLSTATK DTYDALHMQA LPPR (NP_932170; SEQ ID NO:16)
```

[0303] 在某些非限制性实施方案中,CAR的胞内域可进一步包含至少一个共刺激信号转导结构域。这类共刺激信号转导结构域可提供活化提高的T细胞。共刺激信号转导结构域来源于CD28多肽、4-1BB多肽、OX40多肽、ICOS多肽、DAP10多肽、2B4多肽等。之前描述了包含胞内域(其包含含有4-1BB、ICOS或DAP-10的共刺激信号转导区)的CAR(参见U.S. 7,446,190,其通过引用并入本文,其还描述了4-1BB、ICOS和DAP-10的代表性序列)。在一些实施方案中,CAR的胞内域可包含含有2个共刺激分子例如CD28和4-1BB(参见Sadelain et al., Cancer Discov. 3(4):388-398 (2013)),或CD28和OX40,或本文公开的共刺激配体的其它组合的共刺激信号转导区。

[0304] CD28. 分化簇28(CD28)是在为T细胞活化和存活提供共刺激信号的T细胞上表达的蛋白质。CD28是CD80(B7.1)和CD86(B7.2)蛋白的受体。在一个实施方案中,CAR可包含来源于CD28的共刺激信号转导结构域。例如,如本文公开的,CAR可包括CD28的胞内/胞质结构域的至少一部分,例如起共刺激信号转导结构域作用的胞内/胞质结构域(参见图1B)。CD28多肽可具含具有相当于下文提供的GenBank No. P10747或NP\_006130(GI:5453611)的序列的氨基酸序列或其片段。如有需要,除胞内域以外的CD28序列可包括在本发明的CAR内。例如,CAR可包含CD28多肽的跨膜。在一个实施方案中,CAR可具有包含相当于CD28的氨基酸180-220的CD28的胞内域的氨基酸序列或其片段。在另一个实施方案中,CAR可具有包含相当于氨基酸153-179的CD28的跨膜结构域的氨基酸序列或其片段。提及CD28内的结构域,例如信号肽,氨基酸1-18;胞外结构域,氨基酸19-152;跨膜结构域,氨基酸153-179;胞内域,氨基酸180-220,参见GenBank NP\_006130。要了解,如有需要,比具体描述的结构域较长或较短

的CD28的序列可包括在CAR中。要了解,“CD28核酸分子”是指编码CD28多肽的多核苷酸。

[0305] 1 MLRLLLALNL FPSIQVTGNK ILVKQSPMLV AYDNAVNLSC KYSYNLFSRE FRASLHKGLD  
61 SAVEVCVVYG NYSQQLQVYS KTGFNCDGKL GNESTVFYLQ NLYVNQTDIY FCKIEVMYPP  
121 PYLDNEKSNG TIIHVGKHL CPSPLFPGPS KPFWVLVVVG GVLACYSLLV TVAFIIFWVR  
181 SKRSRLHSD YNMTPRRPG PTRKHYQPYA PPRDFAAYRS (NP\_006130; SEQ ID NO:17)

[0306] 4-1BB.4-1BB,亦称为肿瘤坏死因子受体超家族成员9,可起肿瘤坏死因子(TNF)配体的作用并具有刺激活性。在一个实施方案中,CAR可包含来源于4-1BB的共刺激信号转导结构域。4-1BB多肽可具有含有相当于GenBank No.P41273或NP\_001552(GI:5730095)的序列的氨基酸序列或其片段。在一个实施方案中,CAR可具有包含相当于氨基酸214-255的4-1BB的胞内域的共刺激结构域或其片段。在另一个实施方案中,CAR可具有相当于氨基酸187-213的4-1BB的跨膜结构域或其片段。提及4-1BB内的结构域,例如信号肽,氨基酸1-17;胞外结构域,氨基酸18to 186;跨膜结构域,氨基酸187-213;胞内域,氨基酸214-255,参见GenBank NP\_001552。要了解,如有需要,比具体描述的结构域较长或较短的4-1BB的序列可包括在CAR中。还要了解“4-1BB核酸分子”是指编码4-1BB多肽的多核苷酸。

[0307] 1 MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR  
61 TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC  
121 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE  
181 PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG  
241 CSCRFPEEEE GGCEL (NP\_001552; SEQ ID NO:18)

[0308] OX40.OX40,亦称为肿瘤坏死因子受体超家族成员4前体或CD134,是受体的TNFR超家族的成员。在一个实施方案中,CAR可包含来源于OX40的共刺激信号转导结构域。OX40多肽可具有相当于具有下面提供的GenBank No.P43489或NP\_003318(GI:4507579)的序列的氨基酸序列或其片段。在一个实施方案中,CAR可具有包含相当于氨基酸236-277的OX40的胞内域的共刺激结构域或其片段。在另一个实施方案中,CAR可具有包含相当于OX40的氨基酸215-235的OX40的跨膜结构域的氨基酸序列或其片段。提及OX40内的结构域,例如信号肽,氨基酸1-28;胞外结构域,氨基酸29-214;跨膜结构域,氨基酸215-235;胞内域,氨基酸236-277,参见GenBank NP\_003318。要了解如有需要,比具体描述的结构域较长或较短的OX40的序列可包括在CAR中。还要了解“OX40核酸分子”是指编码OX40多肽的多核苷酸。

[0309] 1 MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCRSRSQ  
61 NTVCRPCPGP FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSEKQLCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK  
121 PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ  
181 GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL  
241 RRDQRLPPDA HKPPGGGSFR TPIQEEQADA HSTLAKI (NP\_003318; SEQ ID NO:19)

[0310] ICOS.诱导型T细胞共刺激物前体(ICOS),亦称为CD278,是在活化T细胞上表达的CD28超家族共刺激分子。在一个实施方案中,CAR可包含来源于ICOS的共刺激信号转导结构域。ICOS多肽可具有相当于具有下面提供的GenBank No.NP\_036224(GI:15029518)的序列的氨基酸序列或其片段。在一个实施方案中,CAR可具有包含相当于ICOS的氨基酸162-199的ICOS的胞内域的共刺激结构域。在另一个实施方案中,CAR可具有包含相当于ICOS氨基酸141-161的ICOS的跨膜结构域的氨基酸序列或其片段。提及ICOS内的结构域,例如信号肽,氨基酸1-20;胞外结构域,氨基酸21-140;跨膜结构域,氨基酸141-161;胞内域,氨基酸162-199,参见GenBank NP\_036224。要了解如有需要,比具体描述的结构域较长或较短的ICOS的



序列可包括在CAR中。还要了解“ICOS核酸分子”是指编码ICOS多肽的多核苷酸。

[0311] 1 MKSGLWYFFL FCLRIKVLTG EINGSANYEM FIFHNGGVQI LCKYPDIVQQ FKMQLLKGGQ  
61 ILCDLTKTKG SGNTVSIKSL KFCHSLSNN SVSFFLYNLD HSHANYFCN LSIFDPPPFK  
121 VTLTGGYLHI YESQLCCQLK FWLPICAAF VVVCILGCIL ICWLTKKKYS SSVHDPNGEY  
181 MFMRAVNTAK KSRLTDVTL (NP\_036224; SEQ ID NO:20)

[0312] DAP10. DAP10, 亦称为造血细胞信号转导物, 是与造血细胞中的受体大家族有关的信号转导亚基。在一个实施方案中, CAR可包含来源于DAP10的共刺激结构域。DAP10多肽可具有相当于具有下面提供的GenBank No. NP\_055081.1 (GI: 15826850) 的序列的氨基酸序列或其片段。在一个实施方案中, CAR可具有包含相当于氨基酸70-93的DAP10的胞内域的共刺激结构域或其片段。在另一个实施方案中, CAR可具有相当于氨基酸49-69的DAP10的跨膜结构域或其片段。提及DAP10内的结构域, 例如信号肽, 氨基酸1-19; 胞外结构域, 氨基酸20-48; 跨膜结构域, 氨基酸49-69; 胞内域, 氨基酸70-93, 参见GenBank NP\_055081.1。要了解如有需要, 比具体描述的结构域较长或较短的DAP10的序列可包括在CAR中。还要了解“DAP10核酸分子”是指编码DAP10多肽的多核苷酸。

[0313] 1 MIHLGHILFL LLLPVAAQT TPGERSSLPA FYPGTSGSCS GCGSLSLPLL AGLVAADAVA  
[0314] 61 SLLIVGAVFL CARPRRSPAQ EDGKVYINMP GRG (NP\_055081.1; SEQ ID NO:21)

[0315] CAR的胞外结构域可与指导新生蛋白质进入内质网并且随后转移到那细胞表面的前导序列或信号肽融合。要了解, 一旦含有信号肽的多肽在细胞表面表达, 信号肽一般便会在多肽在内质网加工并转移至细胞表面期间被蛋白水解除去。因此, 多肽例如CAR一般作为缺乏信号肽的成熟蛋白质在细胞表面表达, 而多肽的前体形式包括信号肽。如果CAR要糖基化和/或锚定在细胞膜中, 则信号肽或前导序列可能是必需的。信号序列或前导序列是一般存在于新合成的蛋白质的N端、指导其进入分泌途径的肽序列。信号肽与CAR的胞外抗原结合结构域的N端共价连接作为融合蛋白。本领域众所周知的任何合适的信号肽可适用于CAR以在T细胞中提供细胞表面表达 (参见Gierasch Biochem. 28:923-930 (1989); von Heijne, J. Mol. Biol. 184(1):99-105 (1985))。特别有用的信号肽可来源于在其T细胞中天然表达的细胞表面蛋白质, 包括本文公开的多肽的任何信号肽。因此, 任何合适的信号肽可用来指导CAR在T细胞的细胞表面表达。

[0316] 在某些非限制性实施方案中, CAR的胞外抗原结合结构域可包含连接胞外抗原结合结构域的重链可变区和轻链可变区的接头序列或肽接头。在某些非限制性实施方案中, CAR还可包含使CAR的结构域彼此连接的间隔区或序列。例如, 间隔区可包括在信号肽和抗原结合结构域之间, 在抗原结合结构域和跨膜结构域之间, 在跨膜结构域和胞内域之间, 和/或在胞内域的结构域之间, 例如在刺激结构域和共刺激结构域之间。间隔区可足够柔韧以供不同结构域与其它多肽相互作用, 例如以供抗原结合结构域具有定向的柔性以利于抗原识别。间隔区可以是例如来自IgG的铰链区、免疫球蛋白的CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (恒定) 区和/或CD3 (分化簇3) 的部分或适于作为间隔区的一些其它序列。

[0317] CAR的跨膜结构域通常包含跨越至少一部分膜的疏水 $\alpha$ 螺旋。不同的跨膜结构域导致不同的受体稳定性。在抗原识别后, 受体簇和信号被传送至细胞。在一个实施方案中, CAR的跨膜结构域可来源于在T细胞中天然表达的另一多肽。在一个实施方案中, CAR可具有来源于CD8、CD28、CD3 $\zeta$ 、CD4、4-1BB、OX40、ICOS、CTLA-4、PD-1、LAG-3、2B4、BTLA或具有跨膜结构域的T细胞中表达的其它多肽的跨膜结构域, 包括本文公开的或是本领域众所周知的那

些。任选,跨膜结构域可来源于不是在T细胞中天然表达的多肽,只要跨膜结构域可在从与CAR结合的抗原转导信号至胞内信号转导和/或共刺激结构域时作用。要了解按需要,包含多肽的跨膜结构域的多肽的部分可包括多肽的其它序列,例如邻近跨膜结构域N末端或C末端的其它序列或多肽的其它区。

[0318] CD8.分化簇8(CD8)是用作T细胞受体(TCR)的共同受体的跨膜糖蛋白。CD8与主要组织相容性复合物(MHC)分子结合,并对I类MHC蛋白有特异性。在一个实施方案中,CAR可包含来源于CD8的跨膜结构域。CD8多肽可具有相当于具有下面提供的GenBank No.NP\_001139345.1(GI:225007536)的序列的氨基酸序列或其片段。在一个实施方案中,CAR可具有包含相当于氨基酸183-203的CD8的跨膜结构域的氨基酸序列或其片段。提及CD8内的结构域,例如信号肽,氨基酸1-21;胞外结构域,氨基酸22-182;跨膜结构域氨基酸,183-203;胞内域,氨基酸204-235,参见GenBank NP\_001139345.1。要了解如有需要,氨基酸183-203的跨膜结构域以外的CD8的其它序列可包括在CAR中。要进一步了解如有需要,比具体描述的结构域较长或较短的CD8的序列可包括在CAR中。还要了解“CD8核酸分子”是指编码CD8多肽的多核苷酸。

```

1   MALPVTALLL PLALLLHAAR PSQFRVSPLD RTWNLGETVE LKCQVLLSNP TSGCSWLFQP
61  RGAAASPTFL LYLSQNKPKA AEGLDTQRFS GKRLGDTFVL TLSDFRRENE GYFCSALSN
[0319] 121 SIMYFSHFVP VFLPAKPTTT PAPRPPTPAP TIASQPLSLR PEACRPAAGG AVHTRGLDFA
181 CDIYIWAPLA GTCGVLLLSL VITLYCNHRN RRRVCKCPRP VVKSGDKPSL SARYV
(NP_001139345.1; SEQ ID NO:22)

```

[0320] CD4.分化簇4(CD4),亦称为T细胞表面糖蛋白CD4,是存在于例如T辅助细胞、单核细胞、巨噬细胞和树突细胞等免疫细胞表面的糖蛋白。在一个实施方案中,CAR可包含来源于CD4的跨膜结构域。CD4以不同的同种型存在。要了解,可选择任何同种型以获得所需功能。示例性同种型包括同种型1(NP\_000607.1,GI:10835167)、同种型2(NP\_001181943.1,GI:303522479)、同种型3(NP\_001181944.1,GI:303522485;或NP\_001181945.1,GI:303522491;或NP\_001181946.1,GI:303522569)等。下面提供一个示例性同种型序列,同种型1。在一个实施方案中,CAR可具有包含相当于氨基酸397-418的CD4的跨膜结构域的氨基酸序列或其片段。提及CD4内的结构域,例如信号肽,氨基酸1-25;胞外结构域,氨基酸26-396;跨膜结构域氨基酸,397-418;胞内域,氨基酸419-458,参见GenBank NP\_000607.1。要了解如有需要,氨基酸397-418的跨膜结构域以外的CD4的其它序列可包括在CAR中。要进一步了解,比具体描述的结构域较长或较短的CD4的序列可包括在CAR中,如有需要。还要了解“CD4核酸分子”是指编码CD4多肽的多核苷酸。

```

1   MNRGVPFRHL LLVLQLALLP AATQGGKVVVL GKKGDTVELT CTASQKKSIQ FHWKNSNQIK
61  ILGNQGSFLT KGPSKLNDRD DSRRLWDQD NFPLIINKLK IEDSDTYICE VEDQKEEVQL
121 LVFGLTANS DTHLLQGQSLT LTLESPPGSS PSVQCRSPRG KNIQGGKTL S VSQLELQDSG
181 TWTCTVLQNN KKVEFKIDIV VLAFFKASSI VYKKEGEQVE FSFPLAFTVE KLTGSGELWW
[0321] 241 QAERASSSKS WITFDLKNKE VSVKRVTDQP KLQMGKKLPL HLTLPQALPQ YAGSGNLTLA
301 LEAKTGKLHQ EVNLVVMRAT QLQKNLTCEV WGPTSPKML SLKLENKEAK VSKREKAVWV
361 LNPEAGMWQC LLSDSGQVLL ESNIKVLPTW STPVQPMALI VLGGVAGLLL FIGLGIFFCV
421 RCRHRRRQAE RMSQIKRLLS EKKTCQCPHR FQKTCSPI (NP_000607.1; SEQ ID NO:23)

```

[0322] 要了解,本文所述多肽的结构域可用于癌抗原CAR,如可用于提供所需功能例如信号肽、抗原结合结构域、跨膜结构域、胞内信号转导结构域和/或共刺激结构域。例如,可按

需要选择结构域例如信号肽、跨膜结构域、胞内信号转导结构域或其它结构域,以提供本发明CAR的特定功能。可能的所需功能可包括但不限于提供信号肽和/或跨膜结构域。

[0323] 嵌合共刺激受体(CCR)。嵌合共刺激受体(CCR)是由本发明的治疗性转基因编码的示例性产物。嵌合共刺激受体(CCR)是类似于CAR的嵌合受体,包含抗原结合胞外结构域、跨膜结构域和胞内信号转导结构域(Sadelain et al., Cancer Discov. 3 (4):388-398 (2013))。CCR没有T细胞活化结构域,但的确包含共刺激结构域,例如上文针对CAR所述的共刺激结构域之一,例如CD28、4-1BB、OX40、ICOS、DAP10、2B4、CD70等。CCR可与T细胞受体或CAR联用以提高针对双重抗原表达T细胞的T细胞反应性(Sadelain et al., 同上, 2013)。CCR还可用来提高选择性肿瘤打靶(Sadelain et al., 同上, 2013)。CCR是抗原特异性共刺激受体,在与其结合配偶体(即靶抗原)结合时模拟4-1BB、OX40、ICOS或CD70(根据CCR的共刺激结构域)的作用。

[0324] 可用作可由治疗性转基因编码的产物的示例性共刺激配体(CL)包括但不限于共刺激配体4-1BBL; OX40L; ICOSL; CD70等。可由治疗性转基因编码的示例性嵌合共刺激受体(CCR)包括但不限于抗原特异性共刺激受体,在与靶抗原结合时模拟4-1BB、OX40、ICOS或CD70的作用。

[0325] 细胞因子。细胞因子是由本发明的治疗性转基因编码的示例性产物。当由治疗性转基因编码时特别有用的细胞因子包括刺激或维持本发明T细胞的活化的那些。可用作由治疗性转基因编码的产物用于刺激免疫应答的示例性细胞因子包括但不限于IL2、IL12、IL15、IL18等。可用作由治疗性转基因编码的产物用于抑制免疫应答的示例性细胞因子包括但不限于TGFβ、IL10等。

[0326] 显性阴性物(dominant negatives)。显性阴性物是由本发明的治疗性转基因编码的示例性产物。当由治疗性转基因编码时是特别有用的显性阴性物包括刺激或维持本发明的T细胞活化的那些。示例性显性阴性物包括但不限于抑制性嵌合抗原受体(iCAR)、可分泌可溶性细胞因子受体(例如对于TGFβ、IL10)、可分泌可溶性T细胞抑制性受体(例如来源于PD1、CTLA4、LAG3或TIM-3)等。抑制性嵌合抗原受体是细胞表面受体,由与来源于抑制性T细胞受体(例如PD1、CTLA4)的胞内信号转导结构域融合的胞外scFV结构域(结合靶细胞中的细胞表面分子)组成。经改造的T细胞在与靶细胞相互作用时被抑制。

[0327] 微环境调节剂。微环境调节剂是由本发明的治疗性转基因编码的示例性产物。微环境调节剂是指调节治疗性经改造的T细胞附近的细胞的活性的分子。当由治疗性转基因编码时是特别有用的微环境调节剂包括刺激或维持本发明的T细胞的活化的那些。示例性微环境调节剂包括但不限于肝素酶、疱疹病毒侵入介质(HVEM),亦称为TNFRSF14等。

[0328] 抗体。抗体是由本发明的治疗性转基因编码的示例性产物。示例性抗体包括但不限于针对T细胞抑制性配体例如PD1L、CD80、CD86、Galectin-9、Fas配体等的抗体。

[0329] 抗体可表达为免疫球蛋白(例如IgG)或双特异性T细胞衔接器(BiTE)、双抗体、双亲和重靶向抗体(DART)、Fab、F(ab')、单链可变片段(scFv)、纳米抗体、双特异性抗体等(参见例如Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); Chames et al., Br. J. Pharmacol. 157:220-233 (2009); Rader, Blood, 117:4403-4404 (2011))。

[0330] 生物传感器。生物传感器是由本发明的治疗性转基因编码的示例性产物。生物传

传感器是在配体结合时,向细胞发出信号以产生特定作用的生物分子(蛋白质、DNA或RNA)。生物传感器可以是例如蛋白质、DNA、RNA、微小RNA、代谢物、离子等的生物传感器。示例性生物传感器包括但不限于tol1样受体(TLR),其是DNA、RNA、毒素的生物传感器和离子的生物传感器,例如钙感测钙调蛋白(CaM)-钙调蛋白-结合肽。特定TLR的表达允许经改造的T细胞对胞质中靶分子(例如RNA、毒素)的存在起反应,因此引发可用于激活治疗性分子表达的细胞的确定性信号。类似策略适用于CaM-钙调蛋白结合蛋白(其感测胞内钙)。这些生物传感器可在治疗性分子产生期间起中间产物的作用,并且只有当需要具有这类作用时才的确如此。例如,生物传感器可用来感测细胞状态然后激活另一转基因的表达。在一个具体实施方案中,例如,可使用特异性检测特异性HIV RNA序列的生物传感器。在结合时,生物传感器进行引起嵌合转录阻遏物释放的构象变化,然后转移至核并特异性抑制HIV基因组转录。

[0331] 嵌合受体配体(CRL)。嵌合受体配体(CRL)是由本发明的治疗性转基因编码的示例性产物。CRL是被靶细胞受体(例如细胞因子受体)识别且与其特异性受体相互作用时将引发T细胞反应的细胞表面配体。CRL含有在靶细胞中与其特异性受体相互作用时可启动T细胞反应的胞内域。

[0332] 嵌合免疫受体配体(CIRL)。嵌合免疫受体(CIRL)是由本发明的治疗性转基因编码的示例性产物。CIRL是被免疫细胞受体(例如TCR或免疫球蛋白)识别且与其特异性受体相互作用时可引发T细胞反应的细胞表面配体。CIRL含有在靶细胞中与其特异性受体相互作用时可启动T细胞反应的胞内域。

[0333] 可溶性受体。可溶性受体是由本发明的治疗性转基因编码的示例性产物。这类可溶性受体可以是胞内或胞外的。示例性可溶性受体包括但不限于IL4R、IL10R、PD1、CTL4、TIM-3、LAG3等。这类可溶性受体一般对免疫应答具有刺激作用。

[0334] 溶质传递体。溶质传递体是由本发明的治疗性转基因编码的示例性产物。示例性溶质传递体包括但不限于葡萄糖转运蛋白,例如Glut1或Glut3。已知效应T细胞需要葡萄糖摄取提高以产生能量。表达葡萄糖转运蛋白的经改造的T细胞可获益于当T细胞处于肿瘤细胞(通常为大批)在其中消耗葡萄糖的竞争环境中时葡萄糖转运蛋白数量的增多。

[0335] 酶。酶是由本发明的治疗性转基因编码的示例性产物。示例性治疗性酶包括但不限于PKM2。丙酮酸激酶肌肉同工酶2(PKM2)是分裂细胞(例如效应T细胞)中所需要的酶,具有高的糖酵解速率和高生物合成前体需求。PKM2的过量表达有助于增加生物合成前体,因此提高经改造的T细胞的增殖。

[0336] 核酶。核酶是由本发明的治疗性转基因编码的示例性产物。是治疗性转基因的产物的示例性核酶包括但不限于分别切割病原体或病毒基因组的病原体特异性或病毒特异性核酶。在病毒病原体的情况下,核酶因此可抑制病毒进入期间的病毒RNA反转录和病毒装配期间的病毒RNA基因组包装两者。极显然的是,对于不同病原体(包括靶向病毒基因组)的核酶可表达为治疗性转基因的产物。在一个具体实施方案中,转基因编码切割HIV RNA基因组的HIV特异性核酶,因此抑制病毒进入期间的病毒RNA反转录和病毒装配期间的病毒RNA基因组包装两者。

[0337] 遗传回路。遗传回路是由本发明的治疗性转基因编码的示例性产物。遗传回路是功能上相连接的一组基因表达单位。

[0338] 遗传回路的一个实施方案是表达细胞表面配体特异性合成转录因子(TF)的组成

型转录单位,其中在配体结合时TF部分被释放和转移至核。然后,TF结合其第二转录单位(诱导型,根据定义)中的关联DNA序列,这激活分泌到微环境以截留这类抑制性配体的抑制性配体特异性可溶性受体的表达。在另一个实施方案中,表达嵌合抗原受体(CAR)的组成型转录单位,在靶细胞识别时,通过NFAT反应元件诱导可分泌肿瘤抑制物(例如淋巴瘤特异性soIHEVM)的表达;在这类实施方案中,CAR由在组成型内源启动子控制下的第一转基因编码,该CAR,在靶细胞识别时,诱导可分泌肿瘤抑制物(例如淋巴瘤特异性soIHEVM)从在NFAT反应性诱导型内源启动子控制下的转基因表达。在一个具体实施方案中,合成TF从一个转录单位(在一个位置处整合的单个转基因)表达;可溶性受体从第二转录单位(单一转基因表达盒,在相同或不同的位置处整合)表达,且该表达TF与该第二转录单位结合时发生。

[0339] 在遗传回路的一个具体实施方案中,CAR-表达T细胞含有由HIF1 $\alpha$ -依赖型和TALE-VP64-依赖型转录单位组成的遗传回路。当CAR T细胞在低氧水平的肿瘤微环境中时,HIF1 $\alpha$ 转录因子在T细胞中被激活,结合HIF1 $\alpha$ -依赖型转录单位并诱导嵌合转录因子TALE-VP64表达,后者之后与TALE-VP64-依赖型转录单位结合并刺激靶向微环境中的抑制性分子(例如PD1L或CD80)的可分泌scFv表达。从这个第二转录单位,重组HIF1 $\alpha$ 也表达,这将导致对第一转录单位的正反馈。在前述具体的实施方案中,第一转基因的表达在被HIF1 $\alpha$ 转录因子诱导的内源诱导型启动子的控制下,第二转基因的表达在被TALE-VP64诱导的内源诱导型启动子的控制下,第一转基因编码TALE-VP64,第二转基因编码可分泌scFv。任选,第三转基因的表达,该第三转基因编码HIF1 $\alpha$ ,在也被TALE-VP64诱导的不同内源诱导型启动子的控制下。在一个实施方案中,转录因子可驱动一种或多种基因产物表达,后者发生在多顺反子信息的情况下。双顺反子转录单位的实例: $\alpha$ 和 $\beta$ 链以装配TCR;串联的2个scFv等。在一个实施方案中,单一TALE-VP64反应性转录单位可含有scFv和HIF1 $\alpha$ 两者;这是双顺反子构建体:2个基因将从单一启动子表达。

[0340] 在另一个具体实施方案中,组成型转录单位表达细胞表面CD19特异性scFv-NFAT融合蛋白,在与B细胞结合时释放出NFAT部分,它转移至核,并与第二转录单位中的其关联DNA序列结合,嵌合免疫受体配体从中表达。该第二基因编码由胞外抗原(被靶B细胞上的特异性免疫球蛋白受体识别)和激活经改造的T细胞的胞内信号转导结构域组成的融合蛋白,导致靶B细胞死亡。因此,在这个具体实施方案中,第一转基因的表达在内源组成型启动子的控制下,所述第一转基因编码细胞表面CD19特异性scFv-NFAT融合蛋白,而第二转基因的表达在通过使细胞表面CD19特异性scFv-NFAT融合蛋白与B细胞结合所诱导的内源诱导型启动子的控制下,第二转基因编码包含以下的融合蛋白:(i)胞外抗原(被靶B细胞上的免疫球蛋白受体识别),和(ii)至少一个激活经改造的T细胞的胞内信号转导结构域,导致靶B细胞死亡(例如因活化T细胞的细胞溶解活性所致)。

[0341] 外遗传调节剂。外遗传调节剂是由本发明的治疗性转基因编码的示例性产物。外遗传调节剂是催化特定基因组位置处的染色质(组蛋白或DNA)的特殊修饰的蛋白质/酶。这些修饰导致基因表达的特殊变化,或活化或阻抑。示例性外遗传调节剂包括但不限于与p300乙酰转移酶结构域(一种组蛋白H3乙酰基转移酶)融合的嵌合可编程序列特异性DNA结合结构域,这激活靶基因表达;和与KRAB阻遏物结构域(一种募集异染色质形成复合物的蛋白质)融合的嵌合可编程序列特异性DNA结合结构域,这阻抑靶基因表达。

[0342] 转录激活物或阻遏物。转录激活物或阻遏物(转录因子)是由本发明的治疗性转基

因编码的示例性产物。转录激活物或阻遏物可以是天然存在的或嵌合的。在某些情况下，一个基因的激活物可以是另一个基因的阻遏物，反之亦然。可通过治疗性转基因表达的示例性转录因子包括但不限于Foxp3、NFAT、HIF-1 $\alpha$ 等。

[0343] 示例性嵌合转录激活物包括但不限于由DNA结合结构域(例如TAL、锌指、CRISPR/去活化Cas9)和反式激活域(例如VP16、VP64、p65、Rta或其组合)组成的融合蛋白，其可被设计成特异性激活一个或多个基因。因此，在一个具体实施方案中，治疗性转基因编码包含DNA结合结构域和反式激活域的融合蛋白。

[0344] 示例性嵌合转录阻遏物包括但不限于由DNA结合结构域(例如TAL、锌指、CRISPR/去活化Cas9)和阻遏物结构域(例如KRAB)组成的融合蛋白，这可被设计成特异性阻抑一个或多个基因。因此，在一个具体实施方案中，治疗性转基因编码包含DNA结合结构域和阻遏物结构域的融合蛋白。

[0345] 非编码RNA。非编码RNA是由本发明的治疗性转基因编码的示例性产物。示例性非编码RNA(微小RNA或小干扰RNA)包括靶向抑制性受体基因信使RNA的那些，例如PD1、TIM-3、LAG3、CTLA-4等。因此，在一个具体实施方案中，治疗性转基因编码非编码RNA，例如微小RNA(miRNA)、小干扰RNA(siRNA)、反义RNA等。在其中需要刺激经改造的T细胞的活性的一个具体实施方案中，非编码RNA可靶向例如靶标抑制性受体基因信使RNA，例如PD1、TIM-3、LAG3、CTLA-4的信使RNA等。

[0346] 在其中需要刺激免疫应答的情况下，优选选择治疗性转基因以编码刺激免疫应答的产物。刺激免疫应答的这类产物可以是但不限于IL12、IL15、IL18或来源于这些因子的任一种的功能结构域。在其中需要抑制免疫应答抑制剂的情况下，优选选择治疗性转基因以编码抑制免疫应答的抑制剂的产物。抑制免疫应答的抑制剂的这类产物可以是但不限于对结合T细胞抑制性受体(例如PD1、CTLA4、LAG3或TIM3)的配体(例如PD1L、CD80、CD86或半乳凝素-9)有特异性的抗体；结合例如TGF $\beta$ 、TNF $\alpha$ 、IL1、IL4、IL6或IL10等因子，因此防止因子的细胞表面受体活化的可溶性受体；结合B或T细胞上的特异性自身免疫受体以诱导免疫耐受或细胞死亡等的抗原或其功能衍生物。在一个实施方案中，已知例如PD1L、CD80、CD86、半乳凝素-9配体通过与T细胞上的特异性受体结合抑制T细胞活性。治疗性抗体结合配体一不结合T细胞抑制性受体；抗体可阻断配体及其相应T细胞抑制性受体之间的相互作用。因此，分泌这些抗体的经改造的T细胞将不被这些配体抑制。在一个实施方案中，例如，TGF $\beta$ 是同样抑制T细胞活性的细胞因子。对该细胞因子有特异性的治疗性可溶性受体可通过防止其与T细胞上表达的受体结合阻断其活性。因此，分泌TGF $\beta$ 可溶性受体的经改造的T细胞将不受该细胞因子抑制。

[0347] 在另一个实施方案中，T细胞可任选表达产生报道分子的转基因。报道分子是可在T细胞中与治疗性转基因共表达的本发明的示例性转基因。这类转基因的实例是截短的EGF受体(EGFRt)，如有需要，这允许治疗性T细胞的检出和排除两者(即起细胞自杀开关的作用)。存在体内识别该报道分子和引发抗体介导的靶细胞死亡的特异性抗体(例如西妥昔单抗)(参见美国专利号8,802,374)。因此，在一个具体实施方案中，经改造的T细胞(其中治疗性转基因的表达在内源启动子的控制下)进一步包含报道转基因，报道转基因是编码可检测标记(优选细胞表面)蛋白质的转基因，其中报道转基因的表达在T细胞的内源启动子的控制下(例如上文描述的任何内源启动子)。在一个具体实施方案中，报道转基因不编码

IL4或IL4的膜结合形式。在另一个具体实施方案中,报道转基因编码细胞自杀开关。在一个具体实施方案中,细胞自杀开关是EGFRt;在这类实施方案中,在将经改造的T细胞给予对象用于治疗目的后,可给予对象识别EGFRt和引发经改造的T细胞的细胞死亡的抗体,以在所需治疗后中断T细胞活性。

#### [0348] 7.6. 治疗方法

[0349] 本发明还涉及用T细胞疗法治疗对象的方法,其中对象需要这类疗法。在其中T细胞疗法是促进免疫应答(即治疗需要刺激性免疫应答的对象)的实施方案中,举例来说,接受治疗的对象可能患有癌症或感染性疾病,给予本发明的重组T细胞以分别治疗癌症或感染性疾病。可通过重组表达与癌症或感染性疾病有关的靶抗原的结合配偶体(例如CAR或抗体或受体)(其可由治疗性转基因编码),或通过使之对与癌症或感染性疾病有关的靶抗原敏感,使T细胞靶向癌症或感染性疾病。在使用敏化T细胞的一个具体实施方案中,分别使T细胞对癌症或感染性疾病的抗原敏感。在一个优选的实施方案中,本发明还涉及用CAR疗法治疗对象的方法,其中对象需要这类疗法。在其中CAR疗法是促进免疫应答的实施方案中,举例来说,接受治疗的对象可能患有癌症或感染性疾病,给予本发明的重组T细胞是治疗癌症或感染性疾病,且CAR分别与癌症或感染性疾病病原体的抗原结合。在这类实施方案中,T细胞可以是CD8<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、TSCM、TCM、效应记忆T细胞、效应T细胞、Th1细胞、Th2细胞、Th9细胞、Th17细胞、Th22细胞、Tfh(滤泡辅助性)细胞或本文描述的其它T细胞。

[0350] 在其中T细胞疗法是抑制免疫应答(即治疗对象需要抑制性免疫应答)的实施方案中,举例来说,接受治疗的对象可能患有自身免疫疾病或有移植排斥的风险,且给予本发明的重组T细胞分别是治疗自身免疫疾病或促进移植耐受。另举例来说,其中T细胞疗法是抑制免疫应答,接受治疗的对象可能有移植物抗宿主病的风险或患有移植物抗宿主病,且给予本发明的重组(本文与“工程改造的”互换使用)T细胞是防止或减轻移植物抗宿主病。可通过重组表达与自身免疫疾病(例如自身抗原)、移植或移植物有关的靶抗原的结合配偶体(例如CAR或抗体或受体)(其可由治疗性转基因编码),或通过使之对与自身免疫疾病、移植或移植物有关的靶抗原敏感,使T细胞靶向自身免疫疾病、移植或移植物。在使用敏化T细胞的一个具体实施方案中,使T细胞对分别在自身免疫反应或移植细胞或移植物(或来源于其中的细胞)的部位处的抗原敏感。在这类实施方案中,T细胞可以是调节T细胞(Treg)。在其中CAR疗法是抑制免疫应答的优选的实施方案中,举例来说,接受治疗的对象可能患有自身免疫疾病或有移植排斥的风险,给予本发明的重组T细胞是治疗自身免疫疾病或促进移植耐受,且CAR分别与自身免疫反应或移植细胞的部位的抗原结合。另举例来说,接受治疗的对象可能患有移植物抗宿主病(GVHD)或有移植物抗宿主病的风险,给予本发明的重组T细胞是治疗或预防或降低GVHD的风险,且CAR与GVHD有关的抗原结合。在这类实施方案中,T细胞可以是调节T细胞(Treg)。这类自身免疫病症包括但不限于类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、口炎性腹泻疾病(celiac sprue disease)、恶性贫血、白癜风、硬皮病、银屑病、炎症肠病、桥本病(Hashimoto's disease)、阿狄森病(Addison's disease)、格雷夫斯病(Graves' disease)、反应性关节炎、斯耶格伦综合征(Sjögren's syndrome)和1型糖尿病。移植可以是器官或组织移植,例如肺、肾、心脏、肠、肝和胰腺等的移植。治疗或预防GVHD可以在对象的造血干细胞移植之后。

[0351] 在一个实施方案中,对象患有癌症。在这类实施方案中,T细胞疗法靶向癌症。在一



个具体实施方案中，T细胞表达CAR。(因此治疗性转基因编码CAR)。在一个优选的实施方案中，CAR与癌抗原结合。选择癌抗原以靶向对象的癌症。

[0352] 本发明涉及使用表达转基因的T细胞的各种方法。在一个具体实施方案中，细胞作为表达转基因的细胞群给予。在一个优选的实施方案中，本发明涉及使用表达CAR的T细胞(其中转基因编码CAR)的各种方法。在一个具体实施方案中，细胞作为表达CAR的细胞群给予。任选，待给予的细胞可针对本发明的细胞纯化或富集。

[0353] 在一个实施方案中，本发明的方法用来治疗癌症。在一个实施方案中，T细胞表达CAR。因此，转基因编码CAR。在一个实施方案中，CAR是癌抗原特异性CAR。

[0354] 要了解，治疗癌症的方法可包括改善与癌症有关的体征或症状的任何作用。这类体征或症状包括但不限于减少白血病细胞的数量，降低肿瘤负荷，包括抑制肿瘤的生长，减缓肿瘤的生长速率，缩小肿瘤的大小，减少肿瘤的数量，消除肿瘤，所有这些可采用本领域众所周知的常规肿瘤成像技术测量。与癌症有关的其它体征或症状包括但不限于疲劳、疼痛、体重减轻和与不同癌症有关的其它体征或症状。因此，给予本发明的细胞可减少肿瘤的数量细胞、缩小肿瘤大小和/或根除对象的肿瘤。肿瘤可以是血液癌症或实体瘤。本发明的方法还可供提高或延长患有癌症的对象的生存。另外，本发明的方法可供提高对象的免疫应答，例如提高针对癌症的免疫应答。

[0355] 在本发明的方法中，将T细胞给予需要T细胞疗法的对象，例如需要治疗，例如需要本文公开的癌症、感染性疾病、自身免疫病症、移植排斥等治疗的对象。在本发明方法的一个优选的实施方案中，将T细胞给予需要CAR疗法的对象，例如需要治疗，例如需要本文公开的癌症、感染性疾病、自身免疫病症、移植排斥等治疗的对象。对象可以是哺乳动物，特别是人。优选，对象是人。将包含本发明的细胞的药物组合物给予对象以诱导免疫应答，其目的是减轻对象的病况。临床改善包括风险或发展速度降低或待用T细胞疗法治病的病症(例如癌症)的病理后果减轻。在一个优选的实施方案中，临床改善包括风险或发展速度降低或用CAR疗法治病的病症(例如癌症)的病理后果减轻。

[0356] 对象可能患有晚期形式的疾病，在该情况下，治疗目的可包括疾病进展缓解或逆转和/或副作用减轻。对象可能有已经接受过治疗的病史，在该情况下治疗目的可为降低或延迟复发的风险。在癌症治疗的情况下，难治性或复发性恶性肿瘤可以使用本发明的细胞治疗。任选例如根据家族史和/或遗传检测，可给予本发明的细胞以预防性地防止疑似易感疾病或病况的对象的疾病或病况的发生。

[0357] 将本发明的细胞给予需要T细胞疗法，例如癌症、感染性疾病、自身免疫疾病、移植排斥等治疗的对象，例如人类对象。在一个优选的实施方案中，将本发明的细胞给予需要CAR疗法，例如癌症、感染性疾病、自身免疫疾病、移植排斥等治疗的对象，例如人类对象。在癌症的情况下，癌症可包括实体瘤或不涉及实体瘤的血液癌症。待使用本发明的细胞治疗的癌症包括通常对免疫疗法起作用的癌症。示例性癌症类型包括但不限于癌、肉瘤、白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、黑素瘤、脑与脊髓瘤、生殖细胞肿瘤、神经内分泌肿瘤、类癌瘤等。癌症可以是实体瘤或不形成实体瘤的血液癌症。在实体瘤的情况下，肿瘤可以是原发性肿瘤或转移性肿瘤。

[0358] 可采用本发明的方法治疗的其它瘤或癌症的实例包括骨癌、肠癌、肝癌、皮肤癌、头或颈癌、黑素瘤(皮肤或眼内恶性黑素瘤)、肾癌(例如透明细胞癌)、咽喉癌、前列腺癌(例



如激素难治性前列腺腺癌)、血液癌症(例如白血病、淋巴瘤和骨髓瘤)、子宫癌、直肠癌、肛区癌、膀胱癌、脑癌、胃癌、睾丸癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、白血病(例如急性白血病、急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性粒细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病、急性单核细胞性白血病、急性单核细胞白血病、急性红白血病、慢性白血病、慢性髓细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病)、真性红细胞增多、淋巴瘤(霍奇金病(Hodgkin's disease)、非霍奇金病、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia))、小肠癌、内分泌系统癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、儿童实体瘤、淋巴细胞淋巴瘤、肾或输尿管癌、肾盂癌、中央神经系统(CNS)瘤、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管生成、脊髓轴肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮样癌、鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤、环境诱发性癌症(包括石棉、重链疾病诱发的那些)和实体瘤例如肉瘤和癌,例如纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肉瘤、软骨肉瘤、骨源性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、鳞状细胞癌、基细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肝细胞瘤、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、维尔姆斯瘤、宫颈癌、子宫癌、睾丸癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、神经鞘瘤、脑膜瘤、黑素瘤、成神经细胞瘤、成视网膜细胞瘤、恶性胸膜疾病、间皮瘤、肺癌(例如非小细胞肺癌)、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌(例如转移性乳腺癌、转移性三阴性乳腺癌)、结肠癌、胸膜肿瘤、成胶质细胞瘤、食管癌、胃癌和滑膜肉瘤。实体瘤可以是原发性肿瘤或转移性状态中的肿瘤。

[0359] 在一个具体实施方案中,给予对象的重组表达转基因的细胞包含CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞两者,目的在于在对象中即产生辅助反应,又产生细胞毒性T淋巴细胞(CTL)反应。在其中CAR由转基因表达的一个优选的实施方案中,给予对象的重组表达CAR的细胞包含CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞两者,目的在于在对象中即产生辅助反应,又产生细胞毒性T淋巴细胞(CTL)反应。

[0360] 在一个实施方案中,本发明提供治疗需要T细胞疗法的对象的方法,其中对象需要抑制性免疫应答,所述方法包括给予是免疫抑制性细胞的本发明的T细胞。在一个实施方案中,对象患有自身免疫疾病。在其中T细胞表达CAR(由转基因编码)的情况下,的一个具体实施方案中,CAR与自身免疫病症的自身免疫抗原结合。自身免疫病症包括但不限于类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、口炎性腹泻疾病、恶性贫血、白癜风、硬皮病、银屑病、炎性肠病、桥本病、阿狄森病、格雷夫斯病、反应性关节炎、斯耶格伦综合征和1型糖尿病。

[0361] 在另一个实施方案中,需要用免疫抑制性细胞治疗的对象具有器官移植。在这类方法中,将是免疫抑制性的本发明的T细胞给予对象以提高对移植器官的免疫耐受。在其中T细胞表达CAR(由转基因编码)的情况下,的一个具体实施方案中,CAR与移植器官的抗原结合。移植可以是肺、肾、心脏、肠、肝和胰腺等的移植。

[0362] 在另一个实施方案中,需要用免疫抑制性细胞治疗的对象需要减轻或防止GVHD,例如其中对象进行了造血干细胞移植。在这类方法中,将是免疫抑制性的本发明的T细胞给予对象以通过干细胞移植或来源于对象抗原中的细胞来提高免疫耐受。在其中T细胞表达CAR(由转基因编码)的情况下,的一个具体实施方案中,CAR与移植细胞的抗原结合。

[0363] 对于治疗,给予的量是有效产生所需作用的量。有效量或治疗有效量是在治疗时足以提供有益的或所需的临床效果的量。有效量可以单次给药或系列给药(一个或多个剂量)提供。有效量可以推注或通过连续灌注提供。就治疗而言,有效量是足以缓解、改善、稳定、逆转或减缓疾病的进展,或以别的方式减少疾病的病理后果的量。有效量可由医生针对特定对象确定。在确定合适的剂量以达到有效量时,通常考虑几个因素。这些因素包括对象的年龄、性别和体重、接受治疗的病况、病况的严重程度及要给予的本发明细胞的形式和有效浓度。

[0364] 本发明的细胞一般基于细胞/千克(细胞/kg)体重的剂量给予。通常根据给药方式和部位,细胞剂量的范围为约 $10^4$ -约 $10^{10}$ 个细胞/kg体重,例如约 $10^5$ -约 $10^9$ 、约 $10^5$ -约 $10^8$ 、约 $10^5$ -约 $10^7$ 或约 $10^5$ - $10^6$ 。一般来说,在全身给药的情况下,使用比局部给药(其中将本发明的T细胞施于区域、器官或肿瘤)高的剂量。示例性剂量范围包括但不限于 $1 \times 10^4$ - $1 \times 10^8$ 、 $2 \times 10^4$ - $1 \times 10^8$ 、 $3 \times 10^4$ - $1 \times 10^8$ 、 $4 \times 10^4$ - $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^4$ - $1 \times 10^8$ 、 $6 \times 10^4$ 至 $1 \times 10^8$ 、 $7 \times 10^4$ - $1 \times 10^8$ 、 $8 \times 10^4$ - $1 \times 10^8$ 、 $9 \times 10^4$ - $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^5$ - $1 \times 10^8$ ,例如 $1 \times 10^5$ - $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^5$ - $4 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^5$ - $3 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^5$ - $2 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^5$ - $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^5$ - $9 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^5$ - $8 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^5$ - $7 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^5$ - $6 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^5$ - $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^5$ - $4 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^5$ - $3 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^5$ - $2 \times 10^6$ 、 $2 \times 10^5$ - $7 \times 10^6$ 、 $2 \times 10^5$ - $6 \times 10^6$ 、 $2 \times 10^5$ - $5 \times 10^6$ 、 $2 \times 10^5$ - $4 \times 10^6$ 、 $3 \times 10^5$ - $3 \times 10^6$ 等。这类剂量范围对局部给药可能是特别有用的。在一个具体实施方案中,以 $1 \times 10^5$ - $5 \times 10^6$ ,特别是 $1 \times 10^5$ - $3 \times 10^6$ 或 $3 \times 10^5$ - $3 \times 10^6$ 个细胞/kg的剂量提供细胞用于局部给药,例如胸膜内给药。示例性剂量范围还可包括但不限于 $5 \times 10^5$ - $1 \times 10^8$ ,例如 $6 \times 10^5$ - $1 \times 10^8$ 、 $7 \times 10^5$ - $1 \times 10^8$ 、 $8 \times 10^5$ - $1 \times 10^8$ 、 $9 \times 10^5$ - $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^6$ - $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^6$ - $9 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^6$ - $8 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^6$ - $7 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^6$ - $6 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^6$ - $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^6$ - $4 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^6$ - $3 \times 10^7$ 等。这类剂量对全身给药可能是特别有用的。在一个具体实施方案中,以 $1 \times 10^6$ - $3 \times 10^7$ 个细胞/kg的剂量提供细胞用于全身给药。示例性细胞剂量包括但不限于 $1 \times 10^4$ 、 $2 \times 10^4$ 、 $3 \times 10^4$ 、 $4 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $6 \times 10^4$ 、 $7 \times 10^4$ 、 $8 \times 10^4$ 、 $9 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $2 \times 10^5$ 、 $3 \times 10^5$ 、 $4 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $6 \times 10^5$ 、 $7 \times 10^5$ 、 $8 \times 10^5$ 、 $9 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $2 \times 10^6$ 、 $3 \times 10^6$ 、 $4 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $6 \times 10^6$ 、 $7 \times 10^6$ 、 $8 \times 10^6$ 、 $9 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $2 \times 10^7$ 、 $3 \times 10^7$ 、 $4 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $6 \times 10^7$ 、 $7 \times 10^7$ 、 $8 \times 10^7$ 、 $9 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $2 \times 10^8$ 、 $3 \times 10^8$ 、 $4 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $6 \times 10^8$ 、 $7 \times 10^8$ 、 $8 \times 10^8$ 、 $9 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 等等,范围为约 $10^4$ -约 $10^{10}$ 的剂量。另外,还可调整剂量以说明是否给予单剂量或是否给予多剂量。可被视为有效剂量的精确确定可基于对各对象是独特的因素,如上所述,包括他们的尺寸、年龄、性别、体重和特定对象的病况。本领域技术人员可根据本文的公开内容和本领域的知识容易地确定剂量。

[0365] 本发明的细胞可通过本领域已知的任何方法给予,包括但不限于胸膜给药、静脉内给药、皮下给药、结节内给药、肿瘤内给药、鞘内给药、胸膜内给药、腹膜内给药、颅内给药和胸腺直接给药。在一个实施方案中,可采用众所周知的方法将本发明的细胞局部递送至器官、肿瘤或自身免疫疾病的部位或感染性疾病的部位,包括但不限于肝或主动脉泵;四肢、肺或肝灌注;在门静脉中;通过静脉分流;在肿瘤附近的腔中或静脉中等。在另一个实施方案中,可全身给予本发明的细胞。在又一个实施方案中,将细胞局部给予需要治疗的部位,例如肿瘤的部位。在肿瘤的情况下,细胞还可肿瘤内给药,例如通过在肿瘤部位细胞的直接注射和/或注入肿瘤血管系统。本领域技术人员可根据靶组织或靶区的类型和/或要治疗的靶组织或靶区的位置,选择合适的给药方式。细胞可通过注射或导管导入。任选,可在给予细胞之前、期间或之后将增殖剂和/或分化剂给予对象以体内增加本发明细胞的产生。

[0366] 本发明细胞的增殖一般在给予对象之前离体进行,且可能是在给予对象之后体内所需的(参见Kaiser et al.,Cancer Gene Therapy 22:72-78(2015))。细胞增殖应伴有细胞存活以允许细胞增殖和持久性,例如T细胞。因此,T细胞可按需要离体或体内增殖。

[0367] 本发明的方法可进一步包括与本发明的细胞治疗组合或用本发明的细胞治疗之前、期间或之后的辅助疗法。因此,本发明的细胞治疗方法可与给予本发明的细胞相容的其它标准医护和/或疗法一起使用。

#### [0368] 7.7. 药物组合物

[0369] 本发明另外提供包含本发明细胞的药物组合物。药物组合物包含有效量的本发明的细胞和药学上可接受的载体。本发明的细胞和包含细胞的组合物可方便地以无菌液体制剂提供,例如通常含细胞悬液的等渗水溶液,或任选作为乳液、分散体等,通常被缓冲至所选的pH。组合物可包含适于细胞的完整性和活力并用于给予细胞组合物的载体,例如水、盐水、磷酸缓冲盐水等。

[0370] 无菌可注射溶液可以通过以下方法制备:将用于本发明的细胞与不同量的其它成份(按需要)掺入适量的合适溶剂中。这些组合物可包括适于与细胞组合物一起使用并适于给予对象(例如人)的药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂,例如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等。用于提供细胞组合物的合适的缓冲剂是本领域众所周知的。所用的任何溶媒、稀释剂或添加剂与保存本发明细胞的完整性和活力相容。

[0371] 组合物通常将是等渗的,即,它们具有与血液和泪液相同的渗透压。本发明的细胞组合物所需的等渗性可以使用氯化钠或其它药学上可接受的作用剂例如右旋糖、硼酸、酒石酸钠或其它无机或有机溶质来实现。氯化钠对含有钠离子的缓冲液是特别优选的。一种特别有用的缓冲液是盐水,例如生理盐水。本领域技术人员应认识到,组合物的组分可被选择为化学惰性的,且将不会影响本发明的细胞的活力或功效,对于给予对象(例如人)将是相容的。技术人员可容易地确定本发明的方法中待给予组合物中的细胞和任选添加剂、溶媒和/或载体的量。

[0372] 本发明的细胞可以在任何生理上可接受的溶媒中给予。本文描述了用于给药的合适剂量。包含本发明的细胞的细胞群可包含纯化的细胞群。本领域的技术人员可采用本文描述的各种众所周知的方法容易地测定细胞群中细胞的百分比。包含本发明的遗传修饰的细胞的细胞群的纯度范围可为约25%-约50%、约30%-约50%、约30%-约40%、约40%-50%、约50%-约55%、约55%-约60%、约65%-约70%、约70%-约75%、约75%-约80%、约80%-约85%、约85%-约90%、约90%-约95%或约95%-约100%。要了解,所述群可用本文公开的本发明的方法有效地产生,或任选富集本文公开的表达转基因的遗传修饰的细胞。在其中转基因编码CAR的一个优选的实施方案中,要了解,所述群可用本文公开的本发明的方法有效地产生或任选富集本文公开的表达CAR的遗传修饰的细胞。剂量可容易地由本领域技术人员调整;例如,纯度降低可能需要剂量增加。

[0373] 本发明还提供用于制备本发明的细胞的试剂盒。在一个实施方案中,试剂盒在一个或多个容器中包含:一种或多种载体,用于产生含有在其基因组内整合使得转基因的表达在T细胞的内源启动子控制下的转基因的遗传改造的T细胞。在一个优选的实施方案中,转基因是CAR,而在一个具体实施方案中,试剂盒包含一种或多种载体,用于产生表达CAR的遗传改造的T细胞。在一个具体实施方案中,试剂盒在容器中包含本文公开的重组非整合型

$\gamma$  反转录病毒。试剂盒还可优选在单独的容器中含有合适的同源重组系统,例如锌指核酸酶(ZFN)、转录激活物样效应子核酸酶(TALEN)、成簇有规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)相关蛋白9(Cas9)、Cpf1、大范围核酸酶或Mega-Tal。试剂盒可用来从来源于对象自体细胞的遗传改造的T细胞或从待给予相容的对象的非自体细胞产生。在另一个实施方案中,试剂盒可包含本发明的细胞用于对象的自体或非自体给药。在具体的实施方案中,试剂盒在一个或多个容器中包含本发明的T细胞。

[0374] 在另一个实施方案中,本发明提供包含本文公开的重组非整合型 $\gamma$ 反转录病毒的试剂盒。在具体的实施方案中,试剂盒在一个或多个容器中包含本发明的非整合性 $\gamma$ 反转录病毒。

#### [0375] 7.8. 与报道转基因有关的备选实施方案

[0376] 在本发明的一个备选的具体实施方案中,T细胞将报道转基因(任选而非治疗性转基因)整合至其基因组,其中报道转基因的表达在内源启动子(其可以是本文描述的任何启动子)的控制下。报道转基因是编码可检测标记(优选细胞表面)蛋白质的转基因。在一个具体实施方案中,报道转基因不编码IL4或IL4的膜结合形式。在另一个具体实施方案中,报道转基因编码细胞自杀开关。在一个具体实施方案中,细胞自杀开关是截短EGF受体(EGFRt),如有需要,其允许治疗性T细胞的检出和清除两者。存在体内识别该报道分子和引发抗体介导的靶细胞死亡的特异性抗体(例如西妥昔单抗)(参见美国专利号8,802,374)。因此,例如,编码EGFRt的转基因可在内源组成型或诱导型启动子的控制下,在将经改造的T细胞给予对象后用于治疗目的,可给予对象识别EGFRt和引发经改造的T细胞的细胞死亡的抗体,以在所需治疗后中断T细胞活性。

#### [0377] 7.9. 示例性实施方案

[0378] 本发明提供下列示例性实施方案。

[0379] 实施方案1.一种T细胞,其中转基因在T细胞基因组内的第一位点处整合使得转基因的表达在T细胞的内源启动子控制下,其中转基因编码治疗性蛋白质或治疗性核酸。

[0380] 实施方案2.实施方案1的T细胞,其中转基因编码治疗性蛋白质。

[0381] 实施方案3.实施方案1的T细胞,其中转基因编码治疗性核酸。

[0382] 实施方案4.实施方案1-3中任一个的T细胞,其中转基因在基因组内的单一位点处整合。

[0383] 实施方案5.实施方案1-3中任一个的T细胞,其中转基因在细胞基因组内的两个位点处整合。

[0384] 实施方案6.实施方案1-5中任一个的T细胞,其中第一位点是在内源启动子控制下的内源基因的外显子。

[0385] 实施方案7.实施方案6的T细胞,其中第一位点在内源基因的第一外显子内。

[0386] 实施方案8.实施方案1-7中任一个的T细胞,其中内源启动子是组成型的。

[0387] 实施方案9.实施方案8的T细胞,其中启动子选自CD4启动子、CD8a启动子、CD8b启动子、TCRa启动子、TCRb启动子、CD3d启动子、CD3g启动子、CD3e启动子和CD3z启动子。

[0388] 实施方案10.实施方案1-7中任一个的T细胞,其中内源启动子在T细胞亚群中是有活性的。

[0389] 实施方案11.实施方案10的T细胞,其中内源启动子选自CD4启动子、CD8a启动子、

CD8b启动子、TCRa启动子、TCRb启动子、CD3d启动子、CD3g启动子、CD3e启动子、CD3z启动子、肌动蛋白启动子、CD25启动子、IL2启动子、CD69启动子、GzmB启动子、T-bet启动子、IFN $\gamma$ 启动子、TIM3启动子、IL4启动子、GATA3启动子、IL5启动子、IL13启动子、IL10启动子、IL17A启动子、IL6启动子、IL21启动子、IL23R启动子、FoxP3启动子、CTLA4启动子、CD25启动子、PD1启动子、CD45RO启动子、CCR7启动子、CD28启动子、CD95启动子、CD28启动子、CD27启动子、CD127启动子、PD-1启动子、CD122启动子、CD132启动子、KLRG-1启动子、HLA-DR启动子、CD38启动子、CD69启动子、Ki-67启动子、CD11a启动子、CD58启动子、CD99启动子、CD62L启动子、CD103启动子、CCR4启动子、CCR5启动子、CCR6启动子、CCR9启动子、CCR10启动子、CXCR3启动子、CXCR4启动子、CLA启动子、粒酶A启动子、粒酶B启动子、穿孔蛋白启动子、CD57启动子、CD161启动子、IL-18Ra启动子、c-Kit启动子和CD130启动子。

[0390] 实施方案12.实施方案1-7中任一个的T细胞,其中内源启动子是诱导型的。

[0391] 实施方案13.实施方案12的T细胞,其中内源启动子被T细胞的活化诱导。

[0392] 实施方案14.实施方案12的T细胞,其中启动子被由T细胞表达的嵌合抗原受体(CAR)、嵌合共刺激受体(CCR)、T细胞受体(TCR)、CD28、CD27或4-1BB与其各自的结合配偶体的结合诱导。

[0393] 实施方案15.实施方案14的T细胞,其中启动子被由T细胞表达的CAR、CCR或TCR与其各自的结合配偶体的结合诱导。

[0394] 实施方案16.实施方案15的T细胞,其中启动子选自以下的核因子:活化T细胞(NFAT)启动子、程序性死亡1(PD-1)启动子、T细胞免疫球蛋白黏蛋白-3(TIM-3)启动子、细胞毒性T淋巴细胞抗原-4(CTLA4)启动子、淋巴细胞活化蛋白3(LAG-3)启动子、肿瘤坏死因子(TNF)相关细胞凋亡诱导性配体(TRAIL)启动子、B-和T-淋巴细胞弱化子(BTLA)启动子、CD25启动子、CD69启动子、Fas配体(FasL)启动子、TIGIT启动子和2B4启动子。

[0395] 实施方案17.实施方案12的T细胞,其中启动子被配体与由T细胞表达的抑制性受体的结合诱导。

[0396] 实施方案18.实施方案17的T细胞,其中抑制性受体选自PD-1、CTLA4、TRAIL、LAG-3、BTLA、TIM-3、Fas、TIGIT和2B4。

[0397] 实施方案19.实施方案17的T细胞,其中启动子选自CPT1a启动子和ATGL启动子。

[0398] 实施方案20.实施方案12的T细胞,其中启动子被细胞因子与由T细胞表达的细胞因子受体的结合诱导。

[0399] 实施方案21.实施方案20的T细胞,其中细胞因子选自白介素2(IL2)、白介素7(IL7)、白介素15(IL15)和白介素21(IL21)。

[0400] 实施方案22.实施方案20的T细胞,其中细胞因子选自白介素10(IL10)和转化生长因子 $\beta$ (TGF $\beta$ )。

[0401] 实施方案23.实施方案20的T细胞,其中启动子选自T-bet启动子、Eomes启动子、GATA3启动子和CD45RA启动子。

[0402] 实施方案24.实施方案12的T细胞,其中启动子被细胞与核酸的接触诱导。

[0403] 实施方案25.实施方案24的T细胞,其中核酸选自病毒DNA、病毒RNA和胞内微小RNA。

[0404] 实施方案26.实施方案25的T细胞,其中启动子选自I型干扰素(IFN) $\alpha$ 、I型IFN $\beta$ 、

IRF3、IRF7、NFkB、AP-1、TNF- $\alpha$ 、IL1和IL6。

[0405] 实施方案27.实施方案12的T细胞,其中启动子被细胞与代谢物的接触诱导。

[0406] 实施方案28.实施方案27的T细胞,其中代谢物选自丙酮酸、谷氨酰胺和 $\beta$ -羟基丁酸。

[0407] 实施方案29.实施方案12的T细胞,其中启动子被细胞中的代谢变化或细胞与引起细胞代谢变化的物质的接触诱导。

[0408] 实施方案30.实施方案29的T细胞,其中启动子是PKM2启动子。

[0409] 实施方案31.实施方案12的T细胞,其中启动子被细胞中的特定离子浓度或细胞与特定离子浓度的接触诱导。

[0410] 实施方案32.实施方案31的T细胞,其中离子是钾或钙。

[0411] 实施方案33.实施方案31的T细胞,其中启动子选自IL2启动子、TNF $\alpha$ 启动子和IFN $\gamma$ 启动子。

[0412] 实施方案34.实施方案1-33中任一个的T细胞,其中转基因编码选自以下的分子: CAR、CCR、细胞因子、显性负微环境调节剂、抗体、生物传感器、嵌合受体配体(CRL)、嵌合免疫受体配体(CIRL)、可溶性受体、溶质传递体、酶、核酶、遗传回路、外遗传调节剂、转录激活物、转录阻遏物和非编码RNA。

[0413] 实施方案35.实施方案34的T细胞,其中转基因编码细胞因子,任选细胞因子是免疫刺激的。

[0414] 实施方案36.实施方案35的T细胞,其中细胞因子是免疫刺激的,细胞因子选自IL2、IL12、IL15和IL18。

[0415] 实施方案37.实施方案34的T细胞,其中转基因编码细胞因子,任选细胞因子是免疫抑制的。

[0416] 实施方案38.实施方案37的T细胞,其中细胞因子是免疫抑制的,细胞因子选自TGF $\beta$ 和IL10。

[0417] 实施方案39.实施方案34的T细胞,其中转基因编码抗体、任选抗体选自免疫球蛋白、双特异性T细胞衔接器(BiTE)、双抗体、双重亲和重新靶向(DART)、Fab、F(ab')、单链可变片段(scFv)和纳米抗体。

[0418] 实施方案40.实施方案34的T细胞,其中转基因编码CAR。

[0419] 实施方案41.实施方案40的T细胞,其中CAR与癌抗原结合。

[0420] 实施方案42.实施方案1-39中任一个的T细胞,其中使T细胞对靶抗原敏感。

[0421] 实施方案43.实施方案1-42中任一个的T细胞,其中编码报道分子的转基因(下文称为“报道转基因”)在T细胞的基因组内整合使得报道转基因的表达在启动子的控制下,优选在T细胞的内源启动子的控制下。

[0422] 实施方案44.实施方案1-43中任一个的T细胞,其来源于人。

[0423] 实施方案45.实施方案44的T细胞,其中T细胞是原代人T细胞、源自CD34造血干细胞的T细胞、源自胚干细胞的T细胞或源自诱导的多能干细胞的T细胞。

[0424] 实施方案46.实施方案1-45中任一个的T细胞,其中转基因通过靶向同源重组整合至第一位点。

[0425] 实施方案47.实施方案46的T细胞,其中靶向同源重组通过包括使用锌指核酸酶

(ZFN)、转录激活物样效应子核酸酶 (TALEN)、成簇有规律间隔的短回文重复序列 (CRISPR) 相关蛋白9 (Cas9)、Cpf1、致热原、Aureus、大范围核酸酶或Mega-Tal的方法进行。

[0426] 实施方案48. 实施方案1-47中任一个的T细胞, 其中转基因在T细胞基因组内的多个位点整合, 使得所述多个位点处的转基因的表达在不同内源启动子的控制下。

[0427] 实施方案49. 一种T细胞, 其中第一转基因在细胞基因组内的第一位点处整合使得第一转基因的表达在T细胞的第一内源启动子的控制下, 且其中第二转基因在细胞基因组内的第二位点处整合, 使得第二转基因的表达在第二内源启动子的控制下, 其中所述第一和第二内源启动子是不同的启动子, 且其中第一转基因编码第一治疗性蛋白质或第一治疗性核酸, 第二转基因编码第二治疗性蛋白质或第二治疗性核酸, 优选其中第一治疗性蛋白质或第一治疗性核酸分别不同于所述第二治疗性蛋白质或第二治疗性核酸。

[0428] 实施方案50. 实施方案49的T细胞, 其中第一转基因编码第一治疗性蛋白质。

[0429] 实施方案51. 实施方案49的T细胞, 其中第一转基因编码第一治疗性核酸。

[0430] 实施方案52. 实施方案49的T细胞, 其中第二转基因编码第二治疗性蛋白质。

[0431] 实施方案53. 实施方案49的T细胞, 其中第二转基因编码第二治疗性核酸。

[0432] 实施方案54. 实施方案49-53中任一个的T细胞, 其中第一内源启动子是组成型的, 第二内源启动子是诱导型的。

[0433] 实施方案55. 实施方案54的T细胞, 其中组成型启动子选自CD4启动子、CD8a启动子、CD8b启动子、TCRa启动子、TCRb启动子、CD3d启动子、CD3g启动子、CD3e启动子和CD3z启动子。

[0434] 实施方案56. 实施方案54的T细胞, 其中第一内源启动子和/或第二内源启动子在T细胞亚群中是有活性的。

[0435] 实施方案57. 实施方案56的T细胞, 其中第一内源启动子和/或第二内源启动子独立选自CD4启动子、CD8a启动子、CD8b启动子、TCRa启动子、TCRb启动子、CD3d启动子、CD3g启动子、CD3e启动子、CD3z启动子、肌动蛋白启动子、CD25启动子、IL2启动子、CD69启动子、GzmB启动子、T-bet启动子、IFN  $\gamma$  启动子、TIM3启动子、IL4启动子、GATA3启动子、IL5启动子、IL13启动子、IL10启动子、IL17A启动子、IL6启动子、IL21启动子、IL23R启动子、FoxP3启动子、CTLA4启动子、CD25启动子、PD1启动子、CD45RO启动子、CCR7启动子、CD28启动子、CD95启动子、CD28启动子、CD27启动子、CD127启动子、PD-1启动子、CD122启动子、CD132启动子、KLRG-1启动子、HLA-DR启动子、CD38启动子、CD69启动子、Ki-67启动子、CD11a启动子、CD58启动子、CD99启动子、CD62L启动子、CD103启动子、CCR4启动子、CCR5启动子、CCR6启动子、CCR9启动子、CCR10启动子、CXCR3启动子、CXCR4启动子、CLA启动子、粒酶A启动子、粒酶B启动子、穿孔蛋白启动子、CD57启动子、CD161启动子、IL-18Ra启动子、c-Kit启动子和CD130启动子。

[0436] 实施方案58. 实施方案54的T细胞, 其中诱导型启动子被T细胞的活化诱导。

[0437] 实施方案59. 实施方案54的T细胞, 其中诱导型启动子被由T细胞表达的嵌合抗原受体 (CAR)、嵌合共刺激受体 (CCR)、T细胞受体 (TCR)、CD28、CD27和4-1BB与其各自的结合配偶体的结合诱导。

[0438] 实施方案60. 实施方案59的T细胞, 其中诱导型启动子被由T细胞表达的CAR、CCR或TCR与其各自的结合配偶体的结合诱导。

[0439] 实施方案61.实施方案60的T细胞,其中诱导型启动子选自以下的核因子:活化T细胞(NFAT)启动子、程序性死亡1(PD-1)启动子、T细胞免疫球蛋白黏蛋白-3(TIM-3)启动子、细胞毒性T淋巴细胞抗原-4(CTLA4)启动子、淋巴细胞活化蛋白3(LAG-3)启动子、肿瘤坏死因子(TNF)相关细胞凋亡诱导性配体(TRAIL)启动子、B-和T-淋巴细胞弱化子(BTLA)启动子、CD25启动子、CD69启动子、Fas配体(FasL)启动子、TIGIT启动子和2B4启动子。

[0440] 实施方案62.实施方案54的T细胞,其中诱导型启动子被配体与由T细胞表达的抑制性受体的结合诱导。

[0441] 实施方案63.实施方案62的T细胞,其中抑制性受体选自PD-1、CTLA4、TRAIL、LAG-3、BTLA、TIM-3、Fas、TIGIT和2B4。

[0442] 实施方案64.实施方案62的T细胞,其中诱导型启动子选自CPT1a启动子和ATGL启动子。

[0443] 实施方案65.实施方案54的T细胞,其中诱导型启动子被细胞因子与由T细胞表达的细胞因子受体的结合诱导。

[0444] 实施方案66.实施方案65的T细胞,其中细胞因子选自白介素2(IL2)、白介素7(IL7)、白介素15(IL15)和白介素21(IL21)。

[0445] 实施方案67.实施方案65的T细胞,其中细胞因子选自白介素10(IL10)和转化生长因子 $\beta$ (TGF $\beta$ )。

[0446] 实施方案68.实施方案65的T细胞,其中诱导型启动子选自T-bet启动子、Eomes启动子、GATA3启动子和CD45RA启动子。

[0447] 实施方案69.实施方案54的T细胞,其中诱导型启动子被细胞与核酸的接触诱导。

[0448] 实施方案70.实施方案69的T细胞,其中核酸选自病毒DNA、病毒RNA和胞内微小RNA。

[0449] 实施方案71.实施方案70的T细胞,其中诱导型启动子选自I型干扰素(IFN) $\alpha$ 、I型IFN $\beta$ 、IRF3、IRF7、NF $\kappa$ B、AP-1、TNF- $\alpha$ 、IL1和IL6。

[0450] 实施方案72.实施方案54的T细胞,其中诱导型启动子被细胞与代谢物的接触诱导。

[0451] 实施方案73.实施方案72的T细胞,其中代谢物选自丙酮酸、谷氨酰胺和 $\beta$ -羟基丁酸。

[0452] 实施方案74.实施方案54的T细胞,其中诱导型启动子被细胞中的代谢变化或细胞与引起细胞代谢变化的物质的接触诱导。

[0453] 实施方案75.实施方案74的T细胞,其中诱导型启动子是PKM2启动子。

[0454] 实施方案76.实施方案54的T细胞,其中诱导型启动子被细胞中的特定离子浓度或细胞与特定离子浓度的接触诱导。

[0455] 实施方案77.实施方案76的T细胞,其中离子是钾或钙。

[0456] 实施方案78.实施方案76的T细胞,其中诱导型启动子选自IL2启动子、TNF $\alpha$ 启动子和IFN $\gamma$ 启动子。

[0457] 实施方案79.实施方案49-78中任一个的T细胞,其中第一转基因和/或第二转基因各自编码独立选自以下的分子:CAR、CCR、细胞因子、显性负微环境调节剂、抗体、生物传感器、嵌合受体配体(CRL)、嵌合免疫受体配体(CIRL)、可溶性受体、溶质传递体、酶、核酶、遗



传回路、外遗传调节剂、转录激活物、转录阻遏物和非编码RNA。

[0458] 实施方案80.实施方案79的T细胞,其中第一转基因和/或第二转基因编码细胞因子,优选其中细胞因子是免疫刺激的。

[0459] 实施方案81.实施方案80的T细胞,其中细胞因子是免疫刺激的,选自IL2、IL12、IL15和IL18。

[0460] 实施方案82.实施方案79的T细胞,其中其中第一转基因和/或第二转基因编码细胞因子,优选其中细胞因子是免疫抑制的。

[0461] 实施方案83.实施方案82的T细胞,其中细胞因子是免疫抑制的,选自TGF $\beta$ 和IL10。

[0462] 实施方案84.实施方案79的T细胞,其中第一转基因和/或第二转基因编码抗体,抗体是免疫球蛋白、双特异性T细胞衔接器(BiTE)、双抗体、双重亲和重新靶向(DART)、Fab、F(ab')、单链可变片段(scFv)和纳米抗体。

[0463] 实施方案85.实施方案79的T细胞,其中第一转基因和/或第二转基因编码CAR。

[0464] 实施方案86.实施方案85的T细胞,其中CAR与癌抗原结合。

[0465] 实施方案87.实施方案49-84中任一个的T细胞,其中使T细胞对靶抗原敏感。

[0466] 实施方案88.实施方案49-87中任一个的T细胞,其中编码报道分子的转基因(下文称为“报道转基因”)在T细胞的基因组内整合使得报道转基因的表达在启动子的控制下,优选在T细胞的内源启动子的控制下。

[0467] 实施方案89.实施方案49-88中任一个的T细胞,其来源于人。

[0468] 实施方案90.实施方案89的T细胞,其中T细胞是原代人T细胞、源自CD34造血干细胞的T细胞、源自胚干细胞的T细胞或源自诱导的多能干细胞的T细胞。

[0469] 实施方案91.实施方案49-90中任一个的T细胞,其中第一转基因和/或第二转基因通过靶向同源重组整合至第一位点。

[0470] 实施方案92.实施方案91的T细胞,其中靶向同源重组通过包括使用锌指核酸酶(ZFN)、转录激活物样效应子核酸酶(TALEN)、成簇有规间隔的短回文重复序列(CRISPR)相关蛋白9(Cas9)、Cpf1、致热原、Aureus、大范围核酸酶或Mega-Tal的方法进行。

[0471] 实施方案93.实施方案49-92中任一个的T细胞,其中第一治疗性蛋白质或第一治疗性核酸分别不同于所述第二治疗性蛋白质或第二治疗性核酸。

[0472] 实施方案94.实施方案54的T细胞,其中第二内源启动子被T细胞的活化诱导。

[0473] 实施方案95.实施方案54的T细胞,其中第一转基因编码CAR。

[0474] 实施方案96.实施方案95的T细胞,其中第一内源启动子是T细胞受体启动子。

[0475] 实施方案97.实施方案96的T细胞,其中启动子选自T细胞受体 $\alpha$ 链启动子、T细胞受体 $\beta$ 链启动子、CD3 $\gamma$ 链启动子、CD3 $\delta$ 链启动子、CD3 $\epsilon$ 链启动子和CD3 $\zeta$ 链启动子。

[0476] 实施方案98.实施方案97的T细胞,其中启动子是T细胞受体 $\alpha$ 链启动子。

[0477] 实施方案99.实施方案1-36、39-81或84-98(除非前述实施方案直接或间接依赖于实施方案37-38)中任一个的T细胞,其中T细胞是免疫刺激性T细胞。

[0478] 实施方案100.实施方案99的T细胞,其中T细胞选自细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、CD4<sup>+</sup>亚型、CD8<sup>+</sup>亚型、中央记忆型T细胞(TCM)、干细胞记忆T细胞(TSCM)、效应记忆T细胞、效应T细胞、Th1细胞、Th2细胞、Th9细胞、Th17细胞、Th22细胞和Tfh(滤泡辅助性)细胞。

[0479] 实施方案101.实施方案100的T细胞,其中T细胞是CD4<sup>+</sup>。

- [0480] 实施方案102.实施方案100的T细胞,其中T细胞是CD8+。
- [0481] 实施方案103.实施方案1-34、37-79或82-98(除非前述实施方案直接或间接依赖于实施方案35-36)中任一个的T细胞,其中T细胞是免疫抑制性T细胞。
- [0482] 实施方案104.实施方案103的T细胞,其中T细胞是调节性T细胞。
- [0483] 实施方案105.一种分离的T细胞群,其包含实施方案1-98中任一个的大量T细胞。
- [0484] 实施方案106.一种分离的T细胞群,其包含大量的实施方案99-102中任一个的T细胞。
- [0485] 实施方案107.一种分离的T细胞群,其包含大量的实施方案103或104的T细胞。
- [0486] 实施方案108.一种药物组合物,其包含治疗有效量的实施方案1-98中任一个的T细胞和药学上可接受的载体。
- [0487] 实施方案109.一种包含治疗有效量的T细胞群和药学上可接受的载体的药物组合物,所述群包含大量的实施方案1-98中任一个的T细胞。
- [0488] 实施方案110.一种药物组合物,其包含治疗有效量的实施方案99-102中任一个的T细胞和药学上可接受的载体。
- [0489] 实施方案111.一种包含治疗有效量的T细胞群和药学上可接受的载体的药物组合物,所述群包含大量的实施方案99-102中任一个的T细胞。
- [0490] 实施方案112.一种药物组合物,其包含治疗有效量的实施方案103或104的T细胞和药学上可接受的载体。
- [0491] 实施方案113.一种包含治疗有效量的T细胞群和药学上可接受的载体的药物组合物,所述群包含大量的实施方案103或104的T细胞。
- [0492] 实施方案114.一种治疗需要T细胞疗法的对象的方法,所述方法包括给予对象治疗有效量的实施方案1-98中任一个的T细胞。
- [0493] 实施方案115.一种治疗需要T细胞疗法的对象的方法,所述方法包括给予对象治疗有效量的实施方案105的T细胞群。
- [0494] 实施方案116.一种治疗需要T细胞疗法的对象的方法,所述方法包括给予对象实施方案108或109的药物组合物。
- [0495] 实施方案117.实施方案114-116中任一个的方法,其中对象是人,且其中细胞来源于人。
- [0496] 实施方案118.实施方案114-117中任一个的方法,其中T细胞对于对象是自体的。
- [0497] 实施方案119.实施方案114-117中任一个的方法,其中T细胞对于对象是非自体的。
- [0498] 实施方案120.一种治疗需要T细胞疗法的对象的方法,其中对象需要刺激性免疫应答,所述方法包括给予对象治疗有效量的T细胞,其中转基因在T细胞基因组内的第一位点处整合使得转基因的表达在T细胞的内源启动子控制下,其中转基因编码治疗性蛋白质或治疗性核酸。
- [0499] 实施方案121.实施方案116的方法,其中将细胞或细胞群作为药物组合物给予对象。
- [0500] 实施方案122.实施方案120的方法,其中转基因编码治疗性蛋白质。
- [0501] 实施方案123.实施方案120的方法,其中转基因编码治疗性核酸。

[0502] 实施方案124.实施方案116-123中任一个的方法,其中转基因在基因组内的单一位点处整合。

[0503] 实施方案125.实施方案116-123中任一个的方法,其中转基因在细胞基因组内的两个位点处整合。

[0504] 实施方案126.实施方案116-125中任一个的方法,其中第一位点是在内源启动子控制下的内源基因的外显子。

[0505] 实施方案127.实施方案126的方法,其中第一位点在内源基因的第一外显子内。

[0506] 实施方案128.实施方案116-127中任一个的方法,其中内源启动子是组成型的。

[0507] 实施方案129.实施方案128的方法,其中启动子选自CD4启动子、CD8a启动子、CD8b启动子、TCRa启动子、TCRb启动子、CD3d启动子、CD3g启动子、CD3e启动子和CD3z启动子。

[0508] 实施方案130.实施方案116-127中任一个的方法,其中内源启动子在T细胞亚群中是有活性的。

[0509] 实施方案131.实施方案130的方法,其中内源启动子选自CD4启动子、CD8a启动子、CD8b启动子、TCRa启动子、TCRb启动子、CD3d启动子、CD3g启动子、CD3e启动子、CD3z启动子、肌动蛋白启动子、CD25启动子、IL2启动子、CD69启动子、GzmB启动子、T-bet启动子、IFN $\gamma$ 启动子、TIM3启动子、IL4启动子、GATA3启动子、IL5启动子、IL13启动子、IL10启动子、IL17A启动子、IL6启动子、IL21启动子、IL23R启动子、FoxP3启动子、CTLA4启动子、CD25启动子、PD1启动子、CD45RO启动子、CCR7启动子、CD28启动子、CD95启动子、CD28启动子、CD27启动子、CD127启动子、PD-1启动子、CD122启动子、CD132启动子、KLRG-1启动子、HLA-DR启动子、CD38启动子、CD69启动子、Ki-67启动子、CD11a启动子、CD58启动子、CD99启动子、CD62L启动子、CD103启动子、CCR4启动子、CCR5启动子、CCR6启动子、CCR9启动子、CCR10启动子、CXCR3启动子、CXCR4启动子、CLA启动子、粒酶A启动子、粒酶B启动子、穿孔蛋白启动子、CD57启动子、CD161启动子、IL-18Ra启动子、c-Kit启动子和CD130启动子。

[0510] 实施方案132.实施方案116-127中任一个的方法,其中内源启动子是诱导型的。

[0511] 实施方案133.实施方案132的方法,其中内源启动子被T细胞的活化诱导。

[0512] 实施方案134.实施方案132的方法,其中启动子被由T细胞表达的嵌合抗原受体(CAR)、嵌合共刺激受体(CCR)、T细胞受体(TCR)、CD28、CD27或4-1BB与其各自的结合配偶体的结合诱导。

[0513] 实施方案135.实施方案134的方法,其中启动子被由T细胞表达的CAR、CCR或TCR与其各自的结合配偶体的结合诱导。

[0514] 实施方案136.实施方案135的方法,其中启动子选自以下的核因子:活化T细胞(NFAT)启动子、程序性死亡1(PD-1)启动子、T细胞免疫球蛋白黏蛋白-3(TIM-3)启动子、细胞毒性T淋巴细胞抗原-4(CTLA4)启动子、淋巴细胞活化蛋白3(LAG-3)启动子、肿瘤坏死因子(TNF)相关细胞凋亡诱导性配体(TRAIL)启动子、B-和T-淋巴细胞弱化子(BTLA)启动子、CD25启动子、CD69启动子、Fas配体(FasL)启动子、TIGIT启动子和2B4启动子。

[0515] 实施方案137.实施方案132的方法,其中启动子被配体与由T细胞表达的抑制性受体的结合诱导。

[0516] 实施方案138.实施方案137的方法,其中抑制性受体选自PD-1、CTLA4、TRAIL、LAG-3、BTLA、TIM-3、Fas、TIGIT和2B4。

- [0517] 实施方案139.实施方案137的方法,其中启动子选自CPT1a启动子和ATGL启动子。
- [0518] 实施方案140.实施方案132的方法,其中启动子被细胞因子与由T细胞表达的细胞因子受体的结合诱导。
- [0519] 实施方案141.实施方案140的方法,其中细胞因子选自白介素2 (IL2)、白介素7 (IL7)、白介素15 (IL15) 和白介素21 (IL21)。
- [0520] 实施方案142.实施方案140的方法,其中启动子选自T-bet启动子、Eomes启动子、GATA3启动子和CD45RA启动子。
- [0521] 实施方案143.实施方案132的方法,其中启动子被细胞与核酸的接触诱导。
- [0522] 实施方案144.实施方案143的方法,其中核酸选自病毒DNA、病毒RNA和胞内微小RNA。
- [0523] 实施方案145.实施方案144的方法,其中启动子选自I型干扰素 (IFN)  $\alpha$ 、I型IFN $\beta$ 、IRF3、IRF7、NFkB、AP-1、TNF- $\alpha$ 、IL1和IL6。
- [0524] 实施方案146.实施方案132的方法,其中启动子被细胞与代谢物的接触诱导。
- [0525] 实施方案147.实施方案146的方法,其中代谢物选自丙酮酸、谷氨酰胺和 $\beta$ -羟基丁酸。
- [0526] 实施方案148.实施方案132的方法,其中启动子被细胞中的代谢变化或细胞与引起细胞代谢变化的物质的接触诱导。
- [0527] 实施方案149.实施方案148的方法,其中启动子是PKM2启动子。
- [0528] 实施方案150.实施方案132的方法,其中启动子被细胞中的特定离子浓度或细胞与特定离子浓度的接触诱导。
- [0529] 实施方案151.实施方案150的方法,其中离子是钾或钙。
- [0530] 实施方案152.实施方案150的方法,其中启动子选自IL2启动子、TNF $\alpha$ 启动子和IFN  $\gamma$  启动子。
- [0531] 实施方案153.实施方案120-152中任一个的方法,其中转基因编码选自以下的分子:CAR、CCR、细胞因子、显性负微环境调节剂、抗体、生物传感器、嵌合受体配体 (CRL)、嵌合免疫受体配体 (CIRL)、可溶性受体、溶质传递体、酶、核酶、遗传回路、外遗传调节剂、转录激活物、转录阻遏物和非编码RNA。
- [0532] 实施方案154.实施方案153的方法,其中转基因编码细胞因子,任选细胞因子是免疫刺激的。
- [0533] 实施方案155.实施方案154的方法,其中细胞因子是免疫刺激的,细胞因子选自IL2、IL12、IL15和IL18。
- [0534] 实施方案156.实施方案153的方法,其中转基因编码抗体,任选抗体选自免疫球蛋白、双特异性T细胞衔接器 (BiTE)、双抗体、双重亲和重新靶向 (DART)、Fab、F(ab')、单链可变片段 (scFv) 和纳米抗体。
- [0535] 实施方案157.实施方案153的方法,其中转基因编码CAR。
- [0536] 实施方案158.实施方案157的方法,其中CAR与癌抗原结合。
- [0537] 实施方案159.实施方案120-156中任一个的方法,其中使T细胞对靶抗原敏感。
- [0538] 实施方案160.实施方案120-159中任一个的方法,其中编码报道分子的转基因(下文称为“报道转基因”)在T细胞的基因组内整合使得报道转基因的表达在启动子的控制下,

优选在T细胞的内源启动子的控制下。

[0539] 实施方案161.实施方案120-160中任一个的方法,其来源于人。

[0540] 实施方案162.实施方案161的方法,其中T细胞是原代人T细胞、源自CD34造血干细胞的T细胞、源自胚干细胞的T细胞或源自诱导的多能干细胞的T细胞。

[0541] 实施方案163.实施方案120-162中任一个的方法,其中转基因通过靶向同源重组整合至第一位点。

[0542] 实施方案164.实施方案163的方法,其中靶向同源重组通过包括使用锌指核酸酶(ZFN)、转录激活物样效应子核酸酶(TALEN)、成簇有规间隔的短回文重复序列(CRISPR)相关蛋白9(Cas9)、Cpf1、致热原、Aureus、大范围核酸酶或Mega-Tal的方法进行。

[0543] 实施方案165.实施方案120-164中任一个的T细胞,其中转基因在T细胞基因组内的多个位点整合,使得所述多个位点处的转基因的表达在不同内源启动子的控制下。

[0544] 实施方案166.实施方案120-165中任一个的T细胞,其中T细胞是免疫刺激性T细胞。

[0545] 实施方案167.实施方案166的T细胞,其中T细胞选自细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、CD4+亚型、CD8+亚型、中央记忆型T细胞(TCM)、干细胞记忆T细胞(TSCM)、效应记忆T细胞、效应T细胞、Th1细胞、Th2细胞、Th9细胞、Th17细胞、Th22细胞和Tfh(滤泡辅助性)细胞。

[0546] 实施方案168.实施方案167的T细胞,其中T细胞是CD4+。

[0547] 实施方案169.实施方案167的T细胞,其中T细胞是CD8+。

[0548] 实施方案170.实施方案120-169中任一个的方法,其中对象患有癌症。

[0549] 实施方案171.实施方案170的方法,其中癌症是白血病。

[0550] 实施方案172.实施方案120-170中任一个的方法,其中对象患有肿瘤。

[0551] 实施方案173.实施方案120-172中任一个的方法,其中对象是人,且其中细胞来源于人。

[0552] 实施方案174.实施方案120-173中任一个的方法,其中细胞对于对象是自体的。

[0553] 实施方案175.实施方案120-173中任一个的方法,其中细胞对于对象是非自体的。

[0554] 实施方案176.一种治疗需要T细胞疗法的对象的方法,其中对象需要抑制性免疫应答,所述方法包括给予对象治疗有效量的细胞或细胞群,其中细胞是其中转基因在细胞基因组内的第一位点处整合使得转基因的表达在T细胞的内源启动子控制下的T细胞,其中转基因编码治疗性蛋白质或治疗性核酸。

[0555] 实施方案177.实施方案176的方法,其中细胞或细胞群作为药物组合物给药。

[0556] 实施方案178.实施方案176的方法,其中转基因编码治疗性蛋白质。

[0557] 实施方案179.实施方案176的方法,其中转基因编码治疗性核酸。

[0558] 实施方案180.实施方案176-179中任一个的方法,其中转基因在基因组内的单位点处整合。

[0559] 实施方案181.实施方案176-179中任一个的方法,其中转基因在细胞基因组内的两个位点处整合。

[0560] 实施方案182.实施方案176-181中任一个的方法,其中第一位点是在内源启动子控制下的内源基因的外显子。

[0561] 实施方案183.实施方案182的方法,其中第一位点在内源基因的第一外显子内。

[0562] 实施方案184.实施方案176-183中任一个的方法,其中内源启动子是组成型的。

[0563] 实施方案185.实施方案184的方法,其中启动子选自CD4启动子、CD8a启动子、CD8b启动子、TCRa启动子、TCRb启动子、CD3d启动子、CD3g启动子、CD3e启动子和CD3z启动子。

[0564] 实施方案186.实施方案176-183中任一个的方法,其中内源启动子在T细胞亚群中是有活性的。

[0565] 实施方案187.实施方案186的方法,其中内源启动子选自CD4启动子、CD8a启动子、CD8b启动子、TCRa启动子、TCRb启动子、CD3d启动子、CD3g启动子、CD3e启动子、CD3z启动子、肌动蛋白启动子、CD25启动子、IL2启动子、CD69启动子、GzmB启动子、T-bet启动子、IFN $\gamma$ 启动子、TIM3启动子、IL4启动子、GATA3启动子、IL5启动子、IL13启动子、IL10启动子、IL17A启动子、IL6启动子、IL21启动子、IL23R启动子、FoxP3启动子、CTLA4启动子、CD25启动子、PD1启动子、CD45RO启动子、CCR7启动子、CD28启动子、CD95启动子、CD28启动子、CD27启动子、CD127启动子、PD-1启动子、CD122启动子、CD132启动子、KLRG-1启动子、HLA-DR启动子、CD38启动子、CD69启动子、Ki-67启动子、CD11a启动子、CD58启动子、CD99启动子、CD62L启动子、CD103启动子、CCR4启动子、CCR5启动子、CCR6启动子、CCR9启动子、CCR10启动子、CXCR3启动子、CXCR4启动子、CLA启动子、粒酶A启动子、粒酶B启动子、穿孔蛋白启动子、CD57启动子、CD161启动子、IL-18Ra启动子、c-Kit启动子和CD130启动子。

[0566] 实施方案188.实施方案176-183中任一个的方法,其中内源启动子是诱导型的。

[0567] 实施方案189.实施方案188的方法,其中内源启动子被T细胞的活化诱导。

[0568] 实施方案190.实施方案188的方法,其中启动子被由T细胞表达的嵌合抗原受体(CAR)、嵌合共刺激受体(CCR)、T细胞受体(TCR)、CD28、CD27或4-1BB与其各自的结合配偶体的结合诱导。

[0569] 实施方案191.实施方案190的方法,其中启动子被由T细胞表达的CAR、CCR或TCR与其各自的结合配偶体的结合诱导。

[0570] 实施方案192.实施方案191的方法,其中启动子选自以下的核因子:活化T细胞(NFAT)启动子、程序性死亡1(PD-1)启动子、T细胞免疫球蛋白黏蛋白-3(TIM-3)启动子、细胞毒性T淋巴细胞抗原-4(CTLA4)启动子、淋巴细胞活化蛋白3(LAG-3)启动子、肿瘤坏死因子(TNF)相关细胞凋亡诱导性配体(TRAIL)启动子、B-和T-淋巴细胞弱化子(BTLA)启动子、CD25启动子、CD69启动子、Fas配体(FasL)启动子、TIGIT启动子和2B4启动子。

[0571] 实施方案193.实施方案188的方法,其中启动子被配体与由T细胞表达的抑制性受体的结合诱导。

[0572] 实施方案194.实施方案193的方法,其中抑制性受体选自PD-1、CTLA4、TRAIL、LAG-3、BTLA、TIM-3、Fas、TIGIT和2B4。

[0573] 实施方案195.实施方案193的方法,其中启动子选自CPT1a启动子和ATGL启动子。

[0574] 实施方案196.实施方案188的方法,其中启动子被细胞因子与由T细胞表达的细胞因子受体的结合诱导。

[0575] 实施方案197.实施方案196的方法,其中细胞因子选自白介素10(IL10)和转化生长因子 $\beta$ (TGF $\beta$ )。

[0576] 实施方案198.实施方案196的方法,其中启动子选自T-bet启动子、Eomes启动子、GATA3启动子和CD45RA启动子。

- [0577] 实施方案199.实施方案188的方法,其中启动子被细胞与核酸的接触诱导。
- [0578] 实施方案200.实施方案199的方法,其中核酸选自病毒DNA、病毒RNA和胞内微小RNA。
- [0579] 实施方案201.实施方案200的方法,其中启动子选自I型干扰素 (IFN)  $\alpha$ 、I型IFN $\beta$ 、IRF3、IRF7、NF $\kappa$ B、AP-1、TNF- $\alpha$ 、IL1和IL6。
- [0580] 实施方案202.实施方案188的方法,其中启动子被细胞与代谢物的接触诱导。
- [0581] 实施方案203.实施方案202的方法,其中代谢物选自丙酮酸、谷氨酰胺和 $\beta$ -羟基丁酸。
- [0582] 实施方案204.实施方案188的方法,其中启动子被细胞中的代谢变化或细胞与引起细胞代谢变化的物质的接触诱导。
- [0583] 实施方案205.实施方案204的方法,其中启动子是PKM2启动子。
- [0584] 实施方案206.实施方案188的方法,其中启动子被细胞中的特定离子浓度或细胞与特定离子浓度的接触诱导。
- [0585] 实施方案207.实施方案206的方法,其中离子是钾或钙。
- [0586] 实施方案208.实施方案206的方法,其中启动子选自IL2启动子、TNF $\alpha$ 启动子和IFN $\gamma$ 启动子。
- [0587] 实施方案209.实施方案176-208中任一个的方法,其中转基因编码选自以下的分子:CAR、CCR、细胞因子、显性负微环境调节剂、抗体、生物传感器、嵌合受体配体(CRL)、嵌合免疫受体配体(CIRL)、可溶性受体、溶质传递体、酶、核酶、遗传回路、外遗传调节剂、转录激活物、转录阻遏物和非编码RNA。
- [0588] 实施方案210.实施方案209的方法,其中转基因编码细胞因子,任选细胞因子是免疫抑制的。
- [0589] 实施方案211.实施方案210的方法,其中细胞因子是免疫抑制的,细胞因子选自TGF $\beta$ 和IL10。
- [0590] 实施方案212.实施方案209的方法,其中转基因编码抗体、任选抗体选自免疫球蛋白、双特异性T细胞衔接器(BiTE)、双抗体、双重亲和重新靶向(DART)、Fab、F(ab')、单链可变片段(scFv)和纳米抗体。
- [0591] 实施方案213.实施方案209的方法,其中转基因编码CAR。
- [0592] 实施方案214.实施方案213的方法,其中CAR与癌抗原结合。
- [0593] 实施方案215.实施方案176-212中任一个的方法,其中使T细胞对靶抗原敏感。
- [0594] 实施方案216.实施方案176-215中任一个的方法,其中编码报道分子的转基因(下文称为“报道转基因”)在T细胞的基因组内整合使得报道转基因的表达在启动子的控制下,优选在T细胞的内源启动子的控制下。
- [0595] 实施方案217.实施方案176-216中任一个的方法,其来源于人。
- [0596] 实施方案218.实施方案217的方法,其中T细胞是原代人T细胞、源自CD34造血干细胞的T细胞、源自胚干细胞的T细胞或源自诱导的多能干细胞的T细胞。
- [0597] 实施方案219.实施方案176-218中任一个的方法,其中转基因通过靶向同源重组整合至第一位点。
- [0598] 实施方案220.实施方案219的方法,其中靶向同源重组通过包括使用锌指核酸酶

(ZFN)、转录激活物样效应子核酸酶 (TALEN)、成簇有规律间隔的短回文重复序列 (CRISPR) 相关蛋白9 (Cas9)、Cpf1、致热原、Aureus、大范围核酸酶或Mega-Tal1的方法进行。

[0599] 实施方案221.实施方案176-220中任一个的方法,其中转基因在T细胞基因组内的多个位点整合,使得所述多个位点处的转基因的表达在不同内源启动子的控制下。

[0600] 实施方案222.实施方案176-221中任一个的方法,其中T细胞是免疫抑制性T细胞。

[0601] 实施方案223.实施方案222的方法,其中T细胞是调节性T细胞。

[0602] 实施方案224.实施方案176-223中任一个的方法,其中对象是人,且其中细胞来源于人。

[0603] 实施方案225.实施方案176-224中任一个的方法,其中细胞对于对象是自体的。

[0604] 实施方案226.实施方案176-224中任一个的方法,其中细胞对于对象是非自体的。

[0605] 实施方案227.一种产生表达治疗性转基因的T细胞的方法,所述方法包括:

[0606] 将以下导入T细胞:

[0607] (i) 转基因,和

[0608] (ii) 适于转基因在细胞基因组内的位点处靶向整合的同源重组系统,藉此同源重组系统使转基因在细胞基因组内的所述位点处整合,且其中转基因的表达在内源启动子的控制下,其中转基因编码治疗性蛋白质或治疗性核酸。

[0609] 实施方案228.实施方案227的方法,其中转基因编码治疗性蛋白质。

[0610] 实施方案229.实施方案227的方法,其中转基因编码治疗性核酸。

[0611] 实施方案230.实施方案227的方法,其中内源启动子是组成型的。

[0612] 实施方案231.实施方案230的方法,其中启动子选自CD4启动子、CD8a启动子、CD8b启动子、TCRa启动子、TCRb启动子、CD3d启动子、CD3g启动子、CD3e启动子和CD3z启动子。

[0613] 实施方案232.实施方案227的方法,其中内源启动子在T细胞亚群中是有活性的。

[0614] 实施方案233.实施方案232的方法,其中内源启动子选自CD4启动子、CD8a启动子、CD8b启动子、TCRa启动子、TCRb启动子、CD3d启动子、CD3g启动子、CD3e启动子、CD3z启动子、肌动蛋白启动子、CD25启动子、IL2启动子、CD69启动子、GzmB启动子、T-bet启动子、IFN  $\gamma$  启动子、TIM3启动子、IL4启动子、GATA3启动子、IL5启动子、IL13启动子、IL10启动子、IL17A启动子、IL6启动子、IL21启动子、IL23R启动子、FoxP3启动子、CTLA4启动子、CD25启动子、PD1启动子、CD45RO启动子、CCR7启动子、CD28启动子、CD95启动子、CD28启动子、CD27启动子、CD127启动子、PD-1启动子、CD122启动子、CD132启动子、KLRG-1启动子、HLA-DR启动子、CD38启动子、CD69启动子、Ki-67启动子、CD11a启动子、CD58启动子、CD99启动子、CD62L启动子、CD103启动子、CCR4启动子、CCR5启动子、CCR6启动子、CCR9启动子、CCR10启动子、CXCR3启动子、CXCR4启动子、CLA启动子、粒酶A启动子、粒酶B启动子、穿孔蛋白启动子、CD57启动子、CD161启动子、IL-18Ra启动子、c-Kit启动子和CD130启动子。

[0615] 实施方案234.实施方案227的方法,其中内源启动子是诱导型的。

[0616] 实施方案235.实施方案234的方法,其中内源启动子被T细胞的活化诱导。

[0617] 实施方案236.实施方案234的方法,其中启动子被由T细胞表达的嵌合抗原受体 (CAR)、嵌合共刺激受体 (CCR)、T细胞受体 (TCR)、CD28、CD27和4-1BB与其各自的结合配偶体的结合诱导。

[0618] 实施方案237.实施方案236的方法,其中启动子被由T细胞表达的CAR、CCR或TCR与



其各自的结合配偶体的结合诱导。

[0619] 实施方案238.实施方案237的方法,其中启动子选自以下的核因子:活化T细胞(NFAT)启动子、程序性死亡1(PD-1)启动子、T细胞免疫球蛋白黏蛋白-3(TIM-3)启动子、细胞毒性T淋巴细胞抗原-4(CTLA4)启动子、淋巴细胞活化蛋白3(LAG-3)启动子、肿瘤坏死因子(TNF)相关细胞凋亡诱导性配体(TRAIL)启动子、B-和T-淋巴细胞弱化子(BTLA)启动子、CD25启动子、CD69启动子、Fas配体(FasL)启动子、TIGIT启动子和2B4启动子。

[0620] 实施方案239.实施方案234的方法,其中启动子被配体与由T细胞表达的抑制性受体的结合诱导。

[0621] 实施方案240.实施方案239的方法,其中抑制性受体选自PD-1、CTLA4、TRAIL、LAG-3、BTLA、TIM-3、Fas、TIGIT和2B4。

[0622] 实施方案241.实施方案239的方法,其中启动子选自CPT1a启动子和ATGL启动子。

[0623] 实施方案242.实施方案234的方法,其中启动子被细胞因子与由T细胞表达的细胞因子受体的结合诱导。

[0624] 实施方案243.实施方案242的方法,其中细胞因子选自白介素2(IL2)、白介素7(IL7)、白介素15(IL15)和白介素21(IL21)。

[0625] 实施方案244.实施方案242的方法,其中细胞因子选自白介素10(IL10)和转化生长因子 $\beta$ (TGF $\beta$ )。

[0626] 实施方案245.实施方案242的方法,其中启动子选自T-bet启动子、Eomes启动子、GATA3启动子和CD45RA启动子。

[0627] 实施方案246.实施方案234的方法,其中启动子被细胞与核酸的接触诱导。

[0628] 实施方案247.实施方案246的方法,其中核酸选自病毒DNA、病毒RNA和胞内微小RNA。

[0629] 实施方案248.实施方案247的方法,其中启动子选自I型干扰素(IFN) $\alpha$ 、I型IFN $\beta$ 、IRF3、IRF7、NF $\kappa$ B、AP-1、TNF- $\alpha$ 、IL1和IL6。

[0630] 实施方案249.实施方案234的方法,其中启动子被细胞与代谢物的接触诱导。

[0631] 实施方案250.实施方案249的方法,其中代谢物选自丙酮酸、谷氨酰胺和 $\beta$ -羟基丁酸。

[0632] 实施方案251.实施方案234的方法,其中启动子被细胞中的代谢变化或细胞与引起细胞代谢变化的物质的接触诱导。

[0633] 实施方案252.实施方案251的方法,其中启动子是PKM2启动子。

[0634] 实施方案253.实施方案234的方法,其中启动子被细胞中的特定离子浓度或细胞与特定离子浓度的接触诱导。

[0635] 实施方案254.实施方案253的方法,其中离子是钾或钙。

[0636] 实施方案255.实施方案253的方法,其中启动子选自IL2启动子、TNF $\alpha$ 启动子和IFN $\gamma$ 启动子。

[0637] 实施方案256.实施方案227-255中任一个的方法,其中转基因编码选自以下的分子:CAR、CCR、细胞因子、显性负微环境调节剂、抗体、生物传感器、嵌合受体配体(CRL)、嵌合免疫受体配体(CIRL)、可溶性受体、溶质传递体、酶、核酶、遗传回路、外遗传调节剂、转录激活物、转录阻遏物和非编码RNA。

- [0638] 实施方案257.实施方案256的方法,其中转基因编码细胞因子,任选细胞因子是免疫刺激的。
- [0639] 实施方案258.实施方案257的方法,其中细胞因子是免疫刺激的,细胞因子选自IL2、IL12、IL15和IL18。
- [0640] 实施方案259.实施方案256的方法,其中转基因编码细胞因子,任选细胞因子是免疫抑制的。
- [0641] 实施方案260.实施方案259的方法,其中细胞因子是免疫抑制的,细胞因子选自TGFβ和IL10。
- [0642] 实施方案261.实施方案256的方法,其中转基因编码抗体、任选抗体选自免疫球蛋白、双特异性T细胞衔接器(BiTE)、双抗体、双重亲和重新靶向(DART)、Fab、F(ab')、单链可变片段(scFv)和纳米抗体。
- [0643] 实施方案262.实施方案256的方法,其中转基因编码CAR。
- [0644] 实施方案263.实施方案262的方法,其中CAR与癌抗原结合。
- [0645] 实施方案264.实施方案227-263中任一个的方法,其中使T细胞对靶抗原敏感。
- [0646] 实施方案265.实施方案227-264中任一个的方法,其中编码报道分子的转基因(下文称为“报道转基因”)在T细胞的基因组内整合使得报道转基因的表达在启动子的控制下,优选在T细胞的内源启动子的控制下。
- [0647] 实施方案266.实施方案227-265中任一个的方法,其来源于人。
- [0648] 实施方案267.实施方案266的方法,其中T细胞是原代人T细胞、源自CD34造血干细胞的T细胞、源自胚干细胞的T细胞或源自诱导的多能干细胞的T细胞。
- [0649] 实施方案268.实施方案227-267中任一个的方法,其中转基因通过靶向同源重组整合至第一位点。
- [0650] 实施方案269.实施方案268的方法,其中靶向同源重组通过包括使用锌指核酸酶(ZFN)、转录激活物样效应子核酸酶(TALEN)、成簇有规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)相关蛋白9(Cas9)、Cpf1、致热原、Aureus、大范围核酸酶或Mega-Tal的方法进行。
- [0651] 实施方案270.实施方案227-269中任一个的方法,其中转基因在T细胞基因组内的多个位点整合,使得所述多个位点处的转基因的表达在不同内源启动子的控制下。
- [0652] 实施方案271.实施方案227-270中任一个的方法,其中被导入细胞中的转基因包含在靶向构建体中。
- [0653] 实施方案272.实施方案271的方法,其中靶向构建体包含病毒核酸序列。
- [0654] 实施方案273.实施方案271或272的方法,其中靶向构建体被包在天然或重组腺伴随病毒(AVV)病毒颗粒中。
- [0655] 实施方案274.实施方案273的方法,其中AAV颗粒包含AV6序列。
- [0656] 实施方案275.实施方案271或272的方法,其中靶向构建体被包在非整合型γ-反转录病毒中。
- [0657] 实施方案276.实施方案227-275中任一个的方法,其中靶向构建体中的转基因不与启动子有效连接。
- [0658] 实施方案277.实施方案227-276中任一个的方法,所述方法进一步包括将第二转基因转导至T细胞。

[0659] 实施方案278.实施方案277的方法,其中第一转基因在内源组成型启动子的控制下,第二转基因在内源诱导型启动子的控制下。

[0660] 实施方案279.实施方案278的方法,其中第一转基因是CAR。

[0661] 实施方案280.实施方案279的方法,其中内源组成型启动子是T细胞受体启动子。

[0662] 实施方案281.实施方案280的方法,其中启动子选自T细胞受体 $\alpha$ 链启动子、T细胞受体 $\beta$ 链启动子、CD3  $\gamma$  链启动子、CD3 $\delta$ 链启动子、CD3 $\epsilon$ 链启动子和CD3 $\zeta$ 链启动子。

[0663] 实施方案282.实施方案281的方法,其中启动子是T细胞受体 $\alpha$ 链启动子。

[0664] 实施方案283.一种载体,其包含非整合型 $\gamma$ -反转录病毒。

[0665] 实施方案284.实施方案283的载体,其中非整合型 $\gamma$ -反转录病毒包含突变的整合酶。

[0666] 实施方案285.实施方案284的载体,其中突变的整合酶在DDE基序处突变。

[0667] 实施方案286.实施方案285的载体,其中突变的整合酶具有选自以下的突变:D124A、D124E、D124N、D124V、D183A、D183N、D124A和D183A、D124A和D183N、D124E和D183A、D124E和D183N、D124N和D183A、D124N和D183N、D124V和D183A及D124V和D183N。

[0668] 实施方案287.一种T细胞,其中编码嵌合抗原受体(CAR)的重组核酸序列在细胞基因组内的第一位点处整合使得CAR由细胞在细胞表面表达,且其中编码CAR的核酸在所述第一位点处的整合降低或防止功能性T细胞受体(TCR)复合物在细胞表面表达。

[0669] 实施方案288.实施方案287的T细胞,其中编码CAR的核酸序列在基因组内的单一位点处整合。

[0670] 实施方案289.实施方案287的T细胞,其中编码CAR的核酸序列在细胞基因组的两个位点处整合。

[0671] 实施方案290.实施方案289的T细胞,其中第一位点是编码TCR复合物的蛋白质的基因的外显子。

[0672] 实施方案291.实施方案287-290中任一个的T细胞,其中编码CAR的核酸序列在第一位点处的整合降低或防止选自T细胞受体 $\alpha$ 链、T细胞受体 $\beta$ 链、CD3  $\gamma$  链、CD3 $\delta$ 链、CD3 $\epsilon$ 链和CD3 $\zeta$ 链的蛋白质的表达。

[0673] 实施方案292.实施方案287-291中任一个的T细胞,其中T细胞中整合的核酸序列的表达在内源启动子的控制下。

[0674] 实施方案293.实施方案292的T细胞,其中内源启动子是T细胞受体复合物启动子。

[0675] 实施方案294.实施方案292的T细胞,其中内源启动子是编码T细胞受体 $\alpha$ 链、T细胞受体 $\beta$ 链、CD3  $\gamma$  链、CD3 $\delta$ 链、CD3 $\epsilon$ 链或CD3 $\zeta$ 链的基因的启动子。

[0676] 实施方案295.实施方案287-294中任一个的T细胞,其中CAR与癌抗原结合。

[0677] 实施方案296.实施方案287-295中任一个的T细胞,其中T细胞选自细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、CD4<sup>+</sup>亚型、CD8<sup>+</sup>亚型、中央记忆型T细胞(TCM)、干细胞记忆T细胞(TSCM)、效应记忆T细胞、效应T细胞、Th1细胞、Th2细胞、Th9细胞、Th17细胞、Th22细胞、Tfh(滤泡辅助性)细胞和调节T细胞。

[0678] 实施方案297.实施方案287-296中任一个的T细胞,其来源于人。

[0679] 实施方案298.实施方案297的T细胞,其中T细胞是原代人T细胞、源自CD34造血干细胞的T细胞、源自胚干细胞的T细胞或源自诱导的多能干细胞的T细胞。

[0680] 实施方案299.实施方案287-298中任一个的T细胞,其中编码CAR的核酸序列通过靶向同源重组整合至第一位点。

[0681] 实施方案300.实施方案299的T细胞,其中靶向同源重组使用锌指核酸酶(ZFN)、转录激活物样效应子核酸酶(TALEN)、成簇有规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)相关蛋白9(Cas9)、Cpf1、大范围核酸酶或Mega-Tal进行。

[0682] 实施方案301.实施方案287的T细胞,其中编码CAR的核酸序列在细胞基因组内的多个位点处整合,使得所述多个位点处的编码CAR的核酸序列的表达在不同内源启动子的控制下。

[0683] 实施方案302.实施方案287-301中任一个的T细胞,其中所述编码CAR的核酸序列还在细胞基因组内的第二位点处整合使得CAR由细胞在细胞表面表达。

[0684] 实施方案303.实施方案302的T细胞,其中编码CAR的核酸在所述第二位点处的整合还降低或防止功能性TCR复合物在细胞表面表达,其中所述第一位点和所述第二位点在不同的基因上。

[0685] 实施方案304.实施方案287-303中任一个的T细胞,其中编码第二CAR的第二核酸序列在细胞基因组内的第二位点处整合使得第二CAR由细胞在细胞表面表达,并使得第二核酸序列的表达在所述第二位点的内源启动子的控制下,其中所述第一位点和所述第二位点在不同的基因上。

[0686] 实施方案305.一种人T细胞,其中编码CAR的无启动子重组核酸序列在细胞基因组的位点处整合,所述该位点为TCR $\alpha$ 链的第一外显子,使得CAR在内源TCR $\alpha$ 链启动子的控制下表达以在细胞表面产生所述CAR,且其中CAR在所述位点处的整合降低或防止功能性TCR $\alpha$ 链的表达。

[0687] 实施方案306.实施方案305的人T细胞,其中CAR与CD19结合。

[0688] 实施方案307.一种分离的T细胞群,其包含大量的实施方案287-306中任一个的细胞。

[0689] 实施方案308.一种药物组合物,其包含治疗有效量的实施方案中287-306任一项的细胞和药学上可接受的载体。

[0690] 实施方案309.一种包含治疗有效量的T细胞群和药学上可接受的载体的药物组合物,所述群包含大量的实施方案287-306中任一个的细胞。

[0691] 实施方案310.一种治疗需要CAR疗法的对象的方法,所述方法包括给予对象治疗有效量的实施方案287-306中任一个的细胞。

[0692] 实施方案311.一种治疗需要CAR疗法的对象的方法,所述方法包括给予对象实施方案308的药物组合物。

[0693] 实施方案312.一种治疗需要CAR疗法的对象的方法,所述方法包括给予对象治疗有效量的实施方案307的细胞群。

[0694] 实施方案313.一种治疗需要CAR疗法的对象的方法,所述方法包括给予对象实施方案309的药物组合物。

[0695] 实施方案314.实施方案310-313中任一个的方法,其中对象患有癌症,且其中CAR与癌症的癌抗原结合。

[0696] 实施方案315.实施方案314的方法,其中癌症是白血病。

- [0697] 实施方案316.实施方案310-314中任一个的方法,其中对象患有肿瘤。
- [0698] 实施方案317.实施方案310-316中任一个的方法,其中对象是人,且其中细胞来源于人。
- [0699] 实施方案318.实施方案310-317中任一个的方法,其中细胞对于对象是自体的。
- [0700] 实施方案319.实施方案310-317中任一个的方法,其中细胞对于对象是非自体的。
- [0701] 实施方案320.一种产生嵌合抗原受体(CAR)并缺乏功能性T细胞受体(TCR)复合物的T细胞的方法,所述方法包括:
- [0702] 将以下导入T细胞:
- [0703] (i)编码CAR的核酸序列,和
- [0704] (ii)适于核酸序列在细胞基因组内的位点处靶向整合的同源重组系统,藉此同源重组系统使编码CAR的核酸序列在细胞基因组内的所述位点处整合使得CAR在所述位点处的整合降低或防止功能性T细胞受体复合物在细胞表面表达,从而产生表达CAR并缺乏功能性TCR复合物的T细胞。
- [0705] 实施方案321.实施方案320的方法,其中CAR的表达在内源启动子的控制下。
- [0706] 实施方案322.实施方案321的方法,其中内源启动子是编码T细胞受体 $\alpha$ 链、T细胞受体 $\beta$ 链、CD3 $\gamma$ 链、CD3 $\delta$ 链、CD3 $\epsilon$ 链或CD3 $\zeta$ 链的基因的启动子。
- [0707] 实施方案323.实施方案320-322中任一个的方法,其中同源重组系统包含锌指核酸酶(ZFN)、转录激活物样效应子核酸酶(TALEN)、或成簇有规间隔的短回文重复序列(CRISPR)相关蛋白9(Cas9)、Cpf1、大范围核酸酶或Mega-Tal。
- [0708] 实施方案324.实施方案320-323中任一个的方法,其中被导入细胞中的编码CAR的核酸序列包含在靶向构建体中。
- [0709] 实施方案325.实施方案324的方法,其中靶向构建体包含腺伴随病毒2(AAV2)序列。
- [0710] 实施方案326.实施方案324或325的方法,其中靶向构建体被包在天然或重组腺伴随病毒(AVV)病毒颗粒中。
- [0711] 实施方案327.实施方案326的方法,其中AAV颗粒包含AV6序列。
- [0712] 实施方案328.实施方案320-327中任一个的方法,其中靶向构建体中编码CAR的核酸序列不与启动子有效连接。
- [0713] 实施方案329.实施方案320-328中任一个的方法,其中靶向构建体以5'-3'的顺序包含:第一病毒序列、左同源臂、编码自切割猪捷申病毒2A的核酸序列、编码CAR的核酸序列、多腺苷酸化序列、右同源臂和第二病毒序列第二病毒序列。
- [0714] 实施方案330.实施方案329的方法,其中第一或第二病毒序列来自腺伴随病毒(AAV)。
- [0715] 实施方案331.实施方案330的方法,其中AAV是AAV2、AAV5或AAV6。
- [0716] 实施方案332.一种诱导的多能干细胞,其中编码嵌合抗原受体(CAR)的重组核酸序列在细胞基因组内的第一位点处整合使得CAR由细胞在细胞表面表达,且其中编码CAR的核酸在所述第一位点处的整合降低或防止功能性T细胞受体(TCR)复合物在细胞表面表达。
- [0717] 要了解,还提供了在本文提供的本发明定义内的不实质性影响本发明的不同实施方案的活性的修饰。因此,下列实施例旨在说明但不限制本发明。

[0718] 8. 实施例

[0719] 8.1 实施例1:通用CAR T细胞的一步生产法。

[0720] 下面描述的是通用CAR T细胞的一步生产的策略。

[0721] 该方法包括用在TCR $\alpha$ 启动子控制下的CAR产生通用CAR T细胞的二合一基因组编辑策略。为此,通过使CAR靶向TCR $\alpha$ 恒定链基因来破坏TCR表达,使用内源启动子表达CAR。设计靶向TRAC基因的第一外显子的特制核酸酶(TALEN和CRISPR/cas9),使用AAV载体通过同源定向修复(HDR)以促进CAR与TRAC基因符合读框地整合。

[0722] 特制核酸酶:TALEN和gRNA被设计成靶向TRAC基因上的第一外显子。所靶定的序列位于TCR $\alpha$ 跨膜结构域的上游。该结构域对于TCR $\alpha$ 和 $\beta$ 装配和寻址至细胞表面是必需的。在该基因座非同源末端连接(NHEJ)或CAR通过HDR的整合有效地破坏了TCR复合物。

[0723] TRAC-gRNA序列:

[0724] C\*A\*G\*GGUUCUG GAUAUCUGUG UUUUAGAGCU AGAAAUAGCA AGUUAUAAUA AGGCUAGUCC GUUAUCAACU UGAAAAAGUG GCACCGAGUC GGUGCU\*U\*U\*U(SEQ ID NO:24)

[0725] \*2'-O-甲基3'硫代磷酸酯

[0726] TALEN靶序列(间隔区用下划线表示):

[0727] TTGTCCCACAGATATCC AGAACCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGA(SEQ ID NO:25)

[0728] 信使RNA:编码TALEN的质粒通过Transposagen合成并用AgeI线性化。TALEN mRNA体外使用mMessage mMachine T7 Ultra试剂盒(Life Technologies;Carlsbad,CA)转录和磷酸化。RNA用RNeasy柱(Qiagen;Valencia,CA)纯化,并使用Nanodrop机器定量测定。RNA的品质在变性甲醛/MOPS琼脂糖凝胶上验证。修饰的指导RNA(gRNA)和Cas9 mRNA通过TriLink Biotechnologies合成。将gRNA以1 $\mu$ g/ $\mu$ L在cytoporation T缓冲液(Harvard Apparatus;Holliston,MA)中重配。

[0729] AAV:对于TRAC靶向(参见图1A),根据pAAV-GFP主链(Cellbiolabs;San Diego,CA),设计并克隆pAAV-TRAC-P2A-1928z,其含有两侧接TALEN和gRNA靶向序列的1.9kb基因组TRAC(通过PCR扩增)、与TRAC的第一外显子符合读框的自切割P2A肽、接着是用于临床试验的1928z CAR(Brentjens et al.,Sci.Transl.Med.5(177):177ra38.doi:10.1126/scitranslmed.3005930(2013))。简单地说,CAR包含对人CD19有特异性的单链可变片段19scFV,人CD19的前面是CD8a前导序列肽,后面是CD28铰链-跨膜-胞内区和CD3 $\zeta$ 胞内域。该盒终止于牛生长激素polyA信号(BGHpA)。

[0730] 细胞:来自健康志愿者供体的血沉棕黄层获自纽约血液中心(New York Blood Center)。外周血单核细胞通过密度梯度离心分离,T淋巴细胞然后使用Pan T细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotech;San Diego,CA)纯化。细胞以10<sup>6</sup>个细胞/ml的密度用补充含200U/ml IL-2(Miltenyi Biotech)的人血清(Gemini Bioproducts;West Sacramento,CA)的X-vivo 15培养基(Lonza;Basel,Switzerland)中的Dynabeads(1:1珠粒:细胞)Human T-Activator CD3/CD28(ThermoFisher;Carlsbad CA)激活。每2天更换培养基,细胞以10<sup>6</sup>个细胞/ml接种。

[0731] 基因打靶:在48小时活化后,用磁力除去CD3/CD28珠粒,将细胞在珠粒不存在时培养12-16小时。采用AgilePulse MAX系统(Harvard Apparatus),通过TALEN或Cas9/gRNA RNA的电转移转染T淋巴细胞。简单地说,将细胞在cytoporation培养基T(Harvard

Apparatus)中洗涤。然后将细胞沉淀,以 $30 \times 10^6$ 个细胞/ml重新悬浮在cytoporation培养基T中。将 $3 \times 10^6$ 个细胞与规定剂量的编码特制核酸酶的各mRNA混合至0.2cm小杯中。电穿孔包括600V下的2次0.1ms脉冲,接着100V下的4次0.2ms脉冲。在电穿孔后,将细胞稀释至培养基中,并在 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 下孵育。在电穿孔后2-4小时将AAV加入培养物中,接着再继续 $30^\circ\text{C}$ 孵育20小时。以规定的MOI ( $10^5$ - $10^6$  MOI)加入AAV供体。随后,编辑的细胞采用标准条件培养( $37^\circ\text{C}$ 和在T细胞生长培养基下扩增,需要时每2-3天补充以保持 $\sim 10^6$ 个细胞/ml的密度)。

[0732] 这些条件在供体间是高度可再现的,并在具有TALEN和CRISPR两者的单一步骤中产生多达50%的TCR-/CAR+T细胞。

[0733] 为了获得TCR-阴性T细胞,使用磁性PE-抗TCR $\alpha$ b和抗PE微珠和LS柱(Miltenyi Biotech),从柱中除去TCR-阳性T细胞。

[0734] 反转录病毒载体构建体和反转录病毒产生:编码SFG  $\gamma$ -反转录病毒载体的质粒(Rivière et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92(15):6733-6737(1995))采用标准分子生物学技术制备。之前描述了SFG-1928z和SFG-P28z的合成(Brentjens et al., Nat Med. 9(3):279-286(2003), Brentjens et al., 2007 Clin. Cancer Res. 13(18Pt 1):5426-5435(2007); Maher et al., Nat. Biotechnol. 20(1):70-5(2002))。如前所述使用来源于转导的gpg29成纤维细胞(H29)的VSV-G假型反转录病毒上清液来构建稳定的反转录病毒生产细胞系(Gong et al., Neoplasia 1:123-127(1999))。

[0735] 反转录病毒转导:通过Retronectin(Takara; Mountain View, CA)包被的致癌反转录病毒载结合板上的离心,连续2天对T细胞进行转导。

[0736] 细胞毒性测定法:用CAR转染的T细胞的细胞毒性通过基于标准萤光素酶的测定法测定。简单地说,表达萤火虫萤光素酶-GFP的NALM6用作靶细胞。效应(E)和肿瘤靶(T)细胞使用黑色壁96孔板,板中含NALM6培养基中的 $1 \times 10^5$ 个靶细胞,总体积为100 $\mu\text{l}$ /孔,按规定的E/T比率一式三份共培养。以相同的细胞密度接种单独的靶细胞以测定最大萤光素酶表达(相对光单位;RLU<sub>max</sub>)。18小时后,将100 $\mu\text{l}$ 萤光素酶底物(Bright-Glo, Promega; Madison, WI)直接加入各孔中。在发光读板仪或Xenogen IVIS Imaging System(Xenogen; Alameda, CA)中检测发射光,并使用Living Image软件(Xenogen)定量测定。以 $[1 - (\text{RLU样品}) / (\text{RLU}_{\text{max}})] \times 100$ 求出裂解物。

[0737] 小鼠系统肿瘤模型:所用小鼠模型为8-12周龄NOD.Cg-PrkdcscidIl2rgtm1Wjl/SzJ(NSG)小鼠(Jackson Laboratory; Bar Harbor, ME),根据MSKCC Institutional Animal Care and Use Committee批准的方案进行。通过尾静脉注射用 $0.5 \times 10^6$ 个FFLuc-GFP NALM6细胞接种小鼠,4天后接着注射 $2 \times 10^5$ 个CAR T细胞。NALM6产生非常均匀的肿瘤负荷,在治疗前未剔除小鼠。没有使用盲法。生物发光成像采用带Living Image软件(Xenogen)的Xenogen IVIS Imaging System(Xenogen)用于获取成像数据集。如前所述评价肿瘤负荷(Gade et al., Cancer Res. 65(19):9080-9088(2005))。

[0738] 图1A显示特制核酸酶(TALEN或CRISPR/Cas9)诱导的靶向整合至TCR $\alpha$ 恒定(TRAC)基因座的示意图。靶向构建体(AAV6)含有两侧是同源序列(左同源臂,LHA和右同源臂,RHA)的CAR基因。一旦整合的CAR表达被内源TCR $\alpha$ 启动子驱动,同时TRAC基因座便被破坏(TRA $\nu$ :TCR $\alpha$ 可变区;TRAJ:TCR $\alpha$ 连接区;2A:自切割猪捷申病毒2A序列;pA:牛生长激素PolyA序列)。图1B显示在T细胞用TRAC TALEN mRNA转染并以标示的MOI加入AAV6后5天的代表性TCR/CAR

流式细胞图。如图1B所示,随AAV MOI增加,CAR的表达增加,TCR的表达降低。图1C显示取决于AAV6MOI的TCR破坏(KO:敲除)和靶向整合(KI:敲入)的百分比的柱状图。百分比通过FACS分析评价。图1D显示在CAR载体化进入T细胞后5天的平均CAR表达平均荧光强度(MFI) (n=6-8个独立实验)。结果显示TRAC基因座中CAR的靶向整合导致具有类似的CAR表达水平的均质T细胞群。图1E显示衡量CAR表达中的离散的CAR+T细胞的变异系数(标准差与均值的比率)。TRAC-P2A-1928z:靶向整合至TRAC。SFG-1928z:使用SFG反转录病毒的半随机整合。\*\*\*\*P<0.0001(非配对T检验)。这些结果显示TRAC基因座中CAR的靶向整合导致具有类似表达的均质T细胞群。

[0739] 图2A显示表明CAR和TCR表达的流式细胞术分析。TRAC-P2A-1928z按图1产生。TALEN产生的TCR-细胞用SFG-1928z反转录病毒转导。TCR+细胞用SFG-1928z或SGF-P28z反转录病毒转导。图2B显示在用CD19+靶细胞每周刺激后所标示的CAR T细胞的累积细胞计数,表明表达1928z的细胞显示体外增殖。图2C显示采用18小时生物发光测定法,采用萤火虫萤光素酶(FFL)-表达NALM6作为靶细胞的细胞毒活性。表达1928z的细胞显示细胞毒活性。图2D和2E显示携带FFL-NALM6的小鼠用 $2 \times 10^5$ 个CAR T细胞治疗。肿瘤负荷表示为在40日时间内每周每只动物定量测定的生物发光信号。定量测定是在所有指定时间点每只动物的腹部和背部采集的平均光子计数,并表示为发光。图2E中的每条线代表1只小鼠。n=7只小鼠/组。右下图是图2D和2E中小鼠存活率的Kaplan-Meier分析。这些结果表明CAR靶向整合至TRAC导致存活显著长于使用SFG反转录病毒的半随机整合的存活。

[0740] 总之这些结果显示,在注射的CAR T细胞的同等剂量下,具有靶向进入TRAC基因座的CAR的细胞比用CAR经反转录病毒转导的细胞更强有效。

[0741] 如上所述,通过无启动子CAR基因盒靶向整合至TCR $\alpha$ 恒定链(TRAC) 第一外显子,开发出通用CAR T细胞一步生产的策略。这导致在内源TCR $\alpha$ 启动子的控制下的CAR表达并伴随TCR $\alpha$ 基因表达被破坏。因为TCR复合物的所有组分是其定位于胞质膜所必需的,TCR $\alpha$ 破坏产生TCR阴性细胞。该方法与通常使用的基因组编辑平台(例如TALEN,CRISPR/Cas9,ZFN)相适宜,并在T细胞中导致使用AAV供体模板的TRAC靶位点处的同源重组。对在T细胞中使用AAV6供体模板的TALEN和CRISPR/Cas9促进同源重组的效率进行了比较。情况是确定的,产生多至50%的在单一步骤中结合了靶基因破坏和CAR靶向插入的通用CAR T细胞。CAR转基因的靶向整合在分子学上得到证实,这在人外周血T细胞中产生高均质和稳定的CAR表达。与经反转录病毒转导的CAR T细胞相比,这些T细胞显示相同的体外肿瘤裂解活性和增殖,这支持其在体内抗肿瘤活性中的有用性。内源TCR $\alpha$ 启动子提供未曾预期的益处。该方法在人外周血T细胞中提供高均质和稳定的CAR表达,以及改进的T细胞持久性。最重要的是,与经反转录病毒转导的CAR T细胞相比,这些T细胞显示较高的体外和体内肿瘤裂解活性、增殖和持久性,同时通过减少或防止功能性T细胞受体复合物在细胞表面表达排除了其移植物抗宿主病潜力。本文所述方法,其将通用T细胞生产的可伸缩性与靶向CAR基因整合的一致性和安全性结合,可用于开发按需要可以放大和容易向患者提供的成品CAR疗法。

[0742] 8.2实施例2:用CRISPR/Cas9使CAR靶向的TRAC基因座提高肿瘤排斥。

[0743] 该实施例显示进行了由转基因编码的CAR的T细胞的表达,其中转基因的表达在内源T细胞启动子特别是人T细胞受体 $\alpha$ 链(TRAC)启动子的控制下。下面描述的是表明将CD19特异性CAR导向人T细胞受体 $\alpha$ 链(TRAC)基因座不仅导致人外周血T细胞中均匀的CAR表达,



而且还提高T细胞效能的实验,其中在急性成淋巴细胞白血病小鼠模型中,经编辑的细胞远远胜过常规形成的CAR T细胞。进一步表明了使CAR靶向TRAC基因座防止张力性CAR信号转导并在单次或重复暴露于抗原后确立有效的内化和CAR的重新表达,延长效应T细胞分化和耗尽。这些结果揭示了免疫生物学的方面,并强调CRISPR/Cas9基因组编辑提高免疫疗法的巨大潜力。

[0744] 方法.指导RNA:设计指导RNA(gRNA) gRNA以靶向TCR $\alpha$ 基因 (TRAC) 恒定链的第一外显子。所靶定的序列位于TCR $\alpha$ 跨膜结构域的上游。该结构域是TCR $\alpha$ 和 $\beta$ 装配和寻址至细胞表面所必需的。在该基因座上非同源末端连接(NHEJ) 和CAR通过HDR的整合两者都将有效地破坏TCR复合物。

[0745] 对于B2M,设计了靶向B2M基因的第一外显子的gRNA和TALEN(转录激活物样效应子核酸酶)两者,用TALEN获得较高的切割效率。采用相同方案,从两种方法中获得类似的细胞毒性和特异性,且就活性和增殖而言,所获得的CAR T细胞不可分辨。出于生产原因,在该研究中主要使用B2M TALEN。

[0746] TRAC-gRNA序列:

[0747] C\*A\*G\*GGUUCUG GAUAUCUGUG UUUUAGAGCU AGAAAUAGCA AGUAAAAUA AGGCUAGUCC GUUAUCAACU UGAAAAAGUG GCACCGAGUC GGUGCU\*U\*U\*U (SEQ ID NO:26)

[0748] B2M-gRNA序列:

[0749] G\*G\*C\*CACGGAG CGAGACAUCU UUUUAGAGCU AGAAAUAGCA AGUAAAAUA AGGCUAGUCC GUUAUCAACU UGAAAAAGUG GCACCGAGUC GGUGCU\*U\*U\*U (SEQ ID NO:27)

[0750] \*2'-O-甲基3'硫代磷酸酯

[0751] B2M-TALEN靶向序列:

[0752] TTAGCTGTGCTCGCGC (TACTCTCTCTTTCTG) GCCTGGAGGCTATCCA (SEQ ID NO:28)。左TAL效应物(间隔区)右TAL效应物。

[0753] 信使RNA:修饰的指导RNA(gRNA) 和Cas9mRNA通过TriLink Biotechnologies合成 (San Diego,CA)。将指导RNA以1 $\mu$ g/ $\mu$ L在cytoporation T缓冲液(Harvard Apparatus; Holliston,MA)中重配。

[0754] AAV:根据pAAV-GFP主链(细胞Biolabs;San Diego,CA),设计和克隆了pAAV-TRAC-1928z,其含有两侧是gRNA靶向序列的1.9kb基因组TRAC(通过PCR扩增)、与TRAC的第一外显子符合读框的自切割P2A肽、接着是用于临床试验的1928z CAR (Brentjens et al., Sci.Trans.Med.5:177ra138(2013))。简单地说,CAR包含对人CD19有特异性的单链可变片段19scFV,前面是CD8a前导序列肽、后面是CD28铰链-跨膜-胞内区和CD3 $\zeta$ 胞内域。CAR cDNA接着是牛生长激素polyA信号(bGHPA)。当靶向B2M基因座时,遵循类似策略,不同的是不需要P2A序列,因为1928z-pA序列被置于B2M基因的ATG的读框中。当使用外源启动子(EF1 $\alpha$ 、LTR、PGK或PGK100)时,将启动子-1928z-pA盒按相反方向置于相同的TRAC或B2M进入点。

[0755] 细胞:来自健康志愿者供体的血沉棕黄层获自纽约血液中心。外周血单核细胞通过密度梯度离心分离,T淋巴细胞然后使用Pan T细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotech;San Diego,CA)纯化。将细胞以10<sup>6</sup>个细胞/ml的密度用含补充了5%人血清(Gemini Bioproducts;West Sacramento,CA)与200U/ml IL-2(Miltenyi Biotech)的X-vivo 15培养基(Lonza;Basel,Switzerland)中的Dynabeads (1:1珠粒:细胞)的Human T-Activator

CD3/CD28 (ThermoFisher; Carlsbad, CA) 激活。每2天更换培养基, 以 $10^6$ 个细胞/ml接种细胞。

[0756] 基因打靶: 在启动T细胞活化后48小时, 用磁力除去CD3/CD28珠粒, 使用AgilePulse MAX系统 (Harvard Apparatus), 通过Cas9mRNA和gRNA的电转移来转移T细胞。将 $3 \times 10^6$ 个细胞与5 $\mu$ g Cas9和5 $\mu$ g gRNA混合装入0.2cm小杯中。在电穿孔后, 将细胞稀释至培养基中, 在37 $^{\circ}$ C/5%CO<sub>2</sub>下孵育。在电穿孔后2-4小时, 以规定的MOI ( $1 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$ 范围) 将重组AAV6供体载体 (由SignaGen生产; Gaithersburg, MD) 加入培养物中。随后, 经编辑的细胞采用标准条件培养 (37 $^{\circ}$ C和在T细胞生长培养基中扩增, 按需要每2-3天补充以保持 $\sim 1 \times 10^6$ 个细胞/ml的密度)。

[0757] 为获得TCR-阴性T细胞, 使用磁性生物素-抗TCR $\alpha\beta$ 和抗生物素微珠和LS柱 (Miltenyi Biotech), 将TCR-阳性T细胞从培养物中排除。有关靶向构建体和策略的详情参见图7和14。

[0758] 反转录病毒载体构建体、反转录病毒产生和转导: 编码SFG  $\gamma$ -反转录病毒 (RV) 载体的质粒 (Rivière et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6733-6737 (1995)) 按之前所述制备 (Brentjens et al., Nat. Med. 9, 279-286, (2003); Maher et al., Nat. Biotechnol. 20:70-75 (2002))。如前所述, 将来源于转导的gpg29成纤维细胞 (H29) 的VSV-G假型反转录病毒上清液用来构建稳定的反转录病毒生产细胞系 (Gong et al., Cancer patient T cells genetically targeted to prostate-specific membrane antigen specifically lyse prostate cancer cells and release cytokines in response to prostate-specific membrane antigen. Neoplasia 1:123-127 (1999))。在Retronectin (Takara) 包被板上通过离心转导T细胞。

[0759] 细胞系: NALM-6和NIH/3T3获自ATCC, 并使用MycoAlert支原体检测试剂盒 (Lonza), 针对支原体污染进行常规检查。转导NALM-6细胞以表达萤火虫萤光素酶-GFP并转导NIH/3T3细胞以表达人CD19 (Brentjens et al., Nat. Med. 9, 279-286, (2003); Zhao et al., Cancer Cell 28:415-428 (2015))。

[0760] 细胞毒性测定法: 用CAR转染的T细胞的细胞毒性通过基于标准萤光素酶的测定法测定。简单地说, 表达萤火虫萤光素酶-GFP的NALM-6用作靶细胞。效应 (E) 和肿瘤靶 (T) 细胞使用黑色壁96孔板, 板中含NALM6培养基中的 $1 \times 10^5$ 个靶细胞, 总体积为100 $\mu$ l/孔, 按规定的E/T比率一式三份共培养。以相同的细胞密度接种单独的靶细胞以测定最大萤光素酶表达 (相对光单位; RLU<sub>max</sub>)。18小时后, 将100 $\mu$ l萤光素酶底物 (Bright-Glo, Promega; Madison, WI) 直接加入各孔中。在发光读板仪或Xenogen IVIS Imaging System (Xenogen; Alameda, CA) 中检测发射光, 并使用Living Image软件 (Xenogen) 定量测定。以 $[1 - (\text{RLU样品}) / (\text{RLU}_{\text{max}})] \times 100$ 求出裂解物。

[0761] 抗原刺激和增殖测定法: 表达人CD19的NIH/3T3用作人工抗原呈递细胞 (Brentjens et al., Nat. Med. 9, 279-286, (2003))。对于每周的刺激, 在加入X-vivo 15+人血清+50U IL-2/mL中的 $5 \times 10^5$ 个CAR T细胞之前12小时, 将 $3 \times 10^5$ 经照射的CD19+AAPC接种在24孔板。每隔2天, 对细胞计数, 并加入培养基以达到 $1 \times 10^6$ T个细胞/ml的浓度。对于重复的近端刺激 (图6D), 在24h (2次刺激) 或每隔12h (4次刺激) 后, 将细胞转移到接种3T3-CD19的新的孔中。针对各种条件, 对T细胞计数, 并每12小时通过FACS针对CAR、表型和耗尽标志物

表达进行分析。

[0762] 抗体和胞内染色: CAR用山羊抗小鼠Fab (Jackson ImmunoResearch, 115-606-003; West Grove, PA) 标记。对于T细胞表型确定, 使用下列抗体: 来自BD biosciences (San Jose, CA) 的小鼠抗人BUV-395CD4 (563552)、APC-cy7-CD8 (557834)、BV-421-CD62L (563862)、BV-510-CD279 (PD1, 563076); 来自eBiosciences (Carlsbad, CA) 的小鼠抗人APC-CD25 (17-0259-42)、FITC-CD45RA (11-0458-42)、PerCP-eFluor710 CD223 (LAG-3, 46-2239-42) 和来自Biolegend (San Diego, CA) 的FITC小鼠抗人CD366 (TIM-3, 345032)。对于胞内染色, 按照生产商的推荐, 使用BD Cytofix/Cytoperm Plus试剂盒 (BD Biosciences) 将T细胞固定和透化。将抗CD8-FITC (克隆HIT8a, ebiosciences) 和抗CD4-BUV-395 (克隆SK3, BD Horizon; BD Biosciences) 用于胞外染色。抗TNF-Alexa Fluor 700 (克隆MAb11, BD pharmingen; BD Biosciences)、抗IL2-BV421 (克隆5344.111, BD Horizon) 和抗IFN $\gamma$ -BV510 (克隆B27, BD Horizon) 用于胞内染色。

[0763] 小鼠系统肿瘤模型: 根据MSKCC Institutional Animal Care and Use Committee批准的方案, 使用8-12周龄NOD/SCID/IL-2R $\gamma$  失效 (NSG) 雄性小鼠 (Jackson Laboratory)。过尾静脉注射用 $0.5 \times 10^6$ 个FFLuc-GFP NALM-6细胞接种小鼠, 4天后接着注射 $2 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5$ 或 $5 \times 10^4$ 个CAR T细胞。NALM-6产生非常均匀的肿瘤负荷, 在治疗前未剔除小鼠。未使用随机或盲法。生物发光成像采用带Living Image软件 (Xenogen) 的Xenogen IVIS Imaging System (Xenogen) 用于获取成像数据集。如前所述评价肿瘤负荷 (Gade et al., Cancer Res. 65:9080-9088 (2005))。

[0764] RNA提取和实时定量PCR: 按照生产商说明书, 使用RNeasy试剂盒 (QIAGEN; Hilden, Germany) 联合QIAshredder (QIAGEN), 从T细胞提取总RNA。使用NanoDrop分光光度计 (Thermo Fisher Scientific; Carlsbad, CA), 通过紫外光谱学评价RNA浓度和质量。使用SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen; Carlsbad, CA), 以随机六聚物和寡聚dT的1:1体积比, 使用100-200ng总RNA制备cDNA。完成的cDNA合成反应物在37°C下用2U RNase H处理20分钟。定量PCR使用Absolute Blue qPCR SYBR Green Low ROX Mix (Thermo Fisher Scientific) 和下列引物对进行: 核糖体18S: 正向5'-aaccggttgaacccatt (SEQ ID NO:29), 反向5'-ccatccaatcggtagtagcg (SEQ ID NO:30); 1928z: 正向5'-cgtgcagtctaaagacttg (SEQ ID NO:31), 反向5'-ataggggacttggacaaagg (SEQ ID NO:32); T-bet: 正向5'-gaaaccagttcattgccgt (SEQ ID NO:33), 反向5'-ccccaaaggaattgacagttg (SEQ ID NO:34); EOMES: 正向5'-actggttcccactggatgag (SEQ ID NO:35), 反向5'-ccacgccatcctctgtaact (SEQ ID NO:36); GATA3: 正向5'-cacaaccacactctggagga (SEQ ID NO:37), 反向5'-ggtttctggtctggatgcct (SEQ ID NO:38)。PCR测定法在QuantStudio™ 7Flex系统 (Thermo Fisher Scientific) 上运行, Ct值用QuantStudio实时PCR软件获取。基因表达的相对变化用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析。对于所分析的每组T细胞, 使RNA表达水平归一化至CAR+T细胞的百分比。

[0765] 统计: 所有实验数据表示为均值 $\pm$ s.e.m.。未应用统计学方法预先测定样品大小。应用用于参数数据 (样品大小 $>10$ ) 的Welch两样品t-检验或用于非参数数据 (样品大小 $<10$ ) 的Mann-Whitney检验, 对各组进行比较。采用Welch校正, 因为方差不相同。对于在CAR刺激时CAR MFI和RNA水平的比较, 应用ANOVA F-检验。统计分析用GraphPad Prism 7软件

(GraphPad Software;La Jolla,CA)进行。

[0766] 为了破坏TRAC基因座并将1928z CAR (Brentjens et al.,*Sci.Transl.Med.*5, 177ra138(2013))置于其转录控制下(TRAC-CAR),设计指导RNA靶向TRAC第一外显子的5'端和编码自切割P2A肽的腺伴随病毒(AAV)载体修复矩阵接着是CAR cDNA(图3A和图7A)。Cas9mRNA和gRNA的T细胞电穿孔产生高敲除(KO)频率(~70%,图3B和图7D)而没有有限的细胞死亡。敲入(KI)与AAV剂量成比例,在感染复数(MOI)为106时超过40%(图3B和图7C和7E)。本文首次报道的在TRAC基因座上的这种有效打靶,与在T细胞中在AAVS1、CCR5或CD40L基因座上达到的水平相当(Sather et al.,*Sci.Transl.Med.*7:307ra156(2015);Wang et al.,*Nucleic Acids Res.*44:e30(2016);Hubbard et al.,*Blood* 127:2513-2522(2016))。大约95%的CAR+细胞为T细胞受体(TCR)阴性(图7G),证实了二合一TCR-敲除和CAR-敲入策略。所观察到的5%的CAR+/TCR+细胞与双重-TCR $\alpha$ -表达T细胞的典型频率一致(Corthay et al.,*J.Autoimmun.*16:423-429(2001))。通过对全基因组的AAV载体整合作图,证实了靶向特异性(de Vree et al.,*Nat.Biotechnol.*32:1019-1025(2014)),这证实了对TRAC整合的高选择性和脱靶热点的缺乏(图8)。这些结果表明CRISPR/Cas9提供的基因靶向的高效率和准确性和我们可重复产生多达 $50 \times 10^6$ 个TRAC-CAR T细胞的能力。在多个供体中发现了TRAC-CAR的均质一致的表达,与反转录病毒编码的CAR(RV-CAR)形成对照,后者显示混杂表达,具有两倍较高的平均表达(图3C和3D)。

[0767] 体外功能研究就在用CD19+抗原呈递细胞每周刺激的反应中的细胞毒性或T细胞增殖而言,在TRAC编码的和随机整合的1928z之间未显示任何显著差异(Brentjens et al.,*Nat.Med.*9:279-286(2003))(图9A和9C)。这些实验包括对照组,其中表达经反转录病毒转导的CAR的TCR被破坏的T细胞(RV-CAR-TCR-)同样对RV-CAR TCR+T细胞起反应(图9A)。然而,体内在pre-B急性成淋巴细胞白血病NALM-6小鼠模型中使用“CAR应激试验”,其中逐渐降低CAR T细胞剂量显示不同T细胞群的功能限制(Brentjens et al.,*Nat.Med.*9:279-286(2003);Zhao et al.,*Cancer Cell* 28:415-428(2015))。TRAC-CAR、RV-CAR和RV-CAR-TCR-T细胞在其抗肿瘤活性中显著不同。在每种T细胞剂量下TRAC-CAR T细胞诱导远远较大的反应并显著延长中值存活(图3E和图10A)。TCR破坏对RV-CAR T细胞的效能没有可分辨的作用。用 $1 \times 10^5$ 个CAR T细胞注射的小鼠中的骨髓研究显示10天后在肿瘤部位的类似T细胞蓄积(图3F)。然而,只有TRAC-CAR T细胞达到肿瘤控制(图3G和3H)。到第17天,TRAC-CAR T细胞在数量上超过RV-CAR T细胞,因为后者与第10天相比减少,尽管CD19+肿瘤细胞继续存在(图3F-3G和图10B)。此外,CAR T细胞群在其T细胞分化和耗尽的程度上不同,正如分别反映在终末效应细胞(CD45RA+CD62L-)的比例和共表达的PD1、LAG3和TIM3的蓄积上(Blackburn et al.,*Nat.Immunol.*10:29-37(2009))。因此,常规CAR T细胞显示到第17天耗尽标志物的多达50%阳性表达,与小于2%的TRAC-CAR T细胞形成对照,这也保留了较大的效应记忆组成(图3I-3J和图10C-10D)。该耗尽表型的终末分化和获取与抗肿瘤活性降低一致(Gattinoni et al.,*Nat.Med.*17:1290-1297(2011))。令人好奇地是,骨髓T细胞中的CAR表达类似于TRAC-CAR T细胞的输注前水平但在两个RV-CAR群中减少(图10E)。重要的是,突变型LNGFR报道分子的细胞表面表达(Gallardo et al.,*Gene Ther.*4:1115-1119(1997))(通过自切割2A元件共表达)未减少,排除了载体沉默成为解释CAR表达减少的可能性(图10G-10H)。RV-CAR T细胞中测量的CAR表达水平与肿瘤负荷负相关(图10I),表明细胞

表面CAR与肿瘤抗原成比例地减量调节。这些体内研究结果因此不仅表明TRAC-CAR T细胞的优异的抗肿瘤活性,还在肿瘤控制、T细胞分化和耗尽和CAR表达水平间建立了联系。用另一种CAR,19BBz(其利用4-1BB胞质结构域作为其共刺激部分)也观察到这些相同的模式(图11)。

[0768] 为进一步分析CAR表达水平对T细胞功能的影响,我们首先检查了在抗原不存在或存在下培养时的T细胞表型(图4)。在转导后5天,RV-CAR T细胞也显示活化、耗尽和分化的证据(图4A和图12A),类似于用之前描述的以反转录病毒递送CAR22获得的结果。相比之下,TRAC-CAR T细胞保持类似于主要由幼稚和中央记忆细胞(CD62L<sup>+</sup>细胞)组成的未转导T细胞的表型(图4A),该表型与较大的体内抗肿瘤活性有关(Gattinoni et al.,*Nat.Med.*17:1290-1297(2011);Sommermeier et al.,*Leukemia* 30:492-500(2016))。与组成型激活信号转导一致,我们发现RV-CAR,而非TRAC-CAR,具有基于磷酸化免疫的酪氨酸活化基序(Long et al.,*Nat.Med.*21:581-590(2015))(图4B和4C)。在暴露于抗原时未注意到更多的差异。与TRAC-CAR T细胞形成对照,在48小时时间内刺激1、2或4次的RV-CAR T细胞分化成效应T细胞,根据表型(CD62L丧失)、细胞因子分泌( $\text{IFN } \gamma$ 、IL2和 $\text{TNF } \alpha$ 增加)和主要转录因子表达(T-bet、EOMES和GATA3增加)鉴定(图4D-4E和图12B-12D)。这些结果表明TRAC-CAR T细胞功效的提高与其通过在刺激时降低张力性信号转导和延迟T细胞分化的CAR表达水平有关。

[0769] 为了控制CAR表达,首先尝试改变反转录病毒载体拷贝数。基因转移效率降低仅适度影响CAR表达水平(图13)。令人关注的是,甚至当平均RV-CAR表达与TRAC-CAR的相称时,前者仍显示在多次刺激时分化加快,表明了CAR表达的动态调节,而不是基线表达,促进不同的功能特征。

[0770] 为了进一步界定CAR表达水平的重要性,产生了从不同基因组基因座和启动子表达CAR的T细胞。为了检查TRAC基因座及其启动子的具体贡献,使用内源或外源启动子,设计了另外7个构建体使1928z CAR靶向TRAC或 $\beta 2$ -微球蛋白(B2M)基因座(已知在T细胞中表达的MHC-I相关基因)(图5A-5B和图14A-14E)。工程改造的CAR T细胞在两个基因座被成功改造,实现了均质CAR表达,其平均水平范围是TRAC-CAR内源启动子的双重(TRAC-EF1 $\alpha$ )的7倍以下(B2M-PGK100)或更高(图5C-5E和图14)。

[0771] 赋予比TRAC-CAR高的CAR表达的所有组合显示张力性信号转导签名,与提供较低表达的全然不同,与之前将表达水平与不依赖抗原的信号转导关联的研究一致(Frigault et al.,*Cancer Immunol Res.*3:356-367(2015))(图5E和图14F)。选择这些中的3种用于深度分析:高表达TRAC-EF1 $\alpha$ 和低表达B2M-CAR和TRAC-LTR(RV增强子-启动子),对其针对TRAC-CAR的体外和体内效能进行了比较。体外,在反复的抗原刺激后,TRAC-EF1 $\alpha$ CAR T细胞快速获得效应特征,而B2M和TRAC-CAR T细胞保持中央记忆表型(图5F和图15A)。令人关注的是,虽然TRAC-LTR指导比RV-CAR低的基线CAR表达并防止张力性信号转导,但LTR仍促进从TRAC基因座内与RV-CAR相同的分化模式。在NALM-6应激试验模型中,3种基因座-启动子组合无一显示与TRAC-CAR相同的抗肿瘤功效(图5G-5H)。输注 $1 \times 10^5$ 个CAR T细胞后10和17天,骨髓中蓄积的CAR T细胞的数目类似于或高于TRAC-CAR T细胞;然而,只有TRAC-CAR T细胞可有效控制肿瘤发展(图15C-15E)。虽然B2M-CAR T细胞似乎保持类似于TRAC-CAR T细胞的效应/效应-记忆比率,但它们也获得占优势的耗尽签名(图15F-15G),表明了分化延迟

可能不依赖于耗尽。总之这些结果强调CAR靶向的作用,并进一步说明CAR表达的调节延伸到基线转录控制之外。

[0772] 还严密分析了遇到抗原时的CAR表达。为此,将CAR T细胞与CD19+抗原呈递细胞混合,以有规律的时间间隔检查细胞表面CAR表达(图6A)。在靶定的和随机整合的CAR T细胞中在暴露于CD19数小时内CAR表达降低,当起始水平较低时,伴有更严重的下降和较长的恢复滞后。随后返回基线表达最显著地区分出不同的T细胞群。

[0773] 为了更好地研究CAR细胞表面表达下降背后的机制,我们设计了CAR-GFP融合蛋白以分析细胞表面和胞内CAR表达两者,并将其与表达具有共翻译但切割的LNGFR报道分子的CAR的细胞进行分析(图6B-6C)。我们观察到CAR表达独立于LNGFR地减量调节,表明物理内化而非转录过程。在抗原相遇后CAR和GFP信号的同时降低表明CAR内化后接着其降解。在暴露于抗原后CAR降解的发生表明可能需要来自CAR mRNA的新生CAR合成以确切适时地恢复CAR表达并支持有效的T细胞功能。在重复抗原刺激后CAR细胞表面表达的细致分析(图6D和图16A)鉴定出恢复期(抗原暴露后12-48小时)的2种主要模式。在TRAC-EF1 $\alpha$ 、TRAC-LTR和RV-CAR T细胞中,CAR细胞表面表达在每次刺激增加,在24小时内高于基线2-4倍。在TRAC-和B2M-CAR T细胞两者中,CAR表达在反复刺激时降低,在48小时后保持在基线以下(图6D)。稳态mRNA分析显示在细胞表面蛋白质水平(图6E和图16B)和转录反应间与CAR T细胞活化的线性相关性(图6F),指出了启动子强度和调节使细胞表面CAR表达的最佳刺激后补充成为可能的重要作用。

[0774] 这种CAR蛋白/RNA减量调节和随后的重新表达使人想到在人T细胞刺激后的TCR调节(Schrum et al., Immunol Rev. 196:7-24, (2003))和小鼠T细胞中的抗原诱导的TCR再循环(Liu et al., Immunity 13, 665-675, (2000); Call et al., Annu. Rev. Immunol. 23, 101-125, (2005); Allison et al., Elife. 5, (2016))。同样,还报道了在TCR过度和持续活化的情况下分化和耗尽加快(Schietinger et al., Trends Immunol. 35, 51-60, (2014); Wherry et al., Nat. Rev. Immunol. 15, 486-499, (2015))。总之,这些合并的研究结果支持TRAC在以两种关键方式在CAR表达的控制中起作用的结论。一种是促进最适基线表达,这在抗原不存在时防止张力性信号转导并在与抗原单次或多次接触时允许有效的CAR内化。另一种是指导均衡的转录反应,导致在抗原占用后基线CAR表达的动态最适恢复。与具有较高CAR表达的T细胞不同,TRAC-CAR特征与T细胞分化和耗尽降低相关,导致极好的肿瘤根除。我们对随机整合性CAR与以8种不同转录配置靶向2个基因座的CAR进行比较的研究,说明了CAR调节的微妙灵敏性。因此,虽然内源B2M启动子在CAR刺激时同样对TRAC起作用,但B2M-CAR以及TRAC-CAR体内不反应,表明了它提供的较低基础表达水平对于有效CAR活性不足。TRAC-LTR同样提供与TRAC相当的基线表达,但其在活化后迅速反弹与T细胞性能差和分化加快有关。我们因此得出结论,基础和动态CAR表达水平两者有助于保持T细胞功能。

[0775] 总的来说,结果表明使CAR编码序列靶向TCR基因座,将其置于内源调节性元件的控制下降低张力性信号转导,防止T细胞分化和耗尽加快,并提高经改造的T细胞的治疗性效能。抗原诱导的CAR内化和降解的动力学测量表明取决于驱动CAR表达的增强子/启动子元件的细胞表面CAR的差异性恢复。这些研究结果表明,CAR表达的严密转录调节对有效肿瘤根除是关键的。使CAR靶向TCR基因座因此可提供较安全的治疗性T细胞(通过使插入肿瘤发生和TCR-诱导自身免疫和同种异体反应性的风险降到最低),更确定的T细胞产物(通过

产生不变的CAR表达且避免位置效应多样化和载体拷贝数变化)和更有效的T细胞(通过降低组成型信号转导和延迟T细胞耗尽)。最后,结果表明研究CAR免疫生物学和基因组编辑提高T细胞疗法的巨大潜力的关联性。

[0776] 8.3实施例3.在内源启动子控制下的治疗性转基因的表达。

[0777] 在一个实例中,治疗性嵌合抗原受体(CAR)在TRAC基因座处整合(在内源启动子/增强子元件的控制下);NFAT反应性转录单位在T细胞受体 $\beta$ 链恒定区(TRBC)基因座处整合,两种治疗性PD1L特异性和治疗性CTLA4scFv从中表达。以此配置,经改造的T细胞经由CAR激活,这导致NFAT活化接着治疗性scFv表达。或者,这些转基因可以在NFAT反应性CD69基因座处整合。在一个具体实施方案中,嵌合细胞表面配体转录因子是CD19-NFAT。因此,在一个实施方案中,CAR由第一转基因编码,PD1L scFv和CTLA4scFv由是双顺反子的第二转基因编码,其中第二转基因的表达在被NFAT诱导的内源TRBC启动子的控制下。在一个备选实施方案中,PD1L和CTLA4scFv自单独的转基因(即第二和第三转基因)表达。在一个具体实施方案中,PD1L和CTLA4scFv,从单个多顺反子转基因表达。这类构建体可任选包括可切割序(例如P2A序列),以供作为个别分子的PD1L和CTLA4scFv表达。

[0778] 在另一个实例中,嵌合细胞表面配体(胞外)-转录因子(TF;胞内)融合基因与B细胞中的CD19分子特异性相互作用的TRAC基因座处整合(在内源启动子/增强子元件的控制下);TF反应性转录单位在TRBC基因座处整合,治疗性嵌合免疫受体配体(CIRL)从中表达。该设计允许经改造的T细胞通过释放TF与B细胞的相互作用起反应,这之后激活CIRL表达,所述CIRL与特异性自身免疫B细胞免疫球蛋白受体(IgR)相互作用。后一相互作用信号/激活细胞毒性T细胞反应,导致自身免疫B细胞死亡。在一个实施方案中,嵌合细胞表面配体(胞外)-转录因子(TF;胞内)融合基因由第一转基因编码。在一个实施方案中,CIRL由第二转基因编码。

[0779] 在另一个实例中,编码HIV特异性核酶的DNA序列在CD4基因座处整合;干扰素反应性转录单位在表达与HIV Rev蛋白相互作用的胞内scFv的CCR5基因座处整合。该治疗性T细胞可三重抑制HIV复制:通过核酶切割HIV基因组、通过排除CCR5表达防止HIV感染和通过阻断HIV Rev活性抑制HIV包装。在一个实施方案中,HIV特异性核酶由第一转基因编码。在一个实施方案中,胞内scFv(例如与HIV rev蛋白相互作用的scFv)由第二转基因编码。

[0780] 8.4实施例4.非整合型 $\Gamma$ -反转录病毒的产生

[0781] 重组非整合型(或整合缺陷型) $\gamma$ -反转录病毒(rNIgRV或IDgRV)是含有突变型整合酶蛋白质的反转录病毒载体,不能催化病毒DNA整合至宿主细胞基因组。为制备此突变型反转录病毒载体,编码突变型整合酶蛋白质(具有之前规定的突变)的质粒DNA与包膜编码和反转录病毒基因组编码质粒DNA联用。将这3种质粒转染入生产者哺乳动物细胞,重组突变型病毒载体被释放至培养基,随后收集并用于转导人外周血T细胞。

[0782] 如图18所示,突变型整合酶通过使DDE基序中的氨基酸突变产生(参见Andrake and Skalka(2015).Retroviral Integrase:Then and Now.Ann.Rev.Virol.2:241-264)。DDE氨基酸位置是:D124、D183、E219(残基编号基于GenBank登记号NP\_955592(NP\_955592.1)。所产生的突变型为D124A、D124E、D124N、D124V、D183A、D183N、D124A和D183A、D124A和D183N、D124E和D183A、D124E和D183N、D124N和D183A、D124N和D183N、D124V和D183A及D124V和D183N。突变型采用标准分子生物学技术产生。含有莫洛尼鼠白血病病毒(MLV)Gag-

Po1序列的质粒采用标准分子技术修饰。突变型通过将含有DDE基序的DNA序列区用新的DNA序列(其中使特定的密码子突变以产生各个特定的突变型)替换产生。所得质粒用来产生NIgRV。

[0783] 利用其在靶细胞内的短暂性质,可将rNIgRV用于不同的应用。例如,瞬时表达保持某些细胞表型样记忆T细胞的基因;瞬时表达嵌合核酸酶或CRISPR/Cas组分以破坏特定的DNA序列;递送侧接与特定基因组位置同源的DNA序列的外源DNA,因此能够通过同源重组使侧接的DNA序列整合至T细胞基因组;递送转基因反转录病毒DNA并以不依赖整合酶的NHEJ-依赖型方式使之在特定的DNA断裂处整合。

[0784] 9. 引用的参考文献

[0785] 本文引用的所有参考文献通过引用以其整体并入并用于所有目的,程度如同具体且单独表明每个出版物或专利或专利申请通过引用其整体并入用于所有目的。

[0786] 可以进行本发明的许多修改和变化而不偏离其精神和范围,正如对本领域技术人员将是显而易见的。本文所述具体实施方案仅通过实例提供,本发明只限于所附权利要求书的权项,以及所述要求项权利赋予其权利的等同内容的整个范围。



[0001]	序列表
[0002]	<110> 纪念斯隆-凯特林癌症中心
[0003]	<120> 转基因T细胞和嵌合抗原受体T细胞组合物和相关方法
[0004]	<130> 13542-043-228
[0005]	<140>
[0006]	<141>
[0007]	<150> 62/462,243
[0008]	<151> 2017-02-22
[0009]	<150> 62/461,677
[0010]	<151> 2017-02-21
[0011]	<150> 62/323,675
[0012]	<151> 2016-04-16
[0013]	<150> 62/323,623
[0014]	<151> 2016-04-15
[0015]	<160> 41
[0016]	<170> PatentIn version 3.5
[0017]	<210> 1
[0018]	<211> 407
[0019]	<212> PRT
[0020]	<213> 莫洛尼鼠白血病病毒
[0021]	<400> 1
[0022]	Glu Asn Ser Ser Pro Tyr Thr Ser Glu His Phe His Tyr Thr Val Thr
[0023]	1 5 10 15
[0024]	Asp Ile Lys Asp Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ile Tyr Asp Lys Thr Lys
[0025]	20 25 30
[0026]	Lys Tyr Trp Val Tyr Gln Gly Lys Pro Val Met Pro Asp Gln Phe Thr
[0027]	35 40 45
[0028]	Phe Glu Leu Leu Asp Phe Leu His Gln Leu Thr His Leu Ser Phe Ser
[0029]	50 55 60
[0030]	Lys Met Lys Ala Leu Leu Glu Arg Ser His Ser Pro Tyr Tyr Met Leu
[0031]	65 70 75 80
[0032]	Asn Arg Asp Arg Thr Leu Lys Asn Ile Thr Glu Thr Cys Lys Ala Cys
[0033]	85 90 95
[0034]	Ala Gln Val Asn Ala Ser Lys Ser Ala Val Lys Gln Gly Thr Arg Val
[0035]	100 105 110
[0036]	Arg Gly His Arg Pro Gly Thr His Trp Glu Ile Asp Phe Thr Glu Ile
[0037]	115 120 125
[0038]	Lys Pro Gly Leu Tyr Gly Tyr Lys Tyr Leu Leu Val Phe Ile Asp Thr

[0039]	130	135	140
[0040]	Phe Ser Gly Trp Ile Glu Ala Phe Pro Thr Lys Lys Glu Thr Ala Lys		
[0041]	145	150	155
[0042]	Val Val Thr Lys Lys Leu Leu Glu Glu Ile Phe Pro Arg Phe Gly Met		
[0043]	165	170	175
[0044]	Pro Gln Val Leu Gly Thr Asp Asn Gly Pro Ala Phe Val Ser Lys Val		
[0045]	180	185	190
[0046]	Ser Gln Thr Val Ala Asp Leu Leu Gly Ile Asp Trp Lys Leu His Cys		
[0047]	195	200	205
[0048]	Ala Tyr Arg Pro Gln Ser Ser Gly Gln Val Glu Arg Met Asn Arg Thr		
[0049]	210	215	220
[0050]	Ile Lys Glu Thr Leu Thr Lys Leu Thr Leu Ala Thr Gly Ser Arg Asp		
[0051]	225	230	235
[0052]	Trp Val Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Tyr Arg Ala Arg Asn Thr Pro		
[0053]	245	250	255
[0054]	Gly Pro His Gly Leu Thr Pro Tyr Glu Ile Leu Tyr Gly Ala Pro Pro		
[0055]	260	265	270
[0056]	Pro Leu Val Asn Phe Pro Asp Pro Asp Met Thr Arg Val Thr Asn Ser		
[0057]	275	280	285
[0058]	Pro Ser Leu Gln Ala His Leu Gln Ala Leu Tyr Leu Val Gln His Glu		
[0059]	290	295	300
[0060]	Val Trp Arg Pro Leu Ala Ala Tyr Gln Glu Gln Leu Asp Arg Pro		
[0061]	305	310	315
[0062]	Val Val Pro His Pro Tyr Arg Val Gly Asp Thr Val Trp Val Arg Arg		
[0063]	325	330	335
[0064]	His Gln Thr Lys Asn Leu Glu Pro Arg Trp Lys Gly Pro Tyr Thr Val		
[0065]	340	345	350
[0066]	Leu Leu Thr Thr Pro Thr Ala Leu Lys Val Asp Gly Ile Ala Ala Trp		
[0067]	355	360	365
[0068]	Ile His Ala Ala His Val Lys Ala Ala Asp Pro Gly Gly Gly Pro Ser		
[0069]	370	375	380
[0070]	Ser Arg Leu Thr Trp Arg Val Gln Arg Ser Gln Asn Pro Leu Lys Ile		
[0071]	385	390	395
[0072]	Arg Leu Thr Arg Glu Ala Pro		
[0073]	405		
[0074]	<210> 2		
[0075]	<211> 407		
[0076]	<212> PRT		
[0077]	<213> 人工序列		

[0078]	<220>
[0079]	<221> 来源
[0080]	<223> /注="人工序列描述：合成多肽"
[0081]	<400> 2
[0082]	Glu Asn Ser Ser Pro Tyr Thr Ser Glu His Phe His Tyr Thr Val Thr
[0083]	1 5 10 15
[0084]	Asp Ile Lys Asp Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ile Tyr Asp Lys Thr Lys
[0085]	20 25 30
[0086]	Lys Tyr Trp Val Tyr Gln Gly Lys Pro Val Met Pro Asp Gln Phe Thr
[0087]	35 40 45
[0088]	Phe Glu Leu Leu Asp Phe Leu His Gln Leu Thr His Leu Ser Phe Ser
[0089]	50 55 60
[0090]	Lys Met Lys Ala Leu Leu Glu Arg Ser His Ser Pro Tyr Tyr Met Leu
[0091]	65 70 75 80
[0092]	Asn Arg Asp Arg Thr Leu Lys Asn Ile Thr Glu Thr Cys Lys Ala Cys
[0093]	85 90 95
[0094]	Ala Gln Val Asn Ala Ser Lys Ser Ala Val Lys Gln Gly Thr Arg Val
[0095]	100 105 110
[0096]	Arg Gly His Arg Pro Gly Thr His Trp Glu Ile Ala Phe Thr Glu Ile
[0097]	115 120 125
[0098]	Lys Pro Gly Leu Tyr Gly Tyr Lys Tyr Leu Leu Val Phe Ile Asp Thr
[0099]	130 135 140
[0100]	Phe Ser Gly Trp Ile Glu Ala Phe Pro Thr Lys Lys Glu Thr Ala Lys
[0101]	145 150 155 160
[0102]	Val Val Thr Lys Lys Leu Leu Glu Glu Ile Phe Pro Arg Phe Gly Met
[0103]	165 170 175
[0104]	Pro Gln Val Leu Gly Thr Asp Asn Gly Pro Ala Phe Val Ser Lys Val
[0105]	180 185 190
[0106]	Ser Gln Thr Val Ala Asp Leu Leu Gly Ile Asp Trp Lys Leu His Cys
[0107]	195 200 205
[0108]	Ala Tyr Arg Pro Gln Ser Ser Gly Gln Val Glu Arg Met Asn Arg Thr
[0109]	210 215 220
[0110]	Ile Lys Glu Thr Leu Thr Lys Leu Thr Leu Ala Thr Gly Ser Arg Asp
[0111]	225 230 235 240
[0112]	Trp Val Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Tyr Arg Ala Arg Asn Thr Pro
[0113]	245 250 255
[0114]	Gly Pro His Gly Leu Thr Pro Tyr Glu Ile Leu Tyr Gly Ala Pro Pro
[0115]	260 265 270
[0116]	Pro Leu Val Asn Phe Pro Asp Pro Asp Met Thr Arg Val Thr Asn Ser

[0117]	275	280	285
[0118]	Pro Ser Leu Gln Ala His Leu Gln Ala Leu Tyr Leu Val Gln His Glu		
[0119]	290	295	300
[0120]	Val Trp Arg Pro Leu Ala Ala Ala Tyr Gln Glu Gln Leu Asp Arg Pro		
[0121]	305	310	315
[0122]	Val Val Pro His Pro Tyr Arg Val Gly Asp Thr Val Trp Val Arg Arg		
[0123]	325	330	335
[0124]	His Gln Thr Lys Asn Leu Glu Pro Arg Trp Lys Gly Pro Tyr Thr Val		
[0125]	340	345	350
[0126]	Leu Leu Thr Thr Pro Thr Ala Leu Lys Val Asp Gly Ile Ala Ala Trp		
[0127]	355	360	365
[0128]	Ile His Ala Ala His Val Lys Ala Ala Asp Pro Gly Gly Gly Pro Ser		
[0129]	370	375	380
[0130]	Ser Arg Leu Thr Trp Arg Val Gln Arg Ser Gln Asn Pro Leu Lys Ile		
[0131]	385	390	395
[0132]	Arg Leu Thr Arg Glu Ala Pro		
[0133]	405		
[0134]	<210> 3		
[0135]	<211> 407		
[0136]	<212> PRT		
[0137]	<213> 人工序列		
[0138]	<220>		
[0139]	<221> 来源		
[0140]	<223> /注="人工序列描述：合成多肽"		
[0141]	<400> 3		
[0142]	Glu Asn Ser Ser Pro Tyr Thr Ser Glu His Phe His Tyr Thr Val Thr		
[0143]	1	5	10
[0144]	Asp Ile Lys Asp Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ile Tyr Asp Lys Thr Lys		
[0145]	20	25	30
[0146]	Lys Tyr Trp Val Tyr Gln Gly Lys Pro Val Met Pro Asp Gln Phe Thr		
[0147]	35	40	45
[0148]	Phe Glu Leu Leu Asp Phe Leu His Gln Leu Thr His Leu Ser Phe Ser		
[0149]	50	55	60
[0150]	Lys Met Lys Ala Leu Leu Glu Arg Ser His Ser Pro Tyr Tyr Met Leu		
[0151]	65	70	75
[0152]	Asn Arg Asp Arg Thr Leu Lys Asn Ile Thr Glu Thr Cys Lys Ala Cys		
[0153]	85	90	95
[0154]	Ala Gln Val Asn Ala Ser Lys Ser Ala Val Lys Gln Gly Thr Arg Val		
[0155]	100	105	110

[0156]	Arg Gly His Arg Pro Gly Thr His Trp Glu Ile Glu Phe Thr Glu Ile		
[0157]	115	120	125
[0158]	Lys Pro Gly Leu Tyr Gly Tyr Lys Tyr Leu Leu Val Phe Ile Asp Thr		
[0159]	130	135	140
[0160]	Phe Ser Gly Trp Ile Glu Ala Phe Pro Thr Lys Lys Glu Thr Ala Lys		
[0161]	145	150	155
[0162]	Val Val Thr Lys Lys Leu Leu Glu Glu Ile Phe Pro Arg Phe Gly Met		
[0163]	165	170	175
[0164]	Pro Gln Val Leu Gly Thr Asp Asn Gly Pro Ala Phe Val Ser Lys Val		
[0165]	180	185	190
[0166]	Ser Gln Thr Val Ala Asp Leu Leu Gly Ile Asp Trp Lys Leu His Cys		
[0167]	195	200	205
[0168]	Ala Tyr Arg Pro Gln Ser Ser Gly Gln Val Glu Arg Met Asn Arg Thr		
[0169]	210	215	220
[0170]	Ile Lys Glu Thr Leu Thr Lys Leu Thr Leu Ala Thr Gly Ser Arg Asp		
[0171]	225	230	235
[0172]	Trp Val Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Tyr Arg Ala Arg Asn Thr Pro		
[0173]	245	250	255
[0174]	Gly Pro His Gly Leu Thr Pro Tyr Glu Ile Leu Tyr Gly Ala Pro Pro		
[0175]	260	265	270
[0176]	Pro Leu Val Asn Phe Pro Asp Pro Asp Met Thr Arg Val Thr Asn Ser		
[0177]	275	280	285
[0178]	Pro Ser Leu Gln Ala His Leu Gln Ala Leu Tyr Leu Val Gln His Glu		
[0179]	290	295	300
[0180]	Val Trp Arg Pro Leu Ala Ala Ala Tyr Gln Glu Gln Leu Asp Arg Pro		
[0181]	305	310	315
[0182]	Val Val Pro His Pro Tyr Arg Val Gly Asp Thr Val Trp Val Arg Arg		
[0183]	325	330	335
[0184]	His Gln Thr Lys Asn Leu Glu Pro Arg Trp Lys Gly Pro Tyr Thr Val		
[0185]	340	345	350
[0186]	Leu Leu Thr Thr Pro Thr Ala Leu Lys Val Asp Gly Ile Ala Ala Trp		
[0187]	355	360	365
[0188]	Ile His Ala Ala His Val Lys Ala Ala Asp Pro Gly Gly Gly Pro Ser		
[0189]	370	375	380
[0190]	Ser Arg Leu Thr Trp Arg Val Gln Arg Ser Gln Asn Pro Leu Lys Ile		
[0191]	385	390	395
[0192]	Arg Leu Thr Arg Glu Ala Pro		
[0193]	405		
[0194]	<210> 4		

[0195]	<211> 407															
[0196]	<212> PRT															
[0197]	<213> 人工序列															
[0198]	<220>															
[0199]	<221> 来源															
[0200]	<223> /注="人工序列描述：合成多肽"															
[0201]	<400> 4															
[0202]	Glu	Asn	Ser	Ser	Pro	Tyr	Thr	Ser	Glu	His	Phe	His	Tyr	Thr	Val	Thr
[0203]	1				5					10					15	
[0204]	Asp	Ile	Lys	Asp	Leu	Thr	Lys	Leu	Gly	Ala	Ile	Tyr	Asp	Lys	Thr	Lys
[0205]				20					25					30		
[0206]	Lys	Tyr	Trp	Val	Tyr	Gln	Gly	Lys	Pro	Val	Met	Pro	Asp	Gln	Phe	Thr
[0207]			35					40					45			
[0208]	Phe	Glu	Leu	Leu	Asp	Phe	Leu	His	Gln	Leu	Thr	His	Leu	Ser	Phe	Ser
[0209]		50					55					60				
[0210]	Lys	Met	Lys	Ala	Leu	Leu	Glu	Arg	Ser	His	Ser	Pro	Tyr	Tyr	Met	Leu
[0211]	65					70					75					80
[0212]	Asn	Arg	Asp	Arg	Thr	Leu	Lys	Asn	Ile	Thr	Glu	Thr	Cys	Lys	Ala	Cys
[0213]					85					90					95	
[0214]	Ala	Gln	Val	Asn	Ala	Ser	Lys	Ser	Ala	Val	Lys	Gln	Gly	Thr	Arg	Val
[0215]				100					105					110		
[0216]	Arg	Gly	His	Arg	Pro	Gly	Thr	His	Trp	Glu	Ile	Asn	Phe	Thr	Glu	Ile
[0217]			115					120					125			
[0218]	Lys	Pro	Gly	Leu	Tyr	Gly	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Leu	Val	Phe	Ile	Asp	Thr
[0219]		130					135					140				
[0220]	Phe	Ser	Gly	Trp	Ile	Glu	Ala	Phe	Pro	Thr	Lys	Lys	Glu	Thr	Ala	Lys
[0221]	145					150					155					160
[0222]	Val	Val	Thr	Lys	Lys	Leu	Leu	Glu	Glu	Ile	Phe	Pro	Arg	Phe	Gly	Met
[0223]					165					170					175	
[0224]	Pro	Gln	Val	Leu	Gly	Thr	Asp	Asn	Gly	Pro	Ala	Phe	Val	Ser	Lys	Val
[0225]				180					185					190		
[0226]	Ser	Gln	Thr	Val	Ala	Asp	Leu	Leu	Gly	Ile	Asp	Trp	Lys	Leu	His	Cys
[0227]			195						200				205			
[0228]	Ala	Tyr	Arg	Pro	Gln	Ser	Ser	Gly	Gln	Val	Glu	Arg	Met	Asn	Arg	Thr
[0229]		210					215					220				
[0230]	Ile	Lys	Glu	Thr	Leu	Thr	Lys	Leu	Thr	Leu	Ala	Thr	Gly	Ser	Arg	Asp
[0231]	225					230					235					240
[0232]	Trp	Val	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Tyr	Arg	Ala	Arg	Asn	Thr	Pro
[0233]					245					250					255	

[0234]	Gly	Pro	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Tyr	Glu	Ile	Leu	Tyr	Gly	Ala	Pro	Pro
[0235]				260					265					270		
[0236]	Pro	Leu	Val	Asn	Phe	Pro	Asp	Pro	Asp	Met	Thr	Arg	Val	Thr	Asn	Ser
[0237]				275					280					285		
[0238]	Pro	Ser	Leu	Gln	Ala	His	Leu	Gln	Ala	Leu	Tyr	Leu	Val	Gln	His	Glu
[0239]				290					295					300		
[0240]	Val	Trp	Arg	Pro	Leu	Ala	Ala	Ala	Tyr	Gln	Glu	Gln	Leu	Asp	Arg	Pro
[0241]	305						310					315				320
[0242]	Val	Val	Pro	His	Pro	Tyr	Arg	Val	Gly	Asp	Thr	Val	Trp	Val	Arg	Arg
[0243]					325					330					335	
[0244]	His	Gln	Thr	Lys	Asn	Leu	Glu	Pro	Arg	Trp	Lys	Gly	Pro	Tyr	Thr	Val
[0245]				340						345					350	
[0246]	Leu	Leu	Thr	Thr	Pro	Thr	Ala	Leu	Lys	Val	Asp	Gly	Ile	Ala	Ala	Trp
[0247]				355						360					365	
[0248]	Ile	His	Ala	Ala	His	Val	Lys	Ala	Ala	Asp	Pro	Gly	Gly	Gly	Pro	Ser
[0249]				370						375					380	
[0250]	Ser	Arg	Leu	Thr	Trp	Arg	Val	Gln	Arg	Ser	Gln	Asn	Pro	Leu	Lys	Ile
[0251]	385					390					395					400
[0252]	Arg	Leu	Thr	Arg	Glu	Ala	Pro									
[0253]					405											
[0254]	<210> 5															
[0255]	<211> 407															
[0256]	<212> PRT															
[0257]	<213> 人工序列															
[0258]	<220>															
[0259]	<221> 来源															
[0260]	<223> /注="人工序列描述：合成多肽"															
[0261]	<400> 5															
[0262]	Glu	Asn	Ser	Ser	Pro	Tyr	Thr	Ser	Glu	His	Phe	His	Tyr	Thr	Val	Thr
[0263]	1				5					10					15	
[0264]	Asp	Ile	Lys	Asp	Leu	Thr	Lys	Leu	Gly	Ala	Ile	Tyr	Asp	Lys	Thr	Lys
[0265]				20						25					30	
[0266]	Lys	Tyr	Trp	Val	Tyr	Gln	Gly	Lys	Pro	Val	Met	Pro	Asp	Gln	Phe	Thr
[0267]				35						40					45	
[0268]	Phe	Glu	Leu	Leu	Asp	Phe	Leu	His	Gln	Leu	Thr	His	Leu	Ser	Phe	Ser
[0269]				50						55					60	
[0270]	Lys	Met	Lys	Ala	Leu	Leu	Glu	Arg	Ser	His	Ser	Pro	Tyr	Tyr	Met	Leu
[0271]	65						70					75				80
[0272]	Asn	Arg	Asp	Arg	Thr	Leu	Lys	Asn	Ile	Thr	Glu	Thr	Cys	Lys	Ala	Cys

[0273]	85																90																95																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
[0274]	Ala	Gln	Val	Asn	Ala	Ser	Lys	Ser	Ala	Val	Lys	Gln	Gly	Thr	Arg	Val																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										



[0312]	Arg Leu Thr Arg Glu Ala Pro
[0313]	405
[0314]	<210> 6
[0315]	<211> 407
[0316]	<212> PRT
[0317]	<213> 人工序列
[0318]	<220>
[0319]	<221> 来源
[0320]	<223> /注="人工序列描述：合成多肽"
[0321]	<400> 6
[0322]	Glu Asn Ser Ser Pro Tyr Thr Ser Glu His Phe His Tyr Thr Val Thr
[0323]	1 5 10 15
[0324]	Asp Ile Lys Asp Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ile Tyr Asp Lys Thr Lys
[0325]	20 25 30
[0326]	Lys Tyr Trp Val Tyr Gln Gly Lys Pro Val Met Pro Asp Gln Phe Thr
[0327]	35 40 45
[0328]	Phe Glu Leu Leu Asp Phe Leu His Gln Leu Thr His Leu Ser Phe Ser
[0329]	50 55 60
[0330]	Lys Met Lys Ala Leu Leu Glu Arg Ser His Ser Pro Tyr Tyr Met Leu
[0331]	65 70 75 80
[0332]	Asn Arg Asp Arg Thr Leu Lys Asn Ile Thr Glu Thr Cys Lys Ala Cys
[0333]	85 90 95
[0334]	Ala Gln Val Asn Ala Ser Lys Ser Ala Val Lys Gln Gly Thr Arg Val
[0335]	100 105 110
[0336]	Arg Gly His Arg Pro Gly Thr His Trp Glu Ile Asp Phe Thr Glu Ile
[0337]	115 120 125
[0338]	Lys Pro Gly Leu Tyr Gly Tyr Lys Tyr Leu Leu Val Phe Ile Asp Thr
[0339]	130 135 140
[0340]	Phe Ser Gly Trp Ile Glu Ala Phe Pro Thr Lys Lys Glu Thr Ala Lys
[0341]	145 150 155 160
[0342]	Val Val Thr Lys Lys Leu Leu Glu Glu Ile Phe Pro Arg Phe Gly Met
[0343]	165 170 175
[0344]	Pro Gln Val Leu Gly Thr Ala Asn Gly Pro Ala Phe Val Ser Lys Val
[0345]	180 185 190
[0346]	Ser Gln Thr Val Ala Asp Leu Leu Gly Ile Asp Trp Lys Leu His Cys
[0347]	195 200 205
[0348]	Ala Tyr Arg Pro Gln Ser Ser Gly Gln Val Glu Arg Met Asn Arg Thr
[0349]	210 215 220
[0350]	Ile Lys Glu Thr Leu Thr Lys Leu Thr Leu Ala Thr Gly Ser Arg Asp

[0351]	225	230	235	240
[0352]	Trp Val Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Tyr Arg Ala Arg Asn Thr Pro			
[0353]	245	250	255	
[0354]	Gly Pro His Gly Leu Thr Pro Tyr Glu Ile Leu Tyr Gly Ala Pro Pro			
[0355]	260	265	270	
[0356]	Pro Leu Val Asn Phe Pro Asp Pro Asp Met Thr Arg Val Thr Asn Ser			
[0357]	275	280	285	
[0358]	Pro Ser Leu Gln Ala His Leu Gln Ala Leu Tyr Leu Val Gln His Glu			
[0359]	290	295	300	
[0360]	Val Trp Arg Pro Leu Ala Ala Ala Tyr Gln Glu Gln Leu Asp Arg Pro			
[0361]	305	310	315	320
[0362]	Val Val Pro His Pro Tyr Arg Val Gly Asp Thr Val Trp Val Arg Arg			
[0363]	325	330	335	
[0364]	His Gln Thr Lys Asn Leu Glu Pro Arg Trp Lys Gly Pro Tyr Thr Val			
[0365]	340	345	350	
[0366]	Leu Leu Thr Thr Pro Thr Ala Leu Lys Val Asp Gly Ile Ala Ala Trp			
[0367]	355	360	365	
[0368]	Ile His Ala Ala His Val Lys Ala Ala Asp Pro Gly Gly Gly Pro Ser			
[0369]	370	375	380	
[0370]	Ser Arg Leu Thr Trp Arg Val Gln Arg Ser Gln Asn Pro Leu Lys Ile			
[0371]	385	390	395	400
[0372]	Arg Leu Thr Arg Glu Ala Pro			
[0373]	405			
[0374]	<210> 7			
[0375]	<211> 407			
[0376]	<212> PRT			
[0377]	<213> 人工序列			
[0378]	<220>			
[0379]	<221> 来源			
[0380]	<223> /注="人工序列描述：合成多肽"			
[0381]	<400> 7			
[0382]	Glu Asn Ser Ser Pro Tyr Thr Ser Glu His Phe His Tyr Thr Val Thr			
[0383]	1	5	10	15
[0384]	Asp Ile Lys Asp Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ile Tyr Asp Lys Thr Lys			
[0385]	20	25	30	
[0386]	Lys Tyr Trp Val Tyr Gln Gly Lys Pro Val Met Pro Asp Gln Phe Thr			
[0387]	35	40	45	
[0388]	Phe Glu Leu Leu Asp Phe Leu His Gln Leu Thr His Leu Ser Phe Ser			
[0389]	50	55	60	

[0390]	Lys Met Lys Ala Leu Leu Glu Arg Ser His Ser Pro Tyr Tyr Met Leu
[0391]	65 70 75 80
[0392]	Asn Arg Asp Arg Thr Leu Lys Asn Ile Thr Glu Thr Cys Lys Ala Cys
[0393]	85 90 95
[0394]	Ala Gln Val Asn Ala Ser Lys Ser Ala Val Lys Gln Gly Thr Arg Val
[0395]	100 105 110
[0396]	Arg Gly His Arg Pro Gly Thr His Trp Glu Ile Asp Phe Thr Glu Ile
[0397]	115 120 125
[0398]	Lys Pro Gly Leu Tyr Gly Tyr Lys Tyr Leu Leu Val Phe Ile Asp Thr
[0399]	130 135 140
[0400]	Phe Ser Gly Trp Ile Glu Ala Phe Pro Thr Lys Lys Glu Thr Ala Lys
[0401]	145 150 155 160
[0402]	Val Val Thr Lys Lys Leu Leu Glu Glu Ile Phe Pro Arg Phe Gly Met
[0403]	165 170 175
[0404]	Pro Gln Val Leu Gly Thr Asn Asn Gly Pro Ala Phe Val Ser Lys Val
[0405]	180 185 190
[0406]	Ser Gln Thr Val Ala Asp Leu Leu Gly Ile Asp Trp Lys Leu His Cys
[0407]	195 200 205
[0408]	Ala Tyr Arg Pro Gln Ser Ser Gly Gln Val Glu Arg Met Asn Arg Thr
[0409]	210 215 220
[0410]	Ile Lys Glu Thr Leu Thr Lys Leu Thr Leu Ala Thr Gly Ser Arg Asp
[0411]	225 230 235 240
[0412]	Trp Val Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Tyr Arg Ala Arg Asn Thr Pro
[0413]	245 250 255
[0414]	Gly Pro His Gly Leu Thr Pro Tyr Glu Ile Leu Tyr Gly Ala Pro Pro
[0415]	260 265 270
[0416]	Pro Leu Val Asn Phe Pro Asp Pro Asp Met Thr Arg Val Thr Asn Ser
[0417]	275 280 285
[0418]	Pro Ser Leu Gln Ala His Leu Gln Ala Leu Tyr Leu Val Gln His Glu
[0419]	290 295 300
[0420]	Val Trp Arg Pro Leu Ala Ala Ala Tyr Gln Glu Gln Leu Asp Arg Pro
[0421]	305 310 315 320
[0422]	Val Val Pro His Pro Tyr Arg Val Gly Asp Thr Val Trp Val Arg Arg
[0423]	325 330 335
[0424]	His Gln Thr Lys Asn Leu Glu Pro Arg Trp Lys Gly Pro Tyr Thr Val
[0425]	340 345 350
[0426]	Leu Leu Thr Thr Pro Thr Ala Leu Lys Val Asp Gly Ile Ala Ala Trp
[0427]	355 360 365
[0428]	Ile His Ala Ala His Val Lys Ala Ala Asp Pro Gly Gly Gly Pro Ser

[0429]	370	375	380
[0430]	Ser Arg Leu Thr Trp Arg Val Gln Arg Ser Gln Asn Pro Leu Lys Ile		
[0431]	385	390	395 400
[0432]	Arg Leu Thr Arg Glu Ala Pro		
[0433]	405		
[0434]	<210> 8		
[0435]	<211> 407		
[0436]	<212> PRT		
[0437]	<213> 人工序列		
[0438]	<220>		
[0439]	<221> 来源		
[0440]	<223> /注="人工序列描述：合成多肽"		
[0441]	<400> 8		
[0442]	Glu Asn Ser Ser Pro Tyr Thr Ser Glu His Phe His Tyr Thr Val Thr		
[0443]	1 5 10 15		
[0444]	Asp Ile Lys Asp Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ile Tyr Asp Lys Thr Lys		
[0445]	20 25 30		
[0446]	Lys Tyr Trp Val Tyr Gln Gly Lys Pro Val Met Pro Asp Gln Phe Thr		
[0447]	35 40 45		
[0448]	Phe Glu Leu Leu Asp Phe Leu His Gln Leu Thr His Leu Ser Phe Ser		
[0449]	50 55 60		
[0450]	Lys Met Lys Ala Leu Leu Glu Arg Ser His Ser Pro Tyr Tyr Met Leu		
[0451]	65 70 75 80		
[0452]	Asn Arg Asp Arg Thr Leu Lys Asn Ile Thr Glu Thr Cys Lys Ala Cys		
[0453]	85 90 95		
[0454]	Ala Gln Val Asn Ala Ser Lys Ser Ala Val Lys Gln Gly Thr Arg Val		
[0455]	100 105 110		
[0456]	Arg Gly His Arg Pro Gly Thr His Trp Glu Ile Ala Phe Thr Glu Ile		
[0457]	115 120 125		
[0458]	Lys Pro Gly Leu Tyr Gly Tyr Lys Tyr Leu Leu Val Phe Ile Asp Thr		
[0459]	130 135 140		
[0460]	Phe Ser Gly Trp Ile Glu Ala Phe Pro Thr Lys Lys Glu Thr Ala Lys		
[0461]	145 150 155 160		
[0462]	Val Val Thr Lys Lys Leu Leu Glu Glu Ile Phe Pro Arg Phe Gly Met		
[0463]	165 170 175		
[0464]	Pro Gln Val Leu Gly Thr Ala Asn Gly Pro Ala Phe Val Ser Lys Val		
[0465]	180 185 190		
[0466]	Ser Gln Thr Val Ala Asp Leu Leu Gly Ile Asp Trp Lys Leu His Cys		
[0467]	195 200 205		

[0468]	Ala Tyr Arg Pro Gln Ser Ser Gly Gln Val Glu Arg Met Asn Arg Thr
[0469]	210 215 220
[0470]	Ile Lys Glu Thr Leu Thr Lys Leu Thr Leu Ala Thr Gly Ser Arg Asp
[0471]	225 230 235 240
[0472]	Trp Val Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Tyr Arg Ala Arg Asn Thr Pro
[0473]	245 250 255
[0474]	Gly Pro His Gly Leu Thr Pro Tyr Glu Ile Leu Tyr Gly Ala Pro Pro
[0475]	260 265 270
[0476]	Pro Leu Val Asn Phe Pro Asp Pro Asp Met Thr Arg Val Thr Asn Ser
[0477]	275 280 285
[0478]	Pro Ser Leu Gln Ala His Leu Gln Ala Leu Tyr Leu Val Gln His Glu
[0479]	290 295 300
[0480]	Val Trp Arg Pro Leu Ala Ala Ala Tyr Gln Glu Gln Leu Asp Arg Pro
[0481]	305 310 315 320
[0482]	Val Val Pro His Pro Tyr Arg Val Gly Asp Thr Val Trp Val Arg Arg
[0483]	325 330 335
[0484]	His Gln Thr Lys Asn Leu Glu Pro Arg Trp Lys Gly Pro Tyr Thr Val
[0485]	340 345 350
[0486]	Leu Leu Thr Thr Pro Thr Ala Leu Lys Val Asp Gly Ile Ala Ala Trp
[0487]	355 360 365
[0488]	Ile His Ala Ala His Val Lys Ala Ala Asp Pro Gly Gly Gly Pro Ser
[0489]	370 375 380
[0490]	Ser Arg Leu Thr Trp Arg Val Gln Arg Ser Gln Asn Pro Leu Lys Ile
[0491]	385 390 395 400
[0492]	Arg Leu Thr Arg Glu Ala Pro
[0493]	405
[0494]	<210> 9
[0495]	<211> 407
[0496]	<212> PRT
[0497]	<213> 人工序列
[0498]	<220>
[0499]	<221> 来源
[0500]	<223> /注="人工序列描述：合成多肽"
[0501]	<400> 9
[0502]	Glu Asn Ser Ser Pro Tyr Thr Ser Glu His Phe His Tyr Thr Val Thr
[0503]	1 5 10 15
[0504]	Asp Ile Lys Asp Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ile Tyr Asp Lys Thr Lys
[0505]	20 25 30
[0506]	Lys Tyr Trp Val Tyr Gln Gly Lys Pro Val Met Pro Asp Gln Phe Thr

[0507]	35	40	45
[0508]	Phe Glu Leu Leu Asp Phe Leu His Gln Leu Thr His Leu Ser Phe Ser		
[0509]	50	55	60
[0510]	Lys Met Lys Ala Leu Leu Glu Arg Ser His Ser Pro Tyr Tyr Met Leu		
[0511]	65	70	75
[0512]	Asn Arg Asp Arg Thr Leu Lys Asn Ile Thr Glu Thr Cys Lys Ala Cys		
[0513]	85	90	95
[0514]	Ala Gln Val Asn Ala Ser Lys Ser Ala Val Lys Gln Gly Thr Arg Val		
[0515]	100	105	110
[0516]	Arg Gly His Arg Pro Gly Thr His Trp Glu Ile Ala Phe Thr Glu Ile		
[0517]	115	120	125
[0518]	Lys Pro Gly Leu Tyr Gly Tyr Lys Tyr Leu Leu Val Phe Ile Asp Thr		
[0519]	130	135	140
[0520]	Phe Ser Gly Trp Ile Glu Ala Phe Pro Thr Lys Lys Glu Thr Ala Lys		
[0521]	145	150	155
[0522]	Val Val Thr Lys Lys Leu Leu Glu Glu Ile Phe Pro Arg Phe Gly Met		
[0523]	165	170	175
[0524]	Pro Gln Val Leu Gly Thr Asn Asn Gly Pro Ala Phe Val Ser Lys Val		
[0525]	180	185	190
[0526]	Ser Gln Thr Val Ala Asp Leu Leu Gly Ile Asp Trp Lys Leu His Cys		
[0527]	195	200	205
[0528]	Ala Tyr Arg Pro Gln Ser Ser Gly Gln Val Glu Arg Met Asn Arg Thr		
[0529]	210	215	220
[0530]	Ile Lys Glu Thr Leu Thr Lys Leu Thr Leu Ala Thr Gly Ser Arg Asp		
[0531]	225	230	235
[0532]	Trp Val Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Tyr Arg Ala Arg Asn Thr Pro		
[0533]	245	250	255
[0534]	Gly Pro His Gly Leu Thr Pro Tyr Glu Ile Leu Tyr Gly Ala Pro Pro		
[0535]	260	265	270
[0536]	Pro Leu Val Asn Phe Pro Asp Pro Asp Met Thr Arg Val Thr Asn Ser		
[0537]	275	280	285
[0538]	Pro Ser Leu Gln Ala His Leu Gln Ala Leu Tyr Leu Val Gln His Glu		
[0539]	290	295	300
[0540]	Val Trp Arg Pro Leu Ala Ala Ala Tyr Gln Glu Gln Leu Asp Arg Pro		
[0541]	305	310	315
[0542]	Val Val Pro His Pro Tyr Arg Val Gly Asp Thr Val Trp Val Arg Arg		
[0543]	325	330	335
[0544]	His Gln Thr Lys Asn Leu Glu Pro Arg Trp Lys Gly Pro Tyr Thr Val		
[0545]	340	345	350

[0546] Leu Leu Thr Thr Pro Thr Ala Leu Lys Val Asp Gly Ile Ala Ala Trp  
 [0547] 355 360 365  
 [0548] Ile His Ala Ala His Val Lys Ala Ala Asp Pro Gly Gly Gly Pro Ser  
 [0549] 370 375 380  
 [0550] Ser Arg Leu Thr Trp Arg Val Gln Arg Ser Gln Asn Pro Leu Lys Ile  
 [0551] 385 390 395 400  
 [0552] Arg Leu Thr Arg Glu Ala Pro  
 [0553] 405  
 [0554] <210> 10  
 [0555] <211> 407  
 [0556] <212> PRT  
 [0557] <213> 人工序列  
 [0558] <220>  
 [0559] <221> 来源  
 [0560] <223> /注="人工序列描述：合成多肽"  
 [0561] <400> 10  
 [0562] Glu Asn Ser Ser Pro Tyr Thr Ser Glu His Phe His Tyr Thr Val Thr  
 [0563] 1 5 10 15  
 [0564] Asp Ile Lys Asp Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ile Tyr Asp Lys Thr Lys  
 [0565] 20 25 30  
 [0566] Lys Tyr Trp Val Tyr Gln Gly Lys Pro Val Met Pro Asp Gln Phe Thr  
 [0567] 35 40 45  
 [0568] Phe Glu Leu Leu Asp Phe Leu His Gln Leu Thr His Leu Ser Phe Ser  
 [0569] 50 55 60  
 [0570] Lys Met Lys Ala Leu Leu Glu Arg Ser His Ser Pro Tyr Tyr Met Leu  
 [0571] 65 70 75 80  
 [0572] Asn Arg Asp Arg Thr Leu Lys Asn Ile Thr Glu Thr Cys Lys Ala Cys  
 [0573] 85 90 95  
 [0574] Ala Gln Val Asn Ala Ser Lys Ser Ala Val Lys Gln Gly Thr Arg Val  
 [0575] 100 105 110  
 [0576] Arg Gly His Arg Pro Gly Thr His Trp Glu Ile Glu Phe Thr Glu Ile  
 [0577] 115 120 125  
 [0578] Lys Pro Gly Leu Tyr Gly Tyr Lys Tyr Leu Leu Val Phe Ile Asp Thr  
 [0579] 130 135 140  
 [0580] Phe Ser Gly Trp Ile Glu Ala Phe Pro Thr Lys Lys Glu Thr Ala Lys  
 [0581] 145 150 155 160  
 [0582] Val Val Thr Lys Lys Leu Leu Glu Glu Ile Phe Pro Arg Phe Gly Met  
 [0583] 165 170 175  
 [0584] Pro Gln Val Leu Gly Thr Ala Asn Gly Pro Ala Phe Val Ser Lys Val

[0585]	180	185	190
[0586]	Ser Gln Thr Val Ala Asp Leu Leu Gly Ile Asp Trp Lys Leu His Cys		
[0587]	195	200	205
[0588]	Ala Tyr Arg Pro Gln Ser Ser Gly Gln Val Glu Arg Met Asn Arg Thr		
[0589]	210	215	220
[0590]	Ile Lys Glu Thr Leu Thr Lys Leu Thr Leu Ala Thr Gly Ser Arg Asp		
[0591]	225	230	235
[0592]	Trp Val Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Tyr Arg Ala Arg Asn Thr Pro		
[0593]	245	250	255
[0594]	Gly Pro His Gly Leu Thr Pro Tyr Glu Ile Leu Tyr Gly Ala Pro Pro		
[0595]	260	265	270
[0596]	Pro Leu Val Asn Phe Pro Asp Pro Asp Met Thr Arg Val Thr Asn Ser		
[0597]	275	280	285
[0598]	Pro Ser Leu Gln Ala His Leu Gln Ala Leu Tyr Leu Val Gln His Glu		
[0599]	290	295	300
[0600]	Val Trp Arg Pro Leu Ala Ala Ala Tyr Gln Glu Gln Leu Asp Arg Pro		
[0601]	305	310	315
[0602]	Val Val Pro His Pro Tyr Arg Val Gly Asp Thr Val Trp Val Arg Arg		
[0603]	325	330	335
[0604]	His Gln Thr Lys Asn Leu Glu Pro Arg Trp Lys Gly Pro Tyr Thr Val		
[0605]	340	345	350
[0606]	Leu Leu Thr Thr Pro Thr Ala Leu Lys Val Asp Gly Ile Ala Ala Trp		
[0607]	355	360	365
[0608]	Ile His Ala Ala His Val Lys Ala Ala Asp Pro Gly Gly Gly Pro Ser		
[0609]	370	375	380
[0610]	Ser Arg Leu Thr Trp Arg Val Gln Arg Ser Gln Asn Pro Leu Lys Ile		
[0611]	385	390	395
[0612]	Arg Leu Thr Arg Glu Ala Pro		
[0613]	405		
[0614]	<210> 11		
[0615]	<211> 407		
[0616]	<212> PRT		
[0617]	<213> 人工序列		
[0618]	<220>		
[0619]	<221> 来源		
[0620]	<223> /注="人工序列描述：合成多肽"		
[0621]	<400> 11		
[0622]	Glu Asn Ser Ser Pro Tyr Thr Ser Glu His Phe His Tyr Thr Val Thr		
[0623]	1	5	10
			15



[0624]	Asp	Ile	Lys	Asp	Leu	Thr	Lys	Leu	Gly	Ala	Ile	Tyr	Asp	Lys	Thr	Lys
[0625]				20					25					30		
[0626]	Lys	Tyr	Trp	Val	Tyr	Gln	Gly	Lys	Pro	Val	Met	Pro	Asp	Gln	Phe	Thr
[0627]			35					40					45			
[0628]	Phe	Glu	Leu	Leu	Asp	Phe	Leu	His	Gln	Leu	Thr	His	Leu	Ser	Phe	Ser
[0629]		50					55					60				
[0630]	Lys	Met	Lys	Ala	Leu	Leu	Glu	Arg	Ser	His	Ser	Pro	Tyr	Tyr	Met	Leu
[0631]	65					70					75				80	
[0632]	Asn	Arg	Asp	Arg	Thr	Leu	Lys	Asn	Ile	Thr	Glu	Thr	Cys	Lys	Ala	Cys
[0633]				85					90					95		
[0634]	Ala	Gln	Val	Asn	Ala	Ser	Lys	Ser	Ala	Val	Lys	Gln	Gly	Thr	Arg	Val
[0635]			100					105					110			
[0636]	Arg	Gly	His	Arg	Pro	Gly	Thr	His	Trp	Glu	Ile	Glu	Phe	Thr	Glu	Ile
[0637]			115					120					125			
[0638]	Lys	Pro	Gly	Leu	Tyr	Gly	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Leu	Val	Phe	Ile	Asp	Thr
[0639]		130					135					140				
[0640]	Phe	Ser	Gly	Trp	Ile	Glu	Ala	Phe	Pro	Thr	Lys	Lys	Glu	Thr	Ala	Lys
[0641]	145					150				155					160	
[0642]	Val	Val	Thr	Lys	Lys	Leu	Leu	Glu	Glu	Ile	Phe	Pro	Arg	Phe	Gly	Met
[0643]				165					170					175		
[0644]	Pro	Gln	Val	Leu	Gly	Thr	Asn	Asn	Gly	Pro	Ala	Phe	Val	Ser	Lys	Val
[0645]			180						185				190			
[0646]	Ser	Gln	Thr	Val	Ala	Asp	Leu	Leu	Gly	Ile	Asp	Trp	Lys	Leu	His	Cys
[0647]		195					200					205				
[0648]	Ala	Tyr	Arg	Pro	Gln	Ser	Ser	Gly	Gln	Val	Glu	Arg	Met	Asn	Arg	Thr
[0649]		210				215					220					
[0650]	Ile	Lys	Glu	Thr	Leu	Thr	Lys	Leu	Thr	Leu	Ala	Thr	Gly	Ser	Arg	Asp
[0651]	225					230				235					240	
[0652]	Trp	Val	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Tyr	Arg	Ala	Arg	Asn	Thr	Pro
[0653]			245						250					255		
[0654]	Gly	Pro	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Tyr	Glu	Ile	Leu	Tyr	Gly	Ala	Pro	Pro
[0655]			260					265					270			
[0656]	Pro	Leu	Val	Asn	Phe	Pro	Asp	Pro	Asp	Met	Thr	Arg	Val	Thr	Asn	Ser
[0657]		275					280					285				
[0658]	Pro	Ser	Leu	Gln	Ala	His	Leu	Gln	Ala	Leu	Tyr	Leu	Val	Gln	His	Glu
[0659]		290					295				300					
[0660]	Val	Trp	Arg	Pro	Leu	Ala	Ala	Ala	Tyr	Gln	Glu	Gln	Leu	Asp	Arg	Pro
[0661]	305					310				315				320		
[0662]	Val	Val	Pro	His	Pro	Tyr	Arg	Val	Gly	Asp	Thr	Val	Trp	Val	Arg	Arg

[0663]	325							330							335				
[0664]	His	Gln	Thr	Lys	Asn	Leu	Glu	Pro	Arg	Trp	Lys	Gly	Pro	Tyr	Thr	Val			
[0665]	340							345							350				
[0666]	Leu	Leu	Thr	Thr	Pro	Thr	Ala	Leu	Lys	Val	Asp	Gly	Ile	Ala	Ala	Trp			
[0667]	355							360							365				
[0668]	Ile	His	Ala	Ala	His	Val	Lys	Ala	Ala	Asp	Pro	Gly	Gly	Gly	Pro	Ser			
[0669]	370							375							380				
[0670]	Ser	Arg	Leu	Thr	Trp	Arg	Val	Gln	Arg	Ser	Gln	Asn	Pro	Leu	Lys	Ile			
[0671]	385				390					395					400				
[0672]	Arg	Leu	Thr	Arg	Glu	Ala	Pro												
[0673]	405																		
[0674]	<210> 12																		
[0675]	<211> 407																		
[0676]	<212> PRT																		
[0677]	<213> 人工序列																		
[0678]	<220>																		
[0679]	<221> 来源																		
[0680]	<223> /注="人工序列描述：合成多肽"																		
[0681]	<400> 12																		
[0682]	Glu	Asn	Ser	Ser	Pro	Tyr	Thr	Ser	Glu	His	Phe	His	Tyr	Thr	Val	Thr			
[0683]	1		5				10				15								
[0684]	Asp	Ile	Lys	Asp	Leu	Thr	Lys	Leu	Gly	Ala	Ile	Tyr	Asp	Lys	Thr	Lys			
[0685]	20							25					30						
[0686]	Lys	Tyr	Trp	Val	Tyr	Gln	Gly	Lys	Pro	Val	Met	Pro	Asp	Gln	Phe	Thr			
[0687]	35							40					45						
[0688]	Phe	Glu	Leu	Leu	Asp	Phe	Leu	His	Gln	Leu	Thr	His	Leu	Ser	Phe	Ser			
[0689]	50				55					60									
[0690]	Lys	Met	Lys	Ala	Leu	Leu	Glu	Arg	Ser	His	Ser	Pro	Tyr	Tyr	Met	Leu			
[0691]	65				70					75					80				
[0692]	Asn	Arg	Asp	Arg	Thr	Leu	Lys	Asn	Ile	Thr	Glu	Thr	Cys	Lys	Ala	Cys			
[0693]	85							90					95						
[0694]	Ala	Gln	Val	Asn	Ala	Ser	Lys	Ser	Ala	Val	Lys	Gln	Gly	Thr	Arg	Val			
[0695]	100							105					110						
[0696]	Arg	Gly	His	Arg	Pro	Gly	Thr	His	Trp	Glu	Ile	Asn	Phe	Thr	Glu	Ile			
[0697]	115							120					125						
[0698]	Lys	Pro	Gly	Leu	Tyr	Gly	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Leu	Val	Phe	Ile	Asp	Thr			
[0699]	130				135					140									
[0700]	Phe	Ser	Gly	Trp	Ile	Glu	Ala	Phe	Pro	Thr	Lys	Lys	Glu	Thr	Ala	Lys			
[0701]	145		150					155					160						

[0702]	Val Val Thr Lys Lys Leu Leu Glu Glu Ile Phe Pro Arg Phe Gly Met
[0703]	165 170 175
[0704]	Pro Gln Val Leu Gly Thr Ala Asn Gly Pro Ala Phe Val Ser Lys Val
[0705]	180 185 190
[0706]	Ser Gln Thr Val Ala Asp Leu Leu Gly Ile Asp Trp Lys Leu His Cys
[0707]	195 200 205
[0708]	Ala Tyr Arg Pro Gln Ser Ser Gly Gln Val Glu Arg Met Asn Arg Thr
[0709]	210 215 220
[0710]	Ile Lys Glu Thr Leu Thr Lys Leu Thr Leu Ala Thr Gly Ser Arg Asp
[0711]	225 230 235 240
[0712]	Trp Val Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Tyr Arg Ala Arg Asn Thr Pro
[0713]	245 250 255
[0714]	Gly Pro His Gly Leu Thr Pro Tyr Glu Ile Leu Tyr Gly Ala Pro Pro
[0715]	260 265 270
[0716]	Pro Leu Val Asn Phe Pro Asp Pro Asp Met Thr Arg Val Thr Asn Ser
[0717]	275 280 285
[0718]	Pro Ser Leu Gln Ala His Leu Gln Ala Leu Tyr Leu Val Gln His Glu
[0719]	290 295 300
[0720]	Val Trp Arg Pro Leu Ala Ala Ala Tyr Gln Glu Gln Leu Asp Arg Pro
[0721]	305 310 315 320
[0722]	Val Val Pro His Pro Tyr Arg Val Gly Asp Thr Val Trp Val Arg Arg
[0723]	325 330 335
[0724]	His Gln Thr Lys Asn Leu Glu Pro Arg Trp Lys Gly Pro Tyr Thr Val
[0725]	340 345 350
[0726]	Leu Leu Thr Thr Pro Thr Ala Leu Lys Val Asp Gly Ile Ala Ala Trp
[0727]	355 360 365
[0728]	Ile His Ala Ala His Val Lys Ala Ala Asp Pro Gly Gly Gly Pro Ser
[0729]	370 375 380
[0730]	Ser Arg Leu Thr Trp Arg Val Gln Arg Ser Gln Asn Pro Leu Lys Ile
[0731]	385 390 395 400
[0732]	Arg Leu Thr Arg Glu Ala Pro
[0733]	405
[0734]	<210> 13
[0735]	<211> 407
[0736]	<212> PRT
[0737]	<213> 人工序列
[0738]	<220>
[0739]	<221> 来源
[0740]	<223> /注="人工序列描述：合成多肽"

[0741]	<400>	13														
[0742]	Glu	Asn	Ser	Ser	Pro	Tyr	Thr	Ser	Glu	His	Phe	His	Tyr	Thr	Val	Thr
[0743]	1				5					10					15	
[0744]	Asp	Ile	Lys	Asp	Leu	Thr	Lys	Leu	Gly	Ala	Ile	Tyr	Asp	Lys	Thr	Lys
[0745]					20					25					30	
[0746]	Lys	Tyr	Trp	Val	Tyr	Gln	Gly	Lys	Pro	Val	Met	Pro	Asp	Gln	Phe	Thr
[0747]					35					40					45	
[0748]	Phe	Glu	Leu	Leu	Asp	Phe	Leu	His	Gln	Leu	Thr	His	Leu	Ser	Phe	Ser
[0749]					50					55					60	
[0750]	Lys	Met	Lys	Ala	Leu	Leu	Glu	Arg	Ser	His	Ser	Pro	Tyr	Tyr	Met	Leu
[0751]	65									70					75	80
[0752]	Asn	Arg	Asp	Arg	Thr	Leu	Lys	Asn	Ile	Thr	Glu	Thr	Cys	Lys	Ala	Cys
[0753]					85						90					95
[0754]	Ala	Gln	Val	Asn	Ala	Ser	Lys	Ser	Ala	Val	Lys	Gln	Gly	Thr	Arg	Val
[0755]					100					105					110	
[0756]	Arg	Gly	His	Arg	Pro	Gly	Thr	His	Trp	Glu	Ile	Asn	Phe	Thr	Glu	Ile
[0757]					115					120					125	
[0758]	Lys	Pro	Gly	Leu	Tyr	Gly	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Leu	Val	Phe	Ile	Asp	Thr
[0759]					130					135					140	
[0760]	Phe	Ser	Gly	Trp	Ile	Glu	Ala	Phe	Pro	Thr	Lys	Lys	Glu	Thr	Ala	Lys
[0761]	145									150					155	160
[0762]	Val	Val	Thr	Lys	Lys	Leu	Leu	Glu	Glu	Ile	Phe	Pro	Arg	Phe	Gly	Met
[0763]					165						170					175
[0764]	Pro	Gln	Val	Leu	Gly	Thr	Asn	Asn	Gly	Pro	Ala	Phe	Val	Ser	Lys	Val
[0765]					180						185				190	
[0766]	Ser	Gln	Thr	Val	Ala	Asp	Leu	Leu	Gly	Ile	Asp	Trp	Lys	Leu	His	Cys
[0767]					195					200					205	
[0768]	Ala	Tyr	Arg	Pro	Gln	Ser	Ser	Gly	Gln	Val	Glu	Arg	Met	Asn	Arg	Thr
[0769]					210					215					220	
[0770]	Ile	Lys	Glu	Thr	Leu	Thr	Lys	Leu	Thr	Leu	Ala	Thr	Gly	Ser	Arg	Asp
[0771]	225									230					235	240
[0772]	Trp	Val	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Tyr	Arg	Ala	Arg	Asn	Thr	Pro
[0773]					245						250					255
[0774]	Gly	Pro	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Tyr	Glu	Ile	Leu	Tyr	Gly	Ala	Pro	Pro
[0775]					260					265					270	
[0776]	Pro	Leu	Val	Asn	Phe	Pro	Asp	Pro	Asp	Met	Thr	Arg	Val	Thr	Asn	Ser
[0777]					275					280					285	
[0778]	Pro	Ser	Leu	Gln	Ala	His	Leu	Gln	Ala	Leu	Tyr	Leu	Val	Gln	His	Glu
[0779]					290					295					300	

[0780]	Val Trp Arg Pro Leu Ala Ala Ala Tyr Gln Glu Gln Leu Asp Arg Pro
[0781]	305 310 315 320
[0782]	Val Val Pro His Pro Tyr Arg Val Gly Asp Thr Val Trp Val Arg Arg
[0783]	325 330 335
[0784]	His Gln Thr Lys Asn Leu Glu Pro Arg Trp Lys Gly Pro Tyr Thr Val
[0785]	340 345 350
[0786]	Leu Leu Thr Thr Pro Thr Ala Leu Lys Val Asp Gly Ile Ala Ala Trp
[0787]	355 360 365
[0788]	Ile His Ala Ala His Val Lys Ala Ala Asp Pro Gly Gly Gly Pro Ser
[0789]	370 375 380
[0790]	Ser Arg Leu Thr Trp Arg Val Gln Arg Ser Gln Asn Pro Leu Lys Ile
[0791]	385 390 395 400
[0792]	Arg Leu Thr Arg Glu Ala Pro
[0793]	405
[0794]	<210> 14
[0795]	<211> 407
[0796]	<212> PRT
[0797]	<213> 人工序列
[0798]	<220>
[0799]	<221> 来源
[0800]	<223> /注="人工序列描述：合成多肽"
[0801]	<400> 14
[0802]	Glu Asn Ser Ser Pro Tyr Thr Ser Glu His Phe His Tyr Thr Val Thr
[0803]	1 5 10 15
[0804]	Asp Ile Lys Asp Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ile Tyr Asp Lys Thr Lys
[0805]	20 25 30
[0806]	Lys Tyr Trp Val Tyr Gln Gly Lys Pro Val Met Pro Asp Gln Phe Thr
[0807]	35 40 45
[0808]	Phe Glu Leu Leu Asp Phe Leu His Gln Leu Thr His Leu Ser Phe Ser
[0809]	50 55 60
[0810]	Lys Met Lys Ala Leu Leu Glu Arg Ser His Ser Pro Tyr Tyr Met Leu
[0811]	65 70 75 80
[0812]	Asn Arg Asp Arg Thr Leu Lys Asn Ile Thr Glu Thr Cys Lys Ala Cys
[0813]	85 90 95
[0814]	Ala Gln Val Asn Ala Ser Lys Ser Ala Val Lys Gln Gly Thr Arg Val
[0815]	100 105 110
[0816]	Arg Gly His Arg Pro Gly Thr His Trp Glu Ile Val Phe Thr Glu Ile
[0817]	115 120 125
[0818]	Lys Pro Gly Leu Tyr Gly Tyr Lys Tyr Leu Leu Val Phe Ile Asp Thr

[0819]	130	135	140
[0820]	Phe Ser Gly Trp Ile Glu Ala Phe Pro Thr Lys Lys Glu Thr Ala Lys		
[0821]	145	150	155
[0822]	Val Val Thr Lys Lys Leu Leu Glu Glu Ile Phe Pro Arg Phe Gly Met		160
[0823]	165	170	175
[0824]	Pro Gln Val Leu Gly Thr Ala Asn Gly Pro Ala Phe Val Ser Lys Val		
[0825]	180	185	190
[0826]	Ser Gln Thr Val Ala Asp Leu Leu Gly Ile Asp Trp Lys Leu His Cys		
[0827]	195	200	205
[0828]	Ala Tyr Arg Pro Gln Ser Ser Gly Gln Val Glu Arg Met Asn Arg Thr		
[0829]	210	215	220
[0830]	Ile Lys Glu Thr Leu Thr Lys Leu Thr Leu Ala Thr Gly Ser Arg Asp		
[0831]	225	230	235
[0832]	Trp Val Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Tyr Arg Ala Arg Asn Thr Pro		
[0833]	245	250	255
[0834]	Gly Pro His Gly Leu Thr Pro Tyr Glu Ile Leu Tyr Gly Ala Pro Pro		
[0835]	260	265	270
[0836]	Pro Leu Val Asn Phe Pro Asp Pro Asp Met Thr Arg Val Thr Asn Ser		
[0837]	275	280	285
[0838]	Pro Ser Leu Gln Ala His Leu Gln Ala Leu Tyr Leu Val Gln His Glu		
[0839]	290	295	300
[0840]	Val Trp Arg Pro Leu Ala Ala Tyr Gln Glu Gln Leu Asp Arg Pro		
[0841]	305	310	315
[0842]	Val Val Pro His Pro Tyr Arg Val Gly Asp Thr Val Trp Val Arg Arg		
[0843]	325	330	335
[0844]	His Gln Thr Lys Asn Leu Glu Pro Arg Trp Lys Gly Pro Tyr Thr Val		
[0845]	340	345	350
[0846]	Leu Leu Thr Thr Pro Thr Ala Leu Lys Val Asp Gly Ile Ala Ala Trp		
[0847]	355	360	365
[0848]	Ile His Ala Ala His Val Lys Ala Ala Asp Pro Gly Gly Gly Pro Ser		
[0849]	370	375	380
[0850]	Ser Arg Leu Thr Trp Arg Val Gln Arg Ser Gln Asn Pro Leu Lys Ile		
[0851]	385	390	395
[0852]	Arg Leu Thr Arg Glu Ala Pro		400
[0853]	405		
[0854]	<210> 15		
[0855]	<211> 407		
[0856]	<212> PRT		
[0857]	<213> 人工序列		

[0858]	<220>															
[0859]	<221> 来源															
[0860]	<223> /注="人工序列描述：合成多肽"															
[0861]	<400> 15															
[0862]	Glu	Asn	Ser	Ser	Pro	Tyr	Thr	Ser	Glu	His	Phe	His	Tyr	Thr	Val	Thr
[0863]	1				5					10					15	
[0864]	Asp	Ile	Lys	Asp	Leu	Thr	Lys	Leu	Gly	Ala	Ile	Tyr	Asp	Lys	Thr	Lys
[0865]				20					25					30		
[0866]	Lys	Tyr	Trp	Val	Tyr	Gln	Gly	Lys	Pro	Val	Met	Pro	Asp	Gln	Phe	Thr
[0867]			35					40					45			
[0868]	Phe	Glu	Leu	Leu	Asp	Phe	Leu	His	Gln	Leu	Thr	His	Leu	Ser	Phe	Ser
[0869]		50					55					60				
[0870]	Lys	Met	Lys	Ala	Leu	Leu	Glu	Arg	Ser	His	Ser	Pro	Tyr	Tyr	Met	Leu
[0871]	65					70					75				80	
[0872]	Asn	Arg	Asp	Arg	Thr	Leu	Lys	Asn	Ile	Thr	Glu	Thr	Cys	Lys	Ala	Cys
[0873]				85						90					95	
[0874]	Ala	Gln	Val	Asn	Ala	Ser	Lys	Ser	Ala	Val	Lys	Gln	Gly	Thr	Arg	Val
[0875]				100					105					110		
[0876]	Arg	Gly	His	Arg	Pro	Gly	Thr	His	Trp	Glu	Ile	Val	Phe	Thr	Glu	Ile
[0877]			115					120					125			
[0878]	Lys	Pro	Gly	Leu	Tyr	Gly	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Leu	Val	Phe	Ile	Asp	Thr
[0879]		130					135					140				
[0880]	Phe	Ser	Gly	Trp	Ile	Glu	Ala	Phe	Pro	Thr	Lys	Lys	Glu	Thr	Ala	Lys
[0881]	145					150					155					160
[0882]	Val	Val	Thr	Lys	Lys	Leu	Leu	Glu	Glu	Ile	Phe	Pro	Arg	Phe	Gly	Met
[0883]				165						170					175	
[0884]	Pro	Gln	Val	Leu	Gly	Thr	Asn	Asn	Gly	Pro	Ala	Phe	Val	Ser	Lys	Val
[0885]				180					185					190		
[0886]	Ser	Gln	Thr	Val	Ala	Asp	Leu	Leu	Gly	Ile	Asp	Trp	Lys	Leu	His	Cys
[0887]			195					200					205			
[0888]	Ala	Tyr	Arg	Pro	Gln	Ser	Ser	Gly	Gln	Val	Glu	Arg	Met	Asn	Arg	Thr
[0889]		210					215					220				
[0890]	Ile	Lys	Glu	Thr	Leu	Thr	Lys	Leu	Thr	Leu	Ala	Thr	Gly	Ser	Arg	Asp
[0891]	225					230					235					240
[0892]	Trp	Val	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Tyr	Arg	Ala	Arg	Asn	Thr	Pro
[0893]				245						250					255	
[0894]	Gly	Pro	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Tyr	Glu	Ile	Leu	Tyr	Gly	Ala	Pro	Pro
[0895]				260					265					270		
[0896]	Pro	Leu	Val	Asn	Phe	Pro	Asp	Pro	Asp	Met	Thr	Arg	Val	Thr	Asn	Ser

[0897]	275	280	285
[0898]	Pro Ser Leu Gln Ala His Leu Gln Ala Leu Tyr Leu Val Gln His Glu		
[0899]	290	295	300
[0900]	Val Trp Arg Pro Leu Ala Ala Ala Tyr Gln Glu Gln Leu Asp Arg Pro		
[0901]	305	310	315
[0902]	Val Val Pro His Pro Tyr Arg Val Gly Asp Thr Val Trp Val Arg Arg		
[0903]	325	330	335
[0904]	His Gln Thr Lys Asn Leu Glu Pro Arg Trp Lys Gly Pro Tyr Thr Val		
[0905]	340	345	350
[0906]	Leu Leu Thr Thr Pro Thr Ala Leu Lys Val Asp Gly Ile Ala Ala Trp		
[0907]	355	360	365
[0908]	Ile His Ala Ala His Val Lys Ala Ala Asp Pro Gly Gly Gly Pro Ser		
[0909]	370	375	380
[0910]	Ser Arg Leu Thr Trp Arg Val Gln Arg Ser Gln Asn Pro Leu Lys Ile		
[0911]	385	390	395
[0912]	Arg Leu Thr Arg Glu Ala Pro		400
[0913]	405		
[0914]	<210> 16		
[0915]	<211> 164		
[0916]	<212> PRT		
[0917]	<213> 智人		
[0918]	<400> 16		
[0919]	Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu		
[0920]	1	5	10
[0921]	Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys		15
[0922]	20	25	30
[0923]	Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala		
[0924]	35	40	45
[0925]	Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr		
[0926]	50	55	60
[0927]	Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg		
[0928]	65	70	75
[0929]	Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met		
[0930]	85	90	95
[0931]	Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn		
[0932]	100	105	110
[0933]	Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met		
[0934]	115	120	125
[0935]	Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly		



[0936]	130	135	140
[0937]	Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala		
[0938]	145	150	155
[0939]	Leu Pro Pro Arg		
[0940]	<210> 17		
[0941]	<211> 220		
[0942]	<212> PRT		
[0943]	<213> 智人		
[0944]	<400> 17		
[0945]	Met Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Leu Phe Pro Ser Ile Gln Val		
[0946]	1	5	10
[0947]	Thr Gly Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr		
[0948]	20	25	30
[0949]	Asp Asn Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser		
[0950]	35	40	45
[0951]	Arg Glu Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu		
[0952]	50	55	60
[0953]	Val Cys Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser		
[0954]	65	70	75
[0955]	Lys Thr Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr		
[0956]	85	90	95
[0957]	Phe Tyr Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys		
[0958]	100	105	110
[0959]	Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser		
[0960]	115	120	125
[0961]	Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro		
[0962]	130	135	140
[0963]	Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly		
[0964]	145	150	155
[0965]	Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile		
[0966]	165	170	175
[0967]	Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met		
[0968]	180	185	190
[0969]	Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro		
[0970]	195	200	205
[0971]	Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser		
[0972]	210	215	220
[0973]	<210> 18		
[0974]	<211> 255		

[0975]	<212> PRT															
[0976]	<213> 智人															
[0977]	<400> 18															
[0978]	Met	Gly	Asn	Ser	Cys	Tyr	Asn	Ile	Val	Ala	Thr	Leu	Leu	Leu	Val	Leu
[0979]	1				5					10					15	
[0980]	Asn	Phe	Glu	Arg	Thr	Arg	Ser	Leu	Gln	Asp	Pro	Cys	Ser	Asn	Cys	Pro
[0981]				20					25					30		
[0982]	Ala	Gly	Thr	Phe	Cys	Asp	Asn	Asn	Arg	Asn	Gln	Ile	Cys	Ser	Pro	Cys
[0983]			35					40					45			
[0984]	Pro	Pro	Asn	Ser	Phe	Ser	Ser	Ala	Gly	Gly	Gln	Arg	Thr	Cys	Asp	Ile
[0985]		50					55				60					
[0986]	Cys	Arg	Gln	Cys	Lys	Gly	Val	Phe	Arg	Thr	Arg	Lys	Glu	Cys	Ser	Ser
[0987]	65					70					75					80
[0988]	Thr	Ser	Asn	Ala	Glu	Cys	Asp	Cys	Thr	Pro	Gly	Phe	His	Cys	Leu	Gly
[0989]				85					90						95	
[0990]	Ala	Gly	Cys	Ser	Met	Cys	Glu	Gln	Asp	Cys	Lys	Gln	Gly	Gln	Glu	Leu
[0991]				100					105						110	
[0992]	Thr	Lys	Lys	Gly	Cys	Lys	Asp	Cys	Cys	Phe	Gly	Thr	Phe	Asn	Asp	Gln
[0993]			115						120					125		
[0994]	Lys	Arg	Gly	Ile	Cys	Arg	Pro	Trp	Thr	Asn	Cys	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys
[0995]		130						135				140				
[0996]	Ser	Val	Leu	Val	Asn	Gly	Thr	Lys	Glu	Arg	Asp	Val	Val	Cys	Gly	Pro
[0997]	145					150					155					160
[0998]	Ser	Pro	Ala	Asp	Leu	Ser	Pro	Gly	Ala	Ser	Ser	Val	Thr	Pro	Pro	Ala
[0999]				165					170						175	
[1000]	Pro	Ala	Arg	Glu	Pro	Gly	His	Ser	Pro	Gln	Ile	Ile	Ser	Phe	Phe	Leu
[1001]			180						185					190		
[1002]	Ala	Leu	Thr	Ser	Thr	Ala	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Phe	Phe	Leu	Thr	Leu
[1003]			195						200					205		
[1004]	Arg	Phe	Ser	Val	Val	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe
[1005]		210						215				220				
[1006]	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly
[1007]	225					230					235					240
[1008]	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	
[1009]				245						250					255	
[1010]	<210> 19															
[1011]	<211> 277															
[1012]	<212> PRT															
[1013]	<213> 智人															

[1014]	<400> 19
[1015]	Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
[1016]	1 5 10 15
[1017]	Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val
[1018]	20 25 30
[1019]	Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro
[1020]	35 40 45
[1021]	Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys
[1022]	50 55 60
[1023]	Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro
[1024]	65 70 75 80
[1025]	Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys
[1026]	85 90 95
[1027]	Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly
[1028]	100 105 110
[1029]	Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys
[1030]	115 120 125
[1031]	Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp
[1032]	130 135 140
[1033]	Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn
[1034]	145 150 155 160
[1035]	Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro
[1036]	165 170 175
[1037]	Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr
[1038]	180 185 190
[1039]	Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu
[1040]	195 200 205
[1041]	Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val
[1042]	210 215 220
[1043]	Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu
[1044]	225 230 235 240
[1045]	Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly
[1046]	245 250 255
[1047]	Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser
[1048]	260 265 270
[1049]	Thr Leu Ala Lys Ile
[1050]	275
[1051]	<210> 20
[1052]	<211> 199

[1053]	<212>	PRT
[1054]	<213>	智人
[1055]	<400>	20
[1056]	Met Lys Ser Gly Leu Trp Tyr Phe Phe Leu Phe Cys Leu Arg Ile Lys	
[1057]	1 5 10 15	
[1058]	Val Leu Thr Gly Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asn Tyr Glu Met Phe Ile	
[1059]	20 25 30	
[1060]	Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile Leu Cys Lys Tyr Pro Asp Ile Val	
[1061]	35 40 45	
[1062]	Gln Gln Phe Lys Met Gln Leu Leu Lys Gly Gly Gln Ile Leu Cys Asp	
[1063]	50 55 60	
[1064]	Leu Thr Lys Thr Lys Gly Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Ser Leu	
[1065]	65 70 75 80	
[1066]	Lys Phe Cys His Ser Gln Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu	
[1067]	85 90 95	
[1068]	Tyr Asn Leu Asp His Ser His Ala Asn Tyr Tyr Phe Cys Asn Leu Ser	
[1069]	100 105 110	
[1070]	Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Lys Val Thr Leu Thr Gly Gly Tyr Leu	
[1071]	115 120 125	
[1072]	His Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Phe Trp Leu Pro	
[1073]	130 135 140	
[1074]	Ile Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys Ile Leu	
[1075]	145 150 155 160	
[1076]	Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro	
[1077]	165 170 175	
[1078]	Asn Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser	
[1079]	180 185 190	
[1080]	Arg Leu Thr Asp Val Thr Leu	
[1081]	195	
[1082]	<210>	21
[1083]	<211>	93
[1084]	<212>	PRT
[1085]	<213>	智人
[1086]	<400>	21
[1087]	Met Ile His Leu Gly His Ile Leu Phe Leu Leu Leu Leu Pro Val Ala	
[1088]	1 5 10 15	
[1089]	Ala Ala Gln Thr Thr Pro Gly Glu Arg Ser Ser Leu Pro Ala Phe Tyr	
[1090]	20 25 30	
[1091]	Pro Gly Thr Ser Gly Ser Cys Ser Gly Cys Gly Ser Leu Ser Leu Pro	

[1092]	35	40	45
[1093]	Leu Leu Ala Gly Leu Val Ala Ala Asp Ala Val Ala Ser Leu Leu Ile		
[1094]	50	55	60
[1095]	Val Gly Ala Val Phe Leu Cys Ala Arg Pro Arg Arg Ser Pro Ala Gln		
[1096]	65	70	75
[1097]	Glu Asp Gly Lys Val Tyr Ile Asn Met Pro Gly Arg Gly		80
[1098]	85	90	
[1099]	<210> 22		
[1100]	<211> 235		
[1101]	<212> PRT		
[1102]	<213> 智人		
[1103]	<400> 22		
[1104]	Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu		
[1105]	1	5	10
[1106]	His Ala Ala Arg Pro Ser Gln Phe Arg Val Ser Pro Leu Asp Arg Thr		15
[1107]	20	25	30
[1108]	Trp Asn Leu Gly Glu Thr Val Glu Leu Lys Cys Gln Val Leu Leu Ser		
[1109]	35	40	45
[1110]	Asn Pro Thr Ser Gly Cys Ser Trp Leu Phe Gln Pro Arg Gly Ala Ala		
[1111]	50	55	60
[1112]	Ala Ser Pro Thr Phe Leu Leu Tyr Leu Ser Gln Asn Lys Pro Lys Ala		
[1113]	65	70	75
[1114]	Ala Glu Gly Leu Asp Thr Gln Arg Phe Ser Gly Lys Arg Leu Gly Asp		80
[1115]	85	90	95
[1116]	Thr Phe Val Leu Thr Leu Ser Asp Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr		
[1117]	100	105	110
[1118]	Tyr Phe Cys Ser Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe		
[1119]	115	120	125
[1120]	Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg		
[1121]	130	135	140
[1122]	Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg		
[1123]	145	150	155
[1124]	Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly		160
[1125]	165	170	175
[1126]	Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr		
[1127]	180	185	190
[1128]	Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His		
[1129]	195	200	205
[1130]	Arg Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Lys Ser		

[1131]	210	215	220
[1132]	Gly Asp Lys Pro Ser Leu Ser Ala Arg Tyr Val		
[1133]	225	230	235
[1134]	<210> 23		
[1135]	<211> 458		
[1136]	<212> PRT		
[1137]	<213> 智人		
[1138]	<400> 23		
[1139]	Met Asn Arg Gly Val Pro Phe Arg His Leu Leu Leu Val Leu Gln Leu		
[1140]	1	5	10
[1141]	Ala Leu Leu Pro Ala Ala Thr Gln Gly Lys Lys Val Val Leu Gly Lys		
[1142]	20	25	30
[1143]	Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln Lys Lys Ser		
[1144]	35	40	45
[1145]	Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn Gln Ile Lys Ile Leu Gly Asn		
[1146]	50	55	60
[1147]	Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys Leu Asn Asp Arg Ala		
[1148]	65	70	75
[1149]	Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln Gly Asn Phe Pro Leu Ile Ile		
[1150]	85	90	95
[1151]	Lys Asn Leu Lys Ile Glu Asp Ser Asp Thr Tyr Ile Cys Glu Val Glu		
[1152]	100	105	110
[1153]	Asp Gln Lys Glu Glu Val Gln Leu Leu Val Phe Gly Leu Thr Ala Asn		
[1154]	115	120	125
[1155]	Ser Asp Thr His Leu Leu Gln Gly Gln Ser Leu Thr Leu Thr Leu Glu		
[1156]	130	135	140
[1157]	Ser Pro Pro Gly Ser Ser Pro Ser Val Gln Cys Arg Ser Pro Arg Gly		
[1158]	145	150	155
[1159]	Lys Asn Ile Gln Gly Gly Lys Thr Leu Ser Val Ser Gln Leu Glu Leu		
[1160]	165	170	175
[1161]	Gln Asp Ser Gly Thr Trp Thr Cys Thr Val Leu Gln Asn Gln Lys Lys		
[1162]	180	185	190
[1163]	Val Glu Phe Lys Ile Asp Ile Val Val Leu Ala Phe Gln Lys Ala Ser		
[1164]	195	200	205
[1165]	Ser Ile Val Tyr Lys Lys Glu Gly Glu Gln Val Glu Phe Ser Phe Pro		
[1166]	210	215	220
[1167]	Leu Ala Phe Thr Val Glu Lys Leu Thr Gly Ser Gly Glu Leu Trp Trp		
[1168]	225	230	235
[1169]	Gln Ala Glu Arg Ala Ser Ser Ser Lys Ser Trp Ile Thr Phe Asp Leu		

[1170]	245	250	255
[1171]	Lys Asn Lys Glu Val Ser Val Lys Arg Val Thr Gln Asp Pro Lys Leu		
[1172]	260	265	270
[1173]	Gln Met Gly Lys Lys Leu Pro Leu His Leu Thr Leu Pro Gln Ala Leu		
[1174]	275	280	285
[1175]	Pro Gln Tyr Ala Gly Ser Gly Asn Leu Thr Leu Ala Leu Glu Ala Lys		
[1176]	290	295	300
[1177]	Thr Gly Lys Leu His Gln Glu Val Asn Leu Val Val Met Arg Ala Thr		
[1178]	305	310	315
[1179]	Gln Leu Gln Lys Asn Leu Thr Cys Glu Val Trp Gly Pro Thr Ser Pro		
[1180]	325	330	335
[1181]	Lys Leu Met Leu Ser Leu Lys Leu Glu Asn Lys Glu Ala Lys Val Ser		
[1182]	340	345	350
[1183]	Lys Arg Glu Lys Ala Val Trp Val Leu Asn Pro Glu Ala Gly Met Trp		
[1184]	355	360	365
[1185]	Gln Cys Leu Leu Ser Asp Ser Gly Gln Val Leu Leu Glu Ser Asn Ile		
[1186]	370	375	380
[1187]	Lys Val Leu Pro Thr Trp Ser Thr Pro Val Gln Pro Met Ala Leu Ile		
[1188]	385	390	395
[1189]	Val Leu Gly Gly Val Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile Gly Leu Gly Ile		
[1190]	405	410	415
[1191]	Phe Phe Cys Val Arg Cys Arg His Arg Arg Arg Gln Ala Glu Arg Met		
[1192]	420	425	430
[1193]	Ser Gln Ile Lys Arg Leu Leu Ser Glu Lys Lys Thr Cys Gln Cys Pro		
[1194]	435	440	445
[1195]	His Arg Phe Gln Lys Thr Cys Ser Pro Ile		
[1196]	450	455	
[1197]	<210> 24		
[1198]	<211> 99		
[1199]	<212> RNA		
[1200]	<213> 人工序列		
[1201]	<220>		
[1202]	<221> 来源		
[1203]	<223> /注="人工序列描述：合成寡核苷酸"		
[1204]	<400> 24		
[1205]	cagggguucug gauaucugug uuuuagagcu agaaauagca aguuaaaaaua aggcuaagucc 60		
[1206]	guuaucaacu ugaaaaagug gcaccgaguc ggugcuuuu 99		
[1207]	<210> 25		
[1208]	<211> 49		

- [1209] <212> DNA  
[1210] <213> 人工序列  
[1211] <220>  
[1212] <221> 来源  
[1213] <223> /注="人工序列描述：合成寡核苷酸"  
[1214] <400> 25  
[1215] ttgtcccaca gatatccaga accctgaccc tgccgtgtac cagctgaga 49  
[1216] <210> 26  
[1217] <211> 99  
[1218] <212> RNA  
[1219] <213> 人工序列  
[1220] <220>  
[1221] <221> 来源  
[1222] <223> /注="人工序列描述：合成寡核苷酸"  
[1223] <400> 26  
[1224] cagggauucug gauaucugug uuuuagagcu agaaauagca aguuaaaaua aggcuaagucc 60  
[1225] guuaucacu ugaaaaagug gcaccgaguc ggugcuuuu 99  
[1226] <210> 27  
[1227] <211> 99  
[1228] <212> RNA  
[1229] <213> 人工序列  
[1230] <220>  
[1231] <221> 来源  
[1232] <223> /注="人工序列描述：合成寡核苷酸"  
[1233] <400> 27  
[1234] ggccacggag cgagacau cuuuuagagcu agaaauagca aguuaaaaua aggcuaagucc 60  
[1235] guuaucacu ugaaaaagug gcaccgaguc ggugcuuuu 99  
[1236] <210> 28  
[1237] <211> 47  
[1238] <212> DNA  
[1239] <213> 人工序列  
[1240] <220>  
[1241] <221> 来源  
[1242] <223> /注="人工序列描述：合成寡核苷酸"  
[1243] <400> 28  
[1244] ttagctgtgc tcgcgtact ctctctttct ggccctggagg ctatcca 47  
[1245] <210> 29  
[1246] <211> 18  
[1247] <212> DNA



[1248] <213> 人工序列  
[1249] <220>  
[1250] <221> 来源  
[1251] <223> /注="人工序列描述: 合成引物"  
[1252] <400> 29  
[1253] aacccgttga accccatt 18  
[1254] <210> 30  
[1255] <211> 20  
[1256] <212> DNA  
[1257] <213> 人工序列  
[1258] <220>  
[1259] <221> 来源  
[1260] <223> /注="人工序列描述: 合成引物"  
[1261] <400> 30  
[1262] ccatccaatc ggtagtagcg 20  
[1263] <210> 31  
[1264] <211> 20  
[1265] <212> DNA  
[1266] <213> 人工序列  
[1267] <220>  
[1268] <221> 来源  
[1269] <223> /注="人工序列描述: 合成引物"  
[1270] <400> 31  
[1271] cgtgcagtct aaagacttgg 20  
[1272] <210> 32  
[1273] <211> 20  
[1274] <212> DNA  
[1275] <213> 人工序列  
[1276] <220>  
[1277] <221> 来源  
[1278] <223> /注="人工序列描述: 合成引物"  
[1279] <400> 32  
[1280] ataggggact tggacaaagg 20  
[1281] <210> 33  
[1282] <211> 20  
[1283] <212> DNA  
[1284] <213> 人工序列  
[1285] <220>  
[1286] <221> 来源

[1287] <223> /注="人工序列描述：合成引物"  
[1288] <400> 33  
[1289] gaaaccagct tcattgccgt 20  
[1290] <210> 34  
[1291] <211> 20  
[1292] <212> DNA  
[1293] <213> 人工序列  
[1294] <220>  
[1295] <221> 来源  
[1296] <223> /注="人工序列描述：合成引物"  
[1297] <400> 34  
[1298] cccaaggaa ttgacagttg 20  
[1299] <210> 35  
[1300] <211> 20  
[1301] <212> DNA  
[1302] <213> 人工序列  
[1303] <220>  
[1304] <221> 来源  
[1305] <223> /注="人工序列描述：合成引物"  
[1306] <400> 35  
[1307] actggttccc actggatgag 20  
[1308] <210> 36  
[1309] <211> 20  
[1310] <212> DNA  
[1311] <213> 人工序列  
[1312] <220>  
[1313] <221> 来源  
[1314] <223> /注="人工序列描述：合成引物"  
[1315] <400> 36  
[1316] ccacgccatc ctctgtaact 20  
[1317] <210> 37  
[1318] <211> 20  
[1319] <212> DNA  
[1320] <213> 人工序列  
[1321] <220>  
[1322] <221> 来源  
[1323] <223> /注="人工序列描述：合成引物"  
[1324] <400> 37  
[1325] cacaaccaca ctctggagga 20

- [1326] <210> 38  
[1327] <211> 20  
[1328] <212> DNA  
[1329] <213> 人工序列  
[1330] <220>  
[1331] <221> 来源  
[1332] <223> /注="人工序列描述: 合成引物"  
[1333] <400> 38  
[1334] ggttttctggt ctggatgcct 20  
[1335] <210> 39  
[1336] <211> 20  
[1337] <212> DNA  
[1338] <213> 人工序列  
[1339] <220>  
[1340] <221> 来源  
[1341] <223> /注="人工序列描述: 合成引物"  
[1342] <400> 39  
[1343] acaatgagaa gagcaatgga 20  
[1344] <210> 40  
[1345] <211> 20  
[1346] <212> DNA  
[1347] <213> 人工序列  
[1348] <220>  
[1349] <221> 来源  
[1350] <223> /注="人工序列描述: 合成引物"  
[1351] <400> 40  
[1352] gagattgtcc tggtttctgt 20  
[1353] <210> 41  
[1354] <211> 80  
[1355] <212> DNA  
[1356] <213> 人工序列  
[1357] <220>  
[1358] <221> 来源  
[1359] <223> /注="人工序列描述: 合成寡核苷酸"  
[1360] <400> 41  
[1361] tcctaaccct gatcctcttg tcccacagat atccagaacc ctgaccctgc cgtgtaccag 60  
[1362] ctgagagact ctaaattccag 80

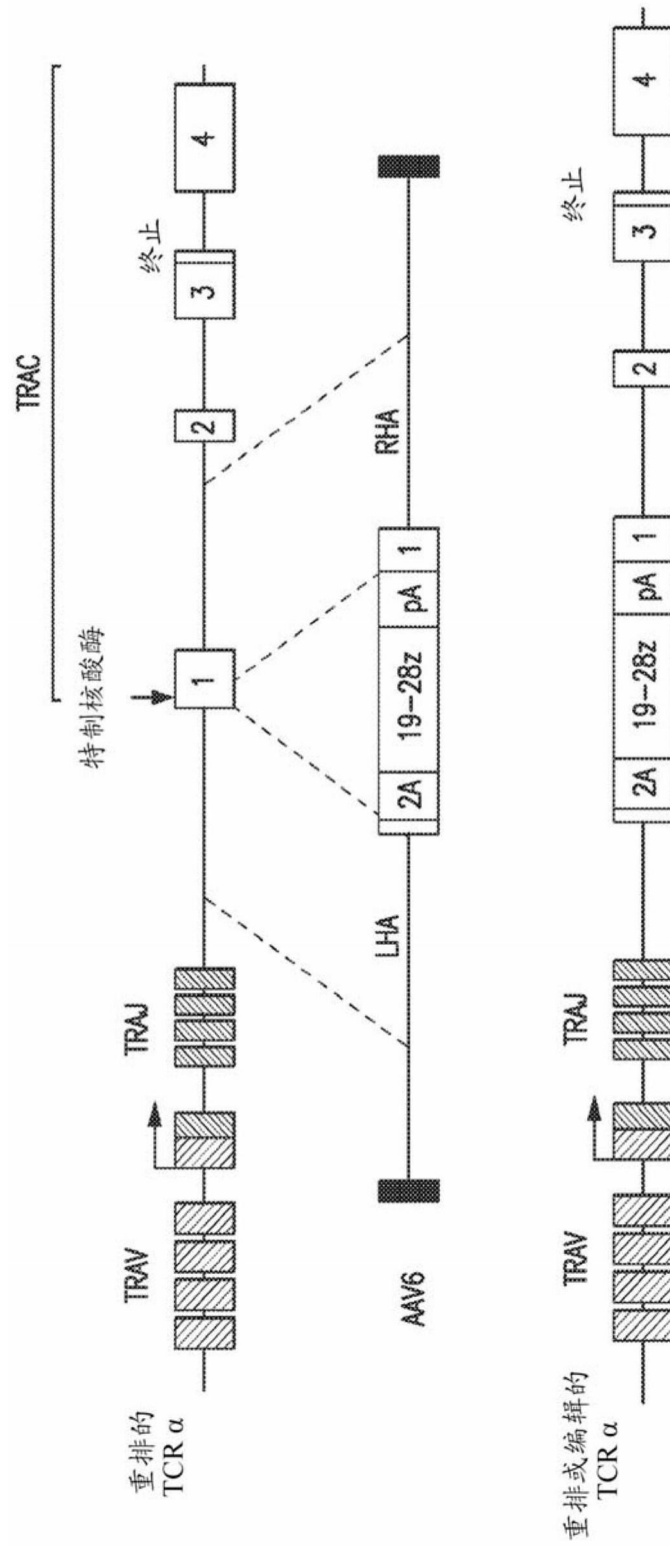


图1A

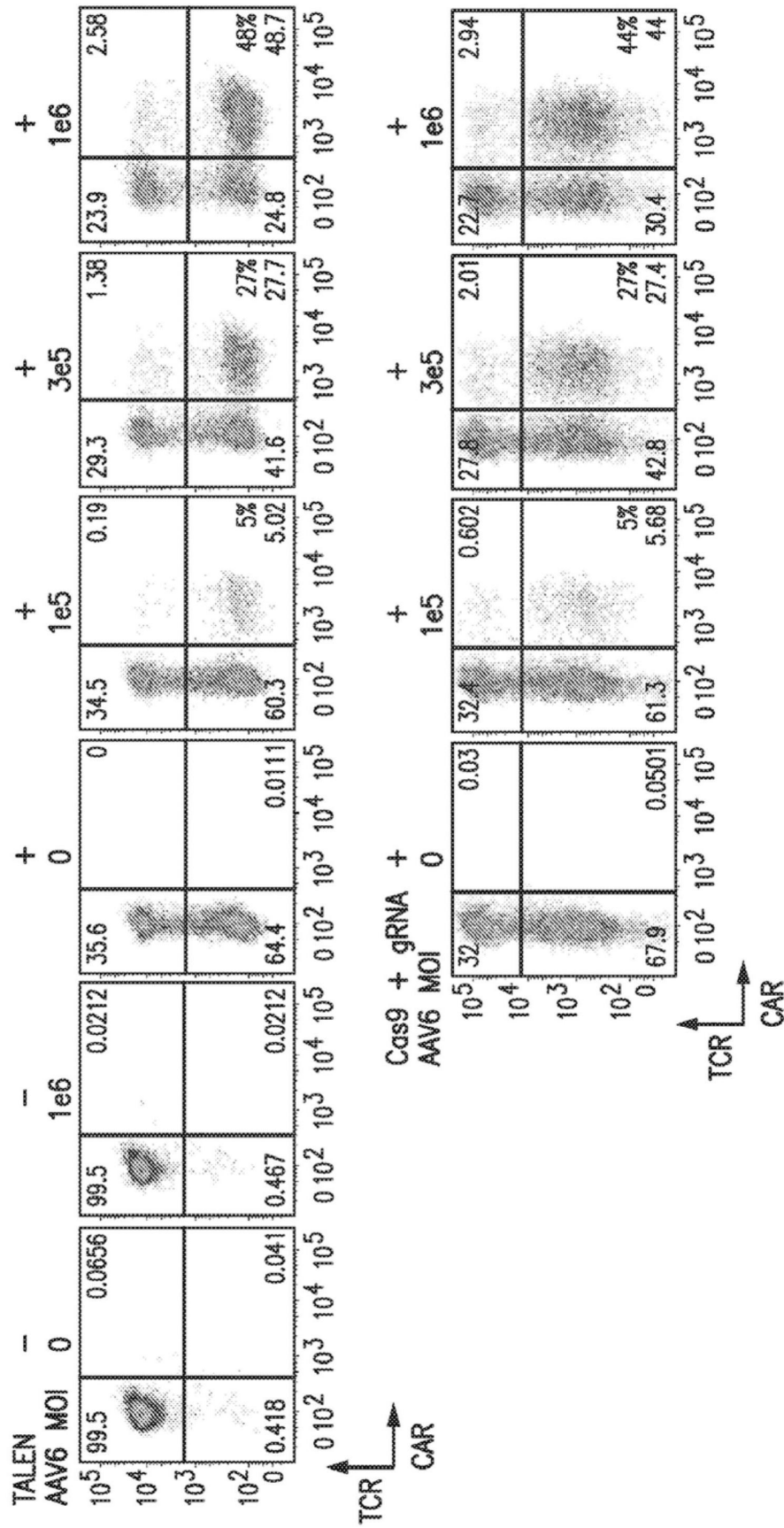


图1B

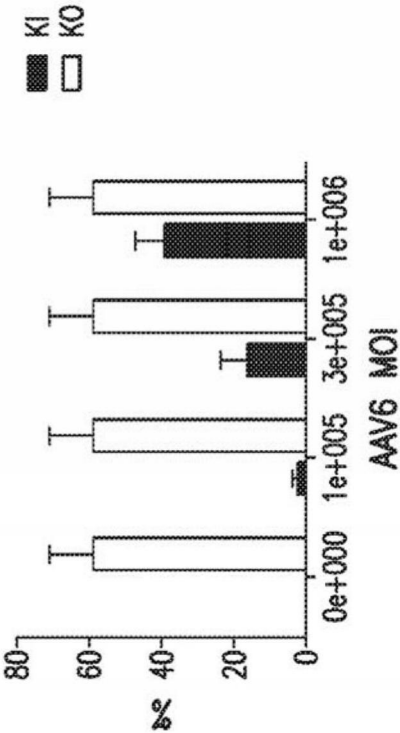


图1C

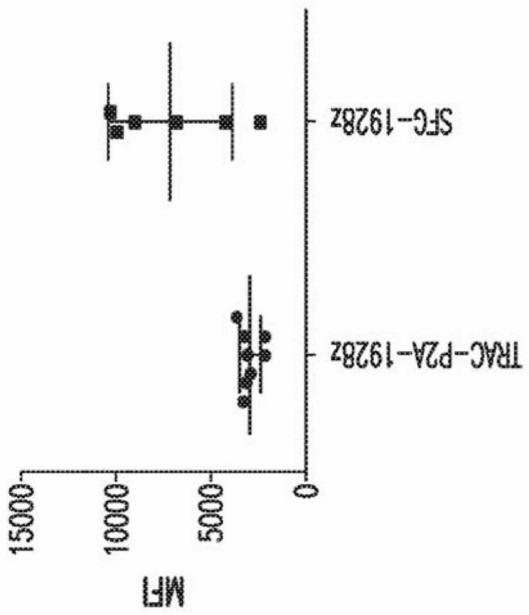


图1D

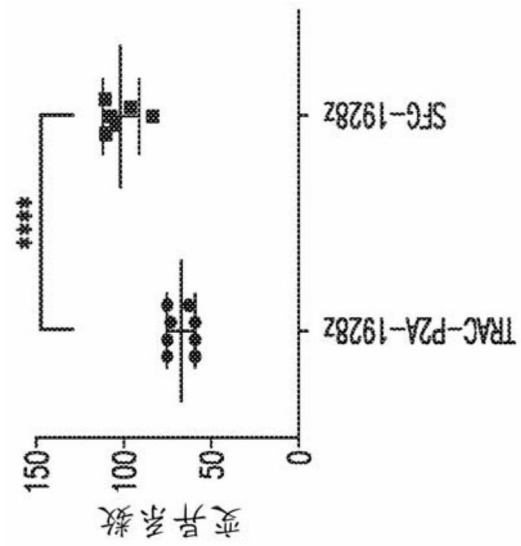


图1E

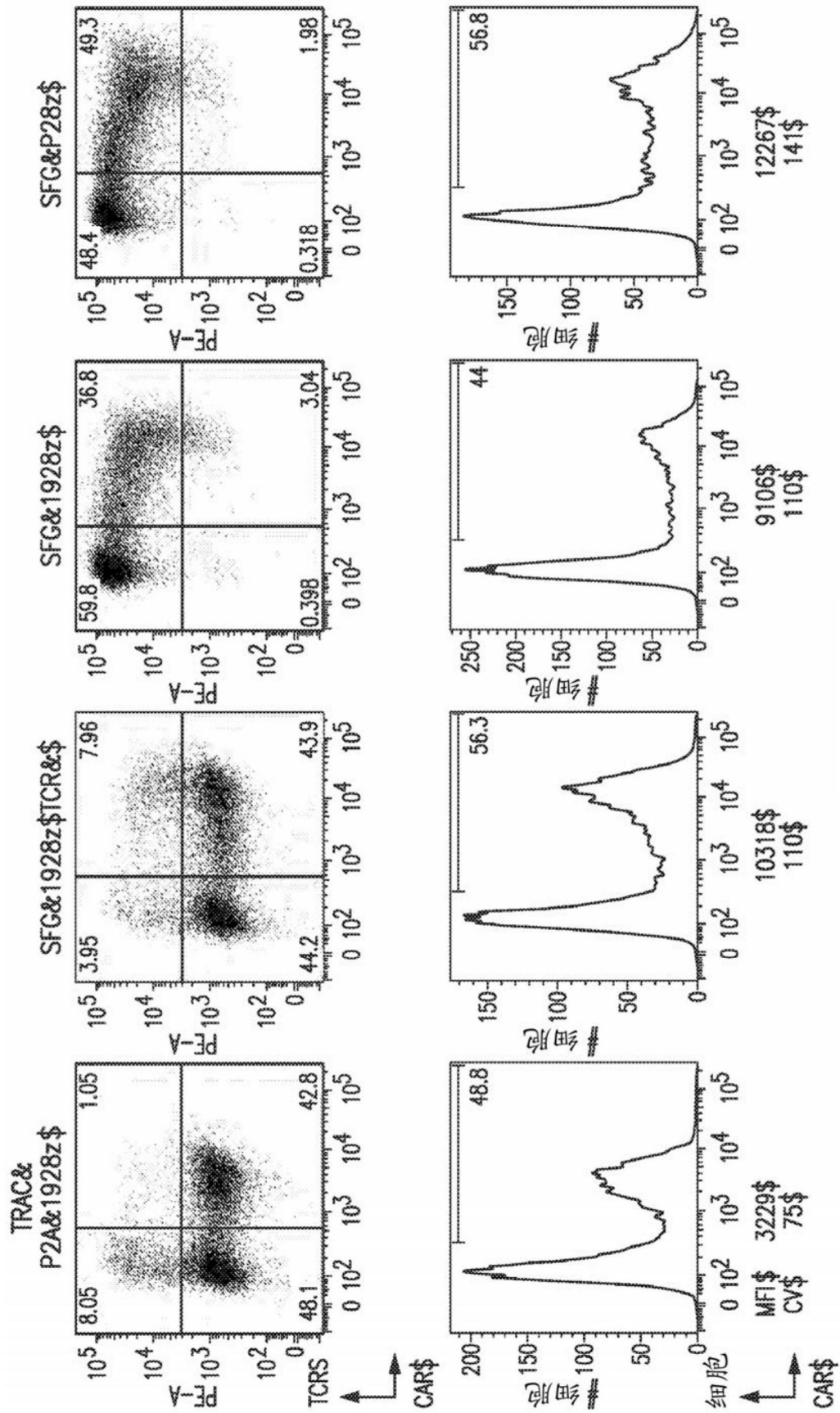


图2A



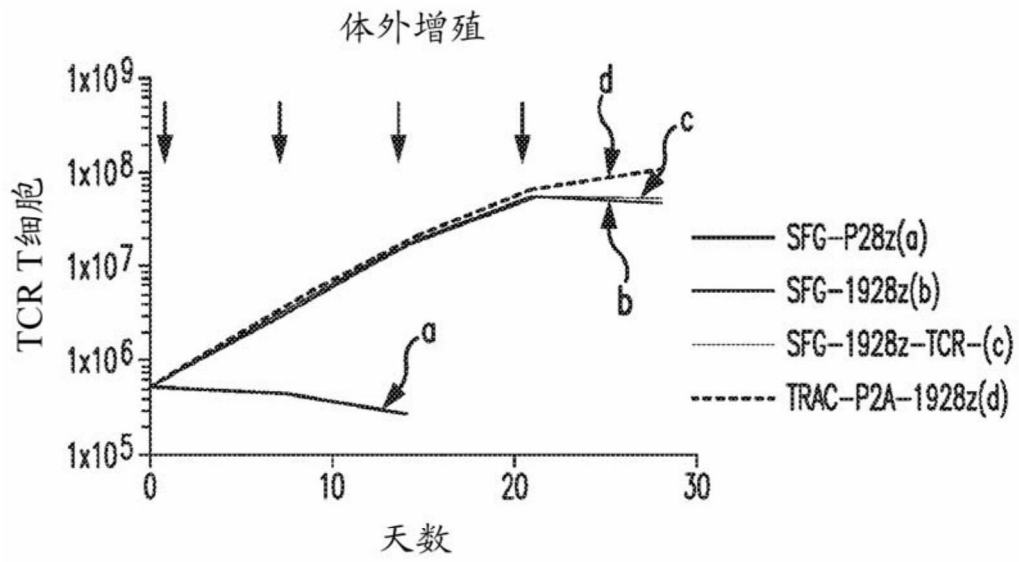


图2B

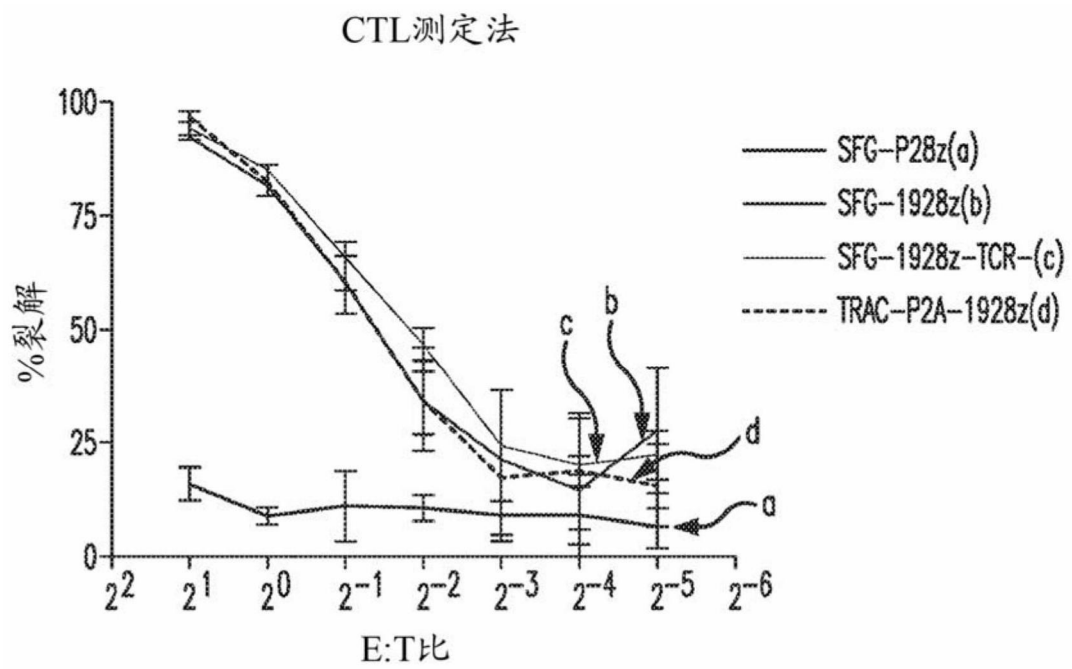


图2C

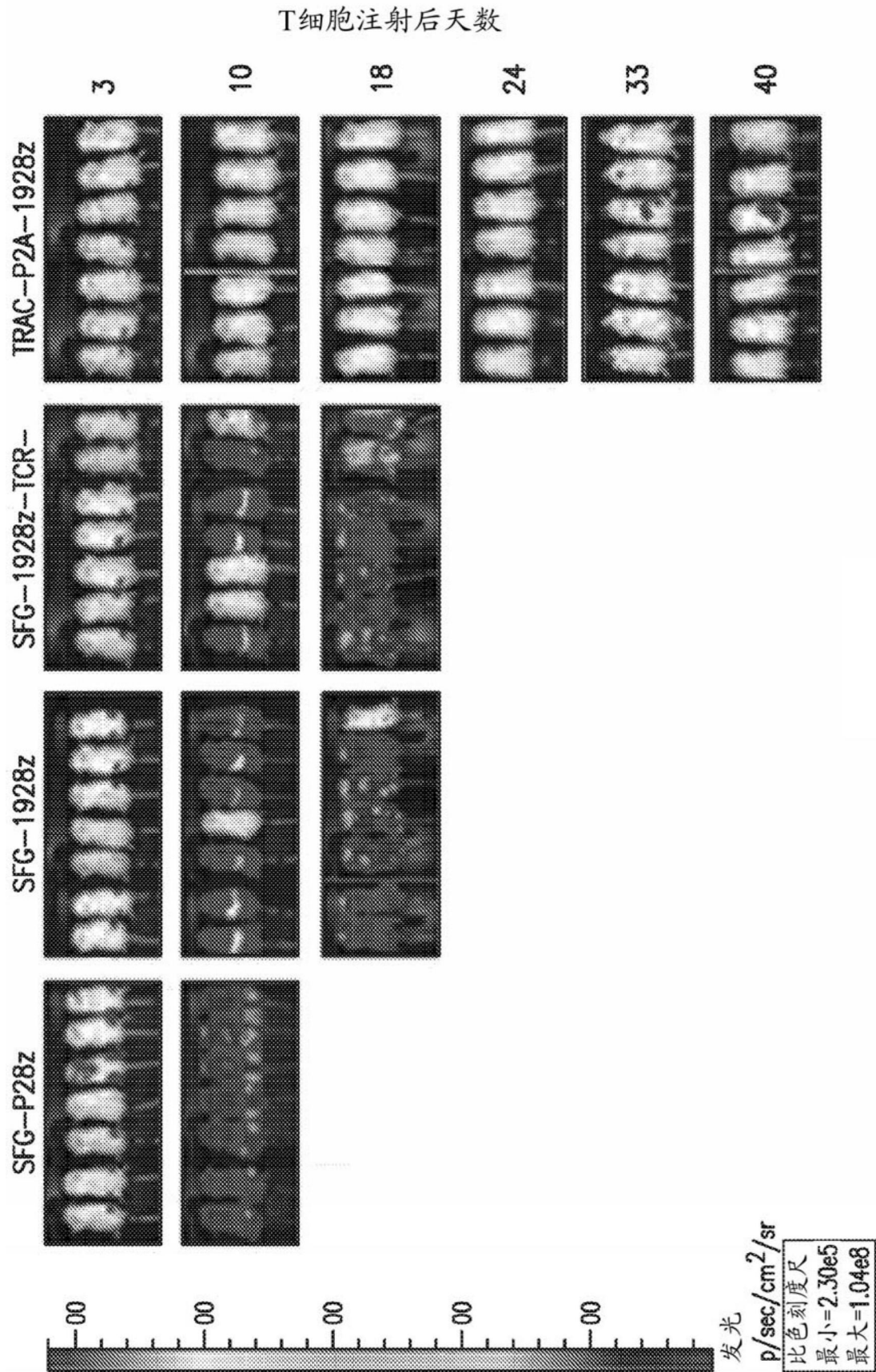


图2D

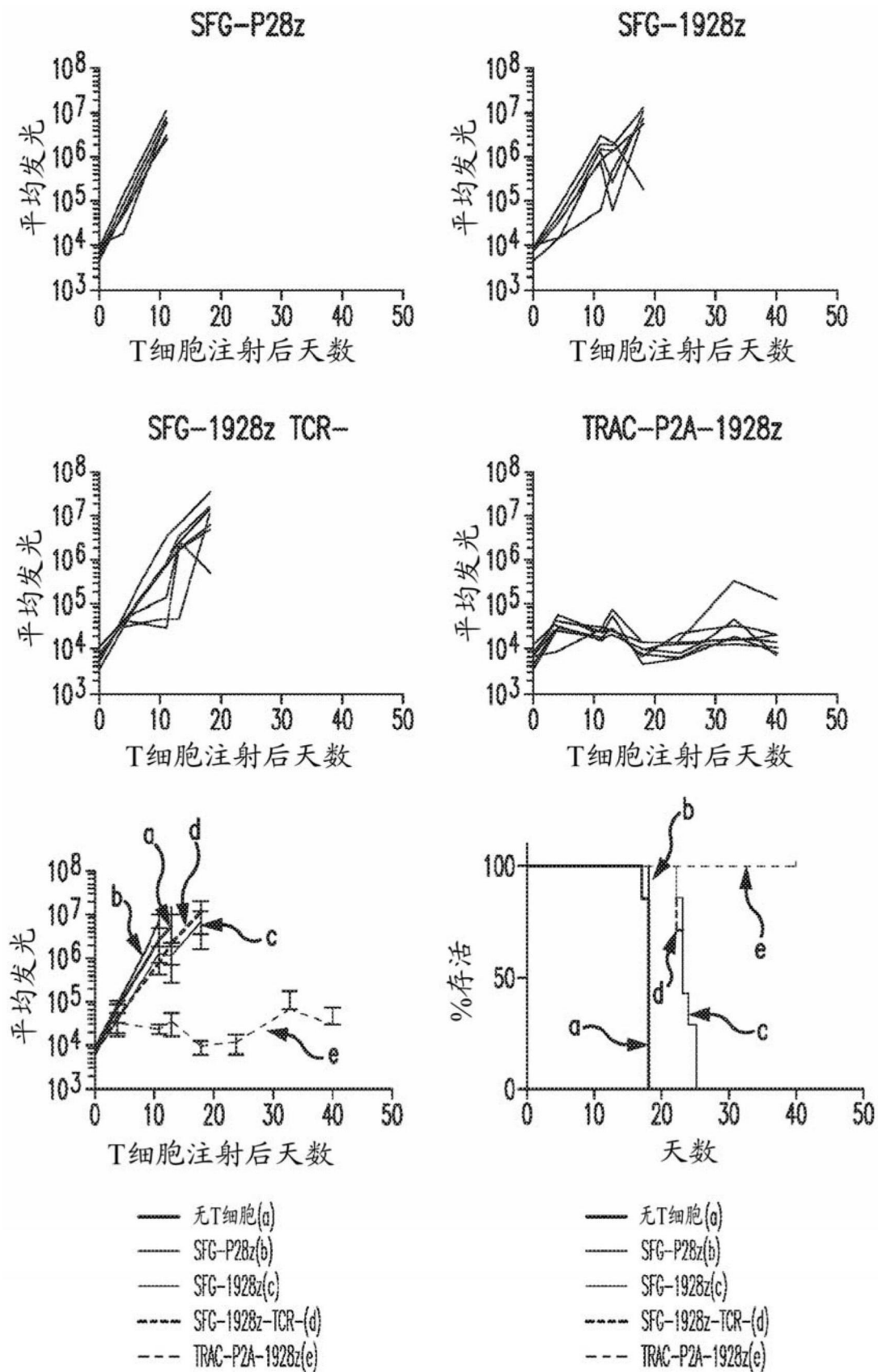


图2E

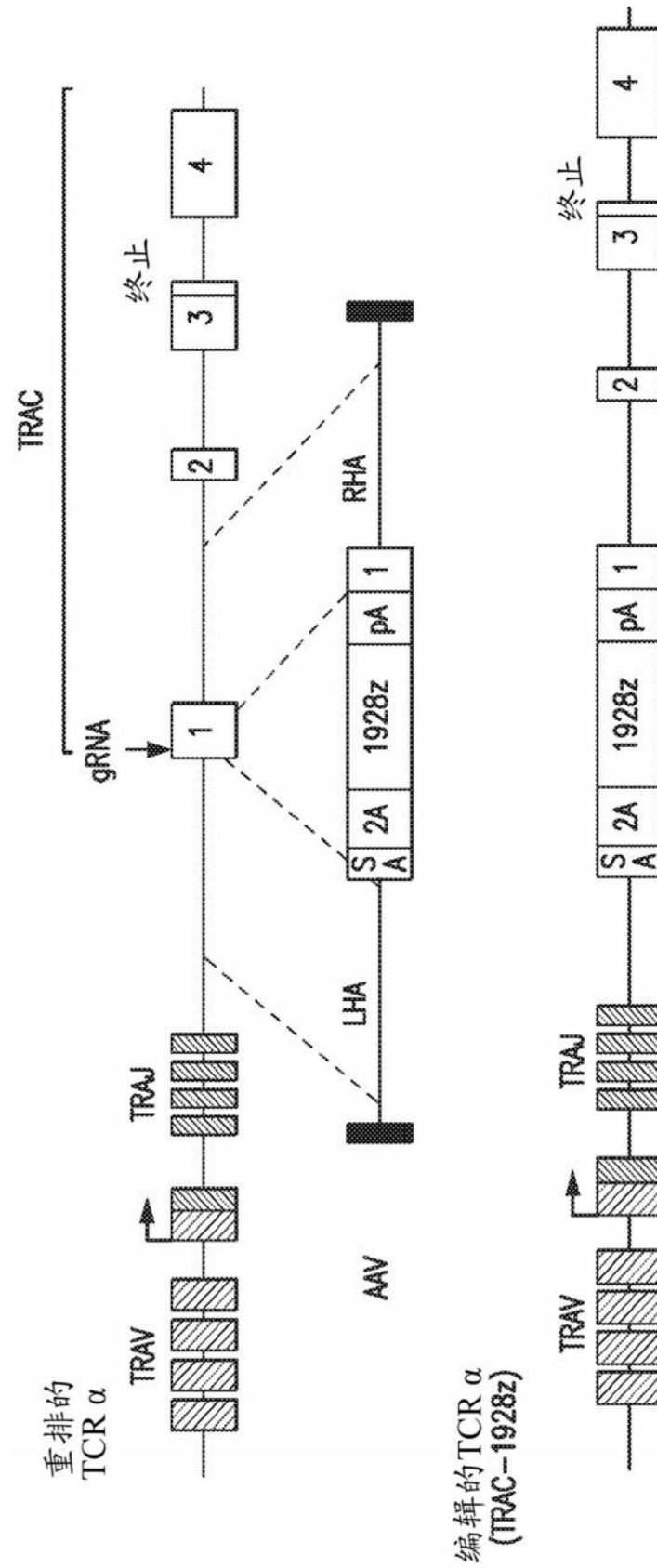


图3A

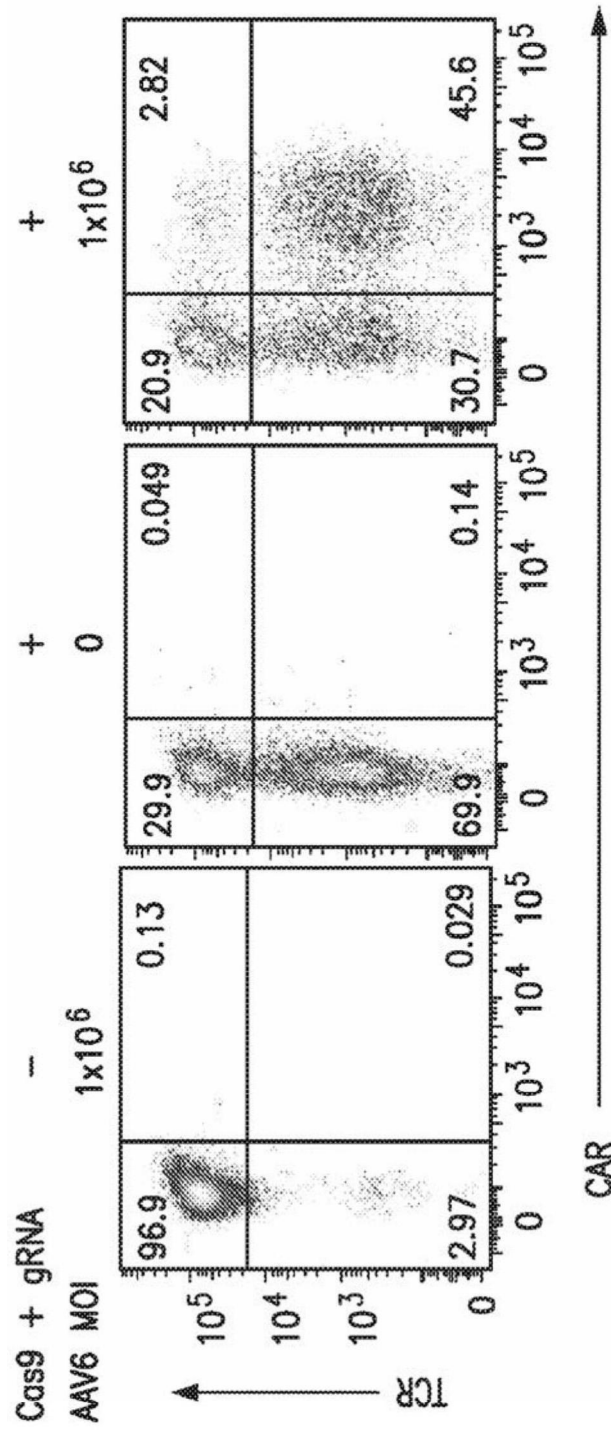


图3B

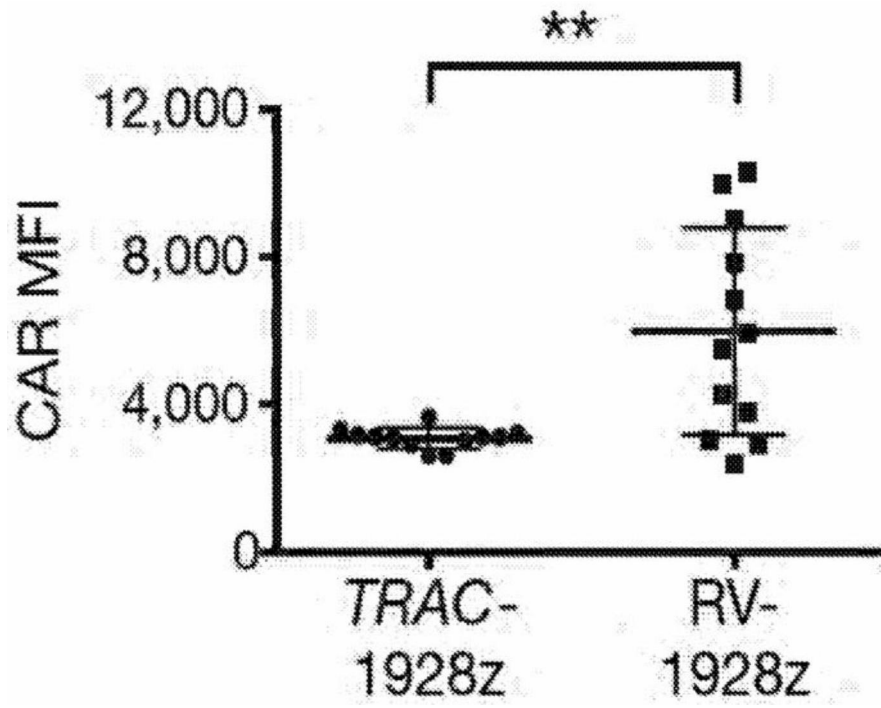


图3C

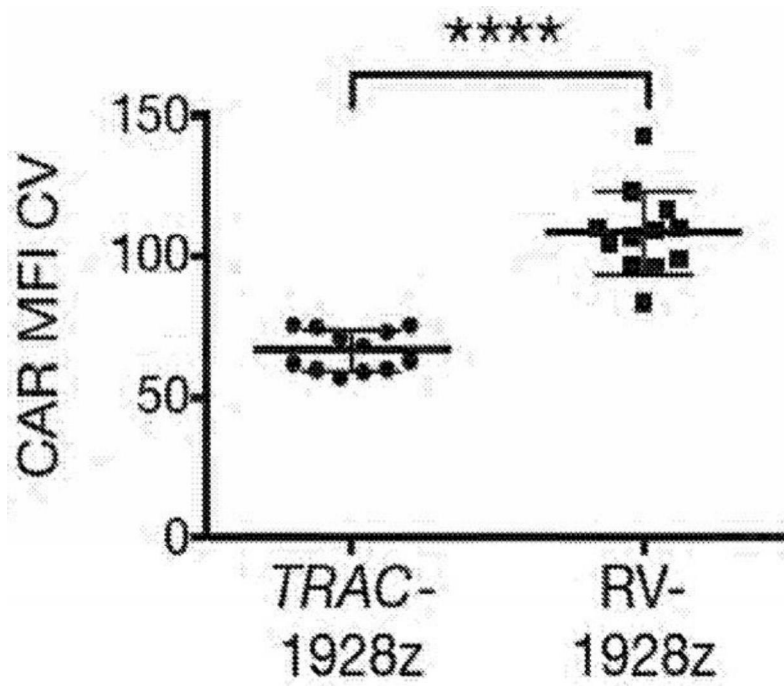


图3D

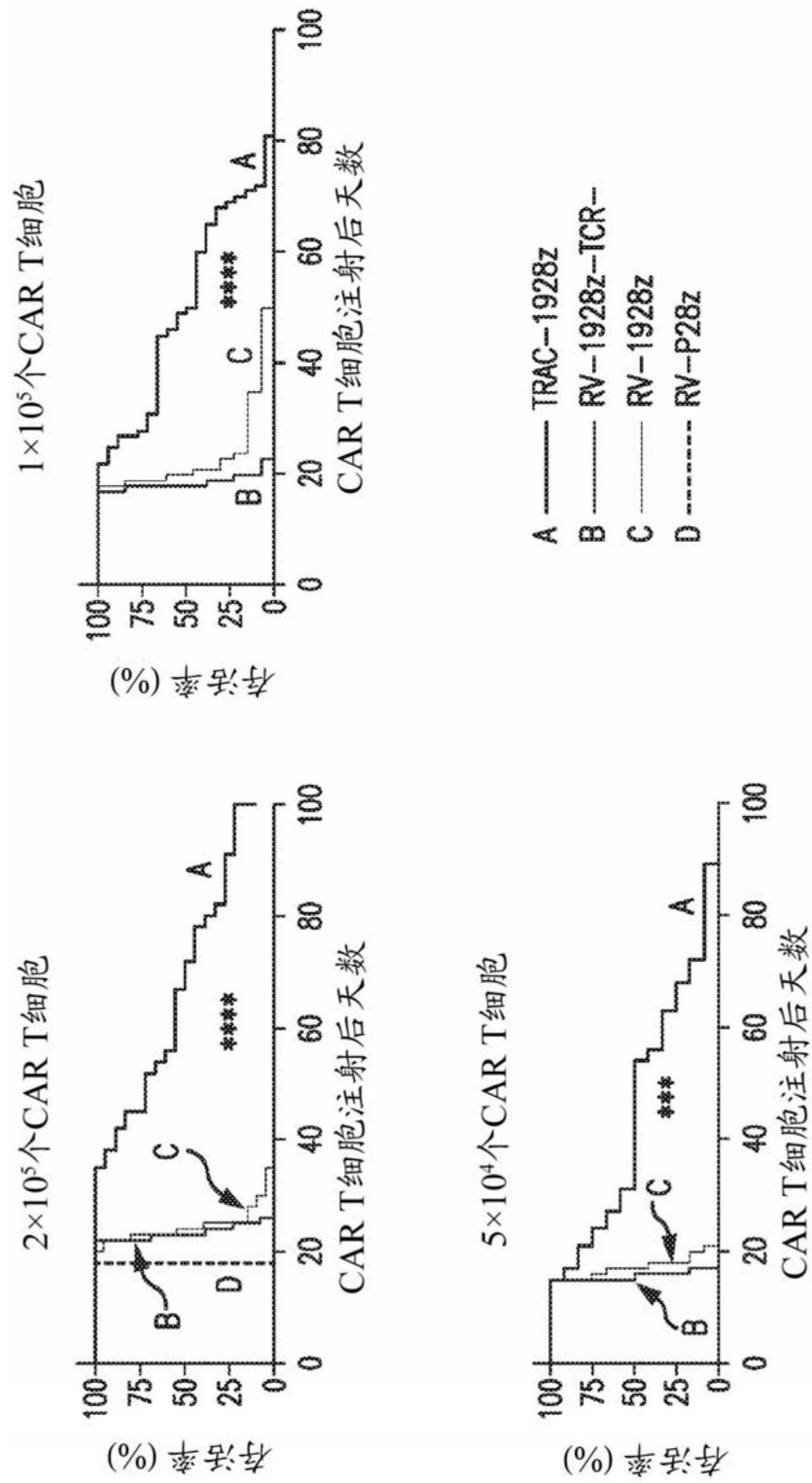


图3E

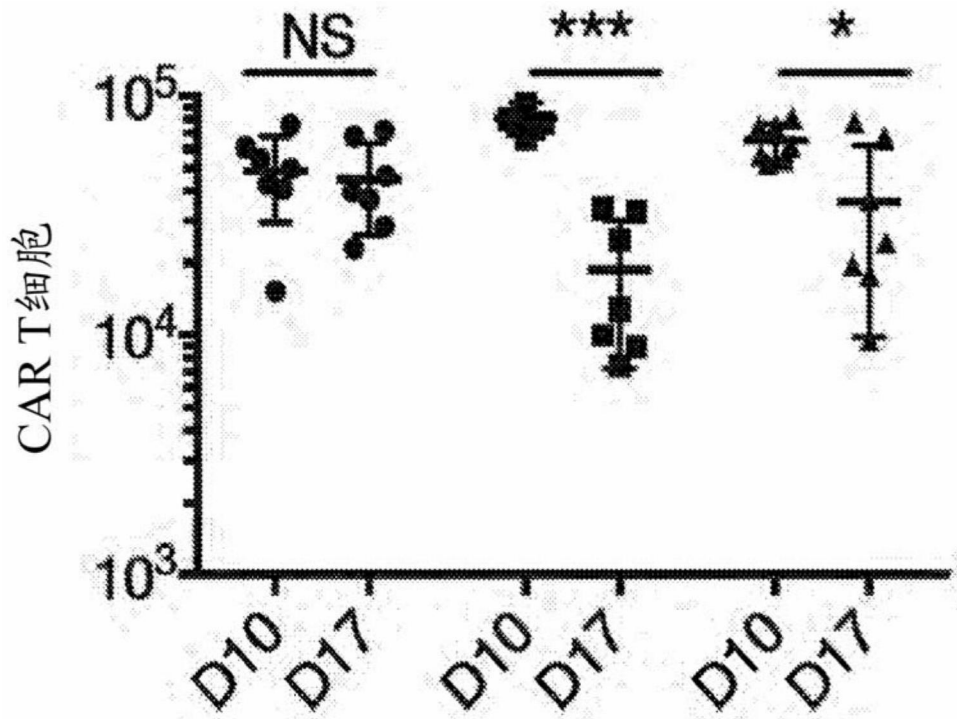


图3F

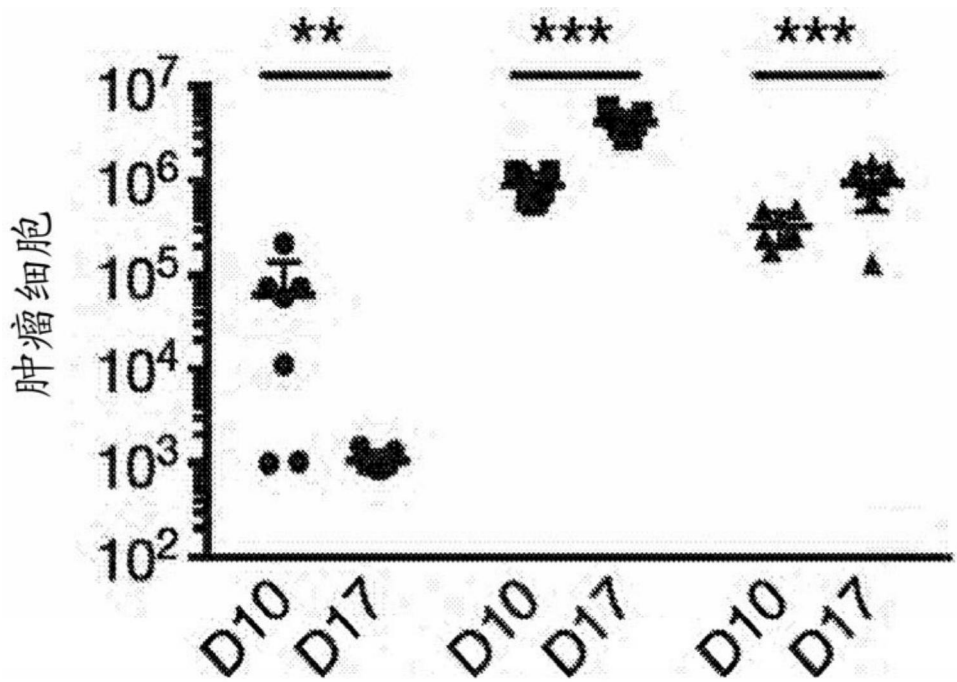


图3G



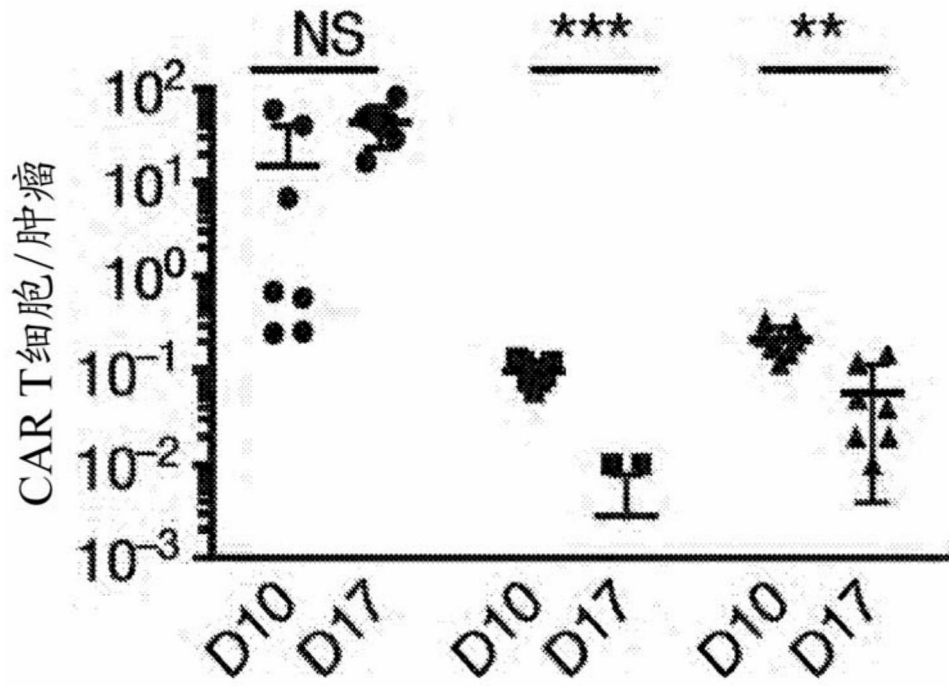


图3H

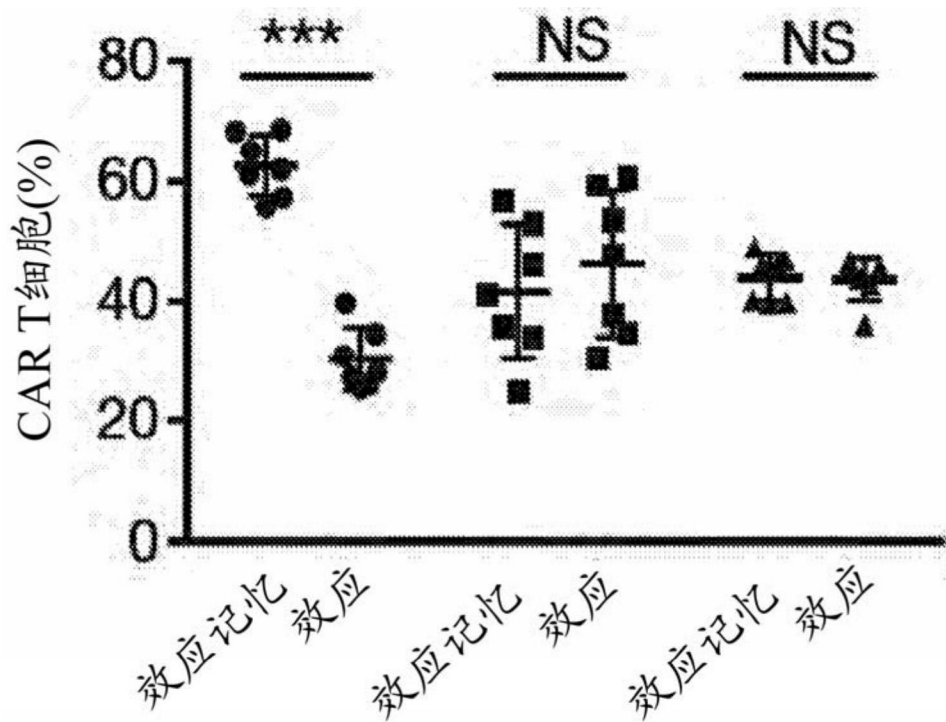


图3I

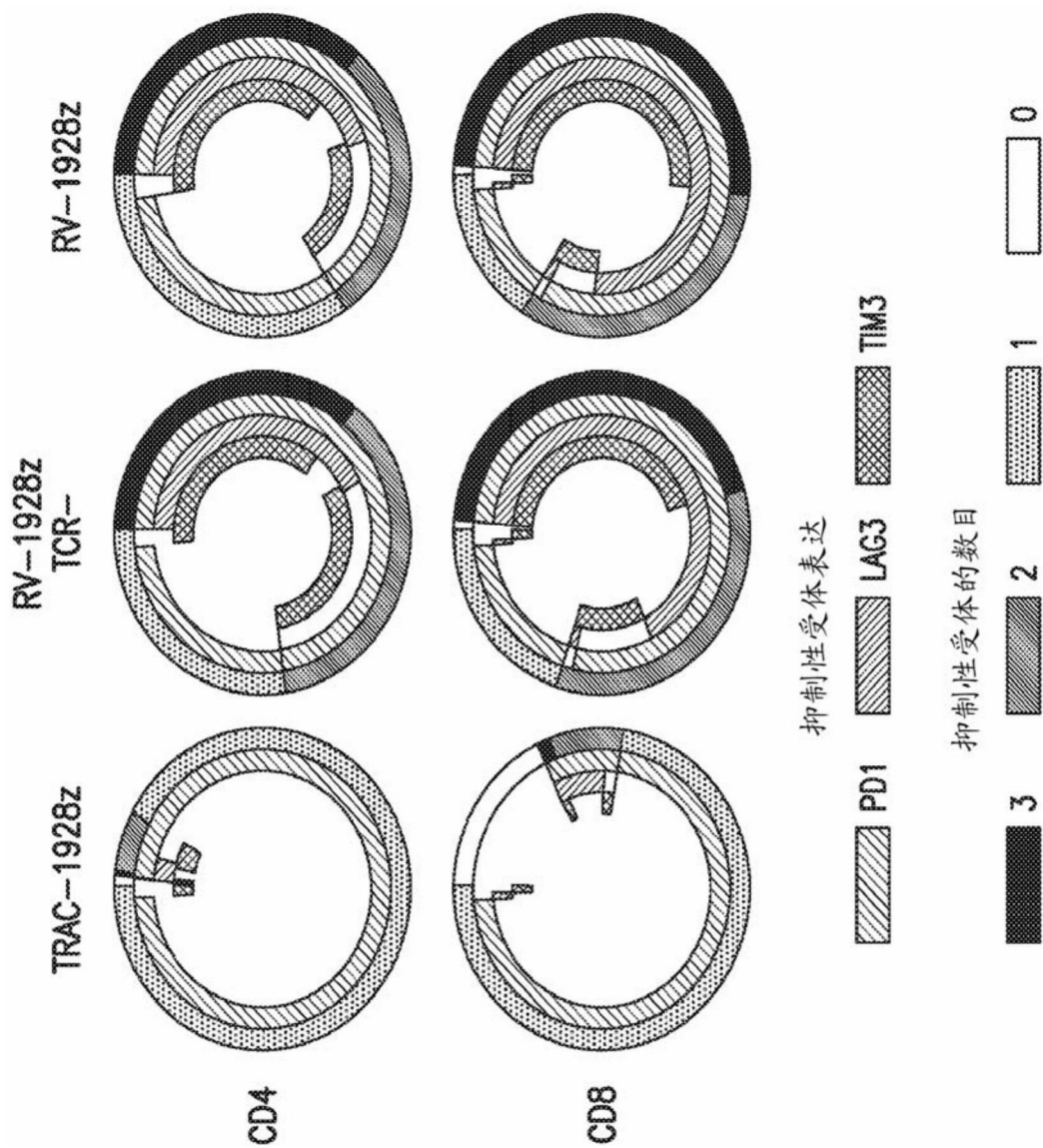


图3J

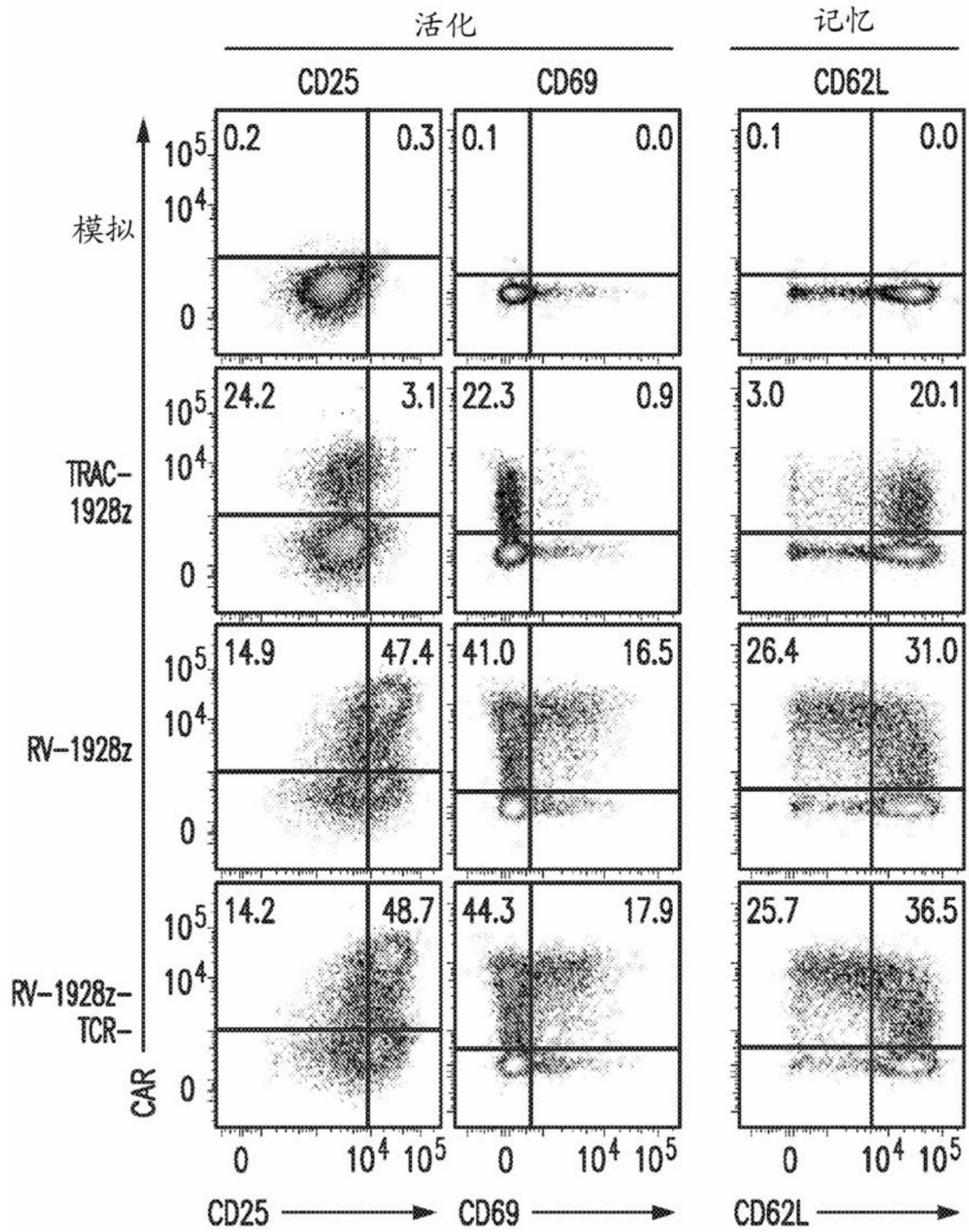


图4A

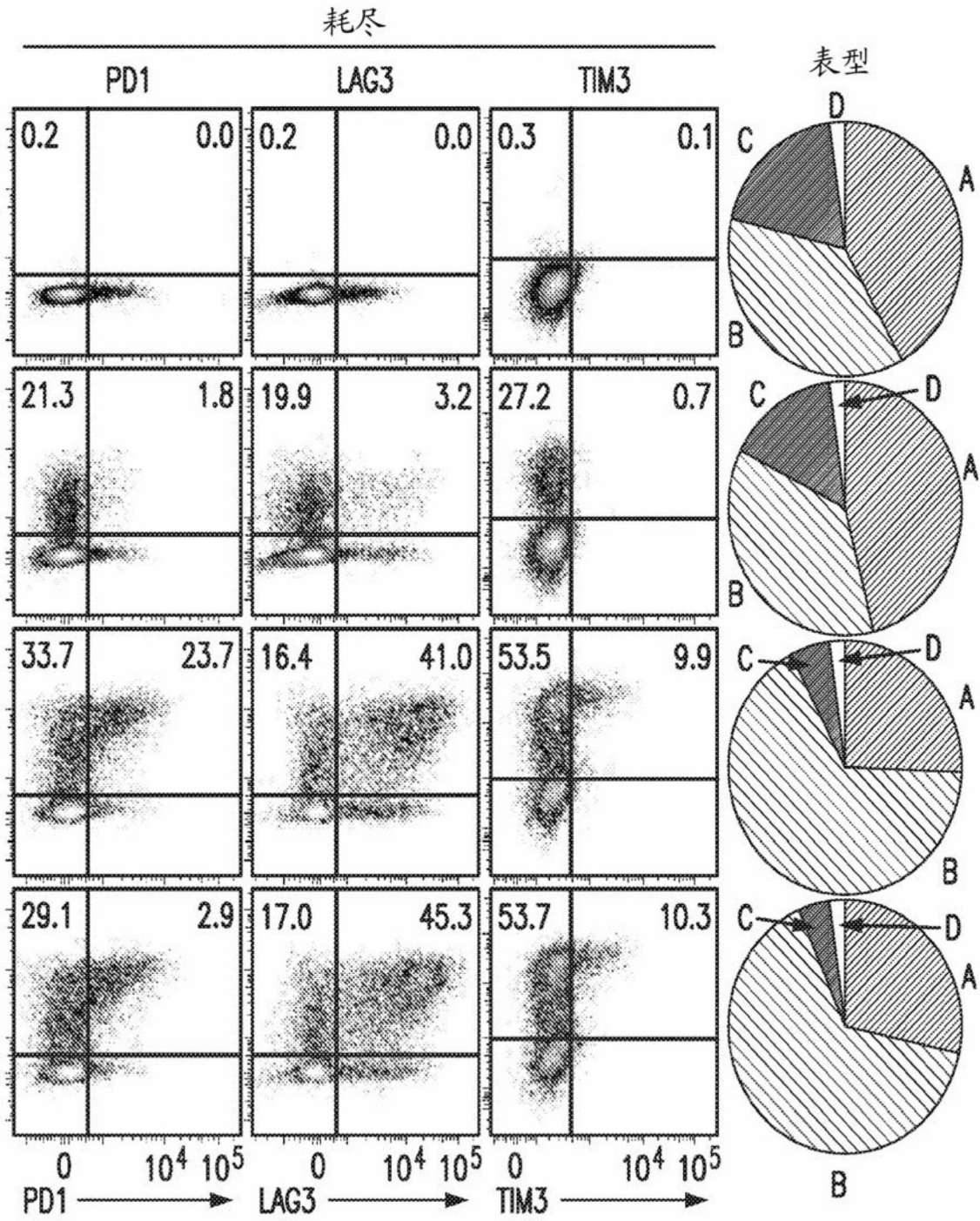


图4A(续)

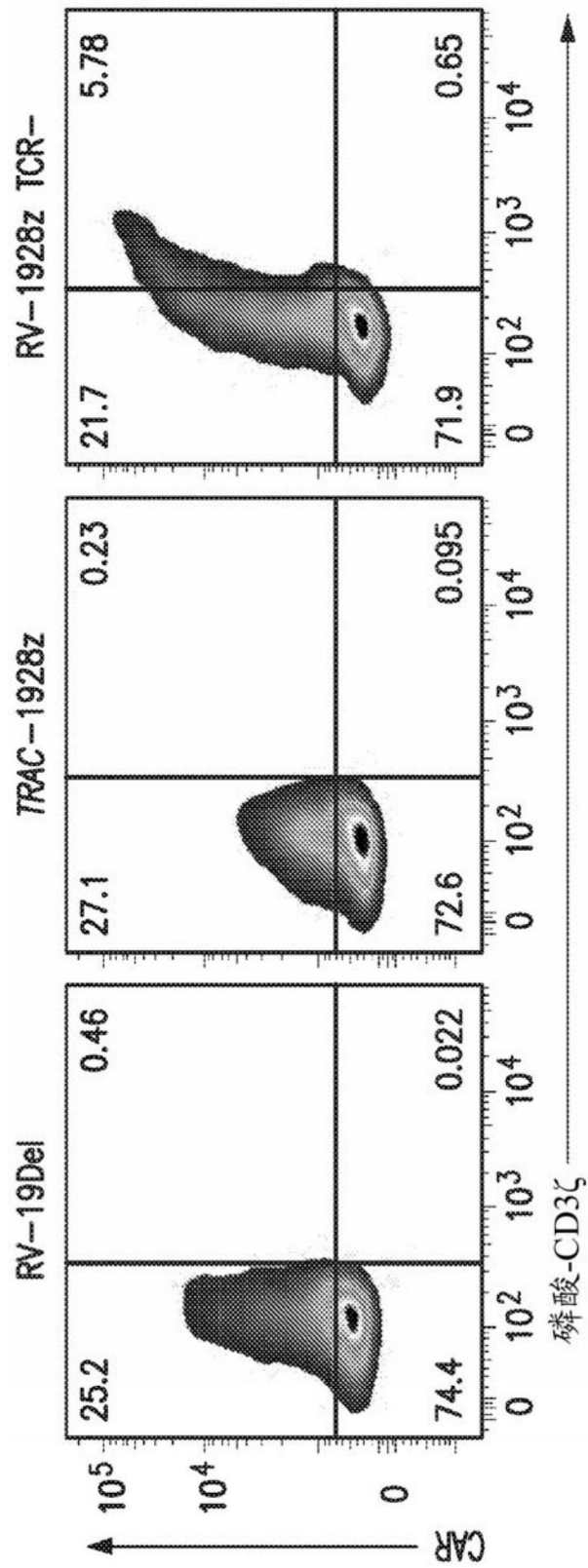


图4B

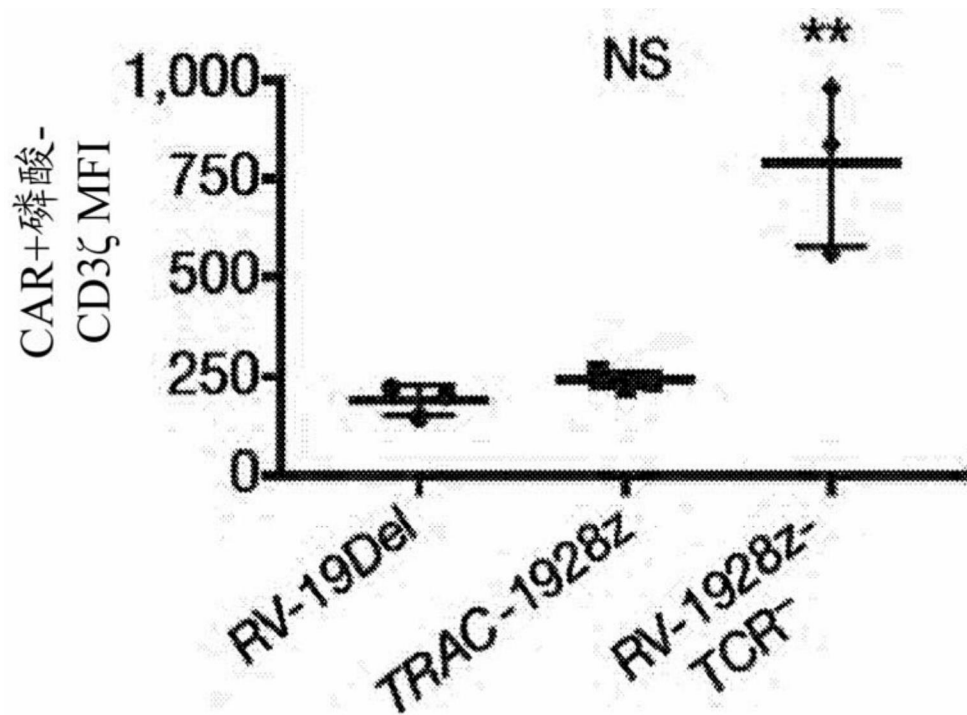


图4C

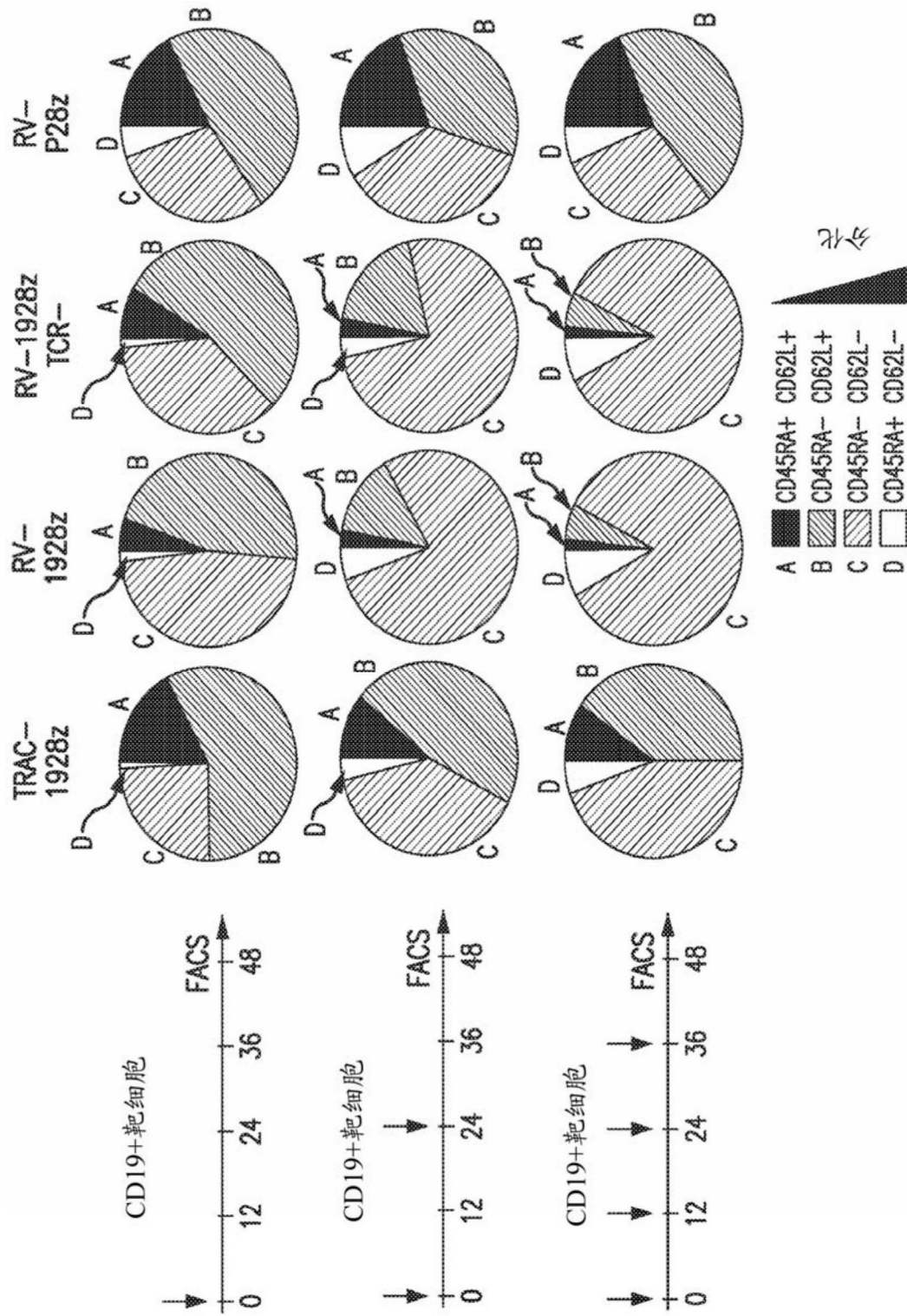


图4D

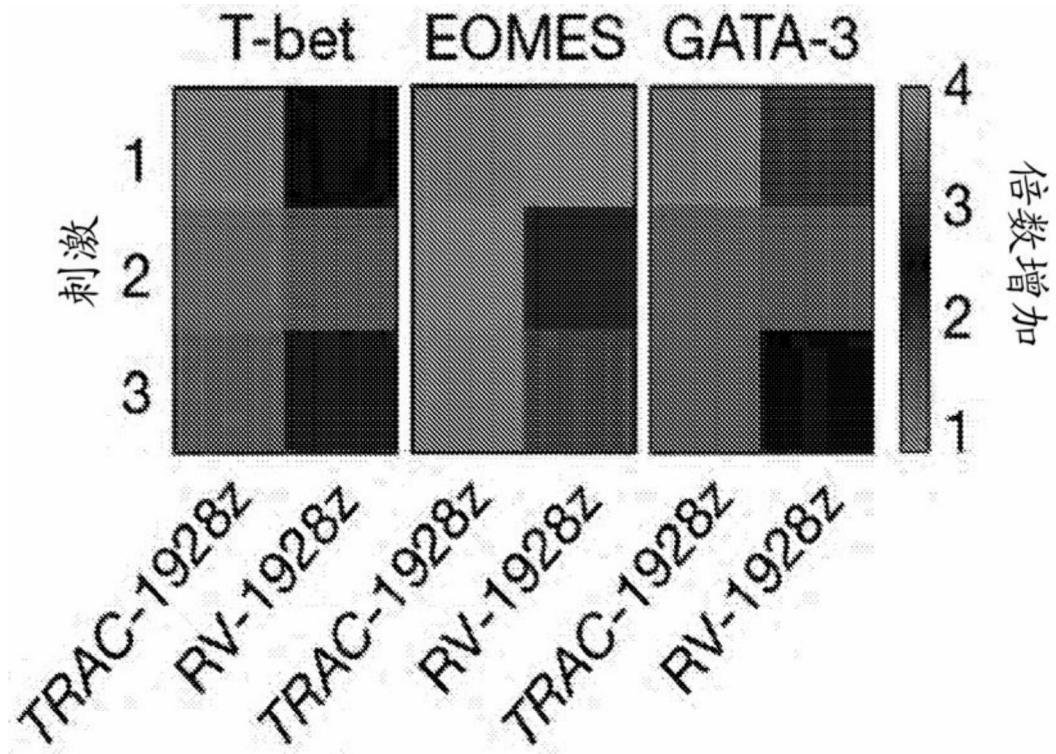


图4E

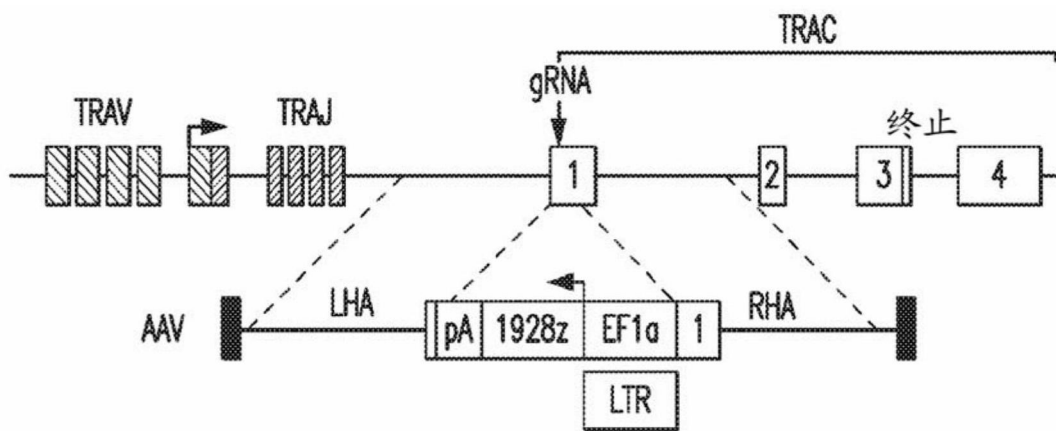


图5A



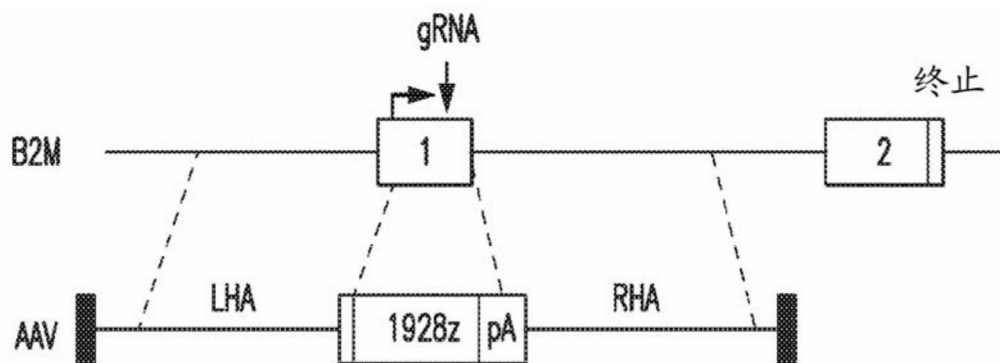


图5B

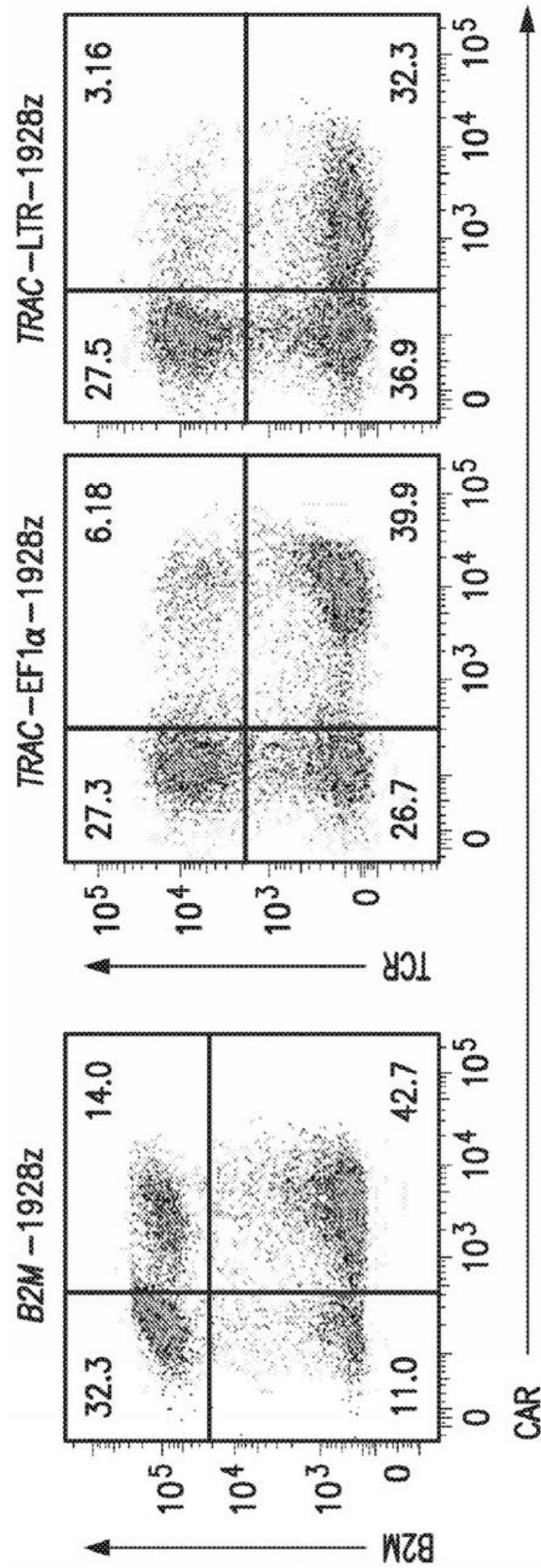


图5C

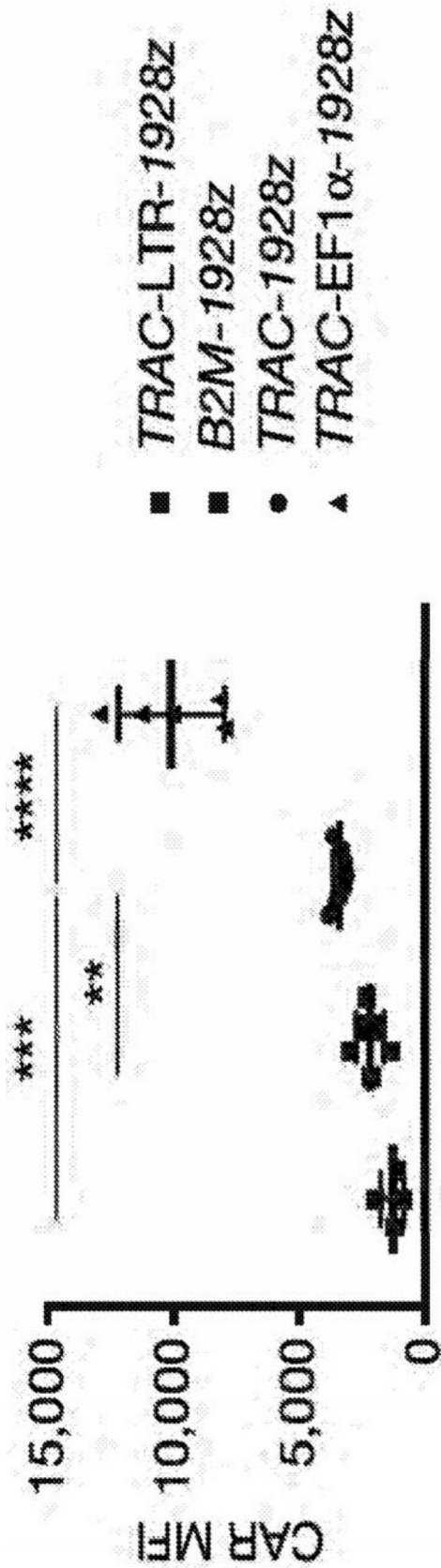


图5D

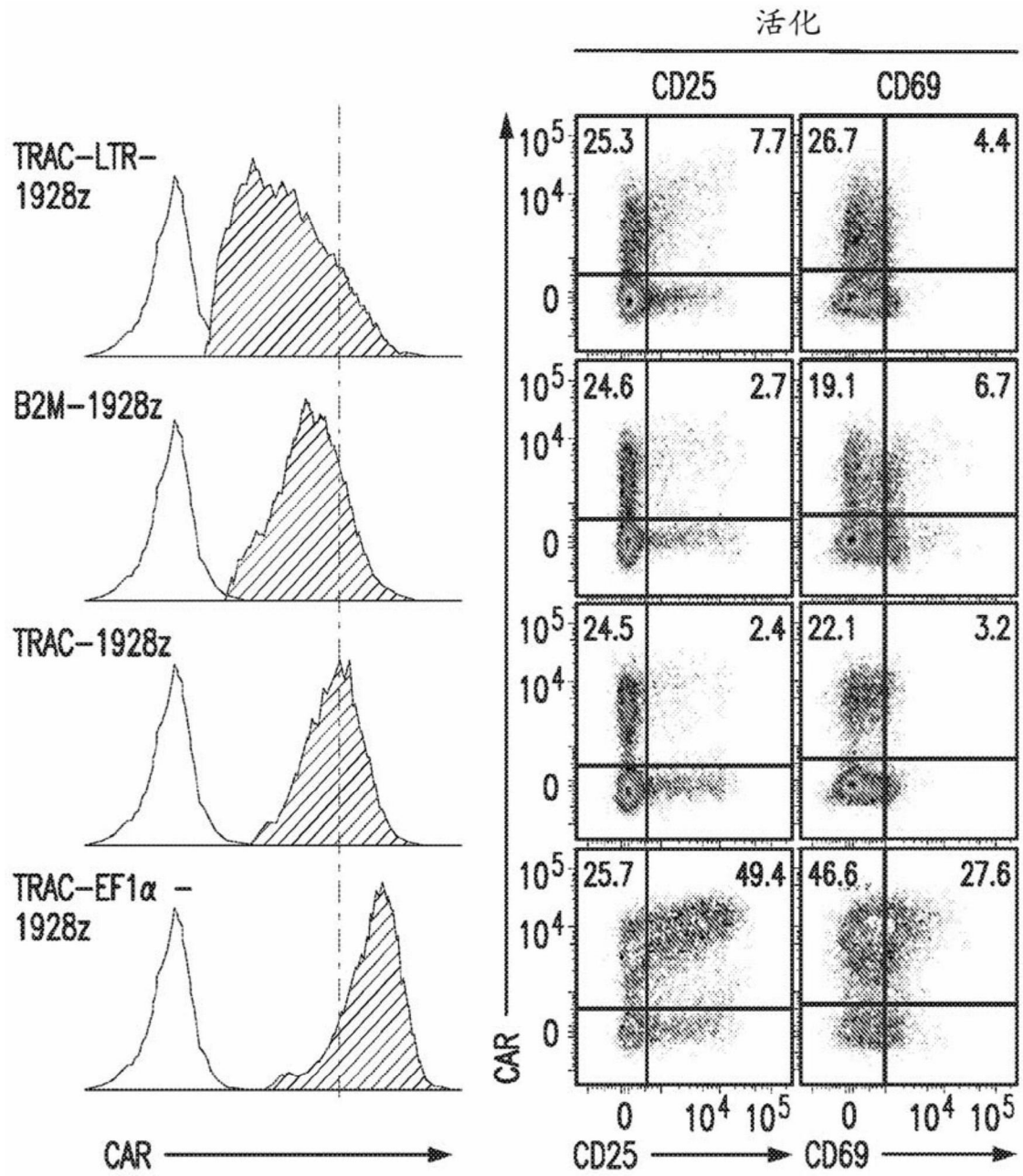


图5E

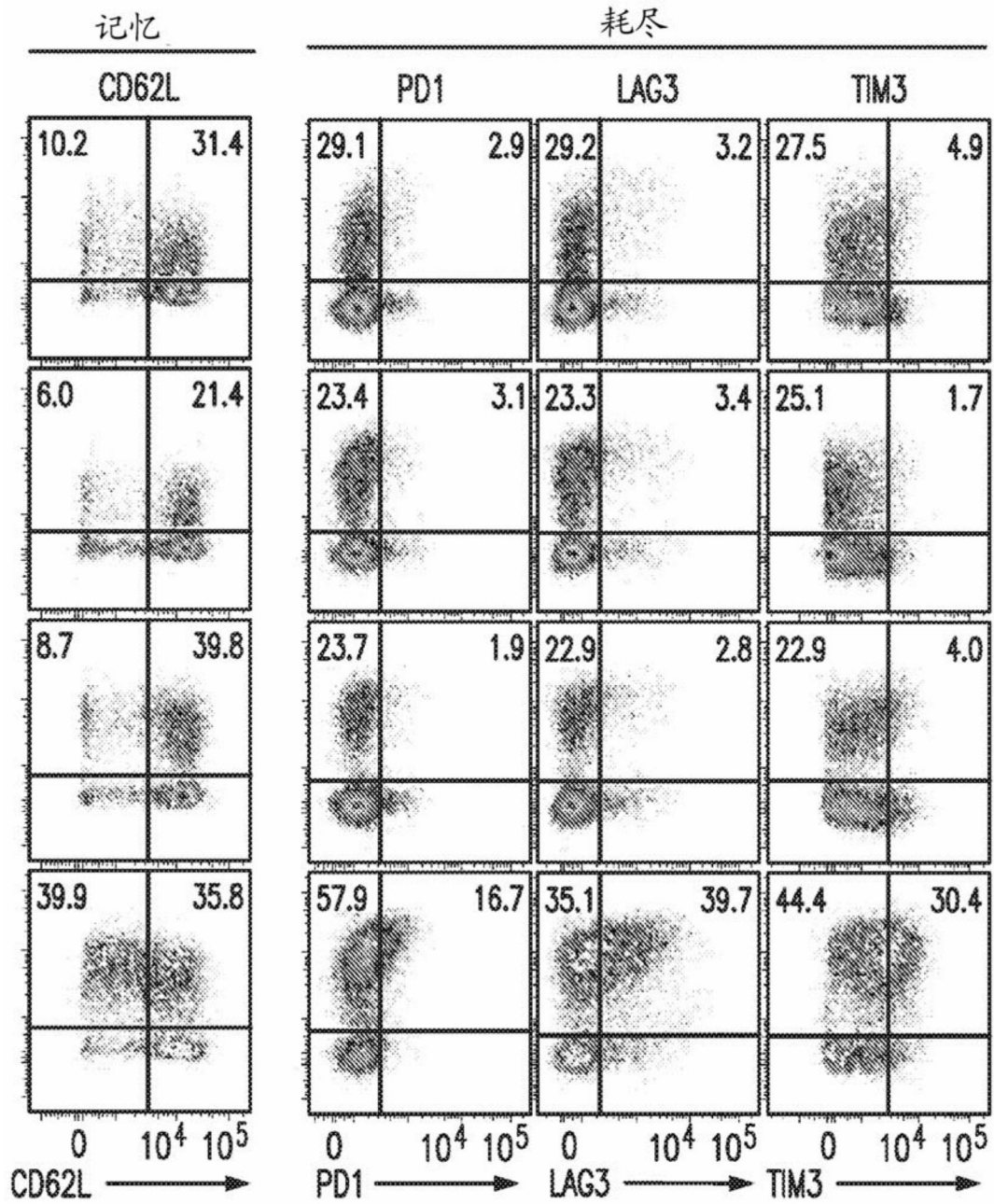


图5E(续)

刺激

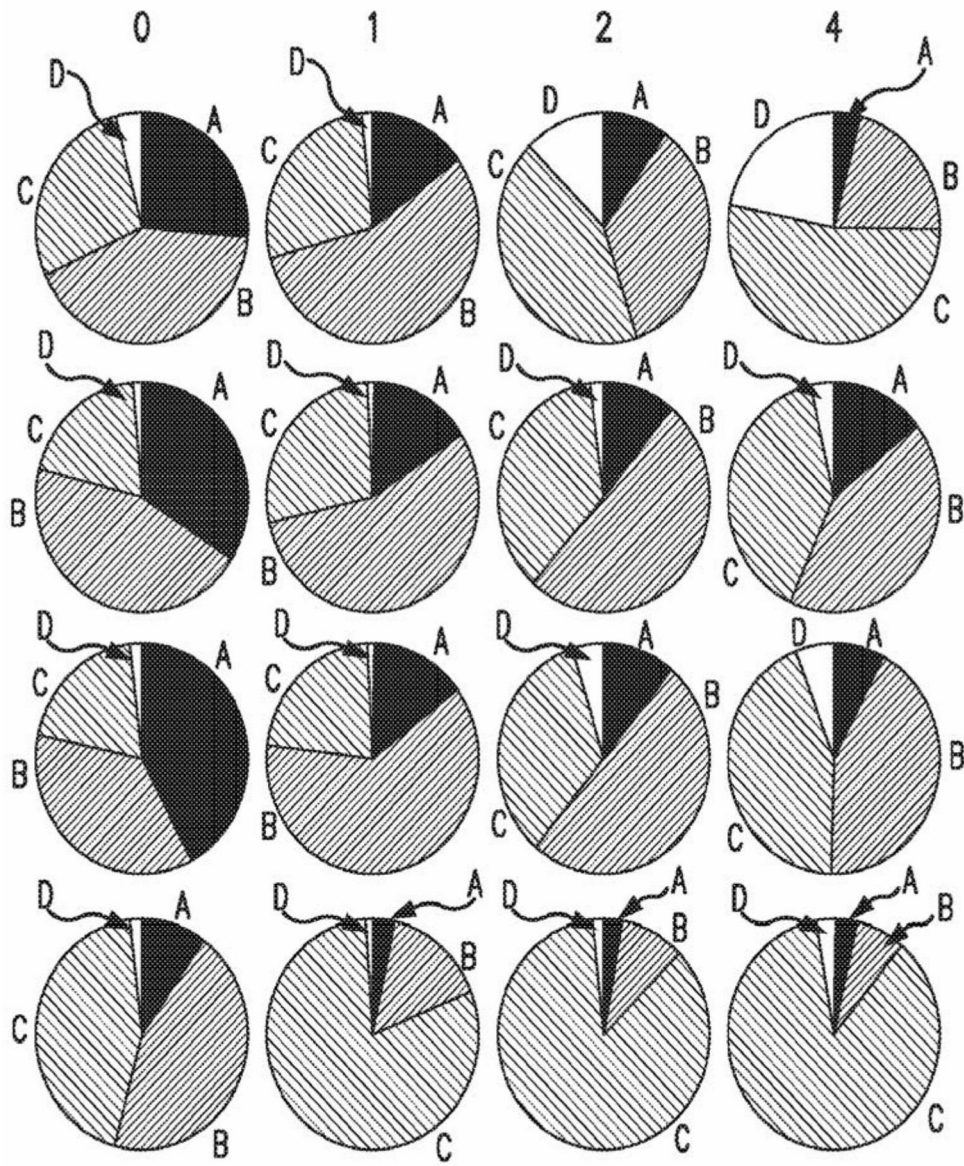


图5F

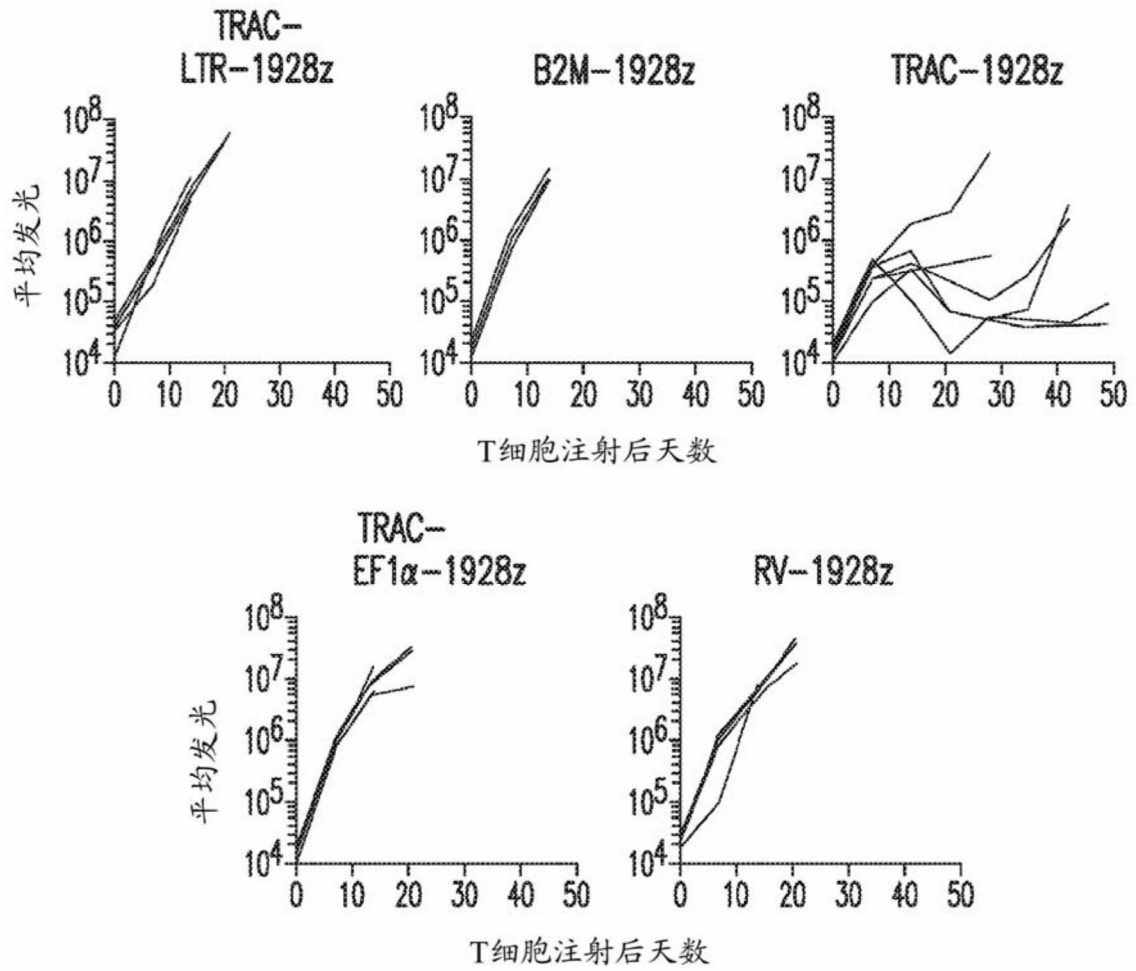


图5G

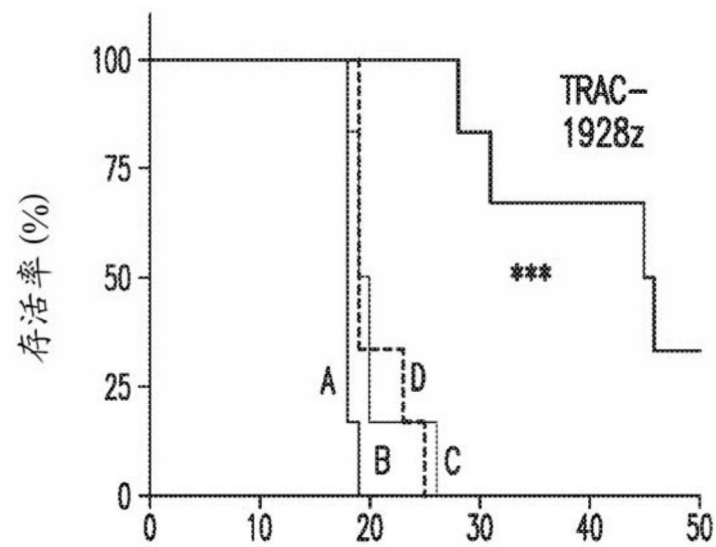


图5H

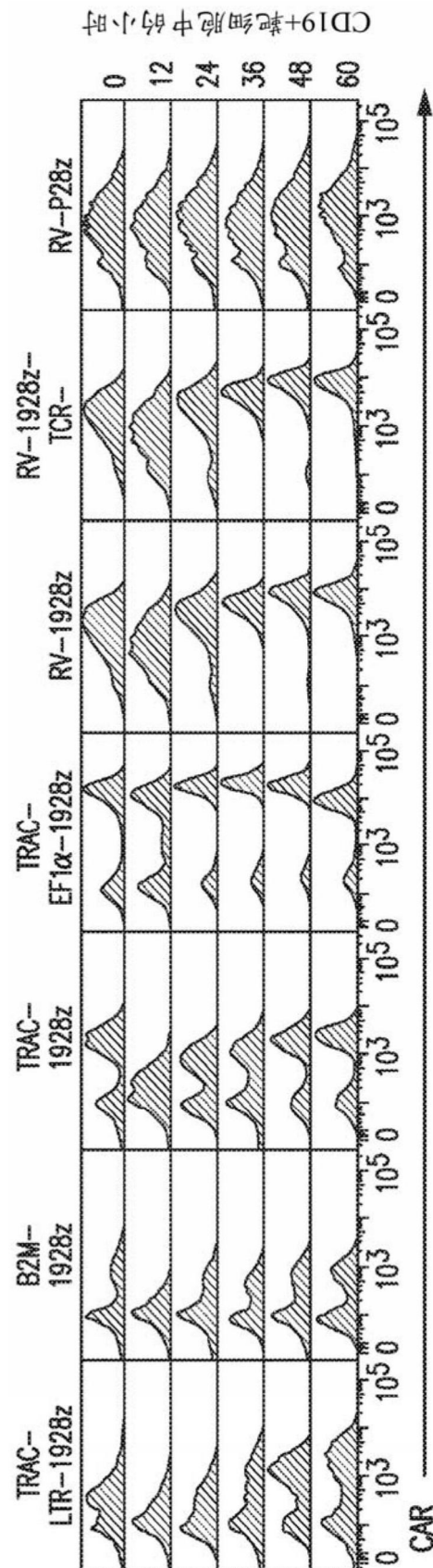


图6A



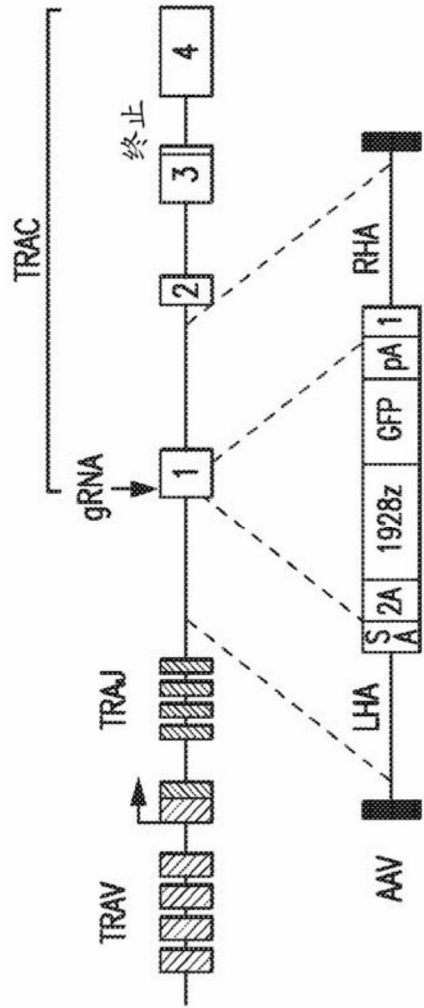


图6B

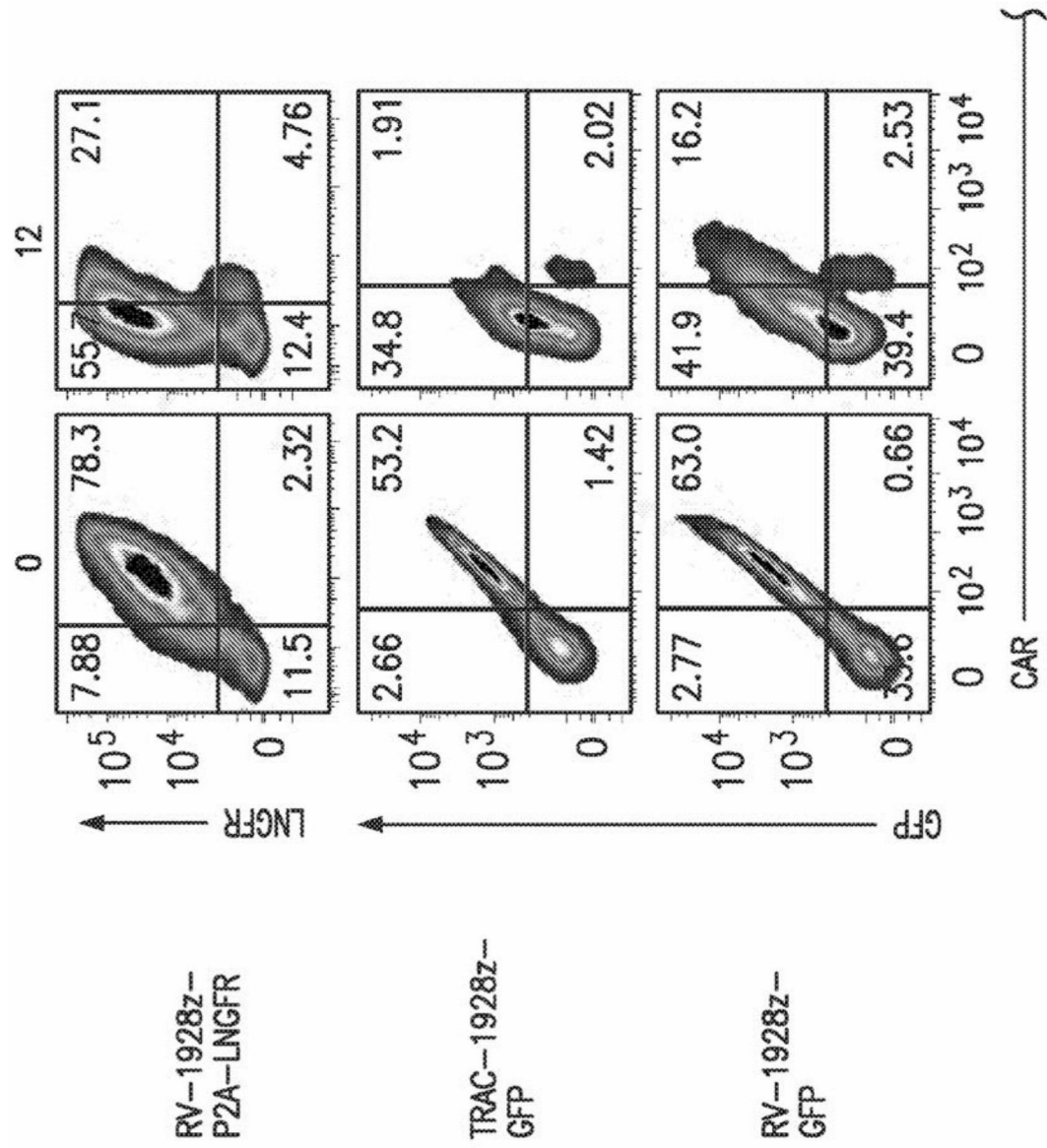


图6C

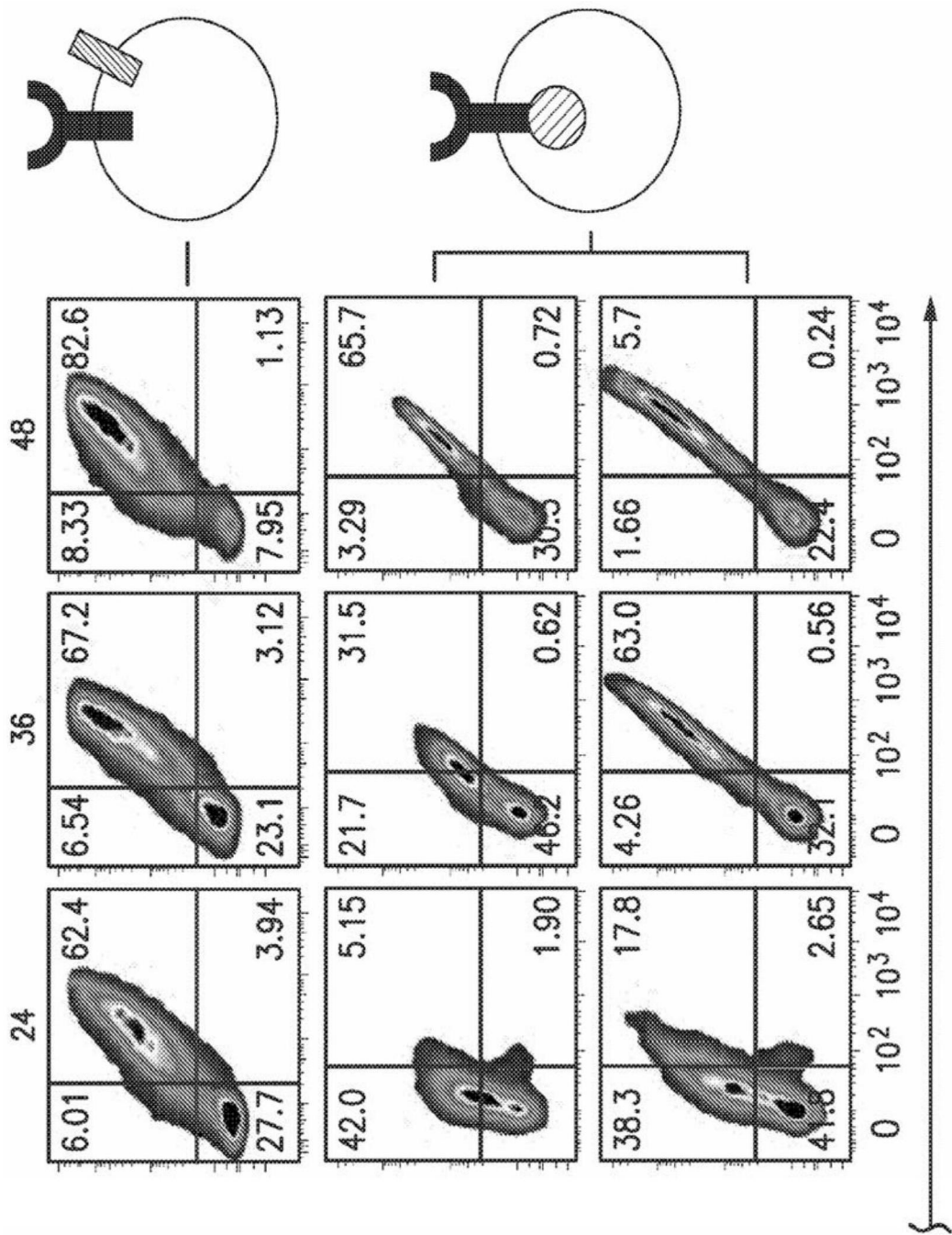


图6C(续)

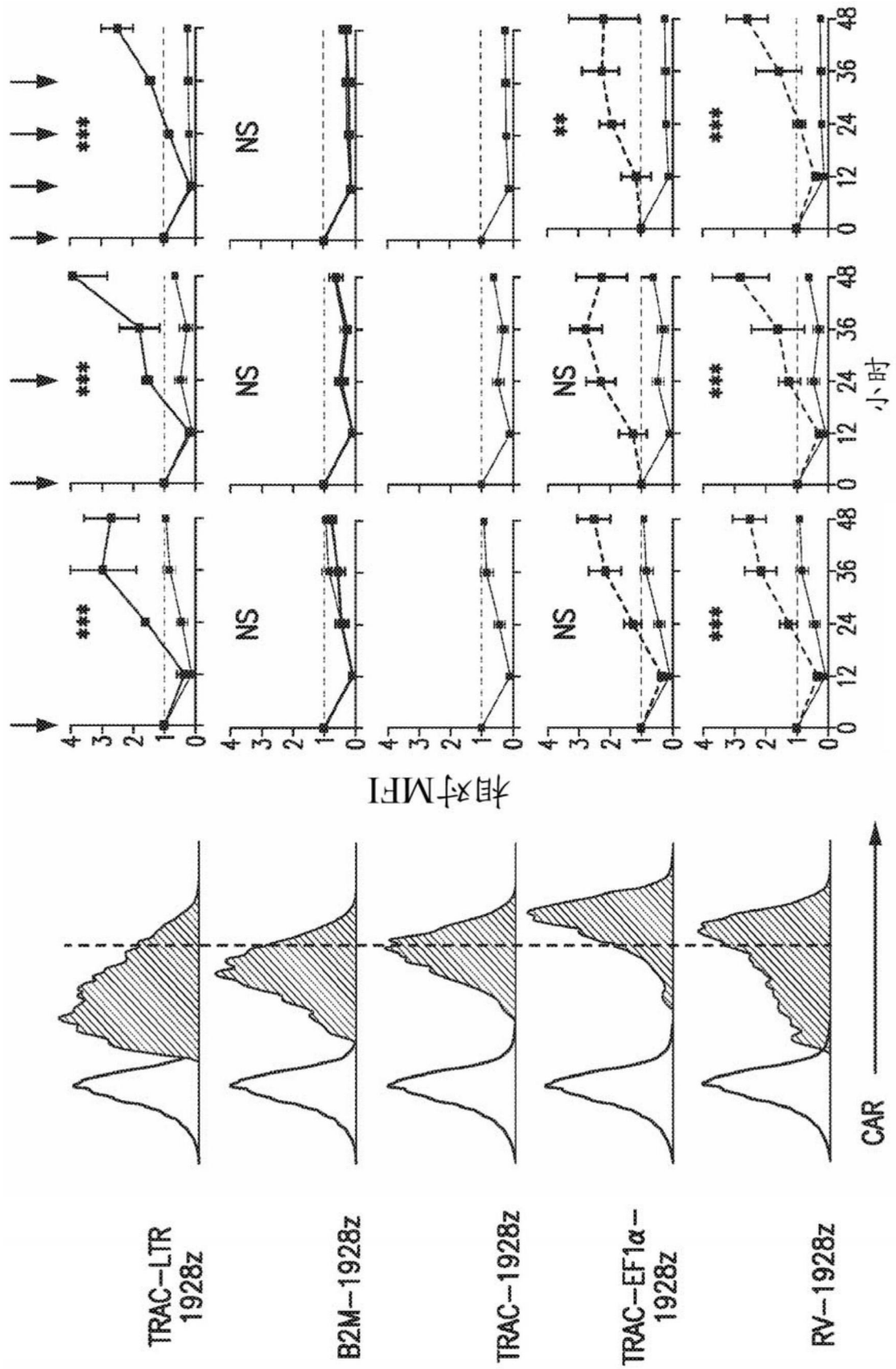


图6D

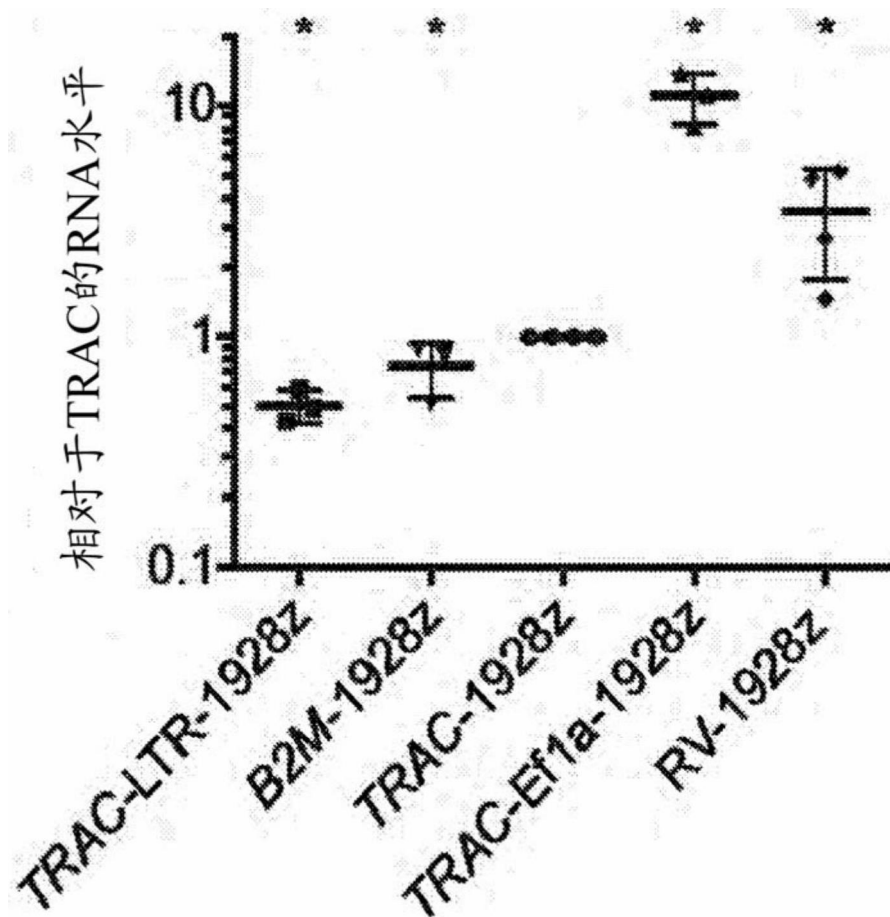


图6E

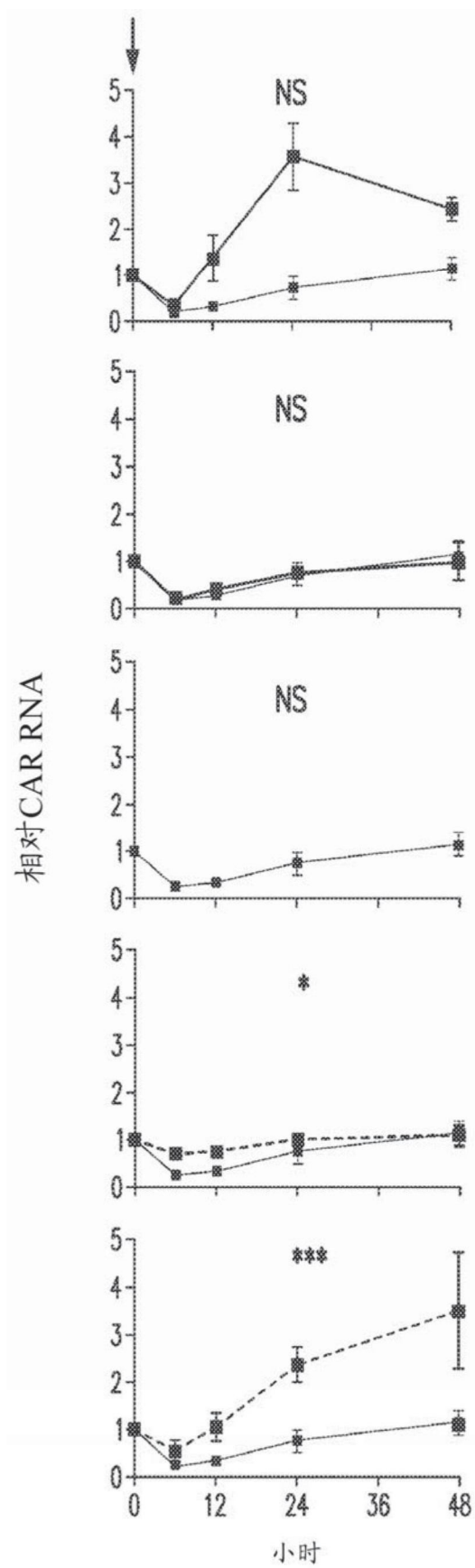


图6F

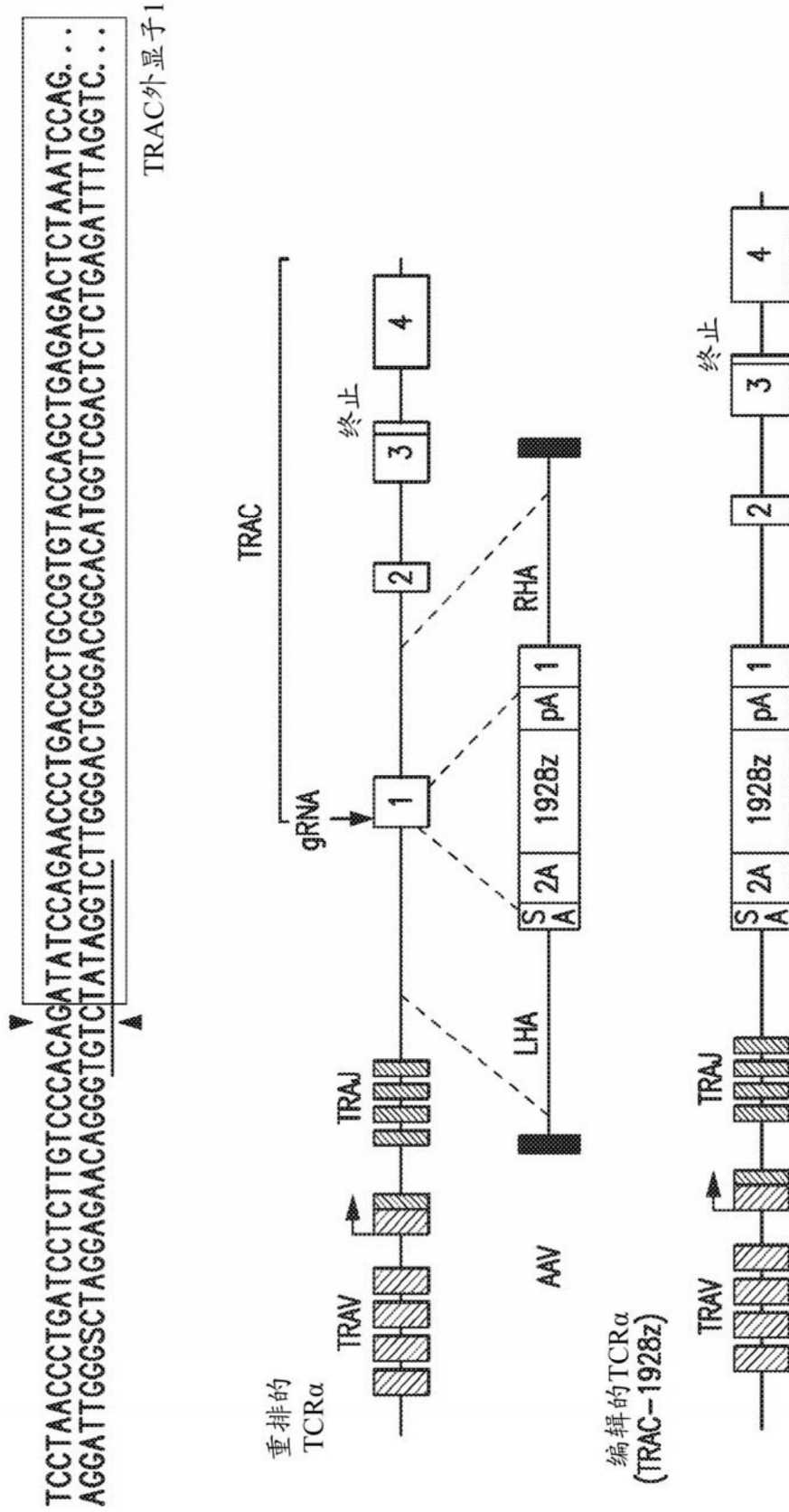


图7A

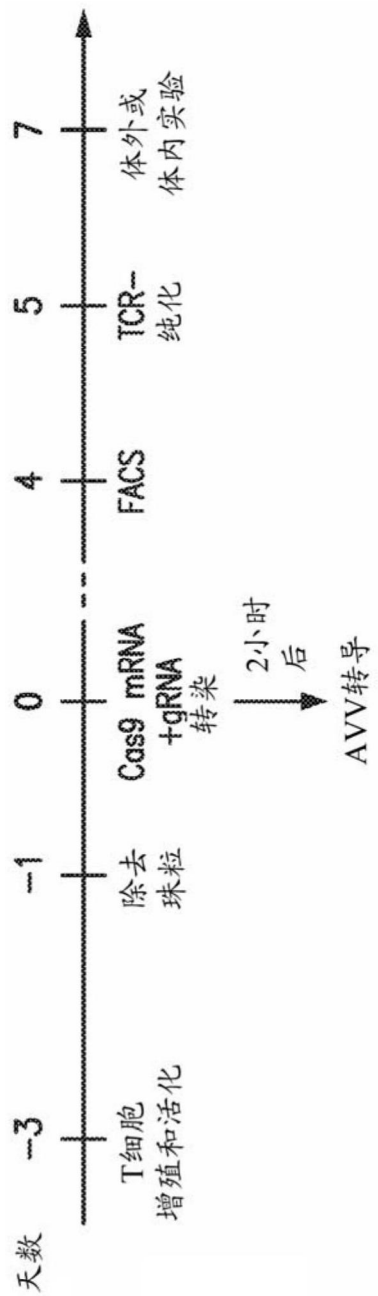


图7B



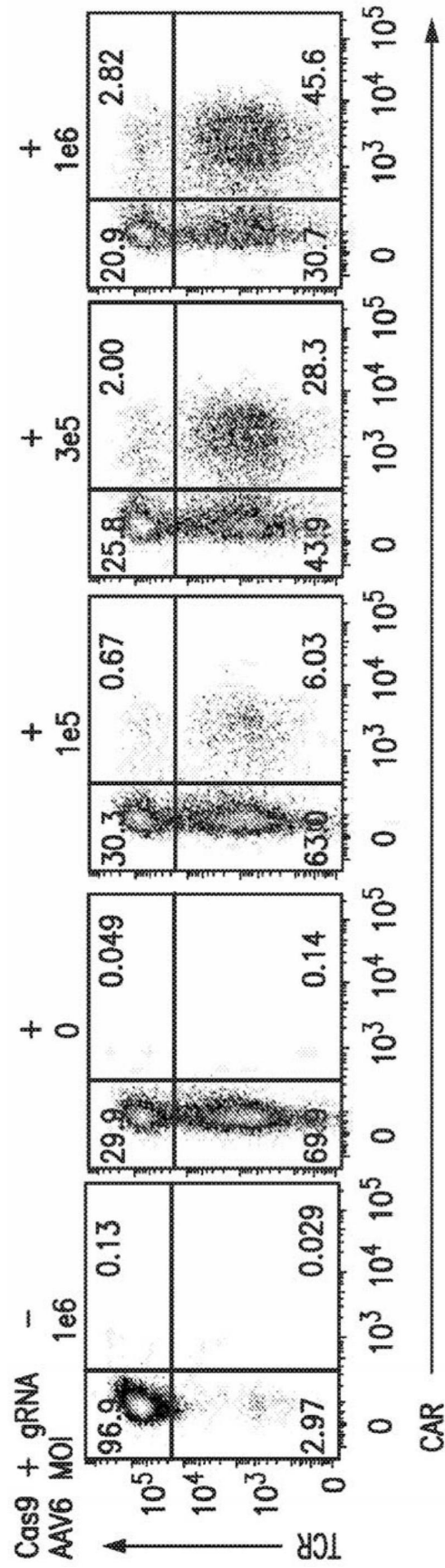


图7C

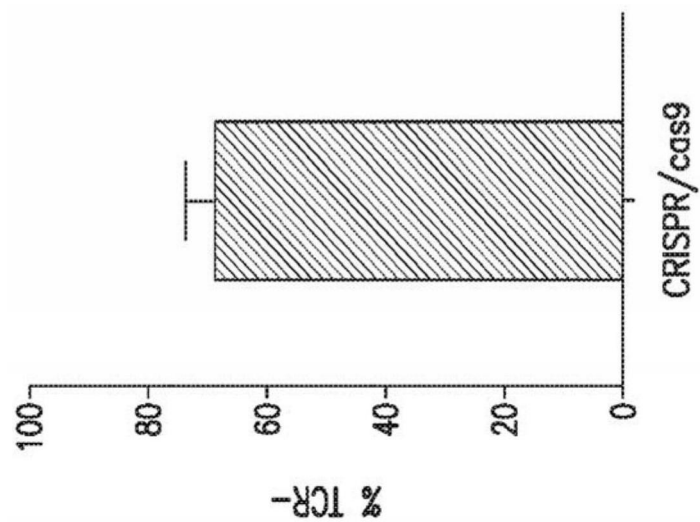


图7D

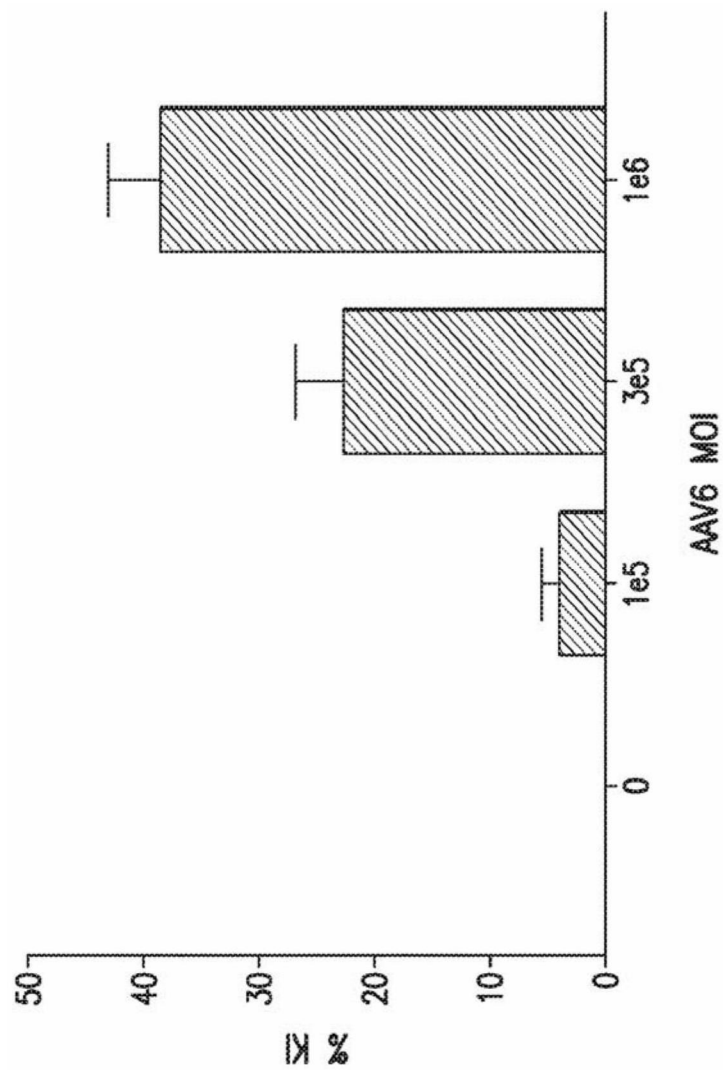


图7E

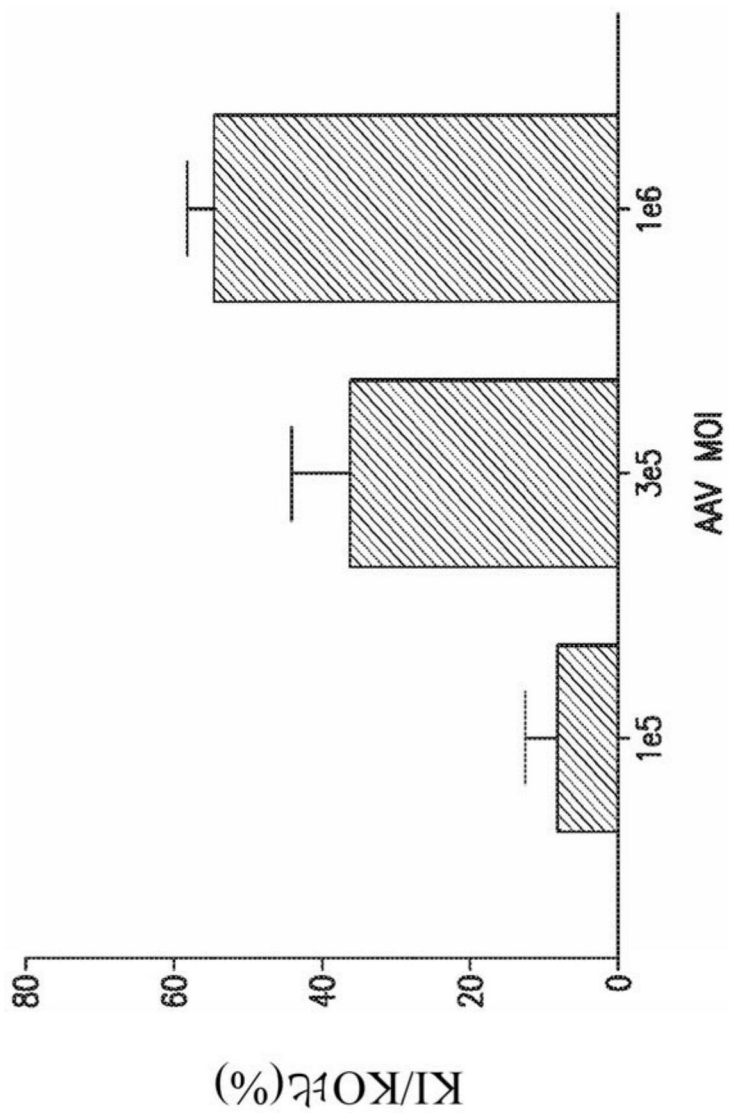


图7F

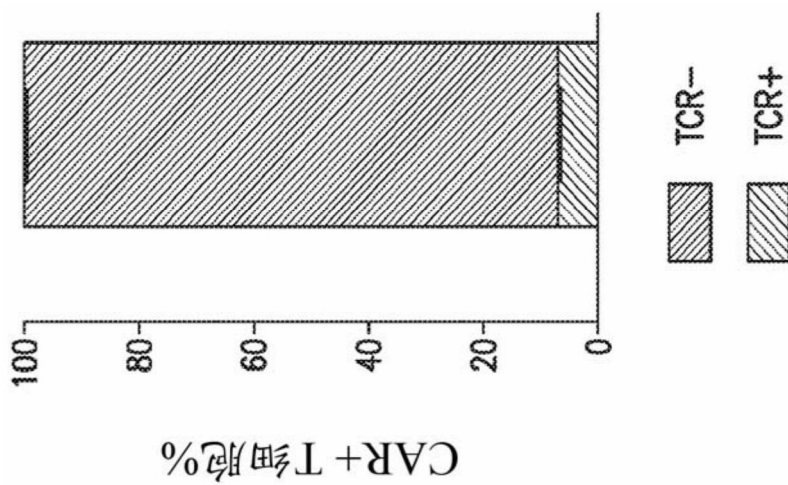


图7G

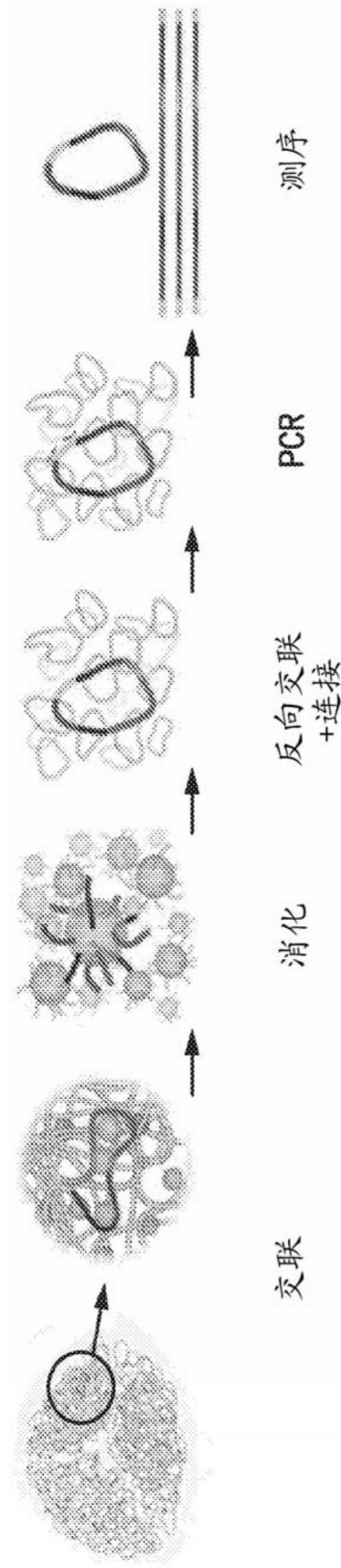


图8A

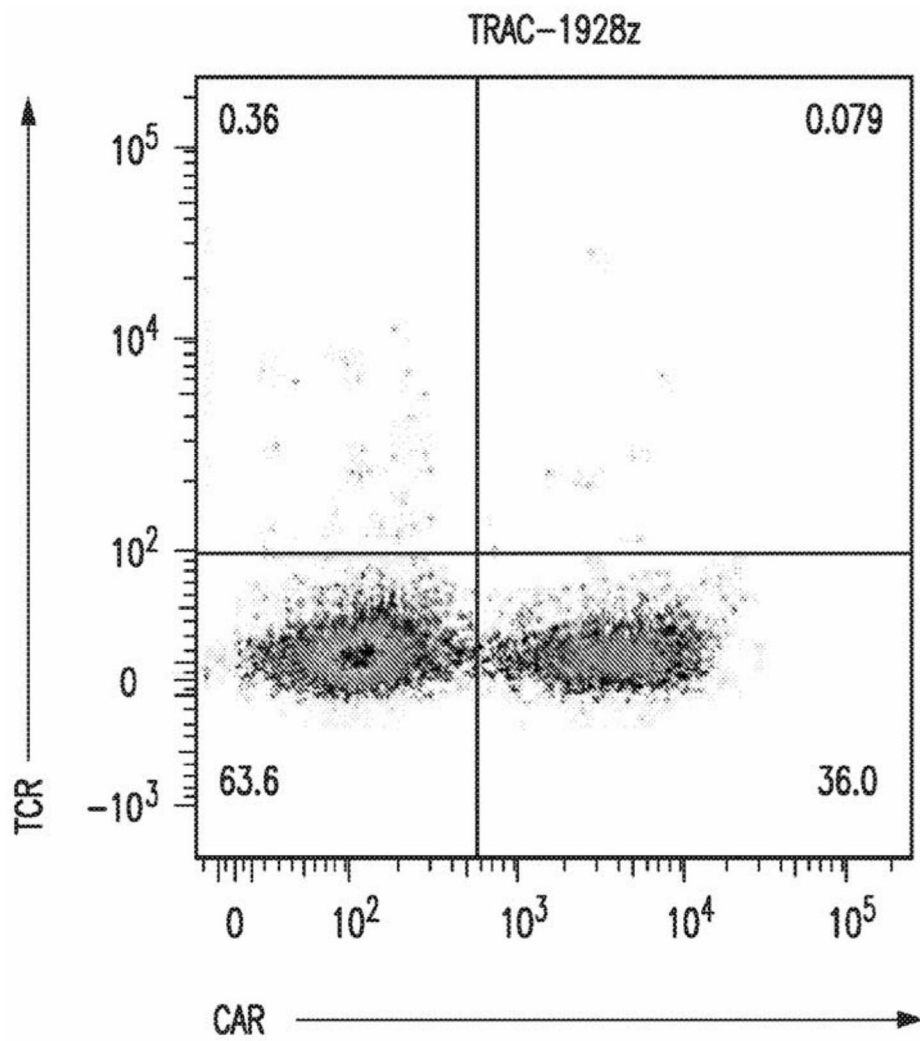


图8B

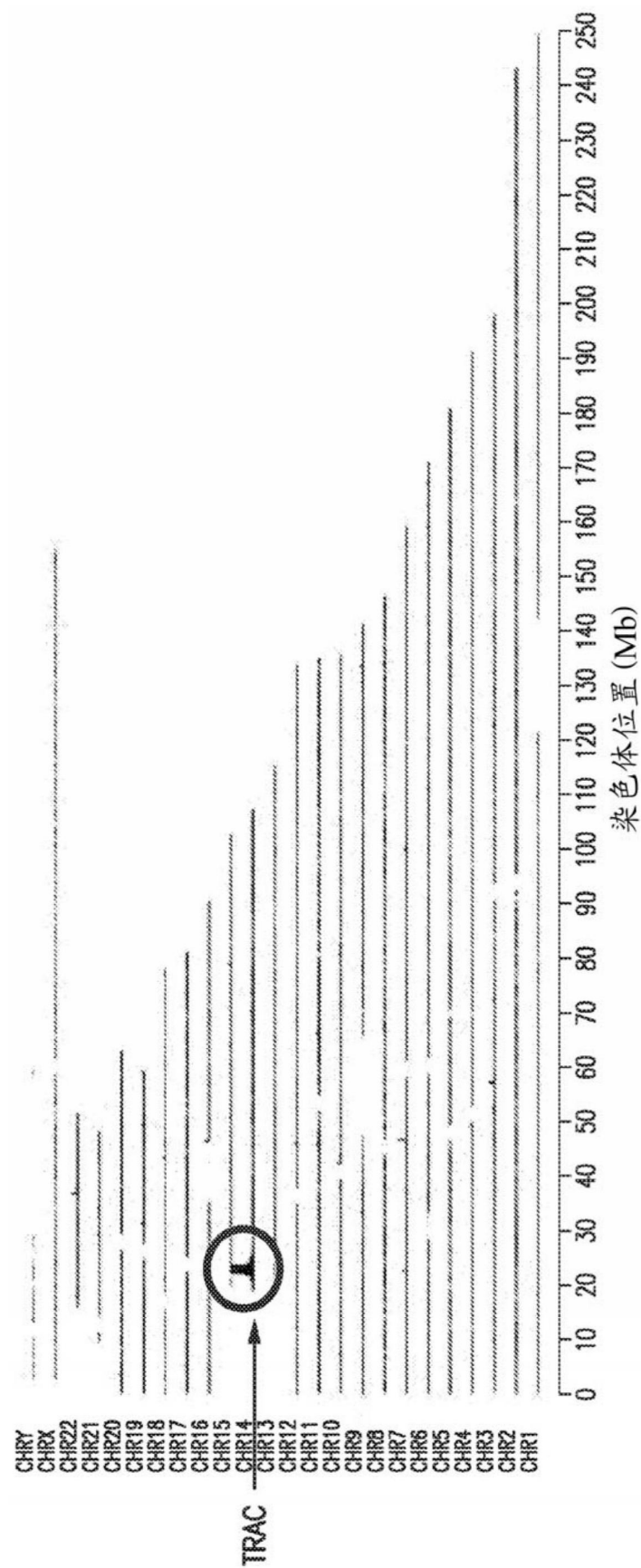


图8C

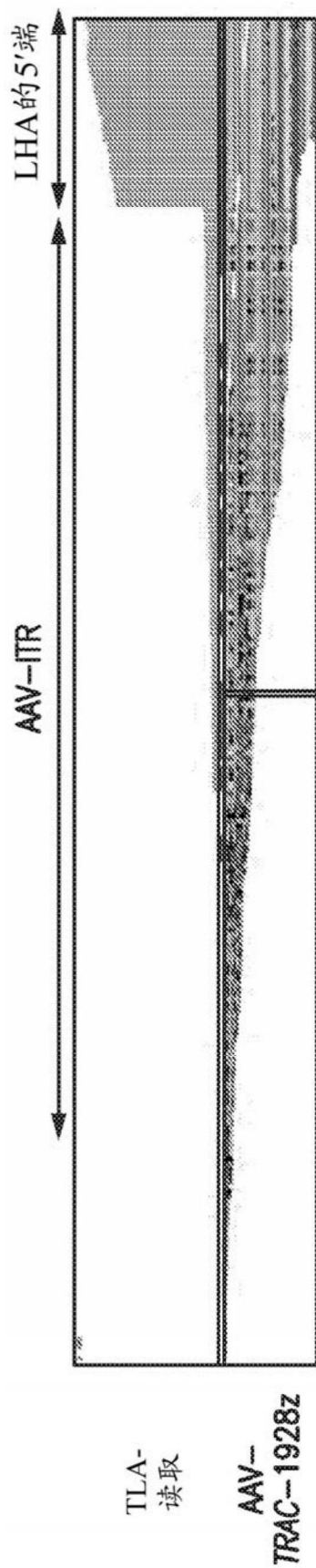


图8D

15	%含完整HR的TRAC等位基因
5	%含不完整HR的TRAC等位基因
0	检出的随机整合 (TLA的灵敏度-5%)

图8E



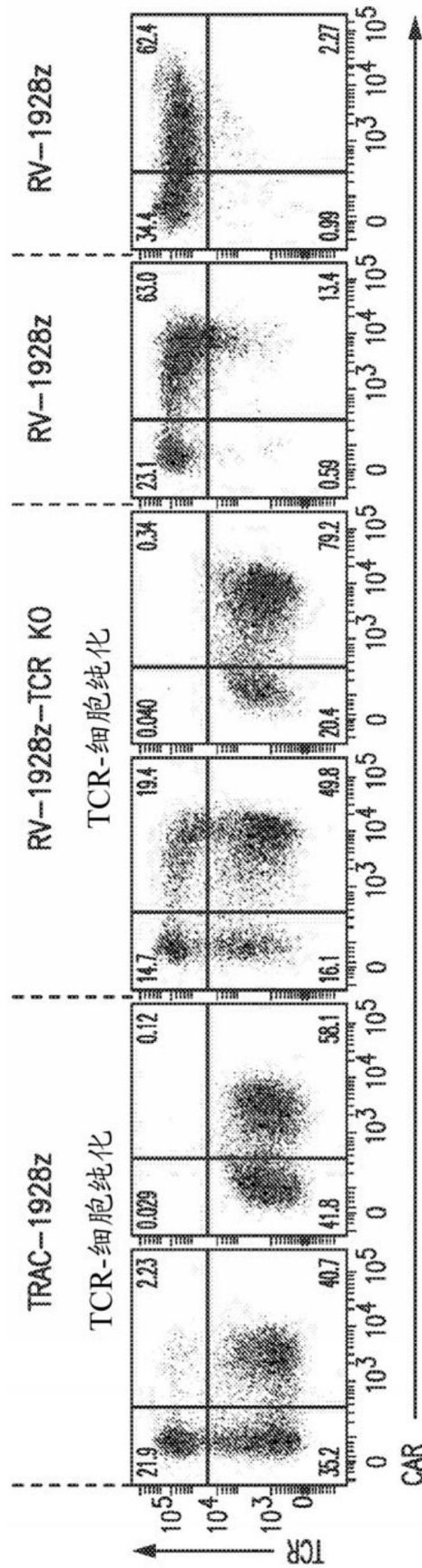


图9A

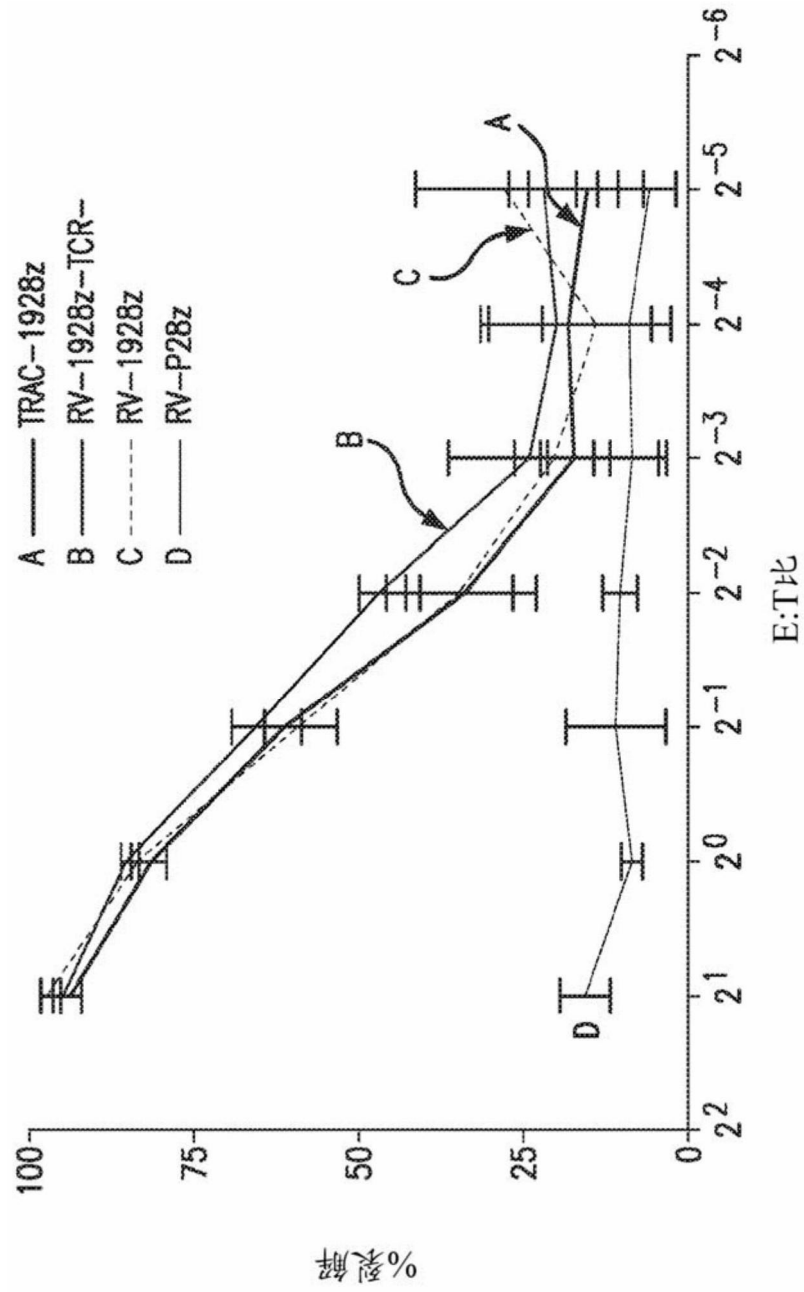


图9B

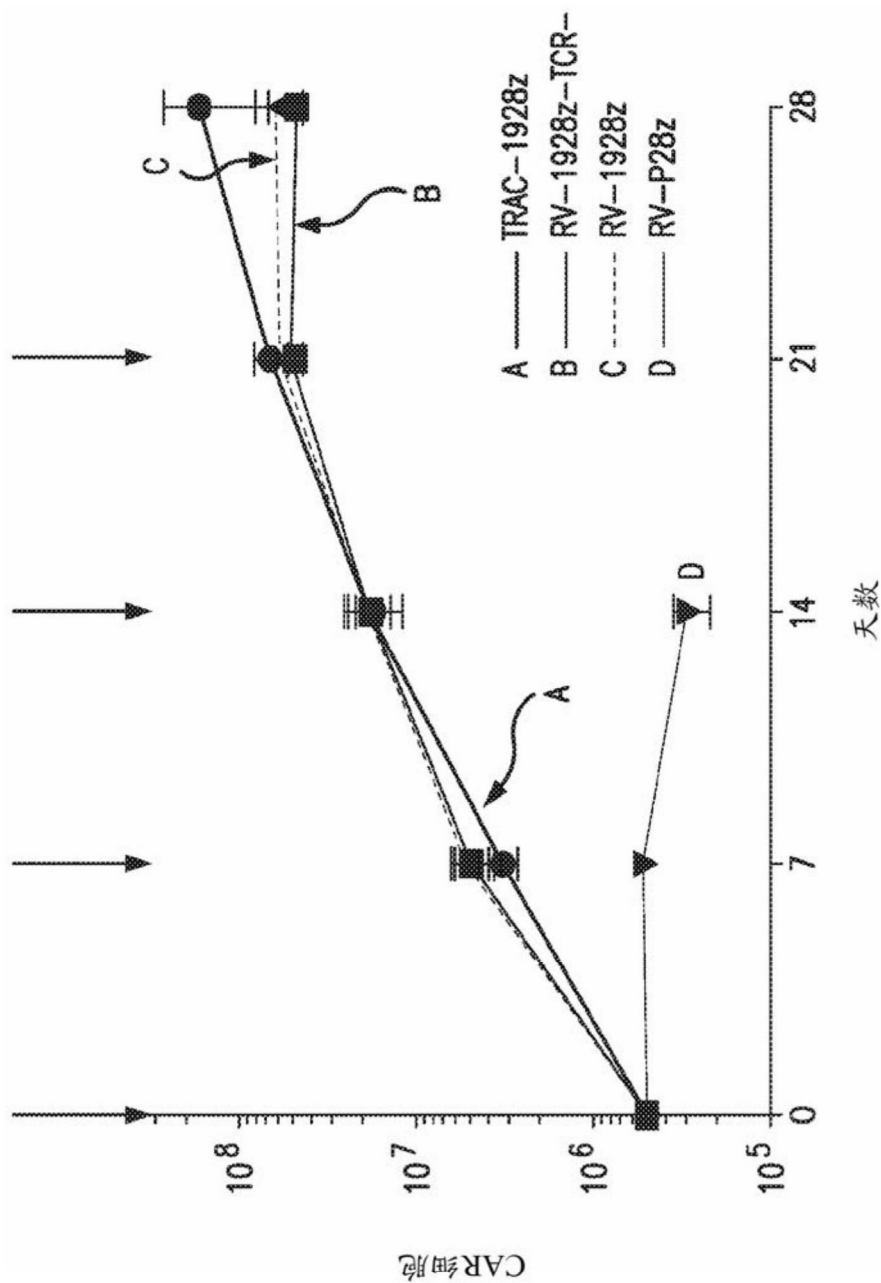


图9C

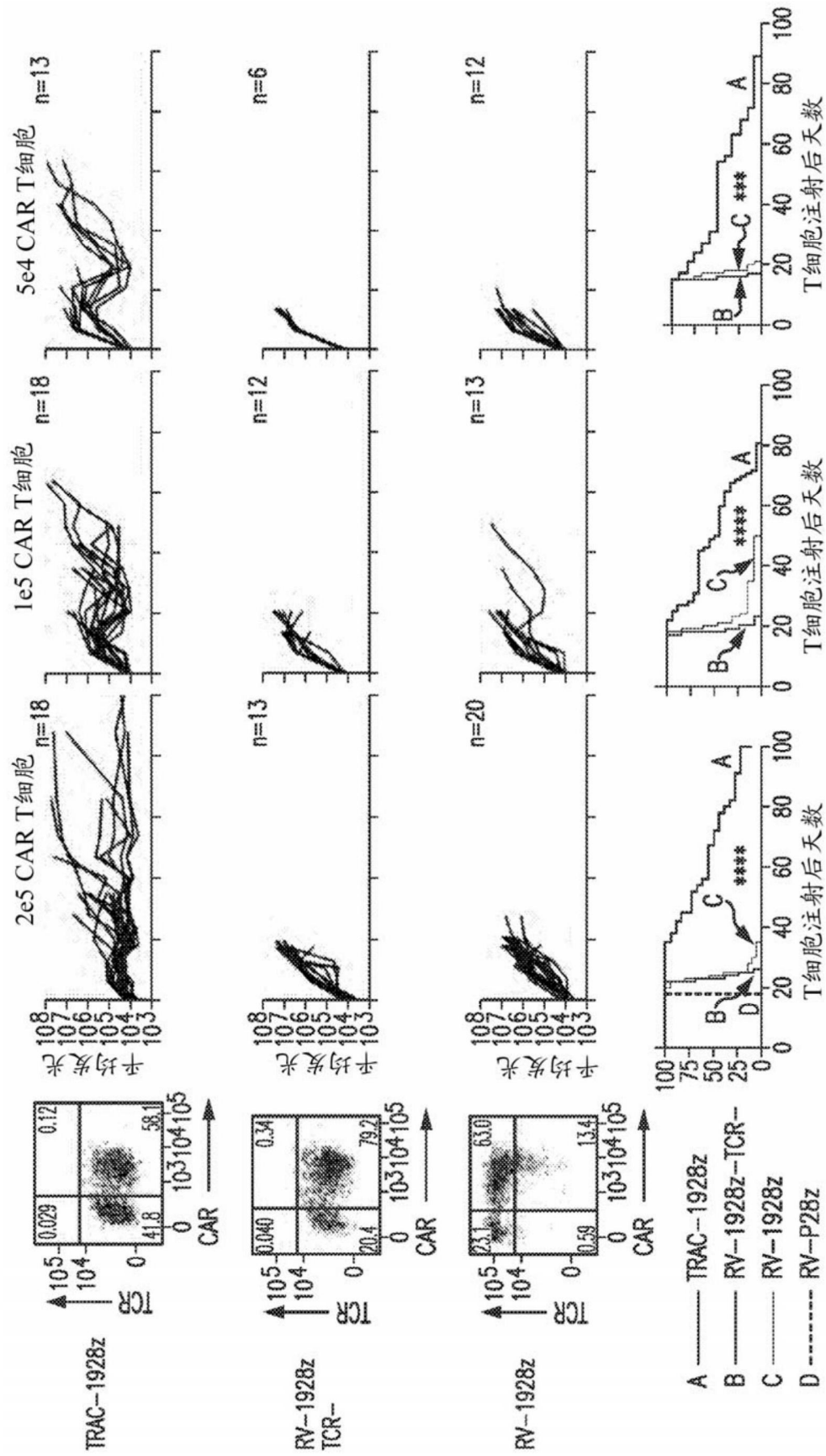


图10A

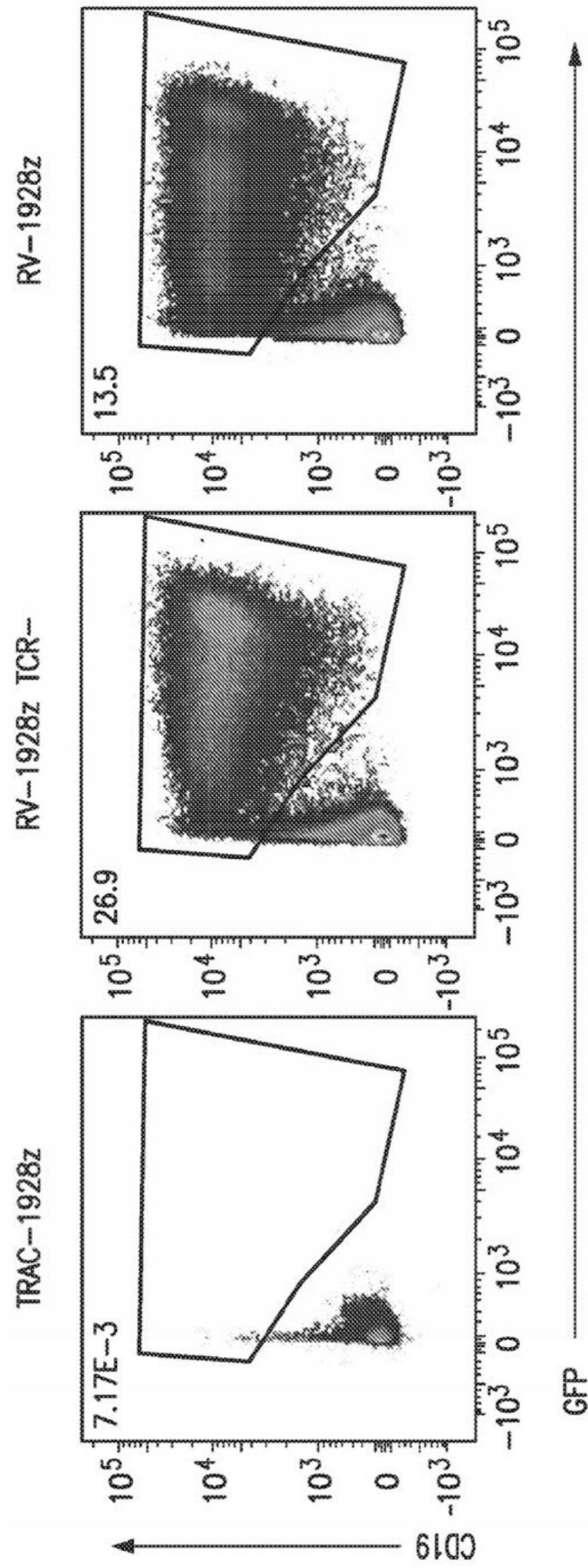


图10B

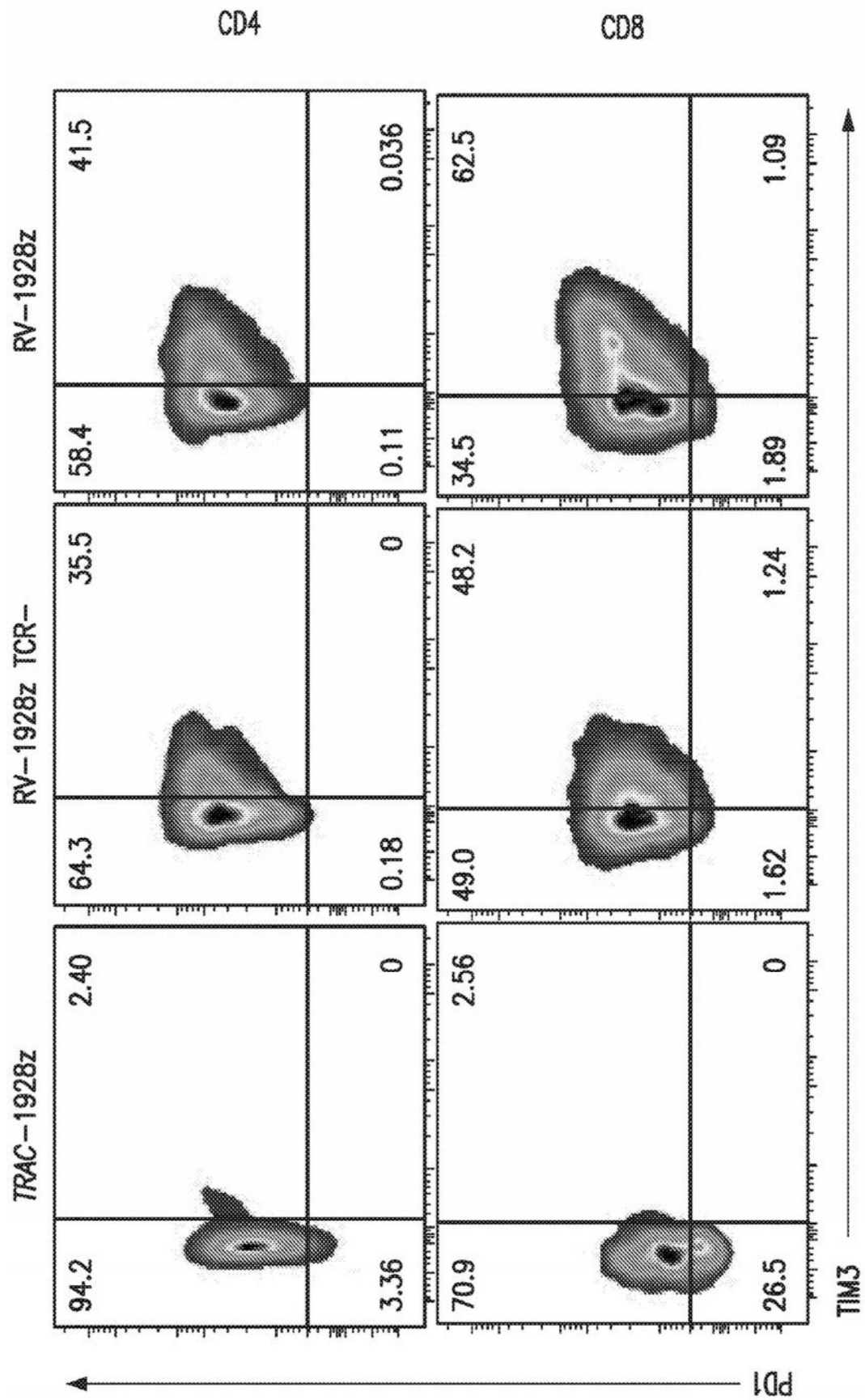


图10C

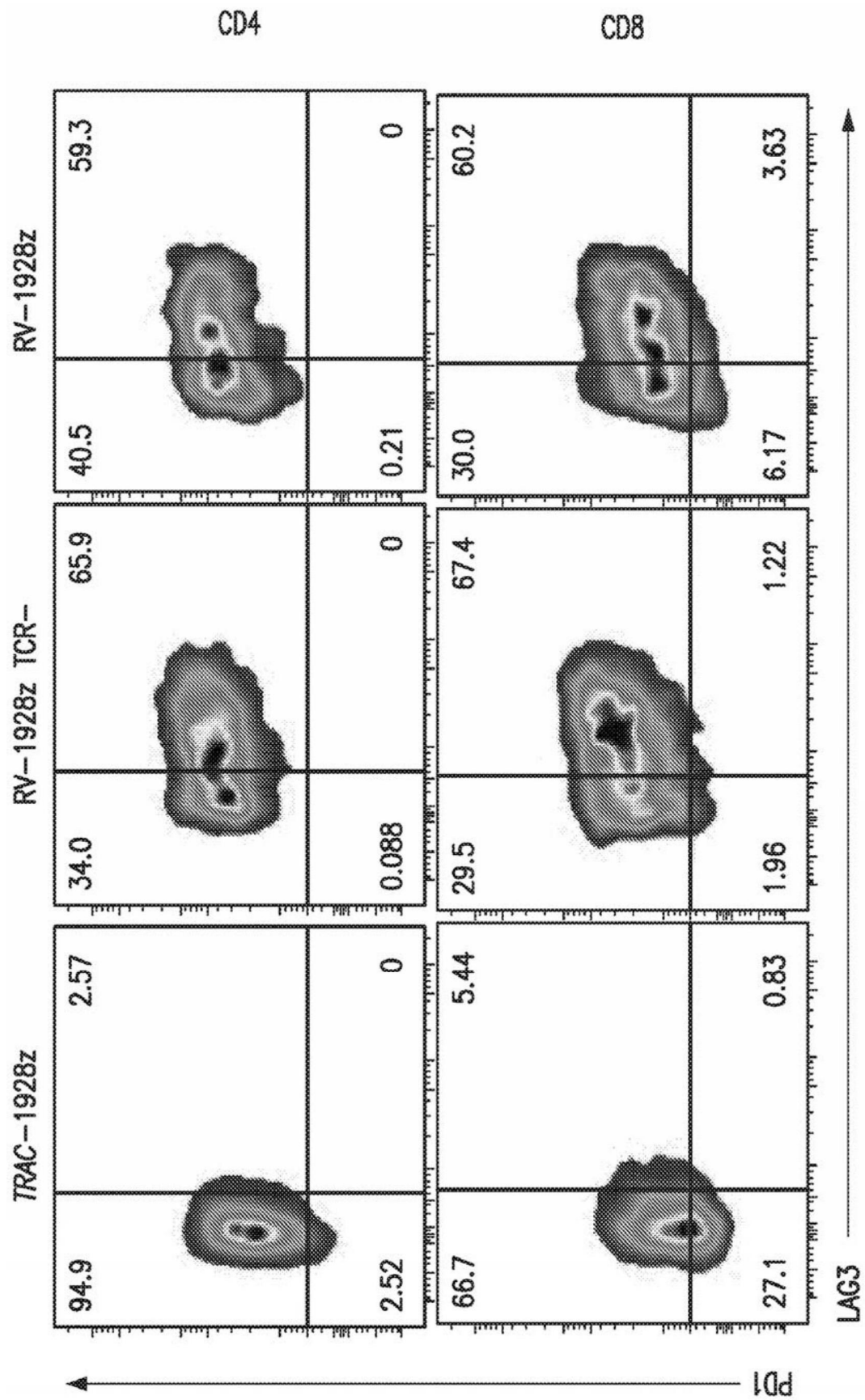


图10D

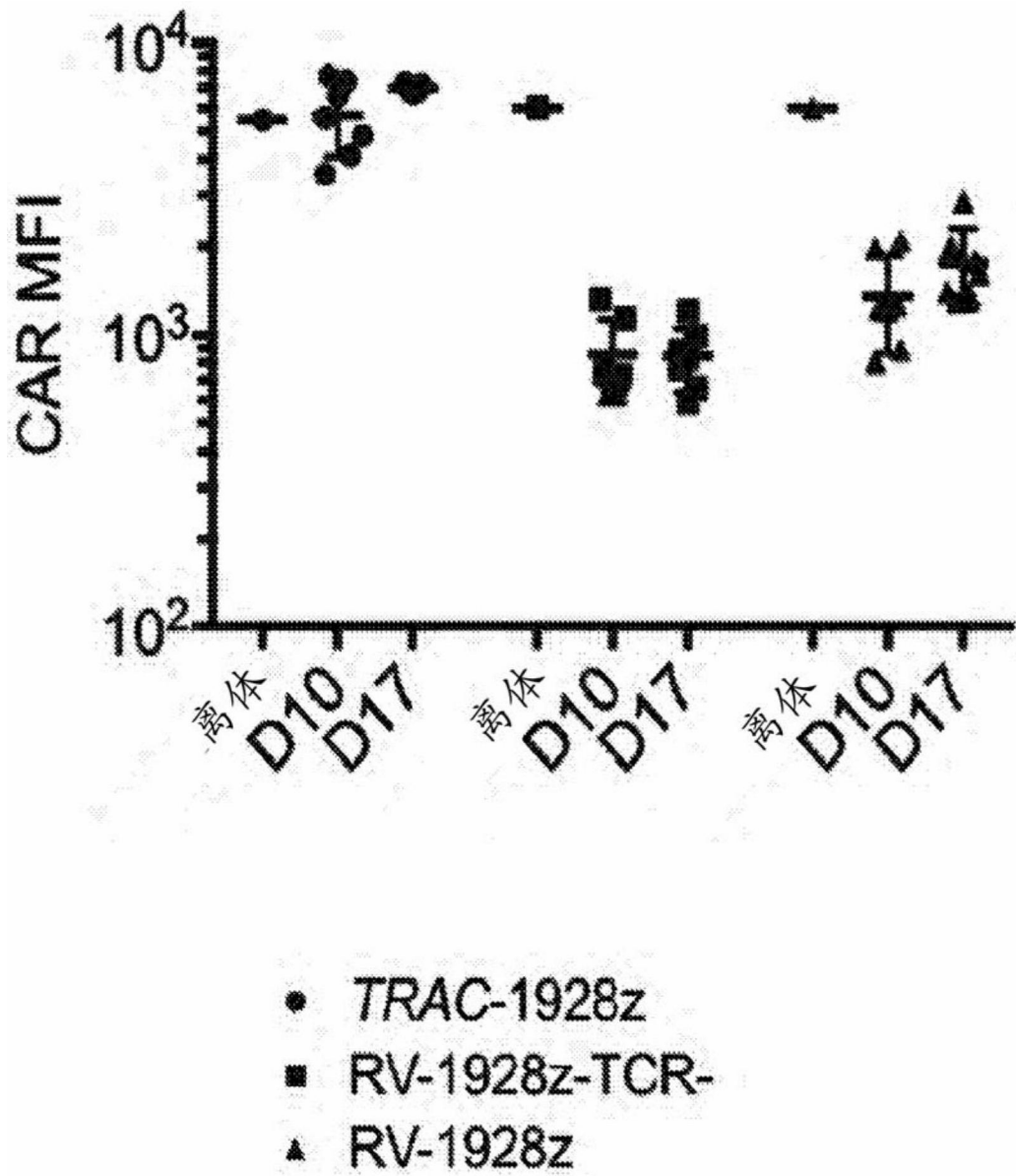


图10E



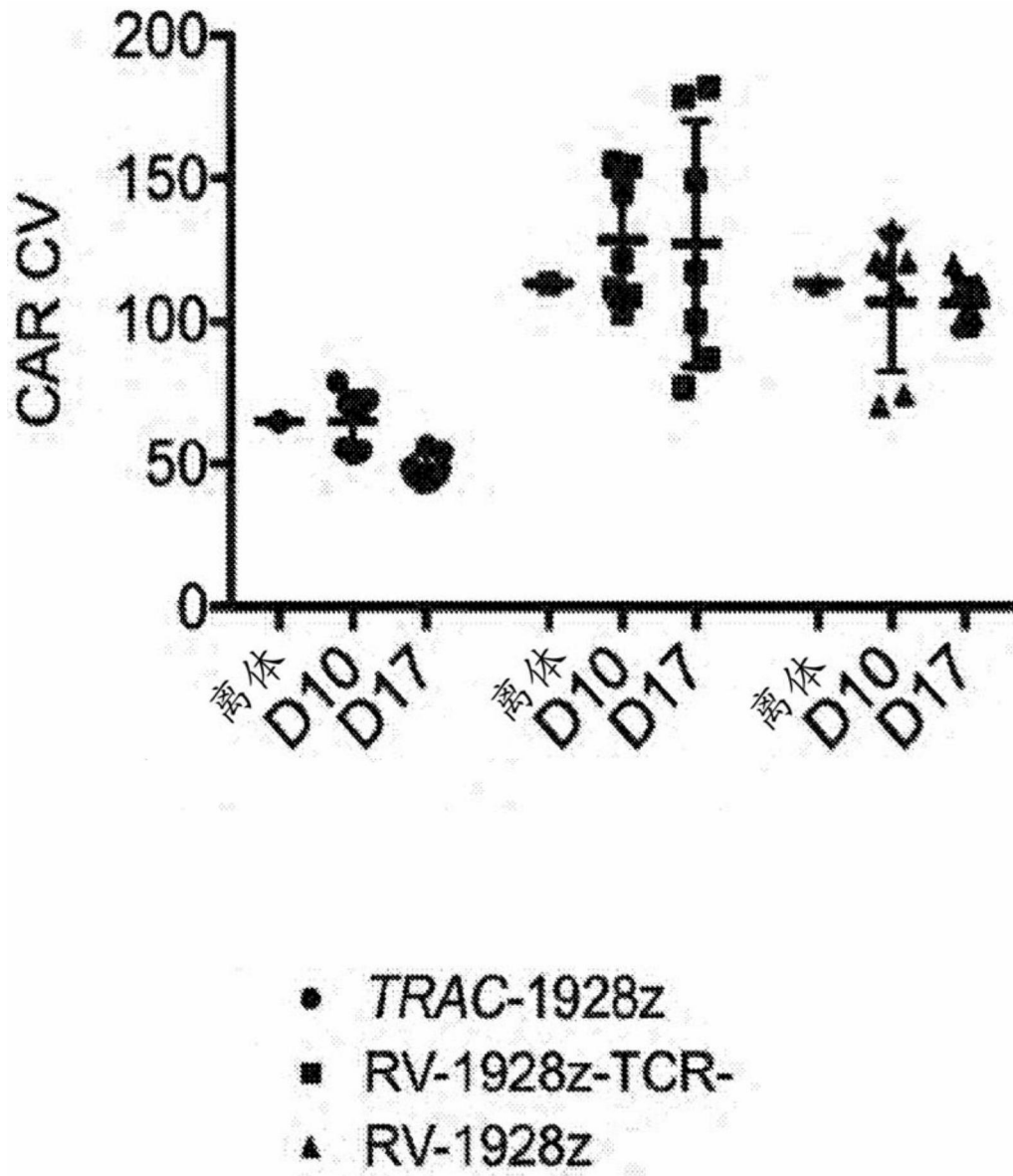


图10F

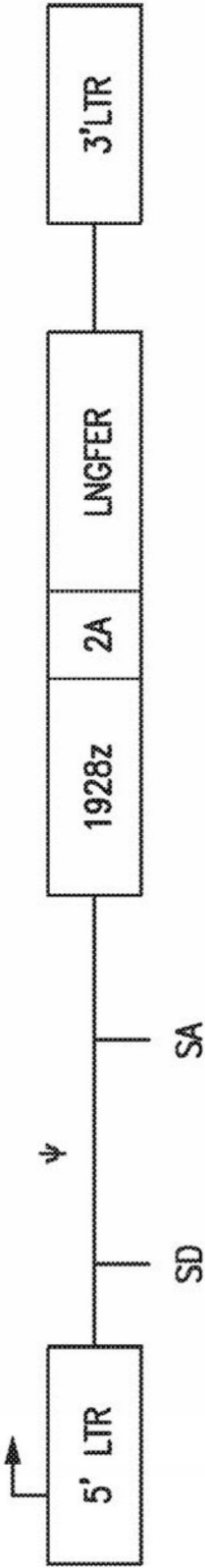


图10G

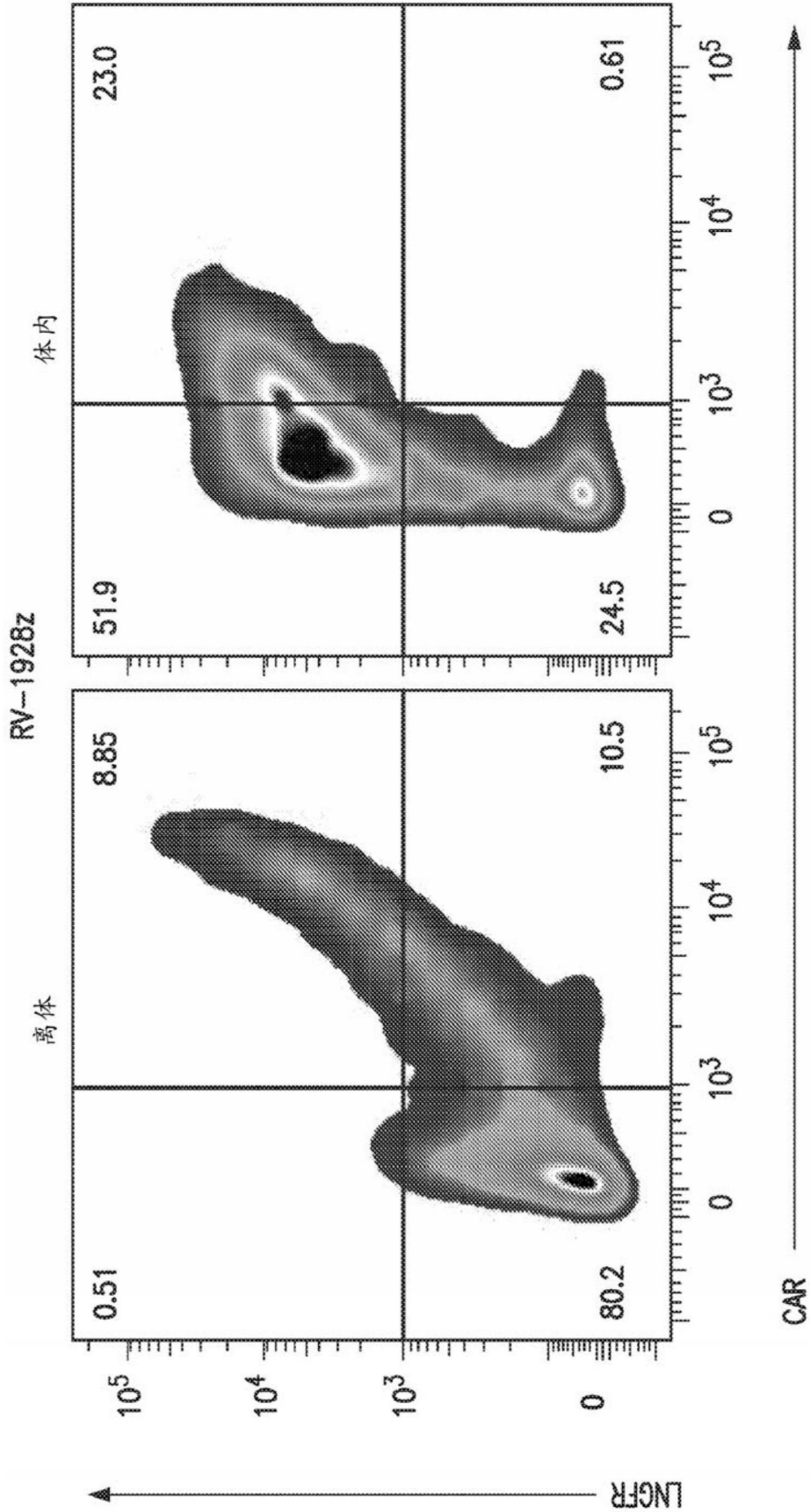


图10H

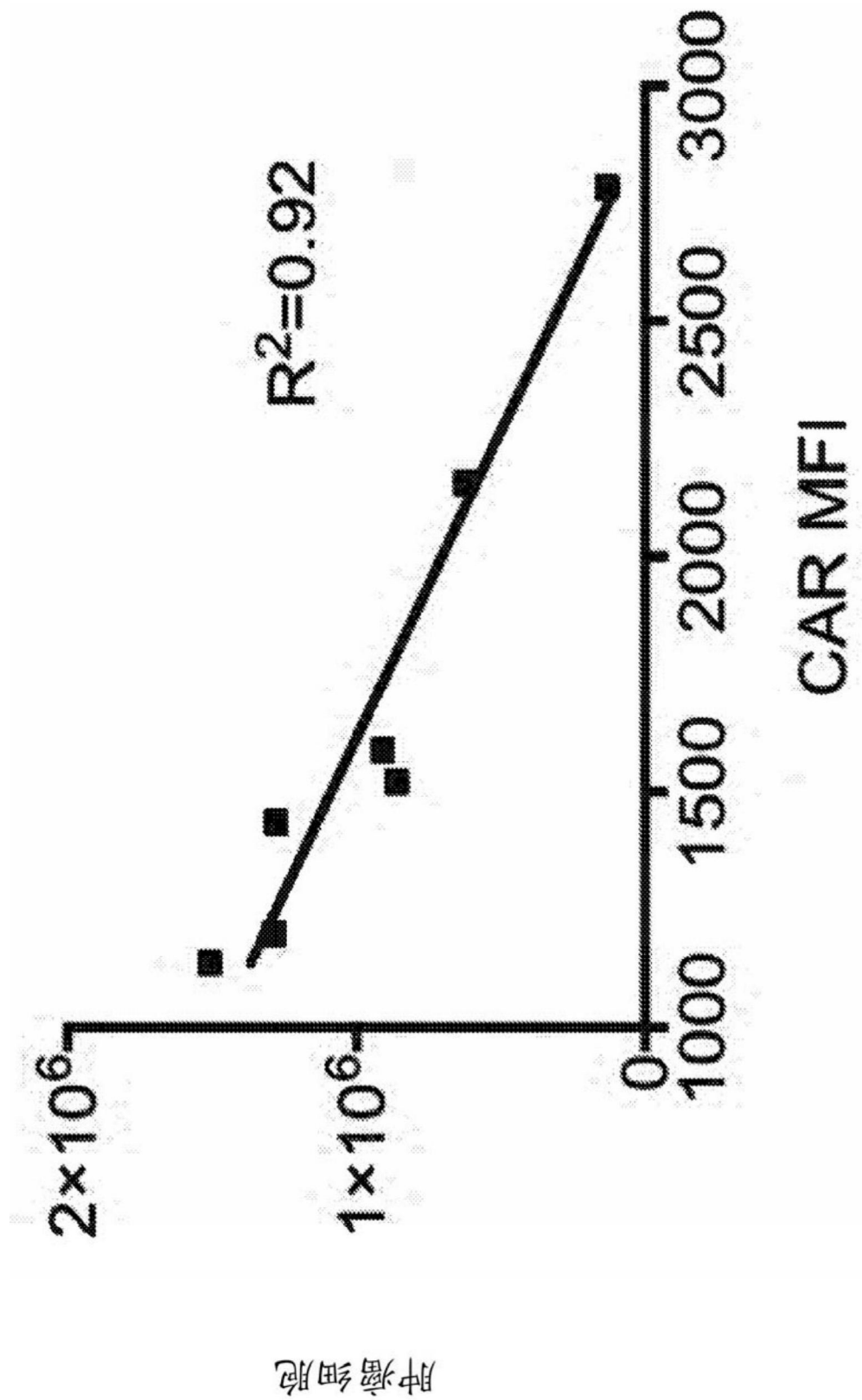


图10I

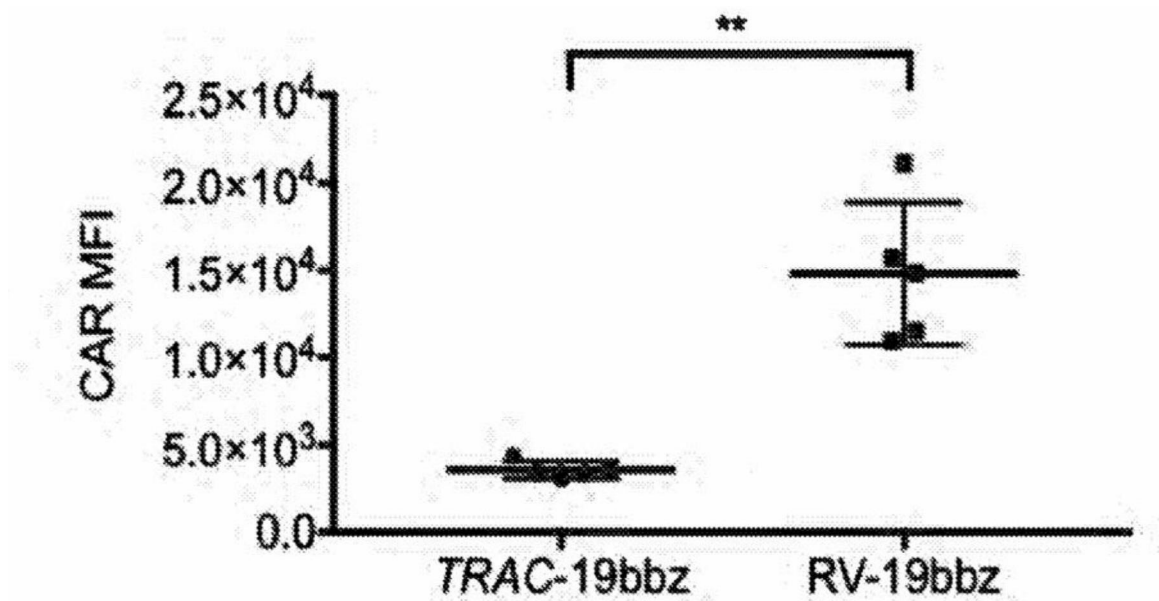


图11A

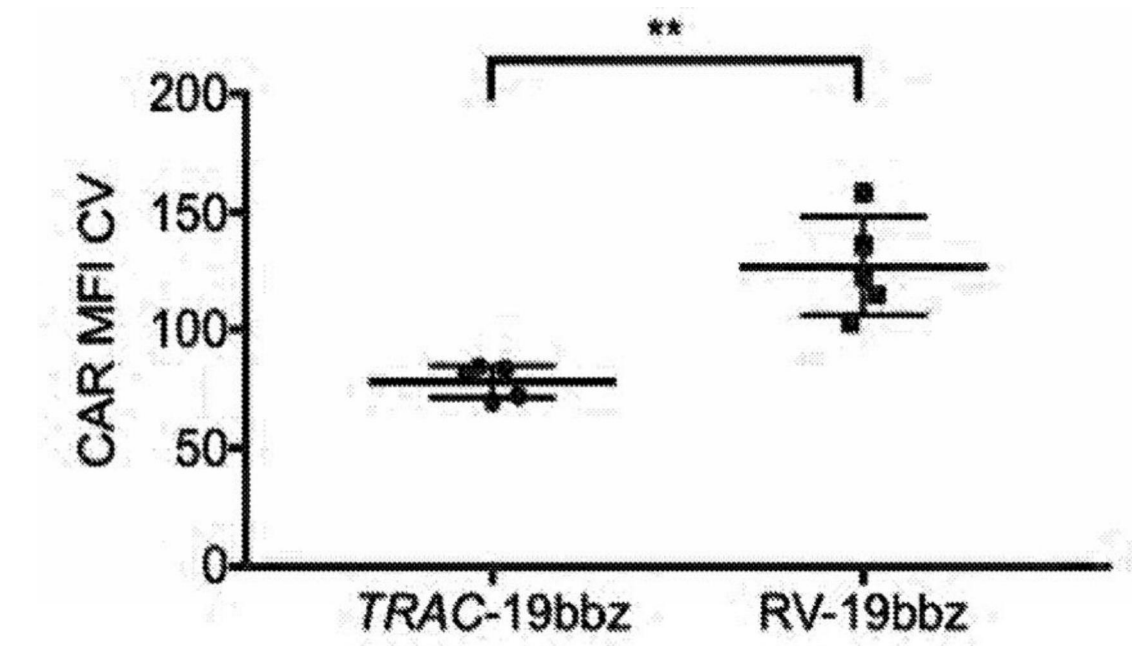


图11B



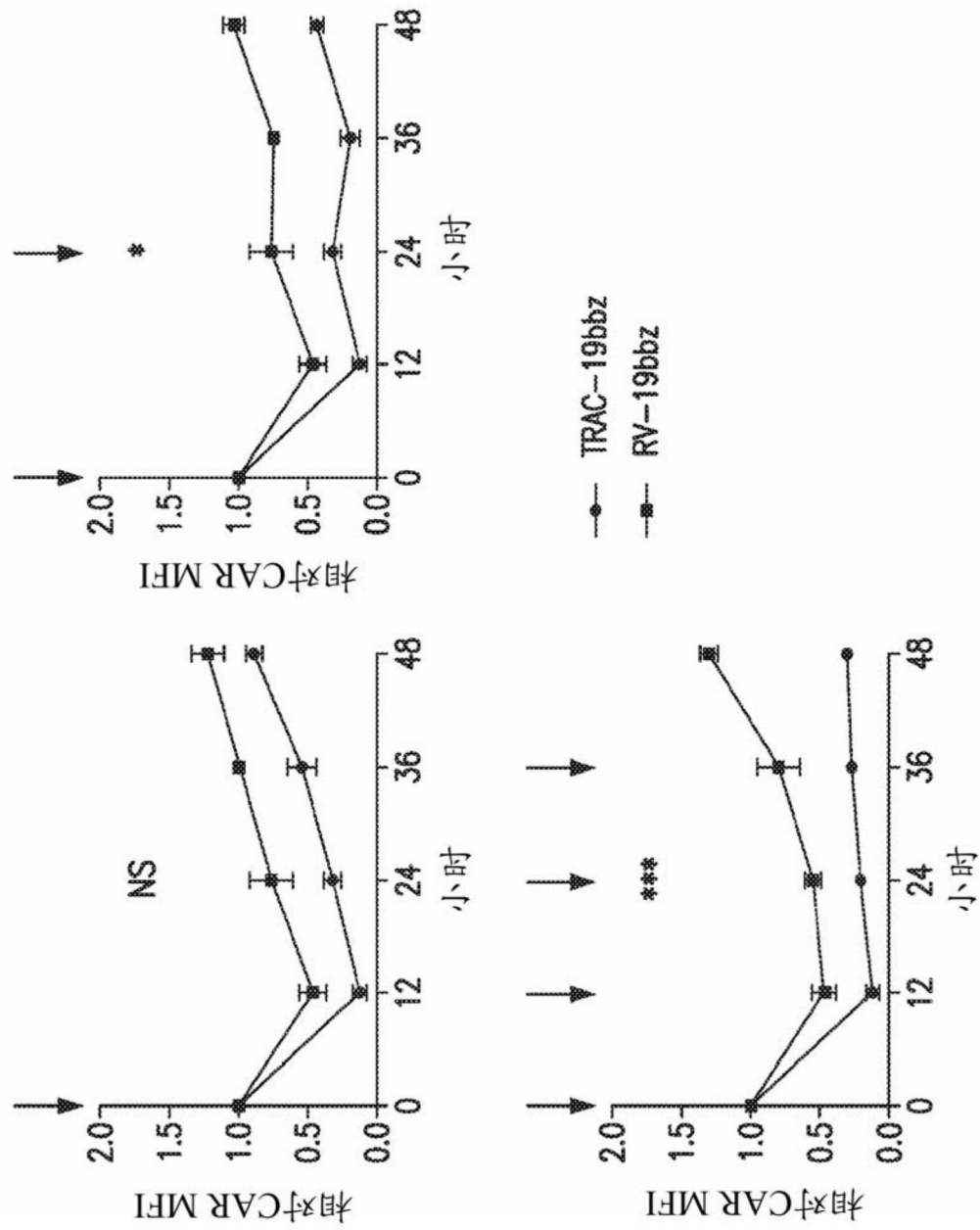


图11D

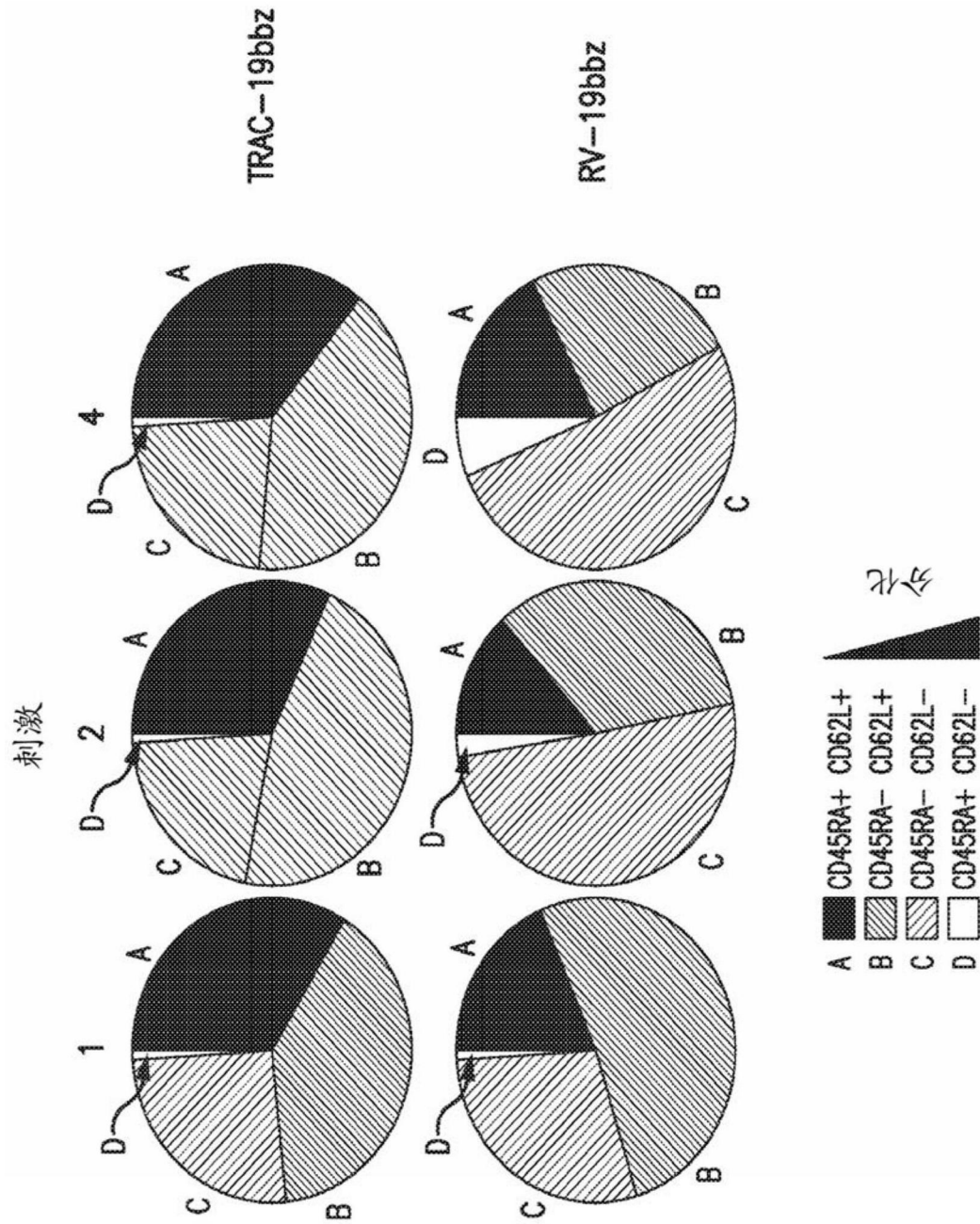


图11E



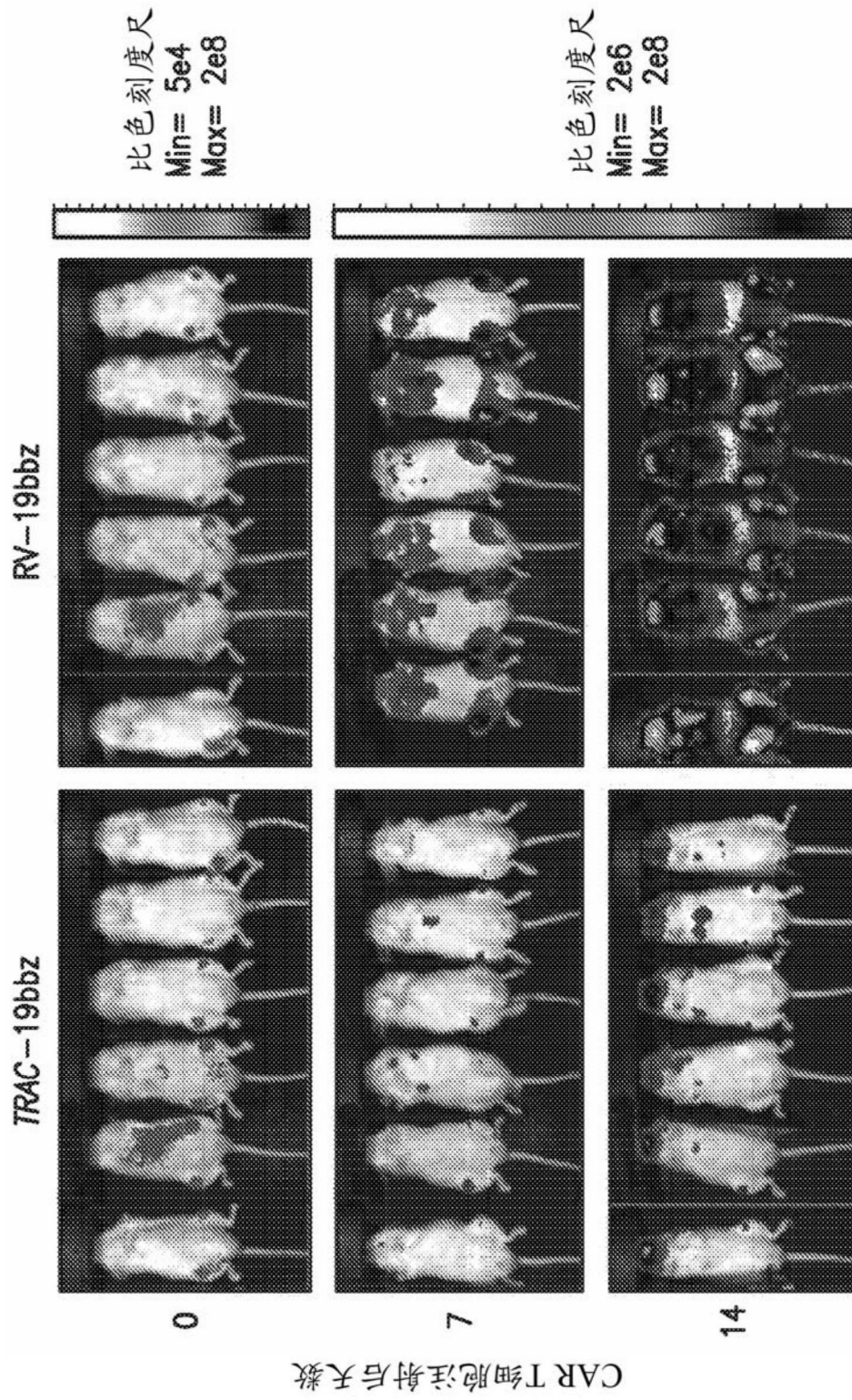


图11F

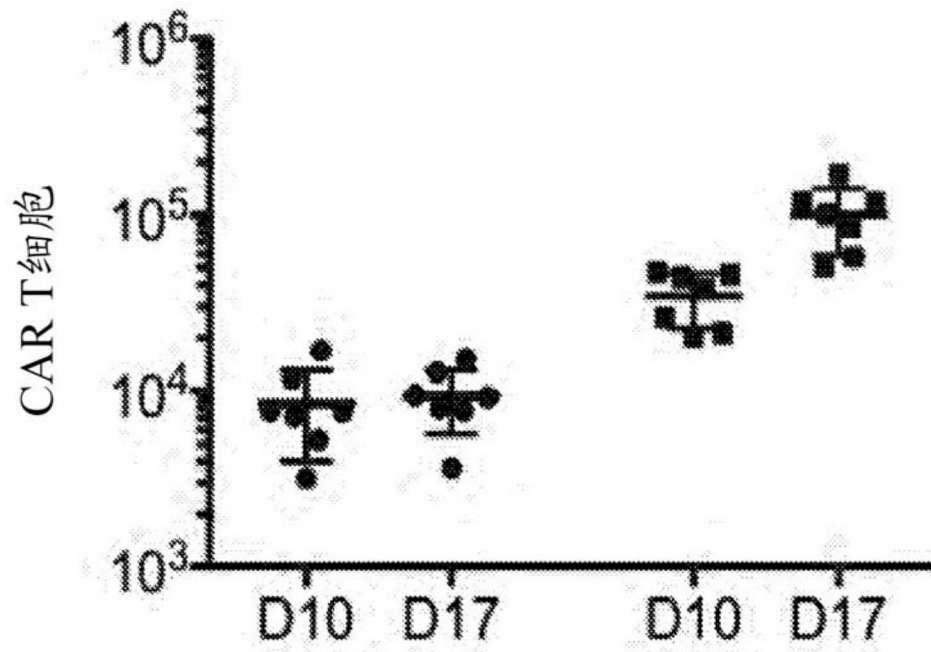


图11G

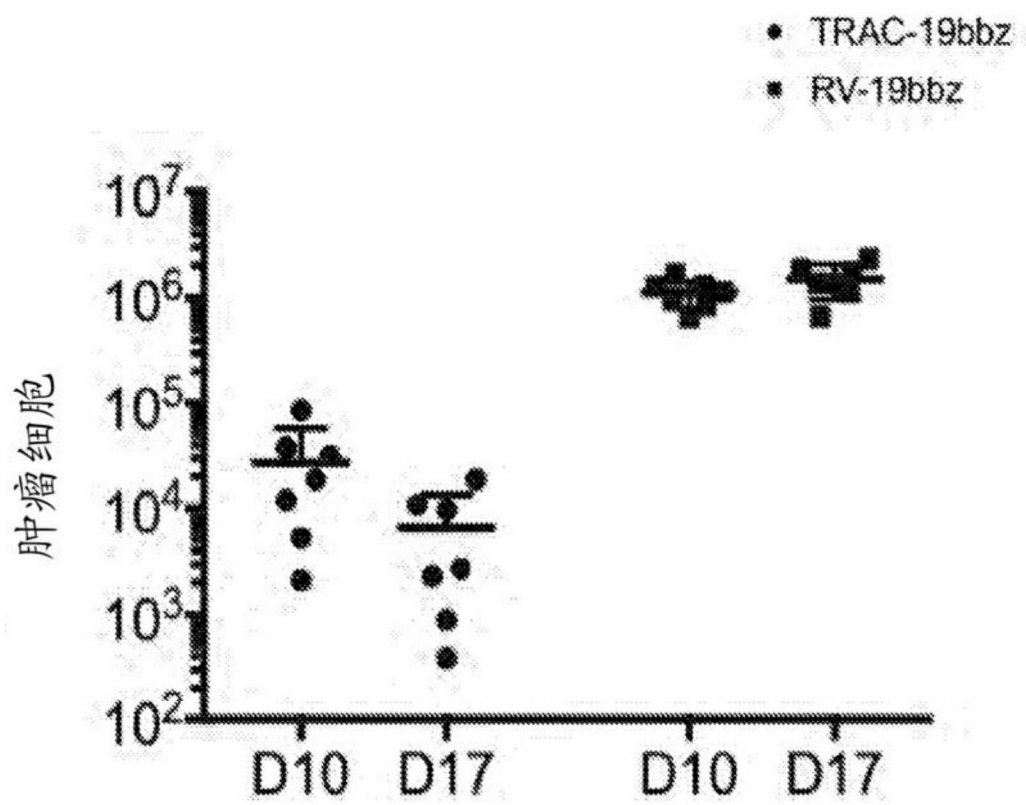


图11H

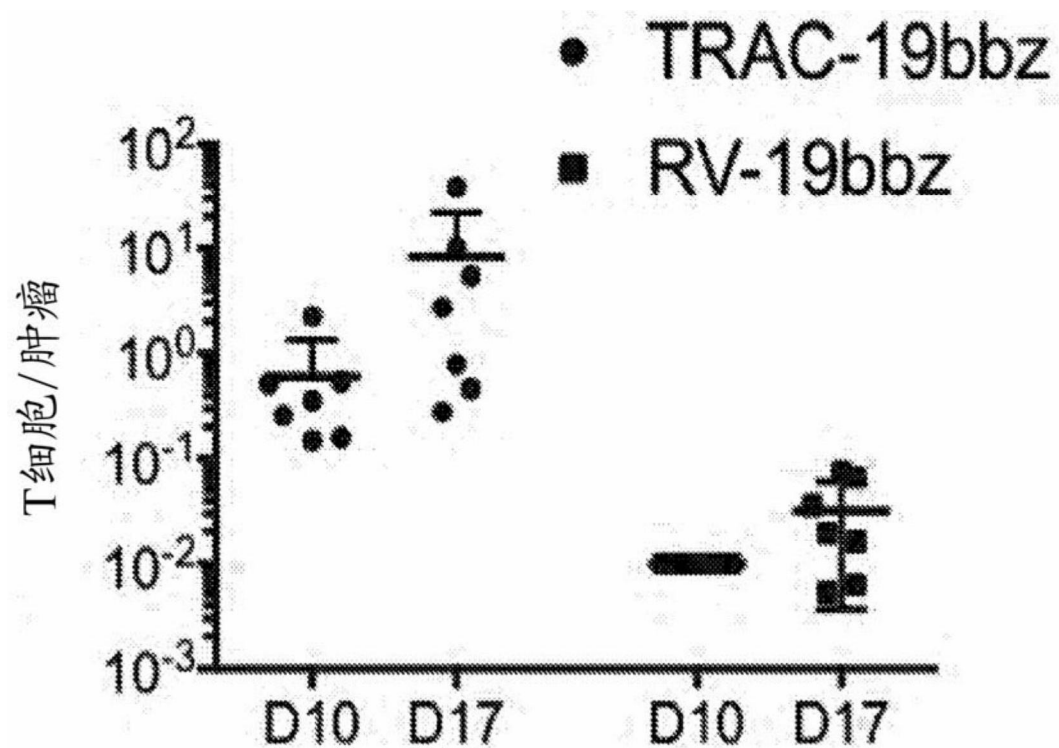


图11I

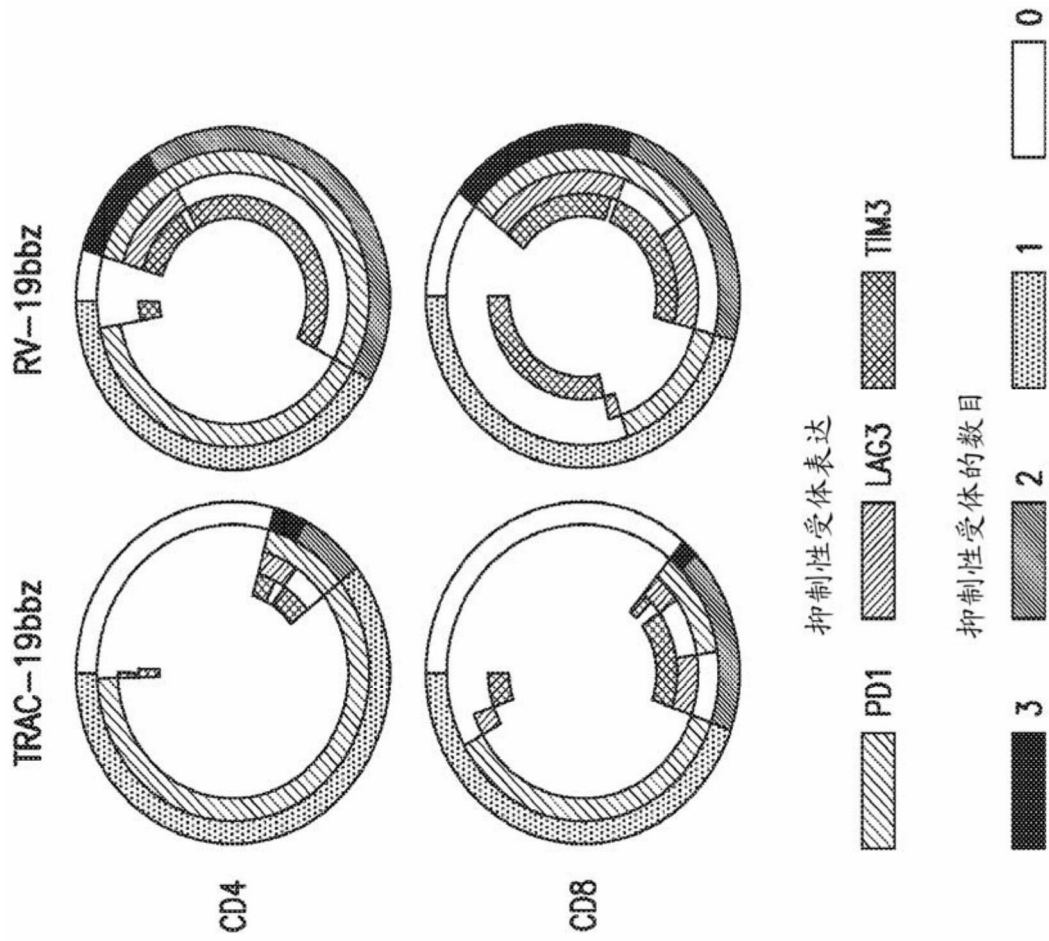


图11J

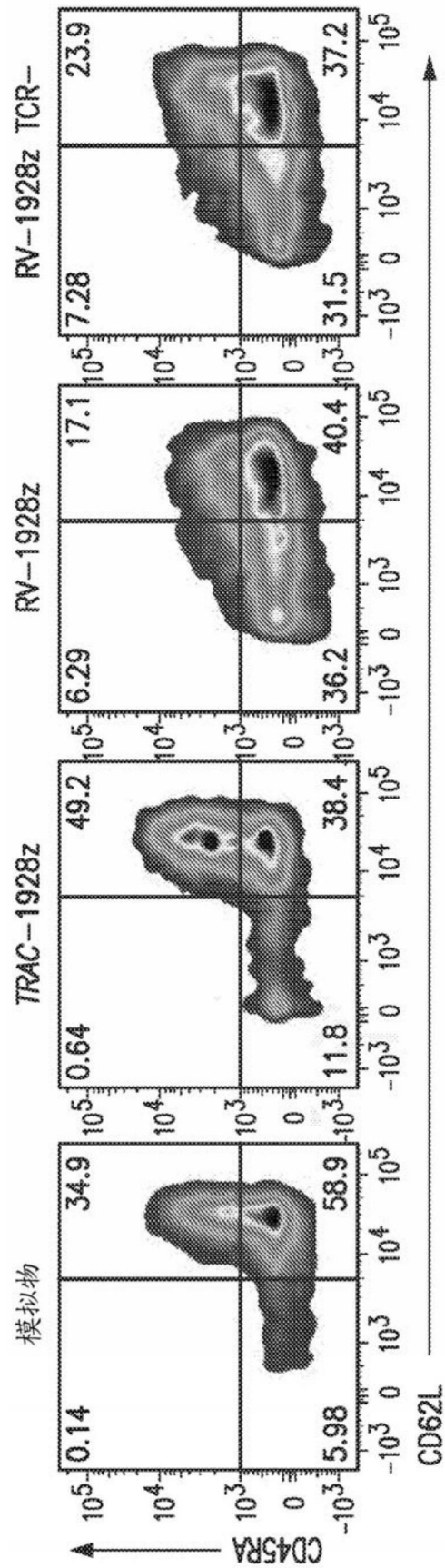


图12A

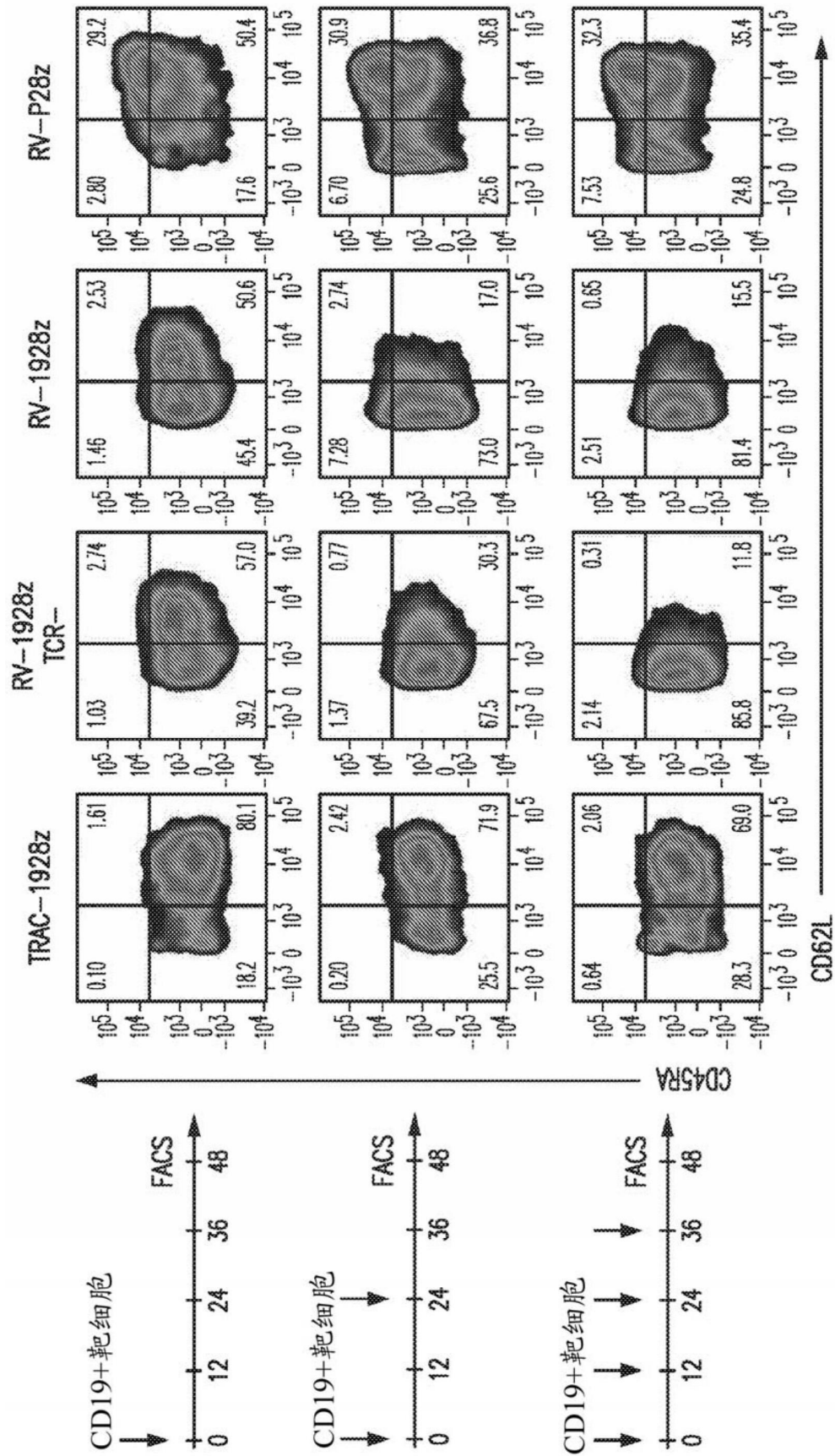


图12B

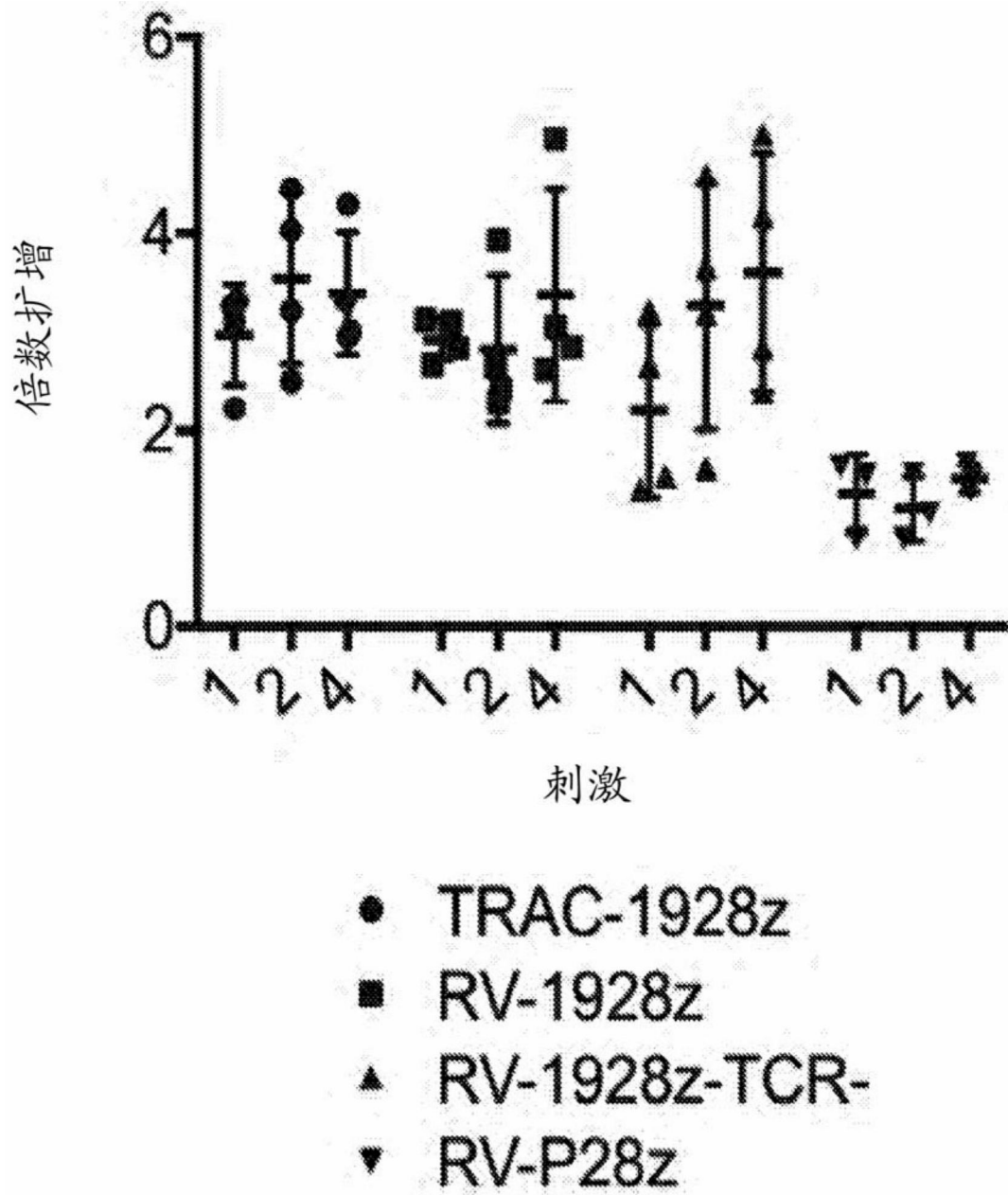


图12C

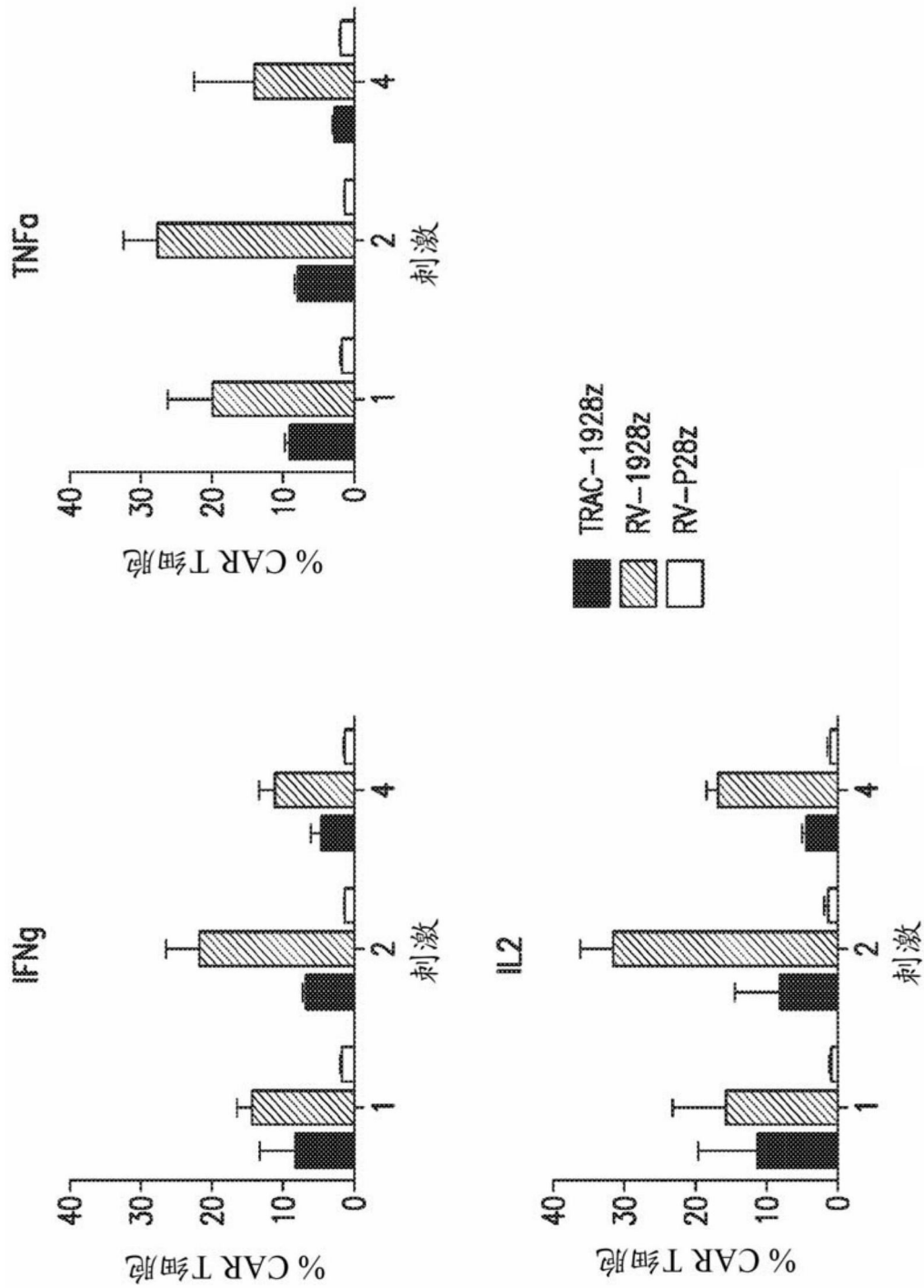


图12D



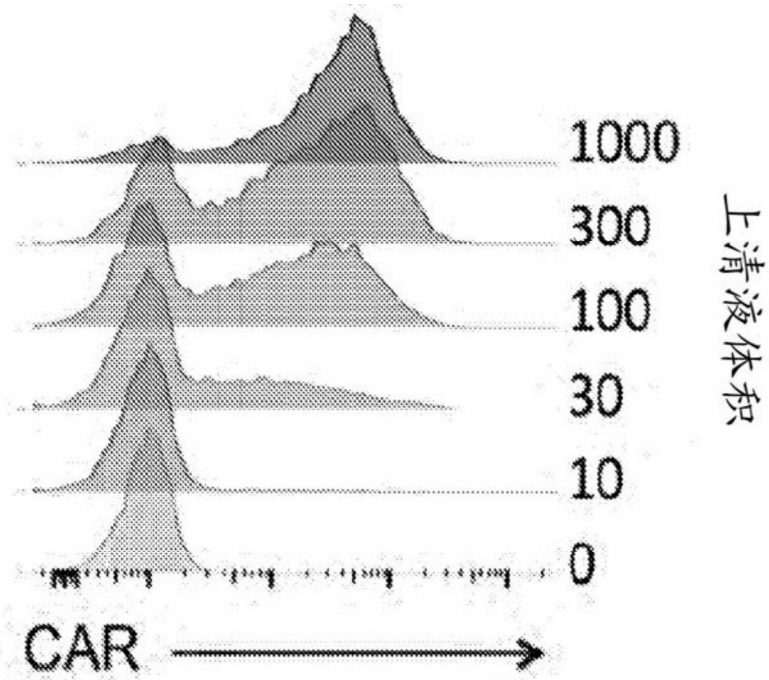


图13A

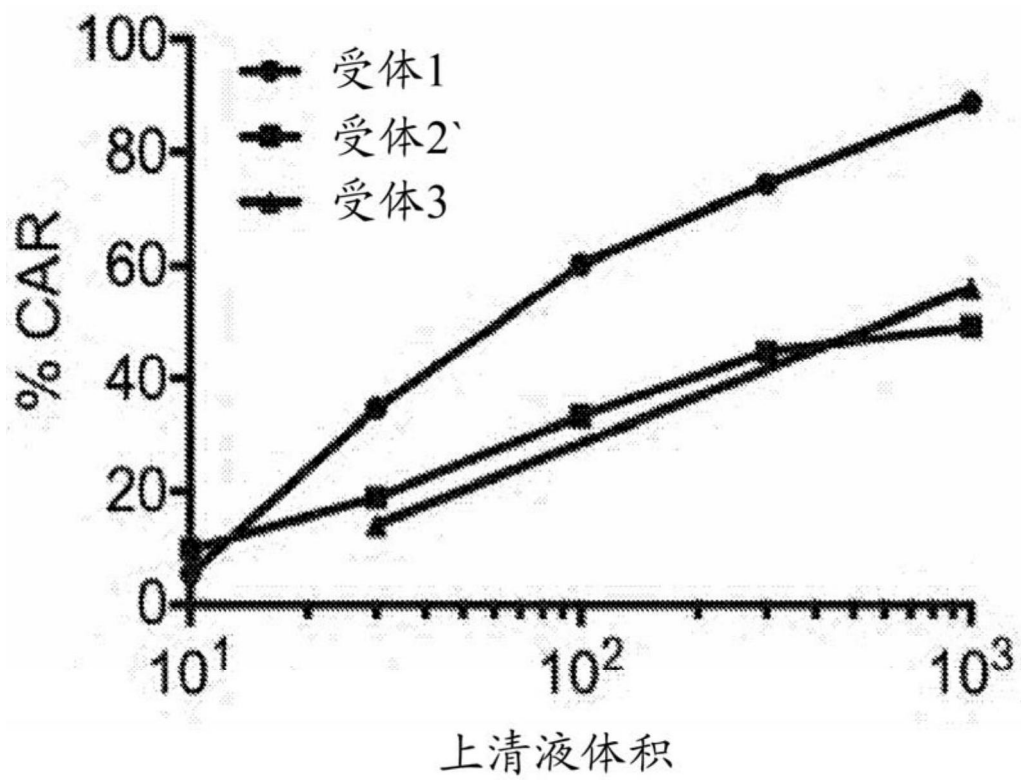


图13B

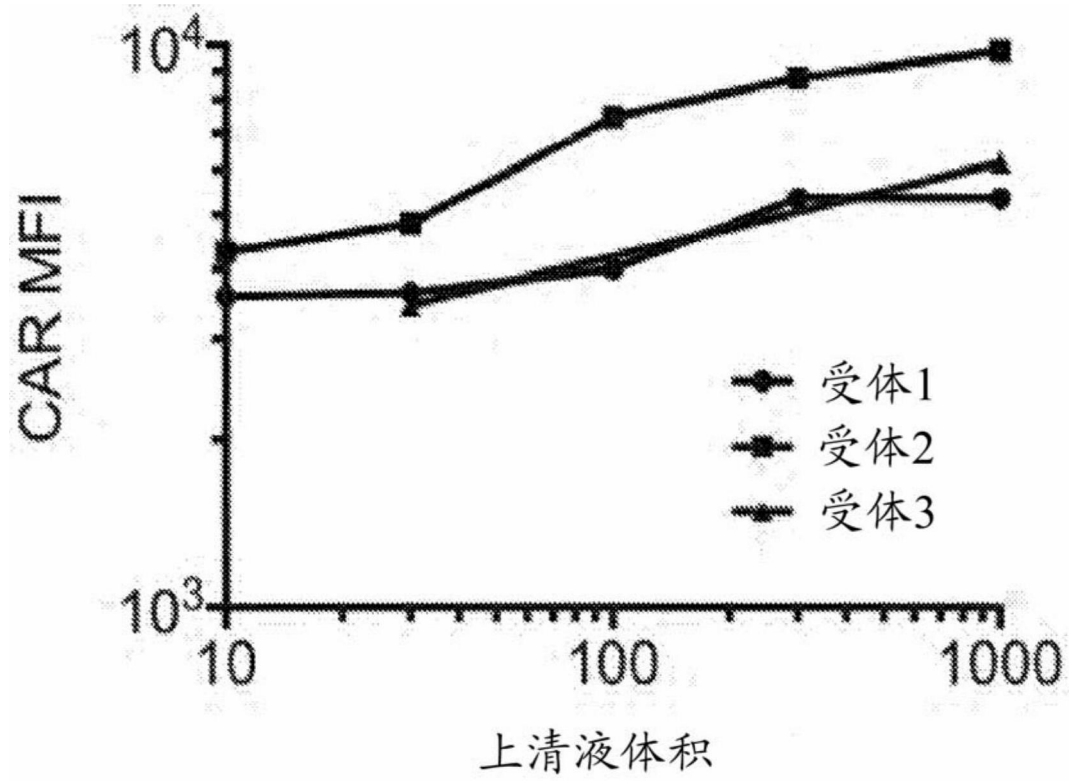


图13C

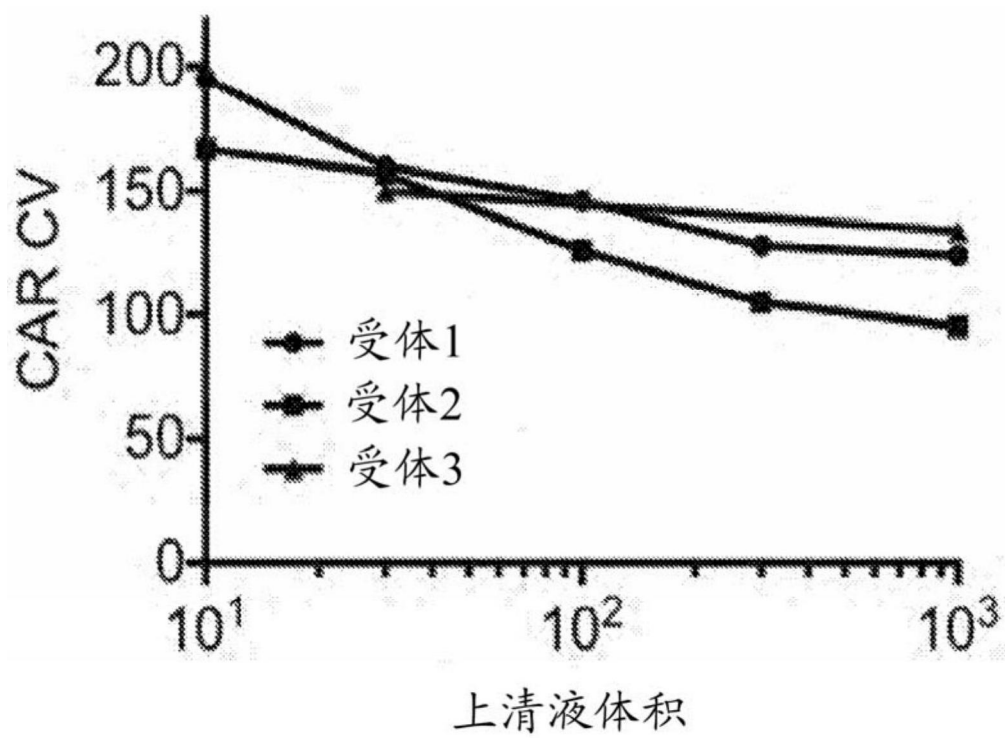


图13D

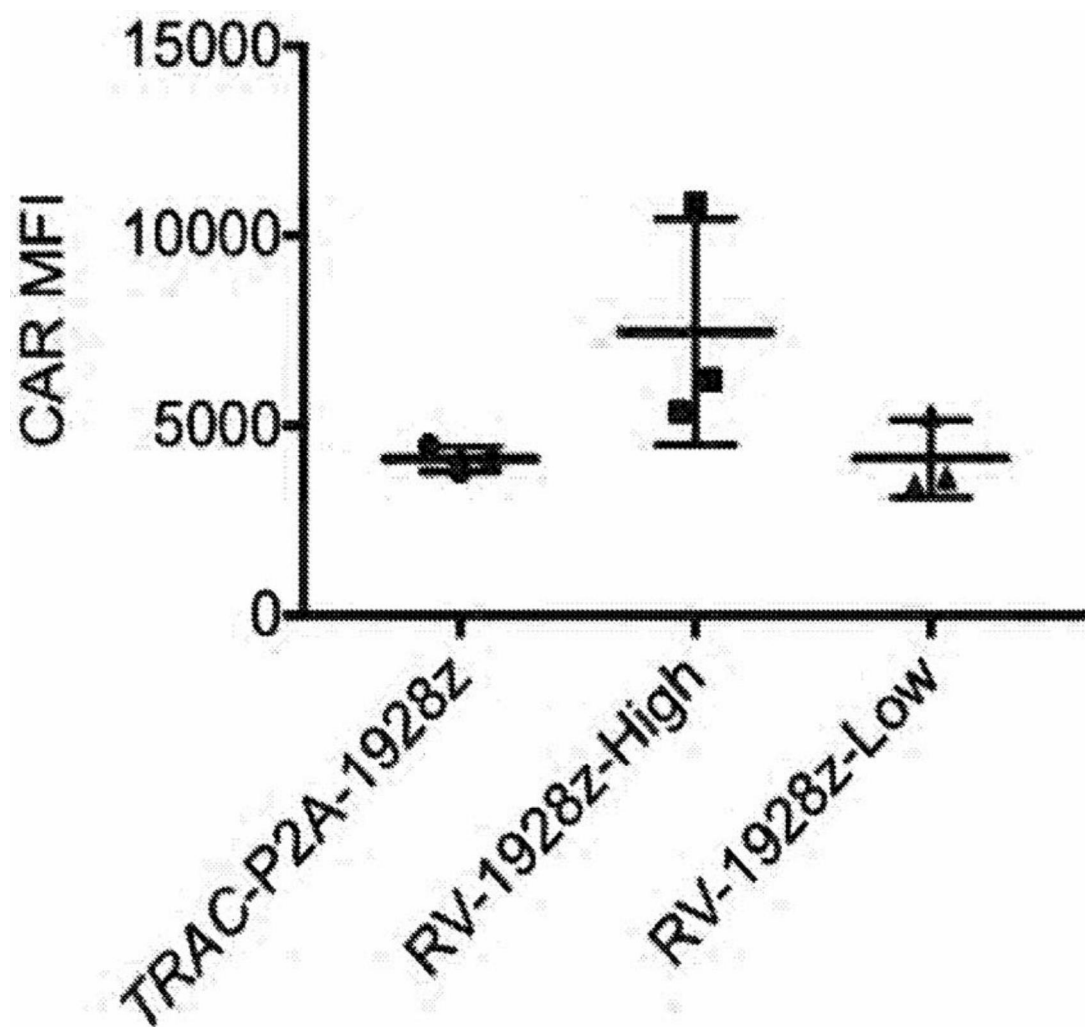


图13E

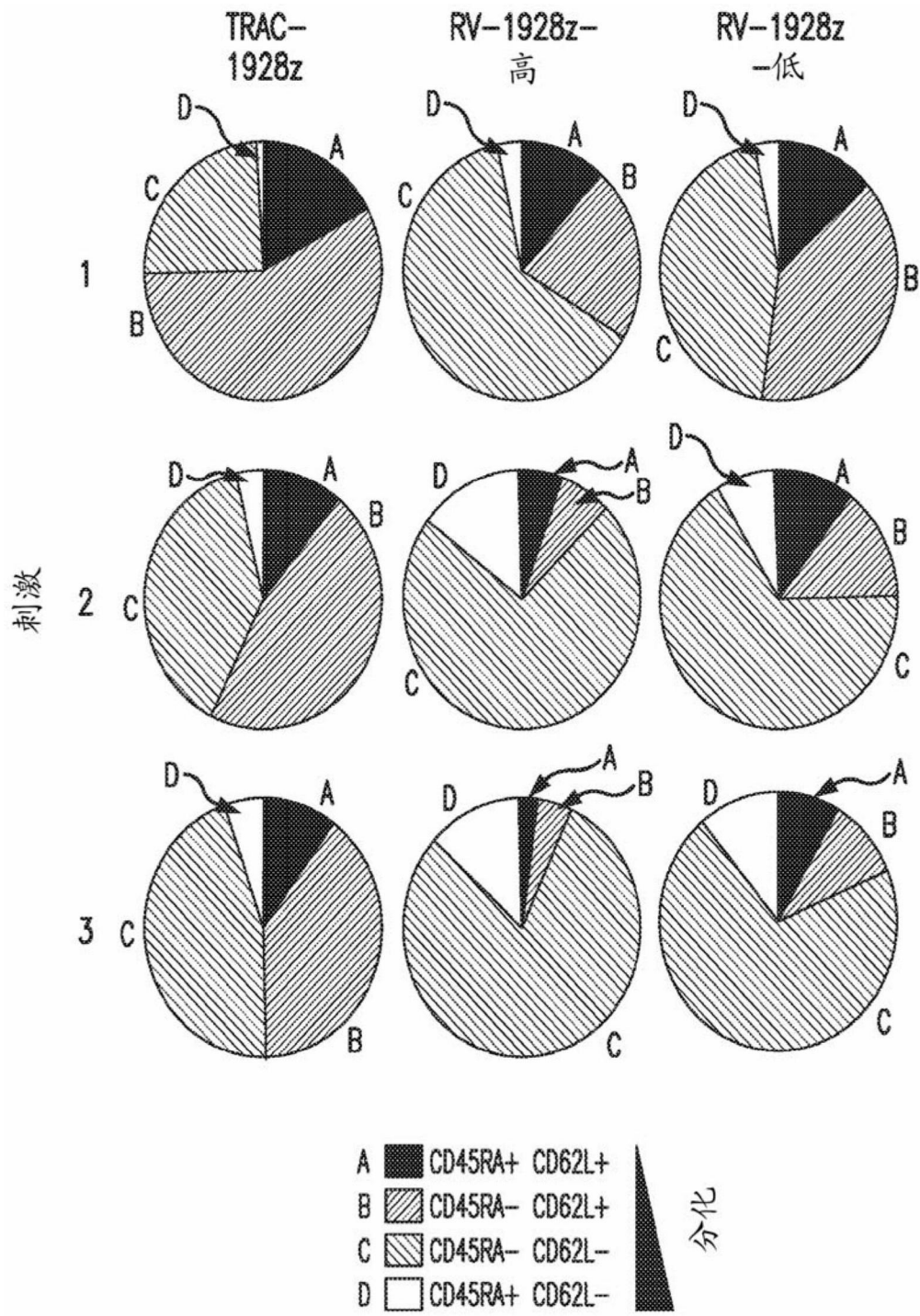


图13F

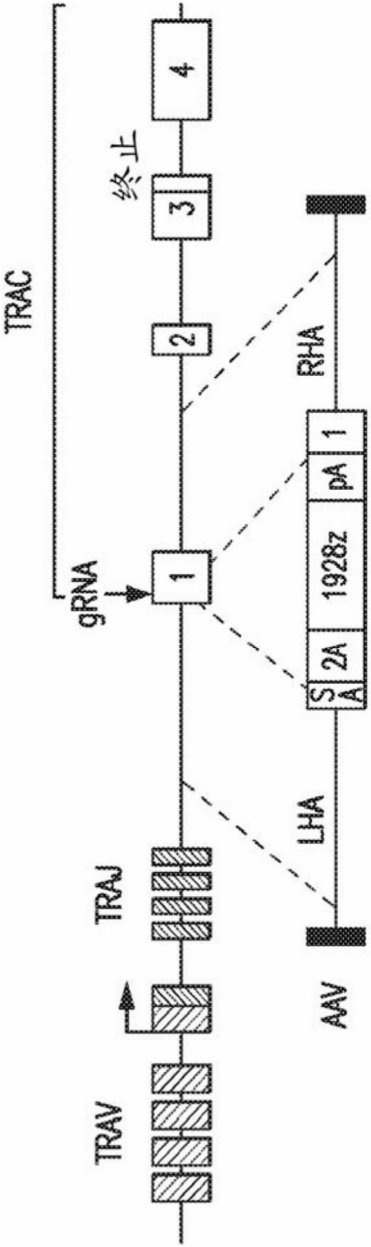


图14A

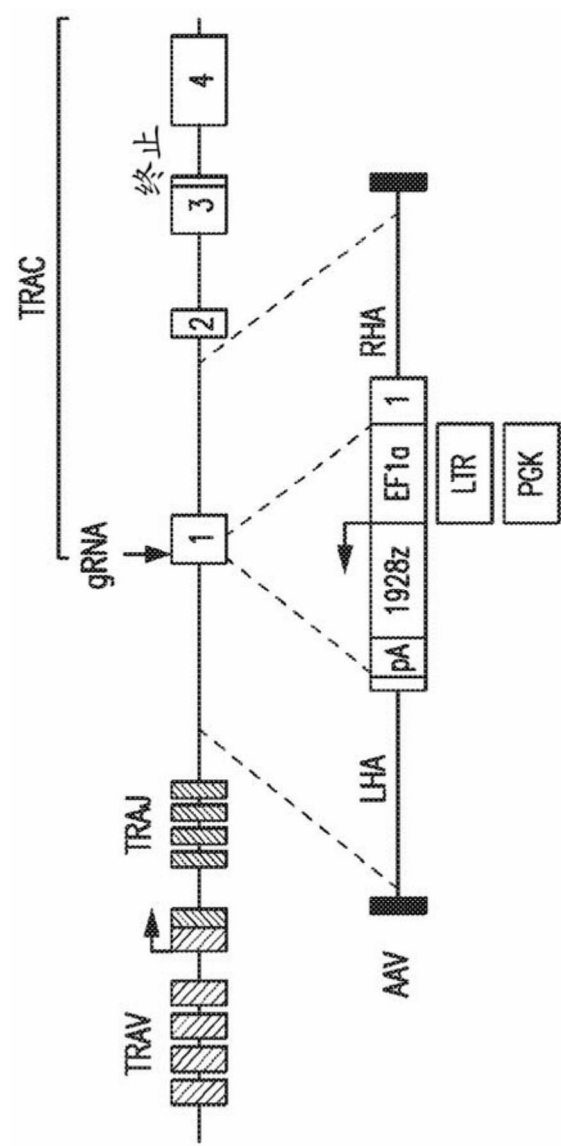


图14B

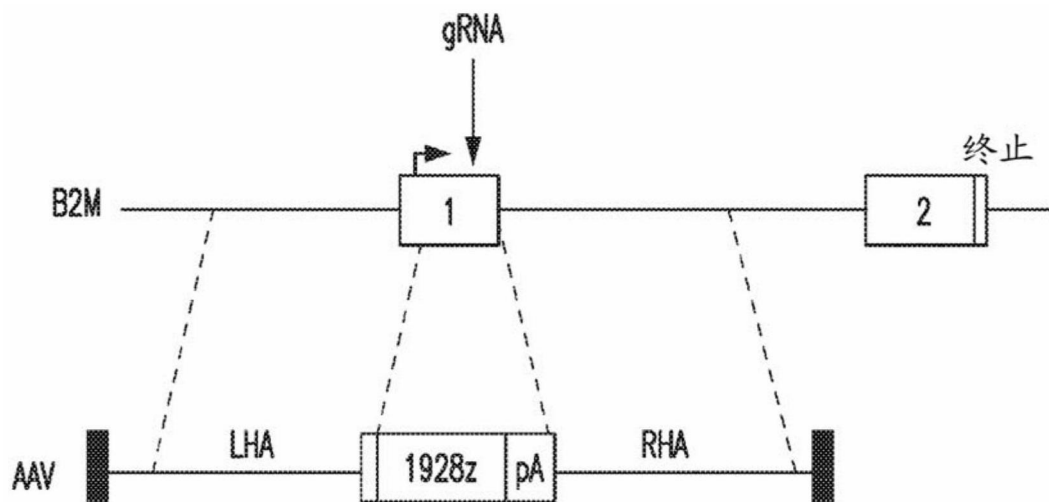


图14C

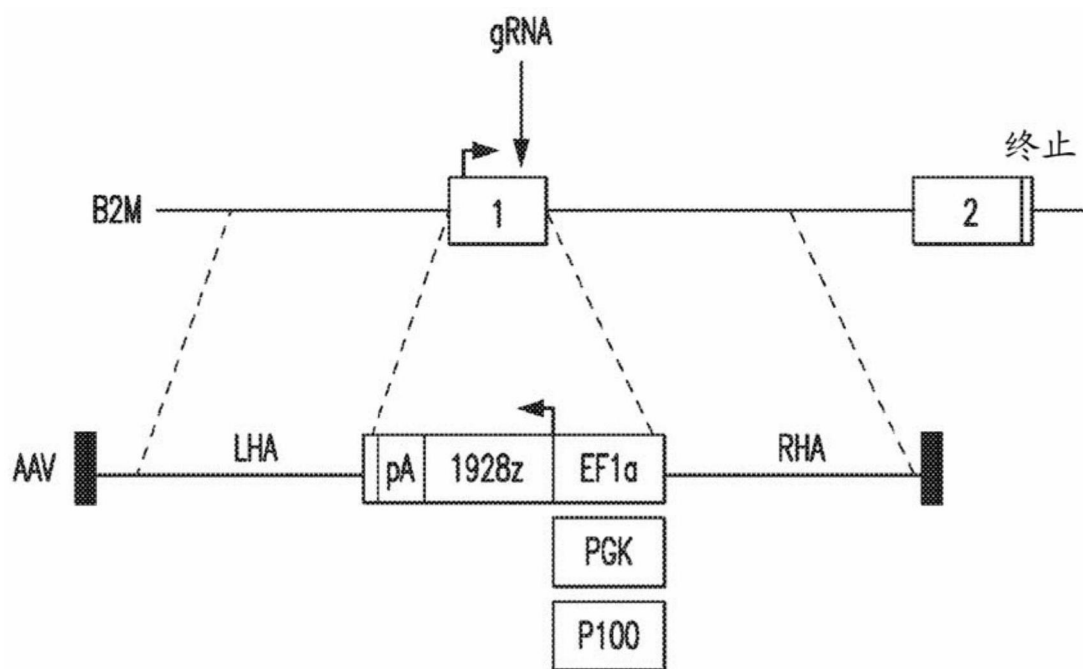


图14D

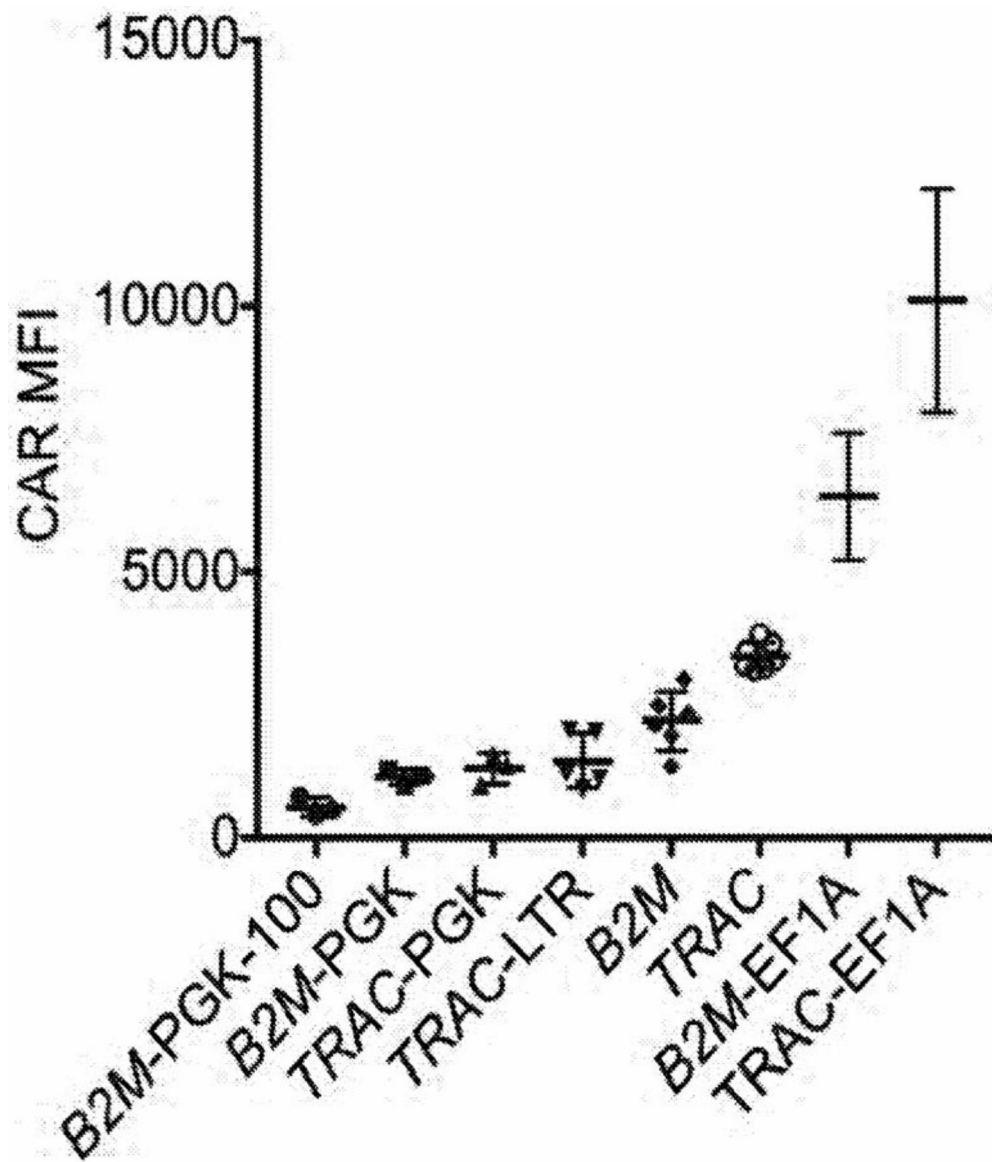


图14E



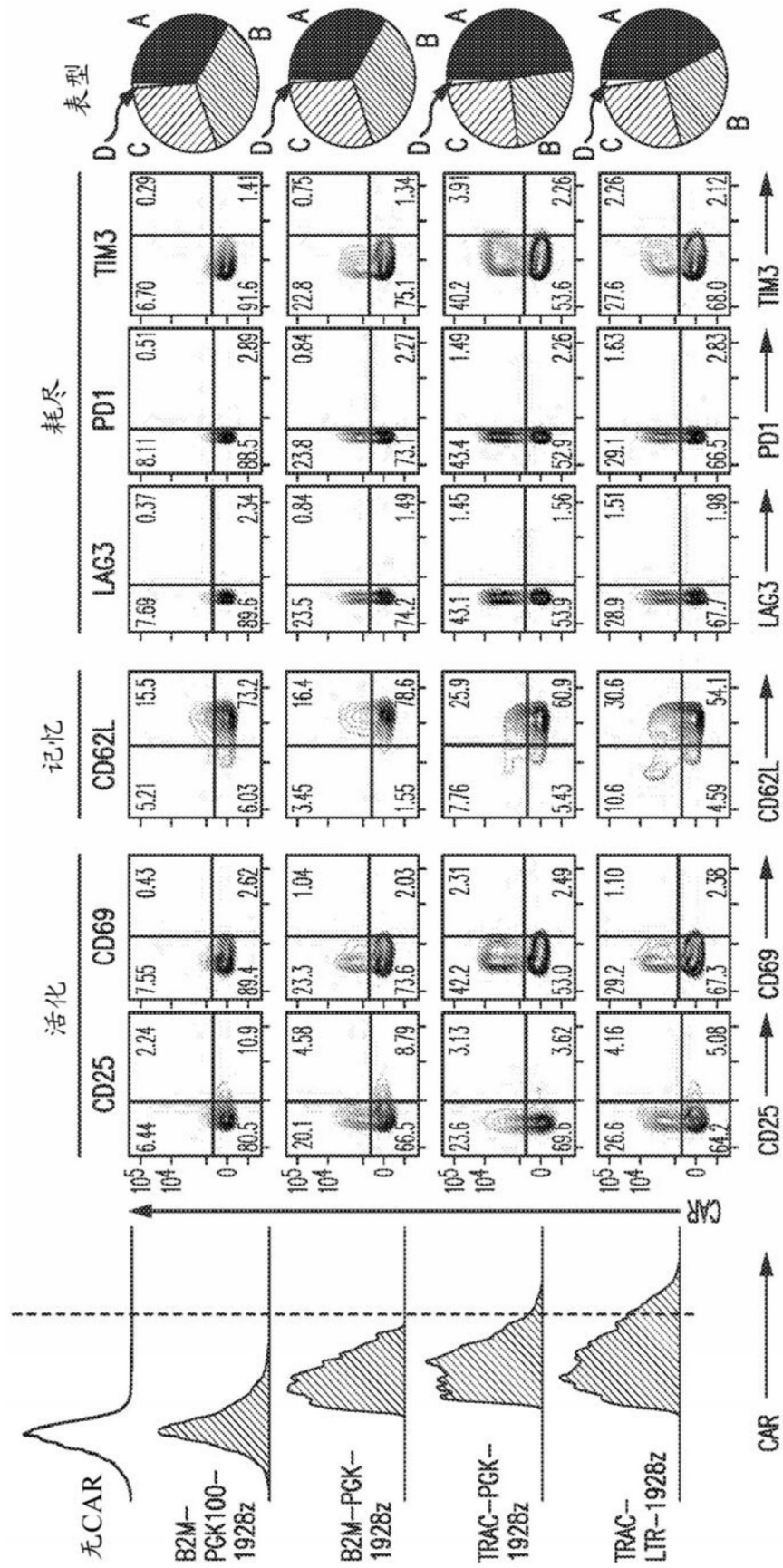


图14F



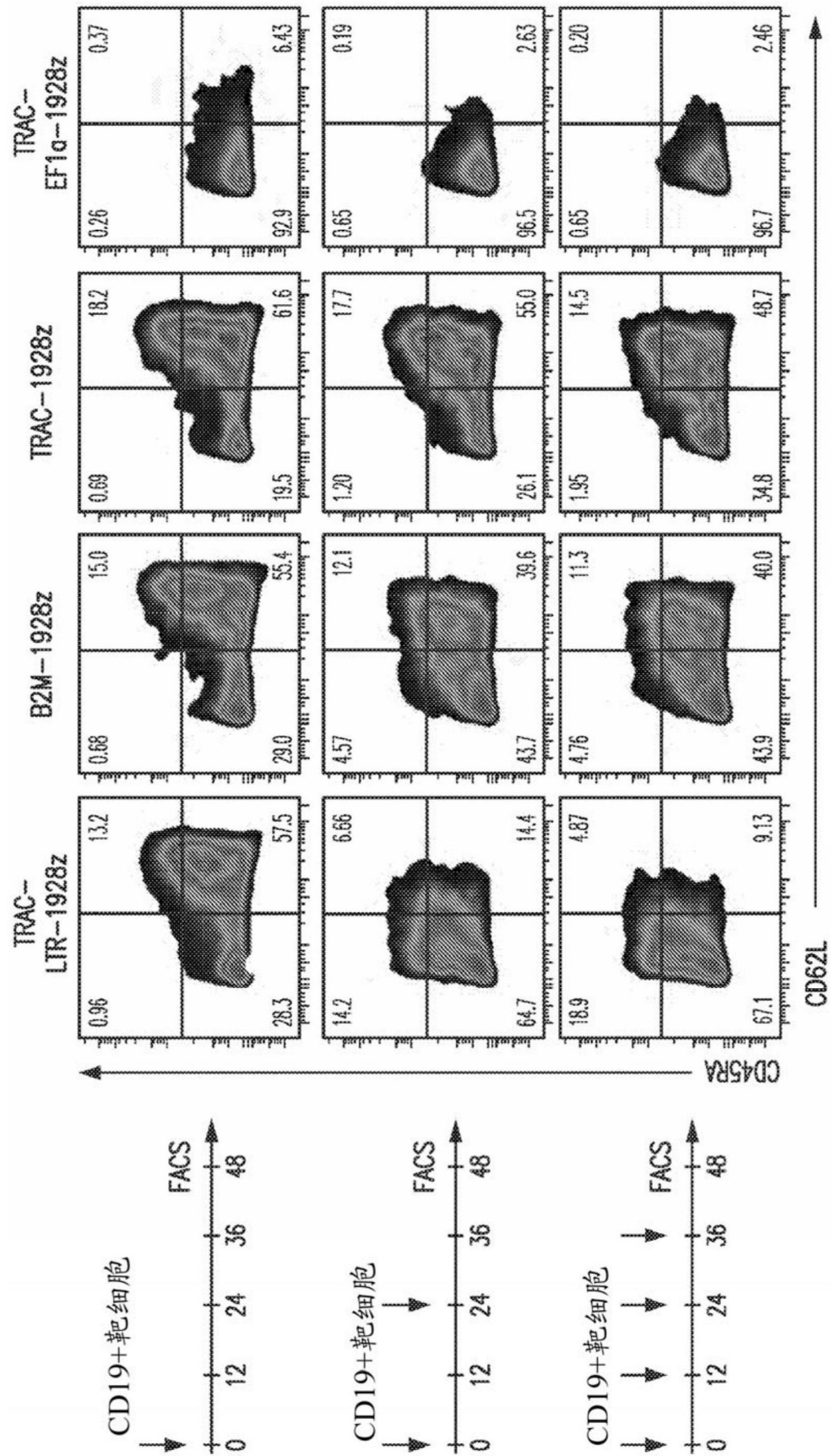


图15A

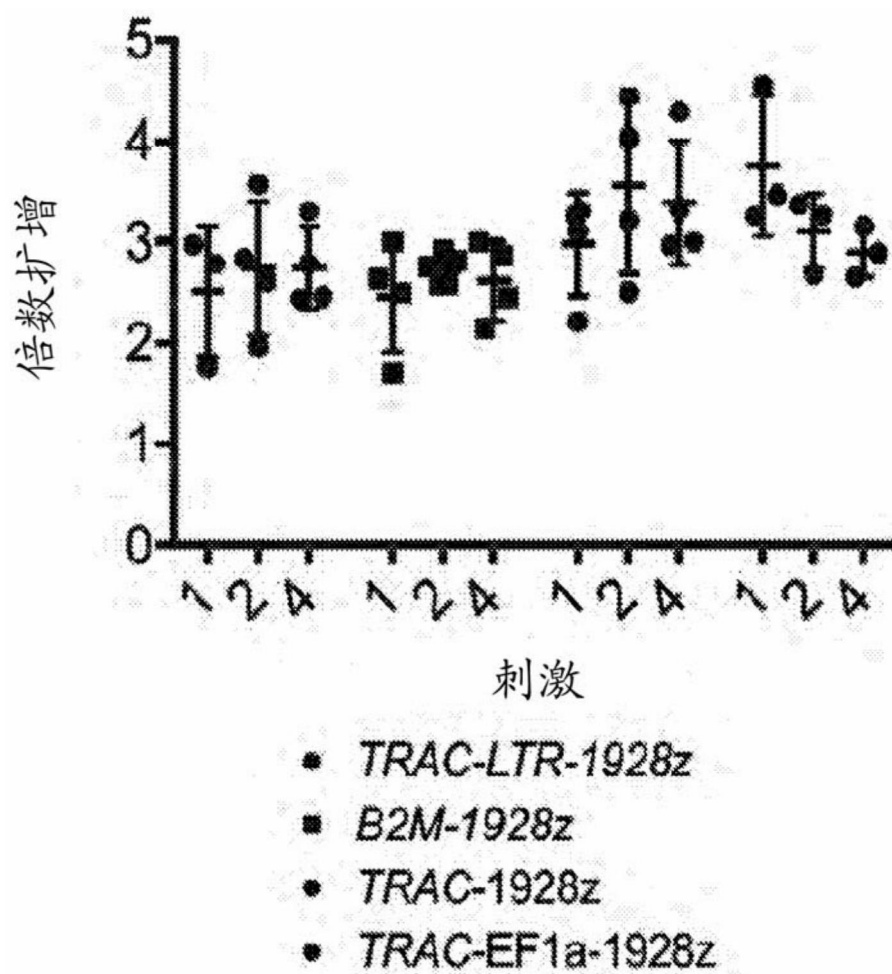


图15B

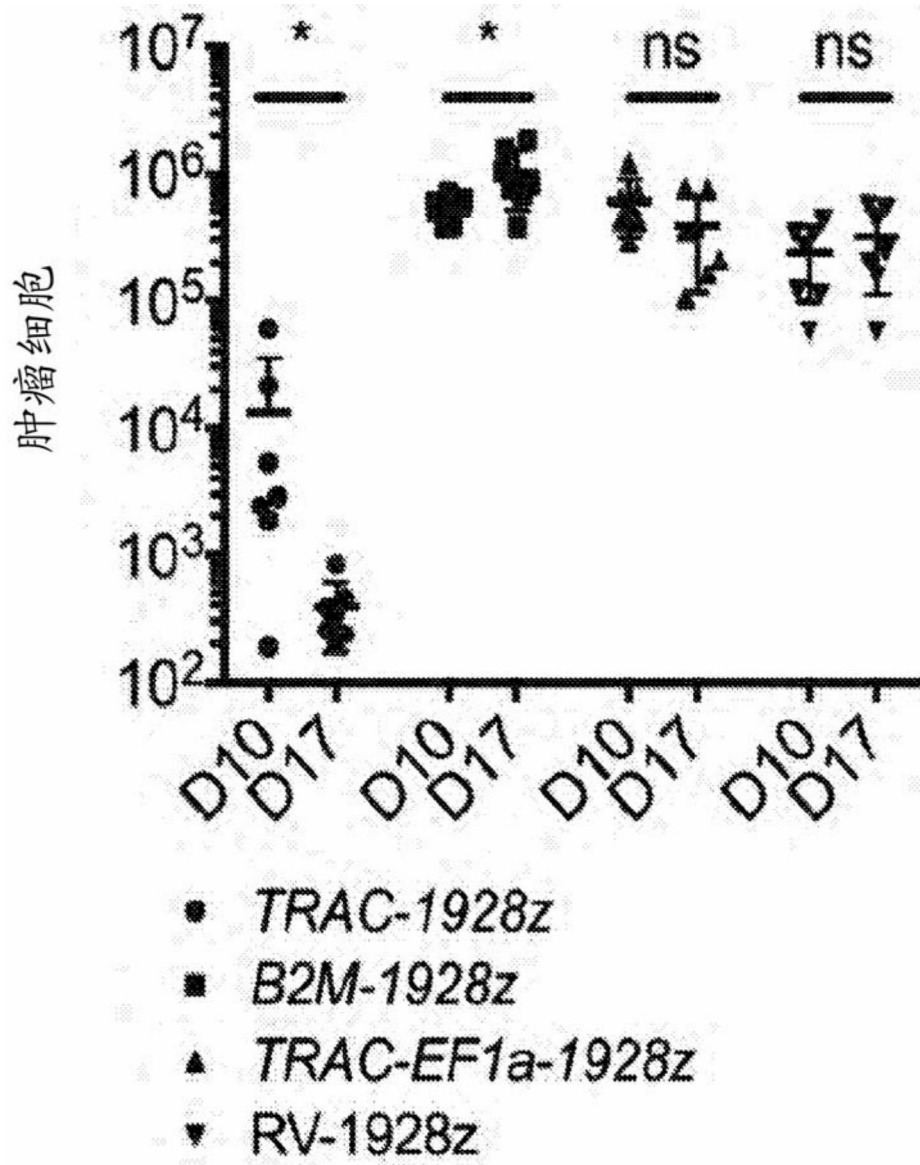


图15C

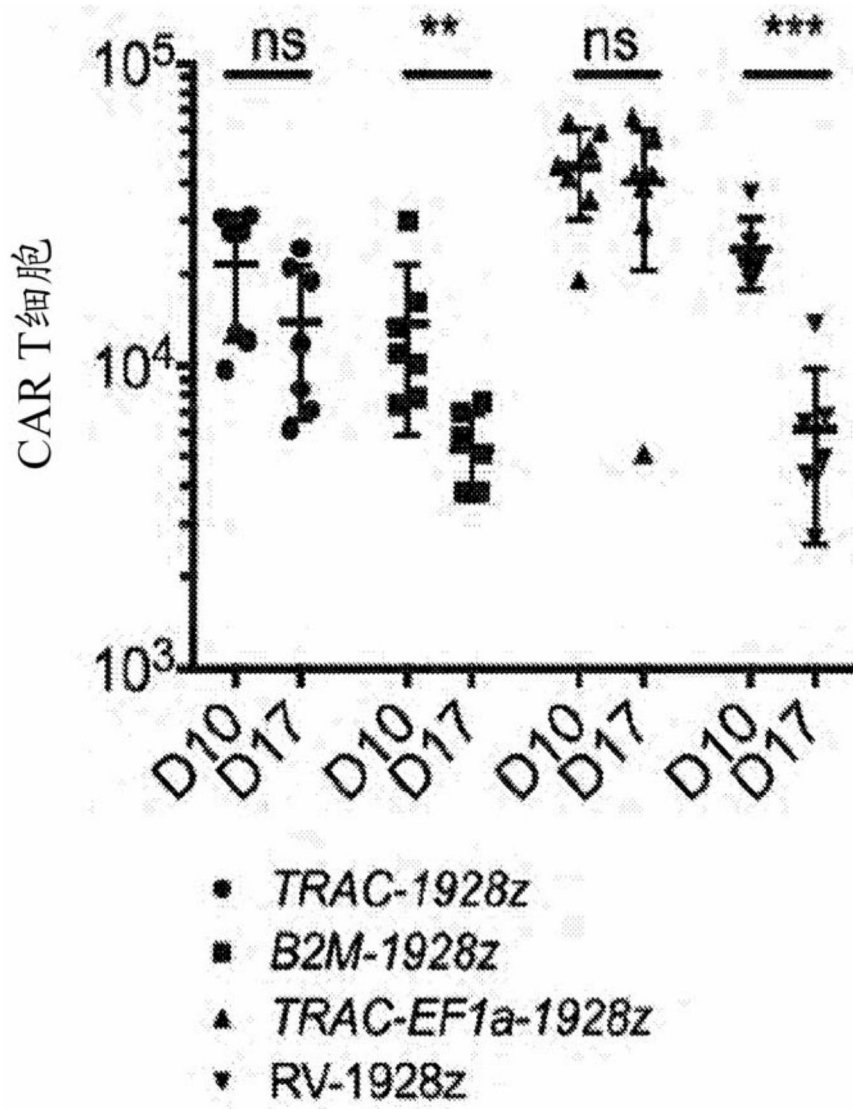


图15D

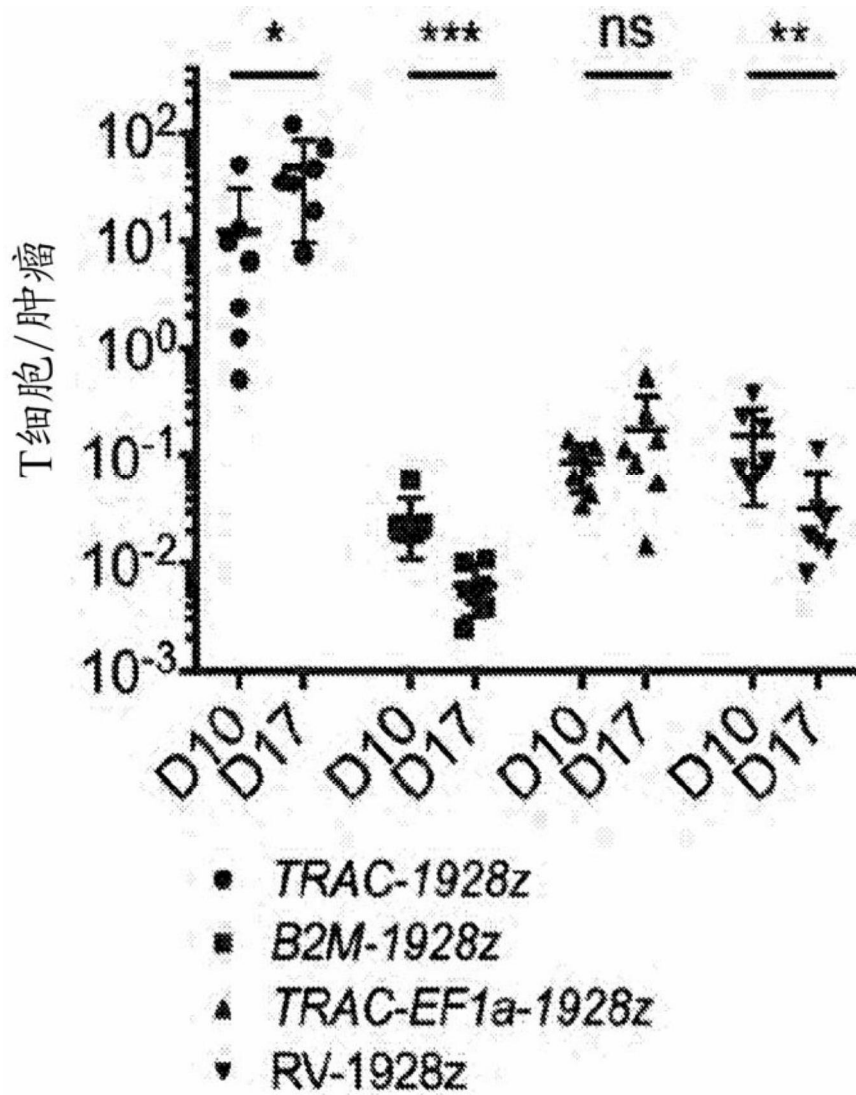


图15E

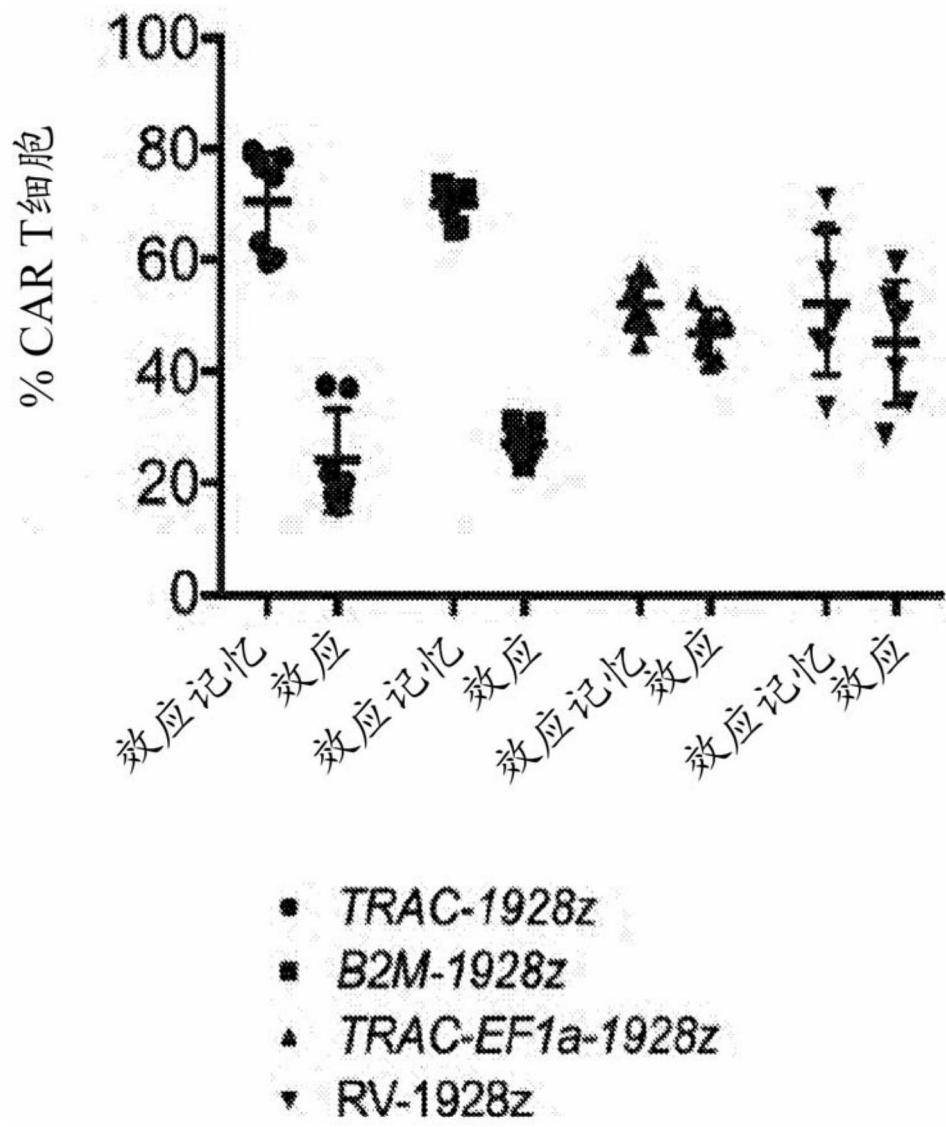


图15F



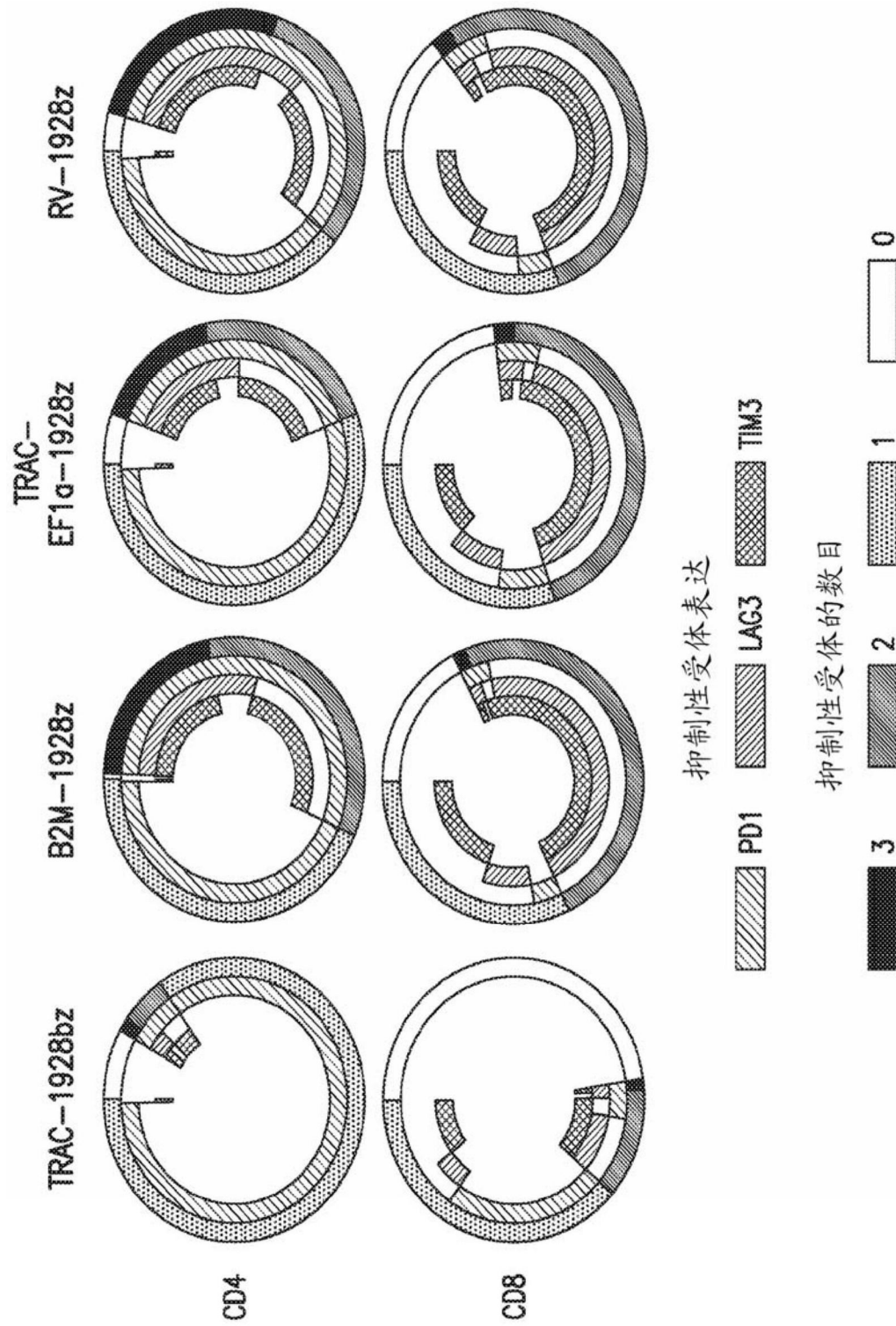


图15G

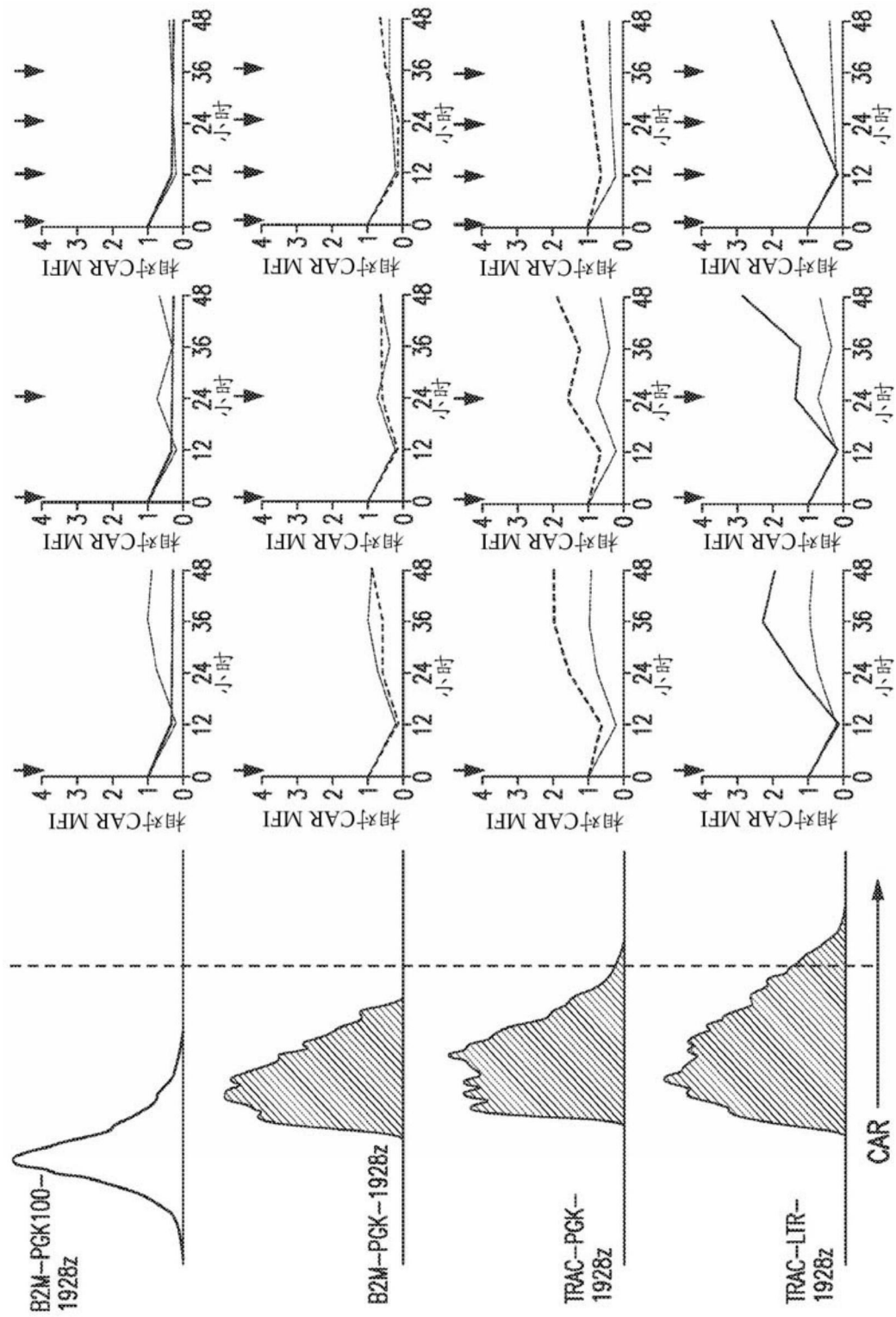


图16A

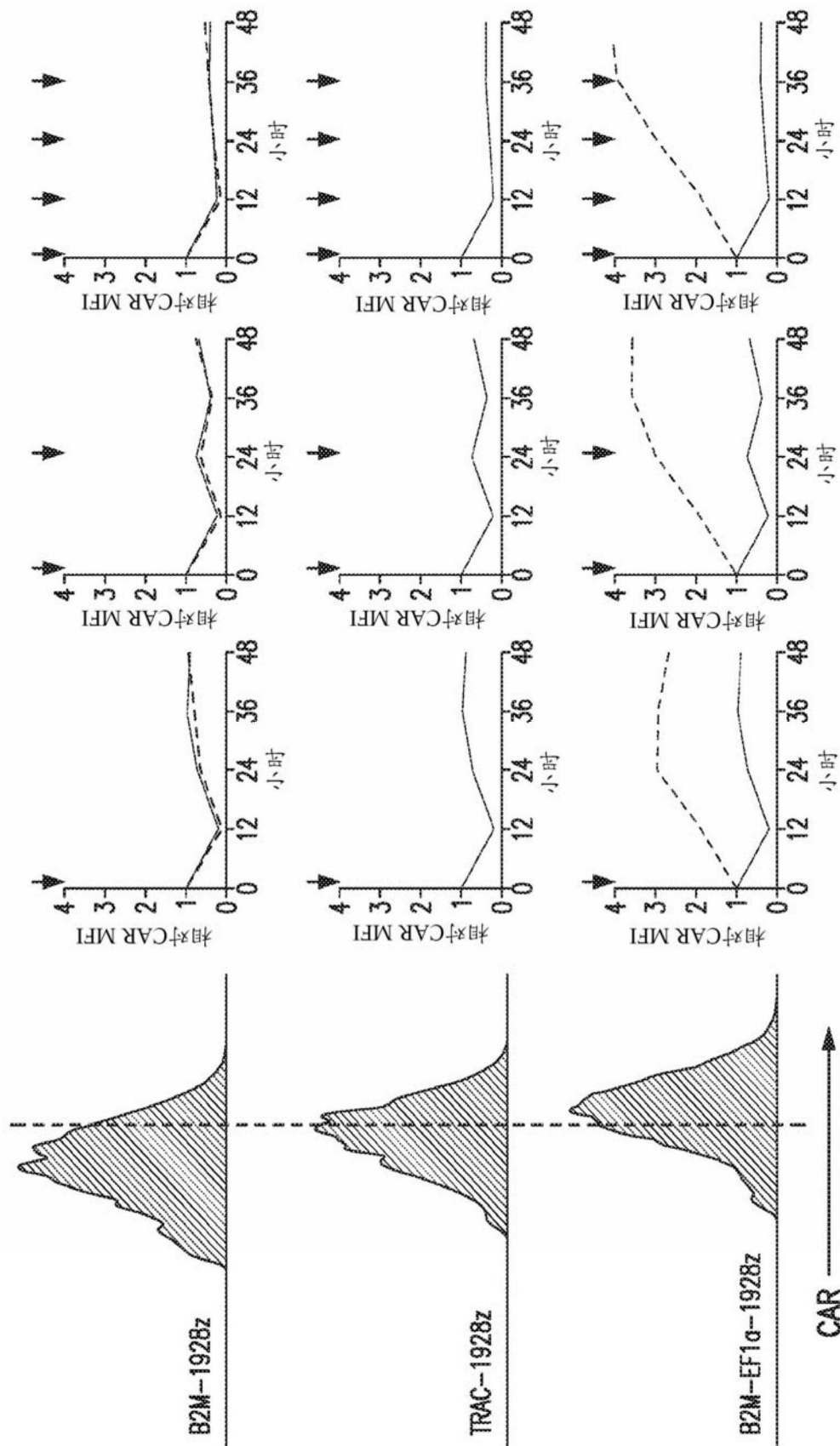


图16A(续)

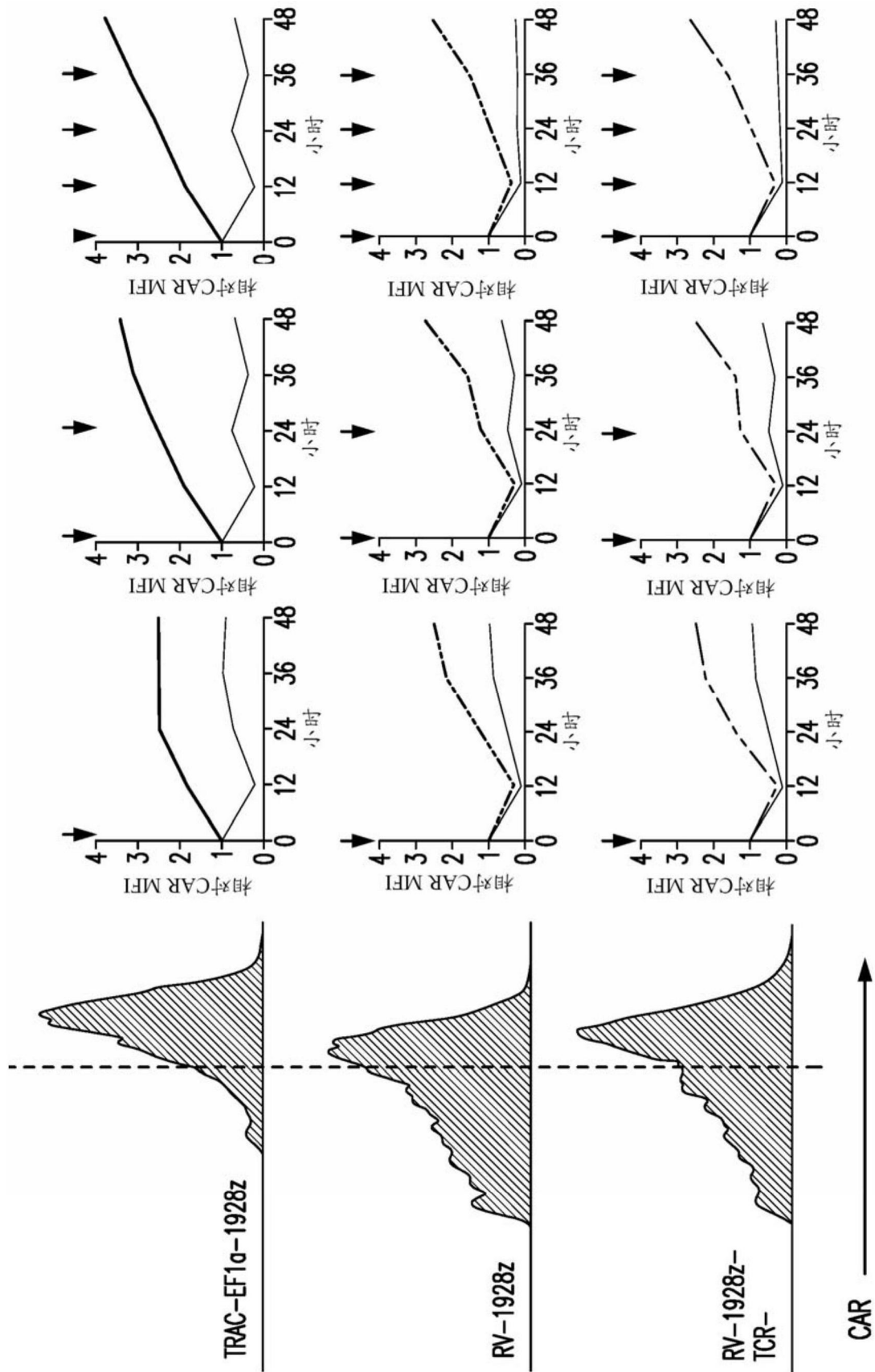


图16A(续)

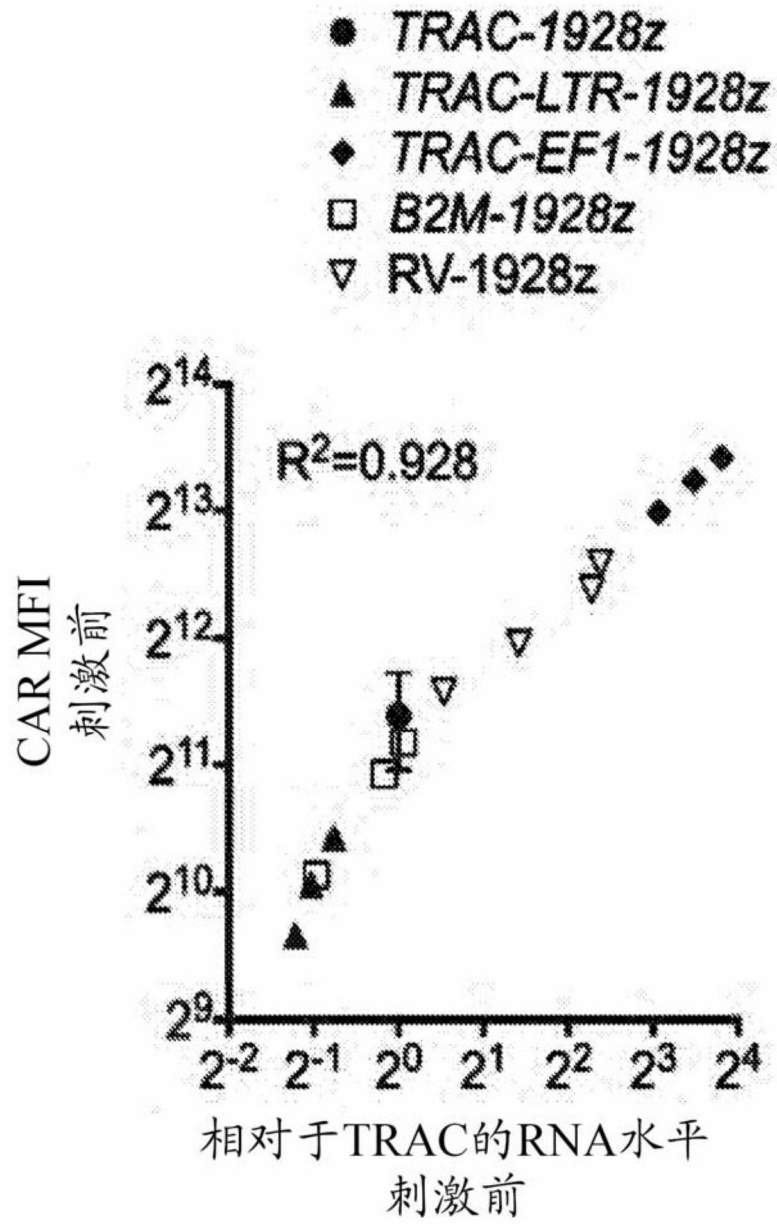


图16B

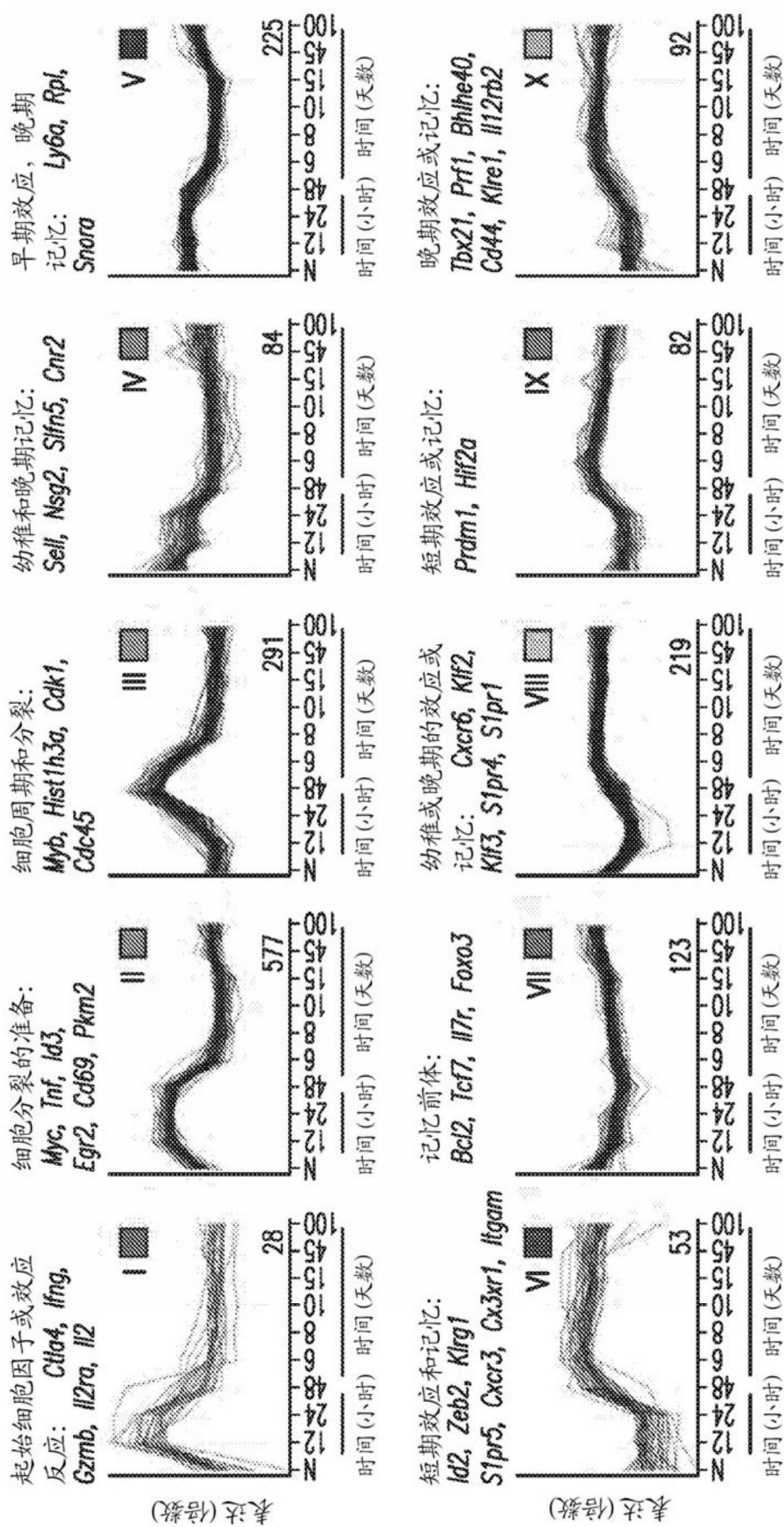


图17

## &gt;野生型MLV IN序列

```

1  ensspytseh fhytvtidkd ltklgaiydk tkkywvyqgk pvmpdqftfe lldflhqlth
61  lsfskmlkall ershsppym lnrdrllknit etckacaqvn asksavkqgt rvrghrpgth
121 weidfteikp glygykyl lv fidtfsowie afptkktak vvtkkllleei fprfgmpqvl
181 gtdngpafvs kvsqtvadll gidwklhcay rpqssgqver mnrtiketlt klrtatgsrd
241 wvlllplaly rarntpgphg ltpyeilyga ppplvnfpdp dmtrvtnsps lqahlaqaly
301 vqhevwrpla aayqeqlrpd vvphpyrvgd tvwvrrhqt nleprwkqpy tvllttptal
361 kvdgiaawih aahvkaadpg ggpssrltwr vqrsqnpiki rltreap

```

## &gt;D124A IN

```

1  ensspytseh fhytvtidkd ltklgaiydk tkkywvyqgk pvmpdqftfe lldflhqlth
61  lsfskmlkall ershsppym lnrdrllknit etckacaqvn asksavkqgt rvrghrpgth
121 weidfteikp glygykyl lv fidtfsowie afptkktak vvtkkllleei fprfgmpqvl
181 gtdngpafvs kvsqtvadll gidwklhcay rpqssgqver mnrtiketlt klrtatgsrd
241 wvlllplaly rarntpgphg ltpyeilyga ppplvnfpdp dmtrvtnsps lqahlaqaly
301 vqhevwrpla aayqeqlrpd vvphpyrvgd tvwvrrhqt nleprwkqpy tvllttptal
361 kvdgiaawih aahvkaadpg ggpssrltwr vqrsqnpiki rltreap

```

## &gt;D124E IN

```

1  ensspytseh fhytvtidkd ltklgaiydk tkkywvyqgk pvmpdqftfe lldflhqlth
61  lsfskmlkall ershsppym lnrdrllknit etckacaqvn asksavkqgt rvrghrpgth
121 weidfteikp glygykyl lv fidtfsowie afptkktak vvtkkllleei fprfgmpqvl
181 gtdngpafvs kvsqtvadll gidwklhcay rpqssgqver mnrtiketlt klrtatgsrd
241 wvlllplaly rarntpgphg ltpyeilyga ppplvnfpdp dmtrvtnsps lqahlaqaly
301 vqhevwrpla aayqeqlrpd vvphpyrvgd tvwvrrhqt nleprwkqpy tvllttptal
361 kvdgiaawih aahvkaadpg ggpssrltwr vqrsqnpiki rltreap

```

## &gt;D124N IN

```

1  ensspytseh fhytvtidkd ltklgaiydk tkkywvyqgk pvmpdqftfe lldflhqlth
61  lsfskmlkall ershsppym lnrdrllknit etckacaqvn asksavkqgt rvrghrpgth
121 weidfteikp glygykyl lv fidtfsowie afptkktak vvtkkllleei fprfgmpqvl
181 gtdngpafvs kvsqtvadll gidwklhcay rpqssgqver mnrtiketlt klrtatgsrd
241 wvlllplaly rarntpgphg ltpyeilyga ppplvnfpdp dmtrvtnsps lqahlaqaly
301 vqhevwrpla aayqeqlrpd vvphpyrvgd tvwvrrhqt nleprwkqpy tvllttptal
361 kvdgiaawih aahvkaadpg ggpssrltwr vqrsqnpiki rltreap

```

## &gt;D124V IN

```

1  ensspytseh fhytvtidkd ltklgaiydk tkkywvyqgk pvmpdqftfe lldflhqlth
61  lsfskmlkall ershsppym lnrdrllknit etckacaqvn asksavkqgt rvrghrpgth
121 weidfteikp glygykyl lv fidtfsowie afptkktak vvtkkllleei fprfgmpqvl
181 gtdngpafvs kvsqtvadll gidwklhcay rpqssgqver mnrtiketlt klrtatgsrd
241 wvlllplaly rarntpgphg ltpyeilyga ppplvnfpdp dmtrvtnsps lqahlaqaly
301 vqhevwrpla aayqeqlrpd vvphpyrvgd tvwvrrhqt nleprwkqpy tvllttptal
361 kvdgiaawih aahvkaadpg ggpssrltwr vqrsqnpiki rltreap

```

## &gt;D183A IN

```

1  ensspytseh fhytvtidkd ltklgaiydk tkkywvyqgk pvmpdqftfe lldflhqlth
61  lsfskmlkall ershsppym lnrdrllknit etckacaqvn asksavkqgt rvrghrpgth
121 weidfteikp glygykyl lv fidtfsowie afptkktak vvtkkllleei fprfgmpqvl
181 gtdngpafvs kvsqtvadll gidwklhcay rpqssgqver mnrtiketlt klrtatgsrd
241 wvlllplaly rarntpgphg ltpyeilyga ppplvnfpdp dmtrvtnsps lqahlaqaly
301 vqhevwrpla aayqeqlrpd vvphpyrvgd tvwvrrhqt nleprwkqpy tvllttptal
361 kvdgiaawih aahvkaadpg ggpssrltwr vqrsqnpiki rltreap

```

图18



## &gt;D183N IN

```

1  ensspytseh fhytvtidik ltklgaiydk tkkywvyqgk pvmpdqftfe lldflhqlth
61 lsfskmlall ershsppym l nrdrllknit etckacaqvn asksavkqgt rvrghrpgth
121 weidfteikp glygykyl lv fidtfsqwie afptkktak vvtkkllleei fprfgmpqvl
181 gtNngpafvs kvsqtvadll gidwklhcay rpqssgqver mnrtiketlt klrtatgsrd
241 wvlllplaly rarntpgphg ltpyeilyga ppplvnfpdp dmtrvtnsps lqahlqalyl
301 vqhevwrpla aayqeql drp vvphpyrvgd tvwvrrhqt nleprwkgy tvllttptal
361 kvdgiaawih aahvkaadpg ggpssrltwr vqrsqnpiki rltreap

```

## &gt;D124A + D183A IN

```

1  ensspytseh fhytvtidik ltklgaiydk tkkywvyqgk pvmpdqftfe lldflhqlth
61 lsfskmlall ershsppym l nrdrllknit etckacaqvn asksavkqgt rvrghrpgth
121 weiAfteikp glygykyl lv fidtfsqwie afptkktak vvtkkllleei fprfgmpqvl
181 gtAngpafvs kvsqtvadll gidwklhcay rpqssgqver mnrtiketlt klrtatgsrd
241 wvlllplaly rarntpgphg ltpyeilyga ppplvnfpdp dmtrvtnsps lqahlqalyl
301 vqhevwrpla aayqeql drp vvphpyrvgd tvwvrrhqt nleprwkgy tvllttptal
361 kvdgiaawih aahvkaadpg ggpssrltwr vqrsqnpiki rltreap

```

## &gt;D124A + D183N IN

```

1  ensspytseh fhytvtidik ltklgaiydk tkkywvyqgk pvmpdqftfe lldflhqlth
61 lsfskmlall ershsppym l nrdrllknit etckacaqvn asksavkqgt rvrghrpgth
121 weiAfteikp glygykyl lv fidtfsqwie afptkktak vvtkkllleei fprfgmpqvl
181 gtNngpafvs kvsqtvadll gidwklhcay rpqssgqver mnrtiketlt klrtatgsrd
241 wvlllplaly rarntpgphg ltpyeilyga ppplvnfpdp dmtrvtnsps lqahlqalyl
301 vqhevwrpla aayqeql drp vvphpyrvgd tvwvrrhqt nleprwkgy tvllttptal
361 kvdgiaawih aahvkaadpg ggpssrltwr vqrsqnpiki rltreap

```

## &gt;D124E + D183A IN

```

1  ensspytseh fhytvtidik ltklgaiydk tkkywvyqgk pvmpdqftfe lldflhqlth
61 lsfskmlall ershsppym l nrdrllknit etckacaqvn asksavkqgt rvrghrpgth
121 weiEfteikp glygykyl lv fidtfsqwie afptkktak vvtkkllleei fprfgmpqvl
181 gtAngpafvs kvsqtvadll gidwklhcay rpqssgqver mnrtiketlt klrtatgsrd
241 wvlllplaly rarntpgphg ltpyeilyga ppplvnfpdp dmtrvtnsps lqahlqalyl
301 vqhevwrpla aayqeql drp vvphpyrvgd tvwvrrhqt nleprwkgy tvllttptal
361 kvdgiaawih aahvkaadpg ggpssrltwr vqrsqnpiki rltreap

```

## &gt;D124E + D183N IN

```

1  ensspytseh fhytvtidik ltklgaiydk tkkywvyqgk pvmpdqftfe lldflhqlth
61 lsfskmlall ershsppym l nrdrllknit etckacaqvn asksavkqgt rvrghrpgth
121 weiEfteikp glygykyl lv fidtfsqwie afptkktak vvtkkllleei fprfgmpqvl
181 gtNngpafvs kvsqtvadll gidwklhcay rpqssgqver mnrtiketlt klrtatgsrd
241 wvlllplaly rarntpgphg ltpyeilyga ppplvnfpdp dmtrvtnsps lqahlqalyl
301 vqhevwrpla aayqeql drp vvphpyrvgd tvwvrrhqt nleprwkgy tvllttptal
361 kvdgiaawih aahvkaadpg ggpssrltwr vqrsqnpiki rltreap

```

## &gt;D124N + D183A IN

```

1  ensspytseh fhytvtidik ltklgaiydk tkkywvyqgk pvmpdqftfe lldflhqlth
61 lsfskmlall ershsppym l nrdrllknit etckacaqvn asksavkqgt rvrghrpgth
121 weiNfteikp glygykyl lv fidtfsqwie afptkktak vvtkkllleei fprfgmpqvl
181 gtAngpafvs kvsqtvadll gidwklhcay rpqssgqver mnrtiketlt klrtatgsrd
241 wvlllplaly rarntpgphg ltpyeilyga ppplvnfpdp dmtrvtnsps lqahlqalyl
301 vqhevwrpla aayqeql drp vvphpyrvgd tvwvrrhqt nleprwkgy tvllttptal
361 kvdgiaawih aahvkaadpg ggpssrltwr vqrsqnpiki rltreap

```

图18(续)



>D124N + D183N IN

```

1  ensspytseh fhytvtdikd ltklgaiydk tkkywvyqgk pvmpdqftfe lldflhqlth
61  lsfskmlall ershspyyml nrdrllknit etckacaqvn asksavkqgt rvrghrpgth
121 weiNfteikp glygykyllv fidtfsgwie afptkktak vvtkkllleei fprfgmpqvl
181 gtNngpafvs kvsqtvadll gidwklhcay rpqssgqver mnrtiketlt kltlatgsrd
241 wvlllplaly rarntpgphg ltpyeilyga ppplvnfpdp dmtrvtnsps lqahlqalyl
301 vqhevwrpla aayqeqldrp vvphpyrvgd tvwvrrhqt nleprwkgpy tvllttptal
361 kvdgiaawih aahvkaadpg ggpssrltwr vqrsqnpiki rltreap

```

>D124V + D183A IN

```

1  ensspytseh fhytvtdikd ltklgaiydk tkkywvyqgk pvmpdqftfe lldflhqlth
61  lsfskmlall ershspyyml nrdrllknit etckacaqvn asksavkqgt rvrghrpgth
121 weiVfteikp glygykyllv fidtfsgwie afptkktak vvtkkllleei fprfgmpqvl
181 gtAngpafvs kvsqtvadll gidwklhcay rpqssgqver mnrtiketlt kltlatgsrd
241 wvlllplaly rarntpgphg ltpyeilyga ppplvnfpdp dmtrvtnsps lqahlqalyl
301 vqhevwrpla aayqeqldrp vvphpyrvgd tvwvrrhqt nleprwkgpy tvllttptal
361 kvdgiaawih aahvkaadpg ggpssrltwr vqrsqnpiki rltreap

```

>D124V + D183N IN

```

1  ensspytseh fhytvtdikd ltklgaiydk tkkywvyqgk pvmpdqftfe lldflhqlth
61  lsfskmlall ershspyyml nrdrllknit etckacaqvn asksavkqgt rvrghrpgth
121 weiVfteikp glygykyllv fidtfsgwie afptkktak vvtkkllleei fprfgmpqvl
181 gtNngpafvs kvsqtvadll gidwklhcay rpqssgqver mnrtiketlt kltlatgsrd
241 wvlllplaly rarntpgphg ltpyeilyga ppplvnfpdp dmtrvtnsps lqahlqalyl
301 vqhevwrpla aayqeqldrp vvphpyrvgd tvwvrrhqt nleprwkgpy tvllttptal
361 kvdgiaawih aahvkaadpg ggpssrltwr vqrsqnpiki rltreap

```

图18(续)