



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108350445 A

(43)申请公布日 2018.07.31

(21)申请号 201680035950.5

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

(22)申请日 2016.06.17

代理人 郑斌 关越

(30)优先权数据

62/181,906 2015.06.19 US

62/325,314 2016.04.20 US

(51)Int.Cl.

C12N 15/00(2006.01)

C12N 15/10(2006.01)

C12N 15/11(2006.01)

C12N 15/63(2006.01)

C12N 15/113(2010.01)

C12Q 1/6886(2018.01)

A61K 39/395(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.12.19

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/038222 2016.06.17

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/205737 EN 2016.12.22

(71)申请人 麻省理工学院

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 蒂莫西·冠-塔·卢

利奥尔·尼西姆 吴名儒

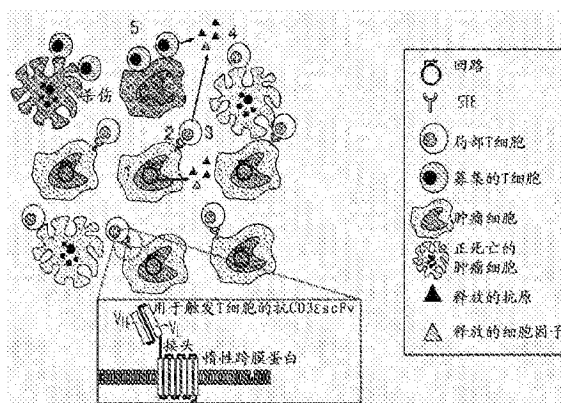
权利要求书6页 说明书43页 附图44页

(54)发明名称

肿瘤免疫治疗

(57)摘要

本公开内容的一些方面提供了这样的平台，其从肿瘤自身内触发针对肿瘤的有力且有效的免疫治疗，因此克服了现有癌症免疫治疗和肿瘤检测基因回路的局限性。



1. 工程改造的遗传回路,其包含:

(a) 第一核酸,其包含与以下可操作地连接的启动子:(i) 编码含有内含子微小RNA(miRNA)的输出信使RNA(mRNA)的核苷酸序列和(ii) 编码与(a)(i)的miRNA互补的至少一个mRNA结合位点的核苷酸序列;和

(b) 第二核酸,其包含与以下可操作地连接的启动子:编码与(a)(i)的miRNA互补的至少一个miRNA结合位点的核苷酸序列。

2. 权利要求1所述的工程改造的遗传回路,其中输出mRNA编码合成的T细胞衔接器(STE)或双特异性T细胞衔接器(BiTE)。

3. 权利要求1所述的工程改造的遗传回路,其中所述输出mRNA编码与T细胞表面标志物结合的输出蛋白。

4. 权利要求3所述的工程改造的遗传回路,其中所述T细胞表面标志物是CD3、CD4、CD8或CD45。

5. 权利要求1至4中任一项所述的工程改造的遗传回路,其中所述输出蛋白是与T细胞表面抗原特异性结合的抗体或抗体片段。

6. 权利要求1至5中任一项所述的工程改造的遗传回路,其中所述输出mRNA编码抗癌剂。

7. 权利要求6所述的工程改造的遗传回路,其中所述抗癌剂是趋化因子、细胞因子或检查点抑制剂。

8. 权利要求1至7中任一项所述的工程改造的遗传回路,其中(a)和/或(b)的所述启动子是诱导型启动子。

9. 权利要求8所述的工程改造的遗传回路,其中(a)和/或(b)的启动子是肿瘤特异性启动子或癌症启动子。

10. 权利要求9所述的工程改造的遗传回路,其中(a)和/或(b)的启动子是SSX1或H2A1。

11. 权利要求1至10中任一项所述的工程改造的遗传回路,其中(a)(ii)的核苷酸序列编码与(a)(i)的miRNA互补的2至5个miRNA结合位点。

12. 权利要求1至11中任一项所述的工程改造的遗传回路,其中(b)的核苷酸序列编码与(a)(i)的miRNA互补的2至10个miRNA结合位点。

13. 权利要求1至12中任一项所述的工程改造的遗传回路,其中所述输出蛋白是转录因子。

14. 权利要求13所述的工程改造的遗传回路,其还包含至少一种核酸,所述核酸包含与编码输出核酸或输出蛋白的核酸可操作地连接的启动子。

15. 权利要求14所述的工程改造的遗传回路,其中所述输出mRNA编码能够与所述至少一种核酸的启动子结合并活化其转录的转录因子。

16. 权利要求1至15中任一项所述的工程改造的遗传回路,其还包含核酸,所述核酸包含与以下可操作地连接的启动子:(i) 编码含有内含子微小RNA(miRNA)的另外的输出信使RNA(mRNA)的核苷酸序列和(ii) 编码与(a)(i)的miRNA互补的至少一个miRNA结合位点的核苷酸序列,其中所述另外的输出mRNA编码趋化因子、细胞因子、检查点抑制剂或其组合。

17. 细胞,其包含权利要求1至16中任一项的至少一种工程改造的遗传回路。

18. 权利要求17所述的细胞,其中所述细胞是肿瘤细胞。

19. 方法,其包括向患有肿瘤的对象施用权利要求1至15中任一项的至少一种工程改造的遗传回路。

20. 权利要求19所述的方法,其中所述对象患有卵巢癌、乳腺癌或肺癌。

21. 权利要求19或20所述的方法,其中向所述对象全身地施用所述工程改造的遗传回路。

22. 权利要求19至21中任一项所述的方法,其中使用病毒递送系统递送所述工程改造的遗传回路。

23. 权利要求22所述的方法,其中所述病毒递送系统是慢病毒递送系统、腺病毒递送系统或腺相关病毒递送系统。

24. 权利要求19至21中任一项所述的方法,其中使用非病毒递送系统递送所述工程改造的遗传回路。

25. 权利要求19或20所述的方法,其中向所述对象的肿瘤局部地施用所述工程改造的遗传回路。

26. 权利要求25所述的方法,其中使用基于水凝胶的递送系统向所述肿瘤局部地施用所述工程改造的遗传回路。

27. 权利要求19至26中任一项所述的方法,其中至少一种所述工程改造的遗传回路的输出mRNA编码与T细胞表面标志物结合的输出蛋白,并且至少一种其他的工程改造的遗传回路的输出mRNA编码趋化因子、细胞因子或检查点抑制剂。

28. 组合物,其包含与跨膜蛋白融合的抗CD3e scFv抗体片段。

29. 权利要求28所述的组合物,其中所述跨膜蛋白包含细胞质截短的达菲抗原/趋化因子受体(DARC)。

30. 组合物,其包含与人IgG1-铰链-CH2-CH3结构域、鼠B7.1-跨膜和胞质结构域融合的抗CD3e scFv抗体片段。

31. 工程改造的遗传回路,其包括:

(a) 第一核酸,其包含与以下可操作地连接的第一肿瘤特异性启动子:(i) 编码含有内含子微小RNA(miRNA)的输出信使RNA(mRNA)的核苷酸序列和(ii) 编码与(a)(i)的miRNA互补的至少一个miRNA结合位点的核苷酸序列,其中所述输出mRNA编码合成的T细胞衔接器或双特异性T细胞衔接器;和

(b) 第二核酸,其包含与第一启动子不同并且与以下可操作地连接的第二启动子:编码与(a)(i)的miRNA互补的至少一个miRNA结合位点的核苷酸序列。

32. 权利要求31所述的工程改造的遗传回路,其还包含核酸,所述核酸包含与以下可操作地连接的肿瘤特异性启动子:(i) 编码含有内含子微小RNA(miRNA)的另外的输出信使RNA(mRNA)的核苷酸序列和(ii) 编码与(a)(i)的miRNA互补的至少一个miRNA结合位点的核苷酸序列,其中所述另外的输出mRNA编码趋化因子、细胞因子、检查点抑制剂或其组合。

33. 工程改造的遗传回路,其包含:

(a) 第一核酸,其包含与以下可操作地连接的启动子:

(i) 编码含有内含子微小RNA(miRNA)的输出信使RNA(mRNA)的核苷酸序列,

(ii) 编码内含子miRNA的核苷酸序列,和

(iii) 编码miRNA结合位点(miRNA-BS)的核苷酸序列;

(b) 第二核酸,其包含与以下可操作地连接的启动子:

(i) 编码含有内含子miRNA的输出mRNA的核苷酸序列,

(ii) 编码内含子miRNA的核苷酸序列,和

(iii) 编码miRNA-BS的核苷酸序列;以及

(c) 第三核酸,其包含与编码输出蛋白的核苷酸序列可操作地连接的启动子,所述输出蛋白与miRNA-BS连接,

其中(a) (iii)的miRNA-BS与(b) (i)的miRNA互补,(b) (iii)的miRNA-BS与(a) (i)的miRNA互补,并且(c)的miRNA-BS与(a) (ii)的miRNA和(b) (ii)的miRNA互补。

34. 工程改造的遗传回路,其包含:

(a) 第一核酸,其包含与以下可操作地连接的启动子:

(i) 编码含有内含子微小RNA (miRNA) 的新生RNA转录物的核苷酸序列,和

(ii) 编码至少一个miRNA结合位点 (miRNA-BS) 的核苷酸序列;

(b) 第二核酸,其包含与以下可操作地连接的启动子:

(i) 编码含有内含子miRNA的新生RNA转录物的核苷酸序列,和

(ii) 编码至少一个miRNA-BS的核苷酸序列;以及

(c) 第三核酸,其包含与编码输出蛋白的核酸可操作地连接的启动子,所述输出蛋白与(i) 第一miRNA-BS和(ii) 第二miRNA-BS连接,

其中(a) (ii)的所述至少一个miRNA-BS与(b) (i)的miRNA互补,(b) (ii)的所述至少一个miRNA-BS与(a) (i)的miRNA互补,(c) (i)的第一miRNA-BS与(a) (i)的miRNA互补,并且(c) (ii)的第二miRNA-BS与(b) (i)的miRNA互补。

35. 工程改造的遗传回路,其包含:

(a) 第一核酸,其包含与编码含有内含子微小RNA (miRNA) 的新生RNA转录物的核苷酸序列可操作地连接的启动子;

(b) 第二核酸,其包含与编码含有内含子miRNA的新生RNA转录物的核苷酸序列可操作地连接的启动子;以及

(c) 第三核酸,其包含与编码输出蛋白的核苷酸序列可操作地连接的启动子,所述输出蛋白与(i) 第一miRNA-BS和(ii) 第二miRNA-BS连接,

其中(c) (i)的第一miRNA-BS与(a)的miRNA互补,并且(c) (ii)的第二miRNA-BS与(b)的miRNA互补。

36. 工程改造的遗传回路,其包含:

(a) 第一核酸,其包含与编码含有内含子微小RNA (miRNA) 的新生RNA转录物的核苷酸序列可操作地连接的启动子;和

(b) 第二核酸,其包含与编码输出蛋白的核苷酸序列可操作地连接的启动子,所述输出蛋白与miRNA结合位点 (miRNA-BS) 连接;

其中(b)的miRNA-BS与(a)的miRNA互补。

37. 工程改造的遗传回路,其包含:

(a) 第一核酸,其包含与以下可操作地连接的启动子:(i) 编码含有内含子微小RNA (miRNA) 的输出信使RNA (mRNA) 的核苷酸序列和(ii) 至少一个miRNA结合位点 (miRNA-BS); 以及

(b) 第二核酸,其包含与以下可操作地连接的启动子:(i) 编码含有内含子miRNA的输出mRNA的核苷酸序列和(ii) 至少一个miRNA-BS,

其中(a)的所述至少一个miRNA-BS与(b)的miRNA互补,(b)的所述至少一个miRNA-BS与(a)的miRNA互补。

38. 工程改造的遗传回路,其包含:

(a) 第一核酸,其包含与编码含有内含子微小RNA(miRNA)的新生RNA转录物的核苷酸序列可操作地连接的启动子;

(b) 第二核酸,其包含与编码输出蛋白的核苷酸序列可操作地连接的启动子;以及

(c) 第三核酸,其包含与编码输出蛋白的核苷酸序列可操作地连接的启动子,所述输出蛋白与miRNA结合位点连接,

其中(c)的miRNA-BS与(a)的miRNA互补。

39. 工程改造的遗传回路,其包含:

(a) 第一核酸,其包含与编码输出蛋白的核苷酸序列可操作地连接的启动子,所述输出蛋白与微小RNA结合位点(miRNA-BS)连接;以及

(b) 第二核酸,其包含与编码含有内含子miRNA的新生RNA转录物的核苷酸序列可操作地连接的启动子,

其中(a)的miRNA-BS与(b)的miRNA互补。

40. 合成的启动子文库,其包含多个核酸,其中每个核酸包含具有串联的至少两个8聚体核苷酸序列的启动子序列,在每个8聚体核苷酸序列之间没有任何间隔物核苷酸。

41. 权利要求40所述的合成的启动子文库,其中每个核酸包含串联的至少六个8聚体核苷酸序列,在每个8聚体核苷酸序列之间没有任何间隔物核苷酸。

42. 权利要求40或权利要求41所述的合成的启动子文库,其中每个核酸包含串联的至少十二个8聚体核苷酸序列,在每个8聚体核苷酸序列之间没有任何间隔物核苷酸。

43. 权利要求40至42中任一项所述的合成的启动子文库,其中所述8聚体核苷酸序列是NNNNNNNN,其中每个N表示任意核苷酸。

44. 权利要求40至43中任一项所述的合成的启动子文库,其中每个所述核酸还包含在5'和3'端的限制性内切核酸酶位点。

45. 权利要求44所述的合成的启动子文库,其中在5'端的限制性内切核酸酶位点是SbfI位点,在3'端的限制性内切核酸酶位点是AscI位点。

46. 权利要求40至45中任一项所述的合成的启动子文库,其中每个所述核酸还包含编码输出分子的核苷酸序列,所述核苷酸序列与所述启动子序列可操作地连接。

47. 权利要求46所述的合成的启动子文库,其中所述输出分子是可检测分子。

48. 合成的启动子文库,其包含多个核酸,其中每个核酸包含具有串联的至少两个8聚体核苷酸序列的启动子序列,在每个8聚体核苷酸序列之间具有3聚体核苷酸间隔物。

49. 权利要求48所述的合成的启动子文库,其中每个核酸包含串联的至少六个8聚体核苷酸序列,在每个8聚体核苷酸序列之间具有3聚体核苷酸间隔物。

50. 权利要求48或权利要求49所述的合成的启动子文库,其中每个核酸包含串联的至少九个8聚体核苷酸序列,在每个8聚体核苷酸序列之间具有3聚体核苷酸间隔物。

51. 权利要求48至50中任一项所述的合成的启动子文库,其中所述8聚体核苷酸序列是

NNNNNNNN,其中每个N表示任意核苷酸。

52. 权利要求48至51中任一项所述的合成的启动子文库,其中每个所述核酸还包含在5'和3'端的限制性内切核酸酶位点。

53. 权利要求52所述的合成的启动子文库,其中在5'端的限制性内切核酸酶位点是SbfI位点,在3'端的限制性内切核酸酶位点是AscI位点。

54. 权利要求48至53中任一项所述的合成的启动子文库,其中所述3聚体核苷酸间隔物选自AGC、ATC、GAC、ACT、AGT、GTC、GAT和GCT。

55. 权利要求54所述的合成的启动子文库,其中每个3聚体核苷酸间隔物是不同的。

56. 权利要求48至55中任一项所述的合成的启动子文库,其中每个所述核酸还包含编码输出分子的核苷酸序列,所述核苷酸序列与所述启动子序列可操作地连接。

57. 权利要求56所述的合成的启动子文库,其中所述输出分子是可检测分子。

58. 合成的启动子文库,其包含多个核酸,其中每个核酸包含具有串联的至少两个11聚体核苷酸序列的启动子序列,在每个11聚体核苷酸序列之间具有3聚体核苷酸间隔物。

59. 权利要求58所述的合成的启动子文库,其中每个核酸包含串联的至少四个11聚体核苷酸序列,在每个11聚体核苷酸序列之间具有3聚体核苷酸间隔物。

60. 权利要求58或权利要求59所述的合成的启动子文库,其中每个核酸包含串联的至少七个11聚体核苷酸序列,在每个11聚体核苷酸序列之间具有3聚体核苷酸间隔物。

61. 权利要求58至60中任一项所述的合成的启动子文库,其中所述11聚体核苷酸序列是NNNNNNNNNN,其中每个N表示任意核苷酸。

62. 权利要求58至61中任一项所述的合成的启动子文库,其中每个所述核酸还包含在5'和3'端的限制性内切核酸酶位点。

63. 权利要求62所述的合成的启动子文库,其中在5'端的限制性内切核酸酶位点是SbfI位点,在3'端的限制性内切核酸酶位点是AscI位点。

64. 权利要求58至63中任一项所述的合成的启动子文库,其中所述3聚体核苷酸间隔物选自AGC、ATC、GAC、ACT、AGT、GTC、GAT和GCT。

65. 权利要求64所述的合成的启动子文库,其中每个3聚体核苷酸间隔物是不同的。

66. 权利要求58至65中任一项所述的合成的启动子文库,其中每个所述核酸还包含编码输出分子的核苷酸序列,所述核苷酸序列与所述启动子序列可操作地连接。

67. 权利要求66所述的合成的启动子文库,其中所述输出分子是可检测分子。

68. 选择合成的启动子的方法,其包括:

获得包含核酸分子的文库,所述核酸分子包含与输出分子可操作地连接的合成的启动子序列,

在一种或更多种类型的细胞中表达所述文库,

检测所述输出分子的表达,以及

分离其中表达所述输出分子的细胞。

69. 权利要求68所述的方法,其还包括:

确定所分离的细胞中的所述合成的启动子序列的序列。

70. 权利要求68或权利要求69所述的方法,其中所述一种或更多种类型的细胞是至少两种不同类型的细胞。

71. 权利要求70所述的方法, 其还包括将在所述至少两种不同类型的细胞的每种中驱动输出分子之表达的合成的启动子序列进行比较, 以鉴定在至少两种不同类型的细胞的一种中比在至少两种不同类型的细胞的另一种中更具活性的合成的启动子序列。

72. 权利要求71所述的方法, 其中所述至少两种不同类型的细胞是癌细胞和非癌细胞, 并且其中鉴定出在癌细胞中比在非癌细胞中更具活性的启动子。

肿瘤免疫治疗

[0001] 相关申请

[0002] 本申请根据35 U.S.C. §119 (e) 要求2015年6月19日提交的美国临时申请号62/181,906和2016年4月20日提交的美国临时申请号62/325,314的权益,其各自通过引用整体并入本文。

技术领域

[0003] 本公开内容的一些方面涉及生物技术的一般领域,并且更具体地涉及合成生物学和免疫学的领域。

背景技术

[0004] 许多癌症(例如,卵巢癌)的现有治疗(例如化学疗法和靶向疗法)无法治愈转移性疾病以及防止肿瘤复发。此外,标准护理治疗(例如化学疗法)可引起显著的发病率和毒性。需要新的治疗策略来治疗原发性和转移性卵巢癌并实现长期的效力。

发明内容

[0005] 在一些方面,本文中提供了这样的平台,其从肿瘤自身内触发针对肿瘤的有力且有效的免疫治疗,因此克服了现有癌症免疫治疗和肿瘤检测基因回路(gene circuit)的局限性。在一些实施方案中,本公开内容的工程改造的遗传回路(genetic circuit)在癌细胞表面上表达T细胞接合蛋白(T-cell-engaging protein)(称为表面T细胞衔接器(Surface T Cell Engager,STE)),其可以触发肿瘤细胞的抗原非依赖性T细胞杀伤。在一些实施方案中,工程改造的遗传回路被递送至肿瘤(参见,例如,图2A和2B),并且仅在癌细胞中选择性地活化,这导致表面展示STE和分泌其他免疫调节分子以募集T细胞靶向肿瘤。有利地,本公开内容的工程改造的遗传回路可以全身性施用,但仅在癌细胞中被局部活化,这导致安全性增强以及副作用降低。因此,在一些实施方案中,本公开内容的平台将全身性递送(例如,治疗转移)的优点与局部治疗的优点(例如安全性、最小的副作用)相结合。

[0006] 现有疗法受到某些局限性的阻碍,所述局限性被本公开内容所克服。例如,在CAR(chimeric antigen receptor,嵌合抗原受体)T细胞治疗中,T细胞必须对每个个体定制。作为另一个实例,双特异性T细胞衔接器(bispecific T cell engager,BiTE)(Iwahori K.等,Molecular Therapy,2015,23(1):171-178,其通过引用并入本文)受其短半衰期的限制,因此需要连续静脉内泵输注4至8周。两种疗法均靶向肿瘤细胞表面抗原;然而,并不是所有的肿瘤类型都具有理想的用于检测的表面肿瘤抗原。癌症检测遗传回路可利用细胞内杀伤机制,通过毒素诱导细胞死亡,但是将这些回路递送至全部(或大部分)肿瘤细胞几乎是不可能的。

[0007] 在一些方面,本公开内容提供了方法和工程改造的(重组或合成的)遗传回路(例如,工程改造的哺乳动物遗传回路),在一些实施方案中其被称为基于RNA的“逻辑门(logic gate)”(例如,遗传回路包括主要包含RNA的核酸,或遗传回路包括由RNA组成的核酸),因此

降低了不期望的免疫原性反应的可能性,因为没有外来蛋白被引入细胞或对象。

[0008] 在一些实施方案中,本公开内容提供了用于特异性检测癌细胞和生产免疫调节剂(例如,细胞因子)的方法和工程改造的遗传回路。在一些实施方案中,如本文中提供的方法和遗传回路用于癌细胞的“旁观者杀伤(bystander killing)”,由此触发记忆T细胞以破坏不被本公开内容的工程改造的遗传回路直接转化的癌细胞。

[0009] 在一些实施方案中,本公开内容提供了用于靶向性表达从特定细胞(例如,癌细胞)释放的组合免疫调节剂的方法和工程改造的遗传回路。在一些实施方案中,工程改造的遗传回路编码与CD3结合的分子,当其在靶向癌细胞(抗CD3细胞)的表面上表达时,作为合成的T细胞衔接器(STE)发挥作用以直接募集T细胞从而杀伤由工程改造的遗传回路靶向/检测到的癌细胞,产生局部和靶向的免疫治疗。在另一些实施方案中,工程改造的遗传回路编码双向T细胞衔接器(bi-directional T cell engager, BiTE),当其由细胞表达并通过抗原特异性区域与所述细胞结合时,其募集T细胞以杀伤细胞。可以使用工程改造的遗传回路(逻辑门)在特定细胞类型内选择性表达BiTE,其使得具有局部性的生产以及使用STE所观察到的同样的优点。

[0010] 在一些实施方案中,STE可用作通用的靶向性免疫治疗,而BiTE通常需要识别肿瘤特异性表面抗原以触发T细胞杀伤。

[0011] 本公开内容的靶向性免疫治疗与现有疗法的不同之处在于其能够以高效力和安全性进行全身性递送。在一些实施方案中,使用其他细胞因子和免疫治疗剂的组合疗法进一步增强本公开内容的靶向性免疫治疗的效力。

[0012] 在一些实施方案中,本公开内容提供了用于检测疾病(包括但不限于自身免疫疾病和神经疾病)中的异常细胞状态和/或用于表达或分泌免疫调节分子和治疗性分子以调节疾病的方法和工程改造的遗传回路。

[0013] 在一些实施方案中,本公开内容的免疫治疗平台还包括可用作诊断的输出(例如,编码可检测分子的工程改造的遗传回路)。

[0014] 一些实施方案提供了包含癌症特异性启动子的工程改造的核酸,所述癌症特异性启动子与以下的核酸可操作地连接:编码mRNA内的微小RNA的核酸,所述mRNA编码免疫调节分子(例如“表面T细胞衔接器”或STE)或与微小RNA结合位点连接的双特异性单克隆抗体。

[0015] 在一些实施方案中,免疫调节分子或双特异性单克隆抗体仅在工程改造的核酸的转录活化时才被翻译。

[0016] 本文中还提供了包含癌症特异性启动子的工程改造的核酸,所述癌症特异性启动子与编码含有微小RNA结合位点的mRNA转录物的核酸可操作地连接。

[0017] 本文中还提供了如图3A-3D、4A、6A、7A-7H、9A、14A、15A、16A和17A中任一幅图中所示的工程改造的核酸。

[0018] 本公开内容还提供了包含如本文中所述的任何工程改造的核酸的载体。本公开内容还提供了包含如本文中所述的任何载体和/或工程改造的核酸的细胞。

[0019] 本公开内容的一些实施方案提供了工程改造的遗传回路,其包含(a)核酸,其包含与以下可操作地连接的启动子:(i) 编码含有内含子微小RNA(miRNA)的输出信使RNA(mRNA)的核苷酸序列和(ii) 编码与(a)(i)的miRNA互补的miRNA结合位点的核苷酸序列,以及(b)核酸,所述核酸包含与以下可操作地连接的启动子:编码与(a)(i)的miRNA互补的至少一个

miRNA结合位点的核苷酸序列。

[0020] 本公开内容的另一些实施方案提供了工程改造的遗传回路,所述工程改造的遗传回路包含(a)第一核酸,其包含与以下可操作地连接的启动子:(i)编码含有内含子微小RNA(miRNA)的输出信使RNA(mRNA)的核苷酸序列,(ii)编码内含子miRNA的核苷酸序列,和(iii)编码miRNA结合位点(miRNA-BS)的核苷酸序列;(b)第二核酸,其包含与以下可操作地连接的启动子:(i)编码含有内含子miRNA的输出mRNA的核苷酸序列,(ii)编码内含子miRNA的核苷酸序列,和(iii)编码miRNA-BS的核苷酸序列;以及(c)第三核酸,其包含与编码输出蛋白的核苷酸序列可操作地连接的启动子,所述输出蛋白与miRNA-BS连接,其中(a)(iii)的miRNA-BS与(b)(i)的miRNA互补,(b)(iii)的miRNA-BS与(a)(i)的miRNA互补,以及(c)的miRNA-BS与(a)(ii)的miRNA和(b)(ii)的miRNA互补。

[0021] 本公开内容的另一些实施方案提供了工程改造的遗传回路,所述工程改造的遗传回路包含(a)第一核酸,其包含与以下可操作地连接的启动子:(i)编码含有内含子微小RNA(miRNA)的新生RNA转录物(例如,非编码RNA转录物)的核苷酸序列,和(ii)编码至少一个miRNA结合位点(miRNA-BS)的核苷酸序列;(b)第二核酸,其包含与以下可操作地连接的启动子:(i)编码含有内含子miRNA的新生RNA转录物的核苷酸序列和(ii)编码至少一个miRNA-BS的核苷酸序列;以及(c)第三核酸,其包含与编码输出蛋白的核苷酸序列可操作地连接的启动子,所述输出蛋白与(i)第一miRNA-BS和(ii)第二miRNA-BS连接,其中(a)(ii)的至少一个miRNA-BS与(b)(i)的miRNA互补,(b)(iii)的至少一个miRNA-BS与(a)(i)的miRNA互补,(c)(i)的第一miRNA-BS与(a)(i)的miRNA互补,并且(c)(ii)的第二miRNA-BS与(b)(i)的miRNA互补。

[0022] 本公开内容的另一些实施方案提供了工程改造的遗传回路,所述工程改造的遗传回路包含(a)第一核酸,其包含与编码含有内含子微小RNA(miRNA)的新生RNA转录物的核苷酸序列可操作地连接的启动子;(b)第二核酸,其包含与编码含有内含子miRNA的新生RNA转录物的核苷酸序列可操作地连接的启动子;以及(c)第三核酸,其包含与编码输出蛋白的核苷酸序列可操作地连接的启动子,所述输出蛋白与(i)第一miRNA-BS和(ii)第二miRNA-BS连接,其中(c)(i)的第一miRNA-BS与(a)的miRNA互补,并且(c)(ii)的第二miRNA-BS与(b)的miRNA互补。

[0023] 本公开内容的另一些实施方案提供了工程改造的遗传回路,所述工程改造的遗传回路包含(a)第一核酸,其包含与编码含有内含子微小RNA(miRNA)的新生RNA转录物的核苷酸序列可操作地连接的启动子;和(b)第二核酸,其包含与编码输出蛋白的核苷酸序列可操作地连接的启动子,所述输出蛋白与miRNA结合位点(miRNA-BS)连接,其中(b)的miRNA-BS与(a)的miRNA互补。

[0024] 本公开内容的另一些实施方案提供了工程改造的遗传回路,所述工程改造的遗传回路包含(a)第一核酸,其包含与以下可操作地连接的启动子:(i)编码含有内含子微小RNA(miRNA)的输出信使RNA(mRNA)的核苷酸序列和(ii)至少一个miRNA结合位点(miRNA-BS);以及(b)第二核酸,其包含与以下可操作地连接的启动子:(i)编码含有内含子miRNA的输出mRNA的核苷酸序列和(ii)至少一个miRNA-BS,其中(a)的至少一个miRNA-BS与(b)的miRNA互补,(b)的至少一个miRNA-BS与(a)的miRNA互补。

[0025] 本公开内容的另一些实施方案提供了工程改造的遗传回路,所述工程改造的遗传

回路包含 (a) 第一核酸,其包含与编码含有内含子微小RNA (miRNA) 的新生RNA转录物的核苷酸序列可操作地连接的启动子; (b) 第二核酸,其包含与编码输出蛋白的核苷酸序列可操作地连接的启动子;以及 (c) 第三核酸,其包含与编码输出蛋白的核苷酸序列可操作地连接的启动子,所述输出蛋白与miRNA结合位点连接,其中 (c) 的miRNA-BS与 (a) 的miRNA互补。

[0026] 本公开内容的另一些实施方案提供了工程改造的遗传回路,所述工程改造的遗传回路包含 (a) 第一核酸,其包含与编码输出蛋白的核苷酸序列可操作地连接的启动子,所述输出蛋白与微小RNA结合位点 (miRNA-BS) 连接;以及 (b) 第二核酸,其包含与编码含有内含子miRNA的新生RNA转录物的核苷酸序列可操作地连接的启动子,其中 (a) 的miRNA-BS与 (b) 的miRNA互补。

[0027] 在一些实施方案中,输出mRNA编码合成的T细胞衔接器 (STE) 或双特异性T细胞衔接器 (BiTE)。

[0028] 在一些实施方案中,输出mRNA编码与T细胞表面标志物结合的输出蛋白。

[0029] 在一些实施方案中,T细胞表面标志物是CD3、CD4、CD8或CD45。

[0030] 在一些实施方案中,输出蛋白是与T细胞表面抗原特异性结合的抗体或抗体片段。

[0031] 在一些实施方案中,输出mRNA编码抗癌剂。例如,输出mRNA可编码趋化因子、细胞因子或检查点抑制剂 (checkpoint inhibitor)。

[0032] 在一些实施方案中,启动子是诱导型启动子。例如,启动子可以是肿瘤特异性启动子 (例如,良性肿瘤特异性启动子或恶性肿瘤特异性启动子) 或癌症启动子。

[0033] 在一些实施方案中,启动子是SSX1或H2A1。

[0034] 在一些实施方案中,核苷酸序列编码2至5或2至10个微小RNA结合。

[0035] 在一些实施方案中,输出蛋白是转录因子。

[0036] 在一些实施方案中,输出蛋白是抗癌剂。

[0037] 在一些实施方案中,输出mRNA编码转录因子,所述转录因子可结合至少一种核酸的启动子并活化其转录。

[0038] 在一些实施方案中,工程改造的遗传回路包含编码脱落蛋白质系统 (split protein system) 的核酸,其中功能性蛋白质二聚体的每个蛋白在单独的核酸上编码并通过单独的启动子调节。

[0039] 本发明并不将其应用局限于以下说明书中阐述的或者附图中示出的结构和组件布置的细节。本发明能够具有其他实施方案并且能够以多种方式实践或实施。以上实施方案和方面中的每一个可以与任何其他实施方案或方面联合。此外,本文中使用的措辞和术语是为了描述的目的,而不应被认为是限制性的。“包括 (including)”,“包含 (comprising)”或“具有 (having)”,“含有 (containing)”,“涉及 (involving)”及其变化形式的使用意在涵盖其后列出的项目及其等同物以及附加项目。

[0040] 附图简述

[0041] 附图并不旨在按比例绘制。为了清楚起见,并非每个元件都在每幅图中标出。

[0042] 图1A-1C. 现有免疫治疗方法的实例。(图1A) 嵌合抗原受体 (CAR) T细胞治疗的作用模式。(图1B和1C) 双特异性T细胞衔接器的作用模式。

[0043] 图2A-2B. STRICT治疗的概述。(图2A) 使用STRICT来分泌BiTE。(1) 通过局部注射或全身性施用将肿瘤鉴定回路引入肿瘤。(2) 经回路转导的肿瘤细胞分泌局部扩散的BiTE和

其他免疫调节分子。(3) BiTE同时接合肿瘤细胞上的HER2和局部肿瘤浸润性T细胞上的T细胞受体,从而触发T细胞以直接杀伤肿瘤细胞。BiTE还可以募集附近的循环T细胞以运输到肿瘤部位。(4)通过第一波杀伤释放的肿瘤抗原致敏(prime)并募集更多的肿瘤反应性T细胞发挥作用。(5)新募集的多克隆T细胞可以杀伤更多的癌细胞,包括HER2阴性肿瘤细胞和不被第一波抗肿瘤免疫应答所杀伤的其他异质肿瘤细胞。(图2B)使用STRICT来展示表面T细胞衔接器(STE)。(1)通过局部注射或全身性施用将肿瘤鉴定基因回路引入肿瘤。(2)经回路转导的肿瘤细胞表达STE和其他免疫调节分子。(3)STE接合局部肿瘤浸润性T细胞上的T细胞受体,从而触发T细胞以直接杀伤肿瘤细胞。(4)通过第一波杀伤释放的肿瘤抗原致敏并募集更多的肿瘤反应性T细胞发挥作用。(5)新募集的多克隆T细胞可以杀伤更多的癌细胞,包括不被第一波抗肿瘤免疫应答所杀伤的其他异质肿瘤细胞和转移瘤。免疫记忆可以防止肿瘤复发。

[0044] 图3A-3H. 仅RNA的单输出AND门的设计。(图3A-3D)示出了所有4个输入状态及其各自的输出状态的计算层。基于RNA的逻辑AND门整合了两个输入启动子P1和P2的活性,并且只有当两个启动子都明确有活性时才产生输出。在这种结构中,输出是表面T细胞衔接器(STE)。启动子P1调节包含合成的miRNA内含子的STE mRNA(mirFF4)的表达。通过在STE/mirFF4转录物的3'端编码完全匹配的mirFF4结合位点(mirFF4-BS)将负向自动调节反馈环并入回路中。因此,当仅启动子P1有活性时,STE mRNA通过细胞miRNA机制被不断降解,并且不产生STE蛋白(状态3)。启动子P2调节miRNA海绵(miRNA sponge)的表达,所述miRNA海绵在3'端含有具有多个凸起的mirFF4结合位点的非编码RNA(诱饵)。因此,当仅启动子P2有活性时,不产生蛋白质输出(状态2)。当两个启动子P1和P2都有活性时,由启动子P1调节的STE/mirFF4mRNA所产生的mirFF4被由启动子P2调节的mirFF4海绵分离开,因此允许产生STE蛋白(状态1)。(图3E-3H)当使用荧光蛋白mKate2作为输出时,AND门回路的4种输入状态及其各自的输出状态。

[0045] 图4A-4B. mKate2AND门实验结果。(图4A)为了检查基于RNA的逻辑AND门设计,用mKate2输出进行编码。作为该设计的启动子输入,我们使用了在许多人癌症中过表达的两种人启动子:SSX1和H2A1(分别为输入1和输入2,而输入1编码mKate2输出和mirFF4)。(图4B)相对于(a)输入1中编码的完全匹配FF4-BS的数目和(b)输入2中海绵设计的两种不同的结构,测量不同的设计的mKate2输出水平。X轴注释:M#表示输入1具有#个在mKate2/mirFF4下游编码的FF4-BS。例如,M3表示输入1具有3个完全匹配FF4-BS,如门示图中所示。S0、S1和S2表示三种不同的海绵设计。S0是无mirFF4-BS的阴性对照转录物。设计S1是在3'上编码的具有10个凸起的FF4-BS的诱饵转录物,如门示图中所示。设计S2与S1类似,但具有另外的环状内含子,在位于转录物3'中编码的10个凸起的FF4-BS的上游具有10个凸起的FF4-BS。因此,门示图表示设计M3-S1(在图中用绿色虚线环绕)。结果以平均mKate2表达(P1)表示,其是在FACS中对SSC/FSC设门以除去细胞团块和碎片的细胞的平均mKate2。误差条表示SEM。我们没有测试输入2条件,因为它无论如何不编码输出蛋白。NT表示未转染的细胞。

[0046] 图5. mKate2 AND门实验结果。为了再次检查基于RNA的逻辑AND门设计,将其用mKate2输出编码。在海绵转录物中编码ECFP以测量通过miRNA的海绵的降解。SSX1和H2A1用作本设计的启动子输入:分别为输入1和输入2,而输入1编码mKate2输出和mirFF4。相对于(a)在输入1中编码的完全匹配FF4-BS的数目和(b)在输入2中海绵设计的两种不同的结构,

测量不同实验设置的mKate2和ECFP输出水平。X轴注释:M#表示输入1具有#个在mKate2/mirFF4的下游编码的FF4-BS。

[0047] 图6A-6B.多输出AND门回路的设计。(图6A)当启动子P1和P2都具有活性时,由启动子P1调节的TF/mirFF4mRNA所产生的mirFF4被由启动子P2调节的mirFF4海绵分离开,因此允许产生人工转录因子(transcription factor,TF)。TF将进一步与其启动子结合并触发多个用户定义输出的转录。(图6B)多输出AND门的输出水平是可调的。CXCL10是CXCL1p,其调节含有mirFF4v2B内含子和10个下游mirFF4-BS的GAL4BD-VP16AD。SSX10是SSX1p,其调节含有mirFF4v2B内含子和10个下游mirFF4-BS的GAL4BD-VP16AD。SSX*10是截短的SSX1p,其中部分5' UTR与KOZAK序列一起被去除,其调节含有mirFF4v2B内含子和10个下游mirFF4-BS的GAL4BD-VP16AD。海绵S0是阴性对照转录物W0 mirFF4-BS。海绵S2是具有在3'上编码的10个凸起的FF4-BS的诱饵转录物,具有另外的环状内含子,其在位于转录物3'中编码的10个凸起的mirFF4-BS上游有10个凸起的mirFF4-BS。在所有样品中,mKate2输出在G5p(含有5个GAL4结合位点的启动子)下编码。通过使用与P1不同强度的启动子和不同的海绵结构可以调节输出水平。

[0048] 图7A-7H.几个布尔(Boolean)逻辑门的设计。AND、NAND、XNOR、NOR、NOT、XOR、IMPLY、NIMPLY门的基于RNA的设计的示意图。OP:输出蛋白;Nan:新生RNA转录物。

[0049] 图8.抗HER2双特异性T细胞衔接器(BiTE)和表面T细胞衔接器(STE)触发T细胞以介导稳健的肿瘤杀伤和IFN- γ 分泌。如所示用多种DNA构建体转染HEK-293T(最低程度表达HER2)细胞。转染后48小时,收集多种HEK-293T细胞并与人T细胞共培养5小时或24小时。通过LDH释放测定法测量通过T细胞的5小时细胞毒性,并且通过IFN- γ ELISA测量通过T细胞的24小时IFN- γ 分泌。数据显示T细胞介导对BiTE分泌性肿瘤细胞的稳健的肿瘤杀伤和IFN- γ 分泌(第1组至第2组)。肿瘤杀伤和IFN- γ 分泌与肿瘤细胞上的HER2表达水平相关(第1组至第2组)。T细胞还介导对STE表达性肿瘤细胞的稳健肿瘤杀伤和IFN- γ 分泌(第3组至第6组),并且细胞毒性和IFN- γ 分泌独立于肿瘤抗原(HER2)表达(第3组至第6组)。此外,当与表达非BiTE和非STE对照蛋白的HEK-293T细胞共培养时,T细胞介导最小的肿瘤杀伤和IFN- γ 分泌(第7组至第9组)。

[0050] 图9A-9C.单输出AND门结构可用于微调肿瘤细胞的T细胞杀伤效率。如所示用多种DNA构建体转染HEK-293T细胞。(图9A)驱动STE表达的单输出AND门的设计。(图9B)mKate AND门的实验结果。(1,0)表示仅用P1组件(module)转染的细胞。(1,1)表示用P1和P2组件转染的细胞。(0,0)表示未转染的细胞。(图9C)STE AND门的实验结果。(1,0)表示仅用P1组件转染的细胞。(1,1)表示用P1和P2组件转染的细胞。(0,0)表示用非STE蛋白转染的细胞。Ctrl表示未转染的细胞。转染后48小时,收集多种HEK-293T细胞并与人T细胞共培养5小时。通过LDH释放测定法测量通过T细胞的细胞毒性。数据显示T细胞杀伤经P1组件转染的293T(第1列),并且通过AND门结构可以大大增强杀伤作用(第2列)。T细胞在非STE表达细胞上表现出最小的杀伤作用(第3列和第4列)。

[0051] 图10.抗HER2双特异性T细胞衔接器(BiTE)和表面T细胞衔接器(STE)触发T细胞以介导稳健的肿瘤杀伤和IFN- γ 分泌。将表达所示DNA构建体的稳定的4T1细胞(HER2-)与人T细胞共培养5小时或24小时。通过LDH释放测定法测量通过T细胞的5小时细胞毒性以及通过IFN- γ ELISA测量通过T细胞的24小时IFN- γ 分泌。数据显示T细胞介导对HER2-或STE-肿

瘤细胞的最小杀伤和IFN- γ 分泌。(第1组和第3组)。T细胞介导对STE-表达性肿瘤细胞的稳健的肿瘤杀伤和IFN- γ 分泌。(第2组)。当与由少量BiTE分泌细胞和非BiTE分泌性肿瘤组成的细胞混合物共培养时,T细胞也介导稳健的肿瘤杀伤和IFN- γ 分泌。这表明在肿瘤块(tumor mass)中最小数量的BiTE分泌细胞可以引起稳健的肿瘤块杀伤和IFN- γ 释放(第4组)。

[0052] 图11.抗HER2双特异性T细胞衔接器(BiTE)和表面T细胞衔接器(STE)触发T细胞以介导对人乳腺癌细胞系的稳健的肿瘤杀伤。如所示通过用多种DNA构建体进行慢病毒转导来产生稳定的MDA-MB453(HER2+)细胞系。收集多种MDA-MB453细胞并与人T细胞共培养5小时。通过LDH释放测定法测量通过T细胞5小时的细胞毒性。数据显示T细胞介导对BiTE分泌性肿瘤细胞的稳健的肿瘤杀伤(第2组)。T细胞还介导对STE表达性肿瘤细胞的稳健的肿瘤杀伤作用(第3组至第4组)。此外,当与亲本MDA-MB453肿瘤细胞系共培养时,T细胞介导最小的肿瘤杀伤(第1组)。

[0053] 图12.两种形式的STE的设计。对于形式1(v1),抗CD3e scFv与惰性跨膜蛋白(DARC)融合。对于形式2(v2),抗CD3e scFv与人IgG1-铰链-CH2-CH3结构域,之后是鼠B7.1-跨膜(TM)和细胞质(CYP)结构域融合。

[0054] 图13.表面T细胞衔接器(STE)形式1(v1)和形式2(v2)二者都触发T细胞以介导对HEK-293T细胞的稳健的肿瘤杀伤。通过慢病毒转导产生多种诱导型STE表达性HEK-293T细胞系。收集多种HEK-293T细胞并与人T细胞共培养5小时。通过LDH释放测定法测量通过T细胞5小时的细胞毒性。数据显示T细胞介导对转染的STE_{v1}表达性肿瘤细胞的稳健的肿瘤杀伤(第2列)。T细胞还介导对诱导型STE_{v1}和STE_{v2}表达性肿瘤细胞的稳健的肿瘤杀伤(第3列和第4列)。此外,当与非STE表达性HEK-293T细胞系共培养时,T细胞介导最小的肿瘤杀伤(第1列)。

[0055] 图14.AND门结构可以用来微调对肿瘤细胞的T细胞杀伤效率。(A)用于STE表达的多输出AND门的设计。(B)如所示用多种DNA构建体转染HEK-293T细胞。(1,0)表示仅用STE转染的细胞。(1,1)表示用STE和海绵转染的细胞。(0,0)表示用非STE蛋白转染的细胞。转染后48小时,收集多种HEK-293T细胞并与人T细胞共培养5小时。通过LDH释放测定法测量经T细胞的细胞毒性。数据显示T细胞杀伤STE表达性(1,0)细胞(第2列和第4列),并且通过AND门(1,1)结构可以大大增强杀伤(第3列和第5列)。T细胞对非STE表达性细胞表现出最小的杀伤(第1列)。

[0056] 图15.AND门结构可以用来微调对肿瘤细胞的T细胞杀伤效率。(A)用于STE表达的多输出AND门的设计。(B)如所示用多种DNA构建体转染HEK-293T细胞。(1,0)表示仅用STE转染的细胞。(1,1)表示用STE和海绵转染的细胞。(0,0)表示用非STE蛋白转染的细胞。转染后48小时,收集多种HEK-293T细胞并与人T细胞共培养5小时。通过LDH释放测定法测量经T细胞的细胞毒性。数据显示T细胞杀伤STE表达性(1,0)细胞(第3和5列),并且通过AND门(1,1)结构可以大大增强杀伤(第4列和第6列)。T细胞在非STE表达性细胞上表现出最小的杀伤(第1列)。在(1,0)条件下的杀伤主要是由于GAL4启动子输出的泄漏(leakage)引起的(第2v.3或5列)。可进行进一步修饰以降低GAL4启动子输出的泄漏(STE_{v1})。我们将通过去除STE_{v1}的KOZAK序列、通过在3'端添加miRNA结合位点使得STE_{v1}输出自我降解、以及两种机制的组合来降低GAL4启动子的泄漏。

[0057] 图16. GAL4门v2结构可用于微调肿瘤细胞的T细胞杀伤效率并在(1,0)状态下表现出较小的细胞毒性。(A)用于STE表达的多输出AND门的设计。(B)如所示用多种DNA构建体转染HEK-293T细胞。(1,0)表示仅用STE转染的细胞。(1,1)表示用STE和海绵转染的细胞。(0,0)表示用非STE蛋白转染的细胞。转染后48小时,收集多种HEK-293T细胞并与人T细胞共培养5小时。通过LDH释放测定法测量经T细胞的细胞毒性。数据显示T细胞杀伤STE表达性(1,0)细胞(第3列),并且通过AND门(1,1)结构可以增强杀伤(第4列)。T细胞对非STE表达性细胞表现出最小的杀伤(第1列)。与GAL4门v1结构(v2更接近于基础水平(0,0))相比,在此形式的(1,0)状态下的杀伤得到改善。可以进行进一步修饰以降低在(1,0)状态下的杀伤。我们将通过在STE基因的3'端添加miR结合位点来降低(1,0)状态下的GAL4启动子输出。

[0058] 图17. GAL4门v3结构可用于微调肿瘤细胞的T细胞杀伤效率并且在(1,0)状态下表现出较小的细胞毒性。(A)用于STE表达的多输出AND门的设计。(B)如所示用多种DNA构建体转染HEK-293T细胞。(1,0)表示仅用STE转染的细胞。(1,1)表示用STE和海绵转染的细胞。(0,0)表示用非STE蛋白转染的细胞。转染后48小时,收集多种HEK-293T细胞并与人T细胞共培养5小时。通过LDH释放测定法测量经T细胞的细胞毒性。数据显示T细胞最低程度地杀伤STE表达性(1,0)细胞(第3列),并且仅在当AND门有活性时(1,1)才达到有效杀伤(第4列)。T细胞对非STE表达性细胞表现出最小的杀伤(第1列)。在(1,0)状态下的杀伤与(0,0)状态一样低。可以进行进一步修饰(例如提高GAL4-VP16输出水平或增加GAL4结合位点)以增强(1,1)状态的杀伤效力。

[0059] 图18. 合成的肿瘤募集免疫细胞治疗(Synthetic Tumor-Recruited Immuno-Cellular Therapy, STRICT)的概述。栏1:设计肿瘤靶向基因回路以整合两种肿瘤特异性的合成启动子的活性,并且仅当两种启动子都有活性时才产生合成的和天然的免疫调节剂的表达,这为我们的回路提供了高的肿瘤选择性;栏2:使用基于水凝胶的递送在体内递送回路;栏3:仅转导的癌细胞表达合成的表面T细胞衔接器(STE)和/或天然免疫调节剂,其募集T细胞以杀伤肿瘤细胞;栏4:肿瘤细胞被活化的T细胞消除。

[0060] 图19. 仅RNA单输出AND门的设计。基于RNA的逻辑AND门整合了两个输入启动子P1和P2的活性,并且只有当两个启动子都明确有活性时才产生并输出。在这个结构中,输出是荧光蛋白mKate2。启动子P1调节包含合成的miRNA内含子(miR1)的mKate2 mRNA的表达。我们通过在mKate2/miR1转录物的3'端编码完全匹配的miR1结合位点(miR1-BS),将负向自动调节反馈环并入回路中。因此,只有当启动子P1和P2二者都具有活性时,由启动子P1调节的mKate2/miR1 mRNA产生的mirR1被由启动子P2调节的miR1海绵分离开,因此允许产生mKate2蛋白。

[0061] 图20. 仅RNA单输出AND门设计。上面的图描绘了仅RNA单输出AND门的设计细节。左表示出了miRNA结合序列影响海绵活性。右图示出由每种海绵得到的mKate2诱导倍数和由miR1得到的ECFP水平降低。

[0062] 图21. 海绵中结合位点的数目和海绵转录物的丰度影响海绵活性。左栏示出了组件1(M1)和多种海绵(S67、S73和S62)的设计细节。右上栏示出了多种实验条件的mKate2和ECFP的原始输出水平。右下栏示出了由每种海绵得到的mKate2诱导倍数。SC表示对照海绵(无结合位点)。

[0063] 图22. 海绵结构影响海绵活性。左栏示出了多种海绵(S76、S99、S100和S101)的设

计细节。右上栏示出了多种实验条件的mKate2和ECFP的原始输出水平。右下栏示出了由每种海绵得到的mKate2诱导倍数。SC表示对照海绵(无结合位点)。

[0064] 图23.miRNA骨架影响门性能。左栏示出组件1(M)和多种海绵(Sx和S76)的设计细节。右上栏示出了多种实验条件的mKate2和ECFP的原始输出水平。右下栏示出了多种组件1构建体(M1、M2A和M2B是组件1的3种形式,其各自由不同的miRNA骨架组成)由多种海绵得到的mKate2诱导倍数。SC表示对照海绵(无结合位点)。

[0065] 图24A-24B.多西环素诱导型STE可触发T细胞以高效杀伤OVCAR8卵巢癌细胞、HEK-293T细胞并分泌IFN-g。Dox诱导型STE(STE、STEv2和STE-snap)的3种形式均可触发通过T细胞的稳健的细胞杀伤和IFN-g分泌。

[0066] 图25.多输出回路严格杀伤肿瘤细胞。(图25A)通过AND门输出的GAD可以靶向能够表达多种蛋白质(例如STE和免疫调节分子)的第三启动子(P3)。(图25B)用编码以下的基因回路转染的HEK-293T细胞:HEK/DARC(0,0)-非STE蛋白;GAD门(1,0)-仅P1+P3构建体,其中P3表达STE;GAD门(1,1)-P1+P2+P3构建体,其中P3表达STE;HEK/const-组成型表达的STE。转染后48小时,将细胞与人T细胞共培养5小时。通过LDH释放测定法测量细胞毒性。只有当AND门打开(ON)(1,1)时,T细胞才能有效地杀伤。T细胞最低程度地杀伤STE阴性细胞(0,0)。在(1,0)状态中的杀伤与在(0,0)状态中一样低。增加GAD表达、GAD结合位点的数目可以进一步增强(1,1)状态的效力。

[0067] 图26.合成的肿瘤特异性启动子比天然启动子显示出更高的肿瘤特异性。(A)上栏举例说明了合成的肿瘤特异性启动子的设计。在最小启动子(晚期腺病毒启动子)的上游串联克隆了16个转录因子结合位点。下栏示出了合成的肿瘤特异性启动子比天然启动子显示出更高的肿瘤特异性。H2A1p是一种天然的肿瘤特异性启动子。S9至S19是合成的启动子的选择性实例,括号表示它们的转录因子结合位点。OVCAR8:卵巢癌细胞。IOSE120,IOSE386:永生化的正常卵巢上皮细胞。aHDF:成人真皮成纤维细胞。CCD:正常结肠成纤维细胞。MCF10A,MCF12A:永生化的正常乳腺细胞。(B)上栏示出了合成的肿瘤特异性启动子的设计。在最小启动子(晚期腺病毒启动子)的上游串联克隆了16个转录因子结合位点。下栏示出了合成的肿瘤特异性启动子比天然特异性启动子显示出更高的肿瘤特异性。SSX1和H2A1p是天然的肿瘤特异性启动子。S9至S28是合成的启动子的选择性实例,括号表示它们的转录因子结合位点。aHDF:成人真皮成纤维细胞。HOV-epi:原发性卵巢上皮细胞。OVCAR8:卵巢癌细胞。

[0068] 图27.多输出AND门在肿瘤细胞中比在正常细胞中显示出显著更高的输出水平。上图描绘的回路在肿瘤细胞(OVCAR8)中比在正常细胞(IOSE120)中显示出约90倍更高的活性。

[0069] 图28.多输出AND门在肿瘤细胞中比在正常细胞中显示出显著更高的输出水平。当两种启动子均有活性时,G8-F回路在肿瘤细胞(OVCAR8)中比在正常细胞(IOSE120)中显示出约90倍更高的活性。G8-F门的输出水平也高于输入启动子活性水平。

[0070] 图29.可以通过修改GAD启动子中GAD结合位点的数目并调整下游输出转录物上的miRNA结合位点的数目来调节肿瘤细胞上回路的输出水平。G8-F门的输出也高于输入启动子(S19p)活性。

[0071] 图30.多输出AND门在肿瘤细胞中比在正常细胞中显示出显著更高的输出水平。当

两种启动子均有活性时,G8-F回路在肿瘤细胞(OVCAR8)中比在正常细胞(ISOE120)中显示约90倍更高的活性。G8-F门的输出也高于输入启动子活性。

[0072] 图31.多输出回路特异性地触发T细胞以杀伤肿瘤细胞并分泌IFN-g。(A)STE触发对回路转导的肿瘤细胞(OVCAR8)而非正常细胞(aHDF,HOV-epi)的稳健的T细胞杀伤。回路还在状态(1,0)下触发最小的肿瘤杀伤。(B)STE触发对回路转导的肿瘤细胞(OVCAR8)而非正常细胞(aHDF,HOV-epi)的稳健的T细胞杀伤。回路还在状态(1,0)下触发最小的肿瘤杀伤。(C)T细胞介导由经回路转导的肿瘤细胞(而非正常细胞)产生的强力的IFN-g分泌。

[0073] 图32.不同的多输出回路显示出不同的抗肿瘤特异性水平。G8-Fv1和G14-Fv1触发相比于对正常细胞(ISOE386)杀伤显著更高的对肿瘤细胞(OVCAR8)杀伤。G8(含有8个GAL4结合位点的启动子),G14(含有14个GAL4结合位点的启动子)。

[0074] 图33.不同的多输出回路显示出不同的抗肿瘤特异性水平。(图33A)几种门设计(G5-Fv1,G8-Fv1,G14-Fv1,G5-Fv2,G8-Fv2,G14-Fv2)对肿瘤细胞(OVCAR8)相比于正常细胞(ISOE386)可以触发T细胞的显著更高的IFN-g分泌。(图33B)G8-F门触发T细胞针对肿瘤细胞(OVCAR8)而非正常细胞(aHDF,HOV-epi)分泌大量的IFN-g。

[0075] 图34.STE在体内有力地降低胰腺肿瘤负荷。经皮下注射展示多西环素(Dox)诱导型STE的NB508肿瘤细胞。接种10天后,将小鼠随机分到Dox诱导的或未处理的组中。上栏:相对于未处理的对照(nt),在Dox诱导的肿瘤(+Dox)中观察到显著的生长降低。由于皮肤刺激性,在第17天过早地处死两只+Dox小鼠。下图:在治疗后第21天解剖的所有肿瘤明显较小。

[0076] 图35.由STRICT触发的组合免疫治疗显著降低了腹膜内播散性卵巢癌模型中的肿瘤负荷。(A)实验计划和治疗时间表。(B)由STRICT触发的组合治疗显著降低肿瘤负荷。左栏表示对照组的肿瘤负荷。右栏表示处理组的肿瘤负荷。括号表示组合治疗策略。

[0077] 图36.由STRICT触发的组合免疫治疗显著降低了腹膜内播散性卵巢癌模型中的肿瘤负荷。这与图35中的数据相同,但是现在所有的组都绘制在相同的图中。

[0078] 图37.由STRICT触发的组合免疫治疗显著降低了腹膜内播散性卵巢癌模型中的肿瘤负荷。这与图35中的数据相同,但绘制方式不同。

[0079] 图38.由STRICT触发的组合免疫治疗显著降低了腹膜内播散性卵巢癌模型中的肿瘤负荷。这与图35中的数据相同,但绘制方式不同。

[0080] 图39A.由STRICT触发的组合免疫治疗显著降低了腹膜内播散性卵巢癌模型中的肿瘤负荷。这与图35的数据相同,但是示出了单个小鼠的肿瘤生长曲线,以及每组的平均负荷。

[0081] 图40.由STRICT触发的组合免疫治疗显著降低了腹膜内播散性卵巢癌模型中的肿瘤负荷。这与图35的数据相同,除了S15p-GAD+G8p-STE-F组未示出之外;示出了各成像时间点的肿瘤负荷和各组的平均负荷。G8p(含有8个GAL4结合位点的启动子)。

[0082] 图41.由STRICT触发的组合免疫治疗显著降低了腹膜内播散性卵巢癌模型中的肿瘤负荷。这与图35的数据相同,但是现在示出了在肿瘤接种后第36天每只小鼠的肿瘤负荷的生物发光图像。

[0083] 图42.由STRICT触发的组合免疫治疗显著降低了腹膜内播散性卵巢癌模型中的肿瘤负荷。这与图35的数据相同,但是现在示出了在肿瘤接种后第43天每只小鼠的肿瘤负荷的生物发光图像。

[0084] 图43.由STRICT触发的组合免疫治疗显著降低了腹膜内播散性卵巢癌模型中的肿瘤负荷。这与图35的数据相同,但是现在示出了在肿瘤接种后第7天和第43天每只小鼠的肿瘤负荷的生物发光图像。

[0085] 图44.鉴定癌症特异性的合成启动子的流水线。将驱动mKate2表达的合成启动子文库引入正常细胞和具有慢病毒的癌细胞中。分选mKate2阳性细胞,并利用下一代测序来鉴定每种细胞类型的富集的合成启动子序列。克隆在癌细胞中而非正常细胞中的高度富集的合成启动子序列,并且将进一步验证肿瘤特异性活性。

[0086] 图45.合成的启动子文库的设计。设计1由串联(12次重复)构建的8聚体序列的所有排列构成,在每个8聚体(mer)之间没有间隔物。设计2由串联(9次重复)构建的8聚体序列的所有排列构成,在每个8聚体之间具有3聚体间隔物。设计3由串联(7次重复)构建的选择性11聚体序列构成,每个11聚体之间没有3聚体间隔物。

[0087] 图46.所选择的合成的启动子的活性。在3种不同的癌细胞系上测试了从FACS分选分离的40种合成的启动子的活性。我们观察到,这40种合成的启动子可以为我们提供广泛的转录活性。

[0088] 图47.所选择的合成的启动子的归一化活性。在3种不同的癌细胞系上测试从FACS分选分离的40种合成的启动子的活性。我们观察到,这40种合成的启动子可以为我们提供广泛的转录活性。对于每个细胞系,将数据相对于组成型启动子(UbCp)进行归一化。

[0089] 发明详述

[0090] 本公开内容的合成的肿瘤募集免疫细胞治疗(STRICT)包括在一些实施方案中具有组合免疫调节输出(例如,抗原和细胞因子)的细胞特异性诊断和治疗回路(工程改造的遗传回路/逻辑门)。细胞特异性遗传回路主要基于RNA,因此通常不会在对象中引起不利的免疫原性反应。组合免疫调节输出可包括例如,合成的T细胞衔接器(STE)、双向T细胞衔接器(BiTE)、抗体、抗体片段、细胞因子和引发细胞毒性T细胞应答的其他分子。

[0091] 在本公开内容的一些方面中,GAL4门能够调节多输出组合治疗。对于有效的组合治疗,可以实施另外的关键免疫调节剂(作为回路输出)。在一些实施方案中,细胞因子可用于增强免疫细胞功能;例如,IL-12可用于增强Th1应答并使得回归至抑制性肿瘤微环境。在一些实施方案中,趋化因子可用于募集免疫细胞;例如,CCL21可用于募集CCR7+T细胞群。在一些实施方案中,免疫检查点阻断抑制剂可用于增强抗癌免疫性(例如抗PD1 mAb、抗PDL1 mAb和抗CTLA4mAb)。

[0092] 此外,在一些实施方案中,抗HER2 BiTE触发T细胞以介导稳健的HER2+肿瘤杀伤和细胞因子产生。在一些实施方案中,多种STE可触发对多种类型的肿瘤细胞的T细胞杀伤。在一些实施方案中,可利用RNA AND门构造来微调STE表达水平和T细胞肿瘤杀伤效率。在一些实施方案中,在整个肿瘤群体中低比例的BiTE分泌细胞足以触发稳健的肿瘤杀伤。

[0093] 如图2A和2B所示,本文中提供的方法导致癌细胞的靶向破坏。例如,首先通过局部注射或全身性施用将肿瘤鉴定遗传回路引入肿瘤中(图2A(1)和2B(1))。然后,以遗传回路转导的肿瘤细胞展示表面T细胞衔接器(STE)并表达免疫调节分子(图2A(2))。STE接合局部肿瘤浸润性T细胞上的T细胞受体并触发T细胞以根除肿瘤细胞(图2A(3))。然后通过第一波根除释放的肿瘤抗原致敏并募集更多的肿瘤反应性T细胞(图2A(4))。新募集的多克隆T细胞根除更多的癌细胞,包括没有被第一波抗肿瘤免疫应答根除的其他异质肿瘤细胞和转移

瘤(图2A(5))。免疫记忆防止肿瘤复发。

[0094] 图3A-3D描绘了基于RNA的逻辑AND门。基于RNA的逻辑AND门整合了两个输入启动子P1和P2的活性,并且只有当两个启动子都明确有活性时才产生并输出。在这个构造中,输出是表面T细胞衔接器(STE)。启动子P1调节包含合成miRNA内含子的STE mRNA(mirFF4)的表达。通过在STE/mirFF4转录物(mirFF4-BS)的3'端编码完全匹配的mirFF4结合位点,将负向自动调节反馈环并入回路中。因此,当仅启动子P1有活性时,STE mRNA被细胞miRNA机制不断地降解,并且不产生STE蛋白(图3C,状态3)。启动子P2调节miRNA海绵的表达,所述miRNA海绵在3'端含有具有多个凸起的mirFF4结合位点的非编码RNA(诱饵)。因此,当仅启动子P2有活性时,不产生蛋白质输出(图3B,状态2)。当启动子P1和P2都具有活性时,由启动子P1调节的STE/mirFF4mRNA产生的mirFF4被由启动子P2调节的mirFF4海绵所拉出(tittered out),因此允许产生STE蛋白(图3A,状态1)。

[0095] 本公开内容的一些实施方案提供了工程改造的遗传回路,所述工程改造的遗传回路包含(a)第一核酸,其包含与以下可操作地连接的第一启动子:(i)编码含有内含子微小RNA(miRNA)的输出信使RNA(mRNA)的核苷酸序列和ii)编码与(a)(i)的miRNA互补的至少一个miRNA结合位点的核苷酸序列,以及(b)第二核酸,其包含与第一启动子不同并且与以下可操作地连接的第二启动子:编码与(a)(i)的miRNA互补的至少一个miRNA结合位点的核苷酸序列。

[0096] 在一些实施方案中,输出mRNA编码与T细胞表面标志物结合的输出蛋白。例如,输出蛋白可以是引发细胞毒性T细胞应答的蛋白。因此,输出蛋白可以是与T细胞表面上的抗原(例如,CD3抗原)结合的受体。表面标志物可以是例如CD3、CD4、CD8或CD45。其他T细胞表面标志物包括在本公开内容中。在一些实施方案中,输出蛋白是与T细胞表面抗原特异性结合的抗体或抗体片段。

[0097] 输出蛋白的具体非限制性实例描绘于图12中。“STE v1”包括用于触发T细胞的抗CD3 ϵ scFV V_L和V_H结构域。因此,在一些实施方案中,遗传回路的第一核酸包含与编码输出信使RNA(mRNA)(含有内含子微小RNA(miRNA))的核苷酸序列可操作地连接的第一启动子,所述输出信使RNA(mRNA)编码跨膜蛋白的抗CD3 ϵ scFV V_L和V_H结构域。“STE v2”包括与人IgG1-铰链-CH2-CH3结构域,之后是鼠B7.1-跨膜(TM)和细胞质(CYP)结构域融合的抗CD3 ϵ scFv。因此,在一些实施方案中,遗传回路的第一核酸包含与编码输出信使RNA(mRNA)(含有内含子微小RNA(miRNA))的核苷酸序列可操作地连接的第一启动子,所述输出信使RNA编码与人IgG1-铰链-CH2-CH3结构域、之后是鼠B7.1-跨膜和细胞质结构域融合的抗CD3 ϵ scFv。

[0098] 在一些实施方案中,输出mRNA编码趋化因子、细胞因子或检查点抑制剂。

[0099] 在一些实施方案中,第一启动子和/或第二启动子是诱导型启动子。通常,第一启动子不同于第二启动子。例如,在一些实施方案中,遗传回路中的启动子可通过存在于细胞中的不同输入信号(例如,不同的转录因子)来调节(输入1调节第一启动子,输入2调节第二启动子)。

[0100] 第一和/或第二启动子(第一启动子、第二启动子或两种启动子共同)可以是肿瘤特异性启动子(或疾病特异性启动子),这意味着它们受仅由肿瘤细胞或癌症细胞(或其他疾病细胞)表达的信号所调节或者由在肿瘤/癌细胞中表达的水平比在非肿瘤/非癌细胞中表达的水平高至少30%(例如至少40%、50%、60%、70%、80%、90%)的信号所调节。

[0101] 如本文中所提供的遗传回路的工程改造的核酸可包括miRNA结合位点。miRNA结合位点是miRNA结合的核苷酸序列(miRNA结合位点与miRNA互补)。因此,miRNA被认为与其同源的miRNA结合位点结合。工程改造的核酸可含有1至50个mirRNA结合位点。在一些实施方案中,编码诱饵分子(其功能是“吸收(soaked up)”细胞中的同源miRNA)的工程改造的核酸编码5至10个、5至20个或5至30个miRNA结合位点。在一些实施方案中,编码诱饵分子的工程改造的核酸编码5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个mRNA结合位点。在一些实施方案中,编码输出mRNA(例如,STE mRNA)的工程改造的核酸编码1至5或1至10个miRNA结合位点。在一些实施方案中,编码输出mRNA的工程改造的核酸编码1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个mRNA结合位点。通常,编码免疫调节分子的mRNA上的miRNA结合位点的数目少于诱饵RNA(例如,与编码miRNA结合位点的核酸可操作地连接的启动子,以及任选的非编码mRNA)上的miRNA结合位点的数目。miRNA的长度可能不同,并且因此同源mRNA结合位点可能不同。在一些实施方案中,miRNA的长度是15至50、15至40、15至30或15至20个核苷酸。在一些实施方案中,miRNA的长度是15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸。

[0102] 在一些实施方案中,输出蛋白是转录因子(例如,与DNA结合以控制转录速率的蛋白质)。

[0103] 工程改造的核酸和遗传回路

[0104] 本公开内容提供了能够从肿瘤/癌细胞内触发针对所述肿瘤/癌细胞和周围癌细胞的免疫治疗的工程改造的遗传回路。“遗传回路”是指在细胞中彼此相互作用以控制mRNA和蛋白质的表达的分子(例如,核酸和蛋白质,例如转录因子、辅因子和聚合酶)的集合。如本文中提供的遗传回路通常包括至少两种核酸,一种编码含有内含子微小RNA(miRNA)的输出信使RNA(mRNA),另一种编码数个miRNA结合位点。“内含子miRNA”是位于共同编码输出分子的两个外显子之间的mRNA转录物内的miRNA。内含子miRNA在转录物成熟过程中被“剪接出”mRNA转录物。例如,参考图3A,“STE-EX1-mirFF4-STE-EX2”(顶行)表示编码位于编码合成的T细胞衔接器(STE)的基因的两个外显子之间的微小RNA mirFF4的DNA序列。图3第二行中的构建体表示编码STE的mRNA转录物,其经历成熟,从而通过RNA剪接去除内含子微小RNA mirFF4。然后编码STE的成熟mRNA可被翻译以产生STE蛋白,这取决于诱饵分子(含有同源mirFF4结合位点的分子)是否存在于细胞中。

[0105] 因此,“输出信使RNA”或“输出mRNA”仅指由工程改造的核酸的特定核苷酸序列编码的mRNA。在一些实施方案中,输出mRNA(通常包括内含子微小RNA)编码与T细胞表面标志物结合的输出蛋白。在一些实施方案中,输出mRNA编码抗癌剂。“抗癌”剂是当暴露于癌细胞时可用于杀伤癌细胞或降低癌细胞的细胞分裂速率(例如至少10%、20%、30%、40%或50%)的任何物质或分子。在一些实施方案中,输出mRNA编码杀伤基因、新抗原(neoantigen)、降解代谢物(癌细胞依赖其生长和/或存活)的代谢酶、趋化因子、细胞因子或检查点抑制剂,如本文中其他地方所讨论的。其他抗癌剂包括在本公开内容中。

[0106] 本公开内容的遗传回路还可被称为“逻辑门”或起到“逻辑门”的作用,其通常具有两个输入和一个输出,尽管本公开内容也包括更多或更少的输入和/或输出。逻辑门(例如AND、OR、XOR、NOT、NAND、NOR和XNOR)可以根据“打开(ON)”状态(其中产生输出)和“关闭(OFF)”状态(其中不产生输出)来描述。对于遗传逻辑门,每个“输入”可以由独立的启动子

调节,每个启动子负责活化编码输出或调节输出分子的产生和/或表达水平的分子的核酸的转录。例如,图3A-3D描绘了AND逻辑门,包括两个构建体的遗传回路:一个由启动子P1调节,另一个由启动子P2调节。在左侧与P1连接的构建体的转录在输入1的存在下被活化,而在右侧与P2连接的构建体的转录在输入2的存在下被活化。对于该AND门,输出分子STE蛋白仅在输入1和输入2的存在下产生(图3A)。在仅输入2存在(图3B)或仅输入1存在(图3C)的情况下,不产生STE蛋白。同样,如果输入1和输入2都不可用,则不产生STE蛋白(图3D)。在仅输入1存在的情况下,产生STE mRNA转录物;然而,切除的内含子miRNA的存在阻止了STE mRNA的翻译和STE蛋白的产生(图3C)。在输入1和输入2两者都存在的情况下,仍然产生STE mRNA转录物和切除的内含子miRNA二者;然而,经切除的内含子miRNA被诱饵miRNA结合位点“吸收”,其转录被输入2活化。因此,大部分STE mRNA不含结合的miRNA并可被翻译以产生STE蛋白。

[0107] 其他逻辑门描绘于图7B-7H中。

[0108] 图7B描绘了包含以下的逻辑门:(a) 第一核酸,其包含与以下可操作地连接的启动子(P1):(i) 编码含有内含子miRNA(miRNA1)的输出mRNA(OP-EX1---OB-EX2)的核苷酸序列;(ii) 编码内含子miRNA(miRNA3)的核苷酸序列,和(iii) 编码miRNA结合位点(miRNA2-BS(P))的核苷酸序列;(b) 第二核酸,其包含与以下可操作地连接的启动子(P2):(i) 编码含有内含子miRNA(miRNA2)的输出mRNA(OP-EX1---OB-EX2)的核苷酸序列,(ii) 编码内含子miRNA(miRNA3)的核苷酸序列,和(iii) 编码miRNA-BS(miRNA1-BS(P))的核苷酸序列;以及(c) 第三核酸,其包含与编码输出蛋白(OP)的核苷酸序列可操作地连接的启动子(Ps),所述输出蛋白(OP)与miRNA-BS(miRNA3-BS(P))连接,其中miRNA1与miRNA1-BS互补并结合,miRNA3与miRNA3-BS(P)互补并结合,并且miRNA2与miRNA2-BS(P)互补并结合。

[0109] 图7C描绘了包含以下的逻辑门:(a) 第一核酸,其包含与以下可操作地连接的启动子(P1):(i) 编码含有内含子微小RNA(miRNA1)的新生RNA转录物(Nan-EX1---Nan-EX2)(例如,非编码RNA转录物或/和编码蛋白质的RNA转录物)的核苷酸序列和(ii) 编码四个miRNA结合位点(miRNA2-BS(Bx4))的核苷酸序列;(b) 第二核酸,其包含与以下可操作地连接的启动子(P2):(i) 编码含有内含子miRNA(miRNA2)的新生RNA转录物(Nan-EX1---Nan-EX2)的核苷酸序列,和(ii) 编码四个miRNA结合位点(miRNA1-BS(Bx4))的核苷酸序列;以及(c) 第三核酸,其包含与编码输出蛋白(OP)的核酸可操作地连接的启动子(Ps):所述输出蛋白(OP)与(i) 第一miRNA结合位点(miRNA1-BS(P))和(ii) 第二miRNA结合位点(miRNA2-BS(P))连接,其中miRNA1与miRNA1-BS(Bx4)互补并结合,并且miRNA2与miRNA2-BS(Bx4)互补并结合。

[0110] 图7D描绘了包含以下的逻辑门:(a) 第一核酸,其包含与编码含有内含子miRNA(miRNA1)的新生RNA转录物(Nan-EX1---Nan-EX2)的核苷酸序列可操作地连接的启动子(P1);(b) 第二核酸,其包含与编码含有内含子miRNA(miRNA2)的新生RNA转录物(Nan-EX1-Nan-EX2)的核苷酸序列可操作地连接的启动子(P2);以及(c) 第三核酸,其包含与编码输出蛋白(OP)的核酸可操作地连接的启动子(P),所述输出蛋白与(i) 第一miRNA结合位点(miRNA1-BS(P))、(ii) 第二miRNA结合位点(miRNA2-BS(P))连接,其中miRNA1与miRNA1-BS(P)互补并结合,并且miRNA2与miRNA2-BS互补并结合。

[0111] 图7E描绘了包含以下的逻辑门:(a) 第一核酸,其包含与编码含有内含子微小RNA(miRNA)的新生RNA转录物(Nan-EX1---Nan-EX2)的核苷酸序列可操作地连接的启动子

(P1) ; 和 (b) 第二核酸, 其包含与编码输出蛋白 (OP) 的核苷酸序列可操作地连接的启动子 (Ps), 所述输出蛋白与miRNA结合位点 (miRNA1-BS (P)) 连接, 其中miRNA1与miRNA-BS (P) 互补并结合。

[0112] 图7F描绘了包含以下的逻辑门: (a) 第一核酸, 其包含与以下可操作地连接的启动子 (P1): (i) 编码含有内含子miRNA (miRNA1) 的输出mRNA (OP-EX1---OP-EX2) 的核苷酸序列和 (ii) 四个miRNA结合位点 (miRNA2-BS (Bx4)); 和 (b) 第二核酸, 其包含与以下可操作地连接的启动子 (P2): (i) 编码含有内含子miRNA (miRNA2) 的输出mRNA (OP-EX1---OP-EX2) 的核苷酸序列和 (ii) 四个miRNA结合位点 (miRNA1-BS (Bx4)), 其中miRNA1与miRNA1-BS (Bx4) 互补并结合, 并且miRNA2与miRNA2-BS (Bx4) 互补并结合。

[0113] 图7G描绘了包含以下的逻辑门: (a) 第一核酸, 其包含与编码含有内含子miRNA (miRNA1) 的新生RNA转录物 (Nan-EX1---Nan-EX2) 的核苷酸序列可操作地连接的启动子 (P1); (b) 第二核酸, 其包含与编码输出蛋白 (OP) 的核苷酸序列可操作地连接的启动子 (P2); 以及 (c) 第三核酸, 其包含编码输出蛋白 (OP) 的启动子 (Ps), 所述输出蛋白与miRNA结合位点 (miRNA1-BS (P)) 连接, 其中miRNA1与miRNA1-BS (P) 互补并结合。

[0114] 图7H描绘了包含以下的逻辑门: (a) 第一核酸, 其包含与编码输出蛋白 (OP) 的核苷酸序列可操作地连接的启动子 (P1), 所述输出蛋白与miRNA结合位点 (miRNA1-BS) 连接; 和 (b) 第二核酸, 其包含与编码含有内含子miRNA (miRNA1) 的新生RNA转录物 (Nan-EX1---Nan-EX2) 的核苷酸序列可操作地连接的启动子 (P2), 其中miRNA1与miRNA1-BS (P) 互补并结合。

[0115] “核酸”是共价连接在一起的至少两个核苷酸, 并且在一些情况下, 可含有磷酸二酯键 (例如, 磷酸二酯“骨架”)。“工程改造的核酸” (也称为“构建体”) 是不天然存在的核酸。然而, 应理解, 尽管工程改造的核酸作为整体是不天然存在的, 但其可包括天然存在的核苷酸序列。在一些实施方案中, 工程改造的核酸包含来自不同生物体 (例如, 来自不同物种) 的核苷酸序列。例如, 在一些实施方案中, 工程改造的核酸包括鼠核苷酸序列、细菌核苷酸序列、人核苷酸序列和/或病毒核苷酸序列。工程改造的核酸包括重组核酸和合成核酸。“重组核酸”是通过连接核酸 (例如, 分离的核酸、合成的核酸或其组合) 而构建的分子, 并且在一些实施方案中, 其可以在活细胞中复制。“合成核酸”是通过扩增的或经化学或通过其他手段合成的分子。合成的核酸包括经化学修饰或以其他方式修饰, 但可以与天然存在的核酸分子碱基配对的的那些。重组核酸和合成核酸还包括由前述任一种的复制产生的那些分子。

[0116] 在一些实施方案中, 认为本公开内容的核酸是核酸类似物, 其可以至少部分包含其他骨架, 所述其他骨架包括例如磷酸胺、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、O-甲基亚磷酸胺键和/或肽核酸。根据指定, 核酸可以是单链 (single-stranded, ss) 或双链 (double-stranded, ds), 或者可含有单链和双链序列二者的一部分。在一些实施方案中, 核酸可含有三链序列的一部分。核酸可以是DNA (基因组DNA和/或cDNA、RNA或杂合体二者), 其中核酸含有脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸 (例如, 人造或天然的) 的任何组合, 以及碱基的任何组合, 包括尿嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶、鸟嘌呤、肌苷、黄嘌呤、次黄嘌呤、异胞嘧啶和异鸟嘌呤。

[0117] 本公开内容的核酸可包括一个或更多个遗传元件。“遗传元件”是指在核酸表达中具有作用的特定核苷酸序列 (例如启动子、增强子、终止子) 或编码工程改造的核酸的离散

产物的特定核苷酸序列(例如,编码引导RNA、蛋白质和/或RNA干扰分子(如siRNA或miRNA)的核苷酸序列)。

[0118] 可使用标准分子生物学方法(参见,例如Green and Sambrook, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2012, Cold Spring Harbor Press)生产本公开内容的核酸。

[0119] 在一些实施方案中,使用GIBSON **ASSEMBLY**®克隆(参见,例如Gibson, D.G.等. *Nature Methods*, 343-345, 2009; 和Gibson, D.G.等. *Nature Methods*, 901-903, 2010, 其各自通过引入并入本文)生产核酸。GIBSON **ASSEMBLY**®通常在单管反应中使用三种酶活性:5' 外切核酸酶、DNA聚合酶的3' 延伸活性和DNA连接酶活性。5' 外切核酸酶活性消化(chews back)5', 末端序列并暴露出用于退火的互补序列。然后聚合酶活性填补退火区域的缺口。然后DNA连接酶封闭切口并将DNA片段共价连接在一起。邻接片段的重叠序列比在Golden Gate组装中使用的序列长得多,因此导致更高百分比的正确组装。在一些实施方案中,在载体上将工程改造的核酸递送至细胞。“载体”是指用作人工携带遗传物质(例如,工程改造的核酸)到细胞中(在那里其可以例如复制和/或表达)的载体的核酸(例如DNA)。在一些实施方案中,载体是附加体型载体(episomal vector)(参见,例如, Van Craenenbroeck K.等. *Eur. J. Biochem.* 267, 5665, 2000, 其通过引用并入本文)。载体的非限制性实例是质粒(例如,图3)。质粒是能够在宿主细胞中自主复制的双链的通常为环状的DNA序列。质粒载体通常含有允许质粒在宿主中进行半独立复制的复制起点,并且还包含转基因插入物。质粒可具有更多特征,包括例如“多克隆位点”,其包括用于插入核酸插入物的核苷酸突出端和插入物两侧的多个限制性酶共有位点。载体的另一个非限制性实例是病毒载体。

[0120] 因此,在一些实施方案中,使用病毒递送系统(例如,逆转录病毒、腺病毒、腺相关、辅助依赖性腺病毒系统、混合型腺病毒系统、单纯疱疹、痘病毒、慢病毒、Epstein-Barr病毒)或非病毒递送系统(例如,物理的:裸DNA、DNA轰击、电穿孔、流体动力学、超声波或磁转染;或化学的:阳离子脂质、不同阳离子聚合物或脂质聚合物)(Nayerossadat N等. *Adv Biomed Res.* 2012;1:27, 其通过引用并入本文)将工程改造的遗传回路递送至细胞(例如,癌细胞)。在一些实施方案中,基于非病毒的递送系统是基于水凝胶的递送系统(参见,例如, Brandl F等, Brandl F,等. *Journal of Controlled Release*, 2010, 142(2):221-228, 其通过引用并入本文)。

[0121] 微小RNA(“miRNA”)是在植物、动物和一些病毒中发现的小的非编码RNA分子(例如,含有约22个核苷酸),其通常在野生型条件下在RNA沉默和基因表达的转录后调节中发挥作用。

[0122] 遗传元件

[0123] 工程改造的核酸的表达由与核酸(其含有例如编码目的分子的核酸)可操作地连接的启动子驱动。“启动子”是指核酸序列的控制区域,在该处控制核酸序列的其余部分之转录的起始和速率。启动子驱动所调节的核酸序列的表达或驱动其转录。启动子还可含有调节蛋白和分子可结合的亚区,例如RNA聚合酶和其他转录因子。启动子可以是组成型的、诱导型的、可活化的、可阻抑的、组织特异性的或其任何组合。

[0124] 本文中,当启动子相对于其调节以控制(“驱动”)该序列的转录起始和/或表达的

核酸序列处于正确的功能位置和方向时,则认为启动子是“可操作地连接的”。

[0125] 启动子可以是与基因或序列天然缔合的启动子,如可通过分离位于给定基因或序列的编码区段上游的5'非编码序列来获得的。这样的启动子可被称为“内源的”。

[0126] 在一些实施方案中,编码核酸序列可位于重组或异源启动子的控制下,所述启动子是指在其天然环境中通常不与编码序列缔合的启动子。这样的启动子可包括其他基因的启动子;从任何其他细胞分离的启动子;以及不是“天然存在”的合成的启动子或增强子,例如,含有不同转录调节区的不同元件和/或通过本领域已知的遗传工程方法改变表达的突变的那些。除了经合成产生启动子和增强子的核酸序列之外,可以使用重组克隆和/或核酸扩增技术(包括聚合酶链式反应(PCR)(参见,美国专利No.4,683,202和美国专利No.5,928,906)来产生序列。

[0127] 在一些实施方案中,启动子是“诱导型启动子”,其是指特征在于当诱导物信号存在、受其影响或与其接触时调节(例如启动或活化)转录活性的启动子。诱导物信号可以是内源的或正常的外源条件(例如,光)、化合物(例如,化学或非化学化合物)或蛋白质,其以这样的方式与诱导型启动子接触,从而具有活性以从诱导型启动子调节转录活性。因此,核酸的“调节转录的信号”是指作用于诱导型启动子的诱导物信号。调节转录的信号可以使转录活化或失活,这取决于所使用的调节系统。转录的活化可涉及直接作用于启动子以驱动转录,或通过使阻遏物(其阻止启动子驱动转录)失活而间接作用于启动子。相反地,转录的失活可能涉及直接作用于启动子以阻止转录或通过活化阻遏物(阻遏物然后作用于启动子)而间接作用于启动子。

[0128] 诱导物信号的施加或去除导致对可操作地连接的核酸序列的转录的活化和失活之间的转换。因此,与核酸序列可操作地连接的启动子的活性状态是指启动子主动调节核酸序列转录时(即,表达连接的核酸序列)的状态。相反,与核酸序列可操作地连接的启动子的失活状态是指启动子不主动调节核酸序列的转录时(即,不表达连接的核酸序列)的状态。

[0129] 本公开内容的诱导型启动子可通过一种或更多种生理条件,例如光、pH、温度、辐射、渗透压、生理盐水梯度、细胞表面结合以及一种或更多种外在或内在诱导剂的浓度的变化来诱导(或抑制)。外来诱导物信号或诱导剂可包括但不限于:氨基酸和氨基酸类似物、糖和多糖、核酸、蛋白质转录活化剂和阻遏物、细胞因子、毒素、基于石油的化合物、含金属化合物、盐、离子、酶底物类似物、激素或其组合。

[0130] 本公开内容的诱导型启动子包括本文中描述的或本领域普通技术人员已知的任何诱导型启动子。诱导型启动子的实例包括但不限于:化学/生物化学调节的和物理调节的启动子,例如醇调节启动子、四环素调节启动子(例如,脱水四环素(aTc)响应启动子和其他四环素响应启动子系统,其包括四环素阻遏物蛋白(tetR)、四环素操纵子基因序列(tetO)和四环素反式活化因子融合蛋白(tTA))、甾类化合物调节的启动子(例如,基于大鼠糖皮质激素受体的启动子、人雌激素受体、蛾蝇皮激素受体以及来自甾类化合物/类维生素A/甲状腺受体超家族的启动子)、金属调节的启动子(例如衍生自酵母、小鼠和人的金属硫蛋白(结合并螯合金属离子的蛋白)基因的启动子),发病原调节的启动子(通过水杨酸、乙烯或苯并噻二唑(BTH)诱导的)、温度/热诱导型启动子(例如,热激启动子)和光调节的启动子(例如,来自植物细胞的光响应启动子)。

[0131] 在一些实施方案中,本公开内容的诱导物信号是异丙基 β -D-1-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG),其是异乳糖的分子模拟物、一种触发lac操纵子的转录的乳糖代谢物,因此其用于诱导蛋白质(其中基因在lac操纵子的控制下)的表达。IPTG与lac阻遏物结合并以变构方式从lac操纵子释放四聚体阻遏物,由此允许转录lac操纵子中的基因,例如编码 β -半乳糖苷酶(一种催化 β 半乳糖苷转化成单糖的水解酶)的基因。硫(S)原子产生不能被细胞水解的化学键,防止细胞代谢或降解诱导物。IPTG是蛋白质表达的有效诱导剂,例如,在100 μ M至1.0mM的浓度范围。使用的浓度取决于所需诱导的强度,以及使用的细胞或质粒的基因型。如果存在lacIq(一种过度产生lac阻遏物的突变体),则可能需要更高浓度的IPTG。在蓝白筛选中,IPTG与X-gal一起使用。蓝白筛选允许在克隆实验中鉴定已用重组质粒而不是以非重组质粒转化的克隆。

[0132] 其他诱导型启动子系统是本领域已知的并且可以根据本公开内容使用。

[0133] 免疫调节剂

[0134] 免疫调节剂是调节免疫应答的物质(例如,蛋白质)。在一些实施方案中,本公开内容提供了工程改造的遗传回路,其包括编码在癌细胞表面表达或由癌细胞分泌或从癌细胞分泌的免疫调节剂的核酸。

[0135] 在一些实施方案中,免疫调节剂是合成的T细胞衔接器(STE)。“合成的T细胞接合器”是与T细胞(例如,细胞毒性T细胞)表面上的分子结合(例如,通过配体-受体结合相互作用)或以其他方式引发细胞毒性T细胞应答的分子(例如,蛋白质)。在一些实施方案中,STE是与T细胞表面上的配体结合的受体。在一些实施方案中,STE是抗CD3抗体或抗体片段。本公开内容的STE通常在癌细胞或其他疾病细胞的表面上表达或由癌细胞或其他疾病细胞分泌(编码STE的核酸被递送至所述癌细胞或其他疾病细胞)。

[0136] 本公开内容的STE的实例包括与T细胞表面抗原结合的抗体、抗体片段和受体。T细胞表面抗原包括例如CD3、CD4、CD8和CD45。由本公开内容的遗传回路表达的STE也可选自下文所述的任何免疫调节剂。

[0137] 在一些实施方案中,本公开内容的遗传回路调节趋化因子、细胞因子或检查点抑制剂的表达。

[0138] 免疫调节剂包括免疫刺激剂和免疫抑制剂。如本文中使用的免疫刺激剂是在其施用的对象中刺激免疫应答(包括增强预先存在的免疫应答)的试剂,无论是单独还是与另一种试剂组合。实例包括抗原、佐剂(例如,TLR配体例如咪喹莫特、咪唑并喹啉,包含未甲基化CpG二核苷酸的核酸、单磷酸脂质A或其他脂多糖衍生物、单链或双链RNA、鞭毛蛋白、胞壁酰二肽)、细胞因子包括白细胞介素(例如,IL-2、IL-7、IL-15/或这些细胞因子的超激动剂/突变体形式)、IL-12、IFN- γ 、IFN- α 、GM-CSF、FLT3-配体等)、免疫刺激抗体(例如,这些分子的抗CTLA-4、抗CD28、抗CD3或单链/抗体片段)等。

[0139] 如本文中使用的免疫抑制剂是在其施用的对象中抑制免疫应答的试剂,无论是单独施用还是与其他试剂组合施用。实例包括甾类化合物、视黄酸、地塞米松、环磷酰胺、抗CD3抗体或抗体片段以及其他免疫抑制剂。

[0140] 抗原可以是但不限于:癌抗原、自身抗原、微生物抗原、过敏原或环境抗原。抗原在性质上可以是肽、脂质或碳水化合物,但不限于此。

[0141] 癌抗原是优先由癌细胞表达的抗原(例如,在癌细胞中比在非癌细胞中以更高的

水平表达),并且在某些情况下,其仅由癌细胞表达。癌抗原可以在癌细胞内或在癌细胞的表面上表达。癌抗原可以是MART-1/Melan-A、gp100、腺苷脱氨酶结合蛋白(ADAbp)、FAP、亲环蛋白b、结直肠相关抗原(CRC)--C017-1A/GA733、癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)、CAP-1、CAP-2、etv6、AML1、前列腺特异性抗原(prostate specific antigen, PSA)、PSA-1、PSA-2、PSA-3、前列腺特异性膜抗原(prostate-specific membrane antigen, PSMA)、T细胞受体/CD3- ζ 链和CD20。癌抗原可以选自:MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-Xp2 (MAGE-B2)、MAGE-Xp3 (MAGE-B3)、MAGE-Xp4 (MAGE-B4)、MAGE-C1、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-C4、MAGE-C5)。癌抗原可以选自:GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8、GAGE-9。癌抗原可以选自:BAGE、RAGE、LAGE-1、NAG、GnT-V、MUM-1、CDK4、酪氨酸酶、p53、MUC家族、HER2/neu、p21ras、RCAS1、 α -胎蛋白、E-钙粘蛋白、 α -连环蛋白、 β -连环蛋白、 γ -连环蛋白、p120ctn、gp100Pmel117、PRAME、NY-ESO-1、cdc27、腺瘤性结肠息肉蛋白(adenomatous polyposis coli protein, APC)、胞衬蛋白、连接蛋白37、Ig-独特型(idiotype)、p15、gp75、GM2神经节苷脂、GD2神经节苷脂、人乳头瘤病毒蛋白、肿瘤抗原的Smad家族、lmp-1、P1A、EBV编码的核抗原(EBNA)-1、脑糖原磷酸化酶、SSX-1、SSX-2 (HOM-MEL-40)、SSX-1、SSX-4、SSX-5、SCP-1和CT-7、CD20以及c-erbB-2。

[0142] 细胞和细胞表达

[0143] 本公开内容的工程改造的遗传回路通常在特定细胞类型(例如癌细胞、良性肿瘤细胞或者其他疾病细胞)中被有条件地(基于输入信号的存在或不存在)全身性递送并活化(活化回路的转录)。因此,在一些实施方案中,遗传回路(逻辑门)被递送至具有肿瘤细胞或癌细胞的对象,并且遗传回路(逻辑门)在肿瘤细胞或癌细胞中表达。

[0144] 癌性细胞可以是任何类型的癌性细胞,包括但不限于:恶化前的赘生物(neoplasm)、恶性肿瘤、转移瘤或以不受控制的细胞生长为特征以使得其被视为癌性或癌前病变性的任何疾病或病症。癌症可以是原发性癌或转移性癌。癌症包括但不限于:眼癌、胆道癌、膀胱癌、胸膜癌、胃癌、卵巢癌、脑膜癌、肾癌、脑癌(包括成胶质细胞瘤和成神经管细胞瘤)、乳腺癌、宫颈癌、绒毛膜癌、结肠癌、子宫内膜癌、食管癌、胃癌、血液肿瘤(包括急性淋巴细胞和髓性白血病)、多发性骨髓瘤、AIDS相关白血病和成人T细胞白血病淋巴瘤、上皮内瘤(包括博文氏病和佩吉特氏病)、肝癌、肺癌、淋巴瘤(包括霍奇金病和淋巴细胞性淋巴瘤)、成神经细胞瘤、口腔癌(包括鳞状细胞癌)、卵巢癌(包括来自上皮细胞、基质细胞、生殖细胞和间充质细胞的那些)、胰腺癌、前列腺癌、直肠癌、肉瘤(包括平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、脂肪肉瘤、纤维肉瘤和骨肉瘤)、皮肤癌(包括黑色素瘤、卡波西肉瘤、基底细胞癌和鳞状细胞癌)、睾丸癌(包括生殖性肿瘤例如精原细胞瘤、非精原细胞瘤)、畸胎瘤、绒毛膜癌、基质瘤和生殖细胞瘤、甲状腺癌(包括甲状腺腺癌和髓质癌)以及肾癌(包括腺癌和韦尔姆斯氏瘤)。常见的癌症包括乳腺癌、前列腺癌、肺癌、卵巢癌、结直肠癌和脑癌。在一些实施方案中,肿瘤是黑素瘤、癌、肉瘤或淋巴瘤。

[0145] 本公开内容的工程改造的核酸可以在宽范围的宿主细胞类型中表达。在一些实施方案中,工程改造的核酸在哺乳动物细胞(例如,人细胞)、细菌细胞(大肠杆菌(*Escherichia coli*)细胞)、酵母细胞、昆虫细胞或其他类型的细胞中表达。本公开内容的工程改造的核酸可以在对象(例如人对象)中在体内表达。

[0146] 在一些实施方案中,工程改造的核酸在哺乳动物细胞中表达。例如,在一些实施方案中,工程改造的核酸在人细胞、灵长类细胞(例如,vero细胞)、大鼠细胞(例如GH3细胞、OC23细胞)或小鼠细胞(例如,MC3T3细胞)中表达。有多种人细胞系,包括但不限于:人胚胎肾(human embryonic kidney,HEK)细胞、HeLa细胞、来自国家癌症研究所的60个癌细胞系(NCI60)的癌细胞、DU145(前列腺癌)细胞、Lncap(前列腺癌)细胞、MCF-7(乳腺癌)细胞、MDA-MB-438(乳腺癌)细胞、PC3(前列腺癌)细胞、T47D(乳腺癌)细胞、THP-1(急性骨髓性白血病)细胞、U87(胶质母细胞瘤)细胞、SHSY5Y人成神经细胞瘤细胞(从骨髓瘤克隆)和Saos-2(骨癌)细胞。在一些实施方案中,工程改造的核酸在人胚胎肾(HEK)细胞(例如,HEK 293或HEK 293T细胞)中表达。在一些实施方案中,工程改造的核酸在干细胞(例如,人干细胞)例如多能干细胞(例如,人多能干细胞,包括人诱导多能干细胞(human induced pluripotent stem cell,hiPSC))中表达。“干细胞”是指具有在培养物中无限期分裂并产生特化细胞的能力的细胞。“多能干细胞”是指能够分化成生物体的所有组织但不能单独维持全部的生物体发育的一类干细胞。“人诱导多能干细胞”是指通过强制表达维持胚胎干细胞定义性质的重要基因和因子,从而已经重编程为胚胎干细胞样状态的体(例如,成熟或成人的)细胞(参见,例如Takahashi和Yamanaka,Cell 126(4):663-76,2006,其通过引用并入本文)。人诱导多能干细胞表达干细胞标志物并且能够产生所有三个胚层(外胚层、内胚层、中胚层)的细胞特征。

[0147] 可以根据本公开内容使用的细胞系的另外的非限制性实例包括293-T、293-T、3T3、4T1、721、9L、A-549、A172、A20、A253、A2780、A2780ADR、A2780cis、A431、ALC、B16、B35、BCP-1、BEAS-2B、bEnd.3、BHK-21、BR 293、BxPC3、C2C12、C3H-10T1/2、C6、C6/36、Ca1-27、CGR8、CHO、CML T1、CMT、COR-L23、COR-L23/5010、COR-L23/CPR、COR-L23/R23、COS-7、COV-434、CT26、D17、DH82、DU145、DuCaP、E14Tg2a、EL4、EM2、EM3、EMT6/AR1、EMT6/AR10.0、FM3、H1299、H69、HB54、HB55、HCA2、Hepa1c1c7、High Five细胞、HL-60、HMEC、HT-29、HUVEC、J558L细胞、Jurkat、JY细胞、K562细胞、KCL22、KG1、Ku812、KY01、LNCap、Ma-Me1 1、2、3...48、MC-38、MCF-10A、MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-435、MDA-MB-468、MDCK II、MG63、MONO-MAC 6、MOR/0.2R、MRC5、MTD-1A、MyEnd、NALM-1、NCI-H69/CPR、NCI-H69/LX10、NCI-H69/LX20、NCI-H69/LX4、NIH-3T3、NW-145、OPCN/OPCT Peer、PNT-1A/PNT 2、PTK2、Raji、RBL细胞、RenCa、RIN-5F、RMA/RMAS、S2、Saos-2细胞、Sf21、Sf9、SiHa、SKBR3、SKOV-3、T-47D、T2、T84、THP1、U373、U87、U937、VCaP、WM39、WT-49、X63、YAC-1和YAR细胞。

[0148] 在一些实施方案中,本公开内容的细胞是经修饰的。经修饰细胞是含有外源核酸或天然不存在的核酸的细胞。在一些实施方案中,经修饰的细胞含有在基因组核酸中的突变。在一些实施方案中,经修饰的细胞含有外源独立复制核酸(例如,存在于附加载体上的工程改造的核酸)。在一些实施方案中,通过将外来或外源核酸引入细胞来产生经修饰的细胞。可通过常规方法将核酸引入细胞,例如电穿孔(参见,例如,Heiser W.C. Transcription Factor Protocols: Methods in Molecular Biology™2000;130:117-134,化学方法(例如,磷酸钙或脂质)转染(参见,例如,Lewis W.H.,等,Somatic Cell Genet.1980年5月;6(3):333-47;Chen C.,等,Mol Cell Biol.1987年8月;7(8):2745-2752),与含有重组质粒的细菌原生质体融合(参见,例如,Schaffner W.Proc Natl Acad Sci USA.1980年4月;77(4):2163-7)、转导、缀合或者将DNA直接显微注射到细胞的细胞核

中(参见,例如,Capecci M.R.Cell.1980年11月;22(2Pt 2):479-88)。

[0149] 在一些实施方案中,细胞被修饰成表达报道分子。在一些实施方案中,细胞被修饰成表达与报道分子(例如,荧光蛋白,例如绿色荧光蛋白(GFP)或其他报道分子)可操作地连接的诱导型启动子。

[0150] 在一些实施方案中,细胞被修饰成过表达目的内源蛋白(例如,通过在编码目的蛋白的内源基因附近引入或修饰启动子或其他调节元件以提高其表达水平)。在一些实施方案中,通过诱变来修饰细胞。在一些实施方案中,通过将工程改造的核酸引入细胞中来修饰细胞以产生目的遗传变化(例如,通过插入或同源重组)。

[0151] 在一些实施方案中,工程改造的核酸可以是密码子优化的,例如用于在哺乳动物细胞(例如,人细胞)或其他类型的细胞中表达。密码子优化是通过将一个物种的核苷酸的DNA序列转化成另一个物种的核苷酸的DNA序列来提高目的基因的翻译效率以使得活生物体中的蛋白质表达最大化的技术。密码子优化的方法是公知的。

[0152] 本公开内容的工程改造的核酸可瞬时表达或稳定地表达。“瞬时细胞表达”是指核酸未整合到细胞的核基因组中的细胞的表达。相比之下,“稳定的细胞表达”是指核酸在细胞核基因组及其子细胞中保留的细胞的表达。通常,为了实现稳定的细胞表达,将细胞与标志物基因和旨在在细胞中稳定表达的外源核酸(例如,工程改造的核酸)共转染。标志物基因给予细胞一些可选的优点(例如,对毒素、抗生素或其他因子的抗性)。很少的经转染细胞会偶然地将外源核酸整合到其基因组中。例如,如果之后将毒素添加到细胞培养物中,那么只有少数具有毒素抗性的标志物基因整合到其基因组中的细胞才能够增殖,而其他细胞则会死亡。在施加该选择压力一段时间之后,只有具有稳定转染的细胞保留下来,并且可以进一步培养。根据本公开内容使用的标志物基因和选择剂的实例包括但不限于:二氢叶酸还原酶与甲氨蝶呤、谷氨酰胺合成酶与甲硫氨酸砒亚胺(methionine sulphoximine)、潮霉素磷酸转移酶与潮霉素、嘌呤霉素N-乙酰转移酶与嘌呤霉素,以及新霉素磷酸转移酶与遗传霉素,也被称为G418。在本文中还可构想其他标志物基因/选择剂。

[0153] 在瞬时转染和/或稳定转染的细胞中核酸的表达可以是组成型或诱导型的。以上描述了如本文所提供的诱导型启动子。

[0154] 本公开内容的一些方面提供了包含1至10种工程改造的核酸的细胞。在一些实施方案中,细胞包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10种或更多种工程改造的核酸。应理解,“包含工程改造的核酸”的细胞是包含工程改造的核酸的拷贝(多于一个)的细胞。因此,“包含至少两种工程改造的核酸”的细胞是包含第一工程改造的核酸的拷贝和第二工程改造的核酸的拷贝的细胞,其中第一工程改造的核酸不同于第二工程改造的核酸。就例如序列组成(例如,核苷酸的类型、数目和排列)、长度或序列组成和长度的组合而言,两种工程改造的核酸可以彼此不同。例如,相同细胞中两种工程改造的核酸的SDS序列可能彼此不同。

[0155] 本公开内容的一些方面提供了包含1至10个附加载体或更多附加载体的细胞,每个载体包含例如工程改造的核酸。在一些实施方案中,细胞包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个载体。

[0156] 在一些方面,本文中还提供了包括将(例如,至少一种、至少两种、至少三种或更多种)工程改造的核酸或附加型载体(例如,包含工程改造的核酸)引入细胞中的方法。如本文其他地方所讨论的,可以通过常规方法将工程改造的核酸引入细胞中,例如电穿孔、化学

(例如,磷酸钙或脂质)转染、与含有重组质粒的细菌原生质体融合、转导、缀合或者将纯化的DNA直接显微注射到细胞的细胞核中。

[0157] 体内递送

[0158] 可通过本领域已知的任何体内递送方法将本公开内容的工程改造的核酸递送至对象(例如,哺乳动物对象,例如人对象)。例如,工程改造的核酸可以经静脉内递送。在一些实施方案中,工程改造的核酸在递送载体(例如,非脂质体纳米颗粒或脂质体)中递送。在一些实施方案中,将工程改造的遗传回路全身地递送至患有癌症或其他疾病的对象,并且其在对象的癌细胞或患病细胞中被特异性地活化(活化转录)。

[0159] 如上文所讨论的,工程改造的遗传回路可以使用病毒递送系统(例如,逆转录病毒、腺病毒、腺相关、辅助依赖性腺病毒系统、混合型腺病毒系统、单纯疱疹、痘病毒、慢病毒、Epstein-Barr病毒)或非病毒递送系统(例如,物理的:裸DNA、DNA轰击、电穿孔、流体动力学、超声波或磁转染;或化学的:阳离子脂质、不同阳离子聚合物或脂质聚合物)(Nayerossadat N等,Adv BiomedRes.2012;1:27,其通过引用并入本文)将工程改造的遗传回路递送至对象的细胞(例如,癌细胞)。在一些实施方案中,基于非病毒的递送系统是基于水凝胶的递送系统(参见,例如,Brandl F等,Journal of Controlled Release,2010,142(2):221-228,其通过引用并入本文)。

[0160] 合成的启动子库

[0161] 提供了包含多个核酸的合成的启动子文库,其中文库中的每个核酸包含合成的启动子序列。提供了用于合成的启动子文库的三种设计。在两种设计(“设计1”和“设计2”)中,文库的启动子序列包含串联(头对尾)连接的8聚体核苷酸序列。在这些设计之一(“设计2”)中,将3聚体核苷酸间隔物置于每对8聚体核苷酸序列之间。在第三种设计(“设计3”)中,文库的核酸序列包含串联(头对尾)连接的11聚体核苷酸序列,在每对11聚体核苷酸序列之间设置有3聚体核苷酸间隔物。

[0162] 串联的8聚体或11聚体核苷酸序列的数目可以是至少:2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个8聚体或11聚体核苷酸序列。核酸中每个8聚体或11聚体核苷酸序列的序列可以是随机的(即,序列NNNNNNNN,其中每个N表示任意核苷酸),并且任何核酸中的8聚体或11聚体核苷酸序列可以是随机选择的,使得启动子文库中的多个核酸代表文库所选择的核酸的基本上所有可能的序列或所有可能的序列长度。或者,如果特定的核苷酸序列或组成(例如,嘧啶含量)是有利的或需要的,或不利的或要避免的,则可将8聚体或11聚体核苷酸序列设计成在某些位置具有如所期望的某些核苷酸或某些核苷酸含量。在这样的情况下,启动子文库中的多个核酸代表所有可能序列的选定子集。

[0163] 在一些实施方案中,将限定序列的核苷酸间隔物置于每个8聚体或11聚体核苷酸序列之间。核苷酸间隔物优选是3聚体核苷酸,但也可以使用其他长度的间隔物,例如1、2、4或5个核苷酸。在一些实施方案中,3聚体核苷酸间隔物选自:AGC、ATC、GAC、ACT、AGT、GTC、GAT和GCT。在一些实施方案中,文库中的核酸中使用的每个核苷酸间隔物不同于相同核酸中的其他核苷酸间隔物。

[0164] 在一些实施方案中,合成的启动子文库中的核酸在5'和3'端还包含限制性内切核酸酶位点。在一些实施方案中,5'末端的限制性内切核酸酶位点是SbfI位点,3'末端的限制性内切核酸酶位点是AscI位点。也可以使用其他限制性内切核酸酶位点。

[0165] 在一些实施方案中,合成的启动子文库中的每个核酸还包含编码输出分子的核苷酸序列,其与启动子序列可操作地连接。在一些实施方案中,输出分子是可检测的分子,例如荧光或有色蛋白质(例如,mKate2)、酶或本领域已知的任何其他类型的可检测的核酸或多肽。

[0166] 在选择合成的启动子的方法中可使用合成的启动子文库。该方法包括获得包含核酸分子的文库,所述核酸分子含有与输出分子可操作地连接的合成的启动子序列;在一种或更多种类型的细胞中表达文库;检测输出分子的表达;以及分离其中表达输出分子的细胞。任选地,该方法还包括确定分离的细胞中合成的启动子序列的序列。

[0167] 在一些实施方案中,一种或更多种类型的细胞是至少两种不同类型的细胞,例如癌细胞和匹配的非癌细胞,例如卵巢癌细胞和卵巢细胞,或乳腺癌细胞和乳腺细胞等。

[0168] 通过比较驱动至少两种不同类型的细胞的每种中的输出分子的表达的合成的启动子序列,鉴定在至少两种不同类型的细胞的一种中比在至少两种不同类型的细胞的另一种中更具活性的合成的启动子序列。因此,如果至少两种不同类型的细胞是癌细胞和非癌细胞,则可以鉴定在癌细胞中有活性而在非癌细胞中无活性的启动子,反之亦然。

[0169] “在至少两种不同类型的细胞的一种中比在至少两种不同类型的细胞的另一种中更具活性”是指在两种类型的细胞的一种中启动子具有至少10%、50%、100%、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、500倍或1000倍(或甚至更高)更高的活性。例如,通过这些方法从文库中分离的合成的启动子可以在一种类型的细胞中基本无活性并且在另一类型的细胞中有活性,这提供了细胞类型特异性的合成的启动子。

实施例

[0170] 实施例1

[0171] 使用两种人启动子作为用于在该实施例中使用的工程改造的遗传回路的启动子输入。这些人启动子SSX1(输入1)和H2A1(输入2)在许多人癌症中是过表达的(输入1编码包含间插mirFF4的mKate2输出)(图4A)。相对于(a)输入1(mK2下游)中编码的完全匹配mirFF4结合位点(FF4-BS)的数目和(b)输入2中的“海绵”构建体的两种不同配置,测量不同回路配置的mKate2输出水平。图4B,x轴注释:M#代表输入1具有的在mKate2/mirFF4下游编码的mirFF4结合位点(FF4-BS)的数目。例如,M3代表输入1具有3个完全匹配mirFF4结合位点(FF4-BS)(图4A)。S0、S1和S2代表三种不同海绵/输入2配置。S0为不具有mirFF4结合位点的阴性对照转录物。S1为具有在构建体3'端编码的10个凸起mirFF4结合位点的诱饵转录物(Decoy transcript)(图4A)。S2与S1相似,但是具有额外的环状内含子,具有位于在构建体3'端编码的10个凸起mirFF4-BS的上游的10个凸起FF4-BS。图4A中描绘的工程改造的遗传回路(逻辑门)对应于图4B中的M3-S1(通过虚线框突出显示)。结果以平均mKate2表达(P1)表示,其是在FACS中对SSC/FSC设门以除去细胞块和碎片的细胞的平均mKate2。误差条代表SEM。NT代表未经转染的细胞。

[0172] 用ECFP标记重复实验(图5)。

[0173] 实施例2

[0174] 该实施例中描述的工程改造的遗传回路(G5)是基于实施例1中描述的编码mKate2

的回路(AND门),不同之处在于AND门产物不是mKate2,而是合成转录因子(在图6A中注释为“TF”)。尽管TF可以为任何转录活化剂,例如rtTA3、TALE-TF和ZF-TF,但是在该实施例中,TF为融合蛋白GAL4BD-VP16AD(与病毒VP16转录活化结构域融合的酵母GAL4 DNA结合结构域)。或者,这也可以是转录阻遏物,例如GAL4BD-KRAB。因为输出是转录因子而不是报道子/效应蛋白,故它可以调节在TF靶启动子的下游编码的多个输出的表达。在该实施例中,靶启动子(被注释为P3)为由具有5个上游GAL4DNA结合位点的最小病毒或人启动子组成的合成G5启动子。该合成的启动子的I/O曲线可以用GAL4结合位点的数量调整。因此,任何多个输出之间的比例以及每个输出的活化阈值可以通过合成P3启动子中的GAL4结合位点的数目确定。

[0175] 图6B示出了实验结果。CXCL10为调节含有mirFF4v2B内含子和10个下游mirFF4-Bs的GAL4BD-VP16AD的CXCL1p。SSX10为调节含有mirFF4v2B内含子和10个下游mirFF4-Bs的GAL4BD-VP16AD的SSX1p。SSX*10为调节含有mirFF4v2B内含子和10个下游mirFF4-Bs的GAL4BD-VP16AD的截短SSX1p,其中5' UTR的一部分与KOZAK序列一起被除去。海绵S0为阴性对照转录物mirFF4-BS。海绵S2为具有额外的环状内含子的具有在3' 端上编码的10个凸起FF4-BS的诱饵转录物,该环状内含子具有位于在转录物3' 中编码的10个凸起mirFF4-BS的上游的10个凸起mirFF4-BS。在所有样品中,在G5p下编码mKate2输出。

[0176] 实施例3. BiTE和STE触发稳健的肿瘤杀伤

[0177] HEK-293T细胞

[0178] 抗HER2双特异性T细胞衔接器(BiTE)和表面T细胞衔接器(STE)触发T细胞以介导稳健的肿瘤杀伤和IFN- γ 分泌(图8)。用所示的多种DNA构建体转染HEK-293T(最低限度表达HER2)细胞。转染后48小时,收集多种HEK-293T细胞并与人T细胞共培养5小时或24小时。通过乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)释放测定法测量T细胞的5小时细胞毒性(Korzeniewski C和Callewaert DM, Journal of Immunological Methods, 1983, 64(3): 313-320, 通过引用并入本文),并且通过IFN- γ ELISA测量T细胞的24小时IFN- γ 分泌。数据表明T细胞介导了对BiTE分泌性肿瘤细胞的稳健的肿瘤杀伤和IFN- γ 分泌(第1组至第2组)。肿瘤杀伤和IFN- γ 分泌与肿瘤细胞上的HER2表达水平相关(第1组至第2组)。T细胞还介导了对STE表达性肿瘤细胞的稳健的肿瘤杀伤和IFN- γ 分泌(第3组至第6组),并且细胞毒性和IFN- γ 分泌不依赖于肿瘤抗原(HER2)表达(第3组至第6组)。此外,当与表达非BiTE和非STE对照蛋白的HEK-293T细胞共培养时,T细胞介导最低的肿瘤杀伤和IFN- γ 分泌(第7组至第9组)。

[0179] 稳定的4T1细胞

[0180] 将表达指示DNA构建体(STRICT017 +018)的稳定4T1细胞(HER2-)与人T细胞共培养5小时或24小时(图10)。LDH释放测定法测量T细胞的5小时细胞毒性,并且通过IFN- γ ELISA测量T细胞的24小时IFN- γ 分泌(图10A)。数据表明T细胞介导了对HER2-或STE-肿瘤细胞的最低的杀伤和IFN- γ 分泌(第1组和第3组)。T细胞介导了对STE表达性肿瘤细胞的稳健的肿瘤杀伤和IFN- γ 分泌(第2组)。当与由少量BiTE分泌细胞和非BiTE分泌肿瘤组成的细胞混合物共培养时,T细胞也介导了稳健的肿瘤杀伤和IFN- γ 分泌。这表明肿瘤块中最低量的BiTE分泌细胞可以引起稳健的肿瘤块杀伤和IFN- γ 释放(第4组)。

[0181] 稳定的HEK-293T细胞

[0182] 将表达指示DNA构建体的稳定HEK-293T细胞(最低限度表达HER2)与人T细胞共培养5小时或24小时。通过LDH释放测定测量T细胞的5小时细胞毒性,并且通过IFN- γ ELISA测量T细胞的24小时IFN- γ 分泌(图10B)。数据表明T细胞介导了对BiTE-或STE-肿瘤细胞的最低的杀伤和IFN- γ 分泌(第4组)。T细胞介导了对BiTE分泌性肿瘤细胞的稳健的细胞毒性和IFN- γ 分泌(第1组)。T细胞也介导了对STE表达性肿瘤细胞的稳健的细胞毒性和IFN- γ 分泌(第2组和第3组)。此外,当与由少量BiTE分泌细胞和非BiTE分泌性肿瘤细胞组成的细胞混合物共培养时,T细胞也介导了稳健的肿瘤杀伤和IFN- γ 分泌。这表明肿瘤块中最低量的BiTE分泌细胞可引起稳健的肿瘤块杀伤和IFN- γ 释放(第5组和第6组)。

[0183] 稳定的MDA-MB452 (HER2+) 细胞(人乳腺癌细胞系)

[0184] 抗HER2双特异性T细胞衔接器(BiTE)和表面T细胞衔接器(STE)触发T细胞介导对人乳腺癌细胞系的稳健的肿瘤杀伤(图11)。通过用所示的多种DNA构建体(STRICT034、035)的慢病毒转导产生了稳定的MDA-MB453 (HER2+) 细胞系。使用供体#2T细胞。E:T比为10:1; 6×10^5 : 6×10^4 。收集多种MDA-MB453细胞并与人T细胞共培养5小时。通过LDH释放测定测量T细胞的5小时细胞毒性。数据表明T细胞介导了对BiTE分泌性肿瘤细胞的稳健的肿瘤杀伤(第2组)。T细胞还介导了对STE表达性肿瘤细胞的稳健的肿瘤杀伤(第3组至第4组)。此外,当与亲本MDA-MB453肿瘤细胞系共培养时,T细胞介导了最低的肿瘤杀伤(组1)。

[0185] 实施例4. T细胞有效杀伤多西环素诱导的STE表达细胞

[0186] 表面T细胞衔接器(STE)形式1(v1)和形式2(v2)二者都触发T细胞介导对HEK-293T细胞的稳健的肿瘤杀伤(图13)。通过慢病毒转导产生了多种诱导型STE表达性HEK-293T细胞系。收集多种HEK-293T细胞并与人T细胞共培养5小时。通过LDH释放测定测量T细胞的5小时细胞毒性。数据表明T细胞介导了对经转染的STE_{v1}表达性肿瘤细胞的稳健的肿瘤杀伤(第2列)。T细胞也介导了对诱导型STE_{v1}和STE_{v2}表达性肿瘤细胞的稳健的肿瘤杀伤(第3列和第4列)。此外,当与非STE表达性HEK-293T细胞系共培养时,T细胞介导最低的肿瘤杀伤(第1列)。

[0187] 实施例5: T细胞对肿瘤细胞的杀伤效率的提高

[0188] HEK-293T细胞

[0189] 利用AND门构造提高T细胞对肿瘤细胞的杀伤效率(图9)。用所示的多种DNA构建体(STRICT014)(图9A)转染HEK-293T细胞,并且使用供体#S T细胞。E:T比为10:1; 6×10^5 : 6×10^4 。关于右栏(图9B), (1,0)表示仅用STE转染的细胞。(1,1)表示用STE和海绵转染的细胞。(0,0)表示用非STE蛋白转染的细胞。Ctr1表示未经转染的细胞。转染后48小时,收集多种HEK-293T细胞并与人T细胞共培养5小时。通过LDH释放测定测量T细胞的细胞毒性。数据表明T细胞杀伤293T/STE表达细胞(第1列),并且杀伤可以通过AND门结构大大地增强(第2列)。T细胞对非STE表达细胞表现出最低杀伤(第3列和第4列)。对于左栏(图9C),没有测试输入2条件,因为它不编码输出蛋白。(0,0)表示未经转染的细胞。进行另外的实验以通过除去Kozak序列和SSX1启动子的5' UTR进一步降低AND门在状态(1,0)下的输出。

[0190] HEK-293T细胞(STE的GAL4门v1)

[0191] 用所示的多种DNA构建体(STRICT037、039、040)转染HEK-293T细胞,并且使用供体#2的T细胞(图14)。E:T比为10:1; 6×10^5 : 6×10^4 。左栏示出了用于该T细胞细胞毒性实验的回路(图14A)。在右栏中,(1,0)表示仅用STE转染的细胞。(1,1)表示用STE和海绵转染的

细胞。(0,0)表示用非STE蛋白转染的细胞。转染后48小时,收集多种HEK-293T细胞并与人T细胞共培养5小时。通过LDH释放测定测量T细胞的细胞毒性(图14B)。数据表明T细胞杀伤STE表达(1,0)细胞(第2列和第4列),并且杀伤可以通过AND门(1,1)结构大大地增强(第3列和第5列)。T细胞对非STE表达细胞表现出最低杀伤(第1列)。

[0192] 用所示的多种DNA构建体(STRICT039、040)转染HEK-293T细胞,并且使用供体#2的T细胞(图15)。E:T比为10:1; $6 \times 10^5:6 \times 10^4$ 。图15A示出了用于该T细胞细胞毒性实验的回路。在图15B中,(1,0)表示仅用STE转染的细胞。(1,1)表示用STE和海绵转染的细胞。(0,0)表示用非STE蛋白转染的细胞。转染后48小时,收集多种HEK-293T细胞并与人T细胞共培养5小时。通过LDH释放测定测量T细胞的细胞毒性。数据表明T细胞杀伤STE表达(1,0)细胞(第3列和第5列),并且杀伤可以通过AND门(1,1)结构大大地增强(第4列和第6列)。T细胞对非STE表达细胞(第1列)表现出最低杀伤。在(1,0)条件下的杀伤主要是由GAL4启动子输出的泄漏引起的(第2列相对于第3列或第5列)。进行另外的实验以通过除去STE v1的Kozak序列、通过在3'端添加miRNA结合位点使STE v1输出自降解以及两种机制的组合降低GAL4启动子泄漏。

[0193] HEK-293T细胞(STE的GAL4门v2)

[0194] 可以利用GAL4门形式2(v2)结构以微调肿瘤细胞的T细胞杀伤效率并在(1,0)状态下表现出更小的细胞毒性。用所示的多种DNA构建体(STRICT039、040)转染HEK-293T细胞,并且使用供体#2的T细胞(图16)。E:T比为10:1; $6 \times 10^5:6 \times 10^4$ 。图16A示出了用于该T细胞细胞毒性实验的回路。在图16B中,(1,0)表示仅用STE转染的细胞。(1,1)表示用STE和海绵转染的细胞。(0,0)表示用非STE蛋白转染的细胞。转染后48小时,收集多种HEK-293T细胞并与人T细胞共培养5小时。通过LDH释放测定测量T细胞的细胞毒性(图16B)。数据表明T细胞杀伤STE表达(1,0)细胞(第3列),并且杀伤可通过AND门(1,1)结构增强(第4列)。T细胞对非STE表达细胞表现出最低杀伤(第1列)。与GAL4门v1结构相比,该形式在(1,0)状态下的杀伤提高(v2更接近基础水平(0,0))。进行另外的实验以降低(1,0)状态下的杀伤。在(1,0)状态下的GAL4启动子输出通过在STE基因的3'端添加miR结合位点而降低。

[0195] HEK-293T细胞(STE的GAL4门v3)

[0196] 可以利用GAL4门形式3(v3)结构以微调肿瘤细胞的T细胞杀伤效率并在(1,0)状态下表现出更小的细胞毒性。用所示的多种DNA构建体(STRICT039、040)转染HEK-293T细胞,并且使用供体#2的T细胞(图16)。E:T比为10:1; $6 \times 10^5:6 \times 10^4$ 。图17A示出了用于该T细胞细胞毒性实验的回路。在图17B中,(1,0)表示仅用STE转染的细胞。(1,1)表示用STE和海绵转染的细胞。(0,0)表示用非STE蛋白转染的细胞。转染后48小时,收集多种HEK-293T细胞并与人T细胞共培养5小时。通过LDH释放测定测量T细胞的细胞毒性(图17B)。数据表明T细胞最低限度地杀伤STE表达(1,0)细胞(第3列),并且仅在AND门有活性(1,1)时达到高效杀伤(第4列)。T细胞对非STE表达细胞表现出最低杀伤(第1列)。在(1,0)状态下的杀伤与(0,0)状态的一样长。进行另外的实验提高GAL4-VP16输出水平或增加GAL4结合位点来增强(1,1)状态的杀伤效率。

[0197] 实施例6

[0198] 该实施例解决了两个首要挑战(图2A至图2B):(1)建立新的乳腺癌疗法,其安全且有效地替代具有危及生命的毒性的介入;以及(2)使用这些新的疗法来消除与转移性乳腺

癌相关的死亡率。

[0199] 免疫治疗已经在临床试验中实现了针对癌症的稳健且潜在治愈的效力。利用T细胞效应物功能(例如嵌合抗原受体(CAR) T细胞或双特异性T细胞衔接器(BiTE))的免疫治疗可具有有力的效力[1,2]。然而,存在与这些疗法相关的重要挑战,特别是针对实体瘤,例如乳腺癌。目前的CAR-T细胞治疗需要对每位患者定制的细胞分离、工程改造的和扩增,这是昂贵且难以扩展的。此外,CAR-T细胞必须运输到肿瘤部位以介导杀伤,并且需要长期持续存在以获得稳健的效力,这可对实体瘤提出了挑战[3]。

[0200] BiTE是包含两个串联融合的单链可变片段(scFv)以能够通过T细胞接合肿瘤细胞从而导致T细胞触发的肿瘤杀伤的融合蛋白。BiTE疗法是有力的并且可以在比肿瘤靶向抗体(Ab)低5个数量级的浓度下赋予肿瘤杀伤[2]。然而,即使多次推注也不能维持高的血清BiTE浓度,因为其在体内的半衰期短(约2小时)[4]。成功的治疗血液性癌症的BiTE临床试验都需要连续静脉输注4至8周[2]。由于实体瘤通常比血液性恶性肿瘤更难以接近免疫细胞,故成功的针对实体瘤的BiTE疗法可能需要甚至更长时间的连续BiTE输注,由于潜在的副作用、患者不便和降低的效力,这是不期望的。最后,CAR T细胞和BiTE疗法二者都靶向细胞外肿瘤特异性抗原,这在许多癌症类型(包括三阴性乳腺癌)中是不可行的。此外,靶抗原可能通过正常细胞展示,因此免疫治疗可能导致脱靶免疫应答,产生严重后果[5]。

[0201] 除了利用采用CAR或BiTE的T细胞效应物功能之外,替代的方法是将表达癌细胞表面上的T细胞接合蛋白并且活化基于T细胞的杀伤的遗传回路递送到肿瘤细胞中。这些表面T细胞衔接器(STE)可以在体外和体内触发肿瘤细胞的抗原非依赖性T细胞杀伤[6-10]。然而,之前的STE研究无法构建仅在肿瘤细胞中被活化的遗传回路。因此,为了避免全身毒性,这些构建体仅限于肿瘤内注射,导致效力降低和无法治疗全身性疾病[7,10]。这是一个主要限制,因为对于许多癌症,特别是乳腺癌,转移性疾病是致死的主要原因。因此,迫切需要可以利用免疫系统来治疗全身性癌症和转移性癌症的具有高抗肿瘤特异性的可扩展疗法,这在本文中被提供。

[0202] 合成生物学家已经开发了基于癌症特异性启动子或miRNA谱的高度特异性细胞内检测癌症状态的遗传回路[11,12]。然而,在这些肿瘤检测回路可以用于临床之前,还需要进一步的开发。例如,这些合成的肿瘤检测回路仅与细胞内杀伤机制偶联,这限制了其对肿瘤的效力,因为其实际上不可能将回路递送至100%的癌细胞。此外,需要高靶向特异性以避免损伤健康组织。最后,过去的回路利用了外来蛋白,但是使异位蛋白表达最小化是对于避免在正常细胞中诱导宿主免疫应答所必不可少的。

[0203] 为了克服现有癌症免疫治疗和肿瘤检测遗传回路的限制,本文中提供了通过遗传回路募集免疫调节系统的肿瘤免疫治疗(Tumor Immunotherapy by Gene-circuit Recruited Immunomodulatory System,TIGRIS),也被称为合成的肿瘤募集免疫细胞治疗(STRICT),一种针对来自肿瘤自身内部的肿瘤触发有力且有效的免疫治疗的平台技术。TIGRIS是肿瘤检测遗传回路与抗癌免疫治疗的组合。可以将工程改造的遗传回路递送到肿瘤。这些工程改造的遗传回路仅在癌细胞中被选择性活化,导致STE的表面展示和其他免疫调节分子的分泌来募集靶向肿瘤的T细胞。我们设计了具有非常高的特异性的肿瘤检测基因回路以使TIGRIS疗法能够全身施用但只在癌细胞中局部活化,产生提高的安全性和降低的副作用。因此,TIGRIS将全身递送的优点(例如,治疗转移)与局部治疗的优点(例如安全

性、最小副作用)结合,并且实现了以下益处。

[0204] 我们开发了针对三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)的TIGRIS,三阴性乳腺癌是一种难以治疗的乳腺癌亚组,其表现出侵袭性行为并且与较差的预后相关[13-15]。对于TNBC没有理想的靶向疗法,因为该乳腺癌亚组不表达雌激素受体、孕激素受体或HER2。TIGRIS克服了其他疗法相关的关键障碍,其包括:

[0205] 1) 乳腺癌异质性的挑战。已知乳腺癌具有非常的肿瘤间和肿瘤内异质性[16]。例如,HER2表达异质性与差的预后相关[17],而传统的靶向疗法不能覆盖整个异质癌症群。相反,我们假设肿瘤特异性STE表达首先募集T细胞来杀伤STE表达癌细胞。最初的杀伤释放免疫原性突变抗原[18],其募集另外的波的具有各种靶向特异性的T细胞。这会产生针对肿瘤抗原的多克隆免疫应答、覆盖广泛的异质肿瘤群的突变情形和防止免疫编辑介导的肿瘤复发。此外,几乎所有的靶向疗法都可产生靶阴性肿瘤变体过度增生(target-negative tumor variant outgrowth)。由于TIGRIS不需要已知的由肿瘤细胞表达的肿瘤特异性抗原,故其不受涉及表面抗原下调的肿瘤逃逸机制的影响。

[0206] 2) 有限的靶向谱。与CAR-T细胞或BiTE疗法不同,TIGRIS不依赖于对于许多癌症可能难以鉴定的肿瘤特异性抗原的表面表达。相反,TIGRIS是通过凭借AND门逻辑的多个肿瘤特异性/组织特异性启动子的协同活化而被活化的,这导致相对于单个启动子系统的增强的特异性。这些逻辑回路可针对不同启动子定制,并且甚至导入肿瘤特异性/组织特异性微小RNA以获得进一步的特异性,从而实现了灵活的治疗效力。此外,可以通过肿瘤细胞测序鉴定这些启动子并针对不同肿瘤定制以克服经免疫编辑的癌症和异质癌细胞类型。

[0207] 3) 转移的致死后果。转移性肿瘤细胞难以治疗,并且导致90%的乳腺癌死亡[19]。我们的基因回路可以全身递送但是由于其特异性仅具有局部作用,因此潜在地能够检测并破坏转移。此外,我们期望由TIGRIS活化的抗癌T细胞巡查机体以靶向转移以进行破坏。

[0208] 4) 在靶向治疗期间肿瘤逃逸变体的演化。TIGRIS可以启动表位扩散,并且该现象募集许多具有不同肿瘤靶向特异性的T细胞。肿瘤逃逸变异的可能性比传统的靶向治疗小得多。

[0209] 5) 肿瘤复发的挑战。许多晚期乳腺癌最终复发,对于复发没有可行的预测或预防措施。由于T细胞可以分化为记忆T细胞并长期存在于机体中,故TIGRIS可以预防未来的肿瘤复发。在此,作为一个实例,我们提供了TNBC,使用传统疗法难以治疗的乳腺癌亚组。

[0210] 6) 治疗递送挑战。非连续治疗递送(例如使用病毒或非病毒载体的核酸或遗传回路)通常不能靶向所有肿瘤细胞。由于STE可以募集T细胞来启动肿瘤杀伤并启动表位扩散现象,故即使我们的肿瘤检测回路只可以递送至一小部分的肿瘤细胞,只要由STE触发的免疫应答足够稳健,该技术就可以杀伤周围的癌细胞。

[0211] 通过工程改造的高特异性癌症检测回路来命令肿瘤细胞表达STE和其他免疫调节剂,我们可以引起稳健的宿主免疫应答以消除原发性肿瘤细胞、靶向异质肿瘤、抑制局部淋巴结侵袭(invasion)以及靶向全身性转移,同时还形成免疫记忆防止未来的肿瘤复发。

[0212] 工程改造的TIGRIS构建体并在体外和体内验证治疗效力

[0213] 我们创建了新的癌症检测回路,其命令肿瘤细胞展示STE。我们测试了STE是否可触发稳健的免疫应答并在体外和体内有效地杀伤乳腺癌细胞。采用TIGRIS取得针对实体瘤(例如乳腺癌)的稳健的效力所需的关键参数(例如,STE表达性肿瘤细胞的最小部分和肿瘤

细胞表面上的最小STE表达水平)是未知的,因此我们采用在体外和体内测定确定这些参数。我们还测试了无论乳腺癌中的肿瘤内异质性如何,经TIGRIS触发的免疫应答是否可以实现有效的抗肿瘤治疗。

[0214] 创建并验证在肿瘤细胞上展示STE的癌症检测回路。我们通过分别使衍生自抗人CD3 ϵ Ab(克隆:OKT3)或抗鼠CD3 ϵ Ab(克隆:2C11)的scFv与惰性膜锚定蛋白(例如,细胞质截短的Duffy抗原/趋化因子受体(Duffy Antigen/Receptor for Chemokine,DARC))融合创建了人和鼠STE(图12A(顶部))。我们进行了体外T细胞细胞毒性测定和细胞因子释放测定以测试在由代表TNBC、慢性粒细胞白血病和胚胎肾肿瘤的多种肿瘤细胞系表达时(分别地4T1、K562和HEK-293T)人STE的功能性。当T细胞与STE表达性肿瘤细胞共培养时,我们观察到T细胞的稳健的细胞毒性和IFN- γ 产生(图24B)。由于人STE和鼠STE分别只与人和鼠T细胞结合,故这些构建体使我们能够证实特异性T细胞接合是治疗效力所必需的。

[0215] 此外,我们设计了特异性检测癌症的细胞内标记的合成基因回路。我们之前工程改造了被称为双启动子积分器(Dual Promoter Integrator,DPI)的癌症检测回路,其输出仅在两个癌症特异性启动子被活化超过最小阈值时被表达,因此执行AND门[12]。DPI是使用非人转录因子执行的,其对于临床应用不理想,因为他们可能引入可在正常细胞中变成免疫原性的外来蛋白。在此,我们创建了仅使用RNA的AND门(图3A至图3D),其具有比基于蛋白质的回路更紧凑的额外益处。该回路设计仅当两个启动子在癌细胞中被活化时表达输出。我们在HEK-293T细胞中使用SSX1和H2A1癌症特异性启动子用荧光蛋白和STE作为输出,构建并验证了我们的仅RNA AND门结构的可调性、模块性和功能性(参见以下描述)。

[0216] 我们调整我们的RNA门以特异性识别乳腺癌细胞。在我们目前的回路下,含有在癌细胞中活化的AND门的两个输入的细胞(40%溶解,图4中的情况1)相较于含有在癌细胞中有活性的仅一个输入的细胞(仅表达STE蛋白的细胞,图3A至3D中的情况3),T细胞介导的杀伤增强了约2倍。该回路的性能(例如增强的ON:OFF比)通过以下可以进一步提高:增加STE转录物中的miRNA结合位点的数量、修饰miRNA骨架用于更稳健的miRNA产生、每STE转录物产生多个miRNA拷贝、测试不同miRNA和海绵的文库、修饰海绵序列和结构、用mRNA降解标签使泄漏最小化、实施反式切割核酶以用于除去STE转录物中的miRNA结合位点以及在STE转录物中包含另外的miRNA结合位点,其通过在正常细胞中高度表达但在肿瘤细胞中下调的内源miRNA被结合并抑制[31]。

[0217] 我们还测试了其他癌症特异性和组织特异性启动子(例如,高乳腺癌特异性的并且已经在TNBC细胞系中验证的RPC1和RRM2[32]),并且验证了我们的回路在4T1癌细胞中被活化但在正常细胞(例如COMMA-1D、EpH4、MCF10A)中不被活化。

[0218] 我们通过将回路转染或稳定地整合到肿瘤细胞中测试回路功能性。我们还在腺病毒、AAV或HSV载体中编码我们的回路以能够递送到4T1和正常乳腺细胞系中来验证肿瘤检测灵敏性、特异性和可调性。我们还利用溶瘤HSV载体,例如T-VEC,其已经用于人患者中的癌症治疗[33]。

[0219] 如果在一些情况下上述癌症特异性启动子中的一些在4T1细胞中没有取得特异性活化,则可用比较转录组学和通过使用FACS和测序筛选在靶细胞中特异性活化的条码化的启动子文库来鉴定另外的癌症特异性启动子。如果一些仅RNA回路不能达到显著的ON:OFF比,则可使用人转录因子(例如人工锌指蛋白[27])使潜在的免疫原性外来蛋白的引入最小

化。

[0220] 鉴定需要通过TIGRIS靶向以获得体内效力的肿瘤细胞的最小百分比。我们阐明了需要通过我们的遗传回路靶向以在体内取得稳健的治疗效力的肿瘤细胞的最小百分比。该信息用于设计全身递送策略,因为在一些情况下,他们不可能靶向100%的肿瘤细胞。我们以不同比例将STE展示性肿瘤细胞(4T1/STE+)与非STE展示性对应物(4T1/STE-)混合,并将其直接移植到有免疫能力的BALB/c小鼠乳腺垫中以产生常位乳腺癌模型。4T1鼠模型类似于晚期人TNBC并且是高度恶性和转移性的[34,35]。通过每隔一天用卡尺测量肿瘤体积监测肿瘤生长动力学。我们用以下实验随着时间推移监测动物存活,该实验保持运行了是对照小鼠的平均存活时间的至少两倍长。鉴定了有效抑制经注射的肿瘤细胞的生长所需的STE表达性肿瘤细胞的最小百分比。使用表达人STE的肿瘤细胞系作为对照来验证T细胞接合特异性。每个实验条件我们利用了4至6只小鼠。

[0221] 当有足够的STE表达性细胞时,肿瘤生长部分或全部被抑制,导致得到长期无病的存活小鼠。我们分别使用Student's t-检验和单向ANOVA来比较两组之间和多于两组之间的肿瘤体积。为了分析存活实验,我们使用Kaplan-Meier存活分析。我们还过继性转移经双生物发光报道系统工程改造的T细胞以用体内成像追踪T细胞肿瘤浸润和活化的动力学[36]。我们用C3(1)/SV40T抗原转基因小鼠(一种非常具侵袭性自发TNBC模型)扩展了该工作[37],以在更加生理相关的肿瘤模型中验证我们的发现。

[0222] 我们确定了需要表达STE以赋予稳健的体内效力的肿瘤细胞的下限。对于大于平均基因递送效率的限制,我们设计了新的可以同时分泌多种免疫刺激效应物的回路。这些分子包括主动吸引T细胞的趋化因子(例如,CCL19和CCL21)[38]、免疫刺激的并且可以调节肿瘤微环境的细胞因子(例如IL-12、IL-15和IL-21)[39]和可释放T细胞活性的免疫检查点阻断Ab(例如,抗CTLA4或抗PD1 Ab)[40]。该组合方法增强了针对异质乳腺癌的治疗效力。例如,在靶向多种实体瘤类型的多次临床试验中,抗PD1 Ab已经取得了20%至50%的应答率。然而,预先存在的免疫力是患者响应抗PD1 Ab所需的[41,42]。通过共同表达STE和抗PD1 Ab,STE可帮助产生针对肿瘤相关和突变的抗原的预先存在免疫性,同时抗PD1 Ab可以增强T细胞功能、增殖和浸润到肿瘤,特别是表达PD-L1(PD-1配体)来关闭T细胞功能的那些[43,44]。

[0223] 评价针对转移性癌症和复发的TIGRIS

[0224] 在晚期乳腺癌中,通常观察到肿瘤细胞淋巴结侵袭和全身性转移,并且导致90%的乳腺癌死亡。手术后的护理标准是化学疗法联合靶向疗法,但是这对于TNBC不是很有效[13-15]。此外,20%至30%的诊断患有浸润性乳腺癌的患者在治疗后复发,但没有用于早期检测复发的预防措施或诊断标志物。我们测试了通过TIGRIS触发的免疫细胞是否可以消除淋巴结和全身性转移并建立长期的免疫记忆。TIGRIS可避免需要全身化学治疗和手术切除淋巴结,这是发病的最常见原因,并且提供防止肿瘤复发的保护。

[0225] 确定TIGRIS是否可通过全身递送消除原发性肿瘤和转移。我们测试了工程改造的遗传回路的全身病毒递送是否可以在体内消除原发性和转移性肿瘤。我们工程改造了4T1细胞以表达用于体内成像的荧光素酶。为了测试针对转移的效力,我们使用上述4T1常位模型,但是只当在淋巴结和重要器官(期望在肺、肝、骨和脑中)中观察到转移时开始我们的通过病毒递送的回路治疗。我们监测了小鼠模型中的总肿瘤负荷(原发性+转移性肿瘤)。

[0226] 我们通过改变参数(例如,病毒载体浓度、时间和类型)测试不同的治疗方案[45]。我们通过活体动物成像追踪在体内通过TIGRIS产生的免疫应答。我们看到治疗后原发性和转移性肿瘤的肿瘤生长降低,特别是在免疫细胞可以轻松进入的器官,例如肺、肝和骨中。脑转移的降低也是可能的,因为基于T细胞的免疫治疗已经显示出浸润脑脊液[1]。我们比较TIGRIS相对于已知的化学治疗方案,例如紫杉烷和蒽环类抗生素[46]。

[0227] 如果在一些情况下只用STE表达没有消除原发性肿瘤,则我们增加了用上述多种免疫刺激效应物的治疗。我们还测试了多次病毒注射是否可以提高治疗效力。此外,我们在回路治疗之前和之后通过外科手术切除原发肿瘤以模拟常见的临床实践并测试原发性肿瘤的外科手术切除可如何影响针对转移的免疫应答。

[0228] 在一些情况下,全身回路递送可对取得高治疗效力造成挑战。在一些实施方案中,我们通过用小的肽使我们的载体(例如,腺病毒)假型化以靶向其他细胞表面受体来改善病毒递送[47]。在一些实施方案中,我们调整已经显示出靶向乳腺癌的溶瘤病毒以同时利用肿瘤溶解和免疫治疗[48]。在一些情况下,病毒颗粒可仅穿透许多实体瘤的肿瘤周边。因此,我们可以表达iRGD肿瘤穿膜肽作为另外的回路输出[49]。这些肽可以显著增强许多治疗剂(包括Ab、溶瘤病毒和纳米颗粒)的肿瘤渗透[49-51]。

[0229] 除了测试全身递送之外,我们还确定了局部回路递送至原发性肿瘤细胞以治疗全身性转移的治疗效力。免疫调节性溶瘤病毒T-Vec的局部肿瘤注射可引起未经注射的肿瘤缩小[33]。该发现表明可以用病毒或非病毒载体实现的TIGRIS回路的局部递送也可赋予治疗效力。通过在经注射的肿瘤中产生局部免疫应答,TIGRIS可启动靶向转移性肿瘤的全身免疫应答。

[0230] 当所有含有基因回路的肿瘤细胞被杀伤时,STE表达应被终止。然而,为了增强可控性和安全性,在一些实施方案中,我们向我们的基因回路中建立了合成的安全机制。在这些设计中,如果门在正常细胞中正常工作,则应是关闭的,不应表达任何外来蛋白。因此,只有门在正常细胞中失灵或门在癌细胞中正常工作,伴随着可以在外部切换的安全机制,治疗性输出蛋白才被表达。首先,我们工程改造了诱导型回路以终止STE表达和/或杀伤STE表达细胞。具体地,STE输出被合成转录因子(例如GAL4BD-VP16AD(GAD))替换。在这种结构中,STE、免疫刺激分子和iRGD肽的基因以及条件杀伤基因TK1共同通过GAD响应性启动子G5p调节。因此,仅当逻辑门有活性时,外来蛋白才与STE、TK1和其他输出基因共同表达。TK1底物(例如,更昔洛韦或阿昔洛韦)的添加能够杀伤其中回路有活性的细胞。或者,我们产生诱导型转录因子(例如多西环素响应性转录因子rtTA3)作为我们逻辑门的输出而不是GAD以驱动治疗性输出表达。在这种情况下,在没有施用外源诱导剂(例如,多西环素)下整个系统不会被活化,从而提供了一种简单且安全的用FDA批准的小分子控制治疗开始和终止的机制。作为安全性的最后一层,我们实施了分泌的STE拮抗剂(例如CD3 ϵ 自身,其可以滴定出功能性STE)的诱导型表达。

[0231] 测试TIGRIS是否可引起免疫记忆以防止未来的肿瘤复发。TIGRIS启动针对复发性乳腺癌的长期免疫记忆。为了表明这一点,我们通过尾静脉注射用4T1肿瘤细胞再次攻击了(来自上述的)长期存活者。4T1肿瘤细胞的尾静脉注射主要导致肺转移,其是乳腺癌的常见转移部位[52]。进行活体动物成像来监测在肺和其他重要器官中的肿瘤种植以确定是否存在针对再引入的肿瘤细胞的保护性免疫。

[0232] 如果在一些情况下,初始治疗引起非常稳健的针对原发性肿瘤的应答但没有针对再次攻击的显著保护,则我们设计另外分泌IL-7和IL-15的肿瘤检测回路,因为这些驱动记忆T细胞形成[53]。此外,4T1肿瘤模型是非常具有免疫抑制性的[54]。因此,在一些情况下,导入检查点阻断Ab和/或促炎细胞因子(参见上文)可帮助产生更稳健的记忆应答。

[0233] 实施例6的参考文献

[0234] 1.Maude,S.L.,et al.,Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia.N Engl J Med,2014.371(16):p.1507-17.

[0235] 2.Bargou,R.,et al.,Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody.Science,2008.321(5891):p.974-7.

[0236] 3.Gilham,D.E.,et al.,CAR-T cells and solid tumors:tuning T cells to challenge an inveterate foe.Trends Mol Med,2012.18(7):p.377-84.

[0237] 4.Klinger,M.,et al.,Immunopharmacologic response of patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia to continuous infusion of T cell-engaging CD19/CD3-bispecific BiTE antibody blinatumomab.Blood,2012.119(26):p.6226-33.

[0238] 5.Kershaw.M.H.,et al.,Clinical application of genetically modified T cells in cancer therapy.Clin Trans Immunol,2014.3:p.e16.

[0239] 6.Liao,K.W.,Y.C.Lo,and S.R.Rofflier,Activation of lymphocytes by anti-CD3 single-chain antibody dimers expressed on the plasma membrane of tumor cells.Gene Ther,2000.7(4):p.339-47.

[0240] 7.Paul,S.,et al.,Tumor gene therapy by MVA-mediated expression of T-cell-stimulating antibodies.Cancer Gene Ther,2002.9(5):p.470-7.

[0241] 8.Liao,K.W.,et al.,Stable expression of chimeric anti-CD3 receptors on mammalian cells for stimulation of antitumor immunity.Cancer Gene Ther.2003.10(10):p.779-90.

[0242] 9.Yang,Z.M.,et al.,Anti-CD3 scFv-B7.1 fusion protein expressed on the surface of HeLa cells provokes potent T-lymphocyte activation and cytotoxicity.Biochem Cell Biol,2007.85(2):p.196-202.

[0243] 10.Liu,Y.,et al.,Adenovirus-mediated intratumoral expression of immunostimulatory proteins in combination with systemic Treg inactivation induces tumor-destructive immune responses in mouse models.Cancer Gene Ther,2011.18(6):p.407-18.

[0244] 11.Weber,W.and M.Fussenegger,Emerging biomedical applications of synthetic biology.Nat Rev Genet,2012.13(1):p.21-35.

[0245] 12.Nissim,L.and R.H.Bar-Ziv,A tunable dual-promoter integrator for targeting of cancer cells.Mol Spst Biol,2010.6:p.444.

[0246] 13.Hudis,C.A.and L.Gianni,Triple-negative breast cancer:an unmet medical need,Oncologist,2011.16 Suppl 1:p.1-11.

[0247] 14.Andre,F.and C.C.Zielinski,Optimal strategies for the treatment of

metastatic triple-negative breast cancer with currently approved agents. *Ann Oncol*, 2012. 23 Suppl 6: p.vi46-51.

[0248] 15. Foulkes, W.D., L.E. Smith, and J.S. Reis-Filho, Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*, 2010. 363 (20): p.1938-48.

[0249] 16. Polyak, K., Heterogeneity in breast cancer. *J Clin Invest*, 2011. 121 (10): p.3786-8.

[0250] 17. Seol, H., et al., Intra-tumoral heterogeneity of HER2 gene amplification in breast cancer: its clinicopathological significance. *Mod Pathol*, 2012. 25 (7): p.938-48.

[0251] 18. Lawrence, M.S., et al., Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature*, 2014. 505 (7484): p.495-501.

[0252] 19. Weigelt, B., J.L. Peterse, and L.J. van't Veer, Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer*, 2005. 5 (8): p.591-602.

[0253] 20. Yang, L., et al., Permanent genetic memory with >1-byte capacity. *Nat Methods*, 2014.

[0254] 21. Nissim, L., et al., Multiplexed and Programmable Regulation of Gene Networks with an Integrated RNA and CRISPR/Cas Toolkit in Human Cells. *Molecular Cell*, 2014. 54 (4): p.698-710.

[0255] 22. Farzadfard, F. and T.K. Lu, Genomically encoded analog memory with precise in vivo DNA writing in living cell populations. *Science*, 2014.

[0256] 23. Siuti, P., J. Yazbek, and T.K. Lu, Synthetic circuits integrating logic and memory in living cells. *Nat Biotechnol*, 2013. 31 (5): p.448-52.

[0257] 24. Purcell, O., J. Peccoud, and T.K. Lu, Rule-Based Design of Synthetic Transcription Factors in Eukaryotes. *ACS Synthetic Biology*, 2013.

[0258] 25. Farzadfard, F., S.D. Perli, and T.K. Lu, Tunable and Multi-Functional Eukaryotic Transcription Factors Based on CRISPR/Cas. *ACS Synthetic Biology*, 2013.

[0259] 26. Daniel, R., et al., Synthetic analog computation in living cells. *Nature*, 2013. 497 (7451): p.619-23.

[0260] 27. Khalil, A., et al., A Synthetic Biology Framework for Programming Eukaryotic Transcription Functions. *Cell*, 2012. 150 (3): p.647-658.

[0261] 28. Cheng, A.A. and T.K. Lu, Synthetic Biology: An Emerging Engineering Discipline. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2012. 14 (1): p.155-178.

[0262] 29. Lu, T.K., A.S. Khalil, and J.J. Collins, Next-generation synthetic gene networks. *Nat Biotechnol*, 2009. 27 (12): p.1139-50.

[0263] 30. Friedland, A.E., et al., Synthetic gene networks that count. *Science*, 2009. 324 (5931): p.1199-202.

[0264] 31. Boyerinas, B., et al., The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocr Relat Cancer*, 2010. 17 (1): p.F19-36.

- [0265] 32.Yun,H.J.,et al.,Transcriptional targeting of gene expression in breast cancer by the promoters of protein regulator of cytokinesis 1 and ribonuclease reductase 2.Exp Mol Med,2008.40 (3) :p.345-53.
- [0266] 33.Senzer,N.N.,et al.,Phase II clinical trial of a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-encoding,second-generation oncolytic herpesvirus in patients with unresectable metastatic melanoma.J Clin Oncol, 2009.27 (34) :p.5763-71.
- [0267] 34.Fantozzi,A.and G.Christofori.Mouse models of breast cancer metastasis.Breast Cancer Res,2006.8 (4) :p.212.
- [0268] 35.Kaur,P.,et al.,A mouse model for triple-negative breast cancer tumor-initiating cells(TNBC-TICs)exhibits similar aggressive phenotype to the human disease.BMC Cancer,2012.12:p.120.
- [0269] 36.Na,I.K.,et al.,Concurrent visualization of trafficking,expansion, and activation of T lymphocytes and T-cell precursors in vivo.Blood,2010.116 (11) :p.e18-25.
- [0270] 37.Green,J.E.,et al.,The C3(I)/SV40 T-antigen transgenic mouse model of mammary cancer:ductal epithelial cell targeting with multistage progression to carcinoma.Oncogene,2000.19 (8) :p.1020-7.
- [0271] 38.Nguyen-Hoai,T.,et al.,CCL21(SLC) improves tumor protection by a DNA vaccine in a Her2/neu mouse tumor model.Cancer Gene Ther,2012.19 (1) :p.69-76.
- [0272] 39.Ferrone,C.R.,et al.,A djuvanticity of plasmid DNA encoding cytokines fused to immunoglobulin Fc domains.Clin Cancer Res,2006.12 (18) : p.5511-9.
- [0273] 40.Hirano.F.,et al.,Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity.Cancer Res,2005.65 (3) : p.1089-96.
- [0274] 41.Tumeh,P.C.,et al.,PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance.Nature,2014.515 (7528) :p.568-71.
- [0275] 42.Gubin,M.M.,et al.,Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens.Nature,2014.515 (7528) :p.577-81.
- [0276] 43.Ghebeh,H.,et al.,The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors.Neoplasia,2006.8 (3) : p.190-8.
- [0277] 44.Soliman,H.,F.Khalil,and S.Antonia,PD-L1 expression is increased in a subset of basal type breast cancer cells.PLoS One,2014.9 (2) :p.e88557.
- [0278] 45.Magnusson,M.K.,et al.,A transductionally retargeted adenoviral vector for virotherapy of Her2/neu-expressing prostate cancer.Hum Gene Ther, 2012.23 (1) :p.70-82.

[0279] 46.Nabholtz,J.M.and A.Riva,Taxane/anthracycline combinations:setting a new standard in breast cancer?Oncologist,2001.6 Suppl 3:p.5-12.

[0280] 47.Dmitriev,I.,et al.,An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism.J Virol,1998.72(12): p.9706-13.

[0281] 48.Zhang,Z.,et al.,Intravenous administration of adenoviruses targeting transforming growth factor beta signaling inhibits established bone metastases in 4T1 mouse mammary tumor model in an immunocompetent syngeneic host.Cancer Gene Ther,2012.19(9):p.630-6.

[0282] 49.Sugahara,K.N.,et al.,Coadministration of a tumor-penetrating peptide enhances the efficacy of cancer drugs.Science,2010.328(5981):p.1031-5.

[0283] 50.Hamilton,A.M.,et al.,Nanoparticles coated with the tumor-penetrating peptide iRGD reduce experimental breast cancer metastasis in the brain.J Mol Med (Berl),2015.

[0284] 51.Puig-Saus,C.,et al.,iRGD tumor-penetrating peptide-modified oncolytic adenovirus shows enhanced tumor transduction,intratumoral dissemination and antitumor efficacy.Gene Ther,2014.21(8):p.767-74.

[0285] 52.Tao,K.,et al.,Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer.BMC Cancer,2008.8:p.228.

[0286] 53.Cieri,N.,et al.,IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naive precursors.Blood,2013.121(4):p.573-84.

[0287] 54.Chen,L.,et al.,Rejection of metastatic 4T1 breast cancer by attenuation of Treg cells in combination with immune stimulation.Mol Ther,2007.15(12):p.2194-202.

[0288] 实施例7

[0289] 卵巢癌的合成的肿瘤募集免疫细胞治疗。需要新的治疗策略来治疗原发性和转移性卵巢癌并取得长期效力。现有卵巢癌治疗(例如化学疗法和靶向疗法)不能治愈转移性疾病和防止肿瘤复发。此外,护理标准治疗(例如化学疗法)可引起显著的发病率和毒性。

[0290] 本文中提供了变革性的新类型的高度特异性、有效且持久的卵巢癌免疫治疗。该治疗策略,合成的肿瘤募集免疫细胞治疗(STRICT)利用肿瘤自身来募集免疫细胞以破坏肿瘤(图2A至图2B),从而诱导可调节的、安全、持久且有效的强的多克隆抗肿瘤应答。

[0291] 具体地,我们提供了仅当多个肿瘤特异性启动子有活性时才在卵巢癌细胞中选择性打开的合成基因回路(例如,通过执行AND逻辑的数字基因回路)。这些合成回路可通过病毒载体全身递送或局部递送到肿瘤中。我们利用合成生物学的最新进展将这些合成基因回路设计成高度紧凑的、基于RNA的(以避免在正常细胞中表达免疫原性外来蛋白)并且仅在卵巢癌细胞中被特异性活化(不在任何其他正常细胞类型中)。当被活化时,这些回路展示表面T细胞衔接器(STE)和其他免疫调节分子(例如检查点抑制剂和细胞因子)以触发稳健

且靶向性的抗肿瘤免疫应答。STE会被设计成接合T细胞上的T细胞受体并触发T细胞以杀伤STE展示性细胞。此外,我们向基因回路中导入安全开关以使其能够从外部打开或关闭。

[0292] 第一波T细胞应进行STE指导的肿瘤细胞杀伤,然后是靶向那些通过细胞裂解释放的更广谱的癌症抗原的第二波多克隆T细胞。因此,通过STRICT触发的免疫治疗可抑制原发性和转移性肿瘤二者,因为T细胞可提供在整个机体内散布的免疫监视。此外,这些免疫应答可使得能够针对卵巢癌建立长期记忆。我们调整了STRICT以靶向卵巢腺癌,这是表现出侵袭性行为并且与差的预后相关的最常见且难以治疗的卵巢癌亚组(1)。

[0293] 利用T细胞效应物功能(例如嵌合抗原受体(CAR)T细胞或双特异性T细胞衔接器(BiTE))的免疫治疗已经取得了有力效果(2,3)。然而,这些疗法的使用造成了重大挑战,特别是针对实体瘤(例如卵巢癌)。目前的CAR-T疗法需要针对每个患者的定制的细胞工程改造和扩增,这是昂贵且难以扩展的。CAR-T细胞需要运输到肿瘤部位、靶向肿瘤特异性抗原并且长期持续介导稳健的肿瘤杀伤和效力[4],这是对于卵巢癌的主要挑战[5]。

[0294] BiTE包含两个串联融合的单链可变片段,从而能够接合并通过T细胞杀伤肿瘤细胞。BiTE可在比肿瘤靶向性抗体(Ab)低5个数量级的浓度下赋予有效且稳健的肿瘤杀伤(3)。然而,由于BiTE在体内的半衰期短(约2小时)(6)并且实体瘤通常比血液性恶性肿瘤更难以接近免疫细胞,故成功的针对实体瘤的疗法可能需要长期连续静脉BiTE输注,由于副作用、患者方便性和治疗效力,这是具有挑战性的。此外,已经在癌细胞上展示表面T细胞衔接器(STE)来募集T细胞介导的杀伤(7-11),但是这样的系统还没有被特异性靶向以使得可以全身治疗而没有显著的副作用。

[0295] 最近,溶瘤病毒(例如T-Vec)已经接近获得FDA批准以治疗黑素瘤。溶瘤病毒依靠病毒复制来杀伤肿瘤细胞。然而,将溶瘤病毒改造成仅在特定的肿瘤细胞中复制可能是具有挑战性的,并且在临床试验中溶瘤病毒还没有证明具有良好的抗卵巢癌效力。此外,合成生物学家已经基于癌症特异性启动子或微小RNA谱开发了用于高度特异性细胞内检测癌细胞的基因回路(12,13)。然而,合成的肿瘤检测回路仅与细胞内杀伤机制偶联,这限制了其针对癌症的效力,因为实际上不可能将回路递送至100%的癌细胞。

[0296] 通过利用合成的癌症检测回路来命令肿瘤细胞展示STE并分泌其他免疫调节剂,我们可引起稳健的宿主免疫应答以消除原发性肿瘤细胞,并触发继发性多克隆T细胞应答。我们测试了STRICT是否可抑制局部淋巴结侵袭、靶向全身性转移以及形成免疫记忆以防止未来复发。稳健的免疫应答可有效针对癌症,并且该合成基因回路可设计成用细胞内标志物特异性检测癌细胞。

[0297] 我们提供了至少两种用STRICT靶向原发性、转移性和复发性卵巢癌的方法:

[0298] 1) 我们提供了命令肿瘤细胞展示STE并分泌免疫调节效应物的癌症检测回路。我们验证了其在体外和体内的治疗效力。在体外,我们测量了由于STRICT得到的T细胞诱导的细胞毒性和由T细胞分泌的关键细胞因子。在体内,我们使用ID8鼠模型确定了为了通过STRICT实现有效肿瘤清除而需要被靶向的STE展示性肿瘤细胞的最低数量(14)。

[0299] 2) 我们在小鼠模型中评价了针对原发性卵巢肿瘤、转移和复发的STRICT。我们使用ID8鼠模型以表明,转移性肿瘤可通过STRICT消除并且STRICT可在初始治疗后存活的小鼠中防止癌症复发。测试STRICT的效力、特异性和可调性的对照包括展示无活性STE的基因回路、无活性的基因回路、在非癌性卵巢细胞和其他正常组织中的测试遗传回路,以及使用

人相对于鼠STE和人相对于鼠T细胞。

[0300] 本公开内容提供了通过使肿瘤转而针对其自身来治疗卵巢癌的方法。STRICT实现了针对卵巢癌的长期活性和针对原发性和转移性肿瘤的散布的T细胞活性。我们的治疗性构建体可以针对多种不同的卵巢癌定制,并且相对于工程改造的细胞治疗在临床实践中更容易扩展和部署。

[0301] STRICT可取得针对原发性和转移性疾病的强力的治疗效果,诱导持久的免疫记忆、导入安全开关并且降低治疗应用所需的成本、人力和基础设施。STRICT可有效针对原发性和转移性肿瘤,并且取得了针对肿瘤复发的长期保护。STRICT通过从肿瘤内实现多克隆抗肿瘤免疫应答和持久免疫记忆的方便、靶向性且安全的诱导,克服了其他治疗的限制。STRICT最终可替代具有毒性和副作用的用于卵巢癌的护理标准治疗,并且广泛地扩展到其他癌症。STRICT是一种变革性的新的治疗方式,其通过利用针对卵巢癌的免疫系统可抑制长期疾病。

[0302] STRICT可有效针对原发性和转移性肿瘤并且取得针对肿瘤复发的长期保护。STRICT可使得能够替代具有有限效力及显著毒性和副作用的用于卵巢癌的护理标准治疗。此外,该技术建立了强大的可以针对大范围癌症得到广泛使用和重新设计的技术平台。

[0303] 实施例7中引用的参考文献

[0304] 1.Ries LAG YJ,Keel GE,Eisner MP,Lin YD,Horner M-J(editors) (2007) SEER Survival Monograph:Cancer Survival Among Adults:U.S.SEER Program,1988-2001, Patient and Tumor Characteristics.National Cancer Institute,SEER Program,NIH Pub No.07-6215.

[0305] 2.Maude SL,Frey N,Shaw PA,Aplenc R,Barrett DM,Bunin NJ,Chew A, Gonzalez VE,Zheng Z,Lacey SF,Mahnke YD,Melenhorst JJ,Rheingold SR,Shen A, Teachey DT,Levine BL,June CH,Porter DL,&Grupp SA (2014) Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia.N Engl J Med 371(16): 1507-1517.

[0306] 3.Bargou R,Leo E,Zugmaier G,Klinger M,Goebeler M,Knop S,Noppeney R, Viardot A,Hess G,Schuler M,Einsele H,Brandl C,Wolf A,Kirchinger P,Klappers P, Schmidt M,Riethmuller G,Reinhardt C,Baeuerle PA,&Kufer P (2008) Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody.Science 321(5891):974-977.

[0307] 4.Kershaw MH,Westwood JA,Slaney CY,&Darcy PK (2014) Clinical application of genetically modified T cells in cancer therapy.Clin Trans Immunol 3:e16.

[0308] 5.Gilham DE,Debets R,Pule M,Hawkins RE,&Abken H (2012) CAR-T cells and solid tumors:tuning T cells to challenge an inveterate foe.Trends Mol Med 18 (7):377-384.

[0309] 6.Klinger M,Brandl C,Zugmaier G,Hijazi Y,Bargou RC,Topp MS,Gokbuget N,Neumann S,Goebeler M,Viardot A,Stelljes M,Bruggemann M,Hoelzer D,Degenhard E,Nagorsen D,Baeuerle PA,Wolf A,&Kufer P (2012) Immunopharmacologic response of

patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia to continuous in fusion of T cell-engaging CD19/CD3-bispecific BiTE antibody blinatumomab. *Blood* 119 (26):6226-6233.

[0310] 7. Liao KW, Lo YC, & Roffler SR (2000) Activation of lymphocytes by anti-CD3 single-chain antibody dimers expressed on the plasma membrane of tumor cells. *Gene Ther* 7(4):339-347.

[0311] 8. Paul S, Regulier E, Rooke R, Stoeckel F, Geist M, Homann H, Balloul JM, Villeval D, Poitevin Y, Kieny MP, & Acres RB (2002) Tumor gene therapy by MVA-mediated expression of T-cell-stimulating antibodies. *Cancer Gene Ther* 9(5):470-477.

[0312] 9. Liao KW, Chen BM, Liu TB, Tzou SC, Lin YM, Lin KF, Su CI, & Roffler SR (2003) Stable expression of chimeric anti-CD3 receptors on mammalian cells for stimulation of antitumor immunity. *Cancer Gene Ther* 10(10):779-790.

[0313] 10. Yang ZM, Li EM, Lai BC, Wang YL, & Si LS (2007) Anti-CD3 scFv-B7.1 fusion protein expressed on the surface of HeLa cells provokes potent T-lymphocyte activation and cytotoxicity. *Biochem Cell Biol* 85(2):196-202.

[0314] 11. Liu Y, Tuve S, Persson J, Beyer I, Yumul R, Li ZY, Tragoolpua K, Hellstrom KE, Roffler S, & Lieber A (2011) Adenovirus-mediated intratumoral expression of immunostimulatory proteins in combination with systemic Treg inactivation induces tumor-destructive immune responses in mouse models. *Cancer Gene Ther* 18(6):407-418.

[0315] 12. Weber W & Fussenegger M (2012) Emerging biomedical applications of synthetic biology. *Nat Rev Genet* 13(1):21-35.

[0316] 13. Nissim L & Bar-Ziv RH (2010) A tunable dual-promoter integrator for targeting of cancer cells. *Mol Syst Biol* 6:444.

[0317] 14. Roby KF, Taylor CC, Sweetwood JP, Cheng Y, Pace JL, Tawfik O, Persons DL, Smith PG, & Terranova PF (2000) Development of a syngeneic mouse model for events related to ovarian cancer. *Carcinogenesis* 21(4):585-591.

[0318] 实施例8

[0319] 肺癌的合成肿瘤募集免疫细胞治疗。需要新的治疗策略来治疗原发性和转移性肺癌并取得长期效力。现有肺癌疗法(例如化学疗法和靶向疗法)不能治愈疾病和防止肿瘤复发。此外,护理标准治疗(例如化学疗法)可引起显著的发病率和毒性。

[0320] 在一些实施方案中,本文中提供了高特异性、有效且持久的用于肺癌的免疫治疗。该治疗策略,合成的肿瘤募集免疫细胞治疗(STRICT)利用肿瘤自身募集免疫细胞来破坏肿瘤(图2A至图2B),从而诱导可调节的、安全、持久且有效的强力的多克隆抗肿瘤应答。

[0321] 具体地,我们设计了仅当多个肿瘤特异性启动子有活性时才在肺癌细胞中选择性打开的合成基因回路(例如,通过执行AND逻辑的数字基因回路)。这些合成回路可以通过病毒载体全身递送或局部递送到肿瘤中。我们利用合成生物学的最新进展将这些合成基因回路设计成高度紧凑的、基于RNA的(以避免在正常细胞中表达免疫原性外来蛋白)并且仅在

肺癌细胞中(不在任何其他正常细胞类型中)被特异性活化。当被活化时,这些回路展示表面T细胞衔接器(STE)和其他免疫调节分子(例如检查点抑制剂和细胞因子)以触发稳健且靶向性的抗肿瘤免疫应答。STE被设计成接合T细胞上的T细胞受体并触发T细胞以杀伤STE展示细胞。此外,我们向基因回路中导入安全开关以使其能够从外部打开或关闭。

[0322] 第一波T细胞应进行STE指导的肿瘤细胞杀伤,然后是靶向那些通过细胞裂解释放的更广谱的癌症抗原的第二波多克隆T细胞。因此,通过STRICT触发的免疫治疗能够抑制原发性和转移性肿瘤二者,因为T细胞可提供在整个机体内散布的免疫监视。此外,这些免疫应答可使得能够针对肺癌建立长期记忆。

[0323] 我们调整了STRICT以靶向非小细胞肺癌(non-small-cell lungcancer, NSCLC),这是最常见且难以治疗的肺癌亚组。由于NSCLC响应一些免疫治疗(例如用抗PD-1免疫检查点阻断抗体(Ab),一种活化宿主T细胞效应物功能的免疫治疗(1,2)),故STRICT表现出针对NSCLC的效力。

[0324] 尽管抗PD-1Ab被FDA批准用于治疗NSCLC,但是抗PD-1Ab的增强的存活益处仅比多西他赛长3.2个月,需要进一步提高。利用T细胞效应物功能(例如嵌合抗原受体(CAR)T细胞或双特异性T细胞衔接器(BiTE))的其他免疫治疗已经取得了针对其他癌症的有利效果(3,4)。然而,这些疗法的使用对于实体瘤(例如肺癌)造成了重大挑战。目前的CAR-T治疗需要针对每个患者进行定制的细胞工程改造和扩增,这是昂贵且难以扩展的。CAR-T细胞需要运输到肿瘤部位、靶向肿瘤特异性抗原并且长期持续介导稳健的肿瘤杀伤和效力(5),这是对于肺癌的主要挑战(6)。

[0325] BiTE包含两个串联融合的单链可变片段,以使得能够接合并通过T细胞杀伤肿瘤细胞。BiTE可以在比肿瘤靶向性Ab低5个数量级的浓度下赋予有效且稳健的肿瘤杀伤(4)。然而,由于BiTE在体内的半衰期短(约2小时)(7)并且实体瘤通常比血液性恶性肿瘤更难以接近免疫细胞,故成功的针对实体瘤的疗法可能需要长期连续静脉BiTE输注,由于副作用、患者方便和治疗效力,这是具有挑战性的。此外,已经在癌细胞上展示表面T细胞衔接器(STE)来募集T细胞介导的杀伤(8-12),但是这样的系统还没有被特异性靶向以使得可以全身治疗而没有显著的副作用。

[0326] 最近,基于病毒复制杀伤肿瘤细胞的溶瘤病毒(例如T-Vec)已经接近获得FDA批准以治疗黑色素瘤。然而,将溶瘤病毒改造成仅在特定的肿瘤细胞中复制可能是具有挑战性的,并且在临床试验中溶瘤病毒还没有证明具有良好的抗肺癌效力。另外,合成生物学家已经基于癌症特异性启动子或微小RNA谱开发了用于高特异性细胞内检测癌细胞的基因回路(13,14)。然而,合成的肿瘤检测回路仅与细胞内杀伤机制偶联,这限制了其针对癌症的效力,因为实际上不可能将回路递送至100%的癌细胞。

[0327] 通过利用合成的癌症检测回路来命令肿瘤细胞展示STE并分泌其他免疫调节剂,我们可引起稳健的宿主免疫应答以消除原发性肿瘤细胞并触发继发性多克隆T细胞应答。我们表明了STRICT可抑制局部淋巴结侵袭、靶向全身性转移并且形成免疫记忆以防止未来复发。稳健的免疫应答可以有效针对癌症,并且合成的基因回路可设计成用细胞内标志物特异性检测癌细胞。

[0328] 我们提供至少两种用STRICT靶向原发性、转移性和复发性肺癌的方法:

[0329] 1)我们创建了命令肿瘤细胞展示STE并分泌免疫调节效应物的癌症检测回路。我

们验证了其在体外和体内的治疗效力。在体外,我们测量了由STRICT造成的T细胞诱导的细胞毒性和由T细胞分泌的关键细胞因子。在体内,我们使用A549异种移植肺癌模型确定了为了通过STRICT实现有效肿瘤清除而需要被靶向的STE展示性肿瘤细胞的最低数目(15)。

[0330] 2)我们在小鼠模型中评价了针对原发性肺肿瘤、转移和复发的STRICT。我们使用A549异种移植模型和LSL-KrasG12D自发肿瘤模型(16),表明转移性肿瘤可以通过STRICT消除并且STRICT可在初始治疗后存活的小鼠中防止癌症复发。测试STRICT的效力、特异性和可调性的对照包括展示无活性STE的回路、无活性的回路、在非癌性肺细胞和其他正常组织中测试回路,以及使用人相对于鼠STE和人相对于鼠T细胞。

[0331] 本公开内容提供了通过使肿瘤转而针对其自身来治疗肺癌的方法。高特异性癌症检测回路尚未与针对肺癌的免疫治疗整合。STRICT应实现了针对肺癌的长期活性以及针对原发性和转移性肿瘤的散布的T细胞活性。我们的治疗性构建体可针对多种不同的肺癌定制,并且相对于工程改造的细胞治疗在临床实践中更容易扩展和部署。

[0332] STRICT可取得针对原发性和转移性疾病的强力的治疗效果、诱导持久的免疫记忆、导入安全开关以及降低治疗应用所需的成本、人力和基础设施。STRICT有效针对原发性和转移性肿瘤,并且取得了针对肿瘤复发的长期保护。STRICT通过从肿瘤内实现多克隆抗肿瘤免疫应答和持久免疫记忆的方便、靶向性且安全的诱导,克服了其他治疗的限制。STRICT最终可替代具有毒性和副作用的用于肺癌的护理标准治疗,并且广泛地扩展到其他癌症。在此,我们的目标是表明STRICT如何是一种变革性的新的治疗方式,其通过利用针对肺癌的免疫系统可抑制长期疾病。

[0333] 本公开内容提供了强大的可针对大范围癌症(包括肺癌)被广泛使用和重新设计的技术平台。

[0334] 实施例8中引用的参考文献

[0335] 1.S.L.Topalian et al.,Safety,activity,and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer.N Engl J Med 366,2443-2454(2012).

[0336] 2.J.R.B.Scott N.Gettinger,Naiyer A.Rizvi,Neal Ready,Laura Quan Man Chow,Scott J.Antonia,Marc E.Buyse,Jacek Jassem,Friedrich Graf Finckenstein, Lucio Crino,Thomas James Lynch,A phase III comparative study of nivolumab(anti-PD-1;BMs-963558;ONO-4538) versus docetaxel in patients(pts)with previously treated advanced/metastatic nonsquamous non-small-cell lung cancer(NSCLC).J Clin Oncol,suppl;abstr TPs8121(2013).

[0337] 3.S.L.Maude et al.,Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia.N Engl J Med 371,1507-1517(2014).

[0338] 4.R.Bargou et al.,Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody.Science 321,974-977(2008).

[0339] 5.M.H.Kershaw,J.A.Westwood,C.Y.Slaney,P.K.Darcy,Clinical application of genetically modified T cells in cancer therapy.Clin Trans Immunol 3,e16(2014).

[0340] 6.D.E.Gilham,R.Debets,M.Pule,R.E.Hawkins,H.Abken,CAR-T cells and solid tumors:tuning T cells to challenge an inveterate foe.Trends Mol Med 18,

377-384 (2012) .

[0341] 7.M.Klinger et al., Immunopharmacologic response of patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia to continuous infusion of T cell-engaging CD19/CD3-bispecific BiTE antibody blinatumomab. *Blood* 119,6226-6233 (2012) .

[0342] 8.K.W.Liao,Y.C.Lo,S.R.Roffler, Activation of lymphocytes by anti-CD3 single-chain antibody dimers expressed on the plasma membrane of tumor cells. *Gene Ther* 7,339-347 (2000) .

[0343] 9.S.Paul et al., Tumor gene therapy by MVA-mediated expression of T-cell-stimulating antibodies. *Cancer Gene Ther* 9,470-477 (2002) .

[0344] 10.K.W.Liao et al., Stable expression of chimeric anti-CD3 receptors on mammalian cells for stimulation of antitumor immunity. *Cancer Gene Ther* 10, 779-790 (2003) .

[0345] 11.Z.M.Yang,E.M.Li,B.C.Lai,Y.L.Wang,L.S.Si, Anti-CD3 scFv-B7.1 fusion protein expressed on the surface of HeLa cells provokes potent T-lymphocyte activation and cytotoxicity. *Biochem Cell Biol* 85,196-202 (2007) .

[0346] 12.Y.Liu et al., Adenovirus-mediated intratumoral expression of immunostimulatory proteins in combination with systemic Treg inactivation induces tumor-destructive immune responses in mouse models. *Cancer Gene Ther* 18,407-418 (2011) .

[0347] 13.W.Weber,M.Fussenegger, Emerging biomedical applications of synthetic biology. *Nat Rev Genet* 13,21-35 (2012) .

[0348] 14.L.Nissim,R.H.Bar-Ziv, A tunable dual-promoter integrator for targeting of cancer cells. *Mol Syst Biol* 6,444 (2010) .

[0349] 15.K.Kondo et al., Orthotopically implanted SCID mouse model of human lung cancer suitable for investigating metastatic potential and anticancer drug effects. *Oncol Rep* 12,991-999 (2004) .

[0350] 16.M.C.Kwon,A.Berns, Mouse models for lung cancer. *Mol Oncol* 7,165-177 (2013) .

[0351] 实施例9

[0352] 合成的启动子文库。在一些实施方案中,本文中提供了简单、快速且成本有效的表征转录因子的翻译后调节的方法。所述方法可用于例如鉴定可以用于靶向目标细胞状态的高特异性且很短的合成启动子,这对于研究和个体化医学二者都是重要的。这可例如通过鉴定在特定细胞状态下被活化的高特异性结合基序来完成。目前的方法(例如RNA-Seq和ChIP-Seq)可产生误导,因为RNA水平不总是与蛋白质活性相关(p53是一个很好的实例),并且TF与DNA的结合不总是与转录活化相关(例如,TF可以起阻遏物的作用)。在一些实施方案中,本公开内容的方法提供了在特定细胞状态下被活化的结合基序的直接证据和这些基序的活化水平。生物信息学层面使得能够表征与这些基序有关的转录因子,并且从而能够破译在目标细胞状态下被活化的转录级联。关于图46和图47,从NB508-low文库中分离合成的

启动子。

[0353] 尽管本文中已经描述和说明了多个发明实施方案,但是本领域普通技术人员将容易预见到用于执行本文中所述的功能和/或获得本文中所述的结果和/或一个或多个优点的多种其他手段和/或结构,并且每个这样的变化和/或修改都视为在本文中所述的发明实施方案的范围内。更一般地,本领域技术人员将容易理解,本文中所述的所有参数、尺寸、材料和配置意指为示例性的,并且实际的参数、尺寸、材料和/或配置将取决于使用发明教导的具体应用。本领域技术人员使用常规实验就将认识到或者能够确定本文中所述的具体发明实施方案的多个等同方案。因此应理解,前述实施方案仅作为实例呈现,并且在所附权利要求及其等同方案的范围内,发明实施方案可以以除具体描述和要求保护的方式之外的方式实施。本公开内容的发明实施方案涉及本文中所述的各个单独的特征、系统、制品、材料、试剂盒/药盒和/或方法。此外,如果这样的特征、系统、制品、材料、试剂盒/药盒和/或方法不互相矛盾,则两种或更多种这样的特征、系统、制品、材料、试剂盒/药盒和/或方法的任意组合包括在本公开内容的发明范围内。

[0354] 本文中限定和使用的定义应理解为涵盖按照字典定义、通过引用并入的文献中的定义和/或所限定的术语的普通含义。

[0355] 本文中公开的所有参考文献、专利和专利申请相对于每一个所引用的主题通过引用并入,在一些情况下可涵盖整个文献。

[0356] 除非清楚相反地指出,否则本文中在说明书和权利要求书中未使用数量词修饰的描述应理解为意指“至少一个/种”。

[0357] 如本文中在说明书和权利要求书中使用的短语“和/或”应理解为意指如此连接的要素中的“任一者或两者”,即,在一些情况下共同存在而在另一些情况下分开存在的要素。用“和/或”列举的多个要素应以相同的方式理解,即如此连接的要素中“一个或多个”。除了由“和/或”子句具体确认的要素之外,可以任选地存在其他要素,无论与那些具体确认的要素有关还是无关。因此,作为非限制性实例,当与开放式语言如“包括”一起使用时,提到的“A和/或B”在一个实施方案中可指仅A(任选地包括除B之外的要素);在另一个实施方案中可指仅B(任选地包括除A之外的要素);在又一个实施方案中可指A和B两者(任选地包括其他要素);等。

[0358] 如本文中在说明书和权利要求书中所使用的,提及一个或多个要素的列表的短语“至少一个”应理解为意指从要素列表中的任一个或多个要素中选择的至少一个要素,但不一定包括要素列表中具体列举的每个要素中的至少一个,也不排除要素列表中要素的任意组合。该定义还允许任选地存在除了在短语“至少一个”所提及的要素列表中具体确认的要素之外的要素,无论其与具体确认的那些要素有关还是无关。因此,作为非限制性实例,“A和B中的至少一个”(或者等效地“A或B中的至少一个”,或者等效地“A和/或B中的至少一个”)在一个实施方案中可指至少一个A,任选地包括多于一个A,而不存在B(并且任选地包括除B之外的要素);在另一个实施方案中可指至少一个B,任选地包括多于一个B,而不存在A(并且任选地包括除A之外的要素);在又一个实施方案中可指至少一个A,任选地包括多于一个A,以及至少一个B,任选地包括多于一个B(并且任选地包括其他要素);等。

[0359] 还应理解,除非清楚相反地指出,否则在本文中要求保护的包括多于一个步骤或动作的任何方法中,该方法的步骤或动作的顺序不一定限于记载该方法的步骤或动作的

顺序。

[0360] 在权利要求书中以及以上的说明书中,所有的过渡短语例如“包含”、“包括”、“携带”、“具有”、“含有”“涉及”、“容纳”、“由...构成”等都理解为开放式的,即,意指包括但不限于。只有过渡短语“由...组成”和“基本上由...组成”分别是封闭式或半封闭式的过渡短语,如在美国专利局专利审查程序指南第2111.03节中所阐明的。

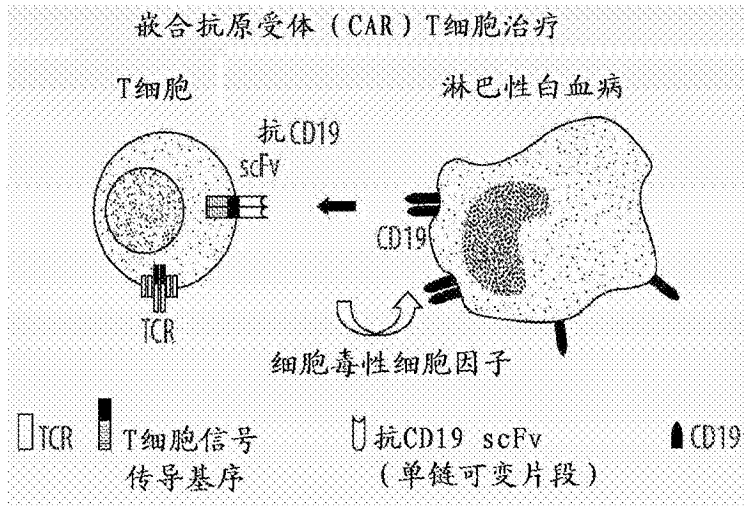


图1A

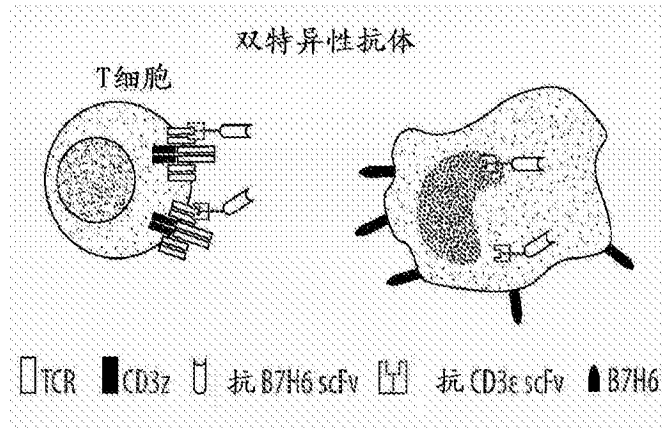


图1B

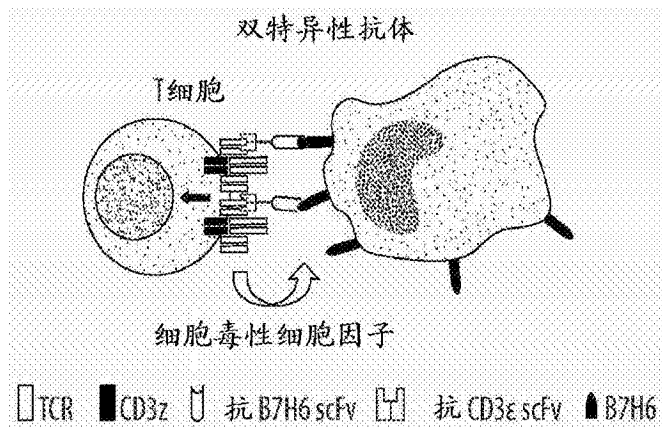
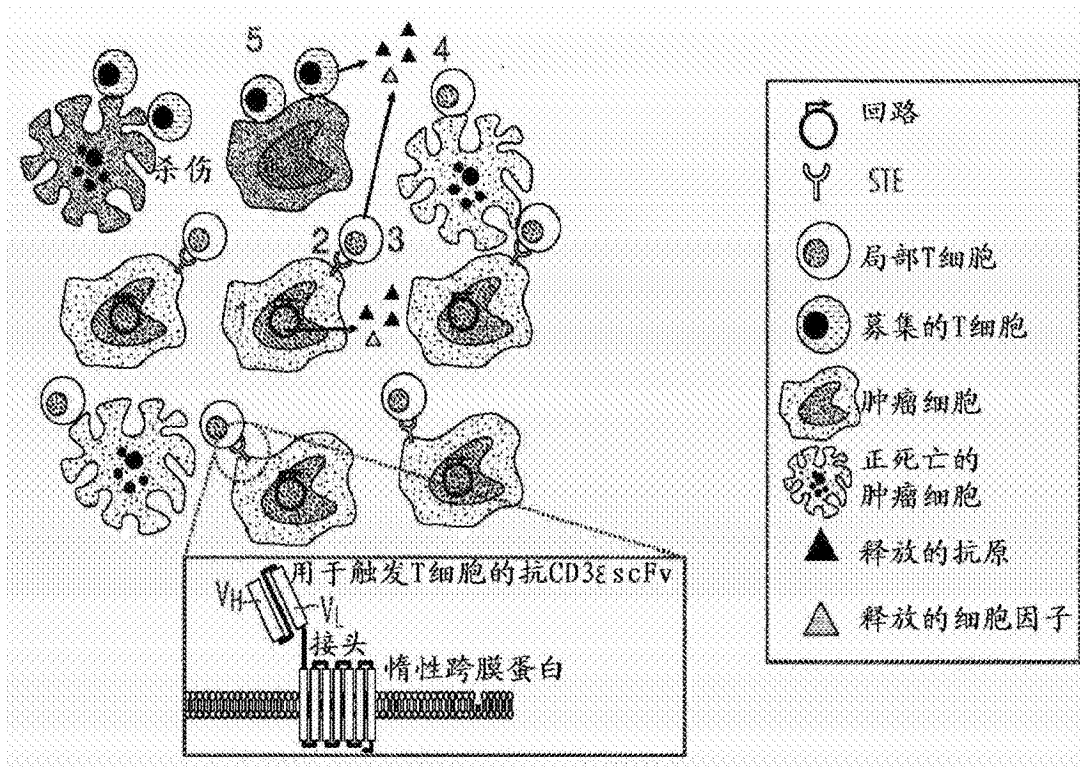
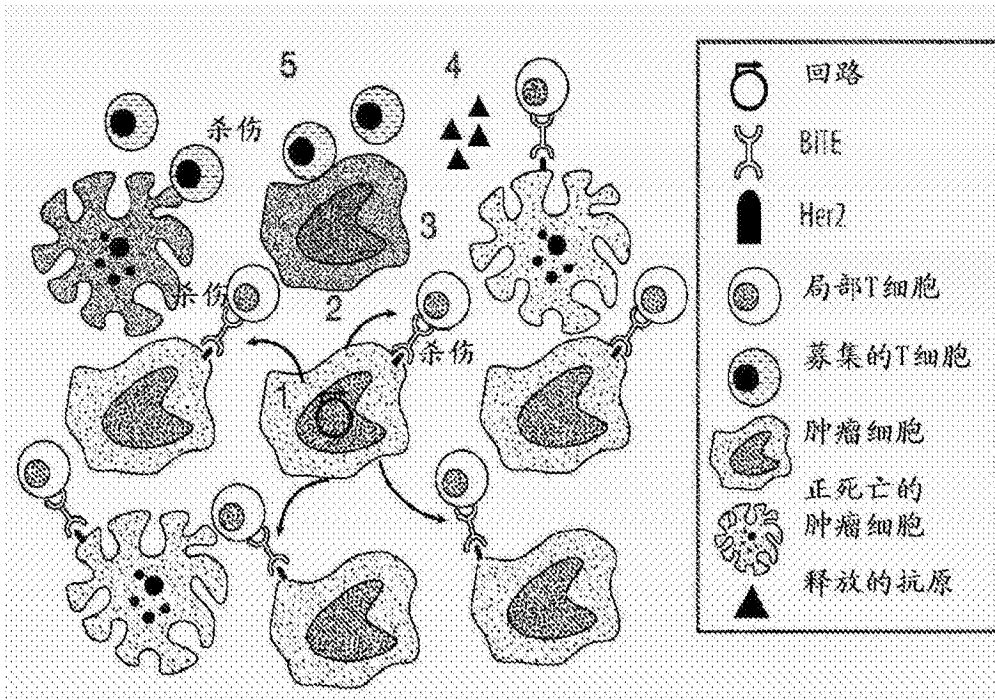


图1C



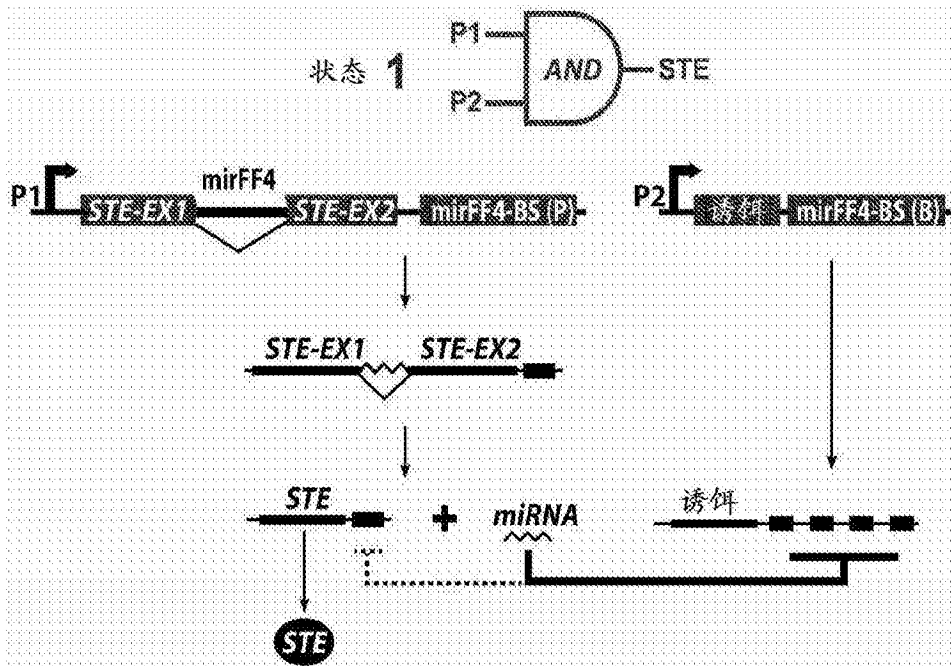


图3A

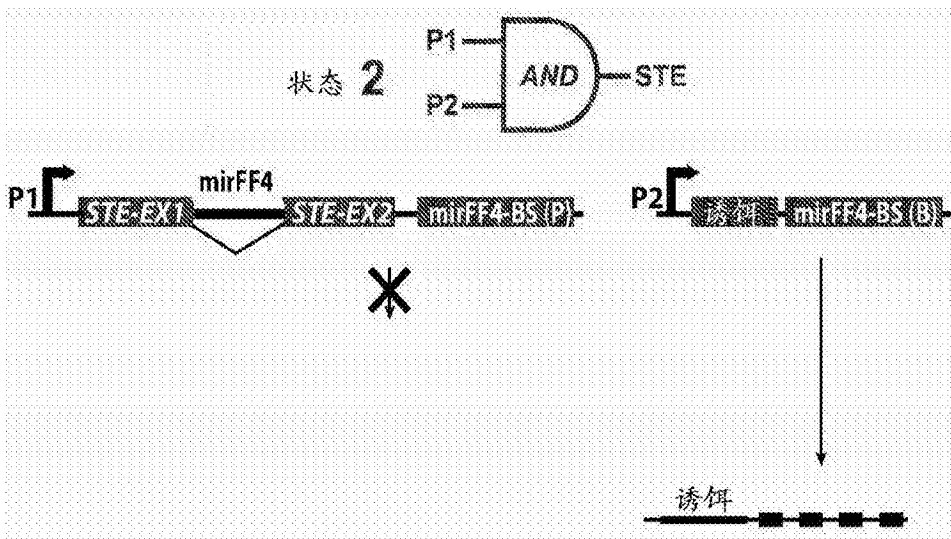


图3B

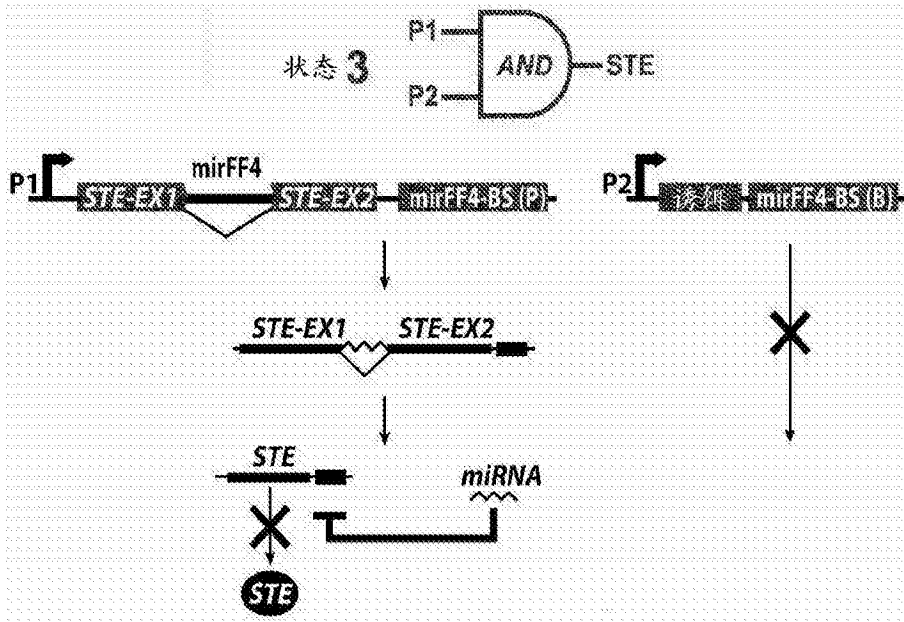


图3C

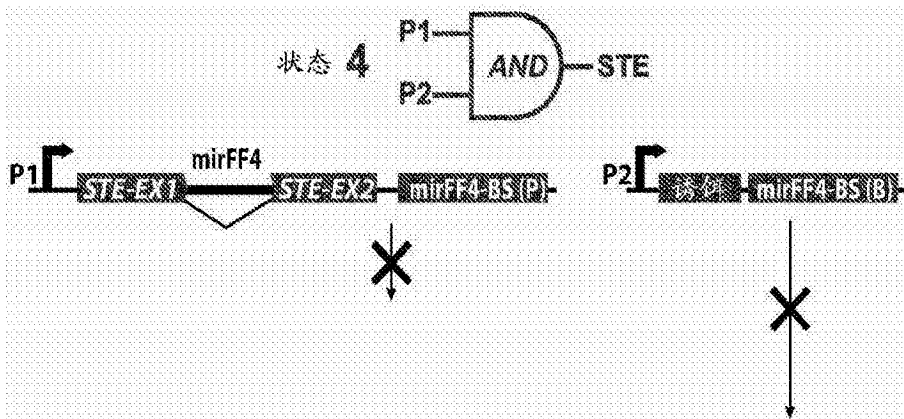


图3D

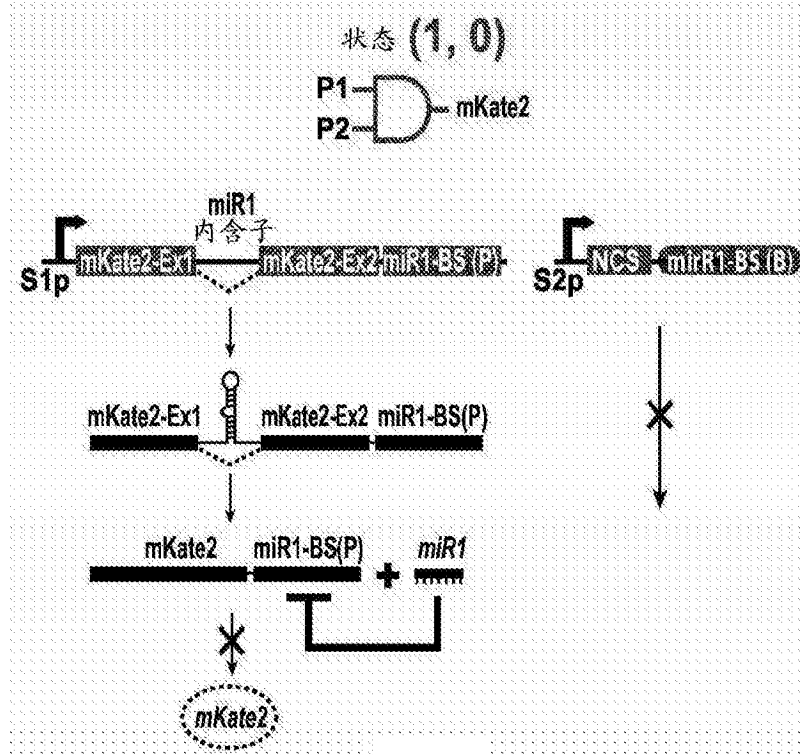


图3E

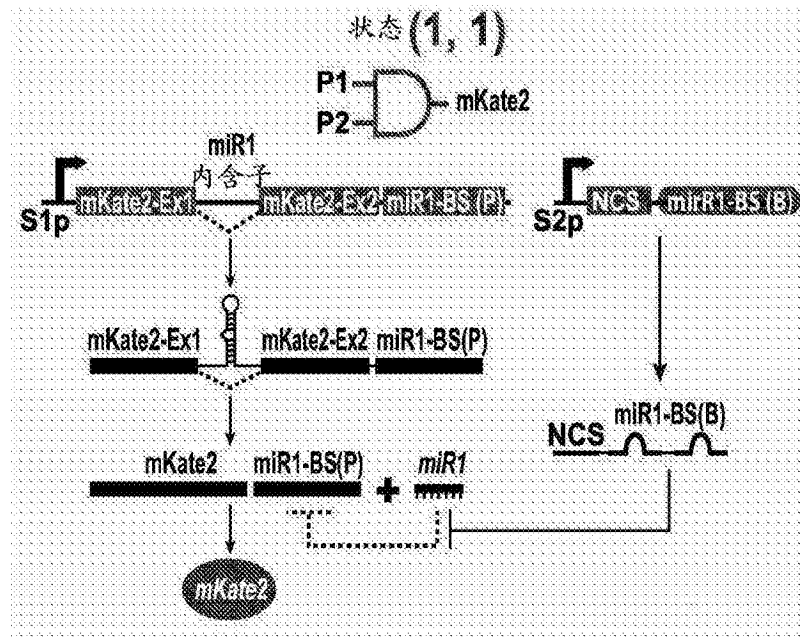


图3F

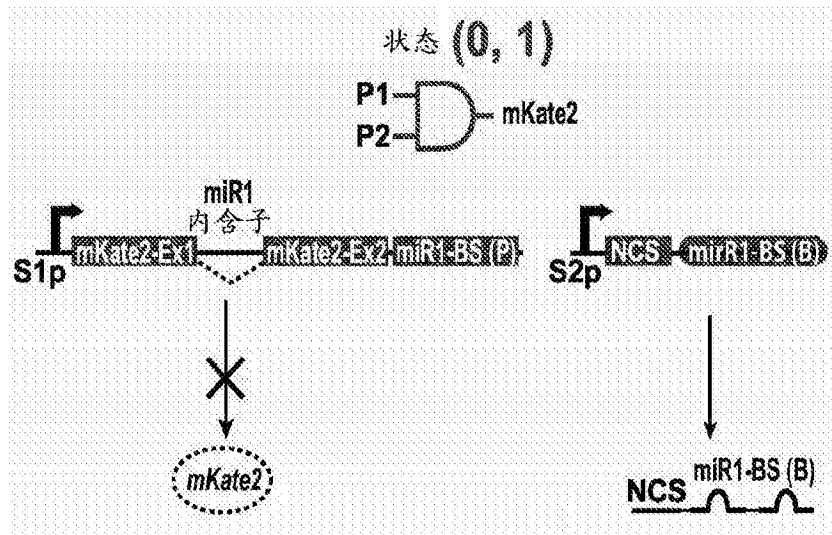


图3G

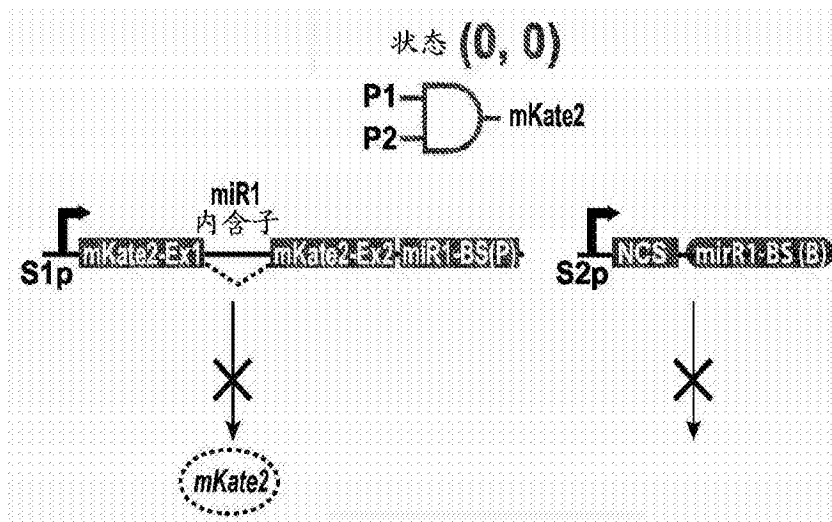


图3H

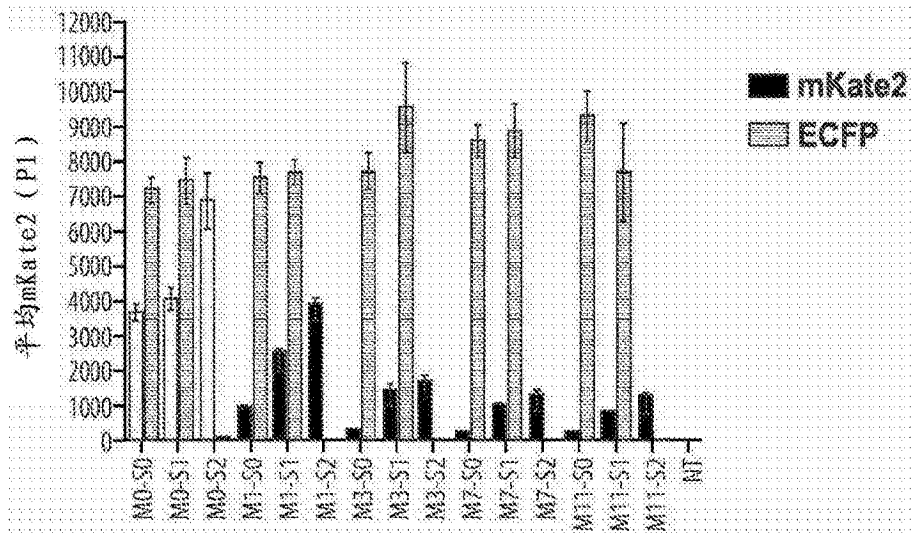


图5

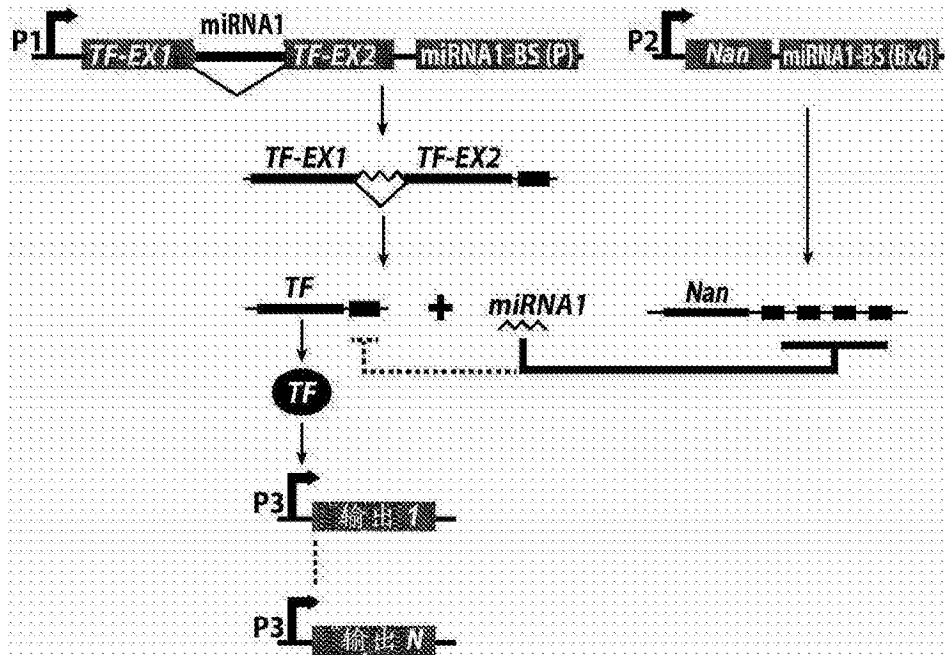


图6A

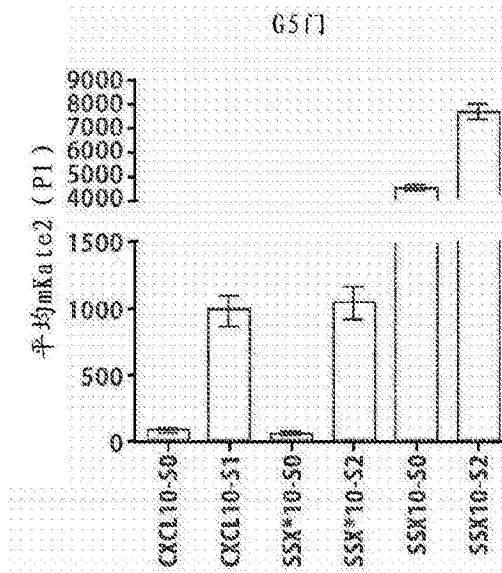


图6B

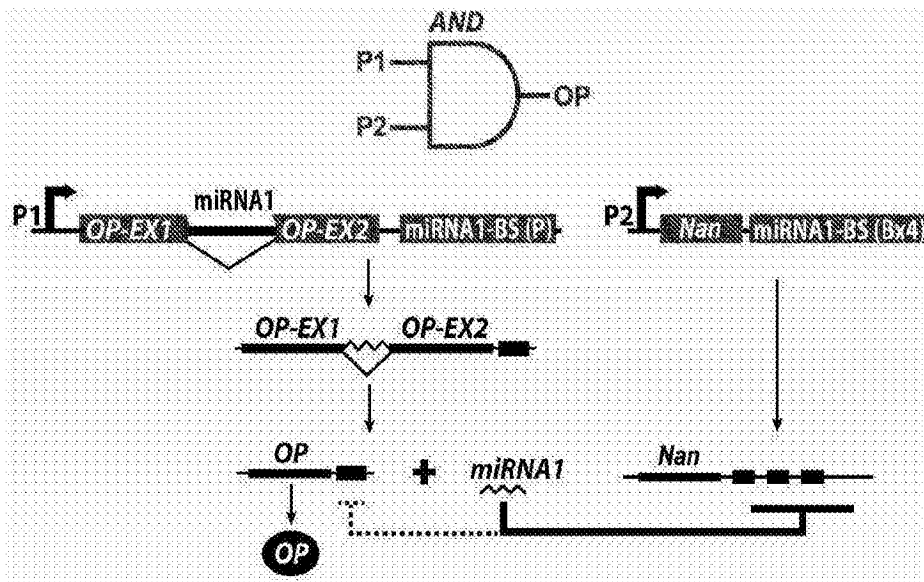


图7A

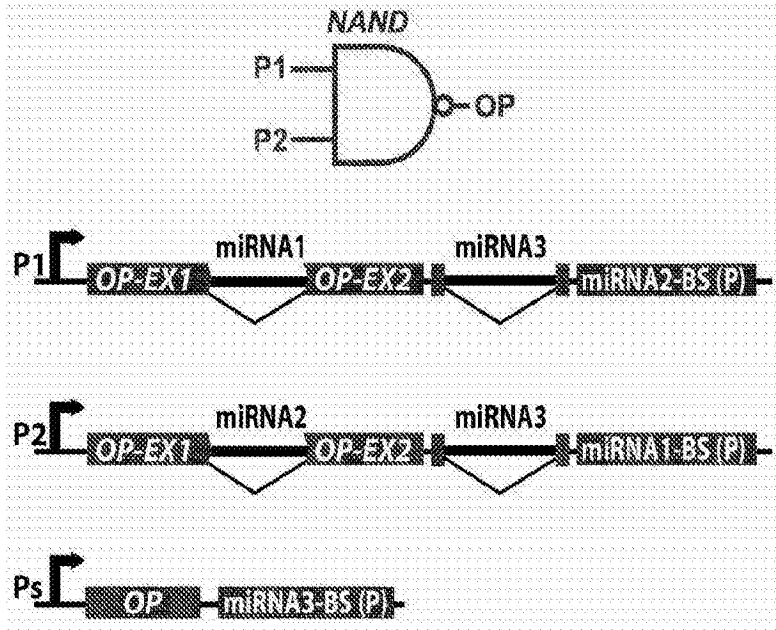


图7B

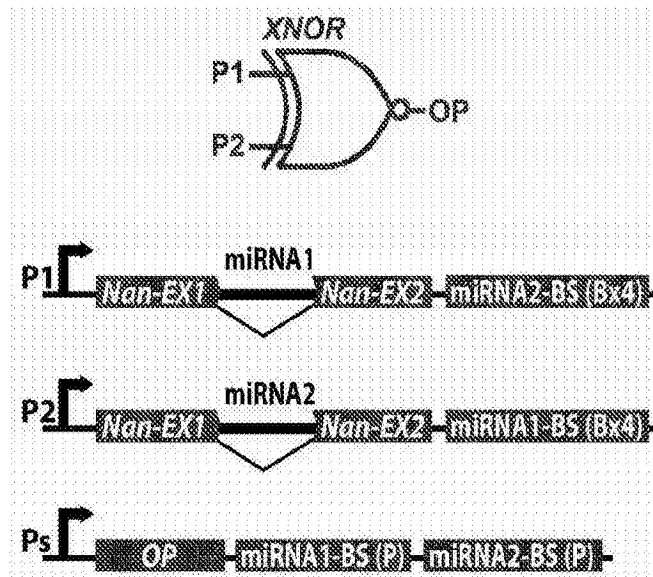


图7C

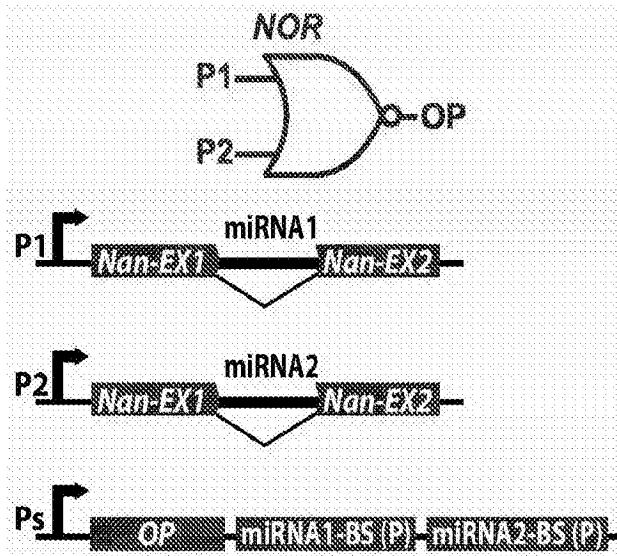


图7D

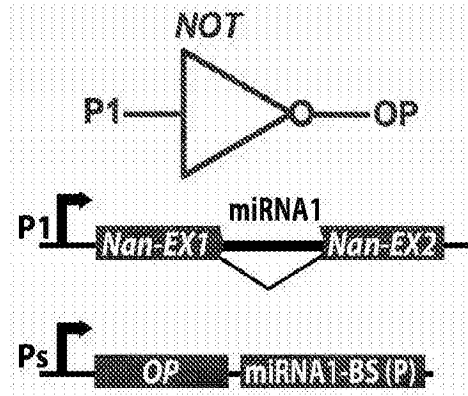


图7E

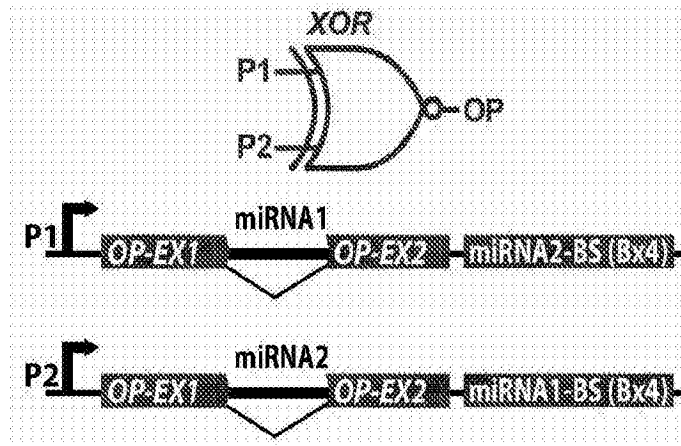


图7F

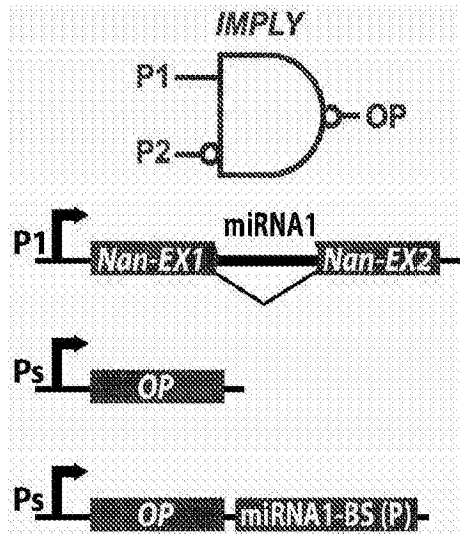


图7G

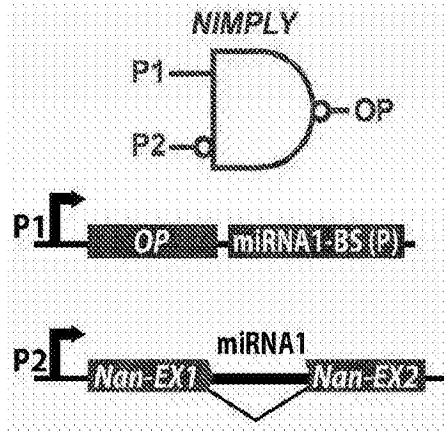


图7H

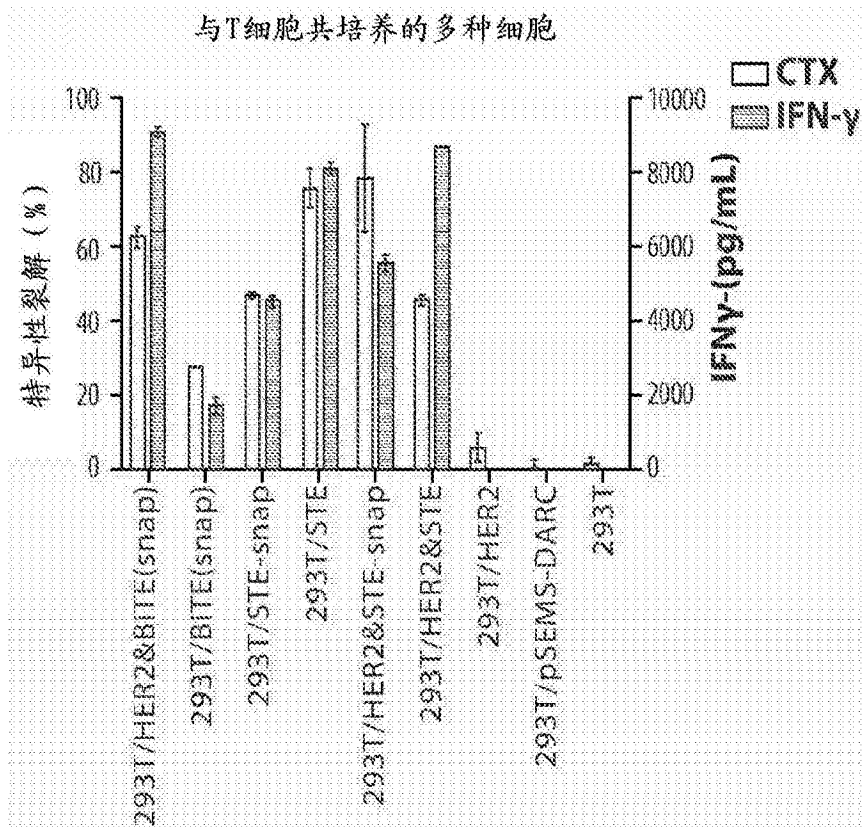


图8

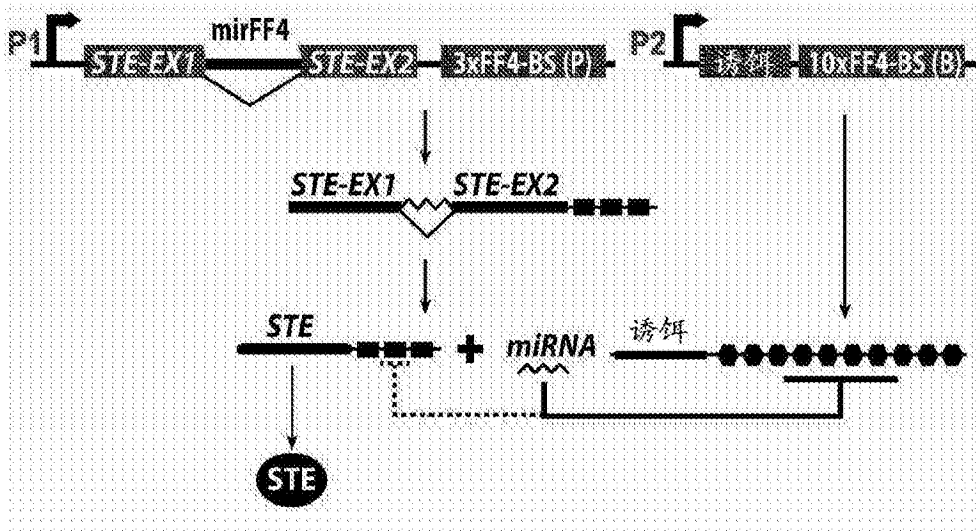


图9A

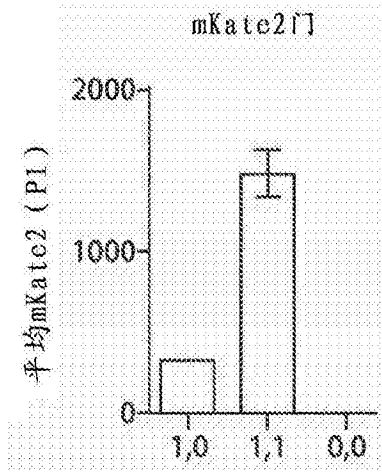


图9B

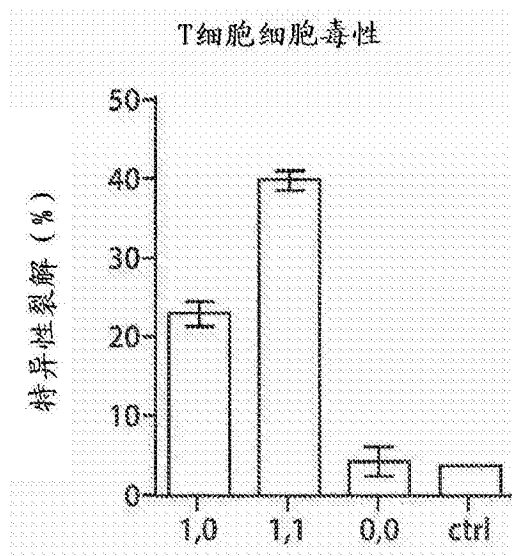


图9C

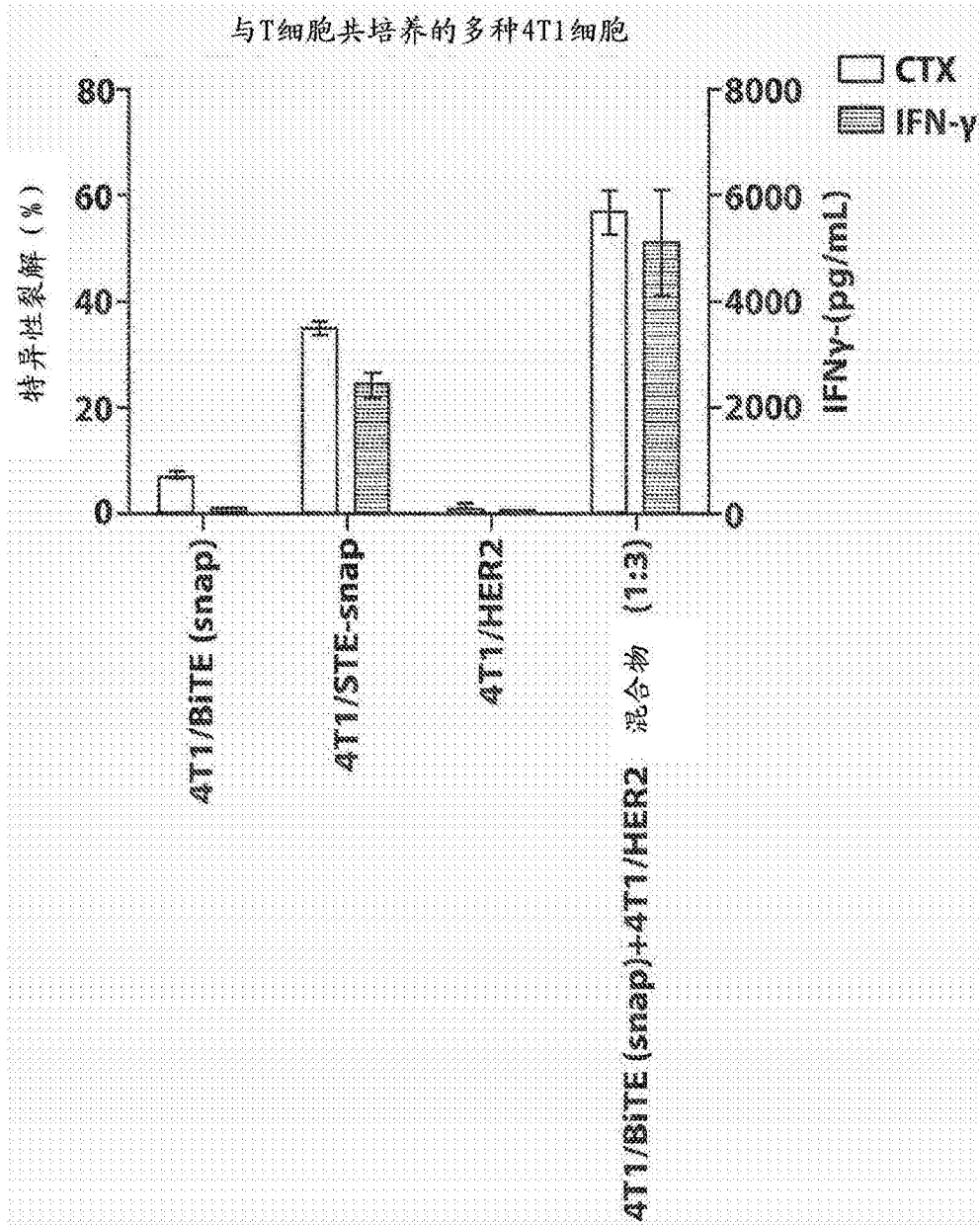


图10

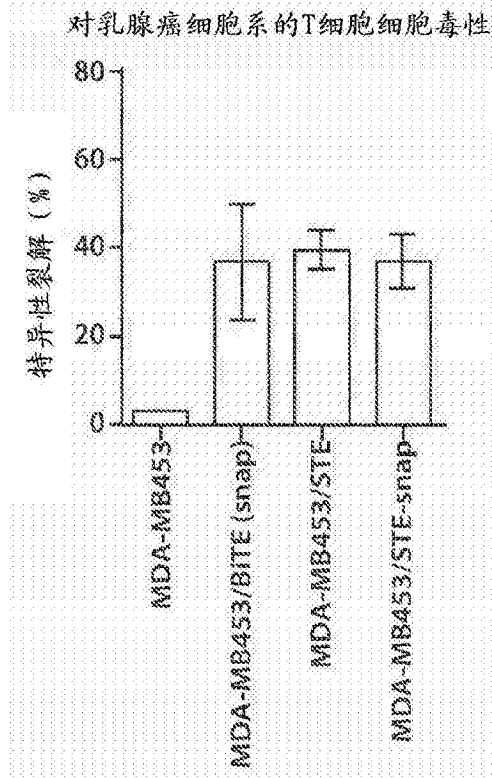


图11

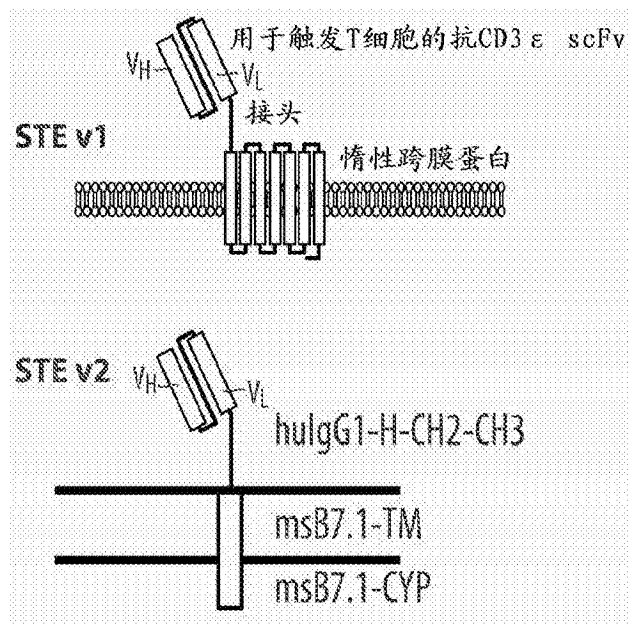


图12

对诱导型STE表达细胞系的T细胞细胞毒性

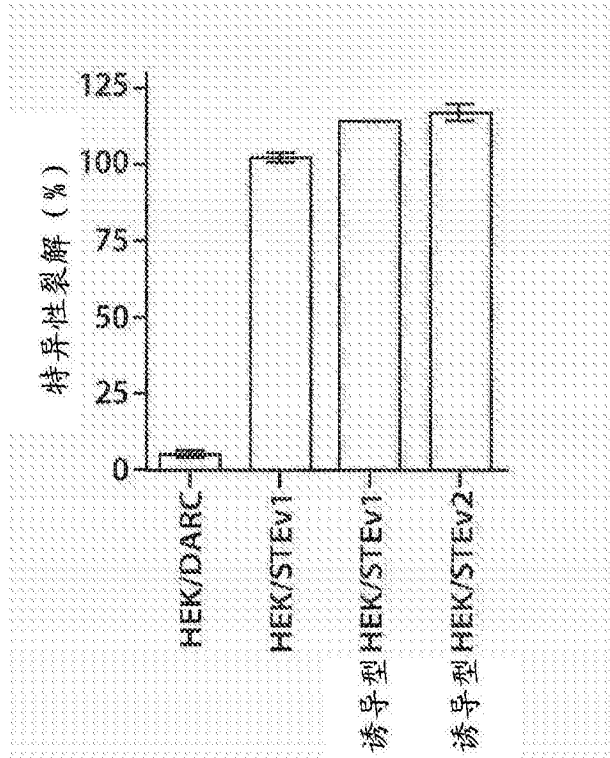


图13

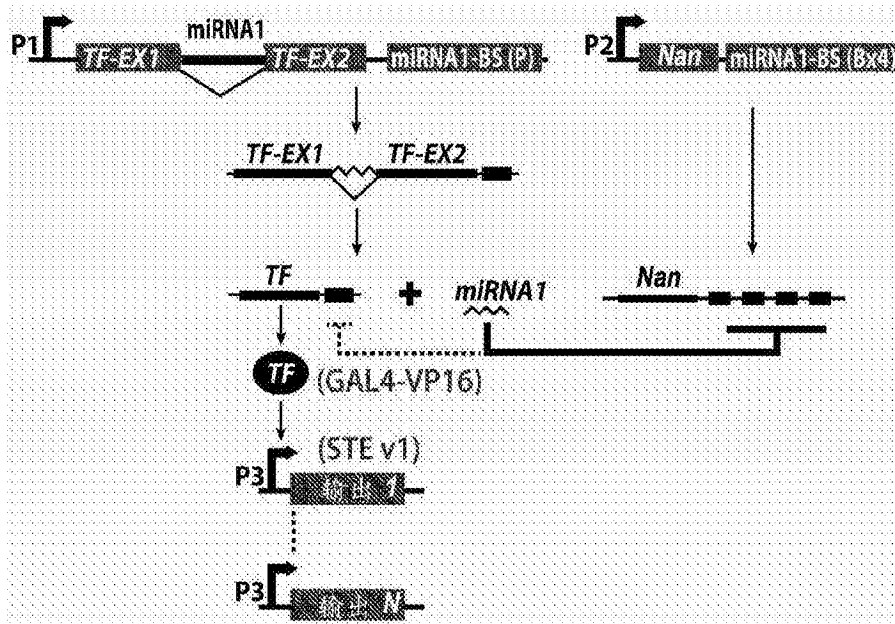


图14A

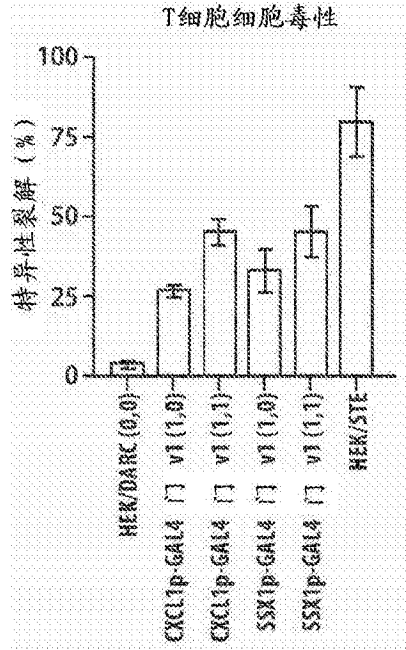


图14B

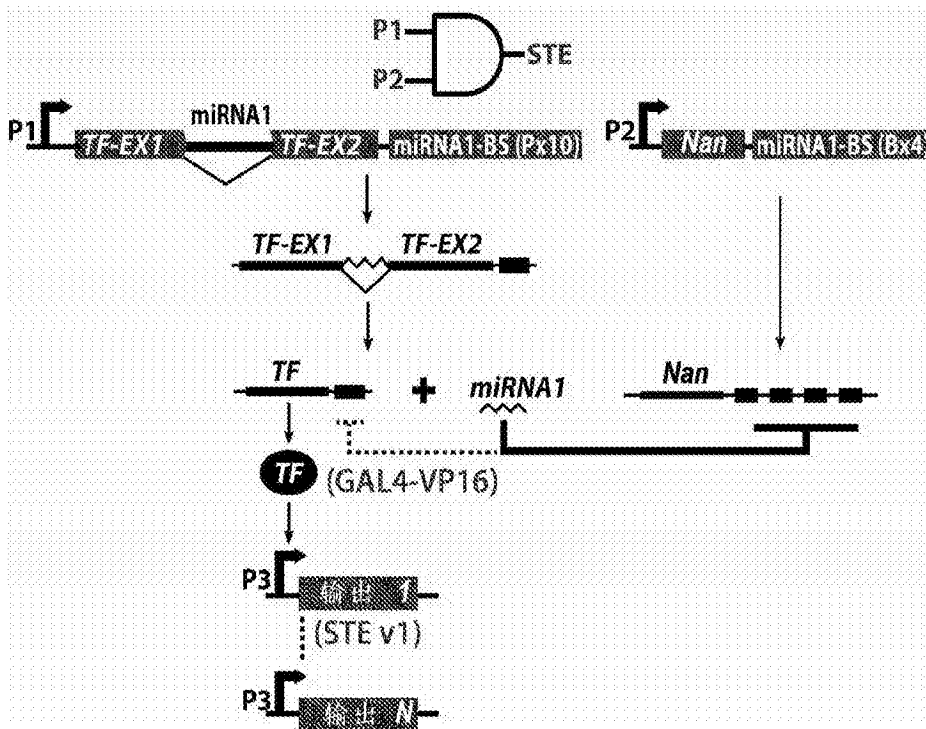


图15A

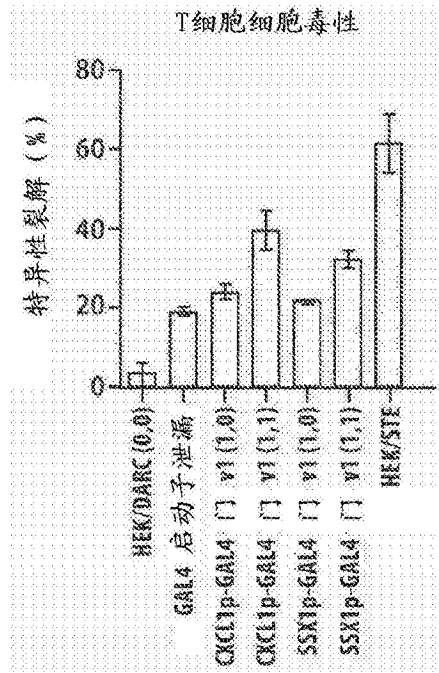


图15B

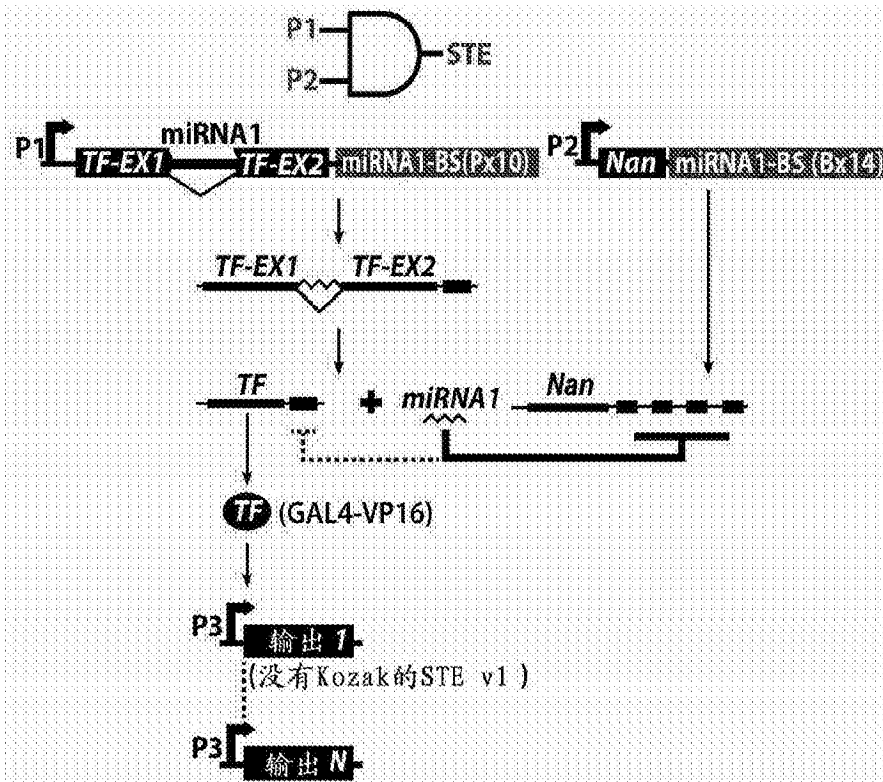


图16A

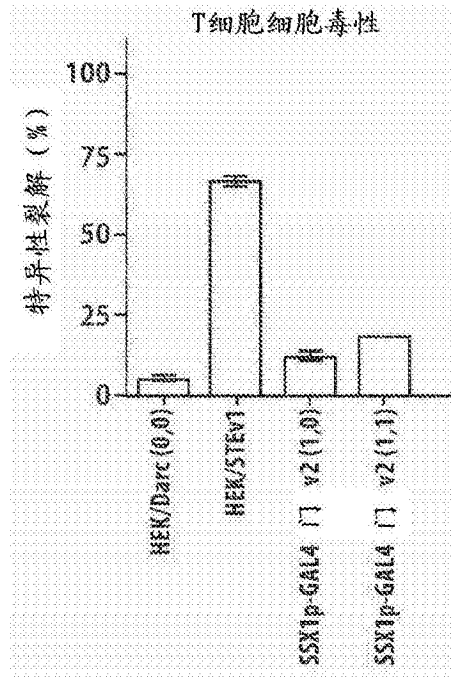


图16B

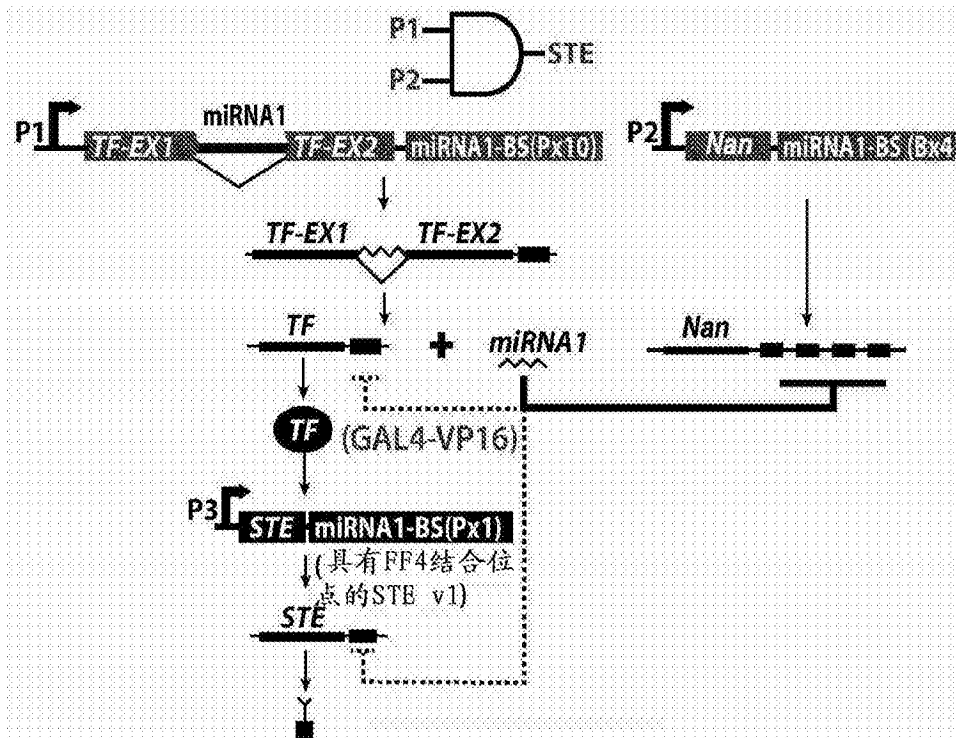


图17A

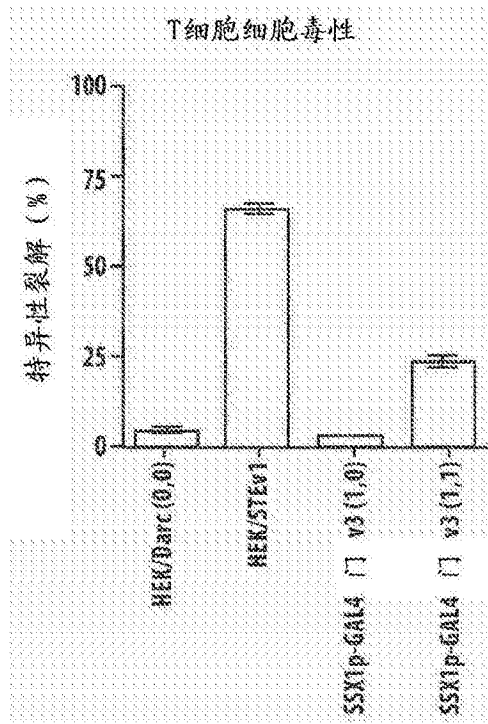


图17B

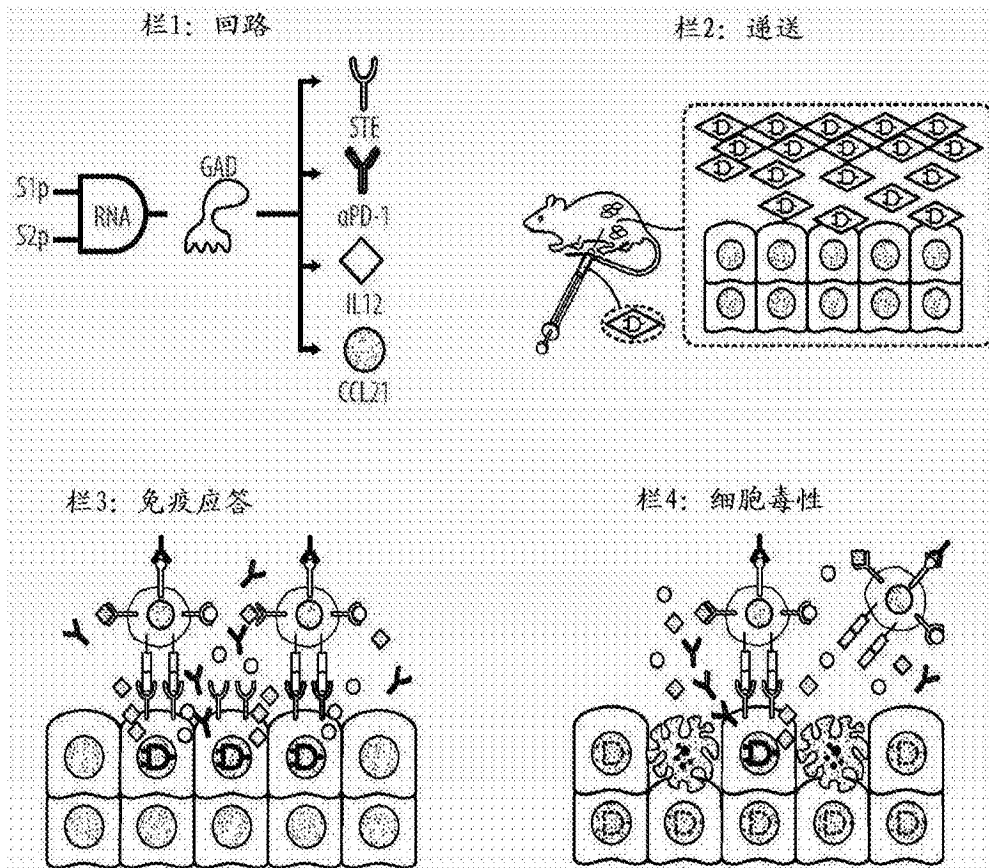


图18

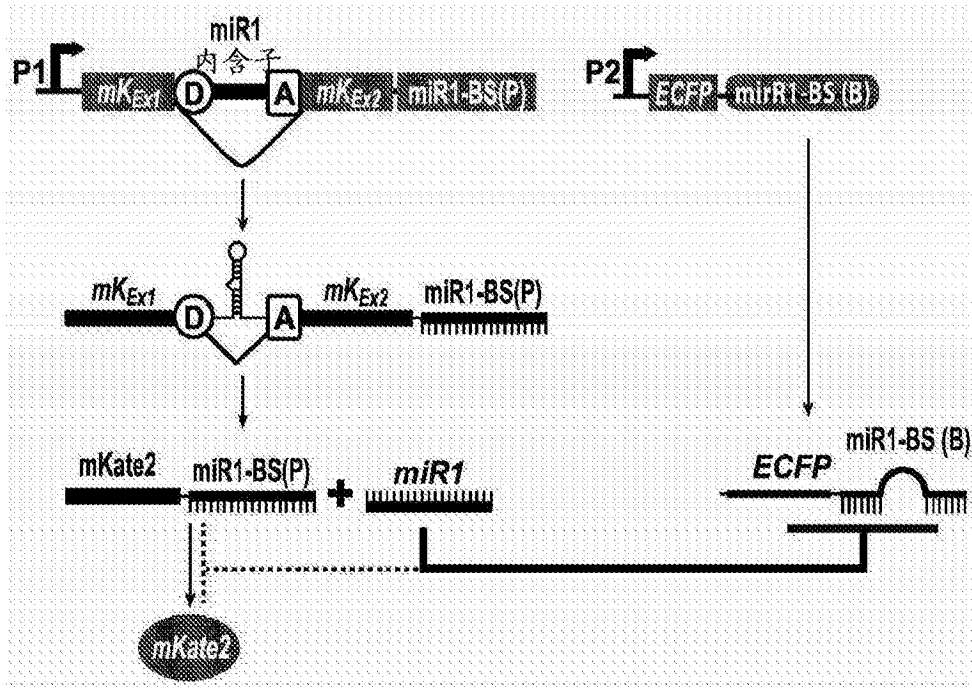


图19

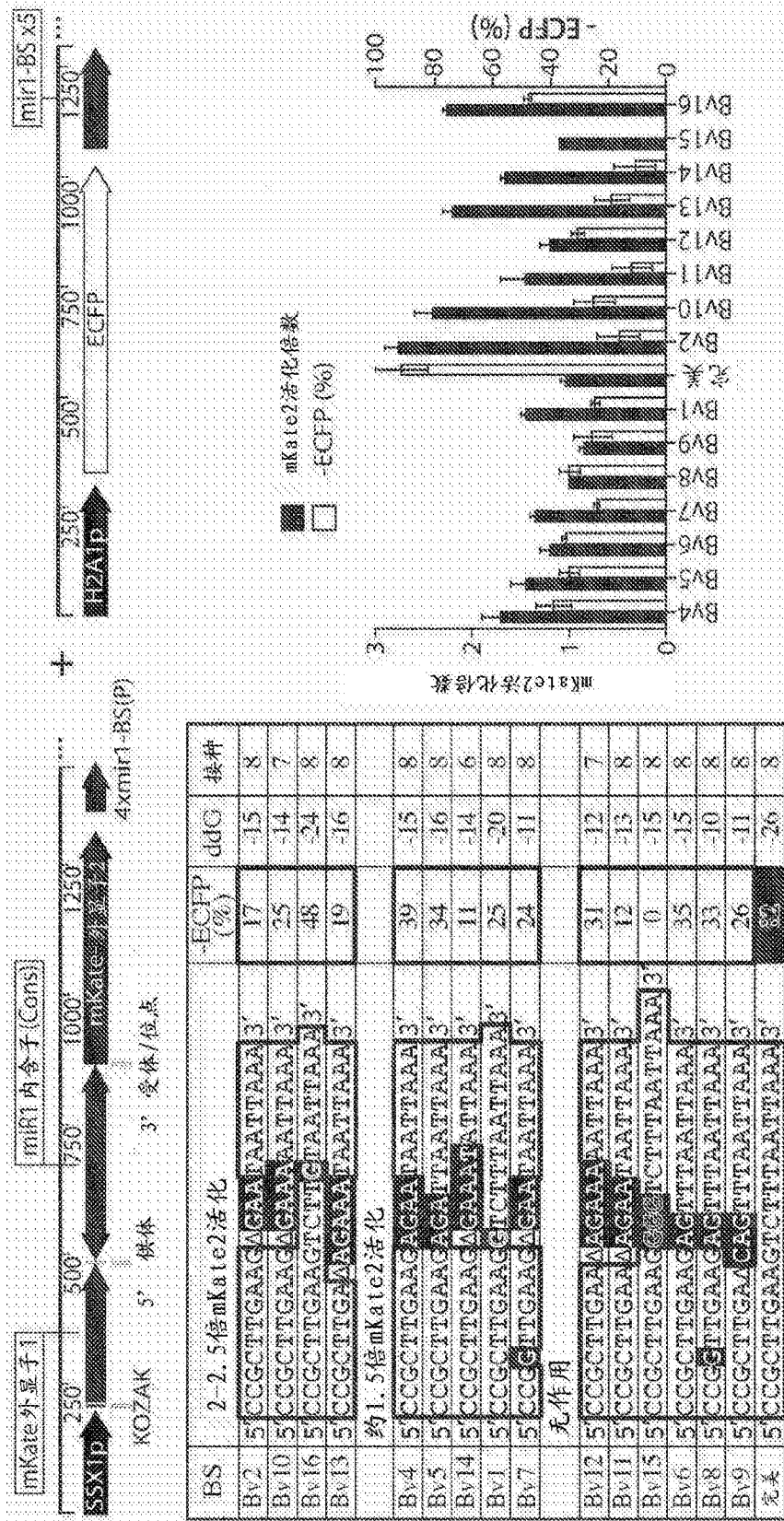


图20

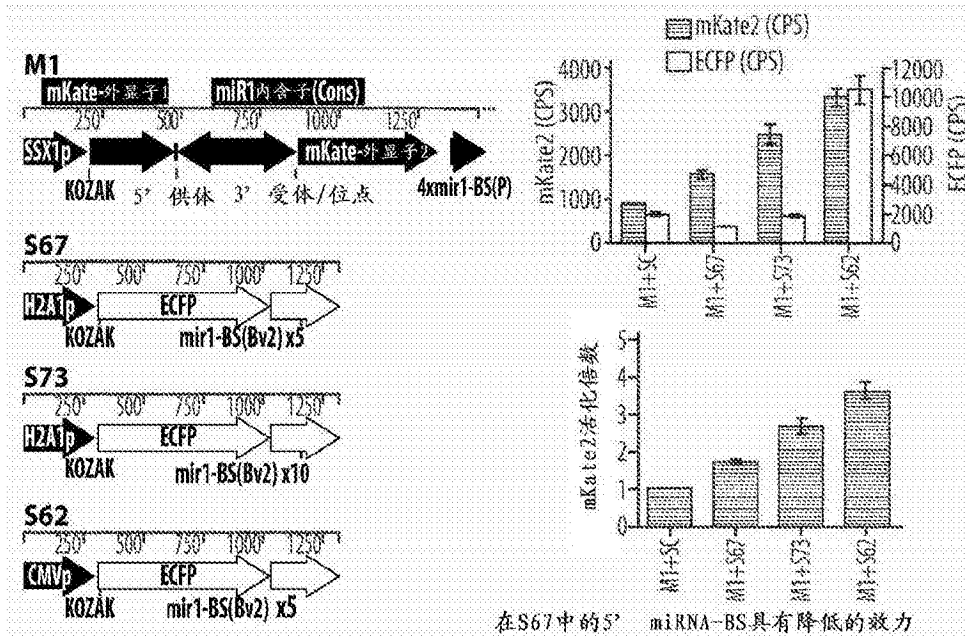


图21

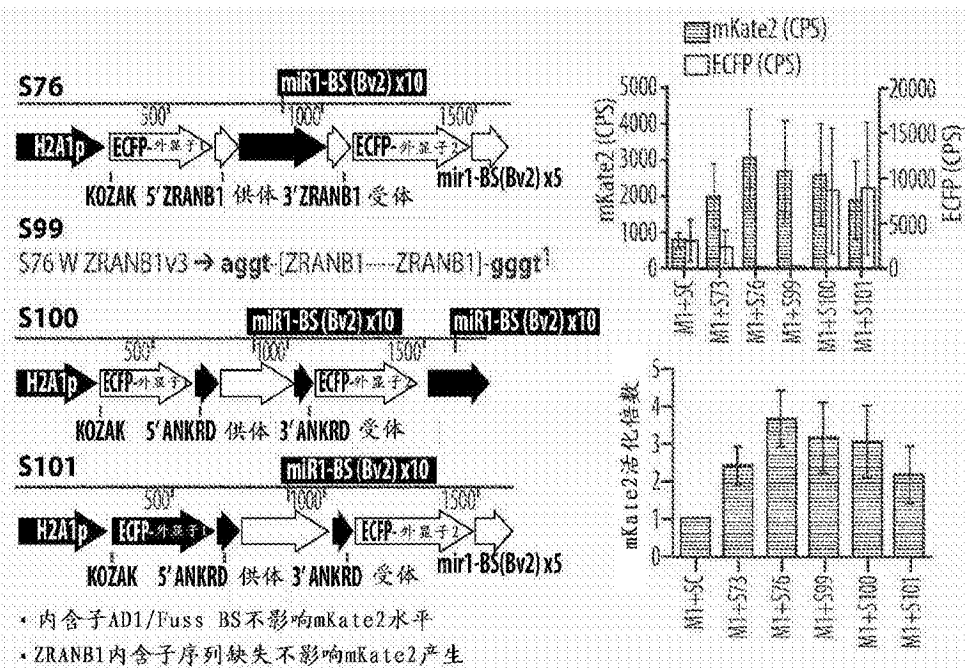


图22

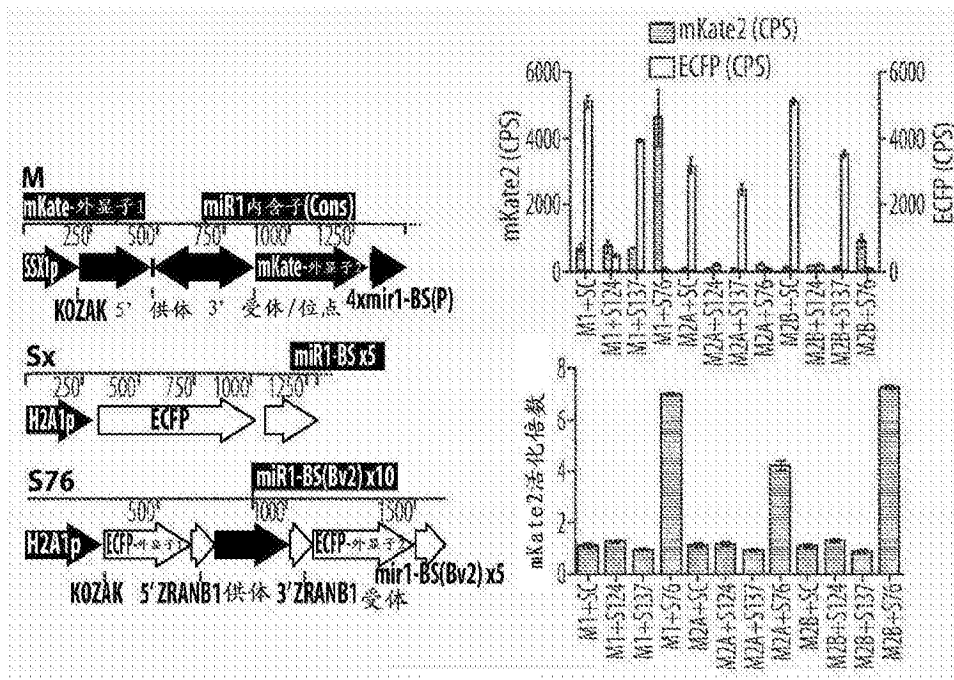


图23

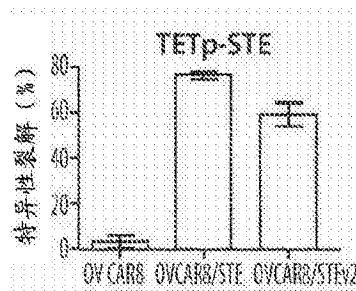


图24A

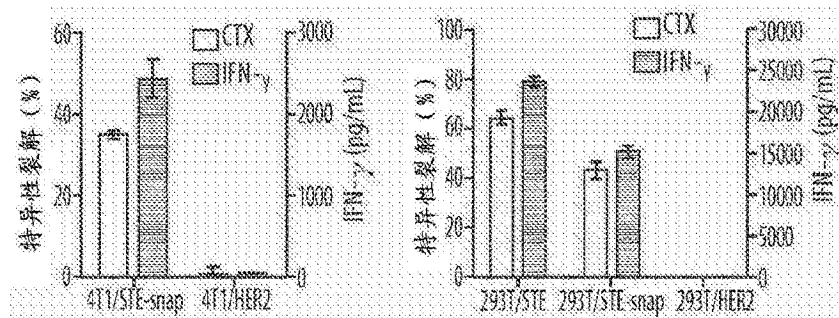


图24B

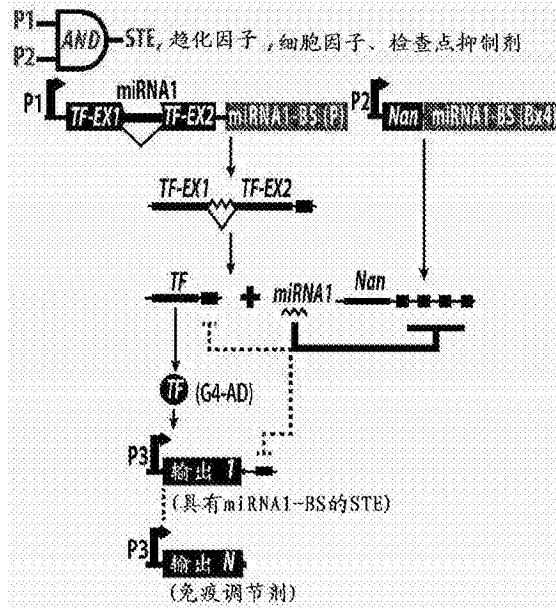


图25A

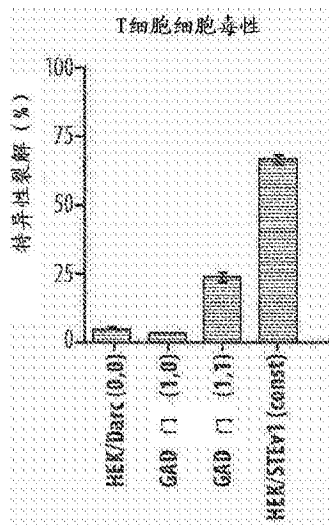


图25B

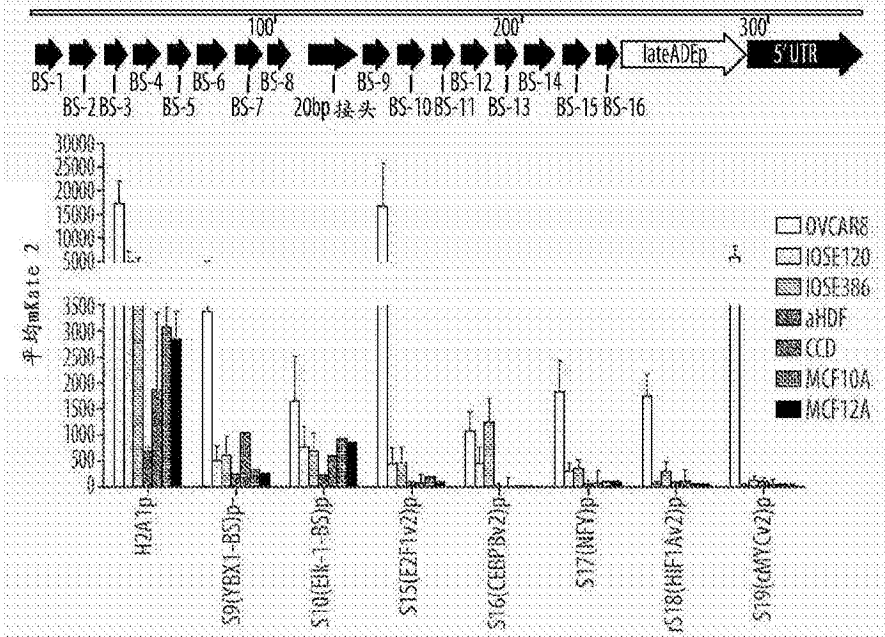


图26A

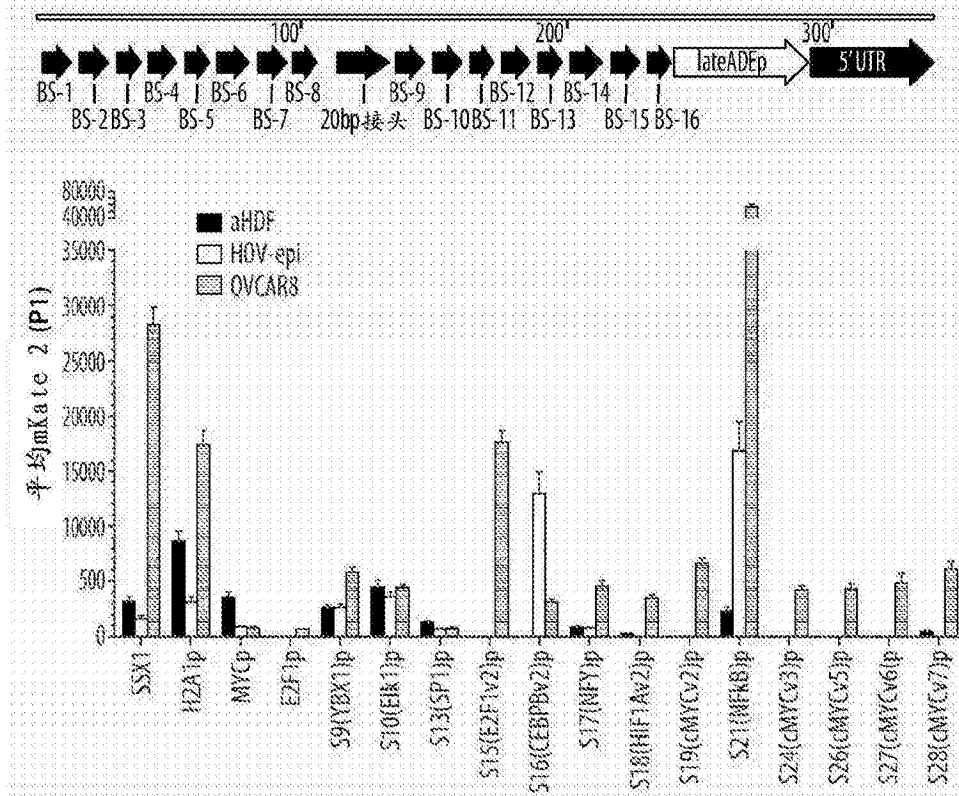


图26B

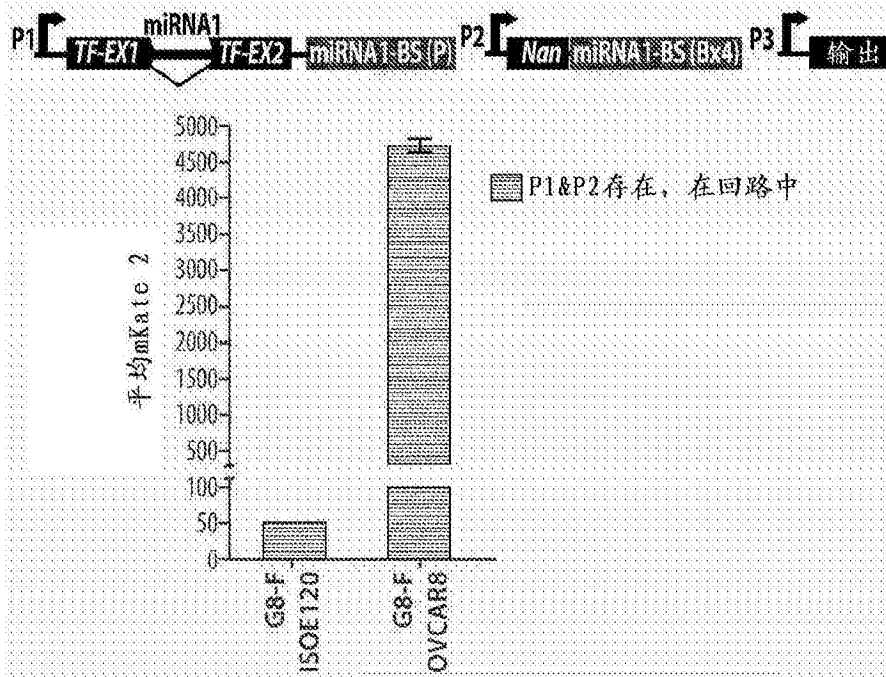


图27

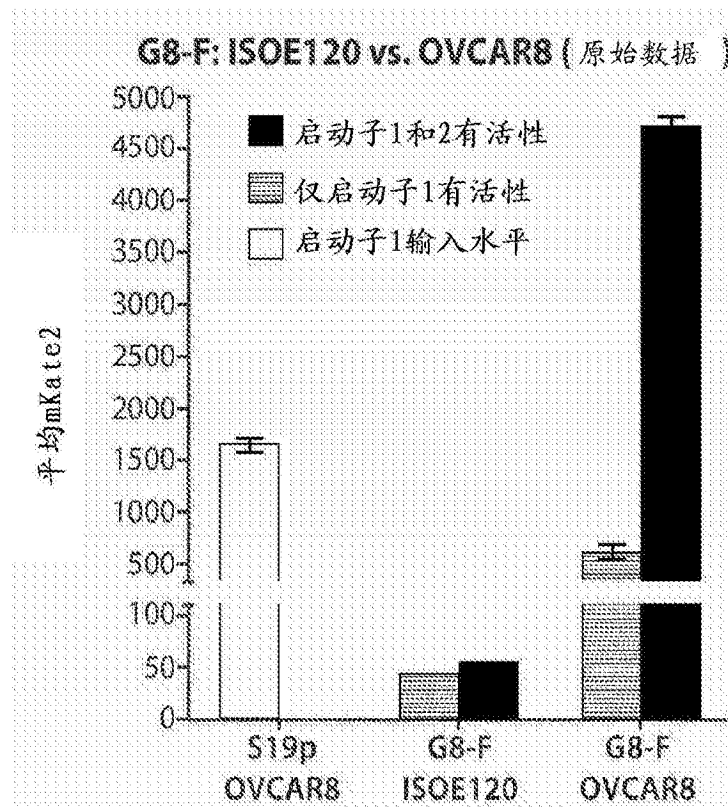


图28

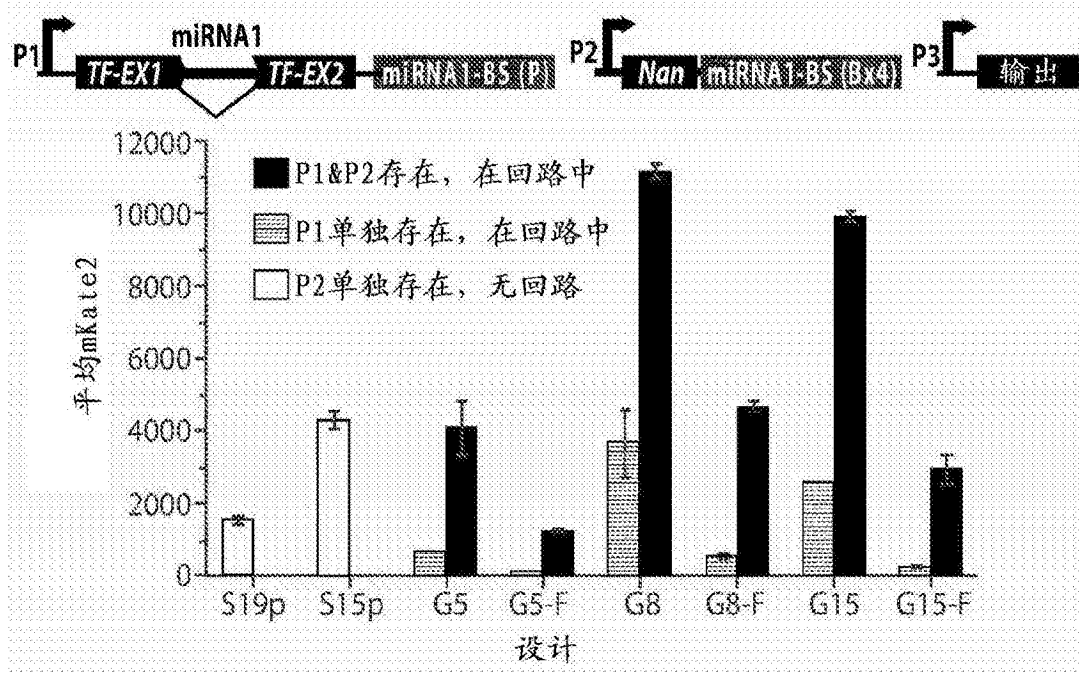


图29

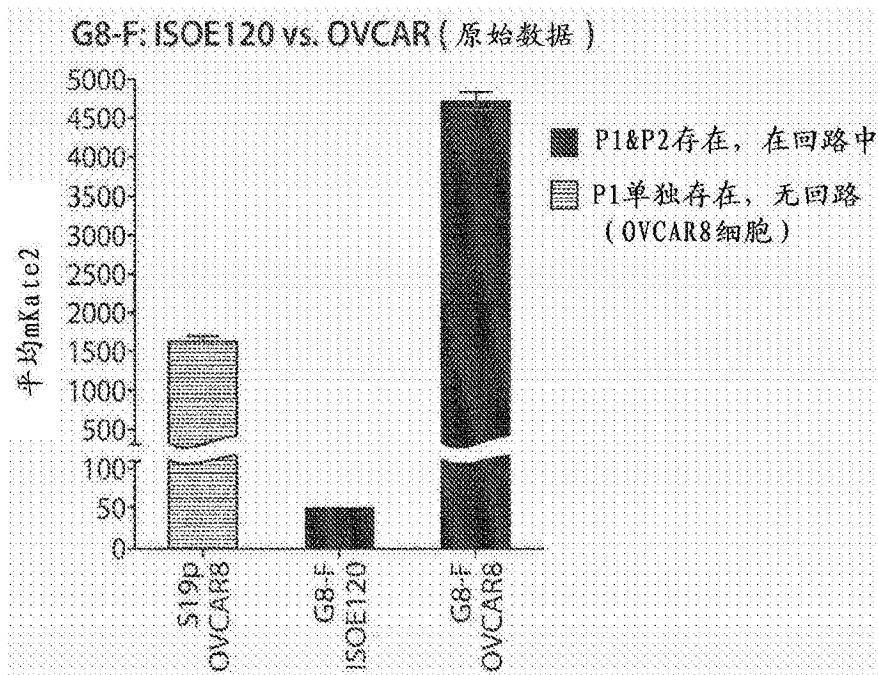


图30

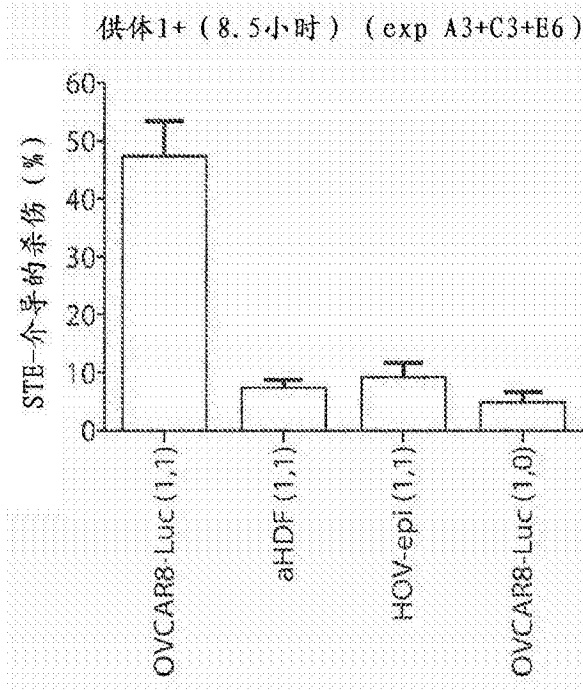


图31A

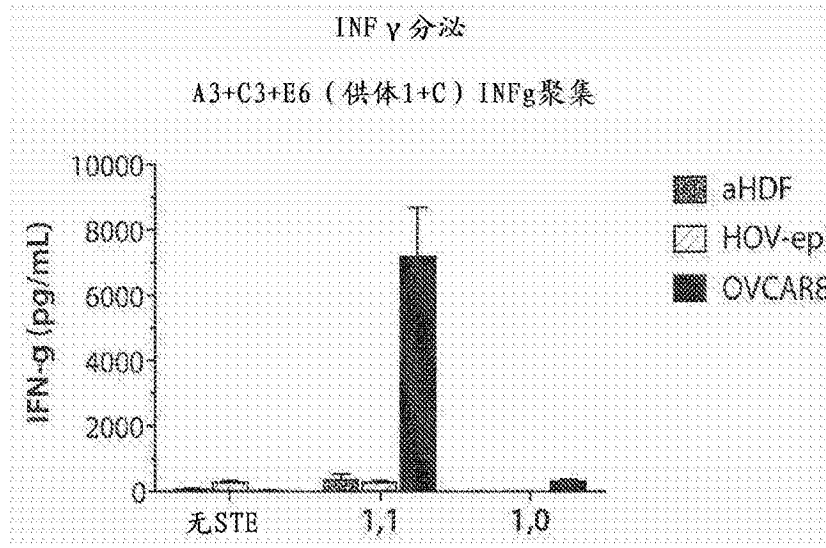


图31B

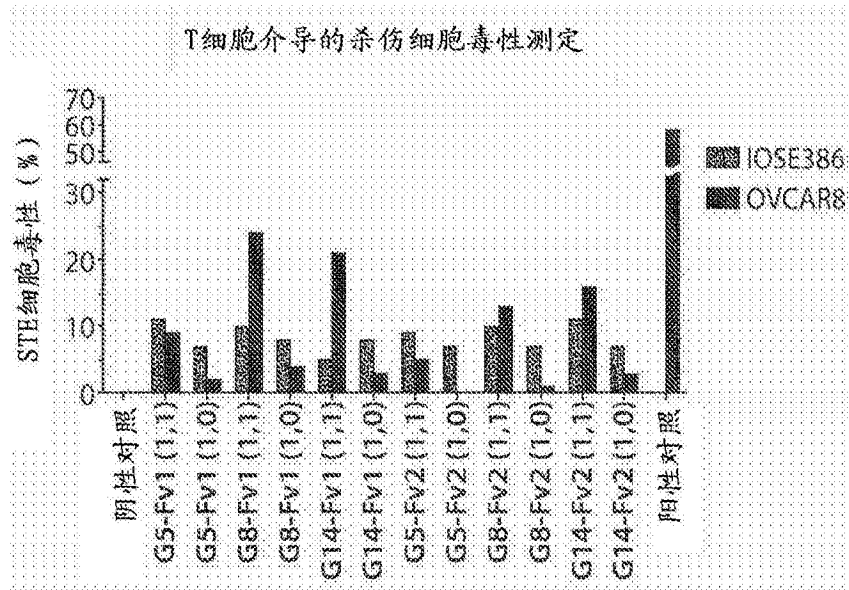


图32

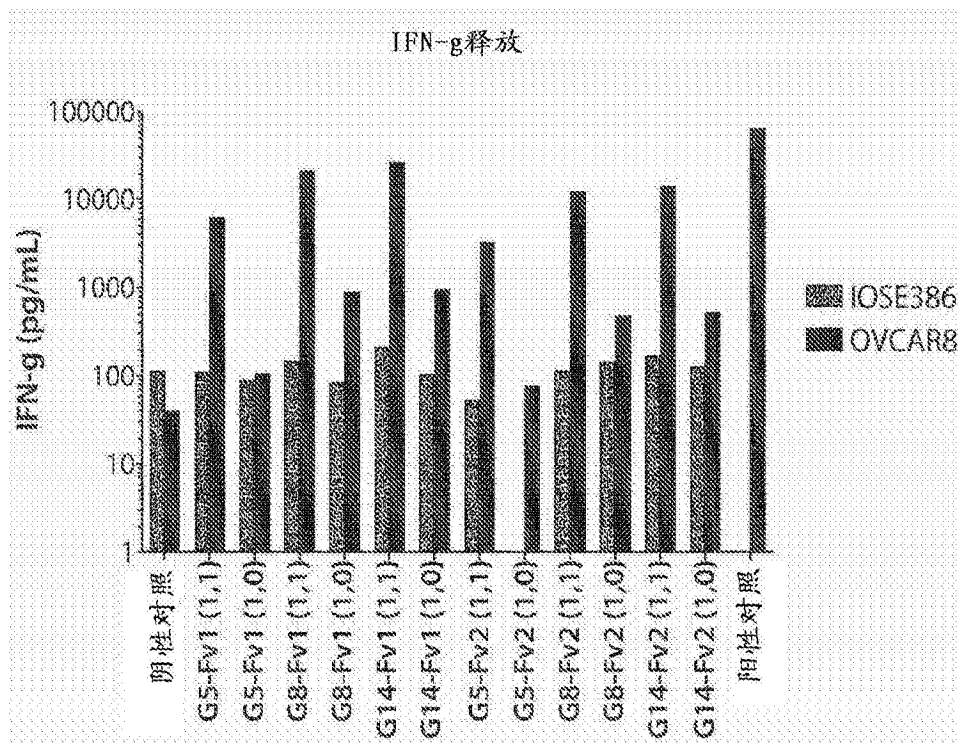


图33A

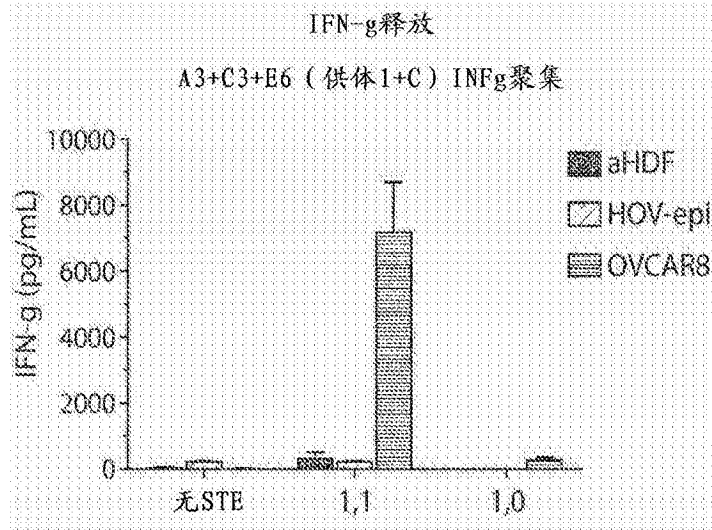


图33B

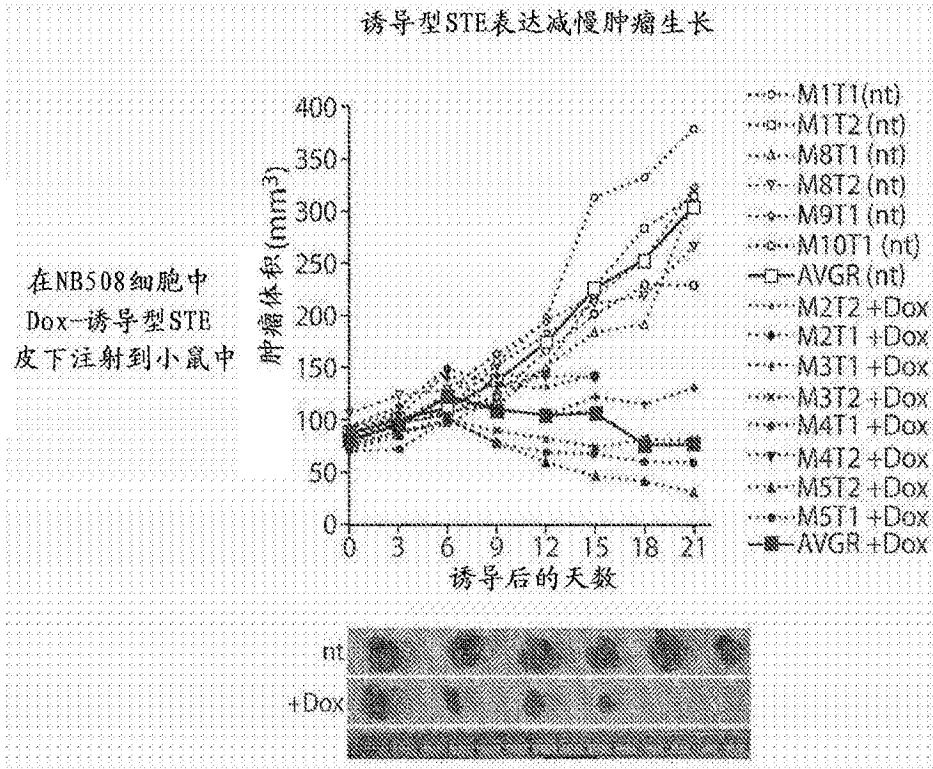


图34

#	名称	DNA	T细胞	试剂	注释
1	未转染 无T细胞		-	-	最大肿瘤生长
2	未转染		+	-	MHC-介导的杀伤
3	仅试剂		-	+	试剂细胞毒性
4	S15p-GAD	S15p-GAD	+	+	T细胞+试剂细胞毒性
5	S15p-GAD-G8p-STE-F	S15p-GAD+G8-STE-F	+	+	高STE治疗效力
6	Γ 1 (STE)	G8-F Γ 1, STE	+	+	G8-F Γ 1 + STE
7	Γ 1 (STE, IL12)	G8-F Γ 1, STE+IL12	+	+	G8-F Γ 1 + STE+IL12
8	Γ 1 (STE, CCL21)	G8-F Γ 1, STE+CCL21	+	+	G8-F Γ 1 + STE+CCL21
9	Γ 1 (STE, α PD1)	G8-F Γ 1, STE+ α PD1	+	+	G8-F Γ 1 + STE+ α PD1
10	Γ 1 (STE, IL12, CCL21, α PD1)	G8-F Γ 1, STE+IL12+CCL21+ α PD1	+	+	G8-F Γ 1 + STE+IL12+CCL21+ α PD1

处理:

- 第0天: IP注射 0.5×10^6 OVCAR-Luc细胞
- 第10天: IP注射DNA/材料¹
- 第12天: IP注射 10×10^6 人活化的T细胞

读出:

VOS中的肿瘤负荷估计, 总流量 [p/s]

图35A

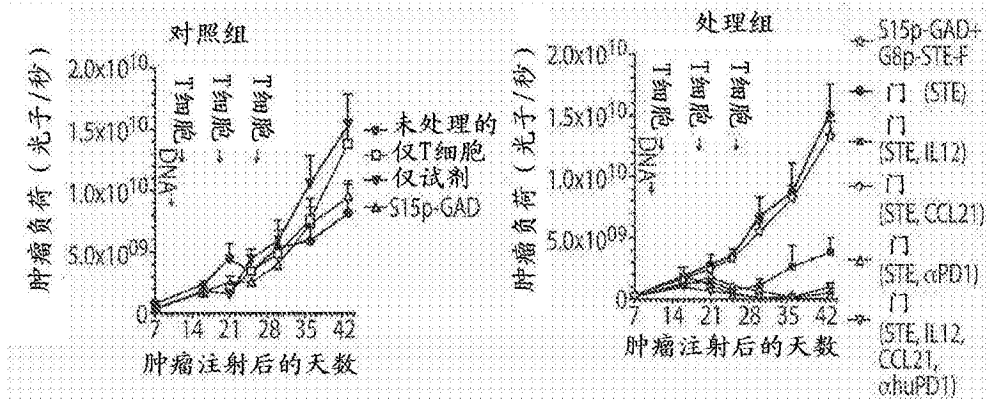


图35B

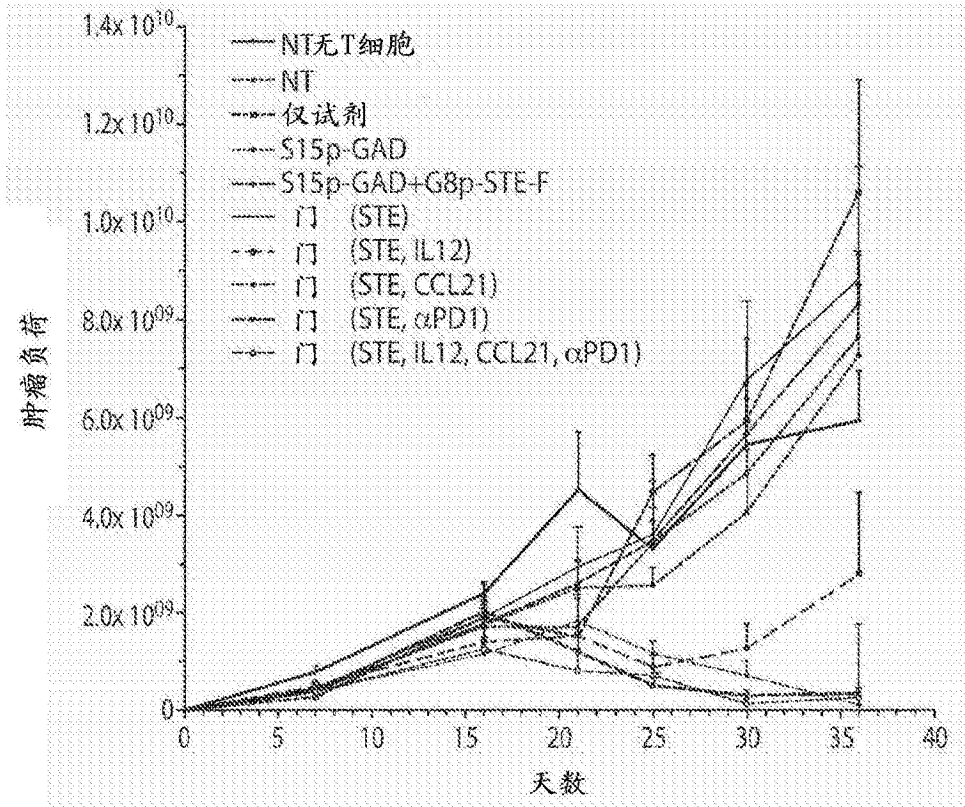


图36

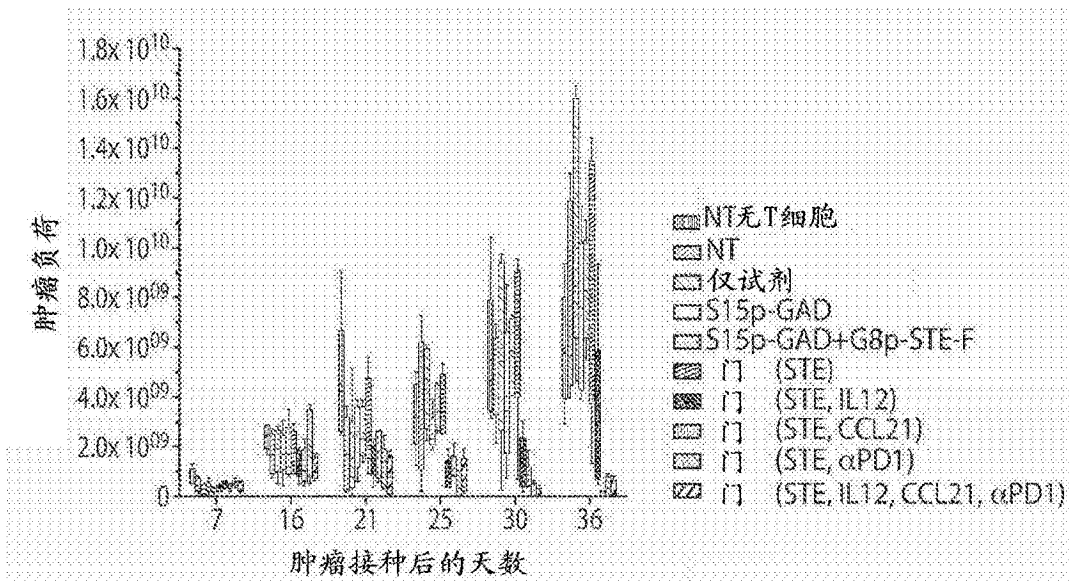


图37

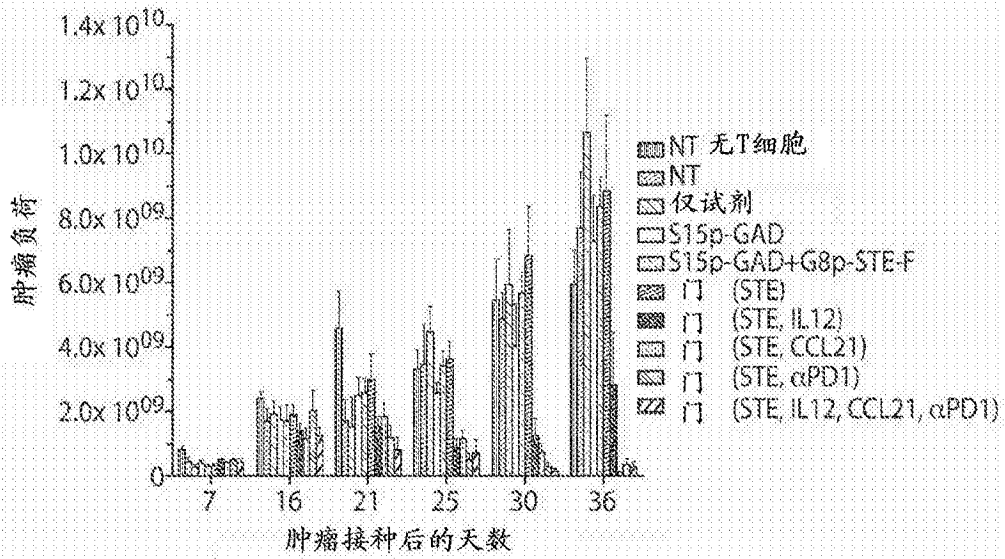


图38

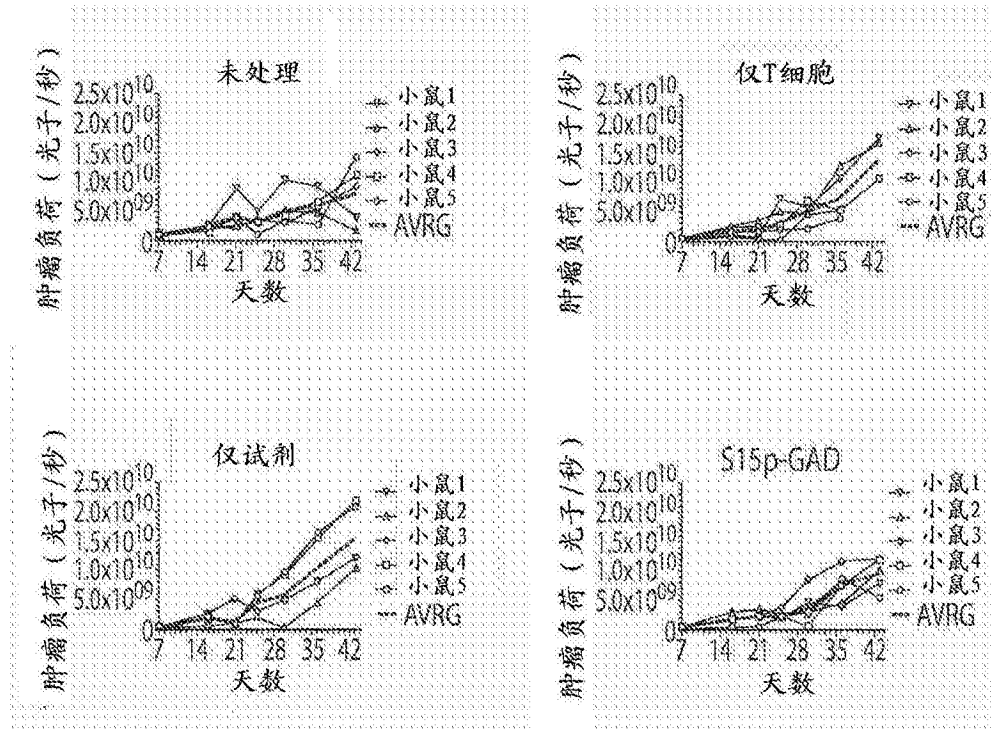


图39

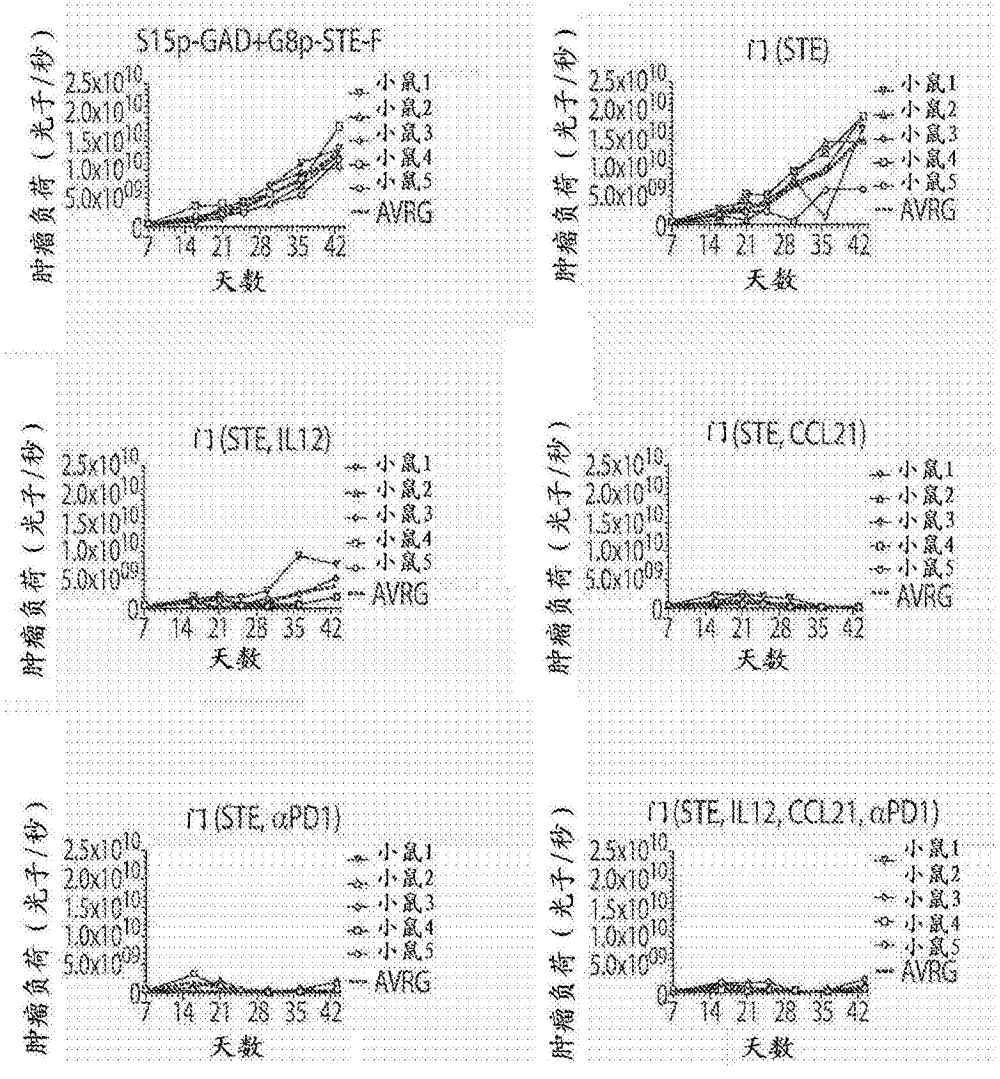


图39(续)

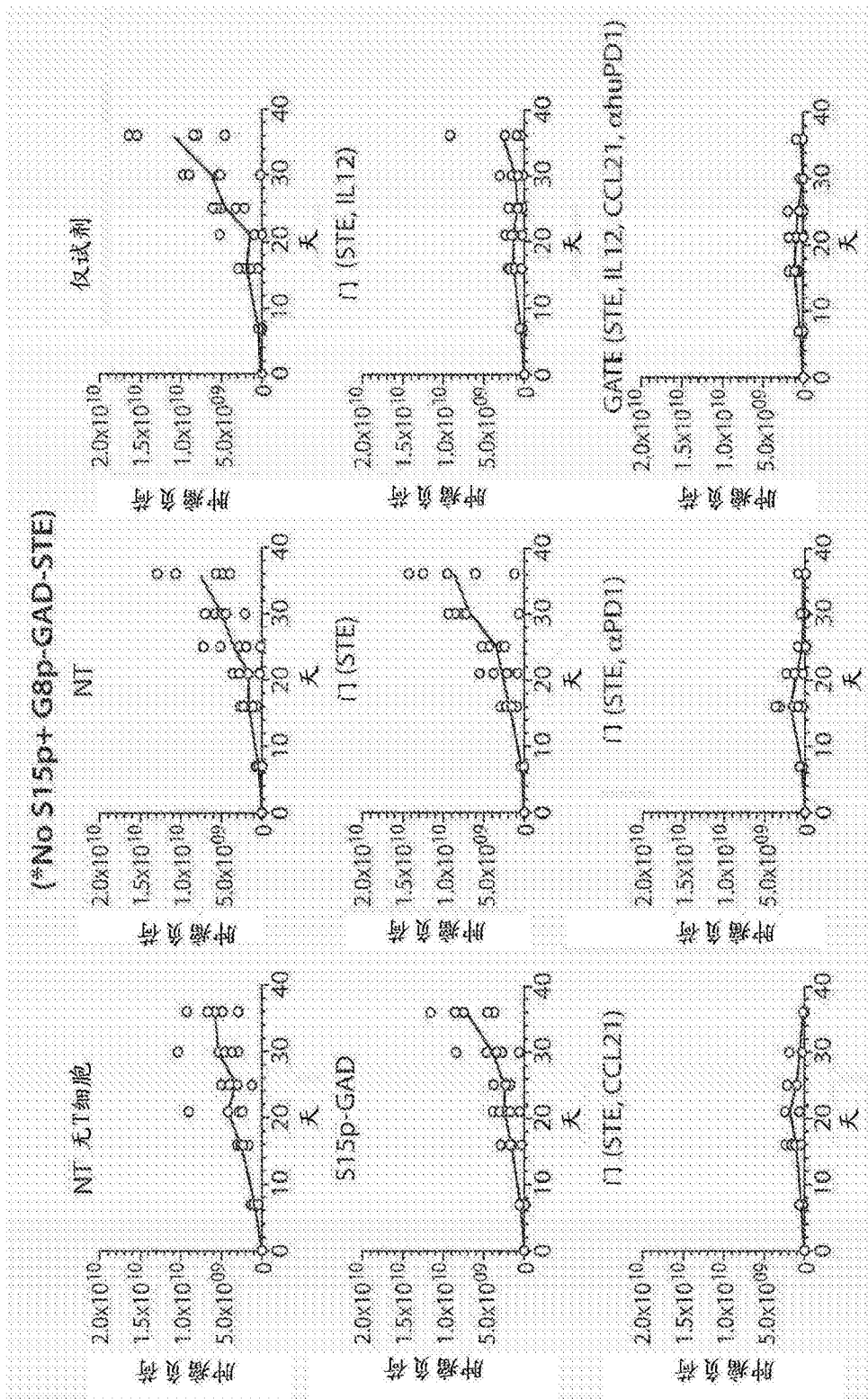


图40

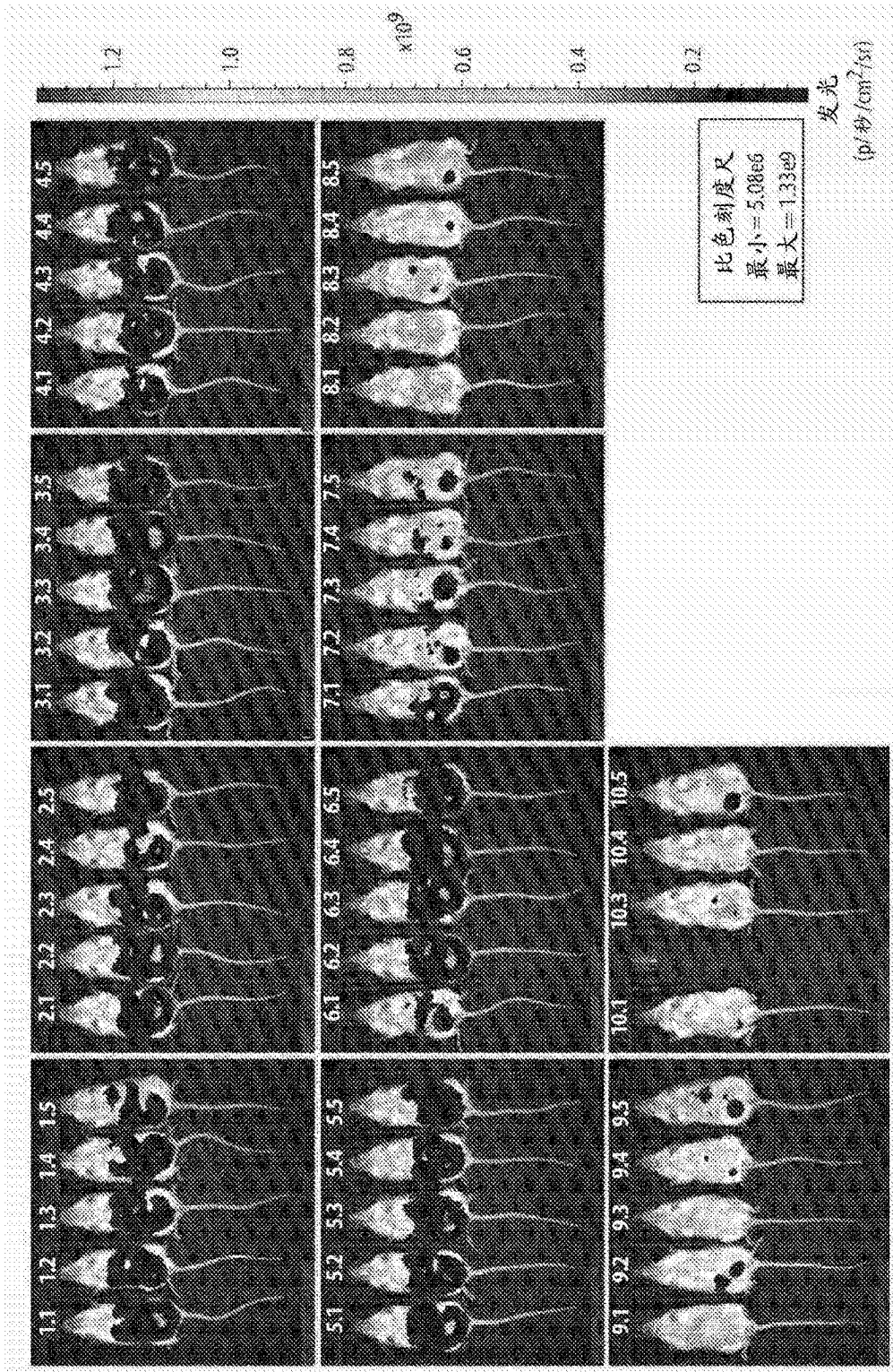


图41

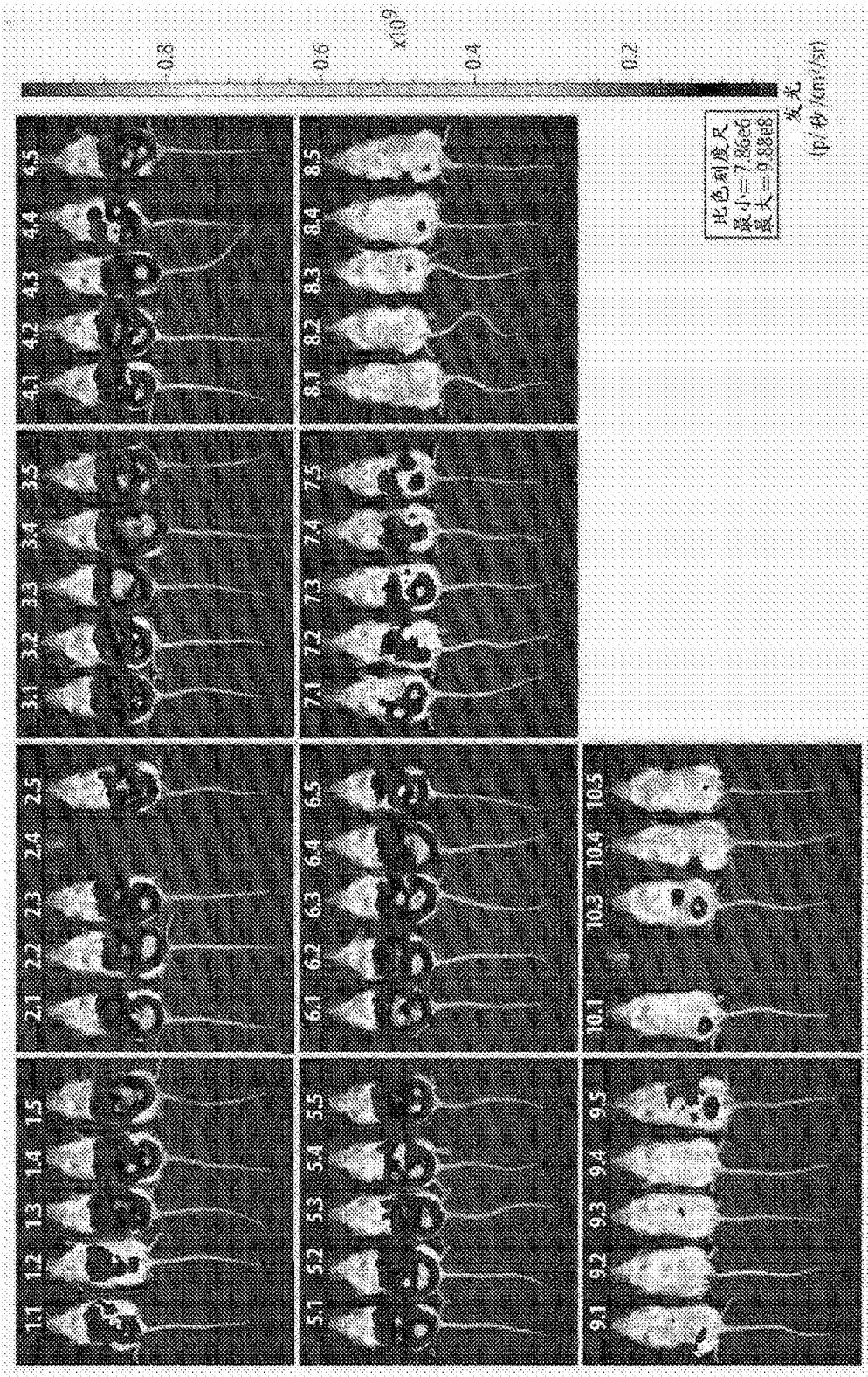


图42

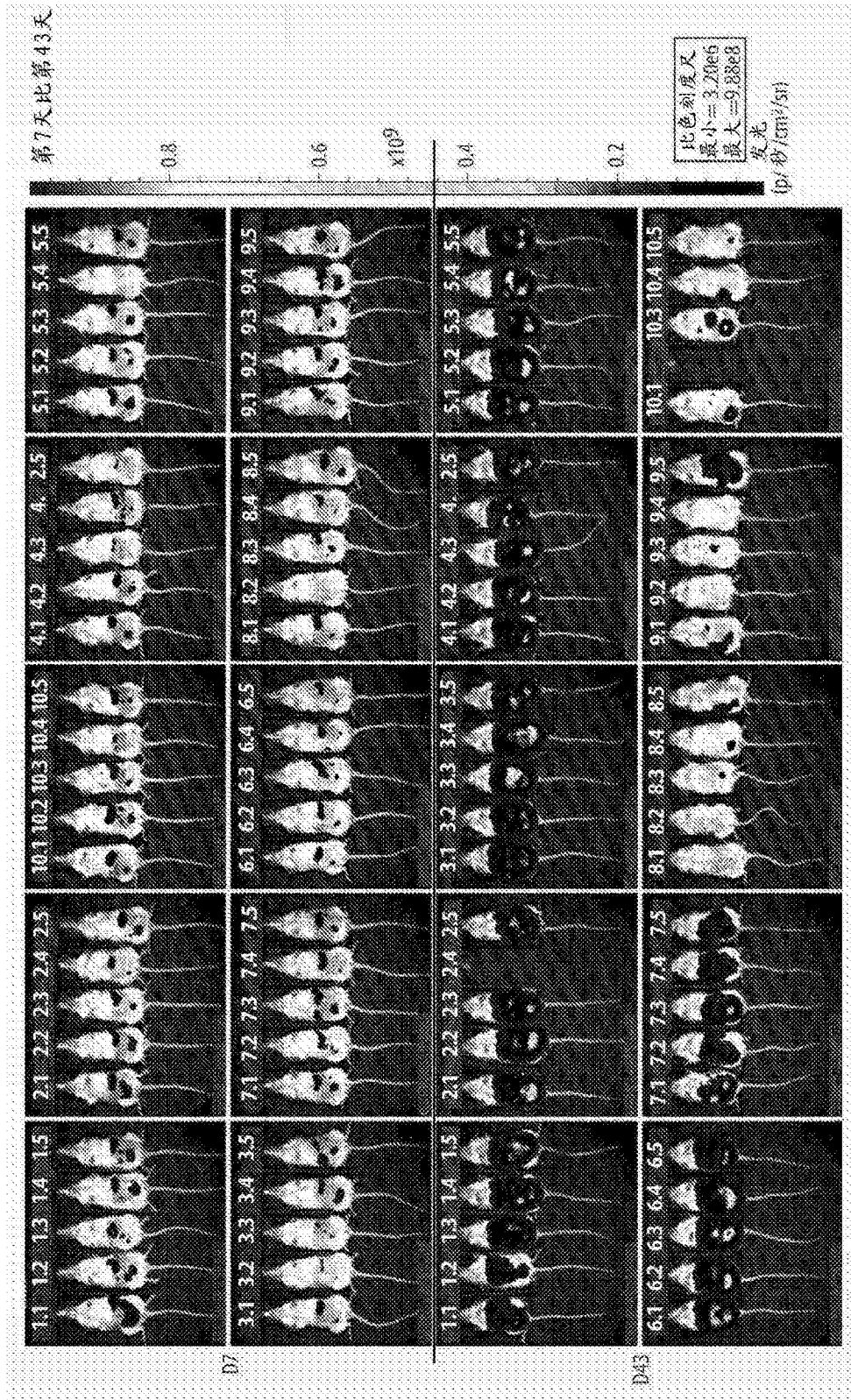


图43

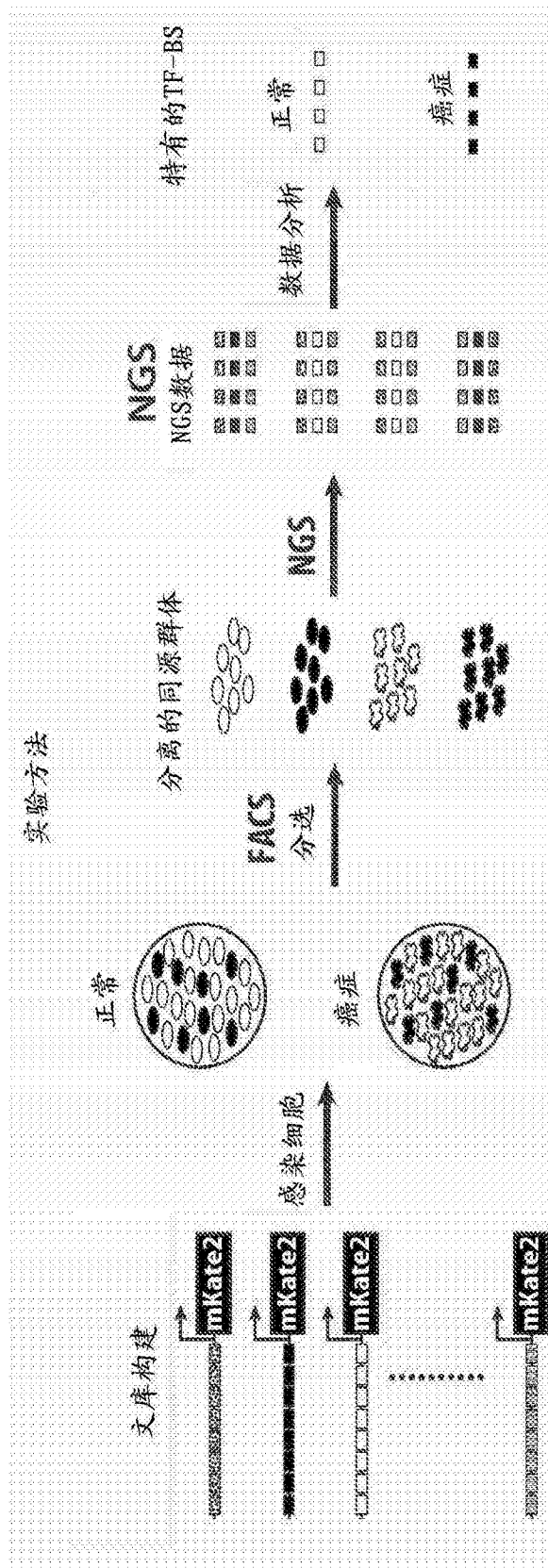


图44

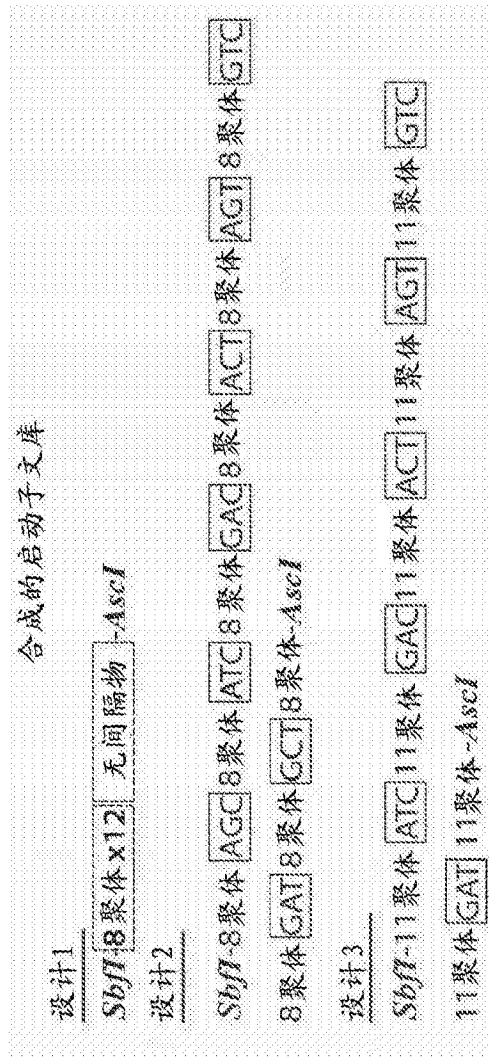


图45

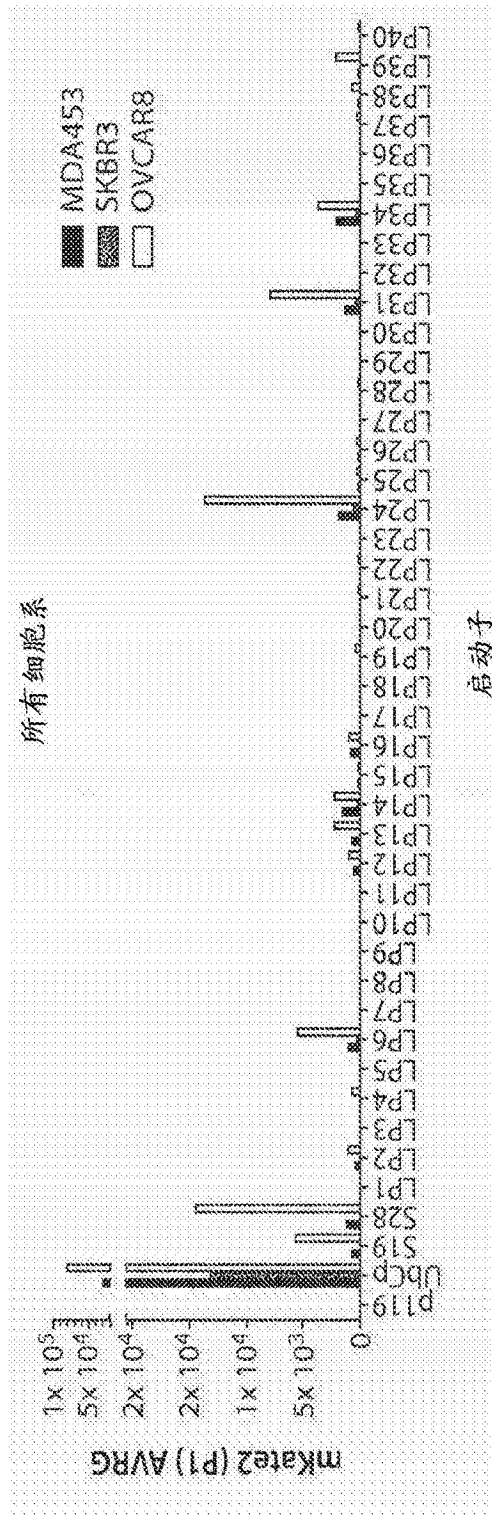


图46

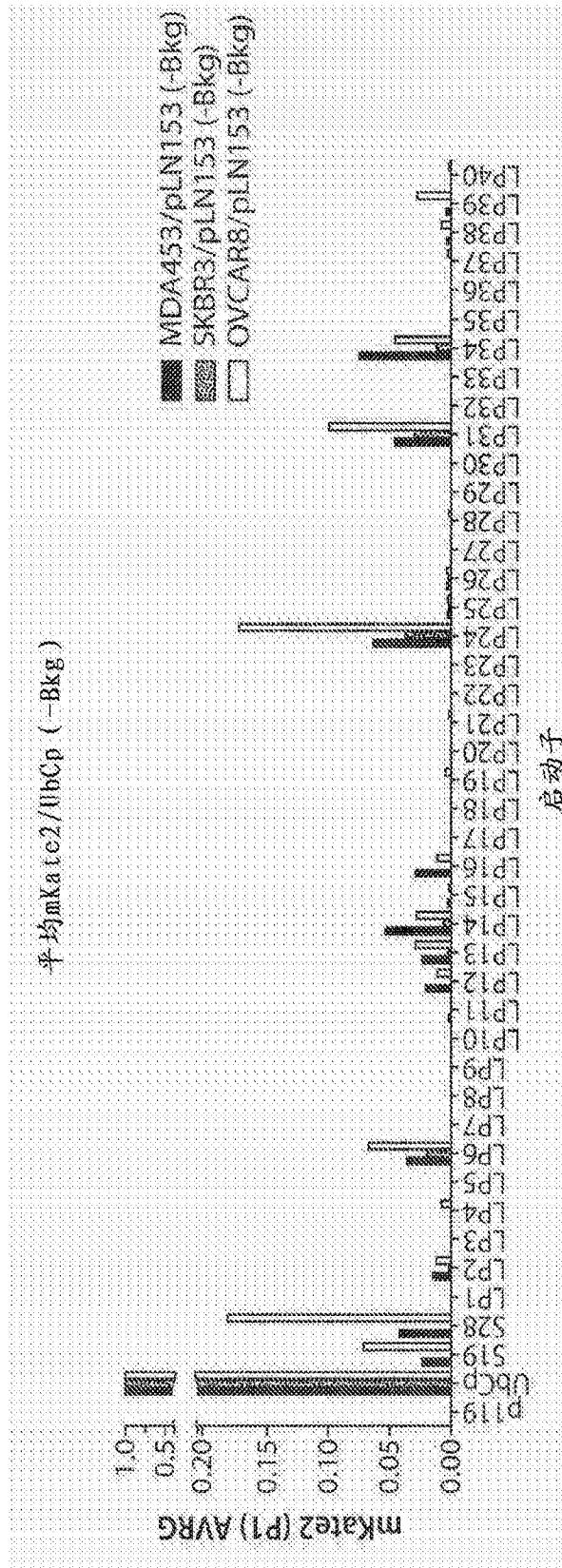


图47