



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114981441 A

(43) 申请公布日 2022. 08. 30

(21) 申请号 202080085552.0

(22) 申请日 2020.10.15

(30) 优先权数据

62/916,110 2019.10.16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.06.09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/055826 2020.10.15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/076788 EN 2021.04.22

(71) 申请人 优莫佳生物制药股份有限公司

地址 美国华盛顿州

(72) 发明人 A·沙伦伯格

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.

G12N 15/85 (2006.01)

权利要求书6页 说明书32页

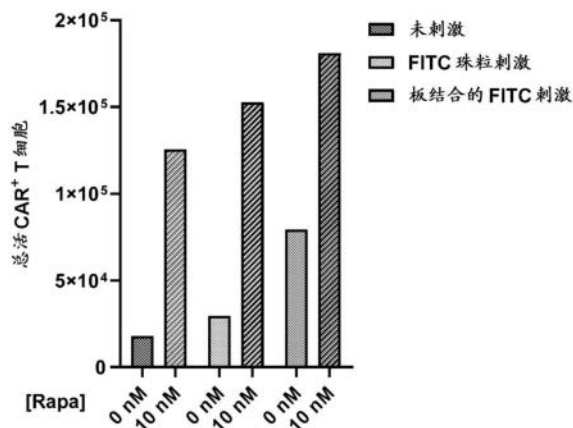
序列表36页 附图8页

(54) 发明名称

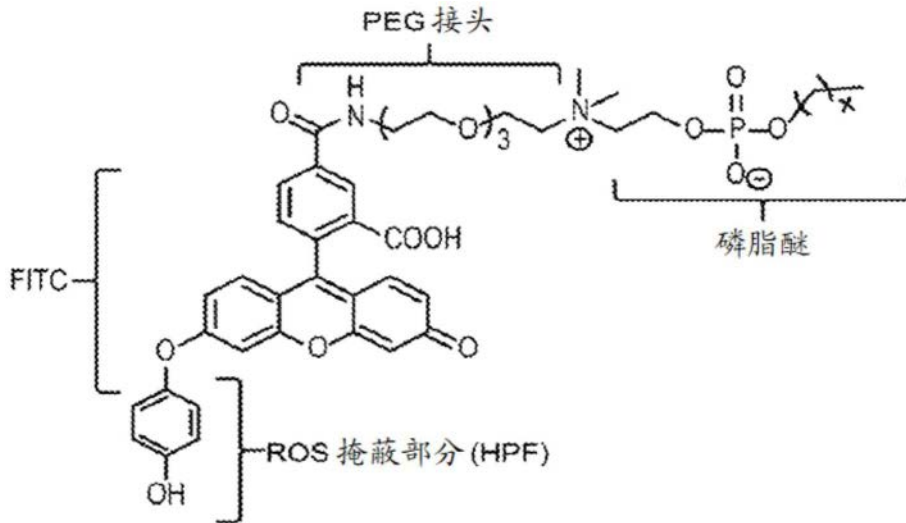
用于通用受体疗法的逆转录病毒载体

(57) 摘要

本公开涉及包括编码半抗原结合受体和T细胞活化受体的多核苷酸的逆转录病毒载体。所述逆转录病毒载体还可包括转导增强子。还公开了衔接分子以及它们与所述逆转录病毒载体和用所述逆转录病毒载体转导的T细胞结合的用途。



1. 一种方法,其包括:
 - (a) 向受试者施用包括靶向部分和半抗原的衔接分子;和
 - (b) 向所述受试者施用 (i) 多个重组逆转录病毒粒子或 (ii) 已离体与多个重组逆转录病毒粒子接触的免疫细胞,其中所述逆转录病毒粒子中的每一者包括多核苷酸,所述多核苷酸包括编码与所述半抗原特异性结合的受体的序列;且其中所述逆转录病毒粒子中的每一者包括病毒包膜。
2. 如权利要求1所述的方法,其中所述免疫细胞是T细胞。
3. 如权利要求1或2所述的方法,其中所述逆转录病毒粒子是慢病毒粒子。
4. 如权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述病毒包膜包括与所述免疫细胞特异性结合的细胞表面受体。
5. 如权利要求4所述的方法,其中所述细胞表面受体包括多部分信号传导复合物。
6. 如权利要求5所述的方法,其中所述多部分信号传导复合物在桥接因子存在下形成功能性多部分信号传导复合物。
7. 如权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述病毒包膜包括一种或多种转导增强子。
8. 如权利要求7所述的方法,其中所述转导增强子中的每一者是T细胞活化受体、NK细胞活化受体或共刺激分子。
9. 如权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述衔接分子包括掩蔽半抗原,所述掩蔽半抗原包括一个或多个与所述半抗原共价连接的掩蔽部分。
10. 如权利要求7所述的方法,其中所述掩蔽半抗原被配置为允许化学反应从所述半抗原去除所述掩蔽部分。
11. 如权利要求9或10中任一项所述的方法,其中所述掩蔽半抗原被配置为允许活性氧类从所述半抗原去除所述掩蔽部分。
12. 如权利要求9至11中任一项所述的方法,其中所述掩蔽半抗原包括羟苯基。
13. 如权利要求9至12中任一项所述的方法,其中所述半抗原包括2,4-二硝基苯酚(DNP)基团。
14. 如权利要求1至13中任一项所述的方法,其中所述半抗原包括荧光素。
15. 如权利要求14所述的方法,其中所述半抗原是包括羟苯基荧光素 (HPF) 的掩蔽半抗原。
16. 如权利要求14所述的方法,其中所述半抗原是包括荧光素-DNP的掩蔽半抗原。
17. 如权利要求1至16中任一项所述的方法,其中所述靶向部分包括磷脂醚 (PLE)。
18. 如权利要求1至16中任一项所述的方法,其中所述靶向部分包括叶酸。
19. 如权利要求15所述的方法,其中所述衔接分子包括与PLE结合的HPF。
20. 如权利要求15所述的方法,其中所述衔接分子包括HPF-PEG₃-C₁₈-烷基磷脂。
21. 如权利要求17所述的方法,其中所述衔接分子包括式I的分子:



式 I。

22. 如权利要求17所述的方法,其中所述衔接分子包括HPF- {接头} -erufosine。

23. 如权利要求1至22中任一项所述的方法,其中所述病毒包膜包括来自可卡耳株的病毒融合糖蛋白或其功能变体。

24. 如权利要求1至23中任一项所述的方法,其中所述病毒包膜包括病毒融合糖蛋白,所述病毒融合糖蛋白包括与SEQ ID NO:1 (可卡耳G蛋白) 至少95%一致的氨基酸序列。

25. 如权利要求1至24中任一项所述的方法,其中所述一种或多种转导增强子包括抗CD3scFv、CD86和CD137L中的一种或多种。

26. 如权利要求1至25中任一项所述的方法,其中所述转导增强子包括抗CD3scFv、CD86和CD137L中的每一种。

27. 如权利要求1至26中任一项所述的方法,其中所述多核苷酸包括编码至少一种T细胞活化蛋白的序列。

28. 如权利要求27所述的方法,其中所述至少一种T细胞活化蛋白是二聚T细胞活化受体。

29. 如权利要求27或28所述的方法,其中所述至少一种T细胞活化蛋白包括第一受体蛋白,其包括第一二聚化域,和第二受体蛋白,其包括第二二聚化域,

其中所述第一二聚化域和所述第二二聚化域响应于分子而特异性地彼此结合。

30. 如权利要求29所述的方法,其中所述分子选自由以下组成的列表:FK1012、他克莫司(FK506)、FKCsA、雷帕霉素、香豆霉素、赤霉素、HaXS、TMP-HTag、ABT-737以及它们的功能衍生物。

31. 如权利要求1至30中任一项所述的方法,其中与所述半抗原特异性结合的所述受体包括抗体的半抗原特异性抗原结合片段。

32. 如权利要求31所述的方法,其中所述抗原结合片段包括Fab片段、单链Fv片段(scFv)或单重链抗体。

33. 如权利要求1至32中任一项所述的方法,其中与所述半抗原特异性结合的所述受体包括半抗原特异性嵌合抗原受体。

34. 如权利要求33所述的方法,其中所述半抗原特异性嵌合抗原受体包括与以下氨基酸序列半抗原至少95%一致的氨基酸序列:NN。

35. 如权利要求1至34中任一项所述的方法,其中所述受试者中的T细胞被所述逆转录病毒粒子转导。

36. 如权利要求1至35中任一项所述的方法,其中所述受试者中的T细胞表达与所述半抗原特异性结合的受体。

37. 如权利要求1至36中任一项所述的方法,其中所述衔接分子特异性结合至和/或标记所述受试者中的癌细胞。

38. 如权利要求1至37中任一项所述的方法,其中所述掩蔽半抗原通过所述受试者中的化学反应被去除。

39. 如权利要求1至38中任一项所述的方法,其中由所述逆转录病毒粒子转导的T细胞特异性地杀死包括未掩蔽半抗原的癌细胞。

40. 如权利要求1至39中任一项所述的方法,其中所述受试者罹患癌症并且所述方法治疗所述癌症。

41. 如权利要求1至40中任一项所述的方法,其中所述方法杀死肿瘤细胞。

42. 一种系统、治疗系统或组合物,其包括:

(a) 包括靶向部分和掩蔽半抗原的衔接分子,其中所述掩蔽半抗原包括与半抗原连接的掩蔽部分;和

(b) 多个重组逆转录病毒粒子,

其中所述逆转录病毒粒子中的每一者包括多核苷酸,其以5'至3'的顺序包括:

(i) 5'UTR,

(ii) 启动子,

(iii) 编码与所述半抗原特异性结合的受体的序列,和

(iv) 3'UTR;

并且

其中所述逆转录病毒粒子中的每一者包括病毒包膜,所述病毒包膜包括

(i) 细胞表面受体,和

(ii) 一种或多种转导增强子

其中任选地,所述转导增强子中的每一者选自由以下组成的组:T细胞活化受体、NK细胞活化受体和共刺激分子。

43. 如权利要求42所述的系统,其中所述逆转录病毒粒子是慢病毒粒子。

44. 如权利要求42或43所述的系统,其中所述病毒包膜包括与所述免疫细胞特异性结合的细胞表面受体。

45. 如权利要求44所述的系统,其中所述细胞表面受体包括多部分信号传导复合物。

46. 如权利要求45所述的系统,其中所述多部分信号传导复合物在桥接因子存在下形成功能性多部分信号传导复合物。

47. 如权利要求42至46中任一项所述的系统,其中所述病毒包膜包括一种或多种转导增强子。

48. 如权利要求47所述的系统,其中所述转导增强子中的每一者是T细胞活化受体、NK

细胞活化受体或共刺激分子。

49. 如权利要求42至48中任一项所述的系统,其中所述衔接分子包括掩蔽半抗原,所述掩蔽半抗原包括一个或多个与所述半抗原共价连接的掩蔽部分。

50. 如权利要求49所述的系统,其中所述掩蔽半抗原被配置为允许化学反应从所述半抗原去除所述掩蔽部分。

51. 如权利要求49或50中任一项所述的系统,其中所述掩蔽半抗原被配置为允许活性氧类从所述半抗原去除所述掩蔽部分。

52. 如权利要求49至51中任一项所述的系统,其中所述掩蔽半抗原包括羟苯基。

53. 如权利要求49至52中任一项所述的系统,其中所述掩蔽部分包括2,4-二硝基苯酚(DNP)基团。

54. 如权利要求42至53中任一项所述的系统,其中所述半抗原包括荧光素。

55. 如权利要求54所述的系统,其中所述半抗原是包括羟苯基荧光素(HPF)的掩蔽半抗原。

56. 如权利要求54所述的系统,其中所述半抗原是包括荧光素-DNP的掩蔽半抗原。

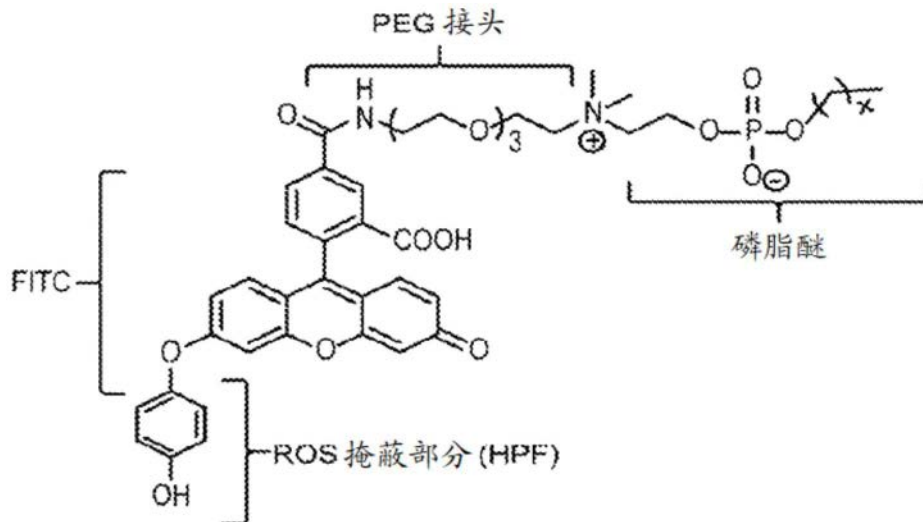
57. 如权利要求42至56中任一项所述的系统,其中所述靶向部分包括磷脂醚(PLE)。

58. 如权利要求42至56中任一项所述的系统,其中所述靶向部分包括叶酸。

59. 如权利要求57所述的系统,其中所述衔接分子包括与PLE结合的HPF。

60. 如权利要求57所述的系统,其中所述衔接分子包括HPF-FITC-PEG₃-C₁₈-烷基磷脂。

61. 如权利要求49所述的系统,其中所述衔接分子包括式I的分子:



式 I。

62. 如权利要求57所述的系统,其中所述衔接分子包括HPF- {接头} -erufosine。

63. 如权利要求42至62中任一项所述的系统,其中所述病毒包膜包括来自可卡耳株的病毒融合糖蛋白或其功能变体。

64. 如权利要求42至63中任一项所述的系统,其中所述病毒包膜包括病毒融合糖蛋白,所述病毒融合糖蛋白包括与SEQ ID NO:1 (可卡耳G蛋白) 至少95%一致的氨基酸序列。

65. 如权利要求42至64中任一项所述的系统,其中所述一种或多种转导增强子包括抗

CD3scFv、CD86和CD137L中的一种或多种。

66. 如权利要求42至65中任一项所述的系统,其中所述转导增强子包括抗CD3scFv、CD86和CD137L中的每一种。

67. 如权利要求42至66中任一项所述的系统,其中所述多核苷酸包括编码至少一种T细胞活化蛋白的序列。

68. 如权利要求67所述的系统,其中所述至少一种T细胞活化蛋白是二聚T细胞活化受体。

69. 如权利要求67或68所述的系统,其中所述至少一种T细胞活化蛋白包括第一受体蛋白,其包括第一二聚化域,和第二受体蛋白,其包括第二二聚化域,

其中所述第一二聚化域和所述第二二聚化域响应于分子而特异性地彼此结合。

70. 如权利要求69所述的系统,其中所述分子选自以下组成的列表:FK1012、他克莫司(FK506)、FKCsA、雷帕霉素、香豆霉素、赤霉素、HaXS、TMP-HTag、ABT-737以及它们的功能衍生物。

71. 如权利要求42至70中任一项所述的系统,其中与所述半抗原特异性结合的所述受体包括抗体的半抗原特异性抗原结合片段。

72. 如权利要求71所述的系统,其中所述抗原结合片段包括Fab片段、单链Fv片段(scFv)或单重链抗体。

73. 如权利要求42至72中任一项所述的系统,其中与所述半抗原特异性结合的所述受体包括半抗原特异性嵌合抗原受体。

74. 如权利要求73所述的系统,其中所述半抗原特异性嵌合抗原受体包括与氨基酸序列SEQ ID NO:53至少95%一致的氨基酸序列。

75. 如权利要求42至74中任一项所述的系统,其中所述受试者中的T细胞被所述逆转录病毒粒子转导。

76. 如权利要求42至75中任一项所述的系统,其中所述受试者中的T细胞表达与所述半抗原特异性结合的受体。

77. 如权利要求42至76中任一项所述的系统,其中所述衔接分子特异性结合至和/或标记所述受试者中的癌细胞。

78. 如权利要求42至77中任一项所述的系统,其中所述掩蔽半抗原通过所述受试者中的化学反应被去除。

79. 如权利要求42至78中任一项所述的系统,其中由所述逆转录病毒粒子转导的T细胞特异性地杀死包括未掩蔽半抗原的癌细胞。

80. 如权利要求42至79中任一项所述的系统,其中所述受试者罹患癌症并且所述系统治疗所述癌症。

81. 如权利要求42至80中任一项所述的系统,其中所述系统杀死肿瘤细胞。

82. 一种试剂盒,其包括如权利要求42至81中任一项所述的系统和所述系统的使用说明书。

83. 一种逆转录病毒粒子,其包括

(a) 多核苷酸,其以5'至3'的顺序包括:

(i) 5'LTR或UTR,

- (ii) 启动子,
- (iii) 编码与所述半抗原特异性结合的受体的序列,和
- (iv) 3'LTR或UTR;以及
- (b) 病毒包膜,其包括
 - (i) 细胞表面受体,和
 - (ii) 一种或多种转导增强子;且

其中任选地,所述转导增强子中的每一者是T细胞活化受体、NK细胞活化受体或共刺激分子。

84. 一种治疗组合物,其包含足以在受试者中引起癌细胞死亡的量的如权利要求83所述的逆转录病毒粒子,所述受试者已经、正在或将被施用包括靶向部分和掩蔽半抗原的衔接分子。

85. 一种治疗受试者中的癌症和/或杀死受试者中的癌细胞的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的如权利要求83所述的逆转录病毒粒子,其中在所述施用步骤之前、期间或之后,所述受试者已接受或接受一定剂量的包括靶向部分和掩蔽半抗原的衔接分子,所述剂量有效地用半抗原标记癌细胞。

86. 一种治疗受试者中的肿瘤和/或杀死受试者中的肿瘤细胞的方法,其包括向所述受试者施用有效量的衔接分子,其中:

- 其中所述衔接分子用掩蔽半抗原标记肿瘤细胞;
- 其中所述掩蔽半抗原被活性氧类活化,产生半抗原;且

其中在所述施用步骤之前、期间或之后,所述受试者已接受或接受如权利要求83所述的逆转录病毒粒子。

87. 一种治疗受试者中的癌症和/或杀死受试者中的癌细胞的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的如权利要求83所述的逆转录病毒粒子,其中在所述施用步骤之前,所述受试者已接受一定剂量的靶向部分和掩蔽半抗原,所述剂量有效地用所述半抗原标记癌细胞。

88. 一种细胞系,其被配置为产生如权利要求83所述的逆转录病毒粒子。

89. 一种治疗受试者中的癌症和/或杀死受试者中的癌细胞的方法,其包括向所述受试者施用如权利要求42至81中任一项所述的系统。

用于通用受体疗法的逆转录病毒载体

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2019年10月16日提交的美国临时申请第62/916,110号的权益,所述申请的内容以引用方式整体并入本文中。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有序列表,所述序列表以ASCII格式通过EFS-Web提交并且特此以引用的方式整体并入。所述ASCII副本创建于2020年10月15日,命名为“UM0J-003-01W0_SeqList_ST25.txt”且大小为72KB。

技术领域

[0005] 本公开涉及编码转导增强子、合成T细胞活化受体和/或半抗原结合受体的病毒载体、包括其的组合和其使用方法。本公开还涉及包括半抗原的衔接分子与病毒载体结合使用的用途。所公开的组合物和方法可用于治疗疾病,例如癌症。

背景技术

[0006] 嵌合抗原受体 (CAR) 是工程化受体,其用于对T细胞进行基因工程改造,以用于过继性细胞免疫疗法(参见Pule等,Cytother.5:3,2003;Restifo等,Nat.Rev.Immunol.12:269,2012)。这些受体包括与细胞内信号传导成分(最常见的是单独或与一个或多个共刺激域组合的CD3)连接的细胞外配体结合域(最常见的是单克隆抗体的单链可变片段(scFv))。抗原结合刺激CAR的胞内段上的信号传导域,从而活化信号传导途径。基于CAR的过继性细胞免疫疗法已被用于治疗难以用常规护理标准疗法治疗的癌症患者(参见Grupp等,N.Engl.J.Med.368:1509,2013;Kalos等,Sci.Transl.Med.3:95ra73,2011)。

[0007] 自体T细胞可以进行基因修饰以表达转基因,所述转基因经过工程改造以在体内转移后提高疗效。尽管转基因修饰的T细胞在例如CD19 B细胞谱系恶性肿瘤的情况下成功过继转移,但尚未鉴定出存在于所有形式的癌细胞上但不存在于正常细胞上的通用CAR靶抗原。因此,所述领域由于鉴定细胞表面靶标的需要而受到阻碍,所述细胞表面靶标天然存在于肿瘤细胞上并且由身体的正常细胞/组织最低限度地表达。因此,CAR T细胞治疗的发展由于可能需要数十个至数百个经过审查的CAR靶标和CAR以涵盖影响人类的大多数癌症类型的前景而受到阻碍。此外,现有的CAR技术通常需要昂贵且耗时的离体操纵步骤,以便在将CAR T细胞重新注入宿主之前用CAR载体活化和转导T细胞。此外,CAR T细胞可能具有许多脱靶效应,可能导致危险甚至致命的不良事件。

[0008] 对更安全、更具成本效益和更通用的CAR T细胞技术的需求尚未得到满足。

发明内容

[0009] 本公开总体上涉及方法,所述方法包括(a)向受试者施用包括靶向部分和半抗原的衔接分子;和(b)向受试者施用(i)多个重组逆转录病毒粒子或(ii)通过使免疫细胞与多个重组逆转录病毒粒子离体接触而产生的细胞。逆转录病毒粒子中的每一者包括多核苷

酸,其按5'到3'的顺序包括:(i)5'长末端重复序列(LTR)或非翻译区(UTR),(ii)启动子,(iii)编码与半抗原特异性结合的受体的序列,和(iv)3'LTR或UTR。逆转录病毒粒子中的每一者包括病毒包膜。在一些实施方案中,所述方法是在有需要的受试者中治疗癌症的方法。在一些实施方案中,所述方法是在有需要的受试者中杀死肿瘤细胞的方法。

[0010] 在另一方面,本公开提供了一种系统或组合物,其包括(a)包括靶向部分和半抗原的衔接分子;和(b)(i)多个重组逆转录病毒粒子或(ii)通过使免疫细胞与多个重组逆转录病毒粒子离体接触而产生的细胞。逆转录病毒粒子中的每一者包括多核苷酸,其按5'到3'的顺序包括:(i)5'长末端重复序列(LTR)或UTR,(ii)启动子,(iii)编码与半抗原特异性结合的受体的序列,和(iv)3'LTR或UTR。逆转录病毒粒子中的每一者包括病毒包膜。在一些实施方案中,系统或组合物以包括其使用说明书的试剂盒提供。

[0011] 本发明的其它方面和实施方案由以下具体实施方式提供。

附图说明

[0012] 图1A-1D是流式细胞术染色图,描绘了FITC-CAR构建体在转导的T细胞中的表面表达。图1A描绘了淋巴细胞的流式细胞术染色图,所述淋巴细胞进一步门控以使单个细胞可视化(图1B)。进一步对单个细胞进行门控以使CD3⁺细胞可视化(图1C)。进一步对CD3⁺细胞进行门控以使FITC-CAR⁺细胞可视化(图1D)。

[0013] 图2A-2F是流式细胞术染色图,描绘了表达RACR-CAR有效负载的转导T细胞如何通过添加雷帕霉素以活化RACR而富集(图2A和图2D),和/或通过添加FITC抗原以活化CAR而富集(图2B-2C和图2E-2F)。图2A-2C描绘了用0nM雷帕霉素处理的转导细胞,且图2D-2F描绘了用10nM雷帕霉素处理的转导细胞。图2B和2E描绘了用FITC涂布的珠粒刺激的转导细胞,且图2C和2F描绘了用板结合的FITC刺激的转导细胞。

[0014] 图3是描绘转导细胞中的活FITC-CAR⁺T细胞百分比的图,所述转导细胞未刺激、用FITC涂布的珠粒刺激或用板结合的FITC刺激,并且含有(10nM)或不含(0nM)雷帕霉素。

[0015] 图4是描绘转导细胞中的活FITC-CAR⁺T细胞总数的图,所述转导细胞未刺激、用FITC涂布的珠粒刺激或用板结合的FITC刺激,并且含有(10nM)或不含(0nM)雷帕霉素。

[0016] 图5是描述在未刺激、用FITC涂布的珠粒刺激或用板结合的FITC刺激并且含有(10nM)或不含(0nM)雷帕霉素的转导细胞中活化标志物CD25的上调的图。gMFI=几何平均荧光强度。

[0017] 图6描绘了FITC-CAR-Frb-RACR的矢量图。

[0018] 图7描绘了CD3-可卡耳病毒粒子包膜的矢量图。

具体实施方式

[0019] 本公开总体上涉及一种方法,所述方法包括(a)向受试者施用包括靶向部分和半抗原的衔接分子;和(b)向受试者施用(i)多个重组逆转录病毒粒子或(ii)通过使免疫细胞与多个重组逆转录病毒粒子离体接触而产生的细胞。逆转录病毒粒子中的每一者包括多核苷酸,所述多核苷酸包括编码与半抗原特异性结合的受体的序列。逆转录病毒粒子中的每一者包括病毒包膜。在一些实施方案中,所述方法是在有需要的受试者中治疗癌症的方法。在一些实施方案中,所述方法是在有需要的受试者中杀死肿瘤细胞的方法。

[0020] 在另一方面,本公开提供了一种系统或组合物,其包括(a)包括靶向部分和半抗原的衔接分子;和(b) (i) 多个重组逆转录病毒粒子或(ii) 通过使免疫细胞与多个重组逆转录病毒粒子离体接触而产生的细胞。逆转录病毒粒子中的每一者包括多核苷酸,其按5'到3'的顺序包括:(i) 5'长末端重复序列(LTR)或非翻译区(UTR), (ii) 启动子, (iii) 编码与半抗原特异性结合的受体的序列,和(iv) 3'LTR或UTR。逆转录病毒粒子中的每一者包括病毒包膜。在一些实施方案中,系统或组合物以包括其使用说明书的试剂盒提供。

[0021] 逆转录病毒粒子

[0022] 逆转录病毒包括慢病毒、 γ -逆转录病毒和 α -逆转录病毒,它们中的每一种都可用于使用本领域中已知的方法将多核苷酸递送至细胞。慢病毒是复杂的逆转录病毒,除了常见的逆转录病毒基因gag、pol和env外,还含有其它具有调节或结构功能的基因。较高的复杂性使得病毒能够调节其生命周期,就像在潜伏感染过程中一样。慢病毒的一些实例包括人免疫缺陷病毒(HIV-1和HIV-2)和猿猴免疫缺陷病毒(SIV)。逆转录病毒载体已通过对HIV毒力基因的多次减毒而产生,例如基因env、vif、vpr、vpu和nef被删除,使得载体具有生物安全性。

[0023] 说明性慢病毒载体包括以下各者中所述的那些:Naldini等(1996) Science 272:263-7; Zufferey等(1998) J. Virol. 72:9873-9880; Dull等(1998) J. Virol. 72:8463-8471; 美国专利第6,013,516号; 和美国专利第5,994,136号,其各自以引用的方式整体并入本文中。一般来讲,这些载体被配置成携带用于选择含有载体的细胞、用于将外来核酸并入慢病毒粒子中以及用于将核酸转移到靶细胞中的基本序列。

[0024] 常用的慢病毒载体系统是所谓的第三代系统。第三代慢病毒载体系统包括四种质粒。“转移质粒”编码由慢病毒载体系统递送到靶细胞中的多核苷酸序列。转移质粒通常具有一个或多个侧接有长末端重复(LTR)序列的目标转基因序列,这有助于将转移质粒序列整合到宿主基因组中。出于安全原因,转移质粒通常被设计成使所产生的载体复制不起作用。例如,转移质粒缺乏在宿主细胞中产生感染粒子所必需的基因元件。此外,可将转移质粒设计成缺失3'LTR,从而使病毒“自身失活”(SIN)。参见Dull等(1998) J. Virol. 72:8463-71; Miyoshi等(1998) J. Virol. 72:8150-57。病毒粒子还可包括3'非翻译区(UTR)和5'UTR。UTR包括逆转录病毒调节元件,其在逆转录病毒粒子与细胞接触后,支持前病毒基因组包装、逆转录和整合到细胞中。

[0025] 第三代系统通常还包括两个“包装质粒”和一个“包膜质粒”。“包膜质粒”通常编码可操作地连接到启动子的Env基因。在示例性第三代系统中,Env基因为VSV-G,且启动子为CMV启动子。第三代系统使用两个包装质粒,一个编码gag和pol,而另一个编码rev作为进一步的安全特征,这是对所谓的第二代系统的单个包装质粒的改进。虽然更安全,但第三代系统使用起来可能更麻烦,并且由于添加另外的质粒而导致病毒滴度降低。示例性包装质粒包括但不限于pMD2.G、pRSV-rev、pMDLg-pRRE和pRRL-GOI。

[0026] 许多逆转录病毒载体系统依赖于使用“包装细胞系”。一般来讲,包装细胞系是在将转移质粒、一个或多个包装质粒和包膜质粒导入细胞时,其细胞能够产生感染性逆转录病毒粒子的细胞系。可使用将质粒导入细胞中的各种方法,包括转染或电穿孔。在一些情况下,包装细胞系适于将逆转录病毒载体系统高效包装成逆转录病毒粒子。

[0027] 如本文所用,术语“逆转录病毒载体”或“慢病毒载体”旨在意指编码基因组包装所

需的逆转录病毒或慢病毒顺式核酸序列和待递送到靶细胞中的一个或多个多核苷酸序列的核酸。逆转录病毒粒子和慢病毒粒子通常包括RNA基因组(源自转移质粒)、嵌入由Env蛋白的脂质双层包膜和其它辅助蛋白,包括整合酶、蛋白酶和基质蛋白。如本文所用,术语“逆转录病毒粒子”和“慢病毒粒子”是指包括包膜、具有慢病毒的一种或多种特征并且能够侵入靶宿主细胞的病毒粒子。此类特征包括例如感染非分裂宿主细胞;转导非分裂宿主细胞;感染或转导宿主免疫细胞;含有包括gag结构多肽,例如p7、p24和p17中的一个或多个的逆转录病毒或慢病毒病毒体;含有包括env编码的糖蛋白,例如p41、p120和p160中的一个或多个的逆转录病毒或慢病毒包膜;含有包括作用于复制、前病毒整合或转录的一个或多个逆转录病毒或慢病毒顺式作用序列的基因组;含有编码逆转录病毒或慢病毒蛋白酶、逆转录酶或整合酶的基因组;或含有编码调控活性的基因组,诸如Tat或Rev。转移质粒可包括cPPT序列,如美国专利第8,093,042号中所述。

[0028] 系统的效率是载体工程化中的重要问题。可以本领域已知的各种方式来评估逆转录病毒或慢病毒载体系统的效率,这些方式包括诸如通过定量聚合酶链反应(qPCR)来测量载体拷贝数(VCN)或载体基因组(vg),或以感染单位/毫升(IU/mL)为单位的病毒滴度。例如,可使用对培养的肿瘤细胞系HT1080执行的功能性测定来评估滴度,如描述于Humbert等Development of Third-generation Coccal Envelope Producer Cell Lines for Robust Retroviral Gene Transfer into Hematopoietic Stem Cells and T-cells.Molecular Therapy 24:1237-1246(2016)中。当在持续分裂的培养细胞系上评估滴度时,不需要刺激,且因此测得的滴度不受逆转录病毒粒子表面工程化的影响。用于评估逆转录病毒载体系统的效率的其它方法提供于Gaererts等Comparison of retroviral vector titration methods.BMC Biotechnol.6:34(2006)中。

[0029] 在一些实施方案中,本公开的逆转录病毒粒子和/或慢病毒粒子包括多核苷酸,所述多核苷酸包括编码与半抗原特异性结合的受体的序列。在一些实施方案中,编码与半抗原特异性结合的受体的序列可操作地连接至启动子。说明性启动子包括但不限于巨细胞病毒(CMV)启动子、CAG启动子、SV40启动子、SV40/CD43启动子和MND启动子。

[0030] 在一些实施方案中,逆转录病毒粒子包括转导增强子。在一些实施方案中,逆转录病毒粒子包括多核苷酸,所述多核苷酸包括编码T细胞活化蛋白的序列。在一些实施方案中,逆转录病毒粒子包括多核苷酸,所述多核苷酸包括编码半抗原结合受体的序列。在一些实施方案中,逆转录病毒粒子包括标记蛋白。

[0031] 在一些实施方案中,逆转录病毒粒子中的每一者包括多核苷酸,其按5'到3'的顺序包括:(i)5'长末端重复序列(LTR)或非翻译区(UTR),(ii)启动子,(iii)编码与半抗原特异性结合的受体的序列,和(iv)3'LTR或UTR。

[0032] 在一些实施方案中,逆转录病毒粒子包括与靶宿主细胞上的配体结合的细胞表面受体,从而允许宿主细胞转导。病毒载体可包括产生假型病毒载体的异源病毒包膜糖蛋白。例如,病毒包膜糖蛋白可以衍生自RD114或其变体之一、VSV-G、长臂猿白血病病毒(GALV),或为两性包膜、麻疹包膜或狒狒逆转录病毒包膜糖蛋白。在一些实施方案中,细胞表面受体是来自可卡耳株的VSV G蛋白或其功能变体。在一些实施方案中,病毒融合糖蛋白包括SEQ ID NO:1(可卡耳G蛋白)的氨基酸序列。在一些实施方案中,病毒融合糖蛋白包括与SEQ ID NO:1(可卡耳G蛋白)至少95%一致的氨基酸序列。在一些实施方案中,病毒融合糖蛋白包括

与SEQ ID NO:1(可卡耳G蛋白)至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或99%一致的氨基酸序列。

[0033] NLLLLTFIVLPLCSHAKFSIVFPQSQKGNWKNVPSSYHYCPSSSDQNWHDLLGITMKVKMPKTHKAIQADGWMCHAAKWITTCDFRWYGPKYIITHSIHSIQPTSEQCKESIKQTKQGTWMSPGFPPQNCGYATVTDVAVVVQATPHHVLVDEYTGWIDSQFPNGKCEEECVHNSTVWYSYKVTGLCDATLVDTEITFFSEDGKKESIGKPNTGYRSNYFAYEKGDVKCKMNYCKHAGVRLPSGVWFVFDQDVYAAAKLPECPVGATISAPTQTSVDVSLILDVERILDYSLCQETWSKIRSKQPVSPVDSLAPKNPGTGPAFTIINGTLKYFETRYIRIDIDNPIISKMVGKISGSQTERELWTEWFPYEGVEIGPNGILKTPTGYKFPFLMIGHGMLDSDLHKTSQAEVFEHPLAEAPKQLPEEETLFFGDTGISKNPVELIEGWFSSWKSTVVTFFFAIGVFILLYVVARIVIAVRYRYQGSNNKRIYNDIEMSRFRK

[0034] (SEQ ID NO:1)

[0035] 各种融合糖蛋白可用于假型化慢病毒载体。虽然最常用的实例是来自水泡性口炎病毒(VSVG)的包膜糖蛋白,但许多其它病毒蛋白也用于慢病毒载体的假型化。参见Joglekar等Human Gene Therapy Methods 28:291-301(2017)。本公开设想了各种融合糖蛋白的取代。值得注意的是,一些融合糖蛋白导致载体效率更高。

[0036] 在一些实施方案中,对融合糖蛋白或其功能变体进行假型化有助于靶向转导特定的细胞类型,包括但不限于T细胞或NK细胞。在一些实施方案中,融合糖蛋白或其功能变体是以下的一个或多个全长多肽、一个或多个功能片段、一个或多个同源物、或一个或多个功能变体:人免疫缺陷病毒(HIV)gp160、鼠白血病病毒(MLV)gp70、长臂猿白血病病毒(GALV)gp70、猫白血病病毒(RD114)gp70、双嗜性逆转录病毒(Ampho)gp70、10A1 MLV(10A1)gp70、亲嗜性逆转录病毒(Eco)gp70、狒狒猿白血病病毒(BaEV)gp70、麻疹病毒(MV)H和F、尼帕病毒(NiV)H和F、狂犬病病毒(RabV)G、莫科拉病毒(MOKV)G、埃博拉扎伊尔型病毒(EboZ)G、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)GP1和GP2、杆状病毒GP64、基孔肯雅病毒(CHIKV)E1和E2、罗斯河病毒(RRV)E1和E2、塞姆利基森林病毒(SFV)E1和E2、辛德毕斯病毒(SV)E1和E2、委内瑞拉马脑炎病毒(VEEV)E1和E2、西方马脑炎病毒(WEEV)E1和E2、甲型、乙型、丙型或丁型流感病毒HA、禽瘟病毒(FPV)HA、水泡性口炎病毒VSV-G、或金迪普拉病毒和皮里病毒CNV-G和PRV-G。

[0037] 在一些实施方案中,融合糖蛋白或其功能变体是以下的G蛋白的全长多肽、功能片段、同源物或功能变体:阿拉戈斯水泡性口炎病毒(VSAV)、卡拉加斯水泡性病毒(CJSV)、金迪普拉水泡性病毒(CHPV)、可卡耳水泡性病毒(COCV)、印第安纳水泡性口炎病毒(VSIV)、伊斯法罕水泡性病毒(ISFV)、马拉巴水泡性病毒(MARAV)、新泽西水泡性口炎病毒(VSNJV)、下刚果热病毒(BASV)。在一些实施方案中,融合糖蛋白或其功能变体是可卡耳病毒G蛋白。

[0038] 在一些实施方案中,融合糖蛋白或其功能变体是以下的G蛋白的全长多肽、功能片段、同源物或功能变体:阿拉戈斯水泡性口炎病毒(VSAV)、卡拉加斯水泡性病毒(CJSV)、金迪普拉水泡性病毒(CHPV)、可卡耳水泡性病毒(COCV)、印第安纳水泡性口炎病毒(VSIV)、伊斯法罕水泡性病毒(ISFV)、马拉巴水泡性病毒(MARAV)、新泽西水泡性口炎病毒(VSNJV)、下刚果热病毒(BASV)。在一些实施方案中,融合糖蛋白或其功能变体是可卡耳病毒G蛋白。

[0039] 本公开进一步提供了各种逆转录病毒载体,包括但不限于 γ -逆转录病毒载体、 α -逆转录病毒载体和慢病毒载体。

[0040] 转导增强子

[0041] 在一些实施方案中,根据本公开的病毒粒子包括转导增强子。

[0042] 如本文所用,“转导增强子”是指活化T细胞的跨膜蛋白。根据本公开,转导增强子可以掺入到病毒粒子的病毒包膜中。转导增强子可包括促有丝分裂和/或基于细胞因子的域。转导增强子可包括T细胞活化受体、NK细胞活化受体、共刺激分子或其部分。

[0043] 促有丝分裂转导增强子

[0044] 本发明的病毒载体可在病毒包膜中包括促有丝分裂转导增强子。在一些实施方案中,促有丝分裂转导增强子衍生自逆转录病毒载体生产过程中的宿主细胞。在一些实施方案中,促有丝分裂转导增强子由包装细胞制备并在细胞表面表达。当新生的逆转录病毒载体从宿主细胞膜出芽时,促有丝分裂转导增强子可以作为包装细胞衍生的脂质双层的一部分并入病毒包膜中。

[0045] 在一些实施方案中,转导增强子为宿主细胞衍生的。术语“宿主细胞衍生的”表示促有丝分裂转导增强子衍生自如上所述的宿主细胞,并且不是作为来自病毒基因之一的融合物或嵌合体产生的,所述病毒基因例如为gag,其编码主要结构蛋白;或env,其编码包膜蛋白。

[0046] 包膜蛋白由两个亚单位形成:将蛋白质锚定到脂质膜中的跨膜(TM),以及与细胞受体结合的表面(SU)。在一些实施方案中,本发明的包装细胞衍生的促有丝分裂转导增强子不包括表面包膜亚单位(SU)。

[0047] 促有丝分裂转导增强子可具有以下结构:M-S-TM,其中M是促有丝分裂域;S是任选的间隔域,且TM是跨膜域。

[0048] 转导增强子促有丝分裂域

[0049] 促有丝分裂域是促有丝分裂转导增强子的一部分,它引起T细胞活化。它可以直接或间接地与T细胞结合或以其它方式相互作用,从而引起T细胞活化。确切地说,促有丝分裂域可以结合T细胞表面抗原,例如CD3、CD28、CD134和CD137。

[0050] CD3是一种T细胞辅助受体。它是由四条不同的链构成的蛋白质复合物。在哺乳动物中,所述复合物含有一条CD3 γ 链、一条CD3 δ 链和两条CD3 ϵ 链。这些链与T细胞受体(TCR)和 ζ 链结合以在T淋巴细胞中产生活化信号。TCR、 ζ 链和CD3分子共同构成TCR复合物。

[0051] 在一些实施方案中,促有丝分裂域可结合至CD3 ϵ 链。

[0052] CD28是在T细胞上表达的蛋白质之一,所述蛋白质提供T细胞活化和存活所需的共刺激信号。除了T细胞受体(TCR)之外,通过CD28刺激T细胞也可以为各种白细胞介素(尤其是IL-6)的产生提供有效信号。CD134,也称为OX40,是TNFR受体超家族的成员,与CD28不同,它在静息的初始T细胞上不组成型表达。OX40是一种次级共刺激分子,在活化后24至72小时后表达;其配体OX40L也不在静息的抗原呈递细胞上表达,而是在其活化后表达。OX40的表达依赖于T细胞的完全活化;如果没有CD28,OX40的表达就会延迟,并且水平会降低四倍。

[0053] CD137,也称为4-1BB,是肿瘤坏死因子(TNF)受体家族的成员。CD137可由活化的T细胞表达,但在CD8上的表达程度大于在CD4T细胞上的表达。此外,在炎症部位的树突状细胞、滤泡树突状细胞、自然杀手细胞、粒细胞和血管壁细胞上发现CD137表达。CD137最具特征性的活性是其对活化T细胞的共刺激活性。CD137的交联增强了T细胞增殖、IL-2分泌存活和细胞溶解活性。

[0054] 促有丝分裂域可包括特异性结合T细胞表面抗原的抗体或其它分子的全部或部分。抗体可活化TCR或CD28。抗体可结合TCR、CD3或CD28。此类抗体的实例包括：OKT3、15E8和TGN1412。其它合适的抗体包括：

[0055] 抗CD28：CD28.2、10F3

[0056] 抗CD3/TCR：UCHT1、YTH12.5、TR66

[0057] 促有丝分裂域可包括来自OKT3、15E8、TGN1412、CD28.2、10F3、UCHT1、YTH12.5或TR66的结合域。

[0058] 促有丝分裂域可包括共刺激分子，例如OX40L和41BBL的全部或部分。例如，促有丝分裂域可包括来自OX40L或41BBL的结合域。

[0059] OKT3，也称为莫罗莫那 (Muromonab) -CD3，是一种靶向CD3e链的单克隆抗体。它在临床上用于减少器官移植患者的急性排斥反应。这是第一种被批准用于人类临床的单克隆抗体。OKT3的CDR如下1

[0060] CDRH1:GYTFTRY (SEQ ID NO.4)

[0061] CDRH2:NPSRGY (SEQ ID NO.5)

[0062] CDRH3:YYDDHYCLDY (SEQ ID NO.6)

[0063] CDRL1:SASSSVSYMN (SEQ ID NO.7)

[0064] CDRL2:DTSKLAS (SEQ ID NO.8)

[0065] CDRL3:QQWSSNPFT (SEQ ID NO.9)

[0066] 15E8是针对人CD28的小鼠单克隆抗体。其CDR如下：

[0067] CDRH1:GFSLTSY (SEQ ID NO.10)

[0068] CDRH2:WAGGS (SEQ ID NO.11)

[0069] CDRH3:DKRAPGKLYGYPDY (SEQ ID NO.12)

[0070] CDRL1:RASESVEYYVTSLMQ (SEQ ID NO.13)

[0071] CDRL2:AASNVES (SEQ ID NO.14)

[0072] CDRL3:QQTRKVPST (SEQ ID NO.15)

[0073] TGN1412 (也称为CD28-SuperMAB) 是一种人源化单克隆抗体，不仅与CD28受体结合，而且是CD28受体的强效激动剂。其CDR如下。

[0074] CDRH1:GYTFSY (SEQ ID NO.16)

[0075] CDRH2:YPGNVN (SEQ ID NO.17)

[0076] CDRH3:SHYGLDWNFDV (SEQ ID NO.18)

[0077] CDRL1:HASQNIYVLN (SEQ ID NO.19)

[0078] CDRL2:KASNLHT (SEQ ID NO.20)

[0079] CDRL3:QQGQTYPYT (SEQ ID NO.21)

[0080] OX40L是CD134的配体，且在例如DC2 (树突状细胞的一种亚型) 等细胞上表达，使得能够放大Th2细胞分化。OX40L也被命名为CD252 (分化簇252)。

[0081] OX40L序列 (SEQ ID NO.22)

- MERVQPLEENVGNAARPRFERNKLLLVASVIQGLGLLLCFTYICLHFSAL
 QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKVQNYLISLKGYS
 [0082] QEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLNVTDDNTSL
 DDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL
- [0083] 4-1BBL是一种细胞因子,其属于肿瘤坏死因子(TNF)配体家族。这种跨膜细胞因子是一种双向信号转导子,可作为4-1BB的配体,4-1BB是T淋巴细胞中的一种共刺激受体分子。4-1BBL已被证明除了促进T淋巴细胞增殖外,还能重新活化无能T淋巴细胞。
- [0084] 41BBL序列(SEQ ID NO.23)
 MEYASDASLDPEAPWPPAPRARACRVLPWALVAGLLLLLLAAACAVFLACPWAVS
 GARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYS
 [0085] PGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQ
 PLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARH
 AWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
- [0086] 转导增强子间隔域
- [0087] 促有丝分裂转导增强子和/或基于细胞因子的转导增强子可包括将抗原结合域与跨膜域连接的间隔序列。灵活的间隔子允许抗原结合域在不同方向上定向以促进结合。
- [0088] 例如,间隔序列可包括IgG1 Fc区、IgG1铰链或人CD8茎或小鼠CD8茎。间隔子可替代地包括具有与IgG1 Fc区、IgG1铰链或CD8茎相似的长度和/或域间隔特性的替代接头序列。可以改变人IgG1间隔子以去除Fc结合基序。
- [0089] 以下给出了这些间隔子的氨基酸序列的实例:
- [0090] SEQ ID NO.24(人IgG1的铰链-CH2CH3)
 AEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCWVDVSHEDPE
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
 [0091] LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPGKKD
- [0092] SEQ ID NO.25(人CD8茎):
- [0093] TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI
- [0094] SEQ ID NO.26(人IgG1铰链):
- [0095] AEPKSPDKTHTCPPCPKDPK
- [0096] SEQ ID NO.27(CD2胞外域):
 KEITNALETWALGQDINLDIPSFQMSDDIDDIKWEKTSKDKKIAQFRKEKETFKEKD
 TYKLFKNGTLKIKHLKTDQDIYKVS IYDTKGKNVLEKIFDLKIQERVSKPKISWTCIN
 [0097] TLTTCCEVMNGTDPELNLYQDGKHLKLSQRVITHKWTTSLSAKFKCTAGNKVSKESSV
 EPVSCPEKGLD
- [0098] SEQ ID NO.28(CD34胞外域):

SLDNNGTATPELPTQGTFNSVSTNVSQYQETTTTPSTLSTLHPVSOHGNEATTNITE
 TTVKFTSTSVITSVYGNTNSSVQSQTSTVISTVFTTPANVSTPETTLKPSLSPGNVSDL
 [0099] STTSTSLATSPTKPYTSSSPILSDIKAEIKCSGIREVKLTQGICLEQNKTS SCAEFKKD
 RGEGLARVLCGEEQADADAGAQVCSLLLAQSEVRPQCLLLVLANRTEISSKLQLMK
 KHQSDLKGLGI LDFTEQDVASHQSYSQKT

[0100] 在一些实施方案中,间隔序列可衍生自人蛋白质。

[0101] 转导增强子跨膜域

[0102] 跨膜域是跨膜的促有丝分裂转导增强子的序列和/或基于细胞因子的转导增强子。跨膜域可包括疏水性 α 螺旋。跨膜域可衍生自CD28。在一些实施方案中,跨膜域衍生自人蛋白质。

[0103] 跨膜域的另一种选择是膜靶向域,例如GPI锚。GPI锚定是一种发生在内质网中的翻译后修饰。预组装的GPI锚前体被转移到带有C端GPI信号序列的蛋白质中。在加工过程中,GPI锚取代了GPI信号序列并通过酰胺键与靶蛋白连接。GPI锚将成熟蛋白靶向膜。在一些实施方案中,本发明的标记蛋白包括GPI信号序列。

[0104] 基于细胞因子的转导增强子

[0105] 本发明的病毒载体可在病毒包膜中包括基于细胞因子的转导增强子。在一些实施方案中,基于细胞因子的转导增强子衍生自病毒载体生产过程中的宿主细胞。在一些实施方案中,基于细胞因子的转导增强子由宿主细胞制备并在细胞表面表达。当新生的病毒载体从宿主细胞膜出芽时,基于细胞因子的转导增强子可以作为包装细胞衍生的脂质双层的一部分并入病毒包膜中。

[0106] 基于细胞因子的转导增强子可包括细胞因子域和跨膜域。它可以具有结构C-S-TM,其中C是细胞因子域,S是任意的间隔域,且TM是跨膜域。间隔域和跨膜域如上所定义。

[0107] 转导增强子细胞因子域

[0108] 细胞因子域可包括一部分或全部的T细胞活化细胞因子,例如来自IL2、IL7和IL15的细胞因子。细胞因子域可包括细胞因子的一部分,只要它保留结合其特定受体并活化T细胞的能力即可。

[0109] IL2是T细胞分泌的调节T细胞和某些B细胞的生长和分化的因子之一。IL2是一种诱导反应性T细胞增殖的淋巴因子。它以单一糖基化多肽的形式分泌,并且其活性需要信号序列的裂解。溶液NMR表明IL2的结构包括一束4个螺旋(称为A-D),两侧是2个较短的螺旋和几个定义不明确的环。螺旋A中以及螺旋A与B之间的环区中的残基对受体结合很重要。IL2的序列展示为SEQ ID NO.29。

[0110] SEQ ID NO.29:

MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR

[0111] MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIIVLELK

GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

[0112] IL7是一种细胞因子,其作为B细胞和T细胞谱系早期淋巴样细胞的生长因子。IL7的序列展示为SEQ ID NO.30。

[0113] SEQ ID NO.30:

MFHVSFRYIFGLPPLILVLLPVASSDCDIEGKDGKQYESVLMVSI DQLLDSMKEIGSN
 CLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGT TILL
 NCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKLNLDLCFLKRL LQEIKTCWNKILM
 GTKEH

[0114]

[0115] IL15是一种与IL-2结构相似的细胞因子。与IL-2一样,IL-15与由IL-2/IL-15受体β链和共同的γ链构成的复合物结合并通过所述复合物发信号。IL-15由单核吞噬细胞和一些其它细胞在病毒感染后分泌。这种细胞因子诱导自然杀手细胞的细胞增殖;自然杀手细胞是先天免疫系统的细胞,其主要作用是杀死病毒感染的细胞。IL-15的序列展示为SEQ ID NO.31。

[0116] SEQ ID NO.31

MRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFI LGCF SAGLPKTEANWVNVI SDLKKI

[0117]

EDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVENLI ILANN
 SLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[0118] 基于细胞因子的转导增强子可包括以下序列之一或其变体:

[0119] SEQ ID NO.32 (膜-IL7)

MAHVSFRYIFGLPPLILVLLPVASSDCDIEGKDGKQYESVLMVSI DQLLDSMKEIGSN

CLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGT TILL

[0120]

NCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKLNLDLCFLKRL LQEIKTCWNKILM

GTKEHSGGGSPAKPTTTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF

ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVV

[0121] SEQ ID NO.33 (膜-IL15)

MGLVRRGARAGPRMPRGWTALCLLSLLPSGFMAGIHVFI LGCF SAGLPKTEANWVNVI S

DLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVE

[0122]

NLI ILANN SLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSPAKPTTTP

APRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLS

LVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVV

[0123] 基于细胞因子的转导增强子可包括如SEQ ID NO.32或33所示的序列的变体,其具有至少80、85、90、95、98或99%序列一致性,条件是变体序列为基于细胞因子的转导增强子,具有所需的特性,即当存在于逆转录病毒或慢病毒载体的包膜蛋白中时活化T细胞的能力。

[0124] 转导增强子的说明性优势

[0125] 在一些实施方案中,本公开提供了具有内置转导增强子的病毒载体。所述载体可具有刺激T细胞以及实现基因插入的能力。这可能会产生一个或多个优点,包括:(1)简化T细胞工程化的过程,因为只需要添加一种组分;(2)避免去除珠粒和相关的产量降低,因为病毒是不稳定的并且不必去除;(3)降低T细胞工程化的成本,因为只需要制造一种组分;(4)允许更大的设计灵活性,因为每个T细胞工程化过程都将涉及制造基因转移载体,同样的产品也可以用转导增强子制造以“适合”产品;(5)缩短生产过程:在基于可溶性抗原/珠粒的方法中,有丝分裂原和载体典型地间隔一天、两天或有时三天依序给予,这可以用本发明的逆转录病毒载体避免,因为转导增强和病毒进入是同步和同时的;(6)简化工程化,因

为不需要测试许多不同的融合蛋白的表达和功能；(7)使得有可能同时添加超过一个信号；和(8)允许分别调节每个信号/蛋白质的表达和/或表达水平。

[0126] 包括转导增强子的病毒载体的说明性实施方案

[0127] 在一些实施方案中,病毒包膜包括一种或多种转导增强子。在一些实施方案中,转导增强子包括T细胞活化受体、NK细胞活化受体和/或共刺激分子。在一些实施方案中,一种或多种转导增强子包括抗CD3scFv、CD86和CD137L中的一种或多种。在一些实施方案中,转导增强子包括抗CD3 scFv、CD86和CD137L中的每一种。

[0128] 在一些实施方案中,转导增强子包括促有丝分裂刺激物,和/或细胞因子刺激物,它被整合到逆转录病毒或慢病毒衣壳中,从而使病毒活化和转导T细胞。这消除了分别添加载体、有丝分裂原和细胞因子的需要。在一些实施方案中,转导增强子包含包括于生产细胞或包装细胞中的促有丝分裂跨膜蛋白和/或基于细胞因子的跨膜蛋白,所述跨膜蛋白在从生产细胞/包装细胞膜出芽时并入逆转录病毒中。在一些实施方案中,转导增强子在生产细胞上表达为单独的细胞表面分子,而不是病毒包膜糖蛋白的一部分。

[0129] 在一些实施方案中,本公开提供具有病毒包膜的逆转录病毒或慢病毒载体,其包括:

[0130] (i) 促有丝分裂转导增强子,其包括促有丝分裂域和跨膜域;和/或

[0131] (ii) 基于细胞因子的转导增强子,其包括细胞因子域和跨膜域。

[0132] 在一些实施方案中,转导增强子不是病毒包膜糖蛋白的一部分。在一些实施方案中,逆转录病毒或慢病毒载体包括由env基因编码的单独的病毒包膜糖蛋白。由于促有丝分裂刺激和/或细胞因子刺激是在与病毒包膜糖蛋白分离的分子上提供的,因此病毒包膜糖蛋白的完整性得以维持,并且对病毒滴度没有负面影响。

[0133] 在一些实施方案中,提供具有病毒包膜的逆转录病毒或慢病毒载体,其包括:

[0134] (i) 病毒包膜糖蛋白:和

[0135] (ii) 具有以下结构的促有丝分裂转导增强子:M-S-TM

[0136] 其中M是促有丝分裂域;S是任意的间隔区,且TM是跨膜域;和/或

[0137] (iii) 基于细胞因子的转导增强子,其包括细胞因子域和跨膜域。

[0138] 在一些实施方案中,促有丝分裂转导增强子和/或基于细胞因子的转导增强子不是病毒包膜糖蛋白的一部分。在一些实施方案中,它们作为单独的蛋白质存在于病毒包膜中并且由单独的基因编码。在一些实施方案中,促有丝分裂转导增强子具有以下结构:

[0139] M-S-TM

[0140] 其中M是促有丝分裂域;S是任意的间隔区,且TM是跨膜域。

[0141] 在一些实施方案中,促有丝分裂转导增强子结合活化T细胞表面抗原。在一些实施方案中,抗原是CD3、CD28、CD134或CD137。促有丝分裂转导增强子可包括此类活化T细胞表面抗原的激动剂。

[0142] 促有丝分裂转导增强子可包括来自抗体,例如OKT3、15E8、TGN1412;或共刺激分子,例如OX40L或41BBL的结合域。病毒载体可在病毒包膜中包括两种或更多种促有丝分裂转导增强子。例如,病毒载体可包括结合CD3的第一促有丝分裂转导增强子和结合CD28的第二促有丝分裂转导增强子。基于细胞因子的转导增强子可例如包括选自IL2、IL7和IL15的细胞因子。

[0143] 在一些实施方案中,提供具有病毒包膜的逆转录病毒或慢病毒载体,其包括:

[0144] (a) 结合CD3的促第一有丝分裂转导增强子;和

[0145] (b) 结合CD28的第二促有丝分裂转导增强子。

[0146] 在一些实施方案中,提供具有病毒包膜的逆转录病毒或慢病毒载体,其包括:

[0147] (a) 结合CD3的促第一有丝分裂转导增强子;

[0148] (b) 结合CD28的第二促有丝分裂转导增强子;和

[0149] (c) 包括IL2的基于细胞因子的转导增强子。

[0150] 在一些实施方案中,提供具有病毒包膜的逆转录病毒或慢病毒载体,其包括:

[0151] (a) 结合CD3的促第一有丝分裂转导增强子;

[0152] (b) 结合CD28的第二促有丝分裂转导增强子;

[0153] (c) 包括IL7的基于细胞因子的转导增强子;和

[0154] (d) 包括IL15的基于细胞因子的转导增强子。

[0155] T细胞活化蛋白

[0156] 本公开还提供了包括多核苷酸的病毒载体,所述多核苷酸包括编码T细胞活化蛋白或T细胞活化蛋白复合物的序列。如本文所提及,术语“T细胞活化蛋白”和“T细胞活化蛋白复合物”可以互换使用,并且可以指单一蛋白或独立蛋白的复合物。在一些实施方案中,病毒载体用编码T细胞活化蛋白的多核苷酸转导宿主T细胞,使得T细胞表达所述蛋白。然后可以接合T细胞活化蛋白以活化转导的T细胞。在一些实施方案中,T细胞活化蛋白是药物诱导的T细胞活化蛋白。在一些实施方案中,T细胞活化蛋白形成化学诱导的信号传导复合物。在一些实施方案中,T细胞活化蛋白形成工程化复合物,所述复合物启动信号进入细胞内部,作为配体诱导的二聚化的直接结果。T细胞活化蛋白可包括于同二聚体(两个相同组分的二聚体)或异二聚体(两个不同组分的二聚体)中。T细胞活化蛋白复合物可以是如本文所述的合成复合物。本领域技术人员将认识到,T细胞活化蛋白复合物的组成部分可以由可用于掺入复合物中的天然或合成组分构成。因此,本文提供的实例并非旨在限制。可在本文中实施的其它T细胞活化蛋白可在WO 2016/139463和WO 2018/111834中找到,其公开内容整体并入本文中。

[0157] 在一些实施方案中,T细胞活化蛋白序列可具有第一和第二序列。第一序列可编码第一T细胞活化蛋白复合物组分,其可包括第一细胞外结合域或其部分、铰链域、跨膜域和信号传导域或其部分。第二序列编码第二T细胞活化蛋白复合物组分,其可包括第二细胞外结合域或其部分、铰链域、跨膜域和信号传导域或其部分。在一些实施方案中,第一和第二组分可定位成使得当表达时,它们在配体存在下二聚化。

[0158] 如本文所用,术语“雷帕霉素活化的细胞因子受体”或“RACR”可互换地指代在雷帕霉素存在下可诱导产生促进细胞增殖和/或活性的细胞内信号的多部分受体。RACR可以在雷帕霉素存在下通过IL-2R细胞内域或其变体在T细胞中转导IL2样信号。

[0159] 在一些实施方案中,本公开提供了异二聚体双组分T细胞活化蛋白复合物的一个或多个蛋白质序列。在一些实施方案中,第一组分是IL2R γ 复合物。在一些实施方案中,IL2R γ 复合物包括如SEQ ID NO:34中所示的氨基酸序列

[0160] (MPLGLLWLGLALLGALHAQAGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKFDSSRDRNKPKF
FMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTI SPDYAYGATGHPGI IPPHATLVFDVELLKLGECSNTSKENPFLFALE

AVVISVSGMGLIISLLCVYFWLERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEIPP
KGGALGEGPGASPCNQHSPYWAPPCYTLKPET;SEQ ID NO:34)。

[0161] 在一些实施方案中,IL2R γ 复合物包括如SEQ ID NO:36中所示的氨基酸序列。

[0162] (MPLGLLWLGLALLGALHAQAGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKFDSSRDRNKPFK
FMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLGECSNTSKENPFLFALE
AVVISVSGMGLIISLLCVYFWLERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEIPP
KGGALGEGPGASPCNQHSPYWAPPCYTLKPET;SEQ ID NO:36)。

[0163] 在一些实施方案中,IL2R γ 复合物包括如SEQ ID NO:37中所示的氨基酸序列。

[0164] (MPLGLLWLGLALLGALHAQAGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKFDSSRDRNKPFK
FMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLGECSNTSKENPFLFALE
AVVISVSGMGLIISLLCVYFWLERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEIPP
KGGALGEGPGASPCNQHSPYWAPPCYTLKPET;SEQ ID NO:37)。

[0165] 在一些实施方案中,IL2R γ 复合物包括如SEQ ID NO:38中所示的氨基酸序列。

[0166] (MPLGLLWLGLALLGALHAQAGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKFDSSRDRNKPFK
FMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLGECSNTSKENPFLFALE
AVVISVSGMGLIISLLCVYFWLERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEIPP
KGGALGEGPGASPCNQHSPYWAPPCYTLKPET;SEQ ID NO:38)

[0167] 在一些实施方案中,第一T细胞活化蛋白复合物组分的蛋白质序列包括编码细胞外结合域、铰链域、跨膜域或信号传导域的蛋白质序列。实施方案还包括编码细胞外结合域、铰链域、跨膜域或信号传导域的核酸序列。在一些实施方案中,包括第一细胞外结合域、铰链域、跨膜域和/或信号传导域的第一T细胞活化蛋白复合物组分的蛋白质序列包括的氨基酸序列与SEQ ID NO:1、3、5或7中所示的序列具有100%、99%、98%、95%、90%、85%或80%序列一致性,或具有在由任两个前述百分比定义的范围内的序列一致性。

[0168] 在一些实施方案中,第二T细胞活化蛋白复合物组分是IL2R β 复合物。在一些实施方案中,IL2R β 复合物包括如SEQ ID NO:39中所示的氨基酸序列。

[0169] (MALPVTALLLPLALLLHAARPILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLK
ETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRIRISKGKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFIILVYLLI
NCRNTGPWLKVKLKCNTDPDSKFFSLSSEHGGDVQKWLSSFPFSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLQDD
KVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDA
YCTFPSRDDLLLFSPSLLGGSPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELV
REAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQ GEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPHTLV;SEQ ID NO:39)。

[0170] 在一些实施方案中,IL2R β 复合物包括如SEQ ID NO:40中所示的氨基酸序列。

[0171] (MALPVTALLLPLALLLHAARPILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLK
ETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRIRISKGKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFIILVYLLI
NCRNTGPWLKVKLKCNTDPDSKFFSLSSEHGGDVQKWLSSFPFSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLQDD
KVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDA
YCTFPSRDDLLLFSPSLLGGSPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELV
REAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPHTLV;SEQ ID NO:40)。

[0172] 在一些实施方案中,IL2R β 复合物包括如SEQ ID NO:41中所示的氨基酸序列。

[0173] (MALPVTALLLPLALLLHAARPILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLK ETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRI SKGKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFIILVYLLI NCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSLSSEHGGDVQKWLSSFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLQQD KVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDYPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDA YCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVL REAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV;SEQ ID NO:41)。

[0174] 在一些实施方案中,IL2R β 复合物包括如SEQ ID NO:42中所示的氨基酸序列。

[0175] (MALPVTALLLPLALLLHAARPILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLK ETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRI SKGKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFIILVYLLI NCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSLSSEHGGDVQKWLSSFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLQQD KVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDYPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDA YCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVL REAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV;SEQ ID NO:42)。

[0176] 在一些实施方案中,第二T细胞活化蛋白复合物组分是IL7R α 复合物。在一些实施方案中,IL7R α 复合物包括如SEQ ID NO:43中所示的氨基酸序列。

[0177] (MALPVTALLLPLALLLHAARPILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLK ETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRI SKGKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFIILVYLLI NCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSLSSEHGGDVQKWLSSFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLQQD KVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDYPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDA YCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVL REAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV;SEQ ID NO:43)。

[0178] 在一些实施方案中,第二T细胞活化蛋白复合物组分的蛋白质序列包括编码细胞外结合域、铰链域、跨膜域或信号传导域的蛋白质序列。实施方案还包括编码第二T细胞活化蛋白复合物组分的细胞外结合域、铰链域、跨膜域或信号传导域的核酸序列。在一些实施方案中,包括第二细胞外结合域、铰链域、跨膜域和/或信号传导域的第二T细胞活化蛋白复合物组分的蛋白质序列包括的氨基酸序列与SEQ ID NO:39-43中所示的序列具有100%、99%、98%、95%、90%、85%或80%序列一致性,或具有在由任两个前述百分比定义的范围内的序列一致性。

[0179] 在一些实施方案中,蛋白质序列可包括接头。在一些实施方案中,接头包括1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸,例如甘氨酸,或在由任两个前述数字定义的范围内的多个氨基酸,例如甘氨酸。在一些实施方案中,甘氨酸间隔子包括至少3个甘氨酸。在一些实施方案中,甘氨酸间隔子包含在SEQ ID NO:44 (GGGS;SEQ ID NO:44)、SEQ ID NO:45 (GGSGGG;SEQ ID NO:45)或SEQ ID NO:46 (GGG;SEQ ID NO:46)中所示的序列。实施方案还包括编码SEQ ID NO:44-46的核酸序列。在一些实施方案中,跨膜域位于信号传导域的N末端,铰链域位于跨膜域的N末端,接头位于铰链域的N末端,且细胞外结合域位于接头的N末端。

[0180] 在一些实施方案中,提供了同二聚体双组分T细胞活化蛋白复合物的一个或多个蛋白质序列。在一些实施方案中,第一T细胞活化蛋白复合物组分是IL2R γ 复合物。在一些实施方案中,IL2R γ 复合物包括如SEQ ID NO:47中所示的氨基酸序列。

[0181] (MPLGLLWLGLALLGALHAQAGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKFDSSRDRNKPFK

FMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDIYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLGESENKSKENPFLFALE
AVVISVSGMGLIISLLCVYFWLERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEIPP
KGGALGEGPGASPCNQHSPIYWAPPCYTLKPET;SEQ ID NO:47)。

[0182] 在一些实施方案中,第一T细胞活化蛋白复合物组分的蛋白质序列包括编码细胞外结合域、铰链域、跨膜域或信号传导域的蛋白质序列。实施方案还包括编码细胞外结合域、铰链域、跨膜域或信号传导域的核酸序列。在一些实施方案中,包括第一细胞外结合域、铰链域、跨膜域和/或信号传导域的第一T细胞活化蛋白复合物组分的蛋白质序列包括的氨基酸序列与SEQ ID NO:47中所示的序列具有100%、99%、98%、95%、90%、85%或80%序列一致性,或具有在由任两个前述百分比定义的范围内的序列一致性。

[0183] 在一些实施方案中,第二T细胞活化蛋白复合物组分是IL2R β 复合物或IL2R α 复合物。在一些实施方案中,IL2R β 复合物包括如SEQ ID NO:48中所示的氨基酸序列。

[0184] (MALPVTALLLPLALLLHAARPILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLK
ETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISKGKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFIILVYLLI
NCRNTGPWLKVKLCNTPDPSKFFSLSSEHGGDVQKWLSSFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLQDD
KVPEPASLSSNHSLSLTCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDA
YCTFPSRDDLLLFSPSLLGGSPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELV
REAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPHTLV;SEQ ID NO:48)。

[0185] 在一些实施方案中,IL2R α 复合物包括如SEQ ID NO:49中所示的氨基酸序列。

[0186] (MALPVTALLLPLALLLHAARPILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLK
ETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISKGKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFIILVYLLI
NCRNTGPWLKVKLCNTPDPSKFFSLSSEHGGDVQKWLSSFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLQDD
KVPEPASLSSNHSLSLTCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDA
YCTFPSRDDLLLFSPSLLGGSPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELV
REAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPHTLV;SEQ ID NO:49)。

[0187] 在一些实施方案中,第二T细胞活化蛋白复合物组分的蛋白质序列包括编码细胞外结合域、铰链域、跨膜域或信号传导域的蛋白质序列。实施方案还包括编码第二T细胞活化蛋白复合物组分的细胞外结合域、铰链域、跨膜域或信号传导域的核酸序列。在一些实施方案中,包括第二细胞外结合域、铰链域、跨膜域和/或信号传导域的第二T细胞活化蛋白复合物组分的蛋白质序列包括的氨基酸序列与SEQ ID NO:48或SEQ ID NO:49中所示的序列具有100%、99%、98%、95%、90%、85%或80%序列一致性,或具有在由任两个前述百分比定义的范围内的序列一致性。

[0188] 在一些实施方案中,用于同二聚化双组分T细胞活化蛋白复合物的序列并入用于与配体AP1903同二聚化的FKBP F36V域。

[0189] 在一些实施方案中,提供了单组分同二聚化T细胞活化蛋白复合物的一个或多个蛋白质序列。在一些实施方案中,单组分T细胞活化蛋白复合物是IL7R α 复合物。在一些实施方案中,IL7R α 复合物包括如SEQ ID NO:50中所示的氨基酸序列。

[0190] (MPLGLLWLGLALLGALHAQAGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLDGGKDFSSRDRNKPFK
FMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDIYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLGESENKSKENPFLFALE
AVVISVSGMGLIISLLCVYFWLERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEIPP

KGGALGEGPGASPCNQHSPYWAPPCYTLKPET;SEQ ID NO:50)。

[0191] 在一些实施方案中,至少一种T细胞活化蛋白包括第一受体蛋白,其包括第一二聚化域,和第二受体蛋白,其包括第二二聚化域,其中所述第一二聚化域和所述第二二聚化域响应于分子而彼此特异性结合。被T细胞活化蛋白结合的分子,或者称为术语“配体”或“试剂”,是指具有所需生物效应的分子。在一些实施方案中,配体被细胞外结合域识别并结合,形成包括配体和两种结合T细胞活化蛋白复合物组分的三部分复合物。配体包括但不限于蛋白质分子,包括但不限于肽、多肽、蛋白质、翻译后修饰的蛋白质、抗体等;小分子(小于1000道尔顿)、无机或有机化合物;和核酸分子,包括但不限于双股或单股DNA,或双股或单股RNA(例如反义、RNAi等)、适体以及三螺旋核酸分子。配体可衍生自或获自任何已知的生物体(包括但不限于动物(例如哺乳动物(人类和非人类哺乳动物))、植物、细菌、真菌和原生生物或病毒)或来自合成分子库。在一些实施方案中,配体是蛋白质、抗体、小分子或药物。在一些实施方案中,配体是雷帕霉素或雷帕霉素类似物(rapalogs)。在一些实施方案中,雷帕霉素类似物包括相对于雷帕霉素具有以下一种或多种修饰的雷帕霉素变体:去甲基化、C7、C42和/或C29处的甲氧基的消除或置换;C13、C43和/或C28处的羟基的消除、衍生化或置换;C14、C24和/或C30处的酮的还原、消除或衍生化;用5元脯氨酰环置换6元甲基哌啶环;和环己基环上的替代取代或用取代的环戊基环置换环己基环。因此,在一些实施方案中,雷帕霉素类似物是依维莫司(everolimus)、诺维莫司(novolimus)、吡美莫司(pimecrolimus)、瑞达福莫司(ridaforolimus)、他克莫司(tacrolimus)、坦罗莫司(temsirolimus)、乌米罗莫司(umirolimus)、佐他莫司(zotarolimus)、CCI-779、C20-甲基烯丙基雷帕霉素、C16-(S)-3-甲基吡啶雷帕霉素、C16-iRap、AP21967、钠霉酚酸、盐酸贝尼地平(benidipine hydrochloride)、雷帕鸣(rapamine)、AP23573或AP1903,或其代谢物、衍生物和/或组合。在一些实施方案中,配体是IMID类药物(例如沙利度胺(thalidomide)、泊马度胺(pomalidomide)、来那度胺(lenalidomide)或相关类似物)。

[0192] 在一些实施方案中,分子选自FK1012、他克莫司(FK506)、FKCsA、雷帕霉素、香豆霉素、赤霉素、HaXS、TMP-HTag和ABT-737或它们的功能衍生物。

[0193] 衔接分子

[0194] 如本文所用,术语“衔接分子”是指具有可被连接至靶向部分的受体识别的半抗原部分的任何分子。“靶向部分”是特异性或非特异性结合至靶细胞的任何分子。在一些实施方案中,靶向部分是蛋白质。用作靶向部分的说明性蛋白质包括在美国专利第9,233,125号中所述的那些,所述专利的公开内容以引用方式整体并入本文中。在一些实施方案中,蛋白质是抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段对肿瘤抗原具有特异性。说明性蛋白质包括但不限于基于抗癌的单克隆抗体,例如西妥昔单抗(抗EGFR)、尼妥珠单抗(抗EGFR)、帕尼单抗(抗EGFR)、利妥昔单抗(抗CD20)、奥马珠单抗(抗CD20)、托西莫单抗(抗CD20)、曲妥珠单抗(抗Her2)、吉妥珠单抗(抗CD33)、阿仑单抗(抗CD52)和贝伐单抗(抗VEGF)。

[0195] 在一些实施方案中,靶向部分是小分子。用作靶向部分的说明性蛋白质包括在美国专利申请第15/296,666号、第16/092,054号和第16/253,562号中所述的那些,所述专利申请各自以引用方式整体并入本文中。可用作靶向部分的说明性小分子包括但不限于叶酸、二羧丙基)脲基]戊二酸(DUPA)、NK-1R配体、CAIX配体、 γ 谷氨酰转肽酶的配体、NKG2D配

体或胆囊收缩素2受体 (CCK2R) 配体。

[0196] 在一些实施方案中,靶向部分是脂质,或更具体地是磷脂醚 (PLE)。用作靶向部分的说明性蛋白质包括在国际专利申请第W02018148224号、第W02019060425号和第W02018148224号中所述的那些,所述专利申请各自以引用方式整体并入本文中。在一些实施方案中,脂质包括极性头基和疏水基。在一些实施方案中,疏水基是碳链或脂肪酸,例如脂族链。在一些实施方案中,碳链或脂肪酸是饱和的或不饱和的。在一些实施方案中,疏水基包括烷基、烯基或炔基。在一些实施方案中,疏水基包括萜类脂质,例如类固醇或胆固醇,或者它包括芳族环。在一些实施方案中,疏水基包括醚键,其中醚键位于极性头基与脂族链之间。在一些实施方案中,脂质是磷脂醚。在一些实施方案中,极性头包括胆碱、磷脂酰胆碱、鞘磷脂、磷酸乙醇胺基团、寡糖残基、糖残基、磷脂酰丝氨酸或磷脂酰肌醇。在一些实施方案中,糖是甘油。在一些实施方案中,靶部分是半抗原、聚 (his) 标签、Strep- 标签、FLAG- 标签、VS- 标签、Myc- 标签、HA- 标签、NE- 标签、生物素、地高辛、二硝基苯酚或荧光素。在一些实施方案中,疏水基包括碳烷基链,其中所述碳烷基链包括至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或22个碳或在由任两个前述值定义的范围内的任何数量。在一些实施方案中,碳烷基链包括8-22个碳,例如8-12、12-14、14-16或16-22个碳。在一些实施方案中,极性头基包括磷酸胆碱、哌啶部分或磷酸三甲基砷乙酯部分。在一些实施方案中,脂质进一步包括将靶部分与极性头基分开的间隔子。在一些实施方案中,间隔子包括PEG间隔子、半抗原 (2x) 间隔子、半抗原 (3x) 间隔子、半抗原 (4x) 间隔子、半抗原 (5x) 间隔子或烷烃链。在一些实施方案中,间隔子包括聚 (羧基甜菜碱)、肽、聚缩水甘油、聚乙烯、聚酸酐、聚磷酸酯、聚己内酯或聚 (环氧乙烷)。在一些实施方案中,PEG间隔子包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21个PEG分子,或在由前述任两个值定义的范围内的任何量的PEG分子。在一些实施方案中,脂质嵌入靶细胞,例如癌细胞的脂质双层中。

[0197] 在一些实施方案中,靶向部分是抗体或其抗原结合片段。如本文所用,术语“抗体”是指与抗原特异性结合的免疫球蛋白分子。抗体可以是源自天然来源或重组来源的完整免疫球蛋白,并且可以是完整免疫球蛋白的免疫反应部分。所述术语以最广义使用,且包括多克隆和单克隆抗体,包括完整抗体和功能性 (抗原结合) 抗体片段,包括片段抗原结合 (Fab) 片段、F (ab')₂ 片段、Fab' 片段、Fv片段、重组IgG (rIgG) 片段、单链抗体片段 (包括单链可变片段 (scFv))、双链抗体和单域抗体 (例如sdAb、sdFv、纳米抗体) 片段。所述术语包括免疫球蛋白的基因工程化和/或其它修饰形式,例如胞内抗体、肽抗体、嵌合抗体、完全人抗体、人源化抗体和异源偶联抗体、多特异性 (例如双特异性) 抗体、双链抗体、三链抗体和四链抗体、串联二-scFv、串联三-scFv。除非另有说明,否则术语“抗体”应理解为包括其功能性抗体片段。所述术语还涵盖完整或全长抗体,包括任何类别或亚类的抗体,包括IgG和其亚类、IgM、IgE、IgA和IgD。术语“抗体片段”是指完整抗体的一部分并且是指完整抗体的抗原决定可变区。抗体片段的实例包括但不限于片段抗原结合 (Fab) 片段、F (ab')₂ 片段、Fab' 片段、Fv片段、重组IgG (rIgG) 片段、单链抗体片段 (包括单链可变片段 (scFv))、单域抗体 (例如sdAb、sdFv、纳米抗体) 片段、双链抗体和由抗体片段形成的多特异性抗体。在一个具体实施方案中,抗体片段是scFv。抗体或其结合片段的非限制性实例包括单克隆抗体、双特异性抗体、Fab、Fab₂、Fab₃、scFv、Bis-scFv、微型抗体、三链抗体、双链抗体、四链抗体、VhH域、VNAR域、IgNAR和骆驼Ig。抗体的其它实例是IgG (例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)、IgM、IgE、IgD

和IgA。抗体的非限制性实例包括人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。重组抗体的非限制性实例包括特异性结合至肿瘤抗原的抗体。

[0198] 在一些实施方案中,靶向部分包括磷脂醚(PLE)。在一些实施方案中,靶向部分包括叶酸。在一些实施方案中,衔接分子包括与PLE结合的HPF。在一些实施方案中,衔接分子包括HPF-FITC-PEG3-C18-烷基磷脂。在一些实施方案中,衔接分子包括HPF- {接头} -erufosine。

[0199] 如本文所用,“半抗原”是指能够被受体,例如嵌合抗原受体等特异性识别的任何部分。在一些实施方案中,衔接分子含有多于一个半抗原,例如2、3、4、5、6个或更多个半抗原。半抗原可以彼此相同或不同。通常,半抗原(hapten/haptens)直接或通过间隔子共价连接至靶向部分。预期几种类型的“间隔子”用于本文所述的实施方案,包括但不限于聚(羧基甜菜碱)、肽、聚缩水甘油、聚乙烯、聚酸酐、聚磷酸酯、聚己内酯、聚(环氧乙烷)、PEG间隔子、小肽或烷烃链。在一些实施方案中,烷烃间隔子可包括2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18个碳,或在由任两个前述值定义的范围之间的任何数量的碳。在一些实施方案中,PEG间隔子包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21个PEG分子,或在由前述任两个值定义的范围内的任何量的PEG分子。

[0200] 各种小分子半抗原在本领域中是已知的。用于本公开的组合物和方法的说明性半抗原包括在国际专利申请公开案第W02018148224号中所述的那些,所述公开案以引用方式整体并入本文中。在另一方面,本公开考虑选择新的半抗原并使用本领域已知的抗半抗原抗体生产技术产生特异性针对所述半抗原的抗体。在一些实施方案中,半抗原包括荧光素。重组人抗体E2是一种能够与荧光素结合的抗体。在一些实施方案中,半抗原包括荧光素并且半抗原结合受体包括抗荧光素抗体或其抗原结合片段,例如抗体E2。在一些实施方案中,半抗原包括2,4-二硝基苯酚(DNP)。

[0201] 在一些实施方案中,衔接分子包括一个或多个与半抗原共价连接的掩蔽部分,从而产生包括至少一个半抗原和至少一个掩蔽部分的“掩蔽半抗原”。“掩蔽部分”是阻止或抑制通常能够结合未掩蔽形式的半抗原的配体或受体与掩蔽形式的半抗原结合的化学部分。掩蔽部分可包括保护基团以通过阻断对半抗原具有特异性的半抗原结合受体(例如嵌合抗原受体)的结合和识别来防止半抗原的识别。当衔接分子整合至细胞中时,其中细胞存在于肿瘤环境或活性氧类的位点中,掩蔽部分可以自我裂解,从而允许嵌合抗原受体结合和识别半抗原。在一些实施方案中,靶向部分是脂质,所述脂质是磷脂醚。在一些实施方案中,掩蔽部分包括酚羟基或PEG。在一些实施方案中,酚羟基与荧光素的咕吨部分上的羟基结合。在一些实施方案中,掩蔽部分通过可裂解部分与衔接分子结合,所述可裂解部分任选地配置为在肿瘤微环境中可特异性裂解。在一些实施方案中,被配置为在肿瘤微环境中可裂解的可裂解部分通过活性氧类反应、酸性pH、缺氧或亚硝基化被裂解。在一些实施方案中,磷脂醚包括半抗原并且CAR通过与所述半抗原的相互作用接合至所述磷脂醚。在一些实施方案中,磷脂醚包括极性头基和碳烷基链。在一些实施方案中,碳烷基链包括至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或22个碳或在由任两个前述值定义的范围内的任何数量。在一些实施方案中,碳烷基链包括8-22个碳,例如8-12、12-14、14-16或16-22个碳。在一些实施方案中,当组合物处于酸性环境中时,掩蔽部分被去除。在一些实施方案中,酸性环境包括4、5、6或6.5的pH或在由任两个前述值定义的范围之间的任何pH。在一些实施方案

中,掩蔽部分通过亚硝基化去除。

[0202] 在一些实施方案中,掩蔽半抗原被配置为允许化学反应从半抗原去除掩蔽部分。在一些实施方案中,掩蔽半抗原被配置为允许活性氧类从半抗原去除掩蔽部分。在一些实施方案中,掩蔽半抗原包括羟苯基。在一些实施方案中,掩蔽部分包括2,4-二硝基苯酚(DNP)基团。在一些实施方案中,半抗原包括荧光素。在一些实施方案中,掩蔽半抗原包括羟苯基荧光素(HPF)。在一些实施方案中,掩蔽半抗原包括荧光素-DNP。

[0203] 半抗原结合受体

[0204] 本公开还提供了与衔接分子结合的受体,特别是与衔接分子所包含的半抗原结合的受体。半抗原和衔接分子可以是前述部分中阐述的那些中的任一者。在一些实施方案中,半抗原结合受体是与半抗原天然结合的细胞表面受体。在一些实施方案中,半抗原结合受体是部分或完全合成的。在一些实施方案中,半抗原结合受体是重组蛋白。在一些实施方案中,半抗原结合受体是嵌合受体。

[0205] 在一些实施方案中,半抗原结合受体是嵌合抗原受体。术语“嵌合抗原受体”或“CAR”或“嵌合T细胞受体”是指合成设计的受体,其包括与分子结合的抗体或其它蛋白质序列的配体结合域、跨膜域、一个或多个细胞内信号传导域和一个或多个共刺激域。配体结合域通过间隔域连接至T细胞或其它受体的一个或多个细胞内信号传导域,例如共刺激域。嵌合受体也可称为人工T细胞受体、嵌合T细胞受体、嵌合免疫受体和嵌合抗原受体(CAR)。这些CAR是工程化受体,可将任意特异性移植到免疫受体细胞上。在一些实施方案中,选择嵌合抗原受体的间隔子(例如间隔子中特定长度的氨基酸)以实现CAR的所需结合特性。接着筛选具有不同长度的间隔子(例如呈递在细胞上)的CAR与CAR所针对的衔接分子和/或半抗原结合或相互作用的能力。

[0206] 在本文的一些实施方案中,CAR包括一个或多个细胞内信号传导域。在一些实施方案中,细胞内信号传导域源自CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3或与CD83或其一部分特异性结合的配体。

[0207] 在一些实施方案中,CAR包括一个或多个共刺激域。“共刺激域”是指向T细胞提供信号的信号传导部分,所述信号外加由例如TCR/CD3复合物的CD3 ζ 链提供的主要信号介导T细胞反应,包括但不限于活化、增殖、分化、细胞因子分泌等。共刺激域可包括但不限于以下中的全部或一部分:CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3或与CD83特异性结合的配体。在一些实施方案中,共刺激域是与其它细胞内介质相互作用以介导包括活化、增殖、分化和细胞因子分泌等在内的细胞反应的细胞内信号传导域。在一些实施方案中,本文中的共刺激域包括41bb和CD3 ζ 。在一些实施方案中,提供了T细胞,其中T细胞包括对衔接分子上的半抗原具有特异性的CAR。在一些实施方案中,T细胞进一步包括806CAR(抗EGFR(806)(41BB-CD3 ζ CAR))。

[0208] 在一些实施方案中,所述嵌合受体与以下各者具有至少80%氨基酸一致性、至少90%氨基酸一致性或至少95%氨基酸一致性:SVLTQPSSVSAAPGQKVTISCSGSTSNI GN NYVSWYQ QHPGKAPKLM IYDVSKRPSGVPDRFSGSKSGNSASLDISGLQSEDEADYYCAAWDDSLSEFLFGTGKLTVLGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLVESGGNLVQPGGSLRLS CAASGFTFGSFSMSWVRQAPGGGLEWVAGLSARSSLTHYADSVKGRFTISRDN AKNSVYLQMN SLRVEDTAVYYCARRSYDSSGYWGHFY SYMDVWGQGLTVVSSSESKYGPCCPPCPMFVWL VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFS

RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR
RGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:53), 或其共享相同互补决定区的变体。

[0209] 在一些实施方案中, 嵌合抗原受体包括通过短的IgG4接头与CD28跨膜跨度和4-1BB ζ 信号传导尾结合的抗FITC scFv。

[0210] 包括抗FITC scFv的说明性嵌合抗原受体包括美国专利申请第63/052,806号中所述的那些, 所述专利申请以引用方式整体并入本文中。

[0211] 在一些实施方案中, 半抗原结合受体包括抗体的半抗原特异性抗原结合片段。在一些实施方案中, 抗原结合片段包括Fab片段或单链Fv片段(scFv)。在一些实施方案中, 特异性结合至半抗原的受体包括半抗原特异性嵌合抗原受体。

[0212] 在一些实施方案中, 半抗原结合受体是T细胞受体(TCR)或其功能部分。“T细胞受体”或“TCR”是指在T淋巴细胞或T细胞表面上发现的负责识别与主要组织相容性复合物分子结合的抗原片段的分子。

[0213] 在一些实施方案中, 半抗原结合受体是二聚化活化受体起始复合物(DARIC)。DARIC提供了结合成分和信号传导成分, 它们各自表达为单独的融合蛋白, 但含有细胞外多聚化机制(桥接因子), 用于在细胞表面上重新偶联两种功能成分(参见美国专利申请第2016/0311901号, 特此明确以引用方式整体并入)。重要的是, DARIC系统中的桥接因子形成异二聚体受体复合物, 其自身不会产生显著的信号传导。所描述的DARIC复合物仅在与其它DARIC复合物进一步共定位后启动生理相关信号。因此, 在没有进一步多聚化DARIC复合物的机制(例如通过与表达配体的肿瘤细胞接触, 所述配体由并入DARIC组分之一的结合域结合)的情况下, 它们不允许选择性扩增所需的细胞类型。因此, 如本文所用, 在一些实施方案中, 并入DARIC组分中的结合域与本文公开的衔接分子所包括的半抗原结合。

[0214] 在一些实施方案中, 半抗原结合受体的半抗原结合部分可包括抗体的抗原结合部分或抗原结合抗体衍生物。抗体的抗原结合部分或衍生物可以是Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、scFv、双链抗体、线性抗体、单链抗体、微型抗体等。在一些实施方案中, 半抗原结合受体的半抗原结合部分可包括DARPin或centyrin。

[0215] 半抗原结合受体可结合至与疾病或病症相关的分子。如本文所用, 分子可为衔接分子所包括的半抗原。在一些实施方案中, 与半抗原结合受体结合或相互作用的半抗原可呈现在基质上, 例如膜、珠粒或载体(例如孔)或结合剂, 例如脂质(例如PLE)、半抗原、配体或抗体或其结合片段。在一些实施方案中, 衔接分子是对癌细胞上存在的抗原具有特异性的结合剂。在一些实施方案中, 衔接分子是对病原体, 例如病毒或细菌具有特异性的结合剂。通过一种方法, 使包括所需半抗原的底物或衔接分子与包括对所述半抗原具有特异性的半抗原结合受体的多个细胞接触, 并确定包括半抗原结合受体的细胞与存在于底物或结合剂上的半抗原的结合水平或量。此类结合评估可包括对结合至衔接分子的细胞的染色或对荧光或荧光损失的评估。同样, 可以这种方式评估对半抗原结合受体结构的修饰, 例如改变间隔子长度。在一些方法中, 还提供了靶细胞, 使得所述方法包括在存在靶细胞, 例如癌细胞或细菌细胞, 或靶病毒的情况下接触细胞, 例如T细胞, 所述细胞包括对包括靶部分和半抗原的衔接分子具有特异性的半抗原结合受体, 并评估包括半抗原结合受体的细胞与衔接分子的结合和/或评估包括半抗原结合受体的细胞与靶细胞或靶病毒的结合。半抗原结合受体的不同元件的变化可例如使得对特定表位或抗原的结合亲和力更强。

[0216] 在本文所述的一些实施方案中,半抗原结合受体对靶向肿瘤或癌细胞的脂质或肽具有特异性,其中脂质或肽包括半抗原并且半抗原结合受体可通过与所述半抗原的相互作用而与所述脂质特异性结合。在一些实施方案中,脂质是磷脂醚。在本文所述的一些实施方案中,半抗原结合受体对磷脂醚具有特异性,其中磷脂醚包括半抗原并且半抗原结合受体通过与所述半抗原的相互作用特异性结合至所述磷脂醚。

[0217] 在一些实施方案中,半抗原结合受体对贴附于抗体或其结合片段的半抗原具有特异性,其中半抗原结合受体通过与所述半抗原的相互作用特异性结合至所述抗体或其结合片段。可与所述抗体或其结合片段结合的示例性半抗原包括聚(his)标签、Strep-标签、FLAG-标签、VS-标签、Myc-标签、HA-标签、NE-标签、生物素、地高辛、二硝基苯酚、绿色荧光蛋白(GFP)、黄色荧光蛋白、橙色荧光蛋白、红色荧光蛋白、远红色荧光蛋白或荧光素(例如异硫氰酸荧光素(FITC))。在一些实施方案中,抗体或其结合片段对癌细胞或病原体(例如病毒或细菌病原体)上存在的抗原或配体具有特异性。在一些实施方案中,抗体或其结合片段对肿瘤细胞、病毒(优选慢性病毒(例如肝炎病毒,例如HBV或HCV,或HIV))或细菌细胞上存在的抗原或配体具有特异性。

[0218] 在一些实施方案中,半抗原结合受体核酸包括编码跨膜域的多核苷酸。跨膜域提供嵌合受体在膜中的锚定。

[0219] 在一些实施方案中,提供一种复合物,其中所述复合物包括与脂质接合的半抗原结合受体,其中脂质包括半抗原并且半抗原结合受体通过与所述半抗原的相互作用而与所述脂质接合。

[0220] 在一些实施方案中,提供一种复合物,其中所述复合物包括与抗体或其结合片段接合的半抗原结合受体,其中抗体或其结合片段包括半抗原(例如聚(his)标签、Strep-标签、FLAG-标签、VS-标签、Myc-标签、HA-标签、NE-标签、生物素、地高辛、二硝基苯酚、绿色荧光蛋白(GFP)、黄色荧光蛋白、橙色荧光蛋白、红色荧光蛋白、远红色荧光蛋白或荧光素(例如异硫氰酸荧光素(FITC)),并且半抗原结合受体通过与所述半抗原的相互作用而与所述抗体或其结合片段接合。在一些实施方案中,抗体或其结合片段进一步与癌细胞或病原体(例如病毒或细菌病原体)上存在的抗原或配体接合。在一些实施方案中,抗体或其结合片段与肿瘤细胞、病毒(优选慢性病毒(例如肝炎病毒,例如HBV或HCV,或HIV))或细菌细胞上存在的抗原或配体接合。在一些实施方案中,半抗原存在于对癌细胞或病原体(例如病毒或细菌细胞)上的抗原具有特异性的抗体或其结合片段上,并且所述半抗原被存在于细胞(例如T细胞)表面上的半抗原结合受体结合,使得具有半抗原结合受体的细胞被重定向到癌细胞或病原体。

[0221] 在一些实施方案中,本公开的半抗原结合受体或T细胞活化蛋白赋予免疫细胞对免疫抑制剂或抗增殖剂的耐药性。在一些情况下,慢病毒载体有助于通过赋予转导细胞对免疫抑制剂或抗增殖剂的耐药性来选择性扩增靶细胞,有助于选择性扩增靶细胞。本公开提供了慢病毒载体,其包括赋予对免疫抑制剂或抗增殖剂的耐药性的任何核酸序列。免疫抑制剂或抗增殖剂的实例包括但不限于雷帕霉素或其衍生物、拉帕洛或其衍生物、他克莫司或其衍生物、环孢霉素或其衍生物、甲氨蝶呤或其衍生物以及霉酚酸酯(MMF)或其衍生物。各种耐药性基因是本领域中已知的。对雷帕霉素的耐药性可由编码蛋白域FRb的多核苷酸序列赋予,见于mTOR域中并且已知是FKBP-雷帕霉素复合物的靶标。对他克莫司的耐药性

可由编码钙调磷酸酶突变体CNa22或钙调磷酸酶突变体CNb30的多核苷酸序列赋予。对环孢霉素的耐药性可由编码钙调磷酸酶突变体CNa12或钙调磷酸酶突变体CNb30的多核苷酸序列赋予。这些钙调磷酸酶突变体描述于Brewin等(2009) *Blood* 114:4792-803中。对甲氨蝶呤的耐药性可由二氢叶酸还原酶(DHFR)的多种突变体形式提供,Volpato等(2011) *J Mol Recognition* 24:188-198,并且对MMF的耐药性可由肌苷一磷酸脱氢酶(IMPDH)的多种突变体形式提供,Yam等(2006) *Mol Ther* 14:236-244。

[0222] 免疫抑制剂或抗增殖剂(例如免疫抑制药物)通常在ACT之前、期间和/或之后使用。在一些情况下,使用免疫抑制药物可改善治疗效果。在一些情况下,使用免疫抑制药物可减少治疗的副作用,诸如但不限于急性移植物抗宿主病、慢性移植物抗宿主病以及移植后淋巴增生性疾病。本公开设想将免疫抑制药物与治疗或预防本公开的疾病或病况的任何方法一起使用,所述方法包括但不限于本公开的方法,其中慢病毒载体赋予转导细胞对免疫抑制药物的耐药性。

[0223] 多核苷酸

[0224] 本公开还涉及编码所公开的转导增强子、T细胞活化蛋白、衔接分子和半抗原结合受体的核酸和多核苷酸。核酸可呈包括编码任何前述蛋白质的多个序列的构建体的形式。如本文所用,术语“多核苷酸”、“核苷酸”和“核酸”旨在彼此同义。

[0225] 技术人员将理解,由于遗传密码的简并性,许多不同的多核苷酸和核酸可编码相同多肽。此外,应当理解,技术人员可以使用常规技术进行不影响由本文所述的多核苷酸编码的多肽序列的核苷酸取代,以反映要在其中表达多肽的任何特定宿主生物的密码子使用。

[0226] 核酸可包括DNA或RNA。它们可以是单股或双股的。它们也可以是多核苷酸,其中包括合成的或修饰的核苷酸。许多不同类型的寡核苷酸修饰是本领域已知的。这些修饰包括甲基磷酸酯和硫代磷酸酯骨架,在分子的3'和/或5'端添加吡啶或聚赖氨酸链。出于本文所述的用途的目的,应理解多核苷酸可通过本领域可用的任何方法进行修饰。可进行此类修饰以增强感兴趣的多核苷酸的体内活性或寿命。

[0227] 与核苷酸序列有关的术语“变体”、“同源物”或“衍生物”包括从所述序列中或向所述序列中的一个(或多个)核酸的任何取代、变异、修饰、置换、缺失或添加。核酸可产生包括一个或多个编码促有丝分裂转导增强子的序列和/或一个或多个编码基于细胞因子的转导增强子的序列的多肽。裂解位点可以是自裂解的,使得当多肽产生时,它立即被裂解成受体成分和信号传导成分,而不需要任何外部裂解活性。

[0228] 各种自裂解位点是已知的,包括口蹄疫病毒(FMDV) 2a自裂解肽和各种变体和2A样肽。肽可具有如SEQ ID NO.51或52中所示的序列。

[0229] SEQ ID NO:51:RAEGRGSLTTCGDVEENPGP。

[0230] SEQ ID NO:52:QCTNYALLKLAGDVESNPGP。

[0231] 共表达序列可以是内部核糖体进入序列(IRES)。共表达序列可以是内部启动子。

[0232] 在一些实施方案中,多核苷酸编码一种蛋白质,所述蛋白质赋予用其转导的免疫细胞对抗血管生成剂的耐药性。

[0233] 病毒粒子标记蛋白

[0234] 病毒载体的病毒包膜还可包括标记蛋白,所述标记蛋白包括与捕获部分结合的结

合域和跨膜域。

[0235] 标记蛋白可包括：与捕获部分结合的结合域；间隔子；和跨膜域。

[0236] 标记蛋白通过标记蛋白与捕获部分的结合促进从细胞上清液纯化病毒载体。‘结合域’是指实体，例如表位，其能够识别并特异性结合至靶实体，例如捕获部分。结合域可包括一个或多个能够特异性结合至捕获部分的表位。例如，结合域可包括至少一个、两个、三个、四个或五个能够特异性结合至捕获部分的表位。在结合域包括多于一个表位的情况下，每个表位可以由接头序列分开，如本文所述。

[0237] 在添加与结合域相比对捕获部分具有更高结合亲和力的实体后，结合域可从捕获部分释放。

[0238] 结合域可包括一个或多个链霉亲和素结合表位。例如，结合域可包括至少一个、两个、三个、四个或五个链霉亲和素结合表位。

[0239] 链霉亲和素是一种从细菌阿维丁链霉菌 (*Streptomyces avidinii*) 中纯化的 52.8kDa 蛋白质。链霉亲和素同源四聚体对生物素 (维生素 B7 或维生素 H) 具有非常高的亲和力，解离常数 (Kd) 为 $\sim 10^{15}$ M。链霉亲和素在本领域中是众所周知的，并且由于链霉亲和素-生物素复合物对有机溶剂、变性剂、蛋白水解酶以及极端温度和 pH 值的耐受性，因此广泛用于分子生物学和生物纳米技术。强链霉亲和素-生物素键可用于将各种生物分子相互连接或连接到固体载体上。然而，需要苛刻的条件来破坏链霉亲和素-生物素的相互作用，这可能会使正纯化的感兴趣的蛋白质变性。

[0240] 结合域可以是例如生物素模拟物。‘生物素模拟物’可指特异性结合至链霉亲和素的短肽序列 (例如 6 至 20、6 至 18、8 至 18 或 8 至 15 个氨基酸)。如上所述，生物素/链霉亲和素相互作用的亲和力非常高。因此，本发明的一个优点是结合域可包括与生物素本身相比对链霉亲和素具有较低亲和力的生物素模拟物。

[0241] 特别地，生物素模拟物与链霉亲和素的结合亲和力低于生物素，因此生物素可用于洗脱链霉亲和素捕获的逆转录病毒载体。例如，生物素模拟物可以 1nM 至 100uM 的 Kd 结合链霉亲和素。

[0242] 生物素模拟物可选自以下组：Streptag11、Flankedccstreptag 和 ccstreptag。结合域可包括多于一种生物素模拟物。例如，结合域可包括至少一种、两种、三种、四种或五种生物素模拟物。在结合域包括多于一种生物素模拟物的情况下，每种模拟物可以是相同或不同的模拟物。

[0243] 本公开还提供了可以纯化的病毒粒子和其纯化方法。在一些实施方案中，病毒载体的病毒包膜还可包括标记蛋白，所述标记蛋白包括：与捕获部分结合的结合域；间隔子；和跨膜域，所述标记蛋白通过标记蛋白与捕获部分的结合促进从细胞上清液纯化病毒载体。

[0244] 标记蛋白的结合域可包括一个或多个链霉亲和素结合表位。链霉亲和素结合表位可以是生物素模拟物，例如以低于生物素的亲和力结合链霉亲和素的生物素模拟物，使得生物素可用于洗脱由包装细胞产生的链霉亲和素捕获的逆转录病毒载体。合适的生物素模拟物的实例包括：Streptag11、Flankedccstreptag 和 ccstreptag。本发明的第一方面的病毒载体可包括编码 T 细胞受体或嵌合抗原受体的核酸序列。病毒载体可以是病毒样粒子 (VLP)。

[0245] 生产/包装细胞系

[0246] 本公开提供了用于根据本公开生产病毒粒子的宿主细胞。在一些实施方案中,宿主细胞在细胞表面表达促有丝分裂转导增强子和/或基于细胞因子的转导增强子。宿主细胞可用于根据前述实施方案生产病毒载体。在一些实施方案中,宿主细胞可包括适用于纯化病毒粒子的标记蛋白。

[0247] 宿主细胞可以是包装细胞并且包括一种或多种以下基因:gag、pol、env和rev。逆转录病毒载体的包装细胞可包括gag、pol和env基因。慢病毒载体的包装细胞可包括gag、pol、env和rev基因。

[0248] 宿主细胞可以是生产细胞并且包括gag、pol、env和任选的rev基因以及逆转录病毒或慢病毒载体基因组。在用于基因疗法的典型重组逆转录病毒或慢病毒载体中,一个或多个gag-pol和env蛋白编码区的至少一部分可从病毒中去除并由包装细胞提供。这使得病毒载体有复制缺陷,因为病毒能够将其基因组整合至宿主基因组中,但修饰的病毒基因组由于缺乏结构蛋白而无法自我繁殖。

[0249] 包装细胞用于繁殖和分离大量病毒载体,即制备合适滴度的逆转录病毒载体用于转导靶细胞。

[0250] 在某些情况下,繁殖和分离可能需要分离逆转录病毒gagpol和env(且在慢病毒的情况下为rev)基因,并将它们单独引入至宿主细胞中以产生包装细胞系。包装细胞系产生包装逆转录病毒DNA所需的蛋白质,但由于缺少psi区域,它不能实现衣壳化。然而,当带有psi区域的重组载体被引入至包装细胞系中时,辅助蛋白可包装psi阳性重组载体以产生重组病毒库存。

[0251] “逆转录病毒(Retroviruses)”(1997Cold Spring Harbour Laboratory Press编者:JM Coffin,SM Hughes,HE Varmus第449页)中提供了可用包装系的概述。

[0252] 还开发了包装细胞,其中gag、pol和env(且在慢病毒载体的情况下为rev)病毒编码区携带在单独的表达质粒上,所述表达质粒被独立转染至包装细胞系中,因此三个重组事件是野生型病毒生产所必需的。

[0253] 瞬时转染避免了产生稳定的载体生产细胞系所需的较长时间,并且在载体或逆转录病毒包装成分对细胞有毒时使用。典型地用于产生逆转录病毒/慢病毒载体的成分包括编码Gag/Pol蛋白的质粒、编码Env蛋白(且在慢病毒载体的情况下为rev蛋白)的质粒和逆转录病毒/慢病毒载体基因组。载体生产涉及将这些成分中的一种或多种瞬时转染到含有其它所需成分的细胞中。本发明的包装细胞可以是能够产生逆转录病毒/慢病毒载体粒子的任何哺乳动物细胞类型。包装细胞可以是293T细胞或293T细胞的变体,其已适应悬浮生长和无血清生长。

[0254] 包装细胞可以通过用以下各者进行瞬时转染而制备:

[0255] a) 转移载体

[0256] b) gagpol表达载体

[0257] c) env表达载体。env基因可为异源的,产生假型逆转录病毒载体。例如,env基因可来自RD1 14或其变体之一、VSV-G、长臂猿白血病病毒(GALV)、两性包膜或麻疹包膜或狒狒逆转录病毒包膜糖蛋白。

[0258] 在慢病毒载体的情况下,也使用rev载体进行瞬时转染。

[0259] 本公开提供了表达根据前述实施方案的病毒粒子的宿主细胞。在一些实施方案中,宿主细胞在细胞表面处表达一种或多种转导增强子。在一些实施方案中,本发明提供了一种宿主细胞,其在细胞表面处表达:

[0260] (a) 促有丝分裂转导增强子,其包括促有丝分裂域和跨膜域;和/或

[0261] (b) 基于细胞因子的转导增强子,其包括细胞因子域和跨膜域;

[0262] 使得包装细胞产生的逆转录病毒或慢病毒载体如前述实施方案中所述。

[0263] 在一些实施方案中,宿主细胞还可在细胞表面处表达标记蛋白,所述标记蛋白包括:与捕获部分结合的结合域;以及跨膜域,所述标记蛋白通过该标记蛋白与捕获部分的结合而促进从细胞上清液纯化病毒载体,使得由包装细胞产生的逆转录病毒或慢病毒载体具有前文部分中所述的特征。

[0264] 标记蛋白还可包括结合域与跨膜域之间的间隔子。

[0265] 术语宿主细胞可用于描述包装细胞或生产细胞。包装细胞可包括一种或多种以下基因:gag、pol、env和/或rev。生产细胞可包括gag、pol、env和任选的rev基因,并且还包含逆转录病毒或慢病毒基因组。在一些实施方案中,宿主细胞可以是稳定表达促有丝分裂和/或细胞因子转导增强子的任何合适的细胞系。它可以用转移载体、gagpol、env(且在慢病毒的情况下为rev)瞬时转染,以产生复制不起作用的逆转录病毒/慢病毒载体。

[0266] 本公开还提供制备根据上述的宿主细胞的方法,其包括用编码一种或多种转导增强子的核酸转导或转染细胞的步骤。还提供生产根据前述实施方案的病毒载体的方法,所述方法包括根据本发明的第二方面在细胞中表达逆转录病毒或慢病毒基因组的步骤。

[0267] 系统和试剂盒

[0268] 本公开提供了一种系统、治疗系统或组合物,其包括:

[0269] (a) 包括靶向部分和掩蔽半抗原的衔接分子,其中所述掩蔽半抗原包括与半抗原连接的掩蔽部分;和

[0270] (b) 多个重组逆转录病毒粒子,

[0271] 其中所述逆转录病毒粒子中的每一者包括多核苷酸,其以5'至3'的顺序包括:

[0272] (i) 5'长末端重复序列(LTR)或非翻译区(UTR),

[0273] (ii) 启动子,

[0274] (iii) 编码与所述半抗原特异性结合的受体的序列,和

[0275] (iv) 3'LTR或UTR;以及

[0276] 其中所述逆转录病毒粒子中的每一者包括病毒包膜,所述病毒包膜包括

[0277] (i) 病毒融合糖蛋白,和

[0278] (ii) 一种或多种转导增强子

[0279] 其中任选地,所述转导增强子中的每一者选自由以下组成的组:T细胞活化受体、NK细胞活化受体和共刺激分子。在一些实施方案中,多核苷酸另外包括编码T细胞活化蛋白的序列。

[0280] 本公开还提供一种试剂盒,其包括所述系统和所述系统的使用说明书。

[0281] 转基因免疫细胞

[0282] 本发明提供一种制备活化的转基因免疫细胞的方法,该方法包括使免疫细胞与根据任一前述实施方案的病毒载体接触的步骤。免疫细胞可以在体内或离体转导。在一些实

实施方案中,将病毒载体施用于活受试者,从而在体内转导免疫细胞,而无需离体分离和操纵宿主细胞。在一些实施方案中,免疫细胞离体进行操纵,且接着返回到有需要的受试者。

[0283] 免疫细胞通常是哺乳动物细胞,并且典型地是人细胞,更典型地是原代人细胞,例如同种异体或自体供体细胞。细胞可从样品,例如生物样品,例如获自或源自受试者的样品中分离。在一些实施方案中,从中分离细胞的受试者是患有疾病或病症或需要细胞疗法或将其施用细胞疗法的受试者。在一些实施方案中,受试者是需要特定治疗干预,例如细胞被分离、加工和/或工程改造的过继细胞疗法的人。在一些实施方案中,细胞源自血液、骨髓、淋巴或淋巴器官,是免疫系统的细胞,例如先天性或适应性免疫系统的细胞,例如骨髓或淋巴样细胞,包括淋巴细胞,典型地T细胞和/或NK细胞。其它示例性细胞包括干细胞,例如多潜能和多能干细胞,包括诱导多能干细胞(iPSC)。细胞典型地是原代细胞,例如直接从受试者分离和/或从受试者分离并冷冻的那些细胞。在一些实施方案中,细胞包括T细胞或其它细胞类型的一个或多个亚群,例如全T细胞群体、CD4+细胞、CD8+细胞和其亚群体,例如由以下各者定义的那些:功能、活化状态、成熟度、分化潜力、扩增、再循环、定位和/或持久能力、抗原特异性、抗原受体的类型、特定器官或隔室中的存在、标志物或细胞因子分泌谱和/或分化程度。

[0284] 在T细胞和/或CD4+和/或CD8+T细胞的亚型和亚群体中包括初始T(TN)细胞、效应T细胞(TEFF)、记忆T细胞和其亚型,例如干细胞记忆T(TSCM)、中枢记忆T(TCM)、效应记忆T(TEM)或终末分化效应记忆T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、未成熟T细胞、成熟T细胞、辅助T细胞、细胞毒性T细胞、粘膜相关不变T(MAIT)细胞、天然存在和适应性调节T(Treg)细胞、辅助T细胞,例如TH1细胞、TH2细胞、TH3细胞、TH17细胞、TH9细胞、TH22细胞、滤泡辅助T细胞、 α/β T细胞和 δ/γ T细胞。

[0285] 在本文的一些实施方案中,所提供的细胞是细胞毒性T淋巴细胞。“细胞毒性T淋巴细胞”(CTL)可包括但不限于例如在其表面上表达CD8的T淋巴细胞(例如CD8+T细胞)。在一些实施方案中,此类细胞优选是经历过抗原的“记忆”T细胞(TM细胞)。在一些实施方案中,细胞是前体T细胞。在一些实施方案中,前体T细胞是造血干细胞。在一些实施方案中,细胞是选自由以下组成的组的CD8+T细胞毒性淋巴细胞:初始CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和大量CD8+T细胞。在一些实施方案中,细胞是选自由以下组成的组的CD4+T辅助淋巴细胞:初始CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和大量CD4+T细胞。

[0286] 如本文所用,对转基因T细胞或转导T细胞或其用途的任何提及也可应用于本文公开的任何其它免疫细胞类型。

[0287] 本公开还提供包括一种或多种外源核酸分子的转基因免疫细胞。在一些实施方案中,转基因免疫细胞包括编码半抗原结合受体的多核苷酸。在一些实施方案中,转基因免疫细胞包括编码转导增强子的多核苷酸。在一些实施方案中,转基因免疫细胞包括编码T细胞活化蛋白的多核苷酸。在一些实施方案中,转基因免疫细胞包括编码半抗原结合受体的多核苷酸和编码T细胞活化蛋白的多核苷酸。

[0288] 用所公开的组合物治疗受试者的方法

[0289] 本公开提供了用本文公开的组合物、治疗组合物、细胞、载体和多核苷酸治疗有需要的受试者的方法。在一些实施方案中,本公开提供了一种治疗受试者中的癌症和/或杀死

受试者中的癌细胞的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的所公开的病毒粒子,其中在施用步骤之前、期间或之后,受试者已接受或接受一定剂量的包括靶向部分和掩蔽半抗原的衔接分子,所述剂量有效地用半抗原标记癌细胞。还提供了一种治疗受试者中的肿瘤和/或杀死受试者中的肿瘤细胞的方法,其包括向受试者施用有效量的衔接分子,其中:衔接分子用掩蔽半抗原标记肿瘤细胞;其中掩蔽半抗原被活性氧类活化,产生半抗原;且其中在施用步骤之前、期间或之后,受试者已接受或接受根据任何前述实施方案的逆转录病毒粒子。

[0290] 在一些实施方案中,本文公开的方法可用于通过施用治疗有效量的根据任何前述实施方案的慢病毒粒子而治疗受试者中的癌症和/或杀死受试者中的癌细胞,其中在施用步骤之前,受试者已接受一定剂量的包括靶向部分和半抗原的衔接分子,所述剂量有效地用半抗原标记癌细胞。在一些实施方案中,本文公开的方法可用于通过施用系统来治疗癌症和/或杀死癌细胞

[0291] 本公开还提供一种治疗受试者的癌症和/或杀死癌细胞的方法,其包括向受试者施用任何前述实施方案的系统。

[0292] 在一些实施方案中,本公开提供一种用本文提供的任何组合物治疗癌症的方法。“癌症”在根据说明书阅读时具有其简单和普通含义,并且可能包括但不限于例如涉及细胞异常生长并有可能侵入或扩散到身体其它部位的一组疾病。可以使用本文所述的方法治疗的受试者包括被鉴定或选择为患有癌症的受试者,所述癌症包括但不限于结肠癌、肺癌、肝癌、乳腺癌、肾癌、前列腺癌、卵巢癌、皮肤癌(包括黑色素瘤)、骨癌和脑癌等。此类鉴定和/或选择可以通过临床或诊断评估进行。在一些实施方案中,肿瘤相关抗原或分子是已知的,例如黑色素瘤、乳腺癌、脑癌、鳞状细胞癌、结肠癌、白血病、骨髓瘤和/或前列腺癌。实例包括但不限于B细胞淋巴瘤、乳腺癌、脑癌、前列腺癌和/或白血病。在一些实施方案中,一种或多种致癌多肽与肾癌、子宫癌、结肠癌、肺癌、肝癌、乳腺癌、肾癌、前列腺癌、卵巢癌、皮肤癌(包括黑色素瘤)、骨癌、脑癌、腺癌、胰腺癌、慢性粒细胞白血病或白血病相关。在一些实施方案中,提供了治疗、改善或抑制受试者的癌症的方法。在一些实施方案中,癌症是乳腺癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌、黑色素瘤、肾癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、髓母细胞瘤、肉瘤、肝癌、结肠癌、皮肤癌(包括黑色素瘤)、骨癌或脑癌。

[0293] 在一些实施方案中,靶细胞是肿瘤细胞。在一些实施方案中,靶细胞是免疫细胞。在一些实施方案中,免疫细胞是T细胞或B细胞。在一些实施方案中,靶细胞存在于肿瘤微环境中。

[0294] 在一些实施方案中,在施用衔接分子组合物之后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、15、20、24、36、48、60或72小时,或在由任两个前述值定义的范围内的任何时间向受试者提供转导的T细胞。在一些实施方案中,在施用组合物之前1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、15、20、24、36或48小时或在由任两个前述值定义的范围内的任何时间向受试者提供细胞。在一些实施方案中,细胞在向受试者提供组合物的几秒钟或几分钟内,例如少于一小时内向受试者提供。在一些实施方案中,向受试者提供细胞和/或组合物的加强。在一些实施方案中,将病毒载体直接施用至受试者。在一些实施方案中,病毒载体与T细胞一起施用。在一些实施方案中,单独施用病毒载体和T细胞。在一些实施方案中,通过施用的病毒载体在体内活化和转导T细胞。

[0295] 在一些实施方案中,提供了额外的癌症疗法,例如小分子,例如化合物、抗体疗法

(例如与放射性核素、毒素或药物结合或不结合的人源化单克隆抗体)、手术和/或放射。

[0296] 在一些实施方案中,选择受试者接受额外的癌症疗法,其可包括癌症治疗剂、放射、化学疗法或用于治疗癌症的药物。在一些实施方案中,药物包括阿比特龙、阿仑单抗、阿那曲唑、阿瑞匹坦、三氧化二砷、阿特殊单抗、阿扎胞苷、贝伐单抗、博来霉素、硼替佐米、卡巴他赛、卡培他滨、卡铂、西妥昔单抗、化疗药物组合、顺铂、克唑替尼、环磷酰胺、阿糖胞苷、地诺单抗、多西他赛、多柔比星、艾日布林、厄洛替尼、依托泊苷、依维莫司、依西美坦、非格司亭、氟尿嘧啶、氟维司群、吉西他滨、伊马替尼、咪喹莫特、伊匹单抗、伊沙匹隆、拉帕替尼、来那度胺、来曲唑、亮丙瑞林、美司钠、甲氨蝶呤、纳武单抗、奥沙利铂、紫杉醇、帕洛诺司琼、派姆单抗、培美曲塞、泼尼松、Radium-223、利妥昔单抗、Sipuleucel-T、索拉非尼、舒尼替尼、滑石胸膜内注射液、他莫昔芬、替莫唑胺、替西罗莫司、沙利度胺、曲妥珠单抗、长春瑞滨或唑来膦酸。

[0297] 施用和给药方式

[0298] 取决于需要局部或全身治疗,所公开的病毒粒子、衔接分子和免疫细胞可以多种方式施用。

[0299] 在过继细胞疗法的情况下,用于过继细胞疗法的细胞的施用方法是已知的并且可以与所提供的方法和组合物结合使用。例如,过继T细胞治疗方法描述于例如颁予Gruenberg等的美国专利申请公开案第2003/0170238号;颁予Rosenberg的美国专利第4,690,915号;Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol. 8 (10) :577-85) 中。参见例如Themeli等 (2013) Nat Biotechnol. 31 (10) :928-933;Tsukahara等 (2013) Biochem Biophys Res Commun 438 (1) :84-9;Davila等 (2013) PLoS ONE 8 (4) :e61338。

[0300] 通常,施用可以是局部的、肠胃外的或肠内的。本公开的组合物典型地适用于肠胃外施用。如本文所用,药物组合物的“肠胃外施用”包括任何施用途径,其特征在于个体组织的物理破裂和通过组织中的破裂处施用药物组合物,因此通常被直接施用到血流中、肌肉中或内部器官中。因此,肠胃外施用包括但不限于通过注射组合物、通过经由手术切口施加组合物、通过经由组织穿透性非手术伤口施加组合物等施用药物组合物。特别地,肠胃外施用预期包括但不限于皮下、腹膜内、肌肉内、胸骨内、静脉内、动脉内、鞘内、脑室内、尿道内、颅内、瘤内、滑膜内注射或输注;和肾透析输注技术。在一个优选的实施方案中,本公开的组合物的肠胃外施用包括静脉内施用。

[0301] 适用于肠胃外施用的药物组合物的配制物典型地通常包括与药学上可接受的载体,例如无菌水或无菌等渗盐水组合的活性成分。此类配制物可以适合于推注施用或连续施用的形式制备、包装或销售。可注射配制物可以单位剂型制备、包装或出售,例如在安瓿中或在含有防腐剂的剂量容器中。用于肠胃外施用的配制物包括但不限于悬浮液、溶液、油性或水性媒剂中的乳液、糊剂等。此类配制物还可包括一种或多种额外成分,包括但不限于悬浮剂、稳定剂或分散剂。在用于肠胃外施用的配制物的一个实施方案中,活性成分以干燥(即粉末或颗粒)形式提供,用于在肠胃外施用复原的组合物之前用合适的媒剂(例如无菌无热原水)复原。肠胃外配制物还包括水溶液,其中可含有赋形剂,例如盐、碳水化合物和缓冲剂(优选pH为3至9),但对于一些应用,它们可能更适合配制成无菌非水溶液或配制成干燥形式以与合适的载体(例如无菌、无热原水)一起使用。示例性肠胃外施用形式包括无菌水溶液中的溶液或悬浮液,例如丙二醇或葡萄糖水溶液。必要时,可以适当地缓冲此类剂

型。其它适用的可肠胃外施用的配制物包括那些包含呈微晶形式或在脂质体制剂中的活性成分的配制物。用于肠胃外施用的配制物可以配制成速释和/或缓释。缓释配制物包括延迟释放、持续释放、脉冲释放、控制释放、靶向释放和程序化释放。

[0302] 本发明的组合物可另外含有通常存在于药物组合物中的其它辅助成分。因此,例如,组合物可含有另外的相容性药物活性物质,例如止痒剂、收敛剂、局部麻醉剂或抗炎剂,或者可含有可用于本发明组合物的各种剂型的物理配制的另外的物质,如染料、调味剂、防腐剂、抗氧化剂、遮光剂、增稠剂和稳定剂。然而,当添加此类物质时,它们不应过度干扰本发明组合物的组分的生物活性。可以将配制物灭菌,并且如果需要的话,与助剂混合,所述助剂例如为润滑剂、防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、用于影响渗透压的盐、缓冲剂、着色剂、调味剂和/或芳香物质等,它们不与配制物的核酸发生不利的相互作用。

[0303] 病毒粒子、衔接分子和/或免疫细胞可以有效治疗或预防疾病或病症的量,例如治疗有效量或预防有效量施用。在一些实施方案中,治疗或预防功效通过对所治疗受试者的定期评估来监测。对于取决于病情在几天或更长时间内的重复施用,重复治疗直到出现所需的疾病症状抑制。然而,其它剂量方案可能是有用的并且可以被确定。所需剂量可以通过组合物的单次推注施用、组合物的多次推注施用或组合物的连续输注施用来递送。

[0304] 在某些实施方案中,在根据本公开输注免疫细胞或转基因免疫细胞的情况下,向受试者施用约100万至约1000亿个范围内的细胞,例如100万至约500亿个细胞(例如约500万个细胞、约2500万个细胞、约5亿个细胞、约10亿个细胞、约50亿个细胞、约200亿个细胞、约300亿个细胞、约400亿个细胞,或由任两个前述值定义的范围),例如约1000万至约1000亿个细胞(例如约2000万个细胞、约3000万个细胞、约4000万个细胞、约6000万个细胞、约7000万个细胞、约8000万个细胞、约9000万个细胞、约100亿个细胞、约250亿个细胞、约500亿个细胞、约750亿个细胞、约900亿个细胞,或由任两个前述值定义的范围),并且在一些情况下约1亿个细胞至约500亿个细胞(例如约1.2亿个细胞、约2.5亿个细胞、约3.5亿个细胞、约4.5亿个细胞、约6.5亿个细胞、约8亿个细胞、约9亿个细胞、约30亿个细胞、约300亿个细胞、约450亿个细胞)或这些范围之间的任何值,和/或每公斤受试者体重的此类细胞数。例如,在一些实施方案中,细胞或细胞群的施用可包括施用约 10^3 至约 10^9 个细胞/kg体重,包括那些范围内的细胞数的所有整数。

[0305] 在施用病毒粒子的情况下,病毒粒子的量和此类粒子的施用时间将在受益于本教导的技术人员的能力范围内。在一些实施方案中,治疗有效量的所公开组合物的施用可以通过单次施用来实现,例如单次注射足够数量的病毒粒子以向经历此类治疗的患者提供治疗益处。在一些实施方案中,在相对较短或相对较长的时间段内向受试者提供慢病毒载体组合物的多次或连续施用,如可由监督此类组合物的施用的医生确定。例如,向哺乳动物施用的感染性粒子的数量可以是大约 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 个病毒粒子/ml或甚至更高,作为单剂量给予,或根据实现所治疗特定疾病或病症的治疗的需要,可分为两次或多次施用。在一些实施方案中,可单独或与一种或多种其它治疗药物组合向受试者施用两种或更多种不同的病毒载体组合物,以实现特定治疗方案的期望效果。在一些实施方案中,病毒载体与转基因免疫细胞组合施用。在一些实施方案中,病毒载体与尚未被转导的免疫细胞组合施用。短语“组合”可包括在同一时间或在短时间段内的不同时间,例如在一周内、一天内、十二小时内、六小时内、一小时内、三十分钟内、十分钟内、五分钟内或一分钟内。

[0306] 在施用衔接分子的情况下,剂量将取决于靶细胞的类型、衔接分子包括的靶向部分和衔接分子包括的半抗原分子。取决于疾病的类型和严重程度,衔接分子的说明性剂量范围可为约1 μ g/kg至约50mg/kg或约5mg/kg至约15mg/kg,包括但不限于5mg/kg、7.5mg/kg、10mg/kg或15mg/kg。施用频率将取决于疾病的类型和严重程度而有所不同。对于几天或更长时间的重复施用,取决于病况,治疗可以持续到病况(例如癌症)得到治疗或达到所需的治疗效果,如通过本领域已知的方法所测量。在一些实施方案中,衔接分子被施用一次。在一些实施方案中,衔接分子每1天、2天、3天、4天、5天、6天、1周、2周、3周、4周、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月或1年施用一次。衔接分子可以与本文公开的病毒粒子和/或转基因免疫细胞组合施用。短语“组合”可包括在同一时间或在短时间段内的不同时间,例如在一周内、一天内、十二小时内、六小时内、一小时内、三十分钟内、十分钟内、五分钟内或一分钟内。

[0307] ****

[0308] 本文提及的所有出版物和专利特此以引用的方式整体并入,如同将每个单独的出版物或专利特定地和单独地指示为以引用的方式并入。在冲突的情况下,以本申请(包括本文中的任何定义)为准。然而,本文所引用的任何参考文献、文章、出版物、专利、专利出版物和专利申请,并不也不应被视为承认或任何形式的建议,它们构成有效的现有技术或形成世界上任何国家的公知常识的一部分。

[0309] 在本说明书中,除非另有说明,否则任何浓度范围、百分比范围、比率范围或整数范围应理解为包括所述范围内的任何整数的值,以及在适当情况下,其分数(例如整数的十分之一和百分之一)。当紧接在数字或数值前面时,术语“约”是指数字或数值范围的加减10%。应理解,除非另有说明,否则本文所用的术语“一个(a/an)”是指“一个或多个”所列举的成分。替代方案(例如,“或”)的使用应理解为意指替代方案中的一个、两个或其任何组合。术语“和/或”应理解为意指一种或两种替代方案。如本文所用,术语“包括”和“包含”按同义使用。

[0310] 本文所使用的小节标题仅出于组织性目的并且不解释为限制所描述的主题。

[0311] 尽管已经说明和描述了说明性实施方案,但应理解,可在其中作出各种改变而不背离本发明的精神和范围。

[0312] 实施例

[0313] 提出以下实施例是为了向本领域普通技术人员提供可如何使用、制备和评估本文所述的组合物和方法的描述,并且旨在纯粹作为本发明的示例且不在限制被视为本发明的范围。

[0314] 实施例1:FITC CAR转导、富集和活化

[0315] 此实施例表明表达CAR的T细胞在抗原异硫氰酸荧光素(FITC)存在下增强的扩增和活化。

[0316] 解冻和静息PBMC

[0317] 在方案的第0天,将冷冻的外周血单核细胞(PBMC)在37 $^{\circ}$ C浴水中快速解冻,并缓慢添加至9mL温热的RPMI-C(RPMI 1640+P/S+10%FBS)培养基中。接着将解冻的PBMC以200x g旋转10分钟。旋转后,吸出培养基,对细胞进行计数且在250mL烧瓶中以约 1×10^6 个细胞/mL的细胞密度接种于RPMI-C培养基中。也将50U/mL IL-2添加至烧瓶中。接种后,20mL含IL-2

的RPMI-C培养基中的总活细胞计数为 2.32×10^7 个细胞。

[0318] 用FITC CAR载体进行转导

[0319] 在方案的第1天,将 1×10^7 个PBMC细胞收集在50mL锥形管中,并以 $400 \times g$ 旋转5分钟。接着在6孔板中将细胞以 2.5×10^6 个细胞/孔的浓度接种在总共2.5mL含50U/mL IL-2的RPMI-C培养基中。用CD3-可卡耳包膜工程化且含有FITC CAR-Frb-RACR多顺反子载体的慢病毒粒子用于以10的感染复数(MOI)转导PBMC。用于转导的慢病毒滴度为 1.61×10^8 TU/mL,目标滴度为 2.5×10^7 TU/孔。添加至每个孔中的粒子的体积为155 μ L。转导的细胞在培养箱中保留6天且每3天向细胞中添加50U/mL IL-2。每天监测转导的细胞,并且如果观察到细胞培养基呈橙黄色,则将含50U/mL IL-2的RPMI-C培养基添加至孔中。

[0320] 将细胞分至雷帕霉素中

[0321] 在方案的第7天,将 1×10^7 个PBMC细胞收集至15mL锥形管中,用RPMI-C培养基洗涤,且以 $400 \times g$ 旋转5分钟。将细胞在2mL含50U/mL IL-2的RPMI-C培养基中以 2×10^6 个细胞/孔的细胞密度分至6孔板的2个孔中。向其中一个孔中添加10nM雷帕霉素,且向第二个孔中添加0nM。雷帕霉素处理和未处理的细胞在培养箱中保留4天且每3天向细胞中添加50U/mL IL-2。每天监测细胞,并且如果观察到细胞培养基呈橙黄色,则将含50U/mL IL-2的RPMI-C培养基+/-10nM雷帕霉素添加至孔中。

[0322] 用FITC-OVA涂布板

[0323] 在方案的第10天,制备5 μ g/mL荧光标记的卵清蛋白(FITC-OVA)于PBS中的溶液。向48孔板的每孔中添加125 μ L FITC-OVA溶液。在4 $^{\circ}$ C下将板与溶液一起包裹于铝箔中培育过夜。

[0324] FITC-生物素珠粒结合

[0325] 在方案的第10天,涡旋抗生物素MACSiBead粒子,并将30 μ g FITC-生物素一抗添加至 10×10^8 个MACSiBead粒子中。使用含有0.5%BSA和2nM EDTA的含PBS缓冲液使总体积达到1mL。

[0326] 将细胞分至抗原(FITC)刺激条件

[0327] 在方案的第11天,将在0nM雷帕霉素中培育的 4.8×10^6 个总活细胞和在10nM雷帕霉素中培育的 1.9×10^6 个总活细胞收集至15mL锥形管中,用RPMI-C培养基洗涤,且以 $400 \times g$ 旋转5分钟。洗涤的细胞以 2.5×10^6 个细胞/mL的细胞密度重悬浮在不含IL-2的RPMI-C培养基中。

[0328] 从经过处理的板中吸出FITC-OVA溶液且用冷PBS洗涤三次。将细胞以 2.5×10^5 个细胞/孔分至48孔板中的500 μ L RPMI-C培养基+/-10nM雷帕霉素中。表1描述了样品的刺激条件。对于在FITC-生物素珠粒条件下处理的细胞,使用1:1比率的珠粒:细胞。细胞在培养箱中保留5天。每天监测细胞,并且如果观察到细胞培养基呈橙黄色,则将RPMI-C培养基+/-10nM雷帕霉素添加至孔中。

[0329] 表1

[0330]	未刺激		FITC-生物素珠粒		板结合的 FITC-OVA	
	0 nM 雷帕霉素	10nM 雷帕霉素	0 nM 雷帕霉素	10nM 雷帕霉素	0 nM 雷帕霉素	10nM 雷帕霉素

[0331] 通过流式细胞术评估CAR表达和活化

[0332] 在方案的第16天,对每种刺激条件下的细胞进行计数,且细胞计数结果如表2中所示。

[0333] 表2

[0334]	条件	未刺激	FITC-生物素 珠粒	板结合的 FITC-OVA
	PBMC FITC CAR-Frb-RACR 0 nM 雷帕霉素		1×10^5 个细胞	1×10^5 个细胞
PBMC FITC CAR-Frb-RACR 10 nM 雷帕霉素		2.4×10^5 个细胞	2.6×10^5 个细胞	5.2×10^5 个细胞

[0335] 将细胞转移到96孔V形底板的单个孔中,将板以400x g旋转5分钟,细胞用200 μ L PBS洗涤并再次以400x g旋转5分钟。将细胞在室温下在50 μ L/孔的Zombie NIR Fixable Viability Dye (在PBS中1:3000稀释)中培育10分钟。接着用150 μ L FACS缓冲液(1X PBS+2%FBS)洗涤细胞并将板以400x g旋转5分钟。接下来,将50 μ L/孔的含表面染色剂的FACS缓冲液添加至细胞中,并在4 $^{\circ}$ C下培育45分钟。

[0336] 用150 μ L FACS缓冲液洗涤细胞,并将板以400x g旋转5分钟。接着用100 μ L/孔的BD Cytofix/Cytoperm缓冲液在4 $^{\circ}$ C下固定细胞20分钟。接着用在水中稀释10倍的100 μ L BD Perm/Wash洗涤细胞,并将板以400x g旋转5分钟。再次用在水中稀释10倍的200 μ L BD Perm/Wash洗涤细胞,并再次将板以400x g旋转5分钟。将50 μ L/孔的含细胞内染色剂的1X BD Perm/Wash添加至细胞中,并在4 $^{\circ}$ C下培育30分钟。用150 μ L FACS缓冲液洗涤细胞,将板以400x g旋转5分钟,且接着将细胞重悬浮在200 μ L FACS缓冲液中,以使用Beckman Coulter CytoFLEX S细胞仪进行分析。如图2A-2F中所示,表达CAR的T细胞在抗原FITC存在下扩增,且雷帕霉素增强了这种扩增。

[0337] 用于流式细胞术分析的抗体和荧光标记分子以如下稀释度使用:

[0338] FITC葡聚糖(1:10)

[0339] CD3-AF700(1:100)

[0340] CD25-BV421(1:100)

[0341] PD1-BV650(1:100)

[0342] Lag3-PECy7(1:100)

[0343] 2A-AF647(1:100)

序列表

- <110> 优莫佳生物制药股份有限公司
 <120> 用于通用受体疗法的逆转录病毒载体
 <130> UMOJ-003/01W0
 <150> US 62/916,110
 <151> 2019-10-19
 <160> 53
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 511
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 可卡耳G蛋白
 <400> 1

```

Asn Phe Leu Leu Leu Thr Phe Ile Val Leu Pro Leu Cys Ser His Ala
1           5           10           15
Lys Phe Ser Ile Val Phe Pro Gln Ser Gln Lys Gly Asn Trp Lys Asn
           20           25           30
Val Pro Ser Ser Tyr His Tyr Cys Pro Ser Ser Ser Asp Gln Asn Trp
           35           40           45
His Asn Asp Leu Leu Gly Ile Thr Met Lys Val Lys Met Pro Lys Thr
           50           55           60
His Lys Ala Ile Gln Ala Asp Gly Trp Met Cys His Ala Ala Lys Trp
65           70           75           80
Ile Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr His
           85           90           95
Ser Ile His Ser Ile Gln Pro Thr Ser Glu Gln Cys Lys Glu Ser Ile
           100          105          110
Lys Gln Thr Lys Gln Gly Thr Trp Met Ser Pro Gly Phe Pro Pro Gln
           115          120          125
Asn Cys Gly Tyr Ala Thr Val Thr Asp Ser Val Ala Val Val Val Gln
           130          135          140
Ala Thr Pro His His Val Leu Val Asp Glu Tyr Thr Gly Glu Trp Ile
145          150          155          160
Asp Ser Gln Phe Pro Asn Gly Lys Cys Glu Thr Glu Glu Cys Glu Thr
           165          170          175
Val His Asn Ser Thr Val Trp Tyr Ser Asp Tyr Lys Val Thr Gly Leu

```

	180		185		190										
Cys	Asp	Ala	Thr	Leu	Val	Asp	Thr	Glu	Ile	Thr	Phe	Phe	Ser	Glu	Asp
	195		200		205										
Gly	Lys	Lys	Glu	Ser	Ile	Gly	Lys	Pro	Asn	Thr	Gly	Tyr	Arg	Ser	Asn
	210		215		220										
Tyr	Phe	Ala	Tyr	Glu	Lys	Gly	Asp	Lys	Val	Cys	Lys	Met	Asn	Tyr	Cys
225			230		235		240								
Lys	His	Ala	Gly	Val	Arg	Leu	Pro	Ser	Gly	Val	Trp	Phe	Glu	Phe	Val
	245		250		255										
Asp	Gln	Asp	Val	Tyr	Ala	Ala	Ala	Lys	Leu	Pro	Glu	Cys	Pro	Val	Gly
	260		265		270										
Ala	Thr	Ile	Ser	Ala	Pro	Thr	Gln	Thr	Ser	Val	Asp	Val	Ser	Leu	Ile
	275		280		285										
Leu	Asp	Val	Glu	Arg	Ile	Leu	Asp	Tyr	Ser	Leu	Cys	Gln	Glu	Thr	Trp
	290		295		300										
Ser	Lys	Ile	Arg	Ser	Lys	Gln	Pro	Val	Ser	Pro	Val	Asp	Leu	Ser	Tyr
305			310		315		320								
Leu	Ala	Pro	Lys	Asn	Pro	Gly	Thr	Gly	Pro	Ala	Phe	Thr	Ile	Ile	Asn
	325		330		335										
Gly	Thr	Leu	Lys	Tyr	Phe	Glu	Thr	Arg	Tyr	Ile	Arg	Ile	Asp	Ile	Asp
	340		345		350										
Asn	Pro	Ile	Ile	Ser	Lys	Met	Val	Gly	Lys	Ile	Ser	Gly	Ser	Gln	Thr
	355		360		365										
Glu	Arg	Glu	Leu	Trp	Thr	Glu	Trp	Phe	Pro	Tyr	Glu	Gly	Val	Glu	Ile
	370		375		380										
Gly	Pro	Asn	Gly	Ile	Leu	Lys	Thr	Pro	Thr	Gly	Tyr	Lys	Phe	Pro	Leu
385			390		395		400								
Phe	Met	Ile	Gly	His	Gly	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Leu	His	Lys	Thr	Ser
	405		410		415										
Gln	Ala	Glu	Val	Phe	Glu	His	Pro	His	Leu	Ala	Glu	Ala	Pro	Lys	Gln
	420		425		430										
Leu	Pro	Glu	Glu	Glu	Thr	Leu	Phe	Phe	Gly	Asp	Thr	Gly	Ile	Ser	Lys
	435		440		445										
Asn	Pro	Val	Glu	Leu	Ile	Glu	Gly	Trp	Phe	Ser	Ser	Trp	Lys	Ser	Thr
	450		455		460										
Val	Val	Thr	Phe	Phe	Phe	Ala	Ile	Gly	Val	Phe	Ile	Leu	Leu	Tyr	Val
465			470		475		480								
Val	Ala	Arg	Ile	Val	Ile	Ala	Val	Arg	Tyr	Arg	Tyr	Gln	Gly	Ser	Asn
	485		490		495										

Asn Lys Arg Ile Tyr Asn Asp Ile Glu Met Ser Arg Phe Arg Lys
500 505 510

<210> 2
<400> 2
000
<210> 3
<400> 3
000
<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> OKT3 CDRH1
<400> 4
Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
1 5
<210> 5
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> OKT3 CDRH2
<400> 5
Asn Pro Ser Arg Gly Tyr
1 5
<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> OKT3 CDRH3
<400> 6
Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr
1 5 10
<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

Trp Ala Gly Gly Ser

1 5

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> CD28抗体- CDRH3

<400> 12

Asp Lys Arg Ala Pro Gly Lys Leu Tyr Tyr Gly Tyr Pro Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> CD28抗体- CDRL1

<400> 13

Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln

1 5 10 15

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> CD28抗体- CDRL2

<400> 14

Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> CD28抗体- CDRL3

<400> 15

Gln Gln Thr Arg Lys Val Pro Ser Thr

1 5

<210> 16

<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> TGN1412 - CDRH1
<400> 16
Gly Tyr Thr Phe Ser Tyr
1 5
<210> 17
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> TGN1412 - CDRH2
<400> 17
Tyr Pro Gly Asn Val Asn
1 5
<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> TGN1412 - CDRH3
<400> 18
Ser His Tyr Gly Leu Asp Trp Asn Phe Asp Val
1 5 10
<210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> TGN1412 - CDRL1
<400> 19
His Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Val Leu Asn
1 5 10
<210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> TGN1412 - CDRL2

<400> 20

Lys Ala Ser Asn Leu His Thr

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> TGN1412 - CDRL3

<400> 21

Gln Gln Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 22

<211> 173

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> OX40L序列

<400> 22

Met Glu Arg Val Gln Pro Leu Glu Glu Asn Val Gly Asn Ala Ala Arg

1 5 10 15

Pro Arg Phe Glu Arg Asn Lys Leu Leu Leu Val Ala Ser Val Ile Gln

20 25 30

Gly Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Thr Tyr Ile Cys Leu His Phe Ser

35 40 45

Ala Leu Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val

50 55 60

Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln

65 70 75 80

Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Tyr Leu Ile Ser Leu Lys

85 90 95

Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp

100 105 110

Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu

115 120 125

Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr

130 135 140

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp

225 230

<210> 25

<211> 46

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人类CD8茎

<400> 25

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala

1 5 10 15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly

20 25 30

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile

35 40 45

<210> 26

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人类IgG1铰链

<400> 26

Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

Lys Asp Pro Lys

20

<210> 27

<211> 185

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CD2胞外域

<400> 27

Lys Glu Ile Thr Asn Ala Leu Glu Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp

1 5 10 15

Ile Asn Leu Asp Ile Pro Ser Phe Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp

20 25 30

Ile Lys Trp Glu Lys Thr Ser Asp Lys Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg

35 40 45

Lys Glu Lys Glu Thr Phe Lys Glu Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys
 50 55 60
 Asn Gly Thr Leu Lys Ile Lys His Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile
 65 70 75 80
 Tyr Lys Val Ser Ile Tyr Asp Thr Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys
 85 90 95
 Ile Phe Asp Leu Lys Ile Gln Glu Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser
 100 105 110
 Trp Thr Cys Ile Asn Thr Thr Leu Thr Cys Glu Val Met Asn Gly Thr
 115 120 125
 Asp Pro Glu Leu Asn Leu Tyr Gln Asp Gly Lys His Leu Lys Leu Ser
 130 135 140
 Gln Arg Val Ile Thr His Lys Trp Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe
 145 150 155 160
 Lys Cys Thr Ala Gly Asn Lys Val Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro
 165 170 175
 Val Ser Cys Pro Glu Lys Gly Leu Asp
 180 185

<210> 28

<211> 259

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> CD34胞外域

<400> 28

Ser Leu Asp Asn Asn Gly Thr Ala Thr Pro Glu Leu Pro Thr Gln Gly
 1 5 10 15
 Thr Phe Ser Asn Val Ser Thr Asn Val Ser Tyr Gln Glu Thr Thr Thr
 20 25 30
 Pro Ser Thr Leu Gly Ser Thr Ser Leu His Pro Val Ser Gln His Gly
 35 40 45
 Asn Glu Ala Thr Thr Asn Ile Thr Glu Thr Thr Val Lys Phe Thr Ser
 50 55 60
 Thr Ser Val Ile Thr Ser Val Tyr Gly Asn Thr Asn Ser Ser Val Gln
 65 70 75 80
 Ser Gln Thr Ser Val Ile Ser Thr Val Phe Thr Thr Pro Ala Asn Val
 85 90 95
 Ser Thr Pro Glu Thr Thr Leu Lys Pro Ser Leu Ser Pro Gly Asn Val
 100 105 110

Ser Asp Leu Ser Thr Thr Ser Thr Ser Leu Ala Thr Ser Pro Thr Lys
 115 120 125
 Pro Tyr Thr Ser Ser Ser Pro Ile Leu Ser Asp Ile Lys Ala Glu Ile
 130 135 140
 Lys Cys Ser Gly Ile Arg Glu Val Lys Leu Thr Gln Gly Ile Cys Leu
 145 150 155 160
 Glu Gln Asn Lys Thr Ser Ser Cys Ala Glu Phe Lys Lys Asp Arg Gly
 165 170 175
 Glu Gly Leu Ala Arg Val Leu Cys Gly Glu Glu Gln Ala Asp Ala Asp
 180 185 190
 Ala Gly Ala Gln Val Cys Ser Leu Leu Leu Ala Gln Ser Glu Val Arg
 195 200 205
 Pro Gln Cys Leu Leu Leu Val Leu Ala Asn Arg Thr Glu Ile Ser Ser
 210 215 220
 Lys Leu Gln Leu Met Lys Lys His Gln Ser Asp Leu Lys Lys Leu Gly
 225 230 235 240
 Ile Leu Asp Phe Thr Glu Gln Asp Val Ala Ser His Gln Ser Tyr Ser
 245 250 255
 Gln Lys Thr
 <210> 29
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> IL2
 <400> 29
 Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
 20 25 30
 Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
 35 40 45
 Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
 50 55 60
 Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
 65 70 75 80
 Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
 85 90 95
 Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile

	100		105		110										
Val	Leu	Glu	Leu	Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala
	115		120		125										
Asp	Glu	Thr	Ala	Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe
	130		135		140										
Cys	Gln	Ser	Ile	Ile	Ser	Thr	Leu	Thr							
145			150												
<210>	30														
<211>	177														
<212>	PRT														
<213>	人工序列(Artificial Sequence)														
<220>															
<223>	IL7														
<400>	30														
Met	Phe	His	Val	Ser	Phe	Arg	Tyr	Ile	Phe	Gly	Leu	Pro	Pro	Leu	Ile
1			5						10					15	
Leu	Val	Leu	Leu	Pro	Val	Ala	Ser	Ser	Asp	Cys	Asp	Ile	Glu	Gly	Lys
			20						25					30	
Asp	Gly	Lys	Gln	Tyr	Glu	Ser	Val	Leu	Met	Val	Ser	Ile	Asp	Gln	Leu
			35						40					45	
Leu	Asp	Ser	Met	Lys	Glu	Ile	Gly	Ser	Asn	Cys	Leu	Asn	Asn	Glu	Phe
			50						55					60	
Asn	Phe	Phe	Lys	Arg	His	Ile	Cys	Asp	Ala	Asn	Lys	Glu	Gly	Met	Phe
65						70								75	80
Leu	Phe	Arg	Ala	Ala	Arg	Lys	Leu	Arg	Gln	Phe	Leu	Lys	Met	Asn	Ser
						85								90	95
Thr	Gly	Asp	Phe	Asp	Leu	His	Leu	Leu	Lys	Val	Ser	Glu	Gly	Thr	Thr
						100								105	110
Ile	Leu	Leu	Asn	Cys	Thr	Gly	Gln	Val	Lys	Gly	Arg	Lys	Pro	Ala	Ala
						115								120	125
Leu	Gly	Glu	Ala	Gln	Pro	Thr	Lys	Ser	Leu	Glu	Glu	Asn	Lys	Ser	Leu
						130								135	140
Lys	Glu	Gln	Lys	Lys	Leu	Asn	Asp	Leu	Cys	Phe	Leu	Lys	Arg	Leu	Leu
145						150								155	160
Gln	Glu	Ile	Lys	Thr	Cys	Trp	Asn	Lys	Ile	Leu	Met	Gly	Thr	Lys	Glu
						165								170	175
His															
<210>	31														
<211>	162														

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> IL15

<400> 31

```

Met Arg Ile Ser Lys Pro His Leu Arg Ser Ile Ser Ile Gln Cys Tyr
1           5           10           15
Leu Cys Leu Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu Ala Gly Ile His
           20           25           30
Val Phe Ile Leu Gly Cys Phe Ser Ala Gly Leu Pro Lys Thr Glu Ala
           35           40           45
Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile
           50           55           60
Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His
65           70           75           80
Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
           85           90           95
Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
           100          105          110
Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val
           115          120          125
Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
           130          135          140
Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
145          150          155          160
Thr Ser

```

<210> 32

<211> 271

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 膜-IL7

<400> 32

```

Met Ala His Val Ser Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Leu Pro Pro Leu Ile
1           5           10           15
Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys
           20           25           30
Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu
           35           40           45

```

Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe
 50 55 60
 Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe
 65 70 75 80
 Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser
 85 90 95
 Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr
 100 105 110
 Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala
 115 120 125
 Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu
 130 135 140
 Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu
 145 150 155 160
 Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu
 165 170 175
 His Ser Gly Gly Gly Ser Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro
 180 185 190
 Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu
 195 200 205
 Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg
 210 215 220
 Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly
 225 230 235 240
 Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn
 245 250 255
 His Arg Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val
 260 265 270
 <210> 33
 <211> 256
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 膜-IL15
 <400> 33
 Met Gly Leu Val Arg Arg Gly Ala Arg Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg
 1 5 10 15
 Gly Trp Thr Ala Leu Cys Leu Leu Ser Leu Leu Pro Ser Gly Phe Met
 20 25 30

Ala Gly Ile His Val Phe Ile Leu Gly Cys Phe Ser Ala Gly Leu Pro
 35 40 45
 Lys Thr Glu Ala Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile
 50 55 60
 Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu
 65 70 75 80
 Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu
 85 90 95
 Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His
 100 105 110
 Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser
 115 120 125
 Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu
 130 135 140
 Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln
 145 150 155 160
 Met Phe Ile Asn Thr Ser Ser Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala
 165 170 175
 Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser
 180 185 190
 Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
 195 200 205
 Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
 210 215 220
 Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
 225 230 235 240
 Asn His Arg Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val
 245 250 255

<210> 34

<211> 251

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> IL2R γ 复合物

<400> 34

Met Pro Leu Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Ala Leu Leu Gly Ala Leu
 1 5 10 15
 His Ala Gln Ala Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly
 20 25 30

Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly
 35 40 45
 Met Leu Glu Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys
 50 55 60
 Pro Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu
 65 70 75 80
 Glu Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile
 85 90 95
 Ser Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro
 100 105 110
 Pro His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Gly Glu
 115 120 125
 Gly Ser Asn Thr Ser Lys Glu Asn Pro Phe Leu Phe Ala Leu Glu Ala
 130 135 140
 Val Val Ile Ser Val Gly Ser Met Gly Leu Ile Ile Ser Leu Leu Cys
 145 150 155 160
 Val Tyr Phe Trp Leu Glu Arg Thr Met Pro Arg Ile Pro Thr Leu Lys
 165 170 175
 Asn Leu Glu Asp Leu Val Thr Glu Tyr His Gly Asn Phe Ser Ala Trp
 180 185 190
 Ser Gly Val Ser Lys Gly Leu Ala Glu Ser Leu Gln Pro Asp Tyr Ser
 195 200 205
 Glu Arg Leu Cys Leu Val Ser Glu Ile Pro Pro Lys Gly Gly Ala Leu
 210 215 220
 Gly Glu Gly Pro Gly Ala Ser Pro Cys Asn Gln His Ser Pro Tyr Trp
 225 230 235 240
 Ala Pro Pro Cys Tyr Thr Leu Lys Pro Glu Thr
 245 250

<210> 35

<400> 35

000

<210> 36

<211> 251

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> IL2R γ 复合物

<400> 36

Met Pro Leu Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Ala Leu Leu Gly Ala Leu

1	5	10	15
His Ala Gln Ala Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly			
	20	25	30
Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly			
	35	40	45
Met Leu Glu Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys			
	50	55	60
Pro Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu			
65	70	75	80
Glu Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile			
	85	90	95
Ser Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro			
	100	105	110
Pro His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Gly Glu			
	115	120	125
Gly Ser Asn Thr Ser Lys Glu Asn Pro Phe Leu Phe Ala Leu Glu Ala			
	130	135	140
Val Val Ile Ser Val Gly Ser Met Gly Leu Ile Ile Ser Leu Leu Cys			
145	150	155	160
Val Tyr Phe Trp Leu Glu Arg Thr Met Pro Arg Ile Pro Thr Leu Lys			
	165	170	175
Asn Leu Glu Asp Leu Val Thr Glu Tyr His Gly Asn Phe Ser Ala Trp			
	180	185	190
Ser Gly Val Ser Lys Gly Leu Ala Glu Ser Leu Gln Pro Asp Tyr Ser			
	195	200	205
Glu Arg Leu Cys Leu Val Ser Glu Ile Pro Pro Lys Gly Gly Ala Leu			
	210	215	220
Gly Glu Gly Pro Gly Ala Ser Pro Cys Asn Gln His Ser Pro Tyr Trp			
225	230	235	240
Ala Pro Pro Cys Tyr Thr Leu Lys Pro Glu Thr			
	245	250	

<210> 37

<211> 251

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> IL2R γ 复合物

<400> 37

Met Pro Leu Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Ala Leu Leu Gly Ala Leu

1	5	10	15
His Ala Gln Ala Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly			
	20	25	30
Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly			
	35	40	45
Met Leu Glu Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys			
	50	55	60
Pro Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu			
65	70	75	80
Glu Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile			
	85	90	95
Ser Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro			
	100	105	110
Pro His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Gly Glu			
	115	120	125
Gly Ser Asn Thr Ser Lys Glu Asn Pro Phe Leu Phe Ala Leu Glu Ala			
	130	135	140
Val Val Ile Ser Val Gly Ser Met Gly Leu Ile Ile Ser Leu Leu Cys			
145	150	155	160
Val Tyr Phe Trp Leu Glu Arg Thr Met Pro Arg Ile Pro Thr Leu Lys			
	165	170	175
Asn Leu Glu Asp Leu Val Thr Glu Tyr His Gly Asn Phe Ser Ala Trp			
	180	185	190
Ser Gly Val Ser Lys Gly Leu Ala Glu Ser Leu Gln Pro Asp Tyr Ser			
	195	200	205
Glu Arg Leu Cys Leu Val Ser Glu Ile Pro Pro Lys Gly Gly Ala Leu			
	210	215	220
Gly Glu Gly Pro Gly Ala Ser Pro Cys Asn Gln His Ser Pro Tyr Trp			
225	230	235	240
Ala Pro Pro Cys Tyr Thr Leu Lys Pro Glu Thr			
	245	250	

<210> 38

<211> 251

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> IL2R γ 复合物

<400> 38

Met Pro Leu Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Ala Leu Leu Gly Ala Leu

1 5 10 15
 His Ala Gln Ala Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly
 20 25 30
 Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly
 35 40 45
 Met Leu Glu Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys
 50 55 60
 Pro Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu
 65 70 75 80
 Glu Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile
 85 90 95
 Ser Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro
 100 105 110
 Pro His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Gly Glu
 115 120 125
 Gly Ser Asn Thr Ser Lys Glu Asn Pro Phe Leu Phe Ala Leu Glu Ala
 130 135 140
 Val Val Ile Ser Val Gly Ser Met Gly Leu Ile Ile Ser Leu Leu Cys
 145 150 155 160
 Val Tyr Phe Trp Leu Glu Arg Thr Met Pro Arg Ile Pro Thr Leu Lys
 165 170 175
 Asn Leu Glu Asp Leu Val Thr Glu Tyr His Gly Asn Phe Ser Ala Trp
 180 185 190
 Ser Gly Val Ser Lys Gly Leu Ala Glu Ser Leu Gln Pro Asp Tyr Ser
 195 200 205
 Glu Arg Leu Cys Leu Val Ser Glu Ile Pro Pro Lys Gly Gly Ala Leu
 210 215 220
 Gly Glu Gly Pro Gly Ala Ser Pro Cys Asn Gln His Ser Pro Tyr Trp
 225 230 235 240
 Ala Pro Pro Cys Tyr Thr Leu Lys Pro Glu Thr
 245 250

<210> 39

<211> 429

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> IL2Rb复合物

<400> 39

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1	5	10	15
His Ala Ala Arg Pro Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu			
	20	25	30
Glu Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met			
	35	40	45
Phe Glu Val Leu Glu Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln			
	50	55	60
Thr Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met			
65	70	75	80
Glu Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys			
	85	90	95
Asp Leu Leu Gln Ala Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile			
	100	105	110
Ser Lys Gly Lys Asp Thr Ile Pro Trp Leu Gly His Leu Leu Val Gly			
	115	120	125
Leu Ser Gly Ala Phe Gly Phe Ile Ile Leu Val Tyr Leu Leu Ile Asn			
	130	135	140
Cys Arg Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn Thr			
145	150	155	160
Pro Asp Pro Ser Lys Phe Phe Ser Gln Leu Ser Ser Glu His Gly Gly			
	165	170	175
Asp Val Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Ser Phe Ser			
	180	185	190
Pro Gly Gly Leu Ala Pro Glu Ile Ser Pro Leu Glu Val Leu Glu Arg			
	195	200	205
Asp Lys Val Thr Gln Leu Leu Leu Gln Gln Asp Lys Val Pro Glu Pro			
	210	215	220
Ala Ser Leu Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn Gln			
225	230	235	240
Gly Tyr Phe Phe Phe His Leu Pro Asp Ala Leu Glu Ile Glu Ala Cys			
	245	250	255
Gln Val Tyr Phe Thr Tyr Asp Pro Tyr Ser Glu Glu Asp Pro Asp Glu			
	260	265	270
Gly Val Ala Gly Ala Pro Thr Gly Ser Ser Pro Gln Pro Leu Gln Pro			
	275	280	285
Leu Ser Gly Glu Asp Asp Ala Tyr Cys Thr Phe Pro Ser Arg Asp Asp			
	290	295	300
Leu Leu Leu Phe Ser Pro Ser Leu Leu Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ser			
305	310	315	320

Thr Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met Pro Pro Ser
 325 330 335
 Leu Gln Glu Arg Val Pro Arg Asp Trp Asp Pro Gln Pro Leu Gly Pro
 340 345 350
 Pro Thr Pro Gly Val Pro Asp Leu Val Asp Phe Gln Pro Pro Pro Glu
 355 360 365
 Leu Val Leu Arg Glu Ala Gly Glu Glu Val Pro Asp Ala Gly Pro Arg
 370 375 380
 Glu Gly Val Ser Phe Pro Trp Ser Arg Pro Pro Gly Gln Gly Glu Phe
 385 390 395 400
 Arg Ala Leu Asn Ala Arg Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu Ser
 405 410 415
 Leu Gln Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val
 420 425
 <210> 40
 <211> 429
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> IL2Rb复合物
 <400> 40
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu
 20 25 30
 Glu Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met
 35 40 45
 Phe Glu Val Leu Glu Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln
 50 55 60
 Thr Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met
 65 70 75 80
 Glu Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys
 85 90 95
 Asp Leu Leu Gln Ala Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile
 100 105 110
 Ser Lys Gly Lys Asp Thr Ile Pro Trp Leu Gly His Leu Leu Val Gly
 115 120 125
 Leu Ser Gly Ala Phe Gly Phe Ile Ile Leu Val Tyr Leu Leu Ile Asn
 130 135 140

Cys Arg Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn Thr
 145 150 155 160
 Pro Asp Pro Ser Lys Phe Phe Ser Gln Leu Ser Ser Glu His Gly Gly
 165 170 175
 Asp Val Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Phe Ser
 180 185 190
 Pro Gly Gly Leu Ala Pro Glu Ile Ser Pro Leu Glu Val Leu Glu Arg
 195 200 205
 Asp Lys Val Thr Gln Leu Leu Leu Gln Gln Asp Lys Val Pro Glu Pro
 210 215 220
 Ala Ser Leu Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn Gln
 225 230 235 240
 Gly Tyr Phe Phe Phe His Leu Pro Asp Ala Leu Glu Ile Glu Ala Cys
 245 250 255
 Gln Val Tyr Phe Thr Tyr Asp Pro Tyr Ser Glu Glu Asp Pro Asp Glu
 260 265 270
 Gly Val Ala Gly Ala Pro Thr Gly Ser Ser Pro Gln Pro Leu Gln Pro
 275 280 285
 Leu Ser Gly Glu Asp Asp Ala Tyr Cys Thr Phe Pro Ser Arg Asp Asp
 290 295 300
 Leu Leu Leu Phe Ser Pro Ser Leu Leu Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ser
 305 310 315 320
 Thr Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met Pro Pro Ser
 325 330 335
 Leu Gln Glu Arg Val Pro Arg Asp Trp Asp Pro Gln Pro Leu Gly Pro
 340 345 350
 Pro Thr Pro Gly Val Pro Asp Leu Val Asp Phe Gln Pro Pro Pro Glu
 355 360 365
 Leu Val Leu Arg Glu Ala Gly Glu Glu Val Pro Asp Ala Gly Pro Arg
 370 375 380
 Glu Gly Val Ser Phe Pro Trp Ser Arg Pro Pro Gly Gln Gly Glu Phe
 385 390 395 400
 Arg Ala Leu Asn Ala Arg Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu Ser
 405 410 415
 Leu Gln Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val
 420 425

<210> 41

<211> 429

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> IL2Rb复合物

<400> 41

```

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1           5           10           15
His Ala Ala Arg Pro Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu
           20           25           30
Glu Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met
           35           40           45
Phe Glu Val Leu Glu Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln
           50           55           60
Thr Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met
65           70           75           80
Glu Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys
           85           90           95
Asp Leu Leu Gln Ala Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile
           100          105          110
Ser Lys Gly Lys Asp Thr Ile Pro Trp Leu Gly His Leu Leu Val Gly
           115          120          125
Leu Ser Gly Ala Phe Gly Phe Ile Ile Leu Val Tyr Leu Leu Ile Asn
           130          135          140
Cys Arg Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn Thr
145           150          155          160
Pro Asp Pro Ser Lys Phe Phe Ser Gln Leu Ser Ser Glu His Gly Gly
           165          170          175
Asp Val Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Ser Phe Ser
           180          185          190
Pro Gly Gly Leu Ala Pro Glu Ile Ser Pro Leu Glu Val Leu Glu Arg
           195          200          205
Asp Lys Val Thr Gln Leu Leu Leu Gln Gln Asp Lys Val Pro Glu Pro
           210          215          220
Ala Ser Leu Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn Gln
225           230          235          240
Gly Tyr Phe Phe Phe His Leu Pro Asp Ala Leu Glu Ile Glu Ala Cys
           245          250          255
Gln Val Tyr Phe Thr Tyr Asp Pro Tyr Ser Glu Glu Asp Pro Asp Glu
           260          265          270
Gly Val Ala Gly Ala Pro Thr Gly Ser Ser Pro Gln Pro Leu Gln Pro

```

275	280	285
Leu Ser Gly Glu Asp Asp Ala Tyr Cys Thr Phe Pro Ser Arg Asp Asp		
290	295	300
Leu Leu Leu Phe Ser Pro Ser Leu Leu Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ser		
305	310	315
Thr Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met Pro Pro Ser		
	325	330
Leu Gln Glu Arg Val Pro Arg Asp Trp Asp Pro Gln Pro Leu Gly Pro		
	340	350
Pro Thr Pro Gly Val Pro Asp Leu Val Asp Phe Gln Pro Pro Pro Glu		
	355	365
Leu Val Leu Arg Glu Ala Gly Glu Glu Val Pro Asp Ala Gly Pro Arg		
	370	380
Glu Gly Val Ser Phe Pro Trp Ser Arg Pro Pro Gly Gln Gly Glu Phe		
385	390	395
Arg Ala Leu Asn Ala Arg Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu Ser		
	405	410
Leu Gln Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val		
	420	425
<210> 42		
<211> 429		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> IL2Rb复合物		
<400> 42		
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu		
1	5	10
His Ala Ala Arg Pro Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu		
	20	25
Glu Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met		
	35	40
Phe Glu Val Leu Glu Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln		
	50	55
Thr Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met		
65	70	75
Glu Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys		
	85	90
Asp Leu Leu Gln Ala Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile		

100	105	110
Ser Lys Gly Lys Asp Thr Ile Pro Trp Leu Gly His Leu Leu Val Gly		
115	120	125
Leu Ser Gly Ala Phe Gly Phe Ile Ile Leu Val Tyr Leu Leu Ile Asn		
130	135	140
Cys Arg Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn Thr		
145	150	155
160	165	170
Pro Asp Pro Ser Lys Phe Phe Ser Gln Leu Ser Ser Glu His Gly Gly		
175	180	185
Asp Val Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Ser Phe Ser		
190	195	200
Pro Gly Gly Leu Ala Pro Glu Ile Ser Pro Leu Glu Val Leu Glu Arg		
205	210	215
Asp Lys Val Thr Gln Leu Leu Leu Gln Gln Asp Lys Val Pro Glu Pro		
220	225	230
Ala Ser Leu Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn Gln		
235	240	245
Gly Tyr Phe Phe Phe His Leu Pro Asp Ala Leu Glu Ile Glu Ala Cys		
250	255	260
Gln Val Tyr Phe Thr Tyr Asp Pro Tyr Ser Glu Glu Asp Pro Asp Glu		
265	270	275
Gly Val Ala Gly Ala Pro Thr Gly Ser Ser Pro Gln Pro Leu Gln Pro		
280	285	290
Leu Ser Gly Glu Asp Asp Ala Tyr Cys Thr Phe Pro Ser Arg Asp Asp		
295	300	305
Leu Leu Leu Phe Ser Pro Ser Leu Leu Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ser		
310	315	320
Thr Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met Pro Pro Ser		
325	330	335
Leu Gln Glu Arg Val Pro Arg Asp Trp Asp Pro Gln Pro Leu Gly Pro		
340	345	350
Pro Thr Pro Gly Val Pro Asp Leu Val Asp Phe Gln Pro Pro Pro Glu		
355	360	365
Leu Val Leu Arg Glu Ala Gly Glu Glu Val Pro Asp Ala Gly Pro Arg		
370	375	380
Glu Gly Val Ser Phe Pro Trp Ser Arg Pro Pro Gly Gln Gly Glu Phe		
385	390	395
Arg Ala Leu Asn Ala Arg Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu Ser		
400	405	410
415		

Leu Gln Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val
 420 425
 <210> 43
 <211> 429
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> IL7Ra复合物
 <400> 43
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu
 20 25 30
 Glu Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met
 35 40 45
 Phe Glu Val Leu Glu Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln
 50 55 60
 Thr Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met
 65 70 75 80
 Glu Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys
 85 90 95
 Asp Leu Leu Gln Ala Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile
 100 105 110
 Ser Lys Gly Lys Asp Thr Ile Pro Trp Leu Gly His Leu Leu Val Gly
 115 120 125
 Leu Ser Gly Ala Phe Gly Phe Ile Ile Leu Val Tyr Leu Leu Ile Asn
 130 135 140
 Cys Arg Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn Thr
 145 150 155 160
 Pro Asp Pro Ser Lys Phe Phe Ser Gln Leu Ser Ser Glu His Gly Gly
 165 170 175
 Asp Val Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Ser Phe Ser
 180 185 190
 Pro Gly Gly Leu Ala Pro Glu Ile Ser Pro Leu Glu Val Leu Glu Arg
 195 200 205
 Asp Lys Val Thr Gln Leu Leu Leu Gln Gln Asp Lys Val Pro Glu Pro
 210 215 220
 Ala Ser Leu Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn Gln
 225 230 235 240

<400> 45
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 1 5

<210> 46
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 甘氨酸间隔子

<400> 46
 Gly Gly Gly
 1

<210> 47
 <211> 251
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> IL2R γ 复合物

<400> 47
 Met Pro Leu Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Ala Leu Leu Gly Ala Leu
 1 5 10 15
 His Ala Gln Ala Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly
 20 25 30
 Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly
 35 40 45
 Met Leu Glu Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys
 50 55 60
 Pro Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu
 65 70 75 80
 Glu Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile
 85 90 95
 Ser Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro
 100 105 110
 Pro His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Gly Glu
 115 120 125
 Gly Ser Asn Thr Ser Lys Glu Asn Pro Phe Leu Phe Ala Leu Glu Ala
 130 135 140
 Val Val Ile Ser Val Gly Ser Met Gly Leu Ile Ile Ser Leu Leu Cys
 145 150 155 160

Val Tyr Phe Trp Leu Glu Arg Thr Met Pro Arg Ile Pro Thr Leu Lys
 165 170 175
 Asn Leu Glu Asp Leu Val Thr Glu Tyr His Gly Asn Phe Ser Ala Trp
 180 185 190
 Ser Gly Val Ser Lys Gly Leu Ala Glu Ser Leu Gln Pro Asp Tyr Ser
 195 200 205
 Glu Arg Leu Cys Leu Val Ser Glu Ile Pro Pro Lys Gly Gly Ala Leu
 210 215 220
 Gly Glu Gly Pro Gly Ala Ser Pro Cys Asn Gln His Ser Pro Tyr Trp
 225 230 235 240
 Ala Pro Pro Cys Tyr Thr Leu Lys Pro Glu Thr
 245 250

<210> 48

<211> 429

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> IL2Rb复合物

<400> 48

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu
 20 25 30
 Glu Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met
 35 40 45
 Phe Glu Val Leu Glu Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln
 50 55 60
 Thr Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met
 65 70 75 80
 Glu Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys
 85 90 95
 Asp Leu Leu Gln Ala Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile
 100 105 110
 Ser Lys Gly Lys Asp Thr Ile Pro Trp Leu Gly His Leu Leu Val Gly
 115 120 125
 Leu Ser Gly Ala Phe Gly Phe Ile Ile Leu Val Tyr Leu Leu Ile Asn
 130 135 140
 Cys Arg Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn Thr
 145 150 155 160

Pro Asp Pro Ser Lys Phe Phe Ser Gln Leu Ser Ser Glu His Gly Gly
 165 170 175
 Asp Val Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Ser Phe Ser
 180 185 190
 Pro Gly Gly Leu Ala Pro Glu Ile Ser Pro Leu Glu Val Leu Glu Arg
 195 200 205
 Asp Lys Val Thr Gln Leu Leu Leu Gln Gln Asp Lys Val Pro Glu Pro
 210 215 220
 Ala Ser Leu Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn Gln
 225 230 235 240
 Gly Tyr Phe Phe Phe His Leu Pro Asp Ala Leu Glu Ile Glu Ala Cys
 245 250 255
 Gln Val Tyr Phe Thr Tyr Asp Pro Tyr Ser Glu Glu Asp Pro Asp Glu
 260 265 270
 Gly Val Ala Gly Ala Pro Thr Gly Ser Ser Pro Gln Pro Leu Gln Pro
 275 280 285
 Leu Ser Gly Glu Asp Asp Ala Tyr Cys Thr Phe Pro Ser Arg Asp Asp
 290 295 300
 Leu Leu Leu Phe Ser Pro Ser Leu Leu Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ser
 305 310 315 320
 Thr Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met Pro Pro Ser
 325 330 335
 Leu Gln Glu Arg Val Pro Arg Asp Trp Asp Pro Gln Pro Leu Gly Pro
 340 345 350
 Pro Thr Pro Gly Val Pro Asp Leu Val Asp Phe Gln Pro Pro Pro Glu
 355 360 365
 Leu Val Leu Arg Glu Ala Gly Glu Glu Val Pro Asp Ala Gly Pro Arg
 370 375 380
 Glu Gly Val Ser Phe Pro Trp Ser Arg Pro Pro Gly Gln Gly Glu Phe
 385 390 395 400
 Arg Ala Leu Asn Ala Arg Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu Ser
 405 410 415
 Leu Gln Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val
 420 425

<210> 49

<211> 429

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> IL2Ra复合物

<400> 49

Met	Ala	Leu	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu
1				5					10					15	
His	Ala	Ala	Arg	Pro	Ile	Leu	Trp	His	Glu	Met	Trp	His	Glu	Gly	Leu
			20					25					30		
Glu	Glu	Ala	Ser	Arg	Leu	Tyr	Phe	Gly	Glu	Arg	Asn	Val	Lys	Gly	Met
		35					40					45			
Phe	Glu	Val	Leu	Glu	Pro	Leu	His	Ala	Met	Met	Glu	Arg	Gly	Pro	Gln
	50					55					60				
Thr	Leu	Lys	Glu	Thr	Ser	Phe	Asn	Gln	Ala	Tyr	Gly	Arg	Asp	Leu	Met
65					70					75				80	
Glu	Ala	Gln	Glu	Trp	Cys	Arg	Lys	Tyr	Met	Lys	Ser	Gly	Asn	Val	Lys
				85					90					95	
Asp	Leu	Leu	Gln	Ala	Trp	Asp	Leu	Tyr	Tyr	His	Val	Phe	Arg	Arg	Ile
			100						105					110	
Ser	Lys	Gly	Lys	Asp	Thr	Ile	Pro	Trp	Leu	Gly	His	Leu	Leu	Val	Gly
		115						120						125	
Leu	Ser	Gly	Ala	Phe	Gly	Phe	Ile	Ile	Leu	Val	Tyr	Leu	Leu	Ile	Asn
		130				135						140			
Cys	Arg	Asn	Thr	Gly	Pro	Trp	Leu	Lys	Lys	Val	Leu	Lys	Cys	Asn	Thr
145					150						155				160
Pro	Asp	Pro	Ser	Lys	Phe	Phe	Ser	Gln	Leu	Ser	Ser	Glu	His	Gly	Gly
				165						170				175	
Asp	Val	Gln	Lys	Trp	Leu	Ser	Ser	Pro	Phe	Pro	Ser	Ser	Ser	Phe	Ser
			180						185					190	
Pro	Gly	Gly	Leu	Ala	Pro	Glu	Ile	Ser	Pro	Leu	Glu	Val	Leu	Glu	Arg
		195					200						205		
Asp	Lys	Val	Thr	Gln	Leu	Leu	Leu	Gln	Gln	Asp	Lys	Val	Pro	Glu	Pro
	210						215					220			
Ala	Ser	Leu	Ser	Ser	Asn	His	Ser	Leu	Thr	Ser	Cys	Phe	Thr	Asn	Gln
225					230					235					240
Gly	Tyr	Phe	Phe	Phe	His	Leu	Pro	Asp	Ala	Leu	Glu	Ile	Glu	Ala	Cys
				245						250				255	
Gln	Val	Tyr	Phe	Thr	Tyr	Asp	Pro	Tyr	Ser	Glu	Glu	Asp	Pro	Asp	Glu
			260						265					270	
Gly	Val	Ala	Gly	Ala	Pro	Thr	Gly	Ser	Ser	Pro	Gln	Pro	Leu	Gln	Pro
		275					280						285		
Leu	Ser	Gly	Glu	Asp	Asp	Ala	Tyr	Cys	Thr	Phe	Pro	Ser	Arg	Asp	Asp

290	295	300
Leu Leu Leu Phe Ser Pro Ser Leu Leu Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ser		
305	310	315
Thr Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met Pro Pro Ser		
	325	330
Leu Gln Glu Arg Val Pro Arg Asp Trp Asp Pro Gln Pro Leu Gly Pro		
	340	345
Pro Thr Pro Gly Val Pro Asp Leu Val Asp Phe Gln Pro Pro Pro Glu		
	355	360
Leu Val Leu Arg Glu Ala Gly Glu Glu Val Pro Asp Ala Gly Pro Arg		
	370	375
Glu Gly Val Ser Phe Pro Trp Ser Arg Pro Pro Gly Gln Gly Glu Phe		
385	390	395
Arg Ala Leu Asn Ala Arg Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu Ser		
	405	410
Leu Gln Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val		
	420	425
<210> 50		
<211> 251		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> IL7Ra复合物		
<400> 50		
Met Pro Leu Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Ala Leu Leu Gly Ala Leu		
1	5	10
His Ala Gln Ala Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly		
	20	25
Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly		
	35	40
Met Leu Glu Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys		
	50	55
Pro Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu		
65	70	75
Glu Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile		
	85	90
Ser Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro		
	100	105
Pro His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Gly Glu		

<210> 53
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> FITC-CAR
 <400> 53
 Ser Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln Lys
 1 5 10 15
 Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr
 20 25 30
 Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Lys Ser Gly Asn Ser Ala Ser Leu Asp Ile Ser Gly Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser
 85 90 95
 Glu Phe Leu Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ser Thr
 100 105 110
 Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln
 115 120 125
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asn Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
 130 135 140
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Ser Phe Ser
 145 150 155 160
 Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gly Gly Leu Glu Trp Val Ala
 165 170 175
 Gly Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 180 185 190
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Val Tyr Leu
 195 200 205
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 210 215 220
 Arg Arg Ser Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Trp Gly His Phe Tyr Ser Tyr
 225 230 235 240
 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Ser
 245 250 255

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Met Phe Trp Val Leu Val
 260 265 270
 Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala
 275 280 285
 Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile
 290 295 300
 Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp
 305 310 315 320
 Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
 325 330 335
 Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
 340 345 350
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 355 360 365
 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 370 375 380
 Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 385 390 395 400
 Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 405 410 415
 Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 420 425 430
 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 435 440 445

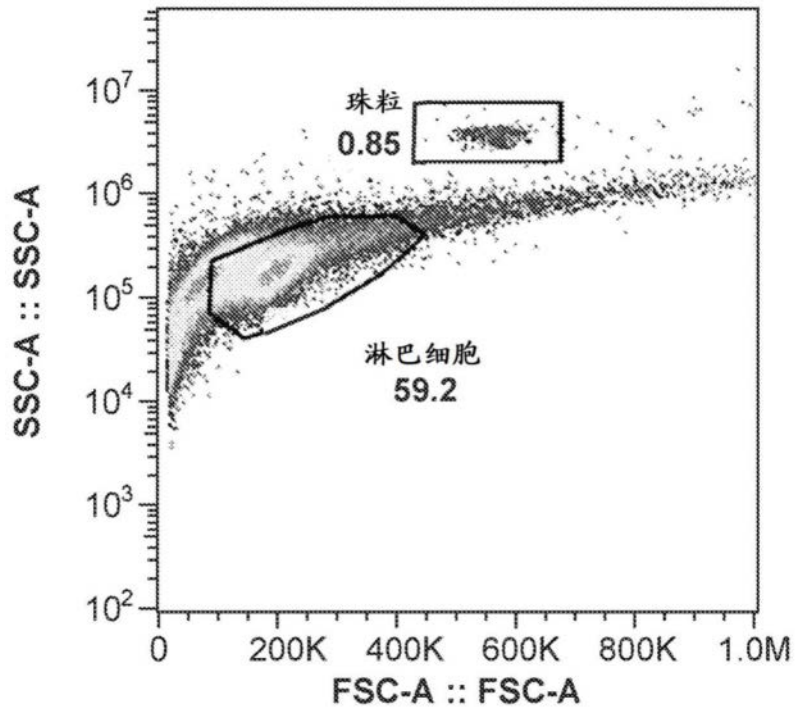


图1A

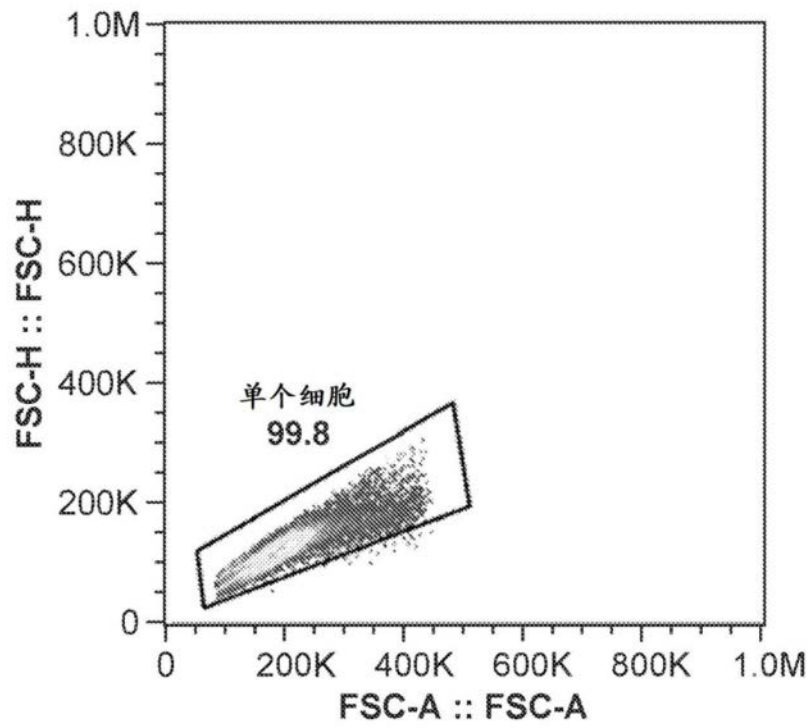


图1B

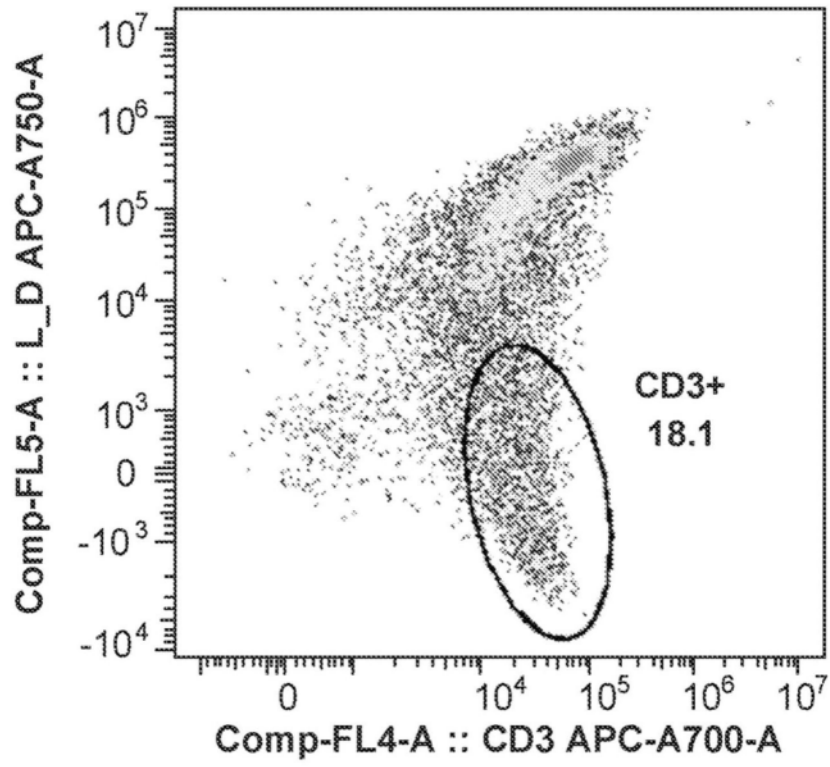


图1C

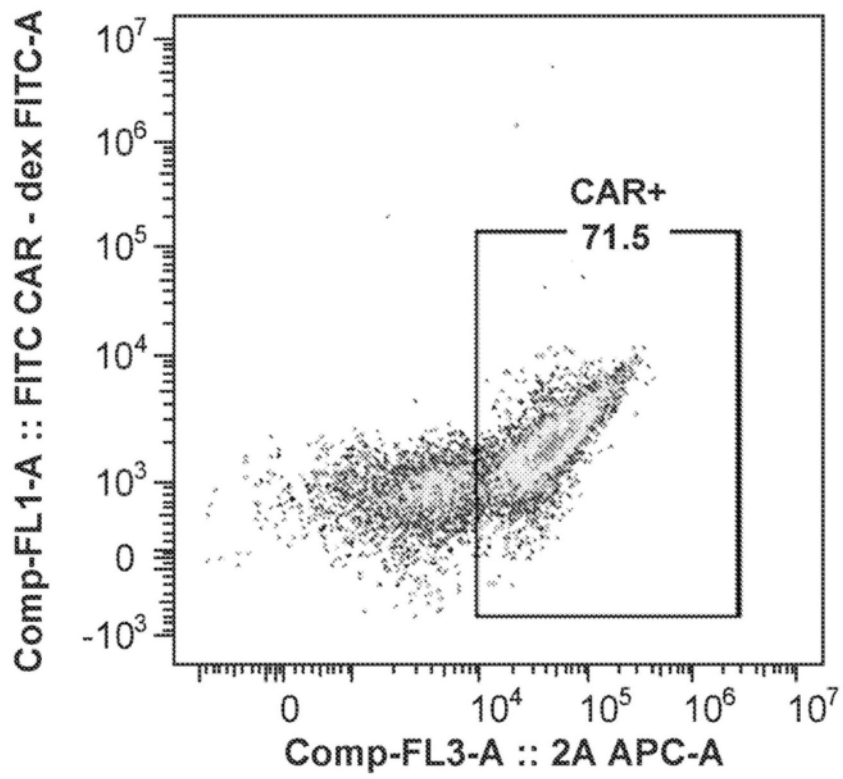


图1D

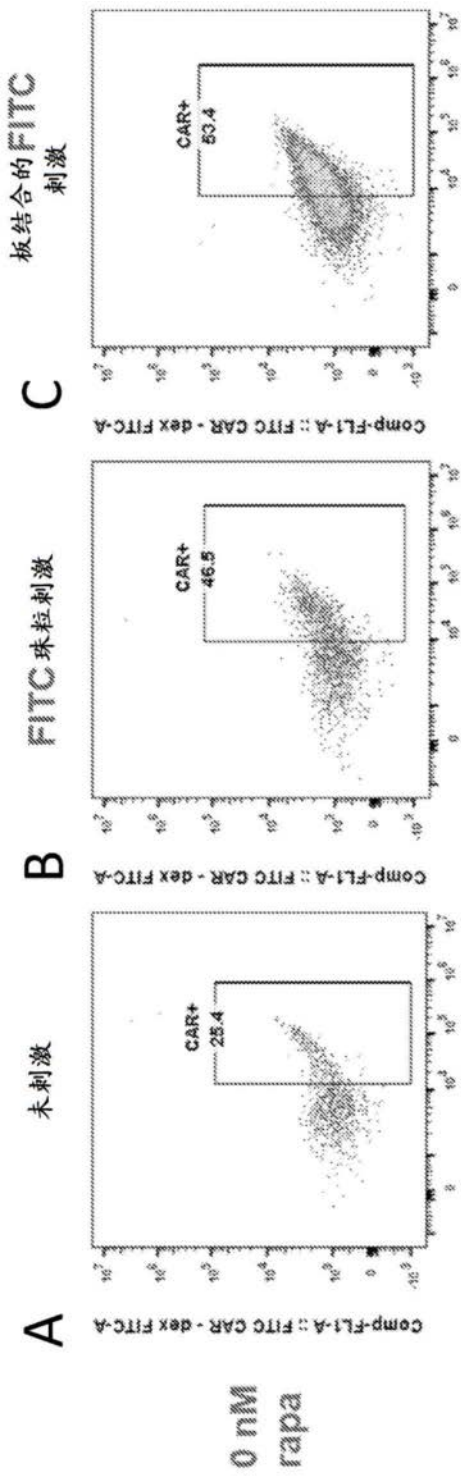


图 2A

图 2B

图 2C

10 nM rapa

D 未刺激
Comp-FL1-A :: FITC CAR - dex FITC-A
CAR+ 57.8

E FITC 珠粒刺激
Comp-FL1-A :: FITC CAR - dex FITC-A
CAR+ 71.5

F 板结合的 FITC 刺激
Comp-FL1-A :: FITC CAR - dex FITC-A
CAR+ 65.8

图 2D

图 2E

图 2F

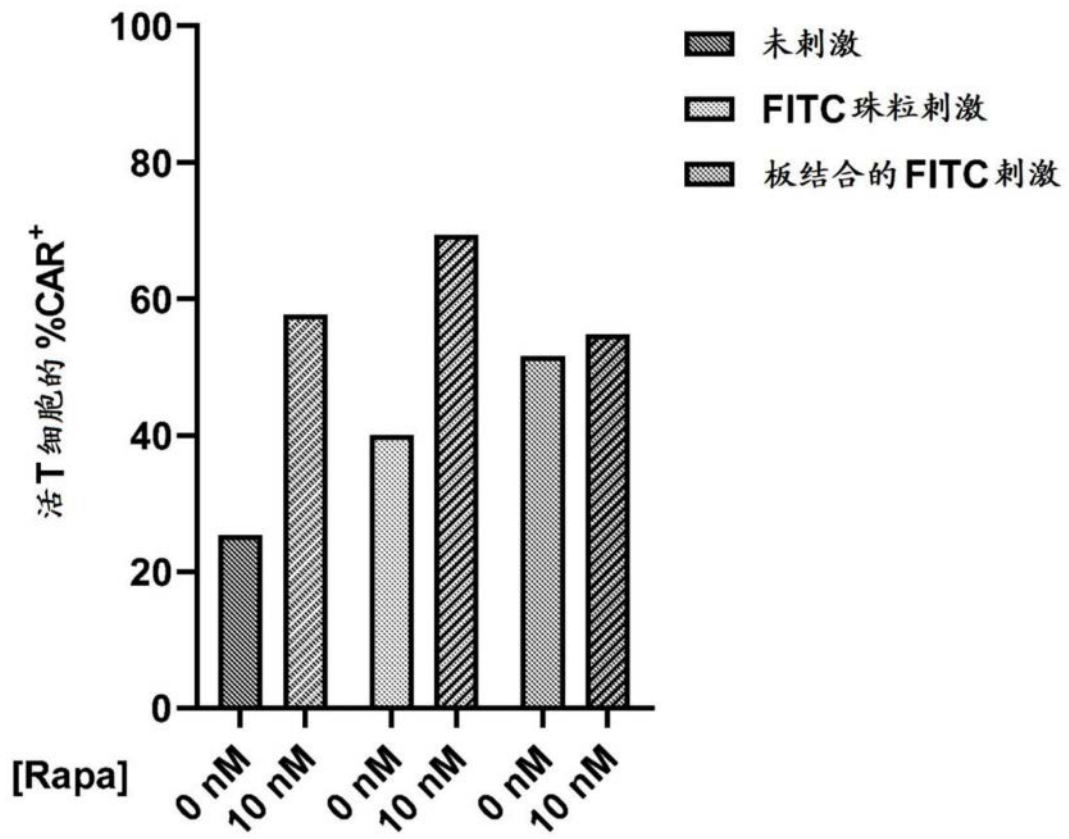


图3

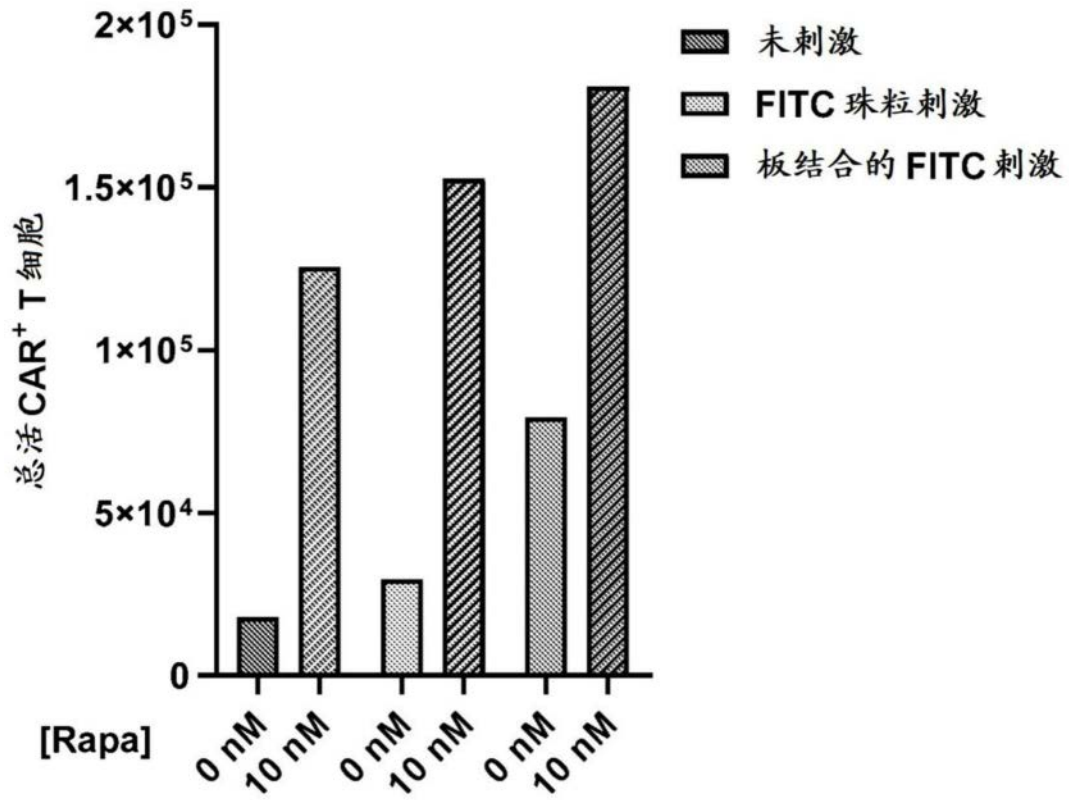


图4

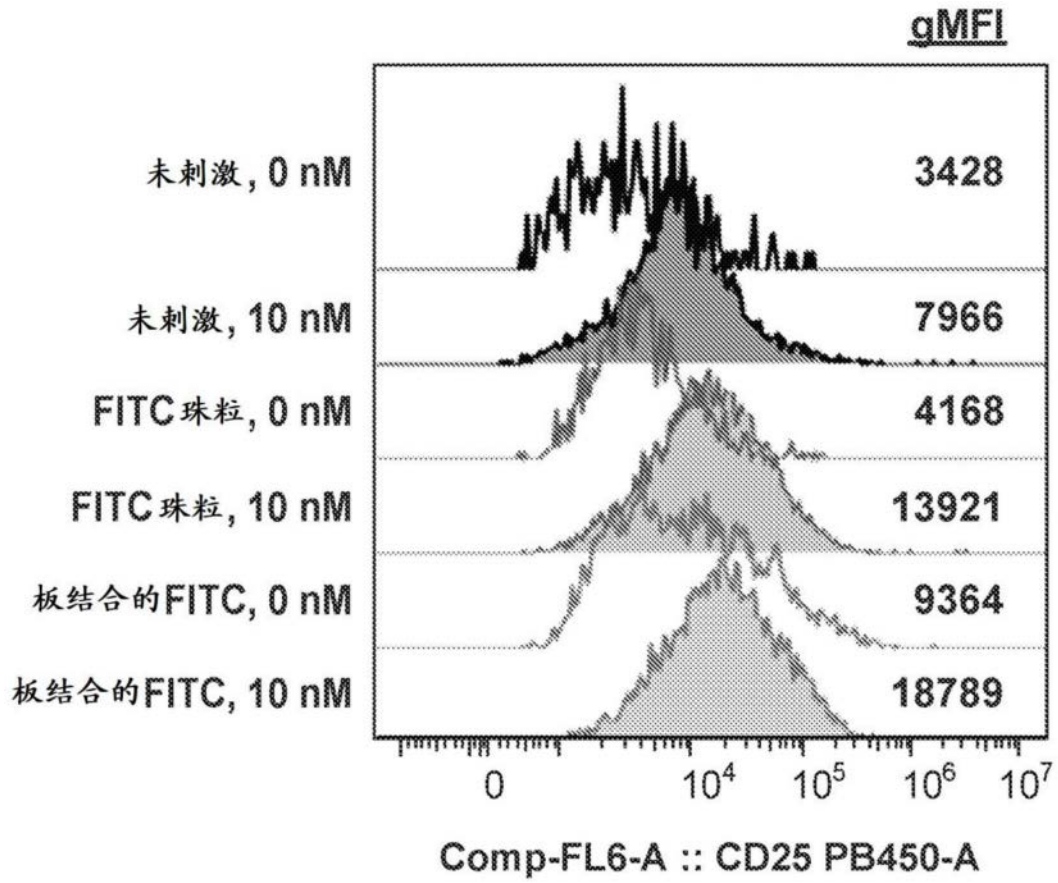


图5

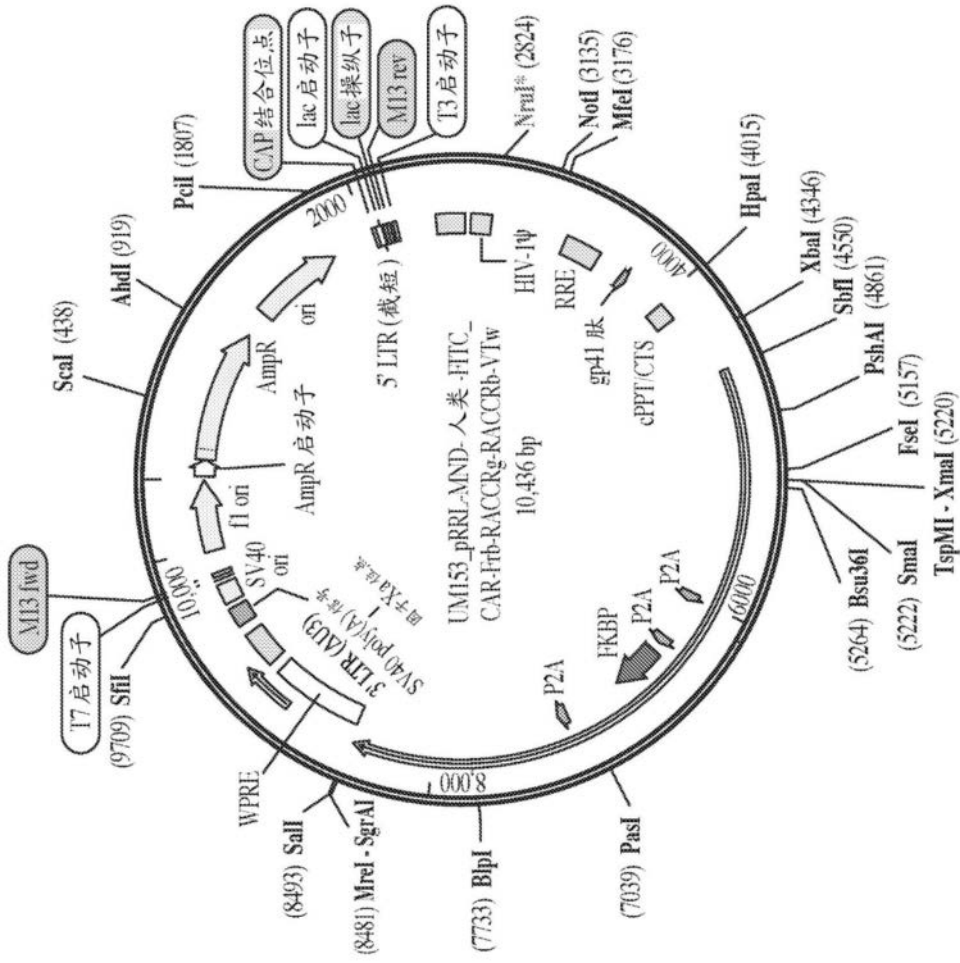


图6

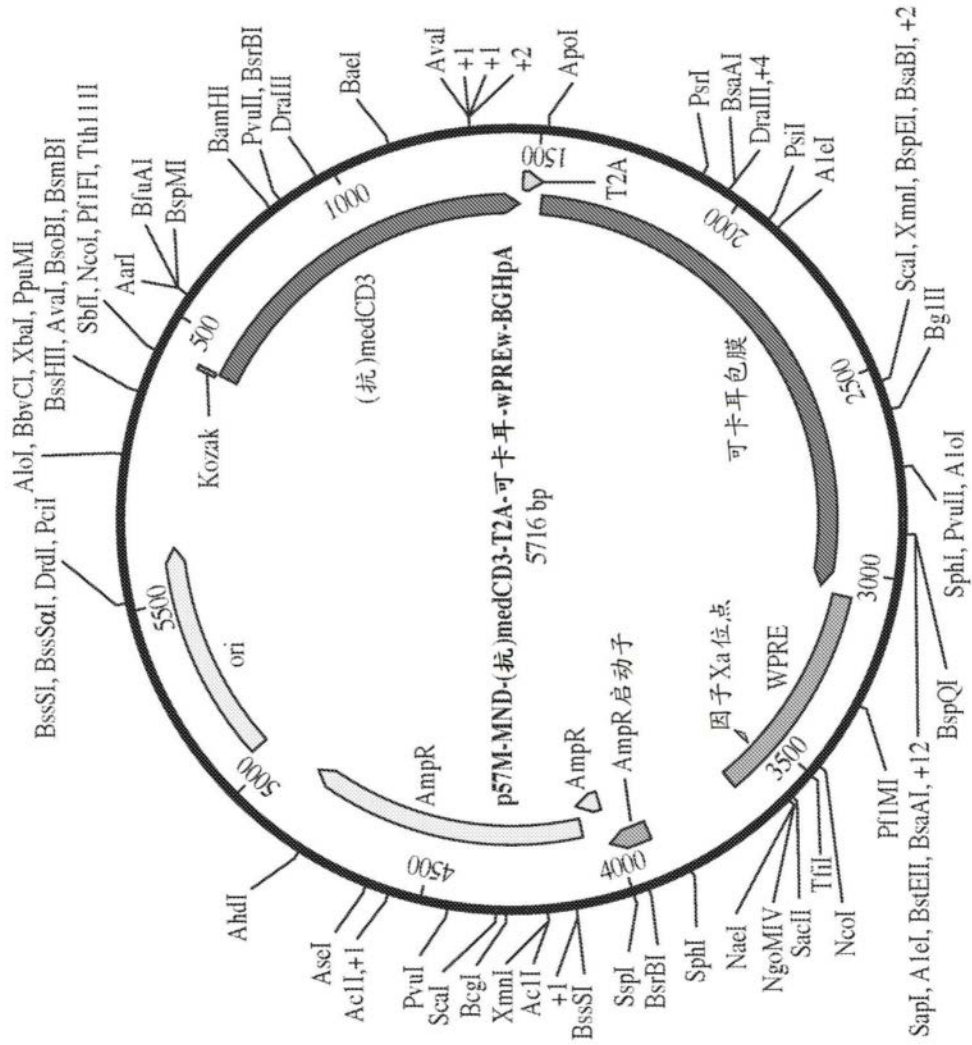


图7