



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106999552 B

(45) 授权公告日 2021.12.28

(21) 申请号 201580065382.9

(51) Int.CI.

(22) 申请日 2015.09.30

A61K 38/24 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106999552 A

(56) 对比文件

US 2014161767 A1, 2014.06.12

(43) 申请公布日 2017.08.01

CN 103492406 A, 2014.01.01

(30) 优先权数据

US 2014241983 A1, 2014.08.28

62/059,068 2014.10.02 US

CN 103509121 A, 2014.01.15

62/202,824 2015.08.08 US

CN 102369021 A, 2012.03.07

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

Tom Stephen et al.. Foxp1 Regulates

2017.06.01

Anti-tumor Effector Functions of CD8+T

(86) PCT国际申请的申请数据

cells in Ovarian Cancer.《The journal of

PCT/US2015/053128 2015.09.30

immunology》.2012, 第188卷(第1期), 摘要.

(87) PCT国际申请的公布数据

朱晨等. 卵泡刺激素受体及其靶向药物的研

W02016/054153 EN 2016.04.07

究进展.《肿瘤》.2014, 第34卷(第9期), 第863-

(73) 专利权人 威斯塔解剖学和生物学研究所

867页.

地址 美国宾夕法尼亚州

王蔚等. NKG2D 在NK 细胞杀伤血液肿瘤细

(72) 发明人 A·佩拉莱斯-普查尔德

胞中的作用.《中国实验血液学杂志》.2012, 第20

J·R·科内霍-加尔西亚

卷(第2期), 第296-299页.

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

张鸿声. 嵌合抗原受体T 细胞肿瘤治疗的前

有限责任公司 11204

生、今世和将来.《转化医学杂志》.2014, 第3卷

代理人 王达佐 洪欣

(第3期), 第129-133页.

审查员 王李娜

权利要求书2页 说明书32页

序列表9页 附图12页

(54) 发明名称

治疗癌症的方法和组合物

(57) 摘要

提供了编码包含配体的嵌合蛋白的核酸序
列, 所述配体包含天然存在的或经修饰的卵泡刺
激素序列(例如, FSHp序列)或其片段, 所述配体
结合人卵泡刺激素(FSH)受体, 所述核酸序列连
接于(a)编码胞外铰链结构域、跨膜结构域、共刺
激信号转导区和信号转导胞内结构域的核酸序
列; 或(b)编码结合NKG2D的配体的核酸序列。还
提供了含有该核酸序列的载体、由其编码的嵌合
蛋白和表达该嵌合蛋白的经修饰的T细胞, 以及
C 使用这些组合物治疗表达FSHR的癌症或肿瘤细
胞的方法。

1. 一种核酸构建体,其包含编码嵌合蛋白的核酸序列,所述嵌合蛋白包含配体、胞外铰链结构域、跨膜结构域、共刺激信号转导区和信号转导胞内结构域,其中所述配体包含卵泡刺激素FSH或FSH片段,并能够结合人卵泡刺激素受体FSHR,并且其中所述嵌合蛋白能够活化表达所述嵌合蛋白的经修饰的人T细胞。

2. 一种包含权利要求1所述的核酸序列的载体。

3. 一种嵌合蛋白,其包含配体、胞外铰链结构域、跨膜结构域、共刺激信号转导区和信号转导胞内结构域,其中所述配体包含FSH或FSH片段,并能够结合人FSHR,并且其中所述嵌合蛋白能够活化表达所述嵌合蛋白的经修饰的人T细胞。

4. 一种经修饰的人T细胞,包含编码嵌合蛋白的核酸序列,所述嵌合蛋白包含配体、胞外铰链结构域、跨膜结构域、共刺激信号转导区和信号转导胞内结构域,其中所述配体包含FSH或FSH片段,并能够结合人FSHR,并且其中所述嵌合蛋白能够活化经修饰的人T细胞。

5. 根据权利要求4所述的经修饰的细胞,其中所述T细胞不表达叉头框蛋白(Foxp1)。

6. 根据权利要求4所述的经修饰的细胞,其中所述T细胞是从个体或个体的骨髓移植匹配配体获得的自体人T细胞或自然杀伤(NK)T细胞。

7. 根据权利要求4所述的经修饰的细胞,其中所述T细胞是内源或异源人T细胞或人T细胞系。

8. 根据权利要求1所述的核酸构建体,其中所述配体包含FSH、FSH β 亚基、通过连接子序列隔开的FSH β 亚基与FSH α 亚基,通过连接子序列隔开的FSH β 亚基与第二FSH β 亚基,或以上的FSH β 片段。

9. 一种组合物,包含:

(a) 核酸构建体,其包含编码嵌合蛋白的核酸序列,所述嵌合蛋白包含配体、胞外铰链结构域、跨膜结构域、共刺激信号转导区和信号转导胞内结构域,其中所述配体包含FSH或FSH片段,并能够结合人FSHR,并且其中所述嵌合蛋白能够活化表达所述嵌合蛋白的经修饰的人T细胞;或

(b) 嵌合蛋白,其包含配体、胞外铰链结构域、跨膜结构域、共刺激信号转导区和信号转导胞内结构域,其中所述配体包含FSH或FSH片段,并能够结合人FSHR,并且其中所述嵌合蛋白能够活化表达所述嵌合蛋白的经修饰的人T细胞;或

(c) 经修饰的人T细胞,其包含编码嵌合蛋白的核酸序列,所述嵌合蛋白包含配体、胞外铰链结构域、跨膜结构域、共刺激信号转导区和信号转导胞内结构域,其中所述配体包含FSH或FSH片段,并能够结合人FSHR,并且其中所述嵌合蛋白能够活化经修饰的人T细胞。

10. 如权利要求9所述的组合物在制备治疗具有表达FSHR的癌细胞的人类个体中的癌症的药物中的用途,

其中所述配体包含天然存在的FSH、天然存在的FSH β 亚基、通过连接子序列隔开的天然存在的FSH β 亚基与FSH α 亚基、通过连接子序列隔开的天然存在的FSH β 亚基与第二FSH β 亚基、或FSH片段、FSH α 片段或FSH β 片段。

11. 根据权利要求10所述的用途,其中所述T细胞不表达叉头框蛋白(Foxp1)。

12. 根据权利要求10所述的用途,其中所述T细胞是从所述个体或所述个体的骨髓移植匹配配体获得的自体人T细胞或自然杀伤(NK)T细胞。

13. 根据权利要求10所述的用途,其中所述配体包含天然存在的FSH β 亚基。

14. 根据权利要求10所述的用途,其中所述个体患有卵巢癌。

15. 根据权利要求10所述的用途,其中所述癌症为前列腺癌、乳腺癌、结肠癌、胰腺癌、膀胱癌、肾癌、肺癌、肝癌、胃癌、睾丸癌或卵巢癌。

16. 根据权利要求15所述的用途,其中所述癌症发现于原发性或转移性肿瘤的血管的细胞中。

17. 根据权利要求10所述的用途,其包含所述经修饰的T细胞,并且其还包括处理所述T细胞来抑制所述细胞中叉头框蛋白(Foxp1)的表达。

18. 根据权利要求17所述的用途,其中所述处理发生在用核酸序列转染T细胞之前,所述核酸序列编码所述嵌合蛋白。

19. 根据权利要求17所述的用途,其中所述处理发生在用核酸序列转染T细胞之后,所述核酸序列编码所述嵌合蛋白。

20. 根据权利要求10所述的用途,其中所述组合物通过腹膜内、静脉内、肿瘤内或淋巴结内给药而系统性地给予。

21. 根据权利要求10所述的用途,其中在将所述组合物给予所述人类个体前,所述人类个体通过以下步骤处理,

- (a) 从所述个体移除T细胞;
- (b) 用表达所述嵌合蛋白的载体离体转导所述T细胞;
- (c) 任选地,在步骤(b)之前或之后,处理所述细胞以消除或降低所述T细胞中Foxp1的表达;
- (d) 任选地,离体培养步骤(c)的T细胞以从所述细胞去除Foxp1;
- (e) 将所述T细胞制备于合适的药学载体中;以及
- (f) 任选地,冷冻所述T细胞以用于后续解冻。

22. 根据权利要求10所述的用途,其中所述人类个体通过以下步骤处理:

- (a) 从所述个体提取T细胞,用于修饰和离体细胞扩增;
- (b) 用化学疗法治疗所述个体并消耗所述个体的淋巴细胞;以及
- (c) 将经修饰的T细胞给予所述个体。

23. 根据权利要求22所述的用途,还包括手术切除肿瘤。

治疗癌症的方法和组合物

[0001] 通过引用的方式并入电子形式递交的材料

[0002] 申请人在此通过引用的方式并入电子形式递交的序列表材料。该文件标记为“WST150PCT_ST25.txt”，生成于2015年9月28日，大小为23KB。

背景技术

[0003] 虽然手术方法和化学疗法不断进步，卵巢癌的5年存活在近40年来改变很小。通过肿瘤浸润T细胞引起针对卵巢癌进展的免疫压力。尽管卵巢癌具有灾难性的病程，T细胞能自发地发挥针对恶性肿瘤进展的临床相关压力，达到T细胞浸润的模式和强度能预测患者结局的程度。因此，卵巢癌是免疫原性的并且是设计新的免疫疗法的理想靶点。

[0004] 在过去的几年里，免疫疗法已作为癌症治疗中有前景的工具出现。例如，嵌合抗原受体 (CAR) 疗法已在化学疗法抵抗的血液学恶性肿瘤的治疗中表现出极好的结果。但是，由于缺乏健康组织不存在的、肿瘤细胞表面上表达的特异性抗原，目前该技术针对包括卵巢癌在内的大部分实体肿瘤的成功受到了阻止。寻找正常组织不存在且引发无法忍受的副作用的肿瘤细胞中特异性抗原存在相当大的难度。另外，实体瘤的肿瘤微环境的免疫抑制效应严重破坏抗肿瘤T细胞应答。

发明内容

[0005] 本文所述的组合物和方法提供有效和有用的治疗癌症的工具和方法，所述癌症包括特征为细胞表达内分泌受体卵泡刺激素 (FSHR) 的实体瘤。

[0006] 一方面，核酸构建体包含编码包含配体的嵌合蛋白的核酸序列，所述配体包含卵泡刺激素 (FSH) 序列，所述配体结合人FSHR，所述核酸序列连接于提供T细胞活化功能的序列。一方面，提供T细胞活化功能的序列为 (a) 编码胞外铰链结构域、间隔子元件、跨膜结构域、共刺激信号转导区和信号转导胞内结构域的核酸序列；或 (b) 编码任选的间隔子和结合NKG2D的配体的核酸序列。在一个实施方案中，配体为天然存在的FSH、FSH的单个亚基、FSH β 、FSH或FSH β 片段或任何前述序列的经修饰的形式。

[0007] 另一方面，嵌合蛋白包含配体，所述配体包含FSH序列，所述配体结合人FSHR，所述配体连接于 (a) 胞外铰链结构域、跨膜结构域、共刺激信号转导区和信号转导胞内结构域；或 (b) 任选的间隔子和结合NKG2D的配体。在一个实施方案中，配体为天然存在的FSH、FSH的单个亚基、FSH β 、FSH或FSH β 片段或任何前述序列的经修饰的形式。

[0008] 另一方面，在药学可接受载体中，经修饰的人T细胞包含核酸序列，所述核酸序列编码包含配体的嵌合蛋白，所述配体包含FSH序列，所述配体结合人FSHR，所述配体连接于胞外铰链结构域、跨膜结构域、共刺激信号转导区和信号转导胞内结构域。在一个实施方案中，经修饰的T细胞为分离自患者的自体T细胞，当T细胞被修饰为含有本文所述的核酸构建体时，所述T细胞会被重新给予所述患者。在另一实施方案中，经修饰的T细胞是通用同种异体平台，即，异源T细胞，当T细胞如本文所述被修饰时，用于给予任何数量或患者。

[0009] 在一个实施方案中，配体为天然存在的FSH、FSH的单个亚基、FSH β 、FSH或FSH β 片

段、或任何前述序的经修饰的形式列。另一方面，治疗人类个体癌症的方法包括将本文所述的组合物给予有需要的个体，所述组合物包括例如核酸序列、嵌合蛋白或经修饰的T细胞。在一个实施方案中，方法包括将经修饰的人T细胞给予有需要的个体，所述经修饰的人T细胞包含编码包含配体、胞外铰链结构域、跨膜结构域、共刺激信号转导区和信号转导胞内结构域的嵌合蛋白的核酸序列，所述配体包含FSH序列，所述配体结合人FSHR。

[0010] 另一方面，治疗人类个体癌症的方法包括将包含核酸序列的组合物给予个体，所述核酸序列编码包含配体的嵌合蛋白，所述配体包含FSH序列，所述配体结合人FSHR，所述核酸序列连接于(a)编码胞外铰链结构域、间隔子元件、跨膜结构域、共刺激信号转导区和信号转导胞内结构域的核酸序列；或(b)编码任选的间隔子和结合NKG2D的配体的核酸序列。在一个实施方案中，配体为天然存在的FSH、FSH的单个亚基、FSH β 、FSH或FSH β 片段、或任何前述序列的经修饰的形式。

[0011] 另一方面，治疗人类个体癌症的方法包括将包含嵌合蛋白的组合物给予个体，所述嵌合蛋白包含配体，所述配体包含FSH序列，所述配体结合人FSHR，连接于(a)编码胞外铰链结构域、间隔子元件、跨膜结构域、共刺激信号转导区和信号转导胞内结构域的核酸序列；或(b)编码任选的间隔子和结合肿瘤相关的NKG2D受体的配体的核酸序列。

[0012] 另一方面，治疗卵巢癌的方法包括将配制于药学可接受载体的经修饰的人T细胞给予有需要的个体，经修饰的人T细胞包含编码包含配体的嵌合蛋白的核酸序列，所述配体包含FSH序列，所述配体结合人FSHR，所述配体连接于胞外铰链结构域、跨膜结构域、共刺激信号转导区和信号转导胞内结构域。在一个实施方案中，配体为天然存在的FSH、FSH的单个亚基、FSH β 、FSH或FSH β 片段、或任何前述序列的经修饰的形式。在另一实施方案中，在给予步骤前，女性个体已被手术治疗来摘除卵巢。

[0013] 在下文优选实施方案的详细描述中，进一步描述这些组合物和方法的其他方面和优势。

附图说明

[0014] 图1为在T细胞中表达嵌合内分泌受体(CER)、FSH配体蛋白的一种构建体(即，核酸构建体或氨基酸构建体)的示意图。

[0015] 图2A的柱状图显示了含有编码表达FSH受体的配体的嵌合蛋白的核酸序列的T细胞(FSHCER-CD8)特异性地响应于表达FSHR的B7F肿瘤细胞。正向转导的(GFP+)T细胞携带图1所示的靶向FSHR的CER(FSHCER-CD8；小棋盘格图案)或无关的靶向间皮素(mesothelin)的(K1)CAR(大棋盘格图案)与用FSHCER-CD8或空载体(ID-8；无关CAR)转导的ID8-Defb29/Vegf-a肿瘤细胞(B7)共同孵育(1:20)6小时。在上清中定量IFN- γ (pg/mL)。转染FSH嵌合蛋白(或靶向FSHR)的经修饰的T细胞响应于过表达FSHR的小鼠B7F卵巢肿瘤细胞而分泌活化标志物干扰素- γ 。针对过表达FSHR的肿瘤细胞系B7F，靶向间皮素的T细胞不分泌干扰素- γ 。同样，表达FSH嵌合蛋白的T细胞不会被不表达FSHR的肿瘤细胞B7活化。

[0016] 图2B的柱状图显示了用FSHCER-CD4构建体进行的相同分析。

[0017] 图3的图显示了含有编码表达FSH受体的配体的嵌合蛋白的核酸序列的T细胞延迟建立的FSHR+肿瘤细胞的进展。过表达FSHR的A7C11同系(B6)乳腺癌细胞被给予两组小鼠(5只小鼠/组)的侧腹。给予肿瘤细胞后4天，10⁶个靶向FSHR的经修饰的T细胞(■)或模拟对照

(pBMN) 转导的T细胞(▲)被过继性腹膜内转移。用携带嵌合蛋白的T细胞治疗的小鼠中肿瘤生长的进展被延迟。

[0018] 图4A的柱状图显示了在携带嵌合蛋白或模拟对照蛋白的T细胞给药后第16天,用等同数量的用嵌合蛋白或模拟对照pBMN T细胞注射的小鼠的脾细胞CD4/CD8比值的。

[0019] 图4B的柱状图显示了按图4A所述治疗的小鼠在第16天的过继性转移的T细胞的细胞计数。

[0020] 图4C的柱状图显示了来自图4A的小鼠在第16天的脾细胞的个体脾CD4计数。

[0021] 图4D的图显示了来自图4A的小鼠在第16天的脾细胞的CD8细胞计数。如以CD8和CD4标志物设门(未显示)的这些脾细胞的流式细胞仪数据(数据图未显示)所示,这些图也显示,与给予携带模拟对照蛋白的T细胞的小鼠相比,给予携带嵌合蛋白的T细胞的小鼠的脾中CD4和CD8转染细胞的数目均增加。图4A-4D显示了,与用携带模拟对照蛋白的T细胞注射的小鼠相比,用携带FSH嵌合蛋白的T细胞注射的小鼠的脾中转移的T细胞的数目增加。转入携带嵌合蛋白的T细胞的脾细胞中检还测到更高的CD4/CD8比值。在该卵巢癌细胞模型中,该比值被发现为是针对癌症的应答的良性标志物。

[0022] 图5是包含下文表1的融合组分的构建体的核酸序列SEQ ID NO:1和氨基酸序列SEQ ID NO:2:

[0023] 表1

组分	SEQ ID NO: 1 的 核酸	SEQ ID NO: 2 的 氨基酸
人 FSH β 信号	1-54	1-18
人 FSH β	55-387	19-129
间隔子	388-432	130-144
人 FSH α	433-801	145-267
来自人 CD8 的铰链	802-936	268-312
来自人 CD8 的跨膜结构域	937-1008	313-336
来自 4-1BB 的人胞内区	1009-1134	337-378
人 CD3 Z 结构域	1135-1473	379-490

[0024] [0025] 图6A是嵌合FSH-Letal构建体的示意图,展示了其如何结合肿瘤细胞和NK细胞或T细胞(例如,CD8T细胞, γ T细胞或NK T细胞)。

[0026] 图6B是包含下文表2的融合组分的构建体的核酸序列SEQ ID NO:3和氨基酸序列SEQ ID NO:4:

[0027] 表2

组分	SEQ ID NO: 3 的 核酸	SEQ ID NO: 4 的 氨基酸
[0028]	人 FSH β 信号	1-3
	人 FSH β	4-336
	间隔子	337-381
	人 FSH α	382-750
	间隔子	751-795
	人胞外 NKG2D 配体 (Letal)	796-1365
		266-454

[0029] 图6C是包含下文表3的融合组分的构建体的核酸序列SEQ ID NO:5和氨基酸序列SEQ ID NO:6。构建体的MW为45.87kD,并且利用非切割酶位点AscI、BamHI、BcgI、BeII、ClaI、HindIII、KpnI、MfeI、MluI、NcoI、NdeI、NotI、PacI、PmeI、PsiI、PvuI、SacII、SalI、SfiI、SgfI、SpeI、SphI、XbaI和XhoI。

[0030] 表3

组分	SEQ ID NO: 5 的 核酸	SEQ ID NO: 6 的 氨基酸
[0031]	小鼠 FSH β 信号	1-3
	小鼠 FSH β	4-336
	间隔子	337-381
	小鼠 FSH α	382-657
	间隔子	658-708
	小鼠 MULT1 的胞外结 构域	709-1260
		237-446

[0032] 图6D是包含下文表4的融合组分的构建体的核酸序列SEQ ID NO:7和氨基酸序列SEQ ID NO:8:

[0033] 表4

组分	SEQ ID NO: 7 的 核酸	SEQ ID NO: 8 的 氨基酸
[0034]	人 FSH β 信号	1-3
	人 FSH β	4-336
	间隔子	337-381
	人 FSH α	382-657
	间隔子	658-702
	Letal 的人胞外结构域	703-1272

[0035] 图7A的柱状图显示了贴壁的FSHR转导的ID8-Defb29/Vegf-a (B7F) 癌细胞与表达FSH CER的或模拟对照转导的T细胞pBMN (1:40比率) 孵育24小时。去除未贴壁细胞后,在血细胞计数仪中对台盼蓝阴性细胞进行计数。FSH靶向型CER T细胞有效清除FSHR⁺肿瘤细胞。

[0036] 图7B的柱状图显示了用本文所述的FSH靶向型构建体转导的贴壁的FSHR转导的A7C11F有效清除FSHR⁺肿瘤细胞。贴壁的FSHR转导的A7C11F癌细胞与表达FSH CER的或模拟对照转导的T细胞 (1:40比率) 孵育24小时。去除未贴壁细胞后,在血细胞计数仪中对台盼蓝阴性细胞进行计数。FSH靶向型CER T细胞有效清除FSHR⁺肿瘤细胞。

[0037] 图8是本文所述的FSH嵌合内分泌受体 (CER) -T构建体的变化形式的示意图。

[0038] 图9的图显示了人FSHCER T细胞以剂量依赖方式杀伤卵巢肿瘤细胞。将HLA-A2+人T细胞用ConA扩增,在20和44小时,用具有retronectin的pBMN中的hFSHCER离心转染或模拟对照转导,并用1ug/mL的IL-7和20U/mL的IL-2保持在0.5-1×10⁶细胞/mL。第7天,将CER和对照T细胞根据GFP表达分选,并静置8小时,用HLA-A2+人OVCAR-3卵巢癌细胞 (10000/孔;自发FSHR+) 以指定的效应物 (E) 与靶标 (T) 的比率进行接种。设置后6小时,用膜联蛋白V和7AAD染色共培养细胞,并通过流式细胞术分析细胞毒性。特异性溶解的百分比计算为(实验死亡-自发死亡)/(最大死亡-自发死亡) × 100%。

[0039] 图10是Western凝胶,显示了晚期人卵巢癌样本表达变化水平的FSHR。通过Western印记 (Santa Cruz#H-190) 分析6个未经选择的人晚期卵巢癌样本中FSHR蛋白表达,并与FSH靶向型CER T细胞敏感OVCAR3细胞进行比较。 β -肌动蛋白抗体, Sigma#A5441

[0040] 图11的图显示FSHCER T细胞消除表达fshr的原位卵巢肿瘤的进展。用FSHR转导的ID8-defb29/vegf-a肿瘤细胞腹膜内激发后第7和14天,携带靶向FSHR的cars (FSH-CER) 的T细胞或相同扩增的模拟对照转导的t细胞 (pBMN) 被腹膜内给药 (n=5只小鼠/组)。比较恶性肿瘤进展。

[0041] 图12的图显示通过使用TALL-103/2细胞产生的经修饰的同种异体或异源人FSH CER T细胞以剂量依赖形式杀伤卵巢肿瘤细胞。用pBMN中的hFSHCER转导TALL-103/2细胞,并保持在含20U/mL的IL-2的培养基中。去除FSH CER-转导的 (■) 或模拟对照转导的 (▲) TALL-103/2细胞的IL-2,24h后,与荧光素酶转导的FSHR⁺人OVCAR-3卵巢癌细胞 (10000/孔) 以指定的效应物 (E) 与靶标 (T) 的比率孵育。设置后4小时,将共培养细胞裂解,并定量荧光素酶信号。特异性溶解的百分比计算为(实验死亡-自发死亡)/(最大死亡-自发死亡) ×

100%。

具体实施方式

[0042] 本文提供的组合物和方法引发针对例如卵巢癌或特征为瘤细胞携带FSH受体(FSHR)的其他癌症(例如,前列腺癌细胞⁵²和转移性肿瘤lesions⁵¹)的保护性抗肿瘤免疫以及预防复发。通过借助于内源配体作为靶向基序的优势而靶向激素受体,阻止针对上皮肿瘤的某些免疫疗法技术获得成功的挑战被攻克。

[0043] 本文使用的技术和科学术语具有与本发明所属技术领域的普通技术人员通常理解相同的含义,并且通过引用出版的教科书,其为本领域技术人员提供说明书中使用的很多术语的一般指导。提供以下定义仅是出于清楚的目的,并且不意图限制请求保护的发明。

[0044] 卵泡刺激素(FSH)哺乳动物繁殖中心激素的,主要产生于垂体前叶中。该激素通过结合质膜卵泡刺激素受体(FSHR)并刺激雌性中卵泡成熟和雌激素产生而发挥其正常生物学作用。在男性中,FSH和FSHR的相互作用刺激塞尔托利细胞增殖并保持正常精子形成。天然存在的FSH激素是α和β亚基两个亚基形成的异二聚体。α亚基也称为CGα,并且是促黄体激素(LH)和甲状腺刺激激素(TSH)共有的。人和其他乳动物种类的FSH的α和β亚基的核酸和氨基酸序列是公众可知的并且能够获得。

[0045] FSHR是选择性表达于女性的卵巢颗粒细胞中的激素受体,并且在卵巢内皮中处于低水平。最重要的是,该表面受体表达于50-70%的卵巢癌,但是不表达于脑中,作为负反馈取决于感应激素。鉴于卵巢切除术是卵巢癌治疗的标准程序,靶向FSHR不应对健康组织造成损伤。

[0046] 本文所用的短语“配体包含FSH序列,所述配体结合FSHR”包括天合适的哺乳动物的然存在的全长FSH序列。配体包含足够的FSH序列而允许通过激素序列和受体之间的天然亲和力方式的配体和FSHR之间的结合。配体不是体或抗体片段,并不以该方式结合受体。如果配体是天然存在的,例如,全长FSH β -FSH α 序列或其天然存在的片段,配体不能在给予配体的个体中诱导免疫原性反应。如果配体包含天然存在的FSH序列的经修饰的全长或片段,在一些实施方案中,修饰不足以在给予配体的个体中诱导任何强烈的免疫原性反应。

[0047] 在一个实施方案中,包含FSH序列的配体是天然存在的全长人FSH,例如,FSH β 序列连接于FSH α 序列。在另一实施方案中,包含FSH序列的配体是连接于天然存在的FSH α 序列的经修饰的FSH β 序列。在另一实施方案中,包含FSH序列的配体是连接于经修饰的FSH α /CG α 序列的经修饰的FSH β 序列。在另一实施方案中,配体是连接于经修饰的FSH α 序列的天然存在的FSH β 序列。在另一实施方案中,当个体哺乳动物是人且目标肿瘤是人肿瘤时,合适的FSH序列是人FSH或人序列的经修饰的形式。或者,配体是经修饰的FSH,例如,通过任选的间隔子连接于天然存在的或经修饰的FSH α 序列的天然存在的或经修饰的FSH β 序列。在另一实施方案中,配体是单独的单一天然存在的或经修饰的FSH β 亚基。在另一实施方案中,配体是天然存在的FSH β 亚基,其通过任选的间隔子序列连接于经修饰的第二FSH β 序列的。在另一实施方案中,配体是经修饰的FSH β 亚基,其通过任选的间隔子序列连接于天然存在的第二FSH β 序列。

[0048] 在另一实施方案中,配体包含天然存在的或经修饰的FSH序列的片段。在另一实施方案中,配体包含天然存在的或经修饰的FSH β 序列的片段。在另一实施方案中,配体是连接

于经修饰的FSH α 亚基或其片段的天然存在的FSH β 亚基。在另一实施方案中，配体是连接于天然存在的或FSH α 亚基的经修饰的FSH β 亚基或其片段。在另一实施方案中，配体包含连接于一起的天然存在的或经修饰的FSH β 序列的片段。

[0049] “天然存在的”表示该序列是在选定哺乳动物中存在的天然核酸或氨基酸序列，包括哺乳动物种类的不同成员之间存在的序列中各种核酸和/或氨基酸位置的任何天然存在的变体。

[0050] “修饰的”表示参考序列，例如，FSH或其片段或FSH β 连接于FSH α 核酸或氨基酸序列或任一亚基序列单独地已被故意处理。合适的修饰包括使用比天然存在的全长激素更短的序列片段。这样的修饰包括核酸序列的改变以包含优选密码子，其可以编码与天然氨基酸序列中存在的相同或相关氨基酸。修饰还包括核酸或氨基酸序列的改变以引入保守型氨基酸改变，例如，从一个带电或中性氨基酸向不同的带电氨基酸的改变。这样的修饰还可以包括使用具有或不具有FSH α 序列的FSH β 和不与FSH β 或FSH α 一起天然存在的其他序列故意创造融合物。修饰还包括使用故意插入的间隔子序列连接亚基或将亚基片段连接在一起或将重复片段或亚基以非天然存在的融合物连接在一起。

[0051] 作为一个实例，包含信号序列的天然存在的人FSH β 核酸序列包含SEQ ID NO:1的核酸1-387或由其组成，氨基酸序列为SEQ ID NO:2的氨基酸1-129。FSH β 信号序列自身包含SEQ ID NO:1的核酸1-54或由其组成，氨基酸序列为SEQ ID NO:2的氨基酸1-18。成熟FSH β 包含SEQ ID NO:1的核酸55-38或由其组成，氨基酸序列为SEQ ID NO:2的氨基酸19-129。

[0052] 作为用于本文的方法和组合物的另一实例，成熟人FSH β 核酸序列包含SEQ ID NO:3或7的核酸4-336或由其组成，氨基酸序列为SEQ ID NO:4或8的氨基酸2-112。作为用于本文的方法和组合物的另一实例，人FSH β 核酸序列的有用的片段包含FSH β SEQ ID NO:1的核酸55-99、FSH β SEQ ID NO:1的核酸153-213、FSH β SEQ ID NO:1的核酸207-249、或FSH β SEQ ID NO:1的核酸295-339或由上述序列组成。作为用于本文的方法和组合物的另一实例，人FSH β 氨基酸序列有用的包含FSH β SEQ ID NO:2的氨基酸19-33、FSH β SEQ ID NO:2的氨基酸51-71、FSH β SEQ ID NO:2的氨基酸69-83、或FSH β SEQ ID NO:2的氨基酸99-113、或由上述序列组成。

[0053] 在配体还包含FSH α 序列的一些实施方案中，天然存在的人FSH α 核酸序列包含SEQ ID NO:1的核酸433-801或由其组成，氨基酸序列为SEQ ID NO:2的氨基酸145-267。在用于本文的方法和组合物的另一实施方案中，人FSH α 核酸序列包含SEQ ID NO:3的核酸382-750或由其组成，氨基酸序列为SEQ ID NO:4的氨基酸128-250。在用于本文的方法和组合物的另一实施方案中，人FSH α 核酸序列的片段包含SEQ ID NO:7的核酸382-657或由其组成，氨基酸序列为SEQ ID NO:8的氨基酸128-219。

[0054] 应当理解，上文所述的施加于这些片段的氨基酸修饰物或核酸修饰物也是该方法中有用的配体。配体不结合抗体或抗体片段-抗原复合物中的FSH。如上文所述，本文所述配体利用天然激素(或天然激素的经修饰的形式)与其受体之间的天然亲和力进行结合。因为配体是天然激素或其经修饰的形式，因此其被设计为避免诱导个体中的抗原反应。

[0055] 术语“连接子”和“间隔子”可交换使用，并且指编码具有足够长度来分隔两个组分的肽的核酸序列和/或指所述肽自身。可以根据连接子所要施加的用途选择连接子的组成和长度。在一个实施方案中，用于分隔FSH α 和FSH β (天然存在的序列或经修饰的序列或片

段)的氨基酸连接子的长度为2至70个氨基酸,包括该范围内的任何数值。例如,在一个实施方案中,连接子的长度为10个氨基酸。在另一实施方案中,连接子的长度为15个氨基酸。在其他实施方案中,连接子的长度为25、35、50或60个氨基酸。参见,例如,上文表1-4描述的序列所限定的间隔子/连接子。

[0056] 因此,编码连接子或间隔子的核酸序列由长度6至210个核苷酸组成,包括该范围内的所有数值。在一些实施方案中,连接子包含多个甘氨酸残基或编码它们的核酸。在一些实施方案中,氨基酸连接子包含多个丝氨酸残基或编码它们的核酸。在其他实施方案中,连接子包含多个胸腺嘧啶残基或编码它们的核酸。在其他实施方案中,连接子和间隔子包含丝氨酸、胸腺嘧啶和甘氨酸残基的任意组合。其他连接子可以容易地根据用途设计。

[0057] 本文所用的“载体”包含任何遗传元件,包括但不限于裸DNA、噬菌体、转座子、粘粒、附加体、质粒、细菌或病毒,其表达或被导致表达希望的核酸构建体。

[0058] 本文所用的术语“个体”或“患者”指雄性或雌性哺乳动物,优选人。但是,哺乳动物个体也可以是兽医或农场动物、驯养动物或宠物,以及常用于临床研究的动物。在一个实施方案中,这些方法和组合物的个体是人。

[0059] 如本领域所知,本文所用的术语“癌症”表示特征为不受调控的细胞生长或增殖的任何疾病、状态、性状、基因型或表型。“癌细胞”以不受控的生长异常分裂和复制的细胞。该细胞能从其原始部位(例如,肿瘤)离开,移动至机体的其他部分并建立另一部位(例如,另一肿瘤),这样的过程称为转移。“肿瘤”是来自不受控的且进行性的过度细胞分裂的异常组织块,并且也成为赘生物。肿瘤可以是良性的(非癌性)或恶性的。本文所述的组合物和方法可用于治疗癌症和肿瘤细胞,即,恶性和良性肿瘤,只要待治疗的细胞表达FSHR。因此,在本文所述的方法和组合物的各种实施方案中,癌症可以包括但不限于乳腺癌、肺癌、前列腺癌、结肠直肠癌、食道癌、胃癌、胆囊癌、胰腺癌、肾癌、宫颈癌、肝癌、卵巢癌和睾丸癌。

[0060] 本文所用的术语“药学可接受载体”或“稀释剂”意图包括与人的给药相容的任何和全部溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟基剂、助剂等。在一个实施方案中,稀释剂是盐水或缓冲盐水。术语“a”或“an”指一个或多个,例如,“抗肿瘤T细胞”被理解为代表一个或多个抗肿瘤T细胞。因此,术语“a”(或“an”),“一个或多个”和“至少一个”在本文中可交换使用。本文所用的术语“约”修饰参考数值,并且包括该参考数值的±0.01%高至±10%的全部数值以及这些端点内的所有数值并包括这些端点,例如,±.5%,±1%,±5%等。使用语言“包含”展示说明书中的各种实施方案,“包含”包括其他组分或方法步骤。当使用“包含”时,应当理解为相关实施方案包括使用“由…组成”术语的描述,其排除其他组分或方法步骤,和“本质上由…组成”术语的描述,其排除实质上改变实施方案或发明的性质的任何组分或方法步骤。

[0061] 在一个实施方案中,本发明提供编码包含配体的嵌合蛋白的核酸序列,所述配体包含结合人FSHR FSH序列的,所述核酸序列连接于编码T细胞活化功能的核酸序列。如上文更详细地描述,在一些实施方案中,配体是具有两个亚基的天然存在的FSH、FSH的单个亚基、仅FSHβ亚基、FSHα/CGα或FSHβ片段、或上述序列的经修饰的形式。

[0062] 在一个实施方案中,可以通过将上文所述配体与编码设计已知嵌合抗原受体(CAR)中有用的组分的核酸序列连接来提供T细胞活化功能。参见,例如,Sadelain,M et al, "The basic principles of chimeric antigen receptor (CAR) design" 2013 April,

Cancer Discov. 3 (4) :388-398; 国际专利申请公布 WO2013/044255, 美国专利申请公布 US2013/0287748 号和涉及使用这些嵌合蛋白的其他出版物。通过引用的方式并入这些出版物以提供关于在设计本文所述的某些构建体有用的各种组分的信息。这样的 CAR T 细胞是经遗传修饰的淋巴细胞, 表达允许它们识别选定抗原的配体。在抗原识别后, 这些经修饰的 T 细胞通过将这些 T 细胞转化为强细胞杀伤者的信号转导结构域而被活化。超过内源 T 细胞的优势在于, 它们不受 MHC 限制, 这允许这些 T 细胞通过降低 MHC 表达¹⁹ 克服很多肿瘤细胞中使用的免疫监视逃避策略。

[0063] 例如, 可以通过将配体通过任选的间隔子连接于跨膜结构域、共刺激信号转导区和/或信号转导胞内结构域来提供这样的 T 细胞活化功能。

[0064] 因此, 本文所述方法中有用的核酸序列的一个实施方案示例于本文图 5 的 SEQ ID NO:1 和表 1。核酸序列或 CER 构建体包含由以下形成的配体: 由 18 个氨基酸的人 FSH β 信号序列和 120 个氨基酸的成熟 FSH β 形成的天然存在的人 FSH β 序列, 连接于 15 个氨基酸的间隔子, 并且连接于天然存在的 123 个氨基酸的 FSH α 序列。CER 构建体还包括其他组分, 即, 胞外铰链结构域、跨膜结构域、人胞内区和信号转导胞内结构域。对于图 5 的构建体, 例如, 铰链区和跨膜结构域来自人 CD8 α , 人胞内区来自 4-1BB, 信号转导结构域为人 CD3 ζ 结构域。

[0065] 可用作这样的核酸构建体的其他实施方案可以包括具有不同配体的构建体, 例如上文所述的配体之一在一个实施方案中, 图 5 所述同一构建体中的 FSH α 序列可以为缩短的序列, 具有 SEQ ID NO:7 的核苷酸 382-657 的核酸序列, 和 SEQ ID NO:8 的氨基酸 128-219 的氨基酸序列。图 5 的构建体中使用的配体另一实施方案的可以包含缺少 SEQ ID NO:2 的信号序列氨基酸 2-18 的 FSH β 序列。可以通过将表 1 的配体部分替换为上文讨论的任何配体、修饰的、天然存在的或片段容易地设计与图 5 的核酸构建体相似的实施方案。

[0066] 与图 5 相似的核酸构建体的其他实施方案可以采用不同组分, 例如上文引用的 Sadelain et al 或通过引用的方式并入本文的专利公开中详细描述的那些。例如, 当采用铰链结构域时, 其他天然存在的或合成的铰链结构域, 包括免疫球蛋白铰链区, 例如来自 IgG1 的铰链区, 免疫球蛋白的 C_{H2}CH₃ 区, CD3 的片段等。与图 5 相似的核酸构建体的其他实施方案可以采用获自 T 细胞受体的不同天然存在的或合成的跨膜结构域。各种跨膜蛋白含有本文所述构建体中有用的结构域。例如, 获自 T 细胞受体的跨膜结构域、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137 或 CD154 已被注意到是有用的。

[0067] 与图 5 相似的核酸构建体的其他实施方案可以采用不同天然存在的或合成的胞内区, 包括共刺激信号转导区以及本领域已知的其他。共刺激信号转导区可以为细胞表面分子的胞内结构域(例如, 共刺激分子), 例如 CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关的抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3。参见, 例如, 上文引用的出版物列出的其他分子。

[0068] 与图 5 相似的核酸构建体的其他实施方案可以采用不同天然存在的或合成的胞质信号转导结构域包括源自 CD3 ζ 、TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD25、CD79a、CD79b 和 CD66d 等的那些胞质信号转导结构域以及本领域中已知的其他胞质信号转导结构域。

[0069] 在给予本文提供的教导并和使用本领域已知的信息后, 可以设计例如图 5 的核酸

构建体的任何数量的变化形式,用于本文所述方法。

[0070] 因此,本文所述另一组成部分是包含配体的嵌合蛋白,配体包含FSH β 序列或所述FSH序列的修饰物或片段,该配体结合人FSHR,配体连接于具有T细胞活化功能肽或蛋白。这样的嵌合蛋白包含上文所述的结合人FSHR的配体,配体连接于胞外铰链结构域、跨膜结构域、共刺激信号转导区和信号转导胞内结构域。示例性嵌合蛋白由上文所述核酸序列编码。这样的嵌合蛋白的一个实施方案是图5所示的SEQ ID NO:2。利用本文鉴定的各种配体可容易地设计其他嵌合蛋白,例如,一个或多个上文详细鉴定出的FSH β 片段或本文鉴定的其他FSHR结合配体替代SEQ ID NO:2具体示例的配体。

[0071] 在另一实施方案中,有用的CER构建体是编码配体的核酸序列,如上文所述,所述配体包含FSH β 序列或所述FSH序列的修饰物或片段,所述配体结合人FSHR,所述核酸序列连接于编码结合肿瘤相关的NKG2D受体的配体的核酸序列。参见,例如,图6A。一种这样的NKG2D配体称为Leta1或ULBP4。Leta1由SEQ ID NO:3的核苷酸796-1365的核酸序列编码,并具有SEQ ID NO:4的氨基酸266-454的氨基酸序列。参见,例如,Conejo-Garcia, J et al., "Leta1, A Tumor-Associated NKG2D Immunoreceptor Ligand, Induces Activation and Expansion of Effector Immune Cells" July 2003, *Cancer Biol. & Ther.*, 2(4):446-451; 和美国专利申请公布20060247420号,通过引用的方式将上述文献并入本文。在本说明书中,其他NKG2D配体或Leta1序列氨基酸修饰物、核酸水平的修饰物或功能片段可以替换示例性Leta1序列。

[0072] 另外,任选地,这些FSHR结合配体和NKG2D配体是通过上文所示合适的间隔子或连接子连接。

[0073] 这样的核构建体的具体实例提供于图6A,图6B,表2,SEQ ID NO:3,图6D,表4,SEQ ID NO:7和图8。在图7B的实施方案中,FSHR结合配体由天然存在的人FSH β 序列连接于15个氨基酸的间隔子,再连接于天然存在的123个氨基酸的FSH α 序列形成,天然存在的人FSH β 序列由来自信号序列的单个氨基酸蛋氨酸,随后为120个氨基酸的成熟FSH β 形成。该配体再通过另一15个氨基酸的间隔子连接于Leta1。在图6D的实施方案中,FSHR结合配体由天然存在的人FSH β 序列,连接于15个氨基酸的间隔子,再连接于经修饰的FSH α 序列(即,SEQ ID NO:8的氨基酸128-219的片段,由SEQ ID NO:7的核苷酸382-657编码)形成,天然存在的人FSH β 序列由来自信号序列的单个氨基酸蛋氨酸,随后为120个氨基酸的成熟FSH β 形成。该配体再通过另一15个氨基酸的间隔子连接于Leta1。

[0074] 可用作这样的核酸构建体的其他实施方案可以包括具有不同配体编码序列(例如编码上文所述配体之一的序列)的图6B和6D的构建体。在一个实施方案中,图6B所述相同构建体中的FSH α 序列可以为单个或多个拷贝具有或不具有信号序列的全长FSH β 。作为另一实例,图6B和6D构建体可以含有由人FSH β 片段形成的配体,所述人FSH β 片段由以下核酸序列编码:所述核酸序列包含FSH β SEQ ID NO:1的核酸55-99,FSH β SEQ ID NO:1的核酸153-213,FSH β SEQ ID NO:1的核酸207-249,或FSH β SEQ ID NO:1的核酸295-339,或由上述序列组成。配体可以由这些片段单独、组成在一起组成,或替代全长FSH β 并因此通过连接子与图6B或6D的FSH α 序列融合。可以通过将表2或4的配体部分替换为上文讨论的任何配体,修饰的,天然存在的或片段容易地设计与图6B或6D的核酸构建体相似的实施方案。

[0075] 因此,另一方面是由上文所述核酸序列编码的嵌合或双特异性蛋白,并包含配体,

所述配体包含本文所述的FSH β 序列或所述FSH序列的修饰物或片段,所述配体结合人FSHR,所述配体连接于结合NKG2D的配体。这些蛋白主要用的是蛋白形式,并且在体内发挥功能而将内源淋巴细胞和FSHR $^+$ 肿瘤细胞引到一起。

[0076] 在其他方面,提供携带上文所述核酸构建体的重组载体。核酸构建体可以携带于基于质粒的系统或复制或非复制重组病毒载体中,并且嵌合蛋白可以表达于基于质粒的系统或复制或非复制重组病毒载体中,基于质粒的系统中有很多是可商业购买的。本文讨论的核酸序列可以在希望的宿主细胞中使用这些载体体外表达和产生或体内表达和产生。因此,在一个实施方案中,载体为非致病性病毒。在另一实施方案中,载体为非复制病毒。在一个实施方案中,理想的病毒载体可以为逆转录病毒载体,例如慢病毒载体。在另一实施方案中,理想的载体是腺病毒载体。在另一实施方案中,合适的载体是腺相关病毒载体。腺病毒、腺相关病毒和慢病毒通常是优选的,因为它们主动感染分裂以及静止和分化的细胞,例如干细胞,巨噬细胞和神经元。多种腺病毒、慢病毒和AAV株可获自美国典型微生物收集中心(American Type Culture Collection, Manassas, Virginia)或通过向多种商业和学术来源申请来获得。此外,很多这样的病毒株的序列可获自多种数据库,包括例如PubMed和GenBank。

[0077] 在一个实施方案中,使用慢病毒载体。有用的载体为马感染性贫血病毒和猫以及牛免疫缺陷病毒,和基于HIV的载体。多种有用的慢病毒载体,以及产生用于转导细胞和表达异源基因的这些载体的方法和处理,例如,N Manjunath et al, 2009 Adv Drug Deliv Rev., 61 (9) :732-745; Porter et al, N Engl J Med. 2011 Aug 25; 365 (8) :725-33)。

[0078] 在另一实施方案中,本文所用载体为腺病毒载体。可以使用一种或多种任意已知腺病毒血清型的腺病毒DNA构建这样的载体。参见,例如,T. Shenk et al, Adenoviridae: The Viruses and their Replication", Ch. 67, in FIELD'S VIROLOGY, 6th Ed., edited by B. N. Fields et al, (Lippincott Raven Publishers, Philadelphia, 1996), p. 111-2112; 6,083,716,其描述两种黑猩猩腺病毒的基因组;美国专利7,247,472号; WO 2005/1071093等。本领域技术人员能容易地构建合适的腺病毒载体,以携带和表达本文所述的核酸构建体。在另一实施方案中,本文所用载体为腺相关病毒(AAV)载体。可以使用一个或多个已知AV血清型的AAV DNA构建这样的载体。参见,例如,美国专利7,803,611号;美国专利7,696,179美国专利等。

[0079] 在另一实施方案中,本文所用载体为细菌载体。在一个实施方案中,细菌载体为单核细胞增多性李斯特氏菌。参见,例如,Lauer et al, Infect. Immunity, 76 (8) :3742-53 (Aug. 2008)。因此,在一个实施方案中,细菌载体是活体减毒的或光化学失活的。可以由细菌重组表达嵌合蛋白,例如,通过导入细菌的质粒,或整合入细菌基因组,即,通过同源重组。

[0080] 这些载体还包括允许转染有质粒载体或感染有病毒载体的细胞中的核酸构建体的转录、翻译和/或表达的常规控制元件。多种表达控制序列是本领域已知的并且可以使用,包括天然、组成型、诱导型和/或组织特异型启动子。在一个实施方案中,启动子的选择是基于选定的载体。在另一实施方案中,当载体是慢病毒时,启动子是U6、H1、CMV IE基因、EF-1 α 、泛素C或磷酸甘油激酶(PGK)启动子。在另一实施方案中,当载体是AAV时,启动子为RSV、U6或CMV启动子。在另一实施方案中,当载体是腺病毒时,启动子为RSV、U6、CMV或H1启

动子。在另一实施方案中,当载体是单核细胞增多性李斯特氏菌时,启动子为hly或actA启动子。其他常规表达控制序列包括选择标记基因或报告基因,其可以包括编码遗传霉素、潮霉素、氨苄青霉素或嘌呤霉素抗性的序列等。载体的其他组分可以包括复制起点。

[0081] 这些和其他启动子和载体元件的选择是常规的,并且很多这样的序列是可获得的(参见,例如,本文引用的文献)。

[0082] 使用本文提供的技术和序列并结合本领域技术人员已知的技术产生这些载体。这些技术包括常规cDNA克隆技术,例如教科书中描述的技术(Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY), 使用重叠寡核苷酸序列,聚合酶链式反应,以及提供希望的核苷酸序列任何合适的方法。

[0083] 因此,在一个实施方案中,使用本文教导的和公众可知的信息和已知的载体构建组分和技术,本领域技术人员能构建表达希望的核酸构建体的病毒载体(或质粒)。由这些核酸构建体编码的嵌合蛋白可以体外或宿主细胞中离体表达,或通过给予哺乳动物个体而体内表达。或者,可以通过已知化学合成方法以合成方式产生嵌合蛋白。根据组分、方法的效率和预期用途,本领域技术人员能选择合适的方法来产生这些嵌合蛋白,例如,是作为蛋白、核酸或以过继性T细胞给药,或其他方式来实现希望的治疗结果。

[0084] 另一方面,提供经修饰的人T细胞,其包含编码包含配体的嵌合蛋白的核酸序列,配体结合人FSHR,所述核酸序列连接于编码T细胞活化功能的核酸序列。在一个实施方案中,这些后面的核酸序列以药学可接受载体编码胞外铰链结构域、跨膜结构域、共刺激信号转导区和信号转导胞内结构域。

[0085] 经修饰的T细胞为已被一种上文所述携带编码嵌合蛋白的核酸构建体的载体转导或转染的T细胞。理想情况下,T细胞为原代T细胞、CD8(细胞毒性)T细胞,或NK T细胞或获自经修饰的T细胞被给予的同一哺乳动物个体的其他T细胞,或获自哺乳动物种类另一成员的其他T细胞。在一个实施方案中,T细胞为获自个体或个体的骨髓移植匹配体的自体人T细胞或自然杀伤(NK)T细胞。其他合适的T细胞包括获自切除的肿瘤的T细胞,多克隆或单克隆肿瘤反应性T细胞。T细胞通常通过分血法(apheresis)获得,并用选择的核酸构建体转染或转导而体内表达嵌合蛋白。

[0086] 其他合适的T细胞包括同种异体或异源T细胞,其可用作携带本文所述核酸构建体的通用T细胞平台。在一个实施方案中,可以选用人细胞毒性T细胞。TALL-104和TALL-103/2细胞是CD3响应性淋巴细胞,分别为CD3⁺TCR $\alpha\beta^+$ 和CD3⁺TCR $\gamma\delta^+$,源自儿童T细胞白血病,其展示主要组织相容性复合体非限制性,NK细胞受体介导的杀肿瘤活性,主要依赖于NKG2D⁵⁹,^{60,61}。TALL细胞展示NKG2D依赖性的宽范围的肿瘤靶标反应性。被辐射的TALL-104细胞由于其自发性(NK样)细胞溶解活性和安全性而已被用于治疗转移性乳腺和卵巢癌。

[0087] 这些经修饰的T细胞,无论是自体的或内源的,通过信号转导结构域被活化,信号转导结构域将这些T细胞转化为有效细胞杀伤者。自体的细胞相比内源T细胞的优势在于,它们不受MHC限制,这允许这些T细胞通过降低MHC表达克服很多肿瘤细胞中使用的免疫监视逃避策略。诸如TALL细胞的内源细胞具有的优势在于,它们是通用的,适应于规模性制备、标准化和进一步细胞工程技术而靶向FSHR⁺卵巢癌。

[0088] 在另一实施方案中,经修饰的T细胞还被离体工程化而抑制、消除或降低叉头框蛋白(Foxp1)表达的。在一个实施方案中,T细胞先被工程化或处理来降低Foxp1,然后用上文

所述核酸序列转染T细胞,所述核酸序列编码包含配体的嵌合蛋白,所述配体包含天然存在的或经修饰的FSH序列或其片段,所述配体结合人FSHR,所述配体连接于其他T细胞刺激或靶向序列。在另一实施方案中,用编码本文所述的嵌合蛋白或双特异性蛋白的核酸序列转染T细胞之后,进行处来降低或消除Foxp1。在一个实施方案中,T细胞被预处理,使得当T细胞被递送至个体后不表达Foxp1。最理想的情况是,经修饰的T细胞中的Foxp1被消除。可以用以下处理T细胞:锌指核酸酶、类转录激活因子效应物核酸酶(TALEN)、CRISPR/Cas体系或工程化大范围核酸酶再工程化归巢内切酶以及被优化和设计为靶向独特Foxp1序列而将缺陷引入Fox-P1基因组序列或缺失Fox-P1基因组序列的序列。通过借助内源DNA修复机制的优势,在过继性转移之前,这些试剂从经修饰的T细胞移除Foxp1。或者,可以用设计为抑制、降低、下调或消除Foxp1的表达的另一核酸序列共转染T细胞。参见,例如,国际专利申请公布W02013/063019,通过引用的方式将上述文献并入本文。也可以在通过引入核酸构建修饰体T细胞之前或之后,使用这些技术的各种组合。

[0089] 通常,当通过向T细胞转染递送载体时,载体的递送量为向约 1×10^4 细胞至约 1×10^{13} 细胞递送约5 μ g至约100 μ g DNA。在另一实施方案中,载体的递送量为向 1×10^4 细胞至约 $\times 10^{13}$ 细胞递送约10至约50 μ g DNA。在另一实施方案中,载体的递送量为向约 10^5 细胞递送约5 μ g至约100 μ g DNA。但是,可以调整载体DNA与T细胞的相对量,考虑的因素例如选择的载体、选取的递送方法和宿主细胞。可以过本领域已知的或上文公开的任何手段将载体引入T细胞,包括转染、转化、感染、extrapolation或直接DNA注射。核酸构建体可以被稳定地并入宿主细胞的基因组、作为附加体稳定地表达、或瞬时表达。

[0090] 得到的经修饰的T细胞被制备为表达以合适的药学载体用于过继性治疗的核酸构建体。但是,如上文所述,嵌合双特异性蛋白可以作为蛋白在合适的药学载体中给药。

[0091] 上文所述全部组合物和组分可以用于本文所述方法来治疗本文所述的癌症和刺激抗肿瘤免疫活性。因此,提供治疗人类个体的癌症的方法,包括以药学可接受制剂或载体给予个体任何如上文所述的组合物。

[0092] 在一个实施方案中,通过所述方法治疗的个体是患有表达FSH的癌症的个体,包括上文列出的那些癌症。在另一实施方案中,在给予本文所述组合物之前,具有表达FSHR的癌症或肿瘤细胞的个体已被手术治疗来切除问题肿瘤。在一个实施方案中,个体为患卵巢癌的女性。在另一实施方案中,患卵巢癌的女性个体已被手术治疗来移除卵巢、输卵管和/或子宫。在施用这些方法之前或之后,患有上文列举的任何其他癌症的个体可以通过合适的手术进行治疗。

[0093] 在一个实施方案中,个体被给予包含上文所述的核酸构建体的组合物。在另一实施方案中,个体被给予包含上文所述的嵌合蛋白的组合物。在一个具体实施方案中,治疗人类个体的癌症的方法包括给予有需要的个体包含配体的双特异性蛋白,所述配体包含FSH β 序列,所述配体结合人FSHR,所述配体连接于结合NKG2D的配体。在另一实施方案中,组合物为携带核酸构建体的病毒载体,从而允许体内感染。

[0094] 在另一实施方案中,治疗人类个体的癌症的方法包括给予有需要的个体经修饰的人T细胞,所述T细胞包含编码嵌合蛋白的核酸序列,所述嵌合蛋白包含FSH序列,所述FSH序列的修饰物或片段,所述配体结合FSHR,所述核算序列连接于编码T细胞活化功能的核酸序列。在一个实施方案中,T细胞活化功能由编码胞外铰链结构域、跨膜结构域、共刺激信号转

导区和信号转导胞内结构域的核酸序列提供。在一个实施方案中,经修饰的T细胞表达本文所述的任何核酸构建体。在一个示例性实施方案中,经修饰的T细胞表达图5的核酸构建体或本文所述的相似构建体。在另一实施方案中,在给药后,经修饰的T细胞不表达叉头框蛋白(Foxp1)。在另一实施方案中,经修饰的T细胞携带表达或共表达消除或降低Foxp1表达的序列的核酸构建体。

[0095] 在另一实施方案中,经修饰的人T细胞与临床可获得的PD-1抑制剂一起给药。在另一实施方案中,经修饰的人T细胞与临床可获得的包括TGF- β 抑制剂(包括阻断抗体)一起给药。在另一实施方案中,经修饰的人T细胞与临床可获得的IL-10抑制剂一起给药。

[0096] 这些治疗方法被设计为增强T细胞的治疗活性和延长癌症患者的存活。通过这些方法给予的治疗组合物,例如,单独的核酸构建体、在病毒载体或纳米颗粒中、作为嵌合或双特异性蛋白或作为用于过继性治疗处理的经修饰的抗肿瘤T细胞,被系统性给药或直接给予至个体的癌细胞的环境或肿瘤微环境。常规和药学可接受的给药途径包括但不限于系统性途径,例如腹膜内、静脉内、鼻内、静脉内、肌肉内、气管内、皮下和其他胃肠外给药途径或肿瘤内或淋巴结内给药。如果需要的话,可以组合给药途径。在一些实施方案中,周期性地重复给药。在一个实施方案中,腹膜内给予组合物。在一个实施方案中,静脉内给予组合物。在另一实施方案中,肿瘤内给予组合物。

[0097] 这些治疗组合物可以被给予患者,优选悬浮于生物相容的溶液或药学可接受递送介质。组合物的各种组分被制备为药通过悬浮或溶解于药学或生理学可接受的载体来进行给,例如等渗盐水,等渗盐溶液或本领域技术人员容易获知的这样给药的其他制剂。合适的载体对于本领域技术人员是可简单确定的,并且很大程度上取决于给药途径。已知可作为药学可接受载体的和本领域技术人员公知的其他水性和非水性等渗无菌注射溶液以及水性和非水性无菌悬液可以用于该目的。

[0098] 这些治疗组合物的剂量主要取决于某些因素,例如组合物类型(即,T细胞、载体、核酸构建体或蛋白),待治疗的疾病状态,患者的年龄、体重和健康水平,并且可以在患者之间有所不同。在一个实施方案中,以 2×10^6 至 200×10^6 个经修饰的T细胞的多个剂量给予含有经修饰的T细胞的组合物。可以选择之间的任何值,取决于个体患者的状态和应答。作为另一实例,过继性转移的抗肿瘤T细胞的数目可以由本领域技术人员优化。在一个实施方案中,这样的剂量范围可以为每公斤个体体重约 10^5 至约 10^{11} 细胞。在另一实施方案中,抗肿瘤T细胞的剂量为每公斤体重约 1.5×10^5 细胞。在另一实施方案中,抗肿瘤T细胞的剂量为每公斤体重约 1.5×10^6 细胞。在另一实施方案中,抗肿瘤T细胞的剂量为每公斤体重约 1.5×10^7 细胞。在另一实施方案中,抗肿瘤T细胞的剂量为每公斤体重约 1.5×10^8 细胞。在另一实施方案中,抗肿瘤T细胞的剂量为每公斤体重约 1.5×10^9 细胞。在另一实施方案中,抗肿瘤T细胞的剂量为每公斤体重约 1.5×10^{10} 细胞。在另一实施方案中,抗肿瘤T细胞的剂量为每公斤体重约 1.5×10^{11} 细胞。这些方法也考虑这些具体量内的其他剂量。

[0099] 在另一实施方案中,病毒载体的治疗有效的成人或兽医剂量通常的范围是约 100μ L至约 100mL 载体,所述载体含有浓度为约 1×10^6 至约 1×10^{15} 个颗粒,约 1×10^{11} 至 1×10^{13} 个颗粒,或约 1×10^9 至 1×10^{12} 个颗粒的病毒。

[0100] 含有蛋白的组合物的给药可以范围为 0.01mg 至 100mg 蛋白的单位剂量(等同于约 $12.5\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重)。

[0101] 确定给药的频率时机(加强剂)的方法会包括评价肿瘤对给药的相应。

[0102] 在其他实施方案中,通过给予本文所述组合物治疗癌症的这些方法是与癌症的各种其他处理或治疗的联合治疗的一部分。

[0103] 在一个实施方案中,方法包括给予例如IL-7的细胞因子治疗作为肿瘤特异性宿主条件化策略。外源给予IL-7还能特异性地提高Foxp1缺陷型T细胞的体内活性。在另一实施方案中,方法还包括给予个体本文所述组合物以及附加抗癌治疗,附加抗癌治疗可以包括单克隆抗体、化学疗法、放射治疗、细胞因子或它们的组合。在另一实施方案中,本文的方法可以包括共同给药或治疗过程,其也使用用于癌症的控制和治疗的其他小核酸分子或小化学分子或治疗或治疗剂。在一个实施方案中,本发明的治疗方法包括在适合癌症治疗的条件下使用一种或多种药物治疗。

[0104] 如上文提及的,在一些实施方案中,手术减瘤是去除大肿瘤块的必要操作,并且可以在施用本文所述的方法和组合物之前、过程中或之后进行。

[0105] 在其他实施方案中,化学疗法和放射疗法支持本文所述方法的效果。这样的联合方式(手术加化学疗法/放射加免疫治疗)预期与本文所述方法一起用于治疗很多癌症中会成功。

[0106] 在其他实施方案中,治疗具有表达FSHR的癌症或肿瘤的个体的方法包括在给予本文所述组合物之前实施以下步骤。在一个实施方案中,所述方法包括从个体移除T细胞和用表达嵌合蛋白的载体离体转导T细胞。在另一实施方案中,在用本文所述核酸构建体转导移除的T细胞之前或之后,移除的T细胞被处理为消除或降低T细胞中的Fox-P1表达。在另一方法中,在给药前,移除的、经处理的T细胞被培养以从细胞离体去除Foxp1。另一方法步骤包括在给药前将T细胞配制于合适的药学载体。也可以冷冻移除的、经处理的T细胞,用于后续解冻和给药。

[0107] 治疗方法还可以包括从个体提取T细胞,用于修饰和离体细胞扩增,随后用化学疗法治疗个体并消耗个体的淋巴细胞,以及任选地,手术切除肿瘤。可以在向个体给予经修饰的T细胞或其他组合物之前进行这些步骤。

[0108] 现结合以下实施例描述本发明。提供这些实施例仅是举例说明的目的。在本申请的教导下,可以制备和实施本文公开的和/或请求保护的组合物、实验操作和方法,不需要过度实验。实施例中描述的操作和方法不应考虑为限制请求保护的发明的范围。事实上,本说明书应当解释为涵盖从本文提供的教导能够容易得出的任何和全部变化形式。本领域技术人员应当理解,可以在实施例公开的实施方案中进行这样的改变或变化,并且预期能获得相似结果。例如,与本文所述的试剂在化学或生理学相关的试剂替换预期能产生相同或相似结果。所有这样相似的替换和修饰是本领域技术人员容易获知的,并且落入本发明的范围。

[0109] 实施例1:人和小鼠的靶向FSHR的构建体的制备

[0110] 我们制备了针对小鼠FSHR的新的全鼠源的本文所述的构建体,其包含成功用于人类患者的小鼠形式的全部信号。为了靶向FSHR,我们合成了构建体,其表达信号肽随后为内源FSH的两个亚基(α和β),通过连接子隔开(参见图1)。该靶向基序与以下同框克隆:来自鼠IgG(例如CD8α)的铰链结构域,随后为CD8α的跨膜结构域,共刺激调节物(例如,鼠4-1BB或CD28)的胞内结构域,最后为活化CD3ζ结构域。

[0111] 我们还制备了具有对应人序列的构建体(参见图5,表1,SEQ ID NOS:1和2)。制备表达FSHR的构建体的人变体以界定领袖制剂并证明小鼠中实验的相关性。用含有FSH靶向构建体逆转录病毒或慢病毒储备液转导来自健康供体的人HLA-A2+T细胞(>50%的高加索人为A2+)，所述构建体被优化用于细胞毒性测试。

[0112] 制备与上文所述的小鼠序列相似的同框构建体，以比较CD28与4-1BB/CD137。CD28是可选的胞内共刺激基序，原因在于，虽然在公开的CAR-T细胞实验中，表达4-1BB/CD137的T细胞在异种移植物模型中表现出增强的持久性，未知的是T细胞的长期存活在多次注射中是优选的。另外，测试了人FSH的 α 亚基的两种人变体(NM_000735.3与NM_001252383.1)。这两种亚基具有不同长度，并且具有促进不同结合亲和力的可能性。

[0113] 总之，克隆(同框)用于表达至病毒载体的8种变体为：1) CG α (长)+4-1BB；2) CG α (长)+CD28；3) CG α (短)+4-1BB；和4) CG α (短)+CD28(参见图8)。

[0114] 仅使用FSH的 β 亚基(其提供FSHR结合的特异性)和也结合FSHR的 β 亚基的15个氨基酸的结合区(例如，FSH β 的SEQ ID NO:2的氨基酸19-32的片段或上文鉴定的其他FSH β 片段)设计其他构建体。

[0115] 实施例2：FSH构建体特异性响应于FSHR⁺肿瘤细胞。

[0116] 测试了逆转录病毒(pSFG)与慢病毒(pELNS)载体去将携带FSHR的构建体转导入人T细胞。没有正式的证据表明慢病毒载体在离体转导中是优异的。最重要的是，在十年来安全使用逆转录病毒载体后，关于在T细胞中插入基因之后的插入性肿瘤形成的风险担忧很小。特别是在临床试验中，pSFG载体已被使用很多次用于相似的T细胞逆转录病毒转导^{41,42}。

[0117] 制备表达这些构建体的逆转录病毒或慢病毒储备液，并将其用于转导来自健康HLA-A2供体(>50%高加索人)的人T细胞。逆转录病毒储备液被用于转导CD3/CD28活化的T细胞脾细胞，其被基于共表达GFP进行FACS分选。然后，测试表达实施例1的FSH核酸构建体的经修饰的T细胞针对FSHR或模拟对照转导的ID8-Defb29/Vegf-a卵巢癌细胞的结合特异性。如图2所示，用FSHR靶向构建体转导的T细胞的共同孵育引起IFN- γ 分泌，而携带无关的间皮素靶向构建体(K1)的T细胞未观察到这样的结果。进一步支持FSHR识别的特异性，在模拟对照转导的(天然FSHR)肿瘤细胞的存在下，IFN- γ 分泌不发生。

[0118] 实施例3：表达FSH构建体的T细胞的肿瘤内给药延迟FSHR⁺乳腺肿瘤的进展。

[0119] 为了了解靶向FSHR的经修饰的T细胞在免疫活性小鼠体内的可能功效和安全性的信息，我们还用小鼠FSHR转导A7C11乳腺癌细胞，A7C11乳腺癌细胞是从本体p53/KRas突变的肿瘤产生的细胞系。然后，用侧腹肿瘤攻击同系小鼠，通过腹膜内注射给予等同处理的10⁶靶向FSHR的经修饰的T细胞或模拟对照转导的T细胞。如图3所示，靶向FSHR的经修饰的T细胞的单次给药足以显著延迟建立的侧腹肿瘤的进展，而没有明显副作用。这些结果支持单独使用靶向FSHR的经修饰的T细胞或与其他临床可用免疫治疗组合来对抗卵巢原位肿瘤。

[0120] 相比于使用靶向人FSHR的构建体，在免疫缺陷小鼠中，使用小鼠FSH作为靶向基序对于靶向FSHR的经修饰的T细胞的效果具有更好的预测性，因为：1) 表达小鼠FSH的T细胞可能靶向于表达内源FSHR的身份不明的健康细胞(不同于给予免疫缺陷小鼠的表达人FSH的T细胞)；2) 某些T细胞(例如，CAR-T细胞)能通过经由抗原传播增强预先存在的T细胞应答和降低免疫抑制负荷而加强多克隆抗肿瘤免疫；和3) FSH和其特异性受体之间的相互作用是

高度保守的。

[0121] 为了证实含有FSHR构建体的T细胞特异性针对FSHR+肿瘤细胞的细胞毒性潜力, 我们再次将FSHR构建体或模拟对照转导的T细胞与FSHR⁺ID8-Defb29/Vegf-a33(卵巢肿瘤)或A7C1134(从本体p53/KRas突变的乳腺肿瘤的实验室产生的细胞系34)细胞一起孵育(按40:1的比率, 孵育24h), 并通过计数台盼蓝阴性(活)肿瘤细胞测定细胞毒性杀伤。如图7A和7B所示, FSH CER T细胞消除两种类型的肿瘤细胞, 但是模拟对照转导的淋巴细胞未观察到该结果。在MTS测试中获得相当的结果(未显示), 进一步支持FSH靶向基序能以FSHR特异性方式引发CER介导的T细胞细胞毒性活性。

[0122] 实施例4: 免疫活性宿主的临床前卵巢癌模型中表达FSH配体的经修饰的T细胞的功效与毒性

[0123] 为了界定在免疫活性临床前肿瘤模型中使用靶向FSHR的经修饰的T细胞的免疫学结果, 所述模型包括内源FSH可能结合(在患者中会发生)的全部健康组织, 我们用全部靶向和活化结构域的小鼠对应物制备了新的核酸构建体。参见表3, 图6C和SEQ ID NOS 4和5。

[0124] 我们验证了靶向FSHR的经修饰的T细胞表现出对表达FSHR的细胞选择性活性的假设, 破坏肿瘤进展, 同时在小鼠中不造成明显副作用。这些结果界定了该有前景的治疗对卵巢癌的效果, 并确保其对该方法未来应用于临床的安全性。

[0125] 我们利用侵袭性原位ID8-Vegf/Defb29肿瘤, 其已被小鼠FSHR转导和选择。我们使用转导的母体ID8细胞和/或本体p53依赖性诱导型肿瘤模型或我们衍生的细胞系而证实选择的发现的一般应用性。

[0126] 实施例5: 小鼠临床试验: 界定靶向FSHR的经修饰的T细胞对人卵巢癌的功效

[0127] 我们用全部人结构域制备了构建体(参见图5), 将其用于我们建立的NSG小鼠中原发性肿瘤衍生的异种移植物的队列。通过使用相同患者的肿瘤和T细胞, 我们模拟有限的临床试验, 其概括临床卵巢癌的异质性。我们假设, 靶向FSHR的经修饰的T细胞能有效对抗来自不同患者的建立的FSHR+卵巢癌, 并且与靶向TME的组合式干预协同作用。

[0128] 通过在多种临床前模型中建立靶向FSHR的经修饰的T细胞的功效和可能毒性, 我们提供机制性原理来测试这些T细胞作为针对卵巢癌的潜在治疗。通过使用FSHR作为特异性肿瘤靶标和包含FSH序列作为靶向基序的配体, 我们克服了阻止多种技术对于上皮肿瘤成功的某些挑战。

[0129] 为了界定靶向FSHR的经修饰的T细胞在免疫活性宿主中的体内全谱活性, 我们制备了全鼠源的靶向FSHR的经修饰的T细胞。在肿瘤攻击后7天, (CD45.1+, 同系)用10⁶腹腔注射抗靶向FSHR的经修饰的T细胞治疗(CD45.2+)携带建立的(FSHR+和FSHR-)卵巢肿瘤的小鼠(n≥10/组)。对照小鼠接受模拟对照转导的T细胞。我们比较存活作为公认的功效读数。根据这些结果给予靶向FSHR的经修饰的T细胞的额外注射。在不同小鼠中, 在肿瘤攻击后14、21和28天, 我们追踪(特异性CD45.1+)转移的CD4和CD8 T细胞的归巢和持续性。包括来自脾、引流(纵膈)淋巴结、骨髓和肿瘤床(腹膜清洗)的样品。包括转移淋巴细胞中活化(例如, CD44, CD69, CD27, CD25)与耗竭(例如, PD-1, Lag3)标志物的详细分析。另外, 分析了BM和淋巴结中靶向FSHR的经修饰的T细胞的可能的中枢记忆分化(同系), 作为长期植入和持久保护的可能预测指标。

[0130] 实施例6: 靶向FSHR的经修饰的T细胞对有抗肿瘤免疫的效果

[0131] 我们确定靶向FSHR的经修饰的CER-T细胞通过抗原传播和降低免疫抑制负荷对进行中的抗肿瘤免疫应答的效果。为了该目的,我们用靶向FSHR的经修饰的CER-T细胞和模拟对照转导的T细胞治疗携带肿瘤的小鼠,并且在过继性转移后7和14天(肿瘤后14和21天),FACS分选来自肿瘤和淋巴位置的内源(CD3+CD8+CD45.2+)T细胞。通过IFN γ 和颗粒酶B ELISPOT分析定量可归因于受治疗影响的已有T细胞的抗肿瘤免疫应答的程度。内源T细胞中的活化与耗竭标志物还界定靶向FSHR的经修饰的T细胞的效果。为了界定针对这些组合式干预可能引起的复发的免疫保护,如果小鼠排斥它们的肿瘤,则再次攻击小鼠。

[0132] 实施例7:靶向FSHR的经修饰的T细胞可能诱导的短期和长期毒性

[0133] T细胞过继性转移方案在短期的主要担忧是出现细胞因子释放综合征,其是系统性炎症反应,诱导非感染性发热并且与高水平TNF α 和IL-6相关。

[0134] 除了明显的疾病指征(例如,毛皮褶皱),我们首先监测治疗与对照小鼠的温度和细胞因子水平。如果细胞因子释放综合征频繁出现,我们界定是否使用类皮质激素或IL6清除能使其成为可控事件。没有报道表明FSHR能表达于卵巢或睾丸之外的正常组织;因此,我们预期不会有长期副作用。但是,我们监测治疗小鼠的任何肉眼改变直至治疗后4个月。

[0135] 实施例8:患者衍生的异种移植物的小鼠临床试验

[0136] 我们移植我们收到的新鲜的晚期卵巢癌(约2-3样本/月)。新鲜样本被通过速递在切除后2h内递送,并且通过优化的手术操作将约1mm³的团块移植入NSG(重度免疫缺陷)小鼠的卵巢囊。重要的是,我们收到来自相同患者的外周血,并且立即冷冻保存血沉棕黄层。在最近2个月,我们用7个不同样本攻击约35只小鼠。尽管肿瘤进展缓慢,但是大部分肿瘤在约45天内变得可触感和可见。每月收到约2-3个新的新鲜样本。我们为来自不同患者的 ≥ 10 个原发性肿瘤制备异种移植物。小鼠被用于界定靶向FSHR的经修饰的T细胞对抗异种人卵巢肿瘤的功效。为了该目的,我们CD3/CD2扩增和转导靶向FHSR的构建体至来自相同患者的T细胞,由此模拟其可能的临床应用。

[0137] 我们已用图1所示对应的人内源FSH β 、铰链和跨膜结构域以及共刺激4-1BB和活化CD3 ζ 基序(全人序列-参见图5)制备FSH靶向型经修饰的T细胞。我们通过Western印迹分析确定每种异种移植物中FSHR的表达,从而界定其如何预测功效。来自健康供体的具有匹配HLA的T细胞可以被转导和转移。

[0138] 为了界定靶向FSHR的经修饰的T细胞对抗卵巢癌的功效,我们使用我们的移植人卵巢癌样本(≥ 3 只小鼠/肿瘤;10名不同患者)的自体外周血。扩增T细胞,用靶向人FSHR的核酸构建体或空载体(和/或无关人CAR T19)进行转导,并过继性转移入被同时攻击的携带异种移植物的NSG小鼠。通过触诊和超声监测肿瘤生长,并且当肿瘤通过腹部突出时处死小鼠,或者如果小鼠表现出危急或晚期疾病的指征,则更早地处死小鼠。肿瘤生长、转移和存活被定量为功效读数。界定肿瘤生长如何被影响作为FSHR表达的函数,在匹配手术样本中使用WB分析。我们分解肿瘤样本来确定转移T细胞在存在和缺少靶标(不具有内源淋巴细胞的NSG小鼠)情况下的积累。测定骨髓和淋巴结位置处靶向FSHR的经修饰的T细胞的持续性,并与靶向激素受体(FSHR)的表达和功效相关。

[0139] 实施例9:调节免疫抑制来增强靶向FSHR的经修饰的T细胞活性对抗卵巢癌的效果。

[0140] 针对实体瘤的过继性T细胞转移干预的潜在挑战是TME中的免疫抑制网络消除外

源T细胞的保护性活性的前景。为了调节肿瘤微环境从而降低其免疫抑制效果和增加存活,用靶向FSHR的经修饰的T细胞施加附属方法。为了引发肿瘤排斥和持续保护,靶向FSHR的经修饰的T细胞与临床可获得的PD-1抑制剂联合给药(或对照组中单独的PD1阻断剂)。以肿瘤细胞中PD-L1表达的函数监测功效。或者,我们阻断接受靶向FSHR的经修饰的T细胞的小鼠中卵巢癌微环境的其他免疫抑制通路,包括TGF- β (对其的阻断抗体最近被开发出来)和IL-10。

[0141] 总之,上文实施例证实,我们靶向G蛋白偶联受体(FSHR),其表达于大部分肿瘤的卵巢癌细胞表面并且还未被用于基于T细胞的干预。为了增强特异性和受体:配体相互作用,我们使用内源激素作为靶向基序,从而提供携带这些基序的人对应物的靶向FSHR的经修饰的T细胞的临床测试的机理。我们使用内源配体(激素),与抗FSHR抗体或抗体片段作为配体相反,来确保功效或特异性。我们证实,针对FSHR的经修饰的T细胞是安全的,并且不诱导明显体内毒性。

[0142] 与本申请最相关的是,靶向FSHR+肿瘤细胞的经修饰的T细胞的细胞毒性活性通过抗原传播加强已有淋巴细胞应答,由此加强多克隆抗肿瘤免疫。另外,我们界定whether of 卵巢癌微环境中运行的抑制网络的组合式靶向是否解除靶向FSHR的经修饰的T细胞和来自能抑制其保护性活性的致耐受性通路的肿瘤浸润淋巴细胞的束缚。

[0143] 因此,本申请在多个概念和实验水平上具有创新性。我们利用新鲜的、原位移植的原发性卵巢癌异种移植物的集合来反映人类疾病在FSHR表达和应答变化性方面的异质性。特别是,我们预期上述研究能证实,与接受模拟对照转导的T细胞的对照相比用靶向FSHR的经修饰的T细胞治疗的携带卵巢癌的小鼠如何显著增加存活(甚至在某些病例中肿瘤排斥)。因此,我们与对照T细胞相比在较长的时间段体内鉴定治疗的小鼠中靶向FSHR的经修饰的T细胞。因为骨髓是我们的系统中记忆T细胞的储存库,因此骨髓是我们观察到的持续性靶向FSHR的经修饰的T细胞的微环境。靶向FSHR的经修饰的T细胞对肿瘤珠处的耗竭机制较为不敏感。总之,这些结果被理解为靶向FSHR的经修饰的T细胞的治疗潜能的证据,并且为后续临床测试铺路。

[0144] 数据预期能证明,靶向FSHR的经修饰的T细胞诱导已有T细胞的次优的、但可测量的抗肿瘤活性的显著加强,正如ELISPOT分析所定量的。靶向FSHR的经修饰的T细胞和内源淋巴细胞的联合活性相应地赋予针对排斥建立的肿瘤的那些小鼠的复发保护。这突出了靶向FSHR的经修饰的T细胞在引发对肿瘤复发的多克隆免疫记忆的潜能,即使肿瘤在过程中丢失靶向的FSHR。

[0145] 数据预期能证明对卵巢癌不存在长期(例如,自身免疫)显著不利作用,因为FSHR的表达局限于卵巢(包括所有有核细胞)。我们不能排除以下可能性:靶向FSHR的经修饰的T细胞的急性给药会导致类似感冒的症状,但是这不太可能导致细胞因子释放综合征。总之,这些数据进一步支持在卵巢癌患者中使用靶向FSHR的经修饰的T细胞。

[0146] 数据预期能证明,>50%的原发性肿瘤最终以指数方式在NSG小鼠中生长,并允许依次植入不同小鼠。50-70%的这些肿瘤表达表面FSHR。尽管我们已经证实移植人培养的卵巢细胞(其可以用作备选或补充方式)的可行性,但是这样的资源概括了人类疾病的异质性。

[0147] 数据预期能证明,靶向FSHR的经修饰的T细胞还能有效对抗表达FSHR的异种移植

的人卵巢癌,但不对抗FSHR-肿瘤。因此,我们预计,具有较高FSHR表达水平的肿瘤是更好的响应者。因此,我们发现FSHR^高肿瘤携带宿主中经修饰的T细胞的增强的持久性,更强的浸润(由于FSH诱导的增殖)和较少的耗竭。这些结果进一步支持本文所述的靶向FSHR的组合物的特异性和治疗潜能。

[0148] PD-1抑制剂与靶向FSHR的经修饰的T细胞的组合促进PD-L1+肿瘤的排斥,同时使用个体治疗仅观察到恶性肿瘤进展中显著的延迟。考虑到PD-1阻断剂初现的临床成功,我们预期,它们总体上会优于其他靶向免疫抑制的干预,如论如何这在PD-L1-肿瘤中是更有效的。

[0149] 整合细胞学和分子学免疫疗法的组合式干预具有后续临床测试的明显暗示意义。

[0150] 实施例10:人T细胞中CER变体的表达

[0151] 我们使用来自健康HLA-A2+供体(>50%的高加索人)的分血法的外周血,以最小化当转导的T细胞与(A2+)肿瘤细胞共同孵育时的同种异体反应。我们使用^{5,29,30,44,45}所述的方法和资源。简言之,从分血法产物去除单核细胞,并在5%正常人AB血清中使用偶联抗CD3(OKT3)和抗CD28(克隆9.3)抗体(3:1的珠/CD3+细胞比)的珠扩增T细胞。在刺激后第1天,在retronectin包被的培养板、50UI/mL的IL-2和1ng/mL的IL-7的存在下,将T细胞暴露于编码FSH靶向型构建体变体(MOI~3)的逆转录病毒或慢病毒上清物,随后进行离心接种(1000g,45min,4°C)。第2天,改变培养基并重复离心接种,随后是长达12天扩增。细胞培养完成后,通过磁分离去除磁珠,清洗细胞并重悬于PlasmaLyte A(Baxter)。通过流式细胞术、使用针对表达于感染的细胞外部的人FSHβ的一抗(克隆405326)和PE标记的抗小鼠IgG作为二抗,测定转导效率。优化人HLA-A2+T细胞的转导用于全部变体的细胞毒性测试。

[0152] 实施例11:FSH靶向型CER变体的体外抗肿瘤活性

[0153] 体外荧光素酶分析被用于测试按照上文实施例所述产生的FSH靶向型T细胞变体的功效,即,细胞毒性活性。我们使用人HLA-A2+OVCAR3卵巢癌细胞¹⁹,其也已知为表达高水平的FSHR^{20,46}。通过使用HLA-A2+OVCAR3 T细胞(表达50%的高加索人和35%的非裔美国人中存在的最常见HLA类型),我们可以使用来自多种供体的T细胞,而不会引发同种免疫应答。因此,我们将细胞毒性杀伤的引发限制于FSHR受体的特异性识别。我们还测量了转导的T细胞响应于表达FSHR的肿瘤细胞的IFN-γ产生。表现出最佳的细胞毒性活性和IFN-γ产生组合的两种表达FSHR的T细胞变体被选择用于后续体内测试。

[0154] 用逆转录病毒载体pBABE-1uc-puro的转染使得OVCAR3细胞自发表达萤火虫荧光素酶,并允许嘌呤霉素抗性基因的选择。

[0155] 本文所述的靶向人HLA-A2+ FSH的构建体转导的T细胞被用作效应物。如果多于60%的T细胞被转导,T细胞被认为已准备好用于分析。如果少于60%的T细胞被转导,我们通过FACS分选FSH+细胞来富集转导的T细胞。

[0156] 在克隆选择和扩增表达荧光素酶的OVCAR3(OVCAR3-1uc)后,我们每孔接种10000个细胞,并与表达不同FSH构建体变体的T细胞以1:1、1:5、1:10和1:20的比率(肿瘤细胞:T细胞)共培养。我们还有无T细胞的条件作为阴性对照(无细胞死亡)和用Triton X处理的另一条件作为最大肿瘤细胞死亡的阳性对照。接种细胞共培养后18小时,我们去除培养基,清洗孔,裂解细胞添加荧光素酶底物。我们测量荧光素酶信号的量,以测定OVCAR3-1uc细胞被FSH靶向型CER T细胞的特异性溶解。

- [0157] 实施例12:所有CER T细胞变体中响应于FSHR的IFN- γ 产生
- [0158] 可能对治疗功效重要的另一参数是效应物细胞因子的产生,其可以影响体内免疫环境。
- [0159] 作为补充,我们以1:1、1:10和1:20的肿瘤细胞与T细胞比共培养OVCAR3细胞和表达FSH靶向型构建体的不同变体的T细胞,并在18小时收集上清,用于通过ELISA测定IFN γ 产生。如果时间允许,我们还通过与FSHR+肿瘤细胞孵育的FSH靶向型转染T细胞的胞内染色测定IFN- γ 产生,以及其他细胞因子,例如TNF- α (ELISA) 和颗粒酶B (胞内染色)。
- [0160] 这些实验(至少)以3平行样品进行,并重复3次,以取得统计学显著性($P<0.05$),使用Mann-Whitney检验。我们鉴定两种FSH靶向型构建体转染的T细胞变体,用于下一步研究和体内体系的开发。我们按照优先级选择提供以下的FSH靶向型CER变体:1) 不同比率下最高百分比的特异性OVCAR3-1uc细胞溶解;2) 选择最高水平的IFN- γ 分泌。当在不同比率存在不同最佳候选物时,我们选择在最低比率下具有最高特异性溶解的候选物。如果所有变体表现相似活性,我们优先使用逆转录病毒载体,包括CD28替代4-1BB,和较短的CG α 变体。如果没有差异,我们选择表现较高转导效率的变体。
- [0161] 如果OVCAR3细胞的靶向FSHR的杀伤是次优的,我们使用Caov-3卵巢癌细胞(ATCC# HTB-75),其还共表达FSHR和HLA-A2。在这种情况下,该细胞系用于后续体内测试。
- [0162] 实施例13:卵巢癌异种移植物中体内测试FSHR构建体变体
- [0163] 我们比较上文实施例鉴定的两种领袖CER T细胞变体的体内功效。OVCAR3细胞(HLA-A2+19;FSHR+20)被植入NSG(严重免疫缺陷)小鼠的卵巢囊9。如下所述,用HLA-A2+CER T细胞治疗携带原位肿瘤的小鼠。肿瘤块($\sim 1\text{mm}^3$)来源于TOV-21G卵巢透明细胞癌细胞,植入免疫缺陷小鼠的侧腹,在约1个月内移植入NSG小鼠的卵巢囊。受攻击的卵巢被恶性肿瘤生长占据,并与左对侧卵巢比较。肿瘤(图中未显示)特别具有侵袭性,并生长约21天。我们还用来自相同新鲜分解的原发性卵巢癌样本的肿瘤块(右侧卵巢)或单细胞悬液攻击小鼠。
- [0164] 为了界定FSH靶向型构建体转导的T细胞针对FSHR+卵巢癌的功效,我们使用表现细胞毒性活性和IFN- γ 产生的最佳组合的两种CER T细胞变体。如果所有变体表现相似活性,我们优先使用逆转录病毒载体,包括CD28替代4-1BB,和较短的CG α 变体。通过超声和/或触诊表现相似尺寸的建立的原位卵巢肿瘤的小鼠(≥ 5 只小鼠/组)接受用靶向FSHR的构建体转导的两种变体转导的T细胞,或模拟对照转导的T细胞作为可选对照。如果达到 $<60\%$ 转导,将阳性转导的T细胞进行FACS分选,并允许在治疗前静置2h。在这些分析中给予 10^7 靶向FSHR的构建体转导的T细胞/注射,两次注射间隔14天(腹膜内注射,配制于PBS)。通过触诊和超声监测肿瘤生长,并且当肿瘤通过腹部突出时处死小鼠,或者如果小鼠表现出危急或晚期疾病的指征,则更早地处死小鼠。肿瘤生长、转移和存活被首先定量为公认的功效读数。
- [0165] 实施例14:携带肿瘤的小鼠中两种CER T细胞变体的体内持久性
- [0166] 长期保护相关的重要参数是能在肿瘤复发时产生新一波的T细胞效应物的中枢记忆FSH靶向型构建体转导的T细胞的持久性。为了确定什么样的CER T细胞变体在体内持续更长时间,我们用FSH靶向型构建体转导的T细胞等同地治疗不同生长OVCAR3的小鼠(≥ 5 只小鼠/组),并监测它们聚集和驻留的位置。首先,在过继性转移后14和28天,使用解离的肿瘤组织、骨髓(中枢记忆T细胞的储存库)、淋巴结和脾样品,通过FACS分析测定转移的T细胞

的积累。我们使用人CD3,因为NSG小鼠不具有内源淋巴细胞。测定它们在淋巴和BM位置的记忆归属(CD62L+CD45RA-CD122+CD127+)。如果在FSH靶向型T细胞给药时小鼠排斥肿瘤,我们用OVACR3侧腹肿瘤再攻击它们,并且与天然(未处理)NSG小鼠的肿瘤进展进行比较。

[0167] 基于我们之前的观察,我们预期,每组5只小鼠应当提供5%的显著水平和95%的效力来使用Mann-Whitney或Wilcoxon检验检测20%或更高的差异。实验使用至少5只小鼠/组(加上重复),并且根据这些统计学参数进行分析。由此,我们鉴定FSH靶向型T细胞领袖变体,其被用于最终临床前优化。选择的候选者按照重要性表现以下的组合:1)针对建立的肿瘤生长的最强功效;2)淋巴或骨髓位置的中枢记忆分化;和3)优异的总体体内持久性。

[0168] 基于治疗白血病的临床证据^{12,38,48},我们的理论是,FSH靶向型T细胞的持久性对于长期缓解是重要的。如果FSH靶向型构建体转导的T细胞变体都表达CD28并且不能持续至少2周,我们还测试携带使用4-1BB的构建体的T细胞的体内功效。如果实现相当的肿瘤减小,我们会选择CD28作为共刺激结构域。

[0169] 我们使用Caov-3卵巢癌细胞补充这些实验,Caov-3卵巢癌细胞表达更高水平的FSH受体并且是HLA-A2⁺。

[0170] 实施例15:单剂量给药的最大耐受剂量(MTD)

[0171] 界定MTD的实验计划包括:(1)向携带肿瘤的免疫活性小鼠中给予单剂量(2×10^6 , 10^7 和 5×10^7)小鼠T细胞;(2)向携带人肿瘤的免疫缺陷小鼠中给予单剂量(2×10^6 , 10^7 和 5×10^7)人T细胞;和(3)向无肿瘤免疫活性小鼠中给予单剂量(2×10^6 , 10^7 和 5×10^7)小鼠T细胞。从这些实验获得单剂量MTD之后,进行以下实验:(4)在21、28和32天向携带肿瘤的免疫活性小鼠中给予多剂量MTD(小鼠T细胞);(5)向携带人癌症的免疫缺陷小鼠给予多剂量MTD(人T细胞)(3次,间隔一周);和(6)在0、7和14天向无肿瘤的免疫活性小鼠给予多剂量MTD(小鼠T细胞)。这些实验的结果界定多剂量MTD。

[0172] 这些实验提供后续开发FSH靶向型CER T细胞用于治疗卵巢癌的机理。它们允许鉴定用于临床干预的领袖变体。为了为立即临床测试铺设道路,我们测定我们的FSH靶向型CER领袖的单次输注最大耐受剂量(MTD)。在输注FSH靶向型CER T细胞后,我们评估肿瘤依赖性、FSH受体特异性和非特异性毒性。

[0173] 免疫活性小鼠的体内单剂量逐步升级

[0174] 为了确定单次输注MTD,在携带肿瘤和未携带肿瘤的免疫活性小鼠中进行单剂量逐步升级。因此,虽然NOD/SCID/γ c-/- (NSG) 小鼠是评估CER T细胞对表达FSHR的肿瘤的临床前功效的最佳可用模型,但是小鼠肿瘤异种移植模型对于测定该具体CER T细胞的某些毒理学性质是不相关种类,因为人FSH组分可以不结合正常小鼠FSHR,并因此,该小鼠能过低地预测毒性。由于该原因,我们首先使用待由鼠原代T细胞表达的FSH靶向型CER T细胞构建体,其含有每个鉴定的基序准确的小鼠对应物的。这些初始实验的目的是具有内源(小鼠FSHR)激素受体存在于卵巢和可能身份不明的健康组织的系统。这些研究测试宿主策划炎症反应的能力,这与在存在完整免疫系统的情况下癌症患者中能观察到的现象相似。因为慢病毒不感染小鼠淋巴细胞,所以用逆转录病毒载体实施小鼠原代T细胞中FSH靶向型CER的表达,与I期的结果无关。基于各种临床前模型^{7,30,43,49,50}中具有T细胞过继性转移5年经验选择剂量,包括使用FSH靶向型CER淋巴细胞治疗免疫活性小鼠的FSHR+肿瘤(图3)。“标准”有效和非毒性剂量为 10^7 个细胞,但是我们已经证实低于该剂量的功效。向小鼠输注 $2 \times$

10^6 、 10^7 和 5×10^7 模拟对照转导的T细胞,FSH靶向型CER T细胞或HBSS。因为FSHR的表达也被报道为存在于转移性病变中发现的改变的内皮(但是不存在于健康血管)⁵¹,以及前列腺癌的上皮细胞⁵²,我们为每个方案构建两个独立实验:一个使用雄性小鼠,另一个使用雌性小鼠,每个实验每组5只小鼠。通过不排除健康雄性或雌性组织中内源FSHR的可能存在,这些实验界定两种性别的毒性。

[0175] 在雄性和雌性中,给予FSHR转导的ID8-Defb29/Vegf-a卵巢癌细胞来产生散布于腹膜腔的卵巢肿瘤。这些肿瘤也生长于雄性小鼠,虽然较为缓慢并且增殖性稍差。肿瘤注射后5天,向携带肿瘤的小鼠输注T细胞或HBSS。因为临床中其他CAR T细胞的标准给药涉及事先淋巴细胞去除²⁸,所以在T细胞过继性转移前5h,我们以亚致死性方式辐照小鼠(300rads)。所有肿瘤细胞和T细胞是初始腹腔内输注,因为这是临床中靶向卵巢癌的NCI所支持的途径⁵³。如果两只或更多只小鼠在特定T细胞剂量表现毒性指征,该剂量的全部小鼠和配对的HBSS治疗对照被处死进行分析。在这样的情况下,评估CER T细胞的静脉内给药。

[0176] 携带人卵巢癌的小鼠的体内单剂量逐步升级

[0177] 这些补充实验在携带OVCAR3 (FSHR+) 卵巢癌的NSG小鼠中进行,该小鼠是评估CER T细胞对表达FSHR的肿瘤的临床前功效(存活)的最佳可用模型。用研发用于临床测试的病毒载体表达FSH靶向型CER。来自HLA-A2+健康供体的分血法的去除单核细胞的人T细胞被用于转导(人)FSH靶向型CER T细胞变体。因为NSG小鼠不具有T、NK或B细胞,过继性转移T细胞无论如何会经历自我平衡扩增,使得淋巴细胞去除(亚致死性照射)不是必要的。这些研究的目的在于鉴定局限于使用人T细胞的可能副作用。例如,人IL-6已知能在小鼠受体上进行信号转导,并因此可以检测可能的细胞因子释放综合征。

[0178] 在两组实验中,监测以下读数:

[0179] 监测小鼠的健康状态,并按照1至4的尺度进行分级:1-正常且健康;1.5-一定程度嗜睡,行走稍缓慢;2-行走缓慢并且稍微肢体拖拽;2.5-移动时肢体拖拽;3-缩团姿势且移动很少;3.5-仰面躺姿,触摸时不移动或移动很少;4-死亡。T细胞输注后6至20小时处死小鼠队列(≥ 5 /组),并记录它们的健康状态。记录存在CER和HBSS下的可能差异和存在和不存在肿瘤之间的可能差异。如果小鼠表现3-4级健康恶化的指征,则收集血清用于定量IL-6循环水平,因为该细胞因子造成一些患者中观察到的细胞因子释放综合征。

[0180] 我们还测量和记录T细胞输注的每天和后续3天的体重。我们继续监测整个实验中的体重。如果小鼠在24h内表现>10%的体重丢失,将它们处死。否则,将记录的体重与对照小鼠比较,并且也比较存在和不存在肿瘤的情况。

[0181] 对所有的处死小鼠,以盲法方式分析组织切片。检查肝、胰腺、脾、小肠、大肠、心脏、肾和肺的H&E染色的组织损伤证据以及通过IHC检查(CD45+)炎症浸润物的存在。将健康组织的白细胞积累与用CER T细胞与HBSS治疗的小鼠进行比较,并且也比较存在和不存在肿瘤的情况。另外监测肺泡腔或气道中红细胞是否存在以监测急性出血。

[0182] 监测接受CER和对照T细胞的单次输注的无肿瘤的小鼠与携带肿瘤的小鼠的存活。如果输注最高剂量(5×10^7 细胞)的FSH靶向型CER T细胞的小鼠遭受严重急性毒性,则将它们处死,无论它们是否具有肿瘤。

[0183] 这些实验界定单次输注我们的FSH靶向型T细胞的最大耐受剂量。

[0184] 多剂量给药的最大耐受剂量

[0185] 单剂量MTD可能为 2×10^6 至 5×10^7 的FSH靶向型CER T细胞。为了确定类似于临床背景的治疗方案的FSH靶向型CER T细胞的多次给药的毒性,在输注FSH靶向型CER T细胞后,评价肿瘤依赖性、FSH受体特异性和非特异性毒性。人异种移植植物和免疫活性小鼠体系均用于预测临床背景下的可能副作用。

[0186] 为了确定该剂量的多次输注是否会导致基于T细胞的体内积累或宿主敏感化作用的毒性,通过3次输注MTD的CER T细胞、相同量的模拟对照转导的(对照)T细胞或HBSS治疗携带肿瘤的和未携带肿瘤的小鼠。携带FSHR-转导的ID8-Defb29/Vegf-a卵巢癌的免疫活性小鼠接受用小鼠形式的我们FSH靶向型CER转导的原代小鼠T细胞。用人HLA-A2+FSH靶向型CER T细胞治疗生长FSHR+HLA-A2+OVCAR3人卵巢癌细胞的免疫缺陷小鼠。为了最大化肿瘤相关毒性的可能性,当肿瘤建立后,在稍晚的时间点治疗小鼠。在肿瘤攻击后21天,缺少治疗的情况下腹水变得明显,开始治疗具有原位ID8-Defb29/Vegf-a卵巢肿瘤的小鼠。重复注射,间隔7天(肿瘤攻击后28和32天)。对于携带OVCAR3肿瘤的小鼠,当肿瘤变得可触知或通过超声确定明显建立时,启动治疗。给予后续注射,间隔一周。接受人T细胞的NSG小鼠预期不能在首次输注30天之前表现GVHD的指征,这提供足够长的演变期来以功效函数界定毒性。通过在晚期阶段治疗肿瘤,我们预期到对用FSH靶向型CER T细胞治疗的小鼠存在显著存活益处,但是我们没有预期完全肿瘤消除。在首次T细胞给药后28天处死用人CER T细胞治疗的NSG小鼠。同样地,每组5只小鼠用于每个实验。

[0187] 监测如上文所述的相同读数,即,健康状态、体重、组织学和存活。我们没有预期在第二和第三次给药后鉴定毒性指征。我们比较肿瘤存在和不存在如何影响毒性。如果发生在重复注射时观察到显著毒性的意外事件,我们逐步下调第二和第三次输注,以先前确定的MTD的50%开始,并在最后一次注射给予全剂量。如果毒性继续存在,则测试最后两次注射的后续降低(50%)。在每次T细胞输注当天和后续3天开始评估体重。我们监测整个实验过程中的体重。我们预期在这些输注后一天体重轻度降低(约1%),可能是反映操作和注射的应激。但是,我们不会预期大量体重丢失。如果发生的话,我们逐步下调第二和第三次注射。我们收集所有的处死小鼠的肝、胰腺、脾、小肠、大肠、心脏、肾和肺,并制备组织切片用于分析明显的组织损伤和炎症浸润物。比较用对照和CER T细胞治疗后的组织学模式,以及在存在和不存在肿瘤的情况下给药的组织学模式。监测接受多个剂量的CER和对照T细胞的无肿瘤的和携带肿瘤的小鼠的存活。我们不会预期未携带肿瘤的小鼠的存活存在差异。但是,我们预期,接受多个剂量的FSH靶向型CER T细胞的携带晚期肿瘤的小鼠会表现出比用对照(模拟对照转导的)T细胞治疗的小鼠显著更长的存活。记录所有组的存活。

[0188] 实施例16:评价生物标志物

[0189] 监测输注的T细胞的PK/PD的能力对于在早期临床解释结果、确定机制和鉴定可能副作用是重要的。另外,重要的考虑在于,CER可以变得具有免疫原性^{31,32}。我们FSH靶向型CER的内源激素的表达最小化那些可能副作用。非正常并列的人信号转导结构域的融合点处产生新的表位(例如,CD28和CD 3ζ的连接区,或CGα和铰链区的连接区)。CER的免疫原性可能导致过继性转移T细胞的排斥并造成炎症反应。作为理解FSH靶向型CER T细胞的体内功能和那些理论上的副作用的手段,我们评价血清中具有细胞活性的特异性生物标志物。使用ELISA和标准测试分析血清的以下标志物:

[0190] 细胞因子是CAR T细胞针对肿瘤细胞的体内活性(例如,肿瘤溶解和可能的过敏/

炎症反应的重要预测指标。通过ELISA测定治疗和对照小鼠的血清中以下炎症细胞因子：IL-6, IFN- γ 和TNF- α 。在这些细胞因子中，基于临床证据⁵⁴，IL-6预期能表现与明显行为学改变或体重改变的最强关联。我们预期，相比于输注HBSS，在CER T细胞给药后前3天内至少IL-6会存在一定升高。这种假设的毒性机制是临床中完全能理解的，并且有效干预（通常为甾体类或IL-6阻断剂）是已知的并且常规使用。这些炎症标志物可用于临床试验来监测患者和确定初始剂量。我们不预期系统性炎症细胞因子在治疗后>3天持续上升，但是无论如何也要监测它们。记录可能改变并与临床应答相关。这些代表标志物用于确定最小的预期生物学效应水平。

[0191] 高峰出现在2-3天的高铁蛋白血症是临床中细胞因子释放综合征的另一重要代表标志物⁵⁷。我们确定对照和治疗小鼠中血清铁蛋白的浓度，并将这些水平与健康恶化、体重丢失和组织学改变相关联。

[0192] 肌酐被测量为肾功能的可能损伤的指示物。对照小鼠中的值与接受FSH靶向型CER T细胞的小鼠的值进行比较。同样，我们不预期由于CER T细胞给药会造成任何肾损伤。

[0193] AST被确定为可能肝损伤的指示物。肝组织的组织学分析与AST值相关，包括肝中可能的肿瘤生长，因为卵巢癌是腹膜疾病。接受HBSS的对照小鼠的值与输注CER T细胞的小鼠的值进行比较。基于其他CER制剂的临床证据，我们不预期FSH靶向型T细胞的治疗会对肝造成不利影响。

[0194] 基于临床信息，我们相信，当靶向的肿瘤决定因素是真的特异性时，长期保护的重要预测指标是过继性转移T细胞的持久性。我们分析携带不同异种移植植物的NSG小鼠（ $\geq 5/$ 组）的淋巴结、骨髓和肿瘤组织（如果肿瘤不被排斥）中FSH靶向型CER T细胞的累积。通过在过继性转移后7和14天（GVHD发生之前⁵⁶）分析解离的淋巴结和骨髓，流式细胞术确定（CD3+，因为NSG小鼠不具有T或B细胞）持续性CER T细胞在获得记忆性质方面（CD45RA-CD62L+CCR7+CD122+淋巴细胞）的表型。因此，虽然免疫缺陷小鼠可能允许，但是转移的人T细胞中共刺激结构域的存在促进长期植入和记忆分化。这被解释为后续治疗功效的预测指标，但是也可以反映循环细胞因子的水平。

[0195] 对于另外的安全性，在小鼠初始使用大大低于毒性剂量的大剂量，但是随着患者被监测毒指征性，剂量缓慢逐步升级。在一项已知的研究中，用抗间皮素CAR T细胞治疗携带人间皮瘤的NSG小鼠的最大耐受剂量（MTD）为 50×10^7 细胞/小鼠。考虑到我们的靶标的特异性，我们预期相似或更好的结果。基于不同T细胞过继性转移方案的临床前证据^{7,30,43}，给药达到3次每周注射。但是，临床方案是基于在3天的疗程输注CAR T细胞²⁸。如果在第三次每周注射后观察到显著毒性，则调整CER T细胞的剂量，用于当连续3天给药时能耐受。

[0196] 实施例17：最小预期生物学效应水平（MABEL）

[0197] 对于人的最小预期生物学效应水平是基于动物/人系统中在体内和/或体外数据产生活性所需的最低动物剂量或浓度。通过来自用CER T细胞治疗的携带人肿瘤的NSG小鼠的体内研究的剂量-响应数据界定MABEL。剂量/浓度-效果曲线从实验数据生成，并且从动物外推至人，以起始小心的剂量逐步升级。起点是对应于最小生物学效应的剂量，使用上文定义的生物标志物作为代表标志物。

[0198] 为了确定MABEL，通过将OVCAR3 (FSHR+) 卵巢癌细胞注射入卵巢囊（ $n \geq 5/$ 组）攻击不同NSG小鼠。当肿瘤变的可触知并通过超声表现相似尺寸（约300mm³）时，来自HLA-A2+健

康供体的分血法的CD3/CD28扩增的人T细胞中由病毒载体表达FSH靶向型CER。选定的(人)FSH靶向型CER T细胞变体被转导,并给予不会观察到的副作用的CER T细胞的最大剂量。对照小鼠接受HBSS。在观察到升高的时间点(即,预期仅在前3天内发生),再次测定血清中的IL-6、IFN- γ 、TNF- α 和铁蛋白。基于该基线,不同队列的携带肿瘤的小鼠被同样地治疗,其中CER T细胞剂量逐步下调50%,直至上述细胞因子的任何升高(相比于对照小鼠)消失(变为与对照组相同)。这样的FSH靶向型CER T细胞的量,相对于体重计算,被用于界定人类干预的起始剂量。

[0199] 在进行中的试验中,患者目前接受按照不同CER/kg体重转导的 10^7 至 10^8 个T细胞²⁸。考虑到我们在 10^9 /kg体重($\sim 10^7$ CER T细胞/小鼠; ~ 30 g/小鼠;图3)的剂量下尚未在小鼠中观察到明显毒性,我们预期,可以在不同患者中调整和逐步升级安全初始剂量,以达到低于这些量的“无可观察副作用水平”。对于额外的安全性,在3天中进行定量给药的“分次剂量”方法,给予CER-转导的T细胞,在第0天使用总计划剂量的10%,第1天30%,第2天60%,遵循化学疗法开始2天²⁸。

[0200] 通过对人FSH的qPCR分析和ELISA,我们分析测试批次的初始病毒来确定哪个克隆产生高滴度的FSH靶向型CER病毒。我们用该病毒转导人T细胞,并通过流式细胞术测定FSH β 、CD3、CD4和CD8的表达,和与FSHR+OVCAR3肿瘤细胞共培养的IFN- γ 产生(如图2所示)。我们选择产生最高滴度的细胞克隆用于扩增、测试和产生主要细胞库。该主要细胞库可用作产病毒细胞的资源用于另外的研究。

[0201] 然后,我们测试产品以确保生物产品的安全性,包括测试(1)无菌性,(2)支原体,和(3)外来病毒体,遵循FDA指导。

[0202] 实施例18:外周血中CER-T细胞的持久性

[0203] 建立用于确定外周血中过继性转移CER T细胞的体内转运和持久性的Q-PCR分析。引物和TaqMan探针被设计为跨越CER的CG α 和跨膜结构域的序列之间的连接区,其不是天然存在于任何患者细胞。另外,基于检测转导的(CD3+)T细胞上的FSH β 优化转移CER T细胞的流式细胞术分析,通过荧光标记的可获得抗人FSH抗体,或使用抗FSH一抗和荧光标记的二抗。转移T细胞的追踪包括分析中的CD4和CD8抗体,从而获得治疗功效的机制理解。在新队列的携带OVCAR3肿瘤的NSG小鼠(≥ 5)中测试这些试剂,小鼠被过继性转移用临床级载体和操作转导的来自健康供体的A2+T细胞。该实验验证新试剂对抗肿瘤生长的功效。

[0204] 所预期的主要毒性是T细胞是否会通过杀伤表达靶标的肿瘤细胞而导致炎症。在设定起始剂量后,常规的剂量逐步升级保守地基于3倍递增。因为我们使用内源FSH,之前对于异种(鼠)scFv描述的CAR T细胞的过敏性反应或免疫靶向的风险可以忽略。重要的是,通过数百万年的进化,FSH受体的表达局限于卵巢。因为它们在卵巢癌患者中常规被切除,并且应该没有其他器官结合FSH激素,我们预期,FSH靶向型CER T细胞代表安全且有效的干预手段。

[0205] 实施例19:使用TALL细胞作为通用平台

[0206] CER构建体已被表达于TALL-103/2细胞和TALL-104细胞(ATCC CRL1 1386;美国专利5,702,702号),通过配体代替scFv而将它们的细胞毒性潜能重新定向于FSHR+肿瘤,但是另外方面使用活化结构域成功对于对抗白血病。

[0207] 优化TALL-103/2细胞作为通用同种异体平台是一项实施方案,因为它们的体外生

长显著快于TALL-104细胞，并因此更易于操作用于规模生产。尽管如此，我们也会使用TALL-104细胞，它们自发运输至肿瘤床。通过其内源(非免疫原性)配体而将它们的细胞毒性活性重新定向于FSHR+卵巢癌细胞，表达FSH靶向型嵌合受体增强TALL-103/2和TALL-104细胞的治疗潜能。初步结果表明，转导我们的FSH CER赋予TALL-103/2或TALL-104细胞的杀死自发表达FSHR的卵巢癌细胞的能力显著有效于它们的模拟对照转导的对应物。FSH靶向型CER TALL细胞能特异性且有效地杀伤表达FSHR的卵巢癌细胞，在临床相关卵巢癌模型中消除恶性肿瘤进展，而不产生显著副作用。这些预期能在后续临床试验中转用至卵巢癌患者。

[0208] 我们已经用编码人靶向FSHR的CER的pBMN逆转录病毒转导和选择TALL-103/2和TALL-104细胞。为了证实TALL-103/2细胞的自发性(NK样)细胞溶解活性能够通过表达我们的FSH靶向型CER而显著增强，我们使用人卵巢癌(A2⁺FSHR⁺)OVCAR3细胞作为靶标再次进行体外细胞毒性实验。如图12所示，模拟对照转导的TALL-103/2细胞如预期地表现出针对卵巢癌细胞的一定剂量依赖性抗肿瘤活性。但是，我们的FSH靶向型CER的表达赋予该细胞系低至1:4的效应物：靶标比率清除约60%的肿瘤细胞的能力。这些实验支持，通过表达FSHR CER，将我们的通用同种异体平台更特异性重新定向于FSHR⁺(70%)卵巢肿瘤是可能的。值得注意的是，在我们的生物反应器中，FSH靶向型CER TALL-103/2细胞与母体细胞同样有效地生长。该实验为潜在的更安全且通用可接受的系统提供概念证据；即，将TALL-103/2或TALL 104细胞的自发治疗活性与我们的FSH靶向型活化受体的效力结合在一起，从而最大化它们的特异性和它们的抗肿瘤细胞毒性活性。

[0209] 重要的是，在不存在CAR/CER表达时，TALL-103/2细胞的自发细胞毒性活性受限于表达NKG2D配体的NK敏感靶标，例如K562和U937白血病细胞，而健康细胞完全免受细胞毒性杀伤。另外，TALL-103/2细胞不太可能在给药至患者时导致GVHD，因为它们表达单个(γ 8) TCR，正如对TALL-104细胞所证实的。但是，通过CD3活化或IL-2给药可以引发TALL-103/2细胞的效应物活性。并且它们相比于临床可获得的TALL-104细胞能在生物反应器中较快地离体生长，这些性质使得TALL-103/2细胞可能成为优异的同种异体平台，用于通过表达我们的FSH靶向型CER将它们的抗肿瘤潜能重新定向。但是，TALL-104细胞对于该用途也是理想的，因为它们自发运输至肿瘤床。

[0210] 通过引用的方式将本文引用的包括美国临时专利申请62/059,068、美国临时专利申请62/202,824在内的每篇专利、专利申请和任何文件以及本文全文引用的任何可公开获得的核酸和/或肽序列的序列明确地整体并入本文。除了上文具体公开的实施方案，本领域技术人员在不脱离本发明的实质和范围的情况下可以设计本发明的实施方案和变化形式。所附权利要求包括这些实施方案和等同变化形式。

[0211] 参考文献

[0212] 1. Siegel, R., Ma, J., Zou, Z. & Jemal, A. *Cancer statistics*, 2014. *CA Cancer J Clin* 64, 9-29 (2014).

[0213] 2. Curiel, T. J., et al. *Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival*. *Nat Med* 10, 942-949 (2004).

[0214] 3. Zhang, L., et al. *Intratumoral T cells, recurrence, and survival in*

- epithelial ovarian cancer.'H Engl J Med 348,203-213(2003) .
- [0215] 4.Cubillo-Ruiz,J.R.,et al.Polyethylenimine-based siRNA nanocomplexes reprogram tumor-associated dendritic cells via TLR5 to elicit therapeutic antitumor immunity.J Clin Invest 119,2231-2244(2009) .
- [0216] 5.Cubillo-Ruiz,J.R.,et al.CD277 is a Negative Co-stimulatory Molecule Universally Expressed by Ovarian Cancer Microenvironmental Cells.Oncotarget 1,329-328(2010) .
- [0217] 6.Huarte,E et al.Depletion of dendritic cells delays ovarian cancer progression by boosting antitumor immunity.Cancer Res 68,7684-7691(2008) .
- [0218] 7.Nesbeth,Y.,et al.CCL5-mediated endogenous antitumor immunity elicited by adoptively transferred lymphocytes and dendritic cell depletion.Cancer Res 69,6331-6338(2009) .
- [0219] 8.Scarlett,U.K.,et al.In situ stimulation of CD40 and Toll-like receptor 3 transforms ovarian cancer-infiltrating dendritic cells from immunosuppressive to immunostimulatory cells.Cancer Res 69,7329-7337(2009) .
- [0220] 9.Scarlett,U.K.,et al.Ovarian cancer progression is controlled by phenotypic changes in dendritic cells.J Exp Med 209,495-506(2012) .
- [0221] 10.Cubillo-Ruiz,J.R.,et al.Reprogramming tumor-associated dendritic cells in vivo using microRNA mimetics triggers protective immunity against ovarian cancer.Cancer Res 72,1683-1693(2012) .
- [0222] 11.Porter,D.L.,Levine,B.L.,Kalos,M.,Bagg,A.&June,C.H.Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia.N Engl J Med 365,725-733(2011) .
- [0223] 12.Maus,M.V.,Grupp,S.A.,Porter,D.L.&June,C.H.Antibody-modified T cells:CARs take the front seat for hematologic malignancies.Blood 123,2625-2635(2014) .
- [0224] 13.Kalos,M et al.T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia.Sci Transl Med 3,95ra73(2011) .
- [0225] 14.Simoni,M.,Gromoll,J.&Nieschlag,E.The follicle-stimulating hormone receptor:biochemistry,molecular biology,physiology, and pathophysiology.Endocr Rev 18,739-773(1997) .
- [0226] 15.Vannier,B.,Loosfelt,H.,Meduri,G.,Pichon,C.&Milgrom,E.Anti-human FSH receptor monoclonal antibodies:immunochemical and immunocytochemical characterization of the receptor.Biochemistry 35,1358-1366(1996) .
- [0227] 16.Zhang,X.Y.,et al.Follicle-stimulating hormone peptide can facilitate paclitaxel nanoparticles to target ovarian carcinoma in vivo.Cancer Res 69,6506-6514(2009) .
- [0228] 17.Al-Timimi,A.,Buckley,C.H.&Fox,H.An immunohistochemical study of

the incidence and significance of human gonadotrophin and prolactin binding sites in normal and neoplastic human ovarian tissue.Br J Cancer 53,321-329 (1986) .

[0229] 18.Hall,J.E.Neuroendocrine changes with reproductive aging in women.Semin Reprod Med 25,344-351 (2007) .

[0230] 19.Rakrishna,V.,et al.Naturally occurring peptides associated with HLA-A2 in ovarian cancer cell lines identified by mass spectrometry are targets of HLA-A2-restricted cytotoxic T cells.Int Immunol 15,751-763 (2003) .

[0231] 20.Chi,J.H.,Choi,K.C.,Auersperg,N.&Leung,P.C.Overexpression of follicle-stimulating hormone receptor activates oncogenic pathways in preneoplastic ovarian surface epithelial cells.J Clin Endocrinol Metab 89, 5508-5516 (2004) .

[0232] 21.Jemal,A et al.Cancer statistics,2009.CA Cancer J Clin 59,225-249 (2009) .

[0233] 22.Jemal,A et al.Cancer statistics,2008.CA Cancer J Clin 58,71-96 (2008) .

[0234] 23.Coukos,G.,Conejo-Garcia,J.R.,Roden,R.B.&Wu,T.C.Immunotherapy for gynaecological malignancies.Expert Opin Biol Ther 5,1193-1210 (2005) .

[0235] 24.Conejo-Garcia,J.R et al.Ovarian carcinoma expresses the NKG2D ligand Letal and promotes the survival and expansion of CD28-antitumor T cells.Cancer Res 64,2175-2182 (2004) .

[0236] 25.Hamanishi,J et al.Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer.Proc Natl Acad Sci U S A 104,3360-3365 (2007) .

[0237] 26.Sato,E et al.Intraepithelial CD8+ rumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer.Proc Natl Acad Sci USA 102,18538-18543 (2005) .

[0238] 27.Urba,W.J.&Longo,D.L.Redirecting T cells.N Engl J Med 365,754-757 (2011) .

[0239] 28.Maude,S.L et al.Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia.N Engl J Med 371,1507-1517 (2014) .

[0240] 29.Huarte,E et al.PILAR is a novel modulator of human T-cell expansion.Blood 112,1259-1268 (2008) .

[0241] 30.Stephen,T.L et al.Transforming Growth Factor beta-Mediated Suppression of Antitumor T Cells Requires FoxP1 Transcription Factor Expression.Immunity 41,427-439 (2014) .

[0242] 31.Lamers,C.H et al.Immune responses to transgene and retroviral vector in patients treated with ex vivo-engineered T cells.Blood 117,72-82 (2011) .

- [0243] 32.Maus,M.V.,et al.T cells expressing chimeric antigen receptors can cause anaphylaxis in humans.Cancer Immunol Res 1,26-31 (2013) .
- [0244] 33.Conejo-Garcia,J.R.,et al.Tumor-infiltrating dendritic cell precursors recruited by a beta-defensin contribute to vasculogenesis under the influence of Vegf-A.Nat Med 10,950-958 (2004) .
- [0245] 34.Rutkowski,M.R.,et al.Initiation of metastatic breast carcinoma by targeting of the ductal epithelium with adenovirus-cre:a novel transgenic mouse model of breast cancer.J Vis Exp (2014) .
- [0246] 35.Song,D.G.,et al.In vivo persistence,tumor localization, and antitumor activity of CAR-engineered T cells is enhanced by costimulatory signaling through CD 137(4-1BB) .Cancer Res 71,4617-4627 (2011) .
- [0247] 36.Milone,M.C.,et al.Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo.Mol Ther 17,1453-1464 (2009) .
- [0248] 37.Heslop,H.E.,et al.Long-term outcome of EBV-specific T-cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients.Blood 115,925-935 (2010) .
- [0249] 38.Scholler,J et al.Decade-long safety and function of retroviral-modified chimeric antigen receptor T cells.Sci Transl Med 4,132ra153 (2012) .
- [0250] 39.Biaco,L.,et al.Integration profile of retroviral vector in gene therapy treated patients is cell-specific according to gene expression and chromatin conformation of target cell EMBO Mol Med 3,89-101 (2011) .
- [0251] 40.Brentjens,R.J.&Curran,KJ.Novel cellular therapies for leukemia: CAR-modified T cells targeted to the CD 19 antigen.Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2012,143-151 (2012) .
- [0252] 41.Hollyman,D et al.Manufacturing validation of biologically functional T cells targeted to CD19 antigen for autologous adoptive cell therapy.J Immunother 32,169-180 (2009) .
- [0253] 42.Pule,M.A et al.Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors:persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma.Nat Med 14,1264-1270 (2008) .
- [0254] 43.Nesbeth,Y.C.,et al.CD4+ T cells elicit host immune responses to MHC class II-ovarian cancer through CCL5 secretion and CD40-mediated licensing of dendritic cells.J Immunol 184,5654-5662 (2010) .
- [0255] 44.Porter,D.L et al.A phase 1 trial of donor lymphocyte infusions expanded and activated ex vivo via CD3/CD28 costimulation.Blood 107,1325-1331 (2006) .
- [0256] 45.Terkura,S.,et al.Generation of CD19-chimeric antigen receptor modified CD8+ T cells derived from virus-specific central memory T

- cells.Blood 119,72-82 (2012) .
- [0257] 46.Maines-Bandiera,S.L et al.Epithelio-mesenchymal transition in a neoplastic ovarian epithelial hybrid cell line.Differentiation 72,150-161 (2004) .
- [0258] 47.Ellis,J.M et al.Frequencies of HLA-A2 alleles in five U.S.population groups.Predominance Of A*02011 and identification of HLA-A*0231.Hum Immunol 61,334-340 (2000) .
- [0259] 48.Ritchie,D.S et al.Persistence and efficacy of second generation CAR T cell against the LeY antigen in acute myeloid leukemia.Mol Ther 21,2122-2129 (2013) .
- [0260] 49.Amatangelo,M.D et al.Three-dimensional culture sensitizes epithelial ovarian cancer cells to EZH2 methyltransferase inhibition.Cell Cycle 12,2113-2119 (2013) .
- [0261] 50.Nesbeth,Y.&Conejo-Garcia,J.R.Harnessing the effect of adoptively transferred tumor-reactive T cells on endogenous (host-derived) antitumor immunity.Clin Dev Immunol 2010,139304 (2010) .
- [0262] 51.Siraj,A et al.Expression of follicle-stimulating hormone receptor by the vascular endothelium in tumor metastases.BMC Cancer 13,246 (2013) .
- [0263] 52.Mariani,S.,et al.Expression and cellular localization of follicle-stimulating hormone receptor in normal human prostate,benign prostatic hyperplasia and prostate cancer.J Urol 175,2072-2077;discussion 2077 (2006) .
- [0264] 53.Walker,J.L et al.Intraperitoneal catheter outcomes in a phase III trial of intravenous versus intraperitoneal chemotherapy in optimal stage III ovarian and primary peritoneal cancer:a Gynecologic Oncology Group Study.Gynecol Oncol 100,27-32 (2006) .
- [0265] 54.Lee,D.W et al.T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults:a phase 1dose-escalation trial.Lancet (2014) .
- [0266] 55.Grupp,S.A et al.Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia.N Engl J Med 368,1509-1518 (2013) .
- [0267] 56.Carpenito,C,et al.Control of large,established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137domains.Proc Natl Acad Sci USA 106,3360-3365 (2009) .
- [0268] 57.Teachey,D.T et al.Cytokine release syndrome after blinatumomab treatment related to abnormal macrophage activation and ameliorated with cytokine-directed therapy.Blood 121,5154-5157 (2013) .
- [0269] 58.Barber,A et al.Chimeric NKG2D receptor-bearing T cells as immunotherapy for ovarian cancer.Cancer Res 67,5003-5008 (2007) .
- [0270] 59.Cesano,A.&Santoli,D.Two unique human leukemic T-cell lines endowed

with a stable cytotoxic function and a different spectrum of target reactivity analysis and modulation of their lytic mechanisms. In Vitro Cell Dev Biol 28A,648-656 (1992) .

[0271] 60.Brando,C,et al.Receptors and lytic mediators regulating anti-tumor activity by the leukemic killer T cell line TALL-104.J Leukoc Biol 78,359-371 (2005) .

[0272] 61.Visonneau,S.,et al.Phase I trial of TALL-104 cells in patients with refractory metastatic breast cancer.Clin Cancer Res 6,1744-1754 (2000) .

[0273] 62.美国专利5,702,702号

- [0001] 序列表
[0002] <110> 威斯塔解剖学和生物学研究所
[0003] <120> 治疗癌症的方法和组合物
[0004] <130> WST150PCT
[0005] <150> 62059068
[0006] <151> 2014-10-02
[0007] <150> 62202824
[0008] <151> 2015-08-04
[0009] <160> 8
[0010] <170> PatentIn version 3.5
[0011] <210> 1
[0012] <211> 1473
[0013] <212> DNA
[0014] <213> 智人
[0015] <400> 1
[0016] atgaagacac tccagtttt cttcctttc tggctggaa aagcaatctg ctgcaatagc 60
[0017] tgtgagctga ccaacatcac cattgcaata gagaaagaag aatgtcgaaa ctgcataagc 120
[0018] atcaacacca cttgggtgtgc tggctactgc tacaccaggg atctgggtgtaa aggaccca 180
[0019] gccaggccca aaatccagaa aacatgtacc ttcaaggaac tggtatacga aacagtgaga 240
[0020] gtgcccggct gtgctcacca tgcagattcc ttgtatacat acccagtggc cacccagtgt 300
[0021] cactgtggca agtgtgacag cgacagcact gattgtactg tgcgaggcct ggggcccagc 360
[0022] tactgctcct ttggtaaaat gaaagaaggt ggtggttctg gtggggatc cggtgggt 420
[0023] tctgggtgt gtgctcctga tgtgcaggag acagggttcc accatgttgc ccaggctgtc 480
[0024] ctcaaactcc tgagctcaag caatccaccc actaaggcct cccaaagtgc taggattaca 540
[0025] gattgcccag aatgcacgct acaggaaaac ccatttttcccagccggg tgccccaaata 600
[0026] cttcagtgcata tggctgtctt cttctctaga gcatatccca ctccactaag gtccaagaag 660
[0027] acgatgttgg tccaaaagaa cgtcacctca gagtcacatt gctgtgtac taaatcatat 720
[0028] aacagggtca cagtaatggg gggttcaaa gtggagaacc acacggcgtc ccactgcgt 780
[0029] acttggattt atcacaatc taccacgacg ccagccgc gaccaccaac accggcgccc 840
[0030] accatcggtc cgccggccct gtccctgcgc ccagaggcgt gcccggcggc ggcggggggc 900
[0031] gcagtgcaca cgagggggct ggacttcgc tggatatct acatctggc gcccggcggc 960
[0032] gggacttgg gggccttct cctgtcactg gttatcaccc tttactgcaa acggggcaga 1020
[0033] aagaaactcc tgtatattt caaacaacca tttatgagac cagtacaac tactcaagag 1080
[0034] gaagatggct gtagctggcgttccagaa gaagaagaag gaggatgtga actgagagtg 1140
[0035] aagttcagca ggagcgcaga cgcggccgc taccacgagg gccagaacca gctctataac 1200
[0036] gagctcaatc taggacgaag agaggatgtac gatgtttgg acaagagacg tggccggac 1260
[0037] cctgagatgg gggaaagcc gagaaggaag aaccctcagg aaggcctgtaaatgactg 1320
[0038] cagaaagata agatggcggaa ggctacagt gagattggta tggatggcga ggcggcggagg 1380
[0039] ggcaggcgc acgatggcct ttaccagggt ctcagttacag ccaccaagga cacctacgac 1440
[0040] gcccttcaca tgcaggccct gcccctcgc taa 1473
[0041] <210> 2

[0042]	<211> 490		
[0043]	<212> PRT		
[0044]	<213> 智人		
[0045]	<400> 2		
[0046]	Met Lys Thr Leu Gln Phe Phe Leu Phe Cys Cys Trp Lys Ala Ile		
[0047]	1	5	10 15
[0048]	Cys Cys Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr Ile Ala Ile Glu Lys		
[0049]	20	25	30
[0050]	Glu Glu Cys Arg Phe Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr Trp Cys Ala Gly		
[0051]	35	40	45
[0052]	Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Leu Val Tyr Lys Asp Pro Ala Arg Pro Lys		
[0053]	50	55	60
[0054]	Ile Gln Lys Thr Cys Thr Phe Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Arg		
[0055]	65	70	75 80
[0056]	Val Pro Gly Cys Ala His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val		
[0057]	85	90	95
[0058]	Ala Thr Gln Cys His Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp Ser Thr Asp Cys		
[0059]	100	105	110
[0060]	Thr Val Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Gly Glu Met Lys		
[0061]	115	120	125
[0062]	Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
[0063]	130	135	140
[0064]	Ala Pro Asp Val Gln Glu Thr Gly Phe His His Val Ala Gln Ala Ala		
[0065]	145	150	155 160
[0066]	Leu Lys Leu Leu Ser Ser Ser Asn Pro Pro Thr Lys Ala Ser Gln Ser		
[0067]	165	170	175
[0068]	Ala Arg Ile Thr Asp Cys Pro Glu Cys Thr Leu Gln Glu Asn Pro Phe		
[0069]	180	185	190
[0070]	Phe Ser Gln Pro Gly Ala Pro Ile Leu Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe		
[0071]	195	200	205
[0072]	Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro Leu Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu Val		
[0073]	210	215	220
[0074]	Gln Lys Asn Val Thr Ser Glu Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys Ser Tyr		
[0075]	225	230	235 240
[0076]	Asn Arg Val Thr Val Met Gly Gly Phe Lys Val Glu Asn His Thr Ala		
[0077]	245	250	255
[0078]	Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr Tyr His Lys Ser Thr Thr Pro Ala		
[0079]	260	265	270
[0080]	Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser		
[0081]	275	280	285
[0082]	Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr		
[0083]	290	295	300

[0084] Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
 [0085] 305 310 315 320
 [0086] Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
 [0087] 325 330 335
 [0088] Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
 [0089] 340 345 350
 [0090] Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
 [0091] 355 360 365
 [0092] Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
 [0093] 370 375 380
 [0094] Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
 [0095] 385 390 395 400
 [0096] Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
 [0097] 405 410 415
 [0098] Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
 [0099] 420 425 430
 [0100] Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
 [0101] 435 440 445
 [0102] Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
 [0103] 450 455 460
 [0104] Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
 [0105] 465 470 475 480
 [0106] Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 [0107] 485 490
 [0108] <210> 3
 [0109] <211> 1365
 [0110] <212> DNA
 [0111] <213> 智人
 [0112] <400> 3
 [0113] atgaatagct gtgagctgac caacatcacc attgcaatag agaaagaaga atgtcgtttc 60
 [0114] tgcataagca tcaacaccac ttggtgtgct ggctactgct acaccaggaa tctggtgtat 120
 [0115] aaggaccagg ccaggcccaa aatccagaaa acatgtacct tcaaggaact ggtatacgaa 180
 [0116] acagttagag tgcccggtg tgctcaccat gcagattcct tgtatacata cccagtggcc 240
 [0117] acccagtgtc actgtggcaa gtgtgacagc gacagcactg attgtactgt gcgaggcctg 300
 [0118] gggcccagct actgctcct tggtaaatg aaagaaggcg gcggaaagcgg aggccggatct 360
 [0119] gggggaggat ctggcggcgg agctcctgat gtgcaggaga cagggttca ccatgttgcc 420
 [0120] caggctgctc tcaaactcct gagctcaagc aatccaccca ctaaggcctc ccaaagtgtct 480
 [0121] aggattacag attgcccaga atgcacgcta caggaaaacc cattttctc ccagccgggt 540
 [0122] gccccaaatac ttcaagtgcattt gggctgctgc ttctcttagat catatccac tccactaagg 600
 [0123] tccaagaaga cgtatgttggt caaaagaac gtcacactcag agtccacttg ctgtgttagct 660
 [0124] aaatcatata acagggtcac agtaatgggg ggtttcaaag tggagaacca cacggcgtgc 720
 [0125] cactgcagta ctgttattatc tcacaaatct ggcggcggaa gcggaggcgg atctggggaa 780

[0126]	ggatctggcg	gccccaaactt	cactataaaa	tcattgtcca	gacctggaca	gccctggtgt	840										
[0127]	gaagcgcagg	tcttcttcaa	taaaaaatctt	ttccttcagt	acaacagtga	caacaacatg	900										
[0128]	gtcaaaccctc	tgggcctcct	ggggagaag	gtatatgccca	ccagcacctg	gggagaattg	960										
[0129]	acccaaacgc	tgggagaagt	ggggcgagac	ctcaggatgc	tccttgcata	catcaaacc	1020										
[0130]	cagataaaga	ccagtgatec	ttccactctg	caagtcgaga	tgtttgtca	acgtgaagca	1080										
[0131]	gaacggtgca	ctggtgcatc	ctggcagttc	gccaccaatg	gagagaaatc	cctcctctt	1140										
[0132]	gacgcaatga	acatgacactg	gacagtaatt	aatcatgaag	ccagtaagat	caaggagaca	1200										
[0133]	tgaaagaaag	acagaggcgt	ggaaaagtat	ttcaggaagc	tctcaaaggg	agactgcgt	1260										
[0134]	cactggctca	gggaattctt	aggcactgg	gaggcaatgc	cagaaccgac	agtgtcacca	1320										
[0135]	gttaaatgctt	cagatatcca	ctggcttct	tctagtctac	catag		1365										
[0136]	<210>	4															
[0137]	<211>	454															
[0138]	<212>	PRT															
[0139]	<213>	智人															
[0140]	<400>	4															
[0141]	Met	Asn	Ser	Cys	Glu	Leu	Thr	Asn	Ile	Thr	Ile	Ala	Ile	Glu	Lys	Glu	
[0142]	1			5			10							15			
[0143]	Glu	Cys	Arg	Phe	Cys	Ile	Ser	Ile	Asn	Thr	Thr	Trp	Cys	Ala	Gly	Tyr	
[0144]				20			25							30			
[0145]	Cys	Tyr	Thr	Arg	Asp	Leu	Val	Tyr	Lys	Asp	Pro	Ala	Arg	Pro	Lys	Ile	
[0146]				35			40							45			
[0147]	Gln	Lys	Thr	Cys	Thr	Phe	Lys	Glu	Leu	Val	Tyr	Glu	Thr	Val	Arg	Val	
[0148]				50			55							60			
[0149]	Pro	Gly	Cys	Ala	His	His	Ala	Asp	Ser	Leu	Tyr	Thr	Tyr	Pro	Val	Ala	
[0150]				65			70							75			80
[0151]	Thr	Gln	Cys	His	Cys	Gly	Lys	Cys	Asp	Ser	Asp	Ser	Thr	Asp	Cys	Thr	
[0152]					85			90						95			
[0153]	Val	Arg	Gly	Leu	Gly	Pro	Ser	Tyr	Cys	Ser	Phe	Gly	Glu	Met	Lys	Glu	
[0154]					100			105						110			
[0155]	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	
[0156]					115			120						125			
[0157]	Pro	Asp	Val	Gln	Glu	Thr	Gly	Phe	His	His	Val	Ala	Gln	Ala	Ala	Leu	
[0158]					130			135						140			
[0159]	Lys	Leu	Leu	Ser	Ser	Ser	Asn	Pro	Pro	Thr	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Ala	
[0160]					145			150						155			160
[0161]	Arg	Ile	Thr	Asp	Cys	Pro	Glu	Cys	Thr	Leu	Gln	Glu	Asn	Pro	Phe	Phe	
[0162]						165			170					175			
[0163]	Ser	Gln	Pro	Gly	Ala	Pro	Ile	Leu	Gln	Cys	Met	Gly	Cys	Cys	Phe	Ser	
[0164]						180			185					190			
[0165]	Arg	Ala	Tyr	Pro	Thr	Pro	Leu	Arg	Ser	Lys	Lys	Thr	Met	Leu	Val	Gln	
[0166]						195			200					205			
[0167]	Lys	Asn	Val	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Cys	Cys	Val	Ala	Lys	Ser	Tyr	Asn	

[0168]	210	215	220
[0169]	Arg Val Thr Val Met Gly Gly Phe Lys Val Glu Asn His Thr Ala Cys		
[0170]	225	230	235
[0171]	His Cys Ser Thr Cys Tyr Tyr His Lys Ser Gly Gly Ser Gly Gly		
[0172]	245	250	255
[0173]	Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Asn Phe Thr Ile Lys Ser Leu		
[0174]	260	265	270
[0175]	Ser Arg Pro Gly Gln Pro Trp Cys Glu Ala Gln Val Phe Leu Asn Lys		
[0176]	275	280	285
[0177]	Asn Leu Phe Leu Gln Tyr Asn Ser Asp Asn Asn Met Val Lys Pro Leu		
[0178]	290	295	300
[0179]	Gly Leu Leu Gly Lys Lys Val Tyr Ala Thr Ser Thr Trp Gly Glu Leu		
[0180]	305	310	315
[0181]	Thr Gln Thr Leu Gly Glu Val Gly Arg Asp Leu Arg Met Leu Leu Cys		
[0182]	325	330	335
[0183]	Asp Ile Lys Pro Gln Ile Lys Thr Ser Asp Pro Ser Thr Leu Gln Val		
[0184]	340	345	350
[0185]	Glu Met Phe Cys Gln Arg Glu Ala Glu Arg Cys Thr Gly Ala Ser Trp		
[0186]	355	360	365
[0187]	Gln Phe Ala Thr Asn Gly Glu Lys Ser Leu Leu Phe Asp Ala Met Asn		
[0188]	370	375	380
[0189]	Met Thr Trp Thr Val Ile Asn His Glu Ala Ser Lys Ile Lys Glu Thr		
[0190]	385	390	395
[0191]	400		
[0192]	Trp Lys Lys Asp Arg Gly Leu Glu Lys Tyr Phe Arg Lys Leu Ser Lys		
[0193]	405	410	415
[0194]	Gly Asp Cys Asp His Trp Leu Arg Glu Phe Leu Gly His Trp Glu Ala		
[0195]	420	425	430
[0196]	Met Pro Glu Pro Thr Val Ser Pro Val Asn Ala Ser Asp Ile His Trp		
[0197]	435	440	445
[0198]	Ser Ser Ser Ser Leu Pro		
[0199]	450		
[0200]	<210> 5		
[0201]	<211> 1260		
[0202]	<212> DNA		
[0203]	<213> 小家鼠		
[0204]	<400> 5		
[0204]	atgcacagct gcgagctgac caacatcacc atcagcgtgg aaaaagagga atgccggttc 60		
[0205]	tgcacatcggca tcaacaccac ttggcgcgcc ggctactgct acaccggga cctgggtgtac 120		
[0206]	aaggaccccg ccagacccaa cacccagaaa gtgtgcaccc tcaaagaact ggtgtacgag 180		
[0207]	acagtgcggc tgcccggtcg tgccagacac agcgatagcc tgtacaccta ccccggtggcc 240		
[0208]	accgagtgcc actgcggcaa gtgtgacagc gacagcacccg actgtaccgt gcggggactg 300		
[0209]	ggccctagct actgcagctt cagcgagatg aaggaaggcg gcggaaagcgg aggcggatct 360		

[0210] gggggaggat ctggcggcgg agacttcatt attcaaggct gccccgagtg caagctgaaa 420
 [0211] gagaacaagt acttcagcaa gctggcgct cccatctacc agtgcattgg ctgctgcttc 480
 [0212] agcagagcct accccacccc tgccagatcc aagaaaacca tgctgggcc caagaacatc 540
 [0213] acctccgagg ccacctgtt cgtggccaag gccttcacca aggccaccgt gatgggcaac 600
 [0214] gccagagtgg aaaaccacac agagtgtcac tgccagcacct gttactacca caagagcgct 660
 [0215] agcggcggcg gaagcggagg cggatctgg ggaggatctg gcggcggacc aaggatagaa 720
 [0216] gagactgctt ctctttaa catttacaag gttAACAGGT cagagtctgg acaacatagt 780
 [0217] catgaagttc aaggcctact caacagacag cctcttttgc tctacaagga taaaaagtgt 840
 [0218] catgccattt gtgctcatag gaacagcatg aatgctacaa agatctgtga aaaagaggtt 900
 [0219] gacactctga aagatggaat tgacatttc aaaggcttc tgcttcacat agtgcaggag 960
 [0220] actaacacaa ccggaaagcc cctcactctg caggctgagg tgtgtggcca gtatgaagta 1020
 [0221] gacaaacatt tcacaggata cgcattgtt agcctcaatg gaaagaatat attccgtgtt 1080
 [0222] gacacaagca ctggcaactg gacccaactg gatcatgaat tcgagaagtt tatagaaatg 1140
 [0223] tgcaaggaag acaaggcccc agctgcctt ttaaagaaga ctacagaggg cgactgcagg 1200
 [0224] acctggctt atgagctcat gttgcactgg aaagaacatc tggagcctgc aggatcttag 1260
 [0225] <210> 6
 [0226] <211> 446
 [0227] <212> PRT
 [0228] <213> 小家鼠
 [0229] <400> 6
 [0230] Met His Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr Ile Ser Val Glu Lys Glu
 [0231] 1 5 10 15
 [0232] Glu Cys Arg Phe Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr Trp Cys Ala Gly Tyr
 [0233] 20 25 30
 [0234] Cys Tyr Thr Arg Asp Leu Val Tyr Lys Asp Pro Ala Arg Pro Asn Thr
 [0235] 35 40 45
 [0236] Gln Lys Val Cys Thr Phe Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Arg Leu
 [0237] 50 55 60
 [0238] Pro Gly Cys Ala Arg His Ser Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val Ala
 [0239] 65 70 75 80
 [0240] Thr Glu Cys His Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp Ser Thr Asp Cys Thr
 [0241] 85 90 95
 [0242] Val Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Ser Glu Met Lys Glu
 [0243] 100 105 110
 [0244] Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Asp
 [0245] 115 120 125
 [0246] Phe Ile Ile Gln Gly Cys Pro Glu Cys Lys Leu Lys Glu Asn Lys Tyr
 [0247] 130 135 140
 [0248] Phe Ser Lys Leu Gly Ala Pro Ile Tyr Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe
 [0249] 145 150 155 160
 [0250] Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro Ala Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu Val
 [0251] 165 170 175

[0252]	Pro Lys Asn Ile Thr Ser Glu Ala Thr Cys Cys Val Ala Lys Ala Phe		
[0253]	180	185	190
[0254]	Thr Lys Ala Thr Val Met Gly Asn Ala Arg Val Glu Asn His Thr Glu		
[0255]	195	200	205
[0256]	Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr Tyr His Lys Ser Ala Ser Gly Gly Gly		
[0257]	210	215	220
[0258]	Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Pro Arg Ile Glu		
[0259]	225	230	235
[0260]	Glu Thr Ala Ser Leu Cys Asn Ile Tyr Lys Val Asn Arg Ser Glu Ser		
[0261]	245	250	255
[0262]	Gly Gln His Ser His Glu Val Gln Gly Leu Leu Asn Arg Gln Pro Leu		
[0263]	260	265	270
[0264]	Phe Val Tyr Lys Asp Lys Lys Cys His Ala Ile Gly Ala His Arg Asn		
[0265]	275	280	285
[0266]	Ser Met Asn Ala Thr Lys Ile Cys Glu Lys Glu Val Asp Thr Leu Lys		
[0267]	290	295	300
[0268]	Asp Gly Ile Asp Ile Phe Lys Gly Leu Leu Leu His Ile Val Gln Glu		
[0269]	305	310	315
[0270]	Thr Asn Thr Thr Gly Lys Pro Leu Thr Leu Gln Ala Glu Val Cys Gly		
[0271]	325	330	335
[0272]	Gln Tyr Glu Val Asp Lys His Phe Thr Gly Tyr Ala Ile Val Ser Leu		
[0273]	340	345	350
[0274]	Asn Gly Lys Asn Ile Phe Arg Val Asp Thr Ser Thr Gly Asn Trp Thr		
[0275]	355	360	365
[0276]	Gln Leu Asp His Glu Phe Glu Lys Phe Ile Glu Met Cys Lys Glu Asp		
[0277]	370	375	380
[0278]	Lys Val Leu Ala Ala Phe Leu Lys Lys Thr Thr Glu Gly Asp Cys Arg		
[0279]	385	390	395
[0280]	Thr Trp Leu Asp Glu Leu Met Leu His Trp Lys Gly Ala Ala Cys Ala		
[0281]	405	410	415
[0282]	Thr Cys Thr Gly Gly Ala Gly Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly Gly Ala		
[0283]	420	425	430
[0284]	Thr Cys Thr Thr Ala Gly Glu His Leu Glu Pro Ala Gly Ser		
[0285]	435	440	445
[0286]	<210> 7		
[0287]	<211> 1272		
[0288]	<212> DNA		
[0289]	<213> 智人		
[0290]	<400> 7		
[0291]	atgaatagct gtgagctgac caacatcacc attgcaatag agaaagaaga atgtcgtttc	60	
[0292]	tgcataagca tcaacaccac ttggtgtgct ggctactgct acaccaggga tctggtgtat	120	
[0293]	aaggaccag ccaggcccaa aatccagaaa acatgtacct tcaaggaact ggtatacgaa	180	

[0294]	acagttagag tgcccggtc tgctcaccat gcagattcct tgtatacata cccagtgccc	240
[0295]	acccagtgtc actgtggcaa gtgtgacagc gacagcactg attgtactgt gcgaggcctg	300
[0296]	gggcccagct actgctccctt tggtaaaatg aaagaaggcg gcggaaagcgg aggcggatct	360
[0297]	gggggaggat ctggcggcgg agctcctgat gtgcaggatt gcccagaatg cacgctacag	420
[0298]	gaaaacccat tcttctccca gccgggtgcc ccaatacttc agtgcattgg ctgctgcttc	480
[0299]	tcttagagcat atcccactcc actaaggctcc aagaagacga tgggttcca aaagaacgctc	540
[0300]	acctcagagt ccacttgctg tggtagctaaa tcatataaca gggtcacagt aatgggggtt	600
[0301]	ttcaaaagtgg agaaccacac ggctgtccac tgcagttactt gttattatca caaatctggc	660
[0302]	ggcggaaagcg gaggcggatc tgggggagga tctggcggcg gaaacttcac tataaaatca	720
[0303]	ttgtccagac ctggacagcc ctgggtgaa gcgcaggctt tcttgaataa aaatctttc	780
[0304]	cttcagtaca acagtgcacaa caacatggtc aaacctctgg gcctcctggc gaagaaggta	840
[0305]	tatgccacca gcacttgccc agaattgacc caaacgcgtt gagaagtggc gcgagaccc	900
[0306]	aggatgctcc ttgtgacat caaacccttccat ataaagacca gtgatccttc cactctgcaa	960
[0307]	gtcgagatgt ttgtcaacg tgaagcagaa cggcgcactg gtgcattctg gcagttcgcc	1020
[0308]	accaatggag agaaatccctt ccttttgcac gcaatgaaca tgacctggac agtaattat	1080
[0309]	catgaagccca gtaagatcaa ggagacatgg aagaaagaca gaggcgtgaa aaagtatttc	1140
[0310]	aggaagctct caaagggaga ctgcgatcac tggctcaggg aattcttagg gcactgggag	1200
[0311]	gcaatgccag aaccgacagt gtcaccagta aatgcttcag atatccactg gtcttcttc	1260
[0312]	agtctaccat ag	1272
[0313]	<210> 8	
[0314]	<211> 423	
[0315]	<212> PRT	
[0316]	<213> 智人	
[0317]	<400> 8	
[0318]	Met Asn Ser Cys Glu Leu Thr Asn Ile Thr Ile Ala Ile Glu Lys Glu	
[0319]	1 5 10 15	
[0320]	Glu Cys Arg Phe Cys Ile Ser Ile Asn Thr Thr Trp Cys Ala Gly Tyr	
[0321]	20 25 30	
[0322]	Cys Tyr Thr Arg Asp Leu Val Tyr Lys Asp Pro Ala Arg Pro Lys Ile	
[0323]	35 40 45	
[0324]	Gln Lys Thr Cys Thr Phe Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Arg Val	
[0325]	50 55 60	
[0326]	Pro Gly Cys Ala His His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val Ala	
[0327]	65 70 75 80	
[0328]	Thr Gln Cys His Cys Gly Lys Cys Asp Ser Asp Ser Thr Asp Cys Thr	
[0329]	85 90 95	
[0330]	Val Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Gly Glu Met Lys Glu	
[0331]	100 105 110	
[0332]	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala	
[0333]	115 120 125	
[0334]	Pro Asp Val Gln Asp Cys Pro Glu Cys Thr Leu Gln Glu Asn Pro Phe	
[0335]	130 135 140	

[0336]	Phe Ser Gln Pro Gly Ala Pro Ile Leu Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe			
[0337]	145	150	155	160
[0338]	Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro Leu Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu Val			
[0339]	165	170	175	
[0340]	Gln Lys Asn Val Thr Ser Glu Ser Thr Cys Cys Val Ala Lys Ser Tyr			
[0341]	180	185	190	
[0342]	Asn Arg Val Thr Val Met Gly Gly Phe Lys Val Glu Asn His Thr Ala			
[0343]	195	200	205	
[0344]	Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr Tyr His Lys Ser Gly Gly Ser Gly			
[0345]	210	215	220	
[0346]	Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Asn Phe Thr Ile Lys Ser			
[0347]	225	230	235	240
[0348]	Leu Ser Arg Pro Gly Gln Pro Trp Cys Glu Ala Gln Val Phe Leu Asn			
[0349]	245	250	255	
[0350]	Lys Asn Leu Phe Leu Gln Tyr Asn Ser Asp Asn Asn Met Val Lys Pro			
[0351]	260	265	270	
[0352]	Leu Gly Leu Leu Gly Lys Lys Val Tyr Ala Thr Ser Thr Trp Gly Glu			
[0353]	275	280	285	
[0354]	Leu Thr Gln Thr Leu Gly Glu Val Gly Arg Asp Leu Arg Met Leu Leu			
[0355]	290	295	300	
[0356]	Cys Asp Ile Lys Pro Gln Ile Lys Thr Ser Asp Pro Ser Thr Leu Gln			
[0357]	305	310	315	320
[0358]	Val Glu Met Phe Cys Gln Arg Glu Ala Glu Arg Cys Thr Gly Ala Ser			
[0359]	325	330	335	
[0360]	Trp Gln Phe Ala Thr Asn Gly Glu Lys Ser Leu Leu Phe Asp Ala Met			
[0361]	340	345	350	
[0362]	Asn Met Thr Trp Thr Val Ile Asn His Glu Ala Ser Lys Ile Lys Glu			
[0363]	355	360	365	
[0364]	Thr Trp Lys Lys Asp Arg Gly Leu Glu Lys Tyr Phe Arg Lys Leu Ser			
[0365]	370	375	380	
[0366]	Lys Gly Asp Cys Asp His Trp Leu Arg Glu Phe Leu Gly His Trp Glu			
[0367]	385	390	395	400
[0368]	Ala Met Pro Glu Pro Thr Val Ser Pro Val Asn Ala Ser Asp Ile His			
[0369]	405	410	415	
[0370]	Trp Ser Ser Ser Ser Leu Pro			
[0371]	420			



图1

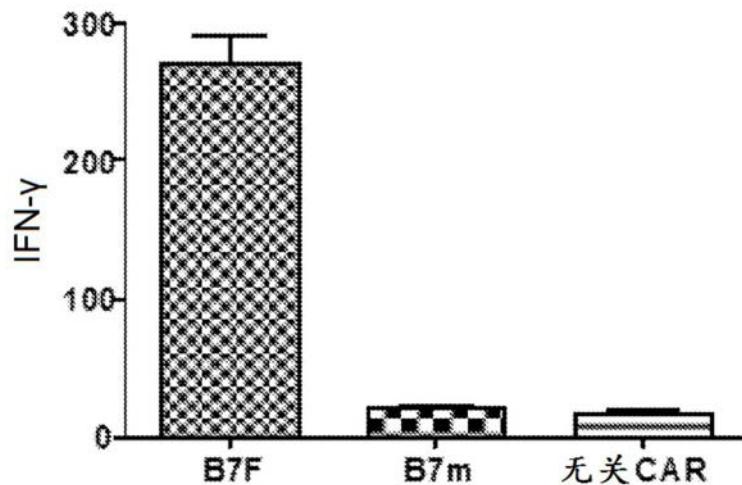


图2A

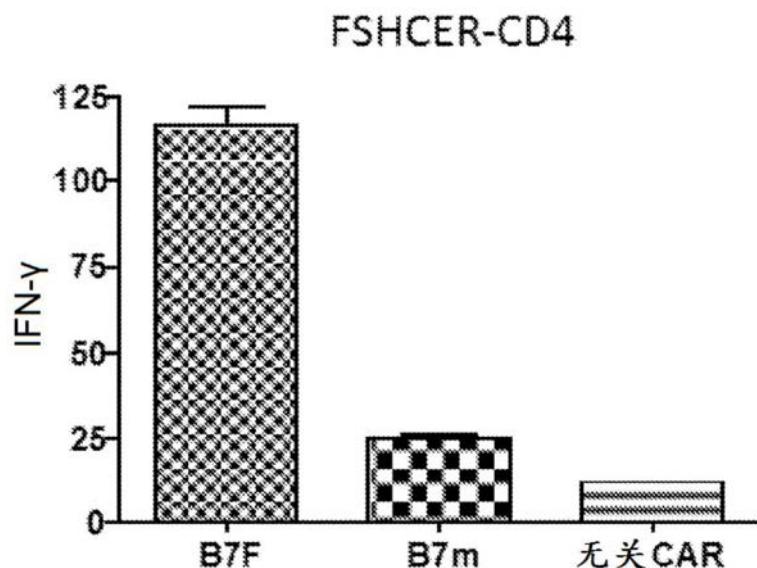


图2B

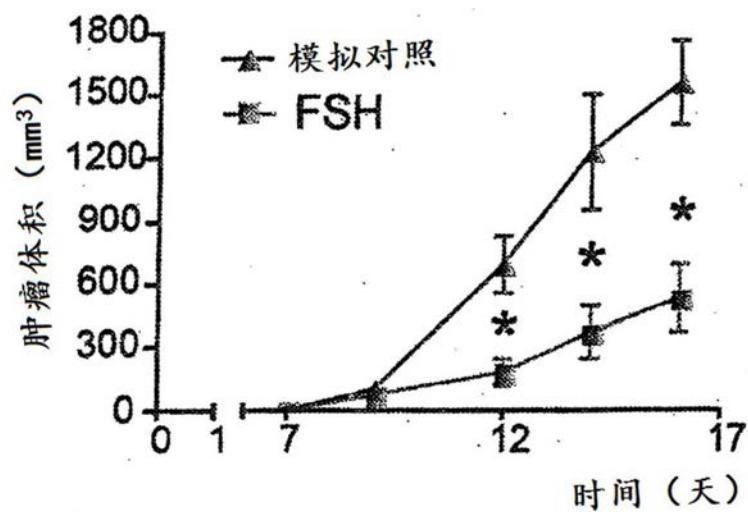


图3

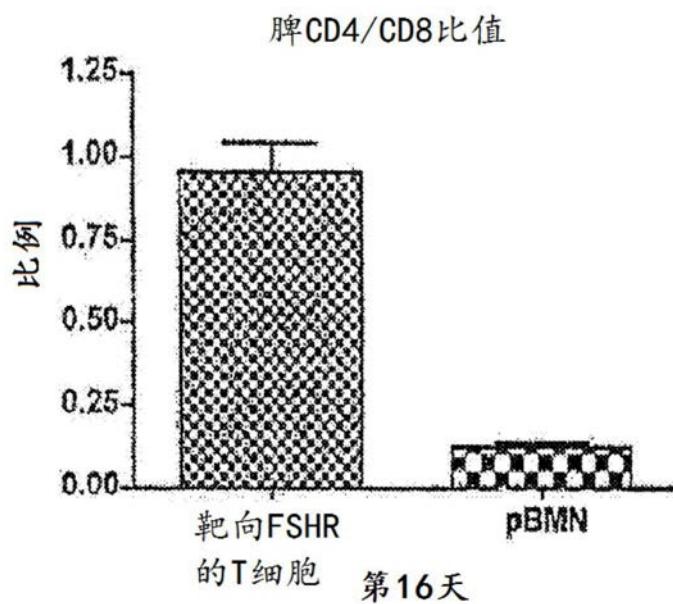


图4A

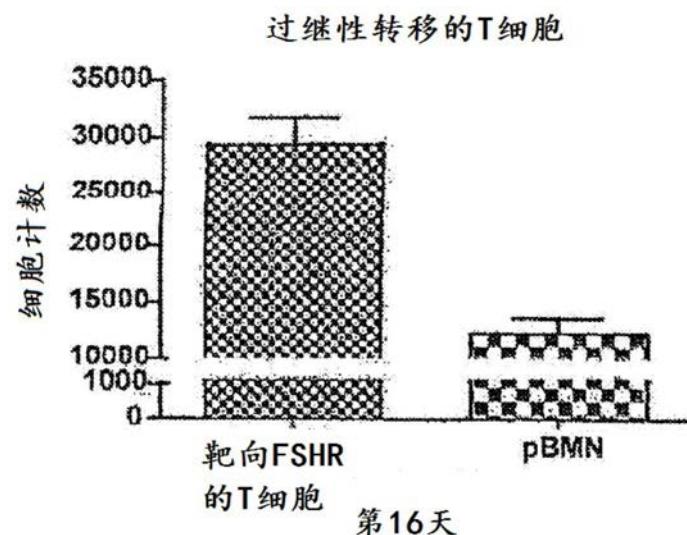


图4B

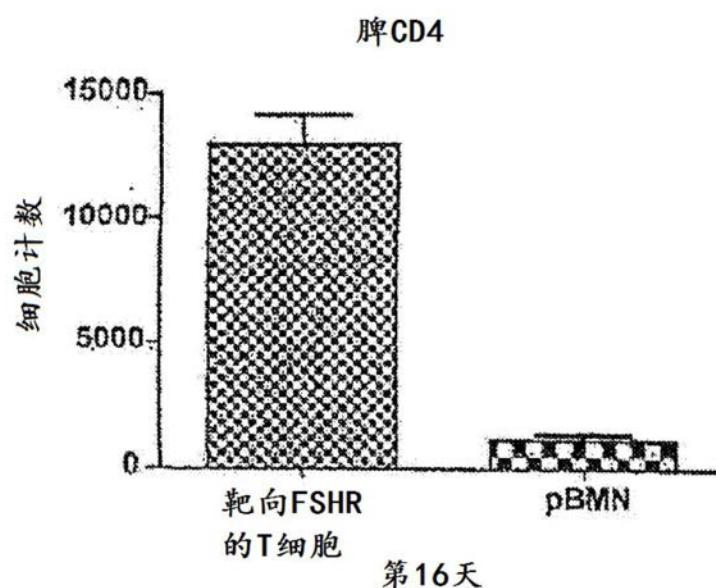


图4C

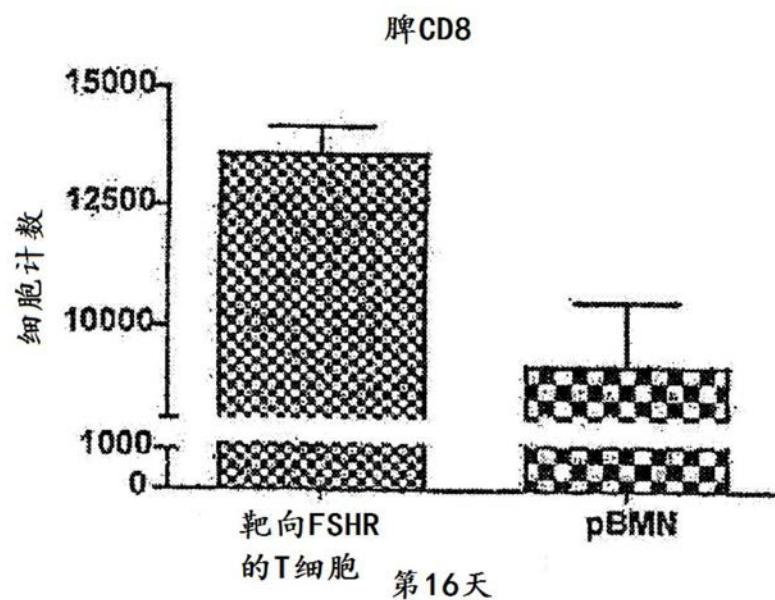


图4D

atgaagacactccagttttcttcctttctgttgctgaaagcaatctgctgcaatagc 60
 M K T L Q F F F L F C C C W K A I C C C N S

 Tgtgagctgaccaacatcaccattgcaatagagaaagaagaatgtcgttctgcataagc 120
 C E L T N I T I A I E K E E C R F C I S

 Atcaacaccacttggtgtgctggctactgctacaccaggatctggtgtataaggaccca 180
 I N T T W C A G Y C Y T R D L V Y K D P

 Gccaggccaaaatccagaaaacatgtaccttcaaggaactggtatagaaacagtgaga 240
 A R P K I Q K T C T F K E L V Y E T V R

 Gtgcggctgtgctcaccatgcagattcctgtatacataccagtggccacccagtg 300
 V P G C A H H A D S L Y T Y P V A T Q C

 Cactgtggcaagtgtgacagcgacagactgattgtactgtgcgaggcctggggccagc 360
 H C G K C D S D S T D C T V R G L G P S

 Tactgctccttggtaaatgaaagaagggtgggtctgggtggatccgggtgg 420
 Y C S F G E M K E G G G S G G G S G G G

 Tctgggtgggtgctcctgatgtgcaggagacagggtttcaccatgttgcggcaggctgtc 480
 S G G G A P D V Q E T G F H H V A Q A A

 Ctcaaactcctgagctcaagcaatccacccactaaggcctccaaagtgtctaggattaca 540
 L K L L S S S N P P T K A S Q S A R I T

 Gattggccagaatgcacgctacaggaaaaccattttctccagccgggtgccccata 600
 D C P E C T L Q E N P F F S Q P G A P I

 Cttcagtgcatgggtgctgcttcttagagcatatcccactccactaagggtccaagaag 660
 L Q C M G C C F S R A Y P T P L R S K K

 Acgatgttggtccaaaagaacgtcacctcagagtccacttgcgtgttagctaaatcatat 720
 T M L V Q K N V T S E S T C C V A K S Y

 Aacagggtcacagtaatgggggtttcaaaagtggagaaccacacggcgtgcactgcagt 780
 N R V T V M G G F K V E N H T A C H C S

 Acttggattatcacaaatctaccacgacgcccagcggccgaccaccaacaccggcc 840
 T C Y Y H K S T T P A P R P P T P A P

 Accatcggtcgagccctgtccctgcggccagaggcgtgcggccagcggccgggggc 900
 T I A S Q P L S L R P E A C R P A A G G

图5

Gcagtgcacacgagggggctggacttcgcctgtatatctacatctggcgcccttggcc 960
 A V H T R G L D F A C D I Y I W A P L A

 Gggacttgtggggccttcctgtcactggttatcacccttactgcaaacggggcaga 1020
 G T C G V L L S L V I T L Y C K R G R

 aagaaaactcctgtatataattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagag 1080
 K K L L Y I F K Q P F M R P V Q T T Q E

 Gaagatggctgttagctgccgattccagaagaagaagaaggaggatgtgaactgagatg 1140
 E D G C S C R F P E E E E G G C E L R V

 Aagttcagcaggagcgcagacgccccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataac 1200
 K F S R S A D A P A Y Q Q G Q N Q L Y N

 Gagctcaatctaggacgaagagaggagtcgtatgtttggacaagagacgtggccggac 1260
 E L N L G R R E E Y D V L D K R R G R D

 Ccttagatgggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactg 1320
 P E M G G K P R R K N P Q E G L Y N E L

 Cagaaagataagatggcgaggcctacagttagatggatgaaaggcgagcgcggagg 1380
 Q K D K M A E A Y S E I G M K G E R R R

 Gcaagggcacatggccttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgac 1440
 G K G H D G L Y Q G L S T A T K D T Y D

 gcccttcacatgcaggccctgccccctcgctaa 1473
 A L H M Q A L P P R *

图5(续)

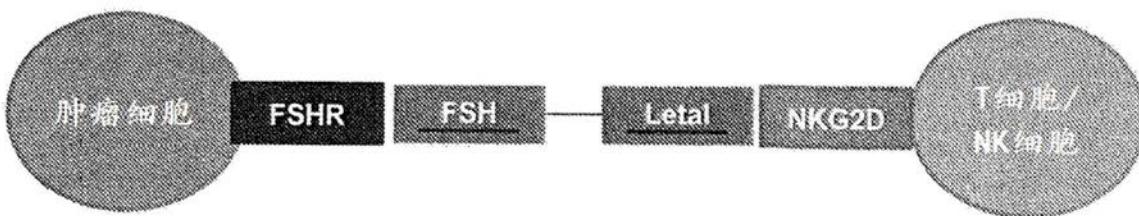


图6A

ATGaatagctgtgagctgaccaacatcaccattcaatagagaaaagaatgtcgtttc
 M N S C E L T N I T I A I E K E E C R F
 tgcataagcatcaacaccacttgggtgtgctggctactgctacaccaggatctgggttat
 C I S I N T T W C A G Y C Y T R D L V Y
 aaggacccagccaggccaaaatccagaaaacatgtacattcaaggaactggtatacgaa
 K D P A R P K I Q K T C T F K E L V Y E
 acagttagtgcggctgtgctcaccatgcagattcctgtatacataccatggcc
 T V R V P G C A H H A D S L Y T Y P V A
 acccagtgtcaactgtggcaagtgtgacagcgacagactgattgtactgtgcgaggcctg
 T Q C H C G K C D S D S T D C T V R G L
 gggcccaactgctccttggtaatgaaagaaggcggcggaaagcggaggcggatct
 G P S Y C S F G E M K E G G G S G G G S
 gggggaggatctggcggcggagctcctgtatgtgcaggagacagggtttcaccatgttgc
 G G G S G G G A P D V Q E T G F H H V A
 caggctgctctcaaactcctgagctcaagcaatccacccactaaggcctcccaaagtgc
 Q A A L K L L S S S N P P T K A S Q S A
 aggattacagattgcccagaatgcacgctacaggaaaacccattttctccagccgggt
 R I T D C P E C T L Q E N P F F S Q P G
 gccccaaacttcagtgcattggctgtgtttcttagagcatatcccactccactaagg
 A P I L Q C M G C C F S R A Y P T P L R
 tccaagaagacgatgttggccaaaagaacgtcacctcagagtccacttgcgttagct
 S K K T M L V Q K N V T S E S T C C V A
 aaatcatataacagggtcacagtaatgggggtttcaaagtggagaaccacacggcgtgc
 K S Y N R V T V M G G F K V E N H T A C
 cactgcagtacttggattatcacaaatctggcggcggaaagcggaggcggatctgggg
 H C S T C Y Y H K S G G G S G G G S G G
 ggatctggcggcggaaacttcactataaaatcattgtccagacactggcgtgc
 G S G G G N F T I K S L S R P G Q P W C
 gaagcgcaggtcttcttgcataaaaaatctttcttcagttacaacagtgacaacaacatg
 E A Q V F L N K N L F L Q Y N S D N N M
 gtcaaaacctctggcctcctggaaagaaggatatgccaccagcacttgggagaattg
 V K P L G L L G K K V Y A T S T W G E L
 acccaaacgctgggagaagttgggcgagacactcaggatgccttgcacatcaaacc
 T Q T L G E V G R D L R M L L C D I K P
 cagataaaagaccagtgcatttcactctgcacgtcgagatgtttgtcaacgtgaagca
 Q I K T S D P S T L Q V E M F C Q R E A
 gaacgggtgcactggcatacctggcagttgccaccatggagagaaaatccctccctt
 E R C T G A S W Q F A T N G E K S L L F
 gacgcaatgaacatgacccggacagtaattatcatgaagccagtaagatcaaggagaca
 D A M N M T W T V I N H E A S K I K E T
 tggaaagaaaagacagaggcgtggaaaagtatttcaggaaagctctcaaaggagactgc
 W K K D R G L E K Y F R K L S K G D C D
 cactggctcaggaaattcttagggcactgggaggcaatgccagaaccgacagtgacca
 H W L R E F L G H W E A M P E P T V S P
 gtaaatgcttcagatatccactggcattttcttagtctaccaTAG
 V N A S D I H W S S S L P Stop

图6B

ATGcacagctgcgagctgaccaacatcaccatcagcgtgaaaaagaggaatgccggttctgcata
 M H S C E L T N I T I S V E K E E C R F C I
 agcatcaacaccacttggcgccggctactgctacaccggacctggtgtacaaggac
 S I N T T W C A G Y C Y T R D L V Y K D
 cccgcacagacccaaaccccagaaagtgtgcaccccaaagaactggtgtacgagacagt
 P A R P N T Q K V C T F K E L V Y E T V
 cggctccggctgtgccagacacagcgtacccgtggccaccgag
 R L P G C A R H S D S L Y T Y P V A T E
 tgccactgcccggactgtgacagcgtacccgtggggactggccct
 C H C G K C D S D S T D C T V R G L G P
 agctactgcagcttcagcggatgaaggcgccggaaagcggaggcgatctggggga
 S Y C S F S E M K E G G G S G G G S G G
 ggatctggcgccggagacttcatttcaaggctgccccggactgcaagctgaaagagaac
 G S G G D F I I Q G C P E C K L K E N
 aagtacttcagcaagctggcgctccatctaccagtgcattggctgcttcagcaga
 K Y F S K L G A P I Y Q C M G C C F S R
 gcctaccccccaccctgcccagatccaagaaaaccatgctgtgcccagaacatcacctcc
 A Y P T P A R S K K T M L V P K N I T S
 gaggccacctgtcgctggccaaggcccttaccatggccaccgtgatggcaacgcccaga
 E A T C C V A K A F T K A T V M G N A R
 gtggaaaaccacacagactgtcactgcagcacctgttactaccacaagagcgtacg
 V E N H T E C H C S T C Y Y H K S A S
 ggcggcggaagcggaggatctggggaggatctggccgg
 G G G S G G S G G G S G G G
 ccaaggatagaagagactgcttctttgttaacatttacaagg
 P R I E E T A S L C N I Y K V
 aacaggtcagactctggacaacatagtcatttcaaggccactcaacagacagcct
 N R S E S G Q H S H E V Q G L L N R Q P
 cttttgtctacaaggataaaaaggtgtcatgcattggctcataggaacagcatgaat
 L F V Y K D K K C H A I G A H R N S M N
 gctacaaagatctgtgaaaaagaggttgcacactctgaaagatggatttgcacatttcaaa
 A T K I C E K E V D T L K D G I D I F K
 ggtctgtcttcacatagtcaggagactaacacaaccggaaagccctcactctgcag
 G L L L H I V Q E T N T T G K P L T L Q
 gctgagggtgtggccagatgtgaaatggatctgcacaggatacggccatttttagc
 A E V C G Q Y E V D K H F T G Y A I V S
 ctcaatggaaagaatataatccgtgttgcacacaagcactggcaactggaccactggat
 L N G K N I F R V D T S T G N W T Q L D
 catgaatttcgagaagttatagaaatgtcaaggaagacaaggatctgcctttta
 H E F E K F I E M C K E D K V L A A F L
 aagaagactacagagggcgactgcaggacctggcttgcactggaaa
 K K T T E G D C R T W L D E L M L H W K
 GaacatctggaggcctgcaggatctTAG
 E H L E P A G S Stop

图6C

ATGaatagctgtgagctgaccaacatcaccattcaatagagaaaagaatgtcgtttc
 M N S C E L T N I T I A I E K E E C R F
 tgcataaggcatcaacaccacttgggtgtctggctactgctacaccaggatctgggttat
 C I S I N T T W C A G Y C Y T R D L V Y
 aaggaccccagccaggccaaaatccagaaaacatgtacccatcaaggaactggtatacgaa
 K D P A R P K I Q K T C T F K E L V Y E
 acagttagatgtccccggctgtgtcaccatgcagattccctgtatacataccaggatggcc
 T V R V P G C A H H A D S L Y T Y P V A
 acccagtgtcaactgtggcaagtgtgacagcgacagcactgattgtactgtgcgaggcctg
 T Q C H C G K C D S D S T D C T V R G L
 gggcccagctactgtcccttggtaatgaaagaaggcggcggaaagcggaggcggatct
 G P S Y C S F G E M K E G G G S G G G S
 gggggaggatctggcggcggagctcctgtatgtgcaggattgcccagaatgcacgctacag
 G G G S G G A P D V Q D C P E C T L Q
 gaaaacccattcttcccccagccgggtgccccaaataacttcagtgcattggctgtgttc
 E N P F F S Q P G A P I L Q C M G C C F
 tctagagcatatcccactccactaaggcataagaagacgatgtggtccaaaagaacgtc
 S R A Y P T P L R S K K T M L V Q K N V
 acctcagagtccacttgcgtgttagctaaatcatataacagggtcacagtaatgggggt
 T S E S T C C V A K S Y N R V T V M G G
 ttcaaagtggagaaccacacggcgtgccactgcagtttttattatcacaatctggc
 F K V E N H T A C H C S T C Y Y H K S G
 ggcggaaagcggaggcggatctggggaggatctggcggcggaaacttcactataaaatca
 G G S G G S G G G S G G G G N F T I K S
 ttgtccagacctggacagccctggatgtgaagcgcaggcttcttgaataaaaaatctt
 L S R P G Q P W C E A Q V F L N K N L
 ttcccttcaagtacaacagtgacaacaacatggtcaaaacctctggcctctgggagaag
 F L Q Y N S D N N M V K P L G L L G K K
 gtatatgccaccaggacttggggagaattgacccaaacgcgtggagaagtggggcggagac
 V Y A T S T W G E L T Q T L G E V G R D
 ctcaggatgtcccttgcacatcaaacccagataaaagaccaggatgtacccactctg
 L R M L L C D I K P Q I K T S D P S T L
 caagtcgagatgtttgtcaacgtgaagcagaacggcgtgcactggatctggcaggatcc
 Q V E M F C Q R E A E R C T G A S W Q F
 gccaccaatggagagaaatccctcttgcacgcaatgaacatgacctggacagtaatt
 A T N G E K S L L F D A M N M T W T V I
 aatcatgaagccagtaagatcaaggagacatgaaagaaaagacagaggctggaaaagtat
 N H E A S K I K E T W K K D R G L E K Y
 ttcaggaagctctcaaagggagactgcgatcactggctcaggatctttagggactgg
 F R K L S K G D C D H W L R E F L G H W
 gaggcaatgccagaaccgacaggatgtcaccaggatgtccatccactggcttct
 E A M P E P T V S P V N A S D I H W S S
 tctagtttaccaTAG
 S S L P Stop

图6D

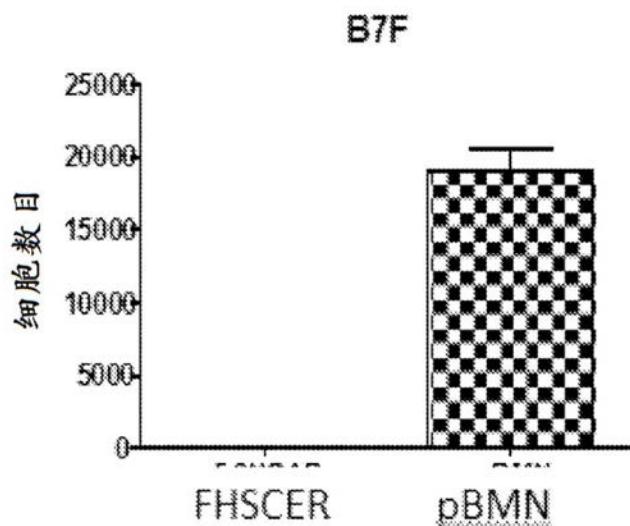


图7A

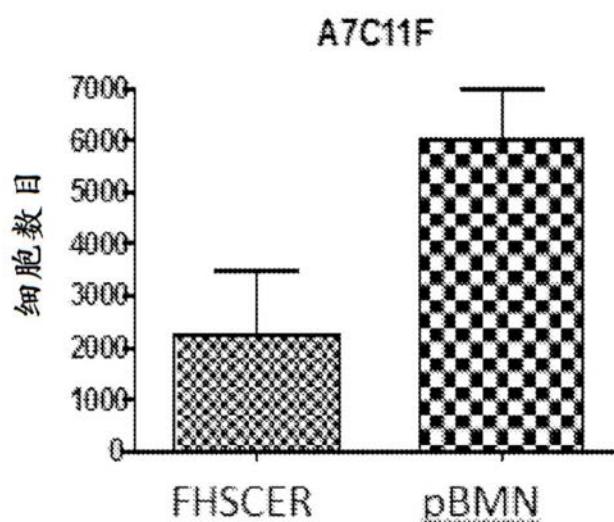


图7B



图8

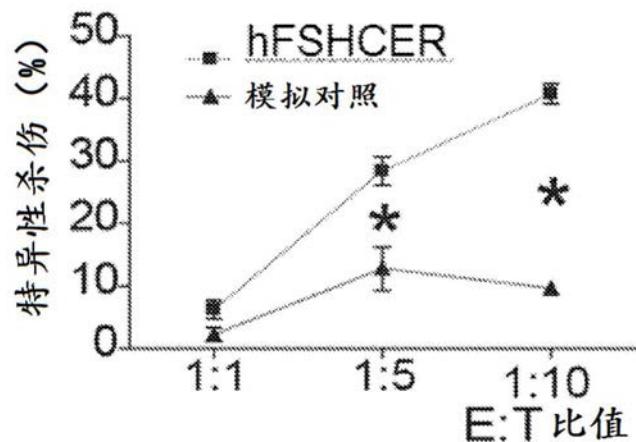


图9

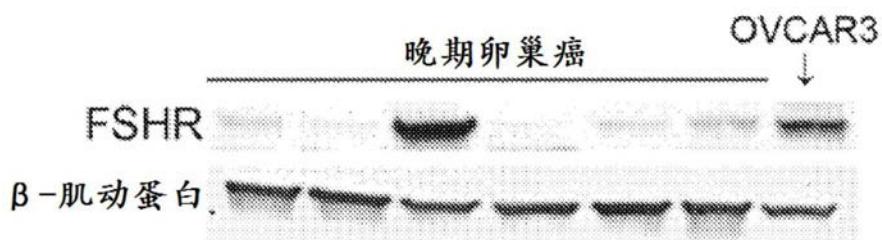


图10

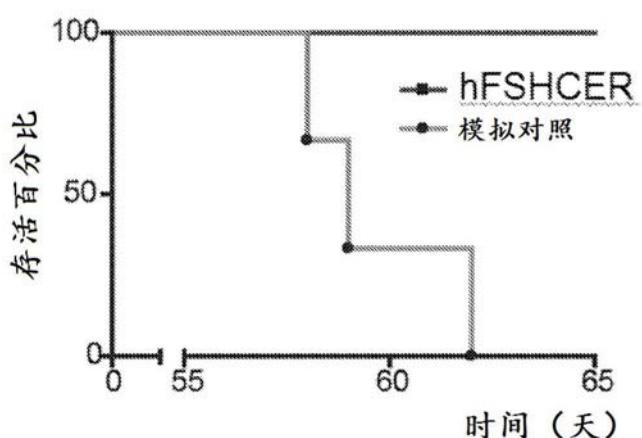


图11

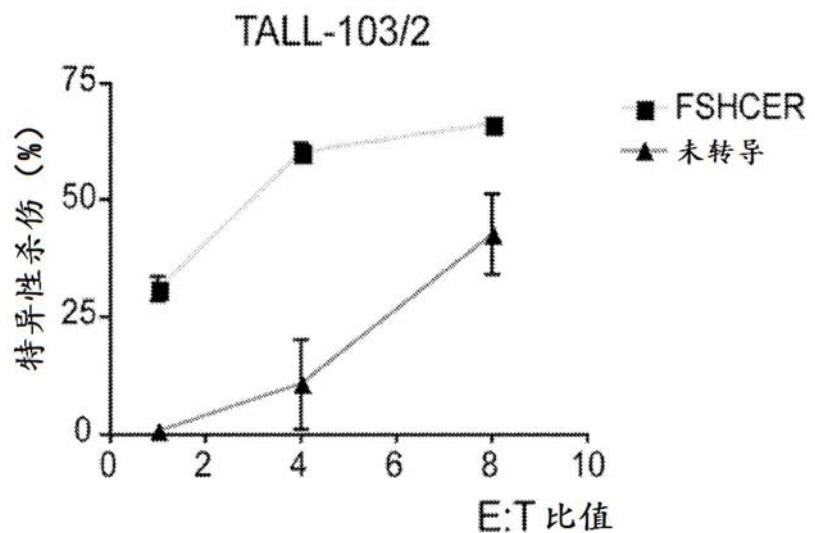


图12