(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118374493 A
(43)申请公布日 2024.07.23

(21)申请号 202410174641.2

(22)申请日 2018.05.15

(30)优先权数据
62/507,565 2017.05.17 US

(62)分案原申请数据
201880047704.0 2018.05.15

(71)申请人 西雅图儿童医院(DBA西雅图儿童研究所)
地址 美国华盛顿州

(72)发明人 魏佳 迈克尔·C·延森

(74)专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理有限责任公司 11290
专利代理师 洪俊梅 杨国强

(51)Int.Cl.
C12N 15/113(2010.01)
C12N 15/12(2006.01)
C12N 15/62(2006.01)
C12N 15/867(2006.01)
C12N 15/85(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61K 35/28(2015.01)

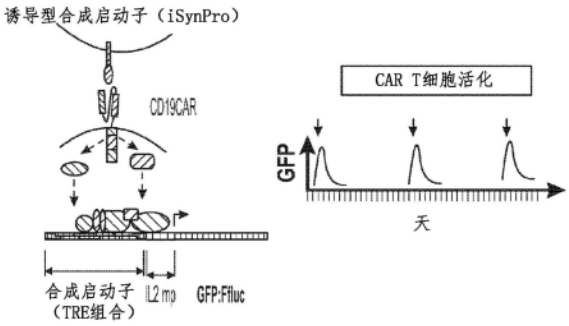
权利要求书1页 说明书28页
序列表（电子公布） 附图37页

(54)发明名称

生成哺乳动物T细胞活化诱导型合成启动子(SYN+PRO)以改善T细胞疗法

(57)摘要

本文描述的本发明的方面涉及制造和使用用于转基因表达的诱导型启动子的方法。所述诱导型启动子衍生自NFAT-RE诱导型系统,并且用于改善或增强T细胞存活和增殖。



CN 118374493 A

1.一种分离的核酸序列,所述核酸序列包含i)转录因子应答元件(TRE),所述转录因子应答元件具有包含SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:39中任一项的序列或者具有与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:39中任一项有至少95%序列同一性的序列,以及ii)最小启动子。

2.如权利要求1所述的分离的核酸序列,其中,所述TRE包含SEQ ID NO:7所示的序列或者包含与SEQ ID NO:7所示的序列有至少95%序列同一性的序列。

3.如权利要求1所述的分离的核酸序列,其中,所述最小启动子包括IL-2最小启动子。

4.如权利要求1所述的分离的核酸序列,其中,所述TRE和最小启动子可操作地连接至编码有效载荷的核酸序列。

5.如权利要求4所述的分离的核酸序列,其中,所述有效载荷改善细胞的健康和/或功能。

6.如权利要求4所述的分离的核酸序列,其中,所述有效载荷包括蛋白质或RNA。

7.如权利要求4所述的分离的核酸序列,其中,所述有效载荷包括CD122、CD127、CD360、caSTAT5、dnSHP1、dnSHP2、PD1:MyD88、PD1:CD28、CD200:CD28、或miRNA155。

8.一种载体,所述载体包含权利要求1所述的分离的核酸序列,其中,所述分离的核酸序列可操作地连接至编码有效载荷的序列。

9.如权利要求8所述的载体,其中,所述有效载荷改善细胞的健康和/或功能。

10.如权利要求8所述的载体,其中,所述有效载荷包括蛋白质或RNA。

11.如权利要求8所述的载体,其中,所述载体包括病毒载体、基于转座酶的微环或纳米质粒。

12.一种细胞,所述细胞包含权利要求1所述的分离的核酸序列或权利要求8所述的载体。

13.如权利要求12所述的细胞,其中,所述细胞为免疫细胞。

14.如权利要求12所述的细胞,其中,所述细胞表达嵌合抗原受体(CAR)。

15.一种制造治疗细胞的方法,所述方法包括:

向细胞提供权利要求8所述的载体,其中,在所述提供后,所述细胞表达嵌合抗原受体(CAR),

从而制造所述治疗细胞。

16.如权利要求15所述的方法,其中,所述治疗细胞为免疫细胞。

17.如权利要求15所述的方法,所述方法进一步包括诱导所述治疗细胞表达有效载荷。

18.如权利要求17所述的方法,其中,所述诱导包括将所述细胞与(i)配体,(ii)抗体或其抗原结合片段,或(iii)化学物质进行接触。

19.如权利要求18所述的方法,其中,所述抗体包括抗CD3抗体或抗CD28抗体。

20.如权利要求18所述的方法,其中,所述化学物质包括佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯或离子霉素。

生成哺乳动物T细胞活化诱导型合成启动子(SYN+PRO)以改善T细胞疗法

[0001] 本申请是申请日为2018年05月15日、发明名称为“生成哺乳动物T细胞活化诱导型合成启动子(SYN+PRO)以改善T细胞疗法”的申请号为201880047704.0的专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2017年5月17日提交的美国临时专利申请号62/507,565的优先权的权益。将前述申请的全部公开整体以引用的方式明确地并入。

[0004] 对序列表的参考

[0005] 本申请与电子格式的序列表一起提交。将序列表作为2018年5月15日创建的名为SCRI.152WO.TXT的22kb大小的文件提供。将序列表的电子格式中的信息以引用的方式整体并入本文。

技术领域

[0006] 本文描述了制造和使用用于转基因表达的诱导型启动子的方法。所述诱导型启动子衍生自NFAT-RE诱导型系统,并且用于改善或增强T细胞存活和增殖。

背景技术

[0007] 在T细胞疗法中已使用了许多不同的诱导型启动子。仍持续需要显示出强信号的启动子,并且特别地,显现出对显示出高信噪比并且可反复开启的启动子的需求。

发明内容

[0008] 在第一方面,提供了制造诱导型合成启动子文库的方法,其中,所述方法包括:筛选启动子,其中,筛选在CAR T细胞活化后被活化的启动子,从而产生一组经筛选的启动子;筛选转录因子应答元件,从而产生一组经筛选的转录因子应答元件;制造诱导型合成启动子文库,所述诱导型合成启动子文库包含在转录因子应答元件的CAR T细胞活化后被活化的启动子;以及合成寡核苷酸,其中,所述寡核苷酸包含编码经筛选的转录因子应答元件的第一序列以及编码经筛选的启动子的第二序列。

[0009] 在第二方面,提供了诱导型合成启动子。所述诱导型合成启动子包含编码转录因子应答元件的第一序列以及编码启动子序列的第二序列,任选地,其中,所述诱导型合成启动子包含SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:33中的一个或多个。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子可通过嵌合抗原受体活化来诱导。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子可通过所述嵌合抗原受体结合至配体来诱导。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子可通过与抗CD3/抗CD28抗体相互作用来诱导。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子可通过化学物质来诱导。在一些替代方式中,所述化学物质为PMA或罗奴霉素。在一些替代方式中,所述启动子包含内源性IL2最小启动子(minimal promoter)序列。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子包含SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:33中任一项所示的序列。在一些

替代方式中,所述转录因子应答元件为E2F1、EGR1、HIF1A、NFAT、LEF1、SP1、PU.1、NFKB、JUN、FOS和/或STAT4。

[0010] 在第三方面,提供了用于分子表达的细胞,其中,所述细胞包含:载体,其中,所述载体包含上述任何替代方式所述的诱导型合成启动子;编码分子的基因;以及编码嵌合抗原受体的序列。所述诱导型合成启动子可包含编码转录因子应答元件的第一序列以及编码启动子序列的第二序列,任选地,其中,所述诱导型合成启动子包含SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:33中的一个或多个。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子可通过嵌合抗原受体活化来诱导。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子可通过所述嵌合抗原受体结合至配体来诱导。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子可通过与抗CD3/抗CD28抗体相互作用来诱导。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子可通过化学物质来诱导。在一些替代方式中,所述化学物质为PMA或罗奴霉素。在一些替代方式中,所述启动子包含内源性IL2最小启动子序列。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子包含SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:33中任一项所示的序列。在一些替代方式中,所述转录因子应答元件为E2F1、EGR1、HIF1A、NFAT、LEF1、SP1、PU.1、NFKB、JUN、FOS和/或STAT4。在一些替代方式中,所述分子为蛋白质、抗体或其结合片段、促增殖分子或可根除肿瘤的分子。在一些替代方式中,所述细胞为造血干细胞。在一些替代方式中,所述嵌合抗原受体对CD19而言是特异性的。在一些替代方式中,所述细胞为CD8+或CD4+。在一些替代方式中,所述分子的表达是可诱导的。在一些替代方式中,所述CAR包含信号转导结构域(signaling domain)。在一些替代方式中,所述信号转导结构域为1G、2G或3G。在一些替代方式中,所述载体为慢病毒载体、基于转座酶的微环或纳米质粒(nanoplasmid)。在一些替代方式中,所述细胞进一步包含用于CAR特异性活化的TCR敲除系统。在一些替代方式中,所述分子为嵌合细胞因子受体。在一些替代方式中,所述嵌合细胞因子受体包括CCR、CASTAT5、PD1嵌合体和/或miRNA。在一些替代方式中,所述miRNA包括miRNA155。在一些替代方式中,所述CCR包括CD122、CD127或CD360。在一些替代方式中,所述PD1嵌合体包括PD1:CD28、dnSHP1/2和/或IL-12。

[0011] 在第四方面,提供了在CAR T细胞疗法中调节基因表达的方法,所述方法包括:提供本文任一替代方式所述的细胞;以及将所述细胞导入需要CAR T细胞疗法的受试者中。所述细胞包含:载体,其中,所述载体包含本文任何替代方式所述的诱导型合成启动子;编码分子的基因;以及编码嵌合抗原受体的序列。所述诱导型合成启动子可包含编码转录因子应答元件的第一序列以及编码启动子序列的第二序列,任选地,其中,所述诱导型合成启动子包含SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:33中的一个或多个。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子可通过嵌合抗原受体活化来诱导。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子可通过所述嵌合抗原受体结合至配体来诱导。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子可通过与抗CD3/抗CD28抗体相互作用来诱导。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子可通过化学物质来诱导。在一些替代方式中,所述化学物质为PMA或罗奴霉素。在一些替代方式中,所述启动子包含内源性IL2最小启动子序列。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子包含SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:33中任一项所示的序列。在一些替代方式中,所述转录因子应答元件为E2F1、EGR1、HIF1A、NFAT、LEF1、SP1、PU.1、NFKB、JUN、FOS和/或STAT4。在一些替代方式中,所述分子为蛋白质、抗体或其结合片段、促增殖分子或可根除肿瘤的分子。在一些替代方式中,所述细胞为造血干细胞。在一些替代方式中,所述嵌合抗原受体对CD19而

言是特异性的。在一些替代方式中,所述细胞为CD8+或CD4+。在一些替代方式中,所述分子的表达是可诱导的。在一些替代方式中,所述CAR包含信号转导结构域。在一些替代方式中,所述信号转导结构域为1G、2G或3G。在一些替代方式中,所述载体为慢病毒载体、基于转座酶的微环或纳米质粒。在一些替代方式中,所述细胞进一步包含用于CAR特异性活化的TCR敲除系统。在一些替代方式中,所述分子为嵌合细胞因子受体,例如CCR(CD122、CD127和CD360)、CASTAT5和PD1嵌合体(例如PD1:CD28、dnSHP1/2、IL-12)和/或miRNA(例如miRNA155)。在一些替代方式中,所述在CAR T细胞疗法中调节基因表达的方法进一步包括监测所述受试者对在所述诱导型合成启动子的控制下表达的分子的应答。在所述在CAR T细胞疗法中调节基因表达的方法的一些替代方式中,进一步监测所述受试者在所述诱导型合成启动子的控制下表达的分子的表达。在所述在CAR T细胞疗法中调节基因表达的方法的一些替代方式中,所述分子为蛋白质、抗体或其结合片段、细胞因子和/或抗癌治疗剂。在所述在CAR T细胞疗法中调节基因表达的方法的一些替代方式中,所述方法进一步包括诱导所述分子的表达。在一些替代方式中,通过给予PMA或罗奴霉素来进行所述诱导。在一些替代方式中,在向有需要的受试者给予所述细胞前进行所述诱导步骤,并且其中,在给予所述细胞前将所述细胞暴露于抗CD3/抗CD28珠。在一些替代方式中,所述受试者患有癌症或曾被诊断为患有癌症。在一些替代方式中,所述分子为嵌合细胞因子受体,例如CCR(CD122、CD127和CD360)、CASTAT5和PD1嵌合体(例如PD1:CD28、dnSHP1/2、IL-12)和/或miRNA(例如miRNA155)。在一些替代方式中,所述分子为嵌合细胞因子受体。在一些替代方式中,所述嵌合细胞因子受体包括CCR、CASTAT5、PD1嵌合体和/或miRNA。在一些替代方式中,所述miRNA包括miRNA155。在一些替代方式中,所述CCR包括CD122、CD127或CD360。在一些替代方式中,所述PD1嵌合体包括PD1:CD28、dnSHP1/2和/或IL-12。

[0012] 在第五方面,提供了改善、抑制或治疗有需要的受试者中的疾病(例如癌症(例如白血病、乳腺癌、胃癌、食道癌、脑癌、子宫癌、前列腺癌、骨癌、肝癌、胰腺癌、卵巢癌、肺癌、结肠癌、肾癌、膀胱癌、子宫癌或甲状腺癌中的任一种或多种))的方法,其中,所述方法包括:向细胞提供载体,其中,所述细胞包含本文所述任一替代方式所述的诱导型合成启动子,并且其中,所述细胞包含嵌合抗原受体;向所述有需要的受试者给予所述细胞;以及诱导分子的表达。所述载体包含本文所述任何替代方式所述的诱导型合成启动子、编码分子的基因以及编码嵌合抗原受体的序列。所述诱导型合成启动子可包含编码转录因子应答元件的第一序列以及编码启动子序列的第二序列,任选地,其中,所述诱导型合成启动子包含SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:33中的一个或多个。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子可通过嵌合抗原受体活化来诱导。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子可通过所述嵌合抗原受体结合至配体来诱导。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子可通过与抗CD3/抗CD28抗体相互作用来诱导。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子可通过化学物质来诱导。在一些替代方式中,所述化学物质为PMA或罗奴霉素。在一些替代方式中,所述启动子包含内源性IL2最小启动子序列。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子包含SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:33中任一项所示的序列。在一些替代方式中,所述转录因子应答元件为E2F1、EGR1、HIF1A、NFAT、LEF1、SP1、PU.1、NFKB、JUN、FOS和/或STAT4。在一些替代方式中,所述分子为蛋白质、抗体或其结合片段、促增殖分子或可根除肿瘤的分子。在一些替代方式中,所述细胞为造血干细胞。在一些替代方式中,所述嵌合抗原受体对CD19而言是特

异性的。在一些替代方式中,所述细胞为CD8+或CD4+。在一些替代方式中,所述分子的表达是可诱导的。在一些替代方式中,所述CAR包含信号转导结构域。在一些替代方式中,所述信号转导结构域为1G、2G或3G。在一些替代方式中,所述载体为慢病毒载体、基于转座酶的微环或纳米质粒。在一些替代方式中,所述细胞进一步包含用于CAR特异性活化的TCR敲除系统。在一些替代方式中,所述分子为CCR(CD122)、CASTAT5和PD1:CD28和/或miRNA。在一些替代方式中,所述细胞来自所述受试者。在所述改善、抑制或治疗有需要的受试者中的疾病的方法的一些替代方式中,所述方法进一步包括监测所述受试者对在所述诱导型合成启动子的控制下表达的分子的应答。在一些替代方式中,所述分子为蛋白质、抗体、细胞因子或抗癌治疗剂。在一些替代方式中,所述方法进一步包括诱导所述分子的表达。在一些替代方式中,通过给予PMA或罗奴霉素进行所述诱导。在一些替代方式中,在向有需要的受试者给予所述细胞前进行所述诱导步骤,其中,在给予所述细胞前将所述细胞暴露于缀合至珠上的抗CD3/抗CD28抗体。在一些替代方式中,所述受试者患有癌症。在一些替代方式中,所述分子为CCR(CD122)、CASTAT5、PD1:CD28和/或miRNA。在一些替代方式中,选择所述受试者以进行癌症疗法。在一些替代方式中,所述癌症为白血病、乳腺癌、胃癌、食道癌、脑癌、子宫癌、前列腺癌、骨癌、肝癌、胰腺癌、卵巢癌、肺癌、结肠癌、肾癌、膀胱癌、子宫癌或甲状腺癌。在一些替代方式中,所述分子为嵌合细胞因子受体。在一些替代方式中,所述嵌合细胞因子受体包括CCR、CASTAT5、PD1嵌合体和/或miRNA。在一些替代方式中,所述miRNA包括miRNA155。在一些替代方式中,所述CCR包括CD122、CD127或CD360。在一些替代方式中,所述PD1嵌合体包括PD1:CD28、dnSHP1/2和/或IL-12。

附图说明

[0013] 图1示出了CAR T细胞疗法中经调节的基因表达的示意图。

[0014] 图2示出了CAR活化诱导的基因表达系统的示意图。

[0015] 图3示出了举例说明诱导型合成启动子(iSynPro)的功能的图和表明通过iSynPro进行CAR T细胞活化的图。当scFv与抗原接合(engagement)后,CAR的胞内结构域诱导各种转录因子结合至不同的启动子区域,以活化相应的基因表达。在内源基因表达的进行过程中,由最佳TRE元件组成的合成启动子可通过利用活化的转录因子开始下游转录。可在CAR T细胞活化后多次诱导此种通过合成启动子进行的转录活化。对启动子进行工程化的传统方式需要在理性设计方面付出努力。测试的TRE数量有限,并且成功率低。如图所示,生成了具有数百万个独特种类的合成启动子文库,并允许CAR T细胞筛选出最强的诱导型启动子。

[0016] 图4为说明CD8+细胞中NFAT启动子的功能的图。如图所示,NFAT调节的启动子导致CD8+细胞中的不良诱导。

[0017] 图5示出了如何设计合成启动子文库以筛选出在CAR T细胞活化后被活化的启动子的示意图。

[0018] 图6示出了如何使用不同数据库来生成合成启动子文库的构成组件(building blocks)的示意图。如文氏图(Ven diagram)所示,蛋白质文库可包含E2F1、EGR1、FOS、HIF1A、JUN、NFAT、LEF1、NFKB、SP1、PU.1和/或STAT4。

[0019] 图7是示出了用于构建诱导型iSynPro文库的步骤和方法的示意图。

[0020] 图8示出了来自iSynPro质粒文库的菌落的Sanger测序的示意图。示出的图说明了

测序结果的映射(mapping)。如图所示,从序列中映射转录因子应答元件(TRE)。在两个条形图中示出了对选择的克隆的测序结果的总结。左图中示出的是对10个克隆中的TRE频率的测量。右图为对每个克隆的TRE数的测量。

[0021] 图9示出了用于评价与NFAT和NFkB调节的启动子相比的iSynPro文库Jurkat细胞的一系列FACS测定。

[0022] 图10为在CD8原代T细胞中筛选启动子文库的实例。如图所示,首先将细胞用具有iSynPro-IL2mp启动子以驱动GFP表达的核酸以及表达具有EGFRt标记蛋白的CD19的核酸共转导。然后用抗CD3/抗CD28珠活化细胞,随后将抗CD3/抗CD28珠去除。然后对细胞进行EGFRt+和GFP-群的分选。然后通过与CD19+细胞共培养来刺激细胞,随后在第1天、第2天、第3天以及重新刺激后第2天分选GFP阳性细胞。

[0023] 图11在条形图中示出了分选细胞中的iSynPro文库的下一代MiSeq测序。如图所示,在第1天、第2天、第3天以及重新刺激后第2天的时间点提供了由细胞表达的独特重叠群(unique contigs)。

[0024] 图12为示出了用于在来自两个供体的CD8 T细胞中进行iSynPro验证的方案的示意图。示出了以下3种核酸:a)用于表达iSynPro启动子-IL2mp以驱动GFP表达的核酸;b)用于表达具有EGFRt标记的CD19的核酸;以及c)用于表达具有EGFRt标记和DHFRdm启动子药物诱导型启动子的CD19+的核酸。用核酸a)和b)或c)转导细胞。如图所示,用抗CD3/抗CD28珠刺激细胞,并在24小时后转导细胞。去除珠并实施MTX选择。然后在第13天将细胞与经照射的Tm-LCL细胞共培养。在第30天和第46天,再次将细胞与经照射的Tm-LCL细胞共培养。

[0025] 图13示出了使用图14中示出的方法在来自两个不同供体的CD8 T细胞中进行iSynPro验证的结果。在抗CD3/抗CD28珠活化后,将CD8 T细胞用CD19CAR和iSynPro文库共转导。珠去除后六天,将细胞与经照射的Tm-LCL细胞共培养,并在24h和72h收获部分细胞用于流式细胞术分析。培养两周后,用Tm-LCL重新刺激其余细胞,接着进行另一轮重新刺激。首先在供体#1$CD8^+$T细胞中验证选择的28个iSynPro最高命中(top hits)。GFP信号由抗CD3/抗CD28珠通过内源性TCR以不同程度开启,并在珠去除后返回基线。当CD19CAR阳性T细胞遇到经照射的Tm-LCL细胞时,至少在3个周期内反复观察到此类向上和向下的信号(up and down signal)。总体而言,诱导后,与6×NFAT启动子相比,28个iSynPro中的27个显示出较高的GFP阳性和较高的MFI;与7×NFkB相比,iSynPro中的一半具有较高的GFP阳性,并且其中10个具有较高的MFI。然后使用28个iSynPro中的9个在供体#2细胞中重复实验。此次将药物选择标记DHFRdm掺入CD19CAR构建体中,这使我们能够选择出更纯的群。观察到与之前非常相似的结果。

[0026] 图14显示了来自以上两种供体细胞的iSynPro调节的GFP表达结果的叠加。两种供体细胞之间的GFP%和MFI结果均非常相似,这意味着iSynPro的诱导是一致且稳健的。

[0027] 图15示出了转录因子下拉(pull down)测定。方法:使用生物素化引物对iSynPro序列和对照序列进行PCR扩增。从经PMA/离子霉素处理的Jurkat细胞中分离核提取物,并与生物素化的双链iSynPro DNA(此处测试了3个iSynPro序列)孵育,然后进行缀合有链霉亲和素的磁珠下拉。将下拉的具有启动子DNA的转录因子变性,施加于SDS-PAGE凝胶,并通过靶向预测的转录因子的抗体进行免疫印迹,所述转录因子的相应TRE显示在此处测试的3个iSynPro序列中的至少两个中。

[0028] 图16示出了可通过CD19CAR和不同CD19+细胞的相互作用来活化iSynPro。从左至右连续示出了携带Tm-LCL、K562/CD19、Raji、DHL-4、SupB15、Be2/CD19、K562和Be2的细胞在刺激后的GFP表达。

[0029] 图17是一系列条形图,示出了通过表达T细胞共刺激因子(CD28受体)CD80和CD86的不同靶细胞系活化CD19CAR T细胞中iSynPro S1-61-GFP:ffluc和7×NFkB-GFP:ffluc的结果。从左至右为K562、K562/OKT3、K562/CD19、K562/CD80/CD86/CD19、K562/CD80/CD86、Raji、Raji/CD19-和Tm-LCL。亲代K562细胞在表面上不表达CD19、CD80或CD86。K562/OKT3用作阳性对照以显示TCR活化的杀灭。在K562上仅表达外源CD80/CD86既不能够活化iSynPro也不能够活化7×NFkB。CD80/CD86和CD19的协同活化作用仅在7×NFkB细胞中可见(右图,其中GFP表达在K562/CD80/CD86/CD19中比在K562/CD19中更强)而非在S1-61细胞中(左图)。Raji和Tm-LCL细胞以不同水平表达CD19和CD80/CD86。S-61和7×NFkB均被它们活化,并且后者显示出较强的信号,这可能与CD19和CD80/CD86的协同作用有关。当通过CRISPR敲除CD19基因时,两个启动子的GFP表达均急剧下降至接近基线水平,这反过来进一步支持了在K562细胞中的观察。总体而言,数据表明T细胞共刺激因子不诱导S1-61或7×NFkB,并且S1-61活化比7×NFkB活化对CAR-抗原相互作用而言更具有特异性。为显示S1-61或7×NFkB的诱导共存并且与CD19CAR功能相关而非随机效应,如下图20和图21所示,同时进行了细胞因子释放测定和铬释放测定。

[0030] 图18示出了仅CD80/CD86-共刺激因子也不诱导细胞中的细胞因子释放。以连续顺序示出了以下细胞:模拟(mock)、CD19CAR、CD19CAR+S1-61-GFP:ffluc和CD19CAR+NFkB-GFP:ffluc。测定的细胞因子为IL-2、IFN-g和TNFa。

[0031] 图19示出了铬释放测定的结果,表明表达CD80/CD86共刺激因子而不表达CD19的细胞未被CD19CAR T细胞杀灭。亲代K562细胞在表面上不表达CD19、CD80或CD86。数据显示当表达外源CD19而不表达CD80/CD86时,K562细胞仅被CD19CAR T细胞杀灭。方法:将CD19CAR靶细胞用Cr51标记,然后与连续稀释的效应细胞共培养以达到不同的效应细胞:靶细胞比30:1、10:1、3:1、1:1。也用2% SDS或RPMI培养基培养标记的靶细胞作为阳性和阴性对照。孵育4小时后,收集上清液并转移至LUMA96孔板。将板干燥过夜,然后通过TopCount微板闪烁计数器读取。

[0032] 图20示出了使用Be2/CD19皮下模型的初步iSynPro体内研究。图中示出了方案的时间线。将15只NSG小鼠分为3组,每组5只。A组小鼠在每侧的侧腹皮下接受300万个Be2细胞。B组小鼠在左侧腹接受300万个Be2细胞,并在右侧腹接受300万个Be2/CD19细胞。C组小鼠在每侧的侧腹接受300万个Be2/CD19细胞。肿瘤植入(engraftment)后5天,将表达CD19CAR/S1-61-GFP:ffluc的250万个CD8 T细胞静脉注射至每组的每只小鼠。在T细胞注射后1天拍摄发光图像,并连续拍摄数天以跟踪植入的T细胞中的荧光素酶(luciferase)表达。

[0033] 图21示出了上述体内实验的结果。T细胞注射后1天,在同时植入Be2细胞和Be2/CD19细胞的B组小鼠中观察到强荧光素酶信号。在两侧腹均植入Be2/CD19细胞的C组小鼠中观察到更强的信号。在仅植入Be2细胞的A组小鼠中几乎未观察到信号。这表明荧光素酶信号对CD19抗原而言是特异性的,并且推测是如之前在体外观察到的由CD19CAR活化引起的。T细胞未定位在侧腹区域,而是扩散至整个机体特别是肺区域,表明在遇到肿瘤细胞后1天,

CAR T细胞未保留在肿瘤区域中。T细胞注射后3天,B组的1只小鼠显示出肿瘤定位的荧光素酶信号(仅右侧腹)。T细胞注射后约7天,在B组的另一小鼠中也观察到相同现象。第一只小鼠的定位荧光素酶信号随时间上升和下降,并且第二只小鼠似乎具有相同的趋势。荧光素酶似乎与肿瘤体积相关。当定位的T细胞荧光素酶信号达到高水平时,上述2只小鼠恰好在所有5只B组小鼠中具有最大的肿瘤体积(数据未显示)。此为第一初步实验,还需要进行更多实验才能得出结论。

[0034] 图22示出了将CD8/CD19CAR/S1-61-GFP:ffluc EGFRt分选细胞注射至小鼠中的结果。

[0035] 图23是用于靶向DNA测序的样品处理的示意图。如图所示,步骤1包括进行PCR以扩增感兴趣的区域。步骤2包括进行第2轮PCR以添加ILMN索引(indices)以及测序接头(adaptors)。步骤3包括PCR纯化、tapestation分析和DNA MiSEQ。

[0036] 图24示出了展示MiSeq结果的启动子长度分布的两个图。

[0037] 图25示出了DNA测序结果总结。图的概述区域中示出了通过测序识别出的独特重叠群的总数。

[0038] 图26示出了iSynPro启动子分析。

[0039] 图27为CD8+CAR T细胞中的Syn-iPro测试的示例时间线。如图所示,首先用CD3/CD28珠刺激CD8 T细胞。24小时后,用病毒载体转导细胞。在第7天去除珠。然后在第11天将细胞与经照射的Tm-LCL细胞共培养。在第27天和第41天重复此步骤。

[0040] 图28是模拟细胞、表达CD19CAR的细胞、表达CD19+CAR(无启动子)的细胞、表达CD19CAR+和IL2mp的细胞、表达CD19CAR+和6×NFAT-IL2mp的细胞以及表达CD19CAR+和7×NFkB-IL2mp的细胞的流式细胞术分析的展示。在所有细胞中测量了EGFRt和GFP。如图所示,在6×NFAT-IL2mp启动子的情况下EGFRt和GFP的表达较少。

[0041] 图29示出了两个图,其表明没有独特的表达模式,但蛋白的表达是可重新诱导的。

[0042] 图30示出了通过靶细胞活化CAR T细胞之前和之后的GFP MFI。从左至右依次为活化前状态和活化后状态。

[0043] 图31示出了如一系列FACS测定中所示的EGFRt+群。上排示出了刺激前的细胞,下排示出了刺激后的细胞(CD19CAR+6×NFAT-IL2mp、CD19CAR+7×NFkB和CD19CAR+S1-61-IL2mp)。如图所示,具有启动子7×NFkB和S1-61-IL2mp的细胞导致刺激后EGFRt的表达。

[0044] 图32示出了CD3/CD28刺激和LCL细胞刺激后EGFRt和GFP在细胞中的表达。使用的细胞为仅CD19CAR、CD19CAR+无启动子、CD19CAR+仅IL2mp、CD19CAR+6×NFAT-IL2mp和CD19CAR+S1-61-IL2mp。如图所示,刺激后,具有S1-61-IL2mp的细胞表达了最多的EGFRt和GFP。

具体实施方式

[0045] 当根据说明书阅读时,本文使用的“条件型(conditional)”或“诱导型(inducible)”具有其普通和常规的含义,并且可包括但不限于例如这样的核酸构建体:该核酸构建体包含在诱导物存在的情况下提供基因表达并且在诱导物不存在的情况下实质上不提供基因表达的启动子。不受限制地,用于哺乳动物表达构建体的诱导型启动子的实例包括四环素、蜕化素、链阳菌素(streptogramins)、大环内酯类或强力霉素

(doxycycline)诱导型启动子。不受限制地,用于细菌表达构建体的诱导型启动子的实例包括但不限于T7启动子、lac启动子、trc启动子、tac启动子、tetA启动子、araBAD启动子或rhaPBAD启动子。不受限制地,昆虫来源的启动子包括但不限于pB2和多角体蛋白启动子。在本文的一些替代方式中,提供了启动子,其中,所述启动子为用于哺乳动物蛋白表达的诱导型启动子。在一些替代方式中,所述启动子为诱导型合成启动子。在一些替代方式中,将所述启动子选择为在CAR T细胞活化后被活化。

[0046] 当根据说明书阅读时,"启动子"具有其普通和常规的含义,并且可包括但不限于例如指导结构基因转录的核苷酸序列。在一些替代方式中,启动子位于基因的5'非编码区中,邻近结构基因的转录起始位点。在转录起始中起作用的启动子内的序列元件通常以共有核苷酸序列为特征。它是启动特定基因转录的DNA的区域。启动子位于基因的转录起始位点附近,DNA的同一条链的上游(朝向有义链的5'区域)。启动子长度可为约100个、200个、300个、400个、500个、600个、700个、800个或1000个碱基对,或在上述长度中的任意两个所限定的范围内。本文所用的启动子可为组成型活性、阻遏型或诱导型。如果启动子为诱导型启动子,则转录速率响应于诱导剂而增加。在一些替代方式中,启动子为合成启动子。

[0047] 当根据说明书阅读时,本文使用的"核酸"或"核酸分子"具有其普通和常规的含义,并且可包括但不限于例如多核苷酸或寡核苷酸,例如脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)、寡核苷酸、通过聚合酶链式反应(PCR)生成的片段以及通过连接、断裂、核酸内切酶作用、核酸外切酶作用和合成生成中的任意方式生成的片段。核酸分子可由作为天然存在的核苷酸(例如DNA和RNA)或天然存在的核苷酸的类似物(例如天然存在的核苷酸的对映体形式)的单体或两者的组合组成。修饰的核苷酸可在糖部分和/或嘧啶或嘌呤碱基部分中具有改变。糖修饰包括例如用卤素、烷基基团、胺和叠氮基基团对一个或多个羟基的置换,或者糖可被官能化为醚或酯。此外,整个糖部分可被空间和电子上相似的结构(例如氮杂糖和碳环糖类似物)置换。碱基部分的修饰的实例包括烷基化嘌呤和嘧啶、酰化嘌呤或嘧啶,或其它众所周知的杂环取代基。核酸单体可通过磷酸二酯键或此类连接的类似物连接。磷酸二酯连接的类似物包括硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯(phosphoroselenoate)、二硒代磷酸酯(phosphorodiselenoate)、苯胺硫代磷酸酯(phosphoroanilothioate)、苯胺磷酸酯(phosphoranilidate)或氨基磷酸酯。术语"核酸分子"还包括所谓的"肽核酸",其包含连接至聚酰胺骨架的天然存在或修饰的核酸碱基。核酸可为单链的或双链的。它们也可称为"寡核苷酸"。

[0048] 当根据说明书阅读时,"转录因子应答元件"具有其普通和常规的含义,并且可包括但不限于例如能够结合特异性转录因子并调节基因转录的基因启动子区域内的短DNA序列。在应激条件下,转录活化蛋白结合至应答元件并刺激转录。它们也可为可被蛋白质(活化剂)结合以增加或促进或增强特定基因转录发生的可能性或发生的转录水平的短(50bp-1500bp)DNA区域。这些活化蛋白通常被称为转录因子。增强子通常为顺式作用的,位于距基因多至1Mbp(1,000,000bp)的位置,并且可位于起始位点的上游或下游,并且可处于正向或反向的方向。增强子可位于其调控的基因的上游或下游。在一些实施方式中,可使用多个增强子结构域以生成更强的转录,例如,可使用多聚化活化结合结构域来进一步增强或增加转录水平。此外,增强子不需要位于转录起始位点附近以影响转录,因为已发现一些增强子位于起始位点上游或下游数十万个碱基对处。增强子不作用于启动子区域本身,而是被活

化蛋白结合。这些活化蛋白与中介体复合物(mediator complex)相互作用,该中介体复合物招募聚合酶II和普通转录因子(其随后开始转录基因)。也可在内含子中找到增强子。增强子的取向甚至可被翻转而不影响其功能。此外,增强子可被切除并插入染色体的其它位置,并且仍然影响基因转录。增强子结合结构域的实例为TCRα增强子。在一些替代方式中,本文所述替代方式中的增强子结构域为TCRα增强子。

[0049] 当根据说明书阅读时,"转录活化结构域(Transcriptional activator domain/Transcriptional activation domain)"具有其普通和常规的含义,并且可包括但不限于例如可被转录因子结合的特异性DNA序列,其中,转录因子可由此控制遗传信息由DNA至信使RNA的转录速率。特异性转录因子可包括但不限于SP1、AP1、C/EBP、热休克因子、ATF/CREB、c-Myc、Oct-1和/或NF-1。

[0050] 当根据说明书阅读时,本文所述的"嵌合抗原受体"(CAR)(也称为嵌合T细胞受体)具有其普通和常规的含义,并且可包括但不限于例如人工T细胞受体或基因工程化受体,其将期望的特异性移植(graft)至免疫效应细胞。CAR可为合成设计的受体,其包含抗体的配体结合结构域或者结合至与疾病或病症相关的分子的其它蛋白序列,并通过间隔区结构域(spacer domain)连接至T细胞或其它受体的一个或多个细胞内信号转导结构域(例如共刺激结构域)。在一些替代方式中,制造细胞(例如哺乳动物细胞),其中,所述细胞包含嵌合抗原受体。这些受体可用于例如将单克隆抗体或其结合部分的特异性移植至T细胞。在本文的一些替代方式中,基因工程化细胞进一步包含编码嵌合抗原受体的序列。在一些替代方式中,嵌合抗原受体对肿瘤细胞上的分子而言是特异性的。嵌合抗原受体或表达T细胞受体的工程化细胞可用于靶向特定组织。

[0051] 本文所述的"配体"是指可与生物分子形成复合物的物质。作为示例而非限制,配体可包括底物、蛋白质、小分子、抑制剂、活化剂、核酸和神经递质。结合可通过分子间力(例如离子键、氢键和范德华相互作用)发生。配体与受体蛋白的结合可改变三维结构并决定其功能状态。配体的结合强度称为结合亲和力,并可通过直接相互作用和溶剂效应来确定。配体可被"配体结合结构域"结合。例如,配体结合结构域可指结构中可结合蛋白质上的特定表位或特定配体的保守序列。配体结合结构域或配体结合部分可包含抗体或其结合片段或scFv、受体配体或其突变体、肽和/或多肽亲和分子或结合伴侣。不受限制地,配体结合结构域可为对一个或多个配体而言具有特异性的蛋白质上的表位或特定蛋白质结构域。

[0052] "PMA"或"佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯"是佛波醇的二酯并且是在生物医学研究中通常用以活化信号转导酶蛋白激酶C(PKC)的强有力的肿瘤启动子。在本文的替代方式中,PMA被用于诱导诱导型合成启动子。

[0053] "罗奴霉素"是由细菌Streptomyces conglobatus产生的离子载体。它用于研究中以提高钙(Ca^{2+})的细胞内水平,并用作了解Ca^{2+}跨生物膜转运的研究工具。它也通常与PMA联合来用于刺激下列细胞因子的细胞内产生:干扰素、穿孔素、IL-2和/或IL-4。在本文的替代方式中,罗奴霉素用于诱导诱导型合成启动子。

[0054] "最小启动子"用于获得靶基因的少量转录。它们具有指定转录起始位点的关键序列,但仅微弱地活化转录,因为它不强烈招募RNA聚合酶或转录因子。在本文的替代方式中,最小启动子序列为IL2最小启动子序列,其为包含TATA盒的IL2启动子的片段(-70至+47)。在IL-2最小启动子的构建和使用前,测试了来自诱导型基因表达构建体的商业化最小启动

子。显示商业上可获得的最小启动子在细胞系中起作用,但在原代T细胞中不起作用。

[0055] “蛋白质”是包含一个或多个多肽链的大分子。蛋白质也可包含非肽成分,例如碳水化合物基团。碳水化合物和其它非肽替代物可由在其中产生蛋白质的细胞添加至该蛋白质,并且将随细胞类型而变化。本文根据蛋白质的氨基酸骨架结构来限定蛋白质;诸如碳水化合物基团的替代物通常未指定,但仍然可存在。在一些替代方式中,提供了细胞,其中,所述细胞包含载体,其中,所述载体包含编码蛋白质、抗体或其结合片段、促增殖分子或可根除肿瘤的分子的基因。

[0056] 本文所述的“抗体”是指由浆细胞产生的大的Y形蛋白,其被免疫系统用来识别和中和诸如细菌和病毒的异物。抗体蛋白可包含4条多肽链:通过二硫键连接的两条相同的轻链和两条相同的重链。每条链由称为免疫球蛋白结构域的结构性结构域组成。这些结构域可包含约70-110个氨基酸,并可根据其大小和功能分为不同类别。

[0057] 本文所述的“促增殖分子”是指嵌合细胞因子受体,例如CCR(CD122)、CCR(CD127)、CCR(CD360)、caSTAT5、miRNA(例如miRNA155)、dnSHP1、dnSHP2、PD1嵌合体(例如PD1:MyD88和PD1:CD28)、CD200:CD28。在本文的一些替代方式中,诱导型合成启动子驱动促增殖分子的合成。

[0058] 当根据说明书阅读时,本文所用的“诱导型合成启动子文库”具有其普通和常规的含义,并且可包括但不限于例如CAR活化诱导型启动子文库、T细胞衰竭(T cell exhaustion)诱导型启动子文库、肿瘤微环境诱导型启动子文库、缺氧诱导型启动子文库。

[0059] 当根据说明书阅读时,本文所用的“诱导型合成启动子”(iSynPro)具有其普通和常规的含义,并且可包括但不限于例如CAR活化诱导型启动子文库、T细胞衰竭诱导型启动子文库、肿瘤微环境诱导型启动子文库、缺氧诱导型启动子文库。

[0060] 本文所述的“T细胞前体”是指可迁移至胸腺并成为T细胞前体的淋巴样前体细胞,其不表达T细胞受体。所有T细胞均源自骨髓中的造血干细胞。来自造血干细胞的造血祖细胞(淋巴样祖细胞)在胸腺中聚集并通过细胞分裂而扩增,从而生成大量未成熟的胸腺细胞。最早的胸腺细胞既不表达CD4也不表达CD8,因此被归类为双阴性($CD4^-CD8^-$)细胞。随着它们通过发育而发展,它们成为双阳性胸腺细胞($CD4^+CD8^+$),并最终成熟为单阳性($CD4^+CD8^-$或$CD4^-CD8^+$)胸腺细胞,然后单阳性胸腺细胞由胸腺释放至周围组织。

[0061] 当根据说明书阅读时,本文所用的CD19具有其普通和常规的含义,并且可包括但不限于例如在白细胞表面发现并可与B淋巴细胞的抗原受体组装以降低抗原受体依赖性刺激的阈值的蛋白。CD19在滤泡树突状细胞和B细胞上表达。CD19存在于由最早的可识别的B谱系细胞发育至B细胞母细胞期间的B细胞上,但在成熟为浆细胞时丢失。CD19主要与CD21和CD81联合充当B细胞共受体。活化后,CD19的细胞质尾被磷酸化,导致被Src家族激酶结合以及PI-3激酶的招募。与在T细胞上一样,数种表面分子在B淋巴细胞上形成抗原受体并形成复合物。

[0062] CD19中的突变与以抗体产生减少为特征的严重免疫缺陷综合征有关。例如,CD19的异常表达是急性骨髓性白血病中单核细胞谱系的标志。由于CD19是B细胞的标志物,该蛋白可用于诊断由此类细胞引起的癌症,特别是B细胞淋巴瘤。自2011年以来,靶向CD19的疗法已开始进入临床试验。大多数目前开发中的实验性抗CD19药物通过利用CD19的存在引导特异性针对B细胞癌症的疗法而起作用。然而,现在显现的是该蛋白通过稳定MYC肿瘤蛋白

的浓度而在驱动这些癌症的生长中发挥积极作用。因此,CD19及其下游信号转导可为有吸引力的治疗靶标。

[0063] 本文所述的“受试者”或“患者”是指可对其使用或给予(例如用于实验、诊断、预防和/或治疗目的)本文所述的替代方式的任何有机体。受试者或患者包括例如动物。在一些替代方式中,所述受试者为小鼠、大鼠、兔、非人灵长类动物和/或人。在一些替代方式中,所述受试者为牛、绵羊、猪、马、犬、猫、灵长类动物或人。

[0064] 本文所述的“细胞因子”是指在细胞信号转导中重要的小蛋白质(5kDa-25kDa)。细胞因子被细胞释放并影响其它细胞的行为,并且有时影响释放细胞(例如T细胞)本身的行为。细胞因子可包括例如趋化因子、干扰素、白介素、淋巴因子和/或肿瘤坏死因子。细胞因子可由广泛的细胞产生,所述细胞可包括例如免疫细胞(如巨噬细胞、B淋巴细胞、T淋巴细胞和/或肥大细胞)以及内皮细胞、成纤维细胞和/或各种基质细胞。

[0065] 细胞因子可通过受体起作用,并且在免疫系统中是重要的,因为细胞因子可调节基于体液和基于细胞的免疫应答之间的平衡,并且它们可调节特定细胞群的成熟、生长和应答性。一些细胞因子以复杂的方式增强或抑制其它细胞因子的作用。不受限制地,细胞因子可包括例如酰化刺激蛋白、脂肪因子(Adipokine)、Albinterferon、CCL1、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL2、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9、趋化因子、集落刺激因子、CX3CL1、CX3CR1、CXCL1、CXCL10、CXCL11、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCL17、CXCL2、CXCL3、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL9、促红细胞生成素、Gc-MAF、粒细胞集落刺激因子、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、肝细胞生长因子、IL 10细胞因子家族、IL 17细胞因子家族、IL1A、IL1B、炎性体、Interferome、干扰素、干扰素β-1a、干扰素β-1b、干扰素γ、干扰素I型、干扰素II型、干扰素III型、白介素、白介素1家族、白介素1受体拮抗剂、白介素10、白介素12、白介素12亚基β、白介素13、白介素15、白介素16、白介素2、白介素23、白介素23亚基α、白介素34、白介素35、白介素6、白介素7、白介素8、白介素36、白血病抑制因子、白细胞促进因子、淋巴因子、淋巴毒素、淋巴毒素α、淋巴毒素β、巨噬细胞集落刺激因子、巨噬细胞炎性蛋白、巨噬细胞活化因子、单核因子、肌肉因子(Myokine)、肌联素(Myonectin)、烟酰胺磷酸核糖基转移酶、制瘤素(Oncostatin)M、奥普瑞白介素(Oprelvekin)、血小板因子4、促炎细胞因子、Promegapoietin、RANKL、基质细胞衍生因子1、Talimogene laherparepvec、肿瘤坏死因子α、肿瘤坏死因子、XCL1、XCL2、GM-CSF和/或XCR1。

[0066] 本文所述的“白介素”或IL是免疫系统主要依赖的细胞因子。本文可利用的白介素的实例包括例如IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8/CXCL8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、IL-30、IL-31、IL-32、IL-33、IL-34、IL-35和/或IL-36。T细胞与白介素的接触可具有促进、支持、诱导或改善细胞植入适应性的效果。例如,IL-1可在T细胞的成熟和增殖中起作用。例如,IL-2可刺激T细胞的生长和分化。例如,IL-3可促进髓样祖细胞的分化和增殖。例如,IL-4可促进增殖和分化。例如,IL-7可促进参与B细胞、T细胞和NK细胞存活、发育和/或体内平衡的淋巴样祖细胞的分化和/或增殖。例如,IL-15可诱导自然杀伤细胞的产生。例如,IL-21共同刺激CD8+T细胞的活化和/或增殖;增强NK细胞毒性;增强CD40驱动的B细胞增殖、分化和/或同种型转换;和/或促进Th17细胞的分化。

[0067] “载体”、“表达载体”或“构建体”是用于将异源核酸引入细胞中的核酸,其具有调节元件以提供异源核酸在细胞中的表达。载体包括但不限于质粒、微环、酵母和/或病毒基因组。在一些替代方式中,载体为质粒、微环、酵母或病毒基因组。在一些替代方式中,载体为病毒载体。在一些替代方式中,病毒载体为慢病毒。在一些替代方式中,载体用于细菌系统(例如大肠杆菌(E.coli))中的蛋白表达。在一些替代方式中,载体为慢病毒载体。在一些替代方式中,载体为泡沫病毒载体、腺病毒载体、逆转录病毒载体或慢病毒载体。在一些替代方式中,载体用于细菌系统(例如大肠杆菌)中的蛋白表达。在一些替代方式中,其中,载体为慢病毒载体、基于转座酶的微环或纳米质粒。

[0068] 本文所述的“联合疗法”是指使用多于一种药物(medication)或方式(modality)用于治疗应用的疗法。例如,联合疗法还可指治疗单一疾病的多种疗法,并且通常所有疗法为药物产品组合。联合疗法还可涉及开处方和给予单独的药物,其中,剂量也可具有多于一种活性成分。在一些替代方式中,提供了联合疗法。在一些替代方式中,联合疗法可进一步包括给予有需要的受试者(例如人)带有CAR的T细胞。

[0069] “化疗药物”为抗癌药物的类别,其可使用例如化学物质,例如可作为标准化化学疗法方案的一部分而给予的抗癌药物(化疗剂)。化疗药物可出于治疗目的给予,或其可旨在延长寿命或减轻症状(姑息化学疗法)。其它化学疗法还可包括激素疗法和靶向疗法,因其为医学肿瘤学的主要类别之一(用于癌症的药物疗法)。这些方式通常与其它癌症疗法(例如放射疗法、手术和/或温热(hyperthermia)疗法)联合使用。在少数情况下,已知癌症因外科手术而扩散。在一些替代方式中,在外科手术之前或之后,向肿瘤部位给予遗传修饰的免疫细胞。

[0070] 一些较新的抗癌药物(例如各种单克隆抗体、它们的人源化形式和/或它们的结合片段)并不是具有不加选择的细胞毒性,而是靶向在癌细胞中异常表达并且对其生长而言必不可少的蛋白。此类疗法通常称为靶向疗法(与经典化学疗法不同),并且经常与传统化疗剂一起用于抗肿瘤方案中。在一些替代方式中,本文描述的方法可进一步包括给予这些靶向抗癌疗法中的任一种或多种(例如各种单克隆抗体、它们的人源化形式和/或它们的结合片段)。

[0071] 化学疗法(在其中给予化疗药物)可一次使用一种药物(单剂化学疗法)或一次使用数种药物(联合化学疗法或综合化学疗法)。化学疗法和放射疗法的组合为放化疗。使用仅在光暴露后转换为细胞毒性活性的药物的化学疗法称为光化学疗法或光动力疗法。在给予本文所述的细胞的一些替代方式中,所述方法可进一步包括在接受所述细胞之后向患有癌症的受试者给予光化学疗法或光动力疗法。

[0072] 化疗药物可包括但不限于抗体-药物缀合物(例如通过接头连接至药物的抗体或其结合片段)、纳米颗粒(例如纳米颗粒可为用于促进肿瘤选择性并协助递送低溶解度药物的1纳米-1000纳米大小的颗粒)、电化学疗法、烷基化剂、抗代谢剂(例如5-氟尿嘧啶(5-FU)、6-巯基嘌呤(6-MP)、卡培他滨(Xeloda®)、克拉屈滨、氯法拉滨、阿糖孢苷(Ara-C®)、氟尿苷、氟达拉滨、吉西他滨(Gemzar®)、羟基脲、甲氨蝶呤、培美曲塞(Alimta®)、喷司他丁和/或硫鸟嘌呤)、抗肿瘤抗生素、拓扑异构酶抑制剂、有丝分裂抑制剂、皮质类固醇、DNA嵌入(intercalating)剂或检查点抑制剂(例如检查点激酶CHK1或CHK2)。在本文所述方法的一些替代方式中,将遗传修饰的免疫细胞或包含遗传修饰的免疫细胞的组合物与一种或

多种抗癌剂(例如前述化合物或疗法中的任一种或多种)组合给予。在一些替代方式中,与遗传修饰的免疫细胞共同给予或联合给予的一种或多种抗癌剂包括抗体-药物缀合物、纳米颗粒、电化学疗法、烷基化剂、抗代谢剂、抗肿瘤抗生素、拓扑异构酶抑制剂、有丝分裂抑制剂、皮质类固醇、DNA嵌入剂或检查点抑制剂。在一些替代方式中,抗代谢剂包括5-氟尿嘧啶(5-FU)、6-巯基嘌呤(6-MP)、卡培他滨(Xeloda®)、克拉屈滨、氯法拉滨、阿糖胞苷(Ara-C®)、氟尿苷、氟达拉滨、吉西他滨(Gemzar®)、羟基脲、甲氨蝶呤、培美曲塞(Alimta®)、喷司他丁或硫鸟嘌呤。

[0073] 本文所述的"癌症"可指恶性肿瘤或恶性赘生物,其中,它们涉及具有侵入或扩散至机体其它部分的潜力的异常细胞生长。在一些替代方式中,提供了治疗、改善或抑制受试者中的疾病或感染的方法,其中,所述方法包括将通过本文所述的任意替代方式制造的细胞递送至受试者。在一些替代方式中,受试者患有癌症。在一些替代方式中,选择受试者进行癌症疗法。在一些替代方式中,癌症包括肾上腺癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、Castleman病、宫颈癌、结肠癌、子宫内膜癌、食道癌、尤文氏肿瘤家族、眼癌、胆囊癌、胃肠类癌肿瘤(carcinoid tumors)、霍奇金病、卡波西肉瘤、肾癌、喉和下咽癌、白血病、肝癌、肺癌、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、恶性间皮瘤、骨髓增生异常综合征、鼻咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、垂体瘤、前列腺癌、视网膜母细胞瘤、皮肤癌、小肠癌、胃癌、睾丸癌、胸腺癌、甲状腺癌或子宫肉瘤。

[0074] 通过转录因子应答元件(TRE)的随机连接生成合成启动子文库,构建在已知的IL2最小启动子(IL2mp)的上游,并在CAR活化后通过嵌合抗原受体(CAR)工程化T细胞中的报告基因表达进行筛选。图5举例说明了开发用于测定的文库的方法,其显示了如何筛选在CAR T细胞活化后被活化的启动子。图3示出了诱导型合成启动子(iSynPro)的作用。从分选细胞中提取DNA并测序。然后合成衍生的启动子序列的最佳候选并在同一系统中进行验证。发现所识别或选择的启动子(在整个本公开中也称为Syn-i-Pro)为CAR活化诱导型、CD3/CD28诱导型或化学物质诱导型(例如PMA/罗奴霉素)。例如,启动子可由包含CD3或CD28或两者的珠诱导(图27)。即使经过多轮刺激(至少4轮),Syn-i-Pro控制的基因表达也未显著减弱。这些启动子可用于CAR T细胞疗法中,例如当选择性地需要期望的分子在CAR T细胞中的表达以避免在例如使用组成型表达时观察到的副作用时。

[0075] 尽管NFAT诱导型启动子已用于T细胞疗法中,但通过本文所述方法生成的诱导型启动子(Syn-i-Pro启动子)显示出比内源性的或未修饰的NFAT启动子更强的报告子信号。在一些实施方式中,通过本文所述途径开发的NFAT诱导型启动子表现出比内源性的或未修饰的NFAT启动子高得多的信噪比,并且使用本文所述方法生成的一些启动子可反复开启(turned on)。如图4所示,NFAT启动子在CD8细胞中具有不良诱导。使用本文所述方法学开发的Syn-i-Pro启动子可用于CAR T细胞,从而不仅控制当组成型表达时可能具有副作用的分子的表达,而且这些启动子还可在CAR T细胞与期望的抗原相互作用之前限制或不表达分子。

[0076] 在一些实施方式中,使用本文所述的途径开发的Syn-i-Pro启动子可表现出相对较高的基础水平表达。可通过对最小启动子序列进行工程化或者通过将表达系统由慢病毒改为基于转座酶的微环或纳米质粒来生成表现出较低水平的基础水平表达的Syn-i-Pro启动子。本文所述的Syn-i-Pro启动子的基因表达的CAR活化的一个优势是,借助CAR活化,不

涉及药物,因此无副作用。下文所述的其它替代方式中描述了使用的方法学和其它实施方式。

[0077] 其它替代方式

[0078] 在一些替代方式中,提供了制造诱导型合成启动子文库的方法,所述方法包括:筛选启动子,其中,筛选在CAR T细胞活化后被活化的启动子,从而产生经筛选的启动子;筛选转录因子应答元件,从而产生经筛选的转录因子应答元件;制造诱导型合成启动子文库,所述诱导型合成启动子文库包含在转录因子应答元件的CAR T细胞活化后被活化的启动子;以及合成寡核苷酸,其中,所述寡核苷酸包含编码经筛选的转录因子应答元件的第一序列以及编码经筛选的启动子的第二序列。

[0079] 在一些替代方式中,提供了诱导型合成启动子,其中,所述诱导型合成启动子包含编码转录因子应答元件的第一序列以及编码启动子序列的第二序列,任选地,其中,所述诱导型合成启动子包含SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:39中的一个或多个。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子可通过嵌合抗原受体活化来诱导。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子可通过所述嵌合抗原受体结合至配体来诱导。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子可通过与CD3/CD28相互作用来诱导。在一些替代方式中,CD3/CD28缀合在珠上。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子可通过化学物质来诱导。在一些替代方式中,所述化学物质为PMA或罗奴霉素。在一些替代方式中,所述启动子包含内源性IL2最小启动子序列。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子包含SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:39中任一项所示的序列。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子包含与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:39中任一项所示的序列具有80％、85％、90％或90％的序列同一性或任何两个前述百分比之间的范围内的序列同一性的序列。在一些替代方式中,所述转录因子应答元件为E2F1、EGR1、HIF1A、NFAT、LEF1、SP1、PU.1、NFKB、JUN、FOS和/或STAT4。

[0080] 在一些替代方式中,提供了用于分子表达的细胞,所述细胞包含:载体,其中,所述载体包含本文任一替代方式所述的诱导型合成启动子;编码分子的基因;以及编码嵌合抗原受体的序列。所述诱导型合成启动子包含编码转录因子应答元件的第一序列以及编码启动子序列的第二序列,任选地,其中,所述诱导型合成启动子包含SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:39中的一个或多个。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子可通过嵌合抗原受体活化来诱导。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子可通过所述嵌合抗原受体结合至配体来诱导。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子可通过与抗CD3/抗CD28相互作用来诱导。在一些替代方式中,抗CD3/抗CD28缀合在珠上。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子可通过化学物质来诱导。在一些替代方式中,所述化学物质为PMA或罗奴霉素。在一些替代方式中,所述启动子包含内源性IL2最小启动子序列。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子包含SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:39中任一项所示的序列。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子包含与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:39中任一项所示的序列具有80％、85％、90％或90％的序列同一性或任何两个前述百分比之间的范围内的序列同一性的序列。在一些替代方式中,所述转录因子应答元件为E2F1、EGR1、HIF1A、NFAT、LEF1、SP1、PU.1、NFKB、JUN、FOS和/或STAT4。在一些替代方式中,所述分子为蛋白质、抗体或其结合片段、促增殖分子或可根除肿瘤的分子。在一些替代方式中,所述细胞为造血干细胞。在一些替代方式中,所述嵌合抗原受体对CD19而言是特异性的。在一些替代方式中,所述细胞为CD8+或

CD4+。在一些替代方式中,所述分子的表达是可诱导的。在一些替代方式中,所述CAR包含信号转导结构域。在一些替代方式中,所述CAR包含间隔区。间隔区可例如以任何顺序包含任何20个氨基酸以在嵌合抗原受体中产生期望长度的多肽链,包括以下氨基酸:精氨酸、组氨酸、赖氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸和/或色氨酸。间隔区序列可为嵌合抗原受体的跨膜结构域和scFv之间的接头。在一些替代方式中,所述信号转导结构域为1G、2G或3G。在一些替代方式中,所述载体为慢病毒载体、基于转座酶的微环或纳米质粒。在一些替代方式中,所述细胞进一步包含用于CAR特异性活化的TCR敲除系统。在一些替代方式中,所述分子为CCR(CD122)、CASTAT5、PD1:CD28和/或miRNA。在一些替代方式中,所述分子是嵌合细胞因子受体。在一些替代方式中,所述嵌合细胞因子受体包括CCR、CASTAT5、PD1嵌合体和/或miRNA。在一些替代方式中,所述miRNA包括miRNA155。在一些替代方式中,所述CCR包括CD122、CD127或CD360。在一些替代方式中,所述PD1嵌合体包括PD1:CD28、dnSHP1/2和/或IL-12。

[0081] 在一些替代方式中,提供了在CAR T细胞疗法中调节基因表达的方法,所述方法包括:提供本文任一替代方式所述的细胞;以及将所述细胞导入需要CAR T细胞疗法的受试者中。所述细胞包含:载体,其中,所述载体包含本文任一替代方式所述的诱导型合成启动子;编码分子的基因;以及编码嵌合抗原受体的序列。所述诱导型合成启动子包含编码转录因子应答元件的第一序列以及编码启动子序列的第二序列,任选地,其中,所述诱导型合成启动子包含SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:39中的一个或多个。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子可通过嵌合抗原受体活化来诱导。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子可通过所述嵌合抗原受体结合至配体来诱导。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子可通过与抗CD3/抗CD28相互作用来诱导。在一些替代方式中,抗CD3/抗CD28缀合在珠上。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子可通过化学物质来诱导。在一些替代方式中,所述化学物质为PMA或罗奴霉素。在一些替代方式中,所述启动子包含内源性IL2最小启动子序列。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子包含SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:39中任一项所示的序列。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子包含与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:39中任一项所示的序列具有80%、85%、90%或90%的序列同一性或任何两个前述百分比之间的范围内的序列同一性的序列。在一些替代方式中,所述转录因子应答元件为E2F1、EGR1、HIF1A、NFAT、LEF1、SP1、PU.1、NFKB、JUN、FOS和/或STAT4。在一些替代方式中,所述分子为蛋白质、抗体或其结合片段、促增殖分子或可根除肿瘤的分子。在一些替代方式中,所述细胞为造血干细胞。在一些替代方式中,所述嵌合抗原受体对CD19而言是特异性的。在一些替代方式中,所述细胞为CD8+或CD4+。在一些替代方式中,所述分子的表达是可诱导的。在一些替代方式中,所述CAR包含信号转导结构域。在一些替代方式中,所述CAR包括间隔区。间隔区可例如以任何顺序包含任何20个氨基酸以在嵌合抗原受体中产生期望长度的多肽链,包括以下氨基酸:精氨酸、组氨酸、赖氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸和/或色氨酸。间隔区序列可为嵌合抗原受体的跨膜结构域和scFv之间的接头。在一些替代方式中,所述信号转导结构域为1G、2G或3G。在一些替代方式中,所述载体为慢病毒载体、基于转座酶的微环或纳米质粒。在一些替代方式中,所述细胞进一步包含用于CAR特异性活化的

TCR敲除系统。在一些替代方式中,所述分子为CCR(CD122)、CASTAT5、PD1:CD28和/或miRNA。在一些替代方式中,所述方法进一步包括监测所述受试者对在所述诱导型合成启动子的控制下表达的分子的应答。在一些替代方式中,进一步监测所述受试者在所述诱导型合成启动子的控制下表达的分子的表达。在一些替代方式中,所述分子为蛋白质、抗体或其结合片段、细胞因子或抗癌治疗剂。在一些替代方式中,所述方法进一步包括诱导所述分子的表达。在一些替代方式中,通过给予PMA或罗奴霉素来进行所述诱导。在一些替代方式中,在向有需要的受试者给予所述细胞前进行所述诱导步骤,并且其中,在给予所述细胞前将所述细胞暴露于抗CD3/抗CD28珠。在一些替代方式中,所述受试者患有癌症或曾被诊断为患有癌症。在一些替代方式中,所述分子为CCR(CD122)、CASTAT5、PD1:CD28和/或miRNA。在一些替代方式中,所述分子为嵌合细胞因子受体。在一些替代方式中,所述嵌合细胞因子受体包括CCR、CASTAT5、PD1嵌合体和/或miRNA。在一些替代方式中,所述miRNA包括miRNA155。在一些替代方式中,所述CCR包括CD122、CD127或CD360。在一些替代方式中,所述PD1嵌合体包括PD1:CD28、dnSHP1/2和/或IL-12。

[0082] 在一些替代方式中,提供了改善、抑制或治疗有需要的受试者中的疾病(例如白血病、乳腺癌、胃癌、食道癌、脑癌、子宫癌、前列腺癌、骨癌、肝癌、胰腺癌、卵巢癌、肺癌、结肠癌、肾癌、膀胱癌、子宫癌或甲状腺癌中的任一种或多种)的方法,所述方法包括:向细胞提供载体,其中,所述细胞包含本文任一替代方式所述的诱导型合成启动子,并且其中,所述细胞包含嵌合抗原受体;向所述有需要的受试者给予所述细胞;以及诱导分子的表达。所述诱导型合成启动子包含编码转录因子应答元件的第一序列以及编码启动子序列的第二序列,任选地,其中,所述诱导型合成启动子包含SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:39中的一个或多个。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子可通过嵌合抗原受体活化来诱导。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子可通过所述嵌合抗原受体结合至配体来诱导。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子可通过与抗CD3/抗CD28相互作用来诱导。在一些替代方式中,抗CD3/抗CD28缀合在珠上。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子可通过化学物质来诱导。在一些替代方式中,所述化学物质为PMA或罗奴霉素。在一些替代方式中,所述启动子包含内源性IL2最小启动子序列。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子包含SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:39中任一项所示的序列。在一些替代方式中,所述诱导型合成启动子包含与SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:39中任一项所示的序列具有80%、85%、90%或90%的序列同一性或任何两个前述百分比之间的范围内的序列同一性的序列。在一些替代方式中,所述转录因子应答元件为E2F1、EGR1、HIF1A、NFAT、LEF1、SP1、PU.1、NFKB、JUN、FOS和/或STAT4。在一些替代方式中,所述细胞来自所述受试者。在一些替代方式中,所述方法进一步包括监测所述受试者对在所述诱导型合成启动子的控制下表达的分子的应答。在一些替代方式中,所述分子为蛋白质、抗体或其结合片段、细胞因子或抗癌治疗剂。在一些替代方式中,所述方法进一步包括诱导所述分子的表达。在一些替代方式中,通过给予PMA或罗奴霉素进行所述诱导。在一些替代方式中,在向有需要的受试者给予所述细胞前进行所述诱导步骤,其中,在给予所述细胞前将所述细胞暴露于抗CD3/抗CD28珠。在一些替代方式中,所述受试者患有癌症。在一些替代方式中,所述分子为嵌合细胞因子受体,例如CCR(CD122、CD127和CD360)、CASTAT5、PD1嵌合体(例如PD1:CD28、dnSHP1/2、IL-12)和/或miRNA(例如miRNA155)。在一些替代方式中,选择所述受试者以进行癌症疗法。在一些替代方式中,所述

癌症为白血病、乳腺癌、胃癌、食道癌、脑癌、子宫癌、前列腺癌、骨癌、肝癌、胰腺癌、卵巢癌、肺癌、结肠癌、肾癌、膀胱癌、子宫癌或甲状腺癌。在一些替代方式中,选择所述受试者以进行联合疗法。在一些替代方式中,所述分子为嵌合细胞因子受体。在一些替代方式中,所述嵌合细胞因子受体包括CCR、CASTAT5、PD1嵌合体和/或miRNA。在一些替代方式中,所述miRNA包括miRNA155。在一些替代方式中,所述CCR包括CD122、CD127或CD360。在一些替代方式中,所述PD1嵌合体包括PD1:CD28、dnSHP1/2和/或IL-12。

[0083] 替代方式1.NFAT启动子导致CD8细胞中的不良诱导

[0084] 考虑了合成启动子以获得在CAR T细胞疗法中对于经调节的基因表达有用的启动子。如图1所示,可使用药物来开启和关闭转基因表达(例如T细胞中CAR或TCR的表达)或开启活化。

[0085] 还考虑了设计合成启动子文库的方法,筛选所述合成启动子文库以分离在CAR T细胞活化后被活化的启动子(图5)。可通过mRNA分析来识别通过T细胞活化而上调的基因以及上调的转录因子(其可被识别为转录应答元件(TRE))(图6)。

[0086] Blair等先前报道了TCR活化的CD8 T细胞的相对完整的基因表达谱(Best,Blair等,2013;以引用的方式整体并入)。通过TRED和TRANSFAC数据库搜索,选择已确认调节这些基因的11种转录因子。选择的基因为E2F1、EGR1、FOS、HIF1a、JUN、NFAT、LEF1、NFkB、SP1、PU.1和STAT4。从JASPAR数据库获得它们相应的TRE序列并合成。

[0087] TRE的基因可用于连接至具有启动子的载体中以驱动CAR或TCR的表达(图7)。如图8所示,TRE的频率可导致数个TRE的表达(取决于驱动它们的启动子的类型)。

[0088] 如图6所示,先前报道了TCR活化的CD8 T细胞的相对完整的基因表达谱(Best,Blair等;2013)。选择在CD8 T细胞活化后显著上调的基因。通过TRED和TRANSFAC数据库搜索,选择已确认调节这些基因的11种转录因子。选择的基因为E2F1、EGR1、FOS、HIF1a、JUN、NFAT、LEF1、NFkB、SP1、PU.1和STAT4。从JASPAR数据库获得它们相应的TRE序列并合成。

[0089] 如先前所述,将有义和反义TRE寡核苷酸退火,并将双链TRE用作“构成组件(building blocks)”以通过随机连接生成合成启动子文库(Brown A.2014;以引用的方式整体并入本文)(图7)。临床试验中的CAR主要为第二代4-1BB-CD3ζCAR。由于已知NFkB为4-1BB的下游转录因子,基于其细胞内信号转导结构域,招募了相对更多的NFkB构成组件。还纳入了两个克隆组件(各自包含限制性酶切位点)以允许克隆至质粒载体中并控制连接产物的大小范围。因此,随机连接反应池包含2×每个TRE组件(无NFkB TRE)、6×NFkB组件以及1×克隆组件。通过限制性酶消化dsDNA连接文库,并且如所预期的,它是在琼脂糖凝胶上显示为范围约75bp-约500bp的拖尾区(smear)的多样化文库。

[0090] 为能够在原代T细胞中筛选文库,将消化的连接文库插入包含GFP和萤火虫荧光素酶融合报告基因(GFP:ffluc)以及IL2最小启动子的HIV7转移质粒中。GFP:ffluc报告基因先前已在实验室中用于体外和体内测定。IL2mp已由多个实验室发表(Durand,Shaw等,1988;Fiering,Northrop等,1990;以引用的方式将它们整体并入本文),并且先前也已在实验室中进行了测试。创建无启动子的构建体以及仅IL2mp的构建体作为阴性对照构建体;并将6×NFAT-IL2mp和7×NFkB-IL2mp用作阳性对照构建体,用于随后的筛选。在继续进行病毒包装和筛选之前,对文库进行了分析以查看文库是否看起来与预期的相同。将小部分转化的大肠杆菌细胞在琼脂糖平板上划线,并挑选10个菌落进行小量制备(mini-prep),然后

进行Sanger测序。结果表明,10个克隆中的9个包含具有6-20个TRE的随机连接启动子。在至少一个具有NFkB的克隆中显示的每个TRE具有最高的频率,这与连接池中的TRE混合比一致(图8)。

[0091] 通过FACS分析了在Syn-iPro合成启动子控制下表达TCR的细胞在与PMA/罗奴霉素或抗CD3/抗CD28接触后CD69和GFP的表达。如所示出的,在化学物质PMA/罗奴霉素的控制下的Syn-iPro合成启动子的使用导致CD69/GFP的表达(图9)。

[0092] 在CD8原代T细胞中筛选了Syn-iPro合成启动子的文库(图10)。临床试验中使用的第二代CD19CAR-T2A-EGFRt已被彻底研究,并显示了有希望的结果。因此,通过将第二代CD19CAR-T2A-EGFRt与iSynPro文库共转导而将第二代CD19CAR-T2A-EGFRt用于触发iSynPro文库表达。为避免筛选出由piggy back效应生成的假阳性序列,需要以低MOI转导文库,以使每个单细胞最多包含一个iSynPro序列。还需要包含“静止”阶段或“关闭(OFF)”阶段以及CAR活化阶段或“开启(ON)”阶段的细胞系统。为避免筛选出组成型活性启动子或在CAR不存在的情况下为GFP阳性的启动子,使用流式细胞仪分选器仅分选出处于“静止”阶段的EGFRt阳性和GFP阴性细胞(抗CD3/抗CD28珠去除后7天)。然后将这些细胞与经照射的Tm-LCL(CD19+)细胞共培养以活化CD19CAR。在24h、48h、72h在GFP中门(gate)和GFP高门中将通过iSynPro活化得到的GFP阳性细胞分选出。将剩余细胞再继续培养1周,然后再次与Tm-LCL细胞共培养。24小时后分选出GFP阳性细胞。

[0093] 如图11所示,在第1天、第2天、第3天以及用PMA/罗奴霉素重新刺激后,针对表达的独特重叠群数筛选细胞。图23示出了用于靶向DNA测序的样品处理。如图所示,使用PCR扩增感兴趣的区域,然后进行纯化。然后对纯化的DNA序列进行第2轮PCR以添加LMN索引和测序接头。此后进行DNA MiSeq测序(图24)。然后分析序列的每个时间点的总独特重叠群(图11)。从左至右为刺激后第1天、第2天、第3天和重新刺激后1天的总独特重叠群数。将来自每个模式的二十八(28)个最高命中用于分析克隆的独特表达模式,并评价带有特定CAR的T细胞的诱导。

[0094] CD8+细胞也用第一载体进行转染,所述第一载体包含连接至最小启动子(IL2mp)的Syn-iPro合成启动子以用于GFP表达。用以下任一载体共转染细胞:a)用于表达具有EGFRt标记的CD19的核酸;或b)用于表达具有EGFRt标记和DHFRdm启动子药物诱导型启动子的CD19+的核酸(图12)。可按照图27中概述的方法对Syn-Pro的表达进行分析。然后收获细胞,并使用下拉测定法分析蛋白质表达。

[0095] 如图16和图17所示,可通过CD19CAR和不同CD19+细胞的相互作用活化iSynPro。从左至右连续显示了由携带Tm-LCL、K562/CD19、Raji、DHL-4、SupB15、Be2/CD19、K562和Be2的细胞产生的GFP表达。

[0096] 还分析了细胞的细胞因子(II-2、IFNg和TNFα)表达。如所示出的,CD80/CD86共刺激因子也不诱导细胞中的细胞因子释放。然而,包含Syn-iPro启动子核酸的细胞被细胞(所述细胞为CD19+CAR T细胞)活化或刺激(图18)。如图19所示,表达CD80/CD86共刺激因子的细胞未被CD19CAR T细胞杀灭(右上图、左中图和左下图)。

[0097] 然后使用Be2/CD19皮下模型进行初步iSynPro体内研究。如图20所示,将Be2细胞皮下注射至小鼠尾中。然后在第5天将CD8 T细胞注射至小鼠中。然后在第6天、第7天、第8天、第9天和第12天拍摄小鼠的图像(图21和图22)。

[0098] 还在用以下载体共转染的细胞中进行了CD8 CAR T细胞中的Syn-iPro测试:a)Syn-Pro-IL2mp-GFP和b)EF1a-CD19scFv-EGFRt(图27)。在病毒转染前,首先用CD3/CD28珠刺激细胞。然后在第12天、第13天、第15天、第26天、第27天、第28天、第29天、第41天、第42天和第43天将细胞与经照射的Tm-LCL细胞共培养。然后在细胞上进行FACS测定。如图28所示,用带有CD19CAR的细胞刺激细胞。如图28所示,仅用CD19 CAR刺激的细胞表达最多的EGFRt。携带Syn iPro合成启动子S1-61-IL2mp的细胞在刺激后表达最多的GFP(图31)。

[0099] 替代方式2

[0100] 来自分选的GFP+细胞的DNA的下一代测序(NGS)产生超过200,000个独特启动子读段(unique promoter reads)。从排名最高的序列(基于读段的排名)中选择约30个独特启动子读段以在CAR T细胞中进行测试,其中大多数为诱导型且比6×NFAT启动子效果更好。预计在未测试的序列池中有更多功能序列。

[0101] 在启动子筛选过程中存在技术限制和偏差,这降低了每个步骤中文库的多样性。例如,通过将随机连接文库克隆至GFP:ffluc_HIV 7质粒并进一步将质粒包装至慢病毒中或取从分选细胞中提取的DNA用于PCR扩增,文库样品大小降低。另一方面,序列冗余在扩增发生的步骤中产生,例如GFP:ffluc_HIV 7质粒转化的大肠杆菌细胞、293t细胞中的慢病毒组装以及用于靶向测序的PCR。只有对每个步骤(原始连接、质粒和病毒)的文库进行测序后,我们才能够知晓偏差并由此从分选细胞测序结果中将其滤除。这样,分选细胞的排名将更有意义。不幸的是,我们尚未完成所有文库的测序。然而,已知PCR有利于短序列,而长序列通常无法获得如短序列一样有效的扩增。两轮PCR扩增可能潜在地降低长序列种类(species)的基于读段的排名。因此,在来自分选细胞的NGS Miseq运行的未测试的序列中,仅可选择长启动子序列(与S-61相似或更长,目前为止的最佳启动子)来申请专利(patent),仅因为它们不是PCR扩增的优势种类。在长序列中,我们进一步选择了在至少3个或4个时间点中显示的序列。此处,读段阈值截止(threshold cut off)数为100(SEQ ID NO:34-SEQ ID NO:39)。

[0102] 在一些替代方式中,提供了制造诱导型合成启动子文库的方法,所述方法包括:对来自包含标记基因的细胞的DNA进行测序;筛选推定的启动子,筛选转录因子应答元件,从而产生经筛选的转录因子应答元件;制造包含推定的启动子的诱导型合成启动子文库;以及合成寡核苷酸,其中,所述寡核苷酸包含编码经筛选的转录因子应答元件的第一序列以及编码启动子的第二序列。在一些替代方式中,所述方法通过下一代测序进行。在一些替代方式中,在CAR T细胞中测试启动子通过CAR结合和CAR T信号转导的活化。在一些替代方式中,所述筛选包括测定标记基因的转录或翻译。在一些替代方式中,在标记基因上调后对启动子进行测序,并对启动子响应于CAR-T细胞与配体的相互作用的活化进行测试。在一些替代方式中,CAR-T细胞相互作用驱动转录因子应答元件的上调。

[0103] 序列

[0104] Syn-iPro的序列

[0105] #序列名称

[0106] SEQ ID NO:1

[0107] S1-17

CTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATCGAGGAGGAAAAAC

TCGATGTGACTCATTCGAAGATCAAAGGGTCGAGGAAAGTCCCCTCGACCCTTTG

[0108] ATCTTCGAATGACATCATCTTTCGAGGAAAGTCCCCTCGAGGGGACTTTCCTCGA

GGGGACTTTCCTCGAATGAGTCACATCGATCTCCGCCCCCTCTTCGAGCGCCAAA

TCGAGGACGTGATCGAGTAGAGTCTAGACTCTACATTTTGACACCCCCAT

[0109] SEQ ID NO:2

[0110] S1-37

CTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATCGAGGGGGCGGGGT

CGATCTCCGCCCCCTCTTCGAGTTTTTCCTCCTCGAGGGGACTTTCCTCGAATGAC

ATCATCTTTCGACCCTTTGATCTTCGAAGGAAGTTCGATCACGTCCTCGATTTGGC

[0111] GCTCGAGGGGACTTTCCTCGAAGATCAAAGGGTCGAGTAGAGTCTAGACTCTAC

ATTTTGACACCCCCAT

SEQ ID NO: 3

[0112] S1-4

CTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATCGATTTCCAAGAAAT

CGAGGAAAGTCCCCTCGACCCTTTGATCTTCGAGGAGGAAAAACTCGAATGAGT

[0113] CACATCGACCCTTTGATCTTCGAAGAGGGGGCGGAGATCGATCTCCGCCCCCTCT

TCGAGGAAAGTCCCCTCGACCCTTTGATCTTCGACCCCGCCCCCTCGAGGAAAGT

CCCCTCGAGTAGAGTCTAGACTCTACATTTTGACACCCCCAT

[0114] SEQ ID NO:4

[0115] S1-1

CTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATCGATCTCCGCCCCCT

[0116] CTTCGAAGATCAAAGGGTCGAGGGGACTTTCCTCGATTTCTTGGAAATCGAATGA

CATCATCTTTCGATTTGGCGCTCGAATGACATCATCTTTCGACCCTTTGATCTTCG

ATGTGACTCATTCGAGGGGACTTTCCTCGAAGATCAAAGGGTCGAGGGGACTTTC

[0117] CTCGAGTAGAGTCTAGACTCTACATTTTGACACCCCCAT

[0118] SEQ ID NO:5

[0119] S1-3

CTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATCGAGGGGACTTTCCT

CGAGGGGGCGGGGTCGATTTGGCGCTCGATCTCCGCCCCCTCTTCGAATGAGTCA

[0120] CATCGAGGAAAGTCCCCTCGAGGAGGAAAAACTCGATGTGACTCATTCGATTTC

CAAGAAATCGAGTAGAGTCTAGACTCTACATTTTGACACCCCCAT

SEQ ID NO: 6

[0121] S1-42

CTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATCGATTTCCAAGAAAT
CGATCTCCGCCCCCTCTTCGAATGACATCATCTTTCGAATGACATCATCTTTCGAG
GAGGAAAAACTCGACCCCGCCCCCTCGATTTCTTGGAAATCGAGGAAAGTCCCC
[0122] TCGAGCGCCAAATCGAAGGAAGTTCGAATGACATCATCTTTCGAATGAGTCACA
TCGAGGAAAGTCCCCTCGAGGAGGAAAAACTCGAGTAGAGTCTAGACTCTACAT
TTTGACACCCCCAT

SEQ ID NO: 7

[0123] S161

CTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATCGAATGAGTCACATC
GATCTCCGCCCCCTCTTCGAGGGGGCGGGGTCGAGGAGGAAAAACTCGAATGAG
TCACATCGACCCTTTGATCTTCGAGGGGACTTTCCGGGGTGGAGCAAGCGTGACA
[0124] AGTCCACGTATGACCCGACCGACGATATCGAAGCCTACGCGCTGAACGCCAGCC
CCGATCGACCCCGCCCCCTCGATTTCCAAGAAATCGAATGACATCATCTTTCGAA
TGACATCATCTTTCGAGGGGACTTTCCTCGAACTTCCTTCGAGGGGACTTTCCTCG
AGGGGACTTTCCTCGAGGAGGAAAAACTCGAGTAGAGTCTAGACTCTACATTTT
GACACCCCCAT

[0125] SEQ ID NO:8

[0126] S1-62

[0127] CTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATCGATTTCCAAGAAAT
CGAGTTTTTCCTCCTCGAGGGGGCGGGGTCGAGGGGACTTTCCTCGACCCTTTGA
[0128] TCTTCGAGGAAAGTCCCCTCGAGCGCCAAATCGATCTCCGCCCCCTCTTCGAGTA
GAGTCTAGACTCTACATTTTGACACCCCCAT

[0129] SEQ ID NO:9

[0130] S1-15

CTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATCGAAGATCAAAGGG
TCGATTTCTTGGAAATCGATGTGACTCATTCGATCACGTCCTCGAGGAGGAAAAA
[0131] CTCGAGGAAAGTCCCCTCGAACTTCCTTCGAGGGGGCGGGGTCGAATGAGTCAC
ATCGAGGAAAGTCCCCTCGAGGGGACTTTCCTCGATTTCTTGGAAATCGAAGAG
GGGGCGGAGATCGAGTTTTTCCTCCTCGAGGAAAGTCCCCTCGATCGACTCTACA
TTTTGACACCCCCAT

[0132] SEQ ID NO:10

[0133] S1-2

[0134] CTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATCGAATGAGTCACATC GAAGATCAAAGGGTCGACCCTTTGATCTTCGATTTGGCGCTCGATGTGACTCATT CGACCCCGCCCCCTCGAGGAAAGTCCCCTCGAGGAAAGTCCCCTCGAGGAAAGT CCCCTCGAGGAAAGTCCCCTCGAGTTTTTCCTCCTCGAAGAGGGGGCGGAGATCG ATTTGGCGCTCGAGGACGTGATCGAGTAGAGTCTAGACTCTACATTTTGACACCC CCAT

[0135] SEQ ID NO:11

[0136] S1-27

[0137] CTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATCGATTTCCAAGAAAT CGAGTTTTTCCTCCTCGATTTCCAAGAAATCGAGGGGACTTTCCTCGAGGGGACT TTCCTCGAATGACATCATCTTTCGATGTGACTCATTCGAAGATCAAAGGGTCGAA GGAAGTTCGAATGAGTCACATCGAATGAGTCACATCGACCCTTGATCTTCGAGG AGGAAAAACTCGATTTGGCGCTCGATTTGGCGCTCGAGTAGAGTCTAGACTCTAC ATTTTGACACCCCCAT

[0138] SEQ ID NO:12

[0139] S1-8

[0140] CTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATCGATTTCTTGGAAAT CGATTTGGCGCTCGAAGGAAGTTCGAGGGGGCGGGGTCGATTTCCAAGAAATCG AGTTTTTCCTCCTCGAGCGCCAAATCGACCCTTTGATCTTCGATCACGTCCTCGAG CGCCAAATCGAGGACGTGATCGAATGAGTCACATCGAATGAGTCACATCGAATG AGTCACATCGATTTGGCGCTCGATCGGGGGGCGGGGTCGAGGAAAGTCCCCTCG

[0141] AGGAAAGTCCCCTCGATTTCCAAGAAATCGATTTGGCGCTCGATCTCCGCCCCCT CTTCGATCTCCGCCCCCTCTTCGAGTTTTTCCTCCTCGAGTAGAGTCTAGACTCTA CATTTTGACACCCCCAT

[0142] SEQ ID NO:13

[0143] S1-30

[0144] CTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATCGAATGACATCATCT TTCGAGGAAAGTCCCCTCGACCCTTTGATCTTCGACCCCGCCCCCTCGAGTTTTTC CTCCTCGAGGAAAGTCCCCTCGACCCTTTGATCTTCGAGGGGACTTTCCTCGAGG GGGCGGGGTCGAGGACGTGATCGAGGAAAGTCCCCTCGAGTAGAGTCTAGACTC TACATTTTGACACCCCCAT

[0145] SEQ ID NO:14

[0146] S1-33

CTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATCGAAGATCAAAGGG
TCGAGGAGGAAAAACTCGAGGGGACTTTCCTCGACCCTTTGATCTTCGAATGAGT
CACATCGATTTCTTGGAAATCGAAGGAAGTTCGAGGGGACTTTCCTCGAGTTTTT
[0147] CCTCCTCGAACTTCCTTCGAGGAAAGTCCCCTCGAAGATCAAAGGGTCGAAGGA
AGTTCGAAAGATGATGTCATTCGATTTCTTGGAAATCGAAGATCAAAGGGTCGA
AGAGGGGGCGGAGATCGATTTCCAAGAAATCGAGTAGAGTCTAGACTCTACATT
TTGACACCCCCAT

[0148] SEQ ID NO:15

[0149] S1-41

CTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATCGAATGAGTCACATC
[0150] GAGCGCCAAATCGAGGGGACTTTCCTCGAGGGGGCGGGGTCGAGTTTTTCCTCCT
CGATTTCCAAGAAATCGAGGGGACTTTCCTCGAGGGGACTTTCCTCGAGGGGACT
TTCCTCGAGTAGAGTCTAGACTCTACATTTTGACACCCCCAT

[0151] SEQ ID NO:16

[0152] S1-59

CTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATCGAGTTTTTCCTCCTC
[0153] GAGGGGACTTTCCTCGAAAGATGATGTCATTCGATCTCCGCCCCCTCTTCGAGGG
GACTTTCCTCGAGGAAAGTCCCCTCGAGGAAAGTCCCCTCGAAGATCAAAGGGT
CGAATGAGTCACATCGACCCTTTGATCTTCGACCCTTTGATCTTCGATTTCCAAGA
[0154] AATCGAGGAAAGTCCCCTCGAGGAAAGTCCCCTCGAGTAGAGTCTAGACTCTAC
ATTTTGACACCCCCAT

[0155] SEQ ID NO:17

[0156] S1-66

CTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATCGAGGGGACTTTCCT
CGAGGAAAGTCCCCTCGATTTCTTGGAAATCGATTTGGCGCTCGAGGAGGAAAA
ACTCGATGTGACTCATTCGACCCTTTGATCTTCGAGGGGACTTTCCTCGAGGGGA
[0157] CTTTCCTCGAGCGCCAAATCGAGGAGGAAAAACTCGAGGGGACTTTCCTCGATTT
CTTGGAAATCGAAAGATGATGTCATTCGACCCTTTGATCTTCGAGTAGAGTCTAG
ACTCTACATTTTGACACCCCCAT

[0158] SEQ ID NO:18

[0159] S1-71

CTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATCGAGGAAAGTCCCCT
CGAGGAAAGTCCCCTCGATTTCTTGGAAATCGAATGACATCATCTTTCGATCACG
[0160] TCCTCGAGGAAAGTCCCCTCGAGTTTTTCCTCCTCGAGGGGACTTTCCTCGATTTC
CAAGAAATCGATTTCTTGGAAATCGACCCTTTGATCTTCGAGGAGGAAAAACTCG
AGTAGAGTCTAGACTCTACATTTTGACACCCCCAT

[0161] SEQ ID NO:19

[0162] S1-56

[0163] CTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATCGATGTGACTCATTC
GAGGAAAGTCCCCTCGATTTGGCGCTCGATGTGACTCATTCGATTTGGCGCTCGA
GGGGACTTTCCTCGATTTCCAAGAAATCGAGGGGACTTTCCTCGAGGAAAGTCCC
CTCGAGTTTTTCCTCCTCGAGTAGAGTCTAGACTCTACATTTTGACACCCCCAT

[0164] SEQ ID NO:20

[0165] S1-6

[0166] CTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATCGATGTGACTCATTC
GAGCGCCAAATCGATTTCCAAGAAATCGAATGAGTCACATCGAATGACATCATC
TTTCGATGTGACTCATTCGAGGAAAGTCCCCTCGATTTCTTGGAAATCGAGGAAA

[0167] GTCCCCTCGAGTTTTTCCTCCTCGAAGAGGGGGCGGAGATCGAATGACATCATCT
TTCGAGTAGAGTCTAGACTCTACATTTTGACACCCCCAT

[0168] SEQ ID NO:21

[0169] S1-60

[0170] CTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATCGAGGGGACTTTCCT
CGATCTCCGCCCCCTCTTCGAGGAAAGTCCCCTCGAAGGAAGTTCGAACTTCCTT
CGAGGGGACTTTCCTCGAAGGAAGTTCGAGCGCCAAATCGAATGAGTCACATCG
ATTTCCAAGAAATCGATCTCCGCCCCCTCTTCGAGGAGGAAAAACTCGAGGGGA
CTTTCCTCGATTTCCAAGAAATCGAGGGGACTTTCCTCGATCACGTCCTCGAGGA
CGTGATCGAATGAGTCACATCGATGTGACTCATTCGACCCTTTGATCTTCGAGTA
GAGTCTAGACTCTACATTTTGACACCCCCAT

[0171] SEQ ID NO:22

[0172] S1-86

[0173] CTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATCGATTTCCAAGAAAT
CGAGGGGGCGGGGTCGAGGGGACTTTCCTCGAGGGGACTTTCCTCGAGGAAAGT
CCCCTCGATCTCCGCCCCCTCTTCGAGGAAAGTCCCCTCGAACTTCCTTCGAGGA
AAGTCCCCTCGAATGAGTCACATCGATTTGGCGCTCGAGGAAAGTCCCCTCGAG
GGGACTTTCCTCGAGGAAAGTCCCCTCGAGGGGGCGGGGTCGAACTTCCTTCGA
GTAGAGTCTAGACTCTACATTTTGACACCCCCAT

[0174] SEQ ID NO:23

[0175] S1-32

[0176] CTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATCGAATGAGTCACATC
GATCTCCGCCCCCTCTTCGATTTGGCGCTCGAGGGGACTTTCCTCGACCCTTTGAT
CTTCGAGGGGACTTTCCTCGAGGAAAGTCCCCTCGAGGAAAGTCCCCTCGAGTA
GAGTCTAGACTCTACATTTTGACACCCCCAT

[0177] SEQ ID NO:24

[0178] S1-10

CTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATCGATTTGGCGCTCGA

[0179] TGTGACTCATTCGAGGAAAGTCCCCTCGAGGGGACTTTCCTCGAAGATCAAAGG

GTCGAAAGATGATGTCATTCGAGGAAAGTCCCCTCGACCCCGCCCCCTCGATTTC

[0180] TTGGAAATCGAATGAGTCACATCGATTTCTTGGAAATCGATGTGACTCATTCGAG

TAGAGTCTAGACTCTACATTTTGACACCCCCAT

[0181] SEQ ID NO:25

[0182] S1-18

CTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATCGAGGGGACTTTCCT

CGATGTGACTCATTCGATTTCTTGGAAATCGATTTCCAAGAAATCGACCCCGCCC

CCTCGAGGAGGAAAAACTCGATTTCCAAGAAATCGAATGACATCATCTTTCGAG

[0183] GGGACTTTCCTCGAAGATCAAAGGGTCGAAGATCAAAGGGTCGAGGAGGAAAA

ACTCGATTTCCAAGAAATCGAATGAGTCACATCGAGTTTTTCCTCCTCGATTTCTT

GGAAATCGAAGAGGGGGCGGAGATCGATTTGGCGCTCGAGTAGAGTCTAGACTC

TACATTTTGACACCCCCAT

[0184] SEQ ID NO:26

[0185] S1-14

CTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATCGAAAGATGATGTCA

TTCGAATGAGTCACATCGATTTGGCGCTCGAGGGGGCGGGGTCGATTTGGCGCTC

[0186] GAAAGATGATGTCATTCGAGTTTTTCCTCCTCGACCCTTTGATCTTCGAAGAGGG

GGCGGAGATCGAAAGATGATGTCATTCGAATGAGTCACATCGATTTCCAAGAAA

TCGATTTCCAAGAAATCGAGTAGAGTCTAGACTCTACATTTTGACACCCCCAT

[0187] SEQ ID NO:27

[0188] S1-16

CTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATCGAGGAGGAAAAAC

TCGATTTCTTGGAAATCGAGGGGACTTTCCTCGAAAGATGATGTCATTCGAAGAT

CAAAGGGTCGATGTGACTCATTCGAGGGGACTTTCCTCGAGGGGGCGGGGTCGA

[0189] ATGACATCATCTTTCGAGGGGACTTTCCTCGAGGGGACTTTCCTCGAATGACATC

ATCTTTCGATTTCTTGGAAATCGAGTAGAGTCTAGACTCTACATTTTGACACCCCC

AT

[0190] SEQ ID NO:28

[0191] S1-19

CTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATCGATCTCCGCCCCCT

[0192] CTTCGAGTTTTTCCTCCTCGATTTCTTGGAAATCGAAGATCAAAGGGTCGATTTCT

TGGAAATCGAGGGGACTTTCCTCGAGGAAAGTCCCCTCGAGGGGACTTTCCTCG

[0193] AGGAGGAAAAACTCGATTTGGCGCTCGAGTAGAGTCTAGACTCTACATTTTGACACCCCCAT

[0194] SEQ ID NO:29

[0195] S1-26

CTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATCGAAAGATGATGTCATTCGAGTTTTTCCTCCTCGAAGGAAGTTCGAGGACGTGATCGAAGAGGGGGCGG

[0196] AGATCGAATGAGTCACATCGAAGGAAGTTCGAGGAAAGTCCCCTCGAGGAAAGTCCCCTCGAAGATCAAAGGGTCGAGTAGAGTCTAGACTCTACATTTTGACACCCCCAT

[0197] SEQ ID NO:30

[0198] S1-65

CTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATCGACCCCGCCCCCTC

[0199] GAGCGCCAAATCGAGGGGACTTTCCTCGAGGGGACTTTCCTCGAGGGGACTTTCCTCGAGTAGAGTCTAGACTCTACATTTTGACACCCCCAT

[0200] SEQ ID NO:31

[0201] S2-n1

CTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATCGAGGGGGCGGGGTCGAATGACATCATCTTTCGAGGAAAGTCCCCTCGAGGAAAGTCCCCTCGAGGAA

[0202] AGTCCCCTCGATTTCCAAGAAATCGACCCTTTGATCTTCGAAGATCAAAGGGTCGATGTGACTCATTCGAAGATCAAAGGGTCGATTTGGCGCTCGAGTAGAGTCTAGACTCTACATTTTGACACCCCCAT

[0203] SEQ ID NO:32

[0204] S4-n1

CTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATCGAGGAAAGTCCCCTCGAGTTTTTCCTCCTCGAAGAGGGGGCGGAGATCGATTTCCAAAAAACTCGAAT

[0205] GACATCATCTTTCGAAGATCAAGGGGTCGAAGATCAAAGGGTCGATTTCCAAGAAATCGATTTCTTGGAAATCGAGGAAAGTCCCCTCGACCCTTTGATCTTCGATCTCCGCCCCCTCTTCGAAGATCAAAGGGTCGAAGAGGGGGCGGAGATCGAGTAGAGTCTAGACTCTACATTTTGACACCCCCAT

[0206] SEQ ID NO:33

[0207] S6-n1

[0208] CTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATCGATTTCCAAGAAATCGATTTCTTGGAAATCGAATGACATCATCTTTCGAGTTTTTCCTCCTCGAAGAGGGGGCGGAGATCGAGGAAAGTCCCCTCGATTTCCAAGAAATCGAACTTCCTTCGAAGGAAGTTCGAGGAGGAAAAACTCGAGGGGGCGGGGTCGAGTTTTTCCTCCTCGAGGGGACTTTCCTCGACCCCGCCCCCTCGACCCTTTGATCTTCGATTTCCAAGAAATCGAGTAGAGTCTAGACTCTACATTTTGACACCCCCAT

[0209] SEQ ID NO:34

[0210] S1-325

[0211] TCGAAGATCAAAGGGTCGATTTCCAAGAAATCGATGTGACTCATTCGATTTGGCGCTCGACCCCGCCCCCTCGAAGAGGGGGCGGAGATCGAATGAGTCACATCGAGGAAAGTCCCCTCGATTTCTTGGAAATCGAGGAAAGTCCCCTCGAGGGGACTTTCCTCGAGGAGGAAAAACTCGAATGACATCATCTTTCGAATGAGTCACATCGATTTCTTGGAAATCGAGGGGACTTTCCTCGACCCCGCCCCCTCGAGGTGACTTTCCTCGAGGGGACTTTCCTCGATGTGACTCATTCGAGGGGACTTTCCTCGAGGGGACTTTCCTCGACCCTTTGATCTTCGATTTGGCGCTCGAGGGGACTTTCCTCGAGGGGACTTTCCTCGAGGGGACTTTCCTCGAGTAGAGTCTAGACTCTACATTTTGACACCCCCA

[0212] SEQ ID NO:35

[0213] S1-60

[0214] TCGAATGAGTCACATCGATCTCCGCCCCCTCTTCGAGGGGGCGGGGTCGAGGAGGAAAAACTCGAATGAGTCACATCGACCCTTTGATCTTCGAGGGGACTTTCCGGGGTGGAGCAAGCGTGACAAGTCCACGTATGACCCGACCGACGATATCGAAGCCTACGCGCTGAACGCCAGCCCCGATCGACCCCGCCCCCTCGATTTCCAAGAAATCGAATGACATCATCTTTCGAATGACATCATCTTTCGAGGGGACTTTCCTCGAACTTCCTTCGAGGGGACTTTCCTCGAGGGGACTTTCCTCGAGGAGGAAAAACTCGAGTAGAGTCTAGACTCTACATTTTGACACCCCCA

[0215] SEQ ID NO:36

[0216] S2-274

[0217] TCGAATGAGTCACATCGATCTCCGCCCCCTCTTCGAGGGGGCGGGGTCGAGGAGGAAAAACTCGAATGAGTCACATCGACCCTTTGATCTTCGAGGGGACTTTCCGGGGTGGAGCAAGCGTGACAAGTCCACGTATGACCCGACCGACGATATCGAAGCCTACGCGCTGAACGCCAGCCCCGATCGACCCCGCCCCCTCGATTTCCAAGAAATCGAATGACATCATCTTTCGAATGACATCATCTTTCGAGGGGACTTTCCTCGAACTTCCTTCGAGGGGACTTTCCTCGAGGGGACTTTCCTCGAGGAGGAAAAACTCGAAAAGATGATGTCATTCGAGTTTTTCCTCCTCGAGGAGGAAAAACTCGAGTAGAGTCTAGACTCTACATTTTGACACCCCCA

[0218] SEQ ID NO:37

[0219] S2-310

TCGAATGAGTCACATCGATCTCCGCCCCCTCTTCGAGGGGGCGGGGTCGAGGAG
GAAAAACTCGAATGAGTCACATCGACCCTTTGATCTTCGAGGGGACTTTCCGGGG
TGGAGCAAGCGTGACAAGTCCACGTATGACCCGACCGACGATATCGAAGCCTAC

[0220] GCGCTGAACGCCAGCCCCGATCGACCCCGCCCCCTCGATTTCCAAGAAATCGAAT
GACATCATCTTTCGAATGACATCATCTTTCGAGGGGACTTTCCTCGAACTTCCTTC
GAGGGGACTTTCCTCGAGGGGACTTTCCTCGAGGGGACTTTCCTCGAGGAGGAA
AAACTCGAGTAGAGTCTAGACTCTACATTTTGACACCCCCA

[0221] SEQ ID NO:38

[0222] S1-367

TCGATTTCCAAGAAATCGACCCCGCCCCCTCGAACTTCCTTCGATTTCTTGGAAA
TCGAGGAAAGTCCCCTCGATTTCTTGGAAATCGATTTCTTGGAAATCGAATGACA
TCATCTTTCGATTTCTTGGAAATCGACCCTTTGATCTTCGAGGAGGAAAAACTCG
AATGACATCATCTTTCGATCACGTCCTCGAAGATCAAAGGGTCGAGTTTTTCCTC

[0223] CTCGAGGAAAGTCCCCTCGATGTGACTCATTCGATTTCTTGGAAATCGAGGGGAC
TTTCCTCGAGGGGACTTTCCTCGAGTTTTTCCTCCTCGAGGAGGAAAAACTCGAT
TTCCAAGAAATCGAGGGGACTTTCCTCGACCCTTTGATCTTCGAGCGCCAAATCG
AGTAGAGTCTAGACTCTACATTTTGACACCCCCA

[0224] SEQ ID NO:39

[0225] S1-7

TCGATTTCTTGGAAATCGATTTGGCGCTCGAAGGAAGTTCGAGGGGGCGGGGTC
GATTTCCAAGAAATCGAGTTTTTCCTCCTCGAGCGCCAAATCGACCCTTTGATCTT
CGATCACGTCCTCGAGCGCCAAATCGAGGACGTGATCGAATGAGTCACATCGAA

[0226] TGAGTCACATCGAATGAGTCACATCGATTTGGCGCTCGATCGGGGGGCGGGGTC
GAGGAAAGTCCCCTCGAGGAAAGTCCCCTCGATTTCCAAGAAATCGATTTGGCG
CTCGATCTCCGCCCCCTCTTCGATCTCCGCCCCCTCTTCGAGTTTTTCCTCCTCGA
GTAGAGTCTAGACTCTACATTTTGACACCCCCA



强促增殖分子：CCR（CD122）、CASTAT5、PD1:CD28、miRNA
可帮助根除肿瘤但也损伤正常组织的分子：IL12

图1

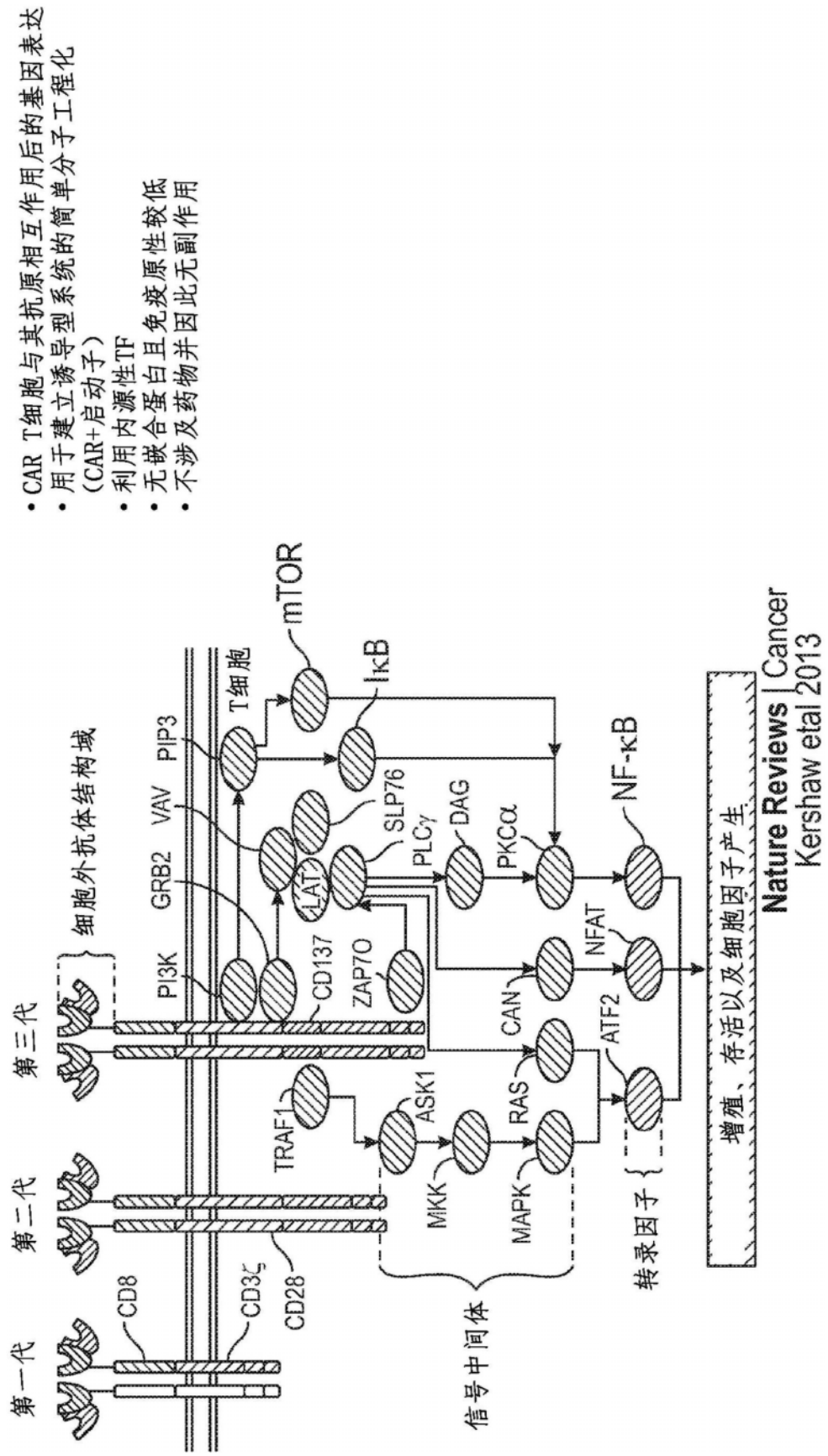

• CAR T细胞与其抗原相互作用后的基因表达
• 用于建立诱导型系统的简单分子工程化
(CAR+启动子)
• 利用内源性TF
• 无嵌合蛋白且免疫原性较低
• 不涉及药物并因此无副作用
第一代
第二代
第三代
细胞外抗体结构域
CD8
CD3ζ
CD28
PI3K
GRB2
VAV
PIP3
T细胞
mTOR
IκB
LAT
SLP76
PLCγ
DAG
PKCα
NF-κB
CD137
ZAP70
CAN
NFAT
TRAF1
ASK1
RAS
ATF2
MKK
MAPK
信号中间体
转录因子
增殖、存活以及细胞因子产生
Nature Reviews | Cancer
Kershaw etal 2013

图2

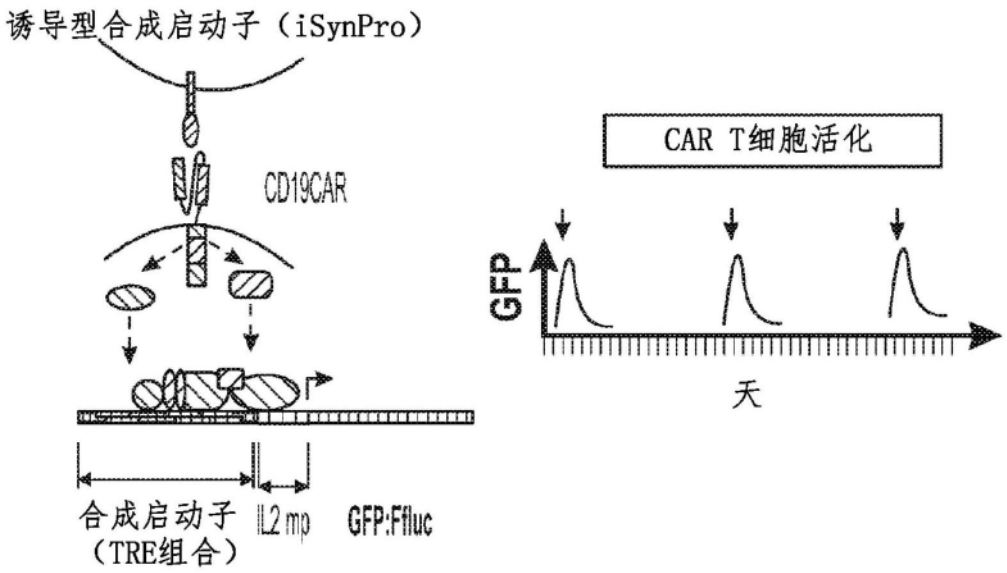

诱导型合成启动子（iSynPro）
CD19CAR
合成启动子
（TRE组合）
IL2 mp
GFP:Ffluc
CAR T细胞活化
GFP
天

图3

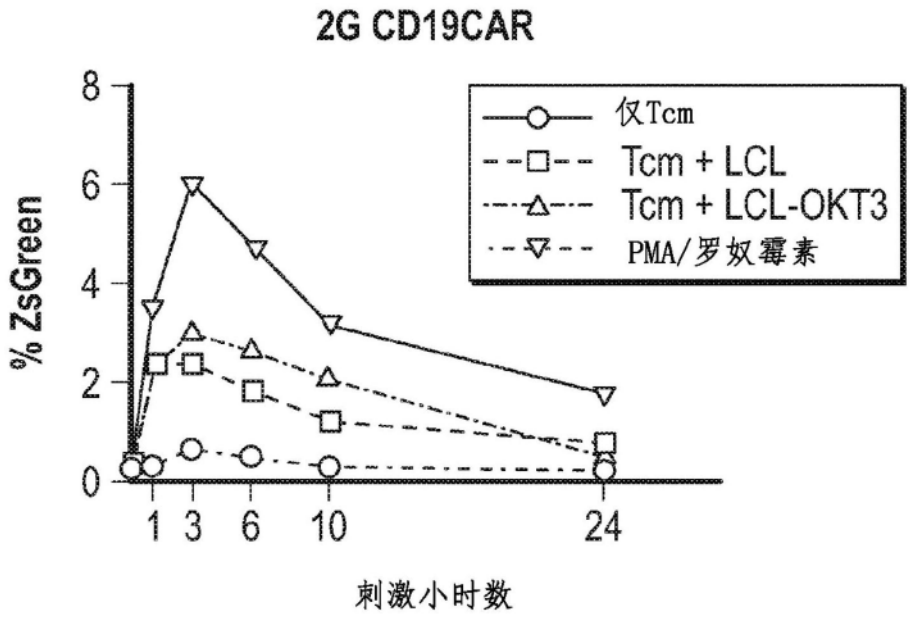

2G CD19CAR
% ZsGreen
0
2
4
6
8
1 3 6 10 24
刺激小时数
仅Tcm
Tcm + LCL
Tcm + LCL-OKT3
PMA/罗奴霉素

图4

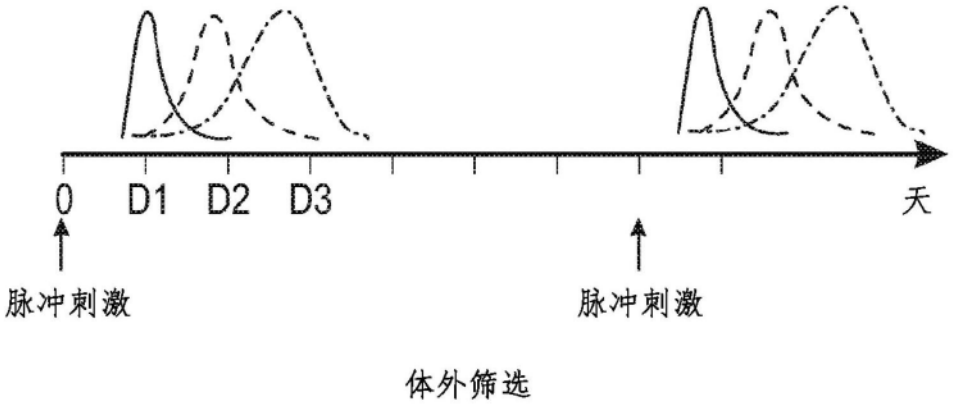

0
D1
D2
D3
天
脉冲刺激
脉冲刺激
体外筛选

图5

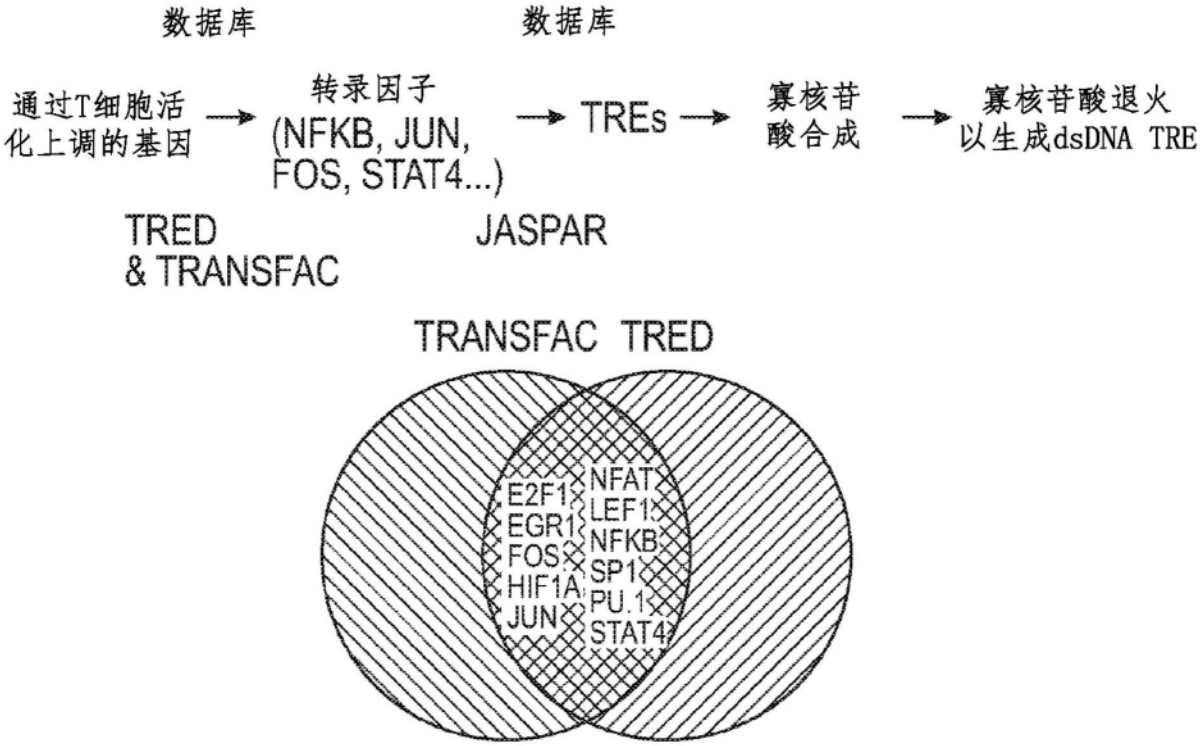

数据库
数据库
通过T细胞活化上调的基因
转录因子
(NFKB, JUN, FOS, STAT4...)
TREs
寡核苷酸合成
寡核苷酸退火以生成dsDNA TRE
TRED & TRANSFAC
JASPAR
TRANSFAC TRED
E2F1
EGR1
FOS
HIF1A
JUN
NFAT
LEF1
NFKB
SP1
PU.1
STAT4

图6

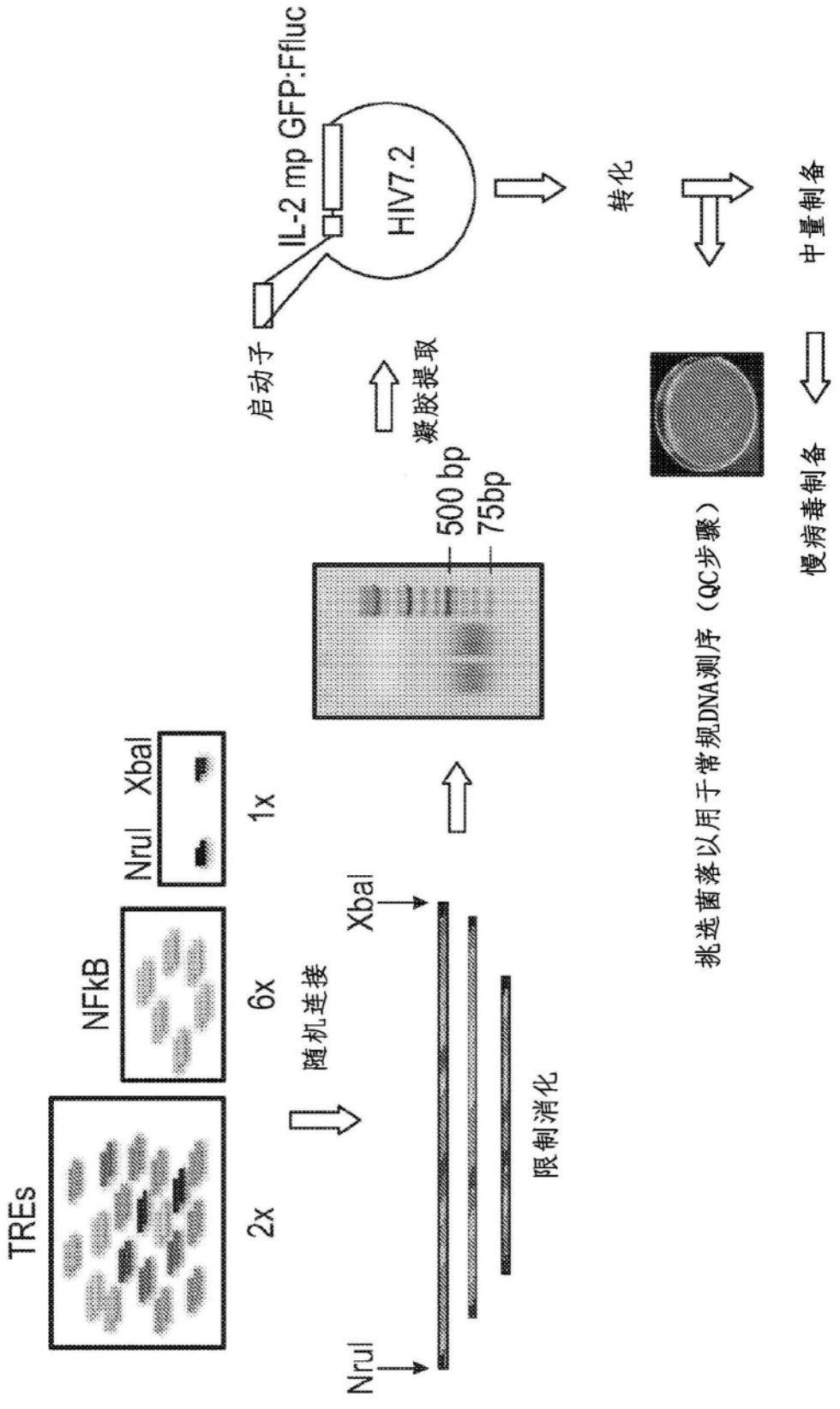

TREs
2x
NFkB
6x
NruI
XbaI
1x
随机连接
XbaI
NruI
限制消化
500 bp
75bp
凝胶提取
启动子
IL-2 mp GFP:Ffluc
HIV7.2
转化
挑选菌落以用于常规DNA测序（QC步骤）
慢病毒制备
中量制备

图7

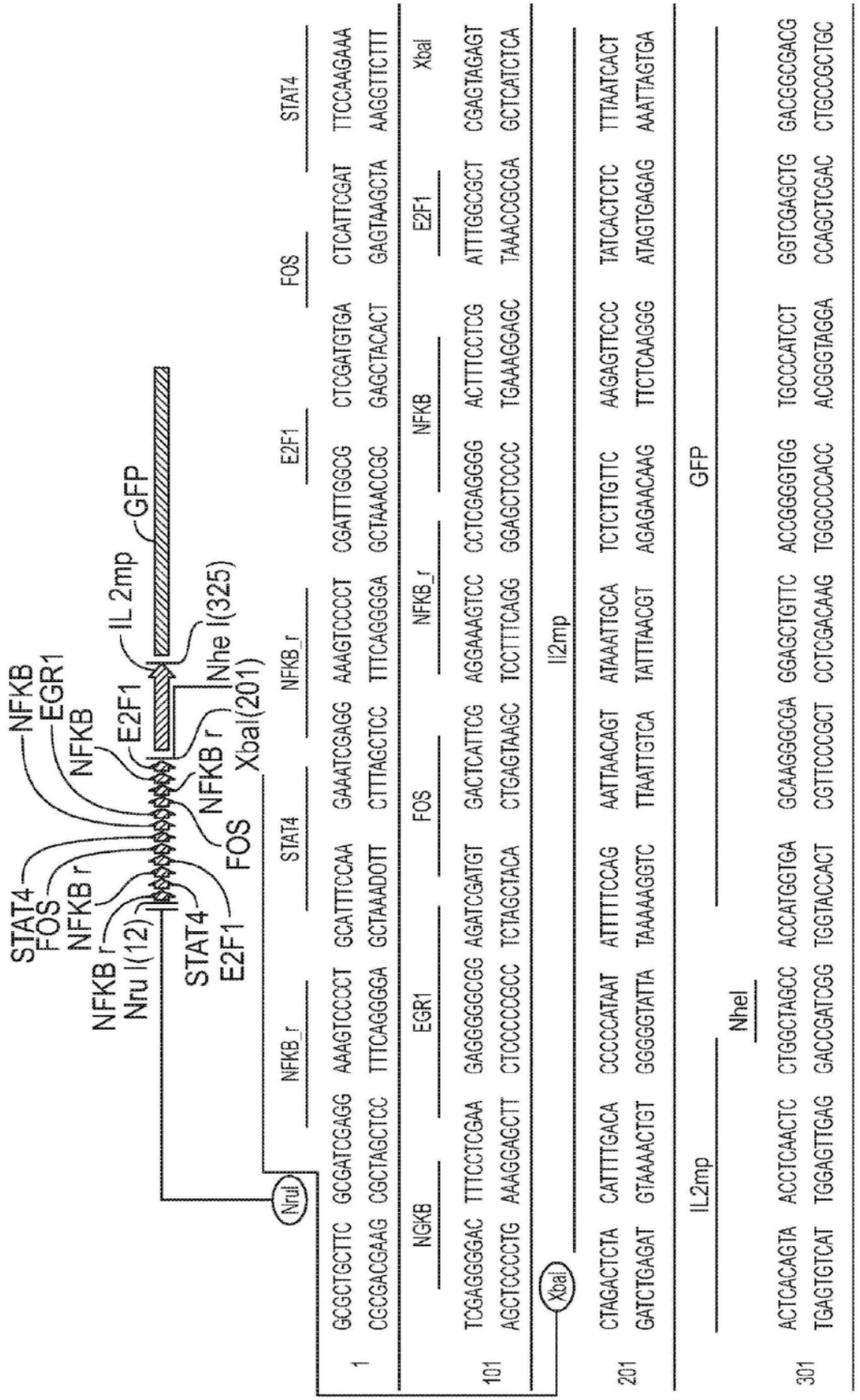
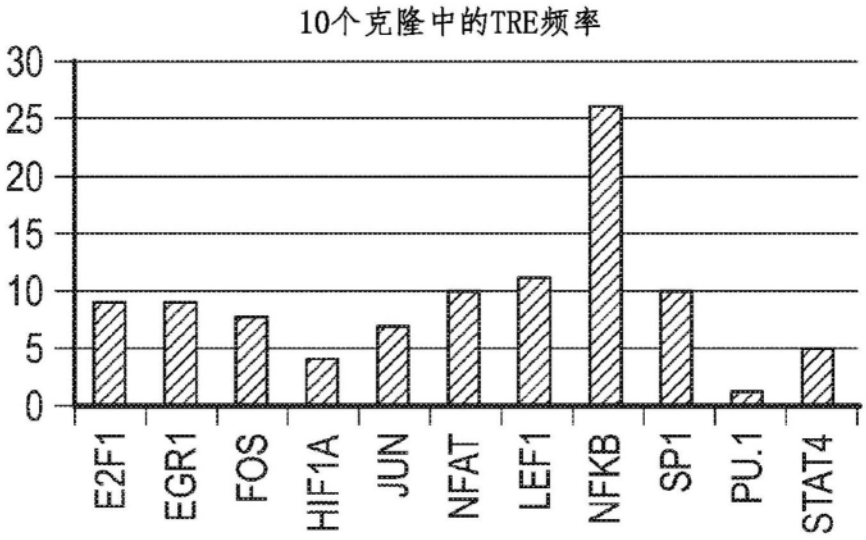

NFKB
EGR1
NFKB
E2F1
IL 2mp
GFP
Nhe I(325)
NFKB r
Xbal(201)
FOS
STAT4
NFKB r
E2F1
Nru I(12)
NFKB r
FOS
STAT4
NFKB r
Nrul
NFKB_r
STAT4
NFKB_r
E2F1
FOS
STAT4
1 GCGCTGCTTC GCGATCGAGG AAAGTCCCCT GCATTTCCAA GAAATCGAGG AAAGTCCCCT CGATTTGGCG CTCGATGTGA CTCATTCGAT TTCCAAGAAA
CGCGACGAAG CGCTAGCTCC TTTCAGGGGA GCTAAADOTT CTTTAGCTCC TTTCAGGGGA GCTAAACCGC GAGCTACACT GAGTAAGCTA AAGGTTCTTT
NGKB
EGR1
FOS
NFKB_r
NFKB
E2F1
Xbal
101 TCGAGGGGAC TTTCCTCGAA GAGGGGGCGG AGATCGATGT GACTCATTCG AGGAAAGTCC CCTCGAGGGG ACTTTCCTCG ATTTGGCGCT CGAGTAGAGT
AGCTCCCCTG AAAGGAGCTT CTCCCCCGCC TCTAGCTACA CTGAGTAAGC TCCTTTCAGG GGAGCTCCCC TGAAAGGAGC TAAACCGCGA GCTCATCTCA
Xbal
Il2mp
201 CTAGACTCTA CATTTTGACA CCCCCATAAT ATTTTTCCAG AATTAACAGT ATAAATTGCA TCTCTTGTTC AAGAGTTCCC TATCACTCTC TTTAATCACT
GATCTGAGAT GTAAAACTGT GGGGGTATTA TAAAAAGGTC TTAATTGTCA TATTTAACGT AGAGAACAAG TTCTCAAGGG ATAGTGAGAG AAATTAGTGA
IL2mp
NheI
GFP
301 ACTCACAGTA ACCTCAACTC CTGGCTAGCC ACCATGGTGA GCAAGGGCGA GGAGCTGTTC ACCGGGGTGG TGCCCATCCT GGTCGAGCTG GACGGCGACG
TGAGTGTCAT TGGAGTTGAG GACCGATCGG TGGTACCACT CGTTCCCGCT CCTCGACAAG TGGCCCCACC ACGGGTAGGA CCAGCTCGAC CTGCCGCTGC

图8-1


10个克隆中的TRE频率
30
25
20
15
10
5
0
E2F1
EGR1
FOS
HIF1A
JUN
NFAT
LEF1
NFKB
SP1
PU.1
STAT4

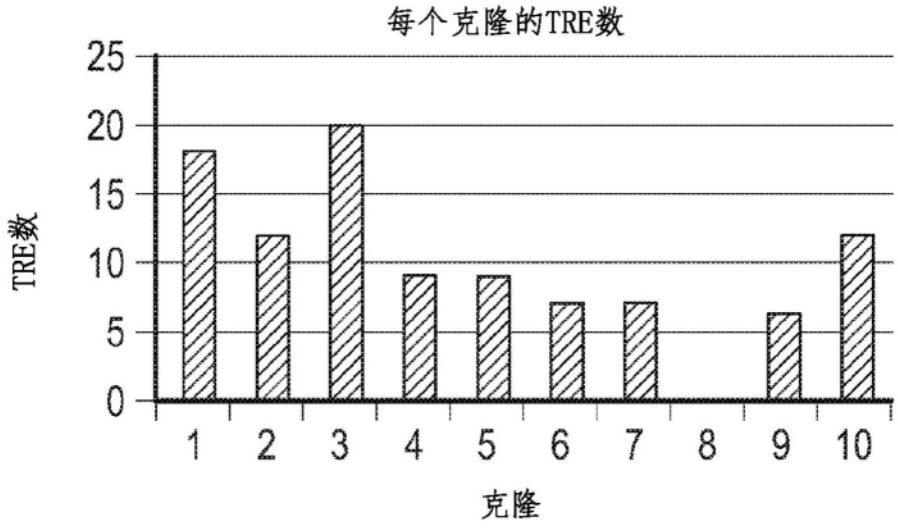

每个克隆的TRE数
TRE数
25
20
15
10
5
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
克隆

图8-2

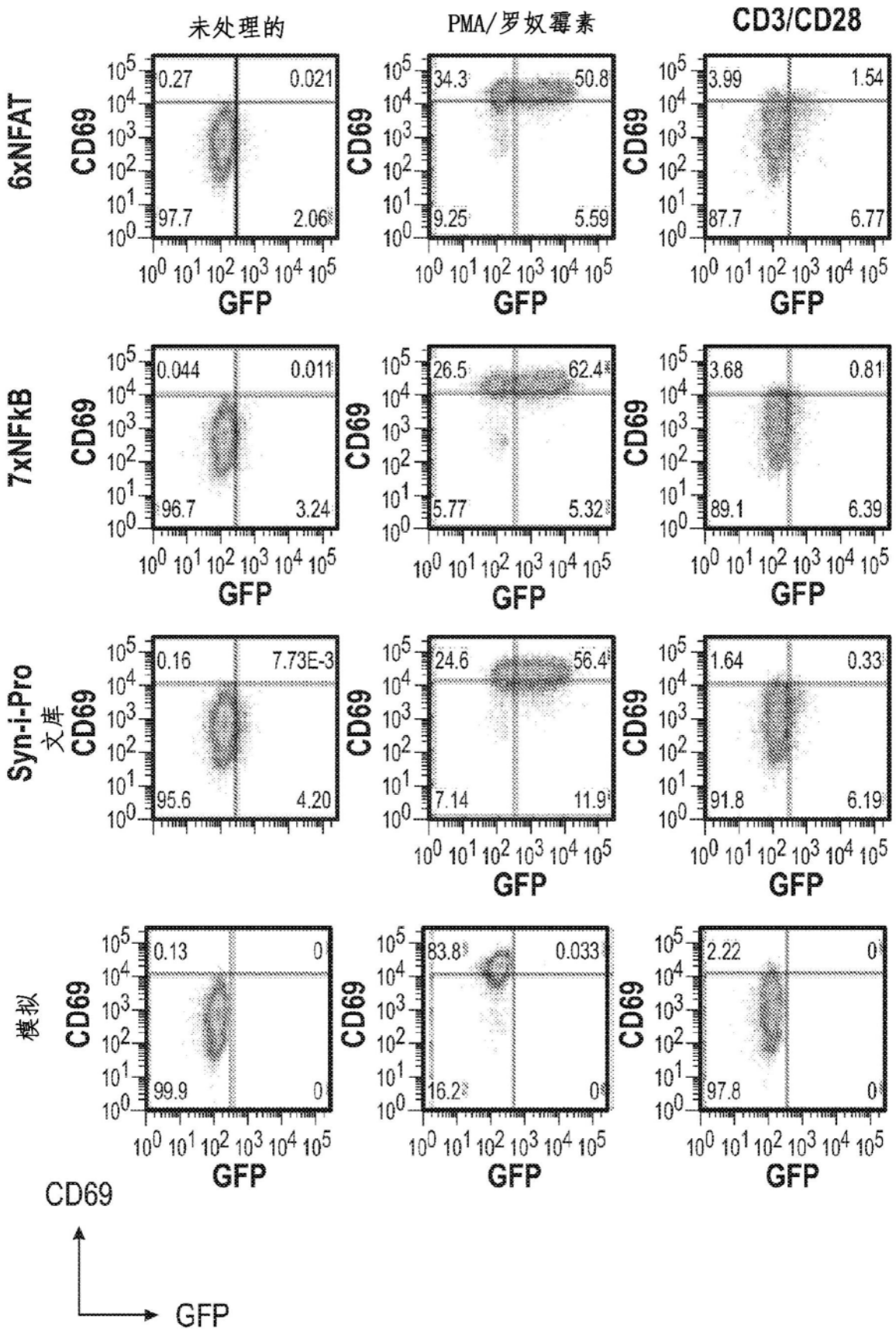

未处理的
PMA/罗奴霉素
CD3/CD28
6xNFAT
7xNFkB
Syn-i-Pro 文库
模拟
CD69
GFP
0.27
0.021
97.7
2.06
34.3
50.8
9.25
5.59
3.99
1.54
87.7
6.77
0.044
0.011
96.7
3.24
26.5
62.4
5.77
5.32
3.68
0.81
89.1
6.39
0.16
7.73E-3
95.6
4.20
24.6
56.4
7.14
11.9
1.64
0.33
91.8
6.19
0.13
0
99.9
0
83.8
0.033
16.2
0
2.22
0
97.8
0

图9

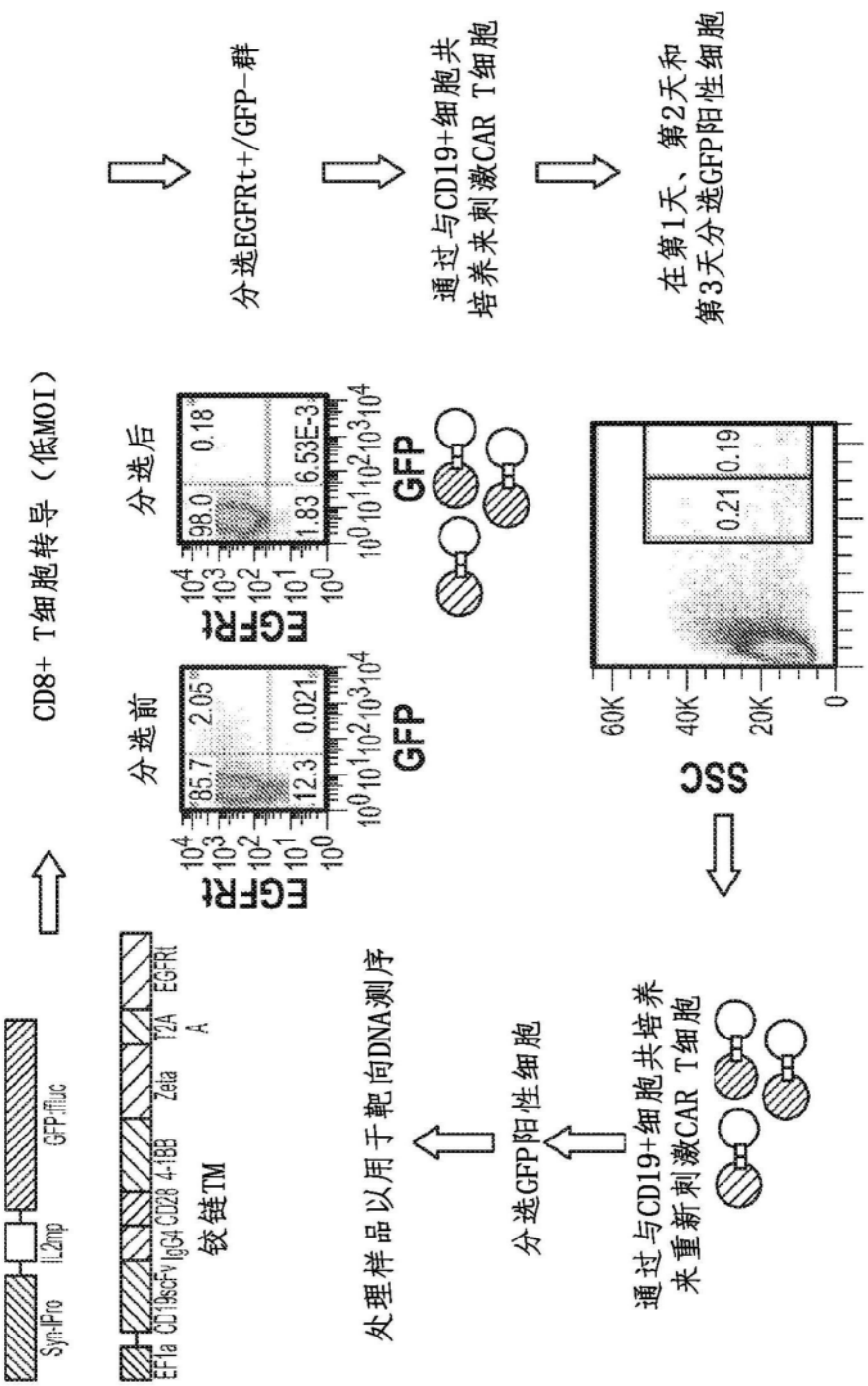

Syn-hPro
IL2mp
GFP-ffluc
EF1a
CD19scFv
IgG4
CD28
4-1BB
Zeta
T2A
EGFRt
铰链TM
CD8+ T细胞转导（低MOI）
分选前
分选后
GFP
EGFRt
85.7
2.05
12.3
0.021
98.0
0.18
1.83
6.53E-3
处理样品以用于靶向DNA测序
分选GFP阳性细胞
通过与CD19+细胞共培养
来重新刺激CAR T细胞
分选EGFRt+/GFP-群
通过与CD19+细胞共
培养来刺激CAR T细胞
在第1天、第2天和
第3天分选GFP阳性细胞
SSC
60K
40K
20K
0
0.21
0.19

图10

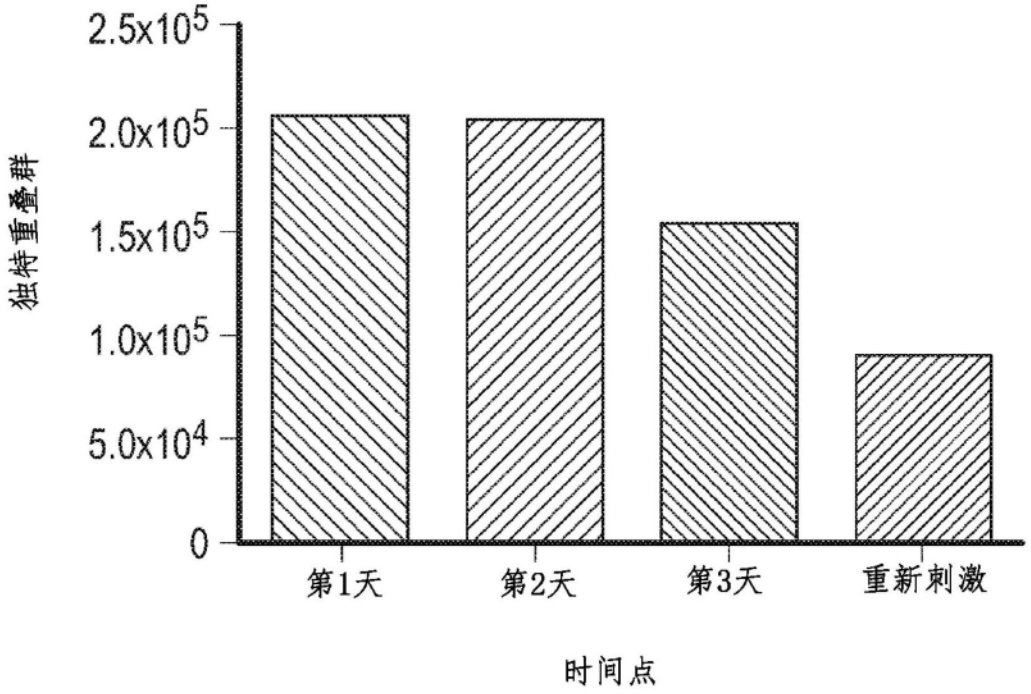

2.5x10^5
2.0x10^5
1.5x10^5
1.0x10^5
5.0x10^4
0
独特重叠群
第1天
第2天
第3天
重新刺激
时间点

图11

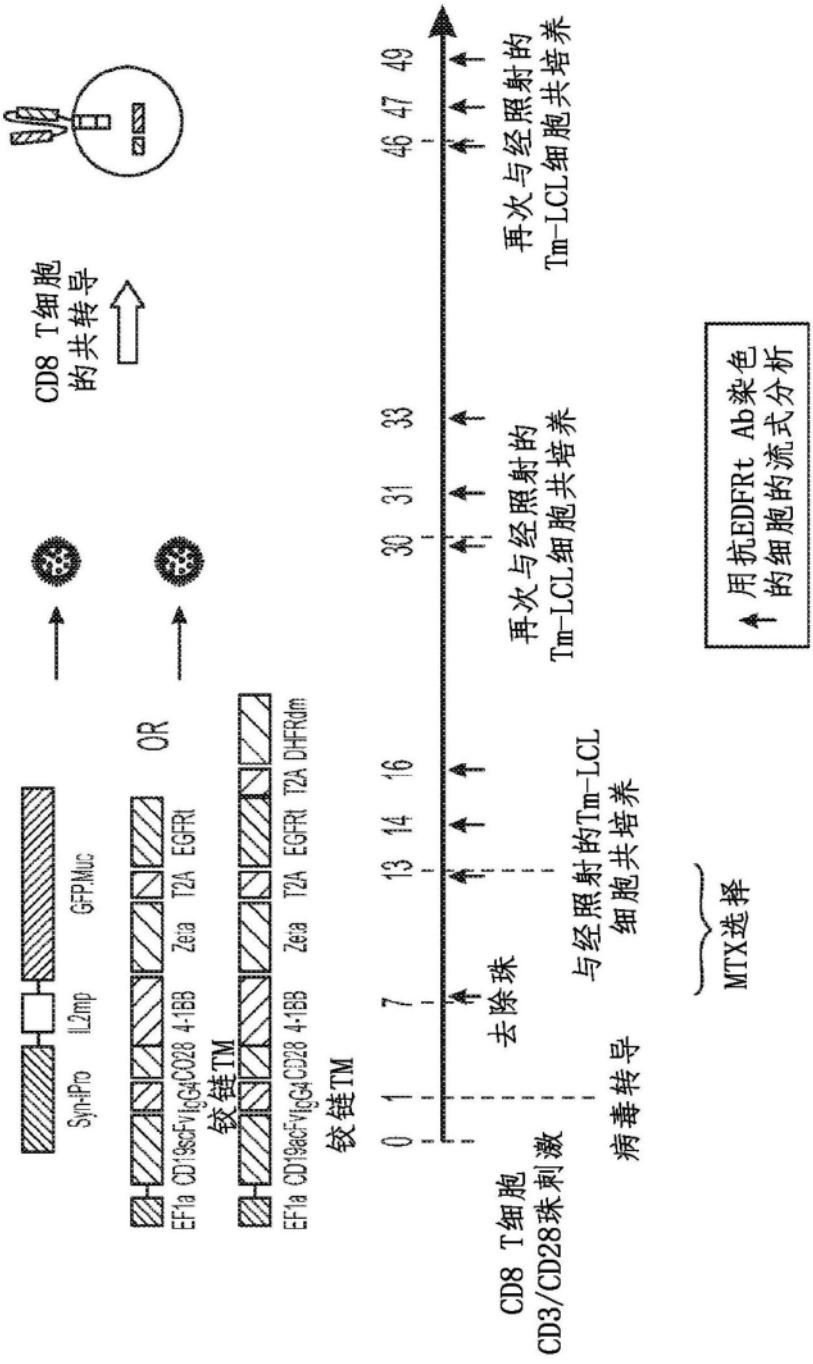

Syn-Pro IL2mp GFP.Muc
EF1a CD19scFvIgG4CD28 4-1BB Zeta T2A EGFRt
铰链TM
OR
EF1a CD19scFvIgG4CD28 4-1BB Zeta T2A EGFRt T2A DHFRdm
铰链TM
CD8 T细胞的共转导
0 1 7 13 14 16 30 31 33 46 47 49
CD8 T细胞 CD3/CD28珠刺激
病毒转导
去除珠
与经照射的Tm-LCL细胞共培养
再次与经照射的Tm-LCL细胞共培养
MTX选择
再次与经照射的Tm-LCL细胞共培养
用抗EDFRt Ab染色的细胞的流式分析

图12

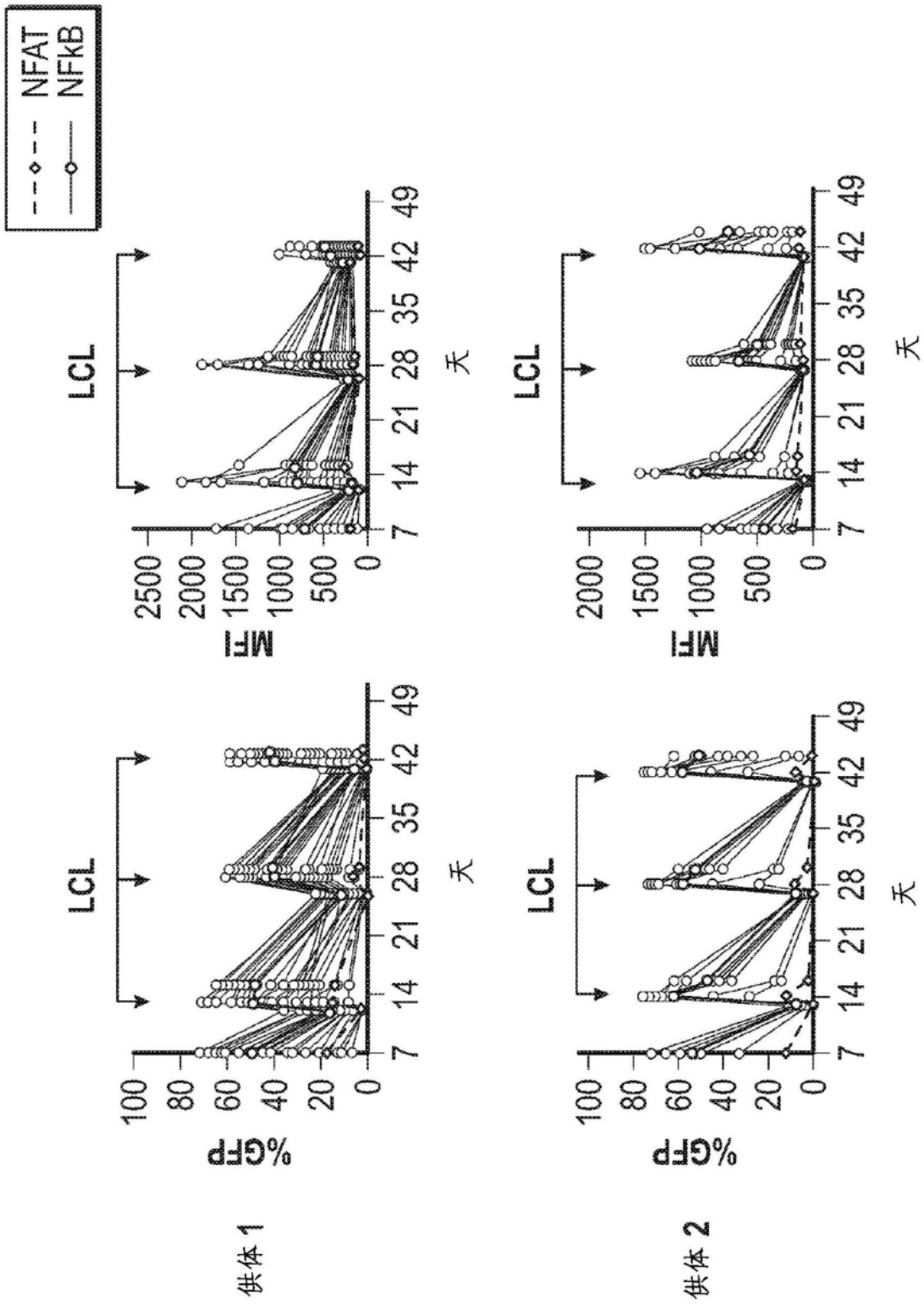


图13

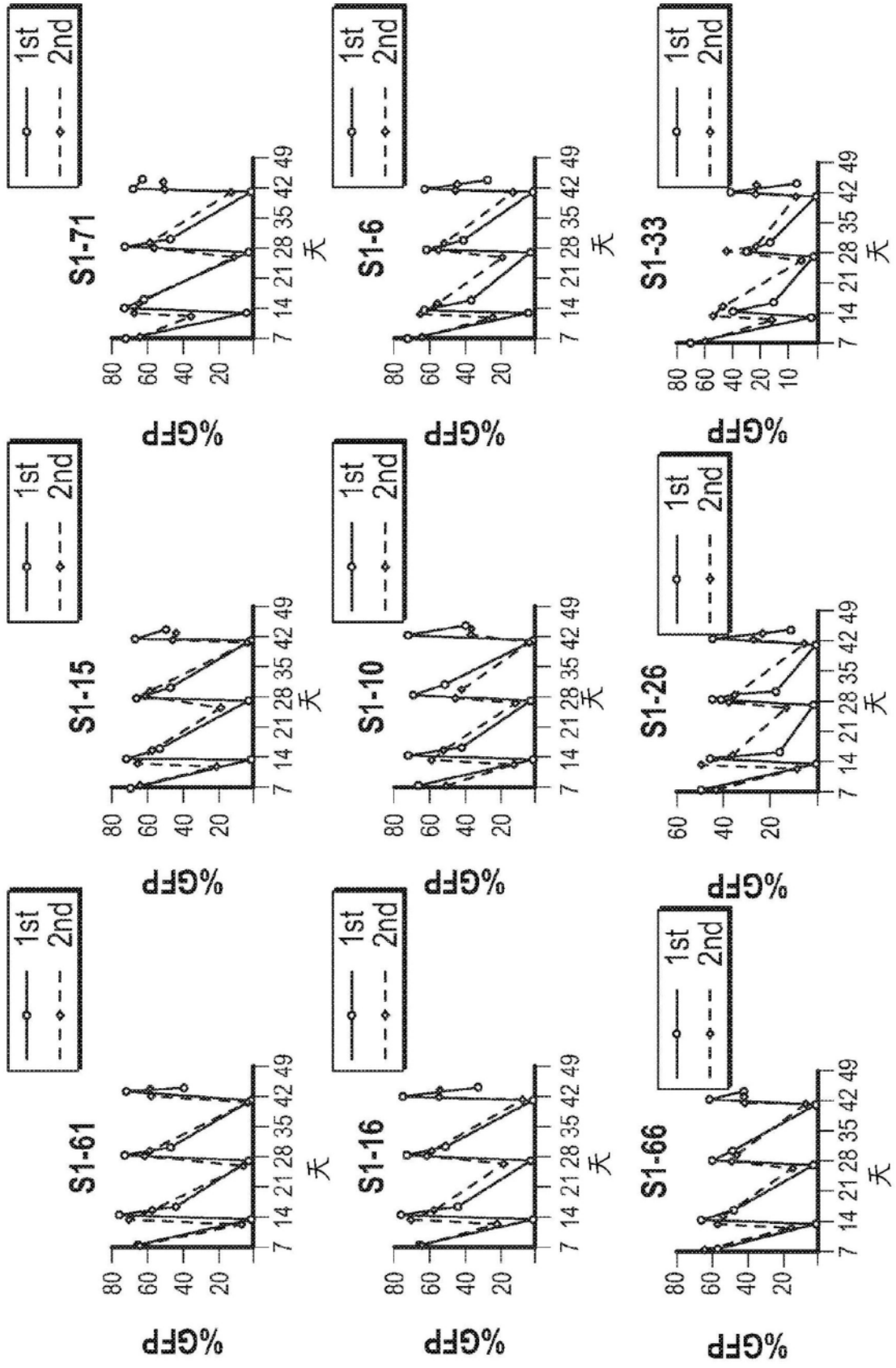

S1-71
S1-6
S1-33
S1-15
S1-10
S1-26
S1-61
S1-16
S1-66
1st
2nd
%GFP
天
7 14 21 28 35 42 49
20 40 60 80
10

图14

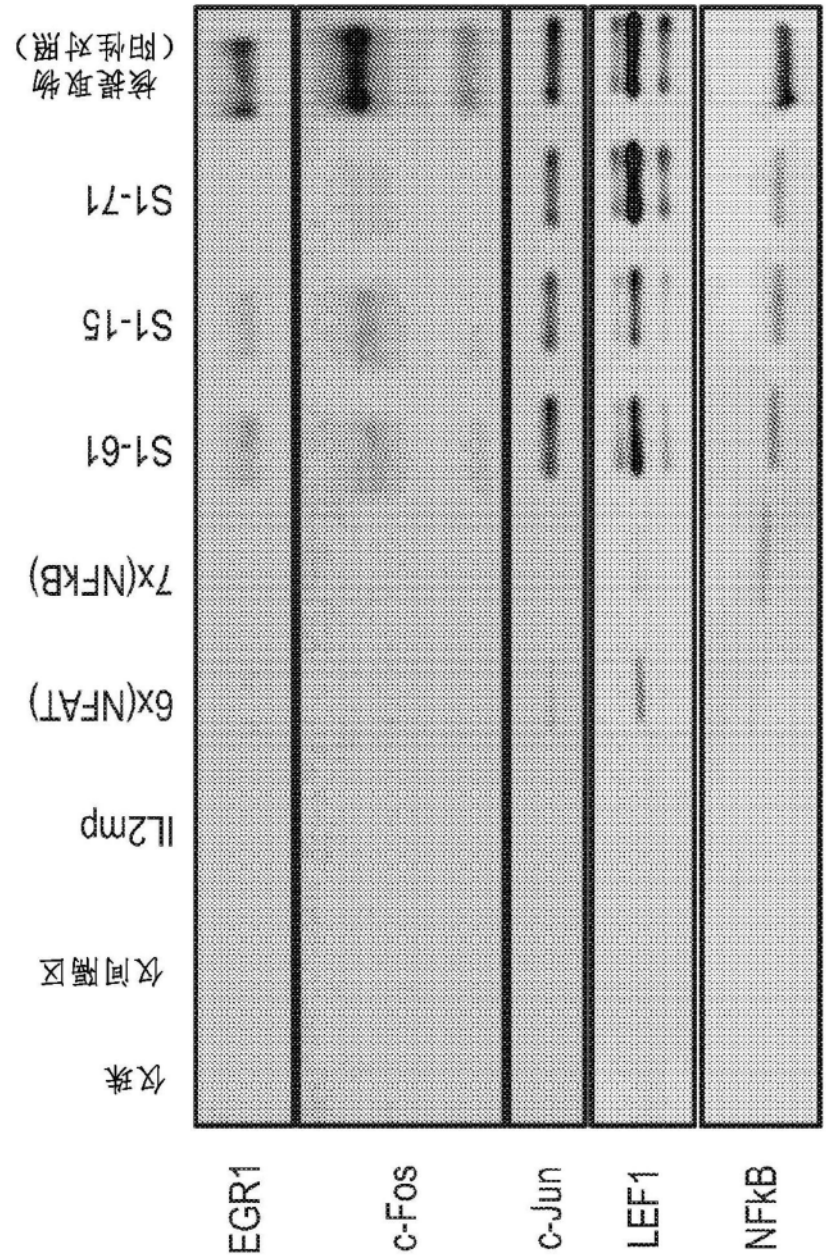

EGR1
c-Fos
c-Jun
LEF1
NFkB
仅珠
仅间隔区
IL2mp
6x(NFAT)
7x(NFkB)
S1-61
S1-15
S1-71
核提取物
（阳性对照）

图15

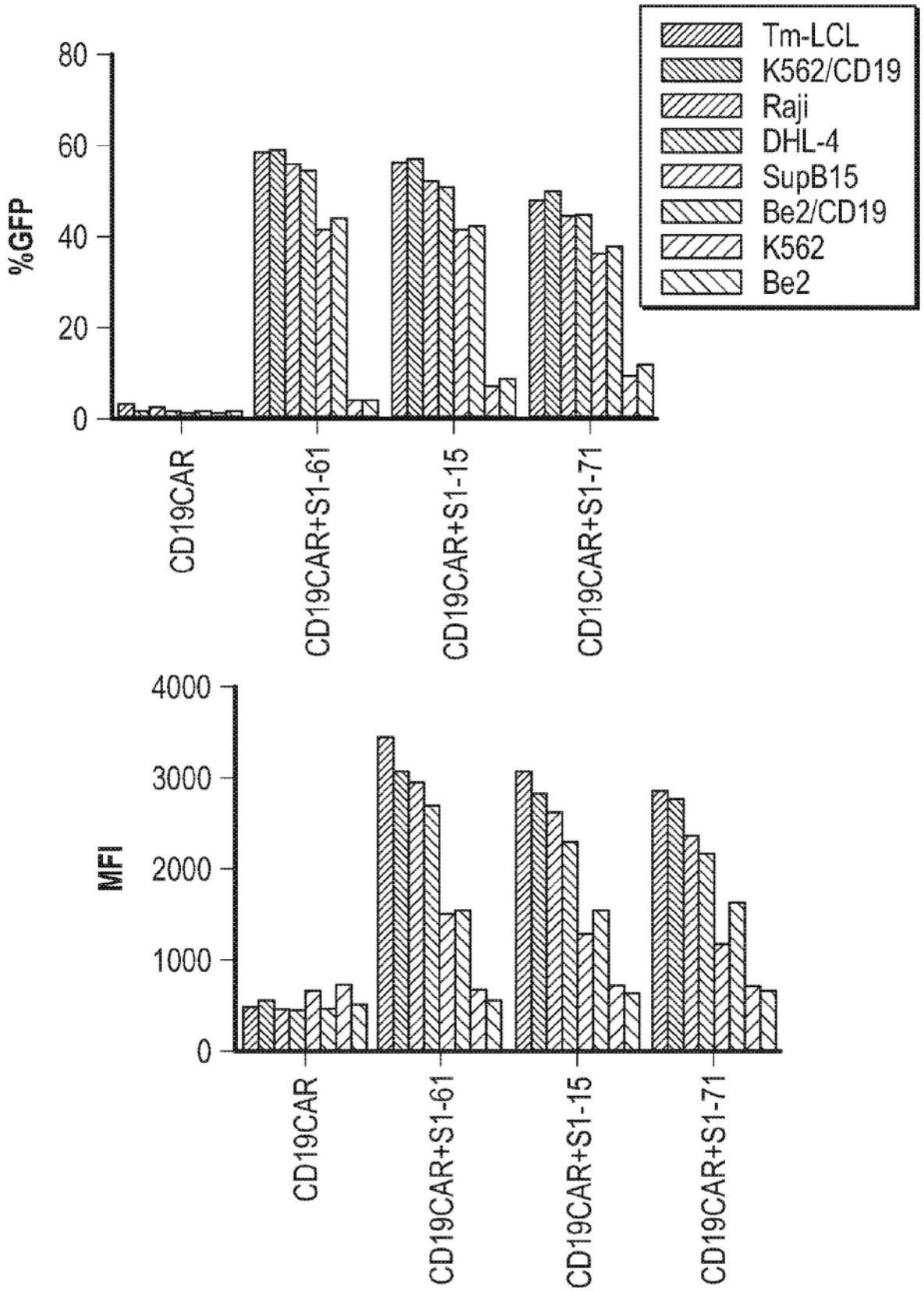

Tm-LCL
K562/CD19
Raji
DHL-4
SupB15
Be2/CD19
K562
Be2
%GFP
80
60
40
20
0
CD19CAR
CD19CAR+S1-61
CD19CAR+S1-15
CD19CAR+S1-71
MFI
4000
3000
2000
1000
0
CD19CAR
CD19CAR+S1-61
CD19CAR+S1-15
CD19CAR+S1-71

图16

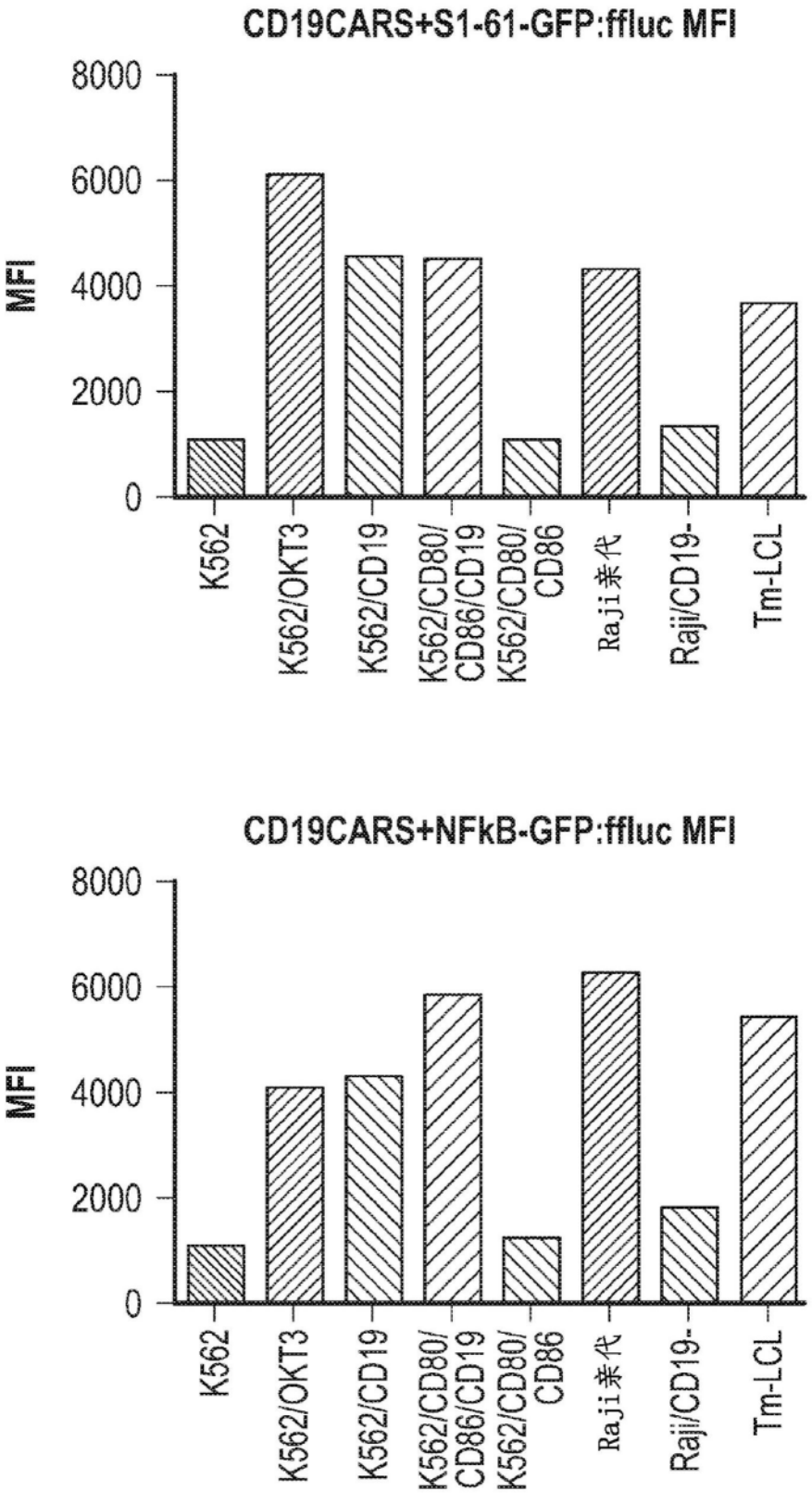

CD19CARS+S1-61-GFP:ffluc MFI
MFI
8000
6000
4000
2000
0
K562
K562/OKT3
K562/CD19
K562/CD80/CD86/CD19
K562/CD80/CD86
Raji亲代
Raji/CD19-
Tm-LCL
CD19CARS+NFkB-GFP:ffluc MFI
MFI
8000
6000
4000
2000
0
K562
K562/OKT3
K562/CD19
K562/CD80/CD86/CD19
K562/CD80/CD86
Raji亲代
Raji/CD19-
Tm-LCL

图17

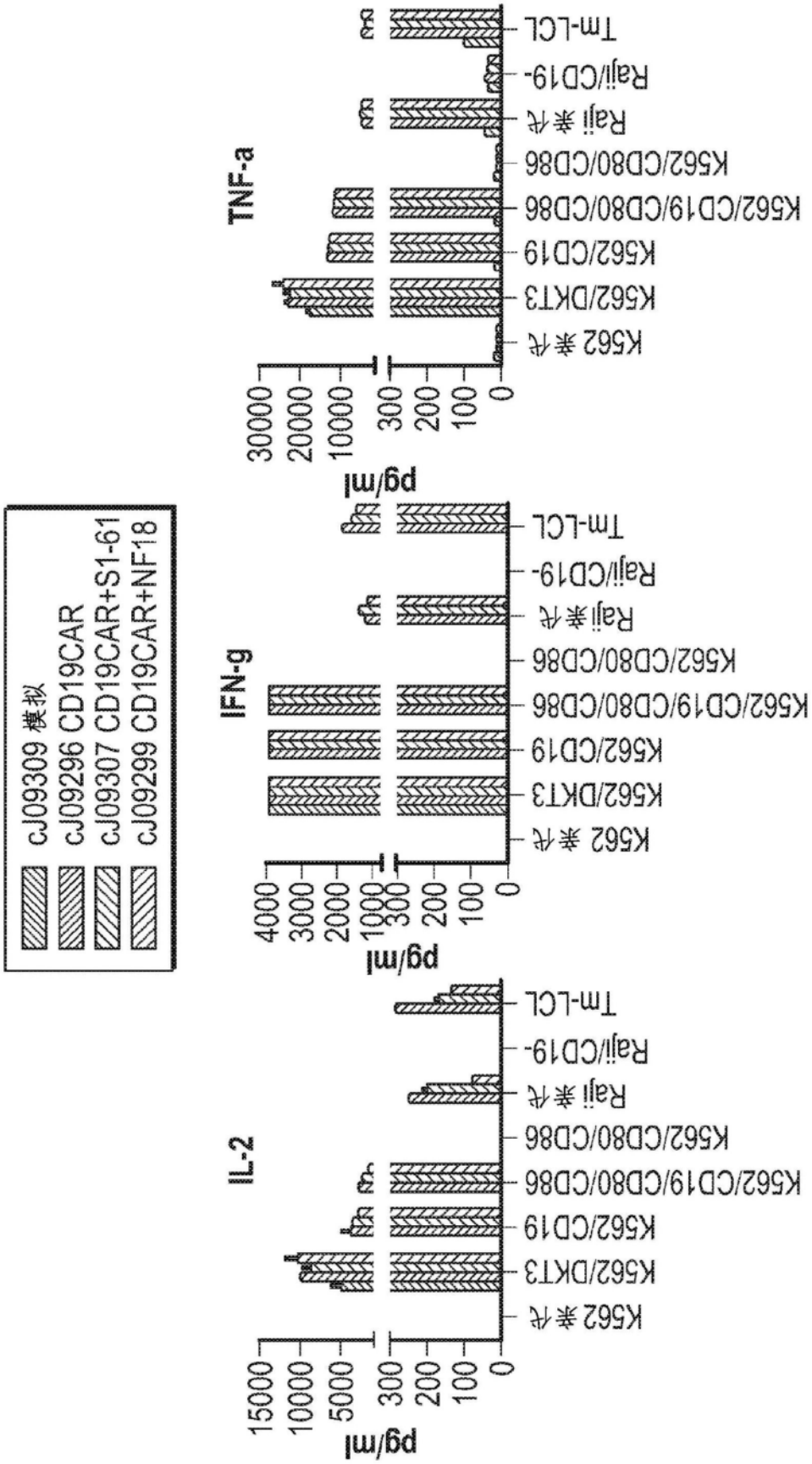

cJ09309 模拟
cJ09296 CD19CAR
cJ09307 CD19CAR+S1-61
cJ09299 CD19CAR+NF18
TNF-a
IFN-g
IL-2
pg/ml
K562 亲代
K562/DKT3
K562/CD19
K562/CD19/CD80/CD86
K562/CD80/CD86
Raji 亲代
Raji/CD19-
Tm-LCL

图18

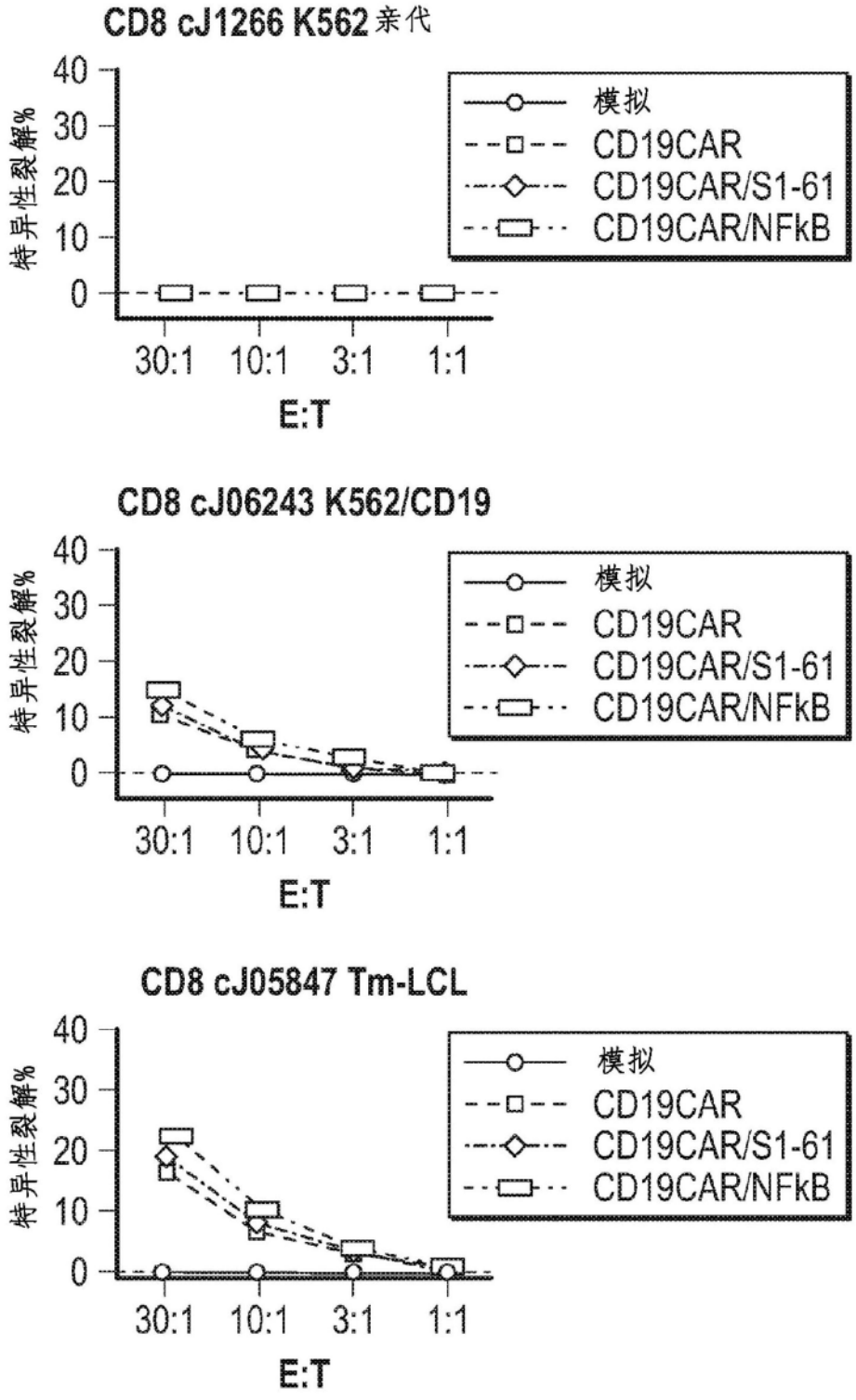

CD8 cJ1266 K562 亲代
特异性裂解%
40
30
20
10
0
30:1
10:1
3:1
1:1
E:T
模拟
CD19CAR
CD19CAR/S1-61
CD19CAR/NFkB
CD8 cJ06243 K562/CD19
特异性裂解%
40
30
20
10
0
30:1
10:1
3:1
1:1
E:T
模拟
CD19CAR
CD19CAR/S1-61
CD19CAR/NFkB
CD8 cJ05847 Tm-LCL
特异性裂解%
40
30
20
10
0
30:1
10:1
3:1
1:1
E:T
模拟
CD19CAR
CD19CAR/S1-61
CD19CAR/NFkB

图19-1

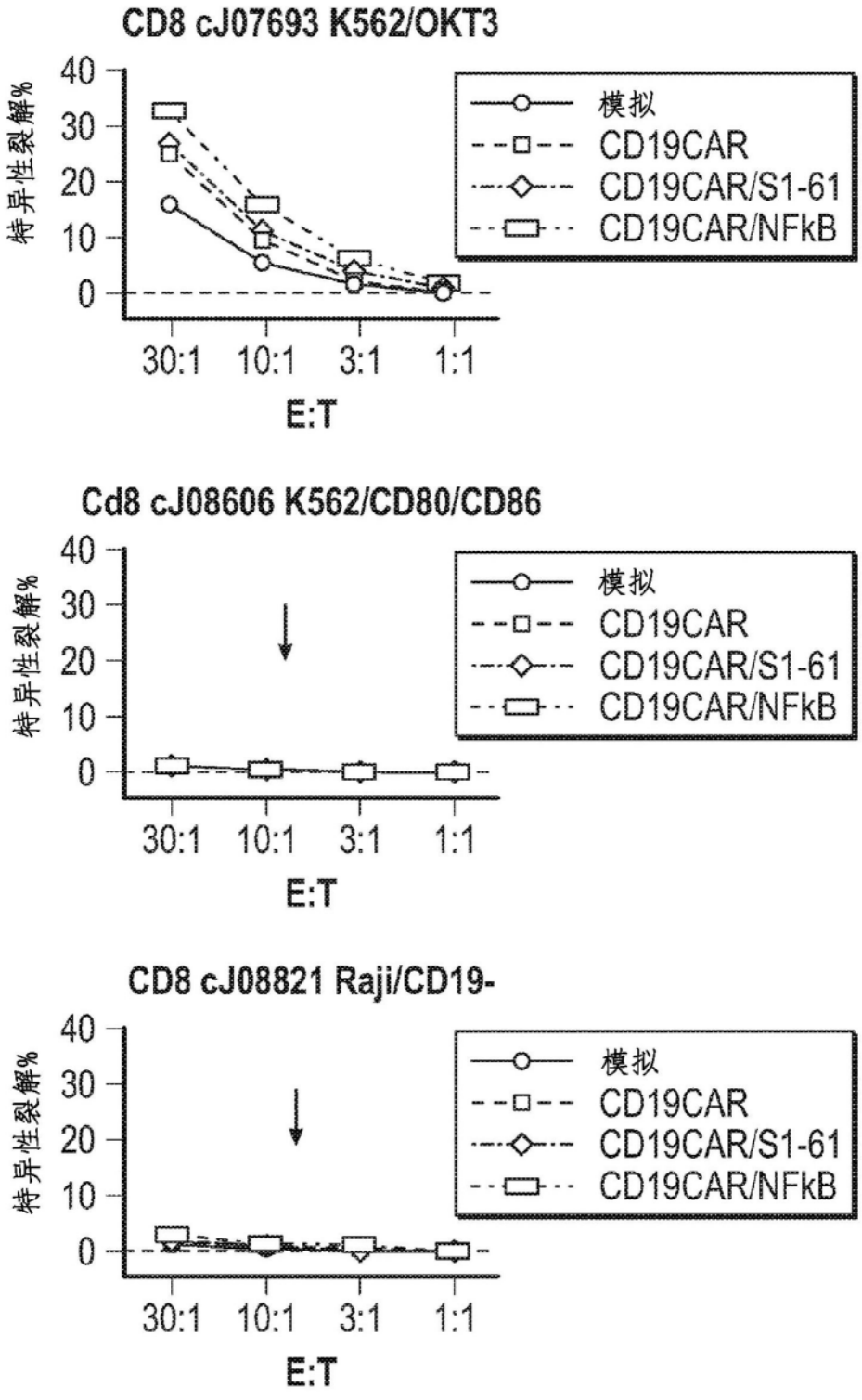

CD8 cJ07693 K562/OKT3
特异性裂解%
40
30
20
10
0
30:1
10:1
3:1
1:1
E:T
模拟
CD19CAR
CD19CAR/S1-61
CD19CAR/NFkB
Cd8 cJ08606 K562/CD80/CD86
特异性裂解%
40
30
20
10
0
30:1
10:1
3:1
1:1
E:T
模拟
CD19CAR
CD19CAR/S1-61
CD19CAR/NFkB
CD8 cJ08821 Raji/CD19-
特异性裂解%
40
30
20
10
0
30:1
10:1
3:1
1:1
E:T
模拟
CD19CAR
CD19CAR/S1-61
CD19CAR/NFkB

图19-2

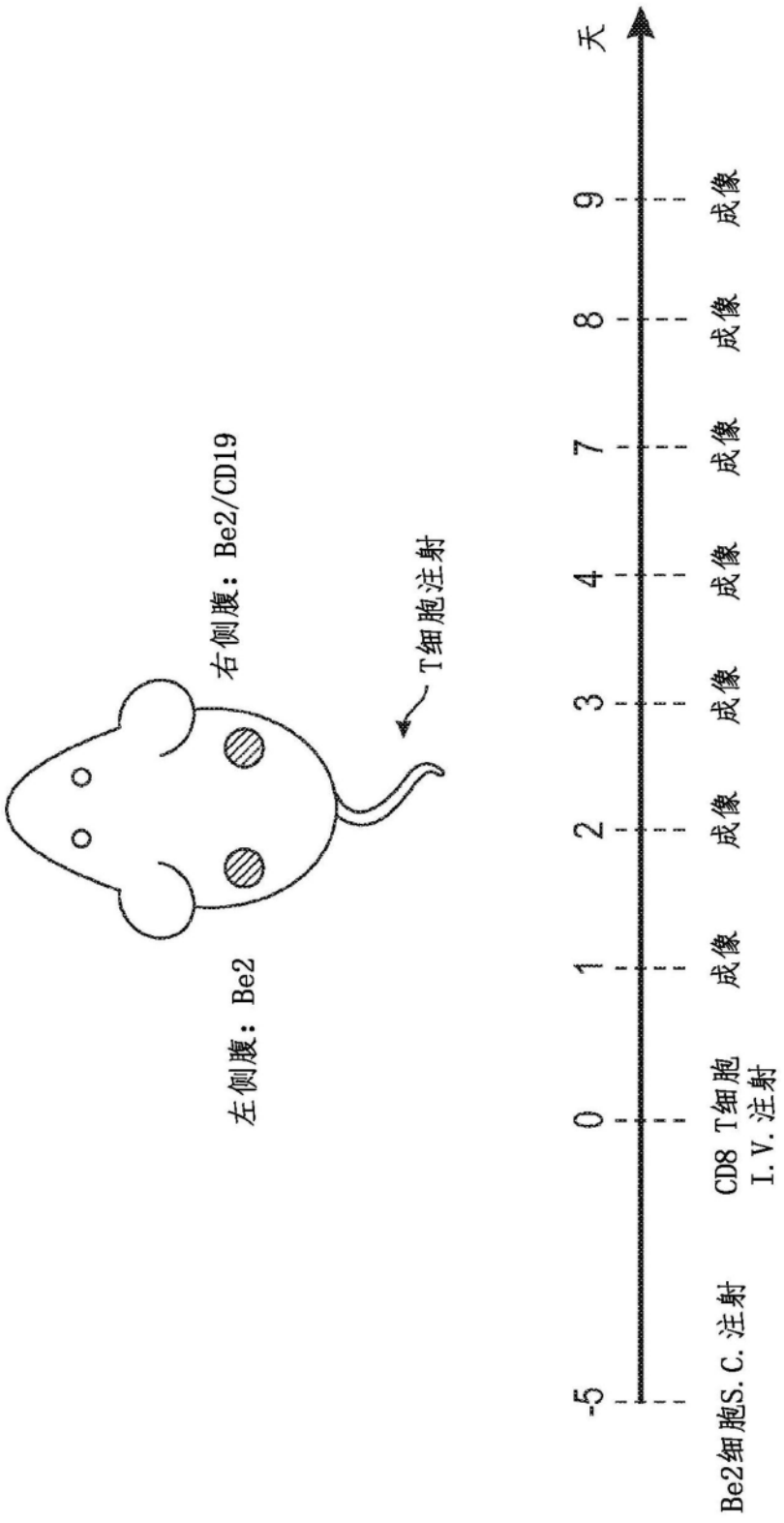

右侧腹：Be2/CD19
T细胞注射
左侧腹：Be2
-5
0
1
2
3
4
7
8
9
天
Be2细胞S.C.注射
CD8 T细胞
I.V.注射
成像
成像
成像
成像
成像
成像
成像

图20

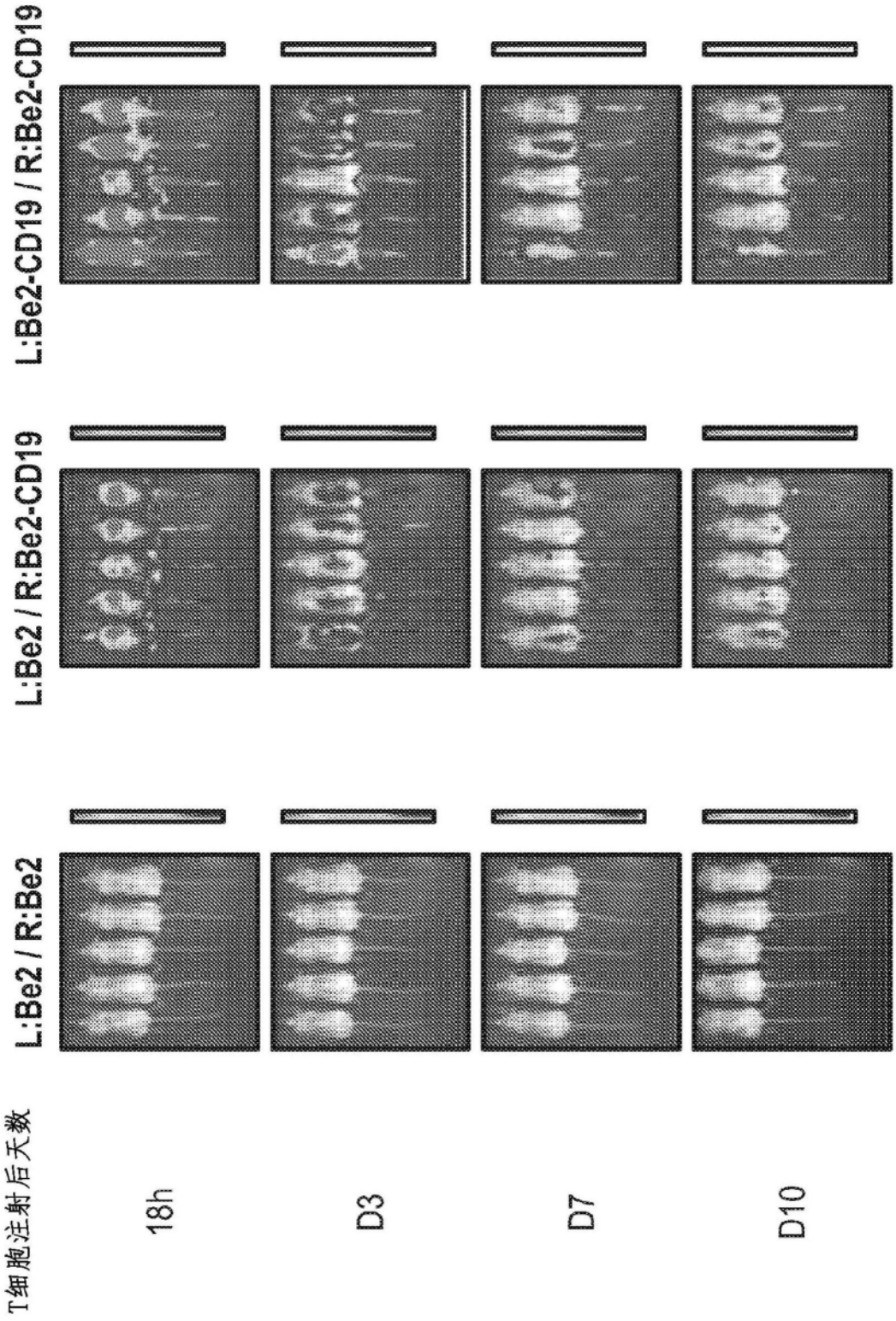

L:Be2-CD19 / R:Be2-CD19
L:Be2 / R:Be2-CD19
L:Be2 / R:Be2
T细胞注射后天数
18h
D3
D7
D10

图21-1

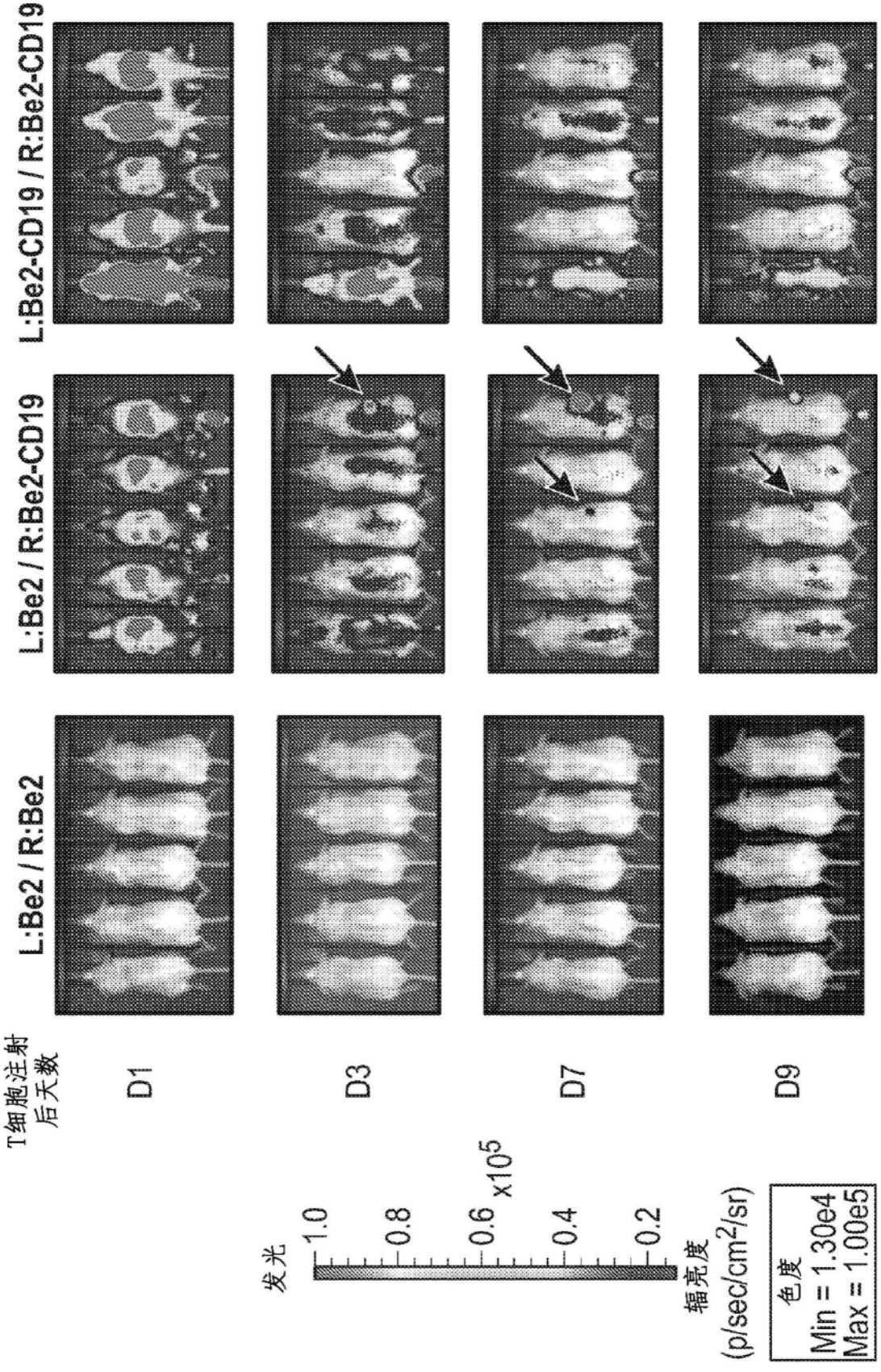

L:Be2 / R:Be2
L:Be2 / R:Be2-CD19
L:Be2-CD19 / R:Be2-CD19
T细胞注射后天数
D1
D3
D7
D9
发光
1.0
0.8
0.6
x10^5
0.4
0.2
辐亮度
(p/sec/cm²/sr)
色度
Min = 1.30e4
Max = 1.00e5

图21-2

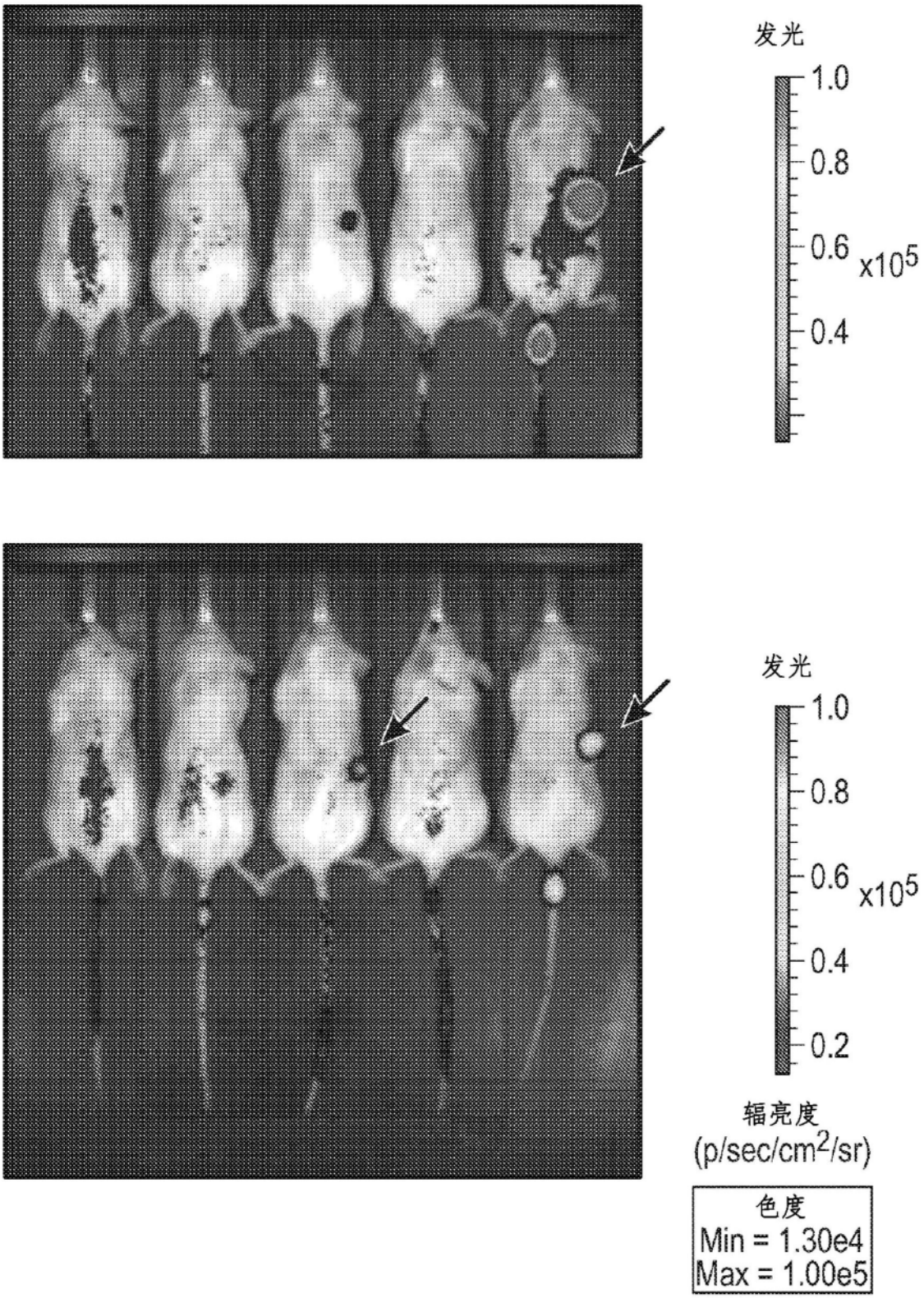

发光
1.0
0.8
0.6
x10^5
0.4
发光
1.0
0.8
0.6
x10^5
0.4
0.2
辐亮度
(p/sec/cm^2/sr)
色度
Min = 1.30e4
Max = 1.00e5

图22

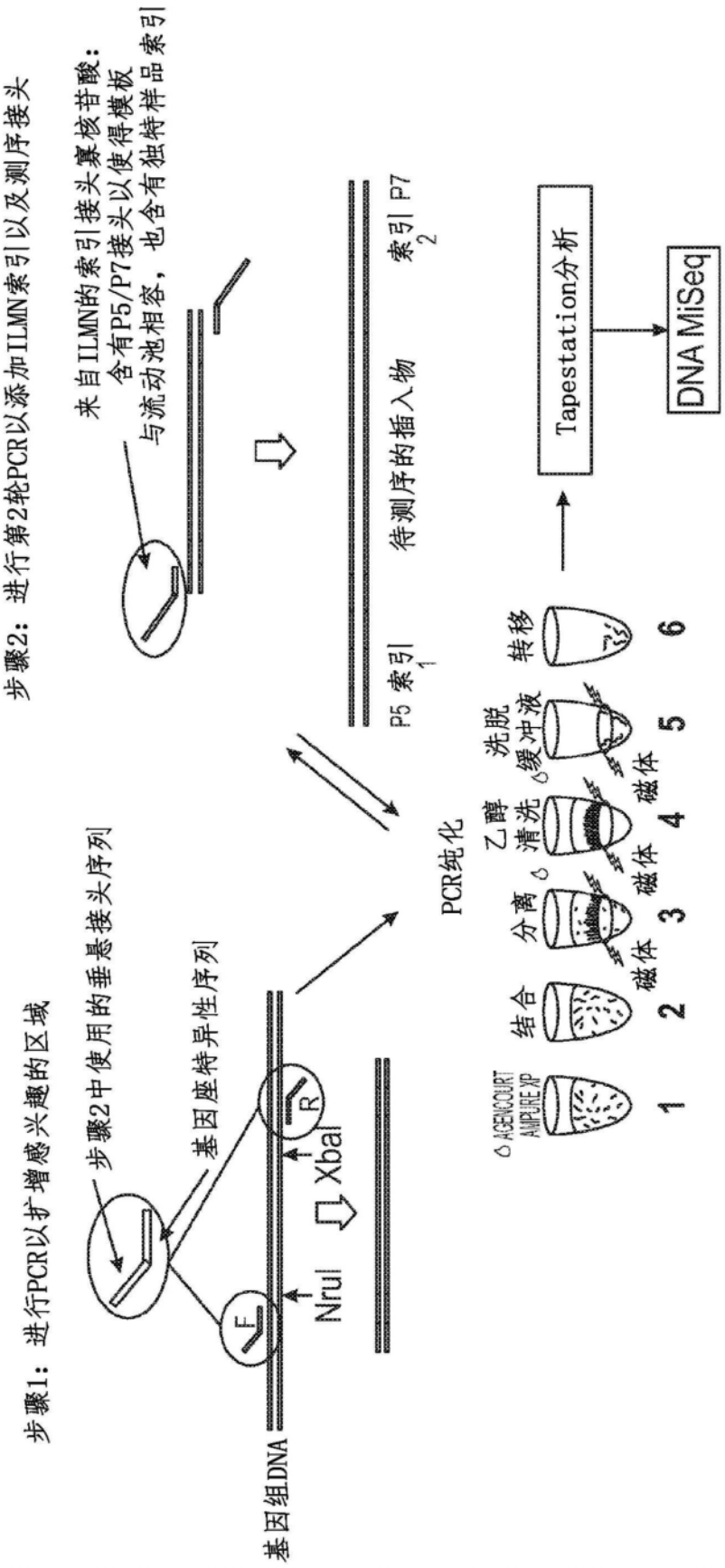

步骤1：进行PCR以扩增感兴趣的区域
步骤2中使用的垂悬接头序列
基因座特异性序列
基因组DNA
F
NruI
R
XbaI
步骤2：进行第2轮PCR以添加ILMN索引以及测序接头
来自ILMN的索引接头寡核苷酸：
含有P5/P7接头以使得模板
与流动池相容，也含有独特样品索引
P5 索引 1
待测序的插入物
索引 2 P7
PCR纯化
AGENCOURT AMPURE XP
结合
磁体
分离
磁体
乙醇清洗
磁体
洗脱缓冲液
磁体
转移
1
2
3
4
5
6
Tapestation分析
DNA MiSeq

图23

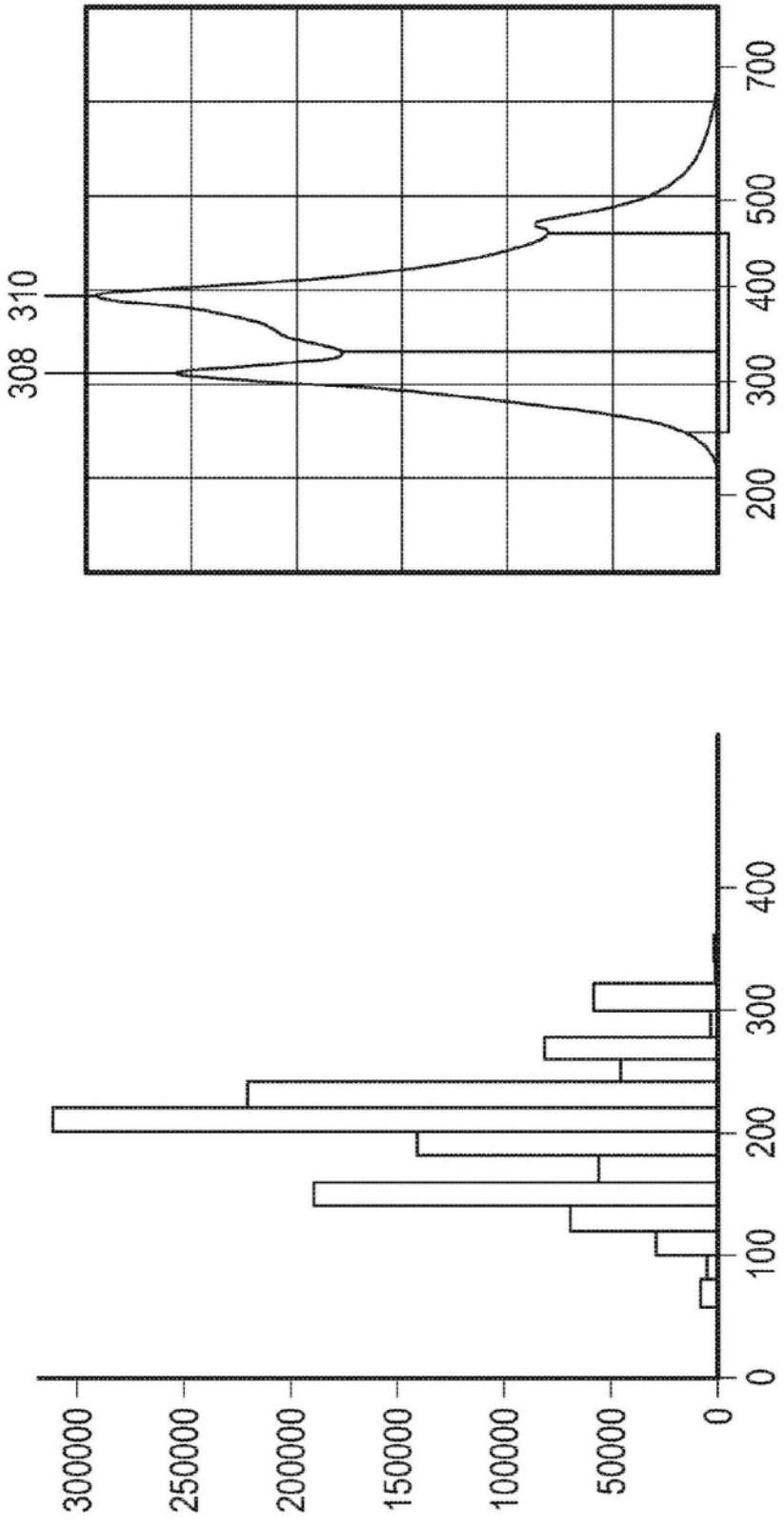

700
500
400
310
308
300
200
400
300
200
100
0
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0

图24

样品	总配对数	总配对读段数	配对读段%	总独特重叠群数	总最丰富的重叠群数	最丰富的重叠群%	最丰富的启动子序列
S1	1826076	1023557	61.66	115035	40806	3.99	2f7r8f11r5r1f5r7f3f8f7r8f
S2	1506812	817484	59.68	88825	60320	7.38	6f3f7r8r7f5r8r8f8f3r2f1r4f
S3	1522386	884653	63.92	91955	34295	3.88	5r7r8f1f8f10r3r5f5f6r8r8f5r
S4	1507421	892453	65.12	110787	31072	3.48	8f8r11r1f6f3f7f8f8f1r6f8f11r5f7f
S5	2185959	1058756	53.28	63144	159200	15.04	2r11r4f11f7r3r2r7r11f2r9f8r8r
S6	2441189	1258036	56.69	88523	116010	9.22	6r11r9f6r6f7r8f3f9f6r1f6f
S7	2075802	1142991	60.57	88841	184563	16.15	5r7r8f1f8f10r3r5f5f6r8r8f5r

图25

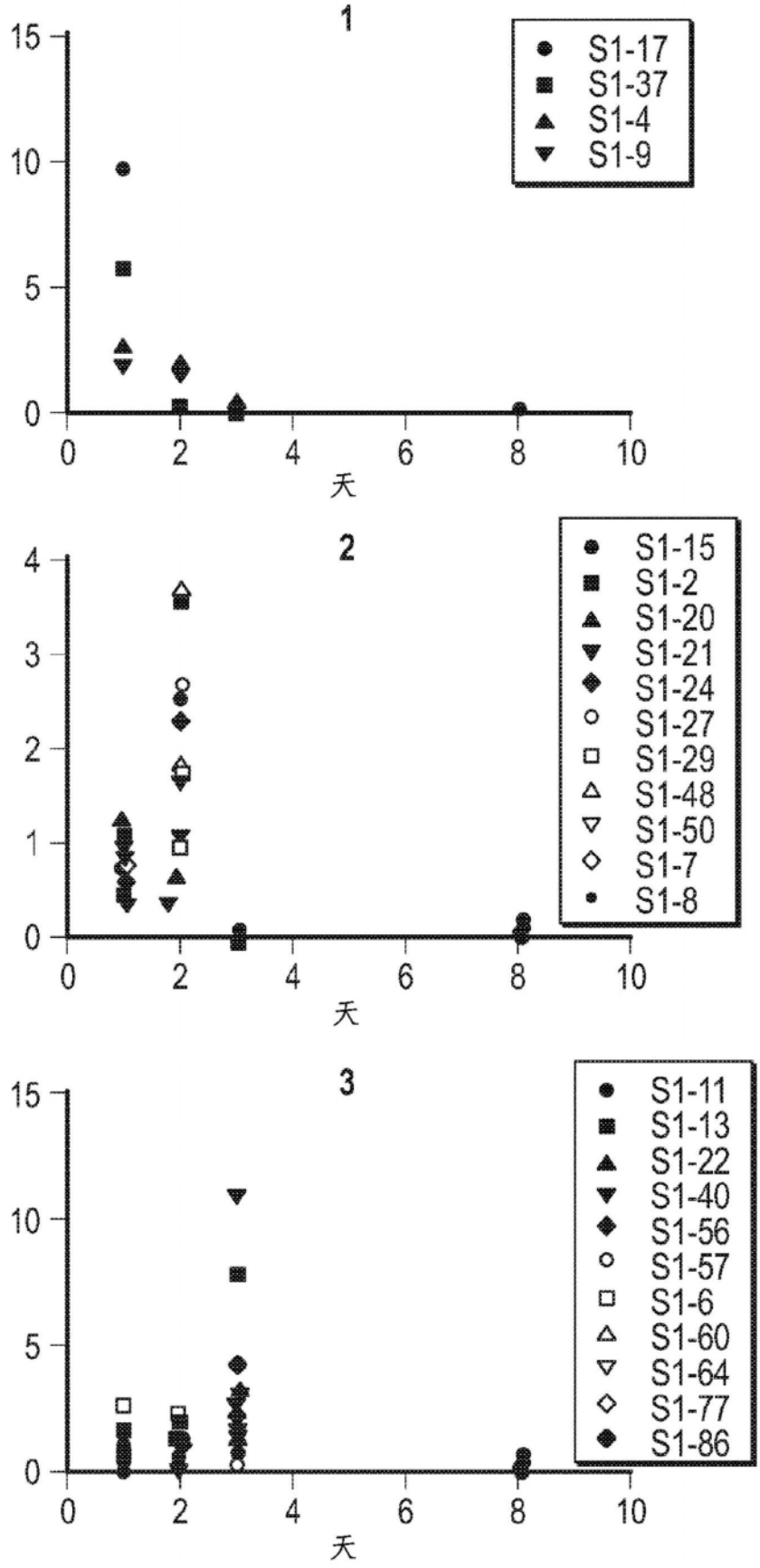

1
S1-17
S1-37
S1-4
S1-9
15
10
5
0
0
2
4
6
8
10
天
2
S1-15
S1-2
S1-20
S1-21
S1-24
S1-27
S1-29
S1-48
S1-50
S1-7
S1-8
4
3
2
1
0
0
2
4
6
8
10
天
3
S1-11
S1-13
S1-22
S1-40
S1-56
S1-57
S1-6
S1-60
S1-64
S1-77
S1-86
15
10
5
0
0
2
4
6
8
10
天

图26-1

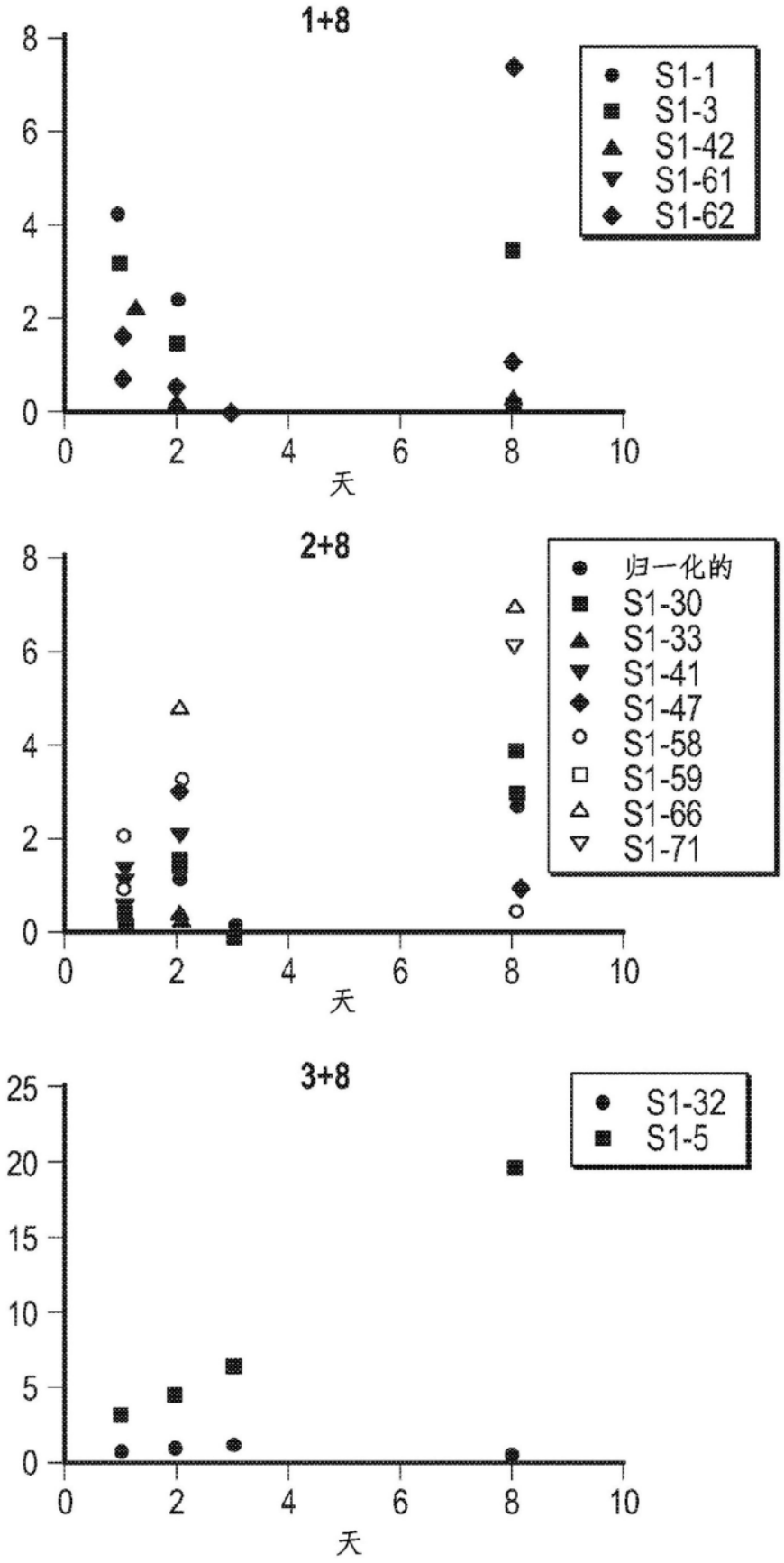

1+8
S1-1
S1-3
S1-42
S1-61
S1-62
天
2+8
归一化的
S1-30
S1-33
S1-41
S1-47
S1-58
S1-59
S1-66
S1-71
天
3+8
S1-32
S1-5
天

图26-2

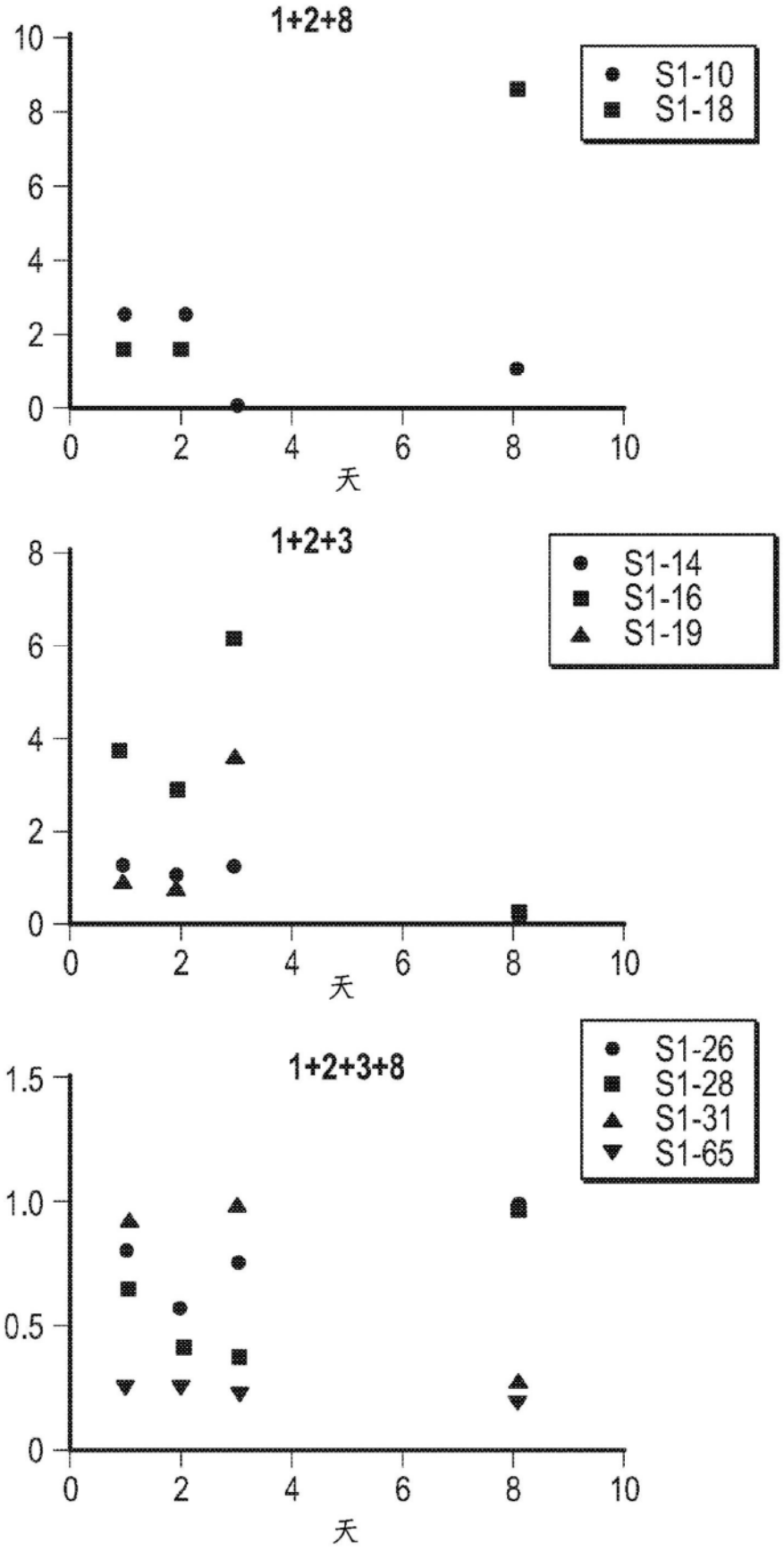


图26-3

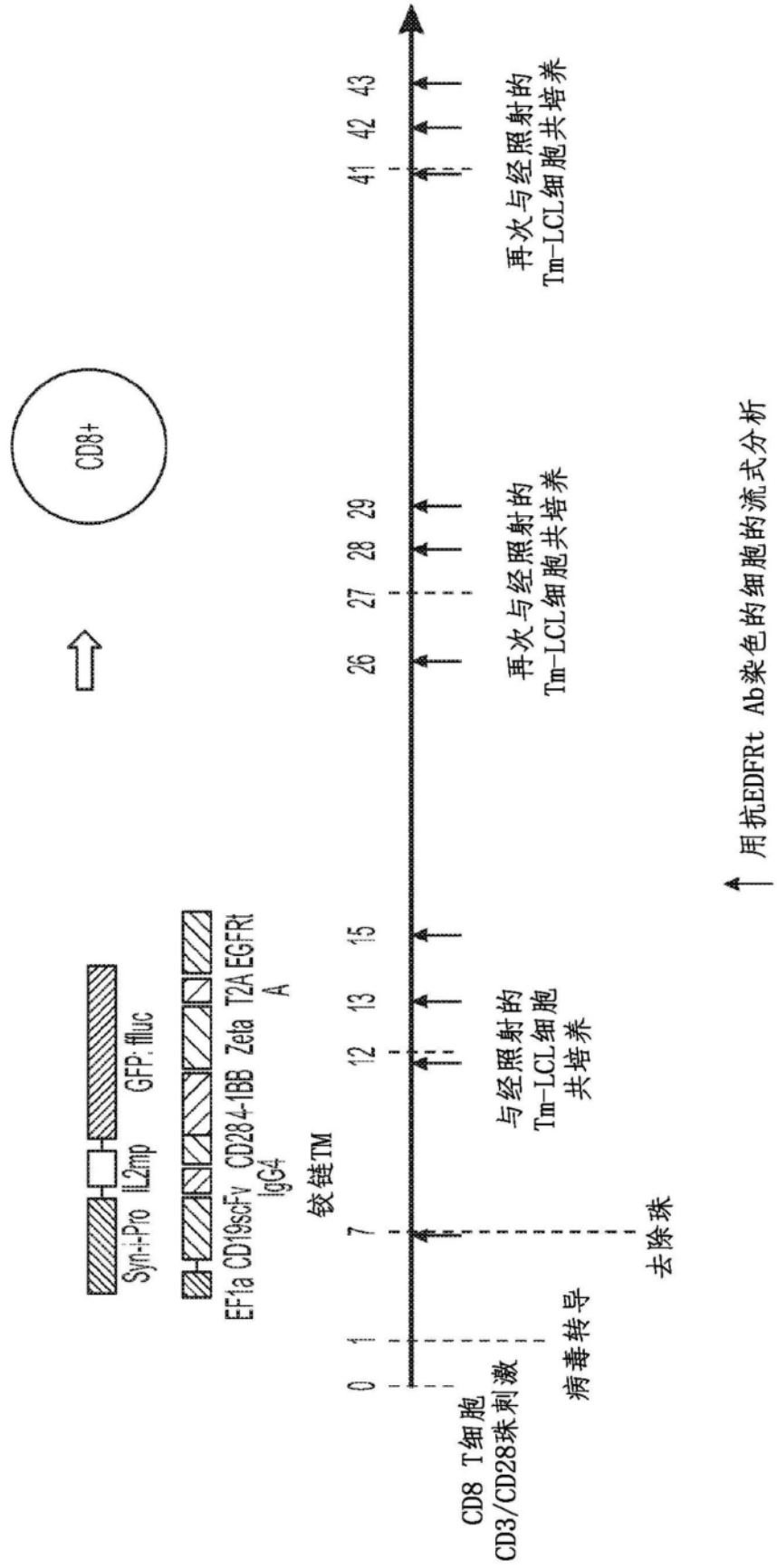

CD8+
Syn-Pro IL2rnp GFP: fluc
EF1a CD19scFv CD28-4-1BB Zeta T2A EGFRt
IgG4
A
铰链TM
0 1 7 12 13 15 26 27 28 29 41 42 43
CD8 T细胞
CD3/CD28珠刺激
病毒转导
去除珠
与经照射的
Tm-LCL细胞
共培养
再次与经照射的
Tm-LCL细胞共培养
再次与经照射的
Tm-LCL细胞共培养
用抗EDFRt Ab染色的细胞的流式分析

图27

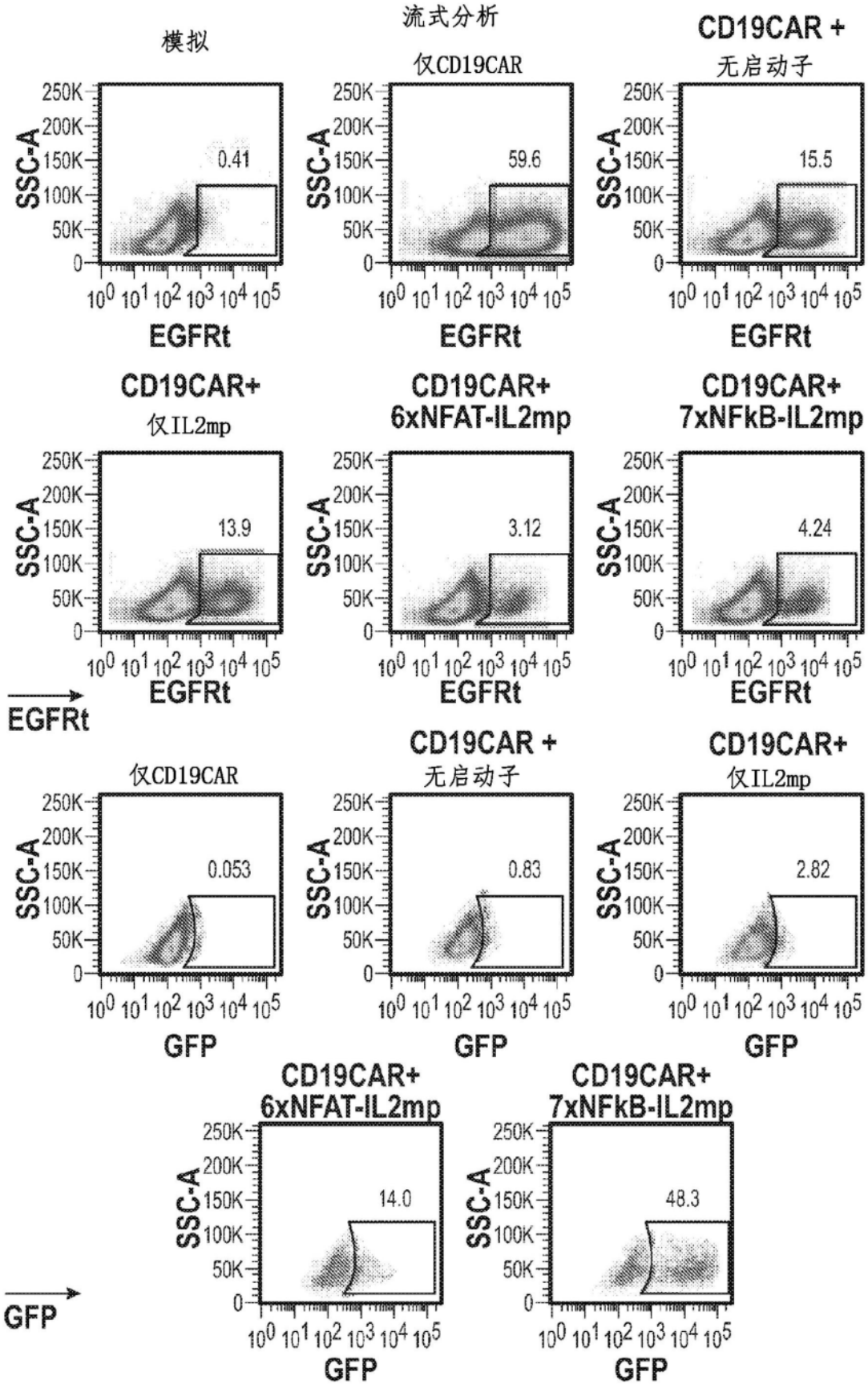

流式分析
模拟
仅CD19CAR
CD19CAR +
无启动子
CD19CAR+
仅IL2mp
CD19CAR+
6xNFAT-IL2mp
CD19CAR+
7xNFkB-IL2mp
SSC-A
EGFRt
GFP
0.41
59.6
15.5
13.9
3.12
4.24
0.053
0.83
2.82
14.0
48.3

图28

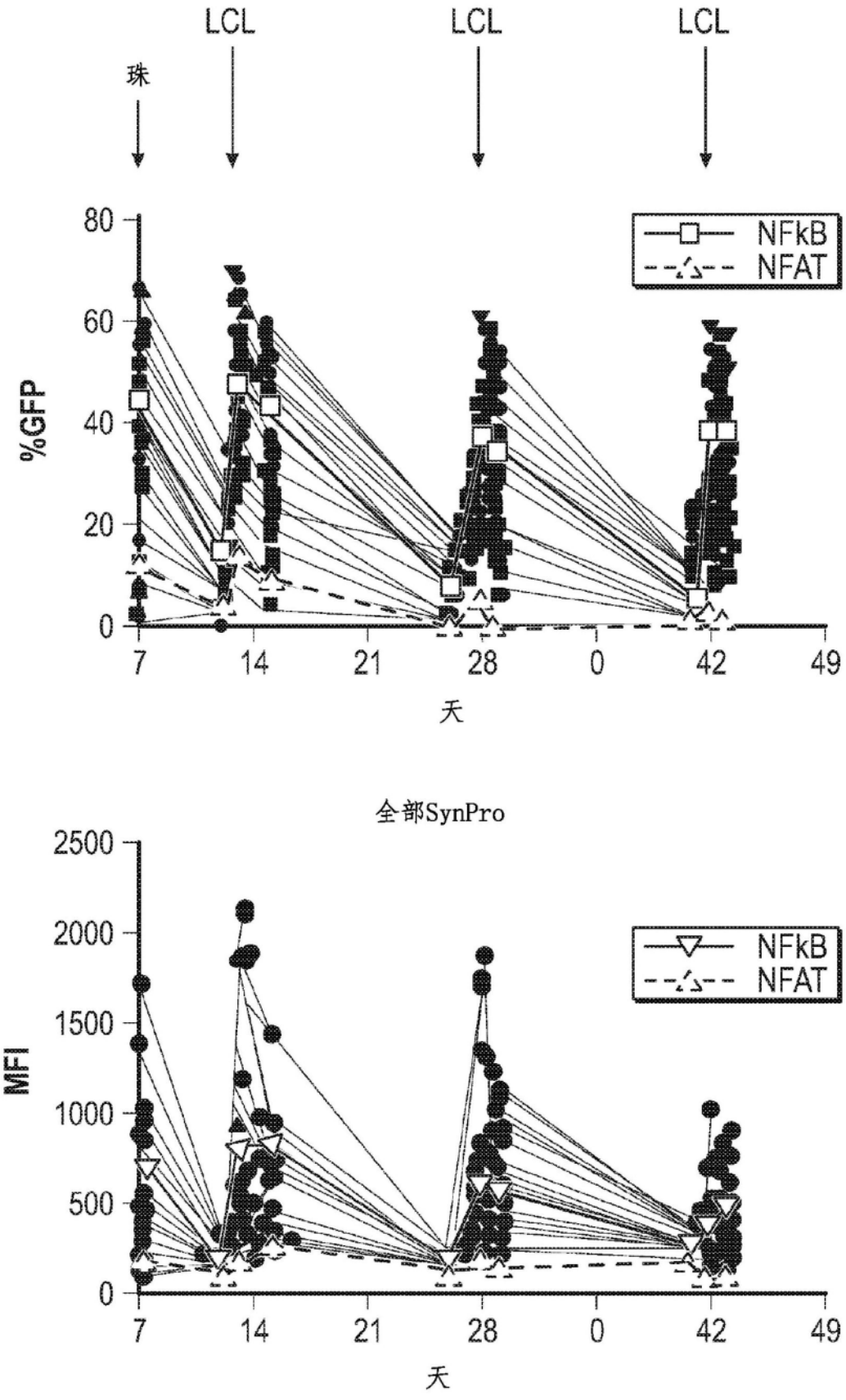

LCL
LCL
LCL
珠
NFkB
NFAT
%GFP
80
60
40
20
0
7
14
21
28
0
42
49
天
全部SynPro
NFkB
NFAT
MFI
2500
2000
1500
1000
500
0
7
14
21
28
0
42
49
天

图29

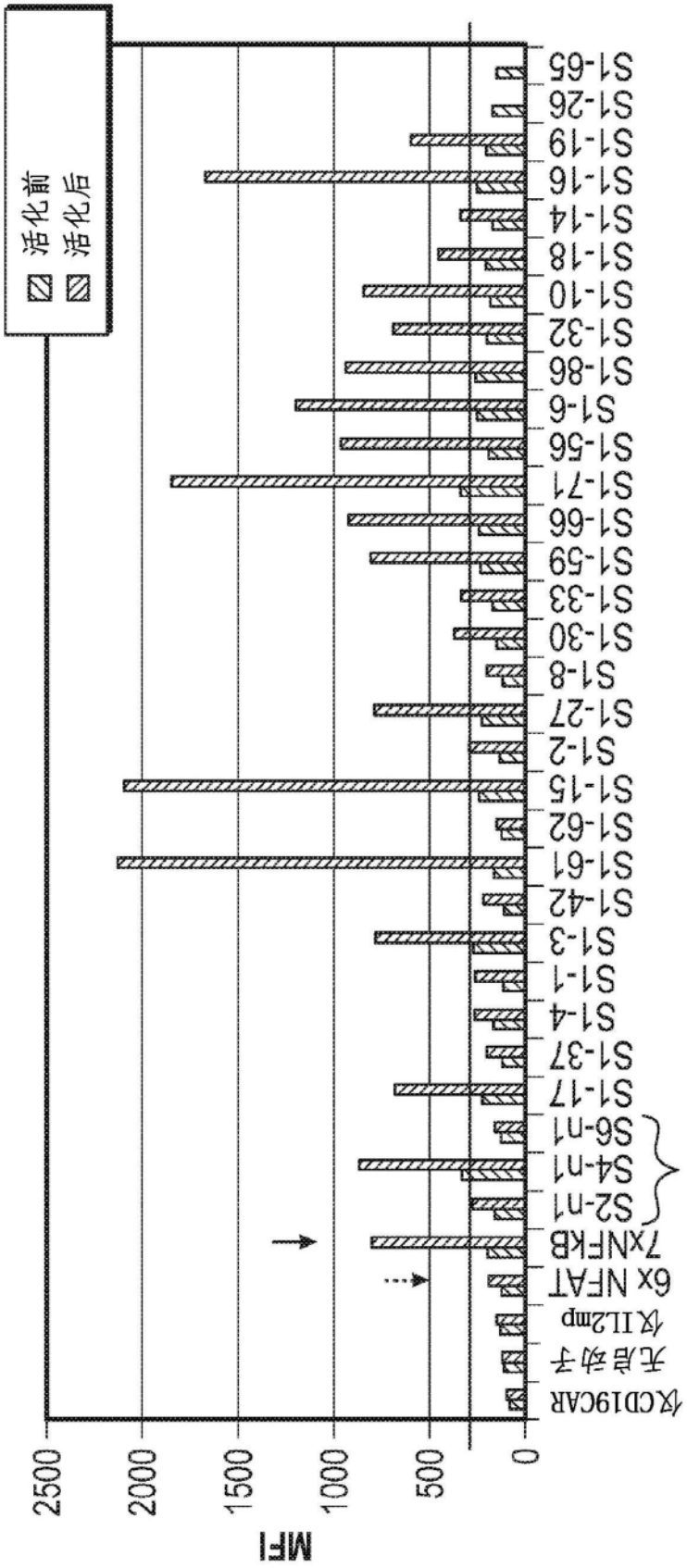

活化前
活化后
MFI
2500
2000
1500
1000
500
0
抗CD19CAR
无启动子
抗IL2mp
6x NFAT
7xNFkB
S2-n1
S4-n1
S6-n1
S1-17
S1-37
S1-4
S1-1
S1-3
S1-42
S1-61
S1-62
S1-15
S1-2
S1-27
S1-8
S1-30
S1-33
S1-59
S1-66
S1-71
S1-56
S1-6
S1-86
S1-32
S1-10
S1-18
S1-14
S1-16
S1-19
S1-26
S1-65

图30

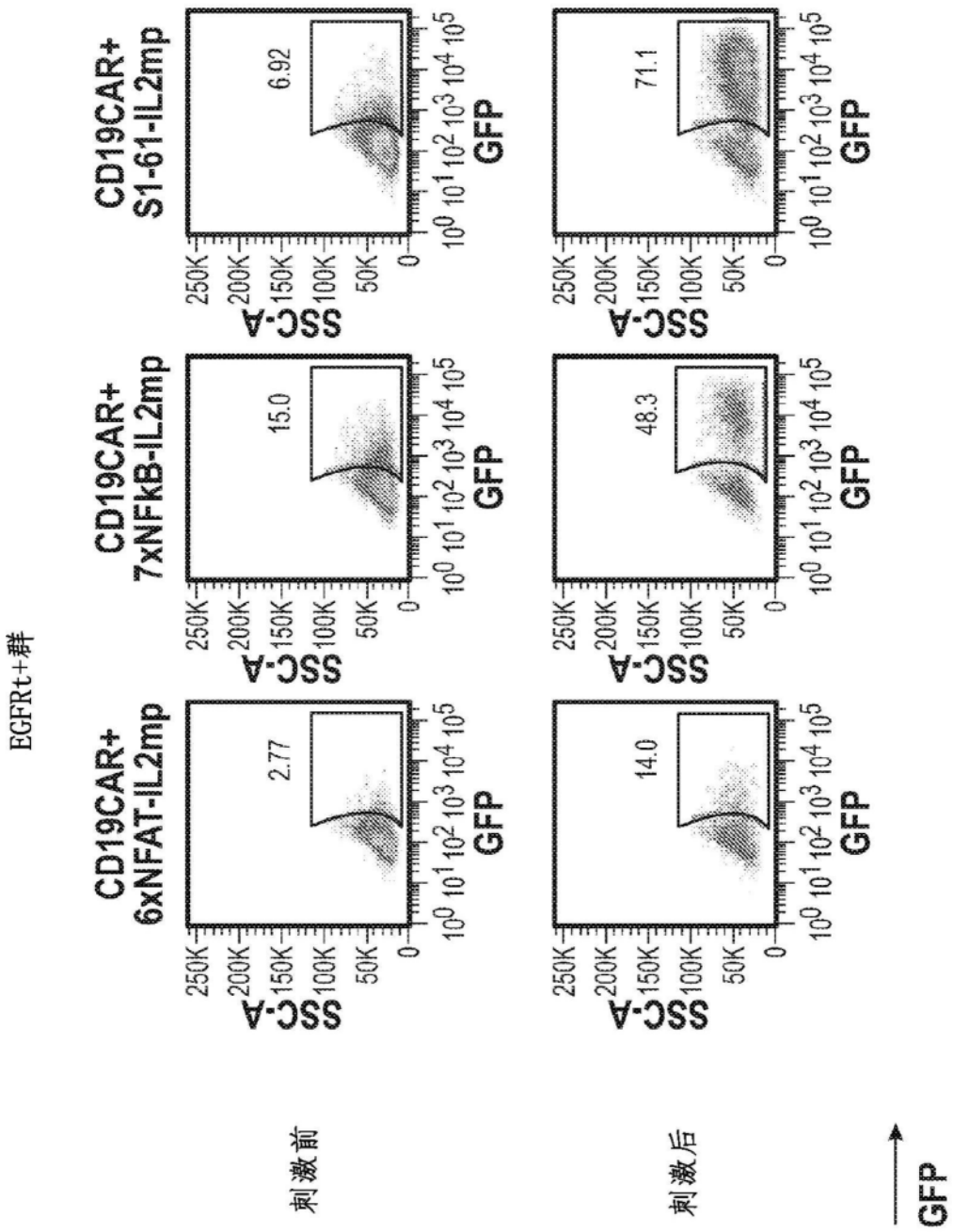

EGFRt+群
CD19CAR+ 6xNFAT-IL2mp
CD19CAR+ 7xNFkB-IL2mp
CD19CAR+ S1-61-IL2mp
2.77
15.0
6.92
14.0
48.3
71.1
SSC-A
GFP
刺激前
刺激后
GFP

图31

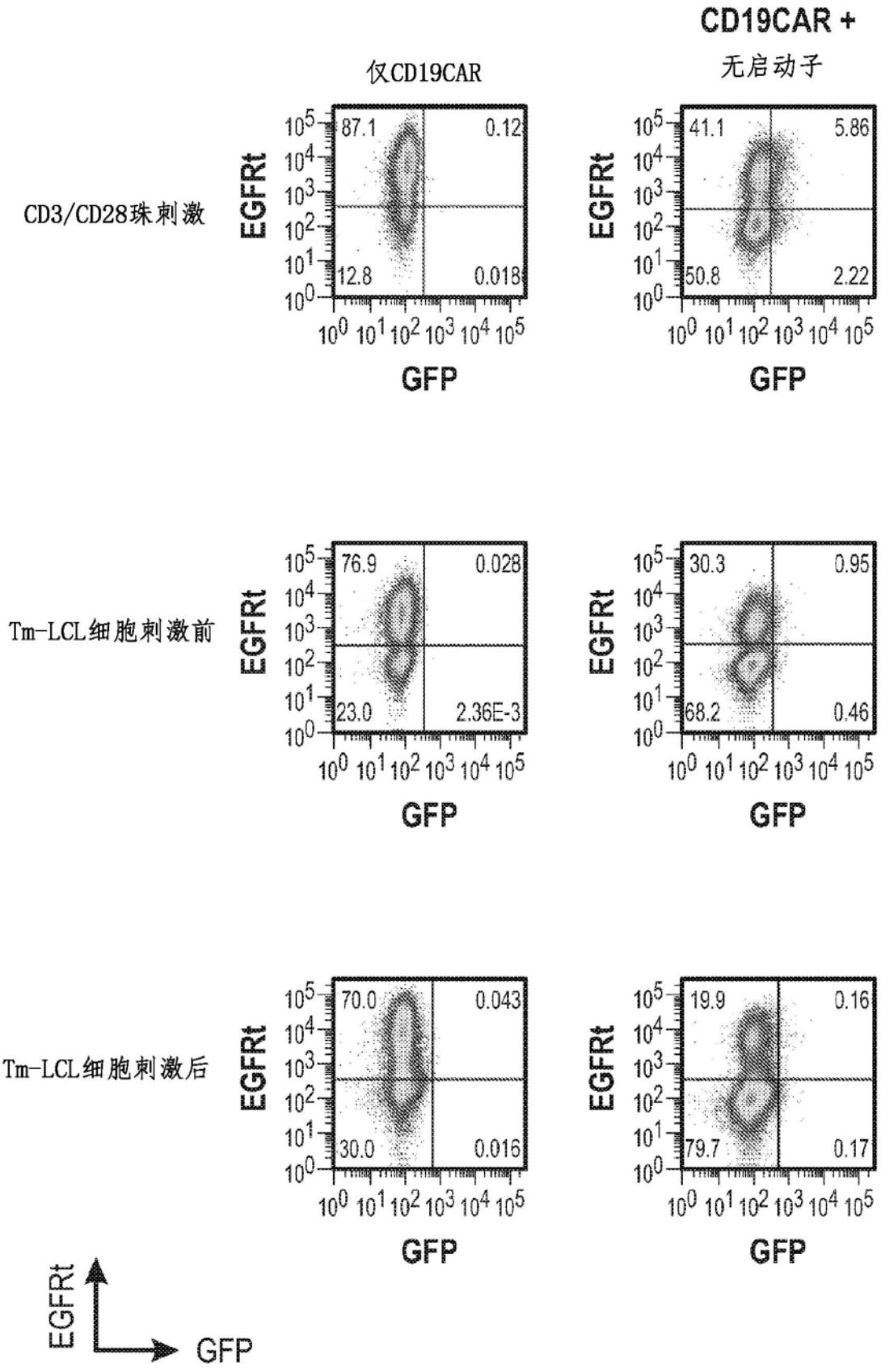

CD19CAR +
仅CD19CAR
无启动子
CD3/CD28珠刺激
Tm-LCL细胞刺激前
Tm-LCL细胞刺激后
EGFRt
GFP
87.1
0.12
12.8
0.018
41.1
5.86
50.8
2.22
76.9
0.028
23.0
2.36E-3
30.3
0.95
68.2
0.46
70.0
0.043
30.0
0.016
19.9
0.16
79.7
0.17

图32-1

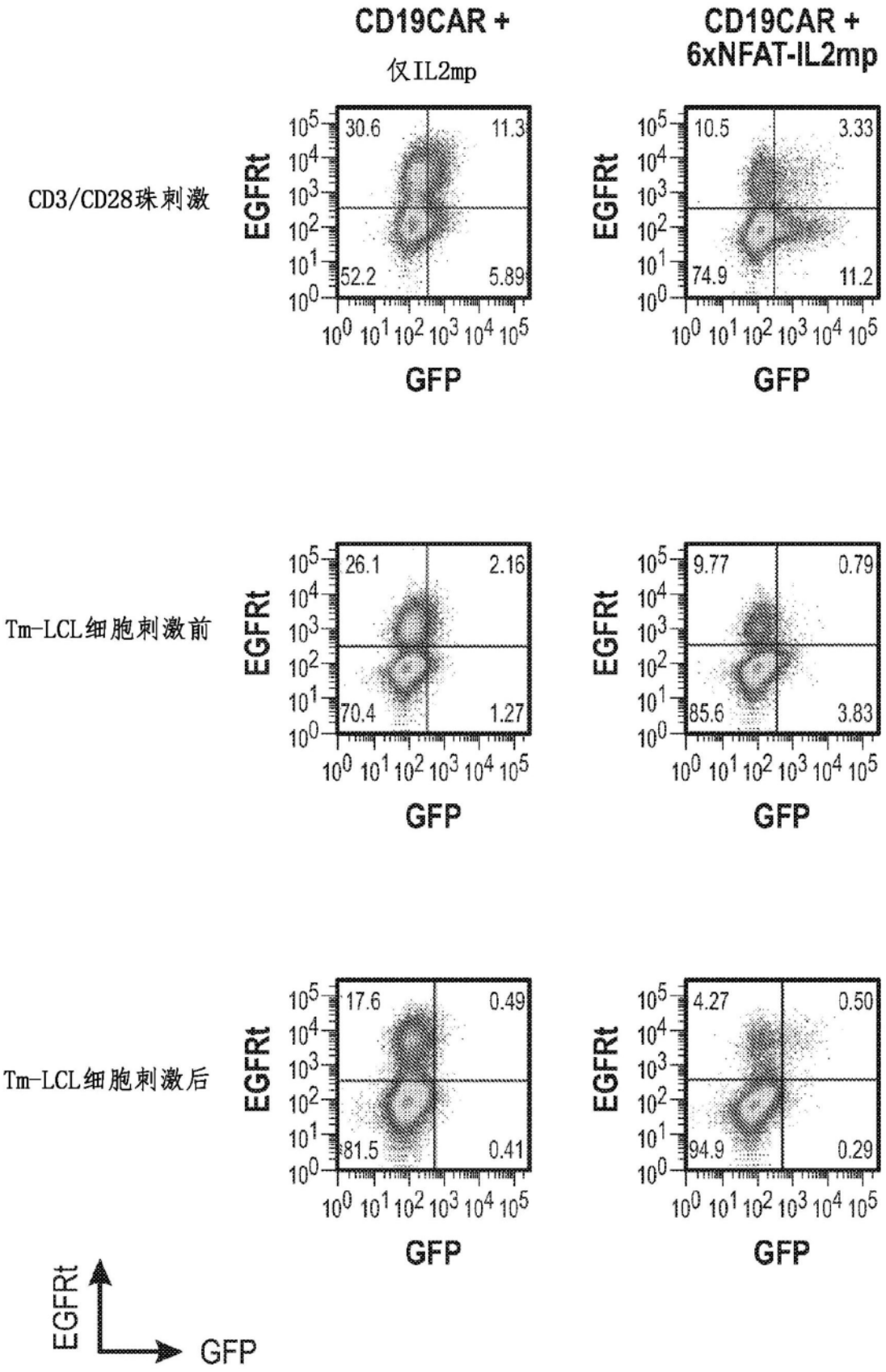

CD19CAR +
仅IL2mp
CD19CAR +
6xNFAT-IL2mp
CD3/CD28珠刺激
Tm-LCL细胞刺激前
Tm-LCL细胞刺激后
EGFRt
GFP
30.6
11.3
52.2
5.89
10.5
3.33
74.9
11.2
26.1
2.16
70.4
1.27
9.77
0.79
85.6
3.83
17.6
0.49
81.5
0.41
4.27
0.50
94.9
0.29

图32-2

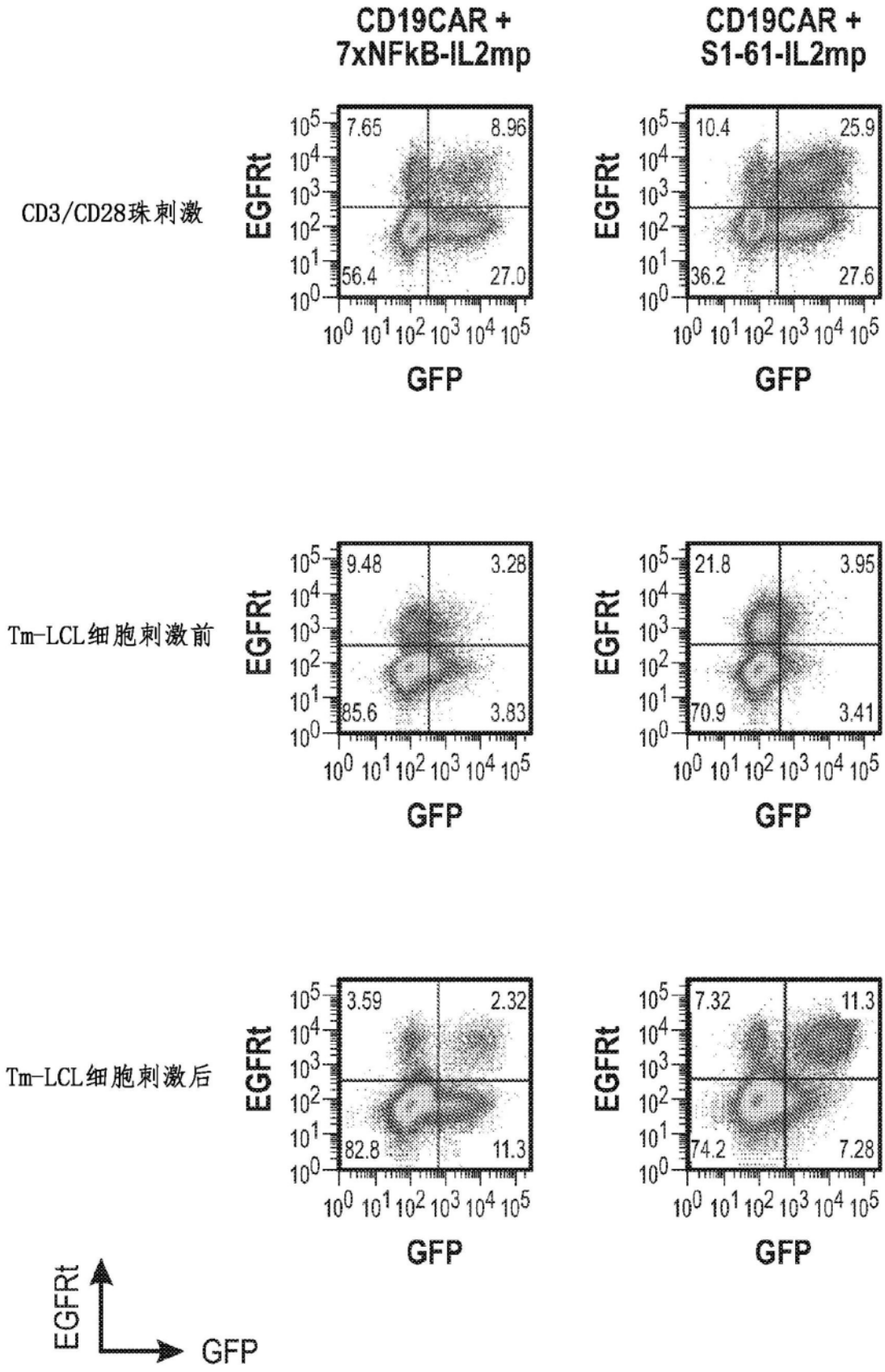

CD19CAR +
7xNFkB-IL2mp
CD19CAR +
S1-61-IL2mp
CD3/CD28珠刺激
Tm-LCL细胞刺激前
Tm-LCL细胞刺激后
EGFRt
GFP
7.65
8.96
56.4
27.0
10.4
25.9
36.2
27.6
9.48
3.28
85.6
3.83
21.8
3.95
70.9
3.41
3.59
2.32
82.8
11.3
7.32
11.3
74.2
7.28

图32-3