(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115397439 A
(43)申请公布日 2022.11.25

(21)申请号 202180023901.0
(22)申请日 2021.01.23
(30)优先权数据
62/965,593 2020.01.24 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.09.23
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/014811 2021.01.23
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/151038 EN 2021.07.29
(71)申请人 宾夕法尼亚大学理事会
地址 美国宾夕法尼亚
(72)发明人 D·J·小鲍威尔 A·楚尔卡斯 N·米努托洛
(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司 72002
专利代理师 王健 林晓红
(51)Int.Cl.
A61K 35/12(2015.01)
A61K 35/15(2015.01)
A61K 35/17(2015.01)
C07K 16/28(2006.01)
A61K 38/00(2006.01)

权利要求书7页 说明书64页
序列表35页 附图14页

(54)发明名称

表达通用免疫受体的工程化细胞活性的定量控制

(57)摘要

本发明提供了用于在哺乳动物中刺激通用免疫受体介导的应答的方法,该方法使用经工程化以表达通用免疫受体的细胞,所述通用免疫受体包含衔接分子如SpyCatcher或SpyTag部分、跨膜结构域和用于T细胞活化的胞内结构域。

CN 115397439 A

1.一种在哺乳动物中刺激对肿瘤的通用免疫受体介导的免疫应答的方法,其中所述肿瘤共表达至少两种不同的抗原,所述方法包括

(a)给所述哺乳动物施用经遗传修饰以表达免疫受体的细胞,所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域,

(b)给所述哺乳动物施用与互配衔接分子连接的第一药剂,其中所述第一药剂特异性结合由所述肿瘤表达的第一抗原,和

(c)给所述哺乳动物施用与互配衔接分子连接的第二药剂,其中所述第二药剂特异性结合由所述肿瘤表达的第二抗原并且其中所述第一抗原和第二抗原是不同的抗原。

2.在有需要的哺乳动物中治疗癌症的方法,其中所述癌症共表达至少两种不同的抗原,所述方法包括

(a)给所述哺乳动物施用有效量的经遗传修饰以表达免疫受体的细胞,所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域,

(b)给所述哺乳动物施用有效量的与互配衔接分子连接的第一药剂,其中所述第一药剂特异性结合由所述癌症表达的第一抗原,和

(c)给所述哺乳动物施用有效量的与互配衔接分子连接的第二药剂,其中所述第二药剂特异性结合由所述癌症表达的第二抗原并且其中所述第一抗原和第二抗原是不同的抗原。

3.权利要求1或2的方法,其中所述胞外结构域包含SpyCatcher或SpyTag。

4.权利要求1至3任一项的方法,其中所述第一和/或第二药剂与SpyTag或SpyCatcher连接。

5.权利要求1至4任一项的方法,其中所述第一和/或第二药剂是抗体、抗体片段、scFv或DARPin。

6.权利要求1至5任一项的方法,其中所述第一和/或第二药剂是抗体并且是人IgG。

7.权利要求1至6任一项的方法,其中所述互配衔接分子SpyTag或SpyCatcher通过光活化位点特异性缀合(LASIC)与所述第一和/或第二药剂连接。

8.权利要求1至7任一项的方法,其中所述细胞是T细胞、天然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、巨噬细胞、干细胞或调节性T细胞。

9.权利要求1至8任一项的方法,其中所述细胞是自体细胞。

10.权利要求1至9任一项的方法,其中所述免疫受体进一步包含共刺激分子的胞内结构域。

11.权利要求10的方法,其中所述共刺激分子是4-1BB、CD28、CD27、CD2、CD3、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3或者特异性结合CD83的配体。

12.权利要求1至11任一项的方法,其中在施用给所述哺乳动物之前,将所述细胞与所述第一和/或第二药剂接触以产生预武装细胞,随后所述预武装细胞被施用给哺乳动物。

13.权利要求1至11任一项的方法,其中在给哺乳动物施用所述第一和/或第二药剂之前,将所述细胞施用给所述哺乳动物。

14.一种产生一定水平的针对肿瘤的裂解活性的方法,所述方法包括

(a)将一定量的细胞与一定量的与互配衔接分子连接的药剂接触,其中所述细胞经遗

传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和胞外结构域，其中所述胞外结构域包含衔接分子，其中所述药剂特异性结合由所述肿瘤表达的抗原，和

其中选择所述药剂的量和/或细胞的量以产生所述水平的针对肿瘤的裂解活性。

15.一种在有需要的哺乳动物中治疗癌症的方法，所述方法包括

(a)给所述哺乳动物施用一定量的经遗传修饰以表达免疫受体的细胞，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，和

(b)给所述哺乳动物施用一定量的与互配衔接分子连接的药剂，其中所述药剂特异性结合所述癌症表达的抗原，其中选择所述细胞的量和/或所述药剂的量以提供一定水平的针对癌症的裂解活性。

16.权利要求14至15任一项的方法，其中增加相对于所述细胞的量的药剂的量增加裂解活性水平，并且降低相对于所述细胞的量的药剂的量降低裂解活性水平。

17.权利要求14至16任一项的方法，其中所述胞外结构域包含SpyCatcher或SpyTag。

18.权利要求14至17任一项的方法，其中所述药剂与SpyTag或SpyCatcher连接。

19.权利要求14至18任一项的方法，其中所述药剂是抗体、抗体片段、scFv或DARPin。

20.权利要求14至19任一项的方法，其中所述药剂是抗体且是人IgG。

21.权利要求14至20任一项的方法，其中所述互配衔接分子SpyTag或SpyCatcher通过光活化位点特异性缀合(LASIC)与所述药剂连接。

22.权利要求14至21任一项的方法，其中所述细胞是T细胞、天然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、巨噬细胞、干细胞或调节性T细胞。

23.权利要求14至22任一项的方法，其中所述细胞是自体细胞。

24.权利要求14至23任一项的方法，其中所述免疫受体进一步包含共刺激分子的胞内结构域。

25.权利要求14至24任一项的方法，其中所述共刺激分子是4-1BB、CD28、CD27、CD2、CD3、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3或者特异性结合CD83的配体。

26.权利要求15至25任一项的方法，其中在施用给所述哺乳动物之前，将所述细胞与所述药剂接触以产生预武装细胞，随后所述预武装细胞被施用给所述哺乳动物。

27.权利要求15至26任一项的方法，其中在将所述药剂施用给所述哺乳动物之前，将所述细胞施用给所述哺乳动物。

28.一种在有需要的哺乳动物中刺激对肿瘤的通用免疫受体介导的免疫应答的方法，所述方法包括

(a)给所述哺乳动物施用经遗传修饰以表达免疫受体的细胞，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，和

(b)随后给所述哺乳动物施用与互配衔接分子连接的药剂，其中所述药剂特异性结合由所述肿瘤表达的抗原。

29.一种在有需要的哺乳动物中治疗癌症的方法，所述方法包括

(a)给所述哺乳动物施用有效量的经遗传修饰以表达免疫受体的T细胞，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，和

(b)随后给所述哺乳动物施用有效量的与互配衔接分子连接的药剂,其中所述药剂特异性结合由所述癌症表达的抗原。

30.权利要求28或29的方法,其中所述胞外结构域包含SpyCatcher或SpyTag。

31.权利要求28至30任一项的方法,其中所述药剂与SpyTag或SpyCatcher连接。

32.权利要求28至31任一项的方法,其中所述药剂是抗体、抗体片段、scFv或DARPin。

33.权利要求28至32任一项的方法,其中所述药剂是抗体且是人IgG。

34.权利要求28至33任一项的方法,其中所述互配衔接分子SpyTag或SpyCatcher通过光活化位点特异性缀合(LASIC)与所述药剂连接。

35.权利要求28至34任一项的方法,其中所述细胞是T细胞、天然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、巨噬细胞、干细胞或调节性T细胞。

36.权利要求28至35任一项的方法,其中其中所述细胞是自体细胞。

37.权利要求28至36任一项的方法,其中所述免疫受体进一步包含共刺激分子的胞内结构域。

38.权利要求28至37任一项的方法,其中所述共刺激分子是4-1BB、CD28、CD27、CD2、CD3、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3或者特异性结合CD83的配体。

39.一种定量细胞表面上通用免疫受体转换的方法,所述方法包括

(a)将经遗传修饰以表达免疫受体的细胞与和互配衔接分子连接的药剂接触,从而产生武装受体,所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域;和

(b)相对于参考量确定所述武装受体的量。

40.权利要求39的方法,其中所述参考量是在先前时间武装受体的量。

41.权利要求40的方法,其中所述武装受体的量通过标记所述药剂并检测经标记的药剂来确定。

42.权利要求41的方法,其中通过将所述药剂与标记分子连接或接触来标记所述药剂,所述标记分子包括myc-标签、FLAG-标签、His-标签、HA-标签、荧光蛋白(例如,绿色荧光蛋白(GFP))、荧光团(例如,四甲基罗丹明(TRITC))、异硫氰酸荧光素(FITC)、二硝基苯酚、peridin叶绿素蛋白复合物、藻红蛋白(PE)、组氨酸、生物素、链霉抗生物素蛋白、抗生物素蛋白、辣根过氧化物酶、棕榈酰化、亚硝基化、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶、谷胱甘肽S-转移酶(GST)、麦芽糖结合蛋白、放射性同位素、重金属、超磁性纳米颗粒以及用于放射性同位素标记的任何类型的化合物,包括1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸(NOTA)或别藻蓝蛋白(APC)。

43.权利要求39至42任一项的方法,其进一步包括步骤(c):将所述细胞和所述药剂与肿瘤细胞接触。

44.权利要求39至43任一项的方法,其中所述胞外结构域包含SpyCatcher。

45.权利要求39至44任一项的方法,其中所述药剂与SpyTag连接。

46.权利要求39至45任一项的方法,其中所述药剂是抗体、抗体片段、scFv或DARPin。

47.权利要求39至46任一项的方法,其中所述药剂是抗体并且是人IgG。

48.权利要求39至47任一项的方法,其中所述细胞是T细胞、天然杀伤(NK)细胞、细胞毒

性T淋巴细胞(CTL)、巨噬细胞、干细胞或调节性T细胞。

49.权利要求39至48任一项的方法,其中所述免疫受体进一步包含共刺激分子的胞内结构域。

50.权利要求39至49任一项的方法,其中所述共刺激分子是4-1BB、CD28、CD27、CD2、CD3、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3或者特异性结合CD83的配体。

51.一种在有需要的哺乳动物中刺激对肿瘤的通用免疫受体介导的免疫应答的方法,所述方法包括

(a)给所述哺乳动物施用有效量的经遗传修饰以表达免疫受体的细胞,所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、4-1BB的胞内结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域,和

(b)给所述哺乳动物施用有效量的与互配衔接分子连接的药剂,其中所述药剂特异性结合由所述肿瘤表达的抗原,

其中所述肿瘤被预先确定为以相对于参考水平增加的水平表达所述抗原。

52.一种在有需要的哺乳动物中治疗癌症的方法,所述方法包括

(a)给所述哺乳动物施用一定量的经遗传修饰以表达免疫受体的细胞,所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、4-1BB的胞内结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域,和

(b)给所述哺乳动物施用一定量的与互配衔接分子连接的药剂,其中所述药剂特异性结合由所述癌症表达的抗原,

其中所述癌症被预先确定为以相对于参考水平增加的水平表达所述抗原。

53.权利要求51或52的方法,其中所述参考水平是所述抗原在健康组织中的表达水平。

54.权利要求51至53任一项的方法,其中所述胞外结构域包含SpyCatcher或SpyTag。

55.权利要求51至54任一项的方法,其中所述药剂与SpyTag或SpyCatcher连接。

56.权利要求51至55任一项的方法,其中所述药剂是抗体、抗体片段、scFv或DARPin。

57.权利要求51至56任一项的方法,其中所述药剂是抗体且是人IgG。

58.权利要求51至57任一项的方法,其中所述SpyTag或SpyCatcher通过光活化位点特异性缀合(LASIC)与所述药剂连接。

59.权利要求51-58任一项的方法,其中所述细胞是T细胞、天然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、巨噬细胞、干细胞或调节性T细胞。

60.权利要求51至59任一项的方法,其中所述细胞是自体细胞。

61.权利要求51至60任一项的方法,其中在施用给所述哺乳动物之前,将所述细胞与药剂接触以产生预武装细胞,随后所述预武装细胞被施用给所述哺乳动物。

62.权利要求51至61任一项的方法,其中在将所述药剂施用给所述哺乳动物之前,将所述细胞施用给所述哺乳动物。

63.用于在有需要的哺乳动物中刺激对肿瘤的通用免疫受体介导的免疫应答的经遗传修饰的细胞、第一药剂和第二药剂,其中所述肿瘤共表达至少两种不同的抗原,

其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体,所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域,

其中所述第一药剂与互配衔接分子连接，并且其中所述第一药剂特异性结合由所述肿瘤表达的第一抗原；

其中所述第二药剂与互配衔接分子连接，并且其中所述第二药剂特异性结合由所述肿瘤表达的第二抗原；其中所述第一抗原和第二抗原是不同的抗原，和

其中所述免疫受体、第一药剂和第二药剂被施用给所述哺乳动物。

64.用于在有需要的哺乳动物中治疗癌症的经遗传修饰的细胞、第一药剂和第二药剂，其中所述癌症共表达至少两种不同的抗原，

其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，

其中所述第一药剂与互配衔接分子连接，并且其中所述第一药剂特异性结合由所述癌症表达的第一抗原；

其中所述第二药剂与互配衔接分子连接，并且其中所述第二药剂特异性结合由所述癌症表达的第二抗原；其中所述第一抗原和第二抗原是不同的抗原。

65.用于产生一定水平的针对肿瘤的裂解活性的经遗传修饰的细胞和药剂，其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，其中所述药剂与互配衔接分子连接，并且其中所述药剂特异性结合所述肿瘤表达的抗原；其中一定量的所述细胞与一定量的所述药剂接触并且其中选择相对于所述细胞的量的所述药剂的量以产生所述水平的针对所述肿瘤的裂解活性。

66.用于在有需要的哺乳动物中治疗癌症的经遗传修饰的细胞和药剂，其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包括T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，其中所述药剂与互配衔接分子连接，并且其中所述药剂特异性结合所述癌症表达的抗原；其中给所述哺乳动物施用一定量的所述细胞和一定量的所述药剂，其中选择所述细胞的量和/或所述药剂的量以提供一定水平的针对所述癌症的裂解活性。

67.用于在有需要的哺乳动物中刺激对肿瘤的通用免疫受体介导的免疫应答的经遗传修饰的细胞和药剂，其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，其中所述药剂与互配衔接分子连接，并且其中所述药剂特异性结合所述肿瘤表达的抗原；其中给哺乳动物施用一定量的所述细胞，随后给哺乳动物施用一定量的所述药剂。

68.用于在有需要的哺乳动物中治疗癌症的经遗传修饰的细胞和药剂，其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，其中所述药剂与互配衔接分子连接，并且其中所述药剂特异性结合所述癌症表达的抗原；其中给哺乳动物施用一定量的所述细胞，随后给哺乳动物施用一定量的所述药剂。

69.用于在有需要的哺乳动物中刺激对肿瘤的通用免疫受体介导的免疫应答的经遗传修饰的细胞和药剂，

其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、4-1BB的胞内结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，

其中所述药剂与互配衔接分子连接，

其中所述药剂特异性结合由所述肿瘤表达的抗原；

其中给所述哺乳动物施用有效量的所述细胞并且给所述哺乳动物施用有效量的所述药剂，和

其中预先确定所述肿瘤以相对于参考水平增加的水平表达所述抗原。

70.用于在有需要的哺乳动物中治疗癌症的经遗传修饰的细胞和药剂，其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包括T细胞受体胞内信号传导结构域、4-1BB的胞内结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，其中所述药剂与互配衔接分子连接，并且其中所述药剂特异性结合所述肿瘤表达的抗原；其中给所述哺乳动物施用有效量的所述细胞并且给所述哺乳动物施用有效量的所述药剂，并且其中预先确定所述肿瘤以相对于参考水平增加的水平表达所述抗原。

71.经遗传修饰的细胞、第一药剂和第二药剂在有需要的哺乳动物中刺激对肿瘤的通用免疫受体介导的免疫应答中的用途，其中所述肿瘤共表达至少两种不同的抗原，

其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，

其中所述第一药剂与互配衔接分子连接，并且其中所述第一药剂特异性结合由所述肿瘤表达的第一抗原；

其中所述第二药剂与互配衔接分子连接，并且其中所述第二药剂特异性结合由所述肿瘤表达的第二抗原；其中所述第一抗原和第二抗原是不同的抗原，和

其中所述免疫受体、第一药剂和第二药剂被施用给所述哺乳动物。

72.经遗传修饰的细胞、第一药剂和第二药剂在有需要的哺乳动物中治疗癌症的用途，其中所述癌症共表达至少两种不同的抗原，

其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，

其中所述第一药剂与互配衔接分子连接，并且其中所述第一药剂特异性结合由所述癌症表达的第一抗原；

其中所述第二药剂与互配衔接分子连接，并且其中所述第二药剂特异性结合由所述癌症表达的第二抗原；其中所述第一抗原和第二抗原是不同的抗原。

73.经遗传修饰的细胞和药剂在产生一定水平的针对肿瘤的裂解活性中的用途，其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，其中所述药剂与互配衔接分子连接，并且其中所述药剂特异性结合所述肿瘤表达的抗原；其中一定量的所述细胞与一定量的所述药剂接触，并且其中选择相对于所述细胞的量的所述药剂的量以产生所述水平的针对所述肿瘤的裂解活性。

74.经遗传修饰的细胞和药剂在有需要的哺乳动物中治疗癌症的用途，其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包括T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，其中所述药剂与互配衔接分子连接，并且其中所述药剂特异性结合所述癌症表达的抗原；其中给哺乳动物施用一定量的所述细胞和一定量的所述药剂，其中选择所述细胞的量和/或所述药剂的量以提供一定水平的针对所述癌症的裂解

活性。

75.经遗传修饰的细胞和药剂在有需要的哺乳动物中刺激对肿瘤的通用免疫受体介导的免疫应答的用途,其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体,所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域,其中所述药剂与互配衔接分子连接,并且其中所述药剂特异性结合所述肿瘤表达的抗原;其中给所述哺乳动物施用一定量的所述细胞,随后给所述哺乳动物施用一定量的所述药剂。

76.经遗传修饰的细胞和药剂在有需要的哺乳动物中治疗癌症的用途,其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体,所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域,其中所述药剂与互配衔接分子连接,并且其中所述药剂特异性结合所述癌症表达的抗原;其中给所述哺乳动物施用一定量的所述细胞,随后给所述哺乳动物施用一定量的所述药剂。

77.经遗传修饰的细胞和药剂在有需要的哺乳动物中刺激对肿瘤的通用免疫受体介导的免疫应答的用途,其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体,所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、4-1BB的胞内结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域,其中所述药剂与互配衔接分子连接,其中所述药剂特异性结合由所述肿瘤表达的抗原;其中给所述哺乳动物施用有效量的所述细胞并且给所述哺乳动物施用有效量的所述药剂,以及其中预先确定所述肿瘤以相对于参考水平增加的水平表达所述抗原。

78.经遗传修饰的细胞和药剂在有需要的哺乳动物中治疗癌症的用途,其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体,所述免疫受体包括T细胞受体胞内信号传导结构域、4-1BB的胞内结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域,其中所述药剂与互配衔接分子连接,并且其中所述药剂特异性结合所述肿瘤表达的抗原;其中给所述哺乳动物施用有效量的所述细胞并且给所述哺乳动物施用有效量的所述药剂,并且其中预先确定所述肿瘤以相对于参考水平增加的水平表达所述抗原。

表达通用免疫受体的工程化细胞活性的定量控制

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35 U.S.C.§119(e)享有2020年1月24日提交的美国临时专利申请号62/965,593的优先权,在此通过引用将其全部内容并入本文。

[0003] 关于联邦赞助的研究或开发的声明

[0004] 本发明是在美国国立卫生研究院颁发的CA168900和CA016520的政府支持下完成的。政府对本发明享有一定权利。

[0005] 发明背景

[0006] 嵌合抗原受体(CAR)T细胞在治疗某些血液系统恶性肿瘤时可以介导显著反应,导致FDA批准两种靶向CD19的CART细胞产品,用于治疗复发/难治性(r/r)B细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)和弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)的tisagenlecleucel,以及用于治疗(r/r)大B细胞淋巴瘤的axicabtagene ciloleucel。由于CD19 CAR T细胞治疗患者的高缓解率和延长的无肿瘤生存期,本领域已将其应用扩展到其它恶性肿瘤。靶向其它B细胞特异性抗原如BCMA、CD20和CD22的CAR T细胞的临床试验产生了令人鼓舞的结果,但在CAR T细胞疗法在血液系统恶性肿瘤和实体瘤中取得广泛成功之前,需要解决一些挑战,包括与独特毒性和随后的复发相关的挑战。

[0007] CAR由连接到细胞内T细胞信号传导和共刺激结构域(例如41BB和/或CD28与CD3ζ串联)的细胞外抗原靶向结构域例如scFv组成,允许抗原特异性、不依赖于MHC的T细胞靶向。这种设计虽然可有效用于单一抗原靶向,但在扩大CAR T细胞在多种肿瘤类型中的使用方面存在固有局限性,并且存在严重不良事件和毒性的可能性。

[0008] 虽然大多数药物允许调整剂量并遵循可预测的药代动力学和药效学,但传统CAR T细胞疗法是活药物,在输注后不易控制。在识别靶抗原后,所施用的CAR T细胞可以在受者中迅速增殖至大数目并释放促炎细胞因子,在某些情况下,导致严重甚至有时是致命的副作用,例如细胞因子释放综合征(CRS)、神经毒性或脑水肿,需要医疗管理。在某些情况下,CAR T细胞靶向并破坏也表达被靶向抗原的非恶性组织,导致潜在的致命的靶向非肿瘤毒性(on-target,off-tumor toxicity)。

[0009] 除了这些挑战之外,刚性CAR架构还限制了对单一肿瘤相关抗原(TAA)的靶向。尽管这种方法在靶向遍在的泛B细胞标志物如CD19时可能是有效的,但在靶向具有异质TAA表达的肿瘤或在复发性抗原阴性肿瘤的情况下,其有效性会受到影响。大约35%的tisagenlecleucel CD19 CAR T细胞受者在治疗后会复发,超过一半的复发疾病与CD19抗原丢失的遗传机制有关,该机制是由于具有无功能或缺失的跨膜结构域的蛋白质截短导致的。抗原丢失的替代机制包括出现缺乏被靶向的抗原表位的抗原剪接变体、肿瘤细胞谱系转换、CD19抗原的胞啃作用(trogocytosis),以及一种罕见的情况,CAR基因被意外引入白血病B细胞。单一抗原靶向在实体瘤的治疗中也存在问题,实体瘤通常由具有不同抗原表达模式的肿瘤细胞组成。在这种情况下,选择性靶向单一抗原会导致不完全清除和适应性抗性,正如在靶向EGFRvIII中所报道的那样。

[0010] 本领域显然需要用于靶向肿瘤的免疫疗法的组合物和方法,以使副作用和非肿瘤

毒性最小化。本发明解决了本领域中这种未满足的需求。

[0011] 发明概述

[0012] 如本文所述，本发明涉及使用经工程化以表达通用免疫受体的细胞在哺乳动物中刺激通用免疫受体介导的应答的方法，所述通用免疫受体包含衔接分子如SpyCatcher或SpyTag部分、跨膜结构域和用于T细胞活化的胞内结构域。

[0013] 在一个方面，本发明提供了一种在哺乳动物中刺激对肿瘤的通用免疫受体介导的免疫应答的方法，其中所述肿瘤共表达至少两种不同的抗原，所述方法包括(a)给哺乳动物施用经遗传修饰以表达免疫受体的细胞，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，(b)给哺乳动物施用与互配衔接(reciprocal adaptor)分子连接的第一药剂，其中所述第一药剂特异性结合由所述肿瘤表达的第一抗原，和(c)给哺乳动物施用与互配衔接分子连接的第二药剂，其中第二药剂特异性结合由所述肿瘤表达的第二抗原并且其中第一抗原和第二抗原是不同的抗原。

[0014] 在另一个方面，本发明提供了一种在有需要的哺乳动物中治疗癌症的方法，其中所述癌症共表达至少两种不同的抗原，所述方法包括(a)给哺乳动物施用有效量的经遗传修饰以表达免疫受体的细胞，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，(b)给哺乳动物施用有效量的与互配衔接分子连接的第一药剂，其中第一药剂特异性结合由所述癌症表达的第一抗原，和(c)给哺乳动物施用有效量的与互配衔接分子连接的第二药剂，其中第二药剂特异性结合由所述癌症表达的第二抗原并且其中第一抗原和第二抗原是不同的抗原。

[0015] 在一些实施方案中，胞外结构域包含SpyCatcher或SpyTag。

[0016] 在一些实施方案中，第一和/或第二药剂与SpyTag或SpyCatcher连接。

[0017] 在一些实施方案中，第一和/或第二药剂是抗体、抗体片段、scFv或DARPin。

[0018] 在一些实施方案中，第一和/或第二药剂是抗体并且是人IgG。

[0019] 在一些实施方案中，互配衔接分子SpyTag或SpyCatcher通过光活化位点特异性缀合(LASIC)连接到第一和/或第二药剂。

[0020] 在一些实施方案中，所述细胞是T细胞、天然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、巨噬细胞、干细胞或调节性T细胞。

[0021] 在一些实施方案中，所述细胞是自体细胞。

[0022] 在一些实施方案中，免疫受体进一步包含共刺激分子的胞内结构域。

[0023] 在一些实施方案中，共刺激分子是4-1BB、CD28、CD27、CD2、CD3、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3或者特异性结合CD83的配体。

[0024] 在一些实施方案中，在施用给哺乳动物之前，将所述细胞与第一和/或第二药剂接触以产生预武装细胞(pre-armed cell)并且随后将预武装细胞施用给哺乳动物。

[0025] 在一些实施方案中，在给哺乳动物施用第一和/或第二药剂之前，将所述细胞施用给哺乳动物。

[0026] 在另一个方面，本发明提供了一种产生抗肿瘤的溶解活性水平的方法，所述方法包括(a)将一定量的细胞与一定量的与互配衔接分子连接的药剂接触，其中所述细胞经遗传修饰以表达包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和胞外结构域的免疫受体，

其中胞外结构域包含衔接分子,其中所述药剂特异性结合由所述肿瘤表达的抗原,并且其中选择所述药剂的量和/或细胞的量以产生抗所述肿瘤的溶解活性水平。

[0027] 在另一个方面,本发明提供了一种在有需要的哺乳动物中治疗癌症的方法,所述方法包括(a)给哺乳动物施用一定量的经遗传修饰以表达免疫受体的细胞,所述免疫受体包含T细胞受体细胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域,和(b)给哺乳动物施用一定量的与互配衔接分子连接的药剂,其中所述药剂特异性结合所述癌症表达的抗原,其中选择所述细胞的量和/或所述药剂的量以提供抗所述癌症的溶解活性水平。

[0028] 在一些实施方案中,增加相对于所述细胞的量的药剂的量增加溶解活性水平,降低相对于所述细胞的量的药剂的量降低溶解活性水平。

[0029] 在一些实施方案中,胞外结构域包含SpyCatcher或SpyTag。

[0030] 在一些实施方案中,所述药剂与SpyTag或SpyCatcher连接。

[0031] 在一些实施方案中,所述药剂是抗体、抗体片段、scFv或DARPin。

[0032] 在一些实施方案中,所述药剂是抗体并且是人IgG。

[0033] 在一些实施方案中,互配衔接分子SpyTag或SpyCatcher通过光活化位点特异性缀合(LASIC)连接到所述药剂。

[0034] 在一些实施方案中,所述细胞是T细胞、天然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、巨噬细胞、干细胞或调节性T细胞。

[0035] 在一些实施方案中,所述细胞是自体细胞。

[0036] 在一些实施方案中,所述免疫受体进一步包含共刺激分子的胞内结构域。

[0037] 在一些实施方案中,所述共刺激分子是4-1BB、CD28、CD27、CD2、CD3、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3或者特异性结合CD83的配体。

[0038] 在一些实施方案中,在施用给哺乳动物之前,将所述细胞与所述药剂接触以产生预武装细胞并且随后将预武装细胞施用给哺乳动物。

[0039] 在一些实施方案中,在给哺乳动物施用所述药剂之前,将所述细胞施用给哺乳动物。

[0040] 在另一个方面,本发明提供了一种在有需要的哺乳动物中刺激对肿瘤的通用免疫受体介导的免疫应答的方法,所述方法包括(a)给哺乳动物施用经遗传修饰以表达免疫受体的细胞,所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域,和(b)随后给哺乳动物施用与互配衔接分子连接的药剂,其中所述药剂特异性结合所述肿瘤表达的抗原。

[0041] 在另一个方面,本发明提供了一种在有需要的哺乳动物中治疗癌症的方法,所述方法包括(a)给哺乳动物施用有效量的经遗传修饰以表达免疫受体的T细胞,所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域,和(b)随后给哺乳动物施用有效量的与互配衔接分子连接的药剂,其中所述药剂特异性结合所述癌症表达的抗原。

[0042] 在一些实施方案中,所述胞外结构域包含SpyCatcher或SpyTag。

[0043] 在一些实施方案中,所述药剂与SpyTag或SpyCatcher连接。

[0044] 在一些实施方案中,所述药剂是抗体、抗体片段、scFv或DARPin。

[0045] 在一些实施方案中,所述药剂是抗体并且是人IgG。

[0046] 在一些实施方案中,互配衔接分子SpyTag或SpyCatcher通过光活化位点特异性缀合(LASIC)连接到所述药剂。

[0047] 在一些实施方案中,所述细胞是T细胞、天然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、巨噬细胞、干细胞或调节性T细胞。

[0048] 在一些实施方案中,所述细胞是自体细胞。

[0049] 在一些实施方案中,所述免疫受体进一步包含共刺激分子的胞内结构域。

[0050] 在一些实施方案中,所述共刺激分子是4-1BB、CD28、CD27、CD2、CD3、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3或者特异性结合CD83的配体。

[0051] 在另一个方面,本发明提供了一种定量细胞表面上通用免疫受体转换(turnover)的方法,所述方法包括(a)将经遗传修饰以表达免疫受体的细胞与连接互配衔接分子的药剂接触,从而产生武装受体,所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域;和(b)确定所述武装受体相对于参考量的量。

[0052] 在一些实施方案中,所述参考量是在先前时间武装受体的量。

[0053] 在一些实施方案中,所述武装受体的量通过标记所述药剂并检测经标记的药剂来确定。

[0054] 在一些实施方案中,通过将药剂与标记分子连接或接触来标记所述药剂,所述标记分子包含myc-标签、FLAG-标签、His-标签、HA-标签、荧光蛋白(例如,绿色荧光蛋白(GFP))、荧光团(例如,四甲基罗丹明(TRITC))、异硫氰酸荧光素(FITC)、二硝基苯酚、peridin叶绿素蛋白复合物、藻红蛋白(PE)、组氨酸、生物素、链霉抗生物素蛋白、抗生物素蛋白、辣根过氧化物酶、棕榈酰化、亚硝基化、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶、谷胱甘肽S-转移酶(GST)、麦芽糖结合蛋白、放射性同位素、重金属、超磁性纳米颗粒以及用于放射性同位素标记的任何类型的化合物,包括1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸(NOTA)或别藻蓝蛋白(APC)。

[0055] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括步骤(c):将所述细胞和所述药剂与肿瘤细胞接触。

[0056] 在一些实施方案中,所述胞外结构域包含SpyCatcher。

[0057] 在一些实施方案中,所述药剂与SpyTag连接。

[0058] 在一些实施方案中,所述药剂是抗体、抗体片段、scFv或DARPin。

[0059] 在一些实施方案中,所述药剂是抗体并且是人IgG。

[0060] 在一些实施方案中,所述细胞是T细胞、天然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、巨噬细胞、干细胞或调节性T细胞。

[0061] 在一些实施方案中,所述免疫受体进一步包含共刺激分子的胞内结构域。

[0062] 在一些实施方案中,所述共刺激分子是4-1BB、CD28、CD27、CD2、CD3、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3或者特异性结合CD83的配体。

[0063] 在另一个方面,本发明提供了一种在有需要的哺乳动物中刺激对肿瘤的通用免疫

受体介导的免疫应答的方法，所述方法包括(a)给哺乳动物施用有效量的经遗传修饰以表达免疫受体的细胞，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、4-1BB的胞内结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，和(b)给哺乳动物施用有效量的与互配衔接分子连接的药剂，其中所述药剂特异性结合所述肿瘤表达的抗原，其中所述肿瘤被预先确定为以相对于参考水平增加的水平表达所述抗原。

[0064] 在另一个方面，本发明提供了一种在有需要的哺乳动物中治疗癌症的方法，所述方法包括(a)给哺乳动物施用一定量的经遗传修饰以表达免疫受体的细胞，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、4-1BB的胞内结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，和(b)给哺乳动物施用一定量的与互配衔接分子连接的药剂，其中所述药剂特异性结合所述癌症表达的抗原，其中所述癌症被预先确定为以相对于参考水平增加的水平表达所述抗原。

[0065] 在一些实施方案中，所述参考水平是所述抗原在健康组织中的表达水平。

[0066] 在一些实施方案中，所述胞外结构域包含SpyCatcher或SpyTag。

[0067] 在一些实施方案中，所述药剂与SpyTag或SpyCatcher连接。

[0068] 在一些实施方案中，所述药剂是抗体、抗体片段、scFv或DARPin。

[0069] 在一些实施方案中，所述药剂是抗体并且是人IgG。

[0070] 在一些实施方案中，SpyTag或SpyCatcher通过光活化位点特异性缀合(LASIC)与所述药剂连接。

[0071] 在一些实施方案中，所述细胞是T细胞、天然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、巨噬细胞、干细胞或调节性T细胞。

[0072] 在一些实施方案中，所述细胞是自体细胞。

[0073] 在一些实施方案中，在施用给哺乳动物之前，将所述细胞与药剂接触以产生预武装细胞，所述预武装细胞随后被施用给哺乳动物。

[0074] 在一些实施方案中，在将所述药剂施用给哺乳动物之前，将所述细胞施用给哺乳动物。

[0075] 在另一个方面，本发明提供了用于在有需要的哺乳动物中刺激对肿瘤的通用免疫受体介导的免疫应答的经遗传修饰的细胞、第一药剂和第二药剂，其中所述肿瘤共表达至少两种不同的抗原，其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，其中第一药剂与互配衔接分子连接，并且其中第一药剂特异性结合由所述肿瘤表达的第一抗原；其中第二药剂与互配衔接分子连接，并且其中第二药剂特异性结合由所述肿瘤表达的第二抗原；其中第一抗原和第二抗原是不同的抗原，并且其中免疫受体、第一药剂和第二药剂被施用给哺乳动物。

[0076] 在另一个方面，本发明提供了用于在有需要的哺乳动物中治疗癌症的经遗传修饰的细胞、第一药剂和第二药剂，其中所述癌症共表达至少两种不同的抗原，其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，其中第一药剂与互配衔接分子连接，并且其中第一药剂特异性结合由所述癌症表达的第一抗原；其中第二药剂与互配衔接分子连接，并且其中第二药剂特异性结合由所述癌症表达的第二抗原；并且其中第一抗原和第二抗原是不同的抗

原。

[0077] 在另一个方面，本发明提供了用于产生一定水平的针对肿瘤的裂解活性的经遗传修饰的细胞和药剂，其中所述细胞经遗传修饰以表达包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域的免疫受体，其中所述药剂与互配衔接分子连接，并且其中所述药剂特异性结合由所述肿瘤表达的抗原；其中一定量的所述细胞与一定量的所述药剂接触，并且其中选择相对于细胞的量的所述药剂的量以产生所述水平的针对肿瘤的裂解活性。

[0078] 在另一个方面，本发明提供了用于在有需要的哺乳动物中治疗癌症的经遗传修饰的细胞和药剂，其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，其中所述药剂与互配衔接分子连接，并且其中所述药剂特异性结合所述癌症表达的抗原；其中给哺乳动物施用一定量的所述细胞和一定量的所述药剂，其中选择所述细胞的量和/或所述药剂的量以提供一定水平的针对癌症的裂解活性。

[0079] 在另一个方面，本发明提供了用于在有需要的哺乳动物中刺激对肿瘤的通用免疫受体介导的免疫应答的经遗传修饰的细胞和药剂，其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，其中所述药剂与互配衔接分子连接，并且其中所述药剂特异性结合由所述肿瘤表达的抗原；其中给哺乳动物施用一定量的所述细胞，随后给哺乳动物施用一定量的所述药剂。

[0080] 在另一个方面，本发明提供了用于在有需要的哺乳动物中治疗癌症的经遗传修饰的细胞和药剂，其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，其中所述药剂与互配衔接分子连接，并且其中所述药剂特异性结合所述癌症表达的抗原；其中给哺乳动物施用一定量的所述细胞，随后给哺乳动物施用一定量的所述药剂。

[0081] 在另一个方面，本发明提供了用于在有需要的哺乳动物中刺激对肿瘤的通用免疫受体介导的免疫应答的经遗传修饰的细胞和药剂，其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、4-1BB的胞内结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，其中所述药剂与互配衔接分子连接，其中所述药剂特异性结合所述肿瘤表达的抗原；其中给哺乳动物施用有效量的所述细胞并且给哺乳动物施用有效量的所述药剂，并且其中预先确定所述肿瘤以相对于参考水平增加的水平表达所述抗原。

[0082] 在另一个方面，本发明提供了用于在有需要的哺乳动物中治疗癌症的经遗传修饰的细胞和药剂，其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、4-1BB的胞内结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，其中所述药剂与互配衔接分子连接，并且其中所述药剂特异性结合所述肿瘤表达的抗原；其中给哺乳动物施用有效量的所述细胞并且给哺乳动物施用有效量的所述药剂，并且其中预先确定所述肿瘤以相对于参考水平增加的水平表达所述抗原。

[0083] 在另一个方面，本发明提供了经遗传修饰的细胞、第一药剂和第二药剂在有需要的哺乳动物中刺激对肿瘤的通用免疫受体介导的免疫应答中的用途，其中所述肿瘤共表达至少两种不同的抗原，其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包含T细胞

受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，其中所述第一药剂与互配衔接分子连接，并且其中第一药剂特异性结合所述肿瘤表达的第一抗原；其中所述第二药剂与互配衔接分子连接，并且其中第二药剂特异性结合所述肿瘤表达的第二抗原；其中第一抗原和第二抗原是不同的抗原，并且其中所述免疫受体、第一药剂和第二药剂被施用于哺乳动物。

[0084] 在另一个方面，本发明提供了经遗传修饰的细胞、第一药剂和第二药剂在有需要的哺乳动物中治疗癌症的用途，其中所述癌症共表达至少两种不同的抗原，其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，其中第一药剂与互配衔接分子连接，并且其中第一药剂特异性结合所述癌症表达的第一抗原；其中第二药剂与互配衔接分子连接，并且其中第二药剂特异性结合所述癌症表达的第二抗原；并且其中第一抗原和第二抗原是不同的抗原。

[0085] 在另一个方面，本发明提供了经遗传修饰的细胞和药剂在产生一定水平的针对肿瘤的裂解活性中的用途，其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，其中所述药剂与互配衔接分子连接，并且其中所述药剂特异性结合所述肿瘤表达的抗原；其中一定量的所述细胞与一定量的所述药剂接触并且其中选择所述药剂的量相对于细胞的量以产生所述水平的针对所述肿瘤的裂解活性。

[0086] 在另一个方面，本发明提供了经遗传修饰的细胞和药剂在有需要的哺乳动物中治疗癌症中的用途，其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包括T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，其中所述药剂与互配衔接分子连接，并且其中所述药剂特异性结合所述癌症表达的抗原；其中给哺乳动物施用一定量的所述细胞和一定量的所述药剂，其中选择所述细胞的量和/或所述药剂的量以提供抗一定水平的针对所述癌症的裂解活性。

[0087] 在另一个方面，本发明提供了经遗传修饰的细胞和药剂在有需要的哺乳动物中刺激针对肿瘤的通用免疫受体介导的免疫应答中的用途，其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，其中所述药剂与互配衔接分子连接，并且其中所述药剂特异性结合所述肿瘤表达的抗原；其中给哺乳动物施用一定量的所述细胞，随后给哺乳动物施用一定量的所述药剂。

[0088] 在另一个方面，本发明提供了经遗传修饰的细胞和药剂在有需要的哺乳动物中治疗癌症中的用途，其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，其中所述药剂与互配衔接分子连接，并且其中所述药剂特异性结合所述癌症表达的抗原；其中给哺乳动物施用一定量的所述细胞，随后给哺乳动物施用一定量的所述药剂。

[0089] 在另一个方面，本发明提供了经遗传修饰的细胞和药剂在有需要的哺乳动物中刺激针对肿瘤的通用免疫受体介导的免疫应答中的用途，其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、4-1BB的胞内结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，其中所述药剂与互配衔接分子连接，并且其中所述药剂特异性结合由所述肿瘤表达的抗原；其中给哺乳动物施用有效量的所述细胞并且给哺乳动

物施用有效量的所述药剂，并且其中预先确定所述肿瘤以相对于参考水平增加的水平表达所述抗原。

[0090] 在另一个方面，本发明提供了经遗传修饰的细胞和药剂在有需要的哺乳动物中治疗癌症中的用途，其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、4-1BB的胞内结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，其中所述药剂与互配衔接分子连接，并且其中所述药剂特异性结合所述肿瘤表达的抗原；其中给哺乳动物施用有效量的所述细胞并且给哺乳动物施用有效量的所述药剂，并且其中预先确定所述肿瘤以相对于参考水平增加的水平表达所述抗原。

[0091] 附图简述

[0092] 当结合附图阅读时，将更好地理解以下对本发明优选实施方案的详细描述。为了说明本发明，在附图中示出了当前优选的实施方案的示例。然而，应当理解，本发明不限于附图中所示实施方案的精确设置和手段。

[0093] 图1A-图1C是一系列示意图和图像，示出SpyCatcher免疫受体靶向配体的开发。图1A：蛋白G-ST与临床级人IgG交联的示意图。图1B：通过在还原条件下用考马斯染色的SDS-Page凝胶分析的赫赛汀(Herceptin)与蛋白G-ST或蛋白G-STDA的交联，随后与SpyCatcher-Venus反应。图1C：通过考马斯染色的SDS-Page凝胶分析的DARPin9.26-ST和DARPin9.26-STDA与SpyCatcher-Venus反应。

[0094] 图2A-图2E是一系列示意图、图像和曲线图，示出SpyCatcher免疫受体被表达并且能够与SpyTag标记的配体共价加载。图2A：慢病毒SpyCatcher免疫受体构建体的示意图。图2B：在含有2000nM RFP-ST或RFP-STDA的培养基中培养表达SpyCatcher免疫受体的SKOV3细胞。通过还原条件下的SDS-Page凝胶和对总CD3ζ蛋白的western印迹染色检测到两种组分之间形成共价键。图2C：在37℃下SpyCatcher T细胞用不同量的赫赛汀-ST武装1小时。通过用APC多克隆抗人IgG染色和流式细胞术分析检测加载到SpyCatcher免疫受体上的赫赛汀-ST。图2D：不同浓度的SpyCatcher免疫受体的共价(DARPin9.26-ST)与非共价(DARPin9.26-ST)最大加载的比较。图2E：SpyCatcher T细胞在含有不同量的固定化赫赛汀-ST的孔中温育16小时。收集上清液并通过ELISA分析IFNγ γ。误差杆代表平均值+/-标准偏差。数据点是三个重复的平均值。示出代表性T细胞供体。*P<0.05；**P<0.01；***P<0.001。

[0095] 图3A-图3G是一系列示意图和曲线图，示出SpyCatcher T细胞能够对许多不同抗原表达肿瘤系具有体外裂解功能。图3A：武装SpyCatcher免疫受体裂解(左)和按需裂解(右)的示意图。图3B：SpyCatcher或未转导(Unt)T细胞用不同浓度的赫赛汀-ST武装并在存在SKOV3(Her2+)肿瘤细胞的情况下共培养。图3C：SpyCatcher T细胞用抗原特异性和非特异性IgG武装并与MDA-MB-468(EGFR+/Her2-)或Ramos(CD20+/EGFR-)肿瘤细胞共培养。图3D：用抗原特异性DARPins武装的SpyCatcher T细胞与表达萤光素酶的SKOV3、MDA-MB-468或A1847(EpCAM+)肿瘤细胞共培养。图3E：DARPin9.26-ST武装的SpyCatcher T细胞与或不与SKOV3肿瘤细胞(E:T＝3:1)一起温育24小时，从培养物中取出，并在培养基+/-2000nM DARPin9.26-ST中温育。通过抗myc染色和流式细胞术分析来分析受体武装。图3F：未武装的SpyCatcher T细胞与SKOV3肿瘤细胞一起温育4小时，然后加入赫赛汀-ST或赫赛汀-STDA(时间＝0)。图3G：SpyCatcher T细胞用不同浓度的DARPin9.26-ST或DARPin9.26-STDA武装并与表达萤光素酶的SKOV3肿瘤细胞共培养。图3B和3F：使用实时细胞分析测量裂解。图3C、

3D和3G:20小时后计算残留萤光素酶表达。所有共培养均使用7:1E:T比率进行。误差杆代表平均值+/-标准偏差。数据点是三个重复的平均值。示出了代表性T细胞供体。*P<0.05;**P<0.01;***P<0.001。

[0096] 图4A-图4C是一系列示意图和曲线图,示出用两个靶向配体同时武装SpyCatcher T细胞产生能够双抗原靶向的单细胞产物。图4A:单靶向配体加载与双靶向配体加载的示意图。图4B:SpyCatcher T细胞用1000nM myc-9.26-ST武装(αHer2;红色)、用1000nM Flag-Eo1-ST武装(αEGFR;蓝色)或用两者各1000nM同时武装(绿色)。使用荧光缀合的抗-myc和抗-flag抗体的组合检测受体加载并通过流式细胞术进行评估。图4C:单武装或双重武装的SpyCatcher T细胞与表达Her2或EGFR和萤光素酶的Ramos细胞共培养。20小时后计算残留萤光素酶表达。所有共培养均使用7:1E:T比率进行。数据点是三个重复的平均值。显示了代表性T细胞供体。

[0097] 图5A-图5D是显示SpyCatcher-BBζT细胞在体内阻止肿瘤生长的一系列曲线图和图像。NSG小鼠(每组n=4)在第0天腹膜内注射1×10^6个表达萤光素酶的SKOV3肿瘤细胞,然后在第7天注射12.5×10^6个赫赛汀-ST武装的SpyCatcher-BBζT细胞。在第8天施用赫赛汀-ST,随后通过在给药窗口期间每3天注射(图5A.橙色框;图5B.虚线)。注射量表示每只小鼠的剂量。图5A:通过发光监测肿瘤生长并绘制为每只小鼠的平均辐射强度。图5B:治疗的小鼠的发光图像。图5C:图5A中治疗的小鼠的存活曲线。图5D:T细胞注射后第7天和第21天总人T细胞(CD3+/CD45+)的TruCount分析。误差杆代表平均值+/-SEM(A)或平均值+/-标准偏差。*P<0.05;**P<0.01;***P<0.001。

[0098] 图6A-图6B是显示SpyTag标记的靶向配体产生的一系列图像。图6A:通过用考马斯染色的还原条件下SDS-Page凝胶分析的利妥昔单抗或西妥昔单抗与蛋白G-ST交联,随后与SpyCatcher-Venus反应。图6B:通过考马斯染色的SDS-Page凝胶分析的DARPin Ec1-ST和E01-ST与SpyCatcher-Venus反应。

[0099] 图7A-图7B是显示通过慢病毒转导在稳定细胞系中表达蛋白质的一系列曲线图。图7A:SKOV3-GFP和SKOV3-GFP-SpyCatcher-BBζ细胞在含有2000nM myc-RFP-ST的培养基中温育。通过抗myc抗体对细胞进行受体武装染色并通过流式细胞术进行分析。图7B:Ramos-Her2和Ramos-EGFR细胞用抗Her2和抗EGFR单克隆抗体共染色。

[0100] 图8A-图8D是显示抗原表达水平和双重武装对SpyCatcher T细胞裂解功能的影响的一系列曲线图。图8A:SKOV3、MDA-MB-361、CRL5803和MDA-MB-468细胞系的Her2表达染色。图8B:用1000nM或100nM赫赛汀-ST武装的SpyCatcher T细胞对来自图8A的细胞系的裂解功能。图8C:SKOV3细胞相对于同种型对照(灰色)的Her2(红色)和EGFR(蓝色)表达染色。图8D:用50nM myc-9.26-ST(αHer2;蓝色)武装的、50nM Flag-Eo1-ST(αEGFR;红色)武装的或用两者各50nM(绿色)同时武装的并与SKOV3肿瘤细胞共培养的SpyCatcher-BBζT细胞。20小时后计算残留萤光素酶表达。所有共培养均使用7:1E:T比率进行。图8D的统计学显著性使用带有Tukey post-test的单向ANOVA计算。误差杆代表平均值+/-标准偏差。数据点是三个重复的平均值。显示了代表性T细胞供体。*P<0.05;**P<0.01;***P<0.001。

[0101] 图9是显示SpyCatcher T细胞和CAR T细胞裂解功能比较的图。用1000nM赫赛汀-ST武装的SpyCatcher T细胞或4D5 CAR T细胞在SKOV3(Her2+)肿瘤细胞存在下以不同E:T比率共培养。在20小时后计算残留萤光素酶表达并在每个E:T比率针对未转导T细胞进行标

准化。误差杆代表平均值+/-标准偏差。数据点是三个重复的平均值。显示了代表性T细胞供体。

[0102] 图10是一系列直方图，显示武装SpyCatcher受体转换(turnover)的基础速率。静息的SpyCatcher T细胞最大程度地用赫赛汀-ST武装，每24小时分析加载的受体，以确定加载的受体从细胞表面丢失的速率。未武装的SpyCatcher T细胞被染色作为阴性对照(灰色直方图)。

[0103] 图11是显示用SpyCatcher-BBζT细胞治疗不会导致体重变化的图。NSG小鼠(每组n＝4)在第0天腹膜内注射1×10^6个SKOV3肿瘤细胞，然后在第7天注射12.5×10^6赫赛汀-ST武装的SpyCatcher-BBζT细胞。在第8天施用赫赛汀-ST，随后每3天注射。注射量表示每只小鼠的剂量。(A)在治疗过程中监测每只小鼠的体重。在治疗组中未观察到体重变化，而在对照组中由于腹水形成而发生体重变化的增加。误差杆代表平均值+/-标准偏差。

[0104] 图12是显示SpyCatcher T细胞在侵袭性S.C.肿瘤模型中减缓肿瘤生长速率的一系列图。NSG小鼠(每组n＝5)在第0天皮下注射1×10^6个SKOV3肿瘤细胞，然后在第6天注射12.5×10^6个用赫赛汀-ST武装的SpyCatcher-BBζT细胞。T细胞输注一天后施用50μg赫赛汀-ST靶向配体，随后在整个研究中每3天注射。通过卡尺测量(A)监测肿瘤体积。黑线代表单个小鼠，而红线代表平均肿瘤体积。相对于SpyCatcher-BBζ单独组，肿瘤生长显著降低的时间点用星号(*)标注。*P<0.05;**P<0.01;***P<0.001。

[0105] 图13显示SpyCatcher受体的转导效率，所述受体包含GFP和受体上游的T2A位点。

[0106] 图14示出SpyCatcher免疫受体被表达并且能够与SpyTag标记的配体共价加载。具体地，显示了代表包含GFP的SpyCatcher003-BBζ与myc-Her2 DARPin-SpyTag003加载的图。表达SpyCatcher003-BBz的T细胞与myc-Her-2 DARPin-SpyTag003(1000nM)一起温育30分钟。用Alexa647荧光缀合的抗myc抗体检测受体加载并通过流式细胞术评估。

[0107] 图15A-图15B示出SpyTag003在表达SpyCatcher003的T细胞上的滴定。SpyCatcher003-ΔζT细胞与增加浓度的myc-TL-SpyTag003一起温育5分钟或30分钟。通过流式细胞术测量Myc表达以量化受体加载。峰值加载为100-200nM并在较高浓度下降低。

[0108] 详细描述

[0109] 本发明涉及使用经工程改造以表达通用免疫受体的细胞的肿瘤的多抗原靶向、可控细胞活性和选择性靶向。通用免疫受体代表了一种迅速出现的过继性T细胞治疗形式，具有克服传统嵌合抗原受体(CAR)T细胞治疗面临的安全性和抗原逃逸挑战的潜力。通过双功能抗原特异性靶向配体将抗原识别和T细胞信号传导结构域解偶联，通用免疫受体可以调节T细胞效应器功能并以单一受体靶向多种抗原。本文描述了SpyCatcher免疫受体的开发，这是第一个通用免疫受体，它允许通过SpyCatcher-SpyTag化学在T细胞表面进行靶向配体的翻译后共价连接。通过在体外和体内添加SpyTag标记的靶向配体，SpyCatcher免疫受体将原代人T细胞重定向到多种肿瘤抗原。SpyCatcher T细胞活性依赖于靶抗原和SpyTag标记的靶向配体二者的存在，允许功能的剂量依赖性控制。受体和靶向配体之间共价键形成的突变破坏仍然允许重定向T细胞功能，但显著损害抗肿瘤功能。因此，SpyCatcher免疫受体允许快速的抗原特异性受体组装、多抗原靶向和可控的T细胞活性。

[0110] 本发明涉及用于过继细胞治疗的组合物和方法，其可用于治疗多种疾病，包括癌症、感染和自身免疫性疾病。本发明涉及一种用于T细胞过继细胞转移的策略，该T细胞经修

饰以表达通用免疫受体，在本文称为SpyTag和SpyCatcher通用免疫受体。本发明的受体是将对希望的抗原的特异性与T细胞受体活化细胞内结构域组合以产生表现出特异性免疫活性的嵌合蛋白的分子。在一个实施方案中，本发明的SpyTag和SpyCatcher通用免疫受体包含胞外标记结合结构域、跨膜结构域和细胞质结构域或胞内结构域。

[0111] 本发明通过将短核苷酸序列掺入免疫受体构建体中提供通用免疫受体策略，所述免疫受体构建体包含用于T细胞活化的细胞内信号传导成分、跨膜区和融合肽标签的细胞外铰链区。在一个实施方案中，T细胞被工程化为在其表面上表达SpyCatcher，其可以被任何掺入SpyTag部分的分子结合。在另一个实施方案中，T细胞被工程化为在其表面上表达SpyTag免疫受体，其可以被任何掺入SpyCatcher部分的分子结合。可以结合的分子包括但不限于那些可以将T细胞重定向到表面抗原的分子(例如抗体、scFv、受体、配体、适体等)或用于体内T细胞追踪的标记剂。此外，重定向分子(例如抗体)上的互配标签(reciprocal tag)可以通过与标记剂结合(例如通过缀合、融合或连接)来标记并用作用于诊断的抗原特异性标记剂，以确定患者进行临床试验资格，确定与靶组织中抗原的最大结合时间(在健康组织中没有残留药剂)，并作为监测治疗应答的一种手段。

[0112] 定义

[0113] 除非另有定义，否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。尽管与本文所述的那些相似或等效的任何方法和材料在实践中可用于测试本发明，但本文描述了优选的材料和方法。在描述和要求保护本发明时，将使用以下术语。

[0114] 还应理解，本文使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的，而不是限制性的。

[0115] 冠词“一个”和“一种”在本文中用于指代冠词的语法对象中的一个或多于一个(即至少一个)。举例来说，“一个元素”是指一个元素或多于一个元素。

[0116] 如本文所用，“大约”在提及诸如量、持续时间等的可测量值时，意在包括指定值±20％或±10％、更优选±5％、甚至更优选±1％并且更优选地是±0.1％的变化，当这样的变化适合于进行本文公开的方法时。

[0117] 如本文所用，“活化”是指已被充分刺激以诱导可检测的细胞增殖的T细胞的状态。活化也可以与诱导的细胞因子产生和可检测的效应功能有关。术语“活化的T细胞”尤其是指正在经历细胞分裂的T细胞。

[0118] 如本文所用，术语“抗体”是指与抗原特异性结合的免疫球蛋白分子。抗体可以是源自天然来源或重组来源的完整免疫球蛋白，也可以是完整免疫球蛋白的免疫反应性部分。抗体典型是免疫球蛋白分子的四聚体。本发明中的抗体可以多种形式存在，包括例如多克隆抗体、单克隆抗体、Fv、Fab和$F(ab)_2$，以及单链抗体和人源化抗体(Harlow et al.,1999,In:Using Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,NY;Harlow et al.,1989,In:Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor,New York;Houston et al.,1988,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883;Bird et al.,1988,Science 242:423-426)。

[0119] 术语“抗体片段”是指完整抗体的一部分并且是指完整抗体的抗原决定可变区。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab’、$F(ab')_2$和Fv片段、线性抗体、scFv抗体和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0120] 如本文所用，“抗体重链”是指在所有抗体分子中以其天然存在的构象存在的两种类型多肽链中较大者。

[0121] 如本文所用，“抗体轻链”是指在所有抗体分子中以其天然存在的构象存在的两种类型的多肽链中的较小者。κ和λ轻链是指两种主要的抗体轻链同种型。

[0122] 如本文所用，术语“合成抗体”是指使用重组DNA技术产生的抗体，例如由如本文所述的噬菌体表达的抗体。该术语还应解释为表示通过合成编码抗体的DNA分子产生的抗体，并且所述DNA分子表达抗体蛋白或限定抗体的氨基酸序列，其中DNA或氨基酸序列使用本领域可得和熟知的合成DNA或氨基酸序列技术获得。

[0123] 如本文所用，术语“抗原”或“Ag”定义为引发免疫应答的分子。这种免疫应答可涉及抗体产生，或特异免疫活性细胞的活化，或两者。本领域技术人员将理解任何大分子，包括几乎所有的蛋白质或肽，都可以用作抗原。此外，抗原可以来源于重组或基因组DNA。本领域技术人员将理解，包含编码引发免疫应答的蛋白质的核苷酸序列或部分核苷酸序列的任何DNA因此编码如本文所用的术语“抗原”。此外，本领域技术人员将理解抗原不需要仅由基因的全长核苷酸序列编码。很明显，本发明包括但不限于使用一种以上基因的部分核苷酸序列并且这些核苷酸序列以各种组合排列以引发所需的免疫应答。此外，本领域技术人员将理解抗原不必须由“基因”编码。很明显，抗原可以合成产生或衍生自生物学样品。这种生物学样品可以包括但不限于组织样品、肿瘤样品、细胞或生物学流体。

[0124] 如本文所用，术语“抗肿瘤作用”是指可以通过肿瘤体积减小、肿瘤细胞数量减少、转移灶数量减少、预期寿命增加或与癌症状况相关的各种生理症状的改善而体现的生物学作用。“抗肿瘤作用”也可以通过本发明的肽、多核苷酸、细胞和抗体首先预防肿瘤发生的能力来体现。

[0125] 根据本发明，术语“自身抗原”是指被免疫系统错误识别为外来的任何自身抗原。自身抗原包括但不限于细胞蛋白、磷蛋白、细胞表面蛋白、细胞脂质、核酸、糖蛋白，包括细胞表面受体。

[0126] 如本文所用，术语“自身免疫疾病”定义为由自身免疫应答引起的病症。自身免疫疾病是对自身抗原的不适当和过度应答的结果。自身免疫疾病的例子包括但不限于Addision病、大脱发、强直性脊柱炎、自身免疫性肝炎、自身免疫性腮腺炎、克罗恩病、糖尿病(I型)、营养不良性大疱性表皮松解症、附睾炎、肾小球肾炎、格雷夫斯病、格林-巴尔病综合征、桥本氏病、溶血性贫血、系统性红斑狼疮、多发性硬化症、重症肌无力、寻常型天疱疮、牛皮癣、风湿热、类风湿性关节炎、结节病、硬皮病、干燥综合征、脊椎关节病、甲状腺炎、血管炎、白癜风、粘液性水肿、恶性贫血、溃疡性结肠炎等。

[0127] 如本文所用，术语“自体”意指源自同一个体随后被重新引入该个体的任何材料。

[0128] “同种异体”是指源自同一物种的不同动物的移植物。

[0129] “异种”是指来源于不同物种的动物的移植物。

[0130] 如本文所用，术语“癌症”定义为以异常细胞快速且不受控制的生长为特征的疾病。癌细胞可以在局部或通过血流和淋巴系统扩散到身体的其它部位。各种癌症的实例包括但不限于乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、胰腺癌、结肠直肠癌、肾癌、肝癌、脑癌、淋巴瘤、白血病、肺癌等。

[0131] 如本文所用，术语“共刺激配体”包括抗原呈递细胞(例如，aAPC、树突细胞、B细胞

等)上的分子,其特异性结合T细胞上的关联共刺激分子,从而提供信号,该信号在由例如TCR/CD3复合物与载有肽的MHC分子结合所提供的第一信号之外,介导T细胞应答,包括但不限于增殖、活化、分化等。共刺激配体可包括但不限于CD7、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、诱导型共刺激配体(ICOS-L)、细胞间粘附分子(ICAM)、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB、HVEM、淋巴毒素β受体、3/TR6、ILT3、ILT4、HVEM、结合Toll配体受体的激动剂或抗体以及特异性结合B7-H3的配体。共刺激配体尤其还包括与存在于T细胞上的共刺激分子特异性结合的抗体,所述共刺激分子例如但不限于CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD3、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3以及与CD83特异性结合的配体。

[0132] “共刺激分子”是指T细胞上与共刺激配体特异性结合的关联结合配偶体(cognate binding partner),从而介导T细胞的共刺激应答,例如但不限于增殖。共刺激分子包括但不限于MHC I类分子、BTLA和Toll配体受体。

[0133] 如本文所用,“共刺激信号”是指与第一信号如TCR/CD3连接组合导致T细胞增殖和/或关键分子的上调或下调的信号。

[0134] “疾病”是动物的健康状态,其中动物不能维持稳态,并且如果疾病没有得到改善,那么动物的健康状况会继续恶化。相比之下,动物的“失调(disorder)”是一种健康状态,其中动物能够维持稳态,但动物的健康状态不如没有失调时的健康状态。如果不加以治疗,失调不一定会导致动物的健康状况进一步下降。

[0135] 如本文所用,“有效量”是指提供治疗或预防益处的量。

[0136] “编码”是指多核苷酸例如基因、cDNA或mRNA中具体核苷酸序列的固有特性,其在生物学过程中用作合成具有确定的核苷酸序列(即rRNA、tRNA和mRNA)或确定的氨基酸序列的其它聚合物和大分子的模板,以及由此产生的生物学特性。因此,如果相应于基因的mRNA的转录和翻译在细胞或其它生物学系统中产生蛋白,则该基因编码该蛋白。编码链(其核苷酸序列与mRNA序列相同,通常在序列表中提供)和非编码链(用作基因或cDNA转录的模板)都可以称为编码该基因或cDNA的蛋白质或其它产物。

[0137] 如本文所用,“内源”是指来自生物体、细胞、组织或系统或在生物体、细胞、组织或系统内部产生的任何材料。

[0138] 如本文所用,术语“外源”是指从生物体、细胞、组织或系统引入或在生物体、细胞、组织或系统外部产生的任何材料。

[0139] 如本文所用,术语“表达”定义为由其启动子驱动的特定核苷酸序列的转录和/或翻译。

[0140] “表达载体”是指包含重组多核苷酸的载体,该重组多核苷酸包含与待表达的核苷酸序列可操作地连接的表达控制序列。表达载体包含足够的用于表达的顺式作用元件;用于表达的其它元件可由宿主细胞提供或在体外表达系统中提供。表达载体包括本领域已知的所有那些,例如掺入重组多核苷酸的粘粒、质粒(例如裸的或包含在脂质体中的)和病毒(例如慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0141] “同源”是指两个多肽之间或两个核酸分子之间的序列相似性或序列相同性。当两个比较序列中的一个位置被相同碱基或氨基酸单体亚基占据时,例如,如果两个DNA分子中每个分子中的一个位置被腺嘌呤占据,那么这两个分子在该位置是同源的。两个序列之间

的同源性百分比是两个序列共有的匹配或同源位置的数量除以比较的位置数量×100的函数。例如，如果两个序列中10个位置中有6个是匹配的或同源的，那么这两个序列是60％同源的。例如，DNA序列ATTGCC和TATGGC具有50％同源性。通常，当两个序列比对以获得最大同源性时进行比较。

[0142] 如本文所用，术语“免疫球蛋白”或“Ig”被定义为一类蛋白质，其作为抗体起作用。B细胞表达的抗体有时称为BCR(B细胞受体)或抗原受体。这类蛋白质中包括的五个成员是IgA、IgG、IgM、IgD和IgE。IgA是存在于身体分泌物例如唾液、眼泪、乳汁、胃肠道分泌物以及呼吸道和泌尿生殖道的粘液分泌物中的一级抗体。IgG是最常见的循环抗体。IgM是大多数受试者的初级免疫应答中产生的主要免疫球蛋白。它是凝集、补体结合和其它抗体应答中最有效的免疫球蛋白，在防御细菌和病毒方面很重要。IgD是没有已知抗体功能但可以作为抗原受体的免疫球蛋白。IgE是通过在暴露于过敏原时引起肥大细胞和嗜碱性粒细胞释放介质来介导速发型超敏反应的免疫球蛋白。

[0143] 如本文所用，“说明材料”包括出版物、记录、图表或可用于传达本发明的组合物和方法的有用性的任何其它表达媒介。本发明的试剂盒的说明材料可以，例如，固定在含有本发明的核酸、肽和/或组合物的容器上，或者与含有核酸、肽和/或组合物的容器一起运输。或者，说明材料可以与容器分开运输，目的是让接收者协同使用说明材料和化合物。

[0144] “分离的”是指从自然状态改变或移出。例如，活体动物中天然存在的核酸或肽不是“分离的”，但与其天然状态的共存材料部分或完全分离的相同核酸或肽是“分离的”。分离的核酸或蛋白质可以以基本上纯化的形式存在，或者可以存在于非天然环境例如宿主细胞中。

[0145] 在本发明的上下文中，使用以下常用核酸碱基的缩写。“A”是指腺苷，“C”是指胞苷，“G”是指鸟苷，“T”是指胸苷，“U”是指尿苷。

[0146] 除非另有说明，否则“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括彼此为简并形式且编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。短语编码蛋白质或RNA的核苷酸序列也可以包括内含子，以至于编码蛋白质的核苷酸序列在某些版本中可以包含内含子。

[0147] 如本文所用，“慢病毒”是指逆转录病毒科的一个属。慢病毒在逆转录病毒中是独特的，其能够感染非分裂细胞；它们可以将大量遗传信息传递到宿主细胞的DNA中，因此它们是最有效的基因递送载体方法之一。HIV、SIV和FIV都是慢病毒的例子。源自慢病毒的载体提供了在体内实现显著水平的基因转移的手段。

[0148] 如本文所用，术语“调节”是指与不存在治疗或化合物时受试者的应答水平相比，和/或与其它方面相同但未经治疗的受试者的应答水平相比，介导受试者的应答水平可检测地增加或降低。该术语包括扰乱和/或影响天然信号或应答，从而在受试者优选人类中介导有益的治疗应答。

[0149] 除非另有说明，否则“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括彼此为简并形式且编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。编码蛋白质和RNA的核苷酸序列可包括内含子。

[0150] 术语“可操作地连接”是指调节序列和异源核酸序列之间的功能性连接，导致后者的表达。例如，当第一核酸序列与第二核酸序列处于功能关系时，第一核酸序列与第二核酸序列可操作地连接。例如，如果启动子影响编码序列的转录或表达，则启动子与编码序列可操作地连接。通常，可操作连接的DNA序列是连续的，并且在需要时将两个蛋白质编码区连

接在同一阅读框中。

[0151] 术语“过表达的”肿瘤抗原或肿瘤抗原的“过表达”旨在表示相对于来自该组织或器官的正常细胞中的表达水平而言，来自疾病区域例如患者的特定组织或器官内的实体瘤的细胞中肿瘤抗原的异常表达水平。患有实体瘤或以肿瘤抗原过表达为特征的血液恶性肿瘤的患者可以通过本领域已知的标准测定来确定。

[0152] 免疫原性组合物的“肠胃外”施用包括例如皮下(s.c.)、静脉内(i.v.)、肌内(i.m.)或胸骨内注射或输注技术。

[0153] 术语“患者”、“受试者”、“个体”等在本文中可互换使用，是指适用于本文所述的方法的任何动物或其细胞，无论是体外还是原位。在某些非限制性实施方案中，患者、受试者或个体是人。

[0154] 如本文所用，术语“多核苷酸”定义为核苷酸链。此外，核酸是核苷酸的聚合物。因此，本文使用的核酸和多核苷酸是可互换的。本领域技术人员具有一般知识，即核酸是多核苷酸，可以水解成单体“核苷酸”。单体核苷酸可以水解成核苷。如本文所用，多核苷酸包括但不限于通过本领域可用的任何方式获得的所有核酸序列，包括但不限于重组方式，即使用普通克隆技术和PCR™等从重组文库或细胞基因组中克隆核酸序列，以及通过合成方式。

[0155] 如本文所用，术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换使用，是指由通过肽键共价连接的氨基酸残基组成的化合物。蛋白质或肽必须包含至少两个氨基酸，并且对可以构成蛋白质或肽序列的氨基酸的最大数量没有限制。多肽包括任何肽或蛋白质，其包含通过肽键彼此连接的两个或更多个氨基酸。如本文所用，该术语既指短链，其在本领域中也通常称为例如肽、寡肽和寡聚体，也指更长链，其在本领域中通常称为蛋白质，其有很多类型。“多肽”包括例如生物学活性片段、基本上同源的多肽、寡肽、同二聚体、异二聚体、多肽的变体、修饰的多肽、衍生物、类似物、融合蛋白等。多肽包括天然肽、重组肽、合成肽或它们的组合。

[0156] 如本文所用，术语“启动子”定义为由细胞的合成机制或引入的合成机制识别的DNA序列，其是启动多核苷酸序列的特异性转录所需的。

[0157] 如本文所用，术语“启动子/调节序列”是指与启动子/调节序列可操作连接的基因产物表达所需的核酸序列。在某些情况下，该序列可以是核心启动子序列，而在其它情况下，该序列还可以包括增强子序列和基因产物表达所需的其它调节元件。例如，启动子/调节序列可以是以组织特异性方式表达基因产物的序列。

[0158] “组成型”启动子是一种核苷酸序列，当其与编码或限定基因产物的多核苷酸可操作地连接时，导致在细胞的大部分或所有生理条件下在细胞中产生基因产物。

[0159] “诱导型”启动子是一种核苷酸序列，当与编码或限定基因产物的多核苷酸可操作地连接时，基本上仅当细胞中存在与该启动子相应的诱导物时才会导致在细胞中产生基因产物。

[0160] “组织特异性”启动子是一种核苷酸序列，当与编码基因或由基因限定的多核苷酸可操作地连接时，基本上仅当细胞是相应于该启动子的组织类型的细胞时才会导致在细胞中产生基因产物。

[0161] 如本文所用，关于抗体的术语“特异性结合”是指识别特定抗原但基本上不识别或结合样品中的其它分子的抗体。例如，特异性结合来自一种物种的抗原的抗体也可以结合来自一种或多种物种的抗原。但是，这种跨物种反应性本身并不会改变抗体的特异性分类。

在另一个例子中，特异性结合抗原的抗体也可以结合该抗原的不同等位基因形式。然而，这种交叉反应本身并不会改变抗体的特异性分类。在一些情况下，术语“特异性结合”可用于指抗体、蛋白质或肽与第二种化学物质的相互作用，以表示该相互作用取决于该化学物质上存在的特定结构(例如，抗原决定簇或表位)；例如，抗体识别并结合特定蛋白质结构，而不是一般的蛋白质。如果抗体对表位“A”具有特异性，则在含有标记的“A”和抗体的反应中，含有表位A(或游离、未标记的A)的分子的存在将减少与抗体结合的标记的A的量。

[0162] 术语“SpyTag”和“SpyCatcher”是指一种方便的蛋白质偶联工具，它克服了通常弱蛋白质-蛋白质相互作用(“Spy”指的是化脓性链球菌(Streptococcus pyogenes))。SpyTag/SpyCatcher系统非常适合结合、标记或固定化蛋白质，因为其会产生不可逆的肽连接。SpyTag是一种遗传编码的肽，其在结合其遗传编码的配偶体SpyCatcher时形成自发酰胺键。SpyTag在广泛条件下与SpyCatcher反应，反应后产物非常稳定((Zachari et al., 2012,PNAS vol.109:12,pp.690-697)。

[0163] 术语“刺激”是指通过刺激分子(例如TCR/CD3复合物)与其关联(cognate)配体结合诱导的初级应答，从而介导信号转导事件，例如但不限于，通过TCR/CD3复合物的信号转导。刺激可以介导某些分子的表达改变，例如TGF-β的下调和/或细胞骨架结构的重构等。

[0164] 如本文所用，术语“刺激分子”是指T细胞上与抗原呈递细胞上存在的关联刺激配体特异性结合的分子。

[0165] 如本文所用，“刺激性配体”是指当存在于抗原呈递细胞(例如aAPC、树突细胞、B细胞等)上时可以与T细胞上的关联结合配偶体(在本文中称为“刺激分子”)特异性结合的配体，从而介导T细胞的初级反应，包括但不限于活化、免疫应答的启动、增殖等。刺激性配体是本领域熟知的并且尤其包括装载有肽的MHC I类分子、抗CD3抗体、超激动剂抗CD28抗体和超激动剂抗CD2抗体。

[0166] 如本文所用，“基本上纯化的”细胞是基本上不含其它细胞类型的细胞。基本上纯化的细胞也指已经从在其天然存在的状态下通常相关的其它细胞类型中分离出来的细胞。在一些情况下，基本上纯化的细胞群是指同质细胞群。在其它情况下，该术语仅指已与在其天然状态下天然相关的细胞分离的细胞。在一些实施方案中，细胞在体外培养。在其它实施方案中，细胞不在体外培养。

[0167] 如本文所用，术语“治疗”是指治疗和/或预防。通过抑制、缓解或根除疾病状态来获得治疗效果。

[0168] 术语“治疗有效量”是指引起研究人员、兽医、医生或其它临床医生正在寻找的组织、系统或受试者的生物学或医学应答的主题化合物的量。术语“治疗有效量”包括这样的化合物的量，当施用时足以防止发展或在一定程度上减轻所治疗的病症或疾病的一种或多种体征或症状。治疗有效量将根据化合物、疾病及其严重程度以及待治疗受试者的年龄、体重等而变化。

[0169] 如本文所用，术语“治疗”疾病是指降低受试者所经历的疾病或失调的至少一种体征或症状的频率或严重性。

[0170] 如本文所用，术语“转染的”或“转化的”或“转导的”是指将外源核酸转移或引入宿主细胞的过程。“转染的”或“转化的”或“转导的”细胞是已经用外源核酸转染、转化或转导的细胞。该细胞包括原代主题细胞及其后代。

[0171] 如本文所用,短语“在转录控制下”或“可操作地连接”是指启动子相对于多核苷酸处于正确的位置和方向,以控制RNA聚合酶的转录起始和多核苷酸的表达。

[0172] 如本文所用,“通用免疫受体”是具有两个分裂但相互作用部分的受体,(i)一个或多个与胞外衔接分子相连的胞内T细胞信号传导结构域和(ii)能够通过互配衔接分子结合衔接分子并且还能够特异性结合靶(例如靶细胞上的抗原,例如由肿瘤细胞表达的抗原)的靶向配体。因此,靶向配体充当免疫桥梁,结合靶和受体上的胞外衔接分子,引发抗原特异性T细胞效应功能。

[0173] 如本文所用,“衔接分子(adaptor molecule)”和“互配衔接分子(reciprocal adaptor molecule)”(或“标签”和“互配标签”)是指结合对系统中的一对组件,其中该对中的每一个特异性地结合另一个。结合对系统的例子包括但不限于Spycatcher/SpyTag和生物素/抗生物素蛋白。结合可以是共价或非共价结合。“衔接分子”是指一对中的一个,“互配衔接分子”是指衔接分子的结合配偶体。因此,在Spycatcher/SpyTag系统中,例如衔接分子可以是SpyCatcher而互配衔接分子是SpyTag,或反之亦然,其中衔接分子可以是SpyTag而互配衔接分子是SpyCatcher。

[0174] 如本文所用,术语“武装受体(armed receptor)”或“武装通用免疫受体”是指一种通用免疫受体,其中其两个相互作用部分彼此连接或结合,即含有胞内T细胞信号传导结构域和胞外衔接分子的部分与能够通过互配衔接分子结合衔接分子并且能够特异性结合靶(例如由细胞如肿瘤细胞表达的抗原)的靶向配体连接或结合,从而使“武装受体”或“武装通用免疫受体”能够结合靶并引发抗原特异性T细胞效应功能。相反,“未武装受体”或“未武装通用免疫受体”是指一种通用免疫受体,其中其两个相互作用部分不彼此连接或结合,即含有胞内T细胞信号传导结构域和胞外衔接分子的部分不与能够通过互配衔接分子结合衔接分子并且能够特异性结合靶(例如由细胞如肿瘤细胞表达的抗原)的靶向配体连接或结合。

[0175] “载体”是包含分离的核酸并且可用于将分离的核酸递送至细胞内部的物质组合物。许多载体是本领域已知的,包括但不限于线性多核苷酸、与离子或两亲化合物相关的多核苷酸、质粒和病毒。因此,术语“载体”包括自主复制质粒或病毒。该术语还应解释为包括促进核酸转移到细胞中的非质粒和非病毒化合物,例如聚赖氨酸化合物、脂质体等。病毒载体的实例包括但不限于腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体等。

[0176] 范围:在本文中,本发明的各个方面可以以范围格式呈现。应当理解,范围格式的描述仅仅是为了方便和简洁,不应理解为对本发明范围的硬性限制。因此,范围的描述应该被认为已经具体公开了所有可能的子范围以及该范围内的各个数值。例如,对如1至6的范围的描述应该被认为具体公开了子范围如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等,以及该范围内的单个数字,例如1、2、2.7、3、4、5、5.3和6。无论范围的广度如何,这都适用。

[0177] 描述

[0178] 当前的基因工程细胞治疗在抗原特异性、患者可及性以及肿瘤或细胞类型方面受到限制。产生具有固定抗原特异性的CAR的替代方法是产生通用T细胞受体,该受体允许根据需要改变T细胞受体的特异性。这是通过工程化表达独特肽或蛋白质标签的T细胞来实现的,这些肽或蛋白质标签可以用与靶向配体(例如抗体、抗体结合结构域、蛋白质支架、适体、受体等)、成像剂、半抗原、酶等融合或附着的互补结合配偶体在翻译后标记。产生可以

随后用任何靶向配体标记的单一工程化通用T细胞的好处包括但不限于能够非常快速和容易地产生大型T细胞组,制备具有多种特异性的个体T细胞并随着时间改变T细胞特异性。

[0179] 为扩展原型CAR架构以允许对T细胞效应功能进行时间和定量控制,在Urbanska et al.,Cancer Research 2012,72(7),1844-1852中产生并披露了利用生物素和抗生物素蛋白之间相互作用的标签特异性受体。这种受体称为生物素结合免疫受体,属于快速扩展的一类正交受体,称为通用免疫受体(UIR)(Minutolo et al.,Frontiers in Oncology 2019,9,176;25-35;Clemenceau et al.,Blood 2006,107(12),4669-4677;Tamada et al.,lin Cancer Res 2012,18(23),6436-6445;Kudo et al.,Cancer Research 2013,74(1);Urbanska et al.,Journal of Translational Medicine 2014,12(1),347;Ochi et al.,Cancer Immunology 2014,2(3),249-262;Feldmann et al.,Oncotarget 2014,5(0);Kim et al.,J Am Chem Soc 2015,137(8),2832-2835;Rodgers et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.2016,113(4);Ma et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.2016,113(4),E450-E458;Cho et al.,Cell 2018,No.Mol.Ther.Oncolytics 3 2016)。UIR由两个分开但相互作用部分组成,(i)连接胞外衔接蛋白的标准胞内T细胞信号传导结构域和(ii)能够结合衔接蛋白的靶向配体。靶向配体充当免疫桥梁,结合靶细胞上的TAA和受体上的胞外衔接物,引发抗原特异性T细胞效应功能。

[0180] 通过将TAA识别与T细胞信号传导解偶联,UIR可以解决CAR T细胞目前面临的几个问题。UIR依赖于抗原特异性靶向配体的存在来驱动T细胞效应功能,因此允许对T细胞效应功能进行剂量依赖性控制(Minutolo et al.,Frontiers in Oncology 2019,9,176),并减轻使用CAR T细胞所见的由于快速活化和扩增所致的毒性,例如CRS(Rodgers et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.2016,113(4))。此外,UIR提供了模块化平台,能够通过使用多个靶向配体以单细胞产品靶向多个TAA,解决与单一抗原丢失相关的TAA异质性和复发问题。

[0181] 目前,所有UIR都依赖于靶向配体和UIR之间的非共价相互作用。在这里,我们详细介绍了下一代UIR系统的开发,该系统允许通过使用SpyCatcher-SpyTag化学将靶向结构域与受体进行翻译后共价连接。由Zakeri等人开发,蛋白质SpyCatcher与其关联肽SpyTag之间的相互作用导致快速自发形成共价酰胺键(Zakeri et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.2012,109(12),E690-7)。肽-蛋白质对之间的反应发生在一系列生理相关的温度和pH水平,使其成为体内使用的潜在候选者(Zakeri et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.2012,109(12),E690-7)。

[0182] SpyCatcher-SpyTag还被用于标记内源表达含有SpyCatcher和SpyTag结构域的蛋白质的活哺乳动物细胞培养物以及转基因秀丽隐杆线虫(C.elegans)中的膜驻留受体(Bedbrook et al.,Chem.Biol.2015,22(8),1108-1121)。总之,广泛的稳健反应条件加上其在哺乳动物细胞和活生物体中的应用使得SpyCatcher-SpyTag系统成为模拟CAR从头组装UIR架构的有利选择。

[0183] 本文描述了一种SpyCatcher免疫受体,其被开发为含有作为其胞外结构域与标准第二代CAR胞内信号传导结构域相连接的SpyCatcher蛋白。添加用SpyTag标记的TAA特异性靶向配体使得通过自发自催化异肽键形成按需形成CAR样受体。表达SpyCatcher免疫受体的原代人类T细胞可以定量加载靶向配体,实现对重定向T细胞效应功能和肿瘤细胞裂解的

剂量可滴定控制。即使作为单细胞产品，SpyCatcher免疫受体T细胞也可以通过添加用SpyTag位点特异性标记的临床级抗体以及遗传融合SpyTag的靶向配体来识别一系列肿瘤抗原。本文所述结果证明了SpyCatcher免疫受体系统的灵活性和功效。

[0184] 多抗原靶向

[0185] 本发明涉及经工程化表达通用免疫受体的细胞靶向多种抗原特别是肿瘤表达的两种或更多种不同抗原的用途。如本文进一步所述，发现双重武装(dual armed) SpyCatcher-BBζ T相对于单独单武装的细胞实现了增加的肿瘤裂解(图8D)。已经证明，用两种具有不同特异性的抗体(以特定剂量)武装SpyCatcher T细胞增强了针对共表达两种不同抗原的癌细胞的活性。

[0186] 因此，在一个方面，提供了一种用于在哺乳动物中刺激对肿瘤的通用免疫受体介导的免疫应答的方法，其中所述肿瘤共表达至少两种不同的抗原。在另一个方面，提供了一种在有需要的哺乳动物中治疗癌症的方法，其中所述癌症共表达至少两种不同的抗原。在一个实施方案中，所述方法包括步骤：(a)给哺乳动物施用经遗传修饰以表达免疫受体的细胞，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，(b)给哺乳动物施用与SpyCatcher或SpyTag连接的第一药剂，其中第一药剂特异性结合由所述肿瘤表达的第一抗原，和(c)给哺乳动物施用与互配衔接分子连接的第二药剂，其中第二药剂特异性结合由所述肿瘤表达的第二抗原，其中第一抗原和第二抗原是不同的抗原。

[0187] 在一些方面，提供了经遗传修饰的细胞、第一药剂和第二药剂用于在有需要的哺乳动物中刺激对肿瘤的通用免疫受体介导的免疫应答或用于在有需要的哺乳动物中治疗癌症，其中所述肿瘤或癌症共表达至少两种不同的抗原，其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，其中第一药剂与互配衔接分子连接，并且其中第一药剂特异性结合由所述肿瘤或癌症表达的第一抗原；其中第二药剂与互配衔接分子连接，并且其中第二药剂特异性结合由所述肿瘤或癌症表达的第二抗原；其中第一抗原和第二抗原是不同的抗原，并且其中将所述免疫受体、第一药剂和第二药剂施用给哺乳动物。

[0188] 在其它方面，提供了经遗传修饰的细胞、第一药剂和第二药剂在有需要的哺乳动物中刺激对肿瘤的通用免疫受体介导的免疫应答或在有需要的哺乳动物中治疗癌症的用途，其中所述肿瘤或癌症共表达至少两种不同的抗原，其中所述细胞被遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，其中第一药剂与互配衔接分子连接，并且其中第一药剂特异性结合由所述肿瘤或癌症表达的第一抗原；其中第二药剂与互配衔接分子连接，并且其中第二药剂特异性结合由所述肿瘤或癌症表达的第二抗原；其中第一抗原和第二抗原是不同的抗原，并且其中将所述免疫受体、第一药剂和第二药剂施用给哺乳动物。

[0189] 在一些实施方案中，衔接分子是SpyCatcher并且互配衔接分子是SpyTag。在一些实施方案中，衔接分子是SpyTag并且互配衔接分子是SpyCatcher。

[0190] 在一些实施方案中，与仅施用第一药剂或仅施用第二药剂相比，施用第一药剂和第二药剂两者导致增强的抗肿瘤活性。在一些实施方案中，与仅施用第一药剂或仅施用第二种药剂时达到的抗肿瘤活性水平相比，当施用较低量的第一药剂和/或第二药剂彼此组

合时达到相似或相同水平的抗肿瘤活性。

[0191] 在一些实施方案中,衔接分子是SpyCatcher并且互配衔接分子是SpyTag。在一些实施方案中,衔接分子是SpyTag并且互配衔接分子是SpyCatcher。

[0192] 在一些实施方案中,胞外结构域包含SpyCatcher或SpyTag。在一个实施方案中,胞外结构域包含SpyCatcher。

[0193] 在一些实施方案中,所述药剂与SpyTag或SpyCatcher连接。在一个实施方案中,所述药剂与SpyTag连接。在另一个实施方案中,所述药剂是抗体、抗体片段、scFv或DARPin。在另一个实施方案中,所述药剂是抗体。在一个实施方案中,所述药剂是人IgG。

[0194] 在一个实施方案中,SpyTag或SpyCatcher通过光活化位点特异性缀合(LASIC)与所述药剂连接。在一个实施方案中,所述细胞是T细胞、天然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、巨噬细胞、干细胞或调节性T细胞。在一个实施方案中,所述细胞是T细胞。在另一个实施方案中,所述细胞是自体细胞。

[0195] 在另一个实施方案中,所述通用免疫受体还包含共刺激分子的胞内结构域。在一些实施方案中,所述共刺激分子是4-1BB、CD28、CD27、CD2、CD3、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3或与CD83特异性结合的配体。在一个实施方案中,所述抗原是HER2、EGFR、EpCAM或CD20。

[0196] 在一个实施方案中,在施用给哺乳动物之前,使所述细胞与所述药剂接触以产生预武装细胞并且随后将预武装细胞施用给哺乳动物。在另一个实施方案中,其中在将所述药剂施用给哺乳动物之前,将所述细胞施用给哺乳动物。在一些实施方案中,选择或调整施用的药剂的量和/或细胞数量或量以产生所需水平的裂解活性。

[0197] 裂解活性的控制

[0198] 在另一方面,提供了产生一定水平的针对肿瘤的裂解活性的方法。在又一方面,提供了治疗受试者(例如哺乳动物)中癌症的方法,其中所述方法提供了对针对所述癌症的裂解活性水平的控制。虽然大多数药物允许调整剂量并遵循可预测的药代动力学和药效学,但传统CAR T细胞治疗是活药物,在它们输注后不易控制。在识别靶抗原后,被施用的CAR T细胞可以在接受者体内迅速大量增殖并释放促炎细胞因子,在一些情况下,导致严重的甚至有时是致命的副作用。如本文其它地方所述,已证实表达SpyCatcher免疫受体的原代人T细胞可以定量加载靶向配体,允许对重定向的T细胞效应功能和肿瘤细胞裂解进行剂量可滴定的控制。

[0199] 在一个实施方案中,所述方法包括将一定量的细胞与一定量的与互配衔接分子连接的药剂接触的步骤,其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体,所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和胞外结构域,其中所述胞外结构域包含衔接分子,其中所述药剂特异性结合由所述肿瘤表达的抗原,并且其中选择所述药剂的量和/或细胞数以产生针对所述肿瘤的裂解活性水平。在另一个实施方案中,所述方法包括步骤:(a)给哺乳动物施用一定量的经遗传修饰以表达免疫受体的细胞,所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域,(b)给哺乳动物施用一定量的与互配衔接分子连接的药剂,其中所述药剂特异性结合由所述癌症表达的抗原,其中选择所述细胞的量和/或所述药剂的量以提供一定水平的针对所述癌症的裂解活性。

[0200] 在一个方面,提供了在有需要的哺乳动物中用于产生一定水平的针对肿瘤的裂解

活性或用于治疗癌症的经遗传修饰的细胞和药剂,其中所述细胞被遗传修饰以表达免疫受体,所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域,其中所述药剂与互配衔接分子连接,并且其中所述药剂特异性结合由所述肿瘤或癌症表达的抗原;其中将一定量的所述细胞与一定量的所述药剂接触并且其中选择所述药剂的量相对于所述细胞的量以产生所述水平的针对所述肿瘤或癌症的裂解活性。

[0201] 在另一方面,提供了经遗传修饰的细胞和药剂在有需要的哺乳动物中产生一定水平的针对肿瘤的裂解活性或治疗癌症的用途,其中所述细胞被遗传修饰以表达免疫受体,所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域,其中所述药剂与互配衔接分子连接,并且其中所述药剂特异性结合由所述肿瘤或癌症表达的抗原;其中将一定量的所述细胞与一定量的所述药剂接触并且其中选择所述药剂的量相对于所述细胞的量以产生所述水平的针对所述肿瘤或癌症的裂解活性。

[0202] 裂解活性水平可以是所选择的任何水平,例如,有效裂解肿瘤细胞并使哺乳动物中不希望的副作用最小化的裂解活性水平。裂解活性水平可以是预先确定的裂解活性水平。在一些实施方案中,裂解活性水平为至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、或至少90%细胞毒性。在一个实施方案中,增加相对于所述细胞的量的药剂的量(例如增加武装剂量)会增加裂解活性水平。在另一个实施方案中,减少相对于所述细胞的量的药剂的量(例如减少武装剂量)会降低裂解活性水平。

[0203] 在一个实施方案中,所述方法包括确定哺乳动物的肿瘤负荷或癌症负荷并选择相对于所述细胞的量的所述药剂的量以基于肿瘤负荷或癌症负荷产生针对所述肿瘤或癌症的裂解活性水平。肿瘤负荷或癌症负荷可以通过标准技术来确定,例如测量实体瘤的肿瘤大小、循环癌细胞的数量(例如对于白血病患者)或确定癌症标志物的水平。

[0204] 在一个实施方案中,所述方法包括给哺乳动物施用一定剂量的所述细胞和/或一定量的所述药剂,确定治疗是否有效并且如果无效则增加所述细胞的剂量和/或所述药剂的量。在一个实施方案中,给哺乳动物施用更多的所述药剂。在一个替代实施方案中,给哺乳动物施用本文定义的第二(或另外的)药剂。

[0205] 在一些实施方案中,衔接分子是SpyCatcher并且互配衔接分子是SpyTag。在一些实施方案中,衔接分子是SpyTag并且互配衔接分子是SpyCatcher。

[0206] 在一些实施方案中,胞外结构域包含SpyCatcher或SpyTag。在一个实施方案中,胞外结构域包含SpyCatcher。

[0207] 在一些实施方案中,所述药剂与SpyTag或SpyCatcher连接。在一个实施方案中,所述药剂与SpyTag连接。在另一个实施方案中,所述药剂是抗体、抗体片段、scFv或DARPin。在另一个实施方案中,所述药剂是抗体。在一个实施方案中,所述药剂是人IgG。

[0208] 在一个实施方案中,衔接分子或互配衔接分子通过光活化位点特异性缀合(LASIC)与所述药剂连接。在一个实施方案中,SpyTag或SpyCatcher通过光活化位点特异性缀合(LASIC)与所述药剂连接。在一个实施方案中,所述细胞是T细胞、天然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、巨噬细胞、干细胞或调节性T细胞。在一个实施方案中,所述细胞是T细胞。在另一个实施方案中,所述细胞是自体细胞。

[0209] 在另一个实施方案中,所述通用免疫受体还包含共刺激分子的胞内结构域。在一些实施方案中,所述共刺激分子是4-1BB、CD28、CD27、CD2、CD3、OX40、CD30、CD40、PD-1、

ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3或与CD83特异性结合的配体。

[0210] 在一个实施方案中,所述抗原是HER2、EGFR、EpCAM或CD20。

[0211] 在一个实施方案中,在施用给哺乳动物之前,将所述细胞与所述药剂接触以产生预武装细胞并且随后将预武装细胞施用给哺乳动物。在另一个实施方案中,其中在将所述药剂施用给哺乳动物之前将所述细胞施用给哺乳动物。在一些实施方案中,选择或调整施用的药剂的量和/或细胞的数量或量以产生所需水平的裂解活性。

[0212] “按需(On-Demand)”靶向

[0213] 在另一方面,本发明提供了在哺乳动物中刺激对肿瘤的通用免疫受体介导的免疫应答的方法和在有需要的哺乳动物中治疗癌症的方法,其使用肿瘤的“按需”靶向。如本文其它地方所述,发现武装的但不是未武装的SpyCatcher T细胞能够靶向和杀死表达抗原的肿瘤细胞,并且进一步证实未武装的SpyCatcher T细胞效应功能可以在随后添加靶向配体到未武装的SpyCatcher T细胞时暂时触发。因此,可以将未武装的SpyCatcher T细胞施用于受试者,其中未武装的细胞在受试者中存在癌细胞时是惰性的,并且可以在后来施用靶向配体以武装SpyCatcher T细胞并触发肿瘤裂解,使得“按需”触发癌症杀伤能力。

[0214] 因此,在一个实施方案中,所述方法包括步骤:(a)给哺乳动物施用经遗传修饰以表达免疫受体的细胞,所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域,(b)随后给哺乳动物施用与互配衔接分子连接的药剂,其中所述药剂特异性结合所述肿瘤表达的抗原。

[0215] 在另一方面,提供了经遗传修饰的细胞和药剂用于在有需要的哺乳动物中刺激对肿瘤的通用免疫受体介导的免疫应答或用于在有需要的哺乳动物中治疗癌症,其中所述细胞被遗传修饰以表达免疫受体,所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域,其中所述药剂与互配衔接分子连接,并且其中所述药剂特异性结合所述肿瘤表达的抗原;其中将一定量的所述细胞施用给哺乳动物,随后将一定量的所述药剂施用给哺乳动物。

[0216] 在另一方面,提供了经遗传修饰的细胞和药剂在有需要的哺乳动物中刺激对肿瘤的通用免疫受体介导的免疫应答或在有需要的哺乳动物中治疗癌症的用途,其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体,所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域,其中所述药剂与互配衔接分子连接,并且其中所述药剂特异性结合所述肿瘤表达的抗原;其中将一定量的所述细胞施用给哺乳动物,随后将一定量的所述药剂施用给哺乳动物。

[0217] 在一些实施方案中,衔接分子是SpyCatcher并且互配衔接分子是SpyTag。在一些实施方案中,衔接分子是SpyTag并且互配衔接分子是SpyCatcher。

[0218] 在一些实施方案中,所述胞外结构域包含SpyCatcher或SpyTag。在一个实施方案中,所述胞外结构域包含SpyCatcher。

[0219] 在一些实施方案中,所述药剂与SpyTag或SpyCatcher连接。在一个实施方案中,所述药剂与SpyTag连接。在另一个实施方案中,所述药剂是抗体、抗体片段、scFv或DARPin。在另一个实施方案中,所述药剂是抗体。在一个实施方案中,所述药剂是人IgG。

[0220] 在一个实施方案中,衔接分子或互配衔接分子通过光活化位点特异性缀合

(LASIC)与所述药剂连接。在一个实施方案中,SpyTag或SpyCatcher通过光活化位点特异性缀合(LASIC)与所述药剂连接。在一个实施方案中,所述细胞是T细胞、天然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、巨噬细胞、干细胞或调节性T细胞。在一个实施方案中,所述细胞是T细胞。在另一个实施方案中,所述细胞是自体细胞。

[0221] 在另一个实施方案中,所述通用免疫受体还包含共刺激分子的胞内结构域。在一些实施方案中,所述共刺激分子是4-1BB、CD28、CD27、CD2、CD3、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3或与CD83特异性结合的配体。

[0222] 在一个实施方案中,所述抗原是HER2、EGFR、EpCAM或CD20。

[0223] 在一些实施方案中,选择或调整施用的药剂的量和/或细胞的数量或量以产生所需水平的裂解活性。

[0224] 基于抗原表达水平靶向肿瘤

[0225] 令人惊讶地发现,用高浓度抗体武装的SpyCatcher-BBζT细胞而非SpyCatcher-28ζT细胞对高抗原表达靶细胞敏感,但对低抗原表达靶细胞不敏感。当与靶向健康组织上表达的高风险抗原的抗体一起应用时,这些发现对T细胞的安全性具有重要意义。

[0226] 因此,在其它方面,提供了一种在有需要的哺乳动物中刺激对肿瘤的通用免疫受体介导的免疫应答的方法和在有需要的哺乳动物中治疗癌症的方法,其使用经过工程化以表达含有4-1BB的胞内结构域的免疫受体的细胞。在一个实施方案中,所述方法包括步骤:(a)给哺乳动物施用一定量的经遗传修饰以表达通用免疫受体的细胞,所述通用免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、4-1BB的胞内结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域,和(b)给哺乳动物施用一定量的与互配衔接分子连接的药剂,其中所述药剂特异性结合由所述癌症表达的抗原,其中所述癌症被预先确定为以相对于参考水平增加的水平表达所述抗原。用于确定肿瘤中抗原表达水平的方法可以是本领域熟知的任何方法,例如免疫组化方法。

[0227] 在一些方面,提供了经遗传修饰的细胞和药剂用于在有需要的哺乳动物中刺激对肿瘤的通用免疫受体介导的免疫应答或用于在有需要的哺乳动物中治疗癌症,其中所述细胞被遗传修饰以表达免疫受体,所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、4-1BB的胞内结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域,其中所述药剂与互配衔接分子连接,并且其中所述药剂特异性结合由所述肿瘤或癌症表达的抗原;其中将有效量的所述细胞施用给哺乳动物并且将有效量的所述药剂施用给哺乳动物,并且其中所述癌症或肿瘤预先确定以相对于参考水平增加的水平表达所述抗原。

[0228] 在其它方面,提供了经遗传修饰的细胞和药剂在有需要的哺乳动物中刺激对肿瘤的通用免疫受体介导的免疫应答或在有需要的哺乳动物中治疗癌症的用途,其中所述细胞被遗传修饰以表达免疫受体,所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、4-1BB的胞内结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域,其中所述药剂与互配衔接分子连接,并且其中所述药剂特异性结合由所述肿瘤或癌症表达的抗原;其中给哺乳动物施用有效量的所述细胞并且给哺乳动物施用有效量的所述药剂,并且其中所述肿瘤或癌症预先确定以相对于参考水平增加的水平表达所述抗原。

[0229] 在一些实施方案中,衔接分子是SpyCatcher并且互配衔接分子是SpyTag。在一些

实施方案中,衔接分子是SpyTag并且互配衔接分子是SpyCatcher。

[0230] 在一些实施方案中,所述胞外结构域包含SpyCatcher或SpyTag。在一个实施方案中,所述胞外结构域包含SpyCatcher。

[0231] 在一些实施方案中,所述药剂与SpyTag或SpyCatcher连接。在一个实施方案中,所述药剂与SpyTag连接。在另一个实施方案中,所述药剂是抗体、抗体片段、scFv或DARPin。在另一个实施方案中,所述药剂是抗体。在一个实施方案中,所述药剂是人IgG。

[0232] 在一个实施方案中,衔接分子或互配衔接分子通过光活化位点特异性缀合(LASIC)与所述药剂连接。在一个实施方案中,SpyTag或SpyCatcher通过光活化位点特异性缀合(LASIC)与所述药剂连接。在一个实施方案中,所述细胞是T细胞、天然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、巨噬细胞、干细胞或调节性T细胞。在一个实施方案中,所述细胞是T细胞。在另一个实施方案中,所述细胞是自体细胞。

[0233] 在一个实施方案中,所述抗原是HER2、EGFR、EpCAM或CD20。

[0234] 在一个实施方案中,在施用给哺乳动物之前,将所述细胞与所述药剂接触以产生预武装细胞并且随后将预武装细胞施用给哺乳动物。在另一个实施方案中,其中在将所述药剂施用给哺乳动物之前将所述细胞施用给哺乳动物。在一些实施方案中,选择或调整施用的药剂的量和/或施用的细胞的数量或量以产生所需水平的裂解活性。

[0235] 组合物

[0236] 本发明提供了一种包含胞外和胞内结构域的通用免疫受体。胞外结构域包含独特的结合元件,称为胞外结合结构域。在一些实施方案中,胞外结构域还包含铰链区。胞内结构域或胞质结构域包含共刺激信号传导区和zeta链部分。共刺激信号传导区是指通用免疫受体的一部分,其包含共刺激分子的胞内结构域。共刺激分子是淋巴细胞对抗原的有效应答所需的抗原受体或其配体以外的细胞表面分子。

[0237] 在通用免疫受体的胞外结构域和跨膜结构域之间,或在通用免疫受体的胞质结构域和跨膜结构域之间,可以掺入间隔结构域。如本文所用,术语“间隔结构域”通常是指起到将跨膜结构域连接至多肽链中的胞外结构域或胞质结构域的功能的任何寡肽或多肽。间隔结构域可包含多达300个氨基酸,优选10至100个氨基酸,最优选25至50个氨基酸。

[0238] 本发明包括可以直接转导到细胞中的能够表达通用免疫受体的逆转录病毒和慢病毒载体构建体。本发明还包括可以直接转染到细胞中的RNA或DNA构建体。产生用于转染的mRNA的方法包括用专门设计的引物对模板进行体外转录(IVT),然后添加polyA,以产生构建体,所述构建体包含3’和5’非翻译序列(“UTR”)、5’帽和/或内部核糖体进入位点(IRES)、要表达的基因和polyA尾,通常长度为50-2000个碱基。这样产生的RNA可以有效地转染不同种类的细胞。在一个实施方案中,模板包括通用免疫受体的序列。

[0239] 可以制备编码通用免疫受体的多核苷酸载体。然后可以对细胞系进行工程化以表达通用免疫受体,并且可以分离表达通用免疫受体的细胞并将其用于本文公开的方法中。

[0240] 可以使用技术人员已知的技术配制表达通用免疫受体的细胞以施用于受试者。表达通用免疫受体的细胞的配制物可以包括药学上可接受的赋形剂。配制物中包括的赋形剂将具有不同目的,例如,取决于标记的性质、细胞组成和施用模式。常用赋形剂的实例包括但不限于:盐水、缓冲盐水、右旋葡萄糖、感染用水、甘油、乙醇及其组合、稳定剂、增溶剂和表面活性剂、缓冲剂和防腐剂、张度剂、填充剂和润滑剂。

[0241] 优选地，通用免疫受体包含胞外结构域、跨膜结构域和胞质结构域。胞外结构域和跨膜结构域可以源自这种结构域的任何所需来源。

[0242] 胞外标记结合结构域

[0243] 本发明的通用免疫受体的胞外结构域包含衔接分子(例如SpyTag或SpyCatcher)。在一个实施方案中，SpyTag或SpyCatcher与其互配标签即分别为SpyCatcher或SpyTag结合，其可以结合任何感兴趣的分子。在一个实施方案中，胞外结构域或互配标签可由Ig重链组成，该重链可由于CH1和铰链区的存在而与Ig轻链共价结合，或可由于铰链、CH2和CH3结构域的存在而与其它Ig重/轻链复合物共价结合。在后一种情况下，与嵌合构建体连接的重链/轻链复合物可以构成抗体，所述抗体具有与嵌合构建体的抗体特异性不同的特异性。根据抗体的功能、所希望的结构和信号转导，可以使用整条链或可以使用截短链，其中可以去除全部或部分CH1、CH2或CH3结构域，或者可以去除全部或部分铰链区。

[0244] 本发明基于使用SpyCatcher或SpyTag系统的过继性T细胞治疗的通用策略，该系统结合分别包含互配标签SpyTag或SpyCatcher的任何分子。本发明涵盖能够与SpyTag或SpyCatcher部分结合例如融合、缀合、连接或标记的任何分子。例如，本发明的分子包括蛋白质(抗体、抗体片段、scFv、蛋白质支架、受体、配体)、肽、寡核苷酸、成像/标记剂等。可用于本发明的其它类型标记的例子包括myc标签、FLAG标签、His标签、HA标签、荧光蛋白(例如绿色荧光蛋白(GFP))、荧光团(例如四甲基罗丹明(TRITC)、异硫氰酸荧光素(FITC))、二硝基苯酚、peridinin叶绿素蛋白复合物、绿色荧光蛋白、生物素、藻红蛋白(PE)、组氨酸、链霉抗生物素蛋白、抗生物素蛋白、辣根过氧化物酶、棕榈酰化、亚硝基化、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶、谷胱甘肽S-转移酶(GST)、麦芽糖结合蛋白、荧光素和任何类型的荧光材料，包括量子点纳米晶体、放射性同位素和用于放射性同位素标记的任何类型的化合物，包括1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)和1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸(NOTA)。

[0245] 在一个实施方案中，本发明的通用免疫受体包含靶特异性结合元件，称为抗原结合结构域。所述部分的选择取决于限定靶细胞表面的配体的类型和数量。例如，可以选择抗原结合结构域以识别作为与特定疾病状态相关的靶细胞上的细胞表面标志物的配体。因此，可作为本发明通用免疫受体中抗原部分结构域的配体的细胞表面标志物的实例包括与病毒、细菌和寄生虫感染、自身免疫疾病和癌细胞相关的那些。

[0246] 在一个实施方案中，逆转录病毒或慢病毒载体包含设计用于在T细胞表面上表达SpyTag或SpyCatcher的通用免疫受体，其可以结合任何掺入SpyTag或SpyCatcher的分子。在一个实施方案中，该分子包含靶特异性或抗原特异性结合元件。可以选择结合结构域来识别作为与特定疾病或病症相关的靶细胞上的细胞表面标志物的靶、配体或抗原。在一些实施方案中，所述抗原可与特定的过度增殖性失调相关。在一些方面，本发明的过度增殖性失调抗原来源于癌症，包括但不限于原发性或转移性黑素瘤、间皮瘤、胸腺瘤、淋巴瘤、肉瘤、肺癌、肝癌、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、白血病、子宫癌、宫颈癌、膀胱癌、肾癌和腺癌如乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、胰腺癌等。一般来说，所述癌症可以是任何类型的癌症，只要癌性肿瘤具有可以被本发明的SpyTag/SpyCatcher通用免疫受体系统识别的细胞表面抗原。

[0247] 本发明不限于针对肿瘤抗原的通用免疫受体。相反，与疾病或失调相关的任何靶、

配体或抗原都可以被本发明的通用免疫受体靶向。例如，在一个实施方案中，本发明的通用免疫受体靶向病毒抗原。在另一个实施方案中，本发明的通用免疫受体靶向自身抗原。自身抗原是通常被健康受试者耐受但在自身免疫性疾病中诱导适应性免疫应答的抗原。例如，表皮钙粘蛋白是一种自身抗原，可在寻常型天疱疮中诱导自身免疫应答。可用于被本发明的组合物靶向的其它非限制性自身抗原(与其相关的自身免疫疾病一起列出)包括胰腺β-细胞抗原(胰岛素依赖性糖尿病)、乙酰胆碱受体(重症肌无力)、甲状腺刺激激素受体(格雷夫斯病)、胰岛素受体(低血糖)、糖蛋白IIb/IIIa(免疫性血小板减少性紫癜)、Rh血型抗原(自身免疫性溶血性贫血)、类风湿因子IgG复合物(类风湿性关节炎)和髓鞘碱性蛋白(实验性自身免疫性脑脊髓炎、多发性硬化症)。

[0248] 跨膜结构域

[0249] 关于跨膜结构域，本发明的SpyTag/SpyCatcher通用免疫受体可以设计为包含与结合SpyTag/SpyCatcher系统的胞外结构域融合的跨膜结构域。在一个实施方案中，使用与通用免疫受体中的另一个结构域天然相关的跨膜结构域。在一些情况下，可以选择或通过氨基酸取代来修饰跨膜结构域，以避免这种结构域与相同或不同的表面膜蛋白的跨膜结构域结合，以使与受体复合物的其它成员的相互作用最小化。

[0250] 跨膜结构域可以来自天然来源或合成来源。在来源是天然的情况下，所述结构域可以衍生自任何膜结合或跨膜蛋白。在本发明中特别使用的跨膜区可以衍生自(即至少包含其跨膜区)T细胞受体的α、β或zeta链、CD28、CD3ε、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154。或者，跨膜结构域可以是合成的，在这种情况下，它将主要包含疏水残基，例如亮氨酸和缬氨酸。优选地，苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体将出现在合成跨膜结构域的每一端。任选地，优选长度为2至10个氨基酸的短寡肽或多肽接头可形成通用免疫受体的跨膜结构域和细胞质信号传导结构域之间的连接。甘氨酸-丝氨酸二联体提供了特别合适的接头。

[0251] 胞质结构域

[0252] 本发明的SpyTag/SpyCatcher通用免疫受体的胞质结构域或胞内信号传导结构域负责活化通用免疫受体已置入的免疫细胞的至少一种正常效应功能。术语“效应功能”是指细胞的专门功能。例如，T细胞的效应功能可以是细胞裂解活性或辅助活性，包括细胞因子分泌。因此，术语“胞内信号传导结构域”是指转导效应功能信号并指导细胞执行专门功能的蛋白质部分。虽然通常可以使用完整胞内信号传导结构域，但在许多情况下不需要使用完整链。就使用胞内信号传导结构域的截短部分而言，该截短部分可用于代替完整链，只要它转导效应功能信号即可。因此，术语胞内信号传导结构域意在包括足以转导效应功能信号的胞内信号传导结构域的任何截短部分。

[0253] 用于本发明的通用免疫受体的胞内信号传导结构域的优选实例包括T细胞受体(TCR)和共受体的细胞质序列，其在抗原受体接合后协同作用以启动信号转导，以及这些序列的任何衍生物或变体和具有相同功能能力的任何合成序列。

[0254] 已知仅通过TCR产生的信号不足以完全活化T细胞，还需要次级或共刺激信号。因此，可以说T细胞活化是由两类不同的细胞质信号传导序列介导的：那些通过TCR(初级细胞质信号传导序列)启动抗原依赖性初级活化的序列，以及那些以抗原非依赖性方式发挥作用以提供次级或共刺激信号的序列(次级细胞质信号传导序列)。

[0255] 初级细胞质信号传导序列以刺激方式或抑制方式调节TCR复合物的初级活化。以刺激方式起作用的初级细胞质信号传导序列可包含信号传导基序,称为基于免疫受体酪氨酸活化基序或ITAM。

[0256] 在本发明中特别使用的含有初级细胞质信号传导序列的ITAM的实例包括衍生自TCR zeta、FcRγ、FcRβ、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的那些。特别优选本发明的通用免疫受体中的细胞质信号传导分子包含源自CD3 zeta的细胞质信号传导序列。

[0257] 在一个优选的实施方案中,通用免疫受体的细胞质结构域可以设计为包含CD3-zeta信号传导结构域本身或其与在本发明的通用免疫受体的背景下有用的任何其它所希望的细胞质结构域组合。例如,通用免疫受体的细胞质结构域可以包含CD3 zeta链部分和共刺激信号区。共刺激信号区是指通用免疫受体的一部分,其包含共刺激分子的胞内结构域。共刺激分子是抗原受体或其配体以外的淋巴细胞对抗原的有效应答所需的细胞表面分子。这种分子的实例包括CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD3、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3和与CD83特异性结合的配体等。因此,虽然本发明主要以CD28和4-1BB作为共刺激信号传导元件来举例说明,但其它共刺激元件也在本发明的范围内。

[0258] 本发明的通用免疫受体的细胞质信号传导部分内的细胞质信号传导序列可以以随机或特定顺序彼此连接。任选地,优选长度为2至10个氨基酸的短寡肽或多肽接头可以形成连接。甘氨酸-丝氨酸双联体提供了特别合适的接头。

[0259] 在一个实施方案中,细胞质结构域被设计成包含CD3-zeta的信号传导结构域。在另一个实施方案中,细胞质结构域被设计为包含CD3-zeta、CD28、4-1BB等的任何组合。

[0260] 在一个实施方案中,SpyTag/SpyCatcher通用免疫受体可以基本上缺乏细胞质结构域或细胞质结构域可以基本上缺乏信号传导能力。在这样的实施方案中,SpyTag/SpyCatcher通用免疫受体可以用作锚定分子将标记的蛋白质包括但不限于抗体、细胞因子和成像部分附着到T细胞表面。

[0261] 分子的标记

[0262] 本发明包含SpyTag/SpyCatcher通用免疫受体,其针对具有互配SpyTag/SpyCatcher部分的经标记的分子。可以通过本领域已知的任何方法标记感兴趣的分子。例如,在一个实施方案中,包含标记分子的组合物与通用免疫受体结合。所述分子可以是例如包含抗原结合结构域或其片段的任何分子,例如抗体、抗体片段和scFv、肽、蛋白质支架、核酸、适体、核酶、小分子等。在一些方面,感兴趣分子缺乏标记但仍与通用免疫受体相互作用。例如,在一个实施方案中,包含感兴趣分子的组合物缺乏标记,而包含通用免疫受体的第二组合物包含标记。

[0263] 在一个方面,提供了产生通用免疫受体靶向配体的方法,其中所述方法包括经衔接分子或互配衔接分子的光活化位点特异性缀合(LASIC)到靶向配体而将衔接分子或互配衔接分子与靶向配体连接。在另一个方面,提供了包含靶向配体的组合物,其中靶向配体通过光活化位点特异性缀合(LASIC)与衔接分子或互配衔接连接。在一些实施方案中,衔接分子是SpyCatcher或SpyTag。在一些实施方案中,互配衔接分子是SpyCatcher或SpyTag。在一些其它实施方案中,靶向配体是抗体、抗体片段、scFv或DARPin。在一些实施方案中,靶向配

体是人IgG。在一些实施方案中，靶向配体是临床级抗体。

[0264] 任何已知的分子集合均可用于将SpyTag/SpyCatcher通用免疫受体靶向感兴趣的抗原。分子的非限制性实例包括任何包含抗原结合结构域或其片段的分子，例如抗体、抗体片段和scFv、肽、蛋白质支架、寡核苷酸、小分子和配体。熟知的可以结合例如融合、缀合或连接或附着到分子上的标记的例子包括myc标签、FLAG标签、His标签、HA标签、荧光蛋白(例如绿色荧光蛋白(GFP))、荧光团(例如四甲基罗丹明(TRITC)、异硫氰酸荧光素(FITC))、二硝基苯酚、peridinin叶绿素蛋白复合物、绿色荧光蛋白、生物素、藻红蛋白(PE)、组氨酸、链霉抗生物素蛋白、抗生物素蛋白、辣根过氧化物酶、棕榈酰化、亚硝基化、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶、谷胱甘肽S-转移酶(GST)、麦芽糖结合蛋白、任何类型的荧光材料包括量子点纳米晶体、放射性同位素和用于放射性同位素标记的任何类型的化合物，包括1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)和1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸(NOTA)。

[0265] 可以直接或间接地用任何这样的标记对分子进行标记。可以使用如化学偶联和化学交联剂的技术将标记与分子缀合。或者，可以制备多核苷酸载体，其将标记分子编码为融合蛋白。然后可以对细胞系进行工程改造以表达标记的分子，可以将标记的分子从培养基中分离、纯化并用于本文公开的方法中。标记的氨基酸、标记的肽、标记的蛋白质或分子报告分子也可以通过表达的蛋白质连接而连接到所述分子上(例如使用分选酶、内含肽等)。

[0266] 可以使用技术人员已知的技术配制标记的分子以施用于受试者。标记分子的配制物可以包括药学上可接受的赋形剂。包括在配制物中的赋形剂将具有不同目的，例如取决于标记的性质、抗原结合组合物和施用模式。常用赋形剂的实例包括但不限于：盐水、缓冲盐水、右旋葡萄糖、感染用水、甘油、乙醇及其组合、稳定剂、增溶剂和表面活性剂、缓冲剂和防腐剂、张度剂、填充剂和润滑剂。

[0267] 在另一个实施方案中，通用免疫受体包含与未标记中间体结合的胞外结构域，其继而结合所述分子或标记的分子。

[0268] 载体

[0269] 本发明包含DNA构建体，所述构建体包含SpyTag/SpyCatcher通用免疫受体的序列，其中所述序列包含与胞内结构域的核酸序列可操作连接的胞外结构域的核酸序列。在一个实施方案中，胞外结构域包含SpyTag结构域。在另一个实施方案中，胞外结构域包含SpyCatcher结构域。可用于本发明的通用免疫受体的示例性胞内结构域包括但不限于CD3-zeta、CD28、4-1BB等的胞内结构域。在一些情况下，通用免疫受体可以包括CD3-zeta、CD28、4-1BB等的任何组合。

[0270] 在一个实施方案中，SpyCatcher/SpyTag免疫受体构建体包含SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:17,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:19,SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:22,SEQ ID NO:23,SEQ ID NO:24,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:30。下表1总结了这些SpyCatcher/SpyTag免疫受体构建体的序列标识符：

[0271] 表1：本发明SpyCatcher/SpyTag构建体的序列标识符

[0272]

SEQ ID NO:	IDENTITY
SEQ ID NO:1	pELNS(SpeI)-GFP-SpyTag-CD28-Zeta，核酸序列
SEQ ID NO:2	pELNS(SpeI)-GFP-SpyTag-CD28-Zeta，氨基酸序列
SEQ ID NO:3	pELNS(SpeI)-GFP-SpyTag-GGS-CD28-Zeta，核酸序列
SEQ ID NO:4	pELNS(SpeI)-GFP-SpyTag-GGS-CD28-Zeta，氨基酸序列
SEQ ID NO:5	pELNS(SpeI)-SpyCatcher-CD28-Zeta，核酸序列
SEQ ID NO:6	pELNS(SpeI)-SpyCatcher-CD28-Zeta，氨基酸序列
SEQ ID NO:7	pELNS(SpeI)-SpyCatcher-GGS-CD28-Zeta，核酸序列
SEQ ID NO:8	pELNS(SpeI)-SpyCatcher-GGS-CD28-Zeta，氨基酸序列
SEQ ID NO:9	pELNS(SpeI)-SpyTag-CD28-Zeta，核酸序列

[0273]

SEQ ID	pELNS(SpeI)-SpyTag-CD28-Zeta，氨基酸序列
SEQ ID	pELNS(SpeI)-SpyTag-GGS-CD28-Zeta，核酸序列
SEQ ID	pELNS(SpeI)-SpyTag-GGS-CD28-Zeta，氨基酸序列
SEQ ID	pELNS(SpeI)-GFP-SpyCatcher-CD28-Zeta，核酸序列
SEQ ID	pELNS(SpeI)-GFP-SpyCatcher-CD28-Zeta 氨基酸序列
SEQ ID	pELNS(SpeI)-GFP-SpyCatcher-GGS-CD28-Zeta，核酸序列
SEQ ID	pELNS(SpeI)-GFP-SpyCatcher-GGS-CD28-Zeta，氨基酸序列
SEQ ID	Myc tag-DARPin9.26-SpyTag- His Tag，核酸序列
SEQ ID	Myc tag-DARPin9.26-SpyTag- His Tag，氨基酸序列
SEQ ID	SpyTag003 EGFR DARPIN，核酸序列
SEQ ID	SpyTag003 EGFR DARPIN，氨基酸序列
SEQ ID	SpyTag003 HER2 DARPIN，核酸序列
SEQ ID	SpyTag003 HER2 DARPIN，氨基酸序列
SEQ ID	SpyTag003 Protein G，核酸序列
SEQ ID	SpyTag003 Protein G，氨基酸序列
SEQ ID	SpyCatcher003 BBz，核酸序列
SEQ ID	SpyCatcher003 BBz，氨基酸序列
SEQ ID	SpyCatcher003 28z，核酸序列
SEQ ID	SpyCatcher003 28z，氨基酸序列
SEQ ID	SpyCatcher003 delta zeta，核酸序列
SEQ ID	SpyCatcher003 delta zeta，氨基酸序列

[0274] 在一个实施方案中，本发明的通用免疫受体包含SpyCatcher或SpyTag结构域、人CD8α铰链和跨膜结构域以及CD28和CD3-zeta信号传导结构域。

[0275] 编码所需分子的核酸序列可以使用本领域已知的重组方法使用标准技术获得。或者可以合成产生感兴趣的基因。

[0276] 本发明还提供了其中插入本发明的DNA(例如编码SpyTag或SpyCatcher结构域的DNA)的载体。衍生自逆转录病毒如慢病毒的载体是实现长期基因转移的合适工具，因为其允许转基因的长期、稳定整合及其在子细胞中的繁殖。慢病毒载体与衍生自肿瘤逆转录病毒如鼠白血病病毒的载体相比具有额外的优势，因为其可以转导非增殖细胞，如肝细胞。其还具有低免疫原性的额外优势。

[0277] 简而言之，编码通用免疫受体的天然或合成核酸的表达典型地通过将编码通用免疫受体(例如SpyTag/SpyCatcher)多肽或其部分的核酸可操作地与启动子连接并将构建体掺入到表达载体中来实现。载体可以适用于在真核生物中复制和整合。典型的克隆载体含有转录和翻译终止子、起始序列和可用于调节所需核酸序列表达的启动子。

[0278] 本发明的表达构建体也可使用标准基因递送方案用于核酸免疫和基因治疗。用于基因递送的方法是本领域已知的。见例如美国专利5,399,346、5,580,859、5,589,466,其全部内容通过引用并入本文。在另一个实施方案中,本发明提供了一种基因治疗载体。

[0279] 可以将核酸克隆到多种类型的载体中。例如,可以将核酸克隆到载体中,包括但不限于质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、动物病毒和粘粒。特别感兴趣的载体包括表达载体、复制载体、探针生成载体和测序载体。

[0280] 此外,表达载体可以以病毒载体的形式提供给细胞。病毒载体技术在本领域中是熟知的并且例如在Sambrook et al.(2001,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,New York)以及其它病毒学和分子生物学手册中有所描述。可用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒和慢病毒。通常,合适的载体含有在至少一种生物体中具有功能的复制起点、启动子序列、方便的限制性内切核酸酶位点和一种或多种选择标记(例如WO 01/96584;WO 01/29058;和美国专利号6,326,193)。

[0281] 已经开发了许多基于病毒的系统用于将基因转移到哺乳动物细胞中。例如,逆转录病毒为基因递送系统提供了一个方便的平台。可以使用本领域已知的技术将选定的基因插入载体并包装在逆转录病毒颗粒中。然后可以在体内或离体分离重组病毒并将其递送至受试者的细胞。许多逆转录病毒系统是本领域已知的。在一些实施方案中,使用腺病毒载体。许多腺病毒载体是本领域已知的。在一个实施方案中,使用慢病毒载体。

[0282] 额外的启动子元件,例如增强子,调节转录起始的频率。典型地,它们位于起始位点上游30至110bp的区域,尽管最近已显示许多启动子也包含起始位点下游的功能元件。启动子元件之间的间距通常是灵活的,因此当元件相对于彼此倒置或移动时,启动子功能得以保留。在胸苷激酶(tk)启动子中,启动子元件之间的间距可以增加到50bp,然后活性开始下降。根据启动子的不同,似乎各个元件可以协同或独立地发挥作用来激活转录。

[0283] 合适的启动子的一个例子是立即早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列。该启动子序列是强组成型启动子序列,能够驱动与其可操作连接的任何多核苷酸序列的高水平表达。合适的启动子的另一个例子是延伸生长因子-1α(EF-1α)。然而,也可以使用其它组成型启动子序列,包括但不限于猴病毒40(SV40)早期启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)、人类免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复(LTR)启动子、MoMuLV启动子、禽白血病病毒启动子、Epstein-Barr病毒立即早期启动子、Rous肉瘤病毒启动子,以及人基因启动子,例如但不限于肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、血红蛋白启动子和肌酸激酶启动子。此外,本发明不应限于使用组成型启动子。诱导型启动子也被认为是本发明的一部分。诱导型启动子的使用提供了一种分子开关,该分子开关能够在需要表达时打开与其可操作连接的多核苷酸序列的表达,或者在不需要表达时关闭表达。诱导型启动子的实例包括但不限于金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素启动子。

[0284] 为评估通用免疫受体多肽或其部分的表达,待引入细胞的表达载体还可以包含选择标记基因或报告基因或两者,以促进从细胞群中鉴定和选择寻求通过病毒载体转染或感染的表达细胞。在其它方面,选择标记可携带在单独的DNA片段上并用于共转染程序。选择标记和报告基因二者的侧翼具有适当的调节序列,以使得能够在宿主细胞中表达。有用的选择标记包括例如抗生素抗性基因,例如neo等。

[0285] 报告基因用于鉴别潜在转染的细胞和评估调节序列的功能性。一般而言，报告基因是不存在于接受者生物体或组织中或由接受者生物体或组织表达的基因，并且其编码的多肽的表达通过一些容易检测的特性例如酶活性来显现。在将DNA引入接受者细胞后的合适时间测定报告基因的表达。合适的报告基因可以包括编码萤光素酶、β-半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、分泌型碱性磷酸酶的基因或绿色荧光蛋白基因(例如Ui-Tei et al., 2000FEBS Letters 479:79-82)。合适的表达系统是熟知的并且可以使用已知技术制备或商业获得。通常，具有显示最高水平的报告基因表达的最小5'侧翼区的构建体被鉴定为启动子。这种启动子区域可与报告基因连接并用于评估药剂调节启动子驱动的转录的能力。

[0286] 将基因引入细胞并表达的方法是本领域已知的。在表达载体的情况下，可以通过本领域中的任何方法将载体容易地引入宿主细胞，例如哺乳动物、细菌、酵母或昆虫细胞。例如，表达载体可以通过物理、化学或生物学方式转移到宿主细胞中。

[0287] 将多核苷酸引入宿主细胞的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂质转染、粒子轰击、显微注射、电穿孔等。用于产生包含载体和/或外源核酸的细胞的方法是本领域熟知的。例如，参见Sambrook et al.(2001,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,New York)。将多核苷酸引入宿主细胞的优选方法是磷酸钙转染。

[0288] 将感兴趣的多核苷酸引入宿主细胞的生物学方法包括使用DNA和RNA载体。病毒载体尤其是逆转录病毒载体已成为将基因插入哺乳动物例如人类细胞中最广泛使用的方法。其它病毒载体可以来源于慢病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒I、腺病毒和腺相关病毒等。参见例如美国专利号5,350,674和5,585,362。

[0289] 用于将多核苷酸引入宿主细胞的化学方式包括胶体分散系统，例如大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠和基于脂质的系统，包括水包油乳液、胶束、混合胶束和脂质体。用作体外和体内递送运载体的示例性胶体系统是脂质体(例如人工膜小泡)。

[0290] 在使用非病毒递送系统的情况下，示例性递送运载体是脂质体。考虑使用脂质配制物将核酸引入宿主细胞(体外、离体或体内)。在另一个方面，核酸可以与脂质缔合。与脂质缔合的核酸可以包封在脂质体的水性内部，散布在脂质体的脂质双层中，通过与脂质体和寡核苷酸均缔合的连接分子连接至脂质体，包埋在脂质体中，与脂质体复合，分散在含有脂质的溶液中，与脂质混合、与脂质组合，作为悬浮液包含在脂质中，包含在或与胶束复合，或以其它方式与脂质结合。脂质、脂质/DNA或脂质/表达载体相关组合物不限于溶液中的任何特定结构。例如，它们可以以双层结构、作为胶束或具有“塌陷”结构的形式存在。它们也可以简单地散布在溶液中，可能形成大小或形状不均匀的聚集体。脂质是脂肪物质，可以是天然存在的或合成的脂质。例如，脂质包括天然存在于细胞质中的脂肪滴以及含有长链脂肪烃及其衍生物的一类化合物，例如脂肪酸、醇、胺、氨基醇和醛。

[0291] 适用的脂质可以从商业来源获得。例如，二肉豆蔻基磷脂酰胆碱(“DMPC”)可以从Sigma,St.Louis,MO获得；磷酸双十六烷基酯(“DCP”)可从K&K Laboratories(Plainview,NY)获得；胆固醇(“Choi”)可以从Calbiochem-Behring获得；二肉豆蔻基磷脂酰甘油(“DMPG”)和其它脂质可以从Avanti Polar Lipids,Inc.(Birmingham,AL)获得。氯仿或氯仿/甲醇中的脂质储备溶液可储存在约-20℃。氯仿被用作唯一溶剂，因为其比甲醇更容易蒸发。“脂质体”是一个通用术语，包括由封闭的脂质双层或聚集体形成的各种单层和多层脂质运载体。脂质体可以表征为具有小泡结构，所述小泡结构具有磷脂双层膜和内部水性

介质。多层脂质体具有由水性介质隔开的多个脂质层。当磷脂悬浮在过量的水溶液中时，它们自发形成。脂质成分在形成封闭结构之前经历自我重排并在脂质双层之间截留水和溶解的溶质(Ghosh et al.,1991Glycobiology 5:505-10)。然而，也包括在溶液中具有不同于正常小泡结构的结构的组合物。例如，脂质可能呈现胶束结构或仅作为脂质分子的不均匀聚集体存在。还包括脂质转染胺-核酸复合物。

[0292] 不管用于将外源核酸引入宿主细胞或以其它方式将细胞暴露于本发明的抑制剂的方法如何，为确认重组DNA序列在宿主细胞中的存在，可以进行多种测定。这样的测定包括例如本领域技术人员熟知的“分子生物学”测定，例如Southern和Northern印迹、RT-PCR和PCR；“生化”测定，例如检测特定肽的存在或不存在，例如通过免疫学手段(ELISA和Western印迹)或通过本文所述的测定来鉴定落入本发明范围内的药剂。

[0293] RNA转染

[0294] 在一个实施方案中，本发明的经遗传修饰的T细胞通过引入RNA进行修饰。在一个实施方案中，可以将体外转录的SpyTag或SpyCatcher通用免疫受体RNA作为瞬时转染形式引入细胞。RNA是使用聚合酶链式反应(PCR)生成的模板通过体外转录产生的。来自任何来源的感兴趣的DNA均可以通过PCR直接转化为模板，用于使用适当的引物和RNA聚合酶进行体外mRNA合成。DNA的来源可以是例如基因组DNA、质粒DNA、噬菌体DNA、cDNA、合成DNA序列或任何其它合适的DNA来源。体外转录所需的模板是本发明的通用免疫受体。例如，通用免疫受体的RNA模板包含胞外结构域，该胞外结构域包含标记结合结构域；包含铰链和CD8a的跨膜结构域的跨膜结构域；胞质结构域包含CD3-zeta的信号传导结构域。

[0295] 在一个实施方案中，用于PCR的DNA包含开放读框。DNA可以来自生物体基因组中天然存在的DNA序列。在一个实施方案中，DNA是全长感兴趣基因或者是基因的一部分。基因可以包括一些或全部的5’和/或3’非翻译区(UTR)。基因可以包括外显子和内含子。在一个实施方案中，用于PCR的DNA是人类基因。在另一个实施方案中，用于PCR的DNA是包括5’和3’UTR的人类基因。或者，DNA可以是通常不在天然存在的生物体中表达的人工DNA序列。示例性人工DNA序列是含有连接在一起形成编码融合蛋白的开放读框的基因部分的序列。连接在一起的DNA部分可以来自单个生物体或来自一个以上的生物体。

[0296] 使用PCR生成用于转染的mRNA的体外转录模板。进行PCR的方法是本领域熟知的。用于PCR的引物设计为具有与用作PCR模板的DNA区域基本互补的区域。如本文所用，“基本互补”是指其中引物序列中的大部分或所有碱基是互补的，或者一个或多个碱基是非互补的或错配的核苷酸序列。在用于PCR的退火条件下，基本互补的序列能够与预期的DNA靶退火或杂交。可以将引物设计成与DNA模板的任何部分基本互补。例如，可以设计引物以扩增在细胞中正常转录的基因部分(开放读框)，包括5’和3’UTR。还可以设计引物以扩增基因的编码特定感兴趣结构域的部分。在一个实施方案中，设计引物以扩增人cDNA的编码区，包括全部或部分5’和3’UTR。用于PCR的引物通过本领域熟知的合成方法产生。“正向引物”是含有与DNA模板上待扩增的DNA序列上游的核苷酸基本互补的核苷酸区域的引物。“上游”在本文中用于指相对于编码链而言待扩增的DNA序列的5’位置。“反向引物”是含有与双链DNA模板上待扩增的DNA序列下游基本互补的核苷酸区域的引物。“下游”在本文中用于指相对于编码链而言待扩增的DNA序列的3’位置。

[0297] 任何可用于PCR的DNA聚合酶均可用于本文公开的方法中。试剂和聚合酶可从许多

来源商购获得。

[0298] 也可以使用具有促进稳定性和/或翻译效率能力的化学结构。RNA优选具有5’和3’UTR。在一个实施方案中，5’UTR的长度在0到3000个核苷酸之间。可通过不同方法改变要添加到编码区的5’和3’UTR序列的长度，包括但不限于设计与UTR不同区域退火的PCR引物。使用这种方法，本领域技术人员可以在转录的RNA转染后修改实现最佳翻译效率所需的5’和3’UTR长度。

[0299] 5’和3’UTR可以是感兴趣基因的天然存在的内源5’和3’UTR。或者，可以通过将UTR序列掺入到正向和反向引物中或通过模板的任何其它修饰来添加对感兴趣的基因不是内源的UTR序列。使用对感兴趣的基因不是内源的UTR序列可用于修饰RNA的稳定性和/或翻译效率。例如，已知3’UTR序列中富含AU的元件会降低mRNA的稳定性。因此，可以根据本领域熟知的UTR的特性选择或设计3’UTR以增加转录的RNA的稳定性。

[0300] 在一个实施方案中，5’UTR可以含有内源基因的Kozak序列。或者，当如上所述通过PCR添加对感兴趣基因不是内源的5’UTR时，可以通过添加5’UTR序列来重新设计共有Kozak序列。Kozak序列可以提高某些RNA转录本的翻译效率，但似乎并非所有RNA都需要其来实现高效翻译。许多mRNA对Kozak序列的要求是本领域已知的。在其它实施方案中，5’UTR可以来源于RNA病毒，其RNA基因组在细胞中是稳定的。在其它实施方案中，可以在3’或5’UTR中使用各种核苷酸类似物以阻止mRNA的外切核酸酶降解。

[0301] 为了能够在不需要基因克隆的情况下从DNA模板合成RNA，转录启动子应连接到DNA模板中待转录序列上游。当作为RNA聚合酶启动子的序列被添加到正向引物的5’端时，RNA聚合酶启动子掺入到PCR产物中待转录的开放读框上游。在一个优选的实施方案中，启动子是T7聚合酶启动子，如本文别处所述。其它有用的启动子包括但不限于T3和SP6 RNA聚合酶启动子。T7、T3和SP6启动子的共有核苷酸序列是本领域已知的。

[0302] 在一个优选的实施方案中，mRNA具有5’端的帽和3’poly(A)尾，其决定核糖体结合、翻译起始和mRNA在细胞中的稳定性。在环状DNA模板例如质粒DNA上，RNA聚合酶产生不适合在真核细胞中表达的长串联产物。在3’UTR末端线性化质粒DNA的转录导致正常大小的mRNA，即使它在转录后被多腺苷酸化，在真核转染中也无效。

[0303] 在线性DNA模板上，噬菌体T7 RNA聚合酶可以将转录物的3’末端延伸到模板的最后一个碱基之外(Schenborn and Mierendorf,Nuc Acids Res.,13:6223-36(1985)；Nacheva and Berzal-Herranz,Eur.J.Biochem.,270:1485-65(2003)。

[0304] 将polyA/T序列段整合到DNA模板中的常规方法是分子克隆。然而，整合到质粒DNA中的polyA/T序列会导致质粒不稳定，这就是为什么从细菌细胞中获得的质粒DNA模板经常被缺失和其它畸变高度污染的原因。这使得克隆过程不仅费力费时，而且通常不可靠。这就是为什么一种无需克隆即可构建具有polyA/T 3’序列段的DNA模板的方法是高度所需的。

[0305] 转录DNA模板的polyA/T区段可以在PCR过程中通过使用含有polyT尾例如100T尾(大小可以是50-5000T)的反向引物产生，或在PCR之后通过任何其它方法产生，包括但不限于DNA连接或体外重组。Poly(A)尾还为RNA提供稳定性并减少其降解。通常，poly(A)尾的长度与转录RNA的稳定性呈正相关。在一个实施方案中，poly(A)尾为100至5000个腺苷。

[0306] 在体外转录后，可以使用poly(A)聚合酶，例如大肠杆菌poly A聚合酶(E-PAP)，进一步延长RNA的poly(A)尾。在一个实施方案中，将poly(A)尾的长度从100个核苷酸增加到

300至400个核苷酸导致RNA的翻译效率增加约两倍。此外,将不同化学基团附着到3'端可以增加mRNA稳定性。这种附着可以包含修饰/人工核苷酸、适体和其它化合物。例如,可以使用poly(A)聚合酶将ATP类似物掺入poly(A)尾。ATP类似物可以进一步增加RNA的稳定性。

[0307] 5'帽也为RNA分子提供稳定性。在一个优选的实施方案中,通过本文公开的方法产生的RNA包括5'帽。5'帽使用本领域已知并在本文中描述的技术提供(Cougot,et al.,Trends in Biochem.Sci.,29:436-444(2001);Stepinski,et al.,RNA,7:1468-95(2001);Elango,et al.,Biochim.Biophys.Res.Commun.,330:958-966(2005))。

[0308] 通过本文公开的方法产生的RNA还可以含有内部核糖体进入位点(IRES)序列。IRES序列可以是任何病毒、染色体或人工设计的序列,其启动不依赖帽的核糖体与mRNA结合并促进翻译的启动。可以包括任何适合细胞电穿孔的溶质,其可以包含促进细胞渗透性和存活力的因子,例如糖、肽、脂质、蛋白质、抗氧化剂和表面活性剂。

[0309] 可以使用多种不同方法中的任何一种将RNA引入靶细胞,例如商业可得方法,包括但不限于电穿孔(Amaxa Nucleofector-II(Amaxa Biosystems,Cologne,Germany))、(ECM830(BTX)(Harvard Instruments,Boston,Mass.)或Gene Pulser II(BioRad,Denver,Colo.)、Multiporator(Eppendorf,Hamburg Germany)、阳离子脂质体介导的脂质体转染、聚合物封装、肽介导的转染或基因枪粒子递送系统例如"基因枪"(见例如Nishikawa,et al.Hum Gene Ther.,12(8):861-70(2001)。

[0310] 遗传修饰的T细胞

[0311] 在一些实施方案中,使用逆转录病毒或慢病毒载体将SpyTag或SpyCatcher通用免疫受体序列递送到细胞中。使用转导细胞作为载体或无细胞局部或全身递送封装的、结合的或裸载体,表达通用免疫受体的逆转录病毒和慢病毒载体可以被递送到不同类型的真核细胞以及组织和整个生物体中。使用的方法可以用于需要稳定表达或稳定表达即足够的任何目的。

[0312] 在其它实施方案中,使用体外转录的mRNA将SpyTag或SpyCatcher通用免疫受体序列递送到细胞中。使用转染细胞作为载体或无细胞局部或全身递送封装的、结合的或裸mRNA,体外转录的mRNA通用免疫受体可以被递送到不同类型的真核细胞以及组织和整个生物体中。使用的方法可以用于需要瞬时表达或瞬时表达即足够的任何目的。

[0313] 所公开的方法可用于在癌症、干细胞、急性和慢性感染以及自身免疫性疾病领域的基础研究和治疗中调节T细胞活性,包括评估遗传修饰的T细胞杀死靶癌细胞的能力。在一些实施方案中,修饰的T细胞被标记并且当转移到受试者中可以在体内被追踪。

[0314] 所述方法还提供了通过改变例如启动子或输入RNA的量来控制广泛范围内的表达水平的能力,从而可以单独调节表达水平。此外,基于PCR的mRNA生产技术极大地促进了具有不同结构和结构域组合的通用免疫受体mRNA的设计。例如,改变在同一细胞中的多个通用免疫受体上不同的胞内效应/共刺激结构域使得可以确定受体组合的结构,从而在通用免疫受体与一种与抗原结合元件相连的互配标签结合后,评估针对多抗原靶点的最高细胞毒性水平,同时对正常细胞的细胞毒性最低。

[0315] 本发明的RNA转染方法的一个优点是RNA转染基本上是瞬时的并且无载体:可以将RNA转基因递送至淋巴细胞并在短暂的体外细胞活化后在其中表达,所述RNA转基因作为最小表达盒而不需任何其它病毒序列。在这些条件下,转基因不太可能整合到宿主细胞基因

组中。由于RNA的转染效率及其均匀修饰整个淋巴细胞群的能力，因此不需要克隆细胞。

[0316] 用体外转录的RNA(IVT-RNA)对T细胞进行遗传修饰利用两种不同的策略，这两种策略都已在各种动物模型中连续测试。通过脂转染或电穿孔，用体外转录的RNA转染细胞。优选地，希望使用各种修饰来稳定IVT-RNA以实现转移的IVT-RNA的延长表达。

[0317] 一些IVT载体在文献中是已知的，它们以标准化方式用作体外转录的模板并且已经被遗传修饰以产生稳定的RNA转录物。目前本领域使用的方案基于具有以下结构的质粒载体：能够转录RNA的5’RNA聚合酶启动子，然后是感兴趣的基因，其3’和/或5’侧翼为非翻译区(UTR)，以及一个含有50-70个A核苷酸的3’聚腺苷酸盒。在体外转录之前，环状质粒通过II型限制酶在聚腺苷酸盒下游线性化(识别序列对应于切割位点)。因此，聚腺苷酸盒对应于转录本中较后的poly(A)序列。作为这个过程的结果，一些核苷酸在线性化后保留为酶切割位点的一部分并延伸或掩蔽3’末端poly(A)序列。尚不清楚这种非生理性突出是否会影响这种构建体在细胞内产生的蛋白质的量。

[0318] 与更传统的质粒或病毒方法相比，RNA有几个优点。从RNA来源的基因表达不需要转录并且在转染后会迅速产生蛋白质产物。此外，由于RNA只能进入细胞质而不是细胞核，因此典型的转染方法会导致极高的转染率。此外，基于质粒的方法要求驱动感兴趣基因表达的启动子在所研究的细胞中具有活性。

[0319] 在另一方面，可以通过电穿孔将RNA构建体递送到细胞中。见例如US2004/0014645、US 2005/0052630A1、US 2005/0070841A1、US 2004/0059285A1、US2004/0092907A1中教导的将核酸构建体电穿孔进入哺乳动物细胞的配制物和方法。包括对任何已知细胞类型进行电穿孔所需的电场强度在内的各种参数在相关研究文献以及该领域的众多专利和申请中通常是已知的。见例如美国专利号6,678,556，美国专利号7,171,264和美国专利号7,173,116。用于电穿孔治疗应用的装置可商购获得，例如MedPulser™DNA电穿孔治疗系统(Inovio/Genetronics,San Diego,Calif.)，并在专利如美国专利号6,567,694；美国专利号6,516,223，美国专利号5,993,434，美国专利号6,181,964，美国专利号6,241,701和美国专利号6,233,482描述；电穿孔也可用于体外转染细胞，如例如在US20070128708A1中描述的。电穿孔也可用于在体外将核酸递送到细胞中。因此，利用本领域技术人员已知的许多可用装置和电穿孔系统中的任何一种，将包括表达构建体的核酸电穿孔介导地施用给细胞提供了一种用于将感兴趣的RNA递送至靶细胞的令人兴奋的新手段。

[0320] T细胞来源

[0321] 在本发明T细胞的扩增和遗传修饰之前，从受试者获得T细胞来源。T细胞可以从多种来源获得，包括外周血单个核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾组织和肿瘤。在本发明的一些实施方案中，可以使用本领域可用的任何数量的T细胞系。在本发明的一些实施方案中，可以使用本领域技术人员已知的许多技术，例如Ficoll™分离，从收集自受试者的血液单位获得T细胞。在一个优选的实施方案中，来自个体循环血液的细胞通过单采术获得。单采产品通常含有淋巴细胞，包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其它有核白细胞、红细胞和血小板。在一个实施方案中，可洗涤通过单采术收集的细胞以去除血浆部分并将细胞置于适当的缓冲液或培养基中以用于后续处理步骤。在本发明的一个实施方案中，细胞用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤。在一个替代实施方

案中,洗涤溶液缺少钙并且可以缺少镁或可以缺少许多(如果不是全部的话)二价阳离子。同样,令人惊讶的是,在没有钙的情况下的初始活化步骤会导致放大的活化。正如本领域技术人员容易理解的,洗涤步骤可以通过本领域技术人员已知的方法来完成,例如根据制造商的说明通过使用半自动"流通"离心机(例如,Cobe 2991细胞处理器、Baxter CytoMate或Haemonetics Cell Saver 5)来完成。洗涤后,可将细胞重悬于各种生物相容性缓冲液中,例如不含Ca^{2+}、不含Mg^{2+}的PBS、PlasmaLyte A或其它有或无缓冲剂的盐水溶液。或者,可以去除单采样品中不需要的成分,并将细胞直接重悬于培养基中。

[0322] 在另一个实施方案中,通过裂解红细胞和耗竭单核细胞而从外周血淋巴细胞中分离T细胞,例如通过PERCOLL™梯度离心或通过逆流离心淘析。可以通过阳性或阴性选择技术进一步分离特定的T细胞亚群,例如$CD3^+$、$CD28^+$、$CD4^+$、$CD8^+$、$CD45RA^+$和$CD45RO^+$T细胞。例如,在一个实施方案中,通过与抗CD3/抗CD28(即3x28)缀合珠如DYNABEADS®M-450CD3/CD28 T一起温育一段足以用于阳性选择希望的T细胞的时间来分离T细胞。在一个实施方案中,该时间段为约30分钟。在进一步的实施方案中,时间段的范围从30分钟到36小时或更长,并且其间的所有整数值。在进一步的实施方案中,时间段是至少1、2、3、4、5或6小时。在又一个优选实施方案中,时间段为10至24小时。在一个优选的实施方案中,温育时间为24小时。为了从白血病患者中分离T细胞,使用较长的温育时间(例如24小时)可以提高细胞产量。在与其它细胞类型相比T细胞很少的任何情况下,可以使用更长的温育时间来分离T细胞,例如从肿瘤组织或免疫受损个体中分离肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。此外,使用更长的温育时间可以提高捕获CD8+T细胞的效率。因此,通过简单地缩短或延长使T细胞与CD3/CD28珠结合的时间和/或通过增加或降低珠与T细胞的比率(如本文进一步描述),可以在培养开始或过程中的其它时间点优先正面或负面选择T细胞亚群。此外,通过增加或减少珠或其它表面上的抗CD3和/或抗CD28抗体的比率,可以在培养开始时或在其它所需时间点优先正面或负面选择T细胞亚群。本领域技术人员将认识到,在本发明的上下文中也可以使用多轮选择。在一些实施方案中,可能希望进行选择程序并在活化和扩增过程中使用"未选择的"细胞。"未选择的"细胞也可以进行进一轮的选择。

[0323] 通过负选择富集T细胞群可以用针对负选择细胞特有的表面标志物的抗体组合来完成。一种方法是通过负磁免疫粘附或流式细胞术进行细胞分选和/或选择,其使用针对存在于负选择的细胞上的细胞表面标志物的单克隆抗体混合物。例如,为了通过负选择富集$CD4^+$细胞,单克隆抗体混合物通常包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。在一些实施方案中,可能需要富集或正选择典型表达$CD4^+$、$CD25^+$、$CD62L^{hi}$、$GITR^+$和$FoxP3^+$的调节性T细胞。或者,在一些实施方案中,T调节细胞被抗C25缀合珠或其它类似的选择方法耗竭。

[0324] 为了通过正或负选择分离希望的细胞群,可以改变细胞和表面(例如颗粒如珠)的浓度。在一些实施方案中,可能希望的是显著减少珠和细胞混合在一起的体积(即增加细胞浓度),以确保细胞和珠的最大接触。例如,在一个实施方案中,使用20亿个细胞/ml的浓度。在一个实施方案中,使用10亿个细胞/ml的浓度。在进一步的实施方案中,使用大于1亿个细胞/ml。在进一步的实施方案中,使用1000万、1500万、2000万、2500万、3000万、3500万、4000万、4500万或5000万个细胞/ml的细胞浓度。在又一个实施方案中,使用7500万、8000万、8500万、9000万、9500万或1亿个细胞/ml的细胞浓度。在进一步的实施方案中,可以使用

1.25亿或1.5亿个细胞/ml的浓度。使用高浓度可提高细胞产量、细胞活化和细胞扩增。此外，使用高细胞浓度可以更有效地捕获可能弱表达感兴趣的靶抗原的细胞如CD28阴性T细胞，或来自存在许多肿瘤细胞的样本(即白血病血液、肿瘤组织等)的细胞。这样的细胞群可能具有治疗价值并且将是希望获得的。例如，使用高浓度的细胞可以更有效地选择通常具有较弱CD28表达的$CD8^+$T细胞。

[0325] 在相关实施方案中，可能希望使用较低浓度的细胞。通过显著稀释T细胞和表面(例如颗粒如珠)的混合物，可以最小化颗粒和细胞之间的相互作用。这样选择表达大量结合到颗粒上的所希望的抗原的细胞。例如，$CD4^+$T细胞表达更高水平的CD28并且比稀释浓度的$CD8^+$T细胞更有效地被捕获。在一个实施方案中，使用的细胞浓度为5×10^6/ml。在其它实施方案中，使用的浓度可以是从大约1×10^5/ml至1×10^6/ml，以及之间的任何整数值。

[0326] 在其它实施方案中，细胞可以在摇床上以不同的速度在2-10℃或在室温下温育不同的时间长度。

[0327] 用于刺激的T细胞也可以在洗涤步骤后冷冻。不希望受理论束缚，冷冻和随后的解冻步骤通过去除细胞群中的粒细胞和在一定程度上去除单核细胞而提供更均匀的产品。在去除血浆和血小板的洗涤步骤之后，可以将细胞悬浮在冷冻溶液中。虽然许多冷冻溶液和参数在本领域中是已知的并且在这种情况下有用，但一种方法涉及使用含有20％DMSO和8％人血清白蛋白的PBS，或含有10％葡聚糖40和5％右旋葡萄糖、20％人血清白蛋白和7.5％DMSO，或者31.25％Plasmalyte-A、31.25％右旋葡萄糖5％、0.45％NaCl、10％葡聚糖40和5％右旋葡萄糖、20％人血清白蛋白和7.5％DMSO的培养基或其它合适的含有例如Hespan和PlasmaLyte A的细胞冷冻培养基，然后将细胞以每分钟1℃的速率冷冻到-80℃并储存在液氮储存罐的气相中。可以使用其它受控冷冻的方法以及立即在-20℃或在液氮中的不受控冷冻的方法。

[0328] 在一些实施方案中，如本文所述将冷冻保存的细胞解冻和洗涤，并在使用本发明的方法活化之前在室温下静置一小时。

[0329] 在本发明的上下文中还包括在可能需要本文所述的扩增细胞之前的时间段从受试者收集血液样品或单采产品。因此，可以在任何必要的时间点收集要扩增的细胞来源，并分离和冷冻所希望的细胞，例如T细胞，以供以后用于T细胞治疗，以治疗任何数量的可受益于T细胞治疗的疾病或病症，例如本文所述的那些。在一个实施方案中，血液样品或单采成分取自总体健康的受试者。在一些实施方案中，从有患疾病风险但尚未患病的总体健康的受试者中采集血液样品或单采成分，并分离和冷冻感兴趣的细胞以备后用。在一些实施方案中，T细胞可以被扩增、冷冻并在以后使用。在一些实施方案中，样品在诊断出本文所述的特定疾病后不久但在任何治疗之前从患者收集。在进一步的实施方案中，在任何数量的相关治疗方式之前从受试者的血液样品或单采成分分离细胞，所述相关治疗方式包括但不限于用药剂如那他珠单抗、依法珠单抗、抗病毒剂、化疗、放疗、免疫抑制剂如环孢素、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤、霉酚酸酯和FK506、抗体或其它免疫清除剂如CAMPATH、抗CD3抗体、环孢素、氟达拉滨、环孢菌素、FK506、雷帕霉素、霉酚酸、类固醇、FR901228和辐射进行治疗。这些药物抑制钙依赖性磷酸酶钙神经素(环孢菌素和FK506)或抑制对生长因子诱导的信号传导很重要的p70S6激酶(雷帕霉素)(Liu et al.,Cell 66:807-815,1991;Henderson et al.,Immun.73:316-321,1991;Bierer et al.,Curr.Opin.Immun.5:763-773,1993)。在另一个

实施方案中，为患者分离细胞并冷冻以供以后与以下治疗联用(例如之前、同时或随后)，所述治疗为骨髓或干细胞移植、使用化疗剂如氟达拉滨、外照射放疗(XRT)、环磷酰胺或抗体如OKT3或CAMPATH的T细胞消融治疗。在另一个实施方案中，细胞在之前被分离并且可以被冷冻以供以后用于B细胞消融治疗之后的治疗，如与CD20反应的药剂，例如Rituxan。

[0330] 在本发明的另一个实施方案中，T细胞从治疗后的患者直接获得。在这方面，已经观察到，在某些癌症治疗之后，特别是使用损害免疫系统的药物治疗后，在治疗后不久患者正常从治疗中恢复期间，获得的T细胞的质量可能是最佳的或其离体扩增的能力改善。同样，在使用本文所述的方法进行离体操作后，这些细胞可能处于增强植入和体内扩增的优选状态。因此，在本发明的上下文中包括在该恢复阶段收集血细胞，包括T细胞、树突细胞或造血谱系的其它细胞。此外，在一些实施方案中，可以使用动员(例如，用GM-CSF动员)和调理方案在受试者中创造条件，其中特定细胞类型的再增殖、再循环、再生和/或扩增是有利的，尤其是在治疗后的特定时间窗口期间。示例性细胞类型包括T细胞、B细胞、树突细胞和免疫系统的其它细胞。

[0331] T细胞活化和扩增

[0332] 无论是在对T细胞进行遗传修饰以表达希望的通用免疫受体之前或之后，通常可以使用例如美国专利6,352,694;6,534,055;6,905,680;6,692,964;5,858,358;6,887,466;6,905,681;7,144,575;7,067,318;7,172,869;7,232,566;7,175,843;5,883,223;6,905,874;6,797,514;6,867,041和美国专利申请公开号20060121005中描述的方法来活化和扩增T细胞。

[0333] 通常，本发明的T细胞通过与表面接触而扩增，所述表面附着有刺激CD3/TCR复合物相关信号的药剂和刺激T细胞表面上的共刺激分子的配体。具体而言，可以如本文所述刺激T细胞群，例如通过与固定化在表面上的抗CD3抗体或其抗原结合片段或抗CD2抗体接触，或通过与蛋白激酶C激活剂(例如苔藓抑素)联合钙离子载体接触。为了共刺激T细胞表面上的辅助分子，使用结合辅助分子的配体。例如，可以在适合刺激T细胞增殖的条件下使T细胞群与抗CD3抗体和抗CD28抗体接触。为了刺激$CD4^+$T细胞或$CD8^+$T细胞的增殖，使用抗CD3抗体和抗CD28抗体。抗CD28抗体的实例包括9.3、B-T3、XR-CD28(Diaclone,Besançon,France)，可以使用本领域熟知的其它方法(Berg et al.,Transplant Proc.30(8):3975-3977,1998;Haanen et al.,J.Exp.Med.190(9):13191328,1999;Garland et al.,J.Immunol Meth.227(1-2):53-63,1999)。

[0334] 在一些实施方案中，T细胞的主要刺激信号和共刺激信号可以由不同的方案提供。例如，提供每个信号的药剂可以在溶液中或与表面偶联。当偶联至表面时，所述药剂可偶联至相同表面(即以“顺式”形式)或偶联至分开的表面(即以“反式”形式)。或者，一种药剂可以与表面偶联，而另一种药剂在溶液中。在一个实施方案中，提供共刺激信号的药剂与细胞表面结合，提供初级活化信号的药剂在溶液中或与表面偶联。在一些实施方案中，两种药剂均在溶液中。在另一个实施方案中，药剂可以是可溶形式，然后交联至表面，例如表达Fc受体或抗体或与药剂结合的其它结合剂的细胞。在这方面，参见例如美国专利申请公开号20040101519和20060034810，其中人工抗原呈递细胞(aAPC)用于在本发明中活化和扩增T细胞。

[0335] 在一个实施方案中，将两种药剂固定在珠上，或者固定在同一个珠上，即“顺式”，

或者固定在分开的珠上，即“反式”。例如，提供初级活化信号的药剂是抗CD3抗体或其抗原结合片段，而提供共刺激信号的药剂是抗CD28抗体或其抗原结合片段；并且两种药剂以相同的分子量共同固定在相同的珠上。在一个实施方案中，使用与用于$CD4^+$T细胞扩增和T细胞生长的与珠结合的1:1比率的每种抗体。在本发明的一些方面，使用与珠结合的抗CD3:CD28抗体的比率，使得与使用1:1的比率观察到的扩增相比，观察到T细胞扩增的增加。在一个具体实施方案中，与使用1:1的比率观察到的扩增相比，观察到约1倍至约3倍的增加。在一个实施方案中，与珠结合的CD3:CD28抗体的比率范围为100:1至1:100以及其间的所有整数值。在本发明的一方面，与抗CD3抗体相比，更多的抗CD28抗体与颗粒结合，即CD3:CD28的比率小于1。在本发明的一些实施方案中，结合到珠上的抗CD28抗体与抗CD3抗体的比率大于2:1。在一个特定的实施方案中，使用与珠结合的1:100的CD3:CD28抗体比率。在另一个实施方案中，使用与珠结合的1:75的CD3:CD28抗体比率。在进一步的实施方案中，使用与珠结合的1:50的CD3:CD28抗体比率。在另一个实施方案中，使用与珠结合的1:30的CD3:CD28抗体比率。在一个优选的实施方案中，使用与珠结合的1:10的CD3:CD28抗体比率。在另一个实施方案中，使用与珠结合的1:3的CD3:CD28抗体比率。在又一个实施方案中，使用与珠结合的3:1的CD3:CD28抗体比率。

[0336] 从1:500至500:1和其间的任何整数值的颗粒与细胞的比率都可用于刺激T细胞或其它靶细胞。正如本领域技术人员可以容易地理解的，颗粒与细胞的比率可以取决于相对于靶细胞的颗粒尺寸。例如，小珠只能结合少数细胞，而较大珠可以结合很多细胞。在一些实施方案中，细胞与颗粒的比率范围为1:100至100:1和其间的任何整数值，并且在进一步的实施方案中，该比率包括1:9至9:1和其间的任何整数值，也可以用于刺激T细胞。导致T细胞刺激的抗CD3和抗CD28偶联颗粒与T细胞的比率可以如上所述变化，但是一些优选值包括1:100、1:50、1:40、1:30、1:20、1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1和15:1，其中一个优选的比率是至少1:1的颗粒/T细胞。在一个实施方案中，使用1:1或更小的颗粒与细胞的比率。在一个具体实施方案中，优选的颗粒:细胞比率为1:5。在进一步的实施方案中，颗粒与细胞的比率可以根据刺激的日期而变化。例如，在一个实施方案中，第一天颗粒与细胞的比率为1:1至10:1，之后每天或每隔一天将额外的颗粒添加到细胞直至10天，最终比率从1:1至1:10(基于添加当天的细胞计数)。在一个具体实施方案中，颗粒与细胞的比率在刺激的第一天为1:1，在刺激的第三天和第五天调整为1:5。在另一个实施方案中，每天或每隔一天添加颗粒，在刺激的第一天最终比率为1:1，在刺激的第三天和第五天为1:5。在另一个实施方案中，颗粒与细胞的比率在刺激的第一天为2:1并且在刺激的第三天和第五天调整为1:10。在另一个实施方案中，每天或每隔一天添加颗粒至最终比率在刺激的第一天为1:1，并且在刺激的第三天和第五天为1:10。本领域技术人员将理解，多种其它比率可适用于本发明。特别地，比率将根据颗粒大小和细胞大小和类型而变化。

[0337] 在本发明的进一步实施方案中，细胞(例如T细胞)与包被药剂的珠组合，随后将珠和细胞分离，然后培养细胞。在替代实施方案中，在培养之前，药剂包被的珠和细胞不分离，而是一起培养。在另一个实施方案中，首先通过施加诸如磁力之类的力来浓缩珠和细胞，导致细胞表面标志物的连接增加，从而诱导细胞刺激。

[0338] 举例来说，可以通过使附着有抗CD3和抗CD28的顺磁珠(3x28珠)接触T细胞来连接

细胞表面蛋白。在一个实施方案中，将细胞（例如10^4至10^9个T细胞）和珠（例如DYNABEADS®M-450CD3/CD28 T顺磁珠，比率为1:1）在缓冲液、优选PBS（不含二价阳离子如钙和镁）中组合。同样，本领域技术人员可以容易地理解可以使用任何细胞浓度。例如，靶细胞在样品中可能非常少，并且仅占样品的0.01％或者整个样品（即100％）可包含感兴趣的靶细胞。因此，任何细胞数都在本发明的范围内。在一些实施方案中，可能希望的是显著降低颗粒和细胞混合在一起的体积（即增加细胞浓度），以确保细胞和颗粒的最大接触。例如，在一个实施方案中，使用约20亿个细胞/ml的浓度。在另一个实施方案中，使用大于1亿个细胞/ml。在进一步的实施方案中，使用1000万、1500万、2000万、2500万、3000万、3500万、4000万、4500万或5000万个细胞/ml的细胞浓度。在又一个实施方案中，使用7500万、8000万、8500万、9000万、9500万或1亿个细胞/ml的细胞浓度。在进一步的实施方案中，可以使用1.25或1.5亿个细胞/ml的浓度。使用高浓度可增加细胞产量、细胞活化和细胞扩增。此外，使用高细胞浓度可以更有效地捕获可能弱表达感兴趣的靶抗原的细胞，例如CD28阴性T细胞。这样的细胞群可能具有治疗价值并且在一些实施方案中将是期望获得的。例如，使用高浓度细胞可以更有效地选择通常具有较弱CD28表达的CD8+T细胞。

[0339] 在本发明的一个实施方案中，混合物可以培养数小时（约3小时）至约14天或其间的任何小时整数值。在另一个实施方案中，混合物可以培养21天。在本发明的一个实施方案中，珠和T细胞一起培养约八天。在另一个实施方案中，珠和T细胞一起培养2-3天。也可能希望若干个刺激周期，由此T细胞的培养时间可以是60天或更长。适合T细胞培养的条件包括合适的培养基（例如最小必需培养基或RPMI培养基1640或X-vivo15，(Lonza)），其可含有增殖和存活力所必需的因子，包括血清（例如胎牛血清或人血清）、白细胞介素-2(IL-2)、胰岛素、IFN-γ、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGFβ和TNF-α或任何本领域技术人员已知的用于细胞生长的其它添加剂。用于细胞生长的其它添加剂包括但不限于表面活性剂、人血浆蛋白粉(plasmanate)和还原剂，例如N-乙酰半胱氨酸和2-巯基乙醇。培养基可以包括RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、α-MEM、F-12、X-Vivo 15和X-Vivo 20、Optimizer，添加氨基酸、丙酮酸钠和维生素，无血清或补充适量的血清（或血浆）或一组确定的激素，和/或足以使T细胞生长和扩增的细胞因子的量。抗生素例如青霉素和链霉素仅包含在实验培养物中，而不包含在要输注到受试者体内的细胞培养物中。将靶细胞维持在支持生长所需的条件下，例如适当的温度（例如37℃）和气氛（例如空气加5％CO_2）。

[0340] 暴露于不同刺激时间的T细胞可表现出不同的特征。例如，典型的血液或单采外周血单个核细胞产品具有辅助T细胞群（T_H，$CD4^+$），其大于细胞毒性或抑制T细胞群（（T_C，$CD8^+$）。通过刺激CD3和CD28受体进行的T细胞离体扩增产生T细胞群，该群在大约8-9天之前主要由T_H细胞组成，而在大约8-9天之后，T细胞群包含越来越多的T_C细胞群。因此，根据治疗目的，给受试者输注主要包含T_H细胞的T细胞群可以是有利的。类似地，如果已分离出T_C细胞的抗原特异性亚群，则扩增该亚群至更大程度可以是有益的。

[0341] 此外，除了CD4和CD8标记外，其它表型标记在细胞扩增过程中也显著但在很大程度上可重复地变化。因此，这种可重复性使得能够为特定目的定制活化的T细胞产品。

[0342] 治疗应用

[0343] 本发明包括经修饰以表达通用免疫受体的细胞（例如T细胞），所述通用免疫受体组合SpyTag或SpyCatcher结构域与T细胞受体的胞内结构域。在一些情况下，通用免疫受体

还包含一种或多种共刺激分子的胞内结构域。因此，在一些情况下，修饰的T细胞可以引发通用免疫受体介导的T细胞应答。

[0344] 本发明提供了通用免疫受体将原代T细胞的特异性重定向到任何掺入SpyTag或SpyCatcher部分的给定分子的用途。因此，本发明还提供了在哺乳动物中刺激对靶细胞群或组织的T细胞介导的免疫应答的方法，包括标签(tagging)/标记靶抗原(例如用SpyTag或SpyCatcher部分)并给哺乳动物施用表达通用免疫受体的T细胞，其中所述通用免疫受体包含与标签/标记的靶特异性相互作用的结合部分、TCR的胞内结构域(例如人CD3zeta的胞内结构域)和共刺激信号传导区。

[0345] 一方面，本发明涉及经工程化以表达通用免疫受体的细胞用于靶向多种抗原特别是肿瘤表达的两种或更多种不同抗原的用途。如本文进一步所述，发现双重武装的SpyCatcher-BBζT相对于仅单武装细胞实现了增加的肿瘤裂解(图8D)。已经证实，用具有不同特异性的两种抗体(以特定剂量)武装SpyCatcher T细胞增强了针对共表达两种不同抗原的癌细胞的活性。

[0346] 在另一个方面，提供了产生一定水平的针对肿瘤的裂解活性的方法。在又一方面，提供了治疗受试者(例如哺乳动物)中癌症的方法，其中所述方法提供了对针对所述癌症的裂解活性水平的控制。如本文其它地方所述，已证实表达SpyCatcher免疫受体的原代人T细胞可以定量加载靶向配体，允许对重定向的T细胞效应功能和肿瘤细胞裂解进行剂量可滴定的控制。与传统CAR T细胞治疗相比，在识别靶抗原后，施用的CAR T细胞可以在接受者体内迅速大量增殖并释放促炎细胞因子，患者体内可控的T细胞活性和裂解可有助于最小化来自施用的T细胞的不受控制的快速增殖的不良副作用。

[0347] 在又一方面，提供了在哺乳动物中刺激针对肿瘤的通用免疫受体介导的免疫应答的方法和在有需要的哺乳动物中治疗癌症的方法，其使用肿瘤的“按需”靶向。可以将未武装的SpyCatcher T细胞施用于受试者，其中未武装的细胞在受试者体内存在癌细胞时是惰性的，并且可以在稍后施用靶向配体以武装SpyCatcher T细胞并触发肿瘤裂解，允许“按需”触发癌症杀伤能力。

[0348] 在其它方面，提供了一种在有需要的哺乳动物中刺激对肿瘤的通用免疫受体介导的免疫反应的方法和在有需要的哺乳动物中治疗癌症的方法，其使用经工程化以表达含有4-1BB的胞内结构域的通用免疫受体的细胞。令人惊讶的发现，用高浓度抗体武装的SpyCatcher-BBζT细胞而非SpyCatcher-28ζT细胞对高抗原表达靶细胞敏感，但对低抗原表达靶细胞不敏感。当与靶向健康组织上表达的高风险抗原的抗体一起应用时，这些发现对T细胞的安全性具有重要意义。

[0349] 在一个实施方案中，靶分子的标签/标记包括给哺乳动物施用包含经标签和/或经标记的分子的组合物。T细胞和经标签/经标记的分子的施用可以以任何顺序进行。例如，在一个实施方案中，经标记的分子在施用T细胞之前施用给哺乳动物。在另一个实施方案中，在施用经标签/经标记的抗原之前将T细胞施用给哺乳动物。在另一个实施方案中，通用免疫受体可以在将T细胞施用给哺乳动物之前与经标签/经标记的分子结合。

[0350] 可以使用技术人员已知的模式和技术将经标签/经标记的分子或包含经标签/经标记的分子的组合物施用给受试者。示例性模式包括但不限于皮下、皮内、肿瘤内、结内、髓内、肌肉内、通过静脉内(i.v.)注射、动脉内、心内、关节内、滑膜内、颅内、脊柱内、鞘内或腹

膜内。在一个实施方案中，经标记的组合物通过皮内或皮下注射施用给患者。在另一个实施方案中，本发明的经标记的组合物优选通过静脉内注射施用。经标签/经标记的分子或包含经标签/经标记的分子的组合物可以直接注射到肿瘤、淋巴结或感染部位。经标签/经标记的分子或包含经标签/经标记的分子的组合物以对标签/标记靶抗原有效且对治疗患者有效的量施用。施用给受试者的具体量将在宽范围之间变化，这取决于疾病的位置、来源、性质、程度和严重程度、待治疗个体的年龄和状况等。

[0351] 在一个实施方案中，本发明包括一种细胞治疗，其中T细胞经遗传修饰以表达SpyTag或SpyCatcher通用免疫受体。SpyTag或SpyCatcher与其互配标签SpyCatcher或SpyTag相缔合，所述互配标签与包含抗原结合结构域的分子结合如融合、标记、连接或缀合。然后将通用免疫受体系统施用给有需要的接受者。在另一个实施方案中，在遗传修饰细胞之前将SpyTag或SpyCatcher结合的分子施用给哺乳动物。在又一个实施方案中，在将遗传修饰细胞施用给哺乳动物之前将通用免疫受体与SpyTag-或SpyCatcher-结合的分子结合。施用的细胞能够杀死接受者体内的肿瘤细胞。

[0352] 虽然本文具体公开了编码SpyCatcher结构域以及人CD8α铰链和跨膜结构域以及人CD28和CD3zeta信号传导结构域的慢病毒载体，但本发明应解释为包括所述构建体的每个组分的任何数量的变体，如本文其它地方所述。

[0353] 本发明还提供一种同时靶向多个靶、例如两个或更多个不同靶的方法。例如，在一个实施方案中，多个不同的分子被直接或间接地用SpyCatcher/SpyTag标签/标记。例如，在一个实施方案中，不同的分子各自与特异于每个分子的SpyCatcher或SpyTag结合如标记、缀合、连接或融合，并且随后与SpyCatcher或SpyTag结合的多个不同分子被施用给哺乳动物。施用表达包含互配标签(SpyTag/SpyCatcher)的通用免疫受体的遗传修饰T细胞使得能将修饰的T细胞靶向多个不同的互配标签标记的分子中的每一个。在一个实施方案中，所述方法包括在给哺乳动物施用遗传修饰细胞之前，给哺乳动物施用多种不同的SpyTag-或SpyCatcher-结合的分子。在这样的实施方案中，通用免疫受体可以结合多个不同的SpyTag-或SpyCatcher-结合的分子。在另一个实施方案中，所述方法包括在给哺乳动物施用遗传修饰细胞之前将通用免疫受体与多种不同的SpyTag-或SpyCatcher-结合的分子结合。

[0354] 在另一个实施方案中，多个不同的分子被多特异性T细胞靶向。例如，表达SpyCatcher/SpyTag通用免疫受体的遗传修饰T细胞与多个不同分子结合，这些分子与互配SpyCatcher/SpyTag结合如标记、缀合、连接或融合，特异于多个不同分子中的每一个。然后将这些多特异性T细胞施用给哺乳动物。经遗传修饰的多特异性T细胞的施用允许将修饰的T细胞靶向多个不同的互配标签标记的分子中的每一个。

[0355] 本发明还提供了一种顺序靶向多个不同靶例如两个或更多个不同靶(例如两个或更多个不同抗原)的方法。例如，在一个实施方案中，第一分子被直接或间接地标签标记/标记。例如，在一个实施方案中，将特异于第一抗原的第一SpyTag或SpyCatcher标签标记的分子施用给哺乳动物。在一个实施方案中，所述方法包括施用表达通用免疫受体的经遗传修饰的T细胞，所述通用免疫受体包含与第一标签标记的分子结合的互补SpyTag或SpyCatcher结合结构域，从而将T细胞靶向第一抗原。在一个实施方案中，所述方法包括直接或间接标签标记/标记第二分子。例如，在一个实施方案中，将特异于第二抗原的第二标

签标记的分子(例如第二SpyTag或SpyCatcher标签标记的分子)施用给哺乳动物。表达包含SpyTag或SpyCatcher结构域的通用免疫受体的经遗传修饰的T细胞与第二标签标记的分子结合,因此被导向第二抗原。在一个实施方案中,所述方法包括在给哺乳动物施用经遗传修饰的细胞之前,依次给哺乳动物施用多种不同的SpyTag-或SpyCatcher-结合的分子。在另一个实施方案中,所述方法包括在施用第一和第二标签标记的分子之间经过足够的时间,以使得在将T细胞引导至第二抗原之前清除表达第一抗原的细胞。在又一个实施方案中,所述方法包括在给哺乳动物施用经遗传修饰的细胞之前将通用免疫受体与多个不同的SpyTag-或SpyCatcher-结合的分子顺序结合。如本领域技术人员将理解的,本发明的方法包括用于靶向另外的不同靶抗原的进一步迭代。

[0356] 在一个实施方案中,本发明提供了一种使用通用免疫受体靶向标签标记的抗原以治疗癌症的方法。可以治疗的癌症包括没有血管化或尚未充分血管化的肿瘤以及血管化肿瘤。癌症可包括非实体瘤(例如血液肿瘤,例如白血病和淋巴瘤)或可以包括实体瘤。用本发明的SpyTag或SpyCatcher通用免疫受体治疗的癌症类型包括但不限于癌、母细胞瘤和肉瘤、以及某些白血病或淋巴恶性肿瘤、良性和恶性肿瘤、以及恶性肿瘤例如肉瘤、癌和黑色素瘤。成人肿瘤/癌症和儿童肿瘤/癌症也包括在内。

[0357] 血液癌症是血液或骨髓的癌症。血液(或血源性)癌症的实例包括白血病,包括急性白血病(例如急性淋巴细胞白血病、急性粒细胞白血病、急性髓性白血病和成髓细胞、早幼粒细胞、骨髓单核细胞、单核细胞和红白血病)、慢性白血病(例如慢性髓细胞(粒细胞)白血病、慢性髓性白血病和慢性淋巴细胞白血病)、真性红细胞增多症、淋巴瘤、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤(惰性和高级形式)、多发性骨髓瘤、沃尔登斯特伦巨球蛋白血症、重链病、骨髓增生异常综合征、毛细胞白血病和脊髓发育不良。

[0358] 实体瘤是组织的异常肿块,通常不包含囊肿或液体区域。实体瘤可以是良性的或恶性的。不同类型的实体瘤以形成它们的细胞类型命名(例如肉瘤、癌和淋巴瘤)。实体瘤例如肉瘤和癌的例子包括纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨肉瘤和其它肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、淋巴恶性肿瘤、胰腺癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝细胞癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、甲状腺髓样癌、甲状腺乳头状癌、嗜铬细胞瘤、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、肾母细胞瘤、宫颈癌、睾丸肿瘤、精原细胞瘤、膀胱癌、黑色素瘤和CNS肿瘤(如胶质瘤(如脑干胶质瘤和混合性胶质瘤)、胶质母细胞瘤(也称为多形性胶质母细胞瘤)、星形细胞瘤、CNS淋巴瘤、生殖细胞瘤、髓母细胞瘤、神经鞘瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突胶质细胞瘤、脑血管瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤和脑转移癌)。

[0359] 在一个实施方案中,本发明提供了一种使用通用免疫受体靶向与病毒、细菌、寄生虫或其它感染相关的抗原以治疗感染的方法。

[0360] 在一个实施方案中,本发明提供了使用SpyTag或SpyCatcher通用免疫受体靶向自身抗原以治疗自身免疫疾病的方法。在一个实施方案中,所述方法包括遗传修饰免疫抑制性T调节细胞以表达包含SpyTag或SpyCatcher结构域的通用免疫受体。在一个实施方案中,包括用互配标签(分别为SpyCatcher或SpyTag)标记包含自身抗原结合结构域的分子,以及施用经修饰以表达包含SpyTag或SpyCatcher结构域的通用免疫受体的调节性T细胞。在一

个实施方案中，将调节性T细胞靶向自身抗原降低针对自身抗原的自身免疫反应。例如，在一个实施方案中，通过与被靶向的自身抗原结合而活化经遗传修饰的T调节细胞降低溶细胞性T细胞增殖。可通过本发明治疗的自身免疫疾病的非限制性实例包括多发性硬化症、炎症性肠病、克罗恩病、溃疡性结肠炎、移植物抗宿主病、类风湿性关节炎、牛皮癣、皮炎、自身免疫性I型糖尿病、系统性红斑狼疮、桥本氏甲状腺炎、重症肌无力等。如本领域技术人员将理解的，本发明可用于治疗任何以针对自身抗原的自身免疫应答为特征的自身免疫病。本发明包括治疗自身免疫疾病，其中自身抗原目前是已知的，以及自身抗原将在未来被阐明。

[0361] 然而，本发明不应被解释为仅限于本文公开的抗原靶和疾病。相反，本发明应解释为包括与疾病相关的任何抗原性靶，其中通用免疫受体可用于治疗该疾病。

[0362] 本发明的通用免疫受体修饰的T细胞也可以作为疫苗用于哺乳动物的离体免疫和/或体内治疗。优选地，哺乳动物是人。

[0363] 关于离体免疫，在将细胞施用给哺乳动物之前，在体外发生以下至少一种：i)细胞的扩增，ii)将编码通用免疫受体的核酸引入细胞，和/或iii)细胞的冷冻保存。

[0364] 离体程序在本领域中是熟知的并且在下面更全面地讨论。简而言之，从哺乳动物(优选人)分离细胞并用表达本文公开的通用免疫受体的载体遗传修饰(即体外转导或转染)。通用免疫受体修饰的细胞可以施用给哺乳动物接受者以提供治疗益处。哺乳动物接受者可以是人并且通用免疫受体修饰的细胞对于接受者可以是自体的。或者，细胞对于接受者而言可以是同种异体的、同系的或异种的。

[0365] 造血干细胞和祖细胞的离体扩增程序描述于通过引用并入本文的美国专利号5,199,942中，可以应用于本发明的细胞。其它合适的方法是本领域已知的，因此本发明不限于任何特定的离体扩增细胞的方法。简而言之，T细胞的离体培养和扩增包括：(1)从哺乳动物的外周血采集或骨髓外植体中收集CD34+造血干细胞和祖细胞；和(2)离体扩增这些细胞。除了美国专利号5,199,942中描述的细胞生长因子，其它因子如flt3-L、IL-1、IL-3和c-kit配体可用于细胞的培养和扩增。

[0366] 除了在离体免疫方面使用基于细胞的疫苗之外，本发明还提供用于体内免疫以在患者体内引发针对抗原的免疫应答的组合物和方法。

[0367] 通常，如本文所述活化和扩增的细胞可用于治疗和预防在免疫受损个体中出现的疾病。特别地，本发明的通用免疫受体修饰的T细胞用于治疗癌症。在一些实施方案中，本发明的细胞用于治疗有患癌症风险的患者。因此，本发明提供了治疗或预防癌症的方法，包括给有需要的受试者施用治疗有效量的本发明的通用免疫受体修饰的T细胞。

[0368] 本发明的SpyTag或SpyCatcher通用免疫受体修饰的T细胞可以单独施用，或作为药物组合物与稀释剂和/或与其它组分如IL-2或其它细胞因子或细胞群组合施用。简而言之，本发明的药物组合物可包含如本文所述的靶细胞群，联合一种或多种药学或生理学可接受的载体、稀释剂或赋形剂。这种组合物可包含缓冲液如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等；碳水化合物如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇；蛋白质；多肽或氨基酸如甘氨酸；抗氧化剂；螯合剂如EDTA或谷胱甘肽；佐剂(例如氢氧化铝)；和防腐剂。本发明的组合物优选配制用于静脉内施用。

[0369] 本发明的药物组合物可以以适合待治疗(或预防)的疾病的方式施用。施用的数量和频率将取决于患者的病情、患者疾病的类型和严重程度等因素，但适当的剂量可通过临

床试验确定。

[0370] 当标明“免疫学有效量”、“抗肿瘤有效量”、“肿瘤抑制有效量”或“治疗量”时，待施用的本发明组合物的精确量可以由医生考虑年龄、体重、肿瘤大小、感染或转移程度以及患者(受试者)的状况等个体差异而确定。通常可以说包含本文所述的T细胞的药物组合物可以以10^4至10^9个细胞/kg体重、优选10^5至10^6个细胞/kg体重的剂量施用，包括这些范围内的所有整数值。T细胞组合物也可以以这些剂量多次施用。可以通过使用免疫治疗中通常已知的输注技术来施用细胞(参见例如Rosenberg et al.,New Eng.J.of Med.319:1676,1988)。医学领域的技术人员可以通过监测患者的疾病迹象并相应地调整治疗容易地确定特定患者的最佳剂量和治疗方案。

[0371] 在一些实施方案中，可能希望将活化的T细胞施用于受试者，然后再抽血(或进行单采术)，根据本发明从其中活化T细胞，并将这些活化和扩增的T细胞重新输注给患者。这个过程可以每隔几周进行多次。在一些实施方案中，T细胞可以从10cc到400cc的抽血中被活化。在一些实施方案中，T细胞从20cc、30cc、40cc、50cc、60cc、70cc、80cc、90cc或100cc的抽血中被活化。不受理论束缚，使用这种多次抽血/多次回输方案可用于选择一些T细胞群。

[0372] 本发明组合物的施用可以以任何方便的方式进行，包括通过气雾剂吸入、注射、摄取、输血、植入或移植。本文所述的组合物可以皮下、皮内、瘤内、结内、髓内、肌内、通过静脉内(i.v.)注射或腹膜内施用于患者。在一个实施方案中，本发明的T细胞组合物通过皮内或皮下注射施用于患者。在另一个实施方案中，本发明的T细胞组合物优选通过静脉内注射施用。T细胞组合物可以直接注射到肿瘤、淋巴结或感染部位。

[0373] 在本发明的一些实施方案中，使用本文所述的方法或本领域已知的将T细胞扩增至治疗水平的其它方法活化和扩增的细胞与任何数量的相关治疗方式一起施用给患者(例如之前、同时或之后)，所述治疗方式包括但不限于使用药剂如抗病毒治疗、西多福韦和白细胞介素-2、阿糖胞苷(也称为ARA-C)或那他珠单抗治疗MS患者或依法珠单抗治疗银屑病患者或PML患者的其它治疗。在进一步的实施方案中，本发明的T细胞可以与化疗、放疗、免疫抑制剂例如环孢素、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤、霉酚酸酯和FK506、抗体或其它免疫消融剂如CAM PATH、抗CD3抗体或其它抗体治疗、细胞毒素、氟达利滨、环孢素、FK506、雷帕霉素、霉酚酸、类固醇、FR901228、细胞因子和辐射联合使用。这些药物抑制钙依赖性磷酸酶钙神经素(环孢菌素和FK506)或抑制对生长因子诱导的信号传导很重要的p70S6激酶(雷帕霉素)(Liu et al.,Cell 66:807-815,1991;Henderson et al.,Immun.73:316-321,1991;Bierer et al.,Curr.Opin.Immun.5:763-773,1993)。在进一步的实施方案中，本发明的细胞组合物与下述治疗联合施用于患者(例如之前、同时或之后)，所述治疗为骨髓移植、使用化疗剂如氟达拉滨的T细胞消融治疗、外照射放疗(XRT)、环磷酰胺或抗体如OKT3或CAMPATH。在另一个实施方案中，本发明的细胞组合物在B细胞消融治疗例如与CD20反应的药剂例如Rituxan之后施用。例如，在一个实施方案中，受试者可以接受高剂量化疗的标准治疗，然后进行外周血干细胞移植。在一些实施方案中，在移植后，受试者接受本发明的扩增免疫细胞的输注。在另一个实施方案中，在手术之前或之后施用扩增的细胞。

[0374] 对患者施用的上述治疗的剂量将随所治疗疾病的确切性质和治疗接受者而变化。可以根据本领域公认的实践来进行人施用剂量的缩放。T细胞给药和计划的策略已有讨论(Ertl et al,2011,Cancer Res,71:3175-81;Junghans,2010,Journal of Translational

Medicine,8:55)。

[0375] 筛选

[0376] 在一个实施方案中,本发明提供了一种筛选潜在抗原结合组合物包括例如抗体、肽、寡核苷酸、核酶、适体等的方法。根据本发明的一个实施方案,修饰以表达包含SpyTag或SpyCatcher结合结构域的通用免疫受体的T细胞用于针对组合物结合靶抗原的能力筛选互配标签标记的组合物(即分别用SpyCatcher或SpyTag部分标签标记)。在一个实施方案中,本发明的筛选系统用于诊断、确定患者的试验资格、确定与靶组织中抗原最大结合的时间(在健康组织中没有残留药剂),以及作为监测对治疗的应答的手段。在一个实施方案中,使用基于细胞的测定筛选组合物,所述测定包含表达通用免疫受体的修饰的T细胞。在一个实施方案中,所述测定包括向该测定施用标签标记的组合物并检测由T细胞诱导的可检测应答。例如,在一个实施方案中,所述测定包括检测T细胞的活化。在另一个实施方案中,所述测定包括检测分泌的细胞因子的水平。在一个实施方案中,抗原结合组合物的靶抗原被固定在表面例如细胞培养板或珠上。在另一个实施方案中,所述测定包括表达靶抗原的细胞。

[0377] 定量通用免疫受体(UIR)转换(turnover)的方法

[0378] 在一个方面,提供了一种定量细胞表面上通用免疫受体的转换的方法。由于SpyCatcher和SpyTag的结合是共价的,因此可以评估武装的通用免疫受体在细胞表面的转换速度。转换率的知识可用于例如为患者限定抗体剂量策略或方案。

[0379] 在一个实施方案中,所述方法包括步骤(a)将经遗传修饰以表达通用免疫受体的细胞与包含SpyCatcher或SpyTag的药剂接触,从而产生武装受体,所述通用免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含SpyCatcher或SpyTag的胞外结构域;和(b)确定所述武装受体相对于参考量的量。在一个实施方案中,参考量是在先前时间武装受体的量。

[0380] 在一个实施方案中,顺次或同时给哺乳动物施用所述细胞和所述药剂,并监测哺乳动物以确定武装受体的水平。如果确定武装受体的水平不足以治疗肿瘤或癌症,则给哺乳动物施用进一步的细胞和/或药剂。

[0381] 在一个实施方案中,所述药剂与SpyTag连接。在另一个实施方案中,所述药剂是抗体、抗体片段、scFv或DARPin。在另一个实施方案中,所述药剂是抗体并且是人IgG。

[0382] 在一个实施方案中,SpyTag或SpyCatcher通过光活化位点特异性缀合(LASIC)与所述药剂连接。在一个实施方案中,所述细胞是T细胞、天然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、巨噬细胞、干细胞或调节性T细胞。在一个实施方案中,所述细胞是T细胞。在另一个实施方案中,所述细胞是自体细胞。在另一个实施方案中,通用免疫受体还包含共刺激分子的胞内结构域。在一些实施方案中,共刺激分子是4-1BB、CD28、CD27、CD2、CD3、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3或与CD83特异性结合的配体。

[0383] 在一个实施方案中,武装受体的量通过标记所述药剂并检测标记的药剂来确定。所述药剂可以通过将所述药剂与标记分子连接或接触来标记,其中标记分子包括例如myc-标签、FLAG-标签、His-标签、HA-标签、荧光蛋白(例如绿色荧光蛋白(GFP))、荧光团(例如四甲基罗丹明(TRITC)、异硫氰酸荧光素(FITC))、二硝基苯酚、peridinin叶绿素蛋白复合物、绿色荧光蛋白、生物素、藻红蛋白(PE)、组氨酸、链霉抗生物素蛋白、抗生物素蛋白、辣根过

氧化物酶、棕榈酰化、亚硝基化、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶、谷胱甘肽S-转移酶(GST)、麦芽糖结合蛋白、任何类型的荧光材料包括量子点纳米晶体、放射性同位素、重金属、超磁性纳米粒子以及用于放射性同位素标记的任何类型的化合物,包括1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸(NOTA)或别藻蓝蛋白(APC)。

[0384] 可以直接或间接地用任何这样的标记对所述药剂进行标记。可以使用诸如化学偶联和化学交联剂的技术将所述标记与所述分子缀合。或者,可以制备多核苷酸载体,其将经标记的分子编码为融合蛋白。然后可以对细胞系进行工程化以表达经标记的分子,并且可以将经标记的分子从培养基中分离、纯化并用于本文公开的方法中。经标记的氨基酸、经标记的肽、经标记的蛋白质或分子报告分子也可以通过表达的蛋白质连接(例如使用分选酶、内含肽等)连接到所述分子上。

[0385] 在一个实施方案中,武装受体的量通过质谱细胞术确定。

[0386] 实验实施例

[0387] 通过参考下面的实验实施例对本发明作进一步详细说明。除非另有说明,提供这些实施例仅用于说明目的,而不意图限制。因此,本发明不应被解释为限于以下实施例,而是应被解释为包括由于本文提供的教导而变得明显的任何和所有变化。

[0388] 在没有进一步描述的情况下,使用前面的描述和下面的说明性实施例,相信本领域技术人员可以制备和使用本发明的化合物并实施要求保护的方法。因此,以下工作实施例具体指出了本发明的优选实施方案,不应被解释为以任何方式限制本文的其余部分。

[0389] 现在描述这些实验中使用的材料和方法。

[0390] A24-蛋白G-SpyTag(A24-PGST)、SpyCatcher和DARPin-SpyTag构建体的克隆

[0391] 如先前研究中所述,将与7xGGS接头和SpyTag融合的在第24个氨基酸位置含有一个琥珀密码子的蛋白G的HTB1结构域通过NdeI和AgeI克隆位点克隆到pSTEPL载体(Warden-Rothman et al.,Anal Chem 2013,85(22),11090-11097;Hui et al.,Bioconjugate Chemistry 2015,26(8),1456-1460.)。合成myc-DARPin9.26-SpyTag、myc-Eo1-SpyTag和myc-Ec1-SpyTag(GeneArt)并通过NdeI和AgeI克隆位点克隆到pSTEPL载体(Kasaraneni,N.,mBio 2017,8(6),e01860-17;Steiner et al.Journal of Molecular Biology 2008,382(5),1211-1227;Stefan et al.Mol Biol 2011,413(4),826-843)。为产生Flag-Eo1-SpyTag,使用聚合酶链反应(PCR)延伸在Eo1-SpyTag构建体的5'末端添加NdeI酶切位点和Flag-tag。然后根据上述方法将Flag-Eo1-SpyTag克隆到pSTEPL载体。myc-RFP-SpyTag通过RFP的PCR扩增产生,使用引物在5'末端添加NdeI酶切位点和myc-tag,在3'末端添加XhoI酶切位点,随后使用添加的酶切位点克隆到pSTEPL载体中7xGGS-SpyTag的上游。SpyCatcher-Venus通过Venus的PCR扩增产生,使用引物在5'末端添加NheI酶切位点,在3'末端添加XhoI酶切位点,随后使用添加的酶切位点克隆到pSTEPL载体中SpyCatcher-7xGGs结构域的下游。

[0392] 为产生上述构建体的SpyTag-DA版本,使用QuickChange定点诱变(Agilent)与正向引物(5'-GCATATCGTTATGGTCGCTGCTTACAAGCCAACGA-3')和反向引物(5'-TCGTTGGCTTGTAAGCAGCGACCATAACGATATGC-3')一起在SpyTag编码区导入A至C点突变,将Asp117突变为Ala117(Zakeri et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.2012,109(12),E690-7)。

[0393] 所有质粒序列均测序证实。

[0394] 细菌表达的蛋白质的表达和纯化

[0395] 将含有A24-蛋白G-SpyTag(A24-PGST)序列的pSTEPL质粒和pEVOL-pBpF共转化到T7 Express Competent E.coli(New England Biolabs)中。将在含有100mg/ml氨苄青霉素和25mg/ml氯霉素的溶原肉汤(LB)中的细菌起始培养物在摇床培养箱(230rpm,37℃)中生长8小时。然后将起始培养物在含有100μmg/ml氨苄青霉素、25μmg/ml氯霉素、500μM L-苯甲酰苯丙氨酸(Bachem)、0.1%w/v L-(+)-阿拉伯糖(Sigma-Aldrich)和0.5%v/v葡萄糖的自诱导培养基(Formedium)中1:1000稀释,在摇床培养箱中生长16小时(230rpm,37℃)。

[0396] 将所有含有DARPin和RFP构建体的pSTEPL质粒转化T7 Express Competent E.coli(New England Biolabs)。如上所述在含有100mg/ml氨苄青霉素和0.5%v/v葡萄糖的自诱导培养基(Formedium)中生长培养物。

[0397] 培养物以7,000rpm沉淀10分钟。以每0.8-1g沉淀5mL缓冲液的比例,将沉淀重悬于补加0.4mg/mL溶菌酶、4μg/mL DNase和无EDTA的完全蛋白酶抑制剂混合物(Roche)的B-PER裂解缓冲液中。裂解物在室温旋转1小时,然后在-80℃冷冻30分钟。然后在室温解冻细胞裂解物,随后在4℃以15,000×g离心10分钟。收集裂解物的水层,在含有Talon 50/50金属亲和树脂(1ml 50/50树脂/100mL细菌培养物;Clontech)的10mL Poly-Prep层析柱中在室温温育1小时。使裂解液流过柱,树脂珠用5柱体积的不含镁和钙的无菌1×PBS(Corning)洗涤。

[0398] 如前所述(Warden-Rothman et al.Anal Chem 2013,85(22),11090-11097)进行分选酶裂解纯化。简而言之,将含有2mM三甘氨酸和50μM氯化钙的1×PBS添加到每个柱中(500μL缓冲液/1mL 50/50树脂)并在37℃温育2小时。收集洗脱液,过滤除菌,并在4℃储存以备后用。

[0399] BCA测定试剂盒(Pierce)用于测定蛋白质浓度。为测试SpyTag结构域的功能,将蛋白质与过量的SpyCatcher-Venus混合并在室温温育30分钟。样品在SDS-PAGE还原凝胶(Bio-Rad)上电泳以确认异肽键形成。对于体内研究,使用1%Triton X-114相分离方法去除内毒素(Liu et al.,Clin Biochem 1997,30,455-463)。使用Endosafe®-PTS系统和鲎变形细胞溶解物(LAL)测试柱(Charles River Laboratories)确认内毒素水平<10内毒素单位/mL。

[0400] A24-蛋白G-SpyTag与临床级IgG的光活化位点特异性缀合

[0401] A24-蛋白G-SpyTag(A24-PGST)与临床级IgG(曲妥珠单抗、利妥昔单抗、西妥昔单抗)按照Hui等人先前描述的方法(Hui et al.,Bioconjugate Chemistry 2015,26(8),1456-1460)交联。简而言之,在A24-PGST纯化后,进行了小型先导缀合试验以确定完全交联1μg IgG所需的A24-PGST体积。缀合在UV光下于4℃进行2小时,样品在SDS-PAGE还原凝胶(Bio-Rad)上电泳以确认IgG重链与A24-PGST缀合。然后将确定实现最大缀合的体积/重量比用于按照相同的步骤大批量生产。

[0402] 为去除过量A24-PGST,将样品在100kDa MWCO自旋过滤柱(Millipore Sigma)中以14,000×g离心,然后用1×PBS以5×柱体积洗涤。通过BCA检测试剂盒(Pierce)测定蛋白质浓度。样品保存在4℃以备后用。

[0403] SDS-PAGE

[0404] 进行了十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳以确定蛋白质的表达、蛋白G-SpyTag和IgG重链的交联以及SpyTag标记的靶向配体和SpyCatcher试剂之间的共价键形成。将样品在2-巯基乙醇存在下在95℃煮5分钟，然后上样到4-15％梯度Tris/甘氨酸凝胶(Bio-Rad)上。将凝胶用SimplyBlue SafeStain(Invitrogen)染色1小时，然后用水脱色过夜。慢病毒构建体的克隆和慢病毒包装

[0405] 合成了编码SpyCatcher截短版本(SpyCatcherΔ)的基因片段(Li et al.,J.Mol.Biol.2014,426(2),309-317)(GeneArt)并用限制酶BamHI和NheI消化。将插入片段连接到第三代无复制能力慢病毒载体中，该载体含有CD28-CD3ζ、41BB-CD3ζ或缺乏功能性胞内T细胞信号传导结构域(Delta-Zeta;Δζ)胞内结构域。编码GFP和T2A位点的区域在受体的上游，以使得使用GFP作为替代标记来检测转基因表达(图2A和图13)。使用含有CD28-CD3ζ或41BB-CD3ζ胞内信号传导结构域的赫赛汀衍生的scFv(4D5)(Zhao,2009)，使用相同方法学克隆抗Her2嵌合抗原受体。所有受体的表达由EF1a启动子驱动(Milone et al.,Molecular Therapy 2009,17(8),1453-1464)。

[0406] HER2 WT是来自Mien-Chie Hung的礼物(Addgene plasmid#16257;http://n2t.net/addgene:16257;RRID:Addgene_16257)(Li et al.,Cancer Cell 2004,6(5),459-469)。EGFR WT是来自Matthew Meyerson的礼物(Addgene plasmid#11011;http://n2t.net/addgene:11011;RRID:Addgene_11011)(Greulich et al.,Plos Med 2005,2(11),e313)。Her2和EGFR序列经PCR扩增并用限制酶XbaI和SalI消化。基因序列连接到第三代无复制能力慢病毒包装载体中EF1a启动子下游。

[0407] 如先前所述(Smith et al.,Molecular Therapy 2016,24(11),1987-1999)，使用HEK293T细胞(Invitrogen)生产无复制能力慢病毒。简而言之，使用Lipofectamine 2000(Invitrogen)将pELNS转移质粒和慢病毒包装质粒pVSV(VSV糖蛋白表达载体)、pRSV.REV(Rev表达载体)和pMDLg/p.RRE(Gag/Pol表达质粒)转染HEK293T细胞。收集24小时和48小时上清液，通过25,000rpm超速离心2小时沉淀病毒。浓缩病毒储存在-80℃直至使用。使用HEK293T细胞的病毒转导通过测量替代标记GFP确定病毒效价(IU/mL)。

[0408] 细胞系

[0409] 已建立的人肿瘤细胞系SKOV3、MDA-MB-468、A1847、CRL5803、MDA-MB-361、Ramos和HEK293T购自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。将细胞在完全培养基(CM)中在37℃和5％CO_2条件下培养，完全培养基由补加10％FBS(VWR)、100U/mL青霉素和100μg/mL链霉素的RPMI 1640(GIBCO)组成。所有细胞系都常规检测支原体。

[0410] 为产生Ramos-Her2和Ramos-EGFR细胞系，用含有两者之一蛋白质编码序列的慢病毒转导Ramos细胞。然后增殖细胞，用抗Her2抗体(APC;BioLegend)或抗EGFR抗体(PE;BioLegend)染色，使用荧光活化细胞分选(FACS)对蛋白质表达进行分选。

[0411] 为产生SKOV3-SpyCatcher-BBζ，SKOV3细胞用含有GFP-T2A-SpyCatcher-BBζ编码序列的慢病毒转导。增殖细胞并用FACS进行GFP表达的分选。

[0412] 健康供体原代人T细胞购自Human Immunology Core(宾夕法尼亚大学)。CD4+和CD8+T细胞等量混合并以3:1比例用抗CD3/CD28珠(Invitrogen)刺激。在扩增过程中，T细胞在37℃和5％CO_2下保持在CM中。24小时后，以5-10的感染复数(MOI)添加慢病毒。活化后7天，通过磁分离将抗CD3/CD28珠从培养物中去除。T细胞以0.5-1×10^6个细胞/mL的密度再

培养7天。在加入慢病毒后,CM补加50-100IU/mL的IL-2(Prometheus Therapeutics and Diagnostics)并维持到T细胞用于功能测定前2天。在扩增过程中使用Coulter Counter(Beckman Coulter)持续跟踪T细胞计数和体积。通过流式细胞术检测GFP表达的转导效率。

[0413] SpyCatcher T细胞武装(arming)和武装受体的检测

[0414] 将表达SpyCatcher的T细胞重悬于含有各种浓度SpyTag标记的靶向剂的CM中。细胞在37℃和5%CO_2下温育30-60分钟,然后用CM洗涤2次。对于IgG-SpyTag武装T细胞的染色,使用与LightningLink APC(Expedeon)缀合的山羊多克隆抗人IgG(Sigma-Aldrich)。对于myc-或Flag-DARPin-SpyTag武装T细胞的染色,使用抗Myc-Alexa647(Cell Signaling Technologies)或抗FLAG-BV421(BioLegend)。通过流式细胞术分析染色的细胞(图14和图15)。

[0415] 对于受体转换(turnover)实验,将T细胞扩增并静息至平均体积<300fL,然后如上所述用SpyTag标记的IgG或SpyTag标记的DARPin武装。对于基础转换(basal turnover),将T细胞保持在CM中,每24小时对加载受体进行染色,总共96小时。对于抗原诱导的转换,T细胞以3:1的效应物与靶的比例组合并在培养24小时后染色。

[0416] Western印迹

[0417] SKOV3-SpyCatcher-BBζ与2000nM myc-RFP-SpyTag或myc-RFP-SpyTag-DA在37℃温育1小时。使用含有蛋白酶抑制剂混合物(Roche,Cat#5892970001)的RIPA裂解缓冲液裂解细胞并离心5分钟。然后收集裂解物并使用BCA测定法(Thermo Scientific)定量蛋白质浓度。将80μg蛋白质样品与含有5%β-巯基乙醇(BioRad)的上样缓冲液(Lammeli缓冲液;BioRad)混合并在95℃温育5分钟。将样品上样到4-15%Minigels protean TGX(BioRad)并在150V电泳1小时。蛋白质阶梯(BioRad)与样品一起电泳。将蛋白质样品在100V下1小时转移到PVDF膜(Millipore)。用TBST(1%Tween)(BioRad)洗膜并与一抗和二抗温育,一抗和二抗包括纯化的小鼠抗人CD3ζ(BD Pharmigen;1:1,000)、抗人/小鼠/大鼠GAPDH(R&D;1:20,000)和过氧化物酶AffiniPure山羊抗小鼠IgG(Jackson Immunology;1:10,000)。在一抗和二抗温育步骤之间将膜洗涤3次。使用ECL prime western印迹检测试剂(GE Healthcare#RPN2236)对膜进行显影并使用GE ImageQuant LAS 4000系列成像系统进行成像。

[0418] 测试SpyCatcher T细胞的效应物功能

[0419] 对于细胞因子分泌测定,赫赛汀-ST蛋白在包被缓冲液(BioLegend)中稀释并在平底MaxiSorp板(Sigma)中于4℃温育过夜。将孔用PBS洗涤两次并在每个孔中加入70,000个免疫受体-(+)细胞。用透气密封盖住平板并在37℃和5%CO_2下温育16小时。收获的上清液储存在-20℃以备后用。使用人IFNγ γELISA试剂盒(BioLegend)按照随附的方案评估IFNγ γ分泌水平。

[0420] 使用Luc-ScreenTM Extended-Glow萤光素酶报告基因检测系统(Applied Biosystems)完成裂解功能的终点测试。对于武装的SpyCatcher T细胞裂解,如上所述,将SpyCatcher T细胞与精确浓度的合适的SpyTag标记的靶向配体一起温育。武装的SpyCatcher T细胞和表达click beetle绿色萤光素酶(CBG)的肿瘤细胞以7:1的E:T比例在200μL无苯酚CM中混合并在37℃和5%CO_2下温育过夜。将平板以1,200rpm离心5分钟,从每个孔中取出100μL培养基,并按照制造商的方案添加萤光素酶缓冲液。使用酶标仪获得萤光素酶读数。对于按需裂解,在无苯酚CM中同时组合SpyCatcher T细胞、靶向配体和肿瘤细

胞。所有其它步骤均以与武装裂解相同的方式进行。使用以下等式计算细胞毒性:[1-(T细胞+靶向配体+靶细胞)/(单独的靶细胞)-1-(T细胞+靶细胞)/(单独的靶细胞)]*100。

[0421] 使用xCELLigence实时细胞分析仪器(ACEA Biosciences)进行实时裂解分析。将贴壁肿瘤细胞铺板并在仪器中在37℃和5%CO_2下温育过夜。然后如上所述在武装后添加SpyCatcher T细胞。对于按需裂解,将SpyCatcher T细胞添加到肿瘤细胞中并温育4小时,然后添加靶向配体。使用RTCA软件(ACEA Biosciences)进行细胞毒性计算。

[0422] 异种移植模型

[0423] NOD-scid IL2Rγγnull购自Stem Cell and Xenograft Core(University of Pennsylvania)。按照University of Pennsylvania Institutional Animal Care and Use Committee批准的方案,将6-12周龄雌性小鼠饲养在无病原体的环境中。对于腹膜内(I.P.)肿瘤模型,小鼠腹膜内注射1×10^6个SKOV3-CBG+GFP肿瘤细胞。7天后,12.5×10^6个SpyCatcher免疫受体T细胞用1000nM赫赛汀-ST武装并腹膜内注射。T细胞注射后1天,腹膜内注射SpyTag标记的靶向配体,随后每3天注射,直至停止治疗。如先前所述(Lanitis et al.,Molecular therapy:the journal of the American Society of Gene Therapy 2012,20(3),633-643),通过生物发光成像测量肿瘤进展并量化为平均辐射强度,在前肢和后肢之间腹部进行门控。由于腹水形成,小鼠在体重增加20%时被处死。从所有组中排除在肿瘤注射后第11天在注射部位形成可触及的皮下(S.C.)肿瘤的小鼠。

[0424] 血液样品由Stem Cell and Xenograft Core(University of Pennsylvania)通过眼眶后出血收集。按照提供的方案(BD Biosciences),使用Trucount™ Tubes定量外周血T细胞。染色组由抗人CD3(Brilliant Violet 605;BioLegend)、抗人CD45(PE;eBiosciences)和抗人CD8(APC-H7;BD Biosciences)组成。

[0425] 对于皮下肿瘤模型,小鼠在侧腹皮下注射1×10^6个SKOV3-CBG+GFP肿瘤细胞。6天后,12.5×10^6个SpyCatcher免疫受体T细胞被武装并腹膜内注射。在T细胞输注后1天,腹膜内注射SpyTag标记的靶向配体,随后每3天注射,直至停止治疗。通过卡尺测量来测量肿瘤进展并使用以下公式量化:体积=3.14/6(长度*(宽度)^2),其中长度为最长直径,宽度为最短直径。

[0426] 统计学分析

[0427] 除非另有说明,否则数据报告为平均值+/-标准偏差(SD)。除非另有说明,否则使用非配对双尾t检验进行统计学分析。GraphPad Prism 8.0软件用于统计学分析。$P<0.05$被认为是显著的。

[0428] 视频

[0429] 用1000nM(V1)、100nM(V2)、10nM(V3)或0nM(V4)赫赛汀-ST武装的GFP-SpyCatcher-BBζT细胞显示,表达核RFP的Her2+SKOV3细胞的剂量依赖性裂解。用1000nM(V5)赫赛汀-ST武装的GFP-SpyCatcher-ΔζT细胞未观察到肿瘤细胞裂解。将赫赛汀-ST添加到与Her2+SKOV3细胞共培养的非武装GFP-SpyCatcher-BBζT细胞中诱导裂解功能(V6;赫赛汀-ST在48小时添加)。

[0430] 现在描述实验的结果。

[0431] SpyTag标记的肿瘤抗原靶向配体的产生

[0432] SpyCatcher免疫受体系统由两个主要成分组成:含有SpyTag结构域的靶向配体和

表达SpyCatcher免疫受体的T细胞(图1A)。我们使用两种方法来产生含有SpyTag的靶向配体:位点特异性缀合和遗传融合。使用由Hui et al Bioconjugate Chemistry 2015,26(8),1456-1460开发的光活化位点特异性缀合(LASIC)衔接蛋白实现了SpyTag与临床级IgG的位点特异性连接。该衔接蛋白源自蛋白G,蛋白G是一种结合IgG的细菌细胞壁蛋白,其在CH2-CH3连接处与人IgG的Fc部分相互作用(Sauer-Eriksson et al.,Struct Lond Engl1993 1995,3(3),265-278)。使用amber-tRNA抑制子氨酰合酶对,表达蛋白G-SpyTag,其在A24氨基酸位置掺入非天然氨基酸苯甲酰苯丙氨酸(BPA)。当与IgG组合时,A24-蛋白G-SpyTag与IgG的Fc结构域非共价结合。在暴露于UV光(365nm)后,BPA分子被活化并将蛋白G-SpyTag位点特异性地共价交联到Fc结构域(图1A)。因此,最终的IgG分子包含两个共价连接的蛋白G-SpyTag分子,各位于Fc结构域的各一侧(图1A)。

[0433] 通过还原SDS-page凝胶对与蛋白G-SpyTag交联的临床级抗体的分析表明,赫赛汀(图1B)、西妥昔单抗和利妥昔单抗的IgG重链几乎完全交联,如带移等于两种蛋白质的组合质量(组合约60kDa)所证实(图6A)。为了证明在UV暴露后SpyTag结构域的功能性保持不变,我们将赫赛汀-SpyTag与过量的SpyCatcher-Venus(38kDa)一起温育。观察到形成的带移在煮沸和还原条件下保持在两种蛋白质的近似组合质量(100kDa)以及单重链-蛋白质G带的丢失,表明在两种蛋白质之间形成共价键(图1B)。为了进一步拓宽靶向配体类型的库,使用分选酶标签表达蛋白质连接(STEPL)系统(Warden-Rothman et al.,Anal Chem 2013,85(22),11090-11097),表达Her2(DARPin9.26;22.5kDa)(Kasaraneni et al.,mBio 2017,8(6),e01860-17)(图1C)、EGFR(E01;22.4kDa)(Steiner et al.,Journal of Molecular Biology 2008,382(5),1211-1227)或EpCAM(Ec1;22.8kDa)(Stefan et al.,J Mol Biol 2011,413(4),826-843)(图6B)(Warden-Rothman et al.,Anal Chem 2013,85(22),11090-11097),其靶向经设计的含有C端SpyTag结构域的锚蛋白重复蛋白(DARPin)。通过与过量Venus-SpyCatcher缀合再次验证SpyTag功能性,证实形成了在两种蛋白质组分的近似组合分子量(61kDa)的移位带,其抗煮沸和还原条件的降解(图1C;图6A-6B)。

[0434] 先前研究表明,含有天冬氨酸到丙氨酸突变(SpyTag-DA)的SpyTag变体的反应消除了与SpyCatcher形成共价键,同时仍允许形成Kd为200nM的非共价复合物(Zakeri et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.2012,109(12),E690-7)。为了作为共价键形成的阴性对照,还产生了赫赛汀-STDA和9.26-STDA靶向配体(图1B-1C)。

[0435] SpyCatcher免疫受体的克隆、表达及检测

[0436] 截短的84个氨基酸版本的SpyCatcher(Li et al.,J.Mol.Biol.2014,426(2),309-317)被克隆到之前验证过的(Lanitis et al.,Molecular therapy:the journal of the American Society of Gene Therapy 2012,20(3),633-643;Song et al.,Human gene therapy 2013,24(3),295-305)含有与CD3ζ串联的4-1BB或CD28共刺激结构域的慢病毒构建体以产生SpyCatcher-BBζ和SpyCatcher-28ζ免疫受体。还产生了缺少胞内信号传导结构域的SpyCatcher受体作为阴性对照(SpyCatcher-Δζ;图2A)。所有构建体都含有在T2A自裂解肽上游的eGFP,允许GFP和受体共表达,并使用GFP作为原代人T细胞转导的替代标记。

[0437] 为确定SpyTag是否可以与在细胞表面上表达的SpyCatcher免疫受体共价连接,转导永生化癌细胞系SKOV3以表达SpyCatcher-BBζ构建体(图7A),然后与可溶性RFP-SpyTag

蛋白温育。当通过CD3ζ的western印迹染色评估时，温育导致形成在还原条件下抗降解的移位带，证实两种蛋白质之间形成共价键(图2B)。剩余的50kDa-37kDa之间的未移动条带可能代表细胞内受体，因为全细胞裂解物被上样到凝胶上。与RFP-SpyTag-DA蛋白温育显示SpyTag中关键天冬氨酸残基突变为丙氨酸消除了其与SpyCatcher形成共价键的能力(图2B)。接下来，原代人T细胞被转导以表达SpyCatcher免疫受体并与不同浓度的赫赛汀-ST温育，如通过APC抗人IgG多克隆抗体染色所检测到的，这导致受体的剂量依赖性加载(“武装”)(图2C)。此外，SpyTag缀合的靶向配体(9.26-ST)和SpyCatcher受体之间的共价键形成是实现最大靶向配体武装所必需的，特别是在低浓度下(图2D)。

[0438] SpyCatcher T细胞的体外效力

[0439] 为确定SpyTag与原代人T细胞上的SpyCatcher免疫受体的结合是否会诱导特异性活化，将SpyCatcher T细胞在不同量的固定化赫赛汀-ST的存在下温育。SpyCatcher-BBζ和SpyCatcher-28ζT细胞在固定化赫赛汀-ST存在下以剂量依赖性方式分泌IFNγ γ，但是SpyCatcher-ΔζT细胞不是这样(图2E)，其中SpyCatcher-28ζT细胞比SpyCatcher-BBζT细胞更免疫学敏感($P<0.001$)。

[0440] 由于SpyCatcher免疫受体是第一个可以由靶向配体共价武装的通用免疫受体，其将抗原特异性永久地附着在受体上直到它被降解，因此我们评估了预武装的SpyCatcher T细胞在没有过量靶向配体存在下的裂解能力。我们试图确定足够量的靶向配体是否可以共价武装到细胞表面的受体上，以在抗原识别后引发癌细胞的T细胞裂解(图3A，左)。用赫赛汀-ST武装的SpyCatcher-BBζ和SpyCatcher-28ζ裂解Her2(+)SKOV3肿瘤细胞，而未转导的和用赫赛汀-ST武装的SpyCatcher-ΔζT细胞在20小时共培养后显示出最低的裂解活性(图3B)。裂解以剂量依赖性方式发生，增加赫赛汀-ST武装浓度与增加裂解能力相关(图3B)，对应于先前观察到的剂量依赖性受体加载(图2C)。使用活细胞成像观察裂解功能证实了这些结果，同时也证明了武装剂量依赖性T细胞聚集(视频)。用1000nM赫赛汀-ST武装的SpyCatcher-ΔζT细胞未观察到肿瘤细胞裂解和T细胞聚集，表明裂解和聚集是活化依赖性的。

[0441] 此外，剂量依赖性武装也影响了SpyCatcher T细胞识别表达不同水平靶抗原的肿瘤细胞的能力。SpyCatcher-BBζT细胞能够以武装浓度依赖性方式裂解表达高水平抗原的肿瘤细胞，但对表达较低水平Her2的细胞系失去功能性(图8A-8B)。相比之下，高度武装的SpyCatcher-28ζT细胞能够靶向具有可变Her2表达的肿瘤细胞，其裂解能力与Her2表达水平相关。当武装浓度降低时，SpyCatcher-28ζT细胞对表达较低水平Her2的肿瘤细胞系失去效力(图8A-8B)。

[0442] 当与含有28ζ或BBζ胞内信号传导结构域的Her2靶向嵌合抗原受体T细胞相比时，发现用赫赛汀-ST最大武装的SpyCatcher T细胞不如CAR有效，特别是在较低E:T比率时(图9)。

[0443] SpyCatcher-BBζ和SpyCatcher-28ζ在分别用EGFR靶向抗体西妥昔单抗-ST或CD20靶向抗体利妥昔单抗-ST武装时也能够裂解EGFR(+)或CD20(+)肿瘤细胞(图3C)。用于现成临床级抗体的位点特异性标记方法导致向两条IgG重链添加SpyTag肽，如Hui等人先前所示，以及进一步通过缀合后重链条带的几乎完全移位所示(图1B)(Hui et al., Bioconjugate Chemistry 2015,26(8),1456-1460)。如果两个SpyCatcher免疫受体被同一

抗体上的两个SpyTag肽交联，或者如果两个SpyCatcher T细胞被同一抗体上的SpyTag肽相互束缚，则这种多价标记方法可能潜在导致抗原非依赖性活化。然而，用由两个SpyTag肽相同缀合的非靶向对照抗体武装的SpyCatcher T细胞不介导显著裂解，表明靶向配体的二价SpyTag标记不导致T细胞在武装时明显的抗原非依赖性活化(图3C)。二价标记的抗体在固定化时能够诱导T细胞活化。共价加载含有靶向肿瘤抗原Her2、EGFR或EpCAM的设计的锚蛋白重复蛋白(DARPin)的SpyTag也导致表达抗原肿瘤细胞的特异性裂解，证明了使用多种靶向配体类型和携带SpyCatcher受体的T细胞的潜力(图3D)。

[0444] 在抗原识别和CAR T细胞活化后，CAR被内化，导致细胞表面的可检测水平降低(Walker et al.,Molecular Therapy 2017,25(9),2189-2201)。为评估抗原刺激环境中T细胞表面武装SpyCatcher受体丢失速率，将SpyCatcher T细胞武装、洗涤，与或不与表达抗原肿瘤细胞共培养。在不存在表达抗原肿瘤细胞的情况下，发生中度武装受体丢失，相对于SpyCatcher-BBζT细胞，SpyCatcher-28ζT细胞在24小时内经历更快的丢失。与CARs52类似，当用表达抗原癌细胞刺激时，在同一时间点在SpyCatcher-BBζ或SpyCatcher-28ζT细胞上均未检测到武装受体表达(图3E)。然而，SpyCatcher-BBζ和SpyCatcher-28ζT细胞都可以重新武装，表明T细胞的SpyCatcher受体的表达得以维持并能够结合新引入的靶向配体(图3E)。为了确定未活化细胞中武装受体从细胞表面丢失的速率，SpyCatcher T细胞被静息，然后用赫赛汀-ST武装，随后每24小时通过流式细胞术分析可检测的武装受体。结果表明，武装受体水平随着时间逐渐耗尽，在武装后大约96小时发生完全丢失(图10)。

[0445] 基于武装的而不是非武装的SpyCatcher T细胞能够靶向和杀死表达抗原肿瘤细胞的发现，假设将靶向配体随后添加到与表达抗原肿瘤细胞共培养的非武装的SpyCatcher T细胞后，可以暂时触发非武装的SpyCatcher T细胞效应功能(图3A，右)。为了测试“按需”癌细胞裂解，在没有靶向配体的情况下，将非武装的SpyCatcher T细胞与SKOV3(Her2+/CD20-)肿瘤细胞温育4小时。4小时后加入赫赛汀-ST在含有SpyCatcher-BBζ或SpyCatcher-28ζT细胞的培养物中诱导快速肿瘤细胞裂解(图3F)。与SpyCatcher-BBζT细胞相比，SpyCatcher-28ζT细胞在加入赫赛汀-ST后反应更快，在较低靶向配体浓度下裂解靶细胞，并达到更高的最大裂解水平。尽管SpyCatcher-28ζT细胞在不同剂量的赫赛汀-ST下实现了相同水平的最大裂解，但初始裂解动力学以剂量依赖性方式发生(图3F)。SpyCatcher-BBζT细胞表现出更可滴定的应答，在较低赫赛汀-ST剂量下具有较低最大裂解。

[0446] 测试共价键形成对于裂解功能的作用

[0447] 为了测试共价键形成对受体武装和T细胞活化的作用，进行了“武装”和“按需”裂解实验，分别比较了赫赛汀-ST和赫赛汀-STDA或者抗Her2 DARPin 9.26-ST和9.26-STDA(图3F和3G)。用9.26-ST武装的SpyCatcher-BBζ和SpyCatcher-28ζT细胞裂解Her2+SKOV3肿瘤细胞，而用9.26-STDA武装的那些表现出降低的裂解或者没有裂解(图3G)。该结果相应于先前数据，表明共价键形成对于SpyCatcher受体的最大加载是必要的，特别是在较低武装浓度下(图2D)。共价键形成也影响“按需”裂解。与同等剂量的赫赛汀-ST相比，赫赛汀-STDA添加导致更慢的裂解动力学和更低的最大裂解(图3F)。在所有情况下，与SpyCatcher-BBζT细胞相比，当用过量赫赛汀-STDA武装或共培养时，SpyCatcher-28ζT细胞表现出增加的效应功能(图3F和3G)。

[0448] 同时受体武装和双重抗原靶向

[0449] 共价通用免疫受体加载的一个优点是能够将具有不同特异性的多个靶向配体附着到T细胞表面的受体上,从而产生具有同时靶向多个抗原的能力的单细胞产物(图4A)。为了测试这一点,将含有用于通过流式细胞术检测的独特标签的Her2靶向(9.26-ST)和EGFR靶向(E0o1-ST)DARPin单独加载到或以1:1摩尔比组合加载到SpyCatcher T细胞上(图4B)。标签染色和流式细胞术分析显示,单个DARPin加载的SpyCatcher T细胞仅对单个标签染色,而与两种DARPin共温育的SpyCatcher T细胞对每个标签显示出同等染色,因此具有同等武装(图4B)。这些双重武装的T细胞能够裂解Her2+/EGFR-和EGFR+/Her2-Ramos细胞(图7B),而用单个DARPin靶向配体武装的SpyCatcher T细胞仅能够裂解表达指定靶抗原的细胞。双重武装的T细胞介导的特异性细胞裂解水平与其单武装对应物相似,证明了这种单细胞产物同时靶向多种抗原的能力(图4C)。无论武装药剂是什么,SpyCatcher-ΔζT细胞都保持无活性(图4C)。

[0450] 为了评估组合武装增强SpyCatcher T细胞功能对抗表达双抗原肿瘤系的能力,SpyCatcher-BBζT细胞用低剂量的9.26-ST或E01-ST或两者的组合武装。当与Her2+/EGFR+SKOV3肿瘤系共培养时(图8C),双重武装的SpyCatcher-BBζT细胞相对于单独的单武装细胞实现了增加的肿瘤裂解(图8D)。

[0451] 在异种移植肿瘤模型中的体内功效

[0452] 接下来,我们使用非肥胖糖尿病(NOD)-scidγ(NSG)小鼠测试了SpyCatcher T细胞系统在异种移植肿瘤模型中的功效。尽管我们的体外结果显示SpyCatcher-28ζT细胞比SpyCatcher-BBζT细胞表现出更有效的效应功能,但我们选择使用SpyCatcher-BBζ受体推进临床前模型。

[0453] 我们使用卵巢癌的腹膜内模型测试了SpyCatcher-BBζT细胞的体内功效。将Her2+SKOV3卵巢癌肿瘤细胞注射到腹膜腔(I.P.)中并使之建立7天。第7天,小鼠腹膜内注射用1000nM浓度的赫赛汀-ST武装的SpyCatcher-BBζT细胞。一组施用给武装的SpyCatcher-ΔζT细胞以控制与抗原依赖性T细胞刺激无关的由T细胞输注或靶向配体施用引起的任何肿瘤减少。从第8天开始,施用额外的靶向配体,然后在给药窗口期间每3天连续给药(图5A;橙色框)。

[0454] 用SpyCatcher-ΔζT细胞与25μg剂量的赫赛汀-ST共同施用的治疗与运载体对照相似,证实肿瘤对靶向配体单独或信号传导缺陷T细胞输注不敏感(图5A-5B)。SpyCatcher-BBζT细胞与25μg剂量的赫赛汀-ST共同施用能够清除3/4小鼠中可检测的肿瘤,这导致相对于所有其它治疗组的存活期延长(图5A-5C)。在停止靶向配体治疗后30天开始在一只小鼠中观察到肿瘤复发。SpyCatcher-BBζT细胞与12.5μg剂量的赫赛汀-ST共同施用显示出在一些小鼠中的肿瘤负荷暂时减少,但在治疗过程中没有保持疗效,表明必须提供足够水平的靶向配体驱动肿瘤清除。在T细胞输注后第7天,在所有组中检测到峰值外周血T细胞水平,信号传导使得SpyCatcher-BBζT细胞计数超过SpyCatcher-ΔζT组的计数(图5D)。SpyCatcher-BBζT细胞组中的人类T细胞计数在两个靶向配体剂量组之间相似,表明靶向配体可用性是有效治疗的一种限制。此外,在治疗组中未观察到由于毒性导致的体重减轻,而在对照组小鼠中观察到由于肿瘤进展期间腹水形成而导致的体重增加(图11)。为评估SpyCatcher系统的全身递送,在快速生长、高度侵袭性皮下Her2+SKOV3肿瘤模型中进行了临床前试验。结果表明,与单独SpyCatcher-BBζT细胞相比,腹膜内注射的SpyCatcher-BBζT

细胞与赫赛汀-ST共同施用导致肿瘤接种后第22天的肿瘤体积减少(图12)。

[0455] 通用免疫受体是一项新兴技术,旨在改进标准CAR T细胞治疗并解决治疗设计中的局限性(Minutolo et al.,Frontiers in Oncology 2019,9,176)。通过使用靶向配体将T细胞重定向到表达抗原肿瘤细胞,UIR允许对T细胞效应功能进行剂量依赖性控制,同时还能够使用单一受体、单细胞产物靶向多种肿瘤抗原。当前UIR平台依赖于它们的细胞外衔接蛋白和靶向配体标签之间的非共价相互作用,使得它们在输注之前无法用抗原特异性共价加载。

[0456] 本发明开发了一种新的通用免疫受体平台,该平台允许通过SpyCatcher/SpyTag化学将靶向配体翻译后共价连接到免疫受体,介导针对多种肿瘤相关抗原的T细胞重定向。产生了两种功能性SpyCatcher免疫受体构建体,其含胞外SpyCatcher结构域和CD28-CD3ζ或4-1BB-CD3ζ胞内结构域,并证实了它们在原代人T细胞中的表达。为了针对靶肿瘤抗原将表达SpyCatcher免疫受体的T细胞重定向,我们使用了两种靶向配体产生的方法。使用由Hui等人开发的LASIC衔接蛋白方法,我们能够用SpyTag部分对现成的临床级抗体进行位点特异性标记(Hui et al.,Bioconjugate Chemistry 2015,26(8),1456-1460)。这种方法使得SpyCatcher T细胞能和临床级抗体潜在优势配对,用于无法从单独的抗体单一治疗中获益或对抗体单一治疗产生抗性(如果抗性不是由于抗原丢失引起的)的患者(Rezvani et al.,Best Practice&Research Clinical Haematology 2011,24(2),203-216;Karapetis et al.,The New England Journal of Medicine 2008,359(17),1757-1765.)。通过将SpyTag与各种设计的锚蛋白重复蛋白(DARPin)基因融合进一步产生了单价靶向配体。通过使用这些靶向配体,SpyCatcher免疫受体在体外靶向多种肿瘤抗原的能力得以证实。SpyCatcher T细胞与SpyTag靶向配体的转移导致在免疫缺陷小鼠异种移植模型中控制侵袭性皮下肿瘤生长和清除已建立的腹膜内疾病。

[0457] 值得注意的是,SpyCatcher和SpyTag之间共价键的形成对于优化T细胞效应功能至关重要。SpyTag-DA突变体和SpyCatcher受体之间形成的瞬时键(Kd=200nM)导致受体加载的大量丧失(图2D),这反过来又导致裂解能力降低(图3G)。在靶向配体被直接添加到培养物中的情况下,在低浓度不能形成共价键大大降低或完全消除了效应功能(图3F)。这表明在靶向配体浓度低的情况下,靶向配体和受体之间的共价键形成可能很重要。

[0458] 本文公开了SpyCatcher免疫受体系统能够解决目前面临CAR T细胞治疗的一些限制。这些限制之一是无法在输注后控制CAR T细胞。与靶抗原结合后,CAR T细胞活化和增殖会迅速发生,并可能导致诸如CRS或正常组织的靶向、非肿瘤裂解等问题(Grupp et al.,The New England Journal of Medicine 2013,368(16),1509-1518;Morgan et al.,Molecular Therapy 2010,18(4),843-851;Lamers et al.,Molecular Therapy 2013,21(4),904-912)。已经示出SpyCatcher T细胞的效应功能可基于肿瘤暴露前共价加载到受体上的或在输注后注射的靶向配体的量进行滴定,并且没有靶向配体的SpyCatcher T细胞无法靶向肿瘤细胞。在我们的I.P.小鼠模型中已经见到靶向配体的次优剂量会导致肿瘤生长,说明持续施用足够水平的靶向配体对于延长T细胞功能是必要的。使用SpyCatcher系统增加、减少或撤回靶向配体剂量作为减弱T细胞效应功能的手段的能力可以减轻靶向、脱肿瘤(off-tumor)毒性。SpyCatcher T细胞通过使用抗体以及DARPin发挥作用,并有进一步扩展到使用scFv、Fab和小分子缀合物的潜力。这可能允许另一个潜在的控制层,因为半衰期

短的靶向配体将更多地导致SpyCatcher T细胞效应功能的更快停止。接受CD19靶向CAR T细胞治疗的患者由于持续消除CD19+正常B细胞而维持长期B细胞不发育。SpyCatcher T细胞在没有靶向配体的情况下不具反应性,因此可以通过停用靶向配体在肿瘤清除后重新建立正常B细胞群。

[0459] 抗原阴性肿瘤群的生长是单抗原靶向T细胞治疗面临的另一个问题。发生这种情况的原因有很多,包括异质肿瘤抗原表达、肿瘤抗原下调、胞啃作用或剪接变体的表达(Bagashev et al.,The Importance of CD19 Exon 2for Surface Localization: Closing the Ig-like Loop.2015;Sotillo et al.,Cancer Discovery 2015,5(12),1282-1295;Jacoby et al.,Nature Communications 2016,7(1),ncomms12320;Gardner et al.,Blood 2016,127(20),2406-2410;Hamieh et al.,Nature 2019,1-5.;Ruella et al.Nature Medicine 2018,24(10),1499-1503)。为了克服通过抗原丢失导致的肿瘤逃逸,其它小组已提议在单T细胞产物57中表达多个CAR,表达具有多个表位结合结构域的CAR(Grada et al.,Molecular Therapy-Nucleic Acids 2013,2(7),e105;Hegde et al.,J Clin Invest 2016,126(8),3036-3052;Schneider et al.,J Immunother Cancer 2017,5(1),42),或者制备含有两个不同CAR群的组合T细胞产物(Ruella et al.,J Clin Invest 2016,126(10),3814-3826)。虽然这些方法可能有助于减轻抗原丢失,但它们并没有解决安全性和毒性问题,并且仍然限制了可靶向抗原的总数。SpyCatcher T细胞能够裂解范围广泛的肿瘤抗原,本文为Her2、EGFR、EpCAM和CD20建立了原理证明。进一步证明了用多个靶向配体同时武装SpyCatcher免疫受体T细胞的能力,使得能创建能够同时靶向多个肿瘤抗原的单载体和单细胞产品。武装受体的转换与T细胞持续表达新的SpyCatcher受体相结合,使得能够用靶向配体重新武装(图3E)和顺序抗原靶向的潜力,如先前用生物素结合免疫受体所证明的那样(Urbanska et al.,Cancer Research 2012,72(7),1844-1852)。

[0460] 尽管SpyCatcher免疫受体系统在体外和体内都显示出前景,但重要的是要承认其扩大使用的潜在限制。SpyCatcher/SpyTag系统本身来源于化脓性链球菌纤连蛋白结合蛋白FbaB的第二个免疫球蛋白样胶原粘附素结构域(CnaB2)。这些蛋白质的细菌来源意味着它们具有潜在的免疫原性,因此可能会被患者的免疫系统抑制。类似问题一直困扰着具有鼠源scFv结构域的CAR,患者会针对这些结构域产生人抗小鼠抗体(HAMA)(Beatty et al.,Cancer Immunology Research 2014,2(2),112-120)。然而,先前的研究已经在免疫活性小鼠中测试了SpyCatcher免疫原性并报告与此处使用的类似的SpyCatcher蛋白的截短版本诱导显著降低的抗体水平(Liu et al.,Sci Rep 2014,4,7266)。

[0461] SpyCatcher免疫受体和UIR一般而言为治疗研究提供了令人兴奋的新途径。然而,就像在CAR T细胞治疗领域一样,最佳临床转化将依赖于面临与UIR相关的独特挑战。例如,用单一受体靶向多种抗原的能力依赖于肿瘤相关抗原和针对这些抗原的临床级靶向配体的发现、验证和安全性分析。对于靶向某些抗原,设计最佳通用免疫受体及其靶向配体对也可能存在挑战,因为最佳靶向配体大小和受体铰链结构域间距可能因靶向抗原表位而异(Rodgers et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.2016,113(4);Ma et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.2016,113(4),E450-E458)。此外,UIR T细胞的临床产生通常依赖于患者T细胞作为起始来源细胞材料,类似于CAR T细胞治疗。因此,UIR治疗还需要解决预先存在的T细胞耗竭和衰老、输注后增殖和持久性差以及缺乏T细胞浸润实体瘤等共同

问题(Maude et al.,The New England Journal of Medicine 2014,371(16),1507-1517;Fraietta et al.,Nature Medicine 2018,24(5),563-571;Lanitis et al.,Ann Oncol 2017;Mueller et al.,Clinical Cancer Research 2018,clincanres.0758.2018),这些问题在一些适应症中可限制有效的CAR T细胞治疗。

[0462] 本文所述的SpyCatcher免疫受体是第一个通用免疫受体,允许靶向配体的翻译后共价加载,以便随后在体外和体内针对一系列肿瘤抗原重定向T细胞。这一平台技术提供了一种单一载体、单一受体同时靶向多种抗原的方法,同时还允许持续重新武装以随着时间产生、调节和多样化持续的T细胞反应。

[0463] 本文引用的每个和全部专利、专利申请和出版物的公开内容均通过引用整体并入本文。尽管本发明已经参考特定实施方案进行了公开,但显然本领域其它技术人员可以设计出本发明的其它实施方案和变化而不背离本发明的真实精神和范围。所附权利要求旨在被解释为包括所有这样的实施方案和等价变化。

[0464] 列举的实施方案

[0465] 提供了下述列举的实施方案,其编号不意味着指定重要性水平。

[0466] 实施方案1提供了在哺乳动物中刺激对肿瘤的通用免疫受体介导的免疫应答的方法,其中所述肿瘤共表达至少两种不同的抗原,所述方法包括(a)给哺乳动物施用经遗传修饰以表达免疫受体的细胞,所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域,(b)给哺乳动物施用与互配衔接分子连接的第一药剂,其中第一药剂特异性结合由所述肿瘤表达的第一抗原,和(c)给哺乳动物施用与互配衔接分子连接的第二药剂,其中第二药剂特异性结合由所述肿瘤表达的第二抗原并且其中第一抗原和第二抗原是不同的抗原。

[0467] 实施方案2提供了在有需要的哺乳动物中治疗癌症的方法,其中所述癌症共表达至少两种不同的抗原,所述方法包括(a)给哺乳动物施用有效量的经遗传修饰以表达免疫受体的细胞,所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域,(b)给哺乳动物施用有效量的与互配衔接分子连接的第一药剂,其中第一药剂特异性结合由所述癌症表达的第一抗原,和(c)给哺乳动物施用有效量的与互配衔接分子连接的第二药剂,其中第二药剂特异性结合由所述癌症表达的第二抗原并且其中第一抗原和第二抗原是不同的抗原。

[0468] 实施方案3提供了实施方案1或2的方法,其中所述胞外结构域包含SpyCatcher或SpyTag。

[0469] 实施方案4提供了实施方案1至3任一项的方法,其中第一和/或第二药剂与SpyTag或SpyCatcher连接。

[0470] 实施方案5提供了实施方案1至4任一项的方法,其中第一和/或第二药剂是抗体、抗体片段、scFv或DARPin。

[0471] 实施方案6提供了实施方案1至5任一项的方法,其中第一和/或第二药剂是抗体并且是人IgG。

[0472] 实施方案7提供了实施方案1至6任一项的方法,其中互配衔接分子SpyTag或SpyCatcher通过光活化位点特异性缀合(LASIC)与第一和/或第二药剂连接。

[0473] 实施方案8提供了实施方案1至7任一项的方法,其中所述细胞是T细胞、天然杀伤

(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、巨噬细胞、干细胞或调节性T细胞。

[0474] 实施方案9提供了实施方案1至8任一项的方法,其中所述细胞是自体细胞。

[0475] 实施方案10提供了实施方案1至9任一项的方法,其中所述免疫受体进一步包含共刺激分子的胞内结构域。

[0476] 实施方案11提供了实施方案10的方法,其中所述共刺激分子是4-1BB、CD28、CD27、CD2、CD3、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3或者特异性结合CD83的配体。

[0477] 实施方案12提供了实施方案1至11任一项的方法,其中在被施用给哺乳动物之前,将所述细胞与第一和/或第二药剂接触以产生预武装细胞,随后预武装细胞被施用给哺乳动物。

[0478] 实施方案13提供了实施方案1至11任一项的方法,其中在给哺乳动物施用第一和/或第二药剂之前将所述细胞施用给哺乳动物。

[0479] 实施方案14提供了产生一定水平的针对肿瘤的裂解活性的方法,所述方法包括(a)将一定量的细胞与一定量的与互配衔接分子连接的药剂接触,其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体,所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域,其中所述药剂特异性结合由所述肿瘤表达的抗原,并且其中选择所述药剂的量和/或细胞的量以产生所述水平的针对所述肿瘤的裂解活性。

[0480] 实施方案15提供了在有需要的哺乳动物中治疗癌症的方法,所述方法包括(a)给哺乳动物施用一定量的经遗传修饰以表达免疫受体的细胞,所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域,和(b)给哺乳动物施用一定量的与互配衔接分子连接的药剂,其中所述药剂特异性结合所述癌症表达的抗原,其中选择所述细胞的量和/或所述药剂的量以提供一定水平的针对所述癌症的裂解活性。

[0481] 实施方案16提供了实施方案14至15任一项的方法,其中相对于所述细胞的量增加所述药剂的量增加裂解活性水平,以及相对于所述细胞的量降低所述药剂的量降低裂解活性水平。

[0482] 实施方案17提供了实施方案14至16任一项的方法,其中所述胞外结构域包含SpyCatcher或SpyTag。

[0483] 实施方案18提供了实施方案14至17任一项的方法,其中所述药剂与SpyTag或SpyCatcher连接。

[0484] 实施方案19提供了实施方案14至18任一项的方法,其中所述药剂是抗体、抗体片段、scFv或DARPin。

[0485] 实施方案20提供了实施方案14至19任一项的方法,其中所述药剂是抗体且是人IgG。

[0486] 实施方案21提供了实施方案14至20任一项的方法,其中互配衔接分子SpyTag或SpyCatcher通过光活化位点特异性缀合(LASIC)与所述药剂连接。

[0487] 实施方案22提供了实施方案14至21任一项的方法,其中所述细胞是T细胞、天然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、巨噬细胞、干细胞或调节性T细胞。

[0488] 实施方案23提供了实施方案14至22任一项的方法,其中所述细胞是自体细胞。

[0489] 实施方案24提供了实施方案14至23任一项的方法,其中所述免疫受体进一步包含

共刺激分子的胞内结构域。

[0490] 实施方案25提供了实施方案14至24任一项的方法，其中所述共刺激分子是4-1BB、CD28、CD27、CD2、CD3、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3或者特异性结合CD83的配体。

[0491] 实施方案26提供了实施方案15至25任一项的方法，其中在施用给哺乳动物之前，将所述细胞与所述药剂接触以产生预武装细胞，随后预武装细胞被施用给哺乳动物。

[0492] 实施方案27提供了实施方案15至26任一项的方法，其中在给哺乳动物施用所述药剂之前将所述细胞施用给哺乳动物。

[0493] 实施方案28提供了在有需要的哺乳动物中刺激对肿瘤的通用免疫受体介导的免疫应答的方法，所述方法包括(a)给哺乳动物施用经遗传修饰以表达免疫受体的细胞，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，和(b)随后给哺乳动物施用与互配衔接分子连接的药剂，其中所述药剂特异性结合由所述肿瘤表达的抗原。

[0494] 实施方案29提供了在有需要的哺乳动物中治疗癌症的方法，所述方法包括(a)给哺乳动物施用有效量的经遗传修饰以表达免疫受体的T细胞，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，和(b)随后给哺乳动物施用有效量的与互配衔接分子连接的药剂，其中所述药剂特异性结合由所述癌症表达的抗原。

[0495] 实施方案30提供了实施方案28或29的方法，其中所述胞外结构域包含SpyCatcher或SpyTag。

[0496] 实施方案31提供了实施方案28至30任一项的方法，其中所述药剂与SpyTag或SpyCatcher连接。

[0497] 实施方案32提供了实施方案28至31任一项的方法，其中所述药剂是抗体、抗体片段、scFv或DARPin。

[0498] 实施方案33提供了实施方案28至32任一项的方法，其中所述药剂是抗体且是人IgG。

[0499] 实施方案34提供了实施方案28至33任一项的方法，其中互配衔接分子SpyTag或SpyCatcher通过光活化位点特异性缀合(LASIC)与所述药剂连接。

[0500] 实施方案35提供了实施方案28至34任一项的方法，其中所述细胞是T细胞、天然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、巨噬细胞、干细胞或调节性T细胞。

[0501] 实施方案36提供了实施方案28至35任一项的方法，其中所述细胞是自体细胞。

[0502] 实施方案37提供了实施方案28至36任一项的方法，其中所述免疫受体进一步包含共刺激分子的胞内结构域。

[0503] 实施方案38提供了实施方案28至37任一项的方法，其中所述共刺激分子是4-1BB、CD28、CD27、CD2、CD3、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3或者特异性结合CD83的配体。

[0504] 实施方案39提供了定量细胞表面上通用免疫受体转换的方法，所述方法包括(a)将经遗传修饰以表达免疫受体的细胞与连接互配衔接分子的药剂接触，从而产生武装受体，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外

结构域;和(b)确定所述武装受体相对于参考量的量。

[0505] 实施方案40提供了实施方案39的方法,其中所述参考量是在先前时间武装受体的量。

[0506] 实施方案41提供了实施方案40的方法,其中所述武装受体的量通过标记所述药剂并检测标记的药剂来确定。

[0507] 实施方案42提供了实施方案41的方法,其中通过将所述药剂与标记分子连接或接触来标记所述药剂,所述标记分子包括myc-标签、FLAG-标签、His-标签、HA-标签、荧光蛋白(例如绿色荧光蛋白(GFP))、荧光团(例如四甲基罗丹明(TRITC))、异硫氰酸荧光素(FITC)、二硝基苯酚、peridin叶绿素蛋白复合物、藻红蛋白(PE)、组氨酸、生物素、链霉抗生物素蛋白、抗生物素蛋白、辣根过氧化物酶、棕榈酰化、亚硝基化、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶、谷胱甘肽S-转移酶(GST)、麦芽糖结合蛋白、放射性同位素以及用于放射性同位素标记的任何类型的化合物,包括1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸(NOTA)或别藻蓝蛋白(APC)。

[0508] 实施方案43提供了实施方案39至42任一项的方法,其进一步包括步骤(c):将所述细胞和所述药剂与肿瘤细胞接触。

[0509] 实施方案44提供了实施方案39至43任一项的方法,其中所述胞外结构域包含SpyCatcher。

[0510] 实施方案45提供了实施方案39至44任一项的方法,其中所述药剂与SpyTag连接。

[0511] 实施方案46提供了实施方案39至45任一项的方法,其中所述药剂是抗体、抗体片段、scFv或DARPin。

[0512] 实施方案47提供了实施方案39至46任一项的方法,其中所述药剂是抗体并且是人IgG。

[0513] 实施方案48提供了实施方案39至47任一项的方法,其中所述细胞是T细胞、天然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、巨噬细胞、干细胞或调节性T细胞。

[0514] 实施方案49提供了实施方案39至48任一项的方法,其中所述免疫受体进一步包含共刺激分子的胞内结构域。

[0515] 实施方案50提供了实施方案39至49任一项的方法,其中所述共刺激分子是4-1BB、CD28、CD27、CD2、CD3、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3或者特异性结合CD83的配体。

[0516] 实施方案51提供了在有需要的哺乳动物中刺激对肿瘤的通用免疫受体介导的免疫应答的方法,所述方法包括(a)给哺乳动物施用有效量的经遗传修饰以表达免疫受体的细胞,所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、4-1BB的胞内结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域,和(b)给哺乳动物施用有效量的与互配衔接分子连接的药剂,其中所述药剂特异性结合由所述肿瘤表达的抗原,其中所述肿瘤被预先确定为以相对于参考水平增加的水平表达所述抗原。

[0517] 实施方案52提供了在有需要的哺乳动物中治疗癌症的方法,所述方法包括(a)给哺乳动物施用一定量的经遗传修饰以表达免疫受体的细胞,所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、4-1BB的胞内结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域,和(b)给哺乳动物施用一定量的与互配衔接分子连接的药剂,其中所述药剂特异性结合由所

述癌症表达的抗原,其中所述癌症被预先确定为以相对于参考水平增加的水平表达所述抗原。

[0518] 实施方案53提供了实施方案51或52的方法,其中所述参考水平是所述抗原在健康组织中的表达水平。

[0519] 实施方案54提供了实施方案51至53任一项的方法,其中所述胞外结构域包含SpyCatcher或SpyTag。

[0520] 实施方案55提供了实施方案51至54任一项的方法,其中所述药剂与SpyTag或SpyCatcher连接。

[0521] 实施方案56提供了实施方案51至55任一项的方法,其中所述药剂是抗体、抗体片段、scFv或DARPin。

[0522] 实施方案57提供了实施方案51至56任一项的方法,其中所述药剂是抗体且是人IgG。

[0523] 实施方案58提供了实施方案51至57任一项的方法,其中SpyTag或SpyCatcher通过光活化位点特异性缀合(LASIC)与所述药剂连接。

[0524] 实施方案59提供了实施方案51至58任一项的方法,其中所述细胞是T细胞、天然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、巨噬细胞、干细胞或调节性T细胞。

[0525] 实施方案60提供了实施方案51至59任一项的方法,其中所述细胞是自体细胞。

[0526] 实施方案61提供了实施方案51至60任一项的方法,其中在施用给哺乳动物之前,将所述细胞与药剂接触以产生预武装细胞,随后预武装细胞被施用给哺乳动物。

[0527] 实施方案62提供了实施方案51至61任一项的方法,其中在给哺乳动物施用所述药剂之前将所述细胞施用给哺乳动物。

[0528] 实施方案63提供了经遗传修饰的细胞、第一药剂和第二药剂用于在有需要的哺乳动物中刺激对肿瘤的通用免疫受体介导的免疫应答,其中所述肿瘤共表达至少两种不同的抗原,其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体,所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域,其中第一药剂与互配衔接分子连接,并且其中第一药剂特异性结合由所述肿瘤表达的第一抗原;其中第二药剂与互配衔接分子连接,并且其中第二药剂特异性结合由所述肿瘤表达的第二抗原;其中第一抗原和第二抗原是不同的抗原,并且其中所述免疫受体、第一药剂和第二药剂被施用给哺乳动物。

[0529] 实施方案64提供了经遗传修饰的细胞、第一药剂和第二药剂用于在有需要的哺乳动物中治疗癌症,其中所述癌症共表达至少两种不同的抗原,其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体,所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域,其中第一药剂与互配衔接分子连接,并且其中第一药剂特异性结合由所述癌症表达的第一抗原;其中第二药剂与互配衔接分子连接,并且其中第二药剂特异性结合由所述癌症表达的第二抗原;其中第一抗原和第二抗原是不同的抗原。

[0530] 实施方案65提供了用于产生一定水平的针对肿瘤的裂解活性的经遗传修饰的细胞和药剂,其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体,所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域,其中所述药剂与互配衔接分子连接,并且其中所述药剂特异性结合所述肿瘤表达的抗原;其中一定量的所述细胞与一定量的所述药剂接触,并且其中选择相对于细胞的量的所述药剂的量以产生所述水平的针对

肿瘤的裂解活性。

[0531] 实施方案66提供了用于在有需要的哺乳动物中治疗癌症的经遗传修饰的细胞和药剂，其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包括T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，其中所述药剂与互配衔接分子连接，并且其中所述药剂特异性结合所述癌症表达的抗原；其中给哺乳动物施用一定量的所述细胞和一定量的所述药剂，其中选择所述细胞的量和/或所述药剂的量以提供针对所述癌症的裂解活性水平。

[0532] 实施方案67提供了用于在有需要的哺乳动物中刺激对肿瘤的通用免疫受体介导的免疫应答的经遗传修饰的细胞和药剂，其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，其中所述药剂与互配衔接分子连接，并且其中所述药剂特异性结合所述肿瘤表达的抗原；其中给哺乳动物施用一定量的所述细胞，随后给哺乳动物施用一定量的所述药剂。

[0533] 实施方案68提供了用于在有需要的哺乳动物中治疗癌症的经遗传修饰的细胞和药剂，其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，其中所述药剂与互配衔接分子连接，并且其中所述药剂特异性结合所述癌症表达的抗原；其中给哺乳动物施用一定量的所述细胞，随后给哺乳动物施用一定量的所述药剂。

[0534] 实施方案69提供了用于在有需要的哺乳动物中刺激对肿瘤的通用免疫受体介导的免疫应答的经遗传修饰的细胞和药剂，其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、4-1BB的胞内结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，其中所述药剂与互配衔接分子连接，并且其中所述药剂特异性结合由所述肿瘤表达的抗原；其中给哺乳动物施用有效量的所述细胞并且给哺乳动物施用有效量的所述药剂，并且其中预先确定所述肿瘤以相对于参考水平增加的水平表达所述抗原。

[0535] 实施方案70提供了用于在有需要的哺乳动物中治疗癌症的经遗传修饰的细胞和药剂，其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包括T细胞受体胞内信号传导结构域、4-1BB的胞内结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，其中所述药剂与互配衔接分子连接，并且其中所述药剂特异性结合所述肿瘤表达的抗原；其中给哺乳动物施用有效量的所述细胞并且给哺乳动物施用有效量的所述药剂，并且其中预先确定所述肿瘤以相对于参考水平增加的水平表达所述抗原。

[0536] 实施方案71提供了经遗传修饰的细胞、第一药剂和第二药剂在有需要的哺乳动物中刺激对肿瘤的通用免疫受体介导的免疫应答的用途，其中所述肿瘤共表达至少两种不同的抗原，其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，其中第一药剂与互配衔接分子连接，并且其中第一药剂特异性结合由所述肿瘤表达的第一抗原；其中第二药剂与互配衔接分子连接，并且其中第二药剂特异性结合由所述肿瘤表达的第二抗原；其中第一抗原和第二抗原是不同的抗原，并且其中所述免疫受体、第一药剂和第二药剂被施用给哺乳动物。

[0537] 实施方案72提供了经遗传修饰的细胞、第一药剂和第二药剂在有需要的哺乳动物中治疗癌症的用途，其中所述癌症共表达至少两种不同的抗原，其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔

接分子的胞外结构域，其中第一药剂与互配衔接分子连接，并且其中第一药剂特异性结合由所述癌症表达的第一抗原；其中第二药剂与互配衔接分子连接，并且其中第二药剂特异性结合由所述癌症表达的第二抗原；其中第一抗原和第二抗原是不同的抗原。

[0538] 实施方案73提供了经遗传修饰的细胞和药剂在产生一定水平的针对肿瘤的裂解活性中的用途，其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，其中所述药剂与互配衔接分子连接，并且其中所述药剂特异性结合所述肿瘤表达的抗原；其中一定量的所述细胞与一定量的所述药剂接触并且其中选择相对于细胞的量的所述药剂的量以产生所述水平的针对所述肿瘤的裂解活性。

[0539] 实施方案74提供了经遗传修饰的细胞和药剂在有需要的哺乳动物中治疗癌症的用途，其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包括T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，其中所述药剂与互配衔接分子连接，并且其中所述药剂特异性结合所述癌症表达的抗原；其中给哺乳动物施用一定量的所述细胞和一定量的所述药剂，其中选择所述细胞的量和/或所述药剂的量以提供一定水平的针对癌症的裂解活性。

[0540] 实施方案75提供了经遗传修饰的细胞和药剂在有需要的哺乳动物中刺激对肿瘤的通用免疫受体介导的免疫应答中的用途，其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，其中所述药剂与互配衔接分子连接，并且其中所述药剂特异性结合所述肿瘤表达的抗原；其中给哺乳动物施用一定量的所述细胞，随后给哺乳动物施用一定量的所述药剂。

[0541] 实施方案76提供了经遗传修饰的细胞和药剂在有需要的哺乳动物中治疗癌症的用途，其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，其中所述药剂与互配衔接分子连接，并且其中所述药剂特异性结合所述癌症表达的抗原；其中给哺乳动物施用一定量的所述细胞，随后给哺乳动物施用一定量的所述药剂。

[0542] 实施方案77提供了经遗传修饰的细胞和药剂在有需要的哺乳动物中刺激对肿瘤的通用免疫受体介导的免疫应答中的用途，其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包含T细胞受体胞内信号传导结构域、4-1BB的胞内结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，其中所述药剂与互配衔接分子连接，其中所述药剂特异性结合由所述肿瘤表达的抗原；其中给哺乳动物施用有效量的所述细胞并且给哺乳动物施用有效量的所述药剂，以及其中预先确定所述肿瘤以相对于参考水平增加的水平表达所述抗原。

[0543] 实施方案78提供了经遗传修饰的细胞和药剂在有需要的哺乳动物中治疗癌症的用途，其中所述细胞经遗传修饰以表达免疫受体，所述免疫受体包括T细胞受体胞内信号传导结构域、4-1BB的胞内结构域、跨膜结构域和包含衔接分子的胞外结构域，其中所述药剂与互配衔接分子连接，并且其中所述药剂特异性结合所述肿瘤表达的抗原；其中给哺乳动物施用有效量的所述细胞并且给哺乳动物施用有效量的所述药剂，并且其中预先确定所述肿瘤以相对于参考水平增加的水平表达所述抗原。

序列表

<110> 宾夕法尼亚大学理事会

<120> 表达通用免疫受体的工程化细胞活性的定量控制

<130> 046483-7294W01(02460)

<150> 62/965,593
<151> 2020-01-24

<160> 30

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 1869
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的

<400> 1

[0001]

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60

ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120

ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 180

ctcgtgacca ccctgaccta cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag 240

cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300

ttcaaggacg acggcaacta caagacccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360

gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420

aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480

ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540

gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600

tacctgagca cccagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc 660

ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaagaga 720

tctggcagcg gagagggcag aggaagtctt ctaacatgcg gtgacgtgga ggagaatccc 780

ggccctagaa tggccttacc agtgaccgcc ttgctcctgc cgctggcctt gctgctccac 840

gccgccaggc cgggatccgg aagcggcgat agcgccaccc acatcaagtt cagcaagcgg 900

gacgaggacg gcaaagagct ggctggcgcc accatggaac tgcgggacag cagcggcaag 960

accatcagca cctggatcag cgacggccag gtcaaagact tctacctgta ccccggcaag 1020

tacaccttcg tggaaacagc cgcccctgac ggctacgagg tggccacagc catcaccttc 1080

accgtgaacg agcagggaca ggtcacagtg aacggcggcg gcagcggcgg cagcggcggc 1140

agcggcggca gcggcggcag cggcggcagc ggcggcagcg ctagcaccac gacgccagcg 1200

ccgcgaccac caacaccggc gcccaccatc gcgtcgcagc ccctgtccct gcgcccagag 1260

gcgtgccggc cagcggcggg gggcgcagtg cacacgaggg ggctggactt cgcctgtgat 1320

ttttgggtgc tggtggtggt tggtggagtc ctggcttgct atagcttgct agtaacagtg 1380

gcctttatta ttttctgggt gaggagtaag aggagcaggc tcctgcacag tgactacatg 1440

aacatgactc cccgccgccc cgggcccacc cgcaagcatt accagcccta tgccccacca 1500

cgcgacttcg cagcctatcg ctccatcgat agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc 1560

cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc tataacgagc tcaatctagg acgaagagag 1620

gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga 1680

aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc 1740

tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc cggaggggca aggggcacga tggcctttac 1800

cagggtctca gtacagccac caaggacacc tacgacgccc ttcacatgca ggccctgccc 1860

cctcgctaa 1869

<210> 2
<211> 528
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的

<400> 2

[0002]

```
Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
1               5                  10                  15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
            20                  25                  30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
        35                  40                  45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
    50                  55                  60

Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
65                  70                  75                  80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
                85                  90                  95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
            100                 105                 110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
        115                 120                 125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
    130                 135                 140
```

```
Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
145                 150                 155                 160

Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
                165                 170                 175

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
            180                 185                 190

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
        195                 200                 205

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
    210                 215                 220

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Arg
225                 230                 235                 240

Ser Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val
                245                 250                 255

Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu
            260                 265                 270

Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His Ala Ala Arg Pro Gly Ser Ala His
        275                 280                 285
```

[0003]

```
Ile Val Met Val Asp Ala Tyr Lys Pro Thr Lys Ala Ser Thr Thr Thr
    290                 295                 300

Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro
305                 310                 315                 320

Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val
                325                 330                 335

His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Phe Trp Val Leu Val Val
            340                 345                 350

Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe
        355                 360                 365

Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp
    370                 375                 380

Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr
385                 390                 395                 400

Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Ile Asp
                405                 410                 415

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
```

420 425 430

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
435 440 445

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
450 455 460

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
465 470 475 480

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
485 490 495

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
500 505 510

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
515 520 525

<210> 3
<211> 1650
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的

[0004]

<400> 3
atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60

ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120

ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 180

ctcgtgacca ccctgaccta cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag 240

cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300

ttcaaggacg acggcaacta caagacccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360

gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420

aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480

ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540

gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600

tacctgagca cccagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc 660

ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaagaga 720

tctggcagcg gagagggcag aggaagtctt ctaacatgcg gtgacgtgga ggagaatccc 780

ggccctagaa tggccttacc agtgaccgcc ttgctcctgc cgctggcctt gctgctccac 840

gccgccaggc cgggatccgc ccacatcgtg atggtggacg cctacaagcc caccaagggc 900

ggcagcggcg gcagcggcgg cagcggcggc agcggcggca gcggcggcag cggcggcagc 960

gctagcacca cgacgccagc gccgcgacca ccaacaccgg cgcccaccat cgcgtcgcag 1020

ccctgtccc tgcgcccaga ggcgtgccgg ccagcggcgg ggggcgcagt gcacacgagg 1080

gggctggact tcgcctgtga tttttgggtg ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc 1140

tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg 1200

ctcctgcaca gtgactacat gaacatgact ccccgccgcc ccgggcccac ccgcaagcat 1260

taccagccct atgccccacc acgcgacttc gcagcctatc gctccatcga tagagtgaag 1320

ttcagcagga gcgcagacgc ccccgcgtac cagcagggcc agaaccagct ctataacgag 1380

ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat gttttggaca agagacgtgg ccgggaccct 1440

gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag 1500

aaagataaga tggcggaggc ctacagtgag attgggatga aaggcgagcg ccggaggggc 1560

aaggggcacg atggccttta ccagggtctc agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc 1620

cttcacatgc aggccctgcc ccctcgctaa 1650

<210> 4
<211> 549
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的

<400> 4

[0005]

```
Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
1               5                  10                  15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
            20                  25                  30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
        35                  40                  45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
    50                  55                  60

Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
65                  70                  75                  80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
                85                  90                  95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
            100                 105                 110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
        115                 120                 125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
    130                 135                 140
```

```
Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
145                 150                 155                 160

Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
                165                 170                 175

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
            180                 185                 190

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
        195                 200                 205

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
    210                 215                 220

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Arg
225                 230                 235                 240

Ser Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val
                245                 250                 255

Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu
            260                 265                 270

Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His Ala Ala Arg Pro Gly Ser Ala His
        275                 280                 285

Ile Val Met Val Asp Ala Tyr Lys Pro Thr Lys Gly Gly Ser Gly Gly
    290                 295                 300

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
305                 310                 315                 320

Ala Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr
                325                 330                 335

Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala
            340                 345                 350

Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Phe
        355                 360                 365

Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu
    370                 375                 380

Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg
385                 390                 395                 400

Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro
                405                 410                 415
```

[0006]

```
Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala
            420                 425                 430

Tyr Arg Ser Ile Asp Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro
        435                 440                 445

Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
    450                 455                 460

Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro
465                 470                 475                 480

Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr
                485                 490                 495

Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly
            500                 505                 510

Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln
        515                 520                 525

Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln
    530                 535                 540

Ala Leu Pro Pro Arg
545
```

[0007]

<210> 5
<211> 1017
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的

<400> 5

```
atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg      60

ccgggatccg gaagcggaga tagcgccacc cacatcaagt tcagcaagcg ggacgaggac     120

ggcaaagagc tggctggcgc caccatggaa ctgcgggata gcagcggcaa gaccatcagc     180

acctggatca gcgacggcca ggtcaaagac ttctacctgt accccggcaa gtacaccttc     240

gtggaaacag ccgcccctga cggctatgag gtggccacag ccatcacctt caccgtgaac     300

gagcagggac aggtcacagt gaacggcgct agcaccacga cgccagcgcc gcgaccacca     360

acaccggcgc ccaccatcgc gtcgcagccc ctgtccctgc gcccagaggc gtgccggcca     420

gcggcggggg gcgcagtgca cacgaggggg ctggacttcg cctgtgattt ttgggtgctg     480

gtggtggttg gtggagtcct ggcttgctat agcttgctag taacagtggc ctttattatt     540

ttctgggtga ggagtaagag gagcaggctc ctgcacagtg actacatgaa catgactccc     600

cgccgccccg ggcccacccg caagcattac cagccctatg ccccaccacg cgacttcgca     660

gcctatcgct ccatcgatag agtgaagttc agcaggagcg cagacgcccc cgcgtaccag     720
```

cagggccaga accagctcta taacgagctc aatctaggac gaagagagga gtacgatgtt 780

ttggacaaga gacgtggccg ggaccctgag atgggggaa agccgagaag gaagaaccct 840

caggaaggcc tgtacaatga actgcagaaa gataagatgg cggaggccta cagtgagatt 900

gggatgaaag gcgagcgccg gaggggcaag gggcacgatg gcctttacca gggtctcagt 960

acagccacca aggacaccta cgacgccctt cacatgcagg ccctgccccc tcgctaa 1017

<210> 6
<211> 338
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的

<400> 6

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gly Ser Gly Ser Gly Asp Ser Ala Thr His Ile
20 25 30

Lys Phe Ser Lys Arg Asp Glu Asp Gly Lys Glu Leu Ala Gly Ala Thr
35 40 45

[0008] Met Glu Leu Arg Asp Ser Ser Gly Lys Thr Ile Ser Thr Trp Ile Ser
50 55 60

Asp Gly Gln Val Lys Asp Phe Tyr Leu Tyr Pro Gly Lys Tyr Thr Phe
65 70 75 80

Val Glu Thr Ala Ala Pro Asp Gly Tyr Glu Val Ala Thr Ala Ile Thr
85 90 95

Phe Thr Val Asn Glu Gln Gly Gln Val Thr Val Asn Gly Ala Ser Thr
100 105 110

Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser
115 120 125

Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly
130 135 140

Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Phe Trp Val Leu
145 150 155 160

Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val
165 170 175

Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His
180 185 190

Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys
195 200 205

His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
210 215 220

Ile Asp Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln
225 230 235 240

Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu
245 250 255

Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly
260 265 270

Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu
275 280 285

Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly
290 295 300

Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser
305 310 315 320

Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro
325 330 335

[0009]

Pro Arg

<210> 7
<211> 1080
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的

<400> 7
atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60

ccgggatccg gaagcggcga tagcgccacc cacatcaagt tcagcaagcg ggacgaggac 120

ggcaaagagc tggctggcgc caccatggaa ctgcgggaca gcagcggcaa gaccatcagc 180

acctggatca gcgacggcca ggtcaaagac ttctacctgt accccggcaa gtacaccttc 240

gtggaaacag ccgcccctga cggctacgag gtggccacag ccatcacctt caccgtgaac 300

gagcagggac aggtcacagt gaacggcggc ggcagcggcg gcagcggcgg cagcggcggc 360

agcggcggca gcggcggcag cggcggcagc gctagcacca cgacgccagc gccgcgacca 420

ccaacaccgg cgcccaccat cgcgtcgcag cccctgtccc tgcgcccaga ggcgtgccgg 480

ccagcggcgg ggggcgcagt gcacacgagg gggctggact tcgcctgtga tttttgggtg 540

ctggtggtgg ttggtggagt cctggcttgc tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt 600

attttctggg tgaggagtaa gaggagcagg ctcctgcaca gtgactacat gaacatgact 660

ccccgccgcc ccgggcccac ccgcaagcat taccagccct atgccccacc acgcgacttc 720

gcagcctatc gctccatcga tagagtgaag ttcagcagga gcgcagacgc ccccgcgtac 780

cagcagggcc agaaccagct ctataacgag ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat 840

gttttggaca agagacgtgg ccgggaccct gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac 900

cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag aaagataaga tggcggaggc ctacagtgag 960

attgggatga aaggcgagcg ccggaggggc aaggggcacg atggccttta ccagggtctc 1020

agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc cttcacatgc aggccctgcc ccctcgctaa 1080

<210> 8
<211> 359
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的

<400> 8

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gly Ser Gly Ser Gly Asp Ser Ala Thr His Ile
20 25 30

[0010]

Lys Phe Ser Lys Arg Asp Glu Asp Gly Lys Glu Leu Ala Gly Ala Thr
35 40 45

Met Glu Leu Arg Asp Ser Ser Gly Lys Thr Ile Ser Thr Trp Ile Ser
50 55 60

Asp Gly Gln Val Lys Asp Phe Tyr Leu Tyr Pro Gly Lys Tyr Thr Phe
65 70 75 80

Val Glu Thr Ala Ala Pro Asp Gly Tyr Glu Val Ala Thr Ala Ile Thr
85 90 95

Phe Thr Val Asn Glu Gln Gly Gln Val Thr Val Asn Gly Gly Gly Ser
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Ser Ala Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
130 135 140

Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
145 150 155 160

Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
165 170 175

Asp Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser
180 185 190

Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg
195 200 205

Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro
210 215 220

Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe
225 230 235 240

Ala Ala Tyr Arg Ser Ile Asp Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp
245 250 255

Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
260 265 270

Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg
275 280 285

Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
290 295 300

[0011] Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
305 310 315 320

Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
325 330 335

Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His
340 345 350

Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
355

<210> 9
<211> 798
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的

<400> 9
atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60

ccgggatccg cccacattgt gatggtggac gcctacaagc ccaccaaggc tagcaccacg 120

acgccagcgc cgcgaccacc aacaccggcg cccaccatcg cgtcgcagcc cctgtccctg 180

cgcccagagg cgtgccggcc agcggcgggg ggcgcagtgc acacgagggg gctggacttc 240

gcctgtgatt tttgggtgct ggtggtggtt ggtggagtcc tggcttgcta tagcttgcta 300

gtaacagtgg cctttattat tttctgggtg aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt 360

gactacatga acatgactcc ccgccgcccc gggcccaccc gcaagcatta ccagccctat 420

gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc tccatcgata gagtgaagtt cagcaggagc 480

gcagacgccc ccgcgtacca gcagggccag aaccagctct ataacgagct caatctagga 540

cgaagagagg agtacgatgt tttggacaag agacgtggcc gggaccctga gatgggggga 600

aagccgagaa ggaagaaccc tcaggaaggc ctgtacaatg aactgcagaa agataagatg 660

gcggaggcct acagtgagat tgggatgaaa ggcgagcgcc ggaggggcaa ggggcacgat 720

ggcctttacc agggtctcag tacagccacc aaggacacct acgacgccct tcacatgcag 780

gccctgcccc ctcgctaa 798

<210> 10
<211> 265
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的

<400> 10

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

[0012] His Ala Ala Arg Pro Gly Ser Ala His Ile Val Met Val Asp Ala Tyr
20 25 30

Lys Pro Thr Lys Ala Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr
35 40 45

Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala
50 55 60

Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe
65 70 75 80

Ala Cys Asp Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys
85 90 95

Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser
100 105 110

Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg
115 120 125

Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg
130 135 140

Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Ile Asp Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser
145 150 155 160

Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu
165 170 175

Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg
180 185 190

Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln
195 200 205

Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
210 215 220

Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp
225 230 235 240

Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
245 250 255

Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
260 265

<210> 11
<211> 861
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
[0013] <223> 人工合成的

<400> 11
atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60

ccgggatccg cccacatcgt gatggtggac gcctacaagc ccaccaaggg cggcagcggc 120

ggcagcggcg gcagcggcgg cagcggcggc agcggcggca gcggcggcag cgctagcacc 180

acgacgccag cgccgcgacc accaacaccg gcgcccacca tcgcgtcgca gcccctgtcc 240

ctgcgcccag aggcgtgccg gccagcggcg gggggcgcag tgcacacgag ggggctggac 300

ttcgcctgtg atttttgggt gctggtggtg gttggtggag tcctggcttg ctatagcttg 360

ctagtaacag tggcctttat tattttctgg gtgaggagta agaggagcag gctcctgcac 420

agtgactaca tgaacatgac tccccgccgc cccgggccca cccgcaagca ttaccagccc 480

tatgccccac cacgcgactt cgcagcctat cgctccatcg atagagtgaa gttcagcagg 540

agcgcagacg cccccgcgta ccagcagggc cagaaccagc tctataacga gctcaatcta 600

ggacgaagag aggagtacga tgttttggac aagagacgtg gccgggaccc tgagatgggg 660

ggaaagccga gaaggaagaa ccctcaggaa ggcctgtaca atgaactgca gaaagataag 720

atggcggagg cctacagtga gattgggatg aaaggcgagc gccggagggg caaggggcac 780

gatggccttt accagggtct cagtacagcc accaaggaca cctacgacgc ccttcacatg 840

caggccctgc cccctcgcta a 861

<210> 12

<211> 286
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的

<400> 12

```
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1               5                  10                  15

His Ala Ala Arg Pro Gly Ser Ala His Ile Val Met Val Asp Ala Tyr
            20                  25                  30

Lys Pro Thr Lys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
        35                  40                  45

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ala Ser Thr Thr Thr Pro Ala
    50                  55                  60

Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser
65                  70                  75                  80

Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
                85                  90                  95
```

[0014]

```
Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly
            100                 105                 110

Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile
        115                 120                 125

Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met
    130                 135                 140

Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro
145                 150                 155                 160

Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Ile Asp Arg Val
                165                 170                 175

Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn
            180                 185                 190

Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
        195                 200                 205

Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
    210                 215                 220

Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
225                 230                 235                 240
```

Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
245 250 255

Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
260 265 270

Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
275 280 285

<210> 13
<211> 1806
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的

<400> 13

[0015]

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60
ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120
ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 180
ctcgtgacca ccctgaccta cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag 240
cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300
ttcaaggacg acggcaacta caagacccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360
gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420
aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480
ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540
gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600
tacctgagca cccagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc 660
ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaagaga 720
tctggcagcg gagagggcag aggaagtctt ctaacatgcg gtgacgtgga ggagaatccc 780
ggccctagaa tggccttacc agtgaccgcc ttgctcctgc cgctggcctt gctgctccac 840
gccgccaggc cgggatccgg aagcggagat agcgccaccc acatcaagtt cagcaagcgg 900
gacgaggacg gcaaagagct ggctggcgcc accatggaac tgcgggatag cagcggcaag 960
accatcagca cctggatcag cgacggccag gtcaaagact tctacctgta ccccggcaag 1020
tacaccttcg tggaaacagc cgcccctgac ggctatgagg tggccacagc catcaccttc 1080
accgtgaacg agcagggaca ggtcacagtg aacggcgcta gcaccacgac gccagcgccg 1140
cgaccaccaa caccggcgcc caccatcgcg tcgcagcccc tgtccctgcg cccagaggcg 1200
tgccggccag cggcgggggg cgcagtgcac acgaggggcc tggacttcgc ctgtgatttt 1260
tgggtgctgg tggtggttgg tggagtcctg gcttgctata gcttgctagt aacagtggcc 1320
tttattattt tctgggtgag gagtaagagg agcaggctcc tgcacagtga ctacatgaac 1380
atgactcccc gccgccccgg gcccacccgc aagcattacc agccctatgc cccaccacgc 1440

gacttcgcag cctatcgctc catcgataga gtgaagttca gcaggagcgc agacgccccc 1500

gcgtaccagc agggccagaa ccagctctat aacgagctca atctaggacg aagagaggag 1560

tacgatgttt tggacaagag acgtggccgg gaccctgaga tgggggaaa gccgagaagg 1620

aagaaccctc aggaaggcct gtacaatgaa ctgcagaaag ataagatggc ggaggcctac 1680

agtgagattg ggatgaaagg cgagcgccgg aggggcaagg ggcacgatgg cctttaccag 1740

ggtctcagta cagccaccaa ggacacctac gacgcccttc acatgcaggc cctgcccct 1800

cgctaa 1806

<210> 14
<211> 601
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的

<400> 14

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
1 5 10 15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
20 25 30

[0016] Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
35 40 45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
50 55 60

Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
65 70 75 80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
85 90 95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
100 105 110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
115 120 125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
130 135 140

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
145 150 155 160

Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
165 170 175

```
Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
            180                 185                 190

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
        195                 200                 205

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
    210                 215                 220

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Arg
225                 230                 235                 240

Ser Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val
                245                 250                 255

Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu
            260                 265                 270

Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His Ala Ala Arg Pro Gly Ser Gly Ser
        275                 280                 285

Gly Asp Ser Ala Thr His Ile Lys Phe Ser Lys Arg Asp Glu Asp Gly
    290                 295                 300

Lys Glu Leu Ala Gly Ala Thr Met Glu Leu Arg Asp Ser Ser Gly Lys
305                 310                 315                 320
```

[0017]

```
Thr Ile Ser Thr Trp Ile Ser Asp Gly Gln Val Lys Asp Phe Tyr Leu
                325                 330                 335

Tyr Pro Gly Lys Tyr Thr Phe Val Glu Thr Ala Ala Pro Asp Gly Tyr
            340                 345                 350

Glu Val Ala Thr Ala Ile Thr Phe Thr Val Asn Glu Gln Gly Gln Val
        355                 360                 365

Thr Val Asn Gly Ala Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr
    370                 375                 380

Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala
385                 390                 395                 400

Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe
                405                 410                 415

Ala Cys Asp Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys
            420                 425                 430

Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser
        435                 440                 445

Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg
```

450 455 460

Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg
465 470 475 480

Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Ile Asp Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser
485 490 495

Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu
500 505 510

Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg
515 520 525

Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln
530 535 540

Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
545 550 555 560

Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp
565 570 575

Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
580 585 590

[0018]

Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
595 600

<210> 15
<211> 1869
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的

<400> 15
atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60

ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120

ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 180

ctcgtgacca ccctgaccta cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag 240

cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300

ttcaaggacg acggcaacta caagacccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360

gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420

aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480

ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540

gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600

tacctgagca cccagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc 660

[0019]

ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaagaga 720

tctggcagcg gagagggcag aggaagtctt ctaacatgcg gtgacgtgga ggagaatccc 780

ggccctagaa tggccttacc agtgaccgcc ttgctcctgc cgctggcctt gctgctccac 840

gccgccaggc cgggatccgg aagcggcgat agcgccaccc acatcaagtt cagcaagcgg 900

gacgaggacg gcaaagagct ggctggcgcc accatggaac tgcgggacag cagcggcaag 960

accatcagca cctggatcag cgacggccag gtcaaagact tctacctgta ccccggcaag 1020

tacaccttcg tggaaacagc cgcccctgac ggctacgagg tggccacagc catcaccttc 1080

accgtgaacg agcagggaca ggtcacagtg aacggcggcg gcagcggcgg cagcggcggc 1140

agcggcggca gcggcggcag cggcggcagc ggcggcagcg ctagcaccac gacgccagcg 1200

ccgcgaccac caacaccggc gcccaccatc gcgtcgcagc ccctgtccct gcgcccagag 1260

gcgtgccggc cagcggcggg gggcgcagtg cacacgaggg ggctggactt cgcctgtgat 1320

ttttgggtgc tggtggtggt tggtggagtc ctggcttgct atagcttgct agtaacagtg 1380

gcctttatta ttttctgggt gaggagtaag aggagcaggc tcctgcacag tgactacatg 1440

aacatgactc cccgccgccc cgggcccacc cgcaagcatt accagcccta tgccccacca 1500

cgcgacttcg cagcctatcg ctccatcgat agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc 1560

cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc tataacgagc tcaatctagg acgaagagag 1620

gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga 1680

aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc 1740

tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc cggaggggca aggggcacga tggcctttac 1800

cagggtctca gtacagccac caaggacacc tacgacgccc ttcacatgca ggccctgccc 1860

cctcgctaa 1869

<210> 16
<211> 622
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的

<400> 16

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
1 5 10 15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
20 25 30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
35 40 45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
50 55 60

Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
65 70 75 80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
85 90 95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
100 105 110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
115 120 125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
130 135 140

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
145 150 155 160

Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
165 170 175

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
180 185 190

[0020] Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
195 200 205

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
210 215 220

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Arg
225 230 235 240

Ser Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val
245 250 255

Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu
260 265 270

Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His Ala Ala Arg Pro Gly Ser Gly Ser
275 280 285

Gly Asp Ser Ala Thr His Ile Lys Phe Ser Lys Arg Asp Glu Asp Gly
290 295 300

Lys Glu Leu Ala Gly Ala Thr Met Glu Leu Arg Asp Ser Ser Gly Lys
305 310 315 320

Thr Ile Ser Thr Trp Ile Ser Asp Gly Gln Val Lys Asp Phe Tyr Leu
325 330 335

```
Tyr Pro Gly Lys Tyr Thr Phe Val Glu Thr Ala Ala Pro Asp Gly Tyr
            340                 345                 350

Glu Val Ala Thr Ala Ile Thr Phe Thr Val Asn Glu Gln Gly Gln Val
        355                 360                 365

Thr Val Asn Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
    370                 375                 380

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ala Ser Thr Thr Thr Pro Ala
385                 390                 395                 400

Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser
                405                 410                 415

Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
            420                 425                 430

Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly
        435                 440                 445

Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile
    450                 455                 460

Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met
465                 470                 475                 480
```

[0021]

```
Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro
                485                 490                 495

Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Ile Asp Arg Val
            500                 505                 510

Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn
        515                 520                 525

Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
    530                 535                 540

Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
545                 550                 555                 560

Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
                565                 570                 575

Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
            580                 585                 590

Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
        595                 600                 605

Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
```

610 615 620

<210> 17
<211> 609
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的

<400> 17
atggaacaga aactgattag cgaagaggat ctgggttctg atctgggtaa aaaactgctg 60

gaagcagcac gtgcaggtca ggatgatgaa gttcgtattc tgatggcaaa tggtgcagat 120

gttaacgcca aagattttta tggtattaca ccgctgcatc tggcagcagc ctatggtcat 180

ctggaaattg ttgaagttct gctgaaacat ggtgccgatg tgaatgcaca tgattggaat 240

ggttggaccc cgttacacct ggcagcaaaa tatggccatt tagaaatcgt ggaagtgctg 300

ttaaaacatg gcgcagacgt taatgcaatt gataatgcag gtaaaacccc tctgcattta 360

gcagccgcac atggccacct ggaaatcgta gaggttttac tgaaatacgg tgcggatgta 420

aacgcgcagg ataaatttgg taaaaccgcc ttcgatatta gcatcgataa tggtaatgag 480

gacctggcag aaattctgca agaggcatgc ggtggtggtg gtagtggtgg cggtggttca 540

gcaagcgcac atattgttat ggttgatgca tataaaccga ccaaactgga acatcatcat 600

caccattaa 609

[0022]

<210> 18
<211> 202
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的

<400> 18

Met Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ser Asp Leu Gly
1 5 10 15

Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg
20 25 30

Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Phe Tyr Gly
35 40 45

Ile Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala Tyr Gly His Leu Glu Ile Val
50 55 60

Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val Asn Ala His Asp Trp Asn
65 70 75 80

Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Lys Tyr Gly His Leu Glu Ile
85 90 95

Val Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val Asn Ala Ile Asp Asn
100 105 110

Ala Gly Lys Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala His Gly His Leu Glu
115 120 125

Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp
130 135 140

Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Asp Asn Gly Asn Glu
145 150 155 160

Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Glu Ala Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly
165 170 175

Gly Gly Gly Ser Ala Ser Ala His Ile Val Met Val Asp Ala Tyr Lys
180 185 190

Pro Thr Lys Leu Glu His His His His His
195 200

<210> 19
<211> 1164
<212> DNA
<213> 人工序列

[0023] <220>
<223> 人工合成的

<400> 19
atggaacaga aactgatcag cgaagaagat ctgggttctg atctgggtaa aaaactgctg 60

gaagcagcac gtgcaggtca ggatgatgaa gttcgtattc tgatggcaaa tggtgcagat 120

gttaatgcag atgatacctg gggttggaca ccgctgcatc tggcagcata tcagggtcat 180

ctggaaattg ttgaagtgct gctgaaaaac ggtgccgatg tgaatgccta tgattatatt 240

ggttggaccc ctctgcactt agcagcagat ggccatttag aaatcgtgga agttttactg 300

aaaaatggcg cagacgtgaa cgcaagcgat tatatcggtg ataccccgtt acacctggca 360

gcacataatg gccacctgga aatcgtagag gttctgttaa aacatggtgc ggacgtgaat 420

gcacaggata aatttggtaa aaccgccttc gatatcagca ttgataatgg caatgaggat 480

ctggcagaaa ttctgcaaga agcatgtctc gagggtggta gtggtggctc tggcggttct 540

ggtggcagtg gcggtagcgg tggtagtggt ggcagtagag gcgtgccaca catcgtgatg 600

gtggacgcct acaagcggta caagggcggt tctggtggca gtctgccgga aaccggtggt 660

ggtagtggtg gctctggcgg ttctggtggc agtggcggta gccaagctaa acctcaaatt 720

ccgaaagata aatcaaaagt ggcaggctat attgaaattc cagatgctga tattaaagaa 780

ccagtatatc caggaccagc aacacctgaa caattaaata gaggtgtaag ctttgcagaa 840

gaaaatgaat cactagatga tcaaaatatt tcaattgcag gacacacttt cattgaccgt 900

ccgaactatc aatttacaaa tcttaaagca gccaaaaaag gtagtatggt gtactttaaa 960

gttggtaatg aaacacgtaa gtataaaatg acaagtataa gagatgttaa gccaacagat 1020

gtagaagttc tagatgaaca aaaaggtaaa gataaacaat taacattaat tacttgtgat 1080

gattacaatg aaaagacagg cgtttgggaa aaacgtaaaa tctttgtagc tacagaagtc 1140

aaacatcacc accatcatca ctaa 1164

<210> 20
<211> 387
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的

<400> 20

Met Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ser Asp Leu Gly
1 5 10 15

Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg
20 25 30

Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Asp Asp Thr Trp Gly
35 40 45

Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Tyr Gln Gly His Leu Glu Ile Val
50 55 60

[0024]

Glu Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Tyr Asp Tyr Ile
65 70 75 80

Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Asp Gly His Leu Glu Ile Val
85 90 95

Glu Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Ser Asp Tyr Ile
100 105 110

Gly Asp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala His Asn Gly His Leu Glu Ile
115 120 125

Val Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp Lys
130 135 140

Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Asp Asn Gly Asn Glu Asp
145 150 155 160

Leu Ala Glu Ile Leu Gln Glu Ala Cys Leu Glu Gly Gly Ser Gly Gly
165 170 175

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
180 185 190

Arg Gly Val Pro His Ile Val Met Val Asp Ala Tyr Lys Arg Tyr Lys
195 200 205

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Leu Pro Glu Thr Gly Gly Gly Ser Gly Gly
210 215 220

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gln Ala Lys Pro Gln Ile
225 230 235 240

Pro Lys Asp Lys Ser Lys Val Ala Gly Tyr Ile Glu Ile Pro Asp Ala
245 250 255

Asp Ile Lys Glu Pro Val Tyr Pro Gly Pro Ala Thr Pro Glu Gln Leu
260 265 270

Asn Arg Gly Val Ser Phe Ala Glu Glu Asn Glu Ser Leu Asp Asp Gln
275 280 285

Asn Ile Ser Ile Ala Gly His Thr Phe Ile Asp Arg Pro Asn Tyr Gln
290 295 300

Phe Thr Asn Leu Lys Ala Ala Lys Lys Gly Ser Met Val Tyr Phe Lys
305 310 315 320

Val Gly Asn Glu Thr Arg Lys Tyr Lys Met Thr Ser Ile Arg Asp Val
325 330 335

[0025] Lys Pro Thr Asp Val Glu Val Leu Asp Glu Gln Lys Gly Lys Asp Lys
340 345 350

Gln Leu Thr Leu Ile Thr Cys Asp Asp Tyr Asn Glu Lys Thr Gly Val
355 360 365

Trp Glu Lys Arg Lys Ile Phe Val Ala Thr Glu Val Lys His His His
370 375 380

His His His
385

<210> 21
<211> 1164
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的

<400> 21
atggaacaga aactgatcag cgaagaagat ctgggttctg atctgggtaa aaaactgctg 60

gaagcagcac gtgcaggtca ggatgatgaa gttcgtattc tgatggcaaa tggtgcagat 120

gttaacgcca aagattttta tggtattaca ccgctgcatc tggcagcagc ctatggtcat 180

ctggaaattg ttgaagttct gctgaaacat ggtgccgatg tgaatgcaca tgattggaat 240

ggttggaccc cgttacacct ggcagcaaaa tatggccatt tagaaatcgt ggaagtgctg 300

ttaaaacatg gcgcagacgt taatgcaatt gataatgcag gtaaaacccc tctgcattta 360

gcagccgcac atggccacct ggaaatcgta gaggttttac tgaaatacgg tgcggatgta 420

aacgcgcagg ataaatttgg taaaaccgcc ttcgatatta gcatcgataa tggtaatgag 480

gacctggcag aaattctgca agaggcactc gagggtggta gtggtggctc tggcggttct 540

ggtggcagtg gcggtagcgg tggtagtggt ggcagtagag gcgtgccaca catcgtgatg 600

gtggacgcct acaagcggta caagggcggt tctggtggca gtctgccgga aaccggtggt 660

ggtagtggtg gctctggcgg ttctggtggc agtggcggta gccaagctaa acctcaaatt 720

ccgaaagata aatcaaaagt ggcaggctat attgaaattc cagatgctga tattaaagaa 780

ccagtatatc caggaccagc aacacctgaa caattaaata gaggtgtaag ctttgcagaa 840

gaaaatgaat cactagatga tcaaaatatt tcaattgcag gacacacttt cattgaccgt 900

ccgaactatc aatttacaaa tcttaaagca gccaaaaaag gtagtatggt gtactttaaa 960

gttggtaatg aaacacgtaa gtataaaatg acaagtataa gagatgttaa gccaacagat 1020

gtagaagttc tagatgaaca aaaaggtaaa gataaacaat taacattaat tacttgtgat 1080

gattacaatg aaaagacagg cgtttgggaa aaacgtaaaa tctttgtagc tacagaagtc 1140

aaacatcacc accatcatca ctaa 1164

[0026]

<210> 22
<211> 387
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的

<400> 22

Met Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ser Asp Leu Gly
1 5 10 15

Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln Asp Asp Glu Val Arg
20 25 30

Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala Lys Asp Phe Tyr Gly
35 40 45

Ile Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala Tyr Gly His Leu Glu Ile Val
50 55 60

Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val Asn Ala His Asp Trp Asn
65 70 75 80

Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Lys Tyr Gly His Leu Glu Ile
85 90 95

Val Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val Asn Ala Ile Asp Asn
100 105 110

Ala Gly Lys Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala His Gly His Leu Glu
115 120 125

Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Asp
130 135 140

Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Asp Asn Gly Asn Glu
145 150 155 160

Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Glu Ala Leu Glu Gly Gly Ser Gly Gly
165 170 175

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
180 185 190

Arg Gly Val Pro His Ile Val Met Val Asp Ala Tyr Lys Arg Tyr Lys
195 200 205

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Leu Pro Glu Thr Gly Gly Gly Ser Gly Gly
210 215 220

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gln Ala Lys Pro Gln Ile
225 230 235 240

Pro Lys Asp Lys Ser Lys Val Ala Gly Tyr Ile Glu Ile Pro Asp Ala
245 250 255

[0027]

Asp Ile Lys Glu Pro Val Tyr Pro Gly Pro Ala Thr Pro Glu Gln Leu
260 265 270

Asn Arg Gly Val Ser Phe Ala Glu Glu Asn Glu Ser Leu Asp Asp Gln
275 280 285

Asn Ile Ser Ile Ala Gly His Thr Phe Ile Asp Arg Pro Asn Tyr Gln
290 295 300

Phe Thr Asn Leu Lys Ala Ala Lys Lys Gly Ser Met Val Tyr Phe Lys
305 310 315 320

Val Gly Asn Glu Thr Arg Lys Tyr Lys Met Thr Ser Ile Arg Asp Val
325 330 335

Lys Pro Thr Asp Val Glu Val Leu Asp Glu Gln Lys Gly Lys Asp Lys
340 345 350

Gln Leu Thr Leu Ile Thr Cys Asp Asp Tyr Asn Glu Lys Thr Gly Val
355 360 365

Trp Glu Lys Arg Lys Ile Phe Val Ala Thr Glu Val Lys His His His
370 375 380

His His His

385

<210> 23
<211> 825
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的

<400> 23
atgaccttta aactgattat taacggcaaa accctgaaag gcgaaattac cattgaagcg 60

gtggatgcgt aggaagcgga aaaaatttt aaacagtatg cgaacgatta tggcattgat 120

ggcgaatgga cctatgatga tgcgaccaaa acctttaccg tgaccgaact cgagggtggt 180

agtggtggct ctggcggttc tggtggcagt ggcggtagcg gtggtagtgg tggcagtaga 240

ggcgtgccac acatcgtgat ggtggacgcc tacaagcggt acaagggcgg ttctggtggc 300

agtctgccgg aaaccggtgg tggtagtggt ggctctggcg gttctggtgg cagtggcggt 360

agccaagcta aacctcaaat tccgaaagat aaatcaaaag tggcaggcta tattgaaatt 420

ccagatgctg atattaaaga accagtatat ccaggaccag caacacctga acaattaaat 480

agaggtgtaa gctttgcaga agaaaatgaa tcactagatg atcaaaatat ttcaattgca 540

ggacacactt tcattgaccg tccgaactat caatttacaa atcttaaagc agccaaaaaa 600

ggtagtatgg tgtactttaa agttggtaat gaaacacgta agtataaaat gacaagtata 660

[0028] agagatgtta agccaacaga tgtagaagtt ctagatgaac aaaaaggtaa agataaacaa 720

ttaacattaa ttacttgtga tgattacaat gaaaagacag gcgtttggga aaaacgtaaa 780

atctttgtag ctacagaagt caaacatcac caccatcatc actaa 825

<210> 24
<211> 273
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的

<400> 24

Met Thr Phe Lys Leu Ile Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Ile
1 5 10 15

Thr Ile Glu Ala Val Asp Ala Glu Ala Glu Lys Ile Phe Lys Gln Tyr
20 25 30

Ala Asn Asp Tyr Gly Ile Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr
35 40 45

Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Leu Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
50 55 60

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Arg Gly
65 70 75 80

Val Pro His Ile Val Met Val Asp Ala Tyr Lys Arg Tyr Lys Gly Gly
85 90 95

Ser Gly Gly Ser Leu Pro Glu Thr Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gln Ala Lys Pro Gln Ile Pro Lys
115 120 125

Asp Lys Ser Lys Val Ala Gly Tyr Ile Glu Ile Pro Asp Ala Asp Ile
130 135 140

Lys Glu Pro Val Tyr Pro Gly Pro Ala Thr Pro Glu Gln Leu Asn Arg
145 150 155 160

Gly Val Ser Phe Ala Glu Glu Asn Glu Ser Leu Asp Asp Gln Asn Ile
165 170 175

Ser Ile Ala Gly His Thr Phe Ile Asp Arg Pro Asn Tyr Gln Phe Thr
180 185 190

Asn Leu Lys Ala Ala Lys Lys Gly Ser Met Val Tyr Phe Lys Val Gly
195 200 205

[0029]

Asn Glu Thr Arg Lys Tyr Lys Met Thr Ser Ile Arg Asp Val Lys Pro
210 215 220

Thr Asp Val Glu Val Leu Asp Glu Gln Lys Gly Lys Asp Lys Gln Leu
225 230 235 240

Thr Leu Ile Thr Cys Asp Asp Tyr Asn Glu Lys Thr Gly Val Trp Glu
245 250 255

Lys Arg Lys Ile Phe Val Ala Thr Glu Val Lys His His His His His
260 265 270

His

<210> 25
<211> 1086
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的

<400> 25
atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60

ccgggatccg tgacaacact gagcggactg tctggcgagc aaggcccttc tggcgatatg 120

accaccgaag aggatagcgc cacacacatc aagttcagca agcgcgacga ggacggcaga 180

gaacttgctg gcgctaccat ggaactgaga gacagcagcg gcaagaccat cagcacctgg 240

atctctgacg gccacgtgaa ggacttctat ctgtaccccg gcaagtacac cttcgtggaa 300

accgccgctc ctgacggcta cgaagtggcc acacctatcg agttcaccgt gaacgaggat 360

ggccaagtga ccgtggatgg cgaagctaca gaaggcgacg cccatacagc tagcaccacg 420

acgccagcgc cgcgaccacc aacaccggcg cccaccatcg cgtcgcagcc cctgtccctg 480

cgcccagagg cgtgccggcc agcggcgggg ggcgcagtgc acacgagggg gctggacttc 540

gcctgtgata tctacatctg ggcgcccttg gccgggactt gtggggtcct tctcctgtca 600

ctggttatca ccctttactg caaacggggc agaaagaaac tcctgtatat attcaaacaa 660

ccatttatga gaccagtaca aactactcaa gaggaagatg gctgtagctg ccgatttcca 720

gaagaagaag aaggaggatg tgaactgaga gtgaagttca gcaggagcgc agacgccccc 780

gcgtacaagc agggccagaa ccagctctat aacgagctca atctaggacg aagagaggag 840

tacgatgttt tggacaagag acgtggccgg gaccctgaga tgggggaaa gccgagaagg 900

aagaaccctc aggaaggcct gtacaatgaa ctgcagaaag ataagatggc ggaggcctac 960

agtgagattg ggatgaaagg cgagcgccgg aggggcaagg ggcacgatgg cctttaccag 1020

ggtctcagta cagccaccaa ggacacctac gacgcccttc acatgcaggc cctgcccccc 1080

cgctaa 1086

[0030] <210> 26
<211> 361
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的

<400> 26

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gly Ser Val Thr Thr Leu Ser Gly Leu Ser Gly
20 25 30

Glu Gln Gly Pro Ser Gly Asp Met Thr Thr Glu Glu Asp Ser Ala Thr
35 40 45

His Ile Lys Phe Ser Lys Arg Asp Glu Asp Gly Arg Glu Leu Ala Gly
50 55 60

Ala Thr Met Glu Leu Arg Asp Ser Ser Gly Lys Thr Ile Ser Thr Trp
65 70 75 80

Ile Ser Asp Gly His Val Lys Asp Phe Tyr Leu Tyr Pro Gly Lys Tyr
85 90 95

Thr Phe Val Glu Thr Ala Ala Pro Asp Gly Tyr Glu Val Ala Thr Pro
100 105 110

Ile Glu Phe Thr Val Asn Glu Asp Gly Gln Val Thr Val Asp Gly Glu
115 120 125

Ala Thr Glu Gly Asp Ala His Thr Ala Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro
130 135 140

Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu
145 150 155 160

Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg
165 170 175

Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly
180 185 190

Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys
195 200 205

Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg
210 215 220

Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro
225 230 235 240

[0031] Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser
245 250 255

Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu
260 265 270

Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg
275 280 285

Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln
290 295 300

Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
305 310 315 320

Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp
325 330 335

Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
340 345 350

Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
355 360

<210> 27
<211> 1098
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的

<400> 27

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60

ccgggatccg tgacaacact gagcggactg tctggcgagc aaggcccttc tggcgatatg 120

accaccgaag aggatagcgc cacacacatc aagttcagca agcgcgacga ggacggcaga 180

gaacttgctg gcgctaccat ggaactgaga gacagcagcg gcaagaccat cagcacctgg 240

atctctgacg gccacgtgaa ggacttctat ctgtaccccg gcaagtacac cttcgtggaa 300

accgccgctc ctgacggcta cgaagtggcc acacctatcg agttcaccgt gaacgaggat 360

ggccaagtga ccgtggatgg cgaagctaca gaaggcgacg cccatacagc tagcaccacg 420

acgccagcgc cgcgaccacc aacaccggcg cccaccatcg cgtcgcagcc cctgtccctg 480

cgcccagagg cgtgccggcc agcggcgggg ggcgcagtgc acacgagggg gctggacttc 540

gcctgtgatt tttgggtgct ggtggtggtt ggtggagtcc tggcttgcta tagcttgcta 600

gtaacagtgg cctttattat tttctgggtg aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt 660

gactacatga acatgactcc ccgccgcccc gggcccaccc gcaagcatta ccagccctat 720

gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc tccatcgata gagtgaagtt cagcaggagc 780

gcagacgccc ccgcgtacaa gcagggccag aaccagctct ataacgagct caatctagga 840

[0032] cgaagagagg agtacgatgt tttggacaag agacgtggcc gggaccctga gatgggggga 900

aagccgagaa ggaagaaccc tcaggaaggc ctgtacaatg aactgcagaa agataagatg 960

gcggaggcct acagtgagat tgggatgaaa ggcgagcgcc ggaggggcaa ggggcacgat 1020

ggcctttacc agggtctcag tacagccacc aaggacacct acgacgccct tcacatgcag 1080

gccctgcccc ctcgctaa 1098

<210> 28
<211> 365
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的

<400> 28

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gly Ser Val Thr Thr Leu Ser Gly Leu Ser Gly
20 25 30

Glu Gln Gly Pro Ser Gly Asp Met Thr Thr Glu Glu Asp Ser Ala Thr
35 40 45

His Ile Lys Phe Ser Lys Arg Asp Glu Asp Gly Arg Glu Leu Ala Gly
50 55 60

Ala Thr Met Glu Leu Arg Asp Ser Ser Gly Lys Thr Ile Ser Thr Trp
65 70 75 80

Ile Ser Asp Gly His Val Lys Asp Phe Tyr Leu Tyr Pro Gly Lys Tyr
85 90 95

Thr Phe Val Glu Thr Ala Ala Pro Asp Gly Tyr Glu Val Ala Thr Pro
100 105 110

Ile Glu Phe Thr Val Asn Glu Asp Gly Gln Val Thr Val Asp Gly Glu
115 120 125

Ala Thr Glu Gly Asp Ala His Thr Ala Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro
130 135 140

Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu
145 150 155 160

Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg
165 170 175

Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly
180 185 190

[0033] Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe
195 200 205

Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn
210 215 220

Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr
225 230 235 240

Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Ile Asp Arg Val Lys
245 250 255

Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln
260 265 270

Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
275 280 285

Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
290 295 300

Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
305 310 315 320

Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
325 330 335

Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
340 345 350

Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
355 360 365

<210> 29
<211> 648
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的

<400> 29

[0034]

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60

ccgggatccg tgacaacact gagcggactg tctggcgagc aaggcccttc tggcgatatg 120

accaccgaag aggatagcgc cacacacatc aagttcagca agcgcgacga ggacggcaga 180

gaacttgctg gcgctaccat ggaactgaga gacagcagcg gcaagaccat cagcacctgg 240

atctctgacg gccacgtgaa ggacttctat ctgtaccccg gcaagtacac cttcgtggaa 300

accgccgctc ctgacggcta cgaagtggcc acacctatcg agttcaccgt gaacgaggat 360

ggccaagtga ccgtggatgg cgaagctaca gaaggcgacg cccatacagc tagcaccacg 420

acgccagcgc cgcgaccacc aacaccggcg cccaccatcg cgtcgcagcc cctgtccctg 480

cgcccagagg cgtgccggcc agcggcgggg ggcgcagtgc acacgagggg gctggacttc 540

gcctgtgatt tttgggtgct ggtggtggtt ggtggagtcc tggcttgcta tagcttgcta 600

gtaacagtgg cctttattat tttctgggtg aggagtaaga ggagctaa 648

<210> 30
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成的

<400> 30

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gly Ser Val Thr Thr Leu Ser Gly Leu Ser Gly
20 25 30

Glu Gln Gly Pro Ser Gly Asp Met Thr Thr Glu Glu Asp Ser Ala Thr
35 40 45

His Ile Lys Phe Ser Lys Arg Asp Glu Asp Gly Arg Glu Leu Ala Gly
50 55 60

Ala Thr Met Glu Leu Arg Asp Ser Ser Gly Lys Thr Ile Ser Thr Trp
65 70 75 80

Ile Ser Asp Gly His Val Lys Asp Phe Tyr Leu Tyr Pro Gly Lys Tyr
85 90 95

Thr Phe Val Glu Thr Ala Ala Pro Asp Gly Tyr Glu Val Ala Thr Pro
100 105 110

Ile Glu Phe Thr Val Asn Glu Asp Gly Gln Val Thr Val Asp Gly Glu
115 120 125

Ala Thr Glu Gly Asp Ala His Thr Ala Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro
130 135 140

[0035]

Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu
145 150 155 160

Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg
165 170 175

Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly
180 185 190

Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe
195 200 205

Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser
210 215

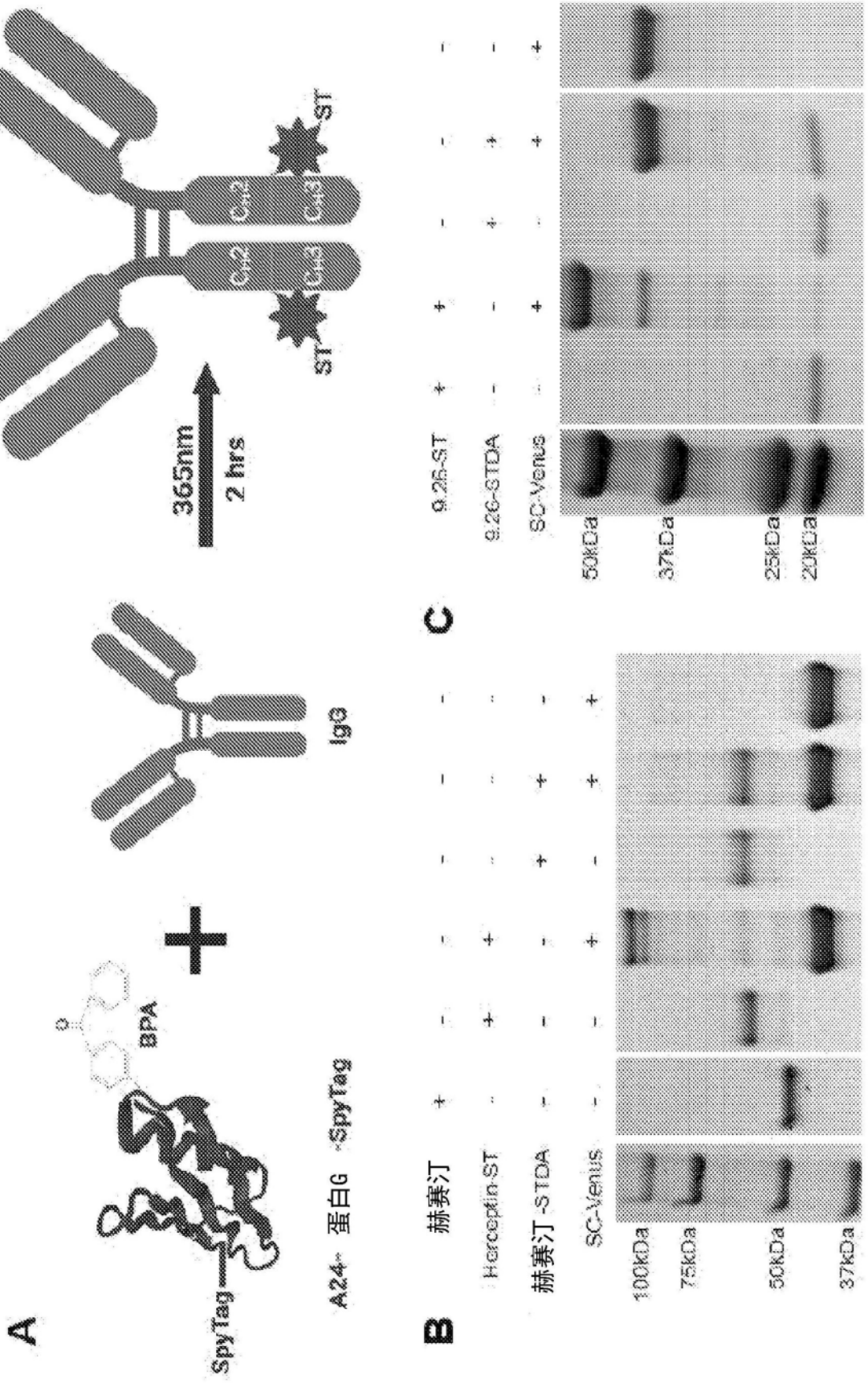

A
SpyTag
BPA
A24-
蛋白G
-SpyTag
Ig3
365nm
2 hrs
ST
ST
B
赫赛汀
Herceptin-ST
赫赛汀-STDA
SC-Venus
100kDa
75kDa
50kDa
37kDa
C
9.26-ST
9.26-STDA
SC-Venus
50kDa
37kDa
25kDa
20kDa

图1

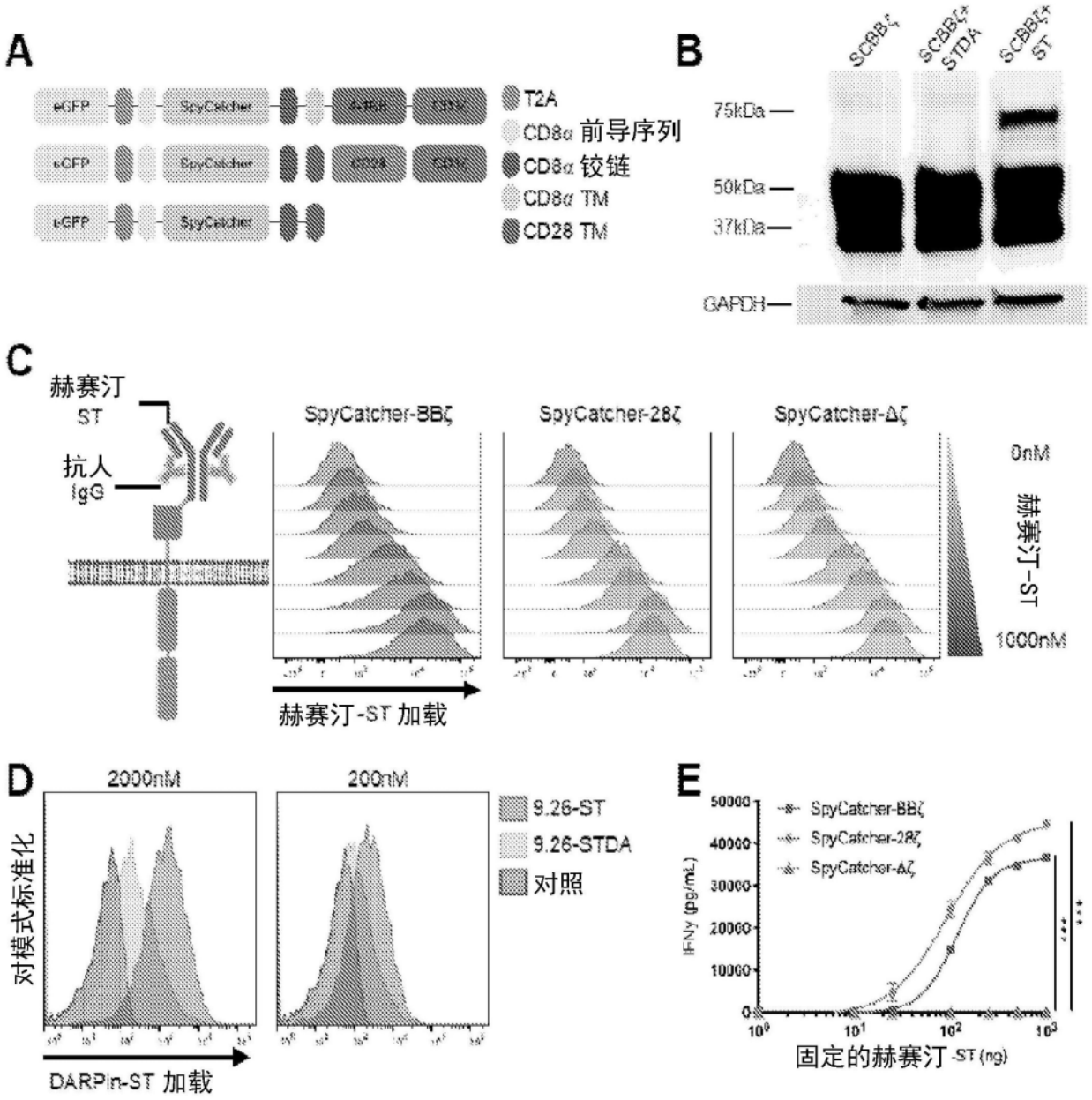

A
eGFP
SpyCatcher
T2A
CD8α 前导序列
CD8α 铰链
CD8α TM
CD28 TM
B
SCBBζ
SCBBζ STDA
SCBBζ ST
75kDa
50kDa
37kDa
GAPDH
C
赫赛汀 ST
抗人 IgG
SpyCatcher-BBζ
SpyCatcher-28ζ
SpyCatcher-Δζ
0nM
赫赛汀-ST
1000nM
赫赛汀-ST 加载
D
2000nM
200nM
对模式标准化
9.26-ST
9.26-STDA
对照
DARPin-ST 加载
E
SpyCatcher-BBζ
SpyCatcher-28ζ
SpyCatcher-Δζ
IFN-γ (pg/mL)
固定的赫赛汀-ST (ng)

图2

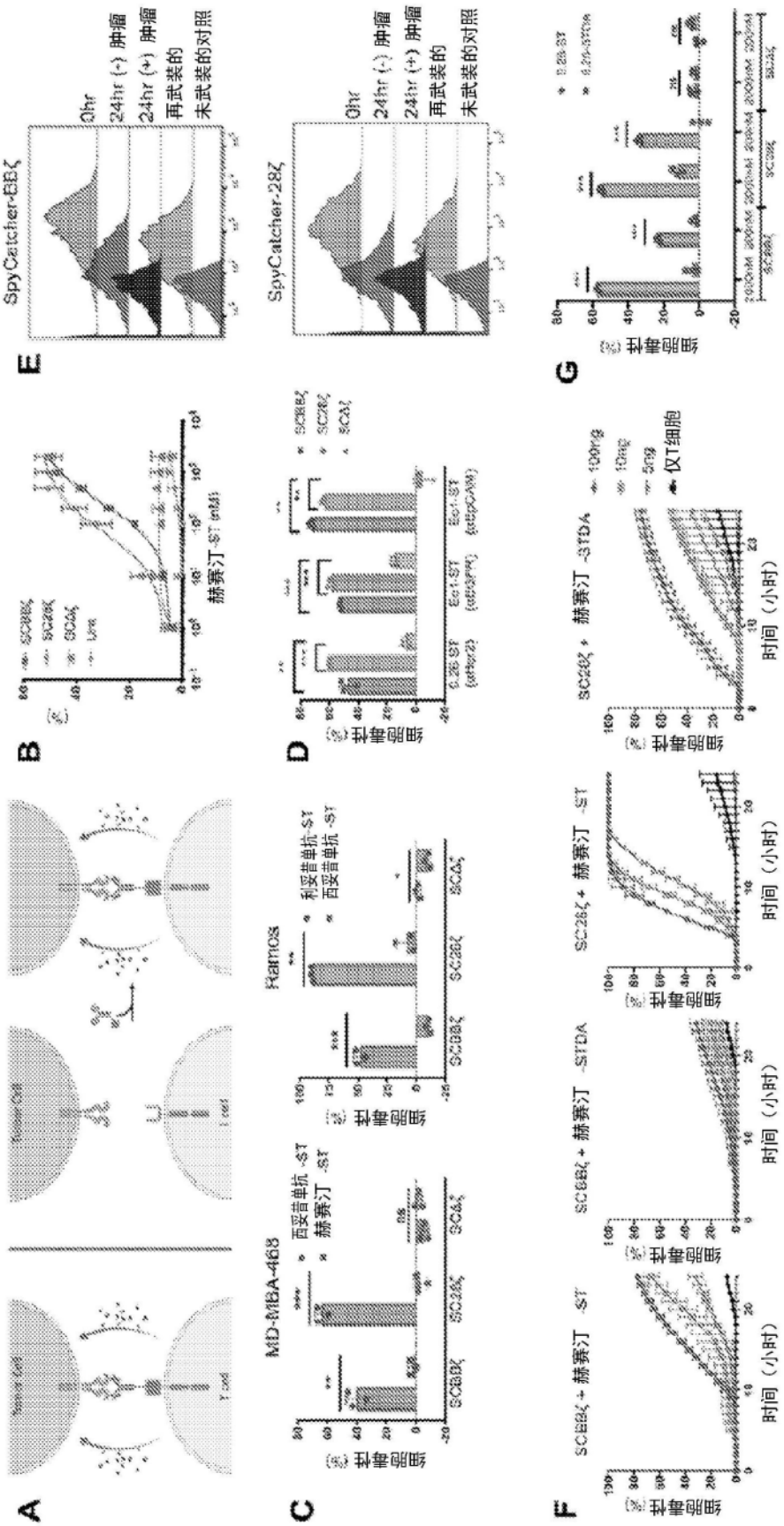

A
B
C
D
E
F
G
SpyCatcher-BBζ
SpyCatcher-28ζ
0hr
24hr (-) 肿瘤
24hr (+) 肿瘤
再武装的
未武装的对照
MD-MBA-468
Ramos
西妥昔单抗-ST
赫赛汀-ST
利妥昔单抗-ST
细胞毒性 (%)
时间（小时）
仅T细胞

图3

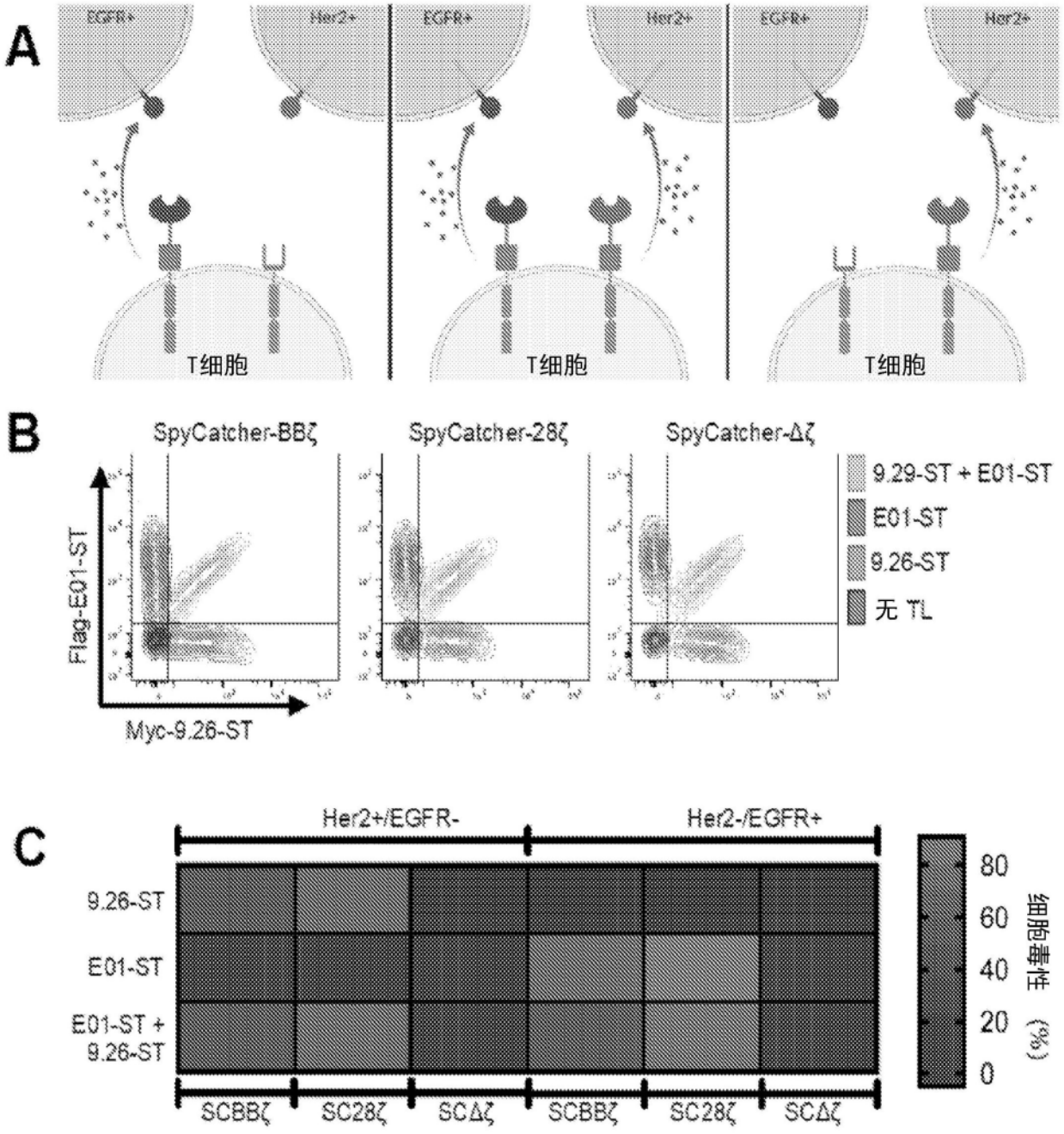

A
EGFR+
Her2+
T细胞
B
SpyCatcher-BBζ
SpyCatcher-28ζ
SpyCatcher-Δζ
Flag-E01-ST
Myc-9.26-ST
9.29-ST + E01-ST
E01-ST
9.26-ST
无 TL
C
Her2+/EGFR-
Her2-/EGFR+
9.26-ST
E01-ST
E01-ST + 9.26-ST
SCBBζ
SC28ζ
SCΔζ
细胞毒性 (%)
80
60
40
20
0

图4

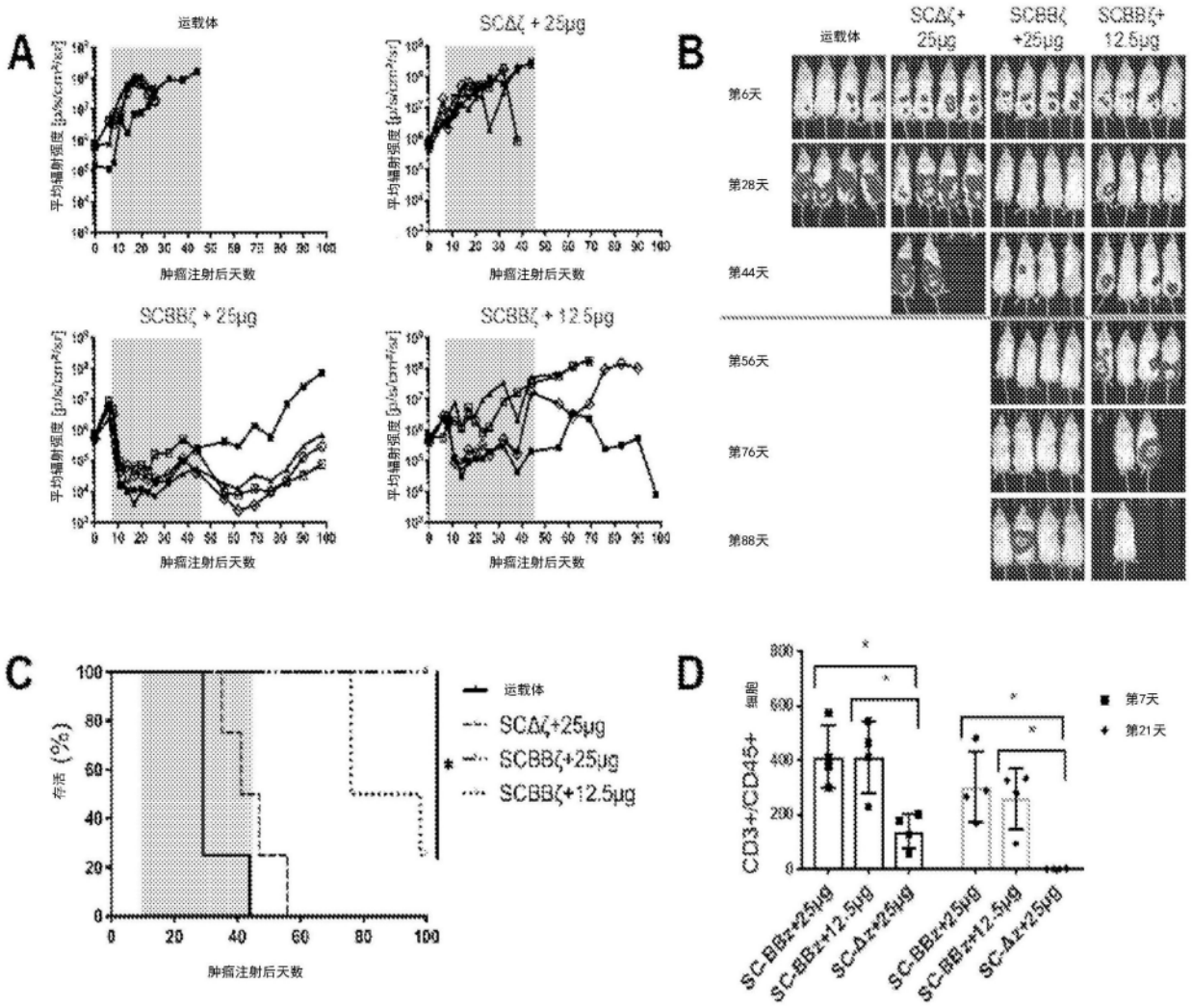

A
运载体
SCΔζ + 25μg
SCBBζ + 25μg
SCBBζ + 12.5μg
肿瘤注射后天数
B
运载体
SCΔζ+ 25μg
SCBBζ +25μg
SCBBζ+ 12.5μg
第6天
第28天
第44天
第56天
第76天
第88天
C
存活（%）
运载体
SCΔζ+25μg
SCBBζ+25μg
SCBBζ+12.5μg
肿瘤注射后天数
D
CD3+/CD45+细胞
第7天
第21天
SC-BBz+25μg
SC-BBz+12.5μg
SC-Δz+25μg
SC-BBz+25μg
SC-BBz+12.5μg
SC-Δz+25μg

图5

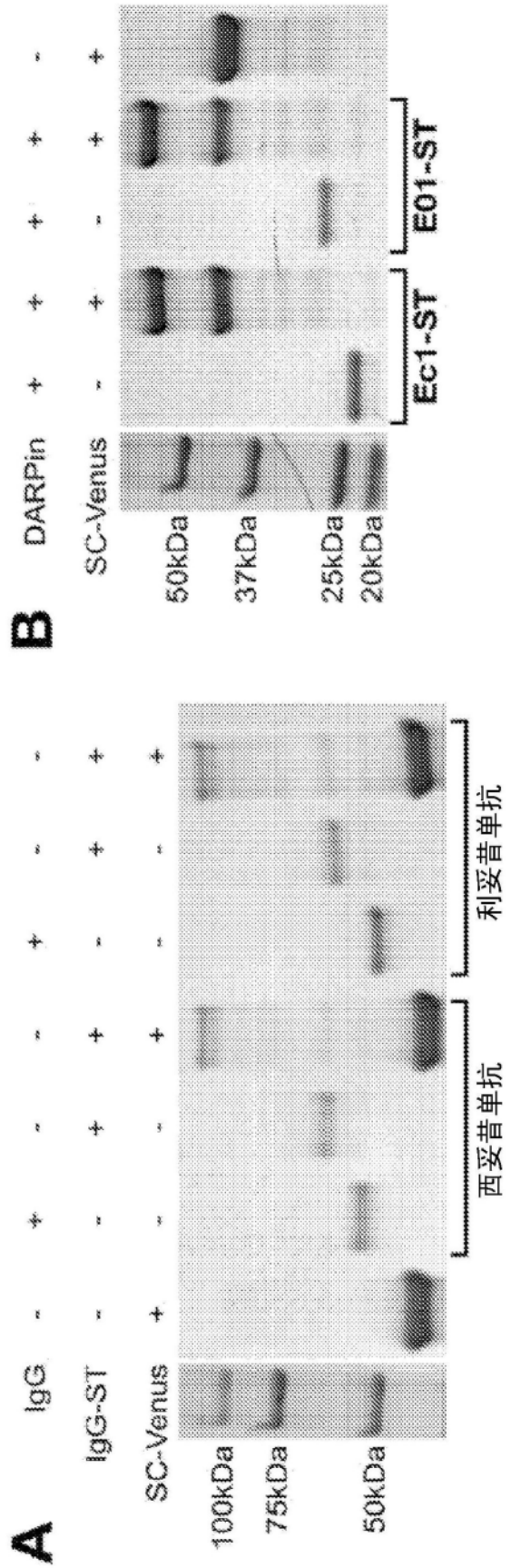

A
IgG
IgG-ST
SC-Venus
100kDa
75kDa
50kDa
西妥昔单抗
利妥昔单抗
B
DARPin
SC-Venus
50kDa
37kDa
25kDa
20kDa
Ec1-ST
E01-ST

图6

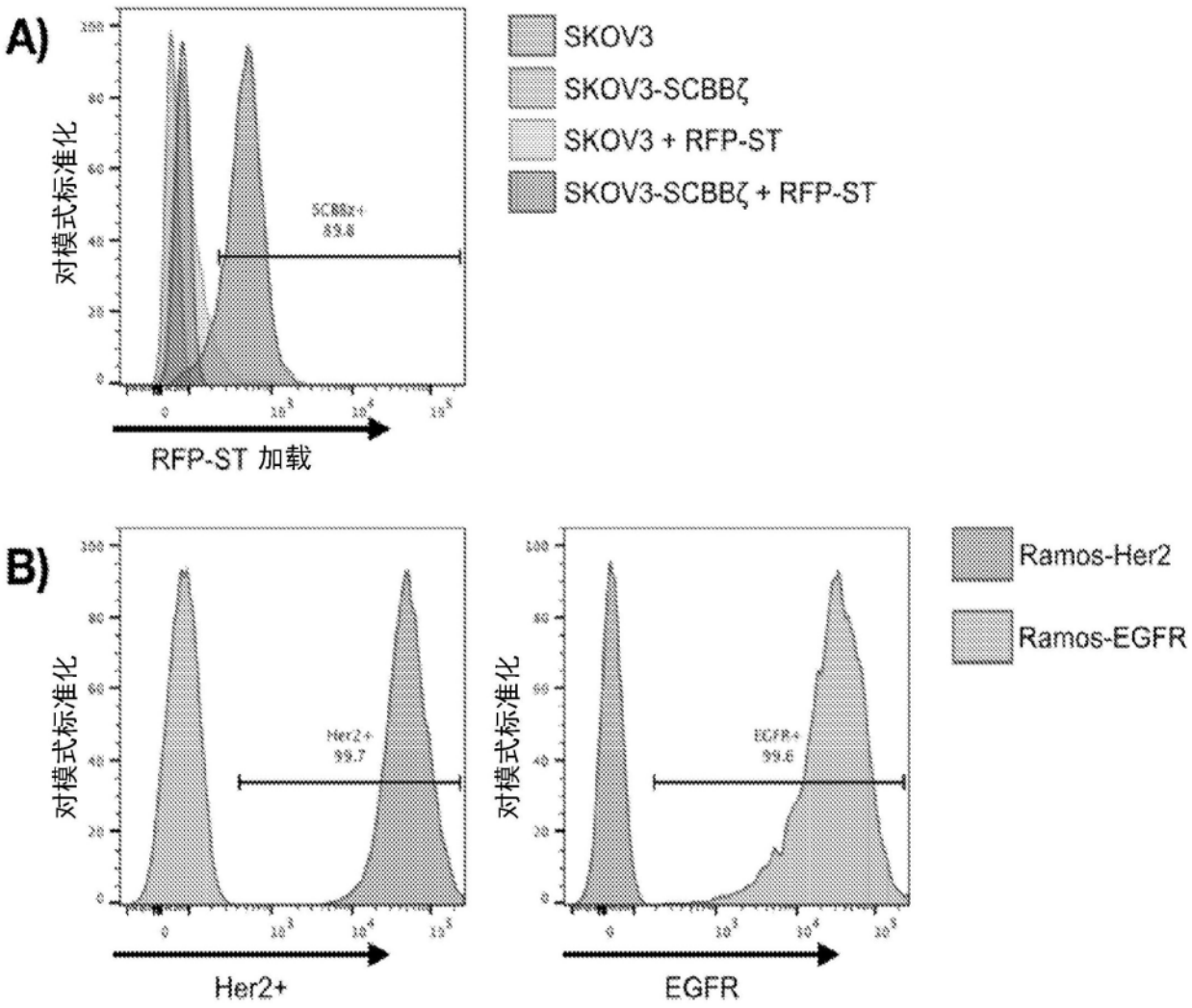

A)
对模式标准化
SCBBz+
89.8
RFP-ST 加载
SKOV3
SKOV3-SCBBζ
SKOV3 + RFP-ST
SKOV3-SCBBζ + RFP-ST
B)
对模式标准化
Her2+
99.7
Her2+
对模式标准化
EGFR+
99.6
EGFR
Ramos-Her2
Ramos-EGFR

图7

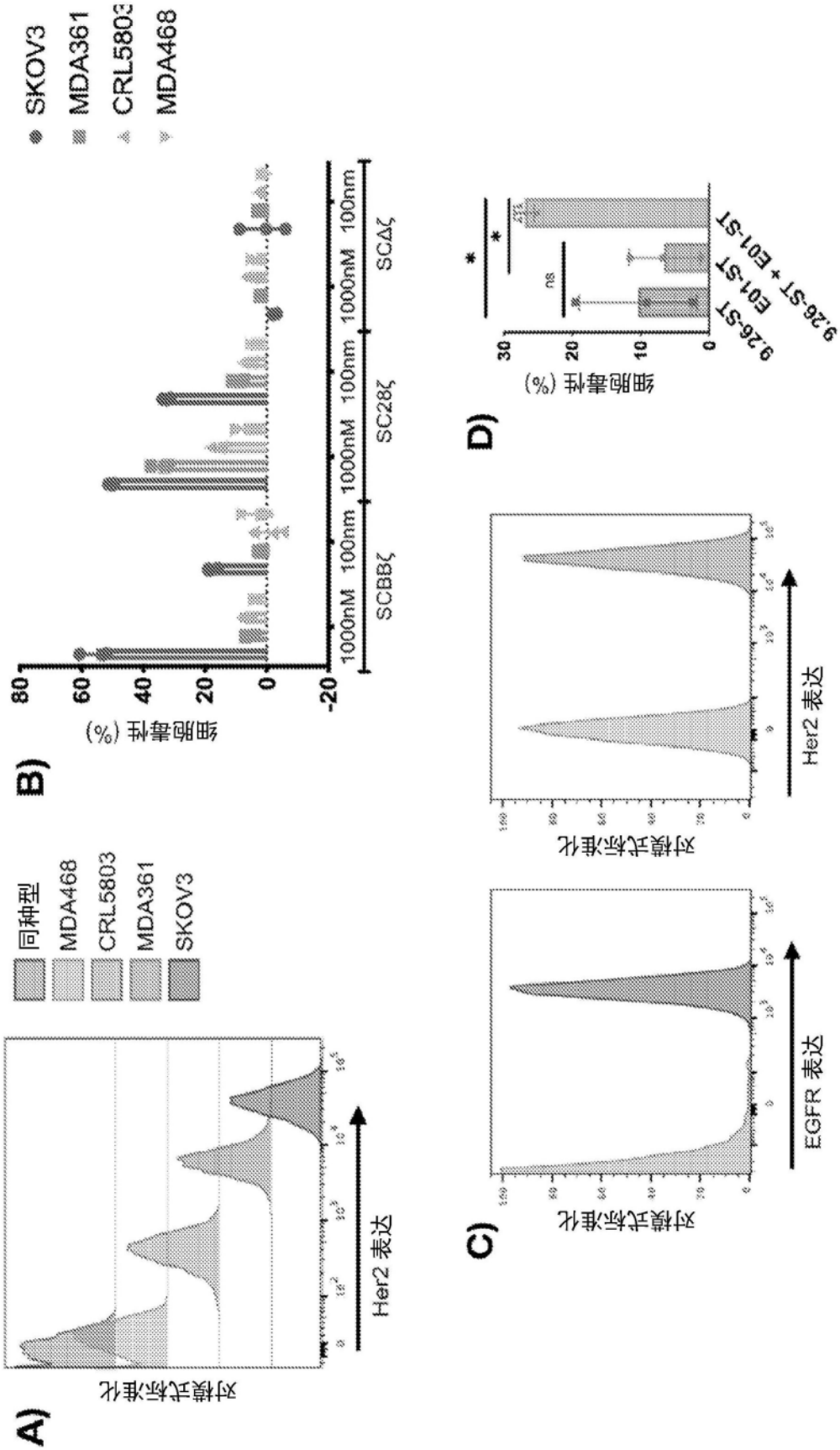

A)
对模式标准化
Her2 表达
同种型
MDA468
CRL5803
MDA361
SKOV3
B)
细胞毒性 (%)
80
60
40
20
0
-20
SKOV3
MDA361
CRL5803
MDA468
1000nM 100nM 1000nM 100nM 1000nM 100nM
SCBBζ
SC28ζ
SCΔζ
C)
对模式标准化
EGFR 表达
对模式标准化
Her2 表达
D)
细胞毒性 (%)
30
20
10
0
ns
*
*
9.26-ST
E01-ST
9.26-ST + E01-ST

图8

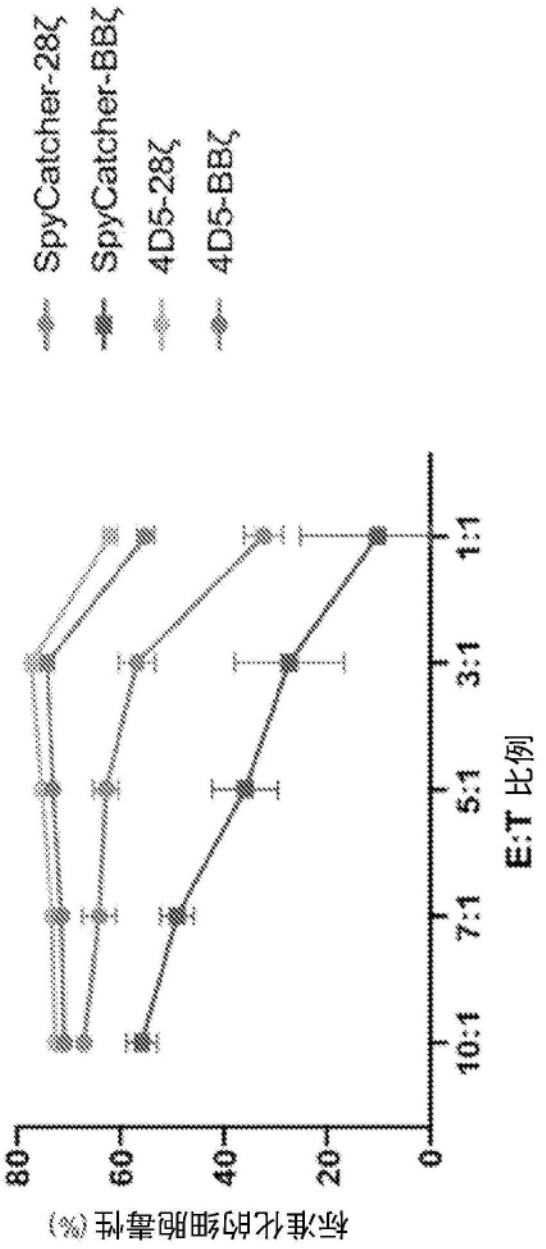

SpyCatcher-28ζ
SpyCatcher-BBζ
4D5-28ζ
4D5-BBζ
标准化的细胞毒性(%)
80
60
40
20
0
10:1
7:1
5:1
3:1
1:1
E:T 比例

图9

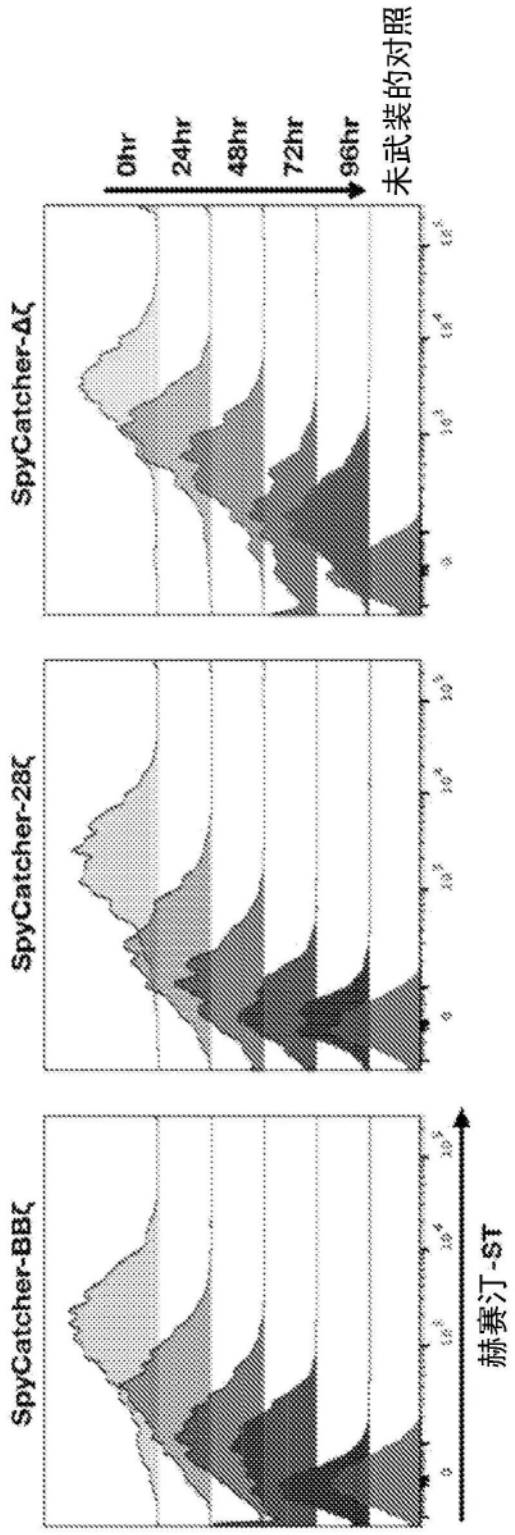

SpyCatcher-Δζ
SpyCatcher-28ζ
SpyCatcher-BBζ
0hr
24hr
48hr
72hr
96hr
未武装的对照
赫赛汀-ST

图10

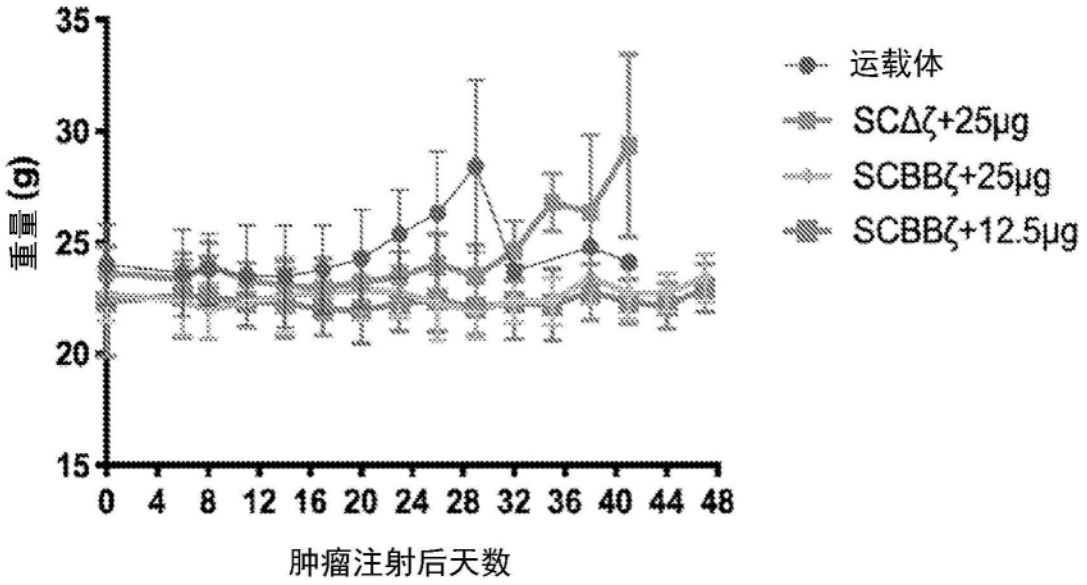

35
30
25
20
15
重量 (g)
0 4 8 12 16 20 24 28 32 36 40 44 48
肿瘤注射后天数
运载体
SCΔζ+25μg
SCBBζ+25μg
SCBBζ+12.5μg

图11

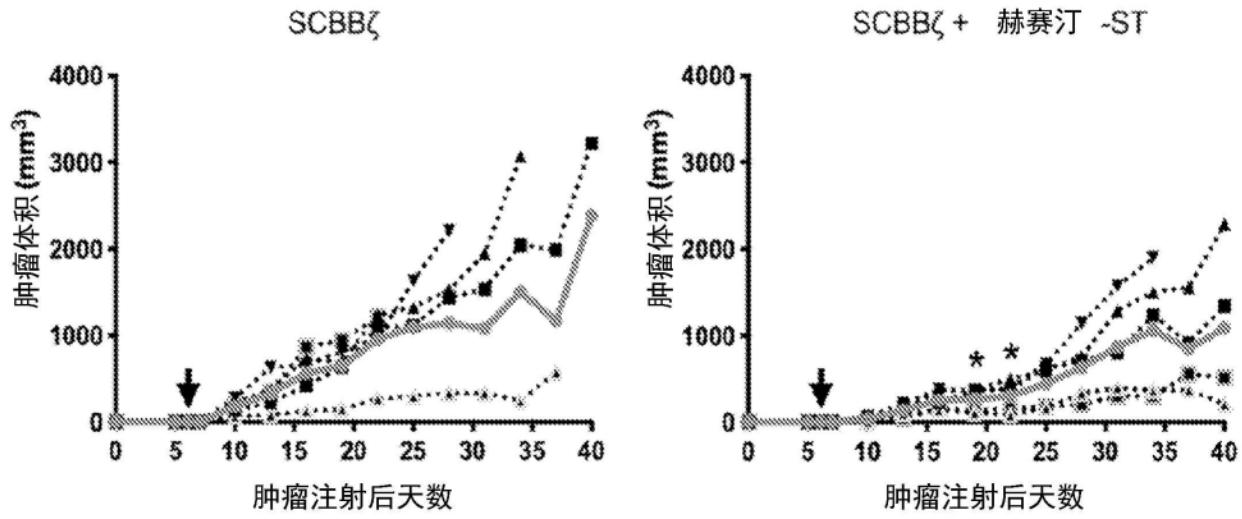

SCBBζ
SCBBζ + 赫赛汀 -ST
肿瘤体积 (mm3)
4000
3000
2000
1000
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40
肿瘤注射后天数
*
*

图12

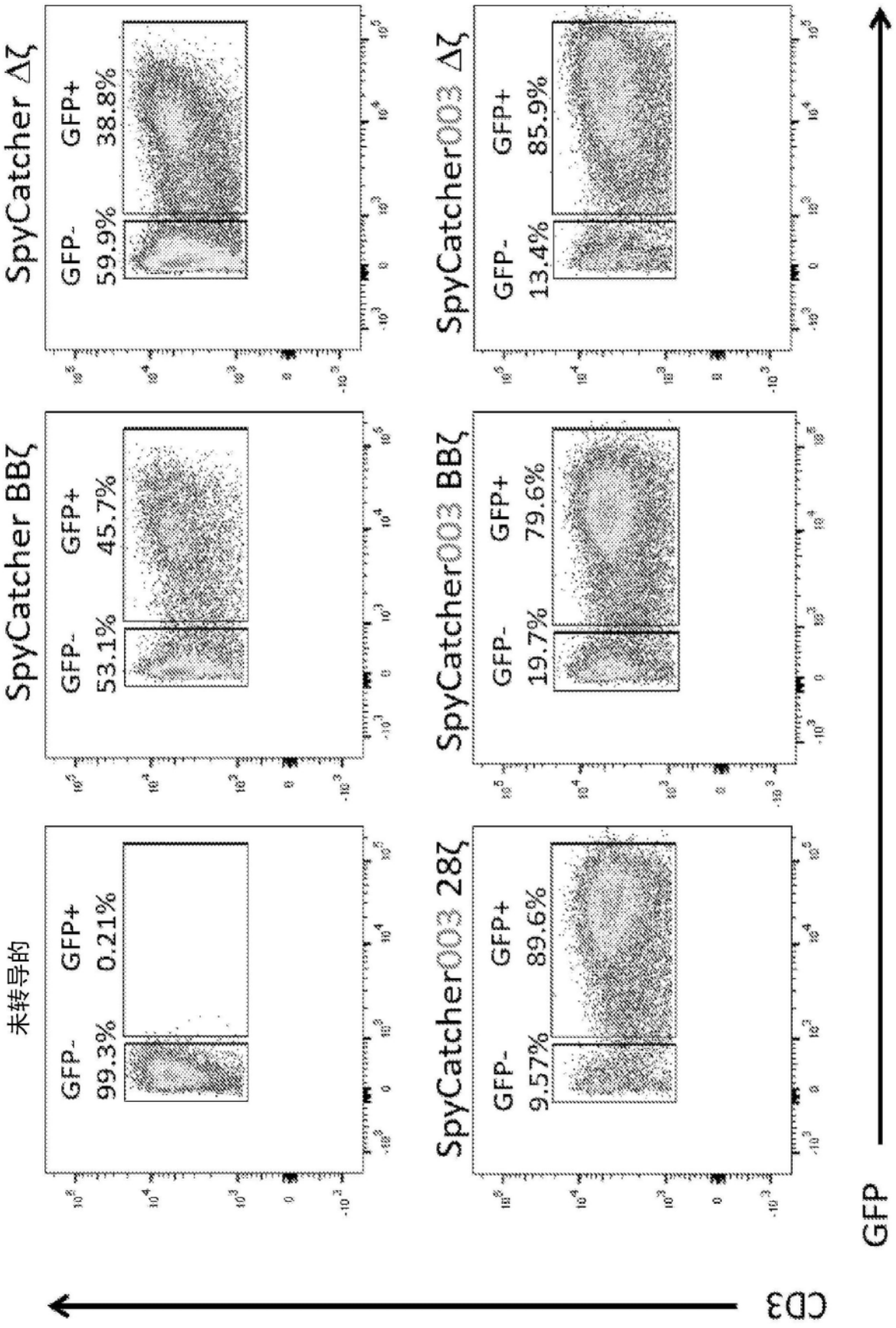

未转导的
GFP-
99.3%
GFP+
0.21%
SpyCatcher BBζ
GFP-
53.1%
GFP+
45.7%
SpyCatcher Δζ
GFP-
59.9%
GFP+
38.8%
SpyCatcher003 28ζ
GFP-
9.57%
GFP+
89.6%
SpyCatcher003 BBζ
GFP-
19.7%
GFP+
79.6%
SpyCatcher003 Δζ
GFP-
13.4%
GFP+
85.9%
CD3
GFP

图13

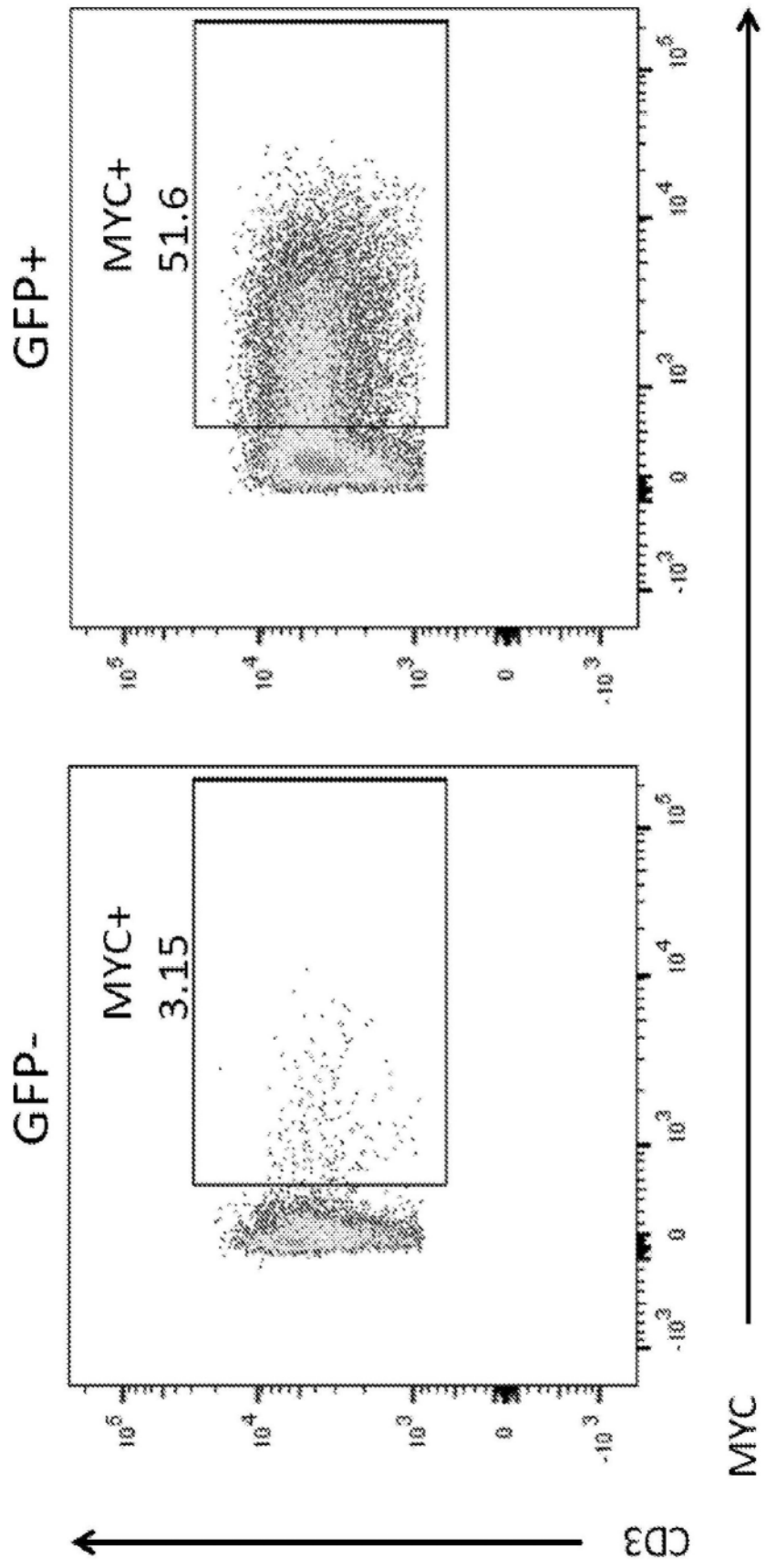


图14

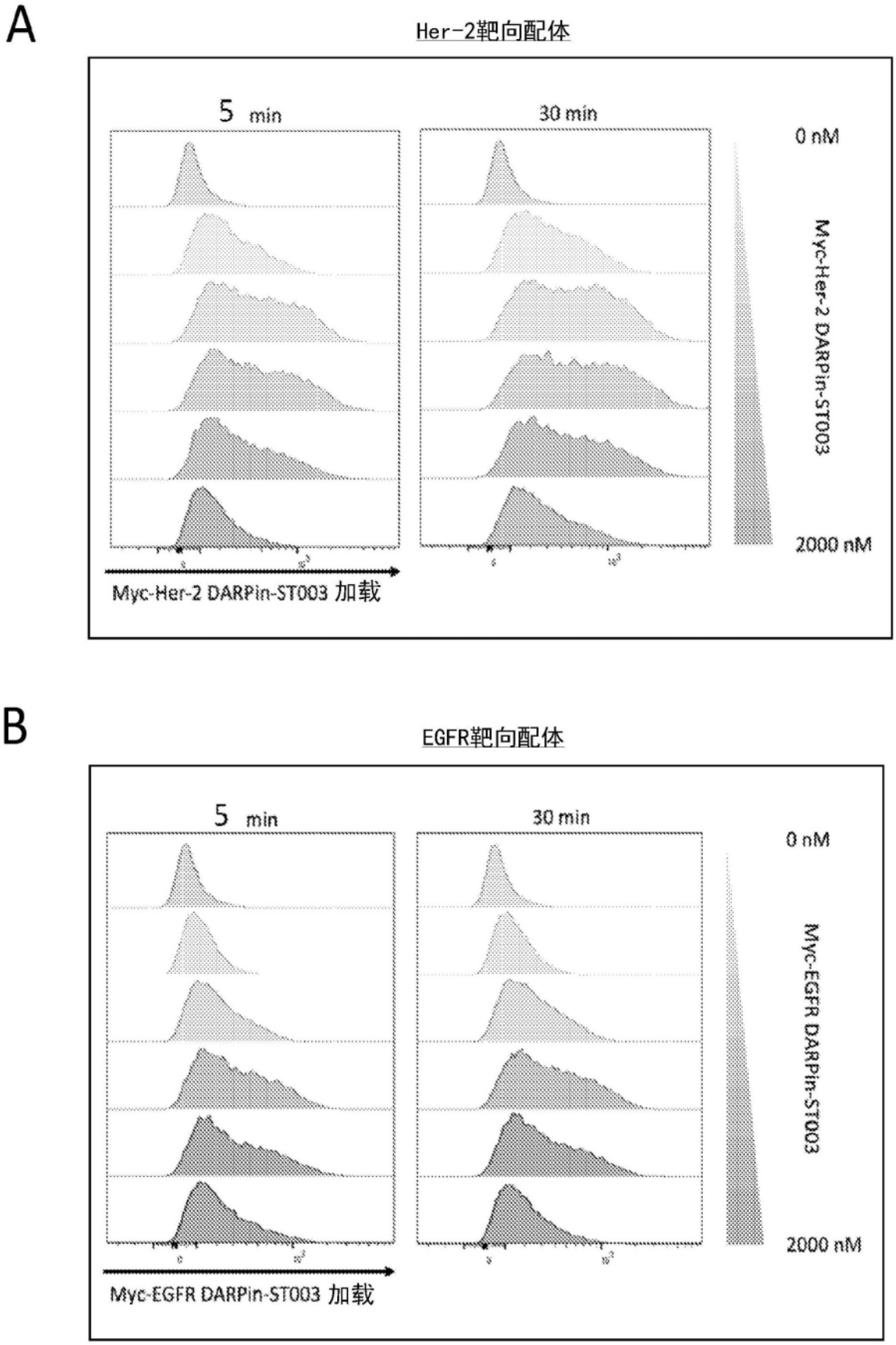

A
Her-2靶向配体
5 min
30 min
0 nM
Myc-Her-2 DARPin-ST003
2000 nM
Myc-Her-2 DARPin-ST003 加载
B
EGFR靶向配体
5 min
30 min
0 nM
Myc-EGFR DARPin-ST003
2000 nM
Myc-EGFR DARPin-ST003 加载

图15