



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113710695 A

(43) 申请公布日 2021. 11. 26

(21) 申请号 202080029850.8

(22) 申请日 2020.02.19

(30) 优先权数据

1902277.1 2019.02.19 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.10.19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2020/050401 2020.02.19

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/169974 EN 2020.08.27

(71) 申请人 伦敦国王学院

地址 英国伦敦

(72) 发明人 詹姆斯·诺布尔·阿诺德

约翰·马赫

帕拉斯凯瓦斯·科斯蒂

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 王玮玮 郑霞

(51) Int. Cl.

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 35/17 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01)

C12N 5/0783 (2006.01)

权利要求书4页 说明书49页

序列表11页 附图32页

(54) 发明名称

低氧反应性嵌合抗原受体

(57) 摘要

本发明涉及治疗剂,特别是涉及在低氧条件下具有选择性表达能力的治疗性多肽和核酸、掺入该核酸的细胞及它们在治疗中的用途,特别是需要在低氧条件(诸如通常在实体癌中发现的)下选择性表达的方法中的用途。所述核酸编码新的低氧反应性嵌合抗原受体(CAR)。本发明还涉及低氧反应性调节核酸。

1. 一种核酸分子,所述核酸分子编码包含一种或更多种氧依赖性降解结构域(ODD)和至少一种具有抗肿瘤特性的多肽的嵌合抗原受体(CAR),其中所述核酸分子的表达由低氧反应性调节核酸以低氧反应性方式调节。

2. 根据权利要求1所述的核酸分子,其中所述低氧反应性调节核酸包含多于一个低氧反应性元件(HRE)、基本上由多于一个低氧反应性元件(HRE)组成或由多于一个低氧反应性元件(HRE)组成,其中所述多于一个HRE中的每个单独的HRE独立地包含(i)至少一个HIF结合位点(HBS):5'-(A/G)CGT(G/C)-3'(SEQ ID NO:1);和任选地(ii)至少一个HIF辅助位点(HAS):5'-CA(C/G)(G/A)(T/C/G)-3'(SEQ ID NO:2);和(iii)进一步任选地至少一个HNF-4位点:5'-TGACCT-3'(SEQ ID NO:3)。

3. 根据权利要求2所述的核酸分子,其中所述HBS和HAS在存在时被接头分隔开,任选地其中所述接头的长度为至少6个核苷酸,诸如长度为6个或8个核苷酸。

4. 根据权利要求2或3所述的核酸分子,其中所述多于一个HRE包含表1中所示的序列(SEQ ID NO 5-17)或以下序列中的至少一种或多种:与SEQ ID NO 5-17中的任一种具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多序列同一性的序列,并且该序列包含如表1中所示或由SEQ ID NO 1和2表示的HBS和任选地HAS。

5. 根据权利要求2至4中任一项所述的核酸分子,其中所述多于一个是至少两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个、十六个、十七个、十八个、十九个、二十个或更多个单独的HRE,所述HRE能够连续定位和/或能够在空间上分隔开。

6. 根据权利要求2至5中任一项所述的核酸分子,其中所述多于一个是至少三个单独的HRE,所述至少三个单独的HRE任选地连续定位,或者其中所述多于一个是至少九个单独的HRE,所述至少九个单独的HRE任选地连续定位。

7. 根据权利要求2至6中任一项所述的核酸分子,其中所述低氧反应性调节核酸包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:SEQ ID No 18、19、20、21、22、23、24、25、26或27中的任一种或其功能片段或其同源物,其中所述功能片段和同源物包含多于一个HRE。

8. 根据权利要求2至7中任一项所述的核酸分子,其中所述低氧反应性调节核酸包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:SEQ ID NO 19或26或者与SEQ ID NO 19或26具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多序列同一性的同源物。

9. 根据权利要求2至8中任一项所述的核酸分子,其中所述低氧反应性调节核酸包含在逆转录病毒载体或慢病毒载体中,任选地包含在SFG逆转录病毒载体中。

10. 根据权利要求9所述的核酸分子,其中所述逆转录病毒载体或慢病毒载体的增强子区域是经修饰的以包括多于一个HRE,优选地九个HRE,所述多于一个HRE能够连续定位和/或能够在空间上分隔开。

11. 根据权利要求9或10所述的核酸分子,其中所述增强子区域被多于一个HRE替代,并且任选地其中所述逆转录病毒载体或慢病毒载体的启动子是未修饰的。

12. 根据权利要求2至11中任一项所述的核酸分子,其中所述HRE源自于以下氧反应性基因中的任一种或更多种或者来自其种间同源物或种内同源物:促红细胞生成素(EPO)、血管内皮生长因子(VEGF)、磷酸甘油酸激酶(PGK)、葡萄糖转运蛋白(例如Glut-1)、乳酸脱氢酶(LDH)、醛缩酶(ALD)、烯醇酶(例如ENO3)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、一氧化氮合成

酶(NOS)、血红素加氧酶、肌糖酵解酶丙酮酸激酶(PKM)、内皮素-1(ET-1),其中所述HRE源自于哺乳动物基因,任选地人类,和/或能够被人工合成。

13.根据任一前述权利要求所述的核酸分子,其中所述ODD由SEQ ID NO:28: $X^1X^2LEMLAPYIXMDDX^3X^4X^5$ 表示,其中“ X^{1-5} ”能够是任何氨基酸残基,任选地其中 X^1 是“L”或任何保守取代; X^2 是“D”或任何保守取代, X^3 是“F”或任何保守取代, X^4 是“Q”或任何保守取代, X^5 是“L”或任何保守取代。

14.根据任一前述权利要求所述的核酸分子,其中所述ODD由SEQ ID NO:29、30或31或者其同源物表示,所述同源物与SEQ ID NO:29、30或31具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多的序列同一性并且包含SEQ ID NO:28。

15.根据任一前述权利要求所述的核酸分子,其中所述ODD由SEQ ID NO:5或其变体表示,所述变体与SEQ ID NO:5具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多的序列同一性,其中所述功能片段或变体包含SEQ ID NO:4。

16.根据任一前述权利要求所述的核酸分子,其中所述具有抗肿瘤特性的多肽包含细胞外抗原特异性靶向区域。

17.根据任一前述权利要求所述的核酸分子,其中所述具有抗肿瘤特性的多肽包括一种或更多种用于递送至肿瘤的蛋白,包括但不限于:免疫刺激抗体;赋予细胞激活和肿瘤杀伤能力的表面或细胞内受体;T-细胞受体(TCR);免疫调节细胞因子(例如,IL-12、IL-15)、诱饵抗体(例如,PD轴相互作用抗体),和/或有益地改变宿主细胞功能的任何其他核酸(Lck、TCR ζ 链、ZAP70等)。

18.根据任一前述权利要求所述的核酸分子,其中所述具有抗肿瘤特性的多肽在常氧条件下被降解。

19.根据任一前述权利要求所述的核酸分子,其中低氧包括低于5%、优选地低于3%的 O_2 浓度,或相对于相应非癌器官、组织或细胞的 O_2 可得性或分压下降的 O_2 可得性,并且其中常氧包括高于5%的 O_2 浓度。

20.根据任一前述权利要求所述的核酸分子,其中所述CAR是包含至少一种氧依赖性降解结构域(ODD)或与至少一种氧依赖性降解结构域(ODD)相关的任何CAR,任选地如权利要求10至12中所定义的,并且其中所述CAR的表达在根据权利要求2至12中任一项的调节核酸序列的控制下。

21.根据任一前述权利要求所述的核酸分子,其中所述CAR选自第一代CAR、第二代CAR、第三代CAR、第四代CAR、分体CAR设计、装甲CAR。

22.根据任一前述权利要求所述的核酸分子,其中所述CAR对ErbB受体家族具有特异性。

23.一种免疫反应性细胞,所述免疫反应性细胞包含和/或表达根据任一前述权利要求所述的CAR,并且任选地包含至少一种另外的CAR和/或另外的嵌合多肽和/或多肽以促进以下中的任何一种或更多种:(i)肿瘤定位,诸如趋化因子受体;(ii)防止脱靶效应;(iii)促进离体扩增。

24.根据权利要求23所述的免疫反应性细胞,其中所述另外的嵌合多肽包含一种或更多种ODD,例如与至少一种ODD组合的白细胞介素(白细胞介素-ODD),其中所述白细胞介素任选地是IL12、IL18、IFN γ 。

25. 根据权利要求23或24所述的免疫反应性细胞,其中所述CAR在低氧条件下表达并且在常氧条件下基本上不表达,并且其中所述具有抗肿瘤特性的多肽在常氧条件下基本上被降解。

26. 用于制备免疫反应性细胞的方法,所述方法包括

- a. 从受试者中分离淋巴来源或髓系来源的细胞;
- b. 修饰所述细胞以引入如权利要求1至22中任一项所定义的核酸分子;
- c. 离体扩增所述经修饰的细胞;
- d. 获得能够在低氧条件下表达所述核酸分子的经扩增的细胞。

27. 能够根据权利要求26所述的方法获得的免疫反应性细胞。

28. 根据权利要求23至25中任一项所述的免疫反应性细胞,其为淋巴来源的细胞,诸如自然杀伤细胞、B细胞或T细胞,优选地T细胞;任选地,所述免疫反应性细胞是髓系来源的细胞,诸如巨噬细胞或中性粒细胞;任选地,所述免疫反应性细胞是干细胞,诸如iPSC。

29. 用于治疗血液癌症或实体癌的方法,所述方法包括向有相应需要的患者施用能够通过根据权利要求26的方法获得的经修饰的免疫反应性细胞,或包括向有相应需要的患者施用根据权利要求23至25、28和28中任一项的经修饰的免疫反应性细胞。

30. 根据权利要求29所述的方法,其中所述实体癌是头颈鳞状细胞癌(HNSCC)。

31. 根据权利要求30所述的方法,其中所述实体癌是早期癌症。

32. 根据权利要求29至31中任一项所述的方法,其中所述施用通过以下中的任一种进行:肿瘤内、静脉内、胸腔积液、腹膜内。

33. 一种药物组合物,所述药物组合物包含能够通过根据权利要求26所述的方法获得的免疫反应性细胞或根据权利要求23至25、27和28中任一项所述的免疫反应性细胞。

34. 一种试剂盒,所述试剂盒包含能够通过根据权利要求26所述的方法获得的免疫反应性细胞或根据权利要求23至25、27和28中任一项所述的免疫反应性细胞和/或根据权利要求33所述的药物组合物。

35. 能够通过根据权利要求26所述的方法获得的免疫反应性细胞或根据权利要求23至25、27和28中任一项所述的免疫反应性细胞和/或根据权利要求33所述的药物组合物在治疗癌症中的用途,特别是在治疗实体癌中的用途。

36. 根据权利要求2至23中任一项所述的低氧反应性调节核酸和/或根据权利要求1至22中任一项所述的核酸在阻止强直CAR信号传导中的用途。

37. 一种低氧反应性调节核酸,所述低氧反应性调节核酸包含至少九个单独的HRE,任选地其中所述HRE被包含在逆转录病毒载体或慢病毒载体中,任选地被包含在SFG逆转录病毒载体中。

38. 低氧反应性调节核酸,其中所述逆转录病毒载体或慢病毒载体的所述增强子区域是修饰的以包括所述至少九个HRE。

39. 根据权利要求37或38所述的低氧反应性调节核酸,其中所述逆转录病毒载体或慢病毒载体的所述增强子区域基本上被多于一个HRE代替,并且任选地其中所述逆转录病毒载体或慢病毒载体的所述启动子是未修饰的。

40. 根据权利要求37至39中任一项所述的低氧反应性调节核酸用于驱动编码嵌合抗原受体(CAR)的核酸分子的表达的用途,任选地,其中所述CAR任选地包含一种或更多种氧依

赖性降解结构域 (ODD) 或与一种或更多种氧依赖性降解结构域 (ODD) 缔合。

41. 一种用于确定受试者对根据权利要求29至32中任一项所述的治疗的适合性的方法,所述方法包括监测以下基因中的至少两个、三个、四个或全部五个的共表达:PGK1、SLC2A1、CA9、ALDOA和VEGFA,其中所述基因在所述受试者中的共表达指示所述受试者对治疗的适合性,和/或所述方法包括对来自受试者的肿瘤活组织检查进行免疫组织化学染色并评估肿瘤或间质中的HIF稳定化和/或评估T细胞(和/或其他免疫反应性细胞)向所述肿瘤的HIF稳定化区域的浸润,其中所述免疫反应性细胞向所述肿瘤的HIF稳定化区域的浸润指示受试者对治疗的适合性。

低氧反应性嵌合抗原受体

技术领域

[0001] 本发明涉及治疗剂,特别是能够低氧反应性表达的治疗性多肽和核酸,掺入其的细胞及它们在治疗性或预防性处理中的用途,特别是在需要在低氧条件(诸如通常在实体癌环境中发现的)下选择性表达治疗剂的方法中的用途。核酸可以编码新的低氧反应性嵌合抗原受体(CAR)。本发明还涉及低氧反应性调节核酸。

[0002] 背景

[0003] 工程化以表达嵌合抗原受体(CAR)或工程化的T细胞受体(TCR)的T细胞是重新引导免疫系统靶向并破坏人体内癌细胞的有效方式。特别地,CAR T-细胞(CAR-T)疗法作为有效且可行的用于血液癌症的治疗已显示出巨大前景。然而,实体癌微环境的复杂性对目前的CAR-T方法提出了挑战。一个主要障碍是缺乏肿瘤特异性靶抗原,该抗原的不存在可能导致正常组织内的脱靶CAR-T细胞激活,具有随之而来的副作用。抗原结合后,CAR启动稳健的T细胞激活,并且随后对靶细胞进行溶细胞性杀伤。然而,CAR介导的肿瘤细胞杀伤的选择性目前仅由CAR抗原的生物分布决定。在目前的方法中,由于CAR T细胞的击中靶但未击中肿瘤激活(on-target off-tumour activation)可以潜在地导致致死毒性,因此肿瘤选择性对于CAR-T疗法的成功至关重要。

[0004] 低氧是大多数实体肿瘤的特征,其中肿瘤细胞的增殖和高代谢需求与低效的肿瘤血管系统一起导致与健康器官/组织(5%-10% O_2)相比供氧不足的状态(<2% O_2)。临床上,低氧与不良预后以及对化学疗法和放射疗法的耐受性相关。细胞已经进化出精巧的生物学机制以通过组成性表达的转录因子低氧诱导因子 α (HIF1 α)来既检测低氧,又对低氧快速反应。在 O_2 充足的条件下,HIF1 α 通过其结构内的氧依赖性降解结构域(ODD)中两个脯氨酸的羟基化而被降解。羟基化的ODD随后被von Hippel-Lindau肿瘤抑制因子识别,该抑制因子形成E3泛素连接酶复合物的一部分,使HIF1 α 泛素化并且从而将它靶向到蛋白酶体降解。与之相比,在有限 O_2 浓度下,HIF1 α 变为稳定化并易位到核,在核里HIF1 α 与HIF1 β 和p300/CBP结合。该复合物然后可以与启动转录的若干低氧反应性基因的启动子区中的低氧反应性元件(HRE)缔合。

[0005] 利用低氧张力的各种癌症疗法正在开发中,其中包括低氧特异性基因疗法、低氧激活的前药、HIF1相互作用药物和专性厌氧细菌。由于低氧将肿瘤微环境与健康的常氧组织的微环境区分开来,因此低氧代表了用于诱导CAR T细胞表达的合意标志物。Juillerat等人,2017,(Scientific Reports 7,39833)研究了与ODD融合的CAR。尽管这种方法赋予了CAR T细胞提高的在体外低氧条件下杀伤肿瘤细胞的能力,但作者观察到在常氧条件下残留的肿瘤杀伤,表明了系统的不期望泄漏(leakiness)。

[0006] 期望开发,能够将表达严格限制于低氧区域,从而减少脱靶效应的治疗性核酸、多肽和工程化细胞,例如呈CAR和CAR T细胞的形式。这继而允许将治疗,特别是实体癌的治疗,扩展到更广泛的肿瘤抗原,特别是在正常组织以及在肿瘤上发现的那些抗原。

[0007] 还期望改进用于驱动和调节治疗剂在肿瘤部位表达的促成技术(enabling technology)。

[0008] 还期望能够在治疗前确定受试者对CAR T-细胞疗法的适合性。

[0009] 发明概述

[0010] 申请人设计了双重氧感知系统(dual oxygen-sensing system),所述双重氧感知系统包含编码包含一种或更多种氧依赖性降解结构域(ODD)和至少一种具有抗肿瘤特性的多肽的嵌合多肽的核酸分子,所述核酸分子可操作地连接到低氧反应性调节核酸,所述低氧反应性调节核酸包含多于一个低氧反应性元件(HRE),基本上由多于一个低氧反应性元件(HRE)组成,或由多于一个低氧反应性元件(HRE)组成。这允许核酸分子在低氧条件下表达,但在常氧条件下具有可忽略不计的表达。由于ODD的存在联合低氧反应性调节核酸的作用,双重氧感知系统进一步提供了具有抗肿瘤特性的至少一种多肽在常氧条件下的降解。例如,核酸分子和/或嵌合多肽可以包含在和/或表达于嵌合抗原受体(CAR)和/或免疫反应性细胞中。CAR与一种或更多种ODD连接并在低氧反应性调节核酸的控制下表达的联合应用在本文中被称为“hypoxiCAR”。仅允许在基本上低氧的条件下表达的低氧反应性调节核酸,与由一种或更多种ODD赋予的在常氧条件下引起具有抗肿瘤特性的多肽降解的能力一起的联合使用,允许减少或基本消除任何脱靶效应。

[0011] 申请人还开发了用于确定受试者对使用hypoxiCAR的治疗的适合性的方法。这可以通过监测任何两个、三个、四个或五个以下基因的共表达来完成:PGK1、SLC2A1、CA9、ALDOA和VEGFA,其中这样的共表达指示受试者对治疗的适合性。可选地或此外,可以对来自受试者的肿瘤活组织检查进行免疫组织化学染色,并评估肿瘤或基质中的HIF稳定化和/或评估T细胞或其他免疫反应性细胞向肿瘤的HIF稳定化区域的浸润,其中这样的HIF稳定化或免疫反应性细胞向肿瘤的HIF稳定化区域的浸润指示受试者对治疗的适合性。

[0012] 申请人还发现,相对于常规调节核酸,本发明的低氧反应性调节核酸能够更好地驱动和调节在实体瘤部位处的表达。

[0013] 详细描述

[0014] 低氧反应性调节核酸

[0015] 本发明的第一方面提供了一种低氧反应性调节核酸,所述低氧反应性调节核酸包含多于一个低氧反应性元件(HRE),基本上由多于一个低氧反应性元件(HRE)组成,或由多于一个低氧反应性元件(HRE)组成。低氧反应性调节核酸能够优先地在低氧条件下驱动和调节核酸分子的表达。

[0016] 低氧反应性调节核酸可以来源于或基于被修饰以将多于一个HRE引入其中的已知调节核酸。可选地,多于一个单独的HRE其本身可以具有调节功能,即启动转录和驱动与其可操作地连接的核酸分子表达的能力。在这样的情况下,多于一个单独的HRE构成低氧反应性调节核酸。

[0017] 本发明的低氧反应性调节核酸是低氧反应性的,意味着与其可操作地连接的核酸分子的表达优先在低氧条件下被诱导。这有利地允许表达仅在身体的低氧区域中被诱导,例如在实体瘤、低氧组织和低氧器官中被诱导(地理靶向(geographic targeting));或者仅在某些时间段期间被诱导,诸如在低氧、缺血的时间段期间被诱导(时间靶向);或者仅响应于某些环境条件被诱导,例如当条件是低氧时被诱导(环境靶向或触发靶向)。本文提到的“优先”表达是用于意指在低氧条件下驱动的表达优先于常氧条件。尽管调节核酸有时具有“泄漏的”表达,但本发明的低氧反应性调节核酸在体外和体内都没有显示出在常氧条件

或组织中激活的证据。

[0018] 此外,在低氧环境中,本发明的调节核酸未预期到地且有利地强于目前使用中的一些最强的慢病毒启动子和逆转录病毒启动子,诸如SFG启动子。因此,与在低氧环境中使用常规逆转录病毒启动子和慢病毒启动子时所观察到的表达水平相比,使用本发明的调节核酸时,肿瘤部位(即在低氧环境中)的表达水平可能增加。这使得本发明的调节核酸的使用在以下情况时特别有利:例如,当在瞬时或低水平低氧中靶向时,或者当需要在低氧微环境中特异性递送高载荷的治疗剂时,或者当靶向低密度抗原时,或者当使用弱治疗剂诸如弱CAR时。

[0019] 本发明的低氧反应性调节核酸的使用不需要限于其中期望肿瘤部位处的表达的应用。它们可用于其中期望低氧反应性表达的任何应用。

[0020] 本文定义的术语“调节核酸”是指能够驱动与其可操作地连接的核酸分子表达的核酸,“驱动表达”是指转录的启动。可操作地连接到调节核酸的核酸分子的表达也依赖于转录的调节,该调节决定诸如表达强度(如例如由每个细胞表达的转基因数量决定的)、核酸分子在何处表达(例如组织特异性表达)以及核酸分子何时表达(例如诱导型表达)的因素。因此,本文定义的“低氧反应性调节核酸”能够在低氧条件下优先驱动与其可操作地连接的核酸分子的表达。

[0021] 表达的调节可以经由转录控制元件来介导,转录控制元件通常嵌入在表达的核酸分子的5'-侧翼或上游的核酸序列中。该上游核酸区域通常被称为“启动子”,因为它促进转录起始复合物的结合、形成和/或激活,并且因此能够驱动和/或调节3'下游核酸分子的表达。

[0022] 本文使用的术语“启动子”是指能够影响(驱动和/或调节)与其可操作地连接的序列表达的调节核酸。“启动子”包括来源于典型基因组基因的转录调节核酸。通常,启动子包含TATA框,其能够将转录起始复合物引导至合适的转录起始的开始位点(transcription initiation start site)。然而,一些启动子没有TATA框(无TATA启动子),但仍然具有驱动和/或调节表达的全部功能。启动子可以另外包含CCAAT框序列和另外的调节元件(即上游激活序列或顺式元件,诸如增强子和沉默子)。术语(低氧反应性)“调节核酸”、“调节序列”和“启动子”在本文中可互换使用。调节核酸可以是“分离”的,即从其原始来源取出。

[0023] 本文提到的与启动子或调节核酸“可操作地连接”是指启动子/调节核酸和待表达的核酸分子的排列和相对定位使得启动子/调节核酸能够驱动核酸分子的表达。合适地,“核酸分子”可以是基因、转基因、编码或非编码序列、RNA分子(例如mRNA或用于沉默的RNA分子,诸如(shRNA、RNAi)、微RNA(miR)、催化RNA、反义RNA、RNA适体等)、表达载体、TCR、CAR(第一代、第二代、第三代、第四代或任何随后代的CAR),或任何其他感兴趣的核酸序列。

[0024] 低氧反应性调节核酸可以是被修饰以包括多于一个HRE或添加一个或更多个另外的HRE的已知调节序列。多于一个HRE可以位于已知启动子(该启动子可以包含另外的调节元件,诸如上游激活序列或顺式元件,诸如增强子和沉默子)内的任何位置,并且可以赋予低氧反应性或可以增强现有的低氧反应性水平。多于一个HRE可以是已知启动子序列内的插入和/或可以取代已知启动子的全部或者一个或多个部分。另外地或可选地,多于一个HRE可以是已知增强子内的插入和/或可以替代已知增强子的全部或者一个或多个部分。多于一个HRE可以在空间上分隔开,或者可以是连续的,或者是两者的组合。

[0025] 被修饰以包括多于一个HRE的启动子可以选自原核或真核启动子,诸如:SFG、hACTB、hEF-1 α 、CAG、CMV、HSV-TK、hACTB、hACTB-R、LTR、EF1 α 、SV40、PGK1、Ubc、人类 β 肌动蛋白、TRE、UAS、Ac5、多角体蛋白、CaMKII α 、GAL1, 10、TEF1、GDS、ADH1、CaMV35S、Ubi、H1、U6、T7、T7lac、Sp6、araBAD、trp、lac、Ptac、pL、NFAT相互作用启动子(诸如IL-2启动子),包括它们的功能片段和最小形式(minimal versions)。可被修饰以包括多于一个HRE的其他启动子包括下文表1中所列的来自Powel等人, (Discov Med. 2015, 19 (102), 49-57)的启动子,还包括表1中列出的启动子的功能片段和最小形式。

[0026] 本发明的低氧反应性调节核酸可以是“杂合启动子”,诸如嵌合启动子,其除了包括多于一个HRE之外,还可以包括来自另一个启动子的一个或多个部分,优选地功能部分。这样的部分的实例包括最小启动子、进一步增强活性和/或改变空间表达模式和/或时间表达模式的另外的调节元件。

[0027] 表1

[0028] 所选的普遍存在和细胞特异性启动子的比较。

[0029]

启动子	特异性	相对强度	尺寸(bps)	参考文献
CMV	普遍存在	+++	750-800	Xu <i>et al.</i> , 2001; Gray <i>et al.</i> , 2011
CBA (包括衍生物: CAG、CBh等)	普遍存在	+++	248-1,600	Klein <i>et al.</i> , 2002; Ohlfest <i>et al.</i> , 2005; Gray <i>et al.</i> , 2011
EF-1 α	普遍存在	++	2,500	Gill <i>et al.</i> , 2001; Xu <i>et al.</i> , 2001; Ikeda <i>et al.</i> , 2002; Gilham <i>et al.</i> , 2010
PGK	普遍存在	++	426	Gilham <i>et al.</i> , 2010
UBC	普遍存在	+	403	Gill <i>et al.</i> , 2001; Qin <i>et al.</i> , 2010
GUSB (hGBp)	普遍存在	+	378	Husain <i>et al.</i> , 2009
UCOE (HNRPA2B1-CBX3的启动子)	普遍存在	++	600-2,500	Antoniou <i>et al.</i> , 2013
hAAT	肝	++	347-1,500	Van Linthout <i>et al.</i> , 2002; Cunningham <i>et al.</i> , 2008
TBG	肝	++	400	Yan <i>et al.</i> , 2012
结蛋白	骨骼肌	+++	1,700	Talbot <i>et al.</i> , 2010
MCK	骨骼肌	++	595-1,089	Wang <i>et al.</i> , 2008; Talbot <i>et al.</i> , 2010; Katwal <i>et al.</i> , 2013
C5-12	骨骼、心和脑	++	312	Wang <i>et al.</i> , 2008
NSE	神经元	+++	300-2,200	Xu <i>et al.</i> , 2001
突触蛋白	神经元	+	470	Kügler <i>et al.</i> , 2003; Hioki <i>et al.</i> , 2007; Kuroda <i>et al.</i> , 2008
PDGF	神经元	+++	1,400	Patterna <i>et al.</i> , 2000; Hioki <i>et al.</i> , 2007
MecP2	神经元	+	229	Rastegar <i>et al.</i> , 2009; Gray <i>et al.</i> , 2011
CaMKII	神经元	++	364-2,300	Hioki <i>et al.</i> , 2007; Kuroda <i>et al.</i> , 2008
mGluR2	神经元	+	1,400	Brené <i>et al.</i> , 2000; Kuroda <i>et al.</i> , 2008
NFL	神经元	+	650	Xu <i>et al.</i> , 2001
NFH	神经元	+	920	Xu <i>et al.</i> , 2001
n β 2	神经元	+	650	Xu <i>et al.</i> , 2001
PPE	神经元	+	2,700	Xu <i>et al.</i> , 2001
Enk	神经元	+	412	Xu <i>et al.</i> , 2001
EAAT2	神经元和星形胶质细胞	++	966	Su <i>et al.</i> , 2003; Kuroda <i>et al.</i> , 2008
GFAP	星形胶质细胞	++	681-2,200	Brenner <i>et al.</i> , 1994; Xu <i>et al.</i> , 2001; Lee <i>et al.</i> , 2008; Dirren <i>et al.</i> , 2014
MBP	少突胶质细胞	++	1,900	Chen <i>et al.</i> , 1998

[0030] 注:关于通常使用的启动子的细胞类型特异性、相对强度(+为最弱,并且+++为最

强)、尺寸以及相关参考文献。

[0031] (多于一个HRE中的) 每一单个HRE元件独立地包含以下,基本上由以下组成,或由以下组成:呈任何顺序的至少一个HIF结合位点(HBS)和任选地至少一个HIF辅助位点(HAS),任选地其中所述HBS和HAS被接头分隔开。合适地,HRE还可以包括HNF-4位点。

[0032] 尽管包括HBS和HAS二者的HRE是优选的,但HAS的存在是任选的。因此,本文对HRE的任何提及也包括其中HRE没有HAS元件的选项。

[0033] HIF结合位点(HBS):5' - (A/G) CGT (G/C) -3' (SEQ ID NO:1)。HBS可以任选地是ACGTG。

[0034] HIF辅助位点(HAS):5' -CA (C/G) (G/A) (T/C/G) -3' (SEQ ID NO:2)。HAS可以任选地是CACAG。

[0035] HNF-4位点:5' -TGACCT-3' (SEQ ID NO:3)。

[0036] HBS和HAS(如果存在的话)可以由可以是刚性或柔性的接头分隔开。合适地,接头的长度为至少6个核苷酸,任选地长度为多于8个核苷酸。优选地,接头的长度为6个或8个核苷酸。

[0037] 接头可以对应于在氧反应性基因的启动子区域中天然地发现的接头。合适的接头的实例在SEQ ID NO:4(5' -GTCTCA-3')中给出。其他合适的接头是本领域熟知的,并且本领域技术人员熟悉接头设计的原理。

[0038] 下文表2示出了代表性但非限制性的HRE的实例。HRE从其来源的基因来源在左栏中示出。HBS和HAS(在存在时)以粗体和下划线示出。

[0039]

基因来源	推定的HRE, 其中突出显示了HBS和HAS	SEQ ID NO
hEPO	GGGCCCT <u>ACGTG</u> CTGTCTCA <u>CACAGC</u>	SEQ ID NO: 5
mEPO	GGGCCCT <u>ACGTG</u> CTGCCTCGCATGGC	SEQ ID NO: 6
hPGK	TGTC <u>ACGTC</u> CCTGCACGACGCGAGTA	SEQ ID NO: 7
mPGK	CGCGTCGTGCAGG <u>ACGTG</u> ACAAAT	SEQ ID NO: 8
mLDH	CCAGCGG <u>ACGTG</u> CGGGAACCC <u>ACGTG</u> TAGG	SEQ ID NO: 9

基因来源	推定的HRE, 其中突出显示了HBS和HAS	SEQ ID NO
葡萄糖trpt	TCCACAG GCGTG CCGTCTGA CACGCA	SEQ ID NO: 10
hVEGF	CCACAGTGCAT ACGTG GGCTCCA ACAGGT CCTCTT	SEQ ID NO: 11
mVEFG	TACGTGGG (保守的, 人类、小鼠、大鼠)	SEQ ID NO: 12
[0040] rVEGF	ACAGTGCAT ACGTG GGCTT CACA	SEQ ID NO: 13
hNOS	ACT ACGTG CTGCCTAGG	SEQ ID NO: 14
h醛缩酶	CCCCTCGG ACGTG ACTCGGACC CACAT	SEQ ID NO: 15
h烯醇酶	ACGCTGAGT GCGTG CGGGACTCGGAGT ACGTG ACGGA	SEQ ID NO: 16
m血红素加氧酶	CGGACGCTG GCGTG GC ACGTC CTCTC	SEQ ID NO: 17

[0041] 除了上文表2中所示的包含HRE的基因,其他基因来源包括:醛缩酶A、醛缩酶C、HIF-1 β 、HIF-2 β 、CTLA-4、PHD2、PHD3、烯醇酶1、烯醇酶2、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、葡萄糖磷酸异构酶1、HIF-3 α 、IL-10、干扰素- γ 、淋巴细胞激活基因3、线粒体编码的12S rRNA、6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酶3、磷酸果糖激酶、磷酸甘油酸激酶1、磷酸葡糖变位酶2、丙酮酸激酶、穿孔素1、glut1、glut3、磷酸丙糖异构酶1、血管内皮生长因子A、von Hippel-Lindau肿瘤抑制因子。Gropper等人,2017 (Cell Reports 20,2547-2555)显示,上述基因在暴露于低氧后在T细胞中被上调。因此,低氧反应性调节核酸中包括的HRE可以来源于上述基因中的任一种或表2中列出的基因中的任一种。可选地,低氧反应性调节核酸中包括的HRE可以人工合成。

[0042] 低氧反应性调节核酸可以包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:表2中所示的至少一种或多于一种序列(SEQ ID NO 5-17),或与SEQ ID NO7-19中的任一种具有至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的序列,并且该序列包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:至少如表1中所示或如本文所定义的HBS(以及任选地还有HAS)。

[0043] 低氧反应性调节核酸包含多于一个HRE,基本上由多于一个HRE组成,或由多于一个HRE组成,其中每个单独的HRE元件包含任何顺序的以下的任何组合、基本上由任何顺序的以下的任何组合组成或由任何顺序的以下的任何组合组成:

[0044] (i) 至少一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个或更多个HIF结合位点(HBS),例如由SEQ ID NO:1表示的HIF结

合位点 (HBS), 和任选地

[0045] (ii) 至少一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个或更多个HIF辅助位点 (HAS), 例如由SEQ ID NO:2表示的HIF辅助位点 (HAS), 和任选地

[0046] (iii) 至少一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个或更多个HNF-4位点, 例如由SEQ ID NO:3表示的HNF-4位点。

[0047] 低氧反应性调节核酸可以包含以下, 基本上由以下组成, 或由以下组成: SEQ ID NO:1的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个、十六个、十七个、十八个、十九个、二十个或更多个拷贝, 任选地与SEQ ID NO:2的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个、十六个、十七个、十八个、十九个、二十个或更多个拷贝一起, 并且还任选地SEQ ID NO:3的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个、十六个、十七个、十八个、十九个、二十个或更多个拷贝。

[0048] 本文定义的“多于一个”HRE用于意指单个HRE元件的至少两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个、十六个、十七个、十八个、十九个、二十个或更多个拷贝, 单个HRE元件为如本文所定义的。组成多于一个HRE的单个(单独的)HRE元件可以是空间上分隔开的(例如, 由诸如增强子、接头、间插序列的元件分隔开), 或者可以是连续的, 或者两者的组合。有利地, 低氧反应性的强度可以根据需要进行定制, 其中HRE数目的增加与低氧反应性的增加相关。

[0049] 根据一种实施方案, 低氧反应性调节核酸或多于一个HRE包含以下, 基本上由以下组成, 或由以下组成: 三个连续的“HBS-接头-HAS”序列, 即HBS-接头-HAS-接头-HBS-接头-HAS-接头-HBS-接头-HAS。接头为如本文所定义的或为任何合适的接头。在可选的实施方案中, 接头不存在, 或者其中不是每个HBS-HAS都被接头分隔开。在可选的实施方案中, HAS元件不存在。

[0050] 根据一种实施方案, 低氧反应性调节核酸或多于一个HRE包含以下, 基本上由以下组成, 或由以下组成: 六个连续的“HBS-接头-HAS”序列, 即HBS-接头-HAS-接头-HBS-接头-HAS-接头-HBS-接头-HAS-接头-HBS-接头-HAS-接头-HBS-接头-HAS-接头-HBS-接头-HAS。接头为如本文所定义的或为任何合适的接头。在可选的实施方案中, 接头不存在, 或者其中不是每个HBS-HAS都被接头分隔开。在可选的实施方案中, HAS元件不存在。

[0051] 根据一种实施方案, 低氧反应性调节核酸或多于一个HRE包含以下, 基本上由以下组成, 或由以下组成: 九个连续的“HBS-接头-HAS”序列, 即HBS-接头-HAS-接头-HBS-接头-HAS-接头-HBS-接头-HAS-接头-HBS-接头-HAS-接头-HBS-接头-HAS-接头-HBS-接头-HAS-接头-HBS-接头-HAS-接头-HBS-接头-HAS。接头为如本文所定义的或为任何合适的接头。在可选的实施方案中, 接头不存在, 或者其中不是每个HBS-HAS都被接头分隔开。在可选的实施方案中, HAS元件不存在。

[0052] 组成每个单独的HRE元件的部分, 即HBS, 以及任选地HAS和进一步任选地HNF-4, 可以是呈任何顺序。部分可以连续定位和/或空间上分隔开, 诸如通过使用合适的接头、间插序列等。连续定位在本文中也称为“串联的”或“堆叠的(stacked)”。

[0053] HRE或组成HRE的部分(即HBS,以及任选地HAS和进一步任选地HNF-4)可以合适地源自于任何氧反应性基因,优选地源自哺乳动物基因来源,诸如人类基因来源,或者它们可以人工合成。这样的氧反应性基因的实例包括,尤其,表2中列出的基因;上文列出的如Gropper等人,2017(Cell Reports 20,2547-2555)所显示的在暴露于低氧后在T细胞中被上调的基因;促红细胞生成素(EPO)、血管内皮生长因子(VEGF)、磷酸甘油酸激酶(PGK)、葡萄糖转运蛋白(例如Glut-1)、乳酸脱氢酶(LDH)、醛缩酶(ALD)、烯醇酶(例如EN03)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、一氧化氮合成酶(NOS)、血红素加氧酶、肌糖酵解酶丙酮酸激酶(PKM)、内皮素-1(ET-1),包括上述任何一种的种间同源物或种内同源物。“种间同源物”和“种内同源物”是同源性的两种形式,包含用于描述基因的祖先关系的进化概念。术语“种内同源物”涉及物种基因组内导致种内同源基因的基因重复。术语“种间同源物”涉及由于物种形成而导致的不同生物体中的同源基因。本领域技术人员可以使用(交互的)blast搜索来容易地鉴定种间同源物和种内同源物。

[0054] 多于一个HRE可以置于表达载体、逆转录病毒载体或慢病毒载体(例如pELNS等)或任何合适地用于表达CAR的载体内的任何位置。任选地,多于一个HRE置于逆转录病毒表达载体中,例如,启动子的任何位置或逆转录病毒启动子的长末端重复序列(LTR)中的任何位置。例如,多于一个HRE可以置于LTR中的任何位置,和/或可以与开放阅读框(ORF)并置。例如,多于一个HRE可以用HRE取代基本上全部或部分的LTR、增强子和/或启动子。任选地,LRT的3'末端被修饰以包含多于一个HRE。任选地,SFG逆转录病毒载体的3'LTR被修饰,以用多于一个HRE替换基本上全部天然增强子,任选地同时保留天然启动子或其一部分。

[0055] 下文SEQ ID NO:18示出了SFG逆转录病毒载体中未修饰的3'LTR。

[0056] SEQ ID NO:18

```
CTGAATATGGGCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAG
ATGGAACAGCTGAATATGGGCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGC
CAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCC
AGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGC
TTCTGTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAACCCCTCACTCGGGGCGCCA
GTCCTCCGATTGACTGAGTCGCCCCGGGTACCCGTGTATCCAATAAACCCCTCTTGCAGTTGCATCCGA
CTTGTGGTCTCGCTGTTCCCTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTT
TCA
```

[0057] 下文示出了被修饰以包含9个HRE的SFG逆转录病毒载体的MLV增强子区域。下文SEQ ID NO:19示出了HRE修饰的3'LTR的序列。下划线部分示出了九个连续放置的HRE,其中单个HRE元件用粗体下划线表示。

[0059] SEQ ID NO:19

ctagcGGCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTGTCTGACGGCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCT
GTCTGACGGCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTGTCTGACGGCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCC
TGTCTGACGGCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTGTCTGACGGCCCTACGTGCTGTCTCACACAGC
CTGTCTGACGGCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTGTCTGACGGCCCTACGTGCTGTCTCACACAG
 [0060] CCTGTCTGACGGCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTGTCTGACTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCC
AGGGTGCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGC
TTCTGTTTCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCAACCCCTCACTCGGGGCGCCA
GTCCTCCGATTGACTGAGTCGCCCGGGTACCCGTGTATCCAATAAACCCCTTTGCAGTTGCATCCGA
CTTGTGGTCTCGCTTTCCTTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGTCTT
 TCA

[0061] SEQ ID NO 20至25注释了SEQ ID NO 18和19的组成部分。对于本领域技术人员将明显的是,并非所有的组成部分对于功能都是必要的。此外,由SEQ ID NO 20至25表示的一个或更多个组成部分可用于产生本文定义的杂合启动子。

[0062] MLV启动子:SEQ ID NO:20

GAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAAC

[0063] AATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCAAC
 CCCTCACTCGG

[0064] CCAAT框:SEQ ID NO:21

CTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAAC

[0065] TAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCAAC

[0066] TATA框:SEQ ID NO:22

[0067] TGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCAACCCCTCACTCGGGGCGCCAGTCCCTCCGAT

[0068] 多A位点:SEQ ID NO:23

[0069] TGACTGAGTCGCCCGGGTACCCGTGTATCCAATAAACCCCTCTTGCAGTTGCA

[0070] 强终止cDNA的RNA模板:SEQ ID NO:24

GCGCCAGTCCCTCCGATTGACTGAGTCGCCCGGGTACCCGTGTATCCAATAAACCCCTCTTGCAGTTGC

[0071] ATCCGACTTGTGGTCTCGCTGTTTCCTTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGG
 GGTCTTTCA

[0072] 11碱基反向重复序列:SEQ ID NO:25

[0073] GGGGTCTTTCA

[0074] 可选地,多于一个HRE本身可以具有足够的调节功能/启动子活性,即启动转录以及驱动和调节与其可操作地连接的核酸分子表达的能力,在这种情况下,多于一个HRE单独构成低氧反应性调节核酸。多于一个HRE的每个单独的HRE元件可以是空间上分隔开的(例如,由诸如增强子、接头、间插序列的元件分隔开),或者可以是连续的,或者是两者的组合。

[0075] 下文SEQ ID NO:26示出了其中多于一个HRE本身构成低氧反应性调节核酸的实例。示出了HRE的9个连续拷贝,其中单个HRE元件被加下划线。

[0076] SEQ ID NO:26

GGCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTGTCTGACGGCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTGTCTGA

[0077] CGGCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTGTCTGACGGCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTGTCTG
ACGGCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTGTCTGACGGCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTGTCT

GACGGCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTGTCTGACGGCCCTACGTGCTGTCT

[0078] 下文SEQ ID NO:27示出了单个HRE元件的实例,其中HBS和HAS以粗体示出。低氧反应性调节核酸可以包含以下,基本上由以下组成,或由以下组成:SEQ ID NO:27或其包含至少HBS和任选地HAS元件的部分的多于一个拷贝,例如,SEQ ID NO:27或其部分的至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个或更多个拷贝。每个单独的HRE拷贝可以是空间上分隔开的(例如,由诸如增强子、接头、间插序列的元件分隔开),或者可以是连续的(本文中也称为“串联的”或“堆叠的”),或者两者的组合。

[0079] SEQ ID NO:27

[0080] **GGCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTGTCTGAC**

[0081] 本发明还提供了本发明的调节核酸的功能片段,如本文所定义的“功能片段”包含多于一个HRE,基本上由多于一个HRE组成,或由多于一个HRE组成,并且保留驱动和调节与其可操作地连接的核酸分子表达的能力。功能片段保留了以与其所源自或片段所基于的未修饰序列相同的方式(尽管可能程度不同)驱动和/或调节表达的能力。可以使用本领域技术人员熟知的标准技术测试合适的功能片段驱动和/或调节表达的能力。功能片段包括其所源自的序列的至少20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300、305、310、315、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370、375、380、385、390、395、400、405、410、415、420、425、430、435、440、445、450、455、460、465、470、475、480、485、490、495、500个或更多个连续核苷酸。在特定实施方案中,功能片段是SEQ ID NO:18、19、20、21、22、23、24、25、26或27的功能片段,并且该功能片段包含如本文定义的多于一个HRE或由如本文定义的多于一个HRE组成。

[0082] 根据另一种实施方案,低氧反应性调节核酸由以下表示,或包含以下,基本上由以下组成,或由以下组成:SEQ ID NO:18、19、20、21、22、23、24、25、26或27或其功能片段或其互补序列。

[0083] 低氧反应性调节核酸还可以包含以下,基本上由以下组成,或由以下组成:能够在严格杂交条件下与SEQ ID NO:18、19、20、21、22、23、24、25、26或27或本文所定义的功能片段杂交的序列,该杂交序列包含多于一个HRE,基本上由多于一个HRE组成,或由多于一个HRE组成,并保留驱动和调节与其可操作地连接的核酸分子表达的能力。严格条件下的杂交是指核酸分子在所定义的温度和盐浓度条件下与靶核酸分子杂交的能力。通常,严格的杂交条件不多于天然双链体的解链温度(T_m)之下25°C至30°C(例如,20°C、15°C、10°C或5°C)。计算 T_m 的方法是本领域熟知的。作为非限制性实例,用于实现严格杂交的代表性盐和温度条件是:1×SSC,0.5%SDS,在65°C。缩写SSC是指核酸杂交溶液中使用的缓冲液。1升20×(20倍浓缩液)储备SSC缓冲溶液(pH 7.0)包含175.3g氯化钠和88.2g柠檬酸钠。用于实现杂交的代表性时间段是12小时。

[0084] 低氧反应性调节核酸可以包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:18、19、20、21、22、23、24、25、26或27具有至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的同源物或其功能片段,该同源物包含多于一个HRE,基本上由多于一个HRE组成,或由多于一个HRE组成。同一性百分比可以使用比对程序

来计算。优选地,可以使用实施Needleman-Wunsch算法(J.Mol.Biol.48:443-453,1970)的成对序列全局比对程序。该算法使匹配数最大化,并且使空位数最小化。这样的程序是,例如,GAP、Needle (EMBOSS包)、stretcher (EMBOSS包)或Align X (Vector NTI套装5.5),并且可以使用标准参数(例如空位开放罚分15和空位扩展罚分6.66)。可选地,可以使用实施Smith-Waterman算法(Advances in Applied Mathematics 2,482-489 (1981))的局部比对程序。这样的程序是,例如,Water (EMBOSS包)或matcher (EMBOSS包)。

[0085] 本发明的低氧反应性调节核酸的其他变体或SEQ ID NO:18、19、20、21、22、23、24、25、26或27的变体包括突变变体、取代变体、插入变体、衍生物、包括间插序列的变体、剪接变体和等位变体(allelic variants),变体包含多于一个HRE或由多于一个HRE组成。

[0086] 核酸的“突变变体”可以使用重组DNA操纵技术或核苷酸合成容易地制造。这样的技术的实例包括经由M13诱变的定点诱变、T7-Gen体外诱变(USB,Cleveland,Ohio)、QuickChange定点诱变(Stratagene,San Diego,Calif.)、PCR介导的定点诱变或其他定点诱变方案。可选地,本发明的核酸可以被随机突变。

[0087] “取代变体”是指其中核酸序列中的至少一个残基已经被去除并且不同的残基插入其位置的那些变体。核酸取代通常是单个残基的,但是可以根据置于核酸序列上的功能限制而簇集;插入通常为约1个至约10个核酸残基的量级,并且缺失的范围可以是约1个至约20个残基。

[0088] 核酸的“插入变体”是其中一个或多个核酸残基被引入该核酸中的预定位点的变体。插入可以包括5'-末端融合和/或3'-末端融合以及单个或多个核苷酸的序列内插入。通常,核酸序列内的插入会小于5'-或3'-末端融合,在约1个至10个残基数量级。5'-或3'-末端融合的实例包括如在酵母双杂交系统或酵母单杂交系统中使用的转录激活因子的结合结构域或激活结构域的编码序列,或噬菌体外壳蛋白、(组氨酸)6-标签、谷胱甘肽S-转移酶-标签、蛋白A、麦芽糖结合蛋白、二氢叶酸还原酶、标签·100表位、c-myc表位、FLAG®-表位、lacZ、CMP(钙调蛋白结合肽)、HA表位、蛋白C表位和VSV表位的编码序列。

[0089] 与天然核酸相比,术语核酸的“衍生物”可以包括天然和非天然存在的核酸残基的取代和/或缺失和/或添加。衍生物可以包括,例如,甲基化核苷酸或人工核苷酸。

[0090] 调节序列可能被间插序列中断。“间插序列”意指破坏另一序列的任何核酸或核苷酸。间插序列的实例包括内含子、核酸标签、T-DNA和可移动的核酸序列,诸如转座子或可通过重组而移动的核酸。特定转座子的实例包括Ac(激活因子)、Ds(解离因子(Dissociation))、Spm(抑制因子-诱变因子(suppressor-Mutator))或En。在间插序列是内含子的情况,可能会产生可变剪接变体。本文使用的术语“可变剪接变体”包括其中间插内含子已经被切下、替换或添加的核酸序列变体。这样的剪接变体可以在自然界中发现,或者可能是人造的。

[0091] 本发明的低氧反应性调节核酸能够在低氧条件下驱动表达,如本文所定义的低氧条件用于意指低于5%(诸如低于4%、3%、2%、1%、0.5%、0.25%或0.1%或mmHg当量)的O₂浓度或相对于相应的非癌器官、组织或细胞的O₂可得性(O₂ availability)或分压降低的O₂可得性。与之相比,本文所定义的“常氧”用于意指高于5%的O₂浓度或与健康器官相关的O₂可得性。本领域技术人员将能够容易地确定任何给定的环境是低氧的还是常氧的。根据设想的启动子用途,技术人员能够使用不同数目的HRE拷贝来调节低氧反应性的程度,其中

HRE拷贝的增加与低氧反应性的增加相关。

[0092] 低氧反应性调节核酸能够驱动核酸分子的表达,该核酸分子可以合适地是基因、转基因、编码或非编码序列、RNA分子(例如mRNA或用于沉默的RNA分子,诸如(shRNA、RNAi)、微RNA(miR)、催化RNA、反义RNA、RNA适体等)、表达载体和工程化受体,诸如CAR(第一代、第二代、第三代、第四代或任何随后代的CAR)或TCR,或任何其他感兴趣的序列。

[0093] 工程化受体

[0094] 在一方面,低氧反应性调节核酸驱动工程化受体的表达,所述工程化受体在免疫反应性细胞中表达时赋予细胞预定的抗原特异性,并且在细胞与预定的抗原结合后向细胞递送激活信号和任选地一种或更多种共刺激信号。在典型的实施方案中,免疫反应性细胞是自然杀伤细胞、恒定NKT-细胞(invariant NKT-cell)、NK T细胞、B细胞、T细胞,诸如细胞毒性T细胞、辅助性T细胞或调节性T细胞、 $\alpha\beta$ T-细胞、 $\gamma\delta$ T-细胞,或髓系来源的细胞诸如巨噬细胞或中性粒细胞,干细胞、诱导性多能干细胞(iPSC)。

[0095] 将低氧反应性调节核酸可操作地连接到编码工程化受体的多核苷酸上,赋予了工程化受体低氧反应性表达和/或使其适于将免疫反应性细胞靶向实体瘤块。

[0096] 最早的嵌合抗体-TCR由Kuwana等人1987(Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.149, No.3)制造。最早的CAR之一是由Zelig Eshhar等人在以色列的Weizmann Institute(Gross等人,1989(PNAS, Vol.86, pp.10024-10028); Eshhar等人,1993(PNAS, Vol.90, pp.720-724))开发的。基于他们的发现,来自抗体的Fab抗原结合区与细胞内TCR信号传导结构域的融合产生了嵌合受体,该嵌合受体在T细胞上表达时是有功能的并响应于指定的MHC/HLA非依赖性抗原递送TCR信号。CAR的模块架构包括各种功能结构域,允许抗原特异性的选择和精细控制信号传导强度。CAR可以包含单链可变片段(scFv)、跨膜结构域和胞内结构域(endodomain),所述单链可变片段(scFv)包含对TAA或对受体的肽配体或肽的融合体有特异性的抗体的可变重链(VH)区和可变轻链(VL)区、合适的间隔物结构域(spacer domain),例如CD8、CD28或IgG-Fc等本领域熟知的。间隔物将scFv定向在离T细胞质膜的最佳距离以发生有效的信号传导。除此之外,间隔物在受体同二聚化、柔性以及分离和聚集中起重要作用。信号传导胞内结构域由包含为天然TCR激活提供共刺激的信号转导基序的蛋白组成。胞内结构域可以包含CD3 ζ 、FcR γ 、CD28、OX40和/或4-1BB等,并且这些结构域的组合决定了嵌合受体的代次(generation),随着时间的推移,嵌合受体变得更加复杂。

[0097] 根据本发明第一方面的低氧反应性调节核酸调节元件可用于驱动和调节任何工程化受体的表达。

[0098] 此外,在某些实施方案中,工程化受体,诸如CAR,包含一种或更多种如本文所定义的氧依赖性降解结构域(ODD)和至少一种具有抗肿瘤特性的多肽。

[0099] 由于CAR的模块性质,一种或更多种ODD或嵌合多肽可以容易地纳入在任何已知的CAR设计中:例如,它们可以纳入在第一代、第二代、第三代、第四代或随后代的CAR;分体CAR系统(split CAR systems);TRUCK或装甲CAR(armoured CAR)等中。已知的CAR可被改适为通过纳入一种或更多种如本文所定义的ODD和/或通过使用根据本发明第一方面的低氧反应性调节核酸来赋予低氧反应性或赋予提高的低氧反应性。

[0100] 第一代CAR由细胞外结合结构域、铰链区、跨膜结构域和一个或更多个细胞内信号

传导结构域组成。通常,细胞外结合结构域包含来源于肿瘤抗原反应性抗体的单链可变片段(scFv),并且通常对肿瘤抗原具有高特异性。第一代CAR通常包含CD3ζ链结构域或其经修饰的衍生物作为细胞内信号传导结构域,该结构域是信号的主要传递者。

[0101] 第二代CAR还包含共刺激结构域,诸如CD28和/或4-1BB。细胞内共刺激结构域的纳入提高了T细胞增殖、细胞因子分泌、对凋亡的抗性以及体内持久性。第二代CAR的共刺激结构域通常与一个或更多个细胞内信号传导结构域成顺式并位于其上游。

[0102] 第三代CAR将多于一个共刺激结构域与一个或更多个细胞内信号传导结构域顺式组合,以增强T细胞活性。例如,第三代CAR可以包含与源自CD3ζ的细胞内信号传导结构域一起的源自CD28和41BB的共刺激结构域。其他第三代CAR可能包含与源自CD3ζ的细胞内信号传导结构域一起的源自CD28和OX40的共刺激结构域。

[0103] 第四代CAR(也称为TRUCK或装甲CAR)将第二代CAR的表达与增强抗肿瘤活性的因子(例如细胞因子、共刺激配体、趋化因子受体,或者免疫调节因子或细胞因子的其他嵌合受体)相结合。因子可以与CAR成反式或顺式,通常与CAR成反式。

[0104] CAR或编码CAR的核酸可以另外地包括其他机制来处理脱靶效应、剂量控制、激活的位置和时机。例如,编码CAR的核酸可以包括一种或更多种自杀基因,诸如单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-TK)或诱导型胱天蛋白酶9(iCas9),或其他手段来控制脱靶效应。控制CAR活性的其他手段包括使用小分子剂(例如Giordano-Attinese等人,2020,Nature Biotechnology Letters中所报道的)。这些控制系统可以被细胞外分子激活以诱导免疫反应性细胞的凋亡。

[0105] 另一种实例包括被设计成表达两个或更多个抗原特异性靶向区域(如本文所定义的)的CAR。CAR可以是分体CAR系统,其中CAR的治疗功能需要肿瘤抗原和良性的外源分子二者的存在。这样的系统可以在本发明中用于控制ODD的部署。

[0106] 在各种实施方案中,工程化受体是第一代CAR,诸如在Eshhar等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1993)90(2):720-724中描述的那些。

[0107] 在各种实施方案中,工程化受体是共刺激嵌合受体,诸如在Krause等人,J.Exp.Med.(1998)188(4):619-26中描述的那些。

[0108] 在各种实施方案中,工程化受体是第二代CAR,诸如在Finney等人,J.Immunol.(1998)161(6):2791-7;Maher等人,Nat.Biotechnol.(2002)20(1):70-75;Finney等人,J.Immunol.(2004)172(1):104-113;和Imai等人,Leukemia(2005)18(4):676-84中描述的那些。

[0109] 在各种实施方案中,工程化受体是第三代CAR,诸如在Pule等人(2005),Mol.Ther.12(5):933-941;Geiger等人,Blood(2001)98:2364-71;和Wilkie等人J.Immunol.(2008)180(7):4901-9中描述的那些。

[0110] 在各种实施方案中,工程化受体是串联(Tan)CAR,如在Ahmed等人,Mol.Ther.Nucleic Acids(2013)2:e105中描述的。

[0111] 在各种实施方案中,工程化受体是TRUCK CAR,如在Chmielewski等人,Cancer Res.(2011),71:5697-5706(2011)中描述的。

[0112] 在各种实施方案中,工程化受体是装甲CAR,如在Pegram等人,Blood(2012)119:4133-4141和Curran等人,Mol.Ther.(2015)23(4):769-78中描述的。

[0113] 在各种实施方案中,工程化受体是开关受体(Switch Receptor),如在WO 2013/019615中描述的。

[0114] 在各种实施方案中,工程化受体与其他工程化构建体一起在细胞中表达。

[0115] 在这些实施方案中的一些实施方案中,工程化受体与其他工程化构建体一起在细胞中表达,以提供顺式和反式的共刺激,如在Stephan等人Nat.Med.(2007) 13(12):1440-49中描述的。

[0116] 在这些实施方案中的一些实施方案中,工程化受体与其他工程化构建体一起在细胞中表达,以提供双重靶向CAR,诸如在Wilkie等人,J.Clin.Immunol.(2012) 32(5):1059-70中描述的那些。

[0117] 在这些实施方案中的一些实施方案中,工程化受体与其他工程化构建体一起在细胞中表达,以提供抑制性CAR(非门(NOT gate)),如在Fedorov等人,Sci.Transl.Med.(2013) 5(215):215ra172中描述的。

[0118] 在这些实施方案中的一些实施方案中,工程化受体与其他工程化构建体一起在细胞中表达,以提供组合CAR(与门(AND gate)),如在Kloss等人,Nat.Biotechnol.(2013) 31(1):71-5和WO 2014/055668中描述的。

[0119] 在这些实施方案中的一些实施方案中,工程化受体与其他工程化构建体一起在细胞中表达,以提供Go-CAR T,如在Foster等人,(2014),摘要,<http://www.bloodjournal.org/content/124/21/1121?sso-checked=true>中描述的。

[0120] 在这些实施方案中的一些实施方案中,工程化受体与其他工程化构建体一起在细胞中表达,以提供工程化共刺激,如在Zhao等人,Cancer Cell(2015) 28:415028中描述的。

[0121] 在这些实施方案中的一些实施方案中,工程化受体与其他工程化构建体一起在细胞中表达,以提供SynNotch/连续与门,如在Roybal等人,Cell(2016) 164:770-79中描述的。

[0122] 在某些优选的实施方案中,工程化受体与其他工程化构建体一起在细胞中表达,以提供平行CAR(pCAR),如在WO 2017/021701中描述的。pCAR可以包含第二代嵌合抗原受体和嵌合共刺激受体,所述第二代嵌合抗原受体包含:

[0123] (a) 信号传导区;

[0124] (b) 共刺激信号传导区;

[0125] (c) 跨膜结构域;和

[0126] (d) 与靶抗原上的第一表位特异性相互作用的结合元件;

[0127] 所述嵌合共刺激受体包含

[0128] (e) 与(b)中不同的共刺激信号传导区;

[0129] (f) 跨膜结构域;和

[0130] (g) 与靶抗原上的第二表位特异性相互作用的结合元件。

[0131] 在各种实施方案中,工程化受体是工程化T细胞受体,诸如在WO 2010/026377、WO 2010/133828、WO 2011/001152、WO 2012/013913、WO 2013/041865、WO 2017/109496、WO 2017/163064和WO 2018/234319中描述的那些。

[0132] 在实施方案中,CAR包括归巢或浸润肿瘤床(tumour bed)的工具(means)。例如,CAR可以包含一种或更多种趋化因子受体。

[0133] 其他工程化受体可以被包括。另外的工程化受体可以被设计成包括归巢或浸润肿

瘤床的工具。例如,另外的工程化受体可以包含嵌合细胞因子受体或趋化因子受体。

[0134] 如下文进一步讨论的,任何已知的CAR设计或类型,诸如上文提及的任何一种,可以被改适为通过使用一种或更多种ODD和/或通过使用根据本发明第一方面的低氧诱导性调节序列,而包括在低氧条件下表达和调节的能力。

[0135] 除了使用低氧诱导性调节序列和任选地纳入一种或更多种如下文进一步讨论的ODD之外,CAR通常包括在下文I至IV中描述的以下已知组成部分。

[0136] I. 细胞外抗原特异性靶向区域(或具有抗肿瘤特性的多肽)

[0137] 除了包括至少一种ODD之外,嵌合多肽包括至少一种具有抗肿瘤特性的多肽,所述具有抗肿瘤特性的多肽在本文中也称为细胞外抗原特异性靶向区域(extracellular antigen-specific targeting region)。细胞外抗原特异性靶向区域可以和一种或更多种ODD连接。

[0138] 用于递送至肿瘤的这样的蛋白包括但不限于以下中的任何一种或更多种:免疫刺激抗体;赋予细胞激活和肿瘤杀伤能力的表面受体或细胞内受体;T细胞受体(TCR)。

[0139] 抗原特异性靶向区域为CAR提供了结合预定的感兴趣抗原的能力。抗原特异性靶向区域优选地靶向临床上感兴趣的抗原。抗原特异性靶向区域可以是具有特异性识别和结合生物分子(例如细胞表面受体或其组成部分)的能力的任何蛋白或肽。抗原特异性靶向区域包括感兴趣生物分子的任何天然存在的、合成的、半合成的或重组地产生的结合配偶体。说明性的抗原特异性靶向区域包括抗体或抗体片段或衍生物、受体的细胞外结构域、细胞表面分子/受体的配体,或其受体结合结构域,以及肿瘤结合蛋白。

[0140] 在优选的实施方案中,抗原特异性靶向区域是抗体,或源自抗体。抗体来源的靶向结构域可以包括抗体的片段或抗体的一个或更多个片段的遗传工程化产物,该片段参与与抗原的结合。实例包括可变区(Fv)、互补决定区(CDR)、Fab、单链抗体(scFv)、重链可变区(VH)、轻链可变区(VL)和单结构域抗体(VHH)。抗原特异性靶向区域可以另外地或可选择地包括单特异抗体(monobody)或由单特异抗体组成或源自单特异抗体。在优选的实施方案中,结合结构域是单链抗体(scFv)。scFv可以是鼠、人类或人源化scFv。

[0141] 关于抗体或其抗原结合片段的“互补决定区”或“CDR”是指抗体重链或轻链的可变区中的高可变环。CDR可以与抗原构象相互作用,并在很大程度上决定与抗原的结合(尽管已知一些框架区参与结合)。重链可变区和轻链可变区各包含3个CDR。“重链可变区”或“VH”是指这样的抗体重链片段:所述抗体重链片段包含间插在被称为框架区的侧翼链段(flanking stretches)之间的三个CDR,所述框架区比CDR更高度保守并形成支持CDR的支架。“轻链可变区”或“VL”是指这样的抗体轻链片段:所述抗体轻链片段包含间插在框架区之间的三个CDR。

[0142] “Fv”是指具有完整抗原结合位点的抗体的最小片段。Fv片段由单条轻链的可变区和单条重链的可变区结合而成。“单链Fv抗体”或“scFv”是指由轻链可变区和重链可变区直接或经由肽接头序列相互连接组成的工程化抗体。

[0143] 可以使用本领域熟知的方法制备特异性结合预定抗原的CAR的抗原结合区。这样的方法包括噬菌体展示,产生人类或人源化抗体的方法,或使用被工程化以产生人类抗体的转基因动物或植物的方法。部分或完全合成的抗体的噬菌体展示文库是可获得的,并且可以筛选能够与靶分子结合的抗体或其片段。人类抗体的噬菌体展示文库也是可获得的。

在鉴定后,编码抗体的氨基酸序列或多核苷酸序列可以被分离和/或确定。

[0144] 可被本发明的CAR靶向的抗原包括但不限于在与实体癌相关的细胞上表达的抗原。

[0145] 待靶向的抗原不限于但可以选自以下及其衍生物和变体中的一种或更多种和任何组合:扩展的ErbB家族,ErbB1、ErbB3、ErbB4、ErbB2/HER-2、黏蛋白、PSMA、CEA、间皮蛋白、GD2、MUC1、叶酸受体、GPC3、CAIX、FAP、NY-ESO-1、gp100、PSCA、ROR1、PD-L1、PD-L2、EpCAM、EGFRvIII、CD19、GD3、CLL-1、导管上皮黏蛋白、Gp36、TAG-72、鞘糖脂类、胶质瘤相关抗原、 β -hCG、AFP(甲胎蛋白)和凝集素反应性AFP、甲状腺球蛋白、晚期糖基化终末产物受体(RAGE)、TERT、端粒酶、羧酸酯酶、M-CSF、PSA、存活蛋白(survivin)、PCTA-1、MAGE、CD22、IGF-1、IGF-2、IGF-1受体、MHC相关肿瘤肽、5T4、肿瘤基质相关抗原(tumour stroma-associated antigen)、WT1、MLANA、CA 19-9、BCMA、 α v β 6整合素、病毒特异性抗原。

[0146] 优选的细胞外抗原特异性靶向区域是T1E(Davies等人,2012,Mol Med 18:565-576),SEQ ID NO:32。其功能片段及变体也包括在内,其中变体与SEQ ID NO:32具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多的序列同一性。

[0147] T1E肽(源自人类TGF α 和EGF);SEQ ID NO: 32

VVSHFNDCPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKWWELR

[0148] (SEQ ID NO: 32)。

[0149] II. 细胞内信号传导结构域(也称为胞内结构域)

[0150] 合适的细胞内信号传导结构域是本领域已知的,并且包括例如包含免疫受体酪氨酸激活基序(Immune-receptor-Tyrosine-based-Activation-Motif,ITAM)的任何区域,例如由Love等人Cold Spring Harbor Perspect.Biol 2010 2(6)1 a002485综述的。在特定实施方案中,信号传导区域包括人类CD3[ζ]链的细胞内结构域,例如美国专利第7,446,190号中描述的,或其变体。

[0151] 细胞内信号传导结构域也可以是用于间接信号传导的转录因子。

[0152] 细胞内结构域可以由SEQ ID NO:33或其功能片段或变体表示,其中该变体与SEQ ID NO:33具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多的序列同一性。

[0153] CD3 ζ 或CD3 ζ (细胞内结构域);SEQ ID NO:33

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM

[0154] AEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR(SEQ ID NO:33)。

[0155] III. 跨膜结构域

[0156] CAR在细胞膜表面上表达,并且因此通常包含跨膜结构域。合适的跨膜结构域是本领域已知的,并且包括例如来自具有跨膜结构域的任何蛋白的跨膜序列,所述蛋白包括I型、II型或III型跨膜蛋白中的任一种。CAR的跨膜结构域也可以包含人工疏水序列。可以选择CAR的跨膜结构域使得不进行二聚化。合适的跨膜结构域包括CD8 α 、CD28、CD4或CD3 ζ 跨膜结构域。

[0157] 在实施方案中,跨膜结构域由SEQ ID NO:34或其功能片段或变体表示,其中该变体与SEQ ID NO:34具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多的序列同一性。

[0158] CD28(跨膜结构域);SEQ ID NO:34

[0159] IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRS
 RLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO:34).

[0160] IV. 共刺激结构域

[0161] 合适的共刺激结构域也是本领域中熟知的,并且包括B7/CD28家族的成员,诸如B7-1、B7-2、B7-H1、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H6、B7-H7、BTLA、CD28、CTLA-4、Gi24、ICOS、PD-1、PD-L2或PDCD6;或ILT/CD85家族蛋白的成员,诸如LILRA3、LILRA4、LILRB1、LILRB2、LILRB3或LILRB4;或肿瘤坏死因子(TNF)超家族成员,诸如4-1BB、BAFF、BAFF R、CD27、CD30、CD40、DR3、GITR、HVEM、LIGHT、淋巴毒素- α 、OX40、RELT、TACI、TL1A、TNF- α 或TNF RII;或SLAM家族的成员,诸如2B4、BLAME、CD2、CD2F-10、CD48、CD58、CD84、CD229、CRACC、NTB-A或SLAM;或TIM家族的成员,诸如TIM-1、TIM-3或TIM-4;或其他共刺激分子,诸如CD7、CD96、CD160、CD200、CD300a、CRTAM、DAP12、Dectin-1、DPPIV、EphB6、整合素 α 4 β 1、整合素 α 4 β 7/LPAM-1、LAG-3或TSLP R。

[0162] 在实施方案中,CAR包含多于一个共刺激结构域,例如两个或更多个共刺激结构域。在一些实施方案中,共刺激结构域源自CD28、4-1BB和/或OX40。

[0163] 在实施方案中,共刺激结构域是CD28或源自CD28。

[0164] 在实施方案中,共刺激结构域是4-1BB或源自4-1BB。

[0165] 包含ODD的嵌合多肽

[0166] 根据一种实施方案,低氧反应性调节核酸可操作地连接至编码嵌合多肽的核酸分子,该嵌合多肽包含(i)一种或更多种氧依赖性降解结构域(ODD)和(ii)至少一种具有抗肿瘤特性的多肽。

[0167] ODD可以源自任何含ODD的蛋白,诸如ATF-4、HIF1- α 、HIF2- α 和HIF3- α ,其可以来自哺乳动物(诸如人类)来源或者可以人工产生。

[0168] ODD可以由SEQ ID NO:28 ($X^1X^2LEMLAPYIXMDDDX^3X^4X^5$)表示,其中“ X^{1-5} ”可以是任何氨基酸残基。任选地, X^1 是“L”或任何保守取代; X^2 是“D”或任何保守取代, X^3 是“F”或任何保守取代, X^4 是“Q”或任何保守取代, X^5 是“L”或任何保守取代。

[0169] 任选地,ODD可以由SEQ ID NO:29、30或31,或其同源物或变体表示,所述同源物或变体与SEQ ID NO:29、30或31具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多的序列同一性,其中该同源物或变体包含SEQ ID NO:28。

[0170] SEQ ID NO:29 (HIF1- α 氨基酸401-603,其中SEQ ID NO:28为粗体)

APAAGDTIISLDFGSNDTETDDQQLLEVPYNDVMLPSPNEKLQINLAMSPPTAETPKPLRSSADPAL
 [0171] NQEVALKLEPNPESLELSFTMPQIQDQTPSPSDGSTRQSSPEPNPSEYCFYVDSDMVNEFKLELVEKLF
 AEDTEAKNPFSTQDSDL**LEMLAPYIPMDDDF**QLRSFDQLSPLESSASPESASPQSTVTVFQ

[0172] SEQ ID NO:30 (HIF1- α 氨基酸530-603,其中SEQ ID NO:28为粗体)

EFKLELVEKLF AEDTEAKNPFSTQDSDL**LEMLAPYIPMDDDF**QLRSFDQLSPLESSASPESASPQST
 [0173] VTVFQ

[0174] SEQ ID NO:31 (HIF1- α 氨基酸530-653,其中SEQ ID NO:28为粗体)

EFKLELVEKLF AEDTEAKNPFSTQDSDL**LEMLAPYIPMDDDF**QLRSFDQLSPLESSASPESASPQST
 [0175] VTVFQQTQIQEPTANATTTTATTDDELKTVTKDRMEDIKILIASPSPHITHKETS

[0176] 另外地或可选地,ODD可以由以下核酸来编码:所述核酸编码SEQ ID NO:29、30或

31或其同源物或变体,所述同源物或变体与SEQ ID NO:29、30或31具有至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的序列同一性并且包含SEQ ID NO:28。

[0177] 本文定义的“同源物”与SEQ ID NO:29、30或31具有至少70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的序列同一性并且包含SEQ ID NO:27。此背景下的(及如本申请中其他地方所提及的)同一性可以使用BLASTP计算机程序来确定,其中例如以SEQ ID NO 29、30或31作为基础序列。BLAST软件是在<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (2009年3月12日可访问) 公众可获得的。

[0178] 更通常地,除非另有陈述,本文提到的术语“变体”是指这样的多肽序列:其是基础序列的天然存在的多态形式以及合成变体,其中链内的一个或更多个氨基酸被插入、去除或替换。变体产生的生物学作用与基础序列产生的生物学作用相似。

[0179] 其中氨基酸被具有广泛相似性质的同一种类中的不同氨基酸替换的氨基酸取代可以被认为是“保守的”。非保守取代是其中氨基酸被不同类型或种类的氨基酸替换。

[0180] 氨基酸种类定义如下:

种类	氨基酸实例
[0182] 非极性:	A、V、L、I、P、M、F、W
[0183] 不带电荷的极性:	G、S、T、C、Y、N、Q
[0184] 酸性:	D、E
[0185] 碱性:	K、R、H

[0186] 如本领域技术人员所熟知的,通过保守取代改变肽的一级结构可能不会显著改变该肽的活性,因为插入到序列中的氨基酸侧链可能能够形成与被取代掉的氨基酸侧链类似的键和接触。即使在取代位于决定肽构象的关键区域时,也是如此。

[0187] 非保守取代也是可能的,只要这些取代不妨碍上文描述的多肽的功能。广义地说,在不改变多肽生物活性的情况下,较少的非保守取代将是可能的。

[0188] 低氧反应性调节核酸可操作地连接至编码包含一种或更多种ODD的嵌合多肽的核酸分子。嵌合多肽可以包含至少一种、两种、三种、四种、五种或更多种ODD,例如,由SEQ ID No 29、30和31中的任何一个所表示的ODD,以及如本文所定义的并且包含SEQ ID NO:28的其同源物和变体。如果设想使用多于一种ODD,它们可以在同一构建体中提供,也可以在单独的构建体中提供;如果在同一构建体上,它们可以是连续的或空间上分隔开的。

[0189] 一种或更多种ODD可以定位在多肽或核酸(包括RNA)中的任何位置。例如,它们可以定位在多肽链的C-末端或N-末端,或者位于多肽链之间的任何位置,或者直接衔接至多肽链,或者使用接头连接至多肽链,该多肽具有抗肿瘤特性。合适的接头是本领域熟知的,并且可以是刚性的或柔性的。在一种实施方案中,一种或更多种ODD可以包含在CAR中,任选地融合到CAR的C-末端。

[0190] 本发明的多肽和编码多肽的核酸、CAR和免疫反应性细胞能够双重感知/双重表达,即在低氧条件(诸如在实体癌环境中发现的)下引起肿瘤靶向多肽的活性或表达,但在常氧环境中很少或没有活性或表达。这是由于由一种或更多种ODD所实现的具有抗肿瘤特性的多肽的降解与本发明第一方面中描述的低氧反应性调节核酸驱动的表达组合。

[0191] 根据本发明第一方面的低氧反应性调节核酸能够调节编码包含一种或更多种氧

依赖性降解结构域(ODD)和至少一种具有抗肿瘤特性的多肽的嵌合多肽的核酸分子的表达。由于调节序列与一种或更多种ODD组合的作用,嵌合多肽的表达以低氧反应性方式被控制,其中系统的严格程度可以通过例如调节HRE拷贝数和/或ODD的数目来调节。

[0192] 除了包含至少一种ODD,嵌合多肽还包含至少一种具有抗肿瘤特性的多肽。用于递送至肿瘤的这样的蛋白包括但不限于以下中的任何一种或更多种:免疫刺激抗体;赋予细胞激活和肿瘤杀伤能力的表面受体或细胞内受体;T细胞受体(TCR),NK受体,To11样受体。还包括与具有抗肿瘤特性的多肽缔合(例如,以促进细胞内信号传导)的共受体。

[0193] 根据一种实施方案,由核酸编码的嵌合多肽包含CAR多肽序列或由CAR多肽序列组成。本发明的另一方面提供了CAR,所述CAR的表达由根据本发明第一方面的调节核酸序列驱动,并且该CAR还包含一种或更多种ODD和至少一种具有抗肿瘤特性的多肽。

[0194] 下文提供了根据本发明的CAR的实例,其中呈现了氨基酸序列(SEQ ID NO:35)和相应的核苷酸序列(SEQ ID NO:36),并且其中CSF1-R前导物Seq(包括任选的另外的甘氨酸)为粗体并加下划线;T1E肽(源自人类TGF α 和EGF)为粗体;CD28(细胞外、跨膜和细胞内结构域)为斜体;CD3 ζ (细胞内结构域)加下划线,并且ODD结构域(源自人类HIF1- α)加灰色阴影。

[0195] T1E28z CAR和融合的ODD氨基酸序列(SEQ ID NO:35)

MGPGVLLLLLVATAWHGQG(G)VVSHFNDCPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYAC
NCVVG YIGERCQYRDLKWWELRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLFP
GPSKPFWLVVVGGVLACYLLVTVAFIIFWVRSKRSLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYA
PPRDFAAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGONQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGK
 [0196] **PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALH**
MQALPPRAPAAGDTIISLDFGSNDTETDDQQL EEVPL YNDVMLPSPNEKLQNINLAMSPL
PTAETPKPLRSSADPALNQEVALKLEPNPESLELSFTMPQIQDQTPSPSDGSTROSSPEPNS
PSEYCFYVDSDMVNEFKLELVEKLF AEDTEAKNPFSTQD TDLDLEMLAPYIPMDDDFQL
RSFDQLSPLESSASPESAS PQSTVTVFQ

[0197] 相应的核苷酸序列(SEQ ID NO:36)

ATGGGCCCAGGAGTTCTGCTGCTCCTGCTGGTGGCCACAGCTTGGCATGGTCAGGGAGGTGT
GGTGTGCGCACTTCAATGACTGTCCACTGTGCGCACGATGGATACTGCCTCCATGATGGTGTGT
GCATGTACATCGAGGCATTGGACAAGTATGCATGCAACTGTGTCGTCGGCTACATCGGAGA
GCGATGTCAGTACCGAGACCTGAAGTGGTGGGAAGTGGAGCGCGCCGCAATTGAAGTTATGTA
TCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTT
 [0198] **GTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCTCT**
GGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGG
CTCCTGCACAGTACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAG
CCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGAcg
CCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGT
ACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAAC

[0199] CCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGG
 ATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCAC
 CAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGCCCCAGCCGCTGGAGACAC
 AATCATATCTTTAGATTTTTGGCAGCAACGACACAGAACTGATGACCAGCAACTTGAGGAAGTACCA
 TTATATAATGATGTAATGCTCCCCTCACCCAACGAAAAATTACAGAATATAAATTTGGCAATGTCTCC
 ATTACCCACCGCTGAAACGCCAAAGCCACTTCGAAGTAGTGCTGACCCTGCACTCAATCAAGAAGTT
 GCATTAATAATTAGAACCAAATCCAGAGTCACTGGAACCTTTCTTTTACCATGCCCCAGATTCAGGATCA
 GACACCTAGTCCTTCCGATGGAAGCACTAGACAAAGTTCACCTGAGCCTAATAGTCCCAGTGAATAT
 TGTTTTTATGTGGATAGTGATATGGTCAATGAATTCAAGTTGGAATTGGTAGAAAACTTTTTGCTGA
 AGACACAGAAGCAAAGAACCCATTTTCTACTCAGGACACAGATTTAGACTTGGAGATGTTAGCTCCC
 TATATCCAATGGATGATGACTTCCAGTTACGTTCCCTTCGATCAGTTGTCACCATTAGAAAGCAGTTC
 CGCAAGCCCTGAAAGCGCAAGTCCTCAAAGCACAGTTACAGTATTCCAG

[0200] 多核苷酸

[0201] 根据本发明的一个方面,提供了编码嵌合多肽的核酸分子,该嵌合多肽可以包括CAR。

[0202] 本发明的多核苷酸可以包括DNA或RNA。它们可以是单链或双链的。本领域技术人员将理解,由于遗传密码的简并性,许多不同的多核苷酸可以编码相同的多肽。另外,应当理解,技术人员可以使用常规技术进行不影响由本发明的多核苷酸所编码的多肽序列的核苷酸取代,以反映待表达本发明的多肽的任何特定宿主生物体的密码子使用。

[0203] 多核苷酸可以通过本领域中任何可获得的方法进行修饰。可以进行这样的修饰以增强本发明的多核苷酸的体内活性或寿命。

[0204] 多核苷酸诸如DNA多核苷酸可以重组地、合成地或通过本领域技术人员可获得的任何手段产生。它们也可以通过标准技术被克隆。

[0205] 较长的多核苷酸通常使用重组手段产生,例如使用聚合酶链式反应(PCR)克隆技术。这涉及制备在期望克隆的靶序列的侧翼的引物(例如约15个至30个核苷酸的引物)的对,使引物与从动物或人类细胞获得的mRNA或cDNA接触,在引起期望区域扩增的条件下进行聚合酶链式反应,分离经扩增的片段(例如通过用琼脂糖凝胶纯化反应混合物)并回收经扩增的DNA。引物可以被设计成包含合适的限制性酶识别位点,以便经扩增的DNA可以克隆到合适的载体中。

[0206] 本发明的多核苷酸还可以包含编码选择标志物的核酸序列。合适的选择标志物是本领域熟知的,并且包括但不限于荧光蛋白—诸如绿色荧光蛋白(GFP)。编码选择标志物的核酸序列可以以多顺反子的核酸构建体的形式与编码本发明的CAR的核酸序列组合来提供。这样的核酸构建体可以在载体中提供。

[0207] 编码CAR的核酸序列和编码选择标志物的核酸序列可以由共表达位点分隔开,该共表达位点能够将每种多肽表达为离散实体。合适的共表达位点是本领域已知的,并且包括例如内部核糖体进入位点(IRES)和自裂解肽。

[0208] 其他合适的共表达位点/序列包括自裂解或裂解结构域。这样的序列可以在蛋白质产生期间自动裂解,或可以被存在于细胞中的常见酶裂解。因此,在多肽序列中纳入这样的自裂解或裂解结构域使得第一多肽和第二多肽能够表达为单一多肽,随后该单一多肽被裂解以提供离散的、分开的功能多肽。

[0209] 选择标志物的使用是有利的,因为它允许使用普通方法,例如流式细胞术,从起始细胞群体中选择和分离其中本发明的多核苷酸或载体已经成功导入(使得编码的CAR被表达)的细胞。

[0210] 密码子优化

[0211] 本发明中使用的多核苷酸可以是密码子优化的。密码子优化先前已经在WO 1999/41397和WO 2001/79518中描述。不同的细胞对特定密码子的使用有差异。这种密码子偏倚对应于细胞类型中特定tRNA的相对丰度中的偏倚。通过改变序列中的密码子使其被定制为与相应tRNA的相对丰度相匹配,有可能使表达增加。同样地,有可能通过故意地选择已知在特定细胞类型中相应tRNA为罕见的密码子来使表达降低。因此,可获得另外程度的翻译控制。

[0212] 载体

[0213] 本发明的另一方面提供了包含本发明的多核苷酸序列的载体。

[0214] 载体是允许或促进实体从一个环境转移到另一个环境的工具。根据本发明,并且举例来说,重组核酸技术中使用的一些载体允许将实体,诸如核酸区段(例如异源DNA区段,诸如异源cDNA区段)转移至靶细胞中。载体可以是非病毒的或病毒的。重组核酸技术中使用的载体的实例包括但不限于质粒、mRNA分子(例如体外转录的mRNA)、染色体、人工染色体和病毒。载体也可以是例如裸核酸(例如,DNA)。在其最简单的形式中,载体本身可以是感兴趣的核苷酸。

[0215] 本发明中使用的载体可以是例如质粒、mRNA或病毒载体,并且可以包括用于多核苷酸表达的启动子和任选的启动子调节物。

[0216] 可以使用本领域已知的各种技术,诸如转化和转导,将包含本发明的多核苷酸的载体引入细胞中。本领域已知若干种技术,例如用重组病毒载体(诸如逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、杆状病毒载体和单纯疱疹病毒载体)感染;核酸直接注射和基因枪转化。

[0217] 非病毒递送系统包括但不限于DNA转染方法。本文中,转染包括使用非病毒载体将基因递送至靶细胞的过程。

[0218] 典型的转染方法包括电穿孔、DNA基因枪、脂质介导的转染、致密DNA介导的转染(compact DNA-mediated transfection)、脂质体、免疫脂质体、lipofectin、阳离子剂介导的转染、阳离子表面两亲物(cationic facial amphiphiles,CFA) (Nat.Biotechnol. (1996) 14:556) 及它们的组合。

[0219] 用于转染的其他方法包括DNA、RNA、mRNA、蛋白、质粒、具有转座酶活性的蛋白、具有切割DNA能力的蛋白(例如,与sgRNA(小指导RNA)结合的Cas蛋白)、用于编辑核酸的分子,诸如单独的Cas9蛋白或与指导RNA(gRNA)连接的Cas9蛋白。

[0220] 用于编辑核酸以例如导致基因敲除、敲入或基因表达下调或过表达,或以一个或更多个缺失、插入或取代的形式引入突变的各种方法是本领域已知的。例如,使用各种核酸酶系统,诸如锌指核酸酶(ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)、兆核酸酶或它们的组合用于编辑核酸是本领域已知的,并且可以用于本发明。在近期,簇集的规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspersed short palindromic repeats, CRISPR)/CRISPR相关(Cas) (CRISPR/Cas) 核酸酶系统已变得更一般地用于基因组工程。

CRISPR/Cas系统在例如W02013/176772、W02014/093635和W02014/089290中详细描述。

[0221] 例如,CRISPR/Cas9可以包括具有Cas9的结合位点的指导RNA (gRNA) 序列和对待修饰的区域有特异性的靶向序列。Cas9与gRNA结合以形成结合并裂解靶区域的核糖核蛋白。除了CRISPR/Cas9平台(其为II型CRISPR/Cas系统)之外,还存在可选的系统,包括I型CRISPR/Cas系统、III型CRISPR/Cas系统和V型CRISPR/Cas系统。以上CRISPR系统中的任一种可以用于制备包含本发明的多核苷酸序列的载体。

[0222] 免疫反应性细胞

[0223] 本发明的另一方面提供了包含编码嵌合多肽的核酸分子的免疫反应性细胞,该嵌合多肽包含一种或更多种氧依赖性降解结构域(ODD)和至少一种具有抗肿瘤特性的多肽。多个核酸可以由IRES肽或自裂解2A肽分隔开,以双顺反的或多顺反的载体的形式可操作地连接至所述低氧反应性调节核酸。在另一方面,本发明提供了包含一种或更多种氧依赖性降解结构域(ODD)和至少一种在免疫反应性细胞中具有抗肿瘤特性的多肽的CAR。

[0224] 在一种实施方案中,免疫反应性细胞能够表达编码一种或更多种CAR的核酸。这些细胞是“工程化细胞”,意指细胞已经被修饰以包含或表达非由细胞天然地编码的多核苷酸。可选地,工程化细胞可以被修饰以使天然地表达的多核苷酸过表达或减少/沉默天然表达(例如,用shRNA敲低)。用于工程化细胞的方法是本领域已知的,并且包括但不限于细胞的遗传修饰,例如通过转导诸如逆转录病毒或慢病毒转导、转染(诸如瞬时转染—基于DNA或RNA的)包括脂质体转染、聚乙二醇、磷酸钙和电穿孔进行的遗传修饰。可以使用任何合适的方法将核酸序列引入细胞中。

[0225] 因此,编码本文描述的CAR的核酸分子不被相应的未修饰的细胞天然地表达。合适地,工程化细胞是其基因组已被修饰,例如通过转导或转染进行修饰的细胞。合适地,工程化细胞是其基因组已通过逆转录病毒转导进行修饰的细胞。合适地,工程化细胞是其基因组已通过慢病毒转导进行修饰的细胞。

[0226] 如本文使用的,术语“引入的”是指用于将外来DNA或RNA插入细胞中的方法。如本文使用的,术语引入的包括转导和转染方法二者。转染是通过非病毒方法将核酸引入细胞中的方法。转导是经由病毒载体将外来DNA或RNA引入细胞中的方法。根据本发明的工程化细胞可以通过引入编码本文描述的CAR的DNA或RNA来产生,所述引入通过包括用病毒载体转导、用DNA或RNA转染在内的许多手段中的一种来进行。细胞可以在引入编码本文描述的CAR的多核苷酸之前或之后被激活和/或扩增。如本文使用的,“激活的”意指细胞已被刺激,导致细胞增殖。如本文使用的,“扩增的”意指细胞或细胞群体已被诱导增殖。细胞群体的扩增可以通过例如对存在于群体中的细胞数进行计数来测量。细胞的表型可以通过本领域已知的方法诸如流式细胞术来确定。

[0227] 编码包含一种或更多种ODD和至少一种具有抗肿瘤特性的多肽的嵌合多肽的核酸分子可以包含在任何哺乳动物细胞中,优选免疫反应性细胞或肿瘤细胞中。细胞可以是体外或体内的。免疫反应性细胞可以包含嵌合多肽,所述嵌合多肽本身可以包含在嵌合抗原受体(CAR)中,其中CAR在低氧条件下表达,而在常氧条件下基本上不表达。

[0228] 合适的免疫反应性细胞包括,但不限于,淋巴来源的细胞诸如自然杀伤细胞、NK T细胞、恒定NKT细胞,或T细胞,诸如细胞毒性T细胞、辅助性T细胞或调节性T细胞; $\alpha\beta$ T细胞, $\gamma\delta$ T细胞,B细胞或髓系来源的细胞诸如巨噬细胞或中性粒细胞;干细胞,诱导性多能干细

胞 (iPSC)。

[0229] 合适地,免疫反应性细胞诸如T细胞从获自受试者的外周血单个核细胞(PBMC)中分离。合适地,受试者是哺乳动物,优选地人类。在“现成的(off the shelf)”CAR T细胞的情况下,免疫反应性细胞可以任选地是同种异基因的,其中T细胞不一定源自患有癌症的受试者(参见例如Depil等人,2020(Nature Reviews Drug Discovery))。

[0230] 合适地,细胞与受试者匹配或是受试者自体的。细胞可以从患者自身的外周血(第1方),或在造血干细胞移植物的背景下从供体外周血(第2方)或从不相关的供体的外周血(第3方)离体产生。合适地,细胞与受试者匹配或是受试者自体的。

[0231] 本发明的另一方面提供了通过本发明的方法可获得的或获得的免疫反应性细胞,特别是T细胞,以及包含其的药物组合物。

[0232] 用于制备免疫反应性细胞的方法

[0233] 在本发明的另一方面,提供了一种用于制备免疫反应性细胞的方法,该方法包括

[0234] -从受试者(其可以是癌症患者或健康供体)中分离淋巴来源的或髓系来源的细胞;

[0235] -修饰所述细胞以引入本文所定义的核酸分子和/或CAR;

[0236] -离体扩增所述经修饰的细胞;

[0237] -获得能够在低氧条件下表达核酸分子和/或CAR的细胞。

[0238] 核酸分子或CAR的表达由包含多于一个HRE的低氧反应性调节核酸驱动,如本文所定义的。

[0239] 本发明的免疫反应性细胞可以通过引入编码本文所定义的核酸分子和/或一种或更多种CAR的DNA或RNA产生,所述引入通过包括用病毒载体转导、用DNA或RNA转染在内的手段来进行。

[0240] 本发明的细胞可以通过以下制备:将本文所定义的多核苷酸或载体引入细胞(例如通过转导或转染)。合适地,细胞可以来自从受试者分离的样品。

[0241] 本发明的另一方面提供了通过本发明的方法可获得的免疫反应性细胞,以及包含其的药物组合物。

[0242] 药物组合物

[0243] 药物组合物是包含治疗有效量的药物活性剂、基本上由治疗有效量的药物活性剂组成或由治疗有效量的药物活性剂组成的组合物,此处的药物活性剂是经修饰的免疫反应性细胞。它优选包括药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂(包括其组合)。用于治疗用途的可接受的载体或稀释剂是熟知的,并且在例如Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., (A.R.Gennaro编著,1985)中描述。药物载体、赋形剂或稀释剂的选择可以根据预期施用途和标准药物实践来选择。药物组合物可以包含载体、赋形剂或稀释剂,或者除了载体、赋形剂或稀释剂以外任何合适的一种或更多种粘合剂、一种或更多种润滑剂、一种或更多种悬浮剂、一种或更多种包衣剂或者一种或更多种增溶剂。

[0244] 药学上可接受的载体的实例包括,例如,水、盐溶液、醇、硅酮、蜡、蜡膏(petroleum jelly)、植物油、聚乙二醇、丙二醇、脂质体、糖类、明胶、乳糖、直链淀粉、硬脂酸镁、滑石、表面活性剂、硅酸、黏性石蜡(viscous paraffin)、芳香油(perfume oil)、脂肪酸甘油单酯和甘油二酯、petroethral脂肪酸酯(petroethral fatty acid esters)、羟甲基纤维素、聚乙

烯吡咯烷酮等。

[0245] 治疗方法

[0246] 本发明的另一方面提供了一种用于治疗肿瘤的方法,所述方法包括向有相应需要的受试者施用本发明的免疫反应性细胞。

[0247] 适于本文描述的治疗的受试者包括哺乳动物,诸如人类、非人类的灵长类动物、牛、马、猪、绵羊、山羊、狗、猫、兔或啮齿动物。在优选的实施方案中,受试者是人类。本文描述的方法在其他哺乳动物受试者中的实践也包括在内,尤其是在常规用作展示在人类中的治疗功效的模型的哺乳动物(例如,鼠、灵长类动物、猪、犬或兔动物)中的实践也包括在内。标准剂量-反应研究用于优化剂量和给药方案。

[0248] “施用”是指使用各种已知方法和递送系统中的任何一种将免疫反应性细胞物理引入至受试者。实例包括肿瘤内(i.t.)、静脉内(i.v.)、肌肉内、皮下、腹膜内、胸膜内、脊柱、胸腔积液(pleural effusion)或其他肠胃外施用途径,例如通过注射或输注。如本文使用的,措辞“肠胃外施用”意指除了肠内和局部施用之外的通常通过注射的施用方式,并且包括而不限于,静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、淋巴管内、病灶内、囊内、腔内、眼眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注,以及体内电穿孔。施用还可以进行例如一次、多于一次和/或经一个或更多个延长的时间段进行。

[0249] 免疫反应性细胞可用于疗法或预防性处理,以刺激T细胞介导的针对靶细胞群体的免疫反应。本发明还提供了在有相应需要的患者中刺激T细胞介导的针对靶细胞群体的免疫反应的方法,所述方法包括向患者施用如上文描述的免疫反应性细胞群体。

[0250] 免疫反应性细胞在实体瘤治疗中特别有用。在根据本发明的基于CAR的抗癌免疫疗法中,从癌症患者(或健康供体)中分离出T淋巴细胞,通过例如逆转录病毒载体/慢病毒载体对其进行修饰和扩增,以在细胞表面组成性地表达对肿瘤细胞在表面上表达的肿瘤相关抗原(TAA)具有结合特异性的CAR分子,并且然后再输注回患者中(图1)。因此,患者自体T细胞和/或非患者来源的同种异基因T细胞的大群体被重新定向于对癌细胞进行杀伤。此外,CAR的双重氧感知特性允许减少或消除脱靶效应(通过使用低氧反应性启动子与一种或更多种ODD的活性的联合),并且此外,由于与常规组成型逆转录病毒启动子相比,低氧反应性启动子强度的未预期到的增加,抗肿瘤多肽在肿瘤部位处的表达增加。

[0251] 用于治疗疾病的方法涉及本发明的免疫反应性细胞的治疗用途。在这方面,细胞可以被施用至患有现有疾病或状况的受试者,以减轻、降低或改善与疾病相关的至少一种症状和/或减缓、降低或阻断疾病的进展。

[0252] 治疗方法可以包括预防性地使用本发明的细胞。在这方面,可以将细胞向尚未罹患疾病和/或未显示出疾病的任何症状的受试者施用,以预防或损害疾病的病因或者减少或预防与疾病相关的至少一种症状的发展。受试者可能具有疾病倾向,或被认为处于发展疾病的风险。

[0253] 治疗方法不需要使用T细胞来进行,而是也可以使用其他合适的免疫反应性细胞来进行,诸如使用淋巴来源的细胞诸如自然杀伤细胞、B细胞、恒定NKT细胞,或T细胞,诸如细胞毒性T细胞、辅助性T细胞或调节性T细胞;或髓系来源的细胞诸如巨噬细胞或中性粒细胞来进行。

[0254] 所公开的方法可用于治疗癌症,例如,抑制癌症生长(cancer growth),包括癌症完全缓解,用于抑制癌症转移,以及用于促进癌症抗性。术语“癌症生长”通常是指表明癌症向更为发展的形式变化的许多指标中的任何一种。用于度量癌症发展的抑制的指标包括但不限于癌细胞生存的降低、肿瘤体积或形态的减小(例如,如使用计算机断层扫描(CT)、声谱学(sonography)或其他成像方法确定的)、延迟的肿瘤生长、肿瘤血管系统的破坏、迟发型超敏反应皮肤试验中改善的表现、溶细胞性T淋巴细胞活性的增加以及肿瘤特异性抗原水平的降低。术语“癌症抗性”是指受试者抵抗癌症生长,特别是已具有的癌症的生长的提高的能力。换言之,术语“癌症抗性”是指受试者中降低的癌症生长倾向。

[0255] 患有癌症的个体中的癌细胞可以是与个体中的正常体细胞在免疫学上不同的细胞。例如,癌细胞可以表达不由个体中的正常体细胞表达的抗原(即肿瘤抗原)。肿瘤抗原是本领域中熟知的,并在本文中更详细的描述。

[0256] 各种类型的癌症在本领域是已知的。癌症可以是转移的或非转移的。癌症可以是家族性的或散发性的。在一些实施方案中,癌症选自自由以下组成的组:白血病和多发性骨髓瘤。可以使用本发明的方法治疗的另外的癌症包括,例如,良性和恶性实体瘤以及良性和恶性非实体瘤。

[0257] 例如,癌症可以包括实体瘤,例如上皮癌或肉瘤。

[0258] 上皮癌包括源自上皮细胞的恶性赘生物,其浸润例如侵袭周围组织并产生转移。腺癌是源自腺组织或来自形成可识别的腺结构的组织的上皮癌。

[0259] 可以治疗的上皮癌包括以下癌症(cancers and carcinomas):肾上腺皮质(adrenocortical)癌、泡状(acinar)癌、腺泡细胞(acinic cell)癌、腺泡状(acinous)癌、腺囊(adenocystic)癌、腺样囊性(adenoid cystic)癌、腺样鳞状细胞癌、腺癌(cancer adenomatousum)、腺鳞(adenosquamous)癌、附件癌、肾上腺皮质的癌症(cancer of adrenal cortex)、肾上腺皮质(adrenocortical)癌、产醛固酮(aldosterone-producing)癌、醛固酮分泌性(aldosterone-secreting)癌、肺泡癌、肺泡细胞癌、成釉细胞癌、壶腹癌、甲状腺未分化癌(anaplastic cancer of thyroid gland)、顶浆分泌癌、基底细胞癌、基底细胞癌、肺泡癌、粉刺性基底细胞(comedo basal cell)癌、囊性基底细胞癌、硬斑样基底细胞癌、多中心性基底细胞癌、结节溃疡性基底细胞癌、色素性基底细胞癌、硬化性基底细胞癌、浅表性基底细胞癌、基底细胞样癌、基底鳞状细胞癌、胆管癌、肝外胆管癌、肝内胆管癌、细支气管肺泡(bronchioalveolar)癌、细支气管癌、细支气管肺泡癌、支气管肺泡癌、支气管肺泡细胞癌、支气管源性(bronchogenic)癌、髓状(cerebriform)癌、胆管细胞癌、绒毛膜癌、脉络丛癌、透明细胞癌、泄殖腔源肛门癌、胶样(colloid)癌、粉刺性癌、子宫(corpus)癌、子宫体癌(cancer of corpus uteri)、产皮质醇(cortisol-producing)癌、筛状(cribriform)癌、柱状(cylindrical)癌、柱状细胞(cylindrical cell)癌、管状(duct)癌、导管癌、前列腺导管癌、导管原位癌(DCIS)、外分泌(eccrine)癌、胚胎性癌、铠甲样癌(cancer en cuirasse)、子宫内膜(endometrial)癌、子宫内膜的癌症(cancer of endometrium)、子宫内膜样(endometrioid)癌、表皮样癌、癌在混合瘤(cancer ex mixed tumour)、癌在多形性腺瘤(cancer ex pleomorphic adenoma)、外生性(exophytic)癌、纤维板层样癌、纤维癌(cancer fibrosum)、滤泡状甲状腺癌、胃癌、胶样(gelatiniform)癌、胶样(gelatinous)癌、巨细胞(giant cell)癌、甲状腺巨细胞癌、巨细胞癌(cancer gigantocellulare)、腺

(glandular) 癌、颗粒细胞癌、肝细胞癌、Hurthle细胞癌、肾上腺样瘤、幼稚型胚胎性 (infantile embryonal) 癌、胰岛细胞癌、炎性乳腺癌、原位癌 (cancer in situ)、管内癌、表皮内癌、上皮内癌、少年胚胎性癌、Kulchitsky细胞癌、大细胞癌、软脑膜癌、小叶癌、浸润性小叶癌、侵袭性小叶癌、原位小叶癌 (LCIS)、淋巴上皮癌、髓样癌 (cancer medullare)、髓样 (medullary) 癌、甲状腺髓样癌 (medullary cancer of thyroid gland)、甲状腺髓样 (medullary thyroid) 癌、黑色素癌、脑膜癌、Merkel细胞癌、变型性细胞 (metatypical cell) 癌、微乳头状 (micropapillary) 癌、黏液 (mucinous) 癌、黏液癌 (cancer muciparum)、黏液细胞癌 (cancer mucocellulare)、黏液表皮样癌、黏液癌 (cancer mucosum)、黏液 (mucous) 癌、鼻咽癌、皮肤神经内分泌癌、非浸润癌、非小细胞性癌、非小细胞肺癌 (NSCLC)、燕麦细胞癌、骨化性癌 (cancer ossificans)、骨样 (osteoid) 癌、佩吉特癌、乳头状癌、甲状腺乳头状癌、壶腹周围 (periampullary) 癌、浸润前癌、棘细胞癌、原发性骨内 (primary intraosseous) 癌、肾癌、瘢痕癌、血吸虫性膀胱癌、施奈德 (Schneiderian) 癌、硬癌、皮脂癌、印戒细胞癌、单纯性癌症 (cancer simplex)、小细胞癌、小细胞肺癌 (SCLC)、梭形细胞癌、海绵体癌、鳞状癌、鳞状细胞癌、终末导管癌、甲状腺未分化 (anaplastic thyroid) 癌、滤泡状甲状腺癌、髓样甲状腺癌、乳头状甲状腺癌、皮肤小梁癌、移行细胞癌、管状癌、甲状腺未分化癌 (undifferentiated cancer of thyroid gland)、子宫体 (uterine corpus) 癌、疣状癌、绒毛 (villous) 癌、绒毛癌 (cancer villosum)、卵黄囊癌、鳞状细胞癌,特别是头颈鳞状细胞癌、食管鳞状细胞癌,以及口腔癌。

[0260] 另一大类癌症包括肉瘤和纤维肉瘤,其是细胞嵌入纤维状或均匀的物质 (诸如胚胎结缔组织) 的肿瘤。

[0261] 可以靶向的肉瘤包括脂肪肉瘤、腺泡状软组织肉瘤、成釉细胞肉瘤、禽肉瘤、葡萄状 (botryoid) 肉瘤、葡萄状肉瘤 (sarcoma botryoides)、鸡肉瘤、绿色 (chloromatous) 肉瘤、成软骨细胞肉瘤、肾透明细胞肉瘤、胚胎性肉瘤、子宫内膜间质肉瘤、上皮样肉瘤、尤因肉瘤、筋膜肉瘤、成纤维细胞肉瘤、鸡 (fowl) 肉瘤、巨细胞肉瘤、粒细胞肉瘤、血管内皮 (hemangioendothelial) 肉瘤、霍奇金肉瘤、特发性多发色素性出血肉瘤、免疫母细胞性B细胞肉瘤 (immunoblastic sarcoma of B cells)、免疫母细胞性T细胞肉瘤 (immunoblastic sarcoma of T-cells)、Jensen肉瘤、卡波西肉瘤、库普弗细胞 (Kupffer cell) 肉瘤、白血病性肉瘤、淋巴肉瘤、黑色素肉瘤、混合细胞肉瘤、多发性肉瘤、淋巴管肉瘤、特发性出血性 (idiopathic haemorrhagic) 肉瘤、多潜能原发性骨肉瘤 (multipotential primary sarcoma of bone)、成骨细胞肉瘤、骨肉瘤、骨旁 (parosteal) 肉瘤、多形性肉瘤、假性卡波西 (pseudo-Kaposi) 肉瘤、网状细胞肉瘤、脑网状细胞肉瘤、横纹肌肉瘤、劳斯肉瘤、软组织肉瘤、梭形细胞肉瘤、滑膜肉瘤、毛细血管扩张型肉瘤、骨肉瘤 (骨肉瘤) / 骨恶性纤维组织细胞瘤 (sarcoma (osteosarcoma) / malignant fibrous histiocytoma of bone), 和软组织肉瘤。

[0262] 可以治疗的淋巴瘤包括获得性免疫缺陷综合征 (AIDS) 相关淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、T细胞白血病/淋巴瘤、非洲 (African) 淋巴瘤、B细胞淋巴瘤、B细胞单核细胞样 (B-cell monocytoid) 淋巴瘤、牛恶性淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、中心细胞性淋巴瘤、皮肤淋巴瘤、弥漫性淋巴瘤、弥漫性大细胞 (diffuse, large cell) 淋巴瘤、弥漫性混合性小细胞和大细胞 (diffuse, mixed small and large cell) 淋巴瘤、弥漫性小裂

细胞(diffuse,small cleaved cell)淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、滤泡性中心细胞淋巴瘤、滤泡性混合小裂细胞和大细胞(follicular,mixed small cleaved and large cell)淋巴瘤、滤泡性主要大细胞型(follicular,predominantly large cell)淋巴瘤、滤泡性主要小裂细胞型(follicular,predominantly small cleaved cell)淋巴瘤、巨滤泡性(giant follicle)淋巴瘤、巨滤泡性(giant follicular)淋巴瘤、肉芽肿淋巴瘤、组织细胞性淋巴瘤、大细胞淋巴瘤、免疫母细胞性淋巴瘤、大裂细胞淋巴瘤、大无裂细胞(large non-cleaved cell)淋巴瘤、Lennert淋巴瘤、淋巴母细胞淋巴瘤、中间淋巴细胞(lymphocytic,intermediate)淋巴瘤;中间分化淋巴细胞(lymphocytic,intermediately differentiated)淋巴瘤、浆细胞样淋巴瘤;低分化淋巴细胞(poorly differentiated lymphocytic)淋巴瘤、小淋巴细胞淋巴瘤、高分化淋巴细胞(well differentiated lymphocytic)淋巴瘤、牛淋巴瘤;黏膜相关淋巴组织(MALT)淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、外套层(mantle zone)淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、地中海淋巴瘤、混合淋巴细胞-组织细胞性淋巴瘤、结节性淋巴瘤、浆细胞样淋巴瘤、多形性(pleomorphic)淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、原发性积液淋巴瘤、小B细胞淋巴瘤、小裂细胞淋巴瘤、小无裂细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤;卷曲T细胞(convoluted T cell)淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、小淋巴细胞性T细胞淋巴瘤、未定义的(undefined)淋巴瘤、未分化的u细胞(u-cell,undifferentiated)淋巴瘤、aids相关淋巴瘤、中枢神经系统淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、积液(基于体腔的)淋巴瘤、胸腺淋巴瘤和皮肤T细胞淋巴瘤。

[0263] 可以靶向的白血病和其他血细胞恶性肿瘤包括急性淋巴母细胞白血病、急性髓性白血病、急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病、毛细胞白血病、红白血病、淋巴母细胞白血病、髓性白血病、淋巴细胞性白血病、髓细胞性白血病、白血病、毛细胞白血病、T细胞白血病、单核细胞白血病、成髓细胞白血病、粒细胞白血病、gross白血病、手镜细胞(hand mirror-cell)白血病、嗜碱细胞性白血病、成血细胞(haemoblastic)白血病、组织细胞性白血病、白细胞减少性(leukopenic)白血病、淋巴性(lymphatic)白血病、Schilling白血病、干细胞白血病、粒单核细胞(myelomonocytic)白血病、单核细胞白血病、幼淋巴细胞白血病、早幼粒细胞白血病、小原粒细胞(micromyeloblastic)白血病、原巨核细胞(megakaryoblastic)白血病、巨核细胞白血病(megakaryocytic)、Rieder细胞白血病、牛白血病、非白血性(aleukemic)白血病、肥大细胞白血病、中幼粒细胞(myelocytic)白血病、浆细胞白血病、subleukaemic白血病、多发性骨髓瘤、非淋巴细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、真性红细胞增多症、淋巴瘤、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤(惰性和高分级形式)、多发性骨髓瘤、Waldenstrom巨球蛋白血症(Waldenstrom'smacroglobulinaemia)、重链病、骨髓增生异常综合征、脊髓发育不良和慢性中幼粒细胞白血病。

[0264] 可以治疗的脑和中枢神经系统(CNS)癌症和肿瘤包括星形细胞瘤(包括小脑的星形细胞瘤和大脑的星形细胞瘤)、脑干神经胶质瘤、脑肿瘤、恶性神经胶质瘤、室管膜瘤、胶质母细胞瘤、髓母细胞瘤、幕上原始神经外胚叶肿瘤、视觉通路和下丘脑神经胶质瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、室管膜瘤、脑干神经胶质瘤、视觉通路和下丘脑神经胶质瘤、颅外生殖细胞瘤、髓母细胞瘤、骨髓增生异常综合征、少突胶质细胞瘤、骨髓增生异常/骨髓增生性疾病、髓细胞性白血病、髓性白血病、多发性骨髓瘤、骨髓增生性疾病、神经母细胞瘤、浆

细胞肿瘤/多发性骨髓瘤、中枢神经系统淋巴瘤、原发性脑肿瘤 (intrinsic brain tumours)、星形细胞脑肿瘤、神经胶质瘤,和中枢神经系统中的转移性肿瘤细胞侵袭。

[0265] 可以治疗的胃肠癌症包括肝外胆管癌、结肠癌、结肠和直肠癌、结直肠癌、胆囊癌、胃癌 (gastric (stomach) cancer)、胃肠类癌肿瘤、胃肠类癌肿瘤、胃肠间质瘤、膀胱癌、胰岛细胞癌 (内分泌胰腺)、胰腺癌、胰岛细胞胰腺癌、前列腺癌、直肠癌、唾液腺癌、小肠癌、结肠癌和与结直肠癌变 (colorectal neoplasia) 相关的息肉。

[0266] 可以治疗的肺和呼吸系统癌症包括支气管腺瘤/类癌、食道癌、下咽癌、喉癌、下咽癌、肺类癌肿瘤、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肺小细胞癌、间皮瘤、鼻腔和副鼻窦癌、鼻咽癌、鼻咽癌、口腔癌、口腔和唇癌、口咽癌;副鼻窦和鼻腔癌和胸膜肺母细胞瘤。

[0267] 可以治疗的尿路和生殖系统癌症包括宫颈癌、子宫内膜癌、卵巢上皮癌、性腺外生殖细胞瘤、颅外生殖细胞瘤、性腺外生殖细胞瘤、卵巢生殖细胞瘤、妊娠滋养细胞瘤、脾癌、肾癌、卵巢癌、卵巢上皮癌、高级别浆液性卵巢癌、卵巢生殖细胞瘤、卵巢低恶性潜能肿瘤、阴茎癌、肾细胞癌 (包括上皮癌)、肾细胞癌、肾盂和输尿管癌 (移行细胞癌)、肾盂和输尿管的移行细胞癌、妊娠滋养细胞瘤、睾丸癌、输尿管和肾盂癌、移行细胞癌、尿道癌、子宫内膜癌、子宫肉瘤、阴道癌、外阴癌、卵巢癌、原发性腹膜上皮赘生物、宫颈癌、子宫癌和卵巢滤泡中的实体瘤、浅表性膀胱肿瘤、侵袭性膀胱移行细胞癌和肌肉侵袭性膀胱癌。

[0268] 可以治疗的皮肤癌和黑色素瘤 (以及非黑色素瘤) 包括皮肤T细胞淋巴瘤、眼内黑色素瘤、人类皮肤角质形成细胞的肿瘤进展、基底细胞癌和鳞状细胞癌。可以被靶向的肝癌包括肝外胆管癌和肝细胞癌。可以被靶向的眼癌包括眼内黑色素瘤、视网膜母细胞瘤和眼内黑色素瘤。

[0269] 可以治疗的激素性癌症 (Hormonal cancer) 包括: 甲状旁腺癌、松果体和幕上原始神经外胚叶肿瘤、垂体瘤、胸腺瘤和胸腺癌 (thymoma and thymic carcinoma)、胸腺瘤、胸腺癌 (thymus cancer)、甲状腺癌、肾上腺皮质癌和产促肾上腺皮质激素 (ACTH) 肿瘤 (adrenocorticotrophic hormone (ACTH) -producing tumours)。

[0270] 可以被靶向的各种其他癌症包括晚期癌症、AIDS相关癌症、肛门癌、肾上腺皮质癌、再生障碍性贫血、苯胺诱发和槟榔诱发的癌症 (aniline-induced and betel-induced cancers)、菱叶性颊癌 (buyo cheek)、髓状癌、扫烟囱工人癌 (chimney-sweeps' carcinoma)、烟管诱发的癌症 (clay pipe-induced cancer)、胶样癌、囊性癌、分支乳头 (dendritic) 癌、配偶癌 (cancer a deux)、管状癌、染工 (dye workers) 癌、脑样 (encephaloid) 瘤、铠甲状癌、子宫内膜癌、内皮癌、上皮癌、腺癌、原位癌、Kang癌、Kangri 癌、潜伏 (latent) 癌、髓样癌、黑色素瘤、纺棉工 (mule-spinners') 癌、隐匿性癌 (occult cancer)、石蜡癌、沥青工 (pitch workers') 癌、瘢痕癌、血吸虫性膀胱癌、硬癌、淋巴结癌、软 (soft) 癌、煤烟癌、梭形细胞癌、沼泽 (swamp) 癌、焦油癌,和管癌 (tubular cancers)。

[0271] 可以被靶向的各种其他癌症还包括类癌 (胃肠类癌和支气管类癌)、Castleman病、慢性骨髓增生性疾病、腱鞘透明细胞肉瘤、尤因肿瘤家族 (Ewing's family of tumours)、头颈癌、唇和口腔癌、原发灶不明的转移性鳞状颈癌 (metastatic squamous neck cancer with occult primary)、多发性内分泌瘤变综合征、Wilms肿瘤、蕈样肉芽肿、嗜铬细胞瘤、Sezary综合征、幕上原始神经外胚叶肿瘤、原发部位不明的肿瘤、腹膜积液、恶性胸腔积液、滋养细胞赘生物和血管外皮细胞瘤。

[0272] 特别地,癌症可以包括但不限于以下任何一种:肺癌、乳腺癌、卵巢癌、头颈癌、胰腺癌、上皮瘤、肉瘤、神经母细胞瘤、前列腺癌、结直肠癌、胃癌、小肠癌、肝癌、骨癌、睾丸癌、肾癌、甲状腺癌。

[0273] 用于确定受试者对治疗的适合性的方法

[0274] 本发明的另一方面提供了确定受试者对用本发明的免疫反应性细胞进行治疗的适合性的方法。方法可以包括监测以下基因中的至少两个、三个、四个或全部五个的共表达:PGK1、SLC2A1、CA9、ALDOA和VEGFA,其中所述基因在所述受试者中的共表达指示受试者对治疗的适合性。与健康对照中的基因表达水平相比,上文提及的基因的表达水平可能增加或变化。

[0275] 另外地或可选地,受试者对用本发明的免疫反应性细胞进行的治疗的适合性可以通过对来自受试者的活组织检查组织进行免疫组织化学染色并评估肿瘤或基质中的HIF稳定化和/或监测T细胞(和/或其他免疫反应性细胞)向肿瘤的HIF稳定化区域的浸润来确定。免疫反应性细胞向肿瘤的HIF稳定化区域的浸润指示受试者对用包含HypoxiCAR系统的本发明的免疫反应性细胞进行的治疗的适合性。

[0276] 试剂盒

[0277] 本发明的另一方面提供了一种试剂盒,所述试剂盒包含以下中的任何一种或更多种:本发明的多肽、核酸、构建体、载体、CAR、免疫反应性细胞和/或药物组合物。

[0278] 核酸、多肽、CAR构建体、CAR载体可以组合在试剂盒中,提供该试剂盒是为了原位产生本发明的免疫反应性细胞。

[0279] 用途

[0280] 本发明的另一方面提供了根据本发明的免疫反应性细胞或包含其的药物组合物在治疗癌症,特别是实体癌中的用途。

[0281] 还提供了根据本发明的多肽、核酸、构建体、载体、CAR和免疫反应性细胞在治疗癌症,特别是实体癌中的用途,或包含其的药物组合物在治疗癌症,特别是实体癌中的用途。

[0282] 本发明还提供了本发明的调节核酸在低氧条件下驱动与相同条件下相应的未修饰野生型对应物相比增加的CAR表达的用途。当靶向瞬时或低水平低氧时,当靶向低密度抗原时,以及当使用弱治疗剂诸如弱CAR时,使用本发明的低氧反应性调节序列是特别有利的。

[0283] 还提供了根据本发明第一方面的低氧反应性调节核酸在阻止或减少强直CAR信号传导(tonic CAR signalling)中的用途。还提供了本发明的双重感知系统(即,使用低氧反应性调节核酸与使用一种或更多种ODD的联合)在阻止强直CAR信号传导中的用途。

[0284] 有利地,通过本发明的双重感知系统基本上阻止或减少了强直CAR信号传导。在CAR T细胞的离体扩增期间和在它们的体内输注之后,CAR T细胞中的强直抗原非依赖性信号传导可增加T细胞的分化和消耗,导致降低的体内效力。这种基础的强直信号传导通常由于CAR的高细胞表面密度和自聚集特性而存在。有利地,在本发明的方法中,除非在低氧环境中,即实体瘤中,否则包含编码CAR的DNA的免疫反应性细胞不在其细胞表面上表达任何CAR(或仅表达极少量的CAR)。当在低氧区域或在肿瘤微环境中发现这种CAR T细胞时,它会在其表面上以高密度表达CAR,如果抗原靶存在的话,这导致持续的T细胞激活和T细胞介导的肿瘤杀伤。

[0285] 贯穿本说明书的描述和权利要求书,词语“包含(comprise)”和“含有(contain)”以及所述词语的变化形式,例如“包含(comprising)”和“包含(comprises)”意指“包括但不限于”并且不排除其他组分、整数或步骤。此外,单数包括复数,除非上下文另有要求:特别地,在使用不定冠词的情况下,除非上下文另有要求,否则说明书应理解为考虑复数以及单数。

[0286] 本发明每个方面的优选特征可以与任何其他方面联合进行描述。在本申请的范围内,明确地意图在前面的段落、在权利要求书和/或在以下的描述和附图中陈述的各个方面、实施方案、实例和替代方案,并且特别是其各个特征,可以独立地或以任何组合采用。也就是说,所有实施方案和/或任何实施方案的特征可以以任何方式和/或组合进行组合,除非这样的特征是不相容的。

[0287] 附图简述

[0288] 本发明的一种或更多种实施方案现将参照附图,仅以实例的方式被描述,其中:

[0289] 图1示出CAR T细胞免疫疗法的示意性表示。在CAR T细胞免疫疗法的实践中,T细胞从癌症患者中分离并经离体遗传修饰,例如使用逆转录病毒颗粒或慢病毒颗粒或者RNA电穿孔进行离体遗传修饰。通过这种手段,T细胞被工程化以表达对感兴趣的肿瘤抗原具有特异性结合亲和力的嵌合受体(CAR)。在这种遗传修饰之后,产生的表达CAR的T细胞使用适当的细胞因子进行扩增,并且扩增的群体被重新输注回患者中,引起T细胞介导的癌症靶向。

[0290] 图2示出哺乳动物细胞中氧感知的示意性表示。在常氧条件下(左),HIF1 α 在需氧的过程中被PHD酶羟基化。羟基化的HIF1 α 然后能够与pVHL泛素连接酶结合,pVHL泛素连接酶在HIF1 α 分子上添加泛素,导致HIF1 α 为蛋白酶体降解。在低氧条件下(右),由于氧缺乏,HIF1 α 羟基化和降解被阻断,导致HIF1 α 的稳定化。稳定化的HIF1 α 然后易位到核,在那里HIF1 α 与HIF1 β 和其他分子(诸如P300和CBP)形成复合物。然后,这种复合物能够与存在于低氧诱导基因上游的HIF-结合位点(HRE)结合并激活它们的转录。

[0291] 图3示出本发明系统的示意性表示,其中细胞毒性T淋巴细胞(CTL)当在循环中或在正常氧张力下的组织中时,不会在其表面上表达任何人工受体。然而,当CTL位于低氧区域时,CTL会表达对感兴趣的癌症抗原具有特异性结合亲和力的细胞表面CAR。因此,由于低氧反应性调节核酸的存在,只有当低氧和感兴趣的抗原二者都存在时,才会发生CTL介导的杀伤。

[0292] 图4示出HIF结合或辅助位点中的核苷酸的频率标识(logos):A.人类低氧诱导基因中HIF结合核苷酸的频率,B.小鼠低氧诱导基因中HIF结合核苷酸的频率,C.低氧诱导基因中HIF辅助核苷酸的频率。每个字母的高度代表每个位置中相应核苷酸的出现频率。

[0293] 图5示出3串联HRE设计的实例。人类促红细胞生成素(hEPO)HRE包括串联的3个HRE,其中每个单独的HRE包括源自人类EPO基因的HIF结合序列-接头-HIF辅助序列。人类血管内皮生长因子A(hVEGFA)HRE包括串联的3个HRE,其中每个单独的HRE包括源自人类VEGFA基因的HIF结合序列-接头-HIF辅助序列。人类葡萄糖转运蛋白3(hGLUT3)HRE包括串联的3个HRE,其中每个单独的HRE包括源自人类GLUT3基因的HIF结合序列-接头-HIF辅助序列。

[0294] 图6示出用于优化技术的构建体的线性图谱表示:A.包含叩头虫(click beetle)萤光素酶(cb1uc)和增强型绿色荧光蛋白(eGFP)cDNA(报告物SFG)的长末端重复序列(LTR)

未修饰的SFG报告物逆转录病毒构建体,B.其中hEPO HRE已插入3' LTR内的修饰报告物SFG载体,C.其中hVEGF HRE已插入3' LTR内的修饰报告物SFG载体,D.其中hGLUT3 HRE已插入3' LTR内的修饰报告物SFG载体。

[0295] 图7示出HIF1 α 氨基酸序列(UniProt数据库)。

[0296] 图8示出用于优化技术的其他构建体的线性图谱表示:A.包含cbluc萤光素酶-ODD融合的报告物SFG载体,B.包含cbluc萤光素酶-ODD融合和hEPO HRE LTR修饰的报告物SFG载体,C.包含cbluc萤光素酶-ODD融合和hVEGF HRE LTR修饰的报告物SFG载体,D.包含cbluc萤光素酶-ODD融合和hGLUT3 HRE LTR修饰的报告物SFG载体。

[0297] 图9示出蛋白印迹结果。这些结果代表了在0.1%氧气和20%氧气中孵育后于细胞系(293T、HT1080、T47D和Jurkat)中检测到的HIF1 α 蛋白水平(和 β -肌动蛋白参考)。柱状图描绘了HIF1 α 条带的强度。这是通过对条带作图并使用ImageJ计算曲线下面积(AUC)来计算的。

[0298] 图10示出设门策略(gating strategy)和通过测量转导的细胞的eGFP荧光信号(图6和图8)确定的转导效率(未修饰的SFG报告物构建体的转导效率)。对7-AAD阴性的细胞(活细胞)设门并用于在直方图中评估eGFP荧光。

[0299] 图11示出qPCR测定验证。该图示出热循环数与以纳克计的DNA量(对数标度)之间的线性($y=x$)关系用于检测转导的细胞中基因组TATA框结合蛋白基因(TBP)和萤光素酶(luc;由构建体编码)。

[0300] 图12示出与其各自的正常氧条件(左侧柱)相比,在5%(A)、1%(B)和0.1%(C)氧(右侧柱)孵育18小时后从293T细胞获得的相对光单位(RLU)数据。

[0301] 图13示出对于所示构建体,在100 μ M或0 μ M氯化钴中培养293T细胞18小时后获得的相对光单位(RLU)数据。

[0302] 图14示出健康小鼠组织中ErbB受体(egfr和erbb2-4)和整合素 β 6(intgb6)基因的mRNA表达。在这个实验中,总共分析了13种组织。组织根据其中每种mRNA相对于管家基因Tbp的表达水平进行排序。

[0303] 图15示出在常氧条件下,3个和9个HRE拷贝对比对照(组成型)在萤光素酶表达中的影响。纳入HRE显著地使下游报告物转基因(萤光素酶)的表达沉默。NT:非转导的;组成型:野生型非HRE修饰的LTR;3HRE:修饰以包含3个串联HRE元件的LTR;9HRE:修饰以包含9个串联HRE元件的LTR。HRE元件源自人类EPO基因启动子。通过修饰LTR(逆转录病毒启动子)以包含多个HRE,萤光素酶的表达在常氧条件下显著降低。

[0304] 图16示出低氧条件下萤光素酶表达的倍数诱导(通过将低氧条件下的基因表达除以常氧条件下观察到的基因表达来计算)。组成型:野生型非HRE修饰的LTR;3HRE:修饰以包含3个串联HRE元件的LTR;9HRE:修饰以包含9个串联HRE元件的LTR。在低氧条件下(0.1% O₂),萤光素酶的表达与启动子中包含的HRE数目相关。

[0305] 图17示出在包含未修饰的LTR的SFG载体中,将不同长度的人类HIF1 α ODD(指示了氨基酸数目)融合至叩头虫萤光素酶的C-末端的影响。评估了常氧条件下的基因表达。组成型:没有ODD添加对比不同的所指示长度的ODD与萤光素酶的融合。

[0306] 17A:包含融合在叩头虫萤光素酶的C末端的可变ODD的构建体。

[0307] 17B:用A中所示的构建体转导的T47D细胞、非转导(NT)细胞或组成型转导细胞(野

生型非ODD修饰的叩头虫萤光素酶)在低氧(0.1%氧气)中暴露18h。倍数诱导是相对于每种构建体中的常氧表达在低氧中观察到的萤光素酶表达诱导。 $N=3$,线=平均值和误差线SEM。

[0308] 图18示出9HRE启动子架构与融合至萤光素酶C末端的人类HIF1 α ODD(氨基酸401-603)的组合。这种双重氧感知系统在常氧条件下没有显示出可检测到的萤光素酶表达,但在低氧条件下(0.1%氧气)被开启。

[0309] 图19示出i.v.输注后,T4-CAR T细胞急剧地驻留在肝和肺中。共表达萤光素酶报告物的T4-CAR T细胞经i.v.注射至荷有已确定的皮下SKOV3肿瘤的NSG免疫受损小鼠中。用IVIS生物发光成像仪追踪CAR T细胞。

[0310] (a)示出在输注后4天,荷有皮下植入的已建立的SKOV3人类卵巢瘤的三只小鼠(左)和来自代表性小鼠的经解剖的器官/肿瘤(右)中的T4-CAR T细胞内表达的萤光素酶的所检测到的光(图中以蓝色/绿色显示)。

[0311] (b)每个所指示的器官中萤光素酶信号的定量($n=6$ 只单独的小鼠)。如在输注后4天的时间点可以观察到的,这些细胞优先驻留在肺和肝中,而不是肿瘤中。

[0312] (c) T4-CAR T细胞对由ErbB受体家族形成的8个同二聚体和异二聚体具有特异性,ErbB受体家族由大多数(如果不是全部的话)上皮细胞表达。对重要器官的ErbB家族的mRNA表达分析(相对于管家基因Tbp来呈现)展示出,肺和肝(T4-CAR T细胞最初积累的地方)二者都是CAR配体的丰富来源。 $N=6$ (组合的生物学重复)。

[0313] 图20示出在暴露于0.1%氧气(例如低氧条件; $n=3$ 个单独的CAR制备物)后20h,所指示的组中设门的可检测CAR T细胞上CAR表达的中值荧光强度(MFI)。“T4”用标准SFG载体(基于LTR的逆转录病毒启动子)表达,并且“HRE-CAR”用修饰的SFG载体(9x HRE元件插入SFG载体的LTR中)表达。编码的HRE CAR不包含另外的ODD。预期不到的是,在HRE-CAR组中,CAR表达的中值荧光强度(MFI)更大。

[0314] 图21示出HypoxiCAR T细胞效应物功能严格受限于低氧条件:(a)描绘了被转导至人类T细胞中的CAR构建体(具有串联的9x HRE,未示出)及其模块化排列(当整合至基因组中时)的示意图;LTR-长末端重复序列。(b)评价表面CAR和CD8 α (以鉴定CD8 $^+$ T细胞)的代表性流式细胞术点图。数据展示出在染色和流式细胞术分析之前,在常氧或低氧(0.1%O₂)条件下维持18h的活(7AAD $^-$)CD3 $^+$ T4-CAR、HypoxiCAR或非转导的T细胞的CAR表达。(c-h)健康供体CD3 $^+$ T细胞($n=6$)被转导以产生T4-CAR或HypoxiCAR T细胞,并且(c)被置于0.1%O₂低氧条件中持续最高18h,然后被转移回常氧条件,其中在所指示的时间使用流式细胞术分析评价CAR表达。(d)来自图(c)的暴露于0.1%O₂低氧18h时,T4-CAR和HypoxiCAR T细胞上CAR表达的中值荧光强度(MFI)。(e)暴露于递减O₂浓度18h后,HypoxiCAR T细胞上可检测到的表面CAR表达;与常氧条件下的表达相比评估统计学显著性。(f)在常氧和0.1%O₂低氧条件下,在所指示的时间,T4-CAR、HypoxiCAR或CD3-截短的HypoxiCAR(去除CD3 ζ 胞内结构域(endodomain)以阻止细胞内信号传导)T细胞的体外SKOV3肿瘤细胞杀伤。从(f)中使用的T细胞释放的IL-2(g)和IFN- γ (h)的定量。对暴露于SKOV3细胞后72h收集的培养基进行ELISA分析,与使用未转导的T细胞(“T细胞”)进行的共培养物进行比较。显示了进行的所有统计学比较。柱状图上的柱示出了组平均值,并且每个点代表组中的单独健康供体。* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$ 。

[0315] 图22在图A)中示出了整合至T细胞的基因组中时的HypoxiCAR逆转录病毒构建体的示意图。HypoxiCAR T细胞通过i.v.或i.t.注射至荷有HN3肿瘤的NSG小鼠中。B)输注后24小时,将肿瘤切下,酶消化并对感兴趣的标志物进行染色,然后进行流式细胞术分析。示出了驻留在所指示的组织中的设门HypoxiCAR T细胞(CD3⁺和CD45⁺),评估了其细胞表面CAR表达(直方图的x轴)。CAR表达仅在驻留于肿瘤内的T细胞中检测到。C)表面CAR表达的定量(如B中所观察到的),其中每个点代表每个相应组织的单只小鼠。

[0316] 图23示出HypoxiCAR在SKOV3和LL2肿瘤中提供肿瘤选择性CAR表达:(a)在NSG小鼠中生长的SKOV3肿瘤的生长曲线(n=6只小鼠)。(b)代表性的堆叠直方图,示出在处死前24小时i.v.和i.t.注射HypoxiCAR T细胞的荷有SKOV3肿瘤的小鼠的酶分散组织和血液中可检测到的细胞表面HypoxiCAR表达。直方图示出设门的活(7AAD⁻)Ter119⁻CD45⁺CD3⁺T细胞连同CAR同种型染色肿瘤(灰色直方图)(左)以及在相应组织中具有可检测到的CAR的T细胞百分比的全队列定量(跨越n=6只单独的小鼠)。(c)与b中所描述等同但是使用荷有LL2肿瘤的Rag2^{-/-}小鼠的等同实验,示出了相应组织内的T细胞的代表性细胞表面HypoxiCAR表达(左)和表达CAR的HypoxiCAR T细胞的百分比的定量(右)(跨越n=3只单独的小鼠)。柱状图上的柱示出了组平均值,并且每个点代表组中单只健康小鼠。*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001,****P<0.0001。

[0317] 图24:T4-CAR T细胞在健康器官中引起炎症。(A)描绘了T4-CAR的图。(B)显示使用流式细胞术评估的活(7AAD⁻)CD3⁺T4-CAR或非转导的人类T细胞上细胞表面CAR表达的代表性直方图。(C-E)皮下HN3肿瘤细胞接种后的第13天,用媒介物或10x10⁶非转导的或T4-CAR T-细胞对小鼠进行i.v.输注(n=5)。(C)描绘了实验的示意图。(D)小鼠的体重变化。箭头指示T细胞输注;十字指示动物因超出人道终点而被剔除(culled)。(E)输注后24h的血清细胞因子。(F)将低剂量人类ErbB-CAR/Luc T细胞(4.5x10⁶)i.v.输注至荷有SKOV3肿瘤的NSG小鼠中,并且4天后,对全身和解剖的器官进行生物发光成像。(G)将光子/s/单位面积定量为所有器官的百分比(n=6),LN-腹股沟淋巴结,SI-小肠。(H,I)i.v.输注低剂量(4.5x10⁶个细胞)T4-CAR或未转导的T细胞或媒介物后5天的H&E染色切片(左)以及肺(H)和肝(I)中髓系浸润(myeloid infiltration)的定量(右)。箭头指示髓系浸润。(J,K)荷瘤NSG小鼠中的对组织切片的还原-激活的哌莫硝唑的免疫组织化学(IHC)染色(J)和染色的定量(K)。所有的实验都代表生物学重复。线图,点标示平均值,并且误差线代表s.e.m。柱状图示出了平均值并且点示出了单只小鼠。*P<0.05,**P<0.01。

[0318] 图25:HypoxiCAR T细胞效应物功能严格受限于低氧。(A)描绘了常氧和低氧条件下HypoxiCAR的图表。(B)示出使用流式细胞术评估的常氧或18h低氧(0.1%O₂)条件下活(7AAD⁻)CD3⁺T4-CAR、HypoxiCAR和非转导的人类T细胞上的细胞表面CAR表达的代表性直方图。(C)使用流式细胞术分析评估的在低氧(0.1%O₂)或常氧条件下在所指示的时间HypoxiCAR T细胞上的表面CAR表达。值针对18h低氧时观察到的那些值(n=6)进行归一化。(D)暴露于0.1%、1%、5%、20%O₂ 18h后,HypoxiCAR T细胞上的表面CAR表达(n=6)。值针对0.1%O₂中观察到的那些值进行归一化。(E-G)在常氧和0.1%O₂低氧条件中,T4-CAR、HypoxiCAR、CD3 ζ -截短的HypoxiCAR(CD3⁻;以阻止细胞内信号传导)和非转导的T细胞(CAR⁺效应物与靶肿瘤细胞的比例为1:1)的体外SKOV3肿瘤细胞杀伤。在常氧和0.1%O₂低氧条件下,分别地暴露于SKOV3细胞24h和48h后,从相应T细胞释放至培养基中的(F)IL-2和(G)IFN

γ 的定量。图上的柱示出了平均值,并且点代表每个单独的健康供体。数据点是平行收集的,并且代表生物学重复。在线图中,点标示平均值并且误差线代表s.e.m。*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001、****P<0.0001。

[0319] 图26:HypoxiCAR T细胞提供抗肿瘤功效而无全身毒性。(A-C) 荷有皮下HN3肿瘤的NSG小鼠在处死前72h经i.v.和i.t.二者注射人类HypoxiCAR T细胞(2.5×10^5 个细胞i.t.和 7.5×10^5 个细胞i.v.)。(A) 描绘了实验的示意图。(B) 示出在所指示的酶分散组织和血液中的存活有核细胞(7AAD⁻, Ter119⁻)、CD45⁺CD3⁺HypoxiCAR T细胞上的表面CAR表达的代表性直方图,以及(C)跨越n=9只单独的小鼠的相应组织中的定量。(D-F) 皮下HN3肿瘤细胞接种后16天,小鼠用媒介物或 10×10^6 个T4-CAR、HypoxiCAR或非转导的人类T细胞(对照)进行i.v.注射(n=4只小鼠)。(D) 描绘了实验的示意图。(E) 小鼠的体重变化。(F) 输注后24h的血清细胞因子。(G、H) 低剂量(4.5×10^6 个)T4-CAR或HypoxiCAR T细胞i.v.输注到NSG小鼠中。五天后,将所指示的组织切下,并在肺(G)和肝(H)中对髓系浸润进行评分。(I) 来自(D-F)的HN3肿瘤生长曲线,箭头标示CAR T细胞输注的点。所有的实验都代表生物学重复。柱状图示出了平均值并且每个点示出了单只小鼠。在线图中,点标示平均值,并且误差线代表s.e.m。*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001。

[0320] 图27:T细胞不被排除在低氧的头颈鳞状细胞癌(SCCHN)的HIF1 α 稳定化区域之外。(A-C) 从SCCHN肿瘤(n=528)中已知的HRE调节基因构建了HRE调节基因特征(signature)。(A) 显示单个基因的皮尔逊相关系数的热图。(B) 基于肿瘤(T)分期的特征表达(T1 n=48, T2 n=136, T3 n=99, T4 n=174)。(C) HRE调节基因特征高表达和低表达的3期和4期SCCHN患者的生存曲线(n=87, 分别地)。(D) HIF1 α (红色)和CD3(棕色)的代表性IHC染色的SCCHN切片(n=60)。(E-F) SCCHN肿瘤中上皮内T细胞(IET)的丰度被分组为低/不存在(n=40)和高(n=55)。IET的实例在(D)中用黑色箭头标示。IET数目针对肿瘤的HIF1 α 稳定化(H)评分进行评估(E)。对于存在大量IET的肿瘤,肿瘤浸润淋巴细胞直接浸润的肿瘤HIF-1 α 稳定化区域(H-TIL)被分组为不存在(n=55个肿瘤中的6个)或存在(n=55个肿瘤中的46个)。在(D)中,H-TIL的实例用白色箭头标示。H-IET数目针对肿瘤的H评分进行评估(F)。(G) 用DAPI(核;蓝色)和抗CD3(绿色)和HIF1 α (红色)的抗体染色的口腔舌癌的共聚焦图像;白色指示CD3和HIF1 α 共定位。框图示出了中值和上/下四分位值,须状线示出了最高值和最低值。*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001。

[0321] 图28:HypoxiCAR T细胞提供了针对已建立的SKOV3肿瘤的抗肿瘤功效。人类HypoxiCAR T细胞(10×10^6 个i.v.)或非转导的对照T细胞i.v.注射到荷有已确定的皮下SKOV3肿瘤的NSG小鼠中。图示出小鼠的相应队列的生长曲线。箭头标示了CAR T细胞输注的点。点标示了平均值并且误差线标示了s.e.m。

[0322] 图29:在常氧(20%氧气)或低氧条件(0.1%氧气)下,用SCOV3靶细胞系以所指示的CAR+效应物与靶的比例培养T4(组成型非HRE修饰的)或经HRE修饰的(单独的HRE,缺乏ODD)CAR T细胞24小时。A. 示出24h共培养后共培养物中活的靶的百分比和B. 示出靶对T细胞的抗原特异性刺激后共培养物中释放的IL-2。示出的数据是图A的使用来自4个独立供体的T细胞的n=4个独立实验的平均值,以及图B的使用来自3个独立供体的T细胞的n=3个独立实验的平均值。误差线示出了SEM。

实施例

[0323] 现在将通过参考以下实施例来描述本发明。

[0324] 材料和方法

[0325] 构建体

[0326] 三种HRE序列由GeneArt (ThermoFisher Scientific) 合成, 并且侧翼是NheI和XbaI限制性位点, 三种HRE序列各自包含来自人类EPO、VEGFA和GLUT3的串联的三个HBS。这些序列被亚克隆并替换了SFG Moloney鼠白血病病毒质粒的3' LTR内的天然NheI/XhoI序列。3' LTR的特异性修饰通过使用包含限制性酶位点和相应HRE盒互补序列的引物合成包含HRE的侧翼为XhoI/EcoRI的中间片段实现。片段的重叠PCR和亚克隆实现了插入到SFG载体中。接下来, 编码由P2A分隔的叩头虫萤光素酶和绿色荧光蛋白的发绿色光变体 (green-emitting variant) 的蛋白编码序列被克隆至SFG的NcoI/XhoI位点中。使用购自New England Biolabs的酶和缓冲液在37°C进行限制性消化。在溴化乙锭染色的1.2%琼脂糖凝胶中检测DNA, 并且切下根据DNA梯状条带 (ladder) 评估的合适尺寸的条带, 并使用QIAquick凝胶提取试剂盒 (Qiagen) 从凝胶中提取。粘性末端连接由T4DNA连接酶 (ThermoFisher Scientific) 在16°C催化1小时。

[0327] CAR/报告物构建体克隆

[0328] 包含人类T1E CAR的SFG逆转录病毒载体被修饰以产生本研究中使用的构建体。编码来自人类HIF1 α 的氨基酸401-603 (SEQ ID NO:29) 的全长ODD cDNA被合成为gBlock[®] (Integrated DNA Technologies), 并且使用Platinum Pfx DNA聚合酶 (Thermo Fisher Scientific) 根据制造商的说明用引物5' - TCCAGCGCTGGGGCGCGAGGGGGCAGGGCC - 3' 和5' - GGCCCTGCCCCCTCGCGCCCCAGCCGCTGGA - 3' 通过重叠PCR附加到T1E CAR内的CD3 ζ 的C末端。PCR产物在1.2%琼脂糖 (Sigma-Aldrich) 凝胶上运行, 并且产物尺寸针对1kb Plus DNA梯状条带 (Thermo Fisher Scientific) 进行估算。使用QIAquick[®] 凝胶提取试剂盒切下并纯化预期尺寸的片段。使用AgeI和XhoI限制性核酸内切酶 (New England Biolabs) 裂解SFG质粒中的AgeI和XhoI限制性酶位点以及已经构建到T1E CAR-ODD cDNA中的那些, 将T1E CAR-ODD克隆至SFG载体中。已被限制性核酸内切酶消化的载体和构建体使用QIAquick PCR纯化试剂盒 (QIAGEN) 纯化并使用T4连接酶 (Thermo Fisher Scientific) 进行连接, 然后转化到One Shot Stbl3[™]化学感受态大肠杆菌 (E.coli) (Thermo Fisher scientific) 中。转化的大肠杆菌使用含有氨苄青霉素 (Santa Cruz Biotechnology) 的Luria Bertani (LB) 琼脂 (Sigma-Aldrich) 板进行选择。转化的菌落在具有100 μ g/ml氨苄青霉素的LB肉汤 (Sigma-Aldrich) 中生长, 并且然后用QIAGEN质粒Midi或Maxi试剂盒纯化。最终构建体经过序列验证 (Source BioScience)。使用类似的方法, 进行了以下另外的修饰: 组成型报告物构建体使用由病毒P2A序列分隔的叩头虫萤光素酶 (Luc) 和eGFP产生, 报告物构建体先前在实验室中产生。这通过使用Platinum Pfx DNA聚合酶 (Thermo Fisher Scientific) 根据制造商的方案用正向引物5' - CCATGGTGAAGCGTGAGAAAAATG - 3' 和反向引物5' - CTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC - 3' 进行的PCR扩增来实现。扩增产物用NcoI和XhoI (New England Biolabs) 消化, 并使用NcoI和XhoI和T4 DNA连接酶 (Thermo Fisher Scientific) 克隆至SFG载体中。全长ODD (如上文描述的) 也通过重叠PCR附加至来自报告物构建体的Luc

的C-末端,所述重叠PCR使用以下引物以扩增侧翼为互补突出端(overhang)的ODD:正向5'-GAGAAGGCCGCGGTGCCCCAGCCGCTGGA-3'和反向5'-CCTCAAAGCACAGTTACAGTATTCAGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAG-3'。随后,进行使用以下引物:正向5'-CCATGGTGAAGCGTGAGAAAAATG-3'和反向5'-CTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC-3'的重叠融合PCR以产生侧翼为NcoI和XhoI限制性位点的编码萤光素酶-ODD-P2A-eGFP的片段,所述NcoI和XhoI限制性位点用于将萤光素酶-ODD-P2A-eGFP插入SFG载体中。HRE修饰被靶向于SFG逆转录病毒载体的3' LTR,因为3' LTR区域在整合后被拷贝到5' LTR。包含9个串联5'-GGCCCTACGTGCTGTCTCACACAGCCTGTCTGAC-3'HRE基序(包含HIF-结合位点和辅助位点二者)的DNA被合成为gBlock[®](Integrated DNA Technologies),并使用NheI和XbaI限制性核酸内切酶(New England Biolabs)亚克隆至SFG载体的NheI和XbaI限制性核酸内切酶位点之间的3' LTR中。T1E CAR CD3⁻截短的对照构建体被合成为具有侧翼SbfI和XhoI限制性位点的gBlock[®](Integrated DNA Technologies),并使用SbfI和XhoI限制性核酸内切酶(New England Biolabs)亚克隆至HRE修饰的SFG载体中。为了产生双顺反的萤光素酶-T2A-CAR构建体,将被设计为包括侧翼为AgeI和NotI限制性位点的萤光素酶-T2A-T1E肽结合物的gBlock[®](Integrated DNA Technologies)插入T1E CAR构建体中。

[0329] 细菌转化

[0330] One Shot Stbl3化学感受态大肠杆菌(ThermoFisher Scientific)用于转化。将5 μl连接混合物添加到一小瓶在冰上解冻的One Shot Stbl3细胞中。细胞随后在冰上孵育30分钟。接下来,对细胞进行热激(45秒,42°C),置于冰上2分钟,然后添加250 μl的S.O.C.培养基,并且小瓶在37°C的细菌摇床中孵育。将细胞涂布在氨苄青霉素(100 μg/ml)琼脂板上,并在加湿的细菌培养箱中在37°C孵育过夜。挑选菌落并在含有100 μg/ml氨苄青霉素的3ml LB肉汤中生长。使用QIAprep Miniprep试剂盒(Qiagen)根据制造商的方案从细菌中提取DNA。DNA通过nanodrop分光光度计在280nm处进行定量,并通过Source BioScience进行测序。SnapGene软件用于测序比对和验证。

[0331] 细胞系

[0332] 所有细胞系都在加湿培养箱中在37°C和5%CO₂生长。人类胚胎肾(HEK)293、Phoenix-ECO(由Sandra Diebold赠送)、人类纤维肉瘤细胞系HT1080、BW5147.G.1.4(购自ATCC)、Jurkat(克隆E6-1)(ATCC)维持在补充有10%胎牛血清(FCS;Thermo Fisher Scientific)的RPMI 1640培养基(Gibco)中。T47D细胞维持在补充有10%FCS和胰岛素(0.2U/ml)的RPMI 1640培养基(Gibco)中。

[0333] SKOV3人类卵巢腺癌细胞最初购自ATCC,并由ATCC为这项研究重新验证。HN3人类头颈腺癌细胞从伦敦Ludwig Institute for Cancer Research获取,并在D10培养基、补充有10%的FCS的Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM;Gibco)和GlutaMAX(Thermo Fisher Scientific)中生长。鼠Lewis肺癌(LL2)细胞购自ATCC,并在补充有10%FCS的RPMI 1640中培养。对于本研究,使用MycoAlert[®]支原体检测试剂盒(Lonza)确认细胞系不含支原体。

[0334] 小鼠

[0335] NSG(NOD-scid IL2R γ^{Δ})小鼠购自Charles River并且在内部繁殖。Balb/c

Rag2^{-/-}小鼠由Adrian Hayday教授(KCL)赠送。雄性小鼠用于涉及HN3的研究,并且雌性小鼠用于涉及SKOV3的研究以及LL2研究。用于异位肿瘤研究的所有小鼠为6-8周龄,并且重量为约22g。

[0336] 逆转录病毒的产生

[0337] 为了产生对人类细胞具有向性(tropism)的逆转录病毒,通过三重转染产生RD114假型瞬时逆转录病毒颗粒,三重转染使用(6孔板中的每一孔)1.5μg Peq-Pam质粒(Moloney GagPol)、1μg RDF质粒(RD114包膜)和1.5μgSFG质粒,使用FuGENE HD转染试剂转染到50%-60%汇合(confluent)HEK 293T细胞(Promega,US)。将Peq-Pam、RDF和SFG质粒在普通RPMI 1640培养基(Gibco)中在室温(RT)孵育15分钟,并且然后逐滴添加到293T细胞上。48小时后收获含逆转录病毒的上清液,并用于转导人类细胞系。

[0338] 低氧条件

[0339] 低氧室(hypoxia chamber)购自STEMCELL Technologies(加拿大),并用由BOC提供的包含0.1%、1%或5%O₂与恒定的5%CO₂和使用N₂作为平衡的经认证气体进行吹扫(purged)。在第一次吹扫后1小时,根据制造商的方案对室进行再次吹扫。将相同数量的细胞铺板在两块平行的板上,其中一块暴露于低氧条件,并且另一块在常氧维持18小时。然后使用萤光素酶测定(Promega,US)根据制造商的方案在Perkin Elmer融合α-FP板读取仪(Life Sciences)上测量萤光素酶活性。用于评估低氧反应性基因表达的孵育时间基于已知的研究。还使用100μM的终浓度的氯化钴(II)(Sigma-Aldrich,US)(PHD抑制剂)模拟低氧条件。

[0340] 蛋白印迹分析

[0341] 细胞在含有1x浓度蛋白酶抑制剂混合物(Thermo Scientific)的Western裂解缓冲液(2.5ml 1M Tris pH 6.8,1g SDS,5ml甘油,17.5ml水)中裂解。细胞裂解物中的总蛋白使用Pierce BCA蛋白测定试剂盒(ThermoFisher Scientific)进行定量。使用12%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS PAGE)在150V分离来自每个裂解物的10ug蛋白连同SeeBlue预染色的蛋白梯状条带(ThermoFisher Scientific),并在30V转移至活化的PVDF硝酸纤维素膜(Thermo Scientific,Pierce)上2小时。膜用在PBS 0.1%吐温-20中的1%牛奶在RT封闭1h,并且然后与1%牛奶中的兔抗-HIF1α抗体(Novus Biologicals,Littleton,CO)(1:2000)或多克隆抗β-肌动蛋白(1:5000;Abcam)在4℃孵育过夜。洗涤后,用1%的牛奶中的二级抗兔辣根过氧化物酶(HRP)山羊抗兔IgG抗体(1:5000;Invitrogen)孵育膜。接下来,将HRP底物3,3',5,5'四甲基联苯胺(TMB)添加至PVDF膜,并使用CL-XPosure胶片(Thermo Scientific)和蛋白印迹X射线分析仪读取信号。

[0342] 定量PCR

[0343] 使用DNeasy血液&组织试剂盒(QIAGEN,Germany)根据制造商的方案从细胞系中提取基因组DNA,并用nanodrop分光光度计在280nm吸光度进行测量。qPCR使用具有ROX的KiCqStart SYBR Green qPCR ReadyMix(购自Sigma-Aldrich,US)根据制造商的方案进行,使用定制设计的引物从基因组中的Tbp、Luc或T2A序列产生扩增子。所用的引物是:鼠Tbp 5'-TGTCTGTCGACAGTAAGAATGGA-3'和5'-AAAATCCCAGACACGGTGGG-3',人类Tbp 5'-TTTGGTGTTCGCTTCAGTCAG-3'和5'-ATACCTAGAAAACAGGAGTTGCTCA-3',Luc 5'-ATTTGACTGCCGGCGAAATG-3'和5'-AAGATTCATCGCCGACCACAT-3',T2A 5'-CGGAGAAAGCGCAGC-

3'和5'-GGGTCCGGGGTTCTCTT-3'。感兴趣基因的扩增在ABI 7900HT快速实时PCR仪(ThermoFisher Scientific)上检测。

[0344] 定量逆转录PCR

[0345] 处死健康雌性C57BL/6小鼠,并且取出以下器官:乳腺、脂肪、肝、肾、结肠、小肠、胃、骨骼肌、肺、心脏、脑、嗅球和眼(n=13)。将器官浸没在RNAlater(Sigma-Aldrich,US)试剂中以稳定和保护细胞RNA,并在4℃保持过夜。使用PrepEase RNA Spin试剂盒(Affymetrix,US)根据制造商的方案从组织中分离RNA,并使用NanoDrop分光光度计在280nm进行定量。使用EXPRESS One-step Superscript qRT-PCR试剂盒(ThermoFisher Scientific)通过定量逆转录酶PCR在纯化的mRNA中分析ErbB1-4和整合素 β -6mRNA表达,同时根据需要测定感兴趣的基因,所述感兴趣的基因包括:Egfr Mm01187858_m1、ErbB2 Mm00658541_m1、ErbB3Mm01159999_m1、ErbB4 Mm01256793_m1、Itgb6 Mm01269869_m1、Tbp Mm01277042_m1。使用ABI 7900HT快速实时PCR仪(ThermoFisher Scientific)进行qRT-PCR,并在Excel中完成数据分析。RNA储存在-80℃。所有基因的表达相对于管家基因Tata结合蛋白(Tbp)来表示。

[0346] 所用引物的列表:

[0347]

引物名称	序列
Fwd EPO HRE	5' - CCA CCT GTA GGT TTG GCA AGC TAG CGT CCG GGA AAC - 3'
Fwd GLUT3 HRE	5' - CCA CCT GTA GGT TTG GCA AGC TAG CCA CGC CTG TAA TC - 3'
fwd VEGFA HRE	5' - CCA CCT GTA GGT TTG GCA AGC TAG CCC CCC TTT GGG - 3'
Xba HRE 下游的 Fwd frag 3	5' - GAA CCA TCA GAT GTT TCC AGG - 3'
在 eGFP 中结合的 Fwd frag A	5' - ATC CGC CAC AAC ATC GAG - 3'
Rev EPO HRE	5' - CCT GGA AAC ATC TGA TGG TTC TCT AGA CCT CAG GCC CGG - 3'
EcoRI 下游的 Rev frag 3	5' - GCG GGC CTC TTC GCT ATT A - 3'
Nhe HRE 上游的 Rev frag A	5' - TTG CCA AAC CTA CAG GTG G - 3'
来自 p3 p4 p5 的 fwd HRE	5' - GGT GGT ACC GGT CTG TAG GTT TGG CAA GCT AGC - 3'
验证 HRE 取向的 fwd 引物 seq 基因组	5' - GAA AGA CCC CAC CTG TAG GTT T - 3'
Fwd puro 加 AgeI 加缓冲	5' - GCC ACG ACC GGT GCC GCC ACC ATC CCC TGA CCC ACG CC - 3'
fwd tataa 接头 gilbert 重叠	5' - GGG TAT ATA ATG GAA GCT CGA ATT CTA GCG - 3'
fwr HRE 重叠和跳过 Nco	5' - CGA AAG GAG CGC ACG ACC AAT TCA ATT GGC CCT ACG TG - 3'
gagSFG seq 引物	5' - CGG ATG GCC GCG AGA - 3'
qPCRfwd Luc	5' - ATT TGA CTG CCG GCG AAA TG - 3'
qPCRfwdrefmouseTBP	5' - TGT CTG TCG CAG TAA GAA TGG A - 3'

[0348]	qPCRreffwdhumanTBP	5' - TTT GGT GTT TGC TTC AGT CAG - 3'
	qPCRrefrevhumanTBP	5' - ATA CCT AGA AAA CAG GAG TTG CTC A - 3'
	qPCRrefrevmouseTBP	5' - AAA ATC CCA GAC ACG GTG GG - 3'
	qPCRrev Luc	5' - AAG ATT CAT CGC CGA CCA CAT - 3'
	rev GLUT3 HRE	5' - CCT GGA AAC ATC TGA TGG TTC TCT AGA TTT GGC CAT GTT GAC TAG - 3'
	rev VEGFA HRE	5' - CCT GGA AAC ATC TGA TGG TTC TCT AGA GTT CCG GGG TTA GTC AGT - 3'
	rev 引物 seq 取向 HRE	5' - CAC CAA AGA GTC CTA AAC GAT C - 3'
	rev puro 跳过 Nco 位点	5' - CAC GTA GGG CCA ATT GAA TTG GTC GTG CGC TCC TTT CG - 3'

[0349] 细胞活力

[0350] 细胞用冷的Dulbecco磷酸盐缓冲盐水 (DPBS) (Gibco) 洗涤两次,并在PE膜联蛋白V凋亡检测试剂盒 (BD Biosciences) 中提供的1X结合缓冲液中重悬。然后根据PE膜联蛋白V凋亡检测试剂盒方案 (BD Biosciences) 用PE膜联蛋白V和7-氨基-放线菌素 (7-AAD) 在RT于黑暗中对细胞染色15分钟,洗涤并重悬在1X结合缓冲液中,并通过流式细胞术 (FACSCanto II流式细胞仪, BD Biosciences) 进行分析。使用FlowJo软件分析流式数据。PE膜联蛋白V和7-AAD阴性细胞被认为是有活力的,PE膜联蛋白V阳性和7-AAD阴性细胞处于早期凋亡,并且PE膜联蛋白V和7-AAD阳性细胞处于晚期凋亡或死亡。

[0351] T细胞分离

[0352] 对于分离人类T细胞;在Guy's and St Thomas' 研究伦理委员会 (REC参考09/H0804/92) 的批准下,从健康志愿者中获得血液。将血液收集到含有抗凝血剂 (10%柠檬酸盐) 的Falcon管中,以1:1与RPMI 1640混合,并经Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) 分层。样品在20°C以750g离心30min,以分离外周血单个核 (PBMC) 细胞级分 (fraction)。使用无菌Pasteur移液管收集处于血浆和Ficoll层之间的界面 (其包含PBMC),并在RPMI 1640中洗涤。T细胞使用人类Pan T细胞分离试剂盒 (Miltenyi Biotec) 从PBMC级分中纯化,并使用MidiMACs™分离器 and LS柱 (Miltenyi Biotec) 根据制造商的方案进行分离。使用CD3/CD28人类T-Activator Dynabead (Gibco) 以1:1的细胞与珠的比例激活纯化的人类T细胞,并以 3×10^6 接种在组织培养板中补充有5%人类血清 (Sigma-Aldrich) 和1X青霉素/链霉素的RPMI 1640中。第二天,向培养物中添加100IU/ml重组人类IL-2 (PROLEUKIN)。

[0353] T细胞和细胞系转导

[0354] 为了产生对人类细胞具有向性的逆转录病毒,使用Peq-Pam质粒 (Moloney GagPol)、RDF质粒 (RD114包膜) 和感兴趣的SFG质粒,使用FuGENE HD转染试剂 (Promega),通过三重转染HEK 293T细胞来产生RD114假型逆转录病毒颗粒,如先前描述的。为了产生具有鼠细胞向性的逆转录病毒,使用FuGENE HD (Promega) 用相关质粒转染Phoenix-ECO逆转录病毒生产细胞。收获包含病毒颗粒的上清液,并与感兴趣的细胞一起孵育至少48h以允许其转导。T细胞在非组织培养处理的板中转导,该板用 $4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ RetroNectin (Takara Bio) 在4°C过夜预包被。在逆转录病毒转导人类T细胞之前,去除CD3/CD28人类T-Activator

Dynabead (Gibco), 并如在T细胞分离部分中所述地添加新鲜IL-2。在用双顺反的4 α B-T2A-CAR构建体转导T细胞的情况下, 在T细胞转导后, 将30ng/ml最终浓度的人类IL-4 (Peprotech) 添加至培养物, 以富集转导的T细胞群体。包括SKOV-3和HN3在内的黏附细胞系用逆转录病毒转导, 逆转录病毒如前所述地在包含4 μ g/ml最终浓度的聚凝胺 (Santa Cruz Biotechnology Inc) 的培养基溶液中产生以提高感染效率。经修饰以表达Luc/eGFP的细胞基于其eGFP荧光通过使用BD FACSAria III (BD Biosciences) 进行细胞分选来纯化。

[0355] 体外研究

[0356] 体外低氧使用低氧孵育室 (Stemcell Technologies) 实现, 所述低氧孵育室用包含0.1%、1%、5%O₂, 5%CO₂和作为平衡的氮气的气体 (BOC) 以25L/min吹扫4min, 之后将室密封。在1h后再次重复该过程。在一些情况下, 低氧介导的HIF1 α 稳定化通过使用100 μ M最终浓度的化学品CoCl₂ (Sigma-Aldrich) (其抑制HIF1 α 羟基化) 来模拟, 除非另有说明。体外细胞毒性测定中, 将1 \times 10⁴个表达Luc/eGFP的SKOV3细胞接种在96孔组织培养板中, 并将转导或非转导的T细胞以所指示的效应物与靶比例添加在孔中。孵育共培养物24h、48h和72h时间点, 并且通过萤光素酶定量确定靶细胞活性 (在常氧条件下, 在每100 μ l培养基中添加1 μ l的在PBS中15mg/ml的XenoLight D-萤光素 (PerkinElmer) 之后)。使用FLUOstar Omega板读取仪 (BMG Labtech) 对发光进行定量。在24h和48h共培养时间点, 从共培养物中获取培养基样品, 并且随后分别用于IL-2和IFN γ 定量。使用第二代人类IL-2ELISA Ready-SET-Go! 试剂盒 (eBioscience) 按照制造商的方案对IL-2进行定量。使用人类IFN- γ DuoSet ELISA试剂盒 (Bio-Techne) 按照制造商的方案对IFN γ 进行定量。在两种ELISA中, 细胞因子浓度通过在融合 α -FP分光光度计 (Perkin-Elmer) 上在450nm处的吸光度测量来确定。

[0357] 体内研究

[0358] 肿瘤细胞系 (PBS中的2.5 \times 10⁵个细胞) 通过皮下 (s.c.) 注射接种到6周龄至8周龄的雌性 (对于SKOV3和LL2) 和雄性 (对于HN3) 小鼠中。在可触知肿瘤后, 每2天或3天进行肿瘤的长 (L) 和短 (S) 维度的数字卡尺测量。使用以下等式确定肿瘤体积: 体积 = (S² \times L) / 2。将血液样品从小鼠中采集在用EDTA包被的MicrovetteTM管 (Sarstedt) 中, 并且通过在2,000g离心这些样品5min来提取血浆。使用30G针通过尾静脉注射所指示剂量的在200 μ l PBS中的CAR T细胞。用于流式细胞术分析的肿瘤组织和其他器官被酶消化以释放单细胞, 如先前描述的。简而言之, 使用解剖刀将组织切碎, 并且然后用RPMI (Gibco) 中1mg/ml来自溶组织梭菌 (Clostridium Histolyticum) 的胶原酶I (Sigma-Aldrich) 和0.1mg/ml脱氧核糖核酸酶I (AppliChem) 在37 $^{\circ}$ C孵育60min来释放单细胞。然后, 释放的细胞通过70 μ m细胞滤器, 然后染色用于流式细胞术分析。活细胞使用血细胞计数器用台盼蓝 (Sigma-Aldrich) 拒染进行计数。

[0359] 生物发光成像

[0360] 为了评估体内萤光素酶生物分布, 在成像前10min, 用200 μ l在无菌PBS中的 (15mg/ml) XenoLight D-萤光素 (PerkinElmer) 腹膜内 (i.p.) 注射小鼠。将动物麻醉进行成像, 并使用体内成像系统 (IVIS[®]) Lumina系列III (PerkinElmer) 检测发射光, 并使用Living Image软件 (PerkinElmer) 分析数据。光以光子/秒/单位面积进行定量。

[0361] 流式细胞术

[0362] 如先前描述地进行流式细胞术。除非另有说明, 以下抗体购自eBioscience并且以

1 μ g/ml使用:抗人类CD3 ϵ Brilliant Violet 421TM(SK7; **Biolegend**[®])、抗人类CD8 α Alexa Fluor 488 (RPA-T8)、抗人类CD4 PE (RPA-T4)、抗人类CD45 Brilliant Violet 510TM(HI30 **Biolegend**[®])、抗小鼠CD4 FITC(克隆:RM4-5)、抗小鼠CD8 α eFluor[®]450(克隆:53-6.7)、抗小鼠CD3 ϵ PE(克隆:145-2C11)、中和抗小鼠CD16/CD32(克隆:2.4G2)。使用荧光减去一个染色样品确定背景染色。用生物素化的抗人类EGF抗体(Bio-Techne:BAF236)对T1E CAR进行染色,并用链霉亲和素APC进行检测。eGFP通过其天然荧光进行检测。使用1 μ g/ml 7-氨基放线菌素D(Cayman Chemical Company)连同抗Ter-119 PerCP-Cy5.5(Ter-119; eBioscience)排除死细胞和红细胞。数据在BD FACS Canto II(BD Biosciences)上收集。使用FlowJo软件(Freestar Inc.)分析数据。

[0363] 统计学

[0364] 正态性和方差齐性分别用Shapiro-Wilk正态性检验和F-检验来确定。然后使用GraphPad Prism 6软件对参数数据使用双侧非配对学生t检验或对非参数数据使用Mann-Whitney检验来确定统计显著性。当比较配对数据时,进行配对比例学生t检验。在比较具有不等方差的组时,应用Welch校正。使用statmod软件包的“CompareGrowthCurves”功能对肿瘤生长曲线进行统计分析。所呈现的任何数据中均没有排除异常值。

[0365] 结果

[0366] HRE设计

[0367] 基于对从Ensembl数据库获得的基因组数据的分析,鉴定出推定的HIF1结合位点(HBS),所述位点在物种之间和在低氧诱导基因之间是保守的。我们基于与HIF结合的6-nt序列中在每个位置的每个核苷酸的频率,比较了来自人类、小鼠和大鼠中的不同氧敏感基因的推定6核苷酸(nt)长的HBS,并构建了人类和小鼠HBS的序列标识(图4A和4B)。在HBS元件之外,基因组HBS序列的下游8nt还存在与氧控制的转录相关的序列。这个位点被称为HIF辅助位点(HAS)(图4C)。

[0368] HRE设计包括由从基因组序列获取的8nt接头区域分隔开的HBS位点和HAS位点。首先,使用了3个连续的HBS-HAS序列。此外,为了观察不同的HBS序列是否对HIF具有不同的敏感性,最初设计了各自包含3个连续的HBS-HAS(为简洁起见,HRE)序列的三个构建体。这些构建体之间的区别在于每个构建体中的HBS源自不同的基因(图5)。这些基因是人类Epo、人类VEGFA和人类GLUT-3。

[0369] LTR中的HRE

[0370] 为了将构建体稳定地整合到宿主细胞的基因组中,我们使用如先前描述的具有修饰的LTR的SFG逆转录病毒载体。SFG载体源自Moloney鼠白血病病毒(MMLV)。我们试图在不影响转基因整合到宿主细胞基因组的情况下,修饰LTR内的逆转录病毒增强子区域。这已经在以前通过将HRE克隆到病毒启动子上游的LTR的NheI/XbaI位点来实现。为了避免使载体失去活性或失去其整合到宿主基因组中的能力,我们用相似长度的片段替换了NheI/XbaI区域。

[0371] 包含我们的HRE序列(其包括5' NheI和3' XbaI限制性位点)的DNA序列由GeneArt合成。这些序列被亚克隆在SFG MMLV载体的3' LTR中的NheI/XbaI位点中。我们修饰了3' LTR,但没有修饰5' LTR,因为当逆转录发生时,修饰的3' LTR U3区被拷贝到5' LTR。由于NheI/

XbaI在SFG中不是独特限制性位点的事实,我们使用连续的重叠PCR在几步中合成了包含独特限制性位点(XhoI/EcoRI)的片段,以实现3' LTR中NheI/XbaI位点的特异性修饰。为了制造氧感知报告物构建体,将由P2A肽(自裂解肽)分隔开的叩头虫萤光素酶和绿色荧光蛋白的发绿色光变体克隆到SFG载体的NcoI/XhoI位点。所得构建体在图7中示出。

[0372] ODD添加

[0373] 我们同时克隆了一组另外的载体,所述另外的载体具有附接到萤光素酶报告物的ODD结构域以在常氧条件下促进蛋白质降解。HIF1 α 稳定性由ODD中的脯氨酸(p402和p564)的氧依赖性羟基化控制。该序列与感兴趣的蛋白融合,以使蛋白的降解为氧依赖的。基于UniProt数据库,人类HIF1 α 的ODD结构域(图7中突出显示)为203个氨基酸长,而小鼠的种间同源物由213个氨基酸组成。使用重叠PCR,我们使来自HIF1 α 的氨基酸序列557-574(图7中粗体)与萤光素酶的C-末端融合。确切的氨基酸序列557-574(LDLEMLAPYIPMDDDFQL)在人类和小鼠中是保守的。所得片段(萤光素酶-ODD融合)被插入到经LTR修饰和未经LTR修饰的SFG报告物构建体中,如图8中所描绘的。

[0374] 在随后的实验中,我们融合了SEQ ID No 29、30、31。所有三个SEQ ID No都赋予融合配偶体氧敏感性,其中用SEQ ID No:29,即完整ODD(401-603)获得了最佳结果(图17)。

[0375] 在常氧或低氧下不同细胞系中的HIF1 α 稳定性

[0376] 细胞系在常氧或低氧条件下(分别为20%O₂或0.1%O₂)培养18小时。在这些条件下筛选了以下人类细胞系:HEK293 T、HT1080、T47D和Jurkat(克隆E6-1)。细胞在18小时暴露后立即裂解,并如方法中描述地进行蛋白印迹以定量HIF1 α 。在所有测试的细胞系中,发现当与常氧(20%O₂)相比时,HIF1 α 在低氧条件(0.1%O₂)下是稳定的(图10)。使用ImageJ软件使用密度测量法对蛋白进行定量。在低氧条件下,293T细胞和HT1080细胞具有最高的HIF1 α 量,然而在这些细胞系中,常氧条件下也检测到一定的HIF1 α 。T47D和Jurkat细胞二者在低氧条件下均有可检测到的HIF1 α 蛋白,但在常氧条件下T47D和Jurkat细胞未观察到可检测到的HIF1 α 条带。

[0377] 细胞选择

[0378] 我们选择在初始实验中使用293T细胞有三个原因。首先,HIF1 α 蛋白印迹分析显示,293T细胞在低氧条件下具有强的HIF1 α 蛋白表达,水平是在常氧所发现的5倍高。其次,我们观察到,当与T47D相比时,293T是快速生长的细胞,允许在短时间段内进行多次实验。第三,293T细胞是我们用来产生逆转录病毒的包装细胞系。因此,转染293T细胞以产生逆转录病毒引起293T细胞自身的自动转导(auto-transduction)。

[0379] 基于流式细胞术的转导效率

[0380] 由于我们的构建体中的转基因的表达是氧敏感的,我们不能依靠流式细胞术来确定准确的转导效率。用组成型萤光素酶-P2A-GFP构建体(SFG报告物构建体)转导的293T细胞的流式细胞术分析揭示了,活细胞群体(7-AAD阴性)中83%的转导效率(图10)。这些结果表明我们使用的逆转录病毒转导方法有效地工作。

[0381] 测序以验证整合后HRE在LTR中的取向

[0382] 为了确认3' LTR中的修饰已经复制到5' LTR并且在整合的原病毒中正确取向,我们在转导后对5' LTR区域进行了测序。从转导的293T细胞中分离基因组DNA,并且经由PCR扩增5' LTR区域,并在1.2%琼脂糖凝胶上运行。切下正确长度的条带,凝胶纯化,并且然后测序。

序列分析揭示了,3' LTR的HRE修饰被正确拷贝,并且在5' LTR中具有正确的取向。

[0383] 拷贝数测定/qPCR (拷贝数) 测定验证的建立

[0384] 对于我们的其中我们定量低氧条件下的萤光素酶表达的测定,我们需要使我们的数据归一化,因为不是每个细胞都会被转导,并且一些细胞可能包含报告物构建体的多个拷贝。为允许这样,我们利用使用参考基因(TBP)(其以2个拷贝存在于每个细胞(自然的基因组DNA)中的扩增以及转基因(萤光素酶)的扩增的定量PCR(qPCR)来允许我们计算整合的转基因的数目。为了设计qPCR引物,我们使用Ensembl数据库以计算机(in silico)筛选了多种可能的引物序列以确保高结合特异性。我们选择了与感兴趣的基因中独特位点结合的引物,使得由PCR产生的扩增子可以指示参考基因和转基因的基因量。我们设计了与叩头虫萤光素酶以及人类和小鼠TBP(因为我们同时使用人类细胞系和小鼠细胞系二者)结合的引物组。使用这种方法,设计了以下三组引物:正向小鼠TBP(5'-TGT CTG TCG CAG TAA GAA TGG A-3')和反向小鼠TBP(5'-AAA ATC CCA GAC ACG GTG GG-3'),其特异性扩增来自小鼠TBP基因的94nt片段;正向人类TBP(5'-TTT GGT GTT TGC TTC AGT CAG-3')和反向人类TBP(5'-ATA CCT AGA AAA CAG GAG TTG CTC A-3'),其特异性扩增来自人类TBP的103nt片段;以及正向萤光素酶(5'-ATT TGA CTG CCG GCG AAA TG-3')和反向萤光素酶(5'-AAG ATT CAT CGC CGA CCA CAT-3'),其特异性扩增来自萤光素酶转基因的90nt片段。

[0385] 为了确定引物结合特异性(单个扩增产物),我们对从细胞中提取的基因组DNA进行qPCR,并在琼脂糖凝胶上运行PCR产物。所有PCR产物都给出了适当长度的单条条带,展示出引物是特异性的。

[0386] 为了验证拷贝数测定,从非转导的细胞和从用含有叩头虫萤光素酶的构建体转导的细胞中提取基因组DNA。将200ng的DNA连续稀释(1:2),并使用设计的引物进行qPCR。每个反应以一式三份进行。如预期的,在从非转导的细胞提取的DNA中没有检测到萤光素酶扩增子。使用从转导的细胞中提取的DNA产生的qPCR数据展示出,来自萤光素酶和TBP引物组二者的qPCR信号与反应的循环数之间存在线性关系,从而验证了该测定。

[0387] 293T细胞在20%、5%、1%和0.1%氧气中的18小时孵育

[0388] 用逆转录病毒转导293T细胞,并且通过qPCR确定转导效率。将非转导的293T细胞和用萤光素酶构建体1-8(来自图6和图8的A、B、C和D)转导的293T细胞接种并在5%、1%和0.1%氧气和常氧(20%氧气)中培养。在这些条件下的18小时孵育后,确定萤光素酶表达和细胞活力。293T细胞在5%氧气和常氧中的18h孵育后获得的原始相对光单位(RLU)数据表明已经产生氧控制的萤光素酶表达系统(图14A)。与常氧相比,在低氧(5%)中,所有HRE和/或ODD修饰的构建体给出了RLU的适度增加,然而在更低的氧浓度没有观察到此种情况。通常,当细胞维持在0.1%氧气时,LTR HRE修饰的构建体与其LTR野生型对应物相比给出了较低的RLU值。基于先前的出版物,在低氧对比常氧条件下,更严重的低氧倾向于增加蛋白表达的倍数诱导。然而,我们没有在我们的数据中观察到这种倾向(图12C)。

[0389] 在构建体中添加ODD结构域的效果通过比较组成型表达未修饰的LTR构建体+/-ODD被最佳地评估。参见图17和图18。在整个实验中,ODD的添加仅适度降低了所述条件下的萤光素酶的检测。仍然有一种可能性,即不存在低氧的显著诱导可能是装置或实验程序的结果,因此为了排除这种可能性,我们用模拟低氧条件(通过钴介导的对HIF1 α 降解的抑制)的100 μ M氯化钴刺激转导的293T细胞18小时。然而,与不存在氯化钴相比,我们在存在100 μ M

氯化钴的情况下没有观察到萤光素酶诱导(图13)。

[0390] 图29展示出HRE启动子对比野生型的优异性。我们观察到,HRE修饰产生了优异的启动子,与相同条件下非修饰的野生型对应物相比,该启动子在低氧环境(例如肿瘤环境)中驱动下游基因的更佳表达。图29A和图29B展示出,单独的HRE修饰在低氧(实体瘤)环境中在所有效应物:靶比例(甚至在低E:T,诸如1:2)引起T细胞中优异的靶向杀伤和激活能力。这一点非常重要,因为通常患者中的已确定的实体瘤中的效应物与靶的比例低,因此HRE-CAR在低E:T比例时有效的能力至关重要,并可能决定CAR T细胞免疫治法的结果。此外,这种增强的CAR表达会仅发生在实体瘤内(由于其低氧状态),并且因此,由于增强的表达将是肿瘤特异性的,它不会造成比来自WT CAR的风险更高的任何未击中肿瘤毒性(off tumour toxicities)风险。

[0391] 启动子中存在数量增加的HRE元件的情况下的低氧诱导性

[0392] 如图15和图16中所示,低氧诱导性随着启动子中HRE元件数量的增加而增加。通过修饰LTR(逆转录病毒启动子)以包含多个HRE,萤光素酶在常氧条件下的表达被有效沉默。

[0393] 在常氧(+/-ODD)中的萤光素酶稳定性

[0394] 各种ODD区段融合到萤光素酶的C-末端,并且结果在图20和图21中示出。测试了SEQ ID NO:29:ODD区段401-603、SEQ ID NO:30:ODD区段530-603和SEQ ID NO:31:ODD区段530-653。三个ODD区段中的每一个的添加都引起常氧条件下降低的表达,其中9HRE启动子架构与SEQ ID NO:29(401-603ODD)的组合显示在常氧中无萤光素酶表达,但在低氧中被开启(图18)。

[0395] 体外和体内T4-CAR结果

[0396] 我们利用了对小鼠和人类二者中可能的ErbB同二聚体和异二聚体中的8/10具有特异性的pan-ErbB CAR T1E28z。我们修饰了CAR构建体以同时共表达报告物叩头虫萤光素酶(Luc),以允许在转导到T细胞中后进行体内追踪。将ErbB-CAR/Luc T细胞i.v.输注到荷有皮下SKOV3卵巢癌异种移植物的免疫受损NSG小鼠中。输注后4天分析CAR T细胞的生物分布。在这个早期时间点,观察到大多数细胞驻留在肺和肝中,而肿瘤中存在最小的摄取(图19b)。对器官的ErbB1-4 mRNA表达的谱分析确认了,来自家族的所有受体跨越所有重要器官,包括肺和肝表达,肺和肝中观察到输注后CAR T细胞积累。

[0397] 由于低氧将肿瘤微环境与健康组织区分开来,我们试图利用这一点来产生低氧感知T4-CAR。T4是与在IL-4结合到细胞外结构域后递送细胞内IL-2/IL-15信号的嵌合IL-4受体共表达的下一代抗ErbB CAR,从而提供了在离体扩增期间选择性富集CAR T细胞而不影响T细胞的CAR依赖性杀伤能力的手段。我们工程化抗ErbB CAR以包含C-端203个氨基酸的ODD,并修饰长末端重复序列中的CAR启动子以包含一系列9HRE,使CAR在转导到T细胞时对低氧选择性地反应(示意图21)。在体外,这种命名为“HypoxiCAR”的CAR在CD4⁺和CD8⁺细胞群体二者中都展示出严格的低氧特异性表面CAR表达(图21b)。

[0398] CAR表达是高度动态的,并且代表了可以以O₂-依赖的方式“打开”和“关闭”的开关(图21c)。HRE被证明是稳健的启动子,因为在低氧条件下,与亲本T4-CAR相比尽管转导效率相等并且CD4/CD8⁺T细胞比例相等,但观察到仅略微较少的总细胞表面CAR表达(图21d)。HypoxiCAR对环境O₂展现出良好反应敏感性,其中在健康器官中发现的O₂浓度(≥5%)不存在CAR表达,但在肿瘤微环境中所观察到的O₂水平(≤1%)可检测到CAR表达。此外,CAR表达

与低氧的严重程度呈正相关(图21e)。

[0399] 在验证了HypoxiCAR感知低氧的能力后,我们试图研究其引发靶细胞的低氧依赖性杀伤的能力。为此,使用了表达ErbB1-4的SKOV3卵巢癌细胞。将细胞接种到培养板上,并在常氧(20%O₂)和低氧(0.1%O₂)条件下与T4-CAR或HypoxiCAR共孵育。尽管转导效率相等,但HypoxiCAR显示出对SKOV3细胞的有效低氧依赖性杀伤,而在常氧条件下没有明显杀伤。靶细胞杀伤是CAR介导的,因为当HypoxiCAR的胞内尾被截短以阻止信号传导(CD3⁻)时,杀伤被取消(图21f)。我们还评估了这些共培养物中IL-2(图21g)和IFN γ (图21g-h)二者的分泌,这两种细胞因子在T细胞反应中起着重要作用。由hypoxiCAR T细胞产生的细胞因子也受到严格调节,因此只有在低氧条件下才发现可检测到的水平。

[0400] 为了将这些观察结果转换到体内,我们评价了HypoxiCAR是否可以规避ErbB-CAR T细胞的未击中肿瘤毒性。这是阻碍它们在临床上全身施用的主要障碍。为了在肿瘤环境中评价此技术,将HypoxiCAR T细胞并行地*i.v.*和*i.t.*注射在荷有HN3肿瘤的NSG小鼠中。通过这种手段,我们实现了这些细胞在肿瘤和重要器官中的快速积累,用于离体研究(图22A)。HypoxiCAR输注后4天,收获组织,经酶消化,并使用流式细胞术评估T细胞的CAR表达。HypoxiCAR实现了表达的肿瘤选择性,并且仅在低氧肿瘤微环境中呈递表面CAR分子,而当T细胞位于血液、肺和肝中时不存在CAR表达(图22B-C)。这种观察不是模型特异性的,因为在荷有SKOV3肿瘤的NSG小鼠和荷有鼠Lewis肺癌(LL2)肿瘤的Rag2^{-/-}小鼠中也观察到。

[0401] 结果显示出一种严格的低氧感知CAR T细胞方法,该方法实现了panErbB靶向的CAR在实体瘤(以供氧不足为特征的微环境)中的选择性表达。尽管ErbB受体在健康器官中广泛表达,但该方法在小鼠异种移植模型中提供抗肿瘤功效而没有未击中肿瘤毒性。这种动态氧感知安全性开关潜在地促进了用于治疗实体恶性肿瘤的CAR T细胞靶储库的无限扩展。

[0402] 鉴定规避未击中肿瘤毒性的方法有可能为癌症打开一个全新的CAR抗原靶储库,其在目前是有限的。

[0403] 为了研究这个问题,我们利用第2代pan-抗ErbB CAR T1E28z,其对可能的ErbB受体同二聚体和异二聚体的8/10具有特异性,并跨越物种屏障等效地结合小鼠受体和人类受体二者。这种CAR目前正在进行在患有SCCHN的患者中通过肿瘤内(*i.t.*)递送的I期评价。CAR与在IL-4与细胞外结构域结合后递送胞内IL-2/IL-15信号的嵌合细胞因子受体(4 $\alpha\beta$)共表达(图24A和B),提供了在离体扩增期间选择性富集CAR T细胞但是然而不影响T细胞的CAR依赖性杀伤能力的手段。这种组合被称为T4免疫疗法。尽管T4-CAR T细胞的*i.t.*递送已被证明在人中是安全的,但是*i.v.*输注是合意的,因为这允许这些细胞归巢至原发性肿瘤和转移瘤二者。将人类T4-CAR T细胞*i.v.*输注到荷有表达ErbB1-4的HN3肿瘤的免疫受损NSG小鼠(图24C)中,导致了致死毒性,这通过这些动物体重的快速下降(图24D)证明。如临床观察到的,对这些小鼠的血液的分析揭示了促炎性细胞因子增加的证据(图24E)。在试图解析CAR T细胞的生物分布时,我们修饰了CAR构建体以并行表达萤光素酶(Luc)报告物,从而允许对转导的T细胞进行体内追踪(图24F)。*i.v.*输注亚致死剂量的报告物人类CAR T细胞后4天的成像分析揭示了,大多数已经在肺和肝中积累,而仅少数存在于肿瘤中,尽管这些细胞上表达ErbB1-4(CAR靶)(图24G)。肝和肺中的积累不是异种移植系统的伪象(artefact),因为当鼠T细胞被转导以表达相同的报告物CAR并*i.v.*输注到Rag2^{-/-}小鼠中

(图24C)时,它们在相同的组织和在脾中积累(图S3)。值得注意的是,肝而不是肺中的鼠T细胞积累是CAR依赖的,因为单独表达Luc报告物的T细胞在该位置明显不太普遍。肺中CAR-非依赖性T细胞积累可能是由于整合素依赖性相互作用。对ErbB1-4mRNA表达的谱分析确认,全部四种受体都在所有重要器官中表达,包括肺和肝。为了研究T4-CAR T细胞介导的组织损伤的直接证据,将亚致死剂量的人类T4-CAR T细胞i.v.输注到NSG小鼠中,并在5天后使用苏木精和伊红(H&E)染色的肝和肺组织切片进行病理组织学检查。该分析揭示了肺和肝中髓系细胞浸润的存在(图24H和I),代表了CAR介导的炎症的替代标志物。观察到浸润既在血管周分布中,又弥散分布于整个实质,由具有丰富胞浆的中性粒细胞(多形核细胞)和大单核细胞(可能是巨噬细胞)二者组成。肝细胞坏死/凋亡也在一些动物中观察到。T4-CAR T细胞在肾中以较低水平积累(图24G),其中在该组织中没有炎症的明显证据。这些数据表明,肝和肺代表了未击中肿瘤的CAR T细胞激活的两个关键器官。

[0404] 低氧是大多数实体瘤的特征。肿瘤细胞的增殖和高代谢需求与低效的肿瘤血管系统一起导致与健康器官/组织(5%-10% O_2)相比供氧不足的状态(<2% O_2) (图24J和K)。由于低氧将肿瘤微环境与健康的常氧组织的微环境区分开来,它代表了用于诱导CAR T细胞表达的合意标志物(图24J和K)。为了产生严格的低氧调节CAR表达系统,我们开发了针对T4-CAR的双重氧感知方法(图25A)。这通过以下来实现:将C末端203个氨基酸的ODD附加到抗ErbB CAR上,同时并行地修饰长末端重复序列(LTR)增强子区域中的CAR启动子以包含一系列9个连续HRE,使CAR表达对低氧选择性地反应。在体外,这种命名为“HypoxiCAR”的CAR展示出CAR分子在人类T细胞的细胞表面上严格的低氧特异性呈递(图25B)。我们展示出双重氧感知系统被证明优于单独使用9HRE盒或ODD的变体。在两种情况下,这些替代方法显示了在常氧条件下CAR表达的泄漏,允许常氧条件下的肿瘤细胞杀伤。HypoxiCAR的CAR表达也是高度动态的并且代表了可以以 O_2 -依赖的方式“打开”和“关闭”的开关(图25C)。在进一步的体外表征中,确认了HypoxiCAR的高 O_2 敏感性,因为在与健康器官一致的 O_2 浓度($\geq 5\%$)下不存在CAR表达,但是在与肿瘤微环境中发现的浓度相当的 O_2 浓度($\leq 1\%$)时变成在细胞表面上可检测到CAR表达(图25D)。已经展示出肿瘤浸润T细胞从肿瘤微环境中离开,这突出了一个潜在的安全性问题,即经历低氧的表达CAR的HypoxiCAR T细胞是否会重新进入健康的常氧组织。然而,由于溶细胞性T细胞介导的靶细胞杀伤可能花费最高6小时(25),在此时间内,在常氧中,预期约62% $\pm 8\%$ 的HypoxiCAR的表面CAR可能已经降解(图2C),因此预期由离开的HypoxiCAR T细胞的任何未击中肿瘤杀伤都是有限的。此外,在HypoxiCAR已经表达了足以杀伤靶的CAR后,细胞离开会是有限的,因为已经展示出CD8⁺T细胞迁移在其遇到表达其同源抗原的肿瘤细胞的区域中停止。

[0405] 在验证了HypoxiCAR感知低氧的能力后,我们试图研究其引发肿瘤靶细胞的低氧依赖性杀伤的能力。将SKOV3卵巢癌细胞接种到培养板上,并在常氧和低氧(0.1% O_2)条件下与T4-CAR或HypoxiCAR共孵育。尽管转导效率和CD4⁺:CD8⁺T细胞比例相当,但是HypoxiCAR T细胞显示出几乎与T4-CAR T细胞相当的对SKOV3细胞的有效低氧依赖性杀伤,而在常氧条件下没有观察到明显的杀伤(图25E)。靶细胞破坏是严格CAR-依赖的,因为当HypoxiCAR的细胞内尾被截短以阻止CD3 ζ 信号传导时,杀伤被取消(图25E)。此外,HypoxiCAR提供了IL-2(图25F)和IFN γ (图25G)二者的严格低氧限制性T细胞分泌,这两种细胞因子在T细胞反应中起重要作用。

[0406] 为了评价HypoxiCAR是否能在体内提供肿瘤限制性CAR表达,将人类HypoxiCAR T细胞并行地i.v.和i.t.注射在荷有HN3肿瘤的NSG小鼠中。这些肿瘤具有约500mm³的体积(图26A),其中确认了低氧的存在(图24J、K)。HypoxiCAR T细胞输注后四天,收获组织,经酶消化,并使用流式细胞术评估T细胞的CAR表达。如体外分析所预测的(图25),当从输注后小鼠的血液、肺或肝中回收时,HypoxiCAR T细胞没有表达可检测到的细胞表面CAR分子,但是它们确实在低氧性肿瘤微环境内的细胞表面上表达CAR分子(图26B、C)。这一发现不是模型特异性的,因为在荷有SKOV3肿瘤的NSG小鼠和荷有鼠Lewis肺癌(LL2)肿瘤的Rag2^{-/-}小鼠二者中都得到了类似的观察。为了确定“Hypoxi”构建体元件是否跨越肿瘤生长的不同期具有活性,开发了Hypoxi-萤光素酶报告物,其中HRE启动子用于驱动萤光素酶-ODD的表达。该报告物被直接稳定地转导到SKOV3和HN3细胞系中。尽管在常氧条件下在肿瘤细胞中不可检测到萤光素酶-ODD,但在SKOV3和HN3肿瘤二者中,在肿瘤生长的所有期,甚至在肿瘤变得可触知之前,均在体内检测到萤光素酶-ODD。这表明,HypoxiCAR T细胞甚至对早期肿瘤也可能具有活性。为了测试这一点,在注射HN3肿瘤细胞后第16天,临在肿瘤变得可触知之前,将HypoxiCAR T细胞输注到小鼠中。与正常氧组织中T细胞上不存在CAR表达的情况相一致,HypoxiCAR也规避了使用i.v.输注高剂量T4-CAR T细胞后观察到的治疗限制性毒性。事实上,用人类HypoxiCAR T细胞i.v.输注的小鼠在输注后没有显示出体重的急剧下降(图26D、E),在体循环中没有促炎细胞因子的证据(图26F),在肺、肝或肾中也没有任何组织损伤的迹象(图26G、H)。重要的是,尽管用人类T4-CAR T细胞i.v.输注的小鼠在28h都到达它们的人道终点(图26E),但是HypoxiCAR T细胞输注的小鼠没有显示出未击中肿瘤的毒性的迹象,并且阻止了肿瘤生长(图26I)。因此,HypoxiCAR克服了目前阻碍靶向在遍及全身的正常组织中表达的抗原的CAR-T细胞的全身施用的主要障碍。

[0407] 在SCCHN中对低氧进行了广泛的研究。为了评估哪些患者可能最适合HypoxiCAR T细胞免疫疗法,我们首先使用患者肿瘤转录组数据生成了HRE调节的基因特征(HRE-regulated gene signature)。分析了已知的HRE调节的基因的共表达,并选择了利用基因PGK1、SLC2A1、CA9、ALDOA和VEGFA的改进特征,因为我们观察到这些基因之间存在显著的正相关性(图27A)。跨越不同的SCCHN亚型(下咽、喉、口腔和口咽),该特征的表达没有差异。然而,该5基因特征的表达随着肿瘤尺寸(T评分;图27B)显著增加,并且也预后3期和4期HNSCC患者中较差的生存率(图27C)。利用HRE调节的基因特征来预测来自活组织检查材料的低氧可以提供一种简单的手段来评估可能对HypoxiCAR疗法有最佳反应的那些患者。

[0408] 对SCCHN肿瘤切片中稳定HIF1 α (HypoxiCAR的CAR表达的主要转录因子)的免疫组织化学染色揭示了,其中HIF1 α 已经变得稳定的大的肿瘤区域(图27D)。尽管若干因素可以使HIF1 α 稳定,但低氧代表了这一观察的最可能的解释。观察到患者之间HIF1 α 稳定化和肿瘤内T细胞浸润二者的异质性。然而,令人鼓舞的是,具有HIF1 α 稳定化的最高出现率(prevalence)和/或强度的那些肿瘤并不排除T细胞进入上皮内间隙(intra-epithelial space)或进入肿瘤的稳定化区域(图27E、F)。使用免疫荧光,我们还展示出浸润HIF1 α 稳定化肿瘤区域的CD3⁺T细胞本身也使HIF1 α 稳定,表明在这些环境中,HypoxiCAR T细胞会成为激活的(图27G)。这些观察表明,HypoxiCAR可在低氧肿瘤类型诸如SCCHN中得到临床应用,其中基因表达(图27A-C)、对活组织检查样品的HIF1 α /CD3染色(图27D-G)和使用低氧放射性示踪剂诸如⁶⁴Cu-ATSM的成像技术诸如PET/CT可能提供生物标志物来确认低氧肿瘤微

环境的存在并指导患者选择。

[0409] 已经开发了提高CAR T细胞的肿瘤特异性的方法,诸如对HLA呈递的抗原具有特异性的T细胞受体-模拟CAR,肿瘤抗原的联合靶向,或调节CAR亲和力以优先靶向高密度抗原。本研究展示了利用了肿瘤微环境最固有的特征之一实现癌症选择性免疫疗法的替代方法。本文描述的“双重低氧感知”系统实现了引人入胜的抗肿瘤功效,同时消除了识别正常组织中多个靶点的CAR的未击中肿瘤毒性。低氧感知HRE模块和附加在CAR上的ODD协同地发挥作用,以提供严格的低氧特异性靶标杀伤(图25E)。这种方法在常氧条件下限制了CAR的转录(HRE)和稳定性(ODD)二者,并且当这两个系统并行地使用时,它们克服了单独使用任何一个系统时观察到的泄漏。

[0410] 低氧肿瘤微环境不利于有效的免疫反应。低氧可以激活基质细胞诸如巨噬细胞中的免疫抑制程序,调节免疫检查点分子的表达,并促进更具侵袭性的肿瘤细胞表型。然而,令人鼓舞的是,我们发现在体外低氧并没有直接负面影响T细胞效应物功能(图25E-G),这与其他人观察到的一致。HypoxiCAR T细胞还能够阻止低氧性肿瘤的生长(图26I),表明在所测试的体内模型中,肿瘤微环境不是HypoxiCAR在体内递送抗肿瘤治疗功效的能力的完整屏障。未来也有可能将HypoxiCAR T细胞疗法与微环境调节剂诸如免疫检查点抑制剂相结合,这可能进一步提高这些细胞靶向肿瘤的能力。此外,由于T细胞没有被排除在人类肿瘤的HIF1 α 稳定化区域之外(图27D-F),因此HypoxiCAR T细胞应当能够进入适当的微环境来激活CAR表达。尽管我们在用高剂量HypoxiCAR T细胞输注的小鼠中没有观察到治疗限制性毒性的证据(图26E和I),但在健康组织中存在其中已经观察到“生理性低氧”的微环境,诸如肠粘膜。这样的组织可能代表了HypoxiCAR T细胞的未击中肿瘤激活可能发生的部位。因此,可以在HypoxiCAR中掺入自杀开关,从而为最普遍的CAR提供另外的安全性水平。尽管“HypoxiCAR”双重氧感知系统使用pan-ErbB-靶向CAR进行了例示,但广泛适用的策略可能用于克服实体恶性肿瘤治疗中可用安全靶点的缺乏。

序列表

<110> 伦敦国王学院

<120> 治疗剂

<130> P3468PC00

<150> 1902277.1

<151> 2019-02-19

<160> 31

<170> PatentIn version 3.5

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 5

gggccctacg tgctgtctca cacagc 26

<210> 6

<211> 26

<212> DNA

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 6

gggccctacg tgctgcctcg catggc 26

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 7

tgtcacgtcc tgcacgacgc gagta 25

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 8

cgcgtcgtgc aggacgtgac aaat 24

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 9

ccagcggacg tgcgggaacc cacgtgtagg 30

<210> 10
<211> 26
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 10
tccacaggcg tgccgtctga cacgca 26
<210> 11
<211> 35
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 11
ccacagtgcata tacgtgggct ccaacaggtc ctctt 35
<210> 13
<211> 24
<212> DNA
<213> 波利尼西亚鼠(Rattus exulans)
<400> 13
acagtgcata cgtgggcttc caca 24
<210> 14
<211> 17
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 14
actacgtgct gcctagg 17
<210> 15
<211> 26
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 15
cccctcggac gtgactcgga ccacat 26
<210> 16
<211> 37
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 16
acgctgagtg cgtgcgggac tcggagtacg tgacgga 37
<210> 17
<211> 26
<212> DNA

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 17

cggacgctgg cgtggcacgt cctctc 26

<210> 18

<211> 470

<212> DNA

<213> Moloney鼠肉瘤病毒 (*Moloney murine sarcoma virus*)

<400> 18

ctgaatatgg gccaaacagg atatctgtgg taagcagttc ctgccccggc tcagggccaa 60
 gaacagatgg aacagctgaa tatgggcca acaggatatac tgtggtaagc agttcctgcc 120
 ccggtcagg gccaaagaaca gatgggtccc agatgcggtc cagcctcag cagtttctag 180
 agaaccatca gatgtttcca ggggtccccca aggacctgaa atgacctgt gccttatttg 240
 aactaaccaa tcagttcget tctcgettct gttcgcgcgc ttctgctccc cgagctcaat 300
 aaaagagccc acaaccctc actcggggcg ccagtcctcc gattgactga gtcgccggg 360
 taccctgta tccaataaac cctcttgag ttgcatccga cttgtgtct cgctgttct 420
 tgggagggtc tcctctgagt gattgactac ccgtcagcgg gggctttca 470

<210> 19

<211> 606

<212> DNA

<213> Moloney鼠肉瘤病毒 (*Moloney murine sarcoma virus*)

<400> 19

ctagcggccc tacgtgctgt ctacacagc ctgtctgac gccctacgtg ctgtctcaca 60
 cagcctgtct gacggccta cgtgctgtct cacacagcct gtctgacggc cctacgtgct 120
 gtctcacaca gcctgtctga cggccctacg tgctgtctca cacagcctgt ctgacggccc 180
 tacgtgctgt ctacacagc ctgtctgac gccctacgtg ctgtctcaca cagcctgtct 240
 gacggccta cgtgctgtct cacacagcct gtctgacggc cctacgtgct gtctcacaca 300
 gcctgtctga ctctagagaa ccatcagatg tttccagggt gcccagaagga cctgaaatga 360
 ccctgtgcct tatttgaact aaccaatcag ttcgettctc gttctgttc gcgcgcttct 420
 gctccccgag ctcaataaaa gagcccaca cccctcactc gggcgccag tcctccgatt 480
 gactgagtcg cccgggtacc cgtgtatcca ataaaccctc ttgcagttgc atccgacttg 540
 tggctcgcct gttccttggg aggtctctct ctgagtgatt gactaccctg cagcgggggt 600
 ctttca 606

<210> 20

<211> 145

<212> DNA

<213> Moloney鼠肉瘤病毒 (*Moloney murine sarcoma virus*)

<400> 20

gaaccatcag atgtttccag ggtgccccaa ggacctgaaa tgacctgtg cttattttga 60
 actaaccaat cagttcgett ctgcgttctg ttcgcgcgt tctgctccc gagctcaata 120

aaagagccca caaccctca ctcgg 145
<210> 21
<211> 107
<212> DNA
<213> Moloney鼠肉瘤病毒(Moloney murine sarcoma virus)
<400> 21
ctagagaacc atcagatggt tccagggtgc cccaaggacc tgaaatgacc ctgtgcctta 60
tttgaactaa ccaatcagtt cgcttctcgc ttctgttcgc gcgcttc 107
<210> 22
<211> 60
<212> DNA
<213> Moloney鼠肉瘤病毒(Moloney murine sarcoma virus)
<400> 22
tgctccccga gctcaataaa agagcccaca acccctcact cggggcgcca gtctctccgat 60
<210> 23
<211> 52
<212> DNA
<213> Moloney鼠肉瘤病毒(Moloney murine sarcoma virus)
<400> 23
tgactgagtc gcccgggtac ccgtgtatcc aataaacct cttgcagttg ca 52
<210> 24
<211> 143
<212> DNA
<213> Moloney鼠肉瘤病毒(Moloney murine sarcoma virus)
<400> 24
gcgccagtcc tccgattgac tgagtcgccc ggtaccctgt gtatccaata aaccctcttg 60
cagttgcatc cgacttgtgg tctcgtggt cttgggagg gtctcctctg agtgattgac 120
taccctcag cgggggtctt tca 143
<210> 25
<211> 11
<212> DNA
<213> Moloney鼠肉瘤病毒(Moloney murine sarcoma virus)
<400> 25
ggggtctttc a 11
<210> 26
<211> 255
<212> DNA
<213> 智人(homo sapiens)
<400> 26

ggccctacgt gctgtctcac acagcctgtc tgacggcct acgtgctgtc tcacacagcc 60
 tgtctgacgg ccctacgtgc tgtctcacac agcctgtctg acggccctac gtgctgtctc 120
 acacagcctg tctgacggcc ctacgtgctg tctcacacag cctgtctgac ggccctacgt 180
 gctgtctcac acagcctgtc tgacggcct acgtgctgtc tcacacagcc tgtctgacgg 240
 ccctacgtgc tgtct 255

<210> 27

<211> 34

<212> DNA

<213> 智人(homo sapiens)

<400> 27

ggccctacgt gctgtctcac acagcctgtc tgac 34

<210> 28

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人(homo sapiens)

<220>

<221> misc_feature

<222> (9) .. (9)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 28

Leu Glu Met Leu Ala Pro Tyr Ile Xaa Met Asp Asp Asp

1 5 10

<210> 29

<211> 203

<212> PRT

<213> 智人(homo sapiens)

<400> 29

Ala Pro Ala Ala Gly Asp Thr Ile Ile Ser Leu Asp Phe Gly Ser Asn

1 5 10 15

Asp Thr Glu Thr Asp Asp Gln Gln Leu Glu Glu Val Pro Leu Tyr Asn

20 25 30

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

35 40 45

Ala Met Ser Pro Leu Pro Thr Ala Glu Thr Pro Lys Pro Leu Arg Ser

50 55 60

Ser Ala Asp Pro Ala Leu Asn Gln Glu Val Ala Leu Lys Leu Glu Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

Gln Thr Pro Ser Pro Ser Asp Gly Ser Thr Arg Gln Ser Ser Pro Glu
 100 105 110
 Pro Asn Ser Pro Ser Glu Tyr Cys Phe Tyr Val Asp Ser Asp Met Val
 115 120 125
 Asn Glu Phe Lys Leu Glu Leu Val Glu Lys Leu Phe Ala Glu Asp Thr
 130 135 140
 Glu Ala Lys Asn Pro Phe Ser Thr Gln Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu
 145 150 155 160
 Met Leu Ala Pro Tyr Ile Pro Met Asp Asp Asp Phe Gln Leu Arg Ser
 165 170 175
 Phe Asp Gln Leu Ser Pro Leu Glu Ser Ser Ser Ala Ser Pro Glu Ser
 180 185 190
 Ala Ser Pro Gln Ser Thr Val Thr Val Phe Gln
 195 200

<210> 30

<211> 74

<212> PRT

<213> 智人(homo sapiens)

<400> 30

Glu Phe Lys Leu Glu Leu Val Glu Lys Leu Phe Ala Glu Asp Thr Glu
 1 5 10 15
 Ala Lys Asn Pro Phe Ser Thr Gln Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu Met
 20 25 30
 Leu Ala Pro Tyr Ile Pro Met Asp Asp Asp Phe Gln Leu Arg Ser Phe
 35 40 45
 Asp Gln Leu Ser Pro Leu Glu Ser Ser Ser Ala Ser Pro Glu Ser Ala
 50 55 60
 Ser Pro Gln Ser Thr Val Thr Val Phe Gln
 65 70

<210> 31

<211> 124

<212> PRT

<213> 智人(homo sapiens)

<400> 31

Glu Phe Lys Leu Glu Leu Val Glu Lys Leu Phe Ala Glu Asp Thr Glu
 1 5 10 15
 Ala Lys Asn Pro Phe Ser Thr Gln Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu Met
 20 25 30
 Leu Ala Pro Tyr Ile Pro Met Asp Asp Asp Phe Gln Leu Arg Ser Phe

35	40	45																	
Asp	Gln	Leu	Ser	Pro	Leu	Glu	Ser	Ser	Ser	Ala	Ser	Pro	Glu	Ser	Ala				
50	55	60																	
Ser	Pro	Gln	Ser	Thr	Val	Thr	Val	Phe	Gln	Gln	Thr	Gln	Ile	Gln	Glu				
65	70	75													80				
Pro	Thr	Ala	Asn	Ala	Thr	Thr	Thr	Thr	Ala	Thr	Thr	Asp	Glu	Leu	Lys				
	85	90													95				
Thr	Val	Thr	Lys	Asp	Arg	Met	Glu	Asp	Ile	Lys	Ile	Leu	Ile	Ala	Ser				
	100	105													110				
Pro	Ser	Pro	Thr	His	Ile	His	Lys	Glu	Thr	Thr	Ser								
	115	120																	

<210> 32
 <211> 500
 <212> PRT
 <213> 融合 (fusion)
 <400> 32

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

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

Thr Val Phe Gln

500

<210> 33

<211> 1500

<212> DNA

<213> 融合(fusion)

<400> 33

atgggcccag gagttctgct gctcctgctg gtggccacag cttggcatgg tcaggagagt 60
gtgggtgtcgc acttcaatga ctgtccactg tcgcacgatg gatactgcct ccatgatggt 120
gtgtgcatgt acatcgagge attggacaag tatgcatgca actgtgtcgt cggctacatc 180
ggagagcgat gtcagtaccg agacctgaag tgggtgggaac tgagagcggc cgcaattgaa 240
gttatgtatc ctctcetta cctagacaat gagaagagca atggaacat tatccatgtg 300
aaagggaaac acctttgtcc aagtccecta tttcccggac cttctaagcc cttttgggtg 360
ctgggtgggtg ttgggtggagt cctggcttgc tatagcttgc tagtaacagt ggcctttatt 420
atthttctggg tgaggagtaa gaggagcagg ctctgcaca gtgactacat gaacatgact 480
ccccgccgcc ccgggcccac ccgcaagcat taccagcct atgccccacc acgcgacttc 540
gcagcctatc gctccagagt gaagttcagc aggagcgcag acgccccgc gtaccagcag 600
ggccagaacc agctctataa cgagctcaat ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg 660
gacaagagac gtggccggga ccctgagatg gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag 720
gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggcctacag tgagattggg 780
atgaaaggcg agcgcgggag gggcaagggg cacgatggcc tttaccaggg tctcagtaca 840
gccaccaagg acacctacga cgcccttac atgcaggccc tgccccctcg cgccccagcc 900
gctggagaca caatcatatc tttagattht ggcagcaacg acacagaaac tgatgaccag 960
caacttgagg aagtaccatt atataatgat gtaatgctcc cctcacccaa cgaaaaatta 1020
cagaatataa atthggcaat gtctccatta cccaccgctg aaacgcaaaa gccacttcga 1080
agtagtgctg accctgcact caatcaagaa gttgcattaa aattagaacc aaatccagag 1140
tcaactggaac thttctttac catgccccag attcaggatc agacacctag tccttccgat 1200
ggaagcacta gacaaagttc acctgagcct aatagtccca gtgaatattg thtttatgtg 1260
gatagtgata tggcaatga attcaagttg gaattggtag aaaaacttht tgctgaagac 1320
acagaagcaa agaaccatt thtactcag gacacagatt tagacttggg gatgttagct 1380
ccctatatcc caatggatga tgacttccag ttacgttctc tcgatcagtt gtcaccatta 1440
gaaagcagtt ccgcaagccc tgaaagcgca agtctctcaa gcacagttac agtattccag 1500

<210> 34

<211> 55

<212> PRT

<213> 智人(homo sapiens)

<400> 34

Val Val Ser His Phe Asn Asp Cys Pro Leu Ser His Asp Gly Tyr Cys

1

5

10

15

Leu His Asp Gly Val Cys Met Tyr Ile Glu Ala Leu Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30
 Cys Asn Cys Val Val Gly Tyr Ile Gly Glu Arg Cys Gln Tyr Arg Asp
 35 40 45
 Leu Lys Trp Trp Glu Leu Arg
 50 55
 <210> 35
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 智人(homo sapiens)
 <400> 35
 Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
 1 5 10 15
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 20 25 30
 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 35 40 45
 Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 50 55 60
 Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 65 70 75 80
 Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 85 90 95
 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 100 105 110
 <210> 36
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人(homo sapiens)
 <400> 36
 Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn
 1 5 10 15
 Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu
 20 25 30
 Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly
 35 40 45
 Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe
 50 55 60
 Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn

65					70					75					80
Met	Thr	Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr
				85					90					95	
Ala	Pro	Pro	Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser					
			100					105							

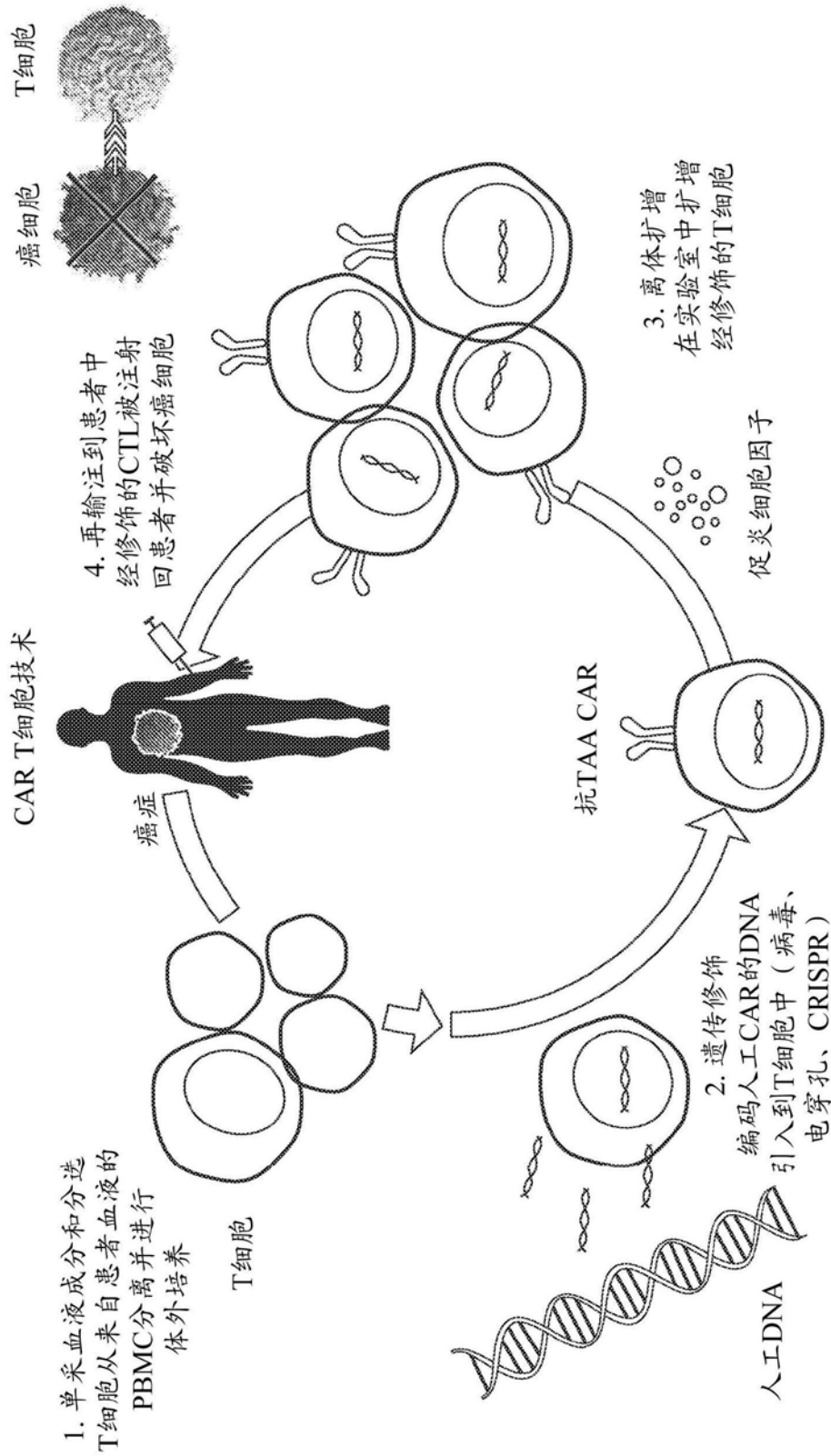


图1

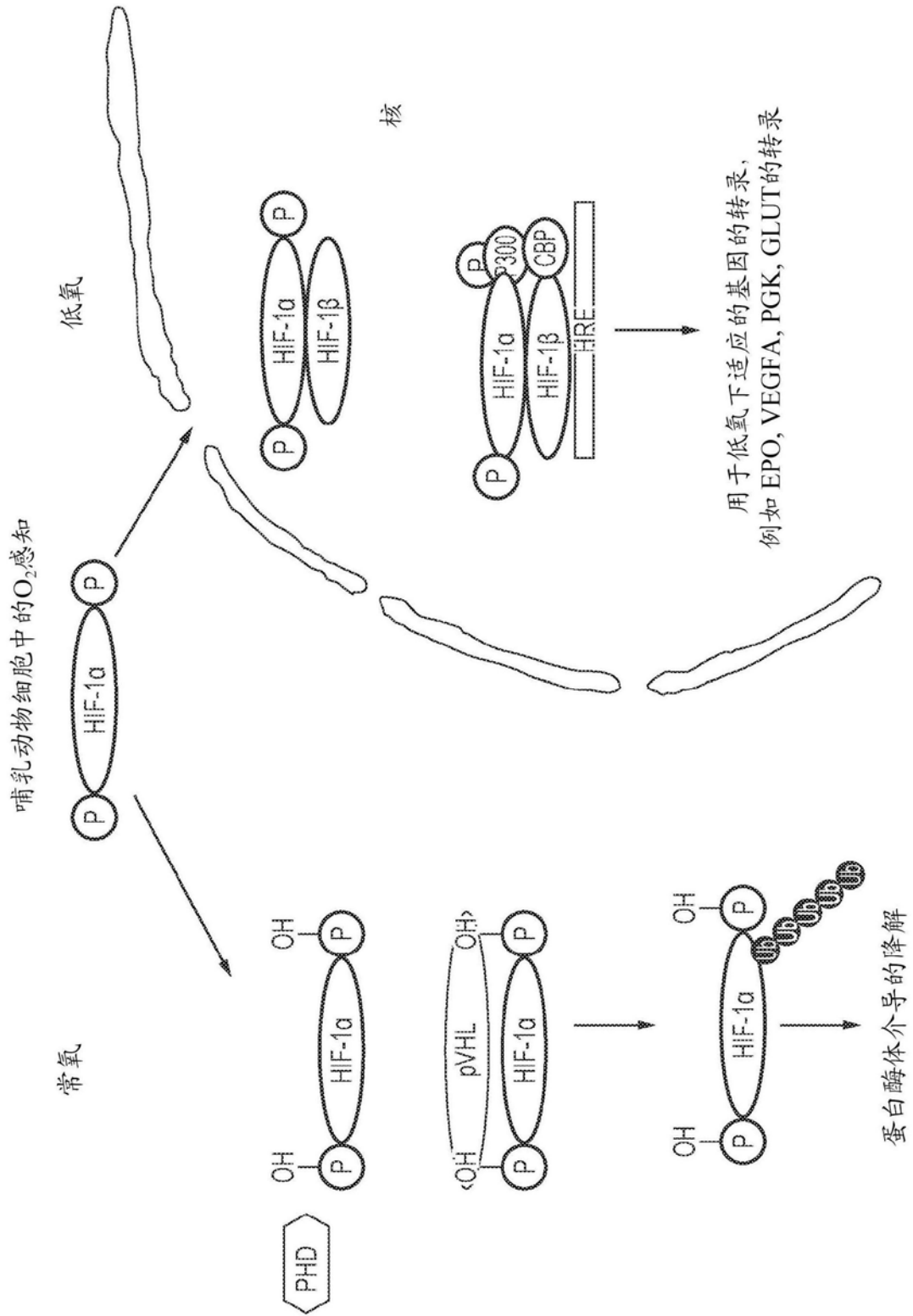


图2

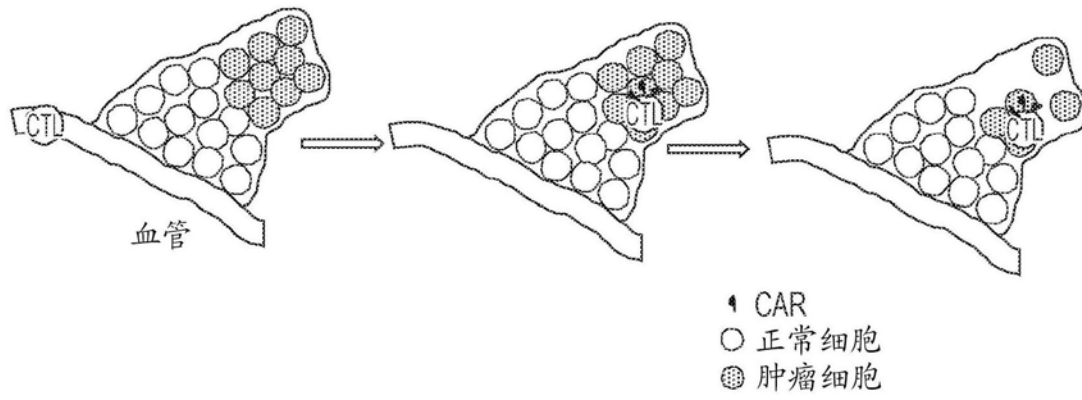


图3

A 人类 (EPO、PGK、葡萄糖tpt、VEGF、NOS、醛缩酶、烯醇酶) **B** 小鼠 (EPO、PGK、LDH、葡萄糖tpt、VEGF、血红素加氧酶)

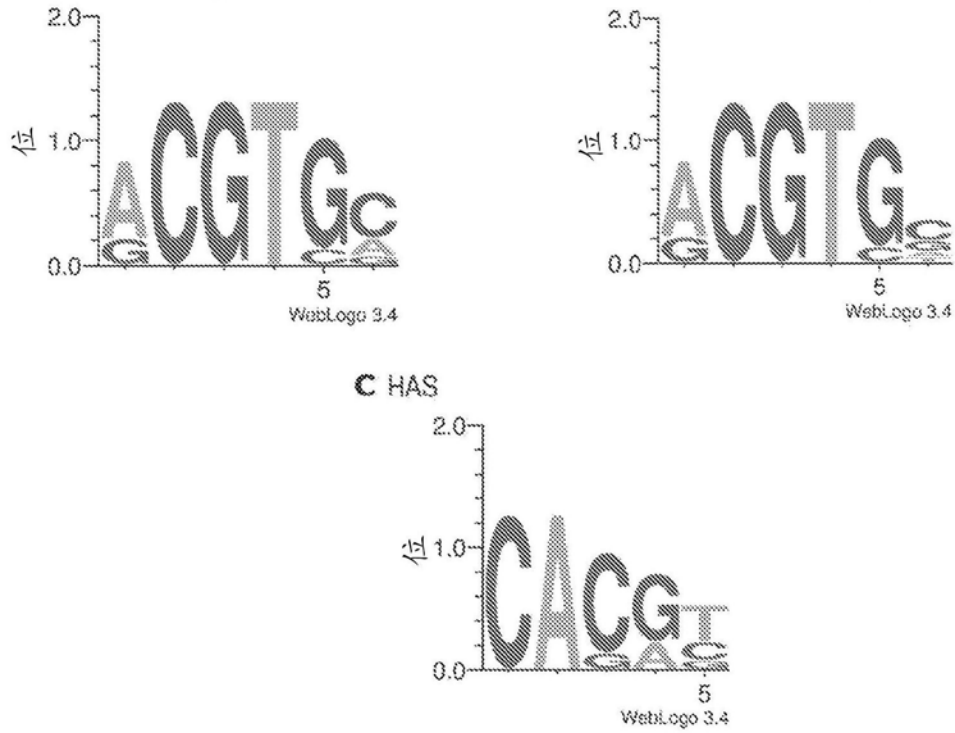


图4

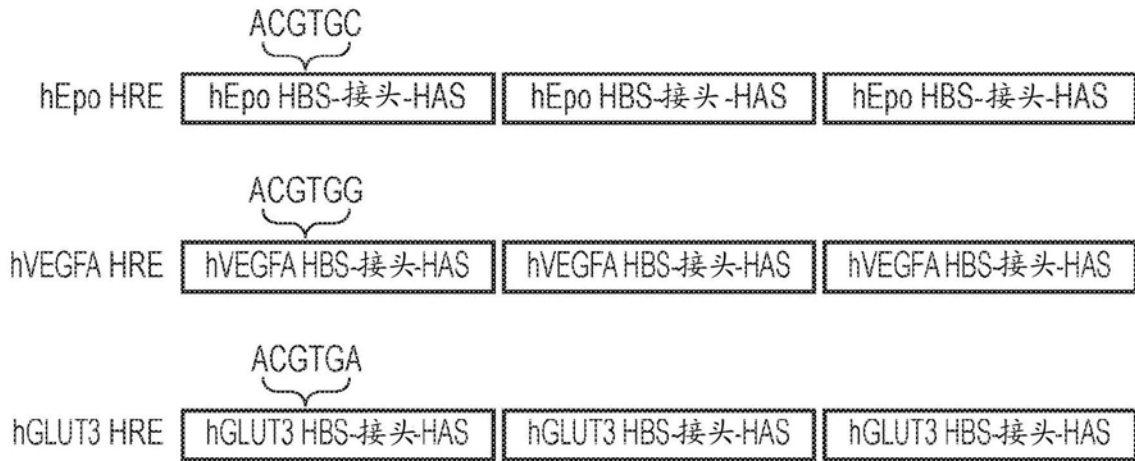


图5

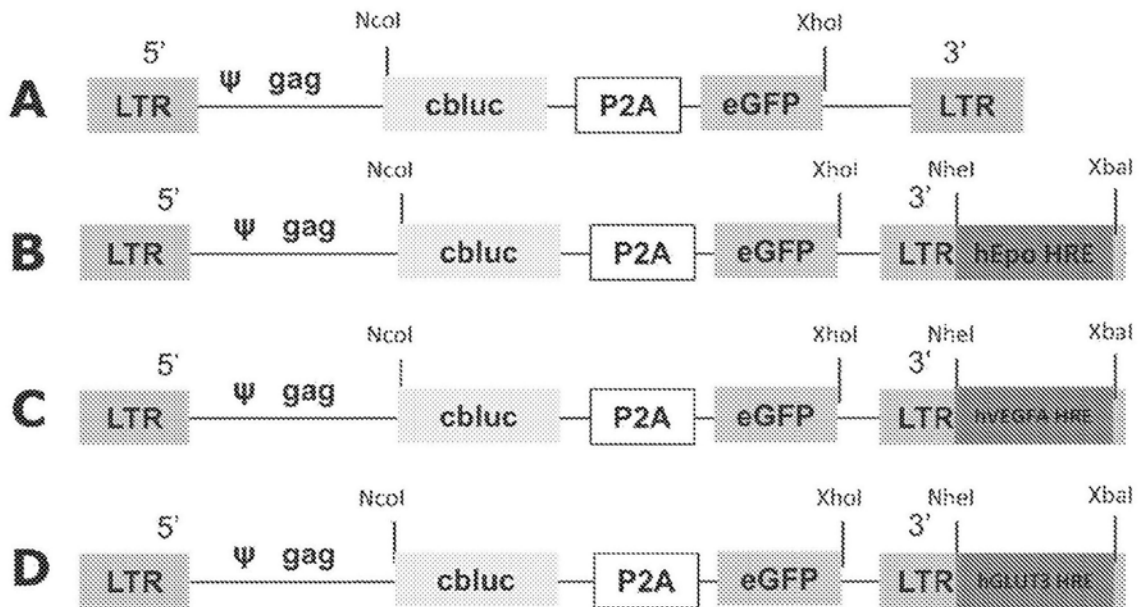


图6

```

>sp|Q16665|HIF1A_人类低氧诱导因子1-α OS=智人(Homo sapiens)
GN=HIF1A PE=1 SV=1
MEGAGGANDKKKISSERRKEKSRDAARSRRSKESEVFYELAHQLPLPHNVSSHLDKASVMRLTISYL
RVRKLLDAGDLIEDDMKAQMNC FYLKALDGFVMTDGDGMIYISDNVNKYMGLTQFELTGHSVDFDT
HPCDHEEMREMLTHRNLVKKGKEQNTQRSFFLRMKCTLT SRGRTMNIKSATWKVLHCTGHIHVYDTNS
NQPQCGYKKPPMTCLVLICEPIPHPSNIEIPLDSKTFLSRHSLDMKFSYCDERITELMGYEPEELLGRS
IYEYYHALDSDHLTKTHHDMFTKGVVTTGQYRMLAKRGGYVWVETQATVIYNTKNSQPQCIVCVNYVVS
GI IQHDLI FSLQQTECVLKPVESSDMKMTQLFTKVESEDTS SLEFDKLLKKEPDALTLI APAAGDTTISID
EGSNDTETDECOLEEVPLINDVMLPSPNEKTONINLMSPLPTAETPKPLRSSADPALNQEVALKLEPN
PESIEISETMEQIQDCTPSPSISGSTRQSSPEPNSPSEYCFYVDSIMVNEFKLEIVKLI FAEDTEAKNPE
STQDTDDIDLEMLAPYIPMDDDFQLEPSEFQISPLESSSASPESASPOSTVTVFQQTQIQEPTANATTTTA
TTDELKTVTKDRMEDIKILIASPSPTHHKETT SATSSPYRDTQSRTASPNRAGKGVIEQTEKSHRSP
NVLSVALSQRTTVPEEELNPKILALQNAQRKRKMEHDGSLFQAVGIGTLLQQPDDHAATTSLSWKRVKG
CKSSEQNGMEQKTIILIPSDLACRLLGQSMDESGLPQLTSYDCEVNAPIQGSRNLLQGEELLRALDQVN
    
```

图7

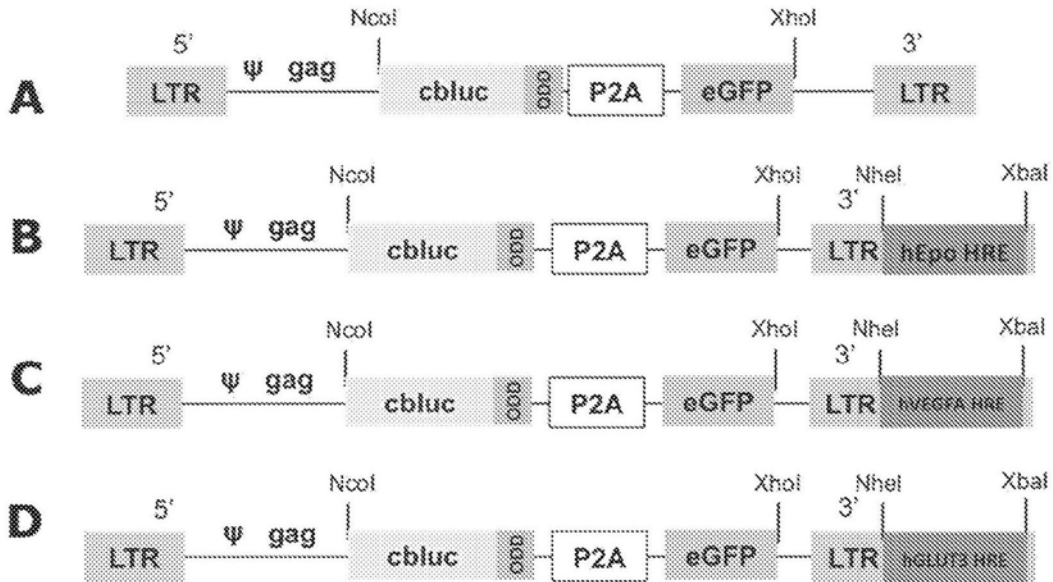


图8

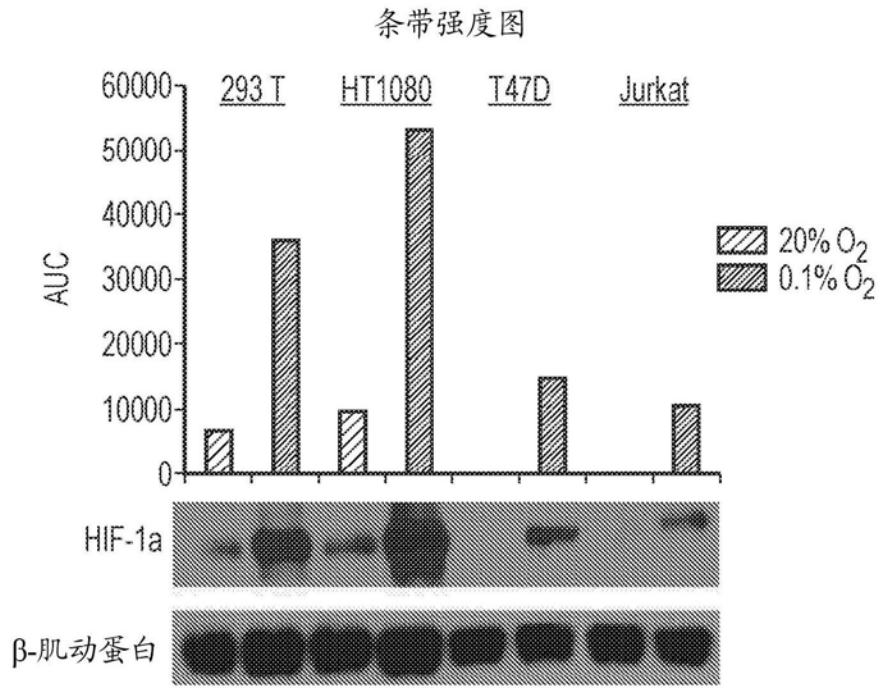


图9

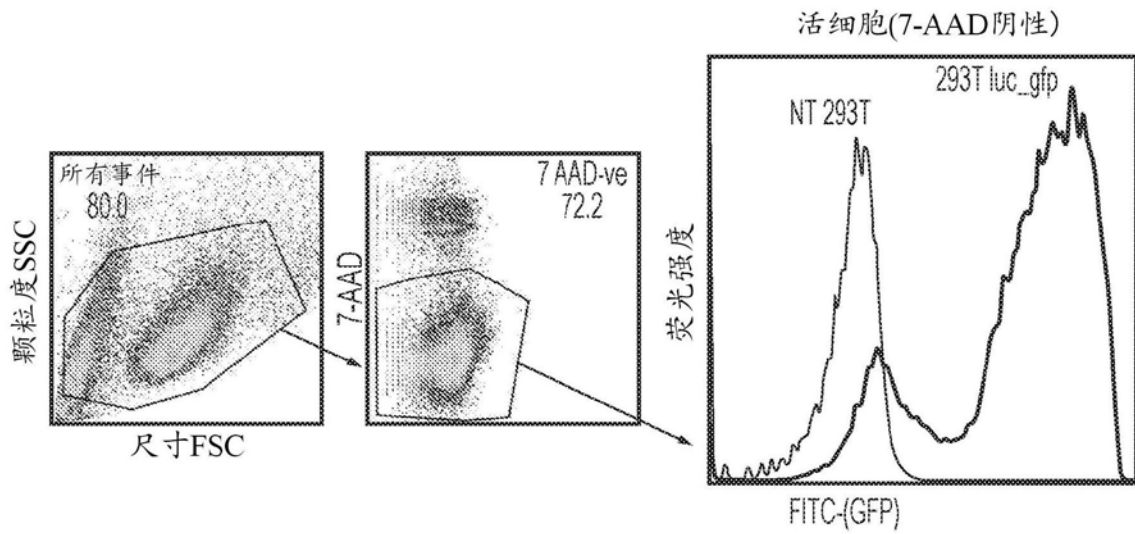


图10

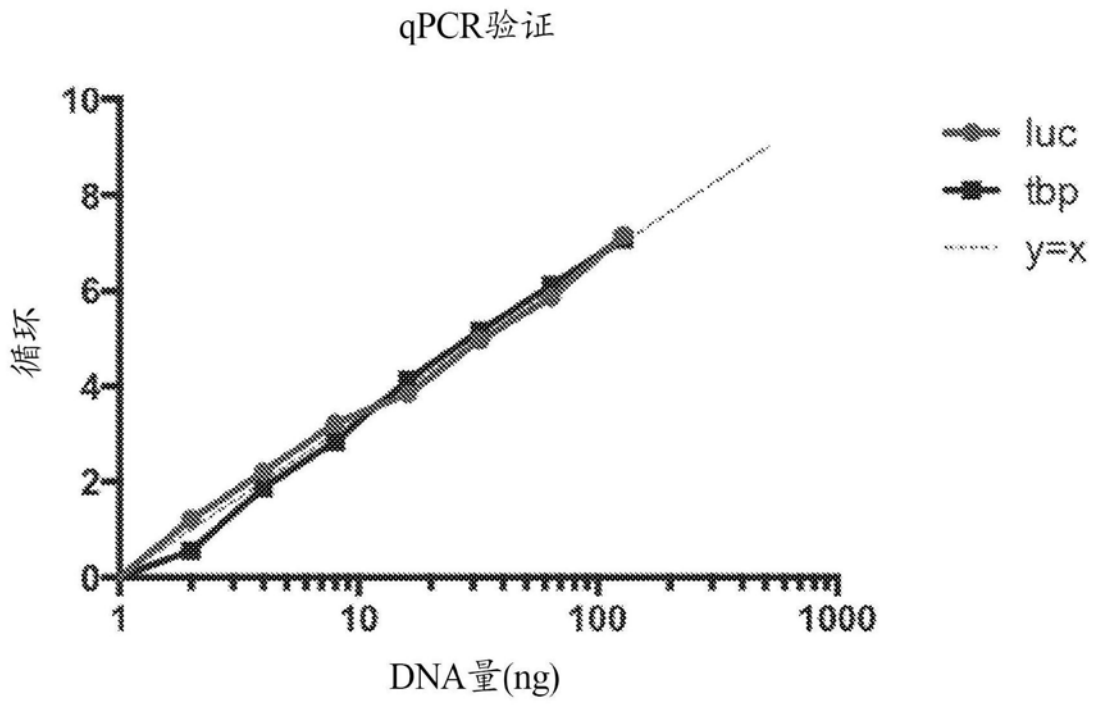


图11

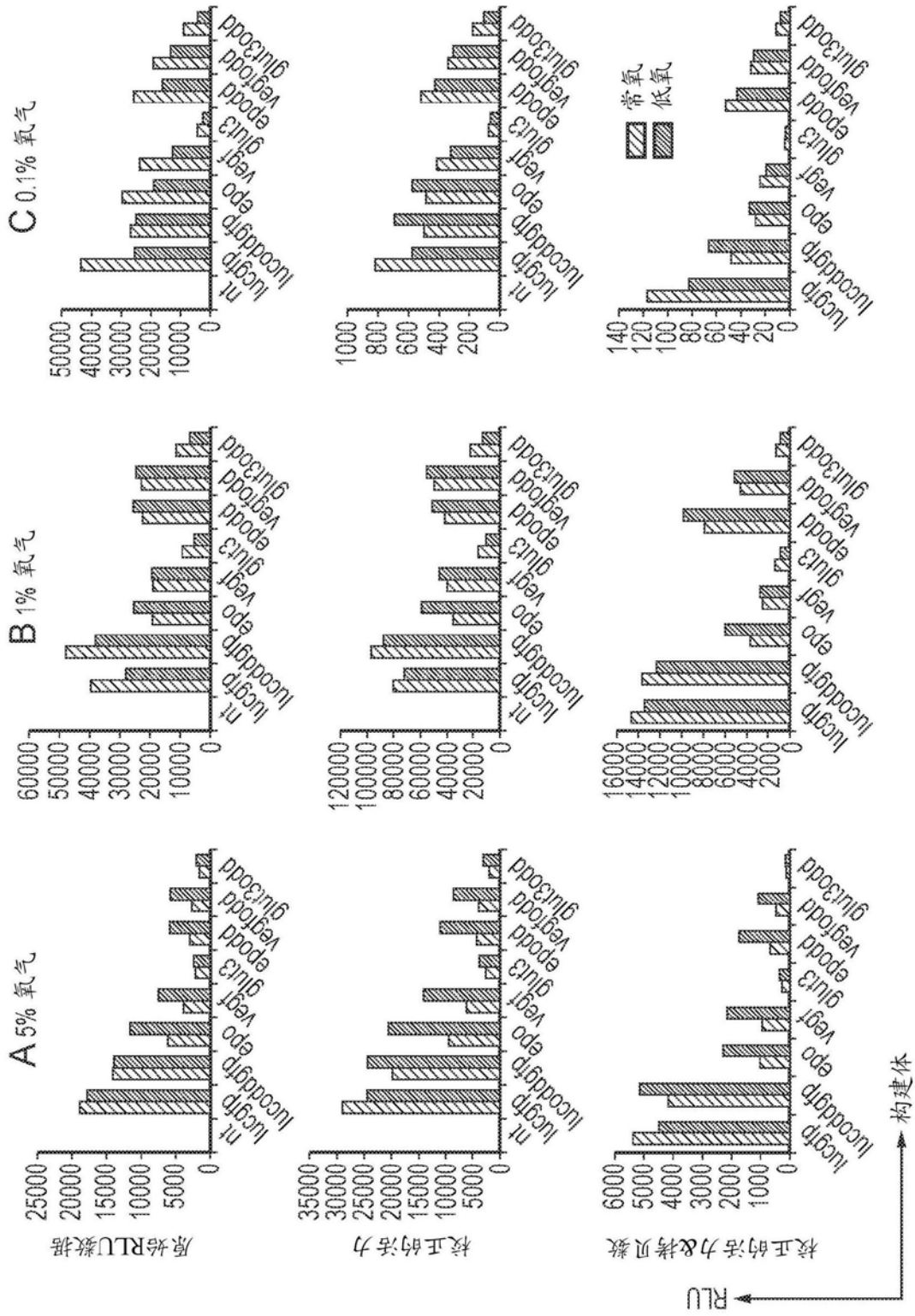


图12

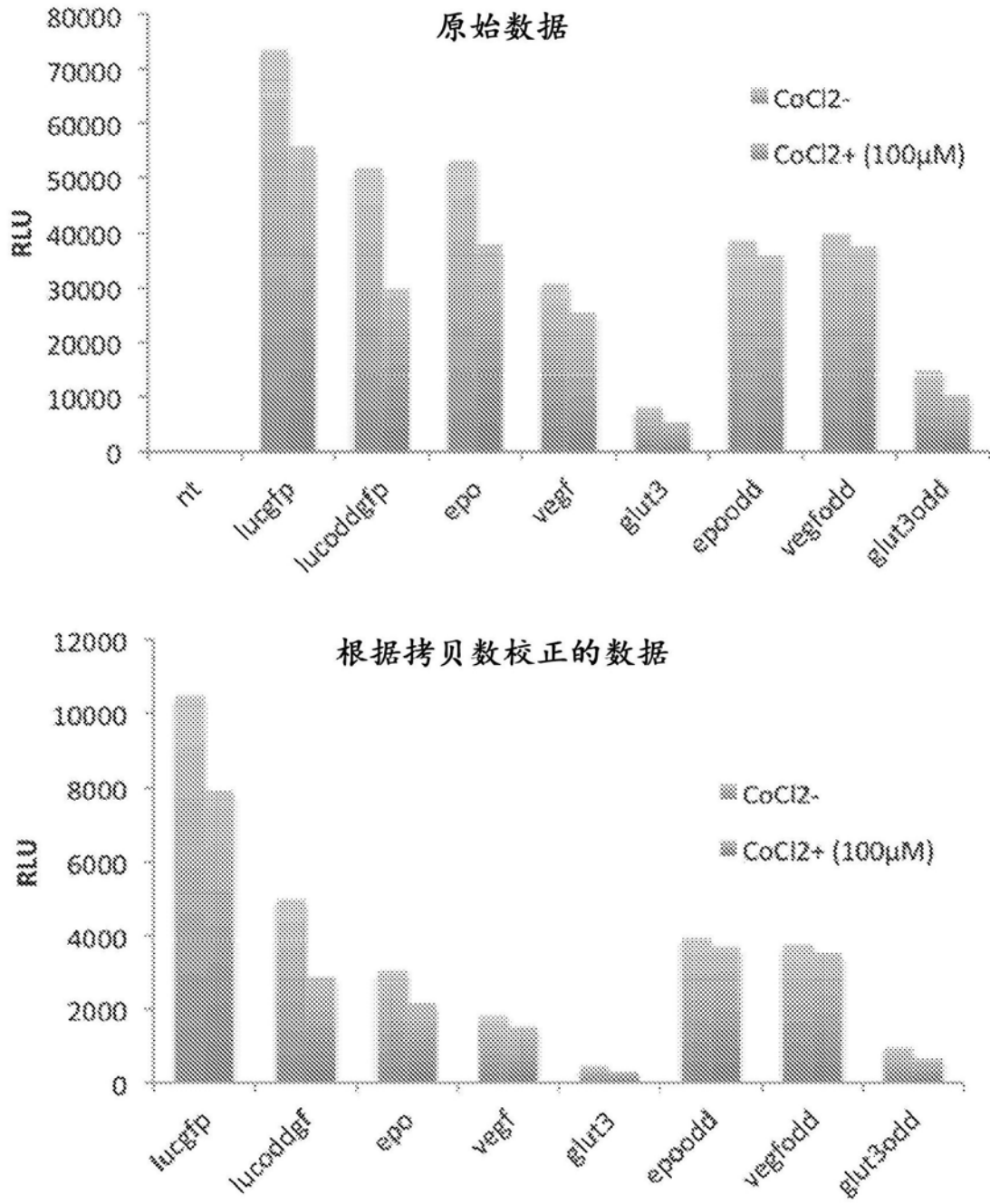


图13

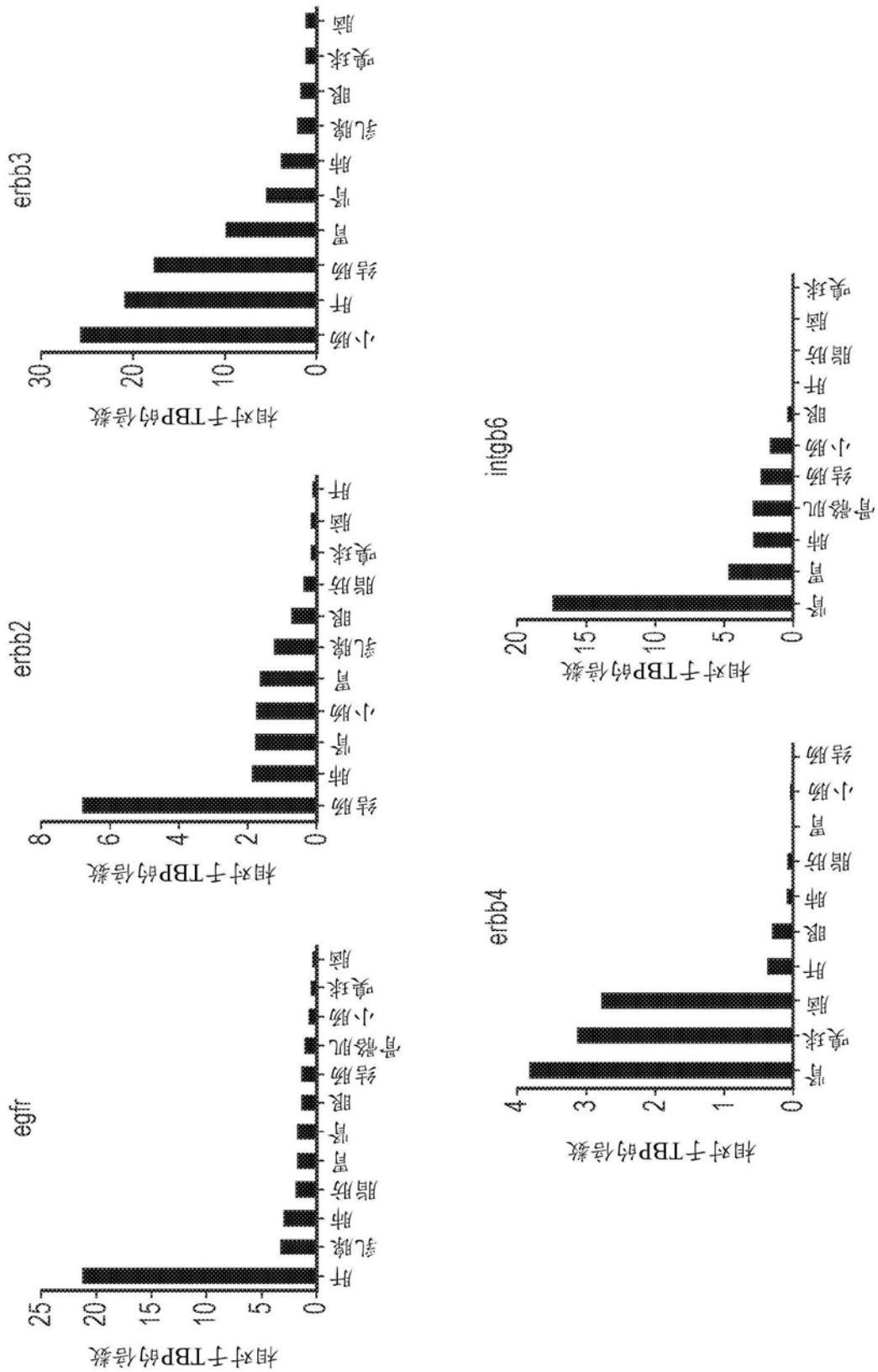


图14

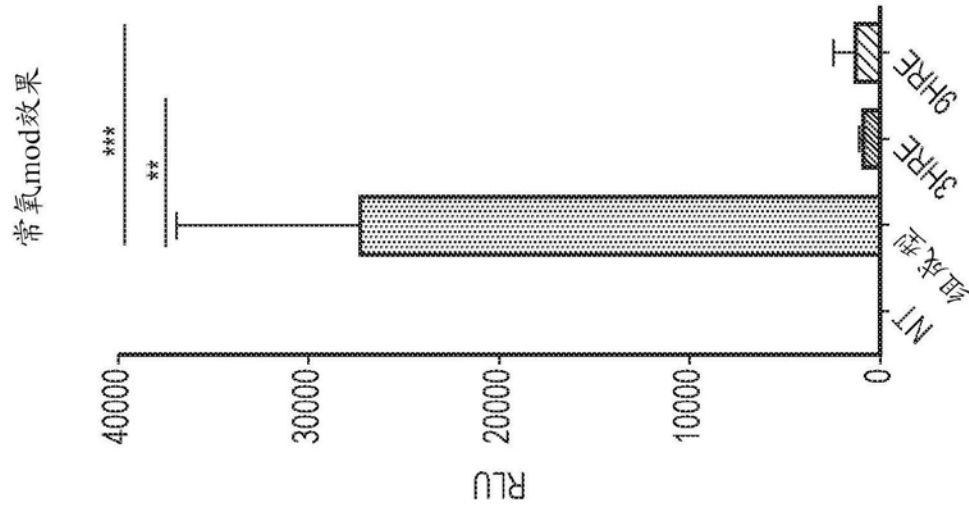


图15

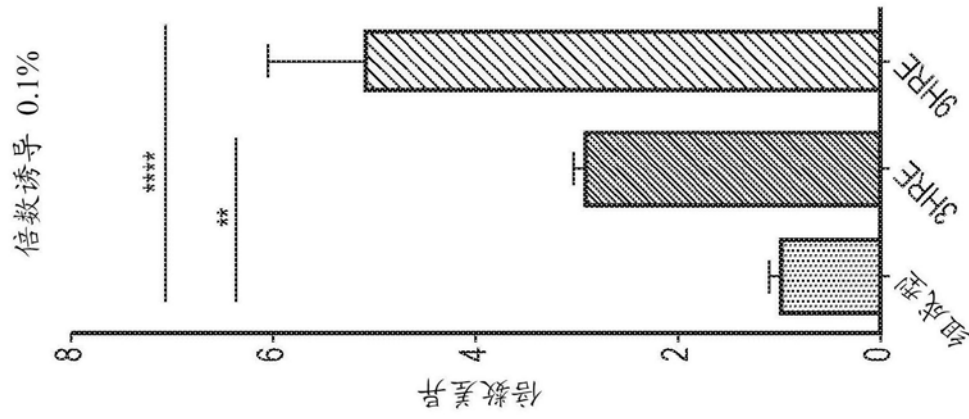


图16

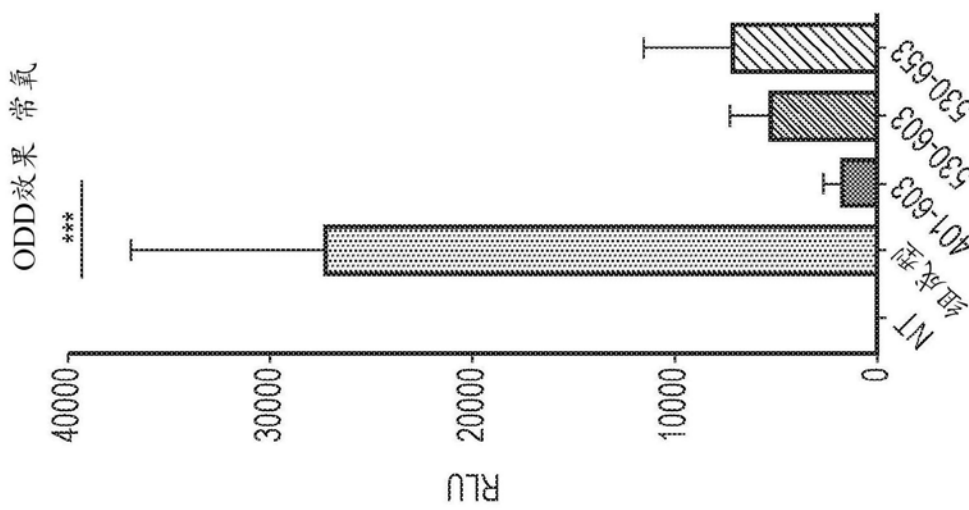


图17

A



图17a

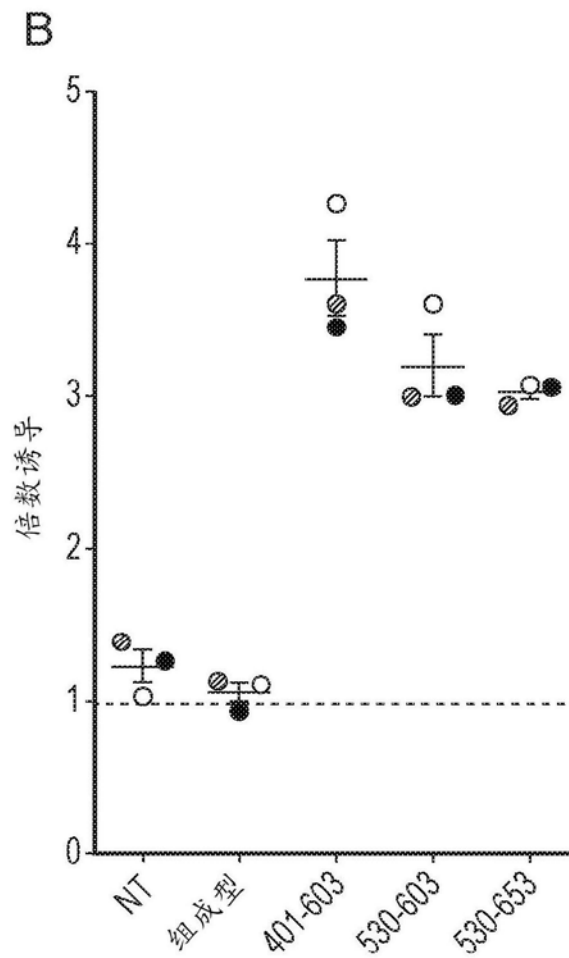


图17b

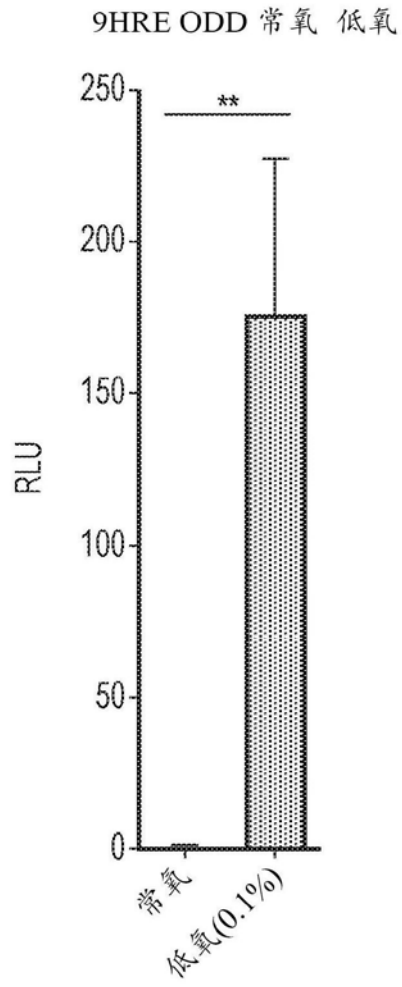


图18

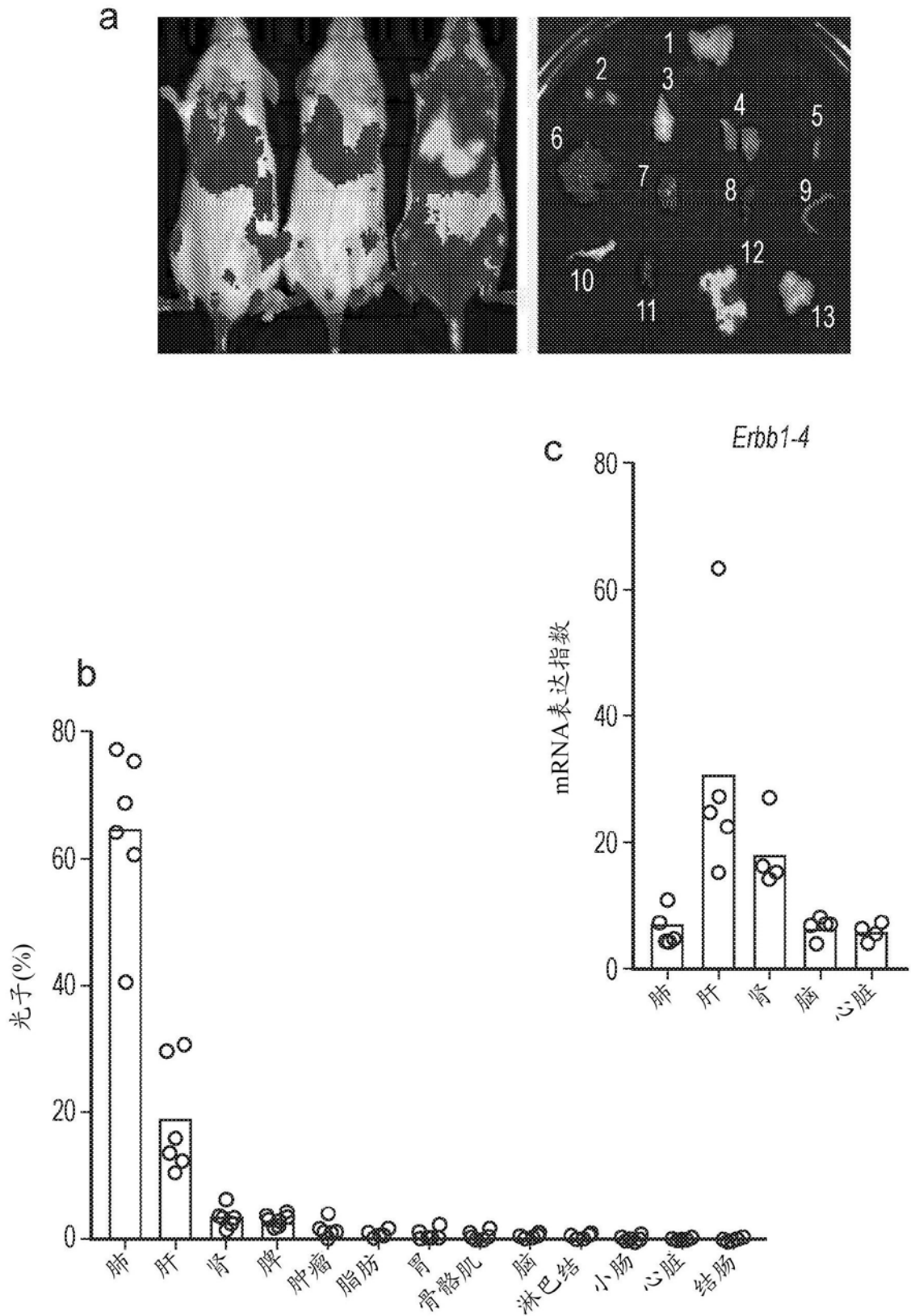


图19

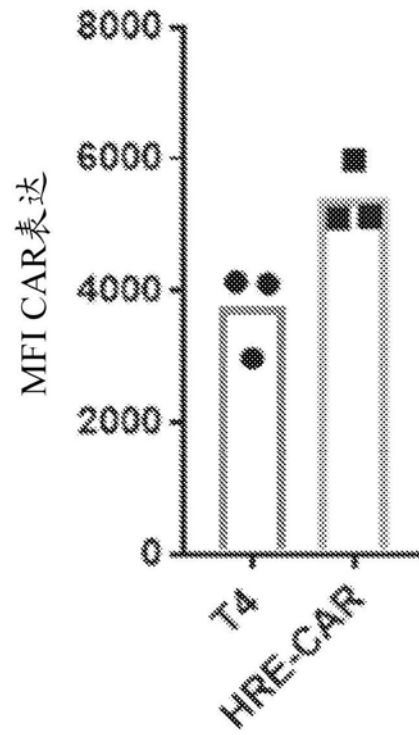


图20

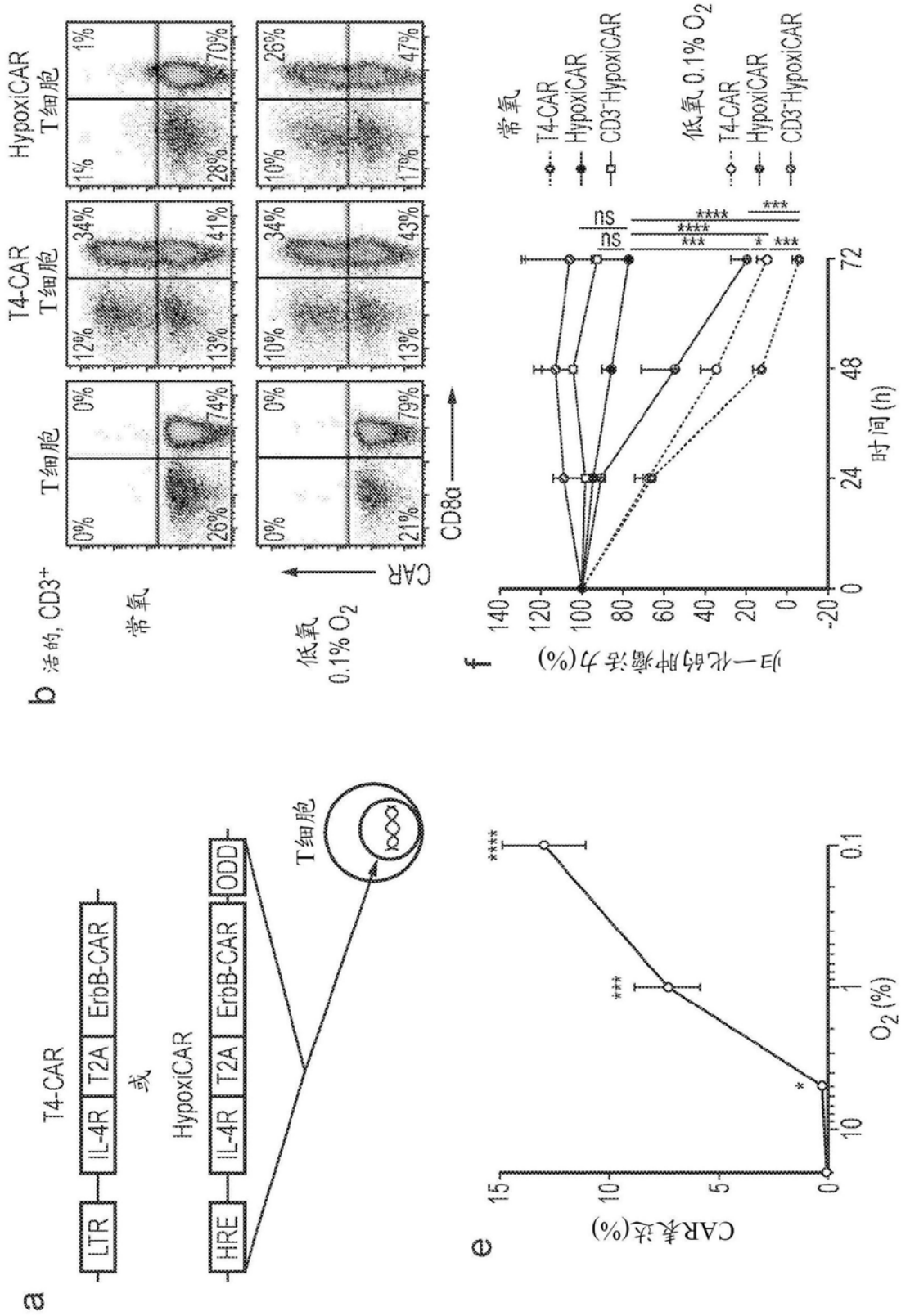


图21

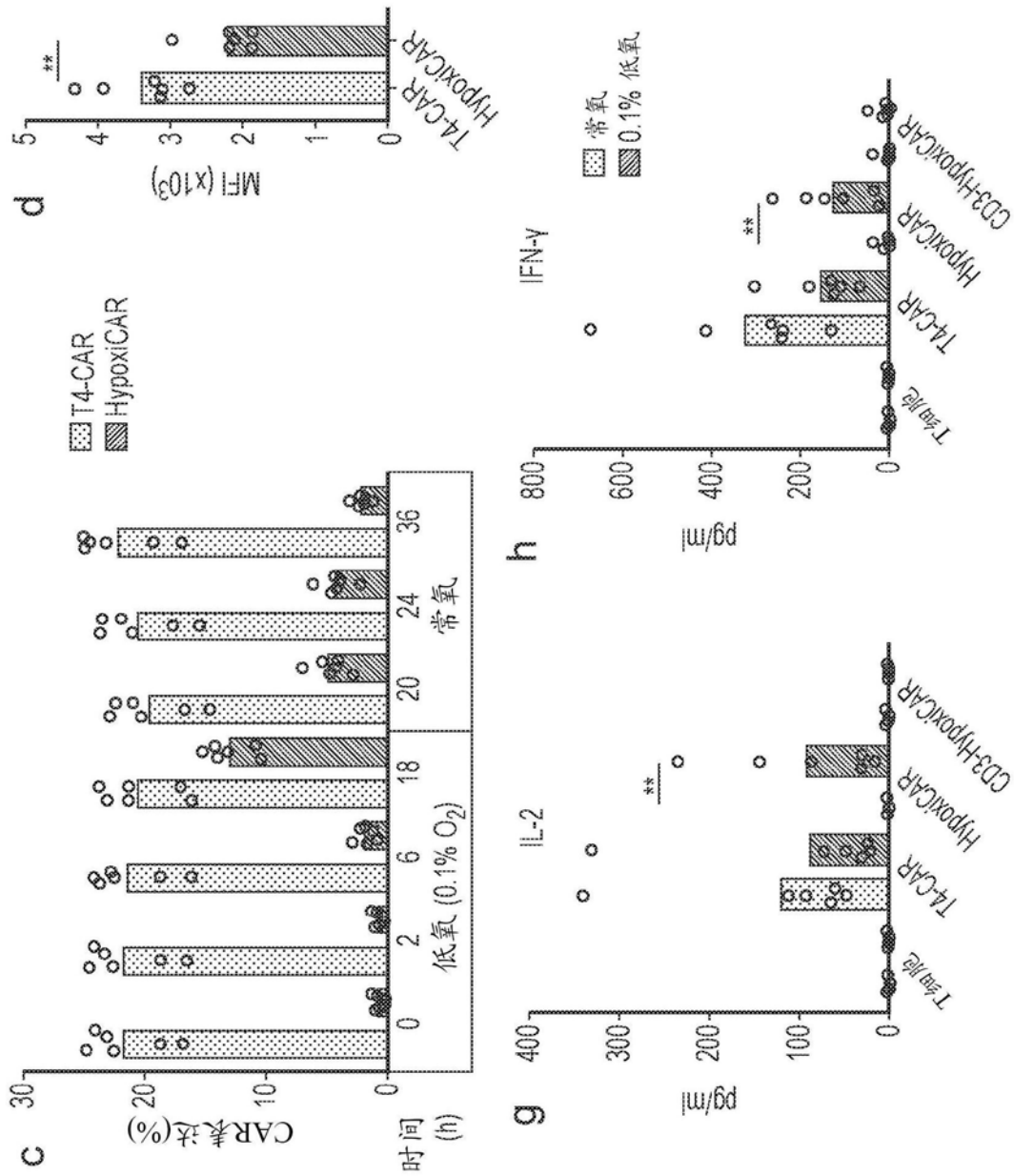


图21 (续)

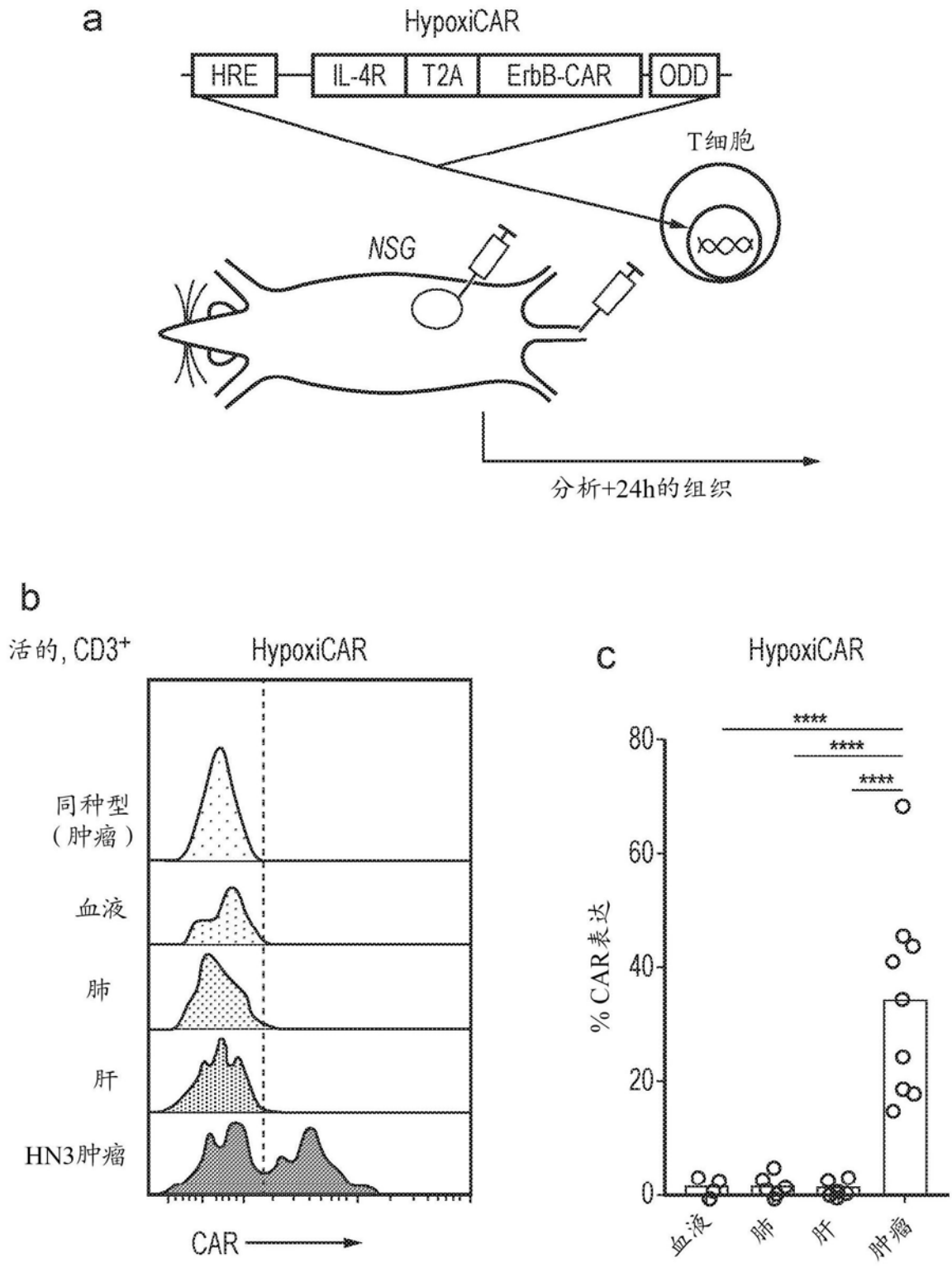


图22

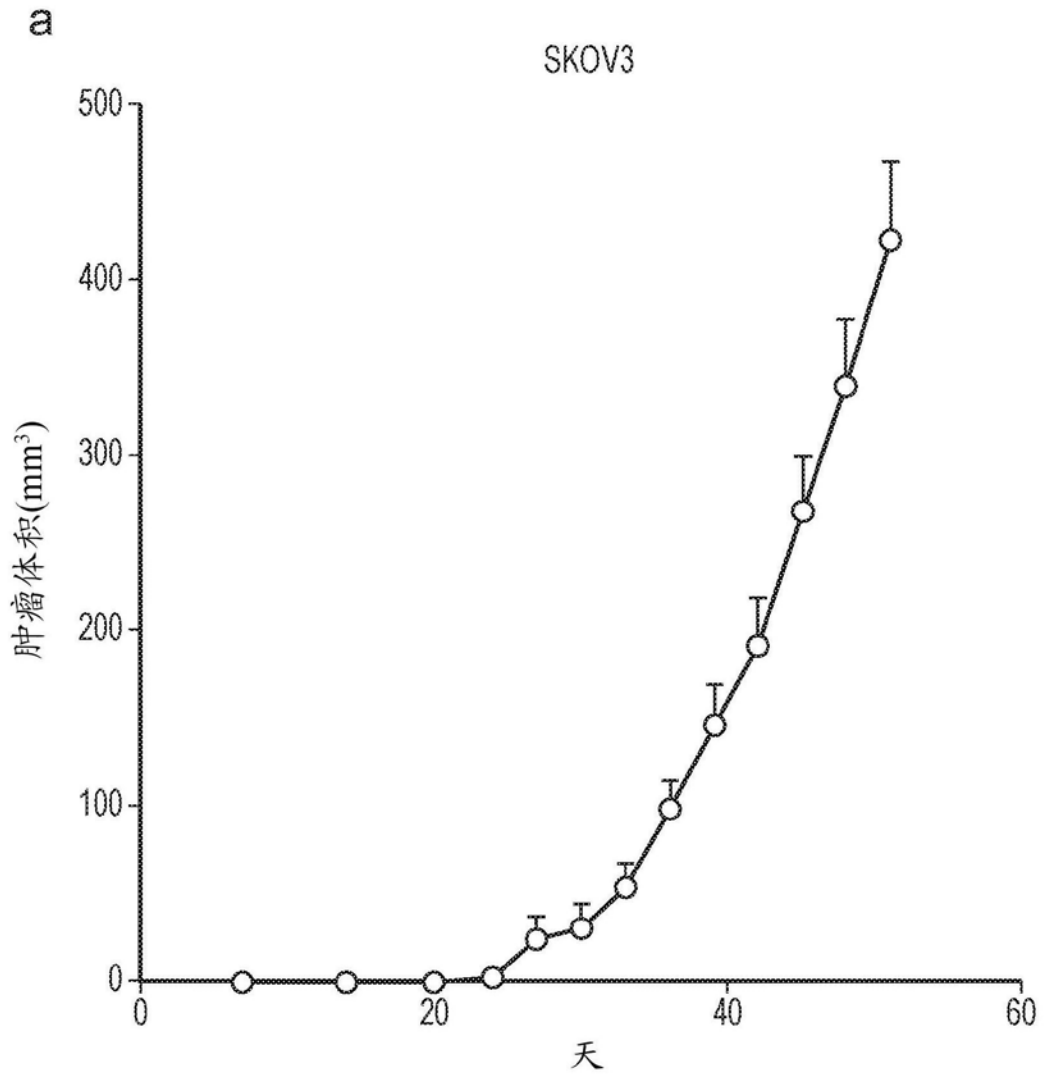


图23

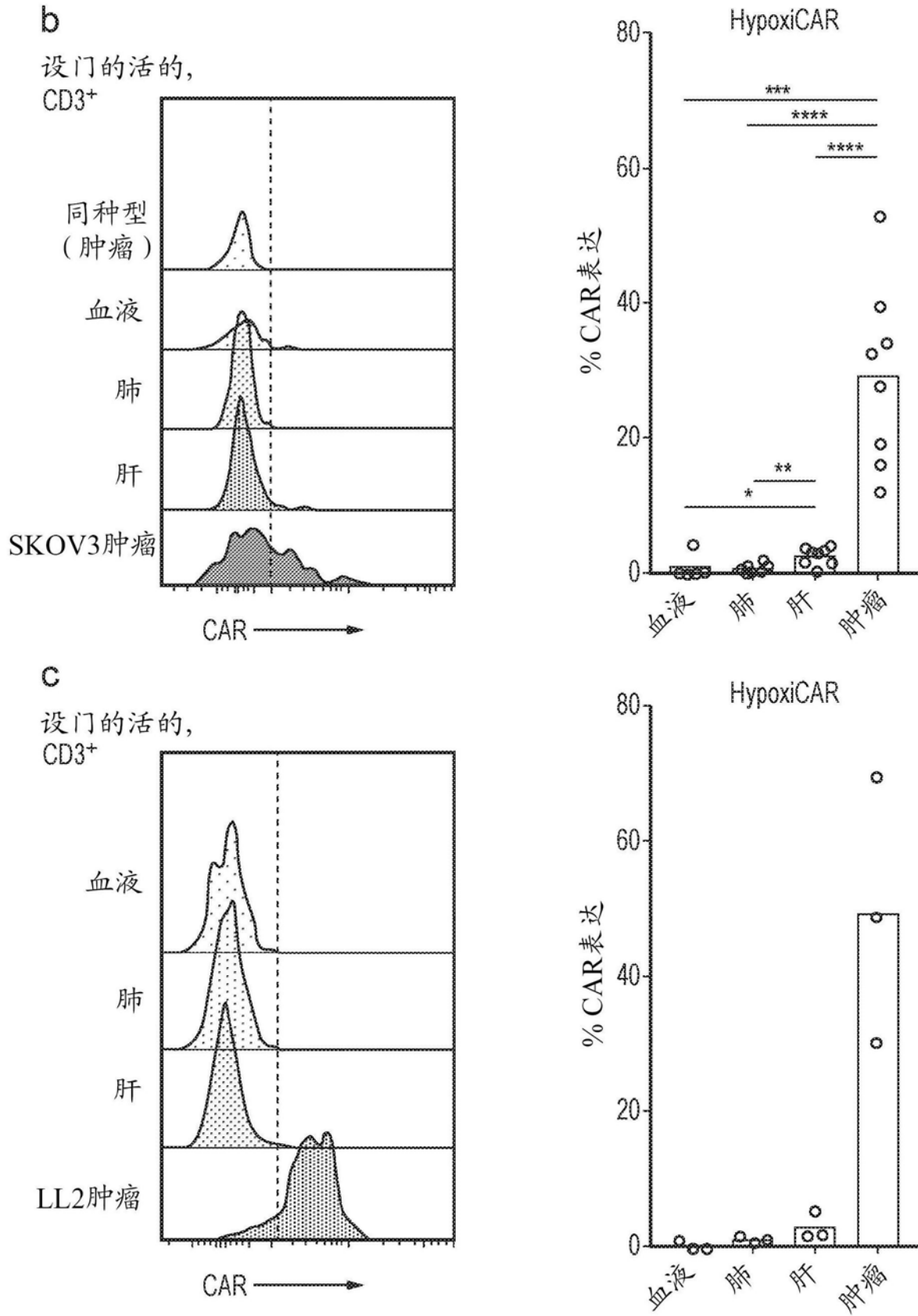


图23(续)

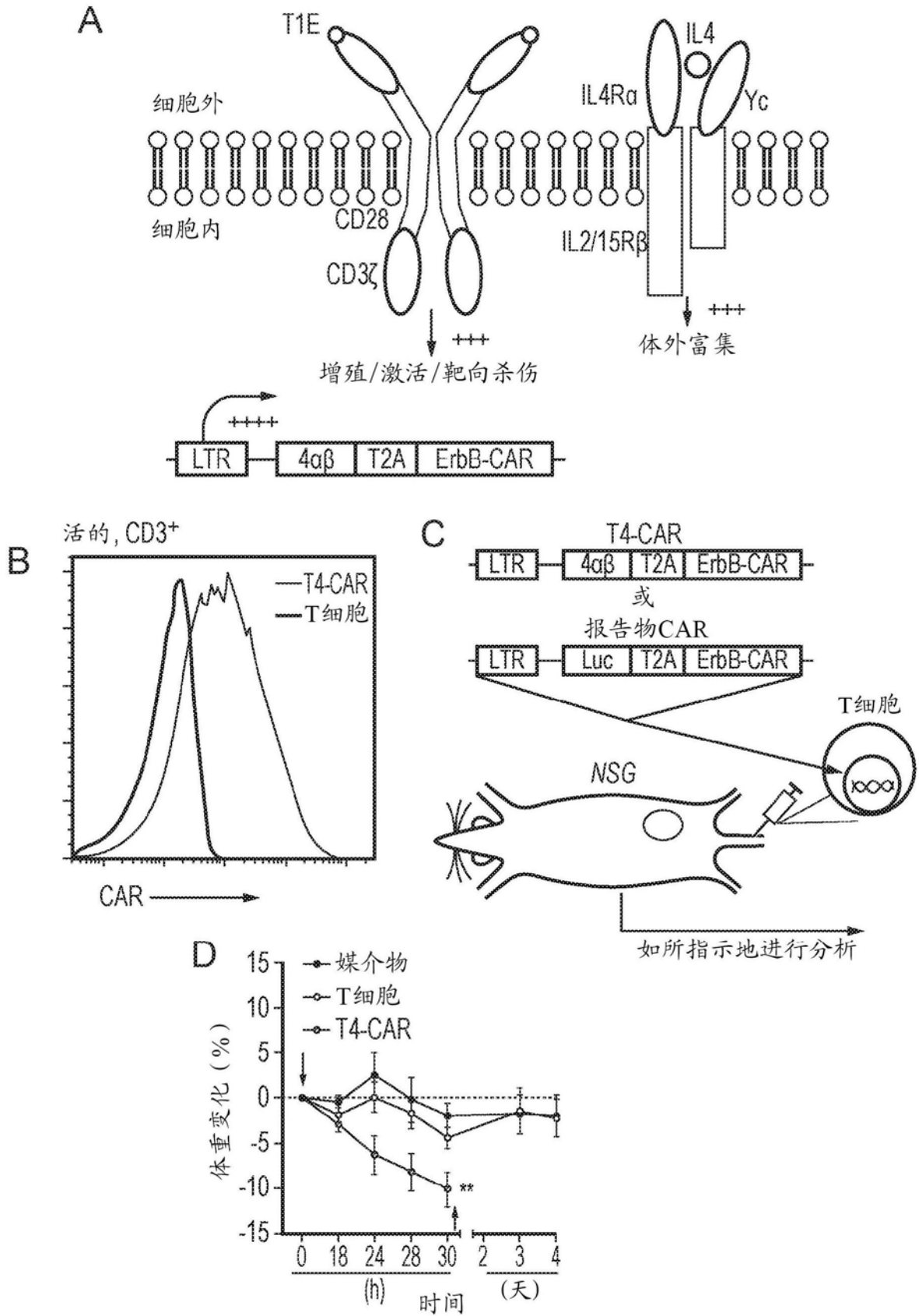


图24

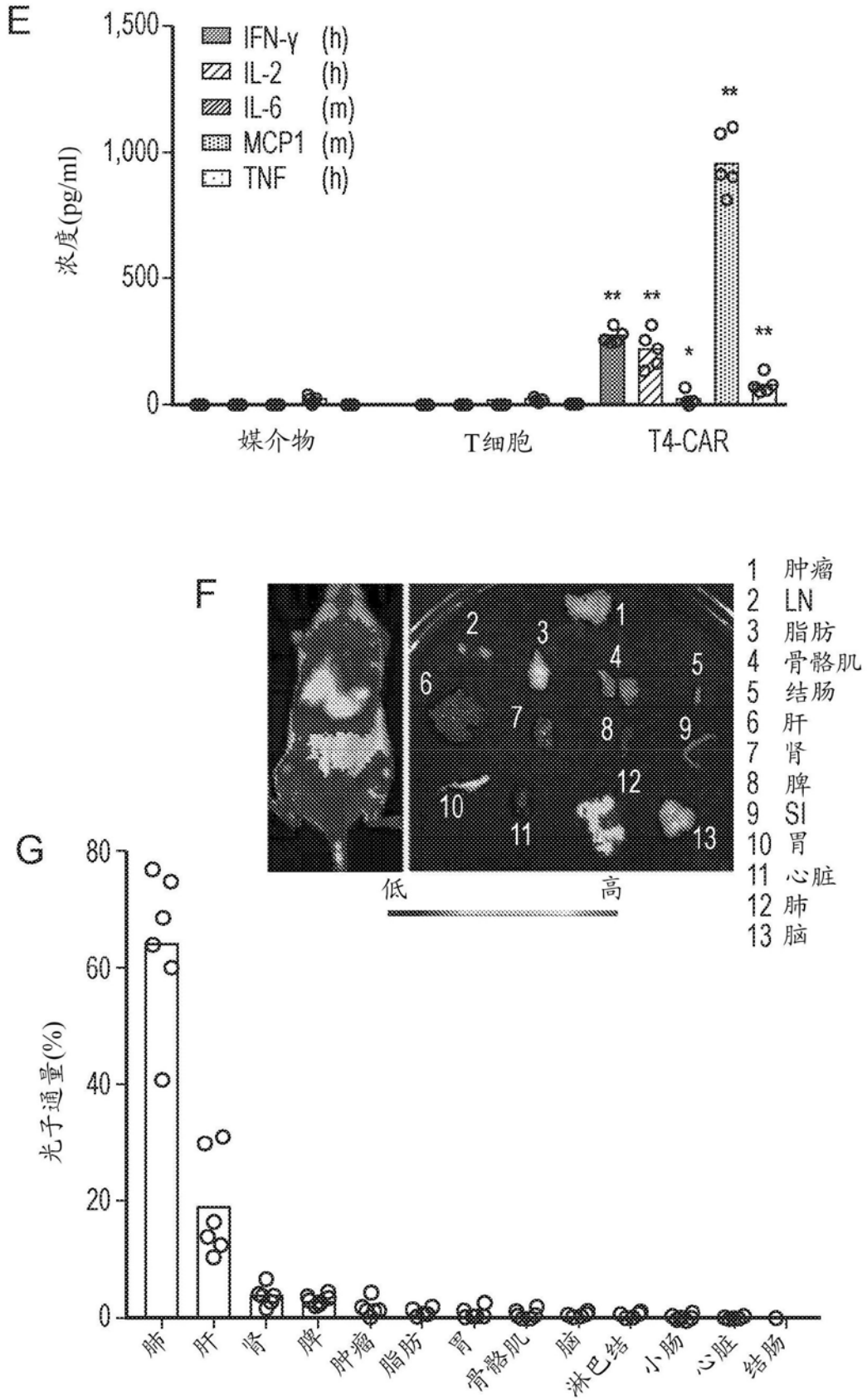


图24(续)

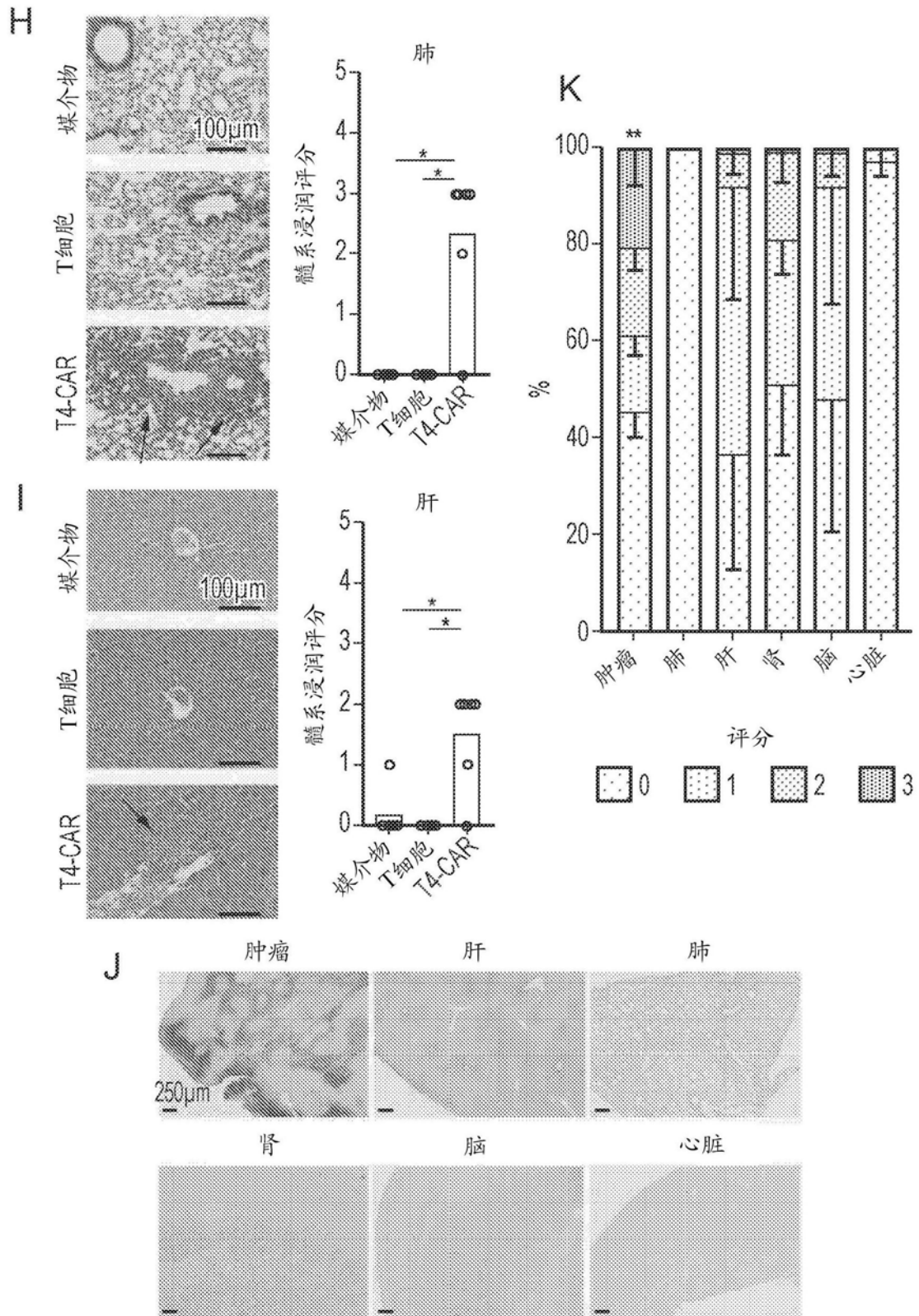
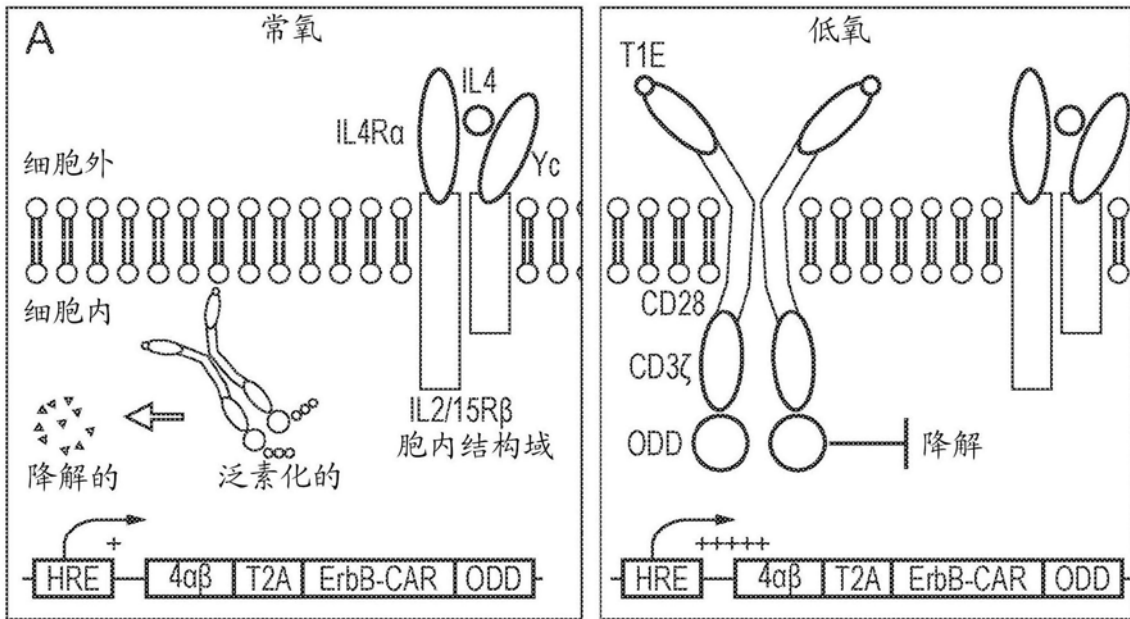


图24(续)



B 活的, CD3⁺ 常氧 低氧 0.1% O₂

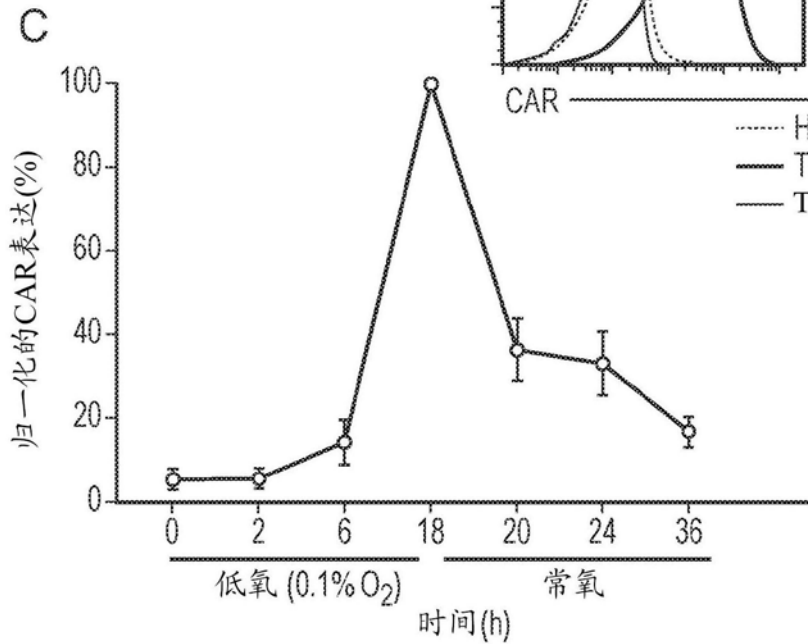
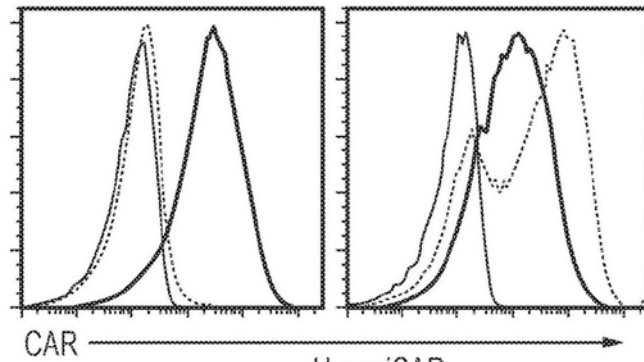


图25

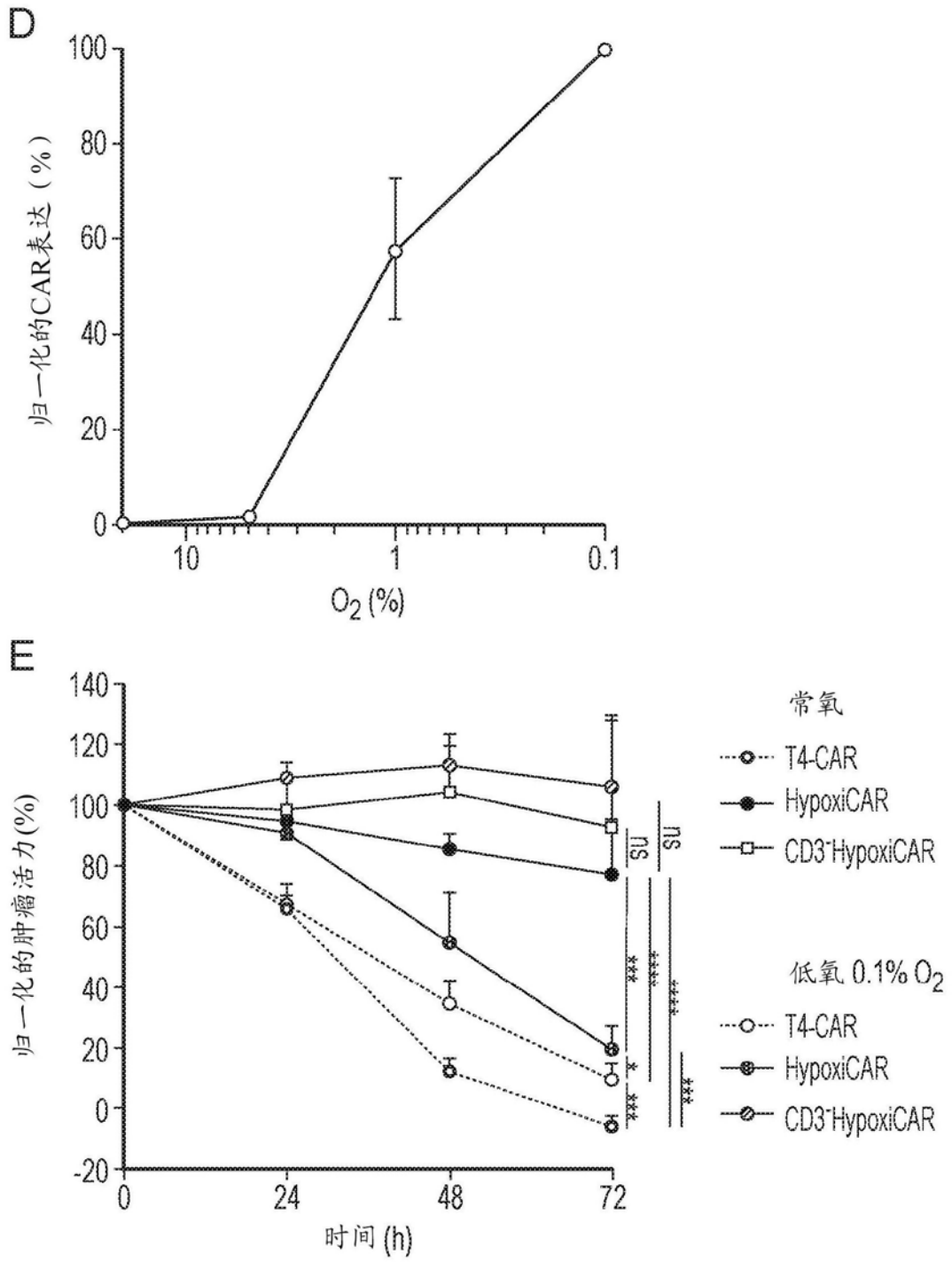


图25 (续)

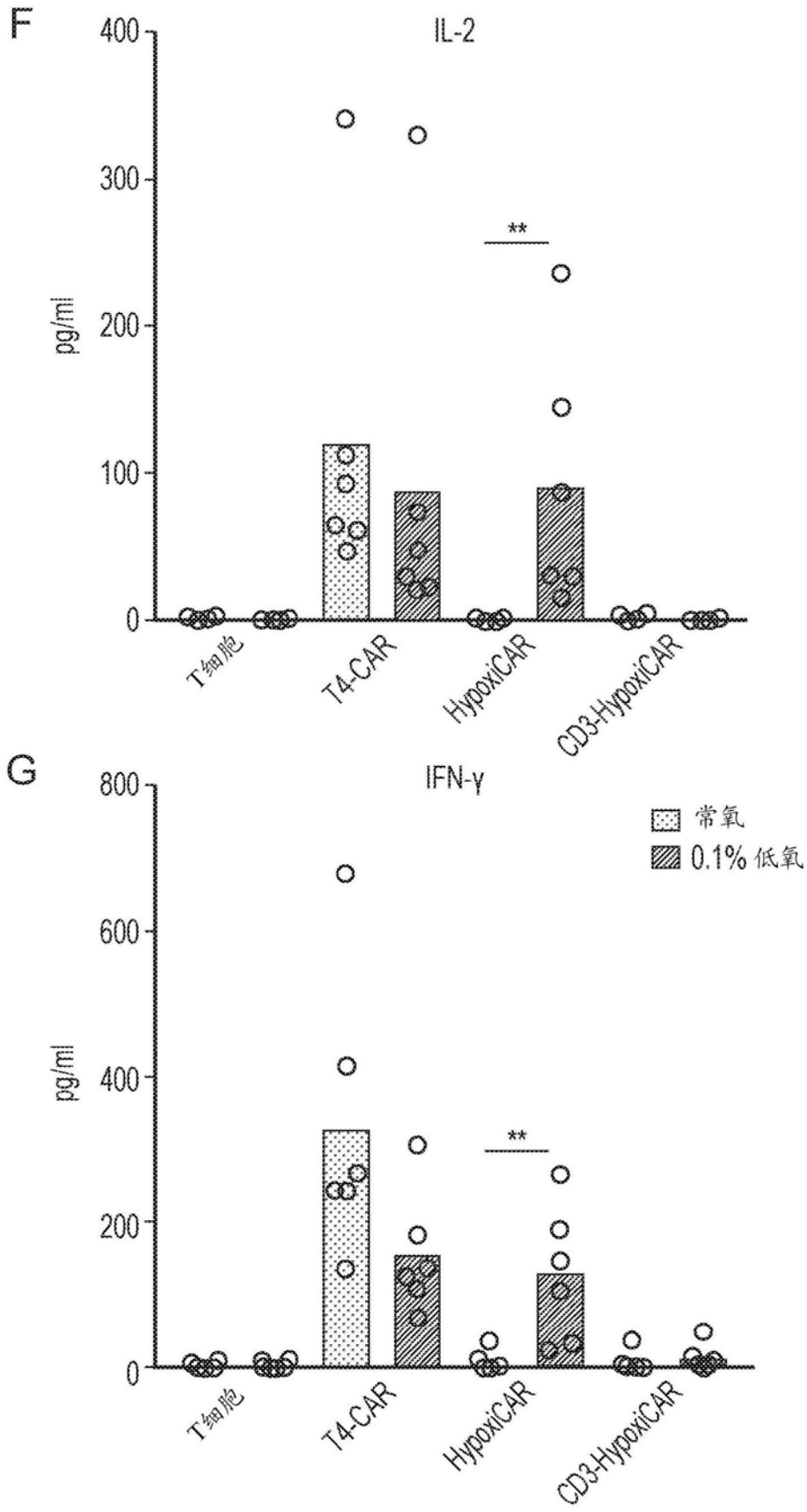


图25 (续)

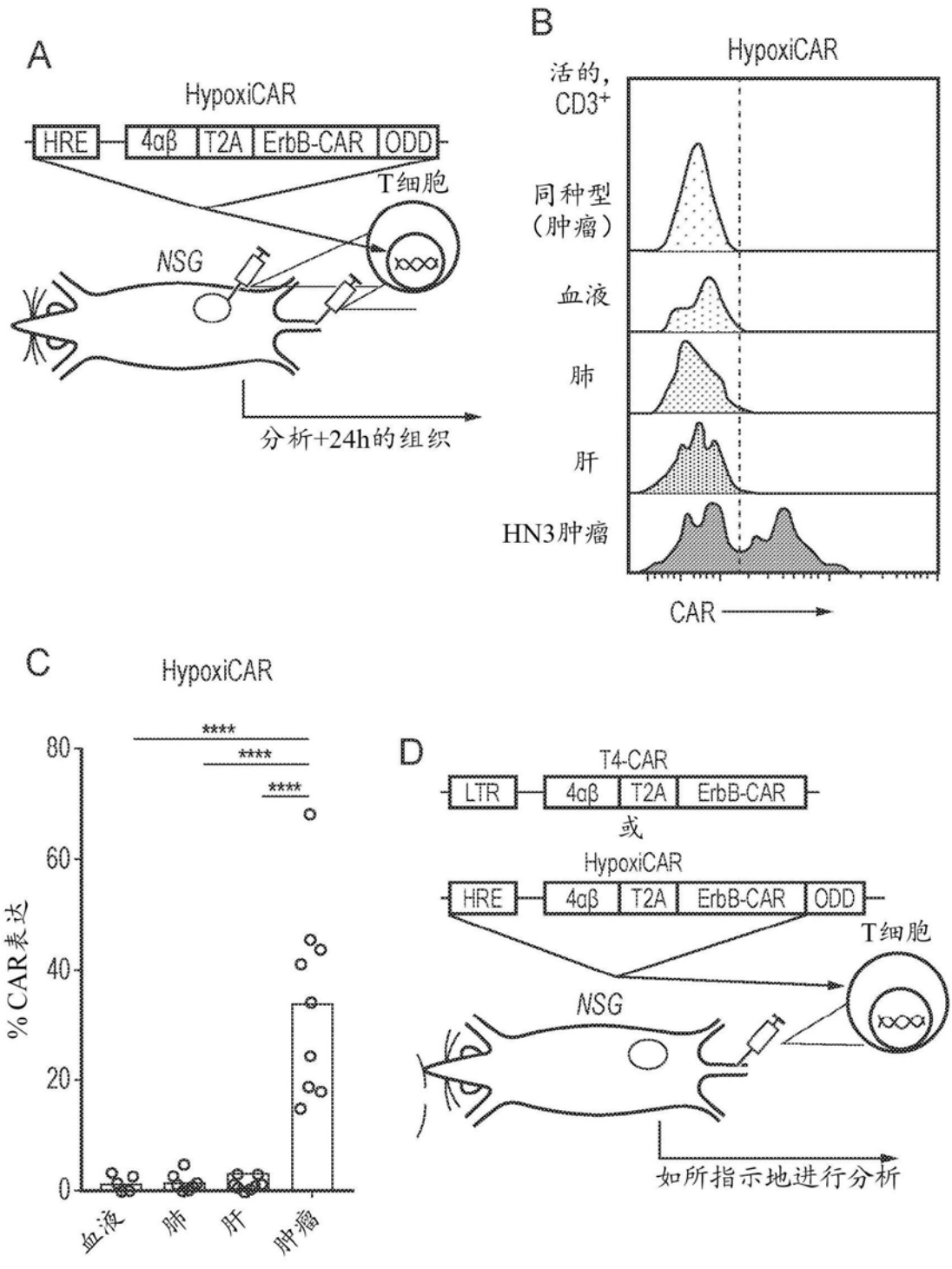


图26

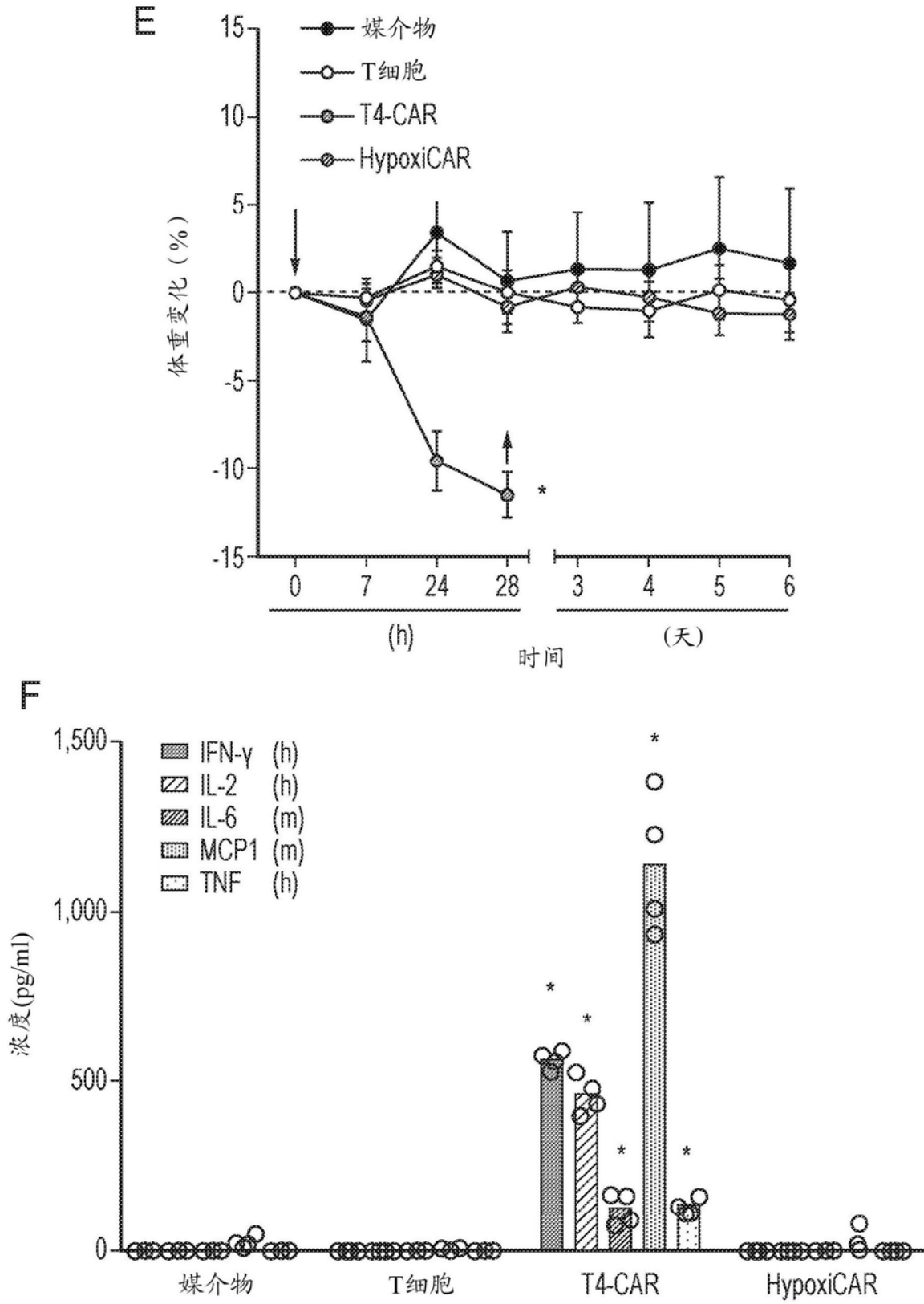


图26 (续)

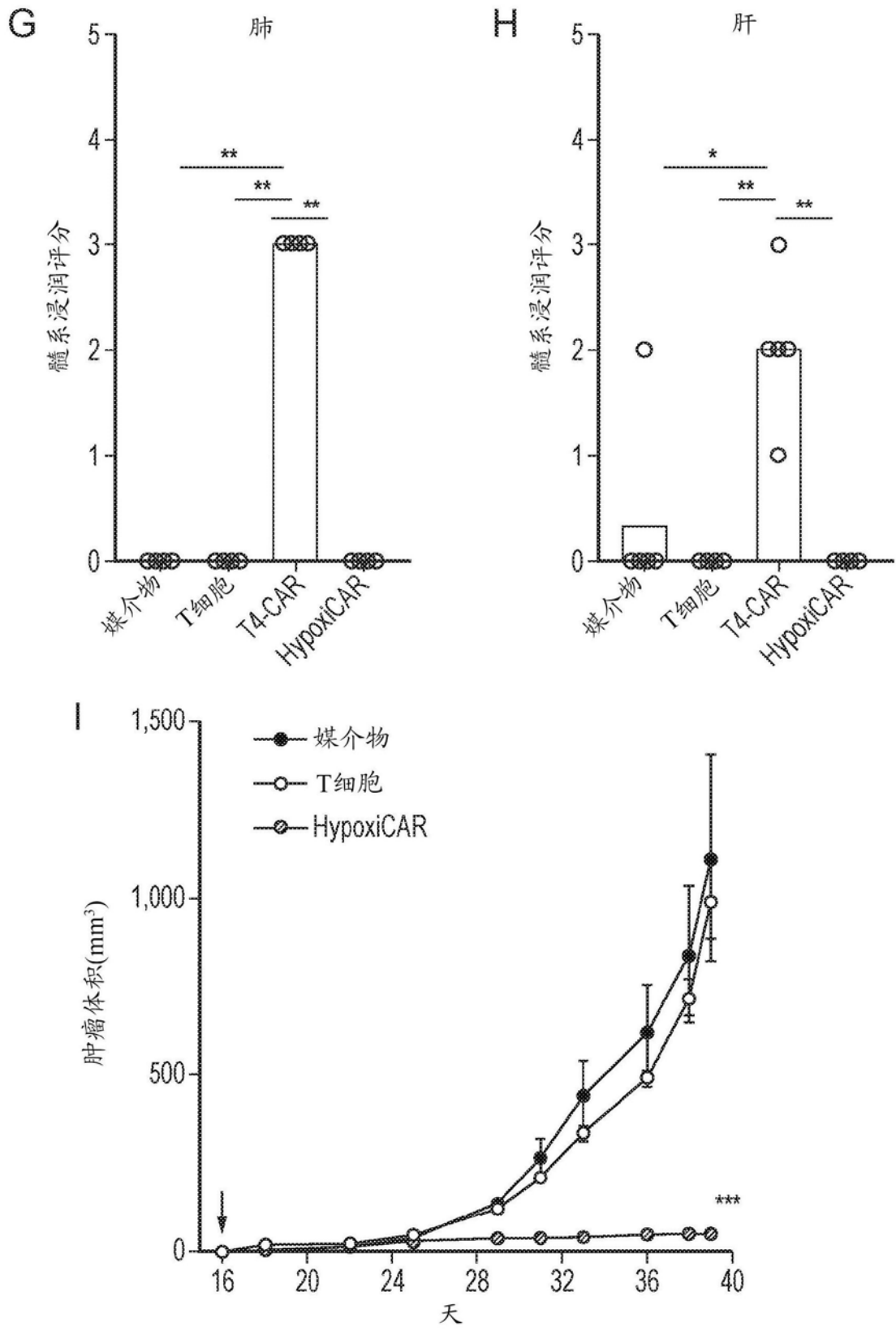


图26 (续)

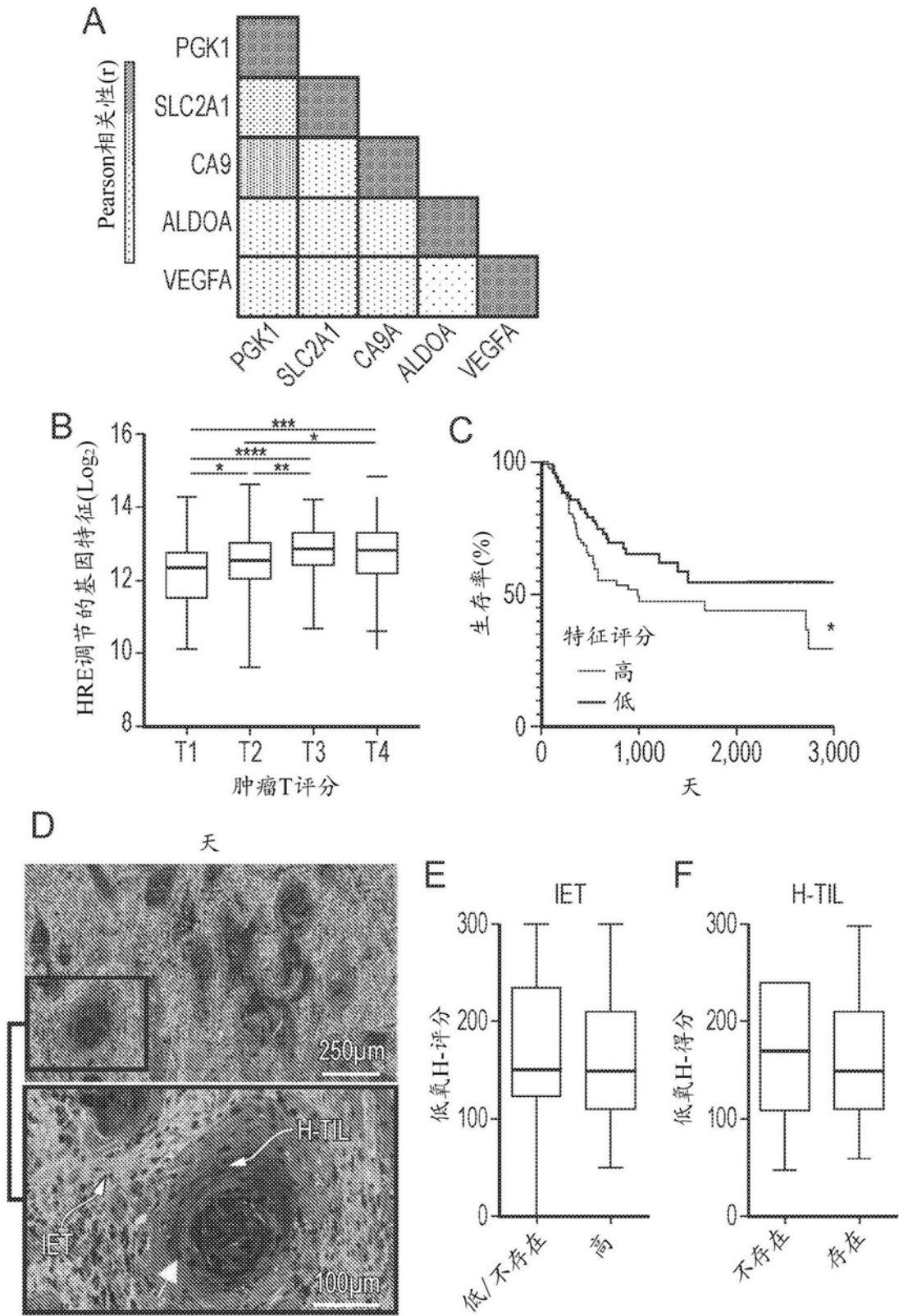


图27

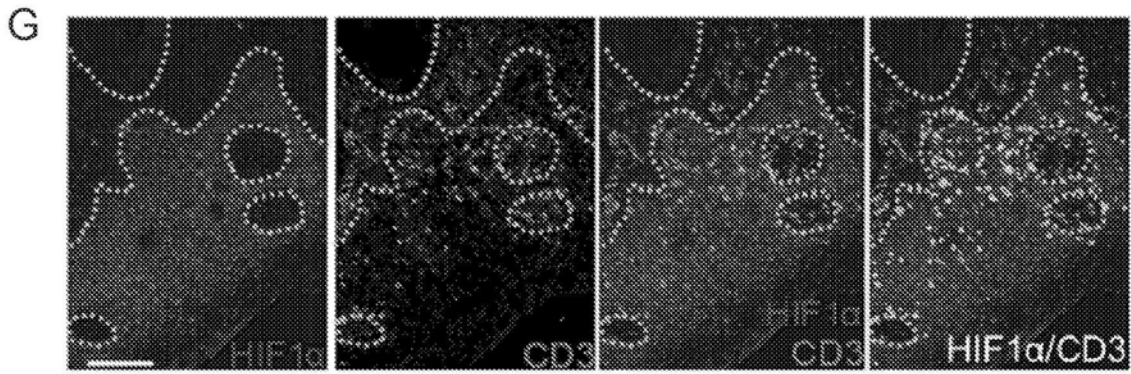


图27(续)

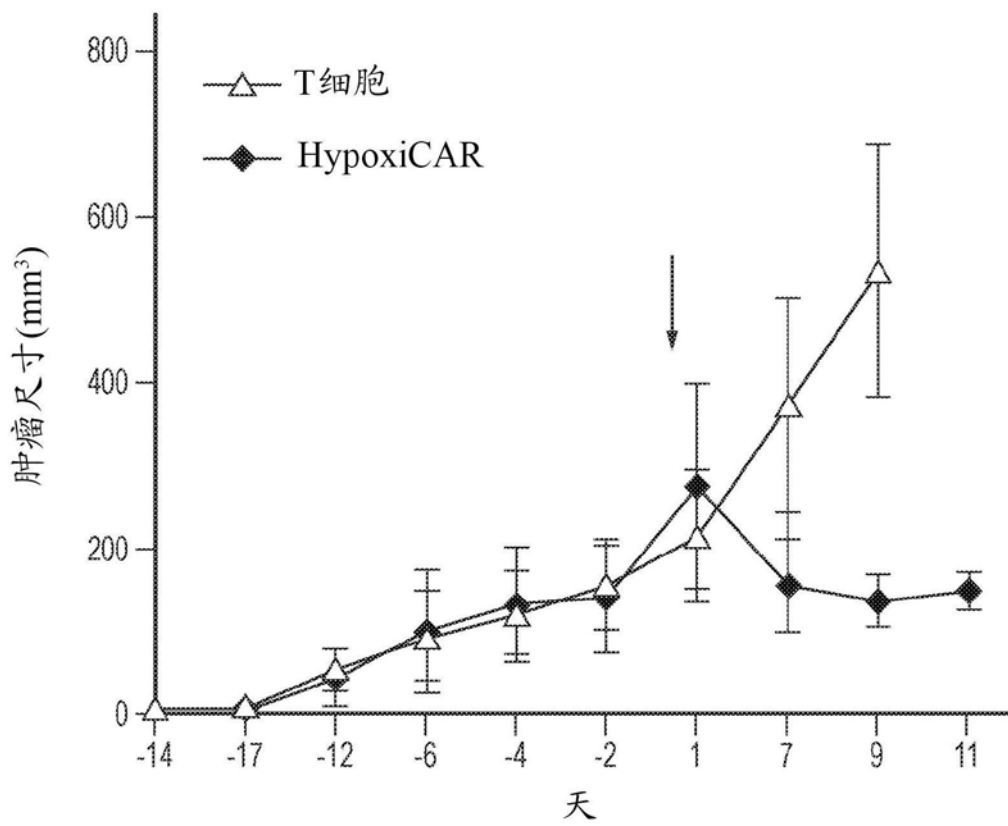


图28

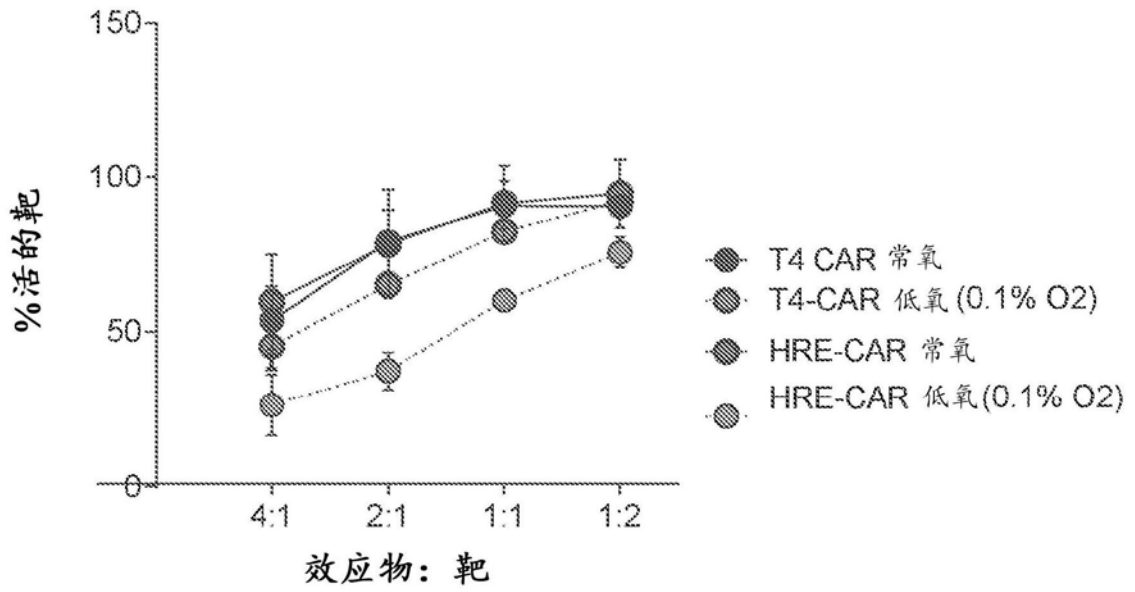


图29A

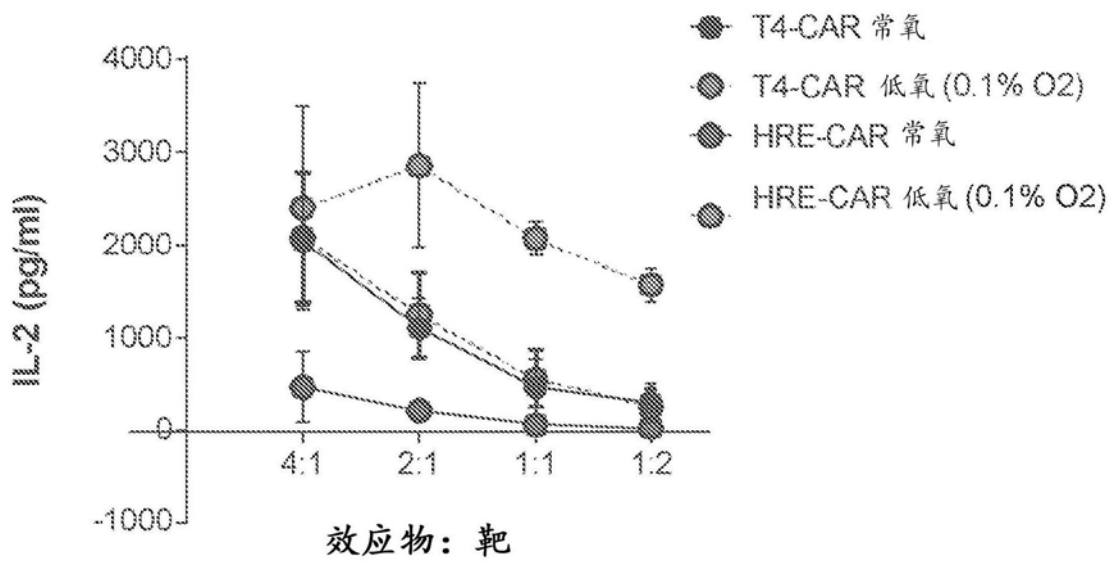


图29B