



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112430580 A

(43) 申请公布日 2021.03.02

(21) 申请号 202011102703.7

A61P 35/00 (2006.01)

(22) 申请日 2013.10.02

A61P 35/02 (2006.01)

(30) 优先权数据

61/709,072 2012.10.02 US

(62) 分案原申请数据

201380063036.8 2013.10.02

(71) 申请人 纪念斯隆-凯特琳癌症中心

地址 美国纽约州

(72) 发明人 C·C·克洛斯 M·塞德莱恩

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322

代理人 龙淳 周琴

(51) Int.Cl.

C12N 5/10 (2006.01)

权利要求书2页 说明书35页

A61K 39/00 (2006.01)

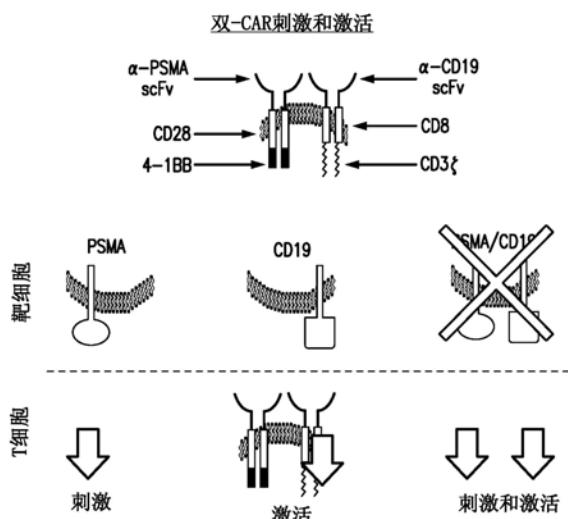
序列表13页 附图20页

(54) 发明名称

用于免疫疗法的组合物和方法

(57) 摘要

本发明提供免疫应答细胞，包括T细胞、细胞毒性T细胞、调节性T细胞、以及自然杀伤(NK)细胞，其表达至少一种抗原识别受体和一种嵌合共刺激受体。使用所述免疫应答细胞的方法包括用于治疗其中需要增加的抗原特异性免疫应答的瘤形成和其它病理学的那些。



## 1. 一种免疫应答细胞,包括:

(a) 嵌合抗原受体(CAR),所述嵌合抗原受体结合第一抗原且其与所述第一抗原结合时能够将激活信号递送到所述免疫应答细胞,所述CAR以 $1 \times 10^{-8}$ M或更高的解离常数( $K_d$ )与所述第一抗原结合,由此所述免疫应答细胞对呈第一抗原单阳性的细胞不表现出或者表现出极低的细胞溶解活性,和

(b) 嵌合共刺激受体(CCR),所述嵌合共刺激受体与不同于所述第一抗原的第二抗原结合且其与所述第二抗原结合时能够将共刺激信号递送到所述免疫应答细胞,

由此相较于对呈第一抗原单阳性的细胞,所述免疫应答细胞对呈所述第一抗原和所述第二抗原双阳性的细胞表现出更高程度的细胞溶解活性。

2. 根据权利要求1所述的免疫应答细胞,其中所述细胞选自T细胞、自然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、调节性T细胞、人类胚胎干细胞和从中能分化出淋巴样细胞的多能干细胞。

3. 根据权利要求1或2所述的免疫应答细胞,其中所述抗原是肿瘤或病原体抗原。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的免疫应答细胞,其中所述CAR以 $5 \times 10^{-8}$ M或更高、 $1 \times 10^{-7}$ M或更高、或 $1 \times 10^{-6}$ M或更高的解离常数( $K_d$ )与所述第一抗原结合。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的免疫应答细胞,其中所述CAR经重组表达。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的免疫应答细胞,其中所述CAR从载体中表达和/或所述CCR从载体中表达。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的免疫应答细胞,其中所述第一和第二抗原选自PSCA、CAIX、CEA、CDS、CD7、CD10、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD49f、CD56、CD74、CD133、CD138、巨细胞病毒(CMV)感染细胞抗原、EGP-2、EGP-40、EpCAM、erb-B2、erb-B3、erb-B4、FBP、胎儿型乙酰胆碱受体、叶酸受体-a、GD2、GD3、HER-2、hTERT、IL-13R-a2、KDR、LeY、LI细胞黏附分子、MAGE-A1、MUC1、间皮素、NKG2D配体、NY-ESO-1、癌胚抗原(h5T4)、PSMA、ROR1、TAG-72、VEGF-R2和WT-1。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的免疫应答细胞,其中所述第一和第二抗原:

(a) 分别为CD10和CD19;

(b) 分别为CD56和CD138;

(c) 选自CD133、巨细胞病毒(CMV)感染细胞抗原、erb-B2、KDR、间皮素、NKG2D配体、NY-ESO-1、癌胚抗原(h5T4)、PSCA、PSMA、CD19、VEGF-R2和WT-1;

(d) 选自间皮素、叶酸受体-a、CD44和CD133;或

(e) 分别为PSCA和PSMA。

9. 根据权利要求1-8中任一项所述的免疫应答细胞,其中所述CAR的细胞内信号转导域是CD3链信号转导域。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的免疫应答细胞,其中CCR的细胞内信号转导域是CD97、CD11a-CD18、CD2、ICOS、CD27、CD154、CD5、OX40、4-1BB或CD28信号转导域。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述的免疫应答细胞,其中所述CAR包含CD3链信号转导域和结合PSCA的细胞外结合结构域。

12. 根据权利要求1-11中任一项所述的免疫应答细胞,其中所述CAR以相较于所述CCR结合所述第二抗原的结合亲和力更低的结合亲和力结合所述第一抗原。

13. 一种体外产生抗原特异性的免疫应答细胞的方法,所述方法包括:

向所述免疫应答细胞引入编码嵌合抗原受体 (CAR) 的第一核酸序列,所述嵌合抗原受体结合第一抗原且其与所述第一抗原结合时能够将激活信号递送到所述免疫应答细胞,所述CAR以 $1\times10^{-8}M$ 或更高的解离常数 ( $K_d$ ) 与所述第一抗原结合,由此所述免疫应答细胞对呈第一抗原单阳性的细胞不表现出或者表现出极低的细胞溶解活性;和

向所述免疫应答细胞引入编码嵌合共刺激受体 (CCR) 的第二核酸序列,所述嵌合共刺激受体与不同于所述第一抗原的第二抗原结合且其与所述第二抗原结合时能够将共刺激信号递送到所述免疫应答细胞,

由此相较于呈第一抗原单阳性的细胞,所述免疫应答细胞对呈所述第一抗原和所述第二抗原双阳性的细胞表现出更高程度的细胞溶解活性。

14. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1-12中任一项所述的免疫应答细胞和药学上可接受的赋形剂。

15. 根据权利要求1-12中任一项所述的免疫应答细胞用于治疗或预防瘤形成或诱导受试者中的肿瘤细胞死亡的用途。

16. 根据权利要求15所述的免疫应答细胞的用途,其中所述诱导肿瘤细胞死亡使肿瘤细胞的数量减少、使肿瘤尺寸减小、和/或根除肿瘤、和/或其中所述治疗或预防使所述受试者中的肿瘤负荷减少或根除。

17. 根据权利要求15或16所述的免疫应答细胞的用途,其中所述瘤形成选自前列腺癌、乳腺癌、B细胞白血病、多发性骨髓瘤和卵巢癌。

18. T细胞用于治疗前列腺癌的用途,其中所述T细胞包含:

嵌合抗原受体,所述嵌合抗原受体结合PSCA且其与PSCA结合时能够激活所述T细胞,所述CAR以 $1\times10^{-8}M$ 或更高的解离常数 ( $K_d$ ) 与PSCA结合,由此所述T细胞对呈PSCA单阳性的细胞不表现出或者表现出极低的细胞溶解活性,和

嵌合共刺激受体 (CCR) ,所述嵌合共刺激受体与PSMA结合且其与PSMA结合时能够将共刺激信号递送到所述T细胞,

由此相较于呈PSCA单阳性的细胞,所述T细胞对呈PSCA和PSMA双阳性的细胞表现出更高程度的细胞溶解活性。

## 用于免疫疗法的组合物和方法

[0001] 本申请是2015年6月2日提交到中华人民共和国国家知识产权局的发明名称为“用于免疫疗法的组合物和方法”、申请号为“201380063036.8”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请是非临时申请,要求于2012年10月2日提交的美国临时申请序列号61/709,072的优先权,其内容并入本申请以作参考。

[0004] 序列表

[0005] 本申请包含于2013年9月30日创建的序列表;文件呈ASCII格式,被命名为3314040AW0\_Sequence Listing\_ST25.txt且大小为27.5kb。序列表文件在此以其整体并入本申请以作参考。

### 背景技术

[0006] 前列腺癌是在美国男性中最频见的癌症并且是每年近31,000例死亡的成因。当早期被确诊时,癌症能够通过手术或放疗被有效地治疗。术后的残留疾病需要放疗和/或激素疗法,其可以防止肿瘤进展和转移。目前,没有对于激素难治性的转移性前列腺癌的有效治疗。免疫疗法是原则上提供用于这些癌症的治疗的靶向疗法。

[0007] 利用基因修饰自体T细胞的靶向T细胞疗法开始表现出在黑色素瘤和惰性B细胞恶性肿瘤中的治疗效力的证据。当前的T细胞工程策略通过转导T细胞受体 (TCR) 或嵌合抗原受体 (CAR) 使患者T细胞重定位于肿瘤抗原。但是,该引起有效免疫反应的新发现的能力,给出了将免疫攻击局限于肿瘤且避免针对可表达目标抗原的正常组织的反应的需求。因此,真正的 (truly) 肿瘤限制性抗原的有限可及性往往使达到高度特异性靶向受阻。在妨碍达到高度特异性靶向的限制中是真正的肿瘤限制性抗原的有限可及性。因此,迫切需要治疗瘤形成 (neoplasia) 的新方法。

### 发明内容

[0008] 本发明大体提供免疫应答细胞,上述免疫应答细胞包括T细胞和自然杀伤 (NK) 细胞,其表达具有免疫细胞激活活性的抗原结合受体 (例如,CAR或TCR) 和嵌合共刺激受体 (CCR),还提供使用其用于治疗瘤形成、传染病和其他病理学的方法。

[0009] 在一方面,本发明提供分离的免疫应答细胞,其具有以低亲和力与第一抗原结合 (其中该结合激活免疫应答细胞) 的抗原识别受体以及与第二抗原结合并刺激免疫应答细胞的嵌合共刺激受体 (CCR)。

[0010] 在另一方面,本发明提供诱导受试者中的肿瘤细胞死亡的方法,该方法包括施用有效量的免疫应答细胞,所述免疫应答细胞包括以低亲和力与第一抗原结合 (其中该结合激活免疫应答细胞) 的抗原识别受体以及与第二抗原结合并刺激免疫应答细胞的嵌合共刺激受体 (CCR),从而在受试者中诱导肿瘤细胞死亡。

[0011] 在又一方面,本发明提供治疗或预防受试者中的瘤形成的方法,该方法包括施用

有效量的免疫应答细胞,所述免疫应答细胞包括以低亲和力与第一抗原结合(其中该结合激活免疫应答细胞)的抗原识别受体以及与第二抗原结合并刺激免疫应答细胞的嵌合共刺激受体(CCR),从而治疗或预防受试者中的瘤形成。

[0012] 在又一方面,本发明提供治疗有需要的受试者中的前列腺癌的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的T细胞,该T细胞包括以低亲和力与PSCA或CD 19结合(其中该结合激活免疫应答细胞)的抗原识别受体以及与PSMA结合并刺激免疫应答细胞的嵌合共刺激受体(CCR),从而治疗受试者中的前列腺癌。

[0013] 在又一方面,本发明提供制备抗原特异性的免疫应答细胞的方法,该方法包括向免疫应答细胞引入编码嵌合共刺激受体(CCR)的核酸序列,其中该嵌合共刺激受体具有与刺激免疫应答细胞的细胞内信号转导域(intracellular signaling domain)结合的抗原结合域,其中该免疫应答细胞具有以低亲和力与第一抗原结合(其中该结合激活免疫应答细胞)的抗原识别受体。

[0014] 在相关方面,本发明提供药物组合物,其包括在药学可接受赋形剂中的有效量的本发明免疫应答细胞(例如,用于治疗瘤形成的药物组合物中的肿瘤抗原特异性T细胞)。

[0015] 在另一方面,本发明提供用于治疗瘤形成、病原体感染、自身免疫性疾病或同种异体移植的试剂盒,该试剂盒包含这样的免疫应答细胞,其中免疫应答细胞具有与第一抗原结合并激活免疫应答细胞的抗原识别受体,以及与第二病毒抗原结合并刺激免疫应答细胞的嵌合共刺激受体(CCR)。该试剂盒还可包括使用免疫应答细胞来治疗具有瘤形成、病原体感染、自身免疫性疾病或同种异体移植的受试者的书面说明。

[0016] 在本文所述方面的任一者的多个实施方式中,该免疫应答细胞被选择为具有亲和力低的抗原识别受体。这可涉及到免疫应答细胞被选择为具有以低亲和力与第一抗原结合的抗原识别受体。在本文所述方面的任一者的多个实施方式中,该抗原识别受体被选择为具有低亲和力用于在细胞中表达。这可涉及到引入编码嵌合抗原受体的第二核酸序列,其中该嵌合抗原受体包括与激活免疫应答细胞的第二细胞内信号转导域结合的第二抗原结合域。在本文所述方面的任一者的多个实施方式中,抗原识别受体是T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)。在多个实施方式中,所述抗原识别受体的细胞内信号转导域是CD-3链信号转导域。在多个实施方式中,该嵌合共刺激受体(CCR)的细胞内信号转导域是CD97、CD11a-CD18、CD2、ICOS、CD27、CD154、CD5、OX40、4-1BB或者CD28信号转导域。

[0017] 在本文所述方面的任一者的多个实施方式中,抗原识别受体是外源或内源的。在本文所述方面的任一者的多个实施方式中,抗原识别受体经重组表达。在多个实施方式中,抗原识别受体从载体中表达。在多个实施方式中,嵌合共刺激受体(CCR)从载体中表达。在特定实施方式中,免疫应答细胞表达重组的或内源性抗原受体,19z1或Pz1。

[0018] 在本文所述方面的任一者的多个实施方式中,免疫应答细胞是T细胞、自然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞、调节性T细胞、人类胚胎干细胞、或从其中可分化出淋巴样细胞的多能干细胞。在本文所述方面的任一者的多个实施方式中,权利要求1-9中任一项的免疫应答细胞,其中所述的免疫应答细胞是自体的。

[0019] 在本文所述方面的任一者的多个实施方式中,抗原是肿瘤或病原体抗原。在本文所述方面的任一者的多个实施方式中,一个或多个抗原结合域是肿瘤抗原结合域。在本文所述方面的任一者的多个实施方式中,抗原或肿瘤抗原选自CAIX、CEA、CD5、CD7、CD10、

CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD49f、CD56、CD74、CD133、CD138、巨细胞病毒(CMV)感染细胞抗原、EGP-2、EGP-40、EpCAM、erb-B2,3,4、FBP、胎儿型乙酰胆碱受体、叶酸受体-a、GD2、GD3、HER-2、hTERT、IL13R-a2、x-轻链、KDR、LeY、L1细胞黏附分子、MAGE-A1、MUC1、间皮素、NKG2D配体、NY-ESO-1、癌胚抗原(h5T4)、PSCA、PSMA、ROR1、TAG-72、VEGF-R2 和WT-1。在多个实施方式中,第一和第二抗原选自CD133、巨细胞病毒(CMV)感染细胞抗原、erb-B2、KDR、间皮素、NKG2D配体、NY-ESO-1、癌胚抗原(h5T4)、PSCA、PSMA、CD19、VEGF-R2 和WT-1。在特定实施方式中,第一和第二抗原选自HER2、MUC1、CD44、CD49f、EpCAM、CEA、CD133、巨细胞病毒(CMV)感染细胞抗原、EGP-2、EGP-40、EpCAM、erb-B2,3,4、FBP、KDR、间皮素、NKG2D配体、NY-ESO-1、癌胚抗原(h5T4)、PSCA、PSMA、VEGF-R2 或WT-1。在特定的实施方式中,第一和第二抗原选自CD10和CD19。在其它的实施方式中,第一和第二抗原选自CD56和CD138。在某些实施方式中,第一和第二抗原选自间皮素、叶酸受体-a、CD44和CD133。

[0020] 在本文所述方面的任一者的多个实施方式中,瘤形成选自前列腺癌、乳腺癌、B细胞白血病、多发性骨髓瘤以及卵巢癌。在本文所述方面的任一者的多个实施方式中,该方法降低受试者中的肿瘤细胞数目,减小受试者中的肿瘤尺寸,和/或根除受试者中的肿瘤。

[0021] 在多个实施方式中,瘤形成是前列腺癌且第一和第二肿瘤抗原是不同的抗原,选自PSCA、PSMA、CD19、CD133、巨细胞病毒(CMV)感染细胞抗原、erb-B2、KDR、间皮素、NKG2D配体、NY-ESO-1、癌胚抗原(h5T4)、VEGF-R2 和WT-1。在多个实施方式中,瘤形成是乳腺癌且第一和第二肿瘤抗原是不同的抗原,选自HER2、MUC1、CD44、CD49f、EpCAM、CEA、CD133、巨细胞病毒(CMV)感染细胞抗原、EGP-2、EGP-40、EpCAM、erb-B2,3,4、FBP、KDR、间皮素、NKG2D配体、NY-ESO-1、癌胚抗原(h5T4)、PSCA、PSMA、VEGF-R2 或WT-1。在特定实施方式中,瘤形成是B细胞白血病且第一和第二肿瘤抗原选自CD10和CD19。在某些实施方式中,瘤形成是多发性骨髓瘤且第一和第二肿瘤抗原选自CD56和CD138。在多个实施方式中,瘤形成是卵巢癌且第一和第二肿瘤抗原是不同的抗原,选自间皮素、叶酸受体-a、CD44和CD133。

[0022] 本发明提供为靶向肿瘤细胞提供T细胞的组合物和方法。本发明限定的组合物和物品是分离的或者另外根据下面提供的实施例制备。本发明的其他特点和优点从详细说明和权利要求中将是显而易见的。

[0023] 1.一种免疫应答细胞,包括:

[0024] a.以低亲和力结合第一抗原的抗原识别受体,其中所述受体与所述第一抗原的结合激活所述免疫应答细胞,以及

[0025] b.结合第二抗原并刺激所述免疫应答细胞的嵌合共刺激受体(CCR)。

[0026] 2.根据实施方式1所述的免疫应答细胞,其中所述细胞选自T细胞、自然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、调节性T细胞、人类胚胎干细胞和从中能分化出淋巴样细胞的多能干细胞。

[0027] 3.根据实施方式1或2所述的免疫应答细胞,其中所述抗原是肿瘤或病原体抗原。

[0028] 4.根据实施方式1-3中任一项所述的免疫应答细胞,其中所述抗原识别受体是T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)。

[0029] 5.根据实施方式1-4中任一项所述的免疫应答细胞,其中所述抗原识别受体是外源或内源的。

[0030] 6. 根据实施方式1-5中任一项所述的免疫应答细胞,其中所述抗原识别受体经重组表达。

[0031] 7. 根据实施方式1-6中任一项所述的免疫应答细胞,其中所述抗原识别受体从载体中表达。

[0032] 8. 根据实施方式1-7中任一项所述的免疫应答细胞,其中所述嵌合共刺激受体(CCR)从载体中表达。

[0033] 9. 根据实施方式1-8中任一项所述的免疫应答细胞,其中所述免疫应答细胞是自体的。

[0034] 10. 根据实施方式1-9中任一项所述的免疫应答细胞,其中所述第一和第二抗原选自CAIX、CEA、CD5、CD7、CD10、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD49f、CD56、CD74、CD133、CD138、巨细胞病毒(CMV)感染细胞抗原、EGP-2、EGP-40、EpCAM、erb-B2,3,4、FBP、胎儿型乙酰胆碱受体、叶酸受体-a、GD2、GD3、HER-2、hTERT、IL-13R-a2、x-轻链、KDR、LeY、L1细胞黏附分子、MAGE-A1、MUC1、间皮素、NKG2D配体、NY-ESO-1、癌胚抗原(h5T4)、PSCA、PSMA、ROR1、TAG-72、VEGF-R2或WT-1。

[0035] 11. 根据实施方式1-9中任一项所述的免疫应答细胞,其中所述第一和第二抗原是选自CD133、巨细胞病毒(CMV)感染细胞抗原、erb-B2、KDR、间皮素、NKG2D配体、NY-ESO-1、癌胚抗原(h5T4)、PSCA、PSMA、CD19、VEGF-R2和WT-1的不同的抗原。

[0036] 12. 根据实施方式1-9中任一项所述的免疫应答细胞,其中所述第一和第二抗原选自HER2、MUC1、CD44、CD49f、EpCAM、CEA、CD133、巨细胞病毒(CMV)感染细胞抗原、EGP-2、EGP-40、EpCAM、erb-B2,3,4、FBP、KDR、间皮素、NKG2D配体、NY-ESO-1、癌胚抗原(h5T4)、PSCA、PSMA、VEGF-R2或WT-1。

[0037] 13. 根据实施方式1-11中任一项所述的免疫应答细胞,其中所述第一和第二抗原是CD10和CD19。

[0038] 14. 根据实施方式1-11中任一项所述的免疫应答细胞,其中所述第一和第二抗原是CD56和CD138。

[0039] 15. 根据实施方式1-11中任一项所述的免疫应答细胞,其中所述第一和第二抗原是选自间皮素、叶酸受体-a、CD44和CD133的不同的抗原。

[0040] 16. 根据实施方式1-15中任一项所述的免疫应答细胞,其中所述抗原识别受体的细胞内信号转导域是CD3链信号转导域。

[0041] 17. 根据实施方式1-16中任一项所述的免疫应答细胞,其中所述嵌合共刺激受体(CCR)的细胞内信号转导域是CD97、CD11a-CD18、CD2、ICOS、CD27、CD154、CD5、OX40、4-1BB或CD28信号转导域。

[0042] 18. 根据实施方式1-17中任一项所述的免疫应答细胞,其中所述细胞表达抗原受体19z1或Pz1。

[0043] 19. 一种诱导肿瘤中的肿瘤细胞死亡的方法,所述方法包括将所述肿瘤细胞与免疫应答细胞接触,所述免疫应答细胞包括以低亲和力结合第一肿瘤抗原的抗原识别受体,其中所述结合激活所述免疫应答细胞,以及结合第二肿瘤抗原并刺激所述免疫应答细胞的嵌合共刺激受体(CCR),由此在所述肿瘤中诱导肿瘤细胞死亡。

[0044] 20. 根据实施方式19所述的方法,其中所述方法使肿瘤细胞的数量减少。

- [0045] 21. 根据实施方式19所述的方法,其中所述方法使肿瘤尺寸减小。
- [0046] 22. 根据实施方式19所述的方法,其中所述方法根除肿瘤。
- [0047] 23. 一种治疗或预防受试者中的瘤形成的方法,所述方法包括施用 有效量的免疫应答细胞,所述免疫应答细胞包括以低亲和力结合第一 抗原的抗原识别受体,其中所述结合激活所述免疫应答细胞,以及结合第二抗原并刺激所述免疫应答细胞的嵌合共刺激受体 (CCR) ,由 此治疗或预防所述受试者中的瘤形成。
- [0048] 24. 根据实施方式23所述的方法,其中所述瘤形成选自前列腺癌、 乳腺癌、B细胞白血病、多发性骨髓瘤、和卵巢癌。
- [0049] 25. 根据实施方式23所述的方法,其中所述瘤形成是乳腺癌且所述第一和第二肿瘤抗原是选自HER2、MUC1、CD44、CD49f、EpCAM、CEA、CD133、巨细胞病毒 (CMV) 感染细胞抗原、EGP-2、EGP-40、EpCAM、erb-B2,3,4、FBP、KDR、间皮素、NKG2D配体、NY-ESO-1、癌胚抗原 (h5T4) 、PSCA、PSMA、VEGF-R2或WT-1的不同的抗原。
- [0050] 26. 根据实施方式23所述的方法,其中所述瘤形成是B细胞白血 病且所述第一和第二肿瘤抗原是CD10和CD19。
- [0051] 27. 根据实施方式24所述的方法,其中所述瘤形成是多发性骨髓 瘤且所述第一和第二肿瘤抗原是CD56和CD138。
- [0052] 28. 根据实施方式24所述的方法,其中所述瘤形成是卵巢癌且所述第一和第二肿瘤抗原是选自间皮素、叶酸受体-a、CD44、和CD133 不同的抗原。
- [0053] 29. 根据实施方式23-28中任一项所述的方法,其中所述免疫应答 细胞被选择为 具有亲和力低的抗原识别受体。
- [0054] 30. 根据实施方式23-28中任一项所述的方法,其中所述抗原识别 受体被选择为 具有低亲和力用于在细胞中表达。
- [0055] 31. 根据实施方式23-28中任一项所述的方法,其中所述抗原识别 受体是T细胞受体 (TCR) 或嵌合抗原受体 (CAR) 。
- [0056] 32. 根据实施方式23-28中任一项所述的方法,其中所述抗原识别 受体是外源或 内源的。
- [0057] 33. 根据实施方式23-32中任一项所述的方法,其中所述抗原识别 受体从载体中 表达。
- [0058] 34. 根据实施方式23-32中任一项所述的方法,其中所述嵌合共刺 激受体 (CCR) 从 载体中表达。
- [0059] 35. 根据实施方式23-34中任一项所述的方法,其中所述细胞选自 T细胞、自然杀 伤 (NK) 细胞、细胞毒性T淋巴细胞 (CTL) 、调节 性T细胞、人类胚胎干细胞和从中能分化出淋 巴样细胞的多能干细胞。
- [0060] 36. 根据实施方式23-35中任一项所述的方法,其中所述方法使所 述受试者中的 肿瘤负荷减少或根除。
- [0061] 37. 一种诱导肿瘤细胞死亡的方法,所述方法包括施用有效量的免 疫应答细胞, 所述免疫应答细胞包括以低亲和力结合第一抗原的抗原 识别受体,其中所述结合激活所 述免疫应答细胞,以及结合第二抗原 并刺激所述免疫应答细胞的嵌合共刺激受体 (CCR) , 由此诱导受试 者中的肿瘤细胞死亡。

[0062] 38. 一种产生抗原特异性免疫应答细胞的方法,所述方法包括向免疫应答细胞中引入编码嵌合共刺激受体(CCR)的核酸序列,其中所述嵌合共刺激受体包括与刺激免疫应答细胞的细胞内信号转导域联接的抗原结合域,其中所述免疫应答细胞包括以低亲和力结合第一抗原的抗原识别受体,其中所述结合激活所述免疫应答细胞。

[0063] 39. 根据实施方式38所述的方法,所述方法还包括引入编码嵌合抗原受体的第二核酸序列,其中所述嵌合抗原受体包括与激活免疫应答细胞的第二细胞内信号转导域联接的第二抗原结合域。

[0064] 40. 根据实施方式38-39中任一项所述的方法,其中所述肿瘤抗原是选自CAIX、CEA、CD5、CD7、CD10、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD49f、CD56、CD74、CD133、CD138、巨细胞病毒(CMV)感染细胞抗原、EGP-2、EGP-40、EpCAM、erbB2,3,4、FBP、胎儿型乙酰胆碱受体、叶酸受体-a、GD2、GD3、HER-2、hTERT、IL-13R-a2、x-轻链、KDR、LeY、L1细胞黏附分子、MAGE-A1、MUC1、间皮素、NKG2D配体、NY-ESO-1、癌胚抗原(h5T4)、PSCA、PSMA、ROR1、TAG-72、VEGF-R2或WT-1的不同的抗原。

[0065] 41. 根据实施方式38-40中任一项所述的方法,其中所述抗原识别受体是T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)。

[0066] 42. 根据实施方式38-41中任一项所述的方法,其中所述抗原识别受体是外源或内源的。

[0067] 43. 根据实施方式38-42中任一项所述的方法,其中所述抗原识别受体经重组表达。

[0068] 44. 根据实施方式38-43中任一项所述的方法,其中所述抗原识别受体从载体中表达。

[0069] 45. 根据实施方式38-44中任一项所述的方法,其中所述嵌合共刺激受体(CCR)从载体中表达。

[0070] 46. 根据实施方式38-45中任一项所述的方法,其中所述细胞选自T细胞、自然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、调节性T细胞、人类胚胎干细胞和从中能分化出淋巴样细胞的多能干细胞。

[0071] 47. 根据实施方式38-46中任一项所述的方法,其中所述抗原识别受体的细胞内信号转导域是CD3链信号转导域。

[0072] 48. 根据实施方式38-47中任一项所述的方法,其中所述嵌合共刺激受体(CCR)的细胞内信号转导域是CD97、CD11a-CD18、CD2、ICOS、CD27、CD154、CD5、OX40、4-1BB或CD28信号转导域。

[0073] 49. 一种治疗有需要的受试者中的前列腺癌的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的T细胞,所述T细胞包括以低亲和力结合PSCA或CD19的抗原识别受体,其中所述结合激活免疫应答细胞,以及结合PSMA并刺激免疫应答细胞的嵌合共刺激受体(CCR),由此治疗受试者中的前列腺癌。

[0074] 50. 一种药物组合物,包括实施方式1-18中任一项所述的免疫应答细胞以及药学上可接受的赋形剂。

[0075] 53. 实施方式1-18中任一项所述的免疫应答细胞用于治疗瘤形成或肿瘤疾病的用途。

[0076] 54. T细胞用于治疗前列腺癌的用途,所述T细胞包括以低亲和力结合PSCA或CD19的抗原识别受体,其中所述结合激活免疫应答细胞,以及结合PSMA并刺激免疫应答细胞的嵌合共刺激受体(CCR)。

[0077] 55. 一种试剂盒,其包括免疫应答细胞,所述免疫应答细胞包括结合第一抗原并激活所述免疫应答细胞的抗原识别受体,以及结合第二病毒抗原并刺激所述免疫应答细胞的嵌合共刺激受体(CCR)。

## 附图说明

[0078] 图1A-C是描述嵌合抗原受体(CAR)和嵌合共刺激受体(CCR)载体设计以及经由原代人类T细胞转导的表达的图。(A)描述了通过将免疫球蛋白可变域的重链和轻链与CD8跨膜域(其被融合至CD3的胞质信号转导域)融合生成CAR。通过使用内部核糖体进入位点(IRES)实现双顺反子表达,CAR表达可通过关联dsRED荧光而很容易地被检测(数据未示出)。通过将scFv融合至CD28跨膜和信号转导域<sup>15</sup>(其被融合至4-1BB(aka CD137)胞质信号转导域)而生成CCR<sup>21</sup>。CCR表达可以与hrGFP的双顺反子表达相关联(数据未示出)。缩写:LTR-长末端重复;SD-剪接供体位点;SA-剪接受体位点;VH或V<sub>L</sub>-分别为可变重域或可变轻域;EC-胞外域;TM-跨膜域;C-胞质域;IRES-内部核糖体进入位点;dsRED-Discosoma菌株红色荧光蛋白,hrGFP-人重组绿色荧光蛋白。(B)描述了使用这些逆转录病毒载体的原代人T细胞的代表性转导效率。(C)描述了本研究中用不同的多种CAR进行的CTL转导。

[0079] 图2A-D显示了当结合两个抗原时,双受体(CAR/CCR)介导的人类T细胞激活可实现强健的CTL功能、长期的增殖以及增强的肿瘤根除。(A)显示与未转导或经P28BB转导的T细胞相比,在CTL实验中当T细胞表达CD19特异性CAR时,表达嵌合受体的T细胞溶解抗原阳性细胞。制图是n>4试验的代表,误差条表示3个重复实验的均值的标准差。(B)显示了与表达两种或单独表达抗原之一的人肿瘤细胞系共培养的T细胞在31天内的T细胞长期增殖(绝对T细胞计数),所述T细胞不表达、表达一种或两种嵌合受体。箭头表示使用经新鲜辐照的肿瘤细胞重刺激T细胞。只有在表达双受体的T细胞遇到两种抗原时才观察到强健的长期增殖。制图是n>4试验的代表,误差条表示3个重复实验的均值的标准差。(C)描述了肿瘤感应T(TTS)细胞的全身性肿瘤根除的效力,通过将1.0×10<sup>6</sup>的T细胞静脉(IV)注射到携带表达荧光素酶的表达CD19<sup>+</sup>PSMA<sup>+</sup>PC3人前列腺肿瘤的NSG小鼠而进行评估。通过使用BLI每周定量测定肿瘤负荷。示出来自每组的两只代表性小鼠的图像,肿瘤发光的像素强度以彩色表示。对平均肿瘤负荷进行制图,误差条表示来自每组6只小鼠的均值的标准差。(D)描述了使用三肿瘤小鼠模型的DP肿瘤选择性根除,通过皮下注射1×10<sup>6</sup>的PC3肿瘤细胞,每种单独对CD19呈阳性的细胞注射入左肋,单独对PSMA呈阳性的细胞注射入右肋,对CD19和PSMA都呈阳性的细胞注入小鼠背部。在肿瘤注入后7天静脉注入表达嵌合受体的19z1或P28BB或19z1+P28BB的T细胞。示出携带这些肿瘤的每组两只小鼠的代表性图像,肿瘤发光以彩色表示。用卡钳定量测量肿瘤,并对每个肿瘤的肿瘤体积相对于时间作图。误差条表示6只小鼠的均值的标准差。用双尾非配对t检验来确定统计学显著性,以比较由19z1 T细胞和19z1+P28BB T细胞得到的值,p值表示为\*<0.05或\*\*<0.01。

[0080] 图3A-E描述了当靶向两种前列腺肿瘤抗原时,肿瘤感应T(TTS)细胞选择性地根除人类前列腺肿瘤。(A)描述了对三种不同的特异于PSCA的scFv组装到双特异性抗体中的评

价,该双特异性抗体还具有 对CD3的特异性。将T细胞与PSCA<sup>+</sup>PC3肿瘤细胞以20:1的比率共同培养且加入不同量的抗体,并测定特异性溶解。(B) 描述了使用在 细胞毒性测定中表现出不同效力的抗PSCA scFv来产生CAR。CAR介 导的表达PSCA的靶细胞的特异性裂解证实了 Lz1 scFv的较弱效力: 其需要50倍高的效应物:靶标比率以达到与Hz1或Mz1相同的细胞溶解水平。(C) 和(D) 描述了表达PSCA和PSMA的全身性前列腺 肿瘤的选择性根除,通过用这些低效的scFv进行研究。如图2所示, 确立肿瘤(图5) 并进行处理。14天后,对Mz1+P28BB(图3C) 或 Lz1+P28BB(图3D) 静脉注射 $1.0 \times 10^6$ 的嵌合受体阳性T细胞。示出 每组两只代表性小鼠的图像,肿瘤发光以彩色示出(从蓝色= $5 \times 10^5$ 至 红色= $2 \times 10^7$ 光子)。平均肿瘤负荷通过发光而加以定量并进行制图, 误差条表示每组5只小鼠的均值的标准差。接受PSMA肿瘤的两只小 鼠(绿线)在49天后死亡,因此发光均值通过从56天和63天的3个 值求均值得到。图3E:与图2D类似,在还有PSCA<sup>-</sup>PSMA<sup>+</sup>和 PSCA<sup>+</sup>PSMA<sup>-</sup>的小鼠中,通过Lz1+P28BB T细胞实现了仅对 PSCA<sup>+</sup>PSMA<sup>+</sup>肿瘤的选择性抗肿瘤反应。用双尾非配对t检验来确定统 计学显著性,以比较由Lz1 T细胞和Lz1+P28BB T细胞得到的值,p 值表示为\* $<0.05$ 或\*\* $<0.01$ 。

[0081] 图4A-E描述了当在DP肿瘤上共培养时,发现由TTS引起的增强 的细胞因子分泌和 Bc1xL表达。(A) 描述了在使用未转导的PC3细 胞(空) 或CD19<sup>+</sup>PSMA<sup>+</sup>PC3细胞进行第一抗原刺激之后48小时对未 转导T细胞或用19z1、P28BB或二者进行转导的T细胞的多重细胞因 子分析。误差条代表2个生物学复制品的均值的标准差。(B-D) 描述 了对未转导T细胞、或者用 Hz1 (B) ;Mz1 (C) 和Lz1 (D) 转导的 T细胞(抗PSCA CAR、P28BB CAR或CAR+CCR二者) 的多重细胞 因子分析,示出在用空白或用PSCA+PSMA+PC3细胞进行第二抗原刺 激后48小时的结果。(E) 描述了在初始抗原刺激后的24小时后,使 用未转导T细胞或用19z1、P28BB或二者进行转导的T细胞的细胞裂 解物进行的Bc1xL蛋白印迹分析。Akt的总量被用作负载对照。

[0082] 图5描述了产生前列腺肿瘤细胞用以表达融合蛋白GFP-萤火虫荧 光素酶(GFP/ Luc) 和肿瘤抗原。使用逆转录表达构建体,用GFP/Luc 以及CD19、PSMA、PSCA或两种抗原的组合对未转导的PC3细胞(空 白)进行转导。通过对GFP/Luc、CD19、PSMA和/或PSCA的双提纯 FACS提纯细胞。

[0083] 图6A-C图示了肿瘤感应T细胞的构思。(A) 描述了表达有效 CAR的TTS细胞,经A<sup>+</sup> 113<sup>+</sup>细胞有效刺激而促进针对A<sup>+</sup>细胞的免疫 应答。CAR<sup>+</sup>CCR<sup>+</sup>细胞能够结合具有提供CD3激活信号的CAR的肿瘤 抗原A<sup>+</sup>细胞。这能够导致短期细胞溶解。CAR<sup>+</sup>CCR<sup>+</sup>细胞能够结合具 有提供CD28和CD137信号的CCR的肿瘤抗原B<sup>+</sup>细胞。该信号单独 不足以引发细胞溶解或增殖。只有当CAR<sup>+</sup>CCR<sup>+</sup>细胞结合具有CAR和 CCR的肿瘤抗原A<sup>+</sup>B<sup>+</sup>细胞时,才能同时提供激活和刺 激。这导致强健 的裂解、T细胞增殖、增强的细胞因子分泌、Bc1xL的上调以及在体内 选择性根除肿瘤的能力。然而,取决于CAR的效力,这些CAR<sup>+</sup>CCR<sup>+</sup>细胞能够潜在地再循环而裂解单独对CAR特异性抗原呈阳性的细胞。图6B描述了通过降低CAR的效力,使得TTC细胞可以在遇到A<sup>+</sup>B<sup>+</sup>细胞时能够通过CCR结合而功能性挽救,从而选择性地响应且根除 A<sup>+</sup>B<sup>+</sup>细胞,同时避免对A<sup>+</sup>细胞的反应。(C) 显示了通过第一CAR(其 在结合肿瘤抗原时提供TCR激活信号) 以及第二CAR(其在结合不同的肿瘤抗原时提供刺激信号)的共表达,T淋巴细胞将只根除表达两种 抗原的肿瘤,而不根除表达单独抗原的肿瘤。

## 具体实施方式

[0084] 说明书中提及的所有专利、公开的申请以及其他参考文献在此并 入本公开中以 作参考。

[0085] 除非另有限定,否则本文所用的所有技术和科学术语具有本发明 所属领域的技术 人员通常理解的含义。以下的参考为本领域技术人员 提供了本发明所用的多个术语的一般 定义:Singleton等人,Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed.1994) ;The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed.,1988) ;The Glossary of Genetics,5th Ed.,R.Rieger等人 (eds.) ,Springer Verlag (1991) ;以及Hale &Marham,The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)。如本文所 用,以下术语具有下文对其所述的含义,除非另有限定。

[0086] “激活免疫应答细胞”意指引起细胞中信号转导或蛋白质表达的 改变,其导致免 疫应答起始。例如,当CD3链响应于配体结合和基于 免疫受体酪氨酸的抑制基序 (ITAM) 而 聚集时,产生信号转导级联。在某些实施方式中,当内源性TCR或外源性CAR与抗原结合时,免 疫突触的形成发生,其包括被结合受体 (例如CD4或CD8、CD3//等 等) 附近的多个分子 的聚集。膜结合信号转导分子的聚集使得包含在 CD3链内的ITAM基序变得磷酸化。该磷酸 化进而起始T细胞激活通 路,最终激活转录因子如NF-KB和AP-1。这些转录因子诱导T细胞 的全局基因表达,使IL-2产生增加用于增殖,并表达主调节性T细胞 蛋白,从而起始T细胞 介导的免疫应答。“刺激免疫应答细胞”意指 引起强健且持久的免疫应答的信号。在多个实 施方式中,这发生在受 体介导的免疫细胞 (例如,T细胞) 激活之后或伴随其发生,受体包括 但不限于,CD28、CD137 (4-1BB) 、OX40和ICOS。不局限于具体 的理论,接收多重刺激信号对于 增强强健和长期的T细胞介导的免疫 应答是重要的。不接收这些刺激信号时,T细胞迅速 变得受抑制并且对 抗原无响应。尽管这些共刺激信号的作用多样化并且仅部分被理解, 但其总体导致基因表达增加以产生长期存活的增殖性的抗细胞凋亡的 T细胞,这些T细胞 稳健地发生抗原应答以实现完全且持久的根除。

[0087] 本文所用的术语“抗原识别受体”是指能够响应于抗原结合而激 活免疫细胞 (例如,T细胞) 的受体。示例性的抗原识别受体可以是内 生的或内源性的T细胞受体或嵌合抗 原受体,在嵌合抗原受体中肿瘤 抗原结合域融合至能够激活免疫细胞 (例如,T细胞) 的细 胞内信号转 导域。在多个实施方式中,抗原识别受体被选择为对抗原具有低或最 小的亲 和力或亲合力 (avidity) 。

[0088] “亲和力”意指抗体与简单半抗原或抗原决定簇之间的结合强度 的衡量。不限于 理论,亲和力取决于抗体结合部位与抗原决定簇的立 体化学配合的紧密程度、它们之间接 触区域的大小、以及带电荷和疏 水基团的分布。亲和力还涵盖术语“亲合力”,其是指在 形成可逆复 合物之后抗原-抗体结合的强度。用于计算抗体对抗原亲和力的方法是 本领域 已知的,包括使用结合实验来计算亲和力。在抗体 (Ab) 结合 抗原 (Ag) 的情况下,使用亲和 常数 (表示为解离常数的倒数) 。

[0089]  $Ab+Ag=AbAg$

$$K_a = \frac{[Ab][Ag]}{[AbAg]} = 1$$

[0090]  $[Ab][Ag] K_a$

[0091] 抗体结合的化学平衡也是结合速率 (on-rate,  $k_{\text{正反应}}$ ) 和解离速率 (off-rate,  $k_{\text{逆反应}}$ ) 常数的比值。两种抗体可具有相同的亲和力,但是 一个可能具有高的结合速率和解离速率常数,而另一个可能具有低的 结合速率和解离速率常数。

$$K_a = \frac{k_{\text{正反应}}}{k_{\text{逆反应}}} = \frac{\text{结合速率}}{\text{解离速率}}$$

[0092]

[0093] 功能测定 (例如,细胞溶解测定) 中的抗体活性也反映了抗体亲 和力。在本发明的多个实施方式中,抗原识别受体具有低亲和力。低 亲和力包括微摩尔和纳摩尔的亲和力 (例如,  $10^{-5}$ 、 $50^{-6}$ 、 $10^{-6}$ 、 $5 \times 10^{-7}$ 、 $10^{-7}$ 、 $5 \times 10^{-8}$ 、 $10^{-8}$ 、 $5 \times 10^{-9}$ 、 $10^{-9}$  M)。抗体和亲和力能够用功能测定 (例如,细胞溶解实验) 直观地表征和比较。

[0094] “亲和力”意指抗体与简单半抗原或抗原决定簇之间的结合强度 的衡量。如本文所用的术语“嵌合共刺激受体” (CCR) 是指独立于 激活的介导共刺激的特定类型的嵌合抗原受体 (CAR)。当与抗原识 别受体 (例如,激活细胞的CAR或TCR) 组合在免疫应答细胞上表达 时,CCR靶向第二抗原。在某些实施方式中,CCR对其靶抗原具有中 等或高的亲和力。

[0095] 如本文所用的术语“嵌合抗原受体 (CAR)”是指与能够激活或 刺激T细胞的细胞内信号转导域融合的肿瘤抗原结合域。最普遍地, 该CAR的细胞外结合域由单链可变片段 (scFv) 构成, scFv通过鼠科 或人源化的单克隆抗体的重链和轻链可变区融合而衍生得到。或者, 可以使用衍生自Fab的scFv (而非来自抗体, 例如从Fab库获得)。在多个实施方式中,此scFv与跨膜域融合,然后与细胞内信号转导域 融合。“第一代”CAR包括在抗原结合时仅提供CD3信号的那些,“第二 代”CAR包括既提供共刺激 (例如,CD28或CD137) 也提供激活 (CD3) 的那些。“第三代”CAR包括提供多重共刺激 (例如,CD28 和CD137) 和激活 (CD3) 的那些。在迄今的CAR应用中,CAR被 选择为对抗原具有高亲和力或亲合力,其与本文所述发明是不同且可 区分的。

[0096] “CD3多肽”意指与NCBI参考号:NP\_932170或其片段具有至 少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的具有激 活或刺激活性的蛋白质。示例性CD3在下面的表1中给出。“CD3核 酸分子”意指编码CD3多肽的多核苷酸。

[0097] “CD8多肽”意指与NCBI参考号:NP\_001759或其片段具有至 少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的具有刺 激活性的蛋白质。示例性CD8在下面的表1中给出。“CD8核酸分子” 意指编码CD8多肽的多核苷酸。

[0098] “CD28多肽”意指与NCBI参考号:NP\_006130或其片段具有至 少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的具有刺 激活性的蛋白质。示例性CD28在下面的表1中给出。“CD28核酸分 子”意指编码CD28多肽的多核苷酸。

[0099] “4-1BB多肽”意指与NCBI参考号:P41273或NP\_001552或其 片段具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一 性的充当肿瘤坏死因子 (TNF) 配体的蛋白 质。示例性4-1BB在下面 的表1中给出。“4-1BBL核酸分子”意指编码4-1BBL多肽的多核苷 酸。

[0100] “CD80多肽”意指与NCBI参考号:NP\_005182或其片段具有至 少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的充当Ig 超家族配体的蛋白 质。示例性CD80多肽在

下面的表1中给出。

[0101] “CD80核酸分子”意指任何编码CD80多肽的多核苷酸。示例性的CD80核酸分子是NM\_005191。

[0102] “OX40L多肽”意指与NCBI参考号: BAB18304或NP\_003317 或其片段具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的作为肿瘤坏死因子(TNF)配体的蛋白质。“OX40L核酸分子”意指编码OX40L多肽的多核苷酸。

[0103] “19z1多肽”意指与以下提供的序列具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性且在与CD19结合时具有激活活性的蛋白质。

[0104] “P28z多肽”意指与以下提供的序列具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的蛋白质。

[0105] “CD19”意指与以下提供的序列具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性且能够结合CD19的蛋白质。

[0106] “PSMA”表示与以下提供的序列具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性且能够结合PSMA的蛋白质。

[0107] “P28BB”表示与以下提供的序列具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性且在与PSMA结合时具有刺激活性的蛋白质。

[0108] 表1

SEQ ID NO.	名称	
1	CD3 ζ	mkwkalfataa ilqaqlpite aqsfglldpk lcylldgilf iygviltalf lrvkfssrad apayqqgqnq lynelnigrr eeydvldkrr grdpemggkp qrrknpgegi ynelqdkdma eayseigmkg errrgkghdg lyqglsta tkdtydalhm qalppr
2	CD8	malpvtalll plalllhaar psqfrvspld rtwnlgetve lkcvllsnp tsgcswlfqp rgaasptfl lylsqnkpka aegldtqrfs gkrlgdtfvl tisdfrrene gyyfcalsn simyfshfvp vflpakettt paprppptap tiasqplslr peacrpagg avhtrgldfa cdiiyiwapla gtcgvlllsl vitlycnhrn rrrvckcprp vvksdgkpsl saryv
3	CD28	mlrlllalnl fpsiqvtgnk ilvkqspmliv aydnnavnlsc kysynlfsre fraslhkglf savevcvvyg nysqlqlvys ktgfncdgk1 gnesvtfylq nlyvnqtdiy fckievmypp pyldneksng tiihvkgkhl cpsplfpgps kpfwvlvvvg gvlacysllv tvafiifwvr skrsrllhds ymnmtprrrpg ptrkhyqpya pprdfaayrs
[0109]	4-1BB	mgnscyniva tlllvlnfer trslqdpcsn cpagtfcdnn rnqicspcpp nsfssaggqr
		tcdicrqckg vfrtrkecss tsnaecdctp gfhclgagcs mceqdckqqq eltkkgckdc cfgtfnqkr gicrpwtncs ldgksvlnng tkerdvvcgp spadlspgas svtpapare pghspqiisf flaltstall fliffltlrf svvkrgrkkl lyifkqpfmr pvqtqeedg cscrfpeeee ggcel
5	CD80	mghtrrqgts pskcpynlnff qlvlvlglsh fcsgvihvtk evkevatlsc ghnvsveela qtriywqkek kmvltmmsgd mniwpeyknr tifditnnls ivilalrpsd egtyecvvik yekdakreh laevtlsvka dfptpsisdf eiptsnirri icstsggfpe phlswlenga elnainttvq qdpetelyav sskldfnmmtt nhsmcliky ghlrvnqtfn wnttkqehfp dnllpswait lisvngifvi ccltycfapr crerrnerl rresvrvp
6	OX40L	mervpgleen vgnaarpfe rnklllvasv iqglgllicf tyiclhfsal qvshrypriq sikvqfteyk kekgfiltsq kedeimkvqn nsviincdgf yliislkgys qevnislhyq kdeeplfqlk kvrsvnslmv asltykdkvy lnttdnts1 ddfhvnggel ilihqnpgef cvl

7	19z1	MALPVTALLPLALLLHAEVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKAS GYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGDNTNGKFKGQA TLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYECARKTISSVVDFYFDY WGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGSDIELTQSPKFMSTSVGD RVSVTCKASQNVGTNVAVYQQKPGQSPKPLIYSATYRNNSGVPD RFTGSGSGTDFLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGK LEIKRAAAPTTTPAPRPPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWIAPLAGTCGVLLSLVITLYCNHRVKFSR SAEPPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDDKRRGRDPEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQG LSTATKDTYDALHMQALPPR
8	P28z	MALPVTALLPLALLLHAEVQLQQSGPELVKPGTSVRISCKTSGYTF TEYTIHWVKQSHGKSLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDKATLTVDKSS STAYMELRSLTSEDSAVYYCAAGWNFDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGTAVDWYQQK GQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFLTITNVQSEDLADY CQQYNSYPLTFGAGTMLDLKRAAAIEVMPYLDNEKSNGTIIHV GKHLCPSPPLFPGPSKPFWLVVVGVLACYSLVTVAFIIFWVRSKR SRLLHSNDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRFSVVKRGR PAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR
		EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEW
[0110]		
9	CD19	IGQIYPGDGDNTNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVY FCARKTISSVVDFYFDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIEL TQSPKFMSTSVGDRVSITCKASQNVGTNVAVYQQKPGQSPKPLIYS TYRNNSGVPDRFTGSGSGTDFLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTS GGGTKLEIKR
10	PSMA	MMALPVTALLPLALLLHAEVQLQQSGPELVKPGTSVRISCKTSGYTF FTEYTIHWVKQSHGKSLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDKATLTVDKSS STAYMELRSLTSEDSAVYYCAAGWNFDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGTAVDWYQQK GQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFLTITNVQSEDLADY FCQQYNSYPLTFGAGTMLDLKRAAAIEVMPYLDNEKSNGTIIHV GKHLCPSPPLFPGPSKPFWLVVVGVLACYSLVTVAFIIFWVRSKR
11	P28BB	MALPVTALLPLALLLHAEVQLQQSGPELVKPGTSVRISCKTSGYTF TEYTIHWVKQSHGKSLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDKATLTVDKSS STAYMELRSLTSEDSAVYYCAAGWNFDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGTAVDWYQQK GQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFLTITNVQSEDLADY CQQYNSYPLTFGAGTMLDLKRAAAIEVMPYLDNEKSNGTIIHV GKHLCPSPPLFPGPSKPFWLVVVGVLACYSLVTVAFIIFWVRSKR SRLLHSNDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRFSVVKRGRK KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEEDGCSCRFPEEEEGGCE

[0111] 可用于本发明方法的核酸分子包括任何编码本发明多肽或其片段的核酸分子。这样的核酸分子无须与内源核酸序列100%相同，但通常会表现出基本一致性(substantial identity)。与内源序列具有“基本一致性”的多核苷酸通常能够与双链核酸分子的至少一条链杂交。“杂交”意指在多种的严谨度(stringency)条件下，在互补的多核苷酸序列(例如，本文所述基因)或其部分之间配对形成双链分子(参见，例如，Wahl, G.M. 和 S.L. Berger (1987) Methods Enzymol. 152:399; Kimmel, A.R. (1987) Methods Enzymol. 152:507)。

[0112] 例如,严谨性盐浓度通常将低于约750mM NaCl和75mM柠檬酸三钠,优选低于约500mM NaCl和50mM柠檬酸三钠,更优选低于约250mM NaCl和25mM柠檬酸三钠。低严谨度杂交可以在不存在有机溶剂(例如甲酰胺)下获得,而高严谨度杂交可以在至少约35%的甲酰胺,更优选至少约50%甲酰胺的存在下获得。严谨性温度条件通常将包括至少约30℃,更优选至少约37℃,最优选至少约42℃的温度。各种其他参数例如杂交时间、洗涤剂例如十二烷基磺酸钠(SDS)的浓度、以及包含或不包含载体DNA对本领域技术人员是熟知的。通过按需组合这些多个条件而实现不同的严谨度水平。在优选的实施方式中,杂交将在30℃下在750mM NaCl、75mM柠檬酸三钠和1% SDS中发生。在更优选的实施方式中,杂交将在37℃下在500mM NaCl、50mM柠檬酸三钠、1% SDS、35% 甲酰胺和1001.1g/ml 变性鲑鱼精子DNA(ssDNA)中发生。在最优选的实施方式中,杂交将在42℃下在250mM NaCl、25mM柠檬酸三钠、1% SDS、50% 甲酰胺和200p.g/ml ssDNA中发生。这些条件的有用改变对本领域技术人员将是显而易见的。

[0113] 对大多数应用,杂交接下来的洗涤步骤在严谨度中也将是可变的。洗涤严谨度条件能够通过盐浓度和温度加以限定。如上,可通过降低盐浓度或升高温度来增加洗涤严谨度。例如,用于洗涤步骤的严谨性盐浓度将优选为低于约30mM NaCl和3mM柠檬酸三钠,最优选低于约15mM NaCl和1.5mM柠檬酸三钠。用于洗涤步骤的严谨性温度条件通常将包括至少约25℃,更优选至少约42℃,甚至更优选至少约68℃的温度。在优选的实施方式中,洗涤步骤将在25℃下在30mM NaCl、3mM柠檬酸三钠和0.1% SDS中发生。在更优选的实施方式中,洗涤步骤将在42℃下在15mM NaCl、1.5mM柠檬酸三钠和0.1% SDS中发生。在另一实施方式中,洗涤步骤将在68℃下在15mM NaCl、1.5mM柠檬酸三钠和0.1% SDS中发生。这些条件的另外改变对本领域技术人员将是显而易见的。

[0114] 杂交技术对本领域技术人员是熟知的且记载于例如Benton和Davis (Science 196:180, 1977) ;Grunstein和Hogness (Proc.Natl.Acad.Sci., USA 72:3961, 1975) ;Ausubel等人 (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York, 2001) ;Berger和Kimmel (Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, New York) ;以及 Sambrook等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York。

[0115] “基本相同”(substantially identical)意指多肽或核酸分子表现出与参考氨基酸序列(例如,任何一种本文所述的氨基酸序列)或核酸序列(例如,至少一种本文所述的核酸序列)至少50%的同一性。优选地,该序列与用于比较的序列在氨基酸水平或核酸水平上是至少60%,更优选80%或85%,更优选90%、95%或甚至99%相同的。

[0116] 序列同一性通常采用序列分析软件(例如,Genetics Computer Group的序列分析软件包,University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis.53705, BLAST, BESTFIT, GAP, 或者PILEUP/PRETTYBOX程序)来测定。该软件通过对各种替换、缺失和/或其他修饰分配同源度来匹配一致或相似的序列。保守替换通常包括限于以下组内的替换:甘氨酸、丙氨酸;缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸;天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺;丝氨酸、苏氨酸;赖氨酸、精氨酸;以及苯丙氨酸、酪氨酸。在测定同一程度的示例性方法中,可使用BLAST程序,概率评分在e-3和e-100之间表示紧密相关的序列。

- [0117] “类似物”意指具有参考多肽或核酸分子的功能的结构相关的多肽或核酸分子。
- [0118] 本文所用的术语“配体”是指结合到受体上的分子。具体地,该配体结合另一个细胞上的受体,允许细胞-细胞间的识别。
- [0119] 本文所用的术语“组成型表达”是指在所有生理条件下的表达。
- [0120] “疾病”意指损害或干扰细胞、组织或器官正常功能的任何病症或障碍。疾病的实例包括瘤形成和细胞的病原体感染。
- [0121] “有效量”意指足以阻止、减轻或抑制瘤形成的继续增殖、生长或转移(例如,侵占或迁移)的量。
- [0122] “加强的耐受性”意指防止靶向移植器官或组织的自身反应性细胞或免疫应答细胞的活性。
- [0123] “外源性”意指这样的核酸分子或多肽,其并非内源性地存在于细胞,或者其存在水平不足以实现当过表达时所达到的功能性作用。术语“外源性”可因此涵盖任何在细胞中表达的重组核酸分子或多肽,如外来的、异源的以及过表达的核酸分子和多肽。
- [0124] “异源的核酸分子或多肽”意指通常不存在于细胞或从细胞中获得的样品中的核酸分子(例如,cDNA、DNA或RNA分子)或者多肽。该核酸可以来自另一生物体,或者其可以是,例如在正常情况下在细胞或样品中不表达的mRNA分子。
- [0125] “免疫应答细胞”意指在免疫应答中起作用的细胞、或祖细胞、或其后代。
- [0126] “分离细胞”意指从天然伴随该细胞的分子和/或细胞组分中分离出来的细胞。
- [0127] 术语“分离的”、“纯化的”或“生物学纯的”是指材料在不同程度上不含有在天然状态下可见的通常伴随其的组分。“分离”表示自原始来源或环境的分离程度。“纯化”表示高于分离的分离程度。“纯化的”或“生物学纯的”蛋白质充分免除了其他材料,从而使任何杂质不会实质性地影响蛋白质的生物学性质或引起其他负面结果。即,如果基本上免除了细胞物质、病毒物质、或当以重组DNA技术准备时的培养基、或者当化学合成时的化学前体或化学品,则本发明的核酸或肽是纯化的。通常用分析化学技术来确定纯度和同质性,例如聚丙烯酰胺凝胶电泳法或高效液相色谱。术语“纯化的”可表示在凝胶电泳中产生基本上一个条带的核酸或蛋白质。对于可经历修饰例如磷酸化或糖基化的蛋白质,不同的修饰可以产生不同的分离的蛋白质,其可单独进行纯化。
- [0128] 本文所用的术语“肿瘤抗原-结合域”意指能够特异性地结合存在于肿瘤上的特定的抗原决定簇或抗原决定簇集合的结构域。
- [0129] “调节”意指正面的或负面的改变。示例性调节包括1%、2%、5%、10%、25%、50%、75%或100%的改变。
- [0130] “瘤形成”是指特征在于细胞或组织的病理学增殖以及其随后迁移或侵染至其他组织或器官的疾病。瘤形成的生长通常是不受控制且进行性的,并且在不会引起正常细胞增殖或会导致其中断的条件下发生。瘤形成能够影响多种细胞类型、组织或器官,包括但不限于选自膀胱、骨、脑、乳腺、软骨、神经胶质、食道、输卵管、胆囊、心脏、肠、肾脏、肝脏、肺、淋巴结、神经组织、卵巢、胰腺、前列腺、骨骼肌、皮肤、脊髓、脾、胃、睾丸、胸腺、甲状腺、气管、泌尿生殖道、输卵管、尿道、子宫和阴道的器官,或其组织或细胞类型。瘤形成包括癌症,如肉瘤、癌(carcinoma)或浆细胞瘤(浆细胞的恶性肿瘤)。对于本发明可使用的示例性的瘤形成包括但不限于,白血病(例如,急性白血病、急性淋巴细胞性白血病、急性粒细

胞性白血病、急性髓细胞性白血病、急性早幼粒细胞白血病、急性髓单核细胞白血病、急性单核细胞白血病、急性红白血病、慢性白血病、慢性粒细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病), 真性红细胞增多症, 淋巴瘤(霍奇金氏病、非霍奇金氏病), Waldenstrom巨球蛋白血症, 重链病, 以及 实体瘤如肉瘤和癌(例如, 纤维肉瘤、黏液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨原性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌(nile duct carcinoma)、绒膜癌、精原细胞瘤、胚胎癌、维耳姆斯瘤(Wilms' tumor)、宫颈癌、子宫癌、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜细胞瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突胶质细胞瘤、神经鞘瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、成神经细胞瘤、和视网膜母细胞瘤)。在一个实施方式中, 本发明的筛选方法鉴定可用于治疗乳腺癌或肺癌的组合物。

[0131] “受体”意指存在于细胞膜上的选择性地结合一个或多个配体的多肽或其部分。

[0132] “识别”意指选择性地结合靶标。识别病毒的T细胞通常表达与病毒所表达的抗原相结合的受体。

[0133] “病原体”意指能够引起疾病的病毒、细菌、真菌、寄生虫或原生动物。示例性的病毒包括, 但不限于, 逆转录病毒科(Retroviridae) (如人免疫缺陷病毒, 例如HIV-1 (还被称之为HTLV-III、LAV或HTLV-III/LAV, 或者HIV-III; 以及其它分离群, 例如HIV-LP); 小RNA病毒科(Picornaviridae) (如脊髓灰质炎病毒 (polio viruses)、甲型肝炎病毒 (hepatitis A virus); 肠道病毒(enteroviruses)、人柯萨奇病毒 (Coxsackie viruses)、鼻病毒 (rhinoviruses)、人肠道弧病毒 (echoviruses)); Calciviridae (如导致肠胃炎的毒株); 披盖病毒科(Togaviridae) (如马脑炎病毒 (equine encephalitis viruses)、风疹病毒 (rubella viruses)); 黄病毒科(Flaviridae) (如登革热病毒 (dengue viruses)、脑炎病毒 (encephalitis viruses)、黄热病毒 (yellow fever viruses)); 冠状病毒科(Coronoviridae) (如冠状病毒 (coronaviruses)); 棒状病毒科(Rhabdoviridae) (如水泡性口膜炎病毒 (vesicular stomatitis viruses)、狂犬病病毒 (rabies viruses)); 线状病毒科(Filoviridae) (如欧鲍拉病毒 (ebola viruses)); 副粘病毒科(Paramyxoviridae) (如副流感病毒 (parainfluenza viruses)、腮腺炎病毒 (mumps virus)、麻疹病毒 (measles virus)、呼吸道合胞病毒 (respiratory syncytial virus)); 正粘病毒科(Orthomyxoviridae) (如流感病毒 (influenza viruses)); 布尼亚病毒科(Bunyaviridae) (如汉坦病毒 (Hantavirus)、bunga viruses、白蛉病毒 (phleboviruses) 和纳伊罗病毒 (Nairo viruses)); 沙粒病毒科(Arenaviridae) (出血热病毒 (hemorrhagic fever viruses)); 呼肠弧病毒科(Reoviridae) (如呼肠弧病毒 (reoviruses)、环状病毒 (orbiviruses) 和轮状病毒 (rotaviruses)); 双RNA病毒科(Birnaviridae); 嗜肝病毒科(Hepadnaviridae) (乙型肝炎病毒 (Hepatitis B virus)); 细小病毒科(Parvoviridae) (细小病毒 (parvoviruses)); 乳多空病毒科(Papovaviridae) (乳头瘤病毒 (papilloma viruses)、多瘤病毒 (polyoma viruses)); 腺病毒科(Adenoviridae) (大多数腺病毒 (adenoviruses)); 疱疹病毒科(Herpesviridae) (单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus) (HSV)) 1 和 2、水痘带状疱疹病毒 (varicella zoster virus)、巨细胞病毒

(cytomegalovirus) (CMV)、疱疹病毒 (herpes virus))；痘病毒科 (Poxviridae) (天花病毒 (variola viruses)、痘苗病毒 (vaccinia viruses)、痘病毒 (pox viruses))；和虹彩病毒科 (Iridoviridae) (如 非洲猪瘟病毒 (African swine fever virus))；以及未分类病毒 (如丁型肝炎病原体 (被认为是乙型肝炎病毒的缺损随体)、非-A非-B肝炎 病原体 (1类=内部传播; 2类=肠胃外传播 (即丙型肝炎))；诺沃克 因子 (Norwalk) 和相关病毒, 以及星状病毒 (astroviruses))。

[0134] 示例性的细菌包括但不限于, 巴氏杆菌属 (*Pasteurella*) 物种、葡萄球菌属 (*Staphylococci*) 物种、链球菌属 (*Streptococcus*) 物种、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 物种、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 物种和 沙门氏菌属 (*Salmonella*) 物种。感染菌的具体实例包括但不限于, 幽门螺杆菌 (*Helicobacter pyloris*)、布氏疏螺旋体 (*Borelia burgdoferi*)、侵肺军团菌 (*Legionella pneumophilia*)、分枝杆菌属菌种 (*Mycobacteria* spp) (例如结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*)、鸟分枝杆菌 (*M. avium*)、胞内分枝杆菌 (*M. intracellulare*)、堪萨斯分枝杆菌 (*M. kansaii*)、戈登分枝杆菌 (*M. gordonae*) )、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、淋病奈瑟氏球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟氏球菌 (*Neisseria meningitidis*)、单核细胞增生利斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*)、酿脓链球菌 (*Streptococcus pyo genes*) (A组链球菌)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) (B组链球菌)、链球菌属 (*Streptococcus*) (viridans组)、粪链球菌 (*Streptococcus faecalis*)、牛链球菌 (*Streptococcus bovis*)、链球菌属 (*Streptococcus*) (厌氧种)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、致病性弯曲杆菌属物种 (*Campylobacter* sp.)、肠球菌属 (*Enterococcus* sp.)、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*)、炭疽杆菌 (*Bacillus antracis*)、白喉棒杆菌 (*corynebacterium diphtheriae*)、棒状杆菌属菌种 (*corynebacterium* sp.)、猪红斑丹毒丝菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*)、破伤风梭菌 (*Clostridium tetani*)、产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*)、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、多杀巴斯德氏菌 (*Pasturella multocida*)、拟杆菌属 (*Bacteroides* sp.)、具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*)、念珠状链杆菌 (*Streptobacillus moniliformis*)、苍白密螺旋体 (*Treponema pallidum*)、极细密螺旋体 (*Treponema pertenue*)、钩端螺旋体属 (*Leptospira*)、立克次氏体属 (*Rickettsia*) 和衣氏放线菌 (*Actinomyces israelii*)。

[0135] “特异性结合”意指多肽或其片段识别和结合所关注的多肽, 但 其基本上不识别和结合样品 (例如天然地包括本发明的多肽的生物学 样品) 中的其他分子。

[0136] 本文所用“肿瘤抗原”意指由能够诱导免疫应答的肿瘤所表达的 任何多肽。

[0137] “病毒抗原”意指由能够诱导免疫应答的病毒所表达的多肽。

[0138] 术语“包含有”、“包含”意在具备美国专利法中赋予其的广泛 含义并且能够表示“包括有”、“包括”等等。

[0139] 如本文所用的“治疗”是指在改变受治疗的个体或细胞的病程的 尝试中的临床干预, 并且可以出于预防或在临床病理学的过程中实施。治疗的疗效包括但不限于, 预防疾病的发生或复发、症状的减轻、疾病的任何直接或间接病理学结果的减少、预防转移、降低疾病的进展 速度、疾病状态的改善或减轻、以及缓解或改善的预后。通过预防疾病或障碍

的进展,治疗既可以预防受感染或诊断的受试者中或者疑似 具有该障碍的受试者中的障碍恶化,而且治疗还可以预防处于障碍风 险的受试者中或疑似具有该障碍的受试者中的障碍或该障碍症状的发 作。

[0140] 本文所用的术语“受试者”是指脊椎动物,优选哺乳动物,更优 选人类。

[0141] 本文所用的术语“免疫低下”是指具有免疫缺陷的受试者。此受 试者极易受机会感染攻击,机会感染这种由生物体引起的感染在具有 健康免疫系统的人中通常不引起疾病,但能够感染具有欠佳功能或抑 制免疫系统的人。

[0142] 本发明的其他方面在下面的公开内容中进行描述并在本发明的范 围之内。

[0143] 本发明总体提供细胞,包括表达至少抗原识别受体(例如TCR或 CAR)和嵌合共刺激受体(CCR)的组合的基因修饰免疫应答细胞(例 如T细胞、自然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T 淋巴细胞(CTL)), 以及使用其治疗其中需要抗原特异性免疫应答增加的瘤形成和其他病理学的方法。本发明基于,至少部分基于以下发现:通过抗原识别受 体和嵌合共刺激受体引起的由肿瘤细胞共表达的两种抗原的同时介入 可用于激活和刺激免疫反应细胞而没有 全身性作用。具体而言,针对 表达单独任一抗原的组织的反应性优选被最小化,在两种抗原均存在 而不是单独一种存在下引发T细胞的激活。T细胞激活由靶向抗原(例 如,CD19或 前列腺干细胞抗原PSCA)的TCR或CAR介导。共刺激 独立地由靶向第二抗原(例如,前列腺特 异性膜抗原,PSMA)的“嵌 合共刺激受体”(CCR)<sup>12,13</sup>而介导。该方法实现了针对双抗原阳性 (DP) 肿瘤的增加反应性,但对单抗原阳性(SP) 肿瘤不会发挥增强活性。已经发现能够使 肿瘤感应T细胞区分DP肿瘤和SP肿瘤,其通过将T 细胞活性削弱至其自身不能实现T细胞激 活、但在肿瘤部位通过CCR 与独立的共表达抗原结合而挽救其功能的水平。这种方法提供了肿瘤 微环境内的免疫原性用于肿瘤根除,同时不影响正常或非瘤形成的SP 细胞,并且 相对于传统采纳的T细胞疗法显示出显著进步。

[0144] 此外,该方法不局限于对瘤形成的治疗,而是可适用于需要增加 的抗原特异性免疫应答的广泛应用,该应用不仅包括瘤形成的治疗, 而且包括用于增强针对病原体感染或 传染性疾病的免疫应答以及在自 体免疫或同种异体移植的环境下增强调节性T细胞中的 免疫耐受性。

[0145] 造血细胞谱系

[0146] 哺乳动物的造血(血)细胞提供了广泛的生理活性。造血细胞分 为淋巴系、髓系和 红系。淋巴系包括B细胞、T细胞和天然杀伤(NK) 细胞,用于产生抗体、调节细胞免疫系统、 检测血液中的外来物质、检测对于主体为外来的细胞等等。本文所用的术语“T细胞”是指 在胸 腺中成熟的且主要负责细胞介导的免疫力的淋巴细胞。T细胞参与到适 应性免疫系 统中。本文所用的术语“天然杀伤(NK) 细胞”是指作为 细胞介导的免疫力的部分并在先天 免疫反应中发挥作用的淋巴细胞。它们不需要事先激活以实现其对靶细胞的细胞毒性作 用。细胞毒性T 细胞(CTL或杀伤T细胞)是能够引起受感染体细胞或肿瘤细胞的死 亡的T淋 巴细胞的集合。

[0147] 用于本发明的方法的细胞

[0148] 本发明提供表达抗原识别受体(其激活免疫应答细胞(例如,TCR、CAR))和嵌合共 刺激受体(CCR)的组合的细胞,以及使用这样的 细胞用于治疗需要增强的免疫应答的疾病的 方法。在一个方法中,肿 瘤抗原特异性T细胞、NK细胞、CTL细胞或其他免疫应答细胞被用

作选择性地富集一种或多种共刺激配体用于治疗或预防瘤形成的穿梭 体(shuttles)。例如, T细胞表达的识别CD19的嵌合抗原受体19z1 在表达识别并结合前列腺特异性膜抗原(PSMA)的嵌合共刺激受体 P28BB的T细胞中被共表达。这些细胞被施用于对前列腺癌治疗或预 防有需要的人类受试者。在另一个方法中,可使用病毒抗原特异性T 细胞、NK细胞、CTL细胞用于病毒疾病的治疗。例如,识别第一CMV 抗原的嵌合共刺激抗原受体和识别并结合第二CMV抗原的嵌合抗原 受体在细胞毒性T淋巴细胞中被共表达以治疗CMV。

[0149] 肿瘤抗原特异性T淋巴细胞(和NK细胞)

[0150] 可用于本发明方法中的肿瘤抗原特异性人类淋巴细胞的类型包括 但不限于,经基因修饰以表达嵌合抗原受体(CAR)的外周供体淋巴 细胞(Sadelain, M. 等人. 2003 Nat Rev Cancer 3:35-45),经基因修饰以 表达全长肿瘤抗原识别T细胞受体复合物(包括a和p 异质二聚体)的外 周供体淋巴细胞(Morgan, R.A. 等人. 2006 Science 314:126-129),衍生自肿瘤活检中的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的淋巴细胞培养物(Panelli, M.C. 等人. 2000 J Immunol 164:495-504; Panelli, M.C. 等人. 2000 J Immunol 164:4382-4392),以及采用人工抗原呈递细胞(AAPC)或致 敏树突状细胞的选择性体外扩张的抗原特异性外周血白细胞(Dupont, J. 等人. 2005 Cancer Res 65:5417-5427; Papanicolaou, G.A. 等人. 2003 Blood 102:2498-2505)。T细胞可以是自体的、异体的或体外衍生自工 程设计的祖细胞或干细胞。

[0151] 任何合适的肿瘤抗原(抗原肽)可适用于本文所述的肿瘤相关的 实施方式中。抗原来源包括,但不限于癌症蛋白质。抗原可以作为肽 或作为完整的蛋白质或其部分表达。完整蛋白质或其部分可以是内生 的或经诱变的。合适的抗原包括前列腺特异性膜抗原(PSMA) 和前列 腺干细胞抗原(PCSAs)。

[0152] 病毒抗原特异性T淋巴细胞(和NK细胞)

[0153] 用于治疗病原体感染或其他传染性疾病的合适的抗原,例如在免 疫低下的受试者中,包括但不限于,存在于巨细胞病毒(CMV)、Epstein Barr病毒(EBV)、人类免疫缺陷病毒(HIV) 以及流感病毒中的病毒 抗原。

[0154] 未纯化的CTL来源可以是任何本领域已知的,如骨髓、胚胎、新生 儿或成人或其他 造血细胞来源,例如,胎肝、外周血或脐带血。可采 用多种技术来分离细胞。例如,负筛选方法可以初步去除非CTL细胞。mAb对于鉴定正筛选和负筛选区分用的与特定细胞谱系和/或 细胞期相 关联的标志物特别有用。

[0155] 可通过相对粗简的分离而除去大部分的终末分化细胞。例如,初 始可利用磁珠分 离以除去大量不相关细胞。优选地,在细胞分离之前 将除去至少约80%,通常至少70%的 总的造血细胞。

[0156] 用于分离的程序包括但不限于,密度梯度离心法;重设法 (resetting);与改变细 胞密度的粒子结合;用抗体包裹的磁珠的磁选 法;亲和色谱法;与mAb结合或与mAb共同使 用的细胞毒性试剂(包 括但不限于补体和细胞毒素);以及用附着在固体基质上的抗体淘 选, 例如铺板、切削(chip)、淘析或任何其他常规技术。

[0157] 用于分离和分析的技术包括但不限于流式细胞术,其可具有不同 的复杂程度 (sophistication),例如多个色道、低角度和钝光散射检测 通道、阻抗通道。

[0158] 可以通过采用与死亡细胞相关联的染料如碘化丙啶(PI),从死亡 细胞中选择细 胞。优选地,细胞被收集在包含2%胎牛血清(FCS) 或 0.2%牛血清白蛋白(BSA) 的介质中或

任何其他合适的优选无菌等渗的介质中。

[0159] 因此,本发明总体提供免疫应答细胞例如病毒特异性或肿瘤特异性T细胞,其包括与第一抗原结合并激活免疫应答细胞的受体以及与第二抗原结合并刺激免疫应答细胞的受体。

[0160] 载体

[0161] 可通过用重组DNA构建体转导基本上同源的细胞组成而实现免疫应答细胞的基因修饰(例如T细胞、CTL细胞、NK细胞)。优选地,使用逆转录病毒载体( $\gamma$ 逆转录病毒或慢病毒)将DNA构建体引入到细胞中。例如,可将编码与抗原(例如肿瘤抗原、或其变体、或片段)结合的受体的多核苷酸克隆到逆转录病毒载体中,并且可从其内源启动子、从逆转录病毒长末端重复、或从所关注靶细胞类型特异性的启动子驱动其表达。也可以使用非病毒载体。

[0162] 对于为提供肿瘤或病毒抗原特异性细胞的初始细胞基因修饰,一般采用逆转录病毒载体用于转导,然而也可使用任何其他合适的病毒载体或非病毒的递送体系。对于为提供含有抗原呈递复合物(其包含至少两种共刺激配体)的细胞的后续细胞基因修饰,逆转录病毒基因传递(转导)同样证明是有效的。逆转录病毒载体和合适的包装系的组合也是合适的,其中衣壳蛋白对于感染人类细胞将是有用的。已知多种产生双嗜性病毒的细胞系,包括但不限于,PA12 (Miller等人 (1985) Mol. Cell. Biol. 5:431-437); PA317 (Miller等人 (1986) Mol. Cell. Biol. 6:2895-2902); 以及CRIP (Danos等人 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6460-6464)。非双嗜性颗粒也是合适的,例如具有VSVG、RD114 或GALV包封的假型颗粒和任何其他本领域已知的那些。

[0163] 可行的转导方法还包括将细胞与制造细胞直接共培养,例如通过 Bregni等人 (1992) Blood 80:1418-1422的方法,或者与单独的病毒上清液或浓缩的载体储液(有或没有合适的生长因子及聚阳离子)一起培养,例如通过Xu等人 (1994) Exp. Hemat. 22:223-230; 以及Hughes等人 (1992) J. Clin. Invest. 89:1817的方法。

[0164] 可使用其他转导病毒载体在免疫应答细胞中表达本发明的共刺激配体。优选地,选择的载体显示出高效的感染以及稳定的整合和表达(参见例如Cayouette等人, Human Gene Therapy 8:423-430, 1997; Kido等人, Current Eye Research 15:833-844, 1996; Bloomer等人, Journal of Virology 71:6641-6649, 1997; Naldini等人, Science 272: 263-267, 1996; 和Miyoshi等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:10319, 1997)。可使用的其它病毒载体包括,例如腺病毒、慢病毒、和腺相关病毒载体、牛痘病毒、牛乳头状瘤病毒或者疱疹病毒,如Epstein-Barr病毒(还参见,例如the vectors of Miller, Human Gene Therapy 15-14, 1990; Friedman, Science 244:1275-1281, 1989; Eglitis等人, BioTechniques 6:608-614, 1988; Tolstoshev等人, Current Opinion in Biotechnology 1:55-61, 1990; Sharp, The Lancet 337:1277-1278, 1991; Cornetta等人, Nucleic Acid Research and Molecular Biology 36:311-322, 1987; Anderson, Science 226:401-409, 1984; Moen, Blood Cells 17:407-416, 1991; Miller等人, Biotechnology 7:980-990, 1989; Le Gal La Salle等人, Science 259:988-990, 1993; 和Johnson, Chest 107:77S-83S, 1995)。逆转录病毒载体已被特别好地开发并已用于临床环境(Rosenberg等人, N. Engl. J. Med 323:370, 1990; Anderson等人, 美国专利号5,399,346)。

[0165] 也可采用非病毒方法用于在细胞中表达蛋白质。例如,可通过在 脂质体转染的存在下施用核酸将核酸分子引入到细胞中(Feigner等人, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.84: 7413, 1987; Ono等人, Neuroscience Letters 17:259, 1990; Brigham等人, Am.J.Med.Sci.298:278, 1989; Staubinger等人, Methods in Enzymology 101:512, 1983), 脱唾液酸血清 类粘蛋白-聚赖氨酸结合(Wu等人, Journal of Biological Chemistry 263:14621, 1988; Wu等人, Journal of Biological Chemistry 264:16985, 1989), 或者通过手术环境下的微注射(Wolff等人, Science 247:1465, 1990)。

[0166] 其他用于基因传递的非病毒方法包括使用磷酸钙、DEAE葡聚糖、电穿孔和原生质体融合在体外的转染。脂质体也可能潜在地有益于对 将DNA输送进细胞。也可以通过将正常核酸转移到可离体(ex vivo) 培养的细胞类型(例如,自体或异源的原代细胞或其后代)中,之后 将细胞(或其子代)注射到目标组织或全身注射,来实现正常基因植 入受试者的感染组织中。也可使用转座酶或靶核酸酶(例如,锌指核 酸酶、兆核酸酶、或TALE核酸酶)衍生或得到重组受体。可以通过 RNA电穿孔实现瞬时表达。可以由任何合适的启动子(例如, 人类巨 细胞病毒(CMV)、猿猴病毒40(SV40)或金属硫蛋白启动子)指导 用于多核苷酸疗法的cDNA表达,并通过任何合适的哺乳动物调控元 素或内含子(例如,延伸因子1c增强子/启动子/内含子结构)进行调 控。例如,如果需要,可使用已知在特定细胞类型中优先指导基因表 达的增强子来指导核酸的表达。使用的增强子可包括,但不限于,那 些以组织或细胞特异性为特征的增强子。或者,如果使用基因组克隆 作为治疗构建体,可通过同族调节序列来介导调节,或者如果需要, 通过衍生自异源来源的调节序列包括上述的任何启动子或调控序列来 介导调节。

[0167] 然后可在与未经修饰的细胞的条件相似的条件下培养所产生的细 胞,其中经修饰的细胞可被扩增并用于多种用途。

[0168] 还包括在本发明中的是,以当在免疫应答细胞中表达时增强其抗 瘤形成的活性的方式被修饰的19z1、CD19、CD8、CD3、dsRed、P28BB、PSMA、CD28、4-1BB、GFP多肽或其片段。本发明提供通过在序列中 产生变化来优化氨基酸序列或核酸序列的方法。该变化可以包括某些 突变、缺失、插入或翻译后修饰。本发明进一步包括本发明任何天然 存在的多肽的类似物。类似物可以以氨基酸序列差异、通过翻译后修 饰或通过二者而与本发明的天然存在的多肽不同。本发明的类似物通 常将与本发明的天然存在的氨基酸序列的全部或部分表现出至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多的同一性。序列比较的长度是至少5、10、15或20个氨基酸残 基,优选至少25、50或75个氨基酸残 基,以及更优选多于100个氨 基酸残基。此外,在测定同一性程度的示例性方法中,可使用 BLAST 程序,概率评分在 $e^3$ 和 $e^{-100}$ 之间表示紧密相关的序列。修饰包括体内 和体外对多肽的化学衍生,例如,乙酰化、羧基化、磷酸化、或糖基 化;这些修饰可以在多肽合成或加工过程中或者在用分离的修饰酶处 理之后发生。类似物还可以以一级序列中的变化而与本发明的天然存 在的多肽不同。这些包括遗传变异,天然和诱导的均包括(例如,因 辐射或暴露于乙烷甲基硫酸盐(ethanemethylsulfate)而引起的随机诱 变,或通过记载于 Sambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular Cloning:A Laboratory Manual (2d ed.), CSH Press, 1989或者Ausubel等人(同上文) 的位点特异性诱变)。还包括的是包含除L-氨 基酸之外的残基的环状 肽、分子和类似物,例如D-氨基酸或非天然存在的或合成的氨基

酸, 例如,-或-氨基酸。

[0169] 除全长多肽之外, 本发明还提供本发明的任一多肽或肽结构域的 片段。如本文所用的术语“片段”意指至少5、10、13或15个氨基酸。在其他实施方式中, 片段为至少20个连续的氨基酸, 至少30个连续 的氨基酸, 或至少50个连续的氨基酸, 在其他的实施方式中为至少 60-80、100、200、300或更多个连续的氨基酸。本发明的片段可以通 过本领域技术人员已知的方法产生或者得自正常的蛋白质加工(例如, 从新生多肽中去除生物活性不需要的氨基酸, 或者通过可选的mRNA 剪切或可选的蛋白质加工事件而去除氨基酸)。

[0170] 非蛋白质类似物具有被设计为模拟本发明蛋白质的功能活性的化 学结构。这样的类似物按照本发明的方法进行施用。这样的类似物可 超越原始多肽的生理活性。类似物设计的方法是本领域熟知的, 并且 类似物的合成可以通过修饰化学结构根据这些方法进行, 从而使得得 到的类似物在免疫应答细胞中表达时, 原始多肽的抗瘤形成活性得以 增加。这些化学修饰包括, 但不限于, 取代参照多肽的特定碳原子上 的可选R基团和改变饱和度。优选地, 蛋白质类似物对体内降解是相 对耐受的, 导致施用时更为延长的治疗效果。用于测定功能活性的测 定法包括但不限于下面实施例所述的那些。

[0171] 共刺激配体

[0172] 与至少一种共刺激配体的相互作用提供对于免疫细胞(例如T细 胞)的充分激活重要的非抗原特异性信号。共刺激配体包括, 但不限 于, 肿瘤坏死因子(TNF)配体、细胞因子(如IL-1、IL-12、IL-15或 IL-21), 以及免疫球蛋白(Ig)超家族配体。

[0173] 肿瘤坏死因子(TNF)是参与全身炎症并刺激急性期反应(acute phase reaction)的细胞因子。其主要作用是调节免疫细胞。肿瘤坏死因 子(TNF)配体享有一些共同的特征。多数配体被合成为包含短的胞 质区段和相对长的细胞外区域的II型跨膜蛋白质(细胞外C 末端)。TNF配体包括, 但不限于, 神经生长因子(NGF)、CD40L(CD40L) /CD154、CD137L/4-1BBL、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNFa)、CD134L/OX40L/CD252、CD27L/CD70、Fas配体(FasL)、CD30L/ CD153、肿瘤坏死因子 $\beta$ (TNF(3)/淋巴毒素 $\alpha$ (LTa)、淋巴毒 素 $\beta$ (ur(3), CD257/B细胞激活因子(BAFF)/Blys/THANK/Ta11-1、糖 皮质激素诱导的TNF受体配体(GITRL), 以及TNF相关的凋亡诱导 配体(TRAIL)、LIGHT(TNFSF14)。免疫球蛋白(Ig)超家族是一 大组参与细胞的识别、结合或粘附过程的细胞表面可溶性蛋白质。这 些蛋白质共有免疫球蛋白的结构特 征——它们具备免疫球蛋白结构域 (折叠)。免疫球蛋白超家族配体包括, 但不限于, CD80 和CD86, 都是CD28的配体。

[0174] 包含本发明的基因修饰免疫应答细胞(例如, T细胞、NK细胞、 CTL细胞或其祖细 胞)的组合物能够被全身性或直接地提供给受试者 以治疗瘤形成、病原体感染或者传染性 疾病。在一个实施方式中, 本 发明的细胞被直接注射到目标器官(例如, 受瘤形成影响的器 官)中。或者, 含有基因修饰免疫应答细胞的组合物被间接提供给目标器官, 例如, 通过施 用到循环系统(例如, 肿瘤血管)中。可以在细胞施用 之前、之中或之后提供扩增剂和分化 剂以增加T细胞、NK细胞或CTL 细胞在体外或体内的产生。

[0175] 修饰的细胞可以在任何生理学可接受的载体中被施用, 通常是血 管内方式, 但是 其也可以被引入至骨或其他便利的部位, 其中细胞可 以找到再生和分化的合适(例如, 胸 腺)部位。通常, 将施用至少 $1 \times 10^5$ 个细胞, 最终达到 $1 \times 10^{10}$ , 或更多。本发明的基因修饰免 疫应 答细胞可包括纯化的细胞群。本领域技术人员可以使用多种已知方法 容易地确定群

体中基因修饰免疫应答细胞的百分比,如荧光激活细胞 分选(FACS)。群体中包含基因修饰免疫应答细胞的纯度的优选范围 是约50%至约55%,约55%至约60%,以及约65%至约70%。更优选 纯度为约70%至约75%,约75%至约80%,约80%至约85%;还更优 选纯度为约85%至约90%,约90%至约95%,和约95%至约100%。本领域技术人员可容易地调整剂量(例如纯度低可能需要剂量增加)。可通过注射、导管等而引入细胞。如果需要,还可包括因子,包括但 不限于,白介素例如IL-2、IL-3、IL-6和IL-11以及其他白介素,集落 刺激因子如G-、M-和GM-CSF,干扰素例如  $\gamma$ -干扰素,以及红细胞生 成素。

[0176] 本发明的组合物包括药物组合物,其包括基因修饰的免疫应答细 胞或其祖细胞以及药学上可接受的载体。施用可以是自体或者是异源 的。例如,免疫应答细胞或祖细胞可以获自一个受试者,并施用至同 一受试者或者不同的相容的受试者。本发明的外周血衍生的免疫应答 细胞或其子代(例如,体内、离体或体外衍生的)可通过局部注射而 施用,包括导管给药、系统性注射、局部注射、静脉注射或者肠胃外 给药。当施用本发明的治疗组合 物(例如,包含基因修饰免疫应答细 胞的药物组合物)时,其通常会以单位剂量可注射的形 式进行配制(溶 液、悬浮液、乳液)。

#### [0177] 配方

[0178] 包含基因修饰免疫应答细胞的本发明组合物可以以无菌液体制剂 被方便地提 供,例如,等渗水溶液、悬浮液、乳液、分散剂或粘性组 合物,其可以被缓冲至选定的pH。液 体制剂通常比凝胶、其他粘性组 合物以及固体组合物更易制备。此外,液体组合物某 种程度上更易于 施用,特别是通过注射。粘性组合物在另一方面可以在合适的粘度范 围内配 制以提供与特定组织更长的接触时间。液体或粘性组合物可包 括载体,其可以是溶剂或分 散介质包含例如水、生理盐水、磷酸盐缓 冲盐水、多元醇(例如,甘油、丙二醇、液体聚乙 二醇等等)及其合 适的混合物。

[0179] 可通过将用于实施本发明的基因修饰免疫应答细胞引入所需量的 合适溶剂,按 需使用多种量的其他组分,而制备无菌注射液。这样的 组合物可以与合适的载体、稀释剂、 或赋形剂如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等混合。组合物还可被冻干。组合物可包含 辅助物质 如润湿剂、分散剂、或乳化剂(例如,甲基纤维素)、pH缓冲剂、凝 胶或粘度增强添 加剂、防腐剂、矫味剂、颜料等等,取决于施用的途 径和所需的制剂。标准文本,如 “REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE”,第17版,1985,引入本文作为参考,可以被用于 查阅以 制备合适的制剂而无需过度的实验。

[0180] 可添加增强组合物稳定性和无菌性的多种添加剂,包括抗微生物 防腐剂、抗氧化 剂、螯合剂以及缓冲剂。可通过多种抗菌剂和抗真菌 剂确保对微生物作用的抑制,例如,对 羟基苯甲酸酯(paraben)、氯 丁醇、苯酚、山梨酸等等。可注射药物形式的延长吸收可通过 延迟吸 收剂的使用实现,例如,单硬脂酸铝和明胶。然而,根据本发明,使 用的任何媒介 (vehicle)、稀释剂或添加剂必须要与基因修饰免疫应 答细胞或其祖细胞相容。

[0181] 组合物可以是等渗的,即,其可以具有与血液或泪液相同的渗透 压。本发明组合 物所需的等渗性可以使用氯化钠或其他药学上可接受 的试剂如右旋糖、硼酸、酒石酸钠、 丙二醇或其他无机或有机溶质达 到。氯化钠对于含有钠离子的缓冲液是特别优选的。

[0182] 如果需要,可使用药学上可接受的增稠剂使组合物的粘度保持在 选定的水平。甲 基纤维素是优选的因为其易得且经济可行,并且易于 工作。其他合适的增稠剂包括,例如,

黄原胶、羧甲基纤维素、羟丙基纤维素、卡波姆等等。优选的增稠剂浓度将取决于所选的试剂。重点是使用会达到选定粘度的量。显然，合适的载体和其他添加剂的选择将取决于确切的施用途径以及特定剂型的性质，例如，液体剂型（例如，组合物是否被配制成溶液、悬浮液、凝胶或其他液体形式，如延时释放（time release）形式或液体填充形式）。

[0183] 本领域技术人员将认识到组合物的组分应当被选为化学惰性且不会影响如本发明所述的基因修饰免疫应答细胞的活性（viability）或有效性。这对技术人员在化学和药学原理上来说不存在问题，或者问题可通过参考标准文本或根据本公开及本文引用的文献通过简单的实验来避免（不涉及过度的实验）。关于本发明的基因修饰免疫应答细胞的治疗应用的一个考虑是达到最优效果所需的细胞量。施用的细胞量会随着被治疗的受试者而变化。在一个实施方式中， $10^4$ 至 $10^{10}$ 之间、 $10^5$ 至 $10^9$ 之间或 $10^6$ 至 $10^8$ 之间的本发明的基因修饰免疫应答细胞被施用于人类受试者。更有效的细胞可以甚至更少的数量进行施用。在一些实施方式中，至少约 $1 \times 10^8$ 、 $2 \times 10^8$ 、 $3 \times 10^8$ 、 $4 \times 10^8$ 和 $5 \times 10^8$ 的本发明的基因修饰免疫应答细胞被施用于人类受试者中。考虑多少是有效剂量的精确判定可以基于个别到每个受试者的因素，包括他们的尺码（size）、年龄、性别、重量和特定受试者的症状。本领域技术人员可从本公开和本领域的知识容易地确定剂量。

[0184] 技术人员可容易地确定组合物中以及在本发明的方法中要施用的细胞和任选的添加剂、媒介和/或载体的量。通常，任何添加剂（活性细胞和/或试剂之外）以0.001%–50%（重量）溶液的量存在于磷酸盐缓冲盐水中，并且活性成分以微克到毫克的量级存在，如约0.0001%–约5wt%，优选约0.0001%–约1wt%，还更优选约0.0001%–约0.05wt%或约0.001%–约20wt%，优选约0.01%–约10wt%，还更优选约0.05%–约5wt%。当然，对于施用于动物或人类的任何组合物，以及任何具体的施用方法，因此优选确定：毒性，如通过测定在合适的动物模型例如啮齿动物如小鼠中的致死剂量（LD）和LD50；以及引起适当响应的组合物剂量、其中的组分浓度以及施用组合物的时机。这样的测定根据技术人员的知识、本公开内容和本文引用的文献来说不需要过度的实验。并且，顺序给药的时机可在无需过度实验下加以确定。

#### [0185] 治疗方法

[0186] 本文提供治疗受试者中的瘤形成的方法。本文还考虑了治疗受试者中的病原体感染或其他传染性疾病的方法，受试者例如免疫低下的人类受试者。该方法包括以有效实现期望效果（现有症状的缓解或防止复发）的量施用本发明的T细胞、NK细胞或CTL细胞。对于治疗，施用量是有效产生所需效果的量。可以在一次或一系列的施用中被提供有效量。有效量可以以大丸剂或通过连续灌注而提供。

[0187] “有效量”（或“治疗有效量”）是在通过治疗足以引起有益或期望临床结果的量。有效量可以以一个或多个剂量提供给受试者。对治疗而言，有效量是足以缓解、减轻、稳定、逆转或减慢疾病进展或以其他方式减少疾病的病理学结果的量。有效量通常由医生就具体案例确定且在本领域技术人员的能力范围内。在确定达到有效量的合适剂量时通常考虑多种因素。这些因素包括受试者的年龄、性别和重量，被治疗的症状，症状的严重程度以及所施用的抗原结合片段的形式和有效浓度。

[0188] 对于使用抗原特异性T细胞的过继性免疫疗法，通常注入 $10^6$ – $10^{10}$ 范围内（例如 $10^9$ ）的细胞剂量。当基因修饰细胞被施用到主体并随后分化时，T细胞被诱导为特异性地

针对特定抗原。T细胞的“诱导”可包括抗原特异性T细胞如通过缺失或失能而引起的失活。失活对于例 如在自身免疫疾病中建立或重建耐受性特别有用。修饰的细胞可通过 任何本领域已知的方法被施用,包括但不限于,静脉注射、皮下、结 节内 (intranodal)、瘤内、鞘内、胸膜内、腹膜内和直接到胸腺。

[0189] 本发明提供用于增加有需要的受试者中的免疫应答的方法。在一个实施方式中,本发明提供治疗或预防受试者中的瘤形成的方法。本 发明提供对治疗患有前列腺癌或传统治疗干预无用的转移性前列腺癌 的受试者特别有用的方法。对于疗法合适的人类受试者通常包括两个 治疗组,其能通过临床标准加以区分。具有“晚期疾病 (advanced disease)”或“高荷瘤 (high tumor burden)”的病人为那些具有临床 上可检测到肿瘤的病人。临幊上可检测到的肿瘤为可基于肿瘤质量而 检测到的肿瘤(例如,通过触诊、CAT扫描、声波图、乳房X线影像 或X射线;其本身上的阳性生化或组织病理学标志物不足以鉴定该人群)。本发明中具体化的药物组合物被施用至这些受试者以引发抗肿瘤反应,目的是减轻他们的症状。理想的是结果为肿瘤质量减小,但是任何临床改善也是有益的。临床改善包括肿瘤的风险或进展速率降低或病理学结果减少。

[0190] 第二组合适的受试者在领域内称为“辅助组”。他们是具有瘤形 成病史但对其他治疗方式产生应答的个体。以前的治疗可以包括但不限于,手术切除、放疗以及传统的化疗。结果,这些个体没有临幊上 可检测到的肿瘤。然而,他们被怀疑在靠近原发肿瘤位点或通过转移 具有疾病进展的风险。辅助组可以进一步分为高风险和低风险个体。此划分是根据开始治疗之前和之后观察到的特征加以确定。这些特征 在临幊上是已知的并且对于每种不同的瘤形成而适当地加以定义。具有高风险亚组的典型特征为其中的肿瘤侵入邻近的组织或者显示有淋巴结参与。

[0191] 另一组对瘤形成具有遗传易感性但尚未显现瘤形成的临幊症状。例如,对于与乳腺癌相关联的遗传突变测试呈阳性、但仍处于育龄的 妇女,可希望在预防性治疗中接受一种或多种本文所述的抗原结合片段,以防止瘤形成的发生直到适于实施预防性手术。

[0192] 具有任何以下的瘤形成的人类瘤形成受试者是特别合适的受试 者:成胶质细胞瘤、黑色素瘤、成神经细胞瘤、腺癌、神经胶质瘤、软组织肉瘤以及多种癌(包括前列腺癌和小细胞肺癌)。合适的癌症 进一步包括任何肿瘤学领域已知的,包括但不限于,星形细胞瘤、纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、少突神经胶质瘤、室管膜瘤、成神经 管细胞瘤、原发性神经外胚层肿瘤 (PNET)、软骨肉瘤、骨源性肉瘤、胰腺导管腺癌、小细胞和大细胞肺腺癌、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉 瘤、鳞状细胞癌、支气管肺泡癌、上皮腺癌、以及它们的肝转移、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、肝细胞瘤、胆管癌、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、基底细胞癌、汗腺癌、乳头状癌、皮脂腺癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、胆 管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎癌、维耳姆斯瘤、睾丸肿瘤、髓 母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经 瘤、少突神经胶质瘤、脑脊膜瘤、成神经细胞瘤、视网膜母细胞瘤、白血病、多发性骨髓瘤、Waldenstrom巨球蛋白血症,以及重链病、乳腺癌如导管腺癌和小叶腺癌、子宫颈鳞状细胞癌和腺癌、子宫和卵巢 上皮癌、前列腺腺癌、膀胱的移行鳞状细胞癌、B细胞和T细胞淋巴 (结 节状的和扩散状的)浆细胞瘤、急性和慢性白血病、恶性黑色素瘤、软组织肉瘤和平滑肌肉瘤。

[0193] 受试者可具有疾病晚期形式,在此情况下治疗目的可包括疾病进 展的缓解或逆

转和/或副作用的改善。受试者可具有患病史,其已经历过治疗,在此情况下治疗目的将通常包括降低或延迟复发风险。

[0194] 因此,本发明提供治疗或预防受试者中的瘤形成的方法,该方法包括施用有效量的免疫应答细胞,该免疫应答细胞包括与肿瘤抗原结合并激活该免疫应答细胞的受体(例如TCR、CAR),以及编码与另一肿瘤抗原结合并激活该免疫应答细胞的受体的载体。在一个实施方式中,瘤形成选自前列腺癌、乳腺癌、血癌(例如白血病、淋巴瘤和骨髓瘤)、卵巢癌、膀胱癌、脑癌、结肠癌、肠癌、肝癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌、胃癌、成胶质细胞瘤和喉癌。在另一个实施方式中,肿瘤抗原是以下中的一种或多种:碳酸酐酶IX(CAIX)、癌胚抗原(CEA)、CD5、CD7、CD10、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD49f、CD56、CD74、CD133、CD138、巨细胞病毒(CMV)感染细胞的抗原(例如细胞表面抗原)、上皮糖蛋白-2(EGP-2)、上皮糖蛋白-40(EGP-40)、上皮细胞黏附分子(EpCAM)、受体酪氨酸-蛋白质激酶erb-B2,3,4、叶酸结合蛋白(FBP)、胎儿型乙酰胆碱受体(AChR)、叶酸受体-a、神经节苷酯G2(GD2)、神经节苷酯G3(GD3)、人表皮生长因子受体2(HER-2)、人端粒酶逆转录酶(hTERT)、白介素-13受体α-2亚基(IL-13Ra2)、ic-轻链、激酶插入域受体(KDR)、Lewis Y(Ley)、L1细胞黏附分子(L1CAM)、黑素瘤抗原家族A,1(MAGE-A1)、粘蛋白1(MUC1)、间皮素(MSLN)、NKG2D配体、睾丸癌抗原NY-ESO-1、癌胚抗原(h5T4)、前列腺干细胞抗原(PSCA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、肿瘤相关糖蛋白72(TAG-72)、血管内皮生长因子R2(VEGF-R2)、或者维耳姆斯瘤蛋白(WT-1)。

[0195] 由于与肿瘤抗原结合并激活免疫应答细胞的受体(例如TCR、CAR)和编码与另一肿瘤抗原结合并刺激免疫应答细胞的受体(例如CCR)的载体的表面表达,过继转移(adoptively transferred)的人类T细胞或NK细胞被赋予在肿瘤部位增强的选择性的溶细胞活性。进而,在其定位于肿瘤或病毒感染及其增殖之后,表达共刺激配体的T细胞将肿瘤或病毒感染部位转变成对参与生理性抗肿瘤或抗病毒反应的广泛的免疫细胞(浸润肿瘤的淋巴细胞、NK-、NKT-细胞、树突状细胞和巨噬细胞)高度传导性的环境。

[0196] 在其他实施方式中,本发明提供治疗病原体感染(例如,病毒感染、细菌感染、真菌感染、寄生虫感染、或原生动物感染)的受试者的方法。本发明对于在免疫低下的受试者中增强免疫应答特别有用。对使用本发明方法进行的治疗易感的示例性病毒感染包括,但不限于,巨细胞病毒(CMV)、Epstein Barr病毒(EBV)、人类免疫缺陷病毒(HIV)以及流感病毒感染。

[0197] 因此,本发明提供在受试者中治疗或预防病原体感染的方法,该方法包括施用有效量的如本文所述的免疫应答细胞。

[0198] 试剂盒

[0199] 本发明提供用于治疗或预防瘤形成、病原体感染、免疫障碍或同种异体移植的试剂盒。在一个实施方式中,该试剂盒包括单位剂量型的包含有效量免疫应答细胞的治疗或预防性组合物,免疫应答细胞包含激活性抗原受体和共刺激抗原受体。在具体的实施方式中,细胞进一步包括共刺激配体。在一些实施方式中,试剂盒包括无菌容器,其包含治疗或预防疫苗;该容器可是盒子、安瓿、瓶、小瓶、管、袋、小袋(pouch)、泡罩包装、或本领域已知的其他合适的容器形式。这些容器可用塑料、玻璃、层压纸、金属箔、或其他适用于容纳药物的材料制造。

[0200] 如果需要,免疫应答细胞与将细胞施用于受试者的说明书共同提供,所述受试者具有瘤形成发展、病原体感染、免疫障碍或同种异体 移植或处于这样的风险中。该说明书将通常包括关于使用组合物来治疗或预防瘤形成、病原体感染、免疫障碍或同种异体移植的信息。在 其他实施方式中,说明书包括以下中的至少一种:治疗剂的说明;用 于治疗或预防瘤形成、病原体感染、免疫障碍或同种异体移植或其症 状的用药方案和实施;预防措施;警告;适应症;禁忌症(counter- indications);过剂量信息;副作用;动物药理学;临床研究;和/或参 考。说明书可以直接印在容器上(如果存在),或者作为标签贴在容 器上,或者作为容器内或与容器一起的单独的纸片、小册子、卡片或 硬纸夹被提供。

[0201] 实施例

[0202] 除非另有说明,本发明的实践运用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术,其在本领域 技术人员的范围之内。这些技术在文献中有全面的阐释,如" Molecular Cloning:A Laboratory Manual", second edition (Sambrook, 1989) ; "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984) ; "Animal Cell Culture" (Freshney, 1987) ; "Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1996) ; "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller and Caios, 1987) ; "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 1987) ; "PCR:The Polymerase Chain Reaction", (Mullis, 1994) ; "Current Protocols in Immunology" (Coligan, 1991)。这些技术可用于生 产本发明的多核苷酸和多肽,并因此在进行和实施本发明中可以考虑。用于特定实施方式的特别有用的技术将在以下部分讨论。

[0203] 提出以下实施例以便为本领域普通技术人员提供关于如何进行和 使用本发明的测定、筛选和治疗方法的完整公开和说明,并非意在限 制发明者所视发明的范围。

[0204] 实施例1.共表达嵌合抗原受体(CAR) 和嵌合共刺激受体(CCR) 的T 细胞根除已确立的肿瘤。

[0205] 本发明提供“肿瘤感应T细胞”,其同时结合由肿瘤细胞共表达的 两种抗原。重要的是,已经发现针对表达单独抗原的组织的反应性应 当是极小的,仅在两种抗原都存在而非单独任一个存在时释放出T细胞 活性。本发明至少部分基于发现在结合中提供选择性的 T细胞免疫反应 性,并因此使得该方法临床相关。首先是将T细胞激活分配给一个抗原(例如,CD19或前列腺干细胞抗原PSCA),其可以由T细胞受体(TCR) 或嵌合抗原受体(CAR) 介导。共刺激由“嵌合共刺激受体”(CCR) 独立介导,<sup>12,13</sup>嵌合共刺激受体靶向第二抗原(例如,前列腺特异性膜 抗原PSMA)。该方法得到了针对双抗原阳性(DP) 肿瘤的增加的免 疫反应性,但对单抗原阳性(SP) 肿瘤不发挥增加的免疫响应性。对 于使肿瘤感应T细胞将DP肿瘤与SP肿瘤区分开而言重要的第二原则 是,使T细胞活性降低至其自身不能实现激活、但在肿瘤部位通过CCR 与独立的共表达抗原结合而挽救其功能的水平。由于CAR和CCR识别 细胞表面抗原而不是HLA-肽复合物,以这种方式设计的T细胞直接靶 向肿瘤并且不会因与交 叉呈递靶抗原的细胞的相互作用而受到共刺 激。如本文所证实的,该方法结果造成多发性 荷瘤小鼠中的选择性肿 瘤根除。

[0206] 为证明可使用两种不同的抗原特异性受体在体内提供T细胞激活 和共刺激信号,对CAR与特异于PSMA的CCR<sup>12,15</sup>的组合进行了评价, 其中CAR在识别B细胞标志物CD19时提供 CD3激活信号<sup>14</sup>。由于CD28 与4-1BB<sup>16,17</sup>之间的协同性,包括串联的胞质域在内<sup>18-21</sup>,如所记

载的<sup>2</sup>将4-1BB胞质域加入至PSMA CCR P28<sup>15</sup>(图1A)。用19z1和/或P28BB 受体转导原代人类外周血T细胞,并显示出容易检测的两种受体的表达,转导效率在4570%范围内(图1B)。在所有随后的研究中分析四组T细胞,包括抗CD19 CAR(19z1)、抗PSMA CCR(P28BB)、抗CD19 CAR和抗PSMA CCR二者组合(19z1+P28BB)、以及模拟转导的对照组(模拟)(图1C)。暴露于CD19和/或PSMA时的体外细胞毒性和增殖响应显示,如所预期的,19z1赋予了指向CD19的细胞毒性,并且其在PSMA的存在下未被改变。

[0207] T细胞组的定量比较(对于19z1和19z1+P28BB组而言归一化为经19z1转导的T细胞的分数,在P28BB组中为经P28BB转导的分数)显示,19z1和19z1+P28BB T细胞以50:1的E:T比率特异性地裂解40-47%的CD19<sup>+</sup>靶标,而经P28BB转导的T细胞不能裂解PSMA<sup>+</sup>靶标(图2A)。然而,在不存在外源细胞因子的情况下重复暴露于这些抗原,当在表达两种抗原的人工抗原呈递细胞(AAPC)上共培养时,仅有19z1+P28BB T细胞表现出强健增殖,扩增58倍持续31天。比较之下,19z1或P28BB T细胞仅在开始的14天表现出适中的扩张,如19z1+P28BB T细胞在CD19<sup>+</sup>PSMA<sup>-</sup>APC上表现的那样(图2B)。对19z1+P28BB T细胞中细胞因子产生和抗凋亡分子BclxL诱导的定量评估提供了两种抗原均存在时有更强的T细胞激活的进一步证据,在CD19<sup>+</sup>PSMA<sup>+</sup>APC存在下的评价结果明显要高于单独任一抗原存在时的结果(图4A、4E)。

[0208] 最初,在携带双阳性(CD19+PSMA+)肿瘤细胞的免疫低下的NOD/SCID-yC K0(NSG)小鼠中,测试了这些表达双受体的T细胞体内根除已确立的系统性人类前列腺肿瘤的能力。对NSG小鼠系统性地植入 $2.0 \times 10^6$ 的表达萤火虫荧光素酶的PC3肿瘤细胞(表达CD19和PSMA)(图5),并在19天后单次静脉输注 $1.0 \times 10^6$ 的19z1、19z1+P28BB、P28BB或对照T细胞进行处理。35天后,接受了P28BB T细胞或对照T细胞的小鼠由于肿瘤负荷而被处死。相比之下,用19z1 T细胞处理的小鼠具有显著减少的肿瘤负荷。引人注目地,用19z1+P28BB T细胞处理的小鼠没有可检测到的肿瘤负荷(图2C)。在输注后监测的70天内,在接受19z1 T细胞的小鼠中CD19<sup>+</sup>肿瘤最终复发,而完全的缓解在所有接受19z1+P28BB T细胞的小鼠中得以持续(图2C)。该结果强烈地表明已达到了肿瘤根除。

[0209] 然而,这些发现由于19z1+P28BB T细胞引起的CD19<sup>+</sup>PSMA<sup>-</sup>肿瘤的潜在基线根除而引发担忧。存在这样的可能性,即由于T细胞的再循环,T细胞免疫反应性可能在携带双阳性CD19<sup>+</sup>PSMA<sup>+</sup>肿瘤的受体中非期望地增强。为测试该假设,对小鼠将CD19<sup>+</sup>PSMA<sup>-</sup>肿瘤皮下注射入左肋,CD19<sup>-</sup>PSMA<sup>+</sup>肿瘤注射入右肋,以及CD19<sup>+</sup>PSMA<sup>+</sup>肿瘤注射入其后背。一周后,小鼠被静脉施以19z1、P28BB或19z1+P28BB T细胞中的一种( $1.0 \times 10^6$ 个细胞)。接受P28BB T细胞的小鼠具有所有三种肿瘤的进展并且须在35天内被处死(图2D)。在用19z1 T细胞处理的小鼠中,在最终进展前,CD19<sup>+</sup>PSMA<sup>-</sup>和CD19<sup>+</sup>PSMA<sup>+</sup>肿瘤相对于其在P28BB T细胞受者中的进展大量减少。与先前结果一致,用19z1+P28BB T细胞处理的小鼠显示出CD19<sup>+</sup>PSMA<sup>+</sup>肿瘤的完全根除。然而,如所假设的,对CD19<sup>+</sup>PSMA<sup>-</sup>肿瘤的排斥也大大增加且高于在19z1 T细胞受体中观察到的(图2D,下部板块)。因此,靶向两个抗原的分割信号方案(split signal approach)未能局限T细胞反应性和保护单抗原肿瘤。

[0210] 为解决单抗原反应性的问题,提出需将T细胞激活最小化,几乎达到消尽点,只有在表达双抗原的部位通过适当CCR参与才能被挽救。因此,寻找具有降低的活性的CAR。对于这些实验,使用靶向PSCA和PSMA的临床相关的抗原组合。对三种PSCA特异性scFv进行评

价,其具有不同的PSCA结合亲和力(图3A)。尽管Hz1 scFv有效地使肿瘤细胞溶解至皮克范围,Lz1 scFv需要1,000-10,000倍更多的抗体来达到相近效力的特异性溶解。这些scFv被用于衍生在细胞毒性测试中具有不同活性的三种基于CD3的CAR(图3B)。两种CAR——Hz1和Mz1产生适中的针对PSCA<sup>+</sup>靶标的溶解活性(在50:1的E:T比例下20%特异性溶解)。相比之下,第三种CAR——Lz1,仅达到10%,其被定性为无效的抗原受体。这种分层(hierarchy)在细胞因子释放测定中得到进一步证实,其显示,相较于具有单独任一受体的细胞,19z1+P28BB T细胞(图4A)和Hz1+P28BB T细胞(图4B)引发增强的细胞因子分泌。该增强在Mz1+P28BB T细胞(图4C)中较少且在Lz1+P28BB T细胞中进一步减少(图4D)。

[0211] 为评价PSCA<sup>+</sup>PSMA<sup>-</sup>反应性T细胞的疗效和靶向特性(targeting profile),在携带PSCA<sup>+</sup>PSMA<sup>-</sup>和/或PSCA<sup>+</sup>PSMA<sup>+</sup>肿瘤的动物中测试这些T细胞的抗肿瘤活性。首先,为测试Mz1+P28BB和Lz1+P28BB T细胞选择性地根除PSCA<sup>+</sup>PSMA<sup>+</sup>细胞的能力,用 $2 \times 10^6$ 的表达FFLuc的PSMA阳性、PSCA阳性或双阳性的PC3细胞静脉接种小鼠(图5)。14天后,一组小鼠接受 $1 \times 10^6$ 的Mz1+P28BB CAR+ T细胞的静脉注射,且另一组接受 $1 \times 10^6$ 的Lz1+P28BB CARP T细胞。用更有效的Mz1+P28BB T细胞处理的携带PSCA+PSMA肿瘤的小鼠比用Lz1+P28BB T细胞处理的小鼠显示出更大的肿瘤消退(图3C)。与CD19实验类似(图2C),这些肿瘤最终复发并进展。然而,在携带PSCA<sup>+</sup>PSMA<sup>+</sup>肿瘤细胞的小鼠中,Mz1+P28BB T细胞引起了强健且长期的肿瘤根除。与Lz1+P28BB T细胞的较低效力相一致,在用Lz1+P28BB T细胞处理的携带PSCA<sup>+</sup>PSMA<sup>+</sup>肿瘤的小鼠中,肿瘤根除较慢但同等成功,结果引起强烈的肿瘤根除和所有处理小鼠的长期存活(图3C)。在携带PSCAVSMA<sup>-</sup>或在携带PSCA<sup>-</sup>PSMA<sup>+</sup>肿瘤的对照小鼠中肿瘤根除均未增强(图3C)。在同样携带PSCA<sup>+</sup>PSMA<sup>+</sup>和PSCAPSMA<sup>+</sup>肿瘤的动物的情景中,进行针对PSCAVSMA<sup>-</sup>肿瘤背景活性的更严谨评价的测试。Lz1+P28BB T细胞介导PSCA+PSMA+肿瘤的根除而没有增加PSCA+PSMA肿瘤的根除(图3E),这不同于Lz1 T细胞引发的结果。

[0212] 因此,这些结果表明了将T细胞激活降低至避免对于表达一种靶抗原的组织的免疫反应性并在共表达两种抗原的肿瘤部位挽救T细胞激活的程度的可行性,而不产生激发对于单抗原表达组织的反应性的风险。这样做,结果显示概念性验证(proof-of-principle)地实现了决定特异性和安全性的双重互补结局:1)在不存在独特的靶抗原的情况下通过组合抗原识别产生靶向特异性的能力;以及2)通过滴定式激活(titrating activation)和共刺激信号来保护仅表达一种抗原的细胞,从而在实践中将活性局限在靶抗原共表达的部位。

[0213] 靶向T细胞疗法具有提供治愈性治疗的潜力,但其实用性由于缺乏有效的肿瘤特异性靶标而受限。肿瘤外的表达实际上导致了“靶标-开启,肿瘤-失效”的效果,因此2-4有时可以是可耐受的但最终是致死的<sup>11</sup>。本文所述的方法经由组合抗原识别给出滴定式激活和共刺激信号而提供改善的靶向(图6A-6C)。

[0214] 在生理学抗原呈递中,<sup>22</sup>T细胞通过在淋巴结接收激活和共刺激信号而致敏并迁移至外周部位,在此T细胞的效应功能不依赖于共刺激。类似的,经抗原受体和CCR接合的T细胞可以再循环至其他外周部位,并表现出针对仅表达一种靶抗原的组织的提高的细胞溶解活性(图6A)。因此,为留下抗原单阳性的细胞包括非肿瘤细胞,开发了现在的策略以解决该潜在的全身性作用的问题(图6B)。在一个三-肿瘤小鼠模型中(PSCA<sup>+</sup>、PSMA<sup>+</sup>和PSCA<sup>+</sup>PSMA<sup>+</sup>),达到了PSCA<sup>+</sup>PSMA<sup>+</sup>的根除,同时留下PSCA<sup>+</sup>PSMA<sup>-</sup>和PSCA<sup>-</sup>PSMA<sup>+</sup>肿瘤(图3E)。

[0215] 如本研究所示,这种DP肿瘤选择性能够通过降低CAR的有效性而 达到,其产生了细胞毒性较低(图3B)并具有降低水平的细胞因子分 泌的细胞(图4A-4D)。尽管对19z1和Hz1 CAR来说TH1和TH2细胞因 子的水平均相对较高,但使用较低有效性的CAR Mz1和Lz1使得这些水 平降低。相对于Lz1 T细胞而言Lz1+P28BB T细胞中细胞因子水平的增 强被最小化,除了IL-2和IL-3。尽管IL-2诱导增殖且能促进TH1或者TH2 响应<sup>23</sup>,IL-13与特异于4-1BB/CD137信号转导的TH2响应相关联。<sup>24,25</sup>

[0216] PSCA和PSMA对于治疗转移性前列腺癌是有前途的靶标<sup>26,27</sup>,尽管 其都不是绝对前列腺特异性的。在人类受试者中,PSCA表达被发现于 前列腺癌以及在肾盂、输尿管、膀胱和尿道中<sup>28</sup>。PSMA的表达与原发 性前列腺癌、转移强烈关联以及在星形细胞II型、肾近球小管和肠刷状 缘中强烈关联<sup>29</sup>。因此期望双PSCA/PSMA靶向会增加前列腺靶向性和 降低针对这些正常组织的反应性。可以理解,该原理能够扩展至其他 表达一对抗原的肿瘤类型,特别是那些赋予真正肿瘤特异性的那些抗 原。例如,HER2、MUC1、CD44、CD49f、和/或EpCAM可以以这样 的方式用于治疗乳腺癌<sup>30,31</sup>。同样地,间皮素、叶酸受体-a、CD44和/或 CD133可以被 用于治疗卵巢癌<sup>32,33</sup>。使用这种方法,对于尚未清楚鉴定 出其中的独特靶抗原/结构的肿瘤起始细胞或癌症干细胞的靶向将特别 有吸引力。

[0217] 该方法的一个重要方面是约束和几乎废止响应于单抗原的T细胞 激活。发现仅提供较弱的激活信号的具有低亲和力或亲合力的CAR对 于达到该效果是有用的。此外,具有低亲和力或亲合力的内源TCR可 与CCR结合使用以提供抗原特异性共刺激。总而言之,该结 果表明了 限制所设计的T细胞的活性的优点,通过肿瘤感应T细胞的组合抗原识 别得以调 和效力与安全性。

[0218]  $\gamma$  逆转录病毒载体构建和病毒制备

[0219]  $\gamma$  逆转录病毒载体SFG-19z1已有广泛描述<sup>14</sup>。通过利用位于scFv的 5'的NcoI位点 和位于scFv的3'的Nod位点进行定向克隆,将骨架构建体 用于交换scFv,以产生SFG-Hz1、 SFG-Mz1和SFG-Lz1。为产生 SFG-P28BB,从SFG-P28BBz1经PCR扩增融合的CD28和CD137域, 并 利用5'的NcoI位点和3'的BamHI位点将其连接到PSMA scFv的3',以在 BB域的3'包含终 止密码子,而CD3域被去除<sup>21</sup>。通过使用先前记载的内 部核糖体进入位点,实现要与dsRED共 表达的CAR以及与hrGFP共表达 的CCR的双顺反子基因表达。如先前记载的,使用载体来瞬 时转染细 胞系以产生稳定的病毒制造系。

[0220] 抗PSCA scFv的产生

[0221] 如先前记载的,使用来自杂交瘤的简并引物,扩增赋予非重叠表 位的PSCA抗原特 异性的重链可变域 (VH) 和轻链可变 (VL) 域,从 而产生三种新的PSCA特异性scFv(命名为 Hz1、Mz1和Lz1)<sup>36</sup>。这些 VH和VL域通过接头被融合在一起,并用于利用5' SphI和3' 位NotI位 点 取代SFG-19z1骨架中的CD19 scFv。

[0222] 原代人类T细胞的分离、逆转录病毒转导和培养

[0223] 使用Ficoll梯度法分离外周血白细胞,并如前所述进行转导。简单 地说,在用2& g/mL的植物凝集素进行的48小时激活后,在接下来的48 小时内,通过离心感染病毒法 (spinoculation) 在纤维连接蛋白 (retronectin) 涂覆的盘上转导细胞两次,持续1小时, 并加入20U/mL 的IL-2。允许载体表达3天后,通过流式细胞术测定转导效率,且大量 未分 选的细胞被用于多种测定或过继转移。

[0224] 产生表达抗原的肿瘤细胞系

[0225] PC3人类前列腺肿瘤细胞系得自ATCC,并通过逆转录病毒转导<sup>16</sup>以产生PC3-GFP/Luc,其随后通过逆转录病毒转导被用于产生10 PC3-CD19、PC3-PSMA、PC3-CD19-PSMA、PC3-PSCA以及 PC3-PSCA-PSMA。

[0226] CTL铬释放杀伤实验

[0227] 表达所需抗原的靶细胞用<sup>51</sup>Cr标记并以降低的效应物:靶比率与T 细胞共培养。4 小时的培养之后,移去上清液并用于测定铬释放出的放 射性。通过扣除未与T细胞共培养的靶细胞的背景放射性,并且除以通 过使用0.2%Triton X-100完全溶解的靶细胞而测定的放射性来计算特 异性细胞溶解。

[0228] 长期T细胞增殖测定

[0229] 以30Gy辐照表达所需抗原的肿瘤细胞,之后以5:1的效应物:靶的 比例与1.0×10<sup>6</sup>的T细胞进行共培养。用Invitrogen细胞计数器每周对T 细胞计数,然后用经辐射的肿瘤细胞进行再刺激。不向这些共培养物 中加入外源细胞因子。

[0230] 产生小鼠中的肿瘤模型

[0231] 将PC3肿瘤细胞输注到得自Jackson实验室的NOD/SCID-IL2Ry小 鼠中或者按照由MSKCC动物保护和利用委员会认可的协议04-10-024 笼内圈养饲养的小鼠中。对于系统性肿瘤实验,将2.0×10<sup>6</sup>的肿瘤输注 到小鼠中,在14天后输注1.0×10<sup>6</sup>的嵌合受体阳性T细胞。对于皮下肿 瘤实验,在每个肿瘤部位注射1.0×10<sup>6</sup>的肿瘤细胞,确立7天后IV输注 1.0 × 10<sup>6</sup>的嵌合阳性T细胞。

[0232] 肿瘤负荷的定量

[0233] 对于系统性肿瘤实验,如前所述,通过使用IVIS 100系统 (Capiler Life Science) 将肿瘤负荷的量与发光相关联,使用生物发光成像(BLI) 来定量测量肿瘤负荷。对于皮下肿瘤,使用卡钳来测量肿瘤尺寸。通 过将每个肿瘤的长、宽和高相乘计算肿瘤体积。

[0234] 双特异性抗体介导的肿瘤裂解

[0235] 在标准4小时铬释放实验中,以多种量分别将包含融合至CD3特异 性scFv的PSCA特异性scFv的双特异性抗体加入至以20:1的比例与 PSCA<sup>+</sup>PC3共培养的未转导T细胞中。

[0236] 流式细胞术

[0237] 如前所述,使用LSRII流式细胞仪对细胞进行分析或用FACSAria 细胞分选器(BD Biosciences) 进行分选<sup>16</sup>。可以直接通过使用AF647 结合的羊抗鼠抗体(Invitrogen) 实现对细胞表面的嵌合受体的检测。抗CD4-PE-Cy7、CD8-Pacific Blue和CD19-APC的抗体得自Invitrogen, PSCA抗体从杂交瘤上清液中纯化,PSMA抗体得自MBL International。

[0238] 细胞因子分析

[0239] 从长期T细胞增殖实验中第二次肿瘤刺激后48小时收集上清液,并 通过使用定制的多路系统HCYTMAG-60K (Millipore) 用于细胞因子 分析,并如前所述使用Luminex 100仪 器(Luminex) 进行分析<sup>21</sup>。

[0240] 蛋白质印迹法分析

[0241] 从长期T细胞增殖实验中第一次肿瘤刺激后24小时收集细胞,用于 Bcl<sub>x</sub>L表达的蛋白质印迹法分析。如前所述<sup>21</sup>使用Bcl<sub>x</sub>L和Akt一抗 (Cell Singaling Technology) 来实施

蛋白质印迹法。

[0242] 从在先的说明书,为适用于多种应用和情况,对本文所述发明作出变形和修改将是显而易见的。这样的实施方式也在所附权利要求的范围内。

[0243] 在任何本文变量的定义中要素列表的解读包括该作为任何单独要素或所列要素的组合(或次组合)的变量定义。本文一个实施方式的解读包括作为任何单独或与任何其他实施方式或其部分结合的实施方式。

[0244] 本申请可与美国专利申请号12/593,751相关,该申请是遵循35 U.S.C. §371的于2010年3月8日提交的国际专利申请号 PCT/US2008/004251的美国国家阶段申请,其要求于2007年3月30日提交的美国临时申请序列号60/921,144的权益,其公开在此整体地并入本文以作参考。

#### [0245] 参考文献

[0246] 1. Robbins, P.F. et al. Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29, 917-924 (2011).

[0247] 2. Kalos, M. et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med* 3, 95ra73 (2011).

[0248] 3. Brentjens, R.J. et al. Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19- targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood* 118, 4817-4828 (2011).

[0249] 4. Kochenderfer, J.N. et al. B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen- receptor- transduced T cells. *Blood* 119, 2709-2720 (2012).

[0250] 5. Sadelain, M., Riviere, I. & Brentjens, R. Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes. *Nat Rev Cancer* 3, 35-45 (2003).

[0251] 6. Ho, W.Y., Blattman, J.N., Dossett, M.L., Yee, C. & Greenberg, P.D. Adoptive immunotherapy: engineering T cell responses as biologic weapons for tumor mass destruction. *Cancer cell* 3, 431-437 (2003).

[0252] 7. Rosenberg, S.A., Restifo, N.P., Yang, J.C., Morgan, R.A. & Dudley, M.E. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nature reviews.Cancer* 8, 299-308 (2008).

[0253] 8. Sadelain, M., Brentjens, R. & Riviere, I. The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors. *Curr Opin Immunol* 21, 215-223 (2009).

[0254] 9. Jorritsma, A., Schotte, R., Coccoris, M., de Witte, M.A. & Schumacher, T.N. Prospects and limitations of T cell receptor gene therapy. *Current gene therapy* 11, 276-287 (2011).

[0255] 10. Johnson, L.A. et al. Gene therapy with human and mouse T, cell

receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood* 114, 535–546 (2009).

[0256] 11. Morgan, R.A. et al. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 18, 843–851 (2010).

[0257] 12. Krause, A. et al. Antigen-dependent CD28 signaling selectively enhances survival and proliferation in genetically modified activated human primary T lymphocytes. *J Exp Med* 188, 619–626 (1998).

[0258] 13. Wilkie, S. et al. Dual Targeting of ErbB2 and MUC1 in Breast Cancer Using Chimeric Antigen Receptors Engineered to Provide Complementary Signaling. *Journal of clinical immunology* (2012).

[0259] 14. Brentjens, R.J. et al. Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. *Nature medicine* 9, 279–286 (2003).

[0260] 15. Maher, J., Brentjens, R.J., Gunset, G., Riviere, I. & Sadelain, M. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta/CD28 receptor. *Nat Bio technol.* 20, 70–75 (2002).

[0261] 16. Stephan, M.T. et al. T cell-encoded CD80 and 4-1BBL induce auto- and transcostimulation, resulting in potent tumor rejection. *Nature medicine* 13, 1440–1449 (2007).

[0262] 17. Watts, T.H. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annual review of immunology* 23, 23–68 (2005).

[0263] 18. Wang, J. et al. Optimizing adoptive polyclonal T cell immunotherapy of lymphomas, using a chimeric T cell receptor possessing CD28 and CD137 costimulatory domains. *Human gene therapy* 18, 712–725 (2007).

[0264] 19. Carpenito, C. et al. Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 3360–3365 (2009).

[0265] 20. Tammana, S. et al. 4-1BB and CD28 signaling plays a synergistic role in redirecting umbilical cord blood T cells against B-cell malignancies. *Hum Gene Th* 21, 75–86 (2010).

[0266] 21. Zhong, X.S., Matsushita, M., Plotkin, J., Riviere, I. & Sadelain, M. Chimeric antigen receptors combining 4-1BB and CD28 signaling domains augment PI3kinase/AKT/Bcl-X L activation and CD8+ T cell-mediated tumor eradication. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 18, 413–420 (2010).

[0267] 22. Schwartz, R.H. T cell anergy. *Annual review of immunology* 21, 305–

33 (2003) .

[0268] 23.Liao,W.,Lin,J.X.&Leonard,W.J.I L-2 family cytokines:new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Current opinion in immunology* 23,598-604(2011) .

[0269] 24.Nam,K.O.,Shin,S.M.&Lee,H.W.Cross-linking of 4-IBB up- regulates IL-13 expression in CD8(+) T lymphocytes. *Cytokine* 33,87-94(2006) .

[0270] 25.Shin,S M.et a 1. 4-IBB triggers IL-13 production from T cells to limit the polarized, Th1-mediated inflammation. *Journal of leukocyte biology* 81,1455-1465(2007) .

[0271] 26.Saeki,N.,Gu,J.,Yoshida,T.&Wu,X.Prostate stem cell antigen:a Jekyll an Hyde molecule? *Clinical cancer research:an official journal of the American Association for Cancer Research* 16,3533-3538(2010) .

[0272] 27.Olson,W.C.,Heston,W.D.&Rajasekaran,A.K.Clinical trials of cancer therapies targeting prostate-specific membrane antigen. *Reviews on recent clinical trials* 2,182-19030(2007) .

[0273] 28.Lam,J.S.et al.Prostate stem cell antigen is overexpressed in prostate cancer metastases. *Clinical cancer research:an official journal of the American Association for Cancer Research* 11,2591-2596(2005) .

[0274] 29.Silver,D.A.,Pellicer,I.,Fair,W.R.,Heston,W.D.&Cordon-Cardo,C. Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues. *Clinic cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 3,81-85 (1997) .

[0275] 30.Liu,J.C.et al.Seventeen-gene signature from enriched Her2/Neu mammary tumor- initiating cells predicts clinical outcome for human HER2+: ERalpha-breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109,58325837(2012) .

[0276] 31.Meyer,M.J.et al.CD44posCD49fhiCD133/2hi defines xenograft-initiating cells in estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer research* 70,4624-4633 (2010) .

[0277] 32.Strauss,R.et al.Analysis of epithelial and mesenchymal markers in ovarian cancer reveals phenotypic heterogeneity and plasticity. *PLoS one* 6,e16186 (2011) .

[0278] 33.Shihle,M.&Davidson,B.Pathogenesis of ovarian cancer:clues from selected overexpressed genes. *Future Oncol* 5,1641-1657(2009) .

[0279] 34.Nguyen,L.V.,Vanner,R.,Dirks,P.&Eaves,C.J.Cancer stem cells:an evolving concept. *Nature reviews.Cancer* 12,133-143(2012) .

[0280] 35.Magee,J.A.,Piskounova,E.&Morrison,S.J.Cancer stem cells:impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer cell* 21,283-296(2012) .

[0281] 36.Orlandi,R.,Gussow,D.H.,Jones,P.T.&Winter,G.Cloning immunoglobulin

variable domains for expression by the polymerase chain reaction. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86,3833-3837 (1989) .

## 序列表

<110> 纪念斯隆-凯特琳癌症中心

M·塞德莱恩

C·C·克洛斯

<120> 用于免疫疗法的组合物和方法

<130> 3314.040AW0

<150> US61/709,072

<151> 2012-10-02

<160> 11

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 164

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu

1 5 10 15

Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys

20 25 30

Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala

35 40 45

Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr

50 55 60

Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg

65 70 75 80

Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met

85 90 95

Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn

100 105 110

Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met

115 120 125

Lys Gly Glu Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly

130 135 140

Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala

145 150 155 160

Leu Pro Pro Arg

<210> 2

<211> 235

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 1 5 10 15  
 His Ala Ala Arg Pro Ser Gln Phe Arg Val Ser Pro Leu Asp Arg Thr  
 20 25 30  
 Trp Asn Leu Gly Glu Thr Val Glu Leu Lys Cys Gln Val Leu Leu Ser  
 35 40 45  
 Asn Pro Thr Ser Gly Cys Ser Trp Leu Phe Gln Pro Arg Gly Ala Ala  
 50 55 60  
 Ala Ser Pro Thr Phe Leu Leu Tyr Leu Ser Gln Asn Lys Pro Lys Ala  
 65 70 75 80  
 Ala Glu Gly Leu Asp Thr Gln Arg Phe Ser Gly Lys Arg Leu Gly Asp  
 85 90 95  
 Thr Phe Val Leu Thr Leu Ser Asp Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr  
 100 105 110  
 Tyr Phe Cys Ser Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe  
 115 120 125  
 Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Pro Ala Pro Arg  
 130 135 140  
 Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg  
 145 150 155 160  
 Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly  
 165 170 175  
 Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr  
 180 185 190  
 Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His  
 195 200 205  
 Arg Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Lys Ser  
 210 215 220  
 Gly Asp Lys Pro Ser Leu Ser Ala Arg Tyr Val  
 225 230 235  
 <210> 3  
 <211> 220  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 3  
 Met Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Leu Phe Pro Ser Ile Gln Val

1	5	10	15												
Thr	Gly	Asn	Lys	Ile	Leu	Val	Lys	Gln	Ser	Pro	Met	Leu	Val	Ala	Tyr
20															
Asp	Asn	Ala	Val	Asn	Leu	Ser	Cys	Lys	Tyr	Ser	Tyr	Asn	Leu	Phe	Ser
35															
Arg	Glu	Phe	Arg	Ala	Ser	Leu	His	Lys	Gly	Leu	Asp	Ser	Ala	Val	Glu
50															
Val	Cys	Val	Val	Tyr	Gly	Asn	Tyr	Ser	Gln	Gln	Leu	Gln	Val	Tyr	Ser
65															
Lys	Thr	Gly	Phe	Asn	Cys	Asp	Gly	Lys	Leu	Gly	Asn	Glu	Ser	Val	Thr
85															
Phe	Tyr	Leu	Gln	Asn	Leu	Tyr	Val	Asn	Gln	Thr	Asp	Ile	Tyr	Phe	Cys
100															
Lys	Ile	Glu	Val	Met	Tyr	Pro	Pro	Pro	Tyr	Leu	Asp	Asn	Glu	Lys	Ser
115															
Asn	Gly	Thr	Ile	Ile	His	Val	Lys	Gly	Lys	His	Leu	Cys	Pro	Ser	Pro
130															
Leu	Phe	Pro	Gly	Pro	Ser	Lys	Pro	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly
145															
Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile
165															
Phe	Trp	Val	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met
180															
Asn	Met	Thr	Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro
195															
Tyr	Ala	Pro	Pro	Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser				
210															
<210>	4														
<211>	255														
<212>	PRT														
<213>	智人														
<400>	4														
Met	Gly	Asn	Ser	Cys	Tyr	Asn	Ile	Val	Ala	Thr	Leu	Leu	Val	Leu	
1		5													15
Asn	Phe	Glu	Arg	Thr	Arg	Ser	Leu	Gln	Asp	Pro	Cys	Ser	Asn	Cys	Pro
20															30
Ala	Gly	Thr	Phe	Cys	Asp	Asn	Asn	Arg	Asn	Gln	Ile	Cys	Ser	Pro	Cys
35															45
Pro	Pro	Asn	Ser	Phe	Ser	Ser	Ala	Gly	Gly	Gln	Arg	Thr	Cys	Asp	Ile

50	55	60	
Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser			
65	70	75	80
Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly			
85	90	95	
Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu			
100	105	110	
Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln			
115	120	125	
Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys			
130	135	140	
Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro			
145	150	155	160
Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala			
165	170	175	
Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu			
180	185	190	
Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu			
195	200	205	
Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe			
210	215	220	
Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly			
225	230	235	240
Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu			
245	250	255	
<210> 5			
<211> 288			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 5			
Met Gly His Thr Arg Arg Gln Gly Thr Ser Pro Ser Lys Cys Pro Tyr			
1	5	10	15
Leu Asn Phe Phe Gln Leu Leu Val Leu Ala Gly Leu Ser His Phe Cys			
20	25	30	
Ser Gly Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu			
35	40	45	
Ser Cys Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile			
50	55	60	
Tyr Trp Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp			

65	70	75	80
Met Asn Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr			
85	90	95	
Asn Asn Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly			
100	105	110	
Thr Tyr Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg			
115	120	125	
Glu His Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr			
130	135	140	
Pro Ser Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile			
145	150	155	160
Ile Cys Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu			
165	170	175	
Glu Asn Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp			
180	185	190	
Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met			
195	200	205	
Thr Thr Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg			
210	215	220	
Val Asn Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro			
225	230	235	240
Asp Asn Leu Leu Pro Ser Trp Ala Ile Thr Leu Ile Ser Val Asn Gly			
245	250	255	
Ile Phe Val Ile Cys Cys Leu Thr Tyr Cys Phe Ala Pro Arg Cys Arg			
260	265	270	
Glu Arg Arg Arg Asn Glu Arg Leu Arg Arg Glu Ser Val Arg Pro Val			
275	280	285	
<210> 6			
<211> 182			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 6			
Met Glu Arg Val Gln Pro Leu Glu Glu Asn Val Gly Asn Ala Ala Arg			
1	5	10	15
Pro Arg Phe Glu Arg Asn Lys Leu Leu Leu Val Ala Ser Val Ile Gly			
20	25	30	
Gly Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Thr Tyr Ile Cys Leu His Phe Ser			
35	40	45	
Ala Leu Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val			

50	55	60
Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln		
65	70	75
Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn		
85	90	95
Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu		
100	105	110
Val Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu		
115	120	125
Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr		
130	135	140
Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Tyr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp		
145	150	155
Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro		
165	170	175
Gly Glu Phe Cys Val Leu		
180		
<210> 7		
<211> 451		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 7		
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu		
1	5	10
His Ala Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro		
20	25	30
Gly Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser		
35	40	45
Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu		
50	55	60
Trp Ile Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly		
65	70	75
Lys Phe Lys Gly Gln Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr		
85	90	95
Ala Tyr Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr		
100	105	110
Glu Cys Ala Arg Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp		
115	120	125
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly		

130	135	140
Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr		
145	150	155
Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val		
165	170	175
Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln		
180	185	190
Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Ser Ala Thr Tyr		
195	200	205
Arg Asn Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr		
210	215	220
Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser Lys Asp Leu Ala Asp		
225	230	235
Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr Ser Gly Gly Gly		
245	250	255
Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Pro Thr Thr Pro Ala		
260	265	270
Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser		
275	280	285
Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr		
290	295	300
Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala		
305	310	315
Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys		
325	330	335
Asn Phe Ile Arg Val Lys Glu Ser Arg Ser Ala Glu Pro Pro Ala Tyr		
340	345	350
Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg		
355	360	365
Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met		
370	375	380
Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu		
385	390	395
Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys		
405	410	415
Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu		
420	425	430
Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu		
435	440	445

Pro Pro Arg  
     450  
 <210> 8  
 <211> 478  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 8  
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 1                  5                  10                  15  
 His Ala Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro  
     20                  25                  30  
 Gly Thr Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr  
     35                  40                  45  
 Glu Tyr Thr Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu  
     50                  55                  60  
 Trp Ile Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln  
 65                  70                  75                  80  
 Lys Phe Glu Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr  
     85                  90                  95  
 Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr  
     100                  105                  110  
 Tyr Cys Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
     115                  120                  125  
 Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
     130                  135                  140  
 Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser  
 145                  150                  155                  160  
 Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Ile Cys Lys Ala Ser Gln Asp  
     165                  170                  175  
 Val Gly Thr Ala Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
     180                  185                  190  
 Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp  
     195                  200                  205  
 Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr  
     210                  215                  220  
 Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn  
 225                  230                  235                  240  
 Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Met Leu Asp Leu Lys Arg  
     245                  250                  255

Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu  
 260 265 270  
 Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro  
 275 280 285  
 Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val  
 290 295 300  
 Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Glu  
 305 310 315 320  
 Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp  
 325 330 335  
 Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr  
 340 345 350  
 Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val  
 355 360 365  
 Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gln Asn  
 370 375 380  
 Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val  
 385 390 395 400  
 Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg  
 405 410 415  
 Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys  
 420 425 430  
 Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg  
 435 440 445  
 Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys  
 450 455 460  
 Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 465 470 475  
 <210> 9  
 <211> 245  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 9  
 Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Glu Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Gln Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp  
 100 105 110  
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
 115 120 125  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser  
 130 135 140  
 Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys  
 145 150 155 160  
 Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys  
 165 170 175  
 Pro Gly Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Ser Ala Thr Tyr Arg Asn  
 180 185 190  
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Glu Thr Gly Ser Gly Thr Asp Phe  
 195 200 205  
 Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser Lys Asp Leu Ala Asp Tyr Phe  
 210 215 220  
 Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr Ser Gly Gly Thr Lys  
 225 230 235 240  
 Leu Glu Ile Lys Arg  
 245  
 <210> 10  
 <211> 257  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 10  
 Met Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Leu His Ala Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys  
 20 25 30  
 Pro Gly Thr Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe  
 35 40 45  
 Thr Glu Tyr Thr Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu  
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn  
 65 70 75 80  
 Gln Lys Phe Glu Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser  
 85 90 95  
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val  
 100 105 110  
 Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 115 120 125  
 Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
 130 135 140  
 Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met  
 145 150 155 160  
 Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Ile Cys Lys Ala Ser Gln  
 165 170 175  
 Asp Val Gly Thr Ala Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 180 185 190  
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro  
 195 200 205  
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
 210 215 220  
 Thr Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr  
 225 230 235 240  
 Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Met Leu Asp Leu Lys  
 245 250 255  
 Arg  
 <210> 11  
 <211> 412  
 <212> PRT  
 <213> 智人  
 <400> 11  
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 1 5 10 15  
 His Ala Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro  
 20 25 30  
 Gly Thr Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr  
 35 40 45  
 Glu Tyr Thr Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu  
 50 55 60  
 Trp Ile Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln

65	70	75	80												
Lys	Phe	Glu	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr
85															95
Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr
100															110
Tyr	Cys	Ala	Ala	Gly	Trp	Asn	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr
115															125
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly		
130															
Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	His	Lys	Phe	Met	Ser
145															160
Thr	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Ser	Ile	Ile	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp
165															175
Val	Gly	Thr	Ala	Val	Asp	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro
180															190
Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	His	Thr	Gly	Val	Pro	Asp
195															205
Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Thr
210															220
Asn	Val	Gln	Ser	Glu	Asp	Leu	Ala	Asp	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn
225															240
Ser	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Met	Leu	Asp	Leu	Lys	Arg
245															255
Ala	Ala	Ala	Ile	Glu	Val	Met	Tyr	Pro	Pro	Pro	Tyr	Leu	Asp	Asn	Glu
260															270
Lys	Ser	Asn	Gly	Thr	Ile	Ile	His	Val	Lys	Gly	Lys	His	Leu	Cys	Pro
275															285
Ser	Pro	Leu	Phe	Pro	Gly	Pro	Ser	Lys	Pro	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val
290															300
Val	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe
305															320
Ile	Ile	Phe	Trp	Val	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu	Leu	His	Ser	Asp
325															335
Tyr	Met	Asn	Met	Thr	Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr
340															350
Gln	Pro	Tyr	Ala	Pro	Pro	Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser	Arg	Phe
355															365
Ser	Val	Val	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln
370															380

Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser  
385 390 395 400  
Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu  
405 410

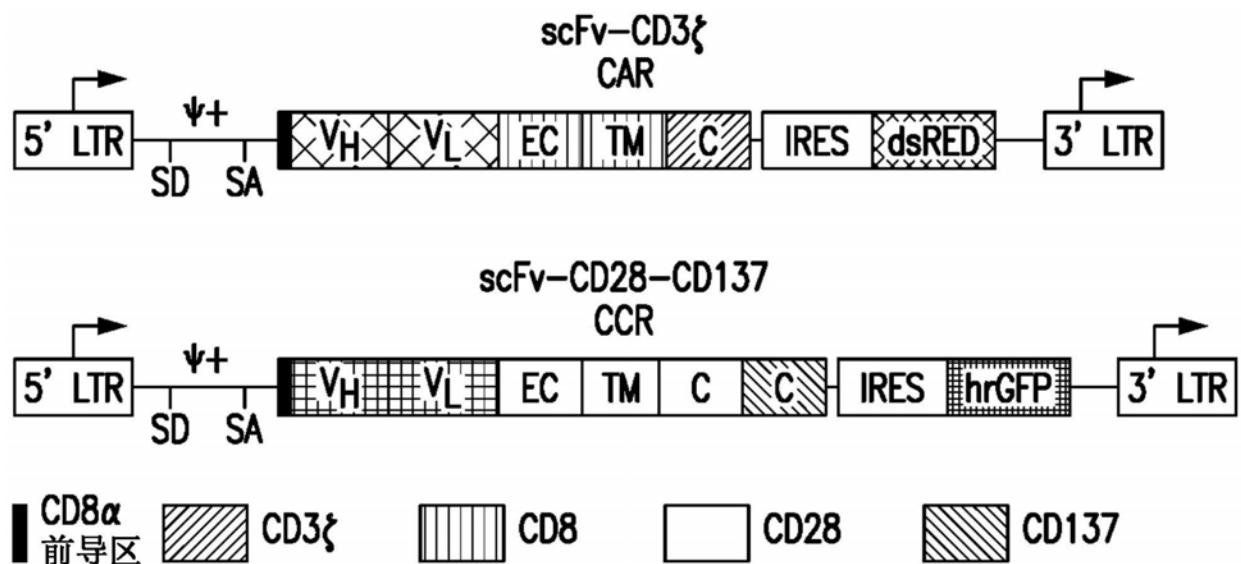


图1A

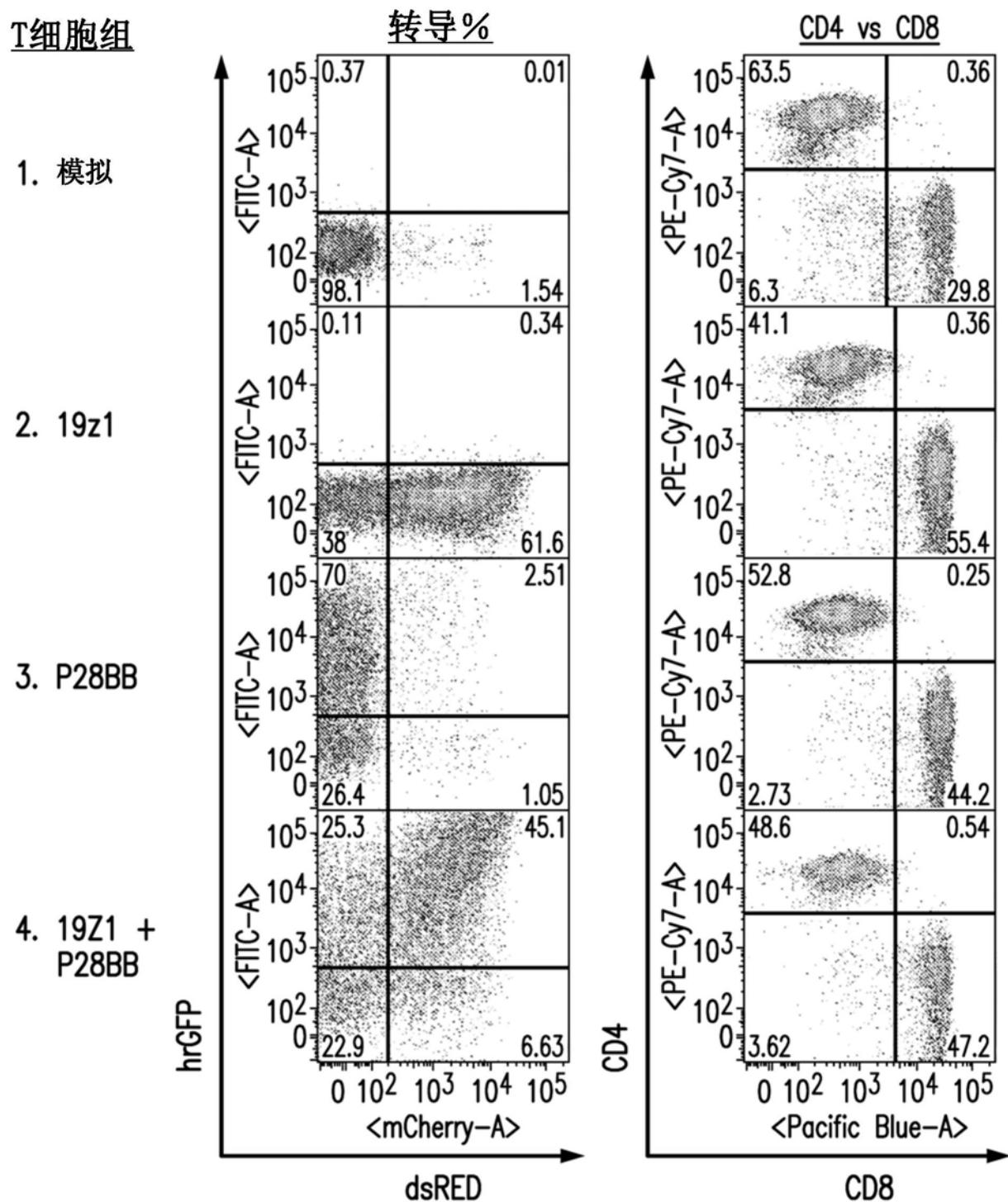


图1B

## 用不同的多种CAR转导CTL

## T细胞组

## SFG逆转录病毒转导

## 1. 模拟

N/A

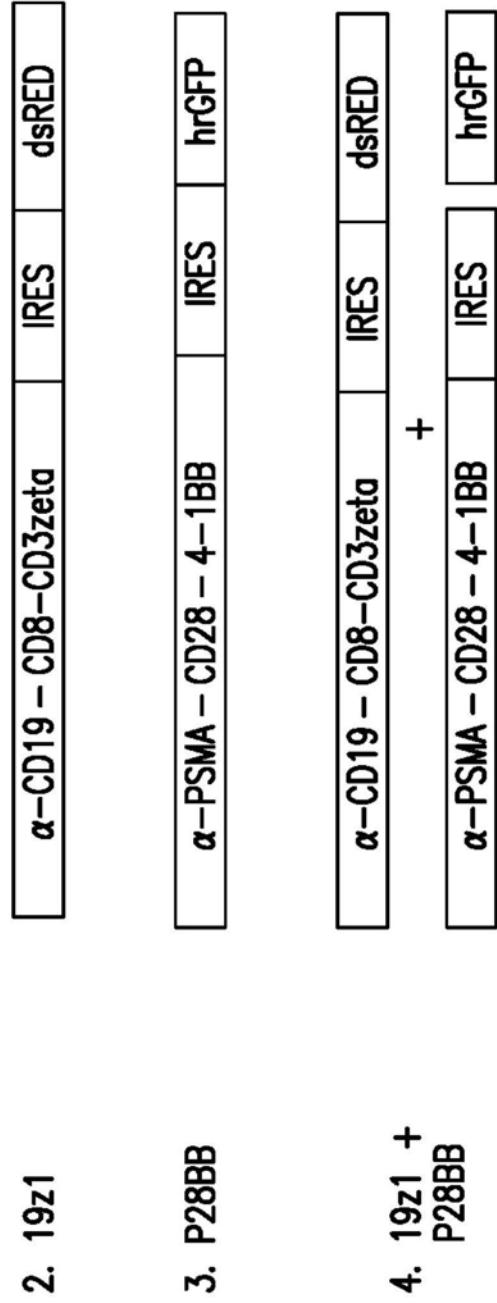


图1C

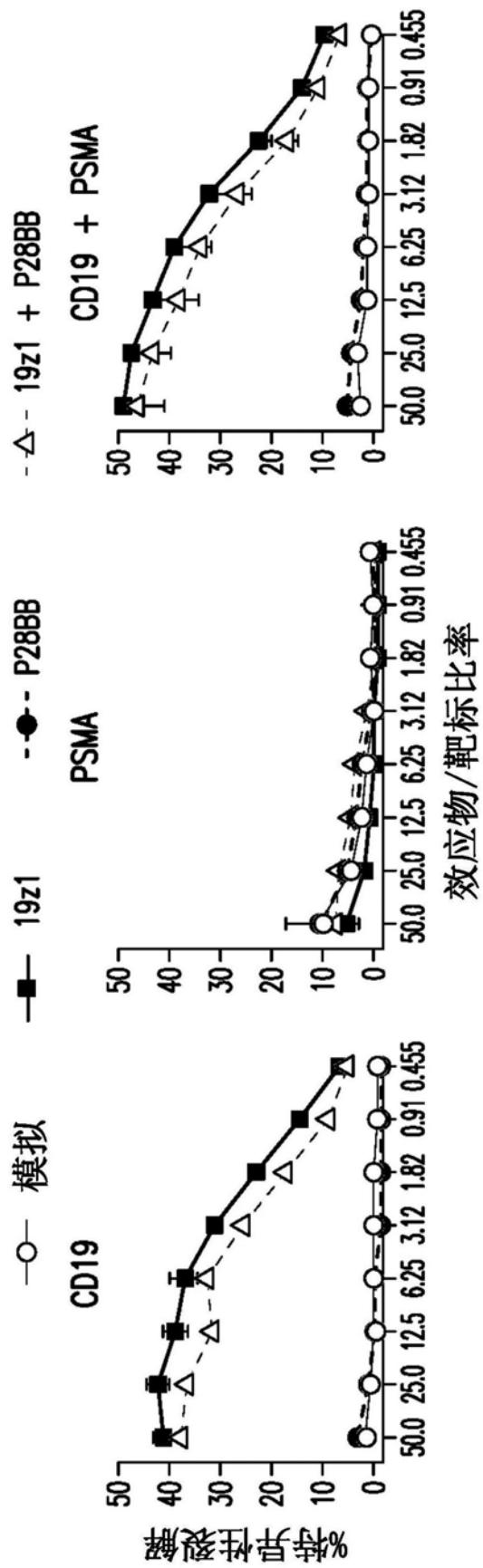


图2A

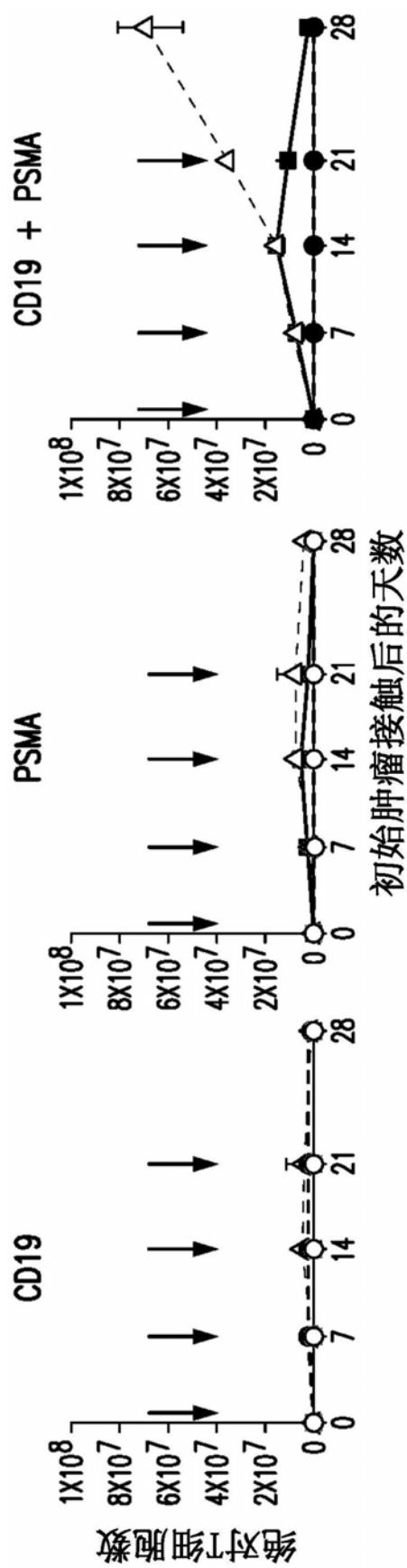


图2B

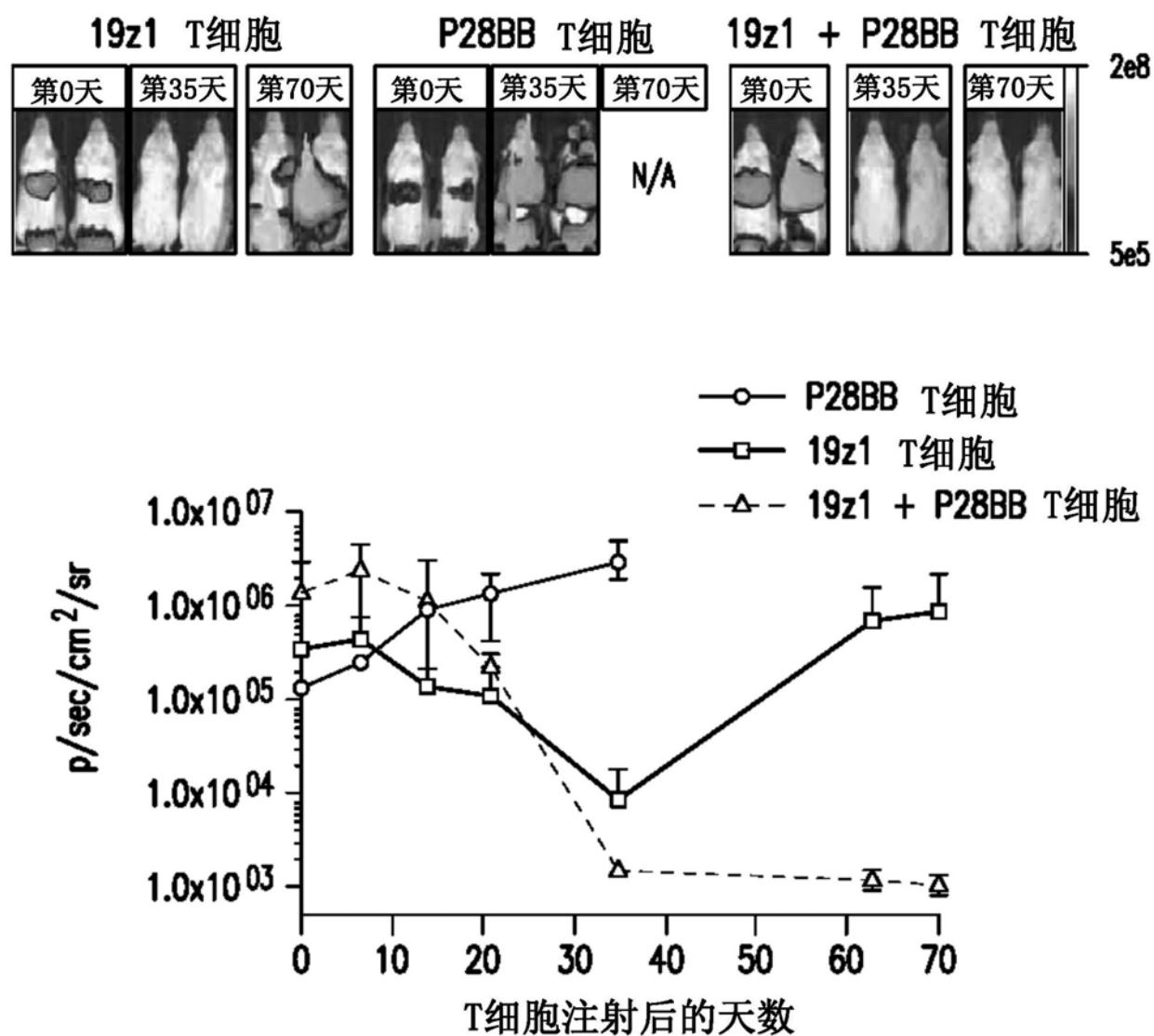


图2C

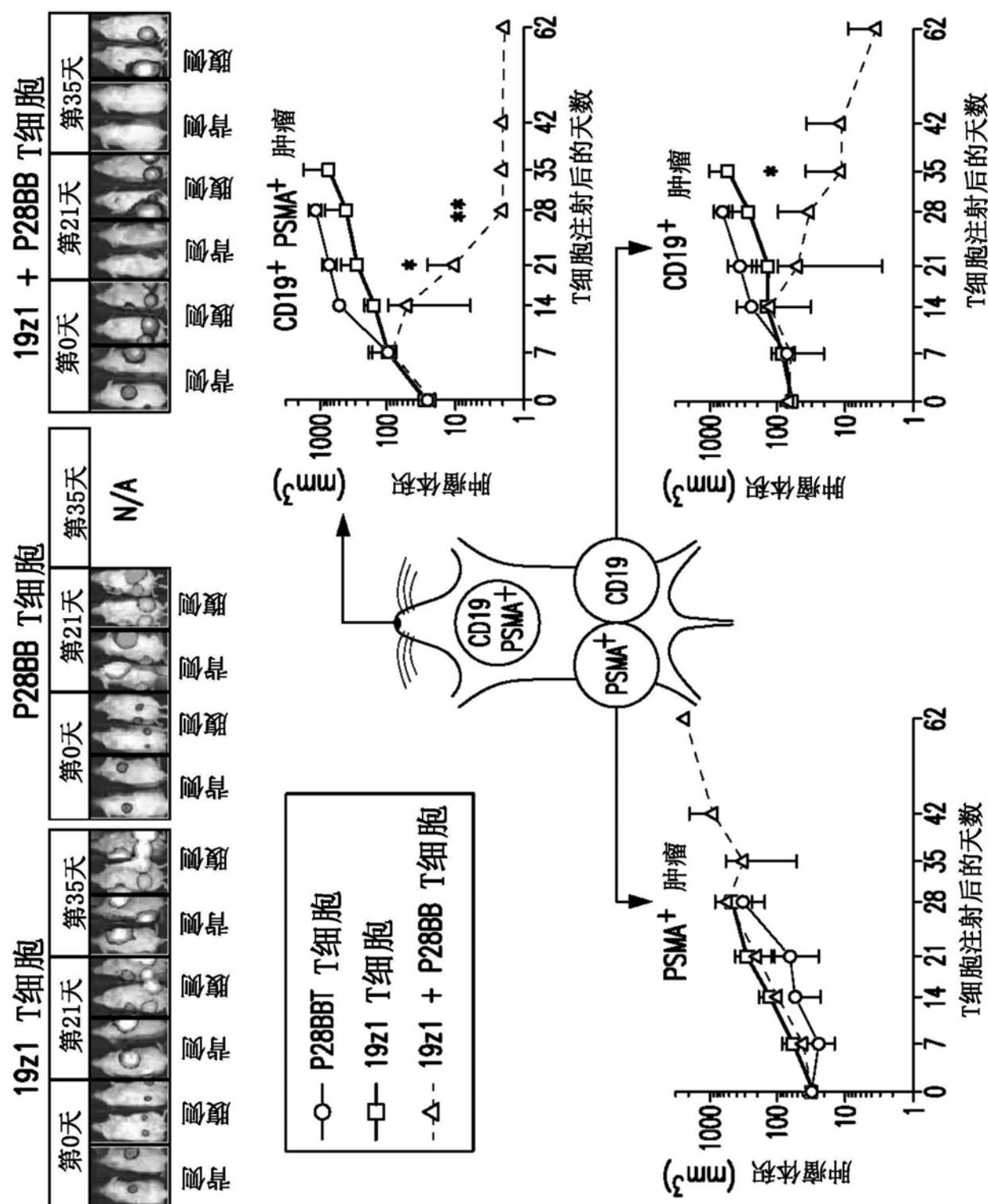


图2D

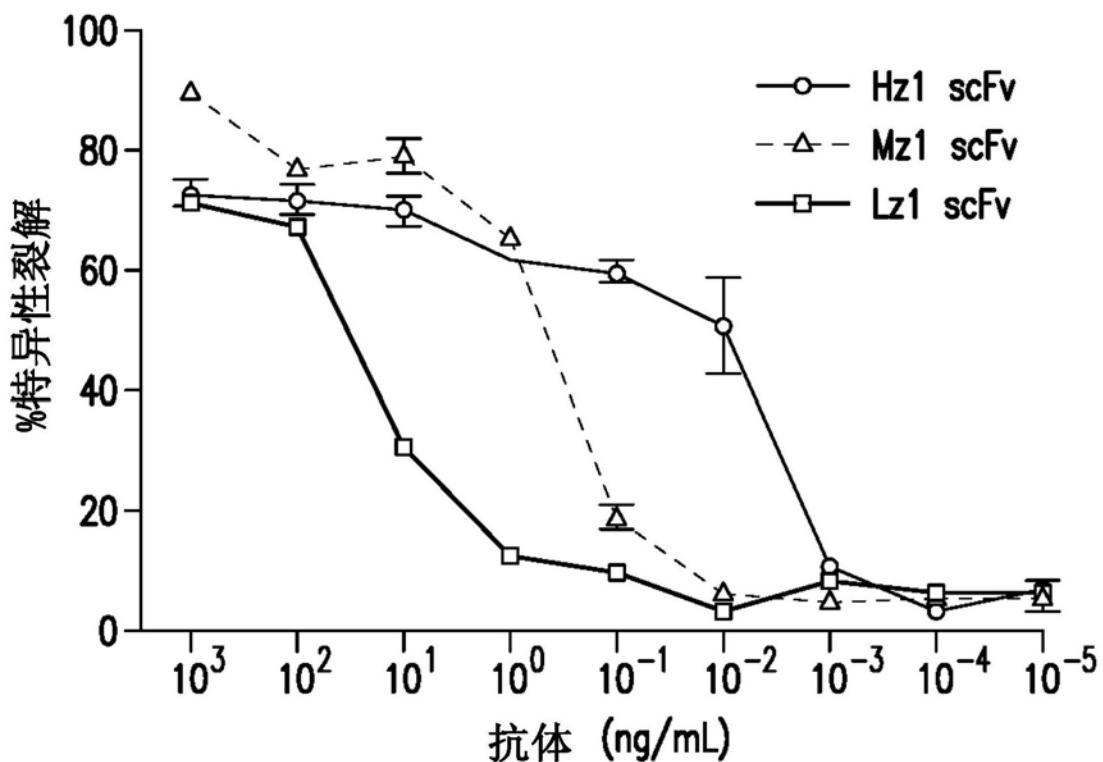


图3A

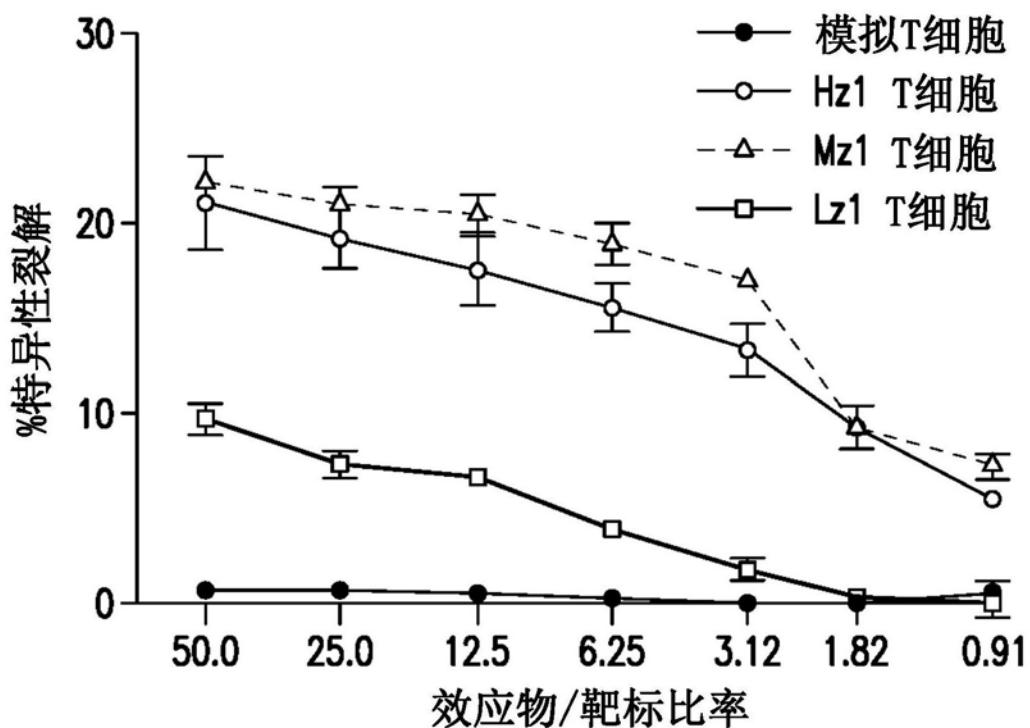


图3B

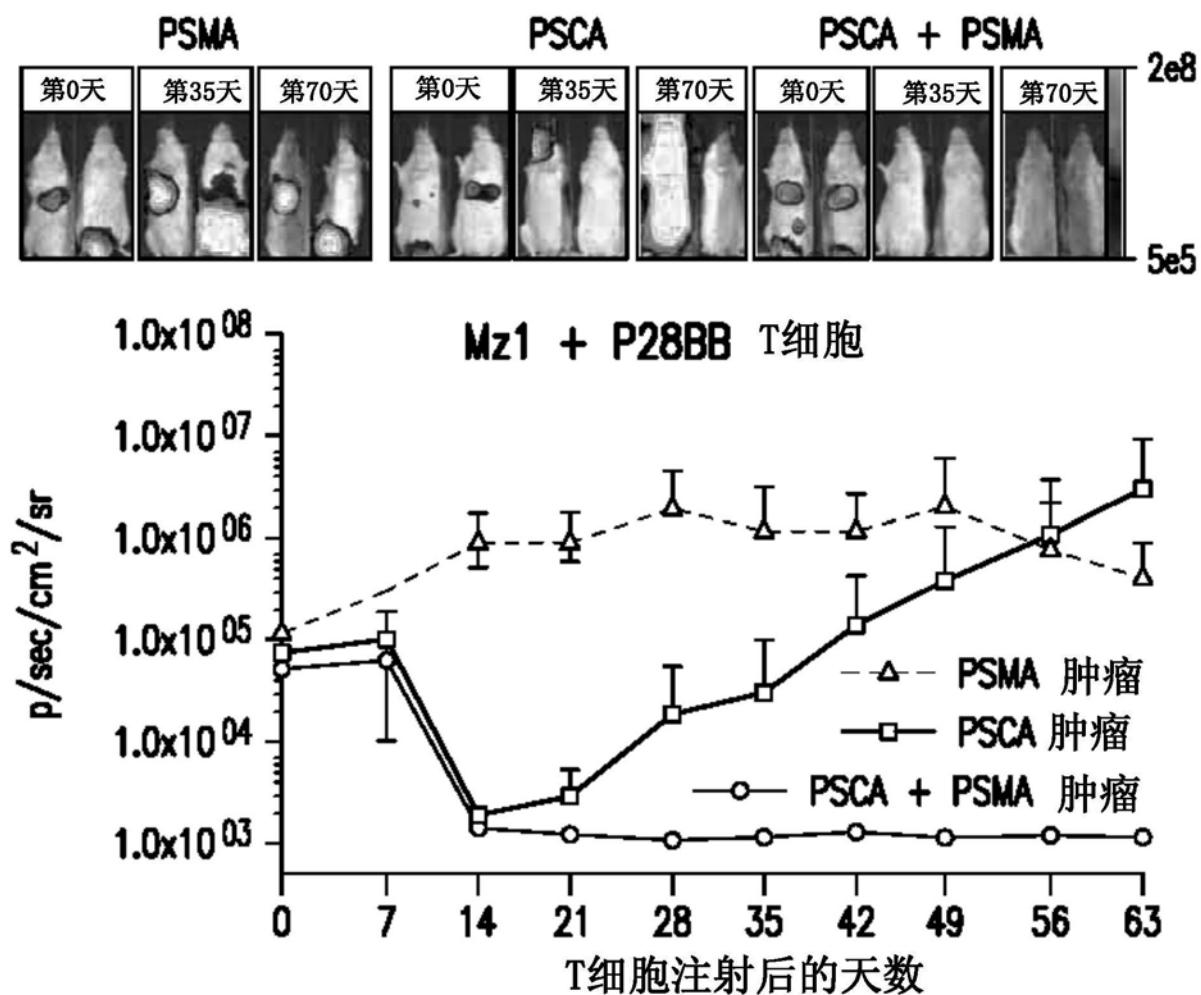


图3C

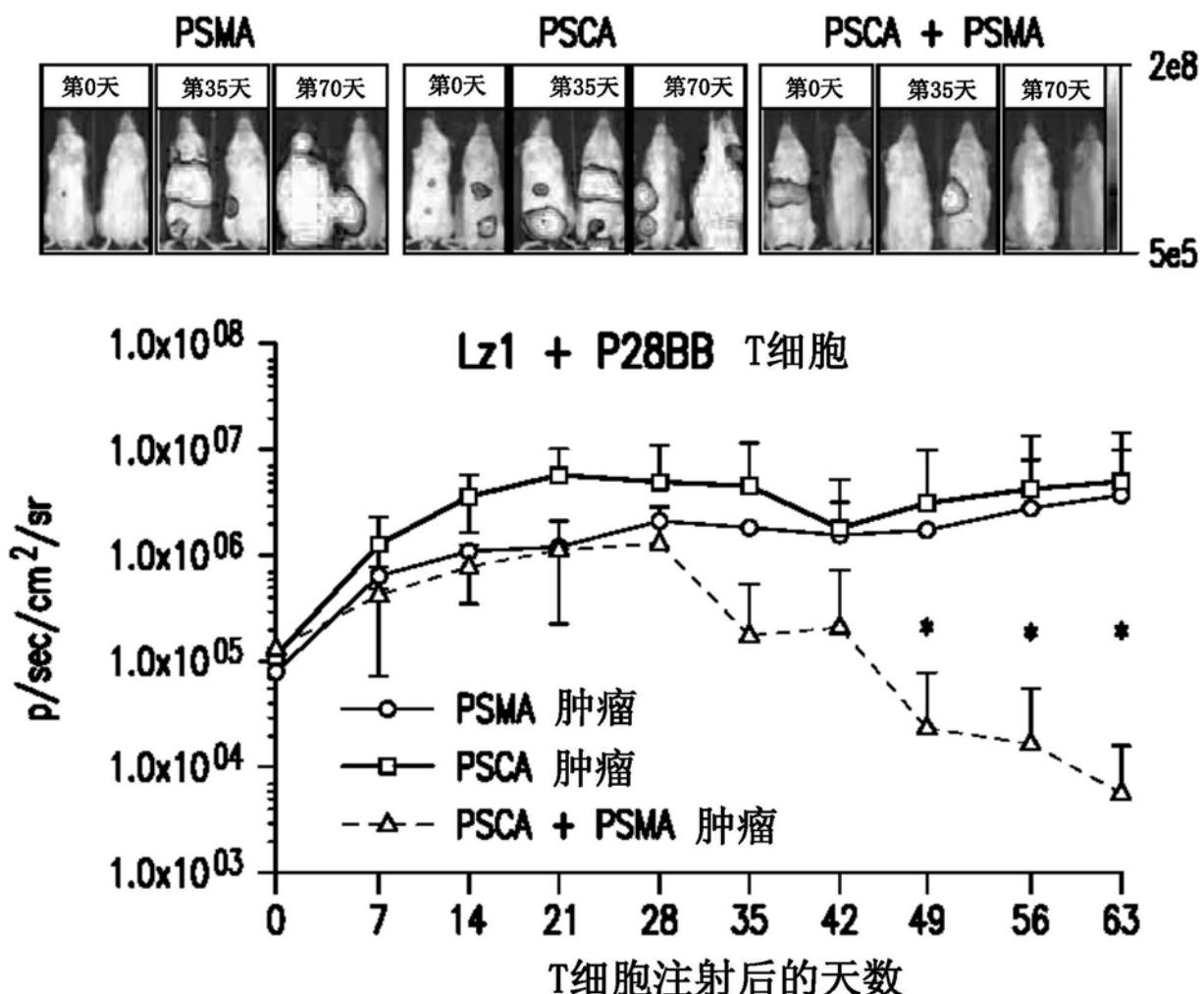


图3D

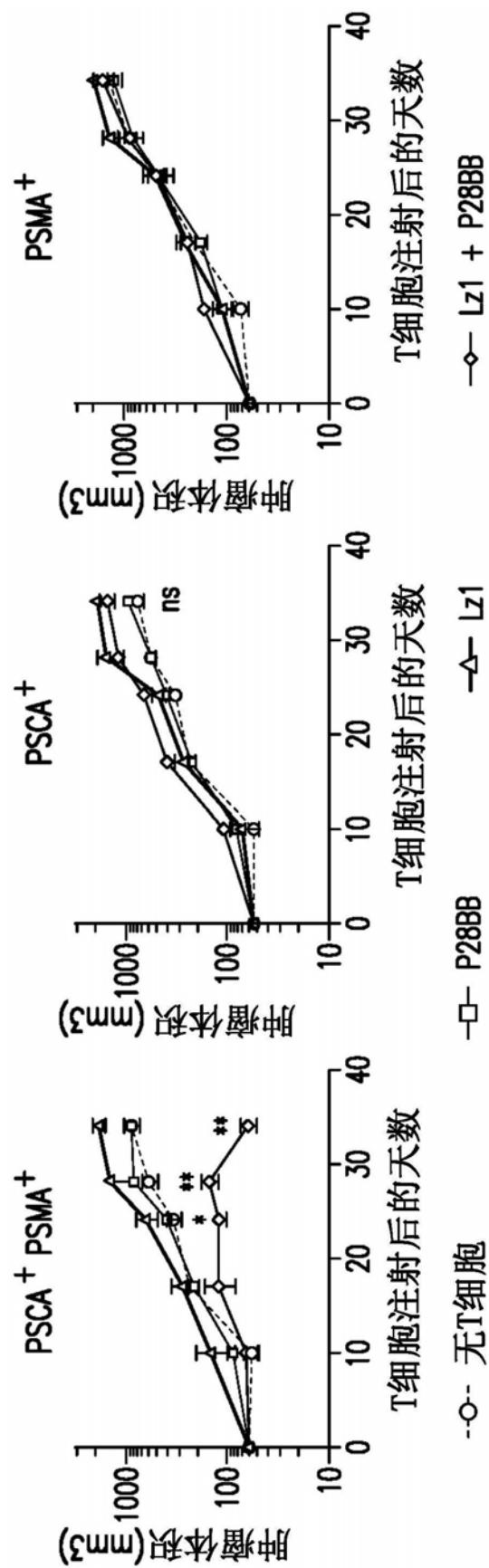


图3E

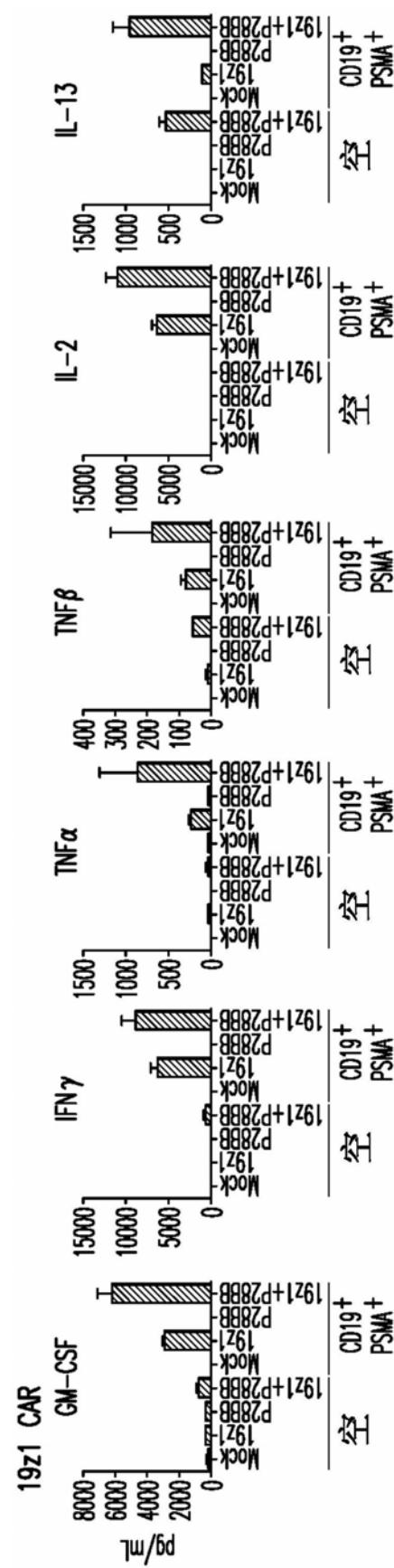


图4A

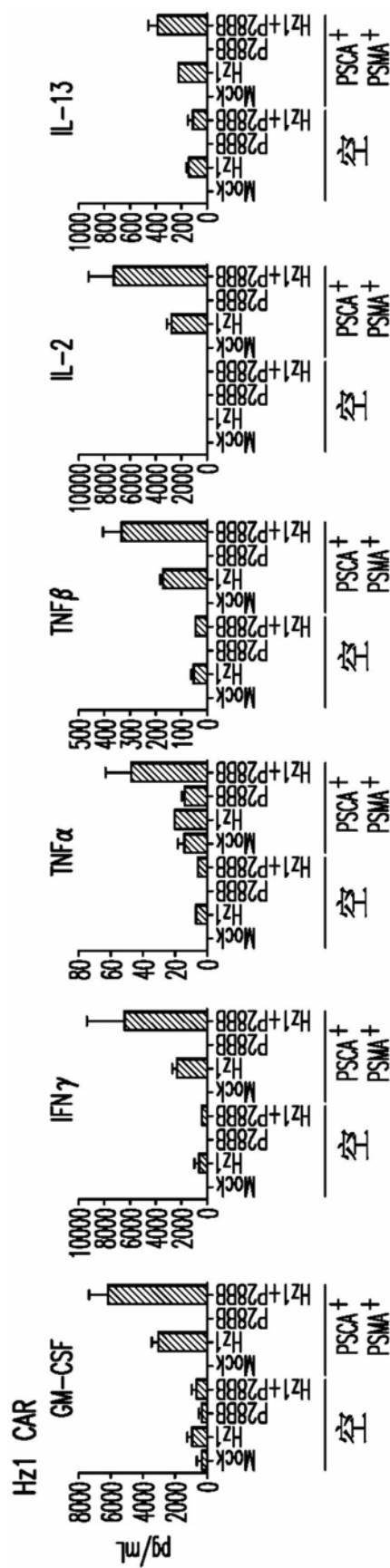


图4B

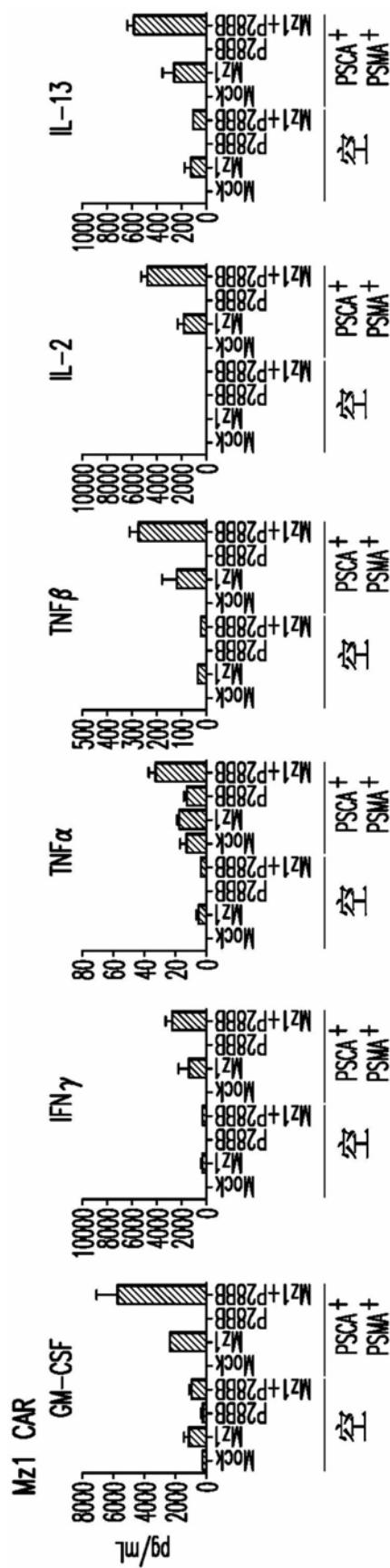


图4C

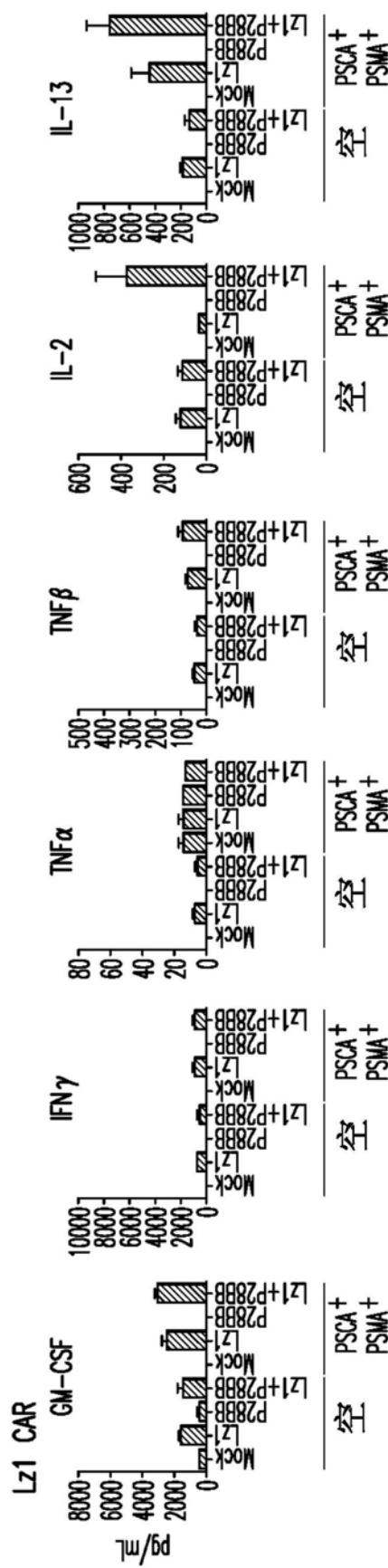


图4D

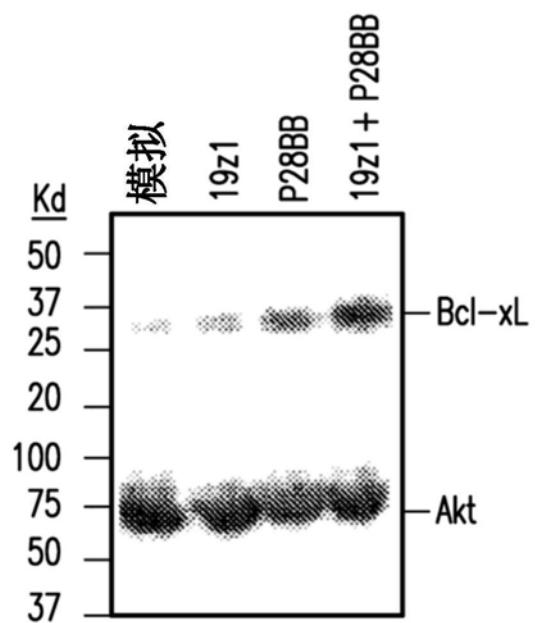


图4E

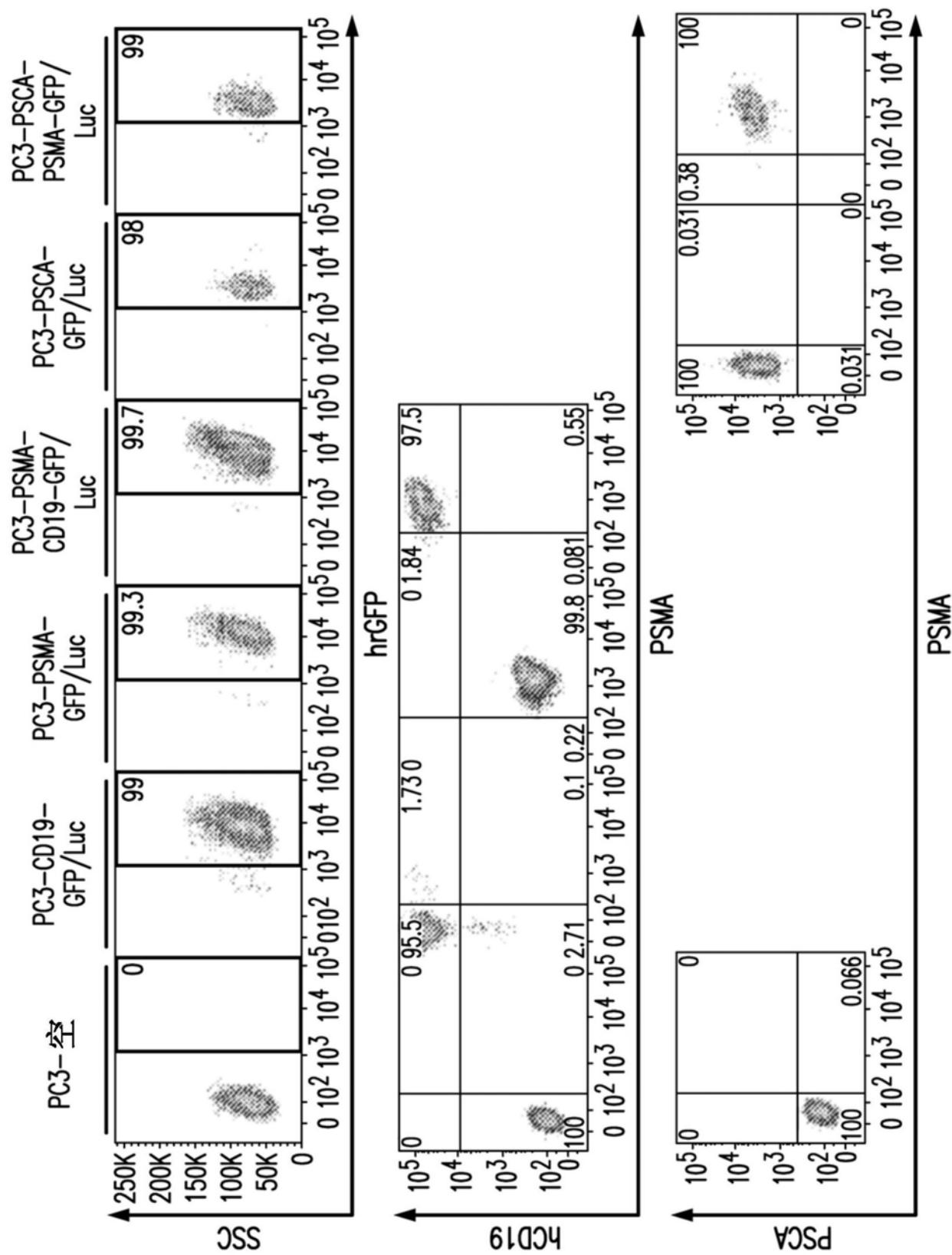


图5

## 分割信号、双-抗原识别策略

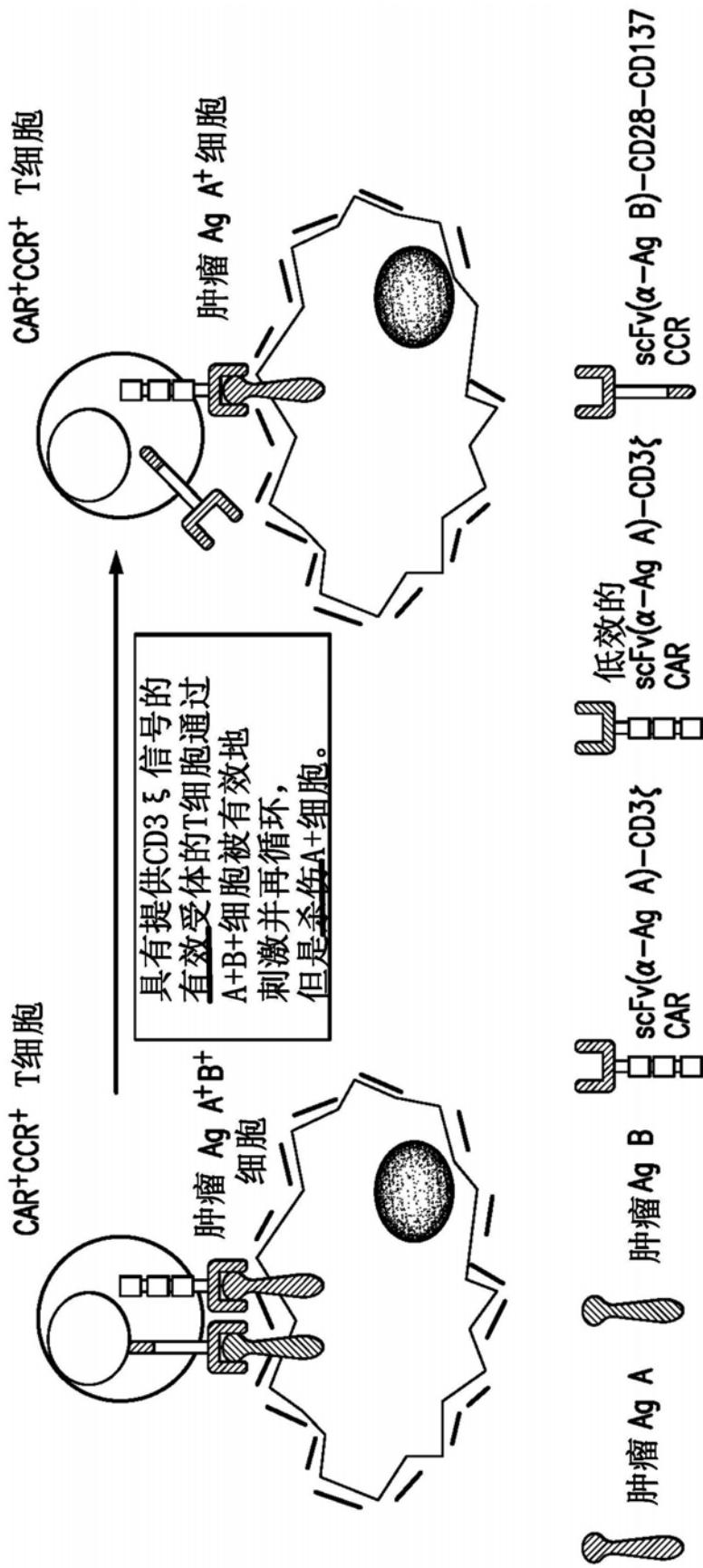


图 6A

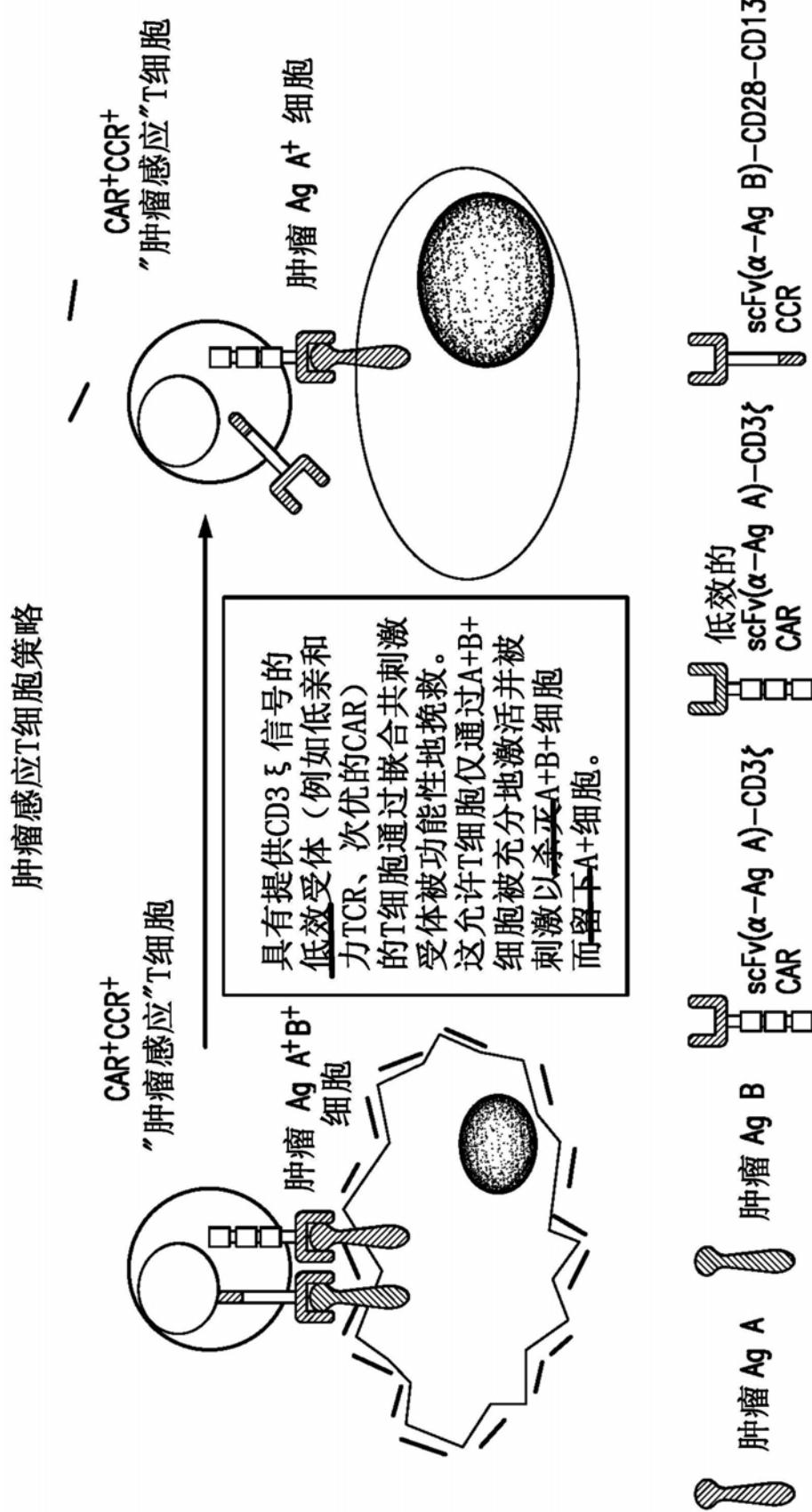


图6B

### 双-CAR刺激和激活

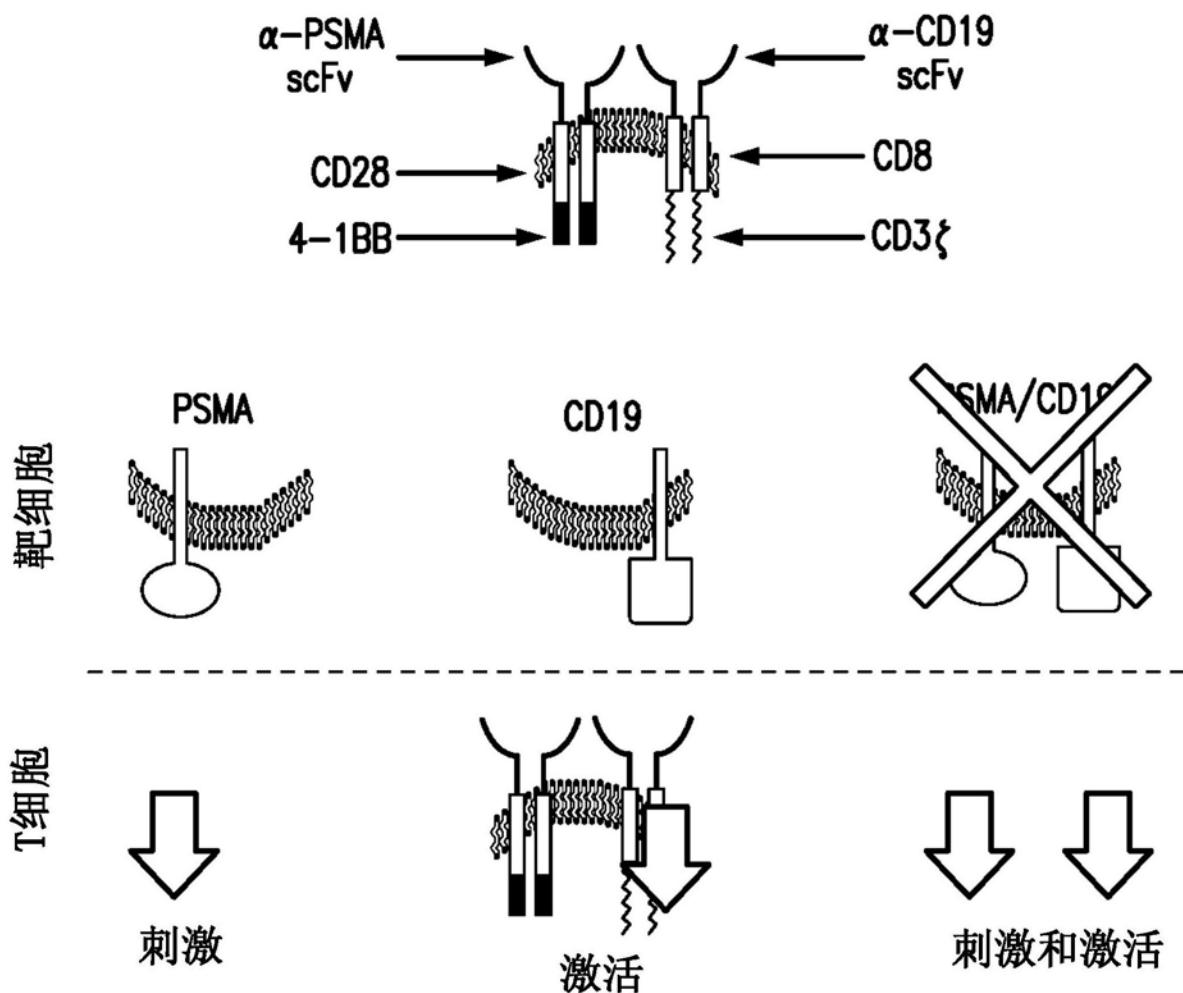


图6C