



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108472346 A

(43)申请公布日 2018.08.31

(21)申请号 201680077930.4

(22)申请日 2016.11.04

(30)优先权数据

62/251,590 2015.11.05 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.07.04

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/060736 2016.11.04

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/079705 EN 2017.05.11

(71)申请人 朱诺治疗学股份有限公司

地址 美国华盛顿州

(72)发明人 L·J·汤普森 V·厄德高

B·萨瑟 A·布拉曼戴姆

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

代理人 陶启长 余颖

(51)Int.Cl.

A61K 39/00(2006.01)

A61K 35/17(2006.01)

C07K 14/00(2006.01)

C07K 14/705(2006.01)

权利要求书6页 说明书69页

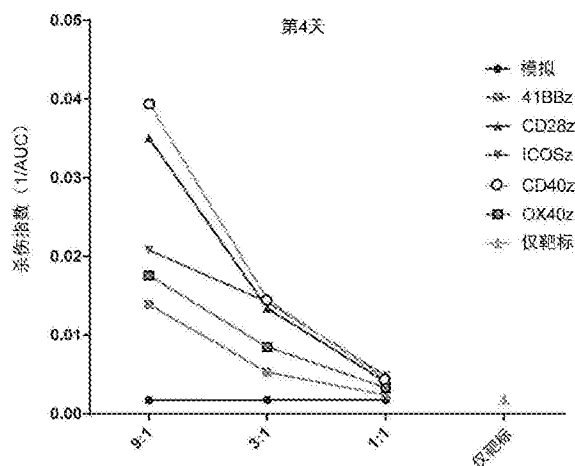
序列表24页 附图17页

(54)发明名称

含有TRAF诱导结构域的嵌合受体及相关组
合物和方法

(57)摘要

提供用于过继治疗的工程改造细胞的嵌合受体,包括T细胞和基因工程细胞。在一些方面,提供了用于工程改造和产生所述细胞的方法和组合物、含有所述细胞的组合物、以及其给予对象的方法。在一些实施方案中,细胞例如T细胞含有特异性结合抗原并且含有能够诱导TRAF6介导的信号传导的细胞内信号传导结构域的基因工程改造的抗原受体,例如嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方式中,方法和细胞的特征提供了增强的或改善的活性、功效和/或持久性。



1. 一种嵌合受体, 包含:
 - (a) 配体结合结构域;
 - (b) 跨膜结构域; 和
 - (c) 细胞内信号传导结构域, 其包含衍生自人CD40的信号传导结构域。
2. 一种嵌合受体, 包含:
 - (a) 配体结合结构域;
 - (b) 衍生自人CD28的跨膜结构域; 和
 - (c) 细胞内信号传导结构域, 其包含衍生自CD40的信号传导结构域。
3. 如权利要求2所述的嵌合受体, 其中所述CD40是人CD40。
4. 如权利要求1-3中任一项所述的嵌合受体, 其中所述衍生自CD40的信号传导结构域包含SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列, 或其功能变体, 所述功能变体包含与SEQ ID NO:12显示至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列相同性的氨基酸序列。
5. 一种嵌合受体, 包含:
 - (a) 配体结合结构域;
 - (b) 跨膜结构域; 和
 - (c) 细胞内信号传导结构域, 其包含SEQ ID NO:12所示氨基酸序列。
6. 如权利要求1或5所述的嵌合受体, 其中所述跨膜结构域包含衍生自分子的跨膜结构域, 所述分子包含TRAF-6诱导型结构域, 或其功能片段或变体。
7. 如权利要求1、5或6所述的嵌合受体, 其中所述跨膜结构域衍生自CD40。
8. 如权利要求1和5中任一项所述的嵌合受体, 其中所述跨膜结构域是或包含衍生自CD4、CD28或CD8的跨膜结构域。
9. 如权利要求8所述的嵌合受体, 其中所述跨膜结构域是或包含衍生自CD28的跨膜结构域。
10. 如权利要求1和5-9中任一项所述的嵌合受体, 其中所述跨膜结构域是人的或衍生自人蛋白质。
11. 如权利要求2-4、9和10中任一项所述的嵌合受体, 其中所述跨膜结构域包含:
 - a) SEQ ID NO:6的氨基酸序列; 或
 - b) 与SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列相同性的氨基酸序列。
12. 如权利要求1-11中任一项所述的嵌合受体, 其中所述细胞内信号传导结构域还包含活化性胞质信号传导结构域。
13. 如权利要求12所述的嵌合受体, 其中活化性胞质信号传导结构域能够在T细胞中诱导初级活化信号, 是T细胞受体 (TCR) 组分和/或包含基于免疫受体酪氨酸的活化基序 (ITAM)。
14. 如权利要求12或13所述的嵌合受体, 其中所述活化性胞质信号传导结构域是或包含CD3- ζ (CD3 ζ) 链的 ζ 链的胞质信号传导结构域或其功能变体或信号传导部分。
15. 如权利要求12-14中任一项所述的嵌合受体, 其中所述细胞内信号传导结构域从其N到C末端依次包含: 衍生自CD40的信号传导结构域和所述活化性胞质信号传导结构域。

16. 如权利要求1-11中任一项所述的嵌合受体,其中所述细胞内信号传导结构域不包含CD3- ζ (CD3 ζ) 链的细胞内信号传导结构域。

17. 如权利要求1-16中任一项所述的嵌合受体,其中所述细胞内信号传导结构域还包含不同于衍生自CD40的信号传导结构域的共刺激信号传导结构域。

18. 如权利要求17所述的嵌合受体,其中所述共刺激信号传导结构域包含T细胞共刺激分子的细胞内信号传导结构域或其非衍生自CD40的信号传导部分。

19. 如权利要求17或18所述的嵌合受体,其中所述共刺激信号传导结构域包含衍生自CD28、4-4BB或ICOS的信号传导结构域或其信号传导部分。

20. 如权利要求1-19中任一项所述的嵌合受体,其中所述配体结合结构域是或包含抗原结合结构域。

21. 如权利要求20所述的嵌合受体,其中所述抗原结合结构域是抗体或抗原结合抗体片段。

22. 如权利要求21所述的嵌合受体,其中抗原结合结构域是抗原结合抗体片段,其为单链片段。

23. 如权利要求21或22所述的嵌合受体,其中所述抗原结合抗体片段包含由柔性免疫球蛋白接头连接的多个抗体可变区。

24. 如权利要求21-23中任一项所述的嵌合受体,其中所述抗原结合结构域是或包含单链可变片段(scFv)。

25. 如权利要求1-24中任一项所述的嵌合受体,其中所述配体结合结构域特异性结合与疾病或病症相关的抗原和/或由所述疾病或病症的细胞或组织表达的抗原。

26. 如权利要求25所述的嵌合受体,其中所述疾病或病症是感染性疾病或病症,自身免疫性疾病或病症,炎性疾病或病症或肿瘤或癌症。

27. 如权利要求16所述的嵌合受体,其中所述癌症是实体瘤。

28. 如权利要求1-27中任一项所述的嵌合受体,其中所述配体结合结构域特异性结合至肿瘤抗原。

29. 如权利要求1-16中任一项所述的嵌合受体,其中所述配体结合结构域特异性结合至选自下组的抗原: ROR1, B细胞成熟抗原 (BCMA), tEGFR, Her2, L1-CAM, CD19, CD20, CD22, 间皮素, CEA, 乙型肝炎表面抗原, 抗叶酸受体, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-4, EPHA2, ErbB2、3或4, erbB二聚体, EGFR vIII, FBP, FCRL5, FCRH5, 胎儿乙酰胆碱e受体, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R- α , IL-13R- α 2, kdr, κ 轻链, Lewis Y, L1-细胞粘附分子 (L1-CAM), 黑素瘤相关抗原 (MAGE) -A1, MAGE-A3, MAGE-A6, 黑素瘤优先表达抗原 (PRAME), 存活素, EGP2, EGP40, TAG72, B7-H6, IL-13受体 α 2 (IL-13Ra2), CA9, GD3, HMW-MAA, CD171, G250/CAIX, HLA-AI MAGE A1, HLA-A2NY-ESO-1, PSCA, 叶酸受体- α , CD44v6, CD44v7/8, avb6整联蛋白, 8H9, NCAM, VEGF受体, 5T4, 胎儿AchR, NKG2D配体, CD44v6, 双重抗原, 和与通用标签关联的抗原, 癌症-睾丸抗原, 间皮素, MUC1, MUC16, PSCA, NKG2D配体, NY-ESO-1, MART-1, gp100, 癌胚抗原, ROR1, TAG72, VEGF-R2, 癌胚抗原 (CEA), 前列腺特异性抗原, PSMA, Her2/neu, 雌激素受体, 孕酮受体, 肝配蛋白B2, CD123, CS-1, c-Met, GD-2, O-乙酰化GD2 (OGD2), CE7, Wilms肿瘤1 (WT-1) 和细胞周期蛋白, 细胞周期蛋白A2, CCL-1, CD138和病原体特异性抗原。

30. 如权利要求1-17中任一项所述的嵌合受体,其中所述配体结合结构域特异性结合

至CD19。

31. 如权利要求1-30中任一项所述的嵌合受体,其中所述嵌合受体还包含连接所述配体结合结构域和所述跨膜结构域的间隔子。

32. 如权利要求31所述的嵌合受体,其中所述间隔子衍生自人IgG。

33. 如权利要求31或32所述的嵌合受体,其中所述间隔子包含氨基酸序列ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:1)。

34. 如权利要求31所述的嵌合受体,其中所述间隔子包含衍生自CD28的细胞外部分,所述CD28任选地是人CD28。

35. 如权利要求34所述的嵌合受体,其中衍生自CD28的胞外部分包含1至50个氨基酸长度,1至40个氨基酸长度,1至30个氨基酸长度,1至20个氨基酸长度或1至10个氨基酸长度。

36. 如权利要求34或35所述的嵌合受体,其中所述间隔子和跨膜结构域一起包含:

a) SEQ ID NO:7的氨基酸序列;或

b) 与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或更多序列相同性的氨基酸序列。

37. 一种核酸分子,其包含编码权利要求1-36中任一项所述的嵌合受体的多核苷酸。

38. 如权利要求37所述的核酸分子,还包含信号序列。

39. 如权利要求37或38所述的核酸分子,其中所述多核苷酸是第一多核苷酸,并且所述核酸分子包含编码不同于所述第一嵌合受体的多肽的第二多核苷酸,其任选地是第二嵌合受体。

40. 如权利要求35所述的核酸分子,其中第一和第二多核苷酸通过内部核糖体进入位点(IRES)或编码自切割肽或引起或促进核糖体跳跃的肽的核苷酸序列分离,所述肽任选为T2A或P2A。

41. 一种载体,其包含权利要求37-40中任一项所述的核酸。

42. 如权利要求41所述的载体,其中所述载体是表达载体。

43. 如权利要求41或42所述的载体,其中所述载体是病毒载体。

44. 如权利要求43所述的载体,其中所述病毒载体是逆转录病毒载体。

45. 如权利要求43或44所述的载体,其中所述病毒载体是慢病毒载体。

46. 如权利要求43或44所述的载体,其中所述病毒载体是 γ 逆转录病毒载体。

47. 一种工程改造的细胞,其包含权利要求37-40中任一项所述的核酸或权利要求41-46中任一项所述的载体或包含或表达权利要求1-38中任一项所述的嵌合受体。

48. 如权利要求47所述的工程改造的细胞,其是T细胞。

49. 如权利要求47或48所述的工程改造的细胞,其是CD8+T细胞。

50. 一种生产工程改造的细胞的方法,所述方法包括将权利要求37-40中任一项所述的核酸分子或权利要求41-46中任一项所述的载体导入细胞中,由此产生工程改造的细胞。

51. 一种通过权利要求50所述方法生产的工程改造的细胞。

52. 一种组合物,其包含权利要求47-49和51中任一项所述的工程改造的细胞。

53. 一种组合物,包含:

权利要求49所述的工程改造的细胞或表达权利要求1-38中任一项所述的嵌合受体的工程改造的CD8+细胞;

工程改造的CD4+细胞,其包含与所述CD8+细胞中表达的嵌合受体不同的不同嵌合受体,其中与所述CD8+细胞中表达的嵌合受体相比,所述不同的嵌合受体包含不同的共刺激信号传导结构域。

54.如权利要求53所述的组合物,其中所述所述第一工程改造的细胞与所述第二工程改造的细胞的比率为或约为1:1、1:2、2:1、1:3或3:1。

55.如权利要求53或54所述的组合物,其中,与CD8+细胞相比,所述CD4+细胞中表达的嵌合受体或所述受体的氨基酸序列和/或编码核酸序列中唯一的区别或基本上唯一的区别是不同的共刺激信号传导结构域。

56.如权利要求53-55中任一项所述的组合物,其中所述不同的共刺激信号传导结构域不包含能够诱导TRAF-6的活化或细胞定位的TRAF-6诱导结构域,和/或不包含能够诱导TRAF-6介导的信号传导的结构域。

57.如权利要求53-56中任一项所述的组合物,其中所述不同的共刺激信号传导结构域是或包含PI-3激酶招募结构域,其能够诱导PI-3激酶的活化或细胞定位和/或能够诱导或促进PI3K/Akt信号传导的诱导。

58.如权利要求53-57中任一项所述的组合物,其中所述不同的共刺激信号传导结构域是或包含CD28、4-1BB或ICOS分子的胞质信号传导结构域,或者是其信号传导部分的功能变体。

59.如权利要求52-58中任一项所述的组合物,其中,当用一种或多种刺激剂体外刺激时,所述组合物中的基因工程改造的细胞与用相同的一种或多种刺激剂刺激时相应的参照细胞组合物相比,表现出增加的增殖或扩张能力。

60.如权利要求52-59中任一项所述的组合物,其中,当在一种或多种刺激剂体外存在下刺激时,所述组合物中的基因工程改造的细胞与用相同的一种或多种刺激剂刺激时相应的参照细胞组合物相比,表现出记忆T细胞或记忆T细胞亚组的数量增加。

61.如权利要求60所述的组合物,其中所述记忆T细胞或记忆T细胞亚组是CD62L+。

62.如权利要求60或61所述的组合物,其中所述记忆T细胞或记忆T细胞亚组是中心记忆T细胞(T_{CM}),长寿命记忆T细胞或T记忆干细胞(T_{SCM})。

63.如权利要求61或62所述的组合物,其中所述记忆T细胞或记忆T细胞亚组还具有表型,所述表型包含:

a) CD127+;和/或

b) CD45RA+、CD45RO-、CCR7+和CD27+中的任何一种或多种,以及t-bet^低、IL-7Ra+、CD95+、IL-2Rβ+、CXCR3+和LFA-1+中的任何一种或多种。

64.如权利要求61-63中任一项所述的组合物,其中所述记忆T细胞或记忆T细胞亚组是CD8+。

65.如权利要求61-64中任一项所述的组合物,其中,相比参照组合物,衍生自给予的基因工程改造的细胞的记忆T细胞或记忆T细胞亚组的数量包括增加的或更高百分比的中心记忆T细胞(T_{CM}),长寿命记忆T细胞或T记忆干细胞(T_{SCM})。

66.如权利要求52-65中任一项所述的组合物,其中当用一种或多种刺激剂体外刺激时,所述组合物中的基因工程改造的细胞与用相同的一种或多种刺激剂刺激时相应的参照细胞组合物相比,表现出持久性和/或存活增加。

67. 如权利要求52-66中任一项所述的组合物,其中当用一种或多种刺激剂体外刺激时,所述组合物中的基因工程改造的细胞与用相同的一种或多种刺激剂刺激时相应的参照细胞组合物相比,产生更多的IL-2。

68. 如权利要求52-67中任一项所述的组合物,其中所述一种或多种刺激剂包含特异结合所述嵌合受体的抗原,抗CD3/抗CD28抗体和/或包含IL-2、IL-15和/或IL-7细胞因子。

69. 如权利要求52-68中任一项所述的组合物,其中在所述刺激开始后的3天,4天,5天,6天,7天,10天或14天内观察到所述增加。

70. 如权利要求52-69中任一项所述的组合物,其中观察到增加并且效应物与靶标比率大于或大于约或约3:1,大于或大于约或约5:1,或大于或大于约或约9:1。

71. 如权利要求52-70中任一项所述的组合物,其中在多轮抗原特异性刺激后的体外测定中,来自所述组合物的T细胞显示或已经观察到显示出持续或升高水平的指示T细胞功能、健康或活性的因子,与包含T细胞群的参照组合物相比、与单次刺激相比、和/或与相同测定中当在单轮刺激和/或小于多轮的刺激轮数后评估时的水平相比。

72. 如权利要求59-71中任一项所述的组合物,其中所述参照细胞组合物含有基本相同的基因工程改造的细胞,除了所表达的嵌合受体包含不同共刺激分子,该共刺激分子不包含CD40衍生的细胞内信号传导结构域。

73. 如权利要求69-72中任一项所述的组合物,其中当与相同测定中当在单轮刺激和/或小于多轮的刺激轮数后评估时的参照群体或水平相比,因子水平未降低。

74. 如权利要求69-73中任一项所述的组合物,其中多轮刺激包括至少3、4或5轮和/或在至少15日,16日,17日,18日,19日,20日,21日,22日,23日,24日或25日的时间段内进行。

75. 一种治疗方法,其包括将权利要求47-49和51中任一项所述的细胞或权利要求52-75中任一项所述的组合物给予患有疾病或病症的对象。

76. 如权利要求75所述的方法,其中所述嵌合受体特异性结合至与所述疾病或病症相关的配体或抗原。

77. 如权利要求75或76所述的方法,其中,所述疾病或病症是癌症、肿瘤、自身免疫性疾病或病症,或感染性疾病。

78. 如权利要求75-77中任一项所述的方法,其中所述基因工程改造的T细胞或所述基因工程改造的T细胞的亚组在所述对象中表现出比在给予相同或约相同剂量参照细胞组合物的对象中增加或更长的扩增和/或持久性。

79. 如权利要求78所述的方法,其中所述基因工程改造的T细胞或所述基因工程改造的T细胞的亚组是CD8+T细胞。

80. 如权利要求78或79所述的方法,其中在给予所述细胞的一个月内,两个月内,六个月内或一年内观察到或存在所述增加或降低。

81. 如权利要求78-80中任一项所述的方法,其中所述参照细胞组合物含有基本相同的基因工程改造的细胞,除了所表达的嵌合受体包含不同共刺激分子,该共刺激分子不包含CD40衍生的细胞内信号传导结构域。

82. 如权利要求52-74中任一项所述的组合物,其用于治疗患有疾病或病症的对象的疾病或病症。

83. 权利要求52-74中任一项所述的组合物用于治疗患有疾病或病症的对象的疾病或

病症的用途。

84. 权利要求52-74中任一项所述的组合物在制备用于治疗患有疾病或病症的对象的疾病或病症的药物中的用途。

85. 如权利要求82所述使用的组合物或权利要求84或85所述的用途, 其中所述配体结合受体特异性结合至与所述疾病或病症相关的配体或抗原。

86. 如权利要求82-85中任一项所述使用的组合物或用途, 其中, 所述疾病或病症是癌症、肿瘤、自身免疫性疾病或病症, 或感染性疾病。

含有TRAF诱导结构域的嵌合受体及相关组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年11月5日提交的标题为“含有Traf诱导结构域的嵌合受体及相关组合物和方法”的美国临时申请号62/251,590的优先权,其内容通过引用整体纳入。

[0003] 通过引用纳入序列列表

[0004] 本申请与电子格式的序列列表一同提交。所提供的序列列表名称为735042002940SeqList.txt,创建于2016年11月3日,其文件大小为37,708字节。该序列列表的电子格式的信息通过引用其全文纳入本文。

技术领域

[0005] 本公开在一些方面涉及用于过继治疗的工程改造的细胞的嵌合受体,包括T细胞和基因工程改造的细胞。在一些方面中,本发明还涉及用于工程改造和产生所述细胞的方法和组合物、含有该细胞的组合物、和用于向对象给予它们的方法。在一些实施方式中,细胞例如T细胞含有特异性结合抗原并且含有诱导TRAF6介导的信号传导的细胞内信号传导结构域的基因工程改造的抗原受体,例如嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方式中,方法和细胞的特征提供了增强的或改善的活性、功效和/或持久性。

背景技术

[0006] 有多种策略可用于产生并给予用于过继治疗的工程改造的细胞。例如,策略可用于对表达基因工程改造的抗原受体(如CAR)的免疫细胞进行工程改造,并将含有这些细胞的组合物给予对象。需要改进的策略来改善细胞的功效,例如,在给予对象时改善细胞的持久性和/或存活。提供了满足此类需求的方法、细胞、组合物、试剂盒和系统。

发明内容

[0007] 本申请在一些方面提供了嵌合受体,其包含配体结合结构域和包含TNF受体相关因子6 (TRAF-6) 诱导结构域和活化性胞质信号传导结构域的细胞内信号传导结构域。

[0008] 本文还提供了嵌合受体,其含有配体结合结构域,跨膜结构域和包含源自人CD40的信号传导结构域的细胞内信号传导结构域。还提供了含有配体结合结构域,源自人CD28的跨膜结构域和包含源自CD40的信号传导结构域的胞内信号传导结构域的嵌合受体。在一些情况下,CD40是人CD40。在任何此类实施方式中的一些中,所述源自CD40的信号传导结构域包含SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列,或其功能变体,所述功能变体包含与SEQ ID NO:12显示至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列相同性的氨基酸序列。

[0009] 还提供了含有配体结合结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域的嵌合受体,所述细胞内信号传导结构域包含源自SEQ ID NO:12所示的CD40的信号传导结构域。在一些示例中,跨膜结构域源自CD40。

[0010] 在任何此类实施方式中的一些中,跨膜结构域是或含有源自CD4, CD28或CD8的跨

膜结构域。在一些示例中,跨膜结构域是或含有源自CD28的跨膜结构域。在一些情况下,跨膜结构域是或源自人蛋白质。

[0011] 在任何此类实施方式中的一些中,源自CD28的跨膜结构域含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列或与SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或更高的序列相同性的氨基酸序列。

[0012] 在任何此类实施方式中的一些中,所述嵌合受体还包含活化性胞质信号传导结构域。在一些情况下,活化性胞质信号传导结构域能够在T细胞中诱导初级活化信号,是T细胞受体(TCR)组分和/或包含基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)。在一些实施方式中,活化性胞质信号传导结构域是或包含CD3- ζ (CD3 ζ) 链的 ζ 链信号传导的胞质信号传导结构域或其功能变体或信号传导部分。

[0013] 在任何此类实施方式中的一些中,细胞内信号传导结构域从N到C末端依次包含源自CD2的信号传导结构域和活化性胞质信号传导结构域。在任何此类实施方式中的一些中,细胞内信号传导结构域不包含CD3-zeta (CD3 ζ) 链的 ζ 链的细胞内信号传导结构域。在一些实施方式中,细胞内信号传导结构域还包含额外的共刺激信号传导结构域。

[0014] 在任何此类实施方式中的一些中,额外的共刺激信号传导结构域包含T细胞共刺激分子的细胞内信号传导结构域或其除了源自CD40的之外的信号传导部分。在一些方面,额外的共刺激信号传导结构域含有源自CD28、4-1BB或ICOS的信号传导结构域或其信号传导部分。

[0015] 在一些实施方式中,配体结合结构域是抗原结合结构域。在一些实例中,抗原结合结构域是抗体或抗原结合抗体片段。在一些情况下,抗原结合结构域是单链片段的抗原结合抗体片段。在一些情况下,抗原结合抗体片段含有通过柔性免疫球蛋白接头连接的抗体可变区。在一些情况下,抗原结合结构域是单链可变片段(scFv)。

[0016] 另一方面,提供了包含第一和第二嵌合受体的多聚体嵌合受体复合物。在其他方面,提供了编码嵌合受体或多聚体嵌合受体复合物的核酸或载体,表达嵌合受体或多聚体嵌合受体复合体的细胞,包含嵌合受体表达细胞或多聚体嵌合受体复合体表达细胞的组合物,以及包括给予这些细胞的治疗方法。

[0017] 在一些实施方式中,提供了嵌合受体,其包含(a)配体结合结构域;和(b)细胞内信号传导结构域,其包含(i)TNF-受体相关因子6 (TRAF-6)-诱导结构域,其能够诱导TRAF-6活化或细胞定位和/或能够诱导TRAF-6介导的信号传导;和(ii)活化性胞质信号传导结构域。在一些实施方式中,TRAF-6诱导结构域包含TRAF-6结合结构域或能够与包含TRAF-6结合结构域的分子结合的结构域或招募包含TRAF-6结合结构域的分子的结构域。在一些实施方式中,TRAF-6-结合结构域包含具有Pro-Xaa-Glu-Xaa-Xaa-Xaa (SEQ ID NO:26)的氨基酸序列;和/或TRAF-6结合结构域不与TRAF-6以外的TRAF分子特异性结合;和/或嵌合受体不包含能够特异性结合和/或招募特异性结合任何其他TRAF分子(TRAF-1,TRAF-2,TRAF-3和/或TRAF-5)的结合结构域。在一些实施方式中,TRAF-6诱导结构域是或包含选自TNF-R家族成员、细胞因子受体和To11样受体(TLR)的分子的TRAF-6诱导结构域,或者是选自TNF-R家族成员、细胞因子受体和To11样受体(TLR)的分子的TRAF-6诱导结构域的功能性片段或变体。

[0018] 在一些实施方式中,根据上述任何嵌合受体,所述分子不包含衍生自该分子的任何其他TRAF诱导结构域;该分子不包含衍生自该分子的TRAF-1诱导结构域;该分子不包含

衍生自该分子的任何其他TRAF-2诱导结构域;该分子不包含衍生自该分子的任何其他TRAF-3诱导结构域;该分子不包含衍生自该分子的任何其他TRAF-4诱导结构域;该分子不包含衍生自该分子的任何其他TRAF-5诱导结构域;该分子不包含能够诱导另一TRAF或TRAF-1、TRAF-2、TRAF-3或TRAF-5的活化或细胞定位的分子的结构域,和/或该分子不包含能够通过另一TRAF和/或TRAF-1、TRAF-2、TRAF-3或TRAF-5诱导信号传导的分子的结构域。

[0019] 在一些实施方式中,根据上述任何嵌合受体,TRAF-6诱导结构域是或包含肿瘤坏死因子(TNF)-受体超家族分子的胞质信号传导结构域,或者是其功能变体或片段;或TRAF-6诱导结构域是或包含Toll/IL-1家族分子的胞质信号传导结构域或者是其功能变体或片段。在一些实施方式中,该分子选自CD40,RANK和1型白细胞介素-1受体(IL1R1)。在一些实施方式中,TRAF-6诱导结构域包含选自以下的氨基酸序列:(i) SEQ ID NO:12、14或16所示的氨基酸序列;(ii) 包含与SEQ ID NO:12、14或16显示至少85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或更多的序列相同性的氨基酸序列的功能变体;(iii) 包含氨基酸序列的功能变体,所述氨基酸序列与SEQ ID NO:12具有小于100%序列相同性,并且与SEQ ID NO:12具有至少85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%的序列相同性;或(iv) (i)、(ii)或(iii)的功能片段。在一些实施方式中,功能变体或功能片段能够诱导TRAF-6的活化或细胞定位,和/或能够诱导TRAF-6介导的信号传导和/或包含TRAF-6结合结构域或能够与包含TRAF-6结合结构域的分子结合或招募包含TRAF-6结合结构域的分子的结构域。在一些实施方式中,TRAF-6诱导部分招募包含TRAF-6结合结构域的分子,并且招募的分子是或包含IRAK和/或TRAF-6诱导部分包含能招募IRAK的TIR结构域。在一些实施方式中,TRAF-6诱导结构域不是或不包含CD40或OX40的胞质信号传导结构域,和/或不是或不包含CD40或OX40的完整胞质结构域,不是或不包含SEQ ID NO:12(由SEQ ID NO:34所示序列编码)或SEQ ID NO:20或32(由SEQ ID NO:33所示序列编码)所示的氨基酸序列,和/或不包含除TRAF-6结合结构域之外的OX40或CD40的TRAF结合结构域。在一些实施方式中,细胞内信号传导结构域按顺序从其N至C末端包含:配体结合结构域,(TRAF-6)诱导结构域和活化性胞质信号传导结构域。

[0020] 在一些实施方式中,根据上述任何嵌合受体,TRAF-6诱导结构域包含IL1R1的胞质信号传导结构域或其功能变体或片段,并且在配体结合后,嵌合受体能够与包含辅助信号传导结构域的第二嵌合受体形成多聚体复合物,该多聚体复合物能够诱导TRAF-6的活化或细胞定位,和/或能够诱导TRAF-6介导的信号传导。在一些实施方式中,辅助信号传导结构域包含足以与第一嵌合受体形成多聚体复合物的IL1RAP的胞质信号传导结构域或其功能变体或片段。在一些实施方式中,多聚体复合物是异二聚体复合物。

[0021] 在一些实施方式中,提供了嵌合受体,其包含(a)配体结合结构域;和(b)细胞内信号传导结构域,其包含:(i) TRAF-6诱导结构域和辅助信号传导结构域,其中在配体结合后,TRAF-6诱导结构域和辅助信号传导结构域能够协同诱导TRAF-6的活化或细胞定位,和/或能够诱导TRAF-6介导的信号传导;和(ii)活化性胞质信号传导结构域。在一些实施方式中,TRAF-6诱导结构域是或包含IL1R1的胞质信号传导结构域或其功能变体或片段;并且辅助信号传导结构域是或包含IL1RAP的胞质信号传导结构域或其功能变体或片段。在一些实施方式中,TRAF-6诱导结构域和辅助信号传导结构域直接或间接串联连接。

[0022] 在一些实施方式下,根据上述任何嵌合受体,活化性胞质信号传导结构域能够在T细胞中诱导初级活化信号,是T细胞受体(TCR)组分和/或包含基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)。在一些实施方式中,活化性胞质信号传导结构域是或包含CD3- ζ (CD3 ζ)链信号传导的胞质信号传导结构域或其功能变体或信号传导部分。在一些实施方式中,配体结合结构域是功能性非TCR抗原受体或转基因TCR。在一些实施方式中,嵌合受体是嵌合抗原受体(CAR),其中配体结合结构域是抗原结合结构域。在一些实施方式中,抗原结合结构域是抗体或抗体片段。在一些实施方式中,抗原结合结构域是为单链片段的抗体片段。在一些实施方式中,片段包含通过柔性免疫球蛋白接头连接的抗体可变区。在一些实施方式中,片段包含scFv。

[0023] 在一些实施方式中,根据上述任何嵌合受体,配体结合结构域特异性结合与疾病或病症相关的抗原。在一些实施方式中,疾病或病症是感染性疾病或病症,自身免疫性疾病,炎性疾病或肿瘤或癌症;配体结合结构域特异性结合肿瘤抗原;和/或配体结合结构域特异性结合选自下组的抗原:ROR1,B细胞成熟抗原(BCMA),tEGFR,Her2,L1-CAM,CD19,CD20,CD22,间皮素,CEA,乙型肝炎表面抗原,抗叶酸受体,CD23,CD24,CD30,CD33,CD38,CD44,EGFR,EGP-2,EGP-4,EPHa2,ErbB2,ErbB3,ErbB4,erbB二聚体,EGFR vIII,FBP,FCRL5,FCRH5,胎儿乙酰胆碱e受体,GD2,GD3,HMW-MAA,IL-22R- α ,IL-13R- α 2,kdr, κ 轻链,Lewis Y,L1-细胞粘附分子(L1-CAM),黑素瘤相关抗原MAGE-A1,MAGE-A3,MAGE-A6,黑素瘤优先表达抗原(PRAME),存活素,EGP2,EGP40,TAG72,B7-H6,IL-13受体 α 2(IL-13Ra2),CA9,GD3,HMW-MAA,CD171,G250/CAIX,HLA-AI MAGE A1,HLA-A2NY-ESO-1,PSCA,叶酸受体- α ,CD44v6,CD44v7/8,avb6整联蛋白,8H9,NCAM,VEGF受体,5T4,胎儿AchR,NKG2D配体,CD44v6,双重抗原,和与通用标签关联的抗原,癌症-睾丸抗原,间皮素,MUC1,MUC16,PSCA,NKG2D配体,NY-ESO-1,MART-1,gp100,癌胚抗原,ROR1,TAG72,VEGF-R2,癌胚抗原(CEA),前列腺特异性抗原,PSMA,Her2/neu,雌激素受体,孕酮受体,肝配蛋白B2,CD123,CS-1,c-Met,GD-2,0-乙酰化GD2(OGD2),MAGE A3,CE7,Wilms肿瘤1(WT-1)和细胞周期蛋白A1(CCN1),细胞周期蛋白A2,CCL-1,CD138和病原体特异性抗原。在任何这样的实施方式中的一些中,配体结合结构域特异性结合CD19。

[0024] 在任何此类实施方式中的一些中,嵌合受体还包含连接配体结合结构域和跨膜结构域的间隔子。在某些情况下,间隔子来源于人IgG。在一些实例中,间隔子含有氨基酸序列ESKYGPPCPPCP(SEQ ID NO:1)。在一些情况下,间隔子含有来自CD28的细胞外部分,其任选地是人CD28。在一些方面,源自CD28的胞外部分包含1至50个氨基酸长度,1至40个氨基酸长度,1至30个氨基酸长度,1至20个氨基酸长度或1至10个氨基酸长度。

[0025] 在任何此类实施方式中的一些中,间隔子和跨膜结构域含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列或与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或更高的序列相同性的氨基酸序列。

[0026] 在一些实施方式中,根据上述任何嵌合受体,嵌合受体还包含连接配体结合结构域和细胞内信号传导结构域的跨膜结构域。在一些实施方式中,跨膜结构域与TRAF-6诱导型结构域连接,由此TRAF-6诱导型结构域位于跨膜结构域和活化信号传导结构域之间。在一些实施方式中,跨膜结构域包含具有TRAF-6诱导型结构域或其功能片段或变体的分子的跨膜结构域。在一些实施方式中,跨膜结构域是或包含选自TNF-R家族成员、细胞因子受体

和Toll样受体 (TLR) 的分子的跨膜结构域或其功能片段或变体。在一些实施方式中,跨膜结构域和TRAF-6诱导型结构域来自相同的分子。在一些实施方式中,该分子选自CD40,RANK和1型白细胞介素-1受体 (IL1R1)。在一些实施方式中,跨膜结构域包含选自以下的氨基酸序列:(i) SEQ ID NO:11、13或15所示的氨基酸序列;(ii) 包含显示与SEQ IDNO:11、13或15具有至少85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或更多的序列相同性的氨基酸序列的功能变体;(iii) (i) 或 (ii) 的功能片段。

[0027] 在一些实施方式中,根据上述任何嵌合受体,细胞内信号传导结构域还包含 (iii) 共刺激信号传导结构域。在一些实施方式中,共刺激信号传导结构域包含T细胞共刺激分子的胞质信号传导结构域或其功能变体或信号传导部分。在一些实施方式中,共刺激信号传导结构域包含磷酸肌醇3-激酶 (PKC) 诱导结构域。在一些实施方式中,共刺激信号传导结构域包含CD28、4-1BB或ICOS分子的胞质信号传导结构域,或者是其信号传导部分的功能变体。在一些实施方式中,共刺激信号传导结构域位于TRAF-6诱导结构域和活化性信号传导结构域之间;或TRAF-6诱导结构域位于共刺激信号传导结构域和活化性信号传导结构域之间。在一些实施方式中,跨膜结构域包含共刺激分子的跨膜结构域。

[0028] 在一些实施方式中,提供了一种多聚体嵌合受体复合物,其包含 (1) 第一嵌合受体,所述第一嵌合受体包含:(a) 第一配体结合结构域;和 (b) 第一细胞内信号传导结构域,其包含 (i) TRAF-6诱导结构域和 (ii) 活化性胞质信号传导结构域;和 (2) 第二嵌合受体,所述第二嵌合受体包含:(c) 第二配体结合结构域,所述第二配体结合结构域与第一配体结合结构域能够结合相同的配体;和 (d) 第二细胞内信号传导结构域,其包含 (iii) 辅助信号传导结构域,其中在配体结合后,TRAF诱导结构域和辅助信号传导结构域能够协同诱导TRAF-6的活化或细胞定位;和/或能够诱导TRAF-6介导的信号传导。在一些实施方式中,TRAF-6诱导结构域包含IL1R1的胞质信号传导结构域或其功能变体或片段;并且辅助信号传导结构域包含IL1RAP的胞质信号传导结构域或其功能变体或片段。在一些实施方式中,第一配体结合结构域和第二配体结合结构域相同或基本相同。

[0029] 在一些实施方式中,根据上述任何多聚体嵌合受体复合物,第二嵌合受体还包含第二活化性胞质信号传导结构域,其任选地与第一活化性胞质结构域相同或基本相同。在一些实施方式中,活化性胞质信号传导结构域(可以是第一和/或第二活化性胞质信号传导结构域)独立地是T细胞受体 (TCR) 组分和/或包含基于免疫受体酪氨酸的活化基序 (ITAM)。在一些实施方式中,活化性胞质信号传导结构域(可以是第一和/或第二活化性胞质信号传导结构域)独立地包含CD3- ζ (CD3 ζ) 链的胞质信号传导结构域或其信号传导部分。

[0030] 在一些实施方式中,根据上述任何多聚体嵌合受体复合物,第一和/或第二嵌合受体包含共刺激信号传导结构域。在一些实施方式中,共刺激信号传导结构域(可以是第一和/或第二共刺激信号传导结构域)独立地包含T细胞共刺激分子的胞质信号传导结构域或其信号传导部分。在一些实施方式中,共刺激信号传导结构域(可以是第一和/或第二共刺激信号传导结构域)独立地包含CD28、4-1BB或ICOS的胞质信号传导结构域或其信号传导部分。在一些实施方式中,第一和/或第二配体结合结构域是功能性非TCR抗原受体或转基因TCR。

[0031] 在一些实施方式中,根据上述任何多聚体嵌合受体复合物,第一和/或第二嵌合受体是嵌合抗原受体 (CAR),其中第一和/或第二配体结合结构域是抗原结合结构域。在一些

实施方式中,抗原结合结构域是抗体或抗体片段。在一些实施方式中,抗原结合结构域是为单链片段的抗体片段。在一些实施方式中,片段包含通过柔性免疫球蛋白接头连接的抗体可变区。在一些实施方式中,片段包含scFv。

[0032] 在一些实施方式中,根据上述任何多聚体嵌合受体复合物,第一和/或第二嵌合受体还包含连接配体结合结构域和胞内信号传导结构域的跨膜结构域。

[0033] 在一些实施方式中,提供了编码根据上述任何实施方式的嵌合受体的核酸分子。在任何此类实施方式中的一些中,核酸分子还含有信号序列。在一些实施方式中,核酸分子包含编码第一嵌合受体的核苷酸序列,所述第一嵌合受体包含:(a) 第一配体结合结构域;(b) 第一细胞内信号传导结构域,其包含(i) TRAF-6诱导结构域和(ii) 活化性胞质信号传导结构域;和/或编码第二嵌合受体的核苷酸序列,所述第二嵌合受体包含:(c) 第二配体结合结构域,所述第二配体结合结构域与第一配体结合结构域能够结合相同的配体;和(d) 第二细胞内信号传导结构域,其包含(iii) 辅助信号传导结构域。

[0034] 在一些实施方式中,核酸分子是包含编码第一嵌合受体的核苷酸序列和编码第二嵌合受体的核苷酸序列的单一多核苷酸,并且任选地还包含至少一个启动子,其可操作地连接以控制第一嵌合受体和/或第二嵌合受体的表达。在一些实施方式中,编码第一嵌合受体的核苷酸序列可操作地连接至第一启动子,并且编码第二嵌合受体的核苷酸序列可操作地连接至第二启动子,所述第一启动子和第二启动子可以相同或不同;或第一嵌合受体和第二嵌合受体被内部核糖体进入位点(IRES) 分开,并且第一和第二嵌合受体在相同启动子的控制下表达。在一些实施方式中,编码的第一嵌合受体和/或编码的第二嵌合受体是根据上述任何实施方式的多聚体复合物的第一和/或第二嵌合受体。在一些实施方式中,第一和第二多核苷酸通过内部核糖体进入位点(IRES) 或编码自身切割肽或引起核糖体跳跃的肽的核苷酸序列分离,任选为T2A或P2A。

[0035] 在一些实施方式中,本文所提供了载体,其含有根据上述的任一实施方式的核酸分子。在一些情况中,载体是表达载体。在一些实施方式中,载体是病毒载体。在一些实施方式中,载体是逆转录病毒载体,其任选为慢病毒载体或 γ 逆转录病毒载体。在一些实施方式中,载体不编码修饰的胱天蛋白酶分子或诱导型胱天蛋白酶分子,任选地,其中胱天蛋白酶分子是修饰的胱天蛋白酶-9或诱导型胱天蛋白酶9。

[0036] 在一些实施方式中,提供了包含根据上述任一实施方式的核酸分子或载体或表达根据上述任何实施方式的嵌合受体的工程改造的细胞。在一些实施方式中,工程改造的细胞包含第一嵌合受体,所述第一嵌合受体包含:(a) 第一配体结合结构域;和(b) 第一细胞内信号传导结构域,其包含(i) TRAF-6诱导结构域和(ii) 活化性胞质信号传导结构域;和/或第二嵌合受体,所述第二嵌合受体包含:(c) 第二配体结合结构域,所述第二配体结合结构域与第一配体结合结构域能够结合相同的配体;和(d) 第二细胞内信号传导结构域,其包含(iii) 辅助信号传导结构域。在一些实施方式中,第一嵌合受体和/或第二嵌合受体是根据上述任何实施方式的多聚体复合物的第一和/或第二嵌合受体。在一些实施方式中,细胞不表达修饰的胱天蛋白酶分子或诱导型胱天蛋白酶分子,任选地,其中胱天蛋白酶分子是修饰的胱天蛋白酶-9或诱导型胱天蛋白酶9。在一些实施方式中,所述工程改造的细胞是T细胞。在一些实施方式中,所述工程改造的T细胞是CD8⁺T细胞。

[0037] 还提供了生产工程改造的细胞的方法,所述方法包括将上文描述的核酸分子或载

体引入细胞中,从而产生工程改造的细胞。还提供了通过上述方法生产的工程改造的细胞。

[0038] 在一些实施方式中,提供了一种组合物,其包含根据上述任何实施方式的工程改造的细胞和任选的药学上可接受的缓冲剂。在一些实施方式中,所述组合物包含:工程改造的CD8⁺细胞,所述工程改造的CD8⁺细胞表达根据任何上述实施方式的嵌合受体或表达根据上述任一实施方式的多聚体复合物的第一和/或第二嵌合受体;包含与CD8⁺细胞中表达的嵌合受体不同的嵌合受体的工程改造的CD4⁺细胞,所述不同嵌合受体包含不同的共刺激信号传导结构域;和任选的药学上可接受的缓冲剂。在一些实施例中,第一工程改造的细胞与第二工程改造的细胞的比率为或约为1:1、1:2、2:1。

[0039] 在一些实施方式中,与CD8⁺细胞相比,CD4⁺细胞中表达的嵌合受体的唯一差异是不同的共刺激信号传导结构域。在一些实施方式中,不同的共刺激信号传导结构域不包含能够诱导TRAF-6的活化或细胞定位和/或能够诱导TRAF-6介导的信号传导的TRAF-6诱导结构域。在一些实施方式中,不同的共刺激信号传导结构域是或包含能够诱导磷酸肌醇3-激酶(PI3K)的活化或细胞定位和/或能够诱导PI3K/Akt信号传导的PI3K诱导结构域。在一些实施方式中,不同的共刺激信号传导结构域是或包含CD28、4-1BB或ICOS分子的胞质信号传导结构域,或者是其信号传导部分的功能变体。

[0040] 在一些实施方式中,与用一种或多种刺激剂体外刺激的相应参照细胞组合物相比,根据上文所述的任何组合物,当用相同的刺激剂刺激时,组合物中的工程改造的细胞显示增加的增殖或扩增能力。在一些实施方式中,与用一种或多种刺激剂体外刺激的相应参照细胞组合物相比,当在相同的刺激剂存在下刺激时,组合物中的工程改造的细胞显示增加数量的记忆T细胞或记忆T细胞亚组。在一些实施方式中,记忆T细胞或记忆T细胞亚组是CD62L⁺。在一些实施方式中,记忆T细胞或记忆T细胞亚组是中心记忆T细胞(T_{CM})、长寿记忆T细胞或T记忆干细胞(T_{SCM})。在一些实施方式中,记忆T细胞或记忆T细胞亚组还包含的表型包括:a) CD127⁺;和/或b) CD45RA⁺、CD45RO⁻、CCR7⁺和CD27⁺中的任何一种或多种,以及t-bet^低、IL-7Ra⁺、CD95⁺、IL-2Rβ⁺、CXCR3⁺和LFA-1⁺中的任何一种或多种。在一些实施方式中,记忆T细胞或记忆T细胞亚组是CD8⁺。在一些实施方式中,相比参照组合物,源自给予的工程改造的细胞的记忆T细胞或记忆T细胞亚组的数量包括增加的或更高百分比的中心记忆T细胞(T_{CM}),长寿记忆T细胞或T记忆干细胞(T_{SCM})。

[0041] 在一些实施方式中,与用一种或多种刺激剂体外刺激的相应参照细胞组合物相比,根据上文所述的任何组合物,当用相同的刺激剂刺激时,组合物中的工程改造的细胞显示增加的持久性和/或存活。在一些实施方式中,一种或多种刺激剂包含抗原,抗CD3/抗CD28抗体和/或包含IL-2,IL-15和/或IL-7细胞因子。在一些实施方式中,在刺激开始后3天,4天,5天,6天,7天,10天或14天内观察到增加。

[0042] 在一些实施方式中,提供了治疗方法,其包括将根据上述任一实施方式的工程改造的细胞给予于患有疾病或病症的对象。在一些实施方式中,嵌合受体特异性结合与疾病或病症相关的配体或抗原。在一些实施方式中,疾病或症状是癌症、肿瘤、自身免疫性疾病或异常,或为感染性疾病。在一些实施方式中,组合物中的工程改造的细胞在对象中表现出比在给予相同或约相同剂量的参照细胞组合物的对象中增加或更长的扩增和/或持久性。在一些实施方式中,与来自以相同或大约相同剂量给予参照细胞组合物中的对象中记忆T细胞或记忆T细胞亚组的数目或持久性相比,在来自给予工程改造的细胞的对象中存在增

加或更多数量的记忆T细胞或记忆T细胞亚组和/或增加或更长持久性的记忆T细胞或记忆T细胞亚组给予参照。在一些实施方式中,记忆T细胞或记忆T细胞亚组是CD62L⁺。在一些实施方式中,记忆T细胞或记忆T细胞亚组是中心记忆T细胞(T_{CM})、长寿命记忆T细胞或T记忆干细胞(T_{SCM})。在一些实施方式中,记忆T细胞或记忆T细胞亚组还包含的表型包括:a) CD127⁺;和/或b) CD45RA⁺、CD45RO⁻、CCR7⁺和CD27⁺中的任何一种或多种,以及t-bet^低、IL-7Ra⁺、CD95⁺、IL-2Rβ⁺、CXCR3⁺和LFA-1⁺中的任何一种或多种。在一些实施方式中,记忆T细胞或记忆T细胞亚组是CD8⁺。

[0043] 在一些实施方式中,根据上述治疗方法中的任何一种,来自给予基因工程改造的细胞的记忆T细胞或记忆T细胞亚组的数量包含增加或更高百分比的中心记忆T细胞(T_{CM})、长寿命记忆T细胞或T记忆干细胞(T_{SCM}),与来自以相同或大约相同剂量给予参照细胞组合物的此类细胞的数量相比。在一些实施方式中,来自给予基因工程改造的改造的T细胞的对象中存在增加或更高的非终末分化的T细胞的数量,与来自以相同或大约相同剂量给予参照细胞组合物的对象的非终末分化的T细胞的数量相比。在一些实施方式中,在一种或多种刺激剂存在下离体再刺激后,来自给予基因工程改造的细胞的对象中的细胞表现出增加的活化或增殖,与在相同刺激剂存在下离体再刺激时来自以相同或大约相同剂量给予参照细胞组合物的对象中的细胞的活化或增殖相比。在一些实施方式中,一种或多种刺激剂包含抗原,抗CD3/抗CD28抗体或包含IL-2,IL-15和/或IL-7细胞因子。

[0044] 在一些实施方式中,在刺激开始后3天,4天,5天,6天,7天,10天或14天内观察到增加。在一些实施方式中,所述增加是至少1.2倍,1.5倍,2倍,3倍,4倍或5倍。在一些实施方式中,与给予相同或约相同剂量的参照细胞组合物的对象中的细胞中耗竭标志物的表达相比,来自给予工程改造的细胞的对象中的细胞中耗竭标志物的表达降低或减少。在一些实施方式中,耗竭标志物选自CD244、CD160和PD-1。在一些实施方式中,表达降低或减少1.2倍,1.5倍,2.0倍,3倍,4倍,5倍,6倍,7倍,8倍,9倍,10倍或更多。在一些实施方式中,在给予细胞的一个月内,两个月内,六个月内或一年内观察到或存在增加或减少。在一些实施方式中,根据上述任何组合物,观察到增加并且效应物与靶标比率大于或大于约或约3:1,大于或大于约或约5:1,或大于或大于约或约9:1。在一些实施方式中,与用一种或多种刺激剂体外刺激的相应参照细胞组合物相比,根据上文所述的任何组合物,当用相同的刺激剂刺激时,组合物中的基因工程改造的细胞产生更多的IL-2。在一些实施方式中,根据上述任何组合物或治疗方法,参照细胞组合物含有基本上相同的工程改造的细胞,除了表达的嵌合受体包含细胞内信号传导结构域,该细胞内信号传导结构域源自比较的嵌合受体的不同或区别共刺激分子。在一些实施方式中,参照细胞组合物含有表达嵌合受体的工程改造的细胞,所述嵌合受体包含不含TRAF-6诱导结构域的细胞内信号传导结构域(例如CD40衍生的信号传导结构域)和/或包含源自能够诱导PI3K/Akt信号传导的共刺激信号传导结构域的信号传导结构域和/或包含CD28、4-1BB或ICOS(例如人类CD28、4-1BB或ICOS)的共刺激结构域。在一些实施方式中,参照细胞组合物含有表达嵌合受体的工程改造的细胞,所述嵌合受体含有源自ICOS(例如人类ICOS)的细胞内信号传导结构域。在一些情况下,不同的共刺激分子是其他共刺激分子,所述其他共刺激分子包括TRAF-6诱导结构域,任选地OX40衍生的细胞内信号传导结构域。

[0045] 在一些实施方式中,根据上述任何组合物,在多次抗原特异性刺激后的体外测定

中,来自组合物的T细胞显示或已经观察到显示出持续或升高水平的指示T细胞功能、健康或活性的因子,与包含T细胞群的参照组合物相比、与单次刺激相比、和/或与相同测定中当在单轮刺激和/或小于多轮的刺激轮数后评估时的水平相比。

[0046] 在任何此类实施方式中的一些中,参照细胞组合物含有基本上相同的基因工程改造的细胞,除了表达的嵌合受体包括不含CD40衍生细胞内信号传导结构域的不同共刺激分子。

[0047] 在一些实施方式中,根据上述任何组合物,多轮刺激包括至少3、4或5轮和/或在至少15日,16日,17日,18日,19日,20日,21日,22日,23日,24日或25日的时间段内进行。

[0048] 在一些任何此类实施方式中,上述组合物用于治疗患有疾病或病症的对象中的疾病或病症中。在一些任何此类实施方式中,上述组合物用于治疗患有疾病或病症的对象中的疾病或病症。在任何这样的实施方式中的一些中,还提供了上述任何组合物在制备用于治疗患有疾病或病症的对象的疾病或病症的药物中的用途。

[0049] 还提供了上述用于上述任何用途的任何组合物,其中配体结合受体特异性结合与疾病或病症相关的配体或抗原。在任何此类实施方式中的一些中,疾病或症状是癌症、肿瘤、自身免疫性疾病或异常,或为感染性疾病。

[0050] 在任何此类实施方式中的一些中,配体结合结构域不与CD40L特异性结合和/或不来自CD40。

附图说明

[0051] 图1描述了由多种CD19-导向的CAR-T细胞进行的对表达CD19的靶细胞(K562-CD19细胞)的靶细胞杀伤,各CAR-T细胞具有含CD3 ζ 信号传导结构域(“z”)的细胞内信号传导结构域和1) 41BB-衍生的共刺激信号传导结构域(41BBz,实心方形)、2) CD28衍生的共刺激信号传导结构域(CD28z,深三角形),3) ICOS衍生的共刺激信号传导结构域(ICOSz,向下的三角形),4) CD40衍生的共刺激信号域(CD40z,带轮廓的圆圈)或5) OX40衍生的共刺激信号传导域(OX40z,带轮廓的方块)。在CAR-T细胞::靶细胞比率为9:1、3:1和1:1共培养后,通过靶细胞生长曲线的1/AUC计算杀伤指数。还描绘了仅具有靶细胞(仅靶标,浅三角形)或具有非CAR转导的T细胞(模拟(mock),实心圆圈)的对照孔的杀伤指数。

[0052] 图2A-D显示以1:1,3:1和9:1的E:T比例孵育表达CAR的表达细胞与表达抗原的K562-CD19靶细胞后第4天上清液中的细胞因子释放。TNF- α (图2A),GM-CSF(图2B),IFN γ (图2C)和IL-2(图2D)。评估的CAR-T细胞含有CD40衍生的共刺激信号传导结构域,OX40衍生的共刺激信号传导结构域,ICOS衍生的共刺激信号传导结构域,4-1BB衍生的共刺激信号传导结构域或CD28衍生的共刺激信号传导结构域。还描述了从非CAR转导的T细胞的细胞因子释放(模拟,实心圆圈)。

[0053] 图3A-E显示在用CD19-K562靶细胞(黑色)或对照亲代细胞(浅灰色)刺激CAR-工程改造的T细胞后,表达CAR的CD8+T细胞亚组中的各种细胞因子的细胞内细胞因子表达,所述CAR包含CD40衍生的共刺激信号传导结构域,OX40衍生的共刺激信号传导结构域,ICOS衍生的共刺激信号传导结构域,4-1BB衍生的共刺激信号传导结构域或CD28衍生的共刺激信号传导结构域。显示下述的细胞内细胞因子表达:TNF- α 和IFN- γ (右下);IL-17A和粒酶B(右上);IL-13和IL-22(左下);或IL-10和IL-2(左上)。

[0054] 图4A-E显示在用CD19-K562靶细胞(黑色)或对照亲代细胞(浅灰色)刺激CAR-工程改造的T细胞后,表达CAR的CD4⁺T细胞亚组中的各种细胞因子的细胞内细胞因子表达,所述CAR包含CD40衍生的共刺激信号传导结构域,OX40衍生的共刺激信号传导结构域,ICOS衍生的共刺激信号传导结构域,4-1BB衍生的共刺激信号传导结构域或CD28衍生的共刺激信号传导结构域。显示下述的细胞内细胞因子表达:TNF- α 和IFN- γ (右下);IL-17A和粒酶B(右上);IL-13和IL-22(左下);或IL-10和IL-2(左上)。

[0055] 图5显示与模拟研究组相比,在连续刺激测定中用表达CD19的靶细胞进行各轮再刺激后,表达含有CD40,OX40,ICOS,CD28或4-1BB衍生的共刺激信号传导结构域的CAR的抗CD19CAR-工程改造的细胞的细胞数目加倍。

[0056] 图6A显示,在扩散型肿瘤异种移植小鼠模型中,与肿瘤单独研究组和模拟研究组相比,给予表达含有CD40、OX40、ICOS、CD28或4-1BB衍生的共刺激信号传导结构域的CAR的CAR-工程改造的细胞的小鼠的肿瘤负荷。通过测量小鼠的平均辐射率(p/s/cm²/sr)来评估肿瘤负荷。

[0057] 图6B显示,在扩散型肿瘤异种移植小鼠模型中,与肿瘤单独研究组和模拟研究组相比,给予表达含有CD40、OX40、ICOS、CD28或4-1BB衍生的共刺激信号传导结构域的CAR的CAR-工程改造的细胞的小鼠的存活。

[0058] 图7A-C显示,与模拟研究组相比,在给予表达含有CD40、OX40、ICOS、CD28或4-1BB衍生的共刺激信号传导结构域的CAR的CAR-工程改造的细胞后第28天小鼠的血液、脾脏和骨髓中的肿瘤细胞计数。

[0059] 图7D-E显示,与模拟研究组相比,在给予表达含有CD40、OX40、ICOS、CD28或4-1BB衍生的共刺激信号传导结构域的CAR的CAR-工程改造的细胞的小鼠骨髓中CAR-T细胞转移后第28天的EGFR⁺ CAR⁺ T细胞的绝对量。

具体实施方式

[0060] 除非另外定义,本文使用的所有专业术语、符号和其它技术和科学术语或专有词汇旨在具有本发明所属领域技术人员通常所理解相同含义。在一些情况中,本文出于阐明和/或便于引用目的对具有常规理解含义的术语加以限定,本文中包括此类限定不应理解为表示与本领域常规理解的有显著差异。

[0061] 本发明中提及的所有出版物,包括专利文件、学术论文和数据集,均以各个体出版物好似独立地通过引用纳入的相同程度通过引用其全文纳入本文用于所有目的。如果本文所示的定义与通过引用纳入本文的专利、公开申请和其它出版物中所示的定义不同或其它情况下不一致,则相对于通过引用纳入本文的文件中的定义,以本文所示的定义为主。

[0062] 本文所用章节标题仅用于组织目的,而不应理解为限制所述客体。

[0063] I. 概览

[0064] 本文提供重组受体,包括嵌合受体,例如嵌合抗原受体,其纳入有能够诱导TRAF分子的活化或细胞定位和/或能够诱导TRAF介导的信号传导的TRAF诱导信号传导结构域的细胞内信号传导结构域。在一些实施方式中,TRAF诱导信号传导结构域来源于细胞信号传导分子的胞质信号传导结构域,所述细胞信号传导分子例如T细胞信号传导分子,例如共刺激分子或细胞因子受体。在一些实施方式中,TRAF诱导信号传导结构域是能够诱导TRAF-6分

子的活化或细胞定位和/或能够诱导TRAF-6介导的信号传导和/或直接或间接激活一种或多种下游信号传导介质的TRAF-6诱导信号传导结构域。在一些实施方式中,TRAF-6诱导结构域是或来源于胞质信号传导结构域,该胞质信号传导结构域是能够或会诱导TRAF-6分子的活化或细胞定位和/或能够诱导TRAF-6介导的信号传导和/或激活一种或多种下游信号传导介质的TNF受体超家族成员或IL-1的成员或Toll家族成员。在一些实施方式中,TRAF-6诱导结构域是或来源于CD40、RANK或IL-1R。

[0065] 在一些实施方式中,TRAF诱导结构域作为嵌合受体(例如嵌合抗原受体)的一部分提供,其还将为所需抗原(例如,肿瘤抗原)提供特异性的配体结合结构域(例如抗体或抗体片段)与提供初级活化信号的活化性细胞内结构域部分(例如T细胞活化结构域)组合。在一些实施方式中,当提供的嵌合受体经基因工程改造入免疫细胞时可调节T细胞活性,并且在一些情况下可调节T细胞分化或体内平衡,从而导致基因工程改造的细胞的体内寿命、存活和/或持久性改善,例如用于过继性细胞治疗方法。

[0066] 过继性细胞疗法(包括涉及给予表达对感兴趣的疾病或病症特异性的嵌合受体如嵌合抗原受体(CAR)和/或其他重组抗原受体的细胞的疗法以及其他过继免疫细胞和过继性T细胞疗法)可以有效治疗癌症和其他疾病和病症。在某些情况下,过继性细胞治疗的可行方法可能并不总是令人满意。在一些情况下,最佳功效可取决于给予的细胞的下述能力:识别和结合靶标(例如靶标抗原),运输、定位并成功进入对象、肿瘤及其环境内的适当位点,被激活、扩增,发挥各种效应功能,包括细胞毒性杀伤作用和各种因子如细胞因子的分泌,持久(包括长期),分化、转换或参与重编程为某些表型状态(如效应物、长效记忆、弱分化和效应状态),在清除和再次暴露于靶配体或抗原之后提供有效和强烈的回忆响应,并且避免或减少耗竭、无反应性、终末分化和/或分化成抑制状态。

[0067] 在某些情况下,过继治疗方法在所有这些方面都不尽如人意。例如,在一些情况下,现有的嵌合受体(例如,CAR)(其中包括那些包含有CD28或4-1BB等分子的共刺激信号传导结构域的那些)可能与缺乏持久性有关。虽然用纳入有例如源自CD28或4-1BB的共刺激信号传导结构域的嵌合受体(例如,CAR)基因工程改造的细胞可以促进强健的T细胞增殖或反应,包括靶细胞杀伤和细胞因子产生,它们也可能导致太多的信号,最终导致T细胞耗竭和/或缺乏基因工程改造的细胞的持久性。例如,在一些情况下,某些细胞信号传导途径,例如由CD28和其他共刺激分子的共刺激信号传导结构域诱导的PI3K/Akt途径可导致T细胞分化或活化状态的改变,这可能导致和/或引起当基因工程改造的细胞给予于对象时降低体内持久性。在可能发生的分化状态的改变中,包括在一些情况下幼稚表型缺失,记忆T细胞表型缺失和/或促进耗竭或无反应性,由此产生具有耗竭的T细胞表型的效应细胞。T细胞的耗竭可导致T细胞功能的逐渐丧失和/或导致细胞消耗(Yi等(2010) *Immunology*, 129:474-481)。T细胞耗竭和/或T细胞持久性的缺乏是过继细胞治疗功效和治疗效果的障碍;临床试验已经揭示了与抗原受体(例如,CAR)表达型细胞更强和/或更久程度的接触与治疗效果之间的关联。

[0068] 因此,虽然基因工程改造的T细胞中表达的嵌合受体(例如CAR)中纳入有某些共刺激信号传导域(例如,PI-3激酶信号传导共刺激结构域和/或CD28或4-1BB胞质共刺激信号传导结构域)可以促进它们的效应物功能,但是长期可能不是最理想的,由于工程改造细胞在记忆区室中的长期留存的能力受损和/或分化成对于长期暴露和抗肿瘤功效可能具有重

要性的记忆细胞亚组的能力受损。在一些情况下,这些事件可能有助于基因工程改造的(例如,CAR+) T细胞在抗原-抗原受体结合后获得耗竭的表型,这又会导致功能性降低。在一些情况下,这可能随时间减少具有记忆或中心记忆表型的这些细胞的数量或百分比,例如,导致长寿命记忆T细胞隔室和/或中心记忆隔室(例如中心记忆隔室(例如,长寿命记忆CD8+T细胞和/或CD8+中心记忆T细胞))的减少和/或降低这些细胞长期存活的潜力。

[0069] 提供的嵌合受体和含有这种嵌合受体的细胞可以提供优于用其他现有嵌合受体工程改造的细胞的优点,所述用其他现有嵌合受体工程改造是通过存在诱导来自其他细胞途径的信号传导的其他信号传导结构域进行。具体而言,所提供的嵌合受体包含来自信号蛋白TRAF家族(例如TRAF-6)的信号传导模式。TRAF或“肿瘤坏死因子受体相关因子”是与某些细胞表面分子关联或偶联以诱导或介导细胞内信号传导的信号衔接物。特别地,TRAF-6是能够传导来自TNF受体超家族和IL-1/To11样受体家族的受体的信号的TRAF蛋白,从而介导表达这些受体的免疫细胞中的细胞内信号传导。在一些实施方式中,配体与这些受体的结合诱导受体构象变化,在一些情况下包括受体寡聚化,其可以通过招募TRAF(例如,TRAF-6)使得受体能传导信号,随后可以激活细胞内信号传导途径。在一些实施方式中,招募或激活的TRAF(例如TRAF-6)可导致形成TRAF的二聚体或三聚体和/或导致TRAF定位于细胞膜。在一些实施方式中,配体结合后TRAF-6的招募和/或活化可以导致I κ B(IKK)和MAP激酶的活化,并且在一些情况下酪氨酸激酶Src家族的活化导致Akt激酶的活化。涉及下游TRAF-6信号传导的示例性介质或参与者可以包括MAP3K TAK1,TAB2,IRAK,ECSIT,Pellino。

[0070] 在一些实施方式中,TRAF-6介导的信号传导与免疫细胞体内平衡和T细胞分化相关,并且在一些情况下,可以充当强抗原性信号的负调节剂,否则可能导致终末分化。例如,在Traf6-/-小鼠中存在过度活化的CD4+T细胞,发现TRAF6在活化的T细胞中快速上调,由此指向TRAF6在维持免疫稳态中的作用(King等.(2006) *Nature Medicine*,12:1088)。还观察到TRAF6调节持续的长寿命记忆T细胞的发育,因为CD8+T细胞中TRAF6的缺失危及长期记忆T细胞的产生而不影响效应T细胞应答(Pearce等(2009) *Nature*,40:103-107)。因此,这些结果证实在嵌合受体中掺入TRAF-6介导的信号传导结构域可以表现出偏向或促进记忆重编程的信号,从而导致表达这种嵌合受体的长寿记忆细胞的产生。

[0071] 在一些实施方式中,用提供的TRAF-6诱导嵌合受体基因工程改造的细胞可以产生长寿命记忆T细胞区室和/或中心记忆区室T细胞群体,例如中心记忆区室(例如长寿命记忆CD8+T细胞和/或CD8+中枢记忆T细胞)和/或增加这些细胞长期存活的潜力。在一些情况下,随着时间的推移,记忆T细胞(例如长寿命和/或中枢记忆T细胞)的T细胞寿命、分化和持久性将有利于增强用嵌合受体工程改造的细胞(例如CAR工程改造的T细胞)的治疗功效。

[0072] 在一些实施方式中,所提供的嵌合受体可以在细胞中表达以产生基因工程改造的T细胞,其在给予于对象时表现出与参照细胞组合物相比得到改善的一种或多种性质。在一些情况下,与参照组合物的给予细胞相比,给予的基因工程改造的细胞的可以改善或增加或更大的一种或多种性质包括:这种给予的细胞在对象中的增加或更长的扩增和/或持久性,记忆T细胞或记忆T细胞亚组(例如中心记忆,长寿命记忆或T记忆干细胞)的增加的或更多的数目,记忆T细胞或记忆T细胞对象(例如中心记忆,长寿命记忆或T记忆干细胞)的增加的或更长的持续时间,非终末分化的T细胞的增加的或更多的数目,用抗原再刺激后增加的或更大的回忆响应,或减少或降低耗竭标志物的表达。在一些实施方式中,所述增加或减少

可以是,与给予参照细胞组合物的相同性质或特征相比,该性质或特征增加或减少至少1.2倍,至少1.5倍,至少2倍,至少3倍,至少4倍,至少5倍,至少6倍,至少7倍,至少8倍,至少9倍,或至少10倍或特征。在一些实施方式中,在基因工程改造的细胞给药后的一个月,两个月,三个月,四个月,五个月,六个月或12个月内可以观察到或存在一种或多种这种性质或特征的增加或减少。

[0073] 在一些实施方式中,提供的嵌合受体(其包括能够诱导TRAF-6介导的信号传导的TRAF-6诱导嵌合受体)能够诱导表达它们的免疫细胞中的信号传导,导致这些免疫细胞偏向或重编程为分化程度较低或非终末分化的表型,从而产生或生产大百分比或数量的记忆T细胞。在一些实施方式中,这样的重编程或偏向导致细胞表现出耗竭标记物的减少或降低,使得基因工程改造的T细胞响应于用抗原再刺激。在一些实施方式中,所提供的嵌合受体的这些特征以及含有此类嵌合受体的基因工程改造的细胞可导致基因工程改造的免疫细胞的长期持久性,例如用于过继性细胞疗法。

[0074] 在一些实施方式中,表达含有TRAF-6诱导细胞内结构域(例如CD40衍生的细胞内结构域)的所提供的嵌合抗原受体的细胞对用抗原刺激有响应。在一些实施方式中,可以在体外连续刺激测定中观察对抗原再刺激的反应。在一些方面中,在重复刺激之后细胞体外扩增的能力可以指示CAR-T细胞持续存在的能力(例如,在初始激活之后)和/或体内功能指示(Zhao等(2015)Cancer Cell,28:415-28)。在一些实施方式中,表达含有TRAF-6诱导细胞内结构域(例如CD40衍生的细胞内结构域)的所提供的嵌合抗原受体的细胞在多轮抗原特异性刺激后表现出持续或增加的因子水平,指示T细胞功能、健康或活性。在一些实施方式中,指示T细胞活性或功能的因子的增加或持续水平是或包含细胞增殖、细胞存活、抗原特异性细胞毒性和/或细胞因子分泌的程度。在一些实施方式中,指示T细胞活性的因子的这种增加或持续水平在多轮抗原特异性刺激例如至少3,4或5轮后观察到和/或至少10日,11日,12日,13日,14日,15日,16日,17日,18日,19日,20日,21日,22日,23日,24日或25日的时间段内进行。在一些实施方式中,与参照细胞组合物相比,T细胞活性或功能的因子的水平增加,例如本文所述的任何。在一些实施方式中,指示T细胞活性或功能的因子与相同测定中当在单轮刺激和/或小于多轮的刺激轮数后评估时的水平相比是持续的或增加的水平。在一些实施方式中,当与参照群体相比或与相同测定中当在单轮刺激和/或小于多轮的刺激轮数后评估时的水平相比,因子水平未降低。

[0075] 参照细胞组合物可以是在相同或基本上条件下获得、分离、生产、产生和/或孵育的细胞或T细胞的组合物,除了T细胞或T细胞群表达不同的嵌合受体,所述嵌合受体与比较的嵌合受体不同和/或含有具有比较的基因工程改造的细胞的不同TRAF-6诱导结构域的细胞内信号传导结构域。在一些实施方式中,参照细胞组合物含有基本上相同的基因工程改造的细胞,除了表达的嵌合受体包含细胞内信号传导结构域,该细胞内信号传导结构域具有来自不包含TRAF-6诱导结构域的不同共刺激分子的部分和/或包含能够诱导PI3K/Akt-信号传导的共刺激信号传导结构域和/或包含(例如人类或人类衍生的)CD28、4-1BB或ICOS的共刺激结构域。在一些实施方式中,参照细胞组合物含有具有嵌合受体的基因工程改造的细胞,所述嵌合受体含有源自OX40(例如人类OX40)的细胞内信号传导结构域。在一些实施方式中,参照细胞组合物含有具有嵌合受体的基因工程改造的细胞,所述嵌合受体含有源自ICOS(例如人类ICOS)的细胞内信号传导结构域。在一些这样的实施方式中,参照组合

物的嵌合受体中的唯一区别或基本上唯一的区别包括与比较细胞的嵌合受体相比的不同的共刺激信号传导结构域。

[0076] 在一些方面,参照细胞组合物除了包含引入不同嵌合受体外,该细胞或T细胞经相同或基本上相同的处理,如已经用TRAF-6诱导嵌合受体引入的T细胞或细胞,从而可以影响细胞的活性或性质的任何一种或多种条件在细胞之间没有变化或基本上不变。例如,参照细胞组合物的细胞表达的嵌合受体包含相同的抗原结合结构域(例如scFv),相同的活化性胞质信号传导结构域,但可以含有替代或不同的共刺激信号传导结构域。此外,给予于对象的参照细胞组合物的剂量与比较组合物中给予的细胞的剂量相比大约相同或相同,或者是相对量。

[0077] 在一些实施方式中,表达所提供的嵌合受体(例如含有CD40衍生的细胞内信号传导结构域)的细胞或这些细胞的亚组显示指示T细胞功能、健康或活性的一个或多个因子,这与表达含有能够诱导PI3K/Akt信号传导的共刺激信号传导结构域的嵌合受体(例如含有衍生自CD28或4-1BB的共刺激结构域的嵌合受体)的细胞中的相同或基本上相同。在一些情况下,这样的因子是或包含细胞扩增、细胞存活、抗原特异性细胞毒性和/或细胞因子分泌的程度。在一些实施方式中,基因工程改造的T细胞是CD3+T细胞或包含CD4+或CD8+T细胞。

[0078] 在一些实施方式中,表达所提供的嵌合受体(例如含有CD40衍生的细胞内信号传导结构域)的细胞是CD8+细胞,并且这些细胞显示指示T细胞功能、健康或活性的一个或多个因子,这相比表达含有能够诱导PI3K/Akt信号传导的共刺激信号传导结构域的嵌合受体(例如含有衍生自CD28或4-1BB的共刺激结构域的嵌合受体)的相似CD8+细胞得到改善或增强。在一些情况下,这样的因子是或包含细胞扩增、细胞存活、抗原特异性细胞毒性和/或细胞因子分泌的程度。

[0079] 在一些实施方式中,所提供的嵌合受体可以在细胞中表达以产生基因工程改造的T细胞,其在给予于对象时表现出增加的持久性和/或减少的T细胞耗竭。在一些实施方式中,这种表达所提供的嵌合受体(例如含有CD40衍生的细胞内信号传导结构域)的基因工程改造的细胞是CD8+T细胞或包含CD8+T细胞。在一些实施方式中,具有增加的持久性和/或减少的耗竭的此类基因工程改造的细胞可以在其给予的对象中表现出更好的效力或持续或更持久的活性。在一些实施方式中,给予后对象中基因工程改造的细胞(例如表达CAR的T细胞)的持久性比通过替代方法(例如涉及给予所述的参照细胞组合物的那些方法)所实现的持久性更大。在一些实施方式中,持久性增大至少或至少约1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或更多。

[0080] 在一些实施方式中,细胞给予对象后,可以对给予的细胞的持久性的程度或范围进行检测或定量。例如,在一些方面,使用定量PCR(qPCR)来评价在对象的血液或血清或器官或组织(例如疾病部位)中表达重组受体的细胞(例如,表达CAR的细胞)的量。在一些方面,持久性被定量为每微克DNA中编码受体,例如CAR的DNA或质粒的拷贝,或作为每微升样品例如,血液或血清的受体表达,例如CAR表达细胞的数量,或每微升样品的外周血单核细胞(PBMC)或白细胞或T细胞的总数。在一些实施方式中,也可以进行通常使用对受体具有特异性的抗体来检测表达受体的细胞的流式细胞试验。还可以使用基于细胞的测定来检测功能细胞的数量或百分比,如能够结合和/或中和和/或诱导针对疾病或病症或表达被受体识别的抗原的细胞的应答(例如,细胞毒性应答)。在这些实施方式的任意一项中,可以使用与

重组受体相关联的另一标志物(例如,表达CAR的细胞)的表达的水平或程度在对象中区分给予的细胞和内源性细胞。

[0081] 在一些实施方式中,所提供的嵌合受体可以在细胞中表达以产生基因工程改造的T细胞,其在给予对象时表现出一种或多种耗竭标志物的表达降低。在一些实施方式中,耗竭标志物可以是CD244、CD160或PD-1。

[0082] 在一些实施方式中,所提供的嵌合受体可以在细胞中表达以产生基因工程改造的T细胞,其在给予对象时表现出与参照细胞组合物相比改变的表面标志物表达概况。在一些实施方式中,该改变的表面标志物表达概况归因于一种或多种T细胞亚组的数量或百分比的改变,所述T细胞亚组对一种或多种选自下组的表面标志物为阳性、阴性或低:CD45RA、CD45RO、CD62L、CD69、CCR7、CD27、CD28、CD122、t-bet、IL-7R α 、CD95、IL-2R β 、CXCR3、LFA-1、和KLRG1。在一些实施方式中,来自给予的基因工程改造的细胞的CD62L和/或IL-7R α (CD127)阳性和/或t-bet阴性或较低的T细胞亚组增加。在一些实施方式中,来自给予的基因工程改造的细胞的CD45RA阳性和/或对CD45RO阴性或较低的T细胞亚组增加。在一些实施方式中,来自给予的基因工程改造的细胞的对CCR7、CD45RA、CD62L、CD27、CD28、IL-7R α (CD127)、CD95、IL-2R β 、CXCR3和LFA-1中的一种或多种为阳性,和/或对CD45RO阴性的T细胞亚组增加。在一些实施方式中,来自给予的基因工程改造的细胞的下述T细胞亚组增加:CD62L+以及a) CD45RA^{低/+}、CD45RO^{低/+}、CCR7+和CD27+中的任意一种和多种,和b) t-bet^低、IL-7R α + (CD127+)、CD95+、IL-2R β +、CXCR3+和LFA-1+中的任意一种或多种。在一些实施方式中,与给予参比组合物给对象所得的T细胞亚组的数量或百分比相比,T细胞亚组数量或百分比提高至少约2倍(例如提高至少约3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍中的任一者)。在一些实施方式中,在给药后1个月,2个月,3个月,4个月,5个月,6个月或12个月内观察到增加。

[0083] 在一些实施方式中,在给予基因工程改造的细胞后对象中增加的T细胞亚组(例如CD62L+T细胞亚组)为或包括记忆T细胞或其具体亚组(例如长寿记忆T细胞),或与记忆T细胞或其具体亚组(例如长寿记忆T细胞)具有相同的表型特征。在一些实施方式中,此类记忆T细胞是中心记忆T细胞(T_{CM})或T记忆干细胞(T_{SCM})细胞。在一些实施方式中,所述记忆T细胞是T_{SCM}细胞。与其他记忆T细胞亚组相比或与原初T细胞相比,T_{SCM}细胞可被描述为具有一种或多种表型差异或功能性特征,例如更少分化或更原初化(参见例如Ahlers和Belyakov (2010) Blood, 115:1678); Cieri等, (2015) Blood, 125:2865; Flynn等, (2014) Clinical & Translational Immunology, 3, e20; Gattinoni等, (2012) Nat. Med., 17:1290-1297; Gattinoni等, (2012) Nat. Reviews, 12:671; Li等, (2013) PLOS ONE, 8:e67401;以及公开的PCT申请号W02014/039044)。在一些情况中,T_{SCM}细胞被认为是唯一一种能产生效应T细胞和所有三个记忆T细胞亚组(T_{SCM}, T_{CM}, 和T_{EM})的记忆T细胞。在一些方面中,在所有记忆T细胞亚组中,T_{SCM}细胞具有针对抗原或稳态刺激的最高增殖应答和存活,以及缺乏关联抗原的最少消耗。在一些实施方式中,在过继转移后,与其他记忆T细胞相比,分化较少的T_{SCM}细胞可具有更大的扩增、长期活力以及靶细胞破坏,由此与用T_{CM}或T_{EM}细胞可能需要的细胞相比,可能以更少的转移细胞介导更有效治疗。

[0084] 在一些方面中,已报导或已知的T_{SCM}细胞功能或表型特性的例子包括,例如,此类细胞:a) 为CD45RO⁻、CCR7⁺、CD45RA⁺、CD62L⁺、CD27⁺、CD28⁺、IL-7R α ⁺、CD95⁺、IL-2R β ⁺、CXCR3⁺和

LFA-1⁺; b) 为CD45RA⁺、CCR7⁺、CD62L⁺和CD95⁺; c) 为CD45RA⁺、CD45RO⁺、CCR7⁺、CD62L⁺、CD27⁺、CD28⁺、CD95⁺和IL-2Rβ⁺; d) 为CD45RO⁺、CD45RA⁺、CCR7⁺、CD62L⁺、CD27⁺、CD28⁺、CD127⁺和CD95⁺; e) 为CD45RA⁺、CD44^{+/−}、CD62L⁺、CD127⁺、IL-2Rβ⁺、CD28⁺、CD43[−]、KLRG1[−]、Peforin[−]和粒酶B[−]; f) 高水平表达CCR7、CD62L、CD27和CD28, 中等水平表达CD95和IL-2Rβ, 低水平表达CD45RA且不表达CD45RO或KLRG-1; 或g) 高水平表达CD62L、低水平表达CD44和t-bet, 且为Sca-1⁺; 和/或具有中等IL-2产生能力, 低IFN γ 产生能力, 低细胞毒性和高自我更新能力。

[0085] 用于评估T细胞标志物的表达和/或水平的方法和技术是本领域已知的。用于检测这些标志物的试剂和抗体是本领域已知且易于获得的。用于检测这样的标志物的试验和方法包括但是不限于, 流式细胞术, 包括胞内流式细胞术, ELISA, ELISPOT, 流式微珠阵列或其它多重化的方法, Western印迹和其它基于免疫亲和性的方法。在一些实施方式中, 评价T细胞上标志物的表面表达包括在给予后检测对象中给予的表达抗原受体(例如, CAR)的细胞。检测对象中表达抗原受体(例如, CAR)的细胞和评价表面标志物的水平在本领域技术人员的能力范围之内。在一些实施方式中, 可以通过流式细胞术或其它基于免疫亲和性的方法来检测表达抗原受体(例如, CAR)的细胞(如获得自对象外周血的细胞)的这些细胞特有的标志物的表达, 然后可以针对另一种或多种T细胞表面标志物对这些细胞进行共同染色。在一些实施方式中, 还可产生表达抗原受体(例如CAR)的T细胞以表达截短EGFR(EGFRt)作为非免疫原性的选择表位(例如通过引入编码被T2A核糖体开关隔开的CAR和EGFRt的构建体, 以从相同构建体表达两种蛋白质), 其随后可被用作标志物以检测所述细胞(参见例如美国专利号8,802,374)。

[0086] 还提供了所述细胞的用途和方法, 如在治疗癌症中的过继治疗中的用途和方法。还提供了用于工程改造、制备、和产生该细胞的方法, 含有该细胞的组合物, 以及含有并用于使用、产生和给予该细胞的装置和试剂盒。还提供了用于产生工程改造的细胞的方法、化合物和组合物。提供了核酸, 例如构建体, 例如编码基因工程改造的抗原受体的病毒载体, 以及通过例如转导将这些核酸引入细胞的方法。还提供了包含工程改造的细胞的组合物, 以及用于向对象给予细胞和组合物, 如用于过继细胞治疗的方法、试剂盒和装置。在一些方面中, 细胞从对象中分离, 经工程改造, 并给予同一对象。在其他方面中, 它们从一个对象中分离, 经工程改造, 并给予另一个对象。

[0087] II. 重组受体, 例如嵌合受体

[0088] 提供了工程改造的或重组的受体和表达此类受体的细胞。在一些实施方式中, 工程改造的或重组受体包括嵌合受体, 包括含有配体结合结构域或其结合片段的那些, 例如功能性非TCR抗原受体, 例如嵌合抗原受体(CAR), 还包括T细胞受体(TCR)及其组分。在一些方面中, 嵌合受体例如CAR一般包括通过接头和/或跨膜结构域与一种或多种胞内信号传导组分连接的胞外抗原(或配体)结合结构域。在一些实施方式中, 此类分子通常通过天然抗原受体与通过介导TRAF信号传导(例如TRAF-6介导的信号传导)的共刺激受体的信号组合来模拟或近似信号。

[0089] 在具体的实施方式中, 重组受体如嵌合受体含有细胞内信号传导结构域, 其包括 i) TRAF诱导结构域, 其能够诱导参与信号传导的TRAF介质的活化或细胞定位和/或能够诱导TRAF介导的信号传导; ii) 跨膜结构域, 和任选地, (ii) 活化性胞质信号传导结构域, 例如能够在T细胞中诱导初级活化信号的活化性胞质结构域, 例如T细胞受体(TCR)组分的胞质

信号传导结构域(例如CD3- ζ (CD3 ζ) 链的 ζ 链的胞质信号传导结构域或其功能变体或信号传导部分)和/或包含基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)。在一些实施方式中,TRAF诱导结构域能够与一分子结合,该分子含有TRAF诱导结构域或招募含有TRAF诱导结构域分子。

[0090] 在一些实施方式中,TRAF诱导结构域是能够诱导参与信号传导和/或能够诱导TRAF-6介导的信号传导的TRAF-6介质的活化或细胞定位的TRAF-6诱导结构域,例如能够与含有TRAF-6介导结构域分子结合和/或招募含有TRAF-6诱导结构域分子。在一些实施方式中,重组受体中的TRAF-6诱导结构域例如嵌合受体能够直接或间接活化一种或多种下游信号传导介质。

[0091] 在一些实施方式中,嵌合受体含有特异性结合至配体(例如抗原)抗原的细胞外配体结合结构域。在一些实施方式中,嵌合受体是含有特异性结合至抗原的细胞外抗原识别结构域的CAR。在一些实施方式中,配体(例如抗原)是在细胞表面表达的蛋白质。在一些实施方式中,CAR是TCR-样CAR并且抗原是经处理的肽抗原,如胞内蛋白质的肽抗原,其像TCR那样在主要组织相容性复合物(MHC)分子中在细胞表面上识别。

[0092] 示例性的重组受体,包括CAR和重组TCR,以及用于工程改造和将受体导入细胞中的方法,包括例如,在国际专利申请公开号W0200014257、W02013126726、W02012/129514、W02014031687、W02013/166321、W02013/071154、W02013/123061,美国专利申请公开号US2002131960、US2013287748、US20130149337,美国专利号6,451,995、7,446,190、8,252,592、8,339,645、8,398,282、7,446,179、6,410,319、7,070,995、7,265,209、7,354,762、7,446,191、8,324,353、和8,479,118,和欧洲专利申请号EP2537416中所述的那些,和/或Sadelaian等,Cancer Discov.2013年4月;3(4):388-398;Davila等,(2013) PLoS ONE 8(4):e61338;Turtle等,Curr.Opin.Immunol.,2012年10月;24(5):633-39;Wu等,Cancer,2012年3月18(2):160-75中所述的那些。在一些实施方式中,基因工程改造的抗原受体包括美国专利号7,446,190中所述的CAR,和国际专利申请公开号W0/2014055668A1中所述的那些。在一些实施方式中,用于构建和引入或转移入免疫细胞的类似方法可用于所提供的嵌合受体。

[0093] A. 配体结合域

[0094] 在一些实施方式中,重组受体,例如嵌合受体(例如,CAR)包括与抗原(或配体)结合(例如特异性结合)的配体结合结构域。由嵌合受体靶向的抗原包括在待通过过继细胞治疗靶向的疾病、病症、或细胞类型中表达的那些。疾病和病症包括增殖性、肿瘤性和恶性疾病和病症,包括癌症和肿瘤,包括血液癌症,免疫系统癌症,如淋巴瘤、白血病和/或骨髓瘤,如B、T和骨髓性白血病、淋巴瘤、和多发性骨髓瘤。

[0095] 在一些实施方式中,抗原(或配体)是多肽。在一些实施方式中,其是碳水化合物或其他分子。在一些实施方式中,与正常或非靶向的细胞或组织相比,抗原(或配体)在疾病或病症的细胞,例如,肿瘤或致病性细胞上选择性表达或过表达。在其他实施方式中,抗原在正常细胞上表达和/或在工程改造的细胞上表达。

[0096] 在一些实施方式中,抗原(或配体)是肿瘤抗原或癌症标志物。在一些实施方式中,抗原(或配体)是或包括孤儿酪氨酸激酶受体ROR1,B细胞成熟抗原(BCMA),tEGFR,Her2,L1-CAM,CD19,CD20,CD22,间皮素,CEA,乙型肝炎表面抗原,抗叶酸受体,CD23,CD24,CD30,CD33,CD38,CD44,EGFR,EGP-2,EGP-4,EPHa2,ErbB2、3或4,erbB二聚体,EGFR vIII,FBP,

FCRL5, FCRH5, 胎儿乙酰胆碱受体, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R- α , IL-13R- α 2, kdr, κ 轻链, Lewis Y, L1-细胞粘附分子 (L1-CAM), 黑素瘤相关抗原 (MAGE) -A1, MAGE-A3, MAGE-A6, 黑素瘤优先表达抗原 (PRAME), 存活素, EGP2, EGP40, TAG72, B7-H6, IL-13受体 α 2 (IL-13Ra2), CA9, GD3, HMW-MAA, CD171, G250/CAIX, HLA-AI MAGE A1, HLA-A2NY-ESO-1, PSCA, 叶酸受体- α , CD44v6, CD44v7/8, avb6整联蛋白, 8H9, NCAM, VEGF受体, 5T4, 胎儿AchR, NKG2D配体, CD44v6, 双重抗原, 和与通用标签关联的抗原, 癌症-睾丸抗原, 间皮素, MUC1, MUC16, PSCA, NKG2D配体, NY-ESO-1, MART-1, gp100, 癌胚抗原, ROR1, TAG72, VEGF-R2, 癌胚抗原 (CEA), 前列腺特异性抗原, PSMA, Her2/neu, 雌激素受体, 孕酮受体, 肝配蛋白B2, CD123, CS-1, c-Met, GD-2, O-乙酰化GD2 (OGD2), CE7, Wilms肿瘤1 (WT-1) 和细胞周期蛋白, 细胞周期蛋白A2, CCL-1, CD138和/或生物素化的分子, 和/或和病原体特异性抗原, 如由HIV, HCV, HBV或其他病原体表达的分子。

[0097] 在一些实施方式中, 抗原是病原体特异性抗原。在一些实施方式中, 抗原是病毒抗原 (例如来自HIV, HCV, HBV等的病毒抗原), 细菌抗原和/或寄生虫抗原。

[0098] I. 抗原受体

[0099] 在一些实施方式中, 嵌合受体包括CAR。在一些实施方式中, 构建CAR以使其具有针对特定抗原 (或标志物或配体) 的特异性, 如在待通过过继治疗靶向的特定细胞类型中表达的抗原, 例如癌症标志物, 和/或意图用以诱导减弱应答的抗原, 如在正常或非疾病细胞类型上表达的抗原。因此, CAR一般在其胞外部分中包含一种或多种抗原结合分子, 例如一种或多种抗原-结合片段、结构域或部分, 或一种或多种抗体可变结构域, 和/或抗体分子。在一些实施方式中, 所述CAR包括抗体分子的一个或多个抗原-结合部分, 例如源自单克隆抗体 (mAb) 的可变重 (VH) 链和可变轻 (VL) 链的单链抗体片段 (scFv)。

[0100] 本文术语“抗体”以最广义使用并且包括多克隆和单克隆抗体, 包括完整抗体和功能性 (抗原-结合) 抗体片段, 包括片段抗原结合 (Fab) 片段、F(ab')₂片段、Fab'片段、Fv片段、重组IgG (rIgG) 片段、能够特异性结合抗原的可变重链 (VH) 区、单链抗体片段, 包括单链可变片段 (scFv), 和单结构域抗体 (例如, sdAb、sdFv、纳米抗体) 片段。该术语包括免疫球蛋白的基因工程改造和/或其他修饰的形式, 如胞内抗体、肽抗体、嵌合抗体、全人抗体、人源化抗体, 和异源偶联抗体、多特异性例如, 双特异性抗体、双抗体、三抗体, 和四抗体、串联二-scFv、串联三-scFv。除非另外说明, 术语“抗体”应理解为包括其功能性抗体片段。该术语也包括完整或全长抗体, 包括任意类型或亚型的抗体, 包括IgG及其亚型, IgM、IgE、IgA, 和IgD。

[0101] 在一些实施方式中, 抗原结合蛋白、抗体及其抗原结合片段特异性识别全长抗体的抗原。在一些实施方式中, 抗体的重链和轻链可以是全长的或者可以是抗原结合部分 (Fab、F(ab')₂、Fv或单链Fv片段 (scFv))。在其他实施方式中, 抗体重链恒定区选自, 例如, IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD、和IgE, 尤其选自, 例如, IgG1、IgG2、IgG3、和IgG4, 更具体地, IgG1 (例如, 人IgG1)。在另一个实施方式中, 抗体轻链恒定区选自, 例如, κ 或 λ , 尤其是 κ 。

[0102] 提供的抗体包括抗体片段。“抗体片段”指除完整抗体以外的分子, 所述分子包含完整抗体的部分, 该部分结合与所述完整抗体结合的抗原。抗体片段的示例包括但不限于, Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂; 双抗体; 线性抗体; 可变重链 (VH) 区、单链抗体分子 (例如

scFv) 和单结构域V_H单抗体;和由抗体片段形成的多特异性抗体。在特定实施方式中,抗体是包含可变重链区和/或可变轻链区的单链抗体片段,如scFv。

[0103] 术语“可变区”或“可变结构域”指涉及抗体与抗原结合的抗体重链或轻链结构域。原始抗体的重链和轻链(分别为V_H和V_L)的可变结构域一般具有相似结构,其中各结构域包含四个保守框架区(FR)和三个CDR。(参见,例如,Kindt等.《免疫学》(Kuby Immunology),第6版,WHF公司,第91页(2007))。单个V_H或V_L结构域可足以赋予抗原结合特异性。此外,可使用来自结合特定抗原的抗体的V_H或V_L结构域分离结合该抗原的抗体以分别筛选互补V_L或V_H结构域文库。参见例如,Portolano等,J.Immunol.150:880-887(1993);Clarkson等,Nature 352:624-628(1991)。

[0104] 单结构域抗体是包含抗体的全部或部分重链可变结构域或者全部或部分轻链可变结构域的抗体片段。在某些实施方式中,单结构域抗体是人单结构域抗体。在一些实施方式中,所述CAR包含特异性结合抗原,如待靶向的细胞或疾病,例如肿瘤细胞或癌细胞的细胞表面抗原或癌症标记物的抗体重链结构域,例如本文所述的或本领域已知的任何靶抗原。

[0105] 可通过各种技术制备抗体片段,包括但不限于对完整抗体的蛋白酶水解消化以及通过重组宿主细胞产生。在一些实施方式中,抗体是重组产生的片段,如包含非天然产生的排列的片段,如具有两个或更多个通过合成接头,例如肽接头连接的抗体区域或链,和/或可能不通过对天然产生的完整抗体的酶促水解消化产生的那些。在一些实施方式中,抗体片段是scFv。

[0106] “人源化”抗体是其中全部或基本全部CDR氨基酸残基衍生自非人CDR并且全部或基本全部FR氨基酸参加衍生自人FR的抗体。人源化的抗体可任选地包含源自人抗体的抗体恒定区的至少一部分。非人抗体的“人源化形式”是指经过人源化,一般为了降低针对人的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和性的非人抗体的变体。在一些实施方式中,人源化抗体中的一些FR残基被来自非人抗体(例如,CDR残基所衍生自的抗体)的相应残基取代,例如,为了恢复或改善抗体特异性或亲和性。

[0107] 在一些实施方式中,CAR含有特异性识别在细胞表面上表达的抗原,如完整抗原的抗体或抗原结合片段(例如,scFv)。

[0108] 在一些实施方式中,CAR含有TCR-状抗体,如特异性识别在细胞表面(如MHC-肽复合物)上呈递的胞内抗原,如肿瘤相关抗原的抗体或抗原结合片段(例如,scFv)。在一些实施方式中,可以重组受体,如抗原受体的部分的形式在细胞上表达识别MHC-肽复合物的抗体或其抗原结合部分。抗原受体包括功能性非-TCR抗原受体,如嵌合抗原受体(CAR)。一般而言,含有显示针对肽-MHC复合物的TCR-状特异性的抗体或抗原结合片段的CAR也可被称为TCR-状CAR。

[0109] “主要组织相容性复合物”(MHC)是指蛋白质,一般是糖蛋白,其含有多晶型肽结合位点或结合沟,其在一些情况中可与多肽的肽抗原,包括由细胞器加工的肽抗原复合。在一些情况中,MHC分子可在细胞表面上展示或表达,包括与肽的复合物,即,MHC-肽复合物,用于在可被T细胞上的抗原受体,如TCR或TCR-状抗体识别的构象中呈递抗原。一般而言,MHC I类分子是具有跨膜 α 链,在一些情况中具有3个 α 结构域,和非共价结合的 β 2微球蛋白的异二聚体。一般而言,MHC II类分子包含2个跨膜糖蛋白 α 和 β ,两者一般都跨膜。MHC分子可包

含含有用于结合肽的一个或多个抗原结合位点和被合适抗原受体识别所需的序列的MHC的有效部分。在一些实施方式中,MHC I类分子递送来源于细胞溶质的肽至细胞表面,在那里MHC-肽复合物被T细胞,如一般是CD8⁺T细胞,但在一些情况中是CD4⁺T细胞识别。在一些实施方式中,MHC II类分子将来源于囊泡系统的肽递送至细胞表面,在那里它们一般被CD4⁺T细胞识别。一般而言,MHC分子由一组连接的基因座编码,其在小鼠中被统称为H-2,并且在人中被统称为人白细胞抗原(HLA)。因此,一般而言,人MHC也被称为人白细胞抗原(HLA)。

[0110] 术语“MHC-肽复合物”或“肽-MHC复合物”或其变体是指肽抗原和MHC分子的结合或复合物,如,一般通过MHC分子的结合沟或裂中肽的非共价相互作用。在一些实施方式中,MHC-肽复合物呈递或展示在细胞表面上。在一些实施方式中,MHC-肽复合物可被抗原受体,如TCR、TCR-状CAR或其抗原结合部分特异性识别。

[0111] 在一些实施方式中,多肽的肽例如肽抗原或表位可与MHC分子关联,如用于被抗原受体识别。一般而言,肽衍生自或基于较长生物分子(如多肽或蛋白质)的片段。在一些实施方式中,肽一般长度为约8至约24个氨基酸。在一些实施方式中,肽具有约9至22个氨基酸的长度,用于在MHC II类复合物中的识别。在一些实施方式中,肽具有约8至13个氨基酸的长度,用于在MHC I类复合物中的识别。在一些实施方式中,在MHC分子中的肽,如MHC-肽复合物识别之后,抗原受体,如TCR或TCR-状CAR产生或触发针对T细胞的活化信号,其诱导T细胞应答,如T细胞增殖、细胞因子产生、细胞毒性T细胞应答或其他应答。

[0112] 在一些实施方式中,可通过用有效量的含有特异性MHC-肽复合物的免疫原免疫宿主来产生特异性结合至MHC-肽复合物的抗体或其抗原结合部分。在一些情况中,MHC-肽复合物的肽是能够结合至MHC的抗原如肿瘤抗原,例如普遍肿瘤抗原、骨髓瘤抗原或下述的其他抗原的表位。在一些实施方式中,然后向宿主给予有效量的免疫原来引发免疫应答,其中免疫原保留其三维形式持续一段充足的时间以引发针对MHC分子的结合沟中肽的三维呈递的免疫应答。然后对从宿主收集的血清进行测试以确定是否产生识别MHC分子的结合沟中的肽的三维呈递的所需抗体。在一些实施方式中,可评价产生的抗体以确认,该抗体可区分MHC-肽复合物与仅MHC分子、仅感兴趣肽、和MHC与不相关肽的复合物。然后可分离所需的抗体。

[0113] 在一些实施方式中,可通过采用抗体文库展示方法,如噬菌体抗体文库来产生特异性结合至MHC-肽复合物的抗体或其抗原结合部分。在一些实施方式中,可生成突变Fab、scFv或其他抗体形式的噬菌体展示文库,其中文库的成员在一种或多种CDR的一个或多个残基处突变。本领域已知这类方法的示例(参见,例如,美国公开申请号US20020150914, US2014/0294841;和Cohen CJ.等,(2003) J Mol. Recogn. 16:324-332)。

[0114] TCR

[0115] 在一些实施方式中,重组抗原受体包括:重组T细胞受体(TCR)和/或从天然存在的T细胞克隆的TCR。

[0116] 在一些实施方式中,T细胞受体(TCR)含有可变 α 和 β 链(也分别称为TCR α 和TCR β)或可变 γ 和 δ 链(也分别称为TCR γ 和TCR δ)或其功能片段,从而该分子能够特异性结合至与MHC受体结合的抗原肽。在一些实施方式中,TCR是 $\alpha\beta$ 形式。一般而言,以 $\alpha\beta$ 和 $\gamma\delta$ 形式存在的TCR一般在结构上相似,但是表达它们的T细胞具有不同的解剖学位置或功能。TCR可存在于细胞表面上或以可溶形式存在。一般而言,TCR存在于T细胞(或T淋巴细胞)的表面上,其中

其一般负责识别与主要组织相容性复合物 (MHC) 分子结合的抗原。在一些实施方式中, TCR 也可含有恒定结构域、跨膜结构域和/或短胞质尾 (参见例如, Janeway 等, 《免疫学: 健康和疾病中的免疫系统》(Immunobiology: The Immune System in Health and Disease), 第3版, 当代生物学出版社 (Current Biology Publications), p.4:33, 1997)。例如, 在一些实施方式中, TCR 的各链可具有一个 N-末端免疫球蛋白可变结构域, 一个免疫球蛋白恒定结构域, 跨膜结构域, 和在 C-末端处的短胞质尾。在一些实施方式中, TCR 与参与介导信号传导的 CD3 复合物的非变异蛋白质结合。

[0117] 除非另外说明, 术语“TCR”应理解为包括其功能性 TCR 片段。该术语也包括完整或全长 TCR, 包括 $\alpha\beta$ 形式或 $\gamma\delta$ 形式的 TCR。因此, 出于本文的目的, 引用 TCR 包括任何 TCR 或功能性片段, 如结合至在 MHC 分子中结合的特异性抗原性肽, 即 MHC-肽复合物的 TCR 的抗原结合部分。可互换使用的 TCR 的“抗原结合部分”或“抗原结合片段”是指含有 TCR 的结构域的部分但结合全长 TCR 结合的抗原 (例如, MHC-肽复合物) 的分子。在一些情况中, 抗原结合部分含有 TCR 的可变结构域, 如 TCR 的可变 α 链和可变 β 链, 其足以形成用于结合至特异性 MHC-肽复合物的结合位点, 如一般而言各链含有 3 个互补决定区的情况。

[0118] 在一些实施方式中, TCR 链的可变结构域结合形成环, 或与免疫球蛋白类似的互补决定区 (CDR), 其通过形成 TCR 分子的结合位点赋予抗原识别并确定肽特异性。一般而言, 像免疫球蛋白那样, CDR 由构架区 (FR) 分开 (参见, 例如, Jores 等, Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 87:9138, 1990; Chothia 等, EMBO J. 7:3745, 1988; 还参见 Lefranc 等, Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003)。在一些实施方式中, CDR3 是负责识别经加工的抗原的主要 CDR, 不过也已经显示 α 链的 CDR1 与抗原性肽的 N-末端部分相互作用, 而 β 链的 CDR1 与肽的 C-末端部分相互作用。CDR2 被认为识别 MHC 分子。在一些实施方式中, β -链的可变区可含有其他超变 (HV4) 区。

[0119] 在一些实施方式中, TCR 链含有恒定结构域。例如, 像免疫球蛋白那样, TCR 链 (例如, α -链, β -链) 的胞外部分可含有 2 个免疫球蛋白结构域, N-末端处的可变结构域 (例如, V_α 或 V_β ; 一般是氨基酸 1 至 116, 基于 Kabat 编号, Kabat 等, 《免疫感兴趣的蛋白质序列》(Sequences of Proteins of Immunological Interest), 美国国立卫生研究院公共健康服务部 (US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health), 1991, 第 5 版), 和一个与细胞膜相邻的恒定区 (例如, α -链恒定结构域或 C_α , 一般是氨基酸 117 至 259, 基于 Kabat, β -链恒定结构域或 C_β , 一般是氨基酸 117 至 295, 基于 Kabat)。例如, 在一些情况中, 由两条链形成的 TCR 的胞外部分含有两个接近膜的恒定结构域, 和两个远离膜的含有 CDR 的可变结构域。TCR 结构域的恒定结构域含有短连接序列, 其中半胱氨酸残基形成二硫键, 组成两条链间的连接。在一些实施方式中, TCR 在 α 和 β 链各自可具有额外的半胱氨酸残基, 使得 TCR 在恒定结构域中含有两个二硫键。

[0120] 在一些实施方式中, TCR 链可含有跨膜结构域。在一些实施方式中, 跨膜结构域带正电。在一些情况中, TCR 链含有胞质尾。在一些情况中, 该结构允许 TCR 与其他分子如 CD3 结合。例如, 含有具有跨膜区的恒定结构域的 TCR 可锚定细胞膜中的蛋白质并与 CD3 信号传导器或复合物的非变异亚基结合。

[0121] 一般而言, CD3 是多蛋白质复合物, 其可具有哺乳动物中的 3 种不同链 (γ 、 δ 、和 ϵ) 和 ζ -链。例如, 在哺乳动物中, 复合物可含有 CD3 γ 链、CD3 δ 链、两条 CD3 ϵ 链、和 CD3 ζ 链的同二

聚体。CD3 γ 、CD3 δ 和CD3 ϵ 链是免疫球蛋白超家族的高度相关细胞表面蛋白,其包含单个免疫球蛋白结构域。CD3 γ 、CD3 δ 和CD3 ϵ 链的跨膜区带负电,所述特征使这些链结合带正电的T细胞受体链。CD3 γ 、CD3 δ 和CD3 ϵ 链的胞内尾各自含有称为基于免疫受体酪氨酸活化基序或ITAM的单个保守基序,而各CD3 ζ 链具有三个。一般而言,ITAM涉及TCR复合物的信号传导能力。这些辅助分子具有带负电的跨膜区并在将信号从TCR传播到细胞中起作用。CD3-和 ζ -链与TCR一起形成称为T细胞受体复合物的物质。

[0122] 在一些实施方式中,TCR可以是2条链 α 和 β (或任选的 γ 和 δ)的异二聚体,或者其可以是单链TCR构建体。在一些实施方式中,TCR是含有,如通过一个或多个二硫键连接的2条单独链(α 和 β 链或 γ 和 δ 链)。

[0123] 在一些实施方式中,针对靶抗原(例如,癌症抗原)的TCR经鉴定并导入细胞中。在一些实施方式中,可从多种来源获得编码TCR的核酸,如通过对公开可得的TCR DNA序列的聚合酶链反应(PCR)扩增。在一些实施方式中,从生物来源,如来自细胞如来自T细胞(例如,细胞毒性T细胞)、T-细胞杂交瘤或其他公众可得的来源获得TCR。在一些实施方式中,可从体内分离的细胞获得T-细胞。在一些实施方式中,可从患者分离高亲和性T细胞克隆,并分离TCR。在一些实施方式中,T-细胞可以是培养的T-细胞杂交瘤或克隆。在一些实施方式中,针对目标抗原的TCR克隆已在用人免疫系统基因(例如,人白细胞抗原系统,或HLA)工程改造的转基因小鼠中产生。参见例如,肿瘤抗原(参见例如,Parkhurst等,(2009) Clin Cancer Res.15:169-180和Cohen等.(2005) J Immunol.175:5799-5808)。在一些实施方式中,使用噬菌体展示分离针对目标抗原的TCR(参见例如,Varela-Rohena等,(2008) Nat Med.14:1390-1395和Li (2005) Nat Biotechnol.23:349-354)。在一些实施方式中,TCR或其抗原结合部分可从已知的TCR序列中合成生成。

[0124] 在一些实施方式中,获得T细胞克隆后,将TCR α 和 β 链分离并克隆入基因表达载体。在一些实施方式中,TCR α 和 β 基因通过小核糖核酸病毒2A核糖体跳跃肽(skip peptide)连接,使得两条链共表达。在一些实施方式中,TCR的遗传转移(genetic transfer)通过逆转录病毒或慢病毒载体,或通过转座子完成(参见例如,Baum等,(2006) Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy.18:1748-1757;和Hackett等,(2010) Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy.18:674-683)。

[0125] B.细胞内信号传导结构域

[0126] 在一些实施方式中,配体结合结构域如抗原特异性结合或识别组分与一个或多个跨膜和胞内信号传导结构域连接。因此,在一些实施方式中,配体结合结构域如抗原识别结构域与一个或多个细胞信号传导模块连接。配体结合结构域例如抗原识别结构域通常与包含一个或多个细胞内信号传导组分的细胞内结构域连接,例如能够诱导TRAF-6信号传导和/或TRAF-6的结合或招募(即是或含有TRAF-6诱导结构域)的信号传导组分和能够或可以通过抗原受体复合物如TCR复合物和/或经由其他细胞表面受体的信号而模拟活化的活化性信号传导结构域。在一些情况下,TRAF-6诱导结构域可以是来源于共刺激分子的胞质信号传导结构域,所述共刺激分子含有TRAF-6结合共有序列(例如,SEQ ID NO:26所示)和/或能够在抗原(例如配体)结合时或之后招募和/或活化TRAF-6。

[0127] 某些方面,T细胞活化被认为通过两类胞质信号传导序列介导:引发通过TCR的抗

原依赖性主活化的那些(主胞质信号传导序列)和以非抗原依赖性方式作用提供次或共刺激信号的那些(次胞质信号传导序列)。在一些实施方式中,嵌合受体(例如,CAR)包括一种或两种此类信号传导组分中,其中至少部分次级信号通过TRAF-6介导的途径介导,这通过在嵌合受体(例如CAR)中包含能够结合和/或招募TRAF-6和其他相关信号分子的TRAF-6诱导结构域来实现。在一些实施方式中,还可以包括其他共刺激信号作为嵌合受体的信号传导组分的一部分,其在一些情况下可以包括诱导来自不同信号传导途径(例如PI3K/Akt信号传导途径)的信号传导的共刺激信号。

[0128] 在一些实施方式中,胞内信号传导结构域的活化性信号传导结构域是模拟或近似通过天然抗原受体的信号、通过此类受体联合共刺激受体的信号,和/或仅通过共刺激受体的信号的那些。在一些实施方式中,受体包括TCR复合物的胞内组分,例如介导T-细胞活化和细胞毒性的TCR CD3链,例如,CD3 ζ 链。在一些实施方式中,活化性信号传导结构域是或包括CD3跨膜结构域,CD3胞内信号传导结构域和/或其他CD跨膜结构域。在一些实施方式中,所述受体,例如,CAR,还包括一种或多种其它分子(例如Fc受体 γ 、CD8、CD4、CD25或CD16)的部分。例如,在一些实施方式中,所述CAR包括CD3- ζ (CD3- ζ)或Fc受体 γ 和CD8、CD4、CD25或CD16之间的嵌合分子。

[0129] 在一些实施方式中,在嵌合受体(例如CAR)的连接之后,该嵌合受体(例如CAR)的胞质结构域或胞内信号传导结构域活化免疫细胞的正常效应功能或应答的至少一种,例如,工程改造的T细胞以表达该嵌合受体(例如CAR)。例如,在一些情况中,CAR诱导T细胞诸如溶细胞活性或辅助性T细胞活性等功能,如分泌细胞因子或其它因子。在一些实施方式中,所述一种或多种胞内信号传导结构域包括T细胞受体(TCR)的胞质序列,且在一些方面中,在天然情况下与此类受体一起作用以在抗原受体衔接之后起始信号传导的共同受体的那些,和/或此类分子的任何衍生物或变体,和/或具有相同功能性能的任何合成序列。

[0130] 在某些实施方式中,CAR包括初级胞质信号传导序列,其调控TCR复合物的初级活化。以刺激方式作用的初级胞质信号传导序列可包含信号传导基序,这些基序又称基于免疫受体酪氨酸的活化基序或ITAM。ITAM的实例包括初级胞质信号传导序列,其包括源自如下的那些:TCR ζ ,FcR γ ,FcR β ,CD3 γ ,CD3 δ ,CD3 ϵ ,CD8、CD22、CD79a、CD79b,和CD66d。在一些实施方式中,CAR中的胞质信号传导分子包含胞质信号传导结构域,其部分,或源自CD3 ζ 的序列。

[0131] 在一些实施方式中,所述嵌合受体(例如CAR)的胞内结构域包含人CD3 ζ 活化性信号传导结构域或其功能变体,例如人CD3 ζ (登录号:P20963.2)同种型3的112AA胞质结构域,或CD3 ζ 活化性信号传导结构域,其描述于美国专利号:7,446,190或美国专利号8,911,993。例如,在一些实施方式中,胞内结构域包含活化信号传导结构域,其包含SEQ ID NO:21-23中任一个所示的氨基酸序列(由SEQ ID NO:41中的序列编码)或与SEQ ID NO:21-23中的任一表现出至少85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或更多的序列相同性的氨基酸序列。

[0132] 就天然TCR而言,完全活化一般不仅需要通过TCR的信号传导,而且还需要共刺激信号。因此,在一些实施方式中,为了促进完全活化,嵌合受体如CAR中还包括用于产生次级或共刺激信号的TRAF-6诱导信号传导结构域。在其他实施方式中,含有活化信号传导结构域的嵌合受体如CAR不包含用于产生共刺激信号的组分,在这种情况下,TRAF-6诱导信号传

导结构域可以在于相同细胞中表达的第二嵌合受体上如在其他CAR上提供。

[0133] 在一些实施方式中,嵌合受体如CAR包含源自共刺激性TRAF-6诱导信号传导分子的信号传导结构域或其功能部分或变体。在一些实施方式中,TRAF-6诱导信号传导分子可以是TNF受体超家族的成员或IL-1/To11超家族的成员。在一些实施方式中,TRAF-6诱导信号传导分子可衍生自或包含CD40,RANK,IL1R-1,BAFF-R,BCMA,TACI,OX40,Troy,XEDAR或Fn14的胞质序列的全部或部分。在一些实施方式中,TRAF-6诱导信号传导分子是或包含源自CD40,RANK或IL1R-1的胞质结构域。在一些实施方式中,TRAF-6诱导信号传导分子能够诱导TRAF-6介导的信号传导,但不含有CD40或OX40的完整胞质序列,例如不含有能够通过其他TRAF诱导信号传导的胞质序列,和/或不含有能够通过TRAF-1,TRAF-2,TRAF-3或TRAF-5诱导信号传导的一个或多个结构域。在一些实施方式中,TRAF-6诱导结构域不是或不包含CD40或OX40的胞质结构域。在一些实施方式中,TRAF-6诱导结构域是或包含衍生自CD40的胞质结构域。在一些实施方式中,共刺激性TRAF-6诱导信号传导分子不是促凋亡性的。

[0134] 在任何此类实施方式中的一些中,TRAF-6诱导信号传导结构域是人的或衍生自人蛋白质的胞质序列,例如人CD40,RANK,IL1R-1,BAFF-R,BCMA,TACI,OX40,Troy,XEDAR或Fn14。在一些实施方式中,TRAF-6诱导信号传导结构域来源于人CD40胞质信号传导结构域。

[0135] 在一些实施方式中,示例性嵌合受体的配体结合结构域例如CAR,配体结合结构域不是来源于CD40,RANK,IL1R-1,BAFF-R,BCMA,TACI,OX40,Troy,XEDAR或Fn14。

[0136] 在一些实施方式中,重组受体(例如CAR)的细胞内结构域包含人CD40的胞质信号传导结构域或其功能变体或部分。例如,细胞内结构域可包含胞质信号传导结构域,其包含示于SEQ ID NO:12(由SEQ ID NO:34所示序列编码)的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:12显示至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列相同性的氨基酸序列。

[0137] 在一些实施方式中,重组受体(例如CAR)的细胞内结构域包含人RANK的胞质信号传导结构域或其功能变体或部分。例如,细胞内信号传导结构域可包含胞质信号传导结构域,其包含示于SEQ ID NO:14的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:14显示至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列相同性的氨基酸序列。

[0138] 在一些实施方式中,重组受体(例如CAR)的细胞内结构域包含人IL1R-1的胞质信号传导结构域或其功能变体或部分。例如,细胞内信号传导结构域可包含胞质信号传导结构域,其包含示于SEQ ID NO:16的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:16显示至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列相同性的氨基酸序列。

[0139] 在一些实施方式中,嵌合受体(如CAR)还含有辅助信号传导结构域和/或与包含辅助信号传导结构域的第二嵌合受体协作形成复合物。在一些实施方式中,辅助信号传导结构域的存在可以增加TRAF-6诱导结构域的TRAF-6诱导活性,例如通过促进一种或多种分子向包含用于促进TRAF-6介导信号传导的TRAF-6结合结构域的复合物招募来实现。例如,在一些情况下,当配体与受体结合时,IL1R-1与IL1R辅助蛋白(IL-1RAcP)复合以促进IL-1受体相关蛋白(IRAK)向复合物的招募,包含用于结合TRAF-6的TRAF-6结合结构域和来自复合物的介导的信号传导。

[0140] 在一些实施方式中,含有是或包含IL1R-1的胞质信号传导结构域或其功能变体或部分的TRAF-6诱导结构域的嵌合受体还可以包含(例如串联的)辅助信号传导结构域。在一些情况下,可以如本文所述提供第一和第二嵌合受体,其中第一嵌合受体含有TRAF-6诱导结构域,其是或包含IL1R-1的胞质信号传导结构域或其功能变体或部分,和含有辅助信号传导结构域的第二嵌合受体。在一些情况下,第一和第二嵌合受体在相同的细胞中表达,其导致产生多聚体复合物,所述复合体在用抗原刺激时或模拟或近似于通过天然抗原受体的信号刺激时能够诱导TRAF-6介导的信号传导。在一些实施方式中,辅助信号传导结构域是嵌合受体的细胞内结构域的组分,例如,CAR。在一些实施方式中,辅助信号传导结构域是或包含人IL1R-1AcP的胞质信号传导结构域或其功能变体或部分。例如,细胞内结构域可包含胞质信号传导结构域,其包含示于SEQ ID NO:18的氨基酸序列,或与SEQ IDNO:18显示至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列相同性的氨基酸序列。

[0141] 在一些实施方式中,相同的CAR包括含有活化和共刺激组分的细胞内信号传导结构域。在一些实施方式中,所述活化结构域(例如CD3 ζ)包括在一个CAR之内,而共刺激部分(例如CD40,RANK,IL1R-1或IL1R-1AcP)由识别另一抗原的另一CAR提供。在一些实施方式中,CAR包括活化或刺激CAR和共刺激CAR,它们表达在同一细胞上(参见W02014/055668)。

[0142] 在一些实施方式中,嵌合受体(例如CAR)还包括另一其他共刺激分子的胞质信号传导结构域。在一些实施方式中,胞质信号传导结构域是或来源于CD28、4-1BB、OX40、DAP10、ICOS或CD27的胞质信号传导结构域。在一些实施方式中,其他共刺激分子能够介导PI3K/Akt信号传导。例如,在一些实施方式中,其他胞质共刺激结构域是或来源于CD28、4-1BB或ICOS。

[0143] 在一些实施方式中,嵌合受体(如CAR)包含由共刺激分子的胞质结构域衍生的TRAF-6-诱导结构域,所述共刺激分子介导与CD3(例如CD3- ζ)活化信号传导结构域连接的TRAF-6信号传导。在一些实施方式中,TRAF-6诱导信号传导分子来源于CD40,RANK,IL1R-1和/或IL1R-1AcP的胞质信号传导结构域。在一些实施方式中,TRAF-6诱导信号传导分子不是促凋亡性的。在某些实施方式中,嵌合受体(如CAR)还包含其他共刺激信号传导结构域,例如源自CD28、4-1BB、OX40、DAP10、ICOS或CD27的胞质信号传导结构域。

[0144] 在一些实施方式中,嵌合受体(例如CAR)包含胞质部分中的一个或多个,例如两个或更多个共同刺激结构域和活化结构域,例如,初级活化结构域。示例性的CAR包括源自下述的细胞内组分:CD3- ζ ,TRAF-6诱导信号传导分子(例如源自CD40,RANK,IL1R-1和/或IL1R-1AcP的胞质信号传导结构域)和任选CD28,ICOS,或者4-1BB。在一些实施方式中,TRAF-6诱导信号传导分子不是促凋亡性的。

[0145] 在一些实施方式中,所述嵌合受体(例如CAR)的胞内结构域还包含人CD28的胞质信号传导结构域或其功能变体或部分,例如在原始CD28蛋白的位置186-187处具有LL-GG取代的结构域。例如,细胞内信号传导结构域还可包含胞质信号传导结构域,其包含示于SEQ ID NO:8或9的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:8或9显示至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列相同性的氨基酸序列。

[0146] 在一些实施方式中,细胞内结构域包含ICOS的胞质信号传导结构域或其功能变体

或部分,其包含示于SEQ ID NO:35 (由SEQ ID NO:36所示序列编码)的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:35显示至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列相同性的氨基酸序列。

[0147] 在一些实施方式中,所述胞内结构域还包含4-1BB (例如 (登录号Q07011.1) 或功能变体或其部分的胞质信号传导结构域,例如示于SEQ ID NO:10的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:10显示至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列相同性的氨基酸序列。

[0148] 在一些实施方式中,所述细胞还包括抑制性CAR (iCAR, 参见Fedorov等, Sci.Transl.Medicine,5 (215) (2013年12月), 例如识别非靶抗原的抗原的CAR,由此通过靶抗原结合的CAR递送的活化信号被抑制性CAR与其配体的结合而减弱或抑制,例如,以减少脱靶效应。

[0149] 在一些实施方式中,配体结合结构域 (例如抗体) 经由一个或多个跨膜结构域与细胞内信号传导结构域连接。在一些实施方式中,跨膜结构域融合于胞外结构域。在一个实施方式中,使用天然与受体 (例如CAR) 中的结构域之一关联的跨膜结构域。在一些情况中,跨膜结构域经氨基酸取代修饰或选择,以避免这类结构域结合相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域,尽可能减少与受体复合物其它成员的相互作用。

[0150] 在一些实施方式中,存在短的寡肽或多肽接头,例如,长度为2至10个氨基酸的接头,例如包含甘氨酸和丝氨酸 (例如,甘氨酸-丝氨酸二联体) 的接头,并在嵌合受体的细胞内信号传导结构域和跨膜结构域之间形成连接。

[0151] 在一些实施方式中,所述跨膜结构域源自天然或合成来源。当所述来源是天然来源时,某些方面,所述结构域源自任何膜结合或跨膜蛋白。跨膜区包括源自T-细胞受体的 α , β 或 ζ 链,CD28,CD3 ϵ ,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD86,CD134,CD137,CD154,RANK,白细胞介素-1受体1型 (IL1R-1),白细胞介素-1受体1型辅助蛋白 (IL1R-1AcP) 和/或跨膜区包含其功能变体 (例如基本保留其结构 (例如,跨膜结构) 性质的那些) 的那些 (即包含至少它们的跨膜区域)。在一些实施方式中,所述跨膜结构域在一些实施方式中是合成的。在一些实施方式中,合成跨膜结构域以疏水残基为主,例如亮氨酸和缬氨酸。在一些实施方式中,合成跨膜结构域的各末端会有苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体。在一些实施方式中,连接是通过接头、间隔子和/或跨膜结构域。

[0152] 在一些实施方式中,跨膜结构域是源自TRAF-6诱导信号传导分子的跨膜结构域。在一些实施方式中,所述跨膜结构域是源自CD4、RANK,IL1R-1或IL1R-1AcP的跨膜结构域或其功能变体。

[0153] 例如,在一些实施方式中,嵌合受体 (例如CAR) 的跨膜结构域是或包含人CD40的跨膜结构域 (例如登录号P25942) 或其变体,例如包含SEQ ID NO:11所示氨基酸序列或与SEQ ID NO:11具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列相同性的氨基酸序列的跨膜结构域。

[0154] 在一些实施方式中,在一些实施方式中,嵌合受体 (例如CAR) 的跨膜结构域是或包含人RANK的跨膜结构域 (例如登录号Q9Y6Q6) 或其变体,例如包含SEQ ID NO:13所示氨基酸序列或与SEQ ID NO:13具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列相同性的氨基酸序列的跨膜结构域。

[0155] 在一些实施方式中,在一些实施方式中,嵌合受体(例如CAR)的跨膜结构域是或包含人IL1R-1的跨膜结构域(例如登录号P14778)或其变体,例如包含SEQ ID NO:15所示氨基酸序列或与SEQ ID NO:15具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列相同性的氨基酸序列的跨膜结构域。

[0156] 在一些实施方式中,在一些实施方式中,嵌合受体(例如CAR)的跨膜结构域是或包含人IL1R-1AcP的跨膜结构域(例如登录号Q9NPH3)或其变体,例如包含SEQ ID NO:17所示氨基酸序列或与SEQ ID NO:17具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列相同性的氨基酸序列的跨膜结构域。

[0157] 在一些实施方式中,跨膜结构域是衍生自另一共刺激分子的跨膜结构域或衍生自已知作为膜蛋白在T细胞表面表达的另一分子的跨膜结构域。在一些实施方式中,所述跨膜结构域是源自CD4、CD28或CD8的跨膜结构域,例如,CD8 α 或其功能变体。

[0158] 例如,所述嵌合受体(例如,CAR)的跨膜结构域是或包括人CD28(例如登录号P01747.1)或其变体的跨膜结构域,例如包含示于SEQ ID NO:6的氨基酸序列的跨膜结构域,或与SEQ ID NO:6显示至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列相同性的氨基酸序列;在一些实施方式中,包含重组受体的部分的跨膜-结构域包含示于SEQ ID NO:7的氨基酸序列,或与其具有至少是或约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列相同性的氨基酸序列。

[0159] 在一些实施方式中,所述嵌合受体,例如CAR,例如其抗体部分,还包括间隔子,其可以是或包括免疫球蛋白恒定区或其变体或修饰形式的至少部分,例如铰链区,例如,IgG4铰链区,和/或CH1/CL和/或Fc区。在一些实施方式中,恒定区的部分作为配体结合结构域之间,例如抗原-识别组分(例如,scFv),和跨膜结构域之间的间隔子区域。间隔子的长度可以是:与没有间隔子相比,该长度的间隔子提高抗原结合之后的细胞响应。在一些示例中,间隔子的长度是或约是12个氨基酸,或者不超过12个氨基酸。示例性的间隔子包括具有如下长度的那些:至少约10至229个氨基酸、约10至200个氨基酸、约10至175个氨基酸、约10至150个氨基酸、约10至125个氨基酸、约10至100个氨基酸、约10至75个氨基酸、约10至50个氨基酸、约10至40个氨基酸、约10至30个氨基酸、约10至20个氨基酸或约10至15个氨基酸,并且包括上述所列范围的任何端点之间的整数。在一些实施方式中,间隔子区具有约12个氨基酸或更短,约119个氨基酸或更短或约229个氨基酸或更短。示例性间隔子包括单IgG4铰链,IgG4铰链连CH2和CH3结构域,或IgG4铰链连CH3结构域。示例性的间隔子包括但不限于,描述于如下文献的那些:Hudecek等.(2013) Clin. Cancer Res., 19:3153,国际专利申请公开号W02014031687,美国专利号8,822,647或公开申请号US2014/0271635。

[0160] 在一些实施方式中,恒定区或部分是人IgG(如IgG4或IgG1)的。在一些实施方式中,所述间隔子具有序列ESKYGPPCPPCP(示于SEQ ID NO:1),并且由示于SEQ ID NO:2的序列编码。在一些实施方式中,所述间隔子具有示于SEQ ID NO:3的序列。在一些实施方式中,所述间隔子具有示于SEQ ID NO:4的序列。在一些实施方式中,所述恒定区或部分是人IgD的。在一些实施方式中,所述间隔子具有示于SEQ ID NO:5的序列。在一些实施方式中,所述间隔子具有与SEQ ID NO:1-5显示至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列相同性的氨基酸序列。

[0161] 在一些实施方式中,所述间隔子仅包含IgG的铰链区,例如仅IgG4或IgG1的铰链,例如仅示于SEQ ID NO:1的间隔子铰链。在其它实施方式中,所述间隔子是或包含Ig铰链,例如,IgG4源性的铰链,其任选地连接至CH2和/或CH3结构域。在一些实施方式中,所述间隔子是Ig铰链,例如,IgG4铰链,其连接至CH2和CH3结构域,例如示于SEQ ID NO:4。在一些实施方式中,所述间隔子是Ig铰链,例如,IgG4铰链,其仅连接至CH3结构域,例如示于SEQ ID NO:3。在一些实施方式中,间隔子是或含富甘氨酸-丝氨酸序列或其它柔性接头,例如已知柔性接头。

[0162] 在一些实施方式中,包含嵌合受体(例如CAR)或其它抗原受体的构建体还包括标志物,例如细胞表面标志物,其可用于确定使细胞表达受体(例如细胞表面受体的截短形式,例如截短的EGFR(tEGFR))的转导或工程改造。在一些实施方式中,所述标志物包括CD34、NGFR或表皮生长因子受体(例如,tEGFR)或其功能变体的全部或部分(例如,截短形式)。在一些实施方式中,编码标志物的核酸可操作性地连接编码接头序列(例如可切割接头序列,例如,T2A)的多核苷酸。例如,标志物,和任选地,接头序列,可以是公开的专利申请号W02014031687中描述的任一种。例如,所述标志物可以是截短的EGFR(tEGFR),其任选地连接至接头序列,例如T2A可切割接头序列。截短的EGFR(例如tEGFR)的示例多肽包含示于SEQ ID NO:25或31(由SEQ ID NO:30所示序列编码)的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:25或31显示至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列相同性的氨基酸序列。T2A连接子的示例多肽包含示于SEQ ID NO:24或29(由SEQ ID NO:40所示序列编码)的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:24或29显示至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列相同性的氨基酸序列。

[0163] 在一些实施方式中,标志物是分子,例如,细胞表面蛋白,其不在T细胞上或T细胞表面上天然可见,或其部分。

[0164] 在一些实施方式中,所述分子是非自体分子,例如,非自体蛋白,即,不被待向其过继转移所述细胞的宿主的免疫系统识别为“自身”的蛋白质。

[0165] 在一些实施方式中,所述标志物无治疗性功能和/或除了用作基因工程改造的标志物(例如,用于选择成功地工程改造的细胞)之外没有任何作用。在其它实施方式中,所述标志物可以是治疗性分子或在其它情况中发挥一些所需效果的分子,例如有待在体内遇到的细胞的配体,例如共刺激或免疫哨点分子,用来增强和/或抑制所述细胞在过继转移和遇到配体之后的响应。

[0166] 在一些情况下,编码基因工程改造的受体和/或表面标志物的核苷酸序列含有编码信号肽的信号序列。在一些方面,信号序列可以编码源自天然细胞表面分子的信号肽。在其他方面,信号序列可以编码异源或非天然信号肽,例如由SEQ ID NO:38或39中列出的核苷酸序列编码并且如SEQ ID NO:37中所示的GMCSFR α 链的示例性信号肽。在一些情况下,编码嵌合抗原受体(CAR)和/或细胞表面标志物的核酸序列含有编码信号肽的信号序列。信号肽的非限制性示例性实例包括例如SEQ ID NO:37中列出的GMCSFR α 链信号肽。

[0167] 在一些情况中,嵌合受体(例如CAR)被称为第一、第二和/或第三代CAR。在某些方面,第一代CAR仅在抗原结合后提供CD3-链诱导的信号;在某些方面,第二代CAR提供信号和共刺激信号,例如包括共刺激受体如CD40、RANK、IL1R-1或IL1R-1AcP的细胞内信号传导结

构域的CAR,所述细胞内信号传导结构域是能够诱导TRAF-6介导的信号传导的TRAF-6诱导结构域;某些方面,第三代CAR包含多个不同共刺激受体的共刺激结构域。

[0168] 在一些实施方式中,所述嵌合抗原受体包括胞外部分,其包含本文所述的抗体或片段。在一些实施方式中,所述嵌合抗原受体包括胞外部分,其包含本文所述的抗体或片段和胞内信号传导结构域。在一些实施方式中,抗体或片段包括scFv,且胞内结构域包含ITAM。在一些实施方式中,胞内信号传导结构域包括CD3- ζ 链的 ζ 链的信号传导结构域。在一些实施方式中,嵌合抗原受体包括跨膜结构域,其连接胞外结构域和胞内信号传导结构域。在一些实施方式中,跨膜结构域包含TRAF-6诱导信号传导分子的跨膜部分。在一些实施方式中,跨膜结构域含有源自CD4,CD28或CD8的跨膜部分,例如来自人CD4,CD28或CD8的跨膜部分。胞外结构域和跨膜结构域可直接或间接相连。在一些实施方式中,胞外结构域和跨膜通过间隔子,例如本文所述的任何间隔子连接。在一些实施方式中,嵌合受体含有细胞内结构域,所述细胞内结构域包含衍生自TRAF-6诱导信号传导分子的共刺激信号传导结构域或其功能性变体。在一些实施方式中,TRAF-6诱导信号传导分子来源于CD40,RANK,IL1R-1或IL1R-1AcP的胞质结构域。在一些实施方式中,细胞内结构域进一步含有所述的另外的共刺激信号传导结构域。

[0169] 在一些实施方式中,嵌合受体(如CAR)包括本文所述的配体结合结构域例如抗原识别结构域、间隔子,例如包含免疫球蛋白分子的部分的间隔子,例如铰链区和/或一个或多个重链分子恒定区,例如包含Ig-铰链的间隔子、包含源自TRAF-6诱导信号传导分子或源自CD4,CD28或CD8的跨膜结构域、源自共刺激信号传导结构域的TRAF-6诱导信号传导分子,和CD3 ζ 活化信号传导结构域。在一些实施方式中,共刺激信号传导结构域位于跨膜结构域和活化信号传导结构域之间。

[0170] 在一些实施方式中,嵌合受体(如CAR)包括本文所述的配体结合结构域例如抗原识别结构域、间隔子,例如包含免疫球蛋白分子的部分的间隔子,例如铰链区和/或一个或多个重链分子恒定区,例如包含Ig-铰链的间隔子、跨膜结构域(例如CD40源性跨膜结构域或源自CD4、CD28或CD8)、作为CD40源性胞质信号传导结构域的TRAF-6诱导结构域,和CD3 ζ 活化信号传导结构域。在一些实施方式中,TRAF-6-诱导结构域位于跨膜结构域和活化信号传导结构域之间。

[0171] 示例性的嵌合受体,例如CAR包含特异性结合如本文所述的任何抗原的抗原结合结构域,例如scFv,如抗CD19结合结构域;Ig源性间隔子(如SEQ ID NO:1所示,例如由SEQ ID NO:2所示序列编码),人CD28源性跨膜结构域(例如SEQ ID NO:6所示,例如由SEQ ID NO:46所示的序列编码);CD40源性细胞内信号传导结构域,例如人CD40源性(例如SEQ ID NO:12所示,例如由SEQ ID NO:34所示的序列编码);和人CD3- ζ 源性信号传导结构域(SEQ ID NO:21,例如由SEQ ID NO:41所示的序列编码)。在一些实施方式中,嵌合受体以N-末端至C-末端的顺序含有上述组分。在一些实施方式中,示例性嵌合受体(例如CAR)的配体结合结构域,配体结合结构域不与CD40L特异性结合和/或不源自CD40。

[0172] 在一些实施方式中,CAR包括本文所述的配体结合结构域例如抗原识别结构域、间隔子,例如包含免疫球蛋白分子的部分的间隔子,例如铰链区和/或一个或多个重链分子恒定区,例如包含Ig-铰链的间隔子、跨膜结构域(例如RANK源性跨膜结构域或源自CD4、CD28

或CD8)、作为RANK源性胞质信号传导结构域的TRAF-6诱导结构域,和CD3 ζ 活化信号传导结构域。在一些实施方式中,TRAF-6-诱导结构域位于跨膜结构域和活化信号传导结构域之间。

[0173] 在一些实施方式中,嵌合受体(如CAR)包括本文所述的配体结合结构域例如抗原识别结构域、间隔子,例如包含免疫球蛋白分子的部分的间隔子,例如铰链区和/或一个或多个重链分子恒定区,例如包含Ig-铰链的间隔子、跨膜结构域(例如IL1R-1源性跨膜结构域或源自CD4、CD28或CD8)、作为IL1R-1源性胞质信号传导结构域的TRAF-6诱导结构域,和CD3 ζ 活化信号传导结构域。在一些实施方式中,TRAF-6-诱导结构域位于跨膜结构域和活化信号传导结构域之间。在一些情况下,这样的嵌合受体是第一嵌合受体,其可以与含有IL1R-1Acp辅助信号传导结构域的第二嵌合受体形成复合物。

[0174] 在一些实施方式中,嵌合受体(例如CAR)还包括辅助信号结构域,其为IL1R-1AcP衍生的胞质结构域。在一些实施方式中,提供第二嵌合受体,其含有辅助信号传导结构域,其为IL1R-1Acp源性胞质结构域。在一些实施方式中,第二嵌合受体包括本文所述的配体结合结构域(其任选可与第一配体结合结构域相同)例如抗原识别结构域、间隔子,例如包含免疫球蛋白分子的部分的间隔子,例如铰链区和/或一个或多个重链分子恒定区,例如包含Ig-铰链的间隔子、跨膜结构域(例如IL1R-1AcP源性跨膜结构域或源自CD4、CD28或CD8)、作为IL1R-1AcP源性胞质信号传导结构域的辅助信号传导结构域,和CD3 ζ 活化信号传导结构域。

[0175] 在一些实施方式中,根据本文所述的任何实施方式的两个嵌合受体,例如CAR,可关联形成多聚体复合物,如功能性异二聚体。在某些方面,第一TRAF-6诱导信号传导分子包含在一种嵌合受体例如CAR中,TRAF-6辅助信号传导分子包括在另一嵌合受体例如CAR中,其中第一和第二嵌合受体都在相同细胞上表达并相互作用以介导TRAF-6信号传导。在一些实施方式中,TRAF-6依赖性信号传导分子不是促凋亡性的。例如,在一些实施方式中,提供关联形成功能性异二聚体的两种嵌合受体例如CAR,包含

[0176] a) 第一嵌合受体例如CAR,其包括本文所述的配体结合结构域,例如抗原识别结构域,间隔子,例如含有免疫球蛋白分子的部分的间隔子,例如铰链区和/或一个或多个重链恒定区,例如含Ig-铰链的间隔子,跨膜结构域,IL1R-1衍生的胞质信号传导结构域和CD3 ζ 活化信号传导结构域;和

[0177] b) 第二嵌合受体例如CAR,其包括本文所述的配体结合结构域,例如抗原识别结构域,间隔子,例如含有免疫球蛋白分子的部分的间隔子,例如铰链区和/或一个或多个重链恒定区,例如含Ig-铰链的间隔子,跨膜结构域,IL1R-1AcP-衍生的辅助信号传导结构域和CD3 ζ 活化信号传导结构域。

[0178] 在一些实施方式中,嵌合受体CAR进一步包括其他共刺激信号传导结构域,其例如衍生自PI3K诱导信号传导分子和/或衍生自CD28、4-1BB或ICOS共刺激信号传导分子。在一些实施方式中,其他共刺激信号传导结构域位于TRAF-6诱导信号传导分子衍生的共刺激信号传导结构域与活化信号传导结构域之间。

[0179] 在一些方面,核酸分子可以被修饰以用于本文所述的构建体中。在一些情况下,为了克隆到载体中,可以将序列设计为含有末端限制性位点序列。在某些情况下,序列可以通过密码子优化进行修饰。密码子优化包括平衡所选择的密码子百分比与公布的大量人类转

移RNA,使得没有一个过载或受限。这在某些情况下可能是必要的,因为大多数氨基酸由多于一个密码子编码,并且密码子使用情况因生物体而异。转染基因和宿主细胞之间密码子使用的差异可能对核酸构建体的蛋白质表达和免疫原性有影响。通常,对于密码子优化,密码子经选择以选择与人类使用频率平衡的那些密码子。通常,氨基酸密码子的冗余使得不同的密码子编码一个氨基酸。在一些实施方式中,在选择用于取代的密码子时,可能期望所得突变是沉默突变,从而密码子改变不影响氨基酸序列。通常,密码子的最后一个核苷酸可以保持不变而不影响氨基酸序列。

[0180] III. 核酸,载体和工程改造的细胞

[0181] 还提供了用于产生基因工程改造的细胞的方法、核酸、组合物和试剂盒。基因工程改造一般涉及将编码嵌合受体的核酸导入含有经培养细胞的组合物中,例如,通过逆转录病毒转导、转染或转化进行。

[0182] 在一些实施方式中,核酸分子编码重组受体,例如嵌合受体,例如上述的任何一种。还提供了含有这种核酸分子的载体或构建体。在一些实施方式中,载体或构建体含有与编码受体的核苷酸可操作地连接以驱动其表达的一个或多个启动子。在一些实施方式中,启动子可操作地连接至一个或多个核酸分子。

[0183] 在嵌合受体的信号传导通过与另一嵌合受体在复合物中关联(例如同型二聚体或异二聚体)而得到促进的某些情况下,每个嵌合受体可以由相同的核酸编码或由分开的核酸分子编码。在一些实施方式中,第一嵌合受体和第二嵌合受体由分开的核酸分子编码,并且各自可以单独转移或引入细胞中用于在细胞中表达两种嵌合受体。在一些实施方式中,核酸分子是单一多核苷酸。在一些实施方式中,第一嵌合受体和第二嵌合受体均在单一多核苷酸上编码。在一些实施方式中,每种嵌合受体的编码序列可以可操作地连接至可相同或不同的启动子。

[0184] 在一些实施方式中,载体或构建体可含有驱动一种或多种核酸分子表达的单一启动子。在一些实施方式中,此类启动子可以是多顺反子(双顺反子或三顺反子,参见例如美国专利号6,060,273)。例如,在一些实施方式中,转录单元可以经工程改造为含有IRES(内部核糖体进入位点)的双顺反子单元,其允许通过来自单一启动子的信息共表达基因产物(例如编码第一和第二嵌合受体)。或者,在一些情况下,单一启动子可指导在单一开放阅读框(ORF)中含有由编码自切割肽(例如T2A)或蛋白酶识别位点(例如弗林蛋白酶)的序列彼此分离的两个或三个基因(例如编码第一和第二嵌合受体)的RNA的表达。因此ORF编码单一多蛋白,其在翻译期间(在T2A的情况下)或翻译后被切割成单独蛋白。在某些情况下,肽如T2A可引起核糖体跳过(核糖体跳跃)2A元件的C-末端的肽键的合成,导致2A序列末端与下一个肽下游之间分离。2A切割肽(包括可诱导核糖体跳跃的那些)的示例是T2A,P2A,E2A和F2A。2A元件的示例性序列包括美国专利公开号20070116690中所述的来自口蹄疫病毒(F2A,例如SEQ ID NO:45)、马鼻肺炎病毒(E2A,例如SEQ ID NO:44)、明脉扁刺蛾β四体病毒(T2A,例如SEQ ID NO:24或29)以及猪后肢病毒-1(P2A,例如SEQ ID NO:42或43)的2A序列。

[0185] 还提供了细胞,例如含有工程改造的嵌合受体的细胞,如本文所述。还提供了这类细胞的群,含有这类细胞或富集这类细胞的组合物,如其中表达嵌合受体的细胞占组合物中的总细胞或某些类型的细胞如T细胞或CD8+或CD4+细胞的至少50、60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或更高百分比。组合物包括用于给药的药物组合物和制剂,如用于

过继细胞治疗。还提供治疗方法,例如,将所述细胞和组合物给予对象(例如患者)的治疗方法。

[0186] 因此还提供了表达嵌合受体的基因工程改造的细胞,例如含有CAR的细胞。所述细胞一般是真核细胞,例如哺乳动物细胞,并且通常是人细胞。在一些实施方式中,细胞衍生自血液、骨髓、淋巴或淋巴器官,是免疫系统的细胞,如先天或适应性免疫的细胞,例如,骨髓或淋巴样细胞,包括淋巴细胞,一般是T细胞和/或NK细胞。其他示例性的细胞包括干细胞,如多能(multipotent)和多潜能(pluripotent)干细胞,包括诱导性多潜能干细胞(iPSC)。细胞一般是原代细胞,如直接从对象分离和/或从对象分离并冷冻的那些细胞。在一些实施方式中,细胞包括T细胞或其他细胞类型的一个或多个亚组,如全T细胞群、CD4+细胞、CD8+细胞及其亚群,如由功能、活化状态、成熟、分化潜力、扩增、再循环、定位,和/或持续能力、抗原特异性、抗原受体类型、特定器官或区室中的存在、标志物或细胞因子分泌概况,和/或分化程度限定的那些。关于待治疗的对象,细胞可以是同种异体和/或自体的。方法包括现成的方法。某些方面,如对于现成的技术,细胞是多潜能和/或多能的,如干细胞,如诱导性多潜能干细胞(iPSC)。在一些实施方式中,该方法包括从对象分离细胞,对其进行制备、处理、培养和/或工程改造,如本文所述,并且在冷冻保存前或后将其回输给同一患者。

[0187] T细胞和/或CD4+和/或CD8+T细胞的亚型和亚群包括:原初T(T_N)细胞、效应T细胞(T_{EFF})、记忆T细胞及其亚型,如干细胞记忆T(T_{SCM})、中心记忆T(T_{CM})、效应记忆T(T_{EM})、或终末分化的效应记忆T细胞、肿瘤-浸润性淋巴细胞(TIL)、不成熟T细胞、成熟T细胞、辅助T细胞、细胞毒性T细胞、粘膜相关的非变体T(MAIT)细胞、天然产生的和过继性调节T(T_{reg})细胞、辅助T细胞,如TH1细胞、TH2细胞、TH3细胞、TH17细胞、TH9细胞、TH22细胞、滤泡辅助T细胞、 α/β T细胞,和 δ/γ T细胞。

[0188] 在一些实施方式中,细胞是自然杀伤(NK)细胞。在一些实施方式中,细胞是单核细胞或粒细胞,例如,骨髓细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞,和/或嗜碱性粒细胞。

[0189] 在一些实施方式中,所述细胞包括通过基因工程改造导入的一种或多种核酸,并,由此表达所述核酸的重组或经基因工程改造的产物。在一些实施方式中,核酸是异源性的,即,通常不存在于细胞或从该细胞获得的样品中,如从另一个生物体或细胞获得的样品,其例如通常不在工程改造中的细胞和/或这类细胞来源的生物体中发现。在一些实施方式中,核酸不是天然存在的,如核酸不是自然中发现的,包括包含编码来自多种不同细胞类型的各种结构域的核酸的嵌合组合。

[0190] A. 用于工程改造的细胞的制备

[0191] 在一些实施方式中,经工程改造的细胞的制备包括一种或多种培养和/或一个或多个制备步骤。用于导入嵌合受体(例如,CAR)的细胞可从样品(例如生物样品,例如获自或源自对象的样品)分离。在一些实施方式中,从中分离细胞的对象是患有疾病或病症或需要细胞治疗或将给予细胞治疗的对象。在一些实施方式中,对象是需要特定治疗性介入的人,如过继细胞疗法,用于该疗法的细胞是经分离、加工和/或经工程改造的。

[0192] 因此,在一些实施方式中,所述细胞是原代细胞,例如,原代人细胞。所述样品包括直接取自对象的组织、体液和其它样品,以及获自一个或多个处理步骤,例如分离、离心、基

因工程改造(例如采用病毒载体的转导)、清洗和/或孵育的样品。所述生物样品可以是直接获自生物来源的样品或经处理的样品。生物样品包括但不限于,体液,例如血液、血浆、血清、脑脊髓液、滑膜液、尿液和汗液,组织和器官样品,包括源自它们的经处理的样品。

[0193] 某些方面,作为衍生或分离细胞来源的样品是血液或血液源性的样品,或者为或衍生自血浆分离置换法或白细胞去除术产物。示例性样品包括全血、外周血单核细胞(PBMC)、白细胞、骨髓、胸腺、组织活检物、肿瘤、白血病、淋巴瘤、淋巴结、肠相关的淋巴样组织、粘膜相关的淋巴样组织、脾、其它淋巴样组织、肝、肺、胃、肠、结肠、肾、胰腺、乳腺、骨、前列腺、子宫颈、睾丸、卵巢、扁桃体或其它器官,和/或源自其中的细胞。在细胞治疗(如过继细胞治疗)中,样品包括来自自体 and 同种异体来源的样品。

[0194] 在一些实施方式中,所述细胞源自细胞系,例如,T细胞系。在一些实施方式中,细胞获自异种异体来源,例如,获自小鼠、大鼠、非人灵长类或猪。

[0195] 在一些实施方式中,细胞的分离包括一个或多个制备和/或非基于亲和性的细胞分离步骤。在一些实施例中,细胞在一种或多种反应剂的存在下经清洗、离心和/或孵育,例如,以去除不需要的组分,富集所需组分,裂解或去除对某些反应剂敏感的细胞。在一些实施例中,细胞基于一种或多种特性如封闭、粘附性质、尺寸、对某些组分的敏感性和/或抗性来分离。

[0196] 在一些实施例中,通过例如单采或白细胞去除术获取对象循环血液的细胞。某些方面,所述样品包括淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其它有核血液白细胞、血红细胞和/或血小板,某些方面包括血红细胞和血小板之外的细胞。

[0197] 在一些实施方式中,采自对象的血液细胞经清洗如去除血浆部分,然后将其置于合适的缓冲液或培养基中留待后用。在一些实施方式中,所述细胞用磷酸盐缓冲盐水(PBS)清洗。在一些实施方式中,清洗溶液不含钙和/或镁和/或许多或所有二价阳离子。在一些方面中,清洗步骤按照生产商说明,通过半自动化的“流通”离心法(例如,Cobe 2991细胞处理器,百特公司(Baxter))完成。在一些方面中,清洗步骤按照生产商说明,通过内切流过滤(TFF)完成。在一些实施方式中,在清洗后,所述细胞在多种生物相容缓冲液中重悬,例如,无 $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ PBS。在某些实施方式中,血液细胞样品中的组分去除后细胞直接重悬于培养基中。

[0198] 在一些实施方式中,所述方法包括基于封闭的细胞分离方法,如通过裂解血红细胞并通过Percoll或Ficoll梯度离心来从外周血制备血液白细胞。

[0199] 在一些实施方式中,所述分离方法包括,基于细胞中一种或多种特定分子,例如表面标志物,例如,表面蛋白质、胞内标志物或核酸的表达或存在来分离不同的细胞类型。在一些实施方式中,可采用任何基于此类标志物进行分离的已知方法。在一些实施方式中,所述分离是基于亲和力或基于免疫亲和力的分离。例如,某些方面,所述分离包括基于细胞的一种或多种标志物(通常是细胞表面标志物)的表达或表达水平来分离细胞和细胞群,例如,通过与特异性地结合此类标志物的抗体或结合伴侣孵育,随后通常是清洗步骤,将已结合所述抗体或结合伴侣的细胞与从未结合至所述抗体或结合伴侣的那些细胞分离。

[0200] 此类分离步骤可基于正选择,保留已结合所述反应剂的细胞被用于后续应用,和/或负选择,保留未结合至所述抗体或结合伴侣的细胞。在一些实施例中,两种级份均保留用于后续应用。某些方面,当没有可用于在异质群中特异性地鉴定细胞类型的抗体时,负选择

可能是特别有用的,这样,分离最好是基于细胞表达的标志物而不是基于想要的细胞群。

[0201] 所述分离的结果必需是特定细胞群或表达特定标志物的细胞的100%的富集或删除。例如,特定类型细胞(如表达某标志物的细胞)的正选择或富集指的是提高此类型细胞的数量或百分数,其结果不必是不表达该标志物的细胞完全消失。同样地,特定类型细胞(如表达某标志物的细胞)的负选择、去除或消除指的是减少此类细胞的数量或百分数,其结果不必是此类细胞的完全清除。

[0202] 在一些实施例中,进行多轮分离步骤,其中,对来自一个步骤的正或负选择的级份进行另一分离步骤,例如后续的正或负选择。在一些实施例中,单个分离步骤同时消除表达多种标志物的细胞,例如通过将细胞与分别对负选择目标标志物具有特异性的多种抗体或结合伴侣一同孵育。同样地,可同时正选择多种细胞类型,通过将细胞与不同类型细胞上表达的多种抗体或结合伴侣一同孵育。

[0203] 例如,某些方面,通过正或负选择技术分离特定T细胞亚群,例如一种或多种表面标志物阳性细胞或高表达T细胞,例如,CD28⁺、CD62L⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺和/或CD45RO⁺T细胞。

[0204] 例如,CD3⁺、CD28⁺T细胞可以采用CD3/CD28磁珠(例如,DYNABEADS® M-450CD3/CD28T细胞扩增仪)来正选择。

[0205] 在一些实施方式中,分离通过如下方式进行:通过正选择富集特定细胞群,或通过负选择消除特定细胞群。在一些实施方式中,正或负选择通过将细胞与特异性地结合一种或多种表面标志物的一种或多种抗体或其它结合剂一同孵育来完成,所述一种或多种表面标志物分别在正选择或负选择的细胞上表达(标志物⁺)或高表达(标志物^高)。

[0206] 在一些实施方式中,通过对非T细胞(例如B细胞、单核细胞或其它血液白细胞)上表达的标志物(例如CD14)进行负选择来从PBMC样品分离T细胞。某些方面,使用CD4⁺或CD8⁺选择步骤来分离CD4⁺辅助T细胞和CD8⁺细胞毒性T细胞。通过针对一种或多种原初、记忆和/或效应T细胞亚群上表达或以相对高表达的标志物进行正或负选择,可将此类CD4⁺和CD8⁺群进一步分选成亚群。

[0207] 在一些实施方式中,在CD8⁺细胞中进一步富集或消除原初、中心记忆、效应记忆和/或中心记忆干细胞,例如通过基于相应亚群相关表面抗原的正选择或负选择。在一些实施方式中,富集中心记忆T(T_{CM})细胞以提高功效,如以改善长期存活、扩增和/或给予后的植入,某些方面,其在此类亚群中特别强势。参见Terakura等.(2012)Blood.1:72-82;Wang等(2012)J Immunother.35(9):689-701。在一些实施方式中,将T_{CM}-富集的CD8⁺T细胞与CD4⁺T细胞合并进一步增强功效。

[0208] 在实施方式中,记忆T细胞存在于CD8⁺外周血淋巴细胞的CD62L⁺和CD62L⁻亚组。可在PBMC中富集或消除CD62L⁻CD8⁺和/或CD62L⁺CD8⁺部分,例如采用抗CD8和抗CD62L抗体。

[0209] 在一些实施方式中,中心记忆T(T_{CM})细胞的富集是基于CD45RO、CD62L、CCR7、CD28、CD3、和/或CD127阳性或高表面表达;在某些方面中,是基于对CD45RA和/或粒酶B表达或高度表达细胞的负选择。在某些方面中,分离CD8⁺T_{CM}细胞富集群是通过如下方式进行:消除CD4、CD14、CD45RA表达细胞,并正选择或富集CD62L表达细胞。某一方面,富集中心记忆T(T_{CM})细胞从基于CD4表达的负选择细胞级份开始,对该级份进行基于CD14和CD45RA表达的负选择和基于CD62L的正选择。某些方面,这些选择同时进行,而在其它方面的内容中,这些

选择按任意顺序依次进行。某些方面,将用于制备CD8⁺细胞群或亚群的基于CD4表达的相同选择步骤用于产生CD4⁺细胞群或亚群,这样,基于CD4分离的阳性和阴性级份均被保留用于后续步骤,可以是任选地继以一种或多种进一步的正选择或负选择步骤之后。

[0210] 在某具体实施例中,对PBMC样品或其它血液白细胞样品进行CD4⁺细胞选择,负选和正选级份都保留。然后,基于CD14和CD45RA或ROR1的表达对阴性部分进行负选择,并基于中心记忆T细胞特征性标志物,例如CD62L或CCR7,进行正选择,其中,所述正和负选择以某一顺序进行。

[0211] 通过鉴定具有细胞表面抗原的细胞群,将辅助CD4⁺T细胞分选成原初、中心记忆和效应细胞。CD4⁺淋巴细胞可通过标准方法获得。在一些实施方式中,原初CD4⁺T淋巴细胞是CD45RO⁻、CD45RA⁺、CD62L⁺、CD4⁺T细胞。在一些实施方式中,中心记忆CD4⁺细胞是CD62L⁺和CD45RO⁺。在一些实施方式中,效应CD4⁺细胞是CD62L⁻和CD45RO⁻。

[0212] 在某一实施例中,为了通过负选择富集CD4⁺细胞,单克隆抗体混合物(cocktail)通常包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。在一些实施方式中,使所述抗体或结合伴侣结合至固体支持物或基质如磁珠或顺磁珠,从而能够分离正选择和/或负选择的细胞。例如,在一些实施方式中,所述细胞和细胞群采用免疫磁性(或亲和性磁性)分离技术分开(separated)或分离(isolated)(综述参见《分子医学方法》(Methods in Molecular Medicine),第58卷:代谢研究方法(Metastasis Research Protocols),第2卷:细胞体外和体内性能(Cell Behavior In Vitro and In Vivo),第17-25页,S.A.Brooks和U.Schumacher编©新泽西州托托华的胡玛纳出版社(Humana Press Inc.))。

[0213] 在一些方面中,待分离的样品或细胞组合物与较小的可磁化或磁响应性材料(如磁响应性颗粒或微粒,例如顺磁珠(例如,Dynalbeads珠或MACS珠))孵育。所述磁响应性材料(例如,颗粒)一般直接或间接连接结合伴侣(例如,抗体),其特异性地结合某一分子,例如,需要分离(例如,需要进行负或正选择)的一种或多种细胞或细胞群上存在的表面标志物。

[0214] 在一些实施方式中,所述磁性颗粒或珠包括磁响应性材料,其结合特异性的结合部分,例如抗体或其它结合伴侣。有多种熟知的磁响应性材料用于磁性分离方法。合适的磁性颗粒包括描述于Molday,美国专利号4,452,773和欧洲专利说明书EP 452342B中的那些,其通过引用纳入本文。胶体定形的颗粒,例如描述于Owen美国专利号4,795,698的那些,而Liberti等,美国专利号5,200,084是其它实例。

[0215] 孵育一般在一定条件下进行,所述条件下所述抗体或结合伴侣或分子(如二抗或其它反应剂,其特异性地结合所述抗体或结合伴侣)连接所述磁性颗粒或珠,特异性地结合所述样品中的细胞上的细胞表面分子(如果存在)。

[0216] 某些方面,将所述样品置于磁场中,并且,具有与其连接的磁性响应或可磁化颗粒的那些细胞将被磁体吸引,并与未标记的细胞分离。对于正选择而言,保留被磁体吸引的细胞;对于负选择而言,保留不被吸引的细胞(未标记的细胞)。某些方面,在同一选择步骤过程中进行正和负选择的组合,其中,保留阳性和阴性部分,并进一步处理或进行进一步分离步骤。

[0217] 在某些实施方式中,磁响应性颗粒外包被一抗或其它结合伴侣、二抗、凝集素、酶或链霉亲和素。在某些实施方式中,磁性颗粒通过一抗覆层连接细胞,所述一抗对一种或多

种标志物具有特异性。在某些实施方式中,所述细胞,而非珠,用一抗或结合伴侣标记,然后,添加细胞类型特异性的二抗或其它结合伴侣(例如,链霉亲和素)包被的磁性颗粒。在某些实施方式中,链霉亲和素包被的磁性颗粒与生物素化一抗或二抗联用。

[0218] 在一些实施方式中,使所述磁响应性颗粒连接和留在待后续孵育、培养和/或工程改造的细胞;某些方面,使所述颗粒连接留在用于给予患者的细胞。在一些实施方式中,从所述细胞去除可磁化的或磁响应性颗粒。用于从细胞去除可磁化颗粒的方法是已知的,包括例如采用竞争性非标记的抗体、可磁化颗粒或与可切割接头相连的抗体等。在一些实施方式中,可磁化颗粒是生物可降解的。

[0219] 在一些实施方式中,基于亲和性的选择通过磁性活化细胞分选(MACS)(加利福尼亚奥本的美天旎生物技术公司(Miltenyi Biotec))进行。磁性活化细胞分选(MACS)系统能够高纯度选择其上连接有磁化颗粒的细胞。在某些实施方式中,MACS以如下模式操作:在施加外部磁场之后,依次洗脱非目标和目标物质。即,使连接磁化颗粒的细胞保持在原位,而洗脱未连接的物质。然后,在该第一洗脱步骤完成后,将滞留在磁场中且防止被洗脱的物质以使得它们可被洗脱和回收的某种方式释放。在某些实施方式中,标记非靶细胞并将其从异质细胞群中消除。

[0220] 在某些实施方式中,分离(isolation)或分开(separation)采用系统、器械或设备来进行,它们实施所述方法分离、细胞制备、分开、处理、孵育、培养和/或配制步骤中的一个或多个步骤。某些方面,系统用以在封闭或无菌环境中进行这些步骤中的每一步骤,为的是例如尽可能减少误差、用户操作和/或污染。在某一实施例中,所述系统是国际专利申请公开号W02009/072003或US 20110003380 A1中描述的系统。

[0221] 在一些实施方式中,所述系统或设备在集成或独立系统中,和/或以自动化的或可编程的形式,进行分离、处理、工程改造和配制步骤中的一个或多个,例如全部。某些方面,所述系统或设备包括与所述系统或设备信息连通的计算机和/或计算机程序,其允许用户编程、控制、评估所述处理、分离、工程改造和配制步骤的结果,和/或调节所述处理、分离、工程改造和配制步骤的各方面。

[0222] 某些方面,进行所述分离和/或其它步骤使用CliniMACS系统(美天旎生物技术公司(Miltenyi Biotec))进行,例如,以供在封闭和无菌系统中进行临床级别水平的细胞的自动化分离。组件可包括集成微型计算机、磁性分离单元、蠕动泵和各种夹管阀。某些方面,集成计算机控制仪器的所有组件,并指示所述系统以标准化的顺序进行重复操作。某些方面,磁性分离单元包括可移动的永久磁体和用于选择柱的握持装置(holder)。蠕动泵控制贯穿通过管组的流速,并且与夹管阀一起确保通过所述系统的缓冲液和连续细胞悬液的受控流速。

[0223] 某些方面,CliniMACS系统使用以无菌、无热源溶液的形式提供的抗体-偶联的可磁化颗粒。在一些实施方式中,在用磁性颗粒标记细胞之后,清洗细胞以去除过量的颗粒。然后,将细胞制备袋连与管组相连,管组再连接含缓冲液的袋和细胞收集袋。所述管组由预组装的无菌管道组成,包括前置柱和分离柱,并且仅用于单次使用。在分离程序启动之后,系统自动将细胞样品上样到分离柱。带标记的细胞留在柱中,而未标记细胞则经一系列清洗步骤去除。在某些实施方式中,用于本文所述方法的细胞群是未标记的,不留在柱中。在某些实施方式中,用于本文所述方法的细胞群是经标记的,并且留在柱中。在某些实施方式

中,撤去磁场之后从柱上洗脱用于本文所述方法的细胞群,并将其收集在细胞收集袋中。

[0224] 在某些实施方式中,分离和/或其它步骤采用CliniMACS Prodigy系统(美天旎生物技术公司)进行。某些方面,CliniMACS Prodigy系统装配有细胞处理单元,所述细胞处理单元允许自动化清洗和离心分级分离细胞。CliniMACS Prodigy系统还可包括内置相机和图像识别软件,通过辨别来源细胞产物的肉眼可见层来确定最优选细胞分级分离终点。例如,外周血可被自动分离成红细胞、血液白细胞和血浆层。CliniMACS Prodigy系统还可包括集成化的细胞培育腔室,其完成细胞培养测序,例如细胞分化和扩增、抗原加载和长期细胞培养。输入端口可允许无菌排出和补充培养基,细胞可采用整合显微镜来监测。参见例如Klebanoff等.(2012) J Immunother. 35 (9) :651-660, Terakura等.(2012) Blood. 1:72-82, 和Wang等.(2012) J Immunother. 35 (9) :689-701。

[0225] 在一些实施方式中,本文所述细胞群通过流式细胞术收集和富集(或消除),其中细胞经多种表面标志物染色并携带于流体流中。在一些实施方式中,本文所述的细胞群通过制备规模(FACS)-分选法收集和富集(或消除)。在某些实施方式中,本文所述的细胞群通过采用微机电系统(MEMS)芯片联合基于FACS的检测系统来收集和富集(或消耗)(参见例如,WO 2010/033140, Cho等(2010) Lab Chip 10, 1567-1573; 和Godin等(2008) J Biophoton. 1 (5) :355-376。在这两种情况中,细胞都可用多种标志物标记,以允许以高纯度分离明确的T细胞亚组。

[0226] 在一些实施方式中,抗体或结合伴侣用一种或多种可检测标志物标记,以利于正选择和/或负选择的分离。例如,分离可基于与荧光标记抗体的结合。在一些实施例中,将基于抗体或对一种或多种细胞表面标志物具有特异性的其它结合伴侣的结合所进行的细胞分离携带于流体流中,例如通过荧光活化的细胞分选(FACS)(其包括制备规模(FACS)和/或微机电系统(MEMS)芯片),例如与流式细胞术检测系统联合。此类方法允许进行基于多种标志物的同时正选择和负选择。

[0227] 在一些实施方式中,制备方法包括冷冻例如冻存所述细胞的步骤,在分离、孵育和/或工程改造之前或之后。在一些实施方式中,所述冷冻和后续融化步骤去除细胞群中的粒细胞,并且一定程度去除细胞群中的单核细胞。在一些实施方式中,将所述细胞悬浮于冷冻溶液中,例如在清洗去除血浆和血小板之后。可采用各种已知冷冻溶液和某些方面的参数。例子质疑用到包含20%DMSO和8%人血清白蛋白(HAS)的PBS,或是其它合适的细胞冷冻培养基。然后,用培养基1:1将其稀释,使得DMSO和HSA的终浓度分别是10%和4%。然后,以1℃/分钟的速率将细胞冷冻至-80℃,并贮存在液氮储罐的汽相中。

[0228] 在一些实施方式中,提供的方法包括培育、孵育、培养,和/或基因工程改造步骤。例如,在一些实施方式中,提供了用于对消耗的细胞群和培养起始组合物进行孵育和/或工程改造的方法。

[0229] 因此,在一些实施方式中,所述细胞群在培养起始组合物中孵育。孵育和/或工程改造可以在培养容器中进行,如单元、腔室、孔、柱、管、管组、阀,小瓶,培养皿,袋或其他培养或培养细胞的容器。

[0230] 在一些实施方式中,在基因工程改造之前或与基因工程改造一起孵育和/或培养细胞。孵育步骤可包括培养、孵育、刺激、活化、和/或增殖。在一些实施方式中,在刺激条件或刺激剂存在下孵育细胞或组合物。这类条件包括设计成诱导群中细胞增殖、繁殖、活化,

和/或存活,模拟抗原接触,和/或细胞预备以备基因改造如导入重组抗原受体的那些条件。

[0231] 所述条件可包括如下一项或多项:特定培养基、温度、含氧量、二氧化碳含量、时间、用剂如营养物、氨基酸、抗生素、离子,和/或刺激因子,例如细胞因子、趋化因子、抗原、结合伴侣、融合蛋白、重组可溶性受体,和设计用来活化细胞的任何其它物质。

[0232] 在一些实施方式中,刺激条件或用剂包括一种或多种物质如配体,它能够活化TCR复合物的胞内信号传导结构域。某些方面,所述物质打开或启动T细胞中的TCR/CD3胞内信号传导级联。这样的物质可包括抗体如对TCR组分和/或共刺激受体具有特异性的那些,例如抗-CD3、抗-CD28,所述抗体可以例如结合在固体支持物如珠上,和/或一种或多种细胞因子。任选地,扩增方法还可包括如下步骤:向培养基(如以至至少约0.5ng/ml的浓度)添加抗CD3和/或抗CD28抗体。在一些实施方式中,刺激型反应剂包括IL-2和/或IL-15,例如,至少约10单位/mL浓度的IL-2。

[0233] 某些方面,进行孵育的技术例如授予Riddell等的美国专利号6,040,177, Klebanoff等.(2012) J Immunother. 35 (9):651-660, Terakura等.(2012) Blood. 117:72-82 和/或Wang等.(2012) J Immunother. 35 (9):689-701中所述的那些。

[0234] 在一些实施方式中,T细胞群通过如下方式扩增:在培养启动组合物在添加饲养层细胞,如非分裂型外周血单核细胞(PBMC), (例如令所得细胞群中初始待扩增群中的各T淋巴细胞有至少约5、10、20或40或更多PBMC饲养层细胞);并孵育所述培养物(例如孵育足以扩增所述数量的T细胞的时间)。某些方面,所述非分裂型饲养细胞可包括经 γ -辐照的PBMC饲养细胞。在一些实施方式中,所述PBMC用约3000-3600拉德范围内的 γ 射线辐照以防止细胞分裂。某些方面,所述饲养细胞在添加T细胞群之前添加至培养基。

[0235] 在一些实施方式中,刺激条件包括适于人T淋巴细胞生长的温度,例如至少约25摄氏度,一般至少约30度,且一般是或约是37摄氏度。可选地,孵育还可包括添加非分裂型EBV-转化的类淋巴母细胞(LCL)作为饲养层细胞。LCL可以用约6000-10000拉德范围内的 α 射线辐照。某些方面,LCL饲养细胞以任何合适的量提供,例如LCL饲养细胞与初始T淋巴细胞的比率是至少约10:1。

[0236] 某些实施方式中,通过用抗原刺激原初或抗原特异性T淋巴细胞来获得抗原特异性T细胞,如抗原特异性CD4+和/或CD8+T细胞。例如,可如下产生对巨细胞病毒抗原的抗原特异性T细胞系或克隆:从感染对象分离T细胞并采用巨细胞病毒抗原体外刺激细胞。

[0237] B. 用于基因工程改造的方法和载体

[0238] 用于引入基因工程改造的组分(例如,抗原受体,例如,CAR或TCR)的各种方法是熟知的,并可用于本文提供的方法和组合物。示例性方法包括用于转移编码受体的核酸的方法,包括经由病毒载体,例如逆转录病毒或慢病毒,非病毒载体或转座子,例如睡美人(Sleeping Beauty)转座子系统。基因转移的方法可以包括转导,电穿孔或导致基因转移到细胞中的其他方法。

[0239] 在一些实施方式中,基因转移通过如下方式进行:首先,刺激细胞,例如,通过将其与刺激物合并,所述刺激物诱导响应,例如增殖、存活和/或活化,例如,通过细胞因子或活化标志物的表达来检测,然后转导该活化的细胞,并且在培养物中扩增至足以供于临床应用的量。

[0240] 在一些情况中,刺激因子(例如,淋巴因子或细胞因子)的过表达可能对对象具有

毒性。因此,在一些情况中,工程改造的细胞包括,例如在过继免疫治疗中给予之后,使细胞对体内负选择易感的基因区段。例如在一些方面中,所述细胞经工程改造,从而它们可因它们所给予的患者的体内状况的变化而被消除。可负选择的表型可通过插入赋予对所给予物质(例如,化合物)敏感性的基因来产生。可负选择的基因包括:单纯疱疹病毒I型胸苷激酶(HSV-I TK)基因(Wigler等,Cell 11:223,1977),其提供更昔洛韦敏感性;细胞次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶(HPRT)基因,细胞腺嘌呤磷酸核糖基转移酶(APRT)基因,细菌胞嘧啶脱氨酶(Mullen等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.89:33(1992))。

[0241] 在一些实施方式中,采用重组感染性病毒颗粒将重组核酸转移进入细胞,例如,源自猿病毒40(SV40)、腺病毒、腺相关病毒(AAV)的载体。在一些实施方式中,采用重组慢病毒载体或逆转录病毒载体,例如 γ -逆转录病毒载体,将重组核酸转移进入T细胞(参见例如,Koste等,(2014)Gene Therapy 2014年4月3日.doi:10.1038/gt.2014.25;Carlens等,(2000)Exp Hematol 28(10):1137-46;Alonso-Camino等,(2013)Mol Ther Nucl Acids 2,e93;Park等,Trends Biotechnol.2011年11月;29(11):550-557)。

[0242] 在一些实施方式中,所述逆转录病毒载体具有长末端重复序列(LTR),例如,源自莫洛尼鼠白血病病毒(MoMLV),骨髓增生性肉瘤病毒(MPSV),鼠胚胎干细胞病毒(MESV),鼠干细胞病毒(MSCV),脾病灶形成病毒(SFFV)或腺相关病毒(AAV)的逆转录病毒载体。大多数逆转录病毒载体源自鼠逆转录病毒。在一些实施方式中,逆转录病毒包括源自任何禽或哺乳动物细胞来源的那些。逆转录病毒通常是兼嗜性的,这意味着它们能够感染数种物种(包括人类)的宿主细胞。在一个实施方式中,用待表达的基因替代逆转录病毒gag、pol和/或env序列。已描述许多示例性逆转录病毒系统(例如,美国专利号5,219,740;6,207,453;5,219,740;Miller和Rosman(1989)BioTechniques 7:980-990;Miller,A.D.(1990)Human Gene Therapy1:5-14;Scarpa等(1991)Virology 180:849-852;Burns等(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:8033-8037;和Boris-Lawrie和Temin(1993)Cur.Opin.Genet.Develop.3:102-109。

[0243] 慢病毒转导方法是已知的。示例性方法描述于,例如,Wang等,(2012)J.Immunother.35(9):689-701;Cooper等,(2003)Blood.101:1637-1644;Verhoeven等,(2009)Methods Mol Biol.506:97-114;和Cavalieri等,(2003)Blood.102(2):497-505。

[0244] 在一些实施方式中,通过电穿孔将重组核酸转移进入T细胞(参见例如,Chicaybam等,(2013)PLoS ONE 8(3):e60298和Van Tedeloo等,(2000)GeneTherapy7(16):1431-1437)。在一些实施方式中,通过转位将重组核酸转移进入T细胞(参见例如,Manuri等(2010)Hum Gene Ther 21(4):427-437;Sharma等,(2013)Molec Ther Nucl Acids 2,e74;和Huang等,(2009)Methods Mol Biol 506:115-126)。在免疫细胞中引入和表达遗传物质的其它方法包括磷酸钙转染(例如,描述于《分子生物学方案新编》(Current Protocols in Molecular Biology),约翰威利父子公司(John Wiley & Sons),纽约州纽约)、原生质体融合、阳离子脂质体介导的转染;钨颗粒促进的微粒轰击(Johnston,Nature,346:776-777(1990));和磷酸锆DNA共沉淀(Brash等,Mol.Cell Biol.,7:2031-2034(1987))。

[0245] 用于转移编码重组产物的核酸的其他方法和载体是描述于,例如,国际专利申请公开号W02014055668和美国专利号7,446,190的那些。

[0246] 在一些实施方式中,可在扩增期间或之后,用T细胞受体或嵌合抗原受体(CAR)转

染细胞(例如T细胞)。用于引入所需受体基因的该转染可用任何合适的逆转录病毒载体进行(例如)。然后,可从起始刺激物(例如CD3/CD28刺激物)释放基因修饰的细胞群,随后用第二类刺激物(例如通过从头诱导的受体(*de novo* introduced receptor))刺激。该第二类刺激物可包括:肽/MHC分子形式的抗原性刺激物,遗传引入受体的同源(交联)配体(例如CAR的天然配体)或任何直接结合新受体框架内的任何配体(如抗体)(例如同识别受体内的恒定区)。参见,例如,Cheadle等,“Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy”(“用于基于T细胞的治疗的嵌合抗原受体”)2012;907:645-66或Barrett等,Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer(“癌症的嵌合抗原受体治疗”)Annual Review of Medicine Vol.65:333-347(2014)。

[0247] 用于引入的其他核酸(例如基因)包括用以例如通过促进转移的细胞的活力和/或功能改善治疗功效的那些;用以提供遗传标志物以供选择和/或评价细胞的基因,例如以评估体内存活或定位;用以改善安全性的基因,例如,通过使细胞对体内负选择易感,如Lupton S.D.等,Mol. and Cell Biol.,11:6(1991);和Riddell等,Human Gene Therapy 3:319-338(1992)所述;也参见Lupton的公开号PCT/US91/08442和PCT/US94/05601等,其描述显性阳性可选择的标志物与阴性可选择的标志物的融合衍生的双功能可选择的融合基因的应用。参见例如Riddell等,美国专利号6,040,177,第14-17栏处。

[0248] IV. 组合物、制剂和施用方法

[0249] 还提供了含有嵌合受体(如CAR),例如含有CD40源性的信号传导结构域的组合物,以及含有工程改造的细胞的组合物,包括药物组合物和制剂。本文还提供了使用这些组合物的方法以及这些组合物的用途,如在表达该抗原的疾病、病症和异常的治疗中的使用和用途,以及在检测、诊断和预防方法中的应用。

[0250] A. 组合物/制剂

[0251] 术语“药物制剂”指此类形式的制剂:所述其中所含活性成分的生物学活性有效,并且不含对待接受该制剂的对象具有不可接受的毒性的其他成分。

[0252] “药学上可接受的运载体”指药物制剂中的一种成分,其不是活性成分,其对对象无毒。药学上可接受的运载体包括但是不限于,缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0253] 某些方面,运载体的选择部分决定于具体的细胞和/或给药方法。因此,存在多种合适的配方。例如,所述药物组合物可包含防腐剂。合适的防腐剂可包括,例如,对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸钠和苯扎氯铵。某些方面,采用两种或更多种防腐剂的混合物。防腐剂或其混合物的存在量通常是约0.0001%至约2%(以组合物总重量计)。运载体描述于,例如,《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences),第16版,Osol, A. 编(1980)。在所用剂量和浓度下,药学上可接受的运载体通常是对受者无毒的,包括但不限于:缓冲剂如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸缓冲剂;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六烃季铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚;丁基或苄基醇;对羟基苯甲酸烷酯,如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(小于约10个残基)的多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它糖,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;形成盐的抗衡离子,如钠;金属络合物(如Zn-

蛋白质络合物);和/或非离子型表面活性剂,例如聚乙二醇(PEG)。

[0254] 某些方面,所述组合物包含缓冲剂。合适的缓冲剂包括,例如,柠檬酸、柠檬酸钠、磷酸、磷酸钾和多种其他酸和盐。某些方面,采用两种或更多种缓冲剂的混合物。缓冲剂或其混合物的存在量通常是约0.001%至约4%(以组合物总重量计)。用于制备可给予的药物组合物的方法是已知的。示例性方法具体描述于,例如,《雷明顿:药物科学与实践》(Remington:The Science and Practice of Pharmacy),LWW公司(Lippincott Williams&Wilkins);第21版(2005年5月1日)。

[0255] 所述制剂或组合物还可包含超过一种对于待接受细胞治疗的具体适应症、疾病或病症有用的活性成分,优选活性与所用细胞互补的那些,这些活性成分各自的活性剂不会对彼此产生不利影响。这类活性成分适合以有效用于所需目的的用量联合存在。因此,在一些实施方式中,所述药物组合物还包含其它药学活性物质或药物,例如化疗剂,例如,天冬酰胺酶,白消安,卡铂,顺铂,柔红霉素,多柔比星,氟尿嘧啶,吉西他滨,羟基脲,甲氨蝶呤,紫杉醇,利妥昔单抗,长春碱,长春新碱等。

[0256] 在一些实施方式中,药物组合物包含有效治疗或预防疾病或病症的量如治疗有效或预防有效量的细胞。在一些实施方式中,通过定期评估治疗的对象来监测治疗或预防功效。对于数天或更长时间的重复给药,可根据所述病症重复治疗直至疾病症状得到所需阻遏。然而,其它剂量方案可能是有用的并且可以确定。所需剂量的递送可以通过单次推注(bolus)给予所述组合物,通过多次推注给予所述组合物或通过连续输注给予组合物。

[0257] 可采用标准给药技术、制剂和/或器械给予细胞。本文提供了用于储存和给予组合物的制剂和装置,如注射器和瓶。所述细胞的给予可以是自体同源或是异源的。例如,可以从一个对象获取免疫抑制细胞或祖细胞,给予同一对象或不同的相容对象。外周血衍生的免疫抑制细胞或其后代(例如,体内、离体或体外衍生的)可通过局部注射给予,包括导管给药、全身注射、局部注射、静脉注射、或胃肠外给药。当给予治疗性组合物(例如含有遗传修饰免疫抑制细胞的药物组合物)时,其通常被配制成单位剂型的可注射形式(溶液、悬液、乳液)。

[0258] 制剂包括用于口服、静脉内、腹膜内、皮下、肺、透皮、肌肉内、鼻内、粘膜、舌下或栓剂给药的那些。在一些实施方式中,所述细胞群胃肠外给予。本文所用的术语“胃肠外”包括静脉内、肌内、皮下、直肠、阴道和腹膜内给予。在一些实施方式中,所述细胞群通过静脉内、腹膜内或皮下注射采用外围全身递送给予对象。

[0259] 在一些实施方式中,组合物是无菌液体制剂,例如等渗水性溶液、悬液、乳液、分散系或粘性组合物,其某些方面可缓冲至选定pH。液体制剂通常比凝胶、其他粘性组合物和固体组合物更容易制备。另外,液体组合物一定程度上多少更便于给药,尤其是通过注射给药。在另一方面,粘性组合物可配制在合适的粘度范围以延长与特定组织的接触时间。液体或粘性组合物可包括运载体,其可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、多羟基化合物(例如,甘油、丙二醇、液体聚乙二醇)及以上合适的混合物。

[0260] 可通过将所述细胞纳入溶剂中,例如与合适的运载体、稀释剂、或赋形剂如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等活化,来制备无菌可注射溶液。也可将该组合物冻干。组合物可含有辅助性物质,如润湿、分散、或乳化剂(例如,甲基纤维素)、pH缓冲剂、胶凝或粘度增强添加剂、防腐剂、风味剂、色素等,这取决于所需的给药和制备途径。某些方面,可查阅

标准文件来制备合适制备物。

[0261] 可添加增强组合物稳定性和无菌性的各种添加剂,包括抗微生物防腐剂、抗氧化剂、螯合剂和缓冲剂。也可通过各种抗细菌剂和抗真菌剂(如对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、山梨酸等)确保避免微生物作用。可通过使用延迟吸收的物质(如单硬脂酸铝和明胶)延长可注射药物形式的吸收。

[0262] 用于体内给药的制剂一般为无菌的。例如,可通过无菌滤膜过滤方便地做到无菌。

[0263] B. 给药方法

[0264] 本文提供给予所述细胞、群和组合物的方法,所述细胞、群和组合物用于治疗或防止疾病、病症和紊乱,包括癌症的应用。在一些实施方式中,将细胞、群和组合物给予具有具体待治疗(例如通过过继细胞治疗(例如过继T细胞治疗))的疾病或病症的对象或患者。在一些实施方式中,向对象,如具有疾病或病症或者处于疾病或病症风险中的对象给予提供的细胞和组合物。某些方面,所述方法由此治疗例如减轻所述疾病或病症的一种或多种症状,例如减小癌症的肿瘤负荷,该癌症表达经改造T细胞识别的抗原。

[0265] 给予过继细胞治疗所用细胞的方法是已知的,可与本文方法和组合物联用。例如,过继T细胞治疗方法描述于,例如,Gruenberg等的美国专利申请公开号2003/0170238;Rosenberg的美国专利号4,690,915;Rosenberg(2011)Nat Rev Clin Oncol.8(10):577-85)。参见例如Themeli等.(2013)Nat Biotechnol.31(10):928-933;Tsukahara等.(2013)Biochem Biophys Res Commun 438(1):84-9;Davila等.(2013)PLoS ONE 8(4):e61338。

[0266] 本文中所用的“对象”是哺乳动物,例如人或其它动物,并且通常是人。在一些实施方式中,向接受所述细胞、细胞群或组合物给予的对象(例如,患者)是哺乳动物,通常是灵长类,例如人。在一些实施方式中,所述灵长类是猴子或猿。所述对象可以是男性或女性,并且可以是任何合适的年龄,包括婴儿,少年,青少年,成人和老年对象。在一些实施方式中,所述对象是非灵长类哺乳动物,例如啮齿类。

[0267] 本文中所用的术语“治疗”(及其语法变化形式例如“治疗的”和“治疗性”)指完全或部分减轻或减少疾病或病症或紊乱或与其相关的症状、不利作用或后果或表型。所需的治疗效果包括但不限于,预防疾病的发生或复发、减轻症状、减少疾病的任何直接或间接病理学结果、防止转移、减缓疾病进展速度、改善或减轻疾病状态和减轻或改善预后。该术语不表示完全治愈疾病或完全消除任一症状或作用或所有症状或后果。

[0268] 本文中所用的“延迟疾病的发展”表示推迟、阻碍、减缓、减慢、稳定、遏制和/或拖延所述疾病(例如癌症)的发展。延缓可有不同的时间长度,这取决于疾病的病史和/或待治疗的个体。如本领域技术人员所知,实际上,充分或显著的延缓可涵盖预防(对于未发展成所述疾病的个体而言)。例如,晚期癌症(例如转移的发展)可被延缓。

[0269] 本文中所用的“预防”包括对于在倾向于发展成某疾病但尚未被诊断为该病的对象中对疾病发生或复发的预防。在一些实施方式中,所提供的细胞和组合物用于延缓疾病发展或减缓疾病进展。

[0270] 本文中,“阻抑”某功能或活性指相比其他相同仅目标条件或参数不同的情况或者相比另一情况,功能或活性降低。例如,与没有细胞条件下的肿瘤生长速率相比,阻抑肿瘤生长的细胞降低了肿瘤的生长速度。

[0271] 用剂(如药物制剂、细胞或组合物)就给药而言的“有效量”指某一个量,按一定数量的剂量/用量且作用必要的时间长度,能够有效实现所需效果,例如治疗或预防性效果。

[0272] 反应剂(如药物制剂或细胞)的“治疗有效量”指某一个量,其按照一定数量的剂量和必需时程,能够有效实现所需治疗效果,例如疾病、病症或紊乱的治疗,和/或该治疗的药物动力学或药代动力学效果。治疗有效量可根据多种因素而不同,例如疾病状态、年龄、性别,和对象体重,以及给予的细胞群。在一些实施方式中,本文方法涉及给予有效量(例如治疗有效量)的所述细胞和/或组合物。

[0273] “预防有效量”指某一个量,其按照一定数量的剂量和必要时程,能够有效实现所需预防效果。通常但非一定,由于预防剂量在疾病的早期或之前用于对象,预防有效量将小于治疗有效量。

[0274] 所治疗的疾病或病症可以是如下所述任何疾病或病症:其中抗原的表达与疾病状况或紊乱的病因相关和/或参与疾病状况或紊乱的病因,例如抗原表达造成、加剧或者涉及该疾病、病症或紊乱。示例性的疾病和病症可包括与细胞恶性化或转化相关的疾病或病症(例如肿瘤)、自身免疫性或炎性疾病或感染性疾病(例如细菌、病毒或其他病原体所致感染)。示例性的抗原,包括与可接受治疗的各自疾病和病症关联的抗原,如前文所描述。某些具体实施方式中,嵌合抗原受体或转基因TCR特异性结合与疾病或病症相关抗原。

[0275] 在一些实施方式中,疾病或病症是肿瘤,例如实体瘤,淋巴瘤,白血病,血液肿瘤,转移性肿瘤或其他癌症或肿瘤类型。

[0276] 在一些实施方式中,所述疾病或病症是感染性疾病或病症,例如但不限于,病毒、逆转录病毒、细菌和原生动物感染、免疫缺陷、巨细胞病毒(CMV)、EB病毒(EBV)、腺病毒、BK多瘤病毒。在一些实施方式中,所述疾病或病症是自体免疫或炎性疾病或病症,例如关节炎,例如类风湿性关节炎(RA),I型糖尿病,系统性红斑狼疮(SLE),炎性肠病,牛皮癣,硬皮病,自身免疫性甲状腺疾病,格雷夫斯病,克罗恩病多发性硬化,哮喘和/与移植相关的疾病或病症。

[0277] 在一些实施方式中,与疾病或病症相关的抗原选自:孤儿酪氨酸激酶受体ROR1,B细胞成熟抗原(BCMA),tEGFR,Her2,L1-CAM,CD19,CD20,CD22,间皮素,CEA,乙型肝炎表面抗原,抗叶酸受体,CD23,CD24,CD30,CD33,CD38,CD44,EGFR,EGP-2,EGP-4,EPHa2,ErbB2、3或4,erbB二聚体,EGFRvIII,FBP,FCRL5,FCRH5,胎儿乙酰胆碱e受体,GD2,GD3,HMW-MAA,IL-22R- α ,IL-13R- α 2,kdr, κ 轻链,Lewis Y,L1-细胞粘附分子(L1-CAM),黑素瘤相关抗原(MAGE)-A1,MAGE-A3,MAGE-A6,黑素瘤优先表达抗原(PRAME),存活素,EGP2,EGP40,TAG72,B7-H6,IL-13受体 α 2(IL-13Ra2),CA9,GD3,HMW-MAA,CD171,G250/CAIX,HLA-AI MAGE A1,HLA-A2NY-ESO-1,PSCA,叶酸受体- α ,CD44v6,CD44v7/8,avb6整联蛋白,8H9,NCAM,VEGF受体,5T4,胎儿AchR,NKG2D配体,CD44v6,双重抗原,和与通用标签关联的抗原,癌症-睾丸抗原,间皮素,MUC1,MUC16,PSCA,NKG2D配体,NY-ESO-1,MART-1,gp100,癌胚抗原,ROR1,TAG72,VEGF-R2,癌胚抗原(CEA),前列腺特异性抗原,PSMA,Her2/neu,雌激素受体,孕酮受体,肝配蛋白B2,CD123,CS-1,c-Met,GD-2,0-乙酰化GD2(OGD2),CE7,Wilms肿瘤1(WT-1)和细胞周期蛋白,细胞周期蛋白A2,CCL-1,CD138和/或生物素化的分子,和/或病原体特异性抗原,如由HIV,HCV,HBV或其他病原体表达的分子。

[0278] 因此,本文方法和应用包括用于过继细胞疗法的方法和应用。在一些实施方式中,

该方法包括向对象、组织或细胞(如患有、易患或疑患某疾病、病症或紊乱的对象、组织或细胞)给予细胞或含有该细胞的组合物。在一些实施方式中,将所述细胞、群和组合物给予患有具体待治疗(例如通过过继细胞治疗(如过继T细胞治疗))的疾病或病症的对象。在一些实施方式中,给予对象(如患有、易患或疑患疾病或病症的对象)细胞或组合物以缓解疾病或病症的一种或多种症状。

[0279] 在一些实施方式中,所述细胞治疗(如过继T细胞治疗)通过自体移植进行,其中,自接受细胞治疗的对象分离和/或以其他方式制得细胞,或者从该对象的样品获得细胞。因此,某些方面,细胞源自需要治疗的对象(例如,患者),并在分离和处理后回输给同一对象。

[0280] 在一些实施方式中,细胞治疗(如过继T细胞治疗)通过同种异体移植进行,其中,作为分离和/或以其他方式制备细胞的来源的对象(如第一对象)不是待接受或最终接受细胞治疗的对象。此类实施方式中,然后将所述细胞给予相同物种的不同对象,例如第二对象。在一些实施方式中,所述第一和第二对象遗传相同。在一些实施方式中,所述第一和第二对象遗传学相似。在一些实施方式中,所述第二对象表达与第一对象病毒相同的HLA类或超型。可用任何合适的手段给予细胞。给药和给予可部分取决于该给予是短期还是长期的。不同给药方案包括但不限于在不同时间点单次或多次给予、推注给予和脉冲输注。

[0281] 在某些实施方式中,所述细胞或各细胞亚型群按照约1000亿细胞和/或每公斤体重该数量的细胞给予对象,例如100万至约500亿细胞(如约500万细胞、约2500万细胞、约5亿细胞、约10亿细胞、约50亿细胞、约200亿细胞、约300亿细胞、约400亿细胞,或以上任意两个值构成的范围),例如约1000万至约1000亿细胞(如约2000万细胞、约3000万细胞、约4000万细胞、约6000万细胞、约7000万细胞、约8000万细胞、约9000万细胞、约100亿细胞、约250亿细胞、约500亿细胞、约750亿细胞、约900亿细胞,或以上任意两个值构成的范围),有时是约1亿细胞至约500亿细胞(如约1.2亿细胞、约2.5亿细胞、约3.5亿细胞、约4.5亿细胞、约6.5亿细胞、约8亿细胞、约9亿细胞、约30亿细胞、约300亿细胞、约450亿细胞),或以上任一范围内任一数值,和/或每公斤体重以上所述数量的细胞。同样,剂量可根据疾病或紊乱和/或患者和/或其它治疗的具体属性而不同。在一些实施方式中,细胞作为联合治疗的一部分给予,例如与另一治疗性干预(如抗体或经工程改造的细胞或受体或药剂(如细胞毒性或治疗行药剂))同时或以任何顺序依次给予。在一些实施方式中,细胞与一种或多种其它治疗剂共同给予或与另一治疗干预联合给予,或者同时或者以任何顺序依次进行。在一些情况中,所述细胞与其他治疗共同给予,时间上足够接近从而细胞群增强一种或多种其它治疗剂的作用,反之亦然。在一些实施方式中,细胞在一种或多种其它治疗剂之前给予。在一些实施方式中,细胞在一种或多种其它治疗剂之后给予。在一些实施方式中,一种或多种其他治疗剂包括细胞因子如IL-2,例如用于以增强持久性。在一些实施方式中,百万方法包括给予化疗剂。

[0282] 在给予细胞之后,在一些实施方式中,检测经工程改造细胞群的生物活性,例如采用任意已知方法。用以评估的参数包括:工程改造的或天然T细胞或其它免疫细胞与抗原的特异性结合,体内方式(例如,通过成像)或离体方式(例如,通过ELISA或流式细胞术)。在某些实施方式中,工程改造的细胞破坏靶细胞的能力可采用本领域已知的任何合适的方法来检测,例如描述于如下文献的细胞毒性试验,例如,Kochenderfer等,J.Immunotherapy,32(7):689-702(2009),和Herman等,J.Immunological Methods,285(1):25-40(2004)。在某

些实施方式中,通过测定一种或多种细胞因子例如CD 107a, IFN γ , IL-2和TNF的表达和/或分泌来检测细胞的生物活性。某些方面,生物活性通过评估临床效果来检测,例如肿瘤负荷或负载的减少。

[0283] 在某些实施方式中,所述工程改造的细胞以各种方式进一步修饰,从而增加其治疗或预防功效。例如,通过细胞群表达的工程改造的CAR或TCR可通过接头直接或间接地偶联靶向部分。与化合物偶联是本领域已知的,例如将CAR或TCR连接至靶向部分。参见例如, Wadwa等, *J. Drug Targeting* 3:1 1 1 (1995), 和美国专利5,087,616。

[0284] 定义

[0285] 如本文所用,单数形式的“一个”、“一种”和“该”包括复数指代对象,除非文本中另有明确说明。例如,“一种”或“一个”指“至少一种或一个”或“一种(个)或多种(个)”。应理解本文中所述的方面和变化形式包括:“由(这些方面和变化形式)组成”和/或“基本由(这些方面和变化形式)组成”。

[0286] 本公开内容中,请求保护的主题的各个方面均以范围形式呈现。应当理解,范围形式的描述仅仅是为了方便和简洁,并且不应被解释为对所要求保护的主题的范围的硬性限制。因此,范围的描述应当被认为已经具体公开了所有可能的子范围以及该范围内的单个数值。例如,在提供值的范围的情况下,应当理解,在该范围的上限和下限之间的每个中间值以及在所述范围内的任何其他所述的或中间的值均被包括在要求保护的主题内。所述较小范围内可独立地包含这些较小范围的上下限,它们也属于请求保护的主题的范围,除非明确地排除所述范围的上下限。设定范围包含一个或两个限值时,请求保护的主题也包括排除所述限值之一或两个的范围。这普遍适用,与范围宽度无关。

[0287] 本文使用的术语“约”是指本技术领域技术人员容易知晓的各值的通常误差范围。提及值或参数时的“约”包括(并公开)涉及该值或参数本身的实施方式。例如,提及“约X”的描述包括“X”的描述。

[0288] 本文中所用的组合物指,两种或更多种产物、物质或化合物,包括细胞,的任何混合物。组合物可以是溶液、悬液、液体、粉末、糊剂、水性、非水性或其任意组合。

[0289] 本文中,就一种或多种具体细胞类型或细胞群的“富集”指提高该细胞类型或群的数量或百分比,例如相比组合物中的总细胞数量或所述组合物的体积、或相对于其它细胞类型提高,例如通过基于细胞群或细胞表达标志物的正选择,或通过基于待消除细胞群或细胞上没有的标志物的负选择。该术语不需要从所述组合物完全去除其它细胞、细胞类型或群,并且不需要如此富集的细胞在组合物中占100%或甚至接近100%。

[0290] 本文中,称细胞或细胞群就特定标志物呈“阳性”指所述细胞上或细胞中存在可测水平的该特定标志物(通常是表面标志物)。说到表面标志物,该术语指据流式细胞术检测到的表面表达,例如用特异性结合该标志物的抗体染色并检测该抗体,其中,该染色可被流式细胞术以一定水平检测到,该水平显著高于用相同同种型的对照—除该对照之外条件完全相同—用相同方法所得染色水平,和/或实质性近似已知该标志物阳性的细胞的水平,和/或显著高于已知该标志物阴性的细胞的水平。

[0291] 本文中,称细胞或细胞群就具体标志物呈“阴性”指所述细胞上或细胞中没有可测水平的该标志物通常是表面标志物。说到表面标志物,该术语指据流式细胞术检测到的表面表达,例如用特异性结合该标志物的抗体染色并检测该抗体,其中,该染色没有能被流式

细胞术以以下所述的水平检测到,该水平显著高于用相同同种型的对照—除该对照之外条件完全相同—用相同方法所得染色水平,和/或检测到的水平显著低于已知该标志物阳性的细胞的水平和/或实质性近似已知该标志物阴性的细胞的水平。

[0292] 本文所用术语“表达”是指基于核酸分子编码序列(例如基因)产生多肽的过程。该过程可包括转录、转录后控制、转录后修饰、翻译、翻译后控制、翻译后修饰或其任意组合。

[0293] 本文中所用的对象包括任何活的生物体,例如人类和其它哺乳动物。哺乳动物,包括但不限于,人类和非人动物,包括农场动物,体育动物,啮齿类和宠物。

[0294] 如本文所用,对照是指与测试样品基本相同的样品,区别在于对照未用测试参数处理,或者,如果是血浆样品,对照可以来自未受目标条件/病症影响的正常志愿者。对照也可作为内部对照。

[0295] 本文所用的“可操作地连接”是指组件,如DNA序列,例如,异源核酸和调节序列以允许在合适的分子(例如,转录活化蛋白)结合至调节序列时的基因表达的方式的结合。因此,这意味着所述的组分处于允许它们以目标方式发挥功能的关系中。

[0296] 当用于核苷酸序列(参照核苷酸序列)或氨基酸序列(参照氨基酸序列)时,本文中所用的“序列相同性百分数(%)”和“相同性百分数”定义为,序列比对和引入间隙(必要时)以实现最大序列相同性百分比之后,候选序列中与参照多肽序列的残基相同的核苷酸残基或氨基酸残基的百分数。以测定序列相同性百分率为目的比对可以本领域技术范围内的不同方式实现,例如,使用公共渠道可获得的计算机软件如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员能够确定用于比对序列的合适参数,包括使比较的序列实现全长最大对齐所需的任何算法。

[0297] 本文所用术语“载体”指能够扩增与之相连的另一核酸的一种核酸分子。该术语包括自复制核酸结构形式的载体,已经进入宿主细胞(载体引入其中的细胞)基因组的载体。某些载体能够引导与之操作性连接的核酸的表达。此类载体在本文中称为“表达载体”。载体包括病毒载体,如慢病毒载体。

[0298] 示例性实施方式

[0299] 提供的实施方式包括:

[0300] 1. 一种嵌合受体,包含:

[0301] (a) 配体结合结构域;和

[0302] (b) 细胞内信号传导结构域,其包含(i) 能够诱导TRAF-6活化或细胞定位和/或能够诱导TRAF-6介导的信号传导的TNF-受体相关因子6 (TRAF-6) 诱导结构域;和(ii) 活化性胞质信号传导结构域。

[0303] 2. 如实施方式1所述的嵌合受体,其中TRAF-6诱导结构域包含TRAF-6结合结构域或能够与包含TRAF-6结合结构域的分子结合的结构域或招募包含TRAF-6结合结构域的分子的结构域。

[0304] 3. 如实施方式1所述的嵌合受体,其中

[0305] TRAF-6结合结构域包含具有Pro-Xaa-Glu-Xaa-Xaa-Xaa (SEQ ID NO:26) 的氨基酸序列;和/或

[0306] TRAF-6结合结构域不与TRAF-6以外的TRAF分子特异性结合;和/或

[0307] 嵌合受体不包含能够特异性结合至任何其他TRAF分子,TRAF-1,TRAF-2,TRAF-3

和/或TRAF-5的结合结构域和/或能够招募特异性结合至任何其他TRAF分子,TRAF-1,TRAF-2,TRAF-3和/或TRAF-5的分子的结合结构域。

[0308] 4.如实施方式1-3中任一项所述的嵌合受体,其中TRAF-6诱导结构域是或包含选自TNF-R家族成员、细胞因子受体和To11样受体(TLR)的分子的TRAF-6诱导结构域,或者是选自TNF-R家族成员、细胞因子受体和To11样受体(TLR)的分子的TRAF-6诱导结构域的功能性片段或变体。

[0309] 5.如实施方式4所述的嵌合受体,其中

[0310] 该分子不包含该分子衍生的任何其他TRAF诱导结构域;

[0311] 该分子不包含该分子衍生的TRAF-1诱导结构域;

[0312] 该分子不包含该分子衍生的任何其他TRAF-2诱导结构域;

[0313] 该分子不包含该分子衍生的任何其他TRAF-3诱导结构域;

[0314] 该分子不包含该分子衍生的任何其他TRAF-4诱导结构域;

[0315] 该分子不包含该分子衍生的任何其他TRAF-5诱导结构域;

[0316] 该分子不包含能够诱导另一TRAF的或TRAF-1、TRAF-2、TRAF-3或TRAF-5的活化或细胞定位的分子的结构域,和/或

[0317] 该分子不包含能够通过另一TRAF和/或TRAF-1,TRAF-2,TRAF-3或TRAF-5诱导信号传导的分子的结构域。

[0318] 6.如实施方式1-5中任一项所述的嵌合受体,其中:

[0319] TRAF-6诱导结构域是或包含肿瘤坏死因子(TNF)-受体超家族的分子的胞质信号传导结构域,或者是其功能变体或片段;或者

[0320] TRAF-6诱导结构域是或包含To11/IL-1家族的分子的胞质信号传导结构域或者是其功能变体或片段。

[0321] 7.如实施方式4-6中任一项所述的嵌合受体,其中所述分子选自CD40,RANK和1型白细胞介素-1受体(IL1R1)。

[0322] 8.如实施方式1-7中任一项所述的嵌合受体,其中所述TRAF-6诱导结构域包含选自以下的氨基酸序列:

[0323] (i) SEQ ID NO:12、14或16所示的氨基酸序列;

[0324] (ii) 包含与SEQ ID NO:12、14或16显示至少85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或更多序列相同性的氨基酸序列的功能变体;

[0325] (iii) 包含氨基酸序列的功能变体,所述氨基酸序列与SEQ ID NO:12具有小于100%的序列相同性,并且与SEQ ID NO:12具有至少85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%的序列相同性;或

[0326] (iv) (i)、(ii)或(iii)的功能片段。

[0327] 9.如实施方式6-8中任一项所述的嵌合受体,其中功能变体或功能片段能够诱导TRAF-6的活化或细胞定位,和/或能够诱导TRAF-6-介导的信号传导和/或包含TRAF-6结合结构域或包含能够与包含TRAF-6结合结构域的分子结合的结构域或招募包含TRAF-6结合结构域的分子的结构域。

[0328] 10.如实施方式2或9所述的嵌合受体,其中TRAF-6诱导部分招募包含TRAF-6结合

结构域的分子,并且招募的分子是或包含IRAK和/或TRAF-6诱导部分包含能招募IRAK的TIR结构域。

[0329] 11.如实施方式1-10中任一项所述的嵌合受体,其中所述TRAF-6诱导结构域不是或不包含CD40或OX40的胞质信号传导结构域,和/或不是或不包含CD40或OX40的完整胞质结构域,不是或不包含SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列,和/或不包含除了TRAF-6结合结构域以外的OX40或CD40的TRAF结合结构域。

[0330] 12.如实施方式1-11中任一项所述的嵌合受体,其中所述细胞内信号传导结构域从其N到C末端依次包含:配体结合域,(TRAF-6)诱导结构域和活化性胞质信号传导结构域。

[0331] 13.如实施方式1-12中任一项所述的嵌合受体,其中TRAF-6诱导结构域包含IL1R1的胞质信号传导结构域或其功能变体或片段,并且在配体结合后,嵌合受体能够与包含辅助信号传导结构域的第二嵌合受体形成多聚体复合物,该多聚体复合物能够诱导TRAF-6的活化或细胞定位,和/或能够诱导TRAF-6介导的信号传导。

[0332] 14.如实施方式13所述的嵌合受体,其中辅助信号传导结构域包含足以与第一嵌合受体形成多聚体复合物的IL1RAP的胞质信号传导结构域或其功能变体或片段。

[0333] 15.如实施方式13或14所述的嵌合受体,其中多聚体复合物是异二聚体复合物。

[0334] 16.一种嵌合受体,包含:

[0335] (a) 配体结合结构域;和

[0336] (b) 细胞内信号传导结构域,其包含:

[0337] (i) TRAF-6诱导结构域和辅助信号传导结构域,其中在配体结合后,TRAF-6诱导结构域和辅助信号传导结构域能够协同诱导TRAF-6的活化或细胞定位,和/或能够诱导TRAF-6介导的信号传导;和

[0338] (ii) 活化性胞质信号传导结构域。

[0339] 17.如实施方式16所述的嵌合受体,其中

[0340] TRAF-6诱导结构域是或包含IL1R1的胞质信号传导结构域或其功能变体或片段;并且

[0341] 辅助信号传导结构域是或包含IL1RAP的胞质信号传导结构域或其功能变体或片段。

[0342] 18.如实施方式16或17所述的嵌合受体,其中所述TRAF-6诱导结构域和所述辅助信号传导结构域直接或间接串联连接。

[0343] 19.如实施方式1-18中任一项所述的嵌合受体,其中活化性胞质信号传导结构域能够在T细胞中诱导初级活化信号,是T细胞受体(TCR)组分和/或包含基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)。

[0344] 20.如实施方式1-19中任一项所述的嵌合受体,其中所述活化性胞质信号传导结构域是或包含CD3- ζ (CD3 ζ) 链的 ζ 链的胞质信号传导结构域或其功能变体或信号传导部分。

[0345] 21.如实施方式1-20中任一项所述的嵌合受体,其中配体结合结构域是功能性非TCR抗原受体或转基因TCR。

[0346] 22.如实施方式1-21中任一项所述的嵌合受体,其是嵌合抗原受体(CAR),其中所述配体结合结构域是抗原结合结构域。

[0347] 23.如实施方式22所述的嵌合受体,其中所述抗原结合结构域是抗体或抗体片段。

[0348] 24.如实施方式23所述的嵌合受体,其中抗原结合结构域是抗体片段,其为单链片段。

[0349] 25.如实施方式23或24所述的嵌合受体,其中所述片段包含通过柔性免疫球蛋白接头连接的抗体可变区。

[0350] 26.如实施方式23-25中任一项所述的嵌合受体,其中所述片段包含scFv。

[0351] 27.如实施方式1-26中任一项所述的嵌合受体,其中所述配体结合结构域特异性结合与疾病或病症相关的抗原。

[0352] 28.如实施方式25所述的嵌合受体,其中

[0353] 所述疾病或病症是感染性疾病或病症,自身免疫性疾病,炎性疾病或肿瘤或癌症;

[0354] 配体结合结构域特异性结合至肿瘤抗原;和/或

[0355] 配体结合结构域特异性结合选自下组的抗原:ROR1,Her2,L1-CAM,CD19,CD20,CD22,间皮素,CEA,乙型肝炎表面抗原,抗叶酸受体,CD23,CD24,CD30,CD33,CD38,CD44,EGFR,EGP-2,EGP-4,EPha2,ErbB2,ErbB3,ErbB4,FBP,胎儿乙酰胆碱e受体,GD2,GD3,HMW-MAA,IL-22R- α ,IL-13R- α 2,kdr, κ 轻链,Lewis Y,L1-细胞粘附分子,MAGE-A1,间皮素,MUC1,MUC16,PSCA,NKG2D配体,NY-ESO-1,MART-1,gp100,肿瘤抗原,TAG72,VEGF-R2,癌胚抗原(CEA),前列腺特异性抗原,PSMA,雌激素受体,孕酮受体,肝配蛋白B2,CD123,CS-1,c-Met,GD-2,MAGE A3,CE7,肾母细胞瘤1(WT-1)细胞周期蛋白A1(CCNA1)

[0356] 29.如实施方式1-28中任一项所述的嵌合抗原受体,还包含连接所述配体结合结构域和所述胞内信号传导结构域的跨膜结构域。

[0357] 30.如实施方式29所述的嵌合受体,其中跨膜结构域与TRAF-6诱导型结构域连接,由此TRAF-6诱导型结构域位于跨膜结构域和活化信号传导结构域之间。

[0358] 31.如实施方式29或30所述的嵌合受体,其中所述跨膜结构域包含一分子的跨膜结构域,所述分子包含TRAF-6诱导型结构域,或其功能片段或变体。

[0359] 32.如实施方式31所述的嵌合受体,其中跨膜结构域是或包含选自TNF-R家族成员、细胞因子受体和To11样受体(TLR)的分子的跨膜结构域或其功能片段或变体。

[0360] 33.如实施方式29-32中任一项所述的嵌合受体,其中跨膜结构域和TRAF-6诱导型结构域来自相同的分子。

[0361] 34.如实施方式32或33所述的嵌合受体,其中所述分子选自CD40,RANK和1型白细胞介素-1受体(IL1R1)。

[0362] 35.如实施方式32-34中任一项所述的嵌合受体,其中所述跨膜结构域包含选自以下的氨基酸序列:

[0363] (i) SEQ ID NO:11、13或15所示的氨基酸序列;

[0364] (ii) 包含与SEQ ID NO:11、13或15显示至少85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或更多序列相同性的氨基酸序列的功能变体;

[0365] (iii) (i) 或(ii) 的功能片段。

[0366] 36.如实施方式1-35中任一项所述的嵌合受体,其中所述细胞内信号传导结构域还包含(iii) 共刺激信号传导结构域。

[0367] 37.如实施方式36所述的嵌合受体,其中所述共刺激信号传导结构域包含T细胞共

刺激分子的胞质信号传导结构域或其功能变体或信号传导部分。

[0368] 38. 如实施方式36或37所述的嵌合受体, 其中所述共刺激信号传导结构域包含PI-3激酶诱导结构域。

[0369] 39. 如实施方式36-38中任一项所述的组合物, 其中所述共刺激信号传导结构域包含CD28、4-1BB或ICOS分子的胞质信号传导结构域, 或者是其功能变体或信号传导部分。

[0370] 40. 如实施方式36-39中任一项所述的嵌合受体, 其中:

[0371] 共刺激信号传导结构域位于TRAF-6诱导结构域和活化性信号传导结构域之间; 或

[0372] TRAF-6诱导结构域位于共刺激信号传导结构域和活化性信号传导结构域之间。

[0373] 41. 如实施方式29、30和36-40中任一项所述的嵌合受体, 其中所述跨膜结构域包含共刺激分子的跨膜结构域。

[0374] 42. 一种多聚体嵌合受体复合物, 其包含:

[0375] (1) 第一嵌合受体, 其包含: (a) 第一配体结合结构域; 和 (b) 第一细胞内信号传导结构域, 其包含 (i) TRAF-6诱导结构域和 (ii) 活化性胞质信号传导结构域; 和

[0376] (2) 第二嵌合受体, 其包含: (c) 第二配体结合结构域, 所述第二配体结合结构域与第一配体结合结构域能够结合相同的配体; 和 (d) 第二细胞内信号传导结构域, 其包含 (iii) 辅助信号传导结构域,

[0377] 其中在配体结合后, TRAF诱导结构域和辅助信号传导结构域能够协同诱导TRAF-6的活化或细胞定位, 和/或能够诱导TRAF-6介导的信号传导。

[0378] 43. 如实施方式41所述的多聚体复合物, 其中:

[0379] TRAF-6诱导结构域包含IL1R1的胞质信号传导结构域或其功能变体或片段; 并且

[0380] 辅助信号传导结构域包含IL1RAP的胞质信号传导结构域或其功能变体或片段。

[0381] 44. 如实施方式42或43所述的多聚体复合物, 其中第一配体结合结构域和第二配体结合结构域相同或基本相同。

[0382] 45. 如实施方式42-44中任一项所述的多聚体嵌合受体复合物, 其中所述第二嵌合受体还包含第二活化性胞质信号传导结构域, 其任选地与第一活化性胞质结构域相同或基本相同。

[0383] 46. 如实施方式42-45中任一项所述的多聚体嵌合受体复合物, 其中活化性胞质信号传导结构域 (可以是第一和/或第二活化性胞质信号传导结构域) 独立地是T细胞受体 (TCR) 组分和/或包含基于免疫受体酪氨酸的活化基序 (ITAM)。

[0384] 47. 如实施方式42-46中任一项所述的多聚体嵌合受体复合物, 其中所述活化性胞质信号传导结构域 (可以是第一和/或所述第二活化性胞质信号传导结构域) 独立地包含CD3- ζ (CD3 ζ) 的 ζ 链的胞质信号传导结构域或其信号传导部分。

[0385] 48. 如实施方式42-47中任一项的多聚体嵌合受体复合物, 其中所述第一和/或第二嵌合受体包含共刺激信号传导结构域。

[0386] 49. 如实施方式48所述的多聚体嵌合受体复合物, 其中共刺激信号传导结构域 (可以是第一和/或第二共刺激信号传导结构域) 独立地包含T细胞共刺激分子的胞质信号传导结构域或其信号传导部分。

[0387] 50. 如实施方式48或49所述的多聚体嵌合受体复合物, 其中共刺激信号传导结构域 (可以是第一和/或第二共刺激信号传导结构域) 独立地包含CD28、4-1BB或ICOS的胞质信

号传导结构域或其信号传导部分。

[0388] 51.如实施方式42-50中任一项所述的嵌合受体,其中第一和/或第二配体结合结构域是功能性非TCR抗原受体或转基因TCR。

[0389] 52.如实施方式42-51中任一项所述的多聚体嵌合受体复合物,其中所述第一和/或第二嵌合受体是嵌合抗原受体(CAR),其中所述第一和/或第二配体结合结构域是抗原结合结构域。

[0390] 53.如实施方式52所述的多聚体嵌合受体复合物,其中所述抗原结合结构域是抗体或抗体片段。

[0391] 54.如实施方式53所述的多聚体嵌合受体复合物,其中抗原结合结构域是抗体片段,其为单链片段。

[0392] 55.如实施方式53或54所述的多聚体嵌合受体复合物,其中所述片段包含通过柔性免疫球蛋白接头连接的抗体可变区。

[0393] 56.如实施方式53-55中任一项所述的多聚体嵌合受体复合物,其中所述片段包含scFv。

[0394] 57.如实施方式42-56中任一项所述的多聚体嵌合受体复合物,其中所述第一和/或第二嵌合受体还包含连接所述配体结合结构域和所述胞内信号传导结构域的跨膜结构域。

[0395] 58.编码实施方式1-41中任一项所述的嵌合受体的核酸分子。

[0396] 59.一种核酸分子,其包括:

[0397] 编码第一嵌合受体的核苷酸序列,其包含:(a)第一配体结合结构域;和(b)第一细胞内信号传导结构域,其包含(i)TRAF-6诱导结构域和(ii)活化性胞质信号传导结构域;和/或

[0398] 编码第二嵌合受体的核苷酸序列,其包含:(c)第二配体结合结构域,所述第二配体结合结构域与第一配体结合结构域能够结合相同的配体;和(d)第二细胞内信号传导结构域,其包含(iii)辅助信号传导结构域。

[0399] 60.如实施方式59所述的核酸分子,其是包含编码第一嵌合受体的核苷酸序列和编码第二嵌合受体的核苷酸序列的单一多核苷酸,并且任选地还包含至少一个启动子,其可操作地连接以控制第一嵌合受体和/或第二嵌合受体的表达。

[0400] 61.如实施方式60所述的核酸分子,其中:

[0401] 编码第一嵌合受体的核苷酸序列可操作地连接至第一启动子,并且编码第二嵌合受体的核苷酸序列可操作地连接至第二启动子,第一启动子和第二启动子可以相同或不同;或

[0402] 第一嵌合受体和第二嵌合受体被内部核糖体进入位点(IRES)、自切割肽或引起核糖体跳跃的肽(任选为T2A多肽)分开,并且第一和第二嵌合受体在相同的启动子控制下表达。

[0403] 62.如实施方式59-61中任一项所述的核酸分子,其中编码的第一嵌合受体和/或编码的第二嵌合受体是实施方式42-57中任一项所述的多聚体复合物的第一和/或第二嵌合受体。

[0404] 63.一种载体,其包括实施方式58-62中任一项所述的核酸分子。

- [0405] 64.如实施方式63所述的载体,其是病毒载体。
- [0406] 65.如实施方式63或64所述的载体,其为逆转录病毒载体,其任选为慢病毒载体或 γ 逆转录病毒载体。
- [0407] 66.一种工程改造的细胞,其包含实施方式58-62中任一项所述的核酸或实施方式63-65中任一项所述的载体或表达实施方式1-42中任一项所述的嵌合受体。
- [0408] 67.一种工程改造的细胞,其包括:
- [0409] 第一嵌合受体,包含:(a)第一配体结合结构域;和(b)第一细胞内信号传导结构域,其包含(i)TRAF-6诱导结构域和(ii)活化性胞质信号传导结构域;和/或
- [0410] 第二嵌合受体,包含:(c)第二配体结合结构域,所述第二配体结合结构域与第一配体结合结构域能够结合相同的配体;和(d)第二细胞内信号传导结构域,其包含(iii)辅助信号传导结构域。
- [0411] 68.如实施方式67所述的工程改造的细胞,其中第一嵌合受体和/或第二嵌合受体是实施方式42-57中任一项所述的多聚体复合物的第一和/或第二嵌合受体。
- [0412] 69.如实施方式63-65中任一项所述的载体或实施方式66-68中任一项所述的工程改造的细胞,其中所述细胞不表达经修饰的胱天蛋白酶分子或诱导型胱天蛋白酶分子,任选地,其中所述胱天蛋白酶分子为修饰的胱天蛋白酶-9或诱导型胱天蛋白酶9。
- [0413] 70.如实施方式66-69中任一项所述的工程改造的细胞,其是T细胞。
- [0414] 71.如实施方式66-70中任一项所述的工程改造的细胞,其是CD8+T细胞。
- [0415] 72.包含实施方式66-71中任一项所述的工程改造的细胞和任选药学上可接受的缓冲剂的组合物。
- [0416] 73.一种组合物,包含:
- [0417] 表达实施方式1-42中任一项所述的嵌合受体或表达实施方式42-57中任一项所述的多聚复合物的第一和/或第二个嵌合受体的工程改造的CD8+细胞;
- [0418] 包含与CD8+细胞中表达的嵌合受体不同的嵌合受体的工程改造的CD4+细胞,所述不同嵌合受体包含不同的共刺激信号传导结构域;和
- [0419] 任选的药学上可接受的缓冲剂。
- [0420] 74.如实施方式73所述的组合物,其中与CD8+细胞相比,CD4+细胞中表达的嵌合受体的唯一差异是不同的共刺激信号传导结构域。
- [0421] 75.如实施方式73或实施方式74所述的组合物,其中不同的共刺激信号传导结构域不包含能够诱导TRAF-6的活化或细胞定位和/或能够诱导TRAF-6介导的信号传导的TRAF-6诱导结构域。
- [0422] 76.如实施方式73-75中任一项所述的组合物,其中所述不同的共刺激信号传导结构域是或包含PI-3激酶诱导结构域,其能够诱导PI-3激酶的活化或细胞定位和/或能够诱导PI3-激酶/Akt信号传导。
- [0423] 77.如实施方式73-76中任一项所述的组合物,其中所述不同的共刺激信号传导结构域是或包含CD28、4-1BB或ICOS分子的胞质信号传导结构域,或者是其信号传导部分的功能变体。
- [0424] 78.如实施方式73-77中任一项所述的组合物,其中当用一种或多种刺激剂体外刺激时,所述组合物中的基因工程改造的细胞与用相同的一种或多种刺激剂刺激时相应的参

照细胞组合物相比,表现出增加的增殖或扩张能力。

[0425] 79.如实施方式73-78中任一项所述的组合物,其中,当在一种或多种刺激剂体外存在下刺激时,所述组合物中的基因工程改造的细胞与用相同的一种或多种刺激剂刺激时相应的参照细胞组合物相比,表现出记忆T细胞或记忆T细胞亚组的数量增加。

[0426] 80.如实施方式79所述的组合物,其中所述记忆T细胞或记忆T细胞亚组是CD62L⁺。

[0427] 81.如实施方式79或80所述的组合物,其中所述记忆T细胞或记忆T细胞亚组是中心记忆T细胞(T_{CM}),长寿命记忆T细胞或T记忆干细胞(T_{SCM})。

[0428] 82.如实施方式80或81所述的组合物,其中所述记忆T细胞或记忆T细胞亚组还包含表型,所述表型包含:

[0429] a) CD127⁺;和/或

[0430] b) CD45RA⁺、CD45RO⁻、CCR7⁺和CD27⁺中的任何一种或多种,以及t-bet^低、IL-7Ra⁺、CD95⁺、IL-2Rβ⁺、CXCR3⁺和LFA-1⁺中的任何一种或多种。

[0431] 83.如实施方式79-82中任一项所述的组合物,其中所述记忆T细胞或记忆T细胞亚组是CD8⁺。

[0432] 84.如实施方式79-83中任一项所述的组合物,其中,相比参照组合物,衍生自给予的基因工程改造的细胞的记忆T细胞或记忆T细胞亚组的数量包括增加的或更高百分比的中心记忆T细胞(T_{CM}),长寿命记忆T细胞或T记忆干细胞(T_{SCM})。

[0433] 85.如实施方式73-84中任一项所述的组合物,其中当用一种或多种刺激剂体外刺激时,所述组合物中的基因工程改造的细胞与用相同的一种或多种刺激剂刺激时相应的参照细胞组合物相比,表现出持久性和/或存活增加。

[0434] 86.如实施方式78-85中任一项所述的组合物,其中所述一种或多种刺激剂包含抗原,抗CD3/抗CD28抗体和/或包含IL-2, IL-15和/或IL-7细胞因子。

[0435] 87.如实施方式78-86中任一项所述的组合物,其中在所述刺激开始后的3天,4天,5天,6天,7天,10天或14天内观察到所述增加。

[0436] 88.一种治疗方法,其包括将实施方式66-71中任一项所述的细胞或实施方式72-87中任一项所述的组合物给予患有疾病或病症的对象。

[0437] 89.如实施方式88所述的方法,其中所述嵌合受体特异性结合至与所述疾病或病症相关的配体或抗原。

[0438] 90.如实施方式88或89所述的方法,其中,所述疾病或病症是癌症、肿瘤、自身免疫性疾病或病症,或感染性疾病。

[0439] 91.如实施方式88-90中任一项所述的方法,其中所述基因工程改造的T细胞在所述对象中表现出比在给予相同或约相同剂量参照细胞组合物的对象中增加或更长的扩增和/或持久性。

[0440] 92.如实施方式88-91中任一项所述的方法,其中在来自给予基因工程改造的细胞的对象中存在增加或更多数量的记忆T细胞或记忆T细胞亚组和/或增加或更长持久性的记忆T细胞或记忆T细胞亚组,与来自以相同或大约相同剂量给予参照细胞组合物中的对象中记忆T细胞或记忆T细胞亚组的数目或持久性相比。

[0441] 93.如实施方式92所述的方法,其中所述记忆T细胞或记忆T细胞亚组是CD62L⁺。

[0442] 94.如实施方式92或93所述的方法,其中所述记忆T细胞或记忆T细胞亚组是中心

记忆T细胞(T_{CM}),长寿命记忆T细胞或T记忆干细胞(T_{SCM})。

[0443] 95.如实施方式93或94所述的方法,其中所述记忆T细胞或记忆T细胞亚组还包含表型,所述表型包含:

[0444] a) CD127⁺;和/或

[0445] b) CD45RA⁺、CD45RO⁻、CCR7⁺和CD27⁺中的任何一种或多种,以及t-bet^低、IL-7Ra⁺、CD95⁺、IL-2Rβ⁺、CXCR3⁺和LFA-1⁺中的任何一种或多种。

[0446] 96.如实施方式88-95中任一项所述的方法,其中所述记忆T细胞或记忆T细胞亚组是CD8⁺。

[0447] 97.如实施方式88-96中任一项所述的方法,其中来自给予的基因工程改造的细胞的记忆T细胞或记忆T细胞亚组的数量包含增加或更高百分比的中心记忆T细胞(T_{CM})、长寿命记忆T细胞或T记忆干细胞(T_{SCM}),与来自以相同或大约相同剂量给予参照细胞组合物的此类细胞的数量相比。

[0448] 98.如实施方式88-97中任一项所述的方法,其中来自给予的基因工程改造的T细胞的对象中存在增加或更高的非终末分化的T细胞的数量,与来自以相同或大约相同剂量给予参照细胞组合物的对象的非终末分化的T细胞的数量相比。

[0449] 99.如实施方式88-98中任一个实施方式的方法,其中,在一种或多种刺激剂存在下离体再刺激后,来自给予的基因工程改造的细胞的对象中的基因工程改造的细胞表现出增加的活化和增殖,与在相同的一种或多种刺激剂存在下离体再刺激时来自以相同或大约相同剂量给予参照细胞组合物的对象中的基因工程改造的细胞的活化和增殖相比。

[0450] 100.如实施方式99所述的方法,其中一种或多种刺激剂包含抗原,抗CD3/抗CD28抗体和/或包含IL-2,IL-15和/或IL-7细胞因子。

[0451] 101.如实施方式91-100中任一项所述的方法,其中所述增加是至少1.2倍,1.5倍,2倍,3倍,4倍或5倍。

[0452] 102.如实施方式88-101中任一项所述的方法,其中与给予相同或约相同剂量的参照细胞组合物的对象中的基因工程改造的细胞中耗竭标志物的表达相比,来自给予的基因工程改造的T细胞的对象中的基因工程改造的细胞中耗竭标志物的表达降低或减少。

[0453] 103.如实施方式102所述的方法,其中所述耗竭标志物选自CD244,CD160和PD-1。

[0454] 104.如实施方式102或103所述的方法,其中表达降低或减少1.2倍,1.5倍,2.0倍,3倍,4倍,5倍,6倍,7倍,8倍,9倍,10倍或更多。

[0455] 105.如实施方式88-104中任一项所述的方法,其中在给予所述细胞的一个月内,两个月内,六个月内或一年内观察到或存在所述增加或降低。

[0456] 106.如实施方式78-87中任一项所述的组合物或实施方式91-105中任一项所述的方法,其中参照细胞组合物含有基本上相同的基因工程改造的细胞,除了表达的嵌合受体包含不同的共刺激分子,该共刺激分子不包含TRAF-6诱导结构域和/或包含能够诱导PI3K/Akt-信号传导的共刺激信号传导结构域和/或包含CD28、4-1BB或ICOS的共刺激结构域。

[0457] 107.一种嵌合受体,包含:

[0458] (a) 配体结合结构域;

[0459] (b) 跨膜结构域;和

[0460] (c) 细胞内信号传导结构域,其包含衍生自人CD40的信号传导结构域。

- [0461] 108. 一种嵌合受体, 包含:
- [0462] (a) 配体结合结构域;
- [0463] (b) 衍生自人CD28的跨膜结构域; 和
- [0464] (c) 细胞内信号传导结构域, 其包含衍生自CD40的信号传导结构域。
- [0465] 109. 如实施方式108所述的嵌合受体, 其中所述CD40是人CD40。
- [0466] 110. 如实施方式107-109中任一项所述的嵌合受体, 其中所述衍生自CD40的信号传导结构域包含SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列, 或其功能变体, 所述功能变体包含与SEQ ID NO:12显示至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列相同性的氨基酸序列。
- [0467] 111. 一种嵌合受体, 包含:
- [0468] (a) 配体结合结构域;
- [0469] (b) 跨膜结构域; 和
- [0470] (c) 细胞内信号传导结构域, 其包含衍生自SEQ ID NO:12所示的CD40的信号结构域。
- [0471] 112. 如实施方式107或111所述的嵌合受体, 其中所述跨膜结构域包含一分子的跨膜结构域, 所述分子包含TRAF-6诱导结构域, 或其功能片段或变体。
- [0472] 113. 如实施方式107、111或112所述的嵌合受体, 其中所述跨膜结构域衍生自CD40。
- [0473] 114. 如实施方式107和111-113中任一项所述的嵌合受体, 其中所述跨膜结构域是或包含衍生自CD4、CD28或CD8的跨膜结构域。
- [0474] 115. 如实施方式114所述的嵌合受体, 其中所述跨膜结构域是或包含衍生自CD28的跨膜结构域。
- [0475] 116. 如实施方式107和111-115中任一项所述的嵌合受体, 其中所述跨膜结构域是人的或衍生自人蛋白质。
- [0476] 117. 如实施方式108-110、115和116中任一项所述的嵌合受体, 其中衍生自CD28的跨膜结构域包含:
- [0477] a) SEQ ID NO:6的氨基酸序列; 或
- [0478] b) 与SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列相同性的氨基酸序列。
- [0479] 118. 如实施方式107-117中任一项所述的嵌合受体, 其进一步包含活化性胞质信号传导结构域。
- [0480] 119. 如实施方式118所述的嵌合受体, 其中活化性胞质信号传导结构域能够在T细胞中诱导初级活化信号, 是T细胞受体 (TCR) 组分和/或包含基于免疫受体酪氨酸的活化基序 (ITAM)。
- [0481] 120. 如实施方式118或119所述的嵌合受体, 其中所述活化性胞质信号传导结构域是或包含CD3- ζ (CD3 ζ) 链的 ζ 链的胞质信号传导结构域或其功能变体或信号传导部分。
- [0482] 121. 如实施方式118-120中任一项所述的嵌合受体, 其中所述细胞内信号传导结构域从其N到C末端依次包含: 衍生自CD40的信号传导结构域和所述活化性胞质信号传导结构域。

[0483] 122.如实施方式107-117中任一项所述的嵌合受体,其中所述细胞内信号传导结构域不包含CD3- ζ (CD3 ζ) 链的 ζ 链的细胞内信号传导结构域。

[0484] 123.如实施方式107-122中任一项所述的嵌合受体,其中所述细胞内信号传导结构域还包含其他共刺激信号传导结构域。

[0485] 124.如实施方式123所述的嵌合受体,其中所述其他共刺激信号传导结构域包含T细胞共刺激分子的细胞内信号传导结构域或其非衍生自CD40的信号传导部分。

[0486] 125.如实施方式123或124所述的嵌合受体,其中所述其他共刺激信号传导结构域包含衍生自CD28、4-4BB或ICOS的信号传导结构域或其信号传导部分。

[0487] 126.如实施方式107-125中任一项所述的嵌合受体,其中所述配体结合结构域是抗原结合结构域。

[0488] 127.如实施方式126所述的嵌合受体,其中所述抗原结合结构域是抗体或抗原结合抗体片段。

[0489] 128.如实施方式127所述的嵌合受体,其中抗原结合结构域是抗原结合抗体片段,其为单链片段。

[0490] 129.如实施方式127或128所述的嵌合受体,其中所述抗原结合抗体片段包含通过柔性免疫球蛋白接头连接的抗体可变区。

[0491] 130.如实施方式127-129中任一项所述的嵌合受体,其中所述抗原结合结构域是单链可变片段(scFv)。

[0492] 131.如实施方式107-130中任一项所述的嵌合受体,其中所述配体结合结构域特异性结合与疾病或病症相关的抗原。

[0493] 132.如实施方式131所述的嵌合受体,其中所述疾病或病症是感染性疾病或病症,自身免疫性疾病,炎性疾病或肿瘤或癌症。

[0494] 133.如实施方式122所述的嵌合受体,其中所述癌症是实体瘤癌。

[0495] 134.如实施方式107-133中任一项所述的嵌合受体,其中所述配体结合结构域特异性结合至肿瘤抗原。

[0496] 135.如实施方式107-122中任一项所述的嵌合受体,其中所述配体结合结构域特异性结合至选自下述的抗原:ROR1,B细胞成熟抗原(BCMA),tEGFR,Her2,L1-CAM,CD19,CD20,CD22,间皮素,CEA,乙型肝炎表面抗原,抗叶酸受体,CD23,CD24,CD30,CD33,CD38,CD44,EGFR,EGP-2,EGP-4,EPHa2,ErbB2、3或4,erbB二聚体,EGFR vIII,FBP,FCRL5,FCRH5,胎儿乙酰胆碱e受体,GD2,GD3,HMW-MAA,IL-22R- α ,IL-13R- α 2,kdr, κ 轻链,Lewis Y,L1-细胞粘附分子(L1-CAM),黑素瘤相关抗原(MAGE)-A1,MAGE-A3,MAGE-A6,黑素瘤优先表达抗原(PRAME),存活素,EGP2,EGP40,TAG72,B7-H6,IL-13受体 α 2(IL-13Ra2),CA9,GD3,HMW-MAA,CD171,G250/CAIX,HLA-AI MAGE A1,HLA-A2NY-ESO-1,PSCA,叶酸受体- α ,CD44v6,CD44v7/8,avb6整联蛋白,8H9,NCAM,VEGF受体,5T4,胎儿AchR,NKG2D配体,CD44v6,双重抗原,和与通用标签关联的抗原,癌症-睾丸抗原,间皮素,MUC1,MUC16,PSCA,NKG2D配体,NY-ESO-1,MART-1,gp100,癌胚抗原,ROR1,TAG72,VEGF-R2,癌胚抗原(CEA),前列腺特异性抗原,PSMA,Her2/neu,雌激素受体,孕酮受体,肝配蛋白B2,CD123,CS-1,c-Met,GD-2,0-乙酰化GD2(OGD2),CE7,Wilms肿瘤1(WT-1)和细胞周期蛋白,细胞周期蛋白A2,CCL-1,CD138和病原体特异性抗原。

- [0497] 136.如实施方式107-123中任一项所述的嵌合受体,其中所述配体结合结构域特异性结合至CD19。
- [0498] 137.如实施方式107-136中任一项所述的嵌合受体,其中所述嵌合受体还包含连接所述配体结合结构域和所述跨膜结构域的间隔子。
- [0499] 138.如实施方式137所述的嵌合受体,其中所述间隔子衍生自人IgG。
- [0500] 139.如实施方式137或138所述的嵌合受体,其中所述间隔子包含氨基酸序列ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:1)。
- [0501] 140.如实施方式137所述的嵌合受体,其中所述间隔子包含来自CD28的胞外部分,所述CD28任选地是人CD28。
- [0502] 141.如实施方式140所述的嵌合受体,其中衍生自CD28的胞外部分包含1至50个氨基酸长度,1至40个氨基酸长度,1至30个氨基酸长度,1至20个氨基酸长度或1至10个氨基酸长度。
- [0503] 142.如实施方式140或141所述的嵌合受体,其中间隔子和跨膜结构域包含:
- [0504] a) SEQ ID NO:7的氨基酸序列;或
- [0505] b) 与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或更多序列相同性的氨基酸序列。
- [0506] 143.一种核酸分子,其包含编码实施方式107-142中任一项所述的嵌合受体的多核苷酸。
- [0507] 144.如实施方式143所述的核酸分子,还包含信号序列。
- [0508] 145.如实施方式143或144所述的核酸分子,其中所述多核苷酸是第一多核苷酸,并且所述核酸分子包含编码第二嵌合受体的第二多核苷酸。
- [0509] 146.如实施方式141所述的核酸分子,其中第一和第二多核苷酸通过内部核糖体进入位点(IRES)或编码自切割肽或引起核糖体跳跃的肽的核苷酸序列分离,所述肽任选为T2A或P2A。
- [0510] 147.一种载体,其包含实施方式143-146中任一项所述的核酸。
- [0511] 148.如实施方式147所述的载体,其中所述载体是表达载体。
- [0512] 149.如实施方式147或148所述的载体,其中所述载体是病毒载体。
- [0513] 150.如实施方式149所述的载体,其中所述病毒载体是逆转录病毒载体。
- [0514] 151.如实施方式149或150所述的载体,其中所述病毒载体是慢病毒载体。
- [0515] 152.如实施方式149或150所述的载体,其中所述病毒载体是 γ 逆转录病毒载体。
- [0516] 153.一种工程改造的细胞,其包含实施方式143-146中任一项所述的核酸或实施方式147-152中任一项所述的载体或表达实施方式107-144中任一项所述的嵌合受体。
- [0517] 154.如实施方式153所述的工程改造的细胞,其是T细胞。
- [0518] 155.如实施方式153或154所述的工程改造的细胞,其是CD8+T细胞。
- [0519] 156.一种生产工程改造的细胞的方法,所述方法包括将实施方式143-146中任一项所述的核酸分子或实施方式147-152中任一项所述的载体导入细胞中,由此产生工程改造的细胞。
- [0520] 157.一种通过实施方式156所述方法生产的工程改造的细胞。
- [0521] 158.一种组合物,其包含实施方式153-155和157中任一项所述的工程改造的细

胞。

[0522] 159.一种组合物,包含:

[0523] 实施方式155所述的工程改造的细胞或表达实施方式107-144中任一项所述的嵌合受体的工程改造的CD8⁺细胞;

[0524] 包含与CD8⁺细胞中表达的嵌合受体不同的嵌合受体的工程改造的CD4⁺细胞,所述不同嵌合受体包含不同的共刺激信号传导结构域。

[0525] 160.如实施方式159所述的组合物,其中第一工程改造的细胞与第二工程改造的细胞的比例为约1:1至2:1,任选为或约为1:1、1:2、2:1。

[0526] 161.如实施方式159或160所述的组合物,其中与CD8⁺细胞相比,CD4⁺细胞中表达的嵌合受体的唯一差异是不同的共刺激信号传导结构域。

[0527] 162.如实施方式159-161中任一项所述的组合物,其中不同的共刺激信号传导结构域不包含能够诱导TRAF-6的活化或细胞定位和/或能够诱导TRAF-6介导的信号传导的TRAF-6诱导结构域。

[0528] 163.如实施方式159-162中任一项所述的组合物,其中所述不同的共刺激信号传导结构域是或包含PI-3激酶诱导结构域,其能够诱导PI-3激酶的活化或细胞定位和/或能够诱导PI3K/Akt信号传导。

[0529] 164.如实施方式159-163中任一项所述的组合物,其中所述不同的共刺激信号传导结构域是或包含CD28、4-1BB或ICOS分子的胞质信号传导结构域,或者是其信号传导部分的功能变体。

[0530] 165.如实施方式158-164中任一项所述的组合物,其中当用一种或多种刺激剂体外刺激时,所述组合物中的基因工程改造的细胞与用相同的一种或多种刺激剂刺激时相应的参照细胞组合物相比,表现出增加的增殖或扩张能力。

[0531] 166.如实施方式158-165中任一项所述的组合物,其中,当在一种或多种刺激剂体外存在下刺激时,所述组合物中的基因工程改造的细胞与用相同的一种或多种刺激剂刺激时相应的参照细胞组合物相比,表现出记忆T细胞或记忆T细胞亚组的数量增加。

[0532] 167.如实施方式166所述的组合物,其中所述记忆T细胞或记忆T细胞亚组是CD62L⁺。

[0533] 168.如实施方式166或167所述的组合物,其中所述记忆T细胞或记忆T细胞亚组是中心记忆T细胞(T_{CM}),长寿命记忆T细胞或T记忆干细胞(T_{SCM})。

[0534] 169.如实施方式167或168所述的组合物,其中所述记忆T细胞或记忆T细胞亚组还包含表型,所述表型包含:

[0535] a) CD127⁺;和/或

[0536] b) CD45RA⁺、CD45RO⁻、CCR7⁺和CD27⁺中的任何一种或多种,以及t-bet^低、IL-7Ra⁺、CD95⁺、IL-2Rβ⁺、CXCR3⁺和LFA-1⁺中的任何一种或多种。

[0537] 170.如实施方式167-169中任一项所述的组合物,其中所述记忆T细胞或记忆T细胞亚组是CD8⁺。

[0538] 171.如实施方式167-170中任一项所述的组合物,其中,相比参照组合物,衍生自给予的基因工程改造的细胞的记忆T细胞或记忆T细胞亚组的数量包括增加的或更高百分比的中心记忆T细胞(T_{CM}),长寿命记忆T细胞或T记忆干细胞(T_{SCM})。

[0539] 172.如实施方式158-171中任一项所述的组合物,其中当用一种或多种刺激剂体外刺激时,所述组合物中的基因工程改造的细胞与用相同的一种或多种刺激剂刺激时相应的参照细胞组合物相比,表现出持久性和/或存活增加。

[0540] 173.如实施方式158-172中任一项所述的组合物,其中当用一种或多种刺激剂体外刺激时,所述组合物中的基因工程改造的细胞与用相同的一种或多种刺激剂刺激时相应的参照细胞组合物相比,产生更多的IL-2。

[0541] 174.如实施方式158-173中任一项所述的组合物,其中所述一种或多种刺激剂包含特异结合所述嵌合受体的抗原,抗CD3/抗CD28抗体和/或包含IL-2、IL-15和/或IL-7细胞因子。

[0542] 175.如实施方式158-174中任一项所述的组合物,其中在所述刺激开始后的3天,4天,5天,6天,7天,10天或14天内观察到所述增加。

[0543] 176.如实施方式158-175中任一项所述的组合物,其中观察到增加并且效应物与靶比率大于或大于约或约3:1,大于或大于约或约5:1,或大于或大于约或约9:1。

[0544] 177.如实施方式158-176中任一项所述的组合物,其中在多轮抗原特异性刺激后的体外测定中,来自所述组合物的T细胞显示或已经观察到显示出持续或升高水平的指示T细胞功能、健康或活性的因子,与包含T细胞群的参照组合物相比、与单次刺激相比、和/或与相同测定中当在单轮刺激和/或小于多轮的刺激轮数后评估时的水平相比。

[0545] 178.如实施方式73-87和165-177中任一项所述的组合物,其中,

[0546] 其中所述参照细胞组合物含有基本相同的基因工程改造的细胞,除了所表达的嵌合受体包含衍生自不同共刺激分子的细胞内信号传导结构域,该共刺激分子不包含CD40衍生的细胞内信号传导结构域;或

[0547] 基因工程改造的细胞包含CD8+T细胞和参照细胞组合物,其基因工程改造的T细胞包含相同嵌合受体但不包含CD8+T细胞或不以相同比例包含CD8+T细胞。

[0548] 179.如实施方式178所述的组合物,其中所述参照细胞组合物包含基因工程改造的T细胞,其包含衍生自不同共刺激分子的细胞内信号传导,其中:

[0549] 不同的共刺激分子是其他共刺激分子,所述其他共刺激分子包括TRAF-6诱导结构域,任选地OX40衍生的细胞内信号传导结构域;或

[0550] 不同的共刺激分子是ICOS衍生的细胞内信号传导结构域。

[0551] 180.如实施方式175-179中任一项所述的组合物,其中当与参照群体相比或与相同测定中当在单轮刺激和/或小于多轮的刺激轮数后评估时的水平相比,因子水平未降低。

[0552] 181.如实施方式175-180中任一项所述的组合物,其中多轮刺激包括至少3、4或5轮和/或在至少15日,16日,17日,18日,19日,20日,21日,22日,23日,24日或25日的时间段内进行。

[0553] 182.一种治疗方法,其包括将实施方式153-155和157中任一项所述的细胞或实施方式158-181中任一项所述的组合物给予患有疾病或病症的对象。

[0554] 183.如实施方式182所述的方法,其中所述嵌合受体特异性结合至与所述疾病或病症相关的配体或抗原。

[0555] 184.如实施方式182或183所述的方法,其中,所述疾病或病症是癌症、肿瘤、自身免疫性疾病或病症,或感染性疾病。

[0556] 185.如实施方式182-184中任一项所述的方法,其中所述基因工程改造的T细胞或所述基因工程改造的T细胞的亚组在所述对象中表现出比在给予相同或约相同剂量参照细胞组合物的对象中增加或更长的扩增和/或持久性。

[0557] 186.如实施方式185所述的方法,其中所述基因工程改造的T细胞或所述基因工程改造的T细胞的亚组是CD8+T细胞。

[0558] 187.如实施方式185或186所述的方法,其中在给予所述细胞的一个月内,两个月内,六个月内或一年内观察到或存在所述增加或降低。

[0559] 188.如实施方式185-187中任一项所述的方法,其中所述参照细胞组合物含有基本相同的基因工程改造的细胞,除了所表达的嵌合受体包含不同共刺激分子,该共刺激分子不包含CD40衍生的细胞内信号传导结构域。

[0560] 189.如实施方式188所述的组合物,其中所述不同共刺激分子是其他共刺激分子,所述其他共刺激分子包括TRAF-6诱导结构域,任选地OX40衍生的细胞内信号传导结构域。

[0561] 190.如实施方式158-181中任一项所述的组合物,其用于治疗患有疾病或病症的对象的疾病或病症。

[0562] 191.如实施方式158-181中任一项所述的组合物用于治疗患有疾病或病症的对象的疾病或病症的用途。

[0563] 192.如实施方式158-181中任一项所述的组合物在制备用于治疗患有疾病或病症的对象的疾病或病症的药物中的用途。

[0564] 193.如实施方式190所述使用的组合物或实施方式191或192所述的用途,其中所述配体结合受体特异性结合至与所述疾病或病症相关的配体或抗原。

[0565] 194.如实施方式190-193中任一项所述使用的组合物或用途,其中,所述疾病或病症是癌症、肿瘤、自身免疫性疾病或病症,或感染性疾病。

[0566] 实施例

[0567] 下面的实施例仅是为了阐述,而不是用来限制本发明的范围。

[0568] 实施例1:包含TRAF-6信号传导内结构域的嵌合抗原受体(CAR)的产生

[0569] 产生编码嵌合抗原受体(CAR)的核酸分子,所述受体除了含CD3 ζ 胞内信号传导结构域之外,还包含衍生自人CD40(SEQ ID NO:12,由SEQ ID NO:34所示序列编码)、人OX40(SEQ ID NO:32,由SEQ IN NO:33所示序列编码)或人ICOS(SEQ ID NO:35,由SEQ IN NO:36所示序列编码)的胞内信号传导结构域的共刺激受体组分。具体而言,由各产生的核酸构建体编码的CAR依次包含:抗CD19scFv(SEQ ID NO:27,由SEQ ID NO:28所示序列编码);Ig衍生的间隔子(SEQ ID NO:1,由SEQ ID NO:2所示的序列编码),人CD28衍生的跨膜结构域(SEQ ID NO:6,由SEQ ID NO:46所示序列编码),上述所示的指定CD40-、OX40-或ICOS-衍生的细胞内信号传导结构域;和人CD3- ζ 衍生的信号传导结构域(SEQ ID NO:21,由SEQ ID NO:41所示序列编码)。

[0570] 编码CAR的核酸序列还含有编码GMCSFR信号肽(SEQ ID NO:37)的信号序列。核酸分子还包括用作转导标志物的截短的EGFR(tEGFR)序列(SEQ ID NO:31,由SEQ ID NO:30所示序列编码),其通过自切割T2A序列(SEQ ID NO:24,由SEQ ID NO:40所示序列编码)与CAR序列分开。

[0571] 为了比较,产生包含抗CD 19scFv、Ig衍生的间隔子、人CD28衍生的跨膜结构域、和

人CD28衍生的共刺激信号传导结构域或人4-1BB衍生的共刺激信号传导结构域、和人CD3- ζ 衍生的信号传导结构域的其他CAR。

[0572] 将核酸分子克隆到慢病毒载体中,其用于转导原代T细胞,该细胞通过来自人供体的基于免疫亲和性富集而分离。

[0573] 实施例2:含有TRAF-6信号传导内结构域的嵌合抗原受体(CAR)的体外功能测定

[0574] 在与表达CD19的细胞共培养后,评估如上所述产生的表达各种CAR的基因工程改造的细胞的各种响应。使用CD19转导的K562细胞进行评估靶细胞杀伤和细胞因子产生的体外测定。

[0575] 2A. 溶细胞活性

[0576] 将表达CD19的靶细胞(转导以表达CD19的K562细胞,K562-CD19)与如上所述的各种工程改造的T细胞孵育,各种的效应物与靶细胞(E:T)比例为9:1、3:1或1:1。仅在靶细胞存在下孵育(仅靶标)或用不表达CAR的T细胞(模拟)孵育靶细胞用作对照。在共培养的第4天,通过向共培养物添加IncuCyte™荧光胱天蛋白酶3/7试剂以检测凋亡细胞来在0至约110小时的时间过程中实时监测细胞裂解。通过自动图像分析随时间对靶细胞死亡进行定量。测定每种浓度的荧光信号随时间的曲线下面积(AUC)。使用公式:1/AUC确定杀伤指数。

[0577] 图1列出了各测试条件的杀伤指数。如图1所示,表达含有CD40衍生的、ICOS衍生的或OX40衍生的共刺激信号传导结构域的CAR的工程改造的T细胞杀伤表达CD19的靶细胞。对于一些测试的CAR,杀伤水平处于与表达含有衍生自4-1BB或CD28的共刺激信号传导结构域的CAR的T细胞相当的水平,尽管在更高的效应物:靶细胞比率下对于某些CAR表达细胞观察到更高的杀伤作用。

[0578] 2B. 细胞因子释放

[0579] 在以1:1、3:1和9:1的E:T比例孵育表达CAR的表达细胞与表达抗原的K562-CD19靶细胞后评估获自上述杀伤测定的第4天上清液中的细胞因子释放。具体而言,使用基于Luminex®珠的多重测定来评估培养上清液中TNF- α , IFN γ , GM-CSF和IL-2的存在。图2A-D中的结果显示,在所有E:T比率下,与用含有CD28衍生的或4-1BB衍生的细胞内信号传导结构域的CAR工程改造的细胞相比,在将靶细胞与含有CD40衍生的、OX40衍生的或ICOS衍生的细胞内信号传导结构域的表达CAR的各T细胞孵育后获得的上清液中存在相当水平的TNF- α , IFN γ 和GM-CSF细胞因子。如图2D所示,在与具有OX40或ICOS共刺激信号传导结构域的表达CAR的T细胞孵育的共培养物中获得的上清液中观察到IL-2水平的一些差异,特别是在最高的E:T比例为9:1时。

[0580] 通过监测在高尔基体抑制剂存在下以1:1的E:T比例与经辐照的K562-CD19靶细胞或不表达CD19抗原的亲本K562细胞共培养4小时的工程改造的T细胞中的细胞内细胞因子水平来进行其他研究。刺激后,固定细胞,透化并针对TNF, IFN- γ , IL-17A, 粒酶B, IL-13, IL-22, IL-10或IL-2染色。通过流式细胞术在CD4+/CAR+细胞和CD8+/CAR+活细胞中鉴定细胞内细胞因子的存在,通过先就CD3+细胞门选然后就CAR+细胞门选(使用用于检测替代EGFRt标志物的抗EGFR抗体或抗CAR抗体鉴定),然后就所指示的细胞内细胞因子分别评估CD8+和CD4+亚组。

[0581] CD8+细胞中的细胞因子表达示于:图3A, CD40;图3B, OX40;图3C, ICOS;图3D 4-1BB,图3E, CD28);对于CD4+则示于图4A, CD40;图4B, OX40;图4C, ICOS;图4D, 4-1BB,图4E,

CD28。以黑色显示在用K562-CD19靶细胞刺激的CAR-工程改造的T细胞中的胞内细胞因子,以灰色显示在用K562亲本细胞刺激的CAR-工程改造的细胞中的胞内细胞因子。每个象限中的数字指已被K562-CD19靶细胞刺激的CAR-工程改造的细胞,并且表示为各个CD8+或CD4+亚组中对于所示一种或多种细胞因子而言为阳性的这种CAR+细胞与该亚组的总CAR+细胞的百分比。

[0582] 实施例3:连续再刺激后的扩增评估

[0583] 在一些方面中,在重复刺激之后细胞体外扩增的能力可以指示CAR-T细胞持续存在的能力(例如,在初始激活之后)和/或是体内功能的指示(Zhao等(2015)Cancer Cell, 28:415-28)。如上所述产生的CAR-T细胞与经辐照的靶细胞(K562-CD19)以1:1的效应物与靶标比例进行培养。刺激细胞,每3-4天收获并计数,在每轮将细胞数重设为初始接种密度后,使用相同的培养条件用新的靶细胞再刺激。在14天的培养期间进行总共4轮刺激。对于每轮刺激,确定倍增数。

[0584] 如图5所示,在群体倍增数中观察到抗CD19CAR-工程改造的细胞的相当的初始生长,该细胞表达含有CD40,OX40,ICOS,CD28或4-1BB衍生的共刺激信号传导结构域的CAR。到刺激第11天,观察到表达含有CD40,CD28或4-1BB衍生的共刺激信号传导结构域的CAR的抗CD19CAR-工程改造的细胞的持续细胞扩增。

[0585] 实施例4:具有TRAF-6信号传导内结构域的CAR-工程改造的T细胞的体内抗肿瘤效力和扩增

[0586] 通过用CD19+Na1m-6扩散的肿瘤细胞系注射NOD/Scid/gc-/- (NSG) 小鼠产生扩散的肿瘤异种移植小鼠模型。

[0587] 在第0天(0),向NSG小鼠静脉内注射表达萤火虫萤光素酶的 5×10^5 Na1m-6细胞。在第4天,将小鼠分组为五个研究组,每组包含8只小鼠,并注射 1×10^6 如实施例1所述产生的CAR-工程改造的T细胞,如下所述:1)组1-表达带有CD40衍生的细胞内信号传导结构域的CAR的CAR-T细胞;2)组2-表达带有OX40衍生的细胞内信号传导结构域的CAR的CAR-T细胞;3)组3-表达带有ICOS衍生的细胞内信号传导结构域的CAR的CAR-T细胞;4)组4-表达带有4-1BB衍生的细胞内信号传导结构域的CAR的CAR-T细胞;或5)组5-表达带有CD28衍生的细胞内信号传导结构域的CAR的CAR-T细胞。添加两个另外的研究组作为对照,具体是未注射任何细胞的5只小鼠的研究组(单独肿瘤研究组)和注射有不表达CAR的 1×10^6 T细胞的8只小鼠研究组(模拟研究组)。

[0588] 4A. 肿瘤生长和存活

[0589] 如上所述处理后,通过生物发光成像测量随时间的肿瘤生长,并在注射表达萤火虫萤光素酶的CD19+Na1m-6细胞后多至28天测量平均辐射率($p/s/cm^2/sr$)。如图6A所示,与单独的肿瘤研究组和模拟研究组相比,在所有测试时间点,注射有表达CD40、OX40、CD28、ICOS或4-1BB衍生的共刺激信号传导结构域的CAR-工程改造的细胞的五个研究小组的小鼠的平均辐射率总量显示相当的减少,这表明本研究中CAR工程改造的细胞具有相似的抗肿瘤功效。

[0590] 还在注射表达萤火虫萤光素酶的CD19+Na1m-6细胞后多至40天评估各研究组中的小鼠存活。图6B描述了给予表达含有CD40、OX40、ICOS、CD28或4-1BB衍生的共刺激信号传导结构域的CAR的CAR-工程改造的细胞的小鼠的存活百分比。与分别仅存活多至肿瘤注射后

23天和24天的单独肿瘤研究组和模拟研究组相比,各测试组中的小鼠的存活达到肿瘤注射后约35天。

[0591] 4B. 体内扩增

[0592] 对给予表达含有CD40、OX40、ICOS、CD28或4-1BB衍生的共刺激信号传导结构域的CAR的CAR-工程改造的细胞的小鼠的血液、脾脏和骨髓,在第7天或第28天分析EGFRt+CAR T细胞和/或肿瘤细胞的存在。分别地,第28天的血液、脾脏或骨髓中肿瘤细胞的量的示例性结果示于图7A-C,第28天时骨髓中循环CD4+或CD8+CAR-T细胞的量分别示于图7D和图7E中。

[0593] 如图7A-C所示,与模拟研究组相比,在给予表达含有CD40、OX40、ICOS、CD28或4-1BB衍生的共刺激信号传导结构域的CAR的CAR工程改造的细胞的小鼠的血液、脾脏或骨髓中检测到较少的肿瘤细胞。如图7D-E所示,与其他表达CAR的细胞相比,表达含有CD40、CD28或4-1BB衍生的共刺激信号传导结构域的CAR的CAR-工程改造的细胞在骨髓中表现出更高数量的循环CD4+和/或CD8+CAR-T细胞。

[0594] 本发明并不意在将范围限制于具体公开的实施方式,这些实施方式仅为提供,例如,对于本发明不同方面的说明。根据本文的描述和教导,对于所述组合物和方法的各种修改形式是显而易见的。这些变化形式可以不偏离本发明实际范围和精神的方式被实施,并且落在本发明范围内。

[0595] 序列

[0596]

SEQ ID NO.	序列	描述
1	ESKYGPPCPPCP	间隔子(IgG4 铰链) (aa) 智人
2	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCCTT GCCCT	间隔子(IgG4 铰链) (nt) 智人
3	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS	铰链-CH3 间隔子 智人

[0597]

	VMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	
4	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SLGK	铰链-CH2-CH3 间隔子 智人
5	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPA TTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPS HTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVG DLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNG SQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQ RLMALREPAAQAPVKLSLNLASSDPPEAASW LLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPAR PPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVV SHEDSRTLLNASRSLEVSYYVTDH	IgD-铰链-Fc 智人
6	FWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (登录号 P10747 氨基酸 153-179) 智人
7	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFP GPSKPFWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (登录号 P10747 的 氨基酸 114-179) 智人
8	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAP PRDFAAYRS	CD28 (P10747 的氨基酸 180-220) 智人
9	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYA PPRDFAAAYRS	CD28 (LL 至 GG) 智人
10	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCEL	4-1BB (Q07011.1 的氨基 酸 214-255) 智人
11	ALVVIPIIFGILFAILLVLVFI	UniProt P25942 氨基酸 残基 194 – 215 CD40 的跨膜结构域
12	KKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNT AAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ	UniProt P25942 氨基酸 残基 216-277 CD40 的胞质结构域 TRAF-6-结合结构域对 应于 SEQ ID NO:12 的氨 基酸残基 18-23 (粗体和 下划线)
13	GLIILLFASVALVAIIFGV	UniProt Q9Y6Q6 氨基

[0598]

		酸残基 213 – 233 RANK (TNFRSF11A)的 跨膜结构域
14	CYRKKKGKALTANLWHWINEACGRLSGDKESS GDSCVSTHTANFGQQGACEGVLLLTLEEKTFP EDMCYPDQGGVCQGTCVGGGPYAQGEDARM LSLVSKTEIEEDSFRQMPTEDEYMDRPSQPTDQ LLFLTEPGSKSTPPFSEPLEVGENDSLQCFTGT QSTVGSESCNCTEPLCRTDWTMSSENYLQKE VDSGHCPhWAASPSNWADVCTGCRNPPGED CEPLVGSPKRGPLPQCA YGMGLPPEEEASRTEA RDQPEDGADGRLPSSARAGAGSGSSPGGQSPA SGNVTGNSNSTFISSGQVMNFKGDIIVVYVSQT SQEGAAAAAEP MGRP VQEETLARRDSFAGNGP RFPDPCGGPEGLREPEKASRPVQEQQGAKA	UniProt Q9Y6Q6 氨基酸 残基 234-616 RANK (TNFRSF11A)的 胞质结构域 TRAF-6-结合结构域对 应于 SEQ ID NO:14 的氨 基酸残基 111-116 (粗体 和下划线)
15	HMIGICVTLTVIIVCSVFIY	UniProt P14778 氨基酸 残基 337 – 356 白介素-1 受体 1 型 (IL1R1)的跨膜结构域
16	KIFKIDIVLWYRDSCYDFLPIKASDGKTYDAYIL YPKTVGEGSTSDCDIFVKVLPEVLEKQCGYKL FIYGRDDYVGEDIVEVINENVKKSRLIILVRE TSGFSWLGGSSSEQIAMYNALVQDGIKVVLE LEKIQDYEKMPESIKFIKQKHGAIRWSGDFTQG PQSAKTRFWKNVRYHMPVQRRSPSSKHQLLSP ATKEKLQREAHVPLG	UniProt P14778 氨基酸 残基 357-569 白介素-1 受体 1 型 (IL1R1)的胞质结构域
17	VLLVVILIVVYHVYWLEMVLF	UniProt Q9NPH3 氨基酸 残基 368 – 388 白介素-1 受体辅助蛋白 (IL1RAP)的跨膜结构域
18	YRAHFGTDETILDGKEYDIYVSYARNAEEEEFV LLTLRGVLENEFGYKLCIFDRDSLPGGIVTDETL SFIQKSRRLLVVLSPNYVLQGTQALLELKAGLE NMA SRGNINVILVQYKAVKETKV KELKRAKT VLTVIKWKGEKSKYPQGRFWKQLQVAMPVKK SPRRSSSDEQGLSYSSLKNV	UniProt Q9NPH3 氨基酸 残基 389-570 白介素-1 受体辅助蛋白 (IL1RAP)的胞质结构域
19	VAAILGLGLVLGLLGPLAILL	UniProt P43489 氨基酸 残基 215-235 OX40 的跨膜结构域 智人
20	ALYLLRRDQRLPPDAH KPPGGGSFRTPIQEEQA DAHSTLAKI	UniProt P43489 氨基酸 残基 236-277 OX40 的胞质结构域 智人

[0599]

21	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDGLYQGL STATKDTYDALHMQALPPR	CD3 ζ 智人
22	RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDGLYQGLS TATKDTYDALHMQALPPR	CD3 ζ 智人
23	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 ζ 智人
24	LEGGGEGRGSLTTCGDVEENPGPR	T2A 人工
25	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEF KDSLSINATNIKHFKNCTISISGDLHILPVAFRGD SFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPEN RTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITS LGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKL FGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPE GCWGPEPRDCVSCRNVSRGECVDKCNLLEGE PREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDN CIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWK YADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNTGP KIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM	tEGFR 人工
26	Pro-Xaa ₁ -Glu-Xaa ₂ -Xaa ₃ -Xaa ₄	TRAF-6 结合结构域共 有 Xaa ₁ , Xaa ₂ , Xaa ₃ = 任何 氨基酸 Xaa ₄ = 芳族或酸性氨基 酸
27	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKY LNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFS GSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLP YTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGE VKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDY GVSWIRQPPRKGLEWLGVWGSSETTYNSA LKSRLTIHKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYY CAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS	抗-CD19 scFv 人工 (aa)
28	GACATCCAGATGACCCAGACCACCTCCAGCC TGAGCGCCAGCCTGGGCGACCGGGTGACCAT CAGCTGCCGGGCCAGCCAGGACATCAGCAA GTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGAC GGCACCGTCAAGCTGCTGATCTACCACACCA GCCGGCTGCACAGCGGCGTGCCAGCCGGTT TAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTACAGC	抗-CD19 scFv 人工 (nt)

[0600]

	CTGACCATCTCCAACCTGGAACAGGAAGATA TCGCCACCTACTTTTGCCAGCAGGGCAACAC ACTGCCCTACACCTTTGGCGGCGGAACAAAG CTGGAAATCACCGGCAGCACCTCCGGCAGCG GCAAGCCTGGCAGCGGCGAGGGCAGCACCA AGGGCGAGGTGAAGCTGCAGGAAAGCGGCC CTGGCCTGGTGGCCCCCAGCCAGAGCCTGAG CGTGACCTGCACCGTGAGCGGCGTGAGCCTG CCCGACTACGGCGTGAGCTGGATCCGGCAGC CCCCAGGAAGGGCCTGGAATGGCTGGGCGT GATCTGGGGCAGCGAGACCACCTACTACAAC AGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCA AGGACAACAGCAAGAGCCAGGTGTTCTGA AGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCG CCATCTACTACTGCGCCAAGCACTACTACTA CGGCGGCAGCTACGCCATGGACTACTGGGGC CAGGGCACCCAGCGTGACCGTGAGCAGC	
29	EGRGSLTTCGDVEENPGP	T2A 人工 (aa)
30	CGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTATTGGTG AATTTAAAGACTCACTCTCCATAAATGCTAC GAATATTAAACACTTCAAAAACTGCACCTCC ATCAGTGGCGATCTCCACATCCTGCCGGTGG CATTTAGGGGTGACTCCTTCACACATACTCCT CCTCTGGATCCACAGGAACTGGATATTCTGA AAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTTTTGCT GATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGAC CTCCATGCCTTTGAGAACCTAGAAATCATAC GCGGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTTC TCTTGCAGTCGTCAGCCTGAACATAACATCC TTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTG ATGGAGATGTGATAATTTAGGAAACAAAAA TTTGTGCTATGCAAATACAATAAACTGGAAA AAACTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACCA AAATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCT GCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCTT GTGCTCCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCCGGAG CCCAGGGACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCA GCCGAGGCAGGGAATGCGTGGAACAAGTGCA ACCTTCTGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTTGT GGAGAACTCTGAGTGCATACAGTGCCACCCA GAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCT GCACAGGACGGGGACCAGACAACTGTATCC AGTGTGCCCACTACATTGACGGCCCCCACTG CGTCAAGACCTGCCCCGGCAGGAGTCATGGGA GAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGCAG	tEGFR 人工 (nt)

[0601]

	ACGCCGGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCC AAACTGCACCTACGGATGCACTGGGCCAGGT CTTGAAGGCTGTCCAACGAATGGGCCTAAGA TCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGGGGGC CCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCCCTGGGG ATCGGCCTCTTCATG	
31	RKVCNGIGIGEFKDSL SINATNIKHFNCTSIG DLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEI TGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHG QFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKN LCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKA TGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGR ECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQA MNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCAPAG VMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGC TGPGLEGCPTNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVA LGIGLFM	tEGFR 人 (aa)
32	RRDQRLPPDAH KPPGGGSFRTPIQEEQADAHST LAKI	OX40 的胞质结构域 智人 (aa)
33	CGGAGGGGACCAGAGGCTGCCCCCGATGCCC ACAAGCCCCCTGGGGGAGGCAGTTTCCGGAC CCCCATCCAAGAGGAGCAGGCCGACGCCAC TCCACCCTGGCCAAGATC	OX40 的胞质结构域 智人 (nt)
34	AAAAAGGTGGCCAAGAAGCCAACCAATAAG GCCCCCACCACAAGCAGGAACCCAGGAG ATCAATTTTCCCGACGATCTTCCTGGCTCCAA CACTGCTGCTCCAGTGCAGGAGACTTTACAT GGATGCCAACCGGTCACCCAGGAGGATGGC AAAGAGAGTCGCATCTCAGTGCAGGAGAGA CAG	CD40 的胞质结构域 智人 (nt)
35	CWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKS RLTDVTL	ICOS 的胞质结构域 智人 (aa)
36	TGTTGGCTTACAAAAAAGAAGTATTCATCCA GTGTGCACGACCCTAACGGTGAATACATGTT CATGAGAGCAGTGAACACAGCCAAAAAATC TAGACTCACAGATGTGACCCTA	ICOS 的胞质结构域 智人 (nt)
37	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP	GMCSFR α 链信号序列 智人 UniProt No. P15509 (aa)
38	ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTG TGAGTTACCACACCCAGCATTCCTCCTGATCC CA	GMCSFR α 链信号序列 智人 (nt)
39	ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGT	GMCSFR α 链信号序列

[0602]

	GCGAGCTGCCCCACCCCGCCTTTCTGCTGATC CCC	智人 (nt)
40	TCGAGGGCGGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTC TTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCC CGGCCCTAGG	T2A 人工 (nt)
41	CGGGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCC CTGCCTACCAGCAGGGCCAGAATCAGCTGTA CAACGAGCTGAACCTGGGCAGAAGGGAAGA GTACGACGTCCTGGATAAGCGGAGAGGCCG GGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCTCGGCG GAAGAACCCCCAGGAAGGCCTGTATAACGA ACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTA CAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAG GCGGGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTATCA GGGCCTGTCCACCGCCACCAAGGATACCTAC GACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAA GG	CD3 ζ 智人 (nt)
42	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
43	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
44	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
45	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
46	TTCTGGGTGCTGGTGGTGGTCGGAGGCGTGC TGGCCTGCTACAGCCTGCTGGTCACCGTGGC CTTCATCATCTTTTGGGTG	CD28 跨膜结构域 (nt)

序列表

<110> 朱诺治疗学股份有限公司(Juno Therapeutics, Inc)

L·J·汤普森

V·厄德高

B·萨瑟

A·布拉曼戴姆

<120> 含有TRAF诱导结构域的嵌合受体及相关组合物和方法

<130> 735042002940

<140> 未指定

<141> 共同提交

<150> 62/251,590

<151> 2015-11-05

<160> 46

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> 间隔子(IgG4铰链)

<400> 1

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 2

<211> 36

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> 间隔子(IgG4铰链)

<400> 2

gaatctaagt acggaccgcc ctgccccct tgcct 36

<210> 3

<211> 119

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> 铰链-CH3间隔子

<400> 3

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

<210> 4

<211> 229

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> 铰链-CH₂-CH₃ 间隔子

<400> 4

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

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 130 135 140
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 145 150 155 160
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 165 170 175
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
 180 185 190
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 195 200 205
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys
 225

<210> 5

<211> 282

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> IgD-铰链-Fc

<400> 5

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

Ala Gly Thr Ser Val Thr Cys Thr Leu Asn His Pro Ser Leu Pro Pro
 145 150 155 160
 Gln Arg Leu Met Ala Leu Arg Glu Pro Ala Ala Gln Ala Pro Val Lys
 165 170 175
 Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser Asp Pro Pro Glu Ala Ala Ser
 180 185 190
 Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe Ser Pro Pro Asn Ile Leu Leu
 195 200 205
 Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu Val Asn Thr Ser Gly Phe Ala Pro
 210 215 220
 Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro Gly Ser Thr Thr Phe Trp Ala Trp Ser
 225 230 235 240
 Val Leu Arg Val Pro Ala Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Thr Tyr Thr
 245 250 255
 Cys Val Val Ser His Glu Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn Ala Ser Arg
 260 265 270
 Ser Leu Glu Val Ser Tyr Val Thr Asp His
 275 280

<210> 6

<211> 27

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> CD28

<300>

<308> UniProt P10747

<309> 1989-07-01

<400> 6

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
 1 5 10 15
 Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
 20 25

<210> 7

<211> 66

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> CD28

<300>

<308> UniProt P10747

<309> 1989-07-01

<400> 7

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

65

<210> 8

<211> 41

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> CD28

<300>

<308> UniProt P10747

<309> 1989-07-01

<400> 8

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr

1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro

20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

35 40

<210> 9

<211> 41

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> CD28

<400> 9

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr

1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro

20	25	30
Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser		
35	40	
<210> 10		
<211> 42		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo sapiens)		
<220>		
<223> 4-1BB		
<300>		
<308> UniProt Q07011.1		
<309> 1995-02-01		
<400> 10		
Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met		
1 5 10 15		
Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe		
20 25 30		
Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu		
35 40		
<210> 11		
<211> 22		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo sapiens)		
<220>		
<223> CD40的跨膜结构域		
<300>		
<308> UniProt P25942		
<309> 1992-05-01		
<400> 11		
Ala Leu Val Val Ile Pro Ile Ile Phe Gly Ile Leu Phe Ala Ile Leu		
1 5 10 15		
Leu Val Leu Val Phe Ile		
20		
<210> 12		
<211> 62		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo sapiens)		
<220>		
<223> CD40的胞质结构域		

<300>

<308> UniProt P25942

<309> 1992-05-01

<400> 12

Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn Lys Ala Pro His Pro Lys Gln
 1 5 10 15
 Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr
 20 25 30
 Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu His Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln
 35 40 45
 Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser Val Gln Glu Arg Gln
 50 55 60

<210> 13

<211> 21

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> RANK (TNFRSF11A) 的跨膜结构域

<300>

<308> UniProt Q9Y6Q6

<309> 2001-09-26

<400> 13

Gly Leu Ile Ile Leu Leu Leu Phe Ala Ser Val Ala Leu Val Ala Ala
 1 5 10 15
 Ile Ile Phe Gly Val
 20

<210> 14

<211> 383

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> RANK (TNFRSF11A) 的胞质结构域

<400> 14

Cys Tyr Arg Lys Lys Gly Lys Ala Leu Thr Ala Asn Leu Trp His Trp
 1 5 10 15
 Ile Asn Glu Ala Cys Gly Arg Leu Ser Gly Asp Lys Glu Ser Ser Gly
 20 25 30
 Asp Ser Cys Val Ser Thr His Thr Ala Asn Phe Gly Gln Gln Gly Ala
 35 40 45

Cys	Glu	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Thr	Leu	Glu	Glu	Lys	Thr	Phe	Pro	Glu
50							55				60				
Asp	Met	Cys	Tyr	Pro	Asp	Gln	Gly	Gly	Val	Cys	Gln	Gly	Thr	Cys	Val
65					70					75					80
Gly	Gly	Gly	Pro	Tyr	Ala	Gln	Gly	Glu	Asp	Ala	Arg	Met	Leu	Ser	Leu
					85					90					95
Val	Ser	Lys	Thr	Glu	Ile	Glu	Glu	Asp	Ser	Phe	Arg	Gln	Met	Pro	Thr
				100					105				110		
Glu	Asp	Glu	Tyr	Met	Asp	Arg	Pro	Ser	Gln	Pro	Thr	Asp	Gln	Leu	Leu
				115					120				125		
Phe	Leu	Thr	Glu	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Pro	Pro	Phe	Ser	Glu	Pro
							135					140			
Leu	Glu	Val	Gly	Glu	Asn	Asp	Ser	Leu	Ser	Gln	Cys	Phe	Thr	Gly	Thr
145						150					155				160
Gln	Ser	Thr	Val	Gly	Ser	Glu	Ser	Cys	Asn	Cys	Thr	Glu	Pro	Leu	Cys
						165				170					175
Arg	Thr	Asp	Trp	Thr	Pro	Met	Ser	Ser	Glu	Asn	Tyr	Leu	Gln	Lys	Glu
						180				185				190	
Val	Asp	Ser	Gly	His	Cys	Pro	His	Trp	Ala	Ala	Ser	Pro	Ser	Pro	Asn
						195				200				205	
Trp	Ala	Asp	Val	Cys	Thr	Gly	Cys	Arg	Asn	Pro	Pro	Gly	Glu	Asp	Cys
									215			220			
Glu	Pro	Leu	Val	Gly	Ser	Pro	Lys	Arg	Gly	Pro	Leu	Pro	Gln	Cys	Ala
225						230					235				240
Tyr	Gly	Met	Gly	Leu	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	Ala	Ser	Arg	Thr	Glu	Ala
										245				255	
Arg	Asp	Gln	Pro	Glu	Asp	Gly	Ala	Asp	Gly	Arg	Leu	Pro	Ser	Ser	Ala
										265				270	
Arg	Ala	Gly	Ala	Gly	Ser	Gly	Ser	Ser	Pro	Gly	Gly	Gln	Ser	Pro	Ala
										275				285	
Ser	Gly	Asn	Val	Thr	Gly	Asn	Ser	Asn	Ser	Thr	Phe	Ile	Ser	Ser	Gly
										295			300		
Gln	Val	Met	Asn	Phe	Lys	Gly	Asp	Ile	Ile	Val	Val	Tyr	Val	Ser	Gln
305						310					315				320
Thr	Ser	Gln	Glu	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Glu	Pro	Met	Gly	Arg	Pro
										325				335	
Val	Gln	Glu	Glu	Thr	Leu	Ala	Arg	Arg	Asp	Ser	Phe	Ala	Gly	Asn	Gly
										340				350	
Pro	Arg	Phe	Pro	Asp	Pro	Cys	Gly	Gly	Pro	Glu	Gly	Leu	Arg	Glu	Pro

355	360	365
Glu Lys Ala Ser Arg Pro Val	Gln Glu Gln Gly Gly	Ala Lys Ala
370	375	380
<210> 15		
<211> 20		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo sapiens)		
<220>		
<223> 1型白介素-1受体(IL1R1)的跨膜结构域		
<300>		
<308> UniProt P14778		
<309> 1990-04-01		
<400> 15		
His Met Ile Gly Ile Cys Val Thr Leu Thr Val Ile Ile Val Cys Ser		
1	5	10
Val Phe Ile Tyr		15
	20	
<210> 16		
<211> 213		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo sapiens)		
<220>		
<223> 1型白介素-1受体(IL1R1)的胞质结构域		
<300>		
<308> UniProt P14778		
<309> 1990-04-01		
<400> 16		
Lys Ile Phe Lys Ile Asp Ile Val Leu Trp Tyr Arg Asp Ser Cys Tyr		
1	5	10
Asp Phe Leu Pro Ile Lys Ala Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Asp Ala Tyr		15
	20	25
Ile Leu Tyr Pro Lys Thr Val Gly Glu Gly Ser Thr Ser Asp Cys Asp		30
	35	40
Ile Phe Val Phe Lys Val Leu Pro Glu Val Leu Glu Lys Gln Cys Gly		45
	50	55
Tyr Lys Leu Phe Ile Tyr Gly Arg Asp Asp Tyr Val Gly Glu Asp Ile		60
65	70	75
Val Glu Val Ile Asn Glu Asn Val Lys Lys Ser Arg Arg Leu Ile Ile		80
	85	90
		95

Ile Leu Val Arg Glu Thr Ser Gly Phe Ser Trp Leu Gly Gly Ser Ser
 100 105 110
 Glu Glu Gln Ile Ala Met Tyr Asn Ala Leu Val Gln Asp Gly Ile Lys
 115 120 125
 Val Val Leu Leu Glu Leu Glu Lys Ile Gln Asp Tyr Glu Lys Met Pro
 130 135 140
 Glu Ser Ile Lys Phe Ile Lys Gln Lys His Gly Ala Ile Arg Trp Ser
 145 150 155 160
 Gly Asp Phe Thr Gln Gly Pro Gln Ser Ala Lys Thr Arg Phe Trp Lys
 165 170 175
 Asn Val Arg Tyr His Met Pro Val Gln Arg Arg Ser Pro Ser Ser Lys
 180 185 190
 His Gln Leu Leu Ser Pro Ala Thr Lys Glu Lys Leu Gln Arg Glu Ala
 195 200 205

His Val Pro Leu Gly
 210

<210> 17

<211> 21

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> 白介素-1受体辅助蛋白(IL1RAP)的跨膜结构域

<300>

<308> UniProt Q9NPH3

<309> 2003-08-22

<400> 17

Val Leu Leu Val Val Ile Leu Ile Val Val Tyr His Val Tyr Trp Leu
 1 5 10 15

Glu Met Val Leu Phe
 20

<210> 18

<211> 182

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> 白介素-1受体辅助蛋白(IL1RAP)的胞质结构域

<300>

<308> UniProt Q9NPH3

<309> 2003-08-22

<400> 18

Tyr Arg Ala His Phe Gly Thr Asp Glu Thr Ile Leu Asp Gly Lys Glu
1 5 10 15

Tyr Asp Ile Tyr Val Ser Tyr Ala Arg Asn Ala Glu Glu Glu Glu Phe
20 25 30

Val Leu Leu Thr Leu Arg Gly Val Leu Glu Asn Glu Phe Gly Tyr Lys
35 40 45

Leu Cys Ile Phe Asp Arg Asp Ser Leu Pro Gly Gly Ile Val Thr Asp
50 55 60

Glu Thr Leu Ser Phe Ile Gln Lys Ser Arg Arg Leu Leu Val Val Leu
65 70 75 80

Ser Pro Asn Tyr Val Leu Gln Gly Thr Gln Ala Leu Leu Glu Leu Lys
85 90 95

Ala Gly Leu Glu Asn Met Ala Ser Arg Gly Asn Ile Asn Val Ile Leu
100 105 110

Val Gln Tyr Lys Ala Val Lys Glu Thr Lys Val Lys Glu Leu Lys Arg
115 120 125

Ala Lys Thr Val Leu Thr Val Ile Lys Trp Lys Gly Glu Lys Ser Lys
130 135 140

Tyr Pro Gln Gly Arg Phe Trp Lys Gln Leu Gln Val Ala Met Pro Val
145 150 155 160

Lys Lys Ser Pro Arg Arg Ser Ser Ser Asp Glu Gln Gly Leu Ser Tyr
165 170 175

Ser Ser Leu Lys Asn Val
180

<210> 19

<211> 21

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> 0X40的跨膜结构域

<300>

<308> UniProt P43489

<309> 1995-11-01

<400> 19

Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val Leu Gly Leu Leu Gly Pro
1 5 10 15

Leu Ala Ile Leu Leu
20

<210> 20
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <220>
 <223> OX40的胞质结构域
 <300>
 <308> UniProt P43489
 <309> 1995-11-01
 <400> 20

Ala	Leu	Tyr	Leu	Leu	Arg	Arg	Asp	Gln	Arg	Leu	Pro	Pro	Asp	Ala	His
1				5					10					15	
Lys	Pro	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Phe	Arg	Thr	Pro	Ile	Gln	Glu	Glu	Gln
			20					25					30		
Ala	Asp	Ala	His	Ser	Thr	Leu	Ala	Lys	Ile						
			35					40							

<210> 21
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <220>
 <223> CD3 ζ
 <400> 21

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> 22
 <211> 112

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> CD3 ζ

<400> 22

Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Glu	Pro	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> 23

<211> 112

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> CD3 ζ

<400> 23

Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Lys	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> 24		
<211> 24		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> T2A		
<400> 24		
Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp		
1 5 10 15		
Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg		
20		
<210> 25		
<211> 357		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> tEGFR		
<400> 25		
Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro		
1 5 10 15		
Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly		
20 25 30		
Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe		
35 40 45		
Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala		
50 55 60		
Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu		
65 70 75 80		
Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile		
85 90 95		
Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu		
100 105 110		
Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala		
115 120 125		
Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu		
130 135 140		
Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr		
145 150 155 160		

Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys		
165	170	175
Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly		
180	185	190
Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu		
195	200	205
Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys		
210	215	220
Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu		
225	230	235
Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met		
245	250	255
Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala		
260	265	270
His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val		
275	280	285
Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His		
290	295	300
Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro		
305	310	315
Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala		
325	330	335
Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly		
340	345	350
Ile Gly Leu Phe Met		
355		

<210> 26

<211> 6

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> TRAF-6结合结构域共有

<220>

<221> 变体

<222> (2) ... (2)

<223> Xaa1是任何氨基酸

<220>

<221> 变体

<222> (4) ... (4)

<223> Xaa2是任何氨基酸

<220>

<221> 变体

<222> (5) ... (5)

<223> Xaa3是任何氨基酸

<220>

<221> 变体

<222> (6) ... (6)

<223> Xaa4是芳族或酸性氨基酸

<400> 26

Pro Xaa Glu Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 27

<211> 245

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-CD19 scFv

<400> 27

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Ser Thr Ser Gly

100 105 110

Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Glu Val Lys

115 120 125

Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser

130 135 140

Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser

145 150 155 160

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile
 165 170 175
 Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu
 180 185 190
 Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn
 195 200 205
 Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr
 210 215 220
 Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 225 230 235 240
 Val Thr Val Ser Ser
 245

<210> 28

<211> 735

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-CD19 scFv

<400> 28

gacatccaga tgaccagac cacctccagc ctgagcgcca gcctgggcca ccgggtgacc 60
 atcagctgcc gggccagcca ggacatcagc aagtacctga actggtatca gcagaagccc 120
 gacggcaccg tcaagctgct gatctaccac accagccggc tgcacagcgg cgtgcccagc 180
 cggtttagcg gcagcggctc cggcaccgac tacagcctga ccatctccaa cctggaacag 240
 gaagatatcg ccacctactt ttgccagcag ggcaacacac tgccctacac ctttggcggc 300
 ggaacaaagc tggaaatcac cggcagcacc tccggcagcg gcaagcctgg cagcggcgag 360
 ggcagcacca agggcgaggt gaagctgcag gaaagcggcc ctggcctggt ggccccagc 420
 cagagcctga gcgtgacctg caccgtgagc ggcgtagacc tgcccacta cggcgtagc 480
 tggatccggc agccccccag gaagggcctg gaatggetgg gcgtgatctg gggcagcgag 540
 accacctact acaacagcgc cctgaagagc cggtgacca tcataagga caacagcaag 600
 agccaggtgt tcctgaagat gaacagcctg cagaccgacg acaccgcat ctactactgc 660
 gccaaagcact actactacgg cggcagctac gccatggact actggggcca gggcaccagc 720
 gtgaccgtga gcagc 735

<210> 29

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> T2A

<400> 29

Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro
 1 5 10 15

Gly Pro

<210> 30

<211> 1005

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> tEGFR

<400> 30

cgcaaagtgt gtaacggaat aggtattggt gaatttaaag actcactctc cataaatgct 60
 acgaatatta aacacttcaa aaactgcacc tccatcagtg gcgatctcca catectgccg 120
 gtggcattta ggggtgactc cttcacacat actcctctc tggatccaca ggaactggat 180
 attctgaaaa ccgtaaagga aatcacaggg tttttgctga ttcaggcttg gcctgaaaac 240
 aggacggacc tccatgcctt tgagaaccta gaaatcatac gcggcaggac caagcaacat 300
 ggtcagtttt ctcttgcaat cgtcagcctg aacataacat ccttgggatt acgctccctc 360
 aaggagataa gtgatggaga tgtgataatt tcaggaaaca aaaatttgtg ctatgcaaat 420
 acaataaact ggaaaaaact gtttgggacc tccggtcaga aaaccaaact tataagcaac 480
 agaggtgaaa acagctgcaa ggccacaggc caggtctgcc atgccttgtg ctcccccgag 540
 ggctgctggg gcccggagcc cagggactgc gtctcttgcc ggaatgtcag ccgaggcagg 600
 gaatgcgtgg acaagtgcaa ccttctggag ggtgagccaa gggagtttgt ggagaactct 660
 gagtgcatac agtgccaccc agagtgcctg cctcaggcca tgaacatcac ctgcacagga 720
 cggggaccag acaactgtat ccagtgtgcc cactacattg acggccccca ctgcgtcaag 780
 acctgcccgg caggagtcac gggagaaaac aacaccctgg tctggaagta cgcagacgcc 840
 ggccatgtgt gccacctgtg ccacccaaac tgcacctacg gatgcactgg gccaggtctt 900
 gaaggctgtc caacgaatgg gcctaagatc ccgtccatcg ccactgggat ggtgggggcc 960
 ctctctcttg tgctggtggt ggccctgggg atcggcctct tcatg 1005

<210> 31

<211> 335

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> tEGFR

<400> 31

Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu
 1 5 10 15

Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile
 20 25 30

Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe

	35					40					45					
Thr	His	Thr	Pro	Pro	Leu	Asp	Pro	Gln	Glu	Leu	Asp	Ile	Leu	Lys	Thr	
	50					55					60					
Val	Lys	Glu	Ile	Thr	Gly	Phe	Leu	Leu	Ile	Gln	Ala	Trp	Pro	Glu	Asn	
65					70					75					80	
Arg	Thr	Asp	Leu	His	Ala	Phe	Glu	Asn	Leu	Glu	Ile	Ile	Arg	Gly	Arg	
				85					90					95		
Thr	Lys	Gln	His	Gly	Gln	Phe	Ser	Leu	Ala	Val	Val	Ser	Leu	Asn	Ile	
			100					105					110			
Thr	Ser	Leu	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Lys	Glu	Ile	Ser	Asp	Gly	Asp	Val	
	115					120					125					
Ile	Ile	Ser	Gly	Asn	Lys	Asn	Leu	Cys	Tyr	Ala	Asn	Thr	Ile	Asn	Trp	
	130					135					140					
Lys	Lys	Leu	Phe	Gly	Thr	Ser	Gly	Gln	Lys	Thr	Lys	Ile	Ile	Ser	Asn	
145					150					155					160	
Arg	Gly	Glu	Asn	Ser	Cys	Lys	Ala	Thr	Gly	Gln	Val	Cys	His	Ala	Leu	
			165					170					175			
Cys	Ser	Pro	Glu	Gly	Cys	Trp	Gly	Pro	Glu	Pro	Arg	Asp	Cys	Val	Ser	
	180					185					190					
Cys	Arg	Asn	Val	Ser	Arg	Gly	Arg	Glu	Cys	Val	Asp	Lys	Cys	Asn	Leu	
	195					200					205					
Leu	Glu	Gly	Glu	Pro	Arg	Glu	Phe	Val	Glu	Asn	Ser	Glu	Cys	Ile	Gln	
	210					215					220					
Cys	His	Pro	Glu	Cys	Leu	Pro	Gln	Ala	Met	Asn	Ile	Thr	Cys	Thr	Gly	
225					230					235					240	
Arg	Gly	Pro	Asp	Asn	Cys	Ile	Gln	Cys	Ala	His	Tyr	Ile	Asp	Gly	Pro	
			245					250					255			
His	Cys	Val	Lys	Thr	Cys	Pro	Ala	Gly	Val	Met	Gly	Glu	Asn	Asn	Thr	
	260					265					270					
Leu	Val	Trp	Lys	Tyr	Ala	Asp	Ala	Gly	His	Val	Cys	His	Leu	Cys	His	
	275					280					285					
Pro	Asn	Cys	Thr	Tyr	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Gly	Leu	Glu	Gly	Cys	Pro	
	290					295					300					
Thr	Asn	Gly	Pro	Lys	Ile	Pro	Ser	Ile	Ala	Thr	Gly	Met	Val	Gly	Ala	
305					310					315					320	
Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Val	Ala	Leu	Gly	Ile	Gly	Leu	Phe	Met		
			325					330					335			

<210> 32

<211> 37

1	5	10	15
Gly	Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser Arg		
	20	25	30
Leu Thr Asp Val Thr Leu			
35			
<210>	36		
<211>	114		
<212>	DNA		
<213>	智人(Homo sapiens)		
<220>			
<223>	ICOS的胞质结构域		
<400>	36		
	tgttggctta caaaaaagaa gtattcatcc agtgtgcacg accctaacgg tgaatacatg 60		
	ttcattgagag cagtgaacac agccaaaaaaa tctagactca cagatgtgac ccta 114		
<210>	37		
<211>	22		
<212>	PRT		
<213>	智人(Homo sapiens)		
<220>			
<223>	GMCSFR α 链信号序列		
<300>			
<308>	UniProt P15509		
<309>	1990-04-01		
<400>	37		
Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro			
1	5	10	15
Ala Phe Leu Leu Ile Pro			
	20		
<210>	38		
<211>	66		
<212>	DNA		
<213>	智人(Homo sapiens)		
<220>			
<223>	GMCSFR α 链信号序列		
<400>	38		
	atgcttctcc tggtgacaag ccttctgctc tgtgagttac cacaccacgc attcctcctg 60		
	atccca 66		
<210>	39		
<211>	66		

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> GMCSFR α 链信号序列

<400> 39

atgctgctgc tggtagaccag cctgctgctg tgcgagctgc cccaccccgc ctttctgctg 60
atcccc 66

<210> 40

<211> 71

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> T2A

<400> 40

tcgagggcgg cggagagggc agaggaagtc ttctaactg cggtgacgtg gaggagaatc 60
ccggccctag g 71

<210> 41

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CD3 ζ

<400> 41

cgggtgaagt tcagcagaag cgccgacgcc cctgcctacc agcagggcca gaatcagctg 60
tacaacgagc tgaacctggg cagaagggaa gactacgacg tcctggataa gcggagaggc 120
cgggaccctg agatgggcgg caagcctcgg cggaagaacc cccaggaagg cctgtataac 180
gaactgcaga aagacaagat ggccgaggcc tacagcgaga tcggcatgaa gggcgagcgg 240
aggcggggca agggccacga cggcctgtat cagggcctgt ccaccgccac caaggatacc 300
tacgacgccc tgcacatgca ggccctgccc ccaagg 336

<210> 42

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> P2A

<400> 42

Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val

1

5

10

15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 43

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> P2A

<400> 43

Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn

1

5

10

15

Pro Gly Pro

<210> 44

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> E2A

<400> 44

Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser

1

5

10

15

Asn Pro Gly Pro

20

<210> 45

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F2A

<400> 45

Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val

1

5

10

15

Glu Ser Asn Pro Gly Pro

20

<210> 46

<211> 81

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> CD28跨膜结构域

<400> 46

ttctgggtgc tggtaggtggc cggaggcgtg ctggcctgct acagcctgct ggtagccgtg 60
gccttcatca tcttttgggt g 81

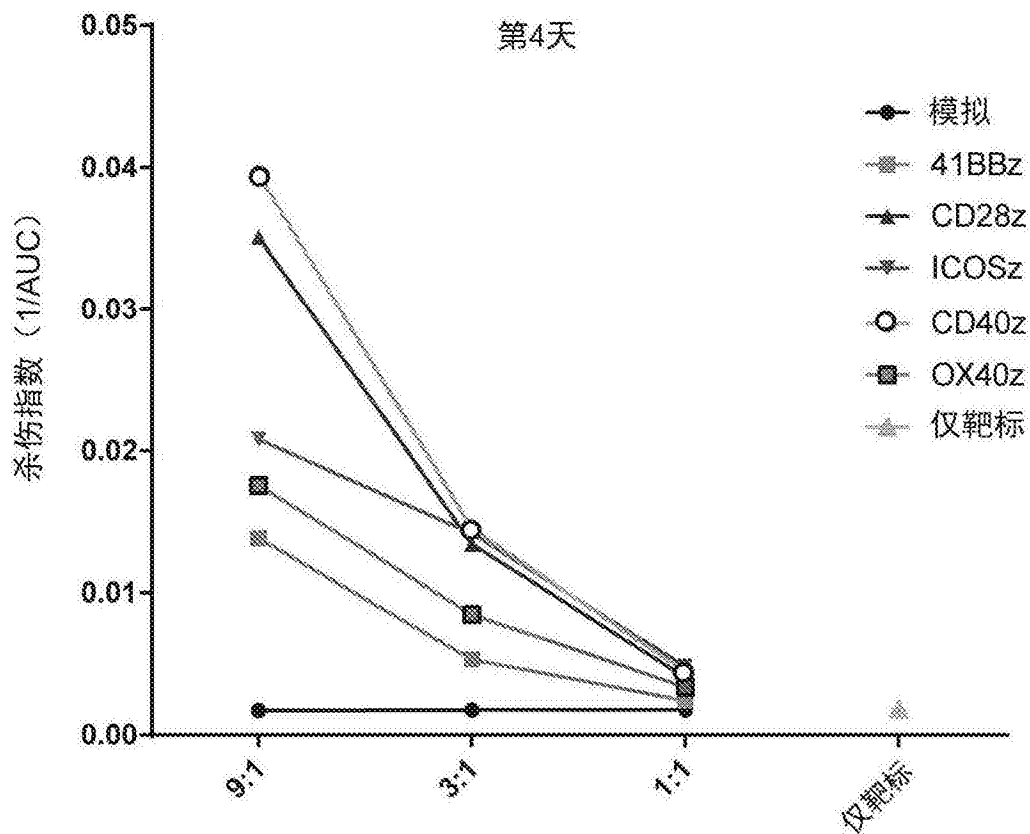


图1

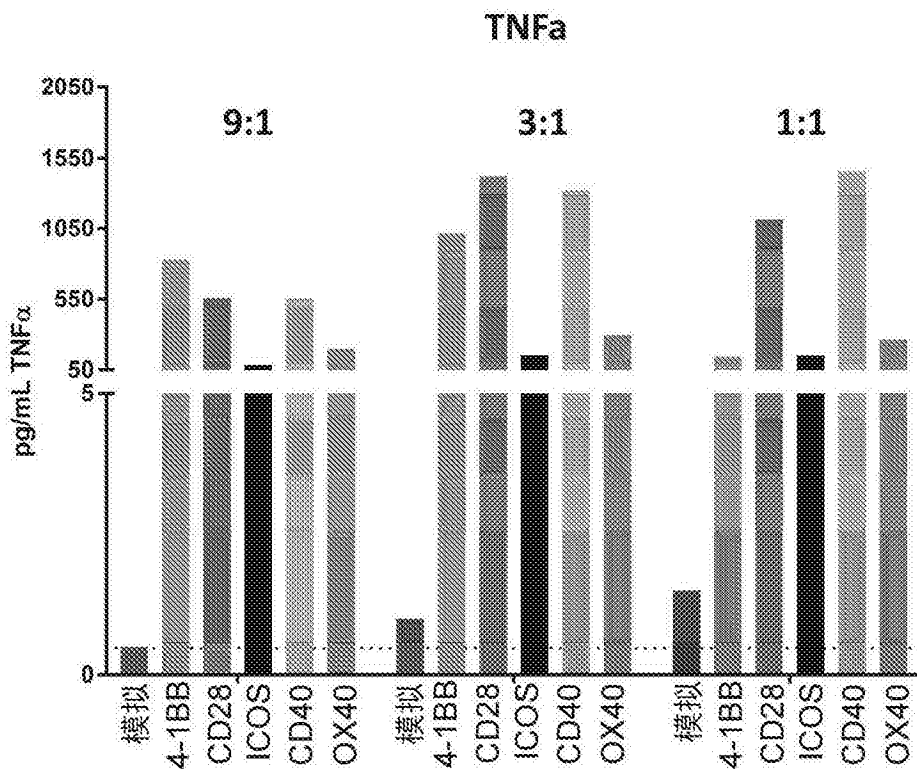


图2A

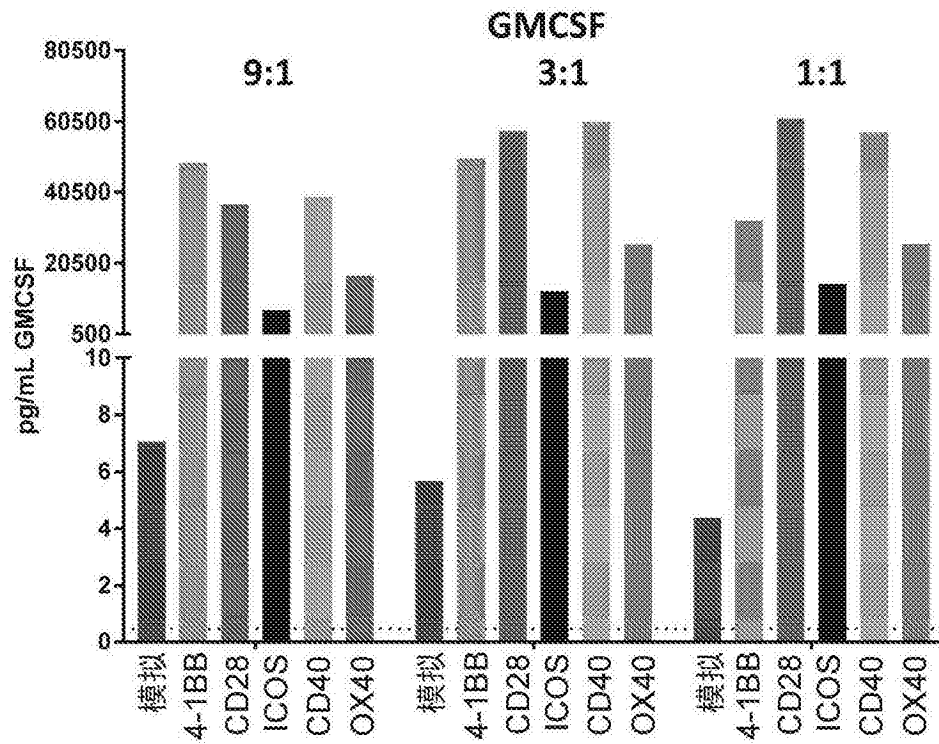


图2B

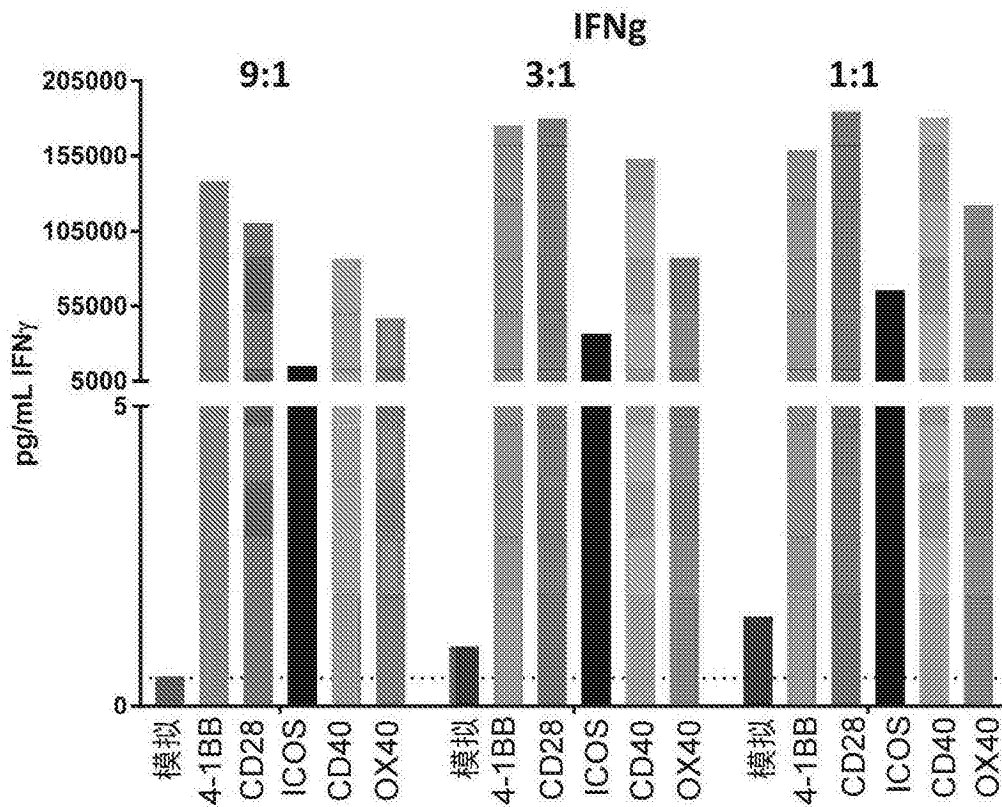


图2C

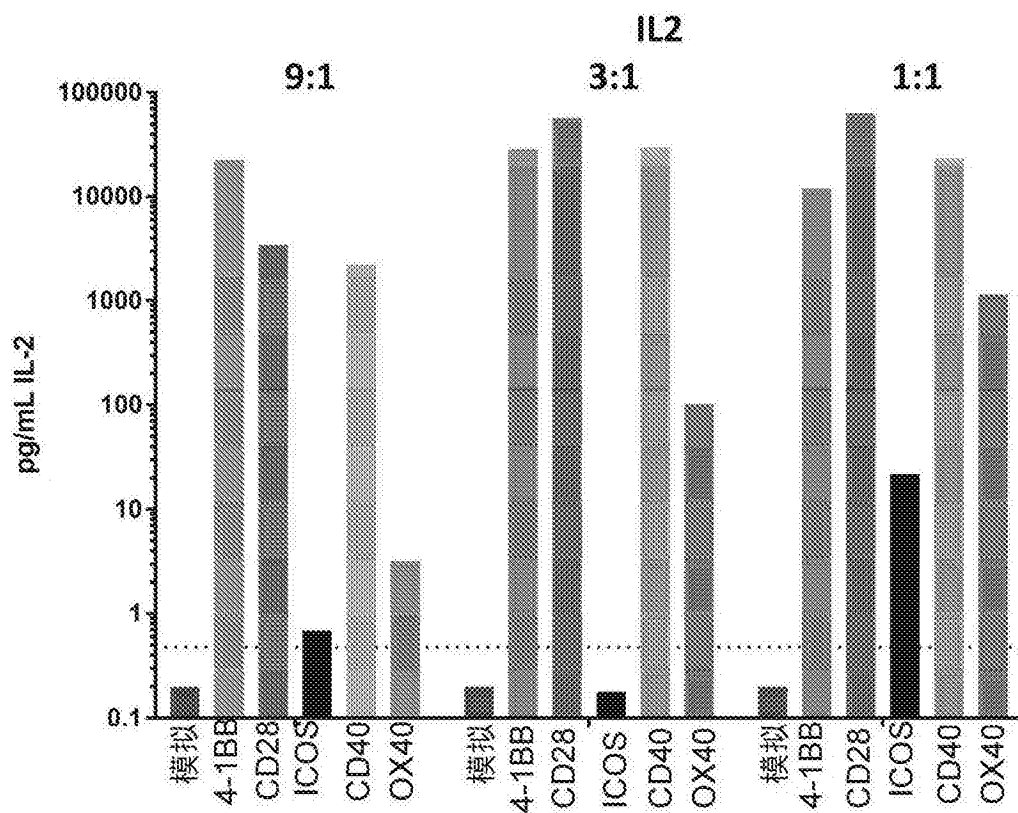


图2D

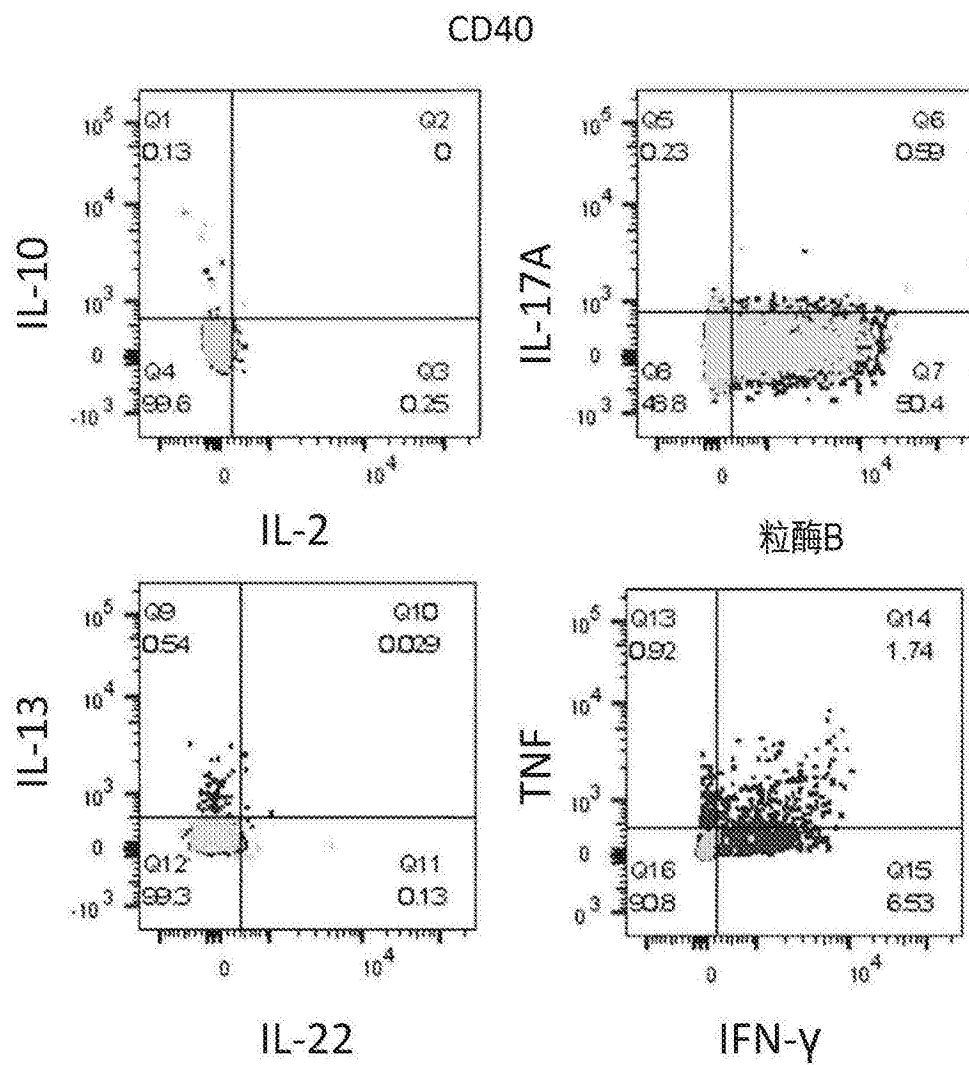


图3A

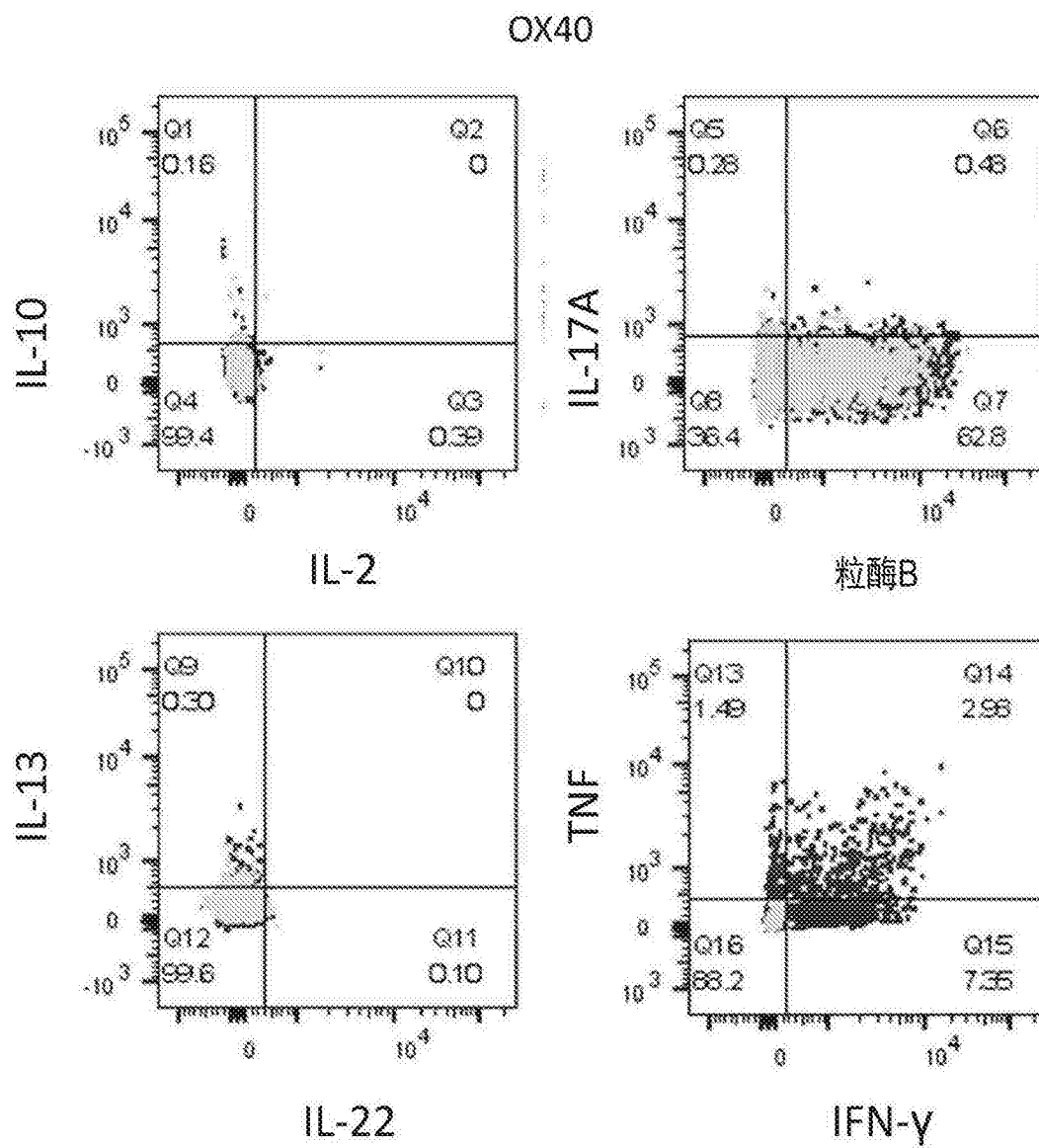


图3B

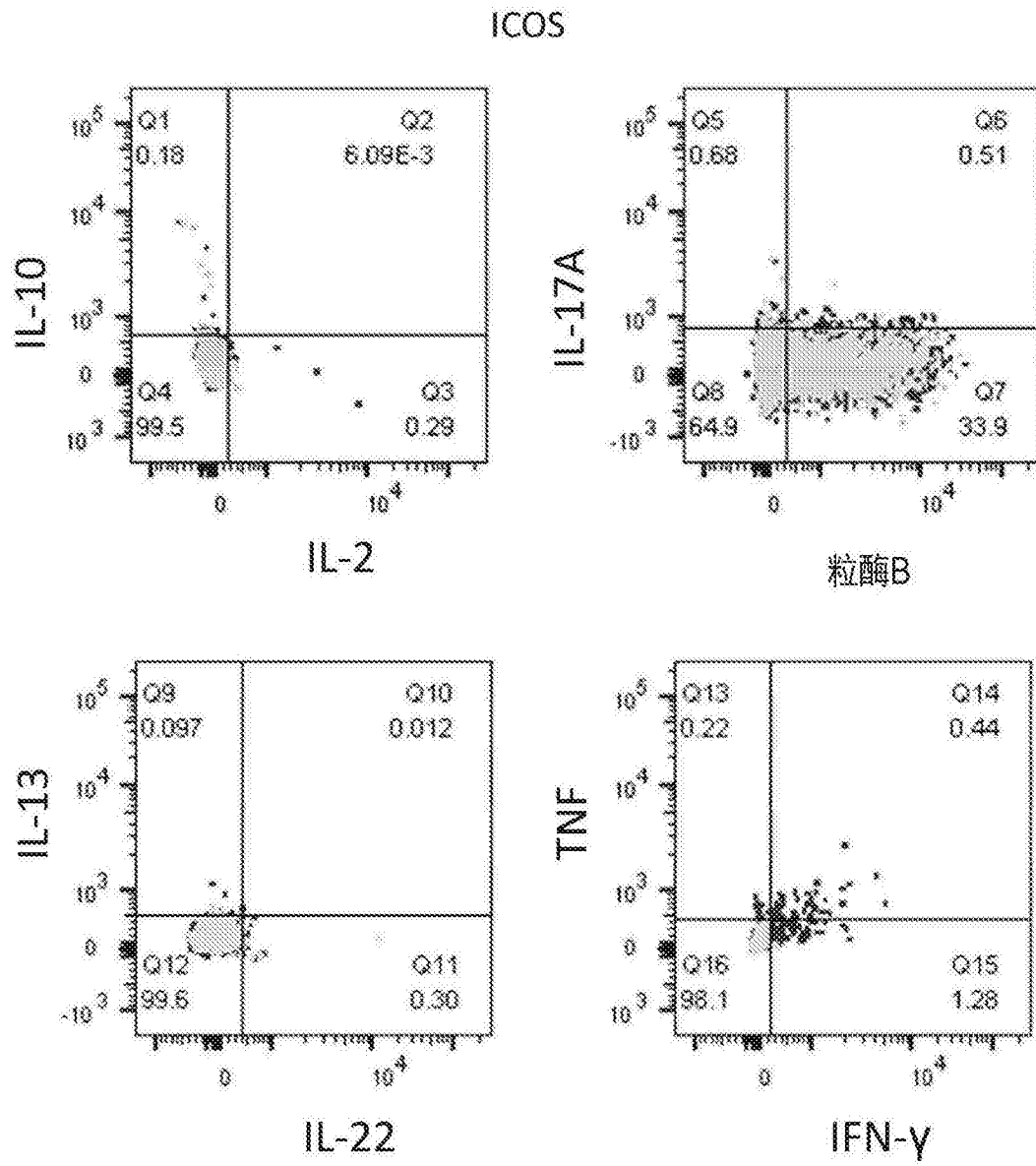


图3C

4-1BB

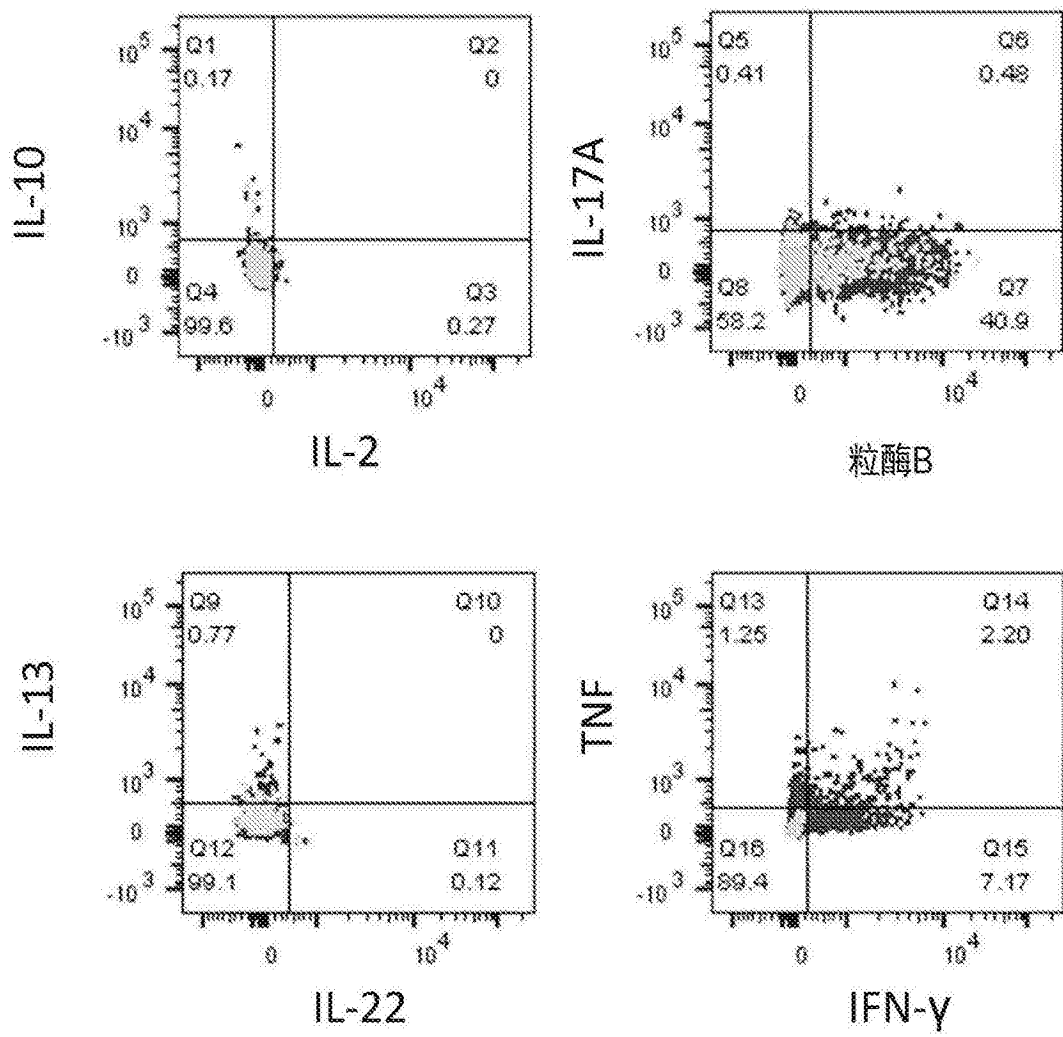


图3D

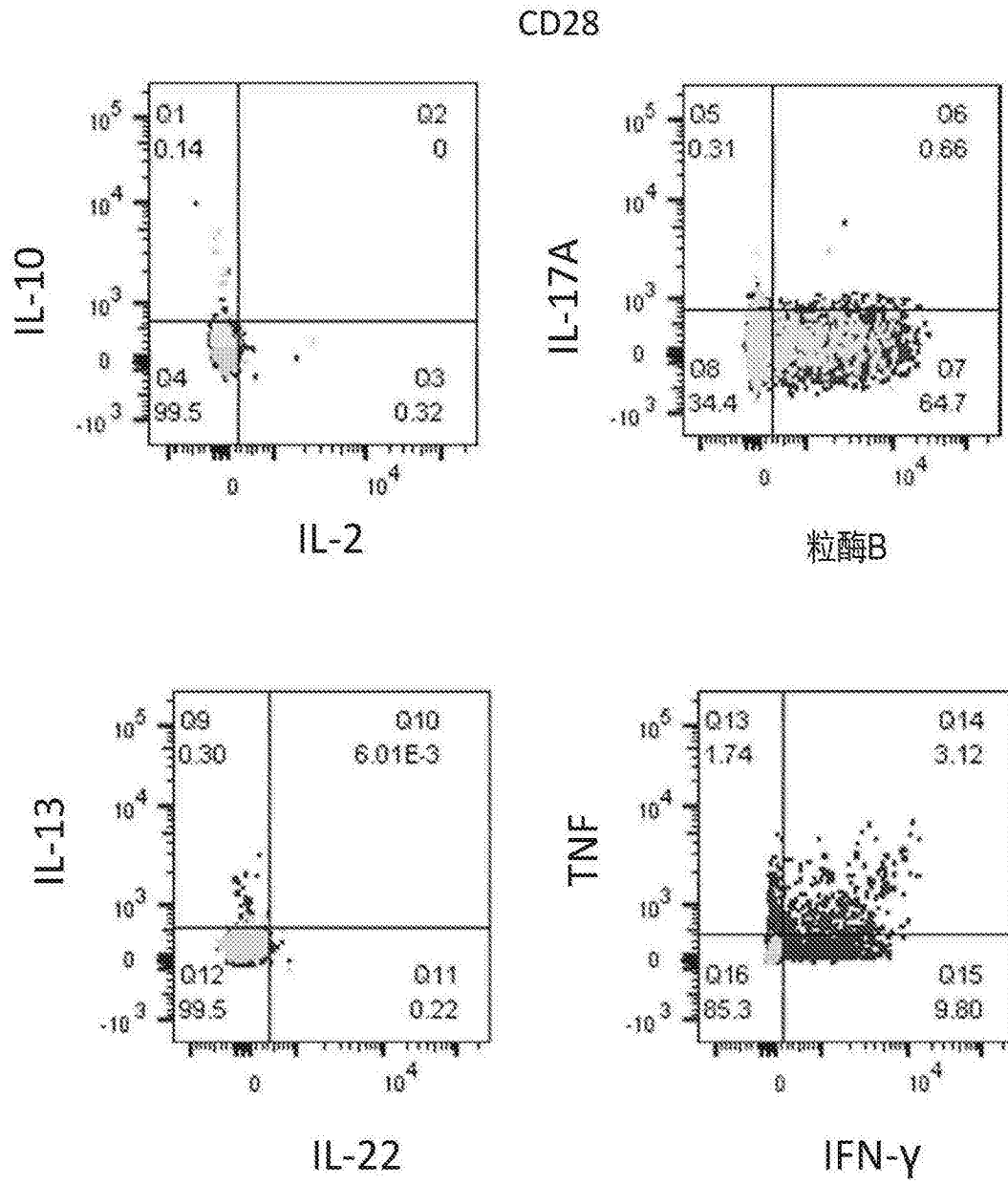


图3E

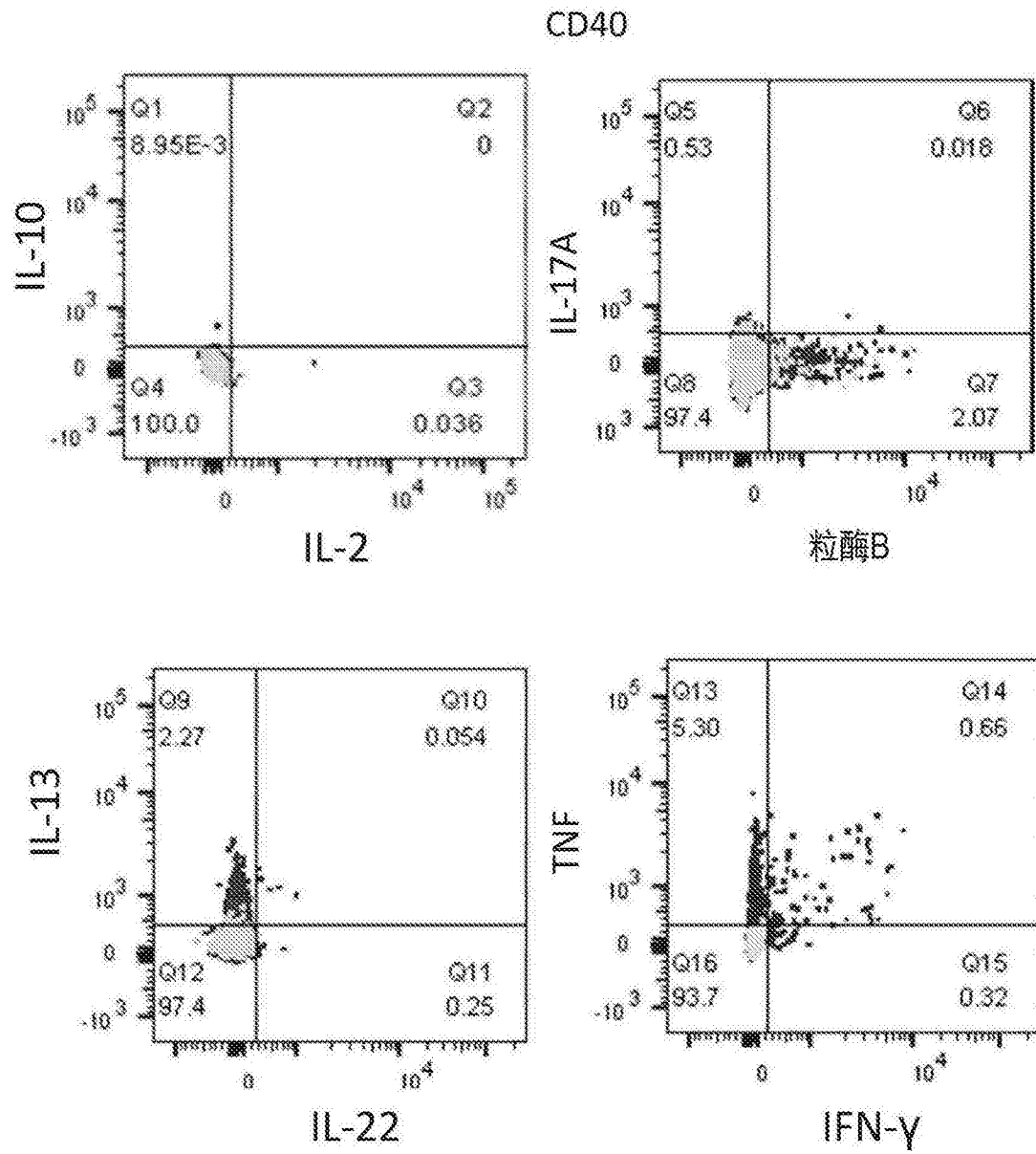


图4A

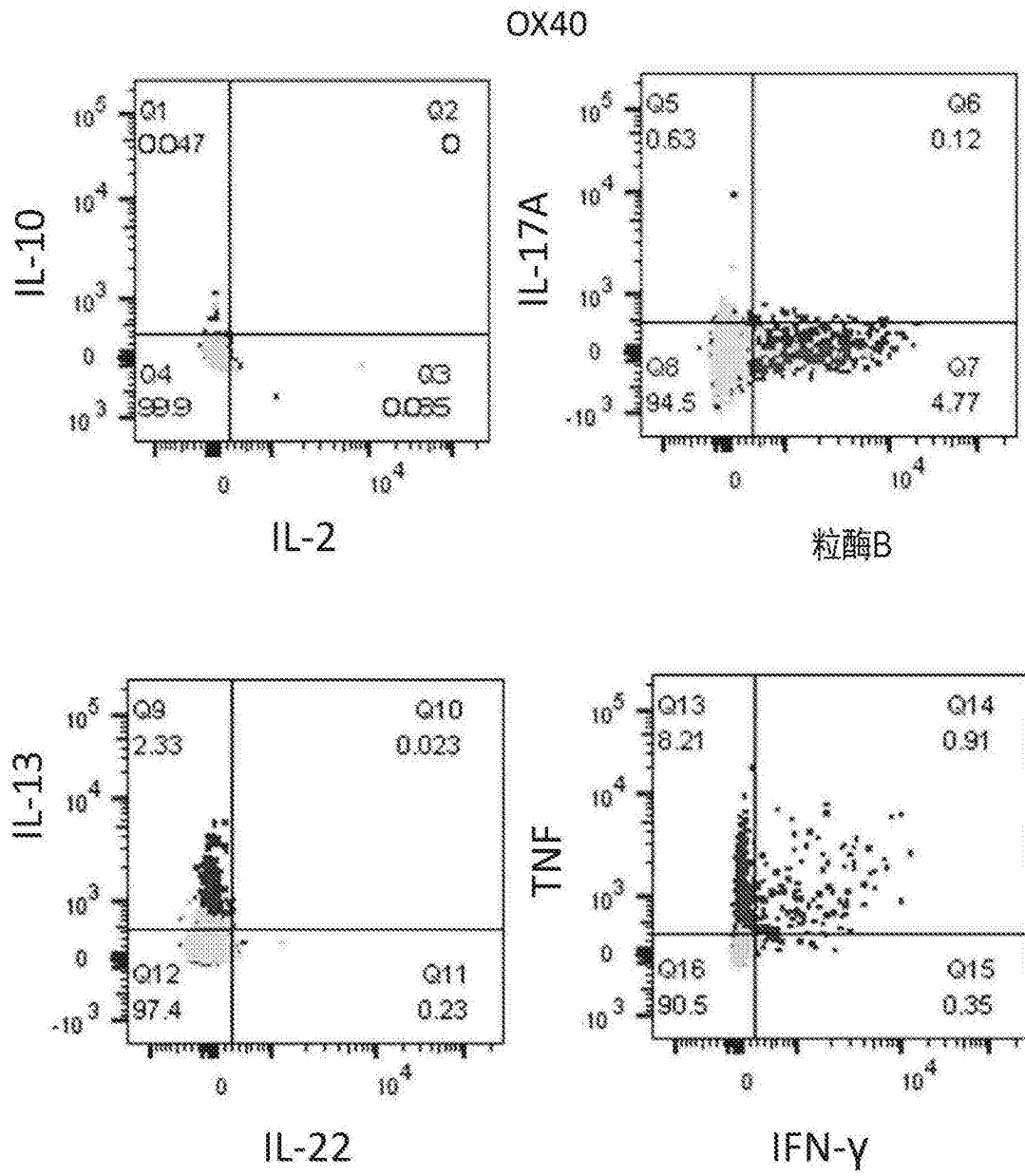


图4B

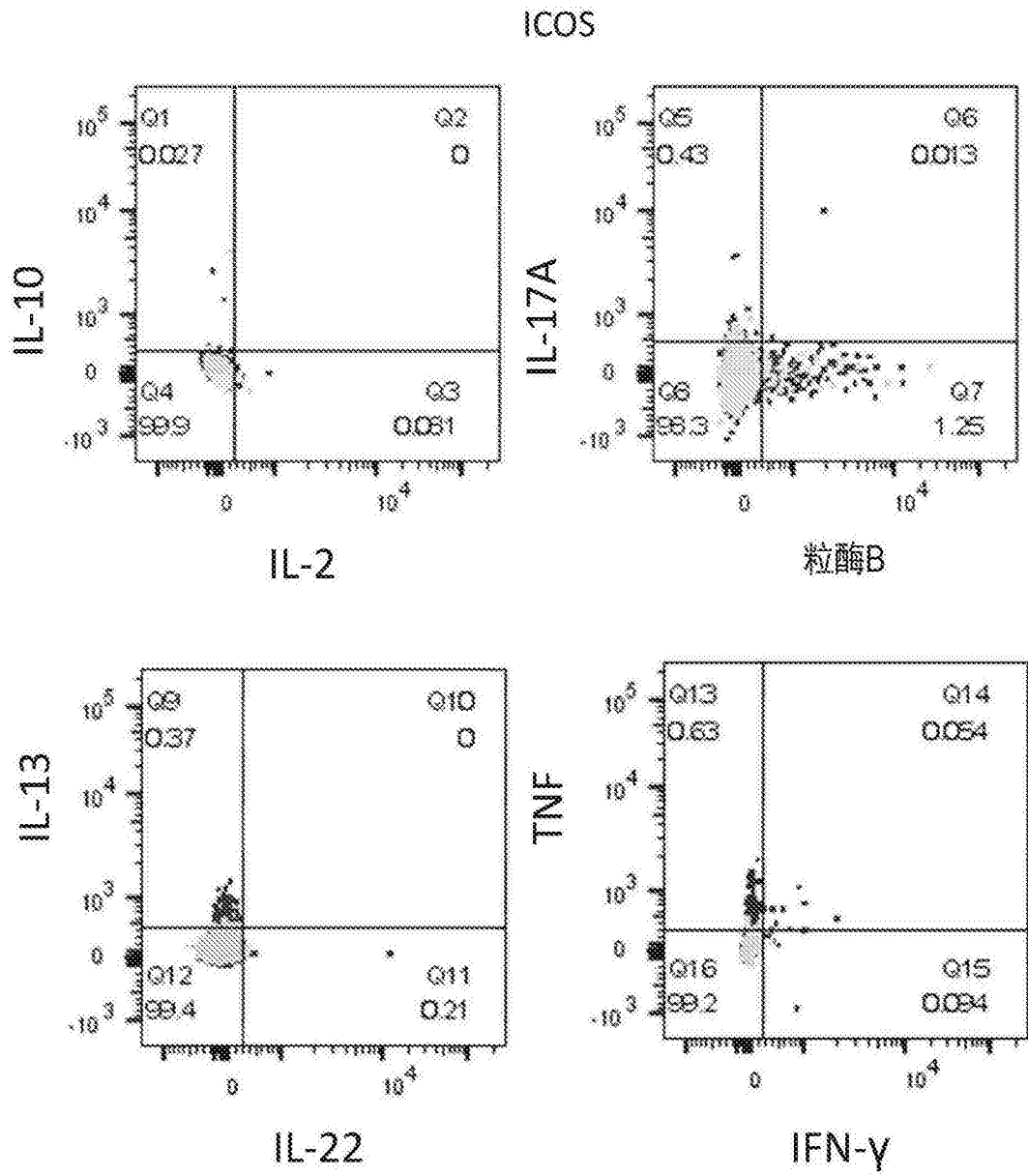


图4C

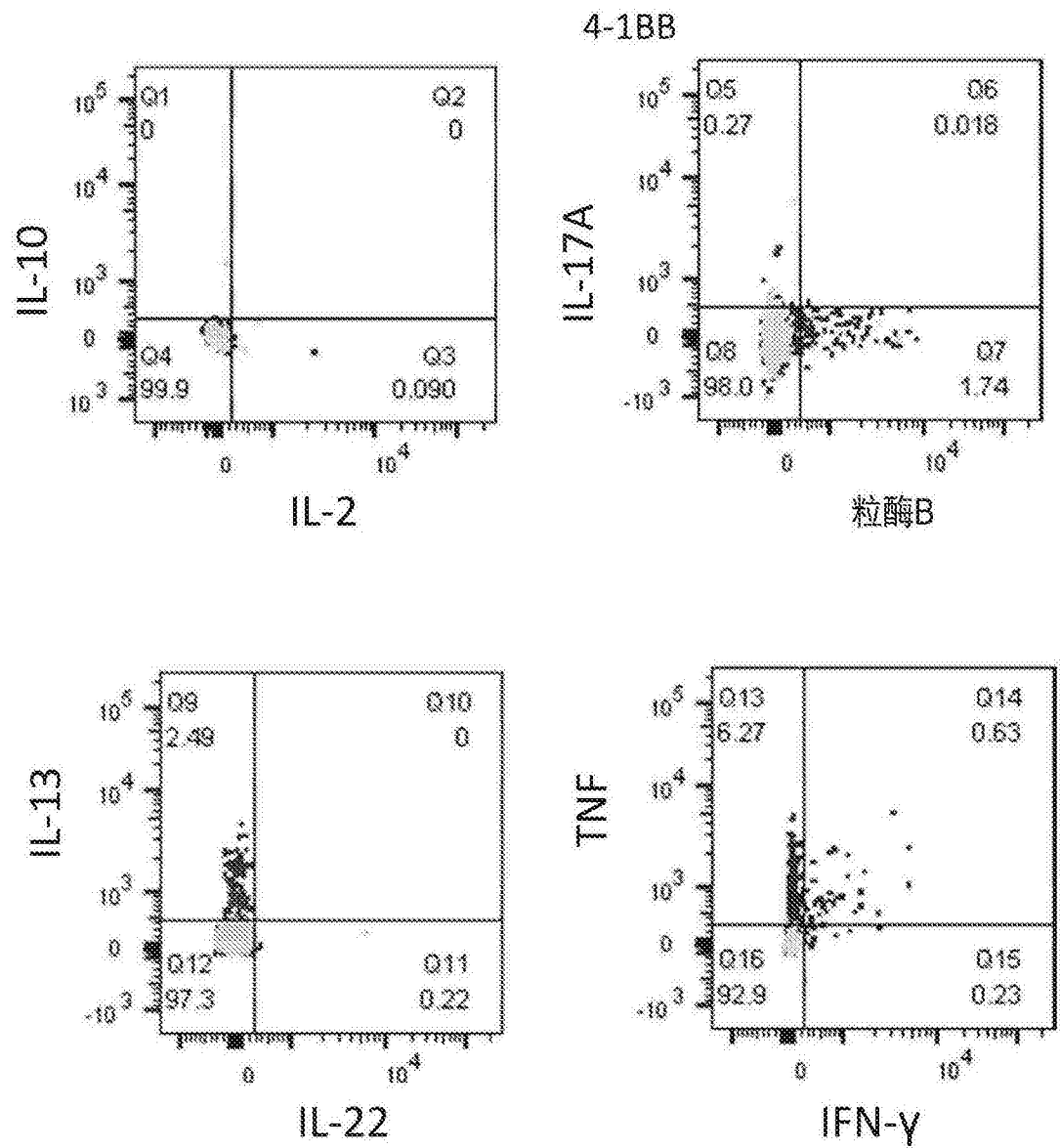


图4D

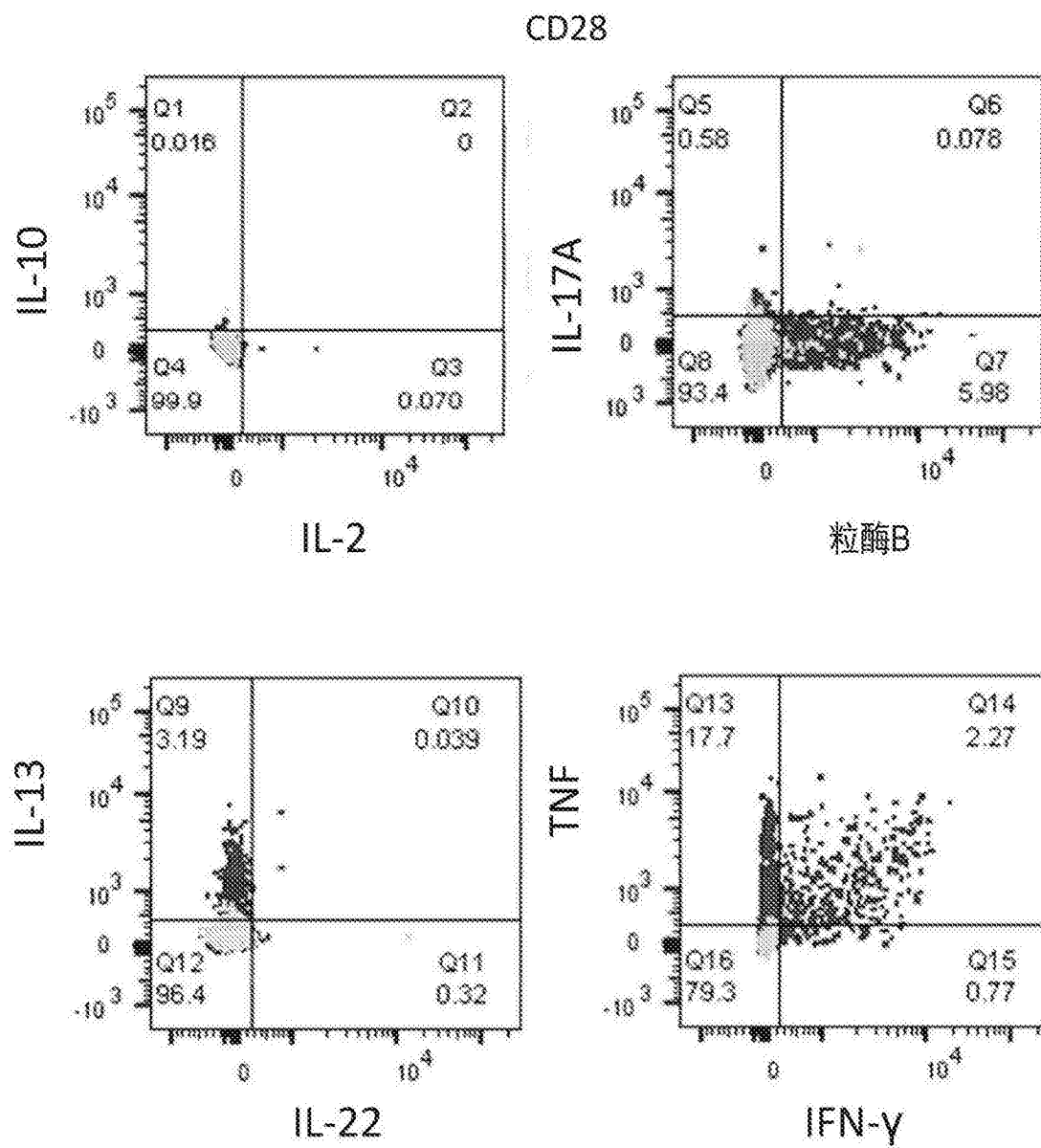


图4E

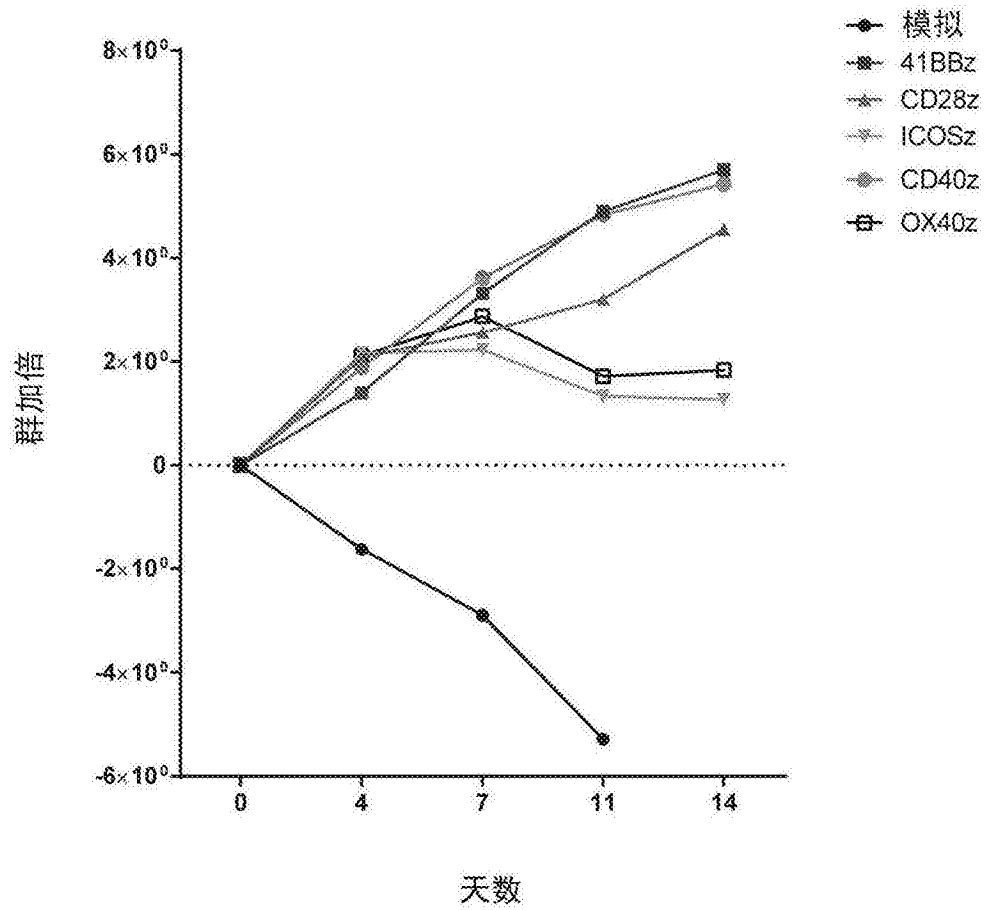


图5

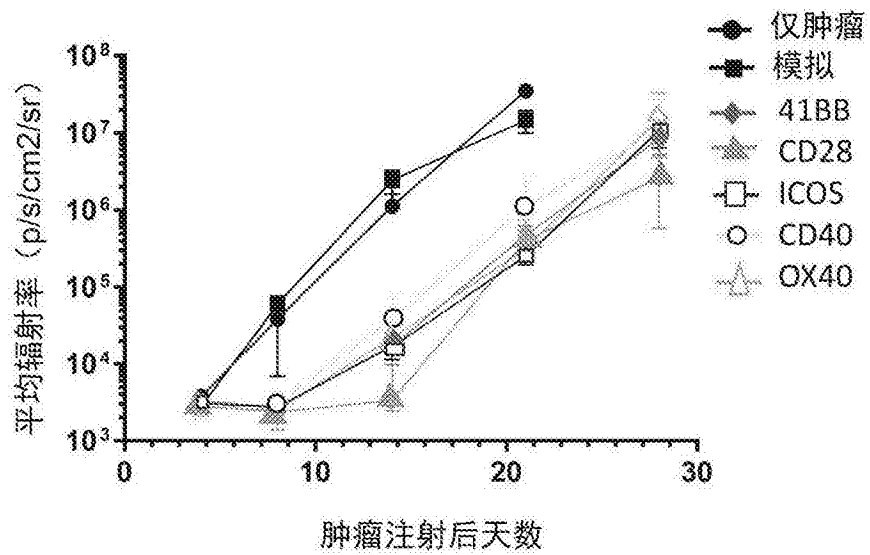


图6A

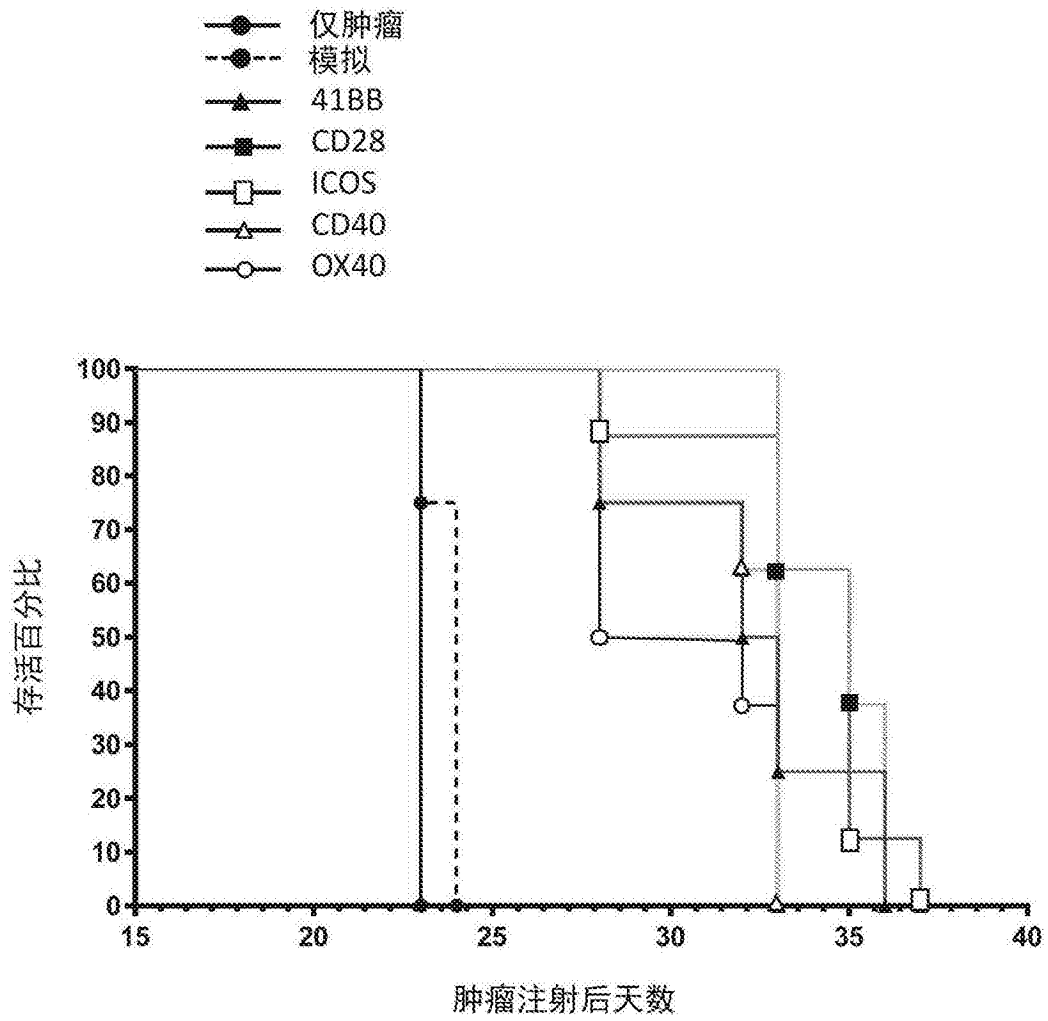


图6B

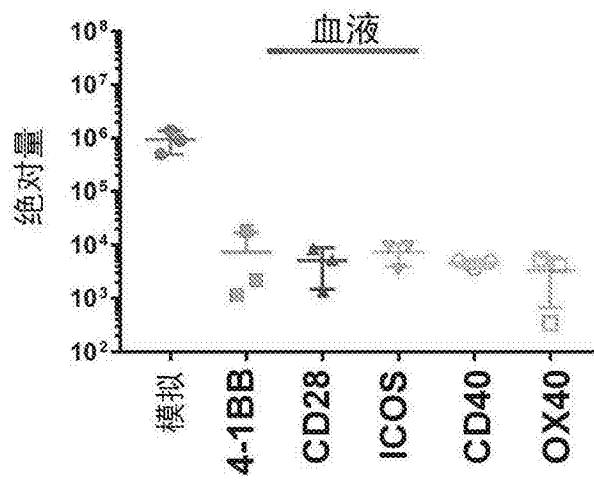


图7A

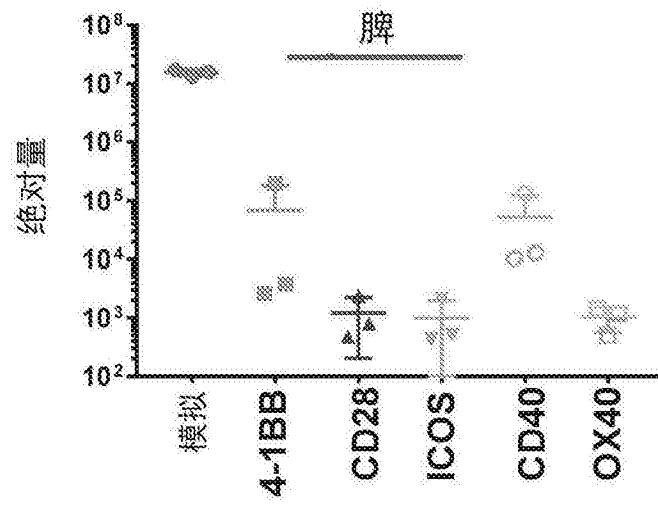


图7B

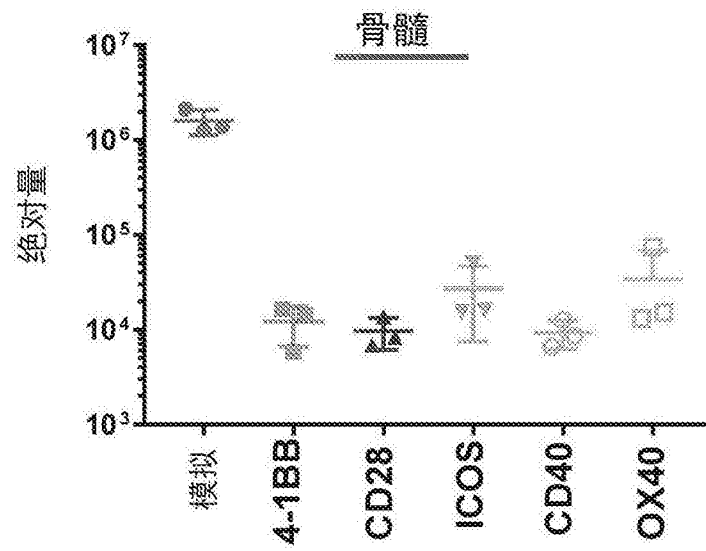


图7C

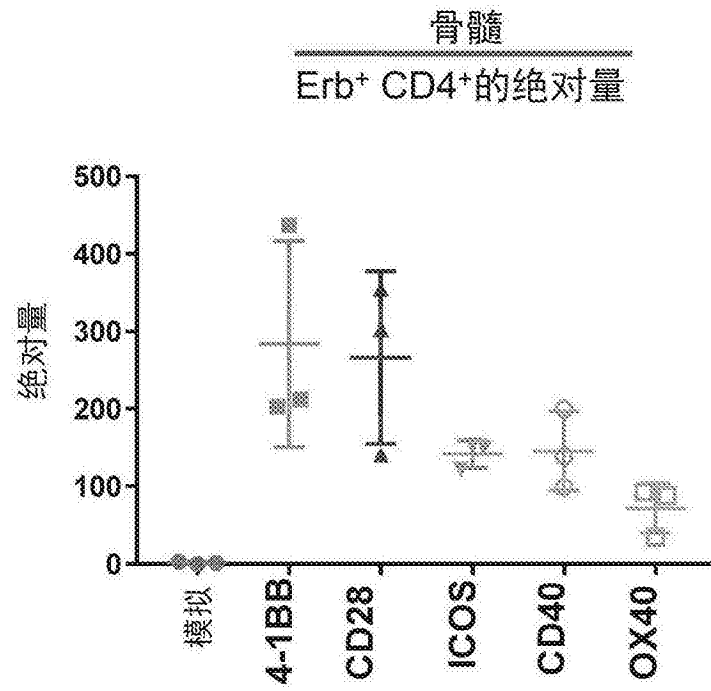


图7D

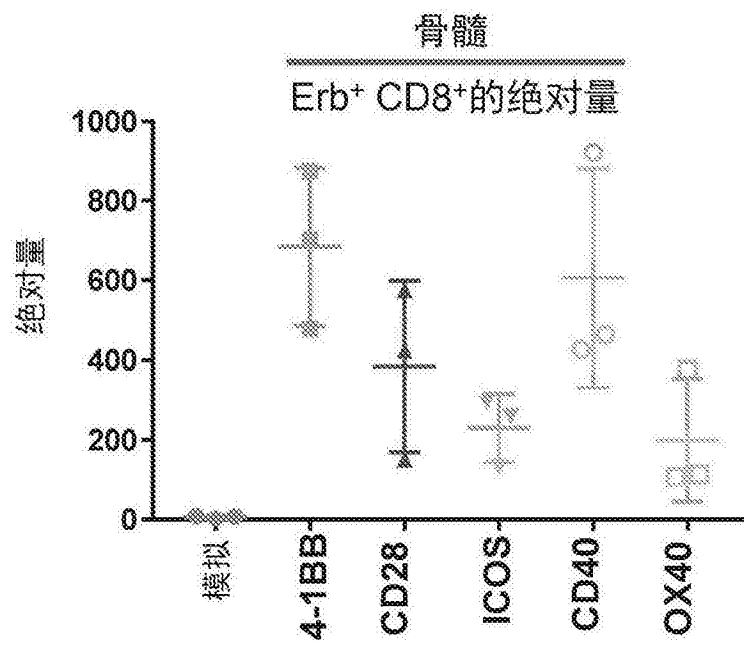


图7E