



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106132423 B

(45)授权公告日 2020.07.31

(21)申请号 201580008723.9

(22)申请日 2015.02.13

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 106132423 A

(43)申请公布日 2016.11.16

(30)优先权数据  
61/940,347 2014.02.14 US  
61/952,839 2014.03.13 US  
62/047,875 2014.09.09 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2016.08.15

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2015/015829 2015.02.13

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02015/123527 EN 2015.08.20

(73)专利权人 贝里坤制药股份有限公司  
地址 美国德克萨斯州

(72)发明人 A·E·福斯特 D·斯班赛  
M·R·柯林森-波茨 K·斯拉文

(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

(51)Int.Cl.  
G12N 15/09(2006.01)

(56)对比文件  
US 2014023647 A1,2014.01.23,  
US 2014023647 A1,2014.01.23,  
CN 103492406 A,2014.01.01,  
Priyadharshini Narayanan, et al..A  
composite MyD88/CD40 switch  
synergistically activates mouse and human  
dendritic cells for enhanced antitumor  
efficacy.《J Clin Invest》.2011,第121卷(第4  
期),第1524-1534页.

审查员 陈皓

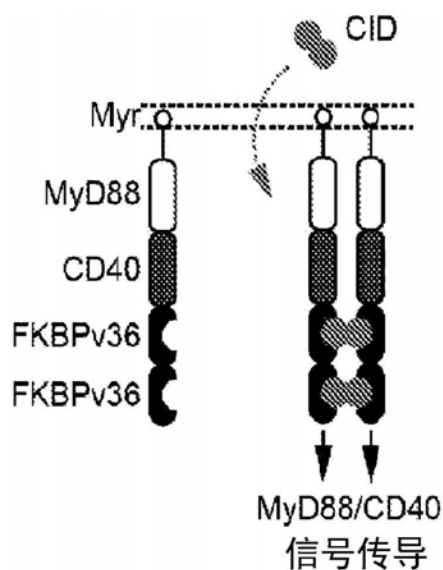
权利要求书4页 说明书180页 附图78页

## (54)发明名称

用诱导型嵌合多肽活化T细胞的方法

## (57)摘要

所述技术一般涉及免疫领域并部分涉及用包括CD40、MyD88或CD40和MyD88多肽的诱导型嵌合多肽活化细胞的方法,所述细胞包括例如T细胞和表达嵌合抗原受体的T细胞。所述技术还部分涉及在患者中诱导免疫应答和治疗肿瘤的治疗方法。



1. 一种转染或转导有核酸的修饰T细胞,包含编码诱导型嵌合刺激分子的多核苷酸,其中所述诱导型嵌合刺激分子包含(i) MyD88多肽区域或缺失TIR结构域的截短的MyD88多肽区域;(ii) 缺失CD40胞外结构域的CD40胞质多肽区域,和(iii) 多聚化区域。

2. 如权利要求1所述的修饰T细胞,其中所述诱导型嵌合刺激分子还包含(iv) 膜靶向区域。

3. 如权利要求1所述的修饰T细胞,其中所述诱导型嵌合刺激分子是以(i)、(ii)、(iii)多肽的氨基至羧基末端的顺序、或以(ii)、(i)、(iii)多肽的氨基至羧基末端的顺序包含区域(i)-(iii)的多肽。

4. 如权利要求2所述的修饰T细胞,其中所述诱导型嵌合刺激分子是以(iv)、(i)、(ii)、(iii)多肽的氨基至羧基末端的顺序、或以(iv)、(ii)、(i)、(iii)多肽的氨基至羧基末端的顺序包含区域(i)-(iv)的多肽。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的修饰T细胞,其中所述多聚化区域是FKBP12配体结合区域变体,其结合多聚化配体,并且所述多聚化配体是AP1903。

6. 如权利要求5所述的修饰T细胞,其中所述FKBP12配体结合区域变体在残基36处包含缬氨酸残基。

7. 如权利要求5所述的修饰T细胞,其中所述FKBP12配体结合区域变体是FKBP12v36区域。

8. 如权利要求7所述的修饰T细胞,其中所述FKBP12配体结合区域变体是Fv' Fv1s。

9. 如权利要求5所述的修饰T细胞,其中所述多聚化区域包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:11的多肽或其功能性片段,或由SEQ ID NO:10的核苷酸序列所编码的多肽或其功能性片段。

10. 如权利要求9所述的修饰T细胞,其中所述多聚化区域还包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:13的多肽或其功能性片段,或由SEQ ID NO:12的核苷酸序列所编码的多肽或其功能性片段。

11. 如权利要求9所述的修饰T细胞,其中所述多聚化区域还包含残基36为缬氨酸的Fv多肽变体。

12. 如权利要求1-4中任一项所述的修饰T细胞,其中所述多聚化区域结合多聚化配体,并且其中所述多聚化配体是FK506二聚体或二聚化FK506类似物配体。

13. 如权利要求1-7中任一项所述的修饰T细胞,其中所述多聚化区域包含两个FKBP12配体结合区域变体,其结合多聚化配体,并且所述多聚化配体是AP1903。

14. 如权利要求2或4所述的修饰T细胞,其中区域(i)-(iv)中至少一个由密码子优化的核苷酸序列所编码。

15. 如权利要求1-14中任一项所述的修饰T细胞,其还包含与编码所述诱导型嵌合刺激分子的多核苷酸操作性连接的启动子。

16. 如权利要求1-15中任一项所述的修饰T细胞,其中所述修饰T细胞还包含编码嵌合抗原受体的多核苷酸。

17. 如权利要求16所述的修饰T细胞,其中所述嵌合抗原受体包括

(i) 跨膜区域;(ii) T细胞活化分子;和(iii) 抗原识别部分。

18. 如权利要求1-17中任一项所述的修饰T细胞,其中所述修饰T细胞还包含编码T细胞

受体的多核苷酸。

19. 如权利要求12-18中任一项所述的修饰T细胞,其中所述修饰T细胞转染或转导有含编码T细胞受体或基于T细胞受体的嵌合抗原受体的多核苷酸的核酸。

20. 如权利要求17所述的修饰T细胞,其中所述嵌合抗原受体还包含共刺激分子。

21. 如权利要求20所述的修饰T细胞,其中所述共刺激分子选自:CD28、OX40和4-1BB。

22. 如权利要求17所述的修饰T细胞,其中所述T细胞活化分子是含ITAM的信号1赋予分子。

23. 如权利要求17所述的修饰T细胞,其中所述T细胞活化分子是CD3 $\zeta$ 多肽。

24. 如权利要求17所述的修饰T细胞,其中所述T细胞活化分子是Fc $\epsilon$ 受体 $\gamma$  (Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$ ) 亚基多肽。

25. 如权利要求17和20-24中任一项所述的修饰T细胞,其中所述抗原识别部分结合肿瘤细胞上的抗原。

26. 如权利要求17和20-24任一项所述的修饰T细胞,其中所述抗原识别部分结合过度增殖疾病中涉及的细胞上的抗原。

27. 如权利要求17和20-24中任一项所述的修饰T细胞,其中所述抗原识别部分结合选自下组的抗原:PSMA、PSCA、MUC1、CD19、ROR1、间皮素、GD2、CD123、MUC16和Her2/Neu。

28. 如权利要求27所述的修饰T细胞,其中所述抗原识别部分结合PSCA。

29. 如权利要求27所述的修饰T细胞,其中所述抗原识别部分结合CD19。

30. 如权利要求27所述的修饰T细胞,其中所述抗原识别部分结合Her2/Neu。

31. 如权利要求17和20-24中任一项所述的修饰T细胞,其中所述抗原识别部分结合病毒或细菌抗原。

32. 如权利要求17和20-24中任一项所述的修饰T细胞,其中所述抗原识别部分是单链可变片段。

33. 如权利要求17和20-24中任一项所述的修饰T细胞,其中所述跨膜区域是CD28跨膜区域。

34. 如权利要求17和20-24中任一项所述的修饰T细胞,其中所述跨膜区域是CD8跨膜区域。

35. 如权利要求34所述的修饰T细胞,其中所述嵌合抗原受体还包含CD8茎部区域。

36. 如权利要求1-35中任一项所述的修饰T细胞,其中所述诱导型嵌合刺激分子包括具有氨基酸序列SEQ ID NO:5的截短的MyD88多肽区域,或其功能性片段。

37. 如权利要求1-35中任一项所述的修饰T细胞,其中所述诱导型嵌合刺激分子包括具有氨基酸序列SEQ ID NO:49的MyD88多肽区域。

38. 如权利要求1-37中任一项所述的修饰T细胞,其中所述CD40胞质多肽区域具有氨基酸序列SEQ ID NO:9,或其功能性片段。

39. 如权利要求23所述的修饰T细胞,其中所述CD3 $\zeta$ 多肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:39,或其功能性片段。

40. 如权利要求2或4所述的修饰T细胞,其中所述膜靶向区域选自豆蔻酰化区域、棕榈酰化区域、异戊二烯化区域和受体跨膜序列。

41. 如权利要求40所述的修饰T细胞,其中所述膜靶向区域是豆蔻酰化区域。

42. 如权利要求41所述的修饰T细胞,其中所述豆蔻酰化区域具有SEQ ID NO:3所示氨基酸序列或其功能性片段。

43. 如权利要求1所述的修饰T细胞,其中所述诱导型嵌合刺激分子没有膜靶向区域。

44. 以下试剂在制备用于刺激对象中T细胞介导的免疫应答的药物中的用途:

a) 如权利要求1-43中任一项所述的修饰T细胞;和

b) 有效量的多聚化配体,所述多聚化配体结合多聚化区域以刺激对象中T细胞介导的免疫应答。

45. 一种核酸,所述核酸包含

a) 编码诱导型嵌合刺激分子的第一多核苷酸,其中所述诱导型嵌合刺激分子包含(i) MyD88多肽区域或缺失TIR结构域的截短的MyD88多肽区域;(ii) 缺失CD40胞外结构域的CD40胞质多肽区域,和(iii) 多聚化区域;和

b) 编码嵌合抗原受体的第二多核苷酸。

46. 如权利要求45所述的核酸,其中所述诱导型嵌合刺激分子还包含(iv) 膜靶向区域。

47. 如权利要求45所述的核酸,其中所述诱导型嵌合刺激分子是以(i)、(ii)、(iii)多肽的氨基至羧基末端的顺序包含区域(i)-(iii)的多肽。

48. 如权利要求46所述的核酸,其中所述诱导型嵌合刺激分子是以(iv)、(i)、(ii)、(iii)多肽的氨基至羧基末端的顺序包含区域(i)-(iv)的多肽。

49. 如权利要求45-48中任一项所述的核酸,其中所述多聚化区域是配体结合区域。

50. 如权利要求49所述的核酸,其中所述配体结合区域是FKBP12区域。

51. 如权利要求50所述的核酸,其中所述FKBP12区域是FKBP12v36区域。

52. 如权利要求50所述的核酸,其中所述FKBP12区域是Fv' Fv1s。

53. 如权利要求49所述的核酸,其中所述多聚化区域包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:11的多肽或其功能性片段,或由SEQ ID NO:10的核苷酸序列所编码的多肽或其功能性片段。

54. 如权利要求53所述的核酸,其中所述多聚化区域还包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:13的多肽或其功能性片段,或由SEQ ID NO:12的核苷酸序列所编码的多肽或其功能性片段。

55. 如权利要求53所述的核酸,其还包含残基36为缬氨酸的Fv多肽变体。

56. 如权利要求49所述的核酸,其中所述多聚化区域结合多聚化配体,并且其中所述多聚化配体是FK506二聚体或二聚化FK506类似物配体。

57. 如权利要求56所述的核酸,其中所述多聚化配体是AP1903。

58. 如权利要求45-57中任一项所述的核酸,其还包含所述第一和第二多核苷酸之间的编码接头多肽的第三多核苷酸,其中所述接头多肽在翻译期间或翻译之后将所述第一和第二多核苷酸的翻译产物分开。

59. 如权利要求58所述的核酸,其中所述接头多肽是2A多肽。

60. 如权利要求45-59中任一项所述的核酸,其中所述嵌合抗原受体包括:

(i) 跨膜区域;(ii) T细胞活化分子;和(iii) 抗原识别部分。

61. 如权利要求60所述的核酸,其中所述嵌合抗原受体还包含共刺激分子。

62. 如权利要求45-61中任一项所述的核酸,其中所述诱导型嵌合刺激分子包括具有氨



基酸序列SEQ ID NO:49的MyD88多肽区域。

63. 如权利要求45-62中任一项所述的核酸,其中所述CD40胞质多肽区域具有氨基酸序列SEQ ID NO:9,或其功能性片段。

64. 转染或转导有权利要求45-63中任一项所述的核酸的修饰细胞。

65. 如权利要求64所述的修饰细胞,其中所述修饰细胞是T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞、NK-T细胞、TCR-表达细胞、或NK细胞。

66. 一种核酸,其包含:

a) 编码诱导型嵌合刺激分子的第一多核苷酸,其中所述诱导型嵌合刺激分子包含(i) MyD88多肽区域或缺失TIR结构域的截短的MyD88多肽区域;(ii) 缺失CD40胞外结构域的CD40胞质多肽区域;和(iii) 多聚化区域,其包含在36位包含氨基酸取代的修饰FKBP12多肽,其中所述修饰FKBP12多肽与AP1903结合,并且其中所述诱导型嵌合刺激分子不包含膜靶向区域,和

b) 编码嵌合抗原受体的第二多核苷酸。

67. 一种用权利要求66所述的核酸转染或转导的修饰细胞。

68. 如权利要求67所述的修饰细胞,其中所述修饰细胞是T细胞,肿瘤浸润淋巴细胞,NK-T细胞,TCR-表达细胞,或NK细胞。

69. 如权利要求68所述的修饰细胞,其中所述修饰细胞是T细胞。

70. 如权利要求67-69中任一项所述的修饰细胞,其中所述修饰细胞是人细胞。

## 用诱导型嵌合多肽活化T细胞的方法

### [0001] 领域

[0002] 所述技术一般涉及免疫领域并部分涉及用包括CD40、MyD88或CD40和MyD88多肽的诱导型嵌合多肽活化细胞的方法,所述细胞包括例如T细胞和表达嵌合抗原受体的T细胞。所述技术还部分涉及在患者中诱导免疫应答和治疗肿瘤的治疗方法。

### [0003] 相关申请

[0004] 优先权为2014年2月14日提交的名为“用诱导型嵌合多肽活化T细胞的方法”的美国临时专利申请61/940,347;2014年3月13日提交的名为“用诱导型嵌合多肽活化T细胞的方法”的美国临时专利申请61/952,839;和2014年9月9日提交的名为“用诱导型嵌合多肽活化T细胞的方法”的美国临时专利申请62/047,875;其通过引用全文纳入本文。

### [0005] 背景

[0006] T细胞活化是对抗环境中致病性微生物(如病毒、细菌和寄生虫)、外来蛋白质和有害化学品的保护性免疫中的重要步骤,并且还作为针对癌症和其他过度增殖疾病的免疫。T细胞在其表面表达受体(即T细胞受体),所述受体识别细胞表面呈递的抗原。正常免疫应答中,这些抗原结合至T细胞受体,启动胞内变化导致T细胞活化。

### [0007] 概述

[0008] 用嵌合抗原受体(CAR)工程改造的T细胞的抗肿瘤功效依赖于其过继转移后的存活和体内扩增。虽然包括共刺激结构域,例如CD28和4-1BB,使T细胞的用于治疗白血病的CD19靶向CAR的扩增提高<sup>1-4</sup>,这些信号结构域与抗原识别之间通过CAR建立起来的不可分割的关联导致不受控的T细胞活性的严重毒性<sup>5,6</sup>。本文提供控制CAR T细胞治疗的方法,在一个实施方式中依赖于T细胞共刺激转换,可在体内被小分子、二聚化化学诱导剂(CID)、rimiducid(AP1903)活化的共刺激分子诱导型MyD88/CD40(iMC),从而为CAR-修饰T细胞提供共刺激、诱导T细胞增殖、存活和抗肿瘤功效。基于iMC的诱导型共刺激可用于调节T细胞体内增殖并作为新型治疗选择来控制CAR-T细胞治疗的安全性和功效。

[0009] 嵌合抗原受体(CAR)是人工受体,设计用于赋予T细胞抗原特异性。其通常包括抗原特异性组分、跨膜组分和胞内组分,这些组分经选择用以活化T细胞并提供特异性免疫。表达嵌合抗原受体的T细胞可用在各种疗法中,包括癌症治疗。虽然具有针对肿瘤的效果,在一些情况中这些疗法会导致副作用,这部分归因于对健康组织的非特异性攻击。需要提供强免疫治疗应答并可以避免毒性副作用的可控T细胞治疗的方法。

[0010] 本文部分提供诱导型嵌合信号传导分子(CSM),其可用于例如诱导或提高免疫应答。CSM可单独使用或与嵌合抗原受体(CAR)组合使用,这使得免疫应答特异导向特定的肿瘤细胞。受控的T细胞活化方法避免了早期基于CAR治疗的许多毒性副作用。

[0011] 本文还提供活化的T细胞,其表达诱导型MyD88、诱导型CD40或诱导型嵌合MyD88/CD40多肽。活化的细胞可用于提高针对疾病的免疫应答或用于治疗癌症,例如降低肿瘤尺寸。用活化的T细胞和活化的CAR T细胞进行的疗程可通过利用下述方法测定肿瘤的大小和血管化来监控:利用各种成像方案(例如CT、骨骼扫描、MRI、PET扫描、Trofex扫描)、利用各种标准血液生物标志物(例如PSA、循环肿瘤细胞),或利用各种炎症、缺氧细胞因子或被治

疗患者的其他因子。

[0012] 本文讨论的诱导型嵌合信号传导分子允许细胞中共表达的嵌合抗原受体 (CAR) 的持久的调节控制。诱导型嵌合分子包括本文所述的诱导型MyD88/CD40多肽。抗原特异性T细胞的活化依赖于配体诱导剂的给予,所述设计用以靶向与疾病或病症有关的细胞抗原。配体诱导剂通过多聚化所述诱导型嵌合信号传导分子来活化表达CAR的细胞,继而激活NF- $\kappa$ B信号和其他胞内信号通路,活化细胞(例如T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞、天然杀伤细胞或天然杀伤T细胞)。(参见例如图57)没有配体诱导剂时,T细胞静息或有基线水平活性。配体的剂量决定表达CAR的T细胞增殖和活化的速率和量级。

[0013] 完全活化和肿瘤细胞杀伤仍取决于抗原识别和通过CD3 $\alpha$ 信号传导的NFAT的额外活性。一旦实现完全应答,停止配体给药。若疾病或病症复发,则重启配体剂量,使静息的肿瘤靶标T细胞再扩增和再活化。

[0014] 在细胞治疗的一个示例中,转导有编码嵌合抗原受体的核酸的T细胞给予患者以治疗癌症(Zhong,X.-S.,(2010)Molecular Therapy 18:413-420)。例如,基于人源化单克隆抗体曲妥珠单抗(Herceptin)表达嵌合抗原受体的T细胞已用于治疗癌症患者。然而可能发生不良事件,至少在一个报道中,所述治疗对患者有致命结果(Morgan,R.A.,等,(2010)Molecular Therapy 18:843-851)。如本文所述,用可控诱导型安全开关(switch)转导细胞能通过停止给予配体诱导剂来提供能停止不良事件发展的安全开关。虽然可能残留低水平的基线活性,移除诱导剂应能显著降低(若非停止)不良事件的症状。

[0015] 嵌合抗原受体 (CAR) 是人工受体,其设计用于向T细胞传递抗原特异性而无需MHC抗原呈递。其包括抗原特异性组分、跨膜组分和胞内组分,这些组分经选择用以活化T细胞并提供特异性免疫。表达嵌合抗原受体的T细胞可用在各种疗法中,包括癌症治疗。共刺激多肽可用于提高表达CAR的T细胞针对把抗原的活化,并因此提高过继免疫治疗的效力。

[0016] 例如,基于人源化单克隆抗体曲妥珠单抗(Herceptin)表达嵌合抗原受体的T细胞已用于治疗癌症患者。然而可能发生不良事件,至少在一个报道中,所述治疗对患者有致命结果(Morgan,R.A.,等,(2010)Molecular Therapy 18:843-851)。如本文所示,用诱导型嵌合刺激分子转导细胞可允许CAR T细胞在配体诱导剂存在时的额外活化;中断配体治疗会使CAR T细胞活化减弱。

[0017] 使用经工程改造以表达嵌合抗原受体 (CAR) 的免疫治疗的抗肿瘤功效得到稳定改善,这是因为CAR分子以纳入额外信号传导结构域以增加其功效。用第一代CAR(仅含CD3 $\zeta$ 胞内信号传导分子)转导的T细胞显示出过继转移后较弱的体内持续性和扩增(Till BG, Jensen MC, Wang J, 等:使用具有CD28和4-1BB结构域的嵌合抗原受体进行CD20-特异性过继免疫治疗淋巴瘤:引导的临床试验结果(CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results).Blood119:3940-50,2012;Pule MA,Savoldo B,Myers GD,等:经工程改造以共表达肿瘤特异性受体的病毒特异性T细胞:成神经细胞瘤个体中的持续性和抗肿瘤活性(Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors:persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma).Nat Med 14:1264-70,2008;Kershaw MH,Westwood JA,Parker LL,等:对使用基因改造T细胞进行的过继免疫治疗卵巢癌的I期研究(A phase I study on

adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer). Clin Cancer Res 12:6106-15, 2006), 因为肿瘤细胞通常缺乏完全T细胞活化所需的必需的共刺激分子。第二代CAR T细胞设计用于改善细胞增殖和存活。纳入CD28或4-1BB的胞外共刺激结构域的第二代CAR T细胞 (Carpenito C, Milone MC, Hassan R, 等: 用含CD28和CD137结构域的遗传靶向的人T细胞控制已建立的大型肿瘤异种移植物 (Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains). Proc Natl Acad Sci U S A 106:3360-5, 2009; Song DG, Ye Q, Poussin M, 等: CD27共刺激体内增加重定向人T细胞的存活和抗肿瘤活性 (CD27 costimulation augments the survival and antitumor activity of redirected human T cells in vivo). Blood 119:696-706, 2012) 在过激转移后显示出改善的存活和体内扩增, 并且使用含有这些共刺激分子的抗CD19 CAR修饰的T细胞的更近期临床试验显示出针对CD19<sup>+</sup>白血病的治疗的显著功效 (Kalos M, Levine BL, Porter DL, 等: 具有嵌合抗原受体的T细胞在晚期白血病患者中具有潜在的抗肿瘤效果并且可建立记忆 (T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia). Sci Transl Med 3:95ra73, 2011; Porter DL, Levine BL, Kalos M, 等: 慢性淋巴性白血病嵌合抗原受体-修饰的T细胞 (Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia). N Engl J Med 365:725-33, 2011; Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, 等: CD19-靶向的T细胞快速诱导患有化疗难以治疗的急性淋巴细胞白血病的成人的分子缓解 (CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia). Sci Transl Med 5:177ra38, 2013) .

[0018] 虽然其他人从肿瘤坏死因子 (TNF) 家族蛋白质例如OX40和4-1BB中开发了其他信号传导分子, 称为“第三代”CAR T细胞 (Finney HM, Akbar AN, Lawson AD: 用嵌合受体活化静息人原代T细胞: CD28、诱导型共刺激因子、CD134、和CD137与来自TCR $\zeta$ 链的信号串联的共刺激 (Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR zeta chain). J Immunol 172:104-13, 2004; Guedan S, Chen X, Madar A, 等: 基于ICOS的嵌合抗原受体程序双极TH17/TH1细胞 (ICOS-based chimeric antigen receptors program bipolar TH17/TH1 cells). Blood, 2014), 诱导T细胞信号传导 (不同于活化的T-细胞的CD3 $\zeta$ 核因子 (NFAT) 通路) 的其他分子可提供T细胞存活和增殖所需的共刺激, 并且可能赋予CAR T细胞额外的有价值功能, 这些是更常规的共刺激分子所无法提供的。一些第二和第三代CAR T细胞与患者死亡有关, 这归因于高度活化的T细胞引起的细胞因子风暴和肿瘤裂解综合征。

[0019] “嵌合抗原受体”或“CAR”表示例如嵌合多肽, 所述嵌合多肽包含识别靶抗原 (抗原识别结构域) 的多肽序列, 其连接跨膜多肽和选择用于活化T细胞并提供特异性免疫的胞内结构域多肽。抗原识别结构域可为单链可变片段 (ScFv), 或可例如源自其它分子例如T细胞受体或模式识别受体。胞内结构域包括引起T细胞活化的至少一种多肽, 例如但不限于CD3 $\zeta$ 和例如共刺激分子, 例如但不限于CD28、OX40和4-1BB。术语“嵌合抗原受体”还可指不源自抗体的嵌合受体, 其为嵌合T细胞受体。这些嵌合T细胞受体可包括识别靶抗原的多肽序列,

其中所述识别序列可为(例如但不限于)源自T细胞受体或scFv的识别序列。胞内结构域多肽为用作活化T细胞的那些。嵌合T细胞受体参见例如Gross, G., 和Eshar, Z., *FASEB Journal* 6:3370-3378 (1992), 和Zhang, Y., 等, *PLoS Pathogens* 6:1-13 (2010)。

[0020] 在一种类型的嵌合抗原受体(CAR)中,针对肿瘤特异单克隆抗体的可变区重链( $V_H$ )和轻链( $V_L$ )与来自T细胞受体复合物CD3 $\zeta$ 链( $\zeta$ )进行框内融合。该 $V_H$ 和 $V_L$ 用甘氨酸-丝氨酸挠性接头连接在一起,然后通过间隔子(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)接合至跨膜结构域直到scFv原理细胞表面的程度,从而其可与肿瘤抗原相互作用。转导后,T细胞现在在其表面表达CAR,并且在与肿瘤抗原接触和连接后,信号通过CD3 $\zeta$ 链诱导细胞毒性和细胞活化。

[0021] 研究者注意到通过CD3 $\alpha$ 的T细胞活化足以诱导肿瘤特异杀伤,但不足以诱导T细胞增殖和存活。早期临床试验使用仅表达 $\zeta$ 链的第一代CAR修饰的T细胞,其显示基因修饰的T细胞表现出较差的体内存活和增殖。

[0022] 由于通过B7轴的共刺激对于完全的T细胞活化来说是必需的,研究者将共刺激多肽CD28信号结构域加入CAR构建体。该区域通常包含跨膜区域(代替CD3 $\zeta$ 形式)和用于结合PI3K和Lck的YNM基序。表达仅 $\zeta$ 的CAR的T细胞或表达 $\zeta$ 和CD28的CAR的T细胞之间的比较证明CD28提高体内扩增,这部分归因于活化后IL-2生产增加。包含CD28称为第二代CAR。最常用的共刺激分子包括CD28和4-1BB,其在肿瘤识别后可引发信号传导级联,导致NF- $\kappa$ B活化,促进T细胞增殖和细胞存活。

[0023] 在CAR设计中使用共刺激多肽1BB或OX40进一步改善了T细胞的存活率和功效。4-1BB看起来尤其显著地提高了T细胞增殖和存活。第三代设计(含3个信号结构域)已被用于PSMA CAR (Zhong XS, 等, *Mol Ther.* 2010年2月;18(2):413-20), 和CD19 CAR中,最著名的是对CLL的治疗 (Milone, M.C., 等, (2009) *Mol. Ther.* 17:1453-1464; Kalos, M., 等, *Sci. Transl. Med.* (2011) 3:95ra73; Porter, D., 等, (2011) *N. Engl. J. Med.* 365:725-533)。这些细胞在3个患者中显示出令人瞩目的功能,体内扩增超过1000倍,并且在3个患者中都产生持久的缓解率。

[0024] 应理解“衍生自”表示核苷酸序列或氨基酸序列可源自所述分子序列。胞内结构域包括引起T细胞活化的至少一种多肽,例如但不限于CD3 $\zeta$ 和例如共刺激分子,例如但不限于CD28、OX40和4-1BB。

[0025] 因此,本文在一些实施方式中提供核酸,所述核酸包含a) 编码诱导型嵌合刺激分子的第一多核苷酸,其中所述诱导型嵌合刺激分子包含(i) MyD88多肽区域或缺失TIR结构域的截短的MyD88多肽区域;(ii) 缺失CD40胞外结构域的CD40胞质多肽区域,和(iii) 多聚化区域;和b) 编码嵌合抗原受体的第二多核苷酸。在一些实施方式中,诱导型嵌合刺激分子还包含(iv) 膜靶向区域。在一些实施方式中,膜靶向区域是豆蔻酰化区域。在一些实施方式中,多聚化区域是配体结合区域。在一些实施方式中,配体结合区域是FKBP区域。在一些实施方式中,所述核酸还包含所述第一和第二多核苷酸之间的编码接头多肽的第三多核苷酸,其中所述接头多肽在翻译期间或翻译之后将所述第一和第二多核苷酸的翻译产物分开。在一些实施方式中,所述嵌合抗原受体包含(i) 跨膜区域;(ii) T细胞活化分子;和(iii) 抗原识别部分。在一些实施方式中,T细胞活化分子是CD3 $\zeta$ 多肽。在一些实施方式中,所述抗原识别部分结合过度增殖疾病中涉及的细胞上的抗原。在一些实施方式中,所述抗原识别部分结合选自下组的抗原:PSMA、PSCA、MUC1、CD19、ROR1、间皮素、GD2、CD123、MUC16和Her2/

Neu。

[0026] 还提供转导或转染有本发明核酸的修饰细胞。在一些实施方式中,所述修饰细胞是T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞、NK-T细胞、TCR-表达细胞、或NK细胞。还提供刺激对象中T细胞修饰的免疫应答的方法,包括给予本发明的修饰细胞和有效量的多聚化配体,所述多聚化配体结合多聚化区域以刺激对象中T细胞介导的免疫应答。在一些实施方式中,所述嵌合抗原受体结合靶细胞。在一些实施方式中,在给予修饰细胞后对象中的靶细胞的数量或浓度降低。

[0027] 还提供治疗患有与靶抗原表达升高有关的疾病或病症的对象的方法,所述方法包括给予结合多聚化配体结合区域的多聚化配体,其中a) 多聚化配体结合诱导型嵌合刺激分子,所述分子包括多聚化嵌合区域、MyD88多肽区域或缺失TIR结构域的截短的MyD88多肽区域,和缺失CD40胞外结构域的CD40胞质多肽区域;b) 对象中循环的T细胞表达(i) 所述诱导型嵌合刺激分子;和(ii) 结合靶抗原的嵌合抗原受体;c) 在对象中循环的靶细胞上呈递靶抗原;和d) 给予多聚化配体后,对象中的靶细胞的数量或浓度降低。在一些实施方式中,诱导型嵌合刺激分子还包含膜靶向区域。

[0028] 在一些实施方式中还提供转染或转导有核酸的修饰T细胞,包含编码诱导型嵌合刺激分子的多核苷酸,其中所述诱导型嵌合刺激分子包含(i) MyD88多肽区域或缺失TIR结构域的截短的MyD88多肽区域;(ii) 缺失CD40胞外结构域的CD40胞质多肽区域,和(iii) 多聚化区域。在一些实施方式中,诱导型嵌合刺激分子还包含(iv) 膜靶向区域。在一些实施方式中,所述膜靶向区域选自豆蔻酰化区域、棕榈酰化区域、异戊二烯化区域和受体跨膜序列。在一些实施方式中,所述修饰的T细胞还包含编码嵌合抗原受体的多核苷酸。

[0029] 在一些实施方式中,还提供刺激对象中T细胞修饰的免疫应答的方法,包括给予对象a) 本发明的修饰T细胞和b) 有效量的多聚化配体,所述多聚化配体结合多聚化区域以刺激对象中T细胞介导的免疫应答。在一些实施方式中,所述嵌合抗原受体结合靶细胞。在一些实施方式中,在给予配体后对象中的靶细胞的数量或浓度降低。

[0030] 还提供包含编码诱导型嵌合刺激分子的多核苷酸的核酸,其中所述诱导型嵌合刺激分子包含(i) MyD88多肽区域或缺失TIR结构域的截短的MyD88多肽区域;(ii) 缺失CD40胞外结构域的CD40胞质多肽区域,和(iii) 多聚化区域。在一些实施方式中,提供的修饰细胞用本发明核酸转染或转化。在一些实施方式中,修饰细胞是T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞、NK-T细胞、TCR-表达细胞、或NK细胞。

[0031] 在一些实施方式中,所述修饰细胞还包含编码嵌合抗原受体的多核苷酸。在一些实施方式中,提供刺激对象中T细胞修饰的免疫应答的方法,包括给予对象本发明的修饰T细胞和有效量的多聚化配体,所述多聚化配体结合多聚化区域以刺激对象中T细胞介导的免疫应答。

[0032] 本发明还提供活化T细胞的方法,包括:用含有编码嵌合蛋白质的多核苷酸的核酸转染或转导T细胞,其中所述嵌合蛋白质包含膜靶向区域、多聚化区域和MyD88多肽;从而T细胞经活化。本发明还提供活化T细胞的方法,包括:用含有编码嵌合蛋白质的多核苷酸的核酸转染或转导T细胞,其中所述嵌合蛋白质包含膜靶向区域、多聚化区域、MyD88多肽和CD40多肽胞质区域,其中所述CD40多肽不具有功能性胞外结构域;从而T细胞经活化。本发明特征为提供活化T细胞的方法,包括:用含有编码嵌合蛋白质的多核苷酸的核酸转染或转

导T细胞,其中所述嵌合蛋白质包含膜靶向区域、多聚化区域和CD40多肽胞质区域,其中所述CD40多肽不具有功能性胞外结构域;从而T细胞经活化。

[0033] 在一些实施方式中,提供在对象中诱导针对肿瘤抗原的免疫应答的方法,降低对象中具有表面肿瘤抗原的肿瘤的尺寸的方法、或治疗对象前列腺癌的方法,所述方法包括根据本发明方法活化T细胞并将该活化的T细胞给予对象。

[0034] 在一些实施方式中,提供含T细胞的组合物,其包括含有编码嵌合蛋白质的多核苷酸的核酸,其中所述嵌合蛋白质包含膜靶向区域、多聚化区域、MyD88多肽。在一些实施方式中提供T细胞,其包括含有编码嵌合蛋白质的多核苷酸的核酸,其中所述嵌合蛋白质包含膜靶向区域、多聚化区域、MyD88多肽和CD40多肽胞质区域,其中所述CD40多肽不具有功能性胞外结构域。在一些实施方式中,提供含T细胞的组合物,其包括含有编码嵌合蛋白质的多核苷酸的核酸,其中所述嵌合蛋白质包含膜靶向区域、多聚化区域和CD40多肽胞质区域,其中所述CD40多肽不具有功能性胞外结构域。

[0035] 在一些实施方式中,提供使用本发明细胞组合物诱导免疫应答或减小肿瘤尺寸的方法

[0036] 在一些实施方式中,提供用于活化对象中T细胞的方法,包括:给予所述对象含有编码嵌合蛋白质的多核苷酸的核酸,其中所述嵌合蛋白质包含膜靶向区域、多聚化区域和MyD88多肽;从而T细胞经活化。在一些实施方式中,本发明提供活化对象中T细胞的方法,包括:给予对象含有编码嵌合蛋白质的多核苷酸的核酸,其中所述嵌合蛋白质包含膜靶向区域、多聚化区域、MyD88多肽和CD40多肽胞质区域,其中所述CD40多肽不具有功能性胞外结构域;从而T细胞经活化。本发明还提供活化对象中T细胞的方法,包括:给予对象含有编码嵌合蛋白质的多核苷酸的核酸,其中所述嵌合蛋白质包含膜靶向区域、多聚化区域和CD40多肽胞质区域,其中所述CD40多肽不具有功能性胞外结构域;从而T细胞经活化。

[0037] 在其他实施方式中,提供本文所述的涉及T细胞的方法和组合物,使用的细胞不是树突细胞或B细胞,例如非淋巴细胞性造血细胞或非造血细胞,例如巨噬细胞、黑素瘤细胞、成纤维细胞,和角化细胞。

[0038] 在一些实施方式中,所述膜靶向区域选自豆蔻酰化区域、棕榈酰化区域、异戊二烯化区域和受体跨膜序列。在一些实施方式中,膜靶向区域是豆蔻酰化区域。在一些实施方式中,所述多聚化区域选自FKBP、亲环蛋白受体、类固醇受体、四环素受体、重链抗体亚基、轻链抗体亚基、由重链和轻链可变区域串联组成并通过挠性接头结构域分割的单链抗体、和其突变序列。在一些实施方式中,多聚化配体结合区域是FKBP12区域。在一些实施方式中,多聚化配体是FK506二聚体或二聚化FK506类似物配体。一些实施方式中,所述配体是AP1903。在一些实施方式中,所述细胞通过静脉内、皮内、皮下、肿瘤内、前列腺内或腹膜内给药来给予所述对象。在一些实施方式中,前列腺癌选自下组:转移性、转移去势抵抗、转移去势敏感、区域晚期和局部前列腺癌。在一些实施方式中,给予对象至少2剂量的细胞和配体。在一些实施方式中,细胞是树突细胞。在一些实施方式中,CD40胞质多肽区域由SEQ ID NO:8中的多核苷酸序列编码。在一些实施方式中,细胞用载体转染,所述载体例如病毒载体,例如腺病毒载体。在一些实施方式中,所述细胞用Ad5f35载体转染。在一些实施方式中,所述FKBP12 12区域是FKBP12v36区域。

[0039] 在一些实施方式中,前列腺癌的进展受到阻止或延迟至少6个月。在一些实施方式

中,前列腺癌的进展受到阻止或延迟至少12个月。在一些实施方式中,前列腺癌的格利森分数为7、8、9、10或更高。在一些实施方式中,在给予多聚化配体后所述对象表现出3个月的部分或完全响应。在一些实施方式中,在给予多聚化配体后所述对象表现出6个月的部分或完全响应。在一些实施方式中,在给予多聚化配体后所述对象表现出9个月的部分或完全响应。在一些实施方式中,给予多聚化配体后,对象中的血清PSA水平6周下降20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%。在一些实施方式中,给予多聚化配体后,对象中的血清PSA水平3个月下降20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%。在一些实施方式中,给予多聚化配体后,对象中的血清PSA水平6个月下降20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%。在一些实施方式中,给予多聚化配体后,对象中的血清PSA水平9个月下降20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%。在一些实施方式中,给予多聚化配体后,前列腺癌肿瘤的大小3个月下降30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%。在一些实施方式中,给予多聚化配体后,前列腺癌肿瘤的大小6个月下降30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%。在一些实施方式中,给予多聚化配体后,前列腺癌肿瘤的大小9个月下降30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%。在一些实施方式中,给予多聚化配体后,前列腺癌肿瘤的血管生成3个月下降30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%。在一些实施方式中,给予多聚化配体后,前列腺癌肿瘤的血管生成6个月下降30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%。在一些实施方式中,给予多聚化配体后,前列腺癌肿瘤的血管生成9个月下降30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%。在一些实施方式中,给予多聚化配体后在对象中检测 $T_H1$ 或 $T_H2$ 抗原特异免疫应答。

[0040] 在一些实施方式中,所述方法还包括给予化疗剂。在一些实施方式中,组合物、配体和化疗剂以有效治疗对象中前列腺癌的量给予。在一些实施方式中,组合物或核苷酸序列、配体和化疗剂以有效治疗对象中前列腺癌的量给予。在一些实施方式中,化疗剂选自卡铂、雌莫司汀磷酸盐(Emcyt)和沙利度胺。在一些实施方式中,该化疗剂是紫杉烷。紫杉烷可例如选自多西他赛(Taxotere)、紫杉醇和卡巴他赛。在一些实施方式中,紫杉烷是多西他赛。在一些实施方式中,在给予细胞、核酸或配体的同时或一周内给予化疗剂。在其他实施方式中,在给予配体后给予化疗剂。在其他实施方式中,在给予配体后1-4周或1周-1个月、1周-2个月或1周-3个月给予化疗剂。在其他实施方式中,所述方法还包括在给予所述细胞或核酸之前1-4周或1周-1个月、1周-2个月或1周-3个月给予化疗剂。在一些实施方式中,在给予所述细胞或核酸之前至少2周给予化疗剂。在一些实施方式中,在给予所述细胞或核酸之前至少1个月给予化疗剂。在一些实施方式中,在给予多聚化配体之后给予化疗剂。在一些实施方式中,在给予多聚化配体之后至少2周给予化疗剂。在一些实施方式中,在给予多聚化配体之后至少1个月给予化疗剂。

[0041] 在一些实施方式中,所述方法还包括给予两种或更多化疗剂。在一些实施方式中,化疗剂选自卡铂、雌莫司汀磷酸盐和沙利度胺。在一些实施方式中,至少一种化疗剂是紫杉烷。紫杉烷可例如选自多西他赛、紫杉醇和卡巴他赛。在一些实施方式中,紫杉烷是多西他赛,在一些实施方式中,在给予细胞、核酸或配体的同时或一周内给予化疗剂。在其他实施方式中,在给予配体后给予化疗剂。在其他实施方式中,在给予配体后1-4周或1周-1个月、1周-2个月或1周-3个月给予化疗剂。在其他实施方式中,所述方法还包括在给予所述细胞或核酸之前1-4周或1周-1个月、1周-2个月或1周-3个月给予化疗剂。



[0042] 在一些实施方式中,该对象是哺乳动物。在一些实施方式中,该对象是人。

[0043] 下述说明、实施例、权利要求和附图中进一步描述某些实施方式。

### 附图说明

[0044] 附图描述本技术的实施方式但不具限制性。为了说明的清楚和方便,附图未按比例制作,并且在一些情况中,可能夸大或放大多个方面以协助对具体实施方式的理解。

[0045] 图1a-1h提供的试验结果显示iMC功能提供诱导型共刺激T细胞。1a)与rimiducid接触后,MyD88和CD40胞质信号结构域的二聚化的示意图。1b)相比NT和对照载体(FKBP)-转导的T细胞,iMC转导的T细胞显示AP1903剂量依赖性活化。1c)用rimiducid进行10nM处理后,用载体转导的T细胞中的IL-6生产分析,所述载体含有仅FKBP、或诱导型MyD88、诱导型CD40或iMC。1d)在转导的T细胞接触10nM rimiducid后,多重阵列测量时间依赖性磷酸化JNK、RelA和p38(MAPK)信号传导通路。1e)在rimiducid处理0、15和60分钟后,用FKBP或iMC转导的T细胞中磷酸化信号传导蛋白质的Western印迹分析。阳性对照表示用PHA和伊屋诺霉素(ionomycin)进行的T细胞处理。1f)用含仅FKBP、或诱导型MyD88、诱导型CD40或iMC的载体转导的T细胞使用或不使用10nM rimiducid和/或50ng/ml可溶性抗-CD3进行活化,并且上清用ELISA测量IL-2并用流式细胞术评估CD25表达(1g和1h)。\*表示p值<0.05。

[0046] 图2a-2f提供分析结果,显示用iMC和PSCA.ζCAR共转导的T细胞以rimiducid依赖的方式改善肿瘤杀伤和扩增。2a)用CAR和iMC遗传修饰的T细胞的示意代表。2b)用PSCA.ζCAR和FKBP或iMC逆转录病毒转染T细胞并通过流式细胞术用CD19-PE和抗CAR-APC测量共表达。2c)用FKBP或iMC修饰的未转导和PSCA.ζCAR T细胞与Capan-1-GFP肿瘤细胞以1:1T细胞与肿瘤细胞的比例在存在或不存在10nM rimiducid的条件下共孵育。7天后用流式细胞术评估肿瘤细胞和T细胞频率。用流式细胞术通过SSC/GFP门选来测量CD3<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>肿瘤细胞从而评估肿瘤细胞频率在共培养试验中通过流式细胞术通过分别测量CD19-PE和抗-CAR-APC频率来评估共表达iMC和CAR的T细胞的富集。2d)然后评估T细胞的CD25表达并测量T细胞增殖,(2e)使用流式细胞术和细胞计数。2f)用iMC或对照载体和PSCA.ζCAR共转导的T细胞与Capan-1肿瘤细胞或不与其共培养,并与10nM rimiducid或不与其共培养,48小时后测量上清的IL-2水平。\*表示p值<0.05。\*\*表示p值<0.01。

[0047] 图3a-3h提供试验结果,显示用iMC共转导的CAR T细胞表现出其体内抗肿瘤功效以rimiducid依赖方式提高。3a)对剪毛的小鼠移植Capan-1肿瘤细胞,并用转导有对照载体或iMC的PSCA.ζCAR T细胞或未转导T细胞进行处理,在第7和14天静脉内注射。i.p.给予外源IL-2直至第21天,然后停止。所有小鼠每周i.p.接受两次5mg/kg rimiducid(biw)。通过卡钳(3b)测量肿瘤尺寸,并在100天内评估存活。3d)为了测量体内CAR T细胞持续性和扩增,使用NSG小鼠。用Capan-1肿瘤细胞s.c.注射小鼠,然后用未转导(NT)或FKBP和PSCA.ζ-修饰的T细胞或iMC和PSCA.ζ-修饰的T细胞进行处理。用iMC激活的T细胞处理的小鼠通过i.p.注射接受2.5mg/kg rimiducid一周1次(qw)、2次(biw)或仅盐水。3e)皮下肿瘤尺寸通过卡钳在30天内进行测量。3f)在用iMC-转导的T细胞处理并接受仅盐水或全身rimiducid给予的小鼠上进行体内生物发光成像。在动物全身(3g)或组内的个体肿瘤上(3h)进行感兴趣区域(ROI)测量。\*表示p值<0.05。

[0048] 图4a和4b是逆转录病毒构建体的设计示意图。4a)使用SFG逆转录病毒骨架生成4

种构建体,所述骨架编码豆蔻酰化结构域(Myrr)和两个串联FKBP12v36二聚体结合结构域,与截短的CD19( $\Delta$ CD19)同框。这些载体缺失信号传导分子,或包含来自MyD88和/或CD40的胞内信号传导结构域。4b)使用抗-PSCA单链可变片段(scFv)bm2B3<sup>4,5</sup>与IgG1 CH2CH3间隔子和CD3 $\zeta$ 胞质信号传导结构域同框生成两种PSCA-靶向CAR。此外,构建包括胞内CD28信号传导结构域的第二代CAR。

[0049] 图5a-d提供转导iMC-修饰的T细胞的效率、功能、和表型的试验结果。5a和5b)非转导T细胞或用FKBP对照载体(SFG-FKBP-2A- $\Delta$ CD19)或用iMC(SFG-iMC-2A- $\Delta$ CD19)(n=7)转导的T细胞的流式细胞分析。5c)未转导T细胞或用FKBP或iMC载体转导T细胞后24小时用10nM rimiducid(CID)接触后的IFN- $\gamma$ 诱导。5d)在CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>转导T细胞上选后14天培养物中FKBP或iMC转导的T细胞的表型。\*表示p值<0.05。

[0050] 图6a和6b提供iMC和对照构建体的转导效率的试验结果。6a)对照和iMC逆转录载体的设计的示意图。6b)用FKBP、iMyD88、iCD40和iMC转导的T细胞的转导效率。

[0051] 图7a-7c提供iMC修饰的T细胞的基因表达分析结果。健康供体(n=3)生成的T细胞用FKBP或iMC逆转录病毒转导,然后用或不用10nM rimiducid(CID)处理。48小时后,提取mRNA并与人基因表达芯片杂交。用ArrayStar提取数据(DNASTAR公司,威斯康星州麦迪逊)。7a)用CID活化后的iMC中上调的基因相比仅iMC修饰的T细胞进行分级聚类。7b)含或不含CID的对照T细胞(FKBP)与含或不含CID的iMC修饰的T细胞之间比较的数据组。7c)从FKBP<sup>+</sup>CID处理的T细胞的基因的组对比iMC<sup>+</sup>CID处理的T细胞(433上调基因)通过ConsensusPathDB分析诱导网络模块,证实围绕NK- $\kappa$ B和TRAF通路的信号传导网络关联。

[0052] 图8a-8c提供原初T细胞中iMC信号传导在缺失IL-2的情况下诱导细胞存活的试验结果。8a和8b)FKBP和iMC转导的T细胞在补充或不补充100U/ml IL-2的培养基中孵育,并用10nM rimiducid(CID)基于每周进行刺激,通过细胞计数测量生长。8c)对于缺失IL-2的培养基中培养的进行或不进行CID刺激的iMC-修饰T细胞,在培养42天后通过流式细胞术(SSC、FSC)测量活力。\*表示p值<0.05。

[0053] 图9a和9b提供iMC-转导的T细胞中通过rimiducid诱导细胞因子的试验结果。用FKBP对照载体(9a)或iMC逆转录病毒(9b)转导的T细胞用10nM rimiducid(CID)处理48小时。然后收集上清并用多重细胞因子/趋化因子阵列分析。

[0054] 图10a-10d提供用iMC和PSCA. $\zeta$ CAR修饰的T细胞的表型和功能的试验结果。10a)FKBP对照或iMC逆转录病毒转导的PSCA. $\zeta$ CAR T细胞的示意代表。10b)用PSCA. $\zeta$ CAR和或FKBP和iMC逆转录病毒共转导的T细胞相比未转导(NT)T细胞的表型。10c)使用DELPHIA细胞毒性试验分析用PSCA. $\zeta$ 和FKBP或iMC转导的T细胞在不同效应子下的细胞毒性:针对PSCA<sup>+</sup>肿瘤细胞系(Capan-1和HPAC)的靶比例。10d)对于肿瘤和rimiducid刺激环境中IL-2的生产,用FKBP或仅iMC、仅PSCA. $\zeta$ 或其组合转导T细胞,然后用流式细胞术分型以检测CAR或信号传导载体的共表达。

[0055] 图11提供实验结果,显示iMC活化提高缺失IL-2时的CAR存活。用iMC和PSCA. $\zeta$ CAR转导的T细胞在不含IL-2的培养基中培养42天。T细胞不接受处理(仅培养基变化)、基于每周接受 $\alpha$ CD3刺激(50ng/ml OKT3)、10nM rimiducid(CID)或CD3和CID都刺激。通过流式细胞术就T细胞存活(FSC/SSC)和流式细胞术的iMC<sup>+</sup>CAR<sup>+</sup>表达对培养物进行分型。

[0056] 图12a-12d提供比较PSCA. $\zeta$ CAR T细胞中CD28和iMC共刺激的试验结果。12a)用

FKBP和iMC分子工程改造的T细胞的示意图,第一(PSCA.ζ)和第二(PSCA.28.ζ)CAR构建体。12b)未转导T细胞和转导有FKBP<sup>+</sup>PSCA.ζ、FKBP<sup>+</sup>PSCA.28.ζ或iMC<sup>+</sup>PSCA.ζ的T细胞与Capan-1-GFP肿瘤细胞以1:1效应子:靶标的比例进行共培养7天,通过流式细胞术分析残留肿瘤细胞(CD3<sup>-</sup>GFP<sup>+</sup>)。12c)在用或不用rimiducid(CID)处理的共培养上清中进行IL-2ELISA。12d)通过总细胞计数乘以CD3<sup>+</sup>GFP<sup>-</sup>细胞的频率(如共培养试验中所获的流式细胞术所测的结果)来评估T细胞数量。

[0057] 图13a-13c PSCA.ζCAR T细胞中iMC的共刺激相对CD28共刺激提高抗肿瘤功效。13a) CD28共刺激和iMC、rimiducid(CID)-依赖的共刺激的比较在载有s.c.Capan-1肿瘤的剪毛小鼠中进行。肿瘤注射7天后,小鼠静脉内接受1剂量的 $1 \times 10^7$ 未转导T细胞或用FKBP<sup>+</sup>PSCA.ζ、FKBP<sup>+</sup>PSCA.28.ζ或iMC<sup>+</sup>PSCA.ζ修饰的T细胞。接受转导T细胞的小鼠随后每周用5mg/kg rimiducid(CID) i.p.处理2次。13b)卡钳所测的各组的肿瘤大小和评估的存活(13c)。

[0058] 图14提供评估用多重逆转录载体共转导的T细胞的转导效率的散点图。未转导T细胞与用下述物质转导的T细胞比较:仅EGFP荧光素酶(EGFP1uc)、和FKBP<sup>+</sup>PSCA.ζ、FKBP<sup>+</sup>PSCA.28.ζ额外用EGFP1uc转导。通过流式细胞术分析FKBP和iMC,和CAR表达。

[0059] 图15是载体pSFG-iΔMC-2A-aCD19-Q-8stm-CD3ζ的质粒图,其不包括氨基末端豆蔻酰化区域。

[0060] 图16是载体pSFG-iΔMC-2A-ΔCD19的质粒图,其不包括氨基末端豆蔻酰化区域。

[0061] 图17a-17b提供柱状图,显示通过豆蔻酰化的(172,607,180,609)诱导的MyD88/CD40相比未豆蔻酰化的(606,608)诱导的MyD88/CD40表达T细胞的rimiducid依赖性IL-6生产。

[0062] 图18a-18b提供柱状图,显示通过豆蔻酰化的(180)诱导的MyD88/CD40相比未豆蔻酰化的(608)诱导的MyD88/CD40表达T细胞的rimiducid依赖性IL-2和IL-6生产。

[0063] 图19是载体SFG-iMcf1-2A-PSCA(A11) scFv-CD34e-CD8stm-ζ的质粒图,其包含序列,所述序列编码豆蔻酰化区域、诱导型CD40/全长MyD88多肽和结合PSCA的CAR。

[0064] 图20是载体pBP0172-SFg-iMcf1.2A.CD19的质粒图,其包含序列,所述序列编码豆蔻酰化区域、诱导型CD40/全长MyD88多肽和CD19多肽标志物。

[0065] 图21是载体pBP0180k-SFG-iMcf1-2A-CD19 CD34e CD8stmζ的质粒图,其包含序列,所述序列编码豆蔻酰化区域、诱导型CD40/全长MyD88多肽和结合CD19的CAR。

[0066] 图22的示意图显示表达诱导型MyD88/CD40嵌合多肽的非树突细胞的活化。

[0067] 图23是实验设计的示意图。

[0068] 图24A和24B提供转导的巨噬细胞的试验的线形图。

[0069] 图25A和25B提供转导的巨噬细胞的试验的线形图。

[0070] 图26A-D提供用巨噬细胞的柱状图结果。

[0071] 图27A和27B提供转导的黑素瘤细胞的试验的线形图。

[0072] 图28A和28B提供转导的黑素瘤细胞的试验的线形图。

[0073] 图29A和29B提供用黑素瘤细胞的柱状图结果。

[0074] 图30A和30B提供转导的成纤维细胞的试验的线形图。

[0075] 图31A和31B提供用成纤维细胞的柱状图结果。

[0076] 图32是试验设计的示意图。

- [0077] 图33提供巨噬细胞中iMC活化的柱状图。
- [0078] 图34提供巨噬细胞中iMC活化的柱状图。
- [0079] 图35提供巨噬细胞中iMC活化的柱状图。
- [0080] 图36是可用于生产实施例的逆转录病毒的质粒的质粒载体图。
- [0081] 图37是可用于生产实施例的腺病毒的质粒的质粒载体图。
- [0082] 图38提供嵌合抗原受体(CAR)的基因转移的示意图。
- [0083] 图39提供CAR改进和相关毒性的示意图。
- [0084] 图40描绘了相对也表达自杀(凋亡)基因的表达CAR的细胞,CID控制的嵌合信号传导分子的理论分析。
- [0085] 图41提供了CID控制的CSM的示意图。
- [0086] 图42提供CSM的CID诱导,以及含CAR的T细胞的诱导型CSM活化的示意图。
- [0087] 图43提供CID控制的T细胞杀伤肿瘤细胞的示意图。
- [0088] 图44提供修饰的T细胞的FACS分选分析的结果。
- [0089] 图45提供修饰和对照T细胞中GM-CSF和干扰素 $\beta$ 水平的柱状图。
- [0090] 图46提供修饰和对照T细胞中IL-10和IL-13水平的柱状图。
- [0091] 图47提供修饰和对照T细胞中IL-4和IL-5水平的柱状图。
- [0092] 图48提供修饰和对照T细胞中IL-6和IL-8水平的柱状图。
- [0093] 图49提供修饰和对照T细胞中IL-1 $\beta$ 和IL-12-p70水平的柱状图。
- [0094] 图50提供修饰和对照T细胞中IP-10和MIP1 $\alpha$ 水平的柱状图。
- [0095] 图51提供修饰和对照T细胞中MIP1 $\beta$ 和RANTES水平的柱状图。
- [0096] 图52提供修饰和对照T细胞中TNF- $\alpha$ 水平的柱状图。
- [0097] 图53:用AP1903对iMC转导的T细胞的活化诱导T细胞杀伤肿瘤细胞。用对照载体(缺少MyD88/CD40信号结构域)或用巨噬细胞中iMC活化所转导的T细胞与CAPAN-1-GFP肿瘤细胞以5:1的T细胞:肿瘤细胞的比例培养。用或不用10nM AP1903培养共培养物。72小时后,通过流式细胞术分析共培养物的GFP<sup>+</sup>肿瘤细胞(X轴)。
- [0098] 图54描述了不同供体的与图53所述相似实验的结果。
- [0099] 图55:用AP1903对iMC转导的T细胞的活化诱导T细胞杀伤肿瘤细胞。用对照载体(缺少MyD88/CD40信号结构域)或用iMC转导的T细胞与CAPAN-1-GFP肿瘤细胞以5:1的T细胞:肿瘤细胞的比例培养。用或不用10nM AP1903培养共培养物。72小时后,通过流式细胞术分析共培养物的GFP<sup>+</sup>肿瘤细胞(n=2)。
- [0100] 图56:用AP1903对iMC转导的T细胞的活化诱导T细胞杀伤肿瘤细胞。用对照载体(缺少MyD88/CD40信号结构域)或用iMC转导的T细胞与CAPAN-1-GFP肿瘤细胞以5:1的T细胞:肿瘤细胞的比例培养。用或不用10nM AP1903培养共培养物。通过荧光显微镜分析共培养物,显示了用10nM AP1903活化时T细胞团的活化(右侧两组图)和GFP<sup>+</sup>肿瘤细胞的消除。
- [0101] 图57是用嵌合抗原受体(左)转导或转染的细胞的示意图和本文所提供的嵌合信号传导分子的示例。
- [0102] 图58是用嵌合抗原受体(左)转导或转染的细胞的示意图和本文所提供的嵌合信号传导分子的示例。
- [0103] 图59是与嵌合抗原受体共表达的诱导型嵌合刺激分子的质粒图,在两个嵌合多肽

中间有2A多肽。

[0104] 图60A-60D提供诱导型嵌合刺激分子的示例。图60A提供诱导型嵌合刺激分子的常规多肽元件的图示。图60B提供表达嵌合刺激分子的T细胞中CD19标志物检测的流式细胞术结果。图60C是表达嵌合刺激分子的T细胞中IFN  $\gamma$  产量的图示。图60D是表达嵌合刺激分子的T细胞中IL-6产量的图示。

[0105] 图61是包括编码诱导型MyD88/CD40嵌合刺激分子的多核苷酸和编码嵌合抗原受体的多核苷酸的质粒的质粒图,其中两个多核苷酸操作性连接相同的启动子。

[0106] 图62是嵌合诱导型共刺激分子的质粒图。所述质粒还编码CD19作为多核苷酸标志物。

[0107] 图63是pBP0172的质粒图,编码含有豆蔻酰化区域的诱导型MyD88/CD40多肽,以及第一代抗CD19-CAR。为了去除外源上游起始位点和下一代载体中伴随的短肽,例如本文实施例8所述,将5' "ATG" 变为"AG" (用下划线"ATG" 序列表示并划去"T")。质粒606、607、608和609共有该相同的5' 非翻译区域。

[0108] 发明详述

[0109] T细胞表达嵌合抗原受体 (CAR) 显示出对一些类型的癌症具有长期治疗功效,但是过量T细胞活化所关联的毒性,例如细胞因子释放综合征 (CRS) 仍受到关注。类固醇或载体内纳入自杀基因 (例如诱导型胱冬酶-9、HSV-TK、CD20、截短的EGFR)<sup>7-12</sup> 可用于改善安全概况,但这些现有方法会降低治疗水平或终止治疗,因而可能有损功效。最近,IL-6受体封闭已用于管理CRS<sup>6</sup>;然而,当直接T细胞毒性造成组织受损时该策略效果较差<sup>13</sup>。此外,CAR-T细胞功效在实体瘤中受到更多限制,这是因为CAR-T细胞的存活、活化和增殖较差,这大概归因于肿瘤微环境中更显著的抑制效应<sup>14,15</sup>。因此,允许肿瘤靶向T细胞的受控的扩增和纯化的策略能够最大化治疗潜力同时最小化毒性。

[0110] 含第一代CAR的T细胞,包括肿瘤抗原特异性、单链可变片段 (scFv) 结构域和T细胞受体 (TCR) -相关CD3 $\zeta$ 胞内信号传导分子,未能在体内维持或扩增<sup>16-18</sup>,这是因为肿瘤细胞通常缺少完全T细胞活化所需的共刺激分子<sup>19</sup>。第二代CAR-T细胞包括潜在的胞内共刺激结构域,例如CD28或4-1BB<sup>20,21</sup>,在过继转移后显示出体内改善的存活和扩增<sup>1-4</sup>。若干研究已经用健康组织活化的抑制结构域<sup>22</sup>工程改造CAR-T细胞或已经使用肿瘤感应性方法,通过用不同抗原靶标分离CAR上的共刺激结构域和CD3 $\zeta$ 来限制"靶上、肿瘤外"的毒性<sup>23,24</sup>。虽然这些方法可改善肿瘤特异性,它们通常依赖于不确定的细胞自主因子。相反,控制T细胞体内扩增和消除的医师激活的方法有利于进行配合临床过程的患者调节的治疗,可能避免极性或长期治疗相关的毒性。

[0111] 通常,T细胞治疗的困难在于输注细胞的体内扩增较差。解决该问题的一个方法是通过给予高剂量的IL-2给患者。该治疗帮助T细胞生长和抗肿瘤功能,但对患者极具毒性。这已普遍用于黑素瘤,因为高剂量的IL-2被认为是该疾病的标准护理治疗。由于毒性效果,大多数其他T细胞治疗应用没有使用IL-2与T细胞治疗。T细胞治疗中发生的其他问题为输注T细胞的移植性和持续性较差 (也是体内增殖的功能),这通过T细胞输注之前的淋巴消耗的调节来解决。研究者通常使用化疗 (尤其是环磷酰胺) 来实现,虽然有些使用抗体,包括坎帕斯。条件作用 (conditioning) 看起来显著有利于T细胞治疗,这是通过产生淋巴"空间"和消耗竞争生长和存活因子的常规免疫细胞实现的。然而其对患者极具毒性,完全消融正常

免疫细胞(例如病原体特异性的)并且不能简单用于一些类型的癌症或年长患者。此外,使用淋巴消融方案可能迫使T细胞治疗变成一项“步骤”而非独立治疗法。

[0112] 由于各患者需要为其制备独特的细胞产品,T细胞治疗大都被认为是奢侈疗法。传统T细胞治疗(由反复抗原刺激或肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)的分离所生成)在其特异性或功能方面不可重复,会导致极其可变的的结果,且在一些情况中,会导致不能生产用于治疗的产品。已开始用天然或嵌合T细胞受体的基因转移解决该问题(高度肿瘤特异T细胞可在2周内生成),但看起来基因修饰的T细胞相比天然产生的T细胞功能上不同。此外,高度特异的CAR T细胞或表达优化的TCR $\alpha$ 和 $\beta$ 链的T细胞可导致脱靶毒性,需要包含自杀基因。

[0113] 图38显示嵌合抗原受体(CAR)的最基本组分。针对肿瘤特异单克隆抗体的可变区重链( $V_H$ )和轻链( $V_L$ )与来自T细胞受体复合物CD3 $\zeta$ 链( $\zeta$ )进行框内融合。该 $V_H$ 和 $V_L$ 用甘氨酸-丝氨酸挠性接头连接在一起,然后通过间隔子( $CH_2CH_3$ )接合至跨膜结构域直到scFv原理细胞表面的程度,从而其可与肿瘤抗原相互作用。

[0114] 转导后,T细胞现在在其表面表达CAR,并且在与肿瘤抗原接触和连接后,信号通过CD3 $\zeta$ 链诱导细胞毒性和细胞活化。

[0115] 图39显示各种嵌合抗原受体的发展。研究者注意到通过CD3 $\alpha$ 的T细胞活化足以诱导肿瘤特异杀伤,但不足以诱导T细胞增殖和存活。早期临床试验使用仅表达 $\zeta$ 链的CAR修饰的T细胞,其显示基因修饰的T细胞表现出较差的体内存活和增殖。这些构建体称为第一代CAR。

[0116] 由于通过B7轴的共刺激对于完全的T细胞活化来说是必需的,研究者将共刺激多肽CD28信号结构域加入CAR构建体。该区域通常包含跨膜区域(代替CD3 $\zeta$ 形式)和用于结合PI3K和Lck的YMN基序。表达仅 $\zeta$ 的CAR的T细胞或表达 $\zeta$ 和CD28的CAR的T细胞之间的比较证明CD28提高体内扩增,这部分归因于活化后IL-2生产增加。包含CD28称为第二代CAR。

[0117] 在CAR设计中使用共刺激多肽1BB或OX40进一步改善了T细胞的存活率和功效。4-1BB看起来尤其显著地提高了T细胞增殖和存活。第三设计(含3个信号结构域)已被用于PSMA CAR(Zhong XS,等,Mol Ther.2010年2月;18(2):413-20),和CD19 CAR中,最著名的是对CLL的治疗(Milone,M.C.,等,(2009)Mol.Ther.17:1453-1464;Kalos,M.,等,Sci.Transl.Med.(2011)3:95ra73;Porter,D.,等,(2011)N.Engl.J.Med.365:725-533)。这些细胞在3个患者中显示出令人瞩目的功能,体内扩增超过1000倍,并且在3个患者中都产生持久的缓解率。

[0118] 然而,由于CAR的抗肿瘤效果得到改善,其也变的更危险。使用第二代和第三代CAR已有两例引人注意的死亡,考虑到仅少数患者被治疗,该死亡数很高。这些死亡源于脓毒血症,这是高度活化的T细胞引起的由于细胞因子风暴和肿瘤裂解症(Morgan,R.A.,等(2010)Mol.Ther.14:843-851)。

[0119] T细胞受体信号可用二聚化的化学诱导剂(CID)联合包含结合该CID的多聚化区域的嵌合受体来诱导,T细胞经工程改造以表达CD3 $\alpha$ 链,其连接1、2或3个FKBP片段。所述细胞表达所述嵌合受体,并证明CID依赖的T细胞活性(Spencer,D.M.,等,Science,1993.262:第1019-1024页)。本发明部分提供由CID控制的诱导型嵌合信号传导分子(CSM)。将表达诱导型CSM的T细胞与CID接触使得细胞活化和并诱导免疫应答。

[0120] 树突细胞(DC)可通过使用小分子(即rimiducid/AP1903)-依赖性嵌合信号传导分

子(包括“通用”Toll样受体(TLR)衔接子、MyD88和TNF家族成员、CD40<sup>25</sup>)进行化学诱导二聚化(CID)而活化。

[0121] 图40比较了本申请的疗法和使用自杀基因的CAR治疗方法。本申请部分提供体内扩大T细胞增殖和功能的基因工程改造方法,从而逐渐提高抗肿瘤效果。二聚化化学诱导剂用在可控制系统中,以体内活化T细胞来增强其功能和提高频率。

[0122] 在一些实施方式中,CSM使用具有一个或多个共刺激多肽(例如CD28和4-1BB)的串联多聚化区域(例如Fv结构域),其具有或不具有CD3 $\alpha$ 链来实现CID依赖性增殖和共刺激。CSM可单独使用以提供共刺激并增强T细胞免疫应答。使用该方法,可用编码CSM的DNA转染或转导T细胞群体(例如具有非特异性靶标的群体),然后给予对象以提高一般的免疫应答。

[0123] 该CSM还可在细胞中随着CAR表达,其可包含例如scFv多肽和CD3 $\zeta$ 链。在本方法中,诱导型CSM分子与CAR联用,从而将CAR信号分为两个单独的功能。由CAR提供的该第二功能提供对工程改造的T细胞的抗原特异性细胞毒性。图41中,所述示例显示具有针对PSMA的特异性的CAR;这些工程改造的T细胞可(例如)给予对象以生成特异免疫应答,例如直接针对前列腺癌肿瘤的特异免疫应答(图43)。

[0124] 如图59所示,在一些实施方式中,诱导型共刺激多肽(例如CD40胞质区域多肽或截短的MyD88多肽)用于控制嵌合抗原受体自身的活化。编码该修饰的诱导型嵌合抗原受体的多核苷酸可用于转导细胞例如T细胞。所述细胞还可表达本文所述的嵌合信号传导分子,并且在一些实施方式中,所述嵌合信号传导分子包含CD3 $\zeta$ 多肽。在一些实施方式中,所述诱导型嵌合抗原受体包含CD40胞质区域多肽和MyD88多肽。

[0125] 嵌合诱导型MyD88/CD40蛋白质可作为潜在的共刺激信号从而在TCR或CAR信号传导环境中增强T细胞存活,并增加T细胞繁殖。此外,该共刺激通路可用高度特异的合成小分子二聚化配体rimiducid进行体内活化。将细胞毒性信号1(CD3 $\zeta$ )结构域从共刺激信号2(iMC)中分离提供了独特的低脂,其中T细胞可相应给予的配体和肿瘤抗原而增殖,或可通过撤出刺激药物来减少数量,并允许不充分的T细胞活化来诱导无能(anergy)和细胞消除。此外,与调控的肿瘤特异性T细胞扩增相关联的iMC-驱动CAR-T细胞的可能的效力提高可调控先前具有CAR-T抗性的肿瘤靶标,例如实体瘤。

[0126] 词语“一”或“一个”当与“包含”在权利要求和说明书中联用时,可表示“一”,但也与“一个或多个”,“至少一个”和“一或多于一个”的意思一致。此外,术语“具有”、“包括”、“包含”和“含有”可互换使用,且本领域技术人员知晓其为开放式术语。

[0127] 本文所使用术语“同种异体”指宿主和供体细胞之间的HLA或MHC基因座的抗原性不同。

[0128] 因此,从相同物种转移的细胞或组织可能抗原性不同。同系小鼠可在一个或多个基因座处不同(同类),并且同种异体小鼠可具有相同背景。

[0129] 本文所用术语“抗原”定义为引发免疫应答的分子。免疫应答可涉及抗体生产或特异免疫竞争细胞的活化,或二者均有。抗原可源自生物体、抗原/蛋白质的亚基、死亡或失活的全细胞或裂解物。示例性的生物体包括但不限于螺杆菌、弯曲菌、梭状芽胞杆菌、白喉棒状杆菌、百日咳杆菌、流感病毒、副流感病毒、呼吸道合胞病毒、伯氏疏螺旋体、疟原虫、单纯疱疹病毒、人类免疫缺陷病毒、乳头状瘤病毒、霍乱弧菌、大肠杆菌、麻疹病毒、轮状病毒、志贺菌、伤寒沙门氏菌、淋病奈瑟球菌。因此,任何大分子(实际上包括所有蛋白质或多肽)都

可作为抗原。此外,抗原可源自重组或基因组DNA。含病原体基因组的核苷酸序列或部分核苷酸序列或能引发免疫应答的蛋白质的基因或基因片段的任何DNA都可合成抗原。此外,本发明并不局限于基因或基因组的完整核酸序列的使用。显然本发明包括但不限于使用多于一种基因或基因组的部分核酸序列,且这些核酸序列以各种组合排列以引发所需的免疫应答。

[0130] “抗原识别部分”可为任何多肽或其片段,例如结合抗原的天然来源或合成的抗体片段可变结构域。抗原识别部分的示例包括但不限于源自抗体的多肽,例如单链可变片段(scFv)、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>和Fv片段;源自T细胞受体的多肽,例如TCR可变结构域;和结合胞外关联蛋白质的任何配体或受体片段。

[0131] 术语“抗原呈递细胞”是能在其细胞表面上(或处)展示、获取、或呈递至少一种抗原或抗原性片段的任何种类的细胞。通常,术语“细胞”可为能实现协助提高针对抗原或抗原组合物的免疫应答目的(即来自免疫系统的T细胞或B细胞路径)的任何细胞。例如Kuby, 2000于《免疫学》(Immunology)第4版增补(WHF公司(W.H.Freeman and company),通过引用纳入本文)所述并用于本文某些实施方式中,向免疫细胞展示或呈递正常抗原或与II类主要组织相容性分子或复合物一起的细胞为所述“细胞”。在某些方面,细胞(例如APC细胞)可与其他细胞(例如表达所需抗原的重组细胞或肿瘤细胞)融合。制备两种或多种细胞的融合的方法如下述文献所述:Goding, J.W., 单克隆抗体:原理和实践(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), 65-66, 71-74页(学术出版社(Academic Press), 1986); Campbell, 单克隆抗体技术, 生物化学和分子生物学中的实验技术(Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology), 13卷, Burden和Von Knippenberg出版社, 阿姆斯特丹, 不同版(Elsevier), 75-83页, 1984; Kohler和Milstein, Nature, 256:495-497, 1975; Kohler和Milstein, Eur. J. Immunol., 6:511-519, 1976, Gafter等, Somatic Cell Genet., 3:231-236, 1977, 各通过引用纳入本文。在一些情况中,细胞向其展示或呈递抗原的免疫细胞是CD4<sup>+</sup>TH细胞。APC或其他免疫细胞上表达的额外分子可协助或改善免疫应答的提高。分泌的或可溶的分子,例如细胞因子和佐剂,还可协助或提高针对抗原的免疫应答。本文讨论各种示例。

[0132] 本文所用术语“癌症”定义为细胞过度增殖,其独特特性(丧失正常控制)导致不受控的生长、缺少分化、局部组织侵入和转移。示例包括但不限于:黑色素瘤、非小细胞肺癌、小细胞肺癌肺、肝癌、白血病、视网膜母细胞瘤、星形细胞瘤、胶质母细胞瘤、牙龈肿瘤、舌肿瘤、神经母细胞瘤、头癌、颈癌、乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、骨癌、睾丸癌、卵巢癌、间皮瘤、宫颈癌、胃肠癌、淋巴瘤、脑癌、结肠癌、肉瘤或膀胱癌。

[0133] 本文所用的术语“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用。所有这些术语也包括其后代,其是任意或全部的后代。应理解,由于有意或偶然的突变,所有的后代可能不是相同的。

[0134] 如本文所用,术语“iCD40分子”定义为诱导型CD40。该iCD40可避开消灭内源CD40信号传导的机制。术语“iCD40”囊括“iCD40核酸”、“iCD40多肽”和/或iCD40表达载体。

[0135] 本文所用术语“cDNA”旨在表示用信使RNA(mRNA)作为模板制备的DNA。相对基因组DNA或从基因组模板、未加工的或部分加工的RNA模板聚合产生的DNA,使用cDNA的优点是cDNA只含对应蛋白质的编码序列。有时则使用全部或部分基因组序列,例如需要非编码区



域以优化表达或反义策略中非编码区域例如内含子要被靶向。

[0136] 术语“树突细胞”(DC)是体内、体外、离体或在宿主或对象中的细胞,或其源自造血干细胞或单核细胞。树突细胞和其前体可从各种淋巴器官例如脾、淋巴结中分离,以及从骨髓和外周血中分离。DC具有特殊形态,其细茎(板状伪足)向多个方向延伸远离树突细胞体。通常,树突细胞表达高水平的MHC和共刺激(例如B7-1和B7-2)分子。树突细胞可诱导T细胞的体外抗原特异分化并能体外和体内的引发原初T细胞响应。

[0137] 如本文所使用,术语“表达构建体”或“转基因”定义为含编码基因产物的核酸的任何类型的基因构建体可插入到载体中,其中部分或所有核酸编码序列能够被转录。转录本翻译为蛋白质,但并非必需。在一些实施方式中,表达包括基因的转录和mRNA翻译为基因产物。在其他实施方式中,表达仅包括编码感兴趣的基因的核酸的转录。术语“治疗性构建体”还可用于表示表达构建体或转基因。表达构建体或转基因可用作(例如)治疗过度增殖疾病或紊乱(例如癌症)的疗法,从而所述表达构建体或转基因为治疗构建体或预防构建体。

[0138] 如本文所用,术语“表达载体”指含核酸序列的载体,所述核酸序列编码能转录的至少部分基因产物。在一些情况中,RNA分子然后翻译成蛋白质、多肽或肽。在其他情况中,这些序列未经翻译,例如,在反义分子或核酶的产生中。表达载体可含有多种控制序列,其是指特定宿主生物体中可操作连接的编码序列的转录和可能的翻译所需的核酸序列。除了控制转录和翻译的控制序列以外,载体和表达载体可含有还具有其他功能并在下文中描述的核酸序列。

[0139] 本文所用术语“离体”指身体“外部”。术语“离体”和“体外”本文可互换使用。

[0140] 如本文所用,术语“功能上等价”表示CD40例如CD40核酸片段、变体或类似物时,指编码用于CD40多肽的核酸或CD40多肽模拟刺激免疫应答以破坏肿瘤或过度增殖疾病。“功能上等价”或CD40多肽的“功能片段”表示(例如)缺少胞外结构域但能通过上调抗原呈递分子的树突细胞表达来放大T细胞介导的肿瘤杀伤应答的CD40多肽。当术语“功能上等价”用于其他核酸或多肽时,例如用于PSA肽、PSMA肽、MyD88、或截短的MyD88,其表示与本发明方法所述多肽具有相同或相似活性的片段、变体等。例如,肿瘤抗原多肽(例如PSMA)的功能性片段可为抗原性的,其允许生产识别具体肿瘤抗原的抗体。配体结合区域(例如Fv1)的功能片段包括配体结合区域多肽中结合合适配体的充足部分。“功能上等价”表示(例如)缺少胞外结构域但在T细胞中表达时能放大T细胞介导的肿瘤杀伤应答的共刺激多肽。

[0141] 术语“过度增殖疾病”定义为细胞过度增殖引起的疾病。示例性过度增殖疾病包括但不限于癌症和自体免疫疾病。其他过度增殖疾病可包括血管堵塞、再狭窄、动脉粥样硬化或炎性肠病。

[0142] 本文所用术语“基因”定义为功能性蛋白质、多肽或肽的编码单元。应理解,该功能性术语包括基因组序列、cDNA序列、和小工程改造基因区段,其表达或适于表达蛋白质、多肽、结构域、肽、融合蛋白和突变体。

[0143] 术语“免疫组合物”或“免疫原”指能引发免疫应答的物质。示例性的免疫原包括例如抗原、在诱导自体免疫疾病中起作用的自体抗原、和癌细胞表面表达的肿瘤相关抗原。

[0144] 本文所用术语“免疫削弱”指具有降低的或减弱的免疫系统的对象。免疫削弱情况可能是由于免疫系统缺陷或功能丧失或由于提高对感染和/或疾病的易感性的其他因素。虽然该分类可以用于评估的概念基础,免疫削弱的个体常常不能完全归入一组或其他组。

身体防御机制的多于一种缺陷都可受到影响。例如,具有HIV导致的特异T淋巴细胞缺陷的个体还可具有抗病毒治疗的药物引起的嗜中性白血球减少,或由于皮肤和粘膜的完整性受到破坏引起的免疫削弱。免疫削弱状态可由留置中心导管(indwelling central lines)或静脉药物滥用引起的其他类型的缺陷所引发;或可由二次恶性肿瘤、营养不良或已感染其他感染物如结核菌或性传播疾病(例如,梅毒或肝炎)所引起。

[0145] 本文所用术语“药物或药学上可接受的”指分子整体和组合物在给予动物或人时不产生副作用、过敏或其他不良反应。

[0146] 本文所用术语“药学上可接受的运载体”包括任何和全部溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂、吸收延迟剂等。药学活性物质的这类介质和试剂的用法是本领域熟知的。除非某些常规介质或试剂与本文所述载体或细胞不相容,否则可考虑在治疗组合物中使用任何这些介质或试剂。也可在组合物中纳入补充活性成分。在一些实施方式中,该对象是哺乳动物。在一些实施方式中,该对象是人。

[0147] 本文所用术语“多核苷酸”定义为核苷酸链。此外,核酸是核苷酸的聚合物。因此,本文所用核酸和多核苷酸可互换使用。核酸是多核苷酸,其可水解为单体“核苷酸”。单体核苷酸和水解为核苷。本文所用多核苷酸包括但不限于本领域任何可用方法(包括但不限于重组方法,即从重组文库或细胞基因组使用常规克隆技术和PCRTM等克隆核酸)和通过合成方法所获得的所有核酸序列。此外,多核苷酸包括多核苷酸的突变,包括但不限于本领域已知方法对核苷酸或核苷的突变。核酸可包括一种或多种多核苷酸。

[0148] 本文所用术语“多肽”定义为氨基酸残基链,其通常具有限定序列。本文所用术语多肽可与术语蛋白质互换使用。

[0149] 本文所用术语“启动子”定义为细胞合成器或导入的合成器所识别的DNA序列,需要其起始基因的特异转录。

[0150] 本文所用术语“调节免疫应答”、“调控免疫应答”或“控制免疫应答”指修饰免疫应答的能力。例如,所述组合物能提高和/或激活免疫应答。此外,所述组合物还能抑制免疫应答。形成调控由与所述组合物一起使用的配体所决定。例如,化学品的二聚化类似物引起共刺激多肽的二聚化,导致T细胞活化;然而化学品的单体类似物不引起共刺激多肽的二聚化,不会导致T细胞活化。

[0151] 本文所用术语“转染”和“转导”可互换使用,指外源DNA导入真核宿主细胞的过程。转染(或转导)可通过许多方法中任一来实现,包括电穿孔、微注射、基因枪递送、逆转录病毒感染、脂质体转染、超染(superfection)等。

[0152] 本文所用术语“同系”指细胞、组织或动物的基因型相同或足够相近以致可进行组织移植或免疫相容。例如,相同纯系的同卵双胞胎或动物。同系和同基因和互换使用。

[0153] 术语“对象”或“患者”在本文中互换使用且包括但不限于,生物体或动物;哺乳动物,包括例如人、非人灵长类(如猴)、小鼠、猪、牛、山羊、兔、大鼠、豚鼠、仓鼠、马、猴、绵羊,或其他非人哺乳动物;和非哺乳动物,包括例如非哺乳类脊椎动物,如鸟、(例如,鸡或鸭)、或鱼,和非哺乳类无脊椎动物。

[0154] “T细胞活化分子”表示当纳入到表达嵌合抗原受体的T细胞时能提高T细胞活性的多肽。示例包括但不限于含ITAM的信号1转移分子例如CD3 $\zeta$ 多肽,和Fc受体 $\gamma$ ,例如Fc $\epsilon$ 受体 $\gamma$ (Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$ )亚基(Haynes, N.M., 等J. Immunol. 166:182-7 (2001))。

[0155] 本文所用术语“疫苗”至含本文提供的组合物的制剂,所述组合物以能给予动物的形式存在。通常,疫苗包含常规盐水或缓冲水性溶液介质,其中悬浮或溶解有组合物。该形式中,所述组合物可方便地组织、缓解或治疗病症。引入对象后,疫苗能引发免疫应答,包括但不限于产生抗体、细胞因子和/或其他细胞应答。

[0156] 本文所用术语“转录控制下”或“可操作连接”表示启动子相对核酸位于正确位置和方向以控制RNA聚合酶起始和表达基因。

[0157] 本文所用术语“治疗”、“处理”、“治疗的”或“治”表示预防和/或疗法。例如涉及实体瘤(例如癌性实体瘤)时,该术语指预防性治疗实现的阻止,其提高了对象对实体瘤或癌症的抵抗。在一些示例中,对象可经治疗以阻止癌症,其中所述癌症为家族性或遗传上相关。例如涉及感染型疾病时,该术语指预防性治疗以及对象感染后为了与感染对抗的治疗(例如降低或消除感染或防止其变得更糟),所述预防性治疗提高对象对病原体感染的抵抗的,或换句话说,降低对象被病原体感染或显示感染引起的病态迹象的可能性。

[0158] 本文所用术语“疫苗”至含本文提供的组合物的制剂,所述组合物以能给予动物的形式存在。通常,疫苗包含常规盐水或缓冲水性溶液介质,其中悬浮或溶解有组合物。该形式中,所述组合物可方便地组织、缓解或治疗病症。引入对象后,疫苗能引发免疫应答,包括但不限于产生抗体、细胞因子和/或其他细胞应答。

[0159] 血液疾病:本文所用术语“血液疾病”和/或“血液病”指影响血液及其组分(包括但不限于血细胞、红细胞、血蛋白)产生、凝血机制、血液产生、血蛋白产生等和其组合的病症。血液疾病的非限制性示例包括贫血、白血病、淋巴瘤、血液肿瘤、白蛋白血症(albuminemias)、血友病(haemophilias)等。

[0160] 骨髓疾病:本文所用术语“骨髓疾病”指导致血液细胞和血小板生产下降的病症。在一些骨髓疾病中,正常骨髓结构可由于感染(结核菌)或恶性肿瘤而移位,继而会导致血液细胞和血小板产生方面的疾病。骨髓疾病的非限制性示例包括白血病、细菌性感染(如结核病)、放射病或中毒、全血细胞减少症(apnocytopenia)、贫血、多发性骨髓瘤等。

[0161] T细胞和活化的T细胞(包括CD3+细胞):T细胞(还称为T淋巴细胞)属于血液白细胞,称为淋巴细胞。淋巴细胞通常涉及细胞介导的免疫。“T细胞”中的“T”指细胞源于胸腺或其成熟受到胸腺影响。通过是否存在称为T细胞受体的细胞表面蛋白,T细胞可与其他淋巴细胞类型区分,例如B细胞和天然杀伤细胞(NK)。本文所用术语“活化的T细胞”指T细胞通过识别II类主要组织相容性(MHC)标志物环境中存在的抗原决定簇,已被刺激而产生免疫应答(例如活化的T细胞的克隆扩增)。通过抗原决定簇、细胞因子和/或淋巴因子和分化细胞表面蛋白簇(例如CD3、CD4、CD8等及其组合)的存在来活化T细胞。表达分化蛋白簇的细胞通常对T细胞表面的该蛋白的表达为“阳性”(例如对CD3或CD4表达为阳性的细胞称为CD3+或CD4+)。CD3和CD4蛋白是细胞表面受体或共受体,其可直接和/或间接参与T细胞的信号转导。

[0162] 外周血:本文所用术语“外周血”指血液的细胞组分(如血液红细胞、血液白细胞和血小板),其从血液的循环库中获得或制备,且不被隔离在淋巴系统、脾肝或骨髓内。

[0163] 脐带血:脐带血与外周血和隔离在淋巴系统、脾肝或骨髓内的血液不同。本文所用术语“脐带血”或“脐血”可互换使用,指胎儿出身后胎盘中中和连接的脐带中留存的血液。脐带血常含有干细胞,包括造血干细胞。

[0164] “获得或制备” (例如细胞的情况中) 表示细胞或细胞培养物从来源分离、纯化或部分纯化, 所述来源可为例如脐带血、骨髓或外周血。该术语还可用于原始来源或细胞培养物经培养且细胞经复制的情况中, 其中后代细胞在该情况下源自原始来源。

[0165] 死亡细胞比例中的“杀伤”或“杀死”表示细胞通过凋亡的死亡, 使用测量凋亡的任何方法进行测量。该术语还可涉及细胞消融。

[0166] 供体T细胞: 本文所用术语“供体T细胞”指通常在同种异体的干细胞移植中给予受者以赋予其抗病毒和/或抗肿瘤免疫的T细胞。供体T细胞常用于抑制骨髓移植排斥和提高同种异体移植 (alloengraftment) 的成功率, 然而相同的供体T细胞可引起针对宿主抗原的同种异体侵略响应, 继而导致移植物抗宿主病 (GVHD)。某些活化的供体T细胞相比其他活化的T细胞可引起更高或更低的GVHD响应。供体T细胞还可针对受体肿瘤细胞具备反应性, 引起有利的移植物对抗肿瘤的效果。

[0167] “功能保守突变体”是给定的氨基酸残基发生变化而不改变蛋白质或酶的总体构型和功能的蛋白质或酶, 包括但不限于相似性质的氨基酸置换, 所述性质包括极性或非极性特征、尺寸、形状和电荷。对于许多常见已知非遗传性编码氨基酸的保守氨基酸取代本领域已知。其他非编码氨基酸的保守取代可基于其物理性质与遗传上编码的氨基酸的性质的比较来确定。

[0168] 除了那些视为保守的氨基酸以外的氨基酸可在蛋白质或酶中不同, 从而具有相似功能的任何两种蛋白质之间的蛋白质或氨基酸序列的相似比例可不同且可 (例如) 至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、更优选至少95%, 这根据比对方案来确定。本文所用术语“序列相似性”表示核苷酸或蛋白质序列相关的程度。两个序列之间的相似程度可基于序列相同性和/或保守型百分比。本文所用术语“序列相同性”表示两种核苷酸或氨基酸序列为非变异的程度。本文所用术语“序列比对”表示将两个或更多序列并列以实现最大水平相同性 (以及氨基酸序列的情况中的保守型) 的过程, 其目的是评估相似性程度。比对序列和评估相似性/相同性的大量方法本领域已知, 例如Cluster Method, 其中所述相似性基于MEGALIGN算法, 以及BLASTN、BLASTP和FASTA。当使用任何这些程序时, 优选的设置是得到最高序列相似性的设置。

[0169] 间充质基质细胞: 本文所用术语“间充质基质细胞”或“骨髓来源的间充质基质细胞”指可离体、体外和体内分化为脂肪细胞、成骨细胞和软骨细胞的多能干细胞, 并可进一步限定为单核骨髓细胞在标准培养条件下粘附塑料培养皿的并对造血干细胞系标志物阴性和对CD73、CD90和CD105阳性的部分。

[0170] 胚胎干细胞: 本文所用术语“胚胎干细胞”指源自成胚 (50-150细胞的早期胚胎) 的内细胞团的多潜能干细胞。胚胎干细胞的特征为其能无限自我再生, 以及其分化为所有其他三个原胚层 (外胚层、内胚层和中胚层) 的衍生物的能力多潜能区别于多能在于多潜能细胞可产生所有细胞类型, 而多能细胞 (如成人干细胞) 尽可产生有限数量的细胞类型。

[0171] 诱导型多潜能干细胞: 本文所用术语“诱导型多潜能干细胞”或“诱导的多潜能干细胞”指成人细胞或分化的细胞, 其被基因操作 (例如基因表达继而活化多潜能性)、生物操作 (例如治疗病毒或逆转录病毒) 和/或化学操作 (例如小分子、肽等) 所“重编程”或诱导以生成能分化为许多类似胚胎干细胞 (若非所有细胞类型) 的细胞。诱导型多潜能干细胞与胚胎干细胞不同在于其实现中间或最终分化状态 (如皮肤细胞、骨细胞、成纤维细胞等) 并且

然后被诱导去分化,从而重新获得生成多能细胞或多潜能细胞的一些或所有能力。

[0172] CD34<sup>+</sup>细胞:本文所用术语“CD34<sup>+</sup>细胞”指在细胞表面表达CD34蛋白的细胞。本文所用“CD34”指细胞表面糖蛋白(例如唾液粘蛋白),其常作为细胞之间的粘附因子并且参与T细胞进入淋巴结,还是“分化簇”基因家族的成员。CD34还可介导干细胞与骨髓、胞外基质或直接与基质细胞的接合。CD34<sup>+</sup>细胞常见于脐带和骨髓作为造血干细胞、骨髓间充质干细胞亚组、内皮祖细胞、血管内皮细胞但不是淋巴管(除了胸膜淋巴管)、肥大细胞、间质中和表皮附属结构周围的树突状细胞亚群(其为负因子XIIIa)、以及某些软组织肿瘤(例如,腺泡状软组织肉瘤、前B急性淋巴细胞白血病(Pre-B-ALL)、急性髓系白血病(AML)、AML7、隆凸性纤维肉瘤、胃肠道间质瘤、巨细胞成纤维细胞瘤、粒细胞肉瘤、卡波氏肉瘤、脂肪肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、恶性周围神经鞘膜瘤、脑膜血管外皮细胞瘤、脑膜瘤、神经纤维瘤、神经鞘瘤和甲状腺乳头状癌)中的细胞。

[0173] 肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)指具有各种受体的T细胞,其浸润肿瘤并在靶区域杀死肿瘤细胞。使用本发明方法调节TIL的活性可允许对肿瘤细胞消除的更直接控制。

[0174] 基因表达载体:本文所用术语“基因表达载体”、“核酸表达载体”或“表达载体”本文可互换使用,通常指可在宿主细胞中复制并用于将基因引入宿主细胞的核酸分子(如质粒、噬菌体、自主复制序列(ARS)、人工染色体、酵母人工染色体(如YAC))。引入到表达载体上的基因可为内源基因(如宿主细胞或生物体中通常可见的基因)或异源基因(如宿主细胞活生物体的基因组中或外部染色体核酸上通常不可见的基因)。通过表达载体引入细胞的基因可为未处理基因或已修饰或工程改造的基因。基因表达载体还可工程改造为含5'和3'非翻译调控序列,其有时可用作增强子序列、启动子区域和/或终止序列,可协助或提高表达载体携带的基因的有效转录。基因表达载体有时还经工程改造以在具体细胞类型、细胞位置或组织类型中复制和/或功能性表达(如转录和翻译)。表达载体有时包括将载体维持在宿主细胞或受体细胞中的可选择标志物。

[0175] 发育调控启动子:本文所用术语“发育调控启动子”指用作RNA聚合酶转录基因的起始结合位置,所述基因在某些受控的情况下表达,由发育程序或途径启动或受其影响。发育调控启动子常在启动子区域处或附近具有其他控制区域,用于结合转录活化剂或抑制剂,其可影响发育程序或途径的部分的基因转录。发育调控启动子有时参与转录基因,该基因的产物影响细胞的发育分化。

[0176] 发育分化细胞:本文所用术语“发育分化细胞”指经历一过程的细胞,所述过程通常涉及特定发育调控基因的表达,通过该过程细胞从较不特异的形式进化为更特异的形式从而行使特定功能。发育分化细胞的非限制性示例是肝细胞、肺细胞、皮肤细胞、神经细胞、血细胞等。发育分化中的改变涉及基因表达(如基因表达模式的改变)、基因重组(如重塑或染色质以分别隐藏或暴露待沉默或表达的基因)、和偶尔涉及DNA序列的变化(如免疫多样性分化)。发育期间的细胞分化可理解为基因调控网络的结果。调控基因和其顺式调控模块是基因调控网络中接受输入(如发育途径或程序中上游表达的蛋白质)并在网络中产生输出(如表达的基因产物在发育途径或程序中其他下游基因上作用)的节点。

[0177] 术语“过度增殖疾病”定义为细胞过度增殖引起的疾病。示例性过度增殖疾病包括但不限于癌症和自体免疫疾病。其他过度增殖疾病可包括血管堵塞、再狭窄、动脉粥样硬化或炎性肠病。

[0178] 在一些实施方式中,所述核酸包含在病毒载体内。在某些实施方式中,病毒载体是腺病毒载体或逆转录病毒或慢病毒载体。应理解在一些实施方式中,细胞离体接触病毒载体,在一些实施方式中,细胞体内接触所述病毒载体。

[0179] 在一些实施方式中,所述细胞是树突细胞例如哺乳动物树突细胞。通常,细胞是人树突细胞。

[0180] 在一些实施方式中,所述细胞还接触抗原。通常,细胞离体接触抗原。有时,细胞体内接触抗原。在一些实施方式中,所述细胞在对象中且免疫应答针对所述抗原产生。有时,免疫应答是细胞毒性T淋巴细胞(CTL)免疫应答。有时,免疫应答针对肿瘤抗原生成。在某些实施方式中,所述细胞在无需添加佐剂的情况下被激活。

[0181] 在一些实施方式中,所述细胞经离体转导有核酸并通过皮内给药给予对象。在一些实施方式中,所述细胞经离体转导有核酸并通过皮下给药给予对象。有时,所述细胞经离体转导有所述核酸。有时,所述细胞经体内转导有所述核酸。

[0182] MyD88表示骨髓分化初次应答基因88,例如但不限于人类形式,如ncbi基因编号4615所示。“截短的”表示所述蛋白质并非全长,可缺失例如结构域。例如,截短的MyD88不是全长,且可例如缺失Toll/白介素-1受体结构域(TIR结构域)。截短的MyD88的一个实施例如本文MyD88L所示,其还如SEQ ID NO:4和5所示。SEQ ID NO 71和72包括亚克隆期间加入的接头。编码“截短的MyD88”的核酸序列表示编码截短的MyD88肽的核酸序列,该术语还指包括编码作为人工克隆物的任何氨基酸(包括编码接头的任何氨基酸)的部分的核酸序列。诱导型MyD88/CD40多肽还可包括全长MyD88多肽,例如具有SEQ ID NO:48或49所示的核苷酸或氨基酸序列。编码MyD88或本文其他多肽的核苷酸序列可经例如密码子优化,包括修饰细胞中的优选密码子、或本文所述的摆动密码子。

[0183] 在本文所述方法中,所述肽的诱导型CD40部分可定位于诱导型MyD88或截短的MyD88多肽部分的上游或下游。而且,诱导型CD40部分和诱导型MyD88或截短的MyD88多肽部分可在相同载体上以顺式或在分别的载体上以反式转染或转导入细胞中。

[0184] 在一些实施方式中,所述细胞接触抗原,有时离体接触。在一些实施方式中,所述细胞在对象中并且免疫应答针对所述抗原产生,例如细胞毒性T-淋巴细胞(CTL)免疫应答。在一些实施方式中,免疫应答针对肿瘤抗原(例如PSMA)生成。在一些实施方式中,所述核酸离体制备,并通过例如皮内给药或皮下给药给予对象。有时细胞用核酸进行离体或体内转导或转染。

[0185] 在一些实施方式中,所述核酸包含可操作地连接至所述多核苷酸序列的启动子序列。或者,核酸包含离体转录的RNA,含有嵌合蛋白质的蛋白编码区域。

[0186] 实体瘤的“减低肿瘤尺寸”或“抑制肿瘤生长”表示对根据标准指南的治疗响应,或疾病稳定化,所述标准指南例如实体瘤响应评估标准(RECIST)。例如,这可包括实体瘤的直径降低约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%,或肿瘤、循环肿瘤细胞或肿瘤标记的数量降低约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。肿瘤尺寸可通过任何方法分析,包括例如CT扫描、MRI,例如CT-MRI、胸腔X-射线(用于肺部肿瘤),或分子成像例如PET扫描例如给予碘123标记的PSA(例如PSMA配体)后的PET扫描,例如其中所述抑制剂是TROFEX™/MIP-1072/1095,或分子成像例如SPECT或使用PSA(例如PSMA抗体)的PET扫描,例如,CP(capromad pendetide)(Prostascint),一种111铷

标记的PSMA抗体。

[0187] “降低、减慢、或抑制肿瘤血管生成”表示当与治疗前的肿瘤血管生成量比较时,降低肿瘤血管生成约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%,或新血管系统的出现减少约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、或100%。所述降低可针对一种肿瘤,或可为多于一种肿瘤的血管生成的加和或均值。测量血管生成的方法包括例如CAT扫描、MRI,例如CT-MRI,或分子成像例如SPECT或PET扫描例如给予碘123标记的PSA(例如PSMA配体)后的PET扫描,例如其中所述抑制剂是TROFEX™/MIP-1072/1095,或使用PSA(例如PSMA抗体)的PET扫描,例如,CP(capromad pendetide)(Prostascint),一种111铟标记的PSMA抗体。

[0188] 当肿瘤存在于前列腺中时或肿瘤源自或转移自前列腺中的肿瘤时或产生PSA时,所述肿瘤分类为前列腺肿瘤。当例如确定肿瘤具有与对象的前列腺中肿瘤相同或相似的染色体断裂点时,所述肿瘤已从前列腺中的肿瘤转移。

[0189] 美国专利号7,404,950于2008年6月29日授权给Spencer,D等,美国专利号8,691,210于2014年4月8日授权给Spencer,D等,其全文通过引用纳入本文。还通过引用纳入本文的是:Spencer,D.等2010年10月26日提交的美国专利申请12/445,939;Spencer,D.等2009年9月21日提交的12/563,991;Slawin,K等2011年4月14日提交的13/087,329;Spencer,D.等2013年2月8日提交的13/763,591;2009年9月21日提交的国际专利申请PCT/US2009/057738,其2010年3月28日公开为W02010/033949;2011年4月14日提交的国际专利申请PCT/US2011/032572,其2011年10月20日公开为W02011/130566。

[0190] 前列腺癌

[0191] 在美国,前列腺癌是男性中最常见的实体恶性肿瘤。预期2008年约有186320个新前列腺癌案例,并且有28660个死亡。Jemal A,等,癌症统计学(Cancer statistics),2008.CA Cancer J Clin.58:71-96,2008。在病程期间,初次治疗后经历PSA发展的患者中约70%发生转移。Gittes RF,N Engl J Med.324:236-45,1991。雄激素剥夺治疗(ADT)时转移性前列腺癌的标准治疗,在80-85%的患者中实现暂时肿瘤控制或抑制。Crawford ED,等,N Engl J Med.321:419-24,1989;Schellhammer PF,等,J Urol.157:1731-5,1997;Scher HI和Kelly WK,J Clin Oncol.11:1566-72,1993;Small EJ和Srinivas S,Cancer.76:1428-34,1995。

[0192] 对激素治疗的响应持续时间,以及激素治疗开始后的存活,已经显示出对因子数量的依赖,包括原初肿瘤的格利森求和、在ADT开始后实现不可检测最低PSA的能力、和ADT开始之前的PSA翻倍时间。即使进行激素治疗,事实上所有转移性前列腺癌患者最终都发展出进行性疾病。Kelly WK和Slovin SF,Curr Oncol Rep.2:394-401,2000;Scher HI,等,J Natl Cancer Inst.88:1623-34,1996;Small EJ和Vogelzang NJ,J Clin Oncol.15:382-8,1997。原初肿瘤的格利森求和或格利森分数用于基于肿瘤的显微评估的对男性前列腺癌评级。高格利森分数表明癌症的预后较差,因其更具有侵略性且更可能扩散。评级系统的示例如Gleason DF.资深人员管理局合作泌尿外科研究小组:前列腺癌病理分级及临床分期(The Veteran's Administration Cooperative Urologic Research Group:histologic grading and clinical staging of prostatic carcinoma).Tannenbaum M(编辑)泌尿外科病理学:前列腺(Urologic Pathology:The Prostate.)利亚飞戈出版社(Lea and



Febiger), 费城, 1977; 171-198。

[0193] 已开始ADT的大多数患前列腺癌的患者在初次治疗(例如放射前列腺切除术、近程治疗、外束放疗、冷冻-融除等)失败后接受针对PSA上升的处理。在没有临床转移时,这些患者经历相当长时间的无疾病间隔7-11年;然而,这些患者中大多数最终发展出激素抗性疾病,如在面对血清睾酮的去势水平时PSA水平上升回复所证实。这些患者也具有较差的预后,大多数在9个月内发生临床转移,存活中值为24个月。Bianco FJ,等, Cancer Symposium:摘要278, 2005。术语“前列腺癌”包括不同形式或截短,包括例如转移性、转移去势抵抗、转移去势敏感、区域晚期和局部前列腺癌。

[0194] 抗原呈递细胞

[0195] 抗原呈递细胞(APC)是能通过在其表面展示具有主要组织相容性复合体(MHC)分子的外源抗原而引导T细胞抵抗外源抗原的细胞。有两种类型的APC,专门和非专门。专门APC表达I类MHC分子和II类MHC分子,非专门APC不组成型表达II类MHC分子。在具体实施方式中,专门APC用于本发明。专门APC包括例如B细胞、巨噬细胞和树突细胞。

[0196] 当观察和/或测量到与活化细胞相关的一种或多种活性时,细胞经“活化”。例如,当细胞与本文的表达载体接触后,相比于未接触表达载体或接触阴性对照载体而言,可在表达载体接触的细胞中测量到与活化关联的活性,则细胞经活化。在一个示例中,增加的活性可为未接触细胞或接触阴性对照的细胞的2、3、4、5、6、7、8、9或10倍或更多。例如,下述活性之一可在与表达载体接触的细胞中得到提高:共刺激分子在细胞中的表达、NF- $\kappa$ B在细胞中的核易位、DC成熟标志物表达例如toll样受体表达或CCR7表达、特定细胞毒性T淋巴细胞响应例如导向肿瘤细胞的特定裂解性活性、或细胞因子(例如IL-2)或趋化因子表达。

[0197] 活化细胞或“提高”免疫应答的组合物的量指与不添加组合物测量的相同免疫应答相比,添加了组合物后使免疫应答以任何方式增强或强化或偏差的量。例如,添加或不添加组合物的细胞毒性T细胞的裂解活性可通过例如使用 $^{51}\text{Cr}$ 释放试验来测量。相比无组合物时CTL裂解活性,使CTL裂解活性增强的物质的量称为足以增强动物对抗原的免疫应答的量。例如,免疫应答可通过至少增加约2倍或例如约3倍或更多。分泌的细胞因子的量还可改变。

[0198] 增强的免疫应答可为主动或被动免疫应答。或者,所述响应可为过继免疫治疗方案的一部分,其中细胞获自对象(例如患者),然后用含本文表达载体或构建体的组合物转导或转染。细胞可获自例如对象的血液或对象的骨髓。然后细胞可给予相同或不同动物或相同或不同对象(例如相同或不同供体)。在一些实施方式中,对象(例如患者)患有或疑似患有癌症,例如前列腺癌,或患有或疑似患有感染疾病。在其他实施方式中,提高免疫应答的方法与已知癌症治疗或任何已知的处理感染疾病的治疗联合实施。

[0199] 树突细胞

[0200] 先天免疫系统使用种系编码的受体组识别微生物种存在的保守分子模式。这些分子模式在微生物某些成分中出现,所述成分包括脂多糖、肽聚糖、脂磷壁酸、磷脂酰胆碱、细菌特异蛋白质,包括脂蛋白、细菌DNA、病毒单链和双链RNA、未甲基化的CpG-DNA、甘露糖和各种其他细菌和真菌细胞壁组分。该分子模式还可在其他分子例如植物生物碱中存在。先天免疫识别的这些靶标称为病原相关分子模式(PAMP),因其由微生物生产而非由被感染的宿主生物体生产(Janeway等(1989) Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 54:1-13;



Medzhitov等, *Nature*, 388:394-397, 1997)。

[0201] 识别PAMP的先天免疫系统的受体称为模式识别受体 (PRR) (Janeway等, 1989; Medzhitov等, 1997)。这些受体结构不同, 属于多种不同蛋白质家族。这些受体中一些直接识别PAMP (例如CD14、DEC205、胶原凝集素), 而其他的 (例如补充受体) 识别PAMP识别所产生的产物。这些受体家族的成员通常可分为三种类型: 1) 血浆中循环的人受体; 2) 免疫细胞表面表达的内吞受体, 和3) 可在细胞表面或细胞内表达的信号受体 (Medzhitov等, 1997; Fearon等 (1996) *Science* 272:50-3)。

[0202] 细胞PRR在先天免疫系统的效应细胞上表达, 包括作为过继免疫中的专门细胞 (APC) 的细胞。该效应细胞包括但不限于巨噬细胞、树突细胞、B淋巴细胞和表面上皮细胞。该表达概况允许PRR直接诱导先天效应机制, 并且还通过诱导内源信号组 (例如炎症细胞因子和趋化因子, 如下所述) 的表达来就感染剂的存在而改变宿主生物体。后一种功能允许效应子的有效转移以对抗入侵者。

[0203] 树突细胞 (DC) 的主要功能是获取外周组织中的抗原、运送至二级淋巴组织并将抗原呈递至免疫系统的效应子T细胞 (Banchereau, J., 等, *Annu Rev Immunol*, 2000, .18: 第767-811页; Banchereau, J. 和Steinman, R.M., *Nature* 392, 245-252 (1998))。由于DC在免疫系统中具有重要作用, 其经历成熟变化, 允许其就各种环境进行合适的功能 (Termeer, C.C., 等, *J Immunol*, 2000年8月15日. 165: 第1863-70页)。在DC成熟期间, 抗原摄取能力丧失, I型和II型主要组织相容性复合物 (MHC) 分子的表面密度增加10-100倍, 并且CD40、共刺激和粘附分子表达也显著增加 (Lanzavecchia, A. 和F. Sallusto, *Science*, 2000. 290: 92-96页)。此外, 其他遗传改变允许DC回到引流淋巴结的富集T细胞的副皮质区, 并表达T细胞趋化因子吸引原初和记忆T细胞并引发抗原特异的原初TH0细胞 (Adema, G.J., 等, *Nature*, 1997年6月12日. 387: 713-7页)。在该阶段期间, 成熟的DC通过其MHC II分子呈递抗原至CD4<sup>+</sup>T辅助细胞, 包括T细胞CD40配体 (CD40L) 上调, 继而接合DC CD40受体。该DC:T细胞相互作用诱导其他DC分子的快速表达, 所述其他DC分子对起始可能的CD8<sup>+</sup>细胞毒性T淋巴细胞 (CTL) 响应至关重要, 包括进一步上调MHC I和II分子、粘附分子、共刺激分子 (例如B7.1, B7.2)、细胞因子 (例如IL-12) 和抗凋亡蛋白质 (例如Bcl-2) (Anderson, D.M., 等, *Nature*, 1997, 11月13日. 390: 175-9页; Ohshima, Y., 等, *J Immunol*, 1997, 10月15日. 159: 3838-48页; Sallusto, F., 等, *Eur J Immunol*, 1998, 9月28日: 2760-9页; Caux, C. *Adv Exp Med Biol*. 1997, 417: 21-5)。CD8<sup>+</sup>T细胞离开淋巴结, 重新进入循环并回到炎症的原始位置以摧毁病原体或恶性细胞。

[0204] 影响DC功能的一个关键参数是CD40受体, 其作为DC“开启开关” (Bennett, S.R., 等, *Nature*, 1998, 6月4日. 393: 478-80页; Clarke, S.R., *J Leukoc Biol*, 2000, 5月. 67: 607-14页; Fernandez, N.C., 等, *Nat Med*, 1999, 4月5日: 405-11页; Ridge, J.P., D.R.F. 和 *Nature*, 1998, 6月4日. 393: 474-8页; Schoenberger, S.P., 等, *Nature*, 1998, 6月4日. 393: 480-3页)。CD40是48-kDa的TNF受体超家族跨膜成员 (McWhirter, S.M., 等, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 7月20日. 96: 8408-13等)。CD40-CD40L相互作用诱导CD40跨膜三聚化, 其为引发信号传导级联所必需, 涉及TNF受体相关因子 (TRAF) (Ni, C., 等, *PNAS*, 2000, 97 (19): 10395-10399; Pullen, S.S., 等, *J Biol Chem*, 1999, 5月14日. 274: 14246-54页)。CD40使用这些信号传导分子来活化DC中的数种转录因子, 包括NF- $\kappa$ B、AP-1、STAT3和p38MAPK

(McWhirter, S.M., 等, 1999)。

[0205] 由于其独特的加工和呈递抗原的方法以及高表达共刺激和细胞因子分子的能力, 树突细胞 (DC) 是引发和活化原初T细胞的有效细胞 (APC) (Banchereau J, 等, *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 987: 180-187)。该性质使其在许多临床试验中广泛用作疫苗细胞平台, 结果令人振奋 (O'Neill DW, 等, *Blood.* 2004; 104: 2235-2246; Rosenberg SA, *Immunity.* 1999; 10: 281-287)。然而, 癌症患者中DC疫苗的临床功效并不令人满意, 可能是由于许多关键的缺陷, 包括活化欠佳、向引流淋巴结的迁移有限、和优化的T细胞活化在淋巴结环境中寿命不足。

[0206] 优化基于DC的癌症疫苗中的参数是DC与免疫效应细胞例如CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T细胞和T调节 (Treg) 细胞的相互作用。在这些相互作用中, DC的成熟状态时确定所得效应子功能的关键因素 (Steinman RM, *Annu Rev Immunol.* 2003; 21: 685-711)。为了最大化CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞引发同时最小化Treg扩增, DC需要完全成熟, 表达高水平的共刺激分子 (例如CD40, CD80, 和 CD86)、和促炎细胞因子, 例如IL-12p70和IL-6。同等重要地是, DC必须能从接种疫苗的位置迁移至引流淋巴结以启动T细胞相互作用 (Vieweg J, 等, *Springer Semin Immunopathol.* 2005; 26: 329-341)。

[0207] 对于单核来源的未成熟DC的离体成熟化, 大部分基于DC的试验使用标准成熟细胞因子混合物 (MC), 包括TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6和PGE2。前列腺素E2 (PGE2) 在标准成熟混合物中的主要功能是使CC趋化因子受体7 (CCR7) 对其配体CC趋化因子配体19 (CCL19) 和CCL21敏化, 并因此提高DC的向引流淋巴结迁移的能力 ((Scandella E, 等, *Blood.* 2002; 100: 1354-1361; Luft T, 等, *Blood.* 2002; 100: 1362-1372))。然而, 还有报道表示PGE2有可能对免疫应答刺激有害的大量特性, 包括抑制T细胞增殖 (Goodwin JS, 等, *J Exp Med.* 1977; 146: 1719-1734; Goodwin JS, *Curr Opin Immunol.* 1989; 2: 264-268)、抑制促炎细胞因子生产 (例如IL-12p70和TNF- $\alpha$  (Kalinski P, *Blood.* 2001; 97: 3466-3469; van der Pouw Kraan TC, 等, *J Exp Med.* 1995; 181: 775-779)) 和下调主要组织相容性复合物 (MHC) II的表面表达 (Snyder DS, *Nature.* 1982; 299: 163-165)。因此, 可避免PGE2而促进迁移的成熟方案可能改善基于DC的疫苗的治疗功效。

[0208] 基于CD40信号传导途径的靶向时间控制的DC活化系统已经开发用于延伸肿瘤组织内DC的预刺激状态。通过提高CD信号传导广度和持续来改善DC功能性 (Hanks BA, 等, *Nat Med.* 2005; 11: 130-137)。为此, CD40受体经重新工程改造从而CD40的胞质结构域沿着膜靶向序列融合至合成的配体结合结构域。给予脂质可穿透性二聚化药物AP20187 (AP) (称为二聚化的化学诱导剂 (CID)) (Spencer DM, 等, *Science.* 1993; 262: 1019-1024) 引起小鼠DC中CD40-依赖性信号传导级联的体内诱导。该诱导策略显著提高了针对限定的抗原和体内肿瘤的免疫原性, 远超其他活化形式所实现的结果 (Hanks BA, 等, *Nat Med.* 2005; 11: 130-137)。

[0209] 模式识别受体 (PRR) 信号传导, 其一个示例是Toll样受体 (TLR) 信号传导, 还在诱导DC成熟和活化; 人DC表达、多种不同TLR中起关键作用 (Kadowaki N, 等, *J Exp Med.* 2001; 194: 863-869) 11种哺乳动物TLR响应各种病原体衍生的大分子, 引起先天免疫应答随着过继免疫的启动而活化。脂多糖 (LPS) 和临床相关衍生物单磷酸脂质A (MPL) 结合细胞表面TLR-4复合物 (Kadowaki N, 等, *J Exp Med.* 2001; 194: 863-869), 导致在转录因子诱导中积

累的各种信号传导通路,例如NF- $\kappa$ B和IRF3,以及丝裂原活化蛋白激酶(MAPK) p38和c-Jun激酶(JNK) (Ardeshna KM,等,Blood.2000;96:1039-1046;Ismaili J,等,J Immunol.2002;168:926-932)。在该过程中,DC成熟并且部分上调促炎细胞因子,例如IL-6、IL-12和I型干扰素(Rescigno M,等,J Exp Med.1998;188:2175-2180)。LPS-诱导的熟化还显示出体外和体内提高DC刺激抗原特异性T细胞响应的能力(Lapointe R,等,Eur J Immunol.2000;30:3291-3298)。包括用编码CD40肽的核酸转导细胞的活化细胞的方法参见美国专利7,404,950,包括用编码嵌合蛋白质(包括诱导型CD40肽和模式识别受体或通路中其他下游蛋白质)的核酸转染细胞的活化细胞的方法参见国际专利申请PCT/US2007/081963,其于2007年10月19日提交,公开号W0 2008/049113,其通过引用纳入本文。

[0210] 诱导型CD40(iCD40)系统已用于人树突细胞(DC),并且还证实将iCD40信号传导与模式识别受体(PRR)衔接子连接引起人DC的持续且强效活化。(Spencer,等,USSN 12/563,991,2009年9月21日提交,相关国际申请W0 2010/033949公开于2010年3月25日,通过引用纳入本文)。

[0211] 工程改造表达构建体

[0212] 表达构建体编码共刺激多肽和配体结合结构域,所有均为可操作性连接。通常,术语“可操作连接”表示启动子序列功能性连接第二序列,其中所述启动子序列起始并介导对应于第二序列的DNA的转录。更具体地,表达构建体中采用多于一种配体结合结构域。进一步,所述表达构建体包含膜靶向序列。合适的表达构建体可在上述FKBP配体结合元件的两侧包括共刺激多肽元件。表达构建体可插入载体,例如病毒载体或质粒中。所提供方法的步骤可用合适方法进行,这些方法包括但不限于本文所述转导、转化的方法或提供核酸至细胞的方法。在一些实施方式中,截短的MyD88肽由SEQ ID NO:4的核苷酸序列编码(具有或不具有DNA接头或具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列)。在一些实施方式中,CD40胞质多肽区域由SEQ ID NO:8中的多核苷酸序列编码。

[0213] 在一些实施方式中,多肽可编码诱导性嵌合刺激多肽和异源多肽,其可为例如标志物多肽且可为例如嵌合抗原受体。异源多肽例如嵌合抗原受体可通过多肽序列例如2A-样接头多肽而连接诱导性嵌合刺激分子。

[0214] 在某些示例中,含编码诱导性嵌合刺激分子的核苷酸的核酸包括在相同载体中,例如病毒或质粒载体,作为编码第二多肽的多核苷酸。该第二多肽可为例如本文所述嵌合抗原受体多肽或标志物多肽。在这些示例中,构建体可与操作性连接核酸的一种启动子进行设计,所述核酸包括编码两种多肽并由2A多肽连接的多核苷酸。该示例中,第一和第二多肽在翻译期间分离,得到嵌合刺激分子多肽和第二多肽。在其他示例中,两种多肽可从不同载体分别表达,其中包括编码多肽之一的多核苷酸的核酸操作性连接单独的启动子。在另其他示例中,一个启动子可操作性连接两个核酸,引导两个分别的RNA转录本的生产,并因此得到两个肽。因此,本文讨论的表达构建体可包括至少一种或至少两种启动子。

[0215] 表达构建体还可包括标志物多肽。在一些实施方式中,标志物多肽连接诱导性嵌合信号传导分子。例如,标志物多肽可通过多肽序列(例如可切割的2A样序列)连接所述诱导性嵌合信号传导分子。所述标志物多肽可为例如CD19,  $\Delta$  CD19或可为例如异源蛋白质,其经选择以不影响诱导型嵌合信号传导分子的活性。

[0216] 2A样序列或“可切割”2A序列源自例如许多不同病毒,包括例如源自明脉扁刺蛾 $\beta$

四体。这些序列有时还称为“肽省略序列(peptide skipping sequence)”。当此类序列置于要分开的两个肽之间的顺反子内时,核糖体会跳过明脉扁刺蛾 $\beta$ 四体序列情况中的肽键,Gly和Pro核酸之间的键会被省略。这样得到两种多肽,在所述情况中为胱冬酶-9多肽和标志物多肽。当使用该序列时,编码2A序列5'的肽可在其他羧酸的羧基末端终止,包括Gly残基和2A序列中的任何上游残基。编码2A序列3'的肽可在其他羧酸的氨基末端终止,包括Pro残基和2A序列中的任何下游残基。“2A”或“2A-样”序列是引起肽结合省略的肽大家族中的一部分。(Donnelly,ML 2001,J.Gen.Virol.82:1013-25)。各种2A序列已得到表征(例如F2A、P2A、T2A),其为可用于本文多肽的2A样序列的示例。

[0217] 共刺激多肽

[0218] 共刺激多肽分子能通过活化参与细胞存活和增殖的信号途径放大细胞介导的免疫应答。可考虑的共刺激多肽包括但不限于肿瘤坏死因子受体(TNFR)家族(即CD40RANK/TRANCE-R、OX40、4-1BB)和CD28家族成员(CD28、ICOS)。共刺激蛋白可包括例如CD28、4-1BB、OX40,和CD3 $\zeta$ 链,或例如其胞质区域。多于一种共刺激多肽或共刺激多肽胞质区域可用在本文所述诱导型嵌合信号传导分子中。例如,诱导型CSM可包括CD28胞质多肽和4-1BB胞质多肽。或例如,诱导型CSM可包括CD28胞质多肽和OX40胞质多肽。或例如,诱导型CSM可包括CD3 $\zeta$ 胞质多肽。

[0219] 共刺激多肽包括活化NF- $\kappa$ B、Akt途径和/或p38途径的任何分子或多肽。细胞活化系统基于利用重组信号分子,其融合至一个或多个配体结合结构域(即小分子结合结构域),其中所述共刺激多肽经活化和/或用引起寡聚化的配体调节(即脂质可穿透、有机、二聚化药物)。可用于共刺激多肽交联或寡聚化的其他系统包括抗体、天然配体和/或人工交叉反应或合成的配体。此外,考虑的其他二聚化系统包括香豆霉素/DNA促旋酶B系统。

[0220] 可用的共刺激多肽包括活化NF- $\epsilon$ B和其他可变区信号级联的那些,例如p38通路和/或Akt通路。该共刺激多肽包括但不限于CD28家族成员(如CD28、ICOS)、TNF受体(即CD40、RANK/TRANCE-R、OX40、4-1BB)。

[0221] 模式识别受体包括但不限于内吞作用模式识别受体(即甘露糖受体、清除剂受体(即Mac-1、LRP、肽聚糖、磷壁酸、毒素、CD11c/CR4));外部信号模式识别受体(Toll样受体(TLR1,TLR2,TLR3,TLR4,TLR5,TLR6,TLR7,TLR8,TLR9,TLR10)),肽聚糖识别蛋白质(PGRP结合细菌肽聚糖和CD14);内部信号模式识别受体(即NOD-受体1和2)、RIG1和PRR。适合用于本发明方法和组合物的模式识别受体还包括例如Werts C.,等,Cell Death and Differentiation(2006)13:798-815;Meylan,E.,等,Nature(2006)442:39-44;和Strober,W.,等,Nature Reviews(2006)6:9-20所述的那些。考虑的共刺激蛋白质还包括例如CD40和MyD88多肽,和本文所述的嵌合CD40和MyD88多肽。在一些实施方式中,嵌合信号传导分子包括CD40胞质区域多肽和截短的MyD88多肽。含CD40胞质区域多肽和截短的MyD88多肽的多肽参见2009年9月21日提交的美国专利申请系列号12/563,991,题目为“通过诱导CD40和模式识别受体衔接自产生免疫应答的方法和组合物”(METHODS AND COMPOSITIONS FOR GENERATING AN IMMUNE RESPONSE BY INDUCING CD40 AND PATTERN RECOGNITION RECEPTOR ADAPTERS),其通过引用全文纳入本文。

[0222] 在具体实施方式中,共刺激多肽分子是CD40。CD40分子包括核酸分子,所述核酸分子(1)在严谨条件下与具有已知CD40基因序列的核酸杂交和(2)编码CD40多肽。CD40多肽在

某些示例中可缺少胞外区域。编码CD40多肽的示例性多核苷酸序列包括但不限于SEQ. ID. NO:1和来自其他物种的CD40同种型。考虑CD40的其他正常或突变变体可用于本发明方法和组合物。因此,CD40区域可具有与天然序列有一个或多个氨基酸取代、缺失和/或插入的不同的氨基酸序列。例如,一个或多个TNF受体相关因子(TRAF)结合区域可被消除或有效消除(例如CD40氨基酸被删除或改变从而TRAF蛋白质相比结合天然CD40序列而不与之结合或以低亲和性结合)。在具体实施方式中,TRAF 3F结合区域经删除或改变从而其被消除或有效消除(例如氨基酸250-254可被改变或删除;Hauer等,PNAS102(8):2874-2879(2005))。

[0223] 在一些实施方式中,本文涉及产生编码诱导型CD40(iCD40)的表达载体的基因材料的操作。该方法涉及产生表达构建体,所述构建体包括例如编码CD40胞质结构域的异源核酸序列和用于其表达的组件。可在合适的辅助细胞(病毒颗粒可从此生产)和感染该重组病毒颗粒的细胞中复制该载体。

[0224] 因此,本文所述的CD40分子可例如缺少胞外结构域。在具体实施方式中,所述胞外结构域被截短或移除。还考虑胞外结构域可用标准诱变、插入、缺失或替换进行突变以产生不具有功能性胞外结构域的CD40分子。CD40核酸可具有SEQ. ID. NO:1的核酸序列。CD40核酸还包括具有SEQ. ID. NO:1序列的核酸的同源物或等位基因,以及前述核酸的功能上等价片段、变体和类似物。构建诱导型CD40载体的方法参见例如2008年7月29日授权的美国专利7,404,950。

[0225] 在基因治疗的环境中,基因为源自除病毒基因组以外来源的异源多核苷酸序列,其提供载体主链。所述基因源自原核或真核来源例如细菌、病毒、酵母、寄生虫、植物或甚至动物。异源DNA还可源自多于一种来源,即多基因构建体或融合蛋白。异源DNA还可包括调节序列,其源自一种来源并且所述基因来自不同来源。

[0226] 共刺激多肽可包括但不限于本文提供的氨基酸序列,可包括功能保守突变,包括缺失或截短,且可包括与本文的氨基酸序列具有70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%相同性的氨基酸序列。

[0227] 细胞例如T细胞中的共刺激多肽表达参见例如2014年3月13日提交的名为“控制T细胞增殖的方法”的美国专利申请号14/210,034,和2014年9月25日以WO 2014/151960公开的国际专利申请PCT/US2014/026734,其通过引用全文纳入本文。

[0228] 配体结合区域

[0229] 表达构建体的配体结合(“二聚化”)结构域可为可使用天然或非天然配体(例如非天然合成配体)进行诱导的任何方便的结构域。多聚化区域或配体结合结构域可为细胞膜之内或之外,取决于构建体的性质和配体的选择。已知各种配体结合蛋白质(包括受体),包括与上述胞质区域关联的配体结合蛋白质。本文术语“配体结合结构域”可与“受体”互换使用。特别感兴趣的是已知或可容易生成配体(如小有机配体)的配体结合蛋白质。这些配体结合结构域或受体包括FKBP和亲环蛋白受体、类固醇受体、四环素受体、上述其他受体等,以及“非天然”受体,其可获自抗体、特别是重链或轻链亚基、其突变序列、随机程序获得的随机氨基酸序列、组合合成物等。在一些实施方式中,所述配体结合区域选自:FKBP配体结合区域、亲环蛋白受体配体结合区域、类固醇受体配体结合区域、亲环蛋白受体配体结合区域,和四环素受体配体结合区域。通常所述配体结合区域包含F<sub>v</sub>F<sub>v1s</sub>序列。有时,F<sub>v</sub>F<sub>v1s</sub>序列

还包含其他Fv' 序列。示例包括例如Kopytek, S.J., 等, *Chemistry&Biology* 7:313-321 (2000) 和Gestwicki, J.E., 等, *Combinatorial Chem.&High Throughput Screening* 10:667-675 (2007); Clackson T (2006) *Chem Biol Drug Des* 67:440-2; Clackson, T., 记载于《化学生物学:从小分子到系统生物学和药物设计》(*Chemical Biology:From Small Molecules to Systems Biology and Drug Design*) (Schreiber, s., 等编, 威力出版社 (Wiley), 2007)) 所述的那些。

[0230] 多数情况中, 配体结合结构域或受体结构域有至少约50氨基酸、少于约350氨基酸、通常少于约200氨基酸作为天然结构域或其截短活性部分。结合结构域可为例如小的 (< 25kDa, 以允许病毒载体的有效转染)、单体、非免疫原性、可通过合成实现、可穿透细胞、非毒性的配体, 其被配置用于二聚化。

[0231] 受体结构域可在胞内或胞外, 取决于表达载体的设计和合适配体的可及性。对于疏水配体, 结合结构域可在膜的两侧, 但对于亲水配体, 尤其是蛋白质配体来说, 结合结构域通常延伸至细胞膜, 除非有转运系统将配体内在化为可用于结合的形式。对于胞内受体来说, 所述构建体可编码受体结构域序列的信号肽和跨膜结构域5' 或3', 或可具有受体结构域序列的脂质接合信号序列5'。受体结构域位于信号肽和跨膜结构域之间时, 所述受体结构域将位于胞外。

[0232] 编码受体的表达构建体的部分可经诱变用于各种目的。诱变的蛋白质可提供较高的结合亲和性, 这样可区分天然形成的受体和诱变受体的配体, 为设计受体配体对等提供机会。受体中的变化可涉及已知位于结合位置的氨基酸, 使用组合技术的随机诱变, 其中关联结合位置的氨基酸或关联构型变化的其他氨基酸的密码子可通过改变(已知的变化或随机的变化) 特定氨基酸的密码子而得到诱变, 在合适和原核宿主中表达所获蛋白质, 然后删选所述蛋白质的结合。

[0233] 抗体和抗体单元如重链或轻链、尤其是其片段、更尤其可变区的全部或部分, 或重链和轻链的融合蛋白(以产生高亲和结合) 可用作结合结构域。考虑的抗体包括异味表达人产物的抗体, 例如会启动免疫应答和通常在外周(即CND/脑区域之外) 表达的胞外结构域。此类示例包括但不限于低亲和神经生长因子受体(LNGFR) 和胚胎表面蛋白质(即癌胚抗原)。

[0234] 此外, 抗体可针对半抗原分子制备, 其为生理可接受, 且为经筛选结合亲和性的个体抗体亚基。编码亚基的cDNA可经缺失恒定区、部分可变区、诱变可变区等来分离和修饰以获得具有对配体的合适亲和性的结合蛋白质结构域。以这种方法, 几乎所有生理可接受半抗原化合物可用作配体或为配体提供表位。还可使用天然受体替代抗体单元, 其中所述结合结构域已知并有用于结合的有用配体。

[0235] 寡聚化

[0236] 虽然其他结合事件例如变购活化可用于启动信号, 转导信号通常来自配体介导的嵌合蛋白分子的寡聚化, 即配体结合后的寡聚化的结果。嵌合蛋白质的构建体会随着各种结构域的顺序和个体结构域的重复数量而不同。

[0237] 为了对所述受体进行多聚化, 嵌合表面膜蛋白质的配体结合结构域/受体结构域的配体通常为多聚化, 意义在于其会具有至少两个结合位点, 各结合位点能结合配体受体结构域。“多聚化配体结合区域”表示结合多聚化配体的配体结合区域。术语“多聚化配体”

包括二聚化配体。二聚化配体具有能结合配体受体结构域的两个结合位点。理想地,主题配体为小合成有机分子的二聚化或更高级寡聚物,通常不高于约四聚化,所述个体分子一般至少为约150Da且小于约5kDa,通常小于约3kDa。可使用各种成对的合成配体和受体。例如,涉及天然受体的实施方式中,二聚化FK506可与FKBP12受体使用,二聚化环孢菌素A可与亲环蛋白受体使用,二聚化雌激素可与雌激素受体使用,二聚化糖皮质激素可与糖皮质激素受体使用,二聚化四环素可与四环素受体使用,二聚化维生素D可与维生素D受体使用等。可使用其他高级配体如三聚物。对于涉及非天然受体(例如抗体亚基、修饰的抗体亚基、由重链和轻链可变区串联组成并由挠性接头结构域分离的单链抗体、或修饰的受体和其突变序列等)的实施方式来说,可采用各种任何组合。这些配体单元的显著特征是各结合位点能以高亲合力结合受体且其能化学上二聚化。而且,有方法可平衡配体的疏水性/亲水性从而其能以功能水平溶于血清,并在多数应用中扩散通过质膜。

[0238] 在一些实施方式中,本发明方法使用化学诱导二聚化(CID)技术来生产条件控制的蛋白质或多肽。该技术除了具有诱导型,还具有可逆性,这是由于不稳定二聚化试剂的降解或给予单体竞争抑制剂。

[0239] CID系统使用合成的二价配体以快速交联融合至配体结合结构域的信号分子。该系统以用于:启动细胞表面蛋白的寡聚化和活化(Spencer,D.M.,等,Science,1993.262:第1019-1024页;Spencer D.M.等,Curr Biol 1996,6:839-847;Blau,C.A.等Proc Natl Acad.Sci.USA 1997,94:3076-3081)、或胞质蛋白的寡聚化和活化(Luo,Z.等Nature 1996,383:181-185;MacCorkle,R.A.等Proc Natl Acad Sci USA1998,95:3655-3660)、招募转录因子至DNA元件以调节转录(Ho,S.N.等Nature1996,382:822-826;Rivera,V.M.等Nat.Med.1996,2:1028-1032)或招募信号分子至质膜以刺激信号传导(Spencer D.M.等Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1995,92:9805-9809;Holsinger,L.J.等Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1995,95:9810-9814)。

[0240] CID系统基于表面受体积聚有效活化下游信号级联的概念。在最简单的实施方式中,CID系统使用可穿透脂质的免疫抑制药物的二聚类似物,FK506,其丧失其正常生物活性而获得交联遗传融合FK506-结合蛋白质(FKBP12)的分子的能力。通过将一种或多种FKBP和豆蔻酰化序列与靶受体的胞质信号结构域融合,可以依赖二聚体药物但不依赖配体和胞外域的方式刺激信号转导。这给系统提供了时间控制,使用单体药物类似物的可逆性和更高的特异性。第三代AP20187/AP1903 CID对其结合结构域FKBP12的高亲和性允许重组受体体内特异活化而不会诱导发生内源FKBP12的非特异性副作用。可使用具有氨基酸取代和缺失的FKBP12变体,例如FKBP12<sub>v36</sub>,其结合二聚体药物。此外,合成的配体抵抗蛋白酶降解,使其比多数递送的蛋白质试剂能更有效地体内活化受体。

[0241] 所用配体能结合两种或多种配体结合结构域。当嵌合蛋白质含多于一种配体结合结构域时,其能结合多于一种配体。配体通常是化学品或非蛋白。示例的配体包括但不限于二聚化FK506(如FK1012)。

[0242] 其他配体结合区域可为例如二聚化区域或具有摆动取代的修饰的配体结合区域,例如FKBP12(V36):F36取代为V的人kDa FK506结合蛋白(完整成熟编码序列(氨基酸1-107))为合成的二聚体药物AP1903提供结合位点(Jemal,A.等CA Cancer J.Clinic.58,71-96(2008);Scher,H.I.和Kelly,W.K.,Journal of Clinical Oncology 11,1566-72

(1993)。蛋白质的两个随机拷贝还可用在构建体中,从而高级寡聚物在被AP1903交联后被诱导。

[0243] F36V'-FKBP:F36V'-FKBP是密码子摆动形式的F36V-FKBP。其编码与F36V-FKBP相同的多肽序列,但在核苷酸水平仅62%同源。

[0244] 设计F36V'-FKBP用于降低逆转录病毒载体的重组(Schellhammer, P. F. 等 J. Urol. 157, 1731-5 (1997))。F36V'-FKBP通过PCR组装程序构建。转基因包含一拷贝的F36V'-FKBP,其直接连接一拷贝的F36V-FKBP。

[0245] 在一些实施方式中,所述配体是小分子。可选择针对所选配体结合区域合适的配体。通常,配体是二聚化的,有时配体是二聚化FK506或二聚化FK506类似物。在一些实施方式中,配体是AP1903(CAS目录名:2-哌啶羧酸,1-[(2S)-1-氧代-2-(3,4,5-三甲氧基苯基)丁基]-,1,2-乙烷二基双[亚氨基(2-氧代-2,1-乙烷二基)氧-3,1-亚苯基[(1R)-3-(3,4-二甲氧基苯基)亚丙基]]酯,[2S-[1(R\*),2R\*[S\*[S\*[1(R\*),2R\*]]]])-(9CI)CAS注册号:195514-63-7;分子式:C78H98N4O20分子量:1411.65)。在某些实施方式中,配体是AP20187。在某些实施方式中,配体是AP20187类似物,例如AP1510。在一些实施方式中,某些类似物适于FKBP12,而某些类似物适于FKBP12的摆动形式。在某些实施方式中,嵌合蛋白质中包含一种配体结合区域。在其他实施方式中,包括两种或更多配体结合区域。例如配体结合区域为FKBP12时,且包括这些区域中的两种时,一种(例如)可为摆动形式。

[0246] 该方法中,多聚化分子可为结合CD40胞外结构域的表位的抗体(例如人源化抗CD40抗体);Tai等Cancer Research 64,2846-2852(2004),可为CD40配体(例如美国专利6,497,876(Maraskovsky等))或可为任何共刺激分子(例如B7/CD28)。应理解序列中的如本文所测的不影响功能的保守变化在所附权利要求的范围之内。

[0247] 由于CD40的基质基本上基于三聚化,所以该受体特别适用于CID系统。CID调控为系统提供了1)时间控制,2)通过在自免疫反应迹象之后添加非活性单体而提供的可逆性,和3)受限非特异性副作用。此外,体内DC CD40活化中的诱导性能避免对第二“危险”的信号的需求而可能促进DC原位存活从而提高T细胞引发,所述信号通常为完成CD40信号传导的诱导所必须。因此,工程改造以表达iCD40的DC疫苗通过上调抗原呈递分子、粘附分子、TH1促进细胞因子和促存活因子的DC表达而扩大了T细胞介导的杀伤响应。

[0248] 考虑的其他二聚化系统包括香豆霉素/DNA促旋酶B系统。香豆霉素诱导的二聚化激活修饰的Raf蛋白质并刺激MAP激酶级联。参见Farrar等,1996。

[0249] 膜靶向

[0250] 提供用于转运嵌合蛋白至细胞表面膜的膜靶向序列,其中相同或其他序列可编码嵌合蛋白和细胞表面膜的结合。关联细胞膜的分子含便于膜关联的某些区域,且此类区域可纳入到嵌合蛋白分子中以生成膜靶向分子。例如,一些蛋白质在N端或C末端含酰化序列,且这些酰基部分便于膜的关联。此类序列由酰基转移酶识别且通常符合特定序列基序。某些酰化基序能用单一酰基部分修饰(常跟有数个正电荷残基(如人c-Src:M-G-S-N-K-S-K-P-K-D-A-S-Q-R-R-R)以改善阴离子脂质头部基团)且其他能用多重酰基部分修饰。例如蛋白酪氨酸激酶Src的N端序列可包含单一肉豆蔻酰部分。双酰化区域位于某些蛋白激酶的N末端区域内,例如Src家族成员(如Yes, Fyn, Lck)的亚组和G蛋白 $\alpha$ 亚基。该双酰化区域常位于所述蛋白的前18个氨基酸内,且符合序列基序Met-Gly-Cys-Xaa-Cys,当Met被切割,Gly



被N酰化且Cys残基之一被S酰化。Gly常被肉豆蔻酰化且Cys可被棕榈酰化。还可利用来自G蛋白 $\gamma$ 亚基的C末端和其他蛋白质(如网址[ebi.ac.uk/interpro/DisplayIproEntry?ac=IPR001230](http://ebi.ac.uk/interpro/DisplayIproEntry?ac=IPR001230))的与序列基序Cys-Ala-Ala-Xaa(所谓“CAAX盒”)一致的酰化区域(可用C15或C10异戊烯基部分进行修饰)。这些和其他酰化基序包括例如Gauthier-Campbell等Molecular Biology of the Cell 15:2205-2217(2004);Glabati等Biochem. J. 303:697-700(1994)和Zlakine等J. Cell Science 110:673-679(1997)所述的那些,其可纳入嵌合分子以诱导膜定位。在某些实施方式中,来自含酰化基序的蛋白质的未处理序列可被纳入嵌合蛋白中。例如,在一些实施方式中,Lck,Fyn或Yes或G-蛋白 $\alpha$ 亚基的N端部分,例如该蛋白质的前25个N端氨基酸或更少氨基酸(如含任选突变的未处理序列的约5-约20个氨基酸、约10-约19个氨基酸、或约15-约19个氨基酸)可纳入嵌合蛋白的N端序列。在某些实施方式中,来自G蛋白 $\gamma$ 亚基的含CAAX盒基序序列的约25个氨基酸或更少氨基酸的C末端序列(如含任选突变的未处理序列的约5-约20个氨基酸、约10-约18个氨基酸或约15-约18个氨基酸)可连接至嵌合蛋白的C末端。

[0251] 在一些实施方式中,酰基部分的log p值为+1至+6,有时log p值为+3至+4.5。Log p值是疏水性的量度,通常源自辛醇/水分配研究,其中较高疏水性分子以更高频率分配至辛醇,且特征为具有更高log p值。log p值公布为亲酯分子的数量,且log p值可用已知分配过程计算(如Chemical Reviews, Vol. 71, 6期, 599页, 词条4493显示的月桂酸具有4.2的log p值)。任何酰基部分可连接至上述肽组分且就抗微生物活性使用已知方法和下述方法进行测试。酰基部分有时例如C1-C20烷基、C2-C20烯基、C2-C20炔基、C3-C6环烷基、C1-C4卤代烷基、C4-C12环烷基烷基、酰基、取代的酰基或酰基(C1-C4)烷基。有时任何含酰基部分为脂肪酸,脂肪酸部分的示例为丙基(C3)、丁基(C4)、戊基(C5)、己基(C6)、庚基(C7)、辛基(C8)、壬基(C9)、癸基(C10)、十一烷基(C11)、月桂基(C12)、肉豆蔻基(C14)、十六烷基(C16)、硬脂基(C18)、二十烷基(C20)、二十二烷基(C22)和二十四烷基部分(C24),各部分可包含0、1、2、3、4、5、6、7或8个不饱和性(即双键)。酰基部分有时是脂质分子,例如磷脂酰脂(如磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱)、鞘脂(例如,鞘磷脂、鞘氨醇、神经酰胺、神经节苷脂、脑苷)或其修饰形式。在某些实施方式中,1、2、3、4、5或更多中酰基部分连接至膜关联区域。

[0252] 本文所述嵌合蛋白质还包括单次或多次跨膜序列(例如嵌合蛋白质的N末端或C末端处)。单次跨膜区域发现于某些CD分子、酪氨酸激酶受体、丝氨酸/苏氨酸激酶受体、TGF $\beta$ 、BMP、激活素和磷酸酶。单次跨膜区域常包括信号肽区域和约20-约25个氨基酸的跨膜区域,其多数为疏水氨基酸且可形成 $\alpha$ 螺旋。正电荷氨基酸的短示踪常位于跨膜区之后以锚定蛋白质于膜上。多次跨膜蛋白质包括离子泵、离子通道和跨膜体,且包括多次跨越膜的两个或更多螺旋。所有或基本所有多次跨膜蛋白有时纳入到嵌合蛋白中。单次和多次跨膜区域的序列已知,且可经选择以纳入嵌合蛋白质分子中。

[0253] 可使用在宿主中有功能的任何膜靶向序列,且其可与或可不与嵌合蛋白的其他结构域之一关联。在一些实施方式中,该序列包括但不限于豆蔻酰化-靶向序列、棕榈酰化-靶向序列、异戊二烯化序列(即法尼基化、牻牛儿酸化、CAAX盒)、蛋白质-蛋白质相互作用基序或来自受体的跨膜序列(采用信号肽)。示例包括例如Klooster JP等,Biology of the Cell (2007) 99, 1-12, Vincent, S., 等Nature Biotechnology 21:936-40, 1098(2003)所述

的那些。

[0254] 存在可提高蛋白质在各种膜上的保持性的其他蛋白质结构域。例如,约120氨基酸普列克底物蛋白同源(PH)结构域发现于超过200个人蛋白质,其通常涉及胞内信号通路。PH结构域可结合膜内各种磷脂酰肌醇(PI)脂质(如PI(3,4,5)-P<sub>3</sub>,PI(3,4)-P<sub>2</sub>,PI(4,5)-P<sub>2</sub>)且因此在招募蛋白质至不同膜或细胞隔室中其关键作用。通常PI脂质的磷酸化状态经条件,例如通过PI-3激酶或PTEN,因此膜与PH结构域的相互作用不如酰基脂质稳定。

[0255] AP1903 API通过奥佛拉研究公司(Alphora Research Inc.)生产,用于注射的AP1903药物产品由AAI制药服务公司(AAI Pharma Services Corp.)制备。其配制为AP1903在非离子增溶剂Solutol HS 15(250mg/mL,BASF)的25%溶液中的5mg/mL溶液。室温下该制剂为清澈溶液。冷冻后,制剂在延长的存储期中经过可逆相变换,形成牛奶状溶液。该相转变在升温至时候后回复。在10mL玻璃瓶中填充8mL(每瓶总计约40mg AP1903用于注射)。

[0256] 为了使用,AP1903升至室温并在应用前稀释。超过50kg的对象,AP1903通过静脉内输注以100mL磷酸盐中稀释40mg的剂量给药2小时,速率为每小时50mL,使用无DEHP盐水袋和溶液组。低于50kg对象接受0.4mg/kg AP1903。

[0257] 所有研究用药保持在2°C-8°C之间,避免光照和过热,储存在封闭区域严格限制接触。

[0258] 确定需要给予AP1903并活化治疗性T细胞(例如嵌合抗原受体和诱导型嵌合共刺激多肽-表达T细胞)后,患者可例如给予单一固定剂量的注射用AP1903(0.4mg/kg),通过静脉输注2小时,使用无DEHP、无环氧乙烷灭菌输注设备。AP1903剂量对所有患者单独计算,且除非体重变动≥10%否则不再计算。输注前将计算的剂量在100mL 0.9%标准盐水中稀释。

[0259] 在AP1903的先前I期研究中,24个健康志愿者用单剂量的注射用AP1903以0.01,0.05,0.1,0.5和1.0mg/kg的剂量水平静脉输注2小时。AP1903血浆水平与剂量成正比,在0.01-1.0mg/kg剂量范围中平均C<sub>最大</sub>值为约10-1275ng/mL。初始输注期后,血液浓度显示出快速分配期,血浆水平在剂量后0.5,2和10小时分别下降至最大浓度的约18,7,和1%。注射用AP1903显示出较安全且在所有剂量水平都良好耐受,表明良好的药代动力学概况。Iuliucci JD,等,J Clin Pharmacol.41:870-9,2001。

[0260] 例如注射的AP1903的固定剂量可为0.4mg/kg静脉输注2小时。细胞有效信号传导的体外所需AP1903量为约10-100nM(MW:1412Da)。这等于14-140μg/L或~0.014-0.14mg/kg(1.4-140μg/kg)。该剂量与申请不同,且在某些示例中可更高,在0.1-10nM的范围,或50-150nM、10-200nM、75-125nM、100-500nM、100-600nM、100-700nM、100-800nM或100-900nM的范围。如上所述多至1mg/kg的AP1903剂量在I期研究中良好耐受。

[0261] 选择性标志物

[0262] 在某些实施方式中,表达构建体包含核酸构建体,其体外或体内表达通过包含在表达构建体中的标志物鉴定。此类标志物赋予细胞可鉴定的改变,使得可以容易地鉴定含表达构建体的细胞。通常,药物选择标志物的纳入能协助克隆和选择转化体。例如,对新霉素、嘌呤霉素、潮霉素、叶酸、GPT、博莱霉素和组氨醇有抗性的基因是有用的选择性标志物。或者,使用酶例如单纯疱疹病毒胸苷激酶(tk)。还可使用含所述胞外、非信号传导结构域或各种蛋白质(如CD34,CD19,LNGFR)的免疫表面标志物,提供了磁性或荧光抗体介导的分选的直接简单的方法。所用选择性标志物并不被认为是重要的,只要其能与编码基因产物的

基因同时表达即可。选择性标志物的其他示例包括例如受体如GFP、EGFP、 $\beta$ -gal或氯霉素乙酰基转移酶。在某些实施方式中,标志物蛋白例如CD19用于选择(例如在免疫磁性选择中)输注用的细胞。

[0263] 如本文所述,CD19标志物不同于抗CD19抗体或例如scFv、TCR或结合CD19的其他抗原识别部分。

[0264] 在一些实施方式中,多肽可包括在表达载体内以辅助分选细胞。例如,CD34最小表位可纳入载体内。在一些实施方式中,用于表达本文所述嵌合抗原受体或嵌合刺激分子的表达载体还包含编码16氨基酸CD34最小表位的多肽。在一些实施方式中,例如本文实施例的某些实施方式中,CD34最小表位纳入到CD8茎部的氨基末端。

[0265] 跨膜区域

[0266] 本文所述嵌合抗原受体包括单次或多次跨膜序列(例如嵌合蛋白质的N末端或C末端处)。单次跨膜区域发现于某些CD分子、酪氨酸激酶受体、丝氨酸/苏氨酸激酶受体、TGF $\beta$ 、BMP、激活素和磷酸酶。单次跨膜区域常包括信号肽区域和约20-约25氨基酸的跨膜区域,其多数为疏水氨基酸且可形成 $\alpha$ 螺旋。正电荷氨基酸的短示踪常位于跨膜区之后以锚定蛋白质于膜上。多次跨膜蛋白质包括离子泵、离子通道和跨膜体,且包括多次跨越膜的两个或更多螺旋。所有或基本所有多次跨膜蛋白有时纳入到嵌合蛋白中。单次和多次跨膜区域的序列已知,且可经选择以纳入嵌合蛋白质分子中。

[0267] 在一些实施方式中,跨膜结构域与CAR的胞外结构域融合。在一个实施方式中,使用天然关联CAR中结构域之一的跨膜结构域。在其他实施方式中,使用与CAR中结构域之一无天然关联的跨膜结构域。在一些示例中,跨膜结构域可通过氨基酸取代来进行选择或修饰从而避免该结构域结合相同或不同表面膜蛋白质的跨膜结构域,从而使与受体复合物的其他成员的相互作用最小化。

[0268] 跨膜结构域可例如源自T细胞受体的 $\alpha$ 、 $\beta$ 、或 $\zeta$ 链、CD3- $\epsilon$ 、CD3 $\zeta$ 、CD4、CD5、CD8、CD8 $\alpha$ 、CD9、CD16、CD22、CD28、CD33、CD38、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137或CD154。或者,在一些示例中,跨膜结构域可从头合成,包括大多数疏水残基例如亮氨酸和缬氨酸。在某些实施方式中,短多肽结构可在嵌合多肽受体的跨膜结构域和胞内结构域之间形成连接。嵌合抗原受体还可包括茎部,即胞外结构域和跨膜结构域之间的胞外氨基酸区域。例如,茎部可为与所选跨膜结构域天然关联的氨基酸序列。在一些实施方式中,嵌合抗原受体包括CD8跨膜结构域,在一些实施方式中,嵌合抗原受体包括CD8跨膜结构域和跨膜结构域的胞外部分上的其他氨基酸,在一些实施方式中,嵌合抗原受体包括CD8跨膜结构域和CD8茎部。嵌合抗原受体还包括跨膜结构域和胞质结构域之间的氨基酸区域,其与衍生跨膜结构域的多肽天然关联。

[0269] 控制区域

[0270] 1. 启动子

[0271] 据信,用于控制感兴趣的多核苷酸表达的特定启动子并不重要,只要其能引导多核苷酸在靶细胞中表达即可。因此,靶向人类细胞时,多核苷酸序列编码区域可例如位于启动子附近并在其控制下,所述启动子能在人类细胞中表达。通常,该启动子可包括人或病毒启动子。

[0272] 在各种实施方式中,人巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子、SV40早期启动子、劳氏

肉瘤病毒长末端重复、 $\beta$ -肌动蛋白、大鼠胰岛素启动子和油醛-3-磷酸脱氢酶可用于获得高水平表达的感兴趣编码序列。还考虑使用本领域熟知的其他病毒或哺乳动物细胞或细菌噬菌体启动子以实现感兴趣的编码序列的表达,限制条件是,表达水平满足给定的目标。通过使用具有已知特性的启动子,可最优化转染或转化后感兴趣的蛋白质的表达水平和模式。

[0273] 选择响应特定生理或合成信号而调控的启动子可进行基因产物的诱导型表达。例如在转基因表达(采用多顺反子载体时)对生产该载体的细胞具有毒性时,需要组织或降低一种或多种转基因的表达。对生产细胞系(producer cell line)有毒的转基因的示例为促凋亡和细胞因子基因。数个诱导型启动子细胞可用于生产转基因产物有毒的病毒载体(加入更多诱导型启动子)。

[0274] 蜕皮激素受体系统(英杰公司,加利福尼亚州卡尔斯巴德(Invitrogen, Carlsbad, CA))是一种此类系统。该系统经设计以在哺乳动物中对感兴趣的基因表达进行调控。其由严格调控表达的机制组成,实际允许转基因的无基底水平表达,但允许超过200倍的诱导率。该系统基于果蝇的异二聚体蜕皮激素受体,当蜕皮激素或类似物例如莫瑞甾酮A结合该受体时,该受体激活启动子以打开下游转基因的表达,实现高水平mRNA转录。该系统中,异源二聚化受体的两个单体从一种载体组成型表达,而驱动感兴趣基因表达的蜕皮激素响应启动子在另一质粒上。因此将该类系统工程改造入感兴趣的基因转移载体中会有用。然后将含感兴趣基因的质粒和受体单体共转染如生产者细胞系可允许产生基因转移载体而不会表达潜在毒性转基因。转基因的表达可通过蜕皮激素或莫瑞甾酮A在合适的时间激活。

[0275] 其他可用的诱导型系统为Tet-Off™或Tet-On™系统(Clontech, Palo Alto, CA),由Gossen和Bujard最初开发(Gossen和Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551, 1992; Gossen等Science, 268:1766-1769, 1995)。该系统还允许响应四环素或四环素衍生物如多西环素而调控高水平的基因表达。Tet-On™系统中,存在多西环素时打开基因表达,而Tet-Off™系统中,不存在多西环素时打开基因表达。这些系统基于源自大肠杆菌的四环素抗性操纵子的两个调控元件。四环素抑制子结合的四环素操纵子序列,和四环素抑制子蛋白质。感兴趣的基因克隆入质粒位于启动子之后,其中存在四环素响应元件。第二质粒包含称为四环素控制的反式激活子的调控元件,其在Tet-Off™系统中由源自单纯疱疹病毒的VP16结构域和野生型四环素抑制子组成。没有多西环素时,转录组成型启动。Tet-On™系统中,四环素抑制子为非野生型,其在存在多西环素时激活转录。为了生产基因治疗载体,可使用Tet-Off™系统,从而生产细胞可在存在四环素或多西环素时生长,并阻止潜在毒性基因的表达,但当载体引入患者时,基因表达则组成型开启。

[0276] 在一些环境中,需要调控基因治疗载体中的转基因表达。例如,具有各种活性强度的不同病毒启动子基于所需表达水平而使用。在哺乳动物细胞中,CMV立刻早期启动子常用于提供强转录活化。CMV启动子参见Donnelly, J. J., 等1997. Annu. Rev. Immunol. 15:617-48。当需要较低水平的转基因表达时,也可使用功效较弱的修饰形式的CMV启动子。需要在造血干细胞中表达转基因时,常使用逆转录启动子例如MLV或MMTV的LTR。可基于所需效果使用的其他病毒启动子包括SV40、RSV LTR、HIV-1和HIV-2LTR、腺病毒启动子例如来自E1A、E2A或MLP区域、AAV LTR、HSV-TK、和禽肉瘤病毒。

[0277] 相似的组织特异性启动子用于在特定组织或细胞中有效转录,从而降低对非靶向组织的潜在毒性和不想要的作用。这些启动子的表达相对强启动子例如CMV启动子可能降

低,但可形成更有限的表达和免疫原性。(Bojak,A.,等,2002.Vaccine.20:1975-79; Cazeaux,N.,等,2002.Vaccine 20:3322-31).例如,合适时可使用组织特异启动子例如PSA 关联启动子或前列腺特异性腺体激肽释放酶或肌肉肌氨酸激酶基因。

[0278] 合适的组织特异或分化特异启动子的示例包括但不限于:B29(B细胞);CD14(单核细胞);CD43(白细胞和血小板);CD45(造血细胞);CD68(巨噬细胞);结蛋白(肌肉);弹性蛋白酶-1(胰腺腺泡细胞);内皮因子(endoglin)(内皮细胞);纤维连接蛋白(分化细胞,愈合组织);和Flt-1(内皮细胞);GFAP(星形细胞)。

[0279] 在某些情况中,需要在给予基因治疗载体后的特定时间或活化转录。这通过激素或细胞因子可调控的启动子实现。可用的细胞因子和炎症蛋白响应启动子包括K和T激肽原(Kageyama等(1987)J.Biol.Chem.,262,2345-2351)、c-fos、TNF- $\alpha$ 、C-反应蛋白(Arcone,等(1988)Nucl.Acids Res.,16(8),3195-3207)、触珠蛋白(Oliviero等(1987)EMBO J.,6,1905-1912)、血清淀粉样蛋白A2、C/EBP $\alpha$ 、IL-1、IL-6(Poli和Cortese,(1989)Proc.Nat'l Acad.Sci.USA,86,8202-8206)、Complement C3(Wilson等(1990)Mol.Cell.Biol.,6181-6191)、IL-8、 $\alpha$ -1酸糖蛋白(Prowse和Baumann,(1988)Mol Cell Biol,8,42-51)、 $\alpha$ -1抗胰蛋白酶蛋白、脂蛋白脂肪酶(Zechner等Mol.Cell.Biol.,2394-2401,1988)、血管紧张素原(Ron,等(1991)Mol.Cell.Biol.,2887-2895)、纤维蛋白原、c-jun(可通过佛波酯、TNF- $\alpha$ 、UV辐射、视黄酸和过氧化氢诱导)、胶原酶(佛波酯和视黄酸诱导)、金属硫蛋白(重金属和糖皮质激素诱导型)、间质溶解素(可通过佛波酯、干扰素-1和EGF诱导)、 $\alpha$ -2巨球蛋白和 $\alpha$ -1抗-糜蛋白酶。其他启动子包括例如SV40、MMTV、人免疫缺陷病毒(MV)、莫罗尼病毒、ALV、EB病毒、劳氏肉瘤病毒、人肌动蛋白、肌球蛋白、血红蛋白和肌酸。

[0280] 考虑任何上述启动子单独或与另一组合可基于所需作用而使用。启动子和其他调控元件经选择从而其在所需细胞或组织中有功能。此外,启动子的列表不应理解为穷尽或限制;本文公开与该启动子联合使用的其他启动子和方法。

[0281] 2. 增强子

[0282] 增强子是增强位于相同DNA分子的远端位置的启动子转录的基因元件。早期示例包括关联免疫球蛋白和T细胞受体的增强子,二者均侧接数个编码序列且均发生在数个内含子中。许多病毒启动子例如CMV、SV40和逆转录病毒LTR与增强子活性紧密关联且常以类似单一元件的形式处理。增强子更类似启动子进行组织。即其由许多单独元件组成,各元件结合一种或两种转录蛋白质。增强子和启动子的基本区别在于操作上。增强子区域整体刺激远处转录,通常不依赖方向;而启动子或其他组件并非如此。另一方面,启动子在特定位置具有以特定方向直接启动RNA合成的一种或多种元件,而增强子没有这些特异性。启动子和增强子常重叠或连续,通常具有非常相似的模块化组织。增强子亚组包括基因座控制区域(LCR),其不仅提高转录活性,还可(连同绝缘子元件)在整合入基因组时协助转录元件与相邻序列隔离。

[0283] 可用任何启动子/增强子组合(按照真核启动子数据库EPDB)以驱动基因表达,虽然需对会将表达限制在特定组织类型或组织亚组中。(参见例如Kutzler,M.A.,和Weiner,D.B.,2008.Nature Reviews Genetics 9:776-88)。示例包括但不限于来自人肌动蛋白、肌球蛋白、血红蛋白、肌肉肌氨酸激酶、序列的增强子以及来自病毒CMV、RSV和EBV的增强子。可选择合适的增强子用于特定应用。如果以递送复合物的部分或额外的基因表达构建体提

供合适的细菌聚合酶,真核细胞可支持来自特定细菌启动子的胞质转录。

#### [0284] 3. 聚腺苷酸化信号

[0285] 使用cDNA插入时,通常希望包括多聚腺苷酸化信号以实现基因转录本的适当多聚腺苷酸化。多聚腺苷酸化信号的性质据信对本方法的成功实施并非关键,且任何此类序列均可使用,例如人或牛生长激素和SV40多聚腺苷酸化信号和LTR多聚腺苷酸化信号。一种非限制性示例是pCEP3质粒中存在的SV40多聚腺苷酸化信号(英杰公司,加利福尼亚州卡尔斯巴德)。还考虑用作表达盒的元件是终止子。这些元件可用于提高信使水平和最小化从所述盒向其他序列的通读。终止或聚(A)信号序列可例如位于mRNA 3'末端的保守序列(AAUAAA)的下游约11-30核苷酸处。(Montgomery, D.L.,等,1993. *DNA Cell Biol.* 12:777-83; Kutzler, M.A.,和Weiner, D.B.,2008. *Nature Rev. Gen.* 9:776-88)。

#### [0286] 4. 起始信号和内部核糖体结合位点

[0287] 编码序列的充分翻译也可能需要特异性启动信号。这些信号包括ATG起始密码子或相邻序列。可能需要提供外源性翻译控制信号,包括ATG起始密码子。该起始密码子与所需编码序列在同一阅读框内,以保证完整插入物的翻译。外源翻译控制信号和起始密码子可为天然或合成的。表达效率可以通过包括合适转录增强子元件等来增强。

[0288] 在某些实施方式中,使用内部核糖体进入位点(IRES)元件来产生多基因,或多顺反子信使。IRES元件能绕开5'甲基化帽依赖的翻译的核糖体扫描模型,并在内部位置开始翻译(Pelletier和Sonenberg, *Nature*, 334:320-325, 1988)。来自小RNA病毒科的两成员(脊髓灰质炎和脑心肌炎)的IRES已经讨论(Pelletier和Sonenberg, 1988)以及来自哺乳动物信使的IRES(Macejak和Sarnow, *Nature*, 353:90-94, 1991)。IRES元件可连接至异源开放阅读框。多种开放阅读框可一起转录,各由IRES分隔,形成多顺反子信使。通过IRES元件,核糖体可及各开发阅读框以有效翻译。使用单启动子/增强子来转录单信使可有效表达多重基因(参见美国专利号5,925,565和5,935,819,各通过引用纳入本文)。

#### [0289] 序列优化

[0290] 通过优化转基因中的密码子还可提供蛋白质产量。物种特异的密码子变化可用于提高蛋白质产量。而且,可优化密码子以生产优化的RNA,其可产生更有效的翻译。通过优化纳入RNA中的密码子,可移除诸如导致二级结构不稳定的元件、诸如抑制核糖体结合的二级mRNA结构、或可抑制mRNA核输出的隐蔽序列。(Kutzler, M.A.,和Weiner, D.B.,2008. *Nature Rev. Gen.* 9:776-88; Yan, J.,等,2007. *Mol. Ther.* 15:411-21; Cheung, Y.K.,等,2004. *Vaccine* 23:629-38; Narum, D.L.,等,2001. *J. Virol.* 75:7250-55; Yadava, A.,和Ockenhouse, C.F.,2003. *Infect. Immun.* 71:4962-69; Smith, J.M.,等,2004. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 20:1335-47; Zhou, W.,等,2002. *Vet. Microbiol.* 88:127-51; Wu, X.,等,2004. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313:89-96; Zhang, W.,等,2006. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349:69-78; Deml, L.A.,等,2001. *J. Virol.* 75:1099-11001; Schneider, R.M.,等,1997. *J. Virol.* 71:4892-4903; Wang, S.D.,等,2006. *Vaccine* 24:4531-40; zur Megede, J.,等,2000. *J. Virol.* 74:2628-2635)。例如,FBP或其他多聚化区域多肽、共刺激多肽胞质信号区域和CD19序列可通过密码子改变而优化。

#### [0291] 前导序列

[0292] 可加入前导序列以增强mRNA的稳定性并获得更有效的翻译。前导序列通常参与靶

向mRNA至内质网。示例包括HIV-1包被糖蛋白(Env)的信号序列(其延缓自身切割),和IgE基因前导序列(Kutzler, M.A., 和Weiner, D.B., 2008. *Nature Rev. Gen.* 9:776-88; Li, V., 等2000. *Virology* 272:417-28; Xu, Z.L., 等2001. *Gene* 272:149-56; Malin, A.S., 等2000. *Microbes Infect.* 2:1677-85; Kutzler, M.A., 等2005. *J. Immunol.* 175:112-125; Yang., J.S., 等2002. *Emerg. Infect. Dis.* 8:1379-84; Kumar., S., 等2006. *DNA Cell Biol.* 25:383-92; Wang, S., 等2006. *Vaccine* 24:4531-40)。IgE前导序列可用于增强向内质网的插入(Tepler, I, 等(1989) *J. Biol. Chem.* 264:5912)。

[0293] 可通过选择合适的优化表达的方法来优化和/或控制转基因表达。这些方法包括例如优化启动子、递送方法和基因序列(例如下述文献所述:Laddy, D.J., 等2008. *PLoS. ONE* 3e2517; Kutzler, M.A., 和Weiner, D.B., 2008. *Nature Rev. Gen.* 9:776-88)。

#### [0294] 核酸

[0295] 本文所用“核酸”通常指DNA、RNA或其包括核碱基的衍生物或类似物的分子(一条、两条或更多链)。核碱基包括例如天然产生的DNA(如腺嘌呤“A”、鸟嘌呤“G”、胸腺嘧啶“T”或胞嘧啶“C”)或RNA(如A、G、尿嘧啶“U”或C)中的嘌呤或嘧啶碱基。术语“核酸”涵盖术语“寡核苷酸”和“多核苷酸”,各为术语“核酸”的亚属。核酸可为至少、至多或约3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、441、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990或1000个核苷酸长或衍生自其任何范围。

[0296] 本文提供的核酸可具有与其他核酸相同或互补的区域。考虑互补或相同的区域可为至少5个连续残基,虽然具体考虑所述区域至少、至多或约6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、441、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990或1000个连续核苷酸。

[0297] 本文所用“杂交”、“杂交的”或“能杂交”表示形成双链或三链分子或具有部分双链或三链性质的分子。本文所用术语“退火”是“杂交”的同义词。“杂交”、“杂交的”或“能杂交”涵盖术语“严谨条件”或“高严谨”和术语“低严谨”或“低严谨条件”。

[0298] 术语“严谨条件”或“高严谨”表示允许含互补序列的一条或多条核酸链之间或内部的杂交,但排除随机序列的杂交。严谨条件极少(若存在)允许核酸和靶链之间的错配。该条件已知且常用于需要高特异性的应用。非限制性应用包括分离核酸,例如其基因或核酸片段,或检测至少一种特异mRNA转录本或其核酸片段等。

[0299] 严谨条件可包括低盐和/或高温条件,例如通过约42°C-约70°C时约0.02M-约0.5M NaCl所提供的条件。应理解所需严谨性的温度和离子强度部分由下述决定:特定核酸长度、靶序列的长度和核碱基含量、核酸电荷组成、和杂交环境中甲酰胺、四甲基氯化铵或其他溶剂的存在或浓度。

[0300] 应理解杂交的这些范围、组成和条件以非限制性示例的方式描述,特定杂交反应所需的严谨性通常通过比较一种或多种阳性或阴性对照根据经验确定。根据所考虑的应用,可使用各种杂交条件以实现核酸向靶序列的各种程度的敏感性。在非限制性示例中,在严谨条件下不与核酸杂交的相关靶核酸的鉴定或分离可通过低温和/或高离子强度的杂交来实现。该条件称为“低严谨性”或“低严谨条件”,其非限制性示例包括如下进行的杂交:约20°C-约50°C下约0.15M-约0.9M NaCl。可进一步修改所述低或高严谨条件以适合特定应用。

[0301] “功能保守突变体”是给定的氨基酸残基发生变化而不改变蛋白质或酶的总体构型和功能的蛋白质或酶,包括但不限于相似性质的氨基酸置换,所述性质包括极性或非极性特征、尺寸、形状和电荷。对于许多常见已知非遗传性编码氨基酸的保守氨基酸取代本领域已知。其他非编码氨基酸的保守取代可基于其物理性质与遗传上编码的氨基酸的性质的比较来确定。

[0302] 除了那些视为保守的氨基酸以外的氨基酸可在蛋白质或酶中不同,从而具有相似功能的任何两种蛋白质之间的蛋白质或氨基酸序列的相似比例可不同且可(例如)至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、更优选至少95%,这根据比对方案来确定。本文所用术语“序列相似性”表示核苷酸或蛋白质序列相关的程度。两个序列之间的相似程度可基于序列相同性和/或保守型百分比。本文所用术语“序列相同性”表示两种核苷酸或氨基酸序列为非变异的程度。本文所用术语“序列比对”表示将两个或更多序列并列以实现最大水平相同性(以及氨基酸序列的情况中的保守型)的过程,其目的是评估相似性程度。比对序列和评估相似性/相同性的大量方法本领域已知,例如Cluster Method,其中所述相似性基于MEGALIGN算法,以及BLASTN、BLASTP和FASTA。当使用任何这些程序时,优选的设置是得到最高序列相似性的设置。

[0303] 核酸修饰

[0304] 下述任何修饰可用于核酸。修饰的示例包括RNA或DNA主链、糖基或碱基的改变,及其各种组合。核酸中任何合适数量的主链连接、糖和/或碱基均可修饰(例如独立地约%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%多至100%)未修饰的核苷为连接至β-D-核糖-呋喃糖的1'碳上的碱基腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶或尿嘧啶中任一。

[0305] 修饰的碱基为除了1'位置处的腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶或尿嘧啶以外的核苷酸碱基。修饰碱基的非限制性示例包括肌苷、嘌呤,吡啶-4-酮,吡啶-2-酮、苯基,假尿嘧啶、2,4,6-三甲氧基苯、3-甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶核苷、萘基、氨基苯基、5-烷基胞苷(例



如,5-甲基胞苷)、5-烷基尿苷(例如,胸腺嘧啶核糖核苷)、5-卤素尿苷(例如,5-溴尿苷)或6-氮杂嘧啶或6-烷基嘧啶(如6-甲基尿苷)、丙炔等。修饰碱基的其他非限制性示例包括硝基吡咯基(如3-硝基吡咯基),硝基吡啶基(如4-,5-,6-硝基吡啶基)、次黄嘌呤基、异肌苷酸基、2-氮杂-肌苷酸基、7-去氮-肌苷酸基、硝基咪唑基、硝基吡唑基、硝基苯并咪唑基、硝基吡唑基、氨基吡啶基、吡咯嘧啶基、二氟甲基基、4-氟-6-甲基苯并咪唑、4-甲基苯并咪唑、3-甲基异羟喹啉基、5-甲基异羟喹啉基、3-甲基-7-丙炔基异羟喹啉基、7-氮杂吡啶基、6-甲基-7-氮杂吡啶基、咪唑并吡啶、9-甲基-咪唑并吡啶、吡咯并吡啶基、异羟喹啉基、7-丙炔基异羟喹啉基、丙炔基-7-氮杂吡啶基、2,4,5-三甲基苯基、4-甲基吡啶基、4,6-二甲基吡啶基、苯基、萘基、蒽基、苯乙酰基蒽(phenanthracenyl)、苊基、茚基、并四苯基、并五苯基等。

[0306] 在一些实施方式中,例如,核酸可包括具有磷酸盐主链修饰的修饰的核酸分子。主链修饰的非限制性示例包括硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、甲基膦酸酯、磷酸三酯、吗啉代、氨基甲酸酰胺、羧甲基、亚氨逐乙酸酯(acetamidate)、聚酰胺、磺酸盐、磺酰胺、氨基甲酸酯、甲缩醛(formacetal)、硫甲缩醛(thioformacetal)和/或烷基硅基修饰。在一些示例中,核苷中天然产生的核糖部分用己糖、多环杂烷基环、或环环己烯基替代。在某些情况中,己糖是阿洛糖、阿卓糖、葡萄糖、甘露糖、古洛糖、艾杜糖、半乳糖、塔罗糖或其衍生物。己糖可为D己糖、葡萄糖或甘露糖。在某些示例中,多环杂烷基可为环中含一个氧原子的二环。在某些示例中,多环杂烷基为二环[2.2.1]庚烷、二环[3.2.1]辛烷或二环[3.3.1]壬烷。

[0307] 硝基吡咯基和硝基吡啶基核碱基是称为通用碱基的化合物种类的成员。通用碱基是可替代四种天然碱基中任一的那些化合物,而不会显著影响寡核苷酸双链的熔解性能或活性。与关联天然产生的核碱基的稳定化氢键相互作用不同,含3-硝基吡咯基核碱基的寡核苷酸双链可通过堆叠相互作用而单独稳定。使用硝基吡咯基核碱基而没有显著氢键相互作用避免了对特定互补碱基的特异性。此外,4-,5-和6-硝基吡啶基显示出对四种天然碱基非常弱的特异性。制备1-(2'-O-甲基-β-D-呋喃核糖基)-5-硝基吡啶的程序参见Gaubert, G.;Wengel, J. *Tetrahedron Letters* 2004, 45, 5629。其他通用碱基包括次黄嘌呤基、异肌苷酸基、2-氮杂-肌苷酸基、7-去氮杂-肌苷酸基、硝基咪唑基、硝基吡唑基、硝基苯并咪唑基、硝基吡唑基、氨基吡啶基、吡咯嘧啶基、和其结构衍生物。

[0308] 二氟甲基基是功能为通用碱基的非天然核碱基。二氟甲基基是天然核碱基胸腺嘧啶的等构物。但与胸腺嘧啶不同,二氟甲基基对任何天然碱基均没有明显的选择性。其他作为通用碱基的芳香化合物为4-氟-6-甲基苯并咪唑和4-甲基苯并咪唑。此外,相比仅含天然碱基的寡核苷酸序列,相对疏水的异羟喹啉基衍生物3-甲基异羟喹啉基、5-甲基异羟喹啉基、3-甲基-7-丙炔基异羟喹啉基是仅引起寡核苷酸双链稍稍不稳定的通用碱基。其他非天然核碱基包括7-氮杂吡啶基、6-甲基-7-氮杂吡啶基、咪唑并吡啶、9-甲基-咪唑并吡啶、吡咯并吡啶基、异羟喹啉基、7-丙炔基异羟喹啉基、丙炔基-7-氮杂吡啶基、2,4,5-三甲基苯基、4-甲基吡啶基、4,6-二甲基吡啶基、苯基、萘基、蒽基、苯乙酰基蒽(phenanthracenyl)、苊基、茚基、并四苯基、并五苯基和其结构类似物。二氟甲基基、4-氟-6-甲基苯并咪唑、4-甲基苯并咪唑和上述其他非天然碱基的详述(包括合成方法)参见Schweitzer等 *J. Org. Chem.*, 59:7238-7242(1994)。

[0309] 此外,化学替代物,例如交联剂可用于给反应添加额外的稳定性或不可逆性。交联剂的非限制性示例包括例如1,1-二(重氮乙酰基)-2-苯乙烷、戊二醛、N-羟基琥珀酰亚胺

酯,例如与4-叠氮水杨酸的酯、同源双功能亚氨酸酯,包括二琥珀酰亚胺酯如3,3'-二硫代双(琥珀酰亚胺基丙酸酯)、双功能马来酰亚胺如双-N-马来酰亚胺-1,8-辛烷和试剂例如甲基-3-[ (p-叠氮苯基) 二硫] 丙亚酰胺。

[0310] 核苷酸类似物还可包括“锁定”核酸。某些组合物可用于主要“锚定”或“锁定”内源核酸至具体结构中。锚定核酸用于防止核酸复合物的解离,并因此不仅阻止复制还可是使内源核酸的标记、修饰和/或克隆得以实现。锁定结构可调控基因表达(即移植或提高转录或复制),或可用作可稳定结构,其可用于标记或修饰内源核酸序列,或可用于分离内源序列,即用于克隆。

[0311] 核酸分子不限于仅含RNA或DNA的那些分子,还涵盖化学修饰的核苷酸和非核苷酸。非核苷酸或修饰的核苷酸的比例可为1%-100%(如约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90或95%)。

[0312] 核酸制备

[0313] 在一些实施方式中,提供核酸用作试验或例如治疗中的对照或标准。可通过任何本领域已知技术制备核酸,例如化学合成、酶生产或生物生产。核酸可从生物样品中回收或分离。可算可为重组的或其对于细胞来说可为天然或内源的(由该细胞基因组生产)。考虑生物样品可以提高小核酸分子回收率的方式进行处理。通常该方法涉及用具有胍和洗涤剂溶液裂解细胞。

[0314] 核酸合成还可根据标准方法进行。合成核酸的非限制性示例(如合成的寡核苷酸),包括用磷酸三酯、亚磷酸酯,或亚磷酰胺化学法体外化学合成的核酸和固相技术或通过脱氧核苷三磷酸H-磷酸酯中间体。已公开各种不同核苷酸合成机制。

[0315] 核酸可用已知技术分离。在具体实施方式中,可使用分离小核酸分子和/或分离RNA分子的方法。色谱是用于从蛋白质或其他核酸分隔或分离核酸的方法。该方法可涉及凝胶基质电泳、过滤柱、醇沉淀和/或其他色谱。若待使用或评估来自细胞的核酸,方法通常涉及用离液剂(如异硫氰酸胍)和/或洗涤剂(如N-月桂酰肌氨酸)裂解细胞,然后实施分离具体RNA群的方法。

[0316] 方法还可涉及使用有机溶剂和/或醇来分离核酸。在一些实施方式中,加入细胞裂解物的醇含量实现的醇浓度为约55%至60%。虽然可使用不同醇,乙醇较佳。固体支持物可为任何结构,其包括珠、滤器和柱,可包括用负电基团支持的材料或聚合物。玻璃纤维滤器或柱有效进行该分离程序。

[0317] 核酸分离过程有时可包括:a)用含胍的裂解液裂解样品中的细胞,产生胍浓度为至少约1M的裂解物;b)用含酚的萃取溶液从裂解物中萃取核酸分子;c)在裂解物中加入醇溶液以形成裂解物/醇混合物,其中混合物中醇的浓度为约35%-约70%;d)将裂解物/醇混合物施加在固体支持物上;e)用离子溶液从固体支持物上洗脱核酸分子;和f)捕获所述核酸分子。样品可经干燥并在适合后续操作的液体和体积中重悬。

[0318] 基因转移方法

[0319] 为了介导细胞中转基因表达的效果,需要转移表达构建体至细胞中。该转移使用病毒或非病毒型基因转移方法。本部分提供基因转移方法和组合物的讨论。

[0320] 通过将表达载体导入细胞来生成含表达载体的转化细胞。用于转化细胞器官、细胞、组织或生物体以与本发明方法一起使用的多核苷酸递送的合适方法实际包括可将多核

苷酸(如DNA)引入细胞器官、细胞、组织或生物体的任何方法。

[0321] 宿主细胞可用作,且已经用作载体的受主。宿主细胞可源自原核或真核细胞,取决于所需结果是载体的复制或载体编码的多核苷酸序列的部分或全部的表达。多种细胞系和培养物可用于宿主细胞,其可通过美国典型培养物保藏中心(ATCC)获取,该组织是活培养物和基因材料的档案库。在具体实施方式中,宿主细胞是T细胞、肿瘤浸润性淋巴细胞、天然杀伤细胞、或天然杀伤T细胞。

[0322] 可确定合适的宿主。通常这基于载体主链和所需结果。例如可将质粒或粘粒导入原核宿主细胞用于复制许多载体。用作宿主细胞以进行载体复制和/或表达的细菌细胞包括DH5 $\alpha$ 、JM109和KC8,以及许多市售可得的细菌宿主例如SURE<sup>®</sup>感受态细胞和SOLOPACK金细胞(加利福尼亚州拉由拉市 STRATAGENE<sup>®</sup>)。或者,细菌细胞例如大肠杆菌LE392可用于噬菌体病毒的宿主细胞。可用作宿主细胞的真核细胞包括但不限于昆虫和哺乳动物。用于载体复制和/或表达的哺乳动物真核宿主细胞的示例包括但不限于HeLa、NIH3T3、Jurkat、293、COS、CHO、Saos和PC12。酵母株系的示例包括但不限于YPH499、YPH500和YPH501。

[0323] 核酸疫苗可包括但不限于非病毒DNA载体,“裸”DNA和RNA和病毒载体。用这些疫苗转化细胞的方法和用于优化疫苗中所含基因的表达的方法已知且如本文所述。

[0324] 核酸或病毒载体转移方法的示例

[0325] 任何合适方法可用于转移或转导细胞例如T细胞,或用于给予本方法的核苷酸序列或组合物。本文提供某些示例,还包括例如用阳离子聚合物、脂质样分子和某些市售产物例如IN-VIVO-JET PEI进行递送的方法。

[0326] 1. 离体转化

[0327] 可用各种方法在离体装置中转染从生物体重移出的血管细胞和组织。例如,犬内皮细胞已通过逆转录基因体外转移而遗传改变并移植到犬内(Wilson等Science, 244: 1344-1346, 1989)。在另一个示例中,Yucatan迷你猪内皮细胞通过逆转录病毒体外转染并用双球囊导管移植入动脉(Nabel等Science, 244 (4910): 1342-1344, 1989)。因此,考虑细胞或组织可被移除并用本文所述的多核苷酸离体转染。在具体方面中,可将移植的细胞或组织放入生物体中。例如,动物的树突细胞,用表达载体转染该细胞,然后将该转染或转导细胞重新给予所述动物。

[0328] 2. 注射

[0329] 在某些实施方式中,细胞或核酸或病毒载体可通过一种或多种注射(即针头注射)给予细胞器官、细胞、组织或生物体,所述注射例如皮下、皮内、肌肉内、静脉内、前列腺内、腹膜内注射等。注射方法包括例如含盐水的组合物的注射。其他实施方式包括通过直接微注射将多核苷酸导入。所用表达载体的量可根据抗原的性质以及所用的细胞器官、细胞、组织或生物体而变化。

[0330] 皮内、节点内或淋巴内注射是DC给药的一些更常用的方法。皮内注射通过向血流的低速率吸收和向淋巴系统的快速摄入来表征。真皮中存在大量朗格汉斯(Langerhans)树突细胞以及加工的抗原会直接转运至引流淋巴结。需要合适的位置制备以使其正确进行(即减去头发以观察合适的针头位置)。节点内注射可实现抗原直接递送至淋巴组织。淋巴内注射允许直接给予DC。

### [0331] 3.电穿孔

[0332] 在某些实施方式中,多核苷酸通过电穿孔引入细胞器官、细胞、组织或生物体。电穿孔涉及细胞和DNA悬液暴露至高压放电。本发明一些变体中,某些细胞壁降解酶例如如果胶降解酶用于使靶受体细胞相比未处理细胞更易通过电穿孔转化(美国专利号5,384,253,其通过引用纳入本文)。

[0333] 通过电穿孔转染真核细胞非常成功。通过该方法,小鼠前B淋巴细胞已用人 $\kappa$ -免疫球蛋白基因转染(Potter等(1984) *Proc.Nat'l Acad.Sci.USA*,7161-7165),且大鼠肝实质细胞已用氯霉素乙酰基转移酶基因转染(Tur-Kaspa等(1986) *Mol.Cell Biol.*,6,716-718)。

[0334] 疫苗或eVac的体内电穿孔临床上通过简单注射技术实施。编码肿瘤抗原的DNA载体皮内注射给患者。然后电极将电脉冲施加在皮内空间,引起该处细胞(尤其是留存的树突细胞)摄取DNA载体并表达编码的肿瘤抗原。这些肿瘤抗原表达树突细胞通过局部炎症活化,然后可转移至淋巴结,呈递肿瘤抗原并初免肿瘤抗原特异性T细胞。当用在(例如但不限于)注射核酸或以其他方式给予核酸后用电穿孔给予核酸时(所述核酸可通过电穿孔递送至细胞),其通过电穿孔给予。

[0335] 电穿孔方法在(例如) Sardesai,N.Y.,和Weiner,D.B.,*Current Opinion in Immunotherapy* 23:421-9(2011)和Ferraro,B.等*Human Vaccines* 7:120-127(2011)中描述,其通过引用全文纳入本文。

### [0336] 4.磷酸钙

[0337] 在其他实施方式中,多核苷酸用磷酸钙沉淀法引入细胞。人KB细胞已用该技术通过腺病毒5DNA(Graham和van der Eb,(1973) *Virology*,52,456-467)进行转染。同样用该方法,小鼠L(A9)、小鼠C127、CHO、CV-1、BHK、NIH3T3和HeLa细胞用新霉素标志物基因转染(Chen和Okayama,*Mol.Cell Biol.*,7(8):2745-2752,1987),且大鼠肝实质细胞通过各种标记基因转染(Rippe等*Mol.Cell Biol.*,10:689-695,1990)。

### [0338] 5.DEAE-右旋糖苷

[0339] 在另一实施方式中,多核苷酸用DEAE-右旋糖酐然后用聚乙二醇递送至细胞。该方法中,报告质粒引入小鼠骨髓瘤和红白血病细胞(Gopal,T.V.,*Mol Cell Biol.*1985年5月;5(5):1188-90)。

### [0340] 6.超声加载

[0341] 其他实施方式包括通过直接超声加载将多核苷酸导入。LTK-成纤维细胞已通过超声加载用胸苷激酶基因转染(Fechheimer等(1987) *Proc.Nat'l Acad.Sci.USA*,84,8463-8467)。

### [0342] 7.脂质体介导的转染

[0343] 其他实施方式中,多核苷酸可包埋在脂质复合物中例如脂质体。脂质体是水泡性结构,特征为磷脂双层膜和内部水性介质。多层脂质体具有水性介质隔开的多重脂质层。当磷脂悬浮在过量水溶液中时其自动形成。脂质组分经过自重排列,然后形成紧密结构并将水包埋在内,并溶解脂双层之间的溶质(Ghosh和Bachhawat,(1991)载于:肝脏疾病、采用特异性受体和配体的靶向诊断与治疗(*Liver Diseases,Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands*).87-104页)。还考虑用Lipofectamine(Gibco

BRL公司)或Superfect(凯杰公司)复合的多核苷酸。

#### [0344] 8. 受体介导的转染

[0345] 此外,多核苷酸可通过受体介导的递送载剂递送至靶细胞。这通过靶细胞中发生的受体介导的内吞作用利用大分子的选择性摄取。考虑各种受体的细胞类型特异分布,该递送方法增加另一程度的特异性。

[0346] 某些受体介导的基因靶向载剂包含细胞受体特异性配体和多核苷酸结合剂。其他包括细胞受体特异性配体,待递送的多核苷酸以可操作地与之结合。数种配体以用作受体介导的基因转移(Wu和Wu,(1987) *J. Biol. Chem.*, 262-4432;Wagner等 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87(9):3410-3414,1990;Perales等 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:4086-4090,1994;Myers, EP0 0273085),其建立了该技术的可操作性。已讨论任何哺乳细胞类型的环境中的特异递送(Wu和Wu, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 12:159-167,1993;其通过引用纳入本文)。在某些方面,选择配体以对应靶细胞群上表达的受体特异性。

[0347] 在其他实施方式中,细胞特异的多核苷酸靶向载剂的多核苷酸递送载剂组分可包括与脂质体组合的特异结合配体。待递送的多核苷酸包埋在脂质体中且特异结合配体功能性纳入到脂质体膜中。该脂质体因此特异结合靶细胞的受体并递送该内容至细胞。已表明此类系统在(例如)表皮生长因子(EGF)用在受体介导的多核苷酸向细胞的递送中的系统中有功能,所述细胞表现出EGF受体下调。

[0348] 在其他实施方式中,靶递送载剂的多核苷酸递送载剂组分为脂质体自身,其可例如包含直接细胞特异性结合的一种或多种脂质或糖蛋白。例如,乳糖基(lactosyl)-神经酰胺、半乳糖-末端无唾液酸神经节苷脂已被纳入脂质体中并观察到肝实质细胞对胰岛素基因摄取的增加(Nicolau等(1987) *Methods Enzymol.*, 149, 157-176)。考虑细胞特异性转化构建体可用类似方式特异递送至靶细胞内。

#### [0349] 9. 微粒轰击

[0350] 微粒轰击技术可用于将多核苷酸导入至少一种细胞器官、细胞、组织或生物体内(美国专利号5,550,318;美国专利号5,538,880;美国专利号5,610,042;和PCT申请W0 94/09699;各通过引用纳入本文)。该方法基于将DNA包被微粒加速至高速的能力以,使其穿透细胞膜并进入细胞而不杀死细胞(Klein等(1987) *Nature*, 327, 70-73)。本领域已知各种微粒轰击技术,许多可用于本方法。

[0351] 该微粒轰击中,一种或多种颗粒可包被有至少一种多核苷酸并通过推入力将其递送至细胞。已开发加速小颗粒的数种装置。一种该装置依赖高压放电以产生电流,继而提供原动力(Yang等(1990) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 87-9572)。所用微颗粒由生物惰性物质组成,例如钨或金颗粒或珠。示例性颗粒包括由钨、铂、和(某些示例中)金组成的颗粒,包括例如纳米颗粒。考虑一些情况中,DNA沉积在金属颗粒上不需要用微粒轰击将DNA寄送至受体细胞。然而考虑颗粒可能含DNA而非用DNA包被。DNA包被颗粒可增加DNA通过颗粒轰击的递送水平,但就其本身而言并非必须。

#### [0352] 病毒载体介导的转移的方法示例

[0353] 本发明可使用适于将核苷酸序列或含核苷酸序列的组合物给予细胞或对象的任何病毒载体,从而所述细胞或对象中的细胞可表达该核苷酸序列编码的基因。在某些实施方式中转基因纳入到病毒颗粒中以介导基因向细胞的转移。通常,病毒会在生理条件下简

单暴露于合适的宿主细胞,允许病毒的摄入。本方法优选使用各种病毒载体,如下所述。

[0354] 1.腺病毒(Adenovirus)

[0355] 腺病毒特别适用于基因转移载体,因为其适中的DNA基因组大小、容易操作、高效价、较宽的细胞范围和高感染型。约36kb病毒基因组由100-200碱基对(bp)的反向末端重复(ITR)所限定,其中含有病毒DNA复制和包装必须的顺式作用元件。含不同转录单元的基因组的早期(E)和晚期(L)区域由病毒复制的发生而分开。

[0356] E1区域(E1A和E1B)编码负责病毒基因组和少量细胞基因的转录调控的蛋白质。E2(E2A和E2B)区域的表达导致用于病毒DNA复制的蛋白质的合成。这些蛋白质参与DNA复制后期基因表达和宿主细胞关闭(Renan, M. J. (1990) *Radiother Oncol.*, 19, 197-218)。后期基因(L1、L2、L3、L4和L5)(包括主要的病毒衣壳蛋白)的生产仅在主要晚期启动子(MLP)提供的单一初级转录本的重要加工后表达。MLP(位于16.8图单元)在感染的晚期特别有效,从该启动子提供的所有mRNA都具有5'三联引导(TL)序列,这使其有用于翻译。

[0357] 为了就基因治疗对腺病毒进行优化,需要最大化携带能力,从而可包括大片段DNA。还非常需要降低某些腺病毒产物关联的毒性和免疫反应。某种程度上,两个目的是一致的,因为消除腺病毒基因作用于二者。通过实施本发明,可能实现这些目的,而保留治疗构建体相对简单的操作能力。

[0358] 可发生DNA的较大置换,这是因为病毒DNA复制所需的顺式元件都位于线性病毒基因组任一端反向末端重复(ITR)(100-200bp)中。含ITR's的质粒可在非缺陷型腺病毒存在下复制(Hay, R. T., 等 *J Mol Biol.* 1984年6月5日; 175(4): 493-510)。因此,腺病毒载体中包含这些元件可允许复制。

[0359] 此外,病毒包封的包装信号位于病毒基因组左端处的194-385bp(0.5-1.1图定位单元)之间(Hearing等 *J. (1987) Virology*, 67, 2555-2558)。该信号模拟病毒噬菌体 $\phi$ DNA中蛋白质识别位点,其中紧邻左端但位于粘性末端序列外侧的特定序列介导对将DNA插入头部结构所需的蛋白质的结合。Ad的E1取代载体已证明病毒基因组左端处的450bp(0-1.25图单元)片段能指导293细胞中的包装(Levero等 *Gene*, 101: 195-202, 1991)。

[0360] 之前已显示腺病毒基因组的某些区域可纳入哺乳动物细胞的基因组中,从而其编码的基因发生表达。这些细胞系能支持该细胞系编码的腺病毒功能中缺失的腺病毒载体的复制。还已报道复制缺陷型腺病毒载体由“辅助”载体互补,例如野生型病毒或条件缺陷型突变体。

[0361] 复制缺陷型腺病毒载体可由辅助病毒反式互补。由于存在辅助病毒(需要提供复制功能)会污染任何制备,该发现本身并不允许对复制缺陷型载体的分离。因此,需要能为复制缺陷型载体的复制和/或包装加入特异性的其他元件。所述元件赋予腺病毒载体的包装功能。

[0362] 已显示腺病毒载体的包装信号存在于常规腺病毒图谱的左端(Tibbetts等(1977) *Cell*, 12, 243-249)。后续研究显示在基因组的E1A(194-358bp)区域存在缺失的突变体生长较差,即使是在补充了早期(E1A)功能的细胞系中亦是如此(Hearing和Shenk, (1983) *J. Mol. Biol.* 167, 809-822)。当补偿腺病毒DNA(0-353bp)重组入突变体的右端时,病毒正常包装。进一步的突变分析在到Ad5基因组的左端中鉴定到短、重复、位置依赖性元件。发现若基因组的任一端存在该重复的一拷贝,则足以有效包装,但当向Ad5 DNA分子的内部移动时

并非如此 (Hearing等J. (1987) *Virology*, 67, 2555-2558)。

[0363] 通过使用突变形式的包装信号,可形成包装有不同效率的的辅助病毒。通常,突变是点突变或缺失。当具有低包装效率的辅助病毒在辅助细胞中生长时,所述病毒被包装(尽管相比野生型病毒其速率变低),从而允许该辅助子增殖。然而,当这些辅助病毒与含野生型包装信号的病毒在细胞中一起生长时,野生型包装信号相比突变形式而被优先识别。给定有限量的包装因子时,含野生型信号的病毒与辅助病毒相比发生选择性包装。如果偏好性足够大,应可获得接近均一性的原种。

[0364] 为了改善ADV构建体对具体组织或物种的趋向性,受体结合纤维序列常可在腺病毒分离物之间替换。腺病毒5中发现的例如柯萨奇腺病毒受体(CAR)配体可替代来自腺病毒35的CD46结合纤维序列,使得病毒具有对人造血细胞具有显著改善的结合亲和性。得到的“假型”病毒Ad5f35是数种临床开发的病毒分离物的基础。此外,存在各种生物化学方法以修饰纤维来使病毒重靶向至靶细胞,例如T细胞。这些方法包括使用双功能抗体(一端结合CAR配体,一端结合靶序列),和纤维的代谢生物素化以允许其与个体的基于亲和素的嵌合配体相关联。或者,可将配体(如通过异双功能接头(如包含PEG)的抗CD205)结合至腺病毒颗粒。

[0365] 2. 逆转录病毒(Retrovirus)

[0366] 逆转录病毒是一组单链RNA病毒,其特征是能够在被感染细胞中通过逆转录过程使其RNA变成双链DNA(Coffin, (1990) 载于:《病毒学》(*Virology*) 编辑,纽约雷文出版社(Raven Press) 第1437-1500页)。然后,所得DNA作为原病毒稳定地整合入细胞染色体中并指导病毒蛋白的合成。整合导致接受的细胞及其后代中保留了该病毒基因序列。逆转录病毒基因组含有三个基因gag, pol和env,它们分别编码衣壳蛋白、聚合酶和包膜成分。gag基因上游所发现的序列(称为Y)起着基因组包装进入毒粒的信号作用。在病毒基因组的5'和3'端有两个长末端重复序列(LTR)。它们含有强的启动子和增强子序列,并且也是整合入宿主细胞基因组所需的(Coffin, 1990)。因此,例如,本文技术包括例如细胞,其中用于转导细胞的多核苷酸整合入细胞基因组中。

[0367] 为了构建逆转录病毒载体,将编码启动子的核酸插入病毒基因组中代替某些病毒序列,产生复制缺陷型病毒。为了生产毒粒,构建一个含有gag, pol和env基因但没有LTR和psi组件的包装细胞系(Mann等(1983) *Cell*, 33, 153-159)。当将含有人cDNA以及逆转录病毒LTR和psi序列的重组质粒导入该细胞系(例如通过磷酸钙沉淀)中时,psi序列使得重组质粒的RNA转录物包装进入病毒颗粒,然后该病毒颗粒被分泌到培养基中(Nicolas, J.F., 和 Rubenstein, J.L.R., (1988) 载于:《载体:分子克隆载体及其应用的调查》(*Vectors: a Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*), Rodriguez和Denhardt编)。Nicolas和Rubenstein; Temin等, (1986) 刊于:《基因传递》(*Gene Transfer*), Kucherlapati (编辑), 纽约:普莱纽姆出版社(Plenum Press), 149-188页; Mann等, 1983)。然后收集含有重组逆转录病毒的培养基,任选方法进行浓缩,并用于基因转移。逆转录病毒载体能感染各类细胞。然而,许多类型的逆转录病毒的整合和稳定表达需要宿主细胞的分裂(Paskind等(1975) *Virology*, 67, 242-248)。

[0368] 基于通过向病毒包膜化学添加半乳糖残基对逆转录病毒进行的化学修饰开发了设计使逆转录病毒载体特异性靶向的新方法。该修饰能通过脱唾液酸糖蛋白受体来特异性

感染细胞(如肝实质细胞),这应当是所希望的。

[0369] 设计了重组逆转录病毒靶向的不同方法,其中使用针对逆转录病毒包膜蛋白和特定细胞受体的生物素化抗体。用链亲和素通过生物素组分来连接抗体(Roux等(1989) Proc.Nat'l Acad.Sci.USA,86,9079-9083)。使用针对I类和II类主要组织相容性复合物抗原的抗体,它们用亲嗜性病毒在体外显示多种人细胞的感染,这些人细胞带有那些表面抗原(Roux等,1989)。

[0370] 3.腺伴随病毒

[0371] AAV使用约4700碱基对的线性单链DNA。反向末端重复侧接所述基因组。基因组中存在两种基因,产生大量不同基因产物。第一种是帽基因,产生三种不同病毒体蛋白质(VP),称为VP-1、VP-2和VP-3。第二种是rep基因,编码四种非结构蛋白质(NS)。一种或多种这些rep基因产物负责反式活化AAV转录。

[0372] AAV中三种启动子由其图单元中和基因组中的位置表示。它们从左至右为p5、p19和p40。转录产生六种转录本,两种在三个启动子处各自启动,其中各对之一发生拼接。源自图单元42-46的拼接位置对各转录本相同。四种非结构蛋白质看起来源自较长的转录本,三种病毒体蛋白全部产生自最小的转录本。

[0373] AAV不关联人的任何病理状态。有趣的是,为了有效复制,AAV需要病毒的“辅助”功能,所述病毒例如单纯疱疹病毒I和II、巨细胞病毒、伪狂犬病病毒和腺病毒。特征最佳的辅助病毒即为腺病毒,许多该病的“早期”功能显示出对AAV复制的协助。低水平表达AAV rep蛋白质据信能保持AAV结构表现受控,而辅助病毒感染被认为会移除这种限制。

[0374] AAV载体的末端重复可由限制性内切核酸酶消化AAV或质粒(例如p201,其含有修饰的AAV基因组(Samulski等J.Virol.,61:3096-3101(1987)))或通过其他方法而获得,所述其他方法包括但不限于基于已发表的AAV序列化学或酶合成末端重复。可通过例如缺失分析来确定行使功能(即稳定且位点特异的整合)所需的AAV ITR的最小序列或部分。还可确定序列的可以耐受哪些微小修饰而保持末端重复引导稳定稳定且位点特异的整合的能力。

[0375] 基于AAV的载体已被证明是安全且有效的体外基因递送载剂,并且这些载体经潜在在离体和体内基因治疗中大量应用的临床前和临床阶段的开发和测试,(Carter和Flotte,(1995) Ann.N.Y.Acad.Sci.,770:79-90;Chattejee,等(1995) Ann.N.Y.Acad.Sci.,770,79-90;Ferrari等(1996) J.Virol.,70,3227-3234;Fisher等(1996) J.Virol.,70,520-532;Flotte等Proc.Nat'l Acad.Sci.USA,90,10613-10617,(1993);Goodman等(1994),Blood,84,1492-1500;Kaplitt等(1994) Nat'l Genet.,8,148-153;Kaplitt,M.G.,等Ann Thorac Surg.1996年12月;62(6):1669-76;Kessler等(1996) Proc.Nat'l Acad.Sci.USA,93,14082-14087;Koeberl等(1997) Proc.Nat'l Acad.Sci.USA,94,1426-1431;Mizukami等(1996) Virology,217,124-130)。

[0376] AAV介导的肺内有效基因转移和表达已步入囊肿性纤维化治疗的临床试验(Carter和Flotte,1995;Flotte等Proc.Nat'l Acad.Sci.USA,90,10613-10617,(1993))。相似地,通过AAV介导的基因递送抗肌萎缩基因至骨骼肌对肌肉萎缩症的治疗预期、酪氨酸羟化酶基因递送至大脑对帕金森病的治疗预期、因子IX基因递送至肝脏对B型血友病的治疗预期、以及可能地血管内皮生长因子递送至心脏对心肌梗塞的治疗预期,这些看起来均



有希望,因为最近显示AAV介导的在这些器官中转基因非常有效(Fisher等(1996) J.Virol.,70,520-532;Flotte等1993;Kaplitt等1994;1996;Koeberl等1997;McCown等(1996) Brain Res.,713,99-107;Ping等(1996) Microcirculation,3,225-228;Xiao等(1996) J.Virol.,70,8098-8108)。

#### [0377] 4.其他病毒载体

[0378] 本发明中可采用其它病毒载体作为表达构建物。可采用从病毒如牛痘苗病毒(Ridgeway, (1988) 载于:《载体:分子克隆载体及其应用的调查》(Vectors:A survey of molecular cloning vectors and their uses)第467-492页;和Sugden, (1986) 载于,《基因传递》(Gene Transfer)第117-148页;Coupar等Gene,68:1-10,1988) 金丝雀痘病毒、以及疱疹病毒获得的载体。这些病毒在用于基因转移入不同哺乳动物细胞中提供了几个有利的特性。

[0379] 构建物一旦被传递到细胞内,编码治疗性基因的核酸可定位于不同位置并表达。在某些实施方式中,编码治疗性基因的核酸可以稳定地整合入细胞基因组中。该整合可通过同源重组(基因替换)而在相互的位置和方向上,或是可以整合入随机的非特异性的位置上(基因增加)。在其他实例中,核酸能以分离的DNA游离片段稳定地保持在细胞内。这种核酸片段或“附加体”编码的序列足以能维持于宿主细胞周期之外或与细胞同步进行复制。表达构建物怎样传递到细胞内、核酸保留在细胞内何处,这均取决于所采用的表达构建物的类型。

#### [0380] 治疗疾病的方法

[0381] 本发明还涵盖治疗或预防疾病的方法,其中所述给予(例如通过输注)所述细胞可能有益。

[0382] 细胞例如T细胞、肿瘤浸润性淋巴细胞、天然杀伤细胞、TCR-表达细胞、天然杀伤T细胞、或祖细胞例如造血干细胞、间充质基质细胞、干细胞、多潜能干细胞和胚胎干细胞可用作细胞治疗。所述细胞可来自供体或可为获自患者的细胞。所述细胞可例如用于再生从而例如替代疾病细胞的功能。所述细胞还可经修饰以表达异源基因从而生物试剂可递送至特定微环境例如疾病骨髓或转移性沉积物。间充质干细胞还可例如用于提供免疫抑制活性,且可用于治疗移植物抗宿主病和自体免疫紊乱。本发明提供的细胞包含安全开关,其在细胞治疗后治疗性细胞的活性需要移除、提高或降低时有价值。例如,当表达嵌合抗原受体的祖细胞T细胞提供给患者时,在一些情况中可能有副作用,例如细胞不是当地分化为更成熟的细胞类型或不想要的侵入到其他组织产生脱靶毒性。停止给予配体会使治疗T细胞返回至非活性状态,保持低、非毒性水平表达。或者例如,当需要移除治疗性细胞时。治疗性细胞可用于减少肿瘤细胞或降低肿瘤大小,且可不再需要。该情况中,可停止给予配体,且所述治疗细胞不在被活化。若初始治疗后肿瘤细胞恢复或肿瘤大小增加,可再次给予配体,从而活化表达嵌合抗原受体的T细胞并再次治疗患者。

[0383] “治疗性细胞”表示用于细胞治疗的细胞,即给予对象以治疗或预防病症或疾病的细胞。

[0384] 术语“单位剂量”涉及接种量,表示适于哺乳动物的单一剂量的物理离散单元,各单元含预定量的药物组合物,其经计算以关联所需稀释度来产生所需免疫刺激效果。接种量的单位剂量的的说明基于药物组合物和待实现的特定免疫效果的独特特征并由其表示。

[0385] 有效量的药物组合物(例如本文所述多聚化配体)为获得所选活化诱导型嵌合信号传导分子表达T细胞(例如超过60%、70%、80%、85%、90%、95%、或97%,或低于80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、或10%的治疗性细胞被活性化)所需的量。该术语与“足量”同义。有效量还可为实现所需治疗响应的量,所述治疗响应例如相比给予配体诱导剂之前时的状况,降低肿瘤大小、降低肿瘤细胞水平、或降低表达CD19的白血病细胞的量。

[0386] 任何具体应用的有效量可根据下述条件而不同:治疗疾病或病症的因子、给药的具体组合物、对象大小、和/或疾病或病症的严重程度。可凭经验确定本文所述具体组合物的有效量而无需过度的必需实验。

[0387] 本文所用术语“接触”和“暴露”用于细胞、组织或生物体时,描述药物组合物和/或其他试剂(例如化疗或放疗试剂)递送给靶细胞、组织或生物体或放置成与所述靶细胞、组织或生物体直接并置所用的方法。为了实现细胞杀伤或静止,以有效杀死所述细胞或阻止其分裂的结合量将药物组合物和/或其他试剂递送给细胞。

[0388] 给予药物组合物可领先、同时和/或晚于其他试剂,间隔范围数分钟至数周。在所述药物组合物和其他试剂对所述细胞、组织或生物体分别应用的实施方式中,一般需保证各递送的时间之间没有显著的时间段,从而所述药物组合物和试剂仍可在细胞、组织或生物体上产生有利的组合效果。例如该示例中,考虑可将细胞、组织或生物体与2、3、4或更多方案和所述药物组合物基本同时(即少于约1分钟以内)接触。在其他方面,给予所述表达载体之前和/或之后,可将一种或多种试剂从基本同时、约1分钟、至约24小时或至约7天至约1至约8周或更多时间以及其任何延伸范围内给予。此外,可使用本文药物组合物的各种组合方案和一种或多种试剂。

#### [0389] 优化和个性化治疗

[0390] 配体诱导剂的剂量和给药防范可根据确定待处理疾病或病症的水平而优化。例如,可确定患者体内可能残留的任何残留实体瘤的大小、或靶细胞例如肿瘤细胞或表达CD19的B细胞的水平。

[0391] 例如,初始治疗后确定患者具有临床相关水平的肿瘤细胞或实体瘤给医师提供了可能需要通过给予多聚化配体来活化细胞从而活化嵌合抗原受体表达T细胞。在另一示例中,确定患者用多聚化配体治疗后具有低水平肿瘤细胞或降低的肿瘤大小可指示医师不需要额外剂量的多聚化配体。相似地,用多聚化配体治疗后,确定患者继续表现疾病或病症或症状复发可指示医师可能需要给予至少一个额外剂量的多聚化配体。术语“剂量”包括药剂的量和给药频率,例如下次药剂的时间。术语“剂量水平”指相对对象体重给予的多聚化配体的量。因此提高剂量水平会提高相对对象体重所给予的配体量。此外,提高给药浓度(例如当用连续输注泵给予多聚化配体)意味着每分钟或每秒钟给药浓度提高(因此所给药量也提高)。

[0392] 因此,例如在某些实施方式中,所述方法还包括:相对给予所述多聚化配体之后的肿瘤尺寸和/或肿瘤细胞数量,确定对象中肿瘤尺寸是否增加和/或肿瘤细胞数量是否增加,和在确定肿瘤尺寸增加和/或肿瘤细胞数量增加的事件中给予所述对象额外剂量的所述多聚化配体。所述方法还包括例如,相对给予所述多聚化配体之后的表达CD19的B细胞的水平,确定对象中表达CD19的B细胞是否增加,和在确定对象中表达CD19的B细胞增加的事件中给予所述对象额外剂量的所述多聚化配体。在这些实施方式中,例如,根据本发明方法

所述患者初始用治疗细胞和配体处理。初始处理后,肿瘤大小、肿瘤细胞数量或表达CD19的B细胞数量可例如相对初始处理后降低。初始处理后的某一时间,再次测试患者,或可继续监控所述患者的疾病病症。若确定了例如肿瘤大小、肿瘤细胞数量、或表达CD19的B细胞数量相对刚进行初始处理后的时间有所增加,则可给予额外剂量的配体。该监控和处理程序可持续,由于表达诱导型嵌合信号传导分子的细胞保留在患者中,虽然在没有其他配体时其是以相对失活的状态。

[0393] 可以任何方便的方式提供调节或维持后续药量的指示,例如多聚化配体的后续剂量和/或后续药物剂量。在一些实施方式中可以表格形式提供指示(如物理或电子介质)。例如,可在表格中提供样品中肿瘤细胞大小或肿瘤细胞的数量或水平,且医师可将病症与疾病的阶段列表或表格进行比较。然后医师可从表格中确定后续药物剂量的指示。在某些实施方式中,可在将病症提供给计算机(如输入计算机储存)后通过计算机显示(如显示器显示)指示。例如,该信息可提供给计算机(如通过用户输入计算机储存或通过计算机网络的远程设备传递给计算机),计算机中的软件可生成调节或维持后续药物剂量的指示和/或提供后续药物药剂含量。

[0394] 基于指示确定后续剂量后,医师可给予后续剂量或提供调节剂量的指令给他人或另一实体。本文术语“医师”指做决定者,在某些实施方式中医师是医药专家。在一些实施方式中,做决定着可为计算机或显示的计算机程序输出,健康服务提供者可按指示或计算机显示的后续药物剂量操作。做决定者可直接(如给对象输注后续剂量)或远程(如做决定者可远程改变抽吸参数)给予所述后续剂量。

[0395] 本文提供的方法包括但不限于递送有效量的活化细胞、核酸或编码该核酸的的表达构建体。通常有效量的药物组合物定义为足以检测并重复实现所需结果的含量,所述结果例如缓解、降低、最小化或限制疾病或病症发展。可使用其他更严格限定,包括消除、根除或治愈疾病。在一些实施方式中,可具有监控生物标志物以评估治疗效果和控制毒性。

[0396] 提高免疫应答

[0397] 在一些实施方式中,考虑DC活化策略,纳入活化生物学通路的信号传导共刺激多肽的操作,所述通路例如免疫学通路,例如NF- $\kappa$ B通路、Akt通路、和/或p38通路。该DC活化系统可与标准疫苗联用或不与其联用以增强免疫应答,因其取代了APC活化期间对CD4<sup>+</sup>T细胞辅助的需求(Bennett, S.R., 等, .Nature, 1998年6月4日 .393: 第478-80页;Ridge, J.P., D.R.F, 和P.Nature, 1998年6月4日 .393: 第474-8页;Schoenberger, S.P., 等, Nature, 1998年6月4日 .393: 第480-3页)。因此,本文所述DC活化系统通过避免对生产II类MHC特异肽的需求而提高免疫应答。

[0398] 在一些实施方式中,DC活化通过CD40活化。因此,通过内源CD40/CD40L相互作用的DC活化可经过负反馈引起的下调,迅速引起“IL-12用尽效应”。CD40活化的7-10小时内,CD40的另外拼接同种型(II型)作为可分泌因子得以生产(Tone, M., 等, Proc Natl Acad Sci U S A, 2001.98(4): 第1751-1756页)。II型CD40可作为显性阴性受体,通过CD40L下调信号传导并可能限制所产生的免疫应答的能力。因此,本发明通过生成诱导型CD40(iCD40)(缺少胞外结构域继而被通过化学诱导二聚化(CID)合成的二聚化配体活化(Spencer, D.M., 等, Science, 1993.262: 第1019-1024页))而吸纳(co-opt)CD40的天然调节。

[0399] 包括提高对象免疫应答的方法,包含给予对象表达载体、表达构建体或转导细胞

的步骤。表达载体编码共刺激多肽例如iCD40。

[0400] 在一些实施方式中,细胞在动物中,例如人、非人灵长类、牛、马、猪、绵羊、山羊、狗、猫或啮齿类。该对象可为例如动物,例如哺乳动物例如人、非人灵长类、牛、马、猪、绵羊、山羊、狗、猫或啮齿类。该对象可为例如人例如患有感染疾病的患者和/或免疫受损的对象,或患有过度增殖疾病的对象。

[0401] 在其他实施方式中,表达构建体和/或表达载体可用作活化细胞的组合物或物质。该组合物“活化细胞”或“提高细胞活性”表示体积一种或多种细胞相关活性的能力。例如,组合物例如本文所述表达构建体或载体可刺激细胞上的共刺激分子的上调、诱导细胞中NF- $\kappa$ B的核易位,活化细胞中的tol1样受体或其他设计细胞因子或区划因子的活性。

[0402] 表达构建体、表达载体和/或转导细胞可增加或引起疫苗的有效性,通过例如提高弱抗原(例如高纯度或重组的抗原)的免疫原性、降低免疫应答所需的抗原的量、降低提供保护性免疫所需的免疫频率、改善低或弱免疫应答的对象(例如新生、年长和免疫受损个体)中疫苗的免疫效力、和提高靶组织的免疫例如肌肉免疫、或通过引发具体细胞因子概况而改善细胞介导免疫或体液免疫。

[0403] 在一些实施方式中,所述细胞还接触抗原。通常,细胞离体接触抗原。有时,细胞体内接触抗原。在一些实施方式中,所述细胞在对象中且免疫应答针对所述抗原产生。有时,免疫应答是细胞毒性T淋巴细胞(CTL)免疫应答。有时,免疫应答针对肿瘤抗原生成。在某些实施方式中,所述细胞被激活而无需添加佐剂。

[0404] 在一些实施方式中,所述细胞经离体转导核酸并通过皮内给药给予对象。在一些实施方式中,所述细胞经离体转导核酸并通过皮下给药给予对象。有时,所述细胞经离体转导有所述核酸。有时,所述细胞经体内转导有所述核酸。

[0405] 在一些实施方式中,细胞可用编码嵌合蛋白质的核酸离体转导或体内转导。细胞可在细胞与多聚化配体接触的同时对抗原敏化或细胞可在于多聚化配体接触之前对所述抗原预敏化。在一些实施方式中,细胞离体接触抗原。在一些实施方式中,细胞用核酸离体转导并通过皮内给药给予对象,且有时细胞用核酸离体转导并通过皮下给药给予对象。抗原可为肿瘤抗原,且CTL免疫应答可通过细胞迁移至引流淋巴结而受到诱导。肿瘤抗原是引发宿主免疫应答的任何抗原,例如肽或多肽。肿瘤抗原可为与肿瘤细胞相关的肿瘤相关抗原。

[0406] 在一些实施方式中,免疫受损的个体或对象是免疫应答减低或减弱的对象。该个体还可包括经过化疗或任何其他治疗而导致免疫系统变弱的对象、移植受体、正在进行免疫抑制的对象、年长个体、或CD4 T辅助细胞减少和/或受损的任何个体。考虑本发明可用于提高免疫受损对象中的CD4 T辅助细胞的含量和/或活性。

[0407] 用靶抗原攻击

[0408] 在具体实施方式中,给予转导细胞之前,细胞受到抗原(本文还称为“靶抗原”)攻击。攻击后,转导的负载细胞经胃肠外、皮内、节内、或淋巴管内给予对象。其他胃肠外途径包括但不限于皮下、肌肉内、腹膜内、静脉内、动脉内、心肌内、经心内膜、经心外膜、鞘内、前列腺内、肿瘤内或输注技术。

[0409] 本文所述靶抗原是抗原或抗原上的免疫学表位,其在免疫识别和最终消除或控制引起疾病的试剂或控制动物疾病状态中至关重要。免疫识别可为细胞的和/或体液的。在细

胞内病原体和癌症中,免疫识别可为例如T淋巴细胞响应。

[0410] 靶抗原可源自或分离自例如病原微生物例如病毒包括HIV (Korber等编HIV分子免疫数据库(HIV Molecular Immunology Database),洛斯阿拉莫斯国家实验室(Los Alamos National Laboratory),洛斯阿拉莫斯,N.Mex.1977)、流感病毒、单纯疱疹病毒、人乳头瘤病毒(美国专利号5,719,054)、乙肝病毒(美国专利号5,780,036)、丙肝病毒(美国专利号5,709,995)、EBV、巨细胞病毒(CMV)等。靶抗原可源自或分离自例如病原细菌例如衣原体(美国专利号5,869,608)、分枝杆菌、军团杆菌、脑膜炎双球菌、A群链球菌、沙门菌、利斯特菌、流感嗜血杆菌(美国专利号5,955,596)等。

[0411] 靶抗原可源自或分离自例如病原体酵母,包括黑曲霉、侵入性念珠菌(美国专利号5,645,992)、诺卡菌、组织胞浆菌、隐孢子等。

[0412] 靶抗原可源自或分离自例如病原体原生动植物和病原体寄生虫,包括但不限于卡氏肺囊虫、克氏锥虫、利什曼原虫(美国专利号5,965,242)、疟原虫(美国专利号5,589,343)和弓形虫。

[0413] 靶抗原包括与肿瘤发生前状态和增生状态相关联的抗原。靶抗原还可与癌症或其致病性关联。该靶抗原可为例如肿瘤特异抗原、肿瘤相关抗原(TAA)或肿瘤特异抗原、其表位和其表位激动剂。该靶抗原包括但不限于癌胚抗原(CEA)和其表位例如CAP-1、CAP-1-6D等(GenBank登录号.M29540)、MART-1(Kawakarni等,J.Exp.Med.180:347-352,1994)、MAGE-1(美国专利号5,750,395)、MAGE-3、GAGE(美国专利号5,648,226)、GP-100(Kawakami等Proc.Nat'l Acad.Sci.USA91:6458-6462,1992)、MUC-1、MUC-2、点突变ras癌基因、正常和点突变p53癌基因(Hollstein等Nucleic Acids Res.22:3551-3555,1994)、PSMA(Israeli等Cancer Res.53:227-230,1993)、酪氨酸酶(Kwon等PNAS 84:7473-7477,1987)TRP-1(gp75)(Cohen等Nucleic Acid Res.18:2807-2808,1990;美国专利号5,840,839)、NY-ESO-1(Chen等PNAS 94:1914-1918,1997)、TRP-2(Jackson等EMBOJ,11:527-535,1992)、TAG72、KSA、CA-125、PSA、HER-2/neu/c-erb/B2、(美国专利号5,550,214)、BRC-I、BRC-II、bcr-abl、pax3-fkhr、ews-fli-1、TAA修饰和组织特异抗原、TAA剪接变体、表位激动剂等。其他TAA通过本领域已知方法进行鉴定、分离和克隆,例如美国专利号4,514,506所述。靶抗原还可包括一种或多种生长因子和各剪接变体。

[0414] 抗原可在癌细胞中以比非癌细胞中更高的频率表达。该抗原可源自修饰的树突细胞与前列腺特异膜抗原(例如前列腺特异膜抗原(PSMA)或其片段)之间的接触。

[0415] 前列腺抗原(PA001)是由PSMA抗原的胞外部分组成的重组蛋白质。PSMA是约100kDa(糖基化之前为84kDa,作为二聚体为约180kDa)的II型膜蛋白,具有神经肽和叶酸水解酶活性,但PSMA的真正功能尚不清楚。Carter RE,等,Proc Natl Acad Sci U S A.93:749-53,1996;Israeli RS,等,Cancer Res.53:227-30,1993;Pinto JT,等,Clin Cancer Res.2:1445-51,1996。

[0416] 表达大部分但非仅为前列腺特异性且在晚期和激素难治性疾病中维持。Israeli RS,等,Cancer Res.54:1807-11,1994.正常组织中弱的非前列腺检测还在涎腺、大脑、小肠、二指肠粘膜、近端肾小管和结肠隐窝中的神经内分泌细胞中观察到。Silver DA,等,Clin Cancer Res.3:81-5,1997;Troyer JK,等,Int J Cancer.62:552-8,1995.此外,PSMA在雄激素剥夺治疗(ADT)后上调。Wright GL,Jr.,等,Urology.48:326-34,1996.虽然大多

数PSMA表达为胞质蛋白质,但交替剪接的跨膜形式是肿瘤前列腺细胞的顶端表面的主要形式。Su SL,等,Cancer Res.55:1441-3,1995;Israeli RS,等,Cancer Res.54:6306-10,1994.

[0417] 此外,PSMA在交联后内化,并且已用于内化结合的抗体或与放射性核苷酸复合的配体或病毒或其他复合的大分子。Liu H,等,Cancer Res.58:4055-60,1998;Freeman LM,等,Q J Nucl Med.46:131-7,2002;Kraaij R,等,Prostate.62:253-9,2005。Bander和同事证明了用微管抑制剂对肿瘤的预处理增加了异常基底侧表面靶向和抗体介导的PSMA内化。Christiansen JJ,等,Mol Cancer Ther.4:704-14,2005。肿瘤靶向可受到在肿瘤血管内皮中观察到PSMA表达而得到促进,所述肿瘤不仅是前列腺中的,还为肾脏和其他肿瘤。Liu H,等,Cancer Res.57:3629-34,1997;Chang SS,等,Urology.57:801-5,2001;Chang SS,等,Clin Cancer Res.5:2674-81,1999.

[0418] PSMA未在对应该良性组织的血管内皮细胞中发现。de la Taille A,等,Cancer Detect Prev.24:579-88,2000。虽然仅一种转移性前列腺疾病的早期组织研究表明仅约50% (18中的8个) 的骨转移瘤 (8个淋巴结转移瘤中有7个) 表达PSMA,更灵敏的试剂<sup>177</sup>Lu-放射标记的MoAb J591 (靶向PSMA的胞外域) 在30各患者中的30个中均可靶向骨和软组织转移瘤的所有已知位点,表明晚期前列腺疾病中的近普遍表达。Bander NH,等,J Clin Oncol.23:4591-601,2005.

[0419] 前列腺特异抗原或PSA旨在包括可针对PSA例如PSMA诱导免疫应答 (例如细胞毒性T淋巴细胞响应) 并且可被任何抗PSA抗体特异识别的任何抗原。本文所用PSA能用于负载细胞,如常规方法测试。因此,“前列腺特异抗原”或“PSA”可例如表示具有PSA的野生型氨基酸序列的蛋白质或包括PSA蛋白质的一部分的多肽。

[0420] 前列腺特异膜抗原或PSMA旨在包括可针对PSMA诱导免疫应答 (例如细胞毒性T淋巴细胞响应) 并且可被任何抗PSMA抗体特异识别的任何抗原。

[0421] 本文所用PSMA能用于负载细胞,如常规方法测试。因此,“前列腺特异膜抗原”或“PSMA”可例如表示具有PSMA的野生型氨基酸序列的蛋白质或包括PSMA蛋白质的一部分的多肽。还包括前述任何的变体,包括例如具有取代和缺失的那些。与野生型PSMA具有不同翻译后加工 (例如糖基化差异) 的蛋白质、多肽和肽也可用于本发明。此外还考虑能诱导针对PSA的免疫应答的各种糖分子。

[0422] PSA例如PSMA多肽可用于装载修饰细胞。在一些实施方式中,修饰细胞接触PSMA多肽片段。在一些实施方式中,PSA例如PSMA多肽片段不包括信号肽序列。在其他实施方式中,修饰细胞接触在多肽中包括氨基酸取代或缺失的PSA例如PSMA多肽片段,且所述片段足以负载细胞。

[0423] 前列腺特异蛋白抗原或PSPA,本文还称其为前列腺特异抗原或PSA,包括可针对前列腺特异蛋白抗原诱导免疫应答 (例如细胞毒性T淋巴细胞响应) 的任何抗原。其包括例如前列腺特异蛋白抗原或前列腺特异抗原。本文所用PSPA能用于负载细胞,如常规方法测试。“前列腺特异抗原”或“PSA”可例如表示具有PSA的野生型氨基酸序列的蛋白质或包括PSA蛋白质的一部分的多肽。

[0424] 前列腺特异膜抗原或PSMA旨在包括可针对PSMA诱导免疫应答 (例如细胞毒性T淋巴细胞响应) 并且可被任何抗PSMA抗体特异识别的任何抗原。本文所用PSMA能用于负载细

胞,如常规方法测试。因此,“前列腺特异膜抗原”或“PSMA”可例如表示具有PSMA的野生型氨基酸序列的蛋白质或包括PSMA蛋白质的一部分的多肽。还包括前述任何的变体,包括例如具有取代和缺失的那些。与野生型PSMA具有不同翻译后加工(例如糖基化差异)的蛋白质、多肽和肽也可用于本发明。此外还考虑能诱导针对PSA的免疫应答的各种糖分子。

[0425] PSPA例如PSMA多肽可用于装载修饰细胞。在一些实施方式中,修饰细胞接触PSMA多肽片段。在一些实施方式中,PSA例如PSMA多肽片段不包括信号肽序列。在其他实施方式中,修饰细胞接触在多肽中包括氨基酸取代或缺失的PSPA例如PSMA多肽片段,且所述片段足以负载细胞。

[0426] 肿瘤抗原是引发宿主针对肿瘤的免疫应答的任何抗原,例如肽或多肽。肿瘤抗原可为与肿瘤细胞相关的肿瘤相关抗原。

[0427] 前列腺癌抗原或PCA是引发宿主针对前列腺癌肿瘤的免疫应答的任何抗原,例如肽或多肽。前列腺癌抗原可对前列腺癌肿瘤特异或不特异。前列腺癌抗原还可引发针对其他类型肿瘤或肿瘤细胞的免疫应答。前列腺癌抗原包括例如前列腺特异蛋白抗原、前列腺特异抗原和前列腺特异膜抗原。

[0428] 细胞可通过各种方法与肿瘤抗原接触,例如PSA例如PSMA多肽,所述方法包括例如用未分级肿瘤裂解物、MHC洗脱的肽、肿瘤衍生的热激蛋白(HSP)、肿瘤相关抗原(TAA(肽或蛋白))脉冲未成熟的DC,或用块状肿瘤mRNA或编码TAA的mRNA转染DC(如Gilboa,E.和Vieweg,J.,*Immunol Rev* 199,251-63(2004);Gilboa,E,*Nat Rev Cancer* 4,401-11(2004)中综述)。

[0429] 对于含DNA基因组的生物体,编码靶抗原或其感兴趣的免疫学表位的基因分离自基因组DNA。对于含RNA基因组的生物体,所需基因可分离自基因组的cDNA拷贝。若可获得基因组的限制性图谱,则含感兴趣基因的DNA片段通过常规方法用限制性内切酶切割。在所需基因已被先前克隆的情况中,该基因可容易地从可得的克隆中获得。或者,若基因的DNA序列已知,所述基因可用合成脱氧核糖核酸的任何常规技术进行合成。

[0430] 编码感兴趣抗原的基因可通过例如克隆入细菌宿主而扩增。为此,可使用各种原核克隆载体。示例为质粒pBR322、pUC和pEMBL。

[0431] 编码至少一种靶抗原或其免疫学表位的基因可制备用于通过标准技术插入设计用于与病毒重组的质粒载体中。通常,克隆的基因可用限制性酶消化而从原核克隆载体上剪切。在多数情况中,剪切片段含有基因的完整编码区域。载有克隆基因的DNA片段可按需修饰,例如使片段末尾与用于与病毒重组的DNA载体的插入位置相容,然后纯化,之后于限制性内切酶切割位置(克隆位置)插入载体。

[0432] 细胞例如树突细胞的抗原负载可通过例如接触细胞(例如树突细胞或祖细胞)和抗原(例如通过孵育细胞和抗原)来实现。负载还可通过例如孵育编码抗原内的DNA(裸或在质粒载体中)或RNA;或与表达抗原的重组细菌或病毒(例如牛痘、禽痘、腺病毒或慢病毒载体)。装载前,抗原可共价偶联至提供T细胞辅助(例如运载分子)的免疫学伴侣。或者,树突细胞可单独地或存在多肽时用未偶联的免疫学伴侣脉冲。来自细胞的抗原或MHC分子可通过酸洗或其他方法获得(参见Zitvogel L,等,*J Exp Med* 1996.183:87-97)。该细胞可在细胞负载抗原之前、之后或同时用本文所述的编码嵌合蛋白质的核苷酸序列转导或转染。在具体实施方式中,抗原负载在转导或转染之后。

[0433] 在其他实施方式中,转导细胞用肿瘤细胞mRNA转染。转导的转染细胞给予动物以实现细胞毒性T细胞和天然杀伤细胞抗肿瘤抗原免疫应答,并用二聚化FK506和二聚化FK506类似物调控。肿瘤细胞mRNA可为例如前列腺肿瘤细胞的mRNA。

[0434] 在一些实施方式中,转导细胞可通过用肿瘤细胞裂解物进行脉冲而负载。经脉冲的转染细胞给予动物以实现细胞毒性T细胞和天然杀伤细胞抗肿瘤抗原免疫应答,并用二聚化FK506和二聚化FK506类似物调控。肿瘤细胞裂解物可为例如前列腺肿瘤细胞的裂解物。

[0435] 免疫细胞和细胞毒性T淋巴细胞响应

[0436] T淋巴细胞可通过接触含本文所述表达载体的细胞来得到活化,其中所述细胞用抗原攻击、转染、脉冲或电融合。

[0437] T细胞在其膜上表达独特的抗原结合受体(T细胞受体),其仅可识别与其他细胞表面上的主要组织相容性(MHC)分子关联的抗原。T细胞有数种群体,例如T辅助细胞和T细胞毒性细胞。T辅助细胞和T细胞毒性细胞主要区别是其对膜结合糖基化蛋白质CD4和CD8的分别展示。T辅助细胞分泌对B细胞、T细胞毒性细胞、巨噬细胞和免疫系统其他细胞的活化至关重要的各种淋巴因子。相反,识别抗原MHC复合物的原初CD8 T细胞增殖并分化为效应细胞,称为细胞毒性CD8 T淋巴细胞(CTL)。CTL通过生产导致细胞裂解的物质来消除展示抗原的体细胞,例如病毒感染细胞和肿瘤细胞。

[0438] CTL活性可通过例如本文所述方法进行评估。例如,CTL可在新鲜分离的外周血单核细胞(PBMC)中、在从PBMC中建立的植物血球凝集素刺激的IL-2扩展细胞系中(Bernard等,AIDS,12(16):2125-2139,1998)、或通过从先前免疫的对象中分离并用感染有腺病毒载体(含抗原)的DC重刺激6天的T细胞来进行评估,使用标准4小时<sup>51</sup>Cr释放微毒性试验。一类试验使用克隆的T细胞。已在重导向的细胞毒性试验中测试克隆的T细胞介导穿孔蛋白和Fas配体依赖性杀伤的能力(Simpson等,Gastroenterology,115(4):849-855,1998)。克隆的细胞毒性T淋巴细胞展示Fas-和穿孔蛋白依赖性杀伤。近期,体外脱氢酶释放试验已被开发,其利用新的荧光扩增系统(Page,B.,等,Anticancer Res.1998年7-8月;18(4A):2313-6)。该方法敏感、快速且可重复,并且可优选用于混合的淋巴细胞反应(MLR)。其可容易被进一步自动化以进行使用细胞膜完整性的大规模细胞毒性测试,并且其因此得到考虑。在开发用于检测细胞介导的细胞毒性的其他荧光测定实验中,所用荧光是非毒性分子AlamarBlue(Nociari等,J.Immunol.Methods,213(2):157-167,1998)。AlamarBlue在线粒体还原发上之前是荧光淬灭的(即低量子产率),其后导致AlamarBlue荧光强度的显著增加(即量子产率增加)。据报道该试验非常灵敏、特异并且需要的效应细胞数量比标准<sup>51</sup>Cr释放试验显著低。

[0439] 可用本发明方法诱导的其他免疫细胞包括天然杀伤细胞(NK)。NK是淋巴细胞,其缺少抗原特异受体,是先天免疫系统的一部分。通常,感染细胞被结合至细胞表面MHC的外源颗粒所改变的T细胞破坏。然而,病毒感染的细胞通过表达抗体识别的病毒蛋白质传递感染信号。这些细胞被NK杀伤。肿瘤细胞中,若肿瘤细胞丧失MHC I分子的表达,则其对NK易感。

[0440] 给予患者的制剂和途径

[0441] 考虑临床应用,需要以本发明适用的形式制备药物组合物-表达构建体、表达载



体、融合蛋白、转导细胞、活化T细胞、转导和装载T细胞。通常,需要制备基本不含热原以及其他可能对人或动物有害的杂质的组合物。

[0442] 多聚化配体,例如AP1903可以下述剂量给予,例如约0.01-1mg/kg患者体重、约0.05-0.5mg/kg患者体重、0.1-2mg/kg患者体重、约0.05-1.0mg/kg患者体重、约0.1-5mg/kg患者体重、约0.2-4mg/kg患者体重、约0.3-3mg/kg患者体重、约0.3-2mg/kg患者体重、或约0.3-1mg/kg患者体重、例如约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、6、7、8、9、或10mg/kg患者体重。在一些实施方式中,所述配体以每药剂0.4mg/kg(例如以5mg/mL的浓度)给予。可提供含配体的药瓶或其他容器,例如所述配体的每药瓶体积例如约0.25ml-约10ml,例如约0.25、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5或10ml,例如约2ml。

[0443] 用于注射的AP1903

[0444] AP1903 API通过奥佛拉研究公司(Alphora Research Inc.)生产,用于注射的AP1903药物产品由Formatech公司(Formatech Inc.)制备。其配制为AP1903在非离子增溶剂Solutol HS 15(250mg/mL,BASF)的25%溶液中的5mg/mL溶液。室温下该制剂为清澈微黄溶液。冷冻后,制剂经过可逆相变换,形成牛奶状溶液。该相转变在升温至时候后回复。在3mL玻璃瓶中填充2.33mL(每瓶总计约10mg AP1903用于注射)。

[0445] 给予患者剂量前一晚从冰箱中移出AP1903并过夜存于约21°C的温度,从而溶液在稀释前清澈。该溶液在输注开始的30分钟内在玻璃或聚乙烯瓶或非DEHP袋中制备并在给药前存于约21°C。

[0446] 所有研究用药保持在2°C-8°C之间,避免光照和过热,储存在封闭区域严格限制接触。

[0447] 给药

[0448] 在一个示例中,患者给予单一固定剂量的AP1903用于通过IV输注注射2小时(0.4mg/kg),使用非DEHP、非环氧乙烷无菌输注设备。AP1903剂量对所有患者单独计算,且除非体重变动 $\geq 10\%$ 否则不再计算。输注前将计算的剂量在100mL 0.9%标准盐水中稀释。

[0449] 在输注结束后观察患者15分钟有无不良副作用。

[0450] 通常希望采用合适的盐和缓冲液来使复合物稳定,并允许靶细胞摄取复合物。当重组细胞引入患者中时,可使用缓冲液。本发明的水性组合物包含溶解或分散在药学上可接受的载体或水性介质中的表达构建物和核酸。该组合物也可称为接种体。术语“药物或药学上可接受的”指分子整体和组合物在给予动物或人时不产生副作用、过敏或其他不良反应。术语“药学上可接受的运载体”包括任何和全部溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂、吸收延迟剂等。这些用于药物活性物质的介质和试剂是本领域技术人员所熟知的。除非某些常规介质或试剂与本文所述载体或细胞不相容,否则可考虑在治疗组合物中使用任何这些介质或试剂。也可在组合物中纳入补充活性成分。

[0451] 所述活性组合物可包括经典药物制剂。这些组合物可通过任何常用途径来给药,只要通过该途径可以达到靶组织。途径包括例如口服、鼻内、颊、直肠、鞘或局部。另外,给药可以通过正位、皮内、皮下、肌内、腹腔膜内或静脉内注射。这些组合物通常作为药学上可接受的组合物给予,如本文所述。

[0452] 适于注射用途的药品形式包括无菌水性溶液或者分散剂和用于临时制备无菌可

注射溶液或分散液的无菌粉末。在所有情况下,剂型都无菌,并是容易装入注射器的流体。它应该在制造和储存条件下稳定,并且在保存过程中能够抵抗微生物如细菌和真菌的污染作用。载体可以是包含水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适的混合物以及植物油的溶剂或分散介质。可通过使用包衣如卵磷脂、如果是分散体则保持所需粒度以及使用表面活性剂,来维持合适的流动性。可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂,例如,对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等带来对微生物作用的阻碍。在某些示例中,可包括等渗剂如糖或氯化钠。可通过将延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶用于组合物中来延长可注射组合物的吸收。

[0453] 为了口服给药,组合物可与赋形剂一起纳入并以非可吸收的漱口水和牙膏形式使用。漱口水可在合适溶剂中以需要量纳入活性成分,所述溶剂例如硼酸钠溶液(朵贝尔氏(Dobell's)溶液)。或者,活性成分可纳入含硼酸钠、甘油和碳酸氢钠的防腐剂中。活性成分还可分散在包括凝胶、浆糊、粉末和浆液的牙膏中。活性成分可以治疗性有效量加入至糊料牙膏中,其可包括例如水、粘合剂、磨料、调味剂、起泡剂和保湿剂。

[0454] 所述组合物可以中性或盐形式配置。药学上可接受的盐包括例如酸加成盐(用蛋白质的游离氨基基团形成),其用无机酸(例如盐酸或磷酸)或有机酸(例如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等)形成。用游离羧基形成的盐还可源自无机碱例如钠、钾、铵、钙、或铁的氢氧化物,和有机碱例如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等。

[0455] 配置后,溶液可以能够与剂量配方相容的方式和有效的量给予。所述制剂容易以各种药剂形式给予,例如可注射溶液、药物释放胶囊等。例如为了在溶液中胃肠外给药,若需要则所述溶液可经适当缓冲,并且用充分的盐水或葡萄糖使液体稀释剂等渗。这些具体水溶液特别适于静脉内、肌肉内、皮下和腹膜内给药。在该情况汇总可使用无菌水性介质。例如,一个剂量可溶于1ml NaCl等渗溶液中,并加入100ml皮下灌输液体中,或在输注的计划位置注射(参见例如《雷明顿药物科学》第15版1035-1038和1570-1580页)。基于治疗患者的病症会需要对剂量进行变化。负责给药的人在任何情况中均可确定个体对象的合适药量。此外,就人的给药而言,制品应当满足FDA生物制品标准部(Office of Biologics standards)要求的无菌性、致热原性、常规安全和纯度标准。

[0456] 可针对患者选择合适的给药方案,并且可例如包括投配方案,其中第0周给予核酸,然后给予二聚化的化学诱导剂,然后当需要获得有效治疗结果时或例如以2、4、6、8、10、12、14、16、18、20周间隔给予其他诱导剂,总计例如2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、或30、40、50、60、70、80、90或100周。

[0457] 可针对患者选择合适的给药方案,并且可例如包括投配方案,其中第0周给予核酸转导的T细胞或其他细胞,然后给予二聚化的化学诱导剂,然后当需要获得有效治疗结果时或例如以2、4、6、8、10、12、14、16、18、20周间隔给予其他诱导剂,总计例如2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、或30、40、50、60、70、80、90或100周。

[0458] 虽然对于给予转导T细胞而言,多剂量配体之后的一剂量可能已足够,但T细胞可给予多于一次,或者其他细胞例如本文所述的非树突细胞和非B细胞也可多次给予。此外,靶向本发明的非T细胞部分的核酸还可给予多次以优化治疗功效。因此,例如可针对患者选择合适的给药方案,并且可例如包括投配方案,其中第0周给予核酸或核酸转导细胞,然后给予二聚化的化学诱导剂,然后以2周间隔给予其他核酸或核酸转导细胞,总计例如2、4、6、

8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28或30周。

[0459] 其他投配方案包括例如给予一剂细胞和一剂诱导剂的方案。在其他示例中,所述方案可包括第0周给予所述细胞和诱导剂,然后以4周间隔给予其他细胞和诱导剂,总计例如4、8、12、16、20、24、28或32周。

[0460] 可在一期或多于一期中给予细胞剂量,但术语剂量可指给予配体之前所给予的细胞总量。

[0461] 若需要,所述方法可包括额外的白细胞提取法以获得更多细胞用于治疗。

[0462] 治疗疾病的方法

[0463] 本方法还涵盖治疗或预防病原性微生物引起的疾病和/或过度增殖性疾病。

[0464] 可治疗或预防的疾病包括病毒、细菌、酵母、寄生虫、原生动物、肿瘤细胞等所致的疾病。药物组合物(转导的T细胞、表达载体、表达构建体等)可用作通用免疫增强剂(T细胞活化组合物或系统)且因此用在治疗疾病中。可治疗和/或预防的示例性疾病包括但不限于病毒病因学感染例如HIV、流感、疱疹、病毒性肝炎、爱波斯坦-巴尔病、脊髓灰质炎、病毒性脑炎、麻疹、水痘和人乳头状瘤病毒等;或细菌病因学感染例如肺炎、肺结核和梅毒等;或寄生虫病因学感染:疟疾、锥虫病、利什曼病、滴虫病和阿米巴病等。

[0465] 可用药物组合物(转导的T细胞、表达载体、表达构建体等)治疗或预防的肿瘤发生前状态和增生状态包括但不限于肿瘤发生前状态和增生状态例如结肠息肉、克罗恩病、溃疡性结肠炎、乳腺病灶等。

[0466] 癌症包括实体瘤,期可用药物组合物治疗,包括但不限于原发性或转移性黑素瘤、腺癌、鳞状细胞癌、腺鳞细胞癌、胸腺瘤、淋巴瘤、肉瘤、肺癌、肝癌、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、白血病、子宫癌、乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、胰腺癌、结肠癌、多发性骨髓瘤、神经母细胞瘤、NPC、膀胱癌、宫颈癌等。

[0467] 其他过度增殖性疾病包括实体瘤,其可用本文所述T细胞或其他治疗细胞活化系统治疗,包括但不限于类风湿关节炎、炎症性肠病、骨关节炎、平滑肌瘤、腺瘤、脂肪瘤、血管瘤、纤维瘤、血管闭塞、再狭窄、动脉粥样硬化、预肿瘤性病变(如腺瘤样增生和前列腺上皮内瘤样病变)、原位癌、口腔毛状白斑或银屑病。

[0468] 本发明方法中,药物组合物(表达构建体、表达载体、融合蛋白、转导细胞、活化T细胞、转导和负载T细胞)的给予可出于“预防性”或“治疗性”目的。提供预防性时,在任何症状之前给予所述药物组合物。药物组合物的预防性给药用于预防或缓解任何后续的安装或疾病。提供治疗性时,在感染或疾病的症状发作时或之后给予所述药物组合物。因此本文提供的组合物可在预期暴露于致病剂之前或疾病状态时或感染或疾病起始之后提供。因此本文提供使用本文所述核酸和配体预防治疗实体瘤的方法,例如在癌症(包括但不限于前列腺癌)中发现的那些。例如,提供预防性防止或降低对象肿瘤大小的方法,包括给予对象含有与编码嵌合蛋白质的多核苷酸操作性连接的启动子的核酸,和含有与编码需要的对象中的肿瘤抗原的多核苷酸操作性连接的启动子的多核苷酸的核酸,其中所述嵌合蛋白质包括膜靶向区域、多聚化配体结合区域、缺失CD40胞外结构域的CD40胞质多肽、MyD88多肽,并将结合所述多聚化配体结合区域的多聚化配体进行给予,从而所述核酸和配体以有效阻止或降低对象肿瘤尺寸的含量进行给予。还提供预防性防止或降低对象肿瘤大小的方法,包括给予对象含有编码嵌合蛋白质的多核苷酸的核酸,和含有编码需要的对象中的肿瘤抗原的多

核苷酸的多核苷酸的核酸,其中所述嵌合蛋白质包括膜靶向区域、多聚化配体结合区域、缺失CD40胞外结构域的CD40胞质多肽、MyD88多肽,并将结合所述多聚化配体结合区域的多聚化配体进行给予,从而所述核酸和配体以有效阻止或降低对象肿瘤尺寸的含量进行给予。术语多聚化区域可替代术语配体结合区域而用于本发明目的。

[0469] 任何组织或器官的实体瘤均可用本发明方法处理,包括例如血管系统中任何表达PSA(例如PSMA)的肿瘤,例如肺、骨、肝、前列腺癌、或大脑中存在的实体瘤,还例如乳房、卵巢、肠、睾丸、结肠、胰腺、肾、膀胱、神经内分泌系统、软组织、骨质和淋巴系统中存在的实体瘤。可治疗的其他实体瘤包括例如胶质母细胞瘤和恶性骨髓瘤。

[0470] 术语“单位剂量”涉及接种量,表示适于哺乳动物的单一剂量的物理离散单元,各单元含预定量的药物组合物,其经计算以关联所需稀释度产生所需免疫原性效果。接种量的单位剂量的的说明基于药物组合物和待实现的特定免疫效果的独特特征并由其表示。

[0471] 有效量的药物组合物为实现提高免疫应答的所选结果所需的量,该量可经确定。例如,治疗免疫系统缺陷的有效量可为引起免疫系统活化、导致与抗原接触后发展抗原特异性免疫应答所需的量。该术语与“足量”同义。

[0472] 任何具体应用的有效量可根据下述条件而不同:治疗疾病或病症的因子、给药的具体组合物、对象大小、和/或疾病或病症的严重度。可凭经验确定本文所述具体组合物的有效量而无需过度的必需实验。因此,例如,在一个实施方式中,转导的T细胞或其他细胞以有效(例如)诱导免疫应答或例如降低肿瘤尺寸或降低肿瘤血数量的量给予对象。

[0473] 在一些实施方式中,多聚化配体的多重剂量给予对象,随着多重剂量有剂量水平的递增。在一些实施方式中,剂量水平递增提高了CAR-T细胞活性的水平,并因此提高了治疗效果,例如降低靶细胞(例如肿瘤细胞)的量和浓度。在一些实施方式中,剂量从0.01递增至1mg/kg。在一些实施方式中,剂量以约15-30分钟的增量给予。在一些实施方式中,多聚化配体用连续输注泵给予,并且多聚化配体的浓度在输注期间增加。在一些实施方式中,多聚化配体以分别剂量给予1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、或30天间隔、或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11个月间隔或1、2、3、4、5、6、7、8、9或10年间隔。

[0474] 在一些实施方式中,提供个性化治疗,其中疾病或病症的阶段或水平在给予多聚化配体之前、给予额外剂量的多聚化配体之前进行确定,或在确定给予多聚化配体中涉及的方法和剂量中进行。这些方法可用于本发明任何方法。在例如治疗实体瘤对象的情况下讨论给予配体之前评估患者的这些方法时,应理解这些方法可相似地用于治疗其他病症和疾病。因此,例如,在本发明的一些实施方式中,所述方法包括想对象给予本发明的修饰细胞,并且还包包括确定多聚化配体的合适剂量以实现肿瘤尺寸降低的有效水平。在一些示例中,较小的剂量对于活化CAR-T细胞来说以足够,通过诱导充足水平的共刺激分子活性来实现所需的治疗结果。在一些示例中,可能需要较高剂量来实现高水平的CAR-T细胞活性的共刺激。配体的量可基于例如对象的临床病症、重量和/或性别或其他相关生理特征来确定。通过控制给予对象的多聚化配体的量,可降低副作用例如细胞因子风暴的可能性。随着CAR表达诱导型MyD88/CD40共刺激分子的修饰细胞的抗肿瘤活性可用合适剂量的多聚化配体极性调控。因此,在一些实施方式中提供方法,其中给予对象修饰细胞并给予多聚化配体剂量;在第一给予之后,所述方法可包括鉴定患者是否存在需要提高或降低CAR-T细胞活性水

平的病症,所述提高或降低可通过比第一剂量高或低浓度的额外剂量的多聚化配体来实现。因此,所述方法包括给予结合诱导型MyD88/CD40共刺激分子的多聚化区域的多聚化配体,维持后续剂量的多聚化配体、或基于患者是否存在鉴定的病症来调整给予患者的后续剂量的多聚化配体。

[0475] 术语“剂量”包括药剂的量和给药频率,例如下次药剂的时间。术语“剂量水平”指相对对象体重给予的多聚化配体的量。因此提高剂量水平会提高相对对象体重所给予的配体量。此外,提高给药浓度(例如当用连续输注泵给予多聚化配体)意味着每分钟或每秒钟给药浓度提高(因此所给药量也提高)。

[0476] 可以任何方便的方式提供调节或维持后续药量的指示,例如多聚化配体的后续剂量和/或后续药物剂量。在一些实施方式中可以表格形式提供指示(如物理或电子介质)。例如,可在表格中提供疾病或病症症状,且医师可将病症与疾病的阶段列表或表格进行比较。然后医师可从表格中确定后续药物剂量的指示。在某些实施方式中,可在将病症或阶段提供给计算机(如输入计算机储存)后通过计算机显示(如显示器显示)指示。例如,该信息可提供给计算机(如通过用户输入计算机储存或通过计算机网络的远程设备传递给计算机),计算机中的软件可生成调节或维持后续药物剂量的指示和/或提供后续药物药剂含量。

[0477] 基于指示确定后续剂量后,医师可给予后续剂量或提供调节剂量的指令给他人或另一实体。本文术语“医师”指做决定者,在某些实施方式中医师是医药专家。在一些实施方式中,做决定着可为计算机或显示的计算机程序输出,健康服务提供者可按指示或计算机显示的后续药物剂量操作。做决定者可直接(如给对象输注后续剂量)或远程(如做决定者可远程改变抽吸参数)给予所述后续剂量。

[0478] 本文提供的方法包括但不限于递送有效量的活化细胞、核酸或编码该核酸的的表达构建体。通常有效量的药物组合物定义为足以检测并重复实现所需结果的含量,所述结果例如缓解、降低、最小化或限制疾病或病症发展。可使用其他更严格限定,包括消除、根除或治愈疾病。在一些实施方式中,可具有监控生物标志物以评估治疗效果和控制毒性。

#### [0479] A. 基于遗传的治疗

[0480] 在某些实施方式中,提供具有表达构建体的细胞,所述构建体能提供共刺激多肽,例如本文所述那些例如T细胞。本文所用表达载体和遗传元件的冗长讨论通过引用纳入本部分。在某些示例中,表达载体可为病毒载体,例如腺病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒、痘苗病毒和逆转录病毒。在其他示例中,所述载体可为溶酶体包封的表达载体。

[0481] 可在体外和离体条件进行基因递送。对于病毒载体,通常可制备病毒载体原液。本申请提供病毒载体介导的离体和体内基因递送的示例。对于体内递送,根据病毒类型和可获得的效价,可递送例如约1、2、3、4、5、6、7、8、或 $9 \times 10^4$ 、1、2、3、4、5、6、7、8、或 $9 \times 10^5$ 、1、2、3、4、5、6、7、8、或 $9 \times 10^6$ 、1、2、3、4、5、6、7、8、或 $9 \times 10^7$ 、1、2、3、4、5、6、7、8、或 $9 \times 10^8$ 、1、2、3、4、5、6、7、8、或 $9 \times 10^9$ 、1、2、3、4、5、6、7、8、或 $9 \times 10^{10}$ 、1、2、3、4、5、6、7、8、或 $9 \times 10^{11}$ 或1、2、3、4、5、6、7、8、或 $9 \times 10^{12}$ 感染型颗粒至患者。通过比较相关摄取效率,可推测脂质体或其他非病毒制剂的相似数据。下文描述作为药学上可接受组合物的制剂。多聚化配体例如AP1903可以例如下述剂量递送:约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、6、7、8、9、或10mg/kg对象体重。

#### [0482] B. 基于细胞的治疗

[0483] 考虑的其他治疗是给予转导T细胞。所述T细胞可体外转导。本文讨论作为药理学上可接受组合物的制剂。

[0484] 基于细胞的治疗中,转导细胞可用例如靶抗原核酸(例如mRNA或DNA或蛋白质)转染;用细胞裂解物、蛋白质或核酸脉冲处理;或用细胞电融合。所述细胞、蛋白质、细胞裂解物或核酸可源自细胞例如肿瘤细胞,或其他病原微生物,例如病毒、细菌、原生动物等。

[0485] C. 联合治疗

[0486] 为了提高本文表达载体的效力,需要将这些组合物和方法与有效治疗疾病的试剂组合。

[0487] 在某些实施方式中抗癌剂可与本发明方法组合使用。“抗癌”剂能对对象的癌症产生不利影响,例如通过杀死一种或多种癌细胞、诱导癌细胞凋亡、降低一种或多种癌细胞生长速率、降低转移的发生率或数量、降低肿瘤尺寸、抑制肿瘤生长、减少对肿瘤或一种或多种癌细胞的血液供给、促进对一种或多种癌细胞或肿瘤的免疫应答、阻止或抑制癌症发展、或延长患癌对象的寿命。抗癌剂包括例如化疗剂(化疗)、放射治疗剂(放疗)、外科手术(手术)、免疫治疗剂(免疫疗法)、基因治疗剂(基因疗法)、激素治疗、其他生物制剂(生物治疗)和/或替代疗法。

[0488] 在其他实施方式中,抗生素可与药物组合物联用以治疗和/或预防感染疾病。该抗生素包括但不限于阿米卡星、氨基糖甙类抗生素(如庆大霉素)、阿莫西林、两性霉素B、氨基苄西林、锍剂、食用葡萄糖酸锍钠、阿奇霉素、卷曲霉素、头孢噻肟、头孢西丁、头孢曲松钠、氯霉素、克拉霉素、克林霉素、氯苯吩嗪、环丝氨酸、氨苯砞、多西环素、乙胺丁醇、乙硫异烟胺、氟康唑、氟喹诺酮类药物、异烟肼、伊曲康唑、卡那霉素、酮康唑、二甲胺四环素、氧氟沙星)、对氨基水杨酸、喷他脒、菌素防卫素(polymixin definsins)、丙硫异烟胺、吡嗪酰胺、乙胺嘧啶磺胺嘧啶、喹诺酮类药物(如环丙沙星)、利福布汀、利福平、司帕沙星、链霉素、磺胺类药物、四环素类药物、氨硫脲、甲氧苄氨嘧啶-磺胺甲基异恶唑、紫霉素或其组合。

[0489] 更通常地,该试剂与表达载体以组合量提供,所述量有效杀伤或抑制该细胞和/或微生物增殖。该方法可涉及将细胞与试剂和药物组合物同时或在一段时间内接触,其中药物组合物和试剂分别给予细胞、组织或生物体,产生所需治疗益处。这可通过下述方法实现:将细胞、组织或生物体与单一组合物或包括药物组合物和一种或多种试剂的药理学制剂接触,或将细胞与两种或更多不同组合物或制剂接触,其中一种组合物包括药物组合物,另一种包括一种或多种试剂。

[0490] 本文所用术语“接触”和“暴露”用于细胞、组织或生物体时,描述药物组合物和/或其他试剂(例如化疗或放疗试剂)递送给靶细胞、组织或生物体或放置成与所述靶细胞、组织或生物体直接并置所用的方法。为了实现细胞杀伤或静止,以有效杀死所述细胞或阻止其分裂的结合量将药物组合物和/或其他试剂递送给细胞。

[0491] 给予药物组合物可领先、同时和/或晚于其他试剂,间隔范围数分钟至数周。在所述药物组合物和其他试剂对所述细胞、组织或生物体分别应用的实施方式中,一般需保证各递送的时间之间没有显著的时间段,从而所述药物组合物和试剂仍可在细胞、组织或生物体上产生有利的组合效果。例如该示例中,考虑可将细胞、组织或生物体与2、3、4或更多方案和所述药物组合物基本同时(即少于约1分钟以内)接触。在其他方面,给予所述表达载体之前和/或之后,可将一种或多种试剂从基本同时、约1分钟、至约24小时或至约7天至约1

至约8周或更多时间以及其任何延伸范围内给予。此外,可使用本文药物组合物的各种组合方案和一种或多种试剂。

[0492] 在一些实施方式中,化疗剂可为Taxotere(多西他赛)或其他紫杉烷,例如卡巴他赛。可在用细胞和诱导剂治疗之前、期间或之后给予化疗剂。例如,可在给予活性核酸首次剂量的约1年、11、10、9、8、7、6、5、或4个月或18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2周或1周之前给予化疗剂。或者例如,可在给予细胞或诱导剂首次剂量的约1周或2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、或18周或4、5、6、7、8、9、10或11个月或1年之后给予化疗剂。

[0493] 给予化疗剂可包括给予多于一种化疗剂。例如可在泰索帝(Taxotere)或其他紫杉烷(例如卡巴他赛)之外给予顺铂。

[0494] 靶向具体肿瘤或疾病产生免疫应答

[0495] 嵌合抗原受体(CAR)是人工受体,设计用于赋予T细胞抗原特异性。其包括抗原特异性组分、跨膜组分和胞内组分,这些组分经选择用以活化T细胞并提供特异性免疫。表达嵌合抗原受体的T细胞可用在各种疗法中,包括癌症治疗。

[0496] 转导有诱导型CD40、诱导型MyD88、或诱导型MyD88/CD40的T细胞后其他细胞还可使用编码嵌合抗原受体或CAR的核酸转导。可对嵌合抗原受体进行选择以靶向待处理肿瘤的表面上存在的肿瘤抗原或关联疾病的其他抗原。然后表达嵌合抗原受体的活化的T细胞会靶向肿瘤或其他疾病。转导的T细胞还可包括记忆T细胞,其会维持针对具体肿瘤或疾病的免疫防御。

[0497] 优化和个性化治疗

[0498] 治疗实体瘤癌症包括例如前列腺癌症可通过确定治疗期间的IL-6、IL6-sR或VCAM-1的浓度来得到优化。IL-6指白介素6。IL-6sR指IL-6可溶受体,其水平通常与IL-6的水平紧密关联。VCAM-1指血管细胞粘附分子。不同阶段或癌症类型的不同患者可对各种治疗产生不同反应。可通过跟踪各种体液或组织中IL-6、IL-6sR、或VCAM-1的浓度或水平来监控对治疗的响应。多肽例如IL-6、IL-6sR、或VCAM-1的浓度、水平或含量的确定可包括检查原厂多肽或其片段或变体。片段或变体可足以通过例如免疫学方法、质谱、核酸杂交等来进行检测。对个体患者的优化治疗可能有助于避免过量剂量引起的副作用,可能有助于确定何时治疗无效和何时改变疗程,或可能有助于确定何时可提高剂量。本文所述技术优化治疗实体瘤癌症的治疗方法,通过允许医师追踪生物标记例如IL-6、IL-6sR、或VCAM-1,并确定给予对象的药物或疫苗的后续剂量是否维持、降低或增加,以及确定后续剂量的时机。

[0499] 实体瘤癌症包括例如前列腺癌的治疗还可通过疗程期间确定尿激酶型纤溶酶原激活物受体(uPAR)、肝细胞生长因子(HGF)、表皮生长因子(EGF)、或管内皮生长因子(VEGF)来进行确定。不同阶段或癌症类型的不同患者可对各种治疗产生不同反应。测量对象1003在疗程期间的uPAR、HGF、EGF、和VEGF的水平。对象1003显示出血清中缺氧因子的全身扰动,这可表明对治疗的阳性响应。不受观察解释的限制,这可表明肿瘤响应治疗分泌缺氧因子。因此,可通过跟踪各种体液或组织中uPAR、HGF、EGF、或VEGF的浓度或水平来监控对治疗的响应。多肽例如uPAR、HGF、EGF、或VEGF的浓度、水平或含量的确定可包括检查原厂多肽或其片段或变体。片段或变体可足以通过例如免疫学方法、质谱、核酸杂交等来进行检测。对个体患者的优化治疗可能有助于避免过量剂量引起的副作用,可能有助于确定何时治疗无效



和何时改变疗程,或可能有助于确定何时可提高剂量。本文所述技术优化治疗护体肿瘤癌症的治疗方法,通过允许医师追踪生物标记例如uPAR、HGF、EGF、或VEGF,并确定给予对象的药物或疫苗的后续剂量是否维持、降低或增加,以及确定后续剂量的时机。

[0500] 例如,已确定实体瘤疗程期间某些生物标记的量或浓度发生变化。该生物标志物的预定靶标水平或生物标志物阈值可在正常对象中进行鉴定,这允许医师确定给予需要的对象例如实体瘤(例如前列腺肿瘤)患者的药物的后续剂量是增加、减少还是维持。在一些实施方式中,医师可基于生物标志物是否存在或其含量分别低于、高于或约等于生物标志物阈值来进行确定。

[0501] 例如,在药物治疗或接种疫苗后,确定过高的生物标志物水平显著降低和/或确定过低的生物标志物水平显著增加表明给予的药物表现出治疗效果。“水平”表示生物标志物在流体或组织中的浓度或在组织中的绝对含量。给予该生物标志物确定,医师可作出维持后续药物剂量后提高或降低后续剂量的决定,包括改良给药时机。术语“药物”包括常规药物例如小分子以及生物药物例如核酸、抗体、蛋白质、多肽、修饰细胞等。在其他示例中,确定过高的生物标志物水平未显著降低和/或确定过低的生物标志物水平未显著增加表明给予的药物未表现出显著治疗效果。基于该生物标志物确定,医师可作出增加后续药物剂量的决定。鉴于药物对对象来说有毒并产生副作用,本发明方法优化治疗方案,其为医师提供“拨入”有效剂量的药物并最小化副作用的能力。在具体示例中,本文提供的方法允许医师“拨动”药物剂量至治疗有效水平,其中拨动的剂量低于有毒的阈值水平。因此,本发明的治疗方法提高功效并降低可能的毒副作用。

[0502] 细胞因子是身体通过不同来源的细胞广泛产生的一大类不同家族的多肽调节剂。细胞因子是小的分泌型蛋白质,包括多肽和糖蛋白,其介导和调控免疫、炎症和造血。其响应免疫刺激而从头生产。通常(但非总是)细胞因子短距离且短时以低浓度作用。它们通常通过结合特异膜受体发挥作用,然后通过第二信使(通常为酪氨酸激酶)对细胞传递信号从而改变细胞行为(例如基因表达)。对细胞因子的响应包括例如增加或降低膜蛋白质(包括细胞因子受体)表达、增殖、和分泌效应分子。

[0503] 术语“细胞因子”是一大家族蛋白质和糖蛋白的统称。其他名称包括淋巴因子(淋巴细胞产生的细胞因子)、单核因子(单核细胞产生的细胞因子)、趋化因子(具有趋化活性的细胞因子)、和白介素(白细胞产生的细胞因子并作用于其他白细胞)。细胞因子可作用在分泌其的细胞上(自分泌作用)、在邻近细胞上(旁分泌作用)或在一些情况中在远处的细胞上(内分泌作用)。

[0504] 细胞因子示例包括但不限于白介素(例如IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18等)、干扰素(例如IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 等)、肿瘤坏死因子(例如TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 等)、淋巴因子、单核因子和趋化因子;生长因子(例如转化生长因子(例如TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 等));集落刺激因子(例如GM-CSF、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)等)等。

[0505] 细胞因子通常通过细胞表面受体对应物作用。然后胞内信号传导的后续级联改变细胞功能。该信号传导可包括数种基因和其转录因子的上调和/或下调,导致其他其他细胞因子的生产、其他分子的表面受体数量增加、或负反馈抑制导致的其自身效果的抑制。

[0506] VCAM-1(血管细胞粘附分子还称为CD106)包括6或7个免疫球蛋白结构域并且仅在



内皮细胞受到细胞因子的刺激后在大和小的血管上都表达。因此,VCAM-1表达是细胞因子表达的标志物。

[0507] 细胞因子可作为全长(例如全)蛋白、多肽、代谢物、信使RNA(mRNA)、互补DNA(cDNA)、和各种中间产物或前述的片段(例如切割产物例如肽、mRNA片段)而检测。例如,IL-6蛋白质可作为完整全长分子或作为大小足以提供各种水平阳性鉴定的任何片段而进行检测。该片段可包括的氨基酸数量少于10、约10-20、约20-50、约50-100、约100-150、约150-200以及更多。同样,VCAM-1蛋白质可作为完整全长氨基酸分子或作为大小足以提供各种水平阳性鉴定的任何片段而进行检测。该片段可包括的氨基酸数量少于10、约10-20、约20-50、约50-100、约100-150以及更多。

[0508] 在一些实施方式中,细胞因子mRNA可通过靶向全长或任何足以特异检测的片段来进行检测。mRNA片段可包括少于10个或任何更多数量的核苷酸。片段可包括具有链的任何部分的mRNA链的3'末端、具有链的任何部分的5'末端和链的任何中间部分。

[0509] 检测可使用合适方法进行,包括但不限于质谱(如基质辅助激光解吸电离质谱(MALDI-MS)、电喷雾质谱(ES-MS))、电泳(例如毛细管电泳)、高效液相色谱法(HPLC)、核酸亲和力(例如杂交)、扩增和检测(例如,实时或逆转录聚合酶链反应(RT-PCR))和抗体检测(如抗体阵列,酶联免疫吸附试验(ELISA))。IL-6的示例和其他细胞因子试验包括例如Millipore公司提供的那些(Milliplex人类细胞因子/趋化因子组“Milliplex Human Cytokine/Chemokine Panel”)。IL6-sR试验的示例包括例如Invitrogen公司提供的那些(可溶性IL-6R:(Invitrogen Luminex®珠-基试验))。VCAM-1试验的示例包括例如R&D系统公司提供的那些(R&D系统公司的(CD106)ELISA开发试剂盒,DuoSet, (#DY809))。

[0510] 生物标志物来源

[0511] 可在对象中(例如原位)或对象外(例如离体)确定是否存在生物标志物或其含量。在一些实施方式中,在细胞(例如分化细胞、干细胞)中确定是否存在生物标志物或其含量,在一些实施方式中,在基本无细胞的培养机中(例如体外)确定是否存在生物标志物或其含量。本文术语“鉴定对象中是否存在生物标志物或其含量”指本领域评估生物标志物并推断对象中其是否存在或含量的任何已知方法(例如原位、离体或体外方法)。

[0512] 通常流体或组织样品获自对象用于离体确定是否存在生物标志物或其含量。在一些实施方式中,可从中获取组织样品的身体的非限制性部分包括腿、手臂、腹部、上背部、下背部、胸部、手、手指、指甲、脚、脚趾、趾甲、颈、直肠、鼻、喉、嘴、头皮、面部、脊柱、喉、心、肺、乳房、肾、肝、小肠、结肠、胰腺、膀胱、宫颈、睾丸、肌肉、皮肤、头发、肿瘤或肿瘤周围区域等。在一些实施方式中,可通过本领域已知任何合适方法获取组织样品,包括但不限于活检(例如剃毛、冲孔、切口、切除、刮宫、细针抽吸、勺舀、扇形、核心针、真空辅助、开放手术活检)等。在一些实施方式中,可获自对象的流体的示例包括但不限于血液、脑脊液、脊髓液、洗液(如支气管肺泡、胃、腹膜、导管、耳朵、关节镜下)、尿、间质液、粪便、痰、唾液、鼻黏膜、前列腺液、灌洗液、精液、淋巴液、胆汁、泪液、汗、乳液、乳腺体液、炎症区域的流体、肌肉消瘦区域的流体等。

[0513] 对象的样品可在确定是否存在生物标志物或其含量前进行加工。例如,对象的血液样品可经加工以产生某些部分,包括但不限于血浆、血清、血沉棕黄层、红细胞层等,并且在这些部分中可确定是否存在生物标志物或其含量。在一些实施方式中,组织样品(例如肿

瘤活检样品)可通过切片组织样品并在切片样品接触可视化生物标志物的试剂之前和/或之后于显微镜下观察样品来进行加工。在一些实施方式中,组织样品可暴露于一种或多种下述非限制性条件下:洗涤、接触高盐或低盐溶液(例如高渗、低渗、等渗溶液)、接触剪切条件(例如超声、压力(例如法式压力))、切碎、离心、分离细胞、分离组织等。在一些实施方式中,生物标志物可从组织中分离并体外确定是否存在生物标志物或其含量。样品还可在确定是否存在生物标志物或其含量之前储存一段时间(例如样品可经冷冻、冷藏、维持在保存培养基(例如甲醛)中)。

[0514] 样品可在向对象递送药物后任何合适的收集时间从对象获取。例如,样品可在向对象递送药物后约1小时内(例如递送药物约5、10、15、20、25、30、35、40、45、55或60分钟内)、向对象递送药物后约1天内(例如递送药物约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24小时内)或向对象递送药物后约2周内(例如递送药物约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天内)收集。收集可根据具体程序进行,包括例如每小时、每天、半周、每周、每2周、每月、每2月、每季度和每年等。若药物在一段时间内连续给予(例如输注),可从药物引入对象的一开始、药物给予停止的时间或期间的的时间点(例如给药时间框架中点或其他点)来确定延迟。

[0515] 生物标志物检测

[0516] 可通过本领域任何已知方法确定是否存在一种或多种生物标志物或其含量,本文描述非限制性确定方法。确定是否存在生物标志物或其含量有时包括使用生物试验。在生物试验中检测的一种或多种信号可转换为是否存在生物标志物或其含量。转换生物试验中检测的信号可包括例如使用标准曲线、一种或多种标准(例如内部的、外部的)、图表、计算机程序等或其组合来将信号转换为是否存在生物标志物或其含量。

[0517] 试验中检测的生物标志物可为例如全长生物标志物、生物标志物片段、改变或修饰的生物标志物(例如生物标志物衍生物、生物标志物代谢物)或两种或更多前述的加和。修饰的生物标志物通常具有与本文所述的生物标志物实质上的序列相同性。例如修饰的生物标志物和本文所述的生物标志物的相同性百分比可为15-20%、20-30%、31-40%、41-50%、51-60%、61-70%、71-80%、81-90%和91-100%(例如15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99和100%相同性)。修饰的生物标志物通常具有与本文所述生物标志物的序列有90%或更多相同的序列(例如氨基酸序列或核苷酸序列)。序列相同性百分比可用本领域已知的比对方法确定。

[0518] 检测生物标志物可用任何本领域已知的合适方法进行,包括但不限于质谱、抗体试验(如ELISA)、核酸亲和性、微阵列杂交、Northern印迹、反向PCR和RT-PCR。例如,可在Nanodrop 1000上通过分光光度法(260/280>1.9)确定RNA纯度和浓度RNA质量可用本领域已知方法评估(例如Agilent 2100生物分析器;RNA6000NanoLabChip®等)。

[0519] 调整或维持后续药物剂量的指示

[0520] 调整或维持后续药物剂量的指示可基于是否存在生物标志物。例如,当(i)可获得生物标志物的低灵敏度测定,(ii)生物标志物水平响应药物而显著变化,(iii)存在低水平

或高水平生物标志物,和/或(iv)药物在给予水平下没有明显毒性时,是否存在生物标志物可足以得到调整或维持后续药物剂量的指示。

[0521] 调整或维持后续药物剂量的指示通常基于生物标志物的含量或水平。在一些实施方式中,生物标志物的含量可为均值、中值、标称值、范围、间隔、最大值、最小值或相对含量。在一些实施方式中,生物标志物的含量可在测量误差窗之内或之外。在一些实施方式中,生物标志物的含量可表达为生物标志物的浓度、每单位重量的生物标志物重量、每单位体积的生物标志物重量、生物标志物摩尔数、每单位体积的生物标志物摩尔数、每单位重量的生物标志物摩尔数、每单位细胞的生物标志物重量、每单位细胞的生物标志物体积、每单位细胞的生物标志物摩尔数等。重量可表示为例如飞克、皮克、纳克、微克、毫克和克。体积可表示为例如飞升、皮升、纳升、微升、毫升和升。摩尔可表示为例如皮摩尔、纳摩尔、微摩尔、毫摩尔和摩尔。在一些实施方式中,单位重量可为对象的重量或对象样品的重量、单位体积可为对象样品的体积(例如血样样品体积)且单位细胞可为每一个细胞或每一定数量细胞(例如酶1000细胞的生物标志物毫克数)。在一些实施方式中,一种组织或流体中确定的生物标志物的含量可与其他流体或组织中的生物标志物的含量关联,如本领域所知。

[0522] 调整或维持后续药物剂量的指示通常通过比较对象中确定的生物标志物的含量与生物标志物的预定水平来生成。在一些实施方式中,生物标志物的预定水平有时与对象中药物的治疗量或有效量相关,有时与药物的毒性水平相关、有时与症状存在相关、有时与治疗中点相关、和有时与治疗终点相关。生物标志物的预定水平有时包括时间作为元素,并且有时阈值是时间依赖的特征。

[0523] 例如,IL-6或IL6-sR水平高于正常水平的约8倍或更多(例如正常水平的约9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74或75倍)表明药物的剂量或给药的频率可在后续给药中增加。

[0524] 术语“剂量”包括药剂的量和给药频率,例如下次药剂的时间。IL-6或IL6-sR水平低于比正常水平的8倍(例如正常水平的约7、6、5、4、3、2或1倍或低于或等于正常水平)表明药物的剂量或给药的频率可在后续给药中降低。VCAM-1水平高于正常水平的约8倍或更多(例如正常水平的约9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74或75倍)表明药物的剂量或给药的频率可在后续给药中增加。VCAM-1水平低于比正常水平的8倍(例如正常水平的约7、6、5、4、3、2或1倍或低于或等于正常水平)表明药物的剂量或给药的频率可在后续给药中降低。IL-6、IL-6sR、或VCAM-1的正常水平可在未诊断有实体瘤或未诊断有患者中正在治疗的实体瘤类型的对象中进行评估。

[0525] 调整或维持药物剂量的其他指示包括例如个体分泌因子(例如GM-CSF、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、MCP-1、IFN- $\gamma$ 、RANTES、EGF或HGF)的浓度的扰动,或分泌因子组(例如选自GM-CSF、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、MCP-1、IFN- $\gamma$ 、RANTES、EGF和HGF的一种或多种标志物)的平均浓度的扰动。该扰动可包括例如个体分泌因子的浓度增加或减少至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%,或分泌因子组的血清浓度的均值相对变化的增加或

减少至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。在下次给药之前,该增加之后可回复或不回复至基线血清浓度。平均相关血清浓度中的平均相对变化的增加或降低可能涉及例如所述组中各因子的相对值的加权。而且,增加或降低可涉及例如收集的数据的各时间点的相对值的加权。各时间点或各因子的加权值可不同,这取决于癌症、转移或肿瘤负载的状态或程度。调节或维持药物剂量的指示可包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、或10或更多给药之后个体分泌因子的浓度或分泌因子组的平均浓度的扰动。例如,在疗程期间(例如给予本发明药物或疫苗或组合物6次)观察到个体分泌因子的浓度或分泌因子组的平均浓度在至少一次给药后发生扰动,则其可指示维持、减少或增加给药频率或后续剂量,或其可指示用例如制备的额外药物、腺病毒疫苗或腺病毒转染或转导细胞继续治疗。

[0526] 一些治疗方法包括(i)在一次或多次给予中向对象给予药物(例如1,2,3,4,5,6,7,8,9或10个剂量),(ii)在(i)之后确定对象中是否存在生物标志物或其含量,(iii)提供增加、减少或维持给予对象的药物的后续剂量的指示,和(iv)任选向对象给予后续剂量,其中所述后续剂量相对于(i)中的早期剂量增加、减少或维持。在一些实施方式中,在向对象给予各剂量药物之后确定是否存在生物标志物或其含量,和有时向对象给予各剂量药物之后不确定是否存在生物标志物或其含量(例如在一个或多个第1、第2、第4、第5、第6、第7、第8、第9、第10剂量之后评估生物标志物,但并非在每次给予剂量之后都评估)。

[0527] 调整后药物剂量的指示可认为需要增加或需要降低后续药物剂量。医师可考虑调整或维持后续药物剂量的指示,且医师可在某些实施方式中根据指示操作。在一些实施方式中,医师可选择不根据指示操作。因此,医师可选择根据所提供的指示调整或不调整后药物剂量。

[0528] 调整或维持后续药物剂量和/或后续药物剂型的指示可以任何合适方式提供。在一些实施方式中可以表格形式提供指示(如物理或电子介质)。例如,生物标志物阈值可在表中提供,医师可比较对象中确定的是否存在生物标志物或其含量与所述阈值。然后医师可从表格中确定后续药物剂量的指示。在某些实施方式中,可在将是否存在生物标志物或其含量提供给计算机(如输入计算机储存)后通过计算机显示(如显示器显示)指示。例如,对象是否存在生物标志物或其含量可提供给计算机(如通过用户输入计算机储存或通过计算机网络的远程设备传递给计算机),计算机中的软件可生成调节或维持后续药物剂量的指示和/或提供后续药物药剂含量。后续剂量可基于是否存在生物标志物或其含量之外的某些因素进行确定,例如对象体重、对象的一种或多种代谢水平(例如维持肝功能的代谢水平)等。

[0529] 基于指示确定后续剂量后,医师可给予后续剂量或提供调节剂量的指令给他人或另一实体。本文术语“医师”指做决定者,在某些实施方式中医师是医药专家。在一些实施方式中,做决定者可为计算机或显示的计算机程序输出,健康服务提供者可按指示或计算机显示的后续药物剂量操作。做决定者可直接(如给对象输注后续剂量)或远程(如做决定者可远程改变抽吸参数)给予所述后续剂量。

[0530] 可对对象进行预筛选以确定是否确定对象是否存在生物标志物或其含量。预筛选的非限制性示例包括鉴定是否存在遗传标志物(例如多态性,具体核苷酸序列);鉴定是否存在具体代谢物或其含量。医师可使用预筛选结果联合是否存在生物标志物或其含量来确定后续药物剂量是否进行调整或维持。

[0531] 抗体和小分子

[0532] 在一些实施方式中,提供抗体或小分子用作例如试验或治疗的对照或标准。在一些实施方式中,抗体或小分子配置为结合细胞因子或细胞因子受体,包括但不限于IL-6、IL-6sR,并改变细胞因子的作用,或者其可配置为结合VCAM-1。在一些实施方式中,抗体或其他细胞分子可结合编码细胞因子或受体的mRNA结构。

[0533] 本文术语小分子表示约800或更少道尔顿的有机分子。在一些实施方式中,小分子可扩散通过细胞膜,接触细胞间作用位点。在一些实施方式中,小分子以高亲合性结合生物聚合物例如蛋白质、核酸或多糖并有时可改变生物聚合物的活性或功能。在各种实施方式中,小分子可为天然的(例如次级代谢物)或人工的(例如抗病毒药物);它们可具有对疾病(例如药物)有利的效果或可为有害的(例如致畸剂和致癌物)。

[0534] 小分子的非限制性示例包括核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸、氨基酸、单糖和小的寡聚物例如二核苷酸、肽例如抗氧化谷胱甘肽和二糖例如蔗糖。

[0535] 本文术语抗体表示脊椎动物的血液或其他体液中发现的 $\gamma$ 球蛋白,并通过免疫系统使用以鉴定或中和外源物体,例如细菌和病毒。抗体通常包括基础结构单元:两个大重链和两个小轻链。

[0536] 特异结合至抗体需要针对具体蛋白质的亲和性进行选择的抗体。例如,可选择针对具体蛋白质、其多态性变体、等位基因、直向同源物和保守修饰变体或剪切变体或部分产生的多克隆抗体以仅获得与GM-CSF、TNF- $\alpha$ 或NF- $\kappa$ -B调节蛋白质发生特异免疫反应而不与其他蛋白质反应的那些多克隆抗体。该选择可通过减去与其它分子交叉反应的抗体来进行。

[0537] 本文提供的方法包括但不限于递送有效量的活化细胞、核酸或编码该核酸的的表达构建体。通常有效量的药物组合物定义为足以检测并重复实现所需结果的含量,所述结果例如缓解、降低、最小化或限制疾病或病症发展。可使用其他更严格限定,包括消除、根除或治愈疾病。在一些实施方式中,可具有监控生物标志物以评估治疗效果和控制毒性。

## 实施例

[0538] 下述实施例说明某些实施方式但不限制本技术。本文讨论的体外或离体转化或转染细胞的方法的示例提供使用表达嵌合多肽的核酸的示例,但不限于此。将转导或转染细胞和配体递送至实验室动物或人对象的示例提供向需要的随想直接给予表达嵌合多肽、肿瘤抗原和配体诱导剂的核酸的示例,但不限于此。

[0539] 此外,后续部分(具体为实施例21以及下列)提供在治疗细胞例如T细胞中表达诱导型嵌合信号传导分子的方法,和使用转化细胞的方法的示例。表达诱导型多肽的方法、转导或转染细胞的用途、和试验描述于例如Spencer, D.M., 等Science 262:1019-1024 (1993); 2008年7月29日授权的美国专利7,404,950“树突细胞的诱导活化(Induced Activation in Dendritic Cell)”; 2011年4月14日提交的美国专利申请13/087,329“治疗实体瘤的方法(Methods for Treating Solid Tumors)”; 和2011年3月20日提交的美国专利申请13/112,739,“诱导选择性凋亡的方法(Methods for Inducing Selective Apoptosis)”; 其全文通过引用纳入本文。

[0540] 实施例1:材料与amp;方法

[0541] 以下讨论后续实施例讨论的研究中所用的材料和方法。

[0542] 小鼠。NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>Hr<sup>hr</sup>/NcrHsd小鼠购自Harlan实验室(印第安纳州印第安纳波利斯)且NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tmlWjl</sup>/SzJ(NSG)小鼠获自Jackson实验室(缅因州巴港)并根据机构方案在德克萨斯健康科学大学(UTHSC)动物房的无病原体小鼠设施中保持。该研究得到UTHSC的动物管理与使用委员会的批准。

[0543] 细胞系、培养基和试剂。293T(HEK 293T/17)、Capan-1、HPAC、Raji细胞系获自美国典型培养物保藏中心。293T、Capan-1和HPAC细胞系在补充有10%胎牛血清(FCS)和2mM Glutamax(英杰公司)的DMEM(英杰公司,纽约州格兰德岛)中于37°C和5%CO<sub>2</sub>保持。在含10%FCS和2mM glutamax的RPMI中培养Raji肿瘤细胞。除非另有说明,获自墨西哥湾岸区血库(德克萨斯州休斯顿市)的外周血单核细胞(PBMC)产生的T细胞在补充有10%胎牛血清(FBS)、2mM glutamax(T细胞培养基;TCM)和100U/ml IL-2(德国贝尔吉施格拉德巴赫的美天旋生物技术公司(Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany))的45%RPMI 1640, 45%克里克培养基(英杰公司)。临床级别的rimiducid在乙醇中稀释至100mM工作溶液用于体外试验,或0.9%盐水用于动物研究。

[0544] 逆转录病毒和质粒构建体。包括豆蔻酰化-靶向序列(M)<sup>1</sup>, TLR衔接体分子, MyD88, CD40胞质区域和2个串联配体-结合FKBP12v36结构域(Fv' Fv)的诱导型MyD88/CD40(iMC)与2A-ΔCD19框内克隆入SFG逆转率病毒骨架<sup>2</sup>, 使用Gibson组装法(新英格兰生物实验室(New England Biolabs))<sup>3</sup>产生SFG-M.MyD88/CD40.Fv' Fv-2A-ΔCD19。相似地, 生产仅含豆蔻酰化-靶向序列和串联FKBP12v36结构域的对照载体(称为FKBP或SFG-FKBP-2A-ΔCD19)。其他逆转录病毒载体用合成DNA方案(集成DNA技术公司(Integrated DNA Technologies), 加利福尼亚州圣地亚哥)构建, 得到仅CD40或MyD88的构建体, 分别称为SFG-M.MyD88-2A-ΔCD19或SFG-M.CD40-2A-ΔCD19。合成第一代PSCA CAR, 其含有鼠bm2B3单链可变片段(scFv)<sup>4,5</sup>、IgG1 CH2CH3间隔区域、CD28跨膜结构域和CD3ζ胞质结构域(PSCA.ζ), 如前所述<sup>6</sup>。通过PCR扩增构建第二代CAR, 其含有CD28跨膜结构域和胞质结构域(PSCA.28.ζ)。对于用PSCA-CAR修饰细胞的共培养试验, Capan-1和HPAC肿瘤细胞通过用GFP表达质粒(pcDNA3.1-GFP.2A.嘌呤霉素)转染来进行修饰, 并用1μg/ml嘌呤霉素(西格玛公司(Sigma))稳定筛选。对于体内肿瘤生物发光研究, 用SFG-EGFP荧光素酶共转导T细胞。

[0545] 逆转录病毒上清通过用SFG载体质粒Peg-Pam-e质粒(含MoMLV gag-pol序列)和RD114包被编码质粒通过GeneJuice(EMD生物科技公司, 新泽西州吉布斯镇)转染试剂瞬时共转染293T细胞来生产逆转录病毒上清, 如前所述<sup>7</sup>。含逆转录病毒的上清在转染后48和72小时进行收集。

[0546] 生成活化的T细胞使用获自墨西哥湾岸区血库(德克萨斯州休斯顿市)外周血单核细胞(PBMC), 基本如<sup>7</sup>所述生成抗-CD3/抗-CD28-活化的T细胞。简言之, 5x10<sup>5</sup> PBMC在TCM中重悬并在非组织培养处理的24孔板上进行刺激, 所述板于100U/ml IL-2存在下用抗-CD3和抗-CD28抗体(美天旋生物技术公司)各0.5μg/ml进行包被。在第三天, 收获活化的T细胞并用逆转录载体转导, 或在补充有IL-2的培养基中扩增, 如下所述。

[0547] 转导T细胞。用7μg/ml重组人纤维蛋白片段(Retronectin)(日本滋贺县大津的Takara生物公司(Takara Bio, Otsu, Shiga, Japan))4°C过夜包被非组织培养处理的24孔板。所述孔用磷酸缓冲盐水清洗, 然后用逆转录病毒上清包被。然后, 在将活化的T细胞在补

充有100U/ml IL-2的病毒上清中以 $3 \times 10^5$ 个细胞/孔铺板。孵育3天后,收获细胞并在含TCM加100U/ml IL-2的组织培养物处理的板中扩增。对于两个或三个基因的转导,方案与上述相同,除了所述孔用等量的各逆转录病毒上清包被,然后活化的T细胞铺板入补充有100U/ml IL-2的含等量病毒上清的各孔。

[0548] 免疫分型。在转导后10-14天用CD3-PerCP.Cy5和CD19-PE(白乐津公司(Biolegend))分析基因修饰T细胞的iMC转基因表达。为了检测CAR转达细胞,用Fc-特异APC偶联的单克隆抗体(杰克逊免疫研究实验室公司(Jackson ImmunoResearch Laboratories),宾夕法尼亚州西格鲁甫)染色T细胞,其识别受体的IgG1 CH2CH3。还用10nM rimiducid和Capan-1肿瘤细胞活化后分析T细胞的CD4、CD8和CD25(白乐津公司)。用LSRII流式细胞器(BD公司(Becton Dickenson),新泽西州东卢瑟福)进行所有流式细胞分析,并用FlowJo(树星公司(Tree Star),俄勒冈州艾士兰)或Kaluza软件(富勒敦的贝克曼库尔特公司(Beckman Coulter),加利福尼亚州帕萨迪纳)分析数据。

[0549] 细胞因子和趋化因子生产。iMC或对照载体修饰的T细胞生产IFN- $\gamma$ 、IL-2和IL-6,按照生产商方案(EB公司(eBioscience),加利福尼亚州圣地亚哥)通过ELISA进行分析。此外,用多重阵列系统(Bio-Plex MAGPIX;伯乐公司,加利福尼亚州海格立斯)分析细胞因子和趋化因子组。该试验中,用或不用10nM rimiducid对未活化的T细胞和iMC-或对照载体(FKBP)修饰的T细胞进行活化,上清于24和48小时进行收集。在一些实验中,还用50ng/ml可溶抗CD3刺激T细胞。利用经iMC(或对照载体)修饰并用PSCA. $\zeta$ CAR、用或不用rimiducid和Capan-1靶细胞共转导的T细胞进行其他实验,用于用PSCA. $\zeta$ CAR和iMC信号传导来测量细胞因子和趋化因子生产的效果。收集上清并在48小时后进行分析。

[0550] 免疫印迹。用SFG-FKBP-2A- $\Delta$ CD19或SFG-iMC-2A- $\Delta$ CD19转导的( $4 \times 10^6$ /点)人原代T细胞在37°C水浴与10nM rimiducid、PMA和伊屋诺霉素各250nM、或仅培养基培养所示时间点。4°C 6000rpm离心2分钟后吸除培养基。胞质提取物通过在含1x MS-SAFE(罗氏公司)的100 $\mu$ l放射免疫沉淀试验缓冲液(50mM Tris、150mM NaCl、1%NP40、2mM EDTA、0.1%SDS、0.25%脱氧胆酸钠)中裂解来制备。裂解物在冰上孵育10分钟,胞质部分通过4°C 11,000rpm离心20分钟进行清理。等价于 $1.5 \times 10^6$ 细胞的胞质提取物在1x利姆里(Laemmli)缓冲液中通过98°C沸腾5分钟来进行变性。通过SDS-PAGE分离蛋白质并电转移至硝酸纤维素膜(Immobilon;密理博公司(Millipore))。用对p-RelA(S536)、p-Akt(S473)、p-p38(T180/Y182)、p-JNK(T183/Y185)、p-ERK1/2(T202/Y204)(细胞信号传导技术公司(Cell Signaling Technology))或总 $\beta$ -微管蛋白(圣克鲁兹公司(Santa Cruz))特异的Ab连续探测膜。结合的Ab通过HRP-偶联的羊抗兔IgG Ab(皮尔斯公司(Pierce))进行检测然后进行ECL(皮尔斯公司)和凝胶逻辑成像系统(Gel Logic imaging system)(Carestream公司)上的检测。

[0551] Milliplex MAP试验。从三个健康供体收获的原代人T细胞用SFG-FKBP-2A- $\Delta$ CD19或SFG-iMC-2A- $\Delta$ CD19转导。细胞( $2 \times 10^6$ 个/点)维持在T细胞培养基(未刺激)中或用10nM rimiducid或PMA和伊屋诺霉素各250nM于37°C水浴中处理指示时间。通过4°C 5000rpm离心5分钟来收获细胞。用补充有蛋白酶混合物(细胞信号传导技术公司)的200 $\mu$ l细胞信号传导裂解缓冲液(MILLIPLEX MAP试剂盒,密理博公司)裂解团块,并在冰上孵育10分钟。裂解物通过桌上摇杆搅动15分钟并10,000rpm沉淀19分钟,均在4°C下进行。液相转移至新



Eppendorf管中,根据生产商建议方案加工各等分并在Bio-Plex MAGPIX多重读数计(伯乐公司)上分析。用对p-Re1A (S536)、p-Akt (S473)、p-p38 (T180/Y182)、p-JNK (T183/Y185)、p-ERK1/2 (T202/Y204) (定制MILLIPLEX磁珠MAPmate试剂盒;密理博公司)或GAPDH(作为对照)特异的抗体在试验缓冲液2 (MILLIPLEX MAP试剂盒)中检测磷酸化的表位。磷酸化增加的倍数通过给定时间点的rimiducid处理的净MFI除对应非刺激时间点的净MFI来计算。

[0552] 基因表达分析。未转导或用FKBP或iMC逆转录病毒载体修饰的T细胞从三个健康供体的PBMC生成。用或不用10nM rimiducid对T细胞刺激24小时,然后收获并提取mRNA (RNeasy;凯杰公司(Qiagen),加州瓦伦西亚)用于在人基因组U133 Plus 2.0阵列(艾菲美特公司(Affymetrix),加州圣克拉拉(Santa Clara,CA))上使用贝勒医学院基因组和RNA概况核心(贝勒医学院,德克萨斯州休斯顿市)进行杂交。用ArrayStar软件12.0.0版本(DNASTAR公司,威斯康星州麦迪逊)从成像文件中提取信号数据。在数据组之间显示>95% BJ (Benjamini-Hochberg) 置信区间和>2倍增加的基因。使用C2 CP:KEGG基因集合、C3转录因子靶标和C7免疫学靶标集合通过分子信号数据库(MSigDB)(布洛德研究所(Broad Institute),马萨诸塞州剑桥)进行基因本体学<sup>8</sup>。使用ConsensusPathDB-人类(分子遗传学Max Plank研究所,德国柏林)进行诱导网络模式分析<sup>9</sup>。

[0553] 细胞毒性试验。针对Capan-1肿瘤细胞的CAR T细胞的特异细毒性在4小时DELFI A细胞毒性试验(Perkin Elmer,Waltham,MA)中根据生产上指导(克隆科技实验室(Clontech Laboratories),加利福尼亚州山景城)进行检测,效应子与靶标(E:T)比例范围10:1-0.5:1,并使用Capan-1和HPAC作为靶细胞。

[0554] 共培养实验。为了在rimiducid依赖和PSCA.ζCAR活化之后检测细胞毒性、活化、增殖和细胞因子生产,用Capan-1-GFP肿瘤细胞以各种效应子:靶标比例在含或不含10nM rimiducid的TCM中于外源IL-2不存在的情况下进行共培养试验。7天后,所有残余细胞通过胰蛋白酶处理进行收集、计数并用CD3、CD19和Fc-特异抗体染色,通过流式细胞术分析。

[0555] 体内研究。为了评估iMC-修饰的CAR-T细胞针对实体瘤的体内功效,用基质胶(Matrigel)(BD生物科学公司)中重悬的 $1 \times 10^6$  Capan-1肿瘤细胞浸润免疫缺陷的剪毛小鼠,并在右肋部注入皮下。通过静脉注射给予小时一次(第7天)或两次(第7和14天) $1 \times 10^7$ 个T细胞。在一些实验中,一周两次(biw)腹膜内给予外源IL-2(4,000U/动物)。对于剪毛小鼠实验,biw给予0.9%盐水中的5mg/kg rimiducid。通过卡钳和肿瘤尺寸计算测量肿瘤。NSG小鼠用于评估iMC和CAR对T细胞体内扩增和功效的贡献。这里NSG小鼠用 $1 \times 10^6$  Capan-1肿瘤细胞进行s.c.浸润。7天后,用单静脉注射剂量的 $5 \times 10^6$  iMC和PSCA.ζCAR修饰的T细胞共转导EGFP荧光素酶来处理小鼠。然后小鼠用rimiducid通过i.p.每周或两种处理一次,之后在i.p.注射150mg/kg D-荧光素(帕金埃尔默公司(Perkin Elmer))后用IVIS成像相机(帕金埃尔默公司)成像。通过对比绘制的感兴趣区域(ROI)和肿瘤区域来分析光子发射,信号检测为总计数,如前所验证<sup>10</sup>。如上,通过用卡钳测量肿瘤来评估功效。

[0556] 统计。数据表示为平均值±SEM。用不成对斯氏t检验分析数据以计算2尾或1尾P值,从而在所有试验中确定比较2个处理组时的差异的统计学显著性。使用单因素ANOVA然后Bonferroni多重比较法检验来比较多重处理组。使用双因素ANOVA然后Bonferroni多重比较检验法来评估不同时间点的多重处理组之间的肿瘤生长中差异的统计学显著性。通过卡普兰-迈耶图记录存活,通过对数秩检验确定显著性。数据用GraphPad Prism 5.0版



(GraphPad公司(GraphPad))进行分析。

[0557] 方法参考文献

[0558] 1.Narayanan,P.等复合MyD88/CD40开关协同活化小鼠和人树突细胞用以增强抗肿瘤功效(A composite MyD88/CD40 switch synergistically activates mouse and human dendritic cells for enhanced antitumor efficacy).The Journal of clinical investigation 121,1524-1534(2011).

[0559] 2.Riviere,I.,Brose,K.和Mulligan,R.C.逆转录病毒载体设计对人腺苷脱氨酶在遗传修饰细胞浸润的小鼠骨髓移植受者中表达的效果(Effects of retroviral vector design on expression of human adenosine deaminase in murine bone marrow transplant recipients engrafted with genetically modified cells).Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92,6733-6737(1995).

[0560] 3.Gibson,D.G.等DNA分子酶组装为数百千碱基(Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases).Nature methods 6,343-345(2009).

[0561] 4.Leyton,J.V.等人源化放射碘化的小抗体用于前列腺干细胞抗原表达肿瘤的成像(Humanized radioiodinated minibody for imaging of prostate stem cell antigen-expressing tumors).Clinical cancer research:an official journal of the American Association for Cancer Research 14,7488-7496(2008).

[0562] 5.Leyton,J.V.等工程改造的人源化双抗体用于前列腺干细胞抗原表达肿瘤的PET成像(Engineered humanized diabodies for microPET imaging of prostate stem cell antigen-expressing tumors).Protein engineering,design&selection:PEDS22, 209-216(2009).

[0563] 6.Katari,U.L.等用于胰腺癌治疗的工程改造的T细胞(Engineered T cells for pancreatic cancer treatment).HPB:the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association 13,643-650(2011).

[0564] 7.Foster,A.E.等通过用IL-7和IL-12基因修饰T淋巴细胞母细胞的自体设计者抗原呈递细胞(Autologous designer antigen-presenting cells by gene modification of T lymphocyte blasts with IL-7and IL-12).Journal of immunotherapy 30,506-516(2007).

[0565] 8.Subramanian,A.等基因集富集分析:一种用于解释基因组范围表达概况的基于知识的方法(Gene set enrichment analysis:a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles).Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102,15545-15550(2005).

[0566] 9.Kamburov,A.,Wierling,C.,Lehrach,H.和Herwig,R.ConsensusPathDB-整合人功能性相互作用网路的数据库(ConsensusPathDB--a database for integrating human functional interaction networks).Nucleic acids research 37,D623-628(2009).

[0567] 10.Vera,J.等再导向人免疫球蛋白 $\kappa$ 轻链的T淋巴细胞有效杀死成熟B淋巴细胞衍生的恶性细胞(T lymphocytes redirected against the $\kappa$ light chain of human immunoglobulin efficiently kill mature B lymphocyte-derived malignant cells)

.Blood 108,3890-3897 (2006) .

[0568] 实施例2:用诱导型MyD88/CD40活化T细胞。

[0569] 用编码iMC和表面标志物  $\Delta$  CD19 (CD19的胞外部分) 的双顺反子载体或对照载体 (缺少MyD88/CD40信号传导部分,但仍保留串联FKBP12v36配体结合结构域) 转导T细胞 (图1a和4a)。通过流式细胞数确定可比较的转导功效后 (分别为 $77 \pm 10\%$ 和 $62 \pm 16\%$  CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>) (图5a,b),将转导和未转导的T细胞与10nM rimiducid接触;二聚化仅在iMC修饰的T细胞中引发IFN- $\gamma$ 生产 (图5c)。重要的是,iMC的表达不改变转导T细胞的表型或分化状态 (图5D)。如树突细胞中所观察到的<sup>25</sup>,rimiducid的滴定证明了iMC开关的高度敏感性,其在亚纳摩尔的范围内活化T细胞 ( $EC_{50} = \sim 0.12nM$ ) (图1b)。仅表达MyD88或CD40 (图4a,6a,和6b) 的其他载体显示出两种分子在接触rimiducid后以协同方式活化T细胞 (图1c)。

[0570] 关键的下游信号传导分子 (包括JNK、Akt、RelA、ERK和p38 MAPK) 的磷酸化在诱导的iMC T细胞中测量。时程分析表明rimiducid在接触后早至15分钟诱导T细胞中的信号传导 (图1d),并且这些信号传导通路各显示T细胞中的磷酸化增加,MAPK和JNK显示出最大的rimiducid依赖性活化 (图1e)。对比例微阵列研究指示rimiducid活化后,iMC修饰的T细胞主要下调与IFN- $\gamma$ 细胞因子生产相关的细胞因子 (IFIT1、IFIT3、CXCL10和CXCL11),MyD88依赖型Toll样受体信号传导 (例如IL-5、IL-6、IL-13),和调控细胞凋亡的CD40相关基因 (例如BCL2L1) (图7a和7b)。基因本体学通路分析显示凋亡相关的MAPK通路增加,对应于蛋白质分析所鉴定的磷酸化事件的增加 (图1d和1e)。此外,基因集合富集分析 (MSigDB和ConsensusPathDB) 显示与NF- $\kappa$ B活化的显著关联 ( $p = 4.4 \times 10^{-15}$ ),以及与TLR4、7和8激动剂活化的DC中基因表达概况的显著重叠 ( $p = 6.1 \times 10^{-40}$ ) (表1-3)。这些数据表明iMC激活许多通路,这些通路诱导促存活基因的网络 (图7c)。事实上,表达iMC的T细胞的rimiducid活化允许外源IL-2存在时T细胞存活的增加以及细胞扩增的增加,但当退出IL-2时则没有观察到增殖 (图8a-8c)。

[0571] 实施例3:活化的修饰T细胞的其他表征

[0572] 为了进一步表征T细胞活化,进行多重阵列分析以测量各种细胞因子和趋化因子 (图9a和9b)。当rimiducid诱导GM-CSF、TNF- $\alpha$ 、IL-5、IL-6、IL-8和IL-13分泌时,IL-2和其他细胞因子的生产未上调,这与完全T细胞活化细胞NFAT和NF- $\kappa$ B信号传导<sup>19</sup>的假说一致。为了对其进行测试,用rimiducid在具有和不具有CD3交联的情况下处理共刺激的T细胞,然后测量IL-2生产和CD25 (高亲和性IL-2受体) 表达。仅用两种信号 (例如TCR和iMC) 活化的iMC (和程度低很多的iM) 修饰的T细胞产生可测量的IL-2 (图1f) 和增加的CD25表达 (图1g和1h)。这些数据表明iMC可在T细胞中作为共刺激信号产生作用,其中天然TCR和iMC的并发信号传导需要生产IL-2并维持T细胞增殖。

[0573] 实施例4:通过诱导型MyD88/CD40刺激表达CAR的T细胞

[0574] TCR复合物的初级信号组分包括两种非共价连接的CD3 $\zeta$ 链,各包含3种免疫受体酪氨酸基活化部分 (ITAM),其结合70kDa的 $\zeta$ 活化蛋白质 (ZAP70),一种启动信号传导级联导致NFAT活化的酪氨酸激酶。第一代CAR通常用与CD3 $\zeta$ 胞质区域偶联的蛋白质特异的scFv区域构建,从而scFv的靶抗原模拟天然TCR信号传导并诱导T细胞活化和靶细胞的细胞裂解。为了检验诱导型MyD88/CD40是否对含CD3 $\zeta$ 的多肽分子的嵌合抗原受体的提供共刺激活性,构建识别肿瘤相关表面蛋白前列腺干细胞抗原 (PSCA)<sup>28</sup>的第一代CAR并用于与iMC或FKBP仅对

照载体共转导T细胞(图4b和5a)。用CD3、CD19和抗-CAR抗体的流式细胞分析显示分别有约 $70 \pm 21\%$ 和 $58 \pm 23\%$ 的T细胞转导有CAR和对照或CAR和iMC载体(图2b、10a和10b),并且CAR修饰的T细胞保持对PSCA<sup>+</sup>肿瘤细胞系(即Capan-1和HPAC)的细胞毒性功能(图10c)。为了测试CAR(具有肿瘤抗原)和iMC(具有rimiducid)是否导致T细胞扩增并增强对肿瘤的控制,进行针对GFP修饰的PSCA<sup>+</sup>肿瘤细胞系(Capan-1)的共刺激试验。没有rimiducid时,用PSCA.ζ和对照载体或者用PSCA.ζCAR和iMC进行工程改造的T细胞显示出相对未转导T细胞的显著肿瘤杀伤;然而,通过添加rimiducid活化iMC进一步提高的Capan-1-GFP的消除(图2c)。流式细胞术分析显示rimiducid活化的CAR<sup>+</sup>iMC<sup>+</sup>T细胞的频率显著增加(图2c)。此外,用CAR和iMC修饰的T细胞不仅生产IL-2,其还在肿瘤抗原和rimiducid存在下上调CD25表达并增殖(图2d和2e)。为了进一步确定对于IL-2生产的需求,在具有或不具有PSCA.ζ时用iMC或对照载体(FKBP)转导T细胞(图10d)并进行综合分析,改变肿瘤抗原刺激和rimiducid活化(图2f)。仅用肿瘤抗原和rimiducid都刺激的iMC和CAR转导的T细胞产生IL-2。重要的是,rimiducid诱导iMC活化在缺失外源IL-2或TCR活化下类似地改善CAR<sup>+</sup>T细胞的存活(图11),表明通过CAR和iMC的共活化可放大T细胞响应,而单独iMC活化可改善存活和持续性。

[0575] 实施例5:通过诱导型MyD88/CD40活化表达CAR的T细胞提高抗肿瘤活性。

[0576] 为了评估通过肿瘤细胞和rimiducid的CAR和iMC共刺激是否转化为改善的抗肿瘤功效,在免疫缺陷小鼠中进行异种移植研究。剪毛("SHrN"无毛NOD.SCID)小鼠经皮下Capan-1肿瘤细胞浸润,用2剂量的未转导T细胞或转导有PSCA.ζCAR和iMC或对照载体的T细胞进行静脉内处理(图3a)。从第1天至第100天以每周2次腹腔内(i.p.)注射来给予rimiducid(5mg/kg),并直至第21天给予外源IL-2。与体外研究相同,用iMC和PSCA.ζCAR-转导的T细胞处理的小鼠相比未转导T细胞或转导有PSCA.ζCAR和对照载体的T细胞而言具有显著改善的肿瘤控制和存活(图3b和3c)。因为iMC交联看起来提供了T细胞的共刺激,测试iMC以确定其是否在第二代PSCA-CAR(PSCA.28.ζ)中替代了CD28的功能(例如提高增殖和存活)(图4b)。这里,对未转导的T细胞或用FKBP和PSCA.ζ或PSCA.28.ζ,或用iMC和PSCA.ζ(图12a)修饰的T细胞就共培养试验中的肿瘤杀伤和IL-2分泌进行检测。虽然包括CD28信号传导结构域改善了肿瘤杀伤、T细胞增殖和IL-2生产,iMC活化能更高度地放大这些特征(图12b-12d),表明iMC能作为rimiducid-依赖型共刺激开关而替代CAR分子中纳入的附属信号传导结构域。为了对此进行体内评估,用单剂量的PSCA.ζ,PSCA.28.ζ或PSCA.ζ和iMC修饰的T细胞处理Capan-1具有肿瘤的免疫缺陷型小鼠,然后以5mg/kg每两周给予rimiducid而无IL-2补充(图13a)。相比表达PSCA.ζ和对照载体的T细胞或表达PSCA.28.ζ的T细胞,PSCA.ζ和iMC修饰的T细胞导致肿瘤负担显著下降并产生改善的总体存活(图13b和13c)。这些数据表明IL-2生产增加以及可能的其他因素改善了由含CD28内结构域的CAR分子所实现的上述抗肿瘤功能以及T细胞持续性。

[0577] 实施例6:在诱导型MyD88/CD40刺激细胞中扩增CAR修饰的T细胞

[0578] 由于rimiducid介导的iMC活化为CAR修饰的T细胞提供生长益处,用生物发光(BLI)来检测NOD/SCID IL-2R $\gamma$ -缺陷型(NSG)小鼠中的T细胞体内扩增。未转导和用iMC或FKBP共转导PSCA.ζCAR随后用编码EGFP萤火虫荧光素酶融合蛋白质逆转率病毒转导(EGFP1uc)(图14)转导,并注入Capan-1具肿瘤的NSG小鼠中,每周用2.5mg/kg rimiducid处理1次(qw)或2次(biw)并对生物发光进行成像(图3d)。相比缺少iMC活化的T细胞,提供给予

rimiducid引起的iMC的活化可提高肿瘤控制(图3e)。体内成像显示rimiducid处理的小鼠全身(图3f和3g)和皮下肿瘤位置(图3h)的T细胞BLI显著增加。这些数据显示使用rimiducid的T细胞共刺激的外部控制能调控T细胞的体内扩增和功效。

[0579] 实施例7:实施例2-6和本文的引用

[0580] 1.Kalos,M.等具有嵌合抗原受体的T细胞在晚期白血病患者中具有潜在的抗肿瘤效果并且可建立记忆(T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia).Science translational medicine 3,95ra73(2011) .

[0581] 2.Porter,D.L.,Levine,B.L.,Kalos,M.,Bagg,A.和June,C.H.慢性淋巴性白血病嵌合抗原受体-修饰的T细胞(Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia).The New England journal of medicine 365,725-733(2011) .

[0582] 3.Brentjens,R.J.等CD19-靶向的T细胞快速诱导患有化疗难以治疗的急性淋巴细胞白血病的成人的分子缓解(CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia).Science translational medicine 5,177ra138(2013) .

[0583] 4.Kochenderfer,J.N.等化疗难治型弥漫性大B细胞淋巴瘤和无痛性B细胞恶性肿瘤可用表达抗CD19嵌合抗原受体的自体T细胞有效处理(Chemotherapy-Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Indolent B-Cell Malignancies Can Be Effectively Treated With Autologous T Cells Expressing an Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor).Journal of clinical oncology:official journal of the American Society of Clinical Oncology(2014) .

[0584] 5.Grupp,S.A.等急性淋巴性白血病中的嵌合抗原受体修饰的T细胞(Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia).The New England journal of medicine 368,1509-1518(2013) .

[0585] 6.Maude,S.L.等白血病中持续缓解的嵌合抗原受体T细胞(Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia).The New England journal of medicine 371,1507-1517(2014) .

[0586] 7.Straathof,K.C.等用于T细胞治疗的诱导型胱冬酶9安全开关(An inducible caspase 9safety switch for T-cell therapy).Blood 105,4247-4254(2005) .

[0587] 8.Di Stasi,A.等诱导型细胞凋亡用于过继细胞治疗作为安全开关(Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy).The New England journal of medicine 365,1673-1683(2011) .

[0588] 9.Introna,M.等用CD20遗传修饰人T细胞:用抗CD20抗体纯化和裂解转导细胞的策略(Genetic modification of human T cells with CD20:a strategy to purify and lyse transduced cells with anti-CD20 antibodies).Human gene therapy 11,611-620(2000) .

[0589] 10.Ciceri,F.等HSV-TK工程改造的供体淋巴细胞在同种异体干细胞移植后的抗肿瘤效果(Antitumor effects of HSV-TK-engineered donor lymphocytes after

allogeneic stem-cell transplantation).Blood 109,4698-4707 (2007) .

[0590] 11.Fisher,D.T.等用于运输细胞毒性T细胞的IL-6跨信号传导批准小鼠和人肿瘤微血管通路(IL-6trans-signaling licenses mouse and human tumor microvascular gateways for trafficking of cytotoxic T cells).The Journal of clinical investigation 121,3846-3859 (2011) .

[0591] 12.Philip,B.等基于高度压缩的表位的标志物/自杀基因用于更简单和安全的T细胞治疗(A highly compact epitope-based marker/suicide gene for easier and safer T-cell therapy).Blood 124,1277-1287 (2014) .

[0592] 13.Linette,G.P.等骨髓瘤和黑色素瘤中亲和性增加的T细胞的心血管毒性肌联蛋白交叉反应性(Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma).Blood 122,863-871 (2013) .

[0593] 14.Jena,B.,Moyes,J.S.,Huls,H.和Cooper,L.J.驱动基于CAR的T细胞治疗走向成功(Driving CAR-based T-cell therapy to success).Current hematologic malignancy reports 9,50-56 (2014) .

[0594] 15.Dotti,G.,Gottschalk,S.,Savoldo,B.和Brenner,M.K.用表达嵌合抗原受体的T细胞设计和开发治疗(Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells).Immunological reviews 257,107-126 (2014) .

[0595] 16.Kershaw,M.H.等对使用基因改造T细胞进行的过继免疫治疗卵巢癌的I期研究(A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer).Clinical cancer research:an official journal of the American Association for Cancer Research 12,6106-6115 (2006) .

[0596] 17.Pule,M.A.等经工程改造以共表达肿瘤特异性受体的病毒特异性T细胞:成神经细胞瘤个体中的持续性和抗肿瘤活性(Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors:persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma).Nature medicine 14,1264-1270 (2008) .

[0597] 18.Till,B.G.等采用具有CD28和4-1BB结构域的嵌合抗原受体针对淋巴瘤的CH20-特异的获得性免疫治疗:先驱临床试验结果(CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and4-1BB domains:pilot clinical trial results).Blood 119,3940-3950 (2012) .

[0598] 19.Inman,B.A.,Frigola,X.,Dong,H.和Kwon,E.D.共刺激、共抑制和癌症(Costimulation,coinhibition and cancer).Current cancer drug targets 7,15-30 (2007) .

[0599] 20.Carpenito,C.等用含CD28和CD137结构域的遗传靶向的人T细胞控制已建立的大型肿瘤异种移植物(Control of large,established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains).Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106,3360-3365 (2009) .

[0600] 21.Song,D.G.等CD27共刺激体内增加重定向人T细胞的存活和抗肿瘤活性(CD27

costimulation augments the survival and antitumor activity of redirected human T cells in vivo). Blood 119,696-706 (2012).

[0601] 22. Fedorov, V.D., Themeli, M. 和 Sadelain, M. 基于 PD-1-和 CTLA-4-的抑制嵌合抗原受体 (iCAR) 传输脱靶免疫治疗响应 (PD-1-and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses). Science translational medicine 5,215ra172 (2013).

[0602] 23. Kloss, C.C., Condomines, M., Cartellieri, M., Bachmann, M. 和 Sadelain, M. 通过工程改造的 T 细胞的具有平衡信号传导的组合抗原识别促进选择性肿瘤根除 (Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells). Nature biotechnology 31,71-75 (2013).

[0603] 24. Lanitis, E. 等具有解离信号传导结构域的嵌合抗原受体 T 细胞表现出具有体内细胞毒性降低可能性的聚焦的抗肿瘤活性 (Chimeric antigen receptor T Cells with dissociated signaling domains exhibit focused antitumor activity with reduced potential for toxicity in vivo). Cancer immunology research 1,43-53 (2013).

[0604] 25. Narayanan, P. 等复合 MyD88/CD40 开关协同活化小鼠和人树突细胞用以增强抗肿瘤功效 (A composite MyD88/CD40 switch synergistically activates mouse and human dendritic cells for enhanced antitumor efficacy). The Journal of clinical investigation 121,1524-1534 (2011).

[0605] 26. Rickert, R.C., Jellusova, J. 和 Miletic, A.V. B 细胞生物学和疾病中肿瘤坏死因子受体超家族的信号传导 (Signaling by the tumor necrosis factor receptor superfamily in B-cell biology and disease). Immunological reviews 244,115-133 (2011).

[0606] 27. Gay, N.J., Symmons, M.F., Gangloff, M. 和 Bryant, C.E. Toll 样受体信号传导复合物的组装和定位 (Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes). Nature reviews. Immunology 14,546-558 (2014).

[0607] 28. Anurathapan, U. 等嵌合抗原受体修饰的 T 细胞的肿瘤破坏动力学 (Kinetics of tumor destruction by chimeric antigen receptor-modified T cells). Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy 22,623-633 (2014).

[0608] 表1:基因本体学通路分析

名称	P-值
凋亡 GenMAPP	5.41E-08
凋亡	7.14E-08
类花生酸合成	0.0004
[0609] 胆固醇生物合成	0.002
炎症响应通路	0.002
小配体 GPCR	0.002
凋亡 KEGG	0.003
细胞核受体	0.004

[0610]	肥大模型	0.004
	S1P 信号传导	0.006
	平滑肌收缩	0.01
	MAPK 级联	0.03

[0611] 表2:KEGG通路基因富集特征

基因集合名称	基因集合中的基因数量(K)	重叠中的基因数量(k)	k/K	p-值	FDR q-值
KEGG_SMALL_CELL_LUNG_CANCER (KEGG_小细胞肺癌)	84	10	0.119	1.52E-10	2.82E-08
KEGG_PATHWAYS_IN_CANCER (KEGG_癌症中的信号通路)	328	16	0.0488	4.04E-10	3.76E-08
KEGG_CYTOKINE_CYTOKINE_RECEPTOR_INTERACTION (KEGG_细胞因子_细胞因子受体相互作用)	267	13	0.0487	1.85E-08	1.15E-06
KEGG_MAPK_SIGNALING_PATHWAY (KEGG_MAPK_信号转导通路)	267	11	0.0412	1.21E-06	5.64E-05
KEGG_TOLL_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY (KEGG_TOLL_样受体信号转导通路)	102	7	0.0686	4.01E-06	1.49E-04
KEGG_JAK_STAT_SIGNALING_PATHWAY (KEGG_JAK_STAT_信号转导通路)	155	8	0.0516	6.87E-06	2.13E-04
KEGG_APOPTOSIS (KEGG_凋亡)	88	6	0.0682	2.07E-05	5.49E-04
KEGG_FOCAL_ADHESION (KEGG_聚集粘附)	201	8	0.0398	4.47E-05	9.48E-04
KEGG_NOD_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY (KEGG_NOD_样受体信号转导通路)	62	5	0.0806	4.59E-05	9.48E-04
KEGG_T_CELL_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY (KEGG_T_细胞受体信号转导通路)	108	6	0.0556	6.57E-05	1.22E-03

[0613] 表3:转录因子靶基因富集特征

基因集合名称	基因集合中的基因数量(K)	重叠中的基因数量(k)	k/K	p-值	FDR q-值
GGGCGGR_V\$SP1_Q6	2940	64	0.0218	1.56E-18	9.57E-16
V\$NFKB_Q6	254	19	0.0748	4.43E-15	1.36E-12
CAGGTG_V\$E12_Q6	2485	52	0.0209	2.17E-14	4.45E-12
V\$NFKB_01	251	17	0.0677	6.32E-13	9.72E-11
GGGAGGRR_V\$MAZ_Q6	2274	45	0.0198	1.02E-11	1.06E-09
V\$CREL_01	256	16	0.0625	1.03E-11	1.06E-09
V\$NFKB65_01	237	15	0.0633	3.86E-11	3.39E-09
RYTTCCTG_V\$ETS2_B	1085	29	0.0267	8.17E-11	6.28E-09
RTAAACA_V\$FREAC2_01	919	25	0.0272	1.23E-09	7.76E-08
TGAAA_V\$NFAT_Q4_01	1896	37	0.0195	1.26E-09	7.76E-08

[0615] 表4:免疫学基因富集特征

基因集合名称	基因集合中的基因数量(K)	重叠中的基因数量(k)	k/K	p-值	FDR q-值
GSE2706_UNSTIM_VS_2H_LPS_DC_DN	200	35	0.175	6.09E-40	1.16E-36
GSE9988_LOW_LPS_VS_CTRL_TREATED_MONOCYTE_UP ( GSE9988_LOW_LPS_VS_CTRL_处理的单核细胞_UP)	200	34	0.17	2.29E-38	2.19E-35
GSE2706_UNSTIM_VS_2H_LPS_AND_R848_DC_DN	200	33	0.165	8.31E-37	5.29E-34
GSE2706_UNSTIM_VS_8H_R848_DC_DN	200	30	0.15	3.10E-32	9.87E-30
GSE9988_ANTI_TREM1_VS_ANTI_TREM1_AN	200	30	0.15	3.10E-32	9.87E-30



[0617]	D_LPS_MONOCYTE_DN ( GSE9988_ANTI_TREM1_VS_ANTI_TREM1_AND_LPS_单核细胞DN)					
	GSE9988_ANTI_TREM1_VS_LOW_LPS_MONOCYTE_DN ( GSE9988_ANTI_TREM1_VS_LOW_LPS_单核细胞DN)	200	30	0.15	3.10E-32	9.87E-30
	GSE2706_UNSTIM_VS_2H_R848_DC_DN	200	29	0.145	9.53E-31	2.28E-28
	GSE9988_LOW_LPS_VS_VEHICLE_TREATED_MONOCYTE_UP ( GSE9988_LOW_LPS_VS_载剂处理的单核细胞UP)	200	29	0.145	9.53E-31	2.28E-28
	GSE22886_CTRL_VS_LPS_24H_DC_DN	200	28	0.14	2.81E-29	4.47E-27
	GSE9988_ANTI_TREM1_VS_LPS_MONOCYTE_DN ( GSE9988_ANTI_TREM1_VS_LPS_单核细胞DN)	200	28	0.14	2.81E-29	4.47E-27

[0618] 实施例8:具有低基础活性的诱导型MyD88/CD40嵌合刺激分子

[0619] 中等二聚体非依赖性(“基底”)NF-κB诱导和IL-6分泌有时使用诱导型MyD88/CD40嵌合刺激分子进行观察。虽然该活性较低,但设计了不包括氨基末端豆蔻酰化区域的修饰MyD88/CD40嵌合刺激分子进行观察。对修饰MyD88/CD40嵌合刺激分子进行测试以确定其是否比含氨基末端豆蔻酰化区域的嵌合刺激分子具有更低水平的自发二聚化或低水平的基础活性。

[0620] 为了严格确定“iMC”的豆蔻酰化靶向结构域的作用,通过将约2-kb BsrGI-SacII片段替代为源自v-Src的缺少14个氨基酸豆蔻酰化靶向氨基末端的相似片段,用pBP180-SFG-iMC-2A-aCD19-CD34e-ζ(参加图63)构建双顺反子γ逆转录载体。为了进一步“清除”亲本载体,将载体180中的上游外部骨架内ATG(其前有次优的核糖体负载的“Kozak”序列)消除,得到稍稍修饰的pBP180,称为“pBP607”,和新的测试载体“pBP606-pSFG-iΔMC.2A-aCD19.Q.8stm.CD3ζ”,其含有未豆蔻酰化的iΔ(图15)。此外,为了产生“遗传”形式的未豆蔻酰化iMC载体,从ΔCD19-共表达iMC载体pBP0172-SFG-iMCnoE-2A-ΔCD19中移除上述第二上游ATG,得到pBP609,从pBP609中移除豆蔻酰化靶向序列,得到“pBP608-pSFG-iΔMC-2A-ΔCD19”(图16)。

[0621] 为了检测未豆蔻酰化iMC相对豆蔻酰化iMC的功能,从编码SFG的质粒中制备相应逆转录病毒载体,并且用3组病毒载体转导10人T细胞,所述病毒载体分别含有具有相同的

5' 未翻译区域或具有相应的原始载体 (pBP0172和pBP0180) 的豆蔻酰化或未豆蔻酰化iMC、含有稍稍修饰的5' 末端、和 $\Delta$  CD19或抗CD19CAR-CD3 $\zeta$ 。接触病毒2天后用抗CD19 (172, 606和607) 或抗-CD34 (180, 608和609) 进行转导T细胞的流式细胞术, 确认成功感染并且表达水平在各组内的载体之间相当 (分别约80%或约40%, 未显示)。之后, 在存在或缺乏10nM rimiducid时用等量细胞重新铺板, 并在24小时后通过ELISA分析培养基的IL-6 (图17)。

[0622] 等量 ( $5^5$ ) T细胞胚加入病毒包被的24孔板。48小时后, 收获细胞并检测CD19表达 (载体172, 606和607) 或CD34 Q表位表达 (180, 608, 和609)。收获细胞并用或不用10nM rimiducid重新铺板。24小时后, 收获上清并通过ELISA检测IL-6水平。上清稀释10倍 (17a) 或50倍 (17b)。10.D. 约300ng/ml (距离标准曲线)。

[0623] 172和180家族的载体的结果表明未豆蔻酰化的i $\Delta$ MC构建体如预期的在缺少rimiducid时产生更少的IL-6; 然而, 诱导水平的IL-6并未降低。因此, 未豆蔻酰化的i $\Delta$ MC可提供缺少CD3 $\zeta$ 信号传导 (相比TCR信号传导) 时的更可控的rimiducid依赖性活化信号。

[0624] 为了进一步比较未豆蔻酰化的诱导型MyD88/CD40 (i $\Delta$ MC) 与豆蔻酰化的诱导型MyD88/CD40 (iMC), 含抗CD19第一代CAR加上iMC (180) 或i $\Delta$ MC (608) 的细胞进行培养, 具有或不具有CD19<sup>+</sup>Raji肿瘤细胞和具有或不具有rimiducid, 对IL-2和IL-6均进行分析。

[0625] 未转导的 (NT) 和转导有iMC和未豆蔻酰化i $\Delta$ MC-激活的CAR构建体的T细胞与CD19<sup>+</sup>Raji肿瘤细胞在24孔板中共培养, T细胞与肿瘤细胞比例1:1。随后用10nM rimiducid刺激T细胞。24小时后, 收集上清并用ELISA检测IL-6 (18a) 和IL-2 (18b) 生产。

[0626] 如上IL-6试验, 不存在外源刺激时, i $\Delta$ MC (608) 修饰细胞分泌的IL6少于表达原始iMC-19构建体的细胞 (180) (图18, 左图)。IL-2也观察到相似结果 (图18, 右图)。此外, 存在Raji细胞不显著改变180和608-修饰细胞相对IL-6的基底信号。有趣的是, 存在Raji细胞时, 即使不存在rimiducid, 也会导致通过iMC或i $\Delta$ MC的高水平IL-2生产, 显示i $\Delta$ MC的基底水平虽然低于iMC但仍足以用于完全的CD19依赖性IL-2生产。然而, CD19hi淋巴细胞可能是个例外, IL-2生产的rimiducid依赖性可能在源自上皮的肿瘤细胞中受到更严格的控制而没有源自B细胞的肿瘤所赋予的残余的APC样性质。这是由于B细胞表达共刺激分子, 如CD80和CD86, 以及高水平的II类MHC, 与其他APC例如DC相类似。

[0627] 从iMC中移除豆蔻酰化的靶向结构域如i $\Delta$ MC赋予了MyD88/CD40嵌合共刺激分子更低的rimiducid非依赖性基底活性, 产生更低的NF- $\kappa$ B信号传导和更低的自发IL-6生产。T细胞存活和扩增在体内可能受到5-氨基末端不包括豆蔻酰化区域的MyD88/CD40嵌合刺激分子的更严格的控制。用这些构建体转导T细胞可在没有CID时具有更低的二聚化非依赖性毒性和更低的持续性。其还可允许用滴定确定的rimiducid最佳水平实现对T细胞扩增和肿瘤尺寸的强化控制。

[0628] 因此还提供实施方式, 其中活化T细胞的方法可调, 其中提供各种剂量的AP1903, 从而通过本文所述的诱导型MyD88/CD40嵌合共刺激分子控制共刺激水平。

[0629] 实施例9: 用于构建质粒的多核苷酸序列

[0630] pSFG-i $\Delta$ MC-2A-aCD19-Q-8stm-CD3 $\zeta$ , (w任选的豆蔻酰化靶向结构域)。

[0631]

片段	核苷酸	肽
Kozak 序列	<b>SEQ ID NO: 1</b> Gccacc	N/A
豆蔻酰化靶向序列 w 接头 (任选)	<b>SEQ ID NO: 2</b> Atggggagtagcaagagcaagcctaaggaccccagccagcgc-ctcgac	<b>SEQ ID NO: 3</b> MGSSKSKPKDPS QR-LD
MyD88L (TIR-缺失)	<b>SEQ ID NO: 4</b> atggctgcaggaggtcccggcggggtctgcggccccggtctcctccacatcctcccttcccctggctgctctcaacatgcgagtgccggcgccgctgtctctgttcttgaacgtgcggacacaggtggcggccgactggaccgctggcggaggagatggacttga gtacttggagatccggcaactggagacacaagcggaccccac tggcaggctgctggacgcctggcagggacgcctggcgctc ttagggcactgctcgcctgcttaccaggctggccgcgcac gacgtgctgctggagctgggaccagcattgaggaggattgc caaaagtatatcttgaagcagcagcaggaggagctgagaag cctttacaggtggccgctgtagacagcagtgcccacggacag cagagctggcgggcatcaccacacttgatgacccctggggc atatgcctgagcgttctgatgccttcatctgtattgccccagcga catc	<b>SEQ ID NO: 5</b> MAAGGPGAGSAA PVSSTSSLPLAAL NMRVRRRLSLFL NVRTQVAADWT ALAEEMDFEYLEI RQLETQADPTGR LLDAWQGRPGAS VGRLLDLLTKLG RDDVLLELGPSIE EDCQKYILKQQQ EEAEKPLQVA AV DSSVPRTAELAGI TTLDDPLGHMPE RFDAFICYCPSDIQ
接头	<b>SEQ ID NO: 6</b> gtcgag	<b>SEQ ID NO: 7</b> VE
CD40 (胞质结构域)	<b>SEQ ID NO: 8</b> aaaaaggtggccaagaagccaaccaataaggccccccacc caagcaggagcccaggagatcaatttcccgacgatcttctg gctccaacactgctgctccagtgaggagactttacatggatgc caaccggtcaccaggaggatggcaagagagtcgcatctca	<b>SEQ ID NO: 9</b> KKVAKKPTNKAP HPKQEPQEINFPD DLPGSNTAAPVQ ETLHGCQPVTQE

[0632]

	gtgcaggagagacag	DGKESRISVQERQ
接头	<b>SEQ ID NO: 6</b> gtcgag	<b>SEQ ID NO: 7</b> VE
Fv' (摆动)	<b>SEQ ID NO: 10</b> GGcGTcCAaGTcGAaACcATtagtCCcGGcG AtGGcaGaACaTTtCCtAAaaGgGGaCAaACa TGtGTcGTcCAtTAtACaGGcATGtTgGAgG AcGGcAAaAAgGTgGAcagtagtaGaGAtcGc AAAtAAaCCtTTcAAaTTcATGtTgGGaAAaC AaGAaGTcATtaGgGGaTGGGAgGAgGGcG TgGcTCAaATGtccGTcGGcCAacGcGcTAAg CTcACcATcagcCCcGAcTAcGCATAcGGcG CtACcGGaCAtCCcGGaATtATtCCcCCtCAc GcTAcctTgGTgTTtGAcGTcGAaCTgtTgAA gCTcGAa	<b>SEQ ID NO: 11</b> GVQVETISPGDGR TFPKRGQTCVVH YTGMLLEDGKKVD SSDRNKPFKFML GKQEVIRGWEEG VAQMSVGQRAKL TISPDYAYGATGH PGIIPPHATLVFDV ELLKLE
接头	<b>SEQ ID NO: 6</b> gtcgag	<b>SEQ ID NO: 7</b> VE
Fv	<b>SEQ ID NO: 12</b> ggagtgcagggtggagactatctccccaggagacgggcgcac cttcccaagcgcggccagacctgcgtggtgcactacaccgg gatgcttgaagatggaaagaaagttgattctccgggacaga aacaagcccttaagtattatgctaggaagcaggaggtgatccg aggctgggaagaaggggtgcccagatgagtgtgggtcagag agccaaactgactatatctccagattatgcctatggtgccactgg gcaccagcatcatcccaccatgccactctcgtcttcgatg tggagcttctaaaactggaa	<b>SEQ ID NO: 13</b> GVQVETISPGDGR TFPKRGQTCVVH YTGMLLEDGKKVD SSDRNKPFKFML GKQEVIRGWEEG VAQMSVGQRAKL TISPDYAYGATGH PGIIPPHATLVFDV ELLKLE
SacII (接头)	<b>SEQ ID NO: 14</b> CCGCGG	<b>SEQ ID NO: 15</b> PR
T2A	<b>SEQ ID NO: 16</b> GAAGGCCGAGGGAGCCTGCTGACATG TGGCGATGTGGAGGAAAACCCAGGAC CA	<b>SEQ ID NO: 17</b> EGRGSLTCDV EENPGP
NcoI (接头)	<b>SEQ ID NO: 18</b> CCATGG	<b>SEQ ID NO: 19</b> PW
信号肽	<b>SEQ ID NO: 20</b> ATGGAGTTTGGACTTTCTTGGTTGTTTT TGGTGGCAATTCTGAAGGGTGTCCAGT GTAGCAGG	<b>SEQ ID NO: 21</b> MEFGLSWLFLVAI LKGVQCSR
FMC63 VL	<b>SEQ ID NO: 22</b> GACATCCAGATGACACAGACTACATCC TCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGA GTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAG GACATTAGTAAATATTTAAATTGGTAT CAGCAGAAACCAGATGGAAGTGTAA ACTCCTGATCTACCATAACATCAAGATT	<b>SEQ ID NO: 23</b> DIQMTQTTSSL SLGDRVTISCRAS QDISKYLWYQQ KPDGTVKLLIYHT SRLHSGVPSRFSG SGSGTDYSLTISN

[0633]

	ACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTTCAG TGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTC TCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGA AGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACA GGGTAATACGCTTCCGTACACGTTCCG AGGGGGGACTAAGTTGGAAATAACA	LEQEDIATYFCQQ GNTLPYTFGGGT KLEIT
Flex	<b>SEQ ID NO: 24</b> GGCGGAGGAAGCGGAGGTGGGGGC	<b>SEQ ID NO: 25</b> GGGSGGGG
FMC63 VH	<b>SEQ ID NO: 26</b> GAGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGACC TGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCT GTCCGTCACATGCACTGTCTCAGGGGT CTCATTACCCGACTATGGTGTAAGCTG GATTCGCCAGCCTCCACGAAAGGGTCT GGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTA GTGAAACCACATACTATAATTTCAGCTC TCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGG ACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAA AAATGAACAGTCTGCAAACCTGATGAC ACAGCCATTTACTACTGTGCCAAACAT TATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATG GACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTC ACCGTCTCCTCA	<b>SEQ ID NO: 27</b> EVKLQESGPGLV APSQSLSVTCTVS GVSLPDYGVSWI RQPPRKGLEWLG VIWGSETTYNS ALKSRLTIKDNS KSQVFLKMNSLQ TDDTAIYYCAKH YYYGGSYAMDY WGQGTSVTVSS
BamHI (接头)	<b>SEQ ID NO: 28</b> ggatcc	<b>SEQ ID NO: 29</b> GS
CD34 表位	<b>SEQ ID NO: 30</b> GAACTTCCTACTCAGGGGACTTTCTCA AACGTTAGCACAAACGTAAGT	<b>SEQ ID NO: 31</b> ELPTQGTFSNVST NVS
CD8 茎部	<b>SEQ ID NO: 32</b> CCCGCCCCAAGACCCCCACACCTGCG CCGACCATTGCTTCTCAACCCCTGAGT TTGAGACCCGAGGCCTGCCGGCCAGCT GCCGGCGGGGCCGTGCATAAAGAGG ACTCGATTTGCTTGCGAC	<b>SEQ ID NO: 33</b> PAPRPPTPAPTIA QPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDF ACD
CD8tm + 终止 tf	<b>SEQ ID NO: 34</b> ATCTATATCTGGGCACCTCTCGCTGGC ACCTGTGGAGTCCTTCTGCTCAGCCTG GTTATTACTCTGTAATCACCAGG AATCGCCGCCGCGTTTGTAAAGTGTCCC AGG	<b>SEQ ID NO: 35</b> IYIWAPLAGTCGV LLLSLVITLYCNH RNRRRVCKCPR
Sall (接头)	<b>SEQ ID NO: 36</b> gtcgac	<b>SEQ ID NO: 37</b> VD
CD3 $\zeta$	<b>SEQ ID NO: 38</b> AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGA CGCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGA ACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAG GACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTG	<b>SEQ ID NO: 39</b> RVKFSRSADAPA YQQGQNQLYNEL NLGRREEYDVLD KRRGRDPEMGGK

[0634]	GACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGA GATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGA ACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAAC TGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCC TACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGA GCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATG GCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCA CCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACA TGCAAGCTCTTCCACCTCGTTGA	PRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTA TKD TYDALHMQA LPPR
--------	--	---

[0635] pSFG-idMC-2A-dCD19 (w任选的豆蔻酰化靶向结构域) .

片段	核苷酸	肽
Kozak 序列	<b>SEQ ID NO: 1</b> Gccacc	N/A
豆蔻酰化靶向序列 w 接头 (任选)	<b>SEQ ID NO: 2</b> Atggggagtagcaagagcaagcctaaggacccccagccagcgc-ctcgac	<b>SEQ ID NO: 3</b> MGSSKSKPKDPSQR-LD
MyD88L (TIR-缺失)	<b>SEQ ID NO: 4</b> atggctgcaggaggtcccggcgcggggtctgcggccccgtctcctccacatcctcctccctggctgctcacaatgcgagtgccggcgcgcctgtctctgttcttgaacgtgcggacacaggtggcggccgactggaccgcgctggcggaggagatggactttgagtacttgagatccggcaactggagacacaagcggacccccactggcaggctgctggacgctggcagggacgccctggcgcctctgtaggccgactgctgatctgcttaccagctgggcccgcgacgactgctgctggagctgggaccagcattgaggaggattgccaagaatatactgaagcagcagcaggaggaggtgagaagcctttacaggtggccgctgtagacagcagtgctccacggacagcagagctggcgggcatcaccacactgatgacccccgggcatatgcctgagcgtttcgatgcctcatctgctattgccccagcagacatc	<b>SEQ ID NO: 5</b> MAAGGPGAGSAAPVSST SSLPLAALNMRVRRRLS LFLNVRTQVAADWTAL AEEMDFEYLEIRQLETQ ADPTGRLLDAWQGRPG ASVGRLLDLLTKLGRDD VLELGPSTIEEDCQKYIL KQQQEEAEKPLQVAAP DSSVPRTAELAGITLDD PLGHMPERFDFAFICYCPS DIQ
接头	<b>SEQ ID NO: 6</b> gtcgag	<b>SEQ ID NO: 7</b> VE
CD40 (胞质结构域)	<b>SEQ ID NO: 8</b> aaaaaggtggccaagaagccaaccaataaggcccccaccccagcaggagccccaggagatcaattttcccgacgactctcctggctccaacactgctgctccagtcaggagactttacatggatgccaaccggtcaccaggaggatggcaaaagagatcgcacatctcagtcaggagagacag	<b>SEQ ID NO: 9</b> KKVAKKPTNKAPHPKQE PQEINFDDLPGSNTAAP VQETLHGCQPVTQEDGK ESRISVQERQ
接头	<b>SEQ ID NO: 6</b> gtcgag	<b>SEQ ID NO: 7</b> VE
Fv' (摆动)	<b>SEQ ID NO: 10</b> GGcGTcCAaGTcGAaACcATtagtCCcGgcGAtGGcaGaACaTTtCCtAAaaGgGGaCAaACaTGtGTcGTcCAtTAtACaGGcATGtTgGAgGAcGGcAAaAAgGTgGAcagtagtaGaGAtcGcAAaAAaCCtTTcAAaTTcATGtTgGGaAAaCAaGAaGTcATtaGgGGaTGGGAgGAgGGcGTgGcTCAaATGtccGtcGGcCAacGcGcTAAgCTcACcATcagcCcGAcTAcGCaTAcGGcGcTACcGGaCAtCCcGGaATtATtCCcCCtCAcGcTACctTg	<b>SEQ ID NO: 11</b> GVQVETISPGDGRTFPKR GQTCVVHYTGMLDGGK KVDSSRDRNKPfKfMLG KQEVIRGWEEGVAQMS VGQRAKLTISPDYAYGA TGHPGIIPPHATLVFDVE LLKLE

[0636]





[0638]	<p>TGGAGTCCCACCCGACAGCGTGTCC  AGAGGCCCTCTGTCCTGGACCCACG  TGCATCCTAAGGGGCCAAAAAGTCT  GCTGTCACTGGAAGTGAAGGACGAT  CGGCCTGCCAGAGACATGTGGGTCA  TGGAGACTGGACTGCTGCTGCCACG  AGCAACCGCACAGGATGCTGGAAA  ATACTATTGCCACCGGGGCAATCTG  ACAATGTCCTTCCATCTGGAGATCA  CTGCAAGGCCCGTGTGTGGCACTG  GCTGCTGCGAACCGGAGGATGGAA  GGTCAGTGCTGTGACACTGGCATAT  CTGATCTTTTGCCTGTGCTCCCTGGT  GGGCATTCTGCATCTGCAGAGAGCC  CTGGTGCTGCGGAGAAAGAGAAAAG  AGAATGACTGACCCAACAAGAAGG  TTTTGA</p>	
--------	--	--

[0639] 实施例10:具体核酸和氨基酸序列的示例

[0640] SEQ ID NO:42 (编码人CD40的核酸序列;Genbank登录号NM\_001250;胞质区域用粗体表示。

- [0641] lgccaaggctg gggcagggga gtcagcagag gcctcgctcg ggcgcccagt ggtcctgccg
- [0642] 6lcctggtctca cctcgctatg gttcgtctgc ctctgcagtg cgtcctctgg ggctgcttgc
- [0643] 12ltgaccgctgt ccatccagaa ccaccactg catgcagaga aaaacagtac ctaataaaca
- [0644] 18lgtcagtgctg ttctttgtgc cagccaggac agaaactggt gagtgactgc acagagttca
- [0645] 24lctgaaacgga atgccttctt tgcggtgaaa gcgaattcct agacacctgg aacagagaga
- [0646] 30lcacactgcca ccagcacaaa tactgcgacc ccaacctagg gcttcgggtc cagcagaagg
- [0647] 36lgcacctcaga aacagacacc atctgcacct gtgaagaagg ctggcactgt acgagtgagg
- [0648] 42lcctgtgagag ctgtgtcctg caccgctcat gctcgcccgg ctttggggtc aagcagattg
- [0649] 48lctacaggggt ttctgatacc atctgcgagc cctgcccagt cggtctcttc tccaatgtgt
- [0650] 54lcatctgcttt cgaaaaatgt cacccttggg caagctgtga gaccaaagac ctggttgtgc
- [0651] 60laacaggcagg cacaaacaag actgatgttg tctgtggtcc ccaggatcgg ctgagagccc
- [0652] 66ltggtggtgat ccccatcacc ttcgggatcc tgtttgccat cctcttggtg ctggtcttta
- [0653] 72ltcaaaaaggt ggccaagaag ccaaccaata agggccccca cccaagcag gaaccccagg
- [0654] 78lagatcaattt tcccagcagat cttcctggct ccaacactgc tgctccagtg caggagactt
- [0655] 84ltacatggatg ccaaccggtc acccaggagg atggcaaaga gagtcgcacc tcagtgcagg
- [0656] 90lagagacagtg aggctgcacc caccaggagg tgtggccacg tgggcaaaca ggcagttggc
- [0657] 96lcagagagcct ggtgctgctg ctgctgtggc gtgagggtga ggggctggca ctgactgggc
- [0658] 102latagctcccc gcttctgcct gcaccctgc agtttgagac aggagacctg gcaactggatg
- [0659] 108lcagaaacagt tcaccttgaa gaacctctca cttcaccctg gagcccatcc agtctcccaa
- [0660] 114lcttgatttaa agacagaggc agaagtttgg tgggtggtgt gttggggtat ggtttagtaa
- [0661] 120ltatccaccag accttccgat ccagcagttt ggtgcccaga gaggcatcat ggtggcttcc
- [0662] 126lctgcgcccag gaagccatat acacagatgc ccattgcagc attgtttgtg atagtgaaca
- [0663] 132lactggaagct gcttaactgt ccatcagcag gagactggct aaataaaaatt agaatatatt

- [0664] 1381tatacaacag aatctcaaaa acactgttga gtaaggaaaa aaaggcatgc tgctgaatga
- [0665] 1441tgggtatgga actttttaa aaagtacatg cttttatgta tgtatattgc ctatggatat
- [0666] 1501atgtataaat acaatatgca tcatatattg atataacaag ggttctggaa gggtagacag
- [0667] 1561aaaaccaca gctcgaagag tggtagcgtc tgggggtggg aagaagggtc tggggg
- [0668] SEQ ID NO:43 (编码人CD40的氨基酸序列;胞质区域用粗体表示)
- [0669] MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECLPCGESEFLD  
TWNRETHCHQHXYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEGWHCTSEACESCVLHRSCSPGFVKQIATGVSDTICEPC  
PVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVCGPQDRLRALVVIPIIFGILFAILLVLFIKKVAKKPT  
NKAPHPKQEPQEIFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ
- [0670] SEQ ID NO:44 (具有SalI接头的MyD88L的核苷酸序列)
- [0671] gtcgacatggctgcaggaggtcccggcgcggggtctgcccggcctctcctccacatcctcccttcc  
cctggctgctctcaacatgcgagtgccggcgccgctgtctctgttcttgaacgtgaggacacaggtggcgccgac  
tggaccgctgctggcgaggagatggactttgagtacttggagatccggcaactggagacacaagcggacccccactg  
gcaggctgctggacgcctggcagggacgccctggcgccctctgtaggcccactgctcgagctgcttaccagctggg  
ccgagcagcagctgctgctggagctgggaccagcattgaggaggattgccaaaagtatacttgaagcagcagcag  
gaggaggctgagaagcctttacaggtggccgctgtagacagcagtgctccacggacagcagagctggcgggcatca  
ccacacttgatgacccccctggggcatatgcctgagcgtttcgatgccttcatctgctattgccccagcagatcgt  
cgac
- [0672] SEQ ID NO:45 (MYD88L的氨基酸序列)
- [0673] MAAGGPGAGSAAPVSSTSSLPLAALNMRVRRRLSLFLNVRTQVAADWTALAEEMDFEYLEIRQLETQAD  
PTGRLLDAWQGRPGASVGRLELLTKLGRDDVLELGPSEEDCQKYILKQQEEAEKPLQVAAVDSSVPRTAELAG  
ITLDDPLGHMPERFDFAFICYCPSDI
- [0674] SEQ ID NO:46 (具有XhoI/SalI接头的Fv' Fv1s核苷酸序列, (Fv' 中摆动密码子小写))
- [0675] ctcgagGGcGTcCAaGTcGAaACcATtagtCCcGGcGAtGGcAGaCaTTtCCtAAaAGgGGaCAaAC  
aTGtGTcGTcCAtTAtAcAGGcATGtTgGAGAcGGcAAaAAGTgGAcagtagtaGaGAtcGcAAtAAACcTTc  
AAaTTcATGtTgGGAaAAcCAaGAaGTcATtAgGGaTGGGAgGAGGGcGTgGcTCAaATGtccGTcGGcCAcGcG  
CtAAgCTcAcATcagcCCcGAcTAcGCaTAcGGcGcTAcCGGaCATCCcGGaATtATtCCcCCtCAcGcTAcctT  
gGTgTtTgAcGTcGAaCTgtTgAAgCTcGAagtcgagggagtgaggtgaaaccatctccccaggagacgggagc  
accttccccaaagcgcggccagacctgcgtggtgcactacaccgggatgcttgaagatgaaagaaagttgattcct  
cccgggacagaaacaagccctttaagtttatgctaggcaagcaggaggtgatccgaggtgggaagaaggggttgc  
ccagatgagtggtgagagccaaactgactatactccagattatgcctatggtgccactgggacccaggc  
atcatcccaccatgccactctcgtcttcgatgtggagcttctaaaactggaatctggcggtggatccggagtcg  
ag
- [0676] SEQ ID NO:47 (FV' FVLS氨基酸序列)
- [0677] GlyValGlnValGluThrIleSerProGlyAspGlyArgThrPheProLysArgGlyGlnThrCysVal  
lValHisTyrThrGlyMetLeuGluAspGlyLysLysValAspSerSerArgAspArgAsnLysProPheLysPhe  
MetLeuGlyLysGlnGluValIleArgGlyTrpGluGluGlyValAlaGlnMetSerValGlyGlnArgAlaLysL  
euThrIleSerProAspTyrAlaTyrGlyAlaThrGlyHisProGlyIleIleProProHisAlaThrLeuValPh

eAspValGluLeuLeuLysLeuGlu (ValGlu)

[0678] GlyValGlnValGluThrIleSerProGlyAspGlyArgThrPheProLysArgGlyGlnThrCysValValHisTyrThrGlyMetLeuGluAspGlyLysLysValAspSerSerArgAspArgAsnLysProPheLysPheMetLeuGlyLysGlnGluValIleArgGlyTrpGluGluGlyValAlaGlnMetSerValGlyGlnArgAlaLysLeuThrIleSerProAspTyrAlaTyrGlyAlaThrGlyHisProGlyIleIleProProHisAlaThrLeuValPheAspValGluLeuLeuLysLeuGluSerGlyGlyGlySerGly

[0679] SEQ ID NO:48 (MyD88核苷酸序列)

[0680] atggctgcaggaggtcccggcgcgggggtctgctggccccgggtctcctccacatcctcccttcccctggc  
tgctctcaacatgcgagtgccggcgcgcctgtctctgttcttgaacgtgctggacacaggtggcggccgactggacc  
gcgctggcggaggagatggactttgagtacttggagatccggcaactggagacacaagcggacccccactggcaggc  
tgctggacgcctggcagggacgccttggcgcctctgttaggcgactgctcgagctgcttaccagctgggcccgcga  
cgacgtgctgctggagctgggaccagcattgaggaggattgccaaaagtatacttgaagcagcagcaggaggag  
gctgagaagcctttacagtgccgctgtagacagcagtgctcccacggacagcagagctggcgggcatcaccacac  
ttgatgacccccctggggcatatgcctgagcgtttcgatgccttcatctgctattgccccagcagacatccagtttgt  
gcaggagatgatccggcaactggaacagacaaactatcgactgaagttgtgtgtgtctgaccgcgatgtcctgct  
ggcacctgtgtctggtctattgctagttagctcatcgaaaagaggtgccgccgatggtggtggttgtctctgatg  
attacctgcagagcaaggaatgtgacttccagaccaaatttgcactcagcctctctccaggtgcccatcagaagcg  
actgatccccatcaagtacaaggcaatgaagaaagagttccccagcatcctgaggttcatcactgtctgcgactac  
accaaccctgcaccaaattcttggttctggactgccttggcaaggccttgtccctgccc

[0681] SEQ ID NO:49 (MyD88氨基酸序列)

[0682] M A A G G P G A G S A A P V S S T S S L P L A A L N M R V R R R L S L  
F L N V R T Q V A A D W T A L A E E M D F E Y L E I R Q L E T Q A D P T G R L  
L D A W Q G R P G A S V G R L L E L L T K L G R D D V L L E L G P S I E E D C  
Q K Y I L K Q Q Q E E A E K P L Q V A A V D S S V P R T A E L A G I T T L D D  
P L G H M P E R F D A F I C Y C P S D I Q F V Q E M I R Q L E Q T N Y R L K L  
C V S D R D V L P G T C V W S I A S E L I E K R C R R M V V V V S D D Y L Q S  
K E C D F Q T K F A L S L S P G A H Q K R L I P I K Y K A M K K E F P S I L R  
F I T V C D Y T N P C T K S W F W T R L A K A L S L P

[0683] 实施例11:诱导型嵌合多肽在不同细胞类型中的表达

[0684] 本发明的诱导型嵌合多肽在各种细胞类型中随着肿瘤抗原表达。转导细胞表达嵌合多肽并诱导免疫应答,如趋化因子和细胞因子的分泌所示。通过例如IL-6表达所证实,免疫应答在存在或缺少AP1903配体时均得到活化。包括角质形成细胞、黑素细胞(例如B16-F10黑素瘤)、巨噬细胞(例如IC-21),和成纤维细胞(例如BLK-CL4)。图22提供加工的示意图,通过该加工,嵌合多肽在接触AP1903后可在转导细胞中诱导炎症细胞因子和趋化因子的表达。图23提供用于测量转导细胞中PSMA表达和细胞因子分泌的试验的示意图。所述细胞用四种腺病毒Ad5载体之一进行转导:Ad5-iMC-RP-FL;Ad5-iMC-P2A-P-FL;Ad5f35iMC-RP-FL;或Ad5f35iMC-P2A-FL。图24提供转导IC-21巨噬细胞的结果图,通过生产IL-6显示对AP1903的响应。IC-21巨噬细胞以100,000个细胞/ml/孔在24孔板上培养。以1000、2000、4000、8000和16000v.p./细胞的比例添加腺病毒,并赋予24小时。之后,100nM AP1903加入

所有孔中,后一天收获细胞和培养上清。A.用抗人PSMA抗体LNI-17(白乐津公司,加利福尼亚州圣地亚哥)标记细胞,通过流式细胞术分析PSMA表达。所示为相比未转导细胞的PSMA<sup>+</sup>细胞的百分比。B.通过ELISA(eB公司(e-Bioscience),加利福尼亚州圣地亚哥)从培养物上清中评估IL-6。图25还评估以不同水平细胞铺板和感染多重性将AP1903加入转导有嵌合多肽的巨噬细胞后的IL-6表达。IC-21巨噬细胞以50,000个细胞/ml/孔在24孔板上培养。以6000、12000、18000、24000和30000v.p./细胞的比例添加腺病毒,并赋予24小时。之后,100nM AP1903加入所有孔中,后一天收获细胞和培养上清。A.用抗人PSMA抗体LNI-17(白乐津公司,加利福尼亚州圣地亚哥)标记细胞,通过流式细胞术分析PSMA表达。所示为相比未转导细胞的PSMA<sup>+</sup>细胞的百分比。B.通过ELISA(eB公司(e-Bioscience),加利福尼亚州圣地亚哥)从培养物上清中评估IL-6。图26表示试验结果,证明转导细胞的活化在添加或不添加AP1903时发生。IC-21巨噬细胞以300,000个细胞/孔在6孔板上培养。以24,000v.p./细胞比例添加腺病毒用于Ad5f35-iMC-RP-FL,以18000v.p./细胞用于Ad5-iMC-P2A-P-FL,细胞孵育24小时。之后,加入100nM AP1903并与6小时和20小时收获培养物上清。通过ELISA(eB公司(e-Bioscience),加利福尼亚州圣地亚哥)从培养物上清中评估IL-6。

[0685] 图27提供转导B16-F10黑素瘤细胞的结果图,通过生产IL-6显示对AP1903的响应。B16.F10黑素瘤以100,000个细胞/ml/孔在24孔板中进行培养。以1000、2000、4000、8000和16000病毒/细胞的比例添加腺病毒,并赋予24小时。之后,100nM AP1903加入所有孔中,后一天收获细胞和培养上清。A.用抗人PSMA抗体LNI-17(白乐津公司,加利福尼亚州圣地亚哥)标记细胞,通过流式细胞术分析PSMA表达。所示为相比未转导细胞的PSMA<sup>+</sup>细胞的百分比。B.通过ELISA(eB公司(e-Bioscience),加利福尼亚州圣地亚哥)从培养物上清中评估IL-6。图28提供不同感染多重性和铺板浓度下的实验结果。B16黑素瘤以50,000个细胞/ml/孔在24孔板中进行培养。以6000、12000、18000、24000和30000病毒/细胞的比例添加腺病毒,并赋予24小时。之后,100nM AP1903加入所有孔中,后一天收获细胞和培养上清。A.用抗人PSMA抗体LNI-17(白乐津公司,加利福尼亚州圣地亚哥)标记细胞,通过流式细胞术分析PSMA表达。所示为相比未转导细胞的PSMA<sup>+</sup>细胞的百分比。B.通过ELISA(eB公司(e-Bioscience),加利福尼亚州圣地亚哥)从培养物上清中评估IL-6。图29提供存在或缺少AP1903下IL-6试验的柱状图,显示转导细胞在不添加AP1903下生产IL-6。B16黑素瘤细胞以300,000个细胞/孔在6孔板中进行培养。以24,000v.p./细胞比例添加腺病毒用于Ad5f35-iMC-RP-FL,以18000v.p./细胞用于Ad5-iMC-P2A-P-FL,细胞孵育24小时。之后,加入100nM AP1903并与6小时和20小时收获培养物上清。通过ELISA(eB公司(e-Bioscience),加利福尼亚州圣地亚哥)从培养物上清中评估IL-6。

[0686] 图30提供转导BLK CL4成纤维细胞的结果图,通过生产IL-6显示对AP1903的响应。BLK CL4成纤维细胞以175,000个细胞/ml/孔在24孔板中进行培养。以6000、12000、18000、24000和30000病毒/细胞的比例添加腺病毒,并赋予24小时。之后,100nM AP1903加入所有孔中,后一天收获细胞和培养上清。A.用抗人PSMA抗体LNI-17(白乐津公司,加利福尼亚州圣地亚哥)标记细胞,通过流式细胞术分析PSMA表达。所示为相比未转导细胞的PSMA<sup>+</sup>细胞的百分比。B.通过ELISA(eB公司(e-Bioscience),加利福尼亚州圣地亚哥)从培养物上清中评估IL-6。对于图31,BLK CL4成纤维细胞以350,000个细胞/孔在6孔板中培养。腺病毒以20,000v.p./细胞的比例加入,细胞孵育24小时。然后加入100nM AP1903,后一天收获培养

物上清。通过ELISA (eB公司 (e-Bioscience), 加利福尼亚州圣地亚哥) 从培养物上清中评估IL-6。

[0687] 图32提供用于测定转导细胞活化的基因表达实验的示意图。在该实验中使用巨噬细胞,图33表示基于巨噬细胞的实验用于研究AP1903的响应性。IC-21巨噬细胞以300,000个细胞/孔在6孔板上培养。以24,000v.p./细胞比例添加腺病毒用于Ad5f35-iMC-RP-FL,以18,000v.p./细胞用于Ad5-iMC-P2A-P-FL,细胞孵育24小时。然后加入100nM AP1903,20小时后收获细胞。使用Syber绿(伯乐公司,加利福尼亚州赫尔克里斯)通过RT-PCR从细胞中评估IL-1、IL-6和TNF- $\alpha$ 基因表达。图34显示CXCL1和CXCL10基因表达的试验结果。IC-21巨噬细胞以300,000个细胞/孔在6孔板上培养。以24,000v.p./细胞比例添加腺病毒用于Ad5f35-iMC-RP-FL,以18,000v.p./细胞用于Ad5-iMC-P2A-P-FL,细胞孵育24小时。然后加入100nM AP1903,20小时后收获细胞。使用Syber绿(伯乐公司,加利福尼亚州赫尔克里斯)通过RT-PCR从细胞中评估CXCL1和CXCL10 mRNA基因表达。图35显示CCL2和CCL3基因表达的试验结果。IC-21巨噬细胞以300,000个细胞/孔在6孔板上培养。以24,000v.p./细胞比例添加腺病毒用于Ad5f35-iMC-RP-FL,以18000v.p./细胞用于Ad5-iMC-P2A-P-FL,细胞孵育24小时。然后加入100nM AP1903,20小时后收获细胞。使用Syber绿(伯乐公司,加利福尼亚州赫尔克里斯)通过RT-PCR从细胞中评估CCL2和CCL3 mRNA基因表达。

[0688] 本实施例中包括转导各种细胞的示例,包括黑素瘤、成纤维细胞、巨噬细胞和角质形成细胞系。巨噬细胞中的IL-6活化在存在或缺少AP1903的条件下发生。转导细胞系中的IL-6基因表达和其他细胞因子和趋化因子的基因表达受到AP1903的诱导。

[0689] 实施例12:质粒构建序列

[0690] 下述核酸序列用于构建Ad5-iMC-P2A-P-FL和Ad5f35-iMC-P2A-P-FL载体。还提供核苷酸序列编码的多肽的氨基酸序列。

[0691] Ad-iMC-2A-P-FL

[0692] SEQ ID NO:50Myr nt

[0693] atggggagtagcaagagcaagcctaaggacccccagccagcgc

[0694] SEQ ID NO:51aa

[0695] MGSSKSKPKDPSQR

[0696] SEQ ID NO:52MyD88 nt

[0697] atggctgcaggaggtcccggcgggggtctgctggccccgggtctcctccacatcctcccttcccctggc  
tgctctcaacatgctgagtgctggcgccgctgtctctgttcttgaacgtgctggacacaggtggcggccgactggacc  
gcgctggcggaggagatggactttgagtacttggagatccggcaactggagacacaagcggacccccactggcaggc  
tgctggacgctggcagggacgccttggcgctctgttaggcgactgctcgatctgcttaccagctgggcccgcga  
cgacgtgctgctggagctgggaccagcattgaggaggattgccaaaagtatacttgaagcagcagcaggaggag  
gctgagaagcctttacagtggtggcgtgtagacagcagtggtcccacggacagcagagctggcgggcatcaccacac  
ttgatgacccccctggggcatatgcctgagcgtttcgatgccttcatctgctattgccccagcgcacatc

[0698] SEQ ID NO:53MyD88 aa

[0699] MAAGPGAGSAAPVSSTSSLPLAALNMRVRRRLSLFLNVRTQVAADWTALAEEMDFEYLEIRQLETQAD  
PTGRLLDAWQGRPGASVGRLLDLLTKLGRDDVLELGPSEEDCQKYILKQQEEAEKPLQVAAVDSSVPRTAELAG  
ITTLDDPLGHMPERFDFAFICYCPSDI

[0700] SEQ ID NO:54 CD40 nt

[0701] aaaaaggtggccaagaagccaaccaataaggccccccacccaagcaggagcccaggagatcaat  
tccccgacgatcttcttggtccaacactgctgctccagtgcaggagactttacatggatgccaaccggtcaccag  
gaggatggcaaagagagtgcacatctcagtgcaggagagacag

[0702] SEQ ID NO:55 CD40 aa

[0703] KKVAKKPTNKAPHPKQEPQEIINFDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ

[0704] SEQ ID NO:56 Fv' nt

[0705] GGcGTcCAaGTcGAaACcATtagtCCcGGcGAtGGcAaGAcATtCCtAAaGgGGaCAaACaTGtGT  
cGTcCAtTAtAcAAGcATGtTgGAGAcGGcAAaAAGTgGAcagtagtaGaGAtcGcAAaAAcCTTcAAaTTc  
ATGtTgGGaAAaCAaGAaGTcATtaGgGGaTGGGAgGAGGGcGTgGcTCAaATGtccGTcGGcCAacGcGCtAAgC  
TcACcATcagcCCcGAcTAcGcATAcGGcGCtACcGGaCAtCCcGGaATtATtCCcCCtCAcGCtACcTgGTgTT  
tGAcGTcGAaCTgtTgAAgCTc

[0706] SEQ ID NO:57 Fv' aa

[0707] GVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLDGGKVDSSRDRNKPFKMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVG  
QRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKL

[0708] SEQ ID NO:58 Fv nt

[0709] ggagtgcaggtggagactatctccccaggagacggggcgaccttccccaaagcggccagacctgcgt  
ggtgcactacaccgggatgcttgaagatggaagaaagttagcttctcccgggacagaaacaagccctttaagttt  
atgctaggcaagcaggaggtgatccgaggctgggaagaaggggttggccagatgagtggtgagagagccaaac  
tgactatatctccagattatgcctatggtgccactgggcacccaggcatcatcccaccacatgccactctcgtctt  
cgatgtggagcttctaaaactggaa

[0710] SEQ ID NO:59 Fv aa

[0711] GVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLDGGKVDSSRDRNKPFKMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVG  
QRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE

[0712] SEQ ID NO:60 P2A nt

[0713] GCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCT

[0714] SEQ ID NO:61 P2A aa

[0715] ATNFSLLKQAGDVEENPGP

[0716] SEQ ID NO:62 PSMA nt

[0717] ATGTGGAATCTCCTTCAGAAACCGACTCGGCTGTGGCCACCGCGCGCCGCCGCTGGCTGTGCGC  
TGGGGCGCTGGTGCTGGCGGGTGGCTTCTTTCTCCTCGGCTTCTCTTCGGGTGGTTTATAAAATCCTCCAATGAA  
GCTACTAACATTACTCCAAAGCATAATATGAAAGCATTTTTGGATGAATTGAAAGCTGAGAACATCAAGAAGTTCT  
TACATAATTTTACACAGATACCACATTTAGCAGGAACAGAACAAAACCTTCAGCTTGCAAAGCAAATTCAATCCCA  
GTGGAAAGAATTTGGCCTGGATTCTGTTGAGCTAGCACATTATGATGTCTGTGCTTACCCAAATAAGACTCAT  
CCCAACTACATCTCAATAATTAATGAAGATGGAATGAGATTTTCAACACATCATTATTTGAACCACCTCCTCCAG  
GATATGAAAATGTTTGGGATATTGTACCACCTTTCAGTGTCTTCTCCTCAAGGAATGCCAgAGGGCGATCTAGT  
GTATGTTaactatgcacgaactgaagacttctttaattggaacgggacatgaaaatcaattgctctgggaaaatt  
gtaattgccagatatgggaaagttttcagaggaataaggttaaaaatgccagctggcaggggccaaggagtca  
ttctctactccgaccctgctgactactttgctcctggggtgaagtcctatccagatggttgaatcttctctggagg

tggtgtccagcgtggaaatatcctaaatctgaatggtgcaggagaccctctcacaccaggttaccagcaaatgaa  
 tatgcttataggcgtggaattgcagaggctgttggtcttccaagtattcctgttcatccaattggatactatgatg  
 cacagaagctcctagaaaaatgggtggctcagcaccaccagatagcagctggagaggaagtctcaaagtgccta  
 caatgttgacctggctttactggaacttttctacacaaaaagtcaagatgcacatccactctaccaatgaagtg  
 acaagaatttacaatgtgtaggtactctcagaggagcagtggaaccagacagatatgtcattctgggaggtcacc  
 gggactcatgggtgtttggtggtattgacctcagagtgagcagctgttgttcatgaaattgtgaggagctttgg  
 aacactgaaaaaggaagggaggagacctagaagaacaattttgtttgcaagctgggatgcagaagaatttggcttt  
 cttggttctactgagtgaggcagaggagaattcaagactccttcaagagcgtggcgtggcttatattaatgctgact  
 catctatagaaggaaactacactctgagagttgattgtacaccgctgatgtacagcttggtacacaacctaacaaa  
 agagctgaaaagccctgatgaaggctttgaaggcaaatctctttatgaaagttggactaaaaaaagtccttcccc  
 gagttcagtgccatgccaggataagcaattgggatctggaaatgattttgaggtgttcttccaacgacttgaa  
 ttgcttcaggcagagcacggtataactaaaaattgggaaacaaacaaattcagcgctatccactgtatcacagtgt  
 ctatgaaacatatgagttggtggaaaagttttatgatccaatgtttaaatatcactcactgtggcccaggttcca  
 ggagggatgggtgtttgagctagccaattccatagtgctcccttttgattgtcgagattatgctgtagtttaagaa  
 agtatgctgacaaaatctacagtatttctatgaaacatccacaggaaatgaagacatacagtgtatcatttgattc  
 acttttttctgcagtaaagaattttacagaaattgcttccaagttcagtgagagactccaggactttgacaaaagc  
 aacccaatagttatgaagaatgatgaatgatcaactcatgtttctggaaagagcatttattgatccattagggttac  
 cagacaggcctttttataggcatgtcatctatgctccaagcagccacaacaagatgcaggggagtcattcccagg  
 aatttatgatgctctgtttgatattgaaagcaaagtgacccttccaaggcctggggagaagtgaagagacagatt  
 tatgttgcagccttcacagtgcaggcagctgctgagactttgagtgaagtagcctaa

[0718] SEQ ID NO:63 PSMA aa

[0719] MWNLLHETDSAVATARRPRWLCAGALVLAGGFFLLGFLFGWFIKSSNEATNITPKHNMKAFLDELKAEN  
 IKKFLHNFTQIPHLAGTEQNFQLAKQIQSQWKEFGLDSVELAHYDVLLSYPNKTHPNYISIIINEDGNEIFNTSLFEP  
 PPPGYENVWDIVPPPSAFSPQGMPEGLVYVNYARTEDFFKLERDMKINCSGKIVARIYRGKVFGRNKVKNAQLAGAK  
 GVILYSDPADYFAPGVKSYPDGWNLPGGGVQRGNILNLGAGDPLTPGYPANEYAYRRGIAEAVGLPSIPVHPIGY  
 DAQKLLKMGGSAPPDSSWRGSLKVPYNVGPFGFTGNFSTQKVKMHIHSTNEVTRIYNVIGTLRGAVEPDRYVILGGH  
 RDSWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRSFGTLKKEGWRRRTILFASWDAEEFLLGSTEWAEENSRLQERGVAYINADS  
 SIEGNYTLRVDCTPLMYSLVHNLTKELKSPDEGFEGKSLYESWTKKSPSPEFSGMPRIKLGSGNDFEVFFQRLGIA  
 SGRARYTKNWETNKFSGYPLYHSVYETYELVEKFYDPMFKYHLTVAQVRGGMVFELANSIVLPFDCRDYAVVLRKYA  
 DKIIYSISMKHPQEMKTYSVSFDLSLFSVAVKNFTEIASKFSERLQDFDKSNPIVLRMMNDQLMFLERAFIDPLGLPDRP  
 FYRHVIYAPSSHNYAGESFPGIYDALFDIESKVDPSKAWGEVKRQIYVAAFTVQAAAETLSEVA

[0720] 图37提供质粒载体的图谱。

[0721] pAd1127-02.iMC-P2A-P-FL是用于制备Ad5-iMC-P2A-P-FL和血清型35假型Ad5f35-iMC-P2A-P-FL的穿梭载体。其在相同转录本上还有诱导型MyD88/CD40和全长PSMA，受到CMV<sub>p</sub>和牛生长激素聚A位置的驱动。

[0722] CMV-iMC-P2A-P-FL的序列如下，各区域高亮：

[0723] 绿：CMV启动子，蓝：豆蔻酰化结构域，红：MyD88L，橙：CD40，青：FKBP<sub>v</sub>36（密码子摆动），琥珀：FKBP<sub>v</sub>36（WT序列），浅绿：P2A肽，红色-下划线：PSMA-FL，棕色：BGHpA

[0724] 实施例13：诱导型嵌合多肽在T淋巴细胞中的表达

[0725] 测试iMC在原始T细胞中活性的实验:

[0726] 1. 通过瞬时转染293T细胞生成逆转录病毒:

[0727] 2. 用SFG-MC.Fv1.Fv2.2A. Δ CD19质粒载体转导CD3/CD28活化的T细胞(序列如本实施例和图36所示),并通过流式细胞术通过检测CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>表达来测量转导效率。

[0728] 3. 用或不用10nM AP1903活化T细胞并在24、48和72小时时进行后续研究:

[0729] 用多重分析测量细胞因子和趋化因子生产

[0730] b. 用CD25、CD69、CD80、CD86和I和II类MHC抗体测量CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞的活性表型。

[0731] c. 用CFSE稀释和细胞计数来测量增殖。

[0732] d. 用阿尔玛蓝和细胞计数试验测量没有外源IL-2时的细胞存活。

[0733] 4. 用其他标志物例如CD62L和CD45RA和CD45RO检测CD4和CD8 T细胞的记忆表型。

[0734] 5. 测试存在Treg细胞、制备TGFβ和/或IL-10时静息和iMC活化的T细胞的抗性。

[0735] 预计结果:

[0736] 1. iMC交联驱动T细胞活化,如使用本实施例中所列的T细胞活化标志物所测,并增加Th1细胞因子的细化(elaboration),例如IL-2和IFN γ (增加T细胞增殖)以及IFN γ (增加细胞毒性)。

[0737] 2. T细胞受到iMC交联的活化,凋亡发生很小变化或无变化。

[0738] 3. 观察到记忆表型的增加以及CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞对Treg细胞的抑制效果的抗性增加。

[0739] 本实施例提供用于在T淋巴细胞中表达诱导型嵌合多肽的方法的实施例。提供使用诱导型嵌合MyD88/CD40多肽的具体示例。类似方法可用于诱导型嵌合MyD88或CD40多肽。

[0740] 为了测试T细胞中的诱导型MyD88/CD40多肽iMyD88/CD40(iMC),在相同转录本上编码iMC和截短CD19的逆转录质粒载体pSFG.Myr-MC-Fv1-Fv2-2A-Δ CD19(“pSFG.iMC-2A-Δ CD19”)与gag-pol表达载体和RD114包被载体瞬时共转染入293细胞以制备高效价逆转录病毒。

[0741] 诱导型多肽包括2个FK506结合蛋白质(FKBPs—例如FKBP12v36变体或FKBP12; GenBank AH002 818),其含有F36V突变,用Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser接头连接至MyD88或CD40序列。FKBPs(Fv2)之一的氨基酸序列是密码子摆动的(例如各密码子的第3核苷酸通过维持原始编码氨基酸的沉默突变发生改变),以防止表达逆转录病毒时的同源重组。构建体克隆入SFG;其还可克隆入pLenti7.3。

[0742] 293T细胞用这些构建体的每个进行转染,转导48小时后通过流式细胞术分析标志物基因GFP或Δ CD19。除了GFP或Δ CD19表达,还通过western印迹分析表达的基因产物以确定嵌合多肽的表达。

[0743] 转染的293T细胞在含抑肽酶、亮抑肽酶和苯甲基磺酰氟(德国格尔海姆的勃林格公司(Boehringer))的裂解缓冲液(50%Tris/Gly、10%十二烷基硫酸钠[SDS]、4%β-巯基乙醇、10%甘油、12%水、4%的0.5%溴酚蓝)中重悬并在冰上孵育30分钟。30分钟离心后收获上清,与利姆里缓冲液(加利福尼亚州赫尔克里斯的伯乐实验室公司)以1:2混合、沸腾并装载于10%SDS聚丙烯酰胺凝胶上。膜用兔抗共刺激多肽免疫球蛋白G(IgG;亲和生物试剂公司(Affinity BioReagents),科罗拉多州古登市;1:500稀释)探测并用鼠抗GFP IgG(科文斯公司(Covance),加利福尼亚州伯克利;1:25,000稀释)探测。然后将印迹暴露于合适的



过氧化物酶偶联的二抗,并用增强的化学发光(ECL;安玛西亚公司(Amersham),伊利诺伊州阿灵顿高地)检测蛋白质表达。然后除去膜并用羊多克隆抗肌动蛋白(圣克鲁兹生物技术公司;1:500稀释)再次探测以检查装载的量。

[0744] 评价诱导型表达构建体。

[0745] 细胞系

[0746] 肿瘤细胞系LNCaP、PC3、DU145和A549和人胚胎肾细胞系HEK-293T获自美国典型培养物保藏中心(马里兰州罗克维尔)细胞维持在37°C、5%二氧化碳(CO<sub>2</sub>)、潮湿气氛中的含10%胎牛血清(Hyclone公司,马萨诸塞州沃特汉姆市)和2mM L-谷氨酰胺的完全IMDM(密苏里州圣路易斯的西格玛公司)中。转导的T细胞和PHA胚维持在补充有100U/ml IL-2(Cellgenix公司)的Cellgenix DC(Cellgenix公司)培养基中。

[0747] 活化T细胞

[0748] 使用可溶性 $\alpha$ CD3和 $\alpha$ CD28(加利福尼亚州奥本的美天旎生物技术公司)进行T细胞活化用于扩增和转导。PBMC在补充有100U/ml IL-2(Cellgenix公司)的Cellgenix DC培养基中以 $1 \times 10^6$ 个细胞/ml重悬,并用0.2 $\mu$ g/ml $\alpha$ CD3和0.5 $\mu$ g/ml $\alpha$ CD28可溶性抗体刺激。然后细胞在37°C、5%CO<sub>2</sub>下培养4天。在第4天,加入含IL-2的1ml新鲜培养基。在第7天,收获细胞并在Cellgenix DC培养基中重悬用于转导。

[0749] 逆转录病毒和慢病毒构建体

[0750] 诱导型嵌合多肽构建体由蓝鹭生物公司(Blue Heron Bio)(华盛顿州玻塞尔)合成,图36显示示意图。通过用编码这些转基因的逆转录病毒或慢病毒经单一或共转导T细胞来进行嵌合多肽的表达评估、炎症细胞因子和趋化因子的表达和分泌的评估。

[0751] 逆转录病毒转导

[0752] 对于短时生产逆转录病毒,用嵌合多肽构建体与编码gag-pol和RD 114包被的质粒一起转染293T细胞,使用GeneJuice转染试剂(诺瓦基公司(Novagen),威斯康星州麦迪逊)。转染后48或72小时收获病毒、速冻、使用前存于-80°C。对于短时生产慢病毒,用构建体与质粒pLP1(gag/pol),pLP2(rev)和pLP/VSVG(VSVG env)一起转染293T细胞,使用GeneJuice。转染后48或72小时收获病毒、速冻、使用前存于-80°C。对于大规模逆转录病毒生产,通过用VSV-G假型瞬时逆转录病毒上清进行多重转导生成稳定的FLYRD 18衍生的逆转录病毒生产系。具有最高转基因表达的FLYRD18细胞是单细胞分选的,产生最高病毒效价的克隆经扩增并用于生产病毒用于淋巴细胞转导。该克隆的转基因表达、功能和逆转录病毒效价在连续培养期间维持超过8周。用7 $\mu$ g/ml重组人纤维蛋白片段(Retronectin)(日本滋贺县大津的Takara生物公司(Takara Bio,Otsu,Shiga,Japan))经37°C 1小时或4°C过夜包被非组织培养处理的24孔板。所述孔用磷酸缓冲盐水(PBS)清洗,然后通过将所述板与1.5ml上清37°C孵育30分钟来包被逆转录病毒上清。随后,将T细胞胚在补充有100U/ml IL-2的病毒上清中以 $5 \times 10^5$ 个细胞/孔铺板。转导进行超过60小时。转导后,收获细胞并通过流式细胞术针对CD19或GFP表达分型。

[0753] 转导的T细胞的细胞毒性

[0754] 各转导T细胞系的细胞毒性活性可在例如标准4小时<sup>51</sup>Cr释放试验中评估,如前所述。T细胞用逆转录病毒或慢病毒转导并针对Cr<sup>51</sup>标记的靶细胞制备,包括自体同源植物血细胞凝集素(PHA)刺激的淋巴细胞(PHA胚)、LNCaP、PC3或DU145和A549肿瘤细胞系,和表达

转基因A549的人PSMA (A549-PSMA)。在完整培养基或1%曲通X-100(密苏里州圣路易斯的西格玛公司)孵育的靶细胞分别用于确定自发和最大<sup>51</sup>Cr释放。重复三次的孔的特异裂解的平均百分比计算为100X(实验释放-自发释放)/(最大释放-自发释放)。除了铬释放试验,还进行共培养实验。此时,细胞系LNCaP、PC3、DU145、A549和A549-PSMA经转导以表达荧光mOrange并用做靶细胞。存在IL-2(50U/ml)的完全培养基中,表达mOrange的肿瘤细胞与未转导或修饰的T细胞以肿瘤细胞与T细胞1:10的比例共培养。24小时后,T细胞用100nM AP1903刺激。72小时后收集细胞、计数并用CD3标记以检测T细胞并用流式细胞术(LSR II;BD公司)分析mOrange肿瘤细胞的百分比。

[0755] 转导的T细胞的表型分型和活化状态

[0756] 转导的T细胞的细胞表面表型使用下述单克隆抗体进行研究:CD3、CD4、CD8、CD19、CD25、CD27、CD28、CD44、CD45RA、CD45RO、CD62L、CD80、CD83、CD86、CD127、CD134、CD137、HLA-ABC和HLA-DR。用或不用100nM AP903进行表型分型。合适匹配的同种型对照用于各实验,并用LSR II流式细胞术(BD公司)分析细胞。用抗F(ab')<sub>2</sub>(宾夕法尼亚州西格鲁甫的杰克逊免疫研究实验室公司)评估嵌合多肽表达。

[0757] 分析转导的T细胞的细胞因子生产

[0758] 使用人Th1/Th2细胞因子细胞计数珠试验(BD药物基因公司(BD Pharmingen))测量100nM AP1903刺激之前和之后(24小时)的T细胞培养物上清中的干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF $\alpha$ )。根据生产商指导通过酶联免疫吸附试验(ELISA;R&D系统公司,明尼苏达州明尼阿波利斯)验证培养物上清中的诱导的细胞因子生产。

[0759] 转导的T细胞的增殖

[0760] AP1903诱导的活性的增殖效果通过测量接触AP1903后的转导和未转导T细胞的细胞生长来评估。37°C下用10 $\mu$ M二乙酸羧基荧光素-琥珀酰亚胺基酯(CFSE)标记T细胞10分钟。孵育后,在PBS中清洗细胞,然后在Cellgenix DC培养基中重悬。1x10<sup>6</sup> CFSE标记的修饰T细胞或未转导T细胞随后在Cellgenix DC培养基中单独培养或用100nM AP1903刺激培养。5天后收获细胞,用CD3-PerCP.Cy5.5和CD19-PE标记并用流式细胞术分析CFSE稀释。

[0761] 为了评估可溶免疫球蛋白是否影响转导T淋巴细胞的增殖和扩增,细胞以1 $\times$ 10<sup>5</sup>个细胞/孔与系列稀释的健康供体人血浆培养或与系列稀释的纯化的人免疫球蛋白(杰克逊免疫研究公司)培养而不添加外源细胞因子。72小时后,用1 $\mu$ Ci(0.037MBq)甲基-3[H]胸苷(安法马西亚生物技术公司(Amersham Pharmacia Biotech),新泽西州皮斯卡塔韦)脉冲细胞并再培养15小时。然后将细胞收获到过滤器上并干燥,在 $\beta$ -闪烁计数器(TriCarb 2500TR;帕卡德生物科学公司(Packard BioScience),康涅狄格州艾美)中测量每分钟计数。实验重复三次。在另一个实验中,对照和修饰的T淋巴细胞用培养基进行单独培养或用每两天加入系列稀释的血浆或纯化免疫球蛋白的培养基进行培养。然后用台盼蓝排除法每三天对细胞进行计数。

[0762] 体内实验

[0763] 活化的T细胞对肿瘤尺寸的体内效果可通过例如下述进行测试。6-8周龄的非肥胖糖尿病严重混合免疫缺陷(NOD/SCID)小鼠经辐射(250拉德)并在右侧腹部中皮下注射基质胶(Matrigel)(BD生物科学公司)中重悬的10x 10<sup>6</sup>-15x 10<sup>6</sup>个LNCaP肿瘤细胞。两周后用未

转导或转导T细胞(总计 $15 \times 10^6$ )注射入具有直径约0.5厘米肿瘤的小鼠的尾静脉。小鼠随机分为2组:一组接受CID(50 $\mu$ g AP1903,腹膜内,一周两次),一组仅接受运载体(16.7%丙二醇,22.5%PEG400和1.25%吐温80,腹膜内,一周两次)以扩增T细胞。通过卡钳测量评估21天的小鼠肿瘤生长。通过眼球后眼部出血于第7、14和21天获取外周血样品,用流式细胞分析表达人CD3/人CD19的T细胞以测量转导T细胞或对照T细胞的持续性和扩增。

[0764] 标注的载体序列:

8931 bp ds-DNA

/注释="MMLV Psi"

/注释="莫洛尼氏白血病毒病毒的包装信号(MMLV)"

[0765] CDS

1226..3802

/密码子\_起始=1

/注释="iMC-2A- $\Delta$ -CD19"

/翻译="

[0766] SEQ ID NO:64 aa

[0767] MGSSKSKPKDPSQRLEMAAGGPGAGSAAPVSSTSSLPLAALNMRV

[0768] RRRLSLFLNVRTQVAADWTALAEEMDFEYLEIRQLETQADPTGRLLDAWQGRPGASVGR

[0769] LLDLLTKLGRDDVLELGPSIEEDCQKYILKQQQEEAEKPLQVAAVDSSVPRTAELAGI

[0770] TTLDDPLGHMPERFDFAFICYCPSDIKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAA

[0771] PVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQVESGGGSGGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCV

[0772] VHYTGMLEDGKKVDSSRDNRNPKFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAY

[0773] GATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLVEGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLD

[0774] GKKVDSSRDNRNPKFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGII

[0775] PPHATLVFDVELLKLSEGGSGVDRAKRGKPIPNPLLGLDSTGSGSATNFSLLKQAGDV

[0776] EENPGPTRMPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLT

[0777] WSRESPLKPFLLKLSLGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPG

[0778] WTVNVEGSGELFRWNVSDLGGLGCGLNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWEG

[0779] EPPCLPPRDSLNSLSQDLTMAPGSTLWLSGCVPPDSVSRGPLSWTHVHPKPKSLLSL

[0780] ELKDDRPARDMWMETGLLLPRATAQDAGKYCHRGNLTMSFHLEITARPVLWHLLRT

[0781] GGWKVSAVTLAYLIFCLCSLVGILHLQRALVLRKRKRMTDPTRRF"

---

	misc_feature	1226..1267	/注释="Myr"
	misc_feature	1268..1273	/注释="XhoI"
	misc_feature	1274..1789	/注释="MyD88"
	misc_feature	1790..1975	/注释="δ-CD40"
	misc_feature	1976	/注释="Sall"
[0782]	misc_feature	1977..1981	/注释="XhoI"
	misc_feature	1982..1999	/注释="L1"
	misc_feature	2000..2320	/注释="LFv1"
	misc_feature	2327..2647	/注释="Fv2L"
	misc_feature	2648..2665	/注释="L1"
	misc_feature	2666	

		/注释="SalI"
	misc_feature	2667..2671 /注释="SalI"
	misc_feature	2672..2683 /注释="Furin"
	misc_feature	2684..2725 /产物="猿病毒 5 的表位标签" /注释="V5 标签"
	misc_feature	2726..2794 /注释="L-2A"
	misc_feature	2795..2800 /注释="MluI"
	misc_feature	2801..3802 /注释="dCD19"
[0783]	misc_feature	3962..4551 /注释="LTR"
	引物_结合	互补(5250..5266) /注释="M13 fwd" /注释="常见序列引物, 多重相似变体之一"
	启动子	5741..5845 /基因="bla" /注释="AmpR 启动子"
	CDS	5846..6706 /密码子_起始=1 /基因="bla" /产物="β-内酰胺酶" /注释="AmpR" /注释="赋予对氨比西林、羧苄青霉素和相关抗体的抗性" /翻译="
[0784]	SEQ ID NO:65 aa	
[0785]	MSIQHFRVALIPFFAAFCLPVFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGYI	

[0786] ELDLNSGKILESFRPEERFPMSTFKVLLCGAVLSRIDAGQEQLGRRIHYSQNDLVEYS  
 [0787] PVTEKHLTDGMTVRELCSAAITMSDNTAANLLTTIGGPKELTAFLHNMGDHVTRLDRW  
 [0788] EPELNEAIPNDERDTTMPVAMATTLRKLLTGELLTLASRQQLIDWMEADKVAGPLLRSA  
 [0789] LPAGWFIADKSGAGERGSRGIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIAEIGAS  
 [0790] LIKHW"

rep\_起始 6877..7465  
 /方向=向右  
 /注释="ori"  
 /注释="高拷贝数 colE1/pMB1/pBR322/pUC 复制起点"

启动子 7789..7819  
 /注释="lac 启动子"  
 /注释="大肠杆菌 lac 操纵子的启动子"

蛋白质\_结合 7827..7843  
 [0791] /结合\_部分="lacI 编码的 lac 抑制子"  
 /注释="lac 操纵子"  
 /注释="lac 抑制子结合 lac 操纵子以抑制大肠杆菌中的转录。该抑制可通过添加乳糖或异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)来释放。"

引物\_结合 7851..7867  
 /注释="M13 rev"  
 /注释="常见序列引物, 多重相似变体之一"

LTR 8276..8869  
 /注释="莫洛尼鼠白血病病毒的长末端重复"

[0792] 起始  
 [0793] SEQ ID NO:66nt  
 [0794] 1 aagctggcca gcaacttate tgtgtctgtc cgattgtcta gtgtctatga ctgattttat  
 [0795] 61 gcgcctgctg cggtagtagt tagctaacta gctctgtatc tggcggaccc gtggtggaac  
 [0796] 121 tgacgagttc ggaacacccg gccgcaacc tgggagacgt cccagggact tcgggggccc  
 [0797] 181 tttttgtggc cggacctgag tcttaaaatc ccgatcgttt aggactcttt ggtgcacccc  
 [0798] 241 ccttagagga gggatatgtg gttctggtag gagacgagaa cctaaacag ttcccgcctc  
 [0799] 301 cgtctgaatt tttgctttcg gtttgggacc gaagccgcgc cgcgcgtctt gtctgctgca  
 [0800] 361 gcatcgttct gtgttgtctc tgtctgactg tgtttctgta tttgtctgaa aatatgggcc  
 [0801] 421 cgggctagcc tgttaccact cccttaagtt tgaccttagg tcaactggaaa gatgtcgagc  
 [0802] 481 ggatcgtca caaccagtcg gtagatgtca agaagagacg ttgggttacc ttctgctctg

[0803] 541 cagaatggcc aacctttaac gtcggatggc cgcgagacgg cacctttaac cgagacctca  
[0804] 601 tcaccaggt taagatcaag gtcttttcac ctggcccga tggacacca gaccaggtgg  
[0805] 661 ggtacatcgt gacctgggaa gccttggtt ttgaccccc ccctgggtc aagccctttg  
[0806] 721 tacaccctaa gcctccgct cctcttctc catccgccc gtctctccc ctgtaacctc  
[0807] 781 ctgttcgac cccgctcga tctctcttt atccagcct cactccttct ctaggcgcc  
[0808] 841 ccatatggcc atatgagatc ttatatgggg cccccgcc cttgtaaac ttccctgacc  
[0809] 901 ctgacatgac aagagtact aacagccct ctctccaagc tcaattacag gctctctact  
[0810] 961 tagtccagca cgaagtctgg agacctctgg cggcagccta ccaagaacaa ctggaccgac  
[0811] 1021 cgggtgtacc tcacccttac cgagtcggcg acacagtgtg ggtccgccga  
caccagacta  
[0812] 1081 agaacctaga acctcgctgg aaaggacctt acacagtctt gctgaccacc  
cccaccgcc  
[0813] 1141 tcaaagtaga cggcatcga gcttgatac acgcgccca cgtgaaggct  
gccgaccgg  
[0814] 1201 ggggtggacc atctctaga ctgcatggg gagtagcaag agcaagccta  
aggaccag  
[0815] 1261 ccagcgcctc gagatggccg ctgggggcc aggcgccgga tcagctgctc  
ccgtatcttc  
[0816] 1321 tacttcttct ttgccgctgg ctgctctgaa catgcgcgtg agaagacgcc  
tctccctggt  
[0817] 1381 ccttaacggt cgcacacaag tcgctgccga ttggaccgcc cttgccgaag  
aatggactt  
[0818] 1441 tgaatacctg gaaattagac aacttgaaac acaggccgac cccactggca  
gactcctgga  
[0819] 1501 cgcattggcag ggaagacctg gtgcaagcgt tggaccgctc ctggatctcc  
tgacaaaact  
[0820] 1561 gggacgcgac gacgtactgc ttgaactcgg acctagcatt gaagaagact  
gcaaaaata  
[0821] 1621 tatcctgaaa caacaacaag aagaagccga aaaacctctc caagtcgcag  
cagtggactc  
[0822] 1681 atcagtacc cgaacagctg agcttgctgg gattactaca ctgcagacc  
cactcggaca  
[0823] 1741 tatgcctgaa agattcgaag ctttcatttg ctattgcccc tctgacataa  
agaaagttgc  
[0824] 1801 aaagaaacc acaataaag cccacaccc taaacaggaa cccaagaa  
tcaatttccc  
[0825] 1861 agatgatctc cctggatcta atactgccgc cccggtccaa gaaacctgc  
atggttgcca  
[0826] 1921 gcctgtcacc caagaggacg gaaaagaatc acggattagc gtacaagaga

gacaagtcga

[0827] 1981 gtctggcggg gatccggag gcgttcaagt agaaacaatc agcccaggag  
acggaaggac

[0828] 2041 tttccccaaa cgaggccaaa catgcgtagt tcattatact gggatgctcg  
aagatggaaa

[0829] 2101 aaaagtagat agtagtagag accgaaacaa accatttaaa tttatgttgg  
gaaaacaaga

[0830] 2161 agtaataagg ggctgggaag aaggtgtagc acaaatgtct gttggccagc  
gcgcaaaact

[0831] 2221 cacaatttct cctgattatg cttacggagc taccggccac cccggcatca  
taccctca

[0832] 2281 tgccacactg gtgtttgacg tcgaattgct caaactggaa gtcgaggag  
tgcaggtgga

[0833] 2341 gacgattagt cctggggatg ggagaacctt tccaaagcgc ggtcagacct  
gtgttctcca

[0834] 2401 ctacaccggg atgctggagg acgggaagaa ggtggactct tcacgcgac  
gcaataagcc

[0835] 2461 tttcaagttc atgctcggca agcaggaggt gatccggggg tgggaggagg  
gcgtggctca

[0836] 2521 gatgtcggtc gggcaacgag cgaagcttac catctcacc gactacgcgt  
atggggcaac

[0837] 2581 ggggcatccg ggaattatcc ctccccacgc tacgctcgta ttcgatgtgg  
agctcttgaa

[0838] 2641 gcttgagtct ggcgggtggat ccggagtcga ccgcgcaaag cgtggaaaac  
ctatacctaa

[0839] 2701 tccattgctg ggcttagact caacaggcag cggaagcgca acgaatTTTT  
ccctgctgaa

[0840] 2761 acaggcaggg gacgtagagg aaaatcctgg tcctacgcgt atgccccctc  
ctagactgct

[0841] 2821 gtttttctg ctctttctca cccaatgga agttagacct gaggaaccac  
tggtcgtaa

[0842] 2881 agtgggaagaa ggtgataatg ctgtcctcca atgccttaaa gggaccagcg  
acggaccaac

[0843] 2941 gcagcaactg acttgagacc gggagtcccc tctcaagccg tttctcaagc  
tgtcacttgg

[0844] 3001 cctgccaggt cttggtatcc acatgcgccc ccttgccatt tggctcttca  
tattcaatgt

[0845] 3061 gtctcaacaa atgggtggat tctacctttg ccagcccggc cccccttctg  
agaaagcttg



[0846] 3121 gcagcctgga tggaccgtca atgttgaagg ctccggtgag ctgttttagat  
ggaatgtgag

[0847] 3181 cgaccttggc ggactcgggtt gcggactgaa aaataggagc tctgaaggac  
cctcttctcc

[0848] 3241 ctccggtaag ttgatgtcac ctaagctgta cgtgtgggcc aaggaccgcc  
ccgaaatctg

[0849] 3301 ggagggcgag cctccatgcc tgccgcctcg cgattcactg aaccagtctc  
tgtcccagga

[0850] 3361 tctcactatg gcgcccggat ctactctttg gctgtcttgc ggcgttcccc  
cagatagcgt

[0851] 3421 gtcaagagga cctctgagct ggacccacgt acaccctaag ggccctaaga  
gcttggtgag

[0852] 3481 cctggaactg aaggacgaca gaccgcacg cgatatgtgg gtaatggaga  
ccggccttct

[0853] 3541 gctccctcgc gctaccgcac aggatgcagg gaaatactac tgtcatagag  
ggaatctgac

[0854] 3601 tatgagcttt catctcgaaa ttacagcagc gcccgttctt tggcattggc  
tcctccggac

[0855] 3661 tggaggctgg aagggtgtctg ccgtaacact cgcttacttg attttttgcc  
tgtgtagcct

[0856] 3721 ggttgggatc ctgcatcttc agcgagccct tgtattgcbc cgaaaaagaa  
aacgaatgac

[0857] 3781 tgaccctaca cgacgattct gagcatgcaa cctcgatccg gattagtcca  
atgtgttaaa

[0858] 3841 gacaggatat cagtgggtcca ggctctagtt ttgactcaac aatatacca  
gctgaagcct

[0859] 3901 atagagtacg agccatagat aaaataaaag attttattta gtctccagaa  
aaagggggga

[0860] 3961 atgaaagacc ccacctgtag gtttggcaag ctagcttaag taacgccatt  
ttgcaaggca

[0861] 4021 tggaaaaata cataactgag aatagagaag ttcagatcaa ggtcaggaac  
agatggaaca

[0862] 4081 gctgaatatg ggccaaacag gatatctgtg gtaagcagtt cctgccccgg  
ctcagggcca

[0863] 4141 agaacagatg gaacagctga atatgggcca aacaggatat ctgtggtaag  
cagttcctgc

[0864] 4201 cccggctcag ggccaagaac agatgggtccc cagatgcggt ccagccctca  
gcagtttcta

[0865] 4261 gagaaccatc agatgtttcc aggggtgcccc aaggacctga aatgacctg

tgccttattt

[0866] 4321 gaactaacca atcagttcgc ttctcgettc tgttcgcgcg cttctgctcc  
ccgagctcaa

[0867] 4381 taaaagagcc cacaaccct cactcggggc gccagtcctc cgattgactg  
agtcgcccgg

[0868] 4441 gtaccctgtg atccaataaa ccctcttgca gttgcatccg acttgtggtc  
tcgctgttcc

[0869] 4501 ttgggagggt ctctctgag tgattgacta cccgtcagcg ggggtcttcc  
acacatgcag

[0870] 4561 catgtatcaa aattaatttg gtttttttcc ttaagtattt acattaaatg  
gccatagtac

[0871] 4621 ttaaagttac attggcttcc ttgaaataaa catggagtat tcagaatgtg  
tcataaatat

[0872] 4681 ttctaatttt aagatagtat ctccattggc tttctacttt ttcttttatt  
tttttttgc

[0873] 4741 ctctgtcttc catttgttgt tgttgttggt tgtttgttg tttgttggtt  
ggttggttaa

[0874] 4801 ttttttttta aagatcctac actatagtcc aagctagact attagctact  
ctgtaacca

[0875] 4861 gggtgacctt gaagtcattg gtagcctgct gttttagcct tcccacatct  
aagattacag

[0876] 4921 gtatgagcta tcatttttgg tatattgatt gattgattga ttgatgtgtg  
tgtgtgtgat

[0877] 4981 tgtgtttgtg tgtgtgactg tgaaaatgtg tgtatgggtg tgtgtgaatg  
tgtgtatgta

[0878] 5041 tgtgtgtgtg tgagtgtgtg tgtgtgtgtg tgcattgtgtg tgtgtgtgac  
tgtgtctatg

[0879] 5101 tgtatgactg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg  
tgtgtttgta

[0880] 5161 aaaaatattc tatggtagtg agagccaacg ctccggctca ggtgtcaggt  
tggtttttga

[0881] 5221 gacagagtct ttcacttagc ttggaattca ctggccgctg ttttacaacg  
tcgtgactgg

[0882] 5281 gaaaaccctg gcgttaccca acttaatcgc cttgcagcac atcccccttt  
cgccagctgg

[0883] 5341 cgtaatagcg aagaggcccc caccgatcgc ctttcccaac agttgcgcag  
cctgaatggc

[0884] 5401 gaatggcgcc tgatgcggta ttttctcctt acgcatctgt gcggtatttc  
acaccgata

[0885] 5461 tgggtgcactc tcagtacaat ctgctctgat gccgcatagt taagccagcc  
ccgacacccg

[0886] 5521 ccaacacccg ctgacgcgcc ctgacgggct tgtctgctcc cggcatccgc  
ttacagacaa

[0887] 5581 gctgtgaccg tctccgggag ctgcatgtgt cagaggtttt caccgtcadc  
accgaaacgc

[0888] 5641 gcgatgacga aagggcctcg tgatacgcct atttttatag gttaatgtca  
tgataataat

[0889] 5701 ggtttcttag acgtcaggtg gcacttttctg gggaaatgtg cgcggaaccc  
ctatttgttt

[0890] 5761 atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct  
gataaatgct

[0891] 5821 tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg  
cccttattcc

[0892] 5881 cttttttgcg gcattttgcc ttctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg  
tgaaagtaaa

[0893] 5941 agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc  
tcaacagcgg

[0894] 6001 taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca  
cttttaaagt

[0895] 6061 tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtat tgacgccggg caagagcaac  
tcggtcgccg

[0896] 6121 catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa  
agcatcttac

[0897] 6181 ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg  
ataacactgc

[0898] 6241 ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt  
ttttgcacaa

[0899] 6301 catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg  
aagccatacc

[0900] 6361 aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc  
gcaaactatt

[0901] 6421 aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga  
tggaggcgga

[0902] 6481 taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta  
ttgctgataa

[0903] 6541 atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca gcactggggc  
cagatggtaa

[0904] 6601 gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg

atgaacgaaa

[0905] 6661 tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt  
cagaccaagt

[0906] 6721 ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa  
ggatctaggt

[0907] 6781 gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt  
cgttccactg

[0908] 6841 agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt  
ttctgcgct

[0909] 6901 aatctgctgc ttgcaaaca aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttggt  
tgccggatca

[0910] 6961 agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga  
taccaaatac

[0911] 7021 tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag  
caccgcctac

[0912] 7081 atacctcgct ctgctaatec tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata  
agtcgtgtct

[0913] 7141 taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg  
gctgaacggg

[0914] 7201 gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga  
gatactaca

[0915] 7261 gcgtgagcat tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca  
ggtatccggt

[0916] 7321 aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa  
acgcctggta

[0917] 7381 tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt  
tgtgatgctc

[0918] 7441 gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac  
ggttcctggc

[0919] 7501 cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tectgctta tcccctgatt  
ctgtggataa

[0920] 7561 ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga  
ccgagcgcag

[0921] 7621 cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cccaatacgc aaaccgcctc  
tccccgcgcg

[0922] 7681 ttggccgatt cattaatgca gctggcacga caggtttccc gactggaaag  
cgggcagtga

[0923] 7741 gcgcaacgca attaatgtga gttagctcac tcattaggca ccccaggctt  
tacactttat

[0924] 7801 gcttccggct cgtatgttgt gtggaattgt gagcggataa caatttcaca  
caggaaacag

[0925] 7861 ctatgacat gattacgcca agctttgctc ttaggagttt cctaatacat  
cccaaactca

[0926] 7921 aatatataaa gcatttgact tgttctatgc cctagggggc ggggggaagc  
taagccagct

[0927] 7981 ttttttaaca tttaaaatgt taattccatt ttaaattgcac agatgttttt  
atttcataag

[0928] 8041 ggtttcaatg tgcataaatg ctgcaatatt cctgttacca aagctagtat  
aaataaaaat

[0929] 8101 agataaacgt ggaaattact tagagtttct gtcattaacg tttccttctc  
cagttgacaa

[0930] 8161 cataaatgcg ctgctgagca agccagtttg catctgtcag gatcaatttc  
ccattatgcc

[0931] 8221 agtcatatta attactagtc aattagttga tttttatfff tgacatatac  
atgtgaatga

[0932] 8281 aagaccccac ctgtaggttt ggcaagctag cttaagtaac gccatfffgc  
aaggcatgga

[0933] 8341 aaaatacata actgagaata gaaaagttca gatcaaggtc agaacagat  
ggaacagctg

[0934] 8401 aatatgggcc aaacaggata tctgtggtaa gcagttcctg ccccggctca  
ggccaagaa

[0935] 8461 cagatggaac agctgaatat gggccaaaca ggatatctgt ggtaagcagt  
tcctgccccg

[0936] 8521 gctcagggcc aagaacagat ggtccccaga tgcggtccag ccctcagcag  
tttctagaga

[0937] 8581 accatcagat gtttccaggg tgccccagg acctgaaatg accctgtgcc  
ttatfffgaac

[0938] 8641 taaccaatca gttcgcttct cgcttctggt cgcgcgctta tgctccccga  
gctcaataaa

[0939] 8701 agagcccaca accctcaact cggggcgcca gtctccgat tgactgagtc  
gcccgggtac

[0940] 8761 ccgtgtatcc aataaacct cttgcagttg catccgactt gtggtctcgc  
tgttccttgg

[0941] 8821 gaggtctctc tctgagtgat tgactaccg tcagcggggg tctttcattt  
gggggctcgt

[0942] 8881ccgggatcgg gagaccctg cccagggacc accgaccac caccgggagg t

[0943] 实施例14:其他序列

[0944] SEQ ID NO:67豆蔻酰化多肽核苷酸序列

- [0945] ATGGGGAGTAGCAAGAGCAAGCCTAAGGACCCAGCCAGCGC
- [0946] SEQ ID NO:68豆蔻酰化多肽氨基酸序列
- [0947] MGSSKSKPKDPSQR
- [0948] SEQ ID NO:69接头核苷酸序列(接头1)
- [0949] CTCGAG
- [0950] SEQ ID NO:70接头氨基酸序列(接头1)
- [0951] LE
- [0952] SEQ ID NO:71截短的MyD88多肽核苷酸序列
- [0953] ATGGCCGCTGGGGGCCAGGCGCCGATCAGCTGCTCCCGTATCTTCTACTTCTTCTTTGCCGCTGGCT  
GCTCTGAACATGCGCGTGAGAAGACGCCTCTCCCTGTTCCCTAACGTTGCGACACAAGTCGCTGCCGATTGGACCGC  
CCTTGCCGAAGAAATGGACTTTGAATACCTGGAAATAGACAACCTGAAACACAGGCCGACCCCACTGGCAGACTCC  
TGGACGCATGGCAGGGAAGACCTGGTGCAAGCGTTGGACGGCTCCTGGATCTCCTGACAAAACCTGGGACGCGACGAC  
GTACTGCTTGAACCTCGGACCTAGCATTGAAGAAGACTGCCAAAAATATATCCTGAAACAACAAGAAGAAGCCGA  
AAAACCTCTCCAAGTCGCAGCAGTGGACTCATCAGTACCCCGAACAGCTGAGCTTGCTGGGATTACTACTCGACG  
ACCCACTCGGACATATGCCTGAAAGATTGACGCTTTTCATTTGCTATTGCCCTCTGACATA
- [0954] SEQ ID NO:72截短的MyD88多肽氨基酸序列
- [0955] MAAGGPGAGSAAPVSSTSSPLAALNMRVRRRLSLFLNVRTQVAADWTALAEEMDFEYLEIRQLETQAD  
PTGRLLDAWQGRPGASVGRLLDLLTKLGRDDVLELGPSTIEEDCQKYILKQQEAEKPLQVAAVDSSVPRTAELAG  
ITLDDPLGHMPERFDFAFICYCPSDI
- [0956] SEQ ID NO:73  $\Delta$  CD40多肽核苷酸序列
- [0957] AAGAAAGTTGCAAAGAAACCCACAAATAAAGCCCCACACCCTAAACAGGAACCCCAAGAAATCAATTC  
CCAGATGATCTCCCTGGATCTAATACTGCCGCCCGGTCCAAGAAACCCTGCATGGTTGCCAGCCTGTCACCCAAGA  
GGACGGAAAAGAATCACGGATTAGCGTACAAGAGAGACAA
- [0958] SEQ ID NO:74  $\Delta$  CD40多肽氨基酸序列
- [0959] KKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ
- [0960] SEQ ID NO:75接头核苷酸序列(接头2)
- [0961] GTCGAGTCTGGCGGTGGATCCGGA
- [0962] SEQ ID NO:76接头氨基酸序列(接头2)
- [0963] VESGGGSG
- [0964] SEQ ID NO:77FKBP<sub>v</sub>36 (F<sub>v</sub>1) 核苷酸序列
- [0965] GGC GTTCAAGTAGAAACAATCAGCCCAGGAGACGGAAGGACTTCCCCAAACGAGGCCAAACATGCGTA  
GTTCACTACTGGGATGCTCGAAGATGGAAAAAAGTAGATAGTAGAGACCGAAACAAACCATTTAAATTTAT  
GTTGGGAAAACAAGAAGTAATAAGGGGCTGGGAAGAAGGTGTAGCACAAATGTCTGTTGGCCAGCGCGCAAACTCA  
CAATTTCTCCTGATTATGCTTACGGAGCTACCGGCCACCCCGGCATCATACCCCTCATGCCACACTGGTGTGTTGAC  
GTCGAATTGCTCAAACCTGGAA
- [0966] SEQ ID NO:78FKBP<sub>v</sub>36 (F<sub>v</sub>1) 氨基酸序列
- [0967] GVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFKFLGKQEVIRGWEEGVAQMSVG  
QRAKLTISPDIYAGATGHPGIIPPHATLVDFVELLKLE
- [0968] SEQ ID NO:79接头核苷酸序列(接头3)

- [0969] GTCGAG
- [0970] SEQ ID NO:80接头氨基酸序列(接头3)
- [0971] VE
- [0972] SEQ ID NO:81FKBPv36 (Fv2) 核苷酸序列
- [0973] GGaGTgCAGGTgGAgACgATtAGtCCtGGgGAtGGgAGaACcTTtCCaAAgCGcGGtCAgACcTGtGTtGTcCAcTAcACcGGtATGCTgGAgGAcGGgAAgAAgGTgGActcTtcacGcGAtCGcAAtAAgCCtTTcAAgTTcATGcTcGGcAAgCAGgAgGTgATccGGGGgTGGGAgGAgGGcGTgGcTCAgATGTCgGTcGGgCAaCGaGCgAAgCTtACcATcTCaCCcGAcTAcGCgTAtGGgGCaACgGGgCAtCCgGGaATtATcCCtCCcCAcGCtACgCTcGTaTtcGAtGTgGAgcTcttgAAgCTtGag
- [0974] SEQ ID NO:82FKBPv36 (Fv2) 氨基酸序列
- [0975] GVQVETISPGDGRFTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFKFLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE
- [0976] SEQ ID NO:83接头核苷酸序列(接头4)
- [0977] TCTGGCGGTGGATCCGGAGTCGAC
- [0978] SEQ ID NO:84接头氨基酸序列(接头4)
- [0979] SGGGSGVD
- [0980] SEQ ID NO:85Furin蛋白酶共有切割位点核苷酸序列
- [0981] CGCGCAAAGCGT
- [0982] SEQ ID NO:86弗林蛋白酶共有切割位点氨基酸序列
- [0983] RAKR
- [0984] SEQ ID NO:87V5表位核苷酸序列
- [0985] GGAAAACCTATACCTAATCCATTGCTGGGCTTAGACTCAACA
- [0986] SEQ ID NO:88V5表位核苷酸序列
- [0987] GKPIPNPLLGLDST
- [0988] SEQ ID NO:89接头核苷酸序列(接头5)
- [0989] GGCAGCGGAAGC
- [0990] SEQ ID NO:90接头氨基酸序列(接头5)
- [0991] GSGS
- [0992] SEQ ID NO:91P2A核苷酸序列
- [0993] GCAACGAATTTTTCCCTGCTGAAACAGGCAGGGGACGTAGAGGAAAAT CCTGGTCCT
- [0994] SEQ ID NO:92P2A氨基酸序列
- [0995] ATNFSLLKQAGDVEENPGP
- [0996] SEQ ID NO 93接头核苷酸序列(接头6)
- [0997] ACGCGT
- [0998] SEQ ID NO:94接头氨基酸序列(接头6)
- [0999] TR
- [1000] SEQ ID NO:95  $\Delta$  CD19核苷酸序列
- [1001] ATGCCCCCTCTAGACTGCTGTTTTTCTGCTCTTTCTACCCCAATGGAAGTTAGACCTGAGGAACCACTGGTCGTTAAAGTGGAAGAAGGTGATAATGCTGTCTCCAATGCCTTAAAGGGACCAGCGACGGACCAACGCAGCA

ACTGACTTGGAGCCGGGAGTCCCCTCTCAAGCCGTTTCTCAAGCTGTCACTTGGCCTGCCAGGTCTTGGTATTACACA  
 TGCGCCCCCTTGCCATTTGGCTCTTCATATTCAATGTGTCTCAACAAATGGGTGGATTCTACCTTTGCCAGCCCGGC  
 CCCCCTTCTGAGAAAGCTTGGCAGCCTGGATGGACCGTCAATGTTGAAGGCTCCGGTGAGCTGTTTAGATGGAATGT  
 GAGCGACCTTGGCGGACTCGGTTGCGGACTGAAAAATAGGAGCTCTGAAGGACCCTCTTCTCCCTCCGGTAAGTTGA  
 TGTCACCTAAGCTGTACGTGTGGCCAAGGACCGCCCGAAATCTGGGAGGGCGAGCCTCCATGCCTGCCGCTCGC  
 GATTCCTGAACCAGTCTCTGTCCCAGGATCTCACTATGGCGCCCGGATCTACTCTTTGGCTGTCTTGC GGCGTTCC  
 CCCAGATAGCGTGTCAAGAGGACCTCTGAGCTGGACCCACGTACACCCTAAGGGCCCTAAGAGCTTGTTGAGCCTGG  
 AACTGAAGGACGACAGACCCGCACGCGATATGTGGGTAATGGAGACCGGCCTTCTGCTCCCTCGCGCTACCGCACAG  
 GATGCAGGGAAATACTACTGTTCATAGAGGGAATCTGACTATGAGCTTTCATCTCGAAATTACAGCACGGCCCGTTCT  
 TTGGCATTGGCTCCTCCGGACTGGAGGCTGGAAGGTGTCTGCCGTAACACTCGCTTACTTGATTTTTTGCCTGTGTA  
 GCCTGGTTGGGATCTGCATCTTCAGCGAGCCCTGTATTGCGCCGAAAAAGAAAACGAATGACTGACCCTACACGA  
 CGATTCTGA

[1002] SEQ ID NO:96  $\Delta$  CD19氨基酸序列

[1003] MPPPRLLFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTS DGPTQQLTWSRESPLKPFLLKLSLGLP  
 GLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPWTVNVEGSGELFRWNVSDLGLGCLKNRSSEGPSS  
 PSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPPCLPPRDSL NQSLSQDLTMAPGSTLWLSGVPDVSVRGPLSWTHVHPKGP  
 SLLSLELKDDRPARDMWMETGLLLPRATAQDAGKYYCHRG NLTMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWKVSAVTLAYL  
 IFCLCSLVGILHLQRALVLRKRKRMTDPTRRF

[1004] 实施例15: 离体T细胞活化和给予人对象

[1005] 本实施例提供使用修饰的T细胞治疗人的方法。这些方法可用于其他非T细胞。

[1006] 材料与amp;方法

[1007] 大规模生成基因修饰的T细胞

[1008] 用标准方法从健康志愿者中生成T细胞。简言之,健康供体或癌症患者的外周血单核细胞(PBMC)经活化以扩增并用合适的 $\alpha$ CD3和 $\alpha$ CD28(加利福尼亚州奥本的美天旋生物技术公司)转导。PBMC在补充有100U/ml IL-2(Cellgenix公司)的Cellgenix DC培养基中以 $1 \times 10^6$ 个细胞/ml重悬,并用0.2 $\mu$ g/ml $\alpha$ CD3和0.5 $\mu$ g/ml $\alpha$ CD28可溶性抗体刺激。然后细胞在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>下培养4天。在第4天,加入含IL-2的1ml新鲜培养基。在第7天,收获细胞并在Cellgenix DC培养基中重悬用于转导。

[1009] 质粒和逆转录病毒

[1010] 基于SFG的质粒由通过可自切割的2A-样序列连接至截短的人CD19的诱导型嵌合多肽组成,其缺少胞质信号结构域。在一个交互中,诱导型嵌合多肽由通过短Val-Glu接头与人嵌合多肽连接的含F36V突变的人FK506结合蛋白质(FKBP12;GenBank AH002818)组成。F36V突变增加FKBP12向合成的同源二聚体AP20187或AP1903的结合亲和性。2A样序列编码20个氨基酸肽脉扁刺蛾 $\beta$ 四体(Thosea asigna)昆虫病毒,其介导甘氨酸和末端脯氨酸残基之间>99%的切割,得到诱导型嵌合多肽C末端的19个额外氨基酸和CD19的N末端的一个额外脯氨酸残基。CD19由氨基酸333处截短的全长CD19(GenBank NM 001770)组成,其缩短了242-19个氨基酸的胞浆内结构域,并移除所有可能用作磷酸化的保守酪氨酸残基。

[1011] 生产长臂猿白血病毒(Gal-V)假型逆转录病毒稳定的PG13克隆通过用SFG质粒瞬时转染Phoenix Eco细胞系(ATCC产品号SD3444;ATCC,弗吉尼亚州玛纳萨斯)来制备。这



样产生Eco假型逆转录病毒。PG13包装细胞系(ATCC)用Eco假型逆转录病毒转导三次,得到每个细胞含多重SFG质粒原病毒成分的生产者细胞系。进行单细胞克隆,并且产生最高效价的PG13克隆经扩增并用于载体生产。

[1012] 逆转录病毒转导

[1013] T细胞活化和扩增的培养基是补充有100U/ml IL-2(Cellgenix公司)的无血清Cellgenix DC培养基(Cellgenix公司)。在用逆转录病毒载体转导7天前通过合适的抗CD3和抗-CD28(美天旆生物技术公司)活化T细胞。若需要,在转导后第4天进行 $\Delta$ CD19免疫磁性选择;阳性部分再扩增2天并冷藏。

[1014] 基因修饰的异体耗尽(allodepleted)的细胞的放大生产

[1015] 用于临床应用的转导过程放大使用非组织培养处理的T75瓶(纽约州罗切斯特的Nunc公司),其用10ml抗CD3 0.5 $\mu$ g/ml和抗-CD28 0.2 $\mu$ g/ml或10ml纤连蛋白7 $\mu$ g/ml于4 $^{\circ}$ C包被过夜。还使用用于增加细胞粘附的氟化乙烯丙烯袋电晕处理(2PF-0072AC,美国氟封公司(American Fluoroseal Corporation),马里兰州盖瑟斯堡)。PBMC以 $1 \times 10^6$ 个细胞/ml于补充有100U/ml IL-2的培养基中接种在抗CD3、抗CD28包被的瓶中。对于逆转录病毒转导,重组人纤维连接蛋白(retronectin)片段包被的瓶或袋再次用10ml含逆转录病毒的上清装载2-3小时。活化的T细胞以 $1 \times 10^6$ 各细胞/ml接种在含逆转录病毒载体的新鲜培养基和T细胞培养基(比例3:1)中,补充有100U/ml IL-2。第二天早上收获细胞并在组织培养处理的T75或T175瓶中扩增,培养基补充有100U/ml IL-2,接种浓度为约 $5 \times 10^5$ 个细胞/ml- $8 \times 10^5$ 个细胞/ml。

[1016] CD19免疫磁性选择

[1017] 可进行CD19的免疫磁性选择,在一个示例中为转导4天后。细胞用偶联单克隆鼠抗人CD19抗体(加利福尼亚州奥本的美天旆生物技术公司)的顺磁性微珠标记并在MS或LS柱上进行小规模实验选择,在CliniMacs Plus自动选择装置上进行大规模实验。CD19选择的细胞再扩增4天并在转导后第8天冷藏。这些细胞称为“基因修饰细胞”。

[1018] 免疫表型分型和五聚体分析

[1019] 使用下述抗体进行流式细胞分析(FACSCalibur和CellQuest软件;BD公司(Becton Dickinson)):CD3、CD4、CD8、CD19、CD25、CD27、CD28、CD45RA、CD45RO、CD56和CD62L。发现CD19-PE(克隆4G7;BD公司)产生最佳的染色并用在后续分析中。未转导对照用于设置CD19的负栅(negative gate)。

[1020] 统计学分析

[1021] 成对双尾斯氏t检验用于确定样品间差异的统计学显著性。所有数据表示为均值 $\pm$ 1标准偏差。

[1022] 实施例16:诱导型嵌合信号传导分子表达载体的构建和评估

[1023] 载体构建和表达确认

[1024] 构建适于用作治疗剂的表达载体,其编码融合人FK506结合蛋白质(FKBP)的信号传导分子,例如FKBP12v36(Fv)。这些方法可用于表达一种或多种诱导型信号传导分子。诱导型CSM可用小分子药物进行二聚化(或多聚化)。编码CSM的核酸与编码配体结合结构域的核酸融合,并插入SFG逆转录病毒或pLenti7.3慢病毒载体,其允许荧光标志物GFP的表达。

[1025] 诱导型CSM多肽包括2、3或更多(在某些实施方式中为2或3)FK506结合蛋白质

(FKBPs—例如FKBP12v36变体、或FKBP12;GenBank AH002 818),其含有F36V突变,用Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser接头与CSM序列连接。一种或多种FKBPs (Fv2) 的氨基酸序列是密码子摆动的(例如各密码子的第3核苷酸通过维持原始编码氨基酸的沉默突变发生改变),以防止表达逆转录病毒时的同源重组。所有构建体克隆入SFG或pLenti7.3。

[1026] 293T细胞用这些构建体的每个进行转染,转导48小时后通过流式细胞术分析标志物基因GFP或 $\Delta$ CD19除了GFP或 $\Delta$ CD19表达,还通过western印迹分析表达的基因产物以确定嵌合多肽的表达。例如,结合共刺激多肽的抗体可用于western印迹。

[1027] 转染的293T细胞在含抑肽酶、亮抑肽酶和苯甲基磺酰氟(德国格尔海姆的勃林格公司(Boehringer))的裂解缓冲液(50%Tris/Gly、10%十二烷基硫酸钠[SDS]、4% $\beta$ -巯基乙醇、10%甘油、12%水、4%的0.5%溴酚蓝)中重悬并在冰上孵育30分钟。30分钟离心后收获上清,与利姆里缓冲液(加利福尼亚州赫尔克里斯的伯乐实验室公司)以1:2混合、沸腾并装载于10%SDS聚丙烯酰胺凝胶上。膜用兔抗共刺激多肽免疫球蛋白G(IgG;亲和生物试剂公司(Affinity BioReagents),科罗拉多州古登市;1:500稀释)探测并用鼠抗GFP IgG(科文斯公司(Covance),加利福尼亚州伯克利;1:25,000稀释)探测。然后将印迹暴露于合适的过氧化物酶偶联的二抗,并用增强的化学发光(ECL;安玛西亚公司(Amersham),伊利诺伊州阿灵顿高地)检测蛋白质表达。然后除去膜并用羊多克隆抗肌动蛋白(圣克鲁兹生物技术公司;1:500稀释)再次探测以检查装载的量。

[1028] 评价诱导型CSM表达构建体。

[1029] 细胞系

[1030] 肿瘤细胞系LNCaP、PC3、DU145和A549和人胚胎肾细胞系HEK-293T获自美国典型培养物保藏中心(马里兰州洛克维尔)细胞维持在37°C、5%二氧化碳(CO<sub>2</sub>)、潮湿气氛中的含10%胎牛血清(Hyclone公司,马萨诸塞州沃特汉姆市)和2mM L-谷氨酰胺的完全IMDM(密苏里州圣路易斯的西格玛公司)中。转导的T细胞和PHA胚维持在补充有100U/ml IL-2(Cellgenix公司)的Cellgenix DC(Cellgenix公司)培养基中。

[1031] 活化T细胞

[1032] 使用可溶性 $\alpha$ CD3和 $\alpha$ CD28(加利福尼亚州奥本的美天旋生物技术公司)进行T细胞活化用于扩增和转导。PBMC在补充有100U/ml IL-2(Cellgenix公司)的Cellgenix DC培养基中以 $1 \times 10^6$ 个细胞/ml重悬,并用0.2 $\mu$ g/ml $\alpha$ CD3和0.5 $\mu$ g/ml $\alpha$ CD28可溶性抗体刺激。然后细胞在37°C、5%CO<sub>2</sub>下培养4天。在第4天,加入含IL-2的1ml新鲜培养基。在第7天,收获细胞并在Cellgenix DC培养基中重悬用于转导。

[1033] 逆转录病毒和慢病毒构建体

[1034] 诱导型CSM(iCSM)和CAR-CD3. $\zeta$ 构建体包括靶向PSMA、PSCA、MUC1和Her2/Neu的密码子优化的单链可变片段,其由蓝鹭生物公司(Blue Heron Bio)(华盛顿州玻塞尔)合成。iCSM构建体由与共刺激内结构域框内连接的FKBP12v36结构域组成,包括T细胞受体的CD28、4-1BB和CD3 $\zeta$ 链。通过scFv片段与人IgG1-CH2CH3结构域和CD3- $\zeta$ 链的框内克隆来生成CAR构建体。iCSM和CAR-CD3. $\zeta$ 构建体均亚克隆入SFG逆转录病毒骨架或pLenti7.3慢病毒骨架(英杰公司),其共表达祖母绿GFP。对iCSM的刺激和共刺激效果和CAR-CD3. $\zeta$ 的细胞毒性的评估通过用编码这些转基因的逆转录病毒或慢病毒单一或共转导T细胞来进行。

[1035] 逆转录病毒转导

[1036] 为了短暂生产逆转录病毒,用iCSM构建体与编码gag-pol和RD 114包被的质粒一起转染293T细胞,使用GeneJuice转染试剂(诺瓦基公司(Novagen),威斯康星州麦迪逊)。转染后48或72小时收获病毒、速冻、使用前存于 $\sim 80^{\circ}\text{C}$ 。对于短时生产慢病毒,用iCAR构建体与质粒pLP1(gag/pol),pLP2(rev)和pLP/VSVG(VSVG env)一起转染293T细胞,使用GeneJuice。转染后48或72小时收获病毒、速冻、使用前存于 $\sim 80^{\circ}\text{C}$ 。对于大规模逆转录病毒生产,通过用VSV-G假型瞬时逆转录病毒上清进行多重转导生成稳定的FLYRD 18衍生的逆转录病毒生产系。具有最高转基因表达的FLYRD18细胞是单细胞分选的,产生最高病毒效价的克隆经扩增并用于生产病毒用于淋巴细胞转导。该克隆的转基因表达、功能和逆转录病毒效价在连续培养期间维持超过8周。用 $7\mu\text{g}/\text{ml}$ 重组人纤维蛋白片段(Retronectin)(日本滋贺县大津的Takara生物公司(Takara Bio,Otsu,Shiga,Japan))经 $37^{\circ}\text{C}$  1小时或 $4^{\circ}\text{C}$ 过夜包被非组织培养处理的24孔板。所述孔用磷酸缓冲盐水(PBS)清洗,然后通过将所述板与 $1.5\text{ml}$ 上清 $37^{\circ}\text{C}$ 孵育30分钟来包被逆转录病毒上清。随后,将T细胞胚在补充有 $100\text{U}/\text{ml}$  IL-2的病毒上清中以 $5\times 10^5$ 个细胞/孔铺板。转导进行超过60小时。转导后,收获细胞并通过流式细胞术针对CD19或GFP表达分型。

[1037] iCSM/CAR-转导T细胞的细胞毒性

[1038] 各转导T细胞系的细胞毒性活性可在标准4小时 $^{51}\text{Cr}$ 释放试验中评估,如前所述。T细胞用iCSM、PSMA CAR-CD3. $\zeta$ 转导或用iCSM和CAR两种病毒转导并针对 $\text{Cr}^{51}$ 标记的靶细胞制备,包括自体同源植物血细胞凝集素(PHA)刺激的淋巴细胞(PHA胚)、LNCaP、PC3或DU145和A549肿瘤细胞系,和表达转基因A549的人PSMA(A549-PSMA)。在完整培养基或1%曲通X-100(密苏里州圣路易斯的西格玛公司)孵育的靶细胞分别用于确定自发和最大 $^{51}\text{Cr}$ 释放。重复三次的孔的特异裂解的平均百分比计算为 $100\times(\text{实验释放}-\text{自发释放})/(\text{最大释放}-\text{自发释放})$ 。除了铬释放试验,还进行共培养实验。此时,细胞系LNCaP、PC3、DU145、A549和A549-PSMA经转导以表达荧光mOrange并用做靶细胞。存在IL-2( $50\text{U}/\text{ml}$ )的完全培养基中,表达mOrange的肿瘤细胞与未转导或CAR-修饰的T细胞以肿瘤细胞与T细胞1:10的比例共培养。24小时后,含iCAR的T细胞用 $100\text{nM}$  AP1903刺激。72小时后收集细胞、计数并用CD3标记以检测T细胞并用流式细胞术(LSR II;BD公司)分析mOrange肿瘤细胞的百分比。

[1039] iCSM转导的T细胞的表型分型和活化状态

[1040] iCAR转导的T细胞的细胞表面表型使用下述单克隆抗体进行研究:CD3、CD4、CD8、CD19、CD25、CD27、CD28、CD44、CD45RA、CD45RO、CD62L、CD80、CD83、CD86、CD127、CD134、CD137、HLA-ABC和HLA-DR。用或不用 $10-100\text{nM}$  AP1903作为iCSM刺激物来进行表型分型。合适匹配的同种型对照用于各实验,并用LSR II流式细胞术(BD公司)分析细胞。用抗F(ab')<sub>2</sub>(宾夕法尼亚州西格鲁甫的杰克逊免疫研究实验室公司)评估CAR表达。

[1041] 分析iCSM转导的T细胞的细胞因子生产

[1042] 使用人Th1/Th2细胞因子细胞术珠试验(BD药物基因公司(BD Pharmingen))测量 $100\text{nM}$  AP1903刺激之前和之后(24小时)的T细胞培养物上清中的干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF $\alpha$ )。根据生产商指导通过酶联免疫吸附试验(ELISA;R&D系统公司,明尼苏达州明尼阿波利斯)验证培养物上清中的诱导的细胞因子生产。

[1043] iCSM转导的T细胞的增殖

[1044] 通过iCSM的AP1903诱导的信号传导的增殖效果通过测量接触AP1903后的转导和未转导T细胞的细胞生长来评估。37℃下用10μM二乙酸羧基荧光素、琥珀酰亚胺基酯(CFSE)标记T细胞10分钟。孵育后,在PBS中清洗细胞,然后在Cellgenix DC培养基中重悬。1x10<sup>6</sup>个CFSE标记的iCSM修饰T细胞或未转导T细胞随后在Cellgenix DC培养基中单独培养或用100nM AP1903刺激培养。5天后收获细胞,用CD3-PerCP.Cy5.5和CD19-PE标记并用流式细胞术分析CFSE稀释。

[1045] 为了评估可溶免疫球蛋白是否影响CAR<sup>+</sup>T淋巴细胞的增殖和扩增,细胞以1×10<sup>5</sup>个细胞/孔与系列稀释的健康供体人血浆培养或与系列稀释的纯化的人免疫球蛋白(杰克逊免疫研究公司)培养而不添加外源细胞因子。72小时后,用1μCi (0.037MBq) 甲基-3[H] 胸苷(安法马西亚生物技术公司(Amersham Pharmacia Biotech),新泽西州皮斯卡塔韦)脉冲细胞并再培养15小时。然后将细胞收获到过滤器上并干燥,在β-闪烁计数器(TriCarb 2500TR;帕卡德生物科学公司,康涅狄格州艾美)中测量每分钟计数。实验重复三次。在另一个实验中,对照和CAR<sup>+</sup>T淋巴细胞用培养基进行单独培养或用每两天加入系列稀释的血浆或纯化免疫球蛋白的培养基进行培养。然后用台盼蓝排除法每三天对细胞进行计数。

[1046] 体内实验

[1047] 6-8周龄的非肥胖糖尿病严重混合免疫缺陷(NOD/SCID)小鼠经辐射(250rad)并在右侧腹部中皮下注射基质胶(Matrigel)(BD生物科学公司)中重悬的10x 10<sup>6</sup>-15x 10<sup>6</sup>个LNCaP肿瘤细胞。两周后用未转导或iCSM/CAR转导的T细胞(总计15x 10<sup>6</sup>)注射入具有直径约0.5厘米肿瘤的小鼠的尾静脉。小鼠随机分为2组:一组接受CID(50-125μg AP1903,腹膜内,一周两次),一组仅接受运载体(16.7%丙二醇,22.5%PEG400和1.25%吐温80,腹膜内,一周两次)以扩增T细胞。通过卡钳测量评估21天的小鼠肿瘤生长。通过眼球后眼部出血于第7、14和21天获取外周血样品,用流式细胞分析表达人CD3/人CD19的T细胞以测量iCSM T细胞或对照T细胞的持续性和扩增。

[1048] 评估iCSM转导的T细胞的体内特征

[1049] 为了确保诱导型CSM的表达不改变T细胞特征,比较未转导或非功能性诱导型CAR(仅PSMA CAR-CD3.ζ)与iCSM/CAR转导的T细胞的功能、表型、抗原特异性、增殖潜力。比较转导和未转导细胞中的CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD56<sup>+</sup>和TCRα/β<sup>+</sup>细胞的数量,作为细胞因子的生产,包括IFN-γ、TNFα、IL-10、IL-4、IL-5和IL-2。评估指数生长CTL的生长特性和增殖对抗原和IL-2的依赖性,作为抗原刺激后T<sub>H</sub>1和T<sub>H</sub>2型细胞因子的表型和分泌数据。

[1050] 实施例17:在人细胞中使用诱导型CSM用于治疗

[1051] 本实施例提供表达构建体和在人细胞中使用该表达构建体的方法。

[1052] 材料与方法

[1053] 大规模生成基因修饰的T细胞

[1054] 用标准方法从健康志愿者中生成T细胞。简言之,健康供体或癌症患者的外周血单核细胞(PBMC)经活化以扩增并用合适的αCD3和αCD28(加利福尼亚州奥本的美天旋生物技术公司)转导。PBMC在补充有100U/ml IL-2(Cellgenix公司)的Cellgenix DC培养基中以1x10<sup>6</sup>个细胞/ml重悬,并用0.2μg/mlαCD3和0.5μg/mlαCD28可溶性抗体刺激。然后细胞在37℃、5%CO<sub>2</sub>下培养4天。在第4天,加入含IL-2的1ml新鲜培养基。在第7天,收获细胞并在Cellgenix DC培养基中重悬用于转导。

[1055] 质粒和逆转录病毒

[1056] SFG质粒由通过可自切割的2A-样序列连接至截短的人CD19的诱导型CSM组成。诱导型CSM由通过Ser-Gly-Gly-Gly-Ser接头与人CSM连接的含F36V突变的人FK506结合蛋白质(FKBP12;GenBank AH002818)组成。F36V突变增加FKBP12向合成的同源二聚体AP20187或AP1903的结合亲和性。2A样序列编码20个氨基酸肽扁刺蛾β四体(*Thosea asigna*)昆虫病毒,其介导甘氨酸和末端脯氨酸残基之间>95%的切割,得到iCSM的C末端的19个额外氨基酸和CD19的N末端的一个额外脯氨酸残基。CD19由氨基酸333处截短的全长CD19(GenBank NM 001770)组成,其缩短了242-19个氨基酸的胞浆内结构域,并移除所有可能用作磷酸化的保守酪氨酸残基。

[1057] 生产长臂猿白血病病毒(Gal-V)假型逆转录病毒稳定的基于PG13克隆通过用SFG质粒瞬时转染Phoenix Eco细胞系(ATCC产品号SD3444;ATCC,弗吉尼亚州玛纳萨斯)来制备。这样产生Eco假型逆转录病毒。PG13包装细胞系(ATCC)用Eco假型逆转录病毒转导三次,得到每个细胞含多重SFG质粒原病毒成分的生产者细胞系。进行单细胞克隆,并且产生最高效价的PG13克隆经扩增并用于载体生产。

[1058] 逆转录病毒转导

[1059] T细胞活化和扩增的培养基是补充有100U/ml IL-2(Cellgenix公司)的无血清Cellgenix DC培养基(Cellgenix公司)。在用逆转录病毒载体转导7天前通过合适的抗CD3和抗-CD28(美天旆生物技术公司)活化T细胞。若需要,在转导后第4天进行ΔCD19免疫磁性选择;阳性部分再扩增2天并冷藏。

[1060] 基因修饰的异体耗尽(allodepleted)的细胞的放大生产

[1061] 用于临床应用的转导过程放大使用非组织培养处理的T75瓶(纽约州罗切斯特的Nunc公司),其用10ml抗CD3 0.5μg/ml和抗-CD28 0.2μg/ml或10ml纤连蛋白7μg/ml于4℃包被过夜。还使用用于增加细胞粘附的氟化乙烯丙烯袋电晕处理(2PF-0072AC,美国氟封公司(American Fluoroseal Corporation),马里兰州盖瑟斯堡)。PBMC以 $1 \times 10^6$ 个细胞/ml于补充有100U/ml IL-2的培养基中接种在抗CD3、抗CD28包被的瓶中。对于逆转率病毒转导,重组人纤维连接蛋白片段(retronectin)包被的瓶或袋再次用10ml含逆转录病毒的上清装载2-3小时。活化的T细胞以 $1 \times 10^6$ 个细胞/ml接种在含逆转录病毒载体的新鲜培养基和T细胞培养基(比例3:1)中,补充有100U/ml IL-2。第二天早上收获细胞并在组织培养处理的T75或T175瓶中扩增,培养基补充有100U/ml IL-2,接种浓度为约 $5 \times 10^5$ 个细胞/ml- $8 \times 10^5$ 个细胞/ml。

[1062] CD19免疫磁性选择

[1063] 可进行CD19的免疫磁性选择,例如在转导4天后。细胞用偶联单克隆鼠抗人CD19抗体(加利福尼亚州奥本的美天旆生物技术公司)的顺磁性微珠标记并在MS或LS柱上进行小规模实验选择,在CliniMacs Plus自动选择装置上进行大规模实验。CD19选择的细胞再扩增4天并在转导后第8天冷藏。这些细胞称为“基因修饰细胞”。

[1064] 免疫表型分型和五聚体分析

[1065] 使用下述抗体进行流式细胞分析(FACSCalibur和CellQuest软件;BD公司(Becton Dickinson)):CD3、CD4、CD8、CD19、CD25、CD27、CD28、CD45RA、CD45R0、CD56和CD62L。发现CD19-PE(克隆4G7;BD公司)产生最佳的染色并用在后续分析中。未转导对照用于设置CD19

的负栅 (negative gate)。用抗F(ab')<sub>2</sub> (宾夕法尼亚州西格鲁甫的杰克逊免疫研究实验室公司) 评估CAR表达。

[1066] 统计学分析

[1067] 成对双尾斯氏t检验用于确定样品间差异的统计学显著性。所有数据表示为均值±1标准偏差。

[1068] 实施例18:测量AP1903依赖的T细胞活化

[1069] 目的:用编码连接至两个FKBPv36分子的信号传导分子的逆转录病毒载体转导原代T细胞以使T细胞发生AP1903活化。本实验中,使用多重细胞因子珠试验测量响应二聚化的细胞因子生产。

[1070] 方法:

[1071] 设计和克隆诱导型T细胞分子:

[1072] 1.通过Gibson克隆构建两种基于SFG的逆转录病毒载体,其中PCR产物从pAd1127-02-iMC扩增并插入pBP0320-SFG-Myr.LFv1.Fv2L.2A.ΔCD19构建体替代LFv1.Fv2L DNA片段。

[1073] a.在第一载体中,PCR扩增产物为Fv' Fv,或在仅FKBPv36片段插入逆转录病毒骨架时,在XhoI和SalI位点替代LFv1.Fv2L。该载体称为pBP0171-SFG-Myr.Fv'.Fv.2A.ΔCD19,并且为对照载体,其缺少任何T细胞信号传导分子。

[1074] b.在第二载体中,PCR扩增产物是MyD88/CD40.Fv'.Fv(或iMCnoE)。其在XhoI和SalI限制性位点插入pBP0320质粒替代LFv1.Fv2L DNA序列。该载体称为pBP0172-SFG-Myr.iMCnoE.2A.ΔCD19。后缀“noE”表示该iMC DNA不编码表位标签。

[1075] 逆转录病毒的生产:

[1076] 2.通过瞬时转染方法生产逆转录病毒,其中HEK293T细胞用下述质粒进行转染:

[1077] a.SFG逆转录病毒载体(分别为pBP0171或pBP0172;RV-171或RV-172)

[1078] b.逆转录病毒包被质粒(RD114)

[1079] c.Gag/pol质粒(pEQ-PAM-E)

[1080] 3.再第48和72小时,收集含复制缺陷型逆转录病毒的转染细胞的上清并在干冰/乙醇中速冻并贮存于-80℃直至T细胞转导。

[1081] 4.为了转导原代T细胞,在补充有100U/ml IL-2的T细胞生长培养基中用抗CD3和抗CD28抗体活化健康供体的PBMC。3天后,T细胞经活化并收获,准备用于逆转录病毒转导。为了转导T细胞,非组织培养处理的板先用纤维连接蛋白片段(Retronectin)4℃包被过夜。然后移除纤维蛋白片段,用PBS洗板。然后逆转录病毒的上清用于包被纤维蛋白片段板。然后在孔中加入活化的T细胞,将所述板配置为便于病毒颗粒结合和转导。48小时后,收获T细胞并用流式细胞术分析其CD3和CD19共表达以确定病毒转导效率。

[1082] 通过细胞因子生产分析AP1903诱导的T细胞活化:

[1083] 5.为了T细胞的评估AP1903依赖性T细胞活化,将 $1 \times 10^5$ 个未转导(NT) T细胞或用对照逆转录病毒(RV-171)或含iMC的逆转录病毒(RV-172)转导的T细胞以三个重复形式在96孔板上铺板并于37℃ 5%CO<sub>2</sub>下用仅培养基或含10nM AP1903的培养基培养。

[1084] 6.24小时后,温和混合细胞并离心板。然后收集上清并铺板在Bio-Plex人细胞因子/趋化因子27-重板内,其测量下述细胞因子和趋化因子:

[1085] a. 基本-FGF、G-CSF、GM-CSF、IFN- $\gamma$ 、IL-1Ra、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12p70、IL-13、IL-15、IL-17RA、嗜伊红粒细胞趋化蛋白、IP10、MCP-1、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、PDGF-bb、RANTES、TNF- $\alpha$ 和VEGF。

[1086] b. 随后用Bio-Plex MAGPIX多重读数计测量上清中的细胞因子和趋化因子并将其与板中的标准进行比较。

[1087] 结果:

[1088] 转导效率:

[1089] 1. 两个健康供体的T细胞用逆转录病毒转导,48小时后,通过流式细胞术确定的CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>共表达的功绩如下:

[1090] a. 供体063

[1091] i. NT=6.54%

[1092] ii. RV-171=73.9%

[1093] iii. RV-172=54.6%

[1094] b. 供体707

[1095] i. NT=2.16%

[1096] ii. RV-171=85.2%

[1097] iii. RV-172=73.6%

[1098] 2. 两种载体和供体的转导均非常高,表明其对HEK293T细胞非毒性且病毒效价良好。

[1099] 细胞因子/趋化因子生产

[1100] 3. 分析对AP1903二聚化上显示显著依赖性的细胞因子和趋化因子分泌。下述T细胞生产的细胞因子和趋化因子显示超过24小时的诱导,但对照载体转导的T细胞或未转导的T细胞则未显示该结果。

[1101] a. GM-CSF、IFN- $\gamma$ 、IL-13、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-1 $\beta$ 、IL-12p70、IP10、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTES和TNF- $\alpha$

[1102] 4. 此外,其他细胞因子和趋化因子似乎不受到iMC的AP1903活化的诱导。

[1103] 这些包括:

[1104] a. 基本-FGF、G-CSF、IL-1Ra、IL-2、IL-7、IL-9、IL-10、IL-15、IL-17RA、嗜酸细胞活化趋化因子(eotaxin)、MCP-1、PDGF-bb和VEGF。

[1105] NT=未转导的活化T细胞

[1106] RV0171=SFG-Myr.Fv'.Fv.2A. $\Delta$ CD19;RV0172=SFG=Myr.MyD88/CD40.Fv'.Fv.2A. $\Delta$ CD19。

[1107] 用10nM AP1903刺激T细胞24小时,然后分析上清的细胞因子水平。

[1108] 实施例19:测量AP1903依赖的T细胞的细胞毒性:

[1109] 目的用编码连接至两个FKBPv36分子的信号传导分子的逆转录病毒载体转导原代T细胞以使T细胞发生AP1903活化。本实验中,检测两方面的AP1903活化。首先,若T细胞与肿瘤细胞非常接近,它们的活化是否诱导肿瘤细胞杀伤?第二,若T细胞通过AP1903得到活化,它们是否增殖?

[1110] 方法:

[1111] 设计和克隆诱导型T细胞分子和逆转录病毒的生产

[1112] 1.所述方法与上述实施例4中所述基本相同。本试验使用相同的细胞。

[1113] 生成GFP标记的CAPAN-1(胰腺癌)细胞系:

[1114] 2.CAPAN-1购自ATCC。随后,用pBP0168-pcDNA3.1-EGFP1uc质粒转染来对细胞系进行基因修饰,所述质粒包含EGFP/萤火虫荧光素酶融合蛋白质以及新霉素抗性基因,允许通过与G418抗体的培养来随时间选择稳定转染的细胞。培养后,选择具有高GFP表达的克隆并进行次培养,直到获得>95%GFP的细胞系。

[1115] iMC激活的T细胞与CAPAN-1肿瘤细胞共培养:

[1116] 3.未转导的T细胞或用RV-171转导(对照载体)或RV-172(iMC载体)的细胞以5:1的T细胞与肿瘤细胞比例在补充有50U/ml IL-2且具有或不具有10nM AP1903的培养基中培养。37°C和5%CO<sub>2</sub>下共培养72小时。随后通过荧光显微镜和用0.25%胰蛋白酶/EDTA收获培养物并通过流式细胞术测量GFP<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>肿瘤细胞在培养物中的频率来分析培养物中是否存在GFP<sup>+</sup>肿瘤细胞。

[1117] 结果:

[1118] 4.检查共培养孔之后,发现在两种供体中,用AP1903刺激的RV-172(含iMC载体)转导的T细胞均增殖,如大T细胞胚克隆所证实。此外,通过荧光显微镜,含接受AP1903的RV-172转导的T细胞的共培养物显示出非常低活力的GFP<sup>+</sup>肿瘤细胞。这些初始观察后,收获T细胞和肿瘤细胞并通过流式细胞术分析以确定剩余CAPAN-1GFP<sup>+</sup>肿瘤细胞的频率。

[1119] 5.如显微镜所观察到的,流式细胞术显示AP1903在含AP1903处理的iMC转导(RV-172)的T细胞的培养物中的明确效果。GFP<sup>+</sup>肿瘤细胞的减少仅发生在该情况中,而非用对照载体转导的T细胞,并且未接受二聚体的RV-172转导的T细胞的程度更低。

[1120] 6.综上,这些数据表明iMC在T细胞中的活化能诱导T细胞杀伤并诱导AP1903处理的T细胞的增殖。总的来说,根据我们针对细胞因子/趋化因子生产的观察,这些数据表明iMC可在T细胞中被活化并且T细胞保持并增强其在iMC二聚化后的效应子功能。

[1121] 实施例20:离体T细胞活化和对于人对象的给予

[1122] 本实施例提供使用修饰的T细胞治疗人的方法。本实施例中,共刺激多肽胞质区域衍生自CD40和MyD88。这些方法可适用于其他细胞例如NK和NKT细胞以及肿瘤浸润性淋巴细胞并且还可适用于含有本文所述其他共刺激多肽胞质区域的嵌合共刺激多肽。

[1123] 材料与方法

[1124] 大规模生成基因修饰的T细胞

[1125] 用标准方法从健康志愿者中生成T细胞。简言之,健康供体或癌症患者的外周血单核细胞(PBMC)经活化以扩增并用合适的 $\alpha$ CD3和 $\alpha$ CD28(加利福尼亚州奥本的美天旋生物技术公司)转导。PBMC在补充有100U/ml IL-2(Cellgenix公司)的Cellgenix DC培养基中以 $1 \times 10^6$ 个细胞/ml重悬,并用0.2 $\mu$ g/ml $\alpha$ CD3和0.5 $\mu$ g/ml $\alpha$ CD28可溶性抗体刺激。然后细胞在37°C、5%CO<sub>2</sub>下培养4天。在第4天,加入含IL-2的1ml新鲜培养基。在第7天,收获细胞并在Cellgenix DC培养基中重悬用于转导。

[1126] 质粒和逆转录病毒

[1127] SFG质粒由通过可自切割的2A-样序列连接至截短的人CD19的诱导型嵌合多肽组成。诱导型嵌合多肽由通过Ser-Gly-Gly-Gly-Ser接头与人嵌合多肽连接的含F36V突变的



人FK506结合蛋白质(FKBP12;GenBank AH002 818)组成。F36V突变增加FKBP12向合成的同源二聚体AP20187或AP1903的结合亲和性。2A样序列编码20个氨基酸肽脉扁刺蛾β四体(Thosea asigna)昆虫病毒,其介导甘氨酸和末端脯氨酸残基之间>99%的切割,得到诱导型嵌合多肽C末端的19个额外氨基酸和CD19的N末端的一个额外脯氨酸残基。CD19由氨基酸333处截短的全长CD19(GenBank NM 001770)组成,其缩短了242-19个氨基酸的胞浆内结构域,并移除所有可能用作磷酸化的保守酪氨酸残基。

[1128] 生产长臂猿白血病毒(Gal-V)假型逆转录病毒稳定的PG13克隆通过用SFG质粒瞬时转染Phoenix Eco细胞系(ATCC产品号SD3444;ATCC,弗吉尼亚州玛纳萨斯)来制备。这样产生Eco假型逆转录病毒。PG13包装细胞系(ATCC)用Eco假型逆转录病毒转导三次,得到每个细胞含多重SFG质粒原病毒成分的生产者细胞系。进行单细胞克隆,并且产生最高效价的PG13克隆经扩增并用于载体生产。

[1129] 逆转录病毒转导

[1130] T细胞活化和扩增的培养基是补充有100U/ml IL-2(Cellgenix公司)的无血清Cellgenix DC培养基(Cellgenix公司)。在用逆转录病毒载体转导7天前通过合适的抗CD3和抗-CD28(美天旋生物技术公司)活化T细胞。若需要,在转导后第4天进行ΔCD19免疫磁性选择;阳性部分再扩增2天并冷藏。

[1131] 基因修饰的异体耗尽(allodepleted)的细胞的放大生产

[1132] 用于临床应用的转导过程放大使用非组织培养处理的T75瓶(纽约州罗切斯特的Nunc公司),其用10ml抗CD3 0.5μg/ml和抗-CD28 0.2μg/ml或10ml纤连蛋白7μg/ml于4℃包被过夜。还使用用于增加细胞粘附的氟化乙烯丙烯袋电晕处理(2PF-0072AC,美国氟封公司(American Fluoroseal Corporation),马里兰州盖瑟斯堡)。PBMC以 $1 \times 10^6$ 个细胞/ml于补充有100U/ml IL-2的培养基中接种在抗CD3、抗CD28包被的瓶中。对于逆转录病毒转导,重组人纤维连接蛋白片段(retronectin)包被的瓶或袋再次用10ml含逆转录病毒的上清装载2-3小时。活化的T细胞以 $1 \times 10^6$ 个细胞/ml接种在含逆转录病毒载体的新鲜培养基和T细胞培养基(比例3:1)中,补充有100U/ml IL-2。第二天早上收获细胞并在组织培养处理的T75或T175瓶中扩增,培养基补充有100U/ml IL-2,接种浓度为约 $5 \times 10^5$ 个细胞/ml- $8 \times 10^5$ 个细胞/ml。

[1133] CD19免疫磁性选择

[1134] 可进行CD19的免疫磁性选择,例如在转导4天后。细胞用偶联单克隆鼠抗人CD19抗体(加利福尼亚州奥本的美天旋生物技术公司)的顺磁性微珠标记并在MS或LS柱上进行小规模实验选择,在CliniMacs Plus自动选择装置上进行大规模实验。CD19选择的细胞再扩增4天并在转导后第8天冷藏。这些细胞称为“基因修饰细胞”。

[1135] 实施例21:白血患者的治疗

[1136] 本实施例提供使用本文所述方法对具有晚期处理难治性白血病的白血患者的治疗,其可应用于其他病症或疾病例如其他过度增殖疾病或实体肿瘤。所述方法可主要如所述使用,应理解单链可变片段可根据靶抗原而变化。

[1137] 用含编码嵌合信号传导分子的多核苷酸的核酸转导T细胞。所述T细胞还用含编码嵌合抗原受体的多核苷酸的核酸转导。诱导型嵌合信号传导分子的示例包括但不限于图41所示的那些,包括CD28多肽胞质刺激区域和4-1BB多肽胞质信号传导区域。诱导型嵌合信号

传导分子还可包括CD3 $\zeta$ 多肽。嵌合抗原受体包括识别CD19的单链可变片段。

[1138] 患者经历淋巴耗尽 (lymphodepletive) 状态, 然后给予转导的CD19靶向T细胞。T细胞可为自体同源、同种异体或非同种异体的。给予T细胞后, 将配体诱导子给予患者, 从而通过诱导所述嵌合信号传导分子来扩增CD19靶向T细胞。药剂可例如每天、每周两次或每周给予。监控肿瘤细胞、配体诱导子例如AP1903的水平, 根据肿瘤细胞负载调整给药方案。由于考虑到T细胞扩增、活化和肿瘤细胞杀伤的下调速率过快可能导致更严重的细胞因子风暴对患者产生不必要的伤害, 给药方案设计为以限制毒性且不对患者产生广泛伤害 (例如保持患者无需进入医院的重症监护室) 的速率实现完全恢复。一旦患者实现完全恢复并维持一定长度时间 (例如一个月、三个月、六个月) 无疾病, 则停止AP1903给药。治疗后, 在没有配体诱导子的情况下, CD19靶向的T细胞的数量下降。可能存在低水平的基底信号传导, 使得少量静息CD19靶向的T细胞得以存活。没有配体诱导子时, 这些细胞保持失活并且允许正常B细胞恢复。如果在未来的任何时间患者复发白血病, 则继续给予配体诱导子AP1903, 再次活化CD19靶向的T细胞并再次诱导患者的完全响应。在多次复发的情况下, 该额外给药可重复多于一次。

[1139] 实施例22: 测量CAR转导T细胞的iMC活性:

[1140] 目的用编码连接至两个FKBPv36分子的信号传导分子的逆转录病毒载体转导原代T细胞以使T细胞发生AP1903活化。实验设计为检测含截短的MyD88和CD40多肽的诱导型共刺激分子是否改善T细胞对GFP修饰的CAPAN-1 (胰腺癌) 细胞的杀伤, 所述T细胞还用在CAPAN-1肿瘤细胞上高表达的识别CAR的前列腺干细胞抗原 (PSCA) 进行转导。

[1141] 方法:

[1142] 设计和克隆诱导型T细胞分子:

[1143] 1. 用RV-172 (SFG-Myr . MyD88 / CD40 . Fv . Fv' . 2A .  $\Delta$  CD19) 和RV-89 (SFG . PSCAscFv . CH2CH3 . CD28 .  $\zeta$ ) 进行T细胞转导。使用来自人源化单克隆抗体1G8 (源自US2012077962A1中的人源化抗PSCA) 的scFv将scFv靶向PSCA。其连接至人IgG1的CH2CH3区域, 其继而连接至含有分子的跨膜和胞质部分的CD28。CD28连接至CD3 $\zeta$ 的胞质部分。

[1144] 逆转录病毒的生产:

[1145] 2. 与前述实施例基本相同。

[1146] 生成GFP标记的CAPAN-1 (胰腺癌) 细胞系:

[1147] 3. CAPAN-1购自ATCC。随后, 用pBP0168-pcDNA3.1-EGFP1uc转染来对细胞系进行基因修饰, 所述质粒包含EGFP/萤火虫荧光素融合蛋白质以及新霉素抗性基因, 允许通过与G418抗体的培养来随时间选择稳定转染的细胞。培养后, 选择具有高GFP表达的克隆并进行次培养, 直到获得>95%GFP的细胞系。

[1148] iMC激活的T细胞与CAPAN-1肿瘤细胞共培养:

[1149] 4. 未转导的T细胞或用RV-89 (对照载体) 和RV-172 (iMC载体) 共转导的T细胞以5:1的T细胞与肿瘤细胞比例在补充有50U/ml IL-2且具有或不具有10nM AP1903的培养基中培养。37°C和5%CO<sub>2</sub>下共培养72小时。随后通过荧光显微镜和用0.25%胰蛋白酶/EDTA收获培养物并通过流式细胞术测量GFP<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>肿瘤细胞在培养物中的频率来分析培养物中是否存在GFP<sup>+</sup>肿瘤细胞。

[1150] 结果:

[1151] 1.通过荧光显微镜检查培养物以评估含诱导型共刺激分子转导的和嵌合抗原受体转导的T细胞并接受AP1903的孔中肿瘤细胞杀伤的改善。

[1152] 2.使用流式细胞术分析胰蛋白酶处理后的培养物中的GFP<sup>+</sup>细胞以确定AP1903是否有助于在该短时培养(72小时)中减少肿瘤细胞数量。培养时间可延长至约5天。流式细胞图显示用两种病毒转导并接受AP1903的孔中的GFP<sup>+</sup>细胞以5:1的比例减少。

[1153] 3.剩余的活CAPAN-1-GFP细胞经标准化为无AP1903的NT T细胞的状态以显示iMC活化对肿瘤细胞杀伤的效果。

[1154] 实施例23:具体核酸和氨基酸序列的示例

[1155] SEQ ID NO:97,CD28 nt

[1156] TTCTGGGTACTGGTTGTAGTCGGTGGCGTACTTGCTTGTATTCTCTTCTTGTACCGTAGCCTTCATTATATTCTGGGTCCGATCAAAGCGCTCAAGACTCCTCCATTCCGATTATATGAACATGACACCTCGCCGACCTGGTCC TACACGCAAACATTATCAACCCTACGCACCCCCCGAGACTTCGCTGCTTATCGATCC

[1157] SEQ ID NO:98,CD28 aa

[1158] FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS

[1159] SEQ ID NO:99,4-1BB nt

[1160] AGTGTAGTTAAAAGAGGAAGAAAAAAGTTGCTGTATATATTTAAACAACCATTTATGAGACCAGTGCAA ACCACCAAGAAGAAGACGGATGTTTCATGCAGATTCACAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAATTG

[1161] SEQ ID NO:100,4-1BB aa

[1162] SVVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL

[1163] SEQ ID NO:101,接头序列(4-1BB和CD3ζ之间)nt

[1164] ACGCGT

[1165] SEQ ID NO:102,接头序列(4-1BB和CD3ζ之间)aa

[1166] TR

[1167] SEQ ID NO:103,CD3ζnt

[1168] CGGGTCAAATTCAGCCGAGTGCTGACGCCCCAGCATAACCAACAGGGACAAAACCAACTCTACAACGAG CTCAACCTGGGTAGACGCGAGGAGTACGACGTTCTGGATAAGAGGCGGGGCCGGGACCCAGAGATGGGGGGCAAACC TCAGCGGCGGAAGAACCCGAGGAGGTCTTTATAACGAGCTCCAGAAGGACAAGATGGCGGAAGCCTATTAGAAA TTGGGATGAAAGGCGAGAGACGCAGGGGAAAAGGTCACGATGGTCTGTATCAAGGACTGTCAACCGCCACCAAAGAC ACTTACGATGCGCTCCACATGCAGGCCCTCCCTCCCCGC

[1169] SEQ ID NO:104,CD3ζaa

[1170] RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPKRRKNPQEGLYNELQKDKMA EAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[1171] 下述是嵌合抗原受体(CAR)序列(按顺序,无scFv片段)的核苷酸和氨基酸序列的示例。

[1172] SEQ ID NO:105,信号肽nt

[1173] ATGGAGTTTGGGCTGTCATGGCTGTTCTCGTGGCCATTCTCAAAGGGGTCCAGTGTCTCGC

[1174] SEQ ID NO:106,信号肽aa

[1175] MGFGLSWLFLVAILKGVQCSR

[1176] SEQ ID NO:107,挠性接头序列nt

- [1177] GGGGGAGGAGGTTCTGGAGGCGGCGGGAGCGGAGGAGGAGGCAGC
- [1178] SEQ ID NO:108, 挠性接头序列aa
- [1179] GGGGSGGGGSGGGGS
- [1180] SEQ ID NO:109, 接头序列 (scFv和CH2CH3之间) nt
- [1181] GGATCC
- [1182] SEQ ID NO:110, 接头序列 (scFv和CH2CH3之间) aa
- [1183] GS
- [1184] SEQ ID NO:111, IgG1 CH2CH3 nt
- [1185] GATCCAGCCGAACCCAAATCCCCGATAAAAACATACTGCCCCCTGTCCCGCACCAGAATTGCTT  
GGCGGACCTTCCGTTTTTCTTTTTCCCCCAAACCTAAAAGATACCCTGATGATTTCCCGAACCCCTGAAGTTACGTG  
CGTAGTCGTAGATGTGTCTCACGAAGATCCAGAAGTAAATTTAACTGGTACGTAGATGGAGTCAAGTTCACAACG  
CAAAGACGAAGCCCCGAGAAGAACAATATAATTCCACATACCGAGTAGTTAGCGTTCTCACCGTACTGCATCAGGAC  
TGGCTTAACGGCAAAGAATATAAATGTAAGGTCTCAAACAAAGCACTCCCAGCCCCTATCGAAAAGACTATCTCCAA  
AGCTAAAGGACAACCCCGGAACCCAGGTCTATACACTTCCCCCTCACGCGATGAACTCACTAAAAATCAGGTTT  
CCCTTACTTGTCTTGTCAAAGGCTTCTACCCTAGCGATATCGCAGTCGAATGGGAATCCAATGGCCAGCCCGAAAAC  
AACTATAAAACAACCCACCTGTCTCGATTGAGATGGCTCATTCTTCTCTATTCCAACTGACTGTAGACAAATC  
CCGATGGCAACAAGGTAACGTGTTCTTGTCTCAGTCATGCATGAAGCGCTTCATAACCATTACACACAAAAATCTC  
TCTCACTGTCTCCCGAAAGAAGGACCCC
- [1186] SEQ ID NO:112, IgG1 CH2CH3 aa
- [1187] DPAEPKSPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG  
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL  
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNH  
YTQKSLSLSPGKKDP
- [1188] SEQ ID NO:113, 接头序列 (scFv和CH2CH3之间) nt
- [1189] CTCGAG
- [1190] SEQ ID NO:114, 接头序列 (scFv和CH2CH3之间) aa
- [1191] LE
- [1192] SEQ ID NO:115, CD3 $\zeta$ 跨膜nt
- [1193] AAAGTGTGTTACCTCCTCGATGGCATCCTCTTTATTTATGGCGTGATTCTGACCGCATTGTTTCTCCGA  
GTAATAATTCTCTAGATCCGACAGCTCCCGCATATCAGCAAGGACAAAATCAGCTTTATAACGAACTTAACCTCGG  
CAGACGCGAAGAATACGATGTACTGGACAAGAGAAGAGGAAGAGATCCCGAAATGGGCGGAAAACCCAGAGAAGAA  
AGAATCCCCAAGAAGGTCTTTATAACGAACTGCAGAAAAGATAAAAATGGCCGAAGCGTACAGTGAAATTGGTATGAAA  
GGAGAAAGAAGACGCGGAAAAGGACATGACGGACTCTACCAAGGACTCTCAACTGCTACTAAAGATACATACGACGC  
CCTTCATATGCAAGCCCTCCCCCGAGATAA
- [1194] SEQ ID NO:116, CD3 $\zeta$ 跨膜aa
- [1195] KLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPENGG  
KPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
- [1196] 其他嵌合信号分子序列
- [1197] SEQ ID NO:117, OX40 nt

[1198] GTTGCCGCCATCCTGGGCTGGGCTGGTGTGGGGCTGCTGGGCCCCCTGGCCATCCTGCTGGCCCTG  
TACCTGCTCCGGGACCAGAGGCTGCCCCCGATGCCACAAGCCCCCTGGGGAGGCAGTTTCCGGACCCCATCCA  
AGAGGAGCAGGCCGACGCCACTCCACCCTGGCCAAGATC

[1199] SEQ ID NO:118,0X40 aa

[1200] VAAILGLGLVLLGLLPLAILLALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSRFTPIQEEQADAHSTLAKI

[1201] SEQ ID NO:119,SEQ ID NO:22 5' LTR序列的核苷酸序列

[1202] TGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCAAGGCATGGAAAAATA  
CATAACTGAGAATAGAAAAGTTCAGATCAAGGTCAGGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCT  
GTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGT  
GGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAG  
AGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTATTTGAACTAACCAATCAGTTC  
GCTTCTCGCTTCTGTTTCGCGCTTATGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCACAACCCCTCACTCGGGGCGCCAG  
TCCTCCGATTGACTGAGTCGCCCGGTACCCGTGTATCCAATAAACCCCTTGCAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTC  
GCTGTTTCTTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGTCTTTCA

[1203] 其他序列

[1204] SEQ ID NO,120来自衣壳蛋白前体核苷酸序列的明脉扁刺蛾β四体 (*Thosea  
asigna*) 病毒-2A

[1205] GCCGAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCCCGGGCCC

[1206] SEQ ID NO,121来自衣壳蛋白前体氨基酸序列的明脉扁刺蛾β四体 (*Thosea  
asigna*) 病毒-2A

[1207] AEGRGSLLTCGDVEENPGP

[1208] SEQ ID NO:122,3' LTR核苷酸序列

[1209] TGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCAAGGCATGGAAAAATA  
CATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTCAGGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCT  
GTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGT  
GGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAG  
AGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTATTTGAACTAACCAATCAGTTC  
GCTTCTCGCTTCTGTTTCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCACAACCCCTCACTCGGGGCGCCAG  
TCCTCCGATTGACTGAGTCGCCCGGTACCCGTGTATCCAATAAACCCCTTGCAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTC  
GCTGTTTCTTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGTCTTTCA

[1210] SEQ ID NO:123,(具有XhoI/SalI位点的接头-F<sub>v</sub>1-F<sub>v</sub>2-接头的核苷酸序列(F<sub>v</sub>2' 中  
的摆动密码子为小写字母))

[1211] CTCGAGTCTGGCGGTGGATCCGGAGGCGTTCAAGTAGAAACAATCAGCCCAGGAGACGGAAGGACTTT  
CCCCAAACGAGGCCAAACATGCGTAGTTCATTATACTGGGATGCTCGAAGATGGAAAAAAGTAGATAGTAGTAGA  
GACCGAAACAACCATTTAAATTTATGTTGGGAAAACAAGAAGTAATAAGGGGCTGGGAAGAAGGTGTAGCACAAA  
TGTCTGTTGGCCAGCGCAGAAAACACAAATTTCTCCTGATTATGCTTACGGAGCTACCGGCCACCCCGGCATCAT  
ACCCCTCATGCCACACTGGTGTGTTGACGTCGAATTGCTCAAACCTGGAAGTCGAGGGaGTgCAgGTgGAgACgATt  
AGtCCtGGgGAtGGgAGaAcTTtCCaAAgCGcGGtCAgAcTgTgTcCAcTAcAcCGgATGCTgGAgGAcG  
GgAAgAAgGTgGActcTtcacGcGAtCGcAAtAAgCCtTTcAAgTTcATGcTcGGcAAgCAgGAgGTgATccGGG

gTGGGAgGAgGGcGTgGcTcAgATGTCgGTcGGgCAaCGaGCgAAgCTtACcATcTCaCCcGAcTAcGCgTAtGGg  
GCaACgGGgCAtCCgGgATtATcCCtCCcCAcGCtACgCTcGTaTTcGAtGTgGAgcTcttgAAgCTtGagTCTG  
GCGGTGGATCCGGAGTCGAC

[1212] SEQ ID NO:124, (Fv FvLS氨基酸序列)

[1213] LESGGGSGGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKVDSSRDRNKPFKFLGKQEVIRGWEE  
GVAQMSVGRRAKLTISPDIYAGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLLEVEGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGM  
LEDGKKVDSSRDRNKPFKFLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGRRAKLTISPDIYAGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKL  
ESGGGSGVD

[1214] SEQ ID NO:125,FKBPv36 (Fv1) 核苷酸序列

[1215] GCGGTTCAAGTAGAAACAATCAGCCCAGGAGACGGAAGGACTTCCCCAAACGAGGCCAAACATGCGTA  
GTTTATTACTGGGATGCTCGAAGATGGAAAAAAGTAGATAGTAGAGACCGAAACAACCATTTAAATTTAT  
GTTGGGAAAAACAAGAAGTAATAAGGGGCTGGGAAGAAGGTGTAGCACAAATGTCTGTTGGCCAGCGCGAAAACTCA  
CAATTTCTCCTGATTATGCTTACGGAGCTACCGGCCACCCCGCATCATACCCCTCATGCCACACTGGTGTGTTGAC  
GTCGAATTGCTCAAACCTGGAA

[1216] SEQ ID NO:126,FKBPv36 (Fv1) 氨基酸序列

[1217] GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKVDSSRDRNKPFKFLGKQEVIRGWEEGVAQMSV  
GQRAKLTISPDIYAGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKL

[1218] SEQ ID NO:127,FKBPv36 (Fv2) 核苷酸序列

[1219] GGAgtGcAgGTgGAgACgATtAgTcCtGGgGAtGGgAGaAcTtCCaAAgCGcGGtCAGAcCtGtGT  
tGTcCAcTAcAcCgGtATGCTgGAgGAcGGgAAgAAgGTgGActcTtcacGcGAtCGcAAtAAgCtTtAAgTtC  
ATGcTcGGcAAgCAGgAgTgATccGGGGgTGGGAgGAgGGcGTgGcTcAGATGTCgGTcGGgCAaCGaGCgAAgC  
TtACcATcTCaCCcGAcTAcGcGTAtGGgGCaACgGGgCAtCCgGgATtATcCCtCCcCAcGCtACgCTcGTaTT  
cGAtGTgGAgcTcttgAAgCTtGag

[1220] SEQ ID NO:128,FKBPv36 (Fv2) 氨基酸序列

[1221] GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKVDSSRDRNKPFKFLGKQEVIRGWEEGVAQMSV  
GQRAKLTISPDIYAGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKL

[1222] 实施例24:诱导型MyD88/CD40嵌合多肽的其他序列

[1223] SEQ ID NO:129,豆蔻酰化多肽的核苷酸序列

[1224] ATGGGGAGTAGCAAGAGCAAGCCTAAGGACCCAGCCAGCGC

[1225] SEQ ID NO:130,豆蔻酰化多肽的氨基酸序列

[1226] MGSSKSKPKDPSQR

[1227] SEQ ID NO:131,接头核苷酸序列(接头1)

[1228] CTCGAG

[1229] SEQ ID NO:132,接头氨基酸序列(接头1)

[1230] LE

[1231] SEQ ID NO:133,截短的MyD88多肽核苷酸序列

[1232] ATGGCCGCTGGGGGCCAGGCGCCGATCAGCTGCTCCCGTATCTTCTACTTCTTCTTTGCCGCTGGCT  
GCTCTGAACATGCGCGTGAGAAGACGCTCTCCCTGTTCTTAACTTCGCACACAAGTCGCTGCCGATTGGACCGC  
CCTTGCCGAAGAAATGGACTTTGAATACCTGGAAATTAGACAACCTGAAACACAGGCCGACCCACTGGCAGACTCC

TGGACGCATGGCAGGGAAGACCTGGTGCAAGCGTTGGACGGCTCCTGGATCTCCTGACAAAACCTGGGACGCGACGAC  
GTACTGCTTGAACCTCGGACCTAGCATTGAAGAAGACTGCCAAAAATATATCCTGAAACAACAAGAAGAAGCCGA  
AAAACCTCTCCAAGTCGACGAGTGGACTCATCAGTACCCCGAACAGCTGAGCTTGCTGGGATTACTACACTCGACG  
ACCCACTCGGACATATGCCTGAAAGATTTCGACGCTTTCATTTGCTATTGCCCTCTGACATA

[1233] SEQ ID NO:134, 截短的MyD88多肽氨基酸序列

[1234] MAAGGPGAGSAAPVSSTSSLPLAALNMRVRRRLSLFLNVRTQVAADWTALAEEMDFEYLEIRQLTQAD  
PTGRLLDAWQGRPGASVGRLLDLLTKLGRDDVLELGPSIEEDCQKYILKQQQEEAEKPLQVAAVDSSVPRTAELAG  
ITLDDPLGHMPERFDFAFICYCPSDI

[1235] SEQ ID NO:135, Δ CD40多肽核苷酸序列

[1236] AAGAAAGTTGCAAAGAAACCCACAAATAAAGCCCCACACCCTAAACAGGAACCCCAAGAAATCAATTTCC  
CAGATGATCTCCCTGGATCTAATACTGCCGCCCGTCCAAGAAACCCTGCATGGTTGCCAGCCTGTCACCCAAGA  
GGACGGAAAAGAATCACGGATTAGCGTACAAGAGAGACAA

[1237] SEQ ID NO:136, Δ CD40多肽氨基酸序列

[1238] KKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ

[1239] SEQ ID NO:137, 接头核苷酸序列(接头2)

[1240] GTCGAGTCTGGCGGTGGATCCGGA

[1241] SEQ ID NO:138, 接头氨基酸序列(接头2)

[1242] VESGGGSG

[1243] SEQ ID NO:140, FKBPv36 (Fv1) 核苷酸序列

[1244] GGC GTTCAAGTAGAAACAATCAGCCCAGGAGACGGAAGGACTTCCCCAAACGAGGCCAAACATGCGTA  
GTTCAATTACTGGGATGCTCGAAGATGGAAAAAAGTAGATAGTAGTAGAGACCGAAACAACCATTTAAATTTAT  
GTTGGGAAAACAAGAAGTAATAAGGGGCTGGGAAGAAGGTGTAGCACAAATGTCTGTTGGCCAGCGCGAAAACCTCA  
CAATTTCTCCTGATTATGCTTACGGAGCTACCGGCCACCCCGGCATCATACCCCTCATGCCACACTGGTGTGGTAC  
GTCGAATTGCTCAAACCTGGAA

[1245] SEQ ID NO:141, FKBPv36 (Fv1) 氨基酸序列

[1246] GVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKVDSSRDRNKPFKFKMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVG  
QRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE

[1247] SEQ ID NO:142, 接头核苷酸序列(接头3)

[1248] GTCGAG

[1249] SEQ ID NO:143, 接头氨基酸序列(接头3)

[1250] VE

[1251] SEQ ID NO:144, FKBPv36 (Fv2) 核苷酸序列

[1252] GGA GTgCAGGTgGAGACgATtAGtCCtGGgGAtGGgAGaAcTTtCCaAAgCGcGGtCAGAcTGTtGT  
tGTcCAcTAcAcCGtATGCTgGAGAcGGgAAgAAgGTgGActcTtcacGcGAtCGcAAtAAgCCTTTcAAgTTc  
ATGcTcGGcAAgCAGGAgGTgATccGGGgTGGGAgGAGGcGTgGCtCAGATGTCgGTcGGgCAaCGaGCgAAgC  
TtAcCAtcTcAcCCgAcTAcGCgTAtGGgGCaACgGGgCAtCCgGGaATtATcCCTCCcCAcGCtACgCTcGTaTT  
cGAtGTgGAgcTcttgAAgCTtGag

[1253] SEQ ID NO:145, FKBPv36 (Fv2) 氨基酸序列

[1254] GVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKVDSSRDRNKPFKFKMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVG

QRAKLTI SPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE

[1255] SEQ ID NO:146, 接头核苷酸序列 (接头4)

[1256] TCTGGCGGTGGATCCGGAGTCGAC

[1257] SEQ ID NO:147, 接头氨基酸序列 (接头4)

[1258] SGGGSGVD

[1259] SEQ ID NO:148, 弗林蛋白酶共有切割位点核苷酸序列

[1260] CGCGCAAAGCGT

[1261] SEQ ID NO:149, 弗林蛋白酶共有切割位点氨基酸序列

[1262] RAKR

[1263] SEQ ID NO:150, V5表位核苷酸序列

[1264] GGAAAACCTATACCTAATCCATTGCTGGGCTTAGACTCAACA

[1265] SEQ ID NO:151, V5表位核苷酸序列

[1266] GKPIPPLLGLDST

[1267] SEQ ID NO:152, 接头核苷酸序列 (接头5)

[1268] GGCAGCGGAAGC

[1269] SEQ ID NO:152, 接头氨基酸序列 (接头5)

[1270] GSGS

[1271] SEQ ID NO:153, P2A核苷酸序列

[1272] GCAACGAATTTTCCCTGCTGAAACAGGCAGGGGACGTAGAGGAAAATCCTGGTCCT

[1273] SEQ ID NO:154, P2A氨基酸序列

[1274] ATNFSLLKQAGDVEENPGP

[1275] SEQ ID NO 155接头核苷酸序列 (接头6)

[1276] ACGCGT

[1277] SEQ ID NO:156, 接头氨基酸序列 (接头6)

[1278] TR

[1279] SEQ ID NO:157, Δ CD19核苷酸序列

[1280] ATGCCCCCTCTAGACTGCTGTTTTCTGCTCTTCTCACCCCAATGGAAGTTAGACCTGAGGAACCA  
CTGGTCGTTAAAGTGAAGAAGGTGATAATGCTGTCCCTCAATGCCTTAAAGGGACCAGCGACGACCAACGCAGCA  
ACTGACTTGAGCCGGGAGTCCCCTCTCAAGCCGTTTCTCAAGCTGTCACTTGGCCTGCCAGGTCTTGGTATTACACA  
TGCGCCCCCTTGCCATTTGGCTCTTCATATTCAATGTGTCTCAACAAATGGGTGGATTCTACCTTTGCCAGCCCGGC  
CCCCCTTCTGAGAAAGCTTGGCAGCCTGGATGGACCGTCAATGTTGAAGGCTCCGGTGAGCTGTTTAGATGGAATGT  
GAGCGACCTTGGCGGACTCGGTTGCGGACTGAAAAATAGGAGCTCTGAAGGACCCTCTTCTCCCTCCGGTAAGTTGA  
TGTCACCTAAGCTGTACGTGTGGCCAAGGACCGCCCCGAAATCTGGGAGGGCGAGCCTCCATGCCTGCCGCCTCGC  
GATTCCTGAACCAGTCTCTGTCCCAGGATCTCACTATGGCGCCCGGATCTACTCTTTGGCTGTCTTGC GGCGTTCC  
CCCAGATAGCGTGTCAAGAGGACCTCTGAGCTGGACCCACGTACACCCTAAGGGCCCTAAGAGCTTGTTGAGCCTGG  
AACTGAAGGACGACAGACCCGACGCGATATGTGGGTAATGGAGACCGCCTTCTGCTCCCTCGCGCTACCGCACAG  
GATGCAGGGAAATACTACTGTTCATAGAGGGAATCTGACTATGAGCTTTCATCTCGAAATTACAGCACGGCCCGTTCT  
TTGGCATTGGCTCCTCCGACTGGAGGCTGGAAGGTGTCTGCCGTAACACTCGCTTACTTGATTTTTTGCCTGTGTA  
GCCTGGTTGGGATCCTGCATCTTCAGCGAGCCCTGTATTGCGCCGAAAAGAAAACGAATGACTGACCCTACACGA



CGATTCTGA

[1281] SEQ ID NO:158, Δ CD19氨基酸序列

[1282] MPPRLLFFLLFLLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTS DGPTQQLTWSRESPLKPFLLKLSLGLP  
GLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGELFRWNVSDLGGLGCGLKNSSEGPSS  
PSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPPCLPPRDSLNSQLS QDLTMAPGSTLWLSGCVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPK  
SLLSLELKDDRPARDMWVME TGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNL TMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWKVSAVTLAYL  
IFCLCSLVGILHLQRALVLRKRKRMTDPTRRF

[1283] SEQ ID NO:159缺少TIR结构域的截短的MyD88

[1284] MAAGGPGAGSAAPVSSTSSPLAALNMRVRRRLSFLNVRTQVAADWTALAEEMDFEYLEIRQLETQAD  
PTGRLLDAWQGRPGASVGRLLDLLTKLGRDDVLELGPSIEEDCQKYILKQQEEAEKPLQVAAVDSSVPRTAELAG  
ITTLDDPLGHMPERFDFAFICYCPSDI

[1285] SEQ ID NO:160无胞外结构域的CD40

[1286] AAGAAAGTTGCAAAGAAACCCACAAATAAAGCCCCACACCCTAAACAGGAACCCCAAGAAATCAATTC  
CCAGATGATCTCCCTGGATCTAATACTGCCGCCCGGTCCAAGAAACCCTGCATGGTTGCCAGCCTGTCACCCAAGA  
GGACGGAAAAGAATCACGGATTAGCGTACAAGAGAGACAA

[1287] SEQ ID NO:161无胞外结构域的CD40

[1288] KKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ

[1289] SEQ ID NO:162CD3ζ

[1290] AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAG  
CTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCC  
GAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTG  
GGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACC  
TACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

[1291] SEQ ID NO:163CD3ζ

[1292] RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE  
AYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMALPPR

[1293] 下文提供编码嵌合抗原受体的质粒插入的示例,所述嵌合抗原受体结合Her2/  
Neu。所述嵌合抗原受体可进一步通过包含共刺激多肽(例如但不限于,CD28、OX40和4-1BB)  
来被修饰。

[1294] SEQ ID NO:164信号肽

[1295] ATGGAGTTTGGACTTTCTTGGTTGTTTTTGGTGGCAATTCTGAAGGGTGCCAGTGTAGCAGG

[1296] SEQ ID NO:165信号肽

[1297] MEFGLSWLFLVAILKGVQCSR

[1298] SEQ ID NO:166FRP5可变轻链(抗-Her2)

[1299] GACATCCAATTGACACAATCACACAAATTTCTCTCAACTTCTGTAGGAGACAGAGTGAGCATAACCTGC  
AAAGCATCCCAGGACGTGTACAATGCTGTGGCTTGGTACCAACAGAAGCCTGGACAATCCCCAAAATTGCTGATTTA  
TTCTGCCTCTAGTAGGTACTGTTGGGTACCTTCTCGGTTTACGGGCTCTGGGTCCGACCAGATTTACGTTTACAA  
TCAGTTCCGTTCAAGCTGAAGACCTCGCTGTTATTTTTGCCAGCAGCACTTCCGAACCCCTTTACTTTTGGCTCA  
GGCACTAAGTTGGAAATCAAGGCTTTG

- [1300] SEQ ID NO:167FRP5可变轻链(抗-Her2)
- [1301] DIQLTQSHKFLSTSVGDRVSITCKASQDVYNAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASSRYTGVPSRFTGSGSGP  
DFTFTISSVQAEDLAVYFCQQHFRTPTFTFGSGTKLEIKAL
- [1302] SEQ ID NO:168挠性接头
- [1303] GGCGGAGGAAGCGGAGGTGGGGGC
- [1304] SEQ ID NO:169挠性接头
- [1305] GGGSGGGG
- [1306] SEQ ID NO:170FRP5可变重链(抗-Her2/Neu)
- [1307] GAAGTCCAATTGCAACAGTCAGGCCCGAATTGAAAAAGCCCGCGAAACAGTGAAGATATCTTGTA  
AGCCTCCGGTTACCCTTTTACGAACTATGGAATGAACTGGGTCAAACAAGCCCCTGGACAGGGATTGAAGTGGATG  
GGATGGATCAATACATCAACAGGCGAGTCTACCTTCGCAGATGATTTCAAAGGTCGCTTTGACTTCTCACTGGAGA  
CCAGTGCAAATACCGCTACCTTCAGATTAACAATCTTAAAAGCGAGGATATGGCAACCTACTTTTTCGCAAGATG  
GGAAGTTTATCACGGGTACGTGCCATACTGGGGACAAGGAACGACAGTGACAGTTAGTAGCSEQ ID NO:  
171FRP5可变重链(抗-Her2/Neu)
- [1308] EVQLQQSGPELKKPGETVKISCKASGYPTNYGMNWVKQAPGQGLKWMGWINTSTGESTFADDFKGRFD  
FSLETSANTAYLQINNLKSEDMATYFCARWEVYHGYPYWGQGTITVTVSS
- [1309] SEQ ID NO:172接头
- [1310] GGATCC
- [1311] SEQ ID NO:173接头
- [1312] GS
- [1313] SEQ ID NO:174CD34最小表位
- [1314] GAACTTCCTACTCAGGGGACTTTCTCAAACGTTAGCACAAACGTAAGT
- [1315] SEQ ID NO:175CD34最小表位
- [1316] ELPTQGTFSNVSTNVS
- [1317] SEQ ID NO:176CD8 $\alpha$ 茎部
- [1318] CCCGCCCAAGACCCCCACACCTGCGCCGACCATTGCTTCTCAACCCCTGAGTTTGTAGACCCGAGGCC  
TGCCGGCCAGCTGCCGGCGGGCCGTGCATACAAGAGGACTCGATTTGCGCTTGCGAC
- [1319] SEQ ID NO:177CD8 $\alpha$ 茎部
- [1320] PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD
- [1321] SEQ ID NO:178CD8 $\alpha$ 跨膜区域
- [1322] ATCTATATCTGGGCACCTCTCGCTGGCACCTGTGGAGTCCTTCTGCTCAGCCTGGTTATTACTCTGTAC  
TGTAATCACCGAATCGCCGCCGCGTTTGTAAAGTGTCAGG
- [1323] SEQ ID NO:179CD8 $\alpha$ 跨膜区域
- [1324] IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPR
- [1325] SEQ ID NO:180接头
- [1326] Ctcgag
- [1327] SEQ ID NO:181接头
- [1328] LE
- [1329] SEQ ID NO:182CD3 $\zeta$ 胞质结构域

[1330] AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACC TACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

[1331] SEQ ID NO:183CD3 $\zeta$ 胞质结构域

[1332] RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQLSTATKDTYDALHMQALPPR

[1333] 其他序列

[1334] SEQ ID NO:184,CD28 nt

[1335] TTCTGGGTACTGGTTGTAGTCGGTGGCGTACTTGCTTGTATTCTTCTTCTTGTACCCTAGCCTTCATTATATTCTGGGTCCGATCAAAGCGCTCAAGACTCCTCCATTCCGATTATATGAACATGACACCTCGCCGACCTGGTCC TACACGCAAACATTATCAACCCTACGCACCCCCCGAGACTTCGCTGCTTATCGATCC

[1336] SEQ ID NO:185,CD28 aa

[1337] FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLRHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS

[1338] SEQ ID NO:186,OX40 nt

[1339] GTTGCCGCATCCTGGGCTGGGCTGGTGTGGGGCTGCTGGGCCCCCTGGCCATCCTGCTGGCCCTGTACCTGCTCCGGGACCAGAGGCTGCCCCCGATGCCACAAGCCCCCTGGGGAGGCAGTTCCGGACCCCCATCCAAGAGGAGCAGGCCGACGCCACTCCACCCTGGCCAAGATC

[1340] SEQ ID NO:187,OX40 aa

[1341] VAAILGLGLVLLGPLAILLALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI

[1342] SEQ ID NO:188,4-1BB nt

[1343] AGTGTAGTTAAAAGAGGAAGAAAAAAGTTGCTGTATATATTTAAACAACCATTTATGAGACCAGTGCAA ACCACCCAAGAAGAAGACGGATGTTTCATGCAGATTCCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAATTG

[1344] SEQ ID NO:189,4-1BB aa

[1345] SVVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

[1346] 实施例25:用诱导型MyD88、CD40或MyD88/CD40活化原代T细胞

[1347] 图60A-60D提供诱导型MyD88、CD40和MyD88/CD40嵌合多肽的示意图。为了检测MyD88、CD40或两种分子是否应包括在潜在嵌合抗原受体中作为内结构域,设计四种不同载体,含有仅AP1903结合结构域(Fv' Fv)、或与MyD88(iMyD88)、CD40(iCD40)遗传融合或与MyD88和CD40(iMC)二者遗传融合(图60A)。转导CD3/CD28活化的T细胞,并且通过流式细胞术检测CD3<sup>+</sup>T细胞(CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>)表面的CD19来测量各载体的转导效率,显示各逆转录病毒在原代T细胞相对未转导T细胞发生充分表达(57%-95%) (图60B)。然后通过ELISA测量IFN- $\gamma$ 和IL-6生产分析iMyD8、iCD40或iMC在接触AP1903后活化T细胞的能力。观察到仅iMC转导的T细胞在AP1903活化后产生显著量的IFN- $\gamma$ 和IL-6,而NT、iMyD88或iCD40均不显示细胞因子生产(图60C和D)。这些数据表明MyD88和CD40在人T细胞中协同作为活化信号传导分子,以及CAR分子应从包含复合MC信号传导结构域获益。

[1348] 进行实验组以检测用iMC分子优化T细胞刺激是否需要MyD88、CD40或二者。观察到MyD88或CD40均不能充分诱导T细胞活化,如细胞因子(IL-2和IL-6)生产所测,但当组合为

单融合蛋白质时可诱导潜在的T细胞活化(图41)。

[1349] 除了存活和生长优势,MC诱导的共刺激还可为CAR修饰的T细胞提供其他功能。Medzhitov等最近证实MyD88信号传导对Th1和Th17响应均很重要,其通过IL-1发挥作用使调节性T细胞(Treg)-驱动的抑制具有CD4<sup>+</sup>T难治性。iMC实验显示在AP1903活化后分泌IL-1 $\alpha$ 和 $\beta$ 。此外,Martin等证实CD8<sup>+</sup>T细胞通过Ras、PI3K和蛋白激酶C进行CD40信号传导,导致引起CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞裂解的穿孔蛋白和细胞毒性介质粒酶的NF- $\kappa$ B-依赖性诱导。因此,MyD88和CD40共活化可使Treg细胞的免疫抑制功效具有CAR-T细胞抗性,该功能在治疗实体瘤和其他类型癌症中至关重要。

[1350] 诱导型MyD88/CD40嵌合刺激分子还可在细胞中随着CAR一起表达,CAR可例如包括scFv多肽和CD3- $\zeta$ 链。在本方法中,iCSM分子与CAR联用,从而将CAR信号分为两个单独的功能。由CAR提供的该第二功能提供对工程改造的T细胞的抗原特异性细胞毒性。例如,对PSMA特异的CAR可在T细胞中随着诱导型MyD88/CD40嵌合刺激分子一起表达。而且,MyD88/CD40诱导型CSM和CAR部份可在相同载体上顺式或在分别的载体上反式转染或转导入细胞。因此,两种多肽可用两种核酸例如两种质粒或两种病毒进行表达,并且T细胞可例如被转染两次或在某些实施方式中,两种核酸可共转染。在其他实施方式中,两种多肽可在一种核酸中例如在相同质粒或病毒中表达。核酸可用两个分离的启动子表达两种多肽,一个用于CAR一个用于iCSM。或者在其他实施方式中,两种多肽可用相同的启动子表达。在该实施方式中,两种多肽可由可切割的多肽例如2A序列分开。可将工程改造的T例如给予对象以产生特异免疫应答,例如针对前列腺癌肿瘤。

[1351] 在一些实施方式中,诱导型嵌合刺激分子不包括CD40。应理解提供MyD88/CD40嵌合刺激分子的方法、构建体、多肽和细胞可按需修饰用于表达并用于MyD88嵌合刺激分子。

[1352] 参考文献

[1353] 引用下述文献或其提供可能与例如本文实施例有关的其他信息。

[1354] 1.Till BG,Jensen MC,Wang J,等:使用具有CD28和4-1BB结构域的嵌合抗原受体进行CD20-特异性过继免疫治疗淋巴瘤:引导的临床试验结果(CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains:pilot clinical trial results).Blood119:3940-50,2012.

[1355] 2.Pule MA,Savoldo B,Myers GD,等:经工程改造以共表达肿瘤特异性受体的病毒特异性T细胞:成神经细胞瘤个体中的持续性和抗肿瘤活性(Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors:persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma).Nat Med 14:1264-70,2008.

[1356] 3.Kershaw MH,Westwood JA,Parker LL,等:对使用基因改造T细胞进行的过继免疫治疗卵巢癌的I期研究(A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer).Clin Cancer Res 12:6106-15,2006.

[1357] 4.Carpenito C,Milone MC,Hassan R,等:用含CD28和CD137结构域的遗传靶向的人R细胞控制已建立的大型肿瘤异种移植体(Control of large,established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28and CD137 domains).Proc Natl Acad Sci U S A 106:3360-5,2009.

[1358] 5.Song DG,Ye Q,Poussin M,等:CD27共刺激体内增加重定向人T细胞的存活和抗

肿瘤活性(CD27 costimulation augments the survival and antitumor activity of redirected human T cells in vivo).*Blood* 119:696-706,2012.

[1359] 6.Kalos M,Levine BL,Porter DL,等:具有嵌合抗原受体的T细胞在晚期白血病患者中具有潜在的抗肿瘤效果并且可建立记忆(T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia).*Sci Transl Med* 3:95ra73,2011.

[1360] 7.Porter DL,Levine BL,Kalos M,等:慢性淋巴性白血病嵌合抗原受体-修饰的T细胞(Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia).*N Engl J Med* 365:725-33,2011.

[1361] 8.Brentjens RJ,Davila ML,Riviere I,等:CD19-靶向的T细胞快速诱导患有化疗难以治疗的急性淋巴细胞白血病的成人的分子缓解(CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia).*Sci Transl Med* 5:177ra38,2013.

[1362] 9.Pule MA,Straathof KC,Dotti G,等:增加细胞因子释放并支持原代人T细胞克隆扩增的嵌合T细胞抗原受体(A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells).*Mol Ther* 12:933-41,2005.

[1363] 10.Finney HM,Akbar AN,Lawson AD:用嵌合受体活化静息人原代T细胞:CD28、诱导型共刺激因子、CD134、和CD137与来自TCR $\zeta$ 链的信号串联的共刺激(Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors:costimulation from CD28,inducible costimulator,CD134,and CD137 in series with signals from the TCR $\zeta$ chain).*J Immunol* 172:104-13,2004.

[1364] 11.Guedan S,Chen X,Madar A,等:基于ICOS的嵌合抗原受体程序双极TH17/TH1细胞(ICOS-based chimeric antigen receptors program bipolar TH17/TH1cells).*Blood*,2014.

[1365] 12.Narayanan P,Lapteva N,Seethammagari M,等:复合MyD88/CD40开关协同活化小鼠和人树突细胞用以增强抗肿瘤功效(A composite MyD88/CD40 switch synergistically activates mouse and human dendritic cells for enhanced antitumor efficacy).*J Clin Invest* 121:1524-34,2011.

[1366] 13.Anurathapan U,Chan RC,Hindi HF,等:嵌合抗原受体修饰的T细胞的肿瘤破坏动力学(Kinetics of tumor destruction by chimeric antigen receptor-modified T cells).*Mol Ther* 22:623-33,2014.

[1367] 14.Craddock JA,Lu A,Bear A,等:通过表达趋化因子受体CCR2b来增强GD2嵌合抗原受体T细胞的肿瘤运输(Enhanced tumor trafficking of GD2 chimeric antigen receptor T cells by expression of the chemokine receptor CCR2b).*J Immunother* 33:780-8,2010.

[1368] 15.Lee DW,Gardner R,Porter DL,等:诊断和管理细胞因子释放综合征的前沿观点(Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome).*Blood* 124:188-95,2014.

- [1369] 16. Becker ML, Near R, Mudgett-Hunter M, 等: 在转基因小鼠中表达杂合免疫球蛋白T细胞受体蛋白质 (Expression of a hybrid immunoglobulin-T cell receptor protein in transgenic mice). *Cell* 58:911-21, 1989.
- [1370] 17. Goverman J, Gomez SM, Segesman KD, 等: 嵌合免疫球蛋白-T细胞受体蛋白质形成功能性受体: 暗示着T细胞受体复合物的形成和活化 (Chimeric immunoglobulin-T cell receptor proteins form functional receptors: implications for T cell receptor complex formation and activation). *Cell* 60:929-39, 1990.
- [1371] 18. Gross G, Waks T, Eshhar Z: 表达作为具有抗体类型特异性的功能受体的免疫球蛋白T细胞受体嵌合分子 (Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity). *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:10024-8, 1989.
- [1372] 19. Kuwana Y, Asakura Y, Utsunomiya N, 等: 表达由免疫球蛋白衍生的V区域和T细胞受体衍生的C区域的嵌合受体 (Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions). *Biochem Biophys Res Commun* 149:960-8, 1987.
- [1373] 20. Jensen MC, Popplewell L, Cooper LJ, 等: 抗转基因排斥响应有助于人体内过激转移CD20/CD19-特异性嵌合抗原受体重导向T细胞的减毒持续性 (Antitransgene rejection responses contribute to attenuated persistence of adoptively transferred CD20/CD19-specific chimeric antigen receptor redirected T cells in humans). *Biol Blood Marrow Transplant* 16:1245-56, 2010.
- [1374] 21. Park JR, Digiusto DL, Slovak M, 等: 成神经细胞瘤患者中嵌合抗原受体重导向细胞裂解T淋巴细胞克隆的过继转移 (Adoptive transfer of chimeric antigen receptor re-directed cytolytic T lymphocyte clones in patients with neuroblastoma). *Mol Ther* 15:825-33, 2007.
- [1375] 22. Ramos CA, Dotti G: 嵌合抗原受体 (CAR) 工程改造的淋巴细胞用于癌症治疗 (Chimeric antigen receptor (CAR)-engineered lymphocytes for cancer therapy). *Expert Opin Biol Ther* 11:855-73, 2011.
- [1376] 23. Finney HM, Lawson AD, Bebbington CR, 等: 在T细胞中从单基因产物提供原代和共刺激信号的嵌合受体 (Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product). *J Immunol* 161:2791-7, 1998.
- [1377] 24. Hombach A, Wieczarkowicz A, Marquardt T, 等: 重组免疫受体对肿瘤特异T细胞的活化: 有效的IL-2分泌同时需要CD3 $\zeta$ 信号传导和CD28共刺激, 它们可整合入一个组合的CD28/CD3 $\zeta$ 信号传导受体分子 (Tumor-specific T cell activation by recombinant immunoreceptors: CD3 $\zeta$  signaling and CD28 costimulation are simultaneously required for efficient IL-2 secretion and can be integrated into one combined CD28/CD3 $\zeta$  signaling receptor molecule). *J Immunol* 167:6123-31, 2001.
- [1378] 25. Maher J, Brentjens RJ, Gunset G, 等: 单嵌合TCR $\zeta$ /CD28受体介导的人T淋巴细胞的细胞毒性和增殖 (Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation

directed by a single chimeric TCR $\zeta$ /CD28 receptor). *Nat Biotechnol* 20:70-5, 2002.

[1379] 26. Imai C, Mihara K, Andreansky M, 等: 具有4-1BB信号传导能力的嵌合受体激发针对急性淋巴细胞性白血病的潜在的细胞毒性 (Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia). *Leukemia* 18:676-84, 2004.

[1380] 27. Wang J, Jensen M, Lin Y, 等: 优化淋巴瘤的过激多克隆T细胞免疫治疗, 使用具有CD28和CD137共刺激结构域的嵌合T细胞受体 (Optimizing adoptive polyclonal T cell immunotherapy of lymphomas, using a chimeric T cell receptor possessing CD28 and CD137 costimulatory domains). *Hum Gene Ther* 18:712-25, 2007.

[1381] 28. Zhao Y, Wang QJ, Yang S, 等: 具有修饰的信号结构域的基于赫赛汀的嵌合抗原受体引起转导的T淋巴细胞和的活性和抗肿瘤活性增强 (A herceptin-based chimeric antigen receptor with modified signaling domains leads to enhanced survival of transduced T lymphocytes and antitumor activity). *J Immunol* 183:5563-74, 2009.

[1382] 29. Milone MC, Fish JD, Carpenito C, 等: 含CD137信号转导结构域的嵌合受体介导体内T细胞的存活增加和抗白血病功效增强 (Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo). *Mol Ther* 17:1453-64, 2009.

[1383] 30. Yvon E, Del Vecchio M, Savoldo B, 等: 用遗传工程改造的GD2特异性T细胞免疫治疗转移性黑素瘤 (Immunotherapy of metastatic melanoma using genetically engineered GD2-specific T cells). *Clin Cancer Res* 15:5852-60, 2009.

[1384] 31. Savoldo B, Ramos CA, Liu E, 等: CD28共刺激改善淋巴瘤患者的嵌合抗原受体修饰的T细胞的扩增和持续 (CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients). *J Clin Invest* 121:1822-6, 2011.

[1385] 32. Kalinski P, Hilkens CM, Wierenga EA, 等: 1型和2型极化树突细胞引发T细胞: 第三信号的概念 (T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal). *Immunol Today* 20:561-7, 1999.

[1386] 33. Kemnade JO, Seethammagari M, Narayanan P, 等: 通过双顺反子表达肿瘤抗原和iMyD88/CD40佐剂实现非专门设计的腺病毒介导的免疫治疗 (Off-the-shelf Adenoviral-mediated Immunotherapy via Bicistronic Expression of Tumor Antigen and iMyD88/CD40 Adjuvant). *Mol Ther*, 2012.

[1387] 34. Schenten D, Nish SA, Yu S, 等: 克服调节性T细胞的抑制需要通过CD4<sup>+</sup>T细胞中的适体分子MyD88的信号传导 (Signaling through the adaptor molecule MyD88 in CD4<sup>+</sup>T cells is required to overcome suppression by regulatory T cells). *Immunity* 40:78-90, 2014.

[1388] 35. Martin S, Pahari S, Sudan R, 等: CD8<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>T细胞汇总的CD40信号传导启动反T调节细胞功能 (CD40 signaling in CD8<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>T cells turns on contra-T regulatory

cell functions). *J Immunol* 184:5510-8, 2010.

[1389] 实施例26:再T细胞受体表达细胞和肿瘤浸润淋巴细胞中表达MyD88/CD40共刺激分子

[1390] 本文提供的表达MyD88/CD40诱导型共刺激分子的修饰细胞还可表达T细胞受体。这些示例中,T细胞受体可为细胞内源的,或可通过用含编码T细胞受体的多核苷酸的核酸转染或转化而提供给细胞。在某些示例中,T细胞受体可在MyD88/CD40诱导型共刺激分子的相同核酸载体上表达。在一些示例中,修饰细胞是肿瘤浸润淋巴细胞。

[1391] 实施例27:通过给予不同剂量多聚化配体诱导控制水平的CAR-T细胞活性的共刺激

[1392] 虽然快速和完整消除靶细胞(例如肿瘤细胞)可能在某些临床情况中是需要的,但仍存在许多其他情况,其中这些细胞的部分消除和减少是更不需要的。此类情况的可能性受到嵌合抗原受体(CAR)-T细胞靶标的各种固有性质以及相关不良事件(AE)类型的控制。这些性质包括靶向严重毒性和快速发作的分子和器官。至少由5种不同类型的CAR-T细胞靶具有关于控制功效和安全的这些性质的不同概况,其与可从递送更加受控的量的多聚化配体中收益的临床情况相关联,从而实现各患者的合适水平的CAR-T细胞活性--获得充分的治疗效果,但平衡对于避免不良事件(例如细胞因子风暴和脱靶毒性)的需求。在这些示例中,可能需要更可控水平的共刺激,使用充分剂量的多聚化配体用于治疗,并避免可能导致副作用效应的过度活性。

[1393] 类别1:分化抗原(例如MART、gp100、CEA、Her-2/neu)在成人中表达水平低。靶向这些抗原的CAR T细胞与高比例的严重和威胁生命的AE相关联,限制了其临床可用度,大多数没有进行到通过早期试验。由于正常器官(例如肺)中这些抗原的低水平表达发生预料不到的患者并发症和死亡。

[1394] 类别2:靶标非必需组织(例如B细胞上的CD19、甲状腺上的甲状腺球蛋白、前列腺细胞上的PSMA)。这些CAR T细胞在患者中显示出显著的抗肿瘤或型,但其还与包括患者死亡的SAE关联,通常与肿瘤裂解综合征和细胞因子风暴相关而非响应治疗。

[1395] 类别3:癌睾丸抗原(CTA)(例如NY-ESO-1, MAGE-A1, -A3; 50%的癌表达这两种家族中的任意。)CTA在生殖细胞和一些肿瘤中表达。由于与家族成员之间的交叉反应性而存在于类别1相似的问题。

[1396] 类别4:独特抗原(例如EGFRvIII)可能在可获得时为最佳,但仅少数肿瘤可获得。

[1397] 类别5:肿瘤基质(例如VEGF-R2、FAP)在肿瘤中为高水平,在正常组织中低水平。有少数完全响应(CR)但SAE的可能风险很高。

[1398] 能利用高剂量化学诱导剂(例如AP1903或AP20187)“产生”高水平CAR-T细胞治疗的共刺激分子阀(rheostat),并在需要避免不良事件是降低水平可能更好地满足了临床上尚未满足的需求,其通过对不同临床情况的细胞治疗毒性产生测量响应来实现。使用诱导型MyD88/CD40共刺激分子技术作为阀能在全剂量0.5-1mg/kg时维持实现>90%快速杀伤的能力,同时允许临床可滴定的治疗例如抗肿瘤治疗。

[1399] 在一个实施方式中,在少至15-30分钟增量或长时间(例如小时、半天、24小时或甚至每天每周或每月的增量)的增量中给予从0.01向1mg/kg的剂量递增,同时监控患者响应的不良事件。



- [1400] 在另一实施方式中,连续输注泵用于以非常低的剂量启动AP1903输注,并在至少15-30分钟增量中缓慢提高滴定并监控患者的不良事件。
- [1401] 在另一实施方式中,在数天或数周期间给予AP1903的慢速释放剂型(口服、IM、SQ、SL)以缓慢实现亚急性、不威胁生命的细胞治疗的控制。
- [1402] 实施例28:代表性实施方式
- [1403] 下文提供了本技术的某些实施方式的示例。
- [1404] A1.一种核酸,所述核酸包含
- [1405] a) 编码诱导性嵌合刺激分子的第一多核苷酸,其中所述诱导性嵌合刺激分子包含(i) MyD88多肽区域或缺失TIR结构域的截短的MyD88多肽区域;(ii) 缺失CD40胞外结构域的CD40胞质多肽区域,和(iii) 多聚化区域;和
- [1406] b) 编码嵌合抗原受体的第二多核苷酸。
- [1407] A2.如实施方式A1所述的核酸,其中所述诱导性嵌合刺激分子还包含(iv) 膜靶向区域。
- [1408] A3.如实施方式A1所述的核酸,其中所述嵌合刺激分子是以(i)、(ii)、(iii)多肽的氨基至羧基末端的顺序包含区域(i)-(iii)的多肽。
- [1409] A4.如实施方式A2所述的核酸,其中所述嵌合刺激分子是以(iv)、(i)、(ii)、(iii)多肽的氨基至羧基末端的顺序包含区域(i)-(iv)的多肽。
- [1410] A5.如实施方式A1-A4中任一项所述的核酸,其中所述多聚化区域是配体结合区域。
- [1411] A6.如实施方式A5所述的核酸,其中所述配体结合区域是FKBP12区域。
- [1412] A7.如实施方式A6所述的核酸,其中所述FKBP12区域是FKBP12v36区域。
- [1413] A8.如实施方式A6所述的核酸,其中所述FKBP12区域是Fv' Fv1s。
- [1414] A9.如实施方式A9所述的核酸,其中所述多聚化区域包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:11的多肽或其功能性片段,和具有氨基酸序列SEQ ID NO:13的多肽或其功能性片段,或还包含SEQ ID NO:12中的核苷酸序列所编码的多肽或其功能性片段。
- [1415] A10.如实施方式A10所述的核酸,其中所述多聚化区域还包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:13的多肽或其功能性片段,或还包含SEQ ID NO:12中的核苷酸序列所编码的多肽或其功能性片段。
- [1416] A11.如实施方式A9所述的核酸,其还包含残基36为缬氨酸的Fv多肽变体。
- [1417] A12.如实施方式A5-A11中任一项所述的核酸,其中所述配体是FK506二聚体或二聚化FK506类似物配体。
- [1418] A13.如实施方式A12所述的核酸,其中所述配体是AP1903。
- [1419] A14.如实施方式A1-A13中任一项所述的核酸,其中区域(i)-(iv)中至少一个由密码子优化的核苷酸序列所编码。
- [1420] A15.如实施方式A1-A14中任一项所述的核酸,其还包含与所述第一多核苷酸和所述第二多核苷酸均操作性连接的启动子。
- [1421] A16.如实施方式A1-A14中任一项所述的核酸,其还包含与所述第一多核苷酸操作性连接的第一启动子,和与所述第二多核苷酸操作性连接的第二启动子。
- [1422] A17.如实施方式A1-A15中任一项所述的核酸,其还包含所述第一和第二多核苷酸

之间的编码接头多肽的第三多核苷酸,其中所述接头多肽在翻译期间或翻译之后将所述第一和第二多核苷酸的翻译产物分开。

[1423] A18.如实施方式A17所述的核酸,其中所述接头多肽是2A多肽。

[1424] A19.如实施方式A1-A18中任一项所述的核酸,其中所述嵌合抗原受体包括

[1425] (i)跨膜区域;(ii)T细胞活化分子;和(iii)抗原识别部分。

[1426] A20.如实施方式A19所述的核酸,其中所述嵌合抗原受体还包含共刺激分子。

[1427] A21.如实施方式A20所述的核酸,其中所述共刺激分子选自:CD28、OX40和4-1BB。

[1428] A22.如实施方式A19-A21中任一项所述的核酸,其中所述T细胞活化分子是含ITAM的信号1赋予分子。

[1429] A23.如实施方式A19-A22中任一项所述的核酸,其中所述T细胞活化分子是CD3 $\zeta$ 多肽。

[1430] A24.如实施方式A19-A22中任一项所述的核酸,其中所述T细胞活化分子是Fc $\epsilon$ 受体 $\gamma$ (Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$ )亚基多肽。

[1431] A25.如实施方式A19-A24中任一项所述的核酸,其中所述抗原识别部分结合肿瘤细胞上的抗原。

[1432] A26.如实施方式A19-A24中任一项所述的核酸,其中所述抗原识别部分结合过度增殖疾病中涉及的细胞上的抗原。

[1433] A27.如实施方式A19-A24中任一项所述的核酸,其中所述抗原识别部分结合选自下组的抗原:PSMA、PSCA、MUC1、CD19、ROR1、间皮素、GD2、CD123、MUC16和Her2/Neu。

[1434] A28.如实施方式A19-A24中任一项所述的核酸,其中所述抗原识别部分结合PSCA。

[1435] A29.如实施方式A19-A24中任一项所述的核酸,其中所述抗原识别部分结合CD19。

[1436] A30.如实施方式A19-A24中任一项所述的核酸,其中所述抗原识别部分结合Her2/Neu。

[1437] A31.如实施方式A19-A24中任一项所述的核酸,其中所述抗原识别部分结合病毒或细菌抗原。

[1438] A32.如实施方式A19-A31中任一项所述的核酸,其中所述抗原识别部分是单链可变片段。

[1439] A33.如实施方式A19-A32中任一项所述的核酸,其中所述跨膜区域是CD28跨膜区域。

[1440] A34.如实施方式A19-A32中任一项所述的核酸,其中所述跨膜区域是CD8跨膜区域。

[1441] A35.如实施方式A34所述的核酸,其还包含CD8茎部区域。

[1442] A36.如实施方式A1-A35中任一项所述的核酸,其中所述嵌合刺激分子包括具有氨基酸序列SEQ ID NO:49的MyD88多肽,或具有氨基酸序列SEQ ID NO:137的截短的MyD88多肽,或其功能性片段。

[1443] A37.如实施方式A1-A36中任一项所述的核酸,其中所述MyD88多肽具有氨基酸序列SEQ ID NO:49。

[1444] A38.如实施方式A1-A37中任一项所述的核酸,其中所述胞质CD40多肽具有氨基酸序列SEQ ID NO:9,或其功能性片段。

- [1445] A40.如实施方式A23-A38中任一项所述的核酸,其中所述CD3 $\zeta$ 多肽具有氨基酸序列SEQ ID NO:39,或其功能性片段。
- [1446] A41.如实施方式A2-A40中任一项所述的核酸,其中所述膜靶向区域选自豆蔻酰化区域、棕榈酰化区域、异戊二烯化区域和受体跨膜序列。
- [1447] A42.如实施方式A2-A40中任一项所述的核酸,其中所述膜靶向区域是豆蔻酰化区域。
- [1448] A43.如实施方式A42所述的核酸,其中所述豆蔻酰化区域具有SEQ ID NO:3所示氨基酸序列或其功能性片段。
- [1449] A44.如实施方式A1-A43中任一项所述的核酸,其中所述核酸包含在病毒载体内。
- [1450] A45.如实施方式A44所述的核酸,其中所述病毒载体是逆转录病毒载体。
- [1451] A46.如实施方式A44所述的核酸,其中所述逆转录病毒载体是鼠白血病病毒载体。
- [1452] A47.如实施方式A44所述的核酸,其中所述逆转录病毒载体是SFG载体。
- [1453] A48.如实施方式A44所述的核酸,其中所述病毒载体是腺病毒载体。
- [1454] A49.如实施方式A44所述的核酸,其中所述病毒载体是慢病毒载体。
- [1455] A50.如实施方式A44所述的核酸,其中所述病毒载体选自腺伴随病毒(AAV)、痘疹病毒和痘苗病毒。
- [1456] A51.如实施方式A1-A43中任一项所述的核酸,其中所述核酸包含在质粒内。
- [1457] A52.实施方式A2-A19中任一项所述的核酸编码的嵌合刺激分子多肽。
- [1458] A53.转染或转导有实施方式A1-A51中任一项所述的核酸的修饰细胞。
- [1459] A54.如实施方式A53所述的修饰细胞,其中所述修饰细胞是T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞、NK-T细胞、TCR-表达细胞、或NK细胞。
- [1460] A55.如实施方式A53所述的修饰细胞,其中所述细胞是T细胞。
- [1461] A56.如实施方式A53-A55中任一项所述的修饰细胞,其中所述细胞获自骨髓或从其制备。
- [1462] A57.如实施方式A53-A55中任一项所述的修饰细胞,其中所述细胞获自脐带血或从其制备。
- [1463] A58.如实施方式A53-A55中任一项所述的修饰细胞,其中所述细胞获自外周血或从其制备。
- [1464] A59.如实施方式A53-A55中任一项所述的修饰细胞,其中所述细胞获自外周血单核细胞或从其制备。
- [1465] A60.如实施方式A53-A55中任一项所述的修饰细胞,其中所述细胞是人细胞。
- [1466] A61.如实施方式A53-A60中任一项所述的修饰细胞,其中所述细胞用选自下述的方法被所述核酸载体转染或转导:电穿孔、声穿孔、基因枪(例如用Au-颗粒的基因枪)、脂质转染、聚合物转染、纳米颗粒或多聚复合体。
- [1467] A62.一种刺激对象中T细胞介导的免疫应答的方法,所述方法包括给予:
- [1468] a)如实施方式A53-A61中任一项所述的修饰细胞至所述对象;和
- [1469] b)有效量的多聚化配体,所述多聚化配体结合多聚化区域以刺激对象中T细胞介导的免疫应答。
- [1470] A63.如实施方式A62所述的方法,其中所述嵌合抗原受体结合靶细胞。

- [1471] A64. 如实施方式A63所述的方法,其中所述靶细胞是肿瘤细胞。
- [1472] A65. 如实施方式A63-A64中任一项所述的方法,其中在给予所述修饰细胞后,所述对象中的靶细胞的数量或浓度下降。
- [1473] A66. 如实施方式A62-A65中任一项所述的方法,所述方法还包含:在给予所述修饰细胞或配体之前测量获自所述对象的第一样品中靶细胞的数量和浓度,在给予所述修饰细胞或配体之后测量获自所述对象的第二样品中靶细胞的数量和浓度,和确定所述第二样品中靶细胞的数量和浓度相对所述第一样品中靶细胞的数量和浓度的增加或降低。
- [1474] A67. 如实施方式A66所述的方法,其中所述第二样品中靶细胞的浓度相对所述第一样品中靶细胞的浓度降低。
- [1475] A68. 如实施方式A66所述的方法,其中所述第二样品中靶细胞的浓度相对所述第一样品中靶细胞的浓度增加。
- [1476] A69. 如实施方式A66-A68中任一项所述的方法,其中给予所述对象额外剂量的配体。
- [1477] A69.1. 如实施方式A62-A69中任一项所述的方法,其中多聚化配体的有效量是有效降低靶细胞数量或浓度并有效减少细胞毒性症状的含量。
- [1478] A69.2. 如实施方式A62-A69.1中任一项所述的方法,其中,在给予所述多聚化配体后,确定所述对象中的细胞毒性症状水平,和(i)停止给予所述多聚化配体或(ii)给予额外剂量的所述多聚化配体,所述额外剂量低于给予的多聚化配体的先前剂量。
- [1479] A69.3. 如实施方式A62-A69.1中任一项所述的方法,其中,在给予所述多聚化配体后,确定所述对象中的细胞毒性症状水平,和给予额外剂量的所述多聚化配体,所述额外剂量高于给予的多聚化配体的先前剂量。
- [1480] A69.4. 如实施方式A62-A69.1中任一项所述的方法,其中在给予所述多聚化配体后,确定所述对象中的靶细胞的数量或浓度,和(i)停止给予所述多聚化配体或(ii)给予额外剂量的所述多聚化配体,所述额外剂量低于给予的多聚化配体的先前剂量。
- [1481] A69.5. 如实施方式A62-A69.1中任一项所述的方法,其中,在给予所述多聚化配体后,确定所述对象中的靶细胞的数量或浓度,和给予额外剂量的所述多聚化配体,所述额外剂量高于给予的多聚化配体的先前剂量。
- [1482] A69.6. 如实施方式69.5所述的方法,其中所述额外剂量的多聚化配体是先前剂量的120%-200%。
- [1483] A69.7. 如实施方式A69.5所述的方法,其中所述额外剂量的多聚化配体是先前剂量的约150%。
- [1484] A70. 一种给对象提供抗肿瘤免疫的方法,包括给予对象有效量的如实施方式A53-A61中任一项所述修饰细胞和给予结合多聚化区域的配体,以为对象提供抗肿瘤免疫。
- [1485] A71. 一种治疗患有与靶抗原表达升高有关的疾病或病症的对象的方法,所述方法包括给予对象有效量的实施方式A53-A61中任一项所述的修饰细胞,和有效量的结合多聚化区域的配体。
- [1486] A72. 如实施方式A71所述的方法,其特征在于,所述靶抗原是肿瘤抗原。
- [1487] A73. 如实施方式A53-A72中任一项所述的方法,其中所述修饰细胞是自体同源T细胞。

- [1488] A74.如实施方式A53-A72中任一项所述的方法,其中所述修饰细胞是同种异体T细胞。
- [1489] A75.一种降低对象中肿瘤大小的方法,所述方法包括给予对象有效量的实施方式A53-A61中任一项所述的修饰细胞,其中所述抗原识别部分结合肿瘤上的抗原。
- [1490] A76.如实施方式A62-A75中任一项所述的方法,其中所述对象诊断有肿瘤。
- [1491] A76.如实施方式A62-A76中任一项所述的方法,其中所述对象患有癌症。
- [1492] A77.如实施方式A62-A76中任一项所述的方法,其中所述对象患有实体瘤。
- [1493] A78.如实施方式A62-A76中任一项所述的方法,其中所述修饰细胞是肿瘤浸润淋巴细胞或T细胞。
- [1494] A79.如实施方式A62-A78中任一项所述的方法,其中所述修饰细胞被递送至肿瘤床。
- [1495] A80.如实施方式A76所述的方法,其中所述癌症存在于所述对象的血液或骨髓中。
- [1496] A81.如实施方式A62-A76中任一项所述的方法,其中所述对象患有血液或骨髓疾病。
- [1497] A82.如实施方式A62-A76中任一项所述的方法,其中所述对象诊断有可通过干细胞移植得到缓解的任何症状或症状。
- [1498] A83.如实施方式A62-A76中任一项所述的方法,其中所述对象诊断有镰状细胞贫血或异染色性脑白质病变。
- [1499] A84.如实施方式A62-A76中任一项所述的方法,其中所述对象诊断有选自下组的病症:原发性免疫缺陷症、嗜血淋巴组织细胞瘤病(HAH)或其他噬血细胞紊乱、遗传性骨髓衰竭症、血红蛋白病、代谢紊乱和破骨细胞紊乱。
- [1500] A84.如实施方式A62-A76中任一项所述的方法,其中所述疾病或病症选自:严重联合免疫缺陷(SCID)、联合免疫缺陷(CID)、先天性T细胞缺陷/不足、常见变异型免疫缺陷病(CVID)、慢性肉芽肿性疾病、IPEX(免疫缺陷、多内分泌病变、肠病、X连锁)或IPEX样病、维斯科特-奥尔德里奇综合征、CD40配体缺陷、白细胞粘附缺陷、DOCA 8缺陷、IL-10不足/IL-10受体缺陷、GATA 2缺陷、X-连锁淋巴细胞增生性疾病(XAP)、软骨毛发发育不良、施戴二氏综合征(Shwachman Diamond Syndrome)、先天性纯红细胞再生障碍性贫血、先天性角化不良、范可尼贫血、先天性中性粒细胞减少、镰状细胞病、地中海贫血、黏多糖贮积症、鞘脂类代谢障碍和石骨症。
- [1501] A85.如实施方式A62-A84中任一项所述的方法,所述方法还包括确定是否将额外剂量的所述配体给予所述患者。
- [1502] A86.如实施方式A62-A85中任一项所述的方法,所述方法还包括将额外剂量的所述配体给予所述患者,其中所述疾病或病症症状保持或在症状减轻后测到。
- [1503] A86.1.如实施方式A71-A86中任一项所述的方法,其中多聚化配体的有效量是有效降低靶抗原表达细胞的数量或浓度、或靶抗原表达细胞的组织浸润程度、和有效减少细胞毒性症状的量。
- [1504] A86.2.如实施方式A71-A86.1中任一项所述的方法,其中,在给予所述多聚化配体后,确定所述对象中的细胞毒性症状水平,和(i)停止给予所述多聚化配体或(ii)给予额外剂量的所述多聚化配体,所述额外剂量低于给予的多聚化配体的先前剂量。

[1505] A86.3.如实施方式A71-A86中任一项所述的方法,其中,在给予所述多聚化配体后,确定所述对象中的细胞毒性症状水平,和给予额外剂量的所述多聚化配体,所述额外剂量高于给予的多聚化配体的先前剂量。

[1506] A86.4.如实施方式A71-A86.3中任一项所述的方法,其中在给予所述多聚化配体后,确定所述对象中靶抗原表达细胞的数量或浓度、或靶抗原表达细胞的组织浸润程度,和(i)停止给予所述多聚化配体或(ii)给予额外剂量的所述多聚化配体,所述额外剂量低于给予的多聚化配体的先前剂量。

[1507] A86.5.如实施方式A71-A86.3中任一项所述的方法,其中,在给予所述多聚化配体后,确定所述对象中靶抗原表达细胞的数量或浓度、或靶抗原表达细胞的组织浸润程度,和给予额外剂量的所述多聚化配体,所述额外剂量高于给予的多聚化配体的先前剂量。

[1508] A87.如实施例A62-A86.5中任一项所述的方法,所述方法还包括:

[1509] 鉴定对象中病症或疾病是否存在或其阶段,和

[1510] 传递指示以给予实施方式A53-A61中任一项所述的配体,基于所述对象中鉴定的病症或疾病是否存在或其阶段来维持配体的后续剂量或调节给予所述对象的所述配体的后续剂量。

[1511] A88.如实施方式A62-A87中任一项所述的方法,其中所述病症是白血病。

[1512] A89.如实施方式A62-A87所述的方法,其中所述对象诊断为选自下组的病毒病因学感染:HIV、流感、疱疹、病毒性肝炎、爱波斯坦-巴尔病、脊髓灰质炎、病毒性脑炎、麻疹、水痘、巨细胞病毒(CMV)、腺病毒(ADV)、HHV-6(人疱疹病毒6、I)和人乳头状瘤病毒,或诊断为选自下组的细菌病因学感染:肺炎、肺结核和梅毒,或诊断为选自下组的寄生病因学感染:疟疾、锥虫病、利什曼病、滴虫病和阿米巴病。

[1513] A90.如实施方式A62-A89中任一项所述的方法,其中所述修饰细胞经离体转染或转导。

[1514] A91.如实施方式A62-A89中任一项所述的修饰细胞,其中所述修饰细胞经体内转染或转导。

[1515] A92.如实施方式A62-A90中任一项所述的方法,其中所述配体是AP1903。

[1516] A93.在细胞中表达嵌合刺激分子的方法,包括将实施方式A1-A51中任一项所述的核酸与细胞在使所述核酸纳入所述细胞的条件下进行接触,由此所述细胞从所纳入的核酸表达所述嵌合抗原受体。

[1517] A94.如实施方式A93所述的方法,其中所述核酸与所述细胞离体接触。

[1518] A95.如实施方式A93所述的方法,其中所述核酸与所述细胞体内接触。

[1519] B1.一种治疗患有与靶抗原表达升高有关的疾病或病症的对象的方法,所述方法包括给予结合多聚化配体结合区域的多聚化配体,其中

[1520] a)多聚化配体结合诱导性嵌合刺激分子,所述分子包括多聚化嵌合区域、MyD88多肽区域或缺失TIR结构域的截短的MyD88多肽区域、和缺失CD40胞外结构域的CD40胞质多肽区域;

[1521] b)对象中循环的T细胞表达(i)所述诱导性嵌合刺激分子;和(ii)结合靶抗原的嵌合抗原受体;

[1522] c)在对象中循环的靶细胞上呈递靶抗原;和

- [1523] d) 给予多聚化配体后,对象中的靶细胞的数量或浓度降低。
- [1524] B2. 如实施方式B1所述的方法,其中所述诱导性嵌合刺激分子还包含膜靶向区域。
- [1525] B3. 如实施方式B1或B2所述的方法,其中所述表达嵌合刺激分子的T细胞包括实施方式A1-A51中任一项所述的核酸。
- [1526] B4. 如实施方式B1-B3中任一项所述的方法,其中所述把抗原在肿瘤细胞中表达,并且所述嵌合抗原受体结合所述肿瘤细胞。
- [1527] B5. 如实施方式B1-B4中任一项所述的方法,所述方法还包含:在给予所述修饰细胞或配体之前测量获自所述对象的第一样品中靶细胞的数量和浓度,在给予所述修饰细胞或配体之后测量获自所述对象的第二样品中靶细胞的数量和浓度,和确定所述第二样品中靶细胞的数量和浓度相对所述第一样品中靶细胞的数量和浓度的增加或降低。
- [1528] B6. 如实施方式B5所述的方法,其中所述第二样品中靶细胞的浓度相对所述第一样品中靶细胞的浓度降低。
- [1529] B7. 如实施方式B5所述的方法,其中所述第二样品中靶细胞的浓度相对所述第一样品中靶细胞的浓度增加。
- [1530] B8. 如实施方式B1-B7中任一项所述的方法,其中给予所述对象额外剂量的配体。
- [1531] B9. 如实施方式B1-B8中任一项所述的方法,其中所述靶抗原是肿瘤抗原。
- [1532] B10. 如实施方式B1-B9中任一项所述的方法,其中所述对象诊断有肿瘤。
- [1533] B11. 如实施方式B1-B9中任一项所述的方法,其中所述对象患有癌症。
- [1534] B12. 如实施方式B1-B11中任一项所述的方法,其中所述对象患有实体瘤。
- [1535] B13. 如实施方式B11所述的方法,其中所述癌症存在于所述对象的血液或骨髓中。
- [1536] B14. 如实施方式B1-B13中任一项所述的方法,其中所述对象患有血液或骨髓疾病。
- [1537] B15. 如实施方式B1-B9中任一项所述的方法,其中所述对象诊断有可通过干细胞移植得到缓解的任何症状或症状。
- [1538] B16. 如实施方式B1-B9中任一项所述的方法,其中所述对象诊断有镰状细胞贫血或异染色性脑白质病变。
- [1539] B17. 如实施方式B1-B9中任一项所述的方法,其中所述对象诊断有选自下组的病症:原发性免疫缺陷症、嗜血淋巴组织细胞瘤病(HAH)或其他噬血细胞紊乱、遗传性骨髓衰竭症、血红蛋白病、代谢紊乱和破骨细胞紊乱。
- [1540] B18. 如实施方式B1-B9中任一项所述的方法,其中所述疾病或病症选自:严重联合免疫缺陷(SCID)、联合免疫缺陷(CID)、先天性T细胞缺陷/不足、常见变异型免疫缺陷病(CVID)、慢性肉芽肿性疾病、IPEX(免疫缺陷、多内分泌病变、肠病、X连锁)或IPEX样病、维斯科特-奥尔德里奇综合征、CD40配体缺陷、白细胞粘附缺陷、DOCA 8缺陷、IL-10不足/IL-10受体缺陷、GATA 2缺陷、X-连锁淋巴细胞增生性疾病(XAP)、软骨毛发发育不良、施戴二氏综合征(Shwachman Diamond Syndrome)、先天性纯红细胞再生障碍性贫血、先天性角化不良、范可尼贫血、先天性中性粒细胞减少、镰状细胞病、地中海贫血、黏多糖贮积症、鞘脂类代谢障碍和石骨症。
- [1541] B19. 如实施方式B1-B18中任一项所述的方法,所述方法还包括确定是否将额外剂量的所述多聚化配体给予所述患者。

- [1542] B20. 如实施方式B1-B18中任一项所述的方法,所述方法还包括将额外剂量的所述多聚化配体给予所述患者,其中所述疾病或病症症状保持或在症状减轻后测到。
- [1543] B21. 如实施例B1-B18中任一项所述的方法,所述方法还包括:
- [1544] 鉴定对象中病症或疾病是否存在或其阶段,和
- [1545] 传递指示以给予对象所述多聚化配体,基于所述对象中鉴定的病症或疾病是否存在或其阶段来维持所述多聚化配体的后续剂量或调节给予所述对象的所述多聚化配体的后续剂量。
- [1546] B22. 如实施方式B1-B21中任一项所述的方法,其中所述病症是白血病。
- [1547] B23. 如实施方式B1-B9所述的方法,其中所述对象诊断为选自下组的病毒病因学感染:HIV、流感、疱疹、病毒性肝炎、爱波斯坦-巴尔病、脊髓灰质炎、病毒性脑炎、麻疹、水痘、巨细胞病毒(CMV)、腺病毒(ADV)、HHV-6(人疱疹病毒6、I)和人乳头状瘤病毒,或诊断为选自下组的细菌病因学感染:肺炎、肺结核和梅毒,或诊断为选自下组的寄生病因学感染:疟疾、锥虫病、利什曼病、滴虫病和阿米巴病。
- [1548] B24. 如实施方式B1-B23中任一项所述的方法,其中所述配体是AP1903。
- [1549] C1. 一种转染或转导有核酸的修饰T细胞,包含编码诱导性嵌合刺激分子的多核苷酸,其中所述诱导性嵌合刺激分子包含(i) MyD88多肽区域或缺失TIR结构域的截短的MyD88多肽区域;(ii) 缺失CD40胞外结构域的CD40胞质多肽区域,和(iii) 多聚化区域。
- [1550] C2. 如实施方式C1所述的修饰T细胞,其中所述诱导性嵌合刺激分子还包含(iv) 膜靶向区域。
- [1551] C3. 如实施方式C1所述的修饰T细胞,其中所述嵌合刺激分子是以(i)、(ii)、(iii)多肽的氨基至羧基末端的顺序包含区域(i)-(iii)的多肽。
- [1552] C4. 如实施方式C2所述的修饰T细胞,其中所述嵌合刺激分子是以(iv)、(i)、(ii)、(iii)多肽的氨基至羧基末端的顺序包含区域(i)-(iv)的多肽。
- [1553] C5. 如实施方式C1-C4中任一项所述的修饰T细胞,其中所述多聚化区域是配体结合区域。
- [1554] C6. 如实施方式C5所述的修饰T细胞,其中所述配体结合区域是FKBP12区域。
- [1555] C7. 如实施方式C6所述的修饰T细胞,其中所述FKBP12区域是FKBP12v36区域。
- [1556] C8. 如实施方式C6所述的修饰T细胞,其中所述FKBP12区域是Fv' Fv1s。
- [1557] C9. 如实施方式C5所述的修饰T细胞,其中所述多聚化区域包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:11的多肽或其功能性片段,和具有氨基酸序列SEQ ID NO:13的多肽或其功能性片段,或还包含SEQ ID NO:12中的核苷酸序列所编码的多肽或其功能性片段。
- [1558] C10. 如实施方式C9所述的修饰T细胞,其中所述多聚化区域还包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:13的多肽或其功能性片段,或还包含SEQ ID NO:12中的核苷酸序列所编码的多肽或其功能性片段。
- [1559] C11. 如实施方式C9所述的修饰T细胞,其还包含残基36为缬氨酸的Fv多肽变体。
- [1560] C12. 如实施方式C5-C11中任一项所述的修饰T细胞,其中所述配体是FK506二聚体或二聚化FK506类似物配体。
- [1561] C13. 如实施方式C12所述的修饰T细胞,其中所述配体是AP1903。
- [1562] C14. 如实施方式C1-C13中任一项所述的修饰T细胞,其中区域(i)-(iv)中至少一



个由密码子优化的核苷酸序列所编码。

[1563] C15. 如实施方式C1-C14中任一项所述的修饰T细胞, 其还包含与编码所述诱导性嵌合刺激分子的多核苷酸操作性连接的启动子。

[1564] C16. 如实施方式C1-C15中任一项所述的修饰T细胞, 其中所述修饰细胞还包含编码嵌合抗原受体的多核苷酸。

[1565] C17. 如实施方式C16所述的修饰T细胞, 其中所述嵌合抗原受体包括

[1566] (i) 跨膜区域; (ii) T细胞活化分子; 和 (iii) 抗原识别部分。

[1567] C18. 如实施方式C1-C15中任一项所述的修饰T细胞, 其中所述修饰细胞还包含编码T细胞受体的多核苷酸。

[1568] C19. 如实施方式C1-C15中任一项所述的修饰T细胞, 其中所述修饰细胞转染或转导有含编码T细胞受体或基于T细胞受体的嵌合抗原受体的多核苷酸的核酸。

[1569] C20. 如实施方式C16所述的修饰T细胞, 其中所述嵌合抗原受体还包含共刺激分子。

[1570] C21. 如实施方式C20所述的修饰T细胞, 其中所述共刺激分子选自: CD28、OX40和4-1BB。

[1571] C22. 如实施方式C17所述的修饰T细胞, 其中所述T细胞活化分子是含ITAM的信号1赋予分子。

[1572] C23. 如实施方式C17所述的修饰T细胞, 其中所述T细胞活化分子是CD3 $\zeta$ 多肽。

[1573] C24. 如实施方式C17所述的修饰T细胞, 其中所述T细胞活化分子是Fc $\epsilon$ 受体 $\gamma$  (Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$ ) 亚基多肽。

[1574] C25. 如实施方式C17或C22-C24中任一项所述的修饰T细胞, 其中所述抗原识别部分结合肿瘤细胞上的抗原。

[1575] C26. 如实施方式C17或C22-C24中任一项所述的修饰T细胞, 其中所述抗原识别部分结合过度增殖疾病中涉及的细胞上的抗原。

[1576] C27. 如实施方式C17或C22-C26中任一项所述的修饰T细胞, 其中所述抗原识别部分结合选自下组的抗原: PSMA、PSCA、MUC1、CD19、ROR1、间皮素、GD2、CD123、MUC16和Her2/Neu。

[1577] C28. 如实施方式C17或C22-C24中任一项所述的修饰T细胞, 其中所述抗原识别部分结合PSCA。

[1578] C29. 如实施方式C17或C22-C24中任一项所述的修饰T细胞, 其中所述抗原识别部分结合CD19。

[1579] C30. 如实施方式C17或C22-C24中任一项所述的修饰T细胞, 其中所述抗原识别部分结合Her2/Neu。

[1580] C31. 如实施方式C17或C22-C24中任一项所述的修饰T细胞, 其中所述抗原识别部分结合病毒或细菌抗原。

[1581] C32. 如实施方式C17或C22-C31中任一项所述的修饰T细胞, 其中所述抗原识别部分是单链可变片段。

[1582] C33. 如实施方式C17或C22-C32中任一项所述的修饰T细胞, 其中所述跨膜区域是CD28跨膜区域。

- [1583] C34.如实施方式C17或C22-C32中任一项所述的修饰T细胞,其中所述跨膜区域是CD8跨膜区域。
- [1584] C35.如实施方式C34所述的修饰T细胞,其中所述嵌合抗原受体还包含CD8茎部区域。
- [1585] C36.如实施方式C1-C35中任一项所述的修饰T细胞,其中所述嵌合刺激分子包括具有氨基酸序列SEQ ID NO:5的截短的MyD88多肽,或其功能性片段。
- [1586] C37.如实施方式C1-C36中任一项所述的修饰T细胞,其中所述MyD88多肽具有氨基酸序列SEQ ID NO:49。
- [1587] C38.如实施方式C1-C37中任一项所述的修饰T细胞,其中所述胞质CD40多肽具有氨基酸序列SEQ ID NO:9,或其功能性片段。
- [1588] C40.如实施方式C23-C38任一项所述的修饰T细胞,其中所述CD3 $\zeta$ 多肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:39,或其功能性片段。
- [1589] C41.如实施方式C2-C40中任一项所述的修饰T细胞,其中所述膜靶向区域选自豆蔻酰化区域、棕榈酰化区域、异戊二烯化区域和受体跨膜序列。
- [1590] C42.如实施方式C2-C40中任一项所述的修饰T细胞,其中所述膜靶向区域是豆蔻酰化区域。
- [1591] C43.如实施方式C42所述的修饰T细胞,其中所述豆蔻酰化区域具有SEQ ID NO:3所示氨基酸序列或其功能性片段。
- [1592] C44-C61保留。
- [1593] C62.一种刺激对象中T细胞介导的免疫应答的方法,所述方法包括给予:
- [1594] a)如实施方式C1-C43中任一项所述的修饰细胞至所述对象;和
- [1595] b)有效量的多聚化配体,所述多聚化配体结合多聚化区域以刺激对象中T细胞介导的免疫应答。
- [1596] C63.如实施方式C62所述的方法,其中所述嵌合抗原受体结合靶细胞。
- [1597] C64.如实施方式C63所述的方法,其中所述靶细胞是肿瘤细胞。
- [1598] C65.如实施方式C62-C64中任一项所述的方法,其中在给予所述配体后,所述对象中的靶细胞的数量或浓度下降。
- [1599] C66.如实施方式C62-C65中任一项所述的方法,所述方法还包含:在给予所述修饰细胞或配体之前测量获自所述对象的第一样品中靶细胞的数量和浓度,在给予所述修饰细胞或配体之后测量获自所述对象的第二样品中靶细胞的数量和浓度,和确定所述第二样品中靶细胞的数量和浓度相对所述第一样品中靶细胞的数量和浓度的增加或降低。
- [1600] C67.如实施方式C66所述的方法,其中所述第二样品中靶细胞的浓度相对所述第一样品中靶细胞的浓度降低。
- [1601] C68.如实施方式C66所述的方法,其中所述第二样品中靶细胞的浓度相对所述第一样品中靶细胞的浓度增加。
- [1602] C69.如实施方式C62-C68中任一项所述的方法,其中给予所述对象额外剂量的配体。
- [1603] C70.一种给对象提供抗肿瘤免疫的方法,包括给予对象有效量的如实施方式C1-C43中任一项所述修饰细胞和给予结合多聚化区域的配体,以为对象提供抗肿瘤免疫。

- [1604] C71. 一种治疗患有与靶抗原表达升高有关的疾病或病症的对象的方法, 所述方法包括给予对象有效量的实施方式C1-C43中任一项所述的修饰细胞, 和有效量的结合多聚化区域的配体。
- [1605] C72. 如实施方式C71所述的方法, 其特征在于, 所述靶抗原是肿瘤抗原。
- [1606] C73. 如实施方式C62-C72中任一项所述的方法, 其中所述修饰T细胞是自体同源T细胞。
- [1607] C74. 如实施方式C62-C72中任一项所述的方法, 其中所述修饰T细胞是同种异体T细胞。
- [1608] C75. 一种降低对象中肿瘤大小的方法, 所述方法包括给予对象有效量的实施方式C1-C43中任一项所述的修饰T细胞, 其中所述抗原识别部分结合肿瘤上的抗原。
- [1609] C76. 如实施方式C62-C75中任一项所述的方法, 其中所述对象诊断有肿瘤。
- [1610] C76. 如实施方式C62-C75中任一项所述的方法, 其中所述对象患有癌症。
- [1611] C77. 如实施方式C62-C75中任一项所述的方法, 其中所述对象患有实体瘤。
- [1612] C78. 如实施方式C62-C75中任一项所述的方法, 其中所述修饰T细胞是肿瘤浸润淋巴细胞、NK细胞或NK-T细胞。
- [1613] C79. 如实施方式C62-C75中任一项所述的方法, 其中所述修饰T细胞被递送至肿瘤床。
- [1614] C80. 如实施方式C76所述的方法, 其中所述癌症存在于所述对象的血液或骨髓中。
- [1615] C81. 如实施方式C62-C75中任一项所述的方法, 其中所述对象患有血液或骨髓疾病。
- [1616] C82. 如实施方式C62-C75中任一项所述的方法, 其中所述对象诊断有可通过干细胞移植得到缓解的任何症状或症状。
- [1617] C83. 如实施方式C62-C75中任一项所述的方法, 其中所述对象诊断有镰状细胞贫血或异染色性脑白质病变。
- [1618] C84. 如实施方式C62-C75中任一项所述的方法, 其中所述对象诊断有选自下组的病症: 原发性免疫缺陷症、嗜血淋巴组织细胞瘤病 (HAH) 或其他噬血细胞紊乱、遗传性骨髓衰竭症、血红蛋白病、代谢紊乱和破骨细胞紊乱。
- [1619] C84. 如实施方式C62-C76中任一项所述的方法, 其中所述疾病或病症选自: 严重联合免疫缺陷 (SCID)、联合免疫缺陷 (CID)、先天性T细胞缺陷/不足、常见变异型免疫缺陷病 (CVID)、慢性肉芽肿性疾病、IPEX (免疫缺陷、多内分泌病变、肠病、X连锁) 或IPEX样病、维斯科特-奥尔德里奇综合征、CD40配体缺陷、白细胞粘附缺陷、DOCA 8缺陷、IL-10不足/IL-10受体缺陷、GATA 2缺陷、X-连锁淋巴细胞增生性疾病 (XAP)、软骨毛发发育不良、施戴二氏综合征 (Shwachman Diamond Syndrome)、先天性纯红细胞再生障碍性贫血、先天性角化不良、范可尼贫血、先天性中性粒细胞减少、镰状细胞病、地中海贫血、黏多糖贮积症、鞘脂类代谢障碍和石骨症。
- [1620] C85. 如实施方式C62-C84中任一项所述的方法, 所述方法还包括确定是否将额外剂量的所述配体给予所述患者。
- [1621] C86. 如实施方式C62-C85中任一项所述的方法, 所述方法还包括将额外剂量的所述配体给予所述患者, 其中所述疾病或病症症状保持或在症状减轻后测到。

- [1622] C87.如实施例C62-C86中任一项所述的方法,所述方法还包括:
- [1623] 鉴定对象中病症或疾病是否存在或其阶段,和
- [1624] 传递指示以给予实施方式C53-C61中任一项所述的配体,基于所述对象中鉴定的病症或疾病是否存在或其阶段来维持配体的后续剂量或调节给予所述对象的所述配体的后续剂量。
- [1625] C88.如实施方式C62-C87中任一项所述的方法,其中所述病症是白血病。
- [1626] C89.如实施方式C62-C87所述的方法,其中所述对象诊断为选自下组的病毒病因学感染:HIV、流感、疱疹、病毒性肝炎、爱波斯坦-巴尔病、脊髓灰质炎、病毒性脑炎、麻疹、水痘、巨细胞病毒(CMV)、腺病毒(ADV)、HHV-6(人疱疹病毒6、I)和人乳头状瘤病毒,或诊断为选自下组的细菌病因学感染:肺炎、肺结核和梅毒,或诊断为选自下组的寄生病因学感染:疟疾、锥虫病、利什曼病、滴虫病和阿米巴病。
- [1627] C90.如实施方式C62-C89中任一项所述的方法,其中所述修饰T细胞经离体转染或转导。
- [1628] C91.如实施方式C62-C89中任一项所述的修饰T细胞,其中所述修饰T细胞经体内转染或转导。
- [1629] C92.如实施方式C62-C90中任一项所述的方法,其中所述配体是AP1903。
- [1630] D1.一种包含编码诱导性嵌合刺激分子的多核苷酸的核酸,其中所述诱导性嵌合刺激分子包含(i) MyD88多肽区域或缺失TIR结构域的截短的MyD88多肽区域;(ii) 缺失CD40胞外结构域的CD40胞质多肽区域,和(iii) 多聚化区域。
- [1631] D2.如实施方式D1所述的核酸,其中所述嵌合刺激分子是以(i)、(ii)、(iii)多肽的氨基至羧基末端的顺序包含区域(i)-(iii)的多肽。
- [1632] D3.如实施方式D1-D2中任一项所述的核酸,其中所述多聚化区域是配体结合区域。
- [1633] D3.如实施方式D3所述的核酸,其中所述配体结合区域是FKBP12区域。
- [1634] D4.如实施方式D3所述的核酸,其中所述FKBP12区域是FKBP12v36区域。
- [1635] D5.如实施方式D3所述的核酸,其中所述FKBP12区域是Fv' Fv1s。
- [1636] D6.如实施方式D3所述的核酸,其中所述多聚化区域包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:11的多肽或其功能性片段,和具有氨基酸序列SEQ ID NO:13的多肽。
- [1637] D7.如实施方式D6所述的核酸,其中所述多聚化区域还包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:13的多肽或其功能片段。
- [1638] D8.如实施方式D6所述的核酸,其还包含残基36为缬氨酸的Fv多肽变体。
- [1639] D9.如实施方式D1-D8中任一项所述的核酸,其中所述配体是FK506二聚体或二聚化FK506类似物配体。
- [1640] D10.如实施方式D9所述的核酸,其中所述配体是AP1903。
- [1641] D11.如实施方式D1-D10中任一项所述的核酸,其中区域(i)-(iii)中至少一个由密码子优化的核苷酸序列所编码。
- [1642] D12.如实施方式D1-D11中任一项所述的核酸,其还包含操作性连接所述多肽的启动子。
- [1643] D13.如实施方式D1-D12中任一项所述的核酸,其中所述核酸包含在病毒载体内。

- [1644] D14. 如实施方式D13所述的核酸,其中所述病毒载体是逆转录病毒载体。
- [1645] D15. 如实施方式D14所述的核酸,其中所述逆转录病毒载体是鼠白血病病毒载体。
- [1646] D16. 如实施方式D14所述的核酸,其中所述逆转录病毒载体是SFG载体。
- [1647] D17. 如实施方式D13所述的核酸,其中所述病毒载体是腺病毒载体。
- [1648] D18. 如实施方式D13所述的核酸,其中所述病毒载体是慢病毒载体。
- [1649] D19. 如实施方式D13所述的核酸,其中所述病毒载体选自腺伴随病毒(AAV)、疱疹病毒和痘苗病毒。
- [1650] D20. 如实施方式D1-D12中任一项所述的核酸,其中所述核酸包含在质粒内。
- [1651] D21. 转染或转导有实施方式D1-D20中任一项所述的核酸的修饰细胞。
- [1652] D22. 如实施方式D21所述的修饰细胞,其中所述修饰细胞是T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞、NK-T细胞、TCR-表达细胞、或NK细胞。
- [1653] D23. 如实施方式D21所述的修饰细胞,其中所述细胞是T细胞。
- [1654] D24. 如实施方式D21-D23中任一项所述的修饰细胞,其中所述细胞获自骨髓或从其制备。
- [1655] D25. 如实施方式D21-D23中任一项所述的修饰细胞,其中所述细胞获自脐带血或从其制备。
- [1656] D26. 如实施方式D21-D23中任一项所述的修饰细胞,其中所述细胞获自外周血或从其制备。
- [1657] D27. 如实施方式D21-D23中任一项所述的修饰细胞,其中所述细胞获自外周血单核细胞或从其制备。
- [1658] D28. 如实施方式D21-D27中任一项所述的修饰细胞,其中所述细胞是人细胞。
- [1659] D29. 如实施方式D21-D28中任一项所述的修饰细胞,其中所述细胞用选自下述的方法被所述核酸载体转染或转导:电穿孔、声穿孔、基因枪(例如用Au-颗粒的基因枪)、脂质转染、聚合物转染、纳米颗粒或多聚复合体。
- [1660] D30. 如实施方式D1-D29中任一项所述的修饰T细胞,其中所述修饰细胞还包含编码T细胞受体的多核苷酸。
- [1661] D31. 如实施方式D1-D29中任一项所述的修饰细胞,其中所述修饰细胞转染或转导有含编码T细胞受体或基于T细胞受体的嵌合抗原受体的多核苷酸的核酸。
- [1662] D32. 如实施方式D21-D29中任一项所述的修饰T细胞,其中所述修饰细胞还包含编码嵌合抗原受体的多核苷酸。
- [1663] D33. 如实施方式D32所述的修饰细胞,其中所述嵌合抗原受体包括
- [1664] (i) 跨膜区域; (ii) T细胞活化分子; 和 (iii) 抗原识别部分。
- [1665] D34. 如实施方式D33所述的修饰细胞,其中所述嵌合抗原受体还包含共刺激分子。
- [1666] D35. 如实施方式D34所述的修饰细胞,其中所述共刺激分子选自:CD28、OX40和4-1BB。
- [1667] D36. 如实施方式D33所述的修饰细胞,其中所述T细胞活化分子是含ITAM的信号1赋予分子。
- [1668] D37. 如实施方式D33所述的修饰细胞,其中所述T细胞活化分子是CD3 $\zeta$ 多肽。
- [1669] D38. 如实施方式D33所述的修饰细胞,其中所述T细胞活化分子是Fc $\epsilon$ 受体 $\gamma$  (Fc $\epsilon$

R1  $\gamma$ ) 亚基多肽。

[1670] D39. 如实施方式D32-D38中任一项所述的修饰细胞, 其中所述抗原识别部分结合肿瘤细胞上的抗原。

[1671] D40. 如实施方式D32-D38中任一项所述的修饰细胞, 其中所述抗原识别部分结合过度增殖疾病中涉及的细胞上的抗原。

[1672] D41. 如实施方式D32-D40中任一项所述的修饰细胞, 其中所述抗原识别部分结合选自下组的抗原: PSMA、PSCA、MUC1、CD19、ROR1、间皮素、GD2、CD123、MUC16和Her2/Neu。

[1673] D42. 如实施方式D32-D40中任一项所述的修饰细胞, 其中所述抗原识别部分结合PSCA。

[1674] D43. 如实施方式D32-D40中任一项所述的修饰细胞, 其中所述抗原识别部分结合CD19。

[1675] D44. 如实施方式D32-D40中任一项所述的修饰细胞, 其中所述抗原识别部分结合Her2/Neu。

[1676] D45. 如实施方式D32-D38中任一项所述的修饰细胞, 其中所述抗原识别部分结合病毒或细菌抗原。

[1677] D46. 如实施方式D32-D45中任一项所述的修饰细胞, 其中所述抗原识别部分是单链可变片段。

[1678] D47. 如实施方式D32-D46中任一项所述的修饰细胞, 其中所述跨膜区域是CD28跨膜区域。

[1679] D48. 如实施方式D32-D46中任一项所述的修饰细胞, 其中所述跨膜区域是CD8跨膜区域。

[1680] D49. 如实施方式D48所述的修饰细胞, 其中所述嵌合抗原受体还包含CD8茎部区域。

[1681] D50. 如实施方式D21-D49中任一项所述的修饰T细胞, 其中所述嵌合刺激分子包括具有氨基酸序列SEQ ID NO:5的截短的MyD88多肽, 或其功能性片段。

[1682] D51. 如实施方式D21-D50中任一项所述的修饰T细胞, 其中所述MyD88多肽具有氨基酸序列SEQ ID NO:49。

[1683] D52. 如实施方式D21-D51中任一项所述的修饰T细胞, 其中所述胞质CD40多肽具有氨基酸序列SEQ ID NO:9, 或其功能性片段。

[1684] D53. 如实施方式D32-D52任一项所述的修饰T细胞, 其中所述CD3 $\zeta$ 多肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:39, 或其功能性片段。

[1685] D54. 一种刺激对象中T细胞介导的免疫应答的方法, 所述方法包括给予:

[1686] a) 如实施方式D21-D53中任一项所述的修饰细胞至所述对象; 和

[1687] b) 有效量的多聚化配体, 所述多聚化配体结合多聚化区域以刺激对象中T细胞介导的免疫应答。

[1688] D55. 保留。

[1689] D56. 如实施方式D54所述的方法, 其中所述嵌合抗原受体结合靶细胞。

[1690] D57. 如实施方式D56所述的方法, 其中所述靶细胞是肿瘤细胞。

[1691] D58. 如实施方式D56或D57中任一项所述的方法, 其中在给予所述配体后, 所述对

象中的靶细胞的数量或浓度下降。

[1692] D59. 如实施方式D56-D58中任一项所述的方法, 所述方法还包含: 在给予所述修饰细胞或配体之前测量获自所述对象的第一样品中靶细胞的数量和浓度, 在给予所述修饰细胞或配体之后测量获自所述对象的第二样品中靶细胞的数量和浓度, 和确定所述第二样品中靶细胞的数量和浓度相对所述第一样品中靶细胞的数量和浓度的增加或降低。

[1693] D60. 如实施方式D59所述的方法, 其中所述第二样品中靶细胞的浓度相对所述第一样品中靶细胞的浓度降低。

[1694] D61. 如实施方式D59所述的方法, 其中所述第二样品中靶细胞的浓度相对所述第一样品中靶细胞的浓度增加。

[1695] D62. 如实施方式D54-D61中任一项所述的方法, 其中给予所述对象额外剂量的配体。

[1696] D63. 一种给对象提供抗肿瘤免疫的方法, 包括给予对象有效量的如实施方式D21-D53中任一项所述修饰细胞和给予结合多聚化区域的配体, 以为对象提供抗肿瘤免疫。

[1697] D64. 一种治疗患有与靶抗原表达升高有关的疾病或病症的对象的方法, 所述方法包括给予对象有效量的实施方式D32-D53中任一项所述的修饰细胞, 和有效量的结合多聚化区域的配体。

[1698] D65. 如实施方式D64所述的方法, 其特征在于, 所述靶抗原是肿瘤抗原。

[1699] D66. 如实施方式D64或D65所述的方法, 其中所述修饰细胞是T细胞。

[1700] D67. 如实施方式D64或D65所述的方法, 其中所述修饰细胞是同种异体T细胞。

[1701] D68. 一种降低对象中肿瘤大小的方法, 所述方法包括给予对象有效量的实施方式D32-D53中任一项所述的修饰细胞, 其中所述抗原识别部分结合肿瘤上的抗原。

[1702] D69. 如实施方式D54-D69中任一项所述的方法, 其中所述对象诊断有肿瘤。

[1703] D70. 如实施方式D54-D70中任一项所述的方法, 其中所述对象患有癌症。

[1704] D71. 如实施方式D54-D70中任一项所述的方法, 其中所述对象患有实体瘤。

[1705] D72. 如实施方式D54-D71中任一项所述的方法, 其中所述修饰细胞是肿瘤浸润淋巴细胞。

[1706] D73. 如实施方式D54-D72中任一项所述的方法, 其中所述修饰细胞被递送至肿瘤床。

[1707] D74. 如实施方式D70所述的方法, 其中所述癌症存在于所述对象的血液或骨髓中。

[1708] D75. 如实施方式D54-D74中任一项所述的方法, 其中所述对象患有血液或骨髓疾病。

[1709] D76. 如实施方式D54-D75中任一项所述的方法, 其中所述对象诊断有可通过干细胞移植得到缓解的任何症状或症状。

[1710] D77. 如实施方式D54-D75中任一项所述的方法, 其中所述对象诊断有镰状细胞贫血或异染色性脑白质病变。

[1711] D78. 如实施方式D54-D75中任一项所述的方法, 其中所述对象诊断有选自下组的病症: 原发性免疫缺陷症、嗜血淋巴组织细胞瘤病 (HAH) 或其他噬血细胞紊乱、遗传性骨髓衰竭症、血红蛋白病、代谢紊乱和破骨细胞紊乱。

[1712] D79. 如实施方式D54-D75中任一项所述的方法, 其中所述疾病或病症选自: 严重联

合免疫缺陷 (SCID)、联合免疫缺陷 (CID)、先天性T细胞缺陷/不足、常见变异型免疫缺陷病 (CVID)、慢性肉芽肿性疾病、IPEX (免疫缺陷、多内分泌病变、肠病、X连锁) 或IPEX样病、维斯科特-奥尔德里奇综合征、CD40配体缺陷、白细胞粘附缺陷、DOCA 8缺陷、IL-10不足/IL-10受体缺陷、GATA 2缺陷、X-连锁淋巴细胞增生性疾病 (XAP)、软骨毛发发育不良、施戴二氏综合征 (Shwachman Diamond Syndrome)、先天性纯红细胞再生障碍性贫血、先天性角化不良、范可尼贫血、先天性中性粒细胞减少、镰状细胞病、地中海贫血、黏多糖贮积症、鞘脂类代谢障碍和石骨症。

[1713] D80. 如实施方式D54-D79中任一项所述的方法, 所述方法还包括确定是否将额外剂量的所述配体给予所述患者。

[1714] D81. 如实施方式D54-D80中任一项所述的方法, 所述方法还包括将额外剂量的所述配体给予所述患者, 其中所述疾病或病症症状保持或在症状减轻后测到。

[1715] D82. 如实施例D54-D80中任一项所述的方法, 所述方法还包括:

[1716] 鉴定对象中病症或疾病是否存在或其阶段, 和

[1717] 传递指示以给予所述配体, 基于所述对象中鉴定的病症或疾病是否存在或其阶段来维持配体的后续剂量或调节给予所述对象的所述配体的后续剂量。

[1718] D83. 如实施方式D54-D82中任一项所述的方法, 其中所述病症是白血病。

[1719] D84. 如实施方式D54-D82所述的方法, 其中所述对象诊断为选自下组的病毒病因学感染: HIV、流感、疱疹、病毒性肝炎、爱波斯坦-巴尔病、脊髓灰质炎、病毒性脑炎、麻疹、水痘、巨细胞病毒 (CMV)、腺病毒 (ADV)、HHV-6 (人疱疹病毒6、I) 和人乳头状瘤病毒, 或诊断为选自下组的细菌病因学感染: 肺炎、肺结核和梅毒, 或诊断为选自下组的寄生病因学感染: 疟疾、锥虫病、利什曼病、滴虫病和阿米巴病。

[1720] D85. 如实施方式D54-D82中任一项所述的方法, 其中所述修饰细胞经离体转染或转导。

[1721] D86. 如实施方式D21-D53中任一项所述的修饰细胞, 其中所述修饰细胞经体内转染或转导。

[1722] D87. 如实施方式D54-D86中任一项所述的方法, 其中所述配体是AP1903。

[1723] 实施例29: 其他代表性实施方式

[1724] 下文提供了本技术的某些实施方式的示例。

[1725] A1. 活化T细胞的方法, 包括:

[1726] 用包含下述的核酸转染或转导T细胞

[1727] 编码嵌合蛋白质的多核苷酸, 其中所述嵌合蛋白质包括

[1728] a) 膜靶向区域,

[1729] b) 多聚化区域, 和

[1730] c) MyD88多肽;

[1731] 其中T细胞经活化。

[1732] A2. 活化T细胞的方法, 包括:

[1733] 用包含下述的核酸转染或转导T细胞

[1734] 编码嵌合蛋白质的多核苷酸, 其中所述嵌合蛋白质包括

[1735] a) 膜靶向区域,



- [1736] b) 多聚化区域,和
- [1737] c) CD40胞质区域,其中CD40多肽不具有功能性胞外结构域;
- [1738] 其中T细胞经活化。
- [1739] B1. 活化T细胞的方法,包括:
- [1740] 用包含下述的核酸转染或转导T细胞
- [1741] 编码嵌合蛋白质的多核苷酸,其中所述嵌合蛋白质包括
- [1742] a) 膜靶向区域,
- [1743] b) 多聚化区域,
- [1744] c) MyD88多肽,和
- [1745] d) CD40多肽胞质区域,其中CD40多肽不具有功能性胞外结构域;
- [1746] 其中T细胞经活化。
- [1747] C1. 活化T细胞的方法,包括:
- [1748] 用包含下述的核酸转染或转导T细胞
- [1749] 编码嵌合蛋白质的多核苷酸,其中所述嵌合蛋白质包括
- [1750] a) 膜靶向区域,
- [1751] b) 多聚化区域,和
- [1752] c) CD40多肽胞质区域,其中CD40多肽不具有功能性胞外结构域;
- [1753] 其中T细胞经活化。
- [1754] D1. 如实施方式A1-C1中任一项所述的方法,其中所述T细胞是原代T细胞。
- [1755] D2. 如实施方式A1-C1中任一项所述的方法,其中所述T细胞是细胞毒性T细胞。
- [1756] D3. 如实施方式A1-C1中任一项所述的方法,其中所述T细胞是天然杀伤细胞。
- [1757] D4. 如实施方式A1-C1中任一项所述的方法,其中所述T细胞是辅助T细胞。
- [1758] D4.1. 如实施方式A1-D4中任一项所述的方法,其中所述T细胞是分离的T细胞。
- [1759] D5. 如实施方式A1-D4.1中任一项所述的方法,所述方法包括将所述T细胞与结合多聚化区域的配体接触产生多聚化,从而活化T细胞。
- [1760] D6. 如实施方式A1-D5中任一项所述的方法,其中所述核酸包含在病毒载体内。
- [1761] D7. 如实施方式D6所述的方法,其中所述病毒载体是慢病毒载体。
- [1762] D8. 如实施方式D6所述的方法,其中所述病毒载体是逆转录病毒载体。
- [1763] D9. 如实施方式D8所述的方法,其中所述逆转录病毒载体用图36的质粒载体生产。
- [1764] D10. 如实施方式A1-D5中任一项所述的方法,其中所述核酸包含在质粒内。
- [1765] D11. 如实施方式D10所述的方法,其中所述核酸不包含在质粒或病毒内。
- [1766] D12. 如实施方式A1-D10中任一项所述的方法,其中所述多核苷酸操作性连接启动子。
- [1767] D13. 如实施方式A1, B1, 或D1-D12中任一项所述的方法,其中所述MyD88多肽是缺少TIR结构域的截短的MyD88多肽。
- [1768] D14. 如实施方式D13所述的方法,其中所述MyD88多肽具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列或其功能性变体。
- [1769] D15. 如实施方式D13或D14所述的方法,其中所述MyD88多肽由具有SEQ ID NO:4的多核苷酸或其功能性变体编码。

- [1770] D16.如实施方式A1-D15中任一项所述的方法,所述方法还包括用含编码肿瘤抗原靶向嵌合抗原受体(CAR)的多核苷酸的核酸转染或转导所述T细胞。
- [1771] D17.如实施方式D16所述的方法,其中所述靶肿瘤抗原是前列腺癌抗原。
- [1772] D18.如实施方式D16所述的方法,其中所述靶肿瘤抗原是前列腺特异膜抗原。
- [1773] D19.如实施方式A1-D18中任一项所述的方法,其中所述膜靶向区域选自豆蔻酰化区域、棕榈酰化区域、异戊二烯化区域和受体跨膜序列。
- [1774] D20.如实施方式D19所述的方法,其中所述膜靶向区域是豆蔻酰化区域。
- [1775] D21.如实施方式A1-D20中任一项所述的方法,其中所述多聚化区域是选自FKBP、亲环蛋白受体、类固醇受体、四环素受体、重链抗体亚基、轻链抗体亚基、由重链和轻链可变区域串联组成并通过挠性接头结构域分割的单链抗体、和其突变序列的配体结合区域。
- [1776] D22.如实施方式D21所述的方法,其中所述配体结合区域是FKBP12区域。
- [1777] D23.如实施方式D22所述的方法,其中所述FKBP12区域是FKBP12v36区域。
- [1778] D24.如实施方式D21所述的方法,其中所述FKBP区域是Fv' Fv1s。
- [1779] D25.如实施方式D5-D24中任一项所述的方法,其中所述配体是FK506二聚体或二聚化FK506类似物配体。
- [1780] D26.如实施方式D25所述的方法,其中所述配体是AP1903。
- [1781] D27.如实施方式A1-D26中任一项所述的方法,其中所述胞质CD40多肽区域具有SEQ ID NO:9的胞质区域的氨基酸序列或其功能片段。
- [1782] D28.如实施方式B1-D27中任一项所述的方法,其中所述CD40胞质多肽区域由SEQ ID NO:8中的核苷酸序列或其功能片段所编码。
- [1783] D29.保留。
- [1784] D30.保留。
- [1785] D31.如实施方式A1-D29中任一项所述的方法,其中所述多聚化区域具有氨基酸序列SEQ ID NO:11或其功能片段。
- [1786] D32.如实施方式A1-D30中任一项所述的方法,其中所述多聚化区域由SEQ ID NO:10中的核苷酸序列或其功能片段所编码。
- [1787] D33.如实施方式D31所述的方法,其中所述多聚化区域还包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:13的多肽或其功能片段。
- [1788] D33.1.如实施方式D31所述的方法,其中所述多聚化区域还包含SEQ ID NO:12中的核苷酸序列所编码的多肽或其功能片段。
- [1789] D33.1.如实施方式D31所述的方法,其中所述多聚化区域还包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:13的多肽或其功能片段。
- [1790] D33.2.如实施方式D31所述的方法,其中所述多聚化区域还包含SEQ ID NO:12中的核苷酸序列所编码的多肽或其功能片段。
- [1791] D33.3.如实施方式D33.1或D33.2所述的方法,其中所述多聚化区域还包含具有SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:32的氨基酸序列的多肽或其功能片段。
- [1792] D33.4.如实施方式D33.1或D33.2所述的方法,其中所述多聚化区域还包含SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:10中的核苷酸序列所编码的多肽或其功能片段。
- [1793] D34.如实施方式A1-D33.24中任一项所述的方法,其中所述膜靶向区域是豆蔻酰

化区域。

[1794] D35. 如实施方式D34所述的方法, 其中所述豆蔻酰化区域具有SEQ ID NO:3所示氨基酸序列或其功能性片段。

[1795] D36. 如实施方式D34所述的方法, 其中所述豆蔻酰化区域由SEQ ID NO:2中的核苷酸序列或其功能性片段编码。

[1796] D37. 如实施方式A1-D36中任一项所述的方法, 其中所述T细胞是人T细胞。

[1797] D38. 如实施方式D1-D37中任一项所述的方法, 其中所述T细胞体内接触多聚化配体。

[1798] E1. 一种在对象中诱导针对肿瘤抗原的免疫应答的方法, 包括根据实施方式A1-D37中任一项所述的方法活化T细胞并将活化的T细胞给予对象。

[1799] E2. 一种降低对象中具有表面肿瘤抗原的肿瘤的尺寸的方法, 包括根据实施方式A1-D37中任一项所述的方法活化T细胞。

[1800] E3. 如实施方式E2所述的方法, 其中所述肿瘤是前列腺癌肿瘤。

[1801] E3. 一种在治疗对象中前列腺癌的方法, 包括根据实施方式A1-D37中任一项所述的方法活化T细胞并将活化的T细胞给予对象, 其中所述肿瘤抗原是前列腺癌抗原。

[1802] E4. 如实施方式E3所述的方法, 其中所述肿瘤抗原是PSMA。

[1803] E5. 如实施方式E1-E4中任一项所述的方法, 其中所述对象是人。

[1804] E6. 如实施方式E1-E5中任一项所述的方法, 其中所述对象患有前列腺癌。

[1805] E7. 如实施方式E1-E6中任一项所述的方法, 其中所述T细胞体内接触多聚化配体。

[1806] E8. 如实施方式E1-E7中任一项所述的方法, 所述方法包括向对象给予多聚化配体。

[1807] E9. 如实施方式E8所述的方法, 其中所述多聚化配体是AP1903。

[1808] E10. 如实施方式E2-E9中任一项所述的方法, 包括在给予所述T细胞之前和/或之后测量肿瘤尺寸。

[1809] E11. 如实施方式E2-E9中任一项所述的方法, 包括在给予所述T细胞之前和/或之后测定对象的血清PSA水平。

[1810] E12. 如实施方式E2-E11中任一项所述的方法, 其中所述对象患有格利森评分为7或更高的前列腺癌。

[1811] E13. 如实施方式E2-E11中任一项所述的方法, 其中所述对象患有格利森评分为8或更高的前列腺癌。

[1812] F1. 一种包含核酸的T细胞, 所述核酸包含:

[1813] 编码嵌合蛋白质的多核苷酸, 其中所述嵌合蛋白质包括

[1814] a) 膜靶向区域,

[1815] b) 多聚化区域, 和

[1816] c) MyD88多肽。

[1817] F2. 一种包含核酸的T细胞, 所述核酸包含:

[1818] 编码嵌合蛋白质的多核苷酸, 其中所述嵌合蛋白质包括

[1819] a) 膜靶向区域,

[1820] b) 多聚化区域,

- [1821] c) MyD88多肽,和
- [1822] d) CD40多肽胞质区域,其中CD40多肽不具有功能性胞外结构域。
- [1823] F3.一种包含核酸的T细胞,所述核酸包含:
- [1824] 编码嵌合蛋白质的多核苷酸,其中所述嵌合蛋白质包括
- [1825] a) 膜靶向区域,
- [1826] b) 多聚化区域,和
- [1827] c) CD40多肽胞质区域,其中CD40多肽不具有功能性胞外结构域。
- [1828] F4.如实施方式F1-F3中任一项所述的T细胞,其还包含含有与编码肿瘤抗原的多核苷酸操作性连接的启动子的核酸。
- [1829] F5.保留。
- [1830] F6.保留。
- [1831] F7.如实施方式F1-F7中任一项所述的T细胞,其中所述T细胞是原代T细胞。
- [1832] F8.如实施方式F1-F7中任一项所述的T细胞,其中所述T细胞是细胞毒性T细胞。
- [1833] F9.保留。
- [1834] F10.如实施方式F1-F7中任一项所述的T细胞,其中所述T细胞是辅助T细胞。
- [1835] F10.1.如实施方式F1-F10中任一项所述的T细胞,其中所述T细胞是分离的T细胞。
- [1836] F11.如实施方式F1-F3或F7-F10.1中任一项所述的T细胞,其中所述核酸包含在病毒载体内。
- [1837] F12.如实施方式F11所述的T细胞,其中所述病毒载体是慢病毒载体。
- [1838] F13.如实施方式F11所述的T细胞,其中所述病毒载体是逆转录病毒载体。
- [1839] F14.如实施方式F13所述的T细胞,其中所述逆转录病毒载体用图36的质粒载体生产。
- [1840] F15.如实施方式F1-F3或F7-F10.1中任一项所述的T细胞,其中所述核酸包含在质粒内。
- [1841] F16.保留。
- [1842] F17.如实施方式F1-F16中任一项所述的T细胞,其中所述多核苷酸操作性连接启动子。
- [1843] F18.如实施方式F1-F2或F4-F18中任一项所述的T细胞,其中所述MyD88多肽是缺少TIR结构域的截短的MyD88多肽。
- [1844] F19.如实施方式18所述的T细胞,其中所述MyD88多肽具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列或其功能性变体。
- [1845] F20.如实施方式F18或F19所述的T细胞,其中所述MyD88多肽由具有SEQ ID NO:4的多核苷酸或其功能性变体编码。
- [1846] F21.保留。
- [1847] F22.如实施方式F4所述的T细胞,其中所述肿瘤抗原是前列腺癌抗原。
- [1848] F23.如实施方式F22所述的T细胞,其中所述肿瘤抗原是前列腺特异膜抗原。
- [1849] F24.如实施方式F1-F23中任一项所述的T细胞,其中所述膜靶向区域选自豆蔻酰化区域、棕榈酰化区域、异戊二烯化区域和受体跨膜序列。
- [1850] F25.如实施方式F24所述的T细胞,其中所述膜靶向区域是豆蔻酰化区域。

- [1851] F26.如实施方式F1-F25中任一项所述的T细胞,其中所述多聚化区域选自FKBP、亲环蛋白受体、类固醇受体、四环素受体、重链抗体亚基、轻链抗体亚基、由重链和轻链可变区域串联组成并通过挠性接头结构域分割的单链抗体、和其突变序列。
- [1852] F27.如实施方式F26所述的T细胞,其中所述多聚化区域是FKBP12区域。
- [1853] F28.如实施方式F27所述的T细胞,其中所述FKBP12区域是FKBP12v36区域。
- [1854] F29.如实施方式F26所述的T细胞,其中所述FKBP区域是Fv' Fv1s。
- [1855] F30.如实施方式F1-F29中任一项所述的T细胞,其在含有能结合多聚化区域的多聚化配体的组合物中。
- [1856] F30.1.如实施方式F30所述的T细胞,其中所述多聚化配体是FK506二聚体或二聚化的FK506类似物配体。
- [1857] F31.如实施方式F30.1所述的T细胞,其中所述多聚化配体是AP1903。
- [1858] F32.如实施方式F2-F3或F5-F31中任一项所述的T细胞,其中所述胞质CD40多肽区域具有SEQ ID NO:9的胞质区域的氨基酸序列或其功能片段。
- [1859] F33.如实施方式F2-F3或F5-F31中任一项所述的T细胞,其中所述CD40胞质多肽区域由SEQ ID NO:8中的核苷酸序列或其功能片段所编码。
- [1860] F34.-F35.保留。
- [1861] F36.如实施方式F1-F35中任一项所述的T细胞,其中所述多聚化区域具有氨基酸序列SEQ ID NO:11或其功能片段。
- [1862] F37.如实施方式F1-F36中任一项所述的T细胞,其中所述多聚化区域由SEQ ID NO:10中的核苷酸序列或其功能片段所编码。
- [1863] F37.1.如实施方式F36所述的方法,其中所述多聚化区域还包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:13的多肽或其功能片段。
- [1864] F37.2.如实施方式F37所述的方法,其中所述多聚化区域还包含SEQ ID NO:12中的核苷酸序列所编码的多肽或其功能片段。
- [1865] F37.3.如实施方式F37.1所述的方法,其中所述多聚化区域还包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:13的多肽或其功能片段。
- [1866] F37.4.如实施方式F37.2所述的方法,其中所述多聚化区域还包含SEQ ID NO:12中的核苷酸序列所编码的多肽或其功能片段。
- [1867] F38.如实施方式F1-F37中任一项所述的T细胞,其中所述膜靶向区域是豆蔻酰化区域。
- [1868] F39.如实施方式F38所述的T细胞,其中所述豆蔻酰化区域具有SEQ ID NO:13所示氨基酸序列或其功能性片段。
- [1869] F40.如实施方式F38所述的T细胞,其中所述豆蔻酰化区域由SEQ ID NO:2中的核苷酸序列或其功能性片段编码。
- [1870] F41.如实施方式F1-F39中任一项所述的T细胞,其中所述T细胞是人T细胞。
- [1871] G1.一种诱导针对对象中肿瘤抗原的免疫应答的方法,包括向对象给予实施方式F1-F14中任一项所述的T细胞。
- [1872] G2.一种降低对象中肿瘤尺寸的方法,包括向对象给予实施方式F1-F14中任一项所述的T细胞。

- [1873] G3.如实施方式G2所述的方法,其中所述肿瘤是前列腺癌肿瘤。
- [1874] G4.一种治疗对象前列腺癌的方法,包括向对象给予实施方式F1-F41中任一项所述的T细胞,其中所述肿瘤抗原是前列腺癌抗原。
- [1875] G5.如实施方式G4所述的方法,其中所述肿瘤抗原是PSMA。
- [1876] G6.如实施方式G1-G5中任一项所述的方法,其中所述对象是人。
- [1877] G7.如实施方式G1-G6中任一项所述的方法,其中所述对象患有前列腺癌症。
- [1878] G8.如实施方式G1-G7中任一项所述的方法,其中在向对象给予T细胞之前,所述T细胞离体接触结合多聚化区域的多聚化配体。
- [1879] G9.如实施方式G1-G8中任一项所述的方法,所述方法还包括向对象给予多聚化配体。
- [1880] G10.如实施方式G9所述的方法,其中所述多聚化配体是AP1903。
- [1881] G11.如实施方式G2-G10所述的方法,包括在给予所述T细胞之前和/或之后测量肿瘤尺寸。
- [1882] G12.如实施方式G2-G10所述的方法,包括在给予所述T细胞之前和/或之后测定对象的血清PSA水平。
- [1883] G13.如实施方式G2-G12所述的方法,其中所述对象患有格里森评分为7或更高的前列腺癌症。
- [1884] G14.如实施方式G2-G12所述的方法,其中所述对象患有格里森评分为8或更高的前列腺癌症。
- [1885] G15.如实施方式G2-G10所述的方法,包括在给予所述T细胞之前和之后测量肿瘤血管系统的水平。
- [1886] H1.一种在对象中活化T细胞的方法,包括:向所述对象给予含编码嵌合蛋白质的多核苷酸的核酸,其中所述嵌合蛋白质包括
- [1887] a) 膜靶向区域,
- [1888] b) 多聚化区域,和
- [1889] c) MyD88多肽区域;
- [1890] 其中T细胞经活化。
- [1891] H2.一种在对象中活化T细胞的方法,包括向所述对象给予含编码嵌合蛋白质的多核苷酸的核酸,其中所述嵌合蛋白质包括
- [1892] a) 膜靶向区域,
- [1893] b) 多聚化区域,
- [1894] c) MyD88多肽,和
- [1895] d) CD40多肽胞质区域,其中CD40多肽不具有功能性胞外结构域;
- [1896] 其中T细胞经活化。
- [1897] H3.一种在对象中活化T细胞的方法,包括向所述对象给予含编码嵌合蛋白质的多核苷酸的核酸,其中所述嵌合蛋白质包括
- [1898] a) 膜靶向区域,
- [1899] b) 多聚化区域,和
- [1900] c) CD40多肽胞质区域,其中CD40多肽不具有功能性胞外结构域;

- [1901] 其中T细胞经活化。
- [1902] H4. 一种在对象中诱导针对肿瘤抗原的免疫应答的方法,包括根据实施方式H1-H3中任一项所述的方法将核酸给予对象。
- [1903] H5. 一种在对象中降低肿瘤尺寸的方法,包括根据实施方式H1-H3中任一项所述的方法将核酸给予对象。
- [1904] H6. 如实施方式H5所述的方法,其中所述肿瘤是前列腺癌肿瘤。
- [1905] H7. 一种在对象中治疗前列腺癌的方法,包括根据实施方式H1-H3中任一项所述的方法将核酸给予对象,还包括给予编码前列腺癌抗原的核酸。
- [1906] H8. 如实施方式H4所述的方法,其中所述肿瘤抗原是PSMA。
- [1907] H6. 如实施方式H1-H5中任一项所述的方法,其中所述对象是人。
- [1908] H7. 如实施方式H1-H6中任一项所述的方法,其中所述对象患有前列腺癌症。
- [1909] H8. 如实施方式H1-H7中任一项所述的方法,还包括给予结合多聚化区域的多聚化配体。
- [1910] H9. 如实施方式H8所述的方法,其中所述多聚化配体是AP1903。
- [1911] H10. 如实施方式H4-H9中任一项所述的方法,包括在给予所述T细胞之前和/或之后测量肿瘤尺寸。
- [1912] H11. 如实施方式H4-H10中任一项所述的方法,包括在给予所述核酸之前和/或之后测定对象的血清PSA水平。
- [1913] H12. 如实施方式H4-H11所述的方法,其中所述对象患有格里森评分为7或更高的前列腺癌症。
- [1914] H13. 如实施方式H4-H11所述的方法,其中所述对象患有格里森评分为8或更高的前列腺癌症。
- [1915] H14. 如实施方式H4-H13所述的方法,包括在给予所述核酸之前和之后测量肿瘤血管系统的水平。
- [1916] 实施例30:其他代表性实施方式
- [1917] 下文提供了本技术的某些实施方式的示例。
- [1918] A1. 一种活化细胞的方法,其中所述细胞不是树突细胞或B细胞,所述方法包括:
- [1919] 用包含下述的核酸转染或转导所述细胞
- [1920] 编码嵌合蛋白质的多核苷酸,其中所述嵌合蛋白质包括
- [1921] a) 膜靶向区域,
- [1922] b) 多聚化区域,和
- [1923] c) MyD88多肽;
- [1924] 其中所述细胞经活化。
- [1925] B1. 一种活化细胞的方法,其中所述细胞不是树突细胞或B细胞,所述方法包括:
- [1926] 用包含下述的核酸转染或转导所述细胞
- [1927] 编码嵌合蛋白质的多核苷酸,其中所述嵌合蛋白质包括
- [1928] a) 膜靶向区域,
- [1929] b) 多聚化区域,
- [1930] c) MyD88多肽,和

- [1931] d) CD40多肽胞质区域,其中CD40多肽不具有功能性胞外结构域;
- [1932] 其中所述细胞经活化。
- [1933] C1.一种活化细胞的方法,其中所述细胞不是树突细胞或B细胞,所述方法包括:
- [1934] 用包含下述的核酸转染或转导所述细胞
- [1935] 编码嵌合蛋白质的多核苷酸,其中所述嵌合蛋白质包括
- [1936] a) 膜靶向区域,
- [1937] b) 多聚化区域,和
- [1938] c) CD40多肽胞质区域,其中CD40多肽不具有功能性胞外结构域;
- [1939] 其中所述细胞经活化。
- [1940] D1.如实施方式A1-C1中任一项所述的方法,其中所述细胞是天然杀伤细胞。
- [1941] D2.如实施方式A1-C1中任一项所述的方法,其中所述细胞是非淋巴细胞性造血细胞。
- [1942] D2.1.如实施方式A1-C1中任一项所述的方法,其中所述细胞是非造血细胞。
- [1943] D3.如实施方式A1-C1中任一项所述的方法,其中所述细胞是巨噬细胞。
- [1944] D4.如实施方式A1-C1中任一项所述的方法,其中所述细胞是骨髓瘤细胞。
- [1945] D4.1.如实施方式A1-C1中任一项所述的方法,其中所述细胞是角质形成细胞或成纤维细胞。
- [1946] D5.如实施方式A1-D4.1中任一项所述的方法,所述方法包括将所述细胞与结合多聚化区域的配体接触产生多聚化,从而活化细胞。
- [1947] D6.如实施方式A1-D5中任一项所述的方法,其中所述核酸包含在病毒载体内。
- [1948] D7.如实施方式D6所述的方法,其中所述病毒载体是慢病毒载体。
- [1949] D8.如实施方式D6所述的方法,其中所述病毒载体是逆转录病毒载体。
- [1950] D8.1.如实施方式D6所述的方法,其中所述病毒载体是腺病毒载体。
- [1951] D9.如实施方式D8所述的方法,其中所述逆转录病毒载体用图36的质粒载体生产。
- [1952] D10.如实施方式A1-D5中任一项所述的方法,其中所述核酸包含在质粒内。
- [1953] D11.如实施方式D10所述的方法,其中所述核酸不包含在质粒或病毒内。
- [1954] D12.如实施方式A1-D10中任一项所述的方法,其中所述多核苷酸操作性连接启动子。
- [1955] D13.如实施方式A1, B1, 或D1-D12中任一项所述的方法,其中所述MyD88多肽是缺少TIR结构域的截短的MyD88多肽。
- [1956] D14.如实施方式D13所述的方法,其中所述MyD88多肽具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列或其功能性变体。
- [1957] D15.如实施方式D13或D14所述的方法,其中所述MyD88多肽由具有SEQ ID NO:4的多核苷酸或其功能性变体编码。
- [1958] D16.如实施方式A1-D15中任一项所述的方法,所述方法还包括用含编码肿瘤抗原靶向嵌合抗原受体(CAR)的多核苷酸的核酸转染或转导所述细胞。
- [1959] D17.如实施方式D16所述的方法,其中所述靶肿瘤抗原是前列腺癌抗原。
- [1960] D18.如实施方式D16所述的方法,其中所述靶肿瘤抗原是前列腺特异膜抗原。
- [1961] D19.如实施方式A1-D18中任一项所述的方法,其中所述膜靶向区域选自豆蔻酰化



区域、棕榈酰化区域、异戊二烯化区域和受体跨膜序列。

[1962] D20. 如实施方式D19所述的方法,其中所述膜靶向区域是豆蔻酰化区域。

[1963] D21. 如实施方式A1-D20中任一项所述的方法,其中所述多聚化区域是选自FKBP、亲环蛋白受体、类固醇受体、四环素受体、重链抗体亚基、轻链抗体亚基、由重链和轻链可变区域串联组成并通过挠性接头结构域分割的单链抗体、和其突变序列的配体结合区域。

[1964] D22. 如实施方式D21所述的方法,其中所述配体结合区域是FKBP12区域。

[1965] D23. 如实施方式D22所述的方法,其中所述FKBP12区域是FKBP12v36区域。

[1966] D24. 如实施方式D21所述的方法,其中所述FKBP区域是Fv' Fv1s。

[1967] D25. 如实施方式D5-D24中任一项所述的方法,其中所述配体是FK506二聚体或二聚化FK506类似物配体。

[1968] D26. 如实施方式D25所述的方法,其中所述配体是AP1903。

[1969] D27. 如实施方式A1-D26中任一项所述的方法,其中所述胞质CD40多肽区域具有SEQ ID NO:9的胞质区域的氨基酸序列或其功能片段。

[1970] D28. 如实施方式B1-D27中任一项所述的方法,其中所述CD40胞质多肽区域由SEQ ID NO:8中的核苷酸序列或其功能片段所编码。

[1971] D29-D30. 保留。

[1972] D31. 如实施方式A1-D29中任一项所述的方法,其中所述多聚化区域具有氨基酸序列SEQ ID NO:11或其功能片段。

[1973] D32. 如实施方式A1-D30中任一项所述的方法,其中所述多聚化区域由SEQ ID NO:10中的核苷酸序列或其功能片段所编码。

[1974] D33. 如实施方式D31所述的方法,其中所述多聚化区域还包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:13的多肽或其功能片段。

[1975] D33.1. 如实施方式D31所述的方法,其中所述多聚化区域还包含SEQ ID NO:12中的核苷酸序列所编码的多肽或其功能片段。

[1976] D33.1. 如实施方式D31所述的方法,其中所述多聚化区域还包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:13的多肽或其功能片段。

[1977] D33.2. 如实施方式D31所述的方法,其中所述多聚化区域还包含SEQ ID NO:12中的核苷酸序列所编码的多肽或其功能片段。

[1978] D33.3. 如实施方式D33.1或D33.2所述的方法,其中所述多聚化区域还包含具有SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:13的氨基酸序列的多肽或其功能片段。

[1979] D33.4. 如实施方式D33.1或D33.2所述的方法,其中所述多聚化区域还包含SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:12中的核苷酸序列所编码的多肽或其功能片段。

[1980] D34. 如实施方式A1-D33.24中任一项所述的方法,其中所述膜靶向区域是豆蔻酰化区域。

[1981] D35. 如实施方式D34所述的方法,其中所述豆蔻酰化区域具有SEQ ID NO:3所示氨基酸序列或其功能性片段。

[1982] D36. 如实施方式D34所述的方法,其中所述豆蔻酰化区域由SEQ ID NO:2中的核苷酸序列或其功能性片段编码。

[1983] D37. 如实施方式A1-D36中任一项所述的方法,其中所述细胞是人细胞。

- [1984] D38. 如实施方式D1-D37中任一项所述的方法,其中所述细胞体内接触多聚化配体。
- [1985] E1. 一种在对象中诱导针对肿瘤抗原的免疫应答的方法,包括根据实施方式A1-D37中任一项所述的方法活化细胞并将活化的细胞给予对象。
- [1986] E2. 一种降低对象中具有表面肿瘤抗原的肿瘤的尺寸的方法,包括根据实施方式A1-D37中任一项所述的方法活化细胞。
- [1987] E3. 如实施方式E2所述的方法,其中所述肿瘤是前列腺癌肿瘤。
- [1988] E3. 一种在治疗对象中前列腺癌的方法,包括根据实施方式A1-D37中任一项所述的方法活化细胞并将活化的细胞给予对象,其中所述肿瘤抗原是前列腺癌抗原。
- [1989] E4. 如实施方式E3所述的方法,其中所述肿瘤抗原是PSMA。
- [1990] E5. 如实施方式E1-E4中任一项所述的方法,其中所述对象是人。
- [1991] E6. 如实施方式E1-E5中任一项所述的方法,其中所述对象患有前列腺癌症。
- [1992] E7. 如实施方式E1-E6中任一项所述的方法,其中所述细胞体内接触多聚化配体。
- [1993] E8. 如实施方式E1-E7中任一项所述的方法,所述方法包括向对象给予多聚化配体。
- [1994] E9. 如实施方式E8所述的方法,其中所述多聚化配体是AP1903。
- [1995] E10. 如实施方式E2-E9中任一项所述的方法,包括在给予所述细胞之前和/或之后测量肿瘤尺寸。
- [1996] E11. 如实施方式E2-E9中任一项所述的方法,包括在给予所述细胞之前和/或之后测定对象的血清PSA水平。
- [1997] E12. 如实施方式E2-E11中任一项所述的方法,其中所述对象患有格里森评分为7或更高的前列腺癌症。
- [1998] E13. 如实施方式E2-E11中任一项所述的方法,其中所述对象患有格里森评分为8或更高的前列腺癌症。
- [1999] F1. 一种包含核酸的细胞,所述核酸包含:
- [2000] 编码嵌合蛋白质的多核苷酸,其中所述嵌合蛋白质包括
- [2001] a) 膜靶向区域,
- [2002] b) 多聚化区域,和
- [2003] c) MyD88多肽。
- [2004] F2. 一种包含核酸的细胞,所述核酸包含:
- [2005] 编码嵌合蛋白质的多核苷酸,其中所述嵌合蛋白质包括
- [2006] a) 膜靶向区域,
- [2007] b) 多聚化区域,
- [2008] c) MyD88多肽,和
- [2009] d) CD40多肽胞质区域,其中CD40多肽不具有功能性胞外结构域,
- [2010] 其中所述细胞不是树突细胞或B细胞。
- [2011] F3. 一种包含核酸的细胞,所述核酸包含:
- [2012] 编码嵌合蛋白质的多核苷酸,其中所述嵌合蛋白质包括
- [2013] a) 膜靶向区域,

- [2014] b) 多聚化区域,和
- [2015] c) CD40多肽胞质区域,其中CD40多肽不具有功能性胞外结构域。
- [2016] F4.如实施方式F1-F3中任一项所述的细胞,其还包含含有与编码肿瘤抗原的多核苷酸操作性连接的启动子的核酸。
- [2017] F5.如实施方式F1-F4中任一项所述的细胞,其中所述细胞是天然杀伤细胞。
- [2018] F6.如实施方式F1-F4中任一项所述的细胞,其中所述细胞是非淋巴细胞性造血细胞。
- [2019] F7.如实施方式F1-F4中任一项所述的细胞,其中所述细胞是非造血细胞。
- [2020] F8.如实施方式F1-F4中任一项所述的细胞,其中所述细胞是巨噬细胞。
- [2021] F9.如实施方式F1-F4中任一项所述的细胞,其中所述细胞是角质形成细胞。
- [2022] F10.如实施方式F1-F4中任一项所述的细胞,其中所述细胞是成纤维细胞。
- [2023] F10.1.如实施方式F1-F4中任一项所述的细胞,其中所述细胞是黑素瘤细胞。
- [2024] F11.如实施方式F1-F3或F7-F10.1中任一项所述的细胞,其中所述核酸包含在病毒载体内。
- [2025] F12.如实施方式F11所述的细胞,其中所述病毒载体是慢病毒载体。
- [2026] F13.如实施方式F11所述的细胞,其中所述病毒载体是逆转录病毒载体。
- [2027] F14.如实施方式F13所述的细胞,其中所述逆转录病毒载体用图36的质粒载体生产。
- [2028] F15.如实施方式F1-F3或F7-F10.1中任一项所述的细胞,其中所述核酸包含在质粒内。
- [2029] F16.保留。
- [2030] F17.如实施方式F1-F16中任一项所述的细胞,其中所述多核苷酸操作性连接启动子。
- [2031] F18.如实施方式F1-F2或F4-F18中任一项所述的细胞,其中所述MyD88多肽是缺少TIR结构域的截短的MyD88多肽。
- [2032] F19.如实施方式18所述的细胞,其中所述MyD88多肽具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列或其功能性变体。
- [2033] F20.如实施方式F18或F19所述的细胞,其中所述MyD88多肽由具有SEQ ID NO:4的多核苷酸或其功能性变体编码。
- [2034] F21.保留。
- [2035] F22.如实施方式F4所述的细胞,其中所述肿瘤抗原是前列腺癌抗原。
- [2036] F23.如实施方式F22所述的细胞,其中所述肿瘤抗原是前列腺特异膜抗原。
- [2037] F24.如实施方式F1-F23中任一项所述的细胞,其中所述膜靶向区域选自豆蔻酰化区域、棕榈酰化区域、异戊二烯化区域和受体跨膜序列。
- [2038] F25.如实施方式F24所述的细胞,其中所述膜靶向区域是豆蔻酰化区域。
- [2039] F26.如实施方式F1-F25中任一项所述的细胞,其中所述多聚化区域选自FKBP、亲环蛋白受体、类固醇受体、四环素受体、重链抗体亚基、轻链抗体亚基、由重链和轻链可变区域串联组成并通过挠性接头结构域分割的单链抗体、和其突变序列。
- [2040] F27.如实施方式F26所述的细胞,其中所述多聚化区域是FKBP12区域。

- [2041] F28.如实施方式F27所述的细胞,其中所述FKBP12区域是FKBP12v36区域。
- [2042] F29.如实施方式F26所述的细胞,其中所述FKBP区域是Fv' Fv1s。
- [2043] F30.如实施方式F1-F29中任一项所述的细胞,其在含有能结合多聚化区域的多聚化配体的组合物中。
- [2044] F30.1.如实施方式F30所述的细胞,其中所述多聚化配体是FK506二聚体或二聚化的FK506类似物配体。
- [2045] F31.如实施方式F30.1所述的细胞,其中所述多聚化配体是AP1903。
- [2046] F32.如实施方式F2-F3或F5-F31中任一项所述的细胞,其中所述胞质CD40多肽区域具有SEQ ID NO:9的胞质区域的氨基酸序列或其功能片段。
- [2047] F33.如实施方式F2-F3或F5-F31中任一项所述的细胞,其中所述CD40胞质多肽区域由SEQ ID NO:8中的核苷酸序列或其功能片段所编码。
- [2048] F34-F35.保留。
- [2049] F36.如实施方式F1-F35中任一项所述的细胞,其中所述多聚化区域具有氨基酸序列SEQ ID NO:11或其功能片段。
- [2050] F37.如实施方式F1-F36中任一项所述的细胞,其中所述多聚化区域由SEQ ID NO:10中的核苷酸序列或其功能片段所编码。
- [2051] F37.1.如实施方式F36所述的方法,其中所述多聚化区域还包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:13的多肽或其功能片段。
- [2052] F37.2.如实施方式F37所述的方法,其中所述多聚化区域还包含SEQ ID NO:12中的核苷酸序列所编码的多肽或其功能片段。
- [2053] F37.3.如实施方式F37.1所述的方法,其中所述多聚化区域还包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:13的多肽或其功能片段。
- [2054] F37.4.如实施方式F37.2所述的方法,其中所述多聚化区域还包含SEQ ID NO:12中的核苷酸序列所编码的多肽或其功能片段。
- [2055] F38.如实施方式F1-F37中任一项所述的细胞,其中所述膜靶向区域是豆蔻酰化区域。
- [2056] F39.如实施方式F38所述的细胞,其中所述豆蔻酰化区域具有SEQ ID NO:3所示氨基酸序列或其功能性片段。
- [2057] F40.如实施方式F38所述的细胞,其中所述豆蔻酰化区域由SEQ ID NO:2中的核苷酸序列或其功能性片段编码。
- [2058] F41.如实施方式F1-F39中任一项所述的细胞,其中所述细胞是人细胞。
- [2059] G1.诱导针对对象中肿瘤抗原的免疫应答的方法,包括向对象给予实施方式F1-F14中任一项所述的细胞。
- [2060] G2.一种降低对象中肿瘤尺寸的方法,包括向对象给予实施方式F1-F14中任一项所述的细胞。
- [2061] G3.如实施方式G2所述的方法,其中所述肿瘤是前列腺癌肿瘤。
- [2062] G4.一种治疗对象前列腺癌的方法,包括向对象给予实施方式F1-F41中任一项所述的细胞,其中所述肿瘤抗原是前列腺癌抗原。
- [2063] G5.如实施方式G4所述的方法,其中所述肿瘤抗原是PSMA。

- [2064] G6.如实施方式G1-G5中任一项所述的方法,其中所述对象是人。
- [2065] G7.如实施方式G1-G6中任一项所述的方法,其中所述对象患有前列腺癌症。
- [2066] G8.如实施方式G1-G7中任一项所述的方法,其中在向对象给予细胞之前,所述细胞离体接触结合多聚化区域的多聚化配体。
- [2067] G9.如实施方式G1-G8中任一项所述的方法,所述方法还包括向对象给予多聚化配体。
- [2068] G10.如实施方式G9所述的方法,其中所述多聚化配体是AP1903。
- [2069] G11.如实施方式G2-G10中任一项所述的方法,包括在给予所述细胞之前和/或之后测量肿瘤尺寸。
- [2070] G12.如实施方式G2-G10中任一项所述的方法,包括在给予所述细胞之前和/或之后测定对象的血清PSA水平。
- [2071] G13.如实施方式G2-G12所述的方法,其中所述对象患有格里森评分为7或更高的前列腺癌症。
- [2072] G14.如实施方式G2-G12所述的方法,其中所述对象患有格里森评分为8或更高的前列腺癌症。
- [2073] G15.如实施方式G2-G10所述的方法,包括在给予所述细胞之前和之后测量肿瘤血管系统的水平。
- [2074] H1.一种在对象中活化细胞的方法,包括:向所述对象给予含编码嵌合蛋白质的多核苷酸的核酸,其中所述嵌合蛋白质包括
- [2075] a) 膜靶向区域,
- [2076] b) 多聚化区域,和
- [2077] c) MyD88多肽;
- [2078] 其中所述细胞经活化,且其中所述细胞不是树突细胞或B细胞。
- [2079] H2.一种在对象中活化细胞的方法,包括向所述对象给予含编码嵌合蛋白质的多核苷酸的核酸,其中所述嵌合蛋白质包括
- [2080] a) 膜靶向区域,
- [2081] b) 多聚化区域,
- [2082] c) MyD88多肽,和
- [2083] d) CD40多肽胞质区域,其中CD40多肽不具有功能性胞外结构域;
- [2084] 其中所述细胞经活化。
- [2085] H3.一种在对象中活化细胞的方法,包括向所述对象给予含编码嵌合蛋白质的多核苷酸的核酸,其中所述嵌合蛋白质包括
- [2086] a) 膜靶向区域,
- [2087] b) 多聚化区域,和
- [2088] c) CD40多肽胞质区域,其中CD40多肽不具有功能性胞外结构域;
- [2089] 其中所述细胞经活化。
- [2090] H4.一种在对象中诱导针对肿瘤抗原的免疫应答的方法,包括根据实施方式H1-H3中任一项所述的方法将核酸给予对象。
- [2091] H5.一种在对象中降低肿瘤尺寸的方法,包括根据实施方式H1-H3中任一项所述的

方法将核酸给予对象。

[2092] H6.如实施方式H5所述的方法,其中所述肿瘤是前列腺癌肿瘤。

[2093] H7.一种在对象中治疗前列腺癌的方法,包括根据实施方式H1-H3中任一项所述的方法将核酸给予对象,还包括给予编码前列腺癌抗原的核酸。

[2094] H8.如实施方式H4所述的方法,其中所述肿瘤抗原是PSMA。

[2095] H6.如实施方式H1-H5中任一项所述的方法,其中所述对象是人。

[2096] H7.如实施方式H1-H6中任一项所述的方法,其中所述对象患有前列腺癌。

[2097] H8.如实施方式H1-H7中任一项所述的方法,还包括给予结合多聚化区域的多聚化配体。

[2098] H9.如实施方式H8所述的方法,其中所述多聚化配体是AP1903。

[2099] H10.如实施方式H4-H9中任一项所述的方法,包括在给予所述细胞之前和/或之后测量肿瘤尺寸。

[2100] H11.如实施方式H4-H10中任一项所述的方法,包括在给予所述核酸之前和/或之后测定对象的血清PSA水平。

[2101] H12.如实施方式H4-H11所述的方法,其中所述对象患有格里森评分为7或更高的前列腺癌。

[2102] H13.如实施方式H4-H11所述的方法,其中所述对象患有格里森评分为8或更高的前列腺癌。

[2103] H14.如实施方式H4-H13所述的方法,包括在给予所述核酸之前和之后测量肿瘤血管系统的水平。

[2104] H15.如实施方式H1-H14中任一项所述的方法,其中所述细胞是天然杀伤细胞。

[2105] H16.如实施方式H1-H14中任一项所述的方法,其中所述细胞是非淋巴细胞性造血细胞。

[2106] H17.如实施方式H1-H14中任一项所述的方法,其中所述细胞是非造血细胞。

[2107] H18.如实施方式H1-H14中任一项所述的方法,其中所述细胞是巨噬细胞。

[2108] H19.如实施方式H1-H14中任一项所述的方法,其中所述细胞是角质形成细胞。

[2109] H20.如实施方式H1-H14中任一项所述的方法,其中所述细胞是成纤维细胞。

[2110] H21.如实施方式H1-H14中任一项所述的方法,其中所述细胞是黑素瘤。

[2111] J1.用含有核酸的组合物转导或转染的细胞,所述核酸包含编码诱导型嵌合信号分子的多核苷酸,其中所述诱导型嵌合信号分子包含膜靶向区域、多聚化区域和缺失TIR结构域的截短的MyD88多肽。

[2112] J1.1.如实施方式J1所述的细胞,其中所述诱导型嵌合信号分子还包含缺失所述胞外结构域的胞质CD40多肽。

[2113] J1.2.用含有核酸的组合物转导或转染的细胞,所述核酸包含编码诱导型嵌合信号分子的多核苷酸,其中所述诱导型嵌合信号分子包含膜靶向区域、多聚化区域和缺失胞外结构域的胞质CD40多肽。

[2114] J2.如实施方式J1或J1.2所述的细胞,其中所述截短的MyD88多肽具有氨基酸序列SEQ ID NO:5或其功能片段。

[2115] J2.1.如实施方式J1.1或J1.2所述的细胞,其中所述胞质CD40多肽具有氨基酸序

列SEQ ID NO:9或其功能片段。

[2116] J3.如实施方式J1-J2.1中任一项所述的细胞,其中所述膜靶向区域是豆蔻酰化-靶向序列。

[2117] J4-J6.保留。

[2118] J7.如实施方式J1-J3中任一项所述的细胞,其中所述诱导型嵌合信号分子还包括CD3 $\zeta$ 多肽。

[2119] J8.如实施方式J1-J7中任一项所述的细胞,其中所述多聚化区域选自FKBP、亲环蛋白受体、类固醇受体、四环素受体、重链抗体亚基、轻链抗体亚基、和其突变序列。

[2120] J9.如实施方式J1-J8中任一项所述的细胞,其中所述多聚化区域是FKBP12区域。

[2121] J10.如实施方式J1-J9中任一项所述的细胞,其中所述FKBP12区域是FKBP12v36区域。

[2122] J11.如实施方式J1-J8中任一项所述的细胞,其中所述多聚化区域是Fv' Fv1s。

[2123] J12.如实施方式J1-J8中任一项所述的细胞,其中所述多聚化区域结合选自FK506二聚体和二聚化FK506类似物配体的配体。

[2124] J13.如实施方式J1-J12中任一项所述的细胞,其中所述配体是AP1903或AP20187。

[2125] J14.如实施方式J1-J13中任一项所述的细胞,其中所述多聚化区域具有氨基酸序列SEQ ID NO:11或其功能片段。

[2126] J15.如实施方式J1-J14中任一项所述的细胞,其中所述多聚化区域由SEQ ID NO:10中的核苷酸序列或其功能片段所编码。

[2127] J16.如实施方式J14所述的细胞,其中所述多聚化区域还包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:13的多肽或其功能片段。

[2128] J17.如实施方式J15所述的细胞,其中所述多聚化区域还包含SEQ ID NO:12中的核苷酸序列所编码的多肽或其功能片段。

[2129] J18.如实施方式J14或J16所述的细胞,其中所述多聚化区域还包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:13的多肽或其功能片段。

[2130] J19.如实施方式J15或J17所述的细胞,其中所述多聚化区域还包含SEQ ID NO:12中的核苷酸序列所编码的多肽或其功能片段。

[2131] J20.如权利要求J14、J16或J18所述的细胞,其中所述多聚化区域还包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:13的多肽或其功能片段。

[2132] J21.如实施方式J15、J17或J19所述的细胞,其中所述多聚化区域还包含由SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:12中的核苷酸序列所编码的多肽或其功能片段。

[2133] J22.如实施方式J1-J21中任一项所述的细胞,其中所述核酸包含可操作连接至所述多核苷酸的启动子序列。

[2134] J23.如实施方式J1-J22中任一项所述的细胞,其中所述核酸包含在病毒载体内。

[2135] J24.如实施方式J23所述的细胞,其中所述病毒载体是逆转录病毒载体。

[2136] J25.如实施方式J24所述的细胞,其中所述逆转录病毒载体是鼠白血病病毒载体。

[2137] J26.如实施方式J24所述的细胞,其中所述逆转录病毒载体是SFG载体。

[2138] J27.如实施方式J23所述的细胞,其中所述病毒载体是腺病毒载体。

[2139] J28.如实施方式J23所述的细胞,其中所述病毒载体是慢病毒载体。

- [2140] J29.如实施方式J1-J22中任一项所述的细胞,其中所述核酸包含在质粒内。
- [2141] J30.保留。
- [2142] J31.如实施方式J1-J30中任一项所述的细胞,其中所述细胞是T细胞、肿瘤浸润性淋巴细胞、NK-T细胞或NK细胞。
- [2143] J32.如实施方式J31所述的细胞,其中所述细胞是T细胞。
- [2144] J33.如实施方式J1-J32中任一项所述的细胞,其中所述细胞获自骨髓或从其制备。
- [2145] J34.如实施方式J1-J32中任一项所述的细胞,其中所述细胞获自脐带血或从其制备。
- [2146] J35.如实施方式J1-J32中任一项所述的细胞,其中所述细胞获自外周血或从其制备。
- [2147] J36.如实施方式J1-J32中任一项所述的细胞,其中所述细胞获自外周血单核细胞或从其制备。
- [2148] J37.如实施方式J31-J36中任一项所述的细胞,其中所述细胞是人细胞。
- [2149] J38.如实施方式J1-J37中任一项所述的细胞,其中所述细胞还转化或转染有含多核苷酸的核酸,所述多核苷酸包含信号肽、单链可变区片段、CH2-CH3铰链区和CD3 $\zeta$ 多肽的诱导性嵌合信号分子。
- [2150] J38.1.如实施方式J38所述的细胞,其中所述诱导型嵌合信号分子不包括CD3 $\zeta$ 多肽。
- [2151] J38.2.如实施方式J38或J38.1所述的细胞,其中所述诱导型嵌合信号分子包括CD3 $\zeta$ 多肽。
- [2152] J39.如实施方式J38-J38.2中任一项所述的细胞,其中所述单链可变区片段结合肿瘤细胞上的抗原。
- [2153] J40.如实施方式J38-J38.2中任一项所述的细胞,其中所述单链可变区片段结合细胞上的抗原,所述细胞涉及过度增殖性疾病。
- [2154] J41.如实施方式J38-J40中任一项所述的细胞,其中所述单链可变区片段选自PSMA, $\alpha$ PSCA, $\alpha$ MUC1, $\alpha$ CD19, $\alpha$ ROR1, $\alpha$ 间皮素, $\alpha$ GD2, $\alpha$ CD123, $\alpha$ MUC16、和 $\alpha$ Her2/Neu单链可变区片段。
- [2155] J42.如实施方式J38-J40中任一项所述的细胞,其中所述单链可变区片段是 $\alpha$ CD19单链可变区片段。
- [2156] J42.1.如实施方式J38-J40中任一项所述的细胞,其中所述单链可变区片段是 $\alpha$ PSCA单链可变区片段。
- [2157] J43.一种诱导免疫应答的方法,所述方法包括将实施方式J1-J42.1所述的细胞与结合多聚化区域的配体接触,使所述诱导型嵌合信号分子发生多聚化。
- [2158] J44.如实施方式J43所述的方法,其中所述细胞体内接触所述配体。
- [2159] J45.如实施方式J43或J44所述的方法,其中所述配体是二聚化的。
- [2160] J46.如实施方式J45所述的方法,其中所述配体是二聚化FK506或二聚化FK506样类似物。
- [2161] J47.如实施方式J45所述的方法,其中所述配体是AP1903或AP20187。



- [2162] J48. 如实施方式J43-J47中任一项所述的方法,还包括将所述转染或转导的细胞给予对象。
- [2163] J49. 如实施方式J48所述的方法,其中所述细胞通过静脉内给药来给予所述对象。
- [2164] J50-J56. 保留。
- [2165] J56. 如实施方式J43-J49中任一项所述的方法,其中所述对象诊断有肿瘤。
- [2166] J57. 如实施方式J43-J49中任一项所述的方法,其中所述对象患有癌症。
- [2167] J58. 如实施方式J43-J49中任一项所述的方法,其中所述对象患有实体瘤。
- [2168] J59. 如实施方式J58所述的方法,其中所述细胞是肿瘤浸润性淋巴细胞或T细胞。
- [2169] J60. 如实施方式J58或J59所述的方法,其中所述细胞递送至肿瘤床。
- [2170] J61. 如实施方式J57所述的方法,其中所述癌症存在于所述对象的血液或骨髓中。
- [2171] J62. 如实施方式J43-J49中任一项所述的方法,其中所述对象患有血液或骨髓疾病。
- [2172] J63. 如实施方式J43-J49中任一项所述的方法,其中所述对象诊断有可通过干细胞移植得到缓解的任何症状或紊乱。
- [2173] J64. 如实施方式J43-J49中任一项所述的方法,其中所述对象诊断有镰状细胞贫血或异染色性脑白质病变。
- [2174] J65. 如实施方式J43-J49中任一项所述的方法,其中所述患者诊断有选自下组的症状:原发性免疫缺陷症、嗜血淋巴组织细胞瘤病(HLH)或其他噬血细胞紊乱、遗传性骨髓衰竭症、血红蛋白病、代谢紊乱和破骨细胞紊乱
- [2175] J66. 如实施方式J43-J49中任一项所述的方法,其中所述病症选自:严重联合免疫缺陷(SCID)、联合免疫缺陷(CID)、先天性T细胞缺陷/不足、常见变异型免疫缺陷病(CVID)、慢性肉芽肿性疾病、IPEX(免疫缺陷、多内分泌病变、肠病、X连锁)或IPEX样病、维斯科特-奥尔德里奇综合征、CD40配体缺陷、白细胞粘附缺陷、DOCK 8缺陷、IL-10不足/IL-10受体缺陷、GATA 2缺陷、X-连锁淋巴细胞增生性疾病(XLP)、软骨毛发发育不良、施戴二氏综合征(Shwachman Diamond Syndrome)、先天性纯红细胞再生障碍性贫血、先天性角化不良、范可尼贫血、先天性中性粒细胞减少、镰状细胞病、地中海贫血、黏多糖贮积症、鞘脂类代谢障碍和石骨症。
- [2176] J67. 一种治疗对象白血病的方法,所述方法包括将实施方式J1-J42.1中任一项所述的细胞给予对象和将多聚化配体给予对象。
- [2177] J68. 如实施方式J67所述的方法,其中所述单链可变区片段结合CD19。
- [2178] J69. 如实施方式J67或J68所述的方法,其中所述多聚化配体是AP1903或AP20187。
- [2179] J70. 如实施方式J67-J69中任一项所述的方法,其中所述细胞是T细胞。
- [2180] J71. 如实施方式J43-J70中任一项所述的方法,其中所述对象是人。
- [2181] J72. 如实施方式J43-J71中任一项所述的方法,所述方法还包括确定是否将额外剂量的所述多聚化配体给予所述患者。
- [2182] J73. 如实施方式J43-J72中任一项所述的方法,所述方法还包括将额外剂量的所述多聚化配体给予所述患者,其中所述疾病或病症症状保持或在症状减轻后测到。
- [2183] J74. 如实施方式J73所述的方法,其中所述对象在给予实施方式1-42.1中任一项所述的细胞之前诊断有疾病或病症,在给予多聚化配体之后测到所述疾病或病症,给予所

述对象额外剂量的多聚化配体。

[2184] J75.如实施例J43-J74中任一项所述的方法,所述方法还包括:

[2185] 鉴定对象中病症或疾病是否存在或其阶段,和

[2186] 传递指示以给予结合所述多聚化结合区域的多聚化配体,基于所述对象中鉴定的病症或疾病是否存在或其阶段来维持或调节给予所述患者的所述多聚化配体的后续剂量。

[2187] J76.如实施方式J72-J75中任一项所述的方法,其中所述病症是癌症。

[2188] J77.如实施方式J72-J75中任一项所述的方法,其中所述病症是白血病。

[2189] J78.如实施方式J72-J75中任一项所述的方法,其中所述病症是实体瘤。

[2190] J79.如实施方式J78所述的方法,该方法还包括:

[2191] 相对给予所述多聚化配体之后的肿瘤尺寸和/或肿瘤细胞数量,确定对象中肿瘤尺寸是否增加和/或肿瘤细胞数量是否增加,和

[2192] 在确定肿瘤尺寸增加和/或肿瘤细胞数量增加的事件中给予所述对象额外剂量的所述多聚化配体。

[2193] J80.如实施方式J77所述的方法,该方法还包括:

[2194] 相对给予所述多聚化配体之后的表达CD19的B细胞的水平,确定对象中表达CD19的B细胞是否增加,和

[2195] 在确定对象中表达CD19的B细胞增加的事件中给予所述对象额外剂量的所述多聚化配体。

[2196] J81.如实施方式J79所述的方法,其中相对于给予所述多聚化配体之前的肿瘤尺寸和/或肿瘤细胞,在给予所述多聚化配体之后的肿瘤尺寸和/或肿瘤细胞数量减低。

[2197] J82.如实施方式J80所述的方法,其中相对于给予所述多聚化配体之前的表达CD19的B细胞水平,在给予所述多聚化配体之后的表达CD19的B细胞水平减低。

[2198] J83.如实施方式J43-J74所述的方法,其中所述对象诊断为选自下组的病毒病因学感染:HIV、流感、疱疹、病毒性肝炎、爱波斯坦-巴尔病、脊髓灰质炎、病毒性脑炎、麻疹、水痘、巨细胞病毒(CMV)、腺病毒(ADV)、HHV-6(人疱疹病毒6、I)和人乳头状瘤病毒,或诊断为选自下组的细菌病因学感染:肺炎、肺结核和梅毒,或诊断为选自下组的寄生病因学感染:疟疾、锥虫病、利什曼病、滴虫病和阿米巴病。

[2199] K1.一种包含核酸的组合物,所述核酸包含编码诱导型嵌合抗原受体的多核苷酸,其中所述诱导型嵌合抗原受体包含多聚化区域、缺失TIR结构域的截短的MyD88多肽,和单链可变区片段。

[2200] K1.1.如实施方式K1所述的组合物,其中所述诱导性嵌合抗原受体还包含缺失所述胞外结构域的胞质CD40多肽。

[2201] K1.2.一种包含核酸的组合物,所述核酸包含编码诱导型嵌合抗原受体的多核苷酸,其中所述诱导型嵌合抗原受体包含多聚化区域、缺失胞外结构域的胞质CD40多肽,和单链可变区片段。

[2202] K2.如实施方式K1或K1.2所述的组合物,其中所述截短的MyD88多肽具有氨基酸序列SEQ ID NO:5或其功能片段。

[2203] K2.1.如实施方式K1.1或K1.2所述的组合物,其中所述胞质CD40多肽具有氨基酸序列SEQ ID NO:4或其功能片段。

- [2204] K3-K6. 保留。
- [2205] K7. 如实施方式K1-K2.1中任一项所述的组合物,其中所述诱导型嵌合抗原受体还包括CD3 $\zeta$ 多肽。
- [2206] K8. 如实施方式K1-K7中任一项所述的组合物,其中所述多聚化区域选自FKBP、亲环蛋白受体、类固醇受体、四环素受体、重链抗体亚基、轻链抗体亚基、和其突变序列。
- [2207] K9. 如实施方式K1-K8中任一项所述的组合物,其中所述多聚化区域是FKBP12区域。
- [2208] K10. 如实施方式K1-K9中任一项所述的组合物,其中所述多聚化区域是FKBP12v36区域。
- [2209] K11. 如实施方式K1-K8中任一项所述的组合物,其中所述多聚化区域是Fv' Fv1s。
- [2210] K12. 如实施方式K1-K8中任一项所述的组合物,其中所述多聚化区域结合选自FK506二聚体和二聚化FK506类似物配体的配体。
- [2211] K13. 如实施方式K1-K12中任一项所述的组合物,其中所述配体是AP1903或AP20187。
- [2212] K14. 如实施方式K1-K13中任一项所述的组合物,其中所述多聚化区域具有氨基酸序列SEQ ID NO:11或其功能片段。
- [2213] K15. 如实施方式K1-K14中任一项所述的组合物,其中所述多聚化区域由SEQ ID NO:10中的核苷酸序列或其功能片段所编码。
- [2214] K16. 如实施方式K14所述的组合物,其中所述多聚化区域还包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:13的多肽或其功能片段。
- [2215] K17. 如实施方式K15所述的组合物,其中所述多聚化区域还包含SEQ ID NO:12中的核苷酸序列所编码的多肽或其功能片段。
- [2216] K18. 如实施方式K14或K16所述的组合物,其中所述多聚化区域还包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:13的多肽或其功能片段。
- [2217] K19. 如实施方式K15或K17所述的组合物,其中所述多聚化区域还包含SEQ ID NO:12中的核苷酸序列所编码的多肽或其功能片段。
- [2218] K20. 如权利要求K14、K16或K18所述的组合物,其中所述多聚化区域还包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:13的多肽或其功能片段。
- [2219] K21. 如实施方式K15、K17或K19所述的组合物,其中所述多聚化区域还包含由SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:12中的核苷酸序列所编码的多肽或其功能片段。
- [2220] K22. 如实施方式K1-K21中任一项所述的组合物,其中所述核酸包含可操作连接至所述多核苷酸的启动子序列。
- [2221] K23. 如实施方式K1-K22中任一项所述的组合物,其中所述核酸包含在病毒载体内。
- [2222] K24. 如实施方式K23所述的细胞,其中所述病毒载体是逆转录病毒载体。
- [2223] K25. 如实施方式K24所述的组合物,其中所述逆转录病毒载体是鼠白血病病毒载体。
- [2224] K26. 如实施方式K24所述的组合物,其中所述逆转录病毒载体是SFG载体。
- [2225] K27. 如实施方式K23所述的组合物,其中所述病毒载体是腺病毒载体。

- [2226] K28. 如实施方式K23所述的组合物,其中所述病毒载体是慢病毒载体。
- [2227] K29. 如实施方式K1-K22中任一项所述的细胞,其中所述核酸包含在质粒内。
- [2228] K30. 转导或转化有实施方式K1-K29中任一项所述的组合物的细胞。
- [2229] K31. 如实施方式K30所述的细胞,其中所述细胞是T细胞、肿瘤浸润性淋巴细胞、NK-T细胞或NK细胞。
- [2230] K32. 如实施方式K31所述的细胞,其中所述细胞是T细胞。
- [2231] K33. 如实施方式K1-K3中任一项所述的细胞,其中所述细胞获自骨髓或从其制备。
- [2232] K34. 如实施方式K1-K3中任一项所述的细胞,其中所述细胞获自脐带血或从其制备。
- [2233] K35. 如实施方式K1-K3中任一项所述的细胞,其中所述细胞获自外周血或从其制备。
- [2234] K36. 如实施方式K1-K3中任一项所述的细胞,其中所述细胞获自外周血单核细胞或从其制备。
- [2235] K37. 如实施方式K1-K3中任一项所述的细胞,其中所述细胞是人细胞。
- [2236] K38. 保留。
- [2237] K39. 如实施方式K1-K37中任一项所述的细胞,其中所述单链可变区片段结合肿瘤细胞上的抗原。
- [2238] K40. 如实施方式K1-K37中任一项所述的细胞,其中所述单链可变区片段结合细胞上的抗原,所述细胞涉及过度增殖性疾病。
- [2239] K41. 如实施方式K1-K40中任一项所述的细胞,其中所述单链可变区片段选自PSMA,  $\alpha$ PSCA,  $\alpha$ MUC1,  $\alpha$ CD19,  $\alpha$ ROR1,  $\alpha$ 间皮素,  $\alpha$ GD2,  $\alpha$ CD123,  $\alpha$ MUC16, 和 $\alpha$ Her2/Neu单链可变区片段。
- [2240] K42. 如实施方式K1-K40中任一项所述的细胞,其中所述单链可变区片段是 $\alpha$ CD19单链可变区片段。
- [2241] K42.1. 如实施方式K1-K40中任一项所述的细胞,其中所述单链可变区片段是 $\alpha$ PSCA单链可变区片段。
- [2242] K43. 一种诱导免疫应答的方法,所述方法包括将实施方式K1-K42.1所述的细胞与结合多聚化区域的配体接触,使所述诱导型嵌合抗原受体发生多聚化。
- [2243] K44. 如实施方式K43所述的方法,其中所述细胞体内接触所述配体。
- [2244] K45. 如实施方式K43或K44所述的方法,其中所述配体是二聚化的。
- [2245] K46. 如实施方式K45所述的方法,其中所述配体是二聚化FK506或二聚化FK506样类似物。
- [2246] K47. 如实施方式K45所述的方法,其中所述配体是AP1903或AP20187。
- [2247] K48. 如实施方式K43-K47中任一项所述的方法,还包括将所述转染或转导的细胞给予对象。
- [2248] K49. 如实施方式K48所述的方法,其中所述细胞通过静脉内给药来给予所述对象。
- [2249] K50-K56. 保留。
- [2250] K56. 如实施方式K43-K49中任一项所述的方法,其中所述对象诊断有肿瘤。
- [2251] K57. 如实施方式K43-K49中任一项所述的方法,其中所述对象患有癌症。

- [2252] K58.如实施方式K43-K49中任一项所述的方法,其中所述对象患有实体瘤。
- [2253] K59.如实施方式K58所述的方法,其中所述细胞是肿瘤浸润性淋巴细胞或T细胞。
- [2254] K60.如实施方式K58或K59所述的方法,其中所述细胞递送至肿瘤床。
- [2255] K61.如实施方式K57所述的方法,其中所述癌症存在于所述对象的血液或骨髓中。
- [2256] K62.如实施方式K43-K49中任一项所述的方法,其中所述对象患有血液或骨髓疾病。
- [2257] K63.如实施方式K43-K49中任一项所述的方法,其中所述对象诊断有可通过干细胞移植得到缓解的任何症状或紊乱。
- [2258] K64.如实施方式K43-K49中任一项所述的方法,其中所述对象诊断有镰状细胞贫血或异染色性脑白质病变。
- [2259] K65.如实施方式K43-K49中任一项所述的方法,其中所述患者诊断有选自下组的症状:原发性免疫缺陷症、嗜血淋巴组织细胞瘤病(HLH)或其他噬血细胞紊乱、遗传性骨髓衰竭症、血红蛋白病、代谢紊乱和破骨细胞紊乱
- [2260] K66.如实施方式K43-K49中任一项所述的方法,其中所述病症选自:严重联合免疫缺陷(SCID)、联合免疫缺陷(CID)、先天性T细胞缺陷/不足、常见变异型免疫缺陷病(CVID)、慢性肉芽肿性疾病、IPEX(免疫缺陷、多内分泌病变、肠病、X连锁)或IPEX样病、维斯科特-奥尔德里奇综合征、CD40配体缺陷、白细胞粘附缺陷、DOCK 8缺陷、IL-10不足/IL-10受体缺陷、GATA 2缺陷、X-连锁淋巴细胞增生性疾病(XLP)、软骨毛发发育不良、施戴二氏综合征(Shwachman Diamond Syndrome)、先天性纯红细胞再生障碍性贫血、先天性角化不良、范可尼贫血、先天性中性粒细胞减少、镰状细胞病、地中海贫血、黏多糖贮积症、鞘脂类代谢障碍和石骨症。
- [2261] K67.一种治疗对象白血病的的方法,所述方法包括将实施方式K1-K42.1中任一项所述的细胞给予对象和将多聚化配体给予对象。
- [2262] K68.如实施方式K67所述的方法,其中所述单链可变区片段结合CD19。
- [2263] K69.如实施方式K67或K68所述的方法,其中所述多聚化配体是AP1903或AP20187。
- [2264] K70.如实施方式K67-K69中任一项所述的方法,其中所述细胞是T细胞。
- [2265] K71.如实施方式K43-K70中任一项所述的方法,其中所述对象是人。
- [2266] K72.如实施方式K43-K71中任一项所述的方法,所述方法还包括确定是否将额外剂量的所述多聚化配体给予所述患者。
- [2267] K73.如实施方式K43-K72中任一项所述的方法,所述方法还包括将额外剂量的所述多聚化配体给予所述患者,其中所述疾病或病症症状保持或在症状减轻后测到。
- [2268] K74.如实施方式K73所述的方法,其中所述对象在给予实施方式1-42.1中任一项所述的细胞之前诊断有疾病或病症,在给予多聚化配体之后测到所述疾病或病症,给予所述对象额外剂量的多聚化配体。
- [2269] K75.如实施例K43-K74中任一项所述的方法,所述方法还包括:
- [2270] 鉴定对象中病症或疾病是否存在或其阶段,和
- [2271] 传递指示以给予结合所述多聚化结合区域的多聚化配体,基于所述对象中鉴定的病症或疾病是否存在或其阶段来维持或调节给予所述患者的所述多聚化配体的后续剂量。
- [2272] K76.如实施方式K72-K75中任一项所述的方法,其中所述病症是癌症。

- [2273] K77.如实施方式K72-K75中任一项所述的方法,其中所述病症是白血病。
- [2274] K78.如实施方式K72-K75中任一项所述的方法,其中所述病症是实体瘤。
- [2275] K79.如实施方式K78所述的方法,该方法还包括:
- [2276] 相对给予所述多聚化配体之后的肿瘤尺寸和/或肿瘤细胞数量,确定对象中肿瘤尺寸是否增加和/或肿瘤细胞数量是否增加,和
- [2277] 在确定肿瘤尺寸增加和/或肿瘤细胞数量增加的事件中给予所述对象额外剂量的所述多聚化配体。
- [2278] K80.如实施方式K77所述的方法,该方法还包括:
- [2279] 相对给予所述多聚化配体之后的表达CD19的B细胞的水平,确定对象中表达CD19的B细胞是否增加,和
- [2280] 在确定对象中表达CD19的B细胞增加的事件中给予所述对象额外剂量的所述多聚化配体。
- [2281] K81.如实施方式C79所述的方法,其中相对于给予所述多聚化配体之前的肿瘤尺寸和/或肿瘤细胞,在给予所述多聚化配体之后的肿瘤尺寸和/或肿瘤细胞数量减低。
- [2282] K82.如实施方式K80所述的方法,其中相对于给予所述多聚化配体之前的表达CD19的B细胞水平,在给予所述多聚化配体之后的表达CD19的B细胞水平减低。
- [2283] K83.如实施方式K43-K74所述的方法,其中所述对象诊断为选自下组的病毒病因学感染:HIV、流感、疱疹、病毒性肝炎、爱波斯坦-巴尔病、脊髓灰质炎、病毒性脑炎、麻疹、水痘、巨细胞病毒(CMV)、腺病毒(ADV)、HHV-6(人疱疹病毒6、I)和人乳头状瘤病毒,或诊断为选自下组的细菌病因学感染:肺炎、肺结核和梅毒,或诊断为选自下组的寄生病因学感染:疟疾、锥虫病、利什曼病、滴虫病和阿米巴病。
- [2284] L1.一种包含编码诱导性嵌合刺激分子的多核苷酸的核酸,其中所述嵌合刺激分子包含(i)膜靶向区域;(ii)MyD88多肽区域或缺失TIR结构域的截短的MyD88多肽区域;(iii)缺失CD40胞外结构域的CD40胞质多肽区域,和(iv)多聚化区域。
- [2285] L2.一种包含编码诱导性嵌合刺激分子的多核苷酸的核酸,其中所述诱导性嵌合刺激分子包含(i)膜靶向区域;(ii)MyD88多肽区域或缺失TIR结构域的截短的MyD88多肽区域,和多聚化区域。
- [2286] L3.一种包含编码诱导性嵌合刺激分子的多核苷酸的核酸,其中所述诱导性嵌合刺激分子包含(i)膜靶向区域;(ii)缺失CD40胞外结构域的CD40胞质多肽区域,和(iv)多聚化区域。
- [2287] L4.如实施方式L1-L3中任一项所述的核酸,其中所述嵌合刺激分子还包含T细胞活化分子。
- [2288] L4.1.如实施方式L1-L4中任一项所述的核酸,其中所述多聚化区域是选自FKBP、亲环蛋白受体、类固醇受体、四环素受体、重链抗体亚基、轻链抗体亚基、由重链和轻链可变区域串联组成并通过挠性接头结构域分割的单链抗体、和其突变序列的配体结合区域。
- [2289] L4.2.如实施方式L4.1所述的核酸,其中所述配体结合区域是FKBP12区域。
- [2290] L4.3.如实施方式L4.2所述的核酸,其中所述FKBP12区域是FKBP12v36区域。
- [2291] L4.4.如实施方式4.2所述的核酸,其中所述FKBP区域是Fv' Fv1s。
- [2292] L4.5.如实施方式L4.1-L4.4中任一项所述的核酸,其中所述配体是FK506二聚体

或二聚化FK506类似物配体。

[2293] L4.6.如实施方式L4.5所述的核酸,其中所述配体是AP1903。

[2294] L4.7.如实施方式L1-L4.6中任一项所述的核酸,其中所述胞质CD40多肽区域具有SEQ ID NO:9的胞质区域的氨基酸序列或其功能片段。

[2295] L4.8.如实施方式L1-L4.7中任一项所述的核酸,其中所述CD40胞质多肽区域由SEQ ID NO:8中的核苷酸序列或其功能片段所编码。

[2296] L4.9.如实施方式L1-L4.8中任一项所述的核酸,其中所述多聚化区域具有氨基酸序列SEQ ID NO:11或其功能片段。

[2297] L4.10.如实施方式L1-L4.9中任一项所述的核酸,其中所述多聚化区域由SEQ ID NO:10中的核苷酸序列或其功能片段所编码。

[2298] L4.11.如实施方式L4.9所述的核酸,其中所述多聚化区域还包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:13的多肽或其功能片段。

[2299] L4.12.如实施方式L4.10所述的核酸,其中所述多聚化区域还包含SEQ ID NO:12中的核苷酸序列所编码的多肽或其功能片段。

[2300] L4.13.如实施方式L4.11所述的核酸,其中所述多聚化区域还包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:13的多肽或其功能片段。

[2301] L4.14.如实施方式L4.12所述的核酸,其中所述多聚化区域还包含SEQ ID NO:12中的核苷酸序列所编码的多肽或其功能片段。

[2302] L4.15.如权利要求L4.11或L4.13所述的核酸,其中所述多聚化区域还包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:13的多肽或其功能片段。

[2303] L4.16.如实施方式L4.12或L4.14所述的细胞,其中所述多聚化区域还包含由SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:12中的核苷酸序列所编码的多肽或其功能片段。

[2304] L4.17.如实施方式L1-L4.16中任一项所述的核酸,其中所述膜靶向区域是豆蔻酰化区域。

[2305] L4.18.如实施方式L4.17所述的核酸,其中所述豆蔻酰化区域具有SEQ ID NO:3所示氨基酸序列或其功能性片段。

[2306] L4.19.如实施方式L4.17所述的核酸,其中所述豆蔻酰化区域由SEQ ID NO:2中的核苷酸序列或其功能性片段编码。

[2307] L4.20.如实施方式L1-L4.19中任一项所述的核酸,还包含编码嵌合抗原受体的多核苷酸。

[2308] L4.21.一种核酸,所述核酸包含

[2309] 编码诱导性嵌合刺激分子的第一多核苷酸,其中所述诱导性嵌合刺激分子包含(i)膜靶向区域;(ii)MyD88多肽区域或缺失TIR结构域的截短的MyD88多肽区域;(iii)缺失CD40胞外结构域的CD40胞质多肽区域,和多聚化区域;和

[2310] 编码嵌合抗原受体的第二多核苷酸。

[2311] L4.22.如实施方式L4.21所述的核酸,其中所述多聚化时配体结合区域。

[2312] L4.23.如实施方式4.22所述的核酸,其中所述配体结合区域是FKBP12区域。

[2313] L4.24.如实施方式L4.23所述的核酸,其中所述FKBP12区域是FKBP12v36区域。

[2314] L4.25.如实施方式L4.23所述的核酸,其中所述FKBP12区域是Fv' Fv1s。

- [2315] L4.26.如实施方式L4.21-L4.25中任一项所述的核酸,其中所述配体是FK506二聚体或二聚化FK506类似物配体。
- [2316] L4.27.如实施方式L4.26所述的核酸,其中所述配体是AP1903。
- [2317] L4.28.如实施方式4.21-4.27中任一项所述的核酸,其还包含至少一个启动子。
- [2318] L4.29.如实施方式4.21-4.27中任一项所述的核酸,其还包含至少两个启动子。
- [2319] L4.30.如实施方式L4.28所述的核酸,其中一个启动子均操作性连接至所述第一和第二多核苷酸。
- [2320] L4.31.如实施方式L4.21-L4.30中任一项所述的核酸,其还包含所述第一和第二多核苷酸之间的编码接头多肽的第三多核苷酸,其中所述接头多肽在翻译期间或翻译之后将所述第一和第二多核苷酸的翻译产物分开。
- [2321] L4.32.如实施方式L4.31所述的核酸,其中所述接头多肽是2A多肽。
- [2322] L4.33.如实施方式L4.21-L4.32中任一项所述的核酸,其中所述核酸编码含嵌合刺激分子的多肽、2A多肽和胱冬酶-9多肽。
- [2323] L4.34.如实施方式L4.21-L4.33中任一项所述的核酸,其中所述第一多肽操作性连接至所述第一多核苷酸,且所述第二多肽操作性连接至所述第二多核苷酸。
- [2324] L4.35.如实施方式L4.21-L4.34中任一项所述的核酸,其中生产与所述两种多核苷酸互补的两种RNA转录本。
- [2325] L5.如实施方式L4-L4.35中任一项所述的核酸,其中所述T细胞活化分子是含ITAM的信号1赋予分子。
- [2326] L6.如实施方式L4-L4.19中任一项所述的核酸,其中所述T细胞活化分子是CD3 $\zeta$ 多肽。
- [2327] L6.1.如实施方式L4-L4.19中任一项所述的核酸,其中所述T细胞活化分子是Fc $\epsilon$ 受体 $\gamma$  (Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$ ) 亚基多肽。
- [2328] L7.如实施方式L1-L6.1中任一项所述的核酸,其中所述截短的MyD88多肽具有氨基酸序列SEQ ID NO:5,或其功能性片段。
- [2329] L8.如实施方式L1或L2-L7中任一项所述的核酸,其中所述胞质CD40多肽具有氨基酸序列SEQ ID NO:4,或其功能性片段。
- [2330] L9.如实施方式L6-L8中任一项所述的核酸,其中所述CD3 $\zeta$ 多肽具有氨基酸序列SEQ ID NO:39,或其功能性片段。
- [2331] L10.如实施方式L1-L9中任一项所述的核酸,其中所述膜靶向区域选自豆蔻酰化区域、棕榈酰化区域、异戊二烯化区域和受体跨膜序列。
- [2332] L11.如实施方式L1-L10中任一项所述的核酸,其中所述膜靶向区域是豆蔻酰化区域。
- [2333] L11.1.如实施方式L1-L10中任一项所述的核酸,其中编码嵌合刺激分子的所述多核苷酸不包括二聚化或多聚化分子结合区域。
- [2334] L12.如实施方式L1-L11.1中任一项所述的核酸,其中所述核酸包含操作性连接所述多核苷酸的启动子序列。
- [2335] L13.如实施方式L1-L12中任一项所述的核酸,其中所述核酸包含在病毒载体内。
- [2336] L14.如实施方式L13所述的核酸,其中所述病毒载体是逆转录病毒载体。



- [2337] L15.如实施方式L14所述的核酸,其中所述逆转录病毒载体是鼠白血病病毒载体。
- [2338] L16.如实施方式L14所述的核酸,其中所述逆转录病毒载体是SFG载体。
- [2339] L17.如实施方式L13所述的核酸,其中所述病毒载体是腺病毒载体。
- [2340] L18.如实施方式L13所述的核酸,其中所述病毒载体是慢病毒载体。
- [2341] L18.1.如实施方式L13所述的核酸,其中所述病毒载体选自腺伴随病毒(AAV)、疱疹病毒和痘苗病毒。
- [2342] L19.如实施方式L1-L12中任一项所述的核酸,其中所述核酸包含在质粒内。
- [2343] L20.实施方式L1-L19中任一项所述的核酸编码的嵌合刺激分子多肽。
- [2344] L21.转染或转导有实施方式L1-L19中任一项所述的核酸的修饰细胞。
- [2345] L22.如实施方式L21所述的修饰细胞,其中所述修饰细胞是T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞、NK-T细胞、TCR-表达细胞、或NK细胞。
- [2346] L23.如实施方式L21所述的修饰细胞,其中所述细胞是T细胞。
- [2347] L24.如实施方式L21-L23中任一项所述的修饰细胞,其中所述细胞获自骨髓或从其制备。
- [2348] L25.如实施方式L21-L23中任一项所述的修饰细胞,其中所述细胞获自脐带血或从其制备。
- [2349] L26.如实施方式L21-L25中任一项所述的修饰细胞,其中所述细胞获自外周血或从其制备。
- [2350] L27.如实施方式L21-L25中任一项所述的修饰细胞,其中所述细胞获自外周血单核细胞或从其制备。
- [2351] L28.如实施方式L21-L27中任一项所述的修饰细胞,其中所述细胞是人细胞。
- [2352] L29.如实施方式L21-L28中任一项所述的修饰细胞,其中所述修饰细胞还包含编码嵌合抗原受体的多核苷酸。
- [2353] L30.如实施方式L29所述的修饰细胞,其中所述嵌合抗原受体包含抗原识别部分。
- [2354] L30.1.如实施方式L21-L30中任一项所述的修饰细胞,其中所述细胞是T细胞。
- [2355] L30.2.如实施方式L21-L28中任一项所述的修饰细胞,其中所述修饰细胞还包含编码T细胞受体的多核苷酸。
- [2356] L30.3.如实施方式L21-28中任一项所述的修饰细胞,其中所述修饰细胞还包含编码基于T细胞受体的CAR的多核苷酸。
- [2357] L30.4.如权利要求L30.2或L30.3中任一项所述的修饰细胞,其中所述修饰细胞转染或转导有含编码T细胞受体或基于T细胞受体的CAR的多核苷酸的核酸。
- [2358] L31.如实施方式L27.1或L30中任一项所述的修饰细胞,其中所述抗原识别部分是单链可变片段。
- [2359] L31.1.如实施方式L29-L31中任一项所述的修饰细胞,其中所述嵌合抗原受体或T细胞受体结合肿瘤细胞上的抗原。
- [2360] L32.如实施方式L29-L31.1中任一项所述的修饰细胞,其中所述嵌合抗原受体或T细胞受体结合涉及过度增殖疾病的细胞上的抗原。
- [2361] L33.如实施方式L29或L31.1中任一项所述的修饰细胞,其中所述嵌合抗原受体或T细胞受体结合选自下组的抗原:PSMA、PSCA、MUC1、CD19、ROR1、间皮素、GD2、CD123、MUC16和

Her2/Neu。

[2362] L34如实施方式L29-L33中任一项所述的修饰细胞,其中所述嵌合抗原受体或T细胞受体结合CD19。

[2363] L35.如实施方式L29-L33中任一项所述的修饰细胞,其中所述嵌合抗原受体或T细胞受体结合Her2<sup>+</sup>。

[2364] L36.如实施方式L29-L33中任一项所述的修饰细胞,其中所述抗原识别部分结合病毒或细菌抗原。

[2365] L36.1.如实施方式L29-L36中任一项所述的修饰细胞,其中所述细胞用选自下述的方法被所述核酸载体转染或转导:电穿孔、声穿孔、基因枪(例如用Au-颗粒的基因枪)、脂质转染、聚合物转染、纳米颗粒或多聚复合体。

[2366] L37.一种在对象中刺激T细胞介导的免疫应答的方法,所述方法包括向所述对象给予实施方式L21-L36.1中任一项所述的修饰细胞。

[2367] L37.1.实施方式L37所述的方法,其中所述修饰细胞包含结合靶细胞上的抗原的T细胞受体或嵌合抗原受体

[2368] L38.如实施方式L37.1所述的方法,其中所述靶细胞是肿瘤细胞。

[2369] L39.如实施方式L37-L38中任一项所述的方法,其中在给予所述修饰细胞后,所述对象中的靶细胞的数量或浓度下降。

[2370] L40.如实施方式L37-L39中任一项所述的方法,所述方法包含:在给予所述修饰细胞之前测量获自所述对象的第一样品中靶细胞的数量和浓度,在给予所述修饰细胞之后测量获自所述对象的第二样品中靶细胞的数量和浓度,和确定所述第二样品中靶细胞的数量和浓度相对所述第一样品中靶细胞的数量和浓度的增加或降低。

[2371] L41.如实施方式L40所述的方法,其中所述第二样品中靶细胞的浓度相对所述第一样品中靶细胞的浓度降低。

[2372] L42.如实施方式L40所述的方法,其中所述第二样品中靶细胞的浓度相对所述第一样品中靶细胞的浓度增加。

[2373] L43.如实施方式L40-L42中任一项所述的方法,其中给予所述对象额外剂量的修饰细胞。

[2374] L44.一种为对象提供抗肿瘤免疫的方法,所述方法包括向对象给予有效量的实施方式L21-L36.1中任一项所述的修饰细胞。

[2375] L45.一种治疗患有与靶抗原表达升高相关联的疾病或病症的对象的方法,包括给予对象有效量的实施方式L21-L36.1中任一项所述的修饰细胞。

[2376] L46.如实施方式L45所述的方法,其特征在于,所述靶抗原是肿瘤抗原。

[2377] L47.如实施方式L37-L46中任一项所述的方法,其中所述修饰细胞是自体同源T细胞。

[2378] L48.如实施方式L37-L46中任一项所述的方法,其中所述修饰细胞是同种异体T细胞。

[2379] L50.一种降低对象中肿瘤大小的方法,所述方法包括给予对象有效量的实施方式L29-L36.1中任一项所述的修饰细胞,其中所述抗原识别部分结合肿瘤上的抗原。

[2380] L51.如实施方式L37-L50中任一项所述的方法,其中所述对象诊断有肿瘤。

- [2381] L52. 如实施方式L37-L51中任一项所述的方法,其中所述对象患有癌症。
- [2382] L53. 如实施方式L37-L51中任一项所述的方法,其中所述对象患有实体瘤。
- [2383] L54. 如实施方式L37-L53中任一项所述的方法,其中所述修饰细胞是肿瘤浸润淋巴细胞或T细胞。
- [2384] L55. 如实施方式L37-L54中任一项所述的方法,其中所述修饰细胞被递送至肿瘤床。
- [2385] L56. 如实施方式L52所述的方法,其中所述癌症存在于所述对象的血液或骨髓中。
- [2386] L57. 如实施方式L37-L51中任一项所述的方法,其中所述对象患有血液或骨髓疾病。
- [2387] L58. 如实施方式L37-L51中任一项所述的方法,其中所述对象诊断有可通过干细胞移植得到缓解的任何症状或症状。
- [2388] L59. 如实施方式L37-L51中任一项所述的方法,其中所述对象诊断有镰状细胞贫血或异染色性脑白质病变。
- [2389] L60. 如实施方式L37-L51中任一项所述的方法,其中所述患者诊断有选自下组的病症:原发性免疫缺陷症、嗜血淋巴组织细胞瘤病(HLH)或其他噬血细胞紊乱、遗传性骨髓衰竭症、血红蛋白病、代谢紊乱和破骨细胞紊乱。
- [2390] L61. 如实施方式L37-L51中任一项所述的方法,其中所述疾病或病症选自:严重联合免疫缺陷(SCID)、联合免疫缺陷(CID)、先天性T细胞缺陷/不足、常见变异型免疫缺陷病(CVID)、慢性肉芽肿性疾病、IPEX(免疫缺陷、多内分泌病变、肠病、X连锁)或IPEX样病、维斯科特-奥尔德里奇综合征、CD40配体缺陷、白细胞粘附缺陷、DOCA 8缺陷、IL-10不足/IL-10受体缺陷、GATA 2缺陷、X-连锁淋巴细胞增生性疾病(XLP)、软骨毛发发育不良、施戴二氏综合征(Shwachman Diamond Syndrome)、先天性纯红细胞再生障碍性贫血、先天性角化不良、范可尼贫血、先天性中性粒细胞减少、镰状细胞病、地中海贫血、黏多糖贮积症、鞘脂类代谢障碍和石骨症。
- [2391] L62. 如实施方式L37-L61中任一项所述的方法,所述方法还包括确定是否将额外剂量的所述修饰细胞给予所述患者。
- [2392] L63. 如实施方式L37-L62中任一项所述的方法,所述方法还包括将额外剂量的所述修饰细胞给予所述患者,其中所述疾病或病症症状保持或在症状减轻后测到。
- [2393] L64. 如实施例L37-L63中任一项所述的方法,所述方法还包括:
- [2394] 鉴定对象中病症或疾病是否存在或其阶段,和
- [2395] 传递指示以给予实施方式L31-L36中任一项所述的修饰细胞,基于所述对象中鉴定的病症或疾病是否存在或其阶段来维持修饰细胞的后续剂量或调节给予所述患者的所述修饰细胞的后续剂量。
- [2396] L65. 如实施方式L37-L64中任一项所述的方法,其中所述病症是白血病。
- [2397] L66. 保留。
- [2398] L67. 如实施方式L37-L64所述的方法,其中所述对象诊断为选自下组的病毒病因学感染:HIV、流感、疱疹、病毒性肝炎、爱波斯坦-巴尔病、脊髓灰质炎、病毒性脑炎、麻疹、水痘、巨细胞病毒(CMV)、腺病毒(ADV)、HHV-6(人疱疹病毒6、I)和人乳头状瘤病毒,或诊断为选自下组的细菌病因学感染:肺炎、肺结核和梅毒,或诊断为选自下组的寄生病因学感染:

疟疾、锥虫病、利什曼病、滴虫病和阿米巴病。

[2399] L68. 如实施方式L37-L67中任一项所述的方法, 其中所述修饰细胞经体内转染或转导。

[2400] L69. 如实施方式L21-L67中任一项所述的修饰细胞, 其中所述修饰细胞经体内转染或转导。

[2401] L70. 在细胞中表达嵌合刺激分子的方法, 包括将实施方式L1-L20中任一项所述的核酸与细胞在使所述核酸纳入所述细胞的条件下进行接触, 由此所述细胞从所纳入的核酸表达所述嵌合抗原受体。

[2402] L71. 如实施方式L70所述的方法, 其中所述核酸与所述细胞离体接触。

[2403] L72. 如实施方式L70所述的方法, 其中所述核酸与所述细胞体内接触。

[2404] M1. 如实施方式L4.20-L72中任一项所述的核酸、修饰细胞或方法, 其中所述核酸编码嵌合抗原受体, 或所述修饰细胞包含嵌合抗原受体。

[2405] M2. 如实施方式M1所述的核酸、修饰细胞或方法, 其中所述嵌合抗原受体包含

[2406] (i) 跨膜区域; (ii) T细胞活化分子; 和 (iii) 抗原识别部分。

[2407] M3. 如实施方式M1-M2中任一项所述的核酸、修饰细胞或方法, 其中所述嵌合抗原受体包含 (i) 跨膜区域; (ii) T细胞活化分子; 和 (iii) 抗原识别部分。

[2408] M4. 如实施方式M3所述的核酸、修饰细胞或方法, 其中所述嵌合抗原受体还包含共刺激分子。

[2409] M5. 如实施方式M4所述的核酸、修饰细胞或方法, 其中所述共刺激分子选自: CD28、OX40和4-1BB。

[2410] M6. 如实施方式M2-M5中任一项所述的核酸、修饰细胞或方法, 其中所述T细胞活化分子含ITAM的信号1赋予分子。

[2411] M7. 如实施方式M2-M5中任一项所述的核酸、修饰细胞或方法, 其中所述T细胞活化分子是CD3 $\zeta$ 多肽。

[2412] M8. 如实施方式M2-M5中任一项所述的核酸、修饰细胞或方法, 其中所述T细胞活化分子是Fc受体 $\gamma$ 多肽。

[2413] M9. 如实施方式M2-M8中任一项所述的核酸、修饰细胞或方法, 其中所述抗原识别部分结合肿瘤细胞上的抗原。

[2414] M9. 如实施方式M2-M8中任一项所述的核酸、修饰细胞或方法, 其中所述抗原识别部分结合涉及过度增殖疾病的细胞上的抗原。

[2415] M10. 如实施方式M2-M8中任一项所述的核酸、修饰细胞或方法, 其中所述抗原识别部分结合选自下组的抗原: PSMA、PSCA、MUC1、CD19、ROR1、间皮素、GD2、CD123、MUC16和Her2/Neu。

[2416] M11. 如实施方式M2-M8中任一项所述的核酸、修饰细胞或方法, 其中所述抗原识别部分结合PSCA。

[2417] M12. 如实施方式M2-M8中任一项所述的核酸、修饰细胞或方法, 其中所述抗原识别部分结合PCD19。

[2418] M13. 如实施方式M2-M8中任一项所述的核酸、修饰细胞或方法, 其中所述抗原识别部分结合病毒或细菌抗原。

[2419] M14.如实施方式M2-M13中任一项所述的核酸、修饰细胞或方法,其中所述抗原识别部分是单链可变片段。

[2420] M15.如实施方式M2-M14中任一项所述的核酸、修饰细胞或方法,其中所述跨膜区域是CD28跨膜区域。

[2421] M16.如实施方式M2-M14中任一项所述的核酸、修饰细胞或方法,其中所述跨膜区域是CD8跨膜区域。

[2422] M17.如实施方式M16所述的核酸、修饰细胞或方法,其还包括CD8茎部区域。

[2423] M18.如实施方式M2-M17中任一项所述的核酸、修饰细胞或方法,其中所述抗原识别部分结合Her2/Neu。

[2424] \*\*\*

[2425] 本文中引用的各专利、专利申请、出版物和文献的全部内容均通过引用纳入本文。对上述专利、专利申请、出版物和文献的引用并不表示承认上述任何内容是相关的现有技术,也并不表示承认这些出版物或文献的内容或日期。

[2426] 可以对上述内容进行改变而不背离本技术的基本方面。尽管参考一个或多个具体实施方式充分详细描述了本技术,但是本领域普通技术人员应认识到可对本申请中具体公开的实施方案进行改变,而这些改良和改进在本技术的范围和精神内。

[2427] 本文中适当地说明性描述的技术可在没有任何本文未具体公开的元素的情况下实施。因此,例如,在本文的各个例子中,术语“包括”、“基本由……组成”和“由……组成”中的任何一个都可用其它两个中的任意一个代替。已经使用的术语和表达用作说明而非限制性的术语,此类术语和表达的使用并不排除对所显示和所描述的特征或其部分的任何等价物,以及在要求权利的本技术范围内可进行各种改良。术语“一个”或“一种”表示一种或多种其修饰的元素(例如“一种试剂”可表示一种或多种试剂),除非上下文清楚表示所描述的是元素之一或是一种以上的元素。本文所使用的术语“约”表示在基础参数的10%范围内的数值(即 $\pm 10\%$ ),在一系列数值的开头处使用的术语“约”表示修饰该列数值中的每个数值(即“约1、2和3”指约1、约2和约3)。例如,“约100克”的重量能包含90克-110克的重量。此外,当本文描述数值列表(例如,约50%、60%、70%、80%、85%或86%)时,该列表包含其所有中间值和分数值(例如,54%、85.4%)。因此,应理解,尽管通过代表性实施方式和任选的特征具体公开了本技术,但是本领域技术人员能对本文所公开内容进行改良和变化,应认为此类改良和变化落在本技术的范围内。

[2428] 本技术的某些实施方式在所附的权利要求中列出。

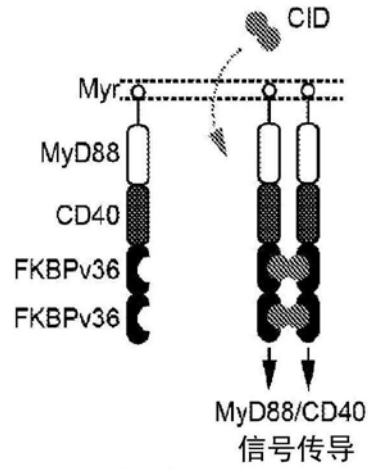


图1A

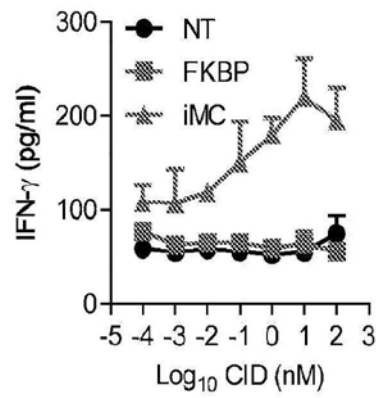


图1B

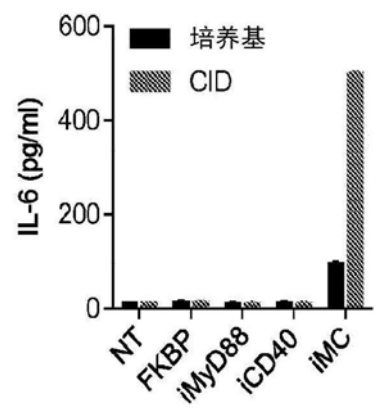


图1C

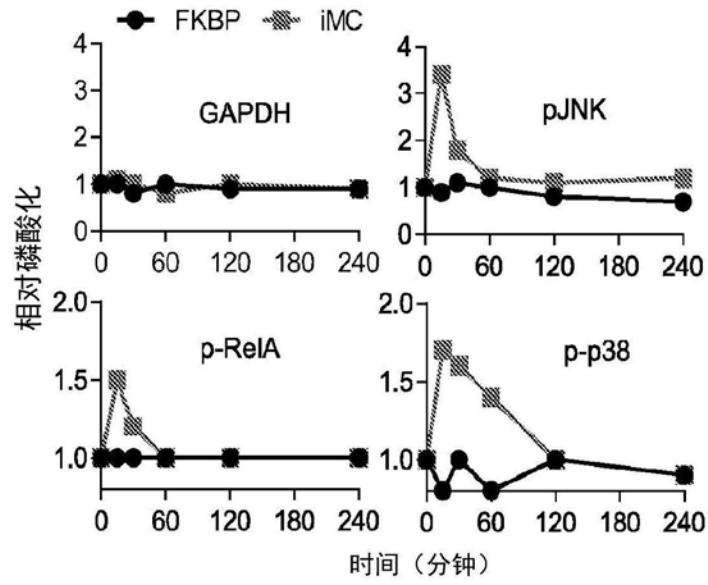


图1D

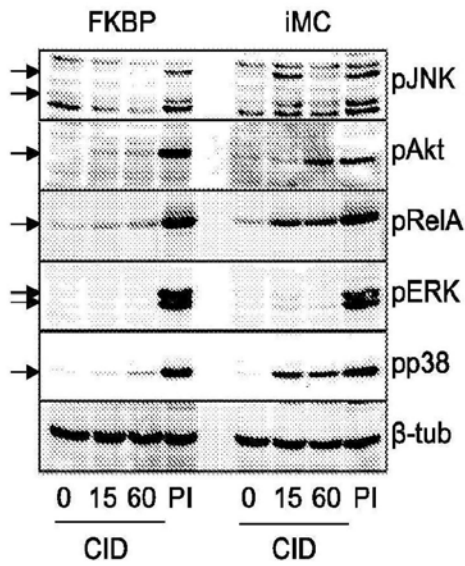


图1E

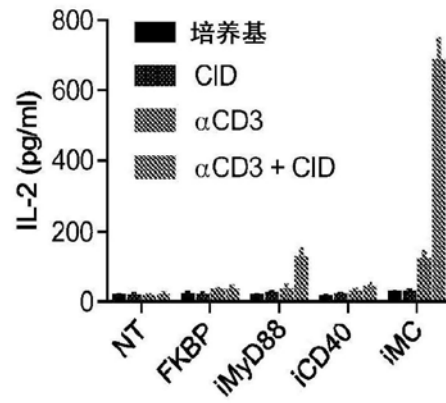


图1F

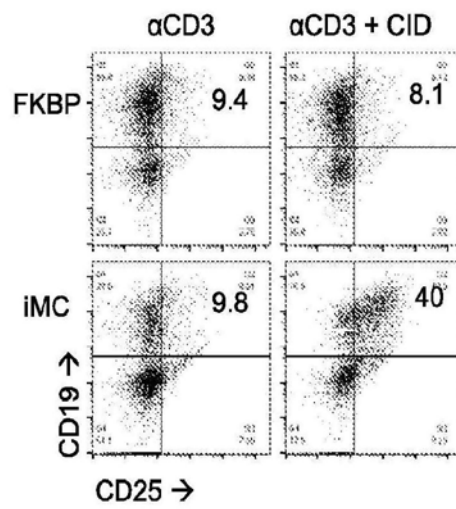


图1G

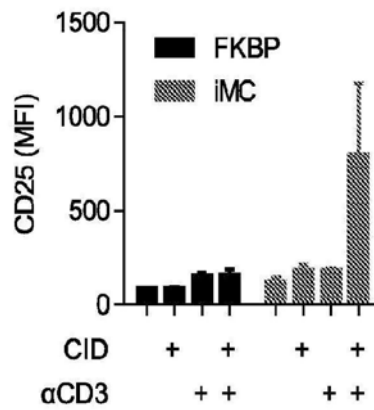


图1H



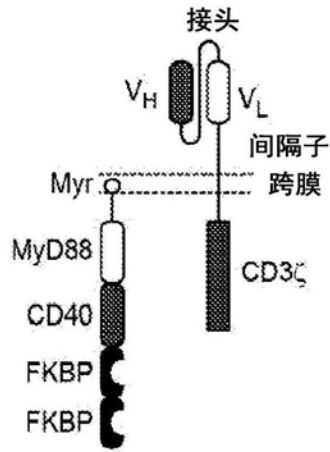


图2A

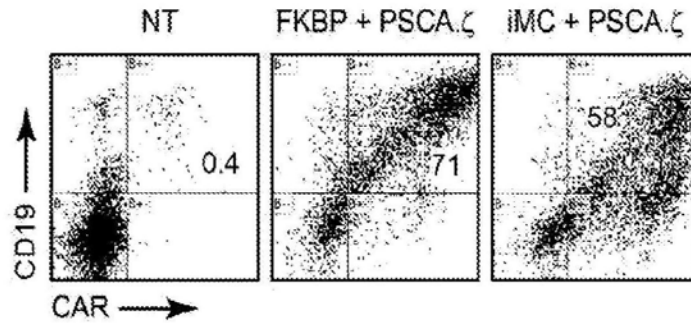


图2B

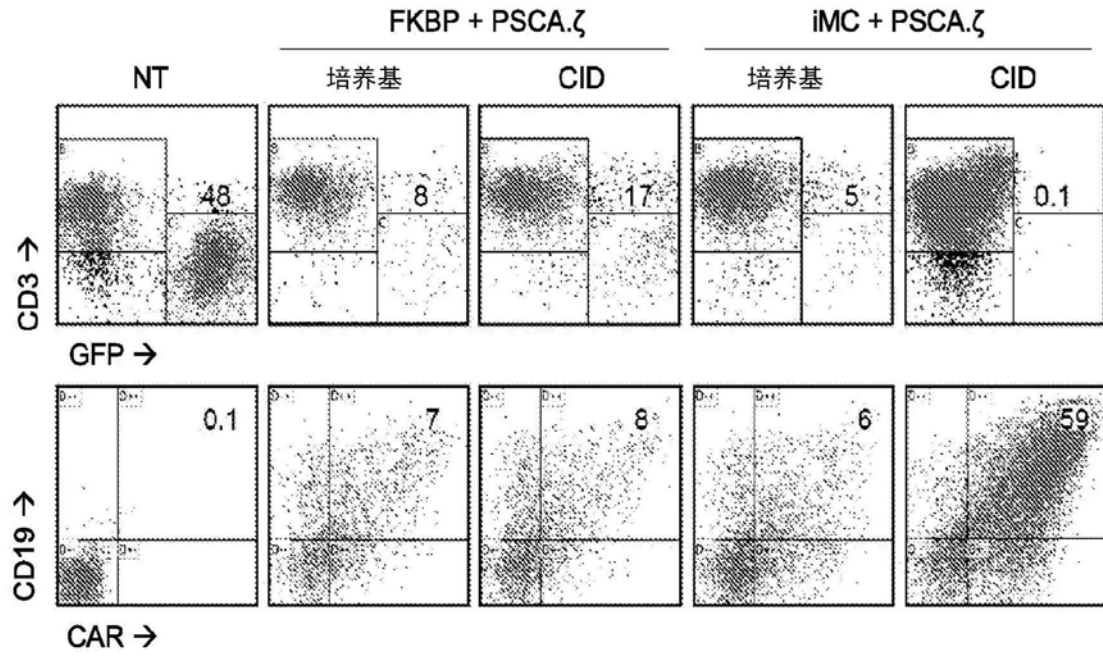


图2C

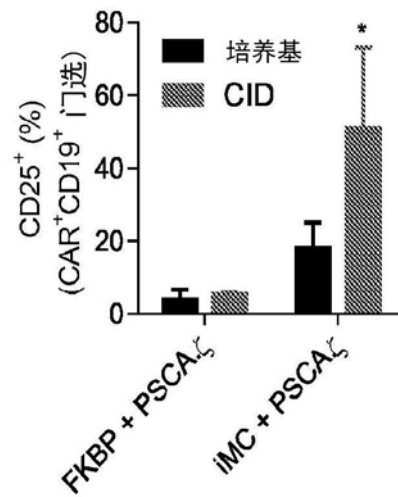


图2D

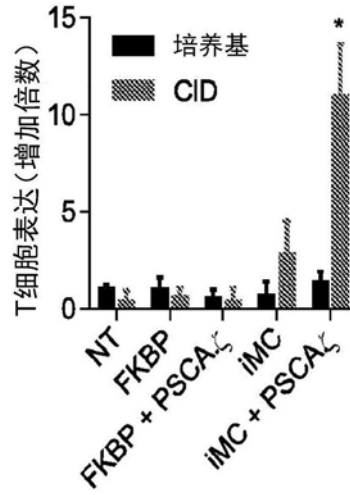


图2E

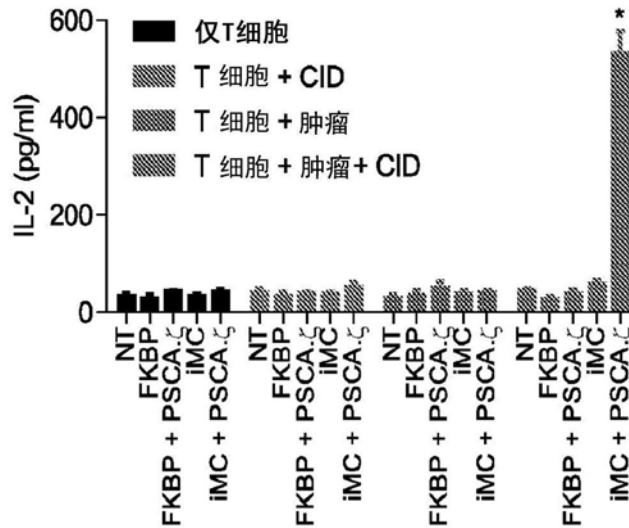


图2F

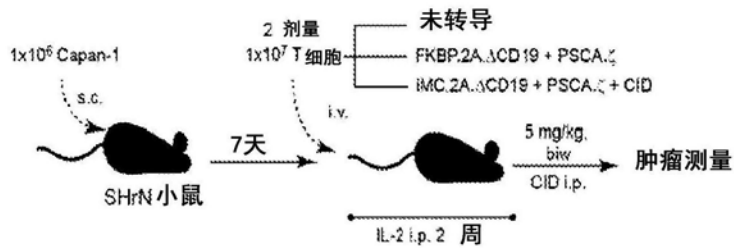


图3A

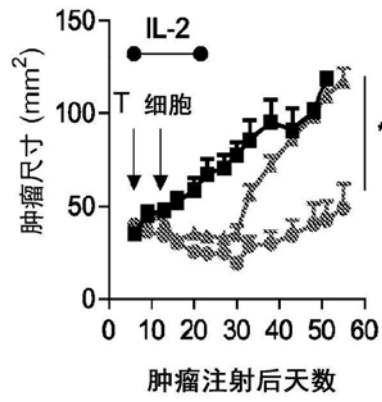


图3B

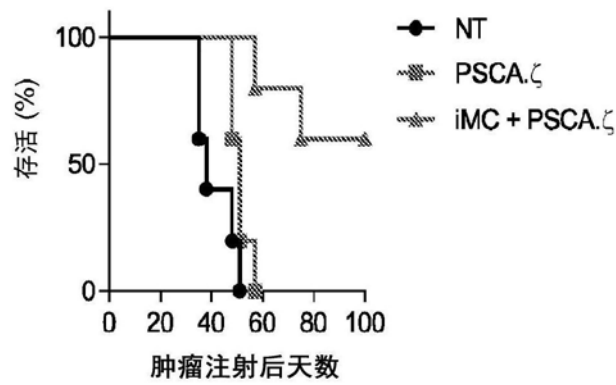


图3C

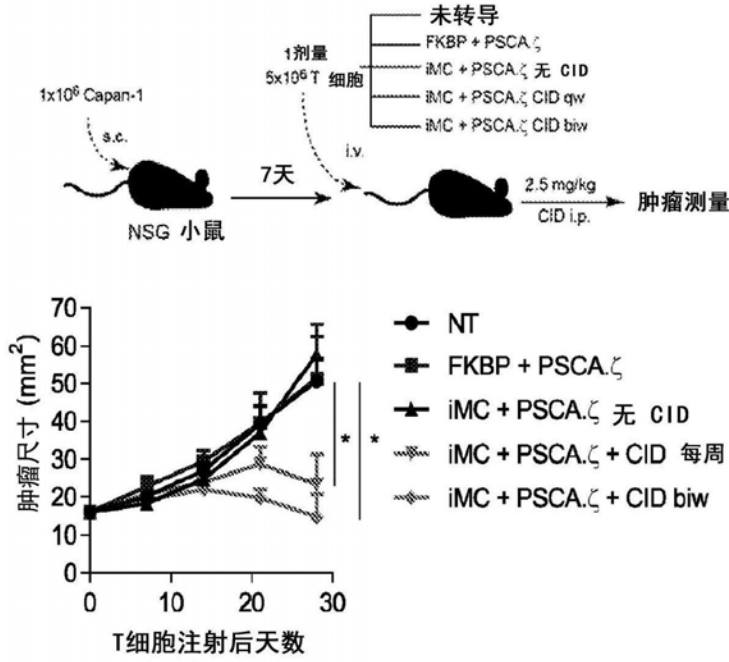


图 3D

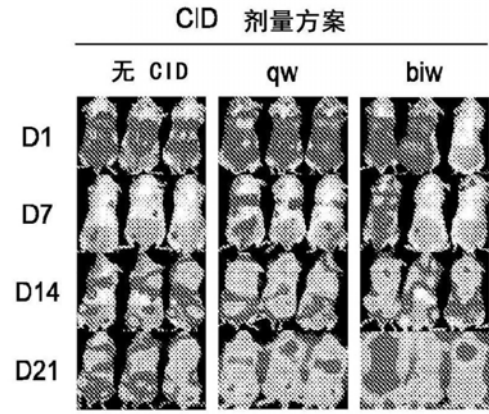


图 3F

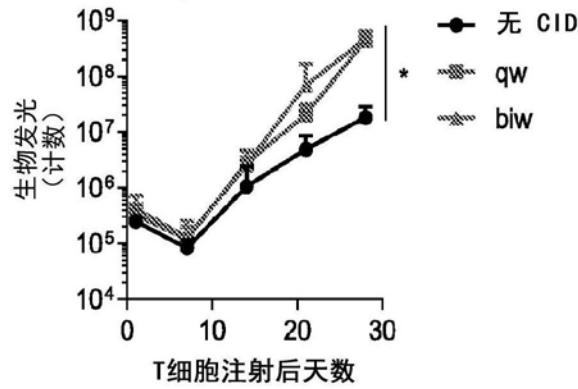


图3G

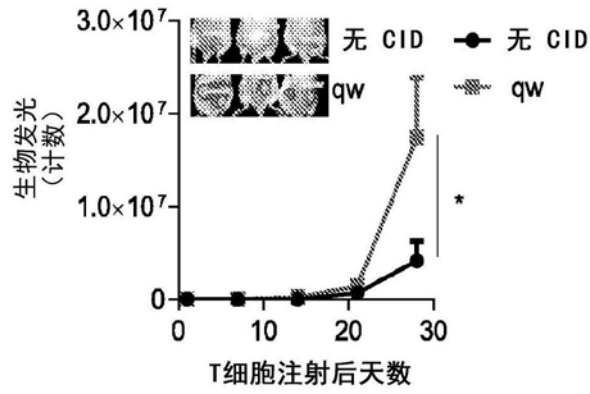


图3H

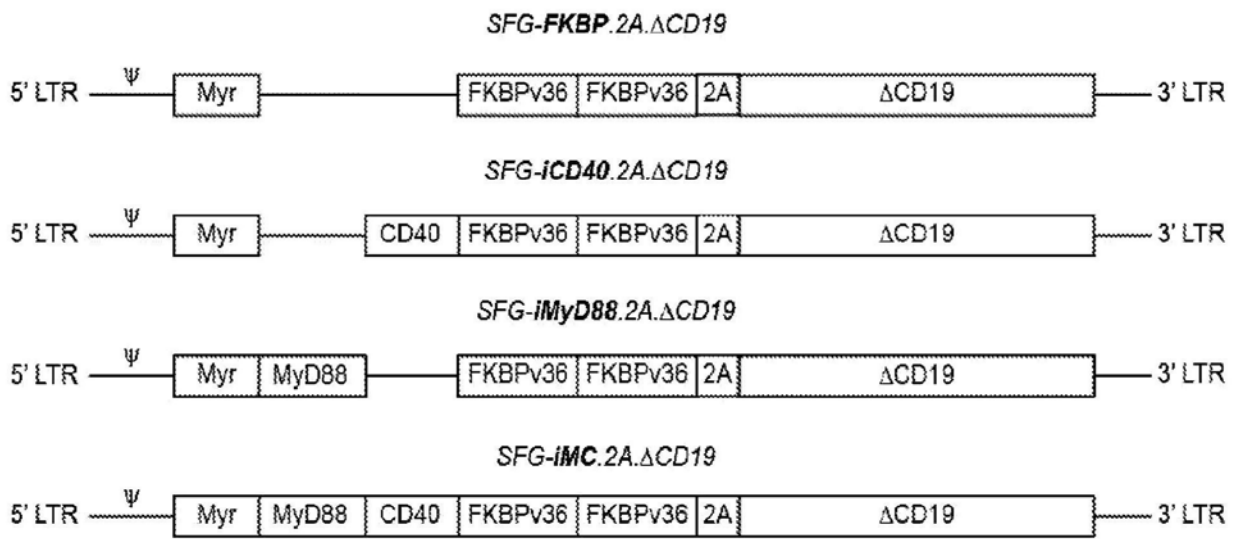


图4A



图4B

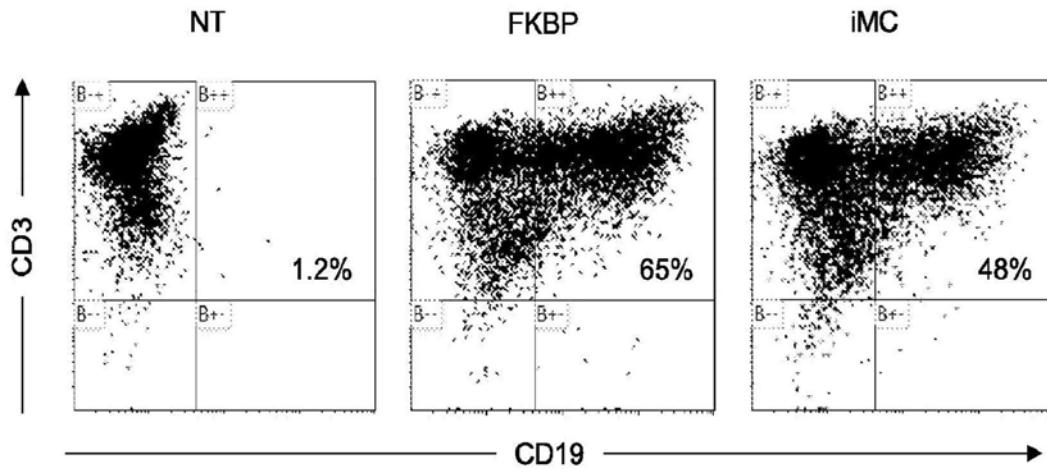


图5A

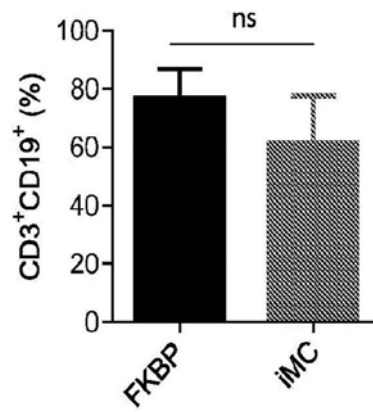


图5B

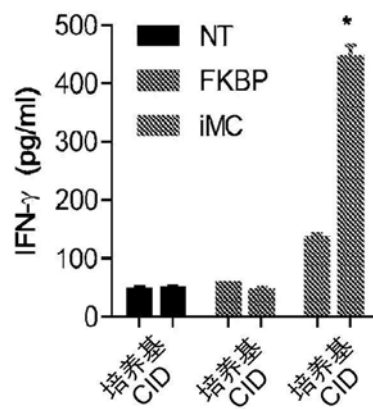


图5C

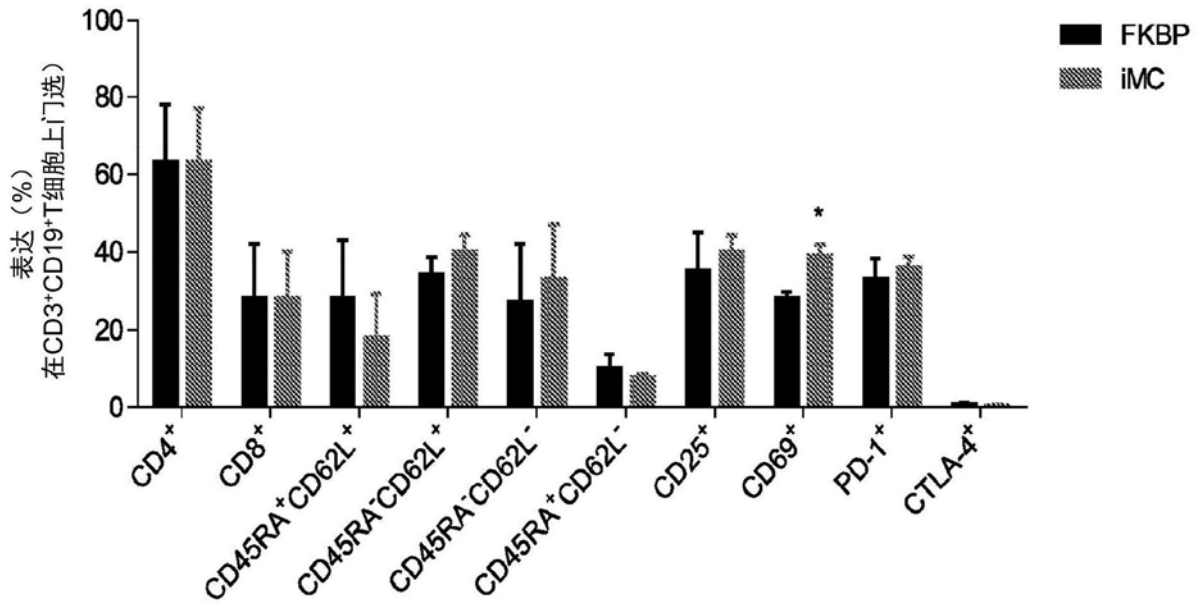


图5D

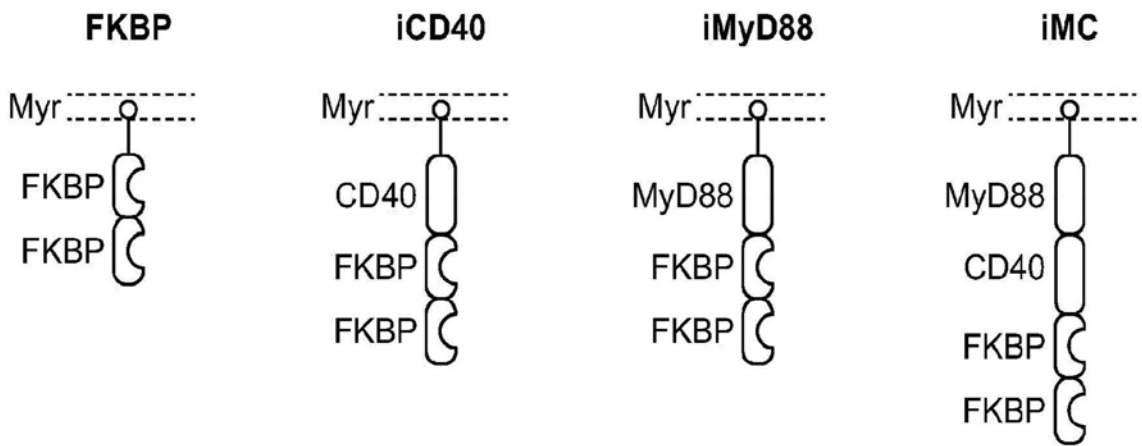


图6A



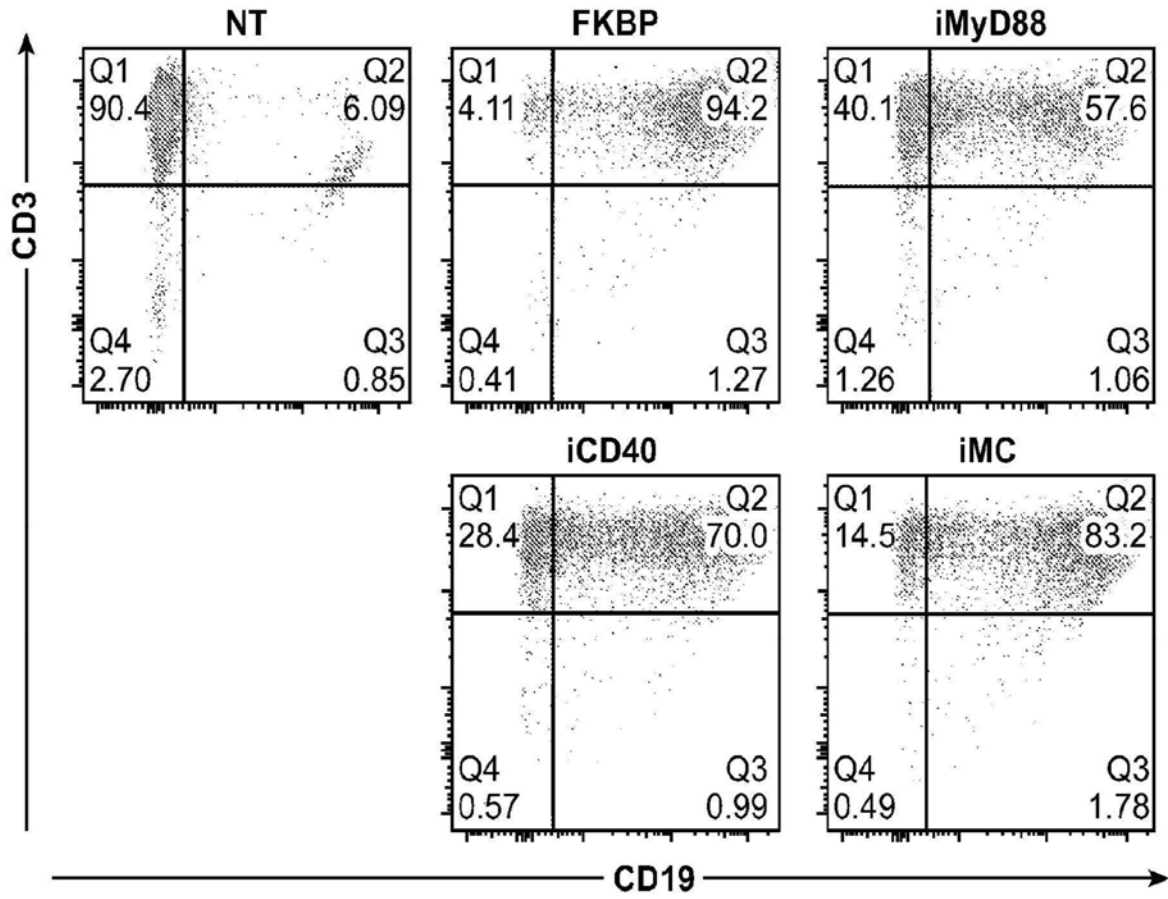


图6B

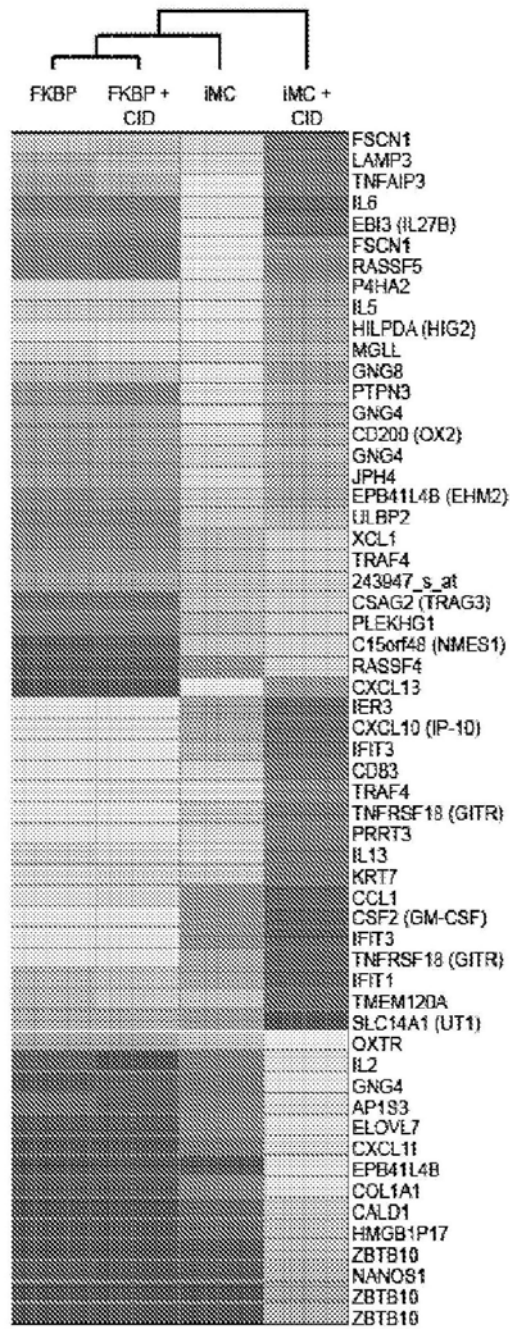


图7A

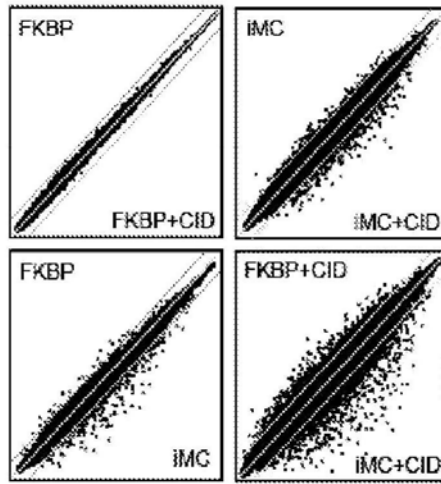


图7B

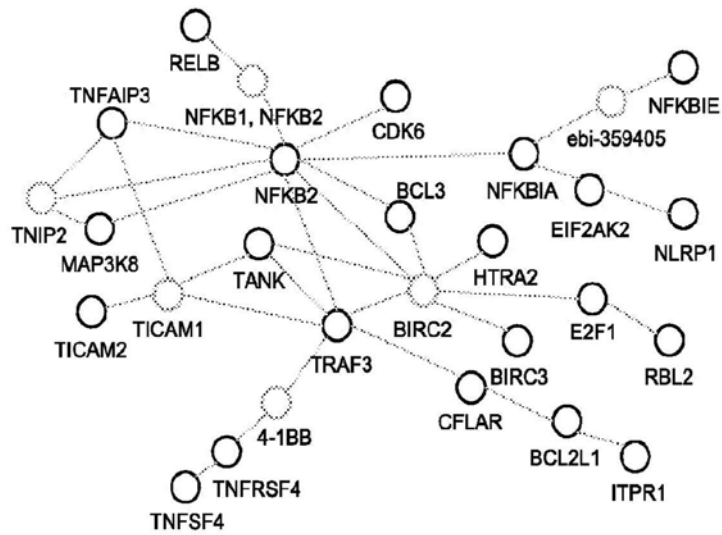


图7C

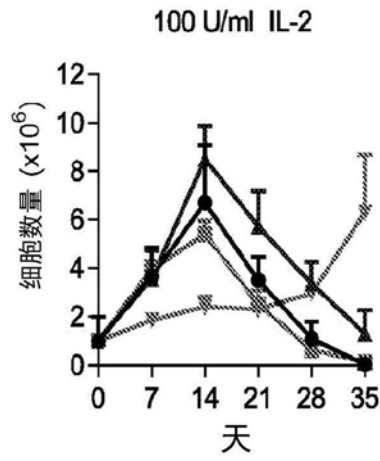


图8A

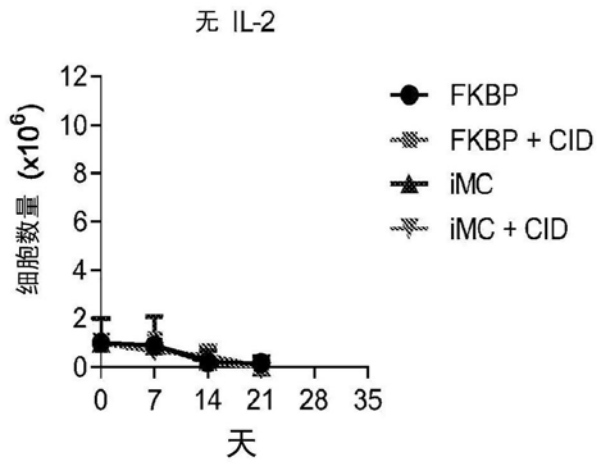


图8B

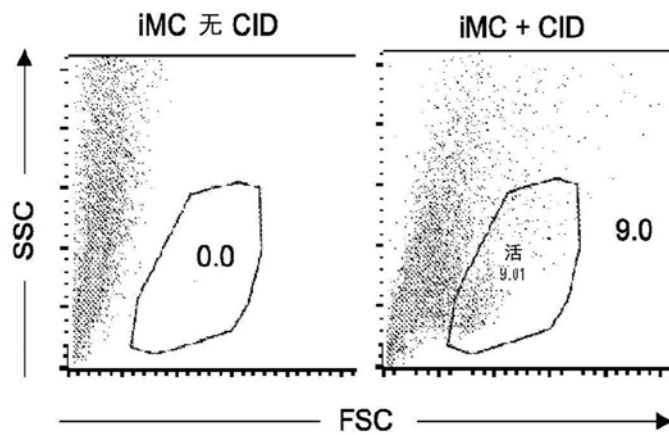


图8C

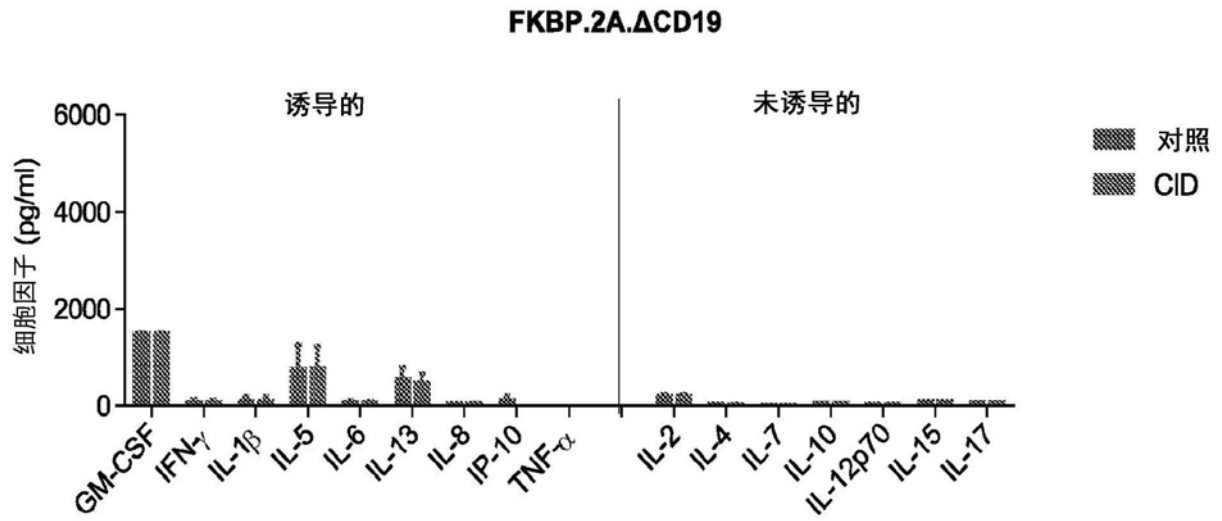


图9A

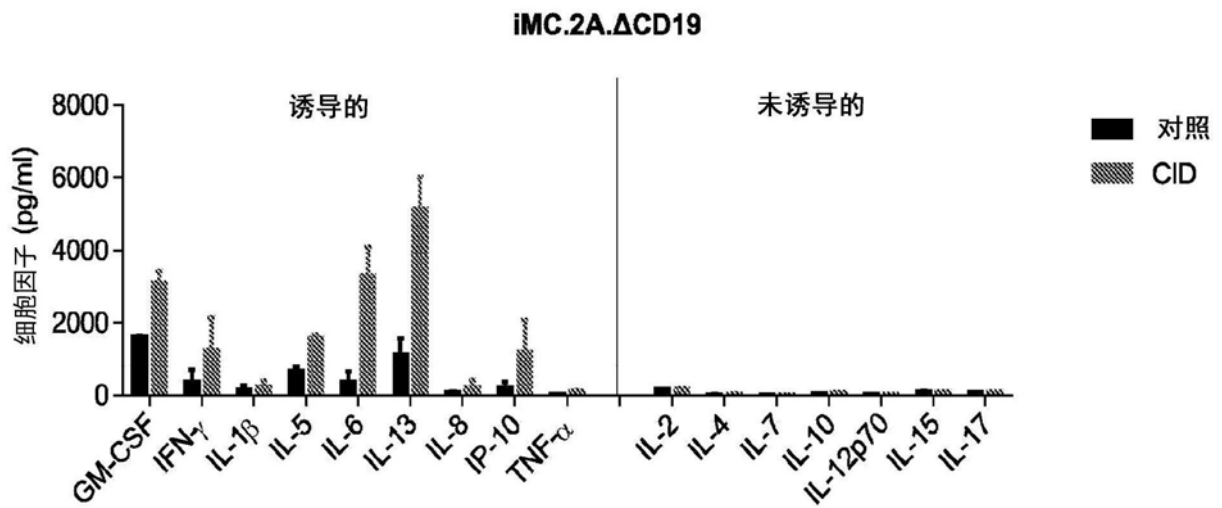


图9B

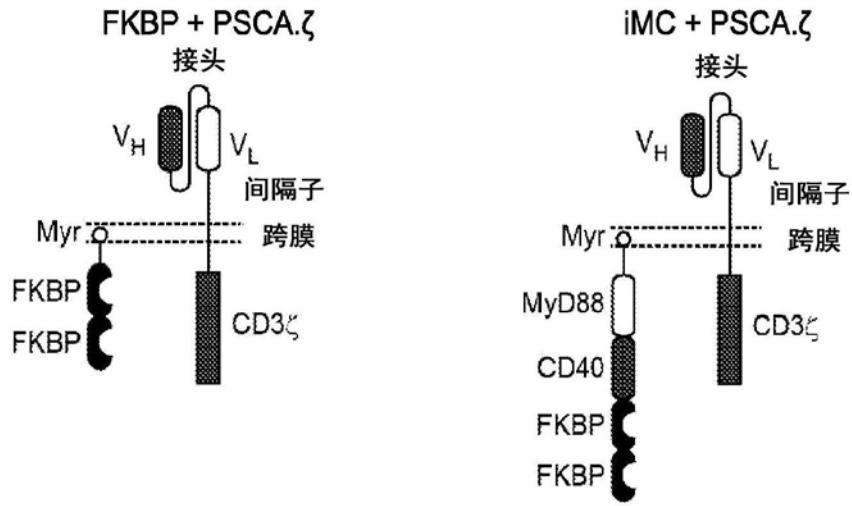


图10A

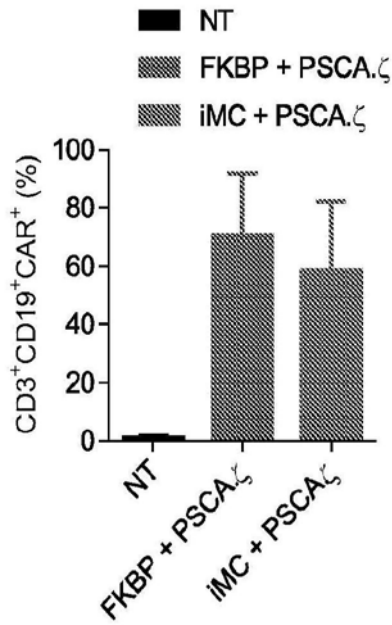


图10B

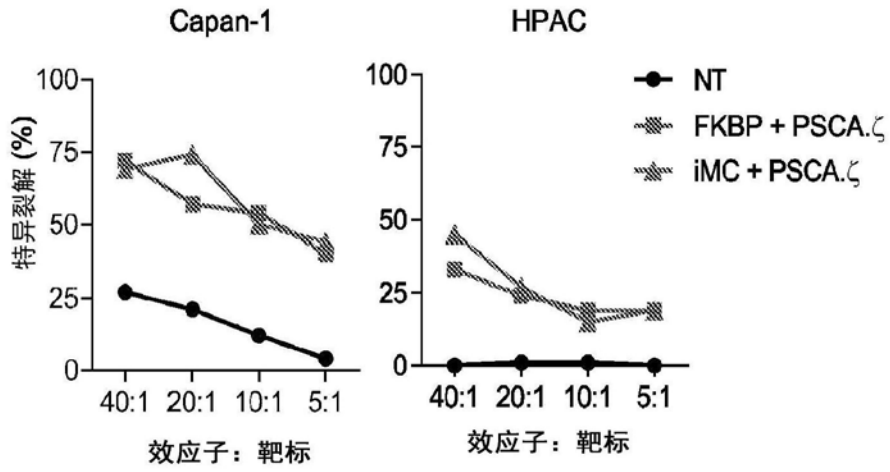


图10C

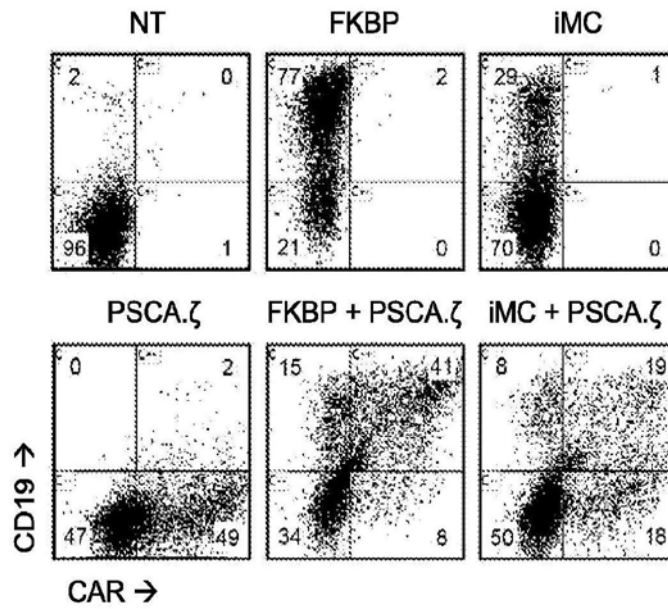


图10D

iMC + PSCA.ζ

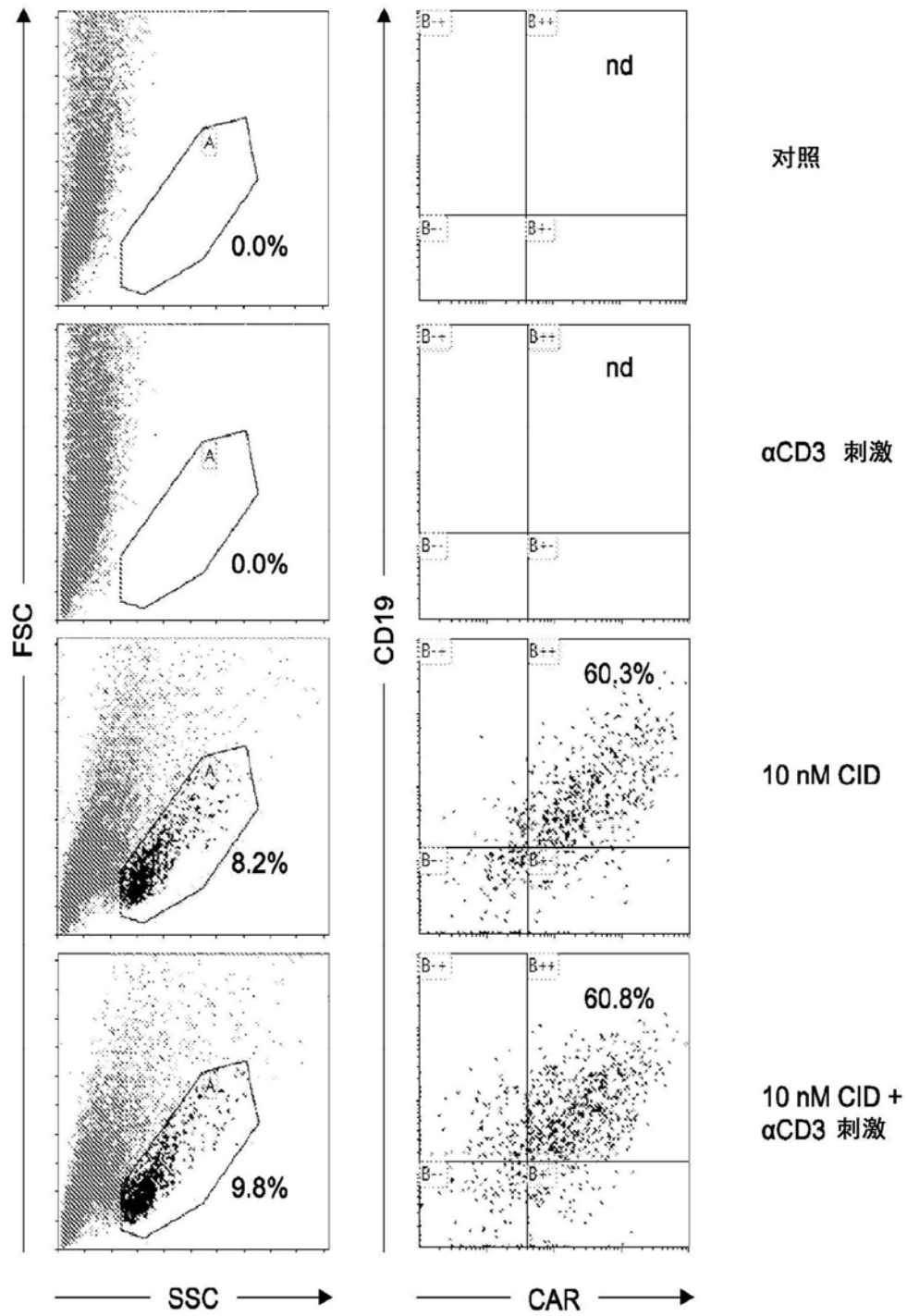


图11



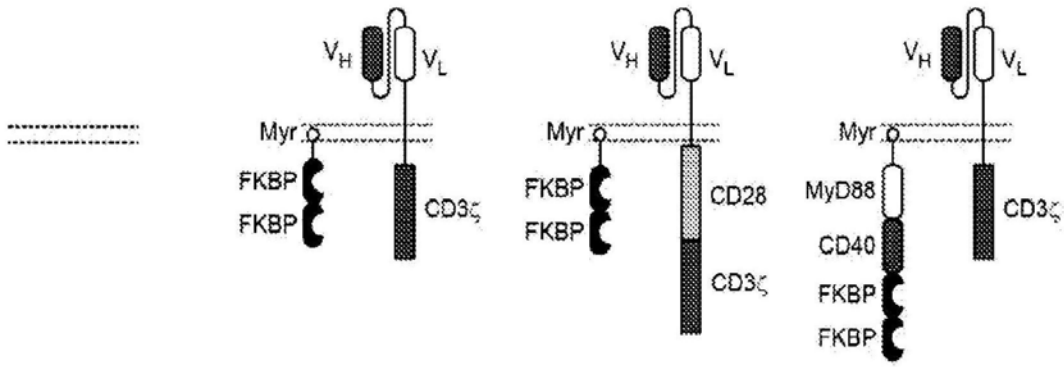


图12A

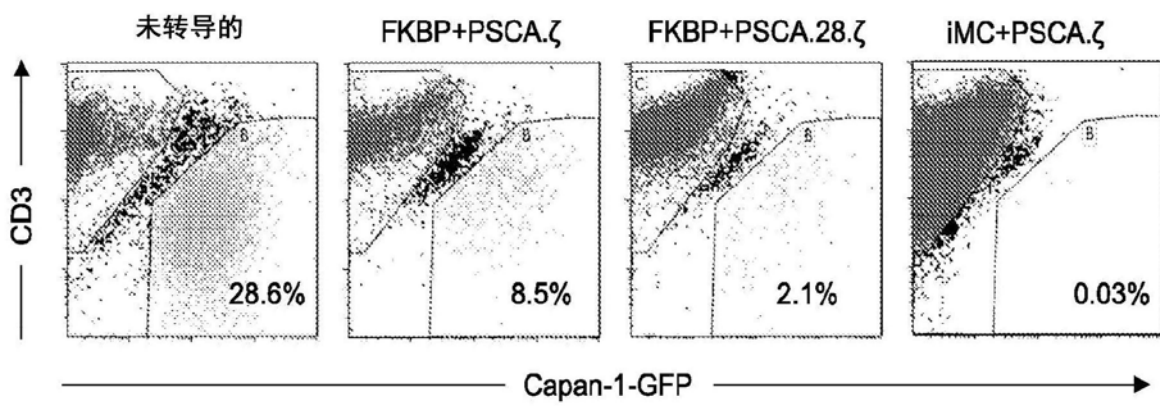


图12B

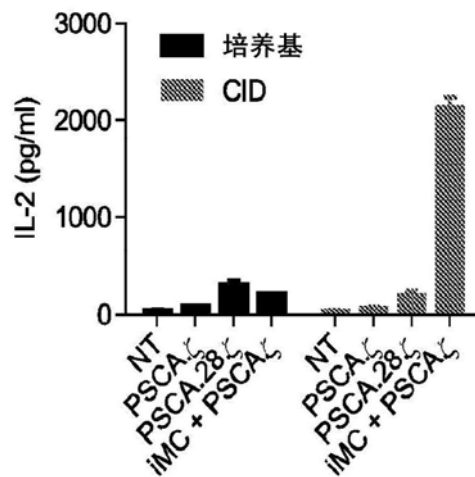


图12C

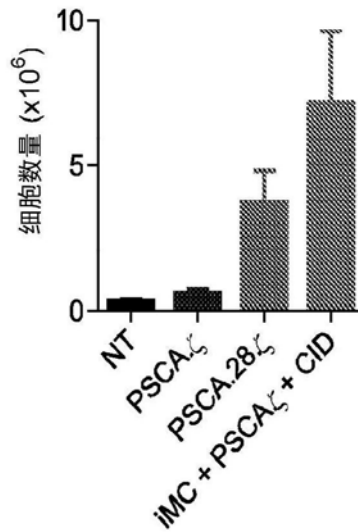


图12D

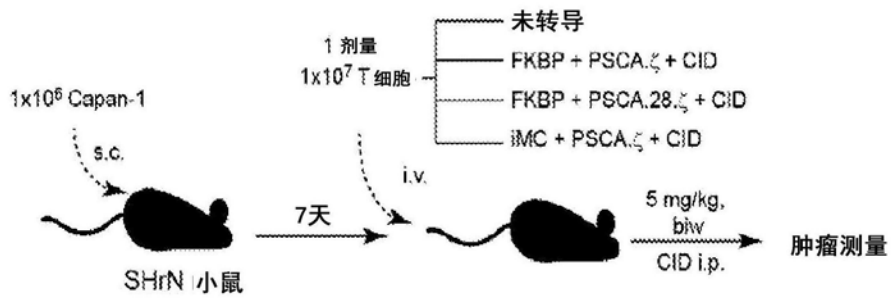


图13A

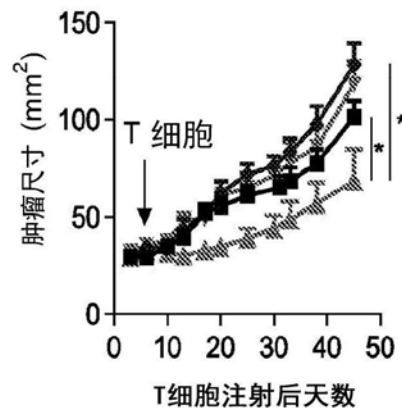


图13B

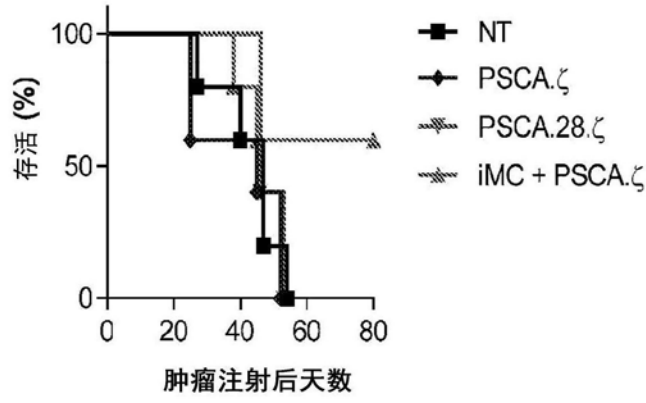


图13C

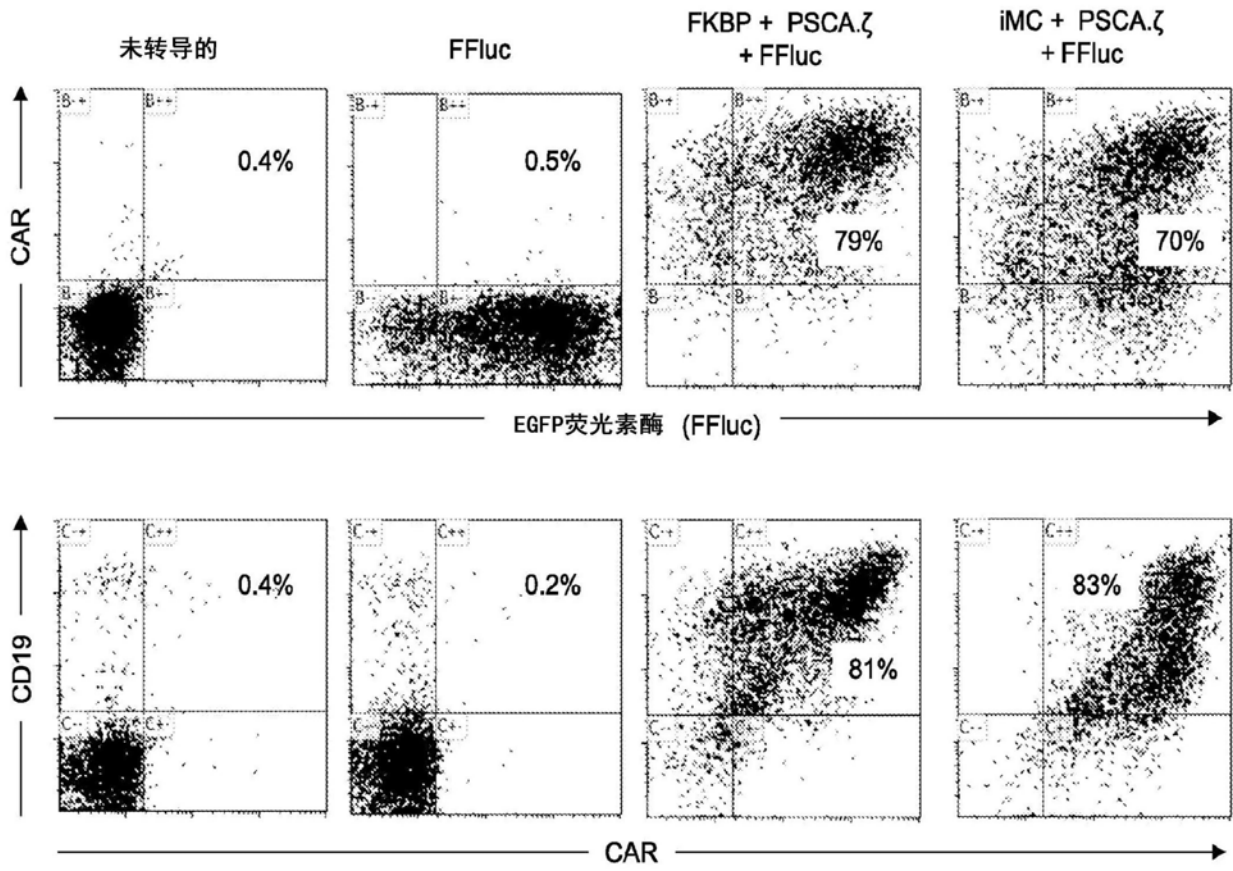


图14

Dr. Corradi with SnapGene®

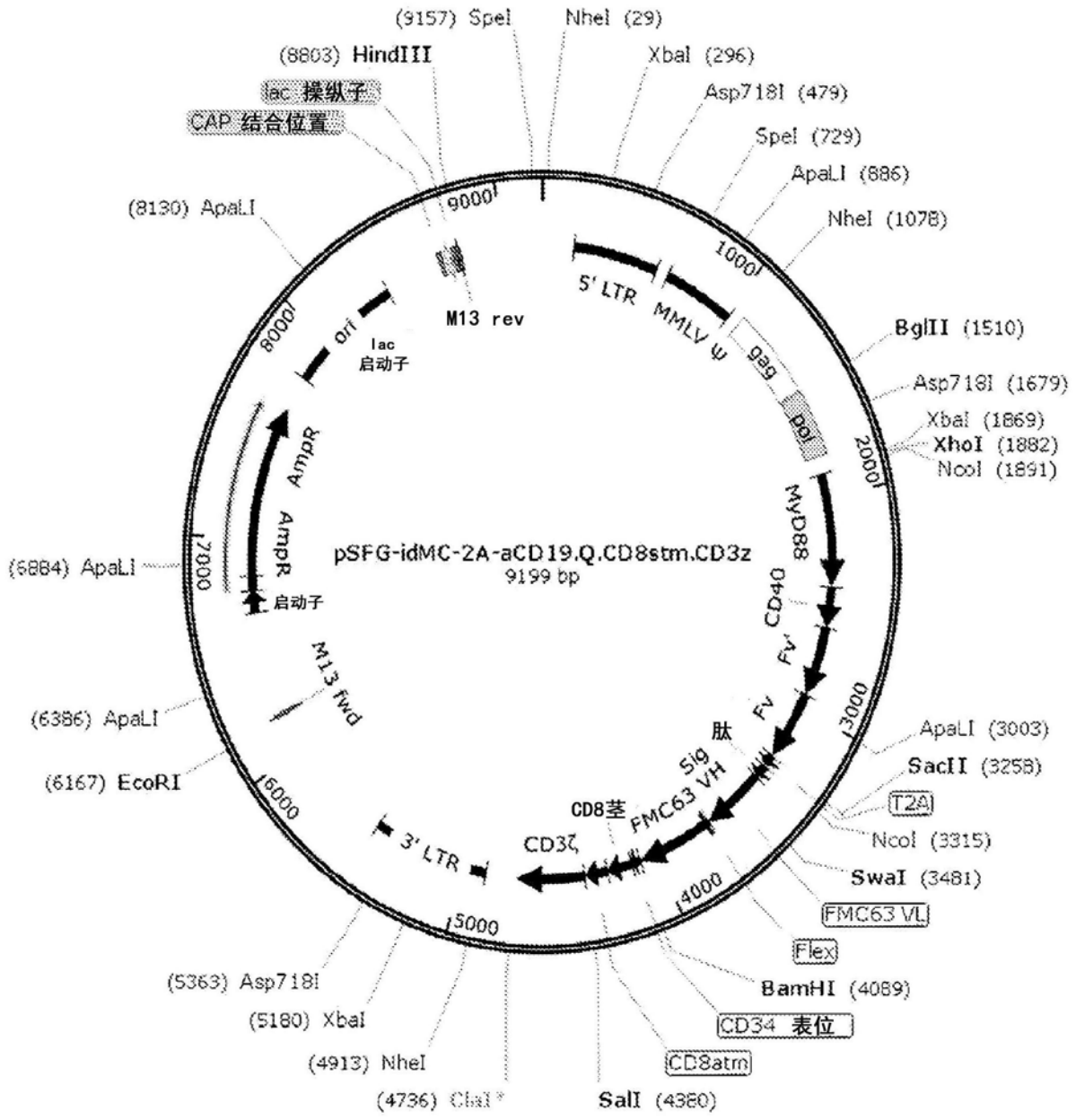


图15

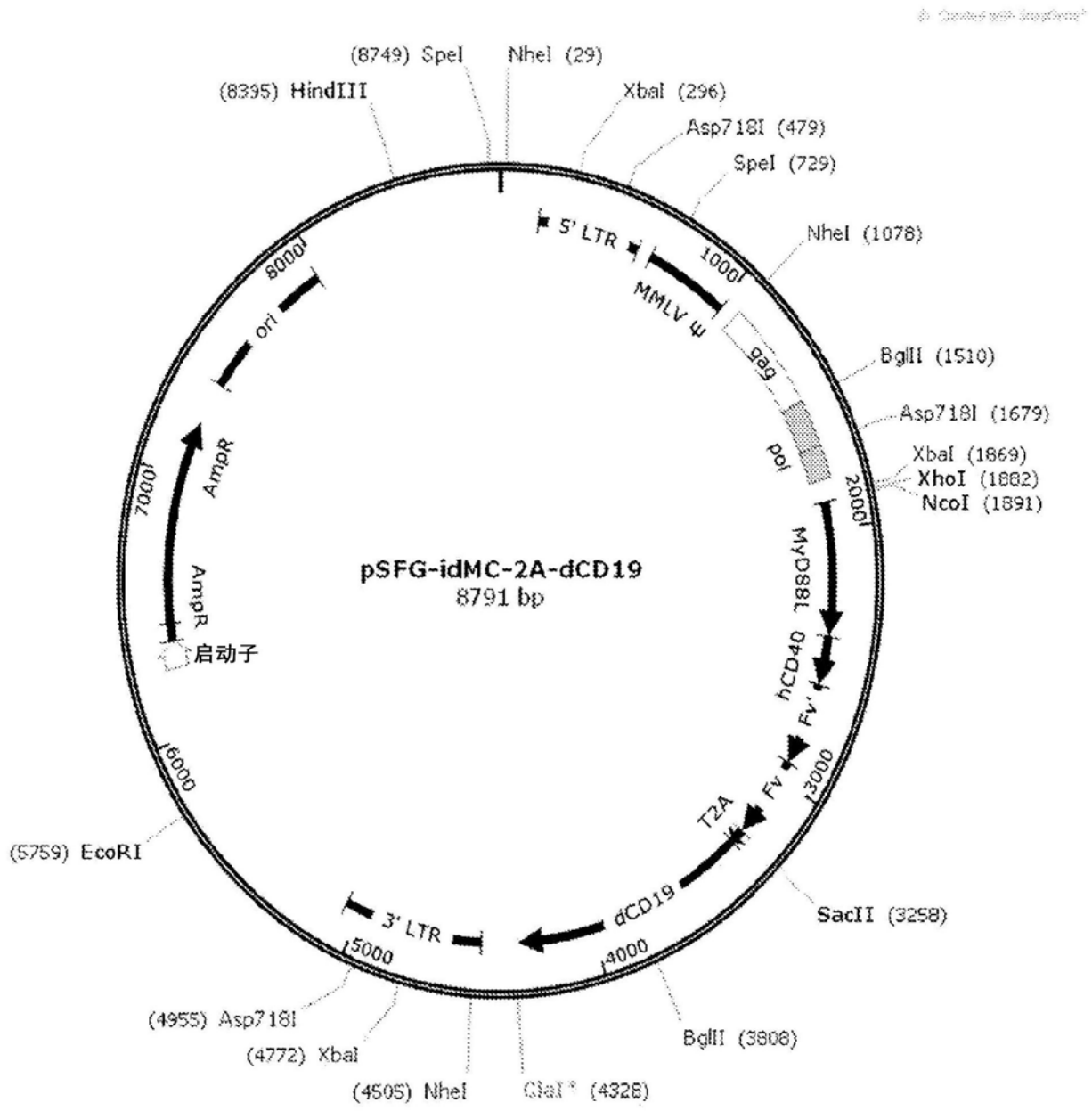


图16

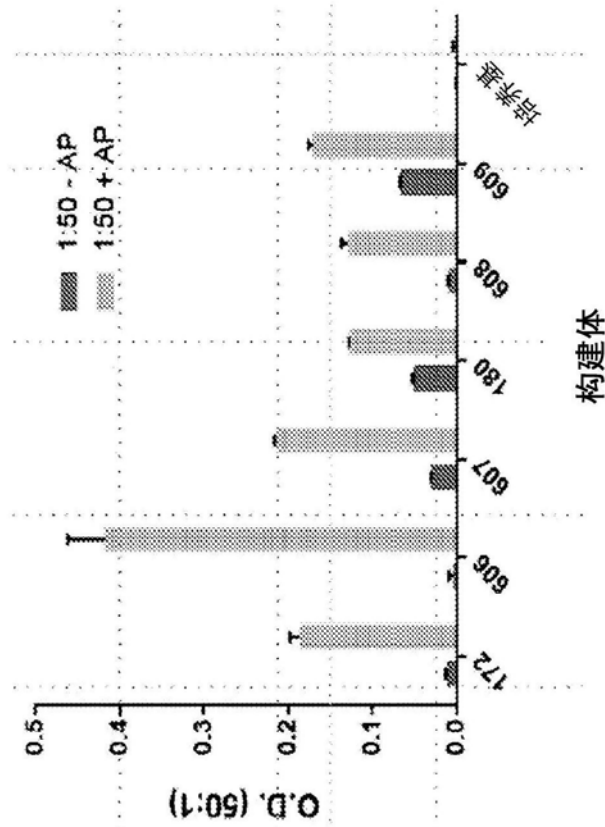


图 17B

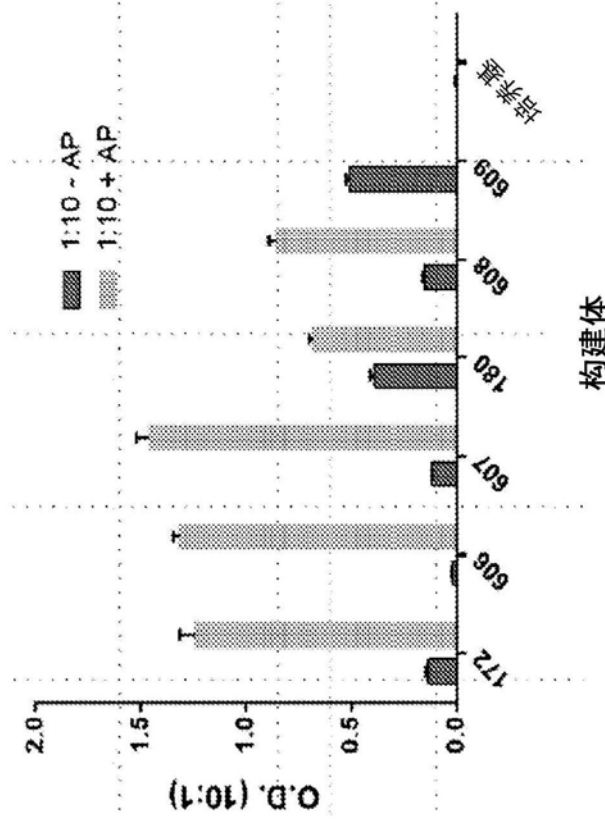


图 17A

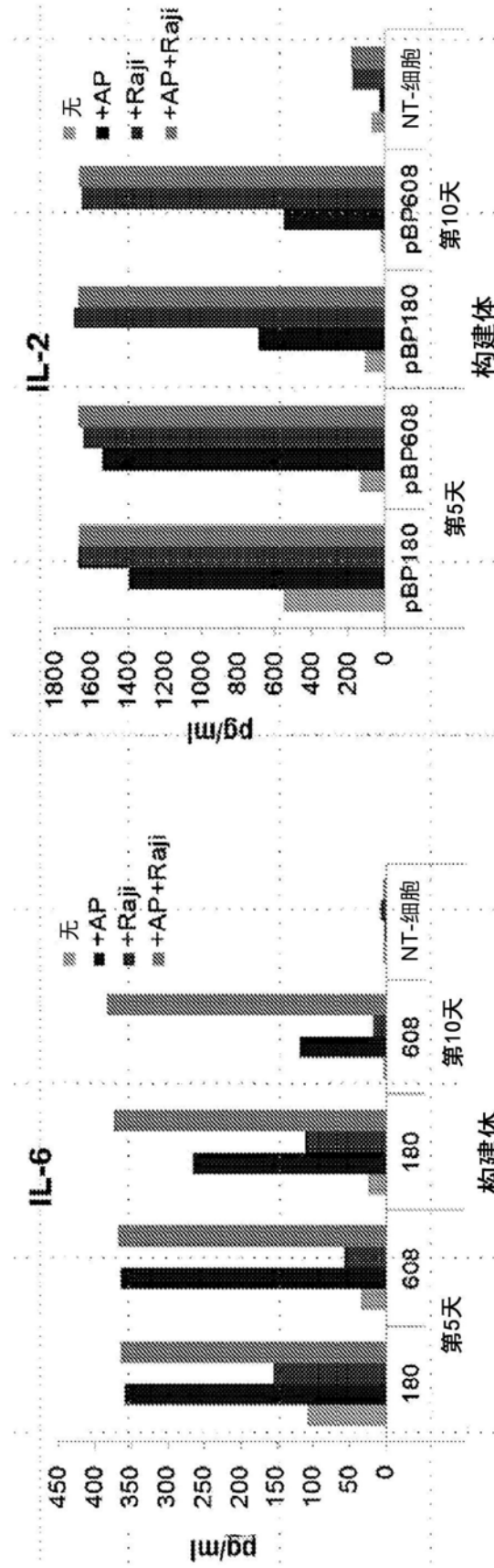


图 18A

图 18B

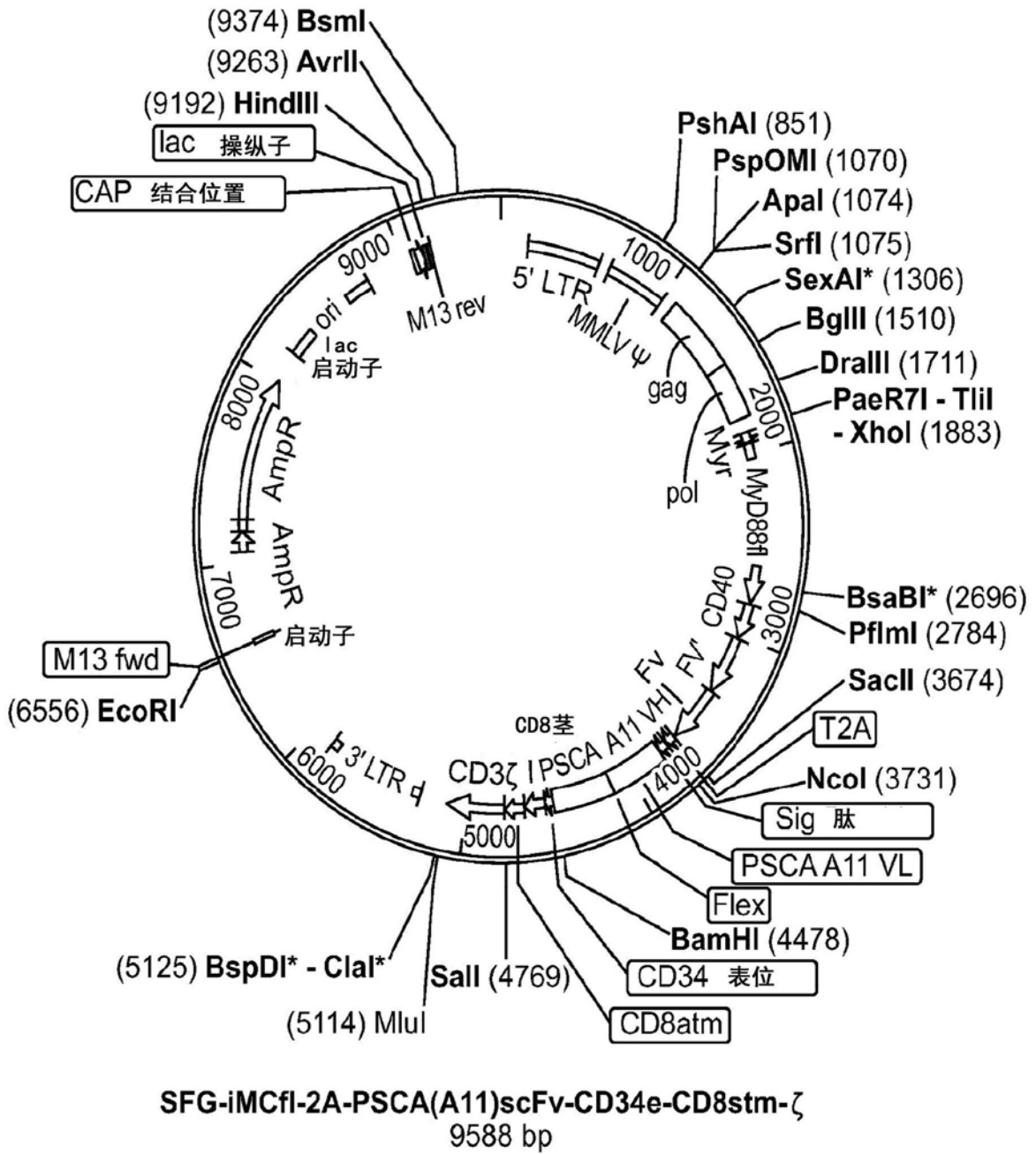


图19



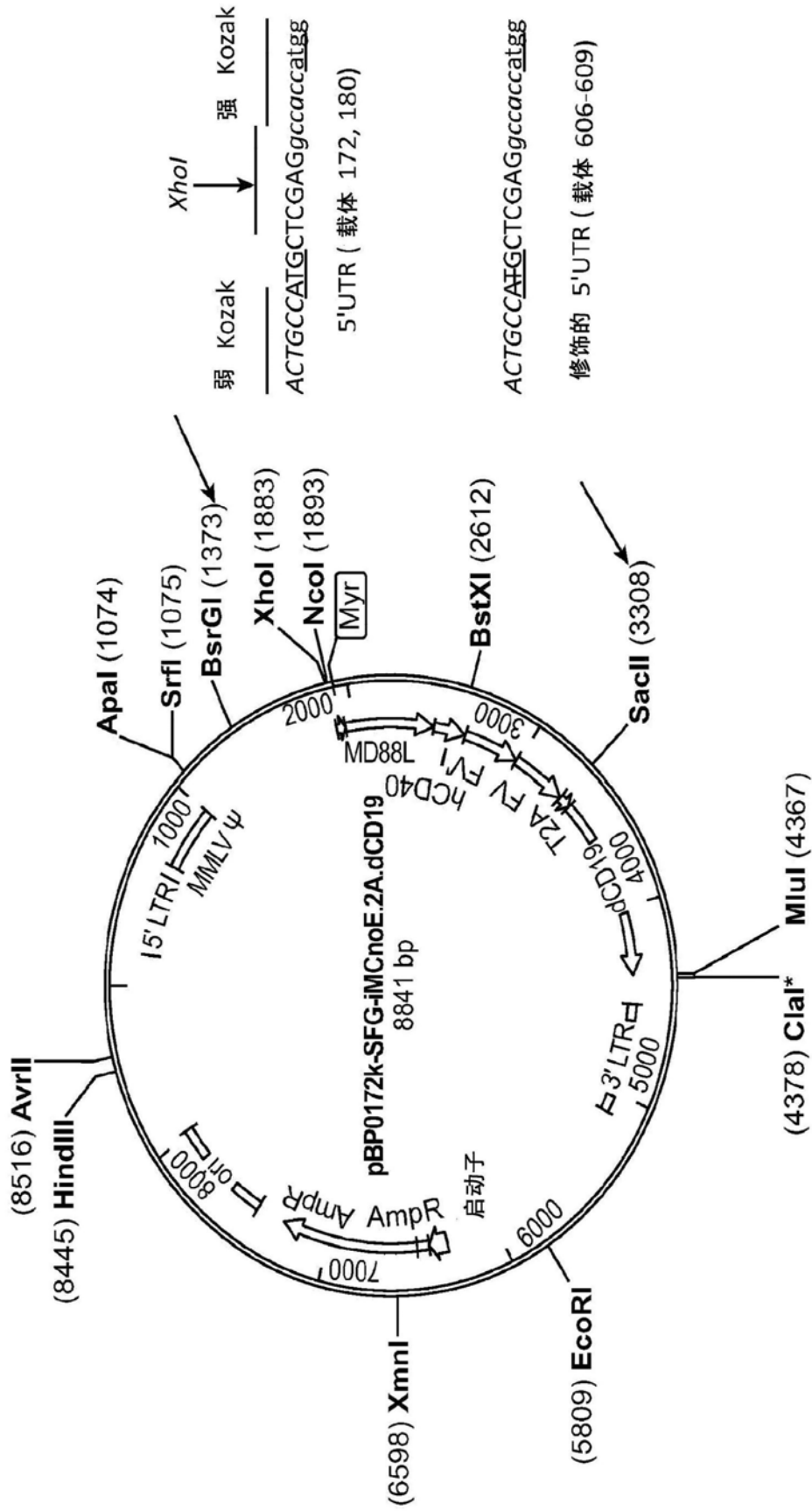


图20

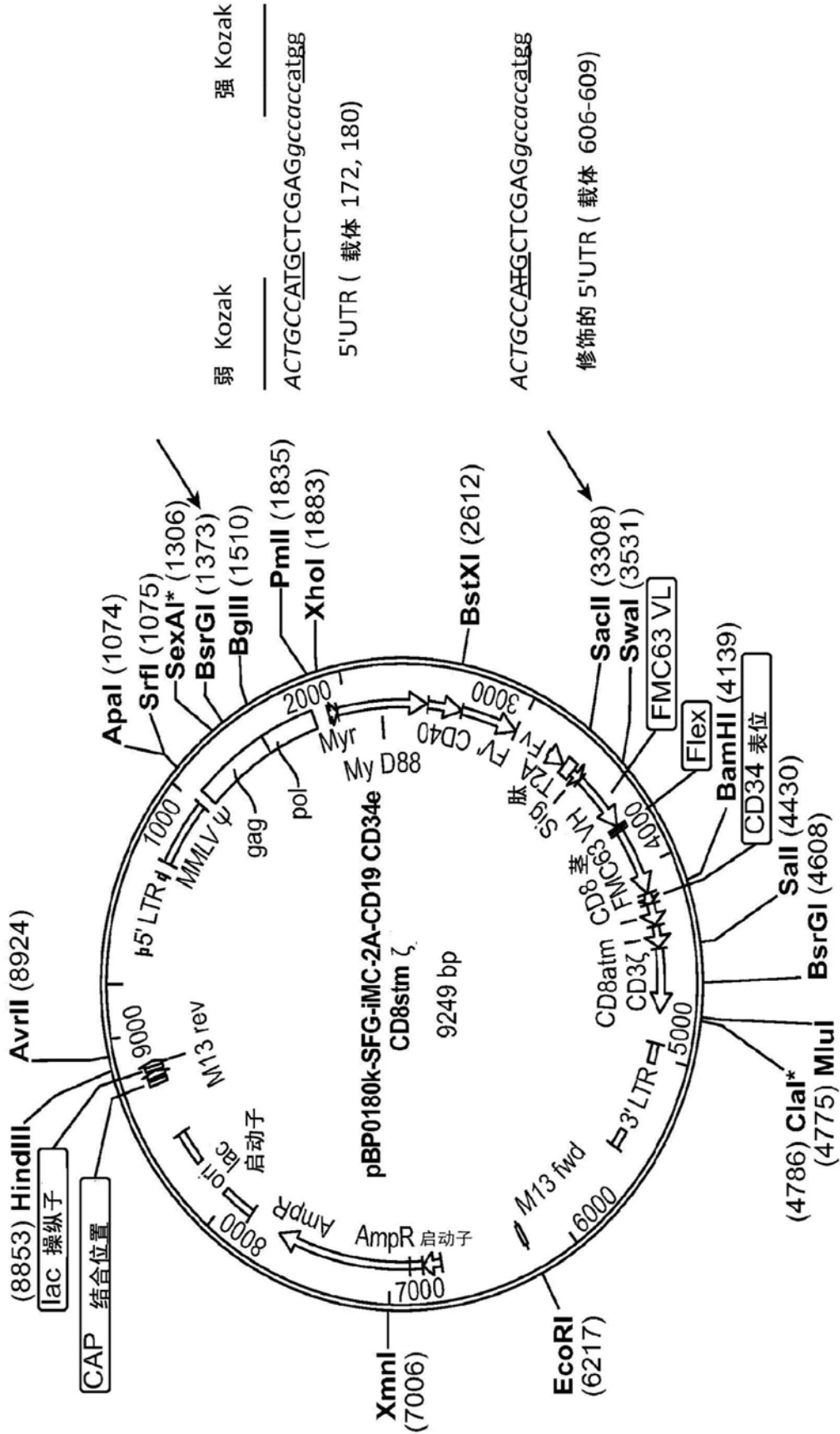


图21

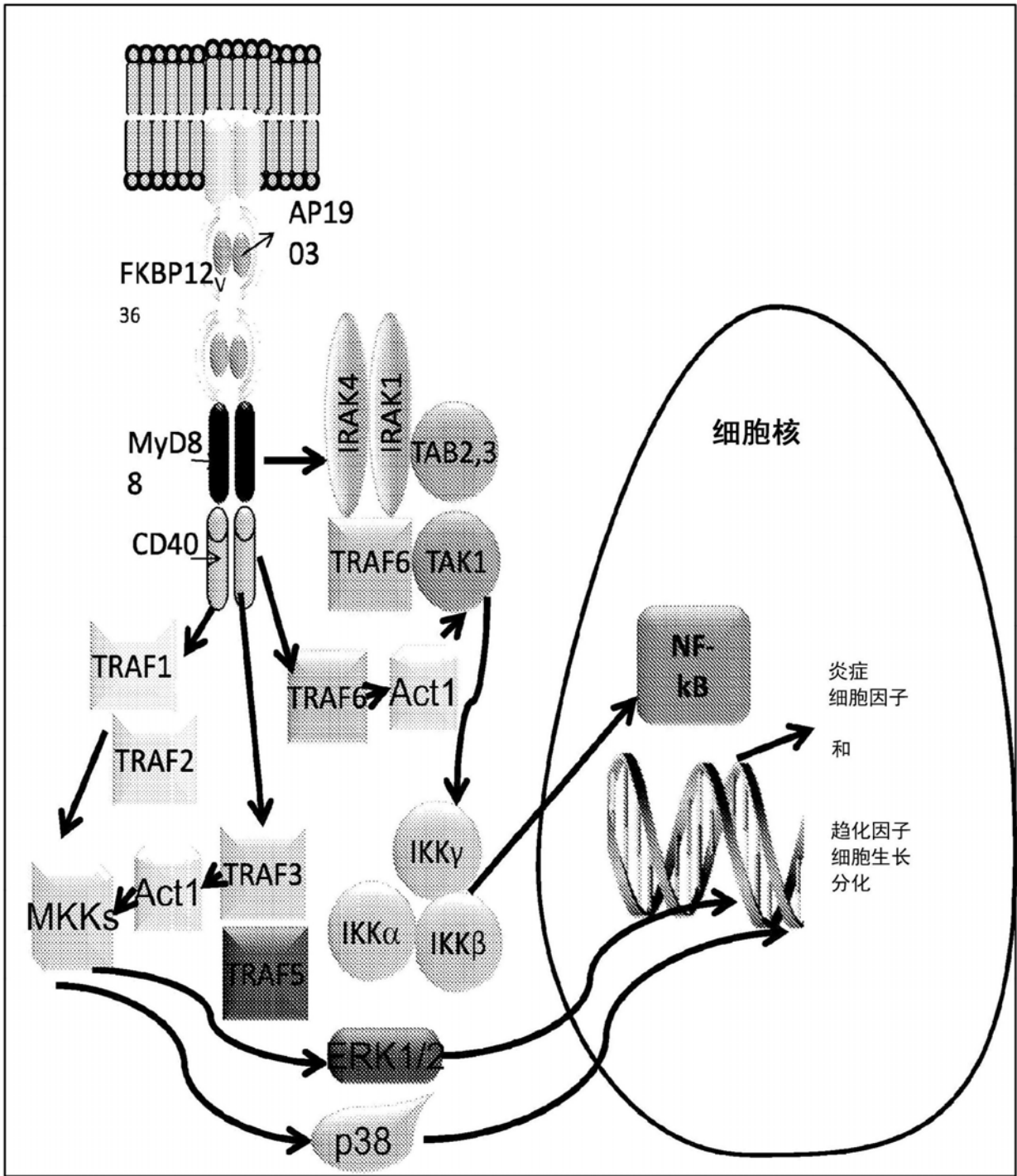


图22

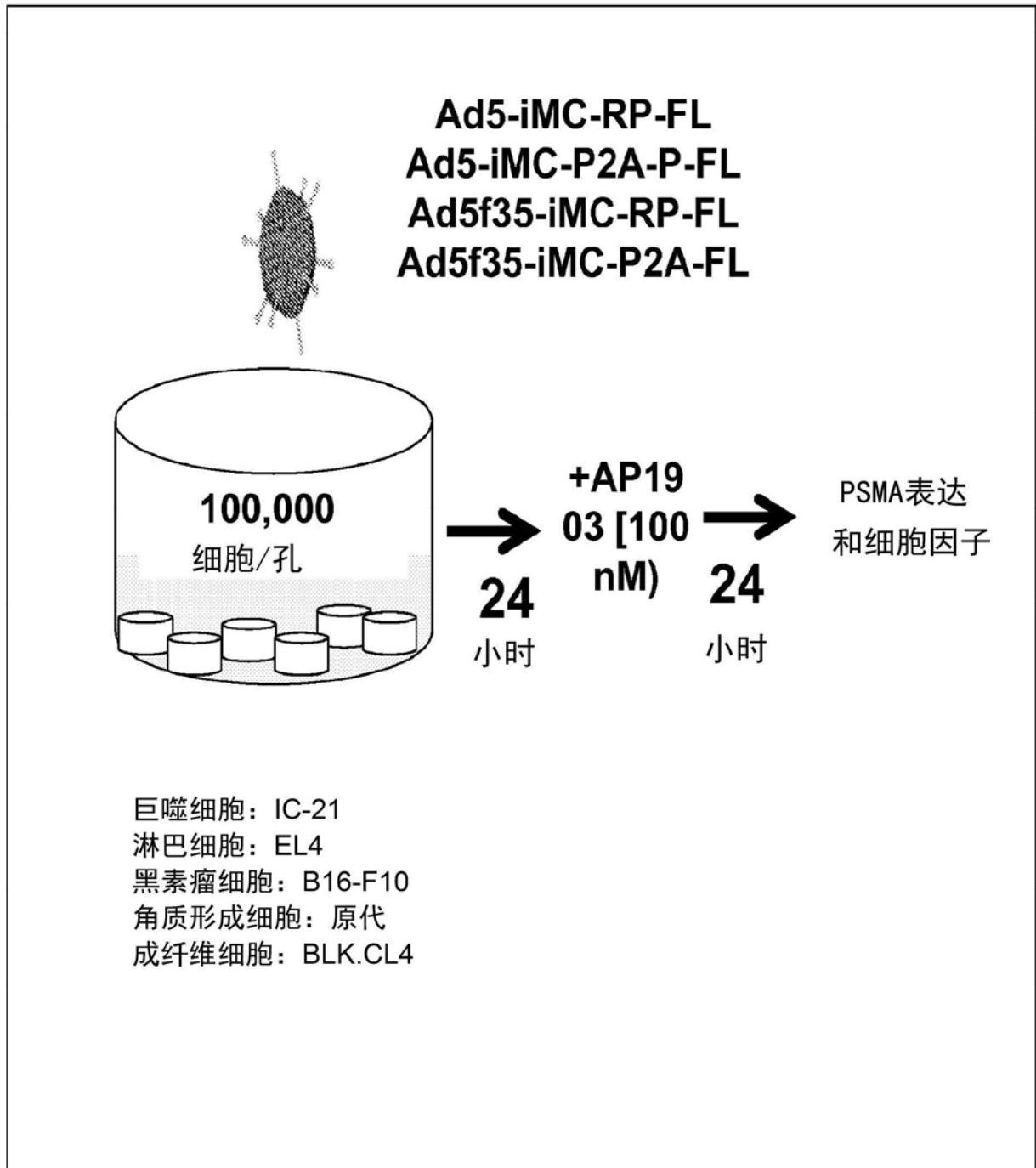


图23

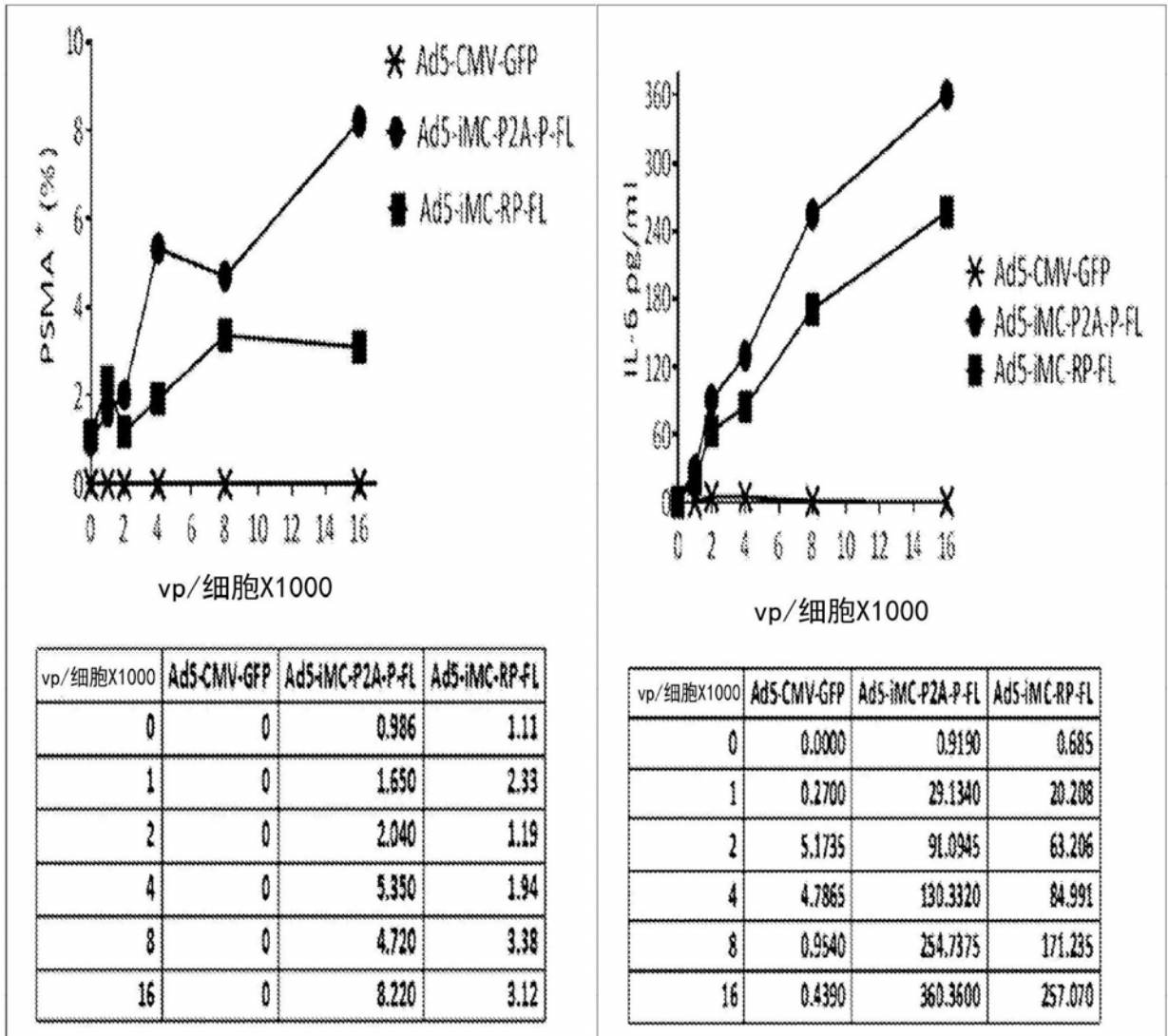


图 24A

图 24B

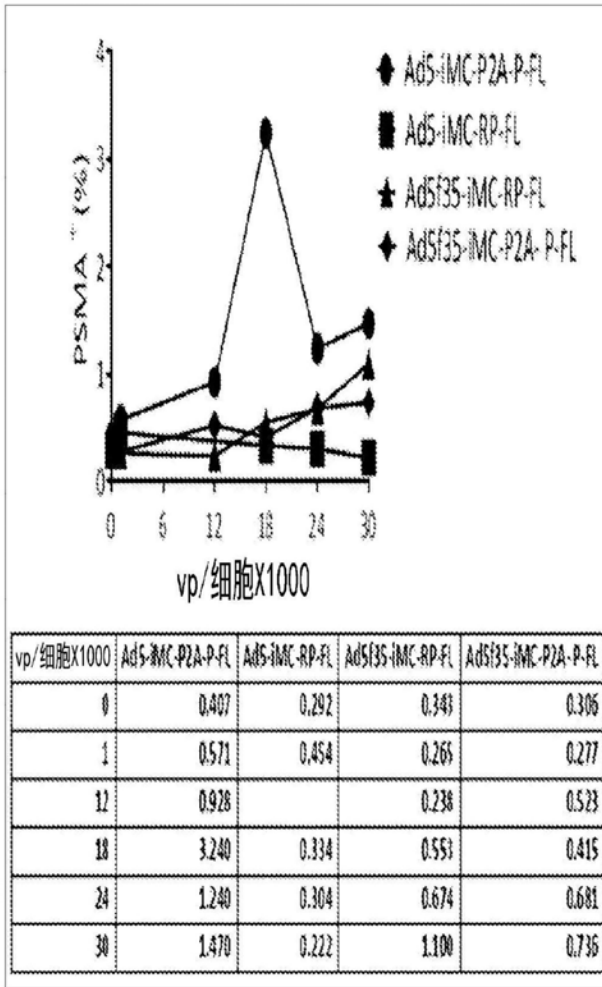


图 25A

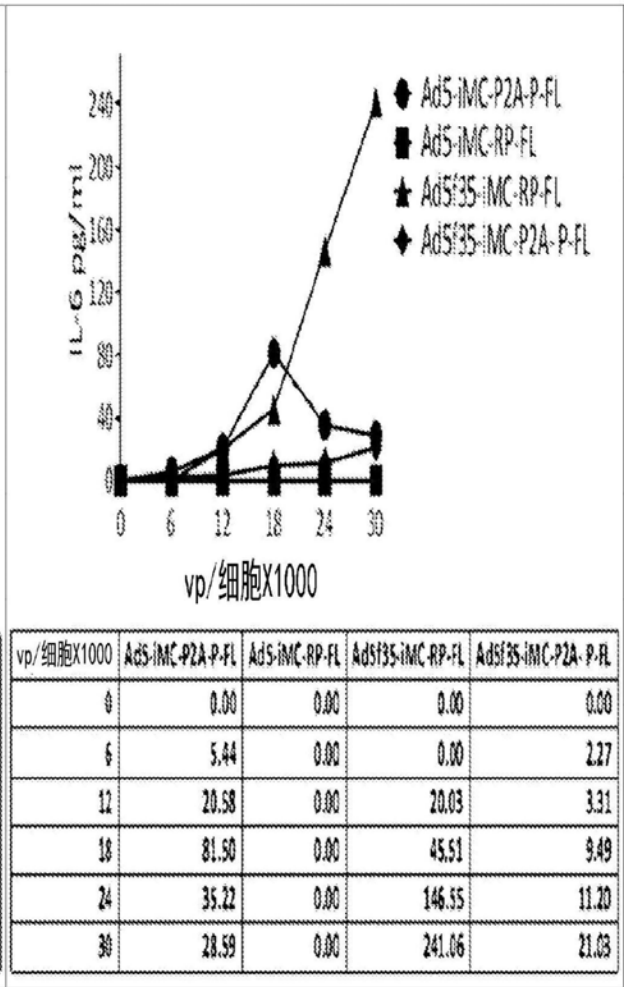


图 25B

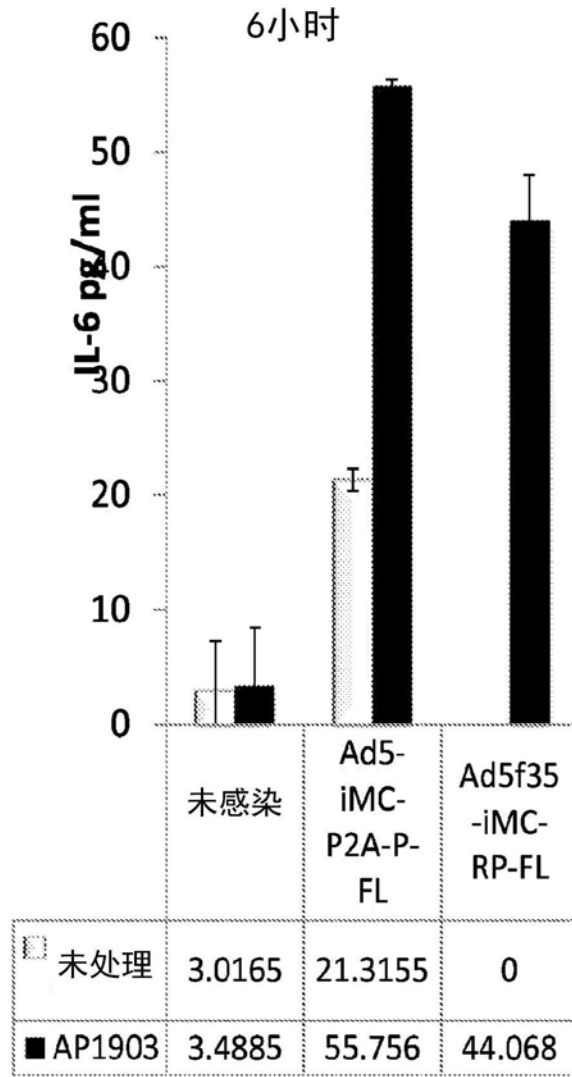


图26A

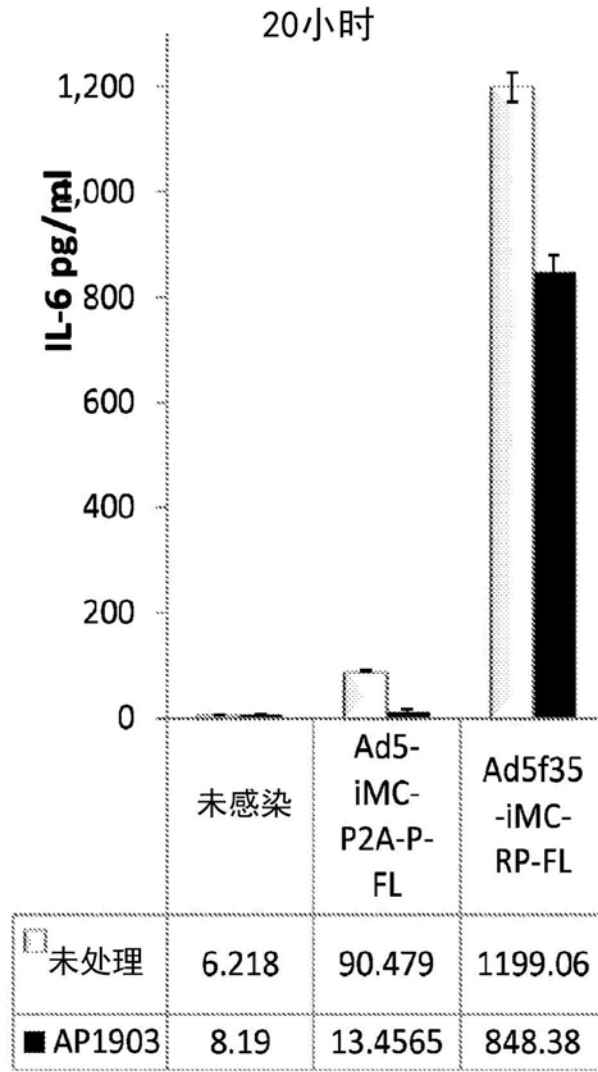


图26B



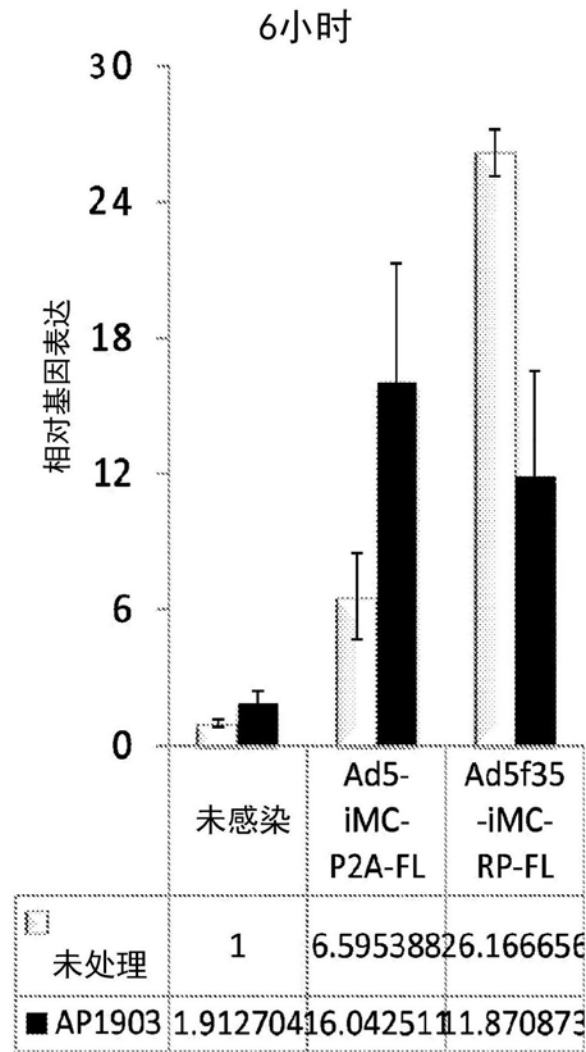


图26C

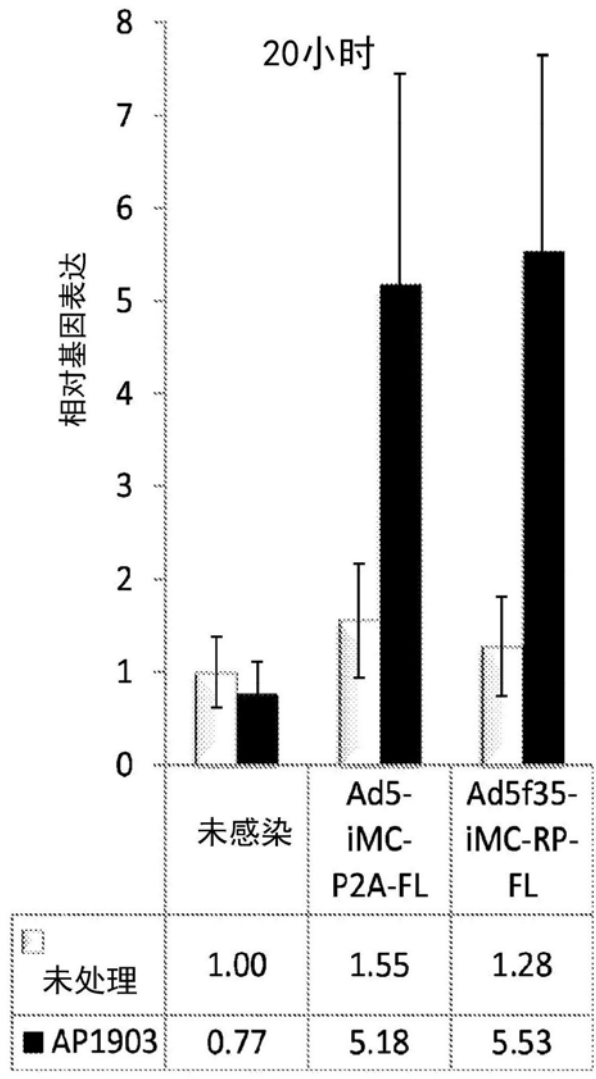
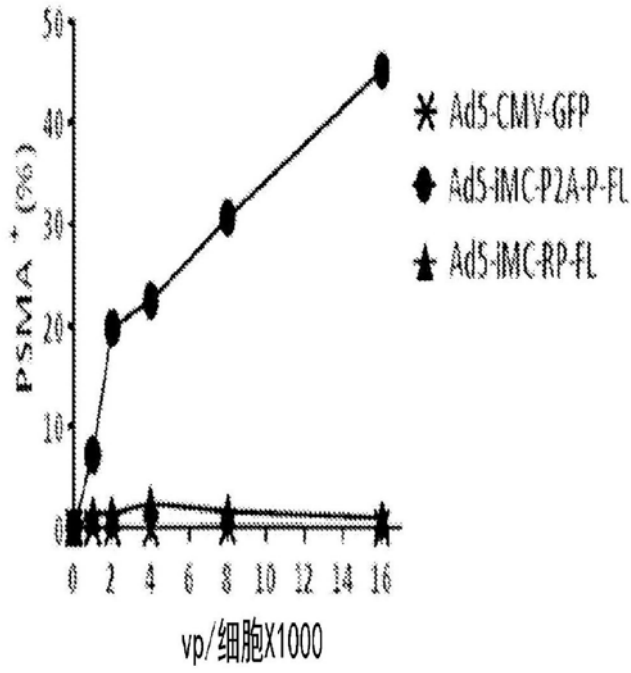


图26D



vp/细胞x1000	Ad5-CMV-GFP	Ad5-iMC-P2A-P-FL	Ad5-iMC-RP-FL
0	0.099	0.160	0.10
1	0.099	7.270	1.40
2	0.080	19.800	1.48
4	0.020	22.500	2.47
8	0.188	30.700	1.69
16	0.059	45.200	1.01

图27A

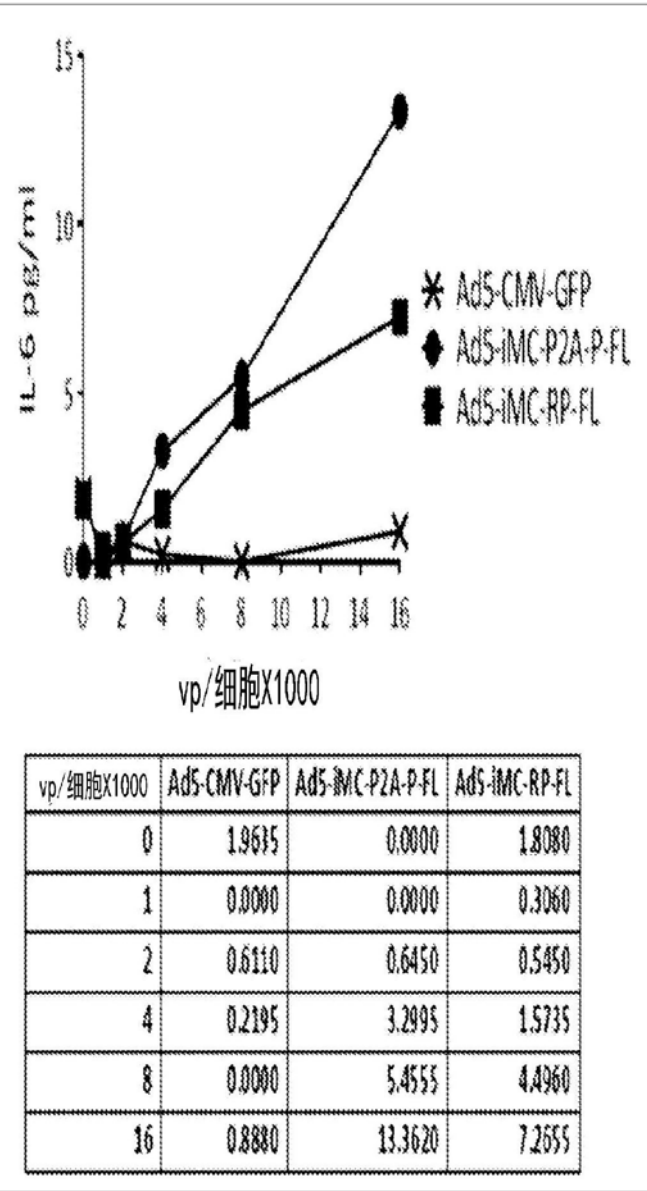


图27B

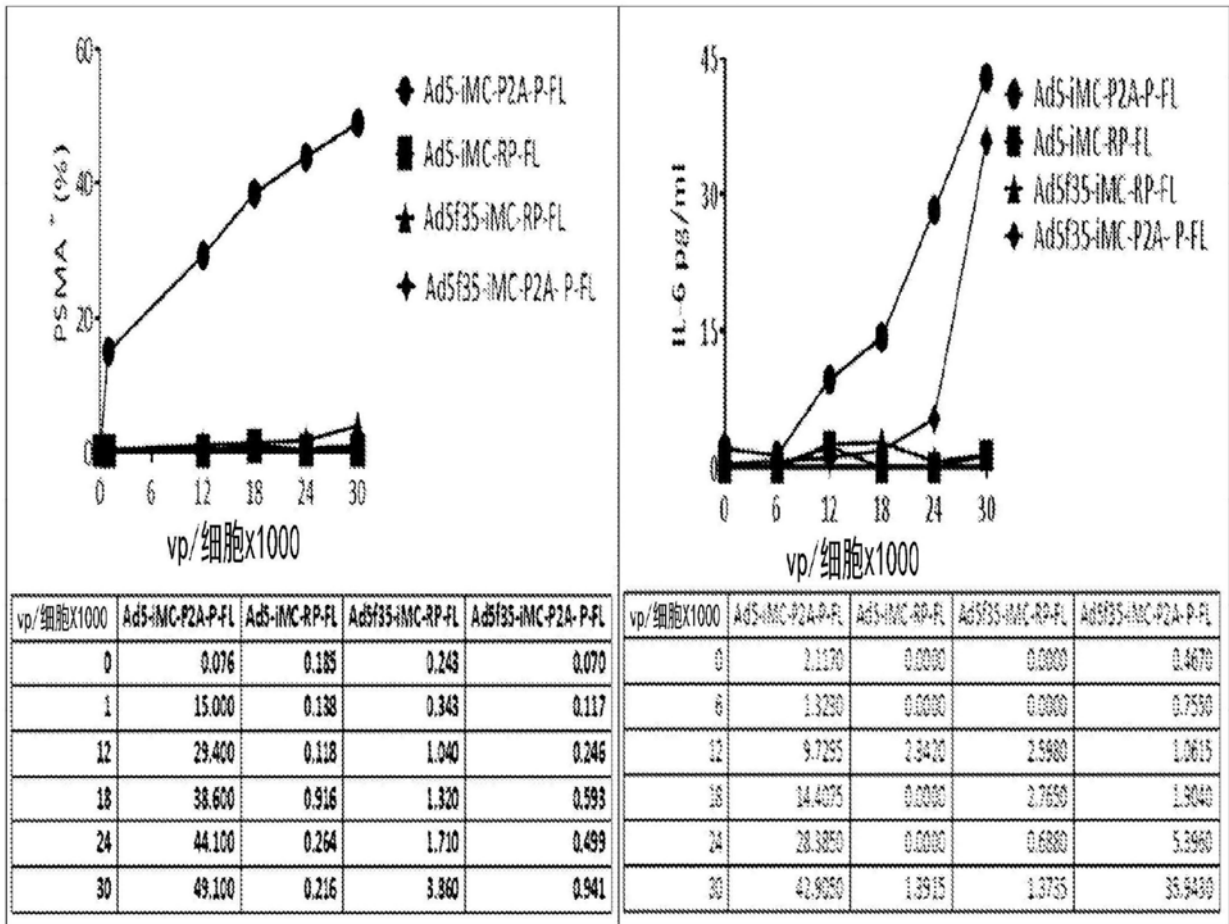


图 28A

图 28B

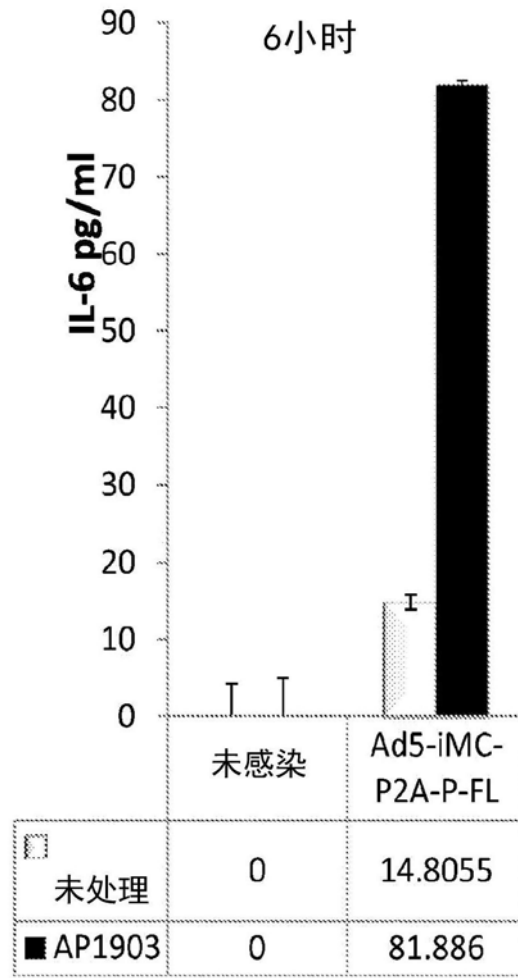


图29A

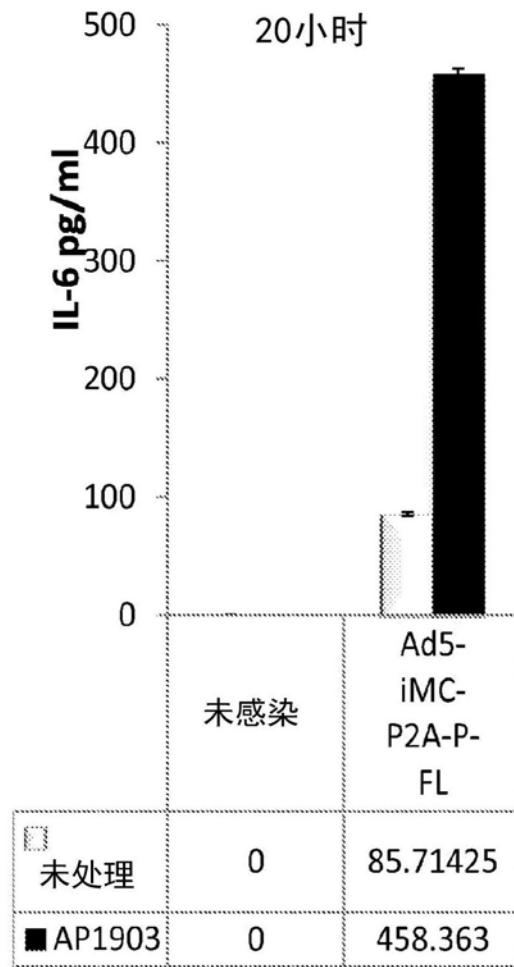


图29B

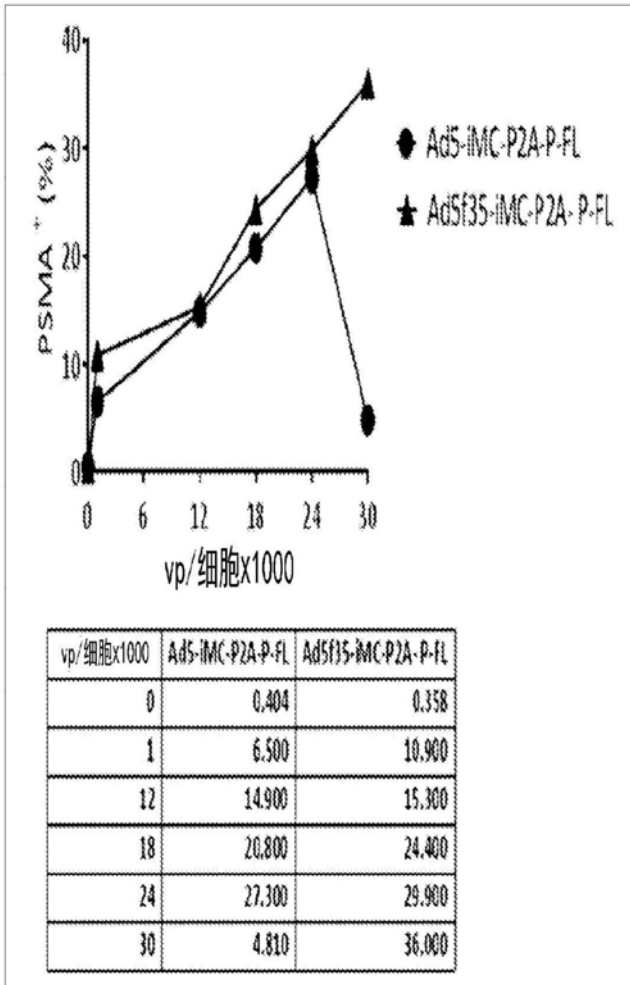


图 30A

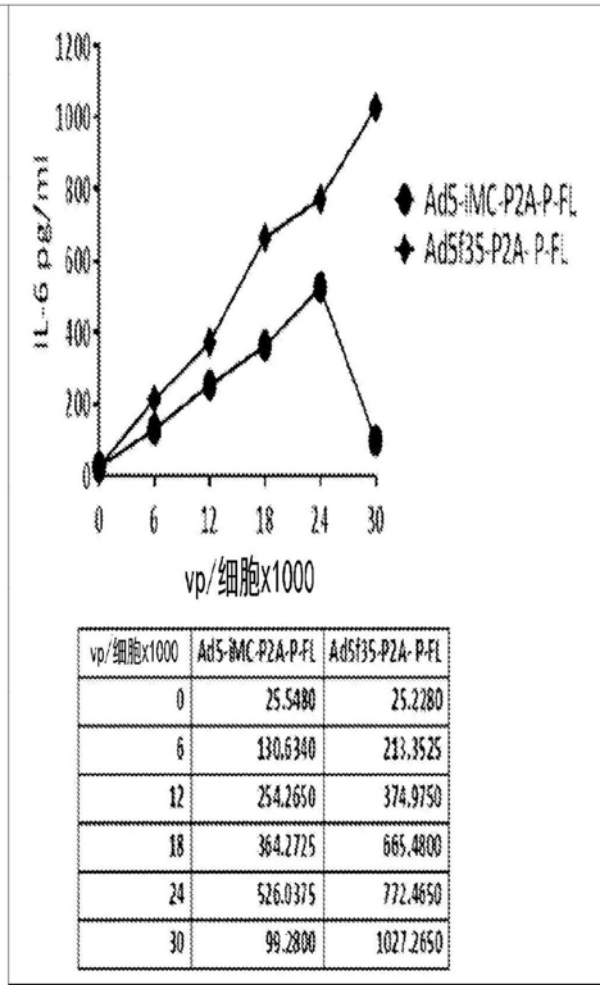


图 30B



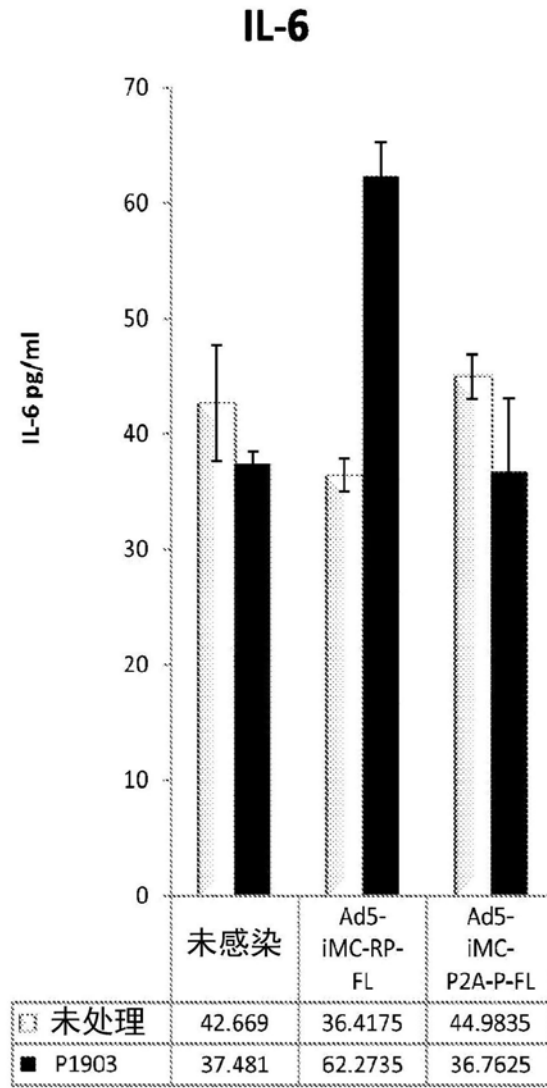


图31A

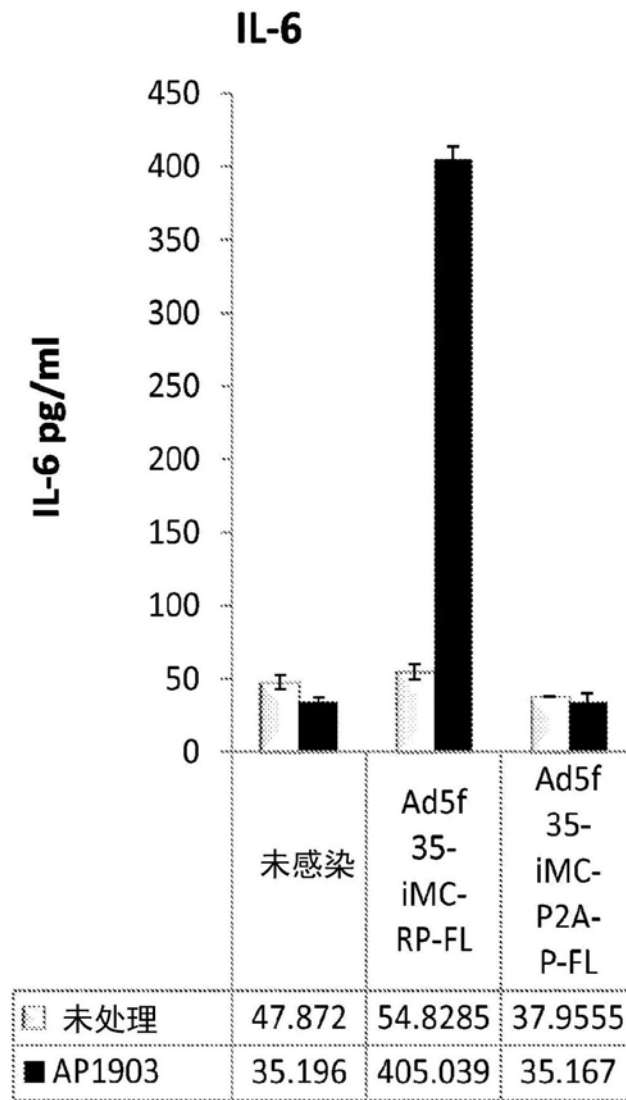


图31B

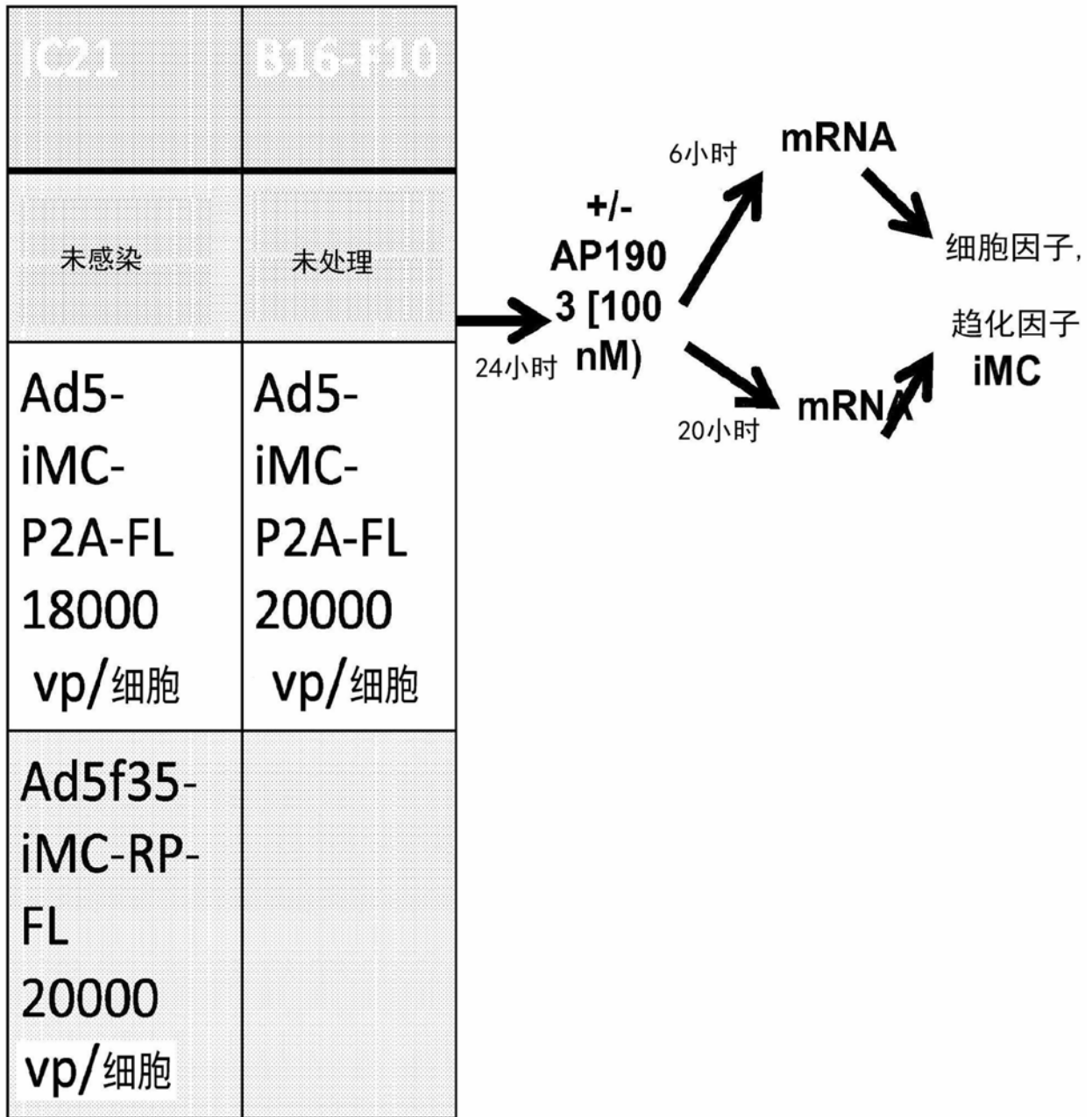


图32

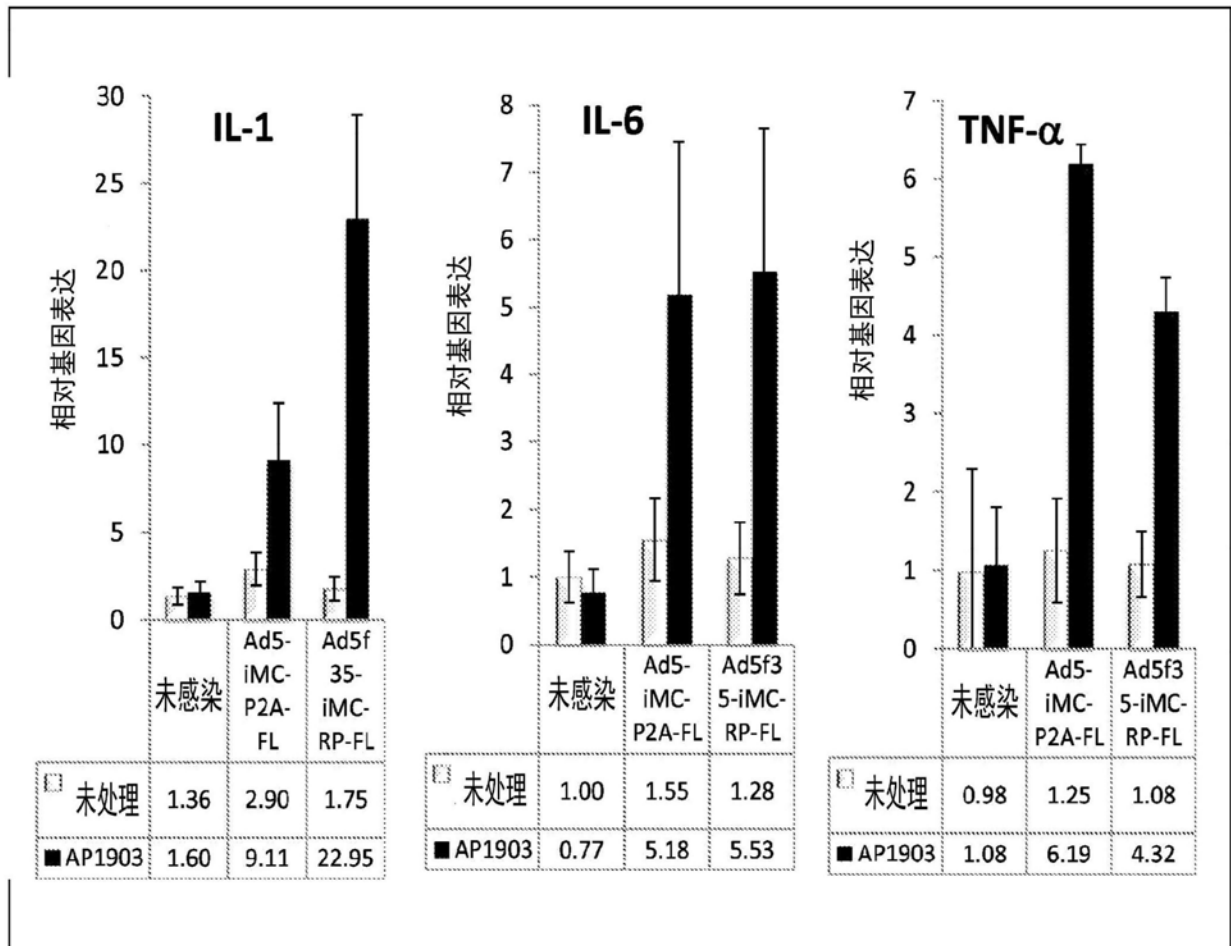


图33

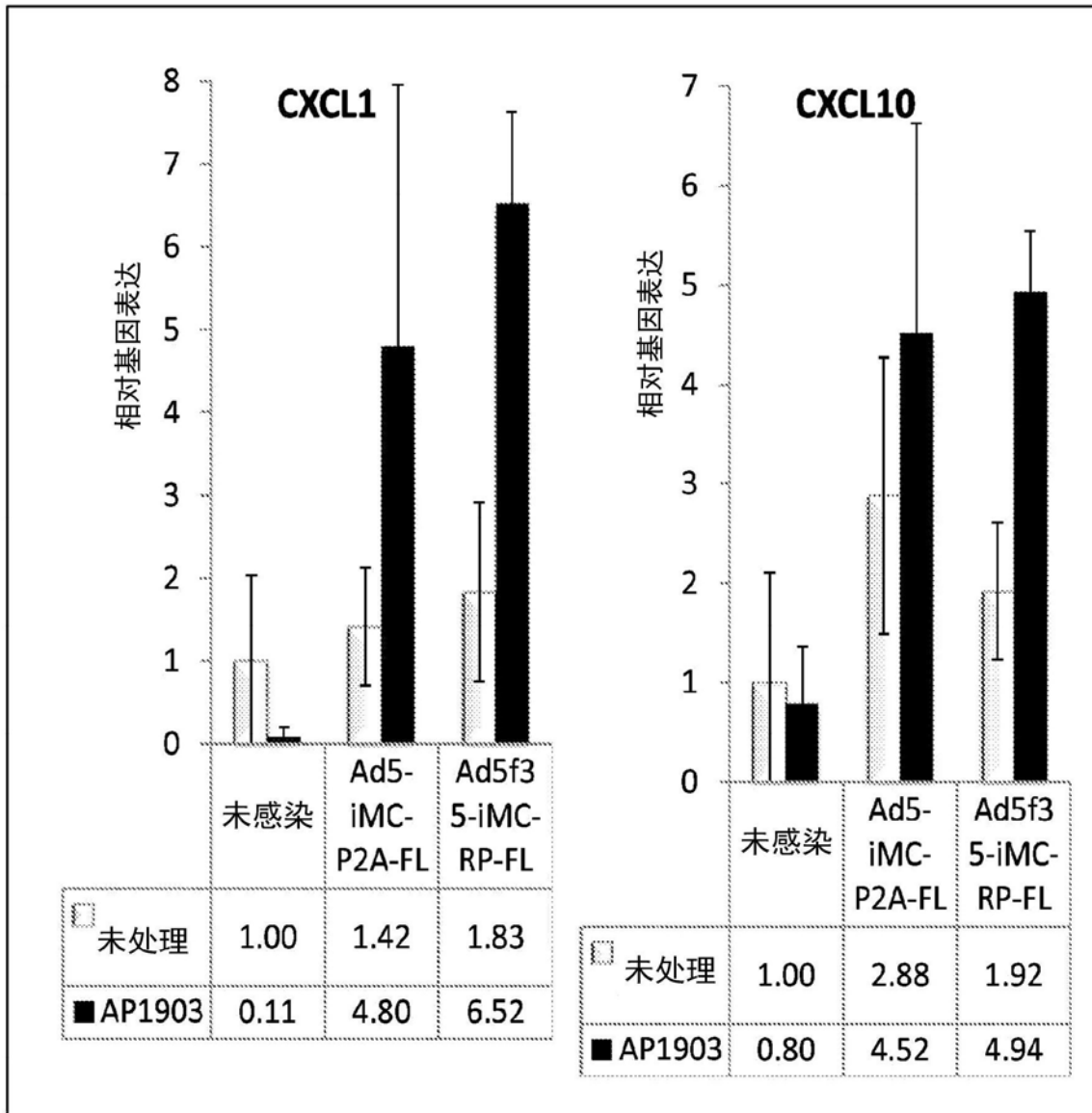


图34

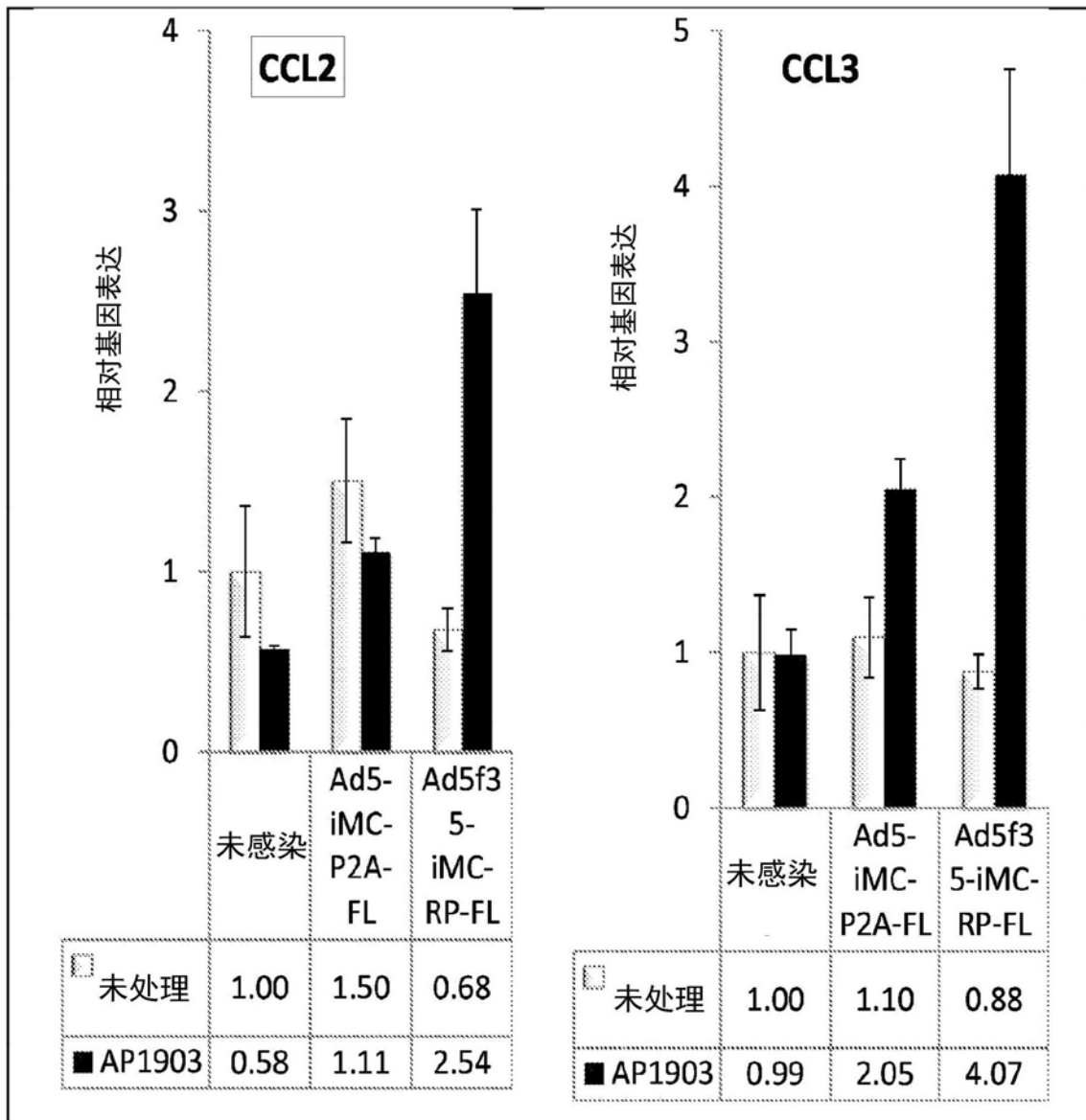


图35

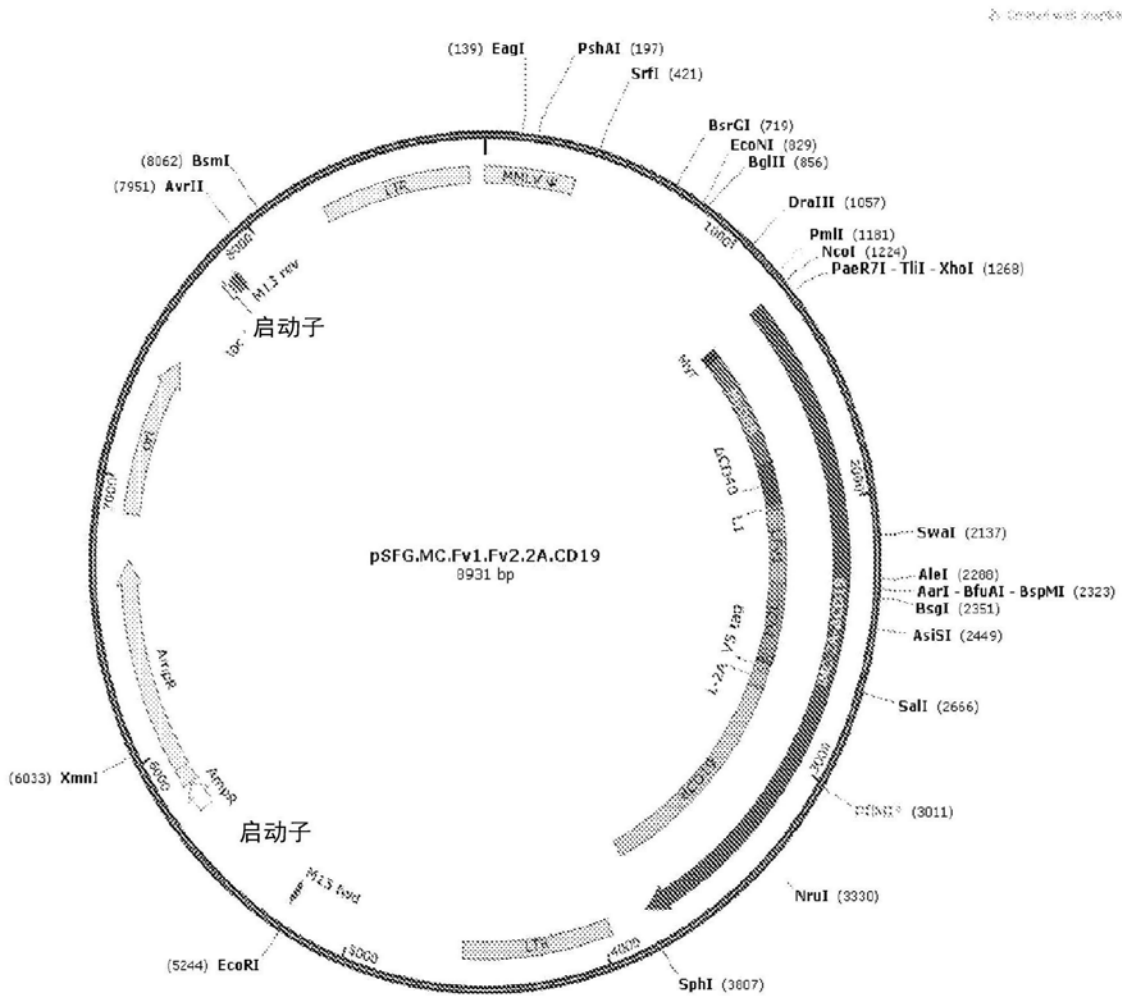


图36

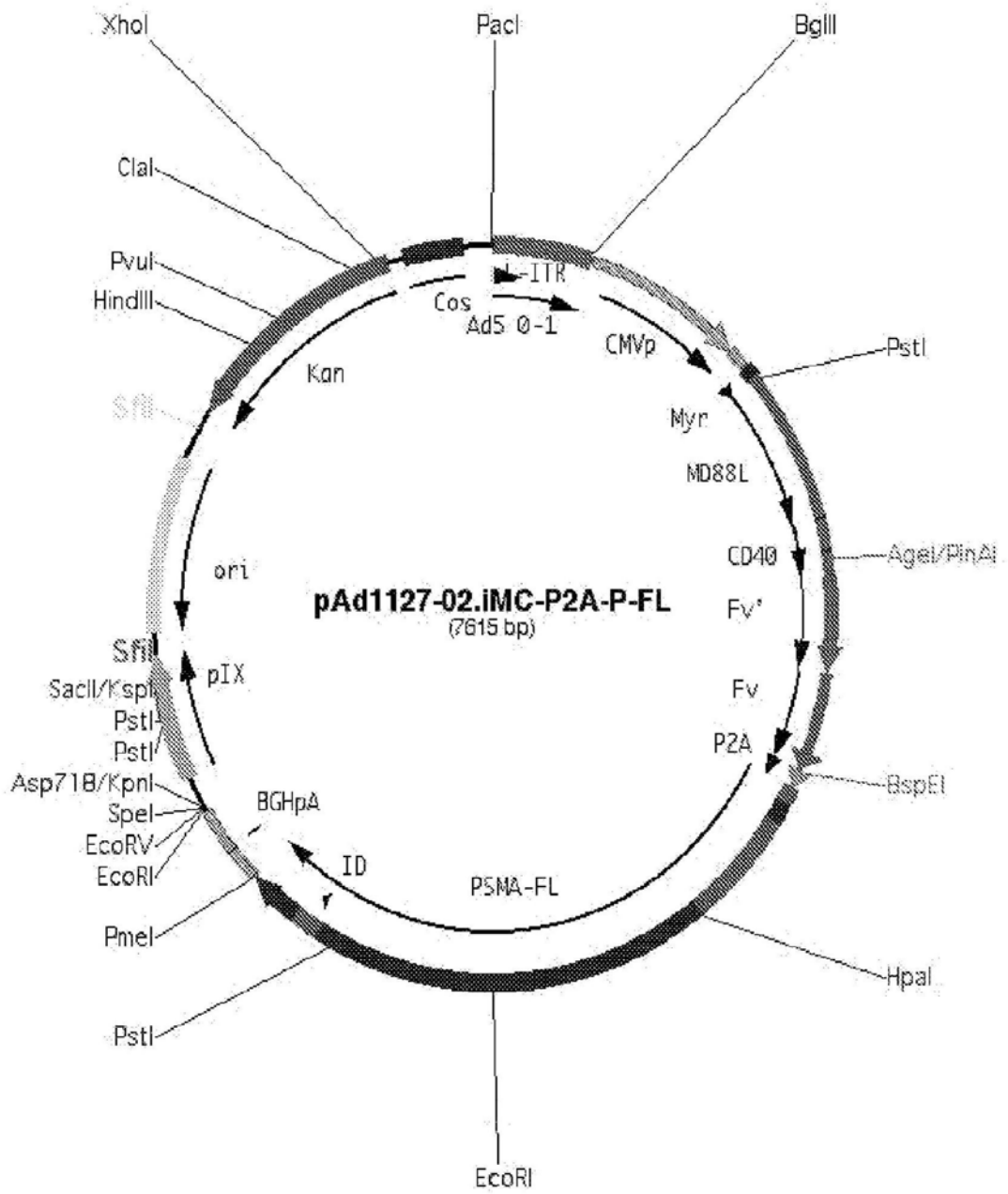


图37



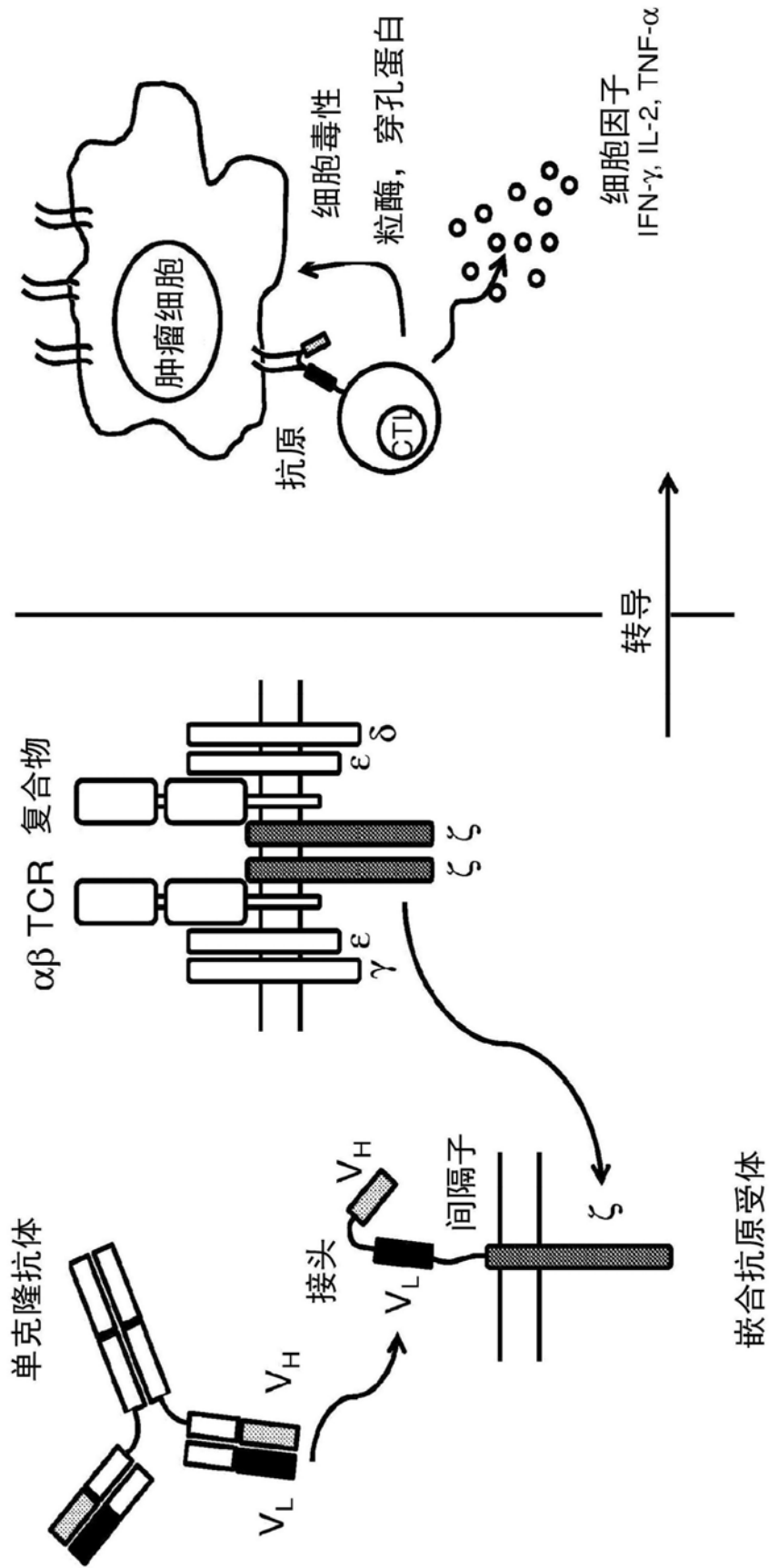


图38

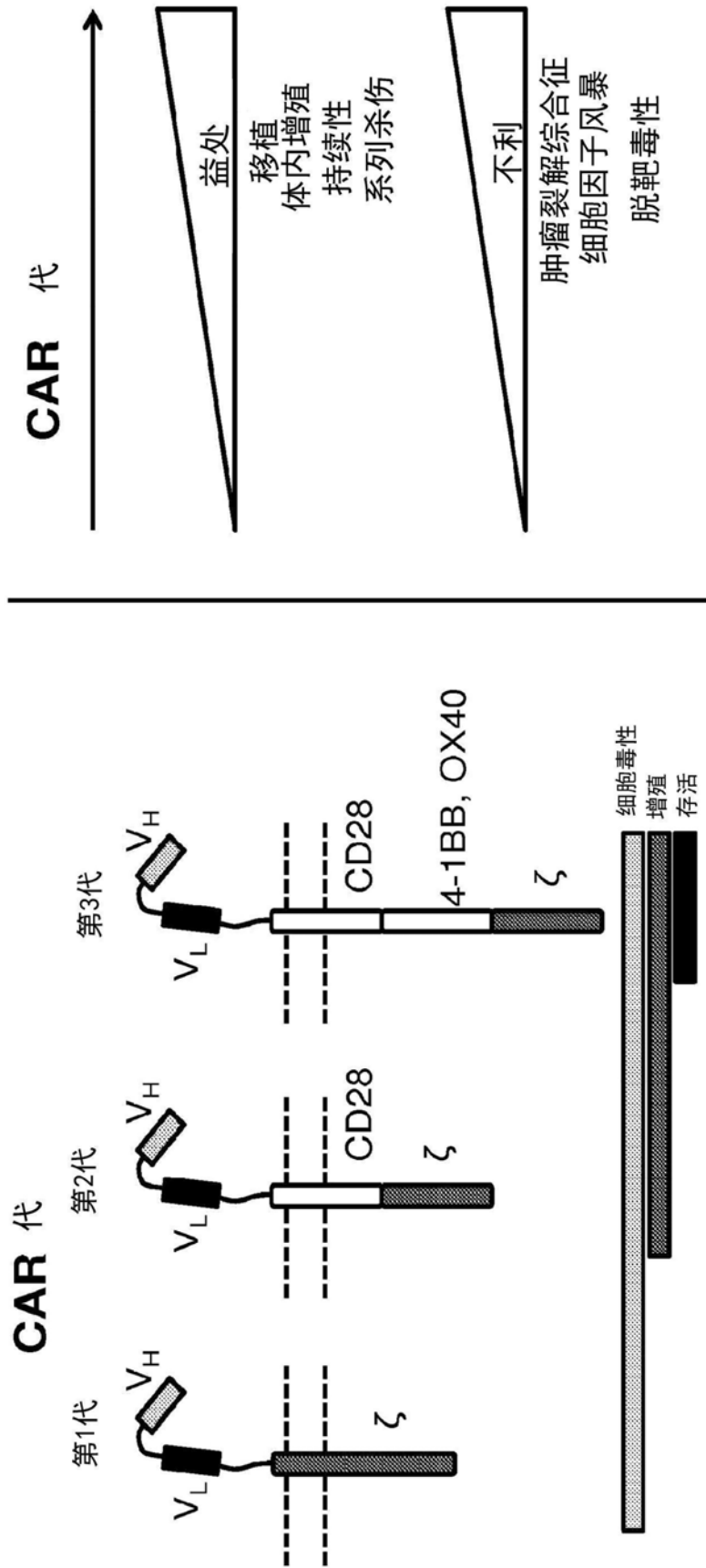
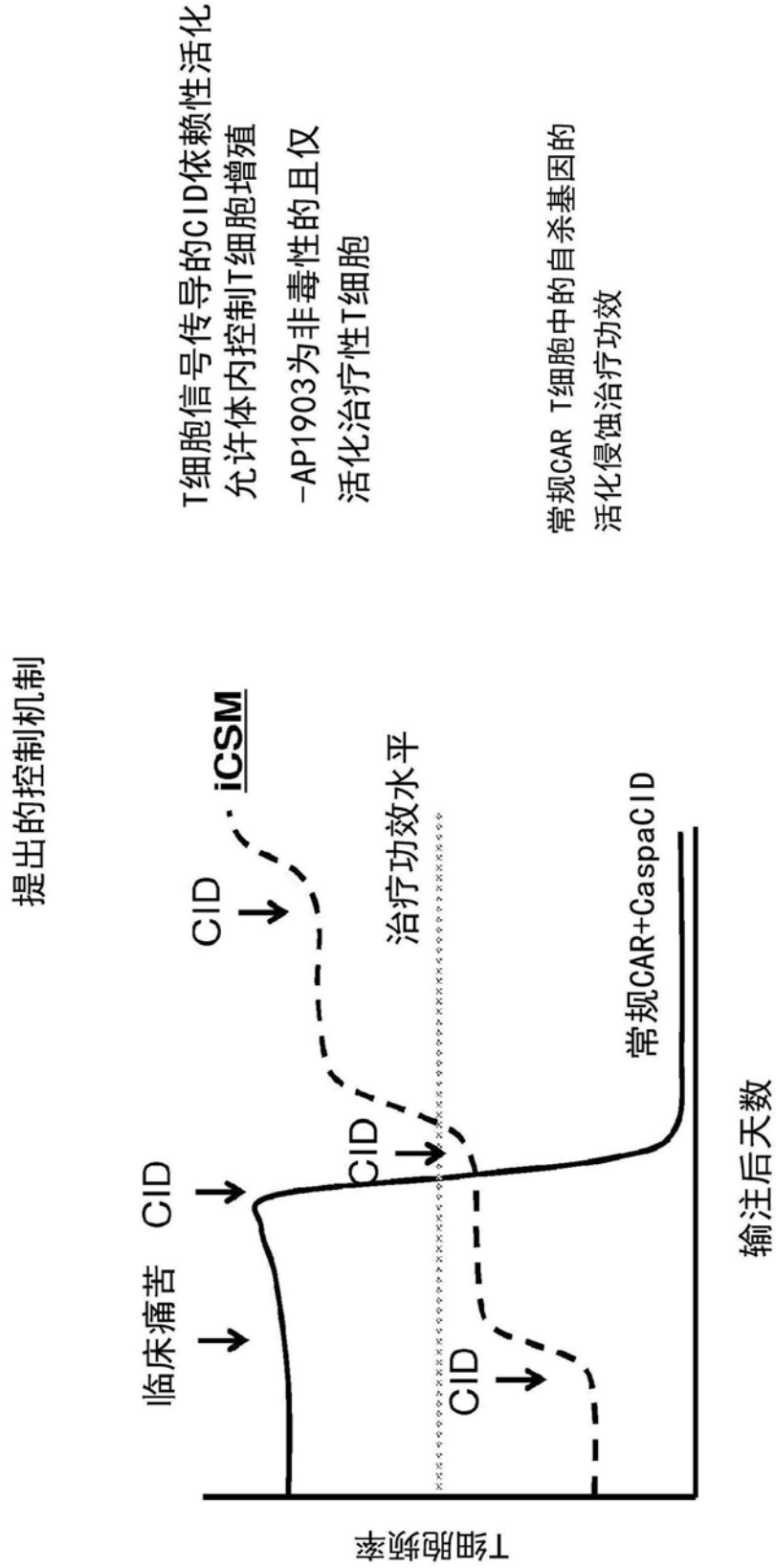


图39



T细胞信号传导的CID依赖性活化  
 允许体内控制T细胞增殖  
 -AP1903为非毒性的且仅  
 活化治疗性T细胞

常规CAR T细胞中的自杀基因的  
 活化侵蚀治疗功效

图40

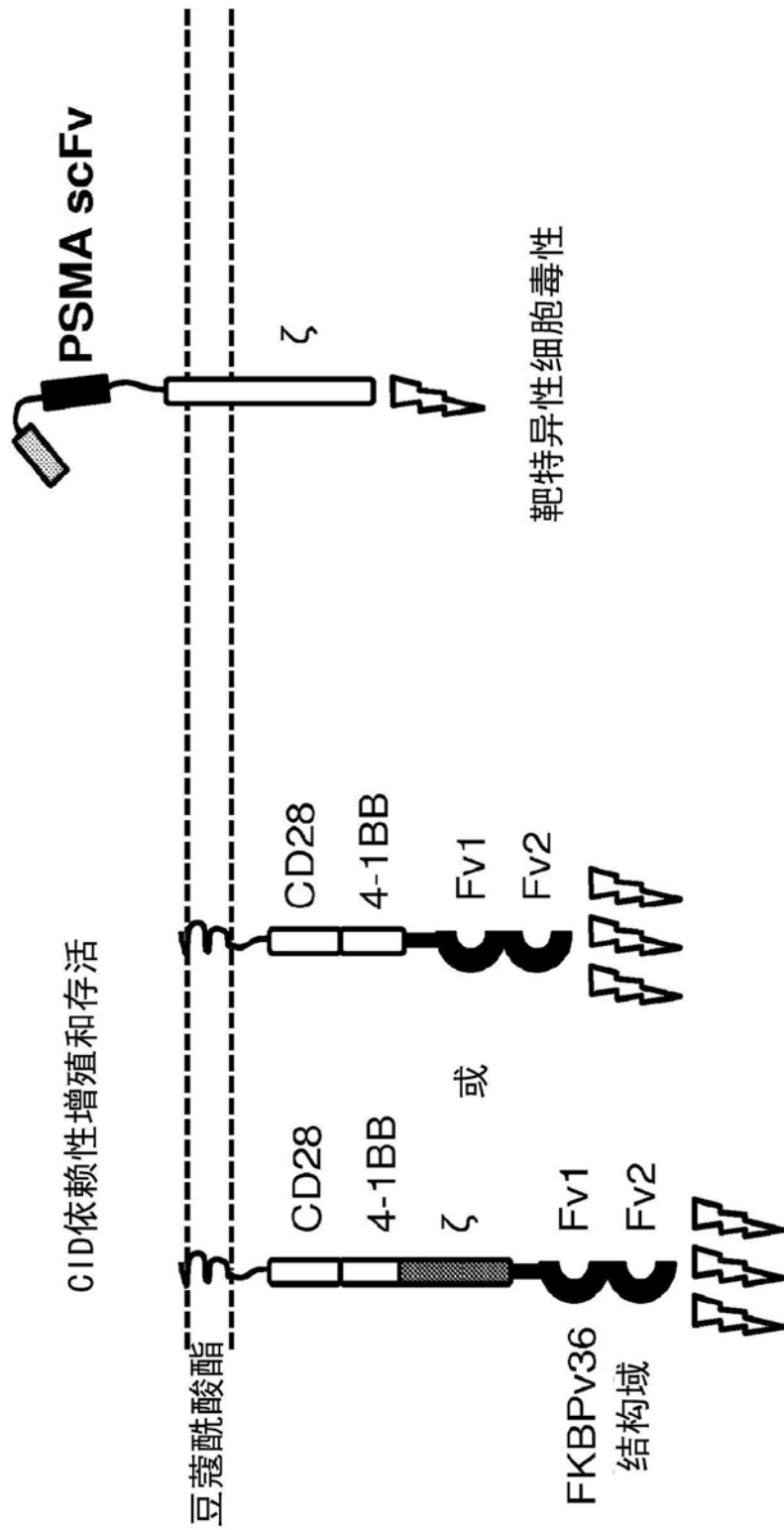


图41

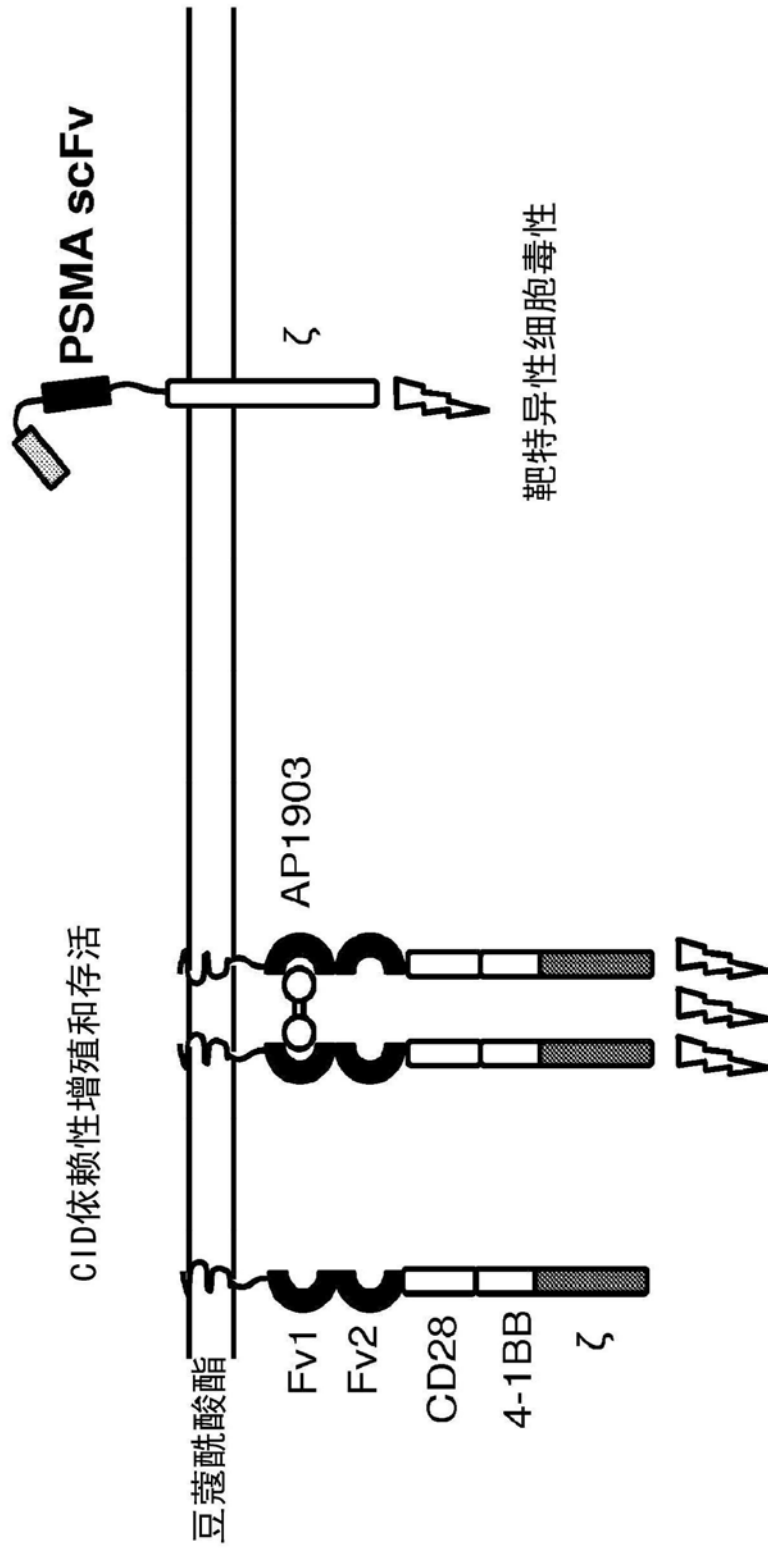


图42

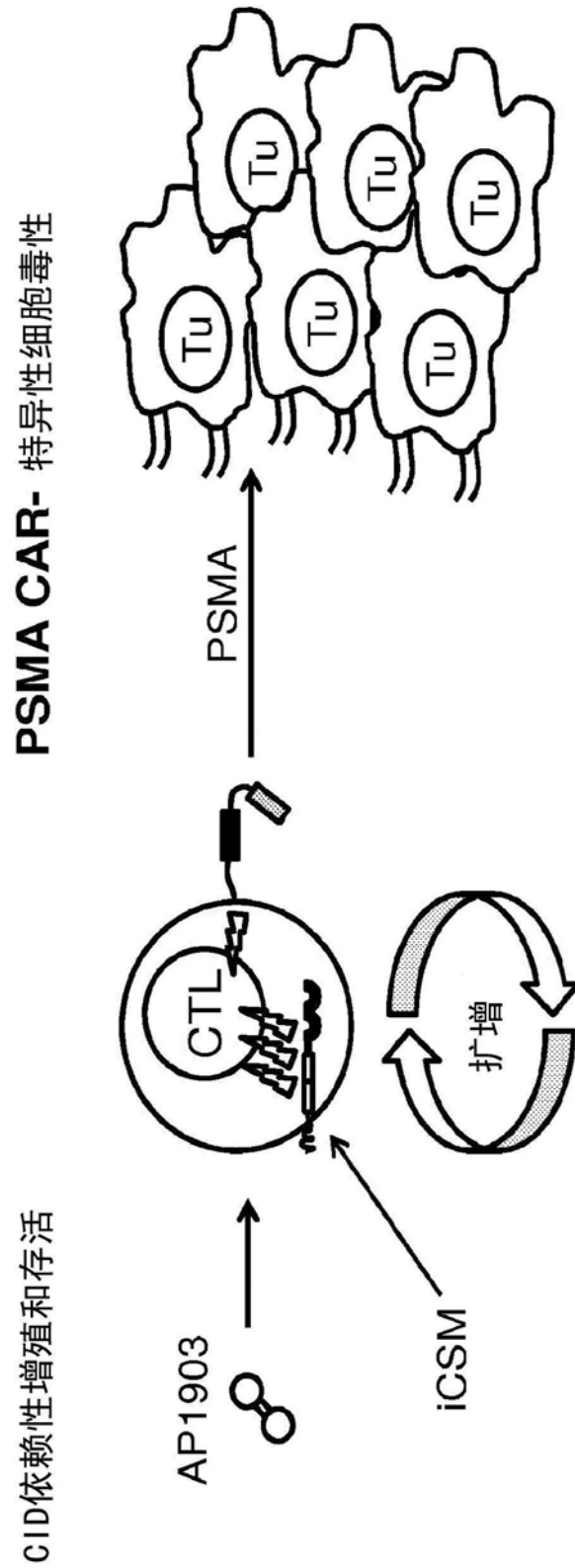


图43

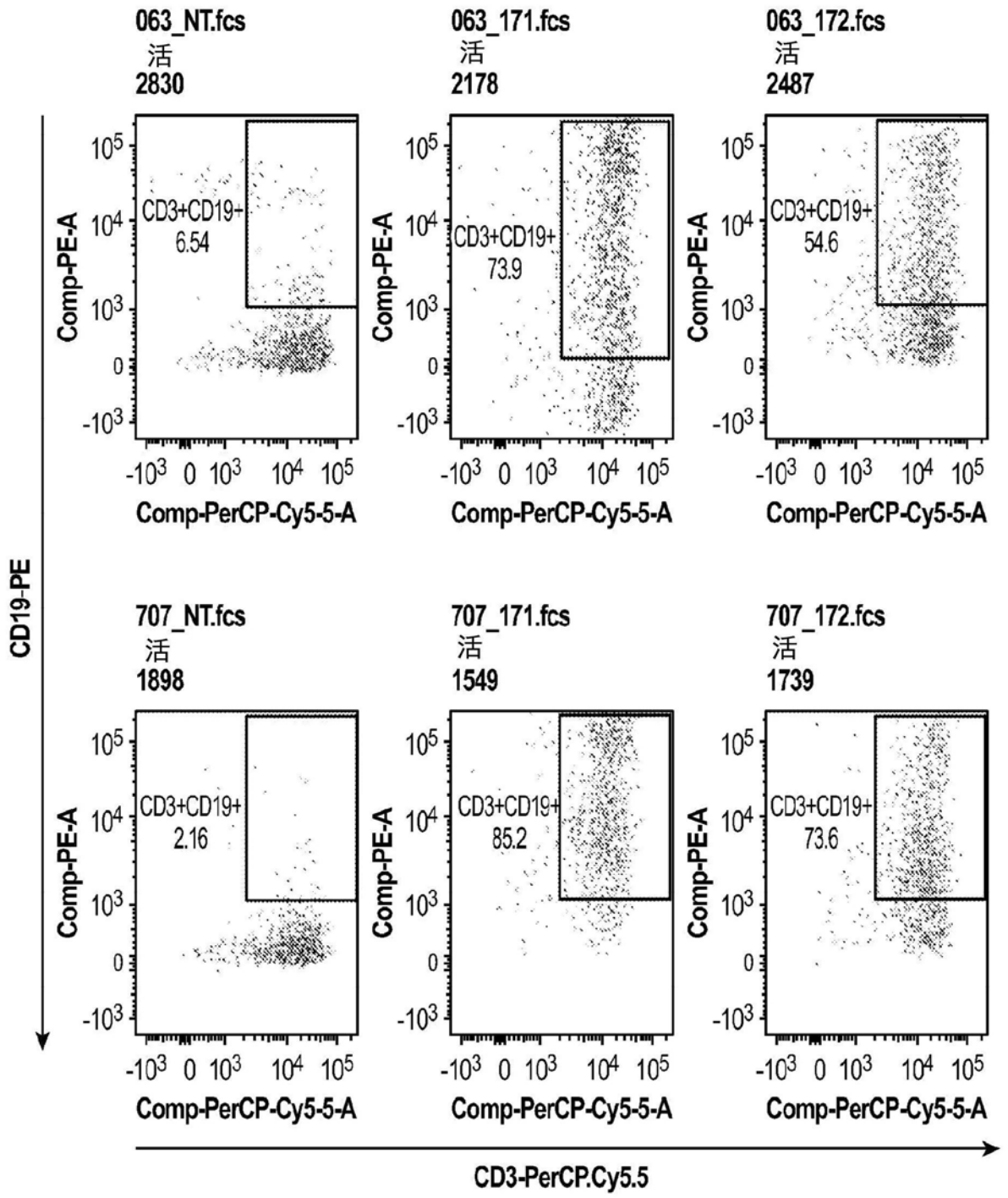


图44

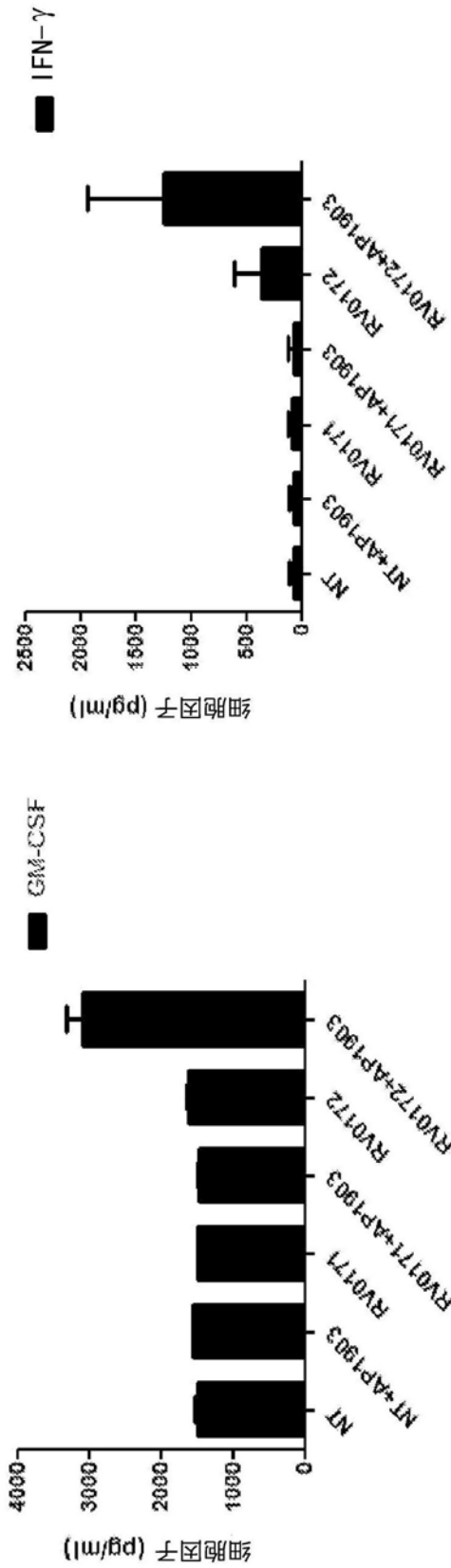


图45



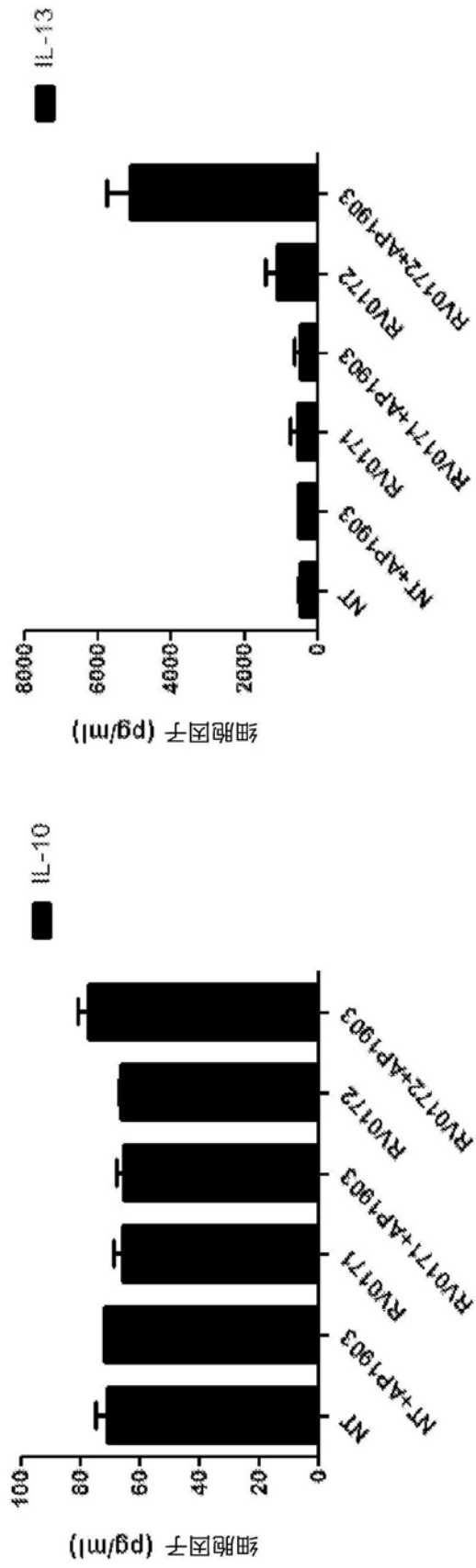


图46

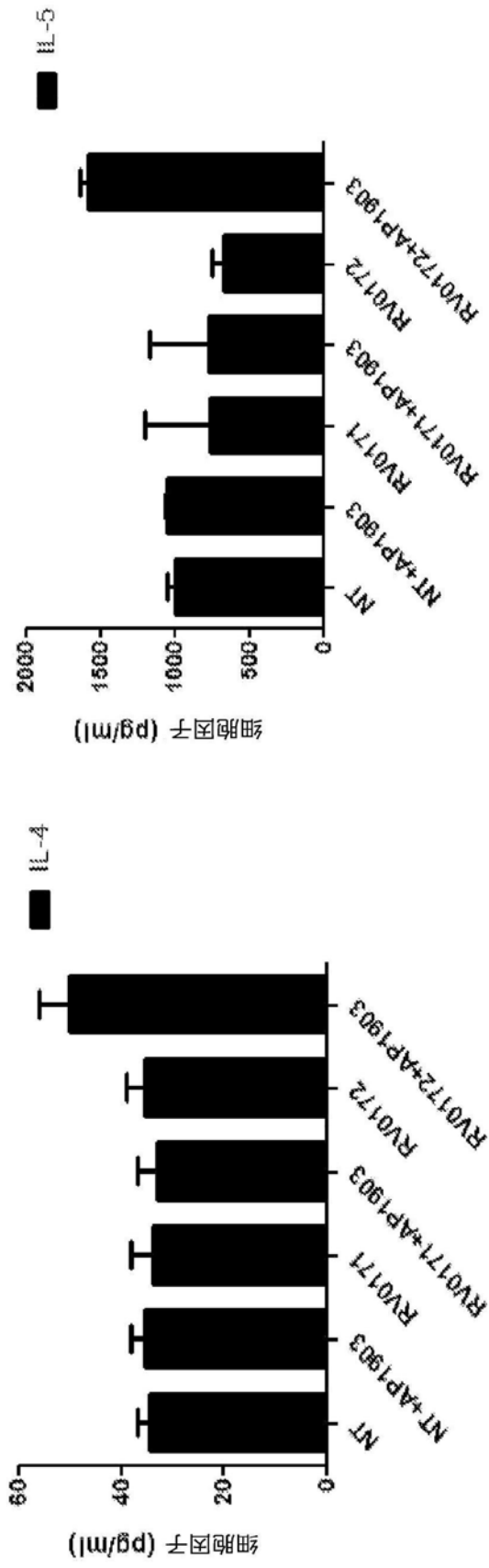


图47

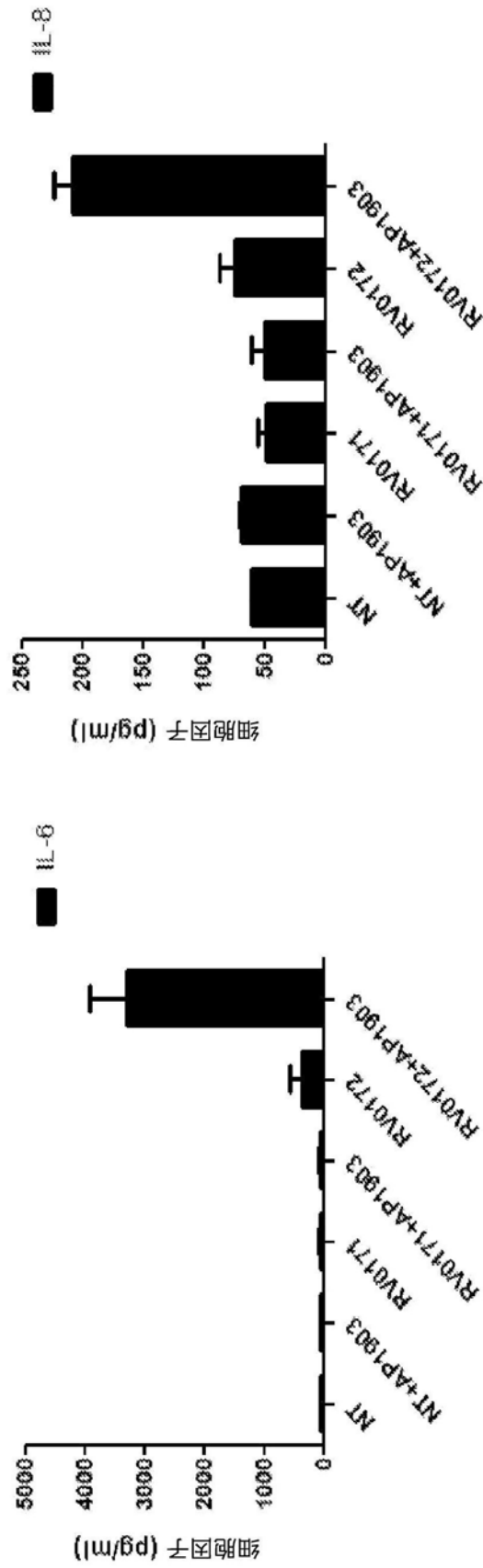


图48

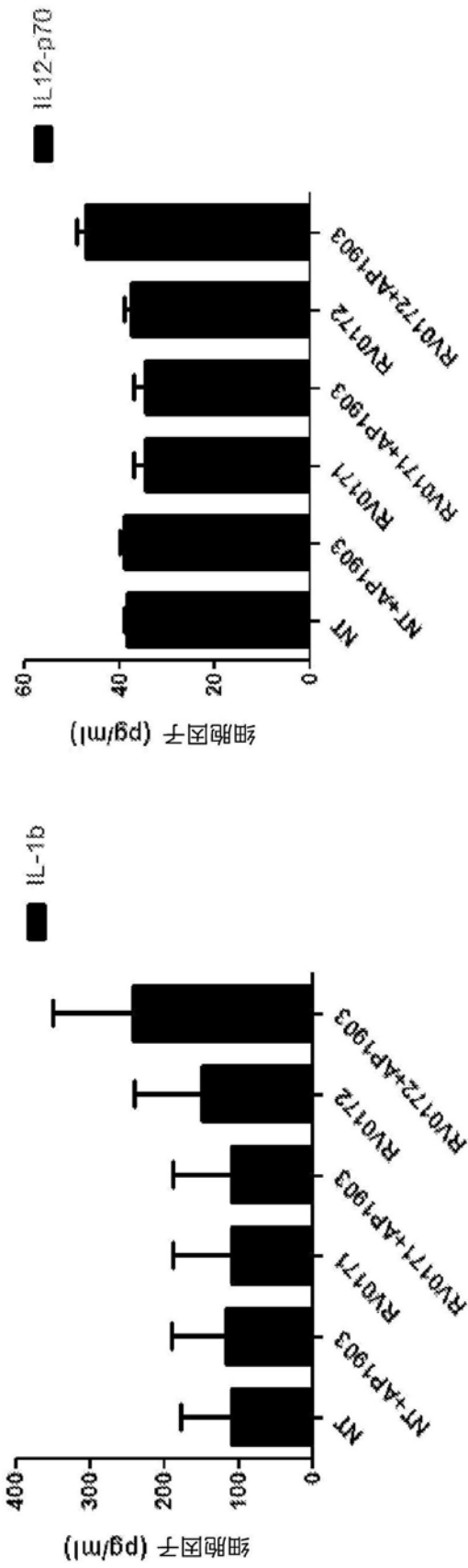


图49

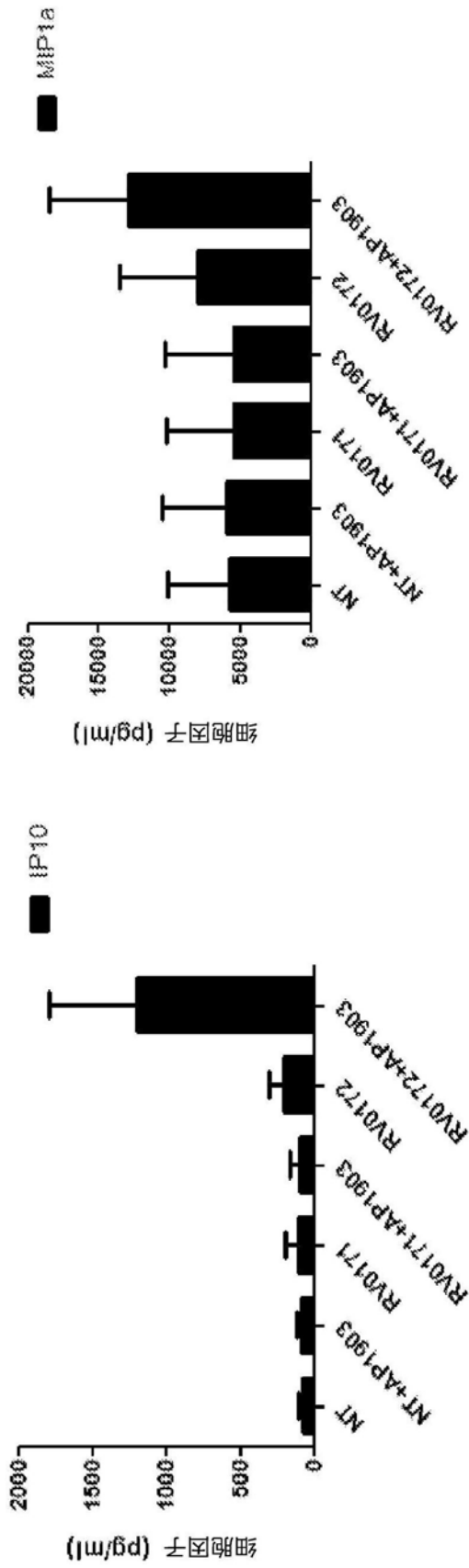


图50

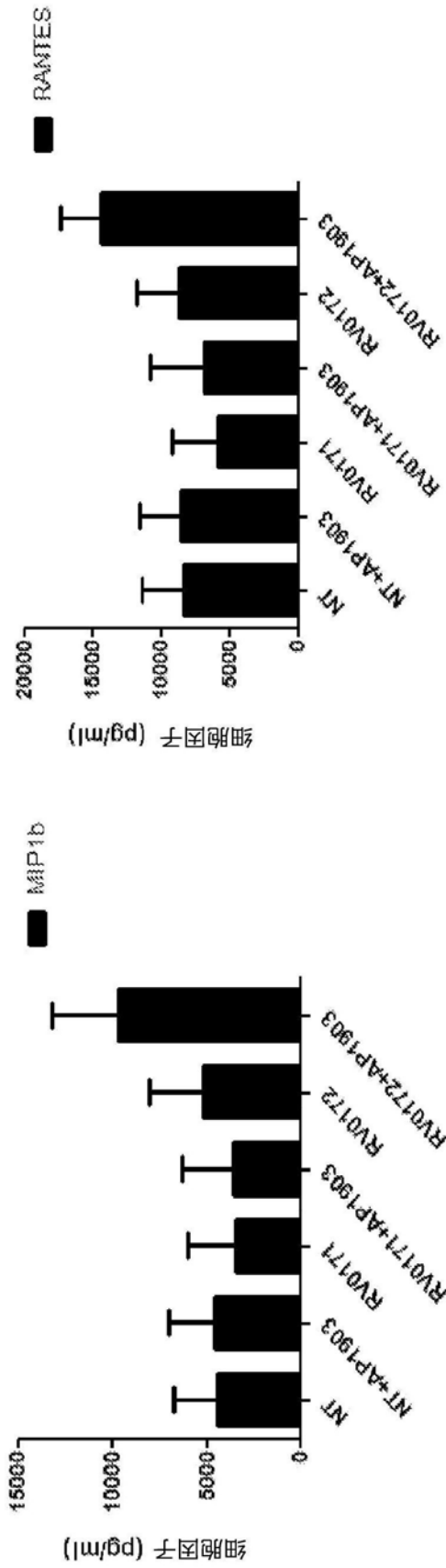


图51

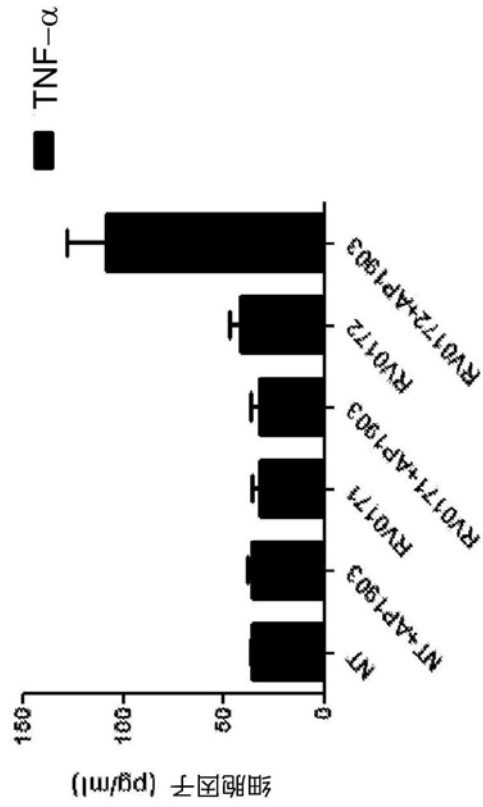


图52

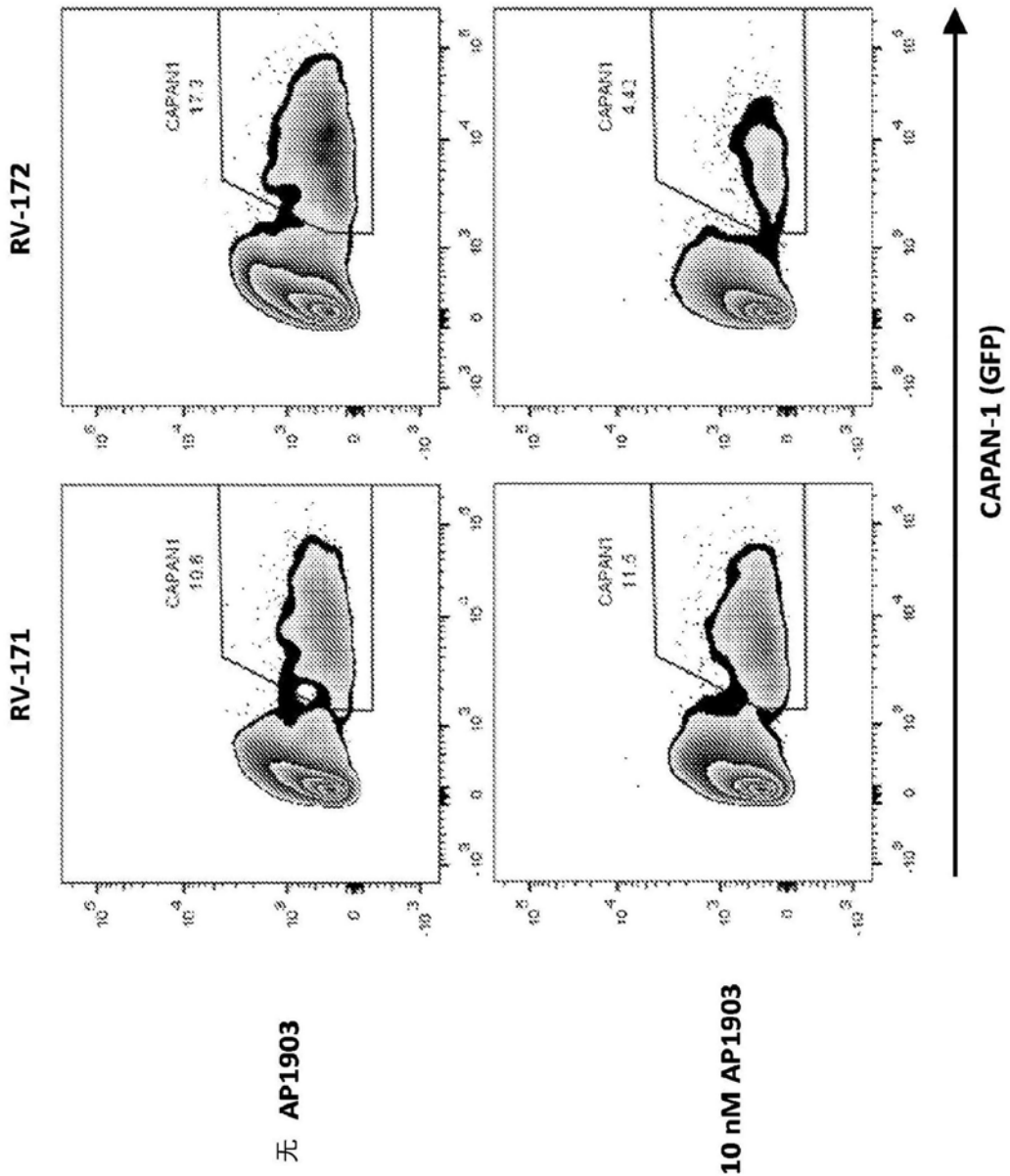


图53



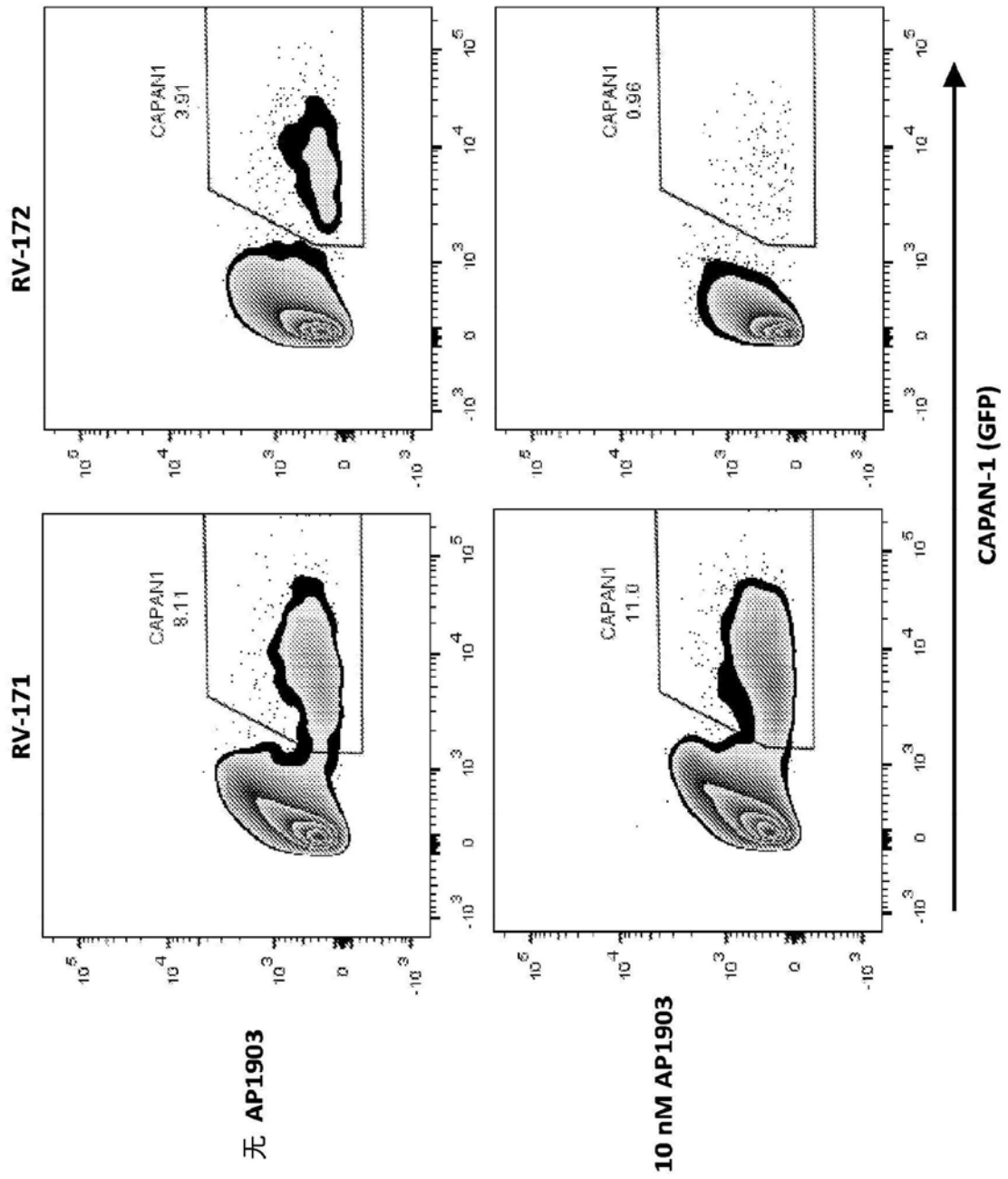


图54

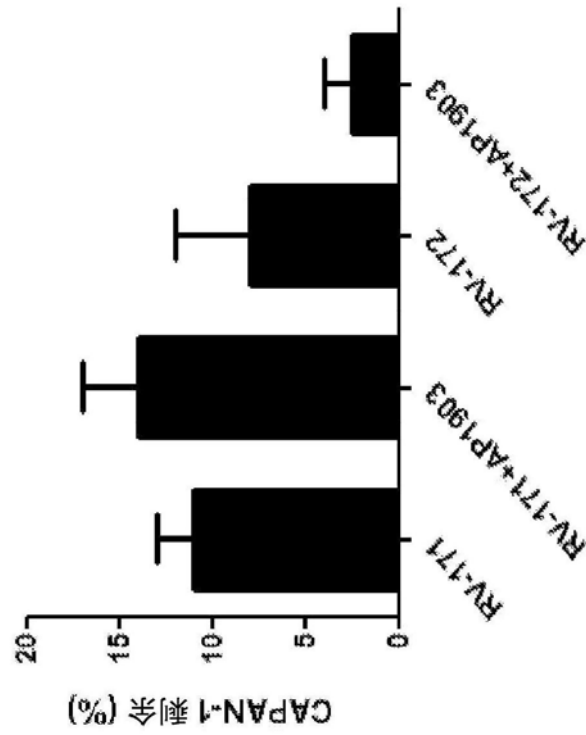


图55

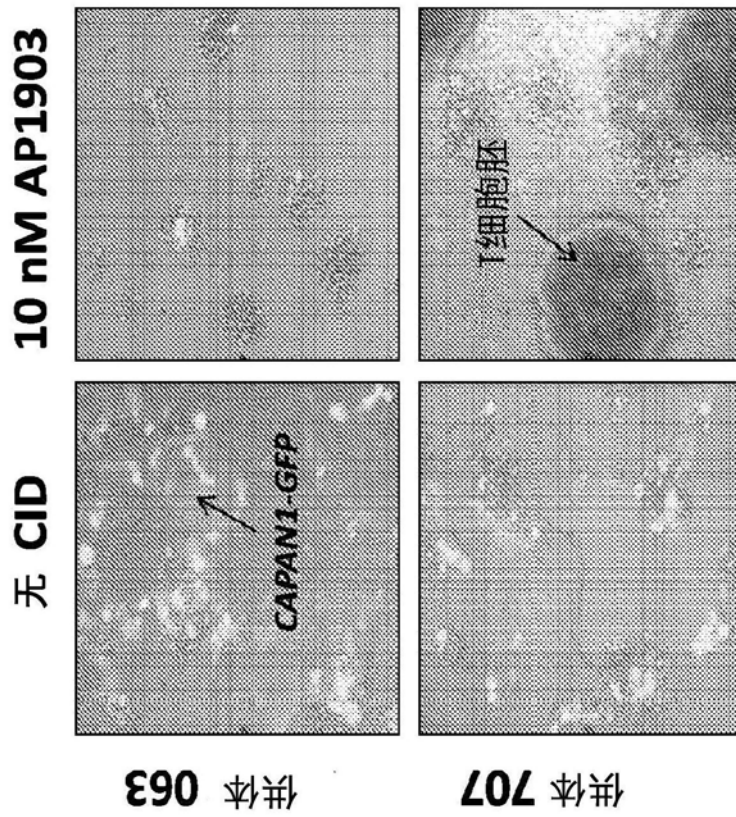


图56

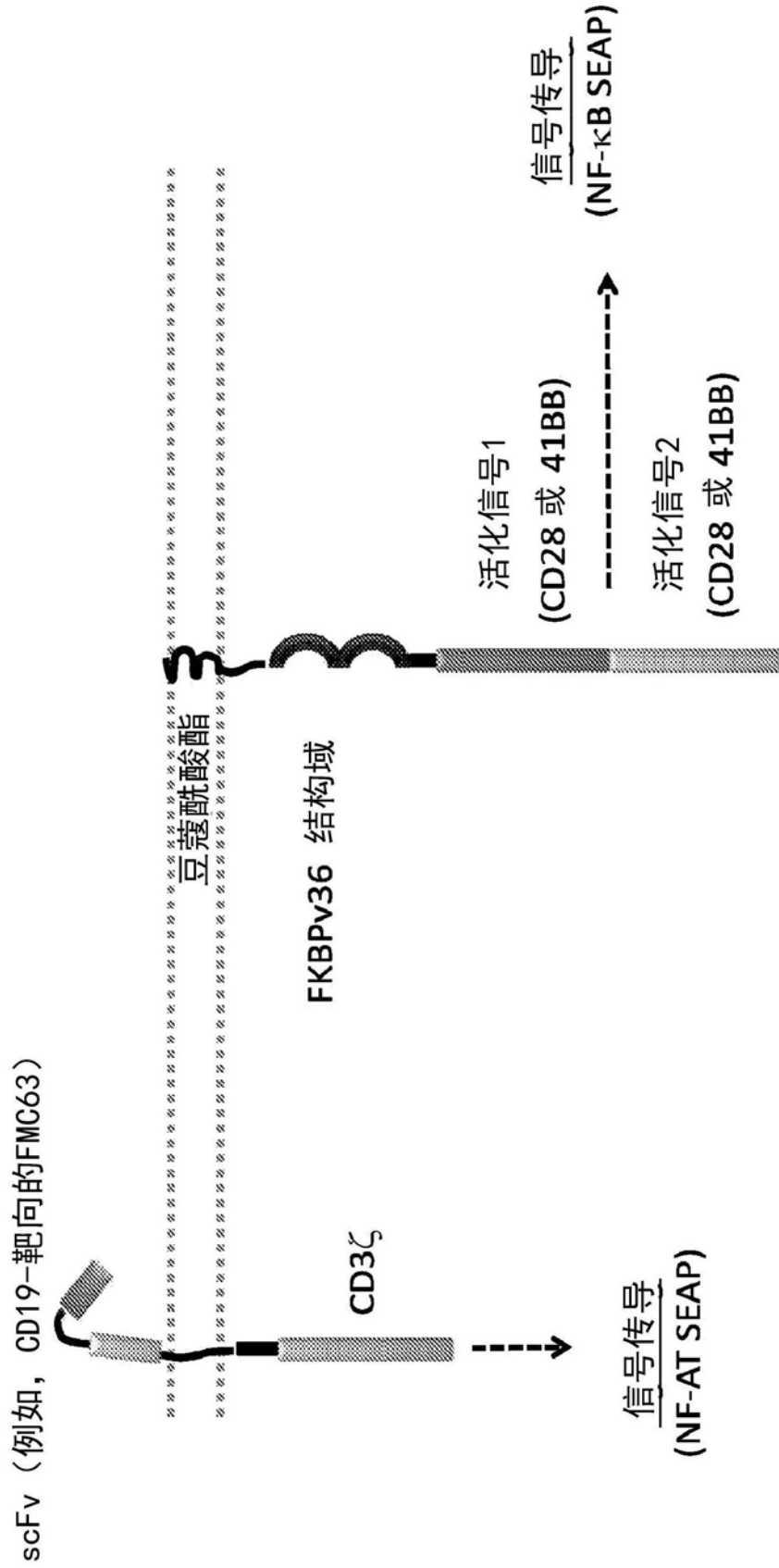


图57

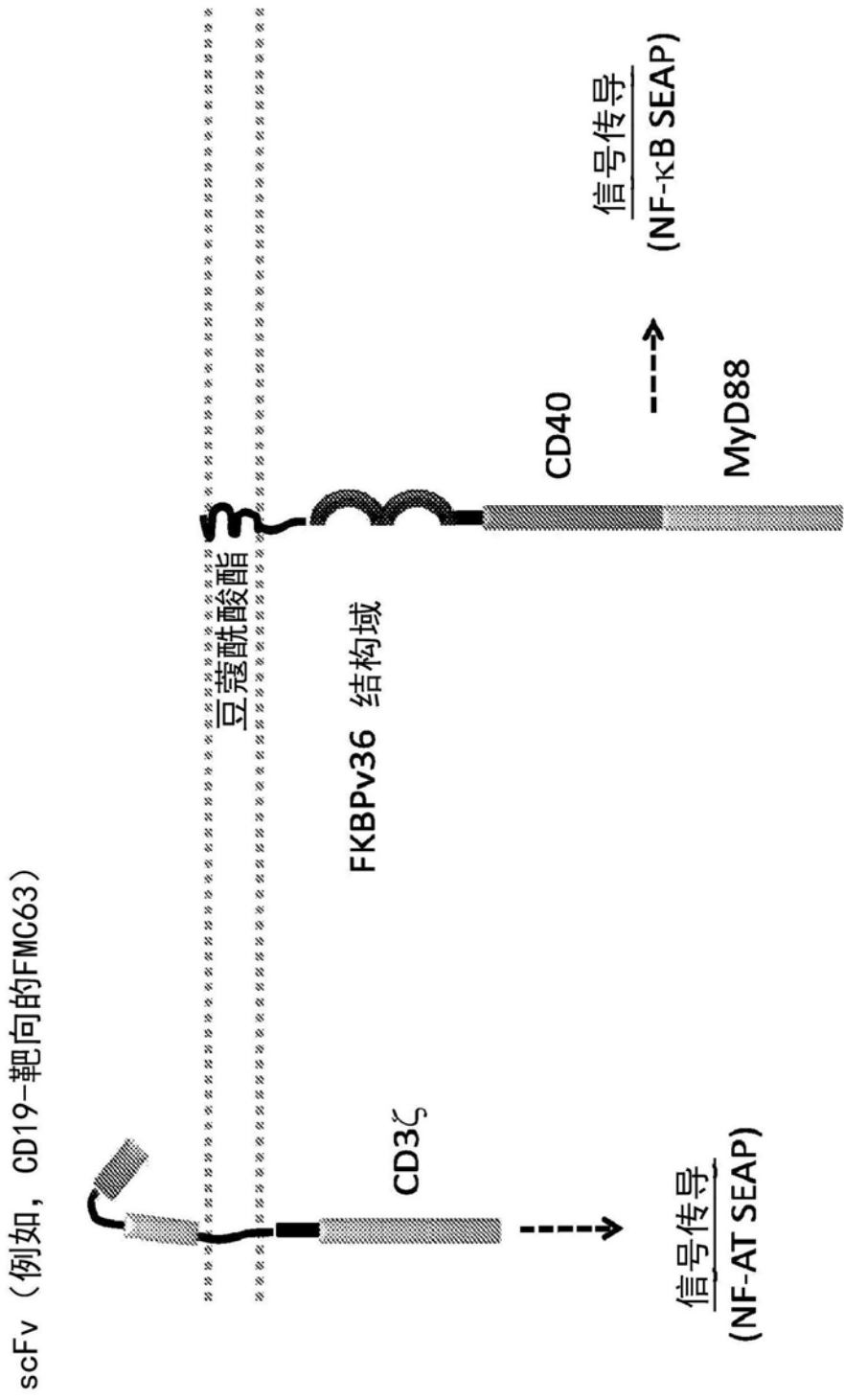


图58

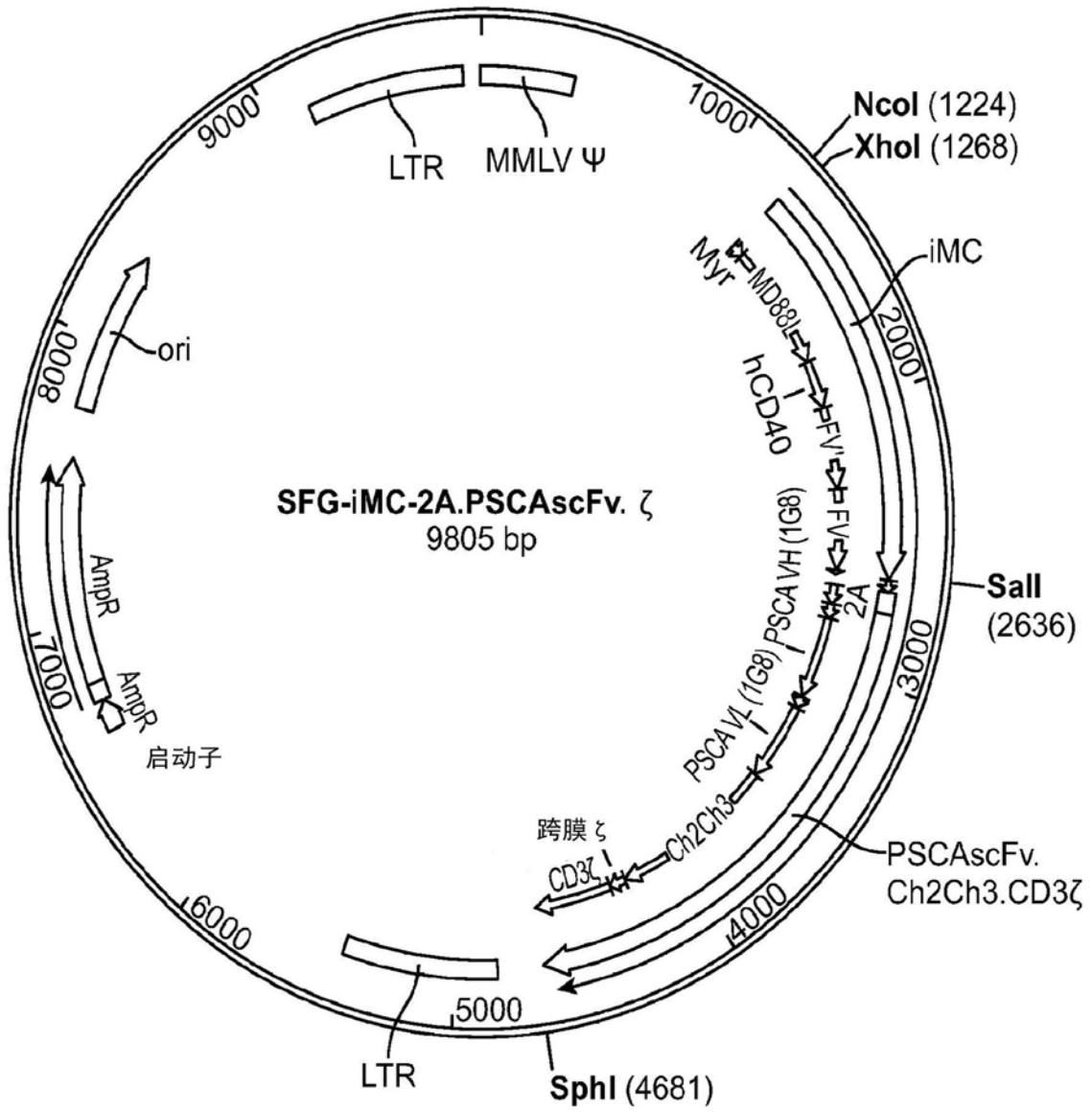


图59

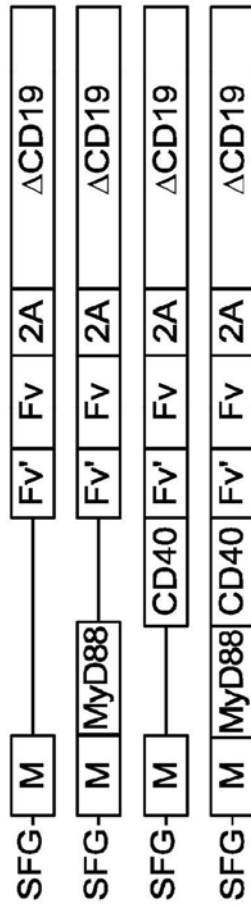


图60A

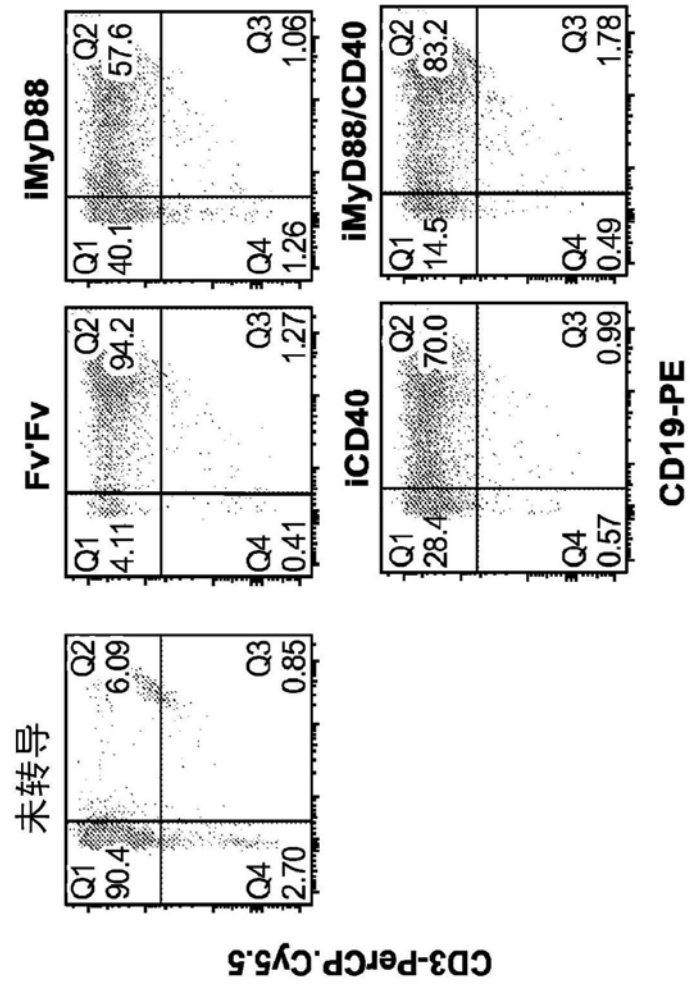


图60B

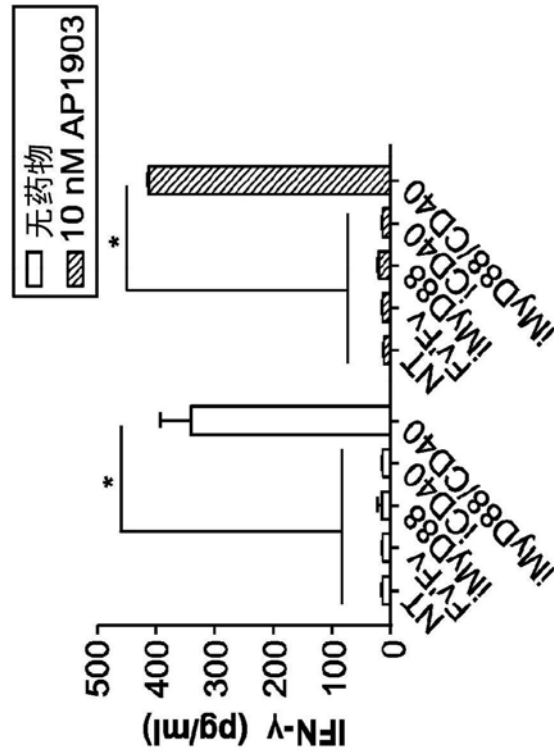


图60C

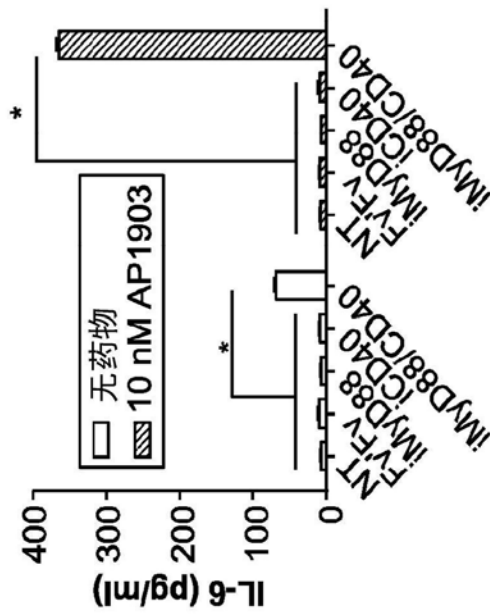


图60D





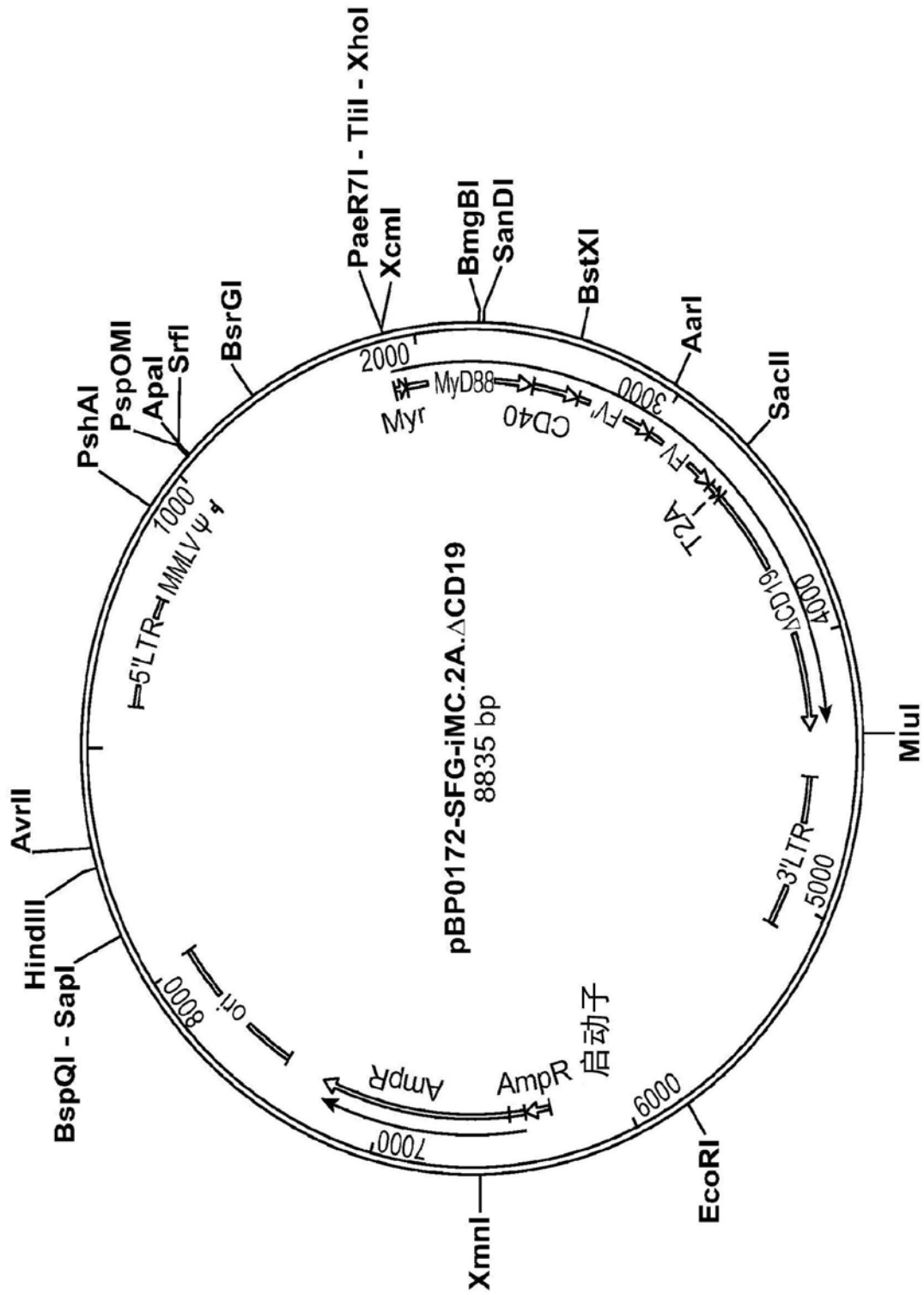


图62

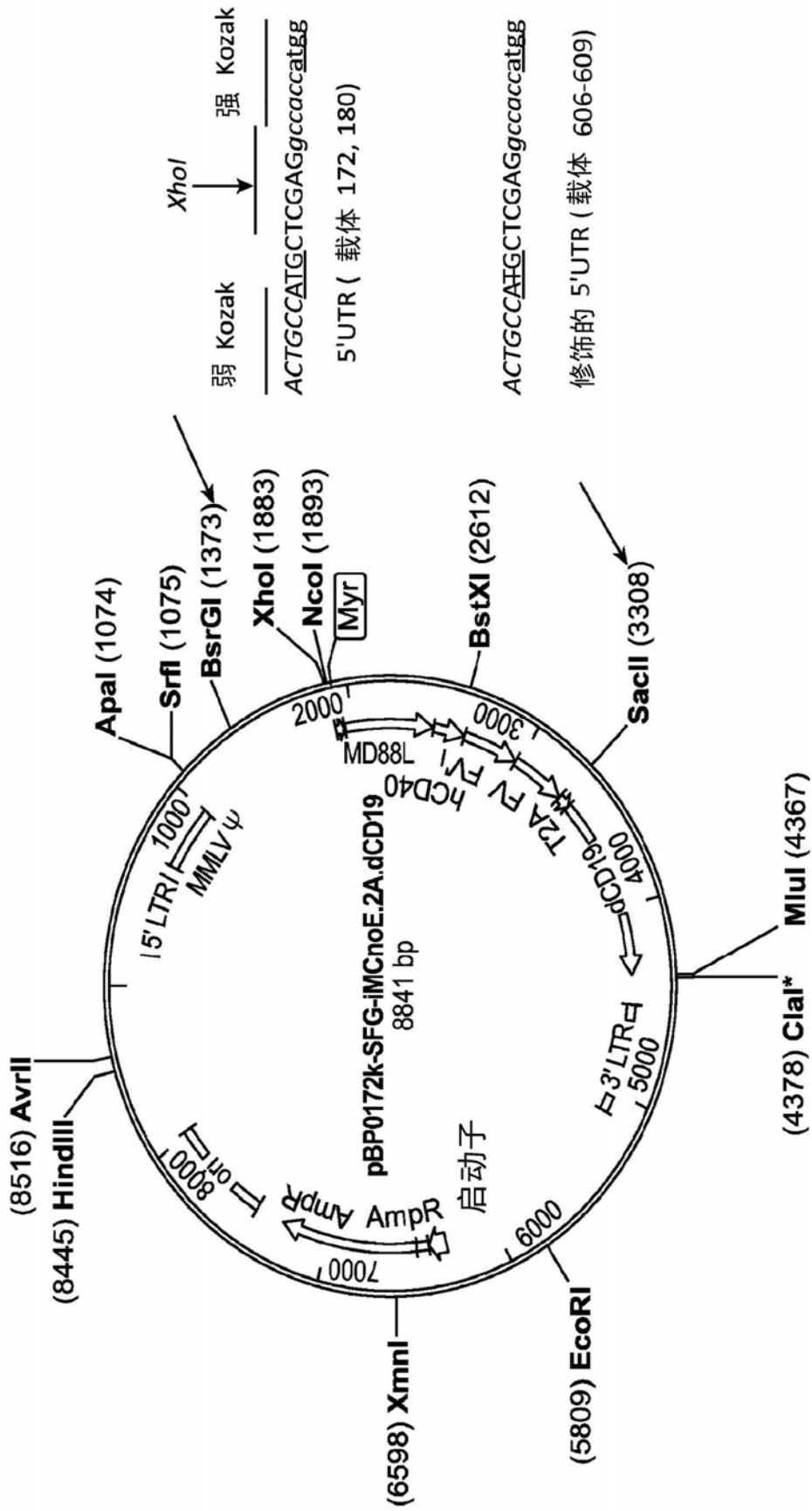


图63