



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113684185 A

(43) 申请公布日 2021. 11. 23

(21) 申请号 202110829586.2

A61P 35/00 (2006.01)

(22) 申请日 2014.02.26

A61P 35/02 (2006.01)

(30) 优先权数据

61/769,543 2013.02.26 US

(62) 分案原申请数据

201480023701.5 2014.02.26

(71) 申请人 纪念斯隆-凯特琳癌症中心

地址 美国纽约州

(72) 发明人 R·J·布伦特延斯 H·J·彼吉姆

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司

公司 11322

代理人 龙淳 周琴

(51) Int. Cl.

G12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书52页

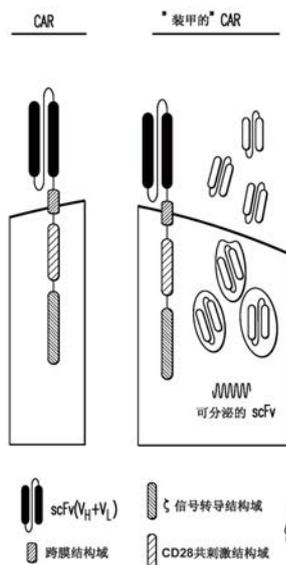
序列表34页 附图42页

(54) 发明名称

用于免疫疗法的组合物和方法

(57) 摘要

本发明提供用于增强对癌症和病原体的免疫应答的方法和组合物。其涉及具有抗原受体的免疫应答细胞,该抗原受体可以是嵌合抗原受体(CAR),该免疫应答细胞表达导入的对于免疫调节分子的配体。在具体实施方式中,基因工程化的免疫应答细胞为抗原导向的且耐受免疫抑制和/或具有增强的免疫激活特性。



装甲的CAR: 修饰成单独表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞在不友好的肿瘤微环境内会受到抑制。进一步修饰这些细胞以表达可分泌的scFv(例如, PD-1、PD-L1、CTLA-4或CD47阻断), 由于其调节肿瘤微环境并耐受抑制因子的能力而具有提高的抗肿瘤功能。

1. 一种分离的免疫应答细胞,其包含:
 - 1) 抗原识别受体,所述抗原识别受体为嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)且与第一抗原结合,其中所述受体与所述第一抗原的结合能够激活所述免疫应答细胞,和
 - 2) 可溶性单链可变片段(scFv),所述可溶性单链可变片段与具有免疫抑制活性或免疫刺激活性的多肽结合。
2. 根据权利要求1所述的免疫应答细胞,其中所述抗原包含肿瘤或病原体抗原。
3. 根据权利要求1所述的免疫应答细胞,其中所述可溶性scFv由所述细胞分泌。
4. 根据权利要求1-3中任一项所述的免疫应答细胞,其中:
 - (a) 所述抗原识别受体是外源性的;
 - (b) 所述抗原识别受体是内源性的;或
 - (c) 所述抗原识别受体是重组表达的。
5. 根据权利要求1-4中任一项所述的免疫应答细胞,其中所述抗原识别受体由载体表达和/或其中所述scFv由载体表达。
6. 根据权利要求1-5中任一项所述的免疫应答细胞,其中所述细胞的类型选自T细胞、自然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、调节性T细胞、和可分化出淋巴样细胞的多能干细胞。
7. 根据权利要求1-6中任一项所述的免疫应答细胞,其中所述抗原是选自CD19、MUC16、MUC1、CA1X、CEA、CDS、CD7、CD10、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD49f、CD56、CD74、CD133、CD138、巨细胞病毒(CMV)感染细胞抗原、EGP-2、EGP-40、EpCAM、erb-B2, 3,4、FBP、胎儿乙酰胆碱受体、叶酸受体-a、GD2、GD3、HER-2、hTERT、IL-13R-a2、K-轻链、KDR、LeY、L1细胞粘附分子、MAGE-A1、间皮素、NKG2D配体、NY-ES0-1、癌胚抗原(h5T4)、PSCA、PSMA、ROR1、TAG-72、VEGF-R2和WT-1的肿瘤抗原。
8. 根据权利要求1-7中任一项所述的免疫应答细胞,其中所述多肽具有免疫抑制活性且选自CD47多肽及其配体、PD-1多肽及其配体、CTLA-4多肽及其配体,及其组合。
9. 根据权利要求1-7中任一项所述的免疫应答细胞,其中所述多肽具有免疫刺激活性且选自CD28多肽及其配体、OX-40多肽及其配体、4-1BB多肽及其配体,及其组合。
10. 根据权利要求1-9中任一项所述的免疫应答细胞,其中所述抗原是CD19或MUC16。
11. 根据权利要求1-10中任一项所述的免疫应答细胞,其中所述抗原识别受体的胞内信号转导结构域是CD3 ξ -链CD97、CD11a-CD18、CD2、ICOS、CD27、CD154、CDS、OX40、4-1BB、CD28的胞内信号转导结构域或其组合。
12. 根据权利要求1-11中任一项所述的免疫应答细胞,其中所述抗原识别受体包含嵌合抗原受体。
13. 根据权利要求1-12中任一项所述的免疫应答细胞,其中所述抗原是CD19。
14. 根据权利要求1-13中任一项所述的免疫应答细胞,其中所述抗原识别受体是1928z。
15. 根据权利要求1-12中任一项所述的免疫应答细胞,其中所述抗原是MUC16。
16. 根据权利要求1-12和15中任一项所述的免疫应答细胞,其中所述抗原识别受体是4H1128z。
17. 根据权利要求1-16中任一项所述的免疫应答细胞,其中所述可溶性scFv提高所述

免疫应答细胞的免疫应答。

18. 根据权利要求1-17中任一项所述的免疫应答细胞,其中所述免疫应答细胞是T细胞。

19. 根据权利要求1-18中任一项所述的免疫应答细胞用于在具有瘤形成的受试者中降低肿瘤负荷和/或大小、或用于提高具有瘤形成的受试者的存活的用途。

20. 根据权利要求19所述的免疫应答细胞的用途,其中所述瘤形成选自血癌、B细胞白血病、多发性骨髓瘤、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病、非霍奇金氏淋巴瘤和卵巢癌。

21. 根据权利要求19或20所述的免疫应答细胞的用途,其中所述细胞对所述受试者是自体的。

22. 用于产生根据权利要求1-18中任一项所述的免疫应答细胞的方法,所述方法包括:向抗原特异性细胞中导入核酸,所述核酸包含编码与具有免疫抑制活性或免疫刺激活性的多肽结合的单链可变片段(scFv)的序列。

23. 一种载体,其包含(a)编码抗原识别受体的核酸序列,所述抗原识别受体为嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)且与第一抗原结合,和(b)编码可溶性单链可变片段(scFv)的核酸序列,所述可溶性单链可变片段与具有免疫抑制活性或免疫刺激活性的多肽结合。

24. 一种药物组合物,其包含在药学可接受的赋形剂中的有效量的根据权利要求1-18中任一项所述的免疫应答细胞。

用于免疫疗法的组合物和方法

[0001] 本申请是2015年10月26日提交到中华人民共和国国家知识产权局的发明名称为“用于免疫疗法的组合物和方法”、申请号为“201480023701.5”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 优先权声明

[0003] 本申请要求2013年2月26日提交的美国临时申请第61/769,543号优先权,其内容通过引用的方式全部并入本文。

[0004] 资助信息

[0005] 本申请在美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)提供的基金CA95152、CA138738、CA059350和CA08748下由政府支持而完成。政府对本发明具有某些权利。

发明领域

[0006] 本发明提供用于提高对于癌症和病原体的免疫应答的方法和组合物。其涉及具有抗原受体的免疫应答细胞,该抗原受体可以是嵌合抗原受体(CAR),该免疫应答细胞表达导入的用于免疫调节分子的配体。在具体实施方式中,基因工程化的免疫应答细胞是抗原导向的,耐受免疫抑制,并且/或者具有提高的免疫激活特性。

背景技术

[0007] 尽管目前可提供多种疗法,但大多数成人B-细胞恶性肿瘤,包括急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病和非霍奇金氏淋巴瘤是不可治愈的。使用基因改造的自体T细胞的过继疗法(adoptive therapy)已经在黑色素瘤和惰性B细胞恶性肿瘤中表现出有治疗效能的证据。通过导入编码对这些抗原特异的称作嵌合抗原受体(CAR)的人工T-细胞受体的基因,T细胞可以修饰成靶向肿瘤相关的抗原。免疫疗法是具有提供癌症治疗的潜力的靶向疗法。

[0008] 但是,恶性细胞经适应而产生免疫抑制性微环境,以保护自身免于免疫识别和消除。这种“敌对的”肿瘤微环境对涉及刺激免疫应答的治疗方法例如靶向T细胞疗法提出挑战。因此,迫切需要有益于治疗瘤形成的新的治疗策略。

发明内容

[0009] 总的来说,本发明提供免疫应答细胞(例如,T细胞、自然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)和调节性T细胞),其表达具有免疫细胞激活活性的抗原结合受体(例如,CAR或TCR)以及与具有免疫抑制活性的抗原(例如,CD47、PD-1、CTLA-4及其配体)结合的单链可变片段(scFv),从而降低或消除抗原的免疫抑制活性。

[0010] 本发明还提供免疫应答细胞(例如,T细胞、自然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)和调节性T细胞),其表达具有免疫细胞激活活性的抗原结合受体(例如,CAR或TCR)以及与具有免疫刺激活性或促炎活性的抗原(例如,CD28、OX-40、4-1BB、CD40及其配

体)结合的单链可变片段(scFv),从而提高抗原的免疫刺激活性。

[0011] 本发明还提供免疫应答细胞(例如,T细胞、自然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)和调节性T细胞),其表达具有免疫细胞激活活性的抗原结合受体(例如,CAR或TCR)以及CD40L例如外源性CD40L(与细胞自身中产生的内源性CD40L相比较,已经直接或间接导入到细胞中的CD40L(例如,经由包含编码CD40L的核酸序列的裸核酸的载体)),从而提高抗原的免疫刺激活性。

[0012] 因此,本发明提供使用这些免疫应答细胞用于治疗瘤形成、感染性疾病和其他病理的方法。

[0013] 在一个方面,本发明提供一种分离的免疫应答细胞,其具有抗原识别受体和可溶性单链可变片段(scFv),抗原识别受体与抗原结合,其中该结合激活免疫应答细胞,可溶性单链可变片段(scFv)与具有免疫抑制活性或免疫刺激活性的多肽结合。

[0014] 在另一方面,本发明提供一种治疗或预防受试者中的瘤形成的方法,该方法包括向受试者施用有效量的免疫应答细胞,从而治疗或预防受试者中的瘤形成,该免疫应答细胞具有抗原识别受体和可溶性单链可变片段(scFv),抗原识别受体与第一抗原结合,其中该结合激活免疫应答细胞,可溶性单链可变片段(scFv)与具有免疫抑制活性或免疫刺激活性的多肽结合。在非限制性实施方式中,抗原识别受体是CAR。

[0015] 在另一方面,本发明提供一种降低受试者中肿瘤负荷的方法,该方法包括对受试者施用有效量的免疫应答细胞,从而诱导受试者中的肿瘤细胞死亡,该免疫应答细胞具有抗原识别受体和可溶性单链可变片段(scFv),抗原识别受体与第一抗原结合,其中该结合激活免疫应答细胞,可溶性单链可变片段(scFv)与具有免疫抑制活性或免疫刺激活性的多肽结合。在另一方面,本发明提供一种延长具有瘤形成的受试者的存活的方法,该方法涉及对受试者施用有效量的免疫应答细胞,从而延长受试者的存活,该免疫应答细胞具有抗原识别受体和可溶性单链可变片段(scFv),抗原识别受体与第一抗原结合,其中该结合激活免疫应答细胞,可溶性单链可变片段(scFv)与具有免疫抑制活性或免疫刺激活性的多肽结合。在非限制性实施方式中,抗原识别受体是CAR。

[0016] 在多种非限制性实施方式中,本发明提供一种增加受试者中应答于癌细胞的免疫激活细胞因子的产生的方法,包括对受试者施用免疫应答细胞,其具有与癌细胞的抗原结合的抗原识别受体并还表达外源性CD40L。在具体的非限制性实施方式中,免疫激活细胞因子为IL-12。在非限制性实施方式中,抗原识别受体是CAR。

[0017] 在多种非限制性实施方式中,本发明提供一种增加受试者中应答于病原体的免疫激活细胞因子的产生的方法,包括对受试者施用免疫应答细胞,其具有与病原体的抗原结合的抗原识别受体并还表达外源性CD40L。在具体的非限制性实施方式中,免疫激活细胞因子是IL-12。在非限制性实施方式中,抗原识别受体是CAR。

[0018] 在多种非限制性实施方式中,本发明提供一种增加受试者中对于癌细胞的CD8⁺细胞毒性T细胞应答的方法,包括对受试者施用免疫应答细胞,其具有与癌细胞的抗原结合的抗原识别受体并还表达外源性CD40L。在非限制性实施方式中,抗原识别受体是CAR。

[0019] 在多种非限制性实施方式中,本发明提供一种增加受试者中对于病原体的CD8⁺细胞毒性T细胞应答的方法,包括对受试者施用免疫应答细胞,其具有与病原体的抗原结合的抗原识别受体并还表达外源性CD40L。在非限制性实施方式中,抗原识别受体是CAR。

[0020] 在多种非限制性实施方式中,本发明提供一种促进具有癌症的受试者中树突状细胞成熟的方法,包括对受试者施用免疫应答细胞,其具有与癌细胞的抗原结合的抗原识别受体并还表达外源性CD40L。在非限制性实施方式中,抗原识别受体是CAR。

[0021] 在多种非限制性实施方式中,本发明提供一种促进具有病原体导致的疾病的受试者中树突状细胞成熟的方法,包括对受试者施用免疫应答细胞,其具有与病原体的抗原结合的抗原识别受体并还表达外源性CD40L。在非限制性实施方式中,抗原识别受体是CAR。

[0022] 在另一方面中,本发明提供一种治疗或预防受试者中的瘤形成的方法,该方法包括对受试者施用有效量的免疫应答细胞,从而治疗或预防受试者中的瘤形成,该免疫应答细胞具有抗原识别受体并还表达外源性CD40L,抗原识别受体与第一抗原结合,其中该结合激活免疫应答细胞。在非限制性实施方式中,抗原识别受体是CAR。

[0023] 在另一方面中,本发明提供一种降低受试者中的肿瘤负荷的方法,该方法包括对受试者施用有效量的免疫应答细胞,从而诱导受试者中的肿瘤细胞死亡,该免疫应答细胞具有抗原识别受体并表达外源性CD40L,该抗原识别受体与第一抗原结合,其中该结合激活免疫应答细胞。在另一方面中,本发明提供一种延长具有瘤形成的受试者的存活的方法,该方法包括对受试者施用有效量的免疫应答细胞,从而延长受试者的存活,该免疫应答细胞具有抗原识别受体并表达外源性CD40L,该抗原识别受体与第一抗原结合,其中该结合激活免疫应答细胞。

[0024] 在另一个方面,本发明提供一种治疗对其有需要的受试者中的血癌的方法,该方法包括对受试者施用治疗有效量的T细胞,从而治疗受试者中的血癌,该免疫应答细胞具有与CD19结合的抗原识别受体(其中该结合激活免疫应答细胞)以及与CD47、PD-1、CTLA-4及其配体中的一种或多种结合的可溶性单链可变片段(scFv)。在非限制性实施方式中,抗原识别受体是CAR。

[0025] 在另一个方面,本发明提供一种治疗对其有需要的受试者中的血癌的方法,该方法包括对受试者施用治疗有效量的T细胞,从而治疗受试者中的血癌,该免疫应答细胞具有与CD19结合的抗原识别受体(其中该结合激活免疫应答细胞)并表达外源性CD40L。在非限制性实施方式中,抗原识别受体是CAR。

[0026] 在一个方面,本发明提供一种制备抗原特异性免疫应答细胞的方法,该方法包括向免疫应答细胞中导入核酸序列,该核酸序列编码与具有免疫抑制活性或免疫刺激活性的多肽结合的单链可变片段(scFv),其中免疫应答细胞具有与抗原结合的抗原识别受体。在非限制性实施方式中,抗原识别受体是CAR。

[0027] 在一个方面,本发明提供一种制备抗原特异性免疫应答细胞的方法,该方法包括向免疫应答细胞中导入编码CD40L的核酸序列,其中免疫应答细胞具有与抗原结合的抗原识别受体。在非限制性实施方式中,编码CD40L的核酸序列与组成性地或诱导性地在免疫应答细胞中表达、并任选地包含在载体中的启动子元件可操作地连接。在非限制性实施方式中,抗原识别受体是CAR。在非限制性实施方式中,本发明提供包含编码CAR和编码CD40L的序列的核酸,其各自任选地与组成性地或诱导性地在免疫应答细胞中表达的启动子元件可操作地连接,并且所述核酸可以任选地包含在载体中。在一个方面,本发明提供一种载体,其具有编码与抗原结合的抗原识别受体的核酸序列,以及编码与具有免疫抑制

活性或免疫刺激活性的多肽结合的可溶性单链可变片段(scFv)的核酸序列。在非限制性实施方式中,抗原识别受体是CAR。

[0028] 在一个方面,本发明提供一种载体,其具有编码与抗原结合的抗原识别受体的核酸序列,以及编码CD40L的核酸序列。在非限制性实施方式中,抗原识别受体是CAR。在一个特定的非限制性实施方式中,本发明提供一种含有编码抗-CD19 CAR(1928z)和CD40L的核酸的逆转录病毒载体。

[0029] 在相关的方面,本发明提供一种在药学可接受的赋形剂中包含有效量的本文所述本发明任一方面的免疫应答细胞的药物组合物。在另一个相关方面,本发明提供在药学可接受的赋形剂中含有有效量的本文所述本发明任一方面的肿瘤抗原特异性T细胞且用于治疗瘤形成的药物组合物。

[0030] 在另外的方面,本发明提供一种用于治疗瘤形成、病原体感染、自身免疫性疾病或同种异体移植的试剂盒,该试剂盒含有免疫应答细胞,该免疫应答细胞具有与抗原结合并激活免疫应答细胞的抗原识别受体以及具有免疫抑制活性或免疫刺激活性的多肽结合的可溶性单链可变片段(scFv)。在非限制性实施方式中,抗原识别受体是CAR。在特定实施方式中,试剂盒还含有用于使用上述细胞治疗具有瘤形成、病原体感染、自身免疫性疾病或同种异体移植的受试者的书面说明书。

[0031] 在另外的方面,本发明提供一种用于治疗瘤形成、病原体感染、自身免疫性疾病或同种异体移植的试剂盒,该试剂盒含有免疫应答细胞,该免疫应答细胞具有与抗原结合并激活免疫应答细胞的抗原识别受体并表达外源性CD40L。在非限制性实施方式中,抗原识别受体是CAR。在特定实施方式中,试剂盒还含有用于使用上述细胞治疗具有瘤形成、病原体感染、自身免疫性疾病或同种异体移植的受试者的书面说明书。

[0032] 在另外的方面,本发明提供一种用于治疗瘤形成、病原体感染、自身免疫性疾病或同种异体移植的试剂盒,该试剂盒包含编码对要治疗的瘤形成、病原体、自身免疫性疾病或移植的抗原进行识别的CAR的核酸,以及编码与具有免疫抑制活性或免疫刺激活性的多肽结合的可溶性单链可变片段(scFv)的核酸。任选地,一种或两种核酸可以包含在载体中,其可以是同一载体(双顺反子)或不同的载体。编码CAR的核酸和/或编码scFv的核酸可以各自与启动子可操作地连接,上述启动子可以是相同的或不同的启动子。在特定实施方式中,试剂盒还含有用于使用上述细胞治疗具有瘤形成、病原体感染、自身免疫性疾病或同种异体移植的受试者的书面说明书。

[0033] 在另外的方面,本发明提供一种用于治疗癌症的试剂盒,该试剂盒包含编码对癌抗原进行识别的CAR的核酸,以及编码与具有免疫抑制活性或免疫刺激活性的多肽结合的可溶性单链可变片段(scFv)的核酸。任选地,一种或两种核酸可以包含在载体中,其可以是同一载体(双顺反子)或不同的载体。编码CAR的核酸和/或编码scFv的核酸可以各自与启动子可操作地连接,上述启动子可以是相同的或不同的启动子。在特定实施方式中,试剂盒还含有用于使用上述细胞治疗具有癌症的受试者的书面说明书。

[0034] 在另外的方面,本发明提供一种用于治疗癌症或病原体介导的疾病的试剂盒,该试剂盒包含编码对癌或病原体的抗原进行识别的CAR的核酸,以及编码与具有免疫抑制活性或免疫刺激活性的多肽结合的可溶性单链可变片段(scFv)的核酸。任选地,一种或两种核酸可以包含在载体中,其可以是同一载体(双顺反子)或不同的载体。编码CAR的核酸

和/或编码scFv的核酸可以各自与启动子可操作地连接，上述启动子可以是相同的或不同的启动子。在特定实施方式中，试剂盒还含有用于使用上述细胞治疗具有癌症或疾病的受试者的书面说明书。在另外的方面，本发明提供一种用于治疗癌症或病原体介导的疾病的试剂盒，该试剂盒包含编码对癌或病原体的抗原进行识别的CAR的核酸，以及编码CD40L的核酸。任选地，一种或两种核酸可以包含在载体中，其可以是同一载体(双顺反子)或不同的载体。编码CAR的核酸和/或编码CD40L的核酸可以各自与启动子可操作地连接，上述启动子可以是相同的或不同的启动子。在特定实施方式中，试剂盒还含有用于使用上述细胞治疗具有癌症或疾病的受试者的书面说明书。

[0035] 在本文所述任意方面的多种实施方式中，细胞选自T细胞、自然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、调节性T细胞、人胚胎干细胞和由其可以分化出淋巴样细胞的多能干细胞。在本文所述任意方面的多种实施方式中，免疫应答细胞是自体的。

[0036] 在本文所述任意方面的多种实施方式中，抗原识别受体是T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)。在本文所述任意方面的多种实施方式中，抗原识别受体是外源性的或内源性的。在本文所述任意方面的多种实施方式中，抗体识别受体是重组表达的。在本文所述任意方面的多种实施方式中，抗体识别受体由载体表达。在本文所述任意方面的多种实施方式中，抗原识别受体的胞内信号转导结构域是CD ζ -链、CD3 ζ -链、CD97、CD11a-CD18、CD2、ICOS、CD27、CD154、CDS、OX40、4-1BB、CD28信号转导结构域、其部分、或其组合。在非限制性实施方式中，抗原识别受体是包含CD28、4-1BB和/或CD3 ζ -链的至少一部分(参见，例如，Zhong等人，2010，*Molecular Ther.* 18(2):413-420)连同抗原结合部分的CAR。在非限制性实施方式中，抗原识别受体是Kohn等人，2011，*Molecular Ther.* 19(3):432-438)中所述的CAR，任选地，其中抗原结合部分被与另一肿瘤或病原体抗原结合的氨基酸序列取代。在多种实施方式中，细胞表达重组的或内源性的抗原受体，其为1928z或4H1128z。

[0037] 在本文所述任意方面的多种实施方式中，抗原是肿瘤或病原体抗原。在本文所述任意方面的多种实施方式中，肿瘤抗原是CD19、MUC16、MUC1、CA1X、CEA、CDS、CD7、CD10、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD49f、CD56、CD74、CD133、CD138、巨细胞病毒(CMV)感染细胞抗原、EGP-2、EGP-40、EpCAM、erb-B2、3、4、FBP、胎儿乙酰胆碱受体、叶酸受体- α 、GD2、GD3、HER-2、hTERT、IL-13R-a2、 κ -轻链、KDR、LeY、L1细胞粘附分子、MAGE-A1、间皮素、NKG2D配体、NY-ESO-1、癌胚抗原(h5T4)、PSCA、PSMA、ROR1、TAG-72、VEGF-R2、或WT-1中的一种或多种。在特定实施方式中，抗原是CD19或MUC16。与所述抗原特异性结合的氨基酸序列在本领域已知，或者可以使用本领域已知的方法制备；例子包括免疫球蛋白、免疫球蛋白的可变区(例如，可变片段(“Fv”)或二价可变片段(“Fab”))、单链抗体等。

[0038] 在本文所述任意方面的多种实施方式中，可溶性scFv被分泌。在本文所述任意方面的多种实施方式中，scFv由载体分泌。在本文所述任意方面的多种实施方式中，免疫抑制多肽是CD47、PD-1、CTLA-4及其配体中的一种或多种。在本文所述任意方面的多种实施方式中，免疫刺激多肽是CD28、OX-40、4-1BB及其配体中的一种或多种。在本文所述任意方面的不同实施方式中，可溶性scFv提高免疫应答细胞的免疫应答。

[0039] 在本文所述任意方面的多种实施方式中，免疫应答细胞分泌细胞因子。在本文所述任意方面的多种实施方式中，细胞因子由载体表达。在本文所述任意方面的多种实施方式

式中,含有本发明的免疫应答细胞的药物组合物含有细胞因子。在本文所述任意方面的多种实施方式中,本发明的免疫应答细胞与细胞因子一起给药。在本文所述任意方面的多种实施方式中,细胞因子是IL-2、IL-3、IL-6、IL-11、IL7、IL12、IL15、IL21、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、 α 、 β 或 γ 干扰素和红细胞生成素中的一种或多种。

[0040] 在本文所述任意方面的多种实施方式中,方法减少肿瘤细胞的数目,减少肿瘤大小,根除受试者中的肿瘤,降低受试者中的肿瘤负荷,并且/或者根除受试者中的肿瘤负荷。

[0041] 可以使用本发明的示例性肿瘤包括,但不限于,白血病(例如,急性白血病、急性淋巴细胞性白血病、急性髓细胞性白血病、急性粒细胞白血病、急性早幼粒细胞性白血病、急性粒单核细胞白血病、急性单核细胞性白血病、急性红白血病、慢性白血病、慢性髓细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病)、真性红细胞增多症、淋巴瘤(霍奇金氏病、非霍奇金氏病)、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)、重链病和实体瘤例如肉瘤和癌(例如,纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨原发性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏瘤(Ewing's tumor)、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌(nile duct carcinoma)、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、肾母细胞瘤(Wilm's tumor)、子宫颈癌、子宫癌、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌(epithelial carcinoma)、神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突胶质细胞瘤(oligodendroglioma)、神经鞘瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、成神经细胞瘤和视网膜母细胞瘤)。

[0042] 在本文所述任意方面的多种非限制性实施方式中,瘤形成是血癌、B细胞白血病、多发性骨髓瘤、淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病、非霍奇金氏淋巴瘤和卵巢癌中的一种或多种。在某些实施方式中,血癌是B细胞白血病、多发性骨髓瘤、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病和非霍奇金氏淋巴瘤中的一种或多种。在特定实施方式中,瘤形成是B细胞白血病,抗原是CD19,且具有免疫抑制活性的多肽是CD47、PD-1、CTLA-4及其配体中的一种或多种。在特定实施方式中,瘤形成是多发性骨髓瘤,抗原是CD19,且具有免疫抑制活性的多肽是CD47、PD-1、CTLA-4及其配体中的一种或多种。在特定实施方式中,瘤形成是急性淋巴细胞性白血病(ALL),抗原是CD19,且具有免疫抑制活性的多肽是CD47、PD-1、CTLA-4及其配体中的一种或多种。在特定实施方式中,瘤形成是慢性淋巴细胞性白血病,抗原是CD19,且具有免疫抑制活性的多肽是CD47、PD-1、CTLA-4及其配体中的一种或多种。在特定实施方式中,瘤形成是非霍奇金氏淋巴瘤,抗原是CD19,且具有免疫抑制活性的多肽是CD47、PD-1、CTLA-4及其配体中的一种或多种。在特定实施方式中,瘤形成是卵巢癌,抗原是MUC16,且具有免疫抑制活性的多肽是CD47、PD-1、CTLA-4及其配体中的一种或多种。

[0043] 定义

[0044] 除非另外指出,本文使用的所有技术和科学术语均具有本领域所属技术领域技术人员通常理解的含义。以下参考文献向本领域技术人员提供本文发明所用的许多术语的通常定义:Singleton等人,Dictionary of Microbiology and Molecular Biology(2nd

ed.1994);The Cambridge Dictionary of Science and Technology(Walker ed.,1988);The Glossary of Genetics,5th Ed.,R.Rieger等人(eds.),Springer Verlag(1991);和Hale& Marham,The Harper Collins Dictionary of Biology(1991)。如本文所用,除非另外指出,以下术语具有以下归于其的含义。

[0045] “激活免疫应答细胞”是指诱导细胞中的信号转导或蛋白表达变化,从而引起免疫应答的起始。例如,当CD3链响应于配体结合和免疫受体酪氨酸类抑制基序(ITAM)而聚簇时,产生信号转导级联反应。在某些实施方式中,当内源性TCR或外源性CAR与抗原结合时,发生免疫突触的形成,其包括许多分子在结合受体(例如,CD4或CD8、CD3 $\gamma/\delta/\epsilon/\zeta$ 等)附近聚簇。这种膜结合信号转导分子的聚簇使得包含在CD3链内的ITAM基序变得磷酸化。该磷酸化反过来引发T细胞激活通路,最终激活转录因子,例如NF- κ B和AP-1。这些转录因子诱导T细胞的全局基因表达,以增加IL-2的产生,以用于增殖和主调节器T细胞蛋白的表达,以引发T细胞介导的免疫应答。“刺激免疫应答细胞”是指引起稳健且持续的免疫应答的信号。在多种实施方式中,这在免疫细胞(例如T细胞)激活之后发生或者同时而发生,通过包括但不限于CD28、CD137(4-1BB)、OX40、CD40和ICOS的受体介导。无意拘泥于任何特定理论,接收多个刺激信号对于发起稳健且长期的T细胞介导的免疫应答是重要的。不接收这些刺激信号,T细胞迅速变得受抑制,且对抗原不反应。尽管这些共刺激信号的作用会变化并且仅部分被理解,它们通常引起基因表达的增加,以产生稳健地应答于抗原的长期增殖性且抗细胞凋亡的T-细胞,以用于完全且持续的根除。

[0046] 如本文所用,术语“抗原识别受体”是指能够响应于抗原结合而激活免疫细胞(例如T-细胞)的受体。示例性的抗原识别受体可以是天然的或内源性的T细胞受体或肿瘤抗原结合结构域与能够激活免疫细胞(例如T-细胞)的胞内信号转导结构域融合的嵌合抗原受体。

[0047] 如本文所用,术语“抗体”不仅指完整的抗体分子,还指抗体分子的保持免疫原结合能力的片段。这些片段也是本领域公知的,并经常在体外和在体内使用。因此,如本文所用,术语“抗体”不仅指完整的免疫球蛋白分子,还指公知的活性片段F(ab')₂和Fab。F(ab')₂和Fab片段缺少完整抗体的Fe片段,更迅速地从循环中清除,并且可能具有完整抗体的稍弱的非特异性组织结合(Wahl等人,J.Nucl.Med. 24:316-325(1983))。本发明的抗体包括完整内生抗体、双特异性抗体;嵌合抗体;Fab、Fab'、单链V区片段(scFv)、融合多肽以及非常规抗体。

[0048] 如本文所用,术语“单链可变片段”或“scFv”是共价连接形成VH::VL杂二聚体的免疫球蛋白的重链(VH)和轻链(VL)可变区的融合蛋白。重链(VH)和轻链(VL)直接连接,或者通过肽编码接头(linker)(例如,10、15、20、25个氨基酸)连接,其将VH的N-端与VL的C-端连接,或者将VH的C-端与VL的N-端连接。接头通常富含用于柔性的甘氨酸,以及用于溶解性的丝氨酸或苏氨酸。尽管除去恒定区并引入接头,scFv蛋白保留原始免疫球蛋白的特异性。单链Fv多肽抗体可以由包含VH-和VL-编码序列的核酸表达,如Huston等人所述(Proc.Nat.Acad.Sci.USA,85:5879-5883,1988)。另外,参见,美国专利第5,091,513号、第5,132,405号和第4,956,778号;以及美国专利公开第20050196754号和第20050196754号。已经描述了具有抑制活性的拮抗性scFv(参见,例如,Zhao等人,Hybridoma(Larchmt)2008 27(6):455-51;Peter等人,J Cachexia Sarcopenia Muscle

2012 August 12;Shieh等人,J Immunol2009 183(4):2277-85;Giomarelli 等人,Thromb Haemost 2007 97(6):955-63;Fife等人,J Clin Invest 2006 116(8):2252-61;Brocks等人,Immunotechnology 1997 3(3):173-84; Moosmayer等人,Ther Immunol 1995 2(10:31-40)。已经描述了具有刺激活性的激动性scFv(参见,例如Peter等人,J Bioi Chern 2003 25278(38):36740-7;Xie等人,Nat Biotech 1997 15(8):768-71;Ledbetter 等人,Crit Rev Immunol1997 17(5-6):427-55;Ho等人,BioChim Biophys Acta 2003 1638(3):257-66)。

[0049] “亲和性”是指结合强度的度量。无意拘泥于理论,亲和性取决于抗体结合位点和抗原决定簇之间立体化学配合密切度,取决于它们之间接触面积的大小,并取决于带电疏水基团的分布。亲和性也包括术语“(抗原和抗体)的亲合力”,其是指形成不可逆的复合物之后抗原-抗体结合的强度。计算抗体对于抗原的亲和性的方法是本领域已知的,包括使用结合实验来计算亲和性。功能检验(例如,流式细胞术)中的抗体活性也反映抗体亲和性。抗体和亲和性可以在表型上加以表征,并使用功能检验(例如,流式细胞术)比较。

[0050] 如本文所用,术语“嵌合抗原受体”或“CAR”是指与能够激活或刺激免疫细胞的胞内信号转导结构域融合的抗原结合结构域。最常见地,CAR的胞外结合结构域由融合鼠科或人源化单克隆抗体的可变重区与轻区而产生的单链可变片段(scFv)组成。另外可选地,可以使用源自Fab的scFv(代替源自抗体的scFv,例如,获自Fab文库)。在多种实施方式中,该scFv与跨膜结构域融合,然后与胞内信号转导结构域融合。“第一代”CAR包括在抗原结合时仅提供CD3 ζ 信号的那些,“第二代”CAR包括提供共刺激(例如CD28或CD137)和激活(CD3 ζ)的那些。“第三代”CAR包括提供多种共刺激(例如CD28和CD137)和激活(CD3 ζ)的那些。在多种实施方式中,CAR选择成对于抗原具有高的亲和性或亲合力。

[0051] 术语“免疫抑制活性”是指在细胞(例如,激活的免疫应答细胞)中诱导信号转导或蛋白表达变化,从而引起免疫应答的降低。已知经 由其结合而抑制或降低免疫应答的多肽包括CD47、PD-1、CTLA-4及其相应的配体,包括SIRPa、PD-L1、PD-L2、B7-1和B7-2。这些多肽存在于肿瘤微环境中,并抑制对赘生性细胞的免疫应答。在多种实施方式中,抑制、阻断或拮抗免疫抑制多肽和/或其配体的相互作用会提高免疫应答细胞的免疫应答。

[0052] 术语“免疫刺激活性”是指在细胞(例如,激活的免疫应答细胞)中诱导信号转导或蛋白表达变化,从而引起免疫应答的增加。免疫刺激活性可以包括促炎活性。已知经 由其结合而刺激或增加免疫应答的多肽包括CD28、OX-40、4-1BB及其相应的配体,包括B7-1、B7-2、OX-40L和4-1BBL。这些多肽存在于肿瘤微环境中,并激活对赘生性细胞的免疫应答。在多种实施方式中,促进、刺激促炎多肽和/或其配体或使其激动会提高免疫应答细胞的免疫应答。

[0053] “CD3 ζ 多肽”是指与具有激活或刺激活性的NCBI参考号:NP_932170或其片段具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的蛋白。示例性的CD3 ζ 提供如下[SEQ ID NO:1]。

```

1 mkwkalftaa ilqaqlpите aqsfglldpk lcyllldgilf iygviltalf lrvkfsrsad
[0054] 61 apayqqggnq lynelnlgr eeydvldkrr grdpemggkp qrrknpqegl ynelqkdkma
121 eayseigmkg errrgkghdg lyqglstatk dtydalhmqa lppr

```

[0055] “CD3 ζ 核酸分子”是指编码CD3 ζ 多肽的多核苷酸。

[0056] “CD28多肽”是指与具有刺激活性的NCBI参考号:NP_006130 或其片段具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100% 同一性的蛋白。示例性的CD28提供如下 [SEQ ID NO:2]。

```

1 mlrllllaln1 fpsiqvtgk ilvkqspmlv aydnavnlsc kysynlfsre fraslhkgld
61 savevcvvyg nysqqlqvys ktgfncdgkl gnesvtfylq nlyvntqtdiy fckievmypp
[0057] 121 pyldneksng tiihvkghl cpsplfpgps kpfwvlvvg gvlacysllv tvafiifwvr
181 skrsrllhsd ymnmtprrrg ptrkhyqpya pprdfaayrs

```

[0058] “CD28核酸分子”是指编码CD28多肽的多核苷酸。

[0059] “CD40L多肽”是指与NCBI参考序列:NP_000065、GenBank参 考号 .GenBank:AAH74950.1或其片段具有至少85%、90%、95%、96%、 97%、98%、99%或100%同一性的蛋白,或者为使用以下引物(1) 5’ -CACGTGCATGATCGAAACATACAACCAAACCTTCTCCCCGATCT GC-3 [SEQ ID NO:3]和(2)5’ -CTCGAGGGATCCTC AGAGTTTGAGTAAGCCAAAGGA-3’ [SEQ ID NO:4]从分离的健康供 体PBMC中通过PCR扩增的核酸所编码的蛋白(图22A)。

[0060] “CD40L核酸分子”是指编码CD40L多肽的多核苷酸。

[0061] “4-1BB多肽”是指与作为肿瘤坏死因子(TNF)配体的NCBI 参考号:P41273或NP_001552或其片段具有至少85%、90%、95%、96%、 97%、98%、2599%或100%同一性的蛋白。示例性的4-1BB提供如下 [SEQ ID NO:5]。

```

1 mgnscyniva tlllvlnfer trslqdpesn cpagtfcdnn rnqicspcpp nsfssaggqr
61 tcdicrqckg vfrtrkecss tsnaecdets gfhclgagcs mceqdckqgg eltkkgckdc
[0062] 121 cfgtfdnqkr gicrpwtncs ldgksvlvng tkerdvvcgp spadlspgas svtpapare
181 pghspqiisf flaltstall flffltrlf svvkrgrkkl lyifkqpfmr pvqttqeedg
241 cscrfpeeee ggcel

```

[0063] “4-1BBL核酸分子”是指编码4-1BBL多肽的多核苷酸。

[0064] “OX40L多肽”是指与作为肿瘤坏死因子(TNF)配体[SEQ ID NO:6]的NCBI参考号: BAB18304或NP_003317或其片段具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100% 同一性的蛋白。

```

1 mervqpleen vgnaarprfe rnklllvasv iqglglllcf tyiclhfsal qvshrypriq
61 sikvqfteyk kekghiltsq kedeimkvqn nsviincdgf ylislkgyfs qevnislhyq
[0065] 121 kdeplfqlk kvrsvnslmv asltykdkvy lnttdntsl ddfhvnggel ilihqnpgef
181 cvl

```

[0066] “OX40L核酸分子”是指编码OX40L多肽的多核苷酸。

[0067] “1928z”是指与以下所提供序列[SEQ ID NO:7]具有至少85%、 90%、95%、96%、 97%、98%、99%或100%同一性的蛋白,并能够结 合CD19,该序列包括在氨基酸1-18处的 CDS前导序列。

MALPVTALLPLALLLHAEVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNW
VKQRPQGQLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSED
SAVYFCARKTISSVVDYFDYWGQTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIELTQS
PKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDR
[0068] FTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKRAAAIEVM
YPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFVWLVVVGGVLACYSLLVT
VAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFS
RSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY
NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRX

[0069] 示例性的包括CDS前导序列的编码1928z多肽的核酸序列提供如下[SEQ ID NO:
8]。

ccatggctctcccagtgactgcctactgcttcccctagcgcttctcctgcatg
cagaggtgaagctgcagcagctctggggctgagctggtgaggcctgggtcctcag
tgaagatttctgcaaggcttctggctatgcattcagtagctactggatgaact
gggtgaagcagaggcctggacagggctttagtgattggacagatttatcctg
[0070] gagatggtgataactacaatggaaagttcaagggcctcaagccacactgactg
cagacaaatcctccagcacagcctacatgcagctcagcggcctaacaatctgagg
actctgcggtctatttctgtgcaagaaagaccattagttcggtagtagatttct
actttgactactggggccaaggaccacgggtcaccgtctcctcaggtggagggtg

gatcaggtggaggtggatctggtggaggtggatctgacattgagctcaccagt
 ctccaaaattcatgtccacatcagtaggagacaggggtcagcgtcacctgcaagg
 ccagtcagaatgtgggtactaatgttagcctggatcaacagaaaccaggacaat
 ctctaaaccactgatttactcggcaacctaccggaacagtggagtccctgatc
 gcttcacaggcagtggtatctgggacagatttcactctcaccatcactaacgtgc
 agtctaaagacttggcagactatctgtcaacaatataacaggtatccgtaca
 cgtccggaggggggaccaagctggagatcaaacgggcgccgcaattgaagtta
 tgtatcctcctccttagacaatgagaagagcaatggaaccattatccatg
 tgaaagggaaacacctttgtccaagtccctatctcccggaccttctaagcct
 [0071] tttgggtgctggtggtggttggaggagtctggcttgcctatagcttgctagtaa
 cagtggcctttattatcttctgggtgaggagtaagaggagcaggctcctgcaca
 gtgactacatgaacatgactccccgcccggggcccaccgcaagcattacc
 agccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatcgctccagagtgaagttca
 gcaggagcgcagagcccccgctaccagcagggccagaaccagctctataacg
 agctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttgacaagagacgtggcc
 gggaccctgagatggggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgt
 acaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatga
 aaggcagcgcggaggggcaaggggcacgatggccttaccagggtctcagta
 cagccaccaaggacacctacgacgccttcacatgcaggccctgccccctcgcg

[0072] “4H1128z”是指与以下所提供序列[SEQ ID NO:9]具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的蛋白,并能够结合MUC,该序列包括在氨基酸1-18处的CDS前导序列。

MALPVTALLLPLALLLHAEVKLQESGGGFVKPGGSLKVS CAASGFTFSSYAMSW
 VRLSPEMRLEWVATISSAGGYIFYSDSVQGRFTISRDNANTLHLQMGSLRSGD
 TAMYYCARQGFNYGDYYAMDYWGQGTTVTVSSGGGSGGGGSGGGSDIELTQ
 SPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNSRTRKNQLAWYQQKPGQSPELLIYWASTR
 [0073] QSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQQSYNLLTFGPGTKLEIKRA
 AAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLVVVGGVLAC
 YLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYR
 SRVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN
 PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQ
 ALPPR

[0074] 示例性的包括κ前导序列的编码4H1128z多肽的核酸序列提供如下 [SEQ ID NO: 10]。

ccatggctctcccagtgactgcctactgcttcccctagecgcttctcctgcatg
cagaggtgaagctgcaggagt cagggggaggcttcgtgaagcctggagggctcc
tcaaagtctcctgtgcagcctctggattcactttcagtagctatgccatgtcct
gggttcgcctgagtcgggagatgaggctggagtgggtcgcaaccattagcagtg
ctggtgggttacatcttctattctgacagtggtgcagggacgattcaccatttcca
gagacaatgccaagaacaccctgcacctgcaaattgggcagtctgaggtctgggg
acacggccatgtattactgtgcaaggcagggtattggtaactacgggtgattact
atgctatggactactggggccaagggaccacgggtcacctctcctcaggtggag
gtggatcaggtggaggtggatctggtggaggtggatctgacattgagctcacc
agtctccatcctcctggctgtgtcagcaggagagaaggctcactatgagctgca
aatccagt cagagtctgctcaacagtagaaccgaaagaaccagttggcttgggt
accagcaaaaaccaggacagtctcctgaaactgctgatctactgggcatccacta
ggcaatctggagtccctgatcgcttcacaggcagtggtctgggacagatttca
ctctcaccatcagcagtggtgcaggctgaagacctggcagtttattactgccagc
[0075] aatcttataatctactcacgttcggctcctgggaccaagctggagatcaaacggg
cggccgcaattgaagttatgtatcctcctccttacctagacaatgagaagagca
atggaaccattatccatgtgaaagggaaacacctttgtccaagtcccctatctc
ccggaccttctaagcccttttgggtgctgggtgggtgggtgggtggagtctggctt
gctatagcttgctagtaacagtggcctttattattttctgggtgaggagtaaga
ggagcaggctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgcccggggc
ccaccgcaagcattaccagccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatc
gctccagagtgaagttcagcaggagcgcagagccccccgcgtaccagcagggcc
agaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttt
tggacaagagacgtggccgggaccctgagatggggggaaagccgagaaggaaga
accctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcct
acagtgagattgggatgaaaggcgcagcgcggaggggcaaggggcacgatggcc
tttaccagggtctcagtagccaccaaggacacctacgacgccttcacatgc
aggccctgccccctcgc

[0076] “B6H12.2 scFv”是指与以下所提供序列[SEQ ID NO:11]具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的蛋白,并 能够结合CD47。

EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTFSGYGMSWVRQTPDKRLEWVAT
ITSGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQIDSLKSEDTAIYFCARSL
[0077] AGNAMDYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPATLSVTPGD
RVSLSCRASQTISDYLHWYQQKSHESPRLLIKFASQSIGIPSRFSGSGS
GSDFTLSINSVEPEDVGVYYCQNGHGFPRTFGGGTKLEIKEQKLISEEDL

[0078] “5C4 scFv”是指与以下所提供序列[SEQ ID NO:12]具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的蛋白,并能够结合人PD-1。

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAV
IWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATND

[0079] DYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLS
CRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDF
LTISSELEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIK

[0080] “J43 scFv”是指与以下所提供序列[SEQ ID NO:13]具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的蛋白,并能够结合人PD-1,该序列包括在氨基酸1-21处的κ前导序列。

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDMGLGLQWVFFVALLKGVHCEVRLLES GGGLVKP
EGSLKLSCVASGFTFSDYFMSWVRQAPGKGLEWVAHIYTKSYNYATYYSGSVKG
RFTISRDDSRSMVYLQMNNLRTE DTATYYCTRDGSGYPSLDFWGQGTQVTVSSA
TTTAPSVYPLAPACDSTTKSGGGGSGGGGSGGGGSYELTQPPSASVNVGETVKI
[0081] TCSGDQLPKYFADWFHQ RSDQTI LQVIYDDNKRPSGIPERISGSSSGTTATLTI
RDVRAEDEGDYYCFSGYVDS DSKLYVFGSGTQLTVLGGPKSSPKVTVFPPSPEE
LRTNKATLVCLVNDFYPGSATVTWKANGATINDGVKTTKPSKQGQNYMTSSYLS
LTADQWKSHNRVSCQVTHEGETVEKSLSPAECLEQKLI SEEDL*

[0082] 示例性的包括κ前导序列的编码J43 scFv多肽的核酸序列提供如下[SEQ ID NO:14]。

ccATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCAGGTT
 CCACTGGTGACatgggattgggactgcagtgggtttctttggtgctcttttaa
 aaggtgtccactgtgaggtgcggtctctggagtctggtggaggattagtgaagc
 ctgagggggtcactgaaactctcctgtgtggcctctggattcacctcagtgact
 atttcatgagctgggtccgccaggctccaggggaaggggctggagtgggttgctc
 acatatacacgaaaagttataattatgcaacttattactcgggttcggtgaaag

 gcagattcaccatctccagagatgattcccgaagcatggtctacctgcaaatga
 acaacctgagaactgaggacacggccacttattactgtacaagagatggaagcg
 gatatccctctctggatttctgggggtcaagggaccaagtcactgtctcctcag
 ccacaacaacagccccatctgtctatcccttggcccctgcctgtgacagcacia
 ccaaatcgggtggaggtggatcaggtggaggtggatctggtggaggtggatctT
 atgagctgactcagccaccttcagcatcagtcagtcaatgtaggagagactgtcaaaa
 [0083] tcacctgctctggggaccaattgccgaaatattttgcagattggtttcatcaaa
 ggtcagaccagaccattttgcaagtgatatatgatgataataagcgcccctcgg
 ggatccctgaaagaatctctgggtccagctcagggacaacagccaccttgacca
 tcagagatgtccgggctgaggatgaaggtgactattactgtttctcaggatatg
 ttgatagtgatagcaaattgtatgtttttggcagcggaaaccagctcacctcc
 taggtggaccaagtcttctccaaagtcacagtgtttccaccttcacctgagg
 agctccggacaaacaaagccacactggtgtgtctggttaatgacttctaccg
 gttctgcaacagtgacctggaaggcaaatggagcaactatcaatgatggggtga
 agactacaaagccttccaaacagggccaaaactacatgaccagcagctacctaa
 gtttgacagcagaccagtggaatctcacaacagggtttctgccaagttaccc
 atgaaggggaaactgtggagaagagtttgtccctgcagaatgtctcgaacaaa
 aactcatctcagaagaggatctgTAActcgag

[0084] 可用于本发明方法的核酸分子包括任何编码本发明的多肽或其片段的核酸分子。这些核酸分子不需要与内源性核酸序列100%相同,但通常将表现出相当程度的同一性。与内源性序列具有“相当程度的同一性”的多核苷酸通常能够与双链核酸分子的至少一条链杂交。“杂交”是指在各种严格性条件下在互补性多核苷酸序列(例如,本文所述的基因)或其部分之间配对形成双链分子。(参见,例如Wahl,G.M.和S.L.Berger(1987) *Methods Enzymol.*152:399;Kimmel,A.R.(1987) *Methods Enzymol.*152:507)。

[0085] 例如,严格的盐浓度将通常小于约750mM NaCl和75mM柠檬酸三钠,优选小于约500mM NaCl和50mM柠檬酸三钠,且更优选小于约250mM NaCl和25mM柠檬酸三钠。低严格性杂交可以在不存在有机溶剂例如甲酰胺的情况下获得,而高严格性杂交可以在存在至少约35%甲酰胺、更优选至少约50%甲酰胺的情况下获得。严格的温度条件将通常包括至

少约30℃、更优选至少约37℃、且最优选至少约42℃ 的温度。变化的其他参数,例如杂交时间、清洁剂例如十二烷基磺酸钠(SDS)的浓度以及包括还是排除载体DNA,是本领域技术人员公知的。不同的严格性水平通过根据需要将这些不同的条件组合来实现。在优选的实施方式中,杂交将在30℃下在750mM NaCl、75mM柠檬酸三钠和1%SDS中发生。在更优选的实施方式中,杂交将会在37℃下在500mM NaCl、50mM柠檬酸三钠、1%SDS、35%甲酰胺和100 μg/ml变性鲑鱼精子DNA(ssDNA)中发生。在最优选的实施方式中,杂交将会在42℃下在250mM NaCl、25mM柠檬酸三钠、1%SDS、50%甲酰胺和200μg/ml ssDNA中发生。有关这些条件的可用变化对本领域技术人员来说将会是显而易见的。

[0086] 对于大多数应用,杂交之后的洗涤步骤也将会在严格性方面变化。洗涤严格性条件可以通过盐浓度及通过温度定义。如上,洗涤严格性可以通过降低盐浓度或者通过增加温度来提高。例如,用于洗涤步骤的严格的盐浓度将优选为小于约30mM NaCl及3mM柠檬酸三钠,最优选小于约15mM NaCl及1.5mM柠檬酸三钠。用于洗涤步骤的严格温度条件将通常包括至少约25℃、更优选至少约42℃、进而更优选至少约68℃的温度。在优选的实施方式中,洗涤步骤将会在25℃下在30 mM NaCl、3mM柠檬酸三钠和0.1%SDS中进行。在更优选的实施方式中,洗涤步骤将会在42℃下在15mM NaCl、1.5mM柠檬酸三钠和0.1%SDS中进行。在更优选的实施方式中,洗涤步骤将会在68℃下在15mM NaCl、1.5mM柠檬酸三钠和0.1%SDS中进行。有关这些条件的其他变化对于本领域技术人员来说将很容易是显而易见的。杂交技术是本领域技术人员公知的,且记载于,例如,Benton和Davis(Science 196:180,1977);Grunstein and Rogness(Proc.Natl.Acad.Sci.,USA 72:3961,1975);Ausubel等人(Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience,New York,2001);Berger and Kimmel(Guide to Molecular Cloning Techniques,1987,Academic Press,New York);和 Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York。

[0087] “基本上相同”是指多肽或核酸分子表现出与参照氨基酸序列(例如,本文所述氨基酸序列中任一个)或核酸序列(例如,本文所述核酸序列中任一个)的至少50%的同一性。优选地,这样的序列与用于对比的序列在氨基酸水平或核酸水平上为至少60%、更优选80%或85%、更优选90%、95%或甚至99%相同。

[0088] 序列同一性通常使用序列分析软件(例如,Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center,1710 University Avenue, Madison, Wis.53705的序列分析软件包,BLAST、BESTFIT、GAP或PILEUP/PRETTYBOX程序)测量。这些软件通过比对与各种置换、缺失和/或其他修饰的同源性程度来匹配相同或相似的序列。保守置换通常包括在以下组别内的置换:甘氨酸、丙氨酸;缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸;天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺;丝氨酸、苏氨酸;赖氨酸、精氨酸;和苯丙氨酸、酪氨酸。在测定同一性程度的示例性方法中,可以使用BLAST程序,概率评分在 e^{-3} 与 e^{-100} 之间,表示序列密切相关。

[0089] “类似物”是指具有参照多肽或核酸分子的功能的结构上相关的多肽或核酸分子。

[0090] 如本文所用,术语“配体”是指与受体结合的分子。具体地,配体与另一细胞上的受体结合,使得可以进行细胞-细胞识别和/或相互作用。

[0091] 如本文所用,术语“组成性表达”是指在所有生理条件下均表达。

[0092] “疾病”是指任何损害或干扰细胞、组织或器官正常功能的病状和障碍。疾病的例子包括瘤形成或细胞的病原体感染。

[0093] “有效量”是指足以具有治疗效果的量。在一个实施方式中,“有效量”是指足以阻止、减轻或抑制瘤形成的持续增殖、生长或转移(例如,侵入或迁移)的量。

[0094] “内源性”是指核酸分子或多肽正常地在细胞或组织中表达。

[0095] “强制执行耐受性(enforcing tolerance)”是指防止靶向移植器官或组织的自反应性细胞或免疫应答细胞的活性。

[0096] “外源性”是指核酸分子或多肽并不内源地存在于细胞中,或者并未以足以达到在过表达时得到的功能效果的水平存在。因此,术语“外源性”包括任何在细胞中表达的重组核酸分子或多肽,例如,外来的、异源性的以及过表达的核酸分子和多肽。

[0097] “异源性核酸分子或多肽”是指核酸分子(例如,cDNA、DNA或RNA分子)或多肽在正常情况下不存在于细胞或获自细胞的样品中。这种核酸可以来自另一有机体,或者,其可以是,例如,通常不在细胞或样品中表达的mRNA分子。

[0098] “免疫应答细胞”是指在免疫应答中发挥作用的细胞或其祖细胞或子代。

[0099] “增加”是指正向地变化至少5%。变化可以是5%、10%、25%、30%、50%、75%或者甚至100%。

[0100] “分离的细胞”是指与天然伴随细胞的分子和/或细胞组分分离的细胞。

[0101] 术语“分离的”、“纯化的”或“生物纯的”是指材料在不同程度上不含在其天然状态下通常伴随其的组分。“分离”是指与原始来源或环境的分开程度。“纯化”是指高于分离的分开程度。“纯化的”或“生物纯的”蛋白充分地不含其他材料,使得没有任何杂质对蛋白的生物特性产生相当的影响或者造成其他不利后果。也就是说,本发明的核酸或肽如果基本不含细胞材料、病毒材料或培养介质(当通过重组DNA技术产生时)或化学前体或其他化学品(当化学合成时),则是纯化的。纯度和均一性通常使用分析化学技术确定,例如,聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱。术语“纯化的”可以是指,核酸或蛋白在电泳凝胶中基本给出一条条带。对于可以进行修饰例如磷酸化或糖基化的蛋白,不同的修饰可以给出不同的分离蛋白,其可以分别纯化。

[0102] 如本文所用,术语“肿瘤抗原结合结构域”是指能够特异性地结合存在于肿瘤上的特定抗原决定簇或一组抗原决定簇的结构域。

[0103] “获得作用剂”中的术语“获得”意在包括购买、合成或者以其他方式获取作用剂(或者所示的物质或材料)。

[0104] 如本文所用,“连接头”是指将两个或更多个多肽或核酸分子共价连接以使得它们彼此相连的官能团(例如,化学品或多肽)。如本文所用,“肽连接头”是指一个或多个用于将两个蛋白连接在一起(例如,使V_H和V_L结构域结合)的氨基酸。用于本发明的示例性连接序列为GGGGSGGGSGGGGS[SEQ ID NO:51]。

[0105] “调节”是指正向地或负向地改变。示例性的调节包括1%、2%、5%、10%、25%、50%、75%或100%的变化。

[0106] “瘤形成”是指以细胞或组织的病理性增殖及其后续迁移或侵入至其他组织或器官为特征性疾病。瘤形成的生长通常是不受控制的且进行性的,并且在不会引起正常细胞

繁殖或者导致其停止的条件下发生。瘤形成会影响许多种细胞类型、组织或器官,包括但不限于,选自膀胱、骨、脑、乳房、软骨、神经胶质、食管、输卵管、胆囊、心脏、肠、肾、肝、肺、淋巴结、神经组织、卵巢、胰腺、前列腺、骨骼肌、皮肤、脊髓、脾、胃、睾丸、胸腺、甲状腺、气管、泌尿生殖道、输尿管、尿道、子宫和阴道中的器官或其组织或细胞类型。瘤形成包括癌症,例如肉瘤、癌或浆细胞瘤(浆细胞的恶性肿瘤)。

[0107] “病原体”是指能够引起疾病的病毒、细菌、真菌、寄生虫或原生动物。

[0108] 示例性的病毒包括,但不限于,逆转录病毒科(Retroviridae)(例如,人免疫缺陷病毒,例如HIV-1(也称作HDTV-III、LAVE或HTLV-III/LAV或HIV-III;以及其他分离物例如HIV-LP);小核糖核酸病毒科(Picornaviridae)(例如,脊髓灰质炎病毒、甲肝病毒;肠道病毒、人柯萨奇病毒、鼻病毒、艾柯病毒);杯状病毒(Calciviridae)(例如,导致肠胃炎的菌株);批膜病毒(Togaviridae)(例如,马脑炎病毒、风疹病毒);纤丝病毒(Flaviridae)(例如,登革热病毒、脑炎病毒、黄热病病毒);冠状病毒(Coronaviridae)(例如,冠状病毒);弹状病毒(Rhabdoviridae)(例如,水疱性口炎病毒、狂犬病毒);丝状病毒(Filoviridae)(例如,埃博拉病毒);副黏病毒(Paramyxoviridae)(例如,副流感病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、呼吸道合胞体病毒);正黏病毒(Orthomyxoviridae)(例如,流感病毒);布尼亚病毒(Bunyaviridae)(例如,汉坦病毒、bunga病毒、白蛉病毒和奈洛病毒);沙状病毒(Arenaviridae)(出血热病毒);呼肠病毒(Reoviridae)(例如,呼肠孤病毒、环状病毒和轮状病毒);双核糖核酸病毒(Birnaviridae);嗜肝病毒(Hepadnaviridae)(乙肝病毒);细小病毒(Parvoviridae)(细小病毒);乳多空病毒(Papovaviridae)(乳头状瘤病毒、多瘤病毒);腺病毒(Adenoviridae)(大多数腺病毒);疱疹病毒(Herpesviridae)(单纯性疱疹病毒(HSV)1和2、水痘带状疱疹病毒、巨细胞病毒(CMV)、疱疹病毒);痘病毒(Poxviridae)(天花病毒、牛痘病毒、痘病毒(pox viruses));和虹彩病毒(Iridoviridae)(例如,非洲猪热病病毒);和未分类的病毒(例如,丁型肝炎药剂(视作是乙肝病毒的缺陷随体)、非甲乙型肝炎的药剂(1类=内部传播;2类=非肠道传播(即,丙肝);诺瓦克和相关病毒以及星状病毒)。

[0109] 示例性的细菌包括,但不限于,巴斯德氏菌(*Pasteurella*)、葡萄球菌(*Staphylococci*)链球菌(*Streptococcus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)和沙门氏菌(*Salmonella*)。感染性细菌的具体实例包括但不限于幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*)、博氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)、嗜肺性军团病杆菌(*Legionella pneumophila*)、分枝杆菌(*Mycobacteria*) (例如,结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)、*M. avium*、胞内分枝杆菌(*M. intracellulare*)、*M. kansasii*、戈登分枝杆菌(*M. goodii*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、淋病奈瑟球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitidis*)、单核细胞增多性李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)、化脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*) (A类链球菌)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*) (B类链球菌)、链球菌(*Streptococcus*) (绿色链球菌类)、粪链球菌(*Streptococcus faecalis*)、牛链球菌(*Streptococcus bovis*)、链球菌(*Streptococcus*) (厌氧种)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、病原性弯曲杆菌(*Campylobacter sp.*)、肠球菌(*Enterococcus sp.*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)、白喉棒状杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)、棒状杆菌(*Corynebacterium sp.*)、猪红斑丹毒丝菌(*Erysipelothrix*

rhusiopathiae)、产气荚膜梭状芽胞杆菌 (*Clostridium perfringens*)、破伤风梭菌 (*Clostridium tetani*)、产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*)、克雷氏肺炎杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、多杀巴斯德菌 (*Pasturella multocida*)、拟杆菌 (*Bacteroides* sp.)、具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*)、念珠状链杆菌 (*Streptobacillus moniliformis*)、苍白密螺旋体 (*Treponema pallidum*)、细弱密螺旋体 (*Treponema pertense*)、钩端螺旋体 (*Leptospira*)、立克次氏体 (*Rickettsia*)、和以色列放线菌 (*Actinomyces israeli*)。

[0110] “受体”是指选择性地与一种或多种配体结合的存在于细胞膜上的多肽或其部分。

[0111] “降低”是指负向地变化至少5%。变化可以是5%、10%、25%、30%、50%、75%或者甚至100%。

[0112] “识别”是指选择性地与目标物结合。识别病毒的T细胞通常表达与病毒表达的抗原结合的受体。

[0113] “参照”或“对照”是指比较的标准。例如，表达CAR和scFv的细胞的scFv-抗原结合水平可以与在仅表达CAR的对应细胞中的scFv-抗原结合水平进行比较。

[0114] “分泌的”是指多肽通过内质网、高尔基体经由分泌通路由细胞释放，以及作为暂时融合在细胞质膜处并将蛋白释放到细胞外部的囊泡而释放。

[0115] “信号序列”或“前导序列”是指在新合成蛋白的N-端处的指导其进入分泌通路的肽序列(长度为5、10、15、20、25、30个氨基酸)。示例性的前导序列包括κ前导序列：METDTLLLWVLLLWVPGSTGD [SEQ ID NO:15] (人)、METDTLLLWVLLLWVPGSTGD [SEQ ID NO:16] (小鼠)；和CDS前导序列：MALPVTALLLPLALLLHAARP [SEQ ID NO:17]。

[0116] “可溶的”是指多肽游离地扩散于水性环境中(例如，非膜结合的)。

[0117] “特异性结合”是指多肽或其片段识别并结合所关注的生物分子(例如，多肽)，但基本上不识别并结合样本(例如，天然地包含本发明多肽的生物样本)中的其他分子。

[0118] 如本文所用，术语“肿瘤抗原”是指与正常或非IS赘生性细胞相比独特地或差异性地在肿瘤细胞上表达的抗原(例如多肽)。参照本发明，肿瘤抗原包括任何由能够经由抗原识别受体(例如CD19、MUC1)激活或诱导免疫应答或者能够经由受体-配体结合(例如CD47、PD-L1/L2、B7.1/2)抑制免疫应答的肿瘤所表达的多肽。

[0119] “病毒抗原”是指由能够诱导免疫应答的病毒所表达的多肽。

[0120] 术语“包括”、“包含”、和意在具有美国专利法中赋予的的广义含义，并且可以表示“包含有”、“含有”等。

[0121] 如本文所用，“治疗”是指致力于改变被治疗的个体或细胞的疾病进程的临床干预，并且可以用于预防或者在临床病理过程中进行。治疗的治疗效果包括，但不限于，预防疾病的发生或复发、减轻症状、消除疾病的任何直接或间接病理后果、防止转移、降低疾病进展的速度、改善或减轻疾病状态以及预后缓解或改善。通过防止疾病或病症的进展，治疗可以防止由感染或诊断的受试者或疑似具有该病症的受试者中的病症所引起的恶化，疾病还可以防止在处于该病症风险或疑似具有该病症的受试者中病症或病症症状的发作。

[0122] 如本文所用，术语“受试者”是指脊椎动物，优选为哺乳动物，更优选为人。

[0123] 如本文所使用,术语“免疫受损的”是指受试者具有免疫缺陷。受试者非常易容易遭受机会性感染,由通常不在具有健康免疫系统的人中造成疾病但可以感染免疫系统功能差或受抑制的人的微生物所引起的感染。

[0124] 本发明的其他方面在以下公开内容中说明,并且在本发明的范围之内。

[0125] 1. 一种分离的免疫应答细胞,其包含:

[0126] 1) 抗原识别受体,其与抗原结合,其中该结合激活所述免疫应答细胞,和

[0127] 2) 可溶性单链可变片段(scFv),其与具有免疫抑制活性或免疫刺激活性的多肽结合。

[0128] 2. 根据实施方式1所述的分离的免疫应答细胞,其中,所述抗原是肿瘤或病原体抗原。

[0129] 3. 根据实施方式1所述的分离的免疫应答细胞,其中,所述可溶性scFv被分泌。

[0130] 4. 根据实施方式1-3中任一项所述的分离的免疫应答细胞,其中,所述抗原识别受体是T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)。

[0131] 5. 根据实施方式1-4中任一项所述的分离的免疫应答细胞,其中,所述抗原识别受体是外源性的或内源性的。

[0132] 6. 根据实施方式1-5中任一项所述的分离的免疫应答细胞,其中,所述抗原识别受体是重组表达的。

[0133] 7. 根据实施方式1-6中任一项所述的分离的免疫应答细胞,其中,所述抗原识别受体由载体表达。

[0134] 8. 根据实施方式1-7中任一项所述的分离的免疫应答细胞,其中,所述scFv由载体表达。

[0135] 9. 根据实施方式1-8中任一项所述的分离的免疫应答细胞,其中,所述细胞选自T细胞、自然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、调节性T细胞、人胚胎干细胞和可分化出淋巴样细胞的多能干细胞。

[0136] 10. 根据实施方式1-9中任一项所述的分离的免疫应答细胞,其中,所述免疫应答细胞是自体的。

[0137] 11. 根据实施方式1-10中任一项所述的分离的免疫应答细胞,其中,所述抗原是选自CD19、MUC16、MUC1、CA1X、CEA、CDS、CD7、CD10、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD49f、CD56、CD74、CD133、CD138、巨细胞病毒(CMV)感染细胞抗原、EGP-2、EGP-40、EpCAM、erb-B2、3、4、FBP、胎儿乙酰胆碱受体、叶酸受体-a、GD2、GD3、HER-2、hTERT、IL-13R-a2、K-轻链、KDR、LeY、L1细胞粘附分子、MAGE-A1、间皮素、NKG2D配体、NY-ES0-1、癌胚抗原(h5T4)、PSCA、PSMA、ROR1、TAG-72、VEGF-R2或WT-1中的肿瘤抗原。

[0138] 12. 根据实施方式1-11中任一项所述的分离的免疫应答细胞,其中,所述免疫抑制多肽选自CD47、PD-1、CTLA-4及其配体。

[0139] 13. 根据实施方式1-11中任一项所述的分离的免疫应答细胞,其中,所述免疫刺激多肽选自CD28、OX-40、4-1BB及其配体。

[0140] 14. 根据实施方式1-13中任一项所述的分离的免疫应答细胞,其中,所述抗原是CD19或MUC16。

[0141] 15. 根据实施方式1-14中任一项所述的分离的免疫应答细胞,其中,所述抗原识

别受体的胞内信号转导结构域是CD3 ζ -链、CD97、CD11a-CD18、CD2、ICOS、CD27、CD154、CDS、OX40、4-1BB、CD28信号转导结构域或其组合。

[0142] 16. 根据实施方式1-15中任一项所述的分离的免疫应答细胞,其中,所述细胞表达重组的或内源性的抗原受体,所述重组的或内源性的抗原受体为1928z或4H1128z。

[0143] 17. 根据实施方式1-16中任一项所述的分离的免疫应答细胞,其中,所述可溶性scFv提高所述免疫应答细胞的免疫应答。

[0144] 18. 一种降低受试者中肿瘤负荷的方法,所述方法包括施用有效量的免疫应答细胞,从而诱导受试者中的肿瘤细胞死亡,所述免疫应答细胞包含抗原识别受体和可溶性单链可变片段(scFv),所述抗原识别受体与第一抗原结合,其中该结合激活所述免疫应答细胞,所述可溶性单链可变片段(scFv)与具有免疫抑制活性或免疫刺激活性的多肽结合。

[0145] 19. 根据实施方式18所述的方法,其中,所述方法减少肿瘤细胞的数量。

[0146] 20. 根据实施方式18所述的方法,其中,所述方法减少肿瘤的大小。

[0147] 21. 根据实施方式18所述的方法,其中,所述方法根除受试者中的肿瘤。

[0148] 22. 一种提高具有瘤形成的受试者的存活的方法,所述方法包括施用有效量的免疫应答细胞,从而治疗或预防受试者中的瘤形成,所述免疫应答细胞包含抗原识别受体和可溶性单链可变片段(scFv),所述抗原识别受体与第一抗原结合,其中该结合激活所述免疫应答细胞,所述可溶性单链可变片段(scFv)与具有免疫抑制活性或免疫刺激活性的多肽结合。

[0149] 23. 根据实施方式22所述的方法,其中,所述瘤形成选自血癌、B细胞白血病、多发性骨髓瘤、淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病、非霍奇金氏淋巴瘤和卵巢癌。

[0150] 24. 根据实施方式23所述的方法,其中,所述瘤形成是B细胞白血病,所述抗原是CD19,且所述具有免疫抑制活性的多肽是CD47、PD-1、CTLA-4及其配体中的一种或多种。

[0151] 25. 根据实施方式23所述的方法,其中,所述瘤形成是多发性骨髓瘤,所述抗原是CD19,且所述具有免疫抑制活性的多肽是CD47、PD-1、CTLA-4及其配体中的一种或多种。

[0152] 26. 根据实施方式23所述的方法,其中,所述瘤形成是急性淋巴细胞性白血病(ALL),所述抗原是CD19,且所述具有免疫抑制活性的多肽是CD47、PD-1、CTLA-4及其配体中的一种或多种。

[0153] 27. 根据实施方式23所述的方法,其中,所述瘤形成是慢性淋巴细胞性白血病,所述抗原是CD19,且所述具有免疫抑制活性的多肽是CD47、PD-1、CTLA-4及其配体中的一种或多种。

[0154] 28. 根据实施方式23所述的方法,其中,所述瘤形成是非霍奇金氏淋巴瘤,所述抗原是CD19,且所述具有免疫抑制活性的多肽是CD47、PD-1、CTLA-4及其配体中的一种或多种。

[0155] 29. 根据实施方式23所述的方法,其中,所述瘤形成是卵巢癌,所述抗原是MUC16,且所述具有免疫抑制活性的多肽是CD47、PD-1、CTLA-4及其配体中的一种或多种。

[0156] 30. 根据实施方式22-29中任一项所述的方法,其中,所述可溶性scFv被分泌。

[0157] 31. 根据实施方式22-30中任一项所述的方法,其中,所述scFv由载体表达。

[0158] 32. 根据实施方式22-31中任一项所述的方法,其中,所述可溶性scFv提高所述免

疫应答细胞的免疫应答。

[0159] 33. 根据实施方式22-32中任一项所述的方法,其中,所述抗原识别受体是T细胞受体 (TCR) 或嵌合抗原受体 (CAR)。

[0160] 34. 根据实施方式22-33中任一项所述的方法,其中,所述抗原识别受体是外源性的或内源性的。

[0161] 35. 根据实施方式22-34中任一项所述的方法,其中,所述抗原识别受体是重组表达的。

[0162] 36. 根据实施方式22-35中任一项所述的方法,其中,所述抗原识别受体由载体表达。

[0163] 37. 根据实施方式22-36中任一项所述的方法,其中,所述细胞选自T细胞、自然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、调节性T细胞、人胚胎干细胞和可分化出淋巴样细胞的多能干细胞。

[0164] 38. 根据实施方式22-37中任一项所述的方法,其中,所述方法降低或根除受试者中的肿瘤负荷。

[0165] 39. 一种制备抗原特异性免疫应答细胞的方法,所述方法包括向所述免疫应答细胞中导入核酸序列,所述核酸序列编码与具有免疫抑制活性或免疫刺激活性的多肽结合的单链可变片段(scFv),其中所述免疫应答细胞包含与抗原结合的抗原识别受体。

[0166] 40. 根据实施方式39所述的方法,其中,所述可溶性scFv被分泌。

[0167] 41. 根据实施方式39或40所述的方法,其中,所述scFv由载体表达。

[0168] 42. 根据实施方式39-41中任一项所述的方法,其中,所述可溶性scFv提高所述免疫应答细胞的免疫应答。

[0169] 43. 根据实施方式39-42中任一项所述的方法,其中,所述免疫抑制多肽选自CD47、PD-1、CTLA-4及其配体。

[0170] 44. 根据实施方式39-42中任一项所述的方法,其中,所述免疫刺激多肽选自CD28、OX-40、4-1BB及其配体。

[0171] 45. 根据实施方式39-44中任一项所述的方法,其中,所述抗原识别受体是T细胞受体 (TCR) 或嵌合抗原受体 (CAR)。

[0172] 46. 根据实施方式39-45中任一项所述的方法,其中,所述抗原识别受体是外源性的或内源性的。

[0173] 47. 根据实施方式39-46中任一项所述的方法,其中,所述抗原识别受体是重组表达的。

[0174] 48. 根据实施方式39-47中任一项所述的方法,其中,所述抗原识别受体由载体表达。

[0175] 49. 根据实施方式39-48中任一项所述的方法,其中,所述细胞选自T细胞、自然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、调节性T细胞、人胚胎干细胞和可分化出淋巴样细胞的多能干细胞。

[0176] 50. 根据实施方式39-49中任一项所述的方法,其中,所述抗原识别受体的胞内信号转导结构域是CD3 ζ -链、CD97、CD11a-CD18、CD2、ICOS、CD27、CD154、CDS、OX40、4-1BB、CD28信号转导结构域或其组合。

- [0177] 51. 一种治疗有需要的受试者中的血癌的方法,所述方法包括对受试者施用治疗有效量的T细胞,从而治疗受试者中的血癌,所述T细胞包含抗原识别受体和可溶性单链可变片段(scFv),所述抗原识别受体与CD19结合,其中该结合激活所述免疫应答细胞,所述可溶性单链可变片段(scFv)与CD47、PD-1、CTLA-4及其配体中的一种或多种结合。
- [0178] 52. 根据实施方式51所述的方法,其中,血癌选自B细胞白血病、多发性骨髓瘤、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病和非霍奇金氏淋巴瘤。
- [0179] 53. 一种载体,其包含编码与抗原结合的抗原识别受体的核酸序列以及编码与具有免疫抑制活性或免疫刺激活性的多肽结合的可溶性单链可变片段(scFv)的核酸序列。
- [0180] 54. 一种药物组合物,其在药学可接受的赋形剂中包含有效量的实施方式1-18中任一项所述的免疫应答细胞。
- [0181] 55. 一种用于治疗瘤形成的药物组合物,其在药学可接受的赋形剂中包含有效量的实施方式1-18中任一项所述的肿瘤抗原特异性T细胞。
- [0182] 56. 一种试剂盒,其用于治疗瘤形成、病原体感染、自身免疫性疾病或同种异体移植,所述试剂盒包含免疫应答细胞,所述免疫应答细胞包含与抗原结合并激活所述免疫应答细胞的抗原识别受体、以及与具有免疫抑制活性或免疫刺激活性的多肽结合的可溶性单链可变片段(scFv)。
- [0183] 57. 根据实施方式56所述的试剂盒,其中,所述试剂盒还包含用于使用所述细胞来治疗具有瘤形成、病原体感染、自身免疫性疾病或同种异体移植的受试者的书面说明书。
- [0184] 58. 一种免疫应答细胞,其表达具有免疫细胞激活活性的抗原结合受体以及外源性CD40L。
- [0185] 59. 根据实施方式58所述的免疫应答细胞,其中,所述抗原结合受体是嵌合抗原受体。
- [0186] 60. 根据实施方式59所述的免疫应答细胞,其中,所述嵌合抗原受体识别肿瘤抗原。
- [0187] 61. 根据实施方式58-60中任一项所述的免疫应答细胞,其中,所述免疫应答细胞选自T细胞、自然杀伤细胞、细胞毒性T细胞和调节性T细胞。
- [0188] 62. 一种增加受试者中响应于癌细胞或病原体的免疫激活细胞因子的产生的方法,其包括对受试者施用免疫应答细胞,所述免疫应答细胞具有分别与癌细胞或病原体的抗原结合的抗原识别受体,并还表达外源性CD40L。
- [0189] 63. 根据实施方式62所述的方法,其中,所述抗原结合受体是嵌合抗原受体。
- [0190] 64. 根据实施方式63所述的方法,其中,所述嵌合抗原受体识别癌抗原。
- [0191] 65. 根据实施方式62-64中任一项所述的方法,其中,所述免疫应答细胞选自T细胞、自然杀伤细胞、细胞毒性T细胞和调节性T细胞。
- [0192] 66. 根据实施方式62-65中任一项所述的方法,其中,所述细胞因子是IL-12。
- [0193] 67. 一种增加受试者中CD8+细胞毒性T细胞对癌细胞或病原体的应答的方法,其包括对受试者施用免疫应答细胞,所述免疫应答细胞具有分别与癌细胞或病原体的抗原结合的抗原识别受体,并还表达外源性CD40L。
- [0194] 68. 根据实施方式67所述的方法,其中,所述抗原结合受体是嵌合抗原受体。

- [0195] 69. 根据实施方式68所述的方法,其中,所述嵌合抗原受体识别 癌抗原。
- [0196] 70. 根据实施方式67-69中任意项所述的方法,其中,所述免疫应 答细胞选自T细胞、自然杀伤细胞、细胞毒性T细胞和调节性T细胞。
- [0197] 71. 一种增加具有癌症或具有病原体引起的疾病的受试者中树突 状细胞的成熟的方法,其包括对受试者施用免疫应答细胞,所述免疫 应答细胞具有分别与癌细胞或病原体的抗原结合的抗原识别受体,并 还表达外源性CD40L。
- [0198] 72. 根据实施方式71所述的方法,其中,所述抗原结合受体是嵌 合抗原受体。
- [0199] 73. 根据实施方式72所述的方法,其中,所述嵌合抗原受体识别 癌抗原。
- [0200] 74. 根据实施方式71-73中任一项所述的方法,其中,所述免疫应 答细胞选自T细胞、自然杀伤细胞、细胞毒性T细胞和调节性T细胞。
- [0201] 75. 一种降低受试者中肿瘤负荷的方法,其包括对受试者施用有效 量的免疫应答细胞,从而诱导受试者中的肿瘤细胞死亡,所述免疫应 答细胞具有抗原识别受体并表达外源性CD40L,所述抗原识别受体与 第一抗原结合,其中该结合激活所述免疫应答细胞。
- [0202] 76. 一种延长具有瘤形成的受试者的存活的方法,所述方法包括对 受试者施用有效量的免疫应答细胞,从而延长受试者的存活,所述免 疫应答细胞具有抗原识别受体并表达外源性CD40L,所述抗原识别受 体与第一抗原结合,其中该结合激活所述免疫应答细胞。
- [0203] 77. 一种治疗或预防受试者中瘤形成的方法,所述方法包括对受试 者施用有效量的免疫应答细胞,从而治疗或预防受试者中的瘤形成, 所述免疫应答细胞具有抗原识别受体并表达外源性CD40L,所述抗原 识别受体与第一抗原结合,其中该结合激活所述免疫应 答细胞。
- [0204] 78. 一种核酸,其包含编码CAR和编码CD40L的序列,各序列任 选地与启动子元件可操作地连接。
- [0205] 79. 根据实施方式78所述的核酸,其包含在载体中。
- [0206] 80. 根据实施方式79所述的核酸,其中,所述载体是病毒。
- [0207] 81. 一种试剂盒,其用于治疗瘤形成、病原体感染、自身免疫性疾 病或同种异体移植,其包含编码对要治疗的瘤形成、病原体、自身免 疫性疾病或移植的抗原进行识别的CAR的核酸、以及编码与具有免疫 抑制活性或免疫刺激活性的多肽结合的可溶性单链可变片段(scFv) 的核酸。
- [0208] 82. 一种用于治疗癌症的试剂盒,所述试剂盒包含编码识别癌抗原 的CAR的核酸、以及编码与具有免疫抑制活性或免疫刺激活性的多肽 结合的可溶性单链可变片段(scFv) 的核酸。
- [0209] 83. 一种用于治疗癌症或病原体介导的病症的试剂盒,所述试剂盒 包含编码识别 癌或病原体的抗原的CAR的核酸、以及编码与具有免疫 抑制活性或免疫刺激活性的多肽结 合的可溶性单链可变片段(scFv) 的核酸。
- [0210] 84. 一种用于治疗癌症或病原体介导的病症的试剂盒,所述试剂盒 包含编码识别 癌或病原体的抗原的CAR的核酸、以及编码CD40L的 核酸。

附图说明

- [0211] 以下通过示例说明方式给出但无意于将本发明限于所述的具体实 施方式的详细

说明可以结合附图进行理解。

[0212] 图1示出修饰成表达单独的嵌合抗原受体 (CAR) 或者还表达可分泌scFv (例如, α PD-1、 α PD-L1、 α CTLA-4或 α CD47) 的T细胞。修饰成表达单独的嵌合抗原受体 (CAR) 的T细胞在不友好的肿瘤微环境内经受到抑制。无意拘泥于特定理论, 对这些细胞进行进一步修饰以表达可分泌的scFv来阻断免疫抑制信号转导, 由于其调节肿瘤微环境并耐受抑制因子的能力而具有提高的抗肿瘤功能。

[0213] 图2A和2B示出可分泌的抗-CD 47scFv构建体的结构。图2A示出设计成包含 κ 前导序列以使得输出该蛋白的可分泌抗-CD47 scFv的结构。可变重链 (V_H) 和轻链 (V_L) 与丝氨酸甘氨酸连接头 (G_4S) 连接, 并包含myc-标签以使得可以对scFv进行检测。图2B示出将可分泌scFv使用所示的P2A元件与1928z CAR构建体连接。

[0214] 图3示出与 κ 前导序列可操作地连接的B6H12.2 scFv序列[SEQ ID NO:18]。将B6H12.2杂交瘤的可变重链 (V_H) 和可变轻链 (V_L) 序列经PCR扩增成具有 κ 前导序列、c-myc标签, 并以丝氨酸甘氨酸连接头连接。示出核酸序列和氨基酸翻译。

[0215] 图4示出与CDS前导序列可操作地连接的B6H12.2 scFv序列[SEQ ID NO:19]。将B6H12.2杂交瘤的可变重链 (V_H) 和可变轻链 (V_L) 序列经PCR扩增成具有CDS前导序列、c-myc探针, 并以丝氨酸甘氨酸连接头连接。示出核酸序列和氨基酸翻译。

[0216] 图5示出1928z-2A-B6H12.2 (κ 前导) 构建体的核酸序列[SEQ ID NO:20]。将B6H12.2 scFv序列克隆到SFG表达载体中, 以与靶向CD19的1928z CAR一起表达。使用P2A元件连接两个元件, 如图所示。

[0217] 图6示出4H1128z-2A-B6H12.2 (κ 前导) 构建体的核酸序列[SEQ ID NO:21]。将B6H12.2 scFv序列克隆到SFG表达载体中, 以与靶向MUC-CD的4H1128z嵌合抗原受体 (CAR) 一起表达。使用P2A元件连接两个元件, 如图所示。

[0218] 图7A和7B示出1928-2A-B6H12.2 293G1v9包装细胞的产生。使用1928z-2A-B6H12.2或1928z载体产生病毒包装细胞。图7A示出两种克隆即克隆5和6的选择, 基于1928z CAR的表达, 与对照1928z 293G1v9细胞相当。CAR表达通过流式细胞术和12d11抗体染色来确定。图7B示出一个实验, 其中将来自1928z或1928z-2A-B6H12.2包装细胞的上清液与CD47⁺肿瘤细胞Nalm-6和Raji孵育, 并将肿瘤细胞洗涤, 并用CD47抗体染色。与用1928z上清液孵育 (黑线) 相比较, 在1928z-2A-B6H12.2上清液中孵育的肿瘤细胞具有降低的抗-CD47结合 (蓝线)。使用来自B6H12.2杂交瘤细胞的上清液作为对照 (红线)。

[0219] 图8A和8B示出1928z-2A-B6H12.2人外周血T细胞的产生。将人外周血T细胞用来自1928z或1928z-2A-B6H12.2包装细胞的上清液进行转导。图8A示出通过流式细胞术使用12d11抗体的CAR表达分析, 以及用荧光标记的抗-c-myc标签抗体染色的结合的抗-CD47 scFv的分析。图8B示出抗-CD47 scFv阻断CD47的能力, 其通过将T细胞用抗-CD47抗体染色而确定。与1928z T细胞 (红线) 相比较, 1928z-2A-B6H12.2 T细胞具有降低的抗-CD47结合 (蓝线)。使用在B6H12.2杂交瘤上清液中孵育的1928z T细胞作为对照 (黑线)。

[0220] 图9A-9C示出1928z-2A人外周血T细胞。进行流式细胞术, 对1928z和1928z-2A-B6H12.2 T细胞的表型进行表征。图9A示出1928z和1928z-2A T细胞具有相当的CD4:CD8 T细胞比、以及相当的激活标记物CD69和CD25的表达。与1928z-2A-B6H12.2 T细胞相比较, 1928z T细胞具有增加的CD62L表达。图9B示出1928z和1928z-2A-B6H12.2 T细胞分泌细胞

因子的能力,其通过在与3T3 (CD19⁺/B7.1⁺) aAPC细胞以及高尔基体转运抑制剂Golgi plug和Golgi Stop孵育后通过流式细胞术测定。在用3T3 (CD19⁺/B7.1⁺) 细胞刺激之后,1928z和1928z-2A-B6H12.2 T细胞产生水平相当的IL-2和IFN γ 。图9C示出,1928z和1928z-2A-B6H12.2 T细胞具有相当的细胞溶解能力,如通过使用Raji肿瘤细胞的标准⁵¹铬释放检验而测定的。

[0221] 图10A和10B示出1928z-2A-B6H12.2 T细胞的抗肿瘤效力。1928z-2A-B6H12.2 T细胞的体内抗肿瘤效力用临床前SCID-Beige小鼠模型考察。将小鼠用 1×10^6 Nalm-6-萤火虫荧光素酶⁺肿瘤细胞进行静脉内接种,随后用 5.7×10^6 CAR⁺1928z、1928z-2A-B6H12.2或对照的卵巢癌靶向的4H1128z-2A-B6H12.2 T细胞进行处理,也是静脉内接种。图10A示出,与未经治疗的、用1928z或4H1128z-2A-B6H12.2处理的小鼠相比较,用1928z-2A-B6H12.2 T细胞处理的小鼠存活提高。图10B示出,与未经治疗的、用1928z或4H1128z-2A-B6H12.2 T细胞处理的小鼠相比较,用1928z-2A-B6H12.2 T细胞处理的小鼠肿瘤负荷降低,使用生物发光成像来监测肿瘤进展。

[0222] 图11示出与 κ 前导序列可操作地连接的5C4 scFv序列[SEQ ID NO:22]。5C4抗体克隆的可变重链(V_H)和可变轻链(V_L)序列设计有 κ 前导序列、c-myc标记,并用丝氨酸甘氨酸连接头连接。示出核酸序列和氨基酸翻译。

[0223] 图12示出1928z-2A-5C4 (κ 前导) 构建体的核酸序列[SEQ ID NO:23]。将5C4 scFv序列克隆到SFG表达载体中,以与靶向CD19的1928z CAR一起表达。使用P2A元件来连接两个元件,如图所示。

[0224] 图13示出4H1128z-2A-5C4 (κ 前导) 构建体的核酸序列[SEQ ID NO:24]。将5C4 scFv克隆到SFG表达载体中,以与靶向MUC-CD的4H1128z CAR一起表达。使用P2A元件来连接两个元件,如图所示。

[0225] 图14示出1928z-2A-5C4 (κ 前导) 293G1v9细胞的产生。使用1928z-2A-5C4产生病毒包装细胞。基于1928z CAR的表达选择两个克隆,即克隆A6和B6,1928z CAR的表达与对照的1928z 293G1v9细胞相当。通过流式细胞术和12d11抗体染色对CAR表达进行测定。

[0226] 图15示出1928z-2A-5C4 (κ 前导) 人外周血T细胞的产生。将人外周血T细胞用1928z或1928z-2A-5C4包装细胞的上清液转染。使用流式细胞术,使用12d11抗体对CAR表达进行分析,并使用荧光标记的抗-c-myc标签抗体染色对结合的抗-CD47 scFv进行分析。

[0227] 图16示出3T3 (CD19⁺/B7.1⁺)、Raji和Nalm-6细胞上的PD-L1的表达。使用流式细胞术来测定已转导以表达PD-L1的3T3 (CD19⁺/B7.1⁺)、Raji和Nalm-6细胞上PD-L1的表达。与对照的未转导细胞相比较,转导的细胞表达相当高水平的PD-L1,将划圈的群分选用于实验。

[0228] 图17示出1928z和1928z-2A-5C4 T细胞扩增。将1928z和1928z-2A-5C4 T细胞与3T3 (CD19⁺/B7.1⁺) 或3T3 (CD19⁺/B7.1⁺/PD-L1⁺) 一起孵育,用台盼蓝监测T细胞扩增,并通过流式细胞术测定CAR表达。扩增和CAR表达与在3T3 (CD19⁺/B7.1⁺) 细胞上扩增细胞的扩增和CAR表达相关。

[0229] 图18示出与小鼠 κ 前导序列可操作地连接的J43 scFv序列[SEQ ID NO:25]。J43抗体克隆的可变重链(V_H)和可变轻链(V_L)序列设计有小鼠 κ 前导序列、c-myc标签,并用丝氨酸甘氨酸连接头连接。示出序列和氨基酸翻译。

[0230] 图19示出19m28mziRESJ43(小鼠κ前导)构建体的核酸序列[SEQ ID NO:26]。将J43 scFv克隆到SFG表达载体中,以与靶向CD19的 19m28mz CAR一起表达。使用内部核糖体进入位点(IRES)元件连接两个元件,如图所示。

[0231] 图20示出4H11m28mziRESJ43(小鼠κ前导)构建体的核酸序列 [SEQ ID NO:27]。将J43 scFv克隆到SFG表达载体中,以与靶向 MUC-CD的4H11m28mz CAR一起表达。使用内部核糖体进入位点 (IRES) 元件连接两个元件,如图所示。

[0232] 图21示出将CART细胞基因修饰成表达scFv分子(“装甲 (armored) CAR T细胞”)以克服“不友好”肿瘤微环境的策略。CAR⁺ T细胞可以修饰成分泌具有免疫调节功能的拮抗性scFv。当激活针对 同源抗原的CAR时 (1), 装甲CAR修饰的T细胞可以诱导成分泌对 融合CAR修饰的T细胞和内源性抗肿瘤T细胞上的抑制性PD-1T细 胞受体拮抗的scFv,以提高抗肿瘤效应物功能 (2); 诱导成分泌对融 合CAR修饰的T细胞和内源性抗肿瘤T细胞上的抑制性CTLA-4T细 胞受体拮抗的scFv,以提高抗肿瘤效应物功能 (3); 或者诱导成分泌 对肿瘤细胞上表达的CD47受体拮抗的scFv,以逆转肿瘤细胞为逃避 宿主天然抗肿瘤应答识别的伪装,导致宿主巨噬细胞对肿瘤的认识和 根除。

[0233] 图22A-22D示出CD40L由人T-细胞的组成性表达。(A) 编码人 CD40L的逆转录病毒构建体载体的示意图;LTR,长末端重复序列; SD、SA,剪接供体和受体;Ψ,包装元件。(B) 逆转录病毒基因转移 之后的CD4⁺和CD8⁺CD40L⁻修饰的T细胞的流式细胞术;x轴,APC- 结合的抗-人CD40L (CD154)。(C) 与空白对照 (mock) 转导的T-细 胞相比较,CD40L修饰的T细胞的增殖提高。(D) 与空白对照转导的 T-细胞相比较,CD40L修饰的T细胞的可溶性CD40L (sCD40L)、IFN-γ 和GM-CSF的分泌提高。所有结果是至少三组独立实验的代表(*表示 统计学显著)。

[0234] 图23A和23B示出CD40⁺肿瘤细胞对CD40L修饰的T细胞的放 大的免疫原性。(A) 流式细胞术显示,与和来自同一供体的空白对照 转导的T细胞(灰线)的培养相比较,在与 CD40L-修饰的T-细胞(实 线)共培养之后,DOHH2肿瘤细胞系上共刺激分子(CD80和CD86)、 粘附分子(CD54、CD58和CD70)HLA分子(I类HLA和HLA-DR) 以及Fas-死亡受体(CD95)的上调。(B) 在与CD40L-修饰的T细胞 共培养之后,CD40⁻肿瘤(所示的NALM6)没有表现出表型变化。所 有结果是至少三组独立实验的代表。

[0235] 图24A和24B示出,CLL细胞对自体CD40L-修饰的T细胞的放 大的免疫原性。(A) 在用含有CD40L的逆转录病毒载体进行逆转录病 毒基因转移之后,得自患者的CD40L修饰的T 细胞的流式细胞术;x 轴,APC-结合的抗-人CD40L (CD154)。(B) 流式细胞术显示,与和 来自同一供体的空白对照转导的T细胞共培养(灰线)相比较,在与 自体CD40L-修饰的T-细胞 (实线)共培养之后,CLL细胞上共刺激分 子(CD80和CD86)、粘附分子(CD54、CD58和CD70) HLA分子(I 类HLA和HLA-DR)以及Fas-死亡受体(CD95)的上调。所有结果 是至少三组独立实验的代表。

[0236] 图25A和25B示出CD40L-修饰的T细胞的IL-12分泌以及单核细 胞来源的树突状细胞(moDC)的成熟。(A) 来自三个不同供体的moDC 和CD40L修饰的T细胞之间的共培养(24小 时)的培养基的细胞因子 分析,表现出升高的IL-12p70分泌。(B) moDC的流式细胞术显示出 在与CD40L修饰的T细胞共培养之后的成熟。所有结果是至少三组独 立实验的代表。

[0237] 图26A-C示出,人T细胞用CAR/CD40L载体有效转导表现出增 强的细胞毒性。(A) 含

有1928z-IRES-CD40L和Pz1-IRES-CD40L基因的逆转录病毒的示意图;LTR,长末端重复序列;SD、SA,剪接供体和受体; Ψ ,包装元件;CD8表示CD8前导序列;scFv,单链可变片段;VH和VL,可变重链和轻链;TM,跨膜结构域。(B)用于体内实验的人T-细胞的FACS分析,其转导成表达19-28z/CD40L载体(刺激前),随后在AAPC(表达CD19和CD80的NIH 3T3成纤维细胞;所示的1928/CD40L T-细胞)上共培养之后CAR/CD40L的表达增强。x轴,PE-结合的1928z CAR-特异性抗体(19e3);y轴,APC-结合的抗-人CD40L(CD154)。(C)如标准 ^{51}Cr 释放检验所测定的,与19-28z T-细胞相比较,19-28z/40L T-细胞溶解DOHH2肿瘤细胞的能力显著增强。所有结果是至少三组实验的代表(*表示统计学显著)。

[0238] 图27示出1928z/CD40L T-细胞输注之后的肿瘤根除和长期存活。在CAR-修饰的T-细胞的单次i.v.给药前2天通过静脉内(i.v.)注射接种DOHH2肿瘤细胞的SCID-Beige小鼠的存活曲线。与对照T细胞的组(1928z组n=8;Pz1和Pz1/40L组n=5)相比较,用1928z/CD40L T-细胞处理的小鼠(n=10)表现出提高的长期存活。所有结果是至少两组实验的代表(*表示统计学显著)。

[0239] 图28示出,CD40+肿瘤细胞对sCD40L的放大的免疫原性。(A)流式细胞术显示,与sCD40L水平没有升高的培养基(空白对照转导的T-细胞培养基)(灰线)相比较,在与含有升高水平的sCD40L的处理培养基(CD40L-修饰的T-细胞培养基)(实线)共培养之后,DOHH2肿瘤细胞系上共刺激分子(CD80)、粘附分子(CD54、CD58和CD70)HLA分子(I类HLA和HLA-DR)以及Fas-死亡受体的上调。

[0240] 图29示出,1928z/CD40L T细胞表现出增加的细胞毒性。如通过标准 ^{51}Cr 释放检验所测定的,与19-28z T-细胞相比较,19-28z/40L T-细胞溶解Raji肿瘤细胞的能力显著增加。

具体实施方式

[0241] 大体上讲,本发明提供至少表达抗原识别受体(例如TCR或CAR)与(i)与免疫抑制抗原(例如 $\alpha\text{PD-1}$ 、 $\alpha\text{PD-L1}$ 、 $\alpha\text{CTLA-4}$ 或 αCD47)结合的scFv;(ii)与免疫刺激抗原(例如 αCD28 、 $\alpha\text{OX-40}$ 、 αCD40 或 $\alpha\text{4-1BB}$)结合的scFv或(iii)CD40L的组成的细胞,包括基因修饰的免疫应答细胞(例如,T细胞、自然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)),以及使用这些细胞治疗瘤形成和其他病理的方法,其中需要增加抗原特异性免疫应答。本发明至少部分地基于以下发现:与免疫抑制抗原(例如本文所示的CD47和PD-L1)结合的scFv可用于激活并刺激免疫应答细胞。具体地,本发明的scFv减少或防止激活的免疫应答细胞在肿瘤微环境中的免疫应答抑制。恶性肿瘤细胞已经发展出一些列保护其自身不受免疫识别和消除的机制。当前的方法提供在肿瘤微环境内的免疫原性以用于肿瘤根除,并且相对传统的过继性T细胞疗法表现出重大的突破。

[0242] 肿瘤微环境

[0243] 肿瘤具有对宿主免疫应答不友好的微环境,涉及一系列恶性肿瘤细胞保护其自身不受免疫识别和消灭的机制。这种“不友好的肿瘤微环境”包括许多种免疫抑制因子,包括浸润性调节CD4⁺T细胞(Treg)、骨髓来源的抑制性细胞(MDSC)、肿瘤相关的巨噬细胞(TAM),免疫抑制细胞因子(包括IL-10和TGF- β),以及靶向激活T细胞所表达的免疫抑制受体的配体(CTLA-4和PD-1)的表达。这些免疫抑制机制在保持耐受性以及抑制不适当的

免疫应答方面发挥作用,但是在肿瘤微环境内,这些机制防止有效的抗肿瘤免疫应答。在遇到靶向的肿瘤细胞时,这些免疫抑制因子统统可以诱导过继性转移的CAR修饰T细胞的显著的无变应性(anergy)或细胞凋亡。

[0244] 细胞毒性T-淋巴细胞抗原4 (CTLA-4)

[0245] CTLA-4是由活化的T细胞表达的抑制性受体,其在被其对应的配体(分别为CD80和CD86:B7-1和B7-2)接合时,介导激活T细胞的抑制或无变应性。在临床前和临床研究中,通过全身性抗体输注进行的CTLA-4阻断,尽管提高内源性抗肿瘤应答,但在临床环境中,具有显著的未预见到的毒性。无疑拘泥于特定理论,通过靶向肿瘤的CAR修饰T细胞经递送拮抗性scFv进行的靶向CTLA-4阻断,使毒性得以降低,而且提供保护不受免疫抑制的肿瘤靶向T细胞的替代“内源性”群(CART细胞群)。可以使用临床前研究(例如,B细胞恶性肿瘤和卵巢癌的人异种移植肿瘤模型和鼠科肿瘤模型)来评测scFv分泌对于CAR修饰的T细胞群以及对于内源性抗肿瘤免疫应答的影响。抗-CTLA-4scFv可以产生自分泌小鼠抗-小鼠CTLA-4单克隆抗体的9D9杂交瘤,或者分泌仓鼠抗-小鼠CTLA-4单克隆抗体的9H10杂交瘤。

[0246] 程序性细胞死亡蛋白1 (PD-1)

[0247] PD-1在与其对应的配体PD-L1和PD-L2(在内源性巨噬细胞和树突状细胞上表达)接合时是激活T细胞的负免疫调节剂。PD-L1的上调是肿瘤细胞可以逃避宿主免疫系统的一种机制。再次,在临床前和最近公开的临床试验中,通过拮抗性抗体进行的PD-1阻断诱导了通过宿主内源性免疫系统介导的抗肿瘤应答。异种移植和同基因鼠科肿瘤模型可以用于表明,由肿瘤靶向的CAR修饰T细胞所分泌的拮抗性抗-PD-1scFv提高这些分泌scFv的CAR修饰T细胞的抗肿瘤类效能。

[0248] CD47

[0249] CD47是具有广泛组织分布的膜蛋白,且其一已经在最近的临床前模型中表现出保护许多种肿瘤细胞不受巨噬细胞识别。在这些模型中,输注抗-CD47单克隆抗体引起所建立的肿瘤进展的减缓。换言之,在肿瘤细胞上的CD47阻断使这些肿瘤细胞暴露于宿主巨噬细胞的识别和吞噬。考虑到这一抗体的相当普遍存在的表达,全身性阻断抗体输注可能潜在地引起脱靶毒性。再次,与靶向递送的范例一致,CAR修饰的T细胞分泌直接递送至肿瘤微环境的类似阻断性抗-CD47 scFv,诱导/提高所需的抗肿瘤效果,在该情形中由天然免疫系统而非获得性宿主免疫系统介导。而且,该方法不限于治疗瘤形成,而可修改成大范围的需要增加抗原特异性免疫应答的应用,这样的应用不仅包括治疗瘤形成,而且用于提高针对病原体感染或传染性疾病的免疫应答,以及在自体免疫或同种异体移植的背景中增强调节性T细胞的免疫耐受性。

[0250] CD40L

[0251] CD40配体(CD40L、CD154),一种属于肿瘤坏死因子(TNF)基因超家族的II型跨膜蛋白,具有提高肿瘤特异性T-细胞功能的潜力。最初在激活的CD4+T-细胞上识别,CD40L的表达在许多种免疫、造血、上皮、内皮和平滑肌细胞上是可诱导的。在激活的T细胞中,CD40L在数分钟内表达,在6小时内达到最高峰,然后在随后的12-24小时中下降。CD40L与其同源受体CD40结合,CD40在许多种免疫和非免疫细胞(包括B细胞、巨噬细胞和树突状细胞(DC))上组成性地表达。明显地,CD40还在若干血液和非血液恶性肿瘤中表达,包括慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、霍奇

金氏淋巴瘤、鼻咽癌、骨肉瘤、尤文氏肉瘤、黑色素瘤、乳腺癌、卵巢癌和宫颈癌,表明CAR/CD40L T-细胞对于许多种恶性肿瘤的潜在应用。参见下文列在实施例6参考文献中的参考文献 8-17。

[0252] 造血细胞谱系

[0253] 哺乳动物造血(血)细胞提供范围很宽的生理学活性。造血细胞划分为淋系、髓系和红系。淋系,包括B、T、和自然杀伤(NK)细胞,提供抗体的产生、细胞免疫系统的调节、血液中外来物的检测、对宿主中外来细胞的检测等。如本文所用,术语“T细胞”是指在胸腺中成熟并主要负责细胞介导的免疫力的淋巴细胞。T细胞与获得性免疫系统有关。如本文所用,术语“自然杀伤(NK)细胞”是指作为细胞介导的免疫力的一部分并在天然免疫应答中发挥作用的淋巴细胞。它们不要求在先的活化来发挥其对目标细胞的细胞毒性作用。细胞毒性T细胞(CTL或杀伤T细胞)是能够诱导感染的体细胞或肿瘤细胞死亡的淋巴细胞的子集。

[0254] 用于本发明方法的细胞

[0255] 本发明提供表达对免疫应答细胞进行激活的抗原识别受体(例如, TCR、CAR)和与免疫抑制抗原(例如, α PD-1、 α PD-L1、 α CTLA-4 或 α CD47)结合的scFv的组合的细胞,以及使用这些细胞来治疗要求提高的免疫应答的疾病的方法。在一个方法中,使用肿瘤抗原特异性T细胞、NK细胞、CTL细胞或其他免疫应答细胞来表达与免疫抑制抗原结合的scFv,以用于治疗或预防瘤形成。例如,表达对CD19进行识别的嵌合抗原受体1928z的T细胞在表达与CD47结合的scFv的T细胞中共表达。将这样的细胞施用给有需求的人类受试者,以用于治疗或预防血癌(例如,白血病、淋巴瘤和骨髓瘤)。在另一个方法中,病毒抗原特异性T细胞、NK细胞、CTL细胞可以用于治疗病毒性疾病。例如,识别第一CMV抗原的嵌合共刺激抗原受体与结合PD-1的scFv在细胞毒性T淋巴细胞中共表达,以治疗CMV。

[0256] 可以将患者自身的T细胞基因修饰成靶向肿瘤,通过导入编码称作嵌合抗原受体(CAR)的人工T细胞受体的基因。第一代CAR通常由融合于可变跨膜结构域、融合于T细胞受体链的胞质信号转导结构域的来源于抗体的抗原识别结构域、单片段长度抗体(scFv)组成。还包含有邻近于C链的一个或两个共刺激受体信号转导结构域(包括CD28、4-1BB和OX-40)提高CAR信号转导,分别得到第二代和第三代CAR。

[0257] 肿瘤抗原特异性T淋巴细胞(和NK细胞)

[0258] 可以用于本发明方法的肿瘤抗原特异性人淋巴细胞的类型包括,但不限于,基因修饰成表达嵌合抗原受体(CAR)的外周供体淋巴细胞(Sadelain, M.等人,2003 Nat Rev Cancer 3:35-45)、基因修饰成表达全长肿瘤抗原识别T细胞受体复合物(包括 α 和 β 杂二聚体)的外周供体淋巴细胞(Morgan, R.A.等人,2006 Science 314:126-129)、来源于肿瘤活组织检查中肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的淋巴细胞培养物(Panelli, M.C.等人,2000 J Immunol 164:495-504;Panelli, M.C.等人,2000 J Immunol 164:4382-4392)、以及采用人工抗原提呈细胞(AAPC)或脉冲树突状细胞的选择性地在体外扩增的抗原特异性外周血白细胞(Dupont, J.等人,2005 Cancer Res 65:5417-5427;Papanicolaou, G.A.等人,2003 Blood 102:2498-2505)。T细胞可以是自体的、同种异体的、或者在体外来源于工程化的祖细胞或干细胞。任何合适的肿瘤抗原(抗原肽)均适合用在本文所述的肿瘤相关的实施方式中。抗原的来源包括,但不限于,癌蛋白。抗原可以表达为肽或完整的蛋白或其部分。完

整的蛋白或其部分可以是天然的或诱变的。

[0259] 合适的抗原包括前列腺特异性膜抗原 (PSMA) 和前列腺干细胞抗原 (PCSA)。

[0260] 病毒抗原特异性T淋巴细胞 (和NK细胞)

[0261] 合适的用于例如在免疫受损的受试者中治疗病原体感染或其他感染性疾病的抗原包括,但不限于,巨细胞病毒 (CMV) 中存在的病毒抗原、Epstein Barr病毒 (EBV)、人免疫缺陷病毒 (HIV) 和流感病毒。

[0262] CTL的未纯化来源可以是本领域任何已知的,例如,骨髓、胎儿、新生儿或成人或其他的造血细胞来源,例如,胎肝、外周血或脐带血。可以使用多种技术来分离细胞。例如,最初,阴性选择方法可以除去非CTL。对于阳性选择和阴性选择,mAb对于识别与特定细胞谱系和/或分化阶段相关的标记物特别有用。

[0263] 较大比例的终分化细胞可以在最初通过相对较粗的分离而除去。例如,最初可以使用磁珠分离,以除去大量不相关的细胞。优选地,至少约80%、通常约70%的总造血细胞将在细胞分离之前除去。

[0264] 分离方法包括,但不限于,密度梯度离心;再凝固 (resetting); 与改变细胞密度的颗粒结合;用涂有抗体的磁珠进行磁性分离;亲和色谱;与mAb连接或结合使用的细胞毒性剂,包括,但不限于,补体和细胞毒素;和用与固体基质例如板、芯片连接的抗体进行淘选,淘析或任何其他传统技术。

[0265] 用于分离和分析的技术包括,但不限于,流式细胞术,其可以具有不同程度的改进,例如,多种色彩通道、低角度和钝角光散射检测通道、阻抗通道。

[0266] 可以通过使用与死亡细胞有关的染料例如碘化丙啶 (PI) 将细胞针对死亡细胞进行选择。优选地,将细胞收集在包含2%胎牛血清 (FCS) 或0.2%牛血清白蛋白 (BSA) 的介质或者任何其他合适的优选为无菌的等渗介质中。

[0267] 因此,本发明总体上提供免疫应答细胞,例如,病毒特异性或肿瘤特异性T细胞,其包含与第一抗原结合并激活免疫应答细胞的受体以及与第二抗原结合并刺激免疫应答细胞的受体。

[0268] 载体

[0269] 免疫应答细胞 (例如,T细胞、CTL细胞、NK细胞) 的基因修饰可以通过将基本上均质的细胞组合物用重组DNA构建体转导而实现。优选地,使用逆转录病毒载体 (γ -逆转录病毒或慢病毒) 将DNA构建体导入到细胞中。例如,可以将编码与抗原 (例如,肿瘤抗原或其变体或片段) 结合的受体的多核苷酸克隆到逆转录病毒载体中,且表达可以由其内源性启动子、由逆转录病毒长末端重复序列或者由对所关注的目标细胞类型特异的启动子驱动。也可以使用非病毒载体。

[0270] 对于对细胞进行最初基因修饰以提供肿瘤或病毒抗原特异性细胞,通常使用逆转录病毒载体进行转导,但可以使用任何其他合适的病毒载体或非病毒递送系统。对于细胞的后续基因修饰以提供包含抗原提呈复合物 (包含至少两种共刺激配体) 的细胞,逆转录病毒基因转移 (转导) 同样证实是有效的。逆转录病毒载体和适当的包装系的组合也是合适的,其中衣壳蛋白作用于感染人细胞。许多种产生双嗜性病毒的细胞系是已知的,包括,但不限于PA12 (Miller等人, (1985) Mol. Cell. Biol. 5:431-437); PA317 (Miller等人, (1986) Mol. Cell. Biol. 6:2895-2902); 和CRIP (Danos等人, (1988)

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:6460-6464)。非双嗜性颗粒也适用,例如,用VSVG、RD114或 GALV 外壳假型化的颗粒和任何其他本领域已知的。

[0271] 可能的转导方法还包括细胞与生产细胞的直接共培养,例如,通过Bregni等人,(1992)Blood 80:1418-1422的方法,或者在存在或不存在适当生长因子和聚阳离子的情况下与单独的病毒上清液或浓缩载体 储液一起培养,例如,通过Xu等人,(1994)Exp.Hemat.22:223-230; 和Hughes等人,(1992)J.Clin.Invest.89:1817的方法。

[0272] 可以使用其他的转导病毒载体在免疫应答细胞中表达本发明的共 刺激配体。优选地,所选的载体表现出高效的感染和稳定的整合和表 达(参见,例如Cayouette等人,Human Gene Therapy 8:423-430,1997; Kido等人,Current Eye Research 15:833-844, 1996;Bloomer等人,Journal of Virology 71:6641-6649,1997;Naldini等人,Science 272:263-267, 1996;和Miyoshi等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.94:10319,1997)。其他可以使用的病毒载体包括,例如,腺病毒、慢病毒、和腺伴随病 毒载体、牛痘病毒、牛乳头状瘤病毒或疱疹病毒,例如Epstein-Barr病 毒(另外参见,例如,the vectors of Miller, Human Gene Therapy 15-14, 1990;Friedman,Science 244:1275-1281,1989;Eglitis等 人, BioTechniques 6:608-614,1988;Tolstoshev等人,Current Opinion in Biotechnology 1:55-61,1990;Sharp,The Lancet 337:1277-1278,1991; Cornetta等人, Nucleic Acid Research and Molecular Biology 36:311-322, 1987;Anderson,Science 226:401-409,1984;Moen,Blood Cells 17:407-416,1991;Miller等人,Biotechnology 7: 980-990,1989;LeGal La Salle等人,Science 259:988-990,1993;和Johnson,Chest 107: 77S-83S, 1995)。逆转录病毒是特别良好开发的,且已经用于临床环境中 (Rosenberg等 人,N.Engl.J.Med 323:370,1990;Anderson等人,美国 专利5,399,346)。

[0273] 也可以将非病毒方法用于细胞中蛋白的表达。例如,核酸分子可 以通过在脂质体 转染的存在下施用核酸(Feigner等人,Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A.84:7413,1987;Ono等 人,Neuroscience Letters 17:259,1990; Brigham等人,Am.J.Med.Sci.298:278,1989; Staubinger等人,Methods in Enzymology 101:512,1983),通过缺乏唾液酸基血清粘蛋 白-多赖氨 酸结合(Wu等人,Journal of Biological Chemistry 263:14621,1988;Wu 等 人,Journal of Biological Chemistry 264:16985,1989),或者在手术条 件下通过微注 射(Wolff等人,Science 247:1465,1990),从而引入到细 胞中。其他用于基因转移的非病 毒方式包括在体外使用磷酸钙、DEAE 右旋糖苷、电穿孔和原生质体融合进行转染。脂质体 对于将DNA递送 至细胞中也是潜在有益的。正常基因移植到受试者的受感染组织中也 可以通过将正常核酸在体转移到可培养细胞型中(例如,自体或异种 原代细胞或其后代),之 后将细胞(或其后代)注射到靶标组织中或全 身性注射而完成。重组受体也可以使用转座 酶或定向核酸酶(例如锌 指核酸酶、大范围核酸酶或TALE核酸酶)得到或获得。暂时的表达 可以通过RNA电穿孔获得。

[0274] 用在多核苷酸疗法中的cDNA表达可以由任何合适的启动子(例 如,人巨细胞病毒 (CMV)、猿猴病毒40 (SV40)或金属硫蛋白启动 子)指导,并通过任何合适的哺乳动物调控元 件或内含子(例如,延 伸因子1 α 增强子/启动子/内含子结构)调节。例如,如果需要的话, 已知偏好地指导基因在特定细胞类型中表达的增强子可以用于指导核 酸的表达。所使用的增强子可以包括,但不限于,特征为组织-或细胞 特异性增强子的那些。或者,如果将基

基因组克隆用作治疗构件时,调控可以通过同源调控序列或如果需要的话通过得自异源的调控序列(包括上述任意的启动子或调控元件)而介导。

[0275] 所得的细胞可以在与用于未修饰细胞相似的生长条件下生长,由此修饰的细胞可以扩增并用于多种目的。

[0276] 多肽和类似物

[0277] 本发明还包括以在免疫应答细胞中表达时提高其抗肿瘤活性的方式进行修饰的CD19、 α CD19、CD28、CD3 ζ 、4H1128z、B6H12.2 scFv、5C4 scFv和J43 scFv多肽或其片段(例如,人化单克隆抗体)。本发明提供通过在序列中产生变化来优化氨基酸序列或核酸序列的方法。这些变化可以包括某些突变、缺失、插入或翻译后修饰。本发明还包括任何本发明的天然多肽的类似物。类似物与本发明天然多肽的差别可以在于氨基酸序列差别、翻译后修饰或者以上二者。本发明的类似物将通常表现出与本发明的天然氨基酸序列的全部或部分的至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的同一性。序列比较的长度为至少5、10、15或20个氨基酸残基,优选至少25、50或75个氨基酸残基,且更优选多于100个氨基酸残基。再次,在确定同一性程度的示例性方法中,可以使用BLAST程序,概率评分为表示序列密切相关的 e^{-3} 与 e^{-100} 之间。修饰包括多肽的体内或体外化学衍生化,例如,乙酰化、羧基化、磷酸化或糖基化;这些修饰可以在多肽合成或处理过程中或者在用分离的修饰酶处理之后发生。类似物与本发明天然多肽的差异也可以在于一级序列的变化。这些包括天然的或诱导的(例如,得自通过辐射或暴露于乙烷硫酸二甲酯(ethanemethylsulfate)的随机诱变,或者通过记载于Sambrook, Fritsch and Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed.), CSH Press, 1989; 或 Ausubel等人(同上)的定点诱变)基因变体。另外包括环化的肽、分子和类似物,其含有除L-氨基酸以外的残基,例如, D-氨基酸或非天然存在或合成的氨基酸,例如, β 或 γ 氨基酸。

[0278] 除全长多肽外,本发明还提供本发明任一多肽或肽结构域的片段。如本文所用,术语“片段”是指至少5、10、13或15个氨基酸。在其他实施方式中,片段为至少20个连续氨基酸、至少30个连续氨基酸或者至少50个连续氨基酸,并且在其他实施方式中为至少60-80、100、200、300或更多个连续氨基酸。本发明的片段可以通过本领域技术人员已知的方法产生,或者可以来自常规的氨基酸处理(例如,从新生多肽中移除生物活性不需要的氨基酸,或者通过另外可选的mRNA剪接或另外可选的蛋白加工事件来移除氨基酸)。

[0279] 非蛋白类似物具有设计成模拟本发明蛋白的功能活性的化学结构。将这样的类似物根据本发明的方法进行给药。这样的类似物可以超过原始多肽的生理活性。类似物设计的方法是本领域公知的,且可以根据这些方法通过对化学结构进行修饰来进行类似物的合成,使得产生的类似物在免疫应答细胞中表达时增加原始多肽的抗肿瘤活性。这些化学修饰包括,但不限于,置换另外可选的R基团,以及改变参照多肽的特定碳原子处的饱和度。优选地,蛋白类似物相对耐受体内降解,引起在给药时更加长久的治疗效果。用于测量功能活性的检验包括,但不限于,在以下实施例中所述的那些。

[0280] 共刺激配体

[0281] 与至少一种共刺激配体的相互作用提供对于免疫细胞(例如T细胞)的完全激活来说非常重要的非抗原特异性信号。共刺激配体包括,但不限于,肿瘤坏死因子(TNF)配体、细胞因子(例如IL-2、IL-12、IL-15或IL21)和免疫球蛋白(Ig)超家族配体。肿瘤坏死因

子(TNF) 是参与全身炎症并刺激急性期反应的细胞因子。其主要作用在于对免疫细胞进行调节。肿瘤坏死因子(TNF)配体共享多种共同特征。大多数配体合成为含有短胞质链段和相对较长的胞外区域的II型跨膜蛋白(胞外C-端)。TNF配体包括,但不限于,神经生长因子(NGF)、CD40L(CD40L)/CD154、CD137L/4-1BBL、肿瘤坏死因子 α (TNF α)、CD134L/OX40L/CD252、CD27L/CD70、Fas配体(FasL)、CD30L/CD153、肿瘤坏死因子 β (TNF β)/淋巴毒素- α (LT α)、淋巴毒素- β (LT β)、CD257/B细胞激活因子(BAFF)/Blys/THANK/Ta11-1、糖皮质激素诱导的TNF受体配体(GITRL)和TNF-相关的细胞凋亡诱导配体(TRAIL)、LIGHT(TNFSF14)。免疫球蛋白(Ig)超家族是一大类参与细胞识别、结合或粘附过程的细胞表面可溶性蛋白。这些蛋白与免疫球蛋白共享结构特征,即它们具有免疫球蛋白结构域(折叠)。免疫球蛋白超家族配体包括,但不限于,CD80和CD86,CD28的两种配体。

[0282] 给药

[0283] 可以将包含本发明的基因修饰的免疫应答细胞(例如,T细胞、NK细胞、CTL细胞或其祖细胞)的组合物全身性地或直接地提供给受试者,用以治疗瘤形成、病原体感染或感染性疾病。在一个实施方式中,将本发明的细胞直接注射到所关注的器官中(例如,受瘤形成影响的器官)。另外可选地,将包含基因修饰的免疫应答细胞的组合物直接提供给所关注的器官,例如,通过施用到循环系统(例如,肿瘤血管)中。可以在施用细胞之前、过程中或之后提供扩增剂和分化剂,以增加T细胞、NK细胞或CTL细胞的体外或体内产生。

[0284] 可以将修饰的细胞在任何生理学可接受的载体中给药,通常是血管内给药,尽管它们也可以引入到骨或其他细胞可以找到再生和分化的合适位点的方便位点中(例如,胸腺)。通常,将会施用至少 1×10^5 细胞,最终达到 1×10^{10} 或更多。本发明的基因修饰的免疫应答细胞可以包括纯化的细胞群。本领域技术人员可以容易地使用各种公知方法例如荧光激活细胞分选(FACS)来确定群中基因修饰的免疫应答细胞的百分比。包含基因修饰的免疫应答细胞的群中的优选纯度范围为约50%至约55%、约55%至约60%、以及约65%至约70%。更优选地,纯度为约70%至约75%、约75%至约80%、约80%至约85%;更优选地,纯度为约85%至约90%、约90%至约95%、以及约95%至约100%。剂量可以由本领域技术人员容易地调节(例如,纯度降低会要求剂量增加)。细胞可以通过注射、导管等引入。如果需要的话,还可以包括因子,包括,但不限于,白介素,例如IL-2、IL-3、IL-6、IL-11、IL7、IL12、IL15、IL21以及其他白介素,菌落刺激因子例如G-、M-和GM-CSF,干扰素例如 γ -干扰素和红细胞生成素。

[0285] 本发明的组合物包括药物组合物,其包含基因修饰的免疫应答细胞或其祖细胞以及药学可接受的载体。给药可以是自体的或异种的。例如,免疫应答细胞或祖细胞可以得自一个受试者,并施用给同一受试者或者不同的相容的受试者。本发明的源自外周血的免疫应答细胞或其子代(例如,体内、在体或体外获得的)可以经由局部注射给药,包括导管给药、全身性注射、局部注射、静脉内注射或肠胃外给药而施用。当施用本发明的治疗组合物(例如,含有基因修饰的免疫应答细胞的药物组合物)时,通常将其配制成可注射形式(溶液、混悬液、乳液)的单位剂量。

[0286] 制剂

[0287] 本发明的包含基因修饰的免疫应答细胞的组合物可以方便地提供为无菌液体制剂,例如,等渗水溶液、混悬液、乳液、分散液或粘性组合物,其可以缓冲至选定的pH。液体

制剂通常比凝胶、其他粘性组合物和固体组合物更容易制备。此外,液体组合物在一定程度上更加方便给药,特别是通过注射。另一方面,粘性组合物可以在适当的粘度范围内配制,以提供与特定组织的更长的接触期。液体或粘性组合物可以包含载体,其可以是溶剂或含有例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、多元醇(例如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)及其适当混合物的分散介质。

[0288] 无菌可注射溶液可以通过以下方法制备:将用于实施本发明的基因修饰的免疫应答细胞与不同量的其他成份(如果需要的话)引入到所需量的适当溶剂中。这些组合物可以与合适的载体、稀释剂或赋形剂混合,例如,无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等。组合物还可以冻干。取决于给药途径和所需的制备,组合物可以含有辅助性物质,例如,润湿剂、分散剂或乳化剂(例如甲基纤维素)、pH缓冲剂、凝胶化或增粘添加剂、防腐剂、风味剂、着色剂等。可以参考标准教科书,例如“REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE”,17th edition,1985(通过引用的方式并入本文),以制备合适的制剂而无需过度的实验。

[0289] 可以加入各种提高组合物稳定性和无菌性的添加剂,包括抗微生物防腐剂、抗氧化剂、螯合剂和缓冲剂。微生物作用的防止可以通过多种抗菌剂和抗真菌剂来确保,例如,对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等。通过使用延迟吸收的作用剂,例如单硬脂酸铝和明胶,可以产生可注射药物形式的延长吸收。但是,根据本发明,使用的任何载体、稀释剂或添加剂均必须与基因修饰的免疫应答细胞或其祖细胞相容。

[0290] 组合物可以是等渗的,即,它们具有的渗透压可以与血液和泪液相同。本发明的组合物所需的等渗性可以使用氯化钠或其他药学可接受的作用剂例如右旋糖、硼酸、酒石酸钠、丙二醇或其他无机或有机溶质来实现。氯化钠对于含有钠离子的缓冲剂来说是特别优选的。

[0291] 如果需要,组合物的粘度可以使用药学可接受的增稠剂而保持在选定的水平。优选甲基纤维素,因为它易于获得,经济,并且易于处理。其他合适的增稠剂包括,例如,黄原胶、羧甲基纤维素、羟丙基纤维素、卡波姆等。优选的增稠剂浓度将取决于所选的作用剂。要点在于使用将会实现所选粘度的量。显然,合适的载体和其他添加剂的选择将取决于精确的给药路径和特定剂量形式例如液体剂型的性质(例如,组合物是否配制成溶液、混悬液、凝胶或其他液体形式例如延时释放形式或液体充填形式)。

[0292] 本领域技术人员将会认识到,组合物的组分应当选择在化学上呈惰性,且不影响本发明所述的基因修饰的免疫应答细胞的生存力或效力。这对于化学和药物原理熟练的技术人员来说不成问题,或者从当前公开内容及本文引用的文件,很容易通过参考标准教科书或通过简单的实验(不涉及过度实验)来避免问题。

[0293] 涉及本发明的基因修饰免疫应答细胞的治疗用途的一个考虑是对实现最优效果所需的细胞的定量。要施用的细胞的数量将针对正被治疗的受试者而变化。在一个实施方式中,将 10^4 至 10^{10} 、 10^5 至 10^9 或者 10^6 至 10^8 本发明的基因修饰的免疫应答细胞施用至人类受试者。更有效的细胞可以进而以更少的数量进行给药。在一些实施方式中,将至少约 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 和 5×10^8 本发明的基因修饰免疫应答细胞施用至人类受试者。何为有效剂量的精确确定可以基于对于每个受试者的单独因素,包括特定受试者的体型大小、年龄、性别、体重和状况。由当前的公开内容和本领域知识,本领域技术人员可以很容易地确定剂量。

[0294] 本领域技术人员可以容易地确定组合物中以及要在本发明方法中 给药的细胞和任选的添加剂、媒介物和/或载体的量。通常而言,任何 添加剂(除活性细胞和/或作用剂以外)以磷酸盐缓冲盐水中0.001-50% (重量)溶液的量存在,且活性成分以微克至毫克的量级存在,例如, 约0.0001wt%至约5wt%,优选为约0.0001wt%至约1wt%,进而更优 选为约0.0001wt%至约0.05wt%,或者约0.001wt%至约20wt%,优 选为约0.01wt%至约10wt%,进而更优选为约0.05wt%至约5wt%。当然,对于任何要给予动物或人的组合物, 以及对于任何具体的给药 方法,因而优选地确定:毒性,例如,通过测定在适当的动物模型 例如啮齿动物如小鼠中的致死剂量(LD)和LD50;和组合物的剂量、其中组分的浓度以及 施用组合物的时机,其引发适当的反应。由技术 人员的知识、当前的公开内容以及本文引 用的文件,这些确定不需要 过度的实验。而且,依序给药的时间可以不经过度实验而确定。

[0295] 治疗方法

[0296] 本文提供治疗受试者中的瘤形成的方法,本文还包含用于治疗受 试者例如免疫 受损的人类受试者中的病原体感染或其他感染性疾病的 方法。上述方法包括以有效实现 所需效果的量施用本发明的T细胞、NK细胞或CTL细胞,所述效果为减轻现有病状或预防复 发。为进行 治疗,施用量是有效产生所需效果的量。有效量可以在一次或系列给 药中提 供。有效量可以在大丸剂中或者通过连续输注而提供。

[0297] “有效量”(或者“治疗有效的量”)是在治疗时足以实现有益或 所需的临床结果的 量。有效量可以在一次或多次给药中给予受试者。就治疗而言,有效量是指足以减轻、减 缓、稳定、逆转或减缓疾病进 展,或者降低疾病的病理后果的量。有效量通常由医师基于个 案确定,并在本领域技术人员的技能以内。当确定达到有效量的适当剂量时, 通常考虑若 干因素。这些因素包括受试者的年龄、性别和体重,要治 疗的病状、病状的严重程度以及施 用的抗原结合片段的形式和有效浓 度。

[0298] 对于使用抗原特异性T细胞的过继性免疫疗法,通常输注范围在 10^6 - 10^{10} (例如 10^9)的细胞剂量。在将基因修饰的细胞施用到宿主中并 进行后续分化时,诱导出特异性地 导向特定抗原的T细胞。T细胞的“诱导”可以包括抗原特异性T细胞的失活,例如通过缺失 或无反应 性。失活特别可用于在自身免疫性疾病建立或重建耐受性。修饰的细 胞可以通过 本领域已知的任意方法进行使用,包括,但不限于,静脉 内、皮下、结节内、瘤内、鞘内、胸 膜内、腹膜内和直接到胸腺。

[0299] 治疗方法

[0300] 本发明提供在有需求的受试者中增加免疫应答的方法。在一个实 施方式中,本发 明提供治疗或预防受试者中瘤形成的方法。本发明提 供特别可用于治疗具有不适合常规 治疗性干预的血癌(例如,白血病、淋巴瘤和骨髓瘤)或卵巢癌的受试者的疗法。适用于疗 法的人类受试 者通常包括可以通过临床标准区分的两个治疗组。具有“重度疾病”或“高 肿瘤负荷”的受试者是荷临床上可测量的肿瘤的受试者。临床 上可测量的肿瘤是可以基于 肿瘤质量而检测的肿瘤(例如,通过触诊、CAT扫描、声波图、乳房X-线照片或X-射线;阳性 生化或组织病理学 标记物本身不足以识别该群体)。将包含在本发明中的药物组合物施用 给这些受试者,以引发抗肿瘤应答,目的在于减轻他们的病状。理想 地,作为结果发生肿瘤 质量的减少,但是任何临床改善均构成益处。临床改善包括风险或进展速度降低或者肿瘤 的病理学后果降低。

[0301] 第二组合适的受试者在本领域中称作“辅助组”。他们是已经具有 瘤形成史,但已经对另一治疗模式有反应的个体。在先的疗法可以包括,但不限于,手术切除、放疗和常规化疗。结果,这些个体没有临床上可测量的肿瘤。但是,他们疑似在初始肿瘤位点附近或者通过转移而处于疾病进展的风险中。这一组可以进一步细分成高风险个体和 低风险个体。细分基于初始治疗之前或之后观察到的特征而作出。这些特征是临床领域已知的,并且对于每种不同的瘤形成均加以适当定义。高风险亚组典型的特征是肿瘤已经侵入邻近组织的那些,或者表现出牵涉到淋巴结的那些。

[0302] 另一组具有瘤形成的遗传倾向性,但尚没有明显的瘤形成的临床 体征。例如,对乳腺癌相关的基因突变测试呈阳性,但仍处于育龄年 纪的女性可能希望在预防性治疗中接受一种或多种本文所述的抗原结 合片段,以防止瘤形成的发生,直至适合进行预防性手术。

[0303] 具有任意以下瘤形成的人类瘤形成受试者是特别适合的受试者:成胶质细胞瘤、黑色素瘤、成神经细胞瘤、腺癌、神经胶质瘤、软组织肉瘤和各种癌(包括前列腺癌和小细胞肺癌)。合适的癌症还包括任 何肿瘤学领域已知者,包括但不限于,星形细胞瘤、纤维肉瘤、黏液 肉瘤、脂肪肉瘤、少突神经胶质瘤、室管膜瘤、成神经管细胞瘤、原 始神经外胚瘤(PNET)、软骨肉瘤、骨原性肉瘤、胰腺导管腺癌、小 细胞和大细胞肺腺癌、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、鳞状细胞癌、支气管肺泡癌、上皮腺癌及其肝转移、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、肝细胞瘤、胆管癌、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏瘤、横纹肌肉瘤、结肠 癌、基底细胞癌、汗腺瘤、乳头状癌、皮脂腺癌、乳头状腺癌、囊腺 癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、Wilms瘤、睾丸瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜 瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、成神经细胞瘤、视网膜母细胞瘤、白血病、多发性骨髓瘤、Waldenstrom 巨球蛋白血症和重链病、乳腺肿瘤例如导管和小叶腺癌、子宫颈鳞状 和腺癌、子宫和卵巢上皮性癌、前列腺癌、膀胱的移行性鳞状细胞癌、B和T细胞淋巴瘤(结节状和弥散性)浆细胞瘤、急性和慢性白血病、恶性黑色素瘤、软组织肉瘤和平滑肌肉瘤。

[0304] 受试者可以具有进展形式的疾病,在该情形中治疗目的可以包括 疾病进展的减轻或逆转,和/或副作用的减轻。受试者可以具有病症史,他们已经对其进行过治疗,在这种情况下,治疗目的将通常包括降低 或延迟复发的风险。

[0305] 因此,本发明提供治疗或预防受试者中瘤形成的方法,该方法包 括施用有效量的免疫应答细胞,该免疫应答细胞包含与肿瘤抗原结合 并激活免疫应答细胞的受体(例如,TCR、CAR)以及编码与具有免 疫抑制活性的抗原(例如,CD47、PD-1、CTLA-4及其配体)结合的 单链可变片段(scFv)的载体。在一个实施方式中,瘤形成选自血癌(例如白血病、淋巴瘤和骨髓瘤)、卵巢癌、前列腺癌、乳腺癌、膀胱 癌、脑癌、结肠癌、肠癌、肝癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌、胃癌、成胶质细胞瘤和喉癌。在另一实施方式中,肿瘤抗原是以下中 的一种或多种:碳酸酐酶IX(CA1X)、癌胚抗原(CEA)、CDS、CD7、CD10、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD49f、CD56、CD74、CD133、CD138、巨细胞病毒(CMV) 感染细胞的抗原(例如,细胞表面抗原)、上皮糖蛋白-2(EGP-2)、上 皮糖蛋白-40(EGP-40)、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、受体酪氨酸- 蛋白激酶erb-B2,3,4、叶酸结合蛋白质(FBP)、胎儿乙酰胆碱受体(AChR)、叶酸受体- α 、神经节苷脂G2(GD2)、神经节苷脂G3(GD3)、人表皮生长因

子受体2 (HER-2)、人端粒酶逆转录酶 (hTERT)、白介素-13受体亚基 α -2 (IL-13R α 2)、 κ -轻链、激酶插入结构域受体 (KDR)、路易斯Y (LeY)、L1细胞粘附分子 (L1CAM)、黑色素瘤抗原家族A、1 (MAGE-A1)、粘液素16 (MUC16)、粘液素1 (MUC1)、间皮素 (MSLN)、NKG2D配体、癌-睾丸抗原NY-ESO-1、癌胚抗原 (h5T4)、前列腺干细胞抗原 (PSCA)、前列腺特异性膜抗原 (PSMA)、肿瘤相关糖蛋白72 (TAG-72)、血管内皮生长因子R2 (VEGF-R2) 或Wilms 肿瘤蛋白 (WT-1)。

[0306] 作为与肿瘤抗原结合并激活免疫应答细胞的受体 (例如, TCR、CAR) 以及编码与具有免疫抑制活性的抗原 (例如, CD47、PD-1、CTLA-4及其配体) 结合的单链可变片段 (scFv) 的载体的表面表达的结果, 过继性转移的人T或NK细胞在肿瘤位点处被赋予放大且选择性的细胞溶解活性。而且, 继其定位于肿瘤或者病毒感染及其增殖后, 表达共刺激配体的T细胞将肿瘤或病毒感染位点变成对于大范围的参与生理性抗肿瘤或抗病毒应答的免疫细胞 (肿瘤浸润性淋巴细胞、NK-、NKT-细胞、树突状细胞和巨噬细胞) 来说为高度有利的环境。

[0307] 在其他实施方式中, 本发明提供治疗具有病原体感染 (例如, 病毒感染、细菌感染、真菌感染、寄生虫感染或原生动感染) 的受试者的方法。本发明尤其可用于提高免疫受损的受试者中的免疫应答。示例性的对使用本发明方法的治疗敏感的病毒感染包括, 但不限于, 巨细胞病毒 (CMV)、Epstein Barr病毒 (EBV)、人免疫缺陷病毒 (HIV) 和流感病毒感染。

[0308] 因此, 本发明提供治疗或预防受试者中病原体感染的方法, 该方法包括施用有效量的本文所述的免疫应答细胞。

[0309] 试剂盒

[0310] 本发明提供用于治疗或预防瘤形成、病原体感染、免疫疾病或同种异体移植的试剂盒。在一个实施方式中, 试剂盒包含单位剂型的含有有效量的免疫应答细胞的治疗或预防性组合物, 上述免疫应答细胞包含激活性抗原受体和与具有免疫抑制活性的抗原结合的单链可变片段 (scFv)。在特定实施方式中, 细胞还包含共刺激配体。在一些实施方式中, 试剂盒包含含有治疗或预防性疫苗的无菌容器; 这样的容器可以是盒、安瓿、瓶、小瓶、管、袋子、小袋、泡罩或本领域已知的其他合适的容器形式。这些容器可以由塑料、玻璃、层压纸、金属箔或其他适于容纳药物的材料制成。

[0311] 如果需要, 免疫应答细胞与用于将细胞施用至具有瘤形成、病原体感染、免疫疾病或同种异体移植或处于其发展风险中的受试者的说明书。说明书通常会包括有关使用组合物治疗或预防瘤形成、病原体感染、免疫疾病或同种异体移植的信息。在其他实施方式中, 说明书包括以下的至少一种: 对治疗剂的说明; 用于治疗或预防瘤形成、病原体感染、免疫疾病或同种异体移植或其症状的剂量日程和给药; 预防措施; 警告; 适应症; 禁忌症; 过量使用信息; 不良反应; 动物药理学; 临床研究; 和/或参考文献。说明书可以直接印刷在容器上 (如果存在), 或者作为涂敷于容器的标签, 或者作为在容器中或者与其一起提供的单独的纸张、小册子、卡片或折叠式印刷物。

[0312] 实施例

[0313] 除非另外指出, 本发明的实施采用常规的分子生物学 (包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的技术, 其均在技术人员知晓的范围以内。这些技术在文献中得以充分解释, 例如, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, second

edition (Sambrook, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984); "Animal Cell Culture" (Freshney, 1987); "Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1996); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller and Calos, 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis, 1994); "Current Protocols in Immunology" (Coligan, 1991)。这些技术适用于本发明的多核苷酸和多肽的制备, 如此, 可以在本发明的制备和实施中加以考虑。特别可用于具体实施方式的技术将在以下部分中讨论。

[0314] 给出以下实施例, 以对本领域普通技术人员提供如何进行并使用本发明的检验、筛选和治疗方法的充分公开和说明, 并无意于对发明人视作其发明的范围进行限定。

[0315] 实施例1. 共表达嵌合抗原受体 (CAR) 和抗-SCD47scFv的T细胞根除肿瘤

[0316] 产生特异性结合人CD47的scFv, 用该scFv和识别肿瘤抗原 (CD19) 的CAR修饰的人外周血T细胞在体外表现出抗肿瘤效力, 并在临床前模型中提高抗肿瘤效力。

[0317] 产生包含1928z-2A-B6H12.2 (图1-5) 的构建体, 通过对CAR和scFv序列进行测序而证实。此外, 产生对照构建体, 其具有对卵巢癌抗原MUC-CD特异的CAR, 称为4H1128z (图6)。使用 κ 前导序列产生稳定的生产细胞系以用于构建体, 并通过流式细胞术验证 (图7A)。含有分泌的抗-CD47 scFv的来自包装细胞系的上清液, 能够在基于流式细胞术的检验中阻断CD47抗体与Nalm-6和Raji肿瘤细胞的结合。另外将与来自包装细胞的上清液孵育的肿瘤细胞用抗-c-myc标签抗体进行染色, 以说明scFv的结合 (图7B)。

[0318] 使用包装细胞来转导人外周血T细胞, 其中转导效率通过CAR表达的流式细胞分析而评测 (图8A)。分泌的scFv能够以自分泌的方式发挥作用, 其中与1928z T细胞相比较, 抗-CD47抗体已经降低了与1928z-2A-B6H12.2 T细胞的结合。抗-c-myc标签抗体的阳性染色示出结合的scFv (图8B)。转导的T细胞的表型通过流式细胞术考察, 并且表明在1928z-2A-B6H12.2与1928z T细胞之间是类似的, CD62L例外, 其被发现在1928z-2A-B6H12.2 T细胞上是降低的 (图9A)。产生抗-CD47scFv的T细胞的功能使用多参数流式细胞术和标准 ^{51}Cr 释放检验进行考察。已表明, 与1928z T细胞相比较, 1928z-2A-B6H12.2 T细胞具有相当的细胞因子产生和细胞毒性功能 (图9B和9C)。

[0319] 1928z-2A-B6H12.2 T细胞在体内应答于肿瘤的能力使用临床前SCID-Beige小鼠模型进行考察。将SCID-Beige小鼠静脉注射 1×10^6 修饰成表达萤火虫荧光素酶的Nalm-6肿瘤细胞, 3天后将小鼠用 5.7×10^6 CAR⁺1928z或1928z-2A-B6H12.2或对照4H1128z-2A-B6H12.2 T细胞进行处理, 也是静脉内注射。用生物发光成像在临床上对肿瘤进展进行监测。与使用1928z T细胞的处理相比较, 对荷肿瘤的小鼠用1928z-2A-B6H12.2 T细胞处理降低了肿瘤负荷, 并提高了荷肿瘤的小鼠的存活 (图10A和10B)。

[0320] 实施例2. 共表达嵌合抗原受体 (CAR) 和抗-人PD-1scFv的T细胞具有增加的增殖并且保持CAR的表达

[0321] 基于抗-PD-1抗体 (克隆5C4) 的 V_H 和 V_L 链产生抗-人PD-1scFv (美国专利第8,008,449号)。5C4 scFv设计成包含 κ 前导序列、丝氨酸甘氨酸连接头和c-myc标签 (图11)。将该scFv构建体克隆到SFG逆转录病毒骨架中, 以产生1928z-2A-5C4和4H1128z-2A-5C4 (图12和13)。为开发与人PD-1结合的高亲和力scFv (例如, 用于在1928z/4H1128z CAR T细胞中

表达),对人抗体噬菌体展示文库进行筛选,确定与人PD-1(以及潜在地与小鼠PD-1)特异性结合的scFvs。

[0322] 产生稳定的293G1v9包装细胞系,通过流式细胞术评测1928z CAR和4H1128z CAR的表达(图14)。使用来自包装细胞的上清液来转导人外周血T细胞,通过流式细胞术评测转导效率,以检测CAR的表达(图15)。

[0323] 该抗-人PD-1scFv响应于人工抗原提呈细胞(aAPC)而增加T细胞增殖的能力被研究。产生PD-L1阳性肿瘤细胞和3T3 aAPC以用于研究(图16)。在将转导T细胞与表达人CD19、人B7.1和人PD-L1的3T3 aAPC共培养之后,与1928z T细胞相比较,1928z-2A-C4 T细胞具有增加的增殖,并保持CAR的表达(图17)。可以使用流式细胞术、luminez细胞因子分析研究、⁵¹铬释放检验和SCID-Beige临床前模型来确定共表达1928z CAR和抗-PD1 scFV的表型和抗肿瘤功能,以确定体内的抗肿瘤功能。

[0324] 实施例3. 嵌合抗原受体(CAR)和抗-小鼠PD-1scFv的共表达刺激小鼠T细胞

[0325] 基于抗-PD-1抗体克隆J43的V_H和V_L产生抗-小鼠PD-1scFv(Honjo等人的美国专利第7,858,746号)。J43 scFv设计成包含小鼠κ链前导序列、丝氨酸甘氨酸连接头和c-myc标签(图18)。将该scFv构建体克隆到表达靶向人CD19或人MUC-CD的CAR(其通过小鼠C28和小鼠CD3ζ进行信号转导)的SFG逆转录病毒骨架中,从而刺激小鼠T细胞。使用这些构建体19m28mz-IRES-J43(图19)和4H11m28mz-IRES-J43(图20)产生稳定的Phoenix包装细胞系,并对原代鼠科T细胞进行基因修饰,如之前所述(Lee等人,Cancer Res 2011, 71(8):2871)。将小鼠19m28mz和19m28mz-IRES-J43 T细胞与已经修饰成表达人CD19和小鼠PD-L1的EL4胸腺瘤肿瘤细胞一起培养,通过活细胞计数和CFSE标记来监测小鼠T细胞的增殖。

[0326] 对于表达靶向MUC-CD抗原的4H11m28mz CAR的鼠科T细胞,可以应答于修饰成表达MUC-CD和小鼠PD-L1的IDS肿瘤细胞而进行功能评测(Chekmasova等人,Clin Cancer Res, 2010, 16:3594)。如上所述,将结合鼠科PD-1的人scFv克隆到SFG-19m28mz和4H11m28mz载体构建体中,并用于修饰鼠科T细胞。用于评测修饰成表达与鼠科PD-1结合的人scFv的T细胞的体内抗肿瘤效果的同基因模型是可行的:使用ID8-MUC-CD肿瘤细胞的卵巢癌肿瘤模型,其经腹膜内接种到C57BL/6小鼠中;和表达人CD19而非小鼠CD19的转基因小鼠,其接种有修饰成表达人CD19的EL4胸腺瘤肿瘤细胞(Pegram等人, Blood 2012, 119(18):4133)。因此,抗肿瘤效果可以在免疫感受态模型中加以评测,使得可以评测抗-PD-1scFv对肿瘤微环境的影响。

[0327] 实施例4. 嵌合抗原受体(CAR)和激动性scFv在免疫细胞中的共表达

[0328] 在一个实施方式中,本发明提供免疫细胞,其表达抗原结合受体(例如,CAR或TCR)以及与具有激动性免疫刺激活性的抗原(例如,CD28、OX-40、4-1BB及其配体)结合的单链可变片段(scFv)。为产生靶向共刺激分子4-1BB的激动性scFv,获得3H3杂交瘤细胞系(Shuford等人,J Exp Med 1997,186:47-55;由Mick Croft教授(拉荷亚过敏与免疫研究所)提供)。为产生靶向共刺激分子OX-40的激动性scFv,获得OX-86杂交瘤细胞系(al-Shamkhani等人,Eur J Immunol1996, 26(8):1695-9;欧洲细胞保藏中心(European Collection of Cell Cultures)(目录编号96110601))。使用QIAGEN RNAeasy试剂盒按照制备商的说明书(QIAGEN,CA,USA)从细胞中分离杂交瘤mRNA,然后使用New England Biolabs Protoscript AMV第一链cDNA合成试剂盒按照制备商的说明书(New England

Biolabs, MA, USA) 制备cDNA。然后使用以下简并引物对可变重链 (VH) 和轻链 (VL) 进行PCR扩增:

- [0329] Orlandi引物 (Orlandi等人, Proc. Natl. Acad. Sci. 1989, 86:3833-37)
- [0330] VHFOR: 5'-tga gga gac ggt gac cgt ggt ccc ttg gcc cca g-3' [SEQ ID NO: 28]
- [0331] VH1BACK: 5'-agg tsm arc tgc ags agt cwg g-3' [SEQ ID NO: 29]
- [0332] VKFOR: 5'-ggt aga tct cca gcttg tcc c-3' [SEQ ID NO: 30]
- [0333] VK1BACK: 5'-gac att cag ctg acc cag tct cca-3' [SEQ ID NO: 31]
- [0334] Cooper引物 (Wang等人, Blood 2002, 99:2459-2467)
- [0335] Vk 5'-GGCTGCAGSTTCAGTGGCAGTGGRTCWGGGRAC-3' [SEQ ID NO: 32],
- [0336] Ck 5'-CTCATTCTGTTGAAGCTCTTGACAATGGG-3' [SEQ ID NO: 33];
- [0337] RACE引物 (Kettleborough等人, Eur. J Immunol 1993, 23:206-211)
- [0338] Vkf1a: ata tcc atg gca gac gtc cag atg atc cag tct cca [SEQ ID NO: 34]
- [0339] Vkf1b: ata tcc atg gca gac att gtg ctg act cag tct cc [SEQ ID NO: 35]
- [0340] Vkf1c: ata tcc atg gca gat gtt gtg atg ace caa act cca [SEQ ID NO: 36]
- [0341] Vkf1d: ata tcc atg gca caa att gtt ctc acc cag tct cc [SEQ ID NO: 37]
- [0342] Vkf1e: ata tcc atg gca gac att gtg atg aca cag tct cca [SEQ ID NO: 38]
- [0343] Vkf1f: ata tcc atg gca gat att gtg atg acg cag gct gca [SEQ ID NO: 39]
- [0344] Vkf1g: ata tcc atg gca gac att gtg atg acc cag tct c [SEQ ID NO: 40]
- [0345] 反向κ: gct tca aca gga atg agt gtt aac tcg agg tag [SEQ ID NO: 41]
- [0346] 为将VH和VL组装到scFv中, 在VH和VL链的PCR过程中加入丝氨酸甘氨酸接头以及c-myc标签和鼠科Igκ链或CDS前导序列。将产生的多核苷酸克隆到编码1928z嵌合抗原受体 (CAR) 的现有逆转录病毒表达载体 (SFG骨架) 中, 以产生SFG-1928z-2A-3H3或 1928z-2A-0X86。
- [0347] 如上描述产生稳定的包装细胞系以用于抗-小鼠PD-1J43 scFv, 并在类似的过继性T细胞转移的鼠科模型中进行测试。
- [0348] 在本文呈现的结果表明, 表达scFv分子的基因修饰的CART细胞 (“装甲CART细胞”是免疫应答性的, 并且可以克服“不友好的”肿瘤微环境, 因此, 在瘤形成的治疗中有效。CAR⁺T细胞被修饰成分泌具有免疫调节功能的拮抗性scFv (图21)。在激活针对同源抗原的CAR时 (1), 装甲CAR修饰的T细胞可以诱导成分泌对融合CAR修饰的T细胞和内源性抗肿瘤T细胞上的抑制性PD-1T细胞受体拮抗的scFv, 以提高抗肿瘤效应物功能 (2); 诱导成分泌对融合CAR修饰的T细胞和内源性抗肿瘤T细胞上的抑制性CTLA-4T细胞受体拮抗的scFv, 以提高抗肿瘤效应物功能 (3); 或者诱导成分泌对肿瘤细胞上表达的CD47受体拮抗的scFv, 以逆转肿瘤细胞为逃避宿主天然抗肿瘤应答识别的伪装, 导致宿主巨噬细胞对肿瘤的认识和根除。
- [0349] 除非另外指出, 在此报道的结果使用以下方法和材料获得。抗-CD47 B6H12.2 scFv的产生
- [0350] B6H12.2杂交瘤细胞系得自美国组织保藏中心 (American Tissue Culture Collection, ATCC, VA, USA; 目录编号HB-9771)。使用QIAGEN RNAeasy试剂盒根据制备商的

说明书(QIAgen,CA,USA)从杂交瘤细胞中分离B6H12.2 mRNA,并使用New England Biolabs Protoscript AMV第一链cDNA合成试剂盒根据制备商的说明书(New England Biolabs,MA,USA)制备cDNA。使用设计成并入κ前导序列、丝氨酸 甘氨酸连接头和c-myc标签(参考图1)的如下引物对可变重链(VH) 和轻链(VL)进行PCR扩增:

[0351] 引物1.B6H12.2 VH正向引物[SEQ ID NO:42]:

[0352] 5'-CCA TGG AGA CAG ACA CAC TCC TGC TAT GGG TAC TGC TGC TCT GGG TTC CAG GTT CCA CTG GTG ACG AGG TGC TGC AGC TGG TGG AGT CCG GGG-3'

[0353] 引物2.B6H12.2 VH反向引物[SEQ ID NO:43]:

[0354] 5'-AGA TCC ACC TCC ACC AGA TCC ACC TCC ACC TGA TCC ACC TCC ACC TGA GGA GAC GGT GAC TGA GGT TCC TTG ACC -3'

[0355] 引物3.B6H12.2 VL正向引物[SEQ ID NO:44]:

[0356] 5'-GGT GGA GGT GGA TCA GGT GGA GGT GGA TCT GGT GGA GGT GGA TCT GAC ATT GTG ATG ACT CAG TCT CCA GCC ACC-3'

[0357] 引物4.B6H12.2 VL反向引物[SEQ ID NO:45]:

[0358] 5'-CTC GAG TTA CAG ATC CTC TTC TGA GAT GAG TTT TTG TTG TTT GAT TTC CAG CTT GGT GCC TCC ACC GAA CG-3'

[0359] 除以上设计以外,还使用以下可替代的正向引物产生具有CD8L 序列的scFv,以确定用于从T细胞输出scFv的有效前导序列:

[0360] 引物5.B6H12.2 VH CD8L正向[SEQ ID NO:46]:

[0361] 5'-TAT ACC ATG GCC TTA CCA GTG ACC GCC TTG CTC CTG CCG CTG GCC TTG CTG CTC CAC GCC GCC AGG CCG GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCC GGG-3'

[0362] 根据制备商的说明书(Invitrogen,NY,USA)将VH和VL的PCR 产物克隆到pCR2.1TOPO中。通过MSKCC DNA测序核心设施使用 M13F2和M13R2引物(Invitrogen)进行测序,以确认VH和VL产物的序列。使用VH和VL的PCR产物以及引物1或5和4进行重叠PCR,产生抗-CD47 scFv(参见图1)。

[0363] 将抗-CD47 scFv构建体克隆到编码1928z嵌合抗原受体(CAR) 的现有逆转录病毒表达载体(SFG骨架)中,以产生 SFG-1928z-2A-B6H12.2。对SFG-1928z-2A-B6H12.2 DNA进行测序,以确定序列。

[0364] 产生稳定的用于人T细胞的包装细胞系

[0365] 为产生稳定的包装细胞系,使用Promega磷酸钙转染试剂盒根据 制备商的说明书(Promega)将H29细胞用10μg SFG-1928z-2A-B6H12.2 DNA进行瞬时转染。使用来自H29上清液的上清液来转导293G1v9细胞,随后将其亚克隆,产生稳定的包装细胞。基于1928z CAR的表达 和293G1v9上清液转导人外周血T细胞的能力(在用12d11抗体染色之后通过流式细胞术测定),来选择两个亚克隆(克隆5和克隆6)。人外 周血T细胞的转导如之前所述进行(Brentjens等人,Clin Cancer Res 2007,13(18Pt1):5426)。

[0366] 抗-CD47 scFv的产生/功能的评测

[0367] 由1928z-2A-B6H12.2 293G1v9和转导的人外周血T细胞产生抗 -CD47 scFv通过将CD47⁺肿瘤细胞(Raji和Nalm-6)在这些细胞的上 清液中孵育而进行确定。随后将肿瘤细胞洗涤,并用荧光结合的抗 -c-myc标签抗体(Cell Signaling,MA,USA)染色,以检测与肿

瘤细胞结合的来自上清液的蛋白。还将肿瘤细胞用荧光结合的抗-CD47 (克隆 B6H12.2, eBioscience) 染色,以检测B6H12 scFv阻断CD47的能力。

[0368] 体内过继性转移模型

[0369] 对小鼠静脉内注射 1×10^6 修饰成表达萤火虫荧光素酶的Nalm-6 (第 0天)。在第3天,将小鼠用也是静脉内接种的 5.7×10^6 CAR⁺T细胞进行处理。使用生物发光成像在临床上监测肿瘤进展,如之前所述 (Santos 等人, Nature Medicine 2009, 15 (3) :338)。

[0370] 5C4抗-人PD-1scFv的产生

[0371] 如上所述获得特异性地结合人PD-1的抗体克隆5C4的序列。将该序列修饰成包含 κ 前导序列、丝氨酸甘氨酸连接头和c-myc标签,并 购自GeneArt (Invitrogen,图9)。如上所述,将该scFv克隆到SFG逆 转录病毒骨架中,从而实现稳定包装细胞的产生、人外周血T细胞的 转导、以及转导效率的评测。

[0372] 抗-人PD-1功能的评测

[0373] 将PD-1的配体,PD-L1,从孵育在200ng/ml重组人干扰素- γ (RnD systems, MN, USA) 中的SKOV3 (ATCC) 肿瘤细胞中经PCR扩增出。用于扩增人PD-L1的引物如下所示:

[0374] 引物6.人PD-L1正向引物[SEQ ID NO:47]

[0375] 5'-CACGTGCCATGGATGAGGATAT TTGCTGTCTT TATAT-3'

[0376] 引物7.人PD-L1反向引物[SEQ ID NO:48]

[0377] 5'CTCGAGTTACGTCTCCTCCAAATGTGTATCACTTT3'

[0378] 将人PD-L1序列克隆到SFG逆转录病毒骨架中,并转导到3T3、Raji和Nalm-6细胞系中,如之前所述 (Brentjens等人, Clin Cancer Res 2007, 13 (18 Pt 1) :5426)。将细胞用抗-PD-L1抗体 (克隆MIH1, BD Pharmingen, CA, USA) 染色,并进行FACS分选,以确保总细胞群表达PD-L1 (图14)。

[0379] 将人1928z-2A-5C4和1928z T细胞与3T3 (CD19/B7.1/PD-L1) aAPC一起培养,使用台盼蓝排除法进行活细胞计数,并进行流式细胞 术以确定CAR的表达。这与T细胞在和3T3 (CD19/B7.1) aAPC一起 培养时的扩增相关。

[0380] 抗-小鼠PD-1scFv的产生

[0381] 如上所述获得与鼠科PD-1特异结合的抗体 (克隆名称为J43) 的序列。将该序列修饰成包含 κ 链前导序列和c-myc标签序列,用丝氨酸甘氨酸连接头形成scFv,并购自GeneArt (Invitrogen,图16)。将其 克隆到编码鼠科CAR的现有逆转录病毒表达载体 (SFG) 中,其中信号转导通过小鼠CD28和CD3 ζ 分子而介导。产生19m28mz-IRES-J43 和4H11m28mz-IRES-J43,以分别靶向B细胞和卵巢瘤 (图17和18)。

[0382] 抗-小鼠PD-1功能的评测

[0383] 从Renca肿瘤细胞 (ATCC) 经PCR扩增出PD-1配体PD-L1,用于扩增小鼠PD-L1的引物如下所示:

[0384] 引物8.小鼠PD-L1正向引物[SEQ ID NO:49]

[0385] 5'-TAT TAC ACG TGT TAC ATG AGG ATA TTT GCT GTC TTT-3'

[0386] 引物9.小鼠PD-L1反向引物[SEQ ID NO:50]

[0387] 5'TAT AGG ATC CTC GAG GAT GTT ACG TCT CCT CCA AAT GTG TA 3'

[0388] 将抗-小鼠PD-1的scFv克隆到SFG逆转录病毒骨架中,并转导到 3T3 aAPC、IDS和

EL4细胞系中。将用抗-PD-L1抗体(克隆MIH1, BD Pharmingen)染色的细胞进行FACS分选,以确保总细胞群表达 PD-L1。

[0389] CTL铬释放杀死检定

[0390] 将表达所需抗原的靶标细胞用⁵¹Cr标记,并以不断降低的效应物: 靶比与T细胞共培养。培养4小时以后,取出上清液,并将其用于测量释放自铬的放射性。通过减去不与25T细胞一起培养的靶标细胞的背景放射性,并除以通过自使用0.2% Triton X-100而完全溶解的靶标细胞测量的放射性,从而确定特异性溶解。

[0391] 实施例5. 阻断CD47会改善CAR T细胞疗法

[0392] T细胞可以行基因修饰成通过嵌合抗原受体(CAR)的表达而靶向肿瘤抗原。CD19-特异性CAR T细胞的过继性转移已经在一些血液学恶性肿瘤中表现出临床效力,但具有大淋巴结病的慢性淋巴细胞性白血病患者对CAR T细胞疗法的反应未达到最佳。而且,CAR T细胞疗法在临床试验中对实体瘤未能表现出效力。在本实施例中,通过经由从CAR T细胞中分泌阻断CD47的单链可变片段(scFv)来补充天然抗肿瘤免疫应答,CAR T细胞的临床效力得到增强。之前的研究表明,阻断肿瘤细胞上的CD47与巨噬细胞上的SIRPα之间的相互作用会引起肿瘤细胞的吞噬作用。为利用这一效果,将T细胞修饰成表达CD19-特异性CAR(1928z),并分泌对克隆自B6H12.2杂交瘤的人CD47有特异性的scFv(1928z/B6H12.2 T细胞)。经显示,1928z/B6H12.2 T细胞分泌对人CD47特异的功能性scFv,其在体外不影响CAR-介导的细胞因子分泌或细胞毒性。1928z/B6H12.2 T细胞而不是1928z T细胞的上清液在体外刺激巨噬细胞吞噬肿瘤细胞。在临床前鼠科模型中,1928z/B6H12.2 T细胞的过继性转移介导了提高的抗肿瘤作用,并根除 NaIm6肿瘤。这一新的策略将CAR T细胞介导的作用与天然免疫细胞介导的肿瘤细胞的破坏结合,有助于提高CAR T细胞治疗的抗肿瘤效力。

[0393] 实施例6. 通过组成性CD40L表达提高嵌合抗原受体修饰的T-细胞的抗肿瘤效力

[0394] 使用表达嵌合抗原受体(CAR)的基因修饰T细胞而进行的过继性细胞疗法对于B-ALL患者来说是有希望的疗法。但是,在大多数临床试验中,CAR-修饰的T-细胞未能表现出显著的治疗益处,特别是在低级B-细胞恶性肿瘤和实体瘤背景中。在本实施例部分所示的实验中,我们通过将T-细胞改造成组成性地表达CD40配体(CD40L、CD154)来进一步提高CAR-修饰的T-细胞的抗肿瘤效力。修饰成组成性地表达CD40L的T-细胞(CD40L-修饰的T细胞)增加了增殖和促炎TH1细胞因子的分泌。而且,CD40L-修饰的T-细胞通过上调在肿瘤细胞表面上的共刺激分子(CD80和CD86)、粘附分子(CD54、CD58和CD70)、HLA分子(I类和HLA-DR)和Fas死亡受体(CD95)而放大了CD40+肿瘤细胞的免疫原性。此外,CD40L-修饰的T-细胞经来自单核细胞的树突状细胞而诱导成熟并刺激促炎细胞因子IL-12的分泌。最后,靶向肿瘤的CAR/CD40L T-细胞在全身性淋巴瘤的异种器官移植模型中增加了针对CD40+肿瘤的细胞毒性,并延长了荷肿瘤小鼠的存活。这些临床前数据支持了还修饰成组成性表达CD40L的CAR T-细胞的临床应用,其预期有增强的抗肿瘤效力和改善的临床成果。

[0395] 材料和方法

[0396] 细胞培养

[0397] 将DoHH2、Raji和NALM-6(美国菌种保藏中心(American Type Culture

Collection)) 肿瘤细胞系保持在补充有10%热灭活胎牛血清 (FBS)、非必需氨基酸、丙酮酸钠、HEPES (N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸) 缓冲剂和2-巯基乙醇 (Invitrogen) 的RPMI 1640培养基 (Gibco) 中。293GP-GLV9逆转录病毒生产细胞系已经在之前有过描述, 将其在补充有10%FBS的DMEM (Invitrogen) 中培养。²⁹将NIH-3T3人工 抗原提呈细胞 (AAPC) 在之前所述的补充有10%热灭活供体牛犊血清 (DCS) 的DMEM中培养。³⁰在纪念斯隆-凯特琳癌症中心 (MSKCC) IRB许可的操作指南95-054下使用BD Vacutainer CPT管 (Becton Dickinson) 根据制备商的说明从健康供体的外周血中分离人T-细胞。患者T-细胞和CLL细胞得自在MSKCC IRB-许可的操作指南06-138 下进行治疗的患者, 并使用Dynabeads ClinExVivo CD3/CD28珠 (Invitrogen) 分离。将T-细胞在补充有10%FBS和20IU/mL IL-2 (R&D Systems) 的RPMI 1640中培养。单核细胞来源的树突状细胞 (moDC) 得自健康供体的组织培养塑料-粘附的外周血单核细胞 (PBMC), 并如 之前所述在补充有1%混合的人A/B血清、HEPES缓冲剂、2-巯基乙醇 (Invitrogen)、白介素-4 (IL-4; 500IU/ml-R&D Systems) 和粒细胞-单核细胞集落刺激因子 (GM-CSF; 1000IU/ml-R&D Systems) 的 RPMI 1640中培养。³¹所有培养基均补充有2mmol/L L-谷氨酰胺 (Invitrogen)、100单位/mL青霉素和100µg/ml链霉素 (Invitrogen)。

[0398] 逆转录病毒构建体的构建

[0399] 使用以下引物 (1) 5' -CACGTGCATGATCGAAACATACAACCAA ACTTCTCCCCGATCTGC- '3 [SEQ ID NO:3] 和 (2) 5' -CTCGAGGGATC CTCAGAGTTTGAGTAAGCCAAAGGA-3' [SEQ ID NO:4], 由分离的健康供体PBMC中经PCR扩增出人CD40L cDNA (图22A)。使用SFG 载体骨架来构建编码人CD40L的γ-逆转录病毒载体。³²1928z和Pz1 (抗-前列腺特异性膜抗原CAR; 抗-PSMA) SFG-载体的构建已经在之前有过描述。^{33,34}使用重叠PCR产生1928z-IRES-40L和Pz1-IRES-40L γ-逆转录病毒载体的构建 (图26A)。³⁵

[0400] 人T-淋巴细胞的逆转录病毒转导

[0401] 稳定的293GP-GLV9逆转录病毒生产细胞系的生成和人T-细胞的 基因修饰已经在之前有过描述。^{29,36}对于T-细胞转导, 将分离的健康供体PBMC用2µg/mL的植物血凝素 (PHA) (Sigma) 激活, 而将患者来源的T-细胞分离、激活并使用Dynabeads ClinExVivo CD3/CD28珠 根据制备商的建议进行扩增。如之前记载的, 将激活的T-细胞在涂有 纤维连接蛋白 (retroectin) 的非组织培养物处理的板上进行逆转录病毒转导。³⁶在第7天通过流式细胞术来评测基因转移。对照的空白对照 (mock) 转导的T-细胞以相同方式产生, 除上清液得自空的 293GP-GLV9细胞培养物外。用 **guava**[®] ViaCount试剂 (EMD Millipore) 根据制备商的说明通过 **guava**[®] easyCyte[™] 细胞计数器评测CD40L修饰的T-细胞的增殖。如上所述, 使用基因改造成表达目标抗原 (CD19或 PSMA) 的NIH-3T3鼠科成纤维细胞来源的AAPC, 并连同共刺激 (CD80), 进行用于体内实验的修饰的T-细胞的扩增。³⁰

[0402] 共培养检定

[0403] 将肿瘤细胞 (DOHH2、Raji、Ph⁺ALL 3.1、NALM-6) 以5:1的比率与CD40L-修饰的T-细胞以及空白对照转导的T-细胞共培养。3天后 进行流式细胞术, 以测定肿瘤细胞的表型。将moDC (2.5x10⁵) 以1:5 比率与自体CD40L-修饰的T-细胞或空白对照转导的T-细胞共培养, 24 小时后在Luminex IS100系统上对组织培养上清液进行IL-12p70分析 (参见下文)。

另外将moDC以5:1的比率与CD40L-修饰的T-细胞以及空白对照转导的T-细胞共培养,24小时后通过流式细胞术分析 moDC的表型。

[0404] 细胞毒性检定

[0405] 如之前所述,使用标准⁵¹Cr释放检定来确定转导的T-细胞的细胞溶解能力。³⁴

[0406] 细胞因子检测检定

[0407] 使用MILLIPLEX人细胞因子检测系统 (Millipore Corp.),并结合 Luminex IS100系统和IS 2.3软件 (Luminex Corp.) 根据制备商的说明, 评测组织培养上清液中的细胞因子检测。

[0408] 流式细胞术

[0409] 使用FACSscan细胞计进行流式细胞术,并使用FlowJo 9.2版本软件 (Tree Star) 分析数据。使用CAR特异性亚美尼亚仓鼠单克隆抗体 19E3 (1928z) 和12D11 (1928z和Pz1, MSKCC单克隆抗体设施) 检测CAR的表达。使用小鼠抗-人CD154 (BD Biosciences) 检测CD40L 的表达。将人T-细胞用小鼠抗-人CD3 (BD Biosciences)、CD4和CD8 (Invitrogen) 染色。将moDC用小鼠抗-人CD11b、HLA-DR、CD83 和CD86 (Invitrogen) 染色。使用小鼠抗-人CD19、CD40、CD54、CD80、CD86、HLA-I类和HLA-DR (Invitrogen)、CD58、CD70和CD95 (BD Biosciences) 检测DOHH2、Raji和NALM6肿瘤细胞表型。

[0410] CAR T-细胞体内研究

[0411] 我们对8-12周龄的SCID/Beige (CB17.Cg-Prkdc^{scid}Lyst^{bg-J}/Cr1) 小鼠 (Charles River Laboratories) 通过静脉内注射接种DOHH2肿瘤细胞 (5x10⁵细胞)。两天后,将小鼠静脉内输注转导的T-细胞 (1x10⁷ CAR T-细胞)。在临床上监测肿瘤进展,当疾病变得临床上明显时 (后肢麻痹发展或对刺激反应降低) 将小鼠无痛致死。所有鼠科研究均根据纪念斯隆-凯特琳癌症中心机构动物护理和使用委员会批准的操作指南 (00-05-065) 进行。

[0412] 统计学分析

[0413] 所有分析均使用Graphpad Prism 5.0软件计算,存活数据使用对数秩分析评测,且所有其他分析用Mann-Whitney检验 (单尾) 实现。

[0414] 结果

[0415] 人T-细胞的CD40L构成性表达

[0416] 我们最初用CD40L逆转录病毒载体转导来自健康供体的T-细胞 (图22A)。CD40L基因对T-细胞的逆转录病毒转导常规地引起≥40% 基因转移,CD40L在CD4+和CD8+T-细胞子集中均稳定表达 (图22B)。与相同三个供体产生的空白对照转导的T-细胞相比较,CD40L-修饰的 T-细胞的增殖显著增加 (图22C)。对CD40-修饰的T-细胞的组织培养基进行分析,显示出如所预计的,与空白对照转导的T-细胞相比较,可溶性CD40L (sCD40L) 显著增加,并且促炎性细胞因子IFN- γ 和 GM-CSF的分泌显著增加 (图22D)。

[0417] CD40L-修饰的T-细胞改变CD40+肿瘤细胞系和患者来源的CLL细胞的表型

[0418] 为考察CD40L/CD40通路对改变肿瘤细胞表型的能力,进行 CD40+B-细胞肿瘤细胞与CD40L-修饰的T-细胞或空白对照转导的T-细胞的共培养。与CD40L-修饰的T-细胞、而非空白对照转导的T-细胞 的一起培养,引起DOHH2肿瘤细胞表面上共刺激分子 (CD80和CD86)、粘附分子 (CD54、CD58和CD70)、HLA分子 (I类HLA和 HLA-DR) 和Fas死亡受体 (CD95) 的上调 (图23A)。当DOHH2肿瘤细胞在CD40L-修饰的T细胞的含有升高水平sCD40L的条件培养

基中培养时,表型变化也很明显(图28)。为确定肿瘤细胞上CD40的表达是否对改变肿瘤细胞表型而言为必要的,进行CD40-肿瘤细胞系(NALM6)与CD40L-修饰的T-细胞以及空白对照转导的T-细胞的共培养。这些研究没有引起表型的变化,说明需要肿瘤的CD40表达来诱导CD40L介导的肿瘤细胞表型的变化(图23B)。

[0419] 为在临床相关背景中进一步验证该作用,我们将得自CLL患者的CD40L-修饰的T-细胞与自体CLL肿瘤细胞共培养。得自CLL患者的T-细胞的逆转录病毒转导常规地引起 $\geq 40\%$ 的基因转移,CD40L基因的表达稳定(图24A)。在该背景下,源自患者的CD40L-修饰的T-细胞、而非空白对照转导的T细胞表现出上调自体CLL细胞表面上共刺激分子、粘附分子、HLA分子和Fas死亡受体的能力(图24B)。

[0420] CD40L-修饰的T-细胞诱导IL-12p70分泌并介导moDC的成熟

[0421] 鉴于CD40L在DC成熟和促炎细胞因子IL-12分泌中的作用,我们接下来考察CD40L-修饰的T-细胞是否可以在与自体moDC共培养时诱导出相同的作用。显著地,我们发现,CD40L-修饰的T-细胞在含有三个不同供体的moDC和自体CD40L-修饰的T-细胞的共培养中诱导出IL-12p70的分泌(图25A)。在与CD40L-修饰的T-细胞而非空白对照转导的T细胞的共培养之后,还观察到通过表面共刺激分子(HLA-DR、CD86和CD83)的上调而确定的moDC成熟(图25B)。

[0422] T-细胞的CAR和CD40L表达引起增加的体外和体内细胞毒性

[0423] 我们接下来使用双顺反子逆转录病毒载体(1928z/CD40L;Figure 26A)来检测T-细胞表达抗-CD19 CAR(1928z)和CD40L的能力。T-细胞的转导常规地引起1928z和CD40L的 $\geq 40\%$ 的表达(1928z/CD40L T-细胞;图26B)。还产生包含抗-CD19 CAR(1928z)和抗-PSMA CAR的对照逆转录病毒载体(Pz1和Pz1/CD40L;图26B)。为检测1928z/CD40L T-细胞的体外抗肿瘤活性,进行标准的4小时 ^{51}Cr 释放检定。在与包含修饰成仅表达1928z CAR的T细胞的对照T-细胞组相比较时,CD40L的组成性表达在统计学上提高1928z T-细胞针对CD19+肿瘤细胞的溶解能力(图26C)。还显示出针对其他CD19+/CD40+肿瘤细胞系的增强的细胞毒性(图29)。

[0424] 为考察1928z/CD40L T-细胞的体内抗肿瘤活性,我们使用全身性DOHH2淋巴瘤的异种器官移植模型。我们之前已经观察到,在SCID/Beige小鼠中,全身性DOHH2肿瘤细胞对于CD19-靶向的CAR T-细胞疗法是明显难治的。为评测CD40L对CAR T-细胞的进一步修饰是否在该模型中增强抗肿瘤效力,我们用CAR/CD40L T-细胞接种并治疗荷全身性DOHH2肿瘤的SCID/Beige小鼠。显著地,与用1928z T-细胞或对照T-细胞(Pz1和Pz1/CD40L T-细胞)的处理相比较,使用1928z/CD40L T-细胞的处理表现出提高的存活,并在30%用1928z/40L T-细胞处理的小鼠中引起长期存活(图27)。

[0425] 讨论

[0426] 使用CAR T-细胞的过继性疗法已经在B-细胞恶性肿瘤患者中显示出有希望的临床反应。²⁻⁴这些研究已经显示出CAR T-细胞作为唯一抗肿瘤效应物细胞的效力。但是,这一方法对具有稳健免疫抑制肿瘤微环境的肿瘤可能成功率有限。⁵而且,以其目前的形式,CAR T-细胞未能显示出在靶标抗原丢失后应答肿瘤逃逸的能力。⁶克服这些限制的一种可能的方法是通过CD40L的组成性表达来进一步改造CAR T-细胞,以致于提高T-细胞的细胞溶解能力/增殖,放大肿瘤免疫原性,并提高DC抗原提呈/功能。通过CD40L的组成性表

达对CAR T-细胞的修饰还可以进一步激活内源性免疫应答,从而提高抗肿瘤效力。

[0427] 为评测T-细胞的CD40L组成性表达的作用,我们首先开发出含有 单独CD40L基因的逆转录病毒载体。当在T-细胞中转导时,表现出 CD4⁺和CD8⁺T-细胞子集的组成性表达(图22B)。尽管更常见地与 CD4⁺细胞有关,记忆CD8⁺T-细胞中的CD40L表达和辅助功能最近才得以报道。³⁷还已知CD40L表达促进T-细胞增殖和促炎性TH1细胞因子(IFN- γ 、GM-CSF)的分泌。^{21,22}与来自同一供体的类似激活但空白 对照转导的T-细胞相比较,CD40L-修饰的T-细胞表现出分泌促炎性细胞因子的能力,并且增强增殖(图22C和22D)。通过CD40L的表达武装T-细胞具有提高其抗肿瘤功能/激活的潜力。

[0428] 细胞表面蛋白(包括HIAI类、共刺激分子和/或粘附分子)的下 调常常被肿瘤用于避免免疫识别。^{5,38,39}随着恶性肿瘤细胞表面上Fas 死亡受体的减少,还会发生细胞凋亡耐受。⁴⁰为抵消这一点,CD40L 可以与恶性肿瘤细胞上的CD40相互作用,以介导共刺激分子(CD80 和CD86)、粘附分子(CD54、CD58和CD70)、HLA分子(HLA I类和HLA-DR)的上调,并通过恶性B-细胞肿瘤上的Fas/FasL通路促进细胞凋亡。^{41,42}CD40L-修饰的T-细胞改变CD40+肿瘤细胞的表型,导致 这些关键表面蛋白的上调,从而抵消肿瘤细胞的免疫逃避能力(图2)。这一作用依赖于肿瘤细胞的CD40表达,因为当CD40-肿瘤细胞与 CD40L-修饰的T-细胞共培养时,不存在表型变化(图23A-B)。这一 作用也在更加临床相关的背景中观察到,其中源自CLL患者的共培养 的CD40L-修饰的T-细胞放大自体CLL细胞的免疫原性(图24A-B)。这一发现表明了T-细胞通过组成性CD40L表达保留了放大自体恶性肿瘤细胞的免疫原性的能力。重要的是,细胞与细胞的接触不是改变肿瘤细胞表型的必要条件,因为含有水平升高的sCD40L的培养基引起 类似的表型变化(图28)。在之前公开的使用以编码CD40L的腺病毒 载体转导的自体CLL肿瘤细胞(Ad-CD40L CLL细胞)的疫苗研究中,已经显示出通过CD40L/CD40通路放大癌细胞的免疫原性会诱导内源 性抗肿瘤应答。^{27,28}输注进一步修饰成组成性地表达CD40L的肿瘤特 异性T细胞还可以具有类似的诱导内源性抗肿瘤应答的能力。这可以 通过补充内源性抗肿瘤T或NK细胞引起表位扩展,从而限制通过下 调单个靶标抗原的肿瘤逃逸能力。

[0429] 树突状细胞(DC)功能在肿瘤微环境内受到阻碍。通常,DC在 淋巴结内成熟、迁移并提呈抗原,从而刺激免疫系统对恶性肿瘤或病 原体存在的适应性武装。⁵但是,暴露于抑制性肿瘤微环境的DC具有 诱导T_{regs}并耐受肿瘤特异性T-细胞的矛盾功能。⁴³为抵消这一点, CD40L/CD40通路可以推进DC抗原提呈、促炎细胞因子IL-12的产生,并促进CD8⁺T细胞的细胞毒性功能。^{19,20}之前已经显示,激动剂CD40 抗体激活DC,并促进CD8⁺T-细胞应答,从而取代对于CD4⁺T-细胞辅 助的需求。²⁶而且,已经显示,CD40L-修饰的肿瘤特异性CD8⁺T-细胞 刺激DC的成熟,并放大荷肿瘤小鼠中过继性转移的CD8⁺T细胞的抗 肿瘤应答。⁴⁴为测试CD40L-修饰的T-细胞放大DC功能的能力,使 用自体moDC的体外共培养实验。显著的是,CD40L-修饰的T-细胞刺 激moDC的IL-12p70分泌(图25A-B)。IL-12是具有若干免疫刺激功 能(包括提高T-细胞增殖、细胞毒性能力和介导对Treg抑制的耐性的 能力,正如我们和其他人在之前示出的)的多效性细胞因子。^{7,45} CAR/40L T-细胞刺激DC产生IL-12的能力可以 解释成过继性转移的 CAR T-细胞的增强的抗肿瘤作用,以及内源性肿瘤特异性T-细胞和 自然杀伤(NK)细胞的补充和激活。通过促进在紧邻肿瘤处产生IL-12,我们预测到与先前 在全身性IL-12给药之后示出严重毒性的研究相反 的最下的IL-12相关毒性。除刺激IL-12

产生以外,CD40L-修饰的T-细胞还促进DC的成熟,这在CAR T-细胞毒性的背景中应当进一步提高DC肿瘤抗原摄取和提呈,从而引起效应物T-细胞和NK细胞对内源性抗肿瘤应答的补充/激活(图25A-B)。综合考虑,增强的DC功能应当解释成基因修饰的肿瘤特异性T-细胞通过补充内源性抗肿瘤免疫应答而提高的抗肿瘤效力。

[0430] 已经显示,在输注到CD40L-缺陷的小鼠中之后,CD40L在骨髓或胸腺细胞上的组成性表达引起T-淋巴增生性疾病。⁴⁷在胸腺细胞不间断的CD40L刺激之后,胸腺内产生的无性系种群可能已引起恶性转化(而不是CD40L-修饰细胞的插入瘤形成(insertional oncogenesis))。尽管我们已经注意到在输注CAR/CD40L T-细胞之后的最小化的细胞毒性以及恶性转化的不存在,考虑到恶性T-细胞转化,可以合意地在逆转录病毒载体内包含有效的自杀基因,例如iCasp9。⁴⁸

[0431] 已经显示,在输注到CD40L-缺陷的小鼠中之后,CD40L在骨髓或胸腺细胞上的组成性表达引起T-淋巴增生性疾病。⁴⁷在胸腺细胞不间断的CD40L刺激之后,胸腺内产生的无性系种群可能已引起恶性转化(而不是CD40L-修饰细胞的插入瘤形成(insertional oncogenesis))。尽管我们已经注意到在输注CAR/CD40L T-细胞之后的最小化的细胞毒性以及恶性转化的不存在,考虑到恶性T-细胞转化,可以合意地在逆转录病毒载体内包含有效的自杀基因,例如iCasp9。⁴⁸

[0432] 实施例6参考文献

[0433] 1.Curran KJ,Pegram HJ,Brentjens RJ.Chimeric antigen receptors for T cell immunotherapy:current understanding and future directions.J Gene Med.2012;14(6):405-415.

[0434] 2.Brentjens RJ,Davila ML,Riviere I等人,CD19-Targeted T Cells Rapidly Induce Molecular Remissions in Adults with Chemotherapy-Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia.Sci Transl Med. 2013;5(177):177ra138.

[0435] 3.Brentjens RJ,Riviere I,Park JH等人,Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias.Blood. 2011;118(18):4817-4828.

[0436] 4.Porter DL,Levine BL,Kalos M,Bagg A,June CH.Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia.N Engl J Med.2011;365(8):725-733.

[0437] 5.Vesely MD,Kershaw MH,Schreiber RD,Smyth MJ.Natural innate and adaptive immunity to cancer.Annu Rev Immunol.2011;29:235-271.

[0438] 6.Grupp SA,Kalos M,Barrett D等人,Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia.N Engl J Med. 2013;368(16):1509-1518.

[0439] 7.Pegram HJ,Lee JC,Hayman EG等人,Tumor-targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning.Blood.2012;119(18):4133-4141.

[0440] 8.Armitage RJ,Fanslow WC,Strockbine L等人,Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40.Nature. 1992;357(6373):80-82.

- [0441] 9.Schonbeck U,Libby P.The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. Cell Mol Life Sci.2001;58(1):4-43.
- [0442] 10.Uckun FM,Gajl-Peczalska K,Myers DE,Jaszcz W,Haissig S, Ledbetter JA.Temporal association of CD40 antigen expression with discrete stages of human B-cell ontogeny and the efficacy of anti-CD40 immunotoxins against clonogenic B-lineage acute lymphoblastic leukemia as well as B-lineage non-Hodgkin's lymphoma cells.Blood. 1990;76(12):2449-2456.
- [0443] 11.Gruss HJ,Ulrich D,Braddy S,Armitage RJ,Dower SK. Recombinant CD30 ligand and CD40 ligand share common biological activities on Hodgkin and Reed-Sternberg cells.Eur J Immunol. 1995;25(7):2083-2089.
- [0444] 12.Zong YS,Lin H,Choy DT等人,Nasopharyngeal carcinoma and lymphoinfiltration.Oncology.1991;48(4):290-296.
- [0445] 13.Lollini PL,Landuzzi L,Frabetti F等人,Expression of functional CD40 on human osteosarcoma and Ewing's sarcoma cells.Clin Cancer Res. 1998;4(8):1843-1849.
- [0446] 14.van den Oord JJ,Maes A,Stas M等人,CD40 is a prognostic marker in primary cutaneous malignant melanoma.Am J Pathol. 1996;149(6):1953-1961.
- [0447] 15.Wingett DG,Vestal RE,Forcier K,Hadjokas N,Nielson CP.CD40 is functionally expressed on human breast carcinomas:variable inducibility by cytokines and enhancement of Fas-mediated apoptosis.Breast Cancer Res Treat.1998;50(1):27-36.
- [0448] 16.Ciaravino G,Bhat M,Manbeian CA,Teng NN.Differential expression of CD40 and CD95 in ovarian carcinoma.Eur J Gynaecol Oncol.2004;25(1):27-32.
- [0449] 17.Altenburg A,Baldus SE,Smola H,Pfister H,Hess S.CD40 ligand-CD40 interaction induces chemokines in cervical carcinoma cells in synergism with IFN-gamma.J Immunol.1999;162(7):4140-4147.
- [0450] 18.Grewal IS,Flavell RA.CD40 and CD154 in cell-mediated immunity.Annu Rev Immunol.1998;16:111-135.
- [0451] 19.Cella M,Scheidegger D,Palmer-Lehmann K,Lane P, Lanzavecchia A, Alber G.Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12and enhances T cell stimulatory capacity:T-T help via APC activation.J Exp Med.1996;184(2):747-752.
- [0452] 20.Clarke SR.The critical role of CD40/CD40L in the CD4-dependent generation of CD8+T cell immunity.J Leukoc Biol. 2000;67(5):607-614.
- [0453] 21.Cayabyab M,Phillips JH,Lanier LL.CD40 preferentially costimulates activation of CD4+T lymphocytes.J Immunol. 1994;152(4):1523-1531.
- [0454] 22.Peng X,Kasran A,Warmerdam PA,de Boer M,Ceuppens JL. Accessory signaling by CD40 for T cell activation:induction of Th1 and Th2 cytokines and synergy with interleukin-12for interferon-gamma production.Eur J

Immunol.1996;26 (7) :1621-1627.

[0455] 23.Bhadra R,Gigley JP,Khan IA.Cutting edge:CD40-CD40 ligand pathway plays a critical CD8-intrinsic and-extrinsic role during rescue of exhausted CD8 T cells.J Immunol.2011;187 (9) :4421-4425.

[0456] 24.Bourgeois C,Rocha B,Tanchot C.A role for CD40 expression on CD8+T cells in the generation of CD8+T cell memory.Science. 2002;297 (5589) :2060-2063.

[0457] 25.Khong A,Nelson DJ,Nowak AK,Lake RA,Robinson BW.The use of agonistic anti-CD40 therapy in treatments for cancer.Int Rev Immunol.2012;31 (4) :246-266.

[0458] 26.Vonderheide RH,Glennie MJ.Agonistic CD40 antibodies and cancer therapy.Clin Cancer Res.2013;19 (5) :1035-1043.

[0459] 27.Wierda WG,Cantwell MJ,Woods SJ,Rassenti LZ,Prussak CE, Kipps TJ.CD40-ligand (CD154) gene therapy for chronic lymphocytic leukemia.Blood.2000;96 (9) :2917-2924.

[0460] 28.Wierda WG,Castro JE,Aguillon R等人,A phase I study of immune gene therapy for patients with CLL using a membrane-stable, humanized CD154.Leukemia.2010;24 (11) :1893-1900.

[0461] 29.Ghani K,Wang X,de Campos-Lima PO等人,Efficient human hematopoietic cell transduction using RD114-and GALV-pseudotyped retroviral vectors produced in suspension and serum-free media.Hum Gene Ther.2009;20 (9) :966-974.

[0462] 30.Brentjens RJ,Latouche JB,Santos E等人,Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15.Nat Med.2003;9 (3) :279-286.

[0463] 31.Ratzinger G,Reagan JL,Heller G,Busam KJ,Young JW. Differential CD52 expression by distinct myeloid dendritic cell subsets: implications for alemtuzumab activity at the level of antigen presentation in allogeneic graft-host interactions in transplantation.Blood. 2003;101 (4) :1422-1429.

[0464] 32.Riviere I,Brose K,Mulligan RC.Effects of retroviral vector design on expression of human adenosine deaminase in murine bone marrow transplant recipients engrafted with genetically modified cells. Proc Natl Acad Sci U S A.1995;92 (15) :6733-6737.

[0465] 33.Brentjens RJ,Santos E,Nikhamin Y等人,Genetically targeted T cells eradicate systemic acute lymphoblastic leukemia xenografts.Clin Cancer Res.2007;13 (18Pt 1) :5426-5435.

[0466] 34.Gong MC,Latouche JB,Krause A,Heston WD,Bander NH, Sadelain M.Cancer patient T cells genetically targeted to prostate-specific membrane antigen specifically lyse prostate cancer cells and release cytokines in response to prostate-specific membrane antigen.Neoplasia. 1999;1 (2) :123-127.

- [0467] 35.Santos EB,Yeh R,Lee J等人,Sensitive in vivo imaging of T cells using a membrane-bound Gaussia princeps luciferase.Nat Med. 2009;15(3):338-344.
- [0468] 36.Quintas-Cardama A,Yeh RK,Hollyman D等人,Multifactorial optimization of gammaretroviral gene transfer into human T lymphocytes for clinical application.Hum Gene Ther.2007;18(12):1253-1260.
- [0469] 37.Frentsch M,Stark R,Matzmohr N等人,CD40L expression permits CD8+T cells to execute immunologic helper functions.Blood. 2013;122(3):405-412.
- [0470] 38.Greaves P,Gribben JG.The role of B7 family molecules in hematologic malignancy.Blood.2013;121(5):734-744.
- [0471] 39.Geijtenbeek TB,van Kooyk Y,van Vliet SJ,Renes MH, Raymakers RA, Figdor CG.High frequency of adhesion defects in B-lineage acute lymphoblastic leukemia.Blood.1999;94(2):754-764.
- [0472] 40.Rieux-Laucat F,Le Deist F,Hivroz C等人,Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. Science.1995;268(5215):1347-1349.
- [0473] 41.Schultze JL,Cardoso AA,Freeman GJ等人,Follicular lymphomas can be induced to present alloantigen efficiently:a conceptual model to improve their tumor immunogenicity.Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(18):8200-8204.
- [0474] 42.Schattner EJ,Mascarenhas J,Bishop J等人,CD4+T-cell induction of Fas-mediated apoptosis in Burkitt's lymphoma B cells.Blood. 1996;88(4):1375-1382.
- [0475] 43.O'Neill DW,Adams S,Bhardwaj N.Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer.Blood. 2004;104(8):2235-2246.
- [0476] 44.Higham EM,Wittrup KD,Chen J.Activation of tolerogenic dendritic cells in the tumor draining lymph nodes by CD8+ T cells engineered to express CD40 ligand.J Immunol.2010;184(7):3394-3400.
- [0477] 45.Trinchieri G.Interleukin-12and the regulation of innate resistance and adaptive immunity.Nat Rev Immunol.2003;3(2):133-146.
- [0478] 46.Laurin D,Marin V,Biagi E等人,Upreulation of Adhesion Molecules on Leukemia Targets Improves the Efficacy of Cytotoxic T Cells Transduced With Chimeric Anti-CD19 Receptor.J Immunother. 2013;36(3):181-189.
- [0479] 47.Brown MP,Topham DJ,Sangster MY等人,Thymic lymphoproliferative disease after successful correction of CD40 ligand deficiency by gene transfer in mice.Nat Med.1998;4(11):1253-1260.
- [0480] 48.Di Stasi A,Tey SK,Dotti G等人,Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy.N Engl J Med.2011;365(18):1673-1683.
- [0481] 本发明实施方式
- [0482] 根据前述说明,显而易见的是,可以对本文所述的发明做出变化 和修改以使其适

合于各种用途和条件。这些实施方式也在权利要求的范围以内。

[0483] 在本文变量的任意定义中对元素名录的列举包括变量作为任何单一元素或所列元素的组合(或亚组合)的定义。本文中对实施方式的列举包括实施方式作为任何单一实施方式或者与任何其他实施方式或其部分组合。

[0484] 本申请的一些主题可能涉及到美国专利申请第12/593,751号,其是2010年3月8日提交的国际专利申请PCT/US2008/004251根据35 U.S.C.§371的美国国家阶段申请,其要求2007年3月30日提交的美国临时申请系列第60/921,144号优先权,其公开内容通过引用的方式全部并入本文。

[0485] 在此通过引用的方式将本说明书中提及的所有专利和公开物并入,其程度如同具体且分别地表明将各个独立的专利和公开物经引用而并入。

序列表

<110> 纪念斯隆-凯特琳癌症中心

<120> 用于免疫疗法的组合物和方法

<130> 072734.0152

<140> PCT/US2014/018667

<141> 2014-02-26

<150> 61/769,543

<151> 2013-02-26

<160> 56

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 164

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu
 1 5 10 15
 Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys
 20 25 30
 Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala
 35 40 45
 Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
 50 55 60
 Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
 65 70 75 80
 Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
 85 90 95
 Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
 100 105 110
 Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
 115 120 125
 Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
 130 135 140
 Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
 145 150 155 160
 Leu Pro Pro Arg

<210> 2

<211> 220

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

```

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

```

<210> 3

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明:合成引物

<400> 3

cacgtgcatg atcgaaacat acaaccaaac ttctccccga tctgc 45

<210> 4

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明:合成引物

<400> 4

ctcgagggat cctcagagtt tgagtaagcc aaagga 36

<210> 5

<211> 255

<212> PRT

<213> 智人

<400> 5

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

Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
 210 215 220
 Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
 225 230 235 240
 Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
 245 250 255

<210> 6

<211> 183

<212> PRT

<213> 智人

<400> 6

Met Glu Arg Val Gln Pro Leu Glu Glu Asn Val Gly Asn Ala Ala Arg
 1 5 10 15
 Pro Arg Phe Glu Arg Asn Lys Leu Leu Leu Val Ala Ser Val Ile Gln
 20 25 30
 Gly Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Thr Tyr Ile Cys Leu His Phe Ser
 35 40 45
 Ala Leu Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val
 50 55 60
 Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln
 65 70 75 80
 Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn
 85 90 95
 Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu
 100 105 110
 Val Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln
 115 120 125
 Leu Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr
 130 135 140
 Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu
 145 150 155 160
 Asp Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn
 165 170 175
 Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu
 180

<210> 7

<211> 486

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明:合成多肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (486) .. (486)

<223> 任何氨基酸

<400> 7

```

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

```

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro
 260 265 270
 Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val
 275 280 285
 Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys
 290 295 300
 Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser
 305 310 315 320
 Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg
 325 330 335
 Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro
 340 345 350
 Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe
 355 360 365
 Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Glu Pro Pro
 370 375 380
 Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
 385 390 395 400
 Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro
 405 410 415
 Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr
 420 425 430
 Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly
 435 440 445
 Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln
 450 455 460
 Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln
 465 470 475 480
 Ala Leu Pro Pro Arg Xaa
 485

<210> 8

<211> 1458

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明:合成多核苷酸

<400> 8

ccattgctct cccagtgaact gccctactgc ttcccctagc gcttctcctg catgcagagg 60
 tgaagctgca gcagtctggg gctgagctgg tgaggcctgg gtcctcagtg aagatttctt 120

gcaaggcttc tggctatgca ttcagtagct actggatgaa ctgggtgaag cagaggcctg 180
 gacagggtct tgagtggatt ggacagattt atcctggaga tggatgatact aactacaatg 240
 gaaagttcaa gggtaagcc aactgactg cagacaaatc ctccagcaca gcctacatgc 300
 agctcagcgg cctaacatct gaggactctg cggctatatt ctgtgcaaga aagaccatta 360
 gttcggtagt agatttctac tttgactact ggggccaagg gaccacggtc accgtctcct 420
 cagggtggagg tggatcaggt ggaggtggat ctgggtggagg tggatctgac attgagctca 480
 cccagtctcc aaaattcatg tccacatcag taggagacag ggtcagcgtc acctgcaagg 540
 ccagtcagaa tgtgggtact aatgtagcct ggtatcaaca gaaaccagga caatctccta 600
 aaccactgat ttactcggca acctaccgga acagtggagt ccctgatcgc ttcacaggca 660
 gtggatctgg gacagatttc actctacca tctaactgct gcagtctaaa gacttggcag 720
 actatttctg tcaacaatat aacaggtatc cgtacacgct cggagggggg accaagctgg 780
 agatcaaacg ggcggccgca attgaagtta tgtatctctc tccttaccta gacaatgaga 840
 agagcaatgg aaccattatc catgtgaaag gaaacacct ttgtccaagt ccctatttc 900
 ccggaccttc taagcccttt tgggtgctgg tgggtggtgg tggagtctg gcttgctata 960
 gcttgctagt aacagtggcc tttattattt tctgggtgag gagtaagagg agcaggctcc 1020
 tgcacagtga ctacatgaac atgactcccc gccgccccgg gccaccgc aagcattacc 1080
 agccctatgc cccaccacgc gacttcgag cctatcgtc cagagtgaag ttcagcagga 1140
 gcgcagagcc ccccgctac cagcagggcc agaaccagct ctataacgag ctcaatctag 1200
 gacgaagaga ggagtacgat gttttggaca agagacgtgg ccgggacct gagatggggg 1260
 gaaagccgag aaggaagaac cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag aaagataaga 1320
 tggcggaggc ctacagtgag attgggatga aaggcgagcg ccggaggggc aaggggcacg 1380
 atggccttta ccagggtctc agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc cttcacatgc 1440
 aggccctgcc ccctcgcg 1458

<210> 9

<211> 491

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明:合成多肽

<400> 9

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

65	70	75	80
Ser Val Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr			
	85	90	95
Leu His Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ser Gly Asp Thr Ala Met Tyr			
	100	105	110
Tyr Cys Ala Arg Gln Gly Phe Gly Asn Tyr Gly Asp Tyr Tyr Ala Met			
	115	120	125
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly			
	130	135	140
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu			
145	150	155	160
Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr			
	165	170	175
Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys			
	180	185	190
Asn Gln Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Glu Leu			
	195	200	205
Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Gln Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe			
	210	215	220
Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val			
225	230	235	240
Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Asn Leu			
	245	250	255
Leu Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala			
	260	265	270
Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn			
	275	280	285
Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu			
	290	295	300
Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly			
305	310	315	320
Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe			
	325	330	335
Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn			
	340	345	350
Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr			
	355	360	365
Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser			
	370	375	380

Arg Ser Ala Glu Pro Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
 385 390 395 400
 Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
 405 410 415
 Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
 420 425 430
 Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
 435 440 445
 Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
 450 455 460
 His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
 465 470 475 480
 Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485 490

<210> 10

<211> 1475

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明:合成多核苷酸

<400> 10

ccatggctct cccagtgact gccctactgc ttcccctagc gcttctcctg catgcagagg 60
 tgaagctgca ggagtcaggg ggaggcttcg tgaagcctgg agggtcctc aaagtctcct 120
 gtgcagcctc tggattcact ttcagtagct atgccatgtc ctgggttcgc ctgagtccgg 180
 agatgaggct ggagtggtc gcaaccatta gcagtgtctg tggttacatc ttctattctg 240
 acagtgtgca gggacgattc accatttcca gagacaatgc caagaacacc ctgcacctgc 300
 aaatgggcag tctgaggtct ggggacacgg ccatgtatta ctgtgcaagg cagggatttg 360
 gtaactacgg tgattactat gctatggact actggggcca agggaccacg gtcaccgtct 420
 cctcaggtgg aggtggatca ggtggaggtg gatctggtgg aggtggatct gacattgagc 480
 tcaccagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact atgagctgca 540
 aatccagtca gagtctgctc aacagtagaa cccgaaagaa ccagttggct tggtaccagc 600
 aaaaaccagg acagtctcct gaactgctga tctactgggc atccactagg caatctggag 660
 tccctgatcg cttcacagge agtggatctg ggacagattt cactctcacc atcagcagtg 720
 tgcaggetga agacctggca gtttattact gccagcaatc ttataatcta ctcacgttcg 780
 gtccctgggac caagctggag atcaaacggg cggccgcaat tgaagttatg tatectctc 840
 cttacctaga caatgagaag agcaatggaa ccattatcca tgtgaaaggg aaacaccttt 900
 gtccaagtcc cctatttccc ggaccttcta agcccttttg ggtgctggtg gtggttggtg 960
 gagtcctggc ttgctatagc ttgctagtaa cagtggcctt tattatcttc tgggtgagga 1020
 gtaagaggag caggctcctg cacagtgact acatgaacat gactccccgc cgccccgggc 1080

ccacccgcaa gcattaccag ccctatgccc caccacgcca cttcgcagcc tategctcca 1140
 gagtgaagtt cagcaggagc gcagagcccc ccgcgtacca gcagggccag aaccagctct 1200
 ataacgagct caatctagga cgaagagagg agtacgatgt tttggacaag agacgtggcc 1260
 gggaccctga gatgggggga aagccgagaa ggaagaacce tcaggaaggc ctgtacaatg 1320
 aactgcagaa agataagatg gcggaggcct acagtgatg tgggatgaaa ggcgagcgcc 1380
 ggaggggcaa ggggcacgat ggcctttacc aggttctcag tacagccacc aaggacacct 1440
 acgacgccct tcacatgcag gccctgcccc ctgcg 1475

<210> 11

<211> 250

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明:合成多肽

<400> 11

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Asp	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly	1	5	10	15
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Gly	Tyr	20	25	30	
Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Asp	Lys	Arg	Leu	Glu	Trp	Val	35	40	45	
Ala	Thr	Ile	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	50	55	60	
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	65	70	75	80
Leu	Gln	Ile	Asp	Ser	Leu	Lys	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Phe	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Ser	Leu	Ala	Gly	Asn	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	100	105	110	
Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	115	120	125	
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	130	135	140	
Ser	Val	Thr	Pro	Gly	Asp	Arg	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	145	150	155	160
Thr	Ile	Ser	Asp	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	His	Glu	Ser	165	170	175	
Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Lys	Phe	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Gly	Ile	Pro	180	185	190	
Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Asp	Phe	Thr	Leu	Ser	Ile				

195	200	205
Asn Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly		
210	215	220
His Gly Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
225	230	235
240		
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu		
245	250	
<210> 12		
<211> 235		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列的说明:合成多肽		
<400> 12		
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser		
20	25	30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe		
65	70	75
80		
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser		
100	105	110
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser		
115	120	125
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
130	135	140
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr		
145	150	155
160		
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile		
165	170	175
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly		
180	185	190
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro		

210	215	220
Lys Tyr Phe Ala Asp Gln Phe His Gln Arg Ser Asp Gln Thr Ile Leu		
225	230	235
Gln Val Ile Tyr Asp Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg		
	245	250
Ile Ser Gly Ser Ser Ser Gly Thr Thr Ala Thr Leu Thr Ile Arg Asp		
	260	265
Val Arg Ala Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Tyr Cys Phe Ser Gly Tyr Val		
	275	280
Asp Ser Asp Ser Lys Leu Tyr Val Phe Gly Ser Gly Thr Gln Leu Thr		
290	295	300
Val Leu Gly Gly Pro Lys Ser Ser Pro Lys Val Thr Val Phe Pro Pro		
305	310	315
Ser Pro Glu Glu Leu Arg Thr Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Val		
	325	330
Asn Asp Phe Tyr Pro Gly Ser Ala Thr Val Thr Trp Lys Ala Asn Gly		
	340	345
Ala Thr Ile Asn Asp Gly Val Lys Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Gly		
	355	360
Gln Asn Tyr Met Thr Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Ala Asp Gln Trp		
370	375	380
Lys Ser His Asn Arg Val Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Glu Thr		
385	390	395
Val Glu Lys Ser Leu Ser Pro Ala Glu Cys Leu Glu Gln Lys Leu Ile		
	405	410
Ser Glu Glu Asp Leu		
	420	

<210> 14

<211> 1274

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明:合成多核苷酸

<400> 14

```

ccatggagac agacacactc ctgctatggg tactgctgct ctgggttcca ggttccactg 60
gtgacatggg attgggactg cagtgggttt tctttgttgc tcttttaaaa ggtgtccact 120
gtgagggtgcg gcttctggag tctggtggag gattagttaa gcctgagggg tcaactgaaac 180
tctcctgtgt ggctctgga ttcacctca gtgactatct catgagctgg gtccgccagg 240
ctccagggaa ggggctggag tgggttctc acatatacac gaaaagtat aattatgcaa 300

```

cttattactc gggttcgggtg aaaggcagat tcaccatctc cagagatgat tcccgaagca 360
 tggctctacct gcaaatgaac aacctgagaa ctgaggacac ggccacttat tactgtacaa 420
 gagatggaag cggatatccc tctctggatt tctgggggtca agggacceaa gtcactgtct 480
 cctcagccac aacaacagcc ccatctgtct atcccttggc cctgcctgt gacagcacia 540
 ccaaatcggg tggaggtgga tcaggtggag gtggatctgg tggaggtgga tcttatgagc 600
 tgactcagcc accttcagca tcagtcaatg taggagagac tgtcaaaatc acctgctctg 660
 gggaccaatt gccgaaatat tttgcagatt ggtttcatca aaggtcagac cagaccattt 720
 tgcaagtgat atatgatgat aataagcgcc cctcggggat ccctgaaaga atctctgggt 780
 ccagctcagg gacaacagcc accttgacca tcagagatgt ccgggctgag gatgaaggtg 840
 actattactg tttctcagga tatgttgata gtgatagcaa attgtatggt tttggcagcg 900
 gaaccagct caccgtccta ggtggacca agtcttctcc caaagtcaca gtgtttccac 960
 cttcacctga ggagctccgg acaaacaaag ccacactggt gtgtctggtt aatgacttct 1020
 acccggttc tgcaacagtg acctggaagg caaatggagc aactatcaat gatgggggtga 1080
 agactacaaa gccttccaaa cagggccaaa actacatgac cagcagctac ctaagtttga 1140
 cagcagacca gtggaaatct cacaacaggg tttctgcca agttacccat gaaggggaaa 1200
 ctgtggagaa gagtttgtcc cctgcagaat gtctcgaaca aaaactcatc tcagaagagg 1260
 atctgtaact cgag 1274

<210> 15

<211> 21

<212> PRT

<213> 智人

<400> 15

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp

20

<210> 16

<211> 21

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus sp.)

<400> 16

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp

20

<210> 17

<211> 21

<212> PRT

<213> 未知物

<220>

<223> 未知物的说明:CDS前导肽

<400> 17

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro

20

<210> 18

<211> 824

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明:合成多核苷酸

<400> 18

ccatggagac agacacactc ctgctatggg tactgctgct ctgggttcca ggttccactg 60
 gtgacgaggt gcagctggtg gagtccgggg gagacttagt gaagcctgga ggttcctga 120
 aactctcctg tgcagcctct ggattcactt tcagtggcta tggcatgtct tgggttcgcc 180
 agactccaga caagaggctg gagtgggtcg caaccattac tagtggtggt acttacacct 240
 actatccaga cagtgtgaag gggcgattca ccatctccag agacaatgcc aagaacaccc 300
 tgtacctgca aatagacagt ctgaagtctg aggatacagc catatatttc tgtgcaagat 360
 ccctcgcggg aatgctatg gactactggg gtcaaggaac ctcagtcacc gtctcctcag 420
 gtggaggtgg atcaggtgga ggtggatctg gtggaggtgg atctgacatt gtgatgactc 480
 agtctccagc caccctgtct gtgactccag gagatagagt ctctctttcc tgcagggcca 540
 gccagactat tagcgactac ttacactggt atcaacaaaa atcacaatgag tctccaaggc 600
 ttctcatcaa atttgcttcc caatccattt ctgggatccc ctccaggttc agtggcagtg 660
 gatcaggctc agatttcact ctcagtatca acagtgtgga acctgaagat gttggagtgt 720
 attactgtca aaatggtcac ggctttctc ggacgttcgg tggaggcacc aagctggaaa 780
 tcaaagaaca aaaactcatc tcagaagagg atctgtaact cgag 824

<210> 19

<211> 824

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明:合成多核苷酸

<400> 19

ccatggcctt accagtgacc gcettgetcc tgecgctggc cttgctgctc cacgccgcca 60
 ggccggaggt gcagctggtg gagtccgggg gagacttagt gaagcctgga ggttcctga 120
 aactctcctg tgcagcctct ggattcactt tcagtggcta tggcatgtct tgggttcgcc 180
 agactccaga caagaggctg gagtgggtcg caaccattac tagtggtggt acttacacct 240

actatccaga cagtgtgaag gggcgattca ccatctccag agacaatgcc aagaacaccc 300
 tgtacctgca aatagacagt ctgaagtctg aggatacagc catatatttc tgtgcaagat 360
 ccctcgcggg aaatgctatg gactactggg gtcaaggaac ctcagtcacc gtctcctcag 420
 gtggagggtg atcagggtga ggtggatctg gtggagggtg atctgacatt gtgatgactc 480
 agtctccagc caccctgtct gtgactccag gagatagagt ctctctttcc tgcagggcca 540
 gccagactat tagcgactac ttacactggt atcaacaaaa atcacatgag tctccaaggc 600
 ttctcatcaa atttgcttcc caatccattt ctgggatccc ctccaggttc agtggcagtg 660
 gatcaggctc agatttcaact ctcagtatca acagtgtgga acctgaagat gttggagtgt 720
 attactgtca aaatggtcac ggctttctc ggacgttcgg tggaggcacc aagctggaaa 780
 tcaaagaaca aaaactcadc tcagaagagg atctgtaact cgag 824

<210> 20

<211> 2337

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明:合成多核苷酸

<400> 20

atggctctcc cagtgactgc cctactgctt ccctagcgc ttctcctgca tgcagagggtg 60
 aagctgcagc agtctggggc tgagctggtg aggctgggt cctcagtga gatttctctgc 120
 aaggcttctg gctatgcatt cagtagctac tggatgaact gggatgaagca gaggcctgga 180
 cagggtcttg agtggattgg acagatttat cctggagatg gtgatactaa ctacaatgga 240
 aagttcaagg gtcaagccac actgactgca gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag 300
 ctcagcggcc taacatctga ggactctgcg gtctatttct gtgcaagaaa gaccattagt 360
 tcggtagtag atttctactt tgactactgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 420
 ggtggagggtg gatcagggtg aggtggatct ggtggagggtg gatctgacat tgagctcacc 480
 cagtctccaa aattcatgtc cacatcagta ggagacaggg tcagcgtcac ctgcaaggcc 540
 agtcagaatg tgggtactaa tgtagcctgg tatcaacaga aaccaggaca atctcctaaa 600
 ccaactgattt actcggcaac ctaccggaac agtggagtcc ctgatcgctt cacaggcagt 660
 ggatctggga cagatttcac tctcaccatc actaacgtgc agtctaaaga cttggcagac 720
 tatttctgtc aacaatataa caggtatccg tacacgtccg gaggggggac caagctggag 780
 atcaaacggg cggccgcaat tgaagttatg tatectctc cttacctaga caatgagaag 840
 agcaatggaa ccattatcca tgtgaaaggg aaacacctt gtccaagtcc cctatttccc 900
 ggaccttcta agcccttttg ggtgctggtg gtggttggtg gagtcttggc ttgctatagc 960
 ttgctagtaa cagtggcctt tattattttc tgggtgagga gtaagaggag caggctcctg 1020
 cacagtgact acatgaacat gactccccgc cgcgccgggc ccaccgcaa gcattaccag 1080
 ccctatgccc caccacgcga cttcgcagcc tategtcca gagtgaagtt cagcaggagc 1140
 gcagagcccc ccgcgtacca gcagggccag aaccagctct ataacgagct caatctagga 1200
 cgaagagagg agtacgatgt tttggacaag agacgtggcc gggaccctga gatgggggga 1260
 aagccgagaa ggaagaaccc tcaggaaggc ctgtacaatg aactgcagaa agataagatg 1320

gcggaggcct acagtgagat tgggatgaaa ggcgagcgcc ggaggggcaa ggggcacgaa 1380
 ggccctttacc agggctctcag tacagccacc aaggacacct acgacgccct tcacatgcag 1440
 gccctgcccc ctgcgaggatc tggagcaaca aacttctcac tactcaaaca agcaggtgac 1500
 gtggaggaga atcccggacc catggagaca gacacactcc tgctatgggt actgctgctc 1560
 tgggttccag gttccactgg tgacgaggtg cagctgggtg agtccggggg agacttagtg 1620
 aagcctggag ggtccctgaa actctcctgt gcagcctctg gattcacttt cagtggctat 1680
 ggcatgtctt gggttcgcca gactccagac aagaggctgg agtgggtcgc aaccattact 1740
 agtgggtgta cttacaccta ctatccagac agtgtgaagg ggcgattcac catctccaga 1800
 gacaatgcca agaacaccct gtacctgcaa atagacagtc tgaagtctga ggatacagcc 1860
 atatatattct gtgcaagatc cctcgcggga aatgctatgg actactgggg tcaaggaacc 1920
 tcagtcaccg tctcctcagg tggaggtgga tcaggtggag gtggatctgg tggaggtgga 1980
 tctgacattg tgatgactca gtctccagcc acctgtctg tgactccagg agatagagtc 2040
 tctcttcctt gcagggccag ccagactatt agcgactact tacactggta tcaacaaaaa 2100
 tcacatgagt ctccaagget tctcatcaaa tttgcttccc aatccatttc tgggatcccc 2160
 tcaggttca gtggcagagg atcaggetca gatttcactc tcagtatcaa cagtgtggaa 2220
 cctgaagatg ttggagtgta ttactgtcaa aatggtcacg gctttcctcg gacgttcggt 2280
 ggaggcacca agctggaaat caaagaacaa aaactcatct cagaagagga tctgtaa 2337

<210> 21

<211> 1644

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明:合成多核苷酸

<400> 21

catggctctc ccagtgactg ccctactgct tcccctagcg cttctcctgc atgcagaggt 60
 gaagctgcag gagtcaagg gaggcttctg gaagcctgga ggtccctca aagtctcctg 120
 tgcagcctct ggattcactt tcagtagcta tgccatgtcc tgggttcgcc tgagtccgga 180
 gatgaggctg gagtgggtcg caaccattag cagtgtctgt gttacatct tctattctga 240
 cagtgtgcag ggacgattca ccatttcag agacaatgcc aagaacacc tgcacctgca 300
 aatgggcagt ctgaggctg gggacacggc catgtattac tgtgcaaggc agggatttgg 360
 taactacggg gattactatg ctatggacta ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc 420
 ctgaggtgga ggtggatcag gtggaggtgg atctgggtgga ggtggatctg acattgagct 480
 caccagctct ccatectccc tggtgtgtc agcaggagag aaggctacta tgagctgcaa 540
 atccagtcag agtctgctca acagtagaac ccgaaagaac cagttggctt ggtaccagca 600
 aaaaccagga cagtctcctg aactgctgat ctactgggca tccactaggc aatctggagt 660
 ccctgatcgc ttacacagga gtggatctgg gacagatttc actctacca tcagcagtgt 720
 gcaggctgaa gacctggcag tttattactg ccagcaatct tataatctac tgcaacaaac 780
 ttctcactac tcaaacaagc aggtgacgtg gaggagaatc ccggacccat ggagacagac 840
 aactcctgc tatgggtact gctgctctgg gttccaggtt cactgggtga cgaggtgcag 900

ctggtggagt ccgggggaga cttagtgaag cctggagggt ccctgaaact ctctgtgca 960
gcctctggat tcactttcag tggctatggc atgtcttggg ttcgccagac tccagacaag 1020
aggctggagt gggctcgaac cactactagt ggtggtactt acacctacta tccagacagt 1080
gtgaaggggc gattcaccat ctccagagac aatgccaaga acaccctgta cctgcaaata 1140
gacagtctga agtctgagga tacagccata tatttctgtg caagatccct cgcgggaaat 1200
gctatggact actgggggtca aggaacctca gtcaccgtct cctcaggtgg aggtggatca 1260
ggtggagggtg gatctgggtg aggtggatct gacattgtga tgactcagtc tccagccacc 1320
ctgtctgtga ctccaggaga tagagtctct ctttctgca gggccagcca gactattagc 1380
gactacttac acaggtatca acaaaaatca catgagtctc caaggcttct catcaaattt 1440
gcttcccaat ccatttctgg gatccctcc aggttcagtg gcagtgatc aggctcagat 1500
ttcactctca gtatcaacag tgtggaacct gaagatgttg gagtgtatta ctgtcaaaat 1560
ggtcacggct ttctcggac gttcgggtga ggcaccaagc tggaaatcaa agaacaaaaa 1620
ctcatctcag aagaggatct gtaa 1644

<210> 22

<211> 801

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明:合成多核苷酸

<400> 22

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60
gaccagggtc agctgggtga gtctggggga ggcgtggtcc agcctgggag gtccctgaga 120
ctcgaactgta aagcgtctgg aatcacctc agtaactctg gcatgactg ggtccgccag 180
gctccaggca aggggctgga gtgggtggca gttatttggg atgatggaag taaaagatac 240
tatgcagact ccgtgaaggg ccgattcacc atctccagag acaattcaa gaacacgctg 300
tttctgcaaa tgaacagcct gagagccgag gacacggctg tgtattactg tgcgacaaac 360
gacgactact ggggccaggg aacctggtc accgtctcct caggtggagg tggatcaggt 420
ggagggtgat ctggtggagg tggatctgaa attgtgttga cacagtctcc agccaccctg 480
tctttgtctc caggggaaag agccaccctc tctgcaggg ccagtcagag tgtagtagt 540
tacttagcct ggtaccaaca gaaacctggc caggtccca ggctcctcat ctatgatgca 600
tccaacaggg ccaactggcat ccagccagg ttcagtggca gtgggtctgg gacagacttc 660
actctacca tcagcagcct agagcctgaa gattttgcag tttattactg tcagcagagt 720
agcaactggc ctcgacggtt cggccaaggg accaaggtgg aatcaaaga acaaaaactc 780
atctcagaag aggatctgta a 801

<210> 23

<211> 2332

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明:合成多核苷酸

<400> 23

atggctctcc cagtgactgc cctactgctt cccctagcgc ttctcctgca tgcagaggtg 60
aagctgcagc agtctggggc tgagctgggt aggctgggt cctcagtga gatttcctgc 120
aaggcttctg gctatgcatt cagtagctac tggatgaact gggatgaagca gaggcctgga 180
cagggcttag agtggattgg acagatttat cctggagatg gtgatactaa ctacaatgga 240
aagttcaagg gtcaagccac actgactgca gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag 300
ctcagcggcc taacatctga ggactctgag gtctatttct gtgcaagaaa gaccattagt 360
tcggtagtag atttctactt tgactactgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 420
ggatggaggt gatcaggtgg aggtggatct ggtggaggtg gatctgacat cgagctcacc 480
cagtctccaa aattcatgtc cacatcagta ggagacaggg tcagcgtcac ctgcaaggcc 540
agtcagaatg tgggtactaa tgtagcctgg tatcaacaga aaccaggaca atctcctaaa 600
ccactgattt actcggcaac ctaccggaac agtggagtc ctgatcgtt cacaggcagt 660
ggatctggga cagattccac tctcaccatc actaacgtgc agtctaaaga cttggcagac 720
tatttctgtc aacaatataa caggtatccg tacacgtccg gaggggggac caagctggag 780
atcaaacggg cggccgcaat tgaagttatg tatcctctc cttacctaga caatgagaag 840
agcaatggaa ccattatcca tgtgaaaggg aaacacctt gtccaagtc ccctatttcc 900
cggaccttct aagcccttg ggtgctggtg gtggttggtg gagtctggc ttgctatagc 960
cgctagtaac agtggccttt attattttct gggatgaggag taagaggagc aggtcctgc 1020
acagtgacta catgaacatg actccccgcc gccccggcc caccgcaag cattaccagc 1080
cctatgcccc accacgcgac ttcgcagcct atcgtccag agtgaagttc agcaggagcg 1140
cagagcccc cgcgtaccag cagggccaga accagctcta taacgagctc aatctaggac 1200
gaagagagga gtacgatgtt ttggacaaga gacgtggccg ggaccctgag atggggggaa 1260
agccgagaag gaagaaccct caggaaggcc tgtacaatga actgcagaaa gataagatgg 1320
cggaggccta cagtgagatt gggatgaaag gcgagcggc gaggggcaag gggcacgatg 1380
gcctttacca ggttctcagt acagccacca aggacaccta cgacgccctt cacatgcagg 1440
ccctgcccc tcgcgatct ggagcaaaa acttctact actcaaaca gcaggtgacg 1500
tggaggagaa tcccggacc atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct 1560
gggttccagg ttccactggt gaccaggtgc agctggtgga gtctggggga ggcgtggtcc 1620
agcctgggag gtccctgaga ctgactgta aagcgtctgg aatcacctc agtaactctg 1680
gcatgcactg ggtccgcccag gctccaggca aggggctgga gtgggtggca gttatttggg 1740
atgatggaag taaaagatac tatgcagact ccgtgaaggg ccgattcacc atctccagag 1800
acaattccaa gaacacgtg tttctgcaa tgaacagcct gagagccgag gacacggctg 1860
tgtattactg tgcgacaaac gacgactact ggggccaggg aacctggtc accgtctct 1920
caggtggagg tggatcaggt ggaggtggat ctggtggagg tggatctgaa attgtgttga 1980
cacagtctcc agccaccctg tctttgtctc caggggaaag agccaccctc tctgcaggg 2040
ccagtccagag tgtagtagt tacttagcct ggtaccaaca gaaacctggc caggctccca 2100
ggctcctcat ctatgatgca tccaacaggg ccaactggat cccagccagg ttcagtggca 2160
gtgggtctgg gacagacttc actctacca tcagcagcct agagcctgaa gatcttgcag 2220

ttattactg tcagcagagt agcaactggc ctccgacggt cggccaaggg accaaggtgg 2280
 aatcaaaga acaaaaactc atctcagaag aggatctgta actcgaggat cc 2332
 <210> 24
 <211> 1640
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的说明:合成多核苷酸
 <400> 24
 catggctctc ccagtgactg ccctactgct tcccctagcg cttctcctgc atgcagaggt 60
 gaagctgcag gaggcaggg gaggtctcgt gaagcctgga gggtcctca aagtctcctg 120
 tgcagcctct ggattcaact tcagtagcta tgccatgtcc tgggttcgcc tgagtccgga 180
 gatgaggctg gagggtgctg caaccattag cagtgtctgt ggttacatct tctattctga 240
 cagtgtgcag ggacgattca ccatttccag agacaatgcc aagaacacc tgcacctgca 300
 aatgggcagt ctgaggtctg gggacacggc catgtattac tgtgcaaggc agggatttgg 360
 taactacggg gattactatg ctatggacta ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc 420
 ctccaggtgga ggtggatcag gtggaggtgg atctggtgga ggtggatctg acattgagct 480
 caccagctct ccattcctcc tggctgtgtc agcaggagag aaggtcacta tgagctgcaa 540
 atccagtcag agtctgctca acagtagaac ccgaaagaac cagttggctt ggtaccagca 600
 aaaaccagga cagtctcctg aactgctgat ctactgggca tccactaggc aatctggagt 660
 ccctgatcgc ttcacaggca gtggatctgg gacagattc actctacca tcagcagtgt 720
 gcaggctgaa gacctggcag ttattactg ccagcaatct tataatctac tgcaacaac 780
 ttctcactac tcaaacaagc aggtgacgtg gaggagaat ccggacccat ggagacagac 840
 aactcctgc tatgggtact gctgctctgg gttccaggtt cactggtga ccaggtgcag 900
 ctggtggagt ctgggggagg cgtggtccag cctgggaggt ccctgagact cgactgtaa 960
 gcgtctggaa tcacctcag taactctggc atgcaactgg tccgccaggc tccaggcaag 1020
 gggctggagt ggggtggcagt tatttggtat gatggaagta aaagatacta tgcagactcc 1080
 gtgaagggcc gattcacat ctccagagac aattccaaga acacgctgtt tctgcaaatg 1140
 aacagcctga gagccgagga cacggctgtg tattactgtg cgacaaacga cgactactgg 1200
 ggccagggaa ccctggtcac cgtctctca ggtggaggtg gatcaggtgg aggtggatct 1260
 ggtggaggtg gatctgaaat tgtgttgaca cagtctccag ccaccctgtc tttgtctcca 1320
 gggaaaagag ccaccctctc ctgcagggcc agtcagagtg ttagtagtta cttagcctgg 1380
 taccaacaga aacctggcca ggtcccagg ctctctatct atgatgcatc caacagggcc 1440
 actggcatcc cagccaggtt cagtggcagt gggctctggga cagacttcc tctcaccatc 1500
 agcagcctag agcctgaaga ttttgagtt tattactgtc agcagagtag caactggcct 1560
 cggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaagaac aaaaactcat ctcagaagag 1620
 gatctgtaac tcgaggatcc 1640
 <210> 25
 <211> 1266

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明:合成多核苷酸

<400> 25

```

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60
gacatgggat tgggactgca gtgggttttc tttgttgctc ttttaaagg tgtccactgt 120
gaggtgcggc ttctggagtc tgggtggagga ttagtgaagc ctgaggggtc actgaaactc 180
tcctgtgtgg cctctggatt caccttcagt gactatttca tgagctgggt ccgccaggct 240
ccagggaaagg ggctggagtg ggttgctcac atatacacga aaagttataa ttatgcaact 300
tattactcgg gttcggtgaa aggcagattc accatctcca gagatgattc ccgaagcatg 360
gtctacctgc aaatgaacaa cctgagaact gaggacacgg ccacttatta ctgtacaaga 420
gatggaagcg gatatccctc tctggatttc tgggtcaag ggaccaagt cactgtctcc 480
tcagccacaa caacagcccc atctgtctat cccttgccc ctgcctgtga cagcacaacc 540
aaatcgggtg gaggtggatc aggtggaggt ggatctggtg gaggtggatc ttatgagctg 600
actcagccac cttcagcatc agtcaatgta ggagagactg tcaaaatcac ctgctctggg 660
gaccaattgc cgaaatattt tgcagattgg tttcatcaaa ggtcagacca gaccattttg 720
caagtgatat atgatgataa taagcgcctc tcggggatcc ctgaaagaat ctctgggtcc 780
agctcagga caacagccac cttgaccatc agagatgtcc gggctgagga tgaaggtgac 840
tattactggt tctcaggata tgttgatagt gatagcaaat tgtatgtttt tggcagcgga 900
accagctca ccgtcctagg tggaccaag tcttctccca aagtcacagt gtttccacct 960
tcacctgagg agctccggac aaacaaagcc aactggtgt gtctggttaa tgacttctac 1020
ccgggttctg caacagtgac ctggaaggca aatggagcaa ctatcaatga tggggtgaag 1080
actacaaagc cttcaaaca gggccaaaac tacatgacca gcagctacct aagtttgaca 1140
gcagaccagt ggaaatctca caacagggtt tctgccaag ttacctatga aggggaaact 1200
gtggagaaga gtttgtcccc tgcagaatgt ctgacaacaa aactcatctc agaagaggat 1260
ctgtaa 1266

```

<210> 26

<211> 3325

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明:合成多核苷酸

<400> 26

```

catggctctc ccagtgactc ccctactgct acccctagcg ttctctgca tgcagaggtg 60
aagctgcagc agtctggggc tgagctggtg aggctgggt cctcagtga gatttctgc 120
aaggcttctg gctatgcatt cagtagctac tggatgaact gggatgaagca gaggcctgga 180
caggttcttg agtggattgg acagatttat cctggagatg gtgatactaa ctacaatgga 240
aagttcaagg gtcaagccac actgactgca gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag 300

```

ctcagcggcc taacatctga ggactctgcg gtctatttct gtgcaagaaa gaccattagt 360
 tcggtagtag atttctactt tgactactgc ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 420
 ggtggagggtg ggcaggggag gtggatctgg ggaggtggat ctgacattga gctcacccag 480
 tctccaaaat tcatgtccac atcagtagga cacagggtca gcgtcacctg caaggccagt 540
 cagaatgtgg gtactaatgt agcctggat caacagaaac caggacaatc tcctaaacca 600
 ctgatttact cggcaaccta ccggaacagt ggagtccttg agcgcttcac aggcagtgga 660
 tctgggacag atttactctt caccatcact aacgtgcagt ctaaagactt ggcagactat 720
 ttctgtcaac aatataacag gtagccgtac acgtccggag gggggaccaa gctggagatc 780
 aaacgggagg cgcgaattga gttcatgtac cctccgcctt acctagacaa cgagaggagc 840
 aatggaacta ttattcacat aaaagagaaa catctttgtc atactcagtc atctcctaag 900
 ctgttttggg cactggtcgt ggttgtggag tctgttttg ttatggcttg ctagtgacag 960
 tggtctttgt gttatctgga caaatagtag aaggaacaga ctcttcaaa gtgactacat 1020
 gaacatgact ccccgagggg cagggtcac tcgaaagcct taccagcctt acgcccctgc 1080
 cagagacttt gcagcgtacc gccccagagc aaaattcagc aggagtgcag agactgctgc 1140
 caacctgcag gaccccaacc agctctacaa tgagctcaat ctagggcgaa gagaggaata 1200
 tgacgtcttg gagaagaagc cggctcggga tccagagatg gcagccaaac agcagaggag 1260
 caggaacccc caggaaggcg tatacaatgc actgcagaaa gacaagatgg cagaagccta 1320
 cagtgagatc ggcacaaaag gcgagaggcg gagaggcaag gggcacgatg gcctttacca 1380
 gggctctcagc actgccacca aggacaccta tgatgggctg catatgcaga ccctggcccc 1440
 tcgctaacag ccactcgagg atccgcccct ctccctcccc cccccctaac gttactggcc 1500
 gaagccgctt ggaataaggc cgggtgtcgt ttgactatat gttattttcc accatattgc 1560
 cgtcttttgg caatgtgagg gcccggaaac ctggccctgt cttcttgacg agcattccta 1620
 ggggtctttc ccctctgcc aaaggaatgc agggctctgtt gaatgtcgtg aaggaagcag 1680
 ttctctgga agcttctga agacaaacia cgtctgtagc gaccctttgc aggcagcgga 1740
 accccccacc tggcgacagg tgcctcagcg accaaaggcc acgtgtataa gatacaccag 1800
 caaaggcggc acaaccccag tgccacgttg tgagttggat agttgtggaa agagtcaaat 1860
 ggctctcctc aagcgtattc aacaaggggc tgaaggatgc ccagaaggta cccattgta 1920
 tgggatctga tctggggcct cggtcacatg cttacatgt gtttagtca ggttaaaaaa 1980
 acgtctaggc cccccgaacc acggggacgt ggttttctt tgaaaaacac gatgataata 2040
 tggccacaaa ctgccatgga gacagacaca ctctgctaa gggactgct gctctgggtt 2100
 ccaggttcca ctggagacat gggattggga ctgcagaggg ttttctttgt tgctctttta 2160
 aaaggtgtcc actgtgaggt gcggctctg gagtctgggtg gaggattagt gaagcctgag 2220
 gggctactga aatctcctgt gtggcctcag gattcacctt cagagactat tcatgagct 2280
 gggctcccca ggctccaggg aaggggtctg agtgggttgc tcacatatac acgaaaagtt 2340
 ataattatgc aacttattac tcgggttcgg tgaaggcag attcaccatc tccagagatg 2400
 attcccgaag catggtctac cgcaaatgaa caacctgaga actgaggaca cggccactta 2460
 ttactgtaca agagatggaa gcggatatcc ctctctggat ttctggggtc aagggacca 2520
 agtcaactgtc tctcagcca caacaacagc cccatctgtc tatcccttgg ccctgcctg 2580
 tgacagcaca accaaatcgg gtggaggtgg atcaggtgga ggtggatctg gtggaggtgg 2640

atccttatgag ctgactcagc caccttcagc atcagtcfaat gtaggagaga ctgtcaaaat 2700
cacctgctct ggggaccaat tgccgaaata ttttgcatat tggtttcatc aaaggtcaga 2760
ccagaccatt ttgcaagtga tatatgatga taataagcgc ccctcgggga tccctgaaag 2820
aatctctggg tccagctcag ggacaacagc caccttgacc atcagagatg tccgggctga 2880
ggatgaaggt gactattact gtttctcagg atatgttgat agtgatagca aattgtatgt 2940
ttttggcagc ggaacccagc tcaccgtcct aggtggacc aagtcttctc ccaaagtcac 3000
agtgtttcca ccttcacctg aggagctccg gacaaacaaa gccacactgg tgtgtctggt 3060
taatgacttc tacccgggtt ctgcaacagt gacctggaag gcaaatggag caactatcaa 3120
tgatgggggtg aagactacaa agccttccaa acagggccaa aactacatga ccagcagcta 3180
cctaagtttg acagcagacc agtggaaatc tcacaacagg gtttctgccc aagttaccca 3240
tgaaggggaa actgtggaga agagtttgtc ccctgcagaa tgtctcgaac aaaaactcat 3300
ctcagaagag gatctgtaac tggag 3325

<210> 27

<211> 3333

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明:合成多核苷酸

<400> 27

ctctcccagt gactgcccta ctgcttccc tagcgtact cctgcatgca gaggtgaagc 60
tgcaggagtc agggggaggc ttcgtgaagc ctggagggtc cctcaaagtc tcctgtgcag 120
cctctggatt cactttcagt agctatgcca tgtcctgggt tcgcctgagt ccggagatga 180
ggctggagtg ggtcgcaacc attagcagtg ctgggtggtta catcttctat tctgacagtg 240
tgcagggacg attcaccatt tccagagaca atgccaagaa caccctgcac ctgcaaatgg 300
gcagtctgag gtctggggac agggccatgt attactgtgc aaggcaggga tttggttaact 360
acggtgatta ctatgctatg gactactggg gccaaaggac cacggtcacc gtctcctcag 420
gtggagggtg atcagggtga ggtggatctg gtggagggtg atctgacatt gagctcacc 480
agtctccatc ctccctggct gtgtcagcag gagagaaggt cactatgagc tgcaaatcca 540
gtcagagtct gctcaacagt agaaccgaa agaaccagtt ggcttggtag cagcaaaaac 600
caggacagtc tcctgaaact ctgatctact gggcatccac taggcaatct ggagtccctg 660
atcgcttcac aggcagtgga tctgggacag atttactct caccatcagc agtgtgcagg 720
ctgaagacct ggcagtttat tactgccagc aatcttataa tctactggga ccaagctgga 780
gatcaaacgg gcgccgcaa ttgagttcat gtaccctccg ccttacctag acaacgagag 840
gagcaatgga actattatc acataaaaga gaaacatctt tgtcatactc agtcatctcc 900
taagctgttt tgggcaactg tcgtggttgc tggagtccag ttttgttatg gcttgctagt 960
gacagtggct ctttgtgtta tctggacaaa tagtagaagg aacagactcc ttcaaagtga 1020
ctacatgaac atgactcccc ggaggcctgg gctcactcga aagccttacc agccctacgc 1080
ccctgccaga gactttgcag cgtaccggcc cagagcaaaa ttcagcagga gtgcagagac 1140
tgctgccaac ctgcaggacc ccaaccagct ctacaatgag ctcaatctag ggcgaagaga 1200

ggaatatgac gtcttggaga agaagcggcc tcgggatcca gagatgggag gcaaacagca 1260
 gaggaggagc aacccccagg aaggcgtata caatgcactg cagaaagaca agatggcaga 1320
 agcctacagt gagatcggca caaaaggcga gaggcggaga ggcaaggggc acgatggcct 1380
 ttaccagggc ctcagcactg ccaccaagga cacctatgat gccctgcata tgcagaccct 1440
 ggccccctgc taacagccac tcgaggatcc gccctctcc ctcccccccc cctaactgta 1500
 ctggccgaag ccgcttggaa taaggccggt gtgcgtttgt ctatatgtta ttttccacca 1560
 tattgccgtc ttttggcaat gtgagggcc ggaaacctgg ccctgtcttc ttgacgagca 1620
 ttcctagggg tctttcccct ctcgccaaag gaatgcaggg tctgttgaat gtcgtgaagg 1680
 aagcagttcc tctggaagct tcttgaagac aaacaacgtc tgtagcgacc ctttgcaggc 1740
 agcggaaacc cccacctggc gacaggtgcc tctgcgacca aaggccacgt gtataagata 1800
 cacctgcaaa ggcggcacaa ccccagtgcc acgttgtgag ttggatagtt gtggaaagag 1860
 tcaaatggct ctctcaagc gtattcaaca aggggctgaa ggatgccag aaggtacccc 1920
 attgtatggg atctgatctg gggcctcggc cacatgcttt acatgtgttt agtcgaggtt 1980
 aaaaaaacgt ctaggcccc cgaaccacgg ggacgtggtt ttctttgaa aaacacgatg 2040
 ataatatggc cacaaactgc catggagaca gacacactcc tgctatgggt actgctgctc 2100
 tgggttccag gttccactgg tgacatggga ttgggactgc agtgggtttt ctttgttgct 2160
 cttttaaaag gtgtccactg tgaggtgcgg cttctggagt ctggtggagg attagtgaag 2220
 cctgaggggt cactgaaact ctctgtgtg gcctctggat tcacctcag tgactatttc 2280
 atgagctggg tccgccaggc tccaggaag gggctggagt gggttgctca catatacacg 2340
 aaaagttata attatgcaac ttattactcg gtttcggtga aaggcagatt caccatctcc 2400
 agagatgatt cccgaagcat ggtctacctg caaatgaaca acctgagaac tgaggacacg 2460
 gccacttatt actgtacaag agatggaagc ggatatccct ctctggattt ctgggggtcaa 2520
 gggacccaag tcaactgtct ctcagccaca acaacagccc catctgtcta tcccttggcc 2580
 cctgcctgtg acagcacaac caaatcgggt ggaggtggat caggtggagg tggatctggt 2640
 ggaggtggat cttatgagct gactcagcca cttcagcat cagtcaatgt aggagagact 2700
 gtcaaaatca cctgctctgg ggaccaattg ccgaaatatt ttgcagattg gtttcatcaa 2760
 aggtcagacc agaccatttt gcaagtata tatgatgata ataagcggcc ctcggggatc 2820
 cctgaaagaa tctctgggtc cagctcaggg acaacagcca cttgacctat cagagatgtc 2880
 cgggctgagg atgaaggatg ctattactgt ttctcaggat atgttgatag tgatagcaaa 2940
 ttgtatgttt ttggcagcgg aaccagctc accgtcctag gtggaccaa gtcttctccc 3000
 aaagtacacag tgtttccacc ttcacctgag gagctccgga caaacaagc cacactggtg 3060
 tgtctgttga atgacttcta cccgggttct gcaacagtga cctggaaggc aatggagca 3120
 actatcaatg atggcgtgaa gactacaaag ctttccaaac agggccaaaa ctacatgacc 3180
 agcagctacc taagtttgac agcagaccag tggaaatctc acaacagggt ttcttgccaa 3240
 gttaccatg aaggggaaac tgtggagaag agtttgtccc ctgcagaatg tctcgaacaa 3300
 aaactcatct cagaagagga tctgtaactc gag 3333

<210> 28

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的说明:合成引物
<400> 28
tgaggagacg gtgaccgtgg tcccttgcc ccag 34
<210> 29
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的说明:合成引物
<400> 29
aggtsmarct gcagsagtcw gg 22
<210> 30
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的说明:合成引物
<400> 30
gtagatctc cagcttggtc cc 22
<210> 31
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的说明:合成引物
<400> 31
gacattcagc tgaccagtc tcca 24
<210> 32
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的说明:合成引物
<400> 32
ggctgcagst tcagtggcag tggrtcwgr ac 32
<210> 33
<211> 30

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的说明:合成引物
<400> 33
ctcattcctg ttgaagctct tgacaatggg 30
<210> 34
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的说明:合成引物
<400> 34
atatccatgg cagacgtcca gatgatccag tctcca 36
<210> 35
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的说明:合成引物
<400> 35
atatccatgg cagacattgt gctgactcag tctcc 35
<210> 36
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的说明:合成引物
<400> 36
atatccatgg cagatgttgt gatgacccaa actcca 36
<210> 37
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的说明:合成引物
<400> 37
atatccatgg cacaaattgt tctcaccag tctcc 35
<210> 38

<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的说明:合成引物
<400> 38
atatccatgg cagacattgt gatgacacag tctcca 36
<210> 39
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的说明:合成引物
<400> 39
atatccatgg cagatattgt gatgacgcag gctgca 36
<210> 40
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的说明:合成引物
<400> 40
atatccatgg cagacattgt gatgaccag tctc 34
<210> 41
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的说明:合成引物
<400> 41
gcttcaacag gaatgagtgt taactcgagg tag 33
<210> 42
<211> 93
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的说明:合成引物
<400> 42
ccatggagac agacacactc ctgctatggg tactgctgct ctgggttcca ggttccactg 60

gtgacgaggt gctgcagctg gtggagtccg ggg 93
<210> 43
<211> 75
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的说明:合成引物
<400> 43
agatccacct ccaccagatc cacctccacc tgatccacct ccacctgagg agacggtgac 60
tgaggttccct tgacc 75
<210> 44
<211> 75
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的说明:合成引物
<400> 44
ggtggaggtg gatcaggtgg aggtggatct ggtggaggtg gatctgacat tgtgatgact 60
cagtctccag ccacc 75
<210> 45
<211> 71
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的说明:合成引物
<400> 45
ctcgagttac agatcctctt ctgagatgag tttttgttgt ttgatttcca gcttggtgcc 60
tccaccgaac g 71
<210> 46
<211> 93
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的说明:合成引物
<400> 46
tataccatgg ccttaccagt gaccgcettg ctctgccc tggecttgct gctccacgcc 60
gccaggccgg aggtgcagct ggtggagtcc ggg 93
<210> 47
<211> 37

<210> 52
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的说明:合成肽
 <400> 52
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 53
 <211> 271
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的说明:合成多肽
 <400> 53
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly Asp Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu
 20 25 30
 Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 35 40 45
 Thr Phe Ser Gly Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys
 50 55 60
 Arg Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr
 65 70 75 80
 Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
 85 90 95
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Ile Asp Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr
 100 105 110
 Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Leu Ala Gly Asn Ala Met Asp Tyr
 115 120 125
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 130 135 140
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln
 145 150 155 160
 Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly Asp Arg Val Ser Leu Ser
 165 170 175
 Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln

	180		185		190
Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Phe Ala Ser Gln Ser					
	195		200		205
Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp					
	210		215		220
Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro Glu Asp Val Gly Val Tyr					
225		230		235	240
Tyr Cys Gln Asn Gly His Gly Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr					
	245		250		255
Lys Leu Glu Ile Lys Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu					
	260		265		270

<210> 54
 <211> 271
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的说明:合成多肽
 <400> 54

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu					
1	5		10		15
His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu					
	20		25		30
Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe					
	35		40		45
Thr Phe Ser Gly Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys					
	50		55		60
Arg Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr					
65		70		75	80
Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala					
	85		90		95
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Ile Asp Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr					
	100		105		110
Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Leu Ala Gly Asn Ala Met Asp Tyr					
	115		120		125
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser					
	130		135		140
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln					
145		150		155	160
Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly Asp Arg Val Ser Leu Ser					

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

<210> 55
 <211> 266
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的说明:合成多肽
 <400> 55

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

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

<210> 56

<211> 422

<212> PRT

<213> 人工序列

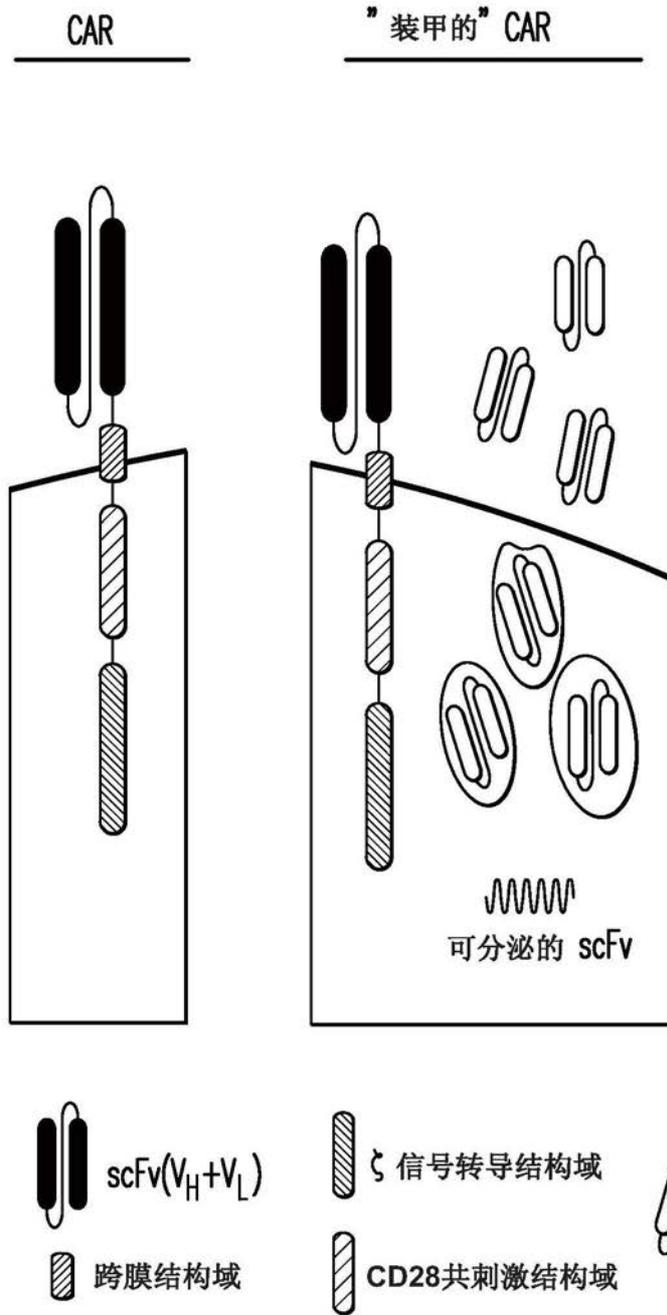
<220>

<223> 人工序列的说明:合成多肽

<400> 56

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

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



装甲的CAR: 修饰成单独表达嵌合抗原受体 (CAR) 的T细胞在不友好的肿瘤微环境内经受到抑制。进一步修饰这些细胞以表达可分泌的scFv (例如, PD-1、PD-L1、CTLA-4或CD47阻断), 由于其调节肿瘤微环境并耐受抑制因子的能力而具有提高的抗肿瘤功能。

图1

具有κ前导序列的B6H12.2 scFv

κ前导序列	
cc atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta ctg ctg ctc tgg gtt cca ggt tcc act ggt gac M E T D T L L L V L L L W V L L L W V P G S T G D	gag gtg cag ctg gtg gag tcc ggg gga gac tta gtg E V Q L V E S G G D L V
aag cct gga ggg tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt ggc tat ggc atg tct tgg gtt cgc cag act cca gac aag agg ctg K P G S L K L S C A A S G F T F S G Y G M S W V R Q T P D K R L	
B6H12.2 VH序列	
gag tgg gtc gca acc att act agt ggt ggt act tac acc tac tat cca gac agt gtg aag ggg cga ttc acc atc tcc aga gac ant gcc aag aac acc ctg E W V A T I T S G C T Y T Y P D S V K G R F T I S R D N A K N T L	
tac ctg caa ata gac agt ctg aag tct gag gat aca gcc ata tat ttc tgt gca aga tcc ctc gcg gga aat gct atg gac tac tgg ggt caa gga acc Y L Q I D S L K S E D T A I Y F C A R S L A G N A M D Y W G Q G T	
丝氨酸甘氨酸连接头序列	
tca gtc acc gtc tcc tca ggt gga ggt gga tca ggt gga ggt gga tct ggt gga ggt gga tct ggt gga ggt gga tct cca gcc acc ctg tct S V T V S S G G G S G G G S G G G S G G G S G G G S D I V M T Q S P A T L S	
gtg act cca gga gat aga gtc tct ctt tcc tgc agg gcc cag act att agc gac tac tta cac tgg tat caa caa aaa tca cat gag tct cca agg ctt V T P G D R V S L S C R A S Q T I S D Y L H W Y Q K S H E S P R L	
B6H12.2 VL序列	
ctc atc aaa ttt gct tcc caa tcc att tct ggg atc ccc tcc agg ttc agt ggc agt gga tca gcc tca gat ttc act ctc agt atc aac agt gtg gaa L I K F A S Q S I S G I P S R F S G S G S G S G S D F T L S I N S V E	
cct gaa gat gtt gga gtg tat tac tgt caa aat ggt cac gcc ttt cct cgg acg ttc ggt gga gcc acc aag ctg gaa atc aaa gaa caa aaa ctc atc P E D V G V Y Y C Q N G H G F P R T F G G G T K L E I K E Q K L I	c-myc标签序列
tca gaa gag gat ctg TAA ctc gag S E E D L * L E	

图3

4H1128z-2A-B6H12.2 (K 前导) 序列

```

CATGGCTCTCCCAGTGACTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCATGCAGAGGTGAAG
CTGCAGGAGTCAGGGGGAGGCTTCGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTCAAAGTCTCCTGTGCAGC
CTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATGCCATGTCCTGGGTTCGCCTGAGTCCGGAGATGAGGCTG
GAGTGGGTCGCAACCATTAGCAGTGCTGGTGGTTACATCTTCTATTCTGACAGTGTGCAGGGA
CGATTCACCATTTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGCACCTGCAAATGGGCAGTCTGAGG
TCTGGGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGGCAGGGATTTGGTAACTACGGTGATTACTATG
CTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGT
GGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGACATTGAGCTCACCCAGTCTCCATCCTCCCTGGCT
GTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCACTATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAACAGTAG
AACCCGAAAGAACCAGTTGGCTTGGTACCAGCAAAAACCAGGACAGTCTCCTGAACTGCTG
ATCTACTGGGCATCCACTAGGCAATCTGGAGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGG
ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGCCAG
CAATCTTATAATCTACTgcaacaaacttctcaactactcaaacagcagggtgacgtggaggagaatcccggacccat
ggagacagacacactcctgctatgggtactgctgctcgggttccaggtccactggtagcagggtgcagctggaggag
tccgggggagacttagtgaagcctggagggtccctgaaactcctctgtagcagcctctggattcacttccagtggctatgg
catgctctgggttcgccagactccagacaagaggctggagtgggtcgcaaccattactagtggtagtacttacactact
atccagacagtgtagagggcgatccaccatctccagagacaatgccagaacacctgtaccagcaatagacagctc
gaagctgaggatcacagccatatactctgtgcaagatcccctcgcggaatgctatggactactggggtcaaggaacc
tcagtcaccgctcctcagggtggaggtagtcagggtggaggtagctcggtaggaggtagctgacattgtgatgact
cagctccagccacctgctctgtagctccaggagatagagctctctcttctgcagggccagccagactatagcgacta
cttacactggatcaacaaaaatcacatgagctccaaggtctctcaaatcttgcctccaatccattctgggatcccct
ccaggtcagtggcagtggtcaggctcagattcactctcagtatcaacagtggtgaacctgaagatgtggagtgat
tactgtcaaatggctcacggcttctctcggacgttcggtagggaccacagctggaaatcaagaacaaaaactcatct
cagaagaggatctgtaa

```

4H1128z CAR
P2A
B6H12.2 scFv

图6

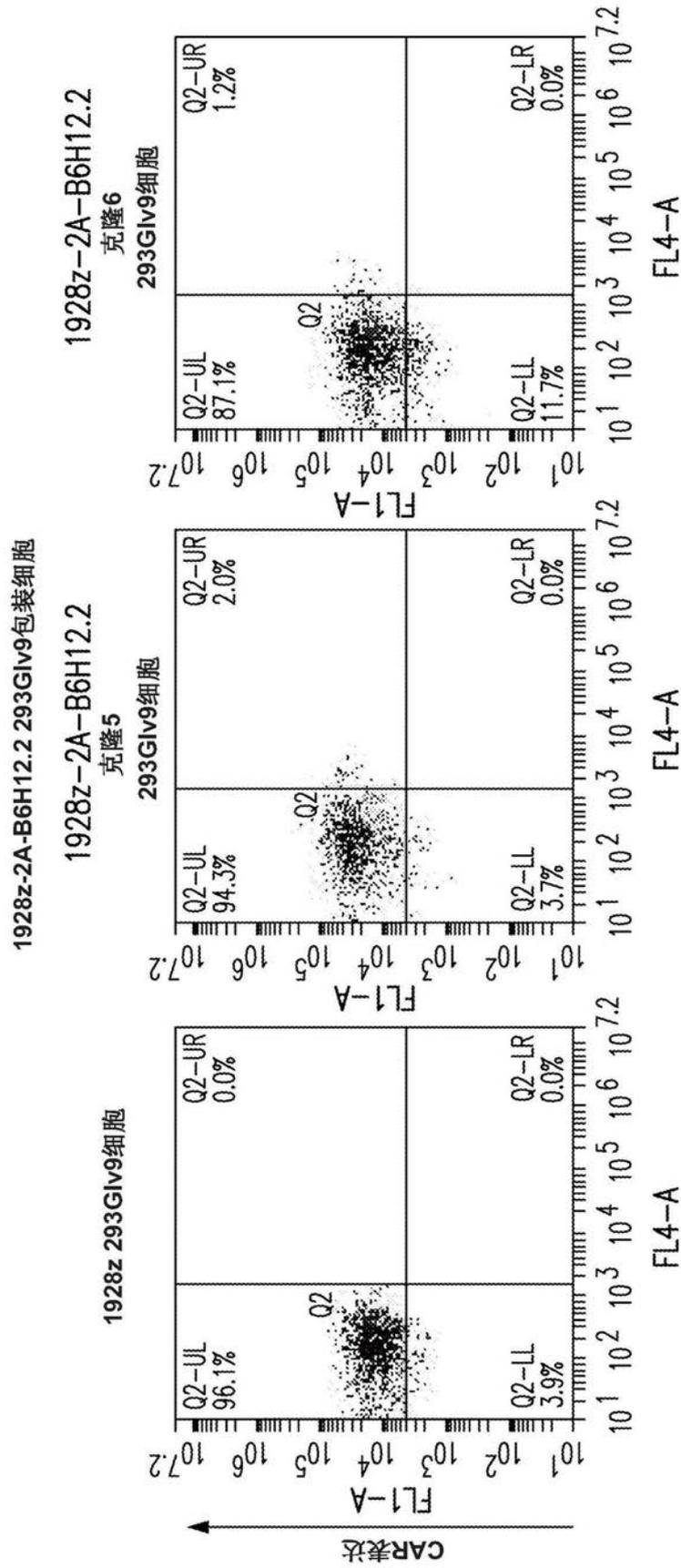


图7A

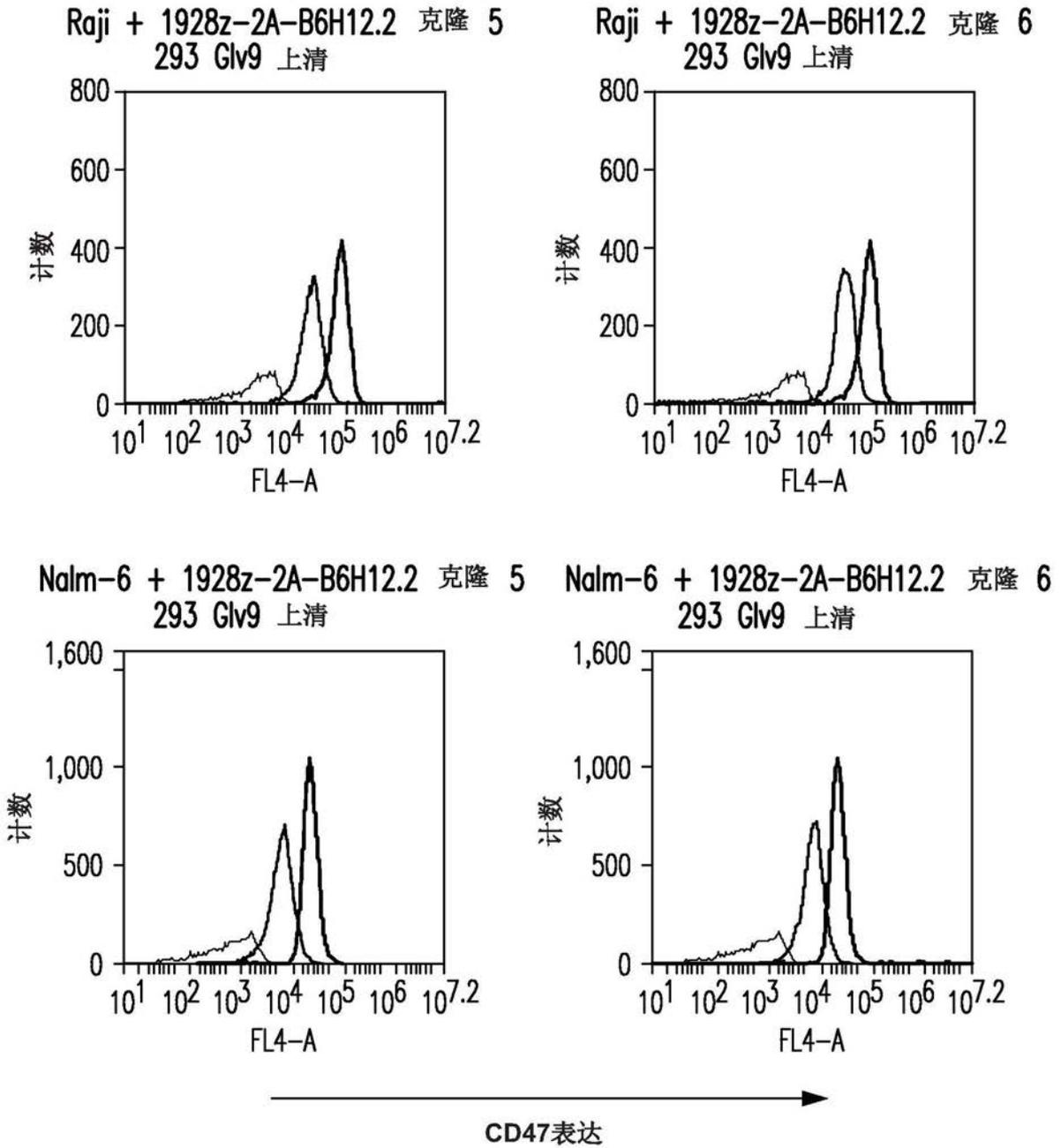


图7B

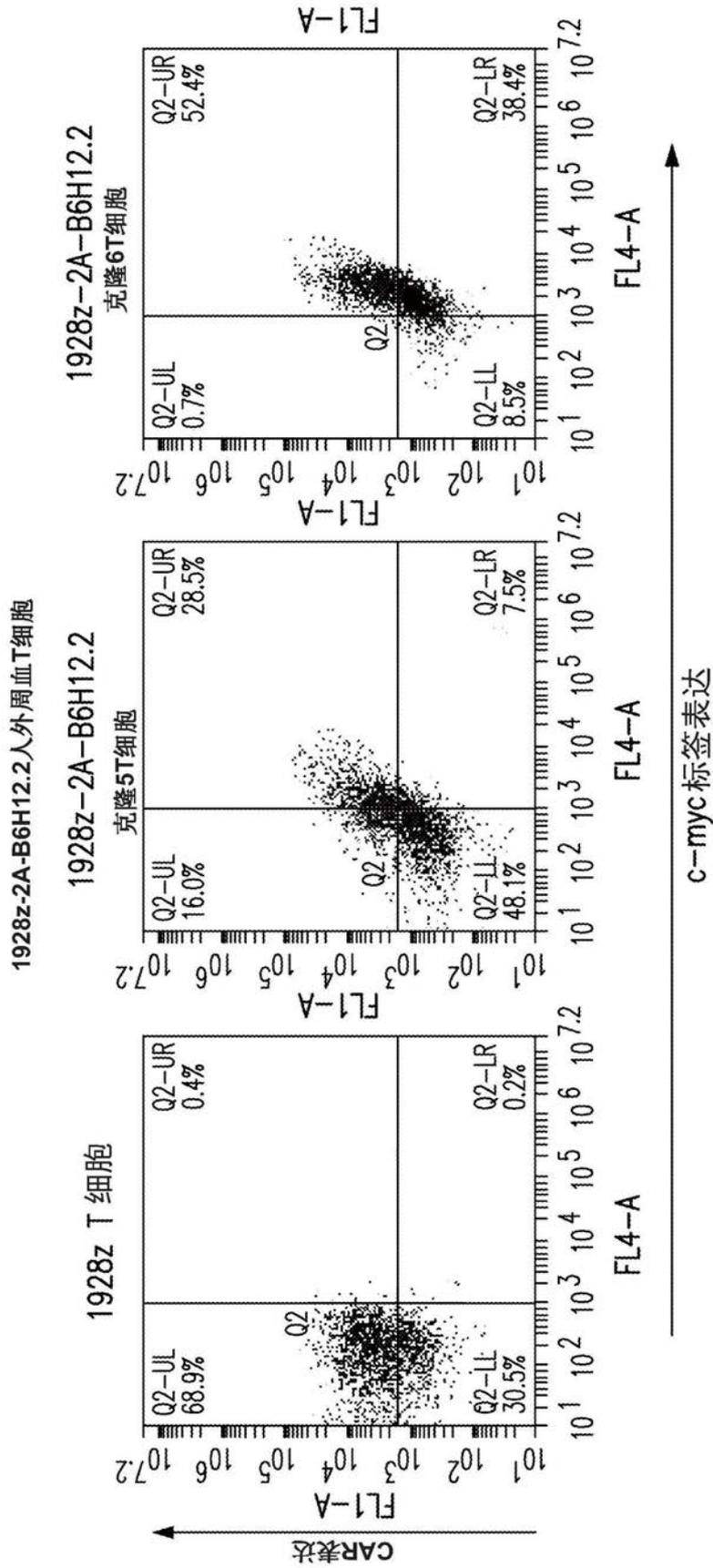


图8A

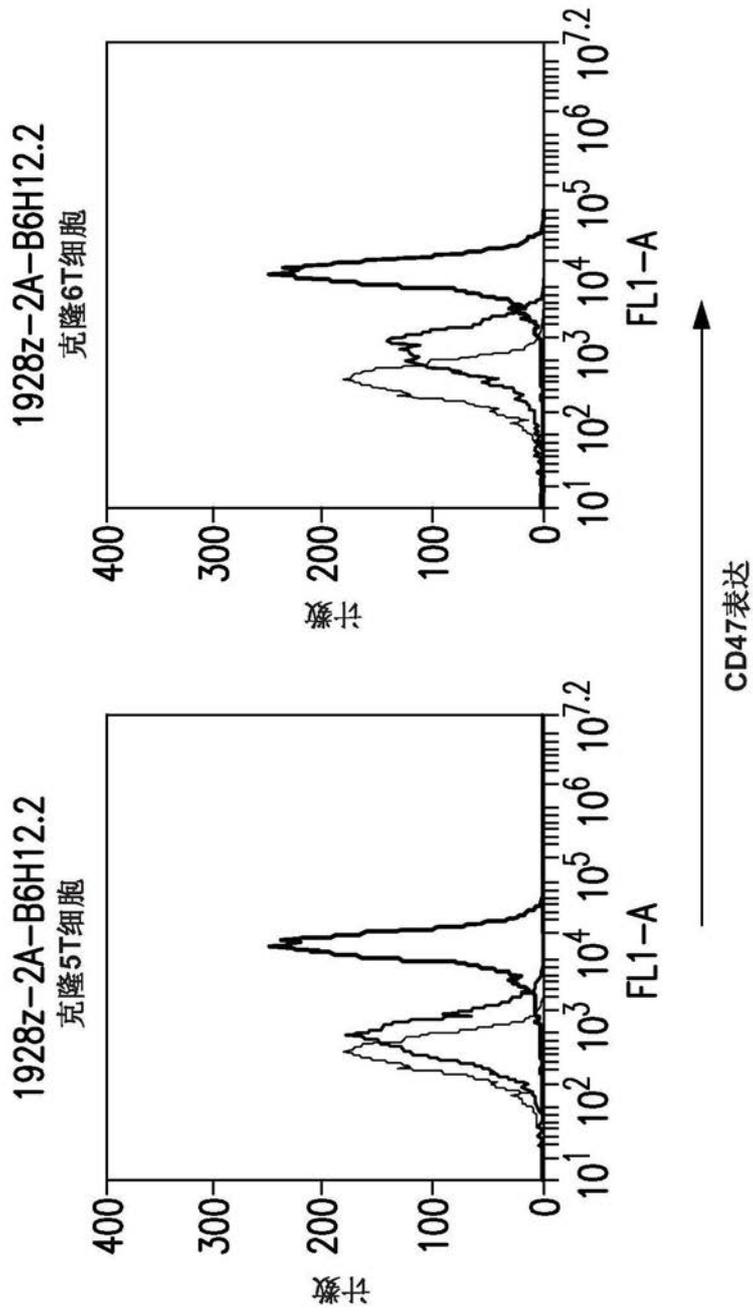


图8B

1928z-2A-B6H12.2人外周血T细胞

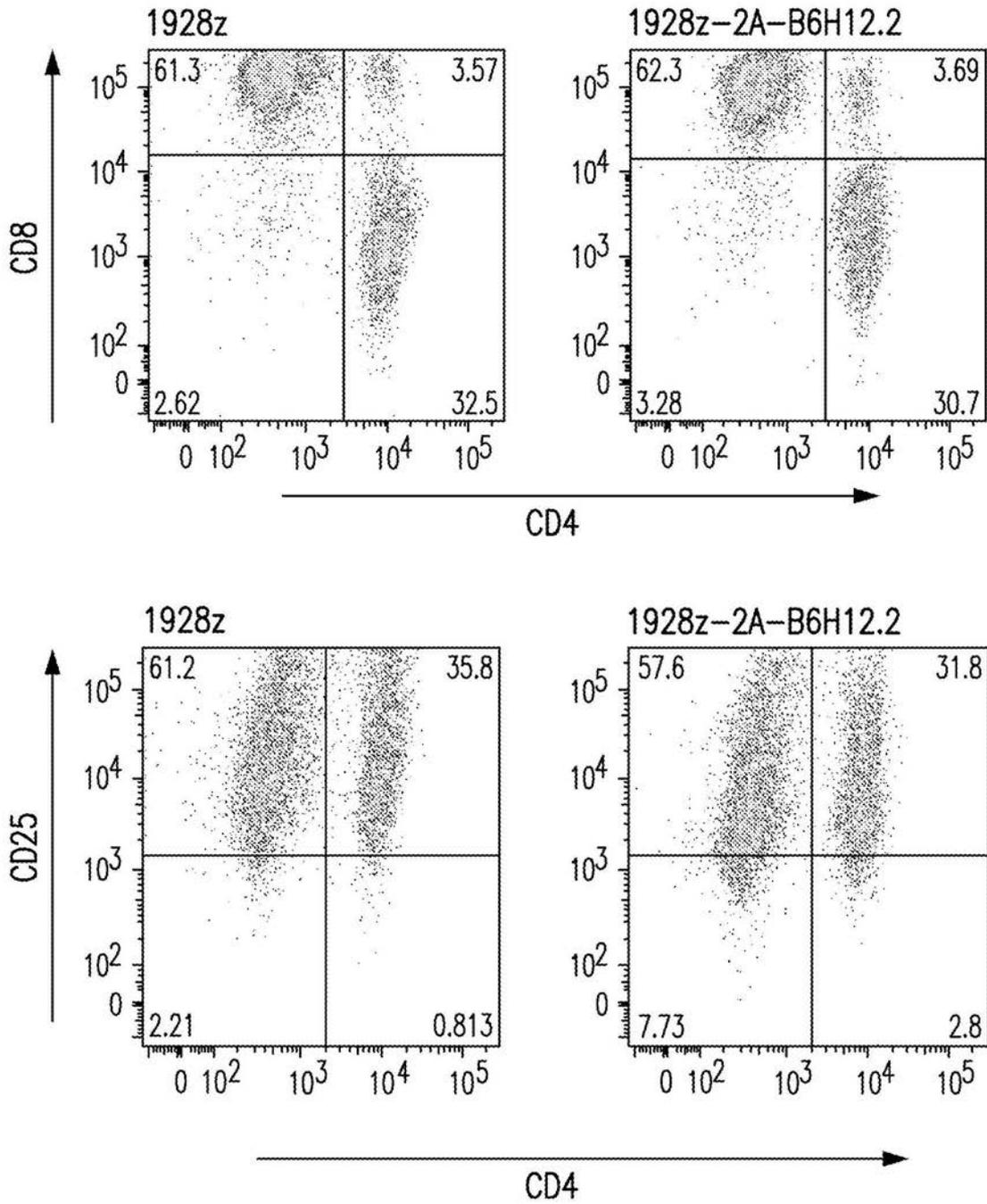


图9A-1

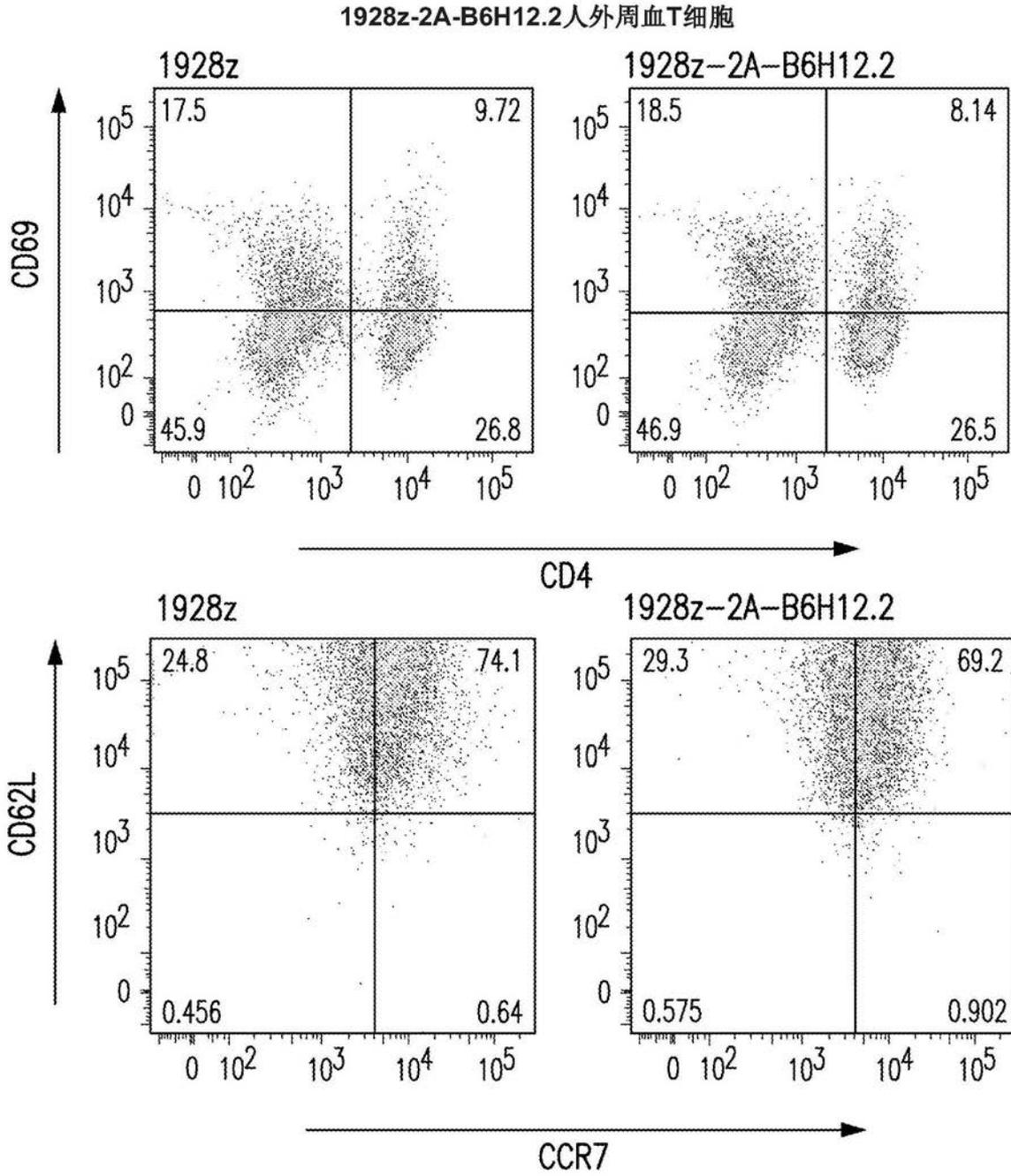


图9A-2

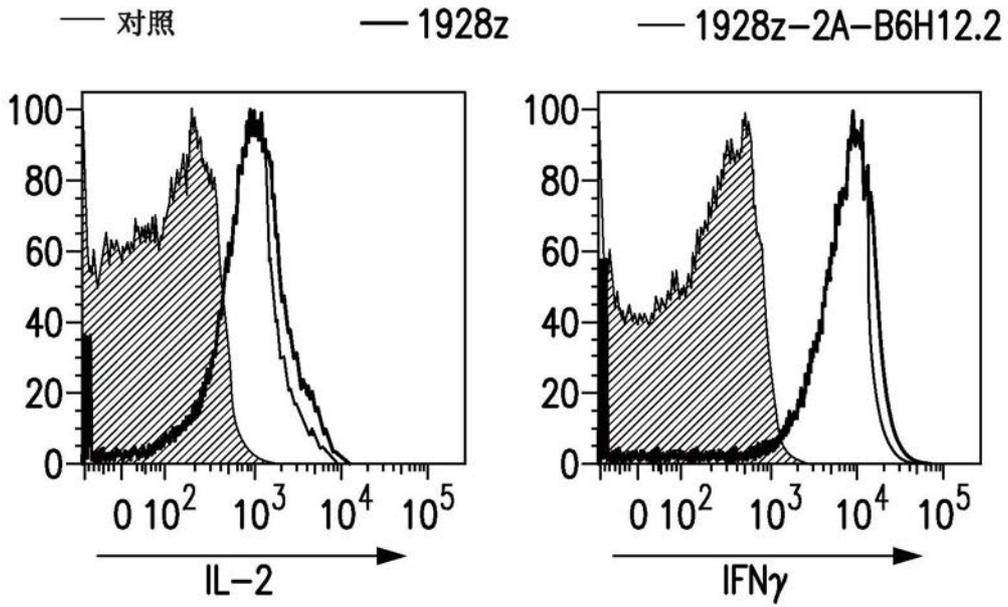


图9B

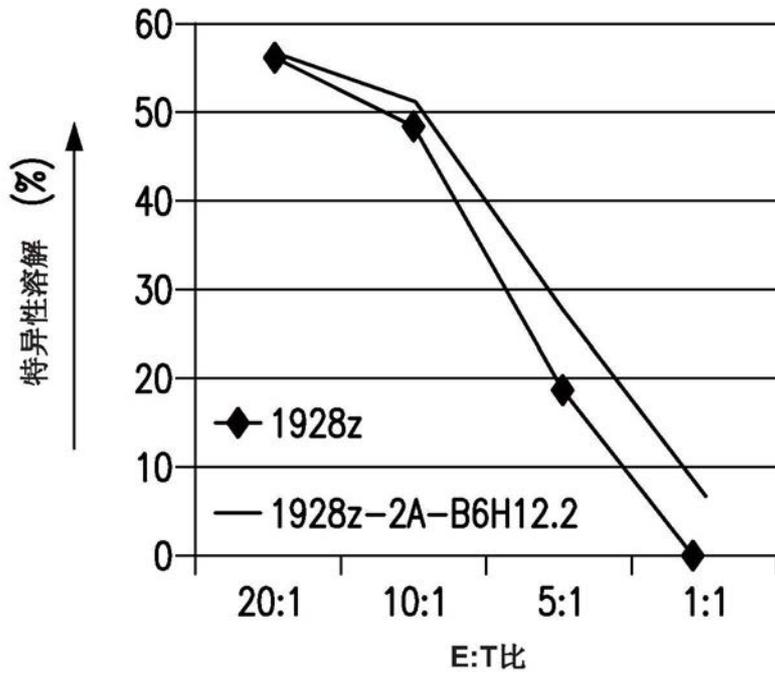


图9C

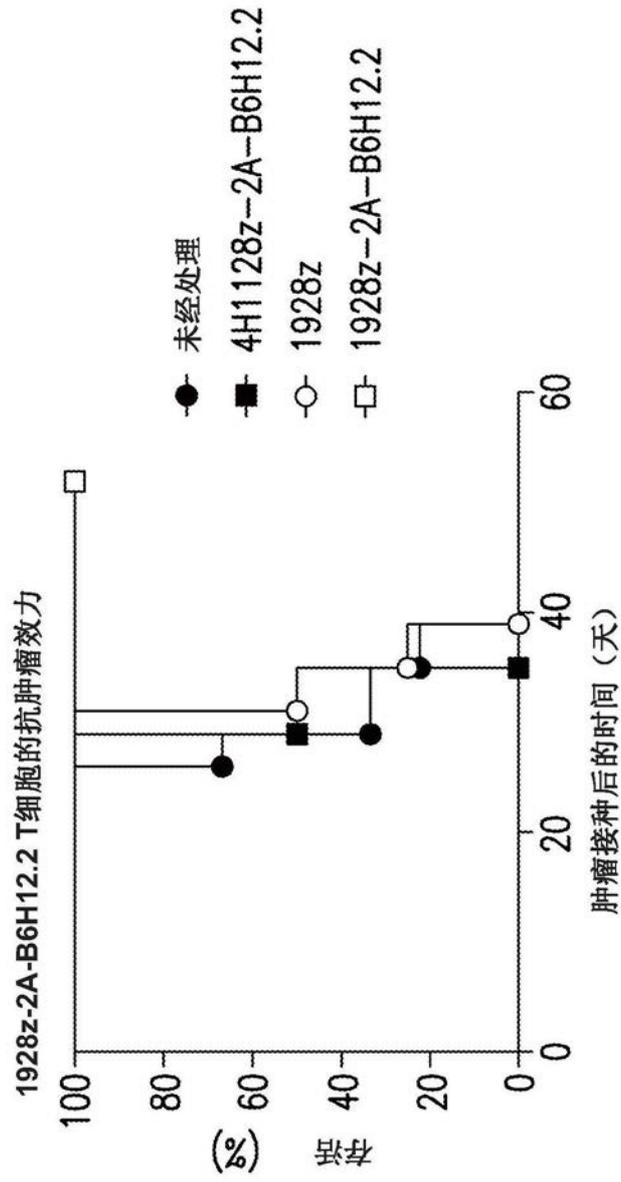


图10A

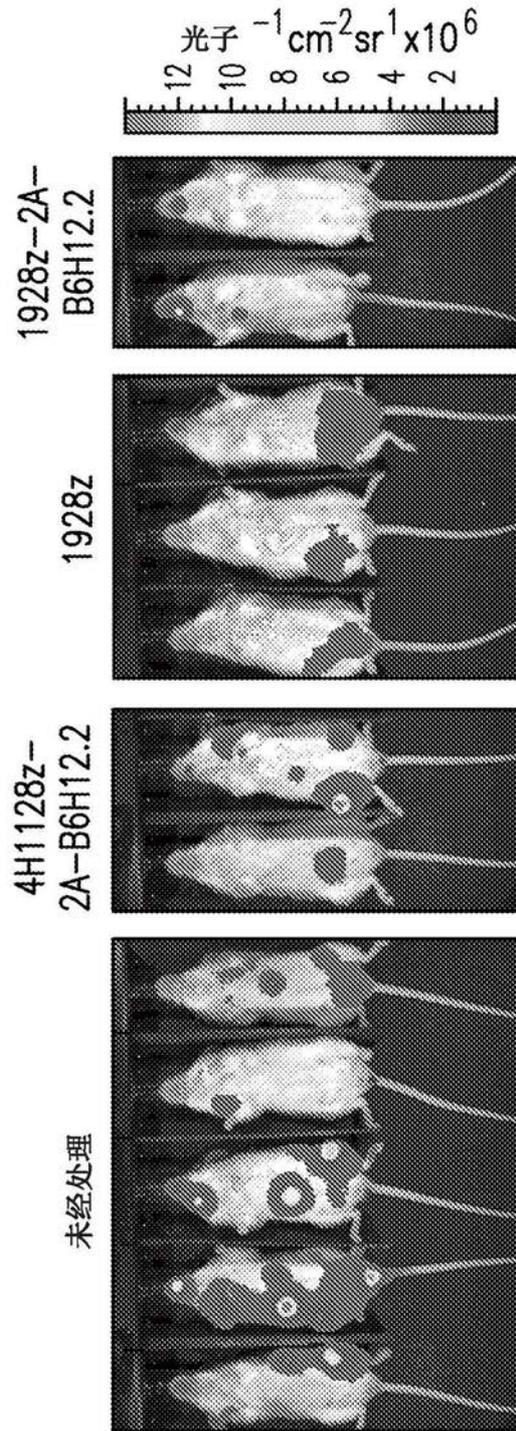


图10B

1928z-2A-5C4 (K 前导) 序列

```

atggctctcccagtgactgccctactgtctcccctagecgttcctctgcatgcagaggtgaagctgcagcagctcggg
gctgagctggtagggcctgggtccctcagtgagatttcttgcaggcttcggctatgcattcagtagctactggatgaa
ctgggtgaagcagaggcctggacagggcttgagtggttggacagatttatctggagatggtagactaactacaat
ggaaagtccaagggtaagccacactgactgcagacaaatcctccagcacagcctacatgcagctcagcggcctaacat
ctgaggactctgcggctctttctgtgcaagaagaccattagttcggtagtagatttctactttgactactggggccaagg
gaccacggtcacgctcctcaggtggaggtggatcaggtggaggtggatctgggtggaggtggatctgacattgagc
tcaccagctcctcaaatctcatgtccacatcagtaggagacagggctcagcgtcaccctgaaggccagtcagaatgtgggt
actaatgtagctgggtatcaacagaaccaggacaatctcctaaaccactgatttactcggcaaccctaccggaacagtg
agtccttgatcgtctcagagcagtggtatctgggacagatttcactctcaccatcaactaacgtgcagctcaaaagactggc
agactatttctgtcaacaatataacaggtatccgtacacgtccggaggggggaccaagctggagatcaaacggcggc
cgcaattgaagtatgtatcctcctcttacctagacaatgagaagagcaatggaaccattatccatgtgaaagggaaaca
ccttctgccaagtcctctatctcccggacctcttaagcccttttgggtgctgggtgggtgggtggagctctggcttctata
gcttctgtagtaacagtgggctttatatttctgggtgagggatagaggagcaggtctctgcacagtgactacatgaac
atgactccccgcgccccgggccccaccgcaagcattaccagccctatgccccaccacgcgactctgcagcctatcgtctc
cagagtgaagttcagcaggagcgcagagcccccgctaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatct
aggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggacccctgagatgggggggaaagccgagaag
gaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatga
aaggcgagcgcgggaggggcaaggggacagatggcctttaccagggctcagtagcagccaccaaggacacctacga
cgccctcactgcagccctgccccctcgcggatctggagcaacaattctcaactactcaaacagcaggtgacgtgg
aggagaaatcccggaccATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTCCAGG
TTCCACTGGTGACCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGT
CCCTGAGACTCGACTGTAAGCGTCTGGAATCACCTTCAGTAACTCTGGCATGCACTGGGTCCG
CCAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATTTGGTATGATGGAAGTAAAAGATA
CTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTTT
CTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTACTGTGCGACAAACGACGAC
TACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGA
TCTGGTGGAGGTGGATCTGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGG
GGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGTAGTTACTTAGCCTGGTACCAA
CAGAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCC
CAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGC
CTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGAGTAGCAACTGGCCTCGGACGTTCCGCCAAGG
GACCAAGGTGAAATCAAAGAACAAAACATCTCAGAAGAGGATCTGTAACCTCGAGGATCC

```

1928z CAR

P2A

sC4 scFv

图12

4H1128Z-2A-5C4 (K 前导) 序列

CATGGCTCTCCAGTGACTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCATGCAGAGGTGAAG
 CTGCAGGAGTCAGGGGGAGGCTTCGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTCAAAGTCTCCTGTGCAGC
 CTCTGGATTCACITTCAGTAGCTATGCCATGTCCTGGGTTGCGCTGAGTCCGGAGATGAGGCTG
 GAGTGGGTCGCAACCATTAGCAGTGCTGGTGGTTACATCTTCTATTCTGACAGTGTGCAGGGA
 CGATTCACCATTTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGCACCTGCAAATGGGCAGTCTGAGG
 TCTGGGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGGCAGGGATTTGGTAACTACGGTGATTACTATG
 CTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGT
 GGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGACATTGAGCTCACCCAGTCTCCATCCTCCCTGGCT
 GTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCACTATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAACAGTAG
 AACCCGAAAGAACCAGTTGGCTTGGTACCAGCAAAAACCAGGACAGTCTCCTGAACTGCTG
 ATCTACTGGGCATCCACTAGGCAATCTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGG
 ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGCCAG
 CAATCTTATAATCTACTgcaacaaacttctcactactcaacaagcaggtgacgtggaggagaatcccggacc

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGTTCCACTGGTGA
CCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACT
CGACTGTAAGCGTCTGGAATCACCTTCAGTAACTCTGGCATGCACTGGTCCGCCAGGCTC
CAGGCAAGGGGCTGGAGTGGTGGCAGTTATTTGGTATGATGGAAGTAAAAGATACTATGC
AGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTTTCTGC
AAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGACAAACGACGACTA
CTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGA
TCTGGTGGAGGTGGATCTGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCA
GGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGTAGTTACTTAGCCTGGTA
CCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTG
GCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAG
CCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGAGTAGCAACTGGCCTCGGACGT
TCGGCCAAGGGACCAAGGTGAAATCAAAGAACAAAACACTCATCTCAGAAGAGGATCTGTA
ACTCGAGGATCC

4H1128z CAR

P2A

SC4 scFv

图13

1928z-2A-5C4 (κ前导) 293GIV9包装细胞

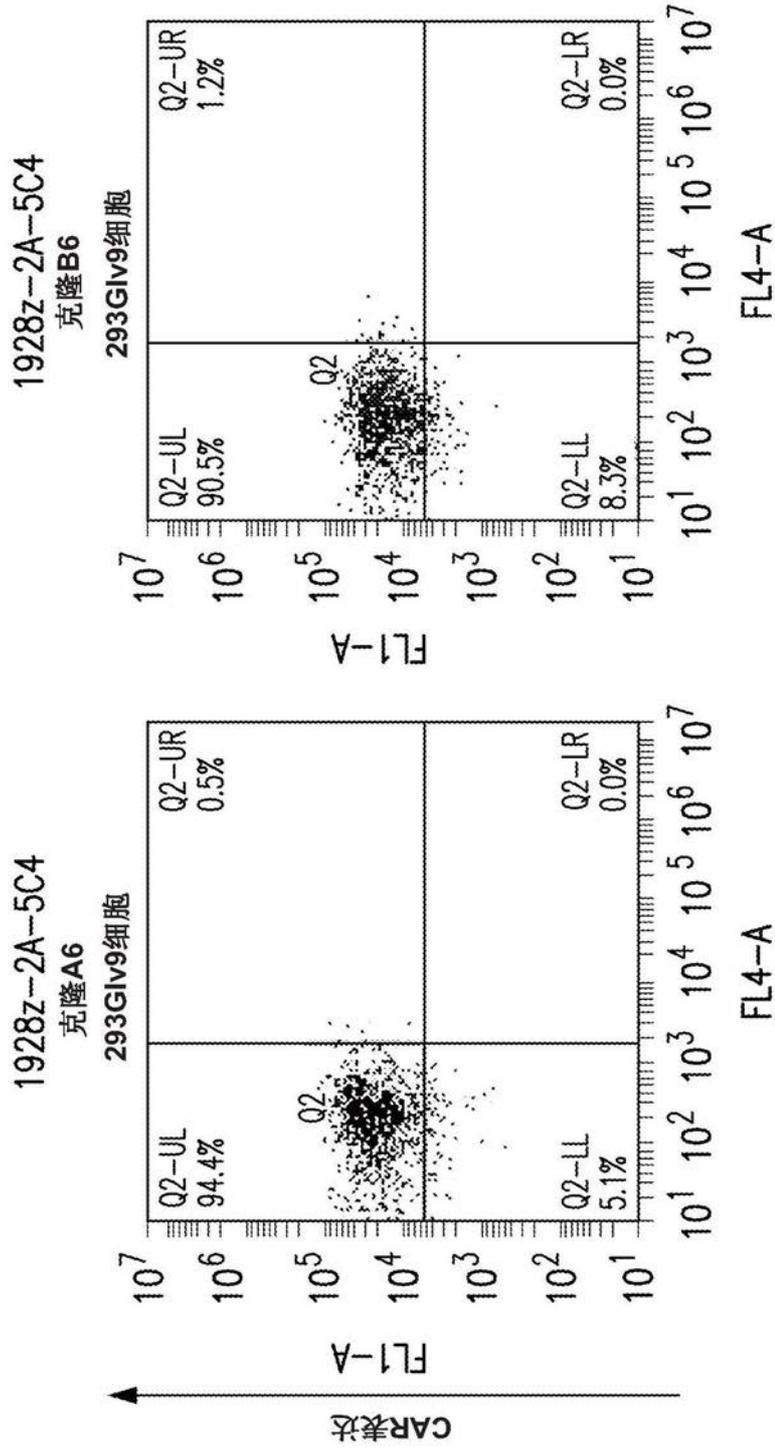


图14

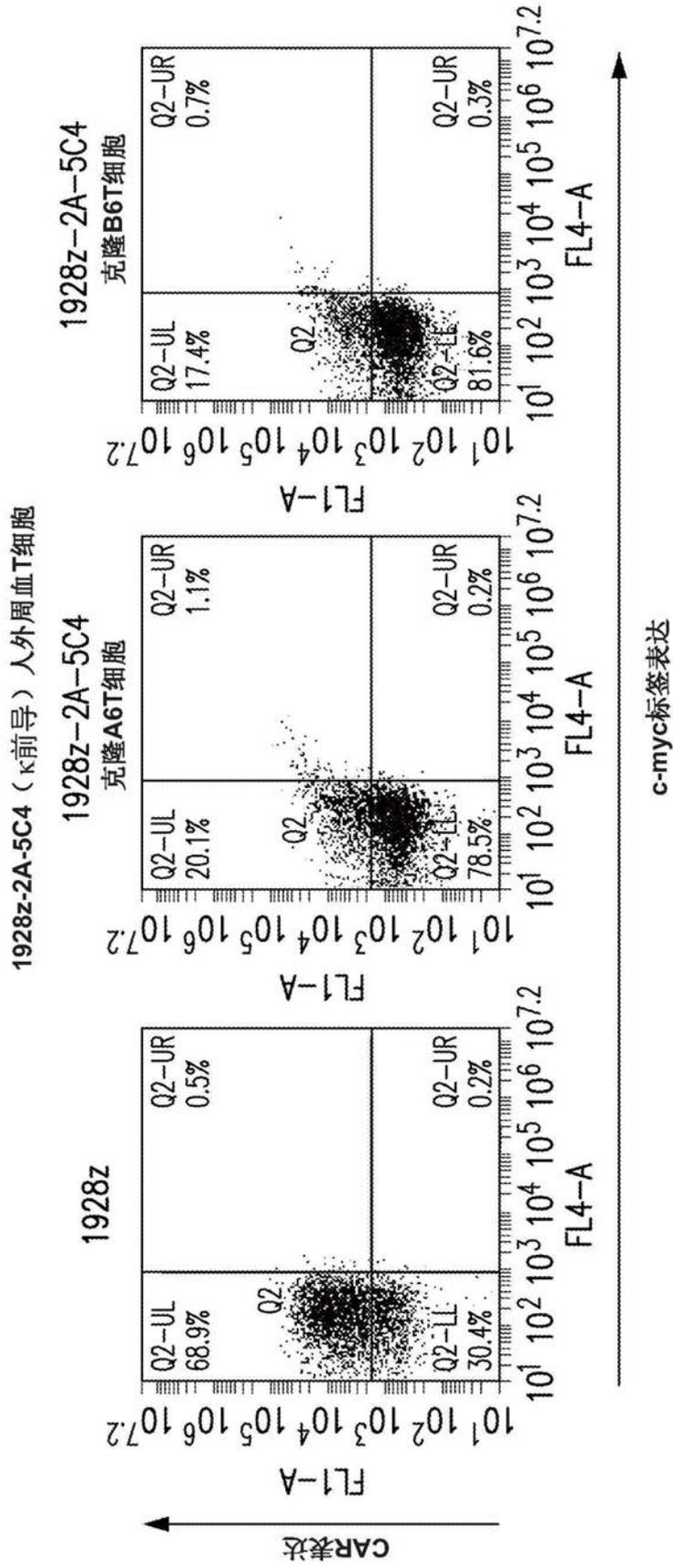


图15

3T3 (CD19+/B7.1+)、Raji和Nalm-6细胞上的PD-L1表达

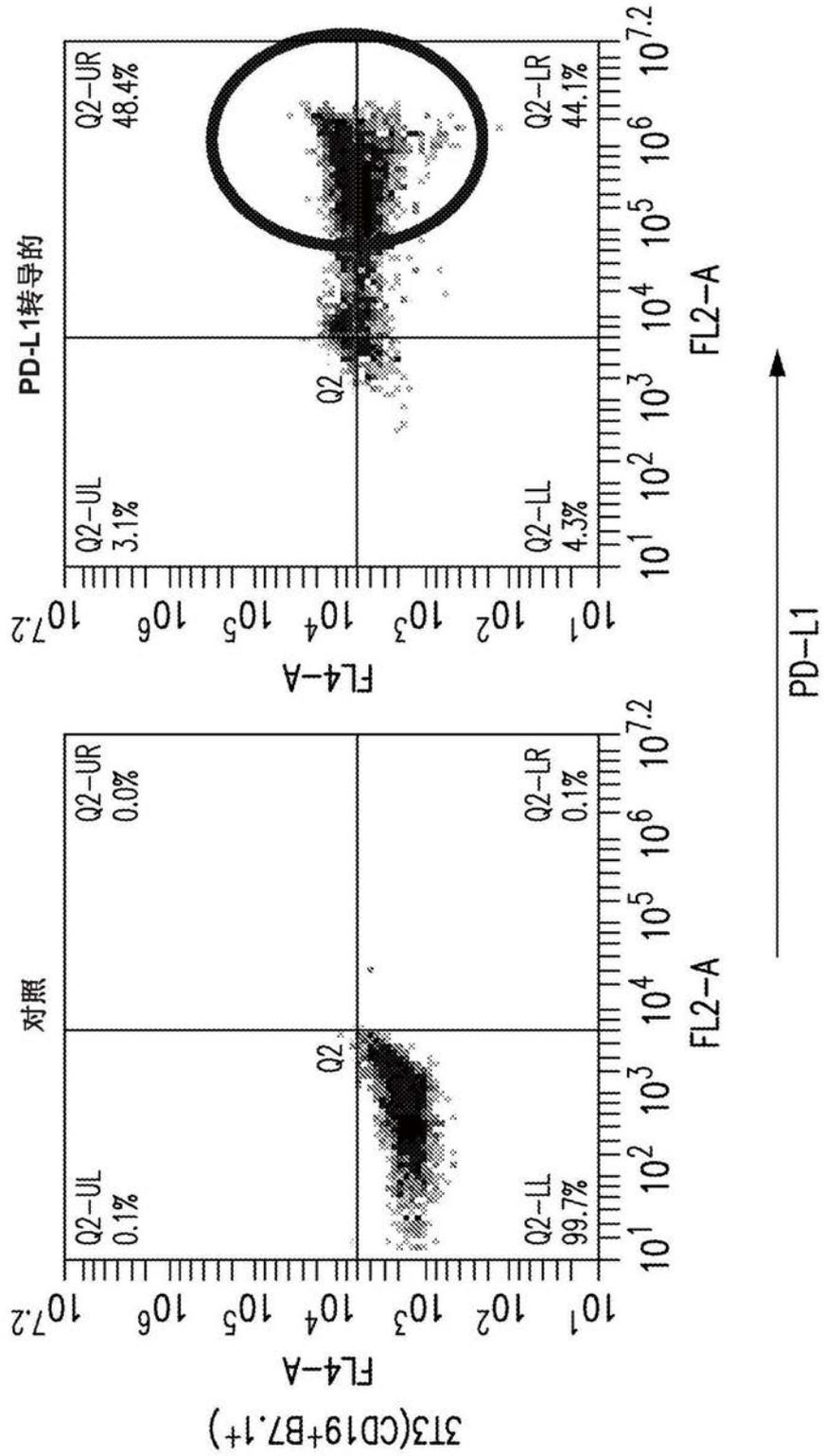


图16A

3T3 (CD19+/B7.1+)、Raji和Nalm-6细胞上的PD-L1表达

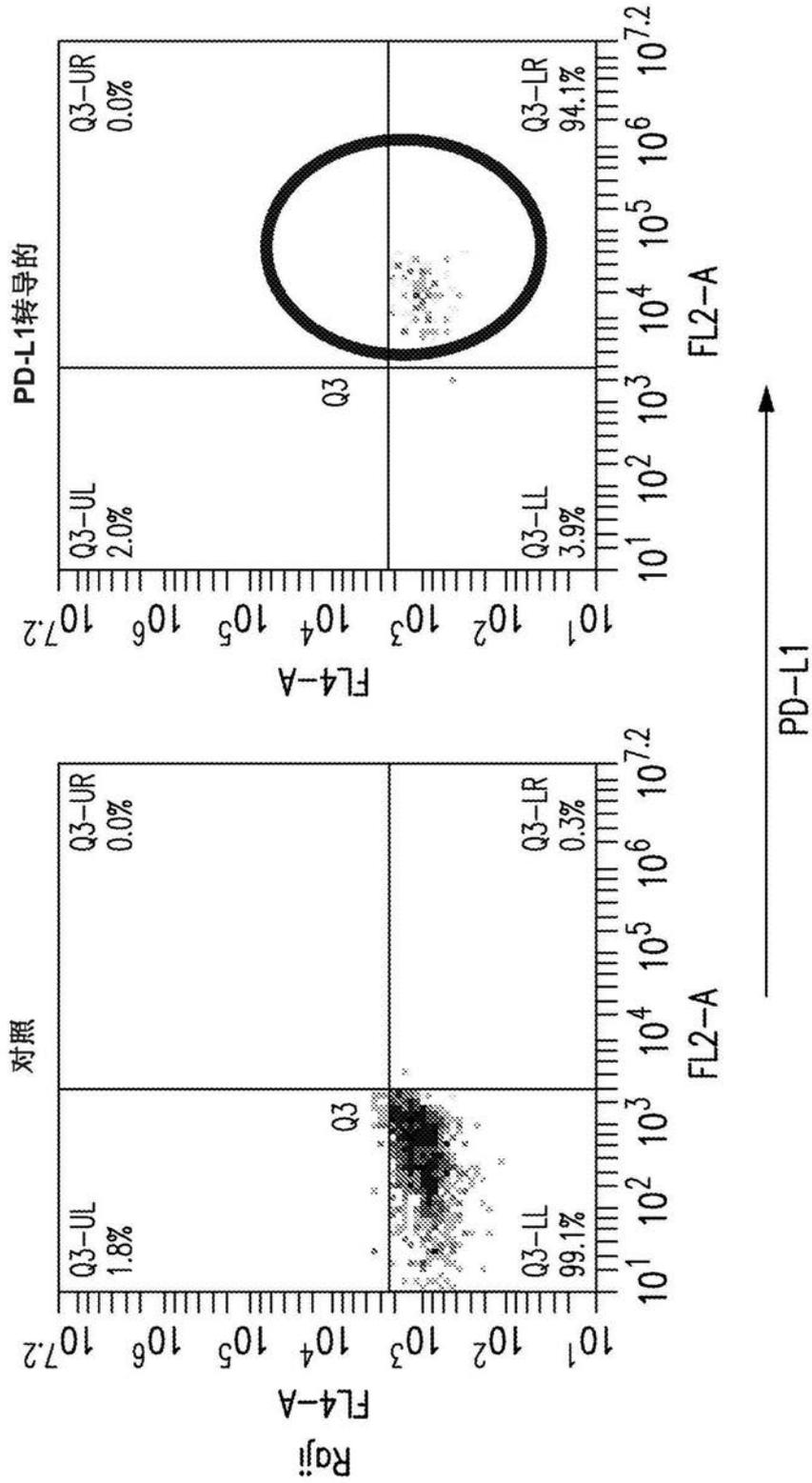


图16B

3T3 (CD19+/B7.1+)、Raji和Nalm-6细胞上的PD-L1表达

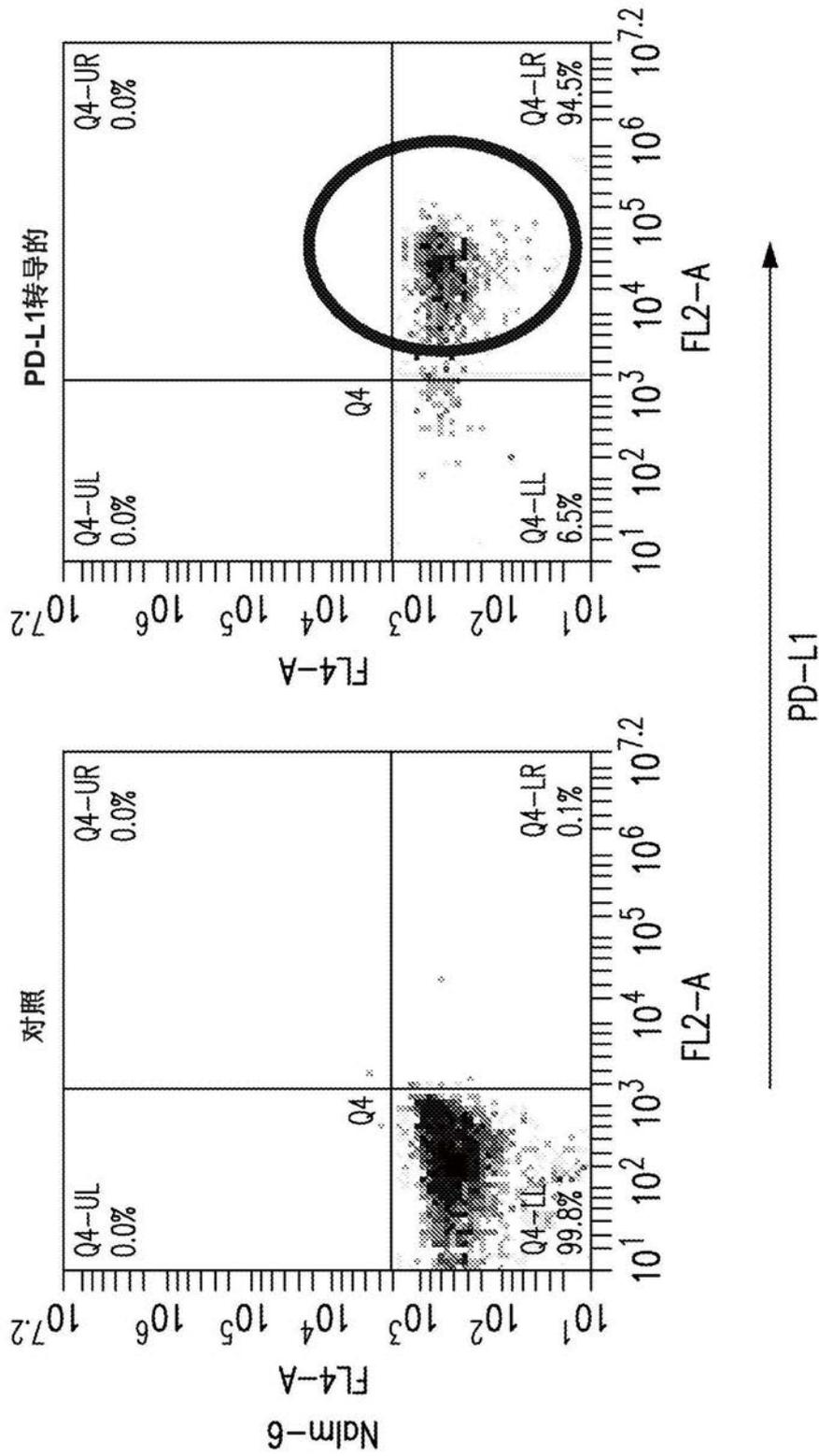


图16C

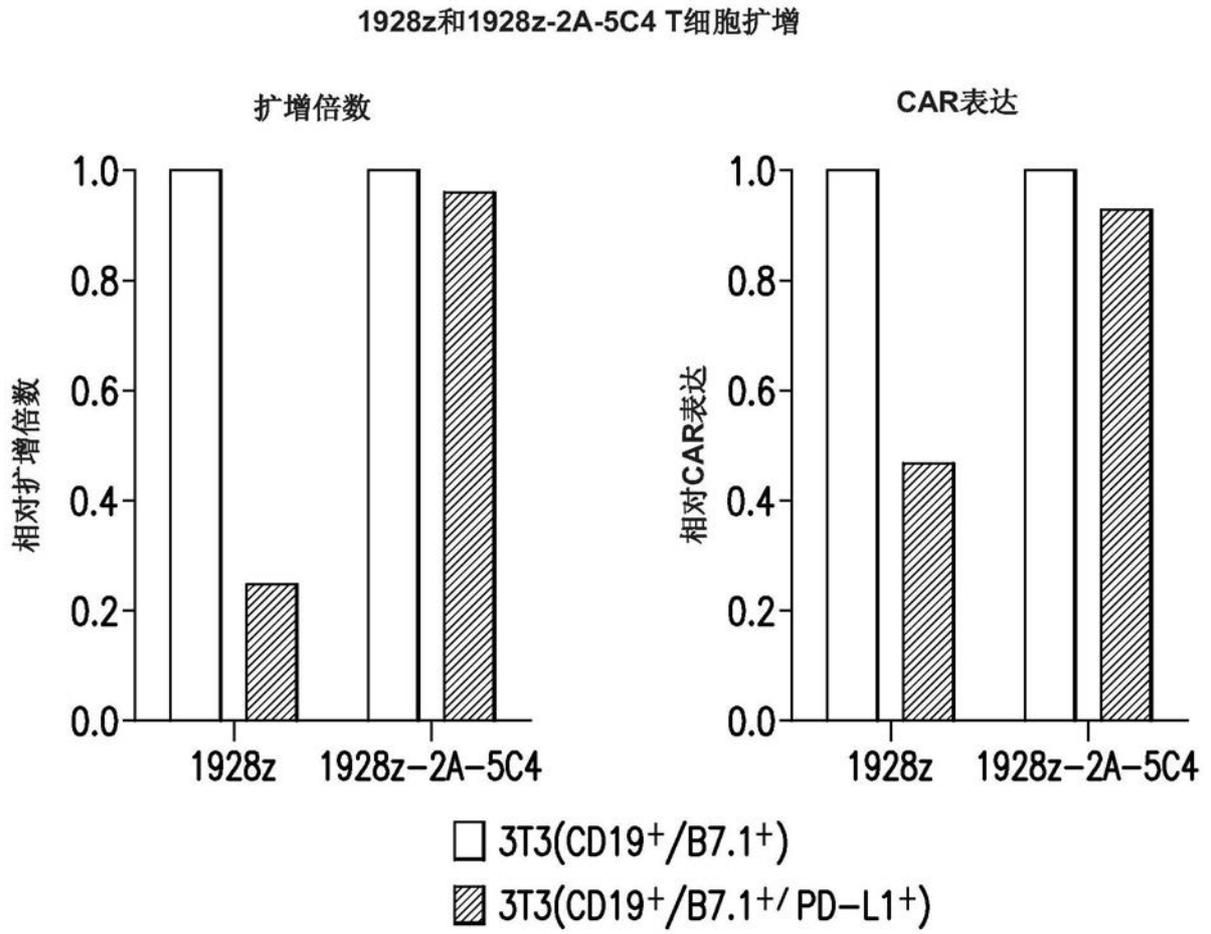


图17

具有小鼠κ前导序列的J43 scFv

小鼠κ前导序列	
ATG GAG ACA GAC ACA CTC CTG CTA TGG GTA CTG CTG CTC TGG GTT CCA GGT TCC ACT GGT GAC	ATG GGA TTG GGA CTG CAG TGG GTT TTC TTT GTT
M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G D	M G L G L O W V F F V
J43 VH序列	
GCT CTT TTA AAA GGT GTC CAC TGT GAG GTG CCG CTT CTG GAG TCT GGT GGA TTA GTG AAC CCT GAG GGG TCA CTG AAA CTC TCC TGT GTG GCC	
A L L K G V H C E V R L L E S G G L V K P E G S L K L S C V A	
TCT GGA TTC ACC TTC AGT GAC TAT TTC ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTT GCT CAC ATA TAC ACG AAA AGT TAT AAT	
S G F T F S D Y F M S W V R Q A P G K G L E W V A H I Y T K S Y N	
TAT GCA ACT TAT TAC TCG GGT TCG GTG AAA GGC AGA TTC ACC ATC TCC AGA GAT GAT TCC CGA AGC ATG GTC TAC CTG CAA ATG AAC AAC CTG AGA ACT GAG	
Y A T Y Y S G S V K G P F T I S R D D S R S M V Y L Q M N N L R T E D	
GAC ACG GCC ACT TAT TAC TGT ACA AGA GAT GGA AGC GGA TAT CCC TCT CTG GAT TTC TGG GGT CAA GGG ACC CAA GTC ACT GTC TCC TCA GCC ACA ACA ACA	
T A T Y Y C T R D G S G Y P S L D F W G Q G T Q V T V S S A T T T	
丝氨酸甘氨酸连接头序列	
GCC CCA TCT GTC TAT CCC TTG GCC GCT GCC TGT GAC AGC ACA ACC AAA TGG GGT CGA GGT GGA TCA GGT GGA TCT CGA TCT GGT GGA CGT GGA TCT TAT	
A P S V Y P L A P A C D S T T K S G G G S G G G G G S G G G S G G S A T T Y	
J43 VL序列	
GAG CTG ACT CAG CCA CCT TCA GCA TCA GTC AAT GTA GGA GAG ACT GTC AAA ATC ACC TGC TCT GGG GAC CAA TTG CCG AAA TAT TTT GCA GAT TGG TTT	
E L T Q P P S A S V N V G E T V K I T C S G D Q L P K Y F A D W F	
CAT CAA AGG TCA GAC CAG ACC ATT TTG CAA GTG ATA TAT GAT AAT AAG CGC CCC TCG GGG ATC CCT GAA AGA ATC TCT GGG TCC AGC TCA GGG ACA	
H Q R S D Q T I L Q V I Y D D N K R P S G I P E R I S G S S S G T	

图18

J43 VL序列

ACA GCC ACC TTG ACC ATC AGA GAT GTC CCG GCT GAG GAT GAA GGT GAC TAT TAC TGT TTC TCA GGA TAT GTT GAT AGT GAT AGC AAA TTG TAT GTT TTT GGC
T A T L T I R D V R A E D E G D Y Y C F S G Y Y D S D S K L Y V F G

AGC GGA ACC CAG CTC ACC GTC CTA GGT GGA CCC AAG TCT TCT CCC AAA GTC ACA GTG TTT CCA CCT TCA CCT GAG GAG CTC CCG ACA AAC AAA GCC ACA
S G T Q L T V L G G P K S S P K V T V F P P S P E E L R T N K A T

CTG GTG TGT CTG GTT AAT GAC TTC TAC CCG GGT TCT GCA ACA GTG ACC TGG AAG GCA AAT GGA GCA ACT ATC AAT GAT GGG GTG AAG ACT ACA AAG CCT
L Y C L V N D F Y P G S A T V T W K A N G A T I N D G V K T T K P

TCC AAA CAG GCC CAA AAC TAC ATG ACC AGC AGC TAC CTA AGT TTG ACA GCA GAC CAG TGG AAA TCT CAC AAC AGG GTT TCC TGC CAA GTT ACC CAT GAA
S K Q G Q N Y M T S S Y L S L T A D Q W K S H N R V S C Q V T H E

GGG GAA ACT GTG GAG AAG AGT TTG TCC CCT GCA GAA TGT CTC GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG TAA
G E T V E K S L S P A E C L E Q K L I S E E D L *

c-myc标签序列

图18继续

19m28mzIRESJ43 (小鼠 前导) 序列

```

CATGGCTCTCCAGTGAAGCTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCATGCAGAGGTGAAGCTGCAGCAGTCTGGG
CTGAGCTGGTGAGGCCTGGTCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGCTTCTGGCTATGCATTCAGTAGCTACTGGATGAAC
TGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTATCCTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGG
AAAGTTCAAGGGTCAAGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCGGCCTAACATCTG
AGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAAAGACCATTAGTTCGGTAGTAGATTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGG
ACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGACATTGAGCTCAC
CCAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGTACTA
ATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACCCTGATTTACTCGGCAACCTACCCGAACAGTGGAGTC
CCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGACAGATTTCACTCTCACCATCACTAACGTGCAGTCTAAAGACTTGGCAGA
CTATTTCTGTCAACAATAAACAGGTATCCGTACAGTCCGGAGGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGGGCGGCCCAA
TTGAGTTCATGTACCCTCCGCTTACCTAGACAACGAGAGGAGCAATGAACTATTATTACATAAAAGAGAAACATCTT
TGTCATACTCAGTCATCTCCTAAGCTGTTTTGGGCACTGGTCTGTTGCTGGAGTCTGTTTTGTTATGGCTTGTAGT
GACAGTGGCTCTTTGTGTTATCTGGACAAATAGTAGAAGGAACAGACTCCTTCAAAGTACTACATGAACATGACTCCCC
GGAGGCCTGGGCTCACTCGAAAGCCTTACCAGCCCTACGCCCTGCCAGAGACTTTGCAGCGTACCGCCCCAGAGCAAAA
TTCAGCAGGAGTGCAGAGACTGCTGCCAACCTGCAGGACCCCAACCAGCTCTACAATGAGCTCAATCTAGGGCGAAGAGA
GGAATATGACGCTCTTGAGAAAGAGCGGGCTCGGGATCCAGAGATGGGAGGCAACAGCAGAGGAGGAGGAACCCCAAGG
AAGCGTATACAATGCACTGCAGAAAGACAAGATGGCAGAAGCCTACAGTGAATCGGCACAAAAGCGGAGAGACGGAGA
GGCAAGGGGACAGTGGCCTTACCAGGGTCTCAGCACTGCCACCAAGGACACCTATGATGCCCTGCATATGCAGACCCT
GGCCCCCTCGCTAACAGCCACTCGAGGATCCGCCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGAA
TAAGGCCGGTGTGCGTTTTGTCTATATGTTATTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCCGAAACCTGG
CCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAGGGTCTGTTGAATGTCTGTAAGG
AAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAGTCTGTAGCGACCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCACTGGC
GACAGGTGCCTCTGCGACCAAGGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGGCGCACAAACCCAGTGCCACGTTGTGAG
TTGGATAGTTGTGGAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCC
ATTGTATGGATCTGATCTGGGCTCGGTACATGCTTTACATGTGTTTGTAGTGCAGGTTAAAAAACGCTTAGGCCCCC
CGAACCCAGGGGACCTGGTTTTCTTTGAAAAACAGGATGATAATAGGCCACAACTGCCATGGAGACAGACACTCC
TGCTATGGTACTGCTGCTCTGGTTCAGGTTCCACTGGTGACATGGGATGGGACTGCAGTGGGTTTTCTTTGTTGCT
CTTTAAAAAGGTGTCCACTGTGAGGTGGGCTTCTGGAGTCTGGTGGAGGATTAGTGAAGCCTGAGGGTCACTGAAACT
CTCCTGTGTGGCTCTGGATTACCTTCAGTGAATTTATGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGT
GGGTGCTCACATATACAGAAAAGTTATAATTATGCAACTTATTACTCGGTTCCGTGAAAGGCAGATTCACCATCTCC
AGAGATGATCCCGAAGCATGGTCTACCTGCAAATGAACAACCTGAGAACTGAGGACACGGCCACTTATTACTGTACAAG
AGATGGAAGCGGATATCCCTCTCTGGATTTCTGGGTCAAGGGACCCAAGTCACTGTCTCCTCAGCCACAACAACAGCCC
CATCTGTCTATCCCTTGGCCCTGCCTGTGACAGCACAACCAATCGGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGT
GGAGGTGGATCTTATGAGCTGACTCAGCCACCTCAGCATCAGTCAATGTAGGAGAGACTGTCAAATCACCTGCTCTGG
GGACCAATTGCCGAAATATTTGCAGATTGTTTCATCAAAGTCAAGCCAGACCATTTTGAAGTATATATGATGATA
ATAAGCCCCCTCGGGATCCCTGAAAGAATCTCTGGGTCCAGCTCAGGGAACAACAGCCACCTTGACCATCAGAGATGT
CGGGCTGAGGATGAAGGTGACTATTACTGTTTTCTCAGGATATGTTGATAGTATAGCAAAATGTATGTTTTTGGCAGCGG
AACCCAGCTCACCGTCTAGGTGGACCAAGTCTTCTCCAAAGTCAAGTGTTCACCTTACCTGAGGAGCTCCGGA
CAACAAGCCACACTGGTGTGTCTGTTAATGACTTCTACCCGGTCTGCAACAGTGACCTGGAAGGCAAAATGGAGCA
ACTATCAATGATGGGTGAAGACTACAAAGCCTTCCAAACAGGGCCAAACTACATGACCAGCAGTACCTAAGTTTGAC
AGCAGACCAGTGGAAATCTCAACAAGGGTTTCTGCCAAGTACCATGAAGGGGAAACTGTGGAGAAGAGTTTGTCCC
CTGCAGAATGTCTCGAACAACAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGTAACCTCGAG

```

19m28mzCAR

IRES

J43 scFv

图19

4H11m28mzIRESJ43 (小鼠*K* 前导) 序列

```

CTCTCCCAGTACTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCATGCAGAGGTGAAGCTGCAGGAGTCAGGGGAGGC
TTCGTGAAGCCTGGAGGTCCCTCAAAGTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTCAGTAGCTATGCCATGTCTGGGT
TCGCCTGAGTCCGGAGATGAGGCTGGAGTGGTCCGAACCATTAGCAGTGTGGTGGTTACATCTTCTATTCTGACAGTG
TGCAGGGACGATTACCATTTCCAGAGACAATGCCAAGAACCCTGCACCTGCAAAATGGGCAGTCTGAGGTCTGGGGAC
ACGGCCATGTATTACTGTGCAACGCAGGGATTTGGTAACTACGGTGATTACTATGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGAC
CACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGACATTGAGCTCAGCC
AGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCACTATGAGCTGCAAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAACAGT
AGAACCCGAAAGAACCAGTTGGCTTGGTACCAGCAAAAACCAGGACAGTCTCCTGAACTGCTGATCTACTGGGCATCCAC
TAGGCAATCTGGAGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGCAGG
CTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGCCAGCAATCTTATAATCTACTGGACCAAGCTGGAGATCAAACGGGGCGGCCGAA
TTGAGTTCATGTACCCTCCGCCTTACCTAGACAACGAGAGGAGCAATGGAATATTATTCACATAAAAGAGAAACATCTT
TGTCATACTCAGTCACTCCTAAGCTGTTTTGGGCACTGGTCTGGTGGTGGTGGAGTCTGTTTTGTTATGGCTTGCTAGT
GACAGTGGCTCTTTGTGTATCTGGACAAATAGTAGAAGGAACAGACTCCTCAAAGTACTACATGAACATGACTCCCC
GGAGGCTGGGCTCACTCGAAAGCCTTACCAGCCCTACGCCCTGCCAGAGACTTTGCAGCGTACCGCCCCAGAGCAAAA
TTCAGCAGGAGTGCAGAGACTGCTGCCAACCTGCAGGACCCCAACCAGCTCTACAATGAGCTCAATCTAGGGCGAAGAGA
GGAATATGACGCTTGGAGAAGAAGCGGGCTCGGGATCCAGAGATGGGAGGCAAAACAGCAGAGGAGGAGAAACCCCCAGG
AAGCGTATACAATGCACTGCAGAAAGACAAGATGGCAGAAGCCTACAGTGAATCGGCACAAAAGCGGAGAGGGCGAGA
GGCAAGGGGCAGATGGCCTTACCAGGGTCTCAGCACTGCCACCAAGGACACCTATGATGCCCTGTATATGCAGACCCT
GGCCCTCGCTAACAGCCACTCGAGGATCCGCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAA
TAAGCGCGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTCCACCATATTGCCGTCTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGG
CCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCTAGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAGGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGG
AAGCAGTTCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGC
GACAGTGCCTCTGCGACCAAGGCCACGTGATAAGATACACCTGCAAAGCGGCACAACCCCACTGCCACGTTGTGAG
TTGGATAGTTGTGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATCAACAAGGGGTGAAGGATGCCAGAAGGTACCCC
ATTGTATGGGATCTGATCTGGGCCTCGGTCACATGCTTACATGTGTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGCCCCC
CGAACACGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACAGATGATAATATGGCCACAAACTGCCATGGAGACAGACACTCC
TGCTATGGTACTGCTGCTCTGGTTCAGGTTCCACTGGTGACATGGGATTGGGACTGCAGTGGGTTTTCTTTGTTGCT
CTTTTAAAGGTGTCCACTGTGAGGTGCCGCTTCTGGAGTCTGGTGGAGGATTAGTGAAGCCTGAGGGTCACTGAAACT
CTCCTGTGTGGCCTCTGGATTCACCTCAGTACTATTTATGAGTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTCGAGT
GGTGTCTCACATATACAGAAAAGTTATAATTATGCAACTTATTACTCGGTTCCGTGAAAGGCAGATTCACCATCTCC
AGAGATGATCCCGAAGCATGGTCTACCTGCAATGAACAACCTGAGAAGTGAAGACAGGCCACTTATTACTGTACAAG
AGATGGAAGCGGATATCCCTCTCTGGATTCTGGGTCAAGGGACCAAGTCACTGTCTCCTCAGCCACAACAACAGCCC
CATCTGTCTATCCCTTGGCCCTGCCTGTGACAGCACAACCAATCGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGT
GGAGGTGGATCTTATGAGCTGACTCAGCCACCTCAGCATCAGTCAATGTAGGAGAGACTGTCAAAATCACCTGCTCTGG
GGACCAATTGCCGAAATATTTGCAAGTTGGTTTCATCAAAGTCAAGCCAGACCATTTTGAAGTGATATATGATGATA
ATAAGCGCCCTCGGGATCCCTGAAAGAATCTCTGGTCCAGCTCAGGGACAACAGCCACCTTGACCATCAGAGATGTC
CGGGCTGAGGATGAAGGTGACTATTACTGTTTCTCAGGATATGTTGATAGTATGCAAAATGATGTTTTTGGCAGCGG
AACCCAGCTCACCGTCTAGGTGGACCAAGTCTTCCCAAAGTCAAGTGTTCACCTTACCTGAGGAGCTCCGGA
CAAACAAGCCACACTGGTGTGCTGGTTAATGACTTCTACCCGGTCTGCAACAGTGACCTGGAAGGCAAAATGGAGCA
ACTATCAATGATGGGTGAAGACTACAAGCCTTCCAAACAGGGCCAAAACACTACATGACCAGCAGCTACCTAAGTTTGAC
AGCAGACCAGTGGAAATCTCACAACAGGGTTTCTGCCAAGTACCATGAAGGGAAACTGTGGAGAAGAGTTTGTCCC
CTGCAGAATGTCTCGAACAAAACACTCATCTCAGAAGAGGATCTGTAACCTGAG

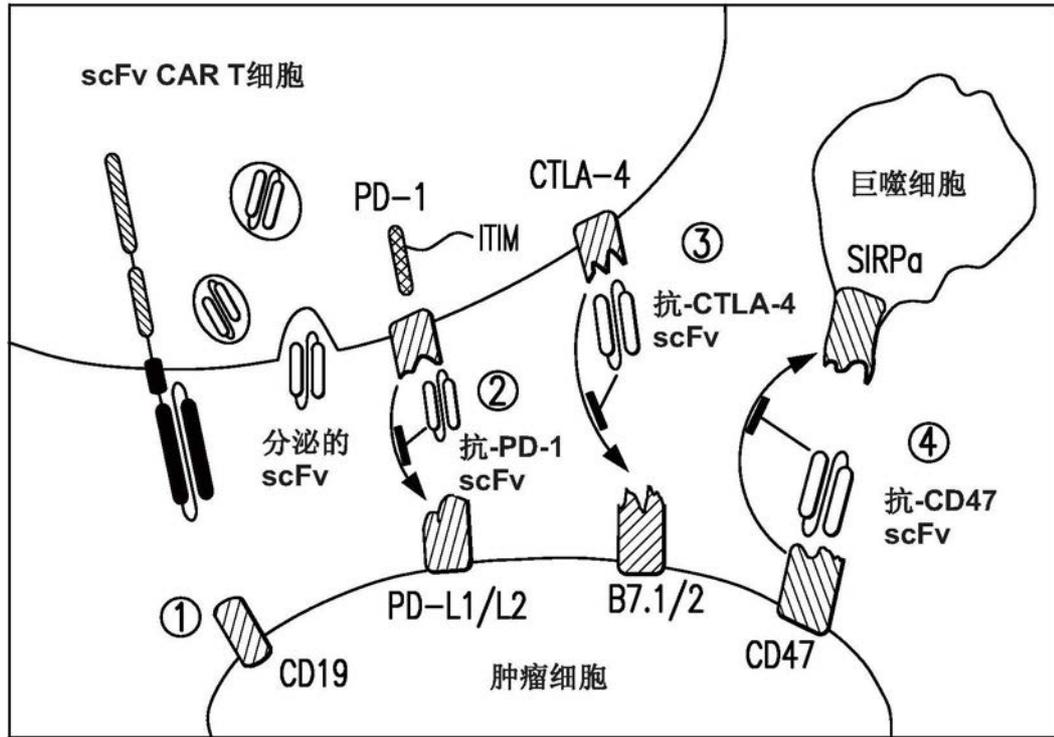
```

4H11m28mz CAR

IRES

J43 scFv

图20



设计成克服“不友好肿瘤微环境”的遗传工程化“装甲”CAR T细胞或者，CAR-T细胞还可以修饰成分泌具有免疫调节功能的拮抗性scFv。在激活针对同源抗原的CAR时（1），装甲CAR修饰的T细胞可以诱导成分泌对融合CAR修饰的T细胞以及内源性抗肿瘤T细胞上的抑制性PD-1 T细胞受体拮抗的scFv，从而提高抗肿瘤效应物功能（2）；可以诱导成分泌对融合CAR修饰的T细胞以及内源性抗肿瘤T细胞上的抑制性CTLA-4 T细胞受体拮抗的scFv，从而提高抗肿瘤效应物功能（3）；或者可以诱导成分泌对肿瘤细胞上表达的CD47受体拮抗的scFv，从而反转肿瘤细胞为逃避宿主天然抗肿瘤免疫应答识别的伪装，从而引起宿主巨噬细胞对肿瘤的认识和根除。

图21

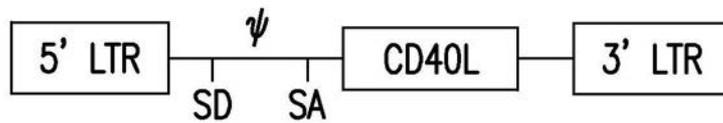


图22A

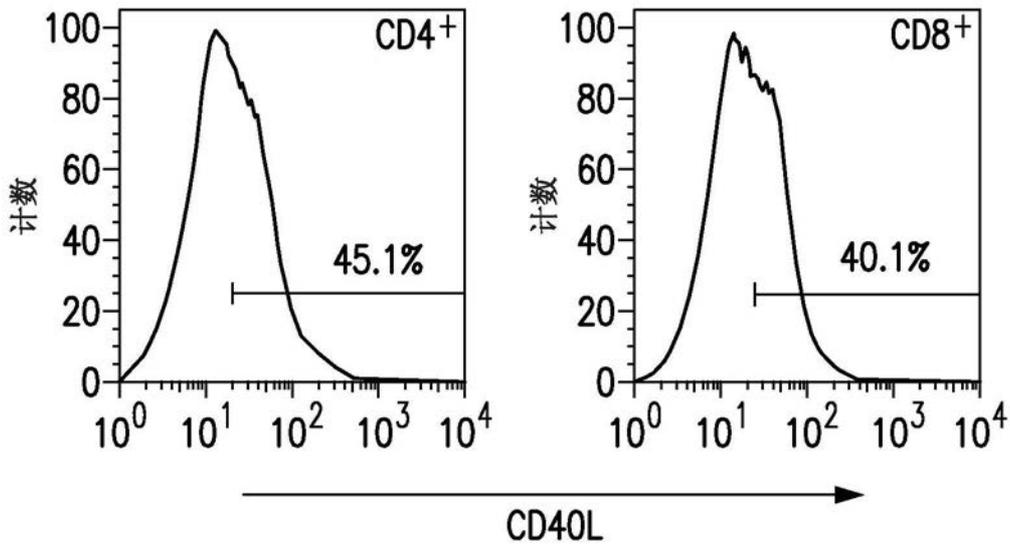


图22B

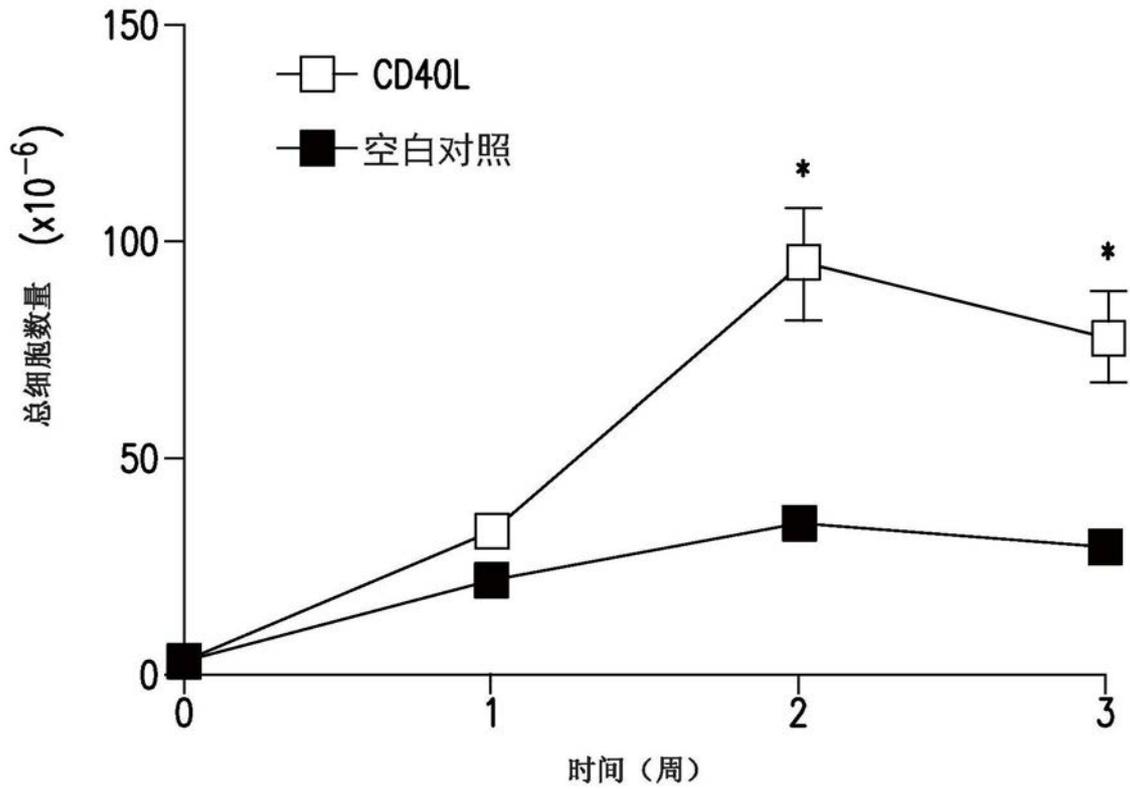


图22C

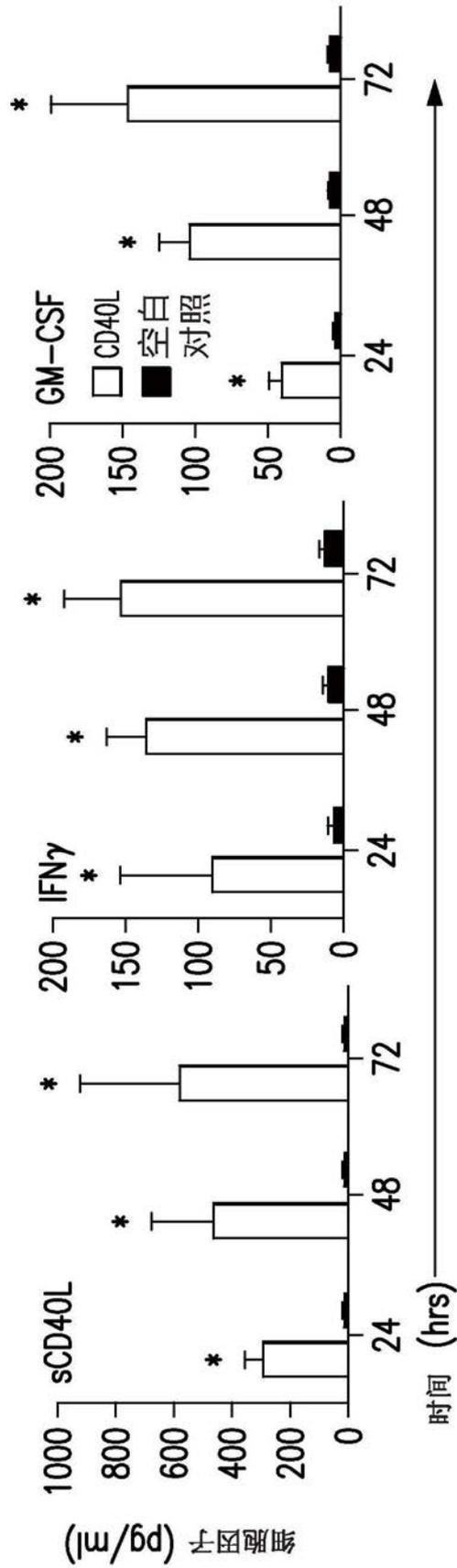


图22D

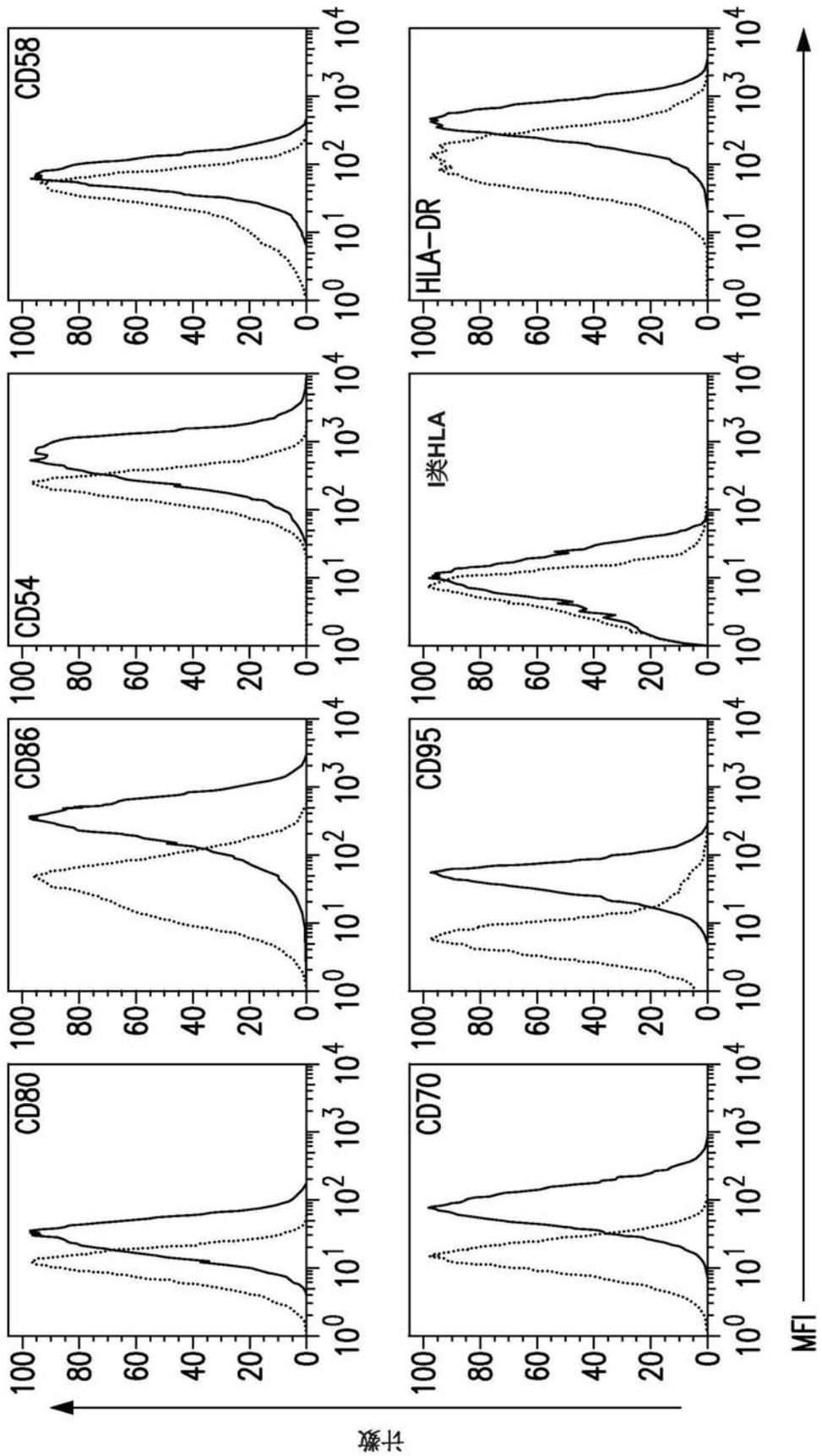


图23A

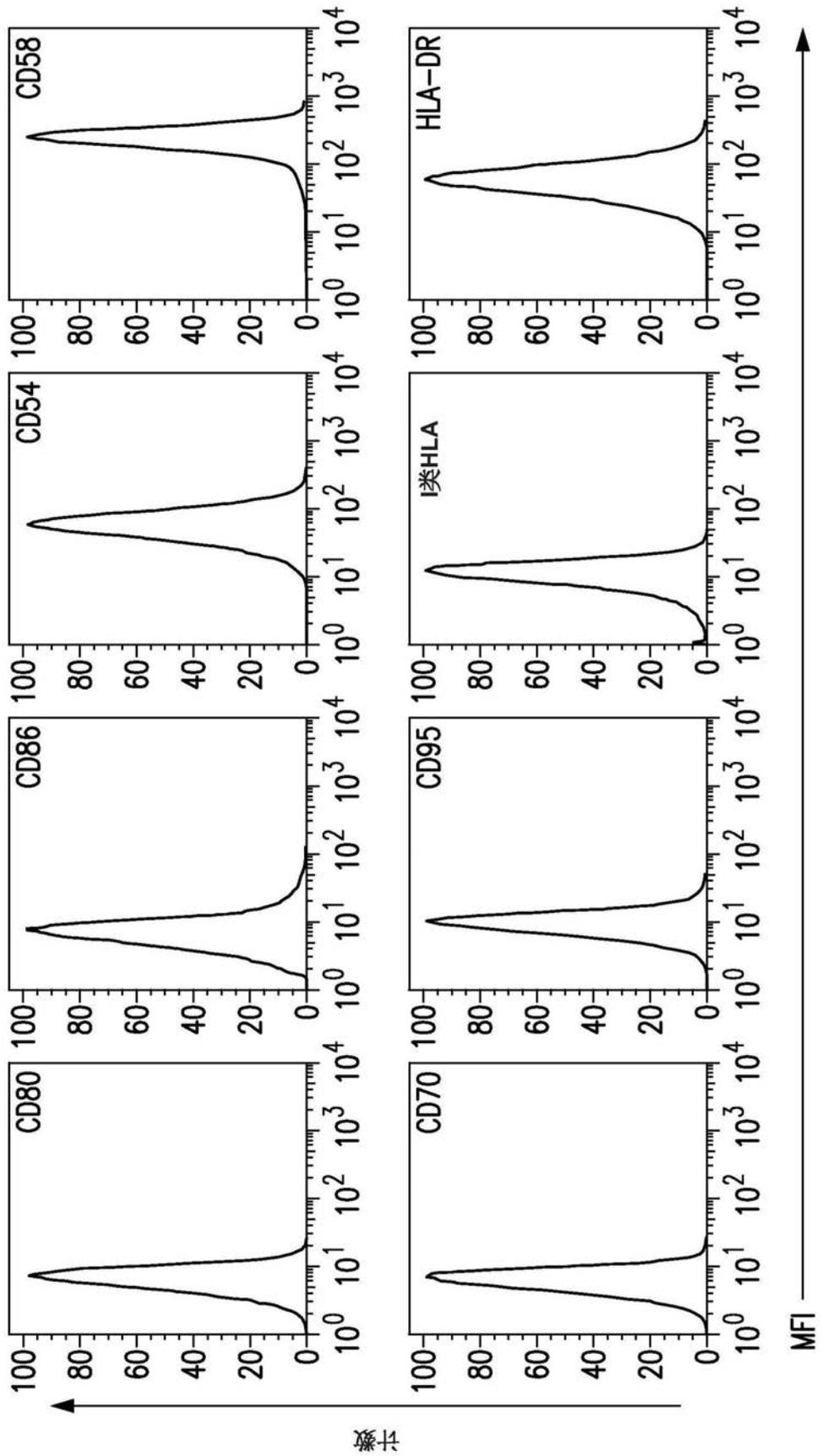


图23B

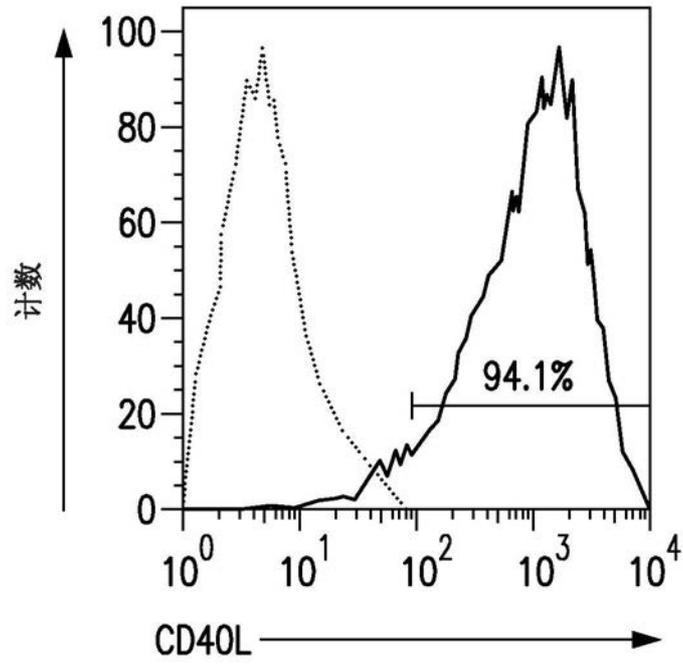


图24A

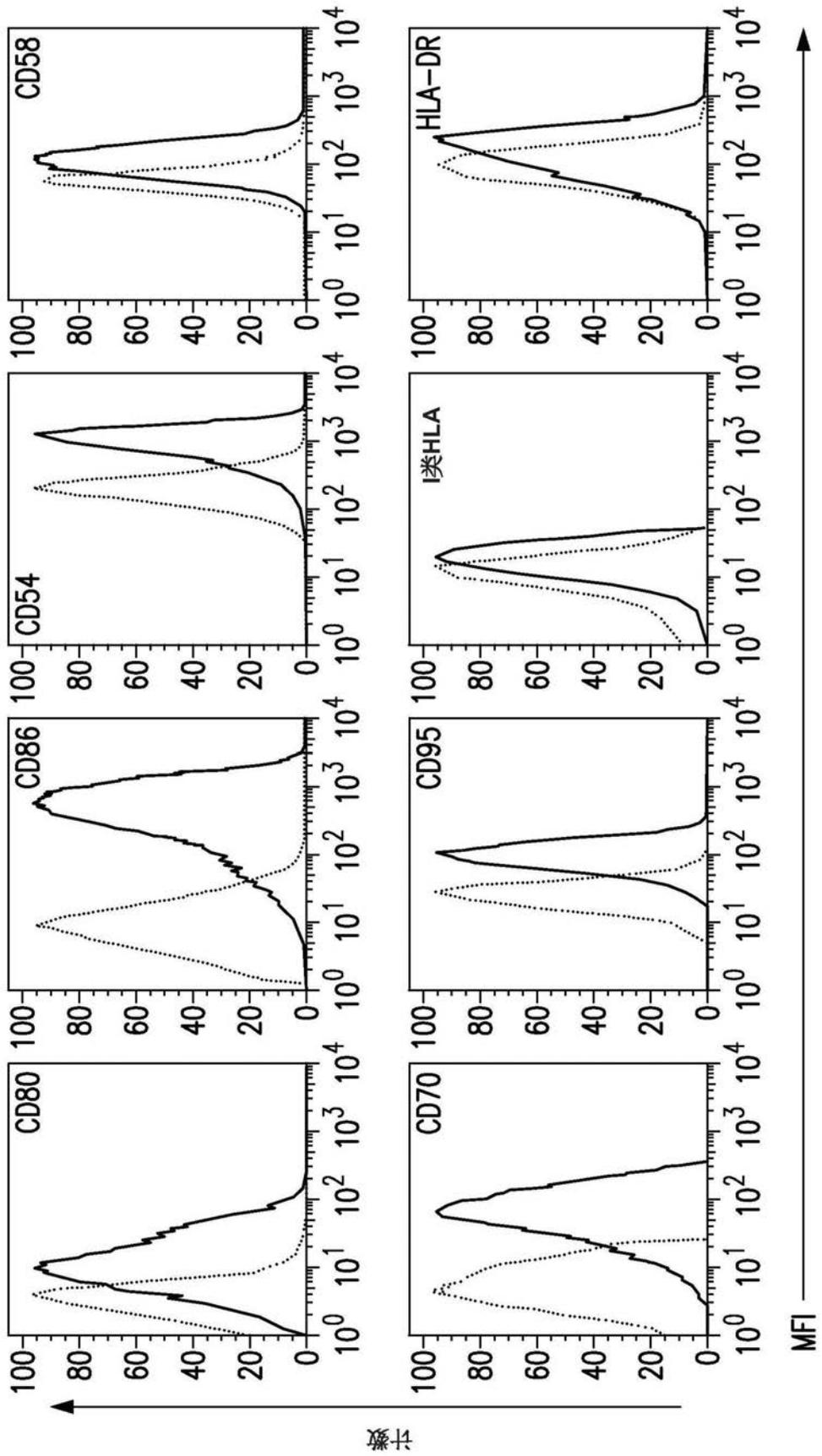


图24B

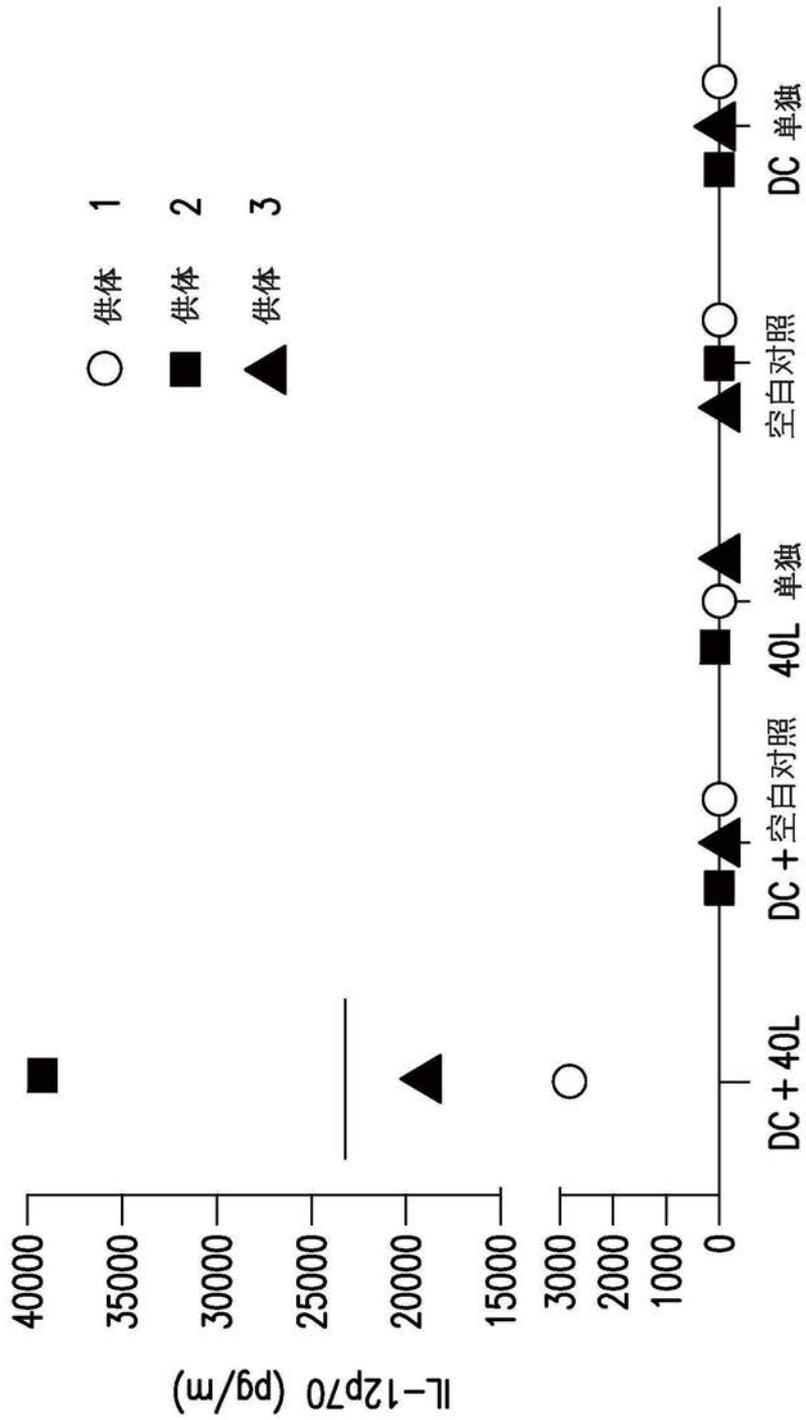


图25A

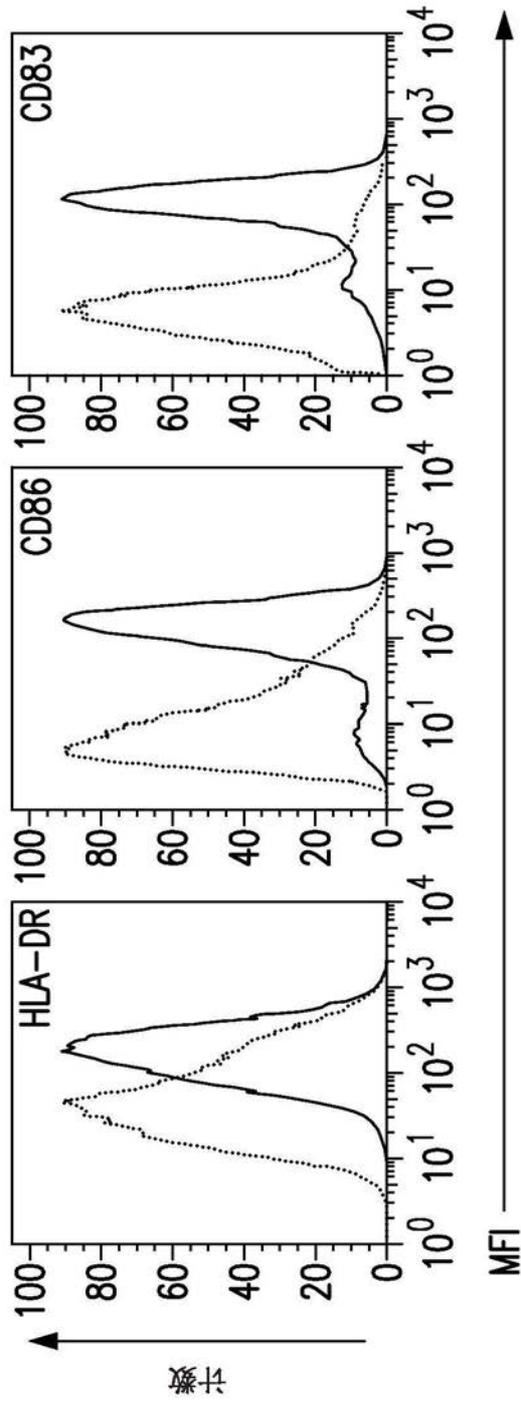


图25B

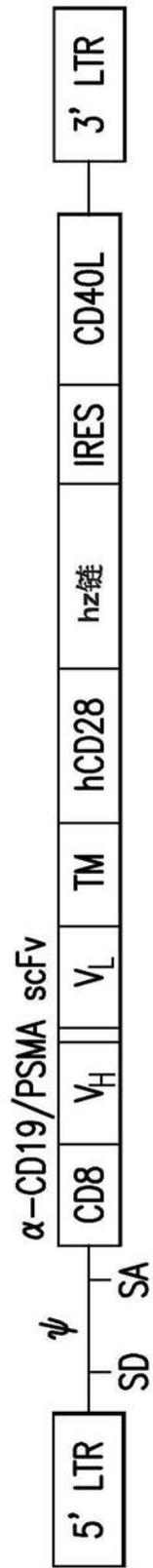


图26A

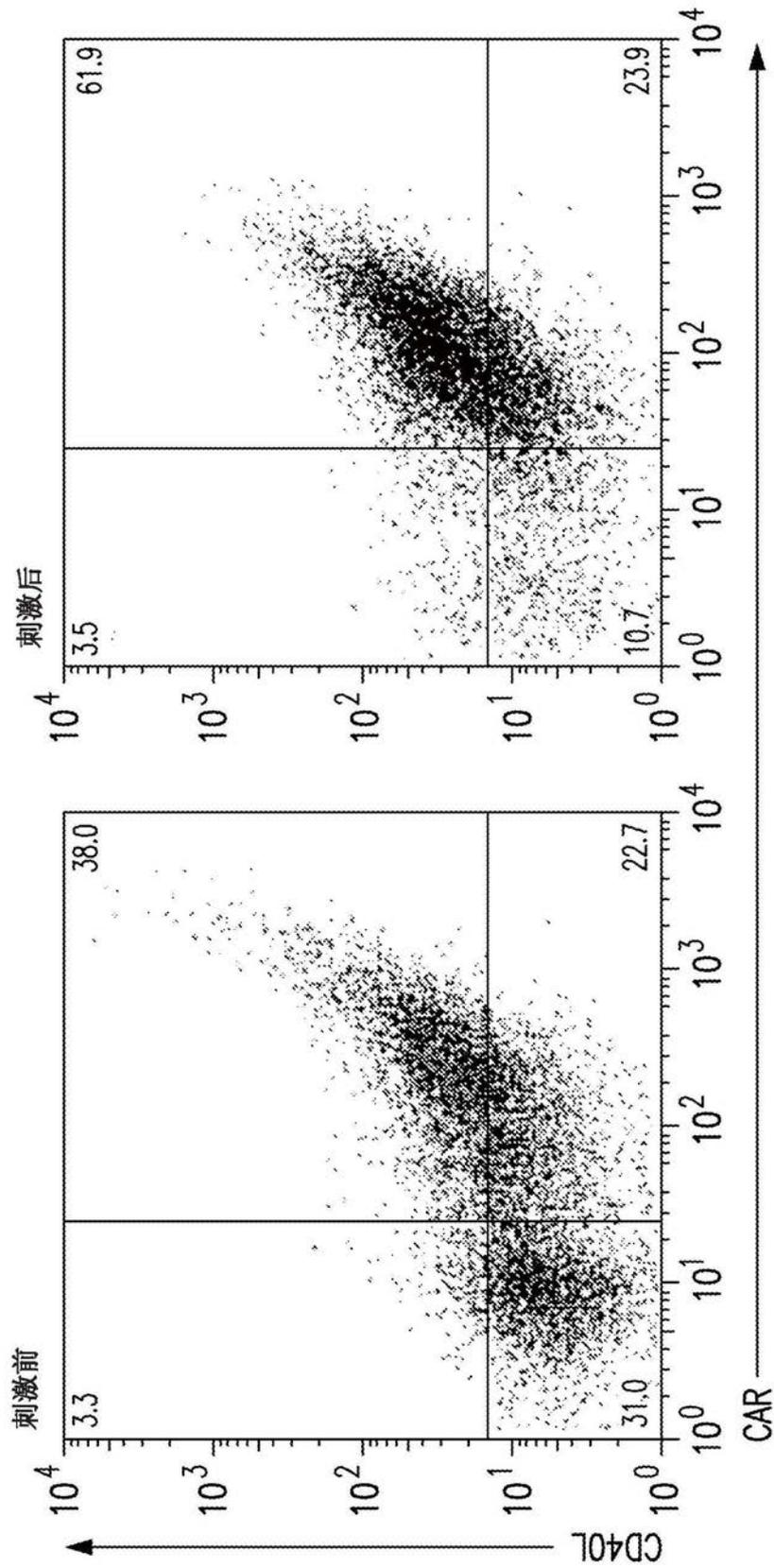


图26B

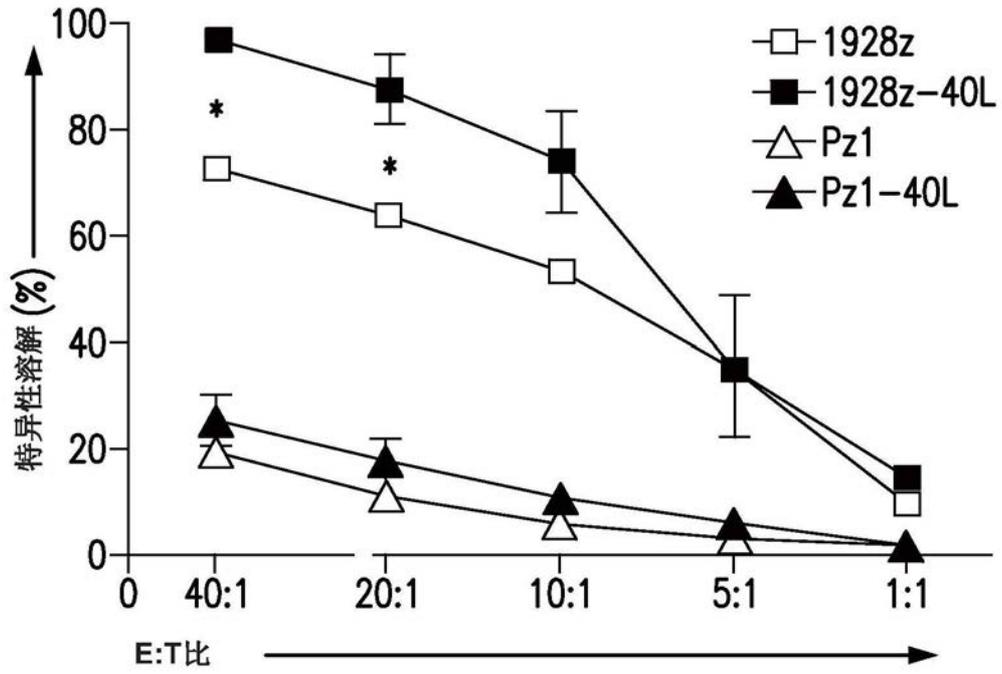


图26C

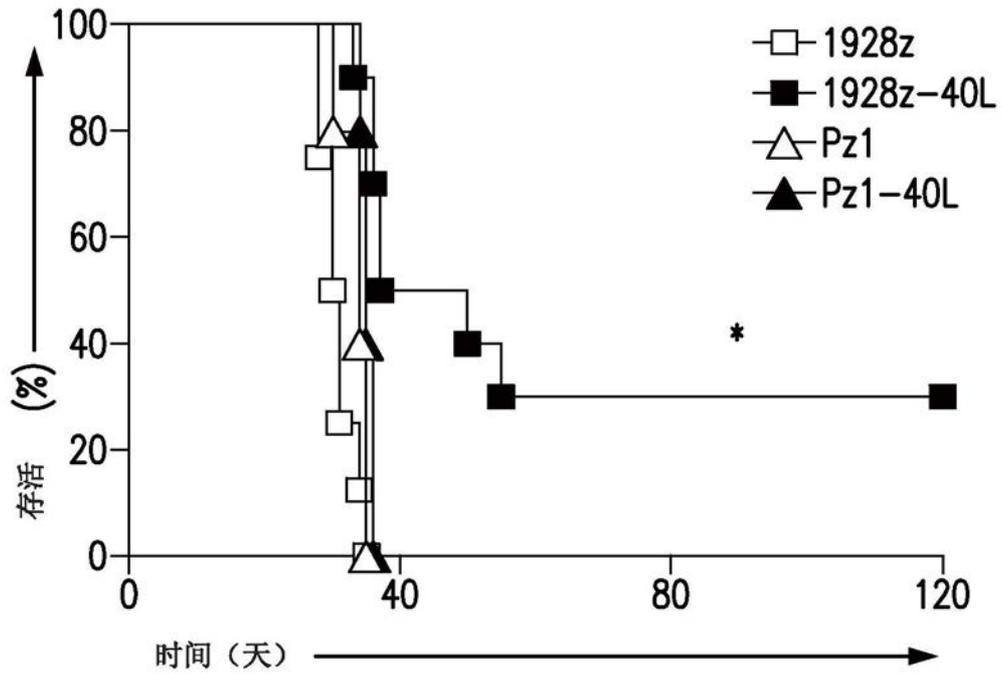
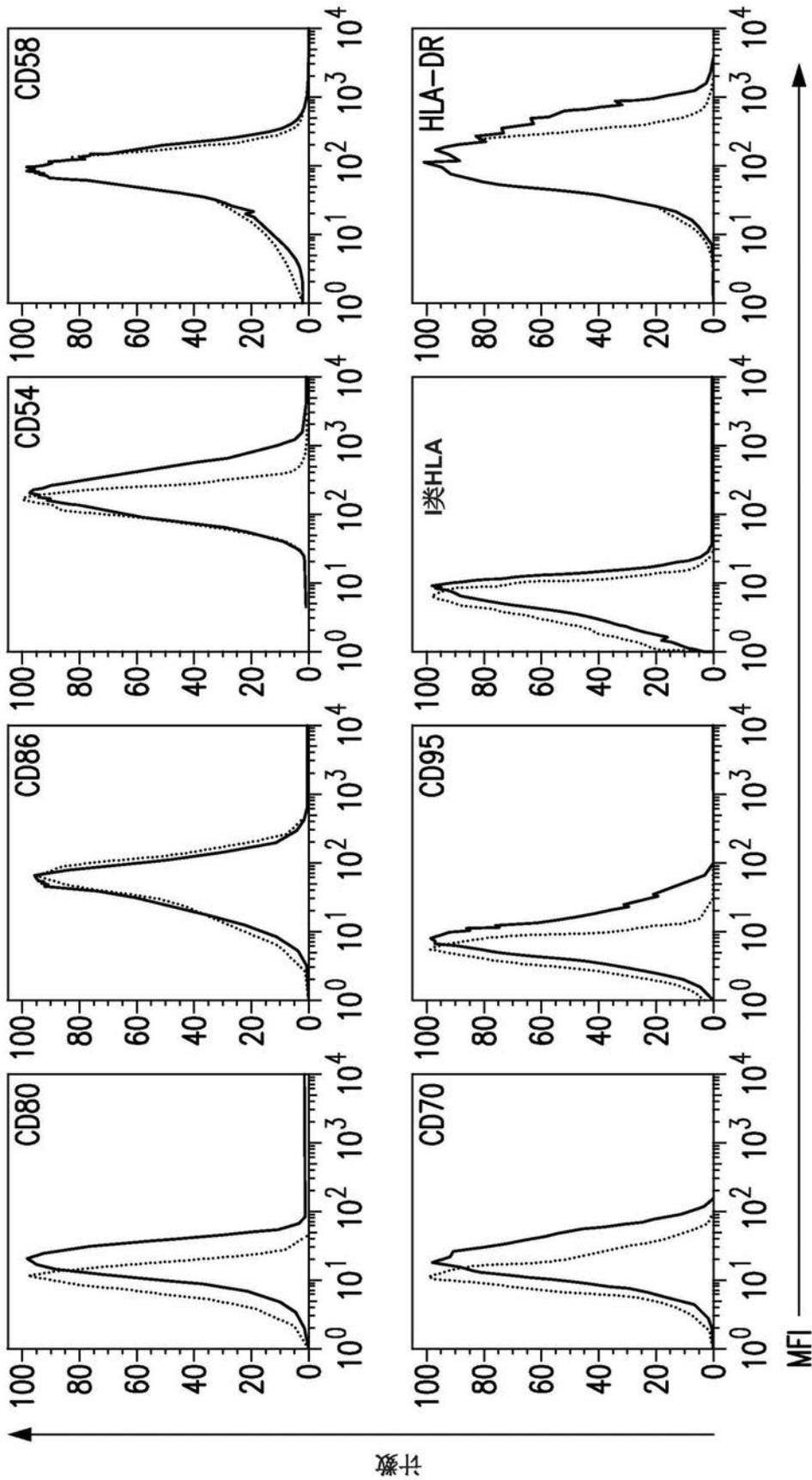


图27



计数

图28

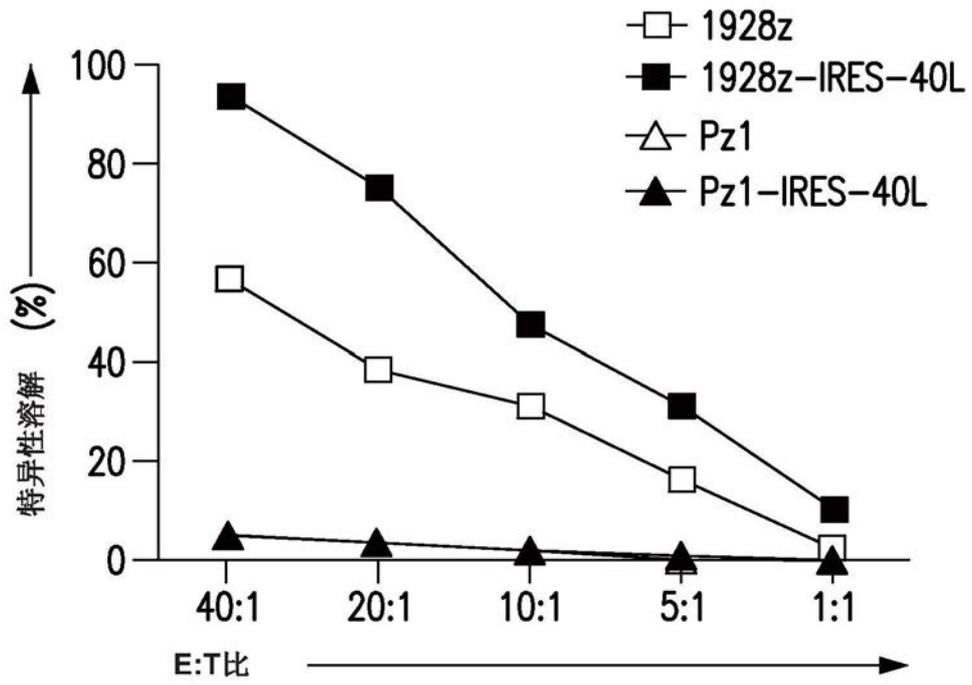


图29