



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116334143 A

(43) 申请公布日 2023.06.27

---

(21) 申请号 202210859203.0 *C07K 14/705* (2006.01)  
(22) 申请日 2016.11.23 *C07K 14/725* (2006.01)  
(30) 优先权数据 *C07K 16/28* (2006.01)  
62/258,798 2015.11.23 US  
(62) 分案原申请数据  
201680079587.7 2016.11.23  
(71) 申请人 诺华股份有限公司  
地址 瑞士巴塞尔  
申请人 宾夕法尼亚大学托管会  
(72) 发明人 V·斯列普什金 D·卢卡谢夫  
(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所  
11247  
专利代理师 黄革生 隋晓平  
(51) Int. Cl.  
*C12N 15/867* (2006.01) 权利要求书5页 说明书88页  
序列表(电子公布) 附图24页

---

(54) 发明名称

优化的慢病毒转移载体及其用途

(57) 摘要

本发明涉及包含待引入细胞的异源核酸的慢病毒转移载体。该慢病毒转移载体可以表征为以下特征：(a) 包含巨细胞病毒(CMV) 启动子；(b) 包含含有减少RNA核输出限制的突变INS1抑制序列的编码部分gag蛋白质的多核苷酸；(c) 不包含编码gag的INS2、INS3和INS4抑制序列的多核苷酸；(d) 不包含SV40复制起点和/或f1复制起点；(e) 包含含有剪接位点的cPPT序列；(f) 包含具有完整剪接供体和受体位点的EF1 $\alpha$  启动子；和(g) 包含在X蛋白质ORF的起始密码子中含有突变的乙型肝炎PRE。

1. 慢病毒转移载体,其包含异源核酸序列且表征为以下特征中的至少两个:
  - (a) 包含巨细胞病毒 (CMV) 启动子;
  - (b) 包含含有相对于野生型INS1减少RNA核输出限制的突变INS1抑制序列的编码至少部分gag蛋白质的多核苷酸;
  - (c) 不包含编码gag的INS2、INS3和INS4抑制序列的多核苷酸;和
  - (d) 不包含SV40复制起点和/或f1复制起点。
2. 权利要求1的慢病毒转移载体,其表征为特征(a) - (d)中的至少三个。
3. 权利要求1的慢病毒转移载体,其表征为特征(a) - (d)中的全部。
4. 权利要求1-3中任一项的慢病毒转移载体,其包含编码gag蛋白质的150-250(例如168)核苷酸部分的多核苷酸,其(i)包含相对于野生型INS1减少RNA核输出限制的突变INS1抑制序列,(ii)包含两个导致移码和提前终止的核苷酸插入,和/或(iii)不包含INS2、INS3和INS4抑制序列。
5. 权利要求1-4中任一项的慢病毒转移载体,其进一步包含选自以下的一个或多个元件:包装信号(psi)、与psi相邻或部分重叠的部分gag序列、rev反应元件、部分env序列和来自pol的cPPT序列(其序列可选地源自HIV-1分离株NL4-3或SF3)。
6. 权利要求5的慢病毒转移载体,其中cPPT序列包含约150-250(例如171-181)个核苷酸,且包含剪接受体SA1序列。
7. 权利要求1-6中任一项的慢病毒转移载体,其进一步包含一个或多个位于所述载体的元件之间的限制位点。
8. 权利要求1-7中任一项的慢病毒转移载体,其进一步包含转录后调节元件(PRE)。
9. 权利要求8的慢病毒转移载体,其中所述PRE是土拨鼠肝炎病毒PRE(WPRE)。
10. 权利要求9的慢病毒转移载体,其中所述WPRE包含与SEQ ID NO:78具有至少95%同一性的核酸序列。
11. 权利要求8的慢病毒转移载体,其中所述PRE是乙型肝炎病毒分离株bba6 PRE(HPRE)。
12. 权利要求11的慢病毒转移载体,其中所述HPRE包含与SEQ ID NO:79具有至少95%同一性的核酸序列,可选地,其中所述HPRE在X蛋白质编码序列中包含失活突变。
13. 权利要求1-12中任一项的慢病毒转移载体,其进一步包含EF1a启动子,可选地其中所述EF1a启动子包含与SEQ ID NO:71具有至少95%同一性的核酸序列,且可选地是全长且包含完整的剪接供体和剪接受体序列(分别为SEQ ID NO:72和73)(SEQ ID NO:95)。
14. 权利要求1-13中任一项的慢病毒转移载体,其中所述慢病毒转移载体的慢病毒成分源自HIV-1。
15. 权利要求1-14中任一项的慢病毒转移载体,其中所述异源核酸序列处于Kozak序列下游。
16. 权利要求1-15中任一项的慢病毒转移载体,其中编码所述至少部分所述gag蛋白质的序列与由pMDLgpRRE包装质粒编码的相应gag蛋白质区域具有不到90%序列同一性。
17. 权利要求1-16中任一项的慢病毒转移载体,其中所述慢病毒转移载体包含:
  - (i) 包含与SEQ ID NO:52具有至少95%同一性的核酸序列的CMV启动子;
  - (ii) 包含与SEQ ID NO:53具有至少95%同一性的核酸序列的LTR R区;

- (iii) 包含与SEQ ID NO:54具有至少95%同一性的核酸序列的LTR U5区;
  - (iv) 包含与SEQ ID NO:55具有至少95%同一性的核酸序列的引物结合位点;
  - (v) 包含与SEQ ID NO:56具有至少95%同一性的核酸序列的包装信号;
  - (vi) 处于所述包装信号内的包含与SEQ ID NO:57具有至少95%同一性的核酸序列的主要剪接供体位点;
  - (vii) 包含与SEQ ID NO:58具有至少95%同一性的核酸序列的部分gag序列;
  - (viii) 包含与SEQ ID NO:60具有至少95%同一性的核酸序列的部分env序列;
  - (ix) 包含与SEQ ID NO:62具有至少95%同一性的核酸序列的Rev反应元件;
  - (x) 包含与SEQ ID NO:64具有至少95%同一性的核酸序列的部分env序列;
  - (xi) 处于(x)部分的所述部分env序列内的包含与SEQ ID NO:65具有至少95%同一性的核酸序列的剪接受体位点;
  - (xii) 包含与SEQ ID NO:67、92或93具有至少95%同一性的核酸序列的中央多聚嘌呤带;
  - (xiii) 处于所述中央多聚嘌呤带内的包含与SEQ ID NO:68或94具有至少95%同一性的核酸序列的剪接受体位点;
  - (xiv) 与SEQ ID NO:71或95具有至少95%序列同一性的EF1 $\alpha$ 启动子;
  - (xv) 处于所述EF1 $\alpha$ 启动子内的包含与SEQ ID NO:72具有至少95%同一性的核酸序列的组成型剪接供体(CD)位点;
  - (xvi) 处于所述EF1 $\alpha$ 启动子内的包含与SEQ ID NO:73具有至少95%同一性的核酸序列的组成型剪接受体(CA)位点;
  - (xvii) 包含与SEQ ID NO:76具有至少95%同一性的核酸序列的编码EGFP的多核苷酸和/或转基因序列;
  - (xviii) 包含与SEQ ID NO:78或79具有至少95%序列同一性的核酸序列的PRE序列;
  - (xix) 包含与SEQ ID NO:83具有至少95%序列同一性的核酸序列的部分nef序列;
  - (xx) 包含与SEQ ID NO:84具有至少95%序列同一性的核酸序列的dU3序列;
  - (xxi) 包含与SEQ ID NO:85具有至少95%同一性的核酸序列的LTR R区;和
  - (xxii) 包含与SEQ ID NO:86具有至少95%同一性的核酸序列的LTR U5区。
18. 权利要求1-17中任一项的慢病毒转移载体,其中所述异源核酸序列编码蛋白质。
19. 权利要求18的慢病毒转移载体,其中蛋白质包含嵌合抗原受体(CAR)。
20. 权利要求19的慢病毒转移载体,其中所述CAR按N端至C端方向包含抗原结合结构域、跨膜结构域和一个或多个信号发放结构域。
21. 权利要求20的慢病毒转移载体,其中所述信号发放结构域包含一个或多个主信号发放结构域。
22. 权利要求20或21的慢病毒转移载体,其中所述信号发放结构域包含一个或多个共刺激信号发放结构域。
23. 权利要求21的慢病毒转移载体,其中所述一个或多个主信号发放结构域之一包含CD3 $\zeta$ 刺激结构域。
24. 权利要求22或23的慢病毒转移载体,其中一个或多个所述共刺激信号发放结构域包含选自如下的胞内结构域,所述胞内结构域选自CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、GITR、

CD30、CD40、ICOS、BAFFR、HVEM、ICAM-1、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CDS、CD7、CD287、LIGHT、NKG2C、NKG2D、SLAMF7、NKp80、NKp30、NKp44、NKp46、CD160、B7-H3和特异性结合CD83的配体的共刺激蛋白质。

25. 权利要求24的慢病毒转移载体,其中所述一个或多个所述共刺激信号发放结构域包含4-1BB(CD137)共刺激结构域。

26. 权利要求24或25的慢病毒转移载体,其中所述一个或多个所述共刺激结构域包含CD28共刺激结构域。

27. 权利要求20-26中任一项的慢病毒转移载体,其中所述抗原结合结构域是scFv。

28. 权利要求20-27中任一项的慢病毒转移载体,其中所述抗原结合结构域结合选自以下的抗原:CD19;CD123;CD22;CD30;CD171;CS-1;C型凝集素样分子-1,CD33;表皮生长因子受体变体III(EGFRvIII);神经节苷脂G2(GD2);神经节苷脂GD3;TNF受体家族成员B细胞成熟(BCMA);Tn抗原((Tn Ag)或(GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr));前列腺特异性膜抗原(PSMA);受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1);Fms样酪氨酸激酶3(FLT3);肿瘤相关糖蛋白72(TAG72);CD38;CD44v6;癌胚抗原(CEA);上皮细胞黏附分子(EPCAM);B7H3(CD276);KIT(CD117);白介素-13受体亚基 $\alpha$ -2;间皮素;白介素11受体 $\alpha$ (IL-11Ra);前列腺干细胞抗原(PSCA);蛋白酶丝氨酸21;血管内皮生长因子受体2(VEGFR2);Lewis(Y)抗原;CD24;血小板衍生生长因子受体 $\beta$ (PDGFR- $\beta$ );阶段特异性胚胎抗原-4(SSEA-4);CD20;叶酸受体 $\alpha$ ;受体酪氨酸蛋白激酶ERBB2(Her2/neu);黏蛋白1,细胞表面结合(MUC1);表皮生长因子受体(EGFR);神经细胞黏附分子(NCAM);Prostate;前列腺酸性磷酸酶(PAP);突变的延伸因子2(ELF2M);肝配蛋白B2;成纤维细胞激活蛋白 $\alpha$ (FAP);胰岛素样生长因子1受体(IGF-I受体),碳酸酐酶IX(CAIX);蛋白酶体(Prosome,Macropain)亚基, $\beta$ 型,9(LMP2);糖蛋白100(gp100);由断点簇区(BCR)和Abelson鼠白血病毒癌基因同源物1(Abl)组成的癌基因融合蛋白(bcr-abl);酪氨酸酶;肝配蛋白A型受体2(EphA2);岩藻糖基GM1;唾液酸Lewis黏附分子(sLe);神经节苷脂GM3;转谷氨酰胺酶5(TGS5);高分子量黑色素瘤相关抗原(HMWMAA);o-乙酰-GD2神经节苷脂(OAcGD2);叶酸受体 $\beta$ ;肿瘤内皮标志1(TEM1/CD248);肿瘤内皮标志7相关(TEM7R);密蛋白6(CLDN6);促甲状腺素受体(TSHR);G蛋白偶联受体C类5组成员D(GPRC5D);染色体X可读框61(CXORF61);CD97;CD179a;大细胞非霍奇金淋巴瘤激酶(ALK);多聚唾液酸;胎盘特异性1(PLAC1);globoH糖神经酰胺(GloboH)的己糖部分;乳腺分化抗原(NY-BR-1);尿路斑块蛋白2(UPK2);甲型肝炎病毒细胞受体1(HAVCR1);肾上腺素受体 $\beta$ 3(ADRB3);泛连接蛋白3(PANX3);G蛋白偶联受体20(GPR20);淋巴细胞抗原6复合物,基因座K 9(LY6K);嗅感受器51E2(OR51E2);TCR $\gamma$ 交替可读框蛋白质(TARP);Wilms肿瘤蛋白质(WT1);癌症/睾丸抗原1(NY-ESO-1);癌症/睾丸抗原2(LAGE-1a);黑色素瘤相关抗原1(MAGE-A1);ETS易位变体基因6,定位于染色体12p(ETV6-AML);精蛋白17(SPA17);X抗原家族成员1A(XAGE1);血管生成素结合细胞表面受体2(Tie 2);黑色素瘤癌症睾丸抗原-1(MAD-CT-1);黑色素瘤癌症睾丸抗原-2(MAD-CT-2);Fos相关抗原1;肿瘤蛋白p53(p53);p53突变体;prostain;存活蛋白;端粒末端转移酶;前列腺癌肿瘤抗原-1,T细胞识别的黑色素瘤抗原1;大鼠肉瘤(Ras)突变体;人端粒末端转移酶反转录酶(hTERT);肉瘤易位断点;黑色素瘤凋亡抑制物(ML-IAP);ERG(跨膜蛋白酶,丝氨酸2(TMPS2)ETS融合基因);N-乙酰葡萄糖胺转移酶V(NA17);配对盒蛋白Pax-3(PAX3);雄激素受体;细胞周期蛋白B1;v-myc禽骨髓细胞瘤病毒癌基因神经母细胞

瘤衍生同源物(MYCN);Ras同源物家族成员C(RhoC);酪氨酸酶相关蛋白2(TRP-2);细胞色素P450 1B1(CYP1B1);T细胞识别的CCCTC结合因子(锌指蛋白)样鳞状细胞癌抗原3(SART3);配对盒蛋白Pax-5(PAX5);前顶体蛋白结合蛋白sp32(OY-TE51);淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶(LCK);A激酶锚定蛋白4(AKAP-4);滑膜肉瘤,X断点2(SSX2);晚期糖化终产物受体(RAGE-1);肾遍在蛋白1(RU1);肾遍在蛋白2(RU2);legumain;人乳头瘤病毒E6(HPV E6);人乳头瘤病毒E7(HPV E7);肠羧基酯酶;突变的热休克蛋白70-2(mut hsp70-2);CD79a;CD79b;CD72;白细胞相关免疫球蛋白样受体1(LAIR1);IgA受体的Fc片段(FCAR或CD89);白细胞免疫球蛋白样受体亚家族A成员2(LILRA2);CD300分子样家族成员f(CD300LF);C型凝集素结构域家族12成员A(CLEC12A);骨髓基质细胞抗原2(BST2);含EGF样模块的黏蛋白样激素受体样2(EMR2);淋巴细胞抗原75(LY75);磷脂酰肌醇聚糖-3(GPC3);Fc受体样5(FCRL5);及免疫球蛋白λ样多肽1(IGLL1)。

29. 权利要求28的慢病毒转移载体,其中所述抗原结合结构域结合CD19、间皮素或CD123。

30. 权利要求19-29中任一项的慢病毒转移载体,其中所述CAR包含抗CD19抗体或其片段、4-1BB(CD137)跨膜结构域和CD3ζ信号发放结构域。

31. 慢病毒转移载体,其从5'至3'包含处于可操作结合的一个或多个以下元件:

启动子;

包含主要剪接供体位点(SD)的包装信号(ψ);

部分gag序列;

部分env序列;

Rev反应元件(RRE);

包含剪接受体位点(SA7)的部分env序列;

包含剪接受体位点(SA1)的中央多聚嘌呤带(cPPT);

包含组成型剪接供体位点(CD)和组成型剪接受体位点(CD)的EF1a启动子;

可选的编码EGFP的基因和/或异源核酸序列;和

转录后调节元件。

32. 权利要求31的慢病毒转移载体,其从5'至3'包含处于可操作结合的一个或多个以下元件:

CMV启动子;

LTR R区;

LTR U5区;

引物结合位点(PBS);

包含主要剪接供体位点(SD)的包装信号(ψ);

部分gag序列;

部分env序列;

Rev反应元件(RRE);

包含剪接受体位点(SA7)的部分env序列;

包含剪接受体位点(SA1)的中央多聚嘌呤带(cPPT);

EF1a启动子;

可选的编码EGFP的基因和/或异源核酸序列；  
转录后调节元件；  
LTR R区；  
LTR U5区；  
SV40 polyA尾；  
卡那霉素抗性基因(nptII)；和  
pUC复制起点。

33. 权利要求31或32的慢病毒转移载体，其中所述转录后调节元件包含土拨鼠肝炎病毒PRE (WPRE) 或乙型肝炎病毒分离株bba6 PRE (HPRE)。

34. 权利要求31至33中任一项的慢病毒转移载体，其中所述异源核酸序列编码嵌合抗原受体(CAR)。

35. 权利要求34的慢病毒转移载体，其中所述CAR包含抗CD19抗体或其片段、4-1BB (CD137)跨膜结构域和CD3 $\zeta$ 信号发放结构域。

36. 宿主细胞，其包含权利要求1-35中任一项的慢病毒转移载体。

37. 权利要求36的宿主细胞，其中所述宿主细胞是293T细胞、Jurkat T细胞或原代人T细胞。

38. 权利要求36或37的宿主细胞，其进一步包含一种或多种慢病毒包装载体。

39. 组合物，其包含权利要求1-35中任一项的慢病毒转移载体和一种或多种包装载体。

40. 产生能够表达异源核酸序列的慢病毒的方法，所述方法包括：

(a) 将以下引入细胞：

(i) 权利要求1-35中任一项的慢病毒转移载体，和

(ii) 一种或多种慢病毒包装载体；和

(b) 在所述细胞中表达由所述慢病毒转移载体和/或所述包装载体编码的病毒蛋白质，从而产生含有所述慢病毒转移载体的异源核酸序列的慢病毒。

41. 权利要求40的方法，其中所述细胞是293T细胞、Jurkat T细胞或原代人T细胞。

## 优化的慢病毒转移载体及其用途

[0001] 本申请是申请日为2016年11月23日、发明名称为“优化的慢病毒转移载体及其用途”的中国专利申请201680079587.7 (国际申请号PCT/US2016/063700)的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及慢病毒转移载体及使用这类载体的方法。

### 背景技术

[0003] 对许多治疗相关应用而言,异源基因在细胞中的表达是希望的。将异源基因引入细胞的一种方法涉及使用在引入宿主细胞时诱导宿主细胞产生包含异源基因的病毒颗粒的转移载体。然后可以用病毒颗粒感染靶细胞,从而诱导靶细胞表达异源基因。用于这类方法的病毒包括慢病毒、腺病毒和腺相关病毒。一些现有的慢病毒载体显示低基因表达水平且可以非常大。此外,就这类载体而言可存在生物安全和毒性考虑。因此,使用这类载体的转染和病毒产生可能是慢的、效率低的、费力的和昂贵的。因此,存在对适合用于快速和有效地产生用于在靶细胞中诱导异源基因表达的病毒的改善的慢病毒载体的需要。

### [0004] 发明概述

[0005] 在第一方面,本发明提供慢病毒转移载体,其可选地包含一个或多个异源核酸序列(其可选地处于Kozak序列下游),其表征为以下特征中的至少两个:(a)包含巨细胞病毒(CMV)启动子,(b)包含含有相对于野生型INS1减少RNA核输出限制的突变INS1抑制序列的编码至少部分gag蛋白质的多核苷酸,(c)不包含编码gag的INS2、INS3和INS4抑制序列的多核苷酸,和(d)不包含SV40复制起点和/或f1复制起点。在多种实施方案中,慢病毒转移载体表征为特征(a)-(d)中的至少三个或全部四个。

[0006] 在多种实例中,该慢病毒载体包含编码gag蛋白质的150-250(例如168)核苷酸部分的多核苷酸,其(i)包含相对于野生型INS1减少RNA核输出限制的突变INS1抑制序列,(ii)包含两个导致移码和提前终止的核苷酸插入,和/或(iii)不包含gag的INS2、INS3和INS4抑制序列。

[0007] 在其他实例中,该慢病毒转移载体进一步包含选自以下的一个或多个元件:包装信号(psi)、与psi相邻或部分重叠的部分gag序列、rev反应元件、部分env序列和来自pol1的cPPT序列(其序列可选地源自HIV-1分离株NL4-3或SF3)。在多种实例中,该cPPT序列包含约150-250(例如171-181)个核苷酸,且包含剪接受体SA1序列。

[0008] 该慢病毒转移载体可以可选地包含一个或多个位于载体元件之间(示例性位置参见例如下文表3-5)的限制位点。

[0009] 此外,该慢病毒转移载体可以可选地包含转录后调节元件(PRE)。例如,土拨鼠肝炎病毒PRE(WPRE;与SEQ ID NO:78具有例如至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性)或乙型肝炎病毒分离株bba6PRE(HPRE;与SEQ ID NO:79具有例如至少95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性),可选地,其中HPRE在X蛋白编码序列中包含失活突变。

[0010] 该慢病毒转移载体可进一步包含可用于驱动转基因表达的亚基因组启动子。在一个实例中,该启动子是EF1a启动子(例如具有与SEQ ID NO:71具有至少95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的核酸序列的EF1a启动子)。该EF1a启动子可选地是全长,且包含完整的剪接供体和剪接受体序列(分别为SEQ ID NOs:72和73)(参见例如SEQ ID NO:95)。

[0011] 该慢病毒转移载体的慢病毒成分可以可选地源自HIV-1(例如HIV-1毒株NL4-3或SF3)。在多种实施方案中,在该慢病毒转移载体中,编码该部分gag蛋白质的序列与由与该慢病毒转移载体一起使用的包装质粒(例如pMDLgpRRE包装质粒)编码的相应gag蛋白质区域具有不到90%序列同一性。

[0012] 在另一方面,本发明包含包括以下特征中的一个或多个(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或22个)的慢病毒转移载体:(i)包含与SEQ ID NO:52具有至少95%同一性的核酸序列的CMV启动子,(ii)包含与SEQ ID NO:53具有至少95%同一性的核酸序列的LTR R区,(iii)包含与SEQ ID NO:54具有至少95%同一性的核酸序列的LTR U5区,(iv)包含与SEQ ID NO:55具有至少95%同一性的核酸序列的引物结合位点,(v)包含与SEQ ID NO:56具有至少95%同一性的核酸序列的包装信号,(vi)处于包装信号内的包含与SEQ ID NO:57具有至少95%同一性的核酸序列的主要剪接供体位点,(vii)包含与SEQ ID NO:58具有至少95%同一性的核酸序列的部分gag序列,(viii)包含与SEQ ID NO:60具有至少95%同一性的核酸序列的部分env序列,(ix)包含与SEQ ID NO:62具有至少95%同一性的核酸序列的rev反应元件,(x)包含与SEQ ID NO:64具有至少95%同一性的核酸序列的部分env序列,(xi)处于(x)部分的部分env序列内的包含与SEQ ID NO:65具有至少95%同一性的核酸序列的剪接受体位点,(xii)包含与SEQ ID NO:67、92或93具有至少95%同一性的核酸序列的中央多聚嘌呤带(tract),(xiii)处于中央多聚嘌呤带内的包含与SEQ ID NO:68或94具有至少95%同一性的核酸序列的剪接受体位点,(xiv)与SEQ ID NO:71或95具有至少95%序列同一性的EF1 $\alpha$ 启动子,(xv)处于EF1 $\alpha$ 启动子内的包含与SEQ ID NO:72具有至少95%同一性的核酸序列的组成型剪接供体(CD)位点,(xvi)处于EF1 $\alpha$ 启动子内的包含与SEQ ID NO:73具有至少95%同一性的核酸序列的组成型剪接受体(CA)位点,(xvii)包含与SEQ ID NO:76具有至少95%同一性的核酸序列的编码EGFP的多核苷酸和/或转基因序列,(xviii)包含与SEQ ID NO:78或79具有至少95%序列同一性的核酸序列的PRE序列,(xix)包含与SEQ ID NO:83具有至少95%序列同一性的核酸序列的部分nef序列,(xx)包含与SEQ ID NO:84具有至少95%序列同一性的核酸序列的dU3序列,(xxi)包含与SEQ ID NO:85具有至少95%同一性的核酸序列的LTR R区,和(xxii)包含与SEQ ID NO:86具有至少95%同一性的核酸序列的LTR U5区。这些成分的序列同一性可以可选地是96%、97%、98%、99%或100%。组合的实例包括含有以下的那些:i、vii、viii、ix、x、xii、xiv和xviii;其中x可选地包含xi,xii可选地包含xiii,xiv可选地包含xv和xvi。此外,该组合还可以包括ii、iii、iv、v、xix、xx、xxi和/或xxv,可选地,其中v包含vi。此外,任意这些组合还可以包括xvii。

[0013] 本发明的慢病毒转移载体可以可选地包含编码蛋白质(例如EGFP和/或嵌合抗原受体(CAR))的异源核酸序列。在CAR的情况下,该CAR可以可选地按N端至C端方向包含抗原结合结构域(例如scFv)、跨膜结构域和一个或多个信号发放结构域(例如一个或多个主信号发放结构域(例如CD3- $\zeta$ 刺激结构域))和/或一个或多个共刺激信号发放结构域(例如选

自选自CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、GITR、CD30、CD40、ICOS、BAFFR、HVEM、ICAM-1、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CDS、CD7、CD287、LIGHT、NKG2C、NKG2D、SLAMF7、NKp80、NKp30、NKp44、NKp46、CD160、B7-H3和特异性结合CD83的配体的共刺激蛋白质的胞内结构域)。

[0014] 在多种实例中,该抗原结合结构域结合选自以下的抗原:CD19;CD123;CD22;CD30;CD171;CS-1;C型凝集素样分子-1,CD33;表皮生长因子受体变体III(EGFRvIII);神经节苷脂G2(GD2);神经节苷脂GD3;TNF受体家族成员B细胞成熟(BCMA);Tn抗原((Tn Ag)或(GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr));前列腺特异性膜抗原(PSMA);受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1);Fms样酪氨酸激酶3(FLT3);肿瘤相关糖蛋白72(TAG72);CD38;CD44v6;癌胚抗原(CEA);上皮细胞黏附分子(EPCAM);B7H3(CD276);KIT(CD117);白介素-13受体亚基 $\alpha$ -2;间皮素(mesothelin);白介素11受体 $\alpha$ (IL-11Ra);前列腺干细胞抗原(PSCA);蛋白酶丝氨酸21;血管内皮生长因子受体2(VEGFR2);Lewis(Y)抗原;CD24;血小板衍生生长因子受体 $\beta$ (PDGFR $\beta$ );阶段特异性胚胎抗原-4(SSEA-4);CD20;叶酸受体 $\alpha$ ;受体酪氨酸蛋白激酶ERBB2(Her2/neu);黏蛋白1,细胞表面结合(MUC1);表皮生长因子受体(EGFR);神经细胞黏附分子(NCAM);Prostate;前列腺酸性磷酸酶(PAP);突变的延伸因子2(ELF2M);肝配蛋白B2;成纤维细胞激活蛋白 $\alpha$ (FAP);胰岛素样生长因子1受体(IGF-I受体),碳酸酐酶IX(CAIX);蛋白酶体(Prosome,Macropain)亚基, $\beta$ 型,9(LMP2);糖蛋白100(gp100);由断点簇区(BCR)和Abelson鼠白血病病毒癌基因同源物1(Abl)组成的癌基因融合蛋白(bcr-abl);酪氨酸酶;肝配蛋白A型受体2(EphA2);岩藻糖基GM1;唾液酸Lewis黏附分子(sLe);神经节苷脂GM3;转谷氨酰胺酶5(TGS5);高分子量黑色素瘤相关抗原(HMWMAA);o-乙酰-GD2神经节苷脂(OAcGD2);叶酸受体 $\beta$ ;肿瘤内皮标志1(TEM1/CD248);肿瘤内皮标志7相关(TEM7R);密蛋白6(CLDN6);促甲状腺素受体(TSHR);G蛋白偶联受体C类5组成员D(GPRC5D);染色体X可读框61(CXORF61);CD97;CD179a;大细胞非霍奇金淋巴瘤激酶(ALK);多聚唾液酸;胎盘特异性1(PLAC1);globoH糖神经酰胺(glycoceramide)(GloboH)的己糖部分;乳腺分化抗原(NY-BR-1);尿路斑块蛋白(uroplakin)2(UPK2);甲型肝炎病毒细胞受体1(HAVCR1);肾上腺素受体 $\beta$ 3(ADRB3);泛连接蛋白(pannexin)3(PANX3);G蛋白偶联受体20(GPR20);淋巴细胞抗原6复合物,基因座K 9(LY6K);嗅感受器51E2(OR51E2);TCR $\gamma$ 交替可读框蛋白质(TARP);Wilms肿瘤蛋白质(WT1);癌症/睾丸抗原1(NY-ESO-1);癌症/睾丸抗原2(LAGE-1a);黑色素瘤相关抗原1(MAGE-A1);ETS易位变体基因6,定位于染色体12p(ETV6-AML);精蛋白17(SPA17);X抗原家族成员1A(XAGE1);血管生成素结合细胞表面受体2(Tie 2);黑色素瘤癌症睾丸抗原-1(MAD-CT-1);黑色素瘤癌症睾丸抗原-2(MAD-CT-2);Fos相关抗原1;肿瘤蛋白p53(p53);p53突变体;prostain;存活蛋白(surviving);端粒末端转移酶;前列腺癌肿瘤抗原-1,T细胞识别的黑色素瘤抗原1;大鼠肉瘤(Ras)突变体;人端粒末端转移酶反转录酶(hTERT);肉瘤易位断点;黑色素瘤凋亡抑制物(ML-IAP);ERG(跨膜蛋白酶,丝氨酸2(TMPPSS2)ETS融合基因);N-乙酰葡萄糖胺转移酶V(NA17);配对盒蛋白Pax-3(PAX3);雄激素受体;细胞周期蛋白B1;v-myc禽骨髓细胞瘤病毒癌基因神经母细胞瘤衍生同源物(MYCN);Ras同源物家族成员C(RhoC);酪氨酸酶相关蛋白2(TRP-2);细胞色素P450 1B1(CYP1B1);T细胞识别的CCCTC结合因子(锌指蛋白)样鳞状细胞癌抗原3(SART3);配对盒蛋白Pax-5(PAX5);前顶体蛋白(proacrosin)结合蛋白sp32(OY-TE51);淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶(LCK);A激酶锚定

蛋白4 (AKAP-4);滑膜肉瘤,X断点2 (SSX2);晚期糖化终产物受体 (RAGE-1);肾遍在蛋白 (renal ubiquitous)1 (RU1);肾遍在蛋白2 (RU2);legumain;人乳头瘤病毒E6 (HPV E6);人乳头瘤病毒E7 (HPV E7);肠羧基酯酶;突变的热休克蛋白70-2 (mut hsp70-2);CD79a;CD79b;CD72;白细胞相关免疫球蛋白样受体1 (LAIR1);IgA受体的Fc片段 (FCAR或CD89);白细胞免疫球蛋白样受体亚家族A成员2 (LILRA2);CD300分子样家族成员f (CD300LF);C型凝集素结构域家族12成员A (CLEC12A);骨髓基质细胞抗原2 (BST2);含EGF样模块的黏蛋白样激素受体样2 (EMR2);淋巴细胞抗原75 (LY75);磷脂酰肌醇聚糖-3 (GPC3);Fc受体样5 (FCRL5);及免疫球蛋白λ样多肽1 (IGLL1)。

[0015] 在具体实例中,该CAR包含抗CD19抗体或其片段、4-1BB (CD137)跨膜结构域和CD3ζ信号发放结构域。

[0016] 在另一方面,本发明包括慢病毒转移载体,其从5'至3'包含处于可操作结合的一个或多个(例如全部)以下元件:启动子、包含主要剪接供体位点 (SD)的包装信号 (psi)、部分gag序列、部分env序列、Rev反应元件 (RRE)、包含剪接受体位点 (SA7)的部分env序列、包含剪接受体位点 (SA1)的中央多聚嘌呤带 (cPPT)、包含组成型剪接供体位点 (CD)和组成型剪接受体位点 (CD)的EF1a启动子、可选的编码EGFP的基因和/或异源核酸序列、及转录后调节元件。

[0017] 在一个实例中,本发明包括慢病毒转移载体,其从5'至3'包含处于可操作结合的一个或多个以下元件:CMV启动子、LTR R区、LTR U5区、引物结合位点 (PBS)、包含主要剪接供体位点 (SD)的包装信号 (psi)、部分gag序列、部分env序列、Rev反应元件 (RRE)、包含剪接受体位点 (SA7)的部分env序列、包含剪接受体位点 (SA1)的中央多聚嘌呤带 (cPPT)、EF1a启动子、可选的编码EGFP的基因和/或异源核酸序列、转录后调节元件、LTR R区、LTR U5区、SV40 polyA尾、卡那霉素抗性基因 (nptII)和pUC复制起点。

[0018] 在多种实例中,该转录后调节元件是本文所述土拨鼠肝炎病毒PRE (WPRE)或乙型肝炎病毒分离株bba6 PRE (HPRE)。

[0019] 在其他实例中,该异源核酸序列编码本文所述嵌合抗原受体 (CAR)。在一个实例中,该CAR可包含抗CD19抗体或其片段、4-1BB (CD137)跨膜结构域和CD3ζ信号发放结构域。

[0020] 在另一方面,本发明包括含有本文所述慢病毒转移载体的宿主细胞(例如293T细胞、Jurkat T细胞或原代人T细胞)。可选地,该宿主细胞可进一步包含一种或多种慢病毒包装载体。

[0021] 在另一方面,本发明包括含有本文所述慢病毒转移载体和一种或多种包装载体的组合物。

[0022] 在另一方面,本发明包括产生能够表达异源核酸序列的慢病毒的方法。这些方法可以可选地包括:(a)将(i)本文所述慢病毒转移载体和(ii)一种或多种慢病毒包装载体引入细胞(例如293T细胞、Jurkat T细胞或原代人T细胞);和(b)在细胞中表达由慢病毒转移载体和/或包装载体编码的病毒蛋白质,从而产生含有慢病毒转移载体的异源核酸序列的慢病毒。

[0023] 定义

[0024] 术语“嵌合抗原受体”或备选地“CAR”指一组多肽,在最简单的实施方案中通常为两条多肽,在处于免疫效应细胞中时,其为该细胞提供对靶细胞(通常为癌细胞)的特异性

和胞内信号产生。在一些实施方案中, CAR至少包含胞外抗原结合结构域、跨膜结构域及含有源自下文定义的刺激分子和/或共刺激分子的功能性信号发放结构域的胞质信号发放结构域(本文中也称为“胞内信号发放结构域”)。在一些方面, 该组多肽相互连接。在一些实施方案中, 该组多肽包含二聚化开关, 在存在二聚化分子时, 该二聚化开关可以使多肽相互偶联, 例如可以使抗原结合结构域与胞内信号发放结构域偶联。在一方面, 该刺激分子是与T细胞受体复合物结合的 $\zeta$ 链。在一方面, 该胞质信号发放结构域进一步包含源自下文定义的至少一个共刺激分子的一个或多个功能性信号发放结构域。在一方面, 该共刺激分子选自本文所述的共刺激分子, 例如4-1BB(即CD137)、CD27和/或CD28。在一方面, 该CAR包含嵌合融合蛋白质, 该嵌合融合蛋白质包含胞外抗原结合结构域、跨膜结构域及含有源自刺激分子的功能性信号发放结构域的胞内信号发放结构域。在一方面, 该CAR包含嵌合融合蛋白质, 该嵌合融合蛋白质包含胞外抗原结合结构域、跨膜结构域及含有源自共刺激分子的功能性信号发放结构域和源自刺激分子的功能性信号发放结构域的胞内信号发放结构域。在一方面, 该CAR包含嵌合融合蛋白质, 该嵌合融合蛋白质包含胞外抗原结合结构域、跨膜结构域及含有源自一个或多个共刺激分子的两个功能性信号发放结构域和源自刺激分子的功能性信号发放结构域的胞内信号发放结构域。在一方面, 该CAR包含嵌合融合蛋白质, 该嵌合融合蛋白质包含胞外抗原结合结构域、跨膜结构域及含有源自一个或多个共刺激分子的至少两个功能性信号发放结构域和源自刺激分子的功能性信号发放结构域的胞内信号发放结构域。在一方面, 该CAR在CAR融合蛋白质氨基端(N端)包含可选的前导序列。在一方面, 该CAR进一步在胞外抗原结合结构域N端包含前导序列, 其中该前导序列在细胞加工和CAR定位至细胞膜期间可选地从抗原结合结构域(例如scFv)切割。

[0025] 包含靶向特异性肿瘤标志X(如本文所述的那些)的抗原结合结构域(例如scFv或TCR)的CAR也称为XCAR。例如, 包含靶向CD19的抗原结合结构域的CAR称为CD19CAR。

[0026] 术语“信号发放结构域”指蛋白质的功能性部分, 其通过在细胞内传递信息发挥作用, 以通过产生第二信使或通过响应这类信使作为效应物发挥作用来经确定的信号传导途径调节细胞活动。

[0027] 本文所用的术语“抗体”指源自特异性结合抗原的免疫球蛋白分子的蛋白质或多肽序列。抗体可以是多克隆或单克隆、多链或单链、或完整免疫球蛋白, 且可以源自天然来源或源自重组来源。抗体可以是免疫球蛋白分子的四聚体。

[0028] 术语“抗体片段”指抗体的至少一个部分, 其保留与抗原表位特异性相互作用(例如通过结合、空间位阻、稳定化/去稳定化、空间分布)的能力。抗体片段的实例包括但不限于Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv片段, scFv抗体片段, 二硫键连接的Fv(sdFv), 由VH和CH1结构域组成的Fd片段, 线性抗体, 单结构域抗体如sdAb(VL或VH), 骆驼VHH结构域, 形成自抗体片段的多特异性抗体如包含在铰链区通过二硫键连接的两个Fab片段的二价片段, 及分离的CDR或抗体的其他表位结合片段。抗原结合片段也可掺入到单结构域抗体、巨型抗体(maxibody)、微型抗体(minibody)、纳米抗体(nanobody)、胞内抗体、双抗体、三抗体、四抗体、v-NAR和bis-scFv中(参见例如Hollinger和Hudson, Nature Biotechnology 23:1126-1136, 2005)。还可将抗原结合片段移植入基于诸如III型纤连蛋白(Fn3)的多肽的支架(参见美国专利号6,703,199, 其描述纤连蛋白多肽微型抗体)。

[0029] 术语“scFv”指包含至少一个含有轻链可变区的抗体片段和至少一个含有重链可

变区的抗体片段的融合蛋白质,其中轻链和重链可变区例如通过合成接头(例如短的柔性多肽接头)连续连接,且能够表达为单链多肽,其中scFv保留它所衍生自的完整抗体的特异性。除非另有说明,本文所用的scFv可以具有任一顺序的VL和VH可变区,例如就多肽的N端和C端而言,scFv可包含VL-接头-VH或可包含VH-接头-VL。

[0030] 本发明的CAR的包含抗体或其抗体片段的部分可以以多种形式存在,其中抗原结合结构域表达为连续多肽链的部分,该连续多肽链包含例如单结构域抗体片段(sdAb)、单链抗体(scFv)、人源化抗体或双特异性抗体(Harlow等,1999,In:Using Antibodies:ALaboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,NY;Harlow等,1989,In:Antibodies:ALaboratory Manual,Cold Spring Harbor,New York;Houston等,1988,Proc.Natl.Acad.Sci.USA85:5879-5883;Bird等,1988,Science 242:423-426)。在一方面,本发明的CAR组合物的抗原结合结构域包含抗体片段。在另一方面,该CAR包含含有scFv的抗体片段。可以用许多众所周知的方案(包括Kabat等(1991),“Sequences of Proteins of Immunological Interest,”第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(“Kabat”编号方案);Al-Lazikani等,(1997)JMB 273,927-948(“Chothia”编号方案)中所述的那些)中的任一种或其组合来确定给定CDR的确切氨基酸序列边界。

[0031] 本文所用的术语“结合结构域”或“抗体分子”指包含至少一个免疫球蛋白可变结构域序列的蛋白质,例如免疫球蛋白链或其片段。术语“结合结构域”或“抗体分子”涵盖抗体和抗体片段。在一个实施方案中,抗体分子是多特异性抗体分子,例如它包含多个免疫球蛋白可变结构域序列,其中该多个免疫球蛋白可变结构域序列中的第一免疫球蛋白可变结构域序列对第一表位具有结合特异性,该多个免疫球蛋白可变结构域序列中的第二免疫球蛋白可变结构域序列对第二表位具有结合特异性。在一个实施方案中,多特异性抗体分子是双特异性抗体分子。双特异性抗体对不超过两种抗原具有特异性。双特异性抗体分子的特征在于对第一表位具有结合特异性的第一免疫球蛋白可变结构域序列和对第二表位具有结合特异性的第二免疫球蛋白可变结构域序列。

[0032] 本发明的CAR的包含抗体或其抗体片段的部分可以以多种形式存在,其中抗原结合结构域表达为连续多肽链的部分,该连续多肽链包含例如单结构域抗体片段(sdAb)、单链抗体(scFv)、人源化抗体或双特异性抗体(Harlow等,1999,In:Using Antibodies:ALaboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,NY;Harlow等,1989,In:Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor,New York;Houston等,1988,Proc.Natl.Acad.Sci.USA85:5879-5883;Bird等,1988,Science 242:423-426)。在一方面,本发明的CAR组合物的抗原结合结构域包含抗体片段。在另一方面,该CAR包含含有scFv的抗体片段。

[0033] 术语“抗体重链”指以其天然存在的构象存在于抗体分子中的两类多肽链中的较大者,其通常决定该抗体所属种类。

[0034] 术语“抗体轻链”指以其天然存在的构象存在于抗体分子中的两类多肽链中的较小者。 $\kappa$ 和 $\lambda$ 轻链指两种主要的抗体轻链同种型。

[0035] 术语“重组抗体”指用重组DNA技术产生的抗体,例如通过噬菌体或酵母表达系统表达的抗体。该术语还应解释为指通过合成编码抗体的DNA分子产生的抗体,该DNA分子表

达抗体蛋白质或指定该抗体的氨基酸序列,其中用本领域可用和公知的重组DNA或氨基酸序列技术获得该DNA或氨基酸序列。

[0036] 术语“抗原”或“Ag”指引起免疫反应的分子。此免疫反应可以涉及抗体产生,或特异性免疫活性细胞活化,或二者。技术人员将理解,任何大分子(包括几乎所有蛋白质或肽)都可作为抗原。此外,抗原可以源自重组DNA或基因组DNA。技术人员将理解,本文中使用的包含编码引出免疫反应的蛋白质从而编码如该术语的“抗原”的核苷酸序列或部分核苷酸序列的任意DNA。此外,本领域技术人员将理解,抗原无需仅由基因的全长核苷酸序列编码。显而易见的是,本发明包括但不限于使用一个以上基因的部分核苷酸序列,这些核苷酸序列以多种组合排列以编码引出所希望的免疫反应的多肽。此外,技术人员将理解,抗原无需完全由“基因”编码。显而易见的是,抗原可以合成产生或可以源自生物样品,或可以是除多肽外的大分子。这种生物样品可以包括但不限于组织样品、肿瘤样品、细胞或具有其他生物成分的流体。

[0037] 术语“自体的”指源自与随后将它重新引入的个体相同的个体(例如细胞或生物体)的任何材料。术语“异源的”可以指源自与引入该材料的个体不同的个体(例如细胞或生物体)的任何材料。在一些情况下,术语“异源的”可以指源自与引入该材料的个体不同物种的个体(例如细胞或生物体)的任何材料。

[0038] 本文所用的术语“胞内信号发放结构域”指分子的胞内部分。胞内信号发放结构域产生促进包含CAR的细胞(例如CART细胞)的免疫效应子功能的信号。例如CART细胞中的免疫效应子功能的实例包括溶细胞活性和辅助活性,包括细胞因子分泌。

[0039] 在一个实施方案中,该胞内信号发放结构域可以包含主胞内信号发放结构域。示例性主胞内信号发放结构域包括源自负责主要刺激或抗原依赖性刺激的分子的那些。在一个实施方案中,该胞内信号发放结构域可以包含共刺激胞内结构域。示例性共刺激胞内信号发放结构域包括源自负责共刺激信号或不依赖抗原的刺激的分子的那些。例如,在CART的情况下,主胞内信号发放结构域可以包含T细胞受体的胞质序列,共刺激胞内信号发放结构域可以包含来自辅助受体或共刺激分子的胞质序列。

[0040] 主胞内信号发放结构域可以包含称为基于免疫受体酪氨酸的活化基序或ITAM的信号发放基序。包含ITAM的胞质信号发放序列的实例包括但不限于源自CD3 $\zeta$ 、常见FcR $\gamma$ (FCER1G)、Fc $\gamma$ RIIa、Fc $\beta$ (Fc $\epsilon$ R1b)、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD79a、CD79b、DAP10和DAP12的那些。

[0041] 术语“ $\zeta$ ”或备选地“ $\zeta$ 链”、“CD3 $\zeta$ ”或“TCR $\zeta$ ”定义为GenBan检索号BAG36664.1所提供的蛋白质,或来自非人物种例如小鼠、啮齿动物、猴、猿等的等同残基,术语“ $\zeta$ 刺激结构域”或备选地“CD3 $\zeta$ 刺激结构域”或“TCR $\zeta$ 刺激结构域”定义为来自 $\zeta$ 链胞质结构域的氨基酸残基或其功能性衍生物,其足以在功能上传递T细胞活化所必需的起始信号。在一方面, $\zeta$ 的胞质结构域包含GenBank检索号BAG36664.1的残基52至164或来自非人物种例如小鼠、啮齿动物、猴、猿等的等同残基,该等同残基是其功能直向同源物。

[0042] 术语“共刺激分子”指T细胞上的关联合配偶体,其与共刺激配体特异性结合,从而通过T细胞介导共刺激反应,如但不限于增殖。共刺激分子是除促成有效免疫反应的抗原受体或其配体外的细胞表面分子。共刺激分子包括但不限于MHC I类分子,BTLA和To11配体受体,以及OX40、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、ICOS(CD278)和4-1BB

(CD137)。这类共刺激分子的其他实例包括CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM (LIGHTR)、SLAMF7、NKp80 (KLRP1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD160、CD19、CD4、CD8 $\alpha$ 、CD8 $\beta$ 、IL2R $\beta$ 、IL2R $\gamma$ 、IL7R $\alpha$ 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a和与CD83特异性结合的配体。

[0043] 共刺激胞内信号发放结构域可以是共刺激分子的胞内部分。共刺激分子可以出现在以下蛋白质家族中：TNF受体蛋白质、免疫球蛋白样蛋白质、细胞因子受体、整联蛋白、信号发放淋巴细胞活化分子 (SLAM蛋白质) 和活化NK细胞受体。这类分子的实例包括CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、GITR、CD30、CD40、ICOS、BAFFR、HVEM、ICAM-1、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CDS、CD7、CD287、LIGHT、NKG2C、NKG2D、SLAMF7、NKp80、NKp30、NKp44、NKp46、CD160、B7-H3和与CD83特异性结合的配体。

[0044] 胞内信号发放结构域可以包含它所衍生自的分子的整个胞内部分或整个天然胞内信号发放结构域,或其功能性片段或衍生物。

[0045] 术语“4-1BB”指具有GenBank检索号AAA62478.2所提供的氨基酸序列或来自非人物种例如小鼠、啮齿动物、猴、猿等的等同残基的TNFR超家族成员;“4-1BB共刺激结构域”定义为GenBank检索号AAA62478.2的氨基酸残基214-255,或来自非人物种例如小鼠、啮齿动物、猴、猿等的等同残基。

[0046] 术语“编码”指多核苷酸(如基因、cDNA或mRNA)中的特异性核苷酸序列的内在特性,其作为用于在生物学过程中合成具有确定核苷酸序列(例如rRNA、tRNA和mRNA)或确定氨基酸序列和源自其的生物学特性的其他聚合物和大分子的模板。因此,如果对应于该基因的mRNA的转录和翻译在细胞或其他生物系统中产生蛋白质,则该基因、cDNA或RNA编码蛋白质。编码链(其核苷酸序列与mRNA序列相同,且通常在序列表中提供)和非编码链(用作基因或cDNA的转录模板)都可以称为编码该基因或cDNA的蛋白质或其他产物。

[0047] 术语“表达”指启动子驱动的具体核苷酸序列的转录和/或翻译。

[0048] 术语“转移载体”指包含分离的核酸且可以用来将该分离的核酸递送入细胞内部的物质的组成。许多载体为本领域已知,包括但不限于线性多核苷酸、与离子或两性分子化合物结合的多核苷酸、质粒和病毒。因此,术语“转移载体”包括自主复制质粒。该术语还应解释为进一步包括便于将转基因转入细胞的非质粒和非病毒化合物。在一些情况下,转移载体是编码转基因及包装和插入宿主基因组所需的慢病毒顺式作用元件的质粒DNA构建体。

[0049] 术语“慢病毒”指逆转录病毒科(Retroviridae)的属。慢病毒在逆转录病毒中的独特性在于能够感染非分裂细胞;它们可以将显著量的遗传信息递送入宿主细胞的DNA,所以它们是基因递送载体的最有效方法之一。HIV、SIV和FIV都是慢病毒的实例。

[0050] 术语“慢病毒载体”指包含源自至少部分慢病毒基因组的一个或多个核酸序列的载体。慢病毒载体可以包含来自慢病毒(例如HIV-1)的一种或多种蛋白质的非编码序列。“慢病毒转移载体”可以包含例如待转移入细胞的异源核酸序列,且可进一步包含例如一个

或多个慢病毒基因或其部分。“慢病毒包装载体”可以包含一个或多个编码慢病毒蛋白质或其部分的基因。例如，慢病毒包膜蛋白可以包含编码env蛋白或其部分的基因。可以用转移载体和一个或多个包装载体对宿主细胞进行转染，以产生病毒，该病毒转而用于感染靶细胞来在该靶细胞内表达包含在异源核酸序列内的一个或多个转基因。“转基因”因此指例如用本发明的慢病毒转移载体转移入靶细胞的异源基因。在本文所述的某些实例中，转基因是编码嵌合抗原受体(如本文所述的那些)的基因。

[0051] 术语“分离的”指从天然状态改变或取出。例如，天然存在于活体动物中的核酸或肽不是“分离的”，但从其天然状态的共存物质部分或完全分开的同一核酸或肽是“分离的”。分离的核酸或蛋白质可以基本纯的形式存在，或可以存在于非天然环境例如宿主细胞中。

[0052] 术语“核酸”或“多核苷酸”指单链或双链形式的脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)及其聚合物。除非另有明确限制，该术语涵盖包含天然核苷酸的已知类似物的核酸，该核酸具有与参考核酸相似的结合特性，且以类似于天然存在的核苷酸的方式代谢。除非另有说明，具体的核酸序列还暗含其保守修饰变体(例如简并密码子取代)、等位基因、直向同源物、SNP和互补序列以及明确显示的序列。具体而言，可通过产生其中用混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代一个或多个选定(或全部)密码子的第三位的序列来达到简并密码子取代(Batzer等, *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka等, *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); 及Rossolini等, *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994))。

[0053] 术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换使用，指由通过肽键共价连接的氨基酸残基组成的化合物。蛋白质或肽必须包含至少两个氨基酸，蛋白质或肽的序列可包含的最大氨基酸数目不设限制。多肽包括含有两个或多个通过肽键相互连接的氨基酸的任意肽或蛋白质。如本文所使用，该术语指短链(其在本领域中还常称为例如肽、寡肽和寡聚物)和更长的链(其在本领域中通常称为蛋白质，其中存在许多类型)二者。“多肽”包括例如生物活性片段、基本同源的多肽、寡肽、同二聚体、异二聚体、多肽变体、经修饰的多肽、衍生物、类似物、融合蛋白质等。多肽包括天然肽、重组肽或其组合。

[0054] 术语“启动子”指细胞的合成装置(synthetic machinery)或细胞中所引入的合成装置识别、起始多核苷酸序列的特异性转录所需的DNA序列。

[0055] 术语“启动子/调节序列”指表达与该启动子/调节序列有效连接的基因产物所需的核酸序列。在一些情况下，此序列可以是核心启动子序列，在其他情况下，此序列还可以包含表达基因产物所需的增强子序列和其他调节元件。启动子/调节序列可以是例如以组织特异性方式表达基因产物的启动子/调节序列。

[0056] 本文所用的“poly(A)”是通过聚腺苷酸化附着至mRNA的一系列腺嘌呤。在用于瞬时表达的构建体的优选实施方案中，polyA长度在50至5000个核苷酸之间，优选大于64个核苷酸，更优选大于100个核苷酸，最优选大于300或400个核苷酸。poly(A)序列可以化学修饰或酶促修饰，以调节mRNA功能性，如定位、稳定性或翻译效率。

[0057] 本文所用的“聚腺苷酸化”指聚腺苷酰部分或其修饰变体与信使RNA分子的共价连接。在真核生物中，大多数信使RNA(mRNA)分子都在3'端聚腺苷酸化。3' poly(A)尾是通过酶(聚腺苷酸聚合酶)的作用添加至前mRNA的腺嘌呤核苷酸(通常为数百个)的长序列。在高级真核生物中，poly(A)尾添加至包含特异性序列聚腺苷酸化信号的转录物上。poly(A)尾和

与它结合的蛋白质帮助保护mRNA免受外切核酸酶降解。聚腺苷酸化对转录终止、mRNA从细胞核输出和翻译也很重要。聚腺苷酸化在DNA转录为RNA后很快发生在细胞核中,但也可以随后发生在细胞质中。转录终止后,通过与RNA聚合酶结合的内切核酸酶复合物切割mRNA链。切割位点的特征通常在于在切割位点附近存在碱基序列AAUAAA。切割mRNA后,在切割位点游离的3'端添加腺嘌呤残基。

[0058] 术语“个体”旨在包括活生物体(例如哺乳动物、人)。在一些情况下,个体可以是可以在其中引出免疫反应的个体。

[0059] 术语“转染”或“转化”或“转导”指通过其来将外源核酸转移入或引入宿主细胞的方法。“转染”或“转化”或“转导”细胞是已用外源核酸转染、转化或转导的细胞。细胞包括原代个体细胞及其后代。“感染”细胞是已用病原体例如病毒(例如慢病毒)转染、转化或转导的细胞。在一些情况下,可将一个或多个病毒核酸元件整合入感染细胞的基因组。

[0060] 本发明提供若干优势。例如,本发明的病毒转移载体可用于达到提高包装细胞中病毒基因组RNA的产生、提高RNA的核输出和提高病毒效价。此外,该病毒转移载体可以具有与现有载体相比相对小的尺寸,这便于容易地使用,并允许插入更大的异源序列。

[0061] 本发明的其他特征和优势将从以下发明详述、附图和权利要求显而易见。

[0062] 附图简述

[0063] 图1是显示pCINS慢病毒转移载体特征图谱的示意图。P-CMV=巨细胞病毒(CMV)启动子;R=LTR R区,U5=LTR U5区,PBS=引物结合位点;SD=主要剪接供体位点;psi=包装信号;RRE=Rev反应元件;SA7=剪接受体位点;cPPT=中央多聚嘌呤带;SA1=剪接受体位点;EF1A=人EF1 $\alpha$ 启动子;EGFP=GFP报告基因可读框(ORF);WPRE=土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件;SV40 polyA=SV40聚腺苷酸化序列;nptII=卡那霉素抗性基因;pUC ori=来自pUC的复制起点。

[0064] 图2是显示pCINS慢病毒转移载体限制图谱的示意图,包括每个限制位点在载体序列中的位置。

[0065] 图3是显示pNOX慢病毒转移载体特征图谱的示意图。P-CMV=巨细胞病毒(CMV)启动子;R=LTR R区,U5=LTR U5区,PBS=引物结合位点;SD=主要剪接供体位点;psi=包装信号;RRE=Rev反应元件;SA7=剪接受体位点;cPPT=中央多聚嘌呤带;SA1=剪接受体位点;EF1A=人EF1 $\alpha$ 启动子;EGFP=GFP报告基因可读框(ORF);HPRE-NoX=乙型肝炎转录后调节元件,不含编码X蛋白质的ORF;dU3=截短的LTR U3区;SV40polyA=SV40聚腺苷酸化序列;nptII=卡那霉素抗性基因;pUC ori=来自pUC的复制起点。

[0066] 图4是显示pNOX慢病毒转移载体限制图谱的示意图,包括每个限制位点在载体序列中的位置。

[0067] 图5是显示编码GFP的pCINS和pNOX载体相对于彼此及与其他慢病毒载体相比的表现的一系列图表。在这些实验中使用以下包装载体:pNVS-MDG-VSVG-Kan;pNVS-MDLgp-RRE;pNVS RSV Rev-Kan。(A) pCINS转移载体的使用导致病毒效价比用优化前的亲本转移载体产生的病毒效价高若干倍。(B) pCINS和pNOX载体在293T细胞中产生相似的病毒效价。(C) 与pCINS相比,pNOX在Jurkat细胞中产生更高的病毒效价。(D) pCINS或pNOX转导原代人T细胞导致产生相似百分比的表达GFP的T细胞,表明pCINS和pNOX在原代人T细胞中产生相似的感染效价。(E) 与用包含WPRE转录后调节元件的pCINS转导的T细胞群体相比,用包含HPRE转录

后调节元件的pNOX转导的T细胞群体在慢病毒载体序列整合后显示相似量的GFP+细胞。

[0068] 图6是显示在用于优化慢病毒产生系统的策略中修饰的某些特征的示意图。

[0069] 图7是显示亲本转移载体和pNLV转移载体相对于彼此的表现的一组图表。(A) 如用Lenti-X qRT-PCR Titration Kit (Clontech)通过qRT-PCR测量,pNLV慢病毒骨架的使用产生比对照GFP载体慢病毒骨架更多的包装慢病毒基因组RNA。(B) 如用qPCR通过前病毒整合测定测量,与对照转移载体相比,用pNLV载体转导293T细胞产生了更高的病毒效价。

[0070] 图8是显示用表达转基因(例如CAR)的pCINS或pNLV慢病毒载体转导的SupT1细胞中的转基因表达的FACS测量结果的一系列图。(A) 用含有转基因的pCINS慢病毒载体转导的细胞的FACS图,用PE缀合抗体作为表面转基因的检测试剂。(B) 用含有转基因的pNLV慢病毒载体转导的细胞的FACS图,用PE缀合抗体作为转基因的检测试剂。(C) 比较(A-B)的FACS分析中测量的MFI的图,显示pNLV转移载体转导的细胞中转基因的表面表达更高。

[0071] 图9是将市售转移载体的病毒效价与对照载体(其是优化前的编码GFP的SIN转移载体)及与pCINS和pNLV转移载体相比较的一系列图表。(A) 用Tat表达构建体产生第二代pLVX(Clontech)慢病毒载体并转导入293T细胞,并发现具有略高于对照转移载体的病毒效价。(B) 将pLenti6.2(Life Technologies)慢病毒载体转导入细胞并发现与对照转移载体相比病毒效价大幅降低。(C) 将pD2109(DNA2.0)慢病毒载体转导入细胞并发现与对照转移载体相比病毒效价小幅降低。(D) 将pCINS慢病毒载体转导入细胞并发现病毒效价比对照转移载体高得多。(E) 将pNLV慢病毒载体转导入细胞并发现病毒效价比pCINS转移载体高。

[0072] 图10是比较对照非优化转移构建体中不同剪接位点突变对病毒效价的影响的示意图和图表。(A) 图A显示显示慢病毒骨架的示意图,标记的箭头表示突变进行后续病毒效价测定的剪接供体和剪接受体位点的位置。(B) 将所示转移载体的多种剪接供体和剪接受体位点突变体转导入细胞,并将一系列突变体与对照转移载体进行病毒效价比较。所有突变都导致病毒效价大幅降低,SA7mut和E-SAmut转移载体具有略微改善的效价。

[0073] 图11是包含gag和/或env衍生序列缺失和比较随后对病毒效价的影响的转移载体骨架的示意图和图表。(A) 图A显示慢病毒骨架示意图,注释表示gag和/或env缺失的大致位置。(B) 将在env和/或gag区中具有缺失的转移载体骨架转导入细胞并测定病毒效价。与对照转移载体相比,-env3'和-gag3'-env5'突变体病毒效价降低,而-env5'和-gag3'显示病毒效价几乎无差异。

[0074] 图12是显示pNLV转移载体和pRRLSIN转移载体间跨越关键病毒顺式作用元件的若干序列比对的一系列示意图。(A) 图A显示两个载体的psi区之间的比对的示意图,阴影区域表示序列变异的区域。(B) 图B显示两个载体的gag区之间的比对的示意图,阴影区域表示序列变异的区域。(C) 图C显示两个载体的env区之间的比对的示意图,阴影区域表示序列变异的区域。(D) 图D显示两个载体的RRE区之间的比对的示意图,阴影区域表示序列变异的区域。(E) 图E显示两个载体的env(含主要剪接受体位点7)区之间的比对的示意图,阴影区域表示序列变异的区域。(F) 图F显示两个载体的pol(含cPPT和主要剪接受体位点1)区之间的比对的示意图,阴影区域表示序列变异的区域。#=单核苷酸取代。上行=pNLV;下行=pRRLSIN。pRRLSIN序列对应于pRRLSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE载体(Addgene质粒#12252)的序列。pNLV cPPT序列是SEQ ID NO:92的序列。

[0075] 图13是显示pNLV慢病毒转移载体特征图谱的示意图。

[0076] 图14是显示pNLV慢病毒转移载体限制图谱的示意图,包括每个限制位点在载体序列中的位置。

[0077] 发明详述

[0078] 本发明提供慢病毒转移载体及其用途。通常,本发明的慢病毒转移载体包含异源核酸序列,例如编码转基因的序列(例如编码嵌合抗原受体(CAR)的基因;参见下文)。该慢病毒转移载体进一步包含下文所述两种或多种希望得到的特征的组合。

[0079] 本发明的慢病毒转移载体可以用于例如为宿主细胞提供异源核酸序列用于包装入病毒,该病毒转而可用于在所希望的靶细胞中表达异源核酸序列内的转基因。例如,可将慢病毒转移载体与例如一种或多种包装载体组合引入宿主细胞,使得宿主细胞产生慢病毒。慢病毒然后可用于例如感染所希望的靶细胞。在某些情况下,慢病毒感染所希望的靶细胞可以导致来自慢病毒转移载体的一个或多个核酸序列(例如编码转基因的异源核酸)整合入所希望的靶细胞(例如T细胞)的基因组。因此,转导的细胞可以能够表达存在于异源核酸和/或病毒元件中的一个或多个基因(例如CAR基因),此能力可以传递给转导细胞的后代。

[0080] 通过在宿主细胞中产生的慢病毒将来自本发明的慢病毒转移载体的核酸序列引入靶细胞可使得能够通过该靶细胞表达来自慢病毒转移载体的元件(例如编码转基因的异源核酸)。

[0081] 转移载体元件

[0082] 本发明的慢病毒转移载体包含适合用于使得能够将存在于该慢病毒转移载体中的异源核酸转移入细胞(例如,用慢病毒转移载体和可选的一种或多种其他载体(如包装载体)转染的细胞)的元件。具体而言,本发明的慢病毒转移载体通常表征为以下特征中的至少两个:(a)包含巨细胞病毒(CMV)启动子;(b)包含含有相对于野生型INS1减少RNA核输出限制的突变INS1抑制序列的编码至少部分gag蛋白质的多核苷酸,(c)不包含编码gag的INS2、INS3和INS4抑制序列的多核苷酸,和(d)不包含SV40复制起点和/或f1复制起点。在一些情况下,本发明的慢病毒转移载体包含具有约178个核苷酸(例如约100、110、120、125、130、140、150、160、170、175、178、180、190、200、225或250个核苷酸)的长度的cPPT元件。在一种情况下,cPPT元件具有178个核苷酸的长度。在某些情况下,载体包含位于待转移入宿主细胞的异源核酸或转基因上游(例如紧靠上游)的Kozak序列。

[0083] 在一些情况下,慢病毒转移载体可以包含以下中的一个或多个:驱动一个或多个病毒序列表达的启动子(例如CMV、RSV或EF1a启动子)、长末端重复(LTR)区(例如R区或U5区)、引物结合位点(PBS)、包装信号(psi)(例如包含主要剪接供体位点(SD)的包装信号)、部分gag序列(例如,如本文所述)、部分env序列、Rev反应元件(RRE)、可选地包含剪接受体位点(例如SA7剪接受体)的另一部分env序列、包含中央多聚嘌呤带(cPPT)(例如包含剪接受体位点例如SA1的cPPT)的部分pol序列、亚基因组启动子(例如P-EF1a)、异源核酸(例如包含编码EGFP的基因和/或目的转基因(例如CAR基因)的异源核酸)、转录后调节元件(例如可选地包含X蛋白质突变的WPPE或HPPE)、polyA序列(例如SV40 polyA尾)、选择标记(例如卡那霉素抗性基因(nptII)、氨苄青霉素(ampicilin)抗性基因、或氯霉素抗性基因)和复制起点(例如pUC复制起点、SV40复制起点、或f1复制起点)。如上文所指出,慢病毒转移载体可以包含EF1a启动子,其可用于驱动转基因表达。在具体情况下,EF1a启动子包含具有核酸序

列SEQ ID NO:95的野生型EF1a启动子序列。在一些情况下,用本发明的慢病毒转移载体和/或本文所述包装载体转染的细胞产生主要剪接的慢病毒RNA。本发明的慢病毒载体还可以包含如本领域公知的附加序列(例如载体骨架序列)。在某些情况下,本发明的慢病毒载体可以包含或掺入来自本文所述载体(例如pNOX、pCINS和/或pNLV)的序列。在具体情况下,本发明的慢病毒载体可以包含或掺入来自本文所述载体(例如pNOX、pCINS和/或pNLV)的载体骨架序列或其部分。在一个实例中,本发明的慢病毒载体掺入来自pNLV的载体骨架序列或其部分。

[0084] 慢病毒转移载体还可以包含适合用于在细胞中驱动异源蛋白质表达的元件。在某些情况下,Kozak序列位于异源蛋白质可读框的上游。例如,慢病毒转移载体可以包含控制异源核酸表达的启动子(例如CMV、RSV或EF1a启动子)。其他适合用于慢病毒转移载体的启动子包括例如组成型启动子或组织/细胞类型特异性启动子。在一些情况下,慢病毒转移载体包含选择性标记由至少部分异源核酸编码的基因产物(例如多肽或RNA)(例如目的基因产物)的手段。例如,慢病毒转移载体可以包含标记基因(例如编码选择标记如荧光蛋白质(例如GFP、YFP、RFP、dsRed、mCherry或其任意衍生物)的基因)。标记基因可以独立于目的基因产物表达。备选地,标记基因可以与目的基因产物共表达。例如,标记基因可以处于与目的基因产物相同或不同的启动子控制下。在另一个实例中,标记基因可以与目的基因产物融合。本发明的慢病毒转移载体的元件通常相互处于可操作结合中,以确保转移载体与一种或多种包装载体在转染细胞中参与慢病毒的形成。

#### [0085] 病毒蛋白质

[0086] 在一些情况下,本发明的慢病毒转移载体可以包含一个或多个编码病毒蛋白质或其部分的基因。例如,慢病毒转移载体可以包含编码至少部分gag蛋白质(例如HIV-1gag蛋白质)的多核苷酸。在多种实例中,编码gag蛋白质的序列包含250个核苷酸或更少,例如200个核苷酸或更少、175个核苷酸或更少、或150个核苷酸或更少。在一个实例中,编码gag蛋白质的序列包含168个核苷酸或由168个核苷酸组成。编码gag的核苷酸序列可以包含INS1序列(例如含有上文指出的突变),但缺乏INS2、INS3和INS4序列。编码gag蛋白质或其部分的多核苷酸可以包含例如本文所述的失活一个或多个抑制序列的突变。可以包含INS1区的以下核苷酸的一个或多个(例如全部)中的突变:G989,G992,C995,G998,C999,G1004,C1007T和C1010(用图12B的pNLV序列作为参考(pNLV))。在具体实例中,这些突变如下:G989A,G992A,C995T,G998A,C999T,G1004A,C1007T和C1010A。此外,编码gag的序列可以包含导致不希望产生的gag蛋白质的移码和提前终止(参见例如下文图12B)的插入。在某些情况下,慢病毒转移载体可以包含部分gag序列(例如与慢病毒转移载体中的包装信号邻近和/或重叠定位的部分gag序列)、部分env序列、和/或部分pol序列(例如来自pol的中央多聚嘌呤带)。在某些情况下,部分gag、部分env和/或部分pol序列可以源自HIV-1(例如HIV-1分离株NL4-3或SF3)。在一个实例中,慢病毒转移载体可以包含处于CMV启动子控制下的部分gag序列。

#### [0087] 转录后调节元件(PRE)

[0088] 本发明的慢病毒转移载体可以包含转录后调节元件(PRE)。PRE是有助于调节PRE定位于其内的DNA序列表达的核酸序列。例如,PRE可随同DNA序列的其余部分转录。得到的mRNA分子的从PRE转录的部分可以形成增强基因产物表达的三级结构。在一些情况下,PRE

可包含三种成分( $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ )。PRE的活性可取决于存在多少成分。例如,全三部分PRE可比单独 $\alpha$ 成分更具活性。适合包含在本发明的慢病毒转移载体中的PRE包括例如土拨鼠肝炎病毒PRE(WPRE)和/或乙型肝炎病毒PRE(HPRE)。在某些情况下,HPRE可包含天然HPRE序列(例如源自乙型肝炎病毒分离株bba6完整基因组的天然HPRE序列;GenBank:KP341007.1)。在一些情况下,可以修饰本发明的慢病毒转移载体中的PRE以失活本文所述X蛋白质。

#### [0089] 删去的元件

[0090] 本发明涉及已在现有载体基础上优化的慢病毒转移载体。在一些情况下,希望减小载体如本发明的慢病毒转移载体的大小。例如,可以从载体去除冗余序列或元件以减小其大小。在某些情况下,可以从慢病毒载体去除不需要的复制起点(例如SV40 ori序列和/或f1 ori序列)。因此,在多种实例中,本发明的慢病毒转移载体长度可以小于8000个核苷酸,例如长度小于7900、7800或7700个核苷酸。

[0091] 在一些情况下,可以从载体删除载体编码的元件或基因的部分。例如,蛋白质编码基因可以包含抑制序列。这类抑制序列可以抑制基因的表达、加工和/或功能。例如,HIV-1gag蛋白质包含一系列称为INS元件的抑制性RNA元件(例如INS1、INS2、INS3和INS4)。这类INS元件描述于例如J.Virol.71(7):4892-4903,1997;J.Virol.66(12):7176-7182,1992;和J.Virol.68(6):3784-3793,1994中;每篇文献在此引入作为参考。在一个实例中,INS1涉及限制未剪接的病毒RNA的核输出(参见例如J.Virol.66(12):7176-7182,1992)。从基因(例如编码gag蛋白质或其部分的基因)去除或突变一个或多个(例如1、2、3或4个)这些抑制序列(例如通过突变成具体INS元件的核苷酸;参见例如上文)因此可以提高基因或其基因产物的表达、加工和/或功能。在一个实例中,突变编码gag蛋白质或其部分的基因中的INS1元件导致未剪接的病毒RNA的核输出增加。

[0092] 在一些情况下,可以从载体删除载体编码的整个元件或基因。例如,一些转录后调节元件(如WPRE)包含编码X蛋白质或其部分的多核苷酸。X蛋白质涉及肝癌的产生(参见例如Gene Ther.12(1):3-4,2005;在此引入作为参考)。因此,从生物安全性角度出发,阻止来自本发明的慢病毒转移载体的PRE的X蛋白质活性、功能和/或表达可以是有益的。例如,可以从载体删除X蛋白质编码基因。备选地,可以突变X蛋白质编码基因的起始密码子(例如从ATG至AGG),从而阻止X蛋白质的翻译。在另一种备选中,可在X蛋白质氨基酸序列中引入一个或多个阻止其功能的失活突变。用于失活X蛋白质的其他方法包括本领域公知的突变方法。

#### [0093] 包装载体

[0094] 本发明的慢病毒转移载体可以与一种或多种附加载体一起共转染入细胞。在一些情况下,该一种或多种附加载体可以包含慢病毒包装载体。在某些情况下,该一种或多种附加质粒可以包含包膜质粒(例如编码VSV-G的包膜质粒,如pMD.G)。通常,包装载体包含一个或多个编码慢病毒蛋白质(例如gag、pol、env、tat、rev、vif、vpr、vpu和/或nef蛋白质、或其衍生物、组合或部分)的多核苷酸序列。待与本发明的慢病毒转移载体共转染入细胞的包装载体可以包含编码一种或多种不由慢病毒转移载体编码的慢病毒蛋白质的序列。例如,慢病毒转移载体可以与编码gag和pol的第一包装载体及编码rev的第二包装载体共转染。因此,慢病毒转移载体与这种(类)包装载体的共转染可以导致引入在细胞中形成病毒颗粒所需的全部基因,从而使得细胞能够产生可以分离的病毒颗粒。适用于本发明的包装载体可

以由本领域技术人员根据例如选择用于本发明的慢病毒转移载体的特征的考虑来选择。可用于或修改用于本发明的包装载体的实例参见例如WO 03/064665、WO 2009/153563、美国专利号7,419,829、WO 2004/022761、美国专利号5,817,491、WO 99/41397、美国专利号6,924,123、美国专利号7,056,699、WO 99/32646、WO 98/51810和WO 98/17815。在一些情况下,包装质粒可编码gag和/或pol蛋白质,且可以可选地包含RRE序列(例如pMDLgpRRE载体;参见例如Dull等,J.Virol.72(11):8463-8471,1998)。在某些情况下,包装载体可以编码rev蛋白质(例如pRSV-Rev载体)。

[0095] 用于慢病毒产生的宿主细胞

[0096] 本发明的慢病毒转移载体可以引入宿主细胞(包装细胞)。慢病毒转移载体通常与一种或多种附加载体(例如一种或多种包装载体)一起共转染入宿主细胞。该一种或多种附加载体可以编码病毒蛋白质和/或调节蛋白质。慢病毒转移载体和一种或多种附加载体的共转染使得宿主细胞能够产生慢病毒(例如编码来自慢病毒转移载体的异源核酸序列的慢病毒)。通过本文所述宿主细胞产生的慢病毒可以用于感染另一细胞。异源核酸和/或一种或多种附加元件(例如启动子和病毒元件)可以整合入感染细胞的基因组,从而允许细胞及其后代表达源自慢病毒转移载体的一个或多个基因。

[0097] 适合用慢病毒转移载体(和一种或多种包装载体)转染的包装细胞可以是真核细胞,如哺乳动物细胞。宿主细胞可以源自细胞系(例如永生化细胞系)。例如,宿主细胞可以是HEK 293细胞(例如包含SV40大T抗原的293T细胞)。下文提供关于通过慢病毒转导的细胞的信息。

[0098] 靶细胞是用编码目的转基因的慢病毒载体(慢病毒)感染(转导)的细胞。转导后,目的转基因稳定插入靶细胞基因组,且可以通过诸如PCR和Southern印迹的分子生物学方法检测。转基因可以在靶细胞中表达,并通过流式细胞术或Western印迹检测。在一些情况下,靶细胞是人细胞。在某些情况下,宿主细胞是特定的目的细胞类型,例如原代T细胞、SupT1细胞、Jurkat细胞或293T细胞。

[0099] 产生慢病毒的方法

[0100] 本发明的慢病毒转移载体可以用于在细胞(例如本文所述宿主细胞)中产生慢病毒。用本文所述慢病毒转移载体产生慢病毒的方法通常将涉及将慢病毒转移载体和一种或多种附加载体(例如慢病毒包装载体)引入细胞。载体可以用本领域公知的转染方法引入细胞。转染后,可以允许细胞表达由慢病毒转移载体和/或一种或多种附加载体编码的病毒蛋白质(例如通过在本领域已知用于诱导病毒基因表达的标准条件下孵育细胞)。在一些情况下,病毒基因在组成型或诱导型启动子控制下表达。在后一种情况下,可以通过在适合用于激活诱导型启动子的条件下孵育细胞来选择性诱导病毒基因表达。细胞产生的病毒蛋白质随后可形成病毒颗粒,该病毒颗粒从细胞表面出芽,且可以从溶液分离(例如按照本领域公知的方法)。病毒形成期间,包含异源核酸序列的多核苷酸可以掺入病毒颗粒。因此,此过程产生包含源自慢病毒转移载体的异源核酸的慢病毒。

[0101] 异源核酸

[0102] 本发明涉及包含异源核酸的慢病毒转移载体。异源核酸可以包含待在细胞中表达的目的转基因(例如编码多肽的基因或非编码RNA的基因)。在一些情况下,异源蛋白质ORF位于Kozak序列下游。在某些情况下,目的基因可以与本文所述标记基因结合(例如融合)。

在一些情况下,慢病毒转移载体的异源核酸将存在于在用慢病毒载体和可选的一种或多种附加载体(例如包装载体)转染的细胞中产生的慢病毒中。在某些情况下,异源核酸可以整合入慢病毒感染的细胞的基因组。异源核酸整合入这种细胞的基因组可允许细胞及其后代表达目的基因。目的基因可以是本领域已知的任何基因。示例性目的基因非限制性地包括编码嵌合抗原受体(CAR)、结合部分(例如抗体和抗体片段)、信号发放蛋白质、细胞表面蛋白质(例如T细胞受体)、涉及疾病(例如癌症、自身免疫病、神经障碍、或本领域已知的任意其他疾病)的蛋白质、或其任意衍生物或组合的基因。

[0103] 嵌合抗原受体

[0104] 本发明的慢病毒转移载体可以用于在细胞中诱导嵌合抗原受体(CAR)的产生。CAR可以是包含以下的跨膜蛋白质:(i)胞外抗原结合结构域;(ii)跨膜结构域;和(iii)胞内信号发放结构域。本发明的慢病毒转移载体编码的CAR可以是本领域已知的任意CAR。在一个实施方案中,该CAR包含抗CD19抗体或其片段、4-1BB(CD137)跨膜结构域和CD3 $\zeta$ 信号发放结构域。

[0105] 抗原结合结构域

[0106] 本发明可以用于制备改造为包含指导免疫效应细胞至不希望得到的细胞(例如癌细胞)的一种或多种CAR的免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞)。这是通过CAR上对癌症相关抗原特异的抗原结合结构域来达到。存在两类本发明的CAR可以靶向的癌症相关抗原(肿瘤抗原):(1)表达在癌细胞表面上的癌症相关抗原;和(2)本身在胞内但这种抗原(肽)的片段通过MHC(主要组织相容性复合物)呈递在癌细胞表面上的癌症相关抗原。

[0107] 在一些情况下,该抗原结合结构域能够特异性结合选自以下的抗原:CD19;CD123;CD22;CD30;CD171;CS-1;C型凝集素样分子-1,CD33;表皮生长因子受体变体III(EGFRvIII);神经节苷脂G2(GD2);神经节苷脂GD3;TNF受体家族成员B细胞成熟(BCMA);Tn抗原((Tn Ag)或(GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr));前列腺特异性膜抗原(PSMA);受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1);Fms样酪氨酸激酶3(FLT3);肿瘤相关糖蛋白72(TAG72);CD38;CD44v6;癌胚抗原(CEA);上皮细胞黏附分子(EPCAM);B7H3(CD276);KIT(CD117);白介素-13受体亚基 $\alpha$ -2;间皮素;白介素11受体 $\alpha$ (IL-11Ra);前列腺干细胞抗原(PSCA);蛋白酶丝氨酸21;血管内皮生长因子受体2(VEGFR2);Lewis(Y)抗原;CD24;血小板衍生生长因子受体 $\beta$ (PDGFR- $\beta$ );阶段特异性胚胎抗原-4(SSEA-4);CD20;叶酸受体 $\alpha$ ;受体酪氨酸蛋白激酶ERBB2(Her2/neu);黏蛋白1,细胞表面结合(MUC1);表皮生长因子受体(EGFR);神经细胞黏附分子(NCAM);Prostate;前列腺酸性磷酸酶(PAP);突变的延伸因子2(ELF2M);肝配蛋白B2;成纤维细胞激活蛋白 $\alpha$ (FAP);胰岛素样生长因子1受体(IGF-I受体),碳酸酐酶IX(CAIX);蛋白酶体(Prosome,Macropain)亚基, $\beta$ 型,9(LMP2);糖蛋白100(gp100);由断点簇区(BCR)和Abelson鼠白血病病毒癌基因同源物1(Ab1)组成的癌基因融合蛋白(bcr-abl);酪氨酸酶;肝配蛋白A型受体2(EphA2);岩藻糖基GM1;唾液酸Lewis黏附分子(sLe);神经节苷脂GM3;转谷氨酰胺酶5(TGS5);高分子量黑色素瘤相关抗原(HMWMAA);o-乙酰-GD2神经节苷脂(OAcGD2);叶酸受体 $\beta$ ;肿瘤内皮标志1(TEM1/CD248);肿瘤内皮标志7相关(TEM7R);密蛋白6(CLDN6);促甲状腺素受体(TSHR);G蛋白偶联受体C类5组成员D(GPRC5D);染色体X可读框61(CXORF61);CD97;CD179a;大细胞非霍奇金淋巴瘤激酶(ALK);多聚唾液酸;胎盘特异性1(PLAC1);globoH糖神经酰胺(GloboH)的己糖部分;乳腺分化抗原(NY-BR-1);尿路斑块蛋白2(UPK2);

甲型肝炎病毒细胞受体1 (HAVCR1); 肾上腺素受体 $\beta$ 3 (ADRB3); 泛连接蛋白3 (PANX3); G蛋白偶联受体20 (GPR20); 淋巴细胞抗原6复合物, 基因座K 9 (LY6K); 嗅感受器51E2 (OR51E2); TCR  $\gamma$  交替可读框蛋白质 (TARP); Wilms肿瘤蛋白质 (WT1); 癌症/睾丸抗原1 (NY-ESO-1); 癌症/睾丸抗原2 (LAGE-1a); 黑色素瘤相关抗原1 (MAGE-A1); ETS易位变体基因6, 定位于染色体12p (ETV6-AML); 精蛋白17 (SPA17); X抗原家族成员1A (XAGE1); 血管生成素结合细胞表面受体2 (Tie 2); 黑色素瘤癌症睾丸抗原-1 (MAD-CT-1); 黑色素瘤癌症睾丸抗原-2 (MAD-CT-2); Fos相关抗原1; 肿瘤蛋白p53 (p53); p53突变体; prostein; 存活蛋白; 端粒末端转移酶; 前列腺癌肿瘤抗原-1, T细胞识别的黑色素瘤抗原1; 大鼠肉瘤 (Ras) 突变体; 人端粒末端转移酶反转录酶 (hTERT); 肉瘤易位断点; 黑色素瘤凋亡抑制物 (ML-IAP); ERG (跨膜蛋白酶, 丝氨酸2 (TMPRSS2) ETS融合基因); N-乙酰葡萄糖胺转移酶V (NA17); 配对盒蛋白Pax-3 (PAX3); 雄激素受体; 细胞周期蛋白B1; v-myc禽骨髓细胞瘤病毒癌基因神经母细胞瘤衍生同源物 (MYCN); Ras同源物家族成员C (RhoC); 酪氨酸酶相关蛋白2 (TRP-2); 细胞色素P450 1B1 (CYP1B1); T细胞识别的CCCTC结合因子 (锌指蛋白) 样鳞状细胞癌抗原3 (SART3); 配对盒蛋白Pax-5 (PAX5); 前顶体蛋白结合蛋白sp32 (OY-TE51); 淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶 (LCK); A激酶锚定蛋白4 (AKAP-4); 滑膜肉瘤, X断点2 (SSX2); 晚期糖化终产物受体 (RAGE-1); 肾遍在蛋白1 (RU1); 肾遍在蛋白2 (RU2); legumain; 人乳头瘤病毒E6 (HPV E6); 人乳头瘤病毒E7 (HPV E7); 肠羧基酯酶; 突变的热休克蛋白70-2 (mut hsp70-2); CD79a; CD79b; CD72; 白细胞相关免疫球蛋白样受体1 (LAIR1); IgA受体的Fc片段 (FCAR或CD89); 白细胞免疫球蛋白样受体亚家族A成员2 (LILRA2); CD300分子样家族成员f (CD300LF); C型凝集素结构域家族12成员A (CLEC12A); 骨髓基质细胞抗原2 (BST2); 含EGF样模块的黏蛋白样激素受体样2 (EMR2); 淋巴细胞抗原75 (LY75); 磷脂酰肌醇聚糖-3 (GPC3); Fc受体样5 (FCRL5); 及免疫球蛋白 $\lambda$ 样多肽1 (IGLL1)。

[0108] 本文所述的CAR可以包含结合肿瘤支持抗原 (例如本文所述肿瘤支持抗原) 的抗原结合结构域 (例如抗体或抗体片段、TCR或TCR片段)。在一些实施方案中, 该肿瘤支持抗原是存在于基质细胞或骨髓来源抑制细胞 (MDSC) 上的抗原。基质细胞可以在微环境中分泌生长因子来促进细胞分裂。MDSC细胞可以抑制T细胞增殖和活化。不希望受限于理论, 在一些实施方案中, 该表达CAR的细胞破坏肿瘤支持细胞, 从而直接抑制肿瘤生长或存活。

[0109] 在一些实施方案中, 该基质细胞抗原选自以下一种或多种: 骨髓基质细胞抗原2 (BST2)、成纤维细胞激活蛋白 (FAP) 和生腱蛋白。在一个实施方案中, 该FAP特异性抗体是 sibrotuzumab、与 sibrotuzumab 竞争结合、或具有与 sibrotuzumab 相同的 CDR。在一些实施方案中, 该MDSC抗原选自以下一种或多种: CD33、CD11b、C14、CD15和CD66b。因此, 在一些实施方案中, 该肿瘤支持抗原选自以下一种或多种: 骨髓基质细胞抗原2 (BST2)、成纤维细胞激活蛋白 (FAP) 或生腱蛋白、CD33、CD11b、C14、CD15和CD66b。

[0110] 抗原结合结构域结构

[0111] CAR的抗原结合结构域可以包含例如本领域已知的任意多肽结合部分。例如, 抗原结合结构域可以包含抗体或抗体片段 (例如scFv、Fv、Fab、(Fab')<sub>2</sub>、单结构域抗体 (SDAB)、VH或VL结构域、骆驼VHH结构域或双功能 (例如双特异性) 杂合抗体)。在优选的情况下, 抗原结合结构域包含scFv。在一些情况下, 抗原结合结构域可以包含是T细胞受体 (TCR) 或其片段 (例如单链TCR (scTCR)) 的抗原结合结构域。在某些情况下, 抗原结合结构域是双或多特

异性分子(例如多特异性抗体分子)。在一些情况下,抗原结合结构域识别一种或多种具体的目的靶分子。目的靶分子可以例如与疾病或其发展相关。

[0112] 在一些情况下,可以按照本领域已知的方法(参见例如Bird等,(1988) *Science* 242:423-426和Huston等,(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883)制备scFv。可以通过用柔性多肽接头连接VH和VL区来产生scFv分子。scFv分子包含具有优化的长度和/或氨基酸组成的接头(例如Ser-Gly接头)。接头长度可极大地影响scFv的可变区如何折叠和相互作用。事实上,如果利用短的多肽接头(例如5-10个氨基酸之间),则阻止了链内折叠。还需要链间折叠来将两个可变区带到一起形成功能性表位结合部位。接头取向和大小的实例参见例如Hollinger等1993 *Proc Natl Acad. Sci. U.S.A.* 90:6444-6448,美国专利申请公开号2005/0100543、2005/0175606、2007/0014794,及PCT公开号W02006/020258和W02007/024715,在此引入作为参考。

[0113] scFv在其VL和VH区之间包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50或更多个氨基酸残基的接头。接头序列可以包含任何天然存在的氨基酸。在一些实施方案中,接头序列包含氨基酸甘氨酸和丝氨酸。在另一实施方案中,接头序列包含甘氨酸和丝氨酸重复组,如(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>n</sub>,其中n是等于或大于1的正整数(SEQ ID NO:22)。在一个实施方案中,接头可以是(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>(SEQ ID NO:29)或(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>(SEQ ID NO:30)。接头长度的变异可保留或增强活性,在活性研究中产生更优的功效。

[0114] 在另一方面,该抗原结合结构域是T细胞受体(“TCR”)或其片段,例如单链TCR(scTCR)。制备这类TCR的方法为本领域已知,参见例如Willemsen RA等,*Gene Therapy* 7:1369-1377(2000);Zhang T等,*Cancer Gene Ther* 11:487-496(2004);Aggen等,*Gene Ther.* 19(4):365-74(2012)(参考文献在此以其整体引入)。例如,可以改造包含通过接头(例如柔性接头)连接的来自T细胞克隆的V $\alpha$ 和V $\beta$ 基因的scTCR。此方法对本身在胞内但这种抗原(肽)的片段通过MHC呈递在癌细胞表面的癌症相关靶标非常有用。

[0115] 在某些实施方案中,所编码的抗原结合结构域具有10<sup>-4</sup>M至10<sup>-8</sup>M的结合亲和力KD。

[0116] 在一个实施方案中,所编码的CAR分子包含对靶抗原具有10<sup>-4</sup>M至10<sup>-8</sup>M,例如10<sup>-5</sup>M至10<sup>-7</sup>M,例如10<sup>-6</sup>M或10<sup>-7</sup>M的结合亲和力KD的抗原结合结构域。在一个实施方案中,该抗原结合结构域具有比参考抗体(例如本文所述抗体)低至少5倍、10倍、20倍、30倍、50倍、100倍或1000倍的结合亲和力。在一个实施方案中,所编码的抗原结合结构域具有比参考抗体(例如该抗原结合结构域所衍生自的抗体)低至少5倍的结合亲和力。在一方面,这类抗体片段是功能性的,因为它们提供可包括但不限于技术人员可理解的免疫反应的激活、源自其靶抗原的信号转导的抑制、激活活性的抑制等的生物学反应。

[0117] 在一方面,该CAR的抗原结合结构域是scFv抗体片段,其与它所衍生自的scFv的鼠序列相比进行了人源化。

[0118] 在一方面,本发明的CAR的抗原结合结构域(例如scFv)由核酸分子编码,该核酸分子的序列针对在哺乳动物细胞中表达进行了密码子优化。在一方面,本发明的整个CAR构建体由核酸分子编码,该核酸分子的序列针对在哺乳动物细胞中表达进行了密码子优化。密码子优化指同义密码子(即编码同一氨基酸的密码子)在编码DNA中出现的频率在不同物种中有偏差的发现。这种密码子简并性允许通过多种核苷酸序列编码相同的多肽。多种密码子优化方法为本领域已知,包括例如至少美国专利号5,786,464和6,114,148中公开的方

法。

[0119] 具体的抗原抗体对

[0120] 在一个实施方案中,抗CD22的抗原结合结构域是例如Haso等,Blood,121(7):1165-1174(2013);Wayne等,Clin Cancer Res 16(6):1894-1903(2010);Kato等,Leuk Res 37(1):83-88(2013);Creative BioMart(creativebiomart.net):MOM-18047-S(P)中所述的抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0121] 在一个实施方案中,抗CS-1的抗原结合结构域是Elotuzumab(BMS)的抗原结合部分,例如CDR。参见例如Tai等,2008,Blood 112(4):1329-37;Tai等,2007,Blood.110(5):1656-63。

[0122] 在一个实施方案中,抗CLL-1的抗原结合结构域是可从R&D,ebiosciences,Abcam获得的抗体(例如PE-CLL1-hu目录号353604(BioLegend)和PE-CLL1(CLEC12A)目录号562566(BD))的抗原结合部分,例如CDR。

[0123] 在一个实施方案中,抗CD33的抗原结合结构域是例如Bross等,Clin Cancer Res 7(6):1490-1496(2001)(Gemtuzumab Ozogamicin,hP67.6),Caron等,Cancer Res 52(24):6761-6767(1992)(Lintuzumab,HuM195),Lapusan等,Invest New Drugs 30(3):1121-1131(2012)(AVE9633),Aigner等,Leukemia 27(5):1107-1115(2013)(AMG330,CD33 BiTE),Dutour等,Adv hematol 2012:683065(2012),和Pizzitola等,Leukemia doi:10.1038/Lue.2014.62(2014)中所述的抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0124] 在一个实施方案中,抗GD2的抗原结合结构域是例如Mujoo等,Cancer Res.47(4):1098-1104(1987);Cheung等,Cancer Res 45(6):2642-2649(1985),Cheung等,J Clin Oncol 5(9):1430-1440(1987),Cheung等,J Clin Oncol 16(9):3053-3060(1998),Handgretinger等,Cancer Immunol Immunother 35(3):199-204(1992)中所述的抗体的抗原结合部分,例如CDR。在一些实施方案中,抗GD2的抗原结合结构域是选自mAb 14.18、14G2a、ch14.18、hu14.18、3F8、hu3F8、3G6、8B6、60C3、10B8、ME36.1和8H9的抗体的抗原结合部分,参见例如W02012033885、W02013040371、W02013192294、W02013061273、W02013123061、W02013074916和W0201385552。在一些实施方案中,抗GD2的抗原结合结构域是美国专利号20100150910或PCT公开号W0 2011160119中所述抗体的抗原结合部分。

[0125] 在一个实施方案中,抗BCMA的抗原结合结构域是例如W02012163805、W0200112812和W02003062401中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0126] 在一个实施方案中,抗Tn的抗原结合结构域是例如US8,440,798,Brooks等,PNAS 107(22):10056-10061(2010),和Stone等,OncoImmunology 1(6):863-873(2012)中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0127] 在一个实施方案中,抗PSMA的抗原结合结构域是例如Parker等,Protein Expr Purif 89(2):136-145(2013),US 20110268656(J591 ScFv);Frigerio等,European J Cancer 49(9):2223-2232(2013)(scFvD2B);W0 2006125481(mAbs 3/A12、3/E7和3/F11及单链抗体片段(scFv A5和D7))中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0128] 在一个实施方案中,抗ROR1的抗原结合结构域是例如Hudecek等,Clin Cancer Res 19(12):3153-3164(2013);W0 2011159847;和US20130101607中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0129] 在一个实施方案中,抗FLT3的抗原结合结构域是例如W02011076922、US5777084、EP0754230、US20090297529中所述抗体和几种市售目录抗体(R&D,ebiosciences,Abcam)的抗原结合部分,例如CDR。

[0130] 在一个实施方案中,抗TAG72的抗原结合结构域是例如Hombach等,Gastroenterology 113(4):1163-1170(1997)中所述抗体和Abcam ab691的抗原结合部分,例如CDR。

[0131] 在一个实施方案中,抗FAP的抗原结合结构域是例如Ostermann等,Clinical Cancer Research 14:4584-4592(2008)(FAP5)、美国专利公开号2009/0304718中所述抗体和sibrotuzumab(参见例如Hofheinz等,Oncology Research and Treatment 26(1),2003;和Tran等,J Exp Med 210(6):1125-1135(2013))的抗原结合部分,例如CDR。

[0132] 在一个实施方案中,抗CD38的抗原结合结构域是daratumumab(参见例如Groen等,Blood 116(21):1261-1262(2010))、MOR202(参见例如US8,263,746)、或US 8,362,211中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0133] 在一个实施方案中,抗CD44v6的抗原结合结构域是例如Casucci等,Blood 122(20):3461-3472(2013)中所述的抗原结合部分,例如CDR。

[0134] 在一个实施方案中,抗CEA的抗原结合结构域是例如Chmielewski等,Gastroenterology 143(4):1095-1107(2012)中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0135] 在一个实施方案中,抗EPCAM的抗原结合结构域是选自MT110、EpCAM-CD3双特异性Ab(参见例如clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00635596)、Edrecolomab、3622W94、ING-1和adecatumumab(MT201)的抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0136] 在一个实施方案中,抗PRSS21的抗原结合结构域是美国专利号8,080,650中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0137] 在一个实施方案中,抗B7H3的抗原结合结构域是抗体MGA271(Macrogenics)的抗原结合部分,例如CDR。

[0138] 在一个实施方案中,抗KIT的抗原结合结构域是例如US7915391、US20120288506中所述抗体和几种市售目录抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0139] 在一个实施方案中,抗IL-13Ra2的抗原结合结构域是例如W02008/146911、W02004087758、几种市售目录抗体和W02004087758中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0140] 在一个实施方案中,抗CD30的抗原结合结构域是例如US7090843 B1和EP0805871中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0141] 在一个实施方案中,抗GD3的抗原结合结构域是例如US7253263、US 8,207,308、US 20120276046、EP1013761、W02005035577和US6437098中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0142] 在一个实施方案中,抗CD171的抗原结合结构域是例如Hong等,J Immunother 37(2):93-104(2014)中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0143] 在一个实施方案中,抗IL-11Ra的抗原结合结构域是可从Abcam(目录号ab55262)或Novus Biologicals(目录号EPR5446)获得的抗体的抗原结合部分,例如CDR。在另一实施方案中,抗IL-11Ra的抗原结合结构域是肽,参见例如Huang等,Cancer Res 72(1):271-281(2012)。

[0144] 在一个实施方案中,抗PSCA的抗原结合结构域是例如Morgenroth等,Prostate 67 (10):1121-1131(2007) (scFv 7F5);Nejatollahi等,J of Oncology 2013(2013),article ID 839831 (scFv C5-II);和美国专利公开号20090311181中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0145] 在一个实施方案中,抗VEGFR2的抗原结合结构域是例如Chinnasamy等,J Clin Invest 120(11):3953-3968(2010)中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0146] 在一个实施方案中,抗LewisY的抗原结合结构域是例如Kelly等,Cancer Biother Radiopharm 23(4):411-423(2008) (hu3S193 Ab(scFvs));Dolezal等,Protein Engineering 16(1):47-56(2003) (NC10 scFv)中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0147] 在一个实施方案中,抗CD24的抗原结合结构域是例如Maliar等,Gastroenterology 143(5):1375-1384(2012)中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0148] 在一个实施方案中,抗PDGFR- $\beta$ 的抗原结合结构域是抗体Abcam ab32570的抗原结合部分,例如CDR。

[0149] 在一个实施方案中,抗SSEA-4的抗原结合结构域是抗体(Cell Signaling)或其他市售抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0150] 在一个实施方案中,抗CD20的抗原结合结构域是抗体Rituximab、Ofatumumab、Ocrelizumab、Veltuzumab或GA101的抗原结合部分,例如CDR。

[0151] 在一个实施方案中,抗叶酸受体 $\alpha$ 的抗原结合结构域是抗体IMGN853或US20120009181、US4851332、LK26:US5952484中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0152] 在一个实施方案中,抗ERBB2 (Her2/neu)的抗原结合结构域是抗体trastuzumab或pertuzumab的抗原结合部分,例如CDR。

[0153] 在一个实施方案中,抗MUC1的抗原结合结构域是抗体SAR566658的抗原结合部分,例如CDR。

[0154] 在一个实施方案中,抗EGFR的抗原结合结构域是抗体cetuximab、panitumumab、zalutumumab、nimotuzumab或matuzumab的抗原结合部分,例如CDR。

[0155] 在一个实施方案中,抗NCAM的抗原结合结构域是抗体克隆2-2B:MAB5324 (EMD Millipore)的抗原结合部分,例如CDR。

[0156] 在一个实施方案中,抗肝配蛋白B2的抗原结合结构域是例如Abengoza等,Blood 119(19):4565-4576(2012)中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0157] 在一个实施方案中,抗IGF-I受体的抗原结合结构域是例如US8344112B2、EP2322550A1、WO 2006/138315或PCT/US2006/022995中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0158] 在一个实施方案中,抗CAIX的抗原结合结构域是抗体克隆303123 (R&D Systems)的抗原结合部分,例如CDR。

[0159] 在一个实施方案中,抗LMP2的抗原结合结构域是例如US7,410,640或US20050129701中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0160] 在一个实施方案中,抗gp100的抗原结合结构域是抗体HMB45、NKIbetaB或WO2013165940或US20130295007中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0161] 在一个实施方案中,抗酪氨酸酶的抗原结合结构域是例如US5843674或

US19950504048中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0162] 在一个实施方案中,抗EphA2的抗原结合结构域是例如Yu等,Mol Ther 22(1):102-111(2014)中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0163] 在一个实施方案中,抗GD3的抗原结合结构域是例如US7253263、US 8,207,308、US 20120276046、EP1013761 A3、20120276046、W02005035577或US6437098中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0164] 在一个实施方案中,抗岩藻糖基GM1的抗原结合结构域是例如US20100297138或W02007/067992中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0165] 在一个实施方案中,抗sLe的抗原结合结构域是抗体G193(对于lewis Y)的抗原结合部分,例如CDR,参见Scott AM等,Cancer Res 60:3254-61(2000),还如Neeson等,J Immunol May 2013 190(Meeting Abstract Supplement)177.10中所述。

[0166] 在一个实施方案中,抗GM3的抗原结合结构域是抗体CA 2523449(mAb 14F7)的抗原结合部分,例如CDR。

[0167] 在一个实施方案中,抗HMWMAA的抗原结合结构域是例如Kmiecik等,Oncoimmunology 3(1):e27185(2014)(PMID:24575382)(mAb9.2.27)、US6528481、W02010033866或US 20140004124中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0168] 在一个实施方案中,抗o-乙酰-GD2的抗原结合结构域是抗体8B6的抗原结合部分,例如CDR。

[0169] 在一个实施方案中,抗TEM1/CD248的抗原结合结构域是例如Marty等,Cancer Lett 235(2):298-308(2006);Zhao等,J Immunol Methods 363(2):221-232(2011)中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0170] 在一个实施方案中,抗CLDN6的抗原结合结构域是抗体IMAB027(Ganymed Pharmaceuticals)的抗原结合部分,例如CDR,参见例如[clinicaltrial.gov/show/NCT02054351](http://clinicaltrial.gov/show/NCT02054351)。

[0171] 在一个实施方案中,抗TSHR的抗原结合结构域是例如US8,603,466、US8,501,415或US8,309,693中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0172] 在一个实施方案中,抗GPRC5D的抗原结合结构域是抗体FAB6300A(R&D Systems)或LS-A4180(Lifespan Biosciences)的抗原结合部分,例如CDR。

[0173] 在一个实施方案中,抗CD97的抗原结合结构域是例如US6,846,911;de Groot等,J Immunol 183(6):4127-4134(2009)中所述抗体或来自R&D的抗体MAB3734的抗原结合部分,例如CDR。

[0174] 在一个实施方案中,抗ALK的抗原结合结构域是例如Mino-Kenudson等,Clin Cancer Res 16(5):1561-1571(2010)中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0175] 在一个实施方案中,抗多聚唾液酸的抗原结合结构域是例如Nagae等,J Biol Chem 288(47):33784-33796(2013)中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0176] 在一个实施方案中,抗PLAC1的抗原结合结构域是例如Ghods等,Biotechnol Appl Biochem 2013doi:10.1002/bab.1177中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0177] 在一个实施方案中,抗GloboH的抗原结合结构域是抗体VK9或例如Kudryashov V等,Glycoconj J.15(3):243-9(1998),Lou等,Proc Natl Acad Sci USA 111(7):2482-

2487(2014);MBr1:Bremer E-G等J Biol Chem 259:14773-14777(1984)中所述抗体的抗原结合部分。

[0178] 在一个实施方案中,抗NY-BR-1的抗原结合结构域是例如Jager等,Appl Immunohistochem Mol Morphol 15(1):77-83(2007)中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0179] 在一个实施方案中,抗WT-1的抗原结合结构域是例如Dao等,Sci Transl Med 5(176):176ra33(2013);或W02012/135854中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0180] 在一个实施方案中,抗MAGE-A1的抗原结合结构域是例如Willemsen等,J Immunol 174(12):7853-7858(2005)(TCR样scFv)中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0181] 在一个实施方案中,抗精蛋白17的抗原结合结构域是例如Song等,Target Oncol 2013年8月14日(PMID:23943313);Song等,Med Oncol 29(4):2923-2931(2012)中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0182] 在一个实施方案中,抗Tie 2的抗原结合结构域是抗体AB33(Cell Signaling Technology)的抗原结合部分,例如CDR。

[0183] 在一个实施方案中,抗MAD-CT-2的抗原结合结构域是例如PMID:2450952;US7635753中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0184] 在一个实施方案中,抗Fos相关抗原1的抗原结合结构域是抗体12F9(Novus Biologicals)的抗原结合部分,例如CDR。

[0185] 在一个实施方案中,抗MelanA/MART1的抗原结合结构域是例如EP2514766A2或US 7,749,719中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0186] 在一个实施方案中,抗肉瘤易位断点的抗原结合结构域是例如Luo等,EMBO Mol.Med.4(6):453-461(2012)中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0187] 在一个实施方案中,抗TRP-2的抗原结合结构域是例如Wang等,J Exp Med.184(6):2207-16(1996)中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0188] 在一个实施方案中,抗CYP1B1的抗原结合结构域是例如Maecker等,Blood 102(9):3287-3294(2003)中所述抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0189] 在一个实施方案中,抗RAGE-1的抗原结合结构域是抗体MAB5328(EMD Millipore)的抗原结合部分,例如CDR。

[0190] 在一个实施方案中,抗人端粒末端转移酶逆转录酶的抗原结合结构域是目录号LS-B95-100(Lifespan Biosciences)的抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0191] 在一个实施方案中,抗肠羧基酯酶的抗原结合结构域是目录号LS-B6190-50(Lifespan Biosciences)的抗体4F12的抗原结合部分,例如CDR。

[0192] 在一个实施方案中,抗mut hsp70-2的抗原结合结构域是Lifespan Biosciences单克隆目录号LS-C133261-100(Lifespan Biosciences)的抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0193] 在一个实施方案中,抗CD79a的抗原结合结构域是可从Abcam获得的抗体抗CD79a抗体[HM47/A9](ab3121)、可从Cell Signalling Technology获得的抗体CD79A抗体#3351或可从Sigma Aldrich获得的在兔中产生的抗体HPA017748-抗CD79A抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0194] 在一个实施方案中,抗CD79b的抗原结合结构域是抗体polatuzumab vedotin、

Dornan等,“Therapeutic potential of an anti-CD79b antibody-drug conjugate, anti-CD79b-vc-MMAE,for the treatment of non-Hodgkin lymphoma”Blood.2009年9月24日;114(13):2721-9.doi:10.1182/blood-2009-02-205500.Epub 2009年7月24日中所述抗CD79b、或“4507Pre-Clinical Characterization of T Cell-Dependent Bispecific Antibody Anti-CD79b/CD3 As a Potential Therapy for B Cell Malignancies” Abstracts of 56<sup>th</sup> ASH Annual Meeting and Exposition, San Francisco, CA December 6-9 2014中所述双特异性抗体抗CD79b/CD3的抗原结合部分,例如CDR。

[0195] 在一个实施方案中,抗CD72的抗原结合结构域是Myers和Uckun,“An anti-CD72 immunotoxin against therapy-refractory B-lineage acute lymphoblastic leukemia.”Leuk Lymphoma.1995年6月;18(1-2):119-22中所述抗体J3-109或Polson等,“Antibody-Drug Conjugates for the Treatment of Non-Hodgkin’s Lymphoma:Target and Linker-Drug Selection”Cancer Res March 15,2009 69;2358中所述抗CD72(10D6.8.1,mIgG1)的抗原结合部分,例如CDR。

[0196] 在一个实施方案中,抗LAIR1的抗原结合结构域是可从ProSpec获得的抗体ANT-301LAIR1抗体或可从BioLegend获得的抗人CD305(LAIR1)抗体的抗原结合部分,例如CDR。

[0197] 在一个实施方案中,抗FCAR的抗原结合结构域是可从Sino Biological Inc获得的抗体CD89/FCAR抗体(Catalog#10414-H08H)的抗原结合部分,例如CDR。

[0198] 在一个实施方案中,抗LILRA2的抗原结合结构域是可从Abnova获得的抗体LILRA2单克隆抗体(M17)克隆3C7或可从Lifespan Biosciences获得的小鼠抗LILRA2抗体单克隆(2D7)的抗原结合部分,例如CDR。

[0199] 在一个实施方案中,抗CD300LF的抗原结合结构域是可从BioLegend获得的抗体小鼠抗CMRF35样分子1抗体单克隆[UP-D2]或可从R&D Systems获得的大鼠抗CMRF35样分子1抗体单克隆[234903]的抗原结合部分,例如CDR。

[0200] 在一个实施方案中,抗CLEC12A的抗原结合结构域是Noordhuis等,“Targeting of CLEC12A In Acute Myeloid Leukemia by Antibody-Drug-Conjugates and Bispecific CLL-1xCD3 BiTE Antibody”53<sup>rd</sup> ASH Annual Meeting and Exposition,2011年12月10-13日中所述抗体双特异性T细胞衔接物(BiTE) scFv抗体和ADC及MCLA-117(Merus)的抗原结合部分,例如CDR。

[0201] 在一个实施方案中,抗BST2(也称为CD317)的抗原结合结构域是可从Antibodies-Online获得的抗体小鼠抗CD317抗体单克隆[3H4]或可从R&D Systems获得的小鼠抗CD317抗体单克隆[696739]的抗原结合部分,例如CDR。

[0202] 在一个实施方案中,抗EMR2(也称为CD312)的抗原结合结构域是可从Lifespan Biosciences获得的抗体小鼠抗CD312抗体单克隆[LS-B8033]或可从R&D Systems获得的小鼠抗CD312抗体单克隆[494025]的抗原结合部分,例如CDR。

[0203] 在一个实施方案中,抗LY75的抗原结合结构域是可从EMD Millipore获得的抗体小鼠抗淋巴细胞抗原75抗体单克隆[HD30]或可从Life Technologies获得的小鼠抗淋巴细胞抗原75抗体单克隆[A15797]的抗原结合部分,例如CDR。

[0204] 在一个实施方案中,抗GPC3的抗原结合结构域是Nakano K,Ishiguro T,Konishi H等Generation of a humanized anti-glypican 3antibody by CDR grafting and

stability optimization. *Anticancer Drugs*. 2010年11月; 21(10):907-916中所述抗体 hGC33、或MDX-1414、HN3或YP7(三者都描述于Feng等, “Glypican-3 antibodies: a new therapeutic target for liver cancer.” *FEBS Lett*. 2014年1月21日; 588(2):377-82中)的抗原结合部分, 例如CDR。

[0205] 在一个实施方案中, 抗FCRL5的抗原结合结构域是Elkins等, “FcRL5 as a target of antibody-drug conjugates for the treatment of multiple myeloma” *Mol Cancer Ther*. 2012年10月; 11(10):2222-32中所述抗FcRL5抗体的抗原结合部分, 例如CDR。

[0206] 在一个实施方案中, 抗IGLL1的抗原结合结构域是可从Lifespan Biosciences获得的抗体小鼠抗免疫球蛋白λ样多肽I抗体单克隆[AT1G4]、可从BioLegend获得的小鼠抗免疫球蛋白λ样多肽I抗体单克隆[HSL11]的抗原结合部分, 例如CDR。

[0207] 在一个实施方案中, 该抗原结合结构域包含来自上文所列抗体的一个、两个、三个(例如全部三个)重链CDR: HC CDR1、HC CDR2和HC CDR3, 和/或来自上文所列抗体的一个、两个、三个(例如全部三个)轻链CDR: LC CDR1、LC CDR2和LC CDR3。在一个实施方案中, 该抗原结合结构域包含上文所列抗体的重链可变区和/或可变轻链区。

[0208] 在另一方面, 该抗原结合结构域包含人源化抗体或抗体片段。在一些方面, 非人抗体是人源化的, 其中修饰该抗体的特定序列或区域来提高与人中天然产生的抗体或其片段的相似性。在一个方面, 该抗原结合结构域是人源化的。

[0209] 双特异性CAR

[0210] 在某些实施方案中, 抗原结合结构域是双或多特异性分子(例如多特异性抗体分子)。在一个实施方案中, 多特异性抗体是双特异性抗体分子。双特异性抗体对不超过两种抗原具有特异性。双特异性抗体分子表征为对第一表位具有结合特异性的第一免疫球蛋白可变结构域序列和对第二表位具有结合特异性的第二免疫球蛋白可变结构域序列。在一个实施方案中, 该第一和第二表位在同一抗原(例如同一种蛋白质(或多聚体蛋白质的亚基))上。在一个实施方案中, 该第一和第二表位重叠。在一个实施方案中, 该第一和第二表位不重叠。在一个实施方案中, 该第一和第二表位在不同抗原(例如不同蛋白质(或多聚体蛋白质的不同亚基))上。在一个实施方案中, 双特异性抗体分子包含对第一表位具有结合特异性的重链可变结构域序列和轻链可变结构域序列, 及对第二表位具有结合特异性的重链可变结构域序列和轻链可变结构域序列。在一个实施方案中, 双特异性抗体分子包含对第一表位具有结合特异性的半抗体和对第二表位具有结合特异性的半抗体。在一个实施方案中, 双特异性抗体分子包含对第一表位具有结合特异性的半抗体或其片段, 及对第二表位具有结合特异性的半抗体或其片段。在一个实施方案中, 双特异性抗体分子包含对第一表位具有结合特异性的scFv或其片段, 及对第二表位具有结合特异性的scFv或其片段。

[0211] 在某些实施方案中, 该抗体分子是多特异性(例如双特异性或三特异性)抗体分子。这类分子包括例如US5637481中所述双特异性融合蛋白, 例如包含两个其间具有亲水性螺旋肽接头的scFv和全长恒定区的表达构建体; 例如US5837821中所述连接在一起的VL和VH链进一步以肽间隔区连接至抗体铰链区和CH3区的微型抗体构建, 其可以二聚化形成双特异性/多价分子; 例如US5864019中所述在C端通过肽键与可交联基团连接的VH结构域(或家族成员中的VL结构域)串(string)进一步与VL结构域结合形成一系列Fv(或scFv); 及例如US5869620中所述, 使用scFv或双抗体类型的型式, 将含有通过肽接头连接的VH和VL结

构域二者的单链结合多肽通过非共价或化学交联组合为多价结构以形成例如同二价、异二价、三价和四价结构。上文引用的申请的内容在此以其整体引入作为参考。

[0212] 在双特异性抗体分子的每个抗体或抗体片段(例如scFv)内,VH可以在VL的上游或下游。在一些实施方案中,上游抗体或抗体片段(例如scFv)按其VH(VH<sub>1</sub>)在其VL(VL<sub>1</sub>)上游排列,下游抗体或抗体片段(例如scFv)按其VL(VL<sub>2</sub>)在其VH(VH<sub>2</sub>)上游排列,使得整个双特异性抗体分子具有排列VH<sub>1</sub>-VL<sub>1</sub>-VL<sub>2</sub>-VH<sub>2</sub>。在其他实施方案中,上游抗体或抗体片段(例如scFv)按其VL(VL<sub>1</sub>)在其VH(VH<sub>1</sub>)上游排列,下游抗体或抗体片段(例如scFv)按其VH(VH<sub>2</sub>)在其VL(VL<sub>2</sub>)上游排列,使得整个双特异性抗体分子具有排列VL<sub>1</sub>-VH<sub>1</sub>-VH<sub>2</sub>-VL<sub>2</sub>。可选地,将接头放置在两个抗体或抗体片段(例如scFv)之间,例如,如果构建体排列为VH<sub>1</sub>-VL<sub>1</sub>-VL<sub>2</sub>-VH<sub>2</sub>,则放置在VL<sub>1</sub>和VL<sub>2</sub>之间,或者如果构建体排列为VL<sub>1</sub>-VH<sub>1</sub>-VH<sub>2</sub>-VL<sub>2</sub>,则放置在VH<sub>1</sub>和VH<sub>2</sub>之间。接头可以是本文所述接头,例如(Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>n</sub>接头,其中n为1、2、3、4、5或6,优选4(SEQ ID NO:29)。通常,两个scFv之间的接头应足够长,以避免两个scFv的结构域之间的错配。可选地,将接头放置在第一scFv的VL和VH之间。可选地,将接头放置在第二scFv的VL和VH之间。在具有多个接头的构建体中,任意两个或多个接头可以相同或不同。因此,在一些实施方案中,双特异性CAR包含按本文所述排列的VL、VH和可选的一个或多个接头。

#### [0213] 跨膜结构域

[0214] CAR的跨膜结构域可以是任意多肽结构域,其能够横跨磷脂双层,使得结构域的一端附着于例如胞外抗原结合结构域,另一端例如附着于胞内信号发放结构域。跨膜结构域可以包含与跨膜区相邻的一个或多个附加氨基酸,例如与衍生该跨膜蛋白质的蛋白质的胞外区结合的一个或多个氨基酸(例如胞外区的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、至多15个氨基酸)和/或与衍生该跨膜蛋白质的蛋白质的胞内区结合的一个或多个附加氨基酸(例如胞内区的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、至多15个氨基酸)。跨膜结构域可以与CAR的其他结构域之一结合。在一些情况下,可以选择或通过氨基酸取代来修饰该跨膜结构域,以避免这类结构域与相同或不同表面膜蛋白质的跨膜结构域结合,例如以最小化与受体复合物的其他成员的相互作用。在一方面,该跨膜结构域能够与表达CAR的细胞的表面上的另一CAR异二聚化。在不同方面,可以修饰或取代该跨膜结构域的氨基酸序列,以最小化与存在于同一表达CAR的细胞中的天然结合配偶体的结合结构域的相互作用。在本发明中尤其使用的跨膜结构域可以至少包含例如以下的一个或多个跨膜区:T细胞受体的 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\zeta$ 链、CD28、CD27、CD3 $\epsilon$ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154。在一些实施方案中,跨膜结构域可以至少包含例如以下的一个或多个跨膜区:KIRDS2、OX40、CD2、CD27、LFA-1(CD11a、CD18)、ICOS(CD278)、4-1BB(CD137)、GITR、CD40、BAFFR、HVEM(LIGHTR)、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD160、CD19、IL2R $\beta$ 、IL2R $\gamma$ 、IL7R $\alpha$ 、ITGA1、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、PAG/Cbp、NKG2D、NKG2C。

[0215] 在一些情况下,该跨膜结构域可以通过铰链(例如来自人蛋白质的铰链)附着至CAR的胞外域,例如CAR的抗原结合结构域。例如,在一个实施方案中,该铰链可以是人Ig(免

疫球蛋白) 铰链(例如IgG4铰链、IgD铰链)、GS接头(例如本文所述GS接头)、KIR2DS2铰链或CD8a铰链。在一个实施方案中,该铰链或间隔区包含(例如由其组成)氨基酸序列SEQ ID NO:4。在一方面,该跨膜结构域包含(例如由其组成)SEQ ID NO:12的跨膜结构域。

[0216] 在某些实施方案中,所编码的跨膜结构域包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:12的至少一个、两个或三个修饰但不超过20、10或5个修饰的CD8跨膜结构域的氨基酸序列,或与氨基酸序列SEQ ID NO:12具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,所编码的跨膜结构域包含序列SEQ ID NO:12。

[0217] 在其他实施方案中,编码CAR的核酸分子包含例如含有序列SEQ ID NO:13或其具有95-99%同一性的序列的CD8跨膜结构域的核苷酸序列。

[0218] 在某些实施方案中,所编码的抗原结合结构域通过铰链区与跨膜结构域连接。在一个实施方案中,所编码的铰链区包含CD8铰链的氨基酸序列,例如SEQ ID NO:4;或IgG4铰链的氨基酸序列,例如SEQ ID NO:6;或与SEQ ID NO:4或6具有95-99%同一性的序列。在其他实施方案中,编码铰链区的核酸序列包含分别对应于CD8铰链或IgG4铰链的序列SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7,或与SEQ ID NO:5或7具有95-99%同一性的序列。

[0219] 在一方面,该铰链或间隔区包含IgG4铰链。例如,在一个实施方案中,该铰链或间隔区包含氨基酸序列ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK(MSEQ ID NO:6)的铰链。在一些实施方案中,该铰链或间隔区包含由下述核苷酸序列编码的铰链:

GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCGAGTTCCTGGGCGGACCCAGCGT  
GTTCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGACCCCGAGGTGACCTGTGT  
GGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGACCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGG  
TGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGGGAGGAGCAGTTCATAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTG  
CTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGGC  
[0220] CTGCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGGTGTA  
CACCTGCCCCCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGG  
GCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAG  
ACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAG  
AGCCGGTGGCAGGAGGGCAACGTCTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTAC  
ACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG (SEQ ID NO:7).

[0221] 在一方面,该铰链或间隔区包含IgD铰链。例如,在一个实施方案中,该铰链或间隔区包含下述氨基酸序列RWPEPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDESRTLLNASRSLEVSIVTDH (SEQ ID NO:8)的铰链。在一些实施方案中,该铰链或间隔区包含由下述核苷酸序列编码的铰链:

[0222] AGGTGGCCCGAAAGTCCCAAGGCCAGGCATCTAGTGTTCTACTGCACAGCCCCAGGCAGAAGG  
 CAGCCTAGCCAAAGCTACTACTGCACCTGCCACTACGCGCAATACTGGCCGTGGCGGGGAGGAGAA  
 GAAAAAGGAGAAAGAGAAAGAAGAAGCAAGGAAGAGAGGGAGACCAAGACCCCTGAATGTCCATCCCA  
 TACCCAGCCGCTGGGCGTCTATCTCTTGACTCCCGCAGTACAGGACTTGTGGCTTAGAGATAAAGGC  
 CACCTTTACATGTTTTCGTCGTGGGCTCTGACCTGAAGGATGCCCATTTGACTTGGGAGGTTGCCGGA  
 AAGGTACCCACAGGGGGGGTTGAGGAAGGGTTGCTGGAGCGCCATTCCAATGGCTCTCAGAGCCA  
 GCACTCAAGACTCACCTTCCGAGATCCCTGTGGAACGCCGGGACCTCTGTACATGTACTCTAAAT  
 CATCCTAGCCTGCCCCACAGCGTCTGATGGCCCTTAGAGAGCCAGCCGCCAGGCACCAGTTAAG  
 CTTAGCCTGAATCTGCTCGCCAGTAGTGATCCCCAGAGGCCGCCAGCTGGCTCTTATGCGAAGTG  
 TCCGGCTTAGCCCGCCCAACATCTTGCTCATGTGGCTGGAGGACCAGCGAGAAGTGAACACCAGC  
 GGCTTCGCTCCAGCCCGGCCCCACCCAGCCGGGTTCTACCACATTCTGGGCCTGGAGTGTCTTA  
 AGGGTCCCAGCACCACTAGCCCCAGCCAGCCACATACACCTGTGTTGTGCCATGAAGATAGC  
 AGGACCCTGCTAAATGCTTCTAGGAGTCTGGAGGTTTCTACGTGACTGACCATT (SEQ ID NO: 9).

[0223] 在一方面,该跨膜结构域可以是重组的,在这种情况下,它将主要包含疏水残基,如亮氨酸和缬氨酸。在一方面,苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸三联体可见于重组跨膜结构域的每一端。

[0224] 可选地,长度2至10个氨基酸之间的短的寡肽或多肽接头可以形成CAR的跨膜结构域和胞质区之间的连接。甘氨酸-丝氨酸双联体提供了尤其适合的接头。例如,在一方面,该接头包含氨基酸序列GGGSGGGGS (SEQ ID NO:10)。在一些实施方案中,该接头由核苷酸序列GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC (SEQ ID NO:11) 编码。

[0225] 在一方面,该铰链或间隔区包含KIR2DS2铰链。

[0226] 信号发放结构域

[0227] CAR可以包含一个或多个胞内信号发放结构域,其可以响应胞外抗原结合结构域与配体的结合而激活和/或抑制一条或多条胞内信号传导途径。在一些情况下,胞内信号发放结构域可以能够诱导免疫反应。例如,T细胞表达的CAR的胞内信号发放结构域可以在抗原结合结构域与其关联的靶分子结合时诱导T细胞激活。

[0228] 在本发明的具有胞内信号发放结构域的实施方案中,这种结构域可以包含例如一个或多个主信号发放结构域和/或共刺激信号发放结构域。在一些实施方案中,胞内信号发放结构域包含编码主信号发放结构域的序列。在一些实施方案中,胞内信号发放结构域包含共刺激信号发放结构域。在一些实施方案中,胞内信号发放结构域包含主信号发放结构域和共刺激信号发放结构域。

[0229] 本发明的CAR的胞质部分内的胞内信号发放序列可以按随机或指定的顺序相互连接。可选地,长度例如2至10个氨基酸(例如2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸)之间的短的寡肽或多肽接头可以形成胞内信号发放序列之间的连接。在一个实施方案中,可以用甘氨酸-丝氨酸双联体作为适宜的接头。在一个实施方案中,可以用单个氨基酸(例如丙氨酸、甘氨酸)作为适宜的接头。

[0230] 在一方面,将胞内信号发放结构域设计为包含两个或多个(例如2、3、4、5或更多个)共刺激信号发放结构域。在一个实施方案中,该两个或多个(例如2、3、4、5或更多个)共刺激信号发放结构域由接头分子(例如本文所述接头分子)分隔开。在一个实施方案中,该胞内信号发放结构域包含两个共刺激信号发放结构域。在一些实施方案中,该接头分子是

甘氨酸残基。在一些实施方案中,该接头是丙氨酸残基。

[0231] 主信号发放结构域

[0232] 主信号发放结构域以刺激方式或以抑制方式调节TCR复合物的主激活。以刺激方式发挥作用的主胞内信号发放结构域可以包含称为基于免疫受体酪氨酸的激活基序或ITAM的信号发放基序。

[0233] 尤其用于本发明的包含ITAM的主胞内信号发放结构域的实例包括CD3 $\zeta$ 、常见FcR $\gamma$  (FCER1G)、Fc $\gamma$  RIIa、FcR $\beta$  (Fc $\epsilon$ R1b)、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD79a、CD79b、DAP10和DAP12的那些。在一个实施方案中,本发明的CAR包含胞内信号发放结构域,例如CD3 $\zeta$ 的主信号发放结构域。

[0234] 在一个实施方案中,所编码的主信号发放结构域包含CD3 $\zeta$ 的功能性信号发放结构域。所编码的CD3 $\zeta$ 主信号发放结构域可以包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:20的至少一个、两个或三个修饰但不超过20个、10个或5个修饰的氨基酸序列,或与氨基酸序列SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:20具有95-99%同一性的序列。在一些实施方案中,所编码的主信号发放结构域包含序列SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:20。在其他实施方案中,编码主信号发放结构域的核酸序列包含序列SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:21,或其具有95-99%同一性的序列。

[0235] 共刺激信号发放结构域

[0236] 在一些实施方案中,所编码的胞内信号发放结构域包含共刺激信号发放结构域。例如,胞内信号发放结构域可包含主信号发放结构域和共刺激信号发放结构域。在一些实施方案中,所编码的共刺激信号发放结构域包含选自以下一种或多种的蛋白质的功能性信号发放结构域:CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、特异性结合CD83的配体、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM (LIGHTR)、SLAMF7、NKp80 (KLRP1)、CD160、CD19、CD4、CD8 $\alpha$ 、CD8 $\beta$ 、IL2R $\beta$ 、IL2R $\gamma$ 、IL7R $\alpha$ 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46或NKG2D。

[0237] 在某些实施方案中,所编码的共刺激信号发放结构域包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:16的至少一个、两个或三个修饰但不超过20个、10个或5个修饰的氨基酸序列,或与氨基酸序列SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:16具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,所编码的共刺激信号发放结构域包含序列SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:16。在其他实施方案中,编码共刺激信号发放结构域的核酸序列包含序列SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:17,或其具有95-99%同一性的序列。

[0238] 在其他实施方案中,所编码的胞内结构域包含序列SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:16和序列SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:20,其中包含胞内信号发放结构域的序列在同一可读框内表达并表达为单条多肽链。

[0239] 在某些实施方案中,编码胞内信号发放结构域的核酸序列包含序列SEQ ID NO:15

或SEQ ID NO:17或其具有95-99%同一性的序列,和序列SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:21或其具有95-99%同一性的序列。

[0240] 在一些实施方案中,该核酸分子进一步编码前导序列。在一个实施方案中,该前导序列包含序列SEQ ID NO:2。

[0241] 在一方面,将胞内信号发放结构域设计为包含CD3 $\zeta$ 的信号发放结构域和CD28的信号发放结构域。在一方面,将胞内信号发放结构域设计为包含CD3 $\zeta$ 的信号发放结构域和4-1BB的信号发放结构域。在一方面,4-1BB的信号发放结构域是SEQ ID NO:14的信号发放结构域。在一方面,CD3 $\zeta$ 的信号发放结构域是SEQ ID NO:18的信号发放结构域。

[0242] 在一方面,将胞内信号发放结构域设计为包含CD3 $\zeta$ 的信号发放结构域和CD27的信号发放结构域。在一方面,CD27的信号发放结构域包含氨基酸序列QRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQED YRKPEPACSP (SEQ ID NO:16)。在一方面,CD27的信号发放结构域由核酸序列AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC (SEQ ID NO:17) 编码。

[0243] 用于CAR表达的宿主细胞

[0244] 如上文所指出,在一些方面,本发明涉及包含本文所述核酸分子、CAR多肽分子或载体的细胞,例如免疫效应细胞(例如细胞群体,例如免疫效应细胞群体)。

[0245] 在本公开的某些方面,免疫效应细胞(例如T细胞)可获自用技术人员已知的任意数目的技术(如Ficoll™分离)从个体采集的血液单位。在一个优选实施方案中,通过单采血液成分术获得来自个体循环血的细胞。单采血液成分术产物通常包含淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其他有核白细胞、红细胞和血小板。在一方面,可以洗涤通过单采血液成分术采集的细胞,以去除血浆级分,可选地将细胞置于适当缓冲液或介质中进行后续处理步骤。在一个实施方案中,用磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗涤细胞。在备选实施方案中,洗涤溶液缺乏钙,且可以缺乏镁,或可以缺乏许多(如果不是全部)二价阳离子。

[0246] 缺乏钙情况下的初始激活步骤可导致放大的激活。如本领域普通技术人员可容易地理解,洗涤步骤可通过本领域技术人员已知的方法达到,如通过按照厂家说明书使用半自动“无逆流”离心机(“flow-through” centrifuge,例如Cobe 2991细胞处理器、Baxter CytoMate或Haemonetics Cell Saver 5)。洗涤后,可将细胞重悬在多种生物相容缓冲液中,例如无钙无镁PBS、PlasmaLyte A、或其他含或不含缓冲剂的盐溶液。备选地,可以去除单采血液成分术样品的不希望得到的成分,将细胞直接重悬在培养基中。

[0247] 认为本申请的方法可以利用包含5%或更少(例如2%)人AB血清的培养基条件,且利用已知的培养基条件和组合物,例如Smith等,“Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement”*Clinical&Translational Immunology* (2015) 4, e31; doi:10.1038/cti.2014.31中所述的那些。

[0248] 在一方面,通过裂解红细胞和排除单核细胞(例如通过PERCOLL™梯度离心或通过对流离心淘析)来从外周血淋巴细胞分离T细胞。

[0249] 本文所述方法可以包括例如使用例如本文所述负选择技术,例如选择特定亚群的免疫效应细胞,例如T细胞,其是T调节细胞排除的群体,CD25+排除的细胞。优选地,T调节排除细胞群体包含不到30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的CD25+细胞。

[0250] 在一个实施方案中,用抗CD25抗体或其片段、或CD25结合配体IL-2从该群体去除T调节细胞,例如CD25<sup>+</sup>细胞。在一个实施方案中,该抗CD25抗体或其片段或CD25结合配体与底物(例如小球)缀合,或以其他方式包被在底物(例如小球)上。在一个实施方案中,该抗CD25抗体或其片段与本文所述底物缀合。

[0251] 在一个实施方案中,用来自Miltenyi™的CD25排除试剂从该群体去除T调节细胞,例如CD25<sup>+</sup>T细胞。在一个实施方案中,细胞与CD25排除试剂的比例为1e7细胞:20uL、或1e7细胞:15uL、或1e7细胞:10uL、或1e7细胞:5uL、或1e7细胞:2.5uL、或1e7细胞:1.25uL。在一个实施方案中,例如对于T调节细胞,例如CD25<sup>+</sup>排除,使用大于500x10<sup>6</sup>细胞/ml。在另一方面,使用600、700、800或900x10<sup>6</sup>细胞/ml的细胞浓度。

[0252] 在一个实施方案中,待排除的免疫效应细胞群体包含约6x10<sup>9</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞。在其他方面,待排除的免疫效应细胞群体包含约1x10<sup>9</sup>至1x10<sup>10</sup>及其间任意整数值的CD25<sup>+</sup>T细胞。在一个实施方案中,所得到的T调节排除细胞群体具有2x10<sup>9</sup>T调节细胞,例如CD25<sup>+</sup>细胞,或更少(例如1x10<sup>9</sup>、5x10<sup>8</sup>、1x10<sup>8</sup>、5x10<sup>7</sup>、1x10<sup>7</sup>或更少CD25<sup>+</sup>细胞)。

[0253] 在一方面,用具有排除管组(例如162-01管)的CliniMAC系统从该群体去除T调节细胞,例如CD25<sup>+</sup>细胞。在一个实施方案中,在排除设置(例如DEPLETION2.1)上运行CliniMAC系统。

[0254] 不希望受限于具体理论,在单采血液成分术之前或在制备表达CAR的细胞产品期间降低个体中免疫细胞负调节物的水平(例如减少不想要的免疫细胞(例如T<sub>REG</sub>细胞)的数目)可降低个体复发的风险。例如,排除T<sub>REG</sub>细胞的方法为本领域已知。减少T<sub>REG</sub>细胞的方法包括但不限于环磷酰胺、抗GITR抗体(本文所述抗GITR抗体)、CD25排除及其组合。

[0255] 在一些实施方案中,该制备方法包括在制备表达CAR的细胞之前减少T<sub>REG</sub>细胞的数目(例如排除)。例如,制备方法包括使样品(例如单采血液成分术样品)与抗GITR抗体和/或抗CD25抗体(或其片段,或CD25结合配体)接触,例如以在制备表达CAR的细胞(例如T细胞、NK细胞)产品之前排除T<sub>REG</sub>细胞。

[0256] 在一个实施方案中,在采集用于表达CAR的细胞产品制备的细胞之前用一种或多种减少T<sub>REG</sub>细胞的治疗预处理个体,从而降低个体在表达CAR的细胞治疗后复发的风险。在一个实施方案中,减少T<sub>REG</sub>细胞的方法包括但不限于对个体施用环磷酰胺、抗GITR抗体、CD25排除或其组合中的一种或多种。环磷酰胺、抗GITR抗体、CD25排除或其组合中的一种或多种的施用可以发生在输注表达CAR的细胞产品之前、期间或之后。

[0257] 在一个实施方案中,在采集用于表达CAR的细胞产品制备的细胞之前用环磷酰胺预处理个体,从而降低个体在表达CAR的细胞治疗后复发的风险。在一个实施方案中,在采集用于表达CAR的细胞产品制备的细胞之前用抗GITR抗体预处理个体,从而降低个体在表达CAR的细胞治疗后复发的风险。

[0258] 在一个实施方案中,待去除的细胞群体不是调节T细胞也不是肿瘤细胞,而是以其他方式负面影响CART细胞的扩增和/或功能的细胞,例如表达CD14、CD11b、CD33、CD15或潜在免疫抑制细胞所表达的其他标志的细胞。在一个实施方案中,考虑与调节T细胞和/或肿瘤细胞同时、或在排除之后、或以另一顺序去除这类细胞。

[0259] 本文所述方法可以包括一个以上选择步骤,例如一个以上排除步骤。可以例如用抗负选择细胞的独特表面标志的抗体的组合达到通过负选择富集T细胞群体。一种方法是

通过负磁免疫黏附或流式细胞术进行细胞分选和/或选择,其使用抗存在于负选择细胞上的细胞表面标志的单克隆抗体的混合物。例如,为了通过负选择富集CD4<sup>+</sup>,单克隆抗体混合物可以包含抗CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。

[0260] 本文所述方法可以进一步包括从该群体去除表达肿瘤抗原(例如不包含CD25的肿瘤抗原,例如CD19、CD30、CD38、CD123、CD20、CD14或CD11b)的细胞,从而提供适合用于表达CAR(例如本文所述CAR)的T调节排除(例如CD25<sup>+</sup>排除)和肿瘤抗原排除的细胞群体。在一个实施方案中,表达肿瘤抗原的细胞与T调节(例如CD25<sup>+</sup>)细胞同时去除。例如,可以使抗CD25抗体或其片段和抗肿瘤抗原抗体或其片段附着于同一底物,例如小球,该小球可用于去除该细胞,或者可以使抗CD25抗体或其片段或抗肿瘤抗原抗体或其片段附着于分开的小球,该小球的混合物可用于去除该细胞。在其他实施方案中,T调节细胞(例如CD25<sup>+</sup>细胞)的去除和表达肿瘤抗原的细胞的去除顺次且可以例如按任一顺序发生。

[0261] 还提供这样的方法,该方法包括从该群体去除表达检验点抑制剂(例如本文所述检验点抑制剂)的细胞,例如PD1<sup>+</sup>细胞、LAG3<sup>+</sup>细胞和TIM3<sup>+</sup>细胞中的一种或多种,从而提供T调节排除(例如CD25<sup>+</sup>排除)细胞和检验点抑制剂排除细胞(例如PD1<sup>+</sup>、LAG3<sup>+</sup>和/或TIM3<sup>+</sup>排除细胞)群体。示例性检验点抑制剂包括B7-H1、B7-1、CD160、P1H、2B4、PD1、TIM3、CEACAM(例如CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、LAG3、TIGIT、CTLA-4、BTLA和LAIR1。在一个实施方案中,表达检验点抑制剂的细胞与T调节(例如CD25<sup>+</sup>)细胞同时去除。例如,可以使抗CD25抗体或其片段和抗检验点抑制剂抗体或其片段附着于同一小球,该小球可用于去除该细胞,或者可以使抗CD25抗体或其片段或抗检验点抑制剂抗体或其片段附着于分开的小球,该小球的混合物可用于去除该细胞。在其他实施方案中,T调节细胞(例如CD25<sup>+</sup>细胞)的去除和表达检验点抑制剂的细胞的去除顺次且可以例如按任一顺序发生。

[0262] 本文所述方法可以包括正选择步骤。例如,通过与抗CD3/抗CD28(例如3x28)缀合小球(如**DYNABEADS**®M-450CD3/CD28T)孵育足以正选择所希望得到的T细胞的时间来分离T细胞。在一个实施方案中,该时间约为30分钟。在另一实施方案中,该时间在从30分钟至36小时或更长的范围内,包括其间所有整数值。在另一实施方案中,该时间为至少1、2、3、4、5或6小时。还在另一实施方案中,该时间为10至24小时,例如24小时。在其中与其他细胞类型相比存在非常少的T细胞的任何情况下,如在从肿瘤组织或从无免疫应答个体分离肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)中,可以用更长孵育时间来分离T细胞。此外,更长孵育时间的使用可以提高捕获CD8<sup>+</sup>T细胞的效率。因此,通过简单地缩短或延长时间,可以使T细胞结合CD3/CD28小球,和/或通过提高或降低小球与T细胞的比例(如本文所述),可以在培养起始时或在该过程期间的其他时间点优选选择T细胞亚群。此外,通过提高或降低小球或其他表面上抗CD3和/或抗CD28抗体的比例,可以在培养起始时或在其他所希望的时间点优先选择T细胞亚群。

[0263] 在一个实施方案中,可以选择表达IFN- $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 、IL-17A、IL-2、IL-3、IL-4、GM-CSF、IL-10、IL-13、粒酶B和穿孔素中的一种或多种或其他适当的分子(例如其他细胞因子)的T细胞群体。可以例如通过PCT公开号W0 2013/126712中所述的方法来确定用于针对细胞表达进行筛选的方法。

[0264] 为了通过正或负选择分离希望得到的细胞群体,可以改变细胞浓度和表面(例如颗粒,如小球)。在某些方面,可希望显著减小小球和细胞混合物在一起的体积(例如提高细

胞浓度),以确保细胞和小球的最大接触。例如,在一方面,使用 $10 \times 10^{10}$ 细胞/ml、 $9 \times 10^{10}$ /ml、 $8 \times 10^{10}$ /ml、 $7 \times 10^{10}$ /ml、 $6 \times 10^{10}$ /ml或 $5 \times 10^{10}$ /ml的浓度。在一方面,使用 $1 \times 10^{10}$ 细胞/ml的浓度。还在一方面,使用75、80、85、90、95或 $100 \times 10^6$ 细胞/ml的细胞浓度。在其他方面,使用125或 $150 \times 10^6$ 细胞/ml的浓度。

[0265] 使用高浓度可导致提高的细胞产率、细胞活化和细胞扩增。此外,使用高细胞浓度允许更有效地捕获可弱表达目的靶抗原(如CD28阴性T细胞)或来自其中存在许多肿瘤细胞的样品(例如白血病血液、肿瘤组织等)的细胞。这类细胞群体可具有治疗价值,且可希望获得。例如,使用高浓度细胞允许更有效地选择通常具有较弱CD28表达的CD8+T细胞。

[0266] 在相关方面,可以希望使用较低浓度的细胞。通过显著稀释T细胞和表面(例如颗粒,如小球)的混合物,使颗粒和细胞间的相互作用最小化。这选择出了高量表达所希望的将要结合于颗粒的抗原的细胞。例如,CD4+T细胞表达更高水平的CD28,在稀释浓度中比CD8+T细胞更容易捕获。在一方面,所使用的细胞浓度为 $5 \times 10^6$ /ml。在其他方面,所使用的浓度可以从约 $1 \times 10^5$ /ml至 $1 \times 10^6$ /ml,及其间的任意整数值。

[0267] 在其他方面,细胞可以在2-10°C或在室温下在旋转器上按不同速度孵育不同时长。

[0268] 用于刺激的T细胞还可以在洗涤步骤后冷冻。不希望受限于理论,冷冻和随后的融化步骤通过去除细胞群体中的粒细胞和某种程度上去除单核细胞提供了更均一的产品。在去除血浆和血小板的洗涤步骤之后,可将细胞重悬在冷冻溶液中。虽然许多冷冻溶液和参数为本领域已知并将在此背景中使用,但一种方法涉及使用包含20%DMSO和8%人血清白蛋白的PBS,或包含10%葡聚糖40和5%葡萄糖、20%人血清白蛋白和7.5%DMSO,或31.25%Plasmalyte-A、31.25%葡萄糖5%、0.45%NaCl、10%葡聚糖40和5%葡萄糖、20%人血清白蛋白和7.5%DMSO的培养基,或包含例如羟乙基淀粉和PlasmaLyte A的其他适宜的细胞冷冻培养基,然后将细胞按每分钟1°C的速率冷冻至-80°C,并保存在液氮保存罐的蒸汽相中。可以使用其他受控冷冻方法,以及立即在-20°C或液氮中的不受控冷冻。

[0269] 在某些方面,按本文所述融化和洗涤冷藏的细胞,使其在室温静置1小时,然后用本发明的方法活化。

[0270] 本发明的背景中还考虑在可能需要本文所述扩增细胞之前的时期从个体采集血液样品或单采血液成分产品。因此,可以在任何必要时间点采集待扩增细胞的来源,并分离和冷冻所希望得到的细胞(例如T细胞),随后用于针对可从免疫效应细胞治疗受益的任意数目的疾病或病症(如本文所述的那些)的免疫效应细胞治疗。在一方面,从一般健康个体采集血液样品或单采血液成分。在某些方面,从处于发展疾病风险但尚未发展疾病的一般健康个体采集血液样品或单采血液成分,分离和冷冻目的细胞用于后续使用。在某些实施方案中,可在随后时间扩增、冷冻和使用T细胞。在某些实施方案中,在诊断本文所述具体疾病之后马上但在任何治疗之前从患者采集样品。在另一方面,从来自任何数目的相关治疗方式之前的个体的血液样品或单采血液成分分离细胞,该治疗方式包括但不限于用药物治疗,如natalizumab、efalizumab、抗病毒剂、化疗、放射、免疫抑制剂(如环孢菌素、硫唑嘌呤、氨甲喋呤、霉酚酸酯和FK506)、抗体、或其他免疫消融剂(如CAMPATH、抗CD3抗体、环磷酰胺、福达拉滨、环孢菌素、FK506、雷帕霉素、霉酚酸、类固醇、FR901228和辐射)。

[0271] 在本发明的另一方面,在使个体保留功能性T细胞的治疗之后直接从患者获得T细

胞。在这方面,已观察到,在某些癌症治疗尤其是损伤免疫系统的药物治疗之后,治疗后很短时间,在正常情况下患者将从治疗恢复的短时期内,可以针对其离体扩增的能力优化或改善所获得的T细胞的质量。同样,用本文所述方法离体操作后,这些细胞可以处于增强植入和体内扩增的优选状态。因此,在本发明的背景内考虑在此恢复期期间采集血细胞,包括T细胞、树突细胞、或造血系的其他细胞。另外,在某些方面,尤其是在治疗后确定的时间窗口期间,可以用动员(例如用GM-CSF动员)和调理方案来在个体中创造有利于特定细胞类型的再繁殖、再循环、再生和/或扩增的条件。说明性细胞类型包括T细胞、B细胞、树突细胞和免疫系统的其他细胞。

[0272] 在一个实施方案中,从已接受低免疫增强剂量mTOR抑制剂的个体获得表达CAR分子(例如本文所述CAR分子)的免疫效应细胞。在一个实施方案中,在足够时间或足够给药的低免疫增强剂量mTOR抑制剂使得个体中PD1阴性免疫效应细胞(例如T细胞)水平或PD1阴性免疫效应细胞(例如T细胞)/PD1阳性免疫效应细胞(例如T细胞)比值提高之后、或从已至少瞬时提高的个体收集待改造为表达CAR的免疫效应细胞(例如T细胞)群体。

[0273] 在其他实施方案中,可以通过与提高PD1阴性免疫效应细胞(例如T细胞)数目或提高PD1阴性免疫效应细胞(例如T细胞)/PD1阳性免疫效应细胞(例如T细胞)比值的量的mTOR抑制剂接触来离体处理已或将改造为表达CAR的免疫效应细胞(例如T细胞)群体。

[0274] 在一个实施方案中,T细胞群体为二酰基甘油(diacylglycerol)激酶(DGK)缺陷。DGK缺陷细胞包括不表达DGK RNA或蛋白质或DGK活性降低或抑制的细胞。DGK缺陷细胞可以通过遗传方法产生,例如施用RNA干扰剂,例如siRNA、shRNA、miRNA,以减少或阻止DGK表达。备选地,DGK缺陷细胞可以通过用本文所述DGK抑制剂处理产生。

[0275] 在一个实施方案中,T细胞群体为Ikaros缺陷。Ikaros缺陷细胞包括不表达Ikaros RNA或蛋白质或Ikaros活性降低或抑制的细胞。Ikaros缺陷细胞可以通过遗传方法产生,例如施用RNA干扰剂,例如siRNA、shRNA、miRNA,以减少或阻止Ikaros表达。备选地,Ikaros缺陷细胞可以通过用Ikaros抑制剂(例如来那度胺(lenalidomide))处理产生。

[0276] 在一些实施方案中,T细胞群体为DGK缺陷和Ikaros缺陷,例如不表达DGK和Ikaros,或DGK和Ikaros活性降低或抑制。这类DGK和Ikaros缺陷细胞可以通过本文所述任意方法产生。

[0277] 在一个实施方案中,从个体获得NK细胞。在另一实施方案中,该NK细胞是NK细胞系,例如NK-92细胞系(Conkwest)。

[0278] 其他表达的活性剂(agent)

[0279] 在另一实施方案中,本文所述表达CAR的免疫效应细胞可进一步表达另一活性剂,例如增强表达CAR的细胞的活性的活性剂。例如,在一个实施方案中,该活性剂可以是抑制抑制性分子的活性剂。抑制性分子的实例包括例如本文所述的PD-1、PD-L1、CTLA-4、TIM-3、CEACAM(例如CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、LAG-3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4或TGFRB。在一个实施方案中,抑制抑制性分子的活性剂包含与为细胞提供正信号的第二多肽(例如本文所述胞内信号发放结构域)结合的第一多肽(例如抑制性分子)。在一个实施方案中,该活性剂包含例如抑制性分子(如PD-1、PD-L1、CTLA-4、TIM-3、CEACAM(例如CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、LAG-3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4和TGFRB、或这些中任一个的片段)的第一多肽,及是本文所述胞内信号发放结构域(例如包含

共刺激结构域(例如,例如本文所述的41BB、CD27或CD28)和/或主信号发放结构域(例如本文所述CD3 $\zeta$ 信号发放结构域)的第二多肽。在一个实施方案中,该活性剂包含PD-1或其片段的第一多肽,及本文所述胞内信号发放结构域(例如本文所述CD28、CD27、OX40或4-1BB信号发放结构域和/或本文所述CD3 $\zeta$ 信号发放结构域)的第二多肽。

[0280] 在一个实施方案中,本文所述表达CAR的免疫效应细胞可进一步包含第二CAR,例如包含例如抗同一靶标(例如上文所述靶标)或不同靶标的不同抗原结合结构域的第二CAR。在一个实施方案中,该第二CAR包含抗与第一CAR的靶标表达在同一癌细胞类型上的靶标的抗原结合结构域。在一个实施方案中,该表达CAR的免疫效应细胞包含靶向第一抗原且含有具有共刺激信号发放结构域但不具有主信号发放结构域的胞内信号发放结构域的第一CAR,及靶向第二不同抗原且含有具有主信号发放结构域但不具有共刺激信号发放结构域的胞内信号发放结构域的第二CAR。

[0281] 不希望受限于理论,将共刺激信号发放结构域(例如4-1BB、CD28、CD27或OX-40)放置在第一CAR上和将主信号发放结构域(例如CD3 $\zeta$ )放置在第二CAR上可以限制CAR对表达两种靶标的细胞的活性。在一个实施方案中,表达CAR的免疫效应细胞包含含有靶向例如上文所述靶标的抗原结合结构域、跨膜结构域和共刺激结构域的第一CAR,及靶向第一CAR所靶向的抗原之外的抗原(例如与第一靶标表达在相同癌细胞类型上的抗原)且含有抗原结合结构域、跨膜结构域和主信号发放结构域的第二CAR。在另一实施方案中,表达CAR的免疫效应细胞包含含有靶向例如上文所述靶标的抗原结合结构域、跨膜结构域和主信号发放结构域的第一CAR,及靶向第一CAR所靶向的抗原之外的抗原(例如与第一靶标表达在相同癌细胞类型上的抗原)且含有抗该抗原的抗原结合结构域、跨膜结构域和共刺激信号发放结构域的第二CAR。

[0282] 在一个实施方案中,表达CAR的免疫效应细胞包含本文所述CAR(例如抗上文所述靶标的CAR)和抑制性CAR。在一个实施方案中,该抑制性CAR包含结合见于正常细胞(例如也表达该靶标的正常细胞)上但不见于癌细胞上的抗原的抗原结合结构域。在一个实施方案中,该抑制性CAR包含抗原结合结构域、跨膜结构域和抑制性分子的胞内结构域。例如,抑制性CAR的胞内结构域可以是PD1、PD-L1、CTLA-4、TIM-3、CEACAM(例如CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、LAG-3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4或TGFR $\beta$ 的胞内结构域。

[0283] 在一个实施方案中,免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞)包含含有结合本文所述肿瘤抗原的抗原结合结构域的第一CAR,及含有PD1胞外结构域或其片段的第二CAR。

[0284] 在一个实施方案中,该细胞进一步包含上文所述抑制性分子。

[0285] 在一个实施方案中,细胞中的第二CAR是抑制性CAR,其中抑制性CAR包含抗原结合结构域、跨膜结构域和抑制性分子的胞内结构域。该抑制性分子可以选自以下一种或多种:PD1、PD-L1、CTLA-4、TIM-3、LAG-3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、TGFR $\beta$ 、CEACAM-1、CEACAM-3和CEACAM-5。在一个实施方案中,该第二CAR分子包含PD1的胞外结构域或其片段。

[0286] 在一些实施方案中,细胞中的第二CAR分子进一步包含含有主信号发放结构域和/或胞内信号发放结构域的胞内信号发放结构域。

[0287] 在其他实施方案中,细胞中的胞内信号发放结构域包含含有CD3 $\zeta$ 的功能性结构域的主信号发放结构域和含有4-1BB的功能性结构域的共刺激信号发放结构域。

[0288] 在一个实施方案中,细胞中的第二CAR分子包含氨基酸序列SEQ ID NO:26。

[0289] 在某些实施方案中,第一CAR分子的抗原结合结构域包含scFv,第二CAR分子的抗原结合结构域不包含scFv。例如,第一CAR分子的抗原结合结构域包含scFv,第二CAR分子的抗原结合结构域包含骆驼VHH结构域。

#### [0290] 分裂CAR

[0291] 在一些实施方案中,表达CAR的细胞使用分裂CAR。分裂CAR方法更详细地描述于公开W02014/055442和W02014/055657中。简言之,分裂CAR系统包含表达具有第一抗原结合结构域和共刺激结构域(例如41BB)的第一CAR的细胞,且该细胞还表达具有第二抗原结合结构域和胞内信号发放结构域(例如CD3 $\zeta$ )的第二CAR。在细胞遇到第一抗原时,共刺激结构域激活,细胞增殖。在细胞遇到第二抗原时,胞内信号发放结构域激活,细胞杀伤活性开始。因此,表达CAR的细胞仅在存在两种抗原时完全激活。

#### [0292] 多CAR表达

[0293] 在一方面,本文所述表达CAR的细胞可进一步包含第二CAR,例如包含例如抗同一靶标或不同靶标(例如本文所述癌症相关抗原之外的靶标或不同的本文所述癌症相关抗原)的不同抗原结合结构域的第二CAR。在一个实施方案中,该第二CAR包含抗与癌症相关抗原表达在同一癌细胞类型上的靶标的抗原结合结构域。在一个实施方案中,该表达CAR的细胞包含靶向第一抗原且含有具有共刺激信号发放结构域但不具有主信号发放结构域的胞内信号发放结构域的第一CAR,及靶向第二不同抗原且含有具有主信号发放结构域但不具有共刺激信号发放结构域的胞内信号发放结构域的第二CAR。不希望受限于理论,将共刺激信号发放结构域(例如4-1BB、CD28、CD27或OX-40)放置在第一CAR上和将主信号发放结构域(例如CD3 $\zeta$ )放置在第二CAR上可以限制CAR对表达两种靶标的细胞的活性。在一个实施方案中,表达CAR的细胞包含含有结合本文所述靶抗原的抗原结合结构域、跨膜结构域和共刺激结构域的第一癌症相关抗原CAR,及靶向不同靶抗原(例如与第一靶抗原表达在相同癌细胞类型上的抗原)且含有抗原结合结构域、跨膜结构域和主信号发放结构域的第二CAR。在另一实施方案中,表达CAR的细胞包含含有结合本文所述靶抗原的抗原结合结构域、跨膜结构域和主信号发放结构域的第一CAR,及靶向除第一靶抗原之外的抗原(例如与第一靶抗原表达在相同癌细胞类型上的抗原)且含有抗该抗原的抗原结合结构域、跨膜结构域和共刺激信号发放结构域的第二CAR。

[0294] 在一些实施方案中,所要求发明包含第一和第二CAR,其中该第一和第二CAR之一的抗原结合结构域不包含可变轻链结构域和可变重链结构域。在一些实施方案中,该第一和第二CAR之一的抗原结合结构域是scFv,另一个的抗原结合结构域不是scFv。在一些实施方案中,该第一和第二CAR之一的抗原结合结构域包含单VH结构域,例如骆驼、鲨鱼或七鳃鳗单VH结构域或源自人或小鼠序列的单VH结构域。在一些实施方案中,该第一和第二CAR之一的抗原结合结构域包含纳米抗体。在一些实施方案中,该第一和第二CAR之一的抗原结合结构域包含骆驼VHH结构域。

#### [0295] 端粒末端转移酶表达

[0296] 不希望受限于任何具体理论,在一些实施方案中,由于T细胞中缩短的端粒,治疗性T细胞在患者中具有短期持续存在;因此,用端粒末端转移酶基因转染可以延长T细胞的端粒,改善T细胞在患者中的持续存在。参见Carl June, "Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic", *Journal of Clinical Investigation*, 117:1466-1476(2007)。

因此,在一个实施方案中,免疫效应细胞(例如T细胞)异位表达端粒末端转移酶亚基,例如端粒末端转移酶的催化亚基,例如TERT,例如hTERT。在一些方面,本公开提供产生表达CAR的细胞的方法,其包括使细胞与编码端粒末端转移酶亚基(例如端粒末端转移酶的催化亚基,例如TERT,例如hTERT)的核酸接触。可以使细胞在与编码CAR的构建体接触之前、与之同时或之后与该核酸接触。

[0297] 扩增和激活

[0298] 免疫效应细胞(如T细胞)通常可用例如美国专利6,352,694;6,534,055;6,905,680;6,692,964;5,858,358;6,887,466;6,905,681;7,144,575;7,067,318;7,172,869;7,232,566;7,175,843;5,883,223;6,905,874;6,797,514;6,867,041;及美国专利申请公开号20060121005中所述的方法活化和扩增,每个专利在此以其整体引入作为参考。

[0299] 通常,可以通过与具有附着于其上的刺激CD3/TCR复合物相关信号的活性剂和刺激T细胞表面共刺激分子的配体的表面接触来扩增免疫效应细胞(例如T调节细胞排除的细胞)群体。具体而言,可以按本文所述刺激T细胞群体,如通过与固定在表面上的抗CD3抗体、或其抗原结合片段、或抗CD28抗体接触,或通过与与钙离子载体结合的蛋白激酶C激活物(例如苔藓抑素)接触。为了共刺激T细胞表面上的辅助分子,使用结合该辅助分子的配体。例如,可以在适合用于刺激T细胞增殖的条件下使T细胞群体与抗CD3抗体和抗CD28抗体接触。为了刺激CD4+T细胞或CD8+T细胞增殖,可以使用抗CD3抗体和抗CD28抗体。抗CD28抗体的实例包括9.3、B-T3、XR-CD28(Diacclone, **Besançon**, 法国),其可用于本领域公知的其他方法(Berg等, *Transplant Proc.* 30(8):3975-3977, 1998; Haanen等, *J. Exp. Med.* 190(9):13191328, 1999; Garland等, *J. Immunol Meth.* 227(1-2):53-63, 1999)。

[0300] 在某些方面,可通过不同流程提供T细胞的主刺激信号和共刺激信号。例如,提供各信号的活性剂可以在溶液中或偶联至表面。在偶联至表面时,该活性剂可以偶联至同一表面(即“顺式”形成)或分开的表面(即“反式”形成)。备选地,可使一种活性剂偶联至表面,另一种活性剂在溶液中。在一方面,可使提供共刺激信号的活性剂结合于细胞表面,提供主激活信号的活性剂在溶液中或偶联至表面。在某些方面,两种活性剂都在溶液中。在一方面,该活性剂可以处于可溶形式,然后交联至表面,如表达Fc受体的细胞或可结合该活性剂的抗体或其他结合剂。在这方面,本发明中考虑用于活化和扩增T细胞的人工抗原呈递细胞(aAPC)参见例如美国专利申请公开号20040101519和20060034810。

[0301] 在一方面,将两种活性剂固定在小球上(固定在同一小球上,即“顺式”,或固定在分开的小球上,即“反式”)。作为实例,提供主活化信号的活性剂是抗CD3抗体或其抗原结合片段,提供共刺激信号的活性剂是抗CD28抗体或其抗原结合片段;两种活性剂以等分子量共同固定至同一小球。在一方面,用1:1比值的各抗体结合于小球用于CD4+T细胞扩增和T细胞生长。在本发明的某些方面,这样使用结合于小球的抗CD3:CD28抗体比值,使得与用1:1比值观察到的扩增相比观察到T细胞扩增增加。在一个具体方面,与用1:1比值观察到的扩增相比,观察到约1倍至约3倍的增加。在一方面,结合于小球的CD3:CD28抗体比值在100:1至1:100范围内,及其间所有整数值。在一方面,比抗CD3抗体多的抗CD28抗体结合于颗粒,即CD3:CD28的比值小于1。在某些方面,结合于小球的抗CD28抗体与抗CD3抗体的比值大于2:1。在一个具体方面,使用1:100CD3:CD28比值的结合于小球的抗体。在一方面,使用1:75CD3:CD28比值的结合于小球的抗体。在另一方面,使用1:50CD3:CD28比值的结合于小球

的抗体。在一方面,使用1:30CD3:CD28比值的结合于小球的抗体。在一个优选方面,使用1:10CD3:CD28比值的结合于小球的抗体。在一方面,使用1:3CD3:CD28比值的结合于小球的抗体。还在一方面,使用3:1CD3:CD28比值的结合于小球的抗体。

[0302] 可以用1:500至500:1及其间任意整数值的颗粒与细胞的比值来刺激T细胞或其他靶细胞。如本领域普通技术人员可容易地理解,颗粒与细胞的比值可取决于颗粒相对于靶细胞的大小。例如,小尺寸小球仅可结合很少细胞,而较大的小球可以结合许多细胞。在某些方面,细胞与颗粒的比值为1:100至100:1及其间任意整数,在其他方面,该比值包含1:9至9:1及其间任意整数,也可以用于刺激T细胞。如上文所指出,导致T细胞刺激的抗CD3和抗CD8偶联的颗粒与T细胞的比值可以变动,但是某些优选的值包括1:100、1:50、1:40、1:30、1:20、1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1和15:1,一个优选的比值是每个T细胞至少一个(1:1)颗粒。在一方面,使用1:1或更小的颗粒与细胞的比值。在一个具体方面,优选的颗粒:细胞比值为1:5。在其他方面,取决于刺激的天数,颗粒与细胞的比值可以改变。例如,在一个实施方案中,在第一天,颗粒与细胞的比值为1:1至10:1,然后按1:1至1:10(根据加入当天的细胞计数)的最终比值每天或每两天向细胞中加入附加的颗粒至多10天。在一个具体方面,颗粒与细胞的比值在刺激第一天为1:1,在刺激第三和第五天调整至1:5。在一方面,以每天或每两天为基础加入颗粒至最终比值在第一天为1:1,在刺激第三和第五天为1:5。在一方面,颗粒与细胞的比值在刺激第一天为2:1,在刺激第三和第五天调整至1:10。在一方面,以每天或每两天为基础加入颗粒至最终比值在第一天为1:1,在刺激第三和第五天为1:10。本领域技术人员将理解,多种其他比值可适合用于本发明。具体而言,比值将取决于颗粒大小及细胞大小和类型而变。在一方面,所使用的最典型的比值在第一天在1:1、2:1和3:1附近。

[0303] 在其他方面,将细胞(如T细胞)与活性剂包被的小球组合,随后将小球和细胞分开,然后培养细胞。在备选方面,在培养之前,不将活性剂包被的小球和细胞分开,而是一起培养。在其他方面,首先通过用力(例如磁力)来浓缩小球和细胞,导致细胞表面标志连接增加,从而诱导细胞刺激。

[0304] 作为实例,可通过使附着了抗CD3和抗CD28的顺磁小球(3x28小球)与T细胞接触来连接细胞表面蛋白质。在一方面,将细胞(例如 $10^4$ 至 $10^9$ T细胞)和小球(例如比值为1:1的**DYNABEADS®**M-450CD3/CD28 T顺磁小球)组合在缓冲液例如PBS(不含二价阳离子,如钙和镁)中。同样,本领域普通技术人员可容易地理解可以使用任何细胞浓度。例如,样品中靶细胞可以非常稀少,仅包含样品的0.01%,或整个样品(即100%)可包含目的靶细胞。因此,任何细胞数都在被发明的背景之内。在某些方面,可希望显著减小颗粒和细胞混合物在一起的体积(例如提高细胞浓度),以确保细胞和颗粒的最大接触。例如,在一方面,使用约 $10 \times 10^{10}$ 细胞/ml、 $9 \times 10^{10}$ /ml、 $8 \times 10^{10}$ /ml、 $7 \times 10^{10}$ /ml、 $6 \times 10^{10}$ /ml或 $5 \times 10^{10}$ /ml或 $2 \times 10^{10}$ 细胞/ml的浓度。在一方面,使用大于 $100 \times 10^6$ 细胞/ml。在另一方面,使用10、15、20、25、30、35、40、45或 $50 \times 10^6$ 细胞/ml的细胞浓度。还在一方面,使用75、80、85、90、95或 $100 \times 10^6$ 细胞/ml的细胞浓度。在其他方面,使用125或 $150 \times 10^6$ 细胞/ml的浓度。使用高浓度可导致提高的细胞产率、细胞活化和细胞扩增。此外,使用高细胞浓度允许更有效地捕获可弱表达目的靶抗原的细胞(如CD28阴性T细胞)。这类细胞群体可具有治疗价值,且在某些实施方案中可希望获得。例如,使用高浓度细胞允许更有效地选择通常具有较弱CD28表达的CD8+T细胞。

[0305] 在一个实施方案中,例如通过本文所述方法扩增用编码CAR(例如本文所述CAR)的核酸转导的细胞。在一个实施方案中,该细胞在培养物中扩增几个小时(例如约2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、18、21小时)至约14天(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天)的时期。在一个实施方案中,该细胞扩增4至9天的时期。在一个实施方案中,该细胞扩增8天或更短(例如7、6或5天)的时期。在一个实施方案中,该细胞在培养物中扩增5天,所得到的细胞比在相同培养条件下在培养物中扩增9天的相同细胞更有效。功效可定义为例如多种T细胞功能,例如增殖、靶细胞杀伤、细胞因子产生、活化、迁移或其组合。在一个实施方案中,与在相同培养条件下在培养物中扩增9天的相同细胞相比,扩增5天的细胞在抗原刺激时显示细胞倍增提高至少一、二、三或四倍。在一个实施方案中,该细胞在培养物中扩增5天,与在相同培养条件下在培养物中扩增9天的相同细胞相比,所得到的细胞显示更高的促炎症细胞因子产生,例如IFN- $\gamma$ 和/或GM-CSF水平。在一个实施方案中,与在相同培养条件下在培养物中扩增9天的相同细胞相比,扩增5天的细胞显示以pg/ml计的促炎症细胞因子产生(例如IFN- $\gamma$ 和/或GM-CSF水平)提高至少一、二、三、四、五、十倍或更多。

[0306] 还可以希望进行几个循环的刺激,使得T细胞培养时间可以是60天或更长。适合用于T细胞培养的条件包括可含有增殖和活率所必需的因子的适当培养基(例如最低必需培养基或RPMI培养基1640或X-vivo 15(Lonza)),该因子包括血清(例如胎牛血清或人血清)、白介素-2(IL-2)、胰岛素、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF $\beta$ 和TNF- $\alpha$ ,或技术人员已知的任何其他用于细胞生长的添加剂。其他用于细胞生长的添加剂包括但不限于表面活性剂、人血浆蛋白粉和还原剂,如N-乙酰-半胱氨酸和2-巯基乙醇。培养基可以包括RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、 $\alpha$ -MEM、F-12、X-Vivo 15、X-Vivo 20、Optimizer,其添加了氨基酸、丙酮酸钠和维生素,无血清或补充了适量血清(或血浆)或确定的激素组,和/或对T细胞生长和扩增足够量的一种或多种细胞因子。仅在实验性培养物中包含抗生素(例如青霉素和链霉素),在将输入入个体的细胞培养物中不包含。将靶细胞维持在支持生长所必需的条件,例如适当的温度(例如37 $^{\circ}$ C)和空气(例如空气加5%CO<sub>2</sub>)。

[0307] 在一个实施方案中,在包含一种或多种白介素的适当培养基(例如本文所述培养基)中扩增细胞,如例如通过本文所述方法(如流式细胞术)测量,其导致细胞在14天扩增期内增加至少200倍(例如200倍、250倍、300倍、350倍)。在一个实施方案中,在IL-15和/或IL-7(例如IL-15和IL-7)存在下扩增细胞。

[0308] 在一些实施方案中,本文所述方法(例如表达CAR的细胞制备方法)包括例如用抗CD25抗体或其片段或CD25结合配体IL-2从细胞群体去除T调节细胞,例如CD25+T细胞。本文描述了从细胞群体去除T调节细胞(例如CD25+T细胞)的方法。在一些实施方案中,该方法(例如制备方法)进一步包括使细胞群体(例如已排除其中T调节细胞(如CD25+T细胞)的细胞群体;或之前已使其与抗CD25抗体或其片段或CD25结合配体接触的细胞群体)与IL-15和/或IL-7接触。例如,在IL-15和/或IL-7存在下扩增细胞群体(例如之前已使其与抗CD25抗体或其片段或CD25结合配体接触)。

[0309] 在一些实施方案中,在例如离体制备表达CAR的细胞期间,使本文所述表达CAR的细胞与包含白介素-15(IL-15)、白介素-15受体 $\alpha$ (IL-15Ra)多肽或IL-15多肽和IL-15Ra多肽(例如hetIL-15)二者的组合的组合物接触。在一些实施方案中,在例如离体制备表达CAR的细胞期间,使本文所述表达CAR的细胞与包含IL-15多肽的组合物接触。在一些实施方案

中,在例如离体制备表达CAR的细胞期间,使本文所述表达CAR的细胞与包含IL-15多肽和IL-15Ra多肽二者的组合的组合物接触。在一些实施方案中,在例如离体制备表达CAR的细胞期间,使本文所述表达CAR的细胞与包含hetIL-15的组合物接触。

[0310] 在一个实施方案中,在离体扩增期间使本文所述表达CAR的细胞与包含hetIL-15的组合物接触。在一个实施方案中,在离体扩增期间使本文所述表达CAR的细胞与包含IL-15多肽的组合物接触。在一个实施方案中,在离体扩增期间使本文所述表达CAR的细胞与包含IL-15多肽和IL-15Ra多肽二者的组合物接触。在一个实施方案中,该接触导致淋巴细胞亚群(例如CD8<sup>+</sup>T细胞)的存活和增殖。

[0311] 暴露于不同刺激时间的T细胞可以显示不同特征。例如,典型血液或单采血液成分外周血单核细胞产品具有大于细胞毒性或抑制T细胞群体(TC,CD8<sup>+</sup>)的辅助T细胞群体(TH,CD4<sup>+</sup>)。通过刺激CD3和CD28受体离体扩增T细胞产生T细胞群体,在约8-9天之前,该T细胞群体主要由TH细胞组成,而在约8-9天之后,该T细胞群体包含逐渐增大的TC细胞群体。因此,取决于处理的目的,用主要包含TH细胞的T细胞群体输注个体可以是有利的。类似地,如果已分离抗原特异性TC细胞亚群,则扩增此亚群至更大程度可以是有益的。

[0312] 此外,除CD4和CD8标记外,其他表型标记变化显著,但在很大程度上可在细胞扩增方法过程中重现。因此,这种重现性使得能够为具体目的量身定制活化T细胞产品。

[0313] 一旦构建本文所述CAR,即可用多种测定来评价该分子的活性,如但不限于在抗原刺激后扩增T细胞、在缺乏再刺激的情况下维持T细胞扩增的能力,及在适当的体外模型和动物模型中的抗癌活性。下文进一步详述评价本发明的CAR的效应的测定。

[0314] 可用原代T细胞中CAR表达的Western印迹分析来检测单体和二聚体的存在。参见例如Milone等,Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009)。简言之,在体外扩增表达CAR的T细胞(CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞的1:1混合物)10天以上,然后进行裂解和还原条件下的SDS-PAGE。用抗TCR- $\zeta$ 链的抗体通过Western印迹检测包含全长TCR- $\zeta$ 胞质结构域的CAR和内源TCR- $\zeta$ 链。用同一T细胞亚群进行非还原条件下的SDS-PAGE分子,以允许评价共价二聚体形成。

[0315] 抗原刺激后CAR<sup>+</sup>T细胞的体外扩增可通过流式细胞术测量。例如,用 $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 aAPC刺激CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞的混合物,然后用在待分析的启动子控制下表达GFP的慢病毒载体转导。示例性启动子包括CMV IE基因、EF-1 $\alpha$ 、泛素C或磷酸甘油激酶(PGK)启动子。在培养第6天通过流式细胞术评价CD4<sup>+</sup>和/或CD8<sup>+</sup>T细胞亚群中的GFP荧光。参见例如Milone等,Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009)。备选地,在0天用 $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28包被的磁性小球刺激CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞的混合物,在第1天用CAR转导,使用用2A核糖体跳跃序列(ribosomal skipping sequence)表达CAR连同eGFP的双顺反子慢病毒载体。洗涤后,在抗CD3和抗CD28抗体存在下,用本文所述癌症相关抗原<sup>+</sup>K562细胞(表达本文所述癌症相关抗原的K562)、野生型K562细胞(K562野生型)或表达hCD32和4-1BBL的K562细胞(K562-BBL-3/28)再刺激培养物。每两天按100IU/ml向培养物中加入外源IL-2。通过使用基于小球的计数的流式细胞术计数GFP<sup>+</sup>T细胞。参见例如Milone等,Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009)。

[0316] 还可以测量缺乏再刺激情况下的持续CAR<sup>+</sup>T细胞扩增。参见例如Milone等,Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009)。简言之,在第0天用 $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28包被的磁性

小球刺激并在第1天用所示CAR转导后,在培养第8天用Coulter Multisizer III颗粒计数仪、Nexcelom Cellometer Vision或Millipore Scepter测量平均T细胞体积(fl)。

[0317] 还可以用动物模型来测量CART活性。例如,可以使用用本文所述人癌症相关抗原特异性CAR<sup>+</sup>T细胞来在免疫缺陷小鼠中治疗原发性人前体B细胞性ALL (pre-B ALL) 的异种移植模型。参见例如Milone等,Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009)。简言之,建立ALL后,将小鼠随机化至治疗组。将不同数目的癌症相关抗原特异性CAR改造T细胞按1:1比值共同注射入具有B-ALL的NOD-SCID- $\gamma^{-/-}$ 小鼠。在T细胞注射后多种时间点评价来自小鼠的脾DNA中癌症相关抗原特异性CAR载体的拷贝数。按每周的间隔对动物进行白血病评估。在本文所述癌症相关抗原- $\zeta$ CAR<sup>+</sup>T细胞或模拟转导T细胞注射的小鼠中测量外周血本文所述癌症相关抗原<sup>+</sup>B-ALL母细胞计数。用对数秩检验比较组存活曲线。此外,还可以分析NOD-SCID- $\gamma^{-/-}$ 小鼠中T细胞注射4周后的绝对外周血CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞计数。用白血病细胞注射小鼠,3周后用通过编码连接至eGFP的CAR的双顺反子慢病毒载体改造为表达CAR的T细胞注射。通过在注射前与模拟转导细胞混合来将T细胞归一化至45-50%输入GFP<sup>+</sup>T细胞,并通过流式细胞术确认。按1周的间隔对动物进行白血病评估。用对数秩检验比较CAR<sup>+</sup>T细胞组存活曲线。

[0318] 可以评价剂量依赖性CAR治疗反应。参见例如Milone等,Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009)。例如,在第21天注射CAR<sup>+</sup>T细胞、等量模拟转导T细胞或不注射T细胞的小鼠中建立白血病后35-70天获得外周血。在第35和49天对来自各组的小鼠随机采血用于测定外周血本文所述癌症相关抗原<sup>+</sup>ALL母细胞计数,然后处死。剩余动物在第57和70天评价。

[0319] 细胞增殖和细胞因子产生的评估之前已描述于例如Milone等,Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009)中。简言之,通过将经洗涤的T细胞与表达本文所述癌症相关抗原(K19)或CD32和CD137(KT32-BBL)的K562细胞按最终T细胞:K562比值为2:1混合,在微量滴定板中进行CAR介导的增殖的评估。K562细胞在使用前用 $\gamma$ 射线照射。向含KT32-BBL细胞的培养物中加入抗CD3(克隆OKT3)和抗CD28(克隆9.3)单克隆抗体作为刺激T细胞增殖的阳性对照,因为这些信号支持CD8<sup>+</sup>T细胞长期离体扩增。按厂家所述用CountBright<sup>TM</sup>荧光小球(Invitrogen,Carlsbad,CA)和流式细胞术计数培养物中的T细胞。使用用表达eGFP-2A连接的CAR的慢病毒载体改造的T细胞,通过GFP表达鉴定CAR<sup>+</sup>T细胞。对于不表达GFP的CAR<sup>+</sup>T细胞,用生物素化重组本文所述癌症相关抗原蛋白质和第二亲和素-PE缀合物检测CAR<sup>+</sup>T细胞。还同时用特异性单克隆抗体(BD Biosciences)检测T细胞上的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>表达。按照厂家说明书用人TH1/TH2细胞因子流式细胞术小球阵列试剂盒(BD Biosciences,San Diego,CA)对再刺激后24小时收集的上清进行细胞因子测量。按照厂家说明书用FACScalibur流式细胞仪评估荧光并分析数据。

[0320] 可通过标准<sup>51</sup>Cr释放测定评估细胞毒性。参见例如Milone等,Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009)。简言之,用<sup>51</sup>Cr(作为NaCrO<sub>4</sub>,New England Nuclear,Boston,MA)在37°C频繁搅拌加载靶细胞(K562细胞系和原代前体-B-ALL细胞)2小时,在完全RPMI中洗涤两次,接种入微量滴定板。效应T细胞按不同的效应细胞:靶细胞(E:T)比值在完全RPMI中在孔中与靶细胞混合。还制备仅包含培养基(自发释放,SR)或1%triton-X 100去垢剂溶液(总释放,TR)的附加孔。37°C孵育4小时后,收集来自每个孔的上清。然后用 $\gamma$ 颗粒计数器

(Packard Instrument Co., Waltham, MA) 测量所释放的<sup>51</sup>Cr。每个条件按至少一式三份进行,用以下公式计算百分比裂解: $\% \text{裂解} = (\text{ER} - \text{SR}) / (\text{TR} - \text{SR})$ ,其中ER代表每个实验条件的平均<sup>51</sup>Cr释放。

[0321] 可用成像技术来评价CAR在具有肿瘤的动物模型中的运输和增殖。这类测定已描述于例如Barrett等, Human Gene Therapy 22:1575-1586 (2011) 中。简言之, NOD/SCID/ $\gamma$  c<sup>-/-</sup> (NSG) 小鼠IV注射Na1m-6细胞,7天后注射用CAR构建体电穿孔后4小时的T细胞。T细胞用慢病毒构建体稳定转染以表达萤火虫荧光素酶,对小鼠进行生物发光成像。备选地,可以按以下测量单次注射的CAR<sup>+</sup>T细胞在Na1m-6异种移植模型中的治疗功效和特异性:用转导为稳定表达萤火虫荧光素酶的Na1m-6注射NSG小鼠,7天后单次尾静脉注射用本发明的CAR电穿孔的T细胞。在注射后多种时间点对动物进行成像。例如,可以产生第5天(治疗前2天)和第8天(CAR<sup>+</sup>PBL后24小时)的代表性小鼠中萤火虫荧光素酶阳性白血病的光子密度热图。

[0322] 也可以用其他测定(包括本文实施例章节中所述的那些,以及本领域已知的那些)来评价本文所述的CAR。

[0323] 治疗方法/联合治疗

[0324] 在另一方面,本发明提供包括施用CAR分子(例如本文所述CAR分子)或包含编码CAR分子(例如本文所述CAR分子)的核酸的细胞的方法。在一个实施方案中,该个体患有本文所述障碍,例如,该个体患有癌症,例如该个体患有表达本文所述靶抗原的癌症。在一个实施方案中,该个体是人。

[0325] 在另一方面,本发明涉及治疗患有与本文所述癌症相关抗原的表达相关的疾病的个体的方法,其包括对该个体施用有效量的包含CAR分子(例如本文所述CAR分子)的细胞。

[0326] 还在另一方面,本发明涉及治疗患有与肿瘤抗原(例如本文所述抗原)的表达相关的疾病的个体的方法,其包括对该个体施用有效量的包含CAR分子的细胞,例如免疫效应细胞(例如免疫效应细胞群体),其中CAR分子包含抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内结构域,该胞内结构域包含共刺激结构域和/或主信号发放结构域,其中该抗原结合结构域结合与该疾病相关的肿瘤抗原,例如本文所述肿瘤抗原。

[0327] 在相关方面,本发明涉及治疗患有与肿瘤抗原的表达相关的疾病的个体的方法。该方法包括与提高免疫细胞功效的活性剂组合,对该个体施用有效量的包含CAR分子的细胞,例如免疫效应细胞(例如免疫效应细胞群体),其中:

[0328] 提高免疫细胞功效的活性剂选自以下一种或多种:

[0329] (i) 蛋白磷酸酶抑制剂;

[0330] (ii) 激酶抑制剂;

[0331] (iii) 细胞因子;

[0332] (iv) 免疫抑制分子的抑制剂;或

[0333] (v) 降低T<sub>REG</sub>细胞的水平或活性的活性剂。

[0334] 在另一方面,本发明涉及包含含有CAR分子(例如本文所述CAR分子)的免疫效应细胞(例如免疫效应细胞群体)的组合物,其用于治疗患有与肿瘤抗原的表达相关的疾病(例如本文所述障碍)的个体。

[0335] 在任意前述方法或用途的某些实施方案中,与肿瘤抗原(例如本文所述肿瘤抗原)相关的疾病选自增生性疾病,如癌症或恶性肿瘤或癌前病症,如脊髓发育不良、脊髓发育不

良综合征或白血病前期,或是与本文所述肿瘤抗原的表达相关的非癌症相关适应症。在一个实施方案中,该疾病是本文所述癌症,例如本文描述为与本文所述靶标相关的癌症。在一个实施方案中,该疾病是血液癌症。在一个实施方案中,该血液癌症是白血病。在一个实施方案中,该癌症选自一种或多种急性白血病,包括但不限于B细胞急性淋巴细胞白血病(“BALL”)、T细胞急性淋巴细胞白血病(“TALL”)、急性淋巴细胞白血病(ALL);一种或多种慢性白血病,包括但不限于慢性髓细胞白血病(CML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL);其他血液癌症或血液病症,包括但不限于B细胞幼淋巴细胞白血病、母细胞性浆细胞样树突细胞肿瘤、伯基特淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、多毛细胞白血病、小细胞或大细胞滤泡性淋巴瘤、恶性淋巴增生性病症、MALT淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、多发性骨髓瘤、脊髓发育不良和脊髓发育不良综合征、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、浆母细胞淋巴瘤、浆细胞样树突细胞肿瘤、Waldenstrom巨球蛋白血症和“白血病前期”(其是通过低效骨髓血细胞产生(或发育不良)联合的各种各样的血液病症);及与本文所述肿瘤抗原的表达相关的疾病,包括但不限于表达本文所述肿瘤抗原的非典型和/或非经典癌症、恶性肿瘤、癌前病症或增生性疾病;及其组合。在另一实施方案中,与本文所述肿瘤抗原相关的疾病是实体瘤。

[0336] 在某些实施方案中,该方法或用途与提高免疫效应细胞功效的活性剂(例如本文所述活性剂)组合进行。

[0337] 在任意前述方法或用途中,与肿瘤抗原的表达相关的疾病选自增生性疾病、癌前病症、癌症和与肿瘤抗原的表达相关的非癌症相关适应症。

[0338] 该癌症可以是血液癌症,例如选自以下一种或多种的癌症:慢性淋巴细胞白血病(CLL)、急性白血病,急性淋巴细胞白血病(ALL)、B细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)、T细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL)、慢性髓细胞白血病(CML)、B细胞幼淋巴细胞白血病、母细胞性浆细胞样树突细胞肿瘤、伯基特淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、多毛细胞白血病、小细胞或大细胞滤泡性淋巴瘤、恶性淋巴增生性病症、MALT淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、多发性骨髓瘤、脊髓发育不良和脊髓发育不良综合征、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、浆母细胞淋巴瘤、浆细胞样树突细胞肿瘤、Waldenstrom巨球蛋白血症或白血病前期。

[0339] 该癌症还可以选自结肠癌、直肠癌、肾细胞癌、肝癌、非小细胞肺癌、小肠癌、食管癌、黑色素瘤、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头或颈癌、皮肤或眼内恶性黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛区癌、胃癌、睾丸癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、内分泌系统癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、儿童期实体瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管发生、脊髓肿瘤、脑干胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮样癌、鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤、环境诱发癌症、该癌症的组合及该癌症的转移灶。

[0340] 在本文所述方法或用途的某些实施方案中,该CAR分子与提高免疫效应细胞功效的活性剂(例如蛋白磷酸酶抑制剂、激酶抑制剂、细胞因子、免疫抑制分子的抑制剂或降低 $T_{REG}$ 细胞的水平或活性的活性剂)组合施用。

[0341] 在本文所述方法或用途的某些实施方案中,该蛋白磷酸酶抑制剂是SHP-1抑制剂和/或SHP-2抑制剂。

[0342] 在本文所述方法或用途的其他实施方案中,激酶抑制剂选自以下一种或多种:CDK4抑制剂、CDK4/6抑制剂(例如palbociclib)、BTK抑制剂(例如ibrutinib或RN-486)、mTOR抑制剂(例如雷帕霉素或依维莫司(everolimus)(RAD001))、MNK抑制剂或双重作用P13K/mTOR抑制剂。在一个实施方案中,该BTK抑制剂不降低或抑制白介素-2诱导激酶(ITK)的激酶活性。

[0343] 在本文所述方法或用途的其他实施方案中,抑制免疫抑制分子的活性剂包含抑制抑制性分子的表达的抗体或抗体片段、抑制性核酸、规律成簇间隔短回文重复(CRISPR)、转录激活因子样效应核酸酶(TALEN)、或锌指内切核酸酶(ZFN)。

[0344] 在本文所述方法或用途的其他实施方案中,降低 $T_{REG}$ 细胞的水平或活性的活性剂选自环磷酸胺、抗GITR抗体、CD25排除、或其组合。

[0345] 在本文所述方法或用途的某些实施方案中,免疫抑制分子选自PD1、PD-L1、CTLA-4、TIM-3、LAG-3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、TGFR $\beta$ 、CEACAM-1、CEACAM-3和CEACAM-5。

[0346] 在其他实施方案中,抑制抑制性分子的活性剂包含含有抑制性分子或其片段的第一多肽和为细胞提供正信号的第二多肽,其中第一和第二多肽表达在含有CAR的免疫细胞上,其中(i)第一多肽包含PD1、PD-L1、CTLA-4、TIM-3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、TGFR $\beta$ 、CEACAM-1、CEACAM-3和CEACAM-5或其片段;和/或(ii)第二多肽包含含有主信号发放结构域和/或共刺激信号发放结构域的胞内信号发放结构域。在一个实施方案中,主信号发放结构域包含CD3 $\zeta$ 的功能性结构域;和/或共刺激信号发放结构域包含选自41BB、CD27和CD28的蛋白质的功能性结构域。

[0347] 在其他实施方案中,细胞因子选自IL-7、IL-15或IL-21、或二者。

[0348] 在其他实施方案中,包含CAR分子的免疫效应细胞和第二活性剂例如本文公开的联合治疗中的任一种(例如提高免疫效应细胞功效的活性剂)基本同时或顺次施用。

[0349] 在其他实施方案中,包含CAR分子的免疫细胞与靶向GITR和/或调节GITR功能的分子组合施用。在某些实施方案中,靶向GITR和/或调节GITR功能的分子在表达CAR的细胞或细胞群体之前或在单采血液成分之前施用。

[0350] 在一个实施方案中,将淋巴细胞输注例如同种异基因淋巴细胞输注用于癌症的治疗,其中淋巴细胞输注包含至少一种本发明的表达CAR的细胞。在一个实施方案中,将自体淋巴细胞输注用于癌症的治疗,其中自体淋巴细胞输注包含至少一种本文所述表达CAR的细胞。

[0351] 在一个实施方案中,该细胞是T细胞,且该T细胞为diacylglycerol激酶(DGK)缺陷。在一个实施方案中,该细胞是T细胞,且该T细胞为Ikaros缺陷。在一个实施方案中,该细胞是T细胞,且该T细胞为DGK和Ikaros二者缺陷。

[0352] 在一个实施方案中,该方法包括与增强表达CAR的细胞活性的活性剂组合施用本文所述表达CAR分子的细胞,其中活性剂是细胞因子,例如IL-7、IL-15、IL-18、IL-21或其组合。细胞因子可以例如与施用表达CAR的细胞同时或在施用表达CAR的细胞后马上组合递送。备选地,细胞因子可以在施用表达CAR的细胞后延长的时期,例如在评估个体对表达CAR的细胞的反应后递送。在一个实施方案中,细胞因子与权利要求61-80中任一项的细胞或细胞群体同时(例如在同一天施用)或在施用权利要求61-80中任一项的细胞或细胞群体后马

上(例如在施用后1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天施用)对个体施用。在其他实施方案中,细胞因子在施用权利要求61-80中任一项的细胞或细胞群体后延长的时期(例如至少2周、3周、4周、6周、8周、10周或更长)或在评估个体对细胞的反应后对个体施用。

[0353] 在其他实施方案中,表达CAR分子的细胞与改善一种或多种与表达CAR分子的细胞的施用相关的副作用的活性剂组合施用。与表达CAR的细胞相关的副作用可以选自细胞因子释放综合征(CRS)或噬血细胞淋巴组织细胞增生症(HLH)

[0354] 在任意前述方法或用途的实施方案中,表达CAR分子的细胞与治疗与肿瘤抗原的表达相关的疾病的活性剂(例如本文公开的任意第二或第三治疗)组合施用。其他示例性组合包括以下一种或多种。

[0355] 在另一实施方案中,表达CAR分子的细胞(例如本文所述)可以与另一活性剂(例如本文所述激酶抑制剂和/或检验点抑制剂)组合施用。在一个实施方案中,表达CAR分子的细胞可进一步表达另一活性剂,例如增强表达CAR的细胞活性的活性剂。

[0356] 例如,在一个实施方案中,增强表达CAR的细胞活性的活性剂可以是抑制抑制性分子(例如免疫抑制分子)的活性剂。抑制性分子的实例包括PD1、PD-L1、CTLA-4、TIM-3、CEACAM(例如CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、LAG-3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4和TGFR $\beta$ 。

[0357] 在一个实施方案中,抑制抑制性分子的活性剂是抑制性核酸dsRNA、siRNA或shRNA。在一些实施方案中,抑制性核酸与编码CAR分子成分的核酸连接。例如,抑制性分子可以表达在表达CAR的细胞上。

[0358] 在另一实施方案中,抑制抑制性分子的活性剂例如是本文所述分子,例如包含与为细胞提供正信号的第二多肽(例如本文所述胞内信号发放结构域)结合的第一多肽(例如抑制性分子)的活性剂。在一个实施方案中,该活性剂包含例如抑制性分子(如PD-1、PD-L1、CTLA-4、TIM-3、CEACAM(例如CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、LAG-3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4或TGFR $\beta$ 、或这些中任一个的片段(例如这些中任一个的至少部分胞外结构域))的第一多肽,及是本文所述胞内信号发放结构域(例如包含共刺激结构域(例如,例如本文所述的41BB、CD27或CD28)和/或主信号发放结构域(例如本文所述CD3 $\zeta$ 信号发放结构域))的第二多肽。在一个实施方案中,该活性剂包含PD-1或其片段(例如PD1的至少部分胞外结构域)的第一多肽,及本文所述胞内信号发放结构域(例如本文所述CD28信号发放结构域和/或本文所述CD3 $\zeta$ 信号发放结构域)的第二多肽。

[0359] 在一个实施方案中,对接受过之前的干细胞移植(例如自体干细胞移植)的个体施用本发明的表达CAR的免疫效应细胞(例如T细胞或NK细胞)。

[0360] 在一个实施方案中,对接受过之前的苯丙氨酸氮芥(melphalan)剂量的个体施用本发明的表达CAR的免疫效应细胞(例如T细胞或NK细胞)。

[0361] 在一个实施方案中,表达CAR分子(例如本文所述CAR分子)的细胞与提高表达CAR分子的细胞功效的活性剂(例如本文所述活性剂)组合施用。

[0362] 在一个实施方案中,表达CAR分子(例如本文所述CAR分子)的细胞与低免疫增强剂量的mTOR抑制剂组合施用。虽然不希望受限于理论,但认为低免疫增强剂量治疗(例如不足以完全抑制免疫系统但足以改善免疫功能的剂量)伴随着PD-1阳性T细胞的减少或PD-1阴性细胞的增加。PD-1阳性T细胞而不是PD-1阴性T细胞可以通过与表达PD-1配体(例如PD-L1

或PD-L2)的细胞衔接来耗尽。

[0363] 在一个实施方案中,此方法可用于优化本文所述CAR细胞在个体中的表现。虽然不希望受限于理论,但在一个实施方案中,认为内源未修饰的免疫效应细胞(例如T细胞或NK细胞)的表型得到改善。虽然不希望受限于理论,但在一个实施方案中,认为表达靶抗原CAR的细胞改善。在其他实施方案中,已或将改造为表达CAR的细胞(例如T细胞或NK细胞)可以通过与一定量的mTOR抑制剂接触来进行离体处理,该量的mTOR抑制剂增加PD1阴性免疫效应细胞(例如T细胞)数目或提高PD1阴性免疫效应细胞(例如T细胞)/PD1阳性免疫效应细胞(例如T细胞)比值。

[0364] 在一个实施方案中,在施用本文所述表达CAR的细胞(例如T细胞或NK细胞)之前起始低免疫增强剂量mTOR抑制剂(例如别构抑制剂例如RAD001,或催化抑制剂)的施用。在一个实施方案中,CAR细胞在足够时间或足够给药的mTOR抑制剂之后施用,使得PD1阴性免疫效应细胞(例如T细胞或NK细胞)的水平或PD1阴性免疫效应细胞(例如T细胞)/PD1阳性免疫效应细胞(例如T细胞)的比值至少瞬时提高。

[0365] 在一个实施方案中,在足够时间或足够给药的低免疫增强剂量的mTOR抑制剂之后收集待改造为表达CAR的细胞(例如T细胞或NK细胞),使得个体中或从个体收集的PD1阴性免疫效应细胞(例如T细胞)的水平或PD1阴性免疫效应细胞(例如T细胞)/PD1阳性免疫效应细胞(例如T细胞)的比值至少瞬时提高。

[0366] 在一个实施方案中,表达CAR分子(例如本文所述CAR分子)的细胞与改善一种或多种与表达CAR分子的细胞的施用相关的副作用的活性剂(例如本文所述活性剂)组合施用。

[0367] 在一个实施方案中,表达CAR分子(例如本文所述CAR分子)的细胞与治疗与本文所述癌症相关抗原相关的疾病的活性剂(例如本文所述活性剂)组合施用。

[0368] 在一个实施方案中,对有需要的个体施用例如本文所述表达两种或多种CAR分子的细胞来治疗癌症。在一个实施方案中,对有需要的个体施用包含例如本文所述表达CAR的细胞的细胞群体来治疗癌症。

[0369] 在一个实施方案中,按本文所述剂量和/或给药方案施用表达CAR分子(例如本文所述CAR分子)的细胞。

[0370] 在一个实施方案中,例如用体外转录将CAR分子引入免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞),个体(例如人)接受包含CAR分子的细胞的初次施用,及包含CAR分子的细胞的一次或多次后续施用,其中该一次或多次后续施用在前一次施用后不到15天(例如14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3或2天)施用。在一个实施方案中,每周对个体(例如人)施用一次以上包含CAR分子的细胞的施用,例如每周施用2、3或4次包含CAR分子的细胞的施用。在一个实施方案中,个体(例如人个体)每周接受一次以上包含CAR分子的细胞的施用(例如每周2、3或4次施用)(本文中也称为周期),然后一周无包含CAR分子的细胞的施用,然后对个体施用一次或多次附加的包含CAR分子的细胞的施用(例如每周一次以上包含CAR分子的细胞的施用)。在另一实施方案中,个体(例如人个体)接受一个以上周期的包含CAR分子的细胞,每个周期之间的时间少于10、9、8、7、6、5、4或3天。在一个实施方案中,包含CAR分子的细胞每两天施用,每周3次施用。在一个实施方案中,包含CAR分子的细胞施用至少2、3、4、5、6、7、8或更多周。

[0371] 在一个实施方案中,表达CAR分子(例如本文所述CAR分子)的细胞作为疾病例如癌

症(例如本文所述癌症)的一线治疗施用。在另一实施方案中,表达CAR分子(例如本文所述CAR分子)的细胞作为疾病例如癌症(例如本文所述癌症)的二线、三线、四线治疗施用。

[0372] 在一个实施方案中,施用本文所述细胞群体。

[0373] 在另一方面,本发明涉及编码本发明的CAR的分离的核酸分子、本发明的CAR的分离的多肽分子、包含本发明的CAR的载体、及包含本发明的CAR的细胞,其用作药物。

[0374] 在另一方面,本发明涉及编码本发明的CAR的分离的核酸分子、本发明的CAR的分离的多肽分子、包含本发明的CAR的载体、及包含本发明的CAR的细胞,其用于治疗表达本文所述癌症相关抗原的疾病。

[0375] 在另一方面,本发明涉及表达本文所述CAR分子的细胞与本文所述细胞因子(例如本文所述IL-7、IL-15和/或IL-21)组合用作药物。在另一方面,本发明涉及本文所述细胞因子与表达本文所述CAR分子的细胞组合用作药物。

[0376] 在另一方面,本发明涉及表达本文所述CAR分子的细胞与本文所述激酶抑制剂和/或检验点抑制剂组合用作药物。在另一方面,本发明涉及本文所述激酶抑制剂和/或检验点抑制剂与表达本文所述CAR分子的细胞组合用作药物。

[0377] 在另一方面,本发明涉及表达本文所述CAR分子的细胞与细胞因子(例如本文所述IL-7、IL-15和/或IL-21)组合用于治疗表达CAR所靶向的肿瘤抗原的疾病。在另一方面,本发明涉及本文所述细胞因子与表达本文所述CAR分子的细胞组合用于治疗表达CAR所靶向的肿瘤抗原的疾病。

[0378] 在另一方面,本发明涉及表达本文所述CAR分子的细胞与本文所述激酶抑制剂和/或检验点抑制剂组合用于治疗表达CAR所靶向的肿瘤抗原的疾病。在另一方面,本发明涉及本文所述激酶抑制剂和/或检验点抑制剂与表达本文所述CAR分子的细胞组合用于治疗表达CAR所靶向的肿瘤抗原的疾病。

[0379] 在另一方面,本发明提供包括施用CAR分子(例如本文所述CAR分子)或包含编码CAR分子(例如本文所述CAR分子)的核酸的细胞的方法。在一个实施方案中,该个体患有本文所述障碍,例如,该个体患有癌症,例如该个体患有癌症且具有表达本文所述肿瘤支持抗原的肿瘤支持细胞。在一个实施方案中,该个体是人。

[0380] 在另一方面,本发明涉及治疗患有与本文所述肿瘤支持抗原的表达相关的疾病的个体的方法,其包括对该个体施用有效量的包含CAR分子(例如本文所述CAR分子)的细胞。

[0381] 还在另一方面,本发明涉及治疗患有与肿瘤支持抗原的表达相关的疾病的个体的方法,其包括对该个体施用有效量的包含CAR分子的细胞,例如免疫效应细胞(例如免疫效应细胞群体),其中CAR分子包含抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内结构域,该胞内结构域包含共刺激结构域和/或主信号发放结构域,其中该抗原结合结构域结合与该疾病相关的肿瘤支持抗原,例如本文所述肿瘤支持抗原。

[0382] 在另一方面,本发明涉及包含含有CAR分子(例如本文所述CAR分子)的免疫效应细胞(例如免疫效应细胞群体)的组合物,其用于治疗患有与肿瘤支持抗原的表达相关的疾病(例如本文所述障碍)的个体。

[0383] 在任意前述方法或用途中,与肿瘤支持抗原的表达相关的疾病选自增生性疾病、癌前病症、癌症和与肿瘤支持抗原的表达相关的非癌症相关适应症。在一个实施方案中,与本文所述肿瘤支持抗原相关的疾病是实体瘤。

[0384] 在本文所述方法或用途的一个实施方案中, CAR分子与另一活性剂组合施用。在一个实施方案中, 该活性剂可以是激酶抑制剂, 例如CDK4/6抑制剂、BTK抑制剂、mTOR抑制剂、MNK抑制剂或双重作用PI3K/mTOR抑制剂及其组合。在一个实施方案中, 该激酶抑制剂是CDK4抑制剂, 例如本文所述CDK4抑制剂, 例如CD4/6抑制剂, 例如6-乙酰基-8-环戊基-5-甲基-2-(5-哌嗪-1-基-吡啶-2-基氨基)-8H-吡啶并[2,3-d]嘧啶-7-酮, 盐酸(也称为palbociclib或PD0332991)。在一个实施方案中, 该激酶抑制剂是BTK抑制剂, 例如本文所述BTK抑制剂, 例如ibrutinib。在一个实施方案中, 该激酶抑制剂是mTOR抑制剂, 例如本文所述mTOR抑制剂, 如雷帕霉素、雷帕霉素类似物、OSI-027。该mTOR抑制剂可以是例如mTORC1抑制剂和/或mTORC2抑制剂, 例如本文所述mTORC1抑制剂和/或mTORC2抑制剂。在一个实施方案中, 该激酶抑制剂是MNK抑制剂, 例如本文所述MNK抑制剂, 如4-氨基-5-(4-氟苯胺基)-吡啶并[3,4-d]嘧啶。该MNK抑制剂可以是例如MNK1a、MNK1b、MNK2a和/或MNK2b抑制剂。该双重作用PI3K/mTOR抑制剂可以是例如PF-04695102。

[0385] 在本文所述方法或用途的一个实施方案中, 该激酶抑制剂是选自以下的CDK4抑制剂: aloisine A; flavopiridol或HMR-1275, 2-(2-氯苯基)-5,7-二羟基-8-[(3S,4R)-3-羟基-1-甲基-4-哌啶基]-4-chromenone; crizotinib (PF-02341066; 2-(2-氯苯基)-5,7-二羟基-8-[(2R,3S)-2-(羟甲基)-1-甲基-3-吡咯烷基]-4H-1-苯并吡喃-4-酮, 盐酸(P276-00); 1-甲基-5-[[2-[5-(三氟甲基)-1H-咪唑-2-基]-4-吡啶基]氧]-N-[4-(三氟甲基)苯基]-1H-苯并咪唑-2-胺(RAF265); indisulam (E7070); roscovitine (CYC202); palbociclib (PD0332991); dinaciclib (SCH727965); N-[5-[[[(5-叔丁基噁唑-2-基)甲基]硫]噻唑-2-基]哌啶-4-羧酰胺 (BMS 387032); 4-[[[9-氯-7-(2,6-二氟苯基)-5H-嘧啶并[5,4-d][2]苯并氮杂-2-基]氨基]-苯甲酸 (MLN8054); 5-[3-(4,6-二氟-1H-苯并咪唑-2-基)-1H-吡啶-5-基]-N-乙基-4-甲基-3-吡啶甲烷胺 (AG-024322); 4-(2,6-二氯苯甲酰胺基)-1H-吡啶-3-羧酸N-(哌啶-4-基)酰胺 (AT7519); 4-[2-甲基-1-(1-甲基乙基)-1H-咪唑-5-基]-N-[4-(甲磺酰基)苯基]-2-嘧啶胺 (AZD5438); 和XL281 (BMS908662)。

[0386] 在本文所述方法或用途的一个实施方案中, 该激酶抑制剂是CDK4抑制剂, 例如palbociclib (PD0332991), palbociclib按约每天50mg、60mg、70mg、75mg、80mg、90mg、100mg、105mg、110mg、115mg、120mg、125mg、130mg、135mg (例如75mg、100mg或125mg)的剂量施用一定时期, 例如, 28天周期中的14-21天每天施用, 或21天周期中的7-12天每天施用。在一个实施方案中, 施用1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更多个周期的palbociclib。

[0387] 在本文所述方法或用途的一个实施方案中, 该激酶抑制剂是选自ibrutinib (PCI-32765)、GDC-0834、RN-486、CGI-560、CGI-1764、HM-71224、CC-292、ONO-4059、CNX-774和LFM-A13的BTK抑制剂。在一个实施方案中, 该BTK抑制剂不降低或抑制白介素-2诱导性激酶 (ITK) 的激酶活性, 且选自GDC-0834、RN-486、CGI-560、CGI-1764、HM-71224、CC-292、ONO-4059、CNX-774和LFM-A13。

[0388] 在本文所述方法或用途的一个实施方案中, 该激酶抑制剂是BTK抑制剂, 例如ibrutinib (PCI-32765), 且ibrutinib按约每天250mg、300mg、350mg、400mg、420mg、440mg、460mg、480mg、500mg、520mg、540mg、560mg、580mg、600mg (例如250mg、420mg或560mg)的剂量施用一定时期, 例如, 21天周期每天施用, 或28天周期每天施用。在一个实施方案中, 施用1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更多个周期的ibrutinib。

[0389] 在本文所述方法或用途的一个实施方案中,该激酶抑制剂是不抑制ITK激酶活性的BTK抑制剂,如RN-486,RN-486按每天约100mg、110mg、120mg、130mg、140mg、150mg、160mg、170mg、180mg、190mg、200mg、210mg、220mg、230mg、240mg、250mg(例如150mg、200mg或250mg)的剂量施用一定时期,例如28天周期每天施用。在一个实施方案中,施用1、2、3、4、5、6、7或更多个周期的RN-486。

[0390] 在本文所述方法或用途的一个实施方案中,该激酶抑制剂是选自以下的mTOR抑制剂:temsirolimus;ridaforolimus(1R,2R,4S)-4-[(2R)-2-[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-二羟基-19,30-二甲氧基-15,17,21,23,29,35-六甲基-2,3,10,14,20-五氧-11,36-二噁-4-氮杂三环[30.3.1.0<sup>4,9</sup>]三十六碳-16,24,26,28-四烯-12-基]丙基]-2-甲氧环己基二甲基亚磷酸盐,也称为AP23573和MK8669;依维莫司(RAD001);雷帕霉素(AY22989);simapimod;(5-{2,4-双[(3S)-3-甲基吗啉-4-基]吡啶并[2,3-d]嘧啶-7-基}-2-甲氧苯基)甲醇(AZD8055);2-氨基-8-[反式-4-(2-羟乙氧基)环己基]-6-(6-甲氧基-3-吡啶基)-4-甲基-吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(8H)-酮(PF04691502);及N<sup>2</sup>-[1,4-二氧-4-[[4-(4-氧-8-苯基-4H-1-苯并吡喃-2-基)吗啉-4-基]甲氧基]丁基]-L-精氨酸甘氨酸-L-α-天冬氨酸-L-丝氨酸-,内盐(SF1126);和XL765。

[0391] 在本文所述方法或用途的一个实施方案中,该激酶抑制剂是mTOR抑制剂,例如雷帕霉素,且雷帕霉素按约每天3mg、4mg、5mg、6mg、7mg、8mg、9mg、10mg(例如6mg)的剂量施用一定时期,例如21天周期每天施用,或28天周期每天施用。在一个实施方案中,施用1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更多个周期的雷帕霉素。在一个实施方案中,该激酶抑制剂是mTOR抑制剂,例如依维莫司,且依维莫司按约每天2mg、2.5mg、3mg、4mg、5mg、6mg、7mg、8mg、9mg、10mg、11mg、12mg、13mg、14mg、15mg(例如10mg)的剂量施用一定时期,例如28天周期每天施用。在一个实施方案中,施用1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更多个周期的依维莫司。

[0392] 在本文所述方法或用途的一个实施方案中,该激酶抑制剂是选自CGP052088、4-氨基-3-(p-氟苯胺基)-吡啶并[3,4-d]嘧啶(CGP57380)、cercosporamide、ETC-1780445-2和4-氨基-5-(4-氟苯胺基)-吡啶并[3,4-d]嘧啶的MNK抑制剂。

[0393] 在本文所述方法或用途的一个实施方案中,该激酶抑制剂是选自以下的双重磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)和mTOR抑制剂:2-氨基-8-[反式-4-(2-羟乙氧基)环己基]-6-(6-甲氧基-3-吡啶基)-4-甲基-吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(8H)-酮(PF-04691502);N-[4-[[4-(二甲氨基)-1-哌啶基]羰基]苯基]-N'-[4-(4,6-二-4-吗啉基-1,3,5-三嗪-2-基)苯基]脲(PF-05212384,PKI-587);2-甲基-2-[4-[3-甲基-2-氧-8-(喹啉-3-基)-2,3-二氢-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基]苯基]丙腈(BEZ-235);apitolisib(GDC-0980,RG7422);2,4-二氟-N-{2-(甲氧基)-5-[4-(4-哒嗪基)-6-喹啉基]-3-吡啶基}苯磺酰胺(GSK2126458);8-(6-甲氧吡啶-3-基)-3-甲基-1-(4-(哌嗪-1-基)-3-(三氟甲基)苯基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-2(3H)-酮马来酸(NVP-BGT226);3-[4-(4-吗啉基吡啶并[3',2':4,5]氟[3,2-d]嘧啶-2-基]苯酚(PI-103);5-(9-异丙基-8-甲基-2-吗啉代-9H-嘌呤-6-基)嘧啶-2-胺(VS-5584,SB2343);和N-[2-[(3,5-二甲氧苯基)氨基]喹噁啉-3-基]-4-[(4-甲基-3-甲氧苯基)羰基]氨基苯磺酰胺(XL765)。

[0394] 在本文所述方法或用途的一个实施方案中,本文所述表达CAR的免疫效应细胞与蛋白质酪氨酸磷酸酶抑制剂(例如本文所述蛋白质酪氨酸磷酸酶抑制剂)组合对个体施用。

在一个实施方案中,该蛋白质酪氨酸磷酸酶抑制剂是SHP-1抑制剂,例如本文所述SHP-1抑制剂,例如葡萄糖酸锑钠。在一个实施方案中,该蛋白质酪氨酸磷酸酶抑制剂是SHP-2抑制剂。

[0395] 在本文所述方法或用途的一个实施方案中,CAR分子与另一活性剂组合施用,且该活性剂是细胞因子。该细胞因子可以是例如IL-7、IL-15、IL-21或其组合。在另一实施方案中,CAR分子与检验点抑制剂(例如本文所述检验点抑制剂)组合施用。例如,在一个实施方案中,该检验点抑制剂是选自PD-1、PD-L1、CTLA-4、TIM-3、CEACAM(例如CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、LAG-3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4和TGFR $\beta$ 的抑制性分子。

[0396] 在一个实施方案中,本发明的CAR可用于消除表达本文所述肿瘤抗原的正常细胞,从而适于用作细胞移植前的细胞调理治疗。在一方面,该表达本文所述肿瘤抗原的正常细胞是正常干细胞,该细胞移植是干细胞移植。

[0397] 治疗应用

[0398] 在另一方面,提供在个体中治疗(例如减轻或改善)过度增生性病症或障碍(例如癌症)(例如实体瘤、软组织肿瘤或转移性病灶)的方法。本文所用的术语“癌症”意在包括所有类型的癌性生长或致癌过程、转移性组织或恶性转化细胞、组织或器官,无论属于哪种组织病理学类型或处于哪个侵染阶段。实体瘤的实例包括多种器官系统的恶性肿瘤(例如肉瘤、腺癌和癌),如影响肝、肺、乳腺、淋巴、胃肠、泌尿生殖道(例如肾、泌尿道上皮细胞)、前列腺和咽的那些。腺癌包括恶性肿瘤,如大多数结肠癌、直肠癌、肾细胞癌、肝癌、非小细胞肺癌、小肠癌和食管癌。在一个实施方案中,该癌症是黑色素瘤,例如晚期黑色素瘤。前述癌症的转移性病灶也可以用本发明的方法和组合物治疗或预防。可以治疗的其他癌症的实例包括骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头或颈癌、皮肤或眼内恶性黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛区癌、胃癌、睾丸癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、食管癌、小肠癌、内分泌系统癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、慢性或急性白血病(包括急性髓细胞白血病、慢性髓细胞白血病、急性淋巴母细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病)、儿童期实体瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管发生、脊髓肿瘤、脑干胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮样癌、鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤、环境诱发癌症(包括石棉诱发的那些)及该癌症的组合。转移性癌症(例如表达PD-L1的转移性癌症)(Iwai等(2005) *Int. Immunol.* 17:133-144)的治疗可以用本文所述抗体分子进行。

[0399] 可抑制其生长的示例性癌症包括通常对免疫治疗有反应的癌症。进行治疗的癌症的非限制性实例包括黑色素瘤(例如转移性恶性黑色素瘤)、肾癌(例如透明细胞癌)、前列腺癌(例如激素难治性前列腺腺癌)、乳腺癌、结肠癌和肺癌(例如非小细胞肺癌)。此外,可以用本文所述分子治疗难治性或复发性恶性肿瘤。

[0400] 在一方面,本发明涉及用于在哺乳动物免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞)中表达的包含与启动子有效连接的CAR的载体。在一方面,本发明提供用于治疗表达本文所述癌症相关抗原的癌症的表达本发明的CAR的重组免疫效应细胞。在一方面,本发明的表达CAR的细胞能够以表达在其表面的至少一种癌症相关抗原结合肿瘤细胞,使得表达CAR的细胞靶向癌细胞并抑制癌症生长。

[0401] 在一方面,本发明涉及抑制癌症生长的方法,其包括使癌症与本发明的表达CAR的

细胞接触,使得CART响应抗原而活化,并靶向癌细胞,其中肿瘤生长被抑制。

[0402] 在一方面,本发明涉及在个体中治疗癌症的方法。该方法包括对该个体施用本发明的表达CAR的细胞,使得在该个体中治疗癌症。在一方面,与本文所述癌症相关抗原的表达相关的癌症是血液癌症。在一方面,该血液癌症是白血病或淋巴瘤。在一方面,与本文所述癌症相关抗原的表达相关的癌症包括癌症和恶性肿瘤,包括但不限于例如:一种或多种急性白血病,包括但不限于例如B细胞急性淋巴细胞白血病(“BALL”)、T细胞急性淋巴细胞白血病(“TALL”)、急性淋巴细胞白血病(ALL);一种或多种慢性白血病,包括但不限于例如慢性髓细胞白血病(CML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)。与本文所述癌症相关抗原的表达相关的其他癌症或血液病症包括但不限于例如B细胞幼淋巴细胞白血病、母细胞性浆细胞样树突细胞肿瘤、伯基特淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、多毛细胞白血病、小细胞或大细胞滤泡性淋巴瘤、恶性淋巴增生性疾病、MALT淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、多发性骨髓瘤、脊髓发育不良和脊髓发育不良综合征、非霍奇金淋巴瘤、浆母细胞淋巴瘤、浆细胞样树突细胞肿瘤、Waldenstrom巨球蛋白血症和“白血病前期”(其是通过低效骨髓血细胞产生(或发育不良)联合的各种各样的血液病症)等。此外,与本文所述癌症相关抗原表达相关的疾病包括但不限于例如与本文所述癌症相关抗原的表达相关的非典型和/或非经典癌症、恶性肿瘤、癌前病症或增生性疾病。

[0403] 在一些实施方案中,可以用本发明的表达CAR的细胞治疗的癌症是多发性骨髓瘤。通常,通过流式细胞术分析认为骨髓瘤细胞为本文所述癌症相关抗原表达阴性。因此,在一些实施方案中,可以用例如本文所述CD19 CAR来靶向骨髓瘤细胞。在一些实施方案中,本发明的CAR治疗可以与一种或多种附加治疗(例如来那度胺治疗)组合。

[0404] 本发明包括这样一类细胞治疗,其中将免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞)遗传修饰为表达嵌合抗原受体(CAR),并将表达CAR的T细胞或NK细胞输注给有需要的受体。所输注的细胞能够杀死受体中的肿瘤细胞。与抗体治疗不一样,CAR修饰的免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞)能够在体内复制,产生可导致持续肿瘤控制的长期持续存在。在多种方面,对患者施用的免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞)或其后代在对患者施用该T细胞或NK细胞后在患者中持续存在至少4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月、21个月、22个月、23个月、2年、3年、4年或5年。

[0405] 本发明还包括一类细胞治疗,其中例如通过体外转录的RNA将免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞)修饰为瞬时表达嵌合抗原受体(CAR),并将CAR T细胞或NK细胞输注给有需要的受体。所输注的细胞能够杀死受体中的肿瘤细胞。因此,在多种方面,对患者施用的免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞)在对患者施用该T细胞或NK细胞后存在至少1个月,例如3周、2周、1周。

[0406] 不希望受限于任何具体理论,CAR修饰的免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞)所引出的抗肿瘤免疫反应可以是主动或被动免疫反应,或备选地,可以由直接对间接的免疫反应引起。在一方面,CAR转导的免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞)响应表达本文所述癌症相关抗原的人癌细胞而显示特异性促炎症细胞因子分泌和有效的溶细胞活性,抵抗可溶性本文所述癌症相关抗原抑制,介导旁观者杀伤,并介导已建立的人肿瘤的消退。例如,表达本文所述癌症相关抗原的肿瘤的异源区域内的无抗原肿瘤细胞可易于由本文所述癌症相关

抗原重定向的免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞)间接破坏,该免疫效应细胞之前对邻近抗原阳性癌细胞反应。

[0407] 在一方面,本发明的全人CAR修饰的免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞)可以是用于哺乳动物中的离体免疫和/或体内治疗的一类疫苗。在一方面,该哺乳动物是人。

[0408] 对于离体免疫,在将该细胞施用于哺乳动物之前在体外发生以下中的至少一项:  
i) 扩增该细胞;ii) 将编码CAR的核酸引入该细胞;或iii) 冷冻保存该细胞。

[0409] 离体方法为本领域公知,并在下文中更充分地讨论。简言之,从哺乳动物(例如人)分离细胞,并用表达本文公开的CAR的载体遗传修饰(即体外转导或转染)。然后可对哺乳动物受体施用CAR修饰的细胞来提供治疗益处。哺乳动物受体可以是人,CAR修饰的细胞对受体而言可以是自体的。备选地,细胞对受体而言可以是同种异基因的、同种同基因的或异种异基因的。

[0410] 用于离体扩增造血干细胞和祖细胞的方法描述于美国专利号5,199,942中,在此引入作为参考,可应用于本发明的细胞。其他适宜的方法为本领域已知,因此本发明不限于离体扩增细胞的任何具体方法。简言之,免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞)的离体培养和扩增包括:(1) 从外周血收获物或骨髓外植体收集来自哺乳动物的CD34+造血干细胞和祖细胞;和(2) 离体扩增这类细胞。除美国专利号5,199,942中所述的细胞生长因子外,可以将其他诸如f1t3-L、IL-1、IL-3和c-kit配体的因子用于细胞的培养和扩增。

[0411] 就离体免疫而言,除使用基于细胞的疫苗外,本发明还提供用于离体免疫来在患者中引出针对抗原的免疫反应的组合物和方法。

[0412] 通常,按本文所述活化和扩增的细胞可用于治疗和预防无免疫应答的个体中产生的疾病。具体而言,本发明的CAR修饰免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞)用于治疗与本文所述癌症相关抗原的表达相关的疾病、障碍和病症。在某些方面,本发明的细胞用于治疗处于发展与本文所述癌症相关抗原的表达相关的疾病、障碍和病症风险的患者。因此,本发明提供用于治疗或预防与本文所述癌症相关抗原的表达相关的疾病、障碍和病症的方法,其包括对有需要的个体施用治疗有效量的本发明的CAR修饰免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞)。

[0413] 在一方面,本发明的表达CAR的细胞可以用于治疗增生性疾病,如癌症或恶性肿瘤,或癌前病症,如脊髓发育不良、脊髓发育不良综合征或白血病前期。此外,与本文所述癌症相关抗原表达相关的疾病包括但不限于例如表达本文所述癌症相关抗原的非典型和/或非经典癌症、恶性肿瘤、癌前病症或增生性疾病。与本文所述癌症相关抗原的表达相关的非癌症相关适应症包括但不限于自身免疫病(例如狼疮)、炎性障碍(变态反应和哮喘)和移植。

[0414] 本发明的CAR修饰免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞)可以单独施用,或作为与稀释剂和/或与其他成分(如IL-1或其他细胞因子或细胞群体)组合的药物组合物施用。

[0415] 血液癌症

[0416] 血液癌症病症是一类影响血液、骨髓和淋巴系统的癌症,如白血病、淋巴瘤和恶性淋巴增生性病症。

[0417] 白血病可分类为急性白血病和慢性白血病。急性白血病可进一步分类为急性髓细胞白血病(AML)和急性淋巴细胞白血病(ALL)。慢性白血病包括慢性髓细胞白血病(CML)和

慢性淋巴细胞白血病 (CLL)。其他相关病症包括骨髓发育不良综合征 (MDS, 之前称为“白血病前期”), 其是通过低效骨髓血细胞产生 (或发育不良) 和转化为 AML 的风险联合的各种各样的血液病症。

[0418] 淋巴瘤是从淋巴细胞发展的一组血细胞肿瘤。示例性淋巴瘤包括非霍奇金淋巴瘤和霍奇金淋巴瘤。

[0419] 本发明还提供用于抑制表达本文所述癌症相关抗原的细胞群体增殖或减少表达本文所述癌症相关抗原的细胞群体的方法, 该方法包括使包含表达本文所述癌症相关抗原的细胞的细胞群体与结合表达本文所述癌症相关抗原的细胞的本发明的表达 CAR 的 T 细胞或 NK 细胞接触。在具体方面, 本发明提供用于抑制表达本文所述癌症相关抗原的癌细胞群体增殖或减少表达本文所述癌症相关抗原的癌细胞群体的方法, 该方法包括使表达本文所述癌症相关抗原的癌细胞群体与结合表达本文所述癌症相关抗原的细胞的本发明的表达 CAR 的 T 细胞或 NK 细胞接触。在一方面, 本发明提供用于抑制表达本文所述癌症相关抗原的癌细胞群体增殖或减少表达本文所述癌症相关抗原的癌细胞群体的方法, 该方法包括使表达本文所述癌症相关抗原的癌细胞群体与结合表达本文所述癌症相关抗原的细胞的本发明的表达 CAR 的 T 细胞或 NK 细胞接触。在某些方面, 相对于阴性对照, 本发明的表达 CAR 的 T 细胞或 NK 细胞使患有髓细胞白血病或与表达本文所述癌症相关抗原的细胞相关的另一癌症的个体或其动物模型中的细胞和/或癌细胞的数量、数目、量或百分比减少至少 25%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 65%、至少 75%、至少 85%、至少 95% 或至少 99%。在一方面, 该个体是人。

[0420] 本发明还提供用于预防、治疗和/或管理与表达本文所述癌症相关抗原的细胞相关的疾病 (例如表达本文所述癌症相关抗原的血液癌症或非典型癌症) 的方法, 该方法包括对有需要的个体施用结合表达本文所述癌症相关抗原的细胞的本发明的 CAR T 细胞或 NK 细胞。在一方面, 该个体是人。与表达本文所述癌症相关抗原的细胞相关的障碍的非限制性实例包括自身免疫障碍 (例如狼疮)、炎性障碍 (如变态反应和哮喘) 和癌症 (如表达本文所述癌症相关抗原的血液癌症或非典型癌症)。

[0421] 本发明还提供用于预防、治疗和/或管理与表达本文所述癌症相关抗原的细胞相关的疾病的方法, 该方法包括对有需要的个体施用结合表达本文所述癌症相关抗原的细胞的本发明的 CAR T 细胞或 NK 细胞。在一方面, 该个体是人。

[0422] 本发明提供用于预防与表达本文所述癌症相关抗原的细胞相关的癌症复发的方法, 该方法包括对有需要的个体施用结合表达本文所述癌症相关抗原的细胞的本发明的 CAR T 细胞或 NK 细胞。在一方面, 该方法包括, 与有效量的另一治疗组合, 对有需要的个体施用有效量的结合表达本文所述癌症相关抗原的细胞的本文所述表达 CAR 的 T 细胞或 NK 细胞。

[0423] 药物组合物和治疗

[0424] 本发明的药物组合物可以包含与一种或多种药物或生理可接受的载体、稀释剂或赋形剂组合的本文所述表达 CAR 的细胞, 例如多个表达 CAR 的细胞。这类组合物可以包含缓冲液, 如中性缓冲盐溶液、磷酸缓冲盐溶液等; 糖类, 如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇; 多肽或氨基酸, 如甘氨酸; 抗氧化剂; 螯合剂, 如 EDTA 或谷胱甘肽; 佐剂 (例如氢氧化铝); 及防腐剂。在一方面, 本发明的组合物配制用于静脉内施用。

[0425] 本发明的药物组合物可以以适合于待治疗 (预防) 的疾病的方式施用。施用的量和

频率将取决于诸如患者的病症、患者疾病的类型和严重度的因素,但适当的剂量可通过临床试验确定。

[0426] 在一个实施方案中,该药物组合物基本不含(例如无可检测水平的)例如选自以下的污染物:内毒素、支原体、有复制能力的慢病毒(RCL)、p24、VSV-G核酸、HIV gag、残留抗CD3/抗CD28包被小球、小鼠抗体、合并人血清、牛血清白蛋白、牛血清、培养基成分、载体包装细胞或质粒成分、细菌和真菌。在一个实施方案中,该细菌是选自以下的至少一种:粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis*)、白假丝酵母(*Candida albicans*)、大肠杆菌、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenza*)、脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitides*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumonia*)和酿脓链球菌A组(*Streptococcus pyogenes* group A)。

[0427] 在指出“治疗有效量”、“抗肿瘤有效量”、“肿瘤抑制有效量”或“治疗量”时,本发明的组合物的精确量可以由医生考虑年龄、体重、肿瘤大小、感染或转移程度和患者(个体)病症的个体差异来确定。一般可以说,包含本文所述免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞)的药物组合物可以按 $10^4$ 至 $10^9$ 细胞/kg体重(在一些情况下为 $10^5$ 至 $10^6$ 细胞/kg体重,包括那些范围内的所有整数值)的剂量施用。T细胞组合物还可以按这些剂量施用多次。该细胞可以通过使用免疫治疗中公知的输注技术来施用(参见例如Rosenberg等, *New Eng. J. of Med.* 319:1676, 1988)。

[0428] 在某些方面,可以希望对个体施用活化免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞),然后再次抽血(或进行单采血液成分术),按照本发明活化从其获得的免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞),用这些活化和扩增免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞)再次输注患者。此过程可以每几周进行多次。在某些方面,可以从10cc至400cc的抽血活化免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞)。在某些方面,从20cc、30cc、40cc、50cc、60cc、70cc、80cc、90cc或100cc的抽血活化免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞)。

[0429] 对个体施用组合物可以以任意方便的方式进行,例如通过气雾剂吸入、注射、摄入、输液、植入或移植。本文所述组合物可以经动脉、皮下、皮内、肿瘤内、结节内、髓内、肌内、通过静脉(i.v.)注射、或腹腔内对患者施用。在一方面,本发明的T细胞组合物通过皮内或皮下注射对患者施用。在一方面,本发明的T细胞组合物通过静脉注射施用。免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞)的组合物可以直接注射入肿瘤、淋巴结或感染部位。

[0430] 在一个具体的实例性方面,患者可以进行白细胞去除,其中离体收集、富集或排除白细胞,已选择和/或分离目的细胞,例如T细胞。这些T细胞分离物可以通过本领域已知的方法扩增,并这样处理,使得可以引入本发明的一个或多个CAR构建体,从而产生本发明的CAR T细胞。有需要的个体随后可以进行高剂量化疗的标准治疗,然后移植外周血干细胞。在某些方面,移植后或与移植同时,个体接受本发明的扩增的CAR T细胞输注。在另一方面,扩增的细胞在手术之前或之后施用。

[0431] 待对患者施用的以上治疗的剂量将随所治疗的病症的治疗的受体的确切性质而变。可以按照本领域接受的实践进行用于人施用的剂量的缩放。对于成分患者,CAMPATH的剂量例如通常将在1至约100mg的范围内,通常在1至30天的时期内每天施用。优选的日剂量为每天1至10mg,但在一些情况下,可以使用每天至多40mg的更大剂量(描述于美国专利号6,120,766中)

[0432] 在一个实施方案中,例如用体外转录将CAR引入免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞),个体(例如人)接受本发明的CAR免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞)的初次施用,及本发明的CAR免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞)的一次或多次后续施用,其中该一次或多次后续施用在前一次施用后不到15天(例如14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3或2天)施用。在一个实施方案中,每周对个体(例如人)施用一次以上本发明的CAR免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞)的施用,例如每周施用2、3或4次本发明的CAR免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞)的施用。在一个实施方案中,个体(例如人)每周接受一次以上CAR免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞)施用(例如每周2、3或4次施用)(本文中也称为周期),然后一周无CAR免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞)施用,然后对个体施用一次或多次附加的CAR免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞)施用(例如每周一次以上CAR免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞)施用)。在另一实施方案中,个体(例如人)接受一个以上周期的CAR免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞),每个周期之间的时间少于10、9、8、7、6、5、4或3天。在一个实施方案中,CAR免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞)每两天施用,每周3次施用。在一个实施方案中,本发明的CAR免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞)施用至少2、3、4、5、6、7、8或更多周。

[0433] 在一方面,本发明的表达CAR的细胞用慢病毒载体(如慢病毒)产生。这样产生的细胞(例如CART)将具有稳定的CAR表达。

[0434] 在一方面,表达CAR的细胞(例如CART)用病毒载体(如 $\gamma$ 反转录病毒载体,例如本文所述 $\gamma$ 反转录病毒载体)产生。用这些载体产生的CART可具有稳定的CAR表达。

[0435] 在一方面,CART在转导后瞬时表达CAR载体4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15天。CAR的瞬时表达可通过RNA CAR载体递送来达到。在一方面,该CAR RNA通过电穿孔转导入T细胞。

[0436] 使用瞬时表达CAR免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞)(尤其是对于具有鼠scFv的CART)可在所治疗的患者中产生的潜在问题是多次施用后的过敏反应。

[0437] 不受限于此理论,认为这种过敏反应可由患者发展体液抗CAR反应(即具有抗IgE同种型的抗CAR抗体)引起。认为在暴露于抗原间断10至14天时,患者的产抗体细胞经历了从IgG同种型(不引起过敏反应)至IgE同种型的种类转换。

[0438] 如果患者在瞬时CAR治疗(如通过RNA转导产生的那些)过程期间处于产生抗CAR抗体反应的高风险,则CART输注间断不应持续超过10至14天。

[0439] 制备表达CAR的细胞的方法

[0440] 在另一方面,本发明涉及制备细胞(例如免疫效应细胞或其群体)的方法,其包括将包含编码CAR(例如本文所述CAR)的核酸的载体或编码CAR分子(例如本文所述CAR)的核酸引入(例如转导)细胞(例如本文所述T细胞或NK细胞)。

[0441] 该方法中的细胞是免疫效应细胞(例如T细胞或NK细胞或其组合)。在一些实施方案中,该方法中的细胞为diacylglycerol激酶(DGK)和/或Ikaros缺陷。

[0442] 在一些实施方案中,引入编码CAR的核酸分子包括转导包含编码CAR的核酸分子的载体,或转染编码CAR的核酸分子,其中核酸分子是体外转录的RNA。

[0443] 在一些实施方案中,该方法进一步包括:

[0444] a. 提供免疫效应细胞(例如T细胞或NK细胞)群体;和

[0445] b. 从该群体去除T调节细胞,从而提供T调节排除细胞群体;

- [0446] 其中步骤a)和b)在将编码CAR的核酸引入该群体之前进行。
- [0447] 在该方法的实施方案中,T调节细胞包含CD25+T细胞,用抗CD25抗体或其片段从细胞群体去除。抗CD25抗体或其片段可以缀合至底物,例如小球。
- [0448] 在其他实施方案中,从步骤(b)提供的T调节排除细胞群体包含不到30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的CD25+细胞。
- [0449] 还在其他实施方案中,该方法进一步包括在将编码CAR的核酸引入该群体之前从该群体去除表达不包含CD25的肿瘤抗原的细胞,以提供T调节排除和肿瘤抗原排除细胞群体。该肿瘤抗原可以选自CD19、CD30、CD38、CD123、CD20、CD14或CD11b或其组合。
- [0450] 在其他实施方案中,该方法进一步包括在将编码CAR的核酸引入该群体之前从该群体去除表达检验点抑制剂的细胞,以提供T调节排除和抑制性分子排除细胞群体。该检验点抑制剂可以选自PD-1、LAG-3、TIM3、B7-H1、CD160、P1H、2B4、CEACAM(例如CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、TIGIT、CTLA-4、BTLA和LAIR1。
- [0451] 本文公开的其他实施方案涵盖提供免疫效应细胞群体。所提供的免疫效应细胞群体可以根据CD3、CD28、CD4、CD8、CD45RA和/或CD45RO中一种或多种的表达来选择。在某些实施方案中,所提供的免疫效应细胞群体是CD3+和/或CD28+。
- [0452] 在该方法的某些实施方案中,该方法进一步包括在引入编码CAR的核酸分子后扩增细胞群体。
- [0453] 在一些实施方案中,使该细胞群体扩增8天或更短时间。
- [0454] 在某些实施方案中,使该细胞群体在培养物中扩增5天,所得到的细胞比在相同培养条件下在培养物中扩增9天的同一细胞更有效。
- [0455] 在其他实施方案中,与在相同培养条件下在培养物中扩增9天的同一细胞相比,在培养物中扩增5天的细胞群体在抗原刺激时显示细胞倍增提高至少一、二、三或四倍。
- [0456] 还在其他实施方案中,使该细胞群体在培养物中扩增5天,与在相同培养条件下在培养物中扩增9天的同一细胞相比,所得到的细胞显示更高的促炎症IFN- $\gamma$ 和/或GM-CSF水平。
- [0457] 在其他实施方案中,通过在刺激CD3/TCR复合物相关信号的活性剂和/或刺激细胞表面共刺激分子的配体存在下培养细胞来扩增细胞群体。该活性剂可以是与抗CD3抗体或其片段和/或抗CD28抗体或其片段缀合的小球。
- [0458] 在其他实施方案中,在包含一种或多种白介素的适当培养基中扩增细胞群体,如通过流式细胞术测量,其导致细胞在14天扩增期内增加至少200倍、250倍、300倍或350倍。
- [0459] 在其他实施方案中,在IL-15和/或IL-17存在下扩增细胞群体。
- [0460] 在某些实施方案中,该方法进一步包括在适当扩增期后冷冻保存细胞群体。
- [0461] 还在其他实施方案中,本文公开的制备方法进一步包括使免疫效应细胞群体与编码端粒末端转移酶亚基(例如hTERT)的核酸接触。编码端粒末端转移酶亚基的核酸可以是DNA。
- [0462] 本发明还提供产生瞬时表达外源RNA的RNA改造细胞(例如本文所述细胞,例如免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞))群体的方法。该方法包括将体外转录的RNA或合成RNA引入细胞,其中RNA包含编码本文所述CAR分子的核酸。
- [0463] 在另一方面,本发明涉及在个体中提供抗肿瘤免疫的方法,其包括对该个体施用

有效量的包含CAR分子的细胞,例如表达本文所述CAR分子的细胞。在一个实施方案中,该细胞是自体T细胞或NK细胞。在一个实施方案中,该细胞是同种异基因T细胞或NK细胞。在一个实施方案中,该个体是人。

[0464] 在一方面,本发明提供用包含编码例如本文所述CAR分子的核酸分子的载体转染或转导的自体细胞群体。在一个实施方案中,该载体是反转录病毒载体。在一个实施方案中,该载体是本文中其他地方所述的自失活慢病毒载体。在一个实施方案中,将该载体递送(例如通过转染或电穿孔)至细胞,例如T细胞或NK细胞,其中载体包含编码本文所述本发明的CAR的核酸分子,该核酸分子转录为mRNA分子,从该RNA分子翻译本发明的CAR,并表达在细胞表面。

[0465] 在另一方面,本发明提供表达CAR的细胞(例如表达CAR的免疫效应细胞(例如T细胞或NK细胞))群体。在一些实施方案中,表达CAR的细胞群体包含表达不同CAR的细胞的混合物。例如,在一个实施方案中,表达CAR的免疫效应细胞(例如T细胞或NK细胞)群体可以包含表达具有结合本文所述第一肿瘤抗原的抗原结合结构域的CAR的第一细胞,及表达具有结合本文所述第二肿瘤抗原的不同抗原结合结构域的CAR的第二细胞。作为另一实例,表达CAR的细胞群体可以包含表达含有结合本文所述肿瘤抗原的抗原结合结构域的CAR的第一细胞,及表达含有抗本文所述肿瘤抗原之外的靶标的抗原结合结构域的CAR的第二细胞。在一个实施方案中,表达CAR的细胞群体包含例如表达含有主胞内信号发放结构域的CAR的第一细胞,及表达含有第二信号发放结构域(例如共刺激信号发放结构域)的CAR的第二细胞。

[0466] 在另一方面,本发明提供细胞群体,其中该群体中的至少一个细胞表达具有结合本文所述肿瘤抗原的抗原结合结构域的CAR,第二细胞表达另一活性剂,例如增强表达CAR的细胞活性的活性剂。例如,在一个实施方案中,该活性剂可以是抑制抑制性分子的活性剂。抑制性分子的实例包括PD-1、PD-L1、CTLA-4、TIM-3、CEACAM(例如CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、LAG-3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4和TGFRB。在一个实施方案中,抑制抑制性分子的活性剂例如是本文所述分子,例如包含与为细胞提供正信号的第二多肽(例如本文所述胞内信号发放结构域)结合的第一多肽(例如抑制性分子)的活性剂。在一个实施方案中,该活性剂包含例如抑制性分子(如PD-1、LAG-3、CTLA-4、CD160、BTLA、LAIR1、TIM-3、CEACAM(例如CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、2B4和TIGIT、或这些中任一个的片段)的第一多肽,及是本文所述胞内信号发放结构域(例如包含共刺激结构域(例如,例如本文所述的41BB、CD27或CD28)和/或主信号发放结构域(例如本文所述CD3 $\zeta$ 信号发放结构域)的第二多肽。在一个实施方案中,该活性剂包含PD-1或其片段的第一多肽,及本文所述胞内信号发放结构域(例如本文所述CD28、CD27、OX40或4-1BB信号发放结构域和/或本文所述CD3 $\zeta$ 信号发放结构域)的第二多肽。

[0467] 在一个实施方案中,编码例如本文所述本发明的CAR分子的核酸分子表达为mRNA分子。在一个实施方案中,可以通过将编码希望得到的CAR的RNA分子(例如无载体序列)转染或电穿孔入细胞来产生表达本发明的遗传修饰CAR的细胞,例如免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞)。在一个实施方案中,一旦掺入即从该RNA分子翻译本发明的CAR分子,并表达在重组细胞表面。

[0468] 用于产生用于转染的mRNA的方法涉及用特别设计的引物体外转录(IVT)模板,然后加入polyA,以产生长度通常为50-2000碱基的含有3'和5'非翻译序列("UTR")(例如本文

所述3' 和/或5' UTR)、5' 帽(例如本文所述5' 帽)和/或内部核糖体进入位点(IRES)(例如本文所述IRES)、待表达的核酸和polyA尾的构建体。这样产生的RNA可以有效转染不同类型的细胞。在一个实施方案中,该模板包含CAR的序列。在一个实施方案中,通过电穿孔将RNA CAR载体转导入细胞,例如T细胞或NK细胞。

[0469] 表1中列出本发明的CAR的多种成分的一些实例的序列,其中aa代表氨基酸,na代表编码相应肽的核酸。

[0470] 表1. CAR的多种成分的序列(aa-氨基酸,na-编码相应蛋白质的核酸)

SEQ ID NO	描述	序列	对应于 huCD19
1	EF-1 启动子	CGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATC GCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGAGGGGTCGGCAAT TGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAACTGGG	100

[0471]

[0472]

		AAAGTGATGTCGTGTA ACTGGCTCCGCCTTTT CCCGAGGGT GGGGGAGAACC GTATATAAGTGCAGT AGTAGTCGCCGTGA ACGT TCTTTTTCGCAAC GGGTTTGCCGCCA GAACACAGGTAAGT G CCGTGTGTGGTTCC CGCGGGCCTGGCCT CTTTACGGGTTAT GGCCCTTGCGTGC CTTGAATTACTTCC ACCTGGCTGCAGTA CGTGATTCTTGAT CCCGAGCTTCGGGT TGGAAAGTGGGTGG G AGAGTTCGAGGCCT TGCGCTTAAGGAGC CCCTTCGCTCGT GCTTGAGTTGAGGC CTGGCCTGGGCGCT GGGGCCGCCCGC G TGCGAATCTGGTGG CACCTTCGCGCCT GTCTCGCTGCTTTC GATAAGTCTCTAG CCATTTAAATTTTT GATGACCTGCTGCG ACGCTTTTTTCTGG CAAGATAGTCTTG TAAATGCGGGGCC AA GATCTGCACACTGG TATTTTCGGTTTT TGGGCGCGGGCG G CGACGGGGCCCGT GCGTCCCAGCGCAC ATGTTTCGGCGAG G CGGGGCCTGCGAG CGCGCCACCGAGA ATCGGACGGGGG TAGTCTCAAGCTGG CCGGCCTGCTCTGG TGCCTGGCCTCGC GCCCGCGTGTATCG CCCCGCCCTGGGCG GCAAGGCTGGCC CGGTCCGGCACCAG TTGCGTGAGCGGAA AGATGGCCGCTTC CCGGCCCTGCTGC AGGGAGCTCAAAT GGAGGACGCGCG CTCGGGAGAGCGG GCGGTGAGTCA CCCCACACAAAGG AAA AGGGCCTTTCCGT CCTCAGCCGTGCT TTCATGTGACTCC AC GGAGTACCGGGCG CCGTCCAGGCACCT CGATTAGTTCTCG A GCTTTTGGAGTAC GTCGTCTT TAGGTTGGGGGG GAGGGGTT TATGCGATGGAGT TTCCCCACTGAGT GGGTGGAGACTGA AGTTAGGCCAGCT TGGCACTTGATGT AATTCTCCTTGA AATT TGCCCTTTT GAGTTGGATCTT GGTTCATTCTCA AGCCTCA GACAGTGGTTCA AAGTTTTTTTCT TCCATTCAGGTG TCGT A	
2	前导序列(aa)	MALPVTALLPLALLHAARP	13
3	前导序列(na)	ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCATGCCGCTAGACCC	54
4	CD 8 铰链(aa)	TTTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACR PAAGGAVHTRGLD FA CD	14
5	CD8 铰链 (na)	ACCACGACGCCAGC GCGCGACCACCAAC ACCGGCGCCCA CCATCGCGTCGC AGCCCTGTCCCTG CGCCAGAGCGGT G CCGGCCAGCGCG GGGGGCGCAGTGC ACACGAGGGGGCT GGACTTCGCCTGT GAT	55
6	Ig4 铰链(aa)	ESKYGPPCPPCPA PEFLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPE VTCV VVDVSDQEDPEVQ FNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTY RVVS VLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSS IEKTISKAKGQPRE PQ VYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQP ENN YKTTPPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVME AL HNHYTQKLSLSL GKM	102
7	Ig4 铰链(na)	GAGAGCAAGTACGG CCCTCCCTGCCCC CCTTGCCCTGCC CCGAGTTCTGGG CGGACCCAGCGT GTTCCCTGTTCC CCCCC AAGCCCAAGGAC ACCCTGATGATCA GACCGGACCCCG GAGG TGACCTGTGTGG TGGTGGACGTGT CCCAGGAGGACCC CGA GGTCCAGTTCA ACTGGTACGTGG ACGGCGTGGAGG TGCAC AACGCCAAGACCA AGCCCCGGGAGG AGCAGTTCAATAG CA CCTACCGGGTGG TGTCCGTGCTGAC CGTGCTGCACCAG GA CTGGCTGAACGG CAAGGAATACAAG TGTAAAGGTGTCCA ACA AGGGCCTGCCCA GCAGCATCGAGAA ACCATCAGCAAGGC CAAGGGCCAGCCT CGGGAGCCCCAG GTGTACACCCTGCC C CCTAGCCAAGAG GAGATGACCAAGA ACCAGGTGTCCCT GAC CTGCCTGGTGA AGGGCTTCTACCC CAGCGACATCGCC GTG GAGTGGGAGAG CAACGGCCAGCCC GAGAACA ACTACAAGA CCACCCCCCTGT GCTGGACAGCGAC GGCAGCTTCTTCT G TACAGCCGGCTG ACCGTGGACAAG AGCCGGTGGCAGG AGG GCAACGTCTTTAG CTGCTCCGTGATG CACGAGGCCCTGC AC AACCCTACCCAGA AGAGCCTGAGCCT GTCCCTGGGCAA GATG	103
8	IgD 铰链(aa)	RWPESPKAQASSV PTAQPQAEGSLAK ATTAPATTRNTGR GGE	47

[0473]

		EKKKEKEKEEQEERETKTPECPSTHTQPLGVYLLTPAVQDLWLR DKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSN GSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREP AAQAPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPNILLMWLE DQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPAT YTCVSHEDSRILLNASRSLEVSIVTDH	
9	IgD 铰链(na)	AGGTGGCCCGAAAGTCCCAAGGCCAGGCATCTAGTGTTCC TACTGCACAGCCCCAGGCAGAAGGCAGCCTAGCCAAAGCTA CTACTGCACCTGCCACTACGCGCAATACTGGCCGTGGCGG GGAGGAGAAGAAAAGGAGAAAAGAGAAAGAAGAACAGGAA GAGAGGGAGACCAAGACCCCTGAATGTCCATCCCATACCCA GCCGCTGGGCTCTATCTTTGACTCCCGCAGTACAGGAT TGTGGCTTAGAGATAAGGCCACCTTTACATGTTTCGTCTGG GCTCTGACCTGAAGGATGCCCATTTGACTTTGGGAGGTTGCC GGAAAGGTACCCACAGGGGGGTTGAGGAAGGGTTGCTGG AGCGCCATTCCAATGGCTCTCAGAGCCAGCACTCAAGACTC ACCCCTCCGAGATCCCTGTGGAACGCCGGGACCTCTGTAC ATGTACTCTAAATCATCTAGCCTGCCCCACAGCGTCTGAT GGCCCTTAGAGAGCCAGCCGCCAGGCACCAGTTAAGCTTA GCCTGAATCTGCTCGCCAGTAGTGATCCCCAGAGGCCGCC AGCTGGCTCTTATGCGAAGTGTCCGGCTTTAGCCCGCCAA CATCTTGCTCATGTGGCTGGAGGACCAGCGAGAAGTGAACA CCAGCGGCTTCGCTCCAGCCCGGCCCCACCCAGCCGGG TTCTACCACATTCTGGGCTGGAGTGTCTTAAGGGTCCAG CACCACCTAGCCCCAGCCAGCCACATACACCTGTGTTGTG TCCCATGAAGATAGCAGGACCCTGCTAAATGCTTCTAGGAG TCTGGAGGTTTCTACGTGACTGACCATT	48
10	GS 铰链/接头(aa)	GGGGSGGGGS	49
11	GS 铰链/接头(na)	GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC	50
12	CD8TM (aa)	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	15
13	CD8 TM (na)	ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGACTTGTGGGGTCCCT TCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACTGC	56
14	4-1BB 胞内结构域(aa)	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	16
15	4-1BB 胞内结构域(na)	AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCA TTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGT AGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACT G	60
16	CD27 (aa)	QRRKYRSNKGESPVPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPE PACSP	51
17	CD27 (na)	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAA CATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTAC CAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTC C	52
18	CD3-ζ (aa)	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGHDGLYQGLSTATKDYDALHMQALPPR	17
19	CD3-ζ (na)	AGAGTGAAGTTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACA AGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGA CGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCG GGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCT CAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGC GGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCCAGCGCCGG AGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTA CAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCC CTGCCCCCTCGC	101

[0474]

20	CD3-ζ (aa)	RVKFSRSADAPAYQQGQNLNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	43
21	CD3-ζ (na)	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACC AGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGA CGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCG GGACCCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCCT CAGGAAGGCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGC GGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGG AGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTA CAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCC CTGCCCCCTCGC	44
22	接头	GGGS	18
23	接头	GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC	50
24	PD-1 胞外结构域(aa)	pgwfidspdrpwnpptsfallvtegdnatftcsfsntsesfvlnwyrmspsnqtdklaaf pedrsqpgqdcfrvtqlpnrdfhmsvvrarrndsgtylcgaislapkaqikesraelrvt erraevptahpspsprpagqfqlv	
25	PD-1 胞外结构域(na)	cccgatggttctgactcctcgatcgccgtggaatcccccaacctctaccggcac tcttggttgactgagggcgataatcgacctcacgtgctcgttccaacacctcgaat cattcgtgctgaactggtaccgcatgagccgtcaaaccagaccgacaagctcgccg gtttccggaagatcggtcgcaaccgggacaggattgctggttccgctgactcaactgcc gaatggcagagactccacatgagcgtggtccgctagggcaaacgactccgggac ctacctgtcggagccatctcgtgctgagcctaaggcccaaatcaagagagctgagg gccgaactgagagtaccgagcagagctgaggtgccaactgcacatccatccccat cgctcggcctgccccgagttcagaccctggtc	
26	具有信号的 PD-1 CAR (aa)	malpvtallplallhaarppgwfidspdrpwnpptsfallvtegdnatftcsfsntsesfv lnwyrmspsnqtdklaafpedrsqpgqdcfrvtqlpnrdfhmsvvrarrndsgtyl aislapkaqikesraelrvterraevptahpspsprpagqfqlvttpprptpaptiasq plslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkillyifkqpfm rpvqttqeedgcscrfeeeggcclrvkfsrsadapaykqgnqlynelnlgrreeydv dkrrgrdpemggkprknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqgl statkdydalhmqalppr	
27	PD-1 CAR (na)	atggcctccctgtcactgctcctcctccctcgcactcctgctccacgcccctagacc accggatggttctggactcctggatcgcccgtggaatcccccaacctctaccggca ctcttggttgactgagggcgataatcgacctcacgtgctcgttccaacacctcga atcattcgtgctgaactggtaccgcatgagccgtcaaaccagaccgacaagctcgcc cgtttccggaagatcggtcgcaaccgggacaggattgctggttccgctgactcaactgc cgatggcagagactccacatgagcgtggtccgctagggcaaacgactccggga cctacctgtcggagccatctcgtgctgagcctaaggcccaaatcaagagagctgagg gccgaactgagagtaccgagcagagctgaggtgccaactgcacatccatccccat cgctcggcctgccccagttcagaccctggtcagaccactccggcggcggcggc accgactccggcccccaactatcgagccagccccctgctgagggcgggaagcatgc cgccctcggcggagggtgctgtgcataccggggattggacttgcacatgacatctac atttggctcctctcgggaacttggcgtgctccttctgctccctggtcataccctgtactg caagcggggtcggaaaaagcttctgtacatittcaagcagccctcatgaggcccgtgca aaccaccaggaggagcgggtgctcctcgggtccccgaagaggaagaaggagg gttgcgagctgcgctgaagtctccggagcgcgacgccccgcctataagcaggg ccagaaccagctgtacaacgaactgaacctgggacggcgggaagagtacgatgtgct ggacaagcggcggcgggacccgaaatggcgggaagcctagaagaagaaga ccctcaggaaggcctgtataacgagctgcagaaggacaagatggccgagccactc cgaaattgggatgaaggagagcggcggggaaggggacagcggcctgtac caaggactgtccaccgccaccaaggacacatagcctgcacatgcaggcccttc cccctcgc	
28	接头	(Gly-Gly-Gly-Ser) <sub>n</sub> , where n = 1-10	105
29	接头	(Gly <sub>4</sub> Ser) <sub>4</sub>	106
30	接头	(Gly <sub>4</sub> Ser) <sub>3</sub>	107
31	接头	(Gly <sub>3</sub> Ser)	108
32	PD1 CAR (aa)	pgwfidspdrpwnpptsfallvtegdnatftcsfsntsesfvlnwyrmspsnqtdklaaf pedrsqpgqdcfrvtqlpnrdfhmsvvrarrndsgtylcgaislapkaqikesraelrvt erraevptahpspsprpagqfqlvttpprptpaptiasqplslrpeacrpaaggavh rgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkillyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfee	

[0475]

33	CD19 CAR (aa) 鼠	eeggcelrvkfsrsadapaykqgnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprkrn ppeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrrgkghdglyggstaktdyldalhmqalppr MALPVTALLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCR ASQDISKYLWNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGS GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKEITVGGGG SGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTAVSGVSLPD YGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLLTIKDNSK SQVFLKMNSLQTDITAIYYCAKHYYGGSYAMDYWGQTSVT VSSSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQ QNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDLVYQGLSTATKD TYDALHMALPPR	
34	CD19 CAR (na) 鼠	atggcctaccagtgaccgcctgctcctgccgctggcctgctcctccacgcccaggc cggacatccagatgacacagactacatcctcctgctcctcctgggagacagagtca ccatcagttgacgggcaagtcaggacattagtaaatatttaaattggtatcagcagaac cagatggaactgttaaacctctgatctaccatacatcaagattacactcaggagtcctc aaggttcagtgccagtggtggaacagattattctcaccattagcaacctggagcaa gaagataatgacacttactttgccaacagggtatacgcctccgtacacgttcggagggg ggaccaagctggagatcacagtggtggtgctcggggcgggtgggtgggtgggtggg gctgctgaggtgaaactgcaggagtcaggacctggcctggtggcctcagcagag cctgctcagatgactgctcaggggtctcattaccgactatggtgtaagctggattcg ccagcctccacgaagggtctggagtgggtgggagtaataatgggtgagtaaacaca tactataatcagctcctcaatccagactgacctatcaaggacaactccaaagagccaa gtttcttaaaatgaacagctgcaaacctgatgacacagccattactactgtgccaaca ttactactcgggtgtagctatgctatggactactgggccaaggaacctcagtcaccgctc cctcaaccagcagcccagcgcgaccaccaacaccggcggccaccatcgctg cagcccctgctcctgcccagaggcgtgcccggcagcggcggggggcagtgac acgagggggctggactcgcctgtgatactacatctggcgccctggccgggactgtg gggtccttctcctgctcactggttatcacccttactgcaaacggggcagaaagaaactctg tatataatcaaacacattatgagaccagtaaacactactcaagaggaagatggctgt agctgccgatttcagagaagaagaaggagatgtgaactgagagtgaagttcagca ggagcgcagacgcccccgctacaagcagggccagaaccagctcataacagagctc aatctaggcagaagagaggagtagatgtttggacaagagacgtggccgggaccctg agatgggggaaagccgagaaggaagaacctcagggaaggcctgtacaatgaaactg cagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcagcggccg gaggggcaaggggcacgatggccttaccagggtctcagtacagccaccaaggacac ctacgacgcccctacatgaggccctgccccctgct	
35	CD19 CAR (aa) 人	MALPVTALLPLALLLHAARPEIVMTQSPATLSLSPGERATLSR ASQDISKYLWNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGS GTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGGGTKEIKGGG GSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLP DYGVSIRQPPGKLEWIGVIWGSETTYQSSLSKSRVTISKDN SKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYYGGSYAMDYWGQTL VTVSSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPF MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQ GQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPPEMGGKPRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDLVYQGLSTATK DYDALHMALPPR	
36	CD19 CAR (na) 人	atggccctccctgtcaccgcctgctcctcctgctcctcctcctccacgcccgctcggcc cgaatgtgatgaccagtcaccgcccactcttagccttaccgggtgagcgcgcaac cctgcttgacagcctccaagacatctcaaaataccttaattggtatcaacagaagccc ggacaggtcctcctcctctgatctaccacaccagccgctccattcggatccctgcca ggttcagcggtagcggatctgggaccgactacacctactatcagctcactgagcca gaggactcgtgctattctgacgaagggaaacacctgcccctacaccttggacagag gcaccaagctcagatgaaaggtggaggtggcagcggaggaggtgggtcggcgggtg gaggaagcaggtccaactccaagaagcggaccgggtcttgtaagccatcagaaa ctcttctactgactgtgagcggagtgtctctcccattacgggtgtctgtgagcag acagccaccggggaagggtctggaatggattggagtgattggggctctgagactacta	

[0476]

		ctaccaatcatccctcaagtcacgcgtcaccatctcaaaggacaactctaagaatcaggt gtcactgaaactgtcatctgtgaccgcagccgacaccgccgtgactattgcgctaagcat tactattatggcgggagctacgcaatggattactggggacagggactctgtcaccggtg ccagcaccactacccagcaccgaggccaccaccgccctctaccatcgctccca gcctctgccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcataccc ggggtctgactcgcctgcgatatctacattggccccttggtggtactgctggggctct gctgcttctactcgtatcactcttactgtaagcgggtcgggaagaagctgtgacatctt aagcaaccctcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgtcatgccg gtcccagaggagggaaggcggctcgaactgcgctgaaattcagccgcagcgc agatgtccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaattggtc ggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggaccagaaatggg cgggaagccgcgagaagaatcccaagagggcctgtacaacgagctccaaaag gataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagagg caaaggccacgacggactgtaccagggactcagaccgccaccaaggacacctatg acgctctcacatgcaggccctgccgctcgg	
--	--	--	--

[0477] 表2. 结合B细胞抗原的抗原结合结构域

[0478]

B 细胞 抗原	名称	氨基酸序列	SEQ ID NO:
CD19	huscFv1	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYH TSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQ GTKLEIKGGGGSGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSG VSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSSETTYSSSLKSRVTISKDNSKN QVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLTVTVSS	37
CD19	huscFv2	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYH TSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQ GTKLEIKGGGGSGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSG VSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSSETTYQSSSLKSRVTISKDNSK NQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLTVTVSS	38
CD19	huscFv3	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIG VIWGSSETTYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKH YGGSYAMDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEIVMTQSPAT LSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPA RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIK	39
CD19	huscFv4	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIG VIWGSSETTYQSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKH YGGSYAMDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEIVMTQSPAT LSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPA RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIK	40
CD19	huscFv5	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYH TSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQ GTKLEIKGGGGSGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSL TCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSSETTYSSSLKSRVTIS KDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGLTVTV SS	41
CD19	huscFv6	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYH TSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQ GTKLEIKGGGGSGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSL	42

[0479]

		TCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYGGSYAMDYWGQGLTVTVSS	
CD19	huscFv7	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYGGSYAMDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSDTYTLTISSLPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKEIK	43
CD19	huscFv8	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYQSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYGGSYAMDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSDTYTLTISSLPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKEIK	44
CD19	huscFv9	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSDTYTLTISSLPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKEIKGGGGSGGGGSGGGGSGVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYNSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYGGSYAMDYWGQGLTVTVSS	45
CD19	Hu scFv10	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYNSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYGGSYAMDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSDTYTLTISSLPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKEIK	46
CD19	Hu scFv11	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSDTYTLTISSLPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKEIKGGGGSGGGGSGGGGSGVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYNSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYGGSYAMDYWGQGLTVTVSS	47
CD19	Hu scFv12	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYNSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYGGSYAMDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSDTYTLTISSLPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKEIK	48
CD19	muCTL 019	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGTKEITGGGGSGGGGSGGGGSEVQLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLVGIWGSETTYNSALKSRLTIIDNSKIQVFLKMNSLQTDDEAIIYCAKHYGGSYAMDYWGQGSVTVSS	49

[0480] 以下实施例旨在说明而非限制本发明。

**实施例**

[0481] 实施例1.pCINS载体的产生

[0482] 使用源自Dull等(J.Virol.72:8463-8471,1998;在此引入作为参考)制备的pRRL.SIN载体骨架的序列,通过DNA2.0从头合成亲本慢病毒转移载体pRRL.SIN.cPPT.EF1a.EGFP.WPRE.图1中显示pCINS的特征图谱,而图2中显示该载体的限制图谱。

[0483] 在产生pCINS载体中,对亲本载体进行了以下修饰:

[0484] 1.用来自HIV-1分离株NL4-3的相应天然序列替换了5'顺式作用元件。所替换的5'顺式作用元件包括:包装信号(ψ)、与ψ相邻的部分gag序列、Rev反应元件(RRE)和围绕它的部分env序列及来自pol的中央多聚嘌呤带(cPPT)序列。

- [0485] 2. SV40和f1复制起点作为冗余部分去除以减小质粒大小。
- [0486] 3. 在顺式作用元件间引入若干限制位点以便于DNA改造。
- [0487] 4. 突变gag中限制未剪接的病毒RNA核输出的INS1抑制序列(J.Virol.71(7):4892-4903,1997;J.Virol.66(12):7176-7182,1992;每篇文献在此引入作为参考),从而减少该载体编码的病毒RNA核输出的限制。
- [0488] 5. 去除gag序列的核苷酸168之后的部分,其包含抑制序列INS2、INS3和INS4(J.Virol.68(6):3784-3793,1994;在此引入作为参考)。
- [0489] 6. 用CMV启动子替换RSV启动子,因为RSV和CMV启动子都可以用于SIN LV表达(Science 272(5259):263-267,1996;J.Virol.72(11):8463-8471,1998;每篇文献在此引入作为参考)
- [0490] pCINS-EGFP序列在下文显示并在表3中详述。如果希望,可以可选地用本领域的标准方法用另一转基因(例如编码CAR的基因)的序列替换EGFP序列。

[0491] pCINS-EGFP序列(SEQ ID NO:50)

```
gcagactagtaagcttagtaataacggtggtcattagttcatagcccatataggagttccgcgtta
cataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgac
gtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaact
gcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaat
ggcccgcctggcattatgccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtatt
[0492] agtcatcgctattaccatgctgatgcggttttggcagtacatcaatgggcgtggatagcggtttgactca
cggggattttccaagctctccacccattgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaatcaacgggact
ttccaaaatgtcgtaacaactccgccccattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacgggtgggaggtcta
tataagcagagctgggttagtgaaaccggggtctctctgggttagaccagatctgagcctgggagctctctg
gctaactaggaaccactgcttaagcctcaataaagcttgcttgagtgcttcaagtagtgtgtgcccg
```

[0493]

tctgttgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaatctctagcagt  
ggcgcccgaacagggacttgaaagcgaaagtaaagccagaggagatctctcgacgcaggactcggcttgc  
tgaagcgcgcacggcaagagggcgagggcgactggtgagtagccaaaaattttgactagcggagggc  
tagaaggagagagatgggtgagagagcgtcggatattaagcgggggagaattagataaatgggaaaaatt  
cggtaataaggccaggggaaagaagaagtaacaagctaaagcacatcgtatgggcaagcaggagctaga  
acgattcgcagttaatcctggccttttagagacatcagaaggcggcgcgtgatcttcagacctggaggag  
gcgatatgagggacaattggagaagtgaaatataaaatataaagtagtaaaaattgaaccattaggagt  
agcaccaccaaggaagagaagagtggtgcagagagaaaaagagcagtggaatttaaataggagct  
ttgttccttgggttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgcagcgtcaatgacgctgacggtaacag  
ccagacaattattgtctgatatagtgacgagcagaacaatttgctgagggctattgaggcgcaacagca  
tctgttgcaactcacagctctggggcatcaaacagctccaggcaagaatcctggctgtgaaagataccta  
aaggatcaacagctcctcctgcaggggatttgggggttgcctctggaaaactcatttgcaccactgctgtgc  
cttggaaatgctagttggagtaataaatctctggaacagatttggaataacatgacctggatggagtggga  
cagagaaattacaattacacaagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaag  
aatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtttgtggaattgggttaacataacaaattggc  
tgtggtatataaaaattatcataatgatagtaggaggccttggtaggtttaagaatagtttttgcctgtact  
ttctatagtgaatagagttaggcagggatattcaccattatcgtttcagaccacctccaatcccgagg  
ggacccgacagggccgaaggaatagaagaagaaggtggagagagagacagagacagatccattcgattag  
tgaacggatctcgacggatcgattagactgtagcccaggaatatggcagctagattgtacacatttaga  
aggaaaagttatcttggtagcagttcatgtagccagtgatataagaagcagaagtaattccagcagag  
acagggcaagaaacagcataacttctcttaaaattagcaggaagatggccagtaaaaacagtaacacag  
acaatggcagcaatttcaccagtaactacagtttaaggccgcctgttgggtgggcggggatcaagcaggaatt  
tggcatccctacaatccccaaagtcaaggagtaataagaatctatgaataaagaattaaagaaaattata  
ggacaggttaagagatcaggctgaacatcttaagacagcagtaaaaatggcagtaattcatccacaatttta  
aaagaaaaggggggattggggggtacagtgacggggaaagaatagtagacataatagcaacagacataca  
aactaaagaattacaaaaacaaattacaaaaattcaaaattttcgggtttattacagggacagcagagat  
ccagtttggctgcattgatcacgtgaggctccgggtgcccgctcagtgggcagagcgcacatcgcccacagt  
ccccgagaagttggggggaggggtcggcaattgaaccgggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaaactgg  
gaaagtgatgtcgtgactggctccgccttttcccgaggggtgggggagaaccgtatataagtgcagttag  
tcgcccgtgaacgttcttttgcgaacgggtttgccgccagaacacaggttaagtgccgtgtgtggttcccg  
cgggcctggcctctttacgggttatggcccttgcgtgccttgaattacttccacctggctgcagtacgtg  
attcttgatcccagacttcgggttggaaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgcttaaggagcccctt  
cgcctcgtgcttgagttgaggcctggcctgggcgctggggccgcgcgctgccaatctggtggcaccttcg  
cgctgtctcgctgctttcgataagtctctagccatataaaaatttttgatgacctgctgcgacgcttttt  
ttctggcaagatagtcttgtaaatgcgggccaagatctgcacactggtatttcggtttttggggccgcgg  
gcggcgacggggcccgctgcgtcccagcgcacatgctcggcgagggcggggcctgcgagcgcggccaccgag  
aatcggacgggggtagtctcaagctggcggcctgctctggtgcctggcctcgcgcgcgctgtatcgcc  
ccgcctggggcggcaaggctggcccggctcggcaccagttgcgtgagcggaaagatggccgcttcccggcc

ctgctgcagggagctcaaaatggaggacgcggcgctcgggagagcgggcggtgagtcaaacacacaaag  
gaaaagggcctttccgtcctcagccgtcgcttcatgtgactccactgagtaccgggcgccgtccaggcac  
ctcgattagttctcgagcttttggagtagctcgtctttagggtggggggaggggtttatgcgatggagt  
ttccccacactgagtgggtggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttgaatt  
tgccctttttgagtttggatcttgggtcattctcaagcctcagacagtggttcaaagttttttcttcca  
tttcagggtgctgtagatctagaggatccgccaccatggtgagcaagggcgaggagctgttaccgggggtg  
tgcccatcctggtcgagctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgaggg  
cgatgccacctacggcaagctgacctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgccctgccctggccc  
accctcgtgaccacctgacctacggcgtgcagtgttccagccgtaccccgaccacatgaagcagcacg  
acttcttcaagtccgccatgccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcttcaaggacgacggcaa  
ctacaagaccgcgcgaggtgaagttcgagggcgacacctggtgaaccgcatcgagctgaagggcatc  
gacttcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctata  
tcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaacatcgaggacggcag  
cgtgcagctcgccgaccactaccagcagaacacccccatcggcgacggccccgtgctgctgccgacaac  
cactacctgagcaccagtcgccctgagcaaacacccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctgg  
agttcgtgaccgcgcgggatcactctcggcatggacgagctgtacaagtaagtcgacaatcaacctct  
ggattacaaaatttgtgaaagattgactggtattcttaactatggtgctccttttacgctatgtggat  
gctgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttccgctatggctttcattttctcctccttataaat  
cctggttgcctgtctctttatgaggagttgtggccgcttgcaggcaacgtggcgtggtgtgactgtgtt  
tgcctgacgcaacccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgcttc  
ccctccctattgccacggcggaactcatcgccgctgcttgccttgcctgctggacaggggctcggctgt  
tgggcaactgacaattccgtggtgtgtcggggaagctgacgtcctttccatggctgctcgctgtgttgc  
cacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttccctcc  
cgcgccctgctgccggctctgcggcctcttccgctcttgccttgcctcagacgagtcggatctccc  
tttgggcgcctccccgctggaattcgagctcggtagctttaaagaccaatgacttacaaggcagctgta  
gatcttagccactttttaaagaaaaggggggactggaagggctaatcactcccaacgaagacaagatc  
tgctttttgcttactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagg  
gaaccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgcttcaagtagtggtgcccgtctgttgtgt  
gactctggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaaatctctagcagtagtagttcat  
gtcatcttattattcagtatttataacttgcaaagaaatgaatatcagagagtgagaggaacttgtttat  
tgcagcttataatggttacaataaagcaatagcatcacaattttcacaataaagcatttttttctactg  
cattctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttcatgtctggctctagctatcccgccct  
aggcaccggggaaatgtgcgcggaaccctatgtgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgc  
tcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagccatattcaacg  
ggaaacgtcgaggccgcgattaaattccaacatggatgctgatttatatgggtataaatgggctcgcgat  
aatgtcgggcaatcaggtgcgacaatctatcgcttgtatgggaagccgatgcgccagagttgtttctga  
aacatggcaaggtagcgttgccaatgatgttacagatgagatggtcagactaaactggctgacggaatt  
tatgccacttccgaccatcaagcattttatccgtactcctgatgatgcatggttactcaccactgcgatc

[0494]

cccggaaaaacagcgttccaggtattagaagaatatcctgattcaggtgaaaatattggtgatgcgctgg  
 cagtgttccctgcgccggttgcaactcgattcctgtttgtaattgtccttttaacagcgcgatcgcgctatctcg  
 cctcgctcagggcgcaatcacgaatgaataacgggttggttgatgagcagtgatcttgatgacgagcgtaat  
 ggctggcctggtgaacaagtctggaaagaaatgcataaaacttttgccattctcaccggattcagtcgtca  
 ctcatgggtgatttctcacttgataaccttatttttgacgaggggaaattaataggttgtattgatggtgg  
 acgagtcggaatcgcagaccgataaccaggatcttgccatcctatggaactgcctcggtagtcttctcct  
 tcattacagaaaacggctttttcaaaaataggattgataatcctgatatgaataaatgcagtttcatt  
 tgatgctcgatgagtttttctaactgtcagaccaagtttactcatatatacttttagattgatataaaact  
 tcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatcctttttgataatctcatgacccaaaatccctaacgt  
 gagtcttcgctccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttttc  
 tgcgcgtaatctgctgcttgcaaaacaaaaaaccaccgctaccagcgggtggtttggttgccggatcaaga  
 gctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaataactgttcttctagtg  
 tagcgcgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaatcctgt  
 taccagtggtgctgctgccagtgccgatagtcgtgtcttaccgggttgactcaagacgatagttaccgga  
 taaggcgcagcggctcgggctgaacgggggggttcgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacctacacc  
 gaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgcacgcttcccgaagggagaaaggcggacaggt  
 atccggtaagcggcaggggtcggaaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggtatct  
 ttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggcg  
 agcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacgggttctggccttttgctggccttttgctcaca  
 tgttctttcctgcttattcccctgattctgtggataaccgctattaccgcctttgagtgagctgataccgc  
 tcgcccagccgaacgaccgagcgcagcagtgatcagtgagcaggaagcgggaagagcgcaccaatcgcmaa  
 ccgctctccccgcgcgttgcccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttcccactggaaagcgg  
 gcagtgagcgcgaacgcaattaatgtgagttagctcactcattaggcaccaccaggtttacactttatgct  
 tccggctcgtatggtgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctatgacctgat  
 tacgccaagcgcgcaattaacctcactaaagggaaacaaaagctggagct

[0495]

[0496] 实施例2. pNOX载体的产生

[0497] 进一步修饰实施例1中产生的pCINS载体来产生pNOX载体。具体而言,用来自乙型肝炎病毒的PRE (HPRE) 替换pCINS中存在的土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件(PRE) (WPRE), HPRE包含乙型肝炎病毒分离株bba6完整基因组(GenBank:KP341007.1)的天然序列。WPRE存在于亲本载体中以确保转基因有效表达。但是,WPRE包含X蛋白质编码序列。X蛋白质ORF在WPRE中的存在为整合慢病毒载体提出了安全性问题。例如,X蛋白质涉及肝癌的产生(Gene Ther. 12(1):3-4,2005;在此引入作为参考)。在pNOX载体中,在X蛋白质的起始密码子中引入点突变(ATG->AGG)。因此,重组HPRE不包含X蛋白质ORF。图13中显示pNOX的特征图谱,而图14中显示该载体的限制图谱。

[0498] pNOX-EGFP序列在下文显示并在表4中详述。如果希望,可以可选地用本领域的标准方法用另一转基因(例如编码CAR的基因)的序列替换EGFP序列。

[0499] pNOX-EGFP序列(SEQ ID NO:51)

[0500]

gcagactagtaagcttagtaatacaattacgggggtcattagttcatagcccatataggagttccgcgtta  
cataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgac  
gtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaat  
gcccacttggcagtagatcaagtgtatcatatgccagtagccccctattgacgtcaatgacggtaaat  
ggcccgcctggcattatgccagtagatgaccttatgggactttcctacttggcagtagatctacgtatt  
agtcacgcctattaccatgctgatgcggttttggcagtagatcaatgggcgtggatagcggtttgactca  
cggggattttccaagtctccaccctattgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaatcaacgggact  
ttccaaaatgtcgtaacactccgcccattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacggggggaggtcta  
tataagcagagctggtttagtgaaccgggggtctctctggtagaccagatctgagcctgggagctctctg  
gctaactagggaaacctgcttaagcctcaataaagcttgccctgagtgcttcaagtagtggtgcccg  
tctgttgtgtagctctggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaaatctctagcag  
ggcggccgaacagggacttgaaagcgaagtaaaagccagaggagatctctcgacgcaggactcggcttgc  
tgaagcgcgcacggcaagagggcagggggcggcagctggtagtagcggcaaaaattttgactagcggaggc  
tagaaggagagagatgggtgagagagcgtcgggtattaagcgggggagaattagataaatgggaaaaatt  
cggtaataaggccagggggaaagaagaagtaaaagctaaagcacatcgtatgggcaagcaggagctaga  
acgattcgcagttaatcctggccttttagagacatcagaaggcggcgcgtgatcttcagacctggaggag  
gcgatagagggacaattggagaagtgaattatataaatataaagtagtaaaaattgaaccattaggagt  
agcaccaccaaggaagagaagagtggtgcagagagaaaaagagcagtggaatttaaataggagct  
ttgttccttgggttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgcagcgtcaatgacgctgacggtagcag  
ccagacaattattgtctgatatagtgacgagcagacaattttgctgagggctattgaggcgcaacagca  
tctgttgcaactcacagctctggggcatcaaacagctccaggcaagaatcctggctgtggaaagataccta  
aaggatcaacagctcctcctgcaggggatttgggggtgctctggaaaactcatttgcaccactgctgtgc  
cttggaatgctagttggagtataaatctctggaacagatttggaataacatgacctggatggagtggga  
cagagaaattaacaattacacaagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaag  
aatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtttgtggaattggtttaacataacaaattggc  
tgtggtatataaaaattattcataatgatagtaggaggcttggtaggtttaagaatagttttgctgtact  
ttctatagtgaaatagagttaggcaggatattcaccattatcgtttcagaccacctccaatcccagg  
ggacccgacaggcccgaaggaatagaagaagaaggtggagagagagacagagacagatccattcgattag  
tgaacggatctcgacggtagcatttagactgtagcccaggaatatggcagctagattgtacacatttaga  
aggaaaagttatcttggtagcagttcatgtagccagtgatataagaagcagaagtaattccagcagag  
acagggcaagaaacagcatacttctcttaaaattagcaggaagatggccagtaaaaacagtagatcacag  
acaatggcagcaatttcaccagtagctacagtttaaggccgcctgttgggtgggcggggatcaagcaggaatt  
tggcattccctacaatccccaaagtcaaggagtaataagaatctatgaataaagaattaagaaaattata

[0501]

ggacaggt aagagatcaggctgaacatcttaagacagcagtagcaaatggcagtagtattcatccacaatttta  
 aaagaaaagggggattgggggtacagtgcaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacataca  
 aactaaagaattacaaaaacaaattacaaaaattcaaaatcttcgggtttattacagggacagcagagat  
 ccagtttggtgcatgatcacgtgaggctccgggtgcccgtagtgggcagagcgcacatcgcccacagt  
 ccccgagaagttggggggaggggtcggcaattgaaccgggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaaactgg  
 gaaagtgatgtcgtgactggctccgccttttcccgaggggtgggggagaaccgtatataagtgcagt ag  
 tcgcccgtgaacgcttcttttccgcaacgggtttgccgccagaacacaggttaagtgcctgtgtggttcccg  
 cgggcctggcctctttacgggttatggccttgcgtgccttgaattacttccacctggctgcagtacgtg  
 attcttgatcccagcctcgggttggaaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgcttaaggagcccctt  
 cgcctcgtgcttgagttgagcctggcctgggcgtggggccgcgcgtgcgaatctggtggcaccttcg  
 cgcctgtctcgtgctttcgataagtctctagccatcttaaaatctttgatgacctgctgcgacgcttttt  
 ttctggcaagatagtcttgaatgcgggccaagatctgcacactggtatctcggtttttggggccgcgg  
 gcggcgacggggcccgtagcgtcccagcgcacatgctcggcgaggcggggcctgcgagcgcggccaccgag  
 aatcggacgggggtagtctcaagctggcggcctgctctggtgcctggcctcgcgcgcctgtatcgcc  
 ccgccctgggcggcaaggtggcccggtcggcaccagttgcgtgagcggaaagatggccgcttcccggcc  
 ctgctgcagggagctcaaaatggaggacgcggcgtcgggagagcgggggggtgagtcacccacacaaag  
 gaaaagggccttccgctcctcagcgcgtcgttcatgtgactccactgagtaccgggcgcctccaggcac  
 ctcgattagttctcgagcttttggagtagcgtcgtctttagggtggggggaggggttttatgcgatggagt  
 tccccacactgagtggtggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttgaatt  
 tgccctttttgagtttggatcttggttcattctcaagcctcagacagtggttcaaagttttttcttcca  
 tttcaggtgctgtagctagaggatccgccaccatggtgagcaagggcgaggagctgttaccgggggtgg  
 tgcccatcctggtcgagctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgaggg  
 cgatgccacctacggcaagctgacctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgccctgccctggccc  
 accctcgtgaccacctgacctacggcgtgcagtgcttcagcgcctaccgccaccacatgaagcagcacg  
 acttcttcaagtcggccatgccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcttcaaggacgacggcaa  
 ctacaagaccgcgcggaggtgaagttcgagggcgacaccctggtgaaccgcatcgagctgaagggcatc  
 gacttcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctata  
 tcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaacatcgaggacggcag  
 cgtgcagctcgcgaccactaccagcagaacacccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaac  
 cactacctgagcaccagtcggcctgagcaaaagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctgg  
 agttcgtgaccgcgcgggatcactctcggcatggacgagctgtacaagtaagtcgactaaacaggcct  
 attgatggaaagtatgtcaacgaattgtgggtcttttgggggttgcctgcccttttacgcaatgtggat  
 atcctgctttaatgcctttatgcatgtatacaagcaaaacaggcttttactttctcgccaacttaaa  
 ggcttttctaagtaaacagtatctgacctttaccggcttgcctcggcaacggcctggtctgtgccaaagt  
 tttgctgacgcaacccccactggttggggcttggccataggccatcagcgcagcgtggaacctttgtgt  
 ctctctgccgatccatactgcggaactcctagcgccttgttttgcctgcagcaggtctggagcgaact  
 catcgggactgacaattctgctgctctcccgaagatatacatcgtttccagggtgctaggctgtgct  
 gccactggatcctgcgcgggacgtcctttgtttacgtcccgtcggcgtgaatcccgcggacgacctt

[0502]

ccccggggccgcttggggctctaccgcccgcttctccgtctgccgtaccgaccgaccacggggcgcacctc  
tctttacgcggaactccccgtctgtgcttctcatctgccggaccgtgtgcaacttcgcttcacctctgcac  
gtcgcatggagaccaccgtgaacgcccaccggaacctgcccaaggtcttgcataagaggactcttggaact  
ttcagcaatgtcaacgaattcgagctcggtaccttaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatctt  
agccactttttaaagaaaaggggggactggaagggctaattcactcccaacgaagacaagatctgcttt  
ttgcttgtactgggtctctctggtagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaaacc  
actgcttaagcctcaataaagcttgcttgagtgcttcaagtagtggtgcccgtctgttgtgtgactct  
ggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaaatctctagcagtagtagttcatgtcatc  
ttattattcagtatttataaacttgcaaagaaatgaatatcagagagtgagaggaacttgtttattgcagc  
ttataatgggttacaataaagcaatagcatcacaatttcacaaataaagcatttttttactgcattct  
agttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggctctagctatcccgccctaggcac  
cggggaaatgtgcgcggaaccctatgtttatgtttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatga  
gacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtagagccatattcaacgggaaac  
gtcgaggccgcatataaattccaacatggatgctgatttatatgggtataaatgggctcgcgataatgtc  
gggcaatcaggtgcgacaatctatcgcttgtatgggaagccgatgcccagagttgtttctgaaacatg  
gcaaaggtagcgttgccaatgatgttacagatgagatggtcagactaaactggctgacggaatttatgcc  
acttccgaccatcaagcattttatccgtaactcctgatgatgcattggttactcaccactgcatccccgga  
aaaacagcgttccaggtattagaagaatattcctgattcaggtgaaaatattggtgatgagctggcagtg  
tccctgcgccggttgcaactcgattcctgtttgtaattgtccttttaacagcagatcgcgatattcgcctcgc  
tcagggcgcaatcacgaatgaataacgggttgggtgatgagagtgattttgatgacgagcgtaatggctgg  
cctgttgaacaagtctggaaagaaatgcataaacttttgccattctcaccggattcagtcgtaactcatg  
gtgatttctcacttgataaccttatttttgacgaggggaaattaatagggtgtattgatgttggacgag  
cggaatcgcagaccgataaccaggatcttgccatcctatggaactgcctcggtgagtttctccttcatta  
cagaaacggctttttcaaaaatattggtattgataatcctgatatgaataaattgcagtttcatttgatgc  
tcgatgagtttttctaactgtcagaccaagtttactcatatatactttagattgatttaaaacttcattt  
ttaattttaaaggatctaggtgaagatcctttttgataatctcatgaccaaatacccttaacgtgagttt  
tcgctccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatccttttttctgcgcg  
taatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgtttgccggatcaagagctacc  
aactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaataactgttcttctagtgtagccg  
tagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgctacatacctcgtctgctaatcctgttaccag  
tggtgctgccagtgccgatgaagcgtgcttaccgggttgactcaagacgatagttaccggataaggc  
gcagcggctcgggctgaacgggggggttcgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactg  
agatacctacagcgtgagctatgagaaagcgcacgcttcccgaaggagaaaggcggacaggtatccgg  
taagcggcagggctcggaaacaggagagcgcacgagggagcttccaggggaaacgcctggatctttatag  
tccctgctgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggaggccta  
tggaaaaaacgccagcaacgcggcctttttacgggttccctggccttttctgctggccttttctcacatgttct  
ttcctgcttattcccctgattctgtggataaccgattaccgcctttgagtgagctgataaccgctcgcg  
cagccgaacgaccgagcgcagcagtgagtcagtcagcagggaaagcggaaagcgcaccaatacgcacaaccgct

[0503] ctccccgcgcgcttgccgattcattaatgcagctggcagcagaggtttcccgactggaaagcgggcagtg  
 agcgcaacgcaattaatgtgagtttagctcactcatttaggcaccccaggctttacactttatgcttccggc  
 tcgtatggtgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaacagctatgacctgattacgcc  
 aagcgcgcaattaaccctcactaaagggaaacaaaagctggagct

[0504] 实施例3. 用pCINS和pNOX载体产生的病毒效价

[0505] 为了测定pCINS和pNOX慢病毒转移载体的功效,进行了一系列实验,其中用包装细胞的瞬时转染将转移载体之一引入细胞。简言之,将Expi293™细胞(ThermoFischer)按 $5 \times 10^6$ /ml (5mln/ml)的浓度200转/分钟、37°C和8%CO<sub>2</sub>、80%湿度培养在5ml Freestyle(FS)培养基中。使用3μg pNVS-MDLgp-RRE、3μg pNVS RSV Rev-Kan、0.75μg pNVS-MDG-VSVG-Kan和6μg转移载体(pCINS或pNOX),用PEIPro Transfer Reagent(PolyPlus)进行转染。转染48小时后收集病毒上清,并进行效价分析(即测量感染效价)。

[0506] 在293T细胞中,pCINS质粒转移载体产生比亲本载体产生的病毒效价高约五倍的病毒效价(图5A)。基于GFP阳性细胞的百分比评价效价。这种意料之外的强烈病毒产生可能是由于CMV启动子介导的转录在包装细胞中产生更高量的慢病毒基因组RNA(通过qRT-PCR测量),及未剪接的LV RNA由于缺乏细胞核滞留而更有效地从细胞核输出。

[0507] 与pCINS相比,pNOX转移载体能够产生相似或更高的载体效价(图5B-5D)。通过转导的293T细胞、Jurkat T细胞和原代人T细胞中的GFP表达来测量感染效价。具体而言,pNOX在293T细胞中(图5B)和在原代人T细胞中(图5D)产生与pCINS相似水平的GFP表达,但实际上相对于pCINS产生实质性更大量的表达GFP的Jurkat细胞(图5C)。

[0508] 还检查了来自慢病毒转移载体的元件基因组整合后的转基因表达水平。用pNOX或pCINS转移载体产生的病毒感染T细胞,使得病毒元件整合入T细胞基因组。与包含WPRES的慢病毒载体pCINS相比,包含HPRES的慢病毒载体pNOX产生相似水平的转基因表达(图5E)。基于之前WPRES(在pCINS中)比HPRES更有效的报道(参见例如J.Virol.72:5085-5092,1998;Gene Therapy 14,1298-1304,2007;每篇文献在此引入作为参考),这些结果令人惊奇。

[0509] 本发明包括pCINS载体,以及包含pCINS载体的部分和/或与pCINS的一个或多个序列具有同一性(例如与pCINS具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性)的序列的相关载体。可以包含在这类相关载体中的序列包括所有pCINS序列,或亚组,包括例如病毒启动子(即驱动病毒蛋白质表达的启动子)、部分gag(例如缺乏INS2、3和4,和/或包含本文所述INS1突变)、部分env、RRE、cPPT、亚基因组启动子(例如本文所述可选地包含组成型剪接供体和剪接受体位点的EF1α启动子)和PRE(可选地含有本文所述X蛋白质失活突变)(这些序列各可选地具有上文所述序列识别号)的多种组合。这类载体可以包含转基因(例如本文所述编码CAR或EGFP的基因)。

[0510] 表3.pCINS特征

特征	核酸序列	SEQ ID NO
CMV 启动子	GTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACA TAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGA CGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACG TCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTGGCAGTACATCAAGTGTAT CATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGC ATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGT ATTAGTCATCGCTATTACCATGCTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGT GGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATG GGAGTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCAAAAATGTCGTAAACAATC CGCCCAATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGCTATATAAGC AGAGCTGGTTTTAGTGAACCG	52
R	GGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGA ACCCACTGCTTAAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTC	53
U5	AAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACC CTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTTAGCAG	54
PBS	TGGCGCCCGAACAGGGAC	55
包装信号	TTGAAAGCGAAAGTAAAGCCAGAGGAGATCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTG AAGCCGCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCC <u>ACTGGTGAGT</u> ACGCCAAAAATTT GACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTCGTATTA	56
SD	ACTGGTGAGT (上文包装信号序列中的下划线所示)	57
含有突变的 INS 信号的部分 gag 序列 (来自 NL4-3)	ATGGGTGCGAGAGCGTTCGGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATAAATG GGAAAAAATTCGGTAATAAAGGCCAGGGGGAAAGAAGAAGTACAAGCT AAAGCACATCGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTCGCAGTTA ATCCTGGCCTTTTAGAGACATCAGAAG	58
NotI 限制位点	GCGGCCGC	59
部分 env 序列	TGATCTTCAGACCTGGAGGAGGCGATATGAGGGACAATTGGAGAAGT GAATTATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTTGAACCATTAGGAGTAGCAC CCACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAGAGCAGT GGGA	60
SwaI 限制位点	ATTTAAAT	61
RRE	AGGAGCTTTGTCTCTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCG TCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGATATAGTGACGAGC AGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGT CTGGGCGCATCAAACAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAG GATCAACAGCTCCT	62
SbfI 限制位点	CCTGCAGG	63
含有剪接受体 SA7 的部分 env 序列	GGATTTGGGGTTGCTCTGGAAAACCTATTTGCACCCTGCTGTGCCT TGGAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATAAC ATGACCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTT AATACACTCCTTAATTGAAGAATCGCAAAACCAGCAAGAAAAGAAATGA ACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGCAAGTTTGTGGAATTGGTT TAACATAACAAATTGGCTGTGGTATATAAAATTTTCATAATGATAGTA GGAGGCTTGGTAGGTTTAAGAATAGTTTTTGCTGTACTTTCTATAGTG AATAG <u>AGTTAGGCAGGGATATTCACCATTATCGTTTCAGAC</u> CCACCT CCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAA GGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTGATTAGTGAACGGATC	64

[0511]

[0512]

	<u>TCGACGGT</u>	
SA7	AGTTAGGCAGGGATATTCACCATTATCGTTTCAGAC	65
<i>ClaI</i> 限制位点	<u>ATCGAT</u>	66
cPPT	TAGACTGTAGCCAGGAATATGGCAGCTAGATTGTACACATTTAGAAGGAAAAAGT TATCTTGGTAGCAGTTCATGTAGCCAGTGGATATATAGAAGCAGAAGTAATTCCA GCAGAGACAGGGCAAGAAACAGCATACTTCCTCTTAAATTAGCAGGAAGATGGC CAGTAAAAACAGTACATACAGACAATGGCAGCAATTCACCAGTACTACAGTTAA GGCCGCTGTGGTGGGCGGGATCAAGCAGGAATTTGGCATTCCCTACAATCCC CAAAGTCAAGGAGTAATAGAATCTATGAATAAAGAATTAAGAAAAATTATAGGAC AGGTAAGAGATCAGGCTGAACATCTTAAGACAGCAGTACAAATGGCAGTATTCAAT CCACAATTTTAAAGAAAAAGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAAFA GTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAA AAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGCT	67
SA1	GTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGG (上文cppt序列中的下划线所示)	68
平端 <i>PstI</i> 限制位点	<u>CTGCAT</u>	69
<i>BclI</i> 限制位点	<u>TGATCA</u>	70
EF1a 启动子	CGTGAGGCTCCGGTGCCCGTFCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGA GAAGTTGGGGGAGGGTTCGGCAATTGAACCGGTGCCAGAGAAGTGGCGCGGG GTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCTTTTTCCCGAGGGTGGGG GAGAACCAGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCCGAACGGGTT TGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGGCGTGTGGTTCGCCGGGGCTGGCCTCTTT ACGGGTTATGGCCCTTCGCTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTTGA TTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCCTTGCGC TTAAGGAGCCCTTCGCCTCGTGTGTTGAGTTGAGGCCCTGGCCTGGGCGCTGGGGC CGCCGCTGCGAATCTGGTGGCAGCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTCGATAAGT CTCTAGCCATTTAAATTTTGTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGCAAGA TAGTCTTGTAATGCGGGCCAGATCTGCACACTGGTATTTCGGTTTTTGGGGCC GCGGGCGGGACGGGCCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCCGGCAGGGCGGGGCC TGCGAGCGCGCCACCGAGAATCGGACGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGC TCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCCGGTGTATCGCCCGCCCTGGCGGCAAGGCTG GCCCGTCCGGCAGCTTGCCTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGCCCTGCTG CAGGGAGCTCAAAATGGAGGACCGGGCCTCGGGAGAGCGGGCGGTGAGTCACC CACACAAAGGAAAAGGGCCCTTCCGTCCTCAGCCGTGCTTCATGTGACTCCACT GAGTACCGGGCGCCGTCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGT CGTCTTAGGTTGGGGGAGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTG GGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCCTCCTTGGAAATTT GCCCTTTTGGATTTGGATCTTGGTTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAA GTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGA	71
组成型剪接供体 (CD)	<u>CAGAACACAGGTAAGTGCCG</u> (上文P-EF1a序列中的下划线所示)	72
组成型剪接受体 (CA)	<u>TCCATTTCAAGGTGTCGTGA</u> (上文P-EF1a序列中的下划线所示)	73
<i>XbaI</i> 限制位点	<u>TCTAGA</u>	74
<i>BamHI</i> 限制位点	<u>GGATCC</u>	75
EGFP	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCATCCTGGTCCGAGC TGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGA TGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCACTGACACCACCGGAAGCTGCC GTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCTGACCTACGGCGTGCAGTGTCTCAGCC GCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGG CTACGTCACAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCACTACAAGACCCGC GCCGAGTGAAGTTCGAGGGCGACACCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCA TCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAA CAGCCACAACGCTATATCATGCGCCGACAAGCAGAAGAAGCGCATCAAGGTGAAC TTCAAGATCCGCCACAACATFCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCCTACC AGCAGAACACCCCATCGCGCAGGCCCGTGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCT GAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCAGATGGTC CTGCTGGAGTTCTGACCGCCCGCGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACA AGTAA	76

<b><i>SalI</i> 限制位点</b>	GTCTGAC	77
<b>WPRE</b>	ATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACATATG TGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATT GCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAAATCCTGGTTGCTGCTC TTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTGAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTT TGCTGACGCAACCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTGCACTCCTTTCC GGGACTTTTCGCTTTCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACATCGCCGCTGCC TTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATCCGTGGTGT GTGGGGGAGCTGAGTCTCTTCCATGGTGTGCTGCGCTGTGTGCCACCTGGATT CTGCGGGGACGCTCCTTCTGCTACGTCCTTCCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTC CTTCCCGCGGCTGCTGCCGGCTCTGCCGCTCTTCCGCGTCTTCCGCTTCCGCTC TCAGACGAGTCGGATCTCCTTTGGGCGCCTCCCGCCTG	78
<b><i>EcoRI</i> 限制位点</b>	GAATTC	80
<b><i>SacI</i> 限制位点</b>	GAGCTC	81
<b><i>KpnI</i> 限制位点</b>	GGTACC	82
<b>含有 PPT 的部分 Nef 序列</b>	CTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTT TAAAAGAAAAGGGGGG	83
<b>dU3</b>	ACTGGAAGGGCTAATTCACCTCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTTGCT TTGTACT	84
<b>R</b>	GGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAAGTAGGGA ACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCCTTGAGTGCTTC	85
<b>U5</b>	AAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACC CTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAG	86
<b>SV40 polyA</b>	AACTTGTTTATGCACTTATAATGGTTACAAAATAAAGCAATAGCATCACAAAAT TCACAAAATAAAGCATTTTTTTCACCTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCAT CAATGTATCTTATCATGTC	87
<b>nptII</b>	ATGAGCCATATTCACGGGAAACGTCGAGGCGCGGATTAATTCACACATGGATG CTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCGGGCAATCAGGTGCGAC AATCTATCGCTTGATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCGAAAACATGGC AAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAACTGGCTGA CGGAATTTATGCCACTTCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTAATCTGATGATGC ATGGTTACTCACCCTGCGATCCCGGAAAAACAGCGTTCCAGGTATTAGAAGAA TATCCTGATTCAGGTGAAAATATGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCCTGCGCCGCT TGCACCTGATTCCTGTTGTAATGTCCTTTAACAGCGATCGCGTATTTCCGCT CGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGTATTTGAT GACGAGCGTAATGGCTGGCTGTGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAACTTT TGCCATTCTCACCAGGATTCAGTCGTCATGATGATTTCTCACTTGATAACCT TATTTTGGACGAGGGGAAATTAATAGTTGTATTTGATGTTGGACGAGTCGGAATC GCAGACCGATAACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAACGCTCGGTCAGTTTCTC CTTCATTACAGAAACGGCTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAA TAAATGCAAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAA	88
<b>pUC ori</b>	AGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCA AACAAAAAACCCCGCTACCAGCGGTGGTTTGGTTGCCGGATCAAGAGCTACCA ACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCCAGCAGAGCGCAGATACCAAACTAGTTC TTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTAC ATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCCG TGCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGCTCGG GCTGAACGGGGGTTCTGTCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGA ACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGA AAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGTCGGAACAGGAGAGCGCACAGGGG AGCTTCCAGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCTGTCGGGTTTCGCCACCT CTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGGGAGCCATGAAAA AACGCCAGCAACCGG	89

[0513]

[0514] 本发明包括pNOX载体,以及包含pNOX载体的部分和/或与pNOX的一个或多个序列具有同一性(例如与pNOX具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性)的序列的相关载体。可以包含在这类相关载体中的序列包括所有pNOX序列,或亚组,包括例如病毒启动子(即驱动病毒蛋白质表达的启动子)、部分gag(例如缺乏INS2、3和4,和/或包含本文所述INS1突变)、部分env、RRE、cPPT、亚基因组启动子(例如本文所述可选地包含组成型剪接供体和剪接受体位点的EF1 $\alpha$ 启动子)和PRE(可选地含有本文所述X蛋白质失活突变)(这些序列各可选地具有上文所述序列识别号)的多种组合。这类载体可以包含转基因(例如本文所述编码CAR或EGFP的基因)。

[0515] 表4.pNOX特征

特征	核酸序列	SEQ ID NO
CMV 启动子	GTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACA TAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTGA CGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACG TCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTAT CATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGC ATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCACTTGGCAGTACATCTACGT ATTAGTCATCGCTATTACCATGCTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGT GGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATG GGAGTTTGTGGTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTC CGCCCCATTGACGCAATGGGCGGTAGCGGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGC AGAGCTGGTTAGTGAACCG	52
R	GGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGA ACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTC	53
U5	AAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACC CTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAG	54
PBS	<b>TGGCGCCCGAACAGGGAC</b>	55
包装信号	TTGAAAGCGAAAAGTAAAGCCAGAGGAGATCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTG AAGCGCGCACGGCAAGAGGGCGAGGGCGGCGG <b>ACTGGTGAGT</b> ACGCCAAAAATTTT GACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTCGGTATTA	56
SD	<b>ACTGGTGAGT</b> (上文包装信号序列中的下划线所示)	57
含有突变的 INS 信号的 部分 gag 序 列 (来自 NL4-3)	ATGGGTGCGAGAGCGTCGGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATAAATGGGAAAAA TTCGGTAATAAGGCCAGGGGAAAAGAAGAAGTACAAGCTAAAGCACATCGTATGG GCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTTCGCAGTTAATCCTGGCCTTTTAGAGACATCAG AAG	58
NotI 限制位 点	<b>GCGGCCGC</b>	59
部分 env 序 列	TGATCTTCAGACCTGGAGGAGGCGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTATA TAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAG AGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAGCAGTGGGA	60
SwaI 限制位 点	<b>ATTTAAAT</b>	61
RRE	AGGAGCTTTGTTCCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCG TCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATGTCTGATATAGTGCAGCAGC AGAACAATTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTGCAACTCACAGT CTGGGGCATCAAACAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAG GATCAACAGCTCCT	62
SbfI 限制位 点	<b>CCTGCAGG</b>	63

[0516]

含有剪接受体 SA7 的部分 env 序列	GGATTTGGGGTTGCTCTGGA <del>AACTC</del> ATTTGCACCACTGCTGTGCCT TGGAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATAAC ATGACCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTT AATACACTCCTTAATTGAAGAATCGCAAACCAGCAAGAAAAGAATGA ACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTT TAACATAACAAATTGGCTGTGGTATATAAAATTATCATAATGATAGTA GGAGGCTTGGTAGGTTAAGAATAGTTTTTGGCTGTACTTTCTATAGTG AATAG <del>AGTTAGGCAGGGATATTCACCATTATCGTTTCAGAC</del> CCACCT CCCAATCCCAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAA GGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTTCGATTAGTGAACGGATC TCGACGGT	64
SA7	<del>AGTTAGGCAGGGATATTCACCATTATCGTTTCAGAC</del>	65
<i>Clal</i> 限制位点	<del>ATCGAT</del>	66
cPPT	TAGACTGTAGCCCAGGAATATGGCAGCTAGATTGTACACATTTAGAAGGAAAAGT TATCTTGGTAGCAGTTCATGTAGCCAGTGGATATATAGAAGCAGAAGTAATTCCA GCAGAGACAGGGCAAGAAACAGCATACTTCCTCTTAAAATTAGCAGGAAGATGGC CAGTAAAAACAGTACATACAGACAATGGCAGCAATTTACCAGTACTACAGTTAA GGCCGCCCTGTTGGTGGGCGGGGATCAAGCAGGAATTTGGCATTCCCTACAATCCC CAAAGTCAAGGAGTAATAGAATCTATGAATAAAGAATTAAGAATAAATTATAGGAC AGGTAAGAGATCAGGCTGAACATCTTAAGACAGCAGTACAAATGGCAGTATTCAT CCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATA GTAGACATAATAGCAACAGACATACAAACTAAAGAATTACAAAAACAATTAACA AAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGCT	67
SA1	<del>GTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGG</del> (上文 <i>cppt</i> 序列中的下划线所示)	68
平端 <i>PstI</i> 限制位点	<del>CTGCAT</del>	69
<i>BclI</i> 限制位点	<del>TGATCA</del>	70
EF1a 启动子	CGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGA GAAGTTGGGGGAGGGTCCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGGGG GTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGACTGGCTCCGCCTTTTCCCGAGGGTGGGG GAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTT TGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTT ACGGGTTATGGCCCTTCCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGA TTCTTGATCCCAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTCGCG TTAAGGAGCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCTGGCCTGGGCGCTGGGGC CGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGT CTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGA TAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCCGGTTTTTGGGGCC GCGGGCGGCGACGGGGCCCGTCCGCTCCAGCGCACATGTTCCGGCAGGCGGGGCC TGCGAGCGCGGCCACCAGAGAATCGGACGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGCGCTGC TCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCCGGTGATCGCCCCGCCCTGGGCGCAAGGCTG GCCCGTCCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGCCCTGCTG CAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGGTACAC CACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACT GAGTACCGGGCGCCGTCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGT CGTCTTTAGGTTGGGGGAGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTG GGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAAATTT GCCCTTTTGGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAA GTTTTTTCTTCCATTTAGGTTGCTGTA	71
组成型剪接供体(CD)	<del>CAGAACACAGGTAAGTGCCG</del> (上文 P-EF1a 序列中的下划线所示)	72
组成型剪接受体(CA)	<del>TCCATTCAGGTGTCGTA</del> (上文 P-EF1a 序列中的下划线所示)	73
<i>XbaI</i> 限制位点	<del>TCTAGA</del>	74
<i>BamHI</i> 限制位点	<del>GGATCC</del>	75

[0517]

[0518]

制位点		
<b>EGFP</b>	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGC TGGACGGCGACGTAACCGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGA TGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACGGCAAGCTGCC GTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCTGACCTACGGCGTGCAGTGTCTCAGCC GCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGG CTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTCAAGGAGCAGCGCAACTACAAGACCCGC GCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCA TCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAATAAAA CAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAC TTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACC AGCAGAACACCCCCATCGGGCAGCGCCCGTGTCTGTGCCCGACAACCACTACCT GAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTC CTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACA AGTAA	<b>76</b>
<b>Sall 限制位点</b>	<b>GTCGAC</b>	<b>77</b>
<b>HPRE NoX</b>	TAAACAGGCCTATTGATTGGAAAGTATGTCAACGAATTGTGGGTCTTTTGGGGTT TGCTGCCCTTTTACGCAATGTGGATATCCTGCTTAAATGCCCTTATATGCATGT ATACAAGCAAACAGGCTTTTACTTTCTCGCCAACTTACAAGGCCTTTCTAAGTA AACAGTATCTGACCCTTTACCCCGTTGCTCGGCAACGGCCTGGTCTGTGCCAAGT GTTTGTGACGCAACCCCACTGGTTGGGGCTTGGCCATAGGCCATCAGCGCATG CGTGGAACCTTTGTGTCTCCTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTAGCCGCTT GTTTTGTCTCGCAGCAGGTCTGGAGCGAAACTCATCGGGACTGACAATCTGTCTG GCTCTCCCGCAAGTATACATCGTTTCCAGGGCTGCTAGGCTGTGTGCCAACTGG ATCCTGCGCGGGACGTCTTTGTTTACGTCCCGTCCGGCGCTGAATCCCGCGGACG ACCCCTCCCGGGGCGCTTGGGGCTCTACCGCCCGCTTCTCCGTCTGCCGTACCG ACCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGACTCCCGTCTGTGCCTTCTCAT CTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTACCTCTGCAGTTCGCATGGAGACCACCGT GAACGCCACCGGAACCTGCCAAGGTCTTGCATAAGAGGACTCTTGGACTTTCA GCAATGTCAAC  (下划线密码子是 X 蛋白质 ORF 的突变 ATG/AGG 密码子)	<b>79</b>
<b>EcoRI 限制位点</b>	<b>GAATTC</b>	<b>80</b>
<b>SacI 限制位点</b>	<b>GAGCTC</b>	<b>81</b>
<b>KpnI 限制位点</b>	<b>GGTACC</b>	<b>82</b>
含有 PPT 的部分 Nef 序列	CTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTT TAAAAGAAAAGGGGGG	<b>83</b>
<b>dU3</b>	ACTGGAAGGGCTAATTCCTCCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTTGCT TTGTACT	<b>84</b>
<b>R</b>	GGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGA ACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTC	<b>85</b>
<b>U5</b>	AAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACC CTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAG	<b>86</b>
<b>SV40 polyA</b>	AACTTGTATTATTGCAGCTTATAATGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATT TCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCAT CAATGTATCTTATCATGTC	<b>87</b>

[0519]	<p><b>nptII</b></p> <p>ATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCGAGGCCGCGATTAATTCACCATGGATG                  CTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCGGGCAATCAGGTGCGAC                  AATCTATCGCTTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGC                  AAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAAACTGGCTGA                  CGGAATTTATGCCACTTCCGACCATCAAGCATTATCCGTAATCCTGATGATGC                  ATGGTTACTCACCCTGCGATCCCGGAAAAACAGCGTTCAGGTATTAGAAGAA                  TATCCTGATTCAGGTGAAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCCTGCGCCGGT                  TGCCTCGATTCTGTTTGTAAATGTCCTTTTAAACAGCGATCGCGTATTTGCGCT                  CGCTCAGGCGCAATCAGCAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGTATTTGAT                  GACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTGAACAAGTCTGGAAAGAAAATGCATAAACTTT                  TGCCATTCTCACCAGGATTCAGTCGTCACCTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCT                  TATTTTTCAGCAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATC                  GCAGACCGATAACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAACGCTCGGTGAGTTTCTC                  CTTTATTACAGAAACGGCTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAA                  TAAATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAA</p>	88
	<p><b>pUC ori</b></p> <p>AGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCA                  AACAAAAAACACCAGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCGCGATCAAGAGCTACCA                  ACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTT                  TTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCCCTAC                  ATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCG                  TGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGG                  GCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGA                  ACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCAGGGGAGA                  AAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGG                  AGCTTCCAGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTTCGCCACT                  CTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAA                  AACGCCAGCAACGCG</p>	89

[0520] 实施例4. pNLV转移载体的产生

[0521] 进一步修饰实施例2中产生的pNOX载体以产生pNLV载体。图13和14中分别显示pNLV的特征和限制图谱。用SEQ ID NO:92中所示cPPT序列替换pNOX的cPPT元件。cPPT代表pol序列位置2698-2850(参见SEQ ID NO:92和93)。在紧靠编码转基因(例如EGFP,如表5中所示)的基因上游包含Kozak序列。最后,利用SEQ ID NO:95的野生型EF1a启动子(P-EF1a)。pNLV载体具有提高的病毒效价和改善的生物安全性特征。

[0522] 下文显示pNLV载体的序列和pNLV载体中元件的序列。在一些情况下,pNLV载体中所包含的载体骨架和元件及其部分可以用于本文所述的任意载体中。可按照本领域公知的克隆方法将载体骨架序列和功能性元件插入另一载体和/或替换另一载体的部分。

[0523] pNLV-EGFP序列在下文显示并在表5中详述。如果希望,可以可选地用本领域的标准方法用另一转基因(例如编码CAR的基因)的序列替换EGFP序列。

[0524] pNLV-EGFP序列(SEQ ID NO:90)

[0525]

GTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAAATTACGGTAA  
ATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCA  
TAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACTT  
GGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCC  
GCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGT  
CATCGCTATTACCATGCTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTGACTCA  
CGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTGGTGGCACAAAATCAACGGG  
ACTTTCCAAAATGTGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGG  
AGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGG  
GAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAG  
TAGTGTGTGCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTG  
GAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGTAAAGCCAGAGGAGATCTCT  
CGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAGTA  
CGCCAAAAATTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTGGTATTAAGC  
GGGGGAGAATTAGATAAATGGGAAAAAATTCGGTAATAAGGCCAGGGGGAAAGAAGAAGTACAAGC  
TAAAGCACATCGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTTCGAGTTAATCCTGGCCTTTAGAGAC  
ATCAGAAGCGCGCCGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGCGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAA  
TTATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCCAAAGAGAAGAGT  
GGTGCAGAGAGAAAAAGAGCAGTGGGAATTTAAATAGGAGCTTTGTTCTTGGGTTCTTGGGAGCA  
GCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGAT  
ATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAG  
TCTGGGGCATCAAACAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCT  
CCTCCTGCAGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAAACCTATTGCACTGCTGTGCCTTGGAAATGCT  
AGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATAACATGACCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAA  
TAAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAATCGCAAAACCAGCAAGAAAAGAATGAA  
CAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTAACATAACAATTGGCTGTG  
GTATATAAAATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTAAGAATAGTTTTGCTGTACTTTC  
TATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATTATCGTTTCAGACCCACCTCCCAATCCCGAGG  
GGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTG  
ATTAGTGAACGGATCTCGACGGTATCGATACTAGTACAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTAAAAG  
AAAAGGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACA  
AACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGA  
TCCACTTTGGCTGCATTGATCACGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGCAGAGCGCACATCGCCC  
ACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGG  
GGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGACTGGCTCCGCTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTA  
TATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTCGCAACGGGTTTGGCCGAGAACACAGGTAAGT  
GCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTACGGGTTATGGCCCTTGCCTGCCTTGAATTACT  
TCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTG  
AGGCCTTGCCTTAAGGAGCCCTTCGCCTCGTCTTGGATTGAGGCTGGCCTGGGCGCTGGGG  
CCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATT

[0526]

TAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGA  
TCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCA  
CATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGC  
TGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCCGCTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGG  
CTGGCCCCGGTTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAG  
CTCAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTACCCACACAAAGGAAAAGGG  
CCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCG  
ATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGCTTTAGGTTGGGGGGAGGGTTTTATGCGATGGAGTT  
TCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGAA  
TTTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTT  
CCATTTCAAGGTGTCGTGATCTAGAGGATCCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACC  
GGGTGGTGGCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGG  
CGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGC  
TGCCCGTGCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACC  
CCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCA  
CCATCTTCTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCC  
TGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAG  
CTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAG  
GTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAG  
AACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGC  
CCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCG  
GGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAGTCGACTAACAGGCCATTGATTGGAAAGTA  
TGTC AACGAATTGTGGGTCTTTTGGGGTTTGTGCCCTTTTACGCAATGTGGATATCCTGCTTTAAT  
GCCTTTATATGCATGTATAAAGCAAAACAGGCTTTTACTTTCTCGCCAACCTACAAGGCCTTTCTAA  
GTAAACAGTATCTGACCCTTACCCCGTTGCTCGGCAACGGCCTGGTCTGTGCCAAGTGTGTGCTGA  
CGCAACCCCACTGGTTGGGGCTTGGCCATAGGCCATCAGCGCATGCGTGGAACTTTGTGTCTCC  
TCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCCGCTTGTGTTGCTCGCAGCAGGTCTGGAGCGAACTC  
ATCGGGACTGACAATTCTGTCGTGCTCTCCCGCAAGTATACATCGTTTCCAGGGCTGCTAGGCTGTG  
CTGCCAACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTCCCGTCCGGCGCTGAATCCCGCGGACG  
ACCCCTCCCGGGGCGCTTGGGGCTCTACCGCCGCTTCTCCGTCTGCCGTACCGACCGACCACG  
GGCGCACCTCTCTTTACGCGGACTCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGACCGTGTGCACTTC  
GCTTACCTCTGCACGTGCGATGGAGACCACCTGAACGCCACCGGAACCTGCCCAAGGCTTGTG  
ATAAGAGGACTCTTGGACTTTCAGCAATGTCAACGAATTCGAGCTCGGTACCTTTAAGACCAATGACT  
TACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGACTGGAAGGGCTAATCACT  
CCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGTTAGACCAGATCTGAGCCTG  
GGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAA  
GTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGT  
GGAAAATCTCTAGCAGTAGTAGTTCATGTATCTTATTATTAGTATTTATAACTTGCAAAGAAATGAA  
TATCAGAGAGTGAGAGGAACCTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACA  
AATTTACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTT  
ATCATGTCTGGCTCTAGCTATCCCGCCCCTAGGCACCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTT  
TATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATA  
TTGAAAAGGAAGAGTATGAGCCATATCAACGGGAAACGTCGAGGCCGCGATTAAATTC AACATG  
GATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTGCGGCAATCAGGTGCGACAATCTATC  
GCTTGTATGGGAAGCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATG  
ATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAACTGGCTGACGGAATTTATGCCACTCCGACCATCAAGCA  
TTTTATCCGTA CTCTGATGATGCATGGTACTCACCCTGCGATCCCCGAAAAACAGCGTCCAG  
GTATTAGAAGAATATCCTGATT CAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCCTGCGCCGGT  
TGC ACTCGATTCTGTTTGTAAATTGTCCTTTAACAGCGATCGCGTATTTGCGCTCGCTCAGGCGCAA  
TCACGAATGAATAACGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTATGATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTG  
ACAAGTCTGGAAGAAATGCATAAATTTTGCCATTCTACCGGATT CAGTCGTCACTCATGGTGAT  
TTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGATTGATGTTGGACGAGTCCG  
AATCGCAGACCGATACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAACGCTCGGTGAGTTTTCTCCTTATTAC

[0527]

AGAAACGGCTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATTGCAGTTTCATTTGATGC  
TCGATGAGTTTTTCTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTT  
TTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAAATCCCTTAACGTGAGTT  
TTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGC  
GCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGGATCAAGA  
GCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAG  
TGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAAGTCTGTAGCACCAGCCTACATACCTCGCTCTGCTAAT  
CCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATA  
GTTACCGGATAAAGGCGCAGCGGTCCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGC  
GAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAG  
GGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGGAACAGGAGAGCGCAGAGGGAGCT  
TCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGA  
TTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACCGGGCCTTTTTACGG  
TTCCTGGCCTTTTGTGTCCTTTTGTGCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAA  
CCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTC  
AGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTC  
ATTAATGCAGCTGGCAGCAGAGTTTTCCCGACTGGAAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATG  
TGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGA  
ATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCGCGCAATTA  
ACCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTGCAGACTAGTAAGCTTA

[0528] 下文表4中显示存在于pNLV载体内的功能性元件。全pNLV序列的部分可以包含载体骨架序列。这类载体骨架序列可以用作和/或替换本文所述任意载体(例如pCINS、pNOX和pNLV)中的载体骨架序列或其部分。

[0529] 本发明包括pNLV载体,以及包含pNLV载体的部分和/或与pNLV的一个或多个序列具有同一性(例如与pNLV具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性)的序列的相关载体。可以包含在这类相关载体中的序列包括所有pNLV序列,或亚组,包括例如病毒启动子(即驱动病毒蛋白质表达的启动子)、部分gag(例如缺乏INS2、3和4,和/或包含本文所述INS1突变)、部分env、RRE、cPPT、亚基因组启动子(例如本文所述可选地包含组成型剪接供体和剪接受体位点的EF1 $\alpha$ 启动子)和PRE(可选地含有本文所述X蛋白质失活突变)(这些序列各可选地具有上文所述序列识别号)的多种组合。这类载体可以包含转基因(例如本文所述编码CAR或EGFP的基因)。

[0530] 表5.pNLV特征

[0531]

特征	核酸序列	来源	SEQ ID NO:
CMV 启动子/ 增强子, P- CMV	GTAATCAATTACGGGGTTCATTAGTTCATAGCCATA TATGGAGTTCCGGTTACATAACTTACGGTAAATG GCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGGCC ATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCATAGTAAC GCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGG AGTATTTACGGTAACTGCCACTTGGCAGTACAT CAAGTGATCATATGCCAAGTACGCCCTATTGA CGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATG CCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGG CAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATG CTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGE ATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCC	GenBank: KT186368.1	52

[0532]

	ACCCATTGACGTC AATGGGAGTTGTTTTGGCAC CAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAA CTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGT GTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTT AGTGAACCG		
<b>R</b>	GGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGG AGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAG CCTCAATAAAGCTTGCCCTTGAGTGCTTC	NL4-3 HIV-1 分 离株 GenBank: AF324493.1	53
<b>U5</b>	AAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGT AACTAGAGATCCCTCAGACCTTTTAGTCAGTGTG GAAATCTCTAGCAG	NL4-3 HIV-1 分 离株 GenBank: AF324493.1	54
<b>PBS</b>	<b>TGGCGCCCGAACAGGGAC</b>	NL4-3 HIV-1 分 离株 GenBank: AF324493.1	55
包装信号 <b>psi</b>	TTGAAAGCGAAAGTAAAGCCAGAGGAGATCTCTCG ACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCA AGAGGCGAGGGGCGCGC <b>ACTGGTGAGT</b> ACGCCA AAAATTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGA TGGGTGCGAGAGCGTCGGTATTA	NL4-3 HIV-1 分 离株 GenBank: AF324493.1	56
主要剪接供体 <b>SD</b>	<b>ACTGGTGAGT</b> (上文包装信号序列内的下划线所 示)		57
含有突变的 <b>INS</b> 信号的部分 <b>gag</b> 序列(来自 NL4-3)	ATGGGTGCGAGAGCGTCGGTATTAAGCGGGGGAG AATTAGATAAATGGGAAAAAATTCGGTAATAAGGC CAGGGGAAAGAAGAAGTACAAGCTAAAGCACAT CGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTTCGA GTTAATCCTGGCCTTTAGAGACATCAGAAG	修饰的来自 NL4-3 HIV-1 分 离株的序列 GenBank: AF324493.1	58
<b>NotI</b> 限制位点	<b>GCGGCCGC</b>		59
部分 <b>env</b> 序列	TGATCTTCAGACCTGGAGGAGGCGATATGAGGGA CAATTGGAGAAGTGAATTATATAAATAAAAGTAGT AAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGG CAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAGC AGTGGGA	NL4-3 HIV-1 分 离株 GenBank: AF324493.1	60
<b>SwaI</b> 限制位点	<b>ATTTAAAT</b>		61
<b>RRE</b>	AGGAGCTTTGTTCCCTGGGTTCTTGGGAGCAGCAG GAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGAC GGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGATATAGTGC AGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGC GCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCA TCAAACAGCTCCAGGCAAGAACTCTGGCTGTGGAA AGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCT	NL4-3 HIV-1 分 离株 GenBank: AF324493.1	62
<b>SbfI</b> 限制位点	<b>CCTGCAGG</b>		63
含有剪接受体 <b>SA7</b> 的部分 <b>env</b> 序列	GGATTTGGGGTTGCTCTGGAAACTCATTTGCACC ACTGCTGTGCCTTGGGAATGCTAGTTGGAGTAATAA ATCTCTGGAACAGATTTGGAATAACATGACCTGGA TGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGC TTAATACACTCCTTAATTGAAGAATCGCAAACCAG CAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGAT AAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTAACATAACA AATTGGCTGTGGTATATAAAATTATTCATAATGATA GTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAAAGAATAGTTTTGC TGTACTTTCTATAGTGAATAG <b>AGTTAGGCAGGGAT</b> <b>ATTCACCATTATCGTTTCAGACCCACCTCCCAATC</b> CCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAG AAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCAT TCGATTAGTGAACGGATCTCGACGGT	NL4-3 HIV-1 分 离株 GenBank: AF324493.1	64
<b>SA7</b>	<b>AGTTAGGCAGGGATATTCACCATTATCGTTT</b> <b>CAGAC</b> (上文 <b>env</b> 序列内的下划线所示)		65
<b>ClaI</b> 限制位点	<b>ATCGAT</b>		66
<b>SpeI</b> 限制位点	<b>ACTAGT</b>		91

<p>含有 cPPT 和剪接受体 SA1 的部分 pol 序列</p>	<p>AGTACAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAG AAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAA AGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAAACT AAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAATTT TTCGG<u>GTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCACT</u> <u>TTGG</u></p> <p>[备选地: ACAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAA AGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAG AATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAAACTAA AGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAATTTT CGG<u>GTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCACTTT</u> <u>GG</u>]</p>	<p>HIV-1 分离株 SF3 GenBank: KJ704796.1</p> <p>[NL4-3 HIV-1 分离株 GenBank: AF324493.1]</p>	<p>92</p> <p>93</p>
<p>SA1</p>	<p><u>GTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCACTTT</u> <u>GG</u> (上文 cPPT 序列中的下划线所示)</p>	<p>NL4-3 HIV-1 分离株 GenBank: AF324493.1</p>	<p>94</p>
<p>平端 PstI 限制位点</p>	<p>CTGCAT</p>		<p>69</p>
<p>BclI 限制位点</p>	<p>TGATCA</p>		<p>70</p>
<p>EF1a 启动子</p>	<p>CGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGC GCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGG AGGGGTCCGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGG TGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGT ACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGA ACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTT TTTTTCGCAACGGGTTGCCGCCAGAACACAGGT <u>AAGTGCCGTGTGTGGTCCCGCGGGCCTGGCCTC</u> <u>TTACGGGTATGGCCCTTGCCTGCCTGAATTAC</u> TTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCG AGCTTCGGGTTGGAAGTGGTGGGAGAGTTCGAG GCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTT GAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCC GCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCT CGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTT TTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAG ATAGTCTTGAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACT GGTATTTCCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACG GGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTCCGGCGAG GCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGG ACGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTG GTCCCTGGCCTCGCGCCGCGTGTATCGCCCCGC CCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCCAG TTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCC TGCTGCAGGGAGCTCAAATGGAGGACGCGGGCGC TCGGGAGAGCGGGCGGGTGAATCACCCACACAAA GGAAAAGGGCCTTTCCGTCTCAGCCGTGCTTCA TGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGC ACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCG TCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGA GTTTCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTA GGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAA TTTGCCCTTTTTGAGTTGGATCTTGGTTCATTCTC AAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCT<u>TCCA</u> <u>TTTCAGGTGTCGTGA</u></p>	<p>GenBank: HQ644134.1</p>	<p>95</p>
<p>组成型剪接供体(CD)</p>	<p><u>CAGAACACAGGTAAGTGCCG</u> (上文 P-EF1a 序列中的下划线所示)</p>		<p>72</p>
<p>组成型剪接受体(CA)</p>	<p><u>TCCATTTCAGGTGTCGTGA</u> (上文 P-EF1a 序列中的下划线所示)</p>		<p>73</p>
<p>XbaI 限制位点</p>	<p>TCTAGA</p>		<p>74</p>
<p>BamHI 限制位点</p>	<p>GGATCC</p>		<p>75</p>

[0533]

<b>Kozak 序列</b>	<b>GCCACC</b>	<b>PMCID: PMC306349</b>	<b>96</b>
<b>EGFP</b>	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGG TGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGT AAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGC GAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGA AGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCC CTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGC GTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGA AGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAA GGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTCAAGGA CGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAG TTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGC TGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACAT CCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACAACAGC CACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAA CGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACA TCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTA CCAGCAGAACACCCCCATCGGGCGACGGCCCCGTG CTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGT CCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGA TCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCC GGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGT AA	<b>GenBank: KJ697753.1</b>	<b>76</b>
<b><i>SalI</i> 限制位点</b>	<b>GTCGAC</b>		<b>77</b>
<b>修饰的 HPRE NoX</b>	TAAACAGGCCTATTGATTGAAAGTATGTCAACGA ATTGTGGGTCTTTTGGGGTTTGCTGCCCTTTTAC GCAATGTGGATATCCTGCTTTAATGCCTTTATATGC ATGTATACAAGCAAACAGGCTTTTACTTTCTCGCC AACTTACAAGGCCTTTCTAAGTAAACAGTATCTGAC CCTTTACCCCGTTGCTCGGCAACGGCCTGGTCTGT GCCAAGTGTTTGTGTCGACGCAACCCCACTGGTTG GGGCTTGGCCATAGGCCATCAGCGCATGCGTGGA ACCTTTGTGTCTCCTCTGCCGATCCATACTGCGGA ACTCCTAGCCGCTTGTGTTTGTGTCGACGAGGTCTG GAGCGAAACTCATCGGGACTGACAATTCTGTCTGTG CTCTCCCGCAAGTATACATCGTTTTCCAGGGCTGCT AGGCTGTGCTGCCAAGTGGATCCTGCGCGGGACG TCCTTTGTTTACGTCCCGTCCGGCGCTGAATCCCGC GGACGACCCCTCCCGGGGCGCTTGGGGCTCTAC CGCCCGCTTCTCCGTCTGCCGTACCGACCGACCA CGGGGCGCACCTCTCTTACGCGGACTCCCCGTC TGTGCCTTCTCATCTGCCGACCGTGTGCACTTCG CTTACCTCTGCACGTGCGATGGAGACCACCGTGA ACGCCACCGGAACCTGCCAAGGTCTTGCATAA GAGGACTCTTGACTTTTCAAGCAATGTCAAC (下划线的密码子是 X 蛋白质的突变 ATG/AGG 密码子)	<b>乙型肝炎病毒 分离株 bba6, GenBank: KP341007.1</b>	<b>79</b>
<b><i>EcoRI</i> 限制位点</b>	<b>GAATTC</b>		<b>80</b>
<b><i>SacI</i> 限制位点</b>	<b>GAGCTC</b>		<b>81</b>
<b><i>KpnI</i> 限制位点</b>	<b>GGTACC</b>		<b>82</b>
<b>含有 PPT 的部分 Nef 序列</b>	CTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGAT CTTAGCCACTTTTTAAAGAAAAGGGGGG	<b>NL4-3 HIV-1 分 离株 GenBank: AF324493.1</b>	<b>83</b>
<b>dU3</b>	ACTGGAAGGGCTAATCACTCCCAACGAAGACAAG ATCTGCTTTTTGCTTGTACT	<b>NL4-3 HIV-1 分 离株 GenBank: AF324493.1</b>	<b>84</b>
<b>R</b>	GGGTCTCTGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGG AGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAG CCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTC	<b>NL4-3 HIV-1 分 离株 GenBank: AF324493.1</b>	<b>85</b>

[0534]

U5	AAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGT AACTAGAGATCCCTCAGACCCCTTTAGTCAGTGTG GAAAATCTCTAGCAG	NL4-3 HIV-1 分 离株 GenBank: AF324493.1	86
SV40 终止和聚 腺苷酸化信号	TAGTAGTTCATGTCATCTTATTATTCAGTATTTATAA CTTGCAAAGAAATGAATATCAGAGAGTGAGAGGAA CTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAG CAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATT TTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCAT CAATGTATCTTATCATGTCTGGCTCTAGCTATCCCG CC	GenBank: KX757255.1	97
Kan-R	ATGAGCCATATTC AACGGGAAACGTCGAGGCCGC GATTAATTC AACATGGATGCTGATTATATGGGT ATAAATGGGCTCGCGATAATGTCGGGCAATCAGGT GCGACAATCTATCGCTTGTATGGGAAGCCCGATGC GCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCG TTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTA AACTGGCTGACGGAATTTATGCCACTTCCGACCAT CAAGCATTATCCGTA CTCTGATGATGCATGGTT ACTCACCCTGCGATCCCCGGAAAACAGCGTTCC AGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATA TTGTTGATGCGCTGGCAGTTCCTGCGCCGTTG CACTCGATTCTGTTTGTAAATGTCCTTTTAAACAGC GATCGCGTATTTGCGCTCGCTCAGGCGCAATCAGC AATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTG ATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTC TGAAAGAAATGCATAA ACTTTTGCCATTCTCACCG GATTCAGTCGTCATCATGGT GATTTCTCACTTGAT AACCTTATTTT GACGAGGGGAAATTAATAGTTGT ATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATA CCAGGATCTTGCCATCCTATGGA ACTGCCTCGGTG AGTTTTCTCTTCATTACAGAAACGGCTTTTTCAA AATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATTGC AGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTCTAA	通过 DNA2.0 合 成	88

[0535]

[0536] 实施例5. 用于慢病毒产生的转移载体的优化

[0537] 发展了具有更高病毒效价、增强的生物安全性特征、提高的转导效率和持久的转基因表达的改善的慢病毒转移载体系统。重新改造了许多顺式作用元件以产生pNLV转移载体骨架(图6)。为了测定编码GFP的pNLV慢病毒转移载体与编码GFP的pCINS转移载体相比的功效,进行了一系列实验,其中通过包装细胞的瞬时转染将转移载体之一引入细胞。简言之,将Expi293™细胞(ThermoFischer)按5x10<sup>6</sup>/ml的浓度200转/分钟、37℃和8%CO<sub>2</sub>、80%湿度培养在5ml Freestyle (FS) 培养基中。使用3μg pNVS-MDLgp-RRE、3μg pNVS 20RSV Rev-Kan、0.75μg pNVS-MDG-VSVG-Kan和6μg转移质粒,用PEIPro Transfer Reagent (PolyPlus)进行转染。转染48小时后收集病毒上清,并进行效价分析(即测量感染效价)。

[0538] pNLV转移载体产生了比对照亲本(即优化前)载体产生的病毒效价高约二至三倍的病毒效价(图7A)。基于病毒RNA拷贝数评价物理效价(例如通过qRT-PCR测量),基于通过前病毒整合效价测定检测的感染单位确定感染效价(图7B)。

[0539] 然后,与pCINS转移载体相比,检查了来自pNLV载体的元件基因组整合后的转基因表达水平。用pCINS或pNLV慢病毒载体产生的病毒感染T细胞,使得病毒元件整合入T细胞基因组。发现pNLV载体与pCINS相比具有更高水平的转基因表达(如通过FACS测量)(如8A-8C)。

[0540] 还就它们的相对感染效价将pNLV和pCINS载体与若干市售转移载体相比较。将每种市售载体和pCINS载体与编码GFP的对照(亲本)载体分开比较,并进一步将pCINS载体与pNLV比较。将pLVX(Clontech)转移载体转导入293T细胞并发现具有比对照载体略高的病毒效价(图9A)。将pLenti6.2(Life Technologies)转移载体转导入细胞并发现与对照载体相

比病毒效价大幅降低(图9B)。将pD2109(DNA2.0)转移载体转导入细胞并发现与对照载体相比病毒效价小幅降低(图9C)。将pCINS转移载体转导入细胞并发现病毒效价比对照载体实质性高(图9D)。还将pNLV转移载体转导入细胞并发现病毒效价比pCINS载体高(图9E)。这些结果表明,用pCINS和pNLV二者制备的病毒总体上比用市售慢病毒转移载体制备的那些显著更具感染性,用pNLV载体制备的病毒显示最高病毒效价。

[0541] 为了探究剪接对感染效价的影响,突变了一系列剪接供体和剪接受体位点用于后续病毒效价测定(图10A)。将pCINS转移载体的多种剪接供体和剪接受体位点突变体转染入包装细胞,并将一系列突变体与对照转移载体进行病毒效价比较(图10B)。所有突变都导致病毒效价大幅降低,表明剪接位点在转移载体骨架中的存在为最大病毒效价所需。这些观察结果表明,剪接位点的存在对慢病毒RNA核输出很重要。基因组慢病毒RNA从细胞核转运可需要与剪接体和Rev蛋白质的相互作用。从包装载体表达的高水平Rev蛋白质可确保保护全尺寸慢病毒RNA免受剪接并转运用于包装。

[0542] 最后,在一系列新改造的转移载体构建体中去除转移载体骨架的gag和env区,以确定gag和env元件对感染病毒效价的重要性。制备了含有3'和5' gag和env缺失的转移载体(即-gag3'、-gag5'、-env3'和-env5'突变体)(图11A),然后将每种载体转导入分开的细胞组。测定每种gag和/或env缺失突变体的病毒效价,并与对照慢病毒转移载体相比较(图11B)。发现-env3'和-gag3'-env5'突变体相对于对照载体显示病毒效价降低,而-env5'和-gag3'显示病毒效价几乎无差异。这些结果表明,可以单独改变3' gag和5' env区,对病毒效价仅有轻微影响,但其他gag和env截短有害于转移载体功效。

[0543] 实施例6.pNLV和pRRLSIN间的序列差异

[0544] 修饰pRRLSIN转移载体以产生pNLV载体。引入这些核苷酸取代和插入来改善慢病毒转移载体的功效和生物安全性特征。在一个实例中,pNLV psi序列与pRRLSIN序列相比具有以下序列差异(图12A):T771C、T784G、A785G、G788A、多核苷酸序列“GAG”(792-794)的插入、A798C和G924A。pNLV具有从907位至1074位的部分gag序列。此外,pNLV与pRRLSIN相比具有以下序列差异(图12B):以下核苷酸的插入:A968和A969(产生终止密码子),以及以下取代:G924A、A949C、A950G、G989A、G992A、C995T、G998A、C999T、G1004A、C1007T、C1010A、T1058G和G1064A。pNLV还具有从1083位至1228位的部分env序列。在此区域中,pNLV与pRRLSIN相比具有以下序列差异(图12C):C1105A。

[0545] 与pRRLSIN相比,pNLV RRE区域具有以下序列差异(图12D):G1291C、A1332G和A1414G。pNLV具有从1479位至1961位的部分env区域(包含主要剪接受体7位点)。此外,pNLV与pRRLSIN相比在此部分env区域中具有以下序列差异(图12E):A1571C、T1575C和T1866C。

[0546] pNLV具有1971位至2118位的cPPT区域,及1974位至2151位的部分pol序列(包含主要剪接受体1位点)(图12F)。在一些情况下,cPPT区包含178个核苷酸的序列。在一些情况下,与亲本载体相比,部分gag、部分env和/或部分pol序列显示与野生型病毒序列的同源性降低,从而改善生物安全性特征。此外,pNLV与pRRLSIN相比在cPPT和部分pol区域内具有以下序列差异插入:+A1971、+ACAAATGGCAG(1974-1984)、+TTCATCC(1987-1993)、+A1996、+A1997和+CGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCACTTTGG(2116-2151)。

[0547] 除cPPT区差异外,上述pNLV和pRRLSIN间的序列差异各适用于pCINS和pNOX与pRRLSIN相比。pCINS或pNOX相对于pRRLSIN间的差异的确切核苷酸位置可以通过比对本文

提供的相关序列来鉴定。

[0548] 其他实施方案

[0549] 以上说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请在此以相同的程度引入作为参考,就如同明确和单独地说明以其整体引入每一单个出版物、专利或专利申请作为参考一样。本发明的所述方法、药物组合物和试剂盒的多种修改和变形对本领域技术人员而言显而易见而不背离本发明的范围和精神。虽然已结合具体实施方案描述了本发明,但应理解它能够进一步修改,所要求的发明不应不适当地限于这类具体实施方案。实际上,对本领域技术人员而言显而易见的是,所述用于实施本发明的方式的多种修改旨在处于本发明的范围之内。本申请旨在涵盖本发明的任何变形、用途或改编,其通常遵循本发明的原理,且包括处于本发明所属领域内的已知惯例内,且可应用于前文所示基本特征的这类对本公开的偏离。

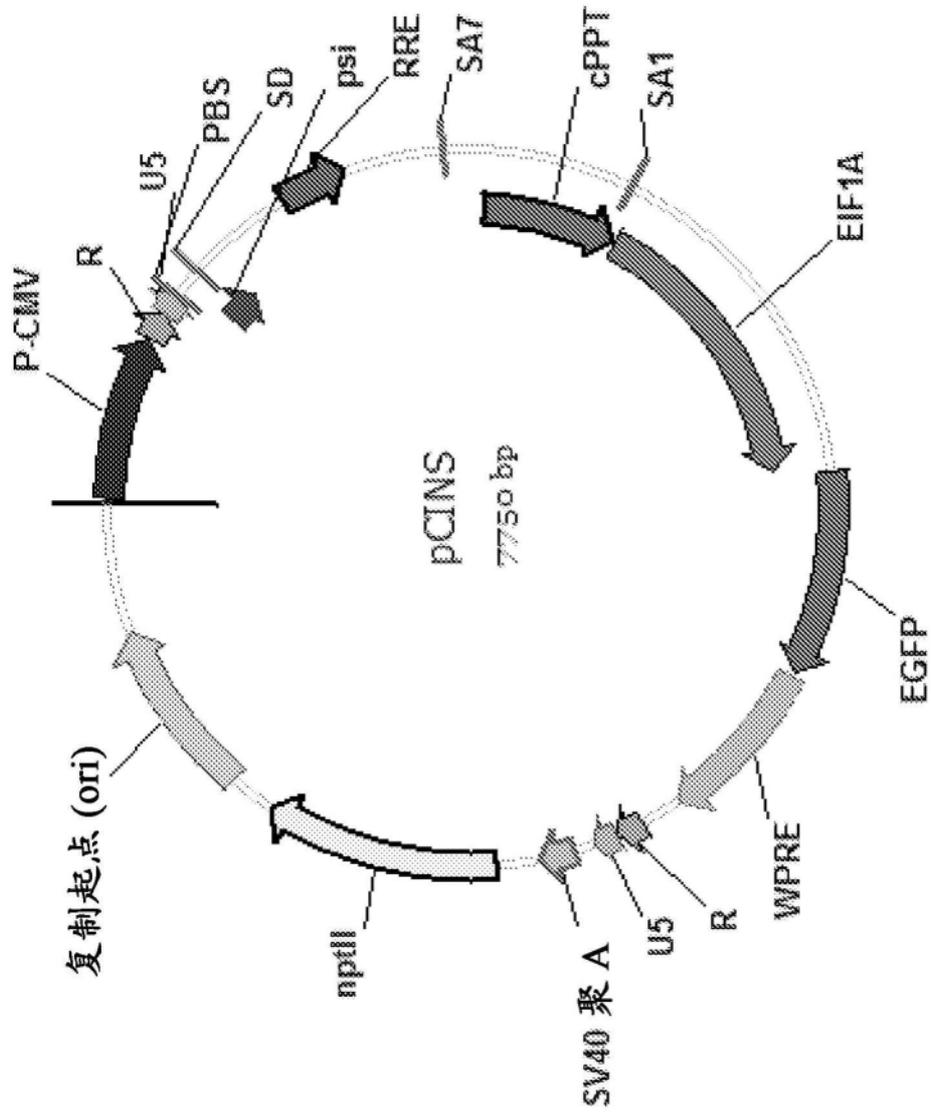


图1

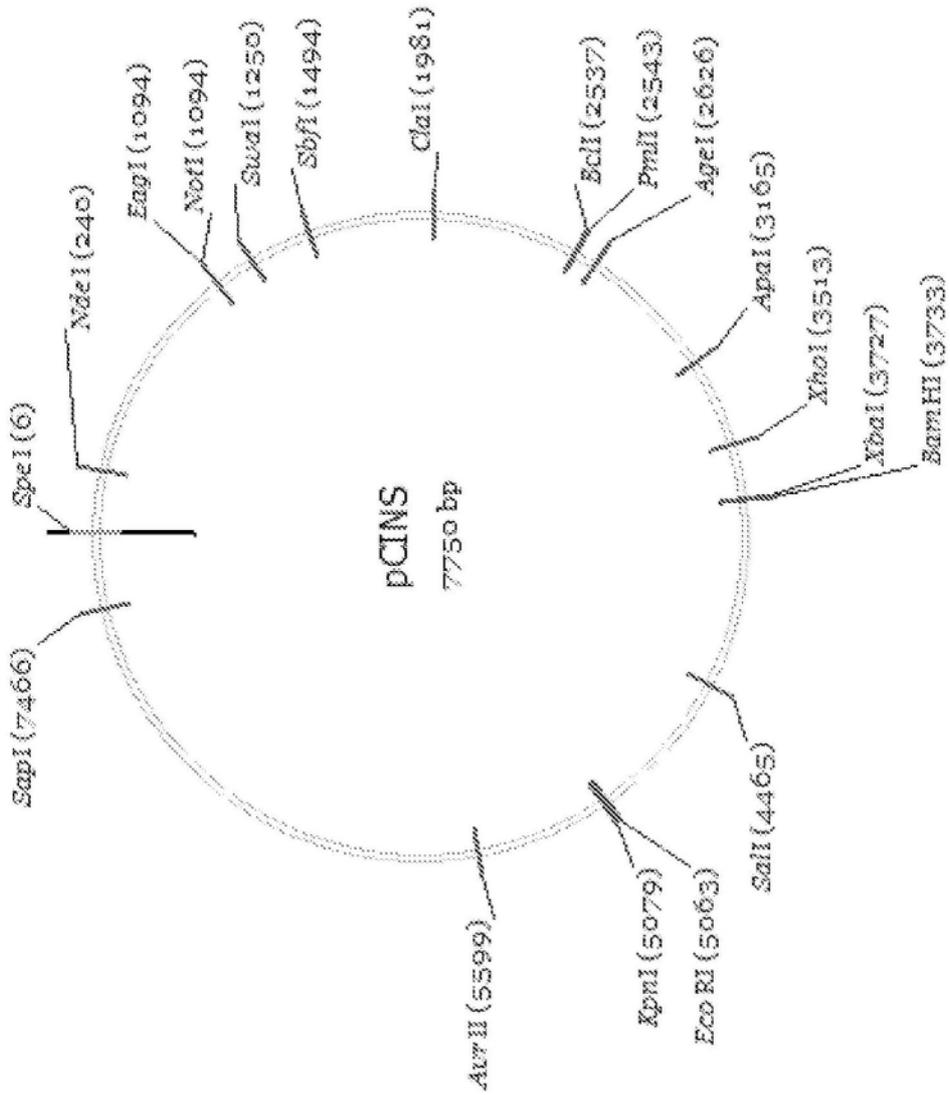


图2

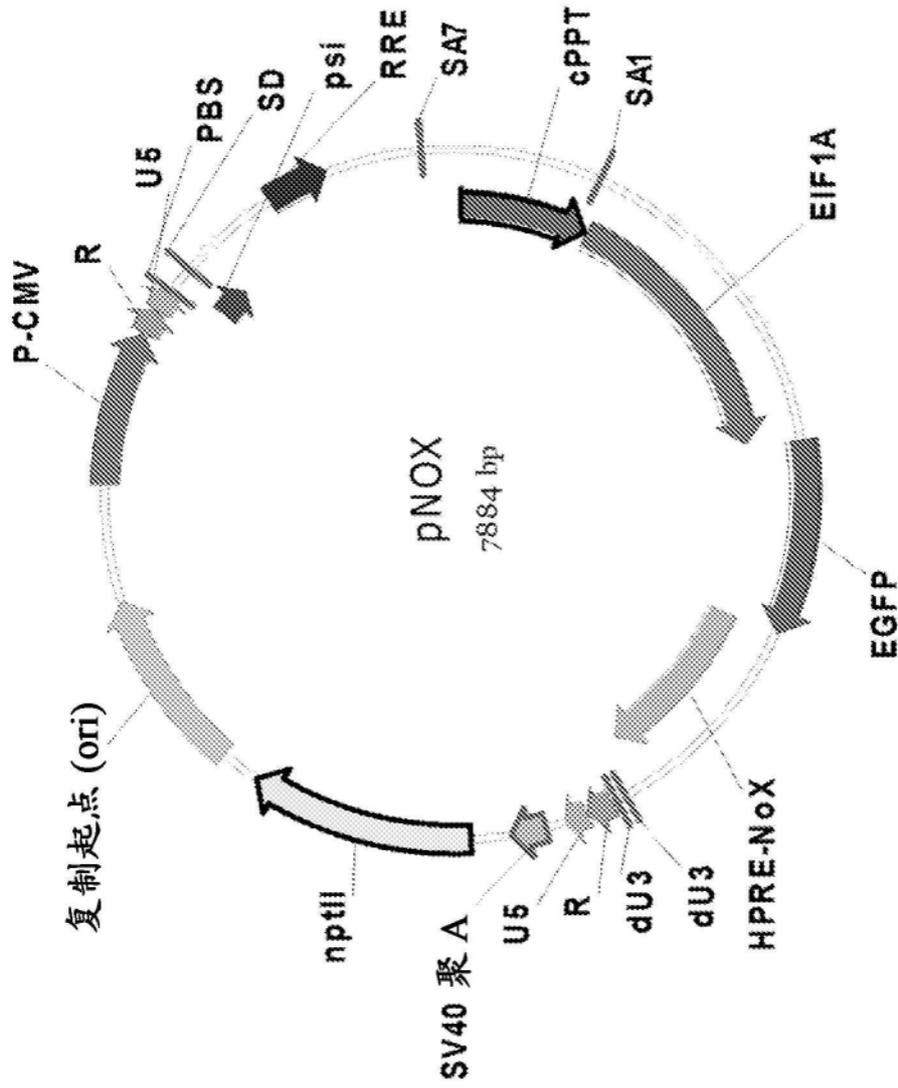


图3

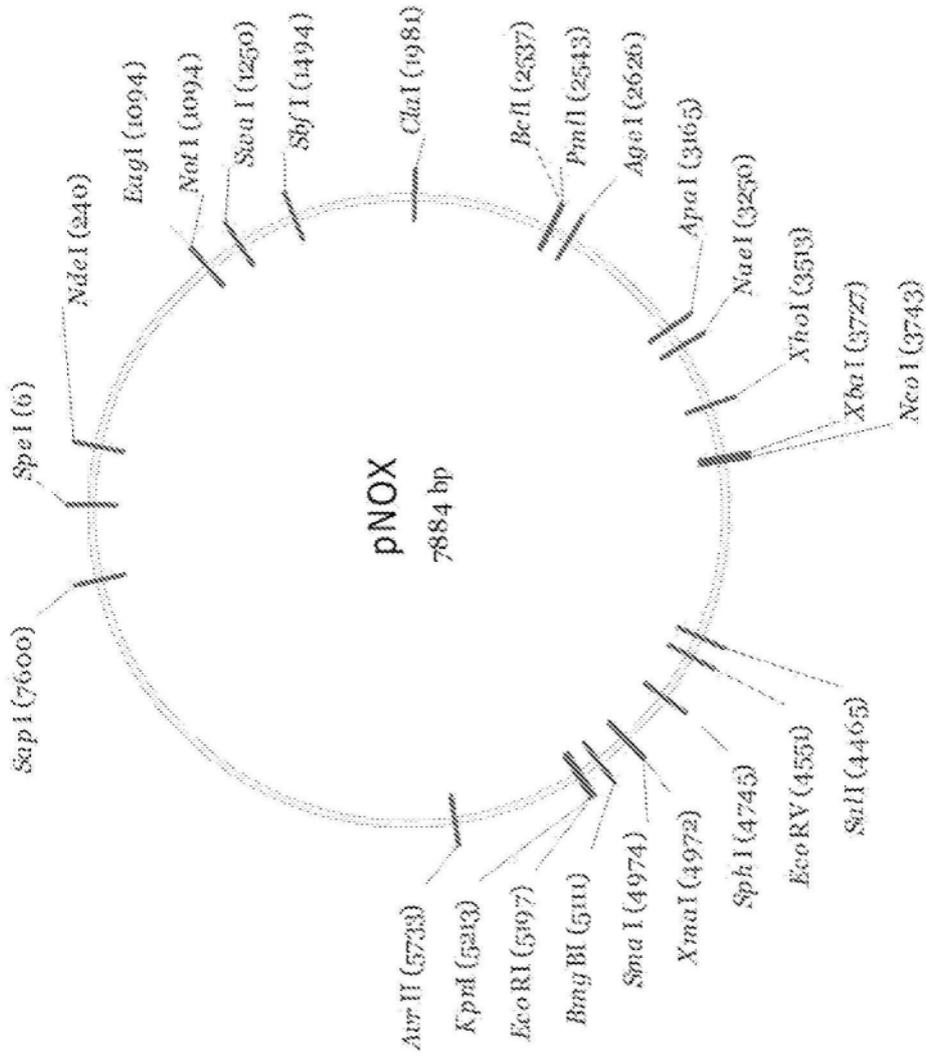


图4

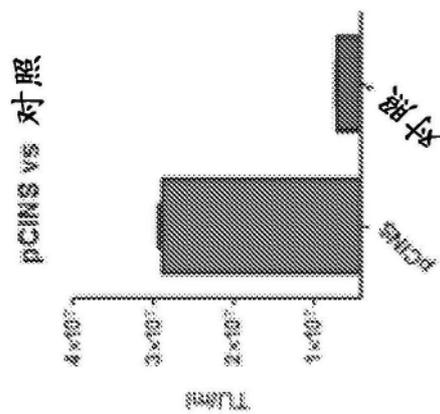


图5A

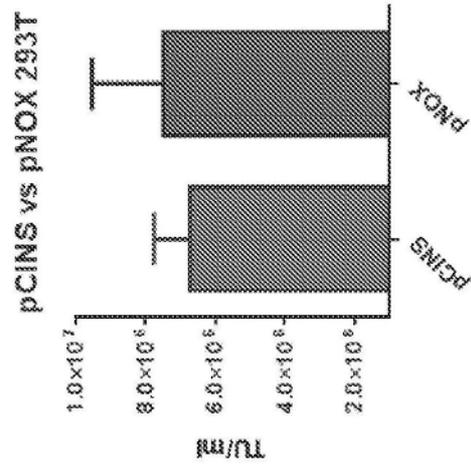


图5B

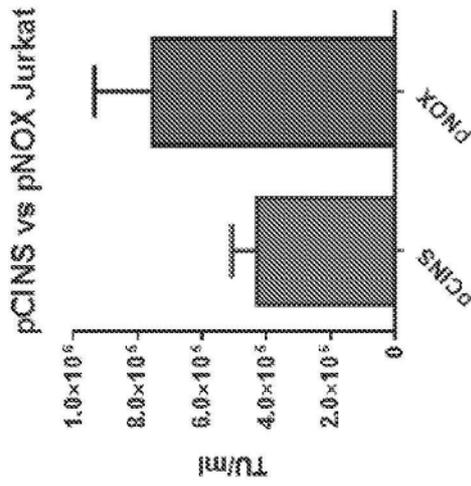


图5C

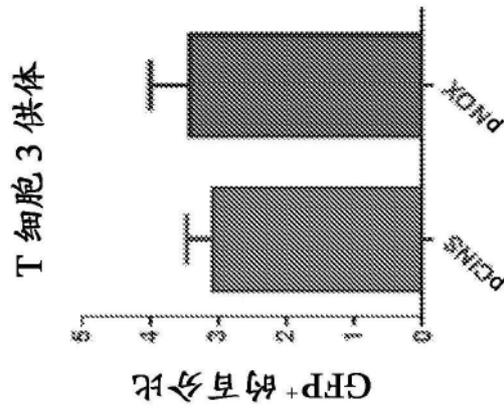


图5D

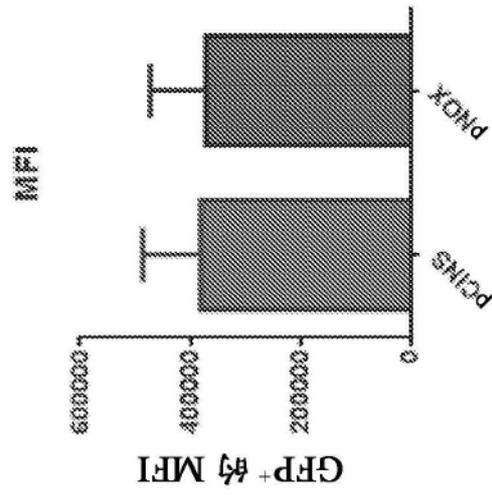


图5E

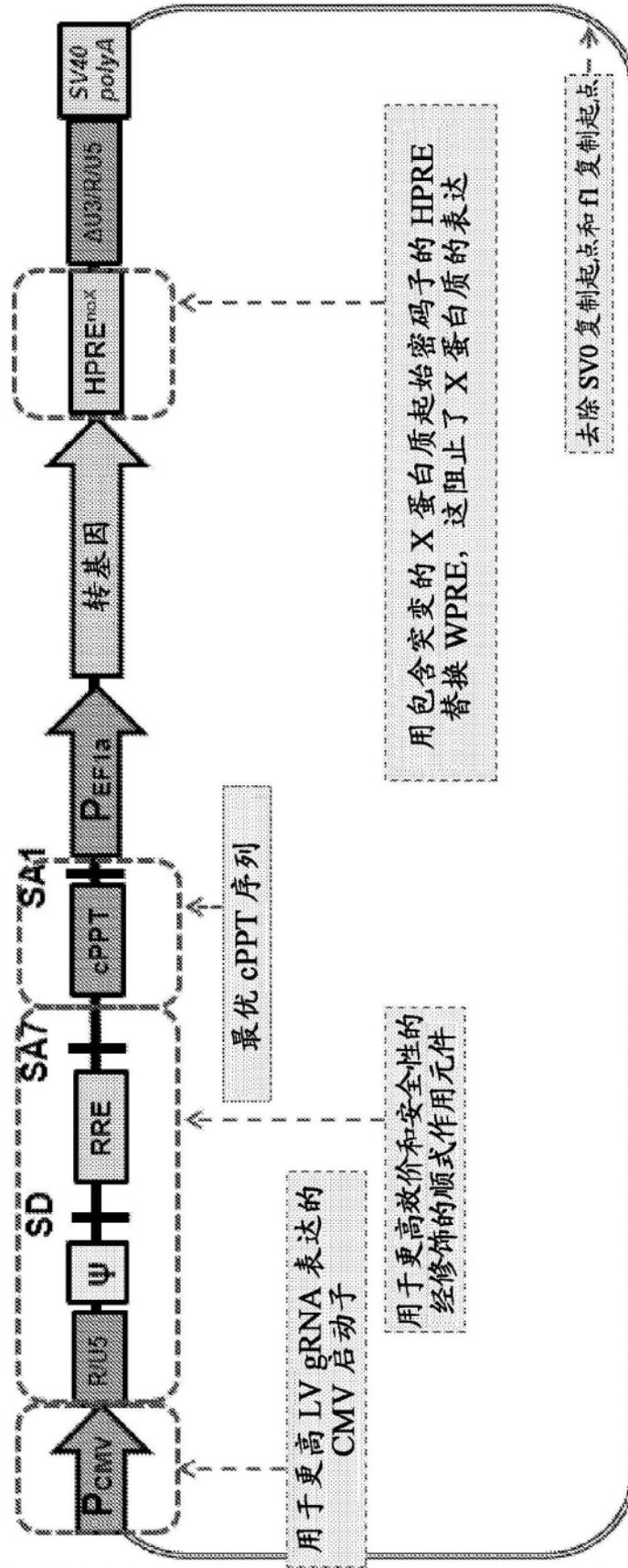


图6

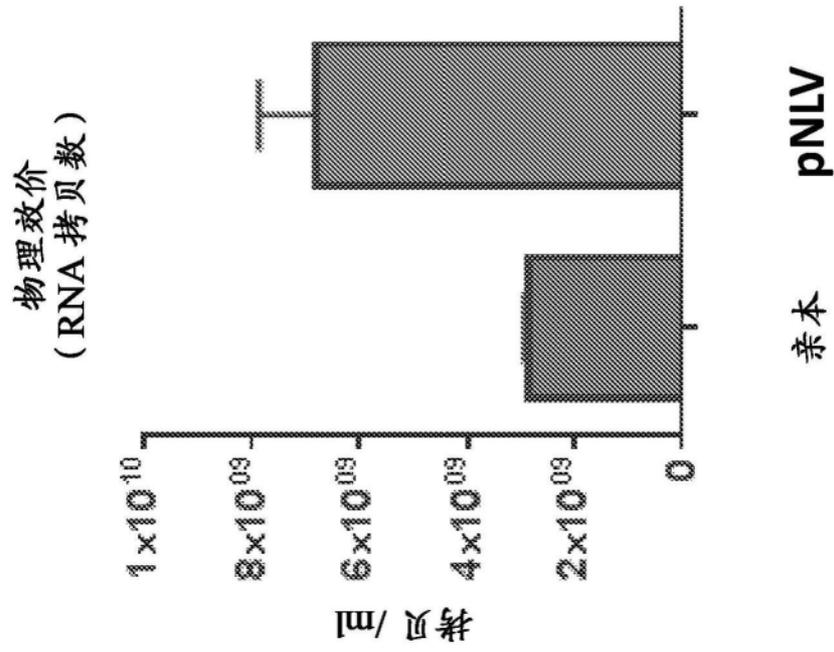


图7A

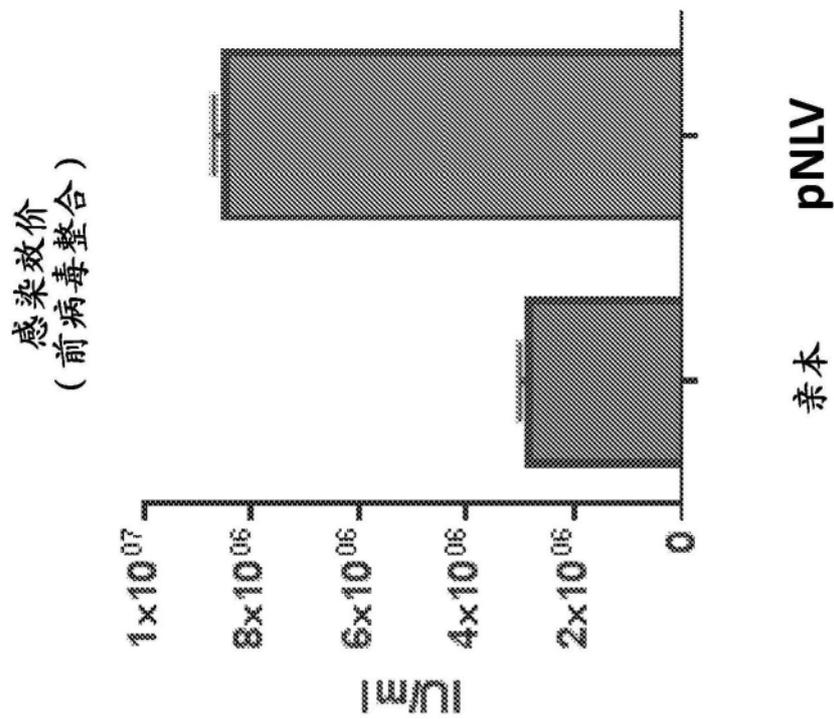


图7B

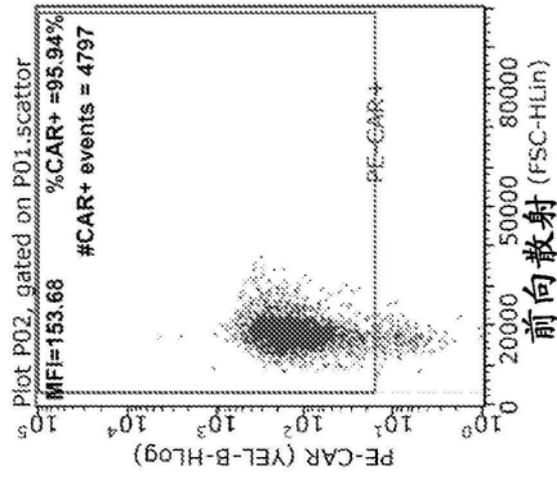


图8A

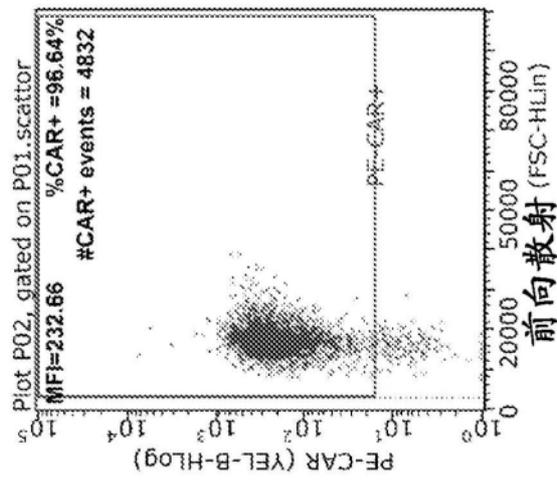


图8B

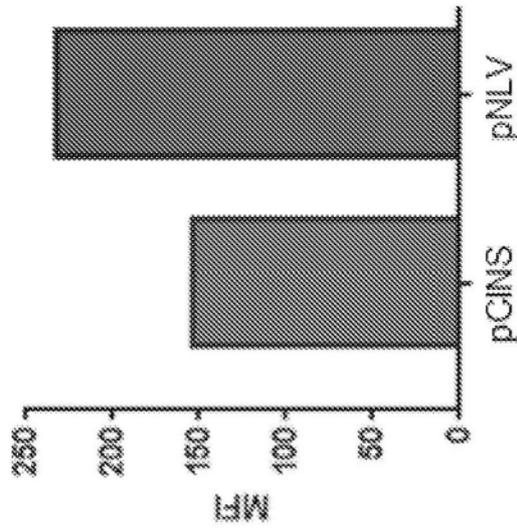


图8C

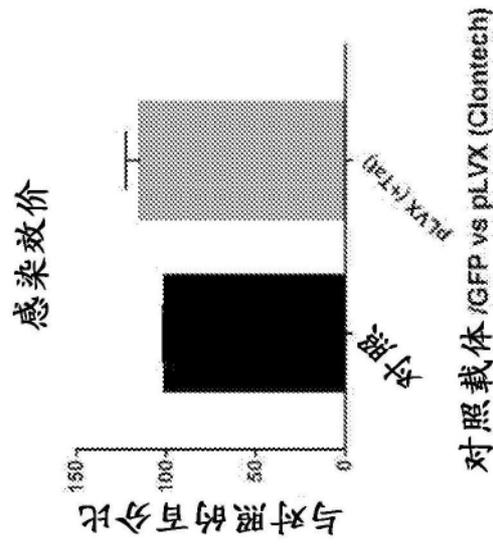


图9A

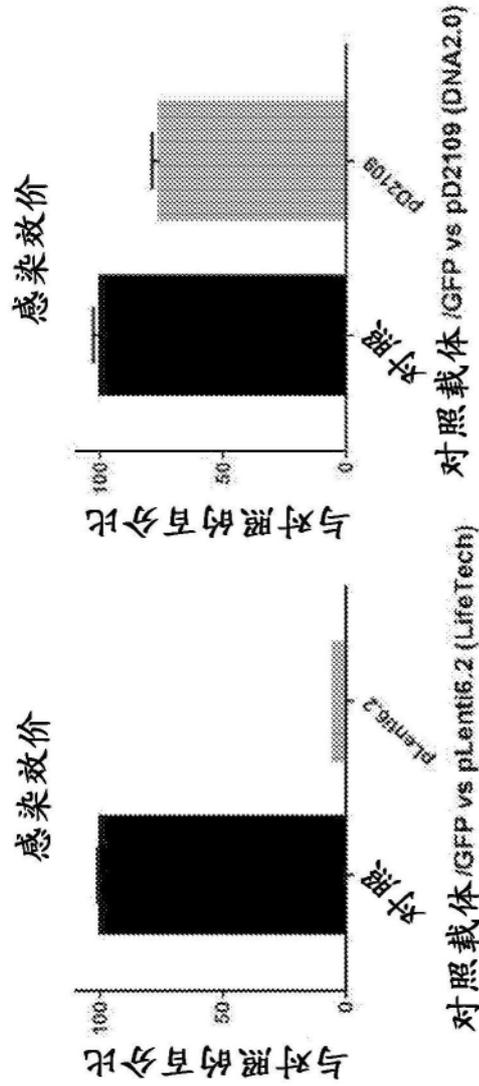


图 9 B

图 9 C

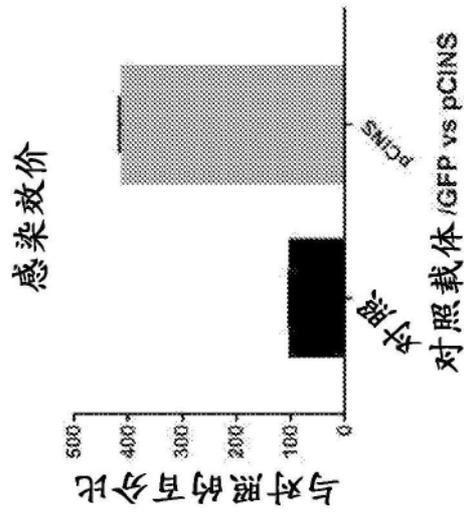


图9D

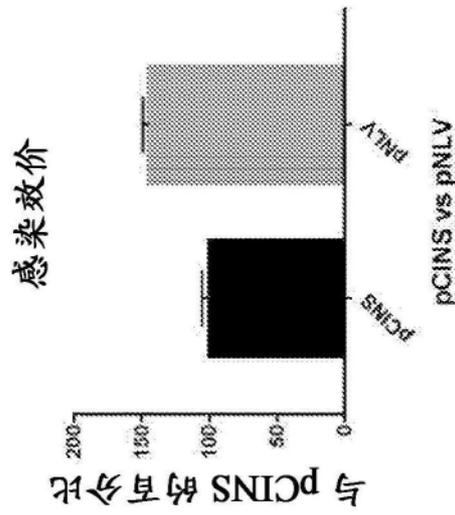


图9E

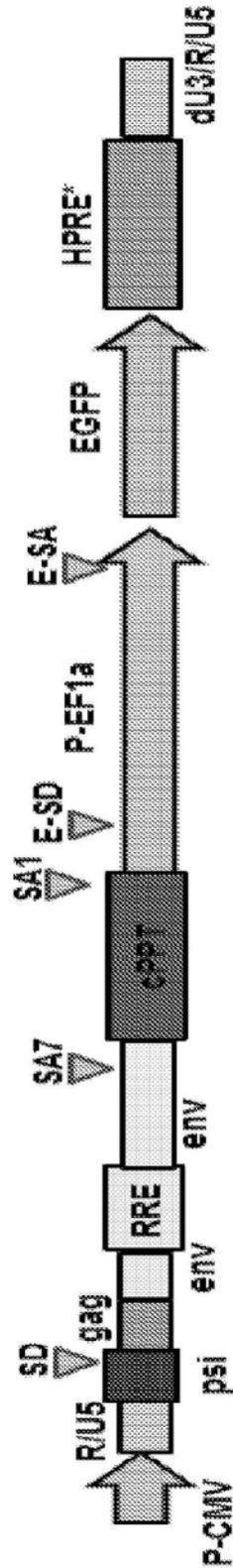


图10A

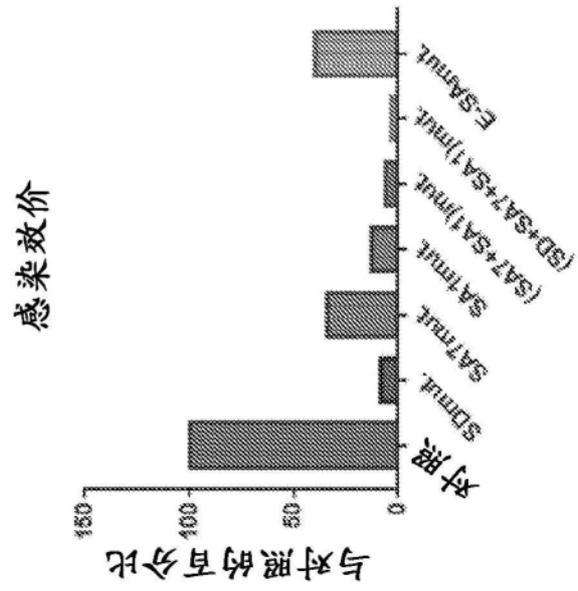


图10B

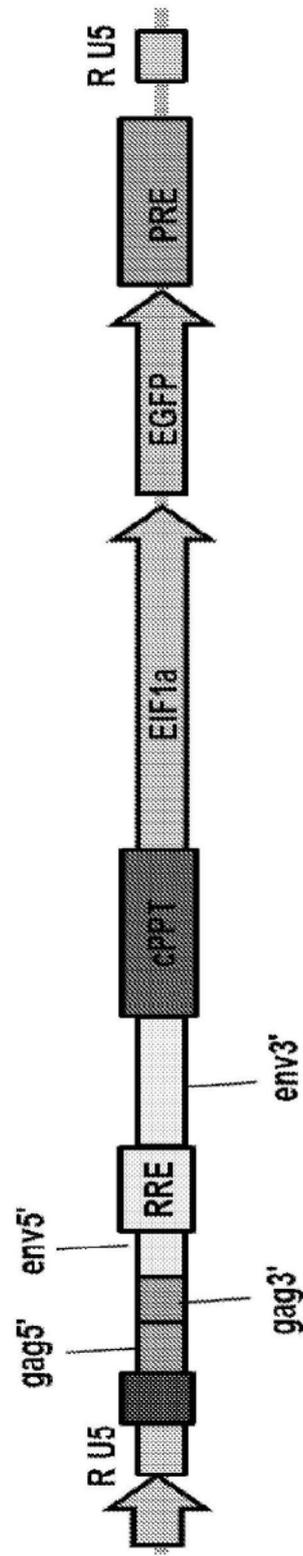


图11A

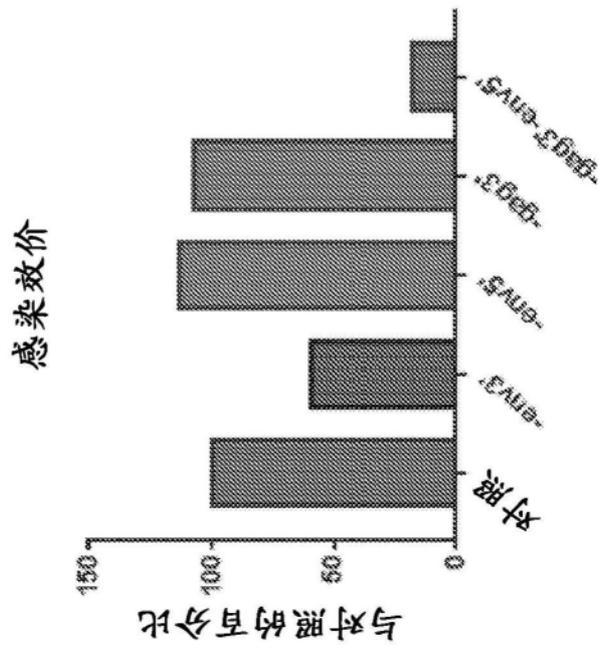


图11B

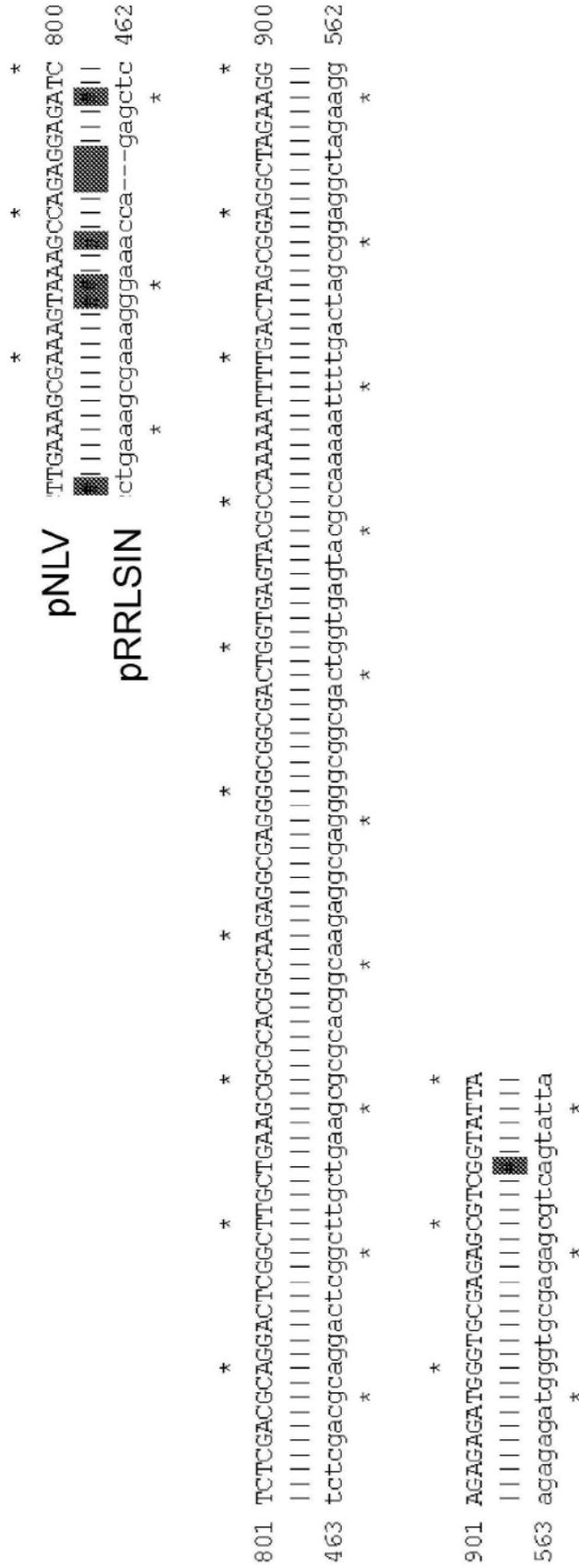


图12A

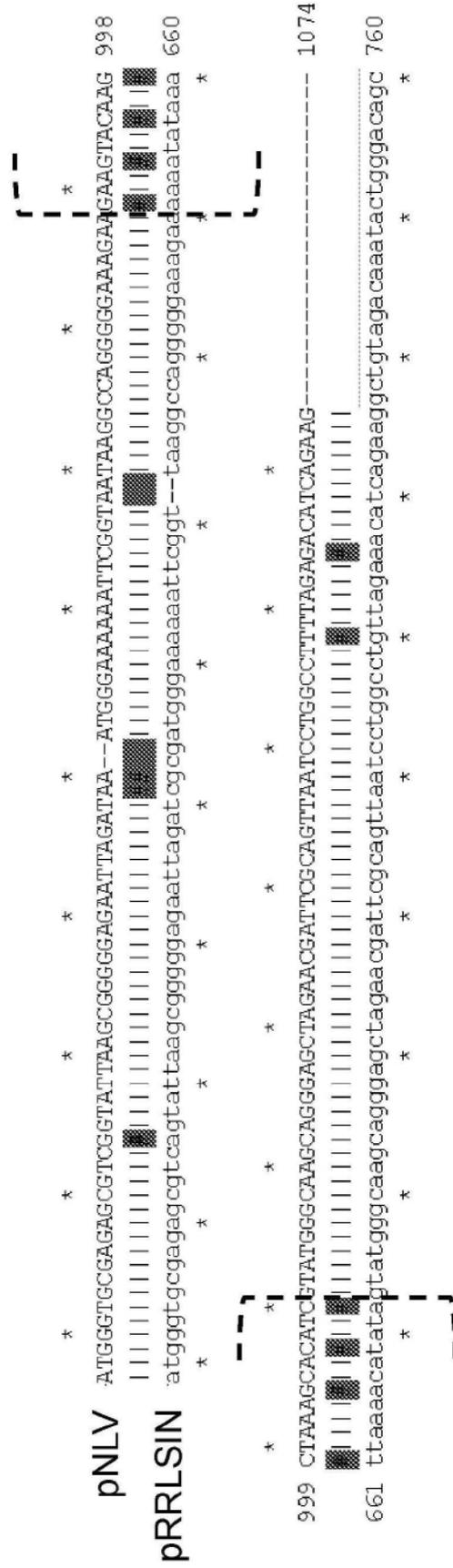


图12B



```

* * * * *
pNLV AGGAGCTTTGTTCCCTTGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGGTACAGG 1313
|||||
pRRLSIN aggagctttgttccttgggttcttgggagcagcaggaagcactatggggcgcagcctcaatgacgctgacggtaacagg 1154
* * * * *

* * * * *
1314 CCAGACAATTATTGTCGTGATATAGTGCCAGCACAGAACAAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCCAACTCACAGTCTGGGGCATCAA 1413
|||||
1155 ccagacaattattgtctgggtatagtgccagcagcagaacaatttgcctgagggctatbgaggcgcaacagcatctgttgcactcaagtcctgggggatcaa 1254
* * * * *

* * * * *
1414 ACAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAGATACCTAAGGATCAACAGCTCCT
|||||
1255 gcagctccaggcaagaatcctggctgtggaagatacctaaggatcaacagctcct
* * * * *

```

图12D



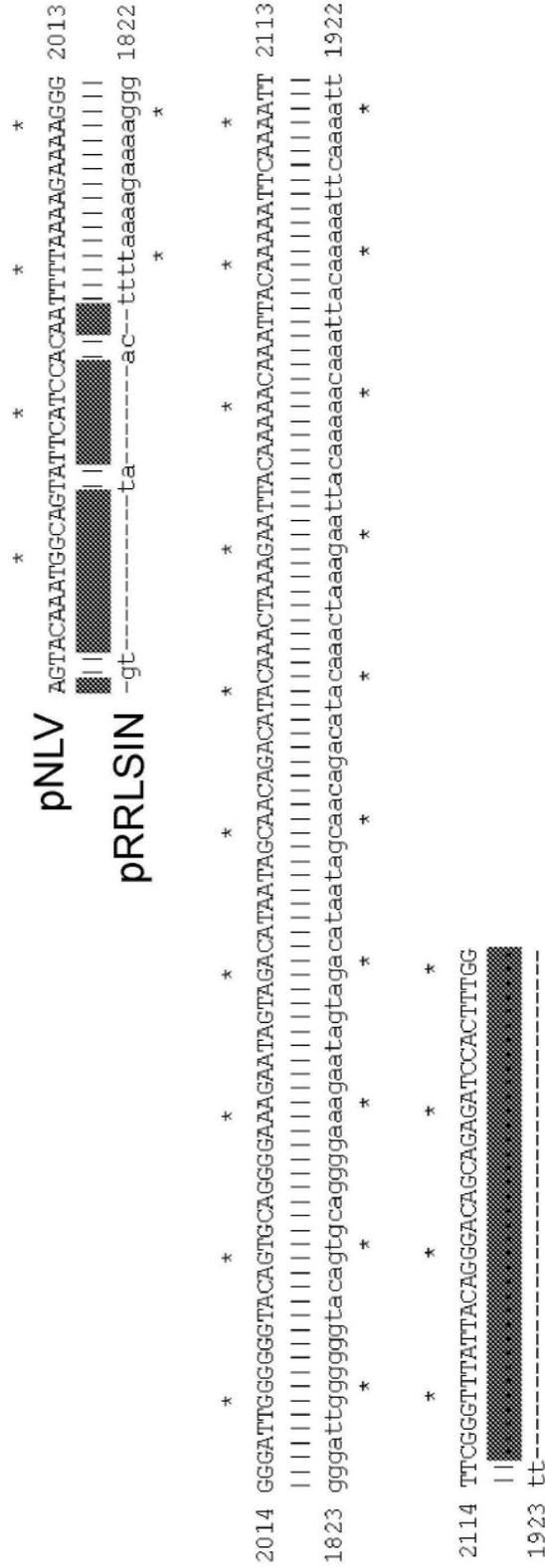


图12F

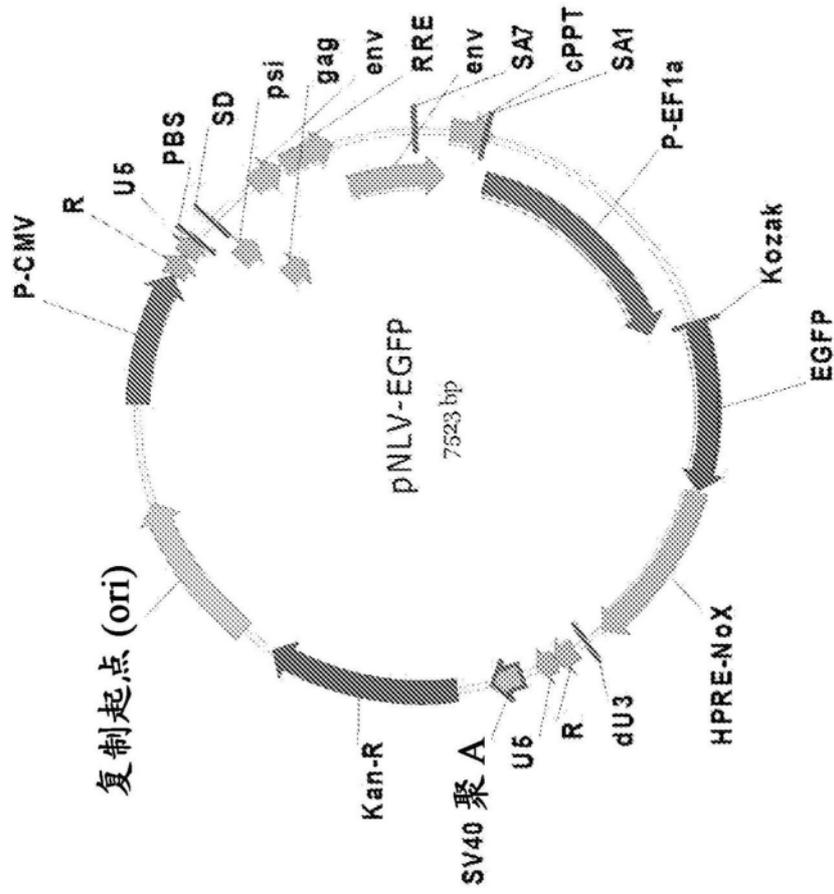


图13

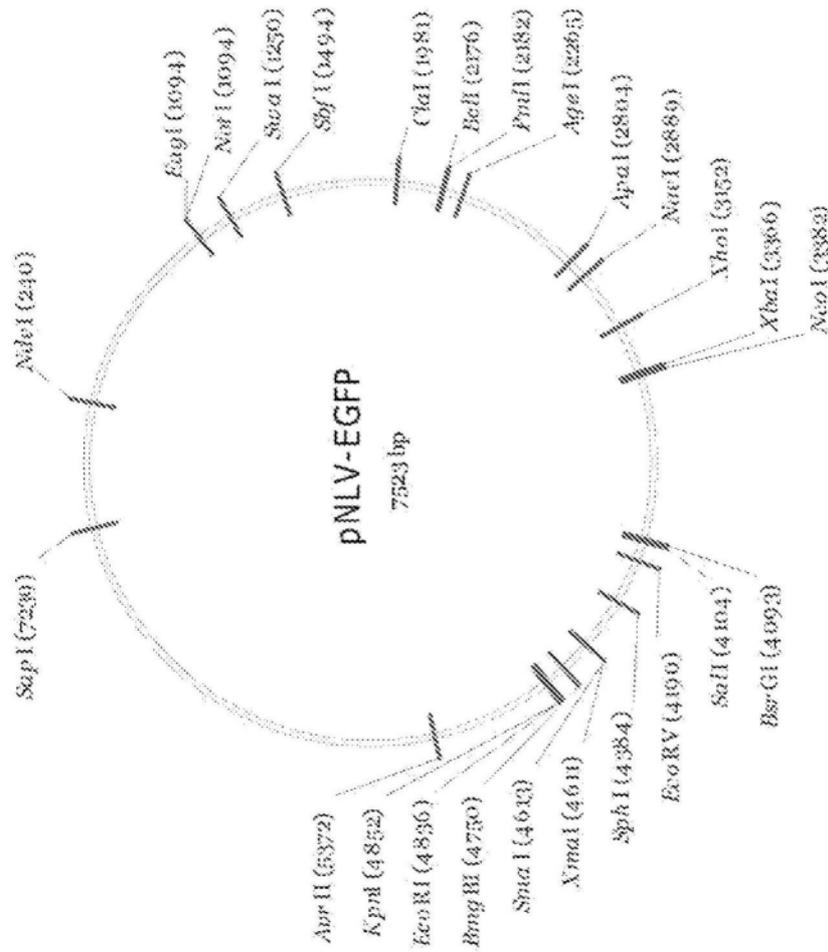


图14