

改进的治疗性 T 细胞

5 技术领域

本发明属于生物医药领域。具体而言，本发明涉及改进的治疗性 T 细胞及其制备方法。具体而言，本发明涉及通过慢病毒载体转导，在 T 细胞中共表达外源抗原特异性受体蛋白和显性负性 TGF-β II 型受体，制备改进的治疗性 T 细胞。

10 发明背景

T 细胞是体内执行肿瘤细胞杀伤和病毒感染细胞杀伤的关键免疫细胞。近年来，使用 T 细胞，包括来源于体外诱导或肿瘤浸润淋巴细胞的抗原特异性 T 细胞、基因改造的嵌合抗原受体 T 细胞(CAR-T 细胞)、基因改造的 T 细胞受体 T 细胞(TCR-T 细胞)进行恶性肿瘤的治疗，在部分临床患者中显示了显著的肿瘤清除和控制作用。然而，由于患者体内肿瘤的免疫逃逸作用，部分肿瘤患者对回输的 T 细胞产生抵抗作用，导致 T 细胞不能发挥应有的抗肿瘤作用。

体内体外的研究均表明，TGF-β 是重要的 T 细胞抑制因子，导致 T 细胞对靶细胞的杀伤作用减弱或消失。在临床上，TGF-β 广泛表达于多种肿瘤组织中，显著抑制肿瘤特异性 T 细胞对肿瘤细胞的杀伤活性，是免疫治疗失败的重要原因。而显性负性 TGF-β II 型受体(dominant negative TGF-β receptor type II, DNR II)是 TGF-β 的负性调节受体，可以抑制 TGF-β 对 T 细胞的抑制作用。在动物体内，通过给予或者表达 T 细胞特异性的 DNR II，或者给予可溶性 TGF-β R II，干扰 TGF-β 信号通路，可以显著提高 T 细胞对肿瘤的杀伤作用。美国贝勒医学院 Catherin M Bollard 领导的研究团队发现，给予患者 EB 病毒特异性的 T 细胞(EBV-CTL)治疗，对 EBV 感染导致的霍杰金和非霍杰金淋巴瘤均有一定的效果。然而，在这些疾病中，由于肿瘤组织表达 TGF-β，EBV-CTL 的疗效受到干扰。该研究团队通过基因转导的方式，将 DNR II 表达于 EBV-CTL 细胞表面，用于治疗复发的霍杰金淋巴瘤。在 7 名患者可以评价的患者中，4 名患者获得了完全缓解，其中 2 例患者完全缓解持续 4 年，其中 1 例是在未经 DNR II 基因修饰的 EBV-CTL 治疗后未能获得完全缓解的患者。然而，这些 EBV-CTL 仅仅表达 DNR II 一种外源蛋白。

在目前应用与临床的 CAR-T 细胞和 TCR-T 细胞治疗中，同样面临肿瘤细胞表达 TGF-β，导致 CAR-T 细胞和 TCR-T 细胞功能受到抑制的问题。本领域也期望将 DNR II 导入 CAR-T 细胞或 TCR-T 细胞中。然而，迄今为止，尚未有将 CAR/TCR 与 DNR II 共表达于同一 T 细胞用于治疗肿瘤的报道。这可能由于两种蛋白的共表达效率低，难以满足临床需要。

35

附图简述

图 1 示出用于表达 CAR-19 的慢病毒载体基因组及完整性鉴定策略。(A)包含 P_{EF1 α} -L(长启动子, 531bp)的老载体 pPVLV1; (B)包括 P_{EF1 α} -S(短启动子, 212bp)的新载体 pPVLV2。从使用随机六聚体引物逆转录的 cDNA 产生预期的 PCR 产物(F1-F5: PCR 片段), 鉴定病毒载体基因组的完整性。

图 2 示出 pPVLV1 和 pPVLV2 的差别。(A) 从病毒基因组的逆转录 cDNA 扩增出预期的 DNA 片段。在含有 P_{EF1 α} -L 的病毒基因片段中观察到缺陷的基因位点。用箭头指示具有意外大小的 DNA 片段(左图)。(B) 比较表达 CAR-19 的细胞的百分比和(C)转导 293T 细胞 48 小时后各载体的滴度。

图 3 示出 CAR-19-Fluc 的结构和荧光素酶活性。(A)和(B)使用的编码克隆在 P2A-Fluc 盒上游的 CAR-19 的双顺反子构建体。(C) 表达的 CAR-19 和 Fluc 分子的示意图。(D) 在慢病毒载体转导 293T 细胞后 48 小时测定的荧光素酶活性。

图 4 示出 CAR-19-DNR II 的结构和病毒载体。(A)和(B)显示共表达截短的 TGFBR II (DNR II)的 CAR-19 的载体图谱。(C) 共表达的 CAR-19 和 DNR II 分子的结构示意图。

图 5 示出转导的 293T 细胞中 CAR-19 和 DNR II 表达的转导效率。图中的数字表示 CAR-19(上)或 DNR II(下)的阳性细胞相对于未转导的 293T 细胞的阴性对照的百分比。给出了来自十个独立实验的代表性实验的结果。

图 6 示出转导的 T 细胞中 CAR-19 和 DNR II 的表达。用慢病毒载体转导活化的 T 细胞以表达 CAR-19 或 CAR-19-DNR II, 并通过流式细胞术评估。图中的数字表示 CAR-19(上)或 DNR II(下)的阳性细胞相对于未转导的 T 细胞的阴性对照的百分比。结果代表三个独立实验。

图 7 示出 CAR-19 或 CAR-19-DNR II 载体转导后的细胞活力和计数。数据表示为平均值 $\pm$ SD。

图 8 示出 DNR II 减少 TGF- β 1 诱导的 SMAD2 磷酸化。

图 9 示出 CAR-T-19 和 CAR-T-19-DNR II 细胞中的 IFN- γ 和 TNF- α 的 mRNA 水平。数据表示为平均值 $\pm$ SEM。

图 10 示出 CAR-T-19 和 CAR-T-19-DNR II 细胞在 TGF- β 1 存在下对 CD19⁺肿瘤细胞的抗原特异性杀死。在 CAR T 初始活化细胞 12 天后, 通过 DELFIA[®] EuTDA 细胞毒性测定法测定细胞裂解活性。在测定前 3 天取 T 细胞, 并用 rhTGF- β 1(10ng/ml)培养 72 小时。用 BATDA 试剂标记靶细胞 15 分钟, 随后以指定的 E:T 比加入作为效应细胞的经转导的 T 细胞。孵育 4 小时后测定裂解。

发明内容

除非另有指示或定义, 否则所有术语均具有本领域中的通常含义, 该含义将为本领域技术人员所了解。参考例如标准手册, 如 Sambrook et al., “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”; Lewin, “Genes VIII”; 及 Roitt et al., “Immunology” (第 8 版), 以

及本文中引用的一般现有技术；此外，除非另有说明，否则未具体详述的所有方法、步骤、技术及操作均可以且已经以本身已知的方式进行，该方式将为本领域技术人员所了解。亦参考例如标准手册、上述一般现有技术及其中引用的其他参考文献。

在第一方面，本发明提供一种制备特异性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞的方法，包括在 T 细胞中共表达外源癌症相关抗原特异性受体蛋白和显性负性 TGF- β II 型受体。

所述癌症相关抗原包括但不限于 CD16、CD64、CD78、CD96、CLL1、CD116、CD117、CD71、CD45、CD71、CD123、CD138、ErbB2(HER2/neu)、癌胚抗原(CEA)、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、表皮生长因子受体(EGFR)、EGFR 变体 III (EGFRvIII)、CD19、CD20、CD30、CD40、双唾液酸神经节苷脂 GD2、导管上皮粘蛋白、gp36、TAG-72、鞘糖脂、神经胶质瘤相关的抗原、 β -人绒毛膜促性腺激素、 α 胎儿球蛋白(AFP)、外源凝集素反应性 AFP、甲状腺球蛋白、RAGE-1、MN-CA IX、人端粒酶逆转录酶、RU1、RU2(AS)、肠羧基酯酶、mut hsp70-2、M-CSF、前列腺酶(prostase)、前列腺酶特异性抗原(PSA)、PAP、NY-ESO-1、LAGA-1a、p53、Prostein、PSMA、存活和端粒酶、前列腺癌肿瘤抗原-1 (PCTA-1)、MAGE、ELF2M、嗜中性粒细胞弹性蛋白酶、肝配蛋白 B2、CD22、胰岛素生长因子(IGF1)-I、IGF-II、IGFI 受体、间皮素、呈递肿瘤特异性肽表位的主要组织相容性复合体(MHC)分子、5T4、ROR1、Nkp30、NKG2D、肿瘤基质抗原、纤维连接蛋白的额外结构域 A(EDA)和额外结构域 B (EDB)、腱生蛋白-C 的 A1 结构域(TnC A1)、成纤维细胞相关蛋白(fap)、CD3、CD4、CD8、CD24、CD25、CD33、CD34、CD133、CD138、Foxp3、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、GM-CSF、细胞因子受体、内皮因子、BCMA (CD269、TNFRSF17)、TNFRSF17 (UNIPROT Q02223)、SLAMF7(UNIPROT Q9NQ25)、GPRC5D(UNIPROT Q9NZD1)、FKBP11(UNIPROT Q9NYL4)、KAMP3、ITGA8 (UNIPROT P53708)和 FCRL5(UNIPROT Q68SN8)。

如本发明所用，“显性负性 TGF- β II 型受体”是指能够与 TGF- β RII 竞争结合 TGF- β 配体(如 TGF- β 1)，但不能执行 TGF- β RII 的信号传导功能的 TGF- β II 型受体的变体。在一些实施方案中，所述显性负性 TGF- β II 型受体的胞内信号传导结构域被突变，从而丧失胞内信号传导能力。在一些实施方案中，所述显性负性 TGF- β II 型受体缺失 TGF- β II 型受体的胞内信号传导结构域。在一些具体实施方案中，所述显性负性 TGF- β II 型受体包含 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列。

本发明所述“外源癌症相关抗原特异性受体蛋白”可以是外源 T 细胞受体(TCR)或者是嵌合抗原受体(CAR)。

“T 细胞受体(TCR)”又称 T 细胞抗原受体，是 T 细胞特异性识别和结合抗原肽-MHC 分子的分子结构，通常与 CD3 分子呈复合物形式存在于 T 细胞表面。大多数 T 细胞的 TCR 由 α 和 β 肽链组成，少数 T 细胞的 TCR 由 γ 和 δ 肽链组成。

“嵌合型抗原受体(CAR)”又称人工 T 细胞受体、嵌合型 T 细胞受体、嵌合型免疫受体，是一种人工设计的受体，可以赋予免疫效应细胞某一种特异性。普遍来讲，这一

技术被用于赋予 T 细胞特异性识别肿瘤表面抗原的特性。通过这种方法，可以产生大量的靶向肿瘤杀伤细胞。

例如，所述 TCR 是特异性结合癌症相关抗原的 TCR(通常包含通常包含 α 和 β 链)。

或者，所述 CAR 可以包含针对癌症相关抗原的细胞外抗原结合结构域。所述细胞外抗原结合结构域例如可以是单克隆抗体、合成的抗体、人抗体、人源化抗体、单域抗体、抗体单链可变区(scFV)，以及其抗原结合片段。例如，所述细胞外抗原结合结构域可以衍生自一或多种已知抗体包括任何商业可获得的抗体，如 FMC63、利妥昔单抗(rituximab)、阿仑珠单抗(alemtuzumab)、依帕珠单抗(epratuzumab)、曲妥珠单抗(trastuzumab)、比伐珠单抗(bivatuzumab)、西妥昔单抗(cetuximab)、拉贝珠单抗(labetuzumab)、帕利珠单抗(palivizumab)、司韦单抗(sevirumab)、妥韦单抗(tuvirumab)、巴利昔单抗(basiliximab)、达克珠单抗(daclizumab)、英利昔单抗(infliximab)、奥马珠单抗(omalizumab)、依法珠单抗(efalizumab)、凯利昔单抗(Keliximab)、西利珠单抗(siplizumab)、那他珠单抗(natalizumab)、克立昔单抗(clenoliximab)、培马单抗(pemtumomab)、依屈洛单抗(Edrecolomab)、坎妥珠单抗(Cantuzumab)等。

在本发明各方面的一些实施方案中，所述 CAR 还包括跨膜结构域和细胞内信号转导结构域。根据本发明的 CAR 的细胞内信号转导结构域负责细胞外配体结合结构域与靶结合之后的细胞内信号转导，导致激活免疫细胞和免疫应答。细胞内信号转导结构域具有激活表达 CAR 的免疫细胞的至少一种正常效应子功能的能力。例如，T 细胞的效应子功能可以是细胞溶解活性或辅助活性，包括细胞因子的分泌。

用于 CAR 的细胞内信号转导结构域可以是细胞质序列，例如但不限于 T 细胞受体和共同受体(它们一致地起作用从而在抗原受体接合之后启动信号转导)的细胞质序列，以及任何这些序列的衍生物或变体以及具有相同功能能力的任何合成序列。细胞内信号转导结构域包括两种不同类型的细胞质信号转导序列：那些启动抗原依赖性初级激活的序列，以及那些以抗原非依赖性方式作用以提供次级或共刺激信号的序列。初级细胞质信号转导序列可以包括称为 ITAM 的免疫受体酪氨酸激活基序的信号转导基序。本发明中使用的 ITAM 的非限制性实例可以包括衍生自 TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、FcR ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b 和 CD66d 的那些。在一些实施方案中，CAR 的细胞内信号转导结构域可以包括 CD3 ζ 信号转导结构域。在一些实施方案中，本发明的 CAR 的细胞内信号转导结构域还包括共刺激结构域。在一些实施方案中，所述共刺激结构域选自 41BB 共刺激结构域或 CD28 共刺激结构域。

CAR 在细胞的表面上表达。因此，CAR 可以包括跨膜结构域。本发明的 CAR 的合适跨膜结构域具有以下能力：(a)在细胞表面表达，优选免疫细胞，例如但不限于淋巴细胞或自然杀伤(NK)细胞，和(b)与配体结合结构域和细胞内信号转导结构域相互作用，用于指导免疫细胞对预定靶细胞的细胞应答。跨膜结构域可以衍生自天然来源或合成来源。跨膜结构域可以衍生自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。作为非限制性实例，跨膜结构域可以衍生自 T 细胞受体的亚基如 α 亚基、 β 亚基、 γ 或 δ 亚基，组成 CD3 复合物的

多肽，IL-2 受体的 p55(α 链)、p75(β 链)或 γ ，Fc 受体的亚基链，特别是 Fc γ 受体 III 或 CD 蛋白。或者，跨膜结构域可以是合成的，并且可以主要包括疏水性残基，如亮氨酸和缬氨酸。在一些实施方案中，所述跨膜结构域衍生自人 CD8 α 链。跨膜结构域可以进一步包括位于细胞外配体结合结构域和所述跨膜结构域之间的铰链区域。所述铰链区域例如来自 CD8、CD4 或 CD28 的胞外区。在一些实施方案中，所述铰链区域是人 CD8 α 链的一部分。

在一些具体实施方案中，本发明中使用的 CAR 可以包括特异性结合癌症相关抗原的细胞外抗原结合结构域如 scFv、CD8 铰链和跨膜结构域、CD3 ζ 信号转导结构域、和 4-1BB 共刺激结构域。

10 在一些具体实施方案中，所述 CAR 包含针对 CD19 的细胞外抗原结合结构域。在一些具体实施方案中，所述 CAR 包含 SEQ ID NO:16 所示氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述方法包括用包含慢病毒载体的慢病毒颗粒转导所述 T 细胞，所述慢病毒载体包含编码融合多肽的核苷酸序列，所述融合多肽包含通过自裂解肽连接的所述外源抗原特异性受体蛋白和所述显性负性 TGF- β II 型受体，由此在所述 T 15 细胞中共表达外源抗原特异性受体蛋白和显性负性 TGF- β II 型受体。

在本发明范围内，“慢病毒载体”指非复制型载体，其用于将包含顺式作用慢病毒 RNA 或 DNA 序列的转基因转导至宿主细胞，且需要以反式形式提供慢病毒蛋白(例如 Gag、Pol 和/或 Env)。慢病毒载体缺少功能性 Gag、Pol 和 Env 蛋白的编码序列。慢病毒载体可以 RNA 或 DNA 分子的形式存在，这取决于所述逆转录病毒载体的产生或发展阶段。 20

慢病毒载体可以是重组 DNA 分子的形式，如质粒(例如转移质粒载体)。慢病毒载体可以是慢病毒颗粒载体的形式，如慢病毒和其他蛋白质的复合物中的 RNA 分子。通常，对应于修饰或重组的慢病毒颗粒的慢病毒载体包含由两个单链 RNA 拷贝组成的基因组。这些 RNA 序列可通过从插入宿主细胞基因组的双链 DNA 序列(原病毒载体 DNA) 25 转录获得，或者可由转化的宿主细胞中质粒 DNA(质粒载体 DNA)的瞬时表达获得。慢病毒载体也可以指整合进宿主细胞的 DNA 序列。

慢病毒载体可以来源于慢病毒，尤其是人免疫缺陷病毒(HIV-1 或 HIV-2)、猿免疫缺陷病毒(SIV)、马传染性脑炎病毒(EIAV)、山羊关节炎脑炎病毒 (CAEV)、牛免疫缺陷病毒(BIV)和猫免疫缺陷病毒(FIV)，其经修饰以除去涉及致病性的遗传决定簇并导入外源 30 表达盒。

如本文所用“自裂解肽”意指可以在细胞内实现自剪切的肽。例如，所述自裂解肽可以包含蛋白酶识别位点，从而被细胞内的蛋白酶识别并特异性切割。

或者，所述自裂解肽可以是 2A 多肽。2A 多肽是一类来自病毒的短肽，其自切割发生在翻译期间。当用 2A 多肽连接两种不同目的蛋白在同一读码框表达时，几乎以 1:1 35 的比例生成两种目的蛋白。常用的 2A 多肽可以是来自猪捷申病毒(porcine techovirus-1)的 P2A、来自明脉扁刺蛾 β 四体病毒(Thosea asigna virus)的 T2A、马甲型鼻病毒(equine

rhinitis A virus)的 E2A 和来自口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus)的 F2A。其中 P2A 的切割效率最高,因此是优选的。本领域也已知多种这些 2A 多肽的功能性变体,这些变体也可以用于本发明。

5 将外源癌症相关抗原特异性受体蛋白和显性负性 TGF- β II 型受体由 2A 多肽隔开,置于同一开放读码框,由同一启动子驱动表达,可以最大程度确保所获得的经转导的细胞同时表达两种蛋白。因为如果两种蛋白在不同载体中分别转导至细胞,将可能造成部分细胞仅表达外源癌症相关抗原特异性受体蛋白,部分细胞仅表达显性负性 TGF- β II 型受体,而共表达两种蛋白的细胞的比例将很低。另外,如果两种蛋白的表达由同一载体中不同启动子驱动表达,由于启动子效率的差异,同样会降低同时表达两种蛋白的细胞的比例。

10 在一些实施方案中,所述编码融合多肽的核苷酸序列与截短的 EF1 α 启动子可操作地连接。本发明人令人意外地发现,用包含长 EF1 α 启动子(如 SEQ ID NO 7)的慢病毒载体转导细胞例如 T 细胞,会出现该启动子区域的异常,导致导入细胞的外源基因(特别是编码 CAR 或其融合蛋白的基因)的低表达率。而更意想不到的是,使用截短的 EF1 α 启动子则可以避免该现象,显著提高所导入外源基因的表达率。在一些具体实施方案中,所述截短的 EF1 α 启动子是包含 SEQ ID NO:13 所示核苷酸序列的 EF1 α 核心启动子。

15 在一些实施方案中,所述慢病毒载体还包含选自以下的至少一种元件:5'LTR、 ψ 序列、RRE 序列、cPPT/CTS 序列、WPPE 序列和 3'LTR。

20 例如,5'LTR 可以是来自 HIV-1 的截短的 5'LTR,其对病毒转录、逆转录和整合至关重要。 ψ 元件是 HIV-1 的包装信号,是慢病毒载体包装必不可少的。RRE 对于病毒转录物的 mRNA 从细胞核到细胞质的 Rev 依赖性输出是必需的。cPPT/CTS 序列可以是 HIV1 的 cPPT/CTS,能够提高载体整合和转导效率。WPPE(来自土拨鼠肝炎病毒的转录后调节元件)可以通过促进 mRNA 转录物成熟来改善转基因表达。3'LTR 可以是来自 HIV-1 的自我灭活 3'LTR,对于病毒转录、逆转录和整合至关重要,且包含防止病毒复制的安全措施。

25 在一些实施方案中,所述慢病毒载体包含可操作连接的 5'LTR、 ψ 元件、RRE 元件、cPPT/CTS 元件、所述截短的 EF1 α 启动子、所述编码融合多肽的核苷酸序列、WPPE 元件和 3'LTR。

30 在一些具体实施方案中,所述 5'LTR 包含 SEQ ID NO:3 或 11 所示核苷酸序列;所述 ψ 元件包含 SEQ ID NO:4 或 12 所示核苷酸序列;所述 RRE 元件包含 SEQ ID NO:5 所示核苷酸序列;所述 cPPT/CTS 元件包含 SEQ ID NO:6 所示核苷酸序列;所述 WPPE 元件包含 SEQ ID NO:9 或 14 所示核苷酸序列;其中所述 3' LTR 包含 SEQ ID NO:10 或 15 所示核苷酸序列。

35 在一些实施方案中,所述慢病毒载体包含可操作连接的包含 SEQ ID NO: 11 所示核苷酸序列的 5' LTR,包含 SEQ ID NO: 12 所示核苷酸序列的 ψ 元件,包含 SEQ ID NO:5 所示核苷酸序列的 RRE 元件,包含 SEQ ID NO:6 所示核苷酸序列的 cPPT/CTS 元件,

包含 SEQ ID NO:13 所示核苷酸序列的截短的 EF1 α 启动子, 所述编码融合多肽的核苷酸序列、包含 SEQ ID NO:14 所示核苷酸序列的 WPRE 元件, 包含 SEQ ID NO: 15 所示核苷酸序列的 3'LTR。

5 在一些实施方案中, 所述慢病毒载体衍生自 SEQ ID NO:2, 其中 SEQ ID NO:2 的 2,042-3,499 位的编码 CAR-19 的核苷酸序列可以被所述编码融合多肽的核苷酸序列取代。

本发明的 T 细胞可以通过各种非限制性方法从许多非限制性来源获得, 包括外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、腹水、胸腔积液、脾组织和肿瘤。在一些实施方案中, 细胞可以衍生自健康供体或来自诊断为癌症的患者。在一些实施方案中, 细胞可以是呈现不同表型特征的细胞的混合群体的一部分。例如, T 细胞可以通过分离外周血单个核细胞(PBMC), 然后用特异性抗体活化、扩增获得。

在本发明各方面的一些实施方案中, 所述 T 细胞衍生自对象的自体细胞。如本文所用, “自体”是指用于治疗对象的细胞、细胞系或细胞群源自所述对象。在一些实施方案中, 所述 T 细胞衍生自异体细胞, 例如源自与所述对象人类白细胞抗原(HLA)相容的供体。可以使用标准方案将来自供体的细胞转化为非同种异体反应性细胞, 并需要进行复制, 从而产生可以施用至一个或多个患者的细胞。

在另一方面, 本发明提供一种特异性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞, 其通过本发明上述的方法产生。

在另一方面, 本发明提供一种特异性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞, 其共表达外源癌症相关抗原特异性受体蛋白和显性负性 TGF- β II 型受体, 所述治疗性 T 细胞包含慢病毒载体(例如整合进细胞基因组的慢病毒载体), 所述慢病毒载体包含编码融合多肽的核苷酸序列, 所述融合多肽包含通过自裂解肽连接的所述外源癌症相关抗原特异性受体蛋白和所述显性负性 TGF- β II 型受体。

在一些实施方案中, 所述治疗性 T 细胞中的所述显性负性 TGF- β II 型受体缺失 TGF- β II 型受体的胞内信号传导结构域。在一些具体实施方式中, 所述显性负性 TGF- β II 型受体包含 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中, 所述治疗性 T 细胞中的所述外源癌症相关抗原特异性受体蛋白选自 T 细胞受体(TCR)和嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中, 所述 TCR 特异性结合癌症相关抗原, 所述 CAR 包含针对癌症相关抗原的细胞外抗原结合结构域。

30 在一些实施方案中, 所述 CAR 包括特异性结合癌症相关抗原的细胞外抗原结合结构域如 scFv、CD8 铰链和跨膜结构域、CD3 ζ 信号转导结构域、和 4-1BB 共刺激结构域。

在一些实施方案中, 所述癌症相关抗原选自 CD16、CD64、CD78、CD96、CLL1、CD116、CD117、CD71、CD45、CD71、CD123、CD138、ErbB2(HER2/neu)、癌胚抗原(CEA)、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、表皮生长因子受体(EGFR)、EGFR 变体 III(EGFRvIII)、CD19、CD20、CD30、CD40、双唾液酸神经节苷脂 GD2、导管上皮粘蛋白、gp36、TAG-72、鞘糖脂、神经胶质瘤相关的抗原、 β -人绒毛膜促性腺激素、 α 胎儿

球蛋白(AFP)、外源凝集素反应性 AFP、甲状腺球蛋白、RAGE-1、MN-CA IX、人端粒酶逆转录酶、RU1、RU2(AS)、肠羧基酯酶、mut hsp70-2、M-CSF、前列腺酶(protease)、前列腺酶特异性抗原(PSA)、PAP、NY-ESO-1、LAGA-1a、p53、Prostein、PSMA、存活和端粒酶、前列腺癌肿瘤抗原-1 (PCTA-1)、MAGE、ELF2M、嗜中性粒细胞弹性蛋白酶、
 5 肝配蛋白 B2、CD22、胰岛素生长因子(IGF1)-I、IGF-II、IGFI 受体、间皮素、呈递肿瘤特异性肽表位的主要组织相容性复合体(MHC)分子、5T4、ROR1、Nkp30、NKG2D、肿瘤基质抗原、纤维连接蛋白的额外结构域 A(EDA)和额外结构域 B (EDB)、腱生蛋白-C 的 A1 结构域(TnC A1)、成纤维细胞相关蛋白(fap)、CD3、CD4、CD8、CD24、CD25、CD33、CD34、CD133、CD138、Foxp3、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、GM-CSF、细胞因
 10 子受体、内皮因子、BCMA (CD269、TNFRSF17)、TNFRSF17 (UNIPROT Q02223)、SLAMF7(UNIPROT Q9NQ25)、GPRC5D(UNIPROT Q9NZD1)、FKBP11(UNIPROT Q9NYL4)、KAMP3、ITGA8 (UNIPROT P53708)和 FCRL5(UNIPROT Q68SN8)。

在一些实施方案中，所述 CAR 包含针对 CD19 的细胞外抗原结合结构域，例如，所述 CAR 包含 SEQ ID NO:16 所示氨基酸序列。

15 在一些实施方案中，所述自裂解肽是 2A 多肽，例如，所述自裂解肽选自 P2A、F2A、E2A 或 T2A 多肽，或其功能性变体。

在一些实施方案中，所述编码融合多肽的核苷酸序列与截短的 EF1 α 启动子可操作地连接，例如，所述截短的 EF1 α 启动子是包含 SEQ ID NO:13 所示核苷酸序列的 EF1 α 核心启动子。

20 在一些实施方案中，所述慢病毒载体还包含选自以下的至少一种元件：5'LTR、 ψ 元件、RRE 元件、cPPT/CTS 元件、WPRES 元件和 3'LTR。

在一些实施方案中，所述慢病毒载体包含可操作连接的 5' LTR、 ψ 元件、RRE 元件、cPPT/CTS 元件、所述截短的 EF1 α 启动子、所述编码融合多肽的核苷酸序列、WPRES 元件和 3' LTR。

25 在一些实施方案中，所述 5' LTR 包含 SEQ ID NO:3 或 11 所示核苷酸序列；所述 ψ 元件包含 SEQ ID NO:4 或 12 所示核苷酸序列；所述 RRE 元件包含 SEQ ID NO:5 所示核苷酸序列；所述 cPPT/CTS 元件包含 SEQ ID NO:6 所示核苷酸序列；所述 WPRES 元件包含 SEQ ID NO:9 或 14 所示核苷酸序列；其中所述 3' LTR 包含 SEQ ID NO:10 或 15 所示核苷酸序列。

30 在一些实施方案中，所述慢病毒载体包含可操作连接的包含 SEQ ID NO: 11 所示核苷酸序列的 5' LTR，包含 SEQ ID NO: 12 所示核苷酸序列的 ψ 元件，包含 SEQ ID NO:5 所示核苷酸序列的 RRE 元件，包含 SEQ ID NO:6 所示核苷酸序列的 cPPT/CTS 元件，包含 SEQ ID NO:13 所示核苷酸序列的截短的 EF1 α 启动子，所述编码融合多肽的核苷酸序列、包含 SEQ ID NO:14 所示核苷酸序列的 WPRES 元件，包含 SEQ ID NO: 15 所示
 35 核苷酸序列的 3' LTR。

在另一方面，本发明提供一种药物组合物，其包含本发明的特异性靶向癌症相关抗

原的治疗性 T 细胞, 和药物可接受的载体。

本文使用的“药学上可接受的载体”包括生理学相容的任何和所有的溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。优选地, 该载体适合于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、脊柱或表皮施用(如通过注射或输注)。

- 5 在另一方面, 本发明提供本发明的特异性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞或本发明的药物组合物在制备用于在对象中治疗癌症的药物中的用途。

如本文所用“对象”是指患有或者易于患有可以通过本发明的细胞、方法、或药物组合物治疗的疾病(如癌症)的生物体。非限制性例子包括人、牛、大鼠、小鼠、狗、猴、山羊、绵羊、母牛、鹿, 及其它非哺乳动物。在优选实施方案中, 对象是人。

- 10 在另一方面, 本发明提供一种一种在对象中治疗癌症的方法, 包括给所述对象施用治疗有效量的本发明的特异性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞或本发明的药物组合物。

- 如本文所用, “治疗有效量”或“治疗有效剂量”或“有效量”指施用于对象之后至少足以产生疗效的物质、化合物、材料或细胞的量。因此, 其为防止、治愈、改善、
15 阻滞或部分阻滞疾病或病症的症状所必需的量。例如, “有效量”的本发明的细胞或药物组合物优选地导致疾病症状的严重性降低, 疾病无症状期的频率和持续时间增加, 或者防止因疾病痛苦而引起的损伤或失能。例如, 对于肿瘤的治疗, 相对于未接受治疗的对象, “有效量”的本发明的细胞或药物组合物优选地将肿瘤细胞生长或肿瘤生长抑制至少约 10%, 优选至少约 20%, 更优选至少约 30%, 更优选至少约 40%, 更优选至少
20 约 50%, 更优选至少约 60%, 更优选至少约 70%, 更优选至少约 80%。抑制肿瘤生长的能力可以在预测对人类肿瘤的疗效的动物模型系统中评价。或者, 也可以通过检查抑制肿瘤细胞生长的能力来评价, 这种抑制可以通过本领域技术人员公知的试验在体外测定。

- 实际应用中, 本发明药物组合物中细胞的剂量水平可能改变, 以获得可有效实现对
25 特定患者、组合物和给药方式的所需治疗反应, 而对患者无毒性的活性成分的量。选择的剂量水平取决于多种药物代谢动力学因素, 包括应用的本发明特定组合物的活性, 给药途径, 给药时间, 应用的特定化合物的排泄速率, 治疗的持续时间, 与应用的特定组合物联合应用的其他药物、化合物和/或材料, 接受治疗的患者的年龄、性别、体重、状况、总体健康情况和病史, 以及医学领域中公知的类似因素。

- 30 在本发明各个方面的实施方案中, 所述癌症选自肺癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、黑色素瘤、肾癌、膀胱癌、乳腺癌、肝癌、淋巴瘤、恶性血液病、头颈癌、胶质瘤、胃癌、鼻咽癌、喉癌、宫颈癌、子宫体瘤、骨肉瘤、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、前列腺癌、子宫癌、肛区癌、睾丸癌、输卵管癌、子宫内膜癌、阴道癌、阴户癌、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软
35 组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、慢性或急性白血病(包括急性髓细胞样白血病、慢性髓细胞样白血病、急性淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病)、儿童实体瘤、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、脊柱肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮状癌、鳞状细胞癌、T 细胞淋巴瘤、环境诱发的癌症，包括石棉诱发的癌症，以及所述癌症的组合，例如，所述癌症是 B 细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)。

5

实施例

实施例中的统计学分析使用 GraphPad 软件(GraphPad Prism v5.0; GraphPad Software, San Diego, CA, USA)进行。通过配对 t 检验然后进行 Newman-Keuls 检验分析数据。结果表示为平均值±SEM。p 值<0.05 被认为是显著的。

10

实施例 1、用于表达 CAR 的慢病毒载体的优化

用于转导 CAR 的慢病毒载体应含有所需的 CAR 转基因并能够在细胞中表达。设计了两种用于表达 CAR 的第三代慢病毒载体，分别为旧载体 pPVLV1(图 1A)和新载体 pPVLV2(图 1B)。pPVLV1 含有 531bp 的长的人延伸因子 1α (EF1α)启动子，pPVLV1 含有 212bp 的截短的人 EF1α 启动子。两种载体中包含的各种元件及其描述见于下表 1。

15

本申请实施例中待表达的 CAR 包含靶向 CD19 的 scFv、人 CD8 的铰链和跨膜结构域、细胞内结构域 4-1BB 和 CD3 ζ。该靶向 CD19 的 CAR 的氨基酸如 SEQ ID NO:16 所示，核苷酸序列如 SEQ ID NO:8 所示。

20

表 1. pPVLV1 和 pPVLV2 慢病毒载体上的相关元件

特征	位置 (大小, bp)		描述
	pPVLV1 ¹⁾	pPVLV2 ²⁾	
5' LTR	1-675 (675) 5'HIV R-U5- Δ gag (SEQ ID NO:3)	1-181 (181) 截短的 (SEQ ID NO:11)	来自 HIV-1 的截短的 5'LTR。对病毒转录、逆转录和整合至关重要。
HIV-psi (ψ)	703-1,560 (858) (SEQ ID NO:4)	228-353 (126) (SEQ ID NO:12)	HIV-1 的包装信号。转移质粒包装必不可少。
RRE	850-1,083 (234) (SEQ ID NO:5)	846-1,079 (234) (SEQ ID NO:5)	对于病毒转录物的 Rev 依赖性 mRNA 从细胞核输出到细胞质是必需的。
cPPT/CTS	1,610,-1,727 (118) (SEQ ID NO:6)	1,606-1,723 (118) (SEQ ID NO:6)	HIV1 的 cPPT/CTS of HIV-1。提高载体整合和转导效率。
EF1α 启动子	1,827-2,357 (531) (SEQ ID NO:7)	1,817-2,028 (212) (SEQ ID NO:13)	驱动转基因表达的启动子。
CAR-19	2,507-3,964 (1,458) (SEQ ID NO:8)	2,042-3,499 (1,458) (SEQ ID NO:8)	转基因；靶向 CD19 的嵌合抗原受体。
WPRE	4,022-4,611 (590) (SEQ ID NO:9)	3,524-4,112 (589) (SEQ ID NO:14)	通过促进 mRNA 转录物成熟来改善转基因表达。
3' LTR	4,631-5,320 (690) 3' SIN LTR (SEQ ID NO:10)	4,184-4,417 (234) Δ -U3 (SEQ ID NO:15)	来自 HIV-1 的自我灭活 3'LTR。对于病毒转录、逆转录和整合至关重要。包含防止病毒复制的安全措施。

1) 包括 EF1 α 长启动子的 pPVLV1 载体(5,320 bp, SEQ ID NO:1)

2) 包括 EF1 α 短启动子的 pPVLV2 载体(4,417 bp, SEQ ID NO:2)

通过用 gag/pol 包装质粒、VSV-G 包膜质粒和包含如上所述慢病毒载体序列的转移构建体转染 293T 细胞产生慢病毒上清液。简言之, 将 DNA 混合物在 Opti-MEM (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA)混合, 并与等体积的含有 Lipofectamine 3000 (Life Technologies)的 Opti-MEM 混合。在室温下孵育 15 分钟后, 将所得混合物施加到 293T 细胞。在转染后 24 小时收集含有慢病毒的培养基。每次收集后, 将上清液通过 PVDF 膜(0.45 μ m)过滤。将慢病毒收获物合并, 并在 4 $^{\circ}$ C 下储存, 然后在 20,000xg 下超速离心 1 小时 30 分钟。将慢病毒颗粒重悬于 PBS 中。

图 1 示出了两种慢病毒载体的结构示意图, 以及通过重叠的 PCR 产物检验慢病毒完整性的策略。设计了合适的引物, 从使用随机引物逆转录的 cDNA 扩增重叠的片段 F1-F5。具有预期大小的 PCR 产物可以证明慢病毒的完整性。

图 2A 示出了从病毒基因组逆转录出的 cDNA 扩增出的各 DNA 片段。令人意想不到的是, 在含有 P_{EF1 α -L}(长启动子)的病毒基因片段中观察到缺陷的基因位点。箭头指示具有非预期的 DNA 片段(左)。在含有 P_{EF1 α -S}(短启动子)的病毒基因片段中没有观察到此现象。此种缺陷的病毒基因组可能影响滴度和转导效率。

为此, 测试了两种慢病毒的滴度和转导效率。对于慢病毒滴定, 将 2×10^6 个 293T 细胞接种到 6 孔板的每个孔中, 并用一系列体积的浓缩慢病毒转导。转导后 48 小时后, 将 293T 细胞从平板上分离。使用 Alexa Fluor 488 标记的山羊抗人 IgG F(ab)₂ 通过流式细胞术检测 CAR 的存在。使用常规 PCR 检查 5'LTR 至 3'LTR 的病毒基因组 RNA。

结果如图 2B 和 C 所示。具有 P_{EF1 α -L} 的病毒(基于 pPVLV1 载体)的转导效率(表达 CAR 的细胞比例)仅为 9.95%, 远远低于具有 P_{EF1 α -S} 的病毒(基于 pPVLV2 载体)的 70.4%。此外, 具有 P_{EF1 α -L} 的病毒(基于 pPVLV1 载体)的滴度也显著低于具有 P_{EF1 α -S} 的病毒(基于 pPVLV2 载体)的慢病毒。表明 pPVLV2 载体优于 pPVLV1 载体, 而这可能是由于不同长度的 EF1 α 启动子造成的。

实施例 2、启动子影响 CAR 基因的转导和表达

为了进一步证明不同启动子的影响, 基于 pPVLV2 构建了图 3 两种 CAR-荧光素酶报告载体, 其区别仅仅在与驱动转基因表达的启动子, 其中 CAR-19 被克隆至 P2A-Fluc(萤火虫荧光素酶)盒的上游, 形成双顺反子(图 3A 和 B)。

在所述载体转导进细胞中后, 由于存在 P2A 自剪切肽的编码序列, 在同一细胞将以大约 1:1 的比例表达出 CAR-19 和荧光素酶两种分子, 其中荧光强度可反映出 CAR-19 转导效率(见图 3C 原理示意图)。图 3D 示出将两种慢病毒载体转导进 293T 细胞 48 小时后测定的荧光素酶活性。结果显示, 用具有 P_{EF1 α -S} 的慢病毒载体转导的细胞荧光显著强于用具有 P_{EF1 α -L} 的慢病毒载体转导的细胞。进一步证明 P_{EF1 α -S} 显著改善了转基因在细胞的表达。

本实施例证明, 常规的强启动子, 531bp 的 EF1 α 启动子, 在慢病毒载体中用于蛋白表达时, 将令人意想不到地导致低转导效率。通过使用截短的 EF1 α 启动子(212bp)可以显著提高转导效率, 改善外源蛋白例如 CAR 在细胞中的表达。

5 实施例 3、在细胞中共表达 CAR 和 DNR II

TGF- β 是重要的 T 细胞抑制因子, 可能导致治疗性 T 细胞对靶细胞的杀伤作用减弱或消失。在临床上, TGF- β 广泛表达于多种肿瘤组织中, 显著抑制肿瘤特异性 T 细胞对肿瘤细胞的杀伤活性, 是免疫治疗失败的重要原因。而显性负性 TGF- β II 型受体 (dominant negative TGF- β receptor type II, DNR II) 是 TGF- β 的负性调节受体, 可以抑制 TGF- β 对 T 细胞的抑制作用。以下实施例研究在 T 细胞中共表达 CAR 和 DNR II 的效果。DNR II 的氨基酸序列示于 SEQ ID NO:17, 其核苷酸序列示于 SEQ ID NO:18。

首先, 类似于实施例 2, 基于 pPVLV2 构建了图 4(A 和 B)中两种 CAR-19-DNR II 载体, 其区别仅仅在驱动转基因表达的启动子。其中 CAR-19 和 DNR II 位于同一开放读码框, 中间包含 2A 多肽编码序列。图 4C 示出 CAR-19 和 DNR II 分子的结构示意图。其中 DNR II 缺失 TGFBR II 的胞内丝氨酸/苏氨酸激酶结构域, 无法向下游传导信号。

将 CAR-19 和 DNR II 编码序列由 2A 编码序列隔开, 置于同一开放读码框, 由同一启动子驱动表达, 可以最大程度确保所获得的经转导的细胞同时表达 CAR-19 和 DNR II。因为如果 CAR-19 和 DNR II 在不同载体中分别转导至细胞, 将可能造成部分细胞仅表达 CAR-19, 部分细胞仅表达 DNR II, 而共表达两种蛋白的细胞的比例将很低。另外, 如果两种蛋白的表达由同一载体中不同启动子驱动表达, 由于启动子效率的差异, 同样会降低同时表达两种蛋白的细胞的比例。

将两种 CAR-19-DNR II 慢病毒载体以相等的 MOI(感染复数)转导至 293T 细胞。使用标记的山羊抗人 IgG F(ab)₂ 或抗 DNR II 抗体通过流式细胞术使用 MACSQuant 分析仪 10 检测 CAR 或 DNR II 的表达, 并用 FlowJo 软件分析数据。

结果如图 5 所示, 用具有 P_{EF1 α} -S 的慢病毒载体转导的 293T 细胞中 CAR-19 和 DNR II 表达均显著高于用具有 P_{EF1 α} -L 的慢病毒载体转导的 293T 细胞。

此外, 还测试了两种 CAR-19 慢病毒载体以及两种 CAR-19-DNR II 慢病毒载体转导 T 细胞后的 CAR-19 和 DNR II 的表达。

健康供者来源的人外周血单个核细胞(PBMC)经过抗 CD3/CD28 Dynabeads 磁珠活化 2 天(珠:细胞=3:1), 以 1×10^6 个细胞/ml 重悬于补充有 rhIL-2 (200IU/mL)的 IMSF100 无血清培养基(LONZA, 比利时)中。分别加入 CAR-19 和 CAR-19-DNR II 慢病毒上清液进行转导。之后在 $1,200 \times g$ 下在 32 $^{\circ}C$ 下离心 2 小时。24 小时后, 除去含有病毒载体的上清液。将细胞以 3×10^5 个细胞/ml 悬浮于含 rhIL-2 (200IU/mL)的培养基, 每 2 至 3 天更换新鲜培养基, 扩增培养 12 天, 获得表达 CAR-19 分子的 CAR-T-19 细胞和共表达 CAR-19 分子和 DNR II 分子的 CAR-T-19-DNR II 细胞。以在同样培养条件下进行培养, 但未进行基因转导的 PBMC 为对照(NC)。使用流式细胞仪检测转导后获得的 CAR-T 细

胞的各蛋白分子的表达。细胞每 2-3 天进行一次碘化丙啶(PI)染色,通过流式细胞仪检测细胞活性。细胞培养过程中,每 2-3 天使用台盼蓝染色法进行细胞计数(每个样本三次重复),并计算细胞数量(均值 $\pm$ SD)。

结果如图 6 所示,未经转导的细胞(NC)不表达 CAR-19 或 DNR II。使用包含 P_{EF1 α} -S 的 pPVLV2 载体的 CAR-T-19 表达 CAR-19(表达率为 67.4%); CAR-T-19-DNR II 细胞既表达 CAR-19(表达率为 62.9%),也表达 DNR II(表达率为 62.3%)。说明 CAR-T-19-DNR II 细胞中 CAR-19 和 DNR II 为共表达,且转导效率与单独转导 CAR-19 相当。使用 P_{EF1 α} -L 载体时, CAR-T-19-DNR II 细胞中 CAR-19 和 DNR II 也为共表达,但是表达率显著降低;而在 CAR-T-19 细胞中, CAR-19 的表达率也显著降低。

此外,如图 7 所示, CAR-T-19-DNR II 细胞的活性与数量与 CAR-T-19 没有差异。

因此,本实施例确定 pPVLV2 载体的骨架(包含 P_{EF1 α} -S)特别适合用于 CAR 在细胞中例如 T 细胞中的表达,尤其适合于 CAR 和其他蛋白如 DNR II 的共表达。此外,将 CAR 和 DNR II 编码序列至于同一开放读码框,可以实现两种分子的高共表达率。

实施例 4、DNR II 的表达降低 TGF- β 1 诱导的 SMAD2 分子的磷酸化

TGF- β 对 T 细胞的抑制作用是通过 TGF- β 与其受体结合后,进行 SMAD2 分子磷酸化实现的。

将转导 9 天后的 CAR-T-19 细胞和 CAR-T-19-DNR II 细胞与重组人 TGF- β 1(10ng/ml)共孵育 24 小时,进行被磷酸化的 SMAD2 (pSMAD2)的表达水平的分析。以 GAPDH 和未磷酸化的 SMAD2 分子作为对照,通过 Western blot 进行 pSMAD2 分子的相对定量。

具体而言,使用 Bradford 测定试剂盒(Sigma-Aldrich)测量全细胞裂解物的蛋白质浓度。将等量的蛋白质加载到 SDS-PAGE 凝胶的孔中,并将分离的蛋白质转移到 PVDF 膜(Thermo Scientific)。用 TBST 中的 10%(w/v)脱脂乳封闭膜,然后与一抗(抗 pSMAD2 和抗 SMAD2;来自 Cell signaling Technologies, Danvers, MA, USA;全部以 1:1000 稀释)一起 4℃孵育过夜。然后用 TBST 洗涤膜,并与 HRP 缀合的山羊抗兔 IgG (1:2000 稀释;Cell Signaling Technologies)在室温下孵育 2 小时。然后将膜暴露于 ECL 试剂(Thermo Scientific),并使用发光图像分析仪(LAS-4000, Fuji Film, Tokyo, Japan)检测所得信号。

结果如图 8 所示, CAR-T-19-DNR II 细胞中 pSMAD2 的水平较 CAR-T-19 细胞显著下降。说明 DNR II 的表达抑制了 TGF- β 信号通路关键信号传导分子 SMAD2 的磷酸化。

实施例 5、经重组人 TGF- β 1 处理的 CAR-T-19-DNR II 细胞和 CAR-T-19 细胞中 IFN- γ 和 TNF- α 表达

IFN- γ 和 TNF- α 是 T 细胞对靶细胞进行杀伤的标志性细胞因子。这两种细胞因子表达水平高,说明 T 细胞对靶细胞的杀伤潜能高,反之,则杀伤潜能低。

将转导 9 天后的 CAR-T-19 细胞和 CAR-T-19-DNR II 细胞与或不与重组人

- TGF- β 1(10ng/ml)共孵育 24 小时后,两种细胞分别与表达 CD19 分子的 CD19⁺-K562 靶细胞共孵育 24 小时。为了定量 IFN- γ 和 TNF- α 的 mRNA 水平,收获每种混合细胞并使用 PureLink RNA Mini 试剂盒(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)提取总 RNA。在 DNase 消化和使用 Agilent 2100 生物分析仪(Agilent Technologies, Palo Alto, USA)进行浓度测定后,使用特异性引物和 One-step SensiFAST SYBR Low- ROX 试剂盒(Bioline, Maryland, USA)对总 RNA 样品进行实时定量 RT-PCR 分析,使用 QuantStudio3 实时 PCR 检测系统(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)。扩增 18s rRNA 为内部对照。通过 $\Delta \Delta Ct$ 法计算表达水平,并使用公式 $2^{-\Delta \Delta Ct}$ 获得表达倍数。所有实验一式三份进行。
- 10 结果显示,经重组人 TGF- β 1 处理后, CAR-T-19-DNR II 细胞中 IFN- γ 和 TNF- α 表达显著高于 CAR-T-19 细胞(图 9)。

实施例 6、经重组人 TGF- β 1 处理的 CAR-T-19-DNR II 细胞和 CAR-T-19 细胞对肿瘤靶细胞特异性杀伤

- 15 靶细胞杀伤实验使用转导 12 天的 CAR-T-19 细胞和 CAR-T-19-DNR II 细胞进行。
- 进行 TDA 释放测定以确定 TGF- β 1 存在下 CAR-T-19 细胞和 CAR-T-19-DNR II 细胞对 K562 或 CD19⁺-K562 的细胞毒活性。CAR-T-19 细胞和 CAR-T-19-DNR II 细胞分别与重组人 TGF- β 1(10ng/ml)共孵育 72 小时。靶细胞用 BA-TDA(Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut, USA)标记 15 分钟后,按分别 20:1、10:1、5:1、2.5:1 的效应细胞(T 细胞):靶细胞(肿瘤细胞)比例与效应细胞混合,共孵育 4 小时后检测 TDA 的释放(靶细胞裂解)。使用时间分辨荧光(TRF)读数器(Thermo Scientific)检测测定上清液的 TDA 释放。如下计算特异性裂解: %裂解=(实验裂解-自发裂解)/(最大裂解-自发裂解) $\times$ 100。
- 20 结果如图 10 所示,经过重组人 TGF- β 1 处理后, CAR-T-19 细胞对表达 CD19 的 K562 靶细胞杀伤作用降低至未加 CAR-T 细胞的背景水平(图 10A);而 CAR-T-19-DNR II 细胞对表达 CD19 的 K562 靶细胞杀伤作用几乎没有下降,与未加 CAR-T 细胞的杀伤作用有显著性差异(图 10B)。说明 DNR II 有效逆转了 TGF- β 对 T 细胞杀伤的抑制作用。
- 25

序列表

SEQ ID NO:1 含 CAR-19 编码序列的 pPVLV1 载体

GGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTT
GCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCCTTTTGTAGTCAGTGT
5 GGAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAACAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGC
TTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGGCGAGGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAATTTTGTAGTAGCGGAGGCTAGAAAGGAG
AGAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAA
GAAAAATATATAAATTAACATATAGTATGGGCAAGCAGGAGCTAGAACGATTGCGAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACAT
10 CAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACA
GTAGCAACCCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGACAAAA
CAAAAGTAAGACCACCGCACAGCAAGCGGGCGGCGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATAGGGACAATTGGAGAAG
TGAATTATATAAATATAAGTAGTAAAAATGAACCATTAGGAGTAGCACCACCAAGGCAAGAGAAAGTGGTGACAGAGAG
AAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCTGGGTTCTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGAGCTCAATGACG
15 CTGACGGTAGACGACAGCAATTATTGTCTGGTATAGTGACAGCAGAAACAATTGCTGAGGGCTATTGAGGCGACAGCA
TCTGTGCAACTCACAGTCTGGGCGATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAACTCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAGGATCAACAGC
TCCTGGGGAATTTGGGGTTGCTCTGGAAAACTCATTGTCACCACTGCTGTGCTTGGAAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTG
GAACAGATTGGAATCACAGACCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCTTAATTGA
AGAATCGCAAAACCAAGAAAGAAATGAACAAGAAATTAATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAAATTTGTTAAACA
20 TAACAATTTGGCTGTGGTATATAAAATTAATCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTAAGAAATAGTTTTTGTGTACTTT
TCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGATATTCACCATTAATCGTTTCAGACCCACCTCCCAACCCCGAGGGGACCCGACAGGGC
CGAAGGAATAGAAAGAGGTTGGAGAGAGACAGACAGATCCATTTCGATTAGTGAACGGATGGGCATGCTGCGGCCAA
TTCTGCAGACAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAAGAAAGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAAATAGT
AGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAAATTAACAAAACAATTAACAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATACAGGG
ACAGCAGAGATCCAGTTTGGTTAGTACCGGGCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGGCGGGGAATTCGATTAGA
25 TCCGGTGCCGTTACGTCAGGCGCACATCGCCACAGTCCCGGAGAAGTTGGGGGAGGGGTGGCAATTGAACCGGTGTC
CTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAACTGGGAAAGTATGTCGTGTACTGGCTCCGCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTG
ATATAAGTGCAAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAAGCGGTTTGCCGCCAGAACACAGCTGAAGCTTCGAGGGGCTCGC
ATCTCTCCTTCACGCGCCCGCGCCCTACCTGAGGCGCCCATCCACGCGGTTGAGTTCGCGTTCTGCCGCTCCCGCCTGTGG
30 TGCCTCCTGAACTGACGAGGCTTACGTTAGTTTAAAGTTCAGGTCGAGACCGGGCCTTTGTCCGGGCTCCCTTGGAGCC
TACCTAGACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTTGCCTGACCTGCTTGTCAACTCTACGTCCTTTGTTTCGTTTCTGTTCTGCGC
CGTTACAGATCCAAGTGTGACCGGCGCCTACGTAAGTGATATCTACTAGATTTATCAAAAGAGTGTTGACTTGTGAGCGCT
CACAAATGATACTTAGATTATCGAGAGGGACAGTCGACTACTAACCTTCTCTCTTCTCTACAGCTGAGATCGCCGCTGGG
35 ATCCCTCCTGAACTGACGAGGCTTACAGTGACCGCTTGTCTGCGGCTGGCCTTGTCTCCACGCGCCAGGCGGAGACA
TCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATT
AGTAAATATTTAAATTTGGTATCAGCAGAAACAGATGGAACCTGTTAAACTCCTGATCTACCATACATCAAGATTACACTCAGG
AGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCA
40 CTTACTTTTGCAACAGGTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGTGATATATATTCAAAACCACTTTATGACCAACTTACTA
CGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAACCACGACGCCAGCGCCGCGACCAC
CAACACCGGGCGCCACCATCGCGTCCGAGCCCTGTCCCTGCGGCCAGAGGCGTGC CGGCCAGCGGCGGGGGCGCAGTGCAC
ACGAGGGGGCTGGACTTCGCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGT
45 TATCACCCCTTTACTGCAACGCGGCGAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAAACCACTTTATGACCAACTTACTA
AAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAGGAGATGTGAACAGAGTGAAGTTTCAGCAGGAGCGCA
GACGCCCCCGGTACAGCAGGGCCAGAACAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGA
50 CAAGAGACGTGGCCGGGACCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAAGTGCAGA
AAGATAAGATGGCGGAGGCTACAGTGAGATTGGGATGAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAG
GGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCGCTTCACATGCAGGCGCTGCCCCCTCGCTAAACATGTTTAAAGGGTTC
GGTTCCACTAGGTACAATTCGATATCAAGCTTATCGATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATT
CTTAATATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTT
55 CATTTTCTCCTCCTTTGATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTGAGGCAACGTGGCGTGGTGT
GCACTGTGTTTGTGACGCAACCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTGAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCC
CTCCCTATTGGCACGGCGGAACCTCATCGCCGCTGCTTGGCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTC
60 CGTGGTGTGTCGGGGAAATCATCGTCTTTTCTTGGCTGCTCGCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGGGGACGTCCTTCT
GCTACGTCCTTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCTTCCCGGCGCTGCTCGGGCTCTGCGGCTCTTCCGCTCTTCGCG
CTTCCGCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCGCCTCCCCGCATCGATACCGTCGACCTCGATCGAGACCTAGAAAAAC
ATGGAGCAATCACAAGTAGCAATACAGCAGCTACCAATGCTGATTGTGCTGGCTAGAAGCACAAGAGGAGGAGGAGGTGGT
65 TTTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTAAAGAAAGGGG
GGGACTTGAAGGGCTTAATCACTCCCAACGAAGACAAGATATCTTTGATGTGGATCTACCAACACAAGGCTACTTCCCTG
ATTGGCAGAATAACACAGGGCCAGGGATCAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCAA
GAGAAGGTAGAGAAGCCAATGAAGGAGAGAACCCGCTTGTACACCTGTGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAG
AGAAGTATTAGAGTGGAGGTTTACAGCCGCTAGCATTTATCATATGGCCGAGAGCTGCATCCGAACTGTACTGGGTCTC
TCTGGTTAGACCAAGTCTGAGCCTGGGAGCTCTGTGGCTAACTAGGGAACCACTGCTTAAGCCTTAATAAGCCTTGCCTTGA
GTGCTTCAAGTAGTGTGCGCCGCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTGTAGTGTGGAAAAAT
CTCTAGCA

SEQ ID NO:2 含 CAR-19 编码序列的 pPVLV2 载体

GGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTT
GCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCCTTTTAGTCAGTGT
GGAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGC
5 TTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTACTAGCGGAGGCTAGAAAGGAG
AGAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGAGAAATTAGATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAA
GAAAAAATATAAATTAACCATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTTCGAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACAT
CAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACA
10 GTAGCAACCCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAA
CAAAAGTAAGACCACCGCACAGCAAGCGGCCGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAA
TTATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTAACCATTAGGATAGCACCCACCAAGGCAAGAGAAAGTGGTGACAGAGAGAAAA
AAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGA
CGGTACAGGCGCAGACATTTATTGTCTGGTATAGTGACAGCAGACAAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGGCAACAGCATCTGT
TTGCAACTCAGAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCT
15 GGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAACTCATTTGCACCACTGCTGTGGCTGTGGCTTGGAAATGCTAGTTGGAGTAATTAATCTCTGGAAC
AGATTTGGAATCACACGACCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAA
TCGCAAAACAGCAAGAAAGAAATGAACAAGAAATTTTGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTTGGTTTAAACATAAC
AAATTTGGCTGTGGTATATAAATTAATCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAAAGATAGTTTTTGTCTGACTTTCTA
TAGTAATAGAGTTAGGCAGGGATATTACCATTTATCGTTTCAGACCCACCTCCCAACCCCGAGGGACCGGCACAGGCCGAA
20 GGAATAGAAGAAGAGTGGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTGATAGTGAACGGATCGGCACTGCGTGCGCCAATTCT
GCAGACAAATGGCAGTATTATCCACCAATTTTAAAGAAAGGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAAATAGTAGAC
ATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAACAAATTACAAAATTCAAATTTTGGGTTTATTACAGGGACAG
CAGAGATCCAGTTTGGTTAAATTCGTAGCTAGGTTGAAAGGAGTGGGAATTTGGCTCCGGTCCGGTCCAGTGGGCGAGCG
CACATCGCCACAGTCCCGAGAAGTTGGGGGAGGGGTGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAACT
25 GGGAAAGTGATGTCTGTACTGGCTCCGCCCTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCCCGTGAAC
GTTCTTTTGCACACGGGTTTGGCGCCAGAACACAGACCGGTTCTAGAATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCTGCCGC
TGGCCTTGTCTCCACGCCGCCAGGCCGACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGA
GTCACCATCAGTTGCAAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATTTGGTATCAGCAGAAACAGATGGAACGTGTTAACT
CCTGATCTACCATACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCACAGGTTTCACTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATCTCTCA
30 CCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCACACAGGTAATACGCTTCCGTACACGTTCCGAGGGGG
ACCAAGCTGGAGATCACAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGTGGGTTGGCGCGGATCTGAGGTGAACTGCAGGAGTC
AGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCAGAGAGCTGTCCGTACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCGGACTATGGTGTA
GCTGGATTCCGACGCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACACATACTATAATTACAGT
35 CTCAAATCAGAGCTGACCATCAATCAAGGACAACTCAGAAAGCTTACTTTTGCACACAGGTAATACGCTTCCGTACACGTTCCGAGGGGG
AGCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGCCAGGAACCTCAGTCACCG
TCTCCTCAACACGAGCGCCAGCGCCGACACCAACACCGCGCCACCATCGCGTCGACAGCCCTGTCCCTGGCGCCAGAG
CGGTGCCGGCCAGCGCGGGGGCGCAGTGACACAGAGGGGGTGGACTTCGCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGC
CGGGACTTCTGGGCTTCTCCTGTCACTGTTATCACTTTTACTGCAACAGGGGAGGCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGCGCAGCGC
40 AACAACCATTTATGAGACAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAGGAGGA
TGTGAATGAGAGTGAAGTTGAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAA
TCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGA
ACCCCTCAGGAAGCCCTGTACAAATGAATCAGAAAGATAAGTGGCGGAGGCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGCGCAGCGC
CGGAGGGGCAAGGGGACGATGGCCTTTACAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGACAGGC
CCTGCCCTCTCGCTGAGGATCCACGCGTTAAGTCGACAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTC
45 TTAATATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTT
ATTTTCTCCTCCTTGTATATAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCGTTGTGAGGCAACGTGGCGTGGTGTG
CACTGTGTTTGTGACGCAACCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTGAGCTCCTTTCCGGGACTTTGCTTTCCCCC
TCCCTATTGCCACGGCGGAACCTCATCGCCGCTGCCCTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCC
GTGGTGTGTCGGGGAAATCATCGTCTTCTTGGCTGCTCGCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCTTCTGTG
50 CTACGTCCTTCGGGCTCAATCCAGCGGACCTTCCCTCCGCGGCTGCTGCGGCTCTGCGGCTCTTCCGCTCTTCCGCT
TTCCGCTCAGACGAGTCCGATCTCCCTTTGGGCCGCTCCCGCGTCGACTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAG
ATCTTAGCCACTTTTAAAGAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCATCCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTGTGTGT
ACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAG
55 CTGCTTGAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCCTTTTAGTCAG
TGTGGAAATCTCTAGCA

SEQ ID NO:3 5' HIV R-U5-Agag

GGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTT
GCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCCTTTTAGTCAGTGT
60 GGAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGC
TTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTACTAGCGGAGGCTAGAAAGGAG
AGAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGAGAAATTAGATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGGCGGGGAAA
GAAAAAATATAAATTAACCATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTTCGAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACAT
CAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACA
65 GTAGCAACCCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAA
CAAAAGTAAGA

SEQ ID NO:4 HIV-psi (ψ)

GATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCAT
70 TAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAGAGAGAGTGGTGACAGAGAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCTTGGG

- TTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGT
GCAGCAGCAGAACAAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGGTCC
AGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTGTTGGGGTGTCTGGAAAACCTATTTCG
5 ACCACTGCTGTGCCTTGGAAATGCTAGTTGGAGTAATAAAATCTCTGGAACAGATTGGAATCACACGACCTGGATGGAGTGGGA
CAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAATCGAAAACCAGCAAGAAAAGAAATGAACAAGAAAT
TATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAACATAACAAATTGGCTGTGGTATATAAAATATTTCATAATG
ATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAAAGAATAGTTTTTGTCTGTAATTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTACCATT
ATCGTTTCAGACCCACCTCCCAACCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAG
ACAGATCCATTGATTAGTGAACGGATC
- 10 SEQ ID NO:5 RRE
AGGAGCTTTGTTCCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGAC
AATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTC
TGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCT
- 15 SEQ ID NO:6 cPPT/CTS
TTTTAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAG
AATTACAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTT
- 20 SEQ ID NO:7 EF1 α 启动子长
TCCGGTGCCCGTCAGTGGGCGAGCGCACATCGCCCAAGTCCCGGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTGCGCAATTGAACCGGTGC
CTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGT
ATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGCTGAAGCTTCGAGGGGCTCGC
25 ATCTCTCCTTCACGCGCCCGCCGCCCTACCTGAGGCGCCCATCCACGCGGTTGAGTCGCGTTCTGCGCGCTCCCGCCTGTGG
TGCCTCCTGAAGTGCCTCCGCGTCTAGGTAAGTTTAAAGTTCAGGTCGAGACCGGGCCTTTGTCCGGCGCTCCCTTGGAGCC
TACCTAGACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTTGCCTGACCCTGCTTGCTCAACTCTACGTCTTTGTTTCGTTTTCTGTTCTGCGC
CGTTACAGATCCAAGCTGTGACCGGCGCCTACG
- 30 SEQ ID NO:8 CAR-19 编码序列
ATGGCCTTACAGTGACCGCCTTGCTCCTCGCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGACATCCAGATGACACAGAC
TACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAATT
GGTATCAGCAGAAACAGATGGAACGTGTTAAACTCCTGATCTACCATACTCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTT
35 AGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACA
GGGTAAATACGCTTCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAGATCACAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGCG
GTGGCGCGGATCTGAGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGTACATGCACT
GTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAGCTGGATTGCGCAGCCTCCACGAAAGGGTCTGGAAGTGGCTGGGAGTAAT
ATGGGAGTAGTGAACACATACTATAATTGAGCTCTCAATCCAGACTGACCATCATCAAGGACAACTCCAAGAGCCAAAGTTT
TCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGACACAGCCATTACTACTGTGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCT
40 ATGGACTACTGGGGCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAACCACGACGCCAGCGCCGCGACCAACACCGGCGCCAC
CATCGCTCGCAGCCCTGTCCCTGCGCCAGAGCGTGCCGCGCAGCGCGGGGGCGCAGTGACACAGAGGGGCTGGACT
TCGCGTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTTATCACCTTTACTGC
AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTTCAAAACACATTATGAGACCACTACTCAAGAGGAAGATGGCTG
TAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACA
45 AGCAGGGCCAGAACAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGG
GACCCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGACCCCTCAGGAAGGCCTGTACAAATGAAGTGCAGAAAGATAAGATGGCGGA
GGCCTACAGTGAAGTTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACAGGGTCTCAGTACAGCCA
CCAAGGACACCTACGACGCCCTTCATATGCAGGCCCTGCCCTCGC
- 50 SEQ ID NO:9 WPRE
TAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTACGCTATGTGGATACG
CTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCT
CTTTATGAGGAGTTGTGGCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGTTGCACTGTGTTTGTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGG
55 CATTGGCACCACTGTGAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCTTCCCTATTGCGACGGCGGAATCATCGCCGCTGGC
TTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATCCGTTGGTGTGTCGGGGAAATCATCGTCTTTCTTTGG
CTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCC
TTCCCGCGGCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCG
CCTCCCCGC
- 60 SEQ ID NO:10 3' SIN LTR
ATCGAGACCTAGAAAAACATGGAGCAATCACAAGTAGCAATACAGCAGCTACCAATGCTGATTGTGCCTGGCTAGAAGCACAA
GAGGAGGAGGAGTTGGGTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCA
65 CTTTTTAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACTCCCAACGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACA
CACAGGCTACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGATCAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGCTACAAG
CTAGTACCAGTTGAGCAAGAGAAGGTAGAAGAAGCAATGAAGGAGAGAACACCCGCTTGTACACCTGTGAGCCTGCATGG
GATGGATGACCCGGAGAGAGAAGTATTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGCTAGCATTTTCATCATGTGCCCCGAGAGCTGCATC
CGGACTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCT

CAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCCTT
TAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCA

5 SEQ ID NO:11 截短的 5'LTR
GGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTT
GCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCCTTTTAGTCAGTGT
GGAAAATCTCTAGCA

10 SEQ ID NO:12 HIV-psi (ψ)
CTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTT
GACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTC

15 SEQ ID NO:13 EF1 α 启动子短
GGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGAGGGGTGGCAATTGATCCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGC
GGGGTAACTGGGAAGTGATGTCTGTACTGGCTCCGCCTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGT
CGCCGTGAACGTTCTTTTCGCAACGGGTTTGC CGCCAGAACACAG

20 SEQ ID NO:14 WPRE
AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGC
TGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTTCTCTCCTTGATATAAATCCTGGTTGCTGTCTC
TTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTGAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGTGCTGACGCAACCCCACTGGTTGGGGC
ATTGCCACCACCTGTGAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCTTCCCTTATTGCCACGGCGGAACATCGCCCGCTGCCT
TGCCCGCTGTGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCGTGGTGTGTCGGGGAATCATCGTCCTTTCCTTGGC
25 TGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCT
TCCCGCGGCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTCCGCGTCTTCGCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCGCG
CTCCCGC

30 SEQ ID NO:15 3' LTR Δ -U3
TGGAAGGGCTAATTCACCTCCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCC
TGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCCTTGAAGTGTGTTGAGTGTGCTGCTG
TCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCA

35 SEQ ID NO:16 CAR-19 氨基酸序列
MALPVTALLL PLALLLHAAR PDIQMTQTTS SLSASLGDRV TISCRASQDI SKYLNWYQQK PDGTVKLLIY HTSRLHSGVP
SRFSGSGSGT DYSLTISNLE QEDIATYFCQ QGNTLPYTFG GGTKLEITGG GSGSGGSGG GGSEVKLQES GPGLVAPSQS
LSVTCTVSGV SLPDYGVSWI RQPPRKGLEW LGVIWGSETT YNSALKSRL TLIKDNSKSQ VFLKMNSLQT DDTAIYYCAK
HYYYGGSYAM DYWGQTSVT VSSTTTPAPR PTPAPTAS QPLSLRPEAC RPAAGGAVHT RGLDFACDIY IWAPLAGTCG
VLLLSLVITL YCKRGRKKLL YIFKQPFMRP VQTTQEEDGC SCRFPETEEG GCELRVKFSR SADAPAYQQG QNQLYNELNL
40 GRREYDVLD KRRGRDPEMG GKPRRKNPQE GLYNELQKDK MAEAYSEIGM KGERRRGKGH DGLYQGLSTA TKDITYDALHM
QALPPR

SEQ ID NO:17 DNRII 的氨基酸序列
MGRGLLRGLW PLHIVLWTRI ASTIPPHVQK SVNNDMIVTD NNGAVKFPQL CKFCDVRFST CDNQKSCMSN CSITSICEKP
45 QEVCVAVWRK NDENITLETV CHDPKLPYHD FILEDAASPK CIMKEKKKPG ETFFMCSSS DECNDNIIFS EYNTSNPDL
LLVIFQVTGI SLLPPLGVAI SVIIFICYR VNRQQKLSST WETGKTRKLM EFSEHCAII

50 SEQ ID NO:18 DNRII 的核苷酸序列
ATGGGTGCGG GGCTGCTCAG GGGCCTGTGG CCGCTGCACA TCGTCTGTG GACGCGTATC GCCAGCACGA TCCCACCGCA
CGTTCAGAAG TCGGTAAATA ACGACATGAT AGTCACTGAC AACACGGTG CAGTCAAGTT TCCACAAC TGTAATTTT
GTGATGTGAG ATTTTCCACC TGTGACAACC AGAAATCTG CATGAGCAAC TGCAGCATCA CCTCCATCTG TGAGAAGCCA
CAGGAAGTCT GTGTGGCTGT ATGGAGAAAG AATGACGAGA ACATAACACT AGAGACAGTT TGCCATGACC CCAAGCTCCC
CTACCATGAC TTTATTCTGG AAGATGCTGC TTCTCCAAAG TGCATTATGA AGGAAAAAA AAAGCCTGGT GAGACTTTCT
55 TCATGTGTTT CTGTAGCTCT GATGAGTGCA ATGACAACAT CATCTTCTCA GAAGAATATA ACACCAGCAA TCCTGACTTG
TTGCTAGTCA TATTTCAAGT GACAGGCATC AGCCTCCTGC CACCACTGGG AGTTGCCATA TCTGTCATCA TCATCTTCTA
CTGCTACCGC GTTAACCGGC AGCAGAAGCT GAGTTCACCC TGGGAAACCG GCAAGACGCG GAAGCTCATG GAGTTCAGCG
AGCACTGTGC CATCATC

权 利 要 求 书

1. 一种制备特异性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞的方法，包括在 T 细胞中共表达外源癌症相关抗原特异性受体蛋白和显性负性 TGF- β II 型受体。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述显性负性 TGF- β II 型受体缺失 TGF- β II 型受体的胞内信号传导结构域，例如，所述显性负性 TGF- β II 型受体包含 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列。

3. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述外源癌症相关抗原特异性受体蛋白选自 T 细胞受体(TCR)和嵌合抗原受体(CAR)。

4. 权利要求 3 的方法，所述 TCR 特异性结合癌症相关抗原，所述 CAR 包含针对癌症相关抗原的细胞外抗原结合结构域。

5. 权利要求 4 的方法，所述 CAR 包括特异性结合癌症相关抗原的细胞外抗原结合结构域如 scFv、CD8 铰链和跨膜结构域、CD3 ζ 信号转导结构域、和 4-1BB 共刺激结构域。

6. 权利要求 1-5 任一项的方法，其中所述癌症相关抗原选自 CD16、CD64、CD78、CD96、CLL1、CD116、CD117、CD71、CD45、CD71、CD123、CD138、ErbB2(HER2/neu)、癌胚抗原(CEA)、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、表皮生长因子受体(EGFR)、EGFR 变体 III (EGFRvIII)、CD19、CD20、CD30、CD40、双唾液酸神经节苷脂 GD2、导管上皮粘蛋白、gp36、TAG-72、鞘糖脂、神经胶质瘤相关的抗原、 β -人绒毛膜促性腺激素、 α 胎儿球蛋白(AFP)、外源凝集素反应性 AFP、甲状腺球蛋白、RAGE-1、MN-CA IX、人端粒酶逆转录酶、RU1、RU2(AS)、肠羧基酯酶、mut hsp70-2、M-CSF、前列腺酶(protease)、前列腺酶特异性抗原(PSA)、PAP、NY-ESO-1、LAGA-1a、p53、Prostein、PSMA、存活和端粒酶、前列腺癌肿瘤抗原-1 (PCTA-1)、MAGE、ELF2M、嗜中性粒细胞弹性蛋白酶、肝配蛋白 B2、CD22、胰岛素生长因子(IGF1)-I、IGF-II、IGFI 受体、间皮素、呈递肿瘤特异性肽表位的主要组织相容性复合体(MHC)分子、5T4、ROR1、Nkp30、NKG2D、肿瘤基质抗原、纤维连接蛋白的额外结构域 A(EDA)和额外结构域 B (EDB)、腱生蛋白-C 的 A1 结构域(TnC A1)、成纤维细胞相关蛋白(fap)、CD3、CD4、CD8、CD24、CD25、CD33、CD34、CD133、CD138、Foxp3、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、GM-CSF、细胞因子受体、内皮因子、BCMA (CD269、TNFRSF17)、TNFRSF17 (UNIPROT Q02223)、SLAMF7(UNIPROT Q9NQ25)、GPCR5D(UNIPROT Q9NZD1)、FKBP11(UNIPROT Q9NYL4)、KAMP3、ITGA8 (UNIPROT P53708)和 FCRL5(UNIPROT Q68SN8)。

7. 权利要求 6 的方法，其中所述 CAR 包含针对 CD19 的细胞外抗原结合结构域，例如，所述 CAR 包含 SEQ ID NO:16 所示氨基酸序列。

8. 权利要求 1-7 中任一项的方法，其包括用包含慢病毒载体的慢病毒颗粒转导所述 T 细胞，所述慢病毒载体包含编码融合多肽的核苷酸序列，所述融合多肽包含通过自裂解肽连接的所述外源抗原特异性受体蛋白和所述显性负性 TGF- β II 型受体，从而在所述

T 细胞中共表达外源抗原特异性受体蛋白和显性负性 TGF- β II 型受体。

9. 权利要求 8 的方法, 其中所述自裂解肽是 2A 多肽, 例如, 所述自裂解肽选自 P2A、F2A、E2A 或 T2A 多肽, 或其功能性变体。

10. 权利要求 8 或 9 的方法, 其中所述编码融合多肽的核苷酸序列与截短的 EF1 α 启动子可操作地连接, 例如, 所述截短的 EF1 α 启动子包含 SEQ ID NO:13 所示核苷酸序列。

11. 权利要求 8-10 中任一项的方法, 其中所述慢病毒载体还包含选自以下的至少一种元件: 5' LTR、 ψ 元件、RRE 元件、cPPT/CTS 元件、WPRE 元件和 3' LTR。

12. 权利要求 11 的方法, 其中所述慢病毒载体包含可操作连接的 5' LTR、 ψ 元件、RRE 元件、cPPT/CTS 元件、所述截短的 EF1 α 启动子、所述编码融合多肽的核苷酸序列、WPRE 元件和 3' LTR。

13. 权利要求 11 或 12 的方法, 其中所述 5' LTR 包含 SEQ ID NO:3 或 11 所示核苷酸序列; 所述 ψ 元件包含 SEQ ID NO:4 或 12 所示核苷酸序列; 所述 RRE 元件包含 SEQ ID NO:5 所示核苷酸序列; 所述 cPPT/CTS 元件包含 SEQ ID NO:6 所示核苷酸序列; 所述 WPRE 元件包含 SEQ ID NO:9 或 14 所示核苷酸序列; 其中所述 3' LTR 包含 SEQ ID NO:10 或 15 所示核苷酸序列。

14. 权利要求 13 的方法, 其中所述慢病毒载体包含可操作连接的包含 SEQ ID NO:11 所示核苷酸序列的 5' LTR, 包含 SEQ ID NO:12 所示核苷酸序列的 ψ 元件, 包含 SEQ ID NO:5 所示核苷酸序列的 RRE 元件, 包含 SEQ ID NO:6 所示核苷酸序列的 cPPT/CTS 元件, 包含 SEQ ID NO:13 所示核苷酸序列的截短的 EF1 α 启动子, 所述编码融合多肽的核苷酸序列、包含 SEQ ID NO:14 所示核苷酸序列的 WPRE 元件, 包含 SEQ ID NO:15 所示核苷酸序列的 3' LTR。

15. 一种特异性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞, 其通过权利要求 1-14 中任一项的方法产生。

16. 一种特异性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞, 其共表达外源癌症相关抗原特异性受体蛋白和显性负性 TGF- β II 型受体, 所述治疗性 T 细胞包含慢病毒载体, 所述慢病毒载体包含编码融合多肽的核苷酸序列, 所述融合多肽包含通过自裂解肽连接的所述外源癌症相关抗原特异性受体蛋白和所述显性负性 TGF- β II 型受体。

17. 权利要求 16 的特异性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞, 其中所述显性负性 TGF- β II 型受体缺失 TGF- β II 型受体的胞内信号传导结构域, 例如, 所述显性负性 TGF- β II 型受体包含 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列。

18. 权利要求 16 或 17 的特异性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞, 其中所述外源癌症相关抗原特异性受体蛋白选自 T 细胞受体(TCR)和嵌合抗原受体(CAR)。

19. 权利要求 18 的特异性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞, 所述 TCR 特异性结合癌症相关抗原, 所述 CAR 包含针对癌症相关抗原的细胞外抗原结合结构域。

20. 权利要求 19 的特异性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞, 所述 CAR 包括特异

性结合癌症相关抗原的细胞外抗原结合结构域如 scFv、CD8 铰链和跨膜结构域、CD3 ζ 信号转导结构域、和 4-1BB 共刺激结构域。

21. 权利要求 16-20 任一项的特定性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞, 其中所述癌症相关抗原选自 CD16、CD64、CD78、CD96、CLL1、CD116、CD117、CD71、CD45、CD71、CD123、CD138、ErbB2(HER2/neu)、癌胚抗原(CEA)、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、表皮生长因子受体(EGFR)、EGFR 变体 III (EGFRvIII)、CD19、CD20、CD30、CD40、双唾液酸神经节苷脂 GD2、导管上皮粘蛋白、gp36、TAG-72、鞘糖脂、神经胶质瘤相关的抗原、 β -人绒毛膜促性腺激素、 α 胎儿球蛋白(AFP)、外源凝集素反应性 AFP、甲状腺球蛋白、RAGE-1、MN-CA IX、人端粒酶逆转录酶、RU1、RU2(AS)、肠羧基酯酶、mut hsp70-2、M-CSF、前列腺酶(protease)、前列腺酶特异性抗原(PSA)、PAP、NY-ESO-1、LAGA-1a、p53、Prostein、PSMA、存活和端粒酶、前列腺癌肿瘤抗原-1 (PCTA-1)、MAGE、ELF2M、嗜中性粒细胞弹性蛋白酶、肝配蛋白 B2、CD22、胰岛素生长因子(IGF1)-I、IGF-II、IGFI 受体、间皮素、呈递肿瘤特异性肽表位的主要组织相容性复合体(MHC)分子、5T4、ROR1、Nkp30、NKG2D、肿瘤基质抗原、纤维连接蛋白的额外结构域 A(EDA) 和额外结构域 B (EDB)、腱生蛋白-C 的 A1 结构域(TnC A1)、成纤维细胞相关蛋白(fap)、CD3、CD4、CD8、CD24、CD25、CD33、CD34、CD133、CD138、Foxp3、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、GM-CSF、细胞因子受体、内皮因子、BCMA (CD269、TNFRSF17)、TNFRSF17 (UNIPROT Q02223)、SLAMF7(UNIPROT Q9NQ25)、GPCR5D(UNIPROT Q9NZD1)、FKBP11(UNIPROT Q9NYL4)、KAMP3、ITGA8 (UNIPROT P53708) 和 FCRL5(UNIPROT Q68SN8)。

22. 权利要求 21 的特定性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞, 其中所述 CAR 包含针对 CD19 的细胞外抗原结合结构域, 例如, 所述 CAR 包含 SEQ ID NO:16 所示氨基酸序列。

23. 权利要求 16-22 中任一项的特定性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞, 其中所述自裂解肽是 2A 多肽, 例如, 所述自裂解肽选自 P2A、F2A、E2A 或 T2A 多肽, 或其功能性变体。

24. 权利要求 16-23 中任一项的特定性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞, 其中所述编码融合多肽的核苷酸序列与截短的 EF1 α 启动子可操作地连接, 例如, 所述截短的 EF1 α 启动子是包含 SEQ ID NO:13 所示核苷酸序列的 EF1 α 核心启动子。

25. 权利要求 16-24 中任一项的特定性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞, 其中所述慢病毒载体还包含选自以下的至少一种元件: 5' LTR、 ψ 元件、RRE 元件、cPPT/CTS 序列、WPRES 元件和 3' LTR。

26. 权利要求 25 的特定性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞, 其中所述慢病毒载体包含可操作连接的 5' LTR、 ψ 元件、RRE 元件、cPPT/CTS 元件、所述截短的 EF1 α 启动子、所述编码融合多肽的核苷酸序列、WPRES 元件和 3' LTR。

27. 权利要求 25 或 26 的特定性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞, 其中所述 5' LTR

包含 SEQ ID NO:3 或 11 所示核苷酸序列；所述 ψ 元件包含 SEQ ID NO:4 或 12 所示核苷酸序列；所述 RRE 元件包含 SEQ ID NO:5 所示核苷酸序列；所述 cPPT/CTS 元件包含 SEQ ID NO:6 所示核苷酸序列；所述 WPRE 元件包含 SEQ ID NO:9 或 14 所示核苷酸序列；其中所述 3' LTR 包含 SEQ ID NO:10 或 15 所示核苷酸序列。

28. 权利要求 27 的 特异性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞，其中所述慢病毒载体包含可操作连接的包含 SEQ ID NO: 11 所示核苷酸序列的 5' LTR，包含 SEQ ID NO: 12 所示核苷酸序列的 ψ 元件，包含 SEQ ID NO:5 所示核苷酸序列的 RRE 元件，包含 SEQ ID NO:6 所示核苷酸序列的 cPPT/CTS 元件，包含 SEQ ID NO:13 所示核苷酸序列的截短的 EF1 α 启动子，所述编码融合多肽的核苷酸序列、包含 SEQ ID NO:14 所示核苷酸序列的 WPRE 元件，包含 SEQ ID NO: 15 所示核苷酸序列的 3' LTR。

29. 药物组合物，其包含权利要求 15-28 中任一项的 特异性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞，和药物可接受的载体。

30. 权利要求 15-28 中任一项的 特异性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞或权利要求 29 的药物组合物在制备用于在对象中治疗癌症的药物中的用途。

31. 一种在对象中治疗癌症的方法，包括给所述对象施用治疗有效量的权利要求 15-28 中任一项的 特异性靶向癌症相关抗原的治疗性 T 细胞或权利要求 29 的药物组合物。

32. 前述权利要求中任一项的方法、治疗性 T 细胞、药物组合物或用途，其中所述癌症选自肺癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、黑色素瘤、肾癌、膀胱癌、乳腺癌、肝癌、淋巴瘤、恶性血液病、头颈癌、胶质瘤、胃癌、鼻咽癌、喉癌、宫颈癌、子宫体瘤、骨肉瘤、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、前列腺癌、子宫癌、肛区癌、睾丸癌、输卵管癌、子宫内膜癌、阴道癌、阴户癌、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、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(包括急性髓细胞样白血病、慢性髓细胞样白血病、急性淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病)、儿童实体瘤、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、脊柱肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮状癌、鳞状细胞癌、T 细胞淋巴瘤、环境诱发的癌症，包括石棉诱发的癌症，以及所述癌症的组合，例如，所述癌症是 B 细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)。