202017576

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本　(11)公開編號：TW 202017576 A

(43)公開日： 中華民國 109 (2020) 年 05 月 16 日

(21)申請案號：108108068　(22)申請日： 中華民國 108 (2019) 年 03 月 11 日

(51)Int. Cl.：　*A61K35/17* *(2015.01)*　*A61K38/17* *(2006.01)*

A61K38/20 *(2006.01)*

(30)優先權：2018/03/09　美國　15/916,689

(71)申請人：史丹佛大學董事會 (美國) THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY　(US)

美國

(72)發明人：賈西亞　奇南 GARCIA, KENAN CHRISTOPHER (US)；索柯斯基　強納森 SOCKOLOSKY, JONATHAN (US)；皮頓　羅拉 PICTON, LORA (US)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無　申請專利範圍項數：30 項　圖式數：23　共 136 頁

(54)名稱

生物相關之正交細胞激素／受體對

(57)摘要

本發明提供經工程處理之正交細胞激素受體/配體對及其使用方法。

Engineered orthogonal cytokine receptor/ligand pairs, and methods of use thereof, are provided.

202017576

【發明摘要】

【中文發明名稱】

生物相關之正交細胞激素／受體對

【英文發明名稱】

BIOLOGICALLY RELEVANT ORTHOGONAL CYTOKINE/ RECEPTOR PAIRS

【中文】

本發明提供經工程處理之正交細胞激素受體/配體對及其使用方法。

【英文】

Engineered orthogonal cytokine receptor/ligand pairs, and methods of use thereof, are provided.

【指定代表圖】無

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

生物相關之正交細胞激素／受體對

【英文發明名稱】

BIOLOGICALLY RELEVANT ORTHOGONAL CYTOKINE/ RECEPTOR PAIRS

交叉參考資料

【0001】本申請案主張2018年3月9日提交之美國部分延續專利申請案編號15/916,689之權益，該申請案之全部內容以引用方式併入本文。

聯邦政府資助之研究和發展

【0002】本發明係在國家衛生研究院授予之合約AI513210下由政府資助完成。政府擁有本發明的某些權利。

【技術領域】

【0003】本發明係關於生物相關之正交細胞激素/受體對。

【先前技術】

【0004】操作細胞，特別是免疫細胞，以分化、發展

專門功能和擴充數量具有很大的臨床利益。本技藝已知許多影響這些活性之蛋白質因子，包括，尤其是細胞激素和趨化介素。然而，這些訊號傳導分子對非作為操作靶的之細胞亦具有多重效果，因此需要在靶細胞群中選擇性活化訊號傳導之方法。特別地，對T細胞進行工程處理以進行受控行為是有利益。例如，在過繼免疫療法中係將T細胞從血液中單離出，在活體外經加工處理後再重新注入患者體內。T細胞已經過工程處理以用於治療性應用中，諸如識別和殺死癌細胞、細胞內病原體及參與自體免疫之細胞。

【0005】在基於細胞之療法中的一種關鍵挑戰是將被內源性訊號傳導途徑阻擋、不會影響非靶向之內源性細胞及一旦投予患者後可受控制之所需之行為(諸如活化、擴增等)經工程處理入過繼轉移之細胞中。由於發展的可塑性及環境因子在決定T細胞命運、功能和定位方面的巨大影響，這與T細胞工程處理特別有關。

【0006】以無關於天然蛋白質或配體之影響、或與天然蛋白質或配體正交影響之方式操縱蛋白質與經修飾之配體結合及對經修飾之配體反應的能力構成在蛋白質工程處理中的重大挑戰。迄今為止，已創建許多與類似之天然交互作用正交之合成配體-異種同源受體對。用於該工作之蛋白質包括核激素受體和G蛋白偶聯受體。儘管已進行大量工作以工程處理該藉由合成之小分子配體活化的受體，但生物學相關之蛋白質對的工程處理仍為重大的挑戰。

【發明內容】

【0007】本發明提供經工程處理之正交細胞激素受體/配體對及其使用方法。經工程處理的(正交的)細胞激素與對應之經工程處理的(正交的)受體特異性結合。在結合時，該正交受體活化透過天然細胞元件轉導之訊號傳導以提供模擬天然反應，但對表現該正交受體之經工程處理的細胞特異性之生物活性。該正交受體顯現出顯著減少與內源性對應之細胞激素(包括該正交細胞激素之天然對應物)的結合，而該正交細胞激素顯現出顯著減少與任何內源性受體(包括該正交受體之天然對應物)的結合。於一些實施態樣中，該正交細胞激素對該正交受體之親和力與該天然細胞激素對該天然受體之親和力相當。

【0008】用於工程處理正交細胞激素受體對之方法可包含下述步驟：(a)進行工程處理以在天然受體中引入胺基酸改變以破壞與天然細胞激素結合；(b)產生多種細胞激素類似物，該細胞激素類似物在天然細胞激素用於受體結合的接觸殘基處具有選擇性胺基酸變化，(c)選擇與異種同源受體結合之細胞激素異種同源物；(d)丟棄與天然受體顯著結合之異種同源細胞激素，或進行步驟(c)和(d)；(e)選擇與異種同源細胞激素結合之受體異種同源物；(f)丟棄與該天然細胞激素結合之異種同源受體。於較佳之實施態樣中，使用該細胞激素/受體複合物之結構知識來選擇用於位置導向之誘變或易錯誘變的胺基酸位置。方便的是，

該選擇過程可使用酵母展示系統，但亦可使用其他顯示和選擇方法。

【0009】於一些實施態樣中，提供經工程處理之細胞，其中該細胞已藉由引入本發明之正交受體進行修飾。任何細胞均可用於此目的。於一些實施態樣中，該細胞為T細胞，包括，但不限於初始$CD8^+$T細胞、細胞毒性$CD8^+$T細胞、初始$CD4^+$T細胞、輔助T細胞，例如T_H1、T_H2、T_H9、T_H11、T_H22、T_{FH}；調節性T細胞，例如T_R1、天然T_{Reg}、誘導型T_{Reg}；記憶T細胞，例如中央記憶T細胞、效應記憶T細胞、NKT細胞、γδT細胞和該等T細胞之經工程處理的變體，包括CAR-T細胞等。於其他實施態樣中，該經工程處理之細胞為幹細胞，例如造血幹細胞、NK細胞、巨噬細胞或樹突細胞。於一些實施態樣中，在轉移入受試者之前，該細胞係在活體外程序中經遺傳修飾。該經工程處理之細胞可提供在用於療法之單位劑量中，且相對於所欲之接受者可為同種異體、自體的等。

【0010】於一些實施態樣中，提供包含編碼正交受體之多核苷酸編碼序列的載體，其中該編碼序列係可操作地連接在所需細胞中具有活性的啟動子。本技藝已知各種載體且可用於此目的，例如病毒載體、質體載體、小環載體，該載體可被整合入靶細胞基因組中或可維持游離基因形式。該受體編碼載體可與編碼正交細胞激素之載體一起提供在套組中，該正交細胞激素與受體結合並活化該受體。於一些實施態樣中，該正交細胞激素之編碼序列係可

操作地連接高表現啟動子並且可經優化以用於生產。於其他實施態樣中，提供一種套組，其中該編碼該正交受體之載體與該正交細胞激素之純化的組成物係提供在，例如經包裝以用於投予患者之單位劑量(例如預填充之注射器)中。再於一些其他實施態樣中，提供一種套組，其中該編碼該正交受體之載體係與編碼該正交細胞激素之載體一起提供，以使該正交受體能夠在細胞中表現且亦表現預期由相同細胞分泌之正交細胞激素，以使自體分泌正交細胞激素-受體訊號傳導成為可行。

【0011】於一些實施態樣中，提供治療方法，該方法包含將經工程處理之細胞群引入有此需要之接受體中，其中該細胞群已藉由引入編碼本發明之正交受體的序列進行修飾。該細胞群可在活體外經工程處理，且相對於該接受體通常為自體的或同種異體的。於一些實施態樣中，在投予該經工程處理之細胞後，該經引入之細胞群與同源正交細胞激素在體內接觸。本發明之優點為該正交細胞激素和天然受體之間無交叉反應性。

【圖式簡單說明】

【0012】當結合附圖閱讀時，從下列之詳細描述中可充分理解本發明。需要強調的是，根據慣例，該附圖之各種特性並未按比例。相反地，為了清楚起見，各種特性之尺寸被任意擴大或縮小。附圖中包括下列附圖。

【0013】**圖1-1(ii).** 控制T細胞擴增之正交IL-2/IL-2

受體對。

【0014】**圖2.** 經工程處理之正交IL-2/IL-2Rβ對的工作流程。

【0015】**圖3.** 正交小鼠IL-2Rβ變體之序列。

【0016】**圖4.** mIL-2RβH134D Y135F突變消除wt mIL-2結合。

【0017】**圖5.** 經工程處理之正交IL-2/IL-2Rβ對的工作流程。

【0018】**圖6.** 經表徵之正交小鼠IL-2變體的序列。

【0019】**圖7.** 正交IL-2變體以類似於或大於野生型IL-2和IL-2Rβ交互作用之親和力與正交IL-2 Rβ結合。

【0020】**圖8.** 正交IL-2變體在野生型CD25陽性和CD25陰性脾細胞上顯現出鈍化活性(磷酸STAT5)。

【0021】**圖9.** 產生表現正交IL-2R之小鼠CTLL-2 T細胞。

【0022】**圖10.** 第一組正交IL-2變體對正交T細胞具有選擇性。

【0023】**圖11.** 正交IL-2變體誘導表現正交IL-2Rβ之CTLL-2細胞上的選擇性STAT5磷酸化。

【0024】**圖12.** 經工程處理以表現正交IL-2Rβ之源自初級淋巴結的T細胞 (H134D Y135F)。

【0025】**圖13.** 正交IL-2變體誘導表現正交IL-2Rβ之原代小鼠T細胞上的選擇性STAT5磷酸化。

【0026】**圖14.** 與野生型T細胞相比較，正交IL-2變

體誘導表現正交IL-2Rβ之CTLL-2細胞的選擇性細胞生長。

【0027】**圖15.** 小鼠和人參考IL-2Rβ/IL-2序列之比對。人IL-2Rβ之部分序列係以SEQ ID NO:1，殘基1-235提供；小鼠IL-2Rβ之部分序列係以SEQ ID NO:2，殘基1-238提供。小鼠IL-2係以SEQ ID NO:3提供。人IL-2係以SEQ ID NO:4提供。

【0028】**圖16A-16D.** 酵母發展正交人IL-2對。(**圖16A**)使用FACS分析酵母展示的與野生型(藍色直方圖)結合，但不與正交(紅色直方圖)人IL-2Rβ H133D Y134F突變體四聚體結合的野生型人IL-2。(**圖16B**)展示人IL-2突變體(~1^8突變體)的集合庫在酵母的表面上，該人IL-2突變體將經預測接近人IL-2RβHY突變體或與人IL-2RβHY突變體接觸之IL-2殘基隨機化。在連續幾輪陽性(針對正交hIL-2Rβ)和陰性(針對野生型hIL-2Rβ)選擇後，我們取得酵母展示之人IL-2突變體，該人IL-2突變體與正交人IL-2Rβ四聚體(紅色直方圖)結合，但不與野生型(藍色直方圖)人IL-2Rβ四聚體結合。(**圖16C、16D**)隨後從酵母庫中單離出正交hIL-2突變體並定序。鑑定指明能與正交hIL-2Rβ結合之正交hIL-2序列集合體的一致突變組。

【0029】**圖17.** 使用活體內小鼠模式來證明在小鼠中選擇性擴增表現正交IL-2Rb之T細胞或增加其存活。從表現CD45.2之野生型C57BL/6J小鼠的脾中單離出供體細胞，在活體外使用CD3/CD28活化，並以編碼正交IL-2Rb-

IRES-YFP之逆轉錄病毒轉導，在100IU/mL mIL-2中擴增2天，並使用小鼠CD8 T細胞單離套組(Miltenyi)純化。將表現野生型(CD45.2陽性，YFP陰性)和正交IL-2Rb(CD45.2陽性，YFP陽性)之T細胞的~1:1混合物經由眼眶後注射過繼性轉移入接受體BL6.Rag2$^{-/-}$xIL2rg$^{-/-}$CD45.1小鼠中。在轉移T細胞(d0)後立即開始每天IP注射PBS、野生型mIL-2(150,000IU/小鼠)或正交-2選殖株1G12/149(1,000,000 IU/小鼠)，每隔24小時注射一次，連續5天(直至d4)。在d5和d7殺死小鼠並藉由流式細胞術定量小鼠血液和脾臟中之總供體T細胞計數。

【0030】**圖18A-18B.** 使用門控策略來定量在接受體小鼠中之供體T細胞擴增。製備來自小鼠血液和脾臟之單細胞懸浮液，並以CD45.2-太平洋藍在4℃下染色1小時以鑑定供體T細胞。在進行流式細胞術之前不久，將細胞與用於活/死排除之碘化丙錠(PI)的1:2000稀釋液一起培育。基於前向和側向散射(SSC-A v FSC-A)、單峰(FSC-A v FSC-H)、活細胞(PI陰性)對細胞進行門控，並經由FACS定量和野生型T細胞(CD45.2陽性，YFP陰性)及正交T細胞(CD45.2陽性，YFP陽性)之總數。**p<0.01，***p<0.001，****p<0.0001，使用Prism藉由單因子ANOVA測定。

【0031】**圖19.** 正交IL-2選殖株1G12/149選擇性地擴增小鼠中之正交T細胞，但不擴增野生型T細胞。如第18圖所示，經由流式細胞術定量血液(10^3細胞/uL)和脾臟(每個脾臟的細胞總數)中之野生型和正交T細胞的數量。藉由將

血液和脾臟中之正交T細胞的總數除以野生型T細胞的總數來測定正交T細胞與野生型T細胞之比例。大於1之比率指明選擇性擴增正交T細胞，此可藉由正交IL-2選殖株1G12/149實現。在第5天(上)和第7天(下)經由流式細胞術定量血液(左)和脾(右)中之活細胞總數。與PBS對照組相比較，使用野生型IL-2處理同時導致野生型和正交T細胞擴增，而使用正交IL-2選殖株1G12/149處理會選擇性地擴增正交T細胞，而對野生型T細胞之活性有限。

【0032】**圖20A-20B.** 正交IL-2對正交IL-2Rβ T細胞具有選擇性活性。(**圖20A**)FACS分析從IL-2 KO NOD小鼠單離出之原代脾衍生之小鼠T細胞，且該T細胞藉由病毒轉導以表現正交IL-2Rβ(此可使用IRES-YFP報告子和對IL-2Rβ之表面染色來確認)。T細胞亦保留野生型IL-2Rβ(**圖20B**)之表現，正交IL-2誘導表現正交IL-2Rβ之T細胞上之選擇性STAT5磷酸化，而對野生型T細胞僅有鈍化活性至無活性。

【0033】**圖21A-21B.** 正交IL-2在試管內選擇性地擴增正交IL-2Rβ T細胞。(**圖21A**)FACS分析原代脾衍生之小鼠T細胞，該T細胞藉由病毒轉導以表現正交IL-2Rβ(此可使用IRES-YFP確認)。將經轉導和未經轉導之T細胞的混合物在各種濃度之野生型、正交IL-2選殖株1G12或3A10中培養5天，並藉由FACS進行分析。IL-2同時擴增野生型和正交T細胞，然而當培養在正交IL-2 3A10中時僅擴增正交T細胞，而正交IL-2 1G12選擇性地擴增正交T細胞，對野

生型T細胞之活性顯著降低。FACS繪圖顯示對應於在100nM IL-2、64pM正交IL-2 1G12和10μM正交IL-2 3A10中之培養。(**圖21B**)在增加濃度之細胞激素中培養5天後之野生型和正交T細胞對野生型和正交IL-2選殖株1G12和3A10的增殖劑量-反應。IL-2以相同效力同時擴增野生型和正交T細胞，正交IL-2 1G12選擇性地擴增正交T細胞，而正交IL-2 3A10特異地擴增正交T細胞。

【0034】**圖22A-22E.** 正交人IL-2在試管內透過表現在YT細胞中之正交IL-2R傳遞訊號。刺激20分鐘後之STAT5磷酸化的劑量反應。在表現人CD25(YT+)，不具有(YFP-，WT)或具有(YFP+，正交)人正交IL-2Rb之YT人NK細胞株中測量Stat5的磷酸化。(**圖22A**)在RPMI完全培養基中滴定人IL-2、或正交變體(**圖22B**)1A1、(**圖22C**)1C7、(**圖22D**)SQVLKA或(**圖22E**)SQVKqA之小鼠血清白蛋白(MSA)融合蛋白並加入細胞中。對WT(YFP-)和正交Rb(YFP+)細胞之APC-pStat5染色的平均螢光強度(MFI)相對於細胞激素之濃度作圖，並使用Prism 5(GraphPad)擬合至對數(促效劑)對反應(三個參數)模型。1C7係在不同於其他蛋白質之日子運行，並標準化至在這二天運行之野生型IL-2染色。所有數據均以平均值(n=3)±SD表示。

【0035】**圖23A-23B.** 正交人IL-2優先擴增表現該正交IL-2R之人PBMC。將人PBMC單離、活化並以含有具有IRES YFP(YFP+)的正交人IL-2Rβ之逆轉錄病毒轉形。YFP+細胞對總活細胞之初始比率為20%。在第1天，將5×

10^5個細胞與指定濃度之MSA-人IL-2(圓圈)或正交變體MSA-SQVLKA(菱形)、MSA-SQVLqA(正方形)或MSA-1A1(三角形)進行平皿接種，並在第3天再次餵食該相同濃度。在第5天，藉由流式細胞術讀取該平皿接種。(**圖23A**)計算YFP+(表現正交)細胞對總活細胞之比率，並將平均值(n=4)±SD相對於濃度(左)作圖。(**圖23B**)亦將總活細胞計數(平均值(n=4)±SD)相對於細胞激素濃度繪圖(右)。正交細胞激素無法支持與相同濃度之野生型MSA-hIL-2所支持者一樣多之總細胞生長。

【實施方式】

實施態樣之詳細描述

【0036】為了更容易理解本發明，下文中及整篇專利說明書中定義某些術語和短語。本文提供之定義為非限制性的且應鑑於本技藝之技術熟習人士在本發明之時點所知之內容來閱讀。

定義

【0037】在描述本發明之方法和組成物之前，應理解本發明不限於所描述之特定方法或組成物，因此當然可以改變。亦應理解的是，本文所使用之術語僅用於描述特定實施態樣，而不意圖限制，因為本發明之範圍將僅受所附之申請專利範圍限制。

【0038】在提供一系列數值之情況下，應理解的是，

除非上下文另有明確規定，否則亦具體揭示在該範圍的上限和下限之間的每個中間值，至該下限單位的十分之一。在該陳述之範圍內的任何陳述值或中間值之間的每個較小範圍和該陳述之範圍內的任何其他陳述值或中間值均包含在本發明內。這些較小範圍的上限和下限可獨立地包括在該範圍內或排除在該範圍外，且視乎該陳述之範圍內任何具體排除之限值而定，其中該較小範圍中包括任一限值、不包括任一限值或同時包括二個限值的每一個範圍亦包含在本發明內。當該陳述之範圍包括一或二個限值時，排除所包括之限值的其中一者或二者的範圍亦包括在本發明中。

【0039】除非另外定義，否則本文使用之所有技術和科學術語具有與本發明所屬技藝之一般技術人士所通常理解者相同的含義。雖然可使用與本文所描述者類似或等同之任何方法和材料來實行或測試本發明，現在描述一些可能和較佳之方法和材料。本文提及之所有出版物均以引用併入本文以揭示和描述與所列出之出版物相關的方法和/或材料。應當理解的是，當所納入之出版物的任何揭示內容與本發明內容相矛盾時，以本發明內容為主。

【0040】應注意的是，除非上下文另有明確說明，如本文和所附之申請專利範圍中所使用之單數形式“一(a、an)”和“該(the)”包括複數指示物。因此，例如，提及“細胞(a cell)”時係包括多個該等細胞，而提及“該肽”時係包括提及一或多種肽及其等同物，例如本技藝之技術熟習人士

已知之多肽，等等。

【0041】本文討論之出版物僅提供本申請案提交日之前的揭示內容。本文中之任何內容均不應被解釋為承認本發明無權憑藉先前之發明而先於該等出版物。此外，所提供之出版日期可能與可能需要獨立確認之實際出版日期不同。

【0042】細胞激素受體和配體對包括，但不限於下述受體：

細胞激素	受體亞單位
IL-1-like	CD121a, CDw121b
IL-1α	CD121a, CDw121b
IL-1β	CD121a, CDw121b
IL-1RA	CD121a
IL-18	IL-18Rα, β
IL-2	CD25, 122,132
IL-4	CD124,213a13, 132
IL-7	CD127, 132
IL-9	IL-9R, CD132
IL-13	CD213a1, 213a2, CD1243, 132
IL-15	IL-15Ra, CD122, 132
IL-3	CD123, CDw131
IL-5	CDw125, 131
GM-CSF	CD116, CDw131
IL-6	CD126, 130
IL-11	IL-11Ra, CD130
G-CSF	CD114
IL-12	CD212
LIF	LIFR, CD130
OSM	OSMR, CD130
IL-10	CDw210
IL-20	IL-20Rα, β
IL-14	IL-14R
IL-16	CD4
IL-17	CDw217

IFN-α	CD118
IFN-β	CD118
IFN-γ	CDw119
CD154	CD40
LT-β	LTβR
TNF-α	CD120a, b
TNF-β	CD120a, b
4-1BBL	CDw137 (4-1BB)
APRIL	BCMA, TACI
CD70	CD27
CD153	CD30
CD178	CD95 (Fas)
GITRL	GITR
LIGHT	LTbR, HVEM
OX40L	OX40
TALL-1	BCMA, TACI
TRAIL	TRAILR1-4
TWEAK	Apo3
TRANCE	RANK, OPG
TGF-β1	TGF-βR1
TGF-β2	TGF-βR2
TGF-β3	TGF-βR3
Epo	EpoR
Tpo	TpoR
Flt-3L	Flt-3
SCF	CD117
M-CSF	CD115
MSP	CDw136

【0043】“異種同源物”或“正交細胞激素/受體對”係指經遺傳工程處理之蛋白質對，其藉由胺基酸改變進行修飾以(a)表現出對天然細胞激素或同源受體中顯著降低之親和力；和(b)特異地結合對應之經工程處理(正交)的配體或受體。當與正交配體結合時，該正交受體活化透過天然細胞元件轉導之訊號傳導，以提供模擬天然反應，但特異於表現該正交受體之經工程處理的細胞之生物活性。

【0044】正交受體顯示出顯著減少與其同源天然細胞

激素配體結合，而正交細胞激素顯示出顯著減少與其同源天然受體結合。於一些實施態樣中，該正交細胞激素對同源正交受體之親和力與該天然細胞激素對天然受體之親和力相當，例如具有之親和力為該天然細胞激素受體對之親和力的至少約1%、至少約5%、至少約10%、至少約25%、至少約50%、至少約75%、至少約100%，且可能更高，例如為該天然細胞激素對天然受體之親和力的2X、3X、4X、5X、10X或更高。

【0045】如本文所用之“不結合”或“無法結合”係指無可檢測之結合或不顯著之結合，即，所具有之結合親和力遠低於該天然配體之結合親和力。該親和力可使用競爭性結合實驗測定，該競爭性結合實驗係在各種濃度之未經標記的配體之存在下使用單一濃度之經標記的配體測量與受體之結合。通常，未經標記之配體的濃度係在至少六個數量級之內變化。透過競爭性結合實驗可測定IC_{50}。如本文所使用者，“IC_{50}”係指抑制50%受體與經標記之配體之間的結合所需之未經標記的配體濃度。IC_{50}為配體-受體結合親和力之指標。低IC_{50}代表高親和力，而高IC_{50}代表低親和力。

【0046】如本文所使用之術語“特異地結合”係指一個分子與另一分子結合之選擇性或親和力的程度。在結合對(例如配體/受體、抗體/抗原、抗體/配體、抗體/受體結合對)之背景下，當該結合對之第一分子不以顯著量與存在於該樣品中之其他組分結合時，該結合對之第一分子被稱

為與該結合對之第二分子特異結合。當結合對之第一分子對第二分子之親和力較第一分子對存在於該樣品中之其他組分的親和力至少高二倍、至少高10倍、至少高20倍或至少高100倍時，該結合對之第一分子被稱為與該結合對之第二分子特異結合。於特定之實施態樣中，在該結合對之第一分子為抗體的情況下，當藉由，例如Scatchard分析(Munsen et al. 1980 Analyt.Biochem.107:220-239)測定時，若抗體對該結合對之第二分子的親和力大於約10^9升/莫耳、或大於約10^{10}升/莫耳、大於約10^{11}升/莫耳、大於約10^{12}升/莫耳，則該抗體與該結合對之第二分子(例如蛋白質、抗原、配體或受體)特異地結合。特異性結合可使用本技藝已知之技術評估，包括，但不限於競爭ELISA、BIACORE®分析和/或KINEXA®分析。

【0047】如本文所使用者，術語“顯示出顯著減少之結合”之使用係關於正交配體與正交受體之結合親和力相對於該正交配體與天然形式之其同源受體的結合親和力。在實行本發明時，術語“顯示出顯著減少之結合”係用於描述該正交配體相對於天然存在之配體與天然存在之受體的比較性結合及活性。若該正交配體與天然形式之受體的結合少於天然形式之配體的20%，或少於約10%，或少於約8%，或少於約6%，或少於約4%，或少於約2%，或少於約1%，或少於約0.5%，則該正交配體顯示出相對於該天然形式之配體顯著減少之結合。類似地，若該天然形式之配體與正交形式之受體的結合少於該天然形式之受體的

20%，或少於約10%，或少於約8%，或少於約6%，或少於約4%，或少於約2%，或少於約1%，或少於約0.5%，則該正交受體顯示出與該天然形式之配體的結合顯著減少。

【0048】正交IL-2多肽顯示出顯著減少之透過天然IL-2Rβ的活化。例如，可在細胞增殖分析中使用CTLL-2小鼠細胞毒性T細胞測量活性，參見Gearing, A.J.H. and C.B. Bird(1987)in Lymphokines and Interferons, A Practical Approach. Clemens, M.J. *et al.* (eds): IRL Press. 295。重組之人IL-2的比活性為約2.1×10^4 IU/μg，其係針對重組之人IL-2 WHO國際標準(NIBSC代碼：86/500)校準。在可比較之分析中，正交人IL-2之活性可少於WHO國際標準(NIBSC代碼：86/500)人IL-2多肽之活性的20%，或少於約10%，或少於約8%，或少於約6%，或少於約4%，或少於約2%，或少於約1%，或少於約0.5%。

【0049】如本文所使用之術語“同一性”當相關於多肽或DNA序列時，其係指二個分子之間的序列同一性。二個胺基酸或二個核苷酸序列之間的相似性為是完全相同位置之數量的直接函數。一般而言，對齊序列以獲得最高階之匹配。若需要時，可使用已發表之技術及可充分取得之電腦程式計算同一性，諸如GCS程式包(Devereux et al., Nucleic Acids Res. 12:387, 1984)、BLASTP、BLASTN、FASTA(Atschul et al., J. Molecular Biol. 215:403, 1990)。序列同一性可使用序列分析軟體測量，諸如威斯康辛大學生物技術中心(威斯康辛州麥迪生市大學大道1710號，

53705)之遺傳電腦組(Genetics Computer Group)的序列分析軟體包及其默認參數。

【0050】術語“多肽”、“蛋白質”或“肽”係指任何胺基酸殘基鏈，不管其長度或轉譯後修飾(例如糖基化或磷酸化)。

【0051】本文中“蛋白質變體”或“變體蛋白質”或“變體多肽”意指憑藉至少一個胺基酸修飾而與野生型蛋白質不同之蛋白質。該親本多肽可為天然存在的或野生型(WT)多肽，或可為經修飾之WT多肽形式。術語變體多肽可指多肽本身，包含該多肽之組成物或編碼彼之核酸序列。較佳地，與親本多肽相比較，該變體多肽包含至少一個胺基酸修飾，例如與該親本多肽相比較，約1至約10個胺基酸修飾，較佳為約1至約5個胺基酸修飾。變體可與該野生型蛋白質具有至少約99%同一性、至少約98%同一性、至少約97%同一性、至少約95%同一性、至少約90%同一性。

【0052】本文所使用之“親本多肽”、“親本蛋白質”、“前體多肽”或“前體蛋白質”係指隨後經修飾以產生變體多肽之未經修飾的多肽。親本多肽可為野生型(或天然)多肽。親本多肽可指多肽本身、包含該親本多肽之組成物、或編碼彼之胺基酸序列。

【0053】本文之“野生型”或“WT”或“天然的”係指在自然界中發現，包括等位基因變異之胺基酸序列或核苷酸序列。WT蛋白質、多肽、抗體、免疫球蛋白、IgG，等具有未藉由人工修飾之胺基酸序列或核苷酸序列。

【0054】本文中，術語“接受體”、“個體”、“受試者”、“宿主”和“患者”可互換使用且係指需要診斷、治療或療法之任何哺乳動物受試者，特別是人。用於治療目的之“哺乳動物”係指被歸類為哺乳動物之任何動物，包括人類、家畜和農場動物，鳳動物園、運動或寵物動物，諸如狗、馬、貓、牛、綿羊、山羊、豬，等。較佳地，該哺乳動物為人。

【0055】如本文所使用之“治療有效量”係指足以預防、治療或管理疾病或病症之治療劑(例如過繼性T細胞或正交細胞激素)之量。治療有效量可指足以延遲或將疾病發作最小化(例如延遲或將癌症擴散最小化)的治療劑之量，或為能有效減少或增加來自所欲受體之訊號傳導的治療劑之量。治療有效量亦可指在治療或控制疾病中提供治療益處之治療劑的量。此外，相關於本發明之治療劑的治療有效量係指在治療或控制疾病中提供治療益處之單獨治療劑的量或與其他療法組合之量。

【0056】如本文所使用之術語“預防(prevent、preventing和prevention)”係指投予預防性藥劑或治療劑所導致之預防受試者中之病症的一或多種症狀復發或發作。

【0057】如本文所使用之術語“組合”係指使用一種以上之預防性藥劑和/或治療劑。使用術語“組合”時並不限制將預防性藥劑和/或治療劑投予患有病症之受試者的順序。第一種預防性藥劑或治療劑可在投予第二種預防性藥劑或治療劑之前(例如5分鐘、15分鐘、30分鐘、45分鐘、

1小時、2小時、4小時、6小時、12小時、24小時、48小時、72小時、96小時、1週、2週、3週、4週、5週、6週、8週或12週之前)、同時或之後(例如5分鐘、15分鐘、30分鐘、45分鐘、1小時、2小時、4小時、6小時、12小時、24小時、48小時、72小時、96小時、1週、2週、3週、4週、5週、6週、8週或12週之後)投予患有病症之受試者。

【0058】介白素2(IL-2)為一種多能細胞激素，其主要由活化之CD4+T細胞產生且在產生正常免疫反應中具關鍵作用。IL-2促進活化之T淋巴細胞增殖和擴增、增進B細胞生長並活化單核細胞和天然殺手細胞。憑藉這些活性，IL-2被測試並被核准作為癌症治療(阿地介白素(aldesleukin)，普留淨(Proleukin®))。人IL-2係以具有153個胺基酸之前體多肽的形式合成，從該前體多肽移除20個胺基酸以產生成熟之分泌型IL-2。如本文所使用之“IL-2”係指天然或野生型IL-2。成熟之人IL-2係以如Fujita, et. al, PNAS USA, 80, 7437-7441(1983)中所描述之133個胺基酸序列形式(扣除該由另外之20個N-端胺基酸組成的訊號肽)產生。人IL-2之胺基酸序列可在Genbank，登錄位址NP_000577.2中找到。人IL-2(SEQ ID NO:4)和小鼠IL-2(SEQ ID NO:3)、人IL-2Rβ(SEQ ID NO:1)和小鼠IL-2Rβ(SEQ ID NO:2)之參考序列提供於圖15中。

【0059】當與IL-2受體(IL-2R)交互作用時，IL-2藉由啟動細胞訊號傳導途徑來支持T淋巴細胞存活和分化。IL-2在臨床上用於治療多種人類疾病，包括癌症和自體免疫

並作為過繼性T細胞療法之佐劑以促進移植之T細胞的存活。然而，IL-2亦可藉由活化脫靶細胞類型而具有相反效果。

【0060】為了將IL-2之活性導向特定之T細胞亞群，本發明提供經工程處理之正交IL-2和IL-2受體對。當與表現在細胞上之正交IL-2受體結合時，正交IL-2藉由誘導強STAT5磷酸化和經工程處理以表現正交IL-2Rβ之T細胞在試管內增殖使野生型IL-2活性再現。正交IL-2已顯著減少分別與體外培養之野生型CD25陽性或陰性小鼠T細胞之結合。本發明之研究表明重塑細胞激素受體界面以創建自然界中不存在之交互作用為可行之策略以將混雜之細胞激素的活性導向所欲之T細胞亞群，從而能透過基因工程處理來精確控制T細胞之功能。

【0061】除了IL-2外，IL-15和IL-7亦調節淋巴穩態且亦已作為佐劑以加強過繼性T細胞療法。IL-2和IL-15分享相同之IL-2R-β鏈。正交IL-15可相對於該用於正交化IL-2之相一致的正交IL-2R-β進行選擇。IL-7利用截然不同的正交化靶的之IL-7R-α鏈。

【0062】於一些實施態樣中，該正交細胞激素，例如正交IL2，可與其他分子軛合以提供所需之藥理學性質，諸如延長之半衰期。於一實施態樣中，該正交IL-2可與IgG、白蛋白或其他分子之Fc結構域融合以延長其半衰期，例如藉由本技藝已知之聚乙二醇化、糖基化，等進行。於一些實施態樣中，該正交細胞激素係與聚乙二醇分

子軛合或“PEG化”。該與正交細胞激素配體軛合之PEG的分子量包括，但不限於其分子量介於5 kDa和80 kDa之間的PEG。於一些實施態樣中，該PEG之分子量為約5 kDa，於一些實施態樣中，該PEG之分子量為約10 kDa，於一些實施態樣中，該PEG之分子量為約20 kDa，於一些實施態樣中，該PEG之分子量為約30 kDa，於一些實施態樣中，該PEG之分子量為約40 kDa，於一些實施態樣中，該PEG之分子量為約50 kDa，於一些實施態樣中，該PEG之分子量為約60 kDa，於一些實施態樣中，該PEG之分子量為約80 kDa。於一些實施態樣中，該分子量為約5 kDa至約80 kDa、約5 kDa至約60 kDa、約5 kDa至約40 kDa、約5 kDa至約20 kDa。於較佳之實施態樣中，(其中該多肽之命名係參照表1)，該正交配體為聚乙二醇化形式之1A1、聚乙二醇化形式之1C7、聚乙二醇化形式之SQVLKA和/或聚乙二醇化形式之SQVLqA，在各個情況下，該PEG之分子量為約5 kDa、或10 kDa、20 kDa、或30 kDa、或40 kDa、或50 kDa、或30 kDa。該與多肽序列軛合之PEG可為直鏈型或支鏈型。該PEG可直接連接該正交多肽或經由連接子分子連接。達成將生物化合物聚乙二醇化所必要之過程和化學反應為本技藝所熟知。

【0063】正交IL-2可使用本技藝中已知之方法在N端乙醯化，例如使用N端乙醯轉移酶(例如乙醯輔酶A)藉由酶催化反應進行。正交IL-2可在一或多個離胺酸殘基處被乙醯化，例如使用離胺酸乙醯轉移酶藉由酶催化反應進行。

參見，例如Choudhary et al.(2009). Science. 325(5942): 834-840。

【0064】Fc融合亦可在體內賦予替代之由Fc受體介導的性質。該“Fc區”可為天然存在的或合成之多肽，其與使用木瓜蛋白酶分解IgG所產生之IgG C端結構域同源。IgG Fc之分子量為約50 kDa。異種同源物IL-2多肽可包括整個Fc區或保留能夠延長嵌合多肽的循環半衰期之能力的較小部分，該較小部分為該嵌合多肽之一部分。此外，全長或片段化之Fc區可為野生型分子之變體。亦即，其可含有可能會或可能不會影響該多肽之功能的突變(如進一步描述於下文中者)；天然活性並非在所有情況下都是必要或需要。

【0065】於其他實施態樣中，正交多肽可包含作為抗原標籤(諸如FLAG序列)之多肽。FLAG序列可被如本文所述之生物素化、高度特異性抗FLAG抗體識別(亦參見Blanar et al., Science 256: 1014, 1992；LeClair et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:8145, 1992)。於一些實施態樣中，該嵌合多肽進一步包含C端c-myc抗原決定部位標籤。

【0066】如上述，本發明之正交蛋白質可以嵌合多肽之一部分的形式存在。除了上述之異源多肽之外或取代上述之異源多肽，本發明之核酸分子可含有編碼“標記”或“報告子”之序列。標記或報告基因之實例包括β-內醯胺酶、氯黴素乙醯轉移酶(CAT)、腺苷脫胺酶(ADA)、胺基

糖苷磷酸轉移酶(neo1，G418r)、二氫葉酸還原酶(DHFR)、潮黴素-B-磷酸轉移酶(HPH)、胸苷激酶(TK))、lacz(編碼β-半乳糖苷酶)和黃嘌呤鳥嘌呤磷酸核糖基轉移酶(XGPRT)。如同許多與實行本發明相關之標準程序，技術熟習人士將知道另外之有用試劑，例如可具有標記或報告子功能的其他序列。

【0067】正交細胞激素和受體亦可在該細胞激素之其他位置(例如除了涉及正交工程處理之外的位置)包括保守性修飾和取代。該等保守性取代包括Dayhoff在The Atlas of Protein Sequence and Structure 5(1978) 和Argos在EMBO J., 8:779-785(1989)中所描述者。例如，屬於下述群組其中一者之胺基酸代表保守性變化：第I組：ala、pro、gly、gin、asn、ser、thr；第Ⅱ組：cys、ser、tyr、thr；第Ⅲ組：val、ile、leu、met、ala、phe；第IV組：lys、arg、his；第V組：phe、tyr、trp、his；和第VI組：asp、glu。在各情況下，可評估引入額外之修飾以將該經修飾之多肽在欲投予該經修飾之多肽的生物中之任何增加的抗原性最小化。

【0068】術語“T細胞”係指可藉由表現CD3和/或T細胞抗原受體表徵之哺乳動物免疫效應細胞，該細胞可經工程處理以表現正交細胞激素受體。於一些實施態樣中，該T細胞係選自初始$CD8^+$ T細胞、細胞毒性$CD8^+$ T細胞、初始$CD4^+$ T細胞、輔助T細胞，例如T_H1、T_H2、T_H9、T_H11、T_H22、T_{FH}；調節性T細胞，例如T_R1、天然T_{Reg}、

誘導型T_{Reg}；記憶T細胞，例如中央記憶T細胞、效應記憶T細胞、NKT細胞、γδT細胞。

【0069】於本發明之一實施態樣中，表現正交受體之T細胞為已經過修飾以在表面表現嵌合抗原受體之T細胞(“CAR-T'細胞)。如本文中所使用者，術語“嵌合抗原受體T細胞”和“CAR-T細胞” 可交換使用以指該已經過重組修飾以表現嵌合抗原受體之T細胞。如本文所使用者，CAR-T細胞可經工程處理以表現正交IL-2Rβ多肽。如本文所使用者，術語“嵌合抗原受體”和“CAR”可交換使用以指包含多個功能結構域之多肽，該多個功能結構域在序列中從胺基端到羧基端之排列如下：(a)抗原結合結構域(ABD)，(b)跨膜結構域(TD)；和(c)一或多個細胞質訊號傳導結構域(CSD)，其中前述之結構域可選擇地藉由一或多個間隔結構域鏈接。CAR亦可進一步包含訊號肽序列，其常規地在轉譯後加工和CAR呈遞在細胞表面上之期間被移除。用於實行本發明之CAR係根據本技藝熟知之原理製備。參見，例如2010年6月22日授權之Eshhaar等人的美國專利案編號7,741,465 B1；Sadelain, *et al*(2013) Cancer Discovery 3(4):388-398；Jensen and Riddell (2015) Current Opinions in Immunology 33:9-15；Gross *et al*.(1989) PNAS(USA) 86(24):10024-10028；Curran *et al*.(2012)J Gene Med 14(6):405-15。可經修飾以納入本發明之正交受體的市售CAR-T細胞產物之實例包括axicabtagene ciloleucel(以Yescarta®販售，可從Gilead製藥購得)和tisagenlecleucel(

以Kymriah®販售，可從Novartis購得)。

【0070】如本文所使用之術語抗原結合結構域(ABD)係指與表現在靶細胞表面上之抗原特異地結合之多肽。該ABD可為與表現在靶細胞表面上之一或多個抗原特異地結合之任何多肽。於某些實施態樣中，該靶細胞抗原為腫瘤抗原。可被CAR之ABD靶向的腫瘤抗原之實例包括，但不限於選自下述群組之一或多個抗原：CD19、CD20、HER2、NY-ESO-1、MUC1、CD123、FLT3、B7-H3、CD33、IL1RAP、CLL1(CLEC12A)PSA、CEA、VEGF、VEGF-R2、CD22、ROR1、間皮素、c-Met、醣脂F77、FAP、EGFRvⅢ、MAGE A3、5T4、WT1、KG2D配體、葉酸鹽受體(FRa)和Wnt1抗原。

【0071】於一實施態樣中，該ABD為單鏈Fv(ScFv)。ScFv為由抗體之免疫球蛋白重鏈和輕鏈的可變區所組成之多肽，該抗體之免疫球蛋白重鏈和輕鏈係藉由肽連接子共價連接(Bird, *et al.*(1988) Science 242:423-426；Huston, *et al.*(1988) PNAS(USA) 85:5879-5883；S-z Hu, *et al.* (1996) Cancer Research, 56, 3055-3061)。基於單株抗體序列產生ScFv為本技藝所熟知。參見，例如The Protein Protocols Handbook, John M. Walker, Ed.(2002)Humana Press Section 150 "*Bacterial Expression, Purification and Characterization of Single-Chain Antibodies*" Kipriyanov, S。可用於製備scFv之抗體可經優化以透過本技藝熟知之技術(諸如噬菌體展示和定向發展)以選擇那些具有特定需

要之特徵(例如增強之親和力)的分子。於一些實施態樣中，該ABD包含抗CD19 scFv、抗PSA scFv、抗HER2 scFv、抗CEA scFv、抗EGFR scFv、抗EGFRvⅢ scFv、抗NY-ESO-1 scFv、抗MAGE scFv、抗5T4 scFv、或抗Wnt1 scFv。於另一實施態樣中，該ABD為透過使用源自靶細胞之抗原，特別是腫瘤抗原將駱駝或美洲駝免疫化所獲得之單結構域抗體。參見，例如Muyldermans, S.(2001) Reviews in Molecular Biotechnology 74: 277-302。或者，該ABD可完全藉由合成產生，此係透過產生肽集合庫進行並基本上根據下列文獻之教示內容分離出具有所需靶細胞抗原結合特性之化合物：Wigler等人，1999年11月12日發布之美國專利案編號63033 13 B1；Knappik等人，2004年2月24日發布之美國專利案編號6,696,248 B1；Binz, *et al.* (2005) Nature Biotechnology 23:1257-1268，和Bradbury, *et al.* (2011) Nature Biotechnology 29:245-254。

【0072】該ABD可對一種以上之靶抗原具有親和力。例如，本發明之ABD可包含嵌合雙特異性結合成員，即，能與第一靶細胞表現之抗原和第二靶細胞表現之抗原特異地結合。嵌合雙特異性結合成員之非限制性實例包括雙特異性抗體、雙特異性軛合之單株抗體$(mab)_2$、雙特異性抗體片段(例如$F(ab)_2$、雙特異性scFv、雙特異性雙抗體、單鏈雙特異性雙抗體，等)、雙特異性T細胞接合物(BiTE)、雙特異性軛合之單結構域抗體、micabody和彼等之突變體等。嵌合雙特異性結合成員之非限制性實例亦包括下列文

獻中所描述之那些嵌合雙特異性試劑：Kontermann(2012) *MAbs*. 4(2): 182-197；Stamova et al. (2012) *Antibodies*, 1(2), 172-198；Farhadfar et al. (2016) *Leuk Res*. 49:13-21；Benjamin et al. *Ther Adv Hematol*. (2016) 7(3):142-56；Kiefer et al. *Immunol Rev*. (2016) 270(1):178-92；Fan et al.(2015) *J Hematol Oncol*. 8:130；May et al. (2016) *Am J Health Syst Pharm*. 73(1):e6-e13。於一些實施態樣中，該嵌合雙特異性結合成員為二價單鏈多肽。參見，例如Thirion, *et al.*(1996) European J. of Cancer Prevention 5(6):507-511；DeKruif and Logenberg(1996) J. Biol. Chem 271(13)7630-7634；和Kay等人，2015年11月5日發表之美國專利申請刊物編號2015/0315566。在一些情況下，嵌合雙特異性結合成員可為雙特異性T細胞接合物(BiTE)。BiTE通常係藉由將與抗原結合之特定結合成員(例如scFv)與具有特異於T細胞分子(諸如CD3)之第二結合結構域的特定結合成員(例如scFv)融合來產生。在一些情況下，嵌合雙特異性結合成員可為CAR T細胞銜接子。如本文所使用之“CART細胞銜接子”係指表現之雙特異性多肽，其與CAR之抗原識別結構域結合並將CAR重定向至第二抗原。一般而言，CART細胞銜接子將具有結合區，一個結合區係特異於其所針對之CAR上的抗原決定部位，而第二抗原決定部位係針對結合配偶體，該結合配偶體當結合時會轉導活化該CAR之結合訊號。有用之CART細胞銜接子包括，但不限於，例如下列文獻中所描述者：Kim et al.

(2015) J Am Chem Soc. 137(8):2832-5；Ma et al. (2016) Proc Natl Acad Sci U S A. 113(4):E450-8和Cao et al. (2016) Angew Chem Int Ed Engl. 55(26):7520-4。

【0073】於一些實施態樣中，連接子多肽分子係可選擇地被併入CAR中，介於該抗原結合結構域和跨膜結構域之間以促進抗原結合。Moritz and Groner(1995) Gene Therapy 2(8)539-546。於一實施態樣中，該連接子為來自免疫球蛋白之鉸鏈區，例如來自下列任一者之鉸鏈區：IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgG4，特別是人蛋白質序列。替代物包括免疫球蛋白之CH2CH3區和CD3部分。在其中該ABD為scFv的那些情況下，可使用IgG鉸鏈區。於一些實施態樣中，該連接子包含胺基酸序列$(G_4S)_n$，其中n為1、2、3、4、5，等且於一些實施態樣中，n為3。

【0074】可用於實行本發明之CAR進一步包含連接ABD(或連接子，若使用時)與該CAR之細胞內胞質結構域的跨膜結構域。該跨膜結構域係由任何在真核細胞膜中為熱力學穩定的多肽序列組成。該跨膜跨結構域可源自天然存在之跨膜蛋白質的跨膜結構域或可為合成的。在設計合成之跨膜結構域時，有利於α-螺旋結構之胺基酸為較佳者。用於構建CAR之跨膜結構域係由約10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、22、23或24個有利於形成α-螺旋二級結構的胺基酸組成。對α-螺旋構形有利之胺基酸為本技藝所熟知。參見，例如Pace, *et al.* (1998) Biophysical Journal 75: 422-427。特別有利於α螺旋

構形之胺基酸包括甲硫胺酸、丙胺酸、亮胺酸、麩胺酸和離胺酸。於一些實施態樣中，該CAR跨膜結構域可源自來自第I型跨膜蛋白質，諸如CD3ζ、CD4、CD8、CD28，等之跨膜結構域。

【0075】該CAR多肽之細胞質結構域包含一或多個胞內訊號結構域。於一實施態樣中，該胞內訊號結構域包含T細胞受體(TCR)和在抗原受體接合後起始訊號轉導之共受體及其功能衍生物和亞片段之細胞質序列。細胞質訊號傳導結構域(諸如源自T細胞受體ζ-鏈者)係作為CAR之一部分以在嵌合受體與靶抗原接合後產生用於T淋巴細胞增殖及效應子功能之刺激訊號。細胞質訊號傳導結構域之實例包括，但不限於CD27之細胞質結構域、CD28之細胞質結構域S、CD137(亦稱為4-1BB和TNFRSF9)之細胞質結構域、CD278(亦稱為ICOS)之細胞質結構域、PI3激酶之p110α、β或δ催化性次單位、人CD3ζ鏈、CD134(亦稱為OX40和TNFRSF4)之細胞質結構域、FcεR1γ和β鏈、MB1(Igα)鏈、B29(Igβ)鏈，等)、CD3多肽(δ、Δ和ε)、syk族酪胺酸激酶(Syk、ZAP 70，等)，src族酪胺酸激酶(Lck、Fyn、Lyn等)和其他參與T細胞轉導之分子，諸如CD2、CD5和CD28。

【0076】於一些實施態樣中，該CAR亦可提供共刺激結構域。術語“共刺激結構域”係指CAR之刺激結構域，通常為內結構域，其提供第二非特異性活化機制，通過該機制可傳播初級特異性刺激。該共刺激結構域係指增強記憶細胞之增殖、存活或發展的CAR部分。共刺激之實例包括

在透過T細胞受體之抗原特異性訊號傳導後的抗原非特異性T細胞共刺激和在透過B細胞受體之訊號傳導後的抗原非特異性B細胞共刺激。共刺激，例如T細胞共刺激和所涉及之因子已描述於Chen & Flies. (2013) Nat Rev Immunol 13(4):227-42中。於本發明之一些實施態樣中，該CSD包含TNFR超家族之一或多個成員、CD28、CD137(4-1BB)、CD134(OX40)、Dap10、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、Lck、TNFR-I、TNFR-Ⅱ、Fas、CD30、CD40、或彼等之組合。

【0077】CAR通常以第一、第二、第三或第四代稱呼。術語第一代CAR係指其中該細胞質結構域僅透過單一訊號傳導結構域(例如源自IgE FcεRI之高親和力受體或CD3ζ鏈的訊號傳導結構域)發送來自抗原結合之訊號的CAR。該結構域含有一或三個用於抗原依賴性T細胞活化之免疫受體酪胺酸活化基序[ITAM]。基於ITAM之活化訊號賦予T細胞在回應抗原結合時溶解該腫瘤靶細胞之能力和分泌細胞激素。第二代CAR包括除了CD3ζ訊號外之共刺激訊號。重合投遞該投遞之共刺激訊號可增強由經CAR轉導之T細胞誘導的細胞激素分泌和抗腫瘤活性。相對於該CD3ζ結構域，該共刺激結構域通常接近膜。第三代CAR包括三重訊號傳導結構域，包含，例如CD28、CD3ζ、OX40或4-1BB訊號傳導區。在第四代或“經防護之car”中，CART細胞進一步經基因修飾以表現或阻斷分子和/或受體以增強免疫活性。

【0078】可被納入本發明之CAR的胞內訊號傳導結構域之實例包括(胺基至羧基)：CD3ζ；CD28-41BB-CD3ζ；CD28-OX40-CD3ζ；CD28-41BB-CD3ζ；41BB-CD-28-CD3ζ和41BB-CD3ζ。

【0079】術語CAR包括CAR變體，該CAR變體包括，但不限於分裂CAR、啟動鈕CAR、雙特異性或串聯CAR、抑制性CAR(iCAR)和經誘導之多能幹細胞(iPS)CAR-T細胞。

【0080】術語“分裂CAR”係指CAR其中該CAR之胞外部分、ABD和細胞質訊號傳導結構域係存在於二個分開的分子上。CAR變體亦包括啟動鈕CAR，其為可條件式活化之CAR，例如包含分裂CAR，其中該分裂CAR的二個部分之條件式異二聚體化係以藥理學方式控制。CAR分子及其衍生物(即，CAR變體)描述於，例如PCT申請案編號US2014/016527、US1996/017060、US2013/063083；Fedorov et al. *Sci Transl Med* (2013)；5(215):215ra172；Glienke et al. *Front Pharmacol*(2015) 6:21；Kakarla & Gottschalk 52 *Cancer J*(2014)20(2):151-5；Riddell et al. *Cancer J*(2014)20(2):141-4；Pegram et al. *Cancer J* (2014) 20(2):127-33；Cheadle et al. *Immunol Rev*(2014) 257(1): 91-106；Barrett et al. *Annu Rev Med* (2014) 65:333-47；Sadelain et al. *Cancer Discov*(2013)3(4):388-98；Cartellieri et al., *J Biomed Biotechnol* (2010) 956304；其全部揭示內容以引用併入本文。

【0081】術語“雙特異性或串聯CAR”係指包括可擴大或抑制初級CAR之活性的二級CAR結合結構域之CAR。

【0082】本文中，術語“抑制性嵌合抗原受體”或“iCAR”可互換使用，其係指CAR，其中結合iCAR係使用靶向關閉活性CAR之活化的雙抗原，其透過接合配備二級CAR結合結構域之抑制性訊號傳導結構域的第二抑制受體導致初級CAR活化受抑制而關閉活性CAR之活化。設計抑制性CAR(iCAR)以透過抑制性受體訊號傳導模塊活化來調節CAR-T細胞活性。此方法相結合二種CAR之活性，其中之一產生優勢負訊號，限制被活化受體所活化之CAR-T細胞的反應。當與僅由正常組織表現之特定抗原結合時，iCAR可關閉中和活化劑CAR之反應。以此方式，iCARs-T細胞可區分癌細胞和健康細胞，並以抗原選擇性方式可逆地阻斷經轉導之T細胞的功能。iCAR中之CTLA-4或PD-1胞內結構域觸發T淋巴細胞上之抑制訊號，導致產生較少的細胞激素、較無效之靶細胞溶解和改變的淋巴細胞運動性。

【0083】術語“串聯CAR”或“TanCAR”係指透過二種嵌合受體之接合來介導雙特異性T細胞活化之CAR，該二種嵌合受體係經過設計以在回應二個不同之腫瘤相關抗原獨立接合時遞送刺激性或共刺激性訊號。

【0084】典型地，該嵌合抗原受體T細胞(CAR-T細胞)為已基本上根據上文之教示內容，藉由編碼CAR之表現載體轉導來重組修飾之T細胞。

【0085】細胞可使用患者自身之用於工程處理的T細胞製備。因此，欲投予該受試者之細胞群體必須是可變的。另外，由於該CAR-T細胞劑為可變的，對該等試劑之反應可能變化，因此涉及不斷監測及管理與療法相關之毒性，該與療法相關之毒性係在投予該CAR-T細胞治療之前以藥理學免疫抑制或B細胞耗竭療程管理。該等免疫抑制方案之實例包括全身性皮質類固醇(例如甲基強的松龍)。用於B細胞耗竭之療法包括藉由已建立之臨床給藥指南靜脈內投予免疫球蛋白(IVIG)，以恢復正常水準之血清免疫球蛋白水準。於一些實施態樣中，在投予本發明之CAR-T細胞療法之前，該受試者可選擇地接受淋巴清除方案。一種該等淋巴清除方案之實例包含對該受試者投予氟達拉濱(fludarabine)(每天靜脈內注射[IV]30 mg/m^2，共4天)和環磷醯胺(每天500mg/m^2 IV，從第一劑氟達拉濱開始注射，共2天)。

【0086】用於以本文所描述之構築體進行工程處理之T細胞包括初始T細胞、中央記憶T細胞、效應記憶T細胞或彼等之組合。用於依上述進行工程處理之T細胞係從受試者或供體收集，其可藉由富集所需細胞之技術從細胞之混合物分離，或可不經分離地進行工程處理並培養。可使用適當之溶液來分散或懸浮。該等溶液通常為平衡之鹽溶液，例如生理鹽水、PBS、Hank氏平衡鹽溶液，等，其可適當地補充以胎牛血清或其他天然存在之因子，加上低濃度之可接受的緩衝液，通常為5至25mM。適當之緩衝液包

括HEPES、磷酸鹽緩衝液、乳酸鹽緩衝液，等。用於親和分離之技術可包括使用經塗覆抗體之磁珠的磁性分離、親和色層分析法、與單株抗體連接或與單株抗體一起使用之細胞毒性劑，例如補體和細胞毒素，及以連接固體基質(例如平板)之抗體“淘選”或其他適當之技術。提供精確分離之技術包括具有不同程度之複雜性的螢光活化之細胞分選器，諸如多重顏色通道、低角度和鈍角光散射檢測通道、阻抗通道，等。該細胞可藉由使用與死細胞相關之染料(例如碘化丙啶(propidium iodide))針對死細胞進行選擇。可採用任何不會對所選擇之細胞的生存力過度傷害之技術。該親和試劑可為上述細胞表面分子之特異性受體或配體。除了抗體試劑外，可使用肽-MHC抗原和T細胞受體對；肽配體和受體；效應子和受體分子，等。

【0087】該經分離之細胞可收集在可維持該細胞之生存力的任何適當培養基中，通常在該收集管之底部具有血清緩衝墊。各種培養基均可商購獲得並可根據細胞之性質使用，包括dMEM、HBSS、dPBS、RPMI、Iscove氏培養基，等，該培養基經常被補充以胎牛血清(FCS)。該經收集且可選擇地經富集之細胞群可立即用於遺傳修飾，或可在液態氮之溫度下冷凍並儲存、解凍且能夠重複使用。通常將細胞儲存在10% DMSO、50% FCS、40% RPMI 1640培養基中。

【0088】於一些實施態樣中，該經工程處理之細胞包含免疫細胞之複雜混合物，例如從需要治療之個體分離出

之腫瘤浸潤淋巴細胞(TIL)。參見，例如Yang and Rosenberg (2016) Adv Immunol. 130:279-94, “Adoptive T Cell Therapy for Cancer；Feldman et al (2015) Semin Oncol. 42(4):626-39 “Adoptive Cell Therapy-Tumor-Infiltrating Lymphocytes, T-Cell Receptors, and Chimeric Antigen Receptors”；Clinical Trial NCT01174121, “Immunotherapy Using Tumor Infiltrating Lymphocytes for Patients With Metastatic Cancer”；Tran et al. (2014) Science 344(6184)641-645, “Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer”。

【0089】於一些實施態樣中，經工程處理之T細胞相對於該被治療之個體為同種異體的，例如，參見臨床試驗NCT03121625；NCT03016377；NCT02476734；NCT02746952；NCT02808442。參見Graham et al.(2018) Cells. 7(10) E15之評論。於一些實施態樣中，同種異體之經工程處理的T細胞為完全HLA匹配的。然而，並非所有患者均具有完全匹配之供體，而與HLA類型無關之適合所有患者的細胞產品提供了替代方案。萬用之“現成”T細胞產品提供收穫和製造均勻性方面的優勢。

【0090】用於依上述進行工程處理之從受試者或供體收集的T細胞可藉由用於富集所需細胞之技術從細胞混合物分離，或可不經分離地進行工程處理和培養。可使用適當之溶液來分散或懸浮。該等溶液通常為平衡之鹽溶液，

例如生理鹽水、PBS、Hank氏平衡鹽溶液，等，其可適當地補充以胎牛血清或其他天然存在之因子，加上低濃度之可接受的緩衝液，通常為5至25mM。適當之緩衝液包括HEPES、磷酸鹽緩衝液、乳酸鹽緩衝液，等。用於親和分離之技術可包括使用經塗覆抗體之磁珠的磁性分離、親和色層分析法、與單株抗體連接或與單株抗體一起使用之細胞毒性劑，例如補體和細胞毒素，及以連接固體基質(例如平板)之抗體“淘選”或其他適當之技術。提供精確分離之技術包括具有不同程度之複雜性的螢光活化之細胞分選器，諸如多重顏色通道、低角度和鈍角光散射檢測通道、阻抗通道，等。該細胞可藉由使用與死細胞相關之染料(例如碘化丙啶(propidium iodide))針對死細胞進行選擇。可採用任何不會對所選擇之細胞的生存力過度傷害之技術。該親和試劑可為上述細胞表面分子之特異性受體或配體。除了抗體試劑外，可使用肽-MHC抗原和T細胞受體對；肽配體和受體；效應子和受體分子，等。該經分離之細胞可收集在可維持該細胞之生存力的任何適當培養基中，通常在該收集管之底部具有血清緩衝墊。各種培養基均可商購獲得並可根據細胞之性質使用，包括dMEM、HBSS、dPBS、RPMI、Iscove氏培養基，等，該培養基經常被補充以胎牛血清(FCS)。該經收集且可選擇地經富集之細胞群可立即用於遺傳修飾，或可在液態氮之溫度下冷凍並儲存、解凍且能夠重複使用。通常將細胞儲存在10% DMSO、50% FCS、40% RPMI 1640培養基中。該經工程處

理之細胞可在任何生理上可接受之介質中藉由任何方便之投予途徑輸注入受試者，通常係經由血管內途徑輸注，儘管它們亦可藉由其他該細胞可在其中找到適合生長之部位的途徑引入。通常，將投予至少1x10^6個細胞/kg、至少1x10^7個細胞/kg、至少1x10^8個細胞/kg、至少1x10^9個細胞/kg、至少1x10^{10}個細胞/kg或更多，通常受限於在收集期間獲得之T細胞的數量。

【0091】用於實行本發明之同種異基因T細胞可經遺傳修飾以減少移植物抗宿主病。例如本發明之經工程處理之細胞可藉由基因編輯技術實現剔除TCRαβ受體。TCRαβ為異二聚體，且需同時存有α和β鏈才能表現。單一基因編碼α鏈(TRAC)，然而編碼該β鏈之基因有2個，因此為達此目的已刪除TRAC基因座KO。已使用許多不同的方法來完成該等刪除，例如CRISPR/Cas9；巨核酸酶；經工程處理之I-CreI歸巢內切核酸酶等。參見，例如Eyquem et al. (2017) Nature 543:113–117，其中該TRAC編碼序列被CAR編碼序列取代；和Georgiadis et al.(2018) Mol. Ther. 26: 1215-122，其藉由群聚之規律間隔的短回文重複序列(CRISPR)/Cas9將CAR表現與TRAC破壞連接，而不直接將該CAR納入TRAC基因座。預防GVHD之另一種策略為修飾T細胞以表現TCRαβ訊號傳導的抑制劑，例如使用截短形式之CD3ζ作為TCR抑制分子。

【0092】製備用於實行本發明之T細胞係藉由使用包含編碼該正交受體之核酸序列的表現載體來轉化該經分離

之T細胞達成；可選擇地與編碼上述CAR多肽之核酸序列組合。該編碼CAR和正交受體之核酸序列可各自提供在分開之表現載體上，各核酸序列係可操作地連接一或多個表現控制元件以達成在該靶細胞中表現CAR和正交受體，該載體係經共同轉染入靶細胞中。或者，該編碼CAR和正交受體之核酸序列可各自提供在單一載體上，各核酸序列係受一或多個表現控制元件控制，以達成表現該相關之核酸序列。或者，該二種核酸序列可受單一啟動子之控制，該單一啟動子具有促進來自該載體的二個序列共同表現之插入的或下游控制元件。

【0093】體外T細胞活化可藉由本技藝完善設立之程序達成，包括基於細胞之T細胞活化、基於抗體之活化或使用各種基於小珠之活化試劑活化。基於細胞之T細胞活化可藉由將T細胞暴露於抗原呈遞細胞(諸如樹突細胞)或人工抗原呈遞細胞(諸如經照射之K562細胞)達成。使用可溶性抗CD3單株抗體進行之基於抗體的T細胞表面CD3分子活化亦支持在IL-2之存在下活化T細胞。

【0094】通常，本發明之T細胞係藉由將細胞與提供藥劑之表面接觸並進行培養來擴充，該表面提供刺激與CD3 TCR複合物相關之訊號的藥劑(例如抗CD3抗體)和刺激該T細胞表面上之共刺激分子的藥劑(例如抗CD28抗體)。基於小珠之T細胞活化已被用於製備臨床使用之CAR-T細胞的技藝接受。基於小珠之T細胞活化可使用市售之T細胞活化試劑達成，包括，但不限於Invitrogen®

CTS Dynabeads® CD3/28(Life 技術公司，加州Carlsbad)或Miltenyi MACS® GMP ExpAct Treg小珠或Miltenyi MACS GMP TransAcT™ CD3/28小珠(Miltenyi Biotec公司)。適合培養T細胞之條件為本技藝所熟知。Lin, et al. (2009) Cytotherapy 11(7):912-922；於2015年1月16日在線發表之Smith, *et al.*(2015) Clinical & Translational Immunology 4:e31。該靶細胞係保持在支持生長所必要之條件下，例如適當之溫度(例如37℃)和大氣(例如空氣加5% CO_2)。

【0095】當該正交受體或表現CAR-T細胞之正交受體為生長因子受體時，表現正交受體之CAR-T細胞亦可透過使用用於該正交受體之配體來選擇性地從背景或經轉導和未經轉導之細胞的混合群體擴增。於一實施態樣中，該正交受體為正交IL-2受體且用於擴增該等細胞之正交IL-2化合物為選自表1中提供之群組的正交IL-2。

【0096】在本方法中，正交蛋白質，特別是該正交細胞激素，可藉由重組方法產生。該正交受體可在表現載體上被引入該待經工程處理之細胞中。編碼正交蛋白質之DNA可在工程處理過程期間依設計從各種來源獲得。

【0097】胺基酸序列變體係依本文之描述藉由將適當之核苷酸變化引入編碼序列中製備。該等變體代表如本文所指出之殘基的插入、取代和/或具體指明之缺失。製造插入、取代和/或具體指明之缺失的任何組合以取得最終之構築體，惟其該最終之構築體具有如本文所定義之所需

生物活性。

【0098】為了達成表現重組蛋白質，將編碼正交蛋白質(和/或CAR)之核酸插入用於表現之可複製載體。可使用之該等載體有多種。該載體組分通常包括，但不限於下列之一或多者：複製起點、一或多個標記基因、增強子元件、啟動子和轉錄終止序列。載體包括病毒載體、質粒載體、整合載體，等。

【0099】用於在T細胞中表現該正交受體及可選擇地，CAR之表現載體可是病毒載體或非病毒載體。質粒為非病毒載體之實例。為了促進該靶細胞之轉染，該靶細胞可在促進攝取非病毒載體之條件下與非病毒載體直接接觸。促進哺乳動物細胞攝取外來核酸之條件的實例為本技藝所熟知，包括，但不限於化學方法(諸如Lipofectamine，Thermo-Fisher科技)、高鹽和磁場(電穿孔)。

【0100】於一實施態樣中，非病毒載體可提供在非病毒遞送系統中。非病毒遞送系統通常為複合物以促進使用核酸負載物轉導該靶細胞，在該核酸負載物中核酸係與諸如陽離子脂質(DOTAP、DOTMA)、表面活性劑、生物製品(明膠、殼聚醣)、金屬(金、磁鐵)和合成聚合物(PLG、PEI、PAMAM)等藥劑複合。本技藝熟知許多非病毒遞送系統之實施態樣，包括脂質載體系統(Lee et al. (1997) Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 14:173-206)；經聚合物塗層之脂質體(Marin等人，於1993年5月25日授權之美國專

利案編號5,213,804；於1991年5月7日授權之Woodle等人，美國專利案編號5,013,556)；陽離子脂質體(於1994年2月1日授權之Epand等人，美國專利案編號5,283,185；於1996年11月26日授權之Jessee, J. A.，美國專利案編號5,578,475；於1994年1月18日授權之Rose等人，美國專利案編號5,279,833；於1994年8月2日授權之Gebeyehu等人，美國專利案編號5,334,761)。

【0101】於另一實施態樣中，該表現載體可為病毒載體。當病毒載體系統係用於CAR和表現正交受體時，逆轉錄病毒或慢病毒表現載體為較佳者。特別地，該病毒載體為γ逆轉錄病毒。(Pule, *et al.* (2008) Nature Medicine 14(11):1264-1270)、自身去活化慢病毒載體(June, *et al.* (2009) Nat Rev Immunol 9(10):704-716)和下列文獻中描述之逆轉錄病毒載體：Naldini, *et al.* (1996) Science 272: 263-267；Naldini, *et al.* (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 93, pp. 11382-11388；Dull, *et al.* (1998) J. Virology 72(11):8463-8471；Milone, et al.(2009)*17(8):1453-1464*；2000年8月1日授權之Kingsman，等人，美國專利案編號6,096,538和2005年8月2日授權之Kingsman，等人，美國專利案編號6,924,123。於本發明一實施態樣中，該CAR表現載體可為從Oxford Biomedica獲得之Lentivector®慢病毒載體。

【0102】以表現載體轉導T-細胞可使用本技藝中熟知之技術完成，包括，但並不限於將宿主T細胞與病毒載體

共同培育、電穿孔和/或以化學方式增進之遞送。

【0103】正交蛋白質不僅可直接重組產生，亦可為與異源多肽(例如訊號序列或在成熟蛋白質或多肽之N端具有特異性裂解位點之其他多肽)之融合多肽形式。通常，該訊號序列可為該載體之組分，或者其可為插入該載體之編碼序列的一部分。所選擇之異源訊號序列較佳為可被宿主細胞識別和加工(即，被訊號肽酶裂解)者。在哺乳動物細胞表現中，可使用天然訊號序列，或者其他哺乳動物訊號序列可能是合適的，諸如來自相同或相關物種之分泌型多肽的訊號序列及病毒分泌型前導序列，例如單純皰疹gD訊號。

【0104】表現載體通常含有選擇基因，亦稱為可選擇之標記。該基因編碼在選擇性培養基中生長之經轉化的宿主細胞存活或生長所必要的蛋白質。未以含有該選擇基因之載體轉化的宿主細胞將無法在該培養基中存活。典型之選擇基因編碼下述蛋白質(a)賦予對抗生素或其他毒素，例如胺苄青黴素、新黴素、甲胺蝶呤或四環素之抗性，(b)補充營養缺陷，或(c)提供無法從 複雜培養基獲得之關鍵營養素。

【0105】表現載體將含有可被宿主生物體識別並可操作地連接正交蛋白質編碼序列之啟動子。啟動子為位於結構基因之起始密碼子上游(5')(通常在約100至1000bp內)的未經轉譯之序列，其控制與它們可操作地連接之特定核酸序列的轉錄和轉譯。該等啟動子通常分成二種類別，誘導

型和組成型。誘導型啟動子為在回應培養條件之某些變化(例如存有或不存有營養素或溫度改變)時啟動增加受其控制之從DNA轉錄之水準的啟動子。為人熟知之可被各種可能之宿主細胞識別的啟動子有多種。

【0106】藉由下述啟動子可控制在哺乳動物宿主細胞中從載體轉錄，例如：從病毒，諸如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒(諸如腺病毒2)、牛乳頭狀瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨細胞病毒、逆轉錄病毒(諸如鼠幹細胞病毒)、B型肝炎病毒，最佳為猿猴病毒40(SV40)之基因組獲得之啟動子、來自異源哺乳動物之啟動子，例如肌動蛋白啟動子、PGK(磷酸甘油酸激酶)或免疫球蛋白啟動子、來自熱休克啟動子，惟其該等啟動子與該宿主細胞系統相容。該SV40病毒之早期和晚期啟動子可方便地以同時含有SV40病毒複製起點之SV40限制性片段形式獲得。

【0107】由高等真核生物進行之轉錄通常可藉由在載體中插入增強子序列來增加。增強子為通常為約10至300 bp之DNA之順式作用元件，其作用在啟動子以增加其轉錄。增強子為方向和位置相對上無關，其係在內含子內及編碼序列本身之內的轉錄單位之5'和3'找到。現已知許多來自哺乳動物基因(球蛋白、彈性蛋白酶、白蛋白、α-胎兒蛋白和胰島素)之增強子序列。然而，通常，人們將使用來自真核細胞病毒之增強子。實例包括在複製起點後側之SV40增強子、巨細胞病毒早期啟動子增強子、在複製起點後側之多瘤增強子和腺病毒增強子。增強子可被剪接

入表現載體中，位於該編碼序列之5’或3’位置處，但較佳為位於啟動子之5’位點。

【0108】用於真核宿主細胞中之表現載體亦將含有對終止轉錄和穩定mRNA而言必要之序列。該等序列通常可從真核生物或病毒DNA或cDNA之5’，偶爾為3’，未轉譯區獲得。構建含有一或多種上述組分之合適載體時係採用標準技術。

【0109】用於在本發明之載體中選殖或表現該DNA之合適的宿主細胞為上述之原核生物、酵母或高等真核生物細胞。有用之哺乳動物宿主細胞株之實例為小鼠L細胞(L-M[TK-]，ATCC#CRL-2648)、藉由SV40轉化之猴腎CV1株(COS-7，ATCC CRL 1651)；人胚腎細胞株(用於在懸浮培養中生長之分殖的293或293細胞)；幼倉鼠腎細胞(BHK，ATCC CCL 10)；中國倉鼠卵巢細胞/-DHFR(CHO)；小鼠塞爾托利氏細胞(sertoli cell)(TM4)；猴腎細胞(CV1 ATCC CCL 70)；非洲綠猴腎細胞(VERO-76，ATCC CRL-1587)；人子宮頸癌細胞(HELA，ATCC CCL 2)；犬腎細胞(MDCK，ATCC CCL 34)；水牛大鼠肝細胞(BRL 3A，ATCC CRL 1442)；人肺細胞(W138，ATCC CCL 75)；人肝細胞(Hep G2，HB 8065)；小鼠乳腺腫瘤(MMT 060562，ATCC CCL 51)；TRI細胞；MRC 5細胞；FS4細胞；和人肝癌細胞株(Hep G2)。

【0110】宿主細胞，包括經工程處理之T細胞，可使用上述之用於正交IL-2或IL-2R的表現載體轉染。細胞可

被培養在經適當修飾之常規營養培養基中以用於誘導啟動子、選擇轉形株或擴增編碼所需序列之基因。哺乳動物宿主細胞可被培養在各種培養基中。可商購之培養基，諸如Ham氏F10(Sigma)、最低要素培養基(Minimal Essential Medium)((MEM)，Sigma)、RPMI 1640(Sigma)和杜氏改良之Eagle氏培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium ((DMEM)，Sigma)適合用於培養宿主細胞。該等培養基之任一者可依需要被補充以激素和/或其他生長因子(諸如胰島素、轉鐵蛋白或表皮生長因子)、鹽類(諸如氯化鈉、氯化鈣、氯化鎂和磷酸鹽)、緩衝液(諸如HEPES)、核苷(諸如腺苷和胸苷)、抗生素、微量元素和葡萄糖或等效之能量來源。亦可包括適當濃度之本技藝之技術熟習人士已知的任何其他必須補充劑。培養條件，諸如溫度、pH，等為那些先前用於選定之表現宿主細胞者，且將為本技藝之一般技術熟習人士所清楚明白。

【0111】當置入與另一核酸序列之功能相關的位置時，該核酸係“可操作地連接”。例如若訊號序列之DNA係以參與多肽分泌之前蛋白形式表現，則其係與多肽之DNA可操作地連接；若啟動子或增強子影響該序列之轉錄，則該啟動子或增強子係與編碼序列可操作地連接；或者若核醣體結合位點之定位可促進轉譯，則其係與編碼序列可操作地連接。通常，“可操作地連接”係指該經連接之DNA序列為相毗鄰的且在分泌型前導序列之情況下，為相毗鄰的且為閱讀相。然而，增強子不必一定是相毗鄰的。

【0112】重組產生之正交多肽可以分泌型多肽之形式從培養基回收，雖然其亦可從宿主細胞之溶胞產物回收。蛋白酶抑制劑，諸如苯甲基磺醯氟(PMSF)亦可用於抑制純化期間之蛋白水解降解，且可包含抗生素以防止外來污染物生長。本技藝已知並可使用各種純化步驟，例如親和色層分析法。親和色層分析法係利用通常存在於生物大分子中之高度特異性結合位點，根據分子與特定配體結合之能力分離分子。共價鍵將配體以明顯地呈遞給該蛋白質樣品的方式連接至不溶性多孔支撐介質，從而利用天然生物特異性結合一種分子物種來將第二物種從混合物中分離和純化。抗體常用於親和色層分析法中。亦可使用尺寸選擇步驟，例如使用凝膠過濾色層分析法(亦稱為尺寸排阻色層分析法或分子篩色層分析法)以根據蛋白質之大小來分離蛋白質。在凝膠過濾中，將蛋白質溶液通過填充半滲透性多孔樹脂之管柱。該半透性樹脂具有一系列孔徑，該一系列孔徑決定可藉由該管柱分離之蛋白質的大小。同樣有吸引力的是陽離子交換色層分析法。

【0113】該正交細胞激素組成物可使用本技藝中已知之方法濃縮、過濾、滲析，等。在治療應用方面，可將該細胞激素投予包含合適之經工程處理之正交受體的哺乳動物。投予可以大丸藥形式藉由靜脈內注射或藉由連續輸注一段時間進行。替代之投予途徑包括肌肉內、腹膜內、腦脊髓內、皮下、關節內、滑膜內、鞘內、口服、局部或吸入途徑。該正交細胞激素亦可合適地藉由腫瘤內、腫瘤周

圍、病灶內或病灶周圍途徑投予或投予至淋巴，以發揮局部和全身治療效果。

【0114】該等劑型包含本身為無毒性和非治療性之生理上可接受的載體。該等載體之實例包括離子交換劑、氧化鋁、硬脂酸鋁、卵磷脂、血清蛋白，諸如人血清白蛋白、緩衝物質，諸如磷酸鹽、甘胺酸、山梨酸、山梨酸鉀、飽和植物脂肪酸之偏甘油酯混合物、水、鹽或電解質，諸如硫酸魚精蛋白、磷酸氫二鈉、磷酸氫鉀、氯化鈉、鋅鹽、膠體二氧化矽、三矽酸鎂、聚乙烯吡咯啶酮、纖維素為底質之物質和PEG。用於局部或凝膠為底質形式之多肽的載體包括多醣，諸如羧甲基纖維素鈉或甲基纖維素、聚乙烯吡咯啶酮、聚丙烯酸酯、聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段聚合物、PEG和木蠟醇。在所有投予方面，適合使用常規儲庫形式。該等形式包括，例如微膠囊、奈米膠囊、脂質體、膏藥、吸入形式、鼻噴霧劑、舌下片劑和緩釋製劑。通常將多肽以約0.1μg/ml至100μg/ml之濃度配製在該等載劑中。

【0115】在本發明之異種同源物IL-2多肽為“基本上純質”的事件中，它們可具有至少約60%(按重量計)(乾重)之所欲多肽(例如含有該異種同源物IL-2胺基酸序列之多肽)。例如，該多肽可具有至少約75%、約80%、約85%、約90%、約95%或約99%(按重量計)之所欲多肽。純度可藉由任何合適之標準方法測量，例如管柱色層分析法、聚丙烯醯胺凝膠電泳或HPLC分析。

【0116】於本發明之另一實施態樣中，提供含有可用於治療上述疾病之材料的製品。該製品包台容器和標籤。合適之容器包括，例如瓶子、小瓶、注射器和試管。該容器可從各種材料形成，諸如玻璃或塑料。該容器容納能有效治療該病症之組成物並可具有無菌進入口(例如該容器可能為靜脈內溶液袋或具有可被皮下注射針刺穿之塞子的小瓶)。該組成物中之活性劑為該正交細胞激素。該容器上或與容器聯結之標籤指明該組成物係用於治療選擇之病況。該製品可與可容納，例如醫藥上可接受之緩衝液(諸如磷酸鹽緩衝鹽水、林格氏溶液或右旋糖溶液)之另外的容器一起提供。該製品可進一步包括其他從商業和用戶角度而言需要之材料，包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針頭、注射器和具有使用說明之藥品仿單。

【0117】如本文所使用者，術語“癌症”(或“癌性”)、“過度增殖性”和“腫瘤性”係指具有自主生長能力之細胞(例如特徵為快速增殖性細胞生長的異常狀態或病況)。過度增殖和腫瘤疾病狀態可被歸類為病理性的(例如表徵或構成疾病狀態)，或者其可被歸類為非病理性的(例如偏離正常但與疾病狀態無關)。該術語旨在包括所有類型之癌性生長或致癌過程、轉移性組織或惡性轉化之細胞、組織或器官，而與組織病理學類型或侵襲階段無關。“病理性過度增生”細胞出現在特徵為惡性腫瘤生長之疾病狀態。非病理性過度增殖細胞之實例包括與傷口修復相關之細胞增殖。術語“癌症”或“腫瘤”係用於指各種器官系統之惡性腫

瘤，包括影響肺、乳腺、甲狀腺、淋巴腺和淋巴組織、胃腸道器官和泌尿生殖道者，以及通常被認為包括下列惡性腫瘤之腺癌，諸如：大多數結腸癌、腎細胞癌、前列腺癌和/或睾丸腫瘤、非小細胞肺癌、小腸癌和食道癌。

【0118】術語“癌瘤”為本技藝所認知，其係指上皮或內分泌組織之惡性腫瘤，包括呼吸系統癌瘤、胃腸系統癌瘤、泌尿生殖系統癌瘤、睾丸癌瘤、乳腺癌瘤、前列腺癌瘤、內分泌系統癌瘤和黑色素瘤。“腺癌”係指源自腺體組織或其中該腫瘤細胞形成可識別之腺體結構的癌瘤。

【0119】腫瘤細胞之實例包括，但不限於AML、ALL、CML、腎上腺皮質癌、肛門癌、再生不良性貧血、膽管癌、膀胱癌、骨癌、骨轉移、腦癌、中樞神經系統(CNS)癌、周圍神經系統(PNS)癌、乳癌、子宮頸癌、兒童期非何杰金氏淋巴瘤、結腸癌和直腸癌、子宮內膜癌、食道癌、尤文氏腫瘤家族(例如尤文氏肉瘤)、眼癌、膽囊癌、胃腸道類癌、胃腸道間質瘤、妊娠滋養細胞疾病(trophoblastic disease)、何杰金氏淋巴瘤、卡波西氏肉瘤、腎癌、喉癌和下嚥癌、肝癌、肺癌、肺類癌腫瘤、非何杰金氏淋巴瘤、男性乳癌、惡性間皮瘤、多發性骨髓瘤、骨髓增生異常症候群、骨髓增生性病症、鼻腔和鼻竇癌、鼻咽癌、神經母細胞瘤、口腔和口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰臟癌、陰莖癌、腦下垂體瘤、前列腺癌、視網膜母細胞瘤、橫紋肌肉瘤、唾液腺癌、肉瘤、黑色素瘤皮膚癌、非黑色素瘤皮膚癌、胃癌、睾丸癌、胸腺癌、甲狀腺

癌、子宮癌(例如子宮肉瘤)、移行細胞癌瘤、陰道癌、外陰癌、間皮瘤、鱗狀細胞或表皮樣癌瘤、支氣管腺瘤、絨毛膜癌瘤、頭頸癌、畸胎瘤或瓦爾登斯特倫氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)。其中該癌細胞表現出與非癌細胞相比較CD47表現增加之任何癌症為適合藉由本發明方法和組成物治療之癌症。

【0120】本發明之組成物和方法可與其他治療劑組合。例如當欲治療之疾病、病症或病況為腫瘤性疾病(例如癌症)時，本發明之方法可與常規化療劑或其他生物性抗癌藥物，諸如檢查點抑制劑(例如PD1或PDL1抑制劑)組合或與治療性單株抗體(例如癌思停(Avastin)、賀癌平(Herceptin))組合。

【0121】本技藝中鑑定之可用於治療腫瘤性疾病的化學藥劑之實例，包括，但不限於必除癌(abitrexate)、阿黴素(adriamycin)、氟尿嘧啶(adrucil)、安吖啶(amsacrine)、天門冬醯胺酶、蒽環類、阿扎胞苷(azacitidine)、硫唑嘌呤(azathioprine)、比努(bicnu)、百時美(blenoxane)、白消安(busulfan)、博來黴素(bleomycin)、坎托沙(camptosar)、喜樹鹼(camptothecin)、卡鉑(carboplatin)、卡莫司汀(carmustine)、塞路比汀(cerubidine)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、順鉑、克拉屈濱(cladribine)、柯美井(cosmegen)、阿糖胞苷(cytarabine)、塞托沙(cytosar)、環磷醯胺(cyclophosphamide)、塞托烷(cytoxan)、更生黴素(dactinomycin)、多西紫杉醇(docetaxel)、阿黴素

(doxorubicin)、柔紅黴素(daunorubicin)、伊蘭斯(ellence)、艾斯帕(elspar)、表阿黴素(epirubicin)、依托泊苷(etoposide)、氟達拉濱(fludarabine)、氟尿嘧啶(fluorouracil)、氟達拉(Fludara)、吉西他濱(gemcitabine)、健擇(gemzar)、海卡汀(hycamtin)、羥基尿、愛治(hydrea)、伊達黴素(idamycin)、依達比星(idarubicin)、異環磷醯胺(ifosfamide)、伊非克司(ifex)、伊立替康(irinotecan)、蘭威斯(lanvis)、瘤克寧(leukeran)、瘤他汀(leustatin)、慕妥崙(matulane)、雙氯乙基甲胺(mechlorethamine)、巰嘌呤(mertotopurine)、甲胺蝶呤(methotrexate)、絲裂黴素(mitomycin)、米托蒽醌(mitoxantrone)、光輝黴素(mithramycin)、自力黴素(mutamycin)、麥樂崙(myleran)、麥洛沙(mylosar)、納維平(navelbine)、尼潘(nipent)、諾蒽醌(novantrone)、安可維(oncovin)、奧沙利鉑(oxaliplatin)、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、伯爾定(paraplatin)、噴司他丁(pentostatin)、普拉丁諾(platinol)、普卡黴素(plicamycin)、甲基苄肼(procarbazine)、嘌呤醇(purinethol)、雷替曲塞(ralitrexed)、泰索帝(taxotere)、紫杉醇、替尼泊苷(teniposide)、硫鳥嘌呤(thioguanine)、托沐德(tomudex)、托泊替康(topotecan)、維路比辛(valrubicin)、長春花鹼(velban)、滅必治(vepesid)、長春鹼(vinblastine)、長春地辛(vindesine)、長春新鹼(vincristine)、長春瑞濱(vinorelbine)、VP-16和衛猛(vumon)。

【0122】可組合投予之標靶治療劑可包括，但不限於酪胺酸激酶抑制劑，諸如伊馬替尼甲磺酸鹽(Imatinib mesylate)(格列衛(Gleevec)，亦稱為STI-571)、吉非替尼(Gefitinib)(易瑞沙(Iressa)，亦稱為ZD1839))、埃羅替尼(Erlotinib)(以Tarceva銷售)、索拉非尼(Sorafenib)(納莎瓦(Nexavar))、舒尼替尼(Sunitinib)(舒坦(Sutent))、達沙替尼(Dasatinib)(斯利塞(Sprycel))、拉帕替尼(Lapatinib)(泰克伯(Tykerb))、尼羅替尼(Nilotinib)(塔西納(Tasigna))和波替柔米(Bortezomib)(維爾卡(Velcade))、Jakafi(路索替尼(ruxolitinib))；Janus激酶抑制劑，諸如託法替尼(tofacitinib)；ALK抑制劑，諸如克唑替尼(crizotinib)；Bcl-2抑制劑，諸如歐托克雷(obatoclax)、文克塔(venclexta)和棉酚(gossypol)；FLT3抑制劑，諸如米杜托林(midostaurin)(Rydapt)、IDH抑制劑，諸如AG-221、PARP抑制劑，諸如因帕利(Iniparib)和歐帕利(Olaparib)；PI3K抑制劑，諸如哌立福辛(perifosine)；VEGF受體2抑制劑，諸如阿帕替尼(Apatinib)；AN-152(AEZS-108)，連接[D-Lys(6)]-LHRH之阿黴素；Braf抑制劑，諸如維沐非尼(vemurafenib)、達布非尼(dabrafenib)和LGX818；MEK抑制劑，諸如托美替尼(trametinib)；CDK抑制劑，諸如PD-0332991和LEE011；Hsp90抑制劑，諸如沙利黴素(salinomycin)；和/或小分子藥物軛合物，諸如文塔氟利(Vintafolide)；絲胺酸/蘇胺酸激酶抑制劑，諸如譚洛莫司(Temsirolimus)(特癌適(Torisel))、依維莫司(Everolimus)

(癌伏妥(Afinitor))、維羅非尼(Vemurafenib)(日沛樂(Zelboraf))、曲美替尼(Trametinib)(麥欣霓(Mekinist))和達拉非尼(Dabrafenib)(泰伏樂(Tafinlar))。

【0123】本技藝中鑑定之可用於治療腫瘤性疾病的生物劑之實例包括，但不限於細胞激素或細胞激素拮抗劑，諸如IL-12、INFα或抗表皮生長因子受體、放射療法、伊立替康；四氫葉酸抗代謝物，諸如培美曲塞(pemetrexed)；針對腫瘤抗原之抗體、單株抗體和毒素之複合物、T細胞佐劑、骨髓移植物或抗原呈遞細胞(例如樹突細胞療法)、抗腫瘤疫苗、具複製能力之病毒、訊號轉導抑制劑(例如格列衛®或賀賽汀®)或用於實現加成或協同抑制腫瘤生長的免疫調節劑、環氧合酶-2(COX-2)抑制劑、類固醇、TNF拮抗劑(例如Remicade®和Enbrel®)、干擾素-β1a(Avonex®)和干擾素-β1b(Betaseron®)以及如本技藝之技術熟習的臨床醫生所輕易理解之已知化療治療方案中實行的前述之一或多者的組合。

【0124】可與抗CD93 ABD多肽或經工程處理之細胞組合投予的腫瘤特異性單株抗體可包括，但不限於利妥昔單抗(Rituximab)(以美羅華(MabThera)或莫須瘤(Rituxan)銷售)、阿崙珠單抗(Alemtuzumab)、帕尼單抗(Panitumumab)、易普利姆瑪(Ipilimumab)(Yervoy)，等。

【0125】於一些實施態樣中，本發明之組成物和方法可與免疫檢查點療法組合。免疫檢查點療法之實例包括PD1與PDL1和/或PDL2結合之抑制劑。PD1與PDL1和/或

PDL2結合之抑制劑為本技藝所熟知。干擾PD1與PDL1和/或PDL2結合之市售單株抗體的實例包括保疾伏(nivolumab)(Opdivo®，BMS-936558，MDX1106，可從紐澤西州普林斯頓必治妥施貴寶商購)、吉舒達(pembrolizumab)(Keytruda®MK-3475，蘭布魯珠單抗(lambrolizumab)，可從紐澤西州凱尼爾沃思默克公司商購)和癌自禦(atezolizumab)(Tecentriq®，加州南舊金山Genentech/羅氏)。PD1抑制抗體之另外的實例包括，但不限於杜瓦單抗(durvalumab)(MEDI4736，Medimmune公司/阿斯利康)、普利珠單抗(pidilizumab)(CT-011，CureTech)、PDR001(諾華)、BMS-936559(MDX1105，必治妥施貴寶公司)和阿維魯單抗(avelumab)(MSB0010718C，默克/輝瑞公司)和SHR-1210(Incyte)。另外之抗體PD1途徑抑制劑描述於2012年7月10日授權之美國專利案編號8,217,149(Genentech公司)；2012年5月1日授權之美國專利案編號8,168,757(Merck Sharp和Dohme公司)、2011年8月30日授權之美國專利案編號8,008,449(Medarex)、2011年5月17日授權之美國專利案編號7,943,743(Medarex公司)。此外，本技藝已知小分子PD1與PDL1和/或PDL2結合之抑制劑。參見，例如Sasikumar等人之WO 2016142833A1和Sasikumar等人之WO2016142886A2、BMS-1166和BMS-1001(Skalniak et al (2017)Oncotarget 8(42):72167-72181)。

【0126】於其他實施態樣中，本發明之方法係用於治療感染。如本文所使用者，術語“感染”係指生物體(即，

受試者)之至少一個細胞被感染劑感染(例如受試者具有細胞內病原體感染，例如慢性細胞內病原體感染)的任何狀態。如本文所使用者，術語“感染劑”係指引起該受感染之生物體的至少一個細胞中CD47表現增加的外來生物實體(即病原體)。例如感染劑包括，但不限於細菌、病毒、原生動物和真菌。細胞內病原體特別令人感興趣。傳染病為由感染劑引起之疾病。一些感染劑在某些情況下不會引起可識別之症狀或疾病，但有可能在改變的條件下引起症狀或疾病。本發明之方法可用於治療慢性病原體感染，例如，包括，但不限於病毒感染，例如逆轉錄病毒、慢病毒、肝脫氧核糖核酸病毒(hepadna virus)、皰疹病毒、痘病毒、人乳頭瘤病毒，等；細胞內細菌感染，例如分枝桿菌(Mycobacterium)、衣原體(Chlamydophila)、埃里希氏體(Ehrlichia)、立克次氏體(Rickettsia)、布魯氏菌(Brucella)、軍團菌(Legionella)、弗朗西斯菌(Francisella)、李斯特菌(Listeria)、柯克斯氏菌(Coxiella)、奈瑟氏菌(Neisseria)、沙門氏菌、耶氏桿菌屬(Yersinia sp)、幽門螺桿菌(Helicobacter pylori)，等；和細胞內原生動物病原體，例如瘧原蟲屬(Plasmodium sp.)、錐蟲屬(Trypanosoma sp.)、賈第蟲屬(Giardia sp.)、弓形蟲屬(Toxoplasma sp.)、利甚曼原蟲屬(Leishmania sp.)，等。

【0127】治療可與其他活性劑組合。抗生素之類別包括青黴素類，例如青黴素G、青黴素V、甲氧西林(methicillin)、苯唑西林(oxacillin)、羧苄青黴素(

carbenicillin)、萘夫西林(nafcillin)、胺苄青黴素(ampicillin)，等；青黴素與β-內醯胺酶抑制劑之組合、頭孢菌素(cephalosporin)類，例如頭孢克洛(cefaclor)、頭孢唑啉(cefazolin)、頭孢呋辛(cefuroxime)、拉氧頭孢(moxalactam)，等；碳青黴烯(carbapenem)類；單醯胺菌素(monobactam)類；胺基糖苷類；四環素類；大環內酯類；林可黴素(lincomycin)類；多黏菌素(polymyxin)類；磺胺類；喹諾酮(quinolone)類；氯黴素；甲硝唑(metronidazole)；大觀黴素(spectinomycin)；甲氧苄啶(trimethoprim)；萬古黴素；等。亦可包括細胞激素，例如干擾素γ、腫瘤壞死因子α、介白素12，等。抗病毒劑，例如阿昔洛韋(acyclovir)、更昔洛韋(gancyclovir)，等亦可用於治療。

【0128】再於其他實施態樣中，將調節性T細胞經工程處理以用於治療自體免疫疾病。炎性疾病和與炎症相關之疾病的範圍很廣且包括自體免疫疾病，諸如類風濕性關節炎(RA)、系統性紅斑性狼瘡(SLE)、多發性硬化症(MS)和自體免疫性肝炎；胰島素依賴性糖尿病、退化性疾病，諸如骨關節炎(OA)、阿茲海默氏病(AD)和黃斑變性。

【0129】許多(若非大多數)自體免疫和炎性疾病涉及多種類型之T細胞，例如TH1、TH2、TH17，等。自體免疫疾病之特徵在於T和B淋巴細胞異常靶向導致體內器官、組織或細胞類型(例如胰臟、腦、甲狀腺或胃腸道)損傷和/或功能障礙之自身蛋白質、自身多肽、自身肽和/或其他自身分子而引起疾病的臨床表現。自體免疫疾病包括

影響特定組織之疾病和可影響多種組織之疾病，此可部分取決於該反應是否針對限定於特定組織之抗原還是廣泛分佈於體內之抗原。

【0130】本發明提供經工程處理之正交細胞激素受體/配體對及彼等之使用方法。經工程處理(正交)之細胞激素與對應之經工程處理(正交)的受體特異結合。當結合時，該正交受體活化透過天然細胞元件轉導之訊號傳導，以提供模擬天然反應，但特異於表現該正交受體之經工程處理的細胞之生物活性。該正交受體表現出顯著減少與內源性對應之細胞激素(包括該正交細胞激素之天然對應物)結合，而該正交細胞激素表現出顯著減少與任何內源性受體(包括該正交受體之天然對應物)結合。於一些實施態樣中，該正交細胞激素對正交受體之親和力與該天然細胞激素對天然受體之親和力相當。

【0131】該正交細胞激素和受體對可選自任何所欲之細胞激素。用於工程處理正交細胞激素受體對之方法可包含以下步驟：(a)將胺基酸改變處理入天然受體中以破壞與天然細胞激素結合；(b)將胺基酸改變處理入天然細胞激素中用於受體結合之接觸殘基處，(c)選擇與該正交受體結合之細胞激素異種同源物；(d)丟棄與該天然受體結合之異種同源細胞激素，或(e)選擇與異種同源細胞激素結合之受體異種同源物；(f)丟棄與天然細胞激素結合之異種同源受體。於較佳之實施態樣中，使用對該細胞激素/受體複合物之結構的知識來選擇用於定點誘變或易錯誘變之胺基

酸位置。酵母展示系統可方便地用於選擇過程，但亦可使用其他顯示和選擇方法。

【0132】在一些情況下，胺基酸變化係藉由親和力成熟獲得。“親和力成熟的”多肽為在一或多個殘基中具有一或多個改變之多肽，其導致該正交多肽相較於不具備該等改變之親本多肽對同源正交受體之親和力改善，或反之亦然。與“親本”多肽相比較，進行親和力成熟可使結合親和力增加至少約10%至50-100-150%或更多，或1至5倍。如上文中所討論者，本發明之經工程處理的正交細胞激素活化該正交受體，但已顯著降低該天然受體之結合和活化，例如當在合適之分析條件下使用足夠量之分子藉由ELISA和/或FACS分析評估時，正交細胞激素在與對應之天然細胞激素的競爭性抑制中可能表現出少於約5%之抑制。

【0133】於本發明之一些實施態樣中，該正交受體為IL-2受體之鏈，即，選自下述群組之多肽：介白素2受體α(IL-2Rα；CD25)、介白素2受體β(IL-2Rβ；CD122)和介白素2受體γ(IL-2Rγ；CD132；共同γ鏈)。於一些特定之實施態樣中，該正交受體為CD132，其參與來自IL-2、IL-4、IL-7和IL-15之訊號傳導。於其他特定之實施態樣中，該正交受體為CD122，其參與來自IL-2和IL-15之訊號傳導。該正交受體通常與對應之正交細胞激素(例如IL-2、IL-4、IL-7、IL-15，等)配對。

【0134】於一些特定之實施態樣中，該正交受體為CD122。於一些該等實施態樣中，該正交受體被引入亦可

能表現CD25和/或CD132之T細胞或NK細胞中。本發明提供該經修飾之CD122蛋白質的核酸編碼序列和蛋白質組成物。在本發明中，CD122係經工程處理以藉由以非天然胺基酸取代該天然序列之胺基酸或藉由刪除涉及與天然IL-2結合之位置處的天然胺基酸來破壞與天然細胞激素結合。於一些實施態樣中，該胺基酸被非保守性改變取代。所欲之用於取代或刪除的位置包括，但不限於人CD122(HCD122)R41、R42、Q70、K71、T73、T74、V75、S132、H133、Y134、F135、E136、Q214。所欲之用於取代或刪除的位置包括，但不限於在小鼠CD122(mCD122)R42、F67、Q71、S72、T74、S75、V76、S133、H134、Y135、I136、E137、R215。

【0135】於一些實施態樣中，CD122係在選自下述群組之一或多個位置之組合中被取代：小鼠蛋白質中之Q71、T74、H134、Y135；或人蛋白質中之Q70、T73、H133、Y134。於一些實施態樣中，該經工程處理之蛋白質包含在mCD122 H134和Y135；或hCD122 H133和Y134處之胺基酸取代。於一些實施態樣中，該胺基酸取代為酸性胺基酸，例如天門冬胺酸和/或麩胺酸。特定之胺基酸取代包括，但不限於mCD122取代Q71Y；T74D；T74Y；H134D，H134E；H134K；Y135F；Y135E；Y135R；和hCD122改變Q70Y；T73D；T73Y；H133D、H133E；H133K；Y134F；Y134E；Y134R。正交細胞激素之選擇可能隨著正交受體之選擇而變化。

【0136】於一些實施態樣中，當該正交受體為CD122時，該正交細胞激素為IL-2或IL-15。該細胞激素可，例如藉由酵母展示發展，易錯或定向誘變，等來選擇用於與正交受體結合。圖6中顯示一組代表性之選定的正交序列。

【0137】於一些實施態樣中，該正交細胞激素為IL-2。於一些實施態樣中，下列胺基酸殘基之一或多者在該位置處被除了天然蛋白質之胺基酸以外的胺基酸取代或被刪除：在小鼠IL-2(mIL-2)方面，H27、L28、E29、Q30、M33、D34、Q36、E37、R41、N103中之任一者；在人IL-2(hIL-2)方面，Q13、L14、E15、H16、L19、D20、Q22、M23、G27、R81、N88中之任一者。於一些該等實施態樣中，該組胺基酸取代係選自下列之一或多者：(在mIL-2方面)E29、Q30、M33、D34、Q36和E37；在hIL-2方面，E15、H16、L19、D20、Q22、M23、R81。

【0138】於一些實施態樣中，該用於mIL-2之胺基酸取代為下列之一或多者：[H27W]、[L28M，L28W]、[E29D，E29T，E29A]、[Q30N]、[M33V，M33I，M33A]、[D34L、D34M]、[Q36S，Q36T，Q36E，Q36K，Q36E]、[E37A，E37W，E37H，E37Y，E37F，E37A，E37Y]、[R41K，R41S]、[N103E，N103Q]；用於hIL-2之胺基酸取代為下列之一或多者：[Q13W]、[L14M，L14W]、[E15D，E15T，E15A，E15S]、[H16N，H16Q]、[L19V，L19I，L19A]、[D20L，D20M]、[Q22S，Q22T，Q22E，Q22K，Q22E]、[M23A，M23W，M23H，M23Y，

M23F，M23Q，M23Y]、[G27K，G27S]、[R81D，R81Y]、[N88E，N88Q]、[T51I]。於一些實施態樣中，該胺基酸取代組包含下列取代組其中一者：用於mIL-2之取代組：[Q30N，M33V，D34N，Q36T，E37H，R41K]；[E29D，Q30N，M33V，D34L，Q36T，E37H]；[E29D，Q30N，M33V，D34L，Q36T，E37A]和[E29D，Q30N，M33V，D34L，Q36K，E37A]，而用於hIL-2之取代組：[H16N，L19V，D20N，Q22T，M23H，G27K]；[E15D，H16N，L19V，D20L，Q22T，M23H]；[E15D，H16N，L19V，D20L，Q22T，M23A]和[E15D，H16N，L19V，D20L，Q22K，M23A]；或其保守性變體。

【0139】於一些實施態樣中，該用於hIL-2之胺基酸取代為下列之一或多者：[E15S，E15T，E15Q，E15H]；[H16Q]；[L19V，L19I]；[D20T，D20S，D20M，D20L]；[Q22K，Q22N]；[M23L，M23S，M23V，M23T]。於一些實施態樣中，該用於hIL-2之一致突變組為[E15S，H16Q，L19V，D20T/S/M；Q22K；M23L/S]。於一些實施態樣中，該用於hIL-2之一致突變組為[E15S，H16Q，L19V，D20L，M23Q/A]和可選擇地，Q22K。

【0140】於一些實施態樣中，該胺基酸取代組包含下列用於hIL-2之取代組其中一者：[E15S；H16Q；L19V，D20T/S；Q22K，M23L/S]；[E15S；H16Q；L19I；D20S；Q22K；M23L]；[E15S；L19V；D20；Q22K；M23S]；[E15T；H16Q；L19V；D20S；M23S]；[E15Q；L19V；

D20；Q22K；M23S]；[E15Q；H16Q；L19V；D20T；Q22K；M23V]；[E15H；H16Q；L19I；D20S；Q22K；M23L]；[E15H；H16Q；L19I；D20L；Q22K；M23T]；[L19V；D20；Q22N；M23S]；[E15S，H16Q，L19V，D20L，M23Q，R81D，T51I]、[E15S，H16Q，L19V，D20L，M23Q，R81Y]、[E15S，H16Q，L19V，D20L，Q22K，M23A]、[E15S，H16Q，L19V，D20L，M23A]。

【0141】提供用於增強細胞反應之方法，該方法係藉由引入本發明之正交受體將來自接受者或供體之細胞進行工程處理，並藉由將該經工程處理之細胞與同源正交細胞激素接觸來刺激該正交受體。本方法包括獲得靶細胞(例如T細胞、造血幹細胞，等)之步驟，該靶細胞可從生物樣品中分離出，或可在試管內從祖細胞來源衍生。該細胞係使用包含編碼該正交受體之序列的表現載體轉導或轉染，該步驟可在任何合適之培養基中進行。

【0142】於一些實施態樣中，提供經工程處理之細胞，其中該細胞已藉由引入本發明之正交受體改質。任何細胞均可用於本目的。於一些實施態樣中，該細胞為T細胞，包括，但不限於初始$CD8^+$T細胞、細胞毒性$CD8^+$T細胞、初始$CD4^+$T細胞、輔助T細胞，例如T_H1、T_H2、T_H9、T_H11、T_H22、T_{FH}；調節性T細胞，例如T_R1、天然T_{Reg}、誘導型T_{Reg}；記憶T細胞，例如中央記憶T細胞、效應記憶T細胞、NKT細胞、γδT細胞；等。於其他實施態樣中，該經工程處理之細胞為幹細胞，例如造血幹細胞或NK細

胞。於一些實施態樣中，該細胞係在轉移入受試者之前，在體外程序中經遺傳修飾。該經工程處理之細胞可在用於療法的單位劑量中提供，且相對於預期之接受者可為同種異體的、自體的，等。

【0143】細胞，例如從受試者收集之細胞，可藉由富集所需細胞之技術從細胞混合物中分開。可使用適當之溶液來分散或懸浮。該等溶液通常為平衡鹽溶液，例如生理鹽水、PBS、Hank氏平衡鹽溶液，等，其可合宜地補充以胎牛血清或其他天然存在之因子，加上低濃度之可接受的緩衝液(通常為5至25mM)。合宜的緩衝液包括HEPES、磷酸鹽緩衝液、乳酸鹽緩衝液，等。或者，可使用經工程處理之細胞株、經擴增之同種異體細胞，等用於工程處理。

【0144】用於親和分離之技術可包括使用經抗體塗層之磁珠的磁力分離、親和色層分析法、連接單株抗體或與單株抗體一起使用之細胞毒性劑，例如補體和細胞毒素，及使用連接固體基質(例如平板)之抗體“淘選”或其他合宜之技術。提供精確分離之技術包括螢光活化之細胞分選器，其可具有不同程度之複雜性，諸如多個顏色通道、低角度和鈍角光散射檢測通道、阻抗通道，等。該細胞可藉由使用與死細胞相關之染料(例如碘化丙錠)針對死細胞來選擇。可採用任何不會過度傷害所選擇之細胞的生存力之技術。該親和試劑可為用於上述細胞表面分子之特異性受體或配體。除了抗體試劑外，可使用肽-MHC抗原和T細胞受體對；肽配體和受體；效應子和受體分子，等。

【0145】該經分開之細胞可被收集在可維持該細胞之生存力的任何適當之培養基中，該收集管之底部通常具有血清緩衝。可商購之培養基有多種並可根據該細胞之性質使用，包括dMEM、HBSS、dPBS、RPMI、Iscove's培養基，等，通常補充以胎牛血清。

【0146】所收集和可選擇地經富集之細胞群可立即使用，或可冷凍在液態氮之溫度下並保存、解凍後能夠被重複使用。該細胞通常被儲存在10% DMSO、50% FCS、40% RPMI 1640培養基中。

【0147】於一些實施態樣中，提供包含編碼該正交受體之編碼序列的載體，其中該編碼序列係可操作地連接在該所需細胞中的活性啟動子。本技藝已知各種載體且可用於此目的，例如病毒載體、質粒載體、小環載體，該等載體可被整合入靶細胞之基因組中，或可保持游離。該受體編碼載體可與編碼正交細胞激素之載體聯合提供在套組中，該正交細胞激素與該受體結合並活化之。於一些實施態樣中，該正交細胞激素之編碼序列係可操作地連接高表現啟動子，並可經優化以用於生產。於其他實施態樣中，提供套組，其中編碼該正交受體之載體係與該正交細胞激素之純化的組成物一起提供在，例如經包裝以投予患者之單位劑量中。

【0148】於一些實施態樣中，提供治療方法，該方法包含對有此需要之接受者引入經工程處理之細胞群，其中該細胞群已藉由引入編碼本發明之正交受體的序列進行修

飾。該細胞群可在體外經工程處理且相對於該接受者通常為自體的或同種異體的。於一些實施態樣中，在投予經工程處理之細胞後，該引入之細胞群在體內與同源正交細胞激素接觸。本發明的一個優點為該正交細胞激素與天然受體之間無交叉反應性。

【0149】當細胞與正交細胞激素在試管內接觸時，添加至該經工程處理之細胞的細胞激素劑量和添加期間係足以活化來自受體之訊號傳導，此可利用天然細胞體系，例如附件蛋白質、共同受體，等進行。可使用任何合適之培養基。由此活化之細胞可用於任何所需目的，包括與測定抗原特異性、細胞激素剖析，等有關之實驗目的及用於體內遞送。

【0150】當在體內進行接觸時，有效劑量之經工程處理的細胞(包括，但不限於經修飾以表現正交IL-2β受體之CAR-T細胞)係與正交細胞激素(例如IL-2)一起或在投予該正交細胞激素之前輸注入該接受者，並允許在T細胞之天然環境中(例如在淋巴結，等中)與T細胞接觸。劑量和頻率可根據該藥劑；投予模式；該細胞激素之性質；等而變化。本技藝之技術熟習人士將理解該等指南將針對該個體情況調整。該劑量亦可因用於局部投予，例如經由鼻內、吸入投予，等，或用於全身投予，例如經由im、ip、iv投予，等而有變化。一般而言，投予至少約10^4個經工程處理之細胞/kg；至少約10^5個經工程處理之細胞/kg；至少約10^6個經工程處理之細胞/kg；至少約10^7個經工程處理之細

胞/kg或更多。

【0151】當該經工程處理之細胞為T細胞時，當朝向存在於該接受者中之靶細胞的T細胞溶細胞反應(例如朝向消除腫瘤細胞、經感染之細胞；減少自體免疫性疾病之症狀；等)增加時可能表現增強之免疫反應。

【0152】經工程處理之T細胞可提供在適合治療用途(例如用於治療人類)之醫藥組成物中。包含該等細胞之治療製劑可冷凍或製備成與生理學上可接受之載體、賦形劑或穩定劑一起投予之水溶液形式(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed.(1980))。該細胞將以符合良好醫療實踐之方式配製、給藥和投予。在該等背景下考慮之因素包括接受治療之特定病症、接受治療之特定哺乳動物、該個別患者之臨床狀況、病症的原因、藥劑之投遞部位、投予方法、投予計劃和醫療從業者已知之其他因素。

【0153】該細胞可藉由任何合適之方式，通常為經由腸胃外途徑投予。腸胃道外輸注包括肌肉內、靜脈內(推注或緩慢輸注)、動脈內、腹膜內、鞘內或皮下投予。

【0154】該經工程處理之T細胞可在任何生理上可接受之介質中輸注入受試者，通常為經由血管內途徑投予，但它們亦可被引入任何其他適合該細胞生長的方便位點。通常，將投予至少1×10^6個細胞/kg，至少1×10^7個細胞/kg，至少1×10^8個細胞/kg，至少1×10^9個細胞/kg，至少1×10^{10}個細胞/kg或更多，此通常受限於在收集期間獲得之T

細胞的數量。

【0155】例如，用於實行本發明之投予細胞的典型範圍為每一療程在約1×10^5至5×10^8個活細胞/kg(受試者體重)之範圍內。因此，根據體重進行調整，投予人類受試者之活細胞的典型範圍為每一療程約1×10^6至約1×10^{13}個活細胞，或約5×10^6至約5×10^{12}個活細胞，或約1×10^7至約1×10^{12}個活細胞，或約5×10^7至約1×10^{12}個活細胞，或約1×10^8至約1×10^{12}個活細胞，或約5×10^8至約1×10^{12}個活細胞，或約1×10^9至約1×10^{12}個活細胞。於一實施態樣中，每一療程之細胞劑量係在2.5至5×10^9個活細胞之範圍內。

【0156】療程可為單一劑量或在一段期間內多個劑量。於一些實施態樣中，該細胞係在單一劑量中投予。於一些實施態樣中，該細胞係在1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、21、28、30、60、90、120或180天之期間內，在二或更多個分次劑量中投予。在該等分次給藥方案中，每次投予之經工程處理之細胞的量可為相同的，或可以不同量提供。監測細胞投予之本技藝的技術熟習人士(例如醫師)可在考慮該受試者對治療之反應(包括治療之不利影響)及依上文所討論者調節後提供在一段期間內之多日給藥方案。

【0157】例如，在目前之CAR-T細胞療法的臨床實踐中，CAR-T細胞通常與淋巴細胞清除(例如藉由投予阿崙單抗(Alemtuzumab)(單株抗CD52)、嘌呤類似物，等進行)組合投予，以在宿主免疫恢復之前促進CAR-T細胞擴增。

於一些實施態樣中，該CAR-T細胞可經過修飾以抵抗阿崙單抗。於本發明之一態樣中，目前與CAR-T療法結合使用之淋巴細胞清除可藉由表現本發明之正交配體的CAR-T來避免或減少。如上文所指明者，通常使用淋巴細胞清除來使CAR-T細胞擴增。然而，淋巴細胞清除亦與CAR-T細胞療法之主要副作用有關。因為該正交配體提供選擇性擴增特定T細胞群之方式，所以可減少投予表現正交配體之CAR-T前對淋巴細胞清除的需求。本發明能夠實行CAR-T細胞療法，而不需在投予表現該正交配體之CAR-T之前清除淋巴細胞或可減少淋巴細胞清除。

【0158】於一實施態樣中，本發明提供治療患有可藉由CAR-T細胞療法治療之疾病、病症或病況(例如癌症)的受試者之方法，該方法係在投予表現正交配體CAR-T之前不進行淋巴細胞清除下投予表現正交配體之CAR-T。於一實施態樣中，本發明提供治療哺乳動物受試者之方法，該哺乳動物受試者罹患與存有異常細胞群相關之疾病、病症或病況(例如腫瘤)，該異常細胞群之特徵在於表現一或多種表面抗原(例如腫瘤抗原)，該治療方法包含下述步驟：(a)從該個體取得包含T細胞之生物樣品；(b)富集該生物樣品中之T細胞；(c)以一或多個表現載體轉染T細胞，該表現載體包含編碼CAR之核酸序列和編碼正交受體之核酸序列，該CAR之抗原靶向結構域能夠與至少一種存在於該異常之細胞群上的抗原結合；(d)在體外擴增該表現正交受體之CAR-T細胞群；(e)將醫藥上有效量之表現正交受體的

CAR-T細胞投予哺乳動物；(f)使用與表現在CAR-T細胞上之正交受體選擇性結合之配體來調節該表現正交受體的CAR-T細胞之生長。於一實施態樣中，在開始CAR-T細胞療法之前，前述方法係與哺乳動物淋巴細胞清除或免疫抑制結合。於另一實施態樣中，前述方法係在無淋巴細胞清除和/或免疫抑制的情況下在哺乳動物中實施。

【0159】較佳之製劑係取決於意圖之投予模式和治療應用。根據所需之製劑，該組成物亦可包括醫藥上可接受之無毒載體或稀釋劑，該無毒載體或稀釋劑之定義為通常用於配製用於投予動物或人類的醫藥組成物之載劑。該稀釋劑係經過選擇以不影響該組合物之生物活性。該等稀釋劑之實例為蒸餾水、磷酸鹽緩衝之生理鹽水、林格氏溶液、右旋糖溶液和Hank氏溶液。此外，該醫藥組成物或製劑亦可包括其他載體、佐劑或無毒性、非治療性、非免疫原性穩定劑，等。

【0160】再於一些其他實施態樣中，醫藥組成物亦可包括大的、緩慢代謝之大分子，諸如蛋白質、多醣，諸如殼聚醣、聚乳酸、聚乙醇酸和共聚物(諸如膠乳官能化之Sepharose™、瓊脂糖、纖維素，等)、聚合性胺基酸、胺基酸共聚物和脂質聚集體(諸如油滴或脂質體)。

【0161】可接受之載體、賦形劑或穩定劑在所使用之劑量和濃度下對接受者無毒，且包括緩衝劑，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽和其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸和蛋胺酸；防腐劑(諸如十八烷基二甲苄基氯化銨；六甲基

氯化銨；苯扎氯銨、苄索氯銨；苯酚、丁醇或苄醇；對羥基苯甲酸烷基酯，諸如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；和間甲酚)；低分子量(少於約10個殘基)多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，諸如聚乙烯吡咯啶酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩胺醯胺、天門冬醯胺、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單醣、雙醣和其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，諸如EDTA；糖，諸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇；形成鹽的抗衡離子，諸如鈉；金屬複合物(例如Zn-蛋白質複合物)；和/或非離子性表面活性劑，諸如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

【0162】欲用於體內投予之製劑通常為無菌的。本發明組成物之滅菌可藉由通過無菌過濾膜輕易地完成過濾。

【0163】通常，組成物係製備成可注射之液體溶液或懸浮液；亦可製備成適合在注射前溶解或懸浮於液體載劑中之固體形式。該製劑亦可經乳化或包封在脂質體或微粒(諸如聚丙交酯、聚乙交酯或共聚物)中以用於增強佐劑之效果，如上文所討論者。Langer, Science 249: 1527, 1990 and Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28: 97-119, 1997。本發明之藥劑可以配製成允許持續或脈衝式釋出活性成分之長效注射劑或植入製劑的形式投予。該醫藥組成物通常係配製成無菌、基本上等張之形式且完全符合美國食品和藥物管理局之所有良好生產規範(GMP)規定。

【0164】亦提供用於該方法之套組。本發明之套組包括編碼正交細胞激素受體之表現載體，或包含該表現載體之細胞。套組可進一步包含同源正交細胞激素。於一些實施態樣中，該組分係以液體或固體形式之劑型(例如治療有效劑型)提供在任何方便的包裝(例如棒狀包裝、劑量包裝，等)中。亦可提供用於選擇或在試管內衍生細胞之試劑，例如生長因子、分化劑、組織培養試劑；等。

【0165】除了上述組分之外，本發明之套組可進一步包括(於某些實施態樣中)用於實行本發明方法之說明書。該等說明書可以各種形式之一或多者存在於本發明之套組中。該等說明書其中一種形式可以印刷在合適之介質或基底上的信息形式(例如其上印刷著信息的一張或多張紙)存在於該套組之包裝中、在仿單中，等。該等說明書之另一種形式為電腦可讀取媒體，例如其上已記錄該信息之軟磁碟、光碟(CD)、隨身碟，等。該等說明書可存在的另一種形式為網站地址，其可經由網路使用以獲取在被移除之站點的信息。

【0166】於一些實施態樣中，本發明之組成物、方法和套組係用於增強由T細胞介導之免疫反應。於一些實施態樣中，該免疫反應係針對其中需要消耗或調節靶細胞(例如癌細胞、受感染之細胞、參與自體免疫疾病之免疫細胞，等)之病況。

【0167】於一些實施態樣中，該病況為慢性感染，即，在長達1週、2週，等之期間內未被宿主免疫系統清除

的感染。在某些情況下，慢性感染涉及病原體之基因元件被整合入宿主基因組中，例如逆轉錄病毒、慢病毒、B型肝炎病毒，等。在其他情況中，慢性感染(例如某些細胞內細菌或原生動物病原體)係由駐留在宿主細胞內之病原體細胞引起。另外，於一些實施態樣中，該感染係處於潛伏期，如同皰疹病毒或人乳頭瘤病毒。

【0168】相對於在無治療下除去，本發明之方法藉由宿主生物體之T效應細胞來更有效地滅殺經感染之細胞，因此可針對該病原體生命週期之胞內期。該方法可進一步包括監測患者之治療效。監測可測量感染之臨床指標，例如發熱、白血球計數，等，和/或直接監測病原體之存在。

【0169】於一些實施態樣中，該病況為癌症。如本文所使用之術語“癌症”係指各種由異常、不受控制之細胞生長引起的病況。能夠引起癌症之細胞稱為“癌細胞”，其具有，例如不受控制之增殖、永生、轉移潛能、快速生長和增殖速率的特性，和/或某些典型之形態特性。癌症可以多種方式之任一者檢測，包括，但不限於檢測腫瘤之存在(例如藉由臨床或放射學方式)、檢查腫瘤內或來自另一生物樣品(例如來自組織活檢)之細胞、測量指示癌症之血液標記及檢測指示癌症之基因型。然而，在上述一或多種檢測方法中的陰性結果不一定指示癌症不存在，例如對癌症治療表現出完全反應之患者可能仍然患有癌症(如隨後之復發所證明者)。

【0170】本發明現在已被充分地描述，本技藝之一般技術人士將清楚明白可在不脫離本發明之精神或範圍的情況下做出各種變化和修飾。

實驗

正交IL-2和IL-2Rβ

【0171】本文中，我們描述涉及經工程處理之細胞激素和受體之發明，該經工程處理之細胞激素和受體使得在活體外過繼細胞療法之設置中選擇性擴增所需之細胞亞群成為可行。該特殊發明描述細胞激素介白素-2(IL-2)及其受體IL-2Rβ鏈(IL-2Rβ)，其使在過繼性細胞療法中特異性擴增T細胞成為可行，從而解決在免疫療法中未被滿足的需求。本文所描述之方法可推廣到其中藉由特定之受體-配體對刺激細胞的過繼性細胞療法之任何設置，包括骨髓和幹細胞移植，及許多其他形態。

【0172】具體而言，本文描述正交IL-2和IL-2Rβ配體-受體對。IL-2之異種同源形式和IL-2Rβ之異種同源形式彼此特異地結合，但其野生型對應物則不。本發明提供多個正交IL-2變體序列，其對正交IL-2Rβ具有不同程度之親和力。本發明顯示正交IL-2依賴性訊號傳導和經工程處理以表現正交IL-2Rβ之T細胞的T細胞增殖。

【0173】由於IL-2具有分別促進效應T細胞和調節性T細胞擴增之能力，IL-2為用於治療癌症和自體免疫治療之有吸引力的生物品。然而，此IL-2之多效性質及脫靶毒性

限制其在臨床中的用途。使IL-2之免疫刺激和免疫抑制性能脫鉤的能力可提供優異形式之IL-2免疫療法。

【0174】本文中證明將T細胞進行工程處理以表現該正交IL-2Rβ之能力。該等經工程處理之T細胞顯示出對正交IL-2反應，導致下游訊號轉導分子(例如STAT5)磷酸化和T細胞增殖。與野生型IL-2之活性相比較，正交IL-2對野生型T細胞之活性是被完全消除或是顯著鈍化。因此，證明可使用正交IL-2/IL-2受體對來選擇性擴增T細胞。

【0175】正交IL-2/IL-2受體對之應用包括，但不限於選擇性擴增用於癌症療法之腫瘤反應性細胞毒性T細胞、用於感染性疾病和/或癌症之NK細胞和用於自體免疫病症之調節性T細胞。

【0176】由於該破壞，但不完全消除與IL-2Rβ結合之突變而對中間親和力(IL-2Rβ和IL-2Rγ)或高親和力野生型IL-2受體(IL-2Rα、Rβ、Rγ)具有鈍化之親和力的IL-2變體亦可用於選擇性靶向異種同源IL-2對高IL-2Rα細胞之活性，例如用於治療自體免疫疾病。對IL-2Rβ鏈之親和力被消除，但維持與IL-2Rα結合，且因此可藉由抑制高親和力IL-2R之形成而作為與野生型IL-2之競爭性拮抗劑的IL-2變體係用於治療自體免疫或移植物抗宿主病。

【0177】產生和利用正交IL-2/IL-2受體對以控制T細胞擴增的整體概念顯示於圖1之示意圖中。圖2提供工作流程，其包括利用結構引導的誘變來產生不與野生型IL-2結合之IL-2Rβ異種同源物的步驟。使用基於酵母之篩選分

析，藉由實驗確認被預測破壞IL-2Rβ與野生型IL-2結合之突變，並進一步使用純化之重組蛋白，經由表面等離子共振驗證之。使用該方法描述多種破壞與野生型IL-2結合之IL-2Rβ點突變且每一該等受體變體可作用為正交受體。單點突變亦可與一、二或更多個另外之點突變組合，以產生更大之IL-2Rβ異種同源物集合庫。

【0178】正交小鼠IL-2Rβ變體之序列顯示在圖3中。該等突變可為單點突變或其任意組合以產生具有1、2、3或更多個點突變之IL-2Rβ異種同源物，只要該組合之突變破壞野生型IL-2結合。

【0179】圖4顯示包含胺基酸變化H134D、Y135F之mIL-2Rβ變體的表徵，該胺基酸變化H134D、Y135F消除野生型mIL-2結合。這二個殘基為已知之IL交互作用熱點(Ring A et al, Nat Immunol (2012) 13: 1187-95)，且我們經由表面電漿子共振(SPR)證實該等突變破壞野生型IL-2結合。

【0180】圖5說明用於工程處理正交IL-2/IL-2Rβ對之工作流程。產生IL-2之異種同源物集合庫，該IL-2在IL-2Rβ正交異種同源胺基酸殘基附近或與該IL-2Rβ正交異種同源胺基酸殘基接觸之殘基隨機化。使用酵母展示，選擇與異種同源IL-2Rβ結合之IL-2變體，丟棄與野生型IL-2Rβ結合之選殖株。該過程可使用位置導向誘變或易錯誘變重複以產生對異種同源物具有差別結合特性，而不與野生型IL-2Rβ結合之IL-2變體。使用該方法，我們產生IL-2異種

同源物集合庫，其：1)保持與IL-2Rα鏈結合(綠色曲線)，表明該酵母展示之正交IL-2變體的完整結構整體性，2)與正交IL-2Rβ結合(橙色曲線)，但，3)不與野生型IL-2Rβ結合(藍色曲線)。

【0181】經表徵之正交小鼠IL-2變體的序列顯示於圖6中。小鼠IL-2和IL-2Rβ與人對應物之比對顯示於圖15中。該4個序列提供天然或野生型序列的參考。經改變以創建正交小鼠IL-2/IL-2Rβ對之胺基酸殘基主要被保留在人類中。因此，該正交小鼠IL-2和IL-2Rβ序列可輕易地被轉譯成人IL-2和IL-2Rβ蛋白質。

【0182】如圖7中所示，正交IL-2變體以類似於或較野生型IL-2與IL-2Rβ交互作用更大之親和力與正交IL-2Rβ結合。令可溶性正交IL-2或野生型IL-2蛋白質流過塗覆野生型或正交IL-2Rβ之傳感器晶片。藉由表面電漿子共振(SPR)測定結合，並使用1:1結合模型來擬合曲線。如圖8所示，正交IL-2變體顯示出對野生型CD25陽性和CD25陰性脾細胞的活性鈍化(磷酸STAT5)。

【0183】圖9顯示表現正交IL-2Rβ之小鼠CTLL-2 T細胞的生成。我們經由慢病毒轉導編碼全長正交受體之基因來創建表現正交IL-2Rβ(正交CTLL-2)之永生化的小鼠T細胞株(CTLL-2)。使用對未經轉導之細胞具有毒性的嘌呤黴素來選擇經轉導之細胞，產生同時表現野生型和正交IL-2Rβ之穩定的CTLL-2細胞株。該細胞株亦為CD25和CD132陽性，因此代表表現該高親和力IL-2受體複合物之T細

胞。該用於檢測細胞表面IL-2Rβ(CD122)之抗體不會區分野生型和正交IL-2Rβ。因此，野生型和正交IL-2Rβ CTLL-2細胞之間的平均螢光強度增加表明該等細胞表現該正交受體。此可藉由它們對嘌呤黴素之抗性(由用於表現該正交IL-2Rβ之相同載體編碼)得到進一步支持。

【0184】如圖10所示，第一組正交IL-2變體對正交T細胞具選擇性。為了查詢正交IL-2訊號傳導，我們利用我們的CTLL-2細胞模型(或是未經操縱(野生型)的或是經轉導以同樣表現該正交IL-2Rβ(正交)者)。然後，我們測定野生型或各種正交IL-2選殖株誘導STAT5磷酸化之能力(IL-2依賴性訊號轉導之定量性讀數)。我們鑑定許多正交IL-2變體，與野生型細胞相比較，其誘導在表現正交IL-2Rβ之細胞上的選擇性STAT5磷酸化。選擇選殖株之劑量-反應曲線顯示於圖11中。

【0185】源自初級淋巴結之T細胞經工程處理以表現正交IL-2Rβ(H134D Y135F)。除了我們的永生化小鼠T細胞模型外，我們亦藉由下述方法產生表現正交IL-2Rβ之原代小鼠T細胞：將小鼠淋巴結和脾細胞分離出，使用CD3/CD28活化，再藉由逆轉錄病毒轉導該編碼全長正交受體的基因。該構築體亦含有IRES，其後為螢光蛋白YFP(其允許經由FACS分析YFP表現來確認轉導)。小鼠T細胞亦表現高親和力IL-2受體複合物(例如CD25、CD122和CD132)，如圖12所示。

【0186】正交IL-2變體誘導在表現正交IL-2Rβ之原代

小鼠T細胞上的選擇性STAT5磷酸化，如圖13所示。

【0187】與野生型CTLL-2細胞相比較，選擇性地透過正交IL-2Rβ訊號傳導之正交IL-2變體(圖11)亦誘導該表現正交IL-2Rβ之CTLL-2細胞選擇性地擴增(圖14)。

【0188】該正交IL-2工程處理方法亦應用於人IL-2和人IL-2Rβ。我們將用於創建小鼠正交IL-2Rβ之H133D Y134F突變引入人IL-2Rβ中，因為該等殘基被高度保留在小鼠和人之間。實際上，該野生型hIL-2Rβ與酵母展示之野生型IL-2結合，而hIL-2Rβ H133D Y134F突變體(正交-hIL-2Rβ)不具有與野生型IL-2之可檢測的結合(圖15)。我們藉由將預期接觸或接近H133D Y134F突變之殘基隨機化來創建展示在酵母表面上之人IL-2突變體集合庫，並選擇與正交人IL-2Rβ結合，而不與野生型人IL-2Rβ結合之IL-2變體。該方案與用於工程處理小鼠IL-2正交對之方案相同，且成功用於人的正交對。該方案顯示於圖16中。鑑定指示能夠與正交hIL-2Rβ結合之正交hIL-2序列群的一致突變組，如圖16C所示。

【0189】本發明之多肽在體內亦具有活性。使用小鼠模型來證明在小鼠中選擇性地擴增表現正交IL-2Rb之T細胞或增加其存活，如圖17至19中所示。正交IL-2選殖株1G12/149被證明選擇性地擴增小鼠中之正交T細胞，而不擴增野生型T細胞。與PBS對照組相比較，使用野生型IL-2處理導致野生型和正交T細胞同時擴增，而使用正交IL-2選殖株1G12/149處理可選擇性地擴增正交T細胞，但對野

生型T細胞之活性有限。

實施例2

人IL-2異種同源物

材料和方法

【0190】產生蛋白質。將編碼野生型人IL-2之DNA選殖入包括用於親和純化之C端8xHIS標籤的昆蟲表現載體pAcGP67-A中。從Integrated DNA Technologies(IDT，Coralville，愛荷華52241)購買編碼小鼠血清白蛋白(MSA)之DNA，並選殖入pAcGP67-A中作為hIL-2的N端和MSA的C端之間融合物。合成從活性篩選中單離出之正交人IL-2的變體為GBlock(IDT)，並透過重疊延伸選殖入pAcGP67-A-MSA載體中。

【0191】使用用於分泌之BaculoGold®桿狀病毒表現系統(BD Biosciences)將昆蟲表現DNA構築體轉染入粉紋夜蛾(Trichoplusia ni)(High Five®)細胞(Invitrogen)中並經由Ni-NTA從澄清之上清液純化，再使用Superdex-200柱進行尺寸排阻色層分析法，並在無菌磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)中配製。將蛋白質濃縮並儲存在-80℃。

【0192】哺乳動物表現載體。將全長人CD25選殖入慢病毒載體pCDH-CMV-MSC-EF1-Puro(System Biosciences)中。使用編碼全長人IL-2Rβ之cDNA作為模板，藉由使用引入H133D和Y134F突變之誘變引子的重疊延伸PCR來選殖全長正交IL-2Rβ。將所產生之PCR產物選殖入逆轉錄病

毒載體pMSCV-MCS-IRES-YFP中。

【0193】細胞培養。YT-NK樣細胞係由京都大學之Junji Yodoi博士慷慨提供。使用pCDH-CMV-MSC-EF1-Puro-hCD25慢病毒轉導YT-細胞，並在10μg/mL嘌呤黴素中選擇穩定表現全長人CD25(YT+)之YT細胞。使用含有pMSCV-MCS-IRES-YFP-正交-人-R□之逆轉錄病毒轉導YT+細胞，並藉由FACS分選以富集YFP+(正交)群體至純化。HEK293T細胞係由史丹福大學的Irving Weissman博士實驗室慷慨提供。將HEK293T細胞維持在補充以10%胎牛血清(FBS)、1% L-麩胺醯胺(L-glu)及1% 青黴素和鏈黴素(P/S)之DMEM中。將YT細胞保持在RPMI完全培養基(RPMI+GlutaMax+10% FBS、1% L-Glu、1% NaPyr、1% NEAA、18mM HEPES和1% pen/strep)中。

【0194】產生慢病毒和逆轉錄病毒。使用第3代包裝載體在HEK293 T細胞中產生慢病毒。簡單地說，以5×10^6個細胞/10cm組織培養皿之密度接種HEK293 T細胞，並令其在完全培養基(DMEM、10% FBS、1% L-Glu、1% Pen/Strep)中黏附5至7小時。去除上清液並補充低FBS(5%) DMEM(10mL)，且按照製造商之建議，使用X-tremeGENE®HP DNA轉染試劑(Sigma Aldrich)，以比例為4:2:1之pCDH：psPAX2：pMD2G轉染細胞，並將細胞在37℃下，在完全培養基中培養過夜。去除培養基並補充7.5mL之低FBS DMEM(DMEM、5% FBS、1% L-Glu、1% P/S)，且在24和48小時之後，從該上清液中收集慢病毒，

合併後通過0.45μm過濾器澄清化，使用PEG-it病毒沉澱溶液(System Bio)沉澱之，丸化，再重新懸浮於為原始體積之1/100的完全培養基中，在液態氮中快速冷凍並儲存於-80℃。

【0195】在HEK293 T細胞中產生逆轉錄病毒。簡單地說，以5x10^6個細胞/10cm組織培養皿之密度接種HEK293 T細胞，並令其在完全培養基(DMEM、10% FBS、1% L-Glu、1% P/S)中黏附5至7小時。去除上清液並補充低FBS DMEM(10 mL)，且遵循製造商的建議，使用X-tremeGENE®HP，以比例為1.5:1之pMSCV逆轉錄病毒載體和pCL10A包裝載體(Novus Biologicals)(史丹福大學Melissa McCracken博士慷慨贈予之禮物)轉染細胞並將細胞在低FBS DMEM中培養過夜。去除培養基並補充7.5mL之低FBS的DMEM，再培養24小時。收集培養基，使用0.45μm過濾器澄清化，在液態氮中快速冷凍並儲存在-80℃。補充培養基(低FBS DMEM)，再將細胞另外培養24小時，收集病毒並依上述儲存。

【0196】酵母展示IL-2。使用pCT302載體(其在Aga2之C端和I-2L之N端之間具有3C蛋白酶裂解位點)和N端cMyc抗原決定部位標籤，藉由融合至Aga2之C端，將人IL-2展示在釀酒酵母菌種EBY100之表面上。簡單地說，使用編碼酵母展示之hIL-2的質體將勝任之EBY100進行電穿孔，並在30℃下，在SDCAA選擇培養基中回收過夜。將經轉形之酵母在SDCAA中傳代一次，並將對數期之酵母培

養物沉澱成丸，並再重新懸浮於含有10% SDCAA之SGCAA誘導培養基中，OD600為1.0，且在20℃下培養24小時。藉由使用AlexaFluor® 488標籤之抗cMyc單株抗體(1:100稀釋；Cell Signaling)及AlexaFluor® 647標籤之野生型hIL-2Rβ的鏈親和素(SA)四聚體(500nM SA)將酵母染色，以藉由FACS證實表面表現之功能性hIL-2。

產生人IL-2突變體酵母展示庫。

【0197】使用具有下列簡併密碼子之引子，藉由裝配PCR來創建位置導向集合庫：集合庫3(E15、H16、L19、D20、Q22、M23):(SEQ ID NO:10)5'-CAAGTTCTACAAAGAAAACACAGCTACAACTGNHKNHKTTACTTNHKNHKTTANHKNHKATTTTGAATGGAATTAATAATTACAAGAATCCCAAACTC-3'、集合庫 4(E15、H16、L19、D20、M23、N88):(SEQ ID NO:11)5'-GTTCTACAAAGAAAACACAGCTACAACTGNHKNHKTTACTTNHKNHKTTACAGNHKATTTTGAATGGAATTAATAATTACAAGAATCC-3'、(SEQ ID NO:12)5'-CCCAGGGACTTAATCAGCNHKATCAACGTAATAGTTCTGGAACTAAAGGG-3'。

【0198】下列引子用於所有集合庫：(SEQ ID NO:13) 5'-CGGTAGCGGTGGGGGCGGTTCTCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGTCCGAGCGGCGGA-3', (SEQ ID NO:14) 5'-GTAGCTGTGTTTTCTTTGTAGAACTTGAAGTAGGTGCGGATCCGC

CGCTCGGACCCTGG-3', (SEQ ID NO:15) 5'-CTTAAATGTGAGCATCCTGGTGAGTTT GGGATTCTTGTAATTATTAATTCCATTCAAAAT -3', (SEQ ID NO:16) 5'-CCAGGATGCTCA CATTTAAGTTTTACATGCCCAAGAAGGCCACAG-3', (SEQ ID NO:17) 5'-GAGGTTTGAGTT CTTCTTCTAGACACTGAAGATGTTTCAGTTCTGTGGCCTTCTTGGGC-3', (SEQ ID NO:18) 5'-CAGTGTCTAGAAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTTAGCTCAAAGC-3', (SEQ ID NO:19) 5'-GATTAAGTCCCTGGGTCTTAAGTGAAAGTTTTTGCTTTGAGCTAAATT TAGCACTTCCTC-3', (SEQ ID NO:20) 5'-CAGCATATTCACACATGAATGTTGTTTCAGATC CCTTTAGTTCCAGAACTATTACGTTG-3', (SEQ ID NO:21) 5'-GAAACAACATTCATGTGTGAA TATGCTGATGAGACAGCAACCATTGTAGAATTTCTGAAC-3', (SEQ ID NO:22) 5'-GAGATG ATGCTTTGACAAAAGGTAATCCATCTGTTCAGAAATTCTACAATGGTTGCTG-3', (SEQ ID NO:23) 5'-GATTACCTTTTGTCAAAGCATCATCTCAACACTAACTGCGGCCGCTTCTGGTGG CGAAC-3', (SEQ ID NO:24) 5'-GATCTCGAGCAAGTCTTCTTCGGAGATAAGCTTTTGTTC GCCACCAGAAGCGG-3' 。

【0199】使用*Pfu*Ultra DNA聚合酶(安捷倫(Agilent))和各引子之等莫耳混合物組裝突變之IL-2基因PCR產物。使用*Phusion* DNA聚合酶(NEB)，利用引子(SEQ ID NO:25) 5'-CGGTAGCGGTGGGGGCGGTTC-3'和(SEQ ID NO:26)5'-CGAAGAAGACTTGCTCGAGATC-3'進一步將產物DNA進行PCR擴增。將所得之組裝的PCR產物進行凝膠純化，並使用線性化pCT302載體電穿孔入EBY-100酵母中以產生~2×10^8個轉形體之集合庫。

【0200】發展正交IL-2。使用磁性活化細胞分選(MACS)和FACS之組合來進行選擇與正交IL-2R特異性結合之酵母選殖株。使用2×10^9個酵母進行第一輪選擇，約10倍於該集合庫之多樣性，以確保100%涵蓋所有轉形體。採用之總體策略為首先富集所有與正交IL-2Rβ結合的全長hIL-2變體之集合庫(第1-3輪)，接下去的數輪係使用陰性選擇以除去與野生型IL-2Rβ結合之IL-2選殖株並降低正交IL-2Rβ之濃度以富集以高親和力與該正交IL-2Rβ結合

之IL-2選殖株。

【0201】基於酵母之結合和功能篩選。經由在SDCAA盤上培養並將單一株落萃取或單細胞FACS置入含有100μL SDCAA之96孔圓底組織培養盤中，在30℃之振盪培養箱中培養過夜以分離單一酵母選殖株。將酵母選殖株在30℃下，96深孔V底盤中，在1.5mL SDCAA/孔中進一步擴增24小時，接著，在含有10% SDCAA之SGCAA培養基中，亦使用1.5mL和96孔深V底盤，在20℃之搖動培養箱中誘導72小時，起始OD600為1.0。將經誘導之酵母沉澱成丸，以PBS洗滌一次，重新懸浮於200μL/孔之裂解培養基(含有25mM HEPES、0.2mM TCEP、20μg/mL 3C蛋白酶之RPMI)中並在室溫下一邊攪拌一邊培育5分鐘，再在4℃下培育過夜，無需攪拌。將酵母沉澱成丸並將該上清液通過96孔0.45μm醋酸纖維素濾板(目錄編號7700-2808，GE Heathcare)澄清化。依IL-2R訊號傳導方法一節中之描述將YT+(野生型和表現正交)和YT-進行平皿接種並添加50μl之含有突變體IL-2選殖株的澄清酵母上清液，在37℃下培育20分鐘，並終止反應並依下述定量pSTAT5。使用FlowJo®(TreeStar公司，Ashland OR)定量為pSTAT5+之野生型或正交YT細胞的百分比，並用來選擇對正交YT+細胞具有選擇性或特異活性之選殖株。

【0202】逆轉錄病毒轉導人外周血單核細胞(PBMC)。從史丹福血液中心獲得白細胞減少室。將血液排入無菌之50ml錐形管(~7ml)中，並加入PBS+2% FBS，使體積成

為34ml。將密度梯度介質(15ml，Ficoll-Paque Plus，GE Healthcare，17-1440-03)加載入二個SepMate®-50管(Stemcell，15450)中並將17ml稀釋之細胞輕輕移液到上方。將該SepMate®管在室溫下，1200×g旋轉15分鐘。將含有該PBMC之頂層倒入新管中並加入RPMI成為50ml。將細胞在1200rpm旋轉5分鐘以沉澱成丸。將丸重新懸浮於10ml ACK溶解緩衝液(Gibco A10492-01)中4分鐘並以完全RPMI淬滅至40ml。再次將細胞沉澱成丸，懸浮於15ml 完全RPMI中並計數。將細胞(1×10^6)平皿接種至24孔組織培養皿的每一個孔中，並在每個孔中加入25μL Dynabeads®人T-活化因子CD3/CD28(目錄編號11131D)和100U/ml hIL-2。令細胞在37℃下，培養箱中活化48小時。

【0203】在32℃和2500 RPM下，使用含有10μg/mL聚凝胺和100 IU/mL hIL-2之未經濃縮的逆轉錄病毒上清液(每孔約2mL)經由離心感染(spinfection)來轉導經活化之人PBMC 1.5小時(參見Berggren WT, Lutz M, Modesto V. General Spinfection Protocol. 2012 Dec 10。在: StemBook [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008)。輕輕吸出病毒上清液，並以含有100 IU/mL hIL-2之新鮮RPMI完全培養基替換之，並在37℃下培養24小時。經由輕輕地移液收穫細胞並使用磁鐵除去Dynabeads®。經由離心將細胞沉澱成丸，以1×10^6細胞/mL之密度重新懸浮於含有100 IU/mL hIL-2之新鮮RPMI完全培養基中並在37℃下擴增過夜，然後再進行進一步之下游

細胞分析。

【0204】經由STAT5磷酸化進行IL-2R訊號傳導。經由細胞內pSTAT5完成IL-2和正交IL-2訊號轉導定量。將活性生長之YT+和YT+正交細胞沉澱成丸，以50/50之比例組合並將其以超低結合96孔圓底板(目錄編號7007；Costar)中每孔5×10^5個細胞之密度接種在50μL溫培養基中。藉由加入50μL含有野生型或正交IL-2之連續稀釋液的培養基，將細胞在37℃下刺激20分鐘，並藉由在室溫(RT)下使用1.5%聚甲醛固定10分鐘並伴隨攪動來終止反應。將細胞沉澱成丸，傾析並使用200μL之100%冰冷甲醇在冰上滲透化至少30分鐘或在-80℃培育過夜。以FACS緩衝液洗滌經固定，滲透化之細胞三次並使用在FACS緩衝液中1:50稀釋之經AlexaFluor®647標籤的抗STAT5 pY694(BD Biosciences)檢測細胞內之磷酸化STAT5並在4℃下，黑暗中培育1小時。洗滌細胞並在配備高通量自動進樣器之CytoFLEX®(Beckman Coulter)上進行分析。數據代表平均螢光強度並使用Prism 5®(GraphPad)將點擬合至對數(促效劑)相對於反應(三個參數)之模型。所有數據均以平均值(n=3)±SD表示。

【0205】試管內原代人PBMC增殖分析。藉由離心收集含有野生型和經轉導之正交T細胞的混合物之人外周血單核細胞，將其重新懸浮於缺乏hIL-2之RPMI完全培養基中，並以50,000個細胞/孔之密度(在50μL中)接種在96孔圓底組織培養盤中(第1天)。藉由添加野生型或正交IL-2之連

續稀釋液(50μL)使總體積達到100μL來刺激細胞生長並在37℃下培養2天。在第3天，餵食細胞額外之100μL體積的新鮮細胞激素並再培養2天。在第5天，加入50μL之DAPI使最終濃度為0.5μg/mL，並使用配備高通量採樣器之CytoFLEX®，藉由FACS定量各測試群體之細胞計數。基於FSC和SSC以及DAPI陰性對活細胞進行門控後推衍出在設定體積中之活細胞的總數。使用FlowJo®(Tree Star公司)分析數據。數據代表相對於細胞激素濃度繪製之總活細胞計數，或為相對於細胞激素濃度繪製之正交細胞對總活細胞之比率。數據係以平均值(n=4)±SD表示。

【0206】如圖22所示，正交人IL-2在試管內透過表現在YT細胞上之正交IL-2R傳達訊號。如圖23所示，正交人IL-2優先擴增表現該正交IL-2R之人PBMC。將人PBMC單離出、活化、並使用含有具有IRES YFP(YFP+)之正交人IL-2Rβ的逆轉錄病毒轉形。YFP+細胞對總活細胞之初始比率為20%。第1天，將5×10^5個細胞與指定濃度之MSA-人IL-2(圓圈)或正交變體MSA-SQVLKA(菱形)、MSA-SQVLqA(正方形)或MSA-1A1(黑色三角形)一起進行平皿接種，並在第3天重新餵食相同的濃度。第5天，藉由流式細胞術讀取該培養盤。(A)計算YFP+(正交表現)細胞對總活細胞之比率，並將平均值(n=4)±SD對濃度作圖(左)。(B)亦將總活細胞計數(平均值(n=4)±SD)對細胞激素濃度作圖(右)。正交細胞激素未支持與相同濃度之野生型MSA-hIL-2一樣多之總細胞生長，但選擇性地強烈擴增該正交表現

的T細胞。

【0207】在正交hIL-2蛋白質中製造的胺基酸取代顯示於下列表1中。

表1

hIL2	E15	H16	L19	D20	Q22	M23	R81	Other
1A1 (MJH lib 4)	S	Q	V	L		Q	D	T51I
1C7 (MJH lib 3)	S	Q	V	L		Q	Y	
SQVLKA (設計)	S	Q	V	L	K	A		
SQVLqA (設計)	S	Q	V	L		A		

【序列表】

<110> 史丹福大學董事會

" 賈西亞, 奇南
" 索柯斯基, 強納森
" 皮頓, 羅拉

<120> 生物相關之正交細胞激素/受體對

<130> STAN-1246CIP

<140> 108108068

<141> 2019-03-11

"<150> 62/217,364"
<151> 2015-09-11

"<150> 62/375,089"
<151> 2016-08-15

<150> PCT/US16/050511
<151> 2016-09-07

<160> 26

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1
<211> 525
<212> PRT
<213> 智人

<400> 1

Ala Val Asn Gly Thr Ser Gln Phe Thr Cys Phe Tyr Asn Ser Arg Ala
1 5 10 15

Asn Ile Ser Cys Val Trp Ser Gln Asp Gly Ala Leu Gln Asp Thr Ser
20 25 30

Cys Gln Val His Ala Trp Pro Asp Arg Arg Arg Trp Asn Gln Thr Cys
35 40 45

Glu Leu Leu Pro Val Ser Gln Ala Ser Trp Ala Cys Asn Leu Ile Leu
50 55 60

Gly Ala Pro Asp Ser Gln Lys Leu Thr Thr Val Asp Ile Val Thr Leu
65 70 75 80

Arg Val Leu Cys Arg Glu Gly Val Arg Trp Arg Val Met Ala Ile Gln
85 90 95

Asp Phe Lys Pro Phe Glu Asn Leu Arg Leu Met Ala Pro Ile Ser Leu
100 105 110

Gln Val Val His Val Glu Thr His Arg Cys Asn Ile Ser Trp Glu Ile
115 120 125

Ser Gln Ala Ser His Tyr Phe Glu Arg His Leu Glu Phe Glu Ala Arg
130 135 140

Thr Leu Ser Pro Gly His Thr Trp Glu Glu Ala Pro Leu Leu Thr Leu
145 150 155 160

Lys Gln Lys Gln Glu Trp Ile Cys Leu Glu Thr Leu Thr Pro Asp Thr
165 170 175

Gln Tyr Glu Phe Gln Val Arg Val Lys Pro Leu Gln Gly Glu Phe Thr
180 185 190

Thr Trp Ser Pro Trp Ser Gln Pro Leu Ala Phe Arg Thr Lys Pro Ala
195 200 205

Ala Leu Gly Lys Asp Thr Ile Pro Trp Leu Gly His Leu Leu Val Gly
210 215 220

Leu Ser Gly Ala Phe Gly Phe Ile Ile Leu Val Tyr Leu Leu Ile Asn
225 230 235 240

Cys Arg Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn Thr
245 250 255

Pro Asp Pro Ser Lys Phe Phe Ser Gln Leu Ser Ser Glu His Gly Gly
260 265 270

Asp Val Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Ser Phe Ser
275 280 285

Pro Gly Gly Leu Ala Pro Glu Ile Ser Pro Leu Glu Val Leu Glu Arg
290 295 300

Asp Lys Val Thr Gln Leu Leu Leu Gln Gln Asp Lys Val Pro Glu Pro
305 310 315 320

Ala Ser Leu Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn Gln
325 330 335

Gly Tyr Phe Phe Phe His Leu Pro Asp Ala Leu Glu Ile Glu Ala Cys
340 345 350

Gln Val Tyr Phe Thr Tyr Asp Pro Tyr Ser Glu Glu Asp Pro Asp Glu
355 360 365

Gly Val Ala Gly Ala Pro Thr Gly Ser Ser Pro Gln Pro Leu Gln Pro
370 375 380

Leu Ser Gly Glu Asp Asp Ala Tyr Cys Thr Phe Pro Ser Arg Asp Asp
385 390 395 400

Leu Leu Leu Phe Ser Pro Ser Leu Leu Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ser

405 410 415

Thr Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met Pro Pro Ser
420 425 430

Leu Gln Glu Arg Val Pro Arg Asp Trp Asp Pro Gln Pro Leu Gly Pro
435 440 445

Pro Thr Pro Gly Val Pro Asp Leu Val Asp Phe Gln Pro Pro Pro Glu
450 455 460

Leu Val Leu Arg Glu Ala Gly Glu Glu Val Pro Asp Ala Gly Pro Arg
465 470 475 480

Glu Gly Val Ser Phe Pro Trp Ser Arg Pro Pro Gly Gln Gly Glu Phe
485 490 495

Arg Ala Leu Asn Ala Arg Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu Ser
500 505 510

Leu Gln Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val
515 520 525

<210> 2
<211> 513
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 2

Ala Val Lys Asn Cys Ser His Leu Glu Cys Phe Tyr Asn Ser Arg Ala
1 5 10 15

Asn Val Ser Cys Met Trp Ser His Glu Glu Ala Leu Asn Val Thr Thr
20 25 30

Cys His Val His Ala Lys Ser Asn Leu Arg His Trp Asn Lys Thr Cys
35 40 45

Glu Leu Thr Leu Val Arg Gln Ala Ser Trp Ala Cys Asn Leu Ile Leu
50 55 60

Gly Ser Phe Pro Glu Ser Gln Ser Leu Thr Ser Val Asp Leu Leu Asp
65 70 75 80

Ile Asn Val Val Cys Trp Glu Glu Lys Gly Trp Arg Arg Val Lys Thr
85 90 95

Cys Asp Phe His Pro Phe Asp Asn Leu Arg Leu Val Ala Pro His Ser
100 105 110

Leu Gln Val Leu His Ile Asp Thr Gln Arg Cys Asn Ile Ser Trp Lys

115 120 125

Val Ser Gln Val Ser His Tyr Ile Glu Pro Tyr Leu Glu Phe Glu Ala
130 135 140

Arg Arg Arg Leu Leu Gly His Ser Trp Glu Asp Ala Ser Val Leu Ser
145 150 155 160

Leu Lys Gln Arg Gln Gln Trp Leu Phe Leu Glu Met Leu Ile Pro Ser
165 170 175

Thr Ser Tyr Glu Val Gln Val Arg Val Lys Ala Gln Arg Asn Asn Thr
180 185 190

Gly Thr Trp Ser Pro Trp Ser Gln Pro Leu Thr Phe Arg Thr Arg Pro
195 200 205

Ala Asp Pro Met Lys Glu Ile Leu Pro Met Ser Trp Leu Arg Tyr Leu
210 215 220

Leu Leu Val Leu Gly Cys Phe Ser Gly Phe Phe Ser Cys Val Tyr Ile
225 230 235 240

Leu Val Lys Cys Arg Tyr Leu Gly Pro Trp Leu Lys Thr Val Leu Lys
245 250 255

Cys His Ile Pro Asp Pro Ser Glu Phe Phe Ser Gln Leu Ser Ser Gln
260 265 270

His Gly Gly Asp Leu Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Val Pro Leu Ser
275 280 285

Phe Phe Ser Pro Ser Gly Pro Ala Pro Glu Ile Ser Pro Leu Glu Val
290 295 300

Leu Asp Gly Asp Ser Lys Ala Val Gln Leu Leu Leu Leu Gln Lys Asp
305 310 315 320

Ser Ala Pro Leu Pro Ser Pro Ser Gly His Ser Gln Ala Ser Cys Phe
325 330 335

Thr Asn Gln Gly Tyr Phe Phe Phe His Leu Pro Asn Ala Leu Glu Ile
340 345 350

Glu Ser Cys Gln Val Tyr Phe Thr Tyr Asp Pro Cys Val Glu Glu Glu
355 360 365

Val Glu Glu Asp Gly Ser Arg Leu Pro Glu Gly Ser Pro His Pro Pro
370 375 380

Leu Leu Pro Leu Ala Gly Glu Gln Asp Asp Tyr Cys Ala Phe Pro Pro
385 390 395 400

Arg Asp Asp Leu Leu Leu Phe Ser Pro Ser Leu Ser Thr Pro Asn Thr
405 410 415

Ala Tyr Gly Gly Ser Arg Ala Pro Glu Glu Arg Ser Pro Leu Ser Leu
420 425 430

His Glu Gly Leu Pro Ser Leu Ala Ser Arg Asp Leu Met Gly Leu Gln
435 440 445

Arg Pro Leu Glu Arg Met Pro Glu Gly Asp Gly Glu Gly Leu Ser Ala
450 455 460

Asn Ser Ser Gly Glu Gln Ala Ser Val Pro Glu Gly Asn Leu His Gly
465 470 475 480

Gln Asp Gln Asp Arg Gly Gln Gly Pro Ile Leu Thr Leu Asn Thr Asp
485 490 495

Ala Tyr Leu Ser Leu Gln Glu Leu Gln Ala Gln Asp Ser Val His Leu
500 505 510

Ile

<210> 3
<211> 149
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 3

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Ser Ser Ser Thr Ala Glu Ala Gln Gln
1 5 10 15

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln His Leu Glu Gln Leu Leu
20 25 30

Met Asp Leu Gln Glu Leu Leu Ser Arg Met Glu Asn Tyr Arg Asn Leu
35 40 45

Lys Leu Pro Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Leu Pro Lys Gln Ala
50 55 60

Thr Glu Leu Lys Asp Leu Gln Cys Leu Glu Asp Glu Leu Gly Pro Leu
65 70 75 80

Arg His Val Leu Asp Leu Thr Gln Ser Lys Ser Phe Gln Leu Glu Asp
85 90 95

Ala Glu Asn Phe Ile Ser Asn Ile Arg Val Thr Val Val Lys Leu Lys
100 105 110

Gly Ser Asp Asn Thr Phe Glu Cys Gln Phe Asp Asp Glu Ser Ala Thr
115 120 125

Val Val Asp Phe Leu Arg Arg Trp Ile Ala Phe Cys Gln Ser Ile Ile
130 135 140

Ser Thr Ser Pro Gln
145

<210> 4
<211> 133
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 5
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 5

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Ser Gln
1 5 10 15

Leu Leu Val Leu Leu Gln Gln Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Ile Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Asp Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 6
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 6

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Ser Gln
1 5 10 15

Leu Leu Val Leu Leu Gln Gln Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Tyr Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 7
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 7

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Ser Gln
1 5 10 15

Leu Leu Val Leu Leu Lys Ala Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 8
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 8

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Ser Gln
1 5 10 15

Leu Leu Val Leu Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 9
<211> 525
<212> PRT
<213> 智人

<400> 9

Ala Val Asn Gly Thr Ser Gln Phe Thr Cys Phe Tyr Asn Ser Arg Ala
1 5 10 15

Asn Ile Ser Cys Val Trp Ser Gln Asp Gly Ala Leu Gln Asp Thr Ser
20 25 30

Cys Gln Val His Ala Trp Pro Asp Arg Arg Arg Trp Asn Gln Thr Cys
35 40 45

Glu Leu Leu Pro Val Ser Gln Ala Ser Trp Ala Cys Asn Leu Ile Leu
50 55 60

Gly Ala Pro Asp Ser Gln Lys Leu Thr Thr Val Asp Ile Val Thr Leu
65 70 75 80

Arg Val Leu Cys Arg Glu Gly Val Arg Trp Arg Val Met Ala Ile Gln
85 90 95

Asp Phe Lys Pro Phe Glu Asn Leu Arg Leu Met Ala Pro Ile Ser Leu
100 105 110

Gln Val Val His Val Glu Thr His Arg Cys Asn Ile Ser Trp Glu Ile
115 120 125

Ser Gln Ala Ser Asp Phe Phe Glu Arg His Leu Glu Phe Glu Ala Arg
130 135 140

Thr Leu Ser Pro Gly His Thr Trp Glu Glu Ala Pro Leu Leu Thr Leu
145 150 155 160

Lys Gln Lys Gln Glu Trp Ile Cys Leu Glu Thr Leu Thr Pro Asp Thr
165 170 175

Gln Tyr Glu Phe Gln Val Arg Val Lys Pro Leu Gln Gly Glu Phe Thr
180 185 190

Thr Trp Ser Pro Trp Ser Gln Pro Leu Ala Phe Arg Thr Lys Pro Ala
195 200 205

Ala Leu Gly Lys Asp Thr Ile Pro Trp Leu Gly His Leu Leu Val Gly
210 215 220

Leu Ser Gly Ala Phe Gly Phe Ile Ile Leu Val Tyr Leu Leu Ile Asn
225 230 235 240

Cys Arg Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn Thr
245 250 255

Pro Asp Pro Ser Lys Phe Phe Ser Gln Leu Ser Ser Glu His Gly Gly
260 265 270

Asp Val Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Ser Phe Ser
275 280 285

Pro Gly Gly Leu Ala Pro Glu Ile Ser Pro Leu Glu Val Leu Glu Arg
290 295 300

Asp Lys Val Thr Gln Leu Leu Leu Gln Gln Asp Lys Val Pro Glu Pro
305 310 315 320

Ala Ser Leu Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn Gln
325 330 335

Gly Tyr Phe Phe Phe His Leu Pro Asp Ala Leu Glu Ile Glu Ala Cys

340 345 350

Gln Val Tyr Phe Thr Tyr Asp Pro Tyr Ser Glu Glu Asp Pro Asp Glu
355 360 365

Gly Val Ala Gly Ala Pro Thr Gly Ser Ser Pro Gln Pro Leu Gln Pro
370 375 380

Leu Ser Gly Glu Asp Asp Ala Tyr Cys Thr Phe Pro Ser Arg Asp Asp
385 390 395 400

Leu Leu Leu Phe Ser Pro Ser Leu Leu Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ser
405 410 415

Thr Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met Pro Pro Ser
420 425 430

Leu Gln Glu Arg Val Pro Arg Asp Trp Asp Pro Gln Pro Leu Gly Pro
435 440 445

Pro Thr Pro Gly Val Pro Asp Leu Val Asp Phe Gln Pro Pro Pro Glu
450 455 460

Leu Val Leu Arg Glu Ala Gly Glu Glu Val Pro Asp Ala Gly Pro Arg
465 470 475 480

Glu Gly Val Ser Phe Pro Trp Ser Arg Pro Pro Gly Gln Gly Glu Phe
485 490 495

Arg Ala Leu Asn Ala Arg Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu Ser
500 505 510

Leu Gln Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val
515 520 525

<210> 10
<211> 98
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<220>
<221> misc_特徵
<222> (33)..(33)
"<223> 在位置33之N可為a.c.g或t

<220>
<221> misc_特徵
<222> (34)..(34)
"<223> 在位置34之N可為a.c或t

<220>

<221> misc_特徵
<222> (35)..(35)
<223> 在位置**35**之**N**可為**g**或**t**

<220>
<221> misc_特徵
<222> (36)..(36)
"<223> 在位置**363**之**N**可為**a**、**c**、**g**或**t**

<220>
<221> misc_特徵
<222> (37)..(37)
"<223> 在位置**37**之**N**可為**a**、**c**或**t**

<220>
<221> misc_特徵
<222> (38)..(38)
<223> 在位置**38**之**N**可為**g**或**t**

<220>
<221> misc_特徵
<222> (45)..(45)
"<223> 在位置**45**之**N**可為**a**、**c**、**g**或**t**

<220>
<221> misc_特徵
<222> (46)..(46)
"<223> 在位置**46**之**N**可為**a**、**c**或**t**

<220>
<221> misc_特徵
<222> (47)..(47)
<223> 在位置**47**之**N**可為**g**或**t**

<220>
<221> misc_特徵
<222> (48)..(48)
"<223> 在位置**48**之**N**可為**a**、**c**或**t**

<220>
<221> misc_特徵
<222> (49)..(49)
"<223> 在位置**49**之**N**可為**a.c**或**t**

<220>
<221> misc_特徵
<222> (50)..(50)
<223> 在位置**50**之**N**可為**g**或**t**

<220>
<221> misc_特徵
<222> (54)..(54)
"<223> 在位置**54**之**N**可為**a**、**c**、**g**或**t**

<220>
<221> misc_特徵
<222> (55)..(55)
"<223> 在位置**55**之**N**可為**a**、**c**或**t**

<220>
<221> misc_特徵
<222> (56)..(56)
<223> 在位置**56**之**N**可為**g**或**t**

<220>
<221> misc_特徵
<222> (57)..(59)

"<223> n 為 a、c、g、或 t"

<400> 10
caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tgnnnnnntt acttnnnnnn ttannnnnna 60

ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactc 98

<210> 11
<211> 88
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<220>
<221> misc_特徵
<222> (30)..(30)
"<223> 在位置**33**之**N**可為**a**、**c**、**g**或**t**

<220>
<221> misc_特徵
<222> (31)..(31)
"<223> 在位置**31**之**N**可為**a**、**c**或**t**

<220>
<221> misc_特徵
<222> (32)..(32)
<223> 在位置**32**之**N**可為**g**或**t**

<220>
<221> misc_特徵
<222> (33)..(33)
"<223> 在位置**33**之**N**可為**a**、**c**、**g**或**t**

<220>
<221> misc_特徵
<222> (34)..(34)
"<223> 在位置**34**之**N**可為**a.c**或**t**

<220>
<221> misc_特徵
<222> (35)..(35)
<223> 在位置**35**之**N**可為**g**或**t**

<220>
<221> misc_特徵
<222> (42)..(42)
"<223> 在位置**42**之**N**可為**a**、**c**、**g**或**t**

<220>
<221> misc_特徵
<222> (43)..(43)
"<223> 在位置**43**之**N**可為**a**、**c**或**t**

<220>
<221> misc_特徵
<222> (44)..(44)
<223> 在位置**44**之**N**可為**g**或**t**

<220>
<221> misc_特徵
<222> (45)..(45)
"<223> 在位置**45**之**N**可為**a**、**c**、**g**或**t**

<220>
<221> misc_特徵
<222> (46)..(46)
"<223> 在位置**46**之**N**可為**a**、**c**或**t**

<220>
<221> misc_特徵
<222> (47)..(47)
<223> 在位置**47**之**N**可為**g**或**t**

<220>
<221> misc_特徵
<222> (54)..(54)
"<223> 在位置**54**之**N**可為**a**、**c**、**g**或**t**

<220>
<221> misc_特徵
<222> (55)..(55)
"<223> 在位置**55**之**N**可為**a**、**c**或**t**

<220>
<221> misc_特徵
<222> (56)..(56)
<223> 在位置**56**之**N**可為**g**或**t**

<400> 11
gttctacaaa gaaaacacag ctacaactgn nnnnnttact tnnnnnntta cagnnnattt 60

tgaatggaat taataattac aagaatcc 88

<210> 12
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<220>
<221> misc_特徵
<222> (19)..(19)
"<223> 在位置**19**之**N**可為**a**、**c**、**g**或**t**

<220>
<221> misc_特徵
<222> (20)..(20)
"<223> 在位置**20**之**N**可為**a**、**c**或**t**

<220>
<221> misc_特徵
<222> (21)..(21)
<223> 在位置**21**之**N**可為**g**或**t**

<400> 12
cccagggact taatcagcnn natcaacgta atagttctgg aactaaaggg 50

<210> 13
<211> 55
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 13
cggtagcggt gggggcggtt ctctggaagt tctgttccag ggtccgagcg gcgga 55

<210> 14
<211> 59
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 14
gtagctgtgt tttctttgta gaacttgaag taggtgcgga tccgccgctc ggaccctgg 59

<210> 15
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 15
cttaaatgtg agcatcctgg tgagtttggg attcttgtaa ttattaattc cattcaaaat 60

<210> 16
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 16
ccaggatgct cacatttaag ttttacatgc ccaagaaggc cacag 45

<210> 17
<211> 59
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 17
gaggtttgag ttcttcttct agacactgaa gatgtttcag ttctgtggcc ttcttgggc 59

<210> 18
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 18
cagtgtctag aagaagaact caaacctctg gaggaagtgc taaatttagc tcaaagc 57

<210> 19
<211> 60
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 19
gattaagtcc ctgggtctta agtgaaagtt tttgctttga gctaaattta gcacttcctc 60

<210> 20
<211> 59
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 20
cagcatattc acacatgaat gttgtttcag atccctttag ttccagaact attacgttg 59

<210> 21
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 21
gaaacaacat tcatgtgtga atatgctgat gagacagcaa ccattgtaga atttctgaac 60

<210> 22
<211> 58
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 22
gagatgatgc tttgacaaaa ggtaatccat ctgttcagaa attctacaat ggttgctg 58

<210> 23
<211> 59
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 23
gattaccttt tgtcaaagca tcatctcaac actaactgcg gccgcttctg gtggcgaac 59

<210> 24
<211> 53
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 24
gatctcgagc aagtcttctt cggagataag cttttgttcg ccaccagaag cgg 53

<210> 25
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 25
cggtagcggt gggggcggtt c 21

<210> 26
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 26
cgaagaagac ttgctcgaga tc 22

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種經工程處理之人IL-2多肽，其(i)已顯著減少與天然人CD122結合；且其(ii)在殘基T51、R81處包含至少一個以除了天然蛋白質之胺基酸以外的胺基酸進行之胺基酸取代，或包含胺基酸取代M23A；及(iii)在E15、H16、L19、D20各處包含胺基酸取代。

【第2項】

如申請專利範圍第1項之經工程處理之人IL-2多肽，其中該多肽包含一或多個選自下述之胺基酸取代：[E15D、E15T、E15A、E15S]、[H16N、H16Q]、[L19V、L19I、L19A]、[D20L、D20M]、[Q22S、Q22T、Q22E、Q22K、Q22E]、[M23A、M23W、M23H、M23Y、M23F、M23Q、M23Y]、[G27K、G27S]、[R81D、R81Y]、[N88E、N88Q]、[T51I]。

【第3項】

如申請專利範圍第1或2項之經工程處理之人IL-2多肽，其中該多肽包含胺基酸取代E15S；H16Q；L19V；和D20L。

【第4項】

如申請專利範圍第1至3項中任一項之經工程處理之人IL-2多肽，其進一步包含胺基酸取代Q22K。

【第5項】

如申請專利範圍第1至4項中任一項之經工程處理之人

IL-2多肽，其包含胺基酸取代T51I。

【第6項】

如申請專利範圍第1至5項中任一項之經工程處理之人IL-2多肽，其包含胺基酸取代R81D或R81Y。

【第7項】

如申請專利範圍第1項之經工程處理之人IL-2多肽，其包含一組胺基酸取代[E15D、H16N、L19V、D20L、Q22T、M23A]。

【第8項】

如申請專利範圍第1項之經工程處理之人IL-2多肽，其包含一組胺基酸取代[E15D、H16N、L19V、D20L、Q22K、M23A]。

【第9項】

如申請專利範圍第1項之經工程處理之人IL-2多肽，其包含一組胺基酸取代[E15S、H16Q、L19V、D20L、M23Q、R81D、T51I]。

【第10項】

如申請專利範圍第1項之經工程處理之人IL-2多肽，其包含一組胺基酸取代[E15S、H16Q、L19V、D20L、M23Q、R81Y]。

【第11項】

如申請專利範圍第1至10項中任一項之經工程處理之人IL-2多肽，其中該多肽與正交人CD122蛋白質結合並活化之。

【第12項】

如申請專利範圍第11項之經工程處理之人IL-2多肽，其中該正交人CD122蛋白質在一或多個選自下述之殘基處經修飾：R41、R42、Q70、K71、T73、T74、V75、S132、H133、Y134、F135、E136、Q214。

【第13項】

如申請專利範圍第12項之經工程處理之人IL-2多肽，其中該正交人CD122蛋白質在H133和Y134處經修飾。

【第14項】

如申請專利範圍第13項之經工程處理之人IL-2多肽，其中該正交人CD122蛋白質包含胺基酸取代H133D和Y134F。

【第15項】

一種用於選擇性活化細胞中的受體之系統，該系統包含：

(a)正交人CD122受體，該受體在H133和Y134處包含胺基酸取代；和

(b)如申請專利範圍第1至10項中任一項之經工程處理之人IL-2多肽。

【第16項】

如申請專利範圍第15項之系統，其中該正交受體係由哺乳動物細胞表現。

【第17項】

如申請專利範圍第16項之系統，其中該細胞為免疫細

胞或乾細胞。

【第18項】

如申請專利範圍第17項之系統，其中該免疫細胞為T細胞。

【第19項】

如申請專利範圍第18項之系統，其中該T細胞為CAR-T細胞。

【第20項】

一種醫藥組成物，其包含如申請專利範圍第1至10項中任一項之經工程處理之人IL-2多肽；和醫藥上可接受之賦形劑。

【第21項】

一種核酸，其編碼如申請專利範圍第1至10項中任一項之經工程處理之人IL-2多肽。

【第22項】

一種表現載體，其包含如申請專利範圍第21項之核酸。

【第23項】

一種細胞，其係經遺傳工程處理以包含如申請專利範圍第22項之載體。

【第24項】

一種治療個體之方法，該方法包含引入表現正交人CD122受體之免疫效應細胞，該正交人CD122受體在H133和Y134處包含胺基酸取代，及藉由與如申請專利範圍第1

至10項中任一項之經工程處理之人IL-2多肽接觸來選擇性地活化該細胞。

【第25項】

如申請專利範圍第24項之方法，其中該免疫效應細胞為T細胞。

【第26項】

如申請專利範圍第25項之方法，其中該T細胞為CAR-T細胞。

【第27項】

如申請專利範圍第24至26項中任一項之方法，其中該個體接受癌症治療。

【第28項】

如申請專利範圍第24至26項中任一項之方法，其中該個體接受自體免疫疾病治療。

【第29項】

如申請專利範圍第24至26項中任一項之方法，其中該個體接受感染治療。

【第30項】

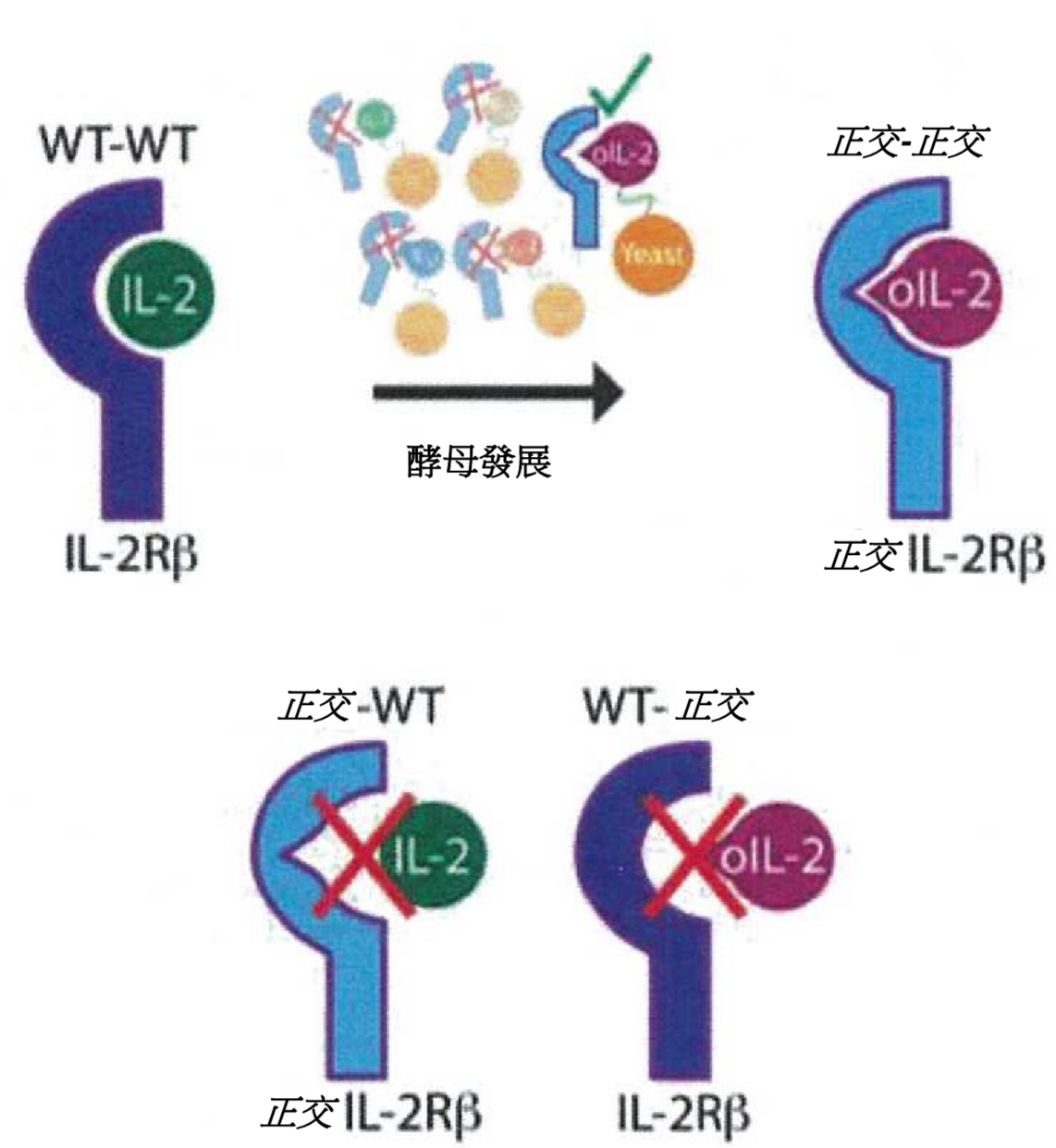
一種套組，其包含如申請專利範圍第15項之系統。

202017576

【發明圖式】

用於控制T細胞擴增之正交IL-2/IL-2受體對

方法



應用：過繼性T細胞療法

圖1(i)

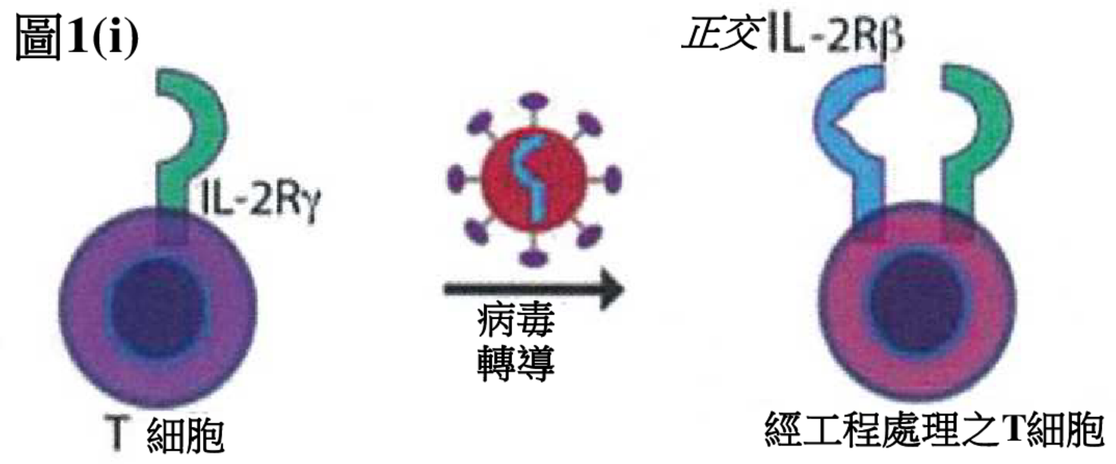
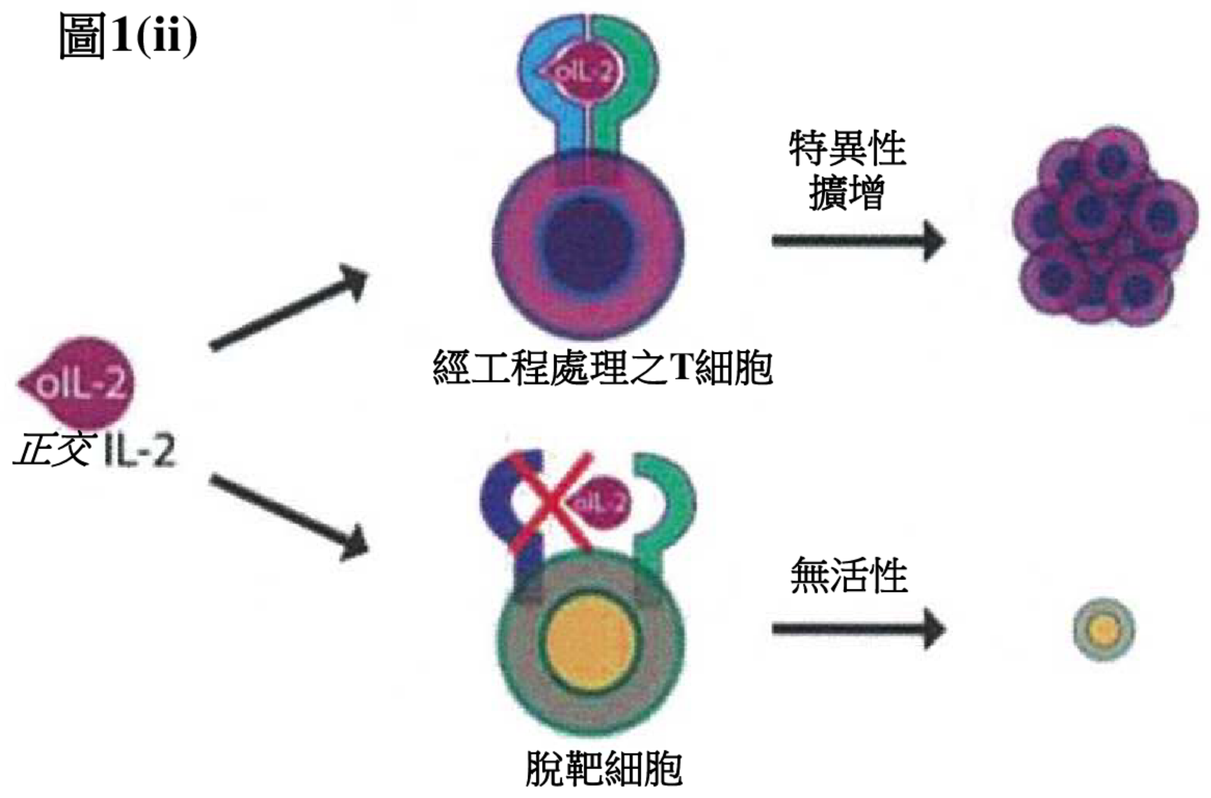
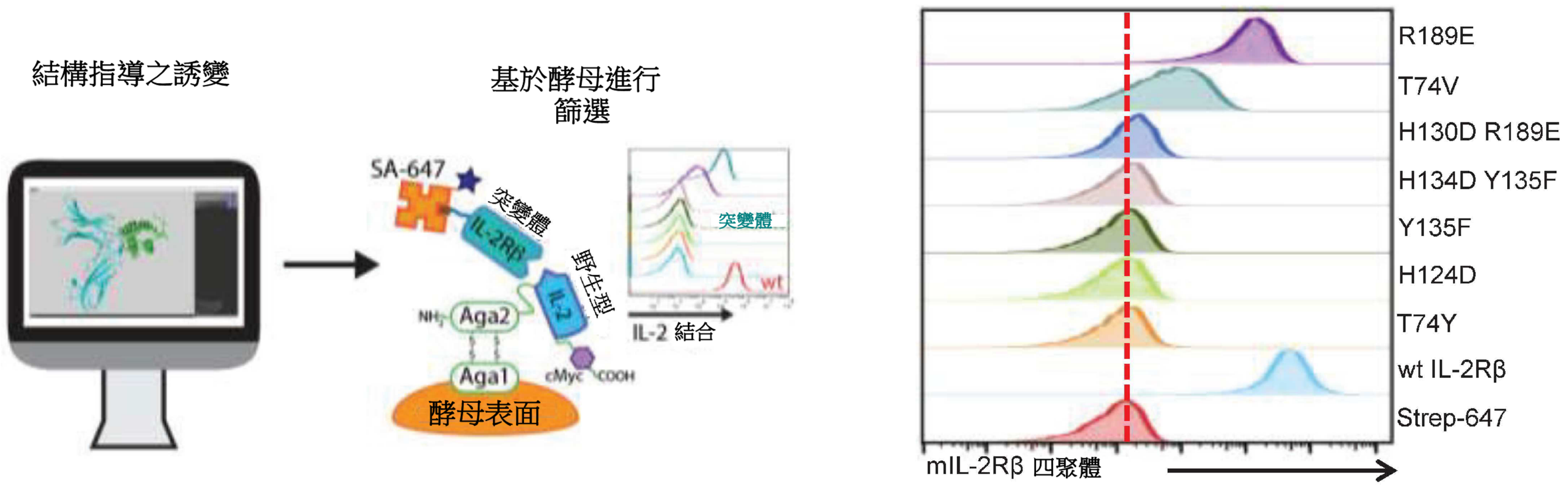


圖1(ii)



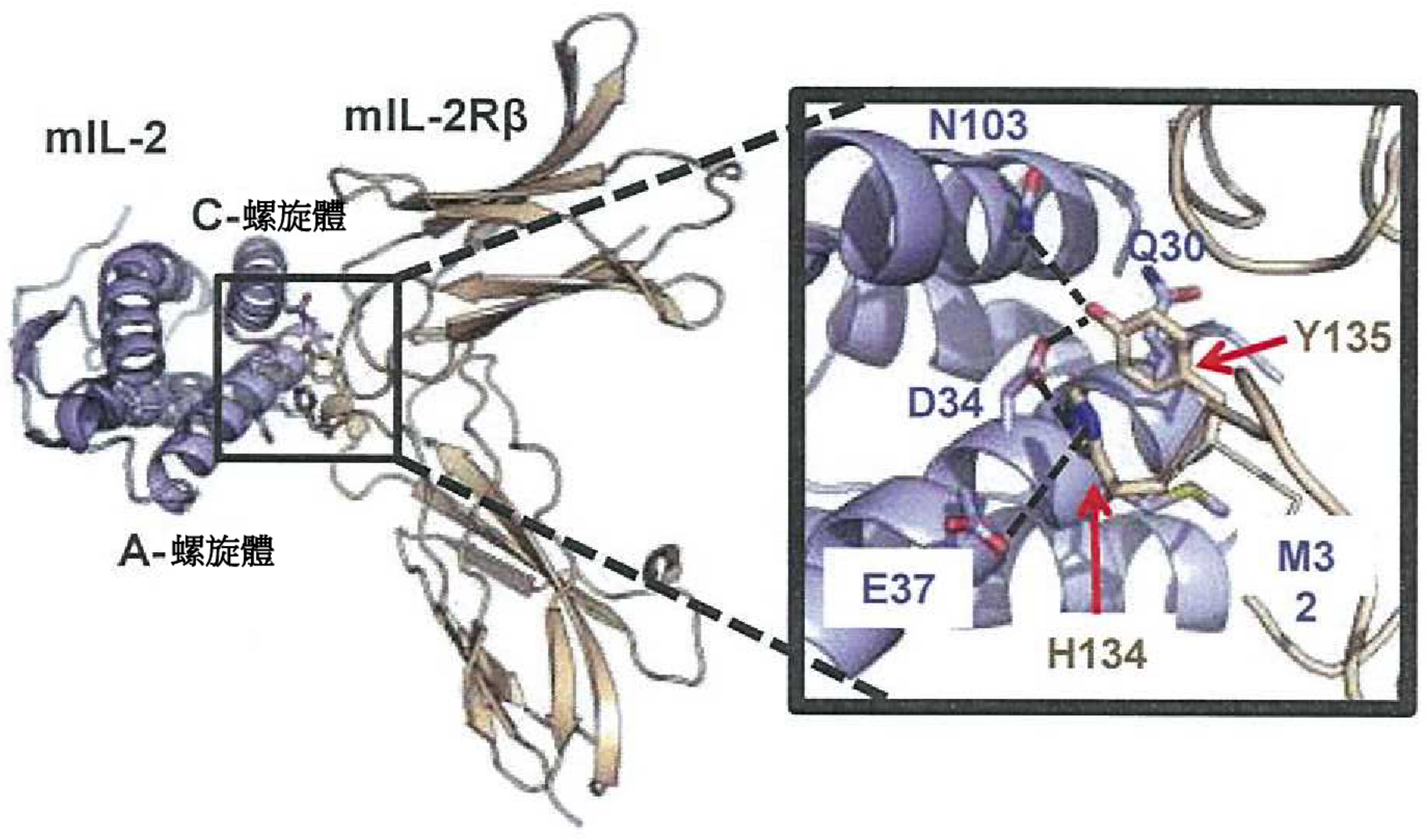
【圖 1】

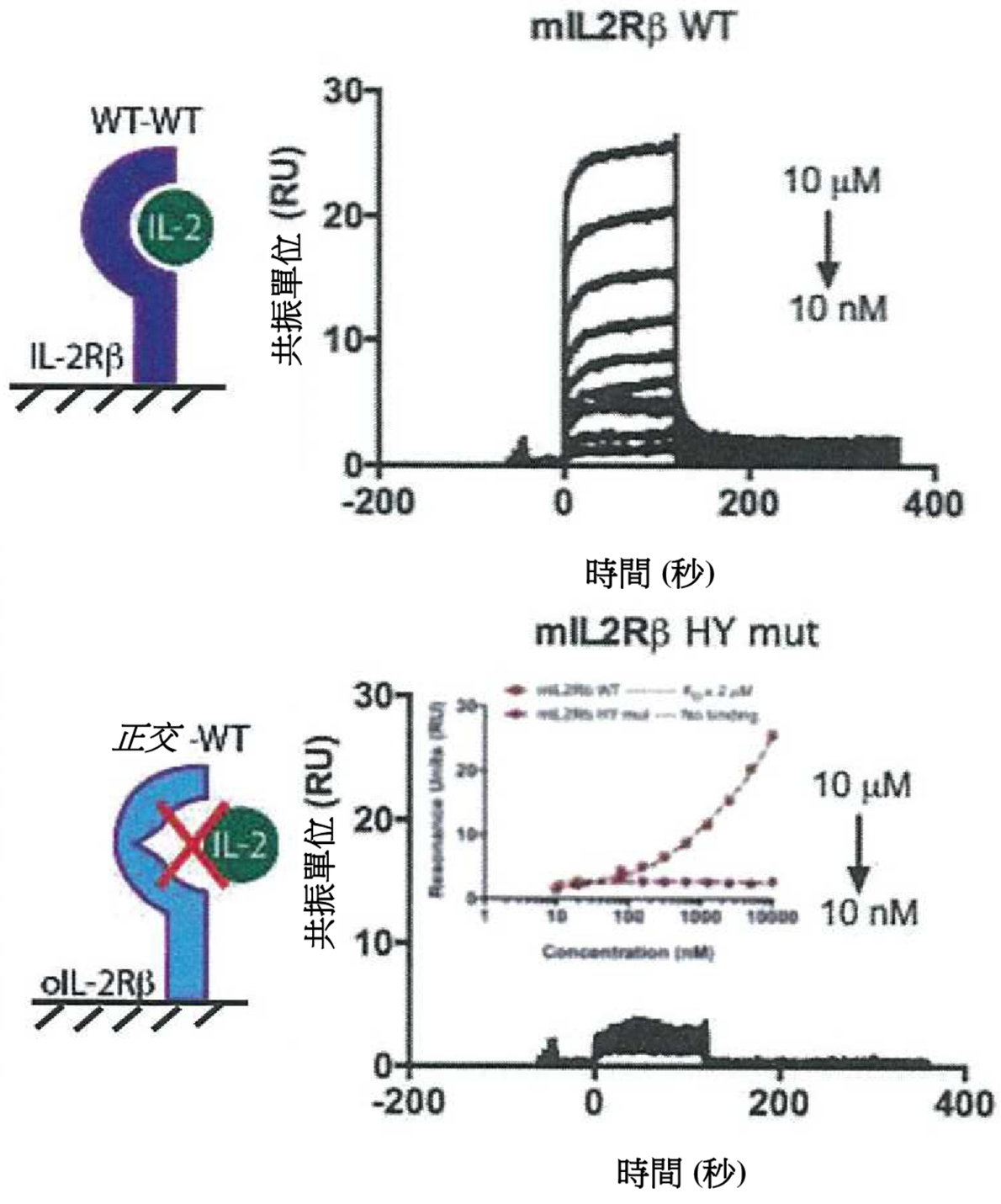

結構指導之誘變
基於酵母進行
篩選
SA-647
突變體
IL-2Rβ
野生型
IL-2
NH2
Aga2
Aga1
cMyc
COOH
酵母表面
突變體
wt
IL-2 結合
R189E
T74V
H130D R189E
H134D Y135F
Y135F
H124D
T74Y
wt IL-2Rβ
Strep-647
mIL-2Rβ 四聚體

【圖 2】

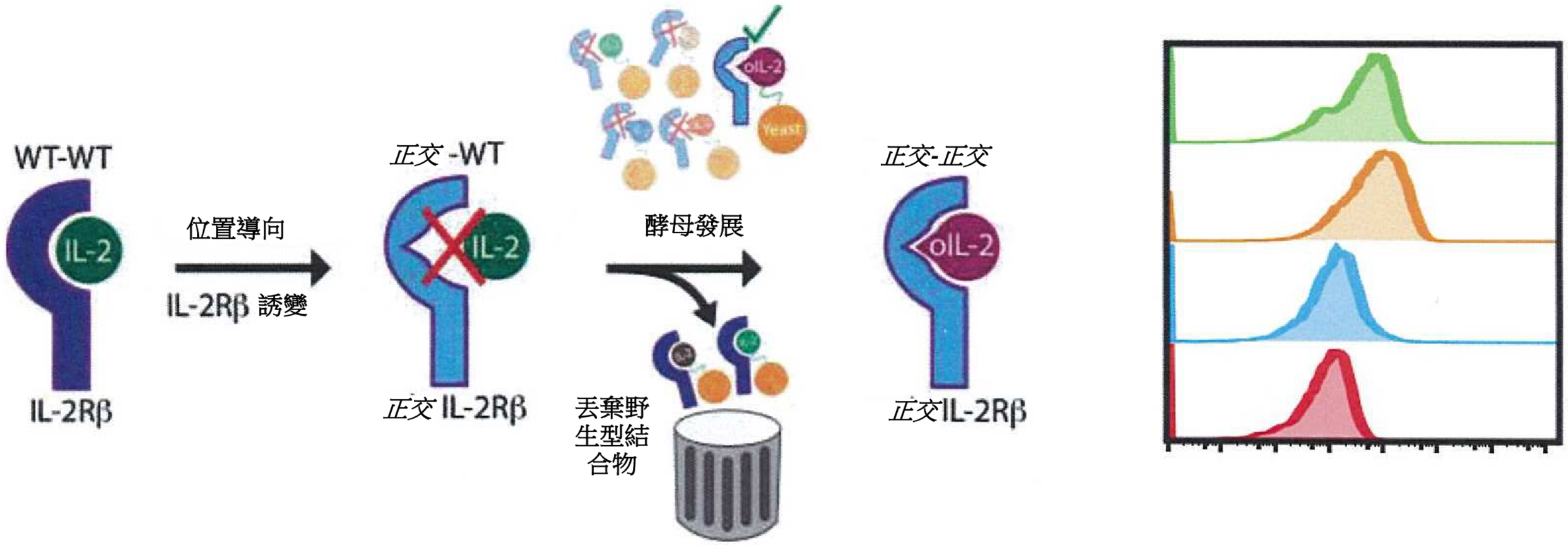
	序列	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	...	70	71	72	73	74	75	...	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	...	212	213	214	215
經驗證破壞野生型IL-2結合	**WT**	**A**	**V**	**K**	**N**	**C**	**S**	**H**	**L**	**E**	**C**	...	**S**	**Q**	**S**	**L**	**T**	**S**	...	**S**	**Q**	**V**	**S**	**H**	**Y**	**I**	**E**	**P**	**Y**	...	**M**	**K**	**E**	**I**
	T74Y	A	V	K	N	C	S	H	L	E	C	...	S	Q	S	L	Y	S	...	S	Q	V	S	H	Y	I	E	P	Y	...	M	K	E	I
	H134D	A	V	K	N	C	S	H	L	E	C	...	S	Q	S	L	T	S	...	S	Q	V	S	D	Y	I	E	P	Y	...	M	K	E	I
	Y135F	A	V	K	N	C	S	H	L	E	C	...	S	Q	S	L	T	S	...	S	Q	V	S	H	F	I	E	P	Y	...	M	K	E	I
	H134D Y135F	A	V	K	N	C	S	H	L	E	C	...	S	Q	S	L	T	S	...	S	Q	V	S	D	F	I	E	P	Y	...	M	K	E	I
	Q71Y	A	V	K	N	C	S	H	L	E	C	...	S	Y	S	L	T	S	...	S	Q	V	S	H	Y	I	E	P	Y	...	M	K	E	I
	T74D	A	V	K	N	C	S	H	L	E	C	...	S	Q	S	L	D	S	...	S	Q	V	S	H	Y	I	E	P	Y	...	M	K	E	I
	H134E Y135E	A	V	K	N	C	S	H	L	E	C	...	S	Q	S	L	T	S	...	S	Q	V	S	E	E	I	E	P	Y	...	M	K	E	I
	H134K Y135R	A	V	K	N	C	S	H	L	E	C	...	S	Q	S	L	T	S	...	S	Q	V	S	K	R	I	E	P	Y	...	M	K	E	I

【圖 3】


mIL-2
mIL-2Rβ
C-螺旋體
A-螺旋體
N103
Q30
Y135
D34
E37
H134
M3
2


mIL2Rβ WT
WT-WT
IL-2
IL-2Rβ
共振單位 (RU)
30
20
10
0
-200
0
200
400
10 μM
10 nM
時間 (秒)
mIL2Rβ HY mut
正交 -WT
IL-2
oIL-2Rβ
共振單位 (RU)
10 μM
10 nM
時間 (秒)

【圖 4】


WT-WT
IL-2
IL-2Rβ
位置導向
IL-2Rβ 誘變
正交 -WT
IL-2
正交 IL-2Rβ
oIL-2
Yeast
酵母發展
丟棄野生型結合物
正交-正交
oIL-2
正交IL-2Rβ

【圖 5】

序列	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	...	100	101	102	103	104	105	...	145	146	147	148	149
WT IL-2	**H**	**L**	**E**	**Q**	**L**	**L**	**M**	**D**	**L**	**Q**	**E**	**L**	**L**	**S**	**R**	**M**	**E**	**N**	**Y**	...	**F**	**I**	**S**	**N**	**I**	**R**	...	**S**	**T**	**S**	**P**	**Q**
145	H	M	E	N	L	L	V	L	L	S	A	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	N	I	R	...	S	T	S	P	Q
146	W	L	E	N	L	L	I	L	L	Q	W	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	N	I	R	...	S	T	S	P	Q
147	H	W	E	N	L	L	V	L	L	Q	H	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	N	I	R	...	S	T	S	P	Q
148	H	L	D	N	L	L	V	M	L	S	W	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	N	I	R	...	S	T	S	P	Q
149	H	L	E	N	L	L	V	L	L	T	H	L	L	S	K	M	E	N	Y	...	F	I	S	N	I	R	...	S	T	S	P	Q
150	H	L	E	N	L	L	V	M	L	T	Y	L	L	S	S	M	E	N	Y	...	F	I	S	N	I	R	...	S	T	S	P	Q
151	H	L	E	N	L	L	V	M	L	S	W	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	N	I	R	...	S	T	S	P	Q
157	H	L	D	N	L	L	V	L	L	K	H	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	N	I	R	...	S	T	S	P	Q
160	H	L	F	N	L	L	V	M	L	Q	Y	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	E	I	R	...	S	T	S	P	Q
161	H	L	Q	N	L	L	V	M	L	M	Y	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	E	I	R	...	S	T	S	P	Q
162	H	L	D	N	L	L	V	L	L	T	H	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	N	I	R	...	S	T	S	P	Q
163	H	L	D	N	L	L	A	M	L	T	F	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	E	I	R	...	S	T	S	P	Q
165	H	L	D	N	L	L	V	M	L	Q	Y	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	Q	I	R	...	S	T	S	P	Q
170	H	L	T	N	L	L	V	L	L	E	V	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	E	I	R	...	S	T	S	P	Q
172	H	L	E	N	L	L	V	L	L	T	H	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	N	I	R	...	S	T	S	P	Q
175	H	L	E	N	L	L	V	L	L	T	H	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	N	I	R	...	S	T	S	P	Q
176	H	L	D	N	L	L	V	L	L	Q	Y	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	Q	I	R	...	S	T	S	P	Q
177	H	L	D	N	L	L	V	L	L	T	A	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	N	I	R	...	S	T	S	P	Q
180	H	L	D	N	L	L	I	L	L	Q	V	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	N	I	R	...	S	T	S	P	Q
181	H	L	D	N	L	L	V	L	L	Q	H	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	N	I	R	...	S	T	S	P	Q
182	H	L	D	N	L	L	V	L	L	K	A	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	N	I	R	...	S	T	S	P	Q
183	H	L	A	N	L	L	V	L	L	E	Y	L	L	S	R	M	E	N	Y	...	F	I	S	N	I	R	...	S	T	S	P	Q

【圖 6】

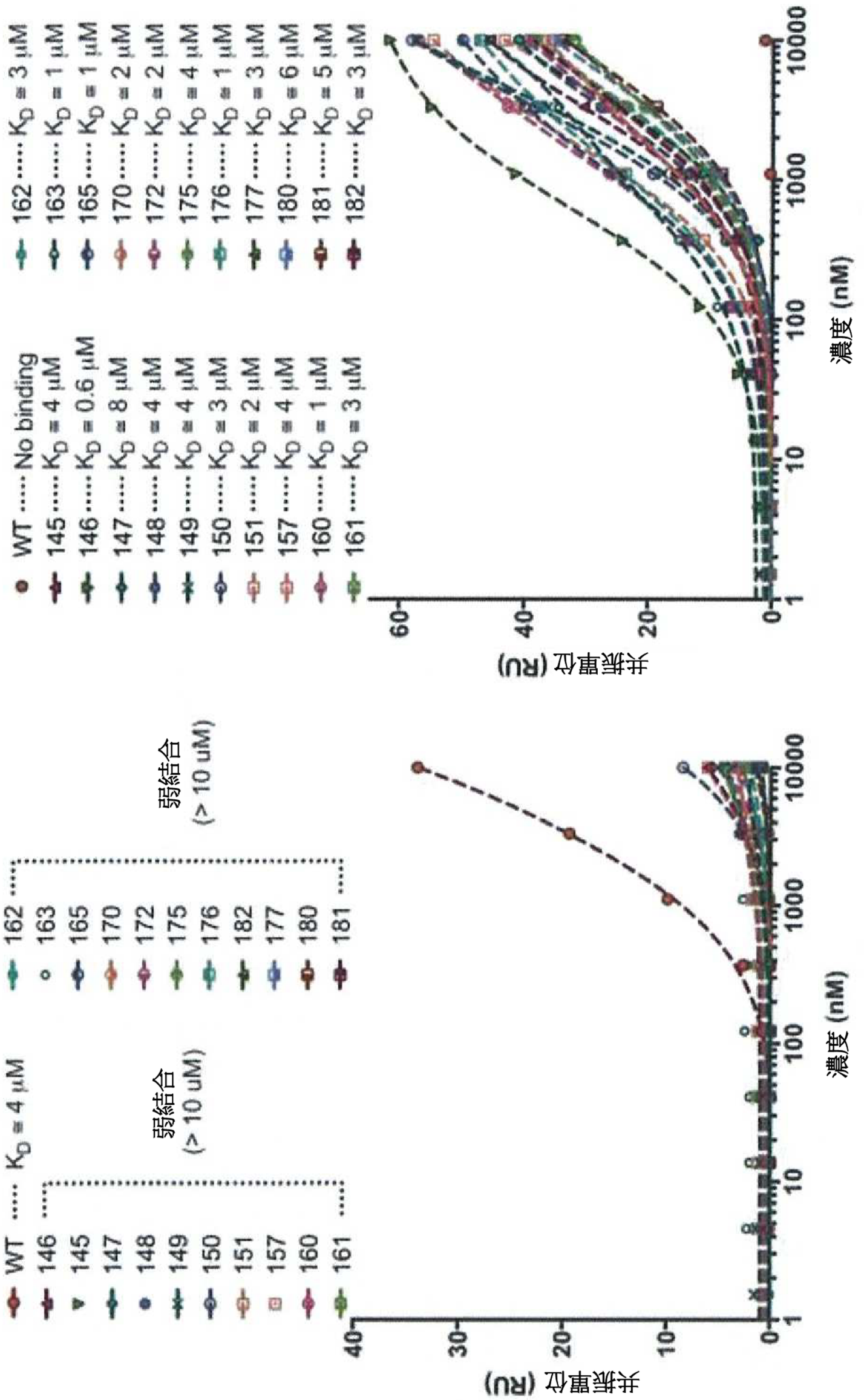
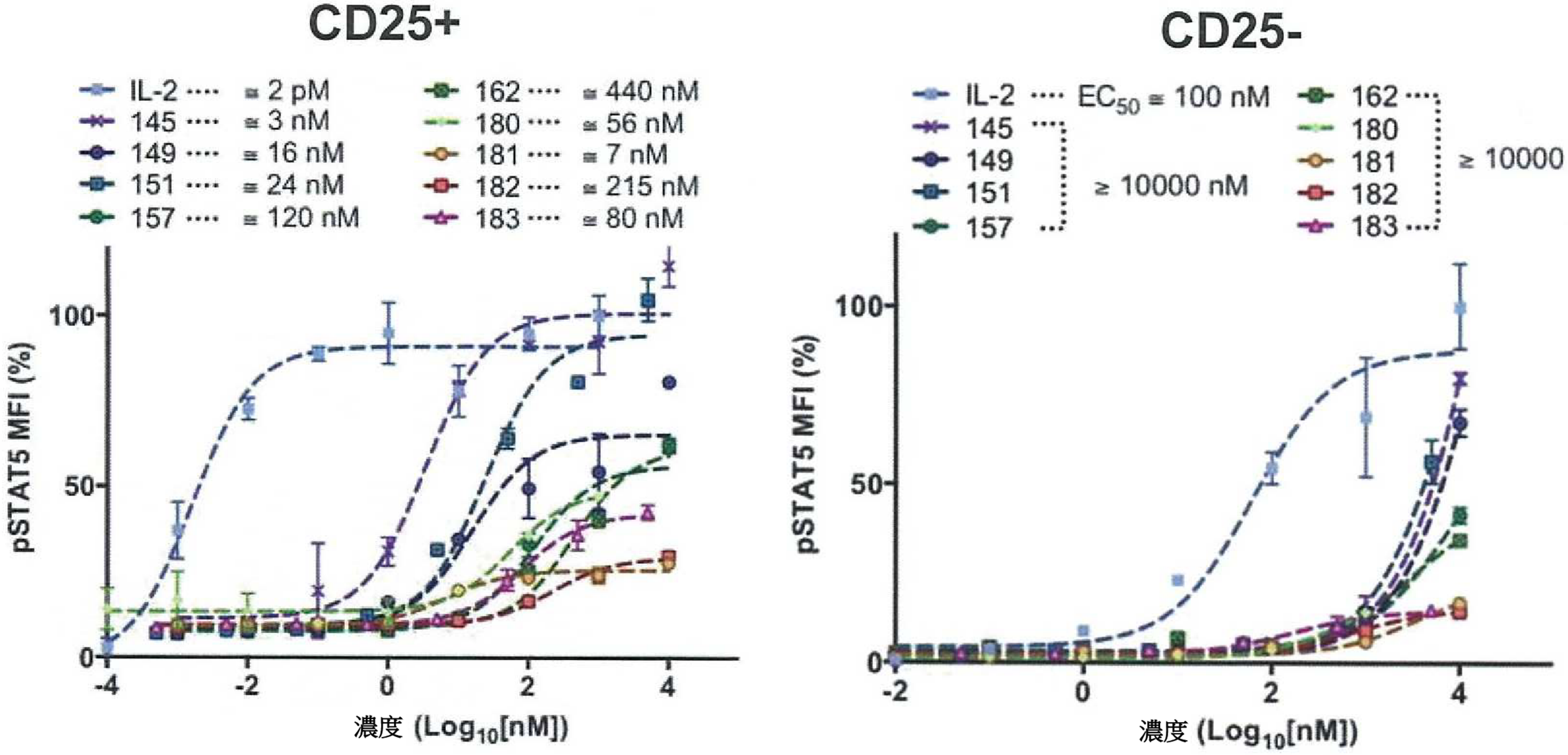
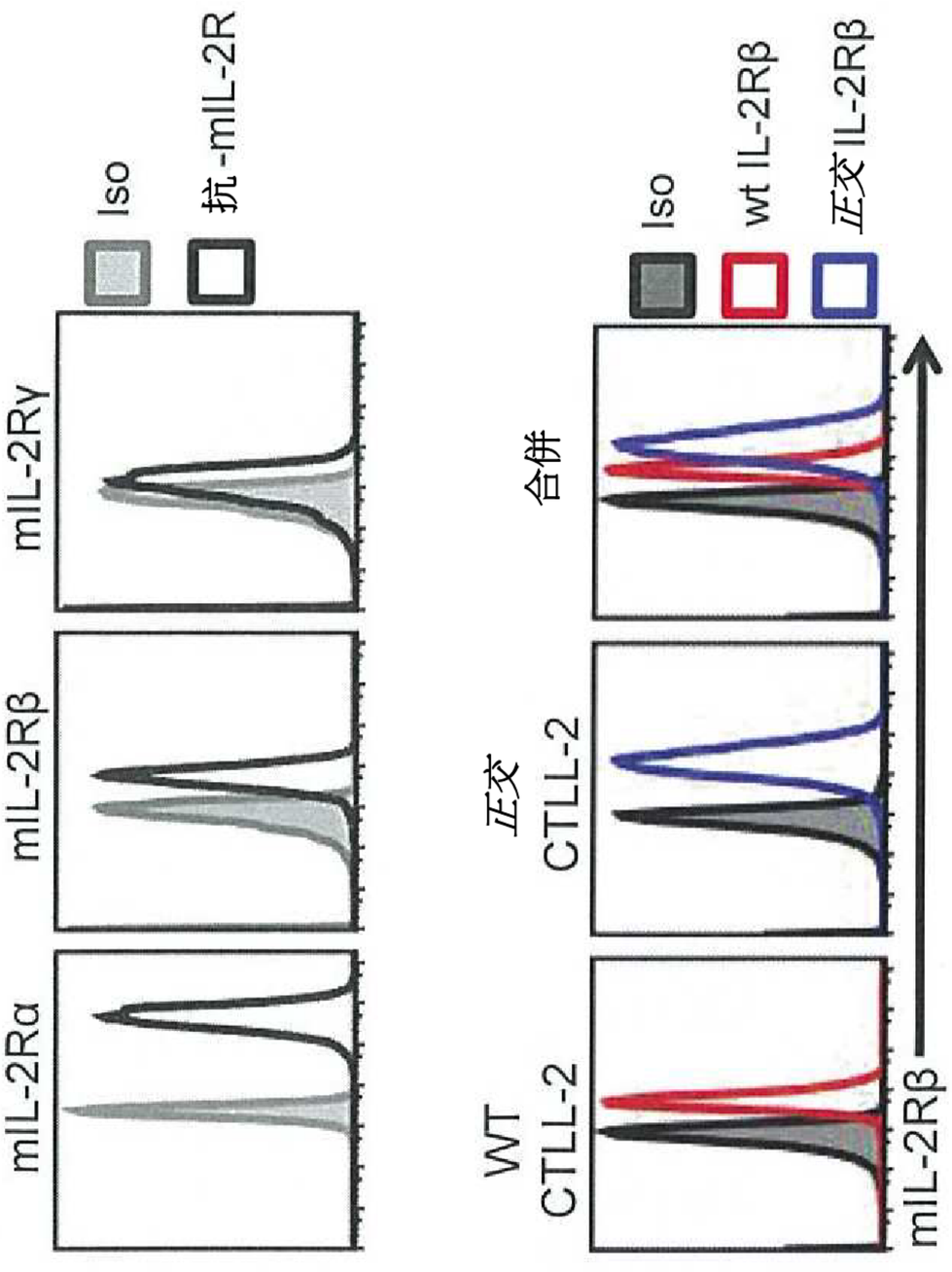

WT ····· No binding
145 ····· K_D = 4 μM
146 ····· K_D = 0.6 μM
147 ····· K_D = 8 μM
148 ····· K_D = 4 μM
149 ····· K_D = 4 μM
150 ····· K_D = 3 μM
151 ····· K_D = 2 μM
157 ····· K_D = 4 μM
160 ····· K_D = 1 μM
161 ····· K_D = 3 μM
162 ····· K_D = 3 μM
163 ····· K_D = 1 μM
165 ····· K_D = 1 μM
170 ····· K_D = 2 μM
172 ····· K_D = 2 μM
175 ····· K_D = 4 μM
176 ····· K_D = 1 μM
177 ····· K_D = 3 μM
180 ····· K_D = 6 μM
181 ····· K_D = 5 μM
182 ····· K_D = 3 μM
共振單位 (RU)
濃度 (nM)
WT ····· K_D = 4 μM
146 ····· 弱結合 (> 10 uM)
145
147
148
149
150
151
157
160
161 ·····
162 ·····
163
165
170
172
175
176
182
177
180
181 ·····
弱結合 (> 10 uM)
共振單位 (RU)
濃度 (nM)

圖 7


CD25+
IL-2 ···· ≅ 2 pM
145 ···· ≅ 3 nM
149 ···· ≅ 16 nM
151 ···· ≅ 24 nM
157 ···· ≅ 120 nM
162 ···· ≅ 440 nM
180 ···· ≅ 56 nM
181 ···· ≅ 7 nM
182 ···· ≅ 215 nM
183 ···· ≅ 80 nM
pSTAT5 MFI (%)
100
50
0
-4
-2
0
2
4
濃度 (Log10[nM])
CD25-
IL-2 ···· EC50 ≅ 100 nM
145 ····
149
151
157 ····
≥ 10000 nM
162 ····
180
181
182
183 ····
≥ 10000 nM
pSTAT5 MFI (%)
100
50
0
-2
0
2
4
濃度 (Log10[nM])

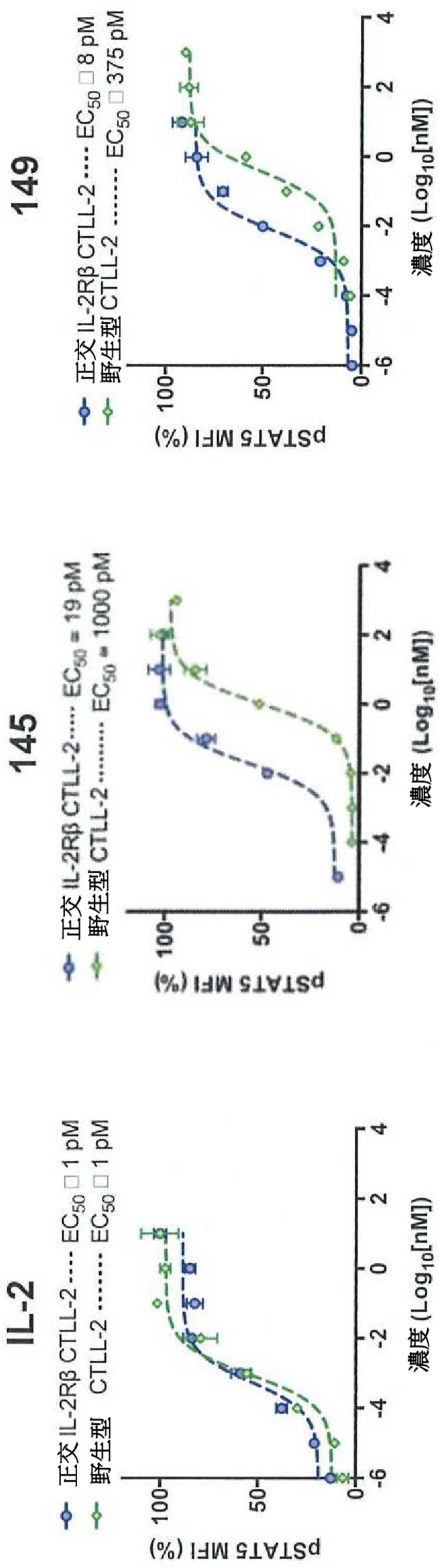
【圖 8】


mIL-2Rγ
Iso
抗-mIL-2R
mIL-2Rβ
mIL-2Rα
合併
Iso
wt IL-2Rβ
正交IL-2Rβ
正交
CTLL-2
WT
CTLL-2
mIL-2Rβ

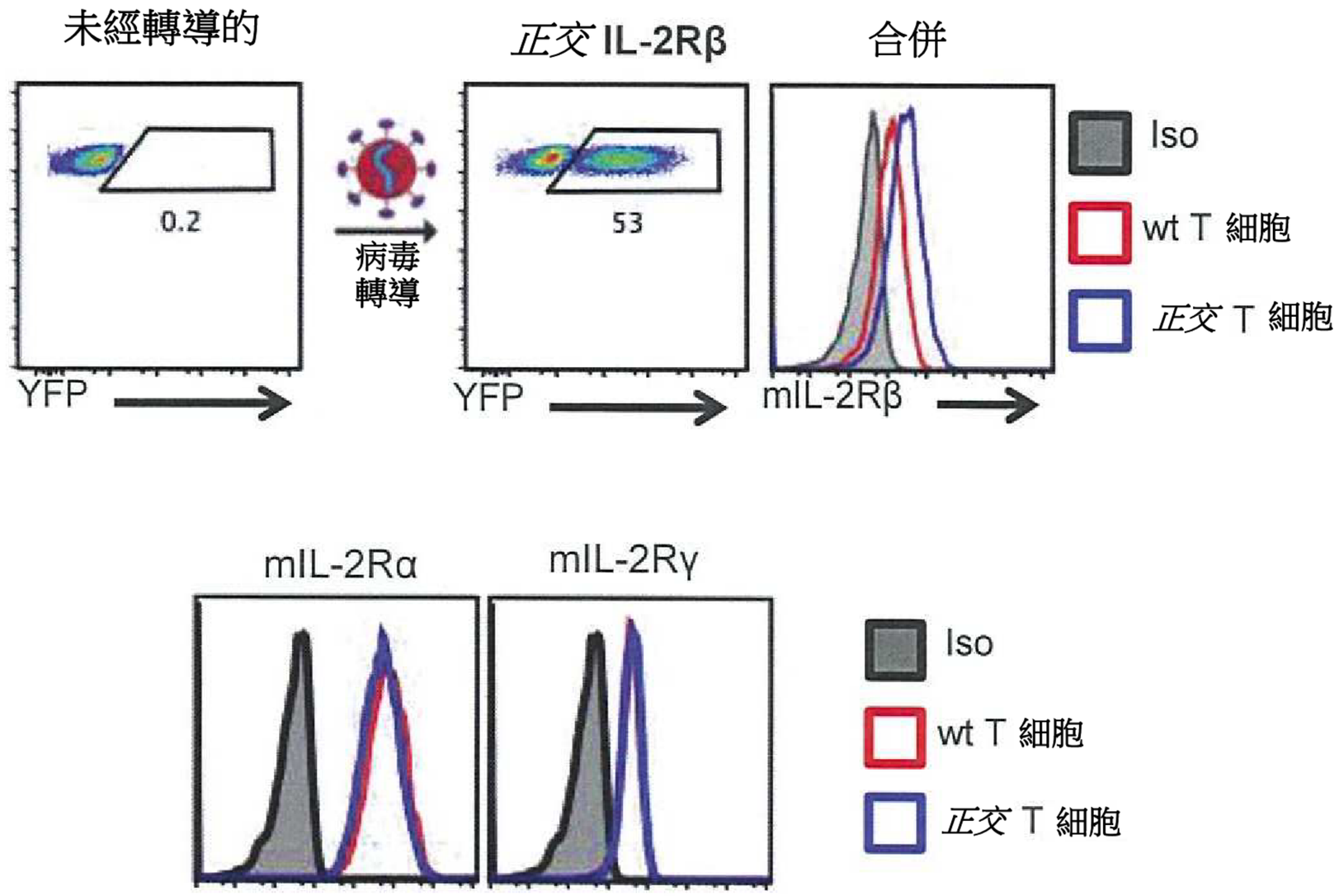
【圖 9】

IL-2 選殖株	CTLL-2 T 細胞株		
	EC_{50} 野生型 (pM)	EC_{50} 正交 (pM)	WT / 正交
WT	1.0	0.6	2
145	1021	20	51
146	40	2	17
147	15	1	14
148	4618	369	13
149	971	15	67
150	140	11	12
151	3382	53	64
157	129400	1543	84
160	16000	2021	8
161	19270	45760	0
162	80640	248	325
163	2104	1080	2
165	39780	21720	2
170	304	470	1
172	555	44	13
173	32830	9067	4
175	831	80	10
176	79220	15020	5
177	89150	345	258
180	1625	18	89
181	4555	67	68
182	5524	813	7
183	15400	1121	14

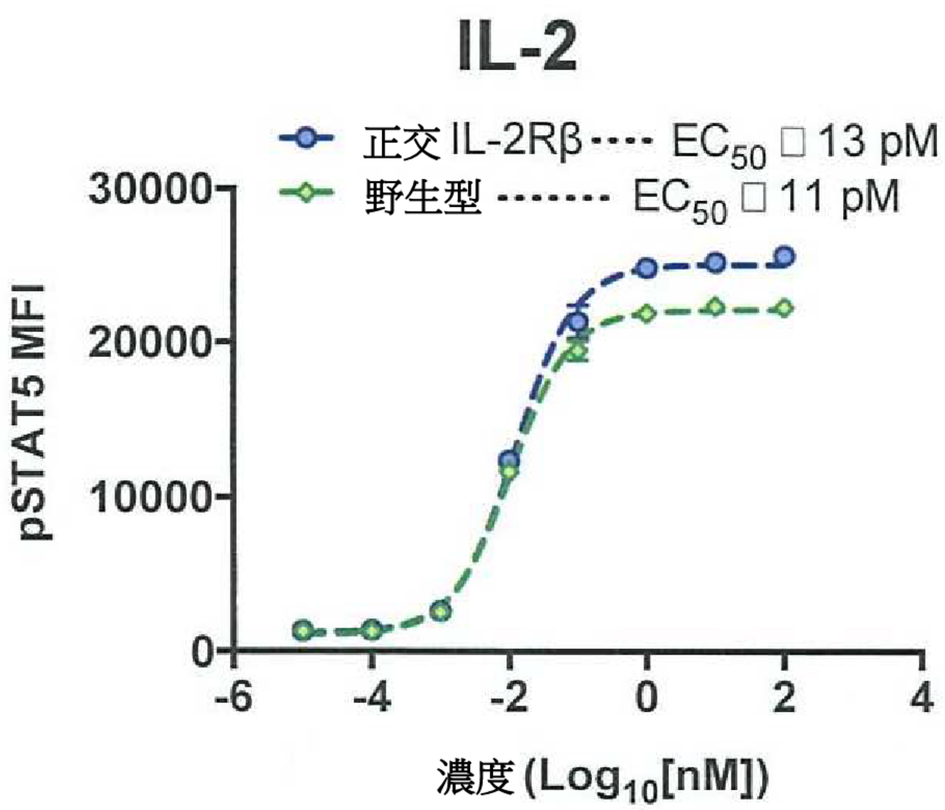
【圖 10】

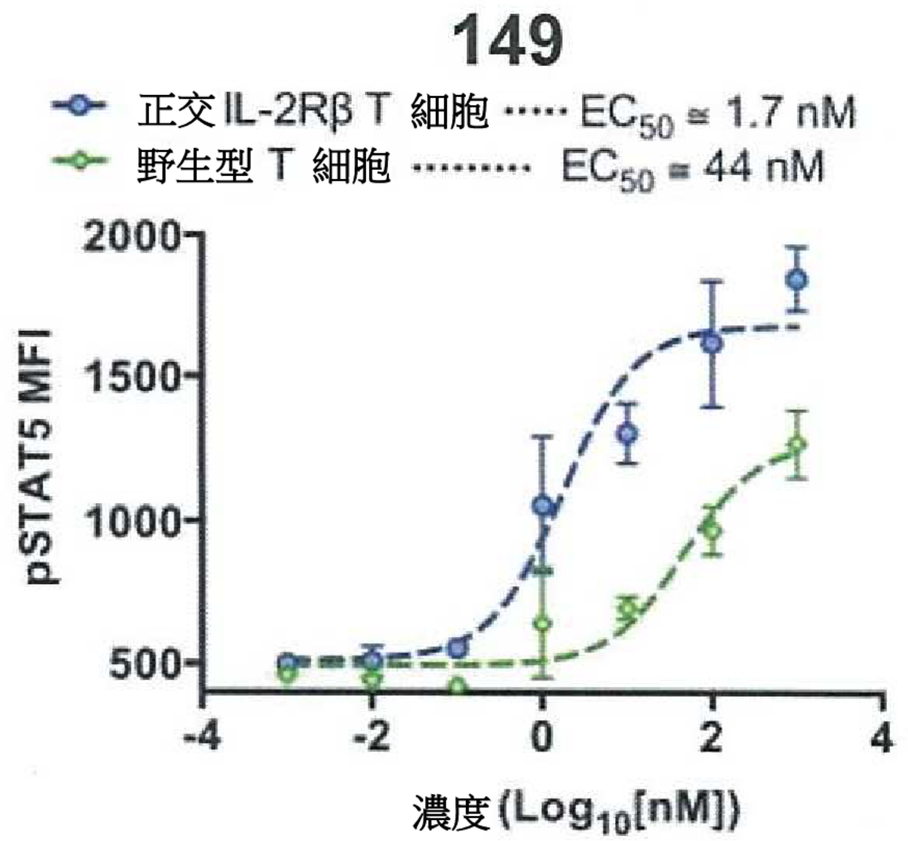

IL-2
正交 IL-2Rβ CTLL-2 ---- EC50 □ 1 pM
野生型 CTLL-2 ..... EC50 □ 1 pM
pSTAT5 MFI (%)
濃度 (Log10[nM])
145
正交 IL-2Rβ CTLL-2---- EC50 = 19 pM
野生型 CTLL-2..... EC50 = 1000 pM
149
正交 IL-2Rβ CTLL-2 ---- EC50 □ 8 pM
野生型 CTLL-2 ..... EC50 □ 375 pM
157
正交IL-2Rβ CTLL-2 ---- EC50 = 1500 pM
野生型 CTLL-2 ..... EC50 = 129000 pM
162
正交IL-2Rβ CTLL-2 ---- EC50 □ 0.3 nM
野生型 CTLL-2 ..... EC50 □ 80 nM
177
正交 IL-2Rβ CTLL-2 ---- EC50 = 345 pM
野生型 CTLL-2 ..... EC50 = 89150 pM
182
EC50 = 1 nM
不良促效劑

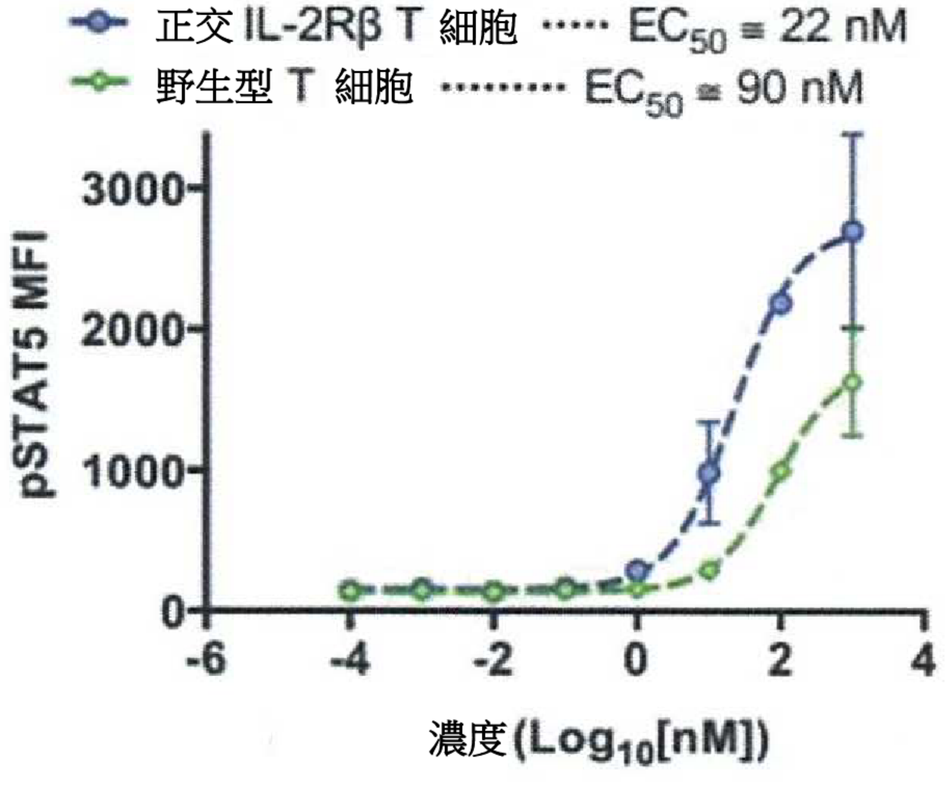
【圖 11】

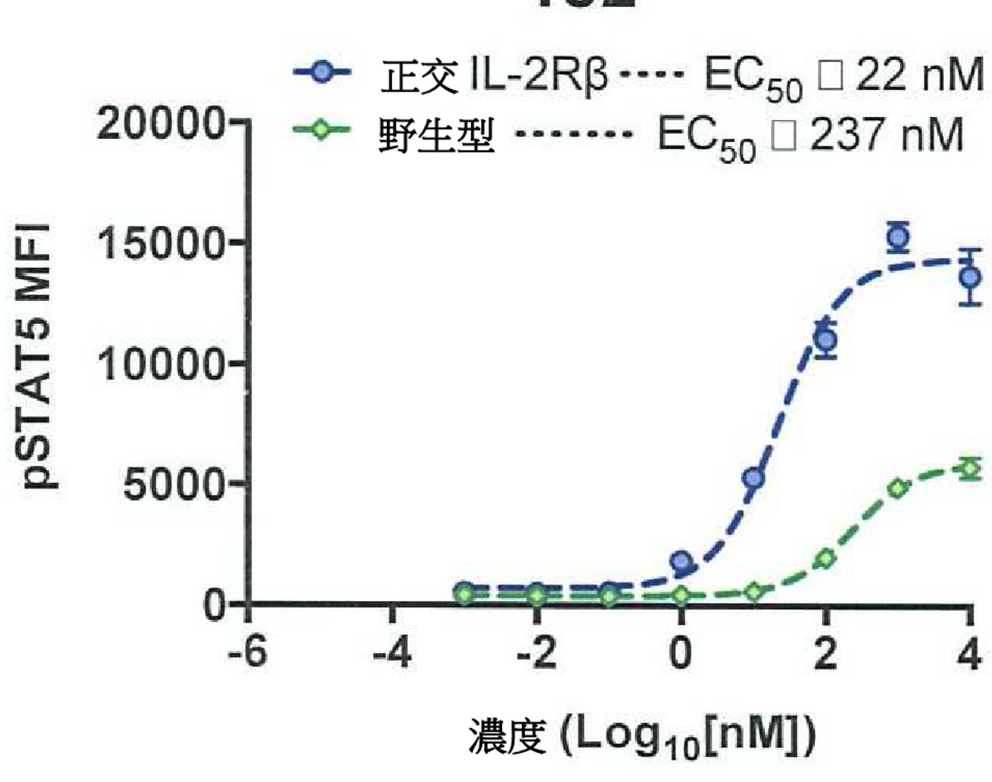

未經轉導的
正交 IL-2Rβ
合併
0.2
病毒
轉導
53
YFP
YFP
mIL-2Rβ
Iso
wt T 細胞
正交 T 細胞
mIL-2Rα
mIL-2Rγ
Iso
wt T 細胞
正交 T 細胞

【圖 12】

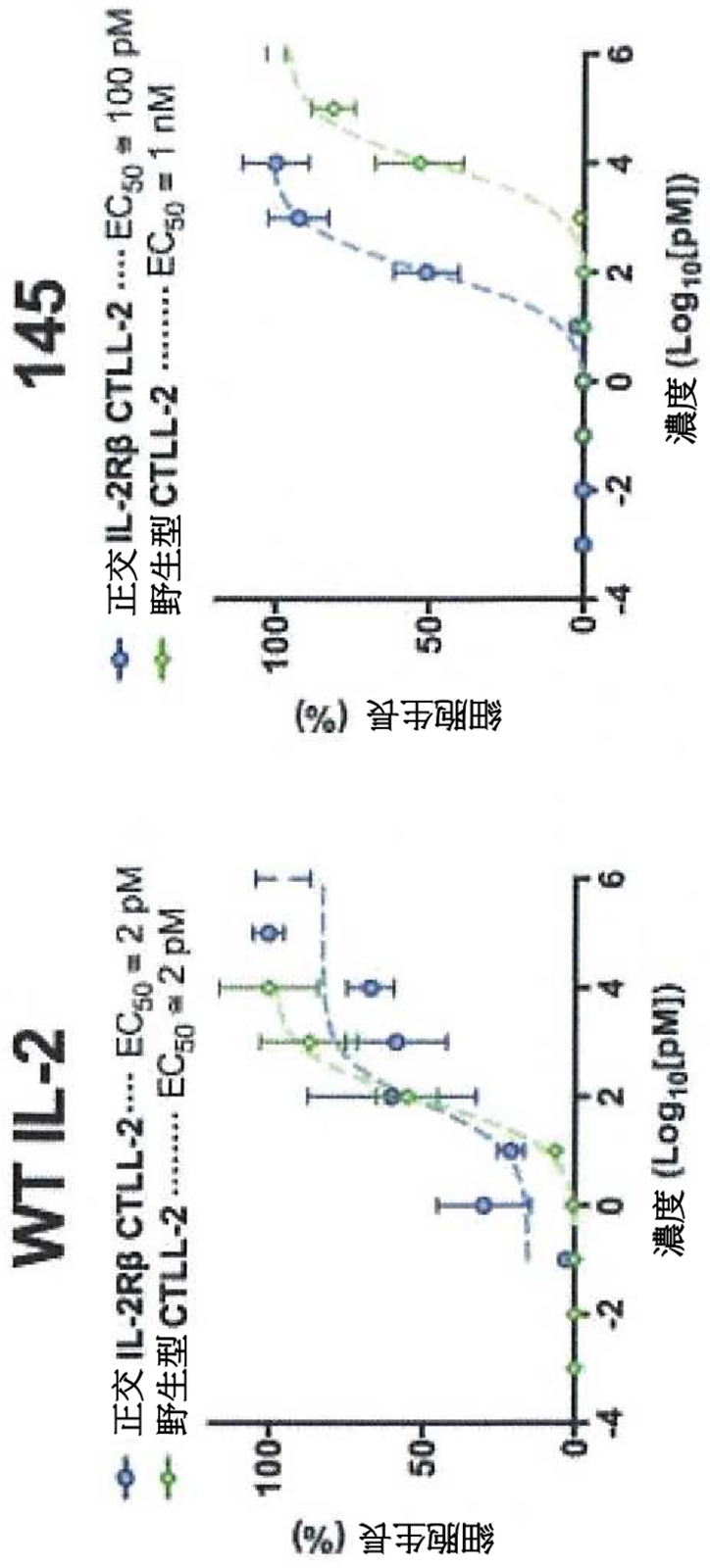

IL-2
正交 IL-2Rβ ···· EC50 □ 13 pM
野生型 ------- EC50 □ 11 pM
pSTAT5 MFI
30000
20000
10000
0
-6
-4
-2
0
2
4
濃度 (Log10[nM])


149
正交 IL-2Rβ T 細胞 ····· EC50 ≈ 1.7 nM
野生型 T 細胞 ····· EC50 ≈ 44 nM
pSTAT5 MFI
2000
1500
1000
500
-4
-2
0
2
4
濃度 (Log10[nM])


162
正交 IL-2Rβ T 細胞 ····· EC50 ≈ 22 nM
野生型 T 細胞 ····· EC50 ≈ 90 nM
pSTAT5 MFI
3000
2000
1000
0
-6
-4
-2
0
2
4
濃度 (Log10[nM])


182
正交 IL-2Rβ ···· EC50 □ 22 nM
野生型 ------- EC50 □ 237 nM
pSTAT5 MFI
20000
15000
10000
5000
0
-6
-4
-2
0
2
4
濃度 (Log10[nM])

【圖 13】


145
正交 IL-2Rβ CTLL-2 .... EC50 = 100 pM
野生型 CTLL-2 ..... EC50 = 1 nM
細胞生長 (%)
100
50
0
-4
-2
0
2
4
6
濃度 (Log10[pM])

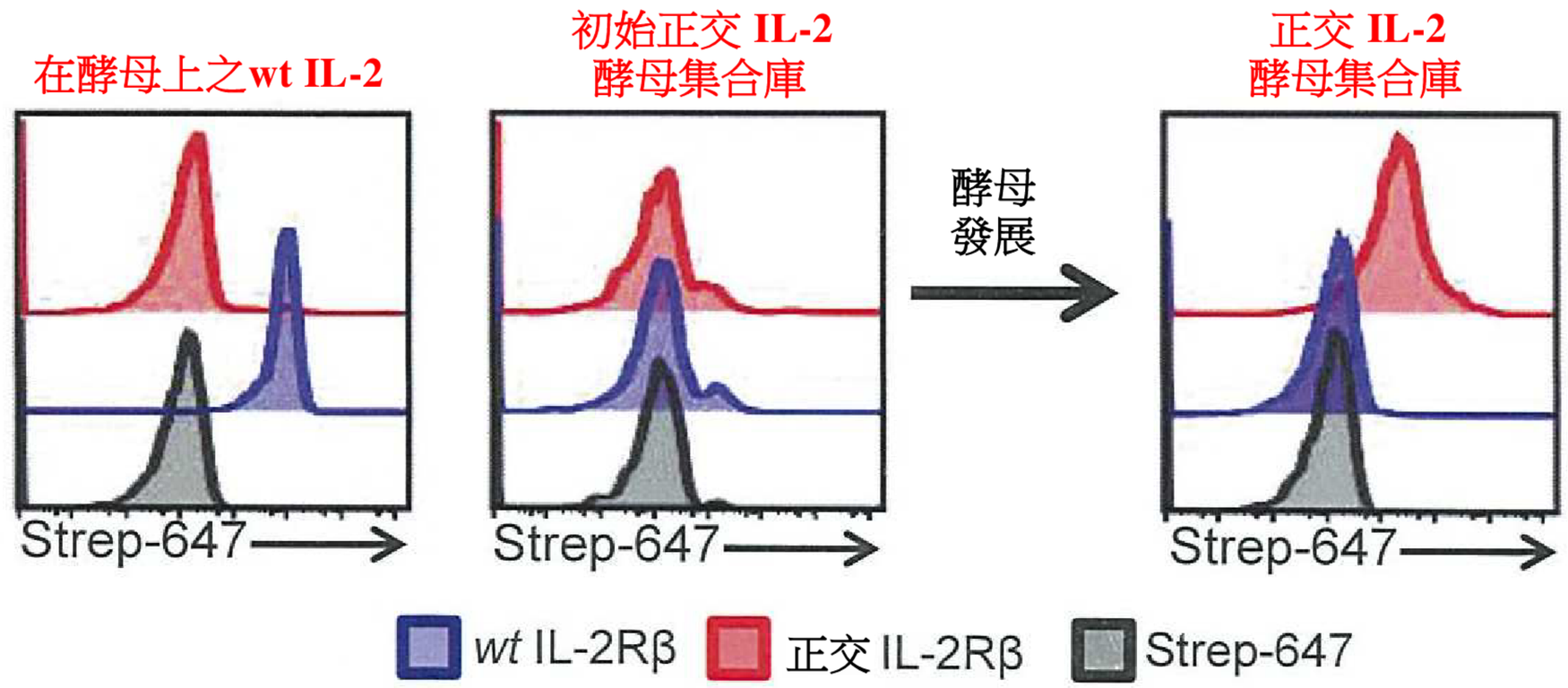
WT IL-2
正交 IL-2Rβ CTLL-2.... EC50 = 2 pM
野生型 CTLL-2 ..... EC50 = 2 pM
細胞生長 (%)
100
50
0
-4
-2
0
2
4
6
濃度 (Log10[pM])

【圖14】

```
IL2RB_人          1    AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDGALQDTSCQVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWAC   60
IL2RB_小鼠        1    AVKNCSHLECFYNSRANVSCMWSHEEALNVTTCHVHAKSNLRHWNKTCELTLVRQASWAC   60
                       **:  *:: ********:**:**:: **: *:*:***  : *:**:****  * ******

IL2RB_人         61    NLILGA-PDSQKLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRLMAPISLQVVHVET  119
IL2RB_小鼠       61    NLILGSFPESQSLTSVDLLDINVVCWEEKGWRRVKTCDFHPFDNLRLVAPHSLQVLHIDT  120
                       *****: *:**.**:**:: :.*:* *   ** :   **:**:****:** ****:*::*

IL2RB_人         120   HRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLTPDTQYE  179
IL2RB_小鼠       121   QRCNISWKVSQVSHYIEPYLEFEARRRLLGHSWEDASVLSLKQRQQWLFLEMLIPSTSYE  180
                       :******::**.***:* :******    **:**:* :*:***:*:*: ** * *.*.**

IL2RB_人         180   FQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTKPAALGKDT--IPWLGHLLVGLSGAFGFIILVYL  237
IL2RB_小鼠       181   VQVRVKAQRNNTGTWSPWSQPLTFRTRPADPMKEILPMSWLRYLLLVLGCFSGFFSCVYI  240
                       .*****  : :  *********:***:**   *:   : ** :**: *.   **:  **:
```

```
IL2_人           1    APTSSSTSSSTAEAQQQQQQQQQQQQHLEQLLMDLQELLSRMENYRNLKLPRMLTFKFYL   60
IL2_小鼠         1    APTSS--------------STKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYM   46
                      *****               . :: * :**:**:*** :*. ::**:* ** ********:

IL2_小鼠         61   PKQATELKDLQCLEDELGPLRHVLDLTQSKSFQLEDAENFISNIRVTVVKLKGSDNTFEC  120
IL2_人           47   PKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRP-RDLISNINVIVLELKGSETTFMC  105
                      **:*****.*****:** **..**:*:***.*:*.  .::****.* *::****:.** *

IL2_小鼠         121  QFDDESATVVDFLRRWIAFCQSIISTSPQ                                149
IL2_人           106  EYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT-                                133
                      :: **:**:*:**.***:********
```

【圖 15】



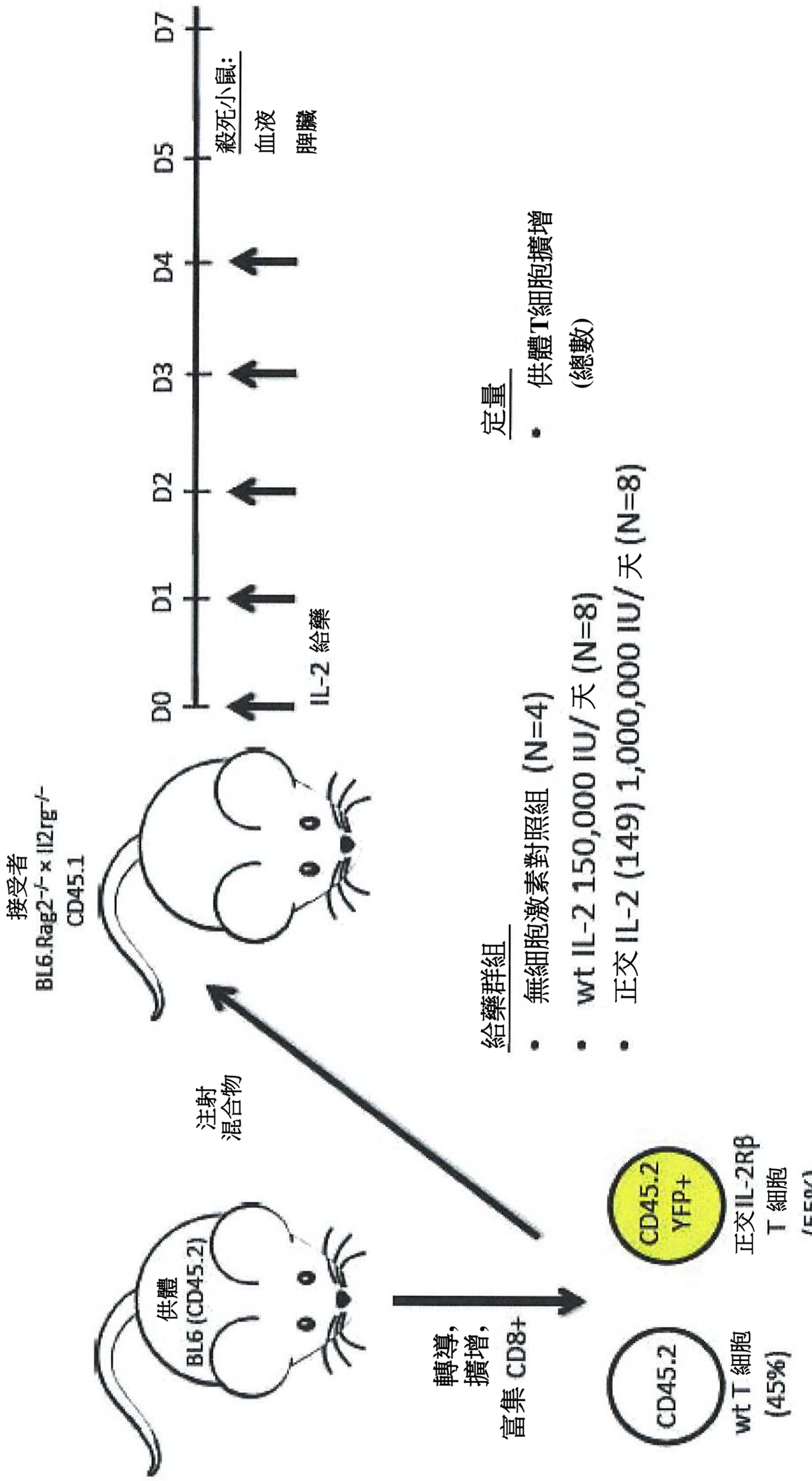
【圖 16A】 【圖 16B】

	15	16	19	20	22	23
WT	E	H	L	D	Q	M
C1	S	Q	V	T	K	L
C2	S	Q	V	S	K	L
C3	S	Q	V	S	K	L
C4	S	Q	I	S	K	L
C5	S		V	M	K	S
C6	T	Q	V	S		S
C7	Q		V	M	K	S
C8	Q	Q	V	T	K	V
C9	H	Q	I	S	K	L
C10	H	Q	I	L	K	T
C11			V	M	N	S

【圖 16C】

	15	16	19	20	23
WT	E	H	L	D	M
C1	H	Q	S	I	E
C2	T	Q	V	T	I
C3	T	Q	I	T	I
C4	T	Q	I	T	T
C5	D	N	I	M	F
C6	S	Q	V	L	Q
C7	K	Q	I	T	V
C8	I	Q	I	S	T
C9	K	Q	V	M	L
C10	K	Q	V	T	L
C11	V	Q	V	S	L
C12		N	V	M	A
C13	K		I	M	Q
C14	S	Q	V	L	V

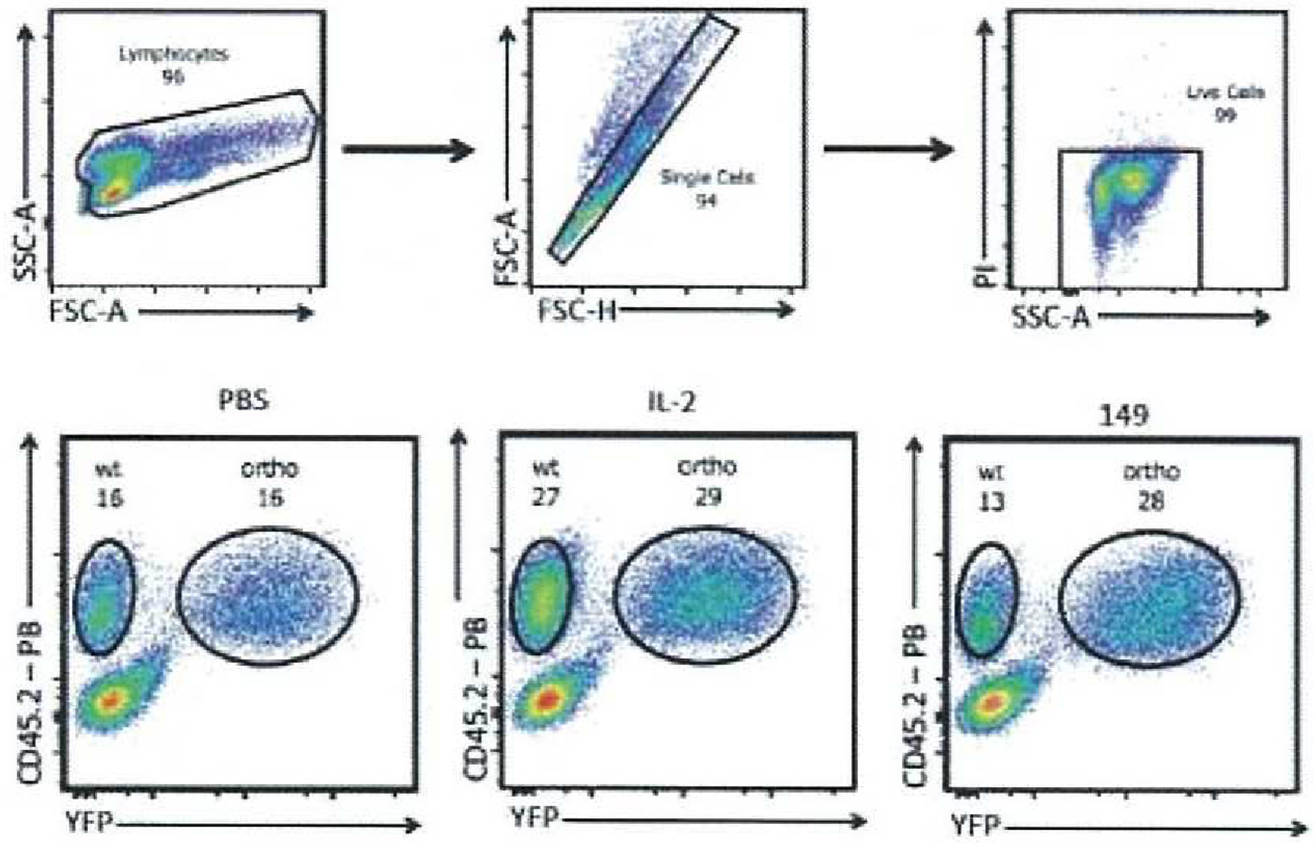
【圖 16D】


D7
D5
殺死小鼠：
血液
脾臟
D1
D2
D3
D4
IL-2 給藥
定量
• 供體T細胞擴增
(總數)
(N=8)
00 IU/ 天 (N=8)
給藥群組
• 無細胞激素對照組 (N=4)
• wt IL-2 150,000 IU/ 天 (N
• 正交 IL-2 (149) 1,000,000
接受者
BL6.Rag2-/- × Il2rg-/-
CD45.1
D0
IL-2 給藥
注射
混合物
供體
BL6 (CD45.2)
轉導，
擴增，
富集 CD8+
CD45.2
YFP+
正交IL-2Rβ
T 細胞
(55%)
CD45.2
wt T 細胞
(45%)

【圖 17】

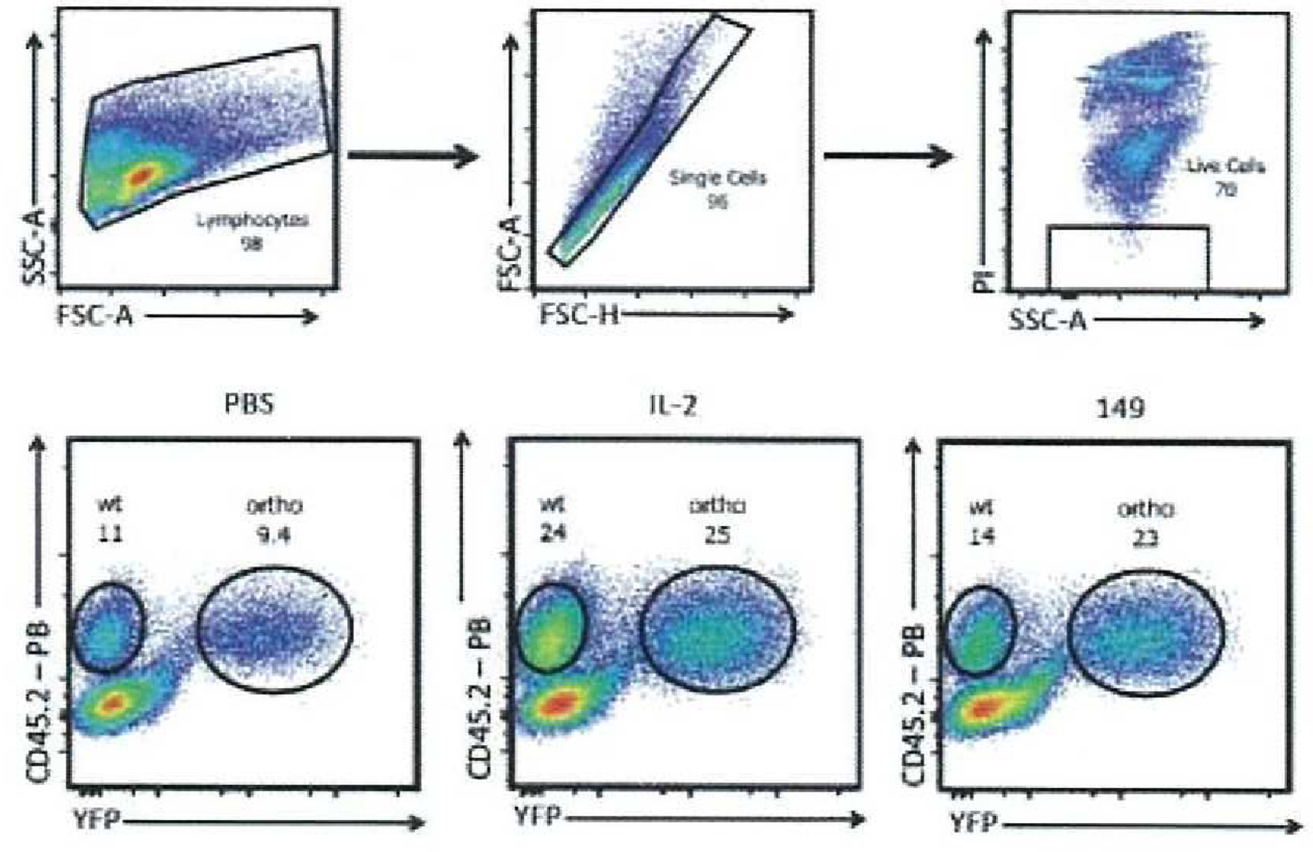
血液中之正交**IL-2 1G12 (149)** 門控策略

【圖 18A】



脾臟中之正交**IL-2 1G12 (149)** 門控策略

【圖 18B】

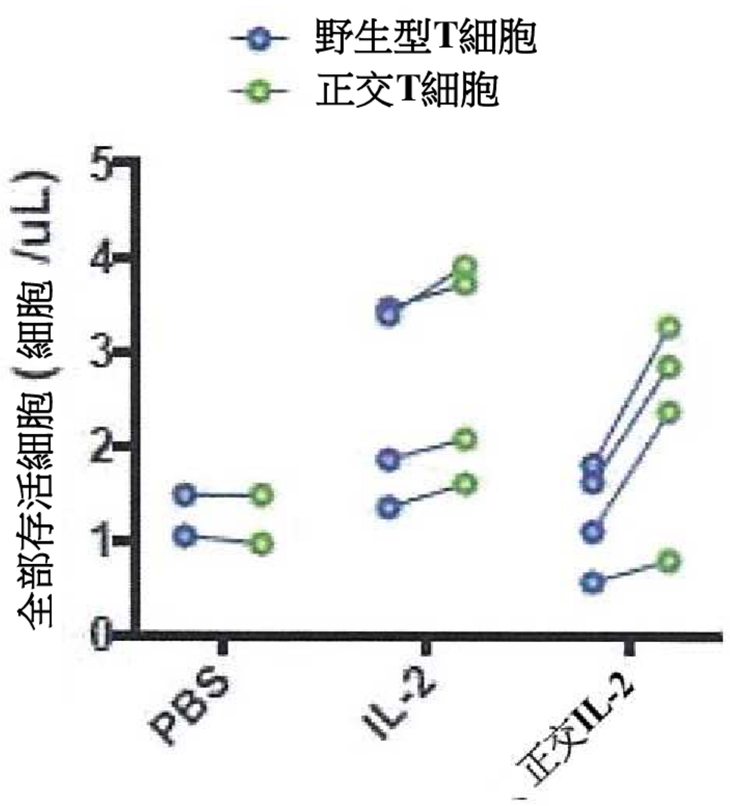


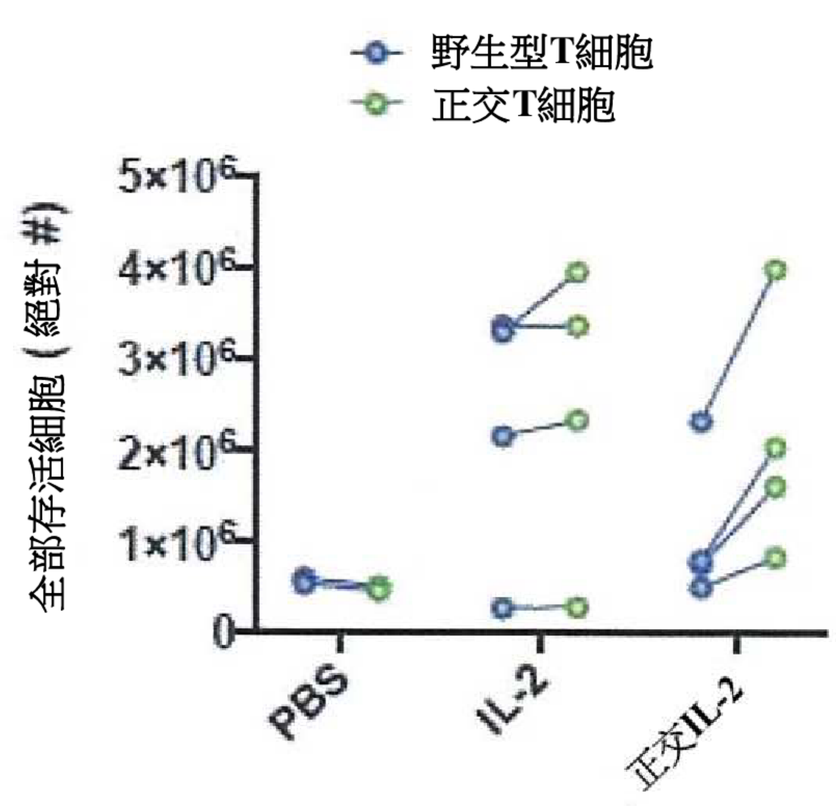
正交IL-2 1G12 (149)活體內擴增正交T細胞

血液

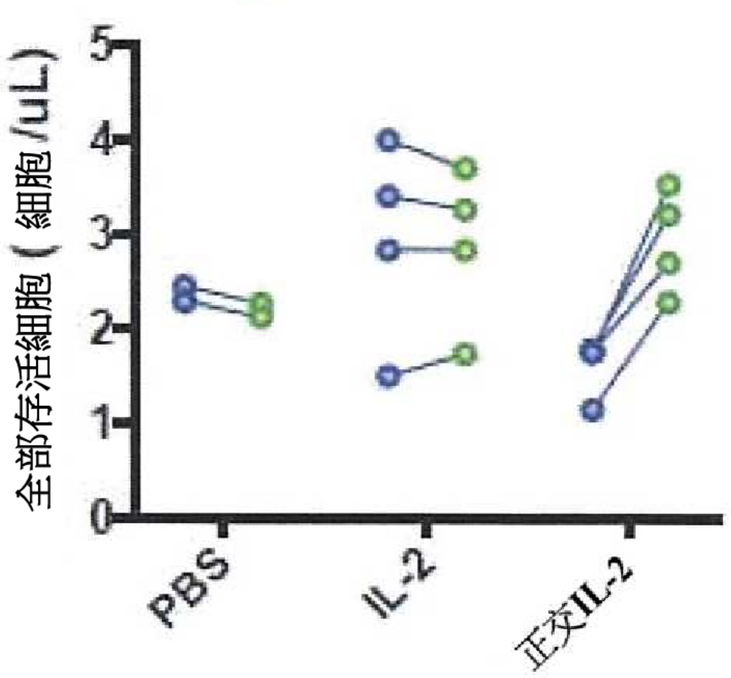
脾臟

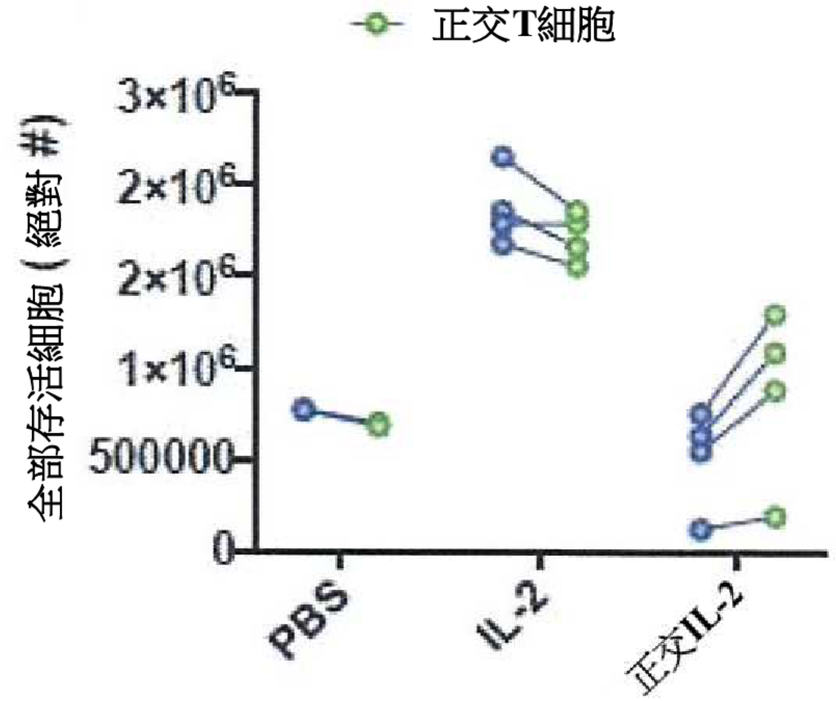
第5天





第7天

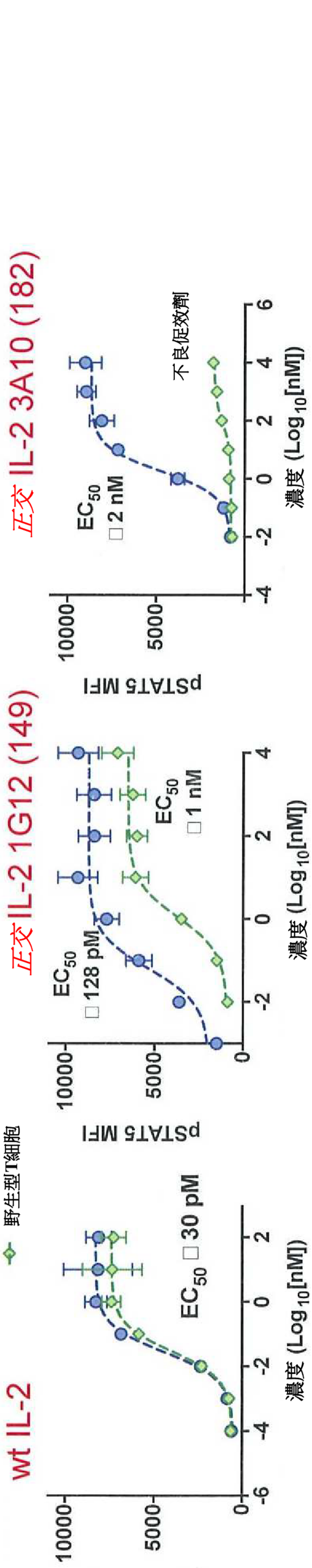




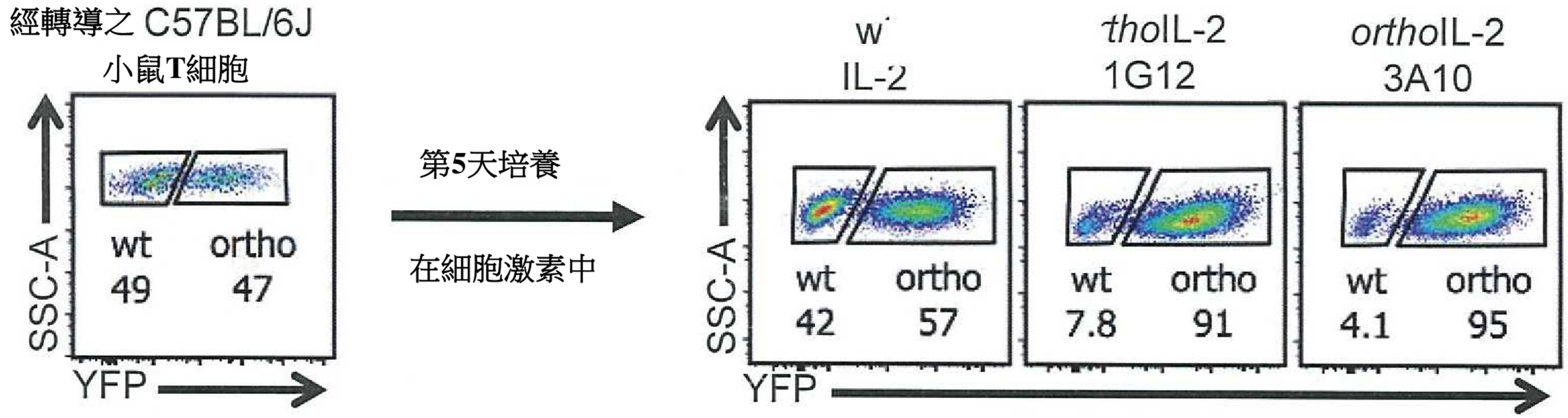
【圖 19】

野生型 IL-2Rβ
正交 IL-2Rβ
合併
正交 IL-2Rβ
53
0.2
未經轉導的
Iso
SSC-A
YFP
IL-2Rβ

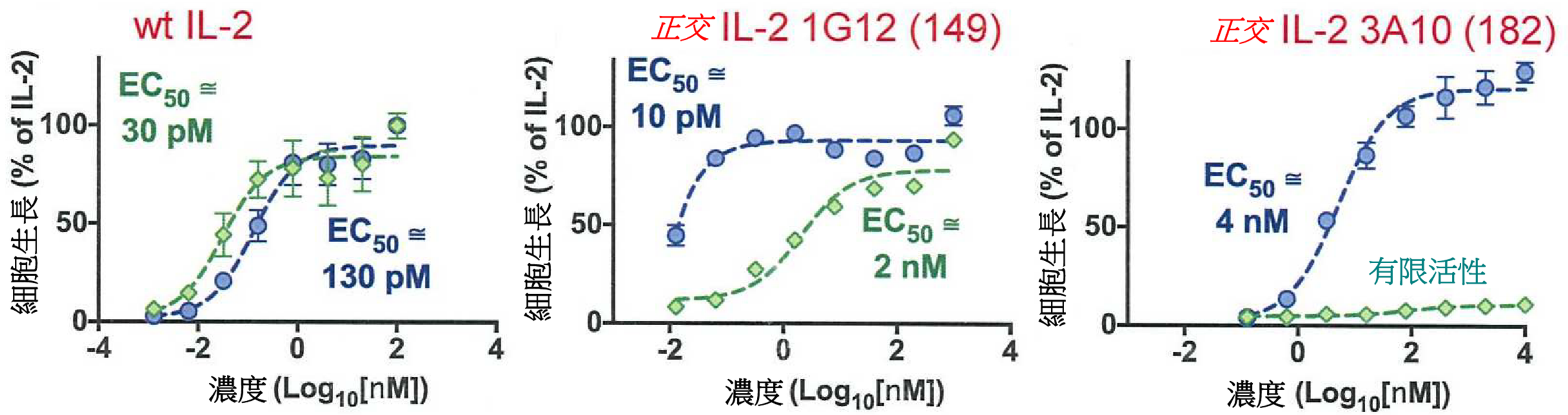
【圖 20A】


正交 IL-2 3A10 (182)
不良促效劑
EC50
2 nM
pSTAT5 MFI
濃度 (Log10[nM])
正交 IL-2 1G12 (149)
EC50
1 nM
正交 IL-2Rβ T 細胞
野生型T細胞
正交 IL-2 1B11 (185)
EC50
128 pM
EC50
30 pM
wt IL-2

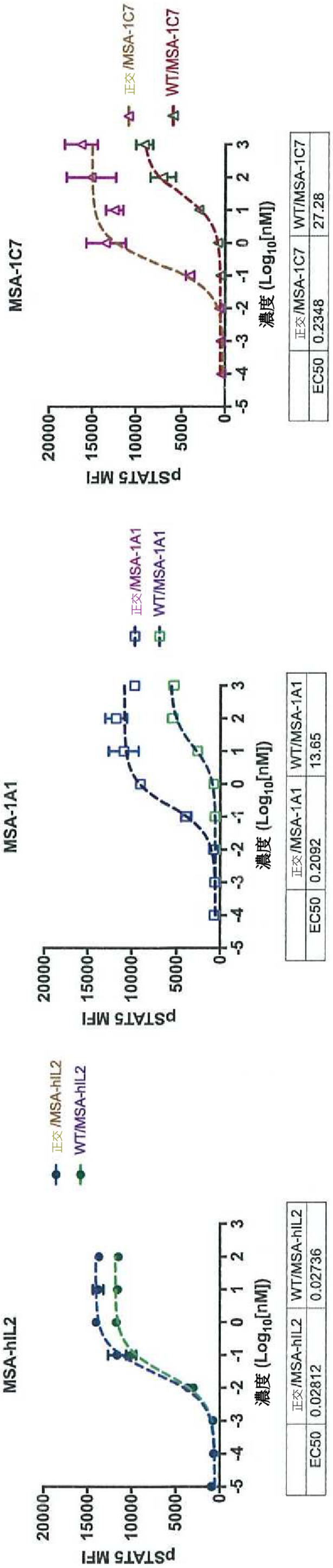
【圖 20B】


經轉導之 C57BL/6J
小鼠T細胞
SSC-A
YFP
wt
49
ortho
47
第5天培養
在細胞激素中
wt
IL-2
thoIL-2
1G12
orthoIL-2
3A10
wt
42
ortho
57
wt
7.8
ortho
91
wt
4.1
ortho
95

【圖 21A】


wt IL-2
EC50 ≅
30 pM
EC50 ≅
130 pM
正交 IL-2 1G12 (149)
EC50 ≅
10 pM
EC50 ≅
2 nM
正交 IL-2 3A10 (182)
EC50 ≅
4 nM
有限活性
細胞生長 (% of IL-2)
濃度 (Log10[nM])

【圖 21B】



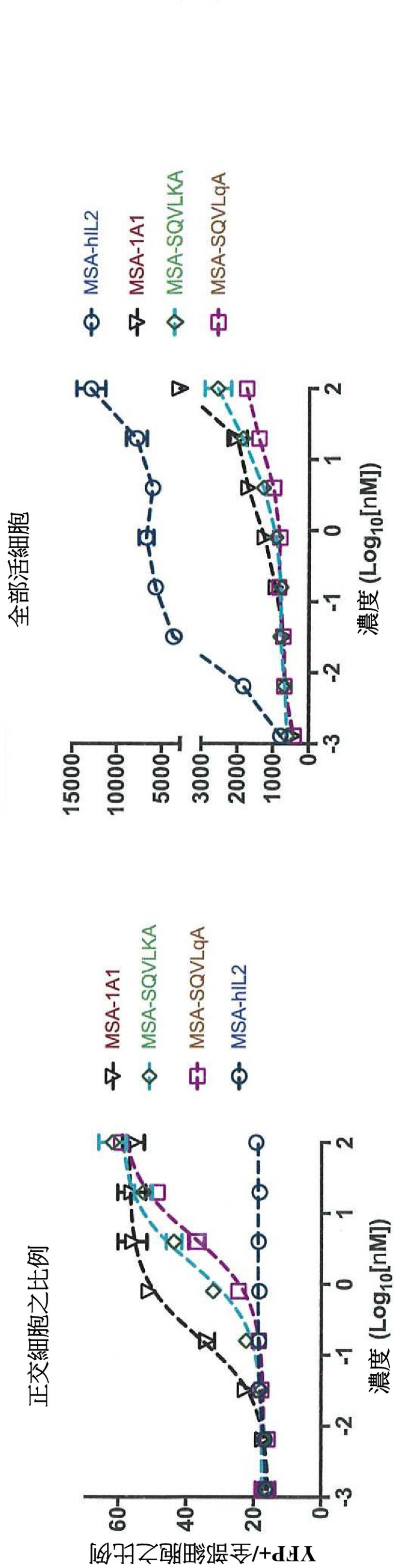
【圖 22C】

【圖 22B】

【圖 22A】

【圖 22E】

【圖 22D】


MSA-hIL2
MSA-1A1
MSA-SQVLKA
MSA-SQVLqA
全部活細胞
15000
10000
5000
3000
2000
1000
0
-3
-2
-1
0
1
2
濃度 (Log10[nM])

【圖 23B】

MSA-1A1
MSA-SQVLKA
MSA-SQVLqA
MSA-hIL2
正交細胞之比例
60
40
20
0
-3
-2
-1
0
1
2
濃度 (Log10[nM])
YFP+/全部細胞之比例

【圖 23A】