(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112888786 A
(43)申请公布日 2021.06.01

(21)申请号 201980067513.5

(22)申请日 2019.09.06

(30)优先权数据
62/728,306 2018.09.07 US
62/728,338 2018.09.07 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.04.13

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/050013 2019.09.06

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/051493 EN 2020.03.12

(71)申请人 SOTIO有限责任公司
地址 美国马塞诸塞州

(72)发明人 K.麦金尼斯 S.埃坦伯格 L.巴伦 M.弗雷 C.威尔逊 G.莫茨

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
代理人 张文辉

(51)Int.Cl.
C12N 15/52(2006.01)
C12N 15/62(2006.01)
C12N 15/63(2006.01)

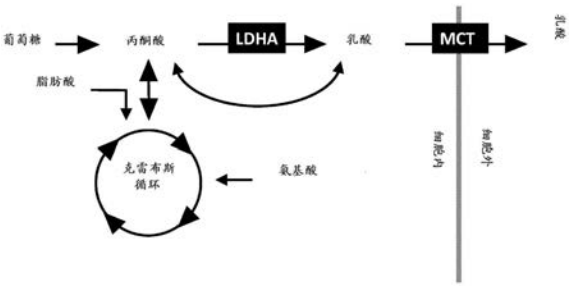
权利要求书7页 说明书100页 附图18页

(54)发明名称

与调节细胞内乳酸浓度的反式代谢分子组合的嵌合受体多肽及其治疗用途

(57)摘要

本文公开了遗传工程化的造血细胞，所述遗传工程化的造血细胞表达一种或多种乳酸调节因子(例如，多肽)和任选的嵌合受体多肽(例如，抗体偶联的T细胞受体(ACTR)多肽或嵌合抗原受体(CAR)多肽)，所述嵌合受体多肽能够与感兴趣的靶抗原结合。本文还公开了工程化的造血细胞用于抑制在有需要的受试者中表达靶抗原的细胞的用途。



CN 112888786 A

1.一种遗传工程化的造血细胞,所述遗传工程化的造血细胞与相同类型的天然造血细胞相比具有增强的细胞内乳酸浓度。

2.如权利要求1所述的遗传工程化的造血细胞,所述遗传工程化的造血细胞表达或过表达

(i)乳酸调节因子。

3.如权利要求2所述的遗传工程化的造血细胞,其中所述乳酸调节因子为乳酸调节多肽。

4.如权利要求3所述的遗传工程化的造血细胞,其中所述乳酸调节多肽是单羧酸转运蛋白(MCT)、参与乳酸合成的酶或抑制竞争乳酸合成底物的途径的多肽。

5.如权利要求4所述的遗传工程化的造血细胞,其中所述MCT为MCT1、MCT2或MCT4。

6.如权利要求4所述的遗传工程化的造血细胞,其中所述参与乳酸合成的酶是乳酸脱氢酶A(LDHA)。

7.如权利要求4所述的遗传工程化的造血细胞,其中所述抑制竞争乳酸合成底物的途径的多肽是丙酮酸脱氢酶激酶1(PDK1)。

8.如权利要求1-7中任一项所述的遗传工程化的造血细胞,所述遗传工程化的造血细胞还表达:

(ii)嵌合受体多肽,其中所述嵌合受体多肽包含:

(a)细胞外靶结合结构域;

(b)跨膜结构域;以及

(c)细胞质信号传导结构域。

9.如权利要求8所述的遗传工程化的造血细胞,其中所述嵌合受体多肽为抗体偶联的T细胞受体(ACTR)多肽,在抗体偶联的T细胞受体中(a)为细胞外Fc结合结构域。

10.如权利要求8所述的遗传工程化的造血细胞,其中所述嵌合受体多肽为嵌合受体抗原(CAR)多肽,在所述嵌合受体抗原多肽中(a)为细胞外抗原结合结构域。

11.如权利要求8-10中任一项所述的遗传工程化的造血细胞,其中所述嵌合受体多肽还包含至少一个共刺激信号传导结构域。

12.如权利要求8-10中任一项所述的遗传工程化的造血细胞,其中所述嵌合受体多肽任选为ACTR多肽,不含共刺激信号传导结构域。

13.如权利要求8-12中任一项所述的遗传工程化的造血细胞,其中所述细胞质信号传导结构域包含基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)。

14.如权利要求8-13中任一项所述的遗传工程化的造血细胞,其中(c)位于所述嵌合受体多肽的C末端处。

15.如权利要求8-14中任一项所述的遗传工程化的造血细胞,其中所述嵌合受体多肽还包含铰链结构域,所述铰链结构域位于(a)的C末端处和(b)的N末端处。

16.如权利要求8-15中任一项所述的遗传工程化的造血细胞,其中所述嵌合受体多肽在其N末端处还包含信号肽。

17.如权利要求8-16中任一项所述的遗传工程化的造血细胞,其中所述嵌合受体多肽为ACTR多肽,在所述ACTR多肽中所述细胞外靶结合结构域(a)为细胞外Fc结合结构域,并且其中所述Fc结合结构域选自由以下组成的组:

(A)Fc受体的细胞外配体结合结构域，

(B)结合免疫球蛋白的所述Fc部分的抗体片段，

(C)结合免疫球蛋白的所述Fc部分或其Fc结合片段的天然存在的蛋白质，以及

(D)结合免疫球蛋白的所述Fc部分的合成多肽。

18.如权利要求17所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述Fc结合结构域为(A)，所述(A)为Fc-γ受体、Fc-α受体或Fc-ε受体的细胞外配体结合结构域。

19.如权利要求18所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述Fc结合结构域为CD16A、CD32A或CD64A的细胞外配体结合结构域。

20.如权利要求18所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述Fc结合结构域为F158 CD16A或V158 CD16A的细胞外配体结合结构域。

21.如权利要求17所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述Fc结合结构域为(B)，所述(B)为单链可变片段(scFv)或单结构域抗体。

22.如权利要求17所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述Fc结合结构域为(C)，所述(C)为蛋白A或蛋白G，或它们的Fc结合片段。

23.如权利要求17所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述Fc结合结构域为(D)，所述(D)为Kunitz肽、SMIP、avimer、亲和体、DARPin或抗运载蛋白。

24.如权利要求8-16中任一项所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述嵌合受体多肽为CAR多肽，在所述CAR多肽中(a)的细胞外靶结合结构域为抗原结合结构域，并且其中所述抗原结合结构域为单链抗体片段，所述单链抗体片段与肿瘤抗原、病原性抗原或对自身抗原有特异性的免疫细胞结合。

25.如权利要求24所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述肿瘤抗原与血液肿瘤相关。

26.如权利要求25所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述肿瘤抗原选自由以下组成的组：CD19、CD20、CD22、κ链、CD30、CD123、CD33、LeY、CD138、CD5、BCMA、CD7、CD40和IL-1RAP。

27.如权利要求24所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述肿瘤抗原与实体瘤相关。

28.如权利要求27所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述肿瘤抗原选自由以下组成的组：GD2、GPC3、FOLR、HER2、EphA2、EFGRVIII、IL13RA2、VEGFR2、ROR1、NKG2D、EpCAM、CEA、间皮素、MUC1、CLDN18.2、CD171、CD133、PSCA、cMET、EGFR、PSMA、FAP、CD70、MUC16、L1-CAM和CAIX。

29.如权利要求24所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述病原性抗原为细菌抗原、病毒抗原或真菌抗原。

30.如权利要求8-29中任一项所述的遗传工程化的造血细胞，其中(b)的所述跨膜结构域属于单穿膜蛋白。

31.如权利要求30所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述跨膜结构域属于选自由以下组成的组的膜蛋白：CD8α、CD8β、4-1BB、CD28、CD34、CD4、FcεRIγ、CD16A、OX40、CD3ζ、CD3ε、CD3γ、CD3δ、TCRα、CD32、CD64、VEGFR2、FAS和FGFR2B。

32.如权利要求8-29中任一项所述的遗传工程化的造血细胞，其中(b)的所述跨膜结构域为非天然存在的疏水性蛋白区段。

33.如权利要求8-11和13-32中任一项所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述至少一个共刺激信号传导结构域属于选自由以下组成的组的共刺激分子：4-1BB、CD28、$CD28_{LL\rightarrow GG}$

变体、OX40、ICOS、CD27、GITR、ICOS、HVEM、TIM1、LFA1和CD2。

34.如权利要求33所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述至少一个共刺激信号传导结构域为CD28共刺激信号传导结构域或4-1BB共刺激信号传导结构域。

35.如权利要求8-11和13-34中任一项所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述嵌合受体多肽包含两个共刺激信号传导结构域。

36.如权利要求35所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述两个共刺激结构域为：

(i)CD28和4-1BB；或者

(ii)$CD28_{LL\ GG}$变体和4-1BB。

37.如权利要求35所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述共刺激信号传导结构域中的一个为CD28共刺激信号传导结构域；并且其中另一个共刺激结构域选自由以下组成的组：4-1BB共刺激信号传导结构域、OX40共刺激信号传导结构域、CD27共刺激信号传导结构域和ICOS共刺激信号传导结构域。

38.如权利要求8-37中任一项所述的遗传工程化的造血细胞，其中(c)的所述细胞质信号传导结构域为CD3ζ或FcεR1γ的细胞质结构域。

39.如权利要求15-38中任一项所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述铰链结构域的长度为1至60个氨基酸。

40.如权利要求15-39中任一项所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述铰链结构域属于CD28、CD16A、CD8α或IgG。

41.如权利要求15-40中任一项所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述铰链结构域为非天然存在的肽。

42.如权利要求41所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述铰链结构域为延伸的重组多肽(XTEN)或$(Gly_4Ser)_n$多肽，其中n为3-12的整数，包括端值在内。

43.如权利要求8-14和16-38中任一项所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述嵌合受体多肽任选为ACTR多肽，不含任何铰链结构域。

44.如权利要求8-42中任一项所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述嵌合受体任选为ACTR多肽，不含来自任何非CD16A受体的铰链结构域。

45.如权利要求17所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述ACTR多肽包含(i)CD28共刺激结构域；以及(ii)CD28跨膜结构域、CD28铰链结构域或它们的组合。

46.如权利要求17所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述ACTR多肽包含如表4所示的组分(a)-(e)。

47.如权利要求17所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述ACTR多肽包含选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:80的氨基酸序列。

48.如权利要求24所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述嵌合受体多肽为CAR多肽，所述CAR多肽包含(i)CD28共刺激结构域与CD28跨膜结构域、CD28铰链结构域或它们的组合的组合，或(ii)4-1BB共刺激结构域与CD8跨膜结构域、CD8铰链结构域或它们的组合的组合。

49.如权利要求24所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述CAR多肽包含SEQ ID NO:97或SEQ ID NO:98的氨基酸序列。

50.如权利要求1-49中任一项所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述造血为造血干

细胞或免疫细胞，任选地其中所述免疫细胞是自然杀伤细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞或T细胞。

51.如权利要求50所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述免疫细胞为T细胞，在所述T细胞中内源性T细胞受体、内源性主要组织相容性复合物、内源性β-2-微球蛋白或它们的组合的表达已被抑制或消减。

52.如权利要求1-51中任一项所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述造血细胞为免疫细胞，所述免疫细胞来源于外周血单核细胞(PBMC)、造血干细胞(HSC)或诱导的多能干细胞(iPSC)。

53.如权利要求1-52中任一项所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述造血细胞包含核酸或核酸组，所述核酸或核酸组共同包含：

(A)编码所述乳酸调节因子的第一核苷酸序列；以及任选地

(B)编码所述嵌合受体多肽的第二核苷酸序列。

54.如权利要求53所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述核酸或所述核酸组为RNA分子或RNA分子组。

55.如权利要求53或54所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述造血细胞包含所述核酸，所述核酸包含所述第一核苷酸序列和所述第二核苷酸序列两者。

56.如权利要求55所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述核酸还包含第三核苷酸序列，所述第三核苷酸序列位于所述第一核苷酸序列与所述第二核苷酸序列之间，其中所述第三核苷酸序列编码核糖体跳跃位点、内部核糖体进入位点(IRES)或第二启动子。

57.如权利要求55所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述第三核苷酸序列编码核糖体跳跃位点，所述核糖体跳跃位点为P2A肽。

58.如权利要求53-57中任一项所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述核酸或所述核酸组包含在载体或载体组内。

59.如权利要求58所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述载体或载体组为表达载体或表达载体组。

60.如权利要求58或59所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述载体或载体组包括一个或多个病毒载体。

61.如权利要求60所述的遗传工程化的造血细胞，其中所述一个或多个病毒载体为逆转录病毒载体，所述逆转录病毒载体任选地为慢病毒载体或γ逆转录病毒载体。

62.一种药物组合物，所述药物组合物包含权利要求1-61中任一项所述的遗传工程化的造血细胞，以及药学上可接受的载体。

63.如权利要求62所述的药物组合物，其中所述遗传工程化的造血表达ACTR多肽，并且其中所述组合物还包含含Fc的治疗剂。

64.如权利要求63所述的药物组合物，其中所述含Fc的治疗剂为治疗性抗体或Fc融合蛋白。

65.如权利要求63或64所述的药物组合物，其中所述含Fc的治疗剂结合至靶抗原，所述靶抗原任选地为肿瘤抗原、病原性抗原或对自身抗原有特异性的免疫细胞。

66.如权利要求65所述的药物组合物，其中所述病原性抗原为细菌抗原、病毒抗原或真菌抗原。

67.如权利要求66所述的药物组合物，其中所述含Fc的治疗剂为选自由以下组成的组的治疗性抗体：阿达木单抗、恩美曲妥珠单抗、阿仑单抗、巴利昔单抗、贝伐单抗、贝利木单抗、本妥昔单抗、卡那单抗、西妥昔单抗、赛妥珠单抗、达利珠单抗、地诺单抗、地那妥昔单抗、依库珠单抗、依法利珠单抗、依帕珠单抗、吉妥珠单抗、戈利木单抗、hu14.18K322A、替伊莫单抗、英夫利昔单抗、伊匹木单抗、拉贝珠单抗、莫罗单抗、那他珠单抗、奥比妥珠单抗、奥法木单抗、奥马珠单抗、帕利珠单抗、帕尼单抗、帕妥珠单抗、雷莫芦单抗、兰尼单抗、利妥昔单抗、托珠单抗、曲妥珠单抗、托西莫单抗、优特克单抗和维多珠单抗。

68.一种药盒，所述药盒包含：

第一药物组合物，所述第一药物组合物包含权利要求8-61中任一项所述的遗传工程化的造血细胞，以及药学上可接受的载体；以及

第二药物组合物，所述第二药物组合物包含含Fc的治疗剂以及药学上可接受的载体。

69.如权利要求68所述的药盒，其中所述含Fc的治疗剂为Fc融合蛋白或治疗性抗体。

70.如权利要求68或权利要求69所述的药盒，其中所述含Fc的治疗剂结合至靶抗原，所述靶抗原任选地为肿瘤抗原、病原性抗原或对自身抗原有特异性的免疫细胞。

71.如权利要求70中任一项所述的药盒，其中所述治疗性抗体选自由以下组成的组：阿达木单抗、恩美曲妥珠单抗、阿仑单抗、巴利昔单抗、贝伐单抗、贝利木单抗、本妥昔单抗、卡那单抗、西妥昔单抗、赛妥珠单抗、达利珠单抗、地诺单抗、地那妥昔单抗、依库珠单抗、依法利珠单抗、依帕珠单抗、吉妥珠单抗、戈利木单抗、hu14.18K322A、替伊莫单抗、英夫利昔单抗、伊匹木单抗、拉贝珠单抗、莫罗单抗、那他珠单抗、奥比妥珠单抗、奥法木单抗、奥马珠单抗、帕利珠单抗、帕尼单抗、帕妥珠单抗、雷莫芦单抗、兰尼单抗、利妥昔单抗、托珠单抗、曲妥珠单抗、托西莫单抗、优特克单抗和维多珠单抗。

72.一种用于抑制受试者中表达靶抗原的细胞的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用权利要求8-61中任一项所述的遗传工程化的造血细胞群。

73.如权利要求72所述的方法，其中所述遗传工程化的造血细胞表达ACTR多肽，并且其中所述受试者已用或正在用对所述靶抗原有特异性的含Fc的治疗剂治疗。

74.如权利要求72所述的方法，其中所述遗传工程化的造血细胞表达CAR多肽，所述CAR多肽包含对靶抗原有特异性的细胞外抗原结合结构域。

75.如权利要求73或权利要求74所述的方法，其中所述靶抗原为肿瘤抗原、病原性抗原或对自身抗原有特异性的免疫细胞。

76.如权利要求75所述的方法，其中所述病原性抗原为细菌抗原、病毒抗原或真菌抗原。

77.如权利要求73-76中任一项所述的方法，其中表达所述靶抗原的所述细胞中的至少一些位于低葡萄糖环境中。

78.如权利要求72-77中任一项所述的方法，其中所述遗传工程化的造血细胞为自体的。

79.如权利要求72-77中任一项所述的方法，其中所述遗传工程化的造血细胞为同种异体的。

80.如权利要求72-79中任一项所述的方法，其中所述遗传工程化的造血细胞是活化的、扩增的或均为离体的。

81.如权利要求73和75-78中任一项所述的方法,其中所述含Fc的治疗剂为治疗性抗体或Fc融合蛋白。

82.如权利要求81所述的方法,其中所述含Fc的治疗剂为选自由以下组成的组的治疗性抗体:阿达木单抗、恩美曲妥珠单抗、阿仑单抗、巴利昔单抗、贝伐单抗、贝利木单抗、本妥昔单抗、卡那单抗、西妥昔单抗、赛妥珠单抗、达利珠单抗、地诺单抗、地那妥昔单抗、依库珠单抗、依法利珠单抗、依帕珠单抗、吉妥珠单抗、戈利木单抗、hu14.18K322A、替伊莫单抗、英夫利昔单抗、伊匹木单抗、拉贝珠单抗、莫罗单抗、那他珠单抗、奥比妥珠单抗、奥法木单抗、奥比妥珠单抗、奥马珠单抗、帕利珠单抗、帕尼单抗、帕妥珠单抗、雷莫芦单抗、兰尼单抗、利妥昔单抗、托珠单抗、托西莫单抗、曲妥珠单抗、优特克单抗和维多珠单抗。

83.如权利要求72-82中任一项所述的方法,其中所述受试者为患有癌症的人患者并且所述靶抗原为肿瘤抗原。

84.如权利要求83所述的方法,其中所述癌症选自由以下组成的组:癌、淋巴瘤、肉瘤、胚细胞瘤和白血病。

85.如权利要求83或权利要求84所述的方法,其中所述癌症选自由以下组成的组:B细胞来源的癌症、乳腺癌、胃癌、成神经细胞瘤、骨肉瘤、肺癌、皮肤癌、前列腺癌、结肠癌、肾细胞癌、卵巢癌、横纹肌肉瘤、白血病、间皮瘤、胰腺癌、头颈癌、视网膜母细胞瘤、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、肝癌和甲状腺癌。

86.如权利要求85所述的方法,其中所述B细胞来源的癌症选自由以下组成的组:B系急性淋巴细胞白血病、B细胞慢性淋巴细胞性白血病和B细胞非霍奇金淋巴瘤。

87.如权利要求72-86中任一项所述的方法,其中所述遗传工程化的造血细胞包括T细胞,所述T细胞在抗CD3抗体、抗CD28抗体、IL-2、植物血凝素和工程化的人工刺激细胞或颗粒中的一者或多者的存在下被活化。

88.如权利要求72所述的方法,其中所述遗传工程化的造血细胞包括自然杀伤细胞,所述自然杀伤细胞在4-1BB配体、抗4-1BB抗体、IL-15、抗IL-15受体抗体、IL-2、IL-12、IL-21、K562细胞和工程化的人工刺激细胞或颗粒中的一者或多者的存在下被活化。

89.一种核酸或核酸组,所述核酸或核酸组共同包含:

(A)编码权利要求8-49中任一项所述的抗体偶联的T细胞受体(ACTR)多肽的第一核苷酸序列;以及

(B)编码乳酸调节因子的第二核苷酸序列。

90.一种核酸或核酸组,其中所述乳酸调节因子是乳酸调节多肽。

91.如权利要求90所述的核酸或核酸组,其中所述乳酸调节多肽是单羧酸转运蛋白(MCT)、参与乳酸合成的酶或抑制竞争乳酸合成底物的途径的多肽。

92.如权利要求91所述的核酸或核酸组,其中所述MCT为MCT1、MCT2或MCT4。

93.如权利要求91所述的核酸或核酸组,其中所述参与乳酸合成的酶是乳酸脱氢酶A(LDHA)。

94.如权利要求91所述的核酸或核酸组,其中所述抑制竞争乳酸合成底物的途径的多肽是丙酮酸脱氢酶激酶1(PDK1)。

95.如权利要求89-94中任一项所述的核酸或核酸组,其中所述核酸或所述核酸组为RNA分子或RNA分子组。

96.如权利要求89-94中任一项所述的核酸或核酸组,其中所述核酸包含所述第一核苷酸序列和所述第二核苷酸序列两者,并且其中所述核酸还包含第三核苷酸序列,所述第三核苷酸序列位于所述第一核苷酸序列与所述第二核苷酸序列之间,所述第三核苷酸序列编码核糖体跳跃位点、内部核糖体进入位点(IRES)或第二启动子。

97.如权利要求96所述的核酸或核酸组,其中所述核糖体跳跃位点为P2A肽。

98.如权利要求89-97中任一项所述的核酸或核酸组,其中所述核酸或所述核酸组包含在载体或载体组内。

99.如权利要求98所述的核酸或核酸组,其中所述载体或载体组为表达载体或表达载体组。

100.如权利要求98或权利要求99所述的核酸或核酸组,其中所述载体或载体组包括一个或多个病毒载体。

101.如权利要求100所述的核酸或核酸组,其中所述一个或多个病毒载体为逆转录病毒载体,所述逆转录病毒载体任选为慢病毒载体或γ逆转录病毒载体。

102.一种在体内产生经修饰的造血细胞的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用权利要求89-101中任一项所述的核酸或核酸组。

103.如权利要求102所述的方法,所述方法还包括向所述受试者施用对所述靶抗原有特异性的含Fc的治疗剂。

与调节细胞内乳酸浓度的反式代谢分子组合的嵌合受体多肽及其治疗用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求提交于2018年9月7日的美国临时申请号62/728,338和提交于2018年9月7日的美国临时申请号62/728,306的提交日的权益。这些在先申请中的每一者的全部内容以引用方式并入本文。

背景技术

[0003] 癌症免疫疗法(包括基于细胞的疗法)用于在保留正常组织的同时激发攻击肿瘤细胞的免疫应答。其为治疗各种类型癌症的有前途选项,因为它有可能逃避耐药性的遗传和细胞机制,并在保留正常组织的同时靶向肿瘤细胞。

[0004] 基于细胞的疗法可涉及反应性偏向癌细胞的细胞毒性T细胞。Eshhar等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.;1993;90(2):720-724;Geiger等人,J Immunol.1999;162(10):5931-5939;Brentjens等人,Nat.Med.2003;9(3):279-286;Cooper等人,Blood.2003;101(4):1637-1644;以及Imai等人,Leukemia.2004;18:676-684。一种方法是表达具有与一个或多个T细胞活化信号传导结构域融合的抗原结合结构域的嵌合受体。癌症抗原通过抗原结合结构域的结合导致T细胞活化并触发细胞毒性。通过输注表达嵌合受体的自体T淋巴细胞进行的临床试验的最新结果为其临床潜能提供了令人信服的证据。Pule等人,Nat.Med.2008;14(11):1264-1270;Porter等人,N Engl J Med;2011;25;365(8):725-733;Brentjens等人,Blood.2011;118(18):4817-4828;Till等人,Blood.2012;119(17):3940-3950;Kochenderfer等人,Blood.2012;119(12):2709-2720;以及Brentjens等人,Sci Transl Med.2013;5(177):177ra138。

[0005] 另一种方法是在造血细胞(例如,造血干细胞、免疫细胞,诸如NK细胞或T细胞)中表达抗体偶联的T细胞受体(ACTR)蛋白,所述ACTR蛋白含有细胞外Fc结合结构域。当表达ACTR的造血细胞(例如,表达ACTR的T细胞,也称为“ACTR T细胞”)与抗癌抗体一起施用给受试者时,它们可以通过它们与抗体的Fc结构域的结合而增强对所述抗体靶向的癌细胞的毒性。Kudo等人,Cancer Research.(2014)74:93-103。

[0006] 基于细胞的免疫疗法,虽然有前途,但是面临着肿瘤微环境(TME)的特定特性引起的挑战,所述TME是通过恶性肿瘤细胞与非转化细胞之间的相互作用而创建的细胞环境。因此,根据TME开发改善基于细胞的免疫疗法的功效的策略非常重要。

发明内容

[0007] 本公开基于调节造血细胞(诸如造血干细胞(HSC)或免疫细胞)中的细胞内乳酸浓度的策略的开发,所述造血细胞包括表达嵌合受体多肽(诸如抗体偶联的T细胞受体(ACTR)多肽或嵌合抗原受体(CAR)多肽)的细胞,本公开用于基于细胞的免疫疗法。细胞内乳酸浓度的调节可以通过在造血细胞(例如,HSC或免疫细胞(例如,T细胞或自然杀伤细胞))中表达(例如,过表达)一种或多种乳酸调节因子(诸如乳酸调节多肽,例如本文所述的乳酸调节

多肽)来实现。例如在低葡萄糖环境、低氨基酸环境、低pH环境和/或低氧环境中(例如,在肿瘤微环境中),预期这种遗传工程化的造血细胞(例如,免疫细胞)相对于相同类型的天然造血细胞(例如,相同类型的免疫细胞)具有增强的代谢活性。此类遗传工程化的免疫细胞还可具有经调节的表观遗传状态(例如,乙酰化状态)和/或经调节的免疫抑制代谢产物(例如,犬尿氨酸)水平。因此,共表达一种或多种乳酸调节因子(例如,多肽)和嵌合受体多肽的造血细胞(诸如HSC或免疫细胞)将表现出优异的生物活性(例如,在肿瘤微环境下,诸如低葡萄糖、低氨基酸、低pH和/或低氧条件下,任选地在治疗性抗体的存在下),例如细胞增殖、活化(例如,增加的细胞因子产生,例如IL-2或IFNγ产生)、细胞毒性和/或体内抗肿瘤活性。

[0008] 因此,本文提供了具有相对于相同类型的野生型免疫细胞具有改变的细胞内乳酸浓度调控的能力的经修饰的(例如,经遗传修饰的)造血细胞(例如,造血干细胞,或免疫细胞(诸如T细胞或自然杀伤细胞))。在一些情况下,经修饰的免疫细胞可表达或过表达乳酸调节因子,例如乳酸调节多肽。乳酸调节多肽可以是参与乳酸合成的酶(例如,LDHA,其催化乳酸和丙酮酸相互转化)、乳酸转运蛋白(例如,MCT)或者抑制竞争乳酸合成底物的途径的多肽(例如,PDK1)。示例性的乳酸调节多肽包括但不限于L-乳酸脱氢酶A链(LDHA)、单羧酸转运蛋白1(MCT1)、单羧酸转运蛋白2(MCT2)、单羧酸转运蛋白4(MCT4)和丙酮酸脱氢酶激酶1(PDK1)。

[0009] 经修饰的免疫细胞还可表达嵌合受体多肽,所述嵌合受体多肽可包含(a)细胞外靶结合结构域;(b)跨膜结构域;以及(c)细胞质信号传导结构域(例如,包含基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)的细胞质结构域)。在一些实施方案中,嵌合受体多肽为抗体偶联的T细胞受体(ACTR),所述ACTR包含细胞外Fc结合结构域(a)。在其他实施方案中,嵌合受体为嵌合抗原受体(CAR),所述CAR包含细胞外抗原结合结构域(a)。在一些实例中,(c)位于嵌合受体多肽的C末端处。在一些情况下,嵌合多肽还可包含至少一个共刺激信号传导结构域。在其他情况下,嵌合受体多肽可不含共刺激信号传导结构域。

[0010] 本文所述的嵌合受体多肽(例如,ACTR多肽或CAR多肽)中的任一者还可包含铰链结构域,所述铰链结构域位于(a)的C末端处和(b)的N末端处。在其他实例中,嵌合受体多肽可不含任何铰链结构域。在其他实例中,嵌合受体多肽,例如ACTR多肽,可不含来自任何非CD16A受体的铰链结构域。可选地或另外,嵌合受体多肽在其N末端处还包含信号肽。

[0011] 在一些实施方案中,本文公开的嵌合受体多肽可为包含Fc结合结构域(a)的ACTR多肽。在一些实例中,(a)的Fc结合结构域可为Fc受体的细胞外配体结合结构域,例如Fc-γ受体、Fc-α受体或Fc-ε受体的细胞外配体结合结构域。在特定实例中,Fc结合结构域为CD16A(例如,F158 CD16A或V158 CD16A)、CD32A或CD64A的细胞外配体结合结构域。在其他实例中,(a)的Fc结合结构域可为结合免疫球蛋白的Fc部分的抗体片段。例如,抗体片段可为单链可变片段(ScFv)、单结构域抗体(例如,纳米抗体)。另外,(a)的Fc结合结构域可为结合免疫球蛋白的Fc部分或其Fc结合片段的天然存在的蛋白质。例如,Fc结合结构域可为蛋白A或蛋白G或它们的Fc结合片段。在另外的实例中,(a)的Fc结合结构域可为结合免疫球蛋白的Fc部分的合成多肽。实例包括但不限于Kunitz肽、SMIP、avimer、亲和体、DARPin或抗运载蛋白(anticalin)。

[0012] 在一些实施方案中,本文公开的嵌合受体多肽可为包含细胞外抗原结合结构域

(a)的CAR多肽。在一些实例中，(a)的细胞外抗原结合结构域为单链抗体片段，所述单链抗体片段结合肿瘤抗原、病原性抗原或对自身抗原有特异性的免疫细胞。在某些实例中，肿瘤抗原与血液肿瘤相关。实例包括但不限于CD19、CD20、CD22、κ链、CD30、CD123、CD33、LeY、CD138、CD5、BCMA、CD7、CD40和IL-1RAP。在某些实例中，肿瘤抗原与实体瘤相关。实例包括但不限于GD2、GPC3、FOLR(例如，FOLR1或FOLR2)、HER2、EphA2、EFGRVIII、IL13RA2、VEGFR2、ROR1、NKG2D、EpCAM、CEA、间皮素、MUC1、CLDN18.2、CD171、CD133、PSCA、cMET、EGFR、PSMA、FAP、CD70、MUC16、L1-CAM、B7H3和CAIX。在某些实例中，病原性抗原为细菌抗原、病毒抗原或真菌抗原，例如本文所述的那些。

[0013] 在一些实施方案中，嵌合受体多肽(例如，ACTR或CAR多肽)中的任一者中的(b)的跨膜结构域可为单穿膜蛋白，例如CD8α、CD8β、4-1BB、CD28、CD34、CD4、FcεRIγ、CD16A、OX40、CD3ζ、CD3ε、CD3γ、CD3δ、TCRα、CD32、CD64、VEGFR2、FAS和FGFR2B。可选地，(b)的跨膜结构域可为非天然存在的疏水蛋白区段。

[0014] 在一些实施方案中，如果适用的话，则本文所述的嵌合受体多肽(例如，ACTR或CAR多肽)的至少一个共刺激信号传导结构域可属于共刺激分子，所述共刺激分子可为4-1BB、CD28、$CD28_{LL\rightarrow GG}$变体、OX40、ICOS、CD27、GITR、ICOS、HVEM、TIM1、LFA1和CD2。在一些实例中，所述至少一个共刺激信号传导结构域为CD28共刺激信号传导结构域或4-1BB共刺激信号传导结构域。在一些情况下，ACTR多肽可包含两个共刺激性信号传导结构域。在一些情况下，所述共刺激信号传导结构域中的一个为CD28共刺激信号传导结构域；并且另一个共刺激结构域可为4-1BB共刺激信号传导结构域、OX40共刺激信号传导结构域、CD27共刺激信号传导结构域或ICOS共刺激信号传导结构域。具体实例包括但不限于CD28和4-1BB；或$CD28_{LL\rightarrow GG}$变体和4-1BB。可选地，嵌合受体多肽中的任何嵌合受体多肽可不含任何共刺激信号传导结构域。

[0015] 在一些实施方案中，本文所述的嵌合受体多肽(例如，ACTR或CAR多肽)中的任何嵌合受体多肽中的(c)的细胞质信号传导结构域可为CD3ζ或FcεR1γ的细胞质结构域。

[0016] 在一些实施方案中，当适用时，本文所述的嵌合多肽(例如，ACTR或CAR多肽)中的任何嵌合多肽的铰链结构域可属于CD28、CD16A、CD8α或IgG。在其他实例中，铰链结构域为非天然存在的肽。例如，非天然存在的肽可为扩展的重组多肽(XTEN)或$(Gly_4Ser)_n$多肽，其中n为3-12的整数，包括端值在内。在一些实例中，铰链结构域为短区段，所述短区段可含有至多60个氨基酸残基。

[0017] 在特定实例中，如本文所述的ACTR多肽可包含(i)CD28共刺激结构域；以及(ii)CD28跨膜结构域、CD28铰链结构域或它们的组合。例如，所述ACTR多肽包含如表4所示的组分(a)-(e)。在具体实例中，ACTR多肽包含选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:80的氨基酸序列。

[0018] 在特定实例中，本文所述的CAR多肽可包含(i)CD28共刺激结构域或4-1BB共刺激结构域；以及(ii)CD28跨膜结构域、CD28铰链结构域或它们的组合。在另外的特定实例中，本文所述的CAR多肽可包含(i)CD28共刺激结构域或4-1BB共同刺激结构域，(ii)CD8跨膜结构域、CD8铰链结构域或它们的组合。例如，CAR多肽可包含选自SEQ ID NO:97和SEQ ID NO:98的氨基酸序列。

[0019] 本文所述的表达乳酸调节因子(例如，多肽)和任选的嵌合受体多肽的造血细胞可为造血干细胞或其后代。在一些实施方案中，造血细胞可为免疫细胞，诸如自然杀伤细胞、

单核细胞/巨噬细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞或T细胞。免疫细胞可来源于外周血单核细胞(PBMC)、造血干细胞(HSC)或诱导性多能干细胞(iPSC)。在一些实例中,所述免疫细胞为T细胞,在所述T细胞中内源性T细胞受体、内源性主要组织相容性复合物、内源性β-2-微球蛋白或它们的组合的表达已被抑制或消减。

[0020] 本文所述的造血细胞(例如,HSC或免疫细胞)中的任何造血细胞可包含核酸或核酸组,所述核酸或核酸组共同包含:(a)编码乳酸调节因子(例如,多肽)的第一核苷酸序列;以及任选的(b)编码嵌合抗原受体(CAR)多肽的第二核苷酸序列。核酸或核酸组为RNA分子或RNA分子组。在一些情况下,免疫细胞包含核酸,所述核酸包含第一核苷酸序列和第二核苷酸序列两者。在一些实施方案中,乳酸调节因子的编码序列在CAR多肽的编码序列的上游。在一些实施方案中,CAR多肽的编码序列在乳酸调节因子的编码序列的上游。此类核酸还可包含第三核苷酸序列,所述第三核苷酸序列位于所述第一核苷酸序列与所述第二核苷酸序列之间,其中所述第三核苷酸序列编码核糖体跳跃位点(例如,P2A肽)、内部核糖体进入位点(IRES)或第二启动子。

[0021] 在一些实例中,核酸或核酸组包含在载体或载体组内,所述载体或载体组可为表达载体或表达载体组(例如,病毒载体,诸如慢病毒载体或逆转录病毒载体)。核酸组或载体组是指两个或更多个核酸分子或两个或更多个载体的组,所述核酸分子或载体中的每一者编码感兴趣的多肽(即,乳酸调节多肽和CAR多肽)中的一个感兴趣的多肽。本文所述的核酸中的任何核酸也在本公开的范围内。

[0022] 在另一方面中,本公开提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含本文所述的免疫细胞中的任何免疫细胞和药学上可接受的载体。

[0023] 此外,本文提供了一种抑制受试者中表达靶抗原的细胞(例如,减少此类细胞的数量、阻断细胞增殖和/或抑制细胞活性)的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用本文所述的免疫细胞群,所述免疫细胞群可共表达乳酸调节因子(例如,多肽)和CAR多肽。受试者(例如,人患者,诸如患有癌症的人患者)可已经或正在用抗癌疗法(例如,抗癌剂)进行治疗。在一些实例中,表达靶抗原的细胞中的至少一些位于低葡萄糖环境、低氨基酸(例如,低谷氨酰胺)环境、低pH环境和/或低氧环境(例如肿瘤微环境)中。

[0024] 在一些实例中,免疫细胞为自体的。在其他实例中,免疫细胞为同种异体的。在本文所述的方法中的任何方法中,免疫细胞可为活化的、扩增的或均为离体的。在一些情况中,所述免疫细胞包括T细胞,所述T细胞在抗CD3抗体、抗CD28抗体、IL-2、植物血凝素和工程化的人工刺激细胞或颗粒中的一者或多者的存在下被活化。在其他情况中,所述免疫细胞包括自然杀伤细胞,所述自然杀伤细胞在4-1BB配体、抗4-1BB抗体、IL-15、抗IL-15受体抗体、IL-2、IL-12、IL-21和K562细胞、工程化的人工刺激细胞或颗粒中的一者或多者的存在下被活化。

[0025] 在一些实例中,要通过本文所述的方法治疗的受试者可为患有癌症,例如癌、淋巴瘤、肉瘤、胚细胞瘤和白血病的人患者。另外的实例性靶癌症包括但不限于B细胞来源的癌症、乳腺癌、胃癌、成神经细胞瘤、骨肉瘤、肺癌、皮肤癌、前列腺癌、结肠癌、肾细胞癌、卵巢癌、横纹肌肉瘤、白血病、间皮瘤、胰腺癌、头颈癌、视网膜母细胞瘤、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、肝癌和甲状腺癌。示例性的B细胞来源的癌症选自由以下组成的组:B系急性淋巴细胞白血病、B细胞慢性淋巴细胞性白血病和B细胞非霍奇金淋巴瘤。

[0026] 也在本公开的范围内的是本文所述的遗传工程化的免疫细胞用于治疗靶疾病或疾患(诸如癌症或传染性疾患)以及其用于制造用于预期医学治疗的药物的用途,所述免疫细胞共表达乳酸调节因子(例如,多肽)和CAR多肽。

[0027] 在以下描述中阐述了本公开的一个或多个实施方案的细节。本公开的其他特征或优点将通过若干实施方案的详细描述以及通过所附权利要求书变得显而易见。

附图说明

[0028] 以下附图形成本说明书的一部分,并且被包括在内以进一步说明本公开的某些方面,通过参考这些附图中的一个或多个附图并结合本文中提出的具体实施方案的详细描述,可以更好地理解本公开。

[0029] 图1是示出乳酸的细胞内合成和代谢途径以及乳酸输出和输入的示意图。用于调节细胞内乳酸浓度的示例性策略包括调控参与乳酸合成、代谢和/或转运(例如,通过例如过表达LDHA增强细胞内乳酸和丙酮酸的相互转化,以及通过例如过表达MCT增加乳酸的细胞转运)的一种或多种酶。

[0030] 图2示出了在表达GPC3的靶细胞的存在下,低葡萄糖浓度对表达抗GPC3嵌合抗原受体的免疫细胞的增殖的影响。

[0031] 图3A至图3B是示出在肿瘤相关(1.25mM;图3A)和大约外周血水平(10mM;图3B)葡萄糖条件下,在T细胞中共表达MCT1(SEQ ID NO:82)和CAR(SEQ ID NO:98)相对于单独的CAR(SEQ ID NO:97)增强了细胞增殖的图。

[0032] 图4A至图4B是示出在肿瘤相关(1.25mM;图4A)和大约外周血水平(10mM;图4B)葡萄糖条件下,在T细胞中共表达MCT2(SEQ ID NO:83)和CAR(SEQ ID NO:97)相对于单独的CAR(SEQ ID NO:97)增强了细胞增殖的图。

[0033] 图5A至图5B是示出在肿瘤相关(1.25mM;图5A)和大约外周血水平(10mM;图5B)葡萄糖条件下,在T细胞中共表达MCT4(SEQ ID NO:84)和CAR(SEQ ID NO:98)相对于单独的CAR(SEQ ID NO:97)增强了细胞增殖的图。

[0034] 图6A至图6B是示出在表达单独的ACTR(SEQ ID NO:57)多肽或ACTR多肽与LDHA的组合的T细胞与表达FOLRα的IGROV-1细胞与抗FOLRα抗体一起孵育约48小时以测量IL-2产量(图6A)或一起孵育8天以通过活T细胞计数测量增殖(图6B)之后,IL-2产量和增殖根据所述T细胞的抗体浓度的变化的图。

[0035] 图7是示出在表达单独的ACTR(SEQ ID NO:57)多肽或ACTR多肽与LDHA的组合的T细胞与表达FOLRα的IGROV-1细胞和抗FOLRα抗体一起孵育8天之后,如通过活T细胞计数测量的增殖根据所述T细胞的培养基葡萄糖浓度变化的图。

[0036] 图8A至图8B是示出在表达单独的ACTR(SEQ ID NO:57)多肽或ACTR多肽与LDHA的组合的T细胞与表达FOLRα的IGROV-1细胞和抗FOLRα抗体一起在不同浓度的实体瘤相关抑制分子PGE_2的存在下孵育约48小时以测量IL-2产量(图8A)或孵育8天以通过活T细胞计数测量增殖(图8B)之后,所述T细胞的IL-2产量和增殖的图。

[0037] 图9是示出在表达单独的ACTR(SEQ ID NO:57)多肽或ACTR多肽与LDHA的组合的T细胞与表达FOLRα的固定IGROV-1细胞和抗FOLRα抗体一起在不同浓度的实体瘤相关抑制分子犬尿氨酸的存在下孵育约48小时以测量IL-2产量之后,所述T细胞的IL-2产量的图。

[0038] 图10是示出在表达单独的ACTR(SEQ ID NO:57)多肽或ACTR多肽与MCT1的组合的T细胞与表达FOLRα的固定OVCAR8细胞和抗FOLRα抗体一起孵育8天以通过ATP含量测量增殖之后,增殖根据所述T细胞的抗体浓度变化的图。

[0039] 图11A至图11C是示出在表达单独的ACTR(SEQ ID NO:57)多肽或ACTR多肽与MCT1的组合的T细胞与表达FOLRα的固定IGROV-1细胞和抗FOLRα抗体一起在不同浓度的实体瘤相关抑制分子犬尿氨酸的存在下孵育之后,所述T细胞的IL-2产量和增殖的图。在孵育约48小时之后,测量IL-2产量(图11A)。在第7天,将细胞分成两组。第一组用BrdU脉冲约16小时,并执行BrdU摄取测定(Millipore Sigma)以评定增殖(图11B)。在第8天通过ATP含量测量第二组中的增殖(图11C)。

[0040] 图12A至图12C是描绘表达单独的ACTR(SEQ ID NO:57)多肽或ACTR多肽与MCT2的组合的T细胞与表达FOLRα的固定OVCAR8细胞和抗FOLRα抗体一起在不同浓度的实体瘤相关抑制分子PGE_2(图12A)、TGF-β(图12B)和犬尿氨酸(图12C)的存在下孵育8天以通过ATP含量测量增殖之后,所述T细胞的增殖的图。

[0041] 图13A至图13C是示出在表达单独的ACTR(SEQ ID NO:57)多肽或ACTR多肽与MCT2的组合的T细胞与表达FOLRα的固定IGROV-1细胞和抗FOLRα抗体一起在不同浓度的实体瘤相关抑制分子犬尿氨酸的存在下孵育之后,所述T细胞的IL-2产量和增殖的图。在孵育约48小时之后,测量IL-2产量(图13A)。在第6天,将细胞分成两组。第一组用BrdU脉冲约16小时,并执行BrdU摄取测定(Millipore Sigma)以评定增殖(图13B)。在第7天通过ATP含量测量第二组中的增殖(图13C)。

[0042] 图14A至图14B是示出在表达单独的ACTR(SEQ ID NO:57)多肽或ACTR多肽与MCT2的组合的T细胞与表达FOLRα的活(图14A)或固定(图14B)IGROV-1细胞和抗FOLRα抗体一起在不同浓度的实体瘤相关抑制分子犬尿氨酸的存在下孵育之后,所述T细胞的IL-2产量的图。

[0043] 图15是示出在表达单独的ACTR(SEQ ID NO:57)多肽或ACTR多肽与MCT4的组合的T细胞与表达FOLRα的固定OVCAR8细胞和抗FOLRα抗体一起孵育8天之后,增殖根据所述T细胞的抗体浓度变化的图。

[0044] 图16是示出表达单独的ACTR(SEQ ID NO:57)多肽或ACTR多肽与MCT4的组合的T细胞与表达FOLRα的固定IGROV-1细胞和抗FOLRα抗体一起在不同浓度的实体瘤相关抑制分子PGE_2的存在下孵育之后,所述T细胞的IL-2产量的图。

[0045] 图17是描绘在表达单独的ACTR(SEQ ID NO:57)多肽或ACTR多肽与MCT4的组合的T细胞与表达FOLRα的固定OVCAR8细胞和抗FOLRα抗体一起在不同浓度的实体瘤相关抑制分子TGF-β的存在下孵育8天以通过ATP含量测量增殖之后,所述T细胞的增殖的图。

[0046] 图18A至图18B是示出在表达单独的ACTR(SEQ ID NO:57)多肽或ACTR多肽与MCT4的组合的T细胞与表达FOLRα的固定IGROV-1细胞和抗FOLRα抗体一起在不同浓度的实体瘤相关抑制分子犬尿氨酸的存在下孵育之后,所述T细胞的IL-2产量和增殖的图。在孵育约48小时之后,测量IL-2产量(图18A)。在第6天,将细胞用BrdU脉冲约16小时,并执行BrdU摄取测定(Millipore Sigma)以评定增殖(图18B)。

具体实施方式

[0047] 肿瘤微环境具有特定的特征，诸如低葡萄糖、低氨基酸、低pH和/或低氧条件，所述特征中的一些可限制效应免疫细胞(诸如效应T细胞)的活性。本公开至少部分地基于用于在肿瘤微环境中增强效应免疫细胞活性的策略的开发。具体地，本公开的特征在于用于经由调节效应免疫细胞中的细胞内乳酸浓度来增强效应免疫细胞的代谢活性，从而增强效应免疫细胞的生长和生物活性的方法。细胞内乳酸浓度可以以各种方式调节，包括增加乳酸的细胞转运(例如，通过表达或过表达乳酸转运蛋白和/或通过调控此类蛋白质的细胞运输或活性)、增加乳酸的合成(例如，通过表达或过表达参与乳酸合成的酶和/或通过调控此类蛋白质的细胞运输或活性)和/或抑制竞争乳酸合成途径中的底物的途径(例如，通过表达或过表达抑制竞争乳酸合成底物的途径的多肽和/或通过调控参与此类途径的蛋白质的细胞运输或活性)。本公开提供了调节免疫细胞中的细胞内乳酸浓度的各种方法。一些实例在图1示出，包括：过表达刺激乳酸和丙酮酸(例如，LDHA)相互转化的内源酶和/或过表达乳酸转运蛋白(例如，MCT1、MCT2或MCT4)。

[0048] 本文公开的研究出乎意料地证明，在免疫细胞诸如T细胞中共表达乳酸调节多肽(例如，LDHA、MCT或PDK1)和嵌合受体多肽(诸如CAR(例如，具有4-1BB共刺激结构域)或ACTR(例如，具有4-1BB或CD28共刺激结构域))在体外和体内均表现出相对于仅表达CAR或ACTR的免疫细胞的卓越特征。例如，LDHA、MCT1、MCT2或MCT4与CAR或ACTR的共表达增强了T细胞增殖/扩增和T细胞功能，特别是在实体瘤微环境条件(例如，缺氧、低葡萄糖条件和TME抑制剂的存在)下。例如，乳酸调节多肽(例如，LDHA、MCT或PDK1)和嵌合受体多肽(例如，CAR或ACTR)的共表达可减少肿瘤生长和/或肿瘤形成。例如，在肿瘤微环境样条件(例如，低葡萄糖、PGE_2、犬尿氨酸)下，LDHA和ACTR的共表达增强了T细胞活性。此外，MCT1、MCT4以及MCT4与ACTR或CAR的共表达在肿瘤微环境样条件(例如，低葡萄糖、PGE_2、犬尿氨酸、TGFβ或腺苷)下显示出增强的T细胞活性。

[0049] 因此，本公开提供了经修饰的(例如，遗传工程化的)造血细胞(例如，HSC或免疫细胞)，所述经修饰的造血细胞相对于相同类型的天然免疫细胞具有增强的代谢活性。细胞内乳酸浓度的调节可以通过任何合适的途径来实现。在一些实施方案中，此类经修饰的免疫细胞可表达一种或多种乳酸调节因子，例如乳酸调节多肽。在一些情况下，乳酸调节因子可以是直接参与乳酸合成、代谢和/或转运的分子，例如参与此类过程的酶或转运蛋白。在其他情况下，乳酸调节因子可以是间接调控乳酸合成、代谢和/或转运(例如，调控参与乳酸合成、代谢和/或转运的多肽的表达、活性和/或降解)的分子。

[0050] 此类遗传工程化的免疫细胞还可表达嵌合受体多肽，例如抗体偶联的T细胞受体(ACTR)多肽或嵌合抗原受体(CAR)多肽。本文还提供了遗传工程化的免疫细胞在需要时(例如，当免疫细胞表达ACTR多肽时)任选地与含Fc的剂组合用于例如经由ADCC改善免疫细胞增殖和/或抑制或减少受试者(例如，人癌症患者)中的靶细胞(例如，靶癌细胞)的用途。本公开还提供了包含所述遗传工程化的免疫细胞的药物组合物和药盒。

[0051] 本文所述的表达(例如，过表达)乳酸调节因子的遗传工程化的免疫细胞可以赋予至少以下优点。乳酸调节因子(例如，多肽或核酸)的表达将增强T细胞的代谢活性。因此，相对于不表达(或不过表达)乳酸调节因子(例如，多肽或核酸)的免疫细胞，遗传工程化的免疫细胞可在肿瘤环境(例如，低葡萄糖、低氨基酸、低pH和/或低氧环境)中更好地增殖，产生

更多的细胞因子，表现出更大的抗肿瘤细胞毒性、表现出更少的免疫抑制代谢产物和/或表现出更大的T细胞存活，从而导致增加的细胞因子产生、存活率、细胞毒性和/或抗肿瘤活性。

[0052] I.乳酸调节因子

[0053] 如本文所用，乳酸调节因子可以是参与乳酸合成和/或代谢的任何类型的分子(例如，参与乳酸合成和/或代谢的酶，或抑制竞争乳酸合成中使用的底物的途径的酶)，或参与乳酸细胞转运的任何类型的分子(例如，细胞表面乳酸转运蛋白)。

[0054] 在一些情况下，乳酸调节因子可以是乳酸调节多肽，所述乳酸调节多肽是指调控细胞内乳酸浓度的多肽。此类乳酸调节多肽可以经由任何机制调控细胞内乳酸浓度。

[0055] 在一些实施方案中，并且如图1中所例示，乳酸调节多肽包括乳酸转运蛋白(即，促进乳酸跨细胞膜转运的细胞膜蛋白)和/或此类蛋白的细胞运输或活性的调控剂。在一些实施方案中，乳酸调节多肽可包含双向乳酸转运蛋白(例如，MCT1、MCT2或MCT4，或它们的功能变体)。在一些实施方案中，乳酸调节多肽包括遗传工程化的乳酸转运蛋白，其中所述乳酸转运蛋白从天然野生型形式突变以模拟活化的乳酸调节多肽(例如，磷酸化模拟物)和/或以影响乳酸的细胞内运输(例如，运输至细胞表面)，使得乳酸调节多肽的活性增大。

[0056] 在其他实施方案中，也如图1中所例示，乳酸调节多肽可以包括参与乳酸合成的酶(例如，刺激乳酸合成或乳酸至另一种分子的转化的酶)。此类酶可以将乳酸转化为丙酮酸。例如，乳酸调节多肽可包括LDHA或其功能变体。在一些实施方案中，乳酸调节多肽可包括参与乳酸合成的遗传工程化的酶，其中所述酶从天然野生型形式突变以模拟活化的酶(例如，磷酸化模拟物)和/或以影响所述乳酸的细胞内运输，使得乳酸的合成或转化增加。

[0057] 在其他实施方案中，乳酸调节多肽可以是抑制竞争乳酸合成底物的途径的多肽和/或参与此类途径的蛋白质的细胞运输或活性的调控剂。例如，乳酸调节多肽可包括PDK1或其功能变体。在一些实施方案中，乳酸调节多肽包括遗传工程化的蛋白质抑制剂，其中所述蛋白质抑制剂从天然野生型形式突变以模拟活化的蛋白质抑制剂(例如，磷酸化模拟物)和/或以影响所述乳酸的细胞内运输，使得对竞争途径的抑制增加。

[0058] 可以考虑可为任何合适物种(例如，哺乳动物，诸如人)的任何此类调节多肽来与本文所述的组合物和方法一起使用。

[0059] 示例性的乳酸调节多肽可包括但不限于L-乳酸脱氢酶A链(LDHA)、单羧酸转运蛋白1(MCT1)、单羧酸转运蛋白2(MCT2)、单羧酸转运蛋白4(MCT4)和丙酮酸脱氢酶激酶1(PDK1)。

[0060] LDHA是一种脱氢酶，其催化丙酮酸(克雷布斯循环中的一种关键分子)与乳酸的相互转化。LDHA的过表达可促进乳酸至丙酮酸的转化，因为细胞的丙酮酸储存在高代谢活性时会减少。这导致细胞内丙酮酸浓度增加并且细胞内乳酸浓度降低，并且具有向克雷布斯循环提供通量和增加乳酸转运的效应。因此，升高的LDHA表达或活性增加了乳酸的转运，从而导致细胞内乳酸浓度最终升高。例示性人LDHA酶的氨基酸序列提供如下：

[0061] LDHA(SEQ ID NO:81)

[0062] MATLKDQLIYNLLKEEQTPQNKITVVGVGAVGMACAISILMKDLADELALVDVIEDKLKGEMMDLQHGSLFLRTPKIVSGKDYNVTANSKLVIITAGARQQEGESRLNLVQRNVNIFKFIIPNVVKYSPNCKLLIVSNPVDILTYVAWKISGFPKNRVIGSGCNLDSARFRYLMGERLGVHPLSCHGWVLGEHGDSSVPVWSGMNVAGVSLKTLHPDLGTDKD

KEQWKEVHKQVVESAYEVIKLKGYTSWAIGLSVADLAESIMKNLRRVHPVSTMIKGLYGIKDDVFLSVPCILGQNGI
SDLVKVTLTSEEEARLKKSADTLWGIQKELQF

[0063] MCT蛋白(例如,MCT1、MCT2或MCT4)是一种单羧酸转运蛋白家族,其催化乳酸以及丙酮酸、酮体和其他结构上相关的代谢产物的双向转运。MCT2对乳酸的亲和力比MCT1高,而MCT4对丙酮酸的亲和力比MCT1低。增加的MCT表达或活性导致乳酸输出增加,这随后导致糖酵解增加。类似地,增加的MCT表达或活性可导致乳酸进入生物途径的代谢通量增加。例示性人MCT1、MCT2和MCT4蛋白的氨基酸序列提供如下:

[0064] MCT1(SEQ ID NO:82)

[0065] MPPAVGGPVGYTPPDGGWGWAVVIGAFISIGFSYAFPKSITVFFKEIEGIFHATTSEVSWISSIMLAVM
YGGGPISSILVNKYGSRIVMIVGGCLSGCGLIAASFCNTVQQLYVCIGVIGGLGLAFNLNPALTMIGKYFYKRRPLA
NGLAMAGSPVFLCTLAPLNQVFFGIFGWRGSFLILGGLLLNCCVAGALMRPIGPKPTKAGKDKSKASLEKAGKSGVK
KDLHDANTDLIGRHPKQEKRSVFQTINQFLDLTLFTHRGFLLYLSGNVIMFFGLFAPLVFLSSYGKSQHYSSEKSAF
LLSILAFVDMVARPSMGLVANTKPIRPRIQYFFAASVVANGVCHMLAPLSTTYVGFCVYAGFFGFAFGWLSSVLFET
LMDLVGPQRFSSAVGLVTIVECCPVLLGPPLLGRLNDMYGDYKYTYWACGVVLIISGIYLFIGMGINYRLLAKEQKA
NEQKKESKEEETSIDVAGKPNEVTKAAESPDQKDTDGGPKEEESPV

[0066] MCT2(SEQ ID NO:83)

[0067] MPPMPSAPPVHPPPDGGWGWIVVGAAFISIGFSYAFPKAVTVFFKEIQQIFHTTYSEIAWISSIMLAVM
YAGGPVSSVLVNKYGSRPVVIAGGLLCCLGMVLASFSSSVVQLYLTMGFITGLGLAFNLQPALTIIGKYFYRKRPMA
NGLAMAGSPVFLSSLAPFNQYLFNTFGWKGSFLILGSLLLNACVAGSLMRPLGPNQTTSKSKNKTGKTEDDSSPKKI
KTKKSTWEKVNKYLDFSLFKHRGFLIYLSGNVIMFLGFFAPIIFLAPYAKDQGIDEYSAAFLLSVMAFVDMFARPSV
GLIANSKYIRPRIQYFFSFAIMFNGVCHLLCPLAQDYTSLVLYAVFFGLGFGSVSSVLFETLMDLVGAPRFSSAVGL
VTIVECGPVLLGPPLAGKLVDLTGEYKYMYMSCGAIVVAASVWLLIGNAINYRLLAKERKEENARQKTRESEPLSKS
KHSEDVNVKVSNAQSVTSERETNI

[0068] MCT4(SEQ ID NO:84)

[0069] MGGAVVDEGPTGVKAPDGGWGWAVLFGCFVITGFSYAFPKAVSVFFKELIQEFGIGYSDTAWISSILLA
MLYGTGPLCSVCVNRFGCRPVMLVGGLFASLGMVAASFCRSIIQVYLTTGVITGLGLALNFQPSLIMLNRYFSKRRP
MANGLAAAGSPVFLCALSPLGQLLQDRYGWRGGFLILGGLLLNCCVCAALMRPLVVTAQPGSGPPRPSRRLLDLSVF
RDRGFVLYAVAASVMVLGLFVPPVFVVSYAKDLGVPDTKAAFLLTILGFIDIFARPAAGFVAGLGKVRPYSVYLFSF
SMFFNGLADLAGSTAGDYGGLVVFCIFFGISYGMVGALQFEVLMAIVGTHKFSSAIGLVLLMEAVAVLVGPPSGGKL
LDATHVYMYVFILAGAEVLTSSLILLLGNFFCIRKKPKEPQPEVAAAEEEKLHKPPADSGVDLREVEHFLKAEPEKN
GEVVHTPETSV

[0070] PDK1是一种激酶,其经由磷酸化抑制丙酮酸脱氢酶(诸如PDHA1)(丙酮酸脱氢酶复合物的一种组分)。丙酮酸脱氢酶复合物通过脱羧作用将丙酮酸转化为乙酰辅酶A。增加的PDK1表达或活性—以及后续对丙酮酸脱氢酶的抑制—增加了可用于LDHA介导的至乳酸的转化的丙酮酸的量。例示性人PDK1酶的氨基酸序列提供如下:

[0071] PDK1(SEQ ID NO:85)

[0072] MRLARLLRGAALAGPGPGLRAAGFSRSFSSDSGSSPASERGVPGQVDFYARFSPSPLSMKQFLDFGSVN
ACEKTSFMFLRQELPVRLANIMKEISLLPDNLLRTPSVQLVQSWYIQSLQELLDFKDKSAEDAKAIYERPRRTWLQV
SSLCCMACKMIFTDTVIRIRNRHNDVIPTMAQGVIEYKESFGVDPVTSQNVQYFLDRFYMSRISIRMLLNQHSLLFG

GKGKGSPSHRKHIGSINPNCNVLEVIKDGYENARRLCDLYYINSPELELEELNAKSPGQPIQVVYVPSHLYHMVFEL
FKNAMRATMEHHANRGVYPPIQVHVTLGNEDLTVKMSDRGGGVPLRKIDRLFNYMYSTAPRPRVETSRAVPLAGFGY
GLPISRLYAQYFQGDLKLYSLEGYGTDAVIYIKALSTDSIERLPVYNKAAWKHYNTNHEADDWCVPSREPKDMTTFR
SA

[0073] 乳酸调节多肽可为来自适当物种的天然存在的多肽，例如，哺乳动物乳酸调节多肽，诸如来源于人或非人灵长类动物的那些乳酸调节多肽。此类天然存在的多肽在本领域中是已知的，并且可以例如使用上述氨基酸序列中的任何氨基酸序列作为查询来搜索可公开获得的基因数据库(例如GenBank)来获得。用于本公开的乳酸调节多肽可与上述示例性蛋白质中的任何示例性蛋白质共享至少85％(例如，90％、95％、97％、98％、99％或更大)的序列同一性。

[0074] 使用Karlin和AltschulProc.Natl.Acad.Sci.USA 87:2264-68,1990，被修改为Karlin和Altschul Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-77,1993的算法确定两个氨基酸序列的“同一性百分比”。这种算法被并入Altschul等人，J.Mol.Biol.215:403-10,1990的NBLAST和XBLAST程序(2.0版)中。BLAST蛋白质搜索可以用XBLAST程序，得分＝50，字长＝3进行，以获得与本发明的蛋白质分子同源的氨基酸序列。在两个序列之间存在缺口的情况下，可以如Altschul等人，Nucleic Acids Res.25(17):3389-3402,1997所述利用带缺口的BLAST。当利用BLAST和带缺口的BLAST程序时，可以使用相应程序(例如XBLAST和NBLAST)的默认参数。

[0075] 可选地，乳酸调节多肽可为天然对应物的功能变体。此类功能变体可在天然对应物的一个或多个功能结构域之外含有一个或多个突变。天然乳酸调节多肽的功能结构域可为本领域已知的，或者可以基于其氨基酸序列来预测。预期一个或多个功能结构域外的突变不会实质上影响蛋白质的生物学活性。在一些情况下，相对于天然对应物，功能变体可表现出乳酸转运方面的增加活性。可选地，相对于天然对应物，功能变体可表现出乳酸转运方面的降低活性。此外，功能变体可具有增加的至细胞表面的运输。可选地，功能变体可具有减少的至细胞表面的运输。

[0076] 可选地或另外，功能变体可在天然对应物中的一个或多个位置(例如，至多20个位置、至多15个位置、至多10个位置、至多5个、4个、3个、2个，1个位置)处含有一个或多个保守突变。如本文所用，“保守氨基酸取代”是指不改变进行氨基酸取代的蛋白质的相对电荷或大小特征的氨基酸取代。可以根据本领域普通技术人员已知的用于改变多肽序列的方法来制备变体，所述方法为诸如可以在编译此类方法的参考文献中找到的方法，所述参考文献为例如Molecular Cloning:A Laboratory Manual,J.Sambrook等人编著，Second Edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York,1989或Current Protocols in Molecular Biology,F.M.Ausubel等人编著，John Wiley&Sons,Inc.,New York。氨基酸的保守取代包括在以下组内的氨基酸之间进行的取代：(a)M、I、L、V；(b)F、Y、W；(c)K、R、H；(d)A、G；(e)S、T；(f)Q、N；以及(g)E、D。

[0077] 在一些实施方案中，乳酸调节因子可以是调控内源性乳酸调节多肽的表达的分子。此类乳酸调节因子可以是转录因子或微小RNA。在一些情况下，乳酸调节因子可为调控一种或多种参与乳酸合成和/或代谢的酶以及一种或多种乳酸转运蛋白的表达的核酸(例如，微小RNA、干扰RNA诸如siRNA或shRNA或反义核酸)。在其他实施方案中，乳酸调节因子可

以是调控一种或多种参与乳酸合成、代谢和/或转运的酶或转运蛋白的表达的转录因子。在其他实施方案中，乳酸调节因子可以是介导内源性乳酸调节多肽(诸如本文所公开的内源性乳酸调节多肽)的降解的分子，例如作为泛素/蛋白酶体途径的一部分的E3连接酶。另外，内源性乳酸调节多肽的运输可以例如通过表达增加其至细胞表面的运输的多肽来调控。

[0078] II.嵌合受体多肽

[0079] 如本文所用，嵌合受体多肽是指可以在宿主细胞的表面上表达的非天然存在的分子。嵌合受体多肽包含可靶向感兴趣的抗原(例如，与疾病诸如癌症相关的抗原或与病原体相关的抗原；参见本文的讨论)的细胞外靶结合结构域。细胞外靶结合结构域可以直接结合感兴趣的抗原(例如，如本文所公开的CAR多肽中的细胞外抗原结合结构域)。可选地，细胞外靶结合结构域可经由中间体(例如含Fc的剂，诸如抗体)与感兴趣的抗原结合。嵌合受体多肽还可包含跨膜结构域、铰链结构域、细胞质信号传导结构域、一个或多个共刺激结构域、细胞质信号传导结构域或它们的组合。在一些情况下，嵌合受体多肽可不含共刺激结构域。嵌合受体多肽经配置为使得当在宿主细胞上表达时，细胞外靶结合结构域位于细胞外以直接或间接地与靶抗原结合。任选的共刺激信号传导结构域可以位于细胞质中以触发活化和/或效应物信号传导。

[0080] 在一些实施方案中，本文所述的嵌合受体多肽还可包含铰链结构域，所述铰链结构域可位于细胞外靶结合结构域的C末端和跨膜结构域的N末端。铰链可具有任何合适的长度。在其他实施方案中，本文所述的嵌合受体多肽可以根本不具有铰链结构域。在其他实施方案中，本文所述的嵌合受体多肽可具有缩短的铰链结构域(例如，包括至多25个氨基酸残基)。

[0081] 在一些实施方案中，如本文所述的嵌合受体多肽可从N末端至C末端包含细胞外靶结合结构域、跨膜结构域和细胞质信号传导结构域。在一些实施方案中，如本文所述的嵌合受体多肽从N末端至C末端包含细胞外靶结合结构域、跨膜结构域、至少一个共刺激信号传导结构域和细胞质信号传导结构域。在其他实施方案中，如本文所述的嵌合受体多肽从N末端至C末端包含细胞外靶结合结构域、跨膜结构域、细胞质信号传导结构域和至少一个共刺激信号传导结构域。

[0082] 在一些实施方案中，嵌合受体多肽可为抗体偶联的T细胞受体(ACTR)多肽。如本文所用，ACTR多肽(也称为ACTR构建体)是指可在宿主细胞的表面上表达的非天然存在的分子，并且包含对免疫球蛋白的Fc部分具有结合亲和力和特异性的细胞外结构域(“Fc结合剂”或“Fc结合结构域”)、跨膜结构域和细胞质信号传导结构域。在一些实施方案中，本文所述的ACTR多肽还可包含至少一个共刺激信号传导结构域。

[0083] 在其他实施方案中，本文公开的嵌合受体多肽可为嵌合抗原受体(CAR)多肽。如本文所用，CAR多肽(也称为CAR构建体)是指可以在宿主细胞的表面上表达的非天然存在的分子，并且包含细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和细胞质信号传导结构域。本文所述的CAR多肽还可包含至少一个共刺激信号传导结构域。

[0084] 细胞外抗原结合结构域可为与靶抗原特异性结合的任何肽或多肽，包括与医学病症(例如，疾病)相关的天然存在的抗原或与靶向疾病相关抗原的治疗剂缀合的抗原部分。

[0085] 在一些实施方案中，本文所述的CAR多肽还可包含至少一个共刺激信号传导结构域。CAR多肽被配置为使得当在宿主细胞上表达时，细胞外抗原结合结构域位于细胞外以结

合靶分子和细胞质信号传导结构域。任选的共刺激信号传导结构域可以位于细胞质中以触发活化和/或效应物信号传导。

[0086] 如本文所用,短语“蛋白质X跨膜结构域”(例如,CD8跨膜结构域)是指给定蛋白质(即跨膜的蛋白质X)的任何在膜中热力学稳定的部分。

[0087] 如本文所用,短语“蛋白质X细胞质信号传导结构域”(例如CD3ζ细胞质信号传导结构域)是指蛋白质(蛋白质X)的任何部分,所述部分与细胞或细胞器内部相互作用并且能够传递如本领域中已知的主要信号,这导致免疫细胞增殖和/或活化。如本文所述的细胞质信号传导结构域不同于共刺激信号传导结构域,所述共刺激信号传导结构域传递次级信号以完全活化免疫细胞。

[0088] 如本文所用,短语“蛋白X共刺激信号传导结构域”(例如CD28共刺激信号传导结构域)是指给定共刺激蛋白(蛋白X,诸如CD28、4-1BB、OX40、CD27或ICOS)的可将共刺激信号(次级信号)转导到免疫细胞(诸如T细胞)中,从而导致免疫细胞的完全活化的部分。

[0089] A.细胞外靶结合结构域

[0090] 本文公开的嵌合受体多肽包含通过直接结合或间接结合(通过中间体,诸如抗体)靶向感兴趣的抗原(例如,本文所述的那些抗原)的细胞外结构域。嵌合受体多肽可为包含Fc结合结构域的ACTR多肽。可选地,嵌合受体多肽可为包含细胞外抗原结合结构域的CAR多肽。

[0091] Fc结合结构域

[0092] 本文所述的ACTR多肽包含细胞外结构域,该细胞外结构域为Fc结合结构域,即能够结合合适的哺乳动物(例如,人、小鼠、大鼠、山羊、绵羊或猴子)的免疫球蛋白(例如,IgG、IgA、IgM或IgE)的Fc部分。合适的Fc结合结构域可来源于天然存在的蛋白质,诸如哺乳动物Fc受体或某些细菌蛋白质(例如,蛋白质A、蛋白质G)。另外,Fc结合结构域可为合成多肽,所合成多肽经特异性工程化以高亲和力和特异性结合本文所述的抗体中的任何抗体的Fc部分。例如,此类Fc结合结构域可为特异性结合免疫球蛋白的Fc部分的抗体或其抗原结合片段。实例包括但不限于单链可变片段(scFv)、结构域抗体或单结构域抗体(例如,纳米抗体)。可选地,Fc结合结构域可为特异性结合Fc部分的合成肽,诸如Kunitz结构域、小型模块化免疫药物(SMIP)、adnectin、avimer、亲和体、DARPin或抗运载蛋白,所述Fc结合结构域可通过筛选肽组合文库的与Fc的结合活性来鉴定。

[0093] 在一些实施方案中,Fc结合结构域为哺乳动物Fc受体的细胞外配体结合结构域。如本文所用,“Fc受体”是在许多免疫细胞(包括B细胞、树突细胞、自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、肥大细胞和嗜酸性粒细胞)的表面上表达并且表现出对抗体的Fc结构域的结合特异性的细胞表面结合受体。Fc受体通常由至少两个免疫球蛋白(Ig)样结构域组成,所述结构域具有对抗体的Fc(片段可结晶)部分的结合特异性。在一些情况下,Fc受体与抗体的Fc部分的结合可触发抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)效应。如本文所述用于构建ACTR多肽的Fc受体可为天然存在的多态性变体(例如,CD16V158变体),该多态性变体可具有与野生型对应物相比增加或降低的对Fc的亲和力。可选地,Fc受体可为野生型对应物的功能变体,该功能变体携带改变对Ig分子的Fc部分的结合亲和力的一个或多个突变(例如,至多10个氨基酸残基取代,包括1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个突变)。在一些情况下,该突变可改变Fc受体的糖基化模式,并由此改变与Fc的结合亲和力。

[0094] 下表列出了Fc受体细胞外结构域中的许多示例性多态性(参见例如,Kim等人,J.Mol.Evol.53:1-9,2001),所述示例性多态性可用于本文所述的方法或构建体中的任何方法或构建体中:

[0095] 表1.Fc受体的示例性多态性

[0096]

氨基酸数	19	48	65	89	105	130	134	141	142	158
FCR10	R	S	D	I	D	G	F	Y	T	V
P08637	R	S	D	I	D	G	F	Y	I	F
S76824	R	S	D	I	D	G	F	Y	I	V
J04162	R	N	D	V	D	D	F	H	I	V
M31936	S	S	N	I	D	D	F	H	I	V
M24854	S	S	N	I	E	D	S	H	I	V
X07934	R	S	N	I	D	D	F	H	I	V
X14356 (FcγRII)	N	N	N	S	E	S	S	S	I	I
M31932 (FcγRI)	S	T	N	R	E	A	F	T	I	G
X06948 (FcαεI)	R	S	E	S	Q	S	E	S	I	V

[0097] Fc受体基于其能够结合的抗体同种型进行分类。例如,Fc-γ受体(FcγR)通常与IgG抗体结合,诸如所述IgG抗体的一种或多种亚型(即,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4);Fc-α受体(FcαR)通常与IgA抗体结合;Fc-ε受体(FcεR)通常与IgE抗体结合。在一些实施方案中,Fc受体为Fc-γ受体、Fc-α受体或Fc-ε受体。Fc-γ受体的实例包括但不限于CD64A、CD64B、CD64C、CD32A、CD32B、CD16A和CD16B。Fc-α受体的实例为FcαR1/CD89。Fc-ε受体的实例包括但不限于FcεRI和FcεRII/CD23。下表列出了用于构建本文所述的ACTR多肽的示例性Fc受体及其对对应的Fc结构域的结合活性:

[0098] 表2.示例性Fc受体

[0099]

受体名称	一抗配体	配体亲和力
FcγRI (CD64)	IgG1 和 IgG3	高(Kd 为约 10^{-9}M)
FcγRIIA (CD32)	IgG	低(Kd>10^{-7}M)
FcγRIIB1 (CD32)	IgG	低(Kd>10^{-7}M)
FcγRIIB2 (CD32)	IgG	低(Kd>10^{-7}M)
FcγRIIIA (CD16a)	IgG	低(Kd>10^{-6}M)
FcγRIIIB (CD16b)	IgG	低(Kd>10^{-6}M)
FcεRI	IgE	高(Kd 为约 10^{-10}M)
FcεRII (CD23)	IgE	低(Kd>10^{-7}M)
FcαRI (CD89)	IgA	低(Kd>10^{-6}M)
Fcα/μR	IgA 和 IgM	对于 IgM 为高，对于 IgA 为中等
FcRn	IgG	

[0100] 用于本文所述的ACTR多肽的Fc受体的配体结合结构域的选择对于本领域技术人员将是显而易见的。例如,其可以取决于诸如Fc受体期望结合的抗体的同种型以及结合相互作用的期望亲和力的因素。

[0101] CAR多肽中的任何一种CAR多肽的细胞外抗原结合结构域在一些实例中,Fc结合结构域是CD16的细胞外配体结合结构域,所述结构域可掺入可调控对Fc的亲和力的天然存在的多态性。在一些实例中,Fc结合结构域是在位置158处掺入多态性(例如,缬氨酸或苯丙氨酸)的CD16的细胞外配体结合结构域。在一些实施方案中,Fc结合结构域在改变其糖基化状态及其对Fc的亲和力的条件下产生。

[0102] 以下提供了人CD16A F158和CD16A V158变体的氨基酸序列,其中F158和V158残基以粗体/黑体突出显示并加下划线(信号肽为斜体):

[0103] CD16A F158(SEQ ID NO:86):

*MWQLLLPTALLLLVSA*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDS
VTLKCQGAYSPEDNS
TQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLE
VHIGWLLLQAPR
WVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYI
PKATLKDSGSYF
CRGL**F**GSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQVSFCLVMVLL
FAVDTGLYFSVKTNIRSSTRDWKDHKFKWRKDPQDK

[0104]

[0105] CD16A V158(SEQ ID NO:87):

*MWQLLLPTALLLLVSA*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDS
VTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYR
CQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKN
TALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGL**V**GS
KNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQVSFCLVMVLLFAVDTGL
YFSVKTNIRSSTRDWKDHKFKWRKDPQDK

[0106]

[0107] 在一些实施方案中,Fc结合结构域是掺入了使得ACTR多肽对IgG抗体的子集具有特异性的修饰的CD16的细胞外配体结合结构域。例如,可以掺入增加或降低对IgG亚型(例如,IgG1)的亲和力的突变。

[0108] 本文所述的Fc结合结构域中的任何Fc结合结构域可对治疗性抗体的Fc部分具有合适的结合亲和力。如本文所用,"结合亲和力"是指表观结合常数或K_A。K_A是解离常数K_D的倒数。本文所述的ACTR多肽的Fc受体结构域的细胞外配体结合结构域对抗体的Fc部分的结合亲和力K_d可为至少10^{-5}、10^{-6}、10^{-7}、10^{-8}、10^{-9}、10^{-10}M或更低。在一些实施方案中,与Fc结合结构域对另一种抗体、抗体的一种或多种同种型或其亚型的结合亲和力相比,Fc结合结构域对抗体、抗体的一种或多种同种型或其亚型具有高结合亲和力。在一些实施方案中,与Fc受体的细胞外配体结合结构域对另一种抗体、抗体的一种或多种同种型或其亚型的结合相比,Fc受体的细胞外配体结合结构域对抗体、抗体的一种或多种同种型或其亚型具有特异性。

[0109] 本领域已知的其他Fc结合结构域也可用于本文所述的ACTR构建体中,包括例如WO2015058018A1和PCT申请号:PCT/US2018/015999中所述的那些Fc结合结构域,所述专利中的每一者的相关公开内容出于此目的和本文所引用的主题而以引用方式并入。

[0110] 细胞外抗原结合结构域

[0111] 本文所述的CAR多肽包含细胞外抗原结合结构域,该细胞外抗原结合结构域可重定向表达CAR多肽的免疫细胞的特异性。如本文所用,"细胞外抗原结合结构域"是指对感兴趣的靶抗原具有结合特异性的肽或多肽,所述感兴趣的靶抗原可为与医学病症(例如,疾病)相关的天然存在的抗原,或与靶向疾病相关抗原的治疗剂缀合的抗原部分。本文所述的

细胞外抗原结合结构域不包含Fc受体的细胞外结构域，并且可以不与免疫球蛋白的Fc部分结合。不与Fc片段结合的细胞外结构域是指使用常规测定无法检测到Fc片段与细胞外结构域之间的结合活性，或者使用常规测定仅检测到背景或生物学上不显著的结合活性。

[0112] 在一些情况下，本文所述的任何CAR多肽的细胞外抗原结合结构域是肽或多肽，所述肽或多肽能够与细胞表面抗原(例如，肿瘤抗原)结合或为与主要组织相容性复合物复合的复合物并在抗原呈递细胞的细胞表面上呈递的抗原(或其片段)结合。此类细胞外抗原结合结构域可为单链抗体片段(scFv)，该scFv可来源于以高结合亲和力结合靶细胞表面抗原的抗体。下表3列出了示例性细胞表面靶抗原和与此类示例性细胞表面靶抗原结合的示例性抗体。

[0113] 表3.示例性细胞表面靶抗原和与所述示例性细胞表面靶抗原结合的示例性抗体

示例性靶抗原	示例性抗体		示例性靶抗原	示例性抗体和 Fc 融合剂
CD137 (4-1BB)	乌托米单抗 (utomilumab)		CD74	米拉珠单抗 (milatuzumab)
滋养层糖蛋白(5T4)	他那莫单抗 (naptumomab estafenatox)		HLA-DR	IMMU-114
腺苷 A2a 受体(A2aR)	抗 A2aR mAb		Hsp70	mi-TUMEXtx
Alk-1 蛋白激酶 (ACVRL1)	ascrinvacumab		Hsp 90	ZSG-102
ADAM-10 (ADAM10)	8C7		ICAM-1	BI-505
TACE (ADAM17)	MEDI-3622		诱导型 T 细胞共刺激因子(ICOS)	GSK-3359609
ADAM-28 (ADAM28)	GFC-201		免疫球蛋白 κ (Ig κ)	κ Mab
CD156; 免疫球蛋白 G1;	MAB-1031		免疫球蛋白抗原 (Ig λ)	λ Mab

[0114]

[0115]

示例性靶抗原	示例性抗体		示例性靶抗原	示例性抗体和 Fc 融合剂
免疫球蛋白 G2 (ADAM8)				
ADAM-9 (ADAM9)	AEX-6003		IL-6 受体(IL-6R)	托珠单抗
前梯度蛋白 2 同源物 (AGR2)	agtuzumab		IL-7 受体(IL-7R)	抗 IL7R mab
间变性淋巴瘤激酶 (ALK)	KTN-0125		IL-13 受体 α 1 亚基(IL13RA1)	ASLAN-004
血管生成素配体 -2 (Ang-2)；血管内皮生长因子 A (VEGF-A)	万古珠单抗 (vanucizumab)		IL-13 受体 α 2 亚基(IL13RA2)	抗 IL13RA2 mAb
乳凝集素(抗独特型)	TriAb (11D10)		IL-1 受体辅助蛋白(IL1RAP)	CAN-04
肿瘤坏死因子配体 13 (APRIL)	BION-1301		IL-2 受体 β (IL2R β)	Mikβ1
天冬氨酸 β-羟化酶 (ASPH)	PAN-622		免疫球蛋白样结构域受体 2 (ILDR2)	BAY-1905254
Axl 酪氨酸激酶(AXL)	BA-3011		整合素 α-X/β-1 (整合素 a10b1)	抗整合素 a10b1 mAb
CD276 抗原 (B7-H3)	BVD m276；hu8H9		整合素 α-3/β-1 (整合素 a3b1)	BCMab-1
含 V 组结构域的 T 细胞活化抑制剂 1(	FPA-150		整合素 α-6/β-4 (整合素 a6b4)	90Y-ITGA6B4

[0116]

示例性靶抗原	示例性抗体		示例性靶抗原	示例性抗体和 Fc 融合剂
VTCN1；还有为 B7-H4)				
B 细胞活化因子；(BAFF; 还有 TNFSF13B 和 CD257)	blisibimod		整合素 α-9 (整合素 a9)	GND-001
B 细胞活化因子受体；(BAFF-R; 还有 TNFSF13C 和 CD268)	VAY736		CD49b (整合素 α 2)	伐特珠单抗
BAG 分子伴侣调节剂 3 (BAG3)	抗 BAG3 mAb		CD49c (整合素 α 3)	抗 CD49c mAb
基础免疫球蛋白 (Basigin) (BSG；CD147)	cHAb18		CD49d; (整合素 α 4)	抗 CD49d mAb
B 细胞成熟抗原 (BCMA；还有 TNFRSF17)	SEA-BCMA		CD51	阿比妥珠单抗 (abituzumab)
ADP 核糖基环化酶 2 (BST1)	OX-001		CD29 (整合素 β 1)	OS-2966
B 和 T 淋巴细胞弱化因子(BTLA)	40E4		CD61 (整合素 β 3)	抗 CD61 mAb
补体 C5a 受体(C5aR)	纽珠单抗 (neutrazumab)		Jagged-1	抗 Jagged-1 mAb

[0117]

示例性靶抗原	示例性抗体		示例性靶抗原	示例性抗体和 Fc 融合剂
CACNA2D1 钙通道亚基 (CACNA2D1)	抗 CACNA2D1 mAb		肾脏相关抗原 1 (KAAG1)	AB-3A4
碳酸酐酶 IX (CAIX)	G250		钾通道亚家族 K 成员 9 (KCNK9)	Y-4
钙网蛋白 (CALR)	抗 CALR mAb		KIR2DL1/2L3	利利单抗 (lirilumab)
小窝蛋白 1 (CAV1)	抗 CAV1 mAb		酪氨酸蛋白激酶试剂盒(KIT)	CDX-0158
碳酸酐酶 XII (CAXII)	177Lu-6A10-Fab；抗 CAXII mAb		L1CAM	抗 L1CAM mAb
CCR2 趋化因子受体 (CCR2)	帕洛珠单抗 (plozalizumab)		死亡受体 5 (DR5)	APOMAB
CCR3 趋化因子受体 (CCR3)	抗 CCR3 mAb		CD223 (LAG3)	relatlimab
CCR4 趋化因子受体 (CCR4)	莫格利珠单抗 (mogamulizumab)		Lewis Y	hu3S193；MB311
CCR5 趋化因子受体 (CCR5)	PRO 140；CCR5mAb004		锌转运蛋白 SLC39A6 (LIV1)	SGN-LIV1
CCR7 趋化因子受体 (CCR7)	抗 CCR7 mAb		赖氨酰氧化酶样蛋白 2 (LOXL2)	AB-0023
CCR9 趋化因子受体 (CCR9)	抗 CCR9 mAb		含富含亮氨酸的重复序列的蛋白 15 (LRRC15)	ABBV-085
白介素 3 受	CSL362 ；		含富含亮氨酸的	ARGX-115

[0118]

示例性靶抗原	示例性抗体		示例性靶抗原	示例性抗体和 Fc 融合剂
体 α (IL3RA ; CD123)	KHK2823		重复序列的蛋白 32 (LRRC32)	
氨肽酶 N (CD13)	MI-130110		淋巴细胞抗原 75 (LY75)	MEN-1309
Prominin 1 (CD133)	抗 CD133 mAb		含 Ly6/PLAUR 结构域的蛋白 3 (LYPD3)	BAY-1129980
多配体蛋白聚糖 -1 (CD138)	依坦希单抗 (indatuximab ravtansine)		黑色素瘤相关抗原(MHC 中存在的 MAGE 肽)	LxC-002
CD160	ELB-021		马曲肽酶 (Matriptase) (ST14)	抗 ST14 mAb
活化白细胞粘附分子 (CD166)	CX-2009		MICA/B	IPH4301
B 淋巴细胞抗原 CD19	MOR208		MIF/HLA-A2 (MHC 中存在的 MIF 肽)	RL21A
B 淋巴细胞抗原 CD20	利妥昔单抗; 阿托珠单抗 (obinituzumab); 奥卡拉妥珠单抗 (ocaratuzumab)		抗缪勒管激素 II (MHR2)	GM-102
膜糖蛋白 OX2 CD200	沙马珠单抗 (samalizumab)		MMP1/HLA (MHC1 中存在的 MMP1 肽)	抗 MMP1/HLA mAb
CD22	依帕珠单抗		金属蛋白酶 9 (MMP9)	安德西昔单抗 (andecaliximab)
免疫球蛋白 εFc 受体 II	鲁昔单抗 (lumiliximab)		间皮素(MSLN)	MORAb-009

[0119]

示例性靶抗原	示例性抗体		示例性靶抗原	示例性抗体和 Fc 融合剂
(CD23)				
信号转导物 CD24	抗 CD24 mAb		粘蛋白 1 (MUC1)	PankoMab-GEX
IL-2 受体 α 亚基 CD25	90Y-达利珠单抗		粘蛋白 13 (MUC13)	抗 MUC13 mAb
CD27	varilumab		内皮粘蛋白 (MUC14)	抗 MUC14 mAb
CD28	曲加珠单抗 (theralizumab)		粘蛋白 16 (MUC16)	索非妥珠单抗 (sofituzumab)
CD3	莫罗单抗-CD3 (OKT3)		细胞表面糖蛋白 MUC18 (CD146)	AA98
CD30	本妥昔单抗 (brentuximab vedotin)		粘蛋白 5AC (MUC5AC)	恩妥昔单抗 (ensituximab)
免疫球蛋白 γFc 受体 IIB (CD32B)	BI-1206		N-甘氨酰 GM3 (NeuGcGM3)	99mTc 标记的 14F7
CD33	林妥珠单抗 (lintuzumab)		钠依赖性磷酸转运蛋白 2B (SLC34A2)	XMT-1536
CD37	奥特托珠单抗 (otlertuzumab)		核仁蛋白(NCL)	抗核仁蛋白 mAb
ADP 核糖基环化酶 1 (CD38)	达雷木单抗 (daratumumab)		连接蛋白-4	恩诺单抗 (enfortumab vedotin)
CD39	OREG-103		神经纤维瘤蛋白 (NF1)	抗神经纤维瘤蛋白 mAb
CD4	IT-1208		NGcGM3 神经节苷脂	雷古托玛单抗 (racotumomab)

[0120]

示例性靶抗原	示例性抗体		示例性靶抗原	示例性抗体和 Fc 融合剂
CD40	卢卡木单抗(lucatumumab)		NKG2A	莫纳利珠单抗(monalizumab)
CD43	leukotuximab		不含 POU 结构域的八聚体结合蛋白(NONO)	PAT-LM1
CD44	RG7356		缺口-1	波替妥珠单抗(brontictuzumab)
CD45	131I-BC8		CD73	oleclumab
膜辅因子蛋白(CD46)	AugmAb		纺锤蛋白-1(NTN1)	NP-137
CD47	Hu5F9-G4		OX-40	PF-04518600
CD52	阿仑单抗(alemtuzumab)		P2X 嘌呤受体 7(P2RX7)	BIL-010t
CD55	PAT-SC1		FGF 受体(pan FGFR)	MM-161
神经元细胞粘附分子 1;(CD56)	IMGN-901		整合素(Pan 整合素)	NOD201
T 细胞分化抗原 CD6	依拓珠单抗(itolizumab)		P-钙粘着蛋白,还有钙粘着蛋白 3 (CDH3)	PCA-062
CD70	SGN-70		程序性细胞死亡蛋白 1 (PD-1)	派姆单抗(pembrolizumab)
CD79b	泊洛妥珠单抗(polatuzumab vedotin)		程序性细胞死亡配体 1 (PD-L1)	阿维鲁单抗(avelumab);Euchloe H12
CD8	抗 CD8 mAb		程序性细胞死亡配体 2 (PD-L2)	rHIgM12B7
CD80	加利昔单抗		PDGF 受体 α	奥拉单抗

[0121]

示例性靶抗原	示例性抗体		示例性靶抗原	示例性抗体和 Fc 融合剂
	(galiximab)		(PDGFRA)	(olaratumumab)
CD98	IGN-523		胎盘特异性蛋白 1 (PLAC1)	抗 PLAC1 mAb
CD99	NV-103		PR1/HLA (MHC 中的 PR1 肽)	抗 PR1/HLA mAb
钙粘着蛋白 1 (CDH1)	抗 CDH1 mAb		催乳素受体 PRLR	ABBV-176
钙粘着蛋白 17 (CDH17)	抗 CDH17 mAb		磷脂酰丝氨酸	抗磷脂酰丝氨酸 mAb
钙粘着蛋白 19 (CDH19)	抗 CDH19 mAb		前列腺干细胞抗原(PSCA)	抗 PSCA mAb
钙粘着蛋白 6 (CDH6)	HKT-288		谷氨酸羧肽酶 II (PSMA)	ATL-101
CD66a (CEACAM1)	CM-24		甲状旁腺素相关蛋白(PTH-rP)	CAL
CD66e (CEACAM5)	IMMU-130		酪氨酸蛋白激酶样 7 (PTK7)	卡非珠单抗 (cofetuzumab pelidotin)
CD66c ; CD66e (CEACAM5/6)	NEO-201		蛋白酪氨酸磷酸酶 IVA3 (PTP4A3)	PRL3-zumab
密封蛋白 18 (密封蛋白 18.2)	IMAB362		包含脊髓灰质炎病毒受体相关免疫球蛋白结构域的蛋白(PVRIG)	COM-701
密封蛋白 6	IMAB027		核因子 κ-B 配体的受体活化剂 (RANKL)	地诺单抗 (denosumab)
SLAM 家族成员 7 (CS1)	埃罗妥珠单抗 (elotuzumab)		受体酪氨酸激酶	抗 RON mAb

[0122]

示例性靶抗原	示例性抗体		示例性靶抗原	示例性抗体和 Fc 融合剂
			(RON)	
集落刺激因子-1 受体(CSF1R)	卡比拉单抗(cabiralizumab)		酪氨酸蛋白激酶跨膜受体 ROR1(ROR1)；还有 NTRKR1	西妥珠单抗(cirmtuzumab)
细胞毒性 T 淋巴细胞蛋白 4(CTLA4)	伊匹单抗(ipilumumab)		酪氨酸蛋白激酶跨膜受体 ROR2(ROR2)；还有 NTRKR2	BA-3021
柯萨奇病毒和腺病毒受体(CXADR)	抗 CXADR mAb		R-脊椎蛋白-3(RSPO3)	rosmantuzumab
CXCR2 趋化因子受体	抗 CXCR2 mAb		鞘氨醇-1-磷酸受体 3 (S1PR3)	EDD7H9
CXCR3 趋化因子受体	抗 CXCR3 mAb		白血病表面抗原(SAIL)	IGN-786
CXCR4 趋化因子受体	ulocuplumab		臂板蛋白-4D(SEMA4D)	VX-15
CXCR5 趋化因子受体	STI-B030X		糖类抗原 19-9(CA 19-9)	MVT-1075
CXCR7 趋化因子受体	抗 CXCR7 mAb		唾液酸化汤姆森新抗原(STn)	抗 STn mAb
DCLK1	抗 DCLK1 mAb		唾液酸结合 Ig 样凝集素 8	AK-002

[0123]

示例性靶抗原	示例性抗体		示例性靶抗原	示例性抗体和 Fc 融合剂
			(Siglec-8)	
Dickkopf 相关蛋白 1 (DKK1)	BHQ-880		唾液酸结合 Ig 样凝集素 9 (Siglec-9)	抗 Siglec-9 mAb
DLK1	ADCT-701		信号调节蛋白 α (SIRPA)	OSE-172
δ 样蛋白配体 3 (DLL3)	SC16LD6.5		CD48；还有 SLAM 家族成员 2 (SLAMF2)	SGN-CD48A
δ 样蛋白配体 4 (DLL4)；VEGF (VEGF)	纳维西珠单抗 (navicixizumab)		CD352；SLAM 家族成员 6 (SLAMF6)	SGN-CD352A
二肽基肽酶 4 (DPP4)，（还有 CD26）	YSCMA		中性氨基酸转运蛋白 B0 (SLC1A5)	KM-8094
死亡受体 3 (DR3)	PTX-35		生长抑素 2 受体 (SSTR2)	XmAb-18087
TRAIL-1 受体(DR4)	HuYON007 多聚体		稳定素 1 (STAB1)	FP-1305
TRAIL-1 受体; TRAIL-2 受体 (DR4/DR5)	DR4/DR5 替代抗体		金属还原酶 (STEAP1)	89Zr-DFO-MSTP2109A
TRAIL-2 受体(DR5)	DS-8273		生存素	抗生存素 mAb
EGF 样蛋白 6 (EGFL6)	抗 EGFL6 mAb		TAG-72	90Y-IDEC-159
表皮生长因子受体 (EGFR)	西妥昔单抗; Sym004; 尼妥珠单抗		T 细胞受体 (TCR)	抗 TCR mAb
表皮生长因子受体 vIII (EGFRvIII)	ABT-806		内皮唾酸蛋白 (TEM1)	欧土希珠单抗 (ontuxizuma

[0124]

示例性靶抗原	示例性抗体		示例性靶抗原	示例性抗体和 Fc 融合剂
				b)
上皮膜蛋白 2 (EMP2)	ONCR-201		炭疽毒素受体 1 (ANTXR1); 还有 TEM8	抗 TEM8 mAb
内皮糖蛋白	卡洛昔单抗 (carotuximab)		组织因子(TF)	MORAb-066
外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶家族成员 3 (ENPP3)	AGS-16C3F		转化生长因子, β 受体 II TGF-β II 型(TGFBR2)	抗 TGFBR2 mAb
前列腺素 E_2 受体 2 (PTGER2)	抗 PTGER2 mAb		汤姆森-弗里登抗原 (Thomsen-Friedenreich Antigen)	JAA-F11
前列腺素 E_2 受体 4 (PTGER4)	抗 PTGER4 mAb		具有 Ig 和 ITIM 结构域的 T 细胞免疫受体 (TIGIT)	BMS-986207
EpCAM	莫奥珠单抗 (oportuzumab monatox)		甲型肝炎病毒细胞受体 1 (HAVCR1); 还有 TIM-1	CDX-014
蝶素 A 型受体 2 (EphA2)	MEDI-547		甲型肝炎病毒细胞受体 2 (HAVCR2); 还有 TIM-3	MBG453
蝶素 A 型受体 3 (EphA3)	KB004		Toll 样受体 2 (TLR-2)	OPN-305
成纤维细胞活化蛋白 (FAP)	F19		Toll 样受体 4 (TLR-4)	抗 TLR4 mAb
CD95 (FAS)	asunercept		跨膜 4 L6 家族成员 1 (TM4SF1)	抗 TM4SF1 mAb
Fc 受体样蛋	RG-6160		肿瘤坏死因子受	抗 TNFR2

[0125]

示例性靶抗原	示例性抗体		示例性靶抗原	示例性抗体和 Fc 融合剂
白 5 (FCRL5)			体 2 (TNFR2)	mAb
FGF 受体 1 (FGFR1)	FP-1039		CD71	抗 CD71 mAb
FGF 受体 2b (FGFR2b)	FPA-144		骨髓细胞上表达的触发性受体 1 (TREM1)	抗 TREM1 mAb
FGF 受体 3 (FGFR3)	B-701		肿瘤相关钙信号转导物 2 (Trop-2)	DS-1062
fms 样酪氨酸激酶 3 (FLT3)	Flysyn		TWEAK 受体 (TWEAKR)	MRT-101
叶酸受体 α (FOLR1)	法利珠单抗 (farletuzumab) ; IMGN853 ; KHK2805		酪氨酸-蛋白激酶受体 TYRO3 (TYRO3)	ELB-031
叶酸受体 β (FOLR2)	抗 FOLR β mAb		尿激酶受体 (uPAR)	MNPR-101
Frizzled-1 ; Frizzled-2 ; Frizzled-5 ; Frizzled-7 ; Frizzled-8 ; (FZD1 、FZD2 、FZD5 、FZD7 、FZD8)	伐提克图单抗 (vantictumab)		VEGF-2 (VEGFR2)	雷莫芦单抗 (ramucirumab)
卵泡抑素样蛋白 1 (FSTL1)	抗 FSTL1 mAb		波形蛋白	普托木单抗 (pritumumab)
岩藻糖基-GM1	BMS-986012		T 细胞活化的 V 结构域 Ig 抑制剂 (VISTA)	JNJ-61610588
Frizzled-10	OTSA-101		整合素 α-4/β-1	那他珠单抗

[0126]

示例性靶抗原	示例性抗体		示例性靶抗原	示例性抗体和 Fc 融合剂
(FZD10)				(natalizumab)
GCSF-R (还称为 CD114 和 CSFR3)	CSL324		免疫球蛋白 ι 链 (VPREB1)	抗 VPREB1 mAb
半乳糖凝集素-3 结合蛋白(LGALS3)	MP-1959		威尔姆氏瘤蛋白 (WT1/HLA) ; MHC 中存在的 WT1 肽	ESK1
鸟苷酸环化酶 2C (GUCY2C)	TAK-164		磷脂酰肌醇聚糖-3 (GPC3)	codrituzumab
GD2	迪妥昔单抗 (dinutuximab)		跨膜糖蛋白 NMB (GPNMB)	CDX-011
GD3	PF-06688992		含有富亮氨酸重复序列的 G 蛋白偶联受体 5 (LGR5)	BNC-101
糖皮质激素诱导的 TNFR 相关蛋白(GITR)	BMS-986156		G 蛋白偶联受体家族 C 组 5 成员 D (GPRC5D)	JNJ-64407564
糖皮质激素诱导的 TNFR 相关蛋白配体 (GITRL)	EU-102		铁蛋白	Ferritarg P
前黑素细胞蛋白(PMEL)	抗 PMEL mAb		Erbb2 酪氨酸激酶(HER2)	曲妥珠单抗 (trastuzumab); 帕妥珠单抗 (pertuzumab); 马格妥昔单抗 (margetuximab)

[0127]

示例性靶抗原	示例性抗体		示例性靶抗原	示例性抗体和 Fc 融合剂
细胞表面A33抗原(GPA33)	抗 GPA33 mAb		Erbb3 酪氨酸激酶(HER3)	帕曲妥单抗(patritumab)
磷脂酰肌醇聚糖-1(GPC1)	MIL-38		Globo H	OBI-888

[0128] 取决于感兴趣的靶抗原，细胞外抗原结合结构域可包含来源于表3中列出的抗体中的任何抗体的抗原结合片段(例如，scFv)。

[0129] 在其他实施方案中，本文所述的CAR多肽中的任何CAR多肽的细胞外抗原结合结构域可对病原性抗原诸如细菌抗原、病毒抗原或真菌抗原有特异性。下面提供一些实例：流感病毒神经氨酸酶、血凝素或M2蛋白、人呼吸道合胞病毒(RSV)F糖蛋白或G糖蛋白、单纯性疱疹病毒糖蛋白gB、gC、gD或gE、衣原体MOMP或PorB蛋白、登革热病毒核心蛋白、基质蛋白或糖蛋白E、麻疹病毒血凝素、单纯性疱疹病毒2型糖蛋白gB、脊髓灰质炎病毒I VP1、HIV 1的包膜糖蛋白、乙型肝炎核心抗原或表面抗原、白喉毒素、链球菌24M表位、淋球菌菌毛蛋白、伪狂犬病病毒g50(gpD)、伪狂犬病病毒II(gpB)、伪狂犬病病毒III(gpC)、伪狂犬病病毒糖蛋白H、伪狂犬病病毒糖蛋白E、传染性胃肠炎糖蛋白195、传染性胃肠炎基质蛋白或人丙型肝炎病毒糖蛋白E1或E2。

[0130] 另外，本文所述的CAR多肽的细胞外抗原结合结构域可对缀合至治疗剂的标签有特异性，所述治疗剂靶向与疾病或疾患相关的抗原(例如，本文所述的肿瘤抗原或病原性抗原)。在一些情况下，缀合至治疗剂的标签可为抗原的，并且CAR多肽的细胞外抗原结合结构域可为对抗原标签具有高结合亲和力和/或特异性的抗体的抗原结合片段(例如，scFv)。示例性抗原标签包括但不限于生物素、亲和素、荧光分子(例如，GFP、YRP、荧光素酶或RFP)、Myc、Flag、His(例如，聚His，诸如6xHis)、HA(血凝素)、GST、MBP(麦芽糖结合蛋白)、KLH(匙孔戚血蓝蛋白)、trx、T7、HSV、VSV(例如，VSV-G)、Glu-Glu、V5、e标签、S标签、KT3、E2、Au1、Au5和/或硫氧还蛋白。

[0131] 在其他情况下，缀合至治疗剂的标签是配体-受体对的成员，并且细胞外抗原结合结构域包含配体-受体对的另一成员或其结合标签的片段。例如，缀合至治疗剂的标签可为生物素，并且CAR多肽的细胞外抗原结合结构域可包含亲和素的生物素结合片段。参见例如Urbanska等人，2012，Lohmueller等人，2018。其他实例包括抗标签CAR，在所述抗标签CAR中细胞外抗原结合结构域为对蛋白质标签有特异性的scFv片段，所述蛋白质标签为例如FITC(Tamada等人，2012；Kim等人，2015；Cao等人，2016；和Ma等人，2016)、PNE(Rodgers等人，2016)、La-SS-B(Cartellieri等人，2016)、生物素(Lohmullular等人，2017)和亮氨酸拉链(Cho等人，2018)。用于本文所述的CAR多肽中的抗原结合结构域的选择对于本领域技术人员将为显而易见的。例如，所述选择可取决于诸如靶抗原的类型和结合相互作用的所需亲和力的因素。

[0132] 本文所述的CAR多肽中的任何CAR多肽的细胞外抗原结合结构域可对靶抗原(例

如,本文所述的靶标中的任何靶标)或其抗原表位具有合适的结合亲和力。如本文所用,“结合亲和力”是指表观结合常数或K_A。K_A是解离常数K_D的倒数。用于本文所述的多肽CAR中的细胞外抗原结合结构域对靶抗原或抗原表位的结合亲和力(K_D)可为至少10^{-5}、10^{-6}、10^{-7}、10^{-8}、10^{-9}、10^{-10}M,或更低。增加的结合亲和力对应于降低的K_D。相对于第二抗原,第一抗原的细胞外抗原结合结构域的较高亲和力结合可通过结合第一抗原的K_A(或更小的数值K_D)高于结合第二抗原的K_A(或数值K_D)来指示。在此类情况下,细胞外抗原结合结构域具有相对于第二抗原(例如,第二构象的相同第一蛋白质或其模拟物;或第二蛋白质)对第一抗原(例如,第一构象的第一蛋白或其模拟物)的特异性。结合亲和力的差异(例如,针对特异性或其他比较)可为至少1.5、2、3、4、5、10、15、20、37.5、50、70、80、91、100、500、1000、10,000或10^5倍。

[0133] 结合亲和力(或结合特异性)可以通过多种方法确定,所述多种方法包括平衡透析、平衡结合、凝胶过滤、ELISA、表面等离振子共振或光谱法(例如,使用荧光测定)。用于评估结合亲和力的示例性条件为在HBS-P缓冲液(10mM HEPES pH7.4、150mM NaCl,0.005%(v/v)表面活性剂P20)中。这些技术可用于测量结合的结合蛋白的浓度随着靶蛋白浓度的变化。结合的结合蛋白([结合])的浓度通常通过以下方程式而与游离靶蛋白([游离])的浓度有关:

[0134] [结合]=[游离]/(Kd+[游离])

[0135] 然而,并非总是需要精确地确定K_A,但是因为有时足以获得亲和力的定量测量值(例如,使用诸如ELISA或FACS分析的方法确定),亲和力与K_A成正比,因此可以用于进行比较,诸如确定较高的亲和力是否为例如2倍高以获得亲和力的定性测量结果,或例如通过功能测定(例如体外或体内测定)中的活性获得亲和力的推论。

[0136] B.跨膜结构域

[0137] 本文所述的嵌合受体多肽(例如,ACTR多肽或CAR多肽)的跨膜结构域可为本领域已知的任何形式。如本文所用,“跨膜结构域”是指在细胞膜,优选真核细胞膜中热力学稳定的任何蛋白质结构。适用于本文所用的嵌合受体多肽的跨膜结构域可获自天然存在的蛋白质。可选地,所述跨膜结构域可为合成的、非天然存在的蛋白质区段,例如在细胞膜中热力学稳定的疏水性蛋白质区段。

[0138] 基于跨膜结构域的三维结构对跨膜结构域进行分类。例如,跨膜结构域可形成α螺旋、多于一个α螺旋的复合体、β桶,或能够跨越细胞磷脂双层的任何其他稳定结构。此外,跨膜结构域也可以或可选地基于跨膜结构域拓扑进行分类,所述跨膜结构域拓扑包括跨膜结构域进行跨膜的通过次数和蛋白质的取向。例如,单穿膜蛋白跨越细胞膜一次,而多穿膜蛋白跨越细胞膜至少两次(例如,2、3、4、5、6、7次或更多次)。

[0139] 膜蛋白可定义为I型、II型或III型,这取决于它们的末端和一个或多个膜传递区段相对于细胞内部和外部的拓扑。I型膜蛋白具有单个跨膜区域,并且被定向为使得该蛋白的N末端存在于细胞脂质双层的细胞外侧并且该蛋白的C末端存在于细胞质侧。II型膜蛋白也具有单个跨膜区域,但其定向为使得该蛋白的C末端位于细胞脂质双层的细胞外侧并且该蛋白的N末端存在于细胞质侧。III型膜蛋白具有多个跨膜区段,并且可以基于跨膜区段的数量以及N末端和C末端的位置进一步细分。

[0140] 在一些实施方案中,本文所述的嵌合受体多肽的跨膜结构域来源于I型单穿膜蛋白。单穿膜蛋白包括但不限于CD8α、CD8β、4-1BB/CD137、CD27、CD28、CD34、CD4、FcεRIγ、

CD16、OX40/CD134、CD3ζ、CD3ε、CD3γ、CD3δ、TCRα、TCRβ、TCRζ、CD32、CD64、CD64、CD45、CD5、CD9、CD22、CD37、CD80、CD86、CD40、CD40L/CD154、VEGFR2、FAS和FGFR2B。在一些实施方案中，跨膜结构域来自选自以下的膜蛋白：CD8α、CD8β、4-1BB/CD137、CD28、CD34、CD4、FcεRIγ、CD16、OX40/CD134、CD3ζ、CD3ε、CD3γ、CD3δ、TCRα、CD32、CD64、VEGFR2、FAS和FGFR2B。在一些实例中，跨膜结构域属于CD8(例如，跨膜结构域属于CD8α)。在一些实例中，跨膜结构域属于4-1BB/CD137。在其他实例中，跨膜结构域属于CD28。在一些情况下，本文所述的嵌合受体多肽可不含来自任何非CD16A受体的铰链结构域。在一些情况下，此类嵌合受体多肽可不含任何铰链结构域。可选地或另外，此类嵌合受体多肽可以包含两个或更多个如本文所述的共刺激区。在其他实例中，跨膜结构域属于CD34。在其他实例中，跨膜结构域不是来源于人CD8α。在一些实施方案中，嵌合受体多肽的跨膜结构域为单通α螺旋。

[0141] 来自多穿膜蛋白的跨膜结构域也可以相容用于本文所述的嵌合受体多肽中。多穿膜蛋白可包含复杂的α螺旋结构(例如，至少2、3、4、5、6、7或更多个α螺旋)或β折叠结构。优选地，多穿膜蛋白的N末端和C末端存在于脂质双层的相对侧，例如，蛋白质的N末端存在于脂质双层的细胞质侧并且蛋白质的C末端存在于细胞外侧。来自多穿膜蛋白的一次或多次螺旋通过可用于构建本文所述的嵌合受体多肽。

[0142] 本文所述的用于嵌合受体多肽的跨膜结构域还可包含合成的、非天然存在的蛋白质区段的至少一部分。在一些实施方案中，跨膜结构域是合成的、非天然存在的α螺旋或β折叠。在一些实施方案中，蛋白质区段为至少约20个氨基酸，例如至少18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或更多个氨基酸。合成的跨膜结构域的实例是本领域中已知的，例如在美国专利号7,052,906B1和PCT公开号WO 2000/032776 A2中已知的，所述参考文献中的每一者的相关公开内容以引用方式并入本文。

[0143] 在一些实施方案中，跨膜结构域的氨基酸序列不包含半胱氨酸残基。在一些实施方案中，跨膜结构域的氨基酸序列包含一个半胱氨酸残基。在一些实施方案中，跨膜结构域的氨基酸序列包含两个半胱氨酸残基。在一些实施方案中，跨膜结构域的氨基酸序列包含多于两个半胱氨酸残基(例如，3、4、5个或更多个)。

[0144] 跨膜结构域可包含跨膜区域和位于跨膜结构域的C末端侧的细胞质区域。跨膜结构域的细胞质区域可包含三个或更多个氨基酸，并且在一些实施方案中，有助于使脂质双层中的跨膜结构域定向。在一些实施方案中，一个或多个半胱氨酸残基存在于跨膜结构域的跨膜区域中。在一些实施方案中，一个或多个半胱氨酸残基存在于跨膜结构域的细胞质区域中。在一些实施方案中，跨膜结构域的细胞质区域包含带正电荷的氨基酸。在一些实施方案中，跨膜结构域的细胞质区域包含氨基酸精氨酸、丝氨酸和赖氨酸。

[0145] 在一些实施方案中，跨膜结构域的跨膜区域包含疏水性氨基酸残基。在一些实施方案中，跨膜区域主要包含疏水性氨基酸残基，诸如丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、色氨酸或缬氨酸。在一些实施方案中，跨膜区域是疏水的。在一些实施方案中，跨膜区域包含聚亮氨酸-丙氨酸序列。

[0146] 蛋白质或蛋白质区段的亲水性、疏水性或亲水性特征可以通过本领域已知的任何方法来评定，所述任何方法包括例如Kyte和Doolittle亲水性分析。

[0147] C.共刺激信号传导结构域

[0148] 除了刺激抗原特异性信号外，许多免疫细胞还需要共刺激，以促进细胞增殖、分化

和存活，以及活化细胞的效应物功能。在一些实施方案中，本文所述的嵌合受体多肽，诸如ACTR或CAR多肽，包含至少一个共刺激信号传导结构域。在某些实施方案中，嵌合受体多肽可含有CD28共刺激信号传导结构域或4-1BB(CD137)共刺激信号传导结构域。如本文所用，术语“共刺激信号传导结构域”是指共刺激信号传导蛋白的至少一个片段，该至少一个片段介导细胞内的信号转导以诱导免疫应答，诸如效应物功能(次级信号)。如本领域中已知的，诸如T细胞的免疫细胞的活化通常需要两个信号：(1)由T细胞受体(TCR)与抗原呈递细胞呈递的抗原肽/MHC复合物的结合触发的抗原特异性信号(主要信号)，所述结合通常由作为TCR复合物的组分的CD3ζ驱动；(ii)由共刺激受体与其配体之间的相互作用触发的共刺激信号(次级信号)。共刺激受体转导共刺激信号(次级信号)以作为TCR触发的信号传导的添加，并调控由免疫细胞(诸如T细胞、NK细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞或嗜酸性粒细胞)介导的应答。

[0149] 宿主细胞(例如，免疫细胞)中共刺激信号传导结构域的活化可诱导细胞增加或减少细胞因子的产生和分泌、吞噬特性、增殖、分化、存活和/或细胞毒性。任何共刺激分子的共刺激信号传导结构域可以相容用于本文所述的嵌合受体多肽。共刺激信号传导结构域的类型是基于诸如以下因素选择的：嵌合受体多肽将在其中表达的免疫细胞的类型(例如，T细胞、NK细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞或嗜酸性粒细胞)和所需的免疫效应物功能(例如ADCC)。用于在嵌合受体多肽中使用的共刺激信号传导结构域的实例可以是共刺激蛋白的细胞质信号传导结构域，包括但不限于B7/CD28家族的成员(例如，B7-1/CD80、B7-2/CD86、B7-H1/PD-L1、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H6、B7-H7、BTLA/CD272、CD28、CTLA-4、Gi24/VISTA/B7-H5、ICOS/CD278、PD-1、PD-L2/B7-DC和PDCD6)；TNF超家族成员(例如，4-1BB/TNFRSF9/CD137、4-1BB配体/TNFSF9、BAFF/BLyS/TNFSF13B、BAFF R/TNFRSF13C、CD27/TNFRSF7、CD27配体/TNFSF7、CD30/TNFRSF8、CD30配体/TNFSF8、CD40/TNFRSF5、CD40/TNFSF5、CD40配体/TNFSF5、DR3/TNFRSF25、GITR/TNFRSF18、GITR配体/TNFSF18、HVEM/TNFRSF14、LIGHT/TNFSF14、淋巴毒素-α/TNF-β、OX40/TNFRSF4、OX40配体/TNFSF4、RELT/TNFRSF19L、TACI/TNFRSF13B、TL1A/TNFSF15、TNF-α和TNF RII/TNFRSF1B)；SLAM家族成员(例如，2B4/CD244/SLAMF4、BLAME/SLAMF8、CD2、CD2F-10/SLAMF9、CD48/SLAMF2、CD58/LFA-3、CD84/SLAMF5、CD229/SLAMF3、CRACC/SLAMF7、NTB-A/SLAMF6和SLAM/CD150)；和任何其他共刺激分子，诸如CD2、CD7、CD53、CD82/Kai-1、CD90/Thy1、CD96、CD160、CD200、CD300a/LMIR1、HLA I类、HLA-DR、Ikaros、整联蛋白α4/CD49d、整合素α4β1、整合素α4β7/LPAM-1、LAG-3、TCL1A、TCL1B、CRTAM、DAP12、Dectin-1/CLEC7A、DPPIV/CD26、EphB6、TIM-1/KIM-1/HAVCR、TIM-4、TSLP、TSLP R、淋巴细胞功能相关抗原1(LFA-1)和NKG2C。在一些实施方案中，共刺激信号传导结构域属于4-1BB、CD28、OX40、ICOS、CD27、GITR、HVEM、TIM1、LFA1(CD11a)或CD2或它们的任何变体。

[0150] 同样在本公开的范围内的是本文所述的共刺激信号传导结构域中的任何共刺激信号传导结构域的变体，使得该共刺激信号传导结构域能够调控免疫细胞的免疫应答。在一些实施方案中，与野生型对应物相比，共刺激性信号传导结构域包含至多10个氨基酸残基突变(例如，1个、2个、3个、4个、5个或8个)，诸如氨基酸取代、缺失或添加。包含一个或多个氨基酸变体(例如，氨基酸取代、缺失或添加)的此类共刺激性信号传导结构域可以称为变体。

[0151] 相对于不包含突变的共刺激信号传导结构域，共刺激信号传导结构域的氨基酸残基的突变可导致信号转导的增加和增强的对免疫应答的刺激。相对于不包含突变的共刺激信号传导结构域，共刺激信号传导结构域的氨基酸残基的突变可导致信号转导的降低和减少的对免疫应答的刺激。例如，天然CD28氨基酸序列的残基186和187的突变可通过嵌合受体多肽的共刺激结构域导致共刺活化性增加和对免疫应答的诱导。在一些实施方案中，突变是用CD28共刺激结构域的甘氨酸残基取代位置186和187中的每一者处的赖氨酸，称为$CD28_{LL\rightarrow GG}$变体。可在共刺激性信号传导结构域中进行的可增强或降低该结构域的共刺活化性的附加突变将对于本领域的普通技术人员为显而易见的。在一些实施方案中，共刺激信号传导结构域属于4-1BB、CD28、OX40或$CD28_{LL\rightarrow GG}$变体。

[0152] 在一些实施方案中，嵌合受体多肽可含有单个共刺激结构域，例如CD27共刺激结构域、CD28共刺激结构域、4-1BB共刺激结构域、ICOS共刺激结构域或OX40共刺激结构域。

[0153] 在一些实施方案中，嵌合受体多肽可包含多于一个共刺激信号传导结构域(例如，2个、3个或更多个)。在一些实施方案中，嵌合受体多肽包含两个或更多个相同的共刺激信号传导结构域，例如CD28的共刺激信号传导结构域的两个拷贝。在一些实施方案中，嵌合受体多肽包含来自不同共刺激蛋白(例如本文所述的任何两个或更多个共刺激蛋白)的两个或更多个共刺激信号传导结构域。共刺激性信号传导结构域的类型的选择可以基于诸如以下因素：要与嵌合受体多肽一起使用的宿主细胞的类型(例如，T细胞或NK细胞)和所需的免疫效应物功能。在一些实施方案中，嵌合受体多肽包含两个共刺激信号传导结构域，例如，CD28的共刺激信号传导结构域的两个拷贝。在一些实施方案中，嵌合受体多肽可包含来自不同共刺激受体的两个或更多个共刺激信号传导结构域，所述不同共刺激受体为诸如本文所述的任何两个或更多个共刺激受体，例如CD28和4-1BB、CD28和CD27、CD28和ICOS、$CD28_{LL\rightarrow GG}$变体和4-1BB、CD28和OX40或$CD28_{LL\rightarrow GG}$变体和OX40。在一些实施方案中，两个共刺激性信号传导结构域是CD28和4-1BB。在一些实施方案中，两个共刺激性信号传导结构域是$CD28_{LL\rightarrow GG}$变体和4-1BB。在一些实施方案中，两个共刺激性信号传导结构域是CD28和OX40。在一些实施方案中，两个共刺激性信号传导结构域是$CD28_{LL\rightarrow GG}$变体和OX40。在一些实施方案中，本文所述的嵌合受体多肽可含有CD28和ICOSL的组合。在一些实施方案中，本文所述的嵌合受体多肽可含有CD28和CD27的组合。在某些实施方案中，4-1BB共刺激结构域位于CD28或$CD28_{LL\rightarrow GG}$变体共刺激信号传导结构域的N末端。

[0154] 在一些实施方案中，本文所述的嵌合受体多肽不包含共刺激信号传导结构域。

[0155] D.细胞质信号传导结构域

[0156] 任何细胞质信号传导结构域可用于产生本文所述的嵌合受体多肽(例如，ACTR多肽或CAR多肽)。此类细胞质结构域可以是触发细胞信号传导(主要信号传导)中所涉及的任何信号传导结构域，所述触发细胞信号传导导致免疫细胞增殖和/或活化。如本文所述的细胞质信号传导结构域不是共刺激信号传导结构域，如本领域中已知的，所述细胞质信号传导结构域传递共刺激或次级信号以完全活化免疫细胞。

[0157] 本文所述的细胞质结构域可包含基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)结构域(例如，至少一个ITAM结构域、至少两个ITAM结构域或至少三个ITAM结构域)或可不含ITAM。如本文所用的“ITAM”是保守的蛋白质基序，该保守的蛋白质基序通常存在于许多免疫细胞中表达的信号传导分子的尾部部分中。该基序可包含由6-8个氨基酸分开的氨基酸序列

YxxL/I的两个重复序列，其中每个x独立地为任何氨基酸，从而产生保守基序YxxL/Ix$_{(6-8)}$YxxL/I。信号传导分子内的ITAM对于细胞内的信号转导很重要，该信号转导至少部分由信号传导分子活化后ITAM中酪氨酸残基的磷酸化介导。ITAM还可以充当信号传导通路中涉及的其他蛋白质的停靠位点。

[0158] 在一些实例中，细胞质信号传导结构域属于CD3ζ或FcεR1γ。在其他实例中，细胞质信号传导结构域不是来源于人CD3ζ。在其他实例中，当同一嵌合受体多肽的细胞外Fc结合结构域来源于CD16A时，细胞质信号传导结构域不是来源于Fc受体。

[0159] 在一个特定实施方案中，几个信号传导结构域可以融合在一起以产生加和或协同效应。有用的附加信号传导结构域的非限制性实例包括以下中的一者或多者的部分或全部：TCRζ链、CD28、OX40/CD134、4-1BB/CD137、FcεRIy、ICOS/CD278，IL2R-β/CD122，IL-2R-γ/CD132和CD40。

[0160] 在其他实施方案中，本文所述的细胞质信号传导结构域不含ITAM基序。实例包括但不限于Jak/STAT的细胞质信号传导结构域、Toll-白介素受体(TIR)和酪氨酸激酶。

[0161] E.铰链结构域

[0162] 在一些实施方案中，本文所述的嵌合受体多肽(诸如ACTR多肽或CAR多肽)还包含位于细胞外配体结合结构域与跨膜结构域之间的铰链结构域。铰链结构域是通常在蛋白质的两个结构域之间发现的氨基酸区段，并且可以允许蛋白质的柔性以及所述结构域中的一个或两个结构域相对于彼此的运动。可以使用提供此类柔性和细胞外配体结合结构域相对于嵌合受体多肽的跨膜结构域的运动的任何氨基酸序列。

[0163] 本领域已知的包含铰链结构域的任何蛋白质的铰链结构域均相容用于本文所述的嵌合受体多肽中。在一些实施方案中，铰链结构域是天然存在的蛋白质的铰链结构域的至少一部分，并且赋予嵌合受体多肽柔性。在一些实施方案中，铰链结构域属于CD8。在一些实施方案中，铰链结构域是CD8的铰链结构域的一部分，例如，含有CD8的铰链结构域的至少15个(例如，20个、25个、30个、35个或40个)连续氨基酸的片段。在一些实施方案中，铰链结构域属于CD28。在一些实施方案中，铰链结构域是CD28的铰链结构域的一部分，例如，含有CD28的铰链结构域的至少15个(例如，20个、25个、30个、35个或40个)连续氨基酸的片段。铰链结构域和/或跨膜结构域可以在N末端部分、C末端或两者处与附加氨基酸(例如，15aa、10-aa、8-aa、6-aa或4-aa)连接。实例可以在例如Ying等人，Nature Medicine，25(6)：947-953(2019)中找到。

[0164] 在一些实施方案中，铰链结构域属于CD16A受体，例如，CD16A受体的整个铰链结构域或其部分，所述铰链结构域或其部分可以由CD16A受体的至多40个连续氨基酸残基(例如，20个、25个、30个、35个或40个)组成。此类嵌合受体多肽(例如，ACTR多肽)可不含来自不同受体(非CD16A受体)的铰链结构域。

[0165] 抗体的铰链结构域，诸如IgG、IgA、IgM、IgE或IgD抗体，也相容用于本文所述的嵌合受体多肽中。在一些实施方案中，铰链结构域是连接抗体的恒定结构域CH1和CH2的铰链结构域。在一些实施方案中，铰链结构域属于抗体，并且包含抗体的铰链结构域和抗体的一个或多个恒定区。在一些实施方案中，铰链结构域包含抗体的铰链结构域和抗体的CH3恒定区。在一些实施方案中，铰链结构域包含抗体的铰链结构域以及抗体的CH2和CH3恒定区。在一些实施方案中，抗体为IgG、IgA、IgM、IgE或IgD抗体。在一些实施方案中，抗体为IgG抗体。

在一些实施方案中，抗体为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体。在一些实施方案中，铰链区包含IgG1抗体的铰链区以及CH2和CH3恒定区。在一些实施方案中，铰链区包含IgG1抗体的铰链区和CH3恒定区。

[0166] 非天然存在的肽也可用作本文所述的嵌合受体多肽的铰链结构域。在一些实施方案中，细胞外靶结合结构域的C末端与跨膜结构域的N末端之间的铰链结构域为肽接头，诸如$(Gly_xSer)_n$接头，其中x和n独立地可为介于3与12之间的整数，包括3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更大。在一些实施方案中，铰链结构域为$(Gly_4Ser)_n$(SEQ ID NO:88)，其中n可为介于3与60之间的整数，包括3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59或60。在某些实施方案中，n可以是大于60的整数。在一些实施方案中，铰链结构域是$(Gly_4Ser)_3$(SEQ ID NO:89)。在一些实施方案中，铰链结构域是$(Gly_4Ser)_6$(SEQ ID NO:90)。在一些实施方案中，铰链结构域是$(Gly_4Ser)_9$(SEQ ID NO:91)。在一些实施方案中，铰链结构域是$(Gly_4Ser)_{12}$(SEQ ID NO:92)。在一些实施方案中，铰链结构域是$(Gly_4Ser)_{15}$(SEQ ID NO:93)。在一些实施方案中，铰链结构域是$(Gly_4Ser)_{30}$(SEQ ID NO:94)。在一些实施方案中，铰链结构域是$(Gly_4Ser)_{45}$(SEQ ID NO:95)。在一些实施方案中，铰链结构域是$(Gly_4Ser)_{60}$(SEQ ID NO:96)。

[0167] 在其他实施方案中，铰链结构域是延伸的重组多肽(XTEN)，所述延伸的重组多肽是由不同长度的亲水性残基(例如，10-80个氨基酸残基)组成的非结构化多肽。XTEN肽的氨基酸序列对于本领域技术人员将是显而易见的，并且可以在例如美国专利号8,673,860中找到，该美国专利的相关公开内容以引用方式并入本文。在一些实施方案中，铰链结构域是XTEN肽并且包含60个氨基酸。在一些实施方案中，铰链结构域是XTEN肽并且包含30个氨基酸。在一些实施方案中，铰链结构域是XTEN肽并且包含45个氨基酸。在一些实施方案中，铰链结构域是XTEN肽并且包含15个氨基酸。

[0168] 用于制备如本文所述的嵌合受体多肽的铰链结构域中的任何铰链结构域可含有至多250个氨基酸残基。在一些情况中，嵌合受体多肽可含有相对较长的铰链结构域，例如含有150-250个氨基酸残基(例如，150-180个氨基酸残基、180-200个氨基酸残基或200-250个氨基酸残基)。在其他情况中，嵌合受体多肽可含有中等大小的铰链结构域，所述中等大小的铰链结构域可含有60-150个氨基酸残基(例如，60-80、80-100、100-120或120-150个氨基酸残基)。可选地，嵌合受体多肽可含有短铰链结构域，所述短铰链结构域可含有少于60个氨基酸残基(例如，1-30个氨基酸或31-60个氨基酸)。在一些实施方案中，本文所述的嵌合受体多肽(例如，ACTR多肽)不含铰链结构域或来自非CD16A受体的铰链结构域。

[0169] F.信号肽

[0170] 在一些实施方案中，嵌合受体多肽(例如，ACTR多肽或CAR多肽)还可在该多肽的N末端处包含信号肽(也称为信号序列)。通常，信号序列是将多肽靶向细胞中所需位点的肽序列。在一些实施方案中，信号序列将嵌合受体多肽靶向细胞的分泌途径，并将允许嵌合受体多肽整合和锚定在脂质双层中。信号序列(包括天然存在的蛋白质的信号序列，或合成的、非天然存在的信号序列，所述信号序列可相容用于本文所述的嵌合受体多肽中)对于本领域技术人员将是显而易见的。在一些实施方案中，信号序列来自CD8α。在一些实施方案中，信号序列来自CD28。在其他实施方案中，信号序列来自鼠κ链。在其他实施方案中，信号

序列来自CD16。

[0171] G.ACTR多肽的实例

[0172] 用于与所述方法和组合物一起使用的示例性ACTR构建体可例如在本说明书和附图中找到,或者可以在PCT专利公开号:WO2016040441A1、WO2017/161333和PCT申请号:PCT/US2018/015999中找到,这些参考文献中的每一者出于该目的而以引用方式并入本文。本文所述的ACTR多肽可包含具有对IgG分子的Fc部分的结合亲和力和特异性的CD16A细胞外结构域、跨膜结构域和CD3ζ细胞质信号传导结构域。在一些实施方案中,ACTR多肽还可包含一个或多个共刺激信号传导结构域,该一个或多个共刺激信号传导结构域中的一个可为CD28共刺激信号传导结构域或4-1BB共刺激信号传导结构域。ACTR多肽被配置为使得当在宿主细胞上表达时,细胞外配体结合结构域位于细胞外以结合靶分子和CD3ζ细胞质信号传导结构域。共刺激信号传导结构域可以位于细胞质中以触发活化和/或效应物信号传导。

[0173] 在一些实施方案中,如本文所述的ACTR多肽可从N末端到C末端包含Fc结合结构域(诸如CD16A细胞外结构域)、跨膜结构域、任选的一个或多个共刺激结构域(例如,CD28共刺激结构域、4-1BB共刺激信号传导结构域、OX40共刺激信号传导结构域、CD27共同刺激信号传导结构域或ICOS共刺激信号传导结构域)和CD3ζ细胞质信号传导结构域。

[0174] 可选地或另外,本文所述的ACTR多肽可含有两个或更多个共刺激信号传导结构域,该两个或更多个共刺激信号传导结构域可彼此连接或被细胞质信号传导结构域分开。ACTR多肽中的细胞外Fc结合剂、跨膜结构域、任选的一个或多个共刺激性信号传导结构域和细胞质信号传导结构域可以直接彼此连接或通过肽接头彼此连接。在一些实施方案中,本文所述的ACTR多肽中的任何ACTR多肽可在N末端处包含信号序列。

[0175] 表4提供了本文所述的示例性ACTR多肽。这些示例性构建体从N末端到C末端依次具有信号序列、Fc结合结构域(例如,Fc受体的细胞外结构域)、铰链结构域和跨膜结构域,而任选的共刺激结构域和细胞质信号传导结构域的位置可以切换。

[0176] 表4:ACTR多肽的示例性组分。

[0177]

示例性AA序列(SEQ ID NO)	信号序列	Fc受体的细胞外结构域(a)	铰链结构域(e)	跨膜结构域(b)	共刺激结构域(d)	细胞质信号传导结构域(c)
1	CD8α	CD16A-V158	CD8α	CD8α	4-1BB (CD137)	CD3ζ
2	CD8α	CD16A-V158	CD8α	4-1BB (CD137)	4-1BB (CD137)	CD3ζ
3	CD8α	CD16A-V158	CD8α	CD28	4-1BB (CD137)	CD3ζ
4	CD8α	CD16A-V158	CD8α	CD34	4-1BB (CD137)	CD3ζ
5	CD8α	CD16A-V158	CD8α	设计的疏水性TM结构域	4-1BB (CD137)	CD3ζ
6	CD8α	CD32A	CD8α	CD8α	4-1BB (CD137)	CD3ζ
7	CD8α	CD16A-V158	CD8α	CD8α	CD28	CD3ζ
8	CD8α	CD16A-V158	CD8α	CD8α	OX40 (CD134)	CD3ζ
9	CD8α	CD16A-V158	CD8α	CD8α	CD28+ 4-1BB	CD3ζ
10	CD8α	CD16A-V158	无	CD8α	4-1BB (CD137)	CD3ζ
11	CD8α	CD16A-V158	XTEN	CD8α	4-1BB (CD137)	CD3ζ
12	CD8α	CD16A-V158	CD8α	CD8α	CD28 LL至GG突变体	CD3ζ
13	CD8α	CD16A-V158	CD8α	CD8α	CD28 LL至GG突变体+ 4-1BB	CD3ζ
14	CD8α	CD16A-V158	CD8α	CD4	4-1BB (CD137)	CD3ζ
15	CD8α	CD16A-V158	CD8α	CD4	CD28 LL至GG突变体+ 4-1BB	CD3ζ
16	CD8α	CD16A-V158	CD8α	FcεRIγ	4-1BB (CD137)	CD3ζ
17	CD8α	CD16A-V158	CD8α	设计的疏水性TM结构域，预测的二聚化	4-1BB (CD137)	CD3ζ
18	CD8α	CD16A-V158	CD8α	CD8β	4-1BB (CD137)	CD3ζ
19	CD8α	CD16A-V158	CD8α	C16α	4-1BB (CD137)	CD3ζ
20	CD8α	CD16A-V158	CD8α	OX40 (CD134)	4-1BB (CD137)	CD3ζ
21	CD8α	CD16A-V158	CD8α	CD3ζ	4-1BB (CD137)	CD3ζ
22	CD8α	CD16A-V158	CD8α	CD3ε	4-1BB (CD137)	CD3ζ
23	CD8α	CD16A-V158	CD8α	CD3γ	4-1BB (CD137)	CD3ζ
24	CD8α	CD16A-V158	CD8α	CD3δ	4-1BB (CD137)	CD3ζ
25	CD8α	CD16A-V158	CD8α	TCR-α	4-1BB (CD137)	CD3ζ
26	CD8α	CD16A-V158	CD8α	CD32	4-1BB (CD137)	CD3ζ
27	CD8α	CD16A-V158	CD8α	CD64	4-1BB (CD137)	CD3ζ
28	CD8α	CD16A-V158	CD8α	VEGFR2	4-1BB (CD137)	CD3ζ
29	CD8α	CD16A-V158	CD8α	FAS	4-1BB (CD137)	CD3ζ

[0178]

示例性AA序列(SEQ ID NO)	信号序列	Fc受体的细胞外结构域(a)	铰链结构域(e)	跨膜结构域(b)	共刺激结构域(d)	细胞质信号传导结构域(c)
30	CD8α	CD16A-V158	CD8α	FGFR2B	4-1BB (CD137)	CD3ζ
31	CD8α	CD16A-F158	CD8α	CD8α	4-1BB (CD137)	CD3ζ
32	CD8α	CD64A	CD8α	CD8α	4-1BB (CD137)	CD3ζ
33	CD8α	CD16A-V158	IgG1(铰链-CH2-CH3)	CD8α	4-1BB (CD137)	CD3ζ
34	CD8α	CD16A-V158	IgG1(铰链-CH3)	CD8α	4-1BB (CD137)	CD3ζ
35	CD8α	CD16A-V158	IgG1(铰链)	CD8α	4-1BB (CD137)	CD3ζ
36	CD8α	CD16A-V158	CD8-α片段1(30个氨基酸)	CD8α	4-1BB (CD137)	CD3ζ
37	CD8α	CD16A-V158	CD8-α片段2(15个氨基酸)	CD8α	4-1BB (CD137)	CD3ζ
38	CD8α	CD16A-V158	(Gly4Ser)×3(60个氨基酸)	CD8α	4-1BB (CD137)	CD3ζ
39	CD8α	CD16A-V158	(Gly4Ser)×6(45个氨基酸)	CD8α	4-1BB (CD137)	CD3ζ
40	CD8α	CD16A-V158	(Gly4Ser)×9(30个氨基酸)	CD8α	4-1BB (CD137)	CD3ζ
41	CD8α	CD16A-V158	(Gly4Ser)×12(15个氨基酸)	CD8α	4-1BB (CD137)	CD3ζ
42	CD8α	CD16A-V158	XTEN	CD8α	4-1BB (CD137)	CD3ζ

[0179]

示例性AA序列(SEQ ID NO)	信号序列	Fc受体的细胞外结构域(a)	铰链结构域(e)	跨膜结构域(b)	，将激结构域(d)	细胞质信号传导结构域(c)
			(60个氨基酸)			
43	CD8α	CD16A-V158	XTEN (30个氨基酸)	CD8α	4-1BB (CD137)	CD3ζ
44	CD8α	CD16A-V158	XTEN (15个氨基酸)	CD8α	4-1BB (CD137)	CD3ζ
45	CD28	CD16A-V158	CD8α	CD8α	4-1BB (CD137)	CD3ζ
46	鼠κ链	CD16A-V158	CD8α	CD8α	4-1BB (CD137)	CD3ζ
47	CD16	CD16A-V158	CD8α	CD8α	4-1BB (CD137)	CD3ζ
48	CD8α	CD16A-V158	CD8α	CD8α	ICOS	CD3ζ
49	CD8α	CD16A-V158	CD8α	CD8α	CD27	CD3ζ
50	CD8α	CD16A-V158	CD8α	CD8α	GITR	CD3ζ
51	CD8α	CD16A-V158	CD8α	CD8α	HVEM	CD3ζ
52	CD8α	CD16A-V158	CD8α	CD8α	TIM1	CD3ζ
53	CD8α	CD16A-V158	CD8α	CD8α	LFA1 (CD11a)	CD3ζ
54	CD8α	CD16A-V158	CD8α	CD8α	CD2	CD3ζ
55	CD8α	CD16A-V158	CD8α	FcεR1γ	4-1BB (CD137)	FcεR1γ
56	CD8α	CD16A-V158	CD8α	CD8α	4-1BB (CD137)	FcεR1γ
57	CD8α	CD16A-V158	CD28 (例如，39aa)	CD28	CD28	CD3ζ
58	CD8α	CD16A-V158	无	CD8	CD28	CD3ζ
59	CD8α	CD16A-V158	CD8	CD8	CD28+CD27	CD3ζ
60	CD8α	CD16A-V158	CD8	CD8	CD28+OX40	CD3ζ
61	CD8α	CD16A-V158	CD8	CD8	4-1BB+CD28	CD3ζ
62	CD8α	CD16A-V158	CD28	CD28	CD28+4-1BB	CD3ζ
63	CD8α	CD16A-V158	CD28	CD28	4-1BB	CD3ζ
64	CD8α	CD16A-V158	CD8	CD8	CD27	CD3ζ
65	CD8α	CD16A-V158	CD8	CD8	CD28	CD3ζ
66	CD8α	CD16A-V158	CD8	CD8	ICOS	CD3ζ
67	CD8α	CD16A-V158	CD8	CD8	OX40	CD3ζ
68	CD8α	CD16A-V158	CD8	CD8	CD28和ICOS	CD3ζ
69	CD8α	CD16A-V158	无	CD8	4-1BB	CD3ζ
70	CD8α	CD16A-V158	无	CD8	CD27	CD3ζ
71	CD8α	CD16A-V158	无	CD8	ICOS	CD3ζ

[0180]

示例性AA序列(SEQ ID NO)	信号序列	Fc 受体的细胞外结构域(a)	铰链结构域(e)	跨膜结构域(b)	共刺激结构域(d)	细胞质信号传导结构域(c)
72	CD8α	CD16A-V158	无	CD8	OX40	CD3ζ
73	CD8α	CD16A-V158	无	CD8+4aa	4-1BB	CD3ζ
74	CD8α	CD16A-V158	无	CD8+4aa	CD28	CD3ζ
75	CD8α	CD16A-V158	CD8	CD28	CD28	CD3ζ
76	CD8α	CD16A-V158	CD28 (26aa)	CD28	CD28	CD3ζ
77	CD8α	CD16A-V158	CD28 (16aa)	CD28	CD28	CD3ζ
78	CD8α	CD16A-V158	无	CD28	CD28	CD3ζ
79	CD8α	CD16A-V158	CD8	CD8	41BB	CD3ζ
80	CD8α	CD16A-V158	CD28 (39 aa)	CD8	CD28	CD3ζ

[0181] 下文提供了示例性ACTR多肽的氨基酸序列(信号序列以斜体表示)。

[0182] SEQ ID NO:1：

[0183] *MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP
TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVL
LLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE
GGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR
GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR
GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0184] SEQ ID NO:2：

[0185] *MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS

GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP
TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIISFFLALTSTALLFL
[0186] LFFLTLRFSVVKRGKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF
PEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL
DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG
ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0187] SEQ ID NO:3：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP
[0188] TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWVLVVVGGVLAC
YSLLVTVAFIIFWVRSKKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS
CRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY
DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG
MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0189] SEQ ID NO:4：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
[0190] SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP
TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDLIALVTSGALLAVL
GITGYFLMNRKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE
EEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK
[0191] RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER
RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0192] SEQ ID NO:5：

[0193] *MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP
TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDLLAALLALLAALL
ALLAALLARSKKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE
EEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD
KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE
RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0194] SEQ ID NO:6：

[0195] *MALPVTALLLPLALLLHAARP*QAAAPPKAVLKLEPPWINVLQE
DSVTLTCQGARSPESDSIQWFHNGNLIPTHTQPSYRFKANNNDSG
EYTCQTGQTSLSDPVHLTVLSEWLVLQTPHLEFQEGETIMLRCHS
WKDKPLVKVTFFQNGKSQKFSHLDPTFSIPQANHSHSGDYHCTGN
IGYTLFSSKPVTITVQVPSMGSSSPMGTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS
LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITL
YCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELR
VKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM
GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDG
LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0196] SEQ ID NO:7：

[0197] *MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP
TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVL
LLSLVITLYCRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDF
AAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR
GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR
GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0198] SEQ ID NO:8:

[0199] *MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP
TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVL
LLSLVITLYCALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAH
STLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR
GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR
GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0200] SEQ ID NO:9:

[0201] *MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP

[0202] TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVL
LLSLVITLYCRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDF
AAYRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC
ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD
PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG
HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0203] SEQ ID NO:10：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR

[0204] GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQIYIWAPLAGTCG
VLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE
EEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD
KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE
RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0205] SEQ ID NO:11：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR

[0206] GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQGGSPAGSPTSTEE
GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTIYIWAPLAGTCGVLL
LSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE
GGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR
GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR
GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0207] SEQ ID NO:12：

[0208] *MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP
TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVL
LLSLVITLYCRSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRD
FAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR
RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR
RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0209] SEQ ID NO:13：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP

[0210] TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVL
LLSLVITLYCRSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRD
FAAYRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC
ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD
PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG
HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0211] SEQ ID NO:14：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL

[0212] EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH

SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP
TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDMALIVLGGVAGLL

[0213] LFIGLGIFFCVRKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE
EEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK
RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER
RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0214] SEQ ID NO:15：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP

[0215] TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDMALIVLGGVAGLL
LFIGLGIFFCVRRSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPP
RDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD
KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE
RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0216] SEQ ID NO:16：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR

[0217] GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP
TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDLCYILDAILFLYGIV
LTLLYCRLKKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE
GGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR
GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR

[0218] GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0219] SEQ ID NO:17：

[0220] *MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP
TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDLLLILLGVLAGVLA
TLAALLARSKKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE
EEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK
RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER
RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0221] SEQ ID NO:18：

[0222] *MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP
TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDITLGLLVAGVLVLL
VSLGVAIHLCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE
EGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR
RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR
RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0223] SEQ ID NO:19：

[0224] *MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL

EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP

[0225] TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDVSFCLVMVLLFAVD
TGLYFSVKTNKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE
EGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR
RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR
RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0226] SEQ ID NO:20:

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP

[0227] TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDVAAILGLGLVLGLL
GPLAILLALYKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE
EGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR
RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR
RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0228] SEQ ID NO:21:

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH

[0229] SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP
TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDLCYLLDGILFIYGVI
LTALFLRVKKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE
GGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR

[0230] GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR
GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0231] SEQ ID NO:22：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP

[0232]

TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDVMSVATIVIVDICIT
GGLLLLVYYWSKNRKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC
RFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD
VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM
KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0233] SEQ ID NO:23：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP

[0234]

TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDGFLFAEIVSIFVLAV
GVYFIAGQDKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE
EGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR
RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR
RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0235] SEQ ID NO:24：

[0236] *MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP
TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDGIIVTDVIATLLLAL
GVFCFAGHETKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE
EEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK
RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER
RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0237] SEQ ID NO:25:

[0238] *MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP
TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDVIGFRILLLKVAGF
NLLMTLRLWKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE
EGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR
RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR
RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0239] SEQ ID NO:26:

[0240] *MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP

TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIIVAVVIATAVAAIVA
AVVALIYCRKKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE

[0241] EGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR
RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR
RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0242] SEQ ID NO:27：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP

[0243] TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDVLFYLAVGIMFLVN
TVLWVTIRKEKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE
EGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR
RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR
RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0244] SEQ ID NO:28：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP

[0245] TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIIILVGTAVIAMFFW
LLLVIILRTKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG
GCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG
RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG
KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0246] SEQ ID NO:29：

[0247] *MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP
TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDLGWLCLLLLPIPLIV
WVKRKKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC
ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD
PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG
HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0248] SEQ ID NO:30:

[0249] *MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP
TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIAIYCIGVFLIACMV
VTVILCRMKKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE
EGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR
RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR
RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0250] SEQ ID NO:31:

[0251] *MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR

[0252] GLFGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVL LLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0253] SEQ ID NO:32：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*QVDTTKAVITLQPPWVSVFQEET VTLHCEVLHLPGSSSTQWFLNGTATQTSTPSYRITSASVNDSGEYR CQRGLSGRSDPIQLEIHRGWLLLQVSSRVFTEGEPLALRCHAWKD KLVYNVLYYRNGKAFKFFHWNSNLTILKTNISHNGTYHCSGMGK HRYTSAGISVTVKELFPAPVLNASVTSPLLEGNLVTLSCETKLLLQ

[0254] RPGLQLYFSFYMGSKTLRGRNTSSEYQILTARREDSGLYWCEAATE DGNVLKRSPELELQVLGLQLPTPVWFHIYIWAPLAGTCGVLLLSL VITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0255] SEQ ID NO:33：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR

[0256] GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ

[0257] VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKIYIWA PLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0258] SEQ ID NO:34：

[0259] *MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQEPKSCDKTHTCP GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKK LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADA PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQALPPR

[0260] SEQ ID NO:35：

[0261] *MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQEPKSCDKTHTCPI YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQ EEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0262]

[0263] SEQ ID NO:36：

[0264] *MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP TIASQPLSLRPEAFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKK LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADA PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQALPPR

[0265] SEQ ID NO:37：

[0266] *MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPFA CDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQ TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL PPR

[0267] SEQ ID NO:38：

[0268] *MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL

EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQGGGGSGGGGSG

[0269] GGGSIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRP
VQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLY
NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK
DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ
ALPPR

[0270] SEQ ID NO:39：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQGGGGSGGGGSG

[0271] GGGSGGGGSGGGGSGGGGSIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKR
GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSR
SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP
RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQG
LSTATKDTYDALHMQALPPR

[0272] SEQ ID NO:40：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH

[0273] SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQGGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIYIWAPLAGT
CGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF
PEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL

[0274] DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG
ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0275] SEQ ID NO:41：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQGGGGSGGGGSG

[0276] GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG
GSGGGGSIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPF
MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQN
QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL
QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALH
MQALPPR

[0277] SEQ ID NO:42：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQGGSPAGSPTSTEE

[0278] GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAI
YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQ
EEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL
GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE
AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0279] SEQ ID NO:43：

[0280] *MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQGGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKK LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADA PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQALPPR

[0281] SEQ ID NO:44：

[0282] *MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQGGSPAGSPTSTEE GTIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQ TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL PPR

[0283] SEQ ID NO:45：

[0284] *MLRLLLALNLFPSIQVTG*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKD SVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEY RCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWK NTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLV

GSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIAS
QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSL
VITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC
[0285] ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD
PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG
HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0286] SEQ ID NO:46：

*METDTLLLWVLLLWVPGSTGD*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRV
LEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDD
SGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRC
HSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFC
RGLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPA
[0287] PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGV
LLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE
EGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR
RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR
RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0288] SEQ ID NO:47：

*MWQLLLPTALLLLVSA*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDS
VTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYR
CQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKN
TALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGS
[0289] KNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAPTIASQP
LSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVI
TLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE
MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD
[0290] GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0291] SEQ ID NO:48：

[0292] *MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP
TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVL
LLSLVITLYCCWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRAVNTAKKSRLTD
VTLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR
DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0293] SEQ ID NO:49：

[0294] *MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP
TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVL
LLSLVITLYCQRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQED
YRKPEPACSPRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL
DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG
ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0295] SEQ ID NO:50：

[0296] *MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS

GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP
TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVL

[0297] LLSLVITLYCQLGLHIWQLRSQCMWPRETQLLLEVPPSTEDARSCQ
FPEEERGERSAEEKGRLGDLWVRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYN
ELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD
KMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

[0298] SEQ ID NO:51：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP

[0299] TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVL
LLSLVITLYCCVKRRKPRGDVVKVIVSVQRKRQEAEGEATVIEALQ
APPDVTTVAVEETIPSFTGRSPNHRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYN
ELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD
KMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

[0300] SEQ ID NO:52：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS

[0301] GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP

TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVL
LLSLVITLYCKKYFFKKEVQQLSVSFSSLQIKALQNAVEKEVQAED

[0302] NIYIENSLYATDRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD
VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM
KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0303] SEQ ID NO:53：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP

[0304] TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVL
LLSLVITLYCYKVGFFKRNLKEKMEAGRGVPNGIPAEDSEQLASG
QEAGDPGCLKPLHEKDSESGGGKDRVKFSRSADAPAYQQGQNQL
YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ
KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM
QALPPR

[0305] SEQ ID NO:54：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR

[0306] GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP
TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVL
LLSLVITLYCKRKKQRSRRNDEELETRAHRVATEERGRKPHQIPAST
PQNPATSQHPPPPPGHRSQAPSHRPPPPGHRVQHQPQKRPPAPSGT
QVHQQKGPPLPRPRVQPKPPHGAAENSLSPSSNRVKFSRSADAPAY
QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE

[0307] GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT
YDALHMQALPPR

[0308] SEQ ID NO:55：

[0309] *MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDPQLCYILDAILFLYG IVLTLLYCRLKIQVRKAAITSYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHE KPPQKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

[0310] SEQ ID NO:56：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR

[0311] GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVL LLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCELRLKIQVRKAAITSYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKP PQ

[0312] SEQ ID NO:57：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL

[0313] EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQIEVMYPPPYLDN EKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVT

[0314] VAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFA AYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0315] SEQ ID NO:58：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR

[0316] GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQIYIWAPLAGTCG
VLLLSLVITLYCRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPR
DFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK
RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER
RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0317] SEQ ID NO:59：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR

[0318] GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP
TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVL
LLSLVITLYCRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDF
AAYRSQRRKYRSNKGESPVEPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYRK
PEPACSPRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR
RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR

[0319] RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0320] SEQ ID NO:60：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP

[0321] TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVL
LLSLVITLYCRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDF
AAYRSRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKF
SRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG
KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLY
QGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0322] SEQ ID NO:61：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP

[0323] TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVL
LLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE
GGCELRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAY
RSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD
PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG
HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0324] SEQ ID NO:62：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQIEVMYPPPYLDN

[0325] EKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVT
VAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFA
AYRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE
LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP
EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0326] SEQ ID NO:63：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQIEVMYPPPYLDN

[0327] EKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVT
VAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG
GCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG
RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG
KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0328] SEQ ID NO:64：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL

[0329] EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR

GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP
TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVL
LLSLVITLYCQRRKYRSNKGESPVEPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQE
[0330] DYRKPEPACSPRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV
LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK
GERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0331] SEQ ID NO:65：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP
[0332] TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVL
LLSLVITLYCRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDF
AAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR
GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR
GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0333] SEQ ID NO:66：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
[0334] GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP
TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVL
LLSLVITLYCKKKYSSSVHDPNGEYMFMRAVNTAKKSRLTDVTLR
VKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM
GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDG
[0335] LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0336] SEQ ID NO:67：

[0337] *MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP
TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVL
LLSLVITLYCRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE
MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD
GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0338] SEQ ID NO:68：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP

[0339] TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVL
LLSLVITLYCRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDF
AAYRSKKKYSSSVHDPNGEYMFMRAVNTAKKSRLTDVTLRVKFS
RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGK
PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQ
GLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0340] SEQ ID NO:69：

[0341] *MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL

[0342] EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQIYIWAPLAGTCG VLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE EEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0343] SEQ ID NO:70：

[0344] *MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQIYIWAPLAGTCG VLLLSLVITLYCQRRKYRSNKGESPVEPAEPCHYSCPREEEGSTIPI QEDYRKPEPACSPRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0345] SEQ ID NO:71：

[0346] *MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQIYIWAPLAGTCG VLLLSLVITLYCKKKYSSSVHDPNGEYMFMRAVNTAKKSRLTDVT LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH

[0347] DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0348] SEQ ID NO:72：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR

[0349] GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQIYIWAPLAGTCG
VLLLSLVITLYCRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTL
AKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR
DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0350] SEQ ID NO:73：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR

[0351] GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQFACDIYIWAPLAG
TCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR
FPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV
LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK
GERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0352] SEQ ID NO:74：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
[0353] GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQFACDIYIWAPLAG
TCGVLLLSLVITLYCRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPY

[0354] APPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV
LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK
GERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0355] SEQ ID NO:75：

[0356] *MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP
TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWVLVVVGGVLAC
YSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYA
PPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL
DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG
ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0357] SEQ ID NO:76：

[0358] *MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQKSNGTIIHVKGK
HLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRS
RLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSAD
APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTA
TKDTYDALHMQALPPR

[0359] SEQ ID NO:77：

[0360] *MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQGKHLCPSPLFPGP SKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMN MTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQN QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPR

[0361] SEQ ID NO:78：

[0362] *MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQFWVLVVVGGVL ACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQP YAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0363] SEQ ID NO:79：

[0364] *MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQTTTPAPRPPTPAP TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVL LLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE

[0365] GGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0366] SEQ ID NO:80：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVL
EKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDS
GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH
SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCR
GLVGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQIEVMYPPPYLDN
EKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT
LYCRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSR
VKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM
GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDG
LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0367]

[0368] H.CAR多肽的实例

[0369] 用于与本文所述的方法和组合物一起使用的示例性CAR多肽可以例如在本说明书和附图中找到或作为本领域已知的那些。本文所述的CAR多肽可包含细胞外结构域，所述细胞外结构域包含对感兴趣的抗原(例如，上表3中列出的那些)具有结合亲和力和特异性的单链抗体片段(scFv)；跨膜结构域；以及CD3ζ细胞质信号传导结构域。在一些实施方案中，CAR多肽还可包含一个或多个共刺激信号传导结构域，该一个或多个共刺激信号传导结构域中的一个可为CD28共刺激信号传导结构域或4-1BB共刺激信号传导结构域。CAR多肽被配置为使得当在宿主细胞上表达时，细胞外抗原结合结构域位于细胞外以结合靶分子和CD3ζ细胞质信号传导结构域。共刺激信号传导结构域可以位于细胞质中以触发活化和/或效应物信号传导。

[0370] 在一些实施方案中，如本文所述的CAR多肽可从N末端到C末端包含细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域、任选的一个或多个共刺激结构域(例如，CD28共刺激结构域、4-1BB共刺激信号传导结构域、OX40共刺激信号传导结构域、CD27共同刺激信号传导结构域或ICOS共刺激信号传导结构域)和CD3ζ细胞质信号传导结构域。

[0371] 可选地或另外，本文所述的CAR多肽可含有两个或更多个共刺激信号传导结构域，该两个或更多个共刺激信号传导结构域可彼此连接或被细胞质信号传导结构域分开。CAR多肽中的细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域、任选的一个或多个共刺激性信号传导结构域和细胞质信号传导结构域可以直接彼此连接或通过肽接头彼此连接。在一些实施方案中，本文所述的CAR多肽中的任何ACTR多肽可在N末端处包含信号序列。

[0372] 表5提供了本文所述的示例性CAR多肽。这些示例性构建体从N末端到C末端依次具有信号序列、抗原结合结构域(例如，靶向抗原(诸如肿瘤抗原或病原性抗原)的scFv片段)、铰链结构域和跨膜结构域，而任选的共刺激结构域和细胞质信号传导结构域的位置可以切换。

[0373] 表5:CAR多肽的示例性组分。

[0374]

信号序列	细胞外结构域(抗原结合)	铰链结构域	跨膜结构域	共刺激结构域	细胞质信号传导结构域
CD8α	scFv（例如，抗GPC3 scFv）	CD8	CD8	4-1BB	CD3ζ
CD8α	scFv（例如，抗GPC3 scFv）	CD28	CD28	CD28	CD3ζ

[0375] 下文提供了示例性CAR多肽的氨基酸序列(信号序列以斜体表示)。

[0376] SEQ ID NO:97：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCR
SSQSLVHSNRNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSG
SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQNTHVPPTFGQGTKLEIKRG
GGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF
TDYEMHWVRQAPGQGLEWMGALDPKTGDTAYSQKFKGRVTLTA

[0377] DKSTSTAYMELSSLTSEDTAVYYCTRFYSYTYWGQGTLVTVSSTTT
PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA
PLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG
CSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI
GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0378] SEQ ID NO:98：

*MALPVTALLLPLALLLHAARP*DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCR
SSQSLVHSNRNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSG
SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQNTHVPPTFGQGTKLEIKRG
GGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF
TDYEMHWVRQAPGQGLEWMGALDPKTGDTAYSQKFKGRVTLTA

[0379] DKSTSTAYMELSSLTSEDTAVYYCTRFYSYTYWGQGTLVTVSSIEV
MYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGG
VLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHY
QPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE
YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI
GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0380] III.表达乳酸调节因子和任选的嵌合受体多肽的造血细胞

[0381] 本文提供了表达如本文所述的克雷布斯循环调节多肽中的一种或多种乳酸调节因子(例如,多肽或核酸)的遗传工程化的宿主细胞(例如,造血细胞,诸如HSC,以及免疫细胞,例如T细胞或NK细胞)。遗传工程化的宿主细胞还可表达也如本文所述的嵌合受体多肽(例如,表达ACTR的细胞,例如ACTR T细胞,或表达CAR的细胞,例如CAR T细胞)。在一些实施方案中,宿主细胞是造血细胞或其后代。在一些实施方案中,造血细胞可以是造血干细胞。在其他实施方案中,宿主细胞是免疫细胞,诸如T细胞或NK细胞。在一些实施方案中,免疫细胞为T细胞。在一些实施方案中,免疫细胞为NK细胞。在其他实施方案中,免疫细胞可为建立的细胞系,例如NK-92细胞。

[0382] 在一些实施方案中,遗传工程化的造血细胞诸如HSC或免疫细胞(例如,T细胞或NK细胞)可共表达CAR构建体中的任何CAR构建体(诸如本文所公开的那些CAR构建体)和乳酸调节因子中的任何乳酸调节因子(诸如乳酸调节多肽(例如,LDHA、MCT或PDK1))。在一些实施方案中,CAR构建体可包含来自4-1BB或CD28的共刺激结构域,并且乳酸调节多肽是LDHA、MCT(例如,MCT1、MCT2或MCT4)或PDK1。CAR构建体还可包含来自CD8或CD28的铰链和跨膜结构域。

[0383] 在其他实施方案中,遗传工程化的造血细胞诸如HSC或免疫细胞(例如,T细胞或NK细胞)可共表达ACTR构建体中的任何ACTR构建体(诸如本文所公开的那些ACTR构建体)和乳酸调节因子中的任何乳酸调节因子(诸如乳酸调节多肽(例如,LDHA、MCT或PDK1))。在一些实施方案中,ACTR构建体可包含来自4-1BB或CD28的共刺激结构域,并且乳酸调节多肽是LDHA、MCT(例如,MCT1、MCT2或MCT4)或PDK1。ACTR构建体还可包含来自CD8或CD28的铰链和跨膜结构域。

[0384] 可选地,本文公开的遗传工程化的宿主细胞可不表达任何嵌合受体多肽。在一些实施方案中,可以过表达如本文所公开的一种或多种乳酸调节因子(例如,多肽)的遗传工程化的免疫细胞可来源于肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。乳酸调节因子的过表达可增强肿瘤微环境中的抗肿瘤活性或TIL。可选地或另外,遗传工程化的免疫细胞可为T细胞,所述T细胞还可具有遗传工程化的T细胞受体。TIL和/或经遗传修饰的TCR可靶向肽-MHC复合物,其中所述肽可源自病原体、肿瘤抗原或自身抗原。下表6中提供了一些实例。

[0385] 本文公开的CAR构建体或要与ACTR T细胞共使用的抗体中的任一者也可靶向此类肽/MHC复合物中的任何肽。

[0386] 表6.示例性肽-MHC靶标

[0387]

靶标	适应症
NY-ESO-1	肉瘤,MM
MAGE-A10	NSCLC,膀胱,HNSCC
MAGE-A4	肉瘤,其他
PMEL	黑素瘤
WT-1	卵巢
AFP	HCC
HPV-16E6	宫颈
HPV-16E7	宫颈

[0388] 在一些实施方案中,宿主细胞为免疫细胞,诸如T细胞或NK细胞。在一些实施方案

中，免疫细胞为T细胞。例如，T细胞可以是CD4+辅助细胞或CD8+细胞毒性细胞或它们的组合。可选地或另外，T细胞可为抑制性T细胞，诸如T_{reg}细胞。在一些实施方案中，免疫细胞为NK细胞。在其他实施方案中，免疫细胞可为建立的细胞系，例如NK-92细胞。在一些实例中，免疫细胞可为本领域已知的不同类型的T细胞和/或NK细胞的混合物。例如，免疫细胞可以是从合适的供体(例如，人患者)分离的免疫细胞群。参见以下公开内容。

[0389] 在一些情况下，要引入宿主细胞中的乳酸调节因子(例如，多肽或核酸)与宿主细胞的内源蛋白质相同。相对于天然对应物，将乳酸调节因子的编码序列的附加拷贝引入宿主细胞将增强多肽的表达水平(即，过表达)。在一些情况下，要引入宿主细胞中的乳酸调节因子与所述宿主细胞是异源的，即在所述宿主细胞中不存在或不表达。此类异源乳酸调节因子可以是在自然中在宿主细胞中不表达的天然存在的蛋白质(例如，来自不同物种)。可选地，异源乳酸调节因子可以是天然蛋白质的变体，诸如本文所述的那些。在一些实例中，编码核酸的外源(即，非宿主细胞天然的)拷贝可以存在于染色体外。在其他实例中，所述编码序列的外源拷贝可以整合到宿主细胞的染色体中，并且可以位于与内源基因的天然基因座不同的位点处。

[0390] 此类遗传工程化的宿主细胞具有增强的糖酵解速率能力，并且可以例如具有增强的从环境中摄取葡萄糖的能力。因此，这些遗传工程化的宿主细胞可在低葡萄糖、低氨基酸、低pH和/或低氧条件下(例如在肿瘤微环境中)表现出更好的生长和/或生物活性。当表达如本文所公开的嵌合受体多肽时，遗传工程化的细胞可以直接(例如通过表达CAR的免疫细胞)或通过含Fc的治疗剂(诸如抗肿瘤抗体)(例如，通过表达ACTR的免疫细胞)来识别和抑制靶细胞。鉴于它们在低葡萄糖、低氨基酸、低pH和/或低氧环境中(例如，在肿瘤微环境中)的预期高增殖率、生物活性和/或存活率，遗传工程化的细胞(诸如T细胞和NK细胞)将预期具有相对于不表达或表达较低水平或较低活性形式的乳酸调节因子的嵌合受体多肽T细胞更高的治疗功效。

[0391] 免疫细胞群可获自任何来源，诸如外周血单核细胞(PBMC)、骨髓或组织(诸如脾脏、淋巴结、胸腺、干细胞或肿瘤组织。可选地，免疫细胞群可以来源于干细胞，例如造血干细胞和诱导性多能干细胞(iPSC)。适用于获得所需类型的宿主细胞的来源对本领域技术人员而言将是显而易见的。在一些实施方案中，免疫细胞群来源于PBMC，所述PBMC可获自本文所述的需要治疗的患者(例如，人患者)。所需的宿主细胞的类型(例如，T细胞、NK细胞或T细胞和NK细胞)可以在通过将细胞与刺激分子共孵育而获得的细胞群中扩增。作为非限制性实例，抗CD3和抗CD28抗体可用于T细胞扩增。

[0392] 为了构建表达本文所述的乳酸调节因子和任选的嵌合受体多肽中的任一者的免疫细胞，可以通过如本文所述的常规方法创建用于乳酸调节因子和/或嵌合受体多肽的稳定或瞬时表达的表达载体，并导入免疫宿主细胞中。例如，可以将编码乳酸调节因子和/或嵌合受体多肽的核酸克隆到一种或两种合适的表达载体(诸如与合适的启动子可操作连接的病毒载体或非病毒载体)中。在一些情况下，嵌合受体多肽和乳酸调节因子的编码序列中的每个编码序列在两个分开的核酸分子上，并且可以被克隆到两个分开的载体中，该两个分开的载体可以同时或顺序地导入合适的宿主细胞中。可选地，嵌合受体多肽和乳酸调节因子的编码序列在一个核酸分子上并且可以被克隆到一个载体中。嵌合受体多肽和乳酸调节因子的编码序列可以与两个不同的启动子可操作地连接，使得这两个多肽的表达由不同

的启动子控制。可选地，嵌合受体多肽和乳酸调节因子的编码序列可以与一个启动子可操作地连接，使得这两个多肽的表达由单个启动子控制。可以在这两个多肽的编码序列之间插入合适的序列，使得可以从单个mRNA分子翻译出两个分开的多肽。此类序列，例如IRES或核糖体跳跃位点，是本领域中众所周知的。下面提供另外的描述。

[0393] 核酸和一个或多个载体可以在合适的条件下与限制酶接触，以在每个分子上产生互补末端，所述互补末端可以彼此配对并与连接酶连接。可选地，可以将合成核酸接头连接至编码乳酸调节因子和/或嵌合受体多肽的核酸的末端。合成接头可含有对应于载体中的特定限制性位点的核酸序列。表达载体/质粒/病毒载体的选择将取决于用于表达乳酸调节因子和/或嵌合受体多肽的宿主细胞的类型，但应适合在真核细胞中整合和复制。

[0394] 多种启动子可用于表达本文所述的乳酸调节因子和/或嵌合受体多肽，该多种启动子包括但不限于巨细胞病毒(CMV)中间早期启动子、病毒LTR(诸如劳斯肉瘤病毒LTR)、HIV-LTR、HTLV-1LTR、猿猴病毒40(SV40)早期启动子、人EF1-α启动子或单纯疱疹tk病毒启动子。用于表达乳酸调节因子和/或嵌合受体多肽的附加启动子包括免疫细胞中的任何组成型活性启动子。可选地，可以使用任何可调节的启动子，使得可以在免疫细胞内调控所述启动子的表达。

[0395] 此外，载体可含有例如以下中的一些或全部：选择性标记基因，诸如新霉素基因或卡那霉素基因，所述选择性标记基因用于在宿主细胞中选择稳定或瞬时转染子；来自人CMV的立即早期基因的增强子/启动子序列，所述增强子/启动子序列用于高水平的转录；来自人EF1-α基因的内含子序列；来自SV40的转录终止和RNA处理信号，所述信号用于mRNA稳定性；SV40多瘤病毒复制起点和ColE1，所述SV40多瘤病毒复制起点和ColE1用于适当的游离型复制；内部核糖体结合位点(IRESes)、多用途多克隆位点；T7和SP6 RNA启动子，所述启动子用于有义和反义RNA的体外转录；“自杀开关”或“自杀基因”，所述“自杀开关”或“自杀基因”在被触发时会导致携带该载体的细胞死亡(例如，HSV胸苷激酶或诱导型胱天蛋白酶，诸如iCasp9)；以及报告基因，所述报告基因用于评定乳酸调节多肽和/或嵌合受体多肽的表达。

[0396] 在一个特定的实施方案中，此类载体还包含自杀基因。如本文所用，术语“自杀基因”是指使表达自杀基因的细胞死亡的基因。自杀基因可以是赋予表达该基因的细胞对剂(例如，药物)的敏感性，并且当该细胞与该剂接触或暴露于该剂时导致该细胞死亡的基因。自杀基因是本领域中已知的(参见例如，Suicide Gene Therapy:Methods and Reviews, Springer,Caroline J.(Cancer Research UK Centre for Cancer Therapeutics at the Institute of Cancer Research,Sutton,Surrey,UK),Humana Press,2004)并且包括例如单纯疱疹病毒(HSV)胸苷激酶(TK)基因、胞嘧啶脱氨酶、嘌呤核苷磷酸化酶、硝基还原酶和胱天蛋白酶(诸如胱天蛋白酶8)。

[0397] 合适的载体和用于产生含有转基因的载体的方法是本领域中众所周知并且可获得的。用于表达乳酸调节因子和/或嵌合受体多肽的载体的制备的实例可在例如US2014/0106449中找到，该专利以引用方式整体并入本文。

[0398] 包含编码本文所述的乳酸调节因子和/或嵌合受体多肽的核酸序列的载体中的任何载体也在本公开的范围内。可以通过任何合适的方法将此类载体或其中含有的编码乳酸调节因子和/或嵌合受体多肽的序列递送至宿主细胞，诸如宿主免疫细胞。将载体递送至免

疫细胞的方法是本领域中众所周知的，并且可包括DNA电穿孔、RNA电穿孔、使用诸如脂质体的试剂进行转染或病毒转导(例如，逆转录病毒转导，诸如慢病毒转导)。

[0399] 在一些实施方案中，将用于表达乳酸调节因子和/或嵌合受体多肽的载体通过病毒转导(例如，逆转录病毒转导，诸如慢病毒转导或γ-逆转录病毒转导)递送至宿主细胞。递送的示例性病毒方法包括但不限于重组逆转录病毒(参见例如，PCT公开号WO 90/07936；WO 94/03622；WO 93/25698；WO 93/25234；WO 93/11230；WO 93/10218；和WO 91/02805；美国专利号5,219,740和4,777,127；GB专利号2,200,651和EP专利号0 345 242)、基于α病毒的载体和腺相关病毒(AAV)载体(参见例如，PCT公开号WO 94/12649、WO 93/03769；WO 93/19191；WO 94/28938；WO 95/11984；和WO 95/00655)。在一些实施方案中，用于表达乳酸调节因子和/或嵌合受体多肽的载体为逆转录病毒。在一些实施方案中，用于表达乳酸调节因子和/或嵌合受体多肽的载体为慢病毒。

[0400] 描述逆转录病毒转导的参考文献的实例包括Anderson等人，美国专利号5,399,346；Mann等人，Cell 33:153(1983)；Temin等人，美国专利号4,650,764；Temin等人，美国专利号4,980,289；Markowitz等人，J.Virol.62:1120(1988)；Temin等人，美国专利号5,124,263；在1995年3月16日公布的Dougherty等人的国际专利公告号WO 95/07358；以及Kuo等人，Blood 82:845(1993)。国际专利公开号WO 95/07358描述了原代B淋巴细胞的高效转导。还参见WO 2016/040441A1，该专利出于本文所引用的目的和主题而以引用方式并入本文。

[0401] 在其中使用病毒载体将编码乳酸调节因子和/或嵌合受体多肽的载体导入宿主细胞的实例中，能够感染免疫细胞并携带该载体的病毒颗粒可以通过本领域已知的任何方法来产生，并且可以例如在PCT申请号WO 1991/002805A2、WO 1998/009271 A1和美国专利6,194,191中找到。从细胞培养上清液中收获病毒颗粒，并且可以在使病毒颗粒与免疫细胞接触之前分离和/或纯化所述病毒颗粒。

[0402] 在一些实施方案中，可以通过常规方法(例如，体外转录)制备编码如本文所述的乳酸调节因子和/或嵌合受体多肽中的任一者的RNA分子，然后通过已知方法将其导入合适的宿主细胞，例如本文所述的那些宿主细胞中，所述已知方法为例如Rabinovich等人，Human Gene Therapy 17:1027-1035。

[0403] 在一些情况下，可以将编码乳酸调节因子的核酸和编码合适的嵌合受体多肽的核酸克隆到单独的表达载体中，所述表达载体可以同时或顺序地导入合适的宿主细胞中。例如，可以首先将用于表达乳酸调节因子的表达载体(或RNA分子)导入宿主细胞，并且可以分离并体外培养表达乳酸调节因子的经转染的宿主细胞。然后可以将用于表达合适的嵌合受体多肽的表达载体(或RNA分子)导入表达乳酸调节因子的宿主细胞中，并且可以分离出表达两种多肽的经转染的细胞。在另一个实例中，各自用于表达乳酸调节因子和嵌合受体多肽的表达载体(或RNA分子)可以同时导入宿主细胞中，并且可以通过常规方法分离表达这两种多肽的经转染的宿主细胞。

[0404] 在其他情况下，可以将编码乳酸调节因子的核酸和编码嵌合受体多肽的核酸克隆到同一表达载体中。用于嵌合受体多肽和乳酸调节因子的表达的多核苷酸(包括其中此类多核苷酸可操作地连接至至少一个调节元件的载体)也在本公开的范围内。本公开的有用载体的非限制性实例包括病毒载体，诸如逆转录病毒载体，所述逆转录病毒载体包括γ逆转录病毒载体和慢病毒载体，以及腺相关病毒载体(AAV载体)。

[0405] 在一些情况下,编码乳酸调节因子和/或嵌合受体多肽的一个或多个核酸可以通过转座子被递送到宿主细胞中。在一些情况下,可以经由例如通过CRISPR、TALEN、锌指核酸酶(ZFN)或大范围核酸酶进行基因编辑将一个或多个编码核酸递送到宿主细胞中。

[0406] 在一些情况下,本文所述的核酸可包含两个编码序列,一个编码序列编码如本文所述的嵌合受体多肽,另一个编码序列编码能够调节(例如,增强)细胞内乳酸浓度(即,乳酸调节因子)。包含本文所述的两个编码序列的核酸可配置为使得由该两个编码序列编码的多肽可以被表达为独立的(和物理上分开的)多肽。为了实现该目的,本文所述的核酸可含有位于第一编码序列与第二编码序列之间的第三核苷酸序列。该第三核苷酸序列可以例如编码核糖体跳跃位点。核糖体跳跃位点是损害正常肽键形成的序列。这种机制导致从一个信使RNA翻译附加开放阅读框。该第三核苷酸序列可例如编码P2A、T2A或F2A肽(参见例如,Kim等人,PLoS One.2011;6(4):e18556)。作为非限制性实例,示例性P2A肽可具有ATNFSLLKQAGDVEENPGP SEQ ID NO.:99的氨基酸序列。

[0407] 在另一个实施方案中,第三核苷酸序列可编码内部核糖体进入位点(IRES)。IRES是RNA元件,该RNA元件允许以末端独立的方式进行翻译起始,还允许翻译来自一个信使RNA的附加开放阅读框。可选地,第三核苷酸序列可编码控制第二多肽表达的第二启动子。第三核苷酸序列还可编码多于一个核糖体跳跃序列、IRES序列、附加启动子序列或它们的组合。

[0408] 核酸还可包含附加编码序列(包括但不限于第四编码序列和第五编码序列),并且可被配置为使得由附加编码序列编码的多肽被表达为另外独立并且物理上分离的多肽。为此目的,可以通过编码一个或多个核糖体跳跃序列、IRES序列或附加启动子序列的一个或多个核苷酸序列将附加编码序列与其他编码序列分开。

[0409] 在一些实例中,核酸(例如,如本文所述的表达载体或RNA分子)可包含乳酸调节因子(例如,本文所述的乳酸调节因子)和合适的嵌合受体多肽两者的编码序列,这两个编码序列以任何次序由编码P2A肽的第三核苷酸序列(例如,ATNFSLLKQAGDVEENPGP;SEQ ID NO:99)分开。因此,可以从此类核酸产生两个分开的多肽(乳酸调节因子和嵌合受体),其中P2A部分ATNFSLLKQAGDVEENPG(SEQ ID NO:100)连接到上游多肽(由上游编码序列编码),并且来自P2A肽的残基P连接至下游多肽(由下游编码序列编码)。在一些实例中,嵌合受体多肽是上游多肽,并且乳酸调节因子是下游多肽。在其他实例中,乳酸调节因子是上游多肽,并且嵌合受体多肽是下游多肽。

[0410] 在一些实例中,核酸(例如,如本文所述的表达载体或RNA分子)可包含乳酸调节因子(例如,本文所述的乳酸调节因子)和合适的ACTR多肽两者的编码序列,这两个编码序列以任何次序由编码P2A肽的第三核苷酸序列(例如,ATNFSLLKQAGDVEENPGP;SEQ ID NO:99)分开。因此,可以从此类核酸产生两个分开的多肽(乳酸调节因子和ACTR),其中P2A部分ATNFSLLKQAGDVEENPG(SEQ ID NO:100)连接到上游多肽(由上游编码序列编码),并且来自P2A肽的残基P连接至下游多肽(由下游编码序列编码)。在一些实例中,ACTR多肽是上游多肽,并且乳酸调节因子是下游多肽。在其他实例中,乳酸调节因子是上游多肽,并且ACTR多肽是下游多肽。

[0411] 在一些实例中,上述核酸还可编码在所编码的序列的两个区段之间,例如在上游多肽与P2A肽之间的接头(例如,GSG接头)。

[0412] 在具体实例中,本文所述的核酸被配置为使得所述核酸在所述核酸转染至的宿主

细胞中表达两种独立的多肽:(i)第一多肽,该第一多肽从N末端到C末端含有合适的CAR(例如,SEQ ID NO:97或SEQ ID NO:98)、肽接头(例如,GSG接头)和来源于P2A肽的ATNFSLLKQAGDVEENPG(SEQ ID NO:100)区段;以及(ii)第二多肽,该第二多肽从N末端到C末端含有来源于P2A肽的P残基和乳酸调节因子(例如,SEQ ID NO:81至SEQ ID NO:87中的任一者)。

[0413] 在具体实例中,本文所述的核酸被配置为使得所述核酸在所述核酸转染至的宿主细胞中表达两种独立的多肽:(i)第一多肽,该第一多肽从N末端到C末端含有合适的ACTR(例如,本文所述的SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:80中的任一者,例如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:57)、肽接头(例如,GSG接头)和来源于P2A肽的ATNFSLLKQAGDVEENPG(SEQ ID NO:100)区段;以及(ii)第二多肽,该第二多肽从N末端到C末端含有来源于P2A肽的P残基和乳酸调节因子(例如,SEQ ID NO:81至SEQ ID NO:87中的任一者)。

[0414] 在一些情况下,还可以将附加感兴趣的多肽引入宿主免疫细胞。

[0415] 将编码本文提供的乳酸调节因子和/或嵌合受体多肽中的任一者的载体或编码嵌合受体多肽和/或乳酸调节因子的核酸(例如,RNA分子)导入宿主细胞后,可将所述细胞在允许乳酸调节因子和/或嵌合受体多肽表达的条件下培养。在其中编码乳酸调节因子和/或嵌合受体多肽的核酸由可调节启动子调节的实例中,可以在其中可调节启动子被活化的条件下培养宿主细胞。在一些实施方案中,启动子是诱导型启动子,并且在诱导分子存在下或在产生诱导分子的条件下培养免疫细胞。确定乳酸调节因子和/或嵌合受体多肽是否表达对本领域技术人员而言将是显而易见的,并且可以通过任何已知方法进行评定,所述方法为例如通过定量逆转录酶PCR(qRT-PCR)检测编码乳酸调节因子和/或嵌合受体多肽的mRNA,或通过包括蛋白质印迹、荧光显微术和流式细胞术的方法检测乳酸调节因子和/或嵌合受体多肽蛋白。

[0416] 可选地,嵌合受体多肽的表达可以在将免疫细胞施用于受试者后在体内发生。如本文所用,术语“受试者”是指任何哺乳动物,诸如人、猴子、小鼠、兔子或家养哺乳动物。例如,受试者可以是灵长类动物。在一个优选的实施方案中,所述受试者为人。

[0417] 可选地,可以通过引入编码乳酸调节因子和/或嵌合受体多肽的RNA分子来实现在本文公开的免疫细胞中的任何免疫细胞中表达乳酸调节因子和/或嵌合受体多肽。此类RNA分子可以通过体外转录或化学合成来制备。然后可以通过例如电穿孔将RNA分子导入合适的宿主细胞,例如免疫细胞(例如,T细胞、NK细胞或T细胞和NK细胞两者)。如,可以按照Rabinovich等人,Human Gene Therapy,17:1027-1035和WO 2013/040557所述的方法合成RNA分子并将其导入宿主免疫细胞。

[0418] 在某些实施方案中,可将包含乳酸调节因子和/或嵌合受体多肽的一个或多个载体或一个或多个RNA分子体内导入宿主细胞或免疫细胞。作为非限制性实例,这可以通过以下方式来实现:将编码本文所述的一种或多种乳酸调节因子和/或一种或多种嵌合受体多肽的载体或RNA分子直接(例如,通过静脉内施用)施用于受试者,从而体内产生包含乳酸调节因子和/或嵌合受体多肽的宿主细胞。

[0419] 用于制备表达本文所述的乳酸调节因子和/或嵌合受体多肽中的任一者的宿主细胞的方法还可包括离体活化宿主细胞。活化宿主细胞是指将宿主细胞刺激到活化状态,在该活化状态下细胞可能能够执行效应物功能。活化宿主细胞的方法将取决于用于表达乳酸

调节因子和/或嵌合受体多肽的宿主细胞的类型。例如,T细胞可以在一种或多种分子的存在下离体活化,该一种或多种分子包括但不限于:抗CD3抗体、抗CD28抗体、IL-2、植物血凝素、工程化的人工刺激细胞或颗粒或它们的组合。工程化的人工刺激细胞可以是本领域中已知的人工抗原呈递细胞。参见例如Neal等人,J.Immunol.Res.Ther.2017,2(1):68-79和Turtle等人,Cancer J.2010,16(4):374-381,这些参考文献中的每一者的相关公开内容出于此处引用的目的和主题而以引用方式并入本文。

[0420] 在其他实例中,NK细胞可以在一种或多种分子(诸如4-1BB配体、抗4-1BB抗体、IL-15、抗IL-15受体抗体、IL-2、IL12、IL-21、K562细胞和/或工程化的人工刺激细胞或颗粒)的存在下离体活化。在一些实施方案中,将表达本文所述的乳酸调节因子和/或嵌合受体多肽中的任一者的宿主细胞(表达ACTR/CAR和/或乳酸调节因子的细胞)在施用于受试者之前离体活化。确定宿主细胞是否被活化对于本领域技术人员而言将是显而易见的,并且可包括评定与细胞活化、细胞因子的表达或分泌以及细胞形态相关的一种或多种细胞表面标记物的表达。

[0421] 用于制备表达本文所述的乳酸调节因子和/或嵌合受体多肽中的任一者的宿主细胞的方法可包括离体扩增宿主细胞。扩增宿主细胞可涉及导致表达乳酸调节因子和/或嵌合受体多肽的细胞的数量增加的任何方法,例如使宿主细胞增殖或刺激宿主细胞增殖。刺激宿主细胞扩增的方法将取决于用于表达乳酸调节因子和/或嵌合受体多肽的宿主细胞的类型,并且将对本领域的普通技术人员为显而易见的。在一些实施方案中,将表达本文所述的乳酸调节因子和/或嵌合受体多肽中的任一者的宿主细胞在施用于受试者之前离体扩增。

[0422] 在一些实施方案中,在施用表达乳酸调节因子和/或嵌合受体多肽的宿主细胞至受试者之前,将所述宿主细胞离体扩增和活化。宿主细胞的活化和扩增可用于允许将病毒载体整合到基因组中,并表达编码如本文所述的乳酸调节因子和/或嵌合受体多肽的基因。尽管电穿孔当在活化的细胞上执行可更有效,但是如果使用mRNA电穿孔,则可不需要活化和/或扩增。在一些情况下,乳酸调节因子和/或嵌合受体多肽在合适的宿主细胞中瞬时表达(例如,持续3-5天)。如果存在潜在的毒性,则瞬时表达可为有利的,并且应有助于可能的副作用的临床测试的初始阶段。

[0423] 可以将表达乳酸调节因子和/或嵌合受体多肽的宿主细胞中的任何宿主细胞与药学上可接受的载体混合以形成药物组合物,所述药物组合物也在本公开的范围内。

[0424] 与本公开的组合物结合使用的短语“药学上可接受的”是指此类组合物的分子实体和其他成分是在生理上可耐受的并且当施用于哺乳动物(例如,人)时通常不产生不良反应。通常,如本文所用,术语“药学上可接受的”意指由联邦监管机构或州政府批准的或者在美国药典或其他通常认可的药典上列出为用于动物并且更具体地用于人的。“可接受的”是指载体与组合物的活性成分(例如,核酸、载体、细胞或治疗性抗体)相容,并且不会不利地影响组合物所施用至的受试者。本发明方法中使用的药物组合物中的任何药物组合物可包含冻干形式或水溶液形式的药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂。

[0425] 药学上可接受的载体,包括缓冲剂,在本领域中是众所周知的,并且可包含磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和蛋氨酸;防腐剂;低分子量多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;氨基酸;疏水聚合物;单糖;二糖;和其他碳水化

合物;金属络合物;和/或非离子表面活性剂。参见例如Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第20版,(2000)Lippincott Williams和Wilkins编辑K.E.Hoover。

[0426] 本公开的药物组合物还可含有正在被治疗的特定适应症所必需的一种或多种附加活性成分,优选地为具有不会不利地互相影响的互补活性的那些附加活性成分。可能的附加活性化合物的非限制性实例包括例如IL-2以及本领域已知的并且在下面的联合治疗的讨论中列出的各种剂。

[0427] IV.使用本文所述的遗传工程化的造血细胞的免疫疗法

[0428] 本文所公开的遗传工程化的造血细胞(例如,造血干细胞、免疫细胞,诸如NK细胞或T细胞)可以用于针对各种疾患的免疫疗法中,所述各种疾患为例如癌症、感染性疾病和自身免疫性疾病。

[0429] (a)表达ACTR多肽的遗传工程化的造血细胞与含Fc的治疗剂的联合免疫疗法

[0430] 本公开的示例性ACTR多肽赋予T淋巴细胞以抗体依赖性的细胞毒性(ADCC)能力并且增强NK细胞中的ADCC。当受体被与细胞结合的抗体结合时,其触发T细胞活化、持续的增殖以及对结合的细胞的特异性细胞毒性。

[0431] CD16对Ig的Fc部分的亲和力程度是ADCC的关键决定因素,并且因此是对抗体免疫疗法的临床反应的关键决定因素。选择相对于具有F158多态性的CD16,具有对Ig的较高结合亲和力并且介导优异ADCC的具有V158多态性的CD16作为实例。尽管F158受体在诱导T细胞增殖和ADCC方面的效力比V158受体低,但是F158受体的体内毒性可比V158受体低,从而使其可用于一些临床环境中。

[0432] 在免疫细胞中与ACTR多肽共表达的乳酸调节因子将通过使细胞在低葡萄糖、低氨基酸、低pH和/或低氧环境中有效生长和/或起作用而促进基于细胞的免疫疗法,例如T细胞疗法或NK细胞疗法。只要需要,可以通过简单地取消抗体施用来停止针对抗体的细胞毒性。临床安全性可通过以下方法来进一步增强:使用mRNA电穿孔以瞬时表达乳酸调节多肽和/或ACTR多肽,以便限制任何潜在的自身免疫反应性。

[0433] 因此,在一个实施方案中,本公开提供了一种用于增强基于抗体的免疫疗法对需要治疗的受试者中的癌症的功效的方法,该受试者正在用含Fc的治疗剂(诸如治疗性抗体)进行治疗,该含Fc的治疗剂可与表达抗原的细胞结合。含Fc的治疗剂含有Fc部分,例如人或人源化的Fc部分,所述Fc部分可以被工程化的免疫细胞上表达的ACTR的Fc结合部分(例如,人CD16A的细胞外结构域)识别并结合。

[0434] 本文所述的方法可包括将治疗有效量的抗体和治疗有效量的遗传工程化的宿主细胞(诸如造血细胞,例如免疫细胞(例如,T淋巴细胞或NK细胞)导入受试者,所述宿主细胞共表达乳酸调节因子和本公开的ACTR多肽。受试者(例如,人患者,诸如人癌症患者)已经用或正在用对靶抗原有特异性的含Fc的治疗剂进行治疗。靶抗原可以是与疾病或病症相关的任何分子,包括但不限于肿瘤抗原、病原性抗原(例如,细菌或病毒)或存在于患病细胞上的抗原,诸如本文所述的那些。

[0435] 在本公开的上下文中,只要涉及本文所述的任何疾病病症,术语“治疗(treat/treatment)”等就意味着缓解或减轻与此类病症相关的至少一种症状或减慢或逆转此类病症的进展。在本公开的含义内,术语“治疗”还表示抑制、延迟疾病的发作(即,在疾病的临床表现之前的时期)和/或降低发展出或恶化疾病的风险。例如,与癌症相关的术语“治疗”可

以表示消除或减轻患者的肿瘤负担,或预防、延迟或抑制转移等。

[0436] 如本文所用,应用于剂量或量的术语“治疗有效的”是指化合物或药物组合物的量在施用于有需要的受试者时足以导致期望的活性。应注意,当施用活性成分的组合(例如,包含抗体的第一药物组合物,以及包含表达乳酸调节因子和/或抗体偶联的T细胞受体(ACTR)构建体的T淋巴细胞或NK细胞群的第二药物组合物)时,该组合的有效量可包括或可不包括如果单独施用时有效的每种成分的量。在本公开的上下文中,术语“治疗有效”是指足以延迟通过本公开的方法治疗的疾患的表现、阻止其进展、缓解或减轻其至少一种症状的化合物或药物组合物的量。

[0437] 表达本文所述的乳酸调节因子和ACTR多肽的宿主细胞(例如,造血细胞,例如免疫细胞,诸如T细胞和NK细胞)可用于增强受试者中的ADCC和/或用于增强基于抗体的免疫疗法的功效和/或用于增强在低葡萄糖环境中免疫细胞的生长和/或增殖。在一些实施方案中,受试者为哺乳动物,诸如人、猴子、小鼠、兔子或家养哺乳动物。在一些实施方案中,受试者为人。在一些实施方案中,受试者为人癌症患者。在一些实施方案中,受试者已经用或正在用本文所述的治疗性抗体中的任何治疗性抗体进行治疗。

[0438] 为了实践本文所述的方法,可以通过合适的途径(诸如静脉内施用)向需要治疗的受试者施用有效量的表达本文所述的乳酸调节因子和ACTR多肽中的任一者的宿主细胞(例如,免疫细胞(例如,NK细胞和/或T淋巴细胞))和有效量的抗体或它们的组合物。如本文所用,有效量是指在施用时赋予对受试者的治疗效应的相应剂(例如,表达乳酸调节因子、ACTR多肽、抗体或它们的组合物的NK细胞和/或T淋巴细胞)的量。确定本文所述的细胞或组合物的量是否实现治疗效应对于本领域技术人员而言将是显而易见的。如本领域技术人员所认识到的,有效量取决于以下项而变化:所治疗的特定病症;病症的严重程度;包括年龄、身体状况、大小、性别(gender)、性别(sex)和体重的个体患者参数;治疗持续时间;同时疗法(如果有的话)的性质;具体施用途径;以及在健康从业人员的知识和专长内的类似因素。在一些实施方案中,有效量减轻、缓解、改善、改进、减少症状,或延迟受试者中的任何疾病或疾患的进展。在一些实施方案中,受试者为人。在一些实施方案中,需要治疗的受试者为人癌症患者。在一些实施方案中,需要治疗的受试者患有一种或多种病原性感染(例如,病毒、细菌和/或真菌感染)。

[0439] 本公开的方法可用于治疗任何癌症或任何病原体。可通过本公开的方法治疗的癌症的具体非限制性实例包括例如淋巴瘤、乳腺癌、胃癌、神经母细胞瘤、骨肉瘤、肺癌、皮肤癌、前列腺癌、结直肠癌、肾细胞癌、卵巢癌、横纹肌肉瘤、白血病、间皮瘤、胰腺癌、头颈癌、视网膜母细胞瘤、神经胶质瘤、胶质母细胞瘤、甲状腺癌、肝细胞癌、食道癌和宫颈癌。在某些实施方案中,癌症可为实体瘤。

[0440] 本公开的方法还可用于治疗可由细菌感染、病毒感染或真菌感染引起的传染病。在此类情况下,遗传工程化的免疫细胞可与靶向病原性抗原(例如,与引起感染的细菌、病毒或真菌相关的抗原)的含Fc的治疗剂(例如,抗体)共同使用。病原性抗原的具体非限制性实例包括但不限于细菌、病毒和/或真菌抗原。下面提供一些实例:流感病毒神经氨酸酶、血凝素或M2蛋白、人呼吸道合胞病毒(RSV)F糖蛋白或G糖蛋白、单纯性疱疹病毒糖蛋白gB、gC、gD或gE、衣原体MOMP或PorB蛋白、登革热病毒核心蛋白、基质蛋白或糖蛋白E、麻疹病毒血凝素、单纯性疱疹病毒2型糖蛋白gB、脊髓灰质炎病毒I VP1、HIV 1的包膜糖蛋白、乙型肝炎核

心抗原或表面抗原、白喉毒素、链球菌24M表位、淋球菌菌毛蛋白、伪狂犬病病毒g50(gpD)、伪狂犬病病毒II(gpB)、伪狂犬病病毒III(gpC)、伪狂犬病病毒糖蛋白H、伪狂犬病病毒糖蛋白E、传染性胃肠炎糖蛋白195、传染性胃肠炎基质蛋白或人丙型肝炎病毒糖蛋白E1或E2。

[0441] 在一些实施方案中,以使ADCC活性有效增强至少20%和/或至少2倍(例如使ADCC增强50%、80%、100%、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍或更高)的量向受试者施用免疫细胞。

[0442] 将免疫细胞与含Fc的治疗剂(诸如治疗抗体)共施用,以靶向表达含Fc的治疗剂所结合的抗原的细胞。在一些实施方案中,可以将多于一种含Fc的治疗剂,诸如多于一种抗体与免疫细胞共同使用。基于抗体的免疫疗法可用于治疗、减轻或减少受试者的被认为该免疫疗法可用于的任何疾病或疾患的症状。

[0443] 抗体(以多种形式可互换地使用)是免疫球蛋白分子,所述免疫球蛋白分子能够通过位于所述免疫球蛋白分子的可变区中的至少一个抗原识别位点与靶标(诸如碳水化合物、多核苷酸、脂质、多肽等)特异性结合。如本文所用,术语"抗体"不仅涵盖完整(即,全长)多克隆或单克隆抗体,而且还涵盖其包含Fc区的抗原结合片段、其突变体、包含抗体部分的融合蛋白、人源化抗体、嵌合抗体、双体抗体、单结构域抗体(例如,纳米抗体)、线性抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和包含具有所需特异性的抗原识别位点和Fc区的免疫球蛋白分子的任何其他经修饰构型,包括抗体的糖基化变体、抗体的氨基酸序列变体以及经共价修饰的抗体。抗体包括任何类别的抗体,诸如IgD、IgE、IgG、IgA或IgM(或其亚类),并且该抗体不必是任何特定类别的。根据免疫球蛋白的重链的恒定结构域的抗体氨基酸序列,可将免疫球蛋白分配为不同类别。存在五种主要类别的免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些中的几种可以被进一步划分成亚类(同种型),例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别被称为α、δ、ε、γ和μ。不同类别免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是熟知的。用于在本公开中使用的抗体含有可被共使用的表达ACTR和/或乳酸调节因子的免疫细胞识别的Fc区。Fc区可以是人Fc区或人源化的Fc区。

[0444] 本文所述的抗体中的任何抗体可以是单克隆或多克隆的。"单克隆抗体"是指同种抗体群体,并且"多克隆抗体"是指异种抗体群体。这两个术语并不限制抗体的来源或制备方式。

[0445] 在一个实例中,本文所述的方法中使用的抗体是人源化抗体。人源化抗体是指非人(例如,鼠)抗体的形式,所述抗体为特异性的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其含有来源于非人免疫球蛋白的最小序列的抗原结合片段。对于大多数情况,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的互补性决定区(CDR)的残基被来自非人物种(供体抗体)(诸如小鼠、大鼠或兔子)的CDR的具有所需特异性、亲和力和能力的残基替代。在一些情况下,所述人免疫球蛋白的Fv构架区(FR)残基被对应的非人残基替代。此外,人源化抗体可包含在受体抗体或导入的CDR或构架序列中均未发现,但被包含以进一步完善和优化抗体性能的残基。通常,人源化抗体将包含基本上全部的至少一个,以及典型地两个可变结构域,其中全部或基本上全部的CDR区对应于非人免疫球蛋白的CDR区,并且全部或基本上全部的FR区是人免疫球蛋白共有序列的FR区。人源化抗体任选还将包含免疫球蛋白恒定区或结构域(Fc)的至少一部分,典型地是人免疫球蛋白的免疫球蛋白恒定区或结构域(Fc)的至

少一部分。抗体可具有如WO 99/58572中所述修饰的Fc区。本文使用的抗体可为糖基化的(例如,岩藻糖基化的)或无岩藻糖基化的。其他形式的人源化抗体具有相对于原始抗体有所改变的一个或多个CDR(一个、两个、三个、四个、五个、六个),该一个或多个CDR也称为一个或多个“来源于”来自原始抗体的一个或多个CDR的CDR。人源化抗体也可涉及亲和力成熟。

[0446] 在另一个实例中,本文描述的抗体是嵌合抗体,所述嵌合抗体可包括来自人抗体的重恒定区和轻恒定区。嵌合抗体是指具有来自第一物种的可变区或可变区的一部分以及来自第二物种的恒定区的抗体。通常,在这些嵌合抗体中,轻链和重链两者的可变区都模仿来源于一个哺乳动物物种(例如,非人哺乳动物,诸如小鼠、兔子和大鼠)的抗体的可变区,而恒定部分与来源于另一种哺乳动物诸如人的抗体中的序列同源。在一些实施方案中,可以在可变区和/或恒定区中进行氨基酸修饰。

[0447] 可以将表达本文公开的乳酸调节因子和/或ACTR多肽中的任一者的造血细胞(例如,免疫细胞(例如,T淋巴细胞和/或NK细胞)或HSC)施用于已经用或正在用含Fc的抗体治疗的受试者。例如,可以将免疫细胞与抗体同时施用于人受试者。可选地,可以在基于抗体的免疫疗法的过程期间将免疫细胞施用于人受试者。在一些实例中,可以将免疫细胞和抗体间隔至少4小时,例如间隔至少12小时、间隔至少1天、间隔至少3天、间隔至少一周、间隔至少两周,或间隔至少一个月施用于人受试者。

[0448] 在一些实施方案中,本文所述的抗体特异性结合对应的靶抗原或其表位。“特异性结合”抗原或表位的抗体是本领域中众所周知的术语。如果某一分子与特定靶抗原的反应比与替代靶标的反应更频繁、更快速、持续时间更长和/或具有更大的亲和力,则说该分子表现出“特异性结合”。如果抗体以比与其他物质结合的更大的亲和力(affinity)、亲合力(avidity)、更容易和/或更长的持续时间结合,则该抗体“特异性结合”靶抗原或表位。例如,与某一抗原或其中的抗原表位特异性(或优先)结合的抗体是以比与其他抗原或同一抗原中的其他表位结合更大的亲和力、更容易和/或更长的持续时间结合该靶抗原的抗体。使用该定义还应理解,例如,特异性结合第一靶抗原的抗体可以或可以不特异性结合或优先结合第二靶抗原。因此,“特异性结合”或“优先结合”并不一定需要(尽管其可包括)排他结合。在一些实例中,“特异性结合”靶抗原或其表位的抗体可能不结合其他抗原或相同抗原中的其他表位。

[0449] 在一些实施方案中,如本文所述的抗体对靶抗原(例如,本文所述的靶标中的任何靶标)或其抗原表位具有合适的结合亲和力。用于本文描述的免疫治疗方法的抗体可以结合(例如,特异性结合)感兴趣的靶抗原,或其中的特定区域或抗原表位。上表3列出了示例性感兴趣的靶抗原和与此类示例性感兴趣的靶抗原结合的示例性抗体。

[0450] (b)表达CAR多肽的遗传工程化的造血细胞的免疫疗法

[0451] 本文所述的共表达乳酸调节因子和CAR多肽的遗传工程化的造血细胞(例如,造血干细胞、免疫细胞,诸如T细胞或自然杀伤细胞)可用于免疫疗法(诸如T细胞疗法或NK细胞疗法)中,以直接或间接(例如,通过与CAR多肽所结合的标签缀合的治疗剂)抑制表达CAR多肽所靶向的抗原的患病细胞。免疫细胞中与CAR多肽共表达的乳酸调节因子通过允许细胞在低葡萄糖、低氨基酸、低pH和/或低氧环境中(例如在肿瘤微环境中)有效生长和/或起作用,将促进基于细胞的免疫疗法。临床安全性可通过以下方法来进一步增强:使用mRNA电穿

孔来瞬时表达乳酸调节因子和/或CAR多肽，以限制任何潜在的非肿瘤特异性反应性。

[0452] 本文所述的方法可包括将治疗有效量的遗传工程化的宿主细胞(诸如造血细胞，例如免疫细胞(例如，T淋巴细胞或NK细胞)导入受试者，所述宿主细胞共表达乳酸调节因子和本公开的CAR多肽。受试者(例如，人患者，诸如人癌症患者)可以另外已经或正在用抗癌或抗感染疗法治疗，所述抗癌或抗感染疗法包括但不限于抗癌治疗剂或抗感染剂。CAR具有可结合任何靶抗原的抗原结合结构域。此类靶抗原可以是与疾病或病症相关的任何分子，包括但不限于肿瘤抗原、病原性抗原(例如，细菌、真菌或病毒)或存在于患病细胞上的抗原，诸如本文所述的那些。

[0453] 表达本文所述的乳酸调节因子和CAR多肽的宿主细胞(例如，造血细胞，例如免疫细胞，诸如T细胞和NK细胞)可用于抑制表达靶抗原的细胞和/或用于增强免疫细胞在低葡萄糖环境、低氨基酸环境、低pH环境和/或低氧环境中(例如，在肿瘤微环境中)的生长和/或增殖。在一些实施方案中，受试者为哺乳动物，诸如人、猴子、小鼠、兔子或家养哺乳动物。在一些实施方案中，受试者为人。在一些实施方案中，受试者为人癌症患者。在一些实施方案中，受试者已经另外用或正在用本文所述的治疗性抗体中的任何治疗性抗体进行治疗。

[0454] 为了实践本文所述的方法，可以通过合适的途径(诸如静脉内施用)向需要治疗的受试者施用有效量的表达本文所述的乳酸调节因子和CAR多肽中的任一者的造血细胞(例如，免疫细胞(NK细胞和/或T淋巴细胞))或它们的组合物。如本文所用，有效量是指在施用时赋予对受试者的治疗效应的相应剂(例如，表达乳酸调节因子、CAR多肽或它们的组合物的NK细胞和/或T淋巴细胞)的量。确定本文所述的细胞或组合物的量是否实现治疗效应对于本领域技术人员而言将是显而易见的。如本领域技术人员所认识到的，有效量取决于以下项而变化：所治疗的特定病症；病症的严重程度；包括年龄、身体状况、大小、性别(gender)、性别(sex)和体重的个体患者参数；治疗持续时间；同时疗法(如果有的话)的性质；具体施用途径；以及在健康从业人员的知识和专长内的类似因素。在一些实施方案中，有效量减轻、缓解、改善、改进、减少症状，或延迟受试者中的任何疾病或疾患的进展。在一些实施方案中，受试者为人。在一些实施方案中，需要治疗的受试者为人癌症患者。在一些实施方案中，需要治疗的受试者患有一种或多种病原性感染(例如，病毒、细菌和/或真菌感染)。

[0455] 本公开的方法可用于治疗任何癌症或任何病原体。可通过本公开的方法治疗的癌症的具体非限制性实例包括例如淋巴瘤、乳腺癌、胃癌、神经母细胞瘤、骨肉瘤、肺癌、皮肤癌、前列腺癌、结直肠癌、肾细胞癌、卵巢癌、横纹肌肉瘤、白血病、间皮瘤、胰腺癌、头颈癌、视网膜母细胞瘤、神经胶质瘤、胶质母细胞瘤、甲状腺癌、肝细胞癌、食道癌和宫颈癌。在某些实施方案中，癌症可为实体瘤。

[0456] 本公开的方法还可用于治疗可由细菌感染、病毒感染或真菌感染引起的传染病。在此类情况下，表达对病原性抗原(例如，与引起感染的细菌、病毒或真菌相关的抗原)有特异性的CAR多肽的遗传工程化的免疫细胞可用于消除感染的细胞。病原性抗原的具体非限制性实例包括但不限于细菌、病毒和/或真菌抗原。

[0457] 在一些实施方案中，以有效抑制表达靶抗原的细胞达至少20％和/或至少2倍(抑制表达靶抗原的细胞达50％、80％、100％、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍或更高)的量向受试者施用免疫细胞。

[0458] 可以使用附加治疗剂(例如,基于抗体的免疫治疗剂)来治疗、减轻或减少受试者的被认为该治疗剂可用于的任何疾病或疾患的症状。

[0459] 如本文所述的基于细胞的免疫疗法的功效可以通过本领域中已知的任何方法来评定,并且对熟练的医学专业人员将是显而易见的。例如,可以通过受试者的存活率或受试者或其组织或样品中的肿瘤或癌症负担来评定基于细胞的免疫疗法的功效。在一些实施方案中,以与不存在表达乳酸调节因子和/或CAR多肽的免疫细胞时的功效相比有效地将基于细胞的免疫疗法的功效提高至少20%和/或至少2倍(例如,将基于抗体的免疫疗法的功效提高50%、80%、100%、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍或更多)的量向需要治疗的受试者施用免疫细胞。

[0460] 在本文所述的组合物或方法中的任一者中,免疫细胞(例如,NK和/或T细胞)可对于受试者为自体的,即,免疫细胞可获自需要治疗的受试者,经遗传工程化以用于表达乳酸调节因子和/或CAR多肽,然后施用至同一受试者。在一个特定的实施方案中,在重新导入受试者之前,自体免疫细胞(例如,T淋巴细胞或NK细胞)被离体活化和/或扩增。与施用非自体细胞相比,向受试者施用自体细胞可导致减少的宿主细胞排斥。

[0461] 可选地,宿主细胞是同种异体细胞,即,所述细胞获自第一受试者,经遗传工程化以表达乳酸调节因子和/或嵌合受体多肽(例如,ACTR多肽或CAR多肽),并施用至不同于第一受试者但为同一物种的第二受试者。例如,同种异体免疫细胞可来源于人供体并施用于不同于该供体的人受体。在一个特定的实施方案中,T淋巴细胞是其中内源性T细胞受体的表达已被抑制或消减的同种异体T淋巴细胞。在一个特定的实施方案中,在引入受试者之前,同种异体T淋巴细胞被离体活化和/或扩增。T淋巴细胞可以通过本领域已知的任何方法活化,例如在抗CD3/CD28、IL-2、植物血凝素、工程化的人工刺激细胞或颗粒或它们的组合的存在下。

[0462] NK细胞可以通过本领域已知的任何方法来活化,所述方法为例如在一种或多种选自由以下组成的组的剂的存在下:CD137配体蛋白、CD137抗体、IL-15蛋白、IL-15受体抗体、IL-2蛋白、IL-12蛋白、IL-21蛋白和K562细胞系,和/或工程化的人工刺激细胞或颗粒。关于对用于扩增NK细胞的可用方法的描述,参见例如美国专利号7,435,596和8,026,097。例如,用于本公开的组合物或方法中的NK细胞可通过暴露于缺乏或不良地表达主要组织相容性复合物I和/或II分子并且已被遗传修饰以表达膜结合的IL-15和/或4-1BB配体(CDI37L)的细胞而优先扩增。此类细胞系包括但不必限于K562[ATCC,CCL 243;Lozzio等人,Blood 45(3):321-334(1975);Klein等人,Int.J.Cancer 18:421-431(1976)],以及威尔姆氏瘤细胞系HFWT(Fehniger等人,Int Rev Immunol 20(3-4):503-534(2001);Harada H等人,Exp Hematol 32(7):614-621(2004))、子宫内膜肿瘤细胞系HHUA、黑素瘤细胞系HMV-II、肝母细胞瘤细胞系HuH-6、肺小细胞癌细胞系Lu-130和Lu-134-A、神经母细胞瘤细胞系NB 19和N1369、来自睾丸NEC 14的胚胎癌细胞系、宫颈癌细胞系TCO-2,以及骨髓转移的神经母细胞瘤细胞系TNB 1[Harada等人,Jpn.J.Cancer Res 93:313-319(2002)]。优选地,所使用的细胞系缺乏或不良地表达MHC I和MHC II分子两者,诸如K562和HFWT细胞系。可以使用固相载体代替细胞系。此类载体应优选在其表面上附着有至少一个能够与NK细胞结合并诱导初级活化事件和/或增殖反应或能够与具有此类影响的分子结合从而充当支架的分子。载体可以在其表面上附着有CD137配体蛋白、CD137抗体、IL-15蛋白或IL-15受体抗体。优选地,载

体将在其表面上结合有IL-15受体抗体和CD137抗体。

[0463] 在所描述的组合物或方法的一个实施方案中，将T淋巴细胞、NK细胞或T淋巴细胞和NK细胞引入(或重新引入)受试者体内，然后向该受试者施用治疗有效量的IL-2。

[0464] 根据本公开，可以通过输注在约10^5至10^{10}个或更多个细胞/千克体重(细胞/Kg)范围内的治疗有效剂量的包含本公开的)和/或CAR多肽的免疫细胞(诸如T淋巴细胞或NK细胞)来治疗患者。输注可以重复达患者能耐受的频率和次数，直到实现所需的应答。适当的输注剂量和时间表将因患者而异，但是可以由治疗医师针对特定患者确定。通常，将输注约10^6个细胞/Kg的初始剂量，逐步上升到10^8个或更多个细胞/Kg。可将IL-2共施用来扩增输注的细胞。IL-2的量可为约1-5×10^6国际单位/平方米体表。

[0465] 术语“约”或“大致”是指在如本领域普通技术人员所确定的特定值的可接受误差范围内，其将部分取决于该值是如何测量或测定的，即测量系统的极限值。例如，根据本领域的实践，“约”可以表示在可接受的标准偏差之内。可选地，“约”可表示给定值的至多±20％，优选地至多±10％，更优选地至多±5％，并且更优选地仍然至多±1％的范围。可选地，特别是关于生物系统或过程，该术语可以意指在值的一个数量级内，优选地在2倍以内。在本申请和权利要求书中描述了特定值的情况下，除非另有说明，否则术语“约”是隐含的，并且在此上下文中意味着在该特定值的可接受误差范围内。

[0466] 本文所述的组合物或方法的功效可以通过本领域中已知的任何方法来评定，并且对熟练的医学专业人员将是显而易见的。例如，可以通过受试者的存活率或受试者或其组织或样品中的癌症或病原体负担来评定本文所述的组合物或方法的功效。在一些实施方案中，本文所述的组合物和方法可以基于该疗法(例如，施用表达乳酸调节因子和/或CAR多肽的免疫细胞)在受试者中的安全性或毒性，例如通过受试者的整体健康状况和/或不良事件或严重不良事件的存在进行评定的。

[0467] (c)其他免疫疗法

[0468] 在一些实施方案中，表达乳酸调节因子中的一种或多种乳酸调节因子(例如，LDHA或MCT，诸如MCT1、MCT2或MCT4)的遗传工程化的免疫细胞可来源于对患病细胞(例如，癌细胞或病原体感染的细胞)有特异性的天然免疫细胞。此类遗传工程化的免疫细胞(例如，肿瘤浸润淋巴细胞或TIL)可不共表达任何嵌合受体多肽，并且可用于破坏靶疾病细胞，例如癌细胞。表达一种或多种乳酸调节因子而不表达嵌合受体的遗传工程化的TIL可以与能够结合靶肿瘤细胞和TIL(BiTE)的双特异性抗体共同使用。

[0469] 在一些实施方案中，表达一种或多种乳酸调节因子(例如，LDHA或MCT，诸如MCT1、MCT2或MCT4)的遗传工程化的免疫细胞可为T_{reg}细胞。此类T_{reg}细胞可共表达如本文所公开的嵌合受体多肽。可选地，T_{reg}细胞可以不共表达任何嵌合受体多肽，并且可以用于预期的疗法。

[0470] V.联合治疗

[0471] 本公开中描述的组合物和方法可以与其他类型的癌症疗法结合利用，所述其他类型的癌症疗法为例如化学疗法、外科手术、放射、基因疗法等等，或抗感染疗法。可以与根据本公开的免疫疗法同时或顺序地(以任何次序)施用此类疗法。当与附加治疗剂共施用时，由于加成作用或协同作用，每种剂的合适治疗有效剂量可能会降低。

[0472] 在一些情况下，可以将表达本文所公开的乳酸调节因子和/或嵌合受体多肽中的

任一者的免疫细胞(例如,T淋巴细胞和/或NK细胞)施用于已经用或正在用附加治疗剂(例如,附加抗癌治疗剂)治疗的受试者。例如,免疫细胞可以与附加治疗剂同时施用于人受试者。可选地,免疫细胞可以在附加治疗剂之前施用于人受试者。可选地,免疫细胞可以在附加治疗剂之后施用于人受试者。

[0473] 共表达乳酸调节因子和对标签特异的CAR多肽的遗传工程化的免疫细胞(例如,T细胞或NK细胞)可以与缀合至所述标签的治疗剂共使用。通过能够与患病细胞(诸如肿瘤细胞)相关抗原结合的治疗剂,此类遗传工程化的免疫细胞可以与患病细胞结合并抑制所述患病细胞的生长。上文表1中列出的抗体中的任何抗体,或也在表1中列出的对同一靶抗原特异的其他抗体,可缀合至合适的标签(例如,本文所述的那些),并与共表达乳酸调节因子和对标签特异的CAR多肽的免疫细胞共使用。

[0474] 本公开的治疗可以与其他免疫调节治疗组合,所述其他免疫调节治疗为例如治疗性疫苗(包括但不限于GVAX、基于DC的疫苗等)、检查点抑制剂(包括但不限于阻断CTLA4、PD1、LAG3,TIM3等的剂)或活化剂(包括但不限于增强41BB、OX40等的剂)。

[0475] 用于与本公开的免疫疗法组合的其他治疗剂的非限制性实例包括:(I)抗血管生成剂(例如,TNP-470、血小板因子4、血小板反应素-1、金属蛋白酶组织抑制剂(TIMP1和TIMP2)、催乳素(16-Kd片段)、血管抑素(纤溶酶原的38-Kd片段)、内皮抑素、bFGF可溶性受体、转化生长因子β、干扰素α、可溶性KDR和FLT-1受体、胎盘增殖蛋白相关蛋白,以及由Carmeliet和Jain(2000)列出的那些);(ii)VEGF拮抗剂或VEGF受体拮抗剂,诸如抗VEGF抗体、VEGF变体、可溶性VEGF受体片段、能够阻断VEGF或VEGFR的适体、中和抗VEGFR抗体、VEGFR酪氨酸激酶的抑制剂以及它们的任何组合;以及(iii)化疗化合物,诸如嘧啶类似物(5-氟尿嘧啶、氟尿苷、卡培他滨、吉西他滨和阿糖胞苷)、嘌呤类似物、叶酸拮抗剂和相关抑制剂(巯基嘌呤、硫鸟嘌呤、喷司他丁和2-氯脱氧腺苷(克拉屈滨));抗增殖/抗有丝分裂剂,包括天然产物,诸如长春花生物碱(长春碱、长春新碱和长春瑞滨)、微管破坏剂诸如紫杉烷(紫杉醇、多西他赛)、长春新碱、长春碱、诺考达唑、埃博霉素和诺维本(navelbine)、表鬼臼毒素(依托泊苷和替尼泊苷)、DNA损伤剂(放线菌素、安吖啶、蒽环类、博莱霉素、白消安、喜树碱、卡铂、苯丁酸氮芥、顺铂、环磷酰胺(cyclophosphamide)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、更生霉素(dactinomycin)、柔红霉素、多柔比星、表柔比星、六甲嘧胺、奥沙利铂、异环磷酰胺、美法仑、氮芥(merchlorehtamine)、丝裂霉素、米托蒽醌、亚硝基脲、普卡霉素、丙卡巴嗪、紫杉醇、泰索帝、替尼泊苷、三亚乙基硫代磷酰胺和依托泊苷(VP16));抗生素,诸如更生霉素(放线菌素D)、柔红霉素、多柔比星(阿霉素)、伊达比星、蒽环类、米托蒽醌、博莱霉素、普卡霉素(光神霉素)和丝裂霉素;酶(系统代谢左旋天冬酰胺并剥夺细胞合成自身天冬酰胺的能力的左旋天冬酰胺酶);抗血小板剂;抗增殖/抗有丝分裂烷化剂,诸如氮芥(nitrogen mustard)(氮芥(merchlorehtamine)、环磷酰胺(cyclophosphamide)及类似物、美法仑、苯丁酸氮芥)、乙烯亚胺和甲基三聚氰胺(六甲嘧胺和噻替派)、烷基磺酸盐-白消安、亚硝基脲(卡莫司汀(BCNU)及类似物、链脲菌素)、三氮烯-达卡巴嗪(DTIC);抗增殖/抗有丝分裂抗代谢物,诸如叶酸类似物(甲氨蝶呤);铂配位络合物(顺铂、卡铂)、丙卡巴嗪、羟基脲、米托坦、氨鲁米特;激素、激素类似物(雌激素、它莫西芬、戈舍瑞林、比卡鲁胺、尼鲁米特)和芳香酶抑制剂(来曲唑、阿那曲唑);抗凝血剂(肝素、合成肝素盐和其他凝血酶抑制剂);纤维蛋白溶解剂(诸如组织纤溶酶原激活剂、链激酶和

尿激酶)、阿司匹林、双嘧达莫、噻氯匹定、氯吡格雷、阿昔单抗;抗迁移剂(antimigratory agent);抗分泌剂(布雷菲德菌素);免疫抑制剂(环孢菌素、他克莫司(FK-506)、西罗莫司(雷帕霉素)、硫唑嘌呤、霉酚酸酯);抗血管生成化合物(例如,TNP-470、金雀异黄素(genistein)、贝伐单抗)和生长因子抑制剂(例如,成纤维细胞生长因子(FGF)抑制剂);血管紧张素受体阻滞剂;一氧化氮供体;反义寡核苷酸;抗体(曲妥珠单抗);细胞周期抑制剂和分化诱导剂(维甲酸);AKT抑制剂(诸如MK-2206 2HCl、哌立福辛(KRX-0401)、GSK690693、Ipatasertib(GDC-0068)、AZD5363、优普色替(uprosertib)、阿氟色替(afuresertib)或曲西立滨(triciribine));mTOR抑制剂、拓扑异构酶抑制剂(多柔比星(阿霉素)、安吖啶、喜树碱、柔红霉素、更生霉素、京尼平苷(eniposide)、表柔比星、依托泊苷、伊达比星、米托蒽醌、拓扑替康和伊立替康)、皮质类固醇(可的松、地塞米松、氢化可的松、甲基强的松龙、强的松和泼尼松龙);生长因子信号转导激酶抑制剂;线粒体功能障碍诱导剂和胱天蛋白酶激活剂;以及染色质破坏剂。

[0476] 有关其他有用的剂的实例,还参见Physician's Desk Reference,第59版,(2005),Thomson P D R,Montvale N.J.;Gennaro等人编著,Remington's The Science and Practice of Pharmacy,第20版,(2000),Lippincott Williams和Wilkins,Baltimore编著;Braunwald等人编著,Harrison's Principles of Internal Medicine,第15版,(2001),McGraw Hill,NY;Berkow等人编著The Merck Manual of Diagnosis and Therapy,(1992),Merck Research Laboratories,Rahway N.J。

[0477] 附加治疗剂的施用可以通过任何合适的途径执行,所述途径包括全身性施用以及直接施用至疾病部位(例如,至肿瘤)。

[0478] 在一些实施方案中,该方法涉及以一个剂量向受试者施用附加治疗剂(例如,抗体)。在一些实施方案中,该方法涉及以多个剂量(例如,至少2、3、4、5、6、7或8个剂量)向受试者施用附加治疗剂(例如,抗体)。在一些实施方案中,将附加治疗剂(例如,抗体)以多个剂量施用于受试者,其中在施用表达乳酸调节因子和/或CAR多肽的免疫细胞之前的约1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天,将第一剂量的附加治疗剂(例如,抗体)施用于所述受试者。在一些实施方案中,在施用表达乳酸调节因子和/或CAR多肽的免疫细胞之前约24-48小时之间,将第一剂量的附加治疗剂(例如,抗体)施用于受试者。在一些情况下,所述附加治疗剂可为对感兴趣的靶抗原特异的抗体,例如表1中列出的那些,以及对同一靶抗原特异的其他抗体。

[0479] 在一些实施方案中,在施用表达乳酸调节因子和/或CAR多肽的免疫细胞之前将附加治疗剂(例如,抗体)施用于受试者,然后随后约每两周将所述附加治疗剂施用于受试者一次。在一些实施方案中,前两个剂量的附加治疗剂(例如,抗体)间隔约一周(例如约6天、7天、8天或9天)施用。在某些实施方案中,第三和后续剂量大约每两周施用一次。

[0480] 在本文所述的实施方案中的任何实施方案中,附加治疗剂(例如,抗体)施用的定时是近似的,并且包括在所示日期之前三天和之后三天(例如,每三周施用一次包括在第18天、第19天、第20天、第21天、第22天、第23天或第24天施用)。

[0481] 本文所述的组合物或方法的功效可以通过本领域中已知的任何方法来评定,并且对熟练的医学专业人员将是显而易见的,和/或为本文所述的那些。例如,可以通过受试者的存活率或受试者或其组织或样品中的癌症负担来评定基于抗体的免疫疗法的功效。在一

些实施方案中，基于抗体的免疫疗法是基于该疗法在受试者中的安全性或毒性，例如通过受试者的整体健康状况和/或不良事件或严重不良事件的存在进行评定的。

[0482] VI.用于治疗用途的药盒

[0483] 本公开还提供了用于本文所述的组合物的用途的药盒。例如，本公开还提供了药盒，所述药盒包含免疫细胞群(例如，T淋巴细胞或NK细胞，是体外或体内构建的)，所述免疫细胞群表达乳酸调节因子和任选的嵌合受体多肽，以用于抑制患病细胞(例如，肿瘤细胞)的生长和/或增强免疫细胞在低葡萄糖环境、低氨基酸环境、低pH环境和/或低氧环境中(例如，在肿瘤微环境中)的生长和/或增殖。该药盒还可包含治疗剂或缀合至标签(例如，本文所述的那些)的治疗剂，在免疫细胞上表达的嵌合受体多肽与所述标签结合。此类药盒可包括一个或多个容器，该一个或多个容器包含如本文所述的遗传工程化的免疫细胞(例如，T淋巴细胞和/或NK细胞)的群体，所述免疫细胞共表达乳酸调节因子和嵌合受体多肽(诸如本文所述的那些)；以及任选的治疗剂或缀合至标签的治疗剂。

[0484] 在一些实施方案中，本文所述的药盒包括在体外扩增的表达乳酸调节因子和表达嵌合受体的免疫细胞；以及对活化的T细胞上存在的细胞表面抗体有特异性的抗体，例如抗CD5抗体、抗CD38抗体或抗CD7抗体。表达乳酸调节因子和表达嵌合受体多肽的免疫细胞可表达本领域中已知或本文公开的嵌合受体多肽构建体中的任何嵌合受体多肽构建体。

[0485] 可选地，本文公开的药盒可包含本文所述的核酸或核酸组，所述核酸或核酸组共同编码也如在本文中所述的任何嵌合受体多肽和任何乳酸调节因子。

[0486] 在一些实施方案中，药盒可另外包含用于本文所述的方法中的任何方法中的使用说明书。所包括的使用说明书可包括对向受试者施用第一药物组合物和第二药物组合物以实现预期活性，例如抑制受试者中的靶细胞生长和/或增强免疫细胞在低葡萄糖环境、低氨基酸环境(例如，低谷氨酰胺环境)、低pH环境和/或低氧环境(例如，低葡萄糖、低氨基酸、低pH和/或低氧肿瘤微环境)中的生长和/或增殖的描述。药盒还可包括对基于识别受试者是否需要治疗来选择适合于治疗的受试者的描述。在一些实施方案中，使用说明书包括对施用遗传工程化的免疫细胞的群体的描述和任选地对施用标签缀合的治疗剂的描述。

[0487] 如本文所述，与免疫细胞和任选的标签缀合的治疗剂的使用有关的使用说明书通常包括关于预期治疗的剂量、投配方案和施用途径的信息。容器可为单位剂量。散装包装(例如，多剂量包装)或亚单位剂量。在本公开的药盒中供应的使用说明书通常是在标签或包装插页上的书面使用说明书。标签或包装插页表明药物组合物用于治疗、延缓发作和/或减轻受试者的疾病或疾患。

[0488] 本文提供的药盒在适当的包装中。适当的包装包括但不限于小瓶、瓶子、广口瓶、软包装等。还考虑了用于与特定装置(诸如吸入器、鼻腔施用装置或输注装置)结合使用的包装。药盒可具有无菌进入口(例如，容器可以是具有通过皮下注射针可刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小瓶)。该容器还可具有无菌进入口。第二药物组合物中的至少一种活性剂是如本文所述的抗体。第一药物组合物中的至少一种活性剂是表达如本文所述的嵌合受体多肽和/或乳酸调节多肽的免疫细胞(例如，T淋巴细胞或NK细胞)的群体。

[0489] 药盒可任选地提供附加组分，例如缓冲剂和解释性信息。通常，药盒包括容器和在容器上或与容器相关联的标签或包装插页。在一些实施方案中，本公开提供了包含上述药盒内容物的制品。

[0490] 一般技术

[0491] 除非另有说明,否则本公开的实践将采用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术,这些技术都在本领域的技术范围内。此类技术在文献中进行了充分解释,所述文献为诸如Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第二版(Sambrook等人,1989)Cold Spring Harbor Press;Oligonucleotide Synthesis(M.J.Gait编著,1984);Methods in Molecular Biology,Humana Press;Cell Biology:A Laboratory Notebook(J.E.Cellis编著,1989)Academic Press;Animal Cell Culture(R.I.Freshney编著,1987);Introduction to Cell and Tissue Culture(J.P.Mather和P.E.Roberts,1998)Plenum Press;Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures(A.Doyle、J.B.Griffiths和D.G.Newell编著,1993-8)J.Wiley and Sons;Methods in Enzymology(Academic Press,Inc.);Handbook of Experimental Immunology(D.M.Weir和C.C.Blackwell编著):Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(J.M.Miller和M.P.Calos编著,1987);Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel等人编著1987);PCR:The Polymerase Chain Reaction,(Mullis等人编著1994);Current Protocols in Immunology(J.E.Coligan等人编著,1991);Short Protocols in Molecular Biology(Wiley and Sons,1999);Immunobiology(C.A.Janeway和P.Travers,1997);Antibodies(P.Finch,1997);Antibodies:a practice approach(D.Catty.编著,IRL Press,1988-1989);Monoclonal antibodies:a practical approach(P.Shepherd和C.Dean编著,Oxford University Press,2000);Using antibodies:a laboratory manual(E.Harlow和D.Lane(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999);The Antibodies(M.Zanetti和J.D.Capra编著,Harwood Academic Publishers,1995);DNA Cloning:A practical Approach,第I卷和第II卷(D.N.Glover编著,1985);Nucleic Acid Hybridization(B.D.Hames&S.J.Higgins编著(1985》;Transcription and Translation(B.D.Hames&S.J.Higgins编著,(1984》;Animal Cell Culture(R.I.Freshney编著(1986》;Immobilized Cells and Enzymes(lRL Press,(1986》;以及B.Perbal,A practical Guide To Molecular Cloning(1984);F.M.Ausubel等人(编辑)。

[0492] 在没有进一步详细描述的情况下,据信本领域技术人员可基于上述描述在本公开的最大程度上利用本公开。因此,以下具体实施方案应解释为仅为说明性的,而决非不以任何方式限制本公开的剩余部分。本文引用的所有出版物出于本文引用的目的或主题而以引用方式并入。

[0493] 实施例

[0494] 实施例1:降低的葡萄糖浓度对T细胞功能的影响

[0495] 通过重组技术产生编码SEQ ID NO:97的示例性的靶向GPC3的CAR表达构建体的γ逆转录病毒,并将其用于感染原代人T细胞,以产生在它们的细胞表面上表达靶向GPC3的CAR多肽的细胞。然后使用六天的基于流量的增殖测定来测试靶向GPC3的CAR表达细胞的功能性。具体而言,将200,000个未转导的模拟T细胞或表达靶向GPC3的CAR构建体的T细胞与50,000个GPC3+肝细胞癌JHH7肿瘤细胞或Hep3B肿瘤细胞以4:1(效应细胞/表达CAR的T细胞与靶细胞)的比率一起孵育。在不同浓度葡萄糖的存在下,将共培养物在37℃下在5%CO_2培养箱中孵育六天。在六天结束时,收获共培养物并用抗CD3抗体染色。通过流式细胞术评估

CD3阳性细胞的数量，作为T细胞增殖的量度。在较低的葡萄糖浓度下，观察到较少的CAR-T增殖(图2)。这些实验证明低葡萄糖环境可对CAR-T细胞增殖活性具有负面影响。

[0496] 实施例2：使用靶向GPC3的CAR-T表达构建体时表达乳酸调节因子对T细胞功能的影响

[0497] 通过重组技术产生编码示例性的靶向GPC3的CAR多肽表达构建体(SEQ ID NO:97)的γ逆转录病毒，并将其用于感染原代人T细胞，以产生在它们的细胞表面上表达靶向GPC3的CAR多肽的细胞。另外，通过重组技术产生编码示例性靶向GPC3的CAR多肽(SEQ ID NO:97或98)和乳酸转运多肽(MCT1、MCT2或MCT4)(SEQ ID NO:82至SEQ ID NO:84)的γ逆转录病毒载体，并将其用于感染原代人T细胞，以产生表达靶向GPC3的多肽和乳酸调节因子(例如，多肽)的细胞。在编码CAR多肽和乳酸调节因子两者的构建体中，这两个多肽被P2A核糖体跳跃序列分开。所表达的变体是CAR与如本文所公开的乳酸调节因子的组合，例如CAR+MCT1(SEQ ID NO:98和SEQ ID NO:82)、CAR+MCT2(SEQ ID NO:97和SEQ ID NO:83)，以及CAR+MCT4(SEQ ID NO:98和SEQ ID NO:84)。然后使用六天的基于流量的增殖测定来测试靶向GPC3的CAR表达细胞的功能性。具体而言，将200,000个未转导的模拟T细胞、表达靶向GPC3的CAR多肽的T细胞或表达靶向GPC3的CAR多肽和乳酸调节因子的T细胞与50,000个GPC3+肝细胞癌JHH7肿瘤细胞以4:1(效应细胞/表达CAR的T细胞与靶细胞)的比率一起孵育。在1.25mM葡萄糖(与肿瘤相关)和10mM葡萄糖(大约外周血水平)的存在下，将共培养物在37℃下在5％CO_2中孵育六天。在六天结束时，收获共培养物并用抗CD3抗体染色。通过流式细胞术评估CD3阳性细胞的数量，作为T细胞增殖的量度。相对于表达单独的CAR构建体的T细胞，除表达CAR多肽外还表达乳酸调节因子的T细胞显示出增强的T细胞增殖(图3至图5)。在与肿瘤相关的低葡萄糖浓度下也发生了这种增强的增殖。这些实验证明在T细胞中表达乳酸调节因子对CAR-T细胞增殖活性具有积极影响。

[0498] 实施例3：表达LDHA与ACTR多肽的组合对T细胞功能的影响

[0499] 用编码ACTR多肽(SEQ ID NO:57)和LDHA(SEQ ID NO:81)的病毒转导T细胞，该ACTR多肽和LDHA被P2A核糖体跳跃序列分开。在37℃下在5％CO_2培养箱中，将T细胞以4:1的E:T比率与表达FOLRα的IGROV-1细胞和0-20μg/mL滴定的抗FOLRα抗体一起在补充有10％胎牛血清的RPMI 1640培养基中培养。在大约48小时后，取出上清液样品进行细胞因子分析。根据制造商的方案，使用均相时间分辨荧光(HTRF)测定(Cisbio)分析上清液的IL-2。并使用EnVision多标签酶标仪(Perkin Elmer)进行分析以检测荧光。基于单独ACTR的T细胞对比共表达ACTR和LDHA的细胞的转导效率，将IL-2产量归一化。在8天后，收获培养物，用活/死标记物和抗CD3抗体染色，并通过流式细胞术进行分析。使用活CD3阳性细胞的数量来测量T细胞增殖。

[0500] 将归一化的IL-2产量(图6A)和T细胞增殖(图6B)绘制为抗FOLRα抗体浓度的函数。这些结果表明，相对于表达单独的ACTR的T细胞，共表达ACTR和LDHA的T细胞增强了T细胞功能，如通过在靶细胞和同源靶向抗体的存在下的IL-2释放或T细胞增殖所测量的。

[0501] 实施例4：共表达ACTR和LDHA的T细胞在受限的葡萄糖条件下显示出增强的增殖

[0502] 用编码ACTR多肽(SEQ ID NO:57)和LDHA(SEQ ID NO:81)的病毒转导T细胞，该ACTR多肽和LDHA被P2A核糖体跳跃序列分开。在37℃下在5％CO_2培养箱中，将T细胞以4:1的E:T比率与表达FOLRα的IGROV-1细胞和5μg/mL抗FOLRα抗体一起在补充有10％胎牛血清和

0-20mM葡萄糖的无葡萄糖RPMI 1640培养基中培养。在8天后,收获培养物,用活/死标记物和抗CD3抗体染色,并通过流式细胞术进行分析。使用活CD3阳性细胞的数量来测量T细胞增殖。

[0503] 将T细胞增殖绘制为葡萄糖浓度的函数(图7)。这些结果表明,在受限葡萄糖条件下,相对于表达单独的ACTR的T细胞,共表达ACTR和LDHA的T细胞增强了T细胞功能,如通过在靶细胞和同源靶向抗体的存在下的T细胞增殖所测量的。

[0504] 实施例5:在实体瘤相关抑制因子PGE_2的存在下共表达ACTR和LDHA的T细胞显示出增强的功能

[0505] 用编码ACTR多肽(SEQ ID NO:57)和LDHA(SEQ ID NO:81)的病毒转导T细胞,该ACTR多肽和LDHA被P2A核糖体跳跃序列分开。在37℃下在5%CO_2培养箱中,将T细胞以4:1的E:T比率与表达FOLRα的IGROV-1细胞、5μg/mL抗FOLRα抗体和0-16μM PGE_2一起在补充有10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中培养。

[0506] 在大约48小时后,取出上清液样品进行细胞因子分析。根据制造商的方案,使用均相时间分辨荧光(HTRF)测定(Cisbio)分析上清液的IL-2,并使用EnVision多标签酶标仪(Perkin Elmer)进行分析以检测荧光。基于单独ACTR的T细胞对比共表达ACTR和LDHA的细胞的转导效率,将IL-2产量归一化。在8天后,收获培养物,用活/死标记物和抗CD3抗体染色,并通过流式细胞术进行分析。使用活CD3阳性细胞的数量来测量T细胞增殖。

[0507] 将归一化的IL-2产量(图8A)或T细胞增殖(图8B)绘制为PGE_2浓度的函数。这些结果表明,当暴露于PGE_2(一种在实体瘤微环境中良好确立的抑制因子)时,相对于表达单独的ACTR的T细胞,共表达ACTR和LDHA的T细胞增强了T细胞功能,如通过在靶细胞和同源靶向抗体的存在下的IL-2释放或T细胞增殖所测量的。

[0508] 实施例6:在实体瘤相关抑制因子犬尿氨酸的存在下共表达ACTR和LDHA的T细胞显示出增强的IL-2产量

[0509] 用编码ACTR多肽(SEQ ID NO:57)和LDHA(SEQ ID NO:81)的病毒转导T细胞,该ACTR多肽和LDHA被P2A核糖体跳跃序列分开。在37℃下在5%CO_2培养箱中,将T细胞以4:1的E:T比率与表达FOLRα的IGROV-1细胞、5μg/mL的抗FOLRα抗体和0-1000μM的犬尿氨酸一起在补充有10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中培养。在大约48小时后,取出上清液样品进行细胞因子分析。根据制造商的方案,使用均相时间分辨荧光(HTRF)测定(Cisbio)分析上清液的IL-2,并使用EnVision多标签酶标仪(Perkin Elmer)进行分析以检测荧光。基于单独ACTR的T细胞对比共表达ACTR和LDHA的细胞的转导效率,将IL-2产量归一化。

[0510] 将归一化的IL-2产量(图9)绘制为犬尿氨酸浓度的函数。这些结果表明,当暴露于犬尿氨酸(一种在实体瘤微环境中良好确立的抑制因子)时,相对于表达单独的ACTR的T细胞,共表达ACTR和LDHA的T细胞增强了T细胞功能,如通过在靶细胞和同源靶向抗体的存在下的IL-2释放所测量的。

[0511] 实施例7:表达MCT1与ACTR多肽的组合对T细胞功能的影响

[0512] 用编码ACTR多肽(SEQ ID NO:57)和MCT1(SEQ ID NO:82)的病毒转导T细胞,该ACTR多肽和MCT1被P2A核糖体跳跃序列分开。在37℃下在5%CO_2培养箱中,将T细胞以4:1的E:T比率与表达FOLRα的固定OVCAR8细胞和0-30μg/mL滴定的抗FOLRα抗体一起在补充有10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中培养。在8天后,收获培养物,并使用ATPlite 1步发光

测定系统(Perkin Elmer)测定ATP含量,所述ATP含量是活细胞的度量。根据制造商的使用说明,使用EnVision多标签酶标仪(Perkin Elmer)分析用作T细胞增殖的度量的ATPlite发光信号,以检测发光。

[0513] 将T细胞增殖(图10)绘制为抗FOLRα抗体浓度的函数。这些结果表明,相对于表达单独的ACTR的T细胞,共表达ACTR和MCT1的T细胞增强了T细胞功能,如通过在靶细胞和同源靶向抗体的存在下的T细胞增殖所测量的。

[0514] 实施例8:在实体瘤相关抑制因子犬尿氨酸的存在下共表达ACTR和MCT1的T细胞显示出增强的功能

[0515] 用编码ACTR多肽(SEQ ID NO:57)和MCT1(SEQ ID NO:82)的病毒转导T细胞,该ACTR多肽和MCT1被P2A核糖体跳跃序列分开。在37℃下在5%CO_2培养箱中,将T细胞以4:1的E:T比率与表达FOLRα的固定IGROV-1细胞、1μg/mL抗FOLRα抗体和0-1000μM的犬尿氨酸一起在补充有10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中培养。

[0516] 在大约48小时后,取出上清液样品进行细胞因子分析。根据制造商的方案,使用均相时间分辨荧光(HTRF)测定(Cisbio)分析上清液的IL-2,并使用EnVision多标签酶标仪(Perkin Elmer)进行分析以检测荧光。基于单独ACTR的T细胞对比共表达ACTR和MCT1的T细胞的转导效率,将IL-2产量归一化。

[0517] 在7天后,将一半细胞转移到新的用于细胞增殖ELISA的平板(Millipore Sigma)中并用BrdU脉冲,在37℃下在5%CO_2培养箱中孵育约16小时,并按照制造商的使用说明使用EnVision酶标仪(Perkin Elmer)分析BrdU摄取以检测化学发光。

[0518] 在8天后,收获剩余的一半细胞,并使用ATPlite 1步发光测定系统(Perkin Elmer)测定ATP含量,所述ATP含量是活细胞的度量。根据制造商的使用说明,使用EnVision多标签酶标仪(Perkin Elmer)分析用作T细胞增殖的度量的ATPlite发光信号,以检测发光。

[0519] 将归一化的IL-2产量(图11A)或如通过BrdU摄取测量的T细胞增殖(图11B)或ATPlite(图11C)绘制成犬尿氨酸浓度的函数。这些结果表明,当暴露于犬尿氨酸(一种在实体瘤微环境中良好确立的抑制因子)时,相对于表达单独的ACTR的T细胞,共表达ACTR和MCT1的T细胞增强了T细胞功能,如通过在靶细胞和同源靶向抗体的存在下的IL-2释放或T细胞增殖所测量的。

[0520] 实施例9:在实体瘤相关抑制因子PGE_2、TGF-β或犬尿氨酸的存在下共表达ACTR和MCT2的T细胞显示出增强的增殖

[0521] 用编码ACTR多肽(SEQ ID NO:57)和MCT2(SEQ ID NO:83)的病毒转导T细胞,该ACTR多肽和MCT2被P2A核糖体跳跃序列分开。在37℃下在5%CO_2培养箱中,将T细胞以4:1的E:T比率与表达FOLRα的固定OVCAR8细胞和1μg/mL的抗FOLRα抗体一起在补充有10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中培养。将以下肿瘤相关抑制因子单独添加到相同的T细胞培养物中:0-16μM PGE_2、0-10ng/ml TGF-β或0-1000至30μM的犬尿氨酸。在7天后,收获细胞,并使用ATPlite 1步发光测定系统(Perkin Elmer)测定ATP含量,所述ATP含量是活细胞的度量。根据制造商的使用说明,使用EnVision多标签酶标仪(Perkin Elmer)分析用作T细胞增殖的度量的ATPlite发光信号,以检测发光。

[0522] 将如通过ATP含量测量的T细胞增殖绘制成PGE_2(图12A)、TGF-β(图12B)和犬尿氨

酸(图12C)浓度的函数。这些结果表明,当暴露于在实体瘤微环境中良好确立的抑制因子PGE_2、TGF-β或犬尿氨酸时,相对于表达单独ACTR的T细胞,共表达ACTR和MCT2的T细胞增强了T细胞功能,如通过在靶细胞和同源靶向抗体的存在下的T细胞增殖所测量的。

[0523] 实施例10:在实体瘤相关抑制因子犬尿氨酸的存在下共表达ACTR和MCT2的T细胞显示出增强的功能

[0524] 用编码ACTR多肽(SEQ ID NO:57)和MCT2(SEQ ID NO:83)的病毒转导T细胞,该ACTR多肽和MCT2被P2A核糖体跳跃序列分开。在37℃下在5%CO_2培养箱中,将T细胞以4:1的E:T比率与表达FOLRα的固定IGROV-1细胞、1μg/mL抗FOLRα抗体和0-1000μM的犬尿氨酸或无犬尿氨酸一起在补充有10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中培养。

[0525] 在大约48小时后,取出上清液样品进行细胞因子分析。根据制造商的方案,使用均相时间分辨荧光(HTRF)测定(Cisbio)分析上清液的IL-2,并使用EnVision多标签酶标仪(Perkin Elmer)进行分析以检测荧光。基于单独ACTR的T细胞对比共表达ACTR和MCT2的细胞的转导效率,将IL-2产量归一化。

[0526] 在6天后,将一半细胞转移到新的用于细胞增殖ELISA的平板(Millipore Sigma)中并用BrdU脉冲,在37℃下在5%CO_2培养箱中孵育约16小时,并按照制造商的使用说明使用EnVision酶标仪(Perkin Elmer)分析BrdU摄取以检测化学发光。

[0527] 在7天后,收获剩余的一半细胞,并使用ATPlite 1步发光测定系统(Perkin Elmer)测定ATP含量,所述ATP含量是活细胞的度量。根据制造商的使用说明,使用EnVision多标签酶标仪(Perkin Elmer)分析用作T细胞增殖的度量的ATPlite发光信号,以检测发光。

[0528] 将归一化的IL-2产量(图13A)和如通过BrdU摄取测量的T细胞增殖(图13B)和ATPlite(图13C)绘制成犬尿氨酸浓度的函数。这些结果表明,当暴露于犬尿氨酸(一种在实体肿瘤微环境中良好确立的抑制因子)时,相对于表达单独的ACTR的T细胞,共表达ACTR和MCT2的T细胞增强了T细胞功能,如通过在靶细胞和同源靶向抗体的存在下的IL-2释放或T细胞增殖所测量的。

[0529] 实施例11:在实体瘤相关抑制因子腺苷的存在下共表达ACTR和MCT2的T细胞显示出增强的IL-2产量

[0530] 用编码ACTR多肽(SEQ ID NO:57)和MCT2(SEQ ID NO:83)的病毒转导T细胞,该ACTR多肽和MCT2被P2A核糖体跳跃序列分开。在37℃下在5%CO_2培养箱中,将T细胞以4:1的E:T比率与表达FOLRα的活的或固定的IGROV-1细胞、1μg/mL的抗FOLRα抗体和0-2000μM的腺苷一起在补充有10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中培养。在大约48小时后,取出上清液样品进行细胞因子分析。根据制造商的方案,使用均相时间分辨荧光(HTRF)测定(Cisbio)分析上清液的IL-2,并使用EnVision多标签酶标仪(Perkin Elmer)进行分析以检测荧光。基于单独ACTR的T细胞对比共表达ACTR和MCT2的细胞的转导效率,将IL-2产量归一化。

[0531] 将用活的(图14A)和固定的(图14B)IGROV-1靶标时的归一化的IL-2产量绘制为腺苷浓度的函数。这些结果表明,当暴露于腺苷(一种在实体瘤微环境中良好确立的抑制因子)时,相对于表达单独的ACTR的T细胞,共表达ACTR和MCT2的T细胞增强了T细胞功能,如通过在靶细胞和同源靶向抗体的存在下的IL-2释放所测量的。

[0532] 实施例12:表达MCT4与ACTR多肽的组合对T细胞功能的影响

[0533] 用编码ACTR多肽(SEQ ID NO:57)和MCT4(SEQ ID NO:84)的病毒转导T细胞,该ACTR多肽和MCT4被P2A核糖体跳跃序列分开。在37℃下在5%CO_2培养箱中,将T细胞以4:1的E:T比率与表达FOLRα的固定OVCAR8细胞和0-30μg/mL抗FOLRα抗体一起在补充有10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中培养。在8天后收获培养物,并使用ATPlite 1步发光测定系统(Perkin Elmer)测定ATP含量,所述ATP含量是活细胞的度量。根据制造商的使用说明,使用EnVision多标签酶标仪(Perkin Elmer)分析用作T细胞增殖的度量的ATPlite发光信号,以检测发光。

[0534] 将T细胞增殖(图15)绘制为抗FOLRα抗体浓度的函数。这些结果表明,相对于表达单独的ACTR的T细胞,共表达ACTR和MCT4的T细胞增强了T细胞功能,如通过在靶细胞和同源靶向抗体的存在下的T细胞增殖所测量的。

[0535] 实施例13:在实体瘤相关抑制因子PGE_2的存在下共表达ACTR和MCT4的T细胞显示出增强的IL-2产量

[0536] 用编码ACTR多肽(SEQ ID NO:57)和MCT4(SEQ ID NO:84)的病毒转导T细胞,该ACTR多肽和MCT4被P2A核糖体跳跃序列分开。在37℃下在5%CO_2培养箱中,将T细胞以2:1的E:T比率与表达FOLRα的IGROV-1细胞、5μg/mL的抗FOLRα抗体和0-16μM的PGE_2一起在补充有10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中培养。在大约48小时后,取出上清液样品进行细胞因子分析。根据制造商的方案,使用均相时间分辨荧光(HTRF)测定(Cisbio)分析上清液的IL-2,并使用EnVision多标签酶标仪(Perkin Elmer)进行分析以检测荧光。基于单独ACTR的T细胞对比共表达ACTR和MCT4的细胞的转导效率,将IL-2产量归一化。

[0537] 将归一化的IL-2产量(图16)绘制为PGE_2浓度的函数。这些结果表明,当暴露于PGE_2(一种在实体瘤微环境中良好确立的抑制因子)时,相对于表达单独的ACTR的T细胞,共表达ACTR和MCT4的T细胞增强了T细胞功能,如通过在靶细胞和同源靶向抗体的存在下的IL-2释放所测量的。

[0538] 实施例14:在实体瘤相关抑制因子TGF-β的存在下共表达ACTR和MCT4的T细胞显示出增强的增殖

[0539] 用编码ACTR多肽(SEQ ID NO:57)和MCT4(SEQ ID NO:84)的病毒转导T细胞,该ACTR多肽和MCT4被P2A核糖体跳跃序列分开。在37℃下在5%CO_2培养箱中,将T细胞以4:1的E:T比率与表达FOLRα的固定OVCAR8细胞、1μg/mL抗FOLRα抗体和0-10ng/ml TGF-β一起在补充有10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中培养。在8天后收获细胞,并使用ATPlite 1步发光测定系统(Perkin Elmer)测定ATP含量,所述ATP含量是活细胞的度量。根据制造商的使用说明,使用EnVision多标签酶标仪(Perkin Elmer)分析用作T细胞增殖的度量的ATPlite发光信号,以检测发光。

[0540] 将如通过ATP含量测量的T细胞增殖绘制为TGF-β浓度的函数(图17)。这些结果表明,当暴露于TGF-β(一种在实体瘤微环境中良好确立的抑制因子)时,相对于表达单独的ACTR的T细胞,共表达ACTR和MCT4的T细胞增强了T细胞功能。

[0541] 实施例15:在实体瘤相关抑制因子犬尿氨酸的存在下共表达ACTR和MCT4的T细胞显示出增强的功能

[0542] 用编码ACTR多肽(SEQ ID NO:57)和MCT4(SEQ ID NO:84)的病毒转导T细胞,该ACTR多肽和MCT4被P2A核糖体跳跃序列分开。在37℃下在5%CO_2培养箱中,将T细胞以4:1的

E:T比率与表达FOLRα的固定IGROV-1细胞、1μg/mL抗FOLRα抗体和0-1000μM的犬尿氨酸一起在补充有10％胎牛血清的RPMI 1640培养基中培养。

[0543] 在大约48小时后，取出上清液样品进行细胞因子分析。根据制造商的方案，使用均相时间分辨荧光(HTRF)测定(Cisbio)分析上清液的IL-2，并使用EnVision多标签酶标仪(Perkin Elmer)进行分析以检测荧光。基于单独ACTR的T细胞对比共表达ACTR和MCT4的细胞的转导效率，将IL-2产量归一化。

[0544] 在7天后，将一半细胞转移到新的用于细胞增殖ELISA的平板(Millipore Sigma)中并用BrdU脉冲，在37℃下在5％CO_2培养箱中孵育约16小时，并按照制造商的使用说明使用EnVision酶标仪(Perkin Elmer)分析BrdU摄取以检测化学发光。

[0545] 将归一化的IL-2产量(图18A)和如通过BrdU摄取测量的T细胞增殖(图18B)绘制成犬尿氨酸浓度的函数。这些结果表明，当暴露于犬尿氨酸(一种在实体肿瘤微环境中良好确立的抑制因子)时，相对于表达单独的ACTR的T细胞，共表达ACTR和MCT4的T细胞增强了T细胞功能，如通过在靶细胞和同源靶向抗体的存在下的IL-2释放或T细胞增殖所测量的。

[0546] 实施例16:表达乳酸调节多肽对肿瘤模型上的T细胞功能的影响。

[0547] 将乳酸调节多肽转基因在相同T细胞中与嵌合受体多肽(例如，ACTR多肽(例如，SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:80)或CAR多肽(例如，SEQ ID NO:97至SEQ ID NO:98))共表达。该转基因是例如LDHA、MCT1、MCT2、MCT4或PDK1(例如，SEQ ID NO:81至SEQ ID NO:85)。用编码该嵌合受体多肽和该乳酸调节多肽的病毒转导T细胞，该嵌合受体多肽和该乳酸调节多肽例如被P2A核糖体跳跃序列分开。在小鼠肿瘤模型中评估转导的T细胞的抗肿瘤活性。对于这些实验，将肿瘤细胞系(例如IGROV-1)接种到NSG™(NOD scidγ，NOD.Cg-Prkdc^{scid} IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ，品系005557)小鼠中。随后向荷瘤小鼠投配表达单独的嵌合受体多肽或嵌合受体多肽和乳酸调节多肽的T细胞。当嵌合受体多肽是ACTR构建体时，施用靶向肿瘤的抗体。

[0548] 在整个实验过程中监测肿瘤生长。预期除了表达嵌合受体多肽(当嵌合受体多肽是ACTR构建体时，任选地还有抗肿瘤抗体)之外还表达乳酸调节多肽的T细胞表现出相对于表达单独的嵌合受体多肽的T细胞增强的抗肿瘤活性，例如相对于表达单独的嵌合受体多肽的T细胞增强的增殖、增强的T细胞持久性和/或增强的细胞因子产生。此外，表达乳酸调节多肽与嵌合受体多肽的组合的T细胞还预期表现出与表达单独的嵌合受体多肽的T细胞相比增强的抗癌活性，例如肿瘤生长和/或肿瘤形成的减少。

[0549] 总之，本研究中公开的实验旨在证明外源性乳酸调节多肽在T细胞(包括共表达嵌合受体多肽(例如，CAR或ACTR)的那些T细胞，如本文所公开的那些T细胞)中的表达将对T细胞功能以及因此体内抗肿瘤效应具有积极影响。

[0550] 其他实施方案

[0551] 本说明书中公开的所有特征可以以任何组合进行组合。本说明书中公开的每个特征可以由用于相同、等同或相似目的的替代特征代替。因此，除非另有明确说明，否则所公开的每个特征仅是一系列等同或相似特征的实例。

[0552] 根据上述描述，本领域的技术人员可容易地确定本公开的基本特征，并且在不背离本公开的精神和范围的前提下，可对本公开做各种变化和修改以使其适应于各种用途和条件。因此，其他实施方案在权利要求内。

[0553] 等效方案

[0554] 尽管已经在本文中描述和示出了几个发明实施方案，但是本领域的普通技术人员将容易想到用于执行功能和/或获得结果和/或本文所述的优点中的一个或多个优点的多种其他手段和/或结构，并且此类变型和/或修改中的每一者都被认为在本文所述的发明实施方案的范围内。更一般地，本领域的技术人员将容易地理解，本文所述的所有参数、尺寸、材料和构造均是示例性的，并且实际参数、尺寸、材料和/或构造将取决于使用本发明的教导所针对的一个或多个具体应用。本领域的技术人员将认识到或能够使用不超过常规实验来探知本文所述的具体发明实施方案的许多等同物。因此，应当理解的是，前述实施方案仅以举例的方式给出，并且在所附权利要求及其等同物的范围内，可以以不同于具体描述和要求保护的方式来实践本发明的实施方案。本公开的发明实施方案涉及本文所述的每个单独特征、系统、制品、材料、试剂盒和/或方法。另外，如果此类特征、系统、制品、材料、试剂盒和/或方法不是相互矛盾的，则两个或更多个此类特征、系统、制品、材料、试剂盒和/或方法的任何组合包括在本公开的发明范围内。

[0555] 如本文所定义和使用的所有定义，应理解为相对于字典定义、通过引用并入的文档中的定义，和/或所定义的术语的普通含义处于支配地位。

[0556] 本文所公开的所有参考文献、专利和专利申请关于各自被引用所针对的主题以引用方式并入本文，在一些情况下该主题可涵盖文档的整体。

[0557] 除非明确相反地指出，否则本文中在说明书和权利要求书中使用的不定冠词“一个”和“一种”应理解为表示“至少一个(种)”。

[0558] 说明书和权利要求书中使用的短语“和/或”应理解为是指如此结合的要素中的“一个或两个”，即，在一些情况下结合存在而在其他情况下分离存在的要素。用“和/或”列出的多个要素应以相同的方式来解释，即，如此结合的要素中的“一个或多个”要素。除了由“和/或”条款具体标识的要素之外，可以可选地存在其他要素，无论这些要素与那些具体标识的要素相关还是无关。因此，作为非限制性实例，当与诸如“包括”的开放式语言结合使用时，在一个实施方案中，对“A和/或B”的引用可以指仅A(可选地包括除B之外的要素)；在另一个实施方案中，指仅B(可选地包括除A之外的要素)；在又一个实施方案中，指A和B两者(可选地包括其他要素)；等等。

[0559] 如在说明书和权利要求书中所使用的，“或”应该理解为具有与上面定义的“和/或”相同的含义。例如，当分离列表中的项目时，“或”或“和/或”应被解释为包含性的，即包括至少一个但也包括多于一个的数量或列表的要素，以及可选地，附加的未列出的项目。只有明确表示相反的术语，例如“仅一个”或“恰好一个”，或者当在权利要求书中结合“由……组成”使用时将指的是包括多个或一系列要素中的恰好一个要素。一般而言，本文中使用的术语“或”仅应在排他性术语(例如“基本上由……组成”中的“任一者”、“一个”“仅一个”或“恰好一个”)之前时解释为表示排他性替代(即，“一个或另一个，但不能同时包含两个”)。当在权利要求书中使用时，“基本上由...组成”应具有其在专利法领域中所使用的普通含义。

[0560] 如本文在说明书和权利要求书中所使用的，在提及一个或多个要素的列表时，短语“至少一个”应理解为是指从该要素列表中的任何一个或多个要素中选择的至少一个要素，但不一定包括要素列表中具体列出的每个要素中的至少一个，并且不排除要素列表中

要素的任何组合。该定义还允许可选地存在除了在短语“至少一个”所指的要素列表中具体标识的要素之外的要素，无论其与那些具体标识的要素相关还是无关。因此，作为非限制性实例，“A和B中的至少一个”或等效地“A或B中的至少一个”或等效地“A和/或B中的至少一个”在一个实施方案中可以指至少一个，任选地包括多于一个A而不存在B(并且任选地包括除B以外的要素)；在另一个实施方案中，是指至少一个，任选地包括多于一个B而不存在A(并且任选地包括除A以外的要素)；在又一个实施方案中，至少一个，可选地包括多于一个A和至少一个，可选地包括多于一个B(以及可选地包括其他要素)；等等。

[0561] 还应当理解，除非明确指出相反的情况，否则在本文要求保护的包括多于一个步骤或动作的任何方法中，该方法的步骤或动作的顺序不一定限于叙述该方法的步骤或动作的顺序。

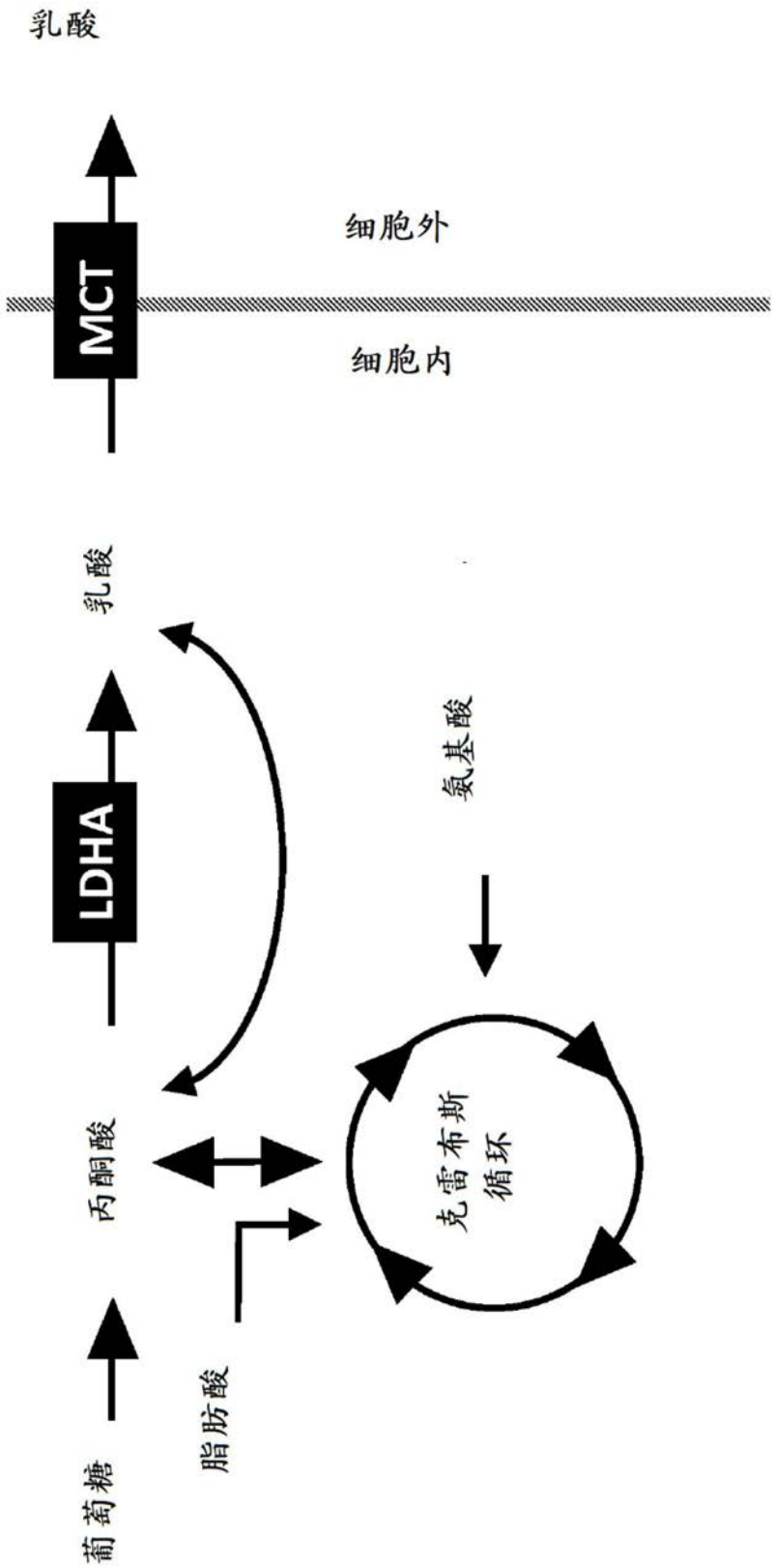


图1

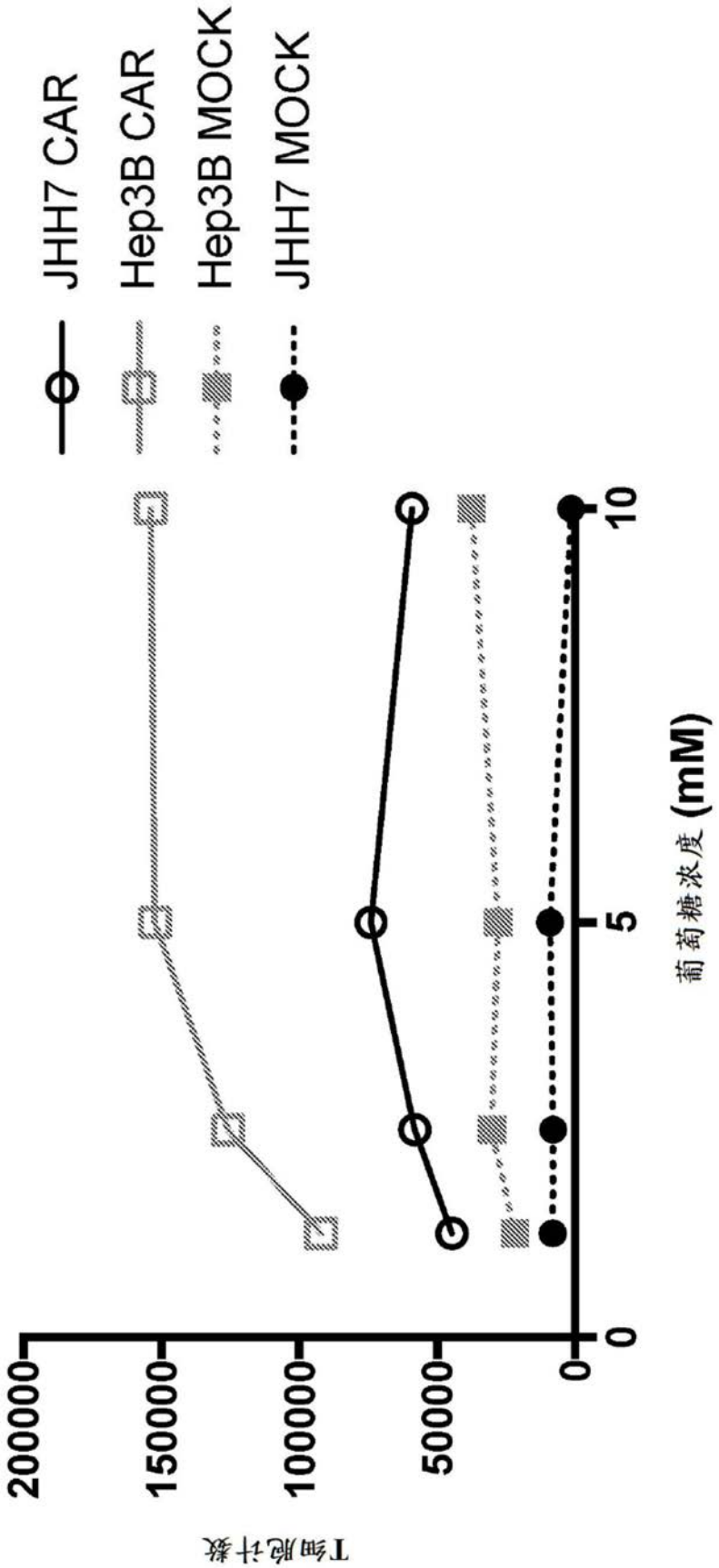

JHH7 CAR
Hep3B CAR
Hep3B MOCK
JHH7 MOCK
200000
150000
100000
50000
0
0
5
10
葡萄糖浓度 (mM)
T细胞计数

图2

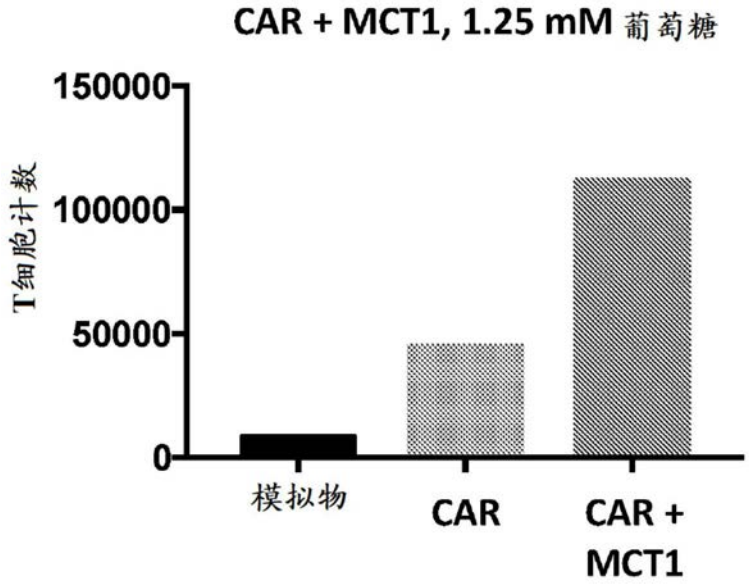

CAR + MCT1, 1.25 mM 葡萄糖
T细胞计数
150000
100000
50000
0
模拟物
CAR
CAR + MCT1

图3A

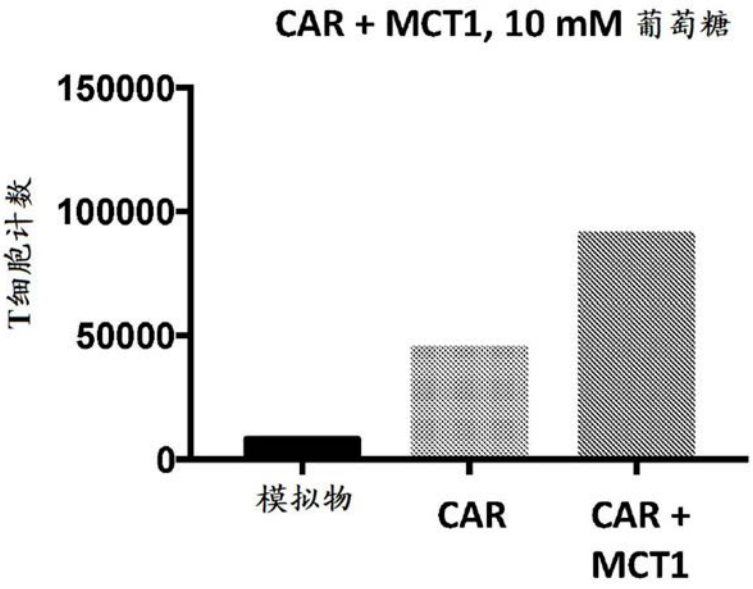

CAR + MCT1, 10 mM 葡萄糖
T细胞计数
150000
100000
50000
0
模拟物
CAR
CAR + MCT1

图3B

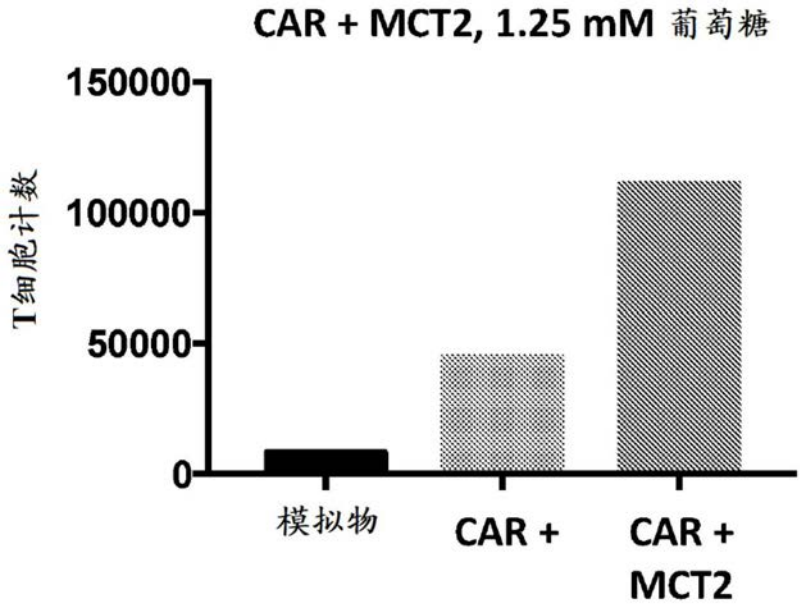

CAR + MCT2, 1.25 mM 葡萄糖
T细胞计数
150000
100000
50000
0
模拟物
CAR +
CAR +
MCT2

图4A

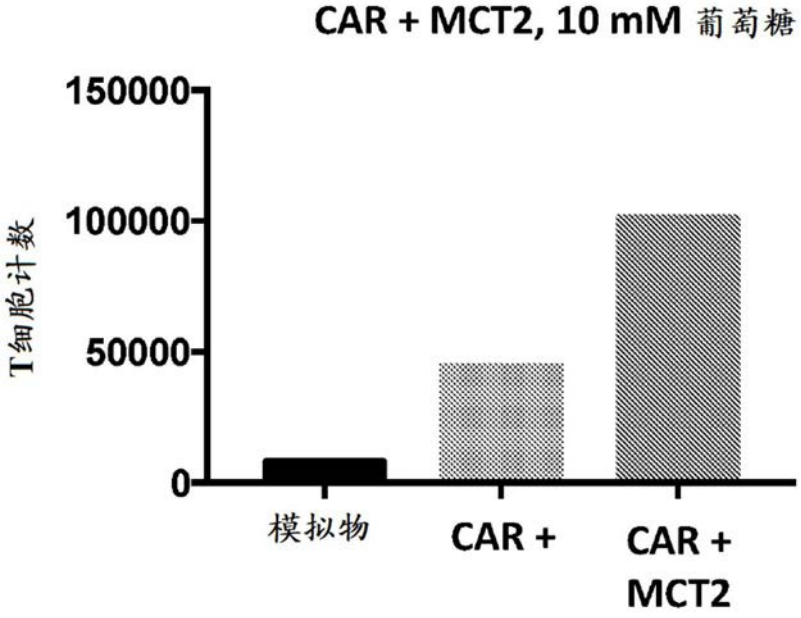

CAR + MCT2, 10 mM 葡萄糖
T细胞计数
150000
100000
50000
0
模拟物
CAR +
CAR +
MCT2

图4B

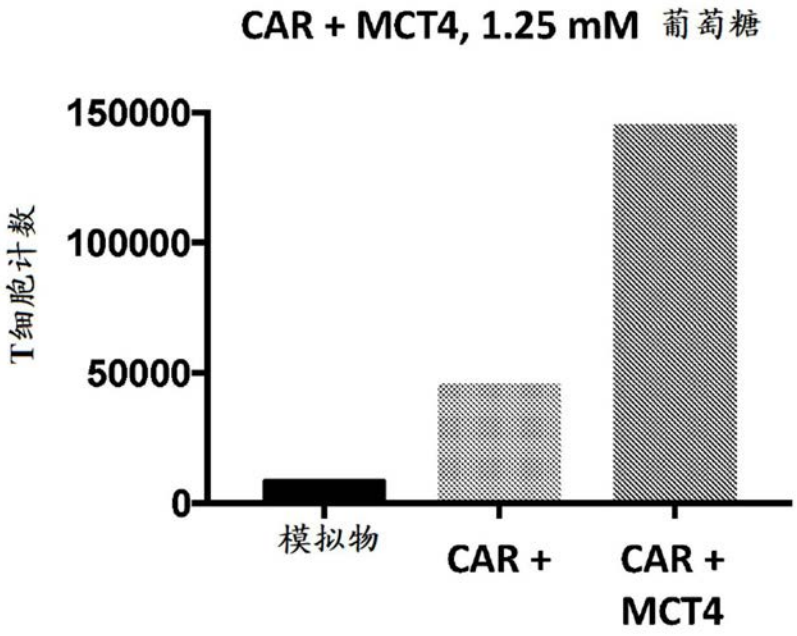

CAR + MCT4, 1.25 mM 葡萄糖
T细胞计数
150000
100000
50000
0
模拟物
CAR +
CAR + MCT4

图5A

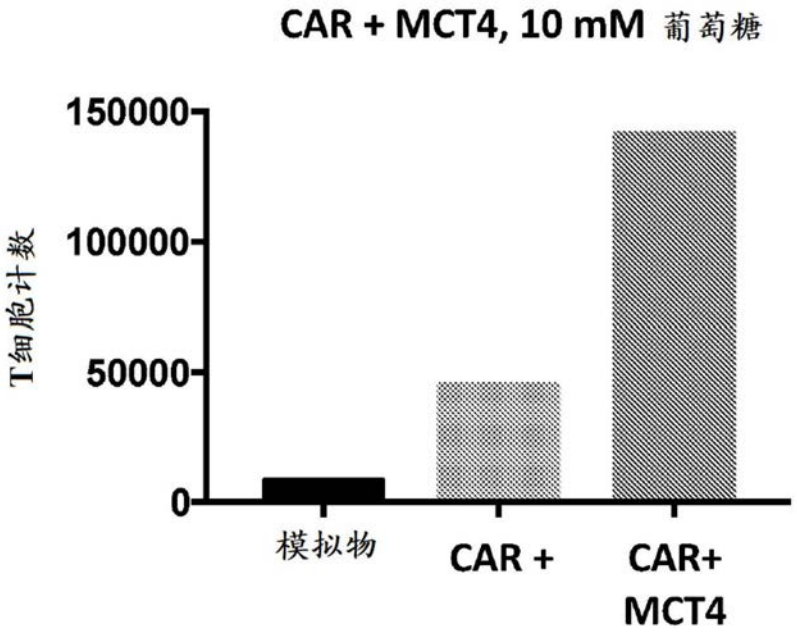

CAR + MCT4, 10 mM 葡萄糖
T细胞计数
150000
100000
50000
0
模拟物
CAR +
CAR+ MCT4

图5B

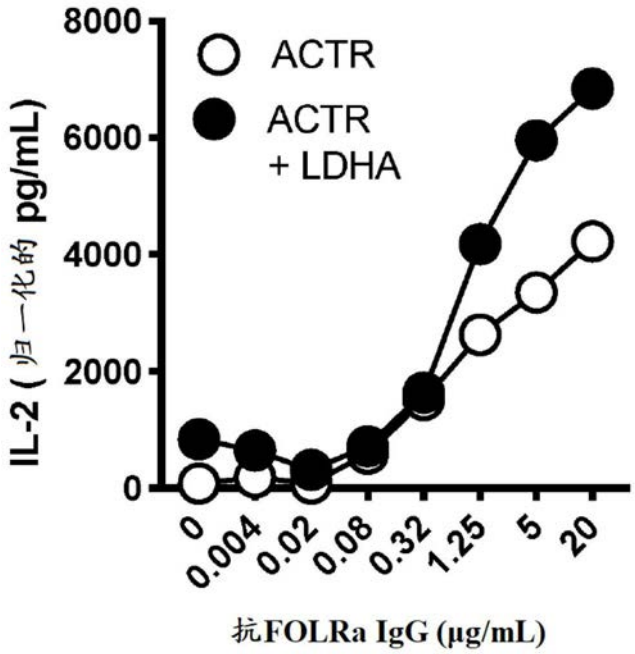

8000
6000
4000
2000
0
IL-2 (归一化的 pg/mL)
ACTR
ACTR
+ LDHA
0
0.004
0.02
0.08
0.32
1.25
5
20
抗FOLRa IgG (μg/mL)

图6A

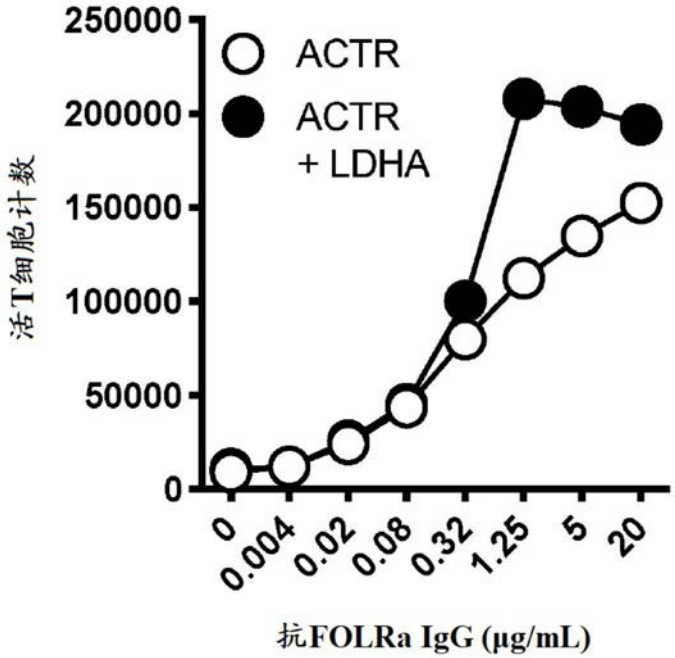

250000
200000
150000
100000
50000
0
活T细胞计数
ACTR
ACTR
+ LDHA
0
0.004
0.02
0.08
0.32
1.25
5
20
抗FOLRa IgG (μg/mL)

图6B

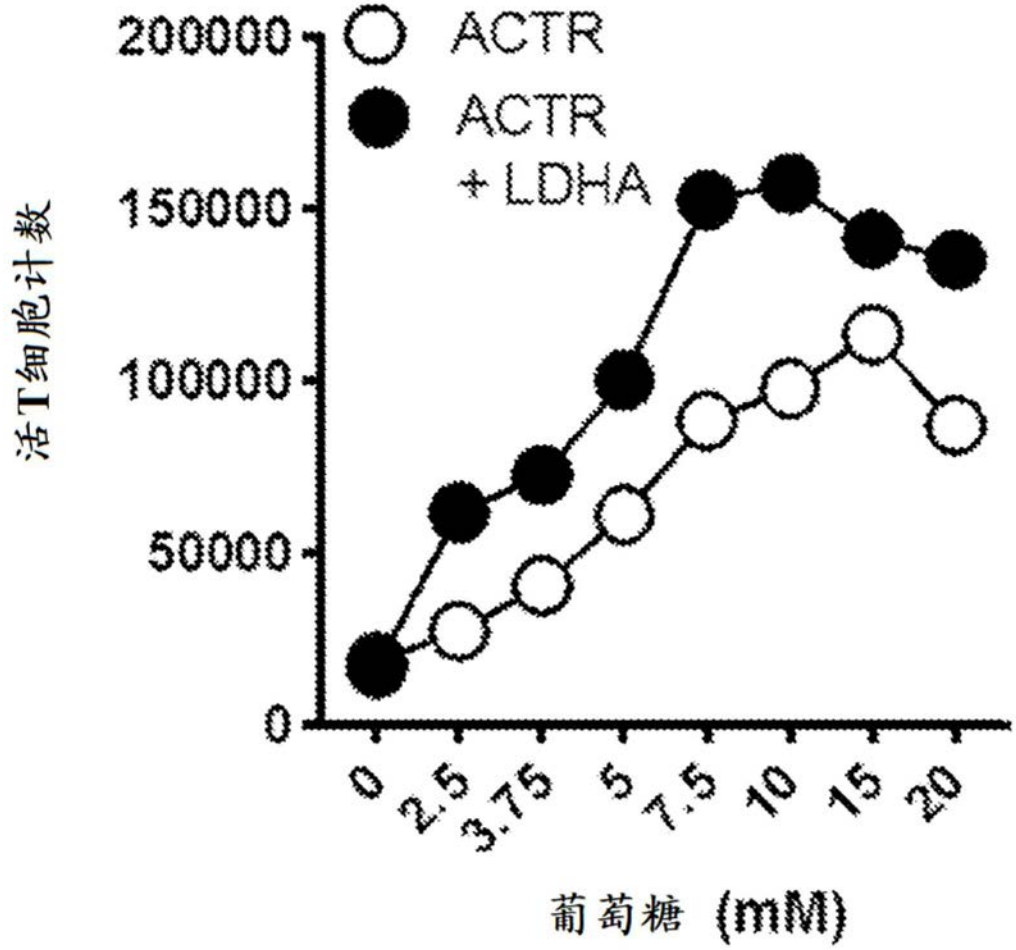

200000
150000
100000
50000
0
ACTR
ACTR
+ LDHA
活T细胞计数
0
2.5
3.75
5
7.5
10
15
20
葡萄糖 (mM)

图7

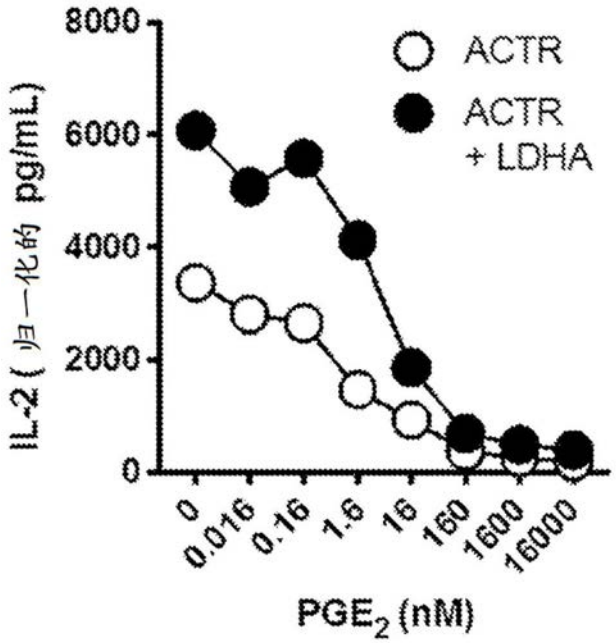

8000
6000
4000
2000
0
IL-2 (归一化的 pg/mL)
ACTR
ACTR
+ LDHA
0
0.016
0.16
1.6
16
160
1600
16000
PGE2 (nM)

图8A

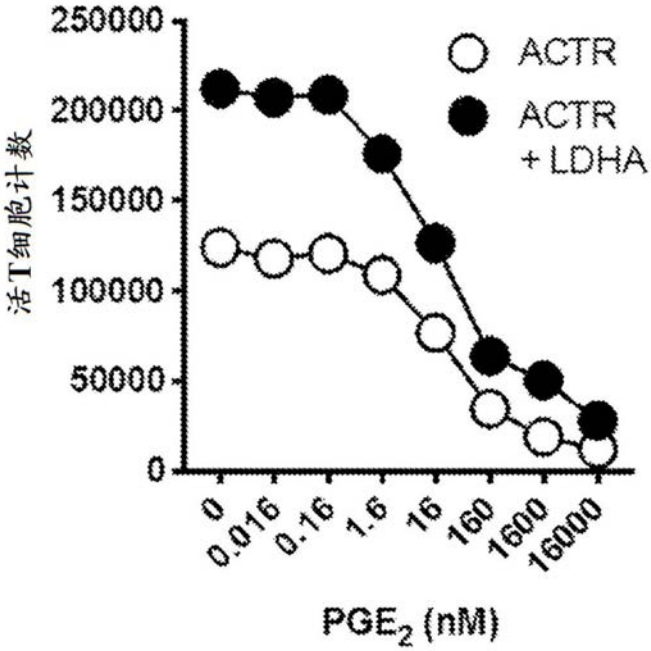

250000
200000
150000
100000
50000
0
活T细胞计数
ACTR
ACTR
+ LDHA
0
0.016
0.16
1.6
16
160
1600
16000
PGE2 (nM)

图8B

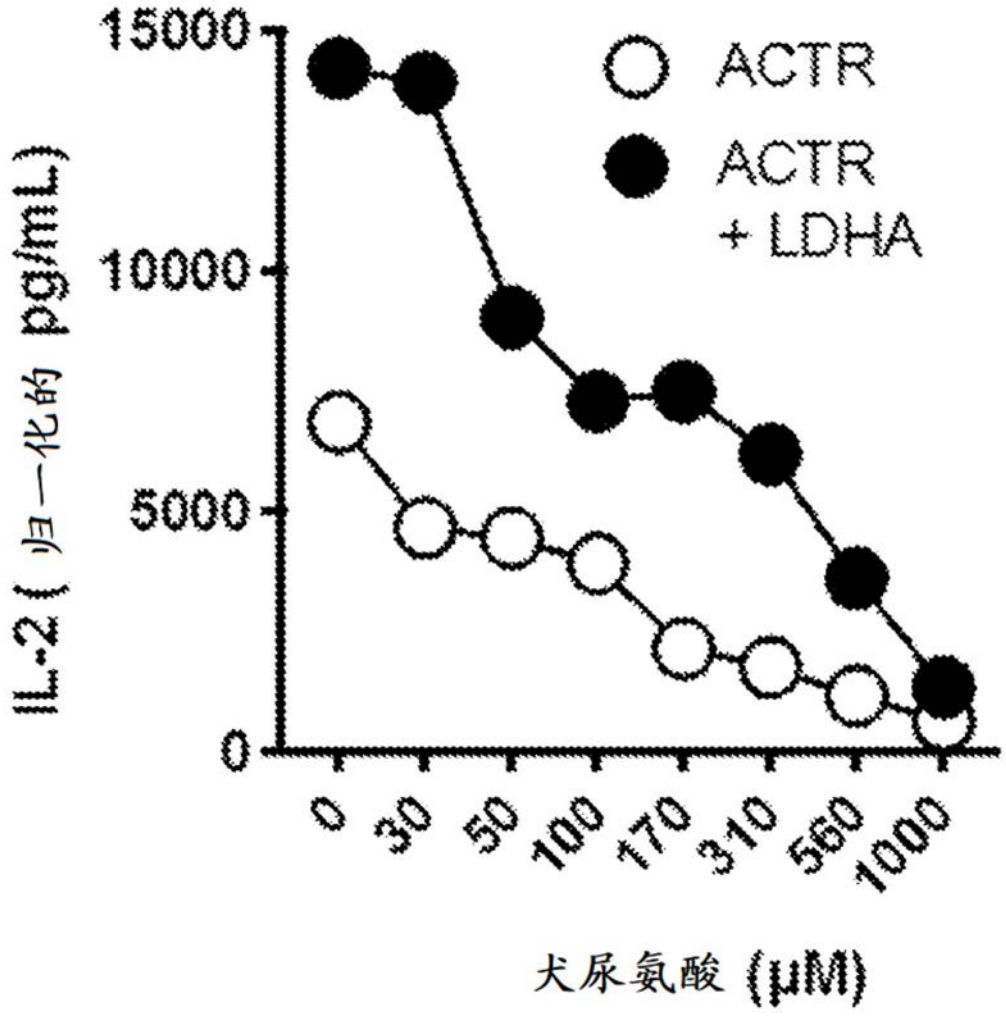

15000
10000
5000
0
IL-2（归一化的 pg/mL）
ACTR
ACTR
+ LDHA
0
30
50
100
170
310
560
1000
犬尿氨酸 (μM)

图9

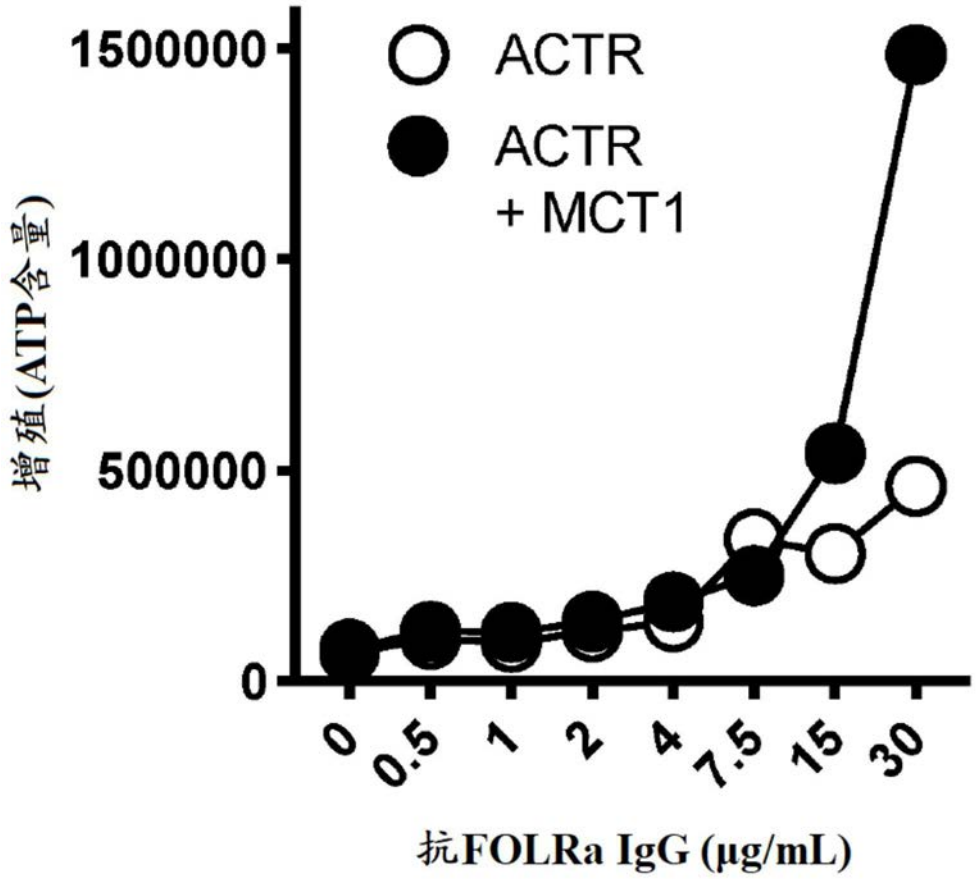

1500000
1000000
500000
0
增殖(ATP含量)
ACTR
ACTR
+ MCT1
0
0.5
1
2
4
7.5
15
30
抗FOLRa IgG (μg/mL)

图10

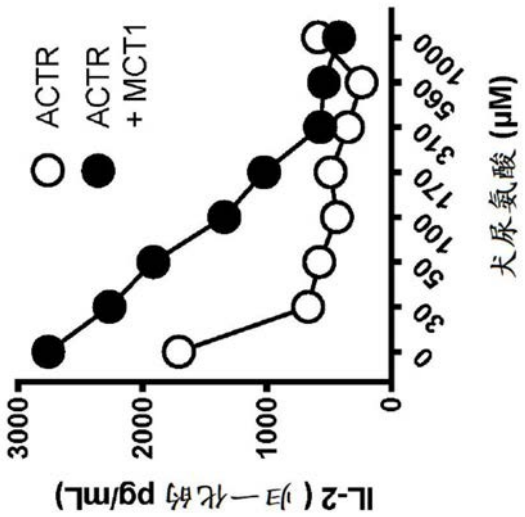

ACTR
ACTR
+ MCT1
3000
2000
1000
0
IL-2 (归一化的 pg/mL)
0
30
50
100
170
310
560
1000
犬尿氨酸 (μM)

图11A

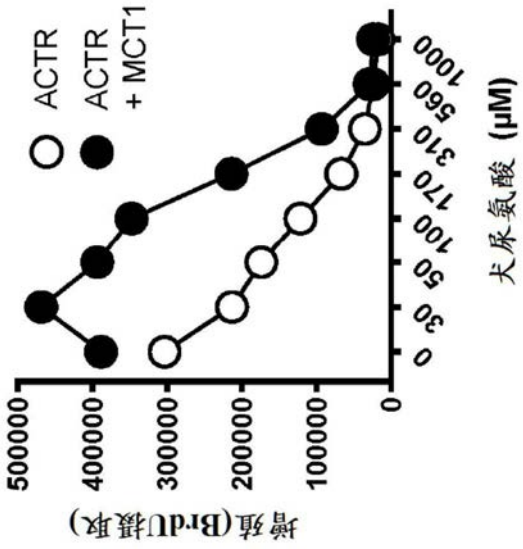

ACTR
ACTR + MCT1
增殖(BrdU摄取)
500000
400000
300000
200000
100000
0
0
30
50
100
170
310
560
1000
犬尿氨酸 (μM)

图11B

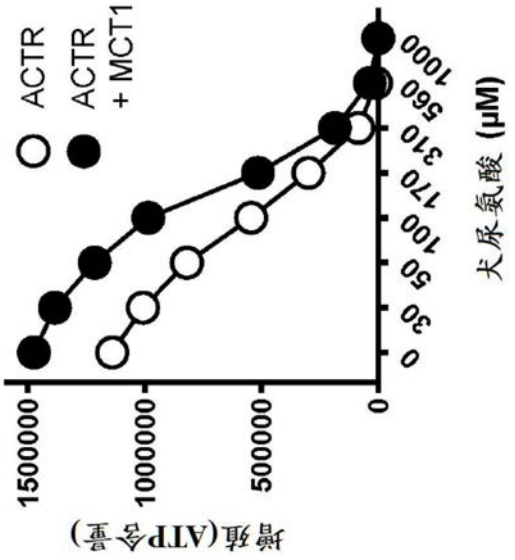

ACTR
ACTR + MCT1
增殖(ATP含量)
1500000
1000000
500000
0
0
30
50
100
170
310
560
1000
犬尿氨酸 (μM)

图11C

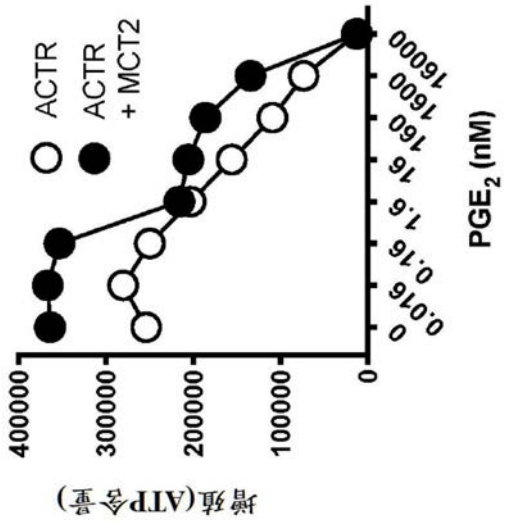

ACTR
ACTR + MCT2
PGE2 (nM)
0
0.016
0.16
1.6
16
160
1600
16000
0
100000
200000
300000
400000
增殖(ATP含量)

图12A

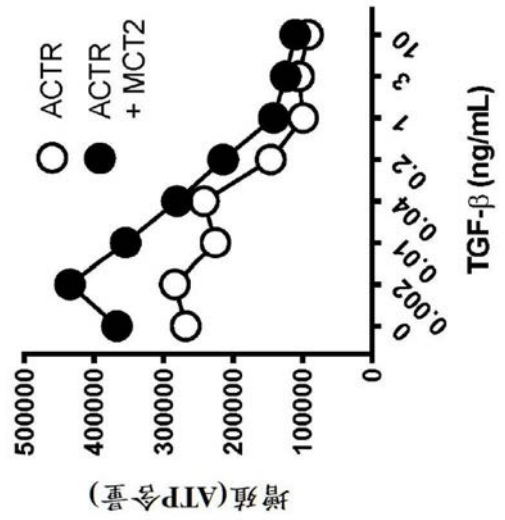

ACTR
ACTR + MCT2
TGF-β (ng/mL)
0
0.002
0.01
0.04
0.2
1
3
10
0
100000
200000
300000
400000
500000
增殖(ATP含量)

图12B

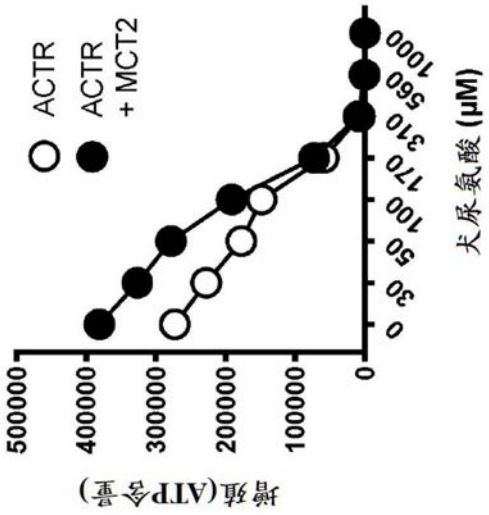

ACTR
ACTR + MCT2
500000
400000
300000
200000
100000
0
0
30
50
100
170
310
560
1000
犬尿氨酸 (μM)
增殖(ATP含量)

图12C

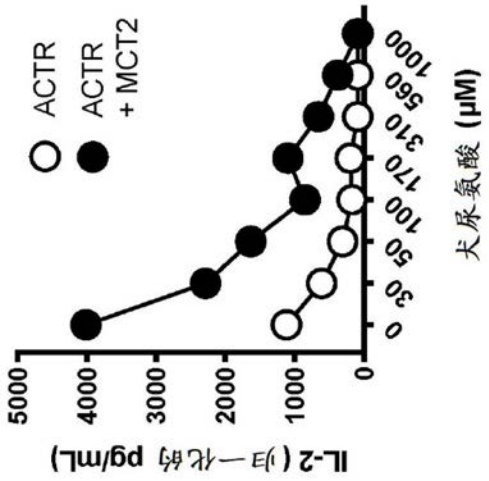

ACTR
ACTR + MCT2
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
30
50
100
170
310
560
1000
犬尿氨酸 (μM)
IL-2 (βラクタム化的 pg/mL)

图13A

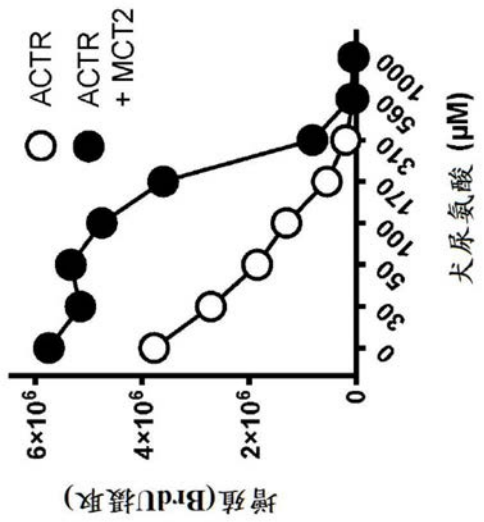

ACTR
ACTR + MCT2
尿氨酸 (μM)
0
30
50
100
170
310
560
1000
增殖(BrdU摄取)
0
2×10^6
4×10^6
6×10^6

图13B

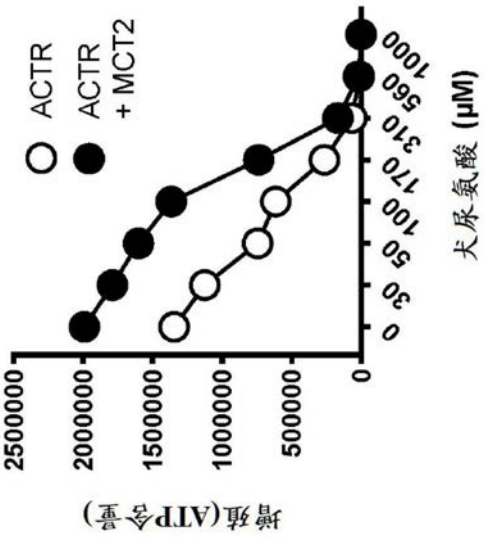

ACTR
ACTR + MCT2
尿氨酸 (μM)
0
30
50
100
170
310
560
1000
增殖(ATP含量)
0
500000
1000000
1500000
2000000
2500000

图13C

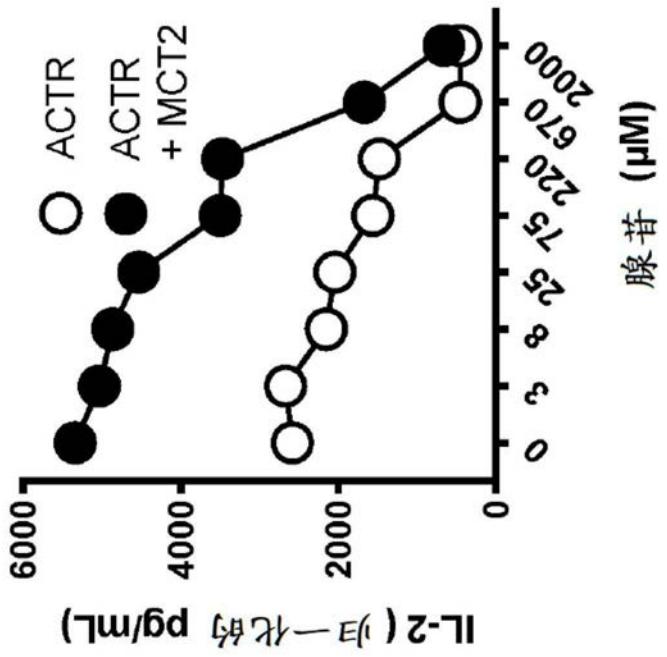

ACTR
ACTR
+ MCT2
IL-2（归一化的 pg/mL）
6000
4000
2000
0
0
3
8
25
75
220
670
2000
腺苷 (μM)

图14A

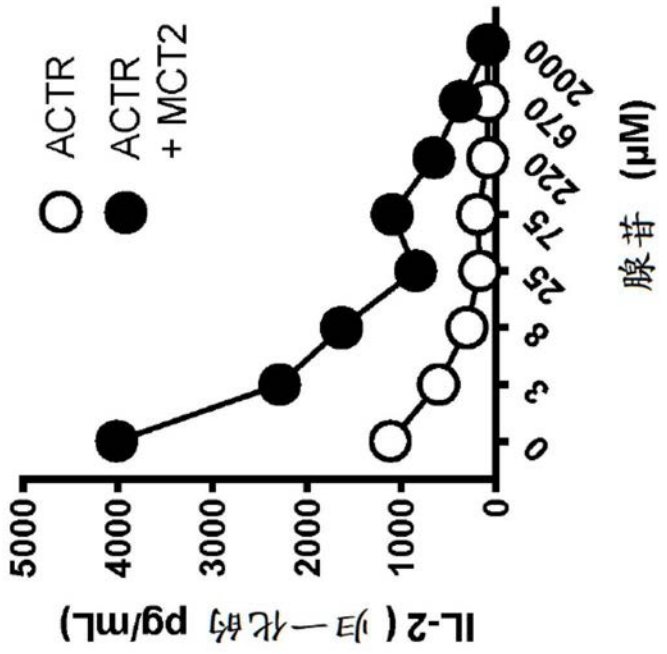

ACTR
ACTR
+ MCT2
IL-2（归一化的 pg/mL）
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
3
8
25
75
220
670
2000
腺苷 (μM)

图14B

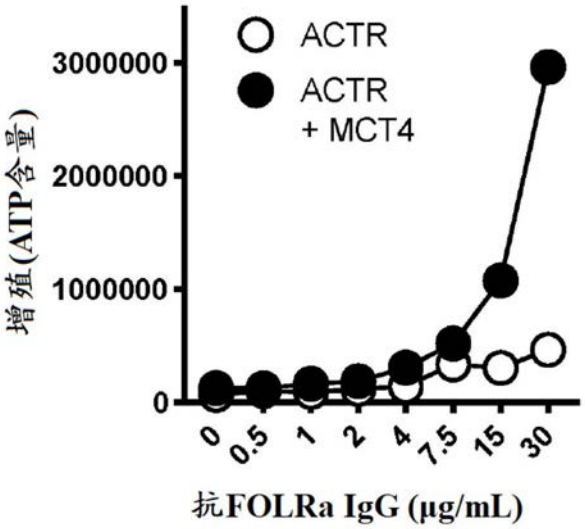

ACTR
ACTR
+ MCT4
增殖(ATP含量)
3000000
2000000
1000000
0
0
0.5
1
2
4
7.5
15
30
抗FOLRa IgG (μg/mL)

图15

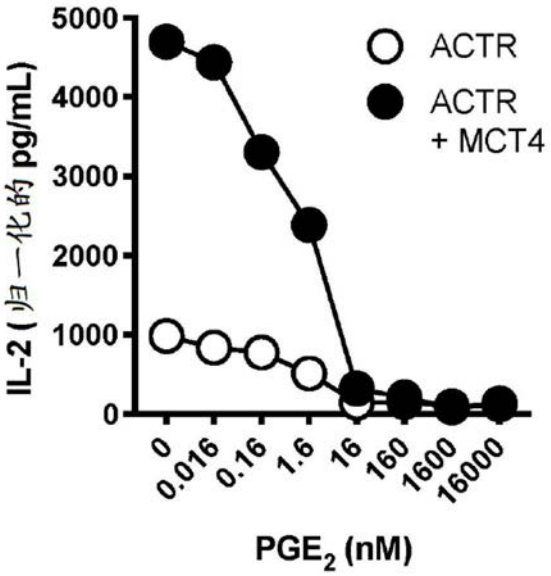

ACTR
ACTR
+ MCT4
IL-2 (归一化的 pg/mL)
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
0.016
0.16
1.6
16
160
1600
16000
PGE2 (nM)

图16

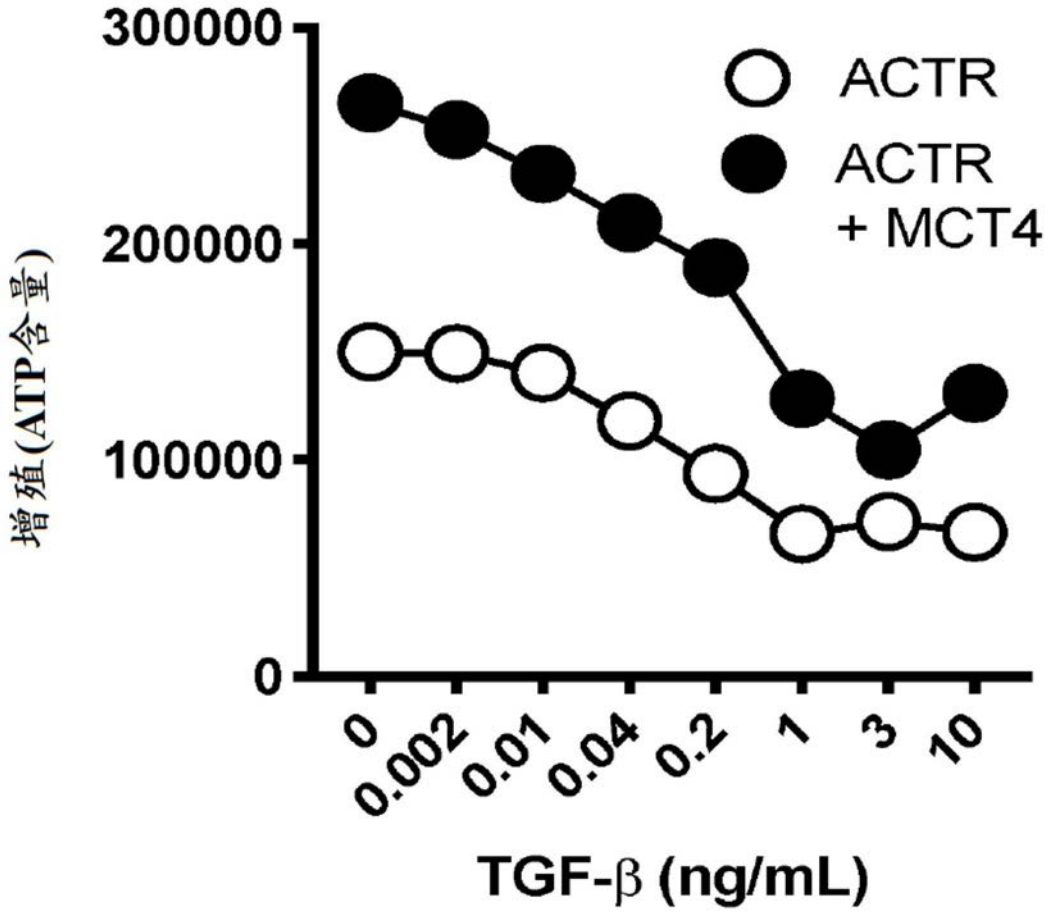

300000
200000
100000
0
增殖(ATP含量)
ACTR
ACTR
+ MCT4
0
0.002
0.01
0.04
0.2
1
3
10
TGF-β (ng/mL)

图17

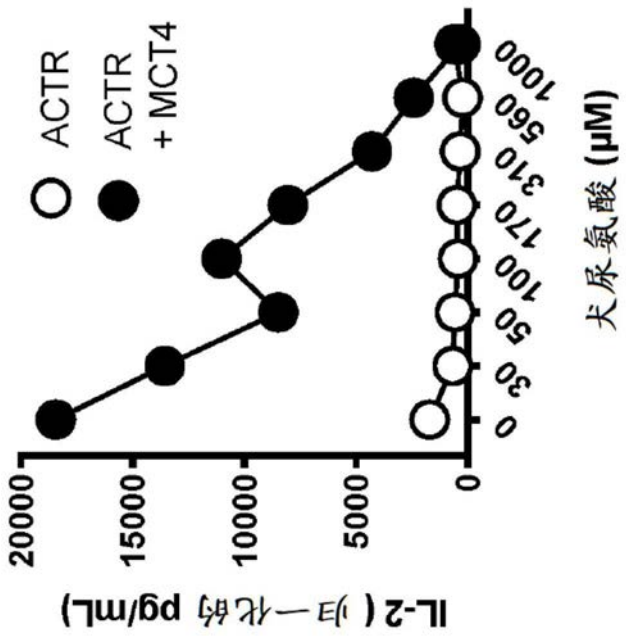

ACTR
ACTR
+ MCT4
20000
15000
10000
5000
0
IL-2 (归一化的 pg/mL)
0
30
50
100
170
310
560
1000
犬尿氨酸 (μM)

图18A

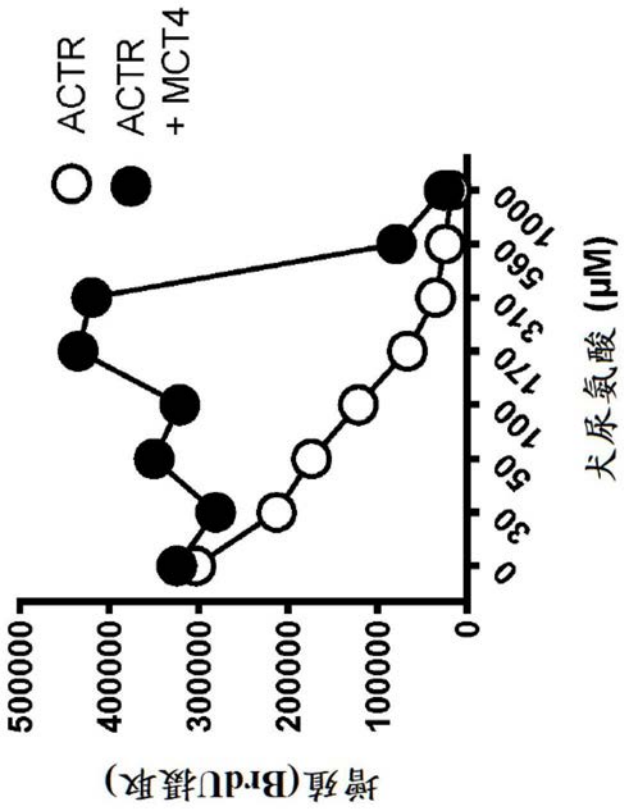

ACTR
ACTR + MCT4
增殖(BrdU摄取)
500000
400000
300000
200000
100000
0
0
30
50
100
170
310
560
1000
犬尿氨酸 (μM)

图18B