(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 120019069 A
(43)申请公布日 2025.05.16

(21)申请号 202380071941.1
(22)申请日 2023.08.14
(30)优先权数据
63/398,185 2022.08.15 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.04.09
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/072181 2023.08.14
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/040033 EN 2024.02.22
(71)申请人 加利福尼亚大学董事会
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 K·T·罗伊鲍尔 R·刘
(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 岑晓东
(51)Int.Cl.
C07K 14/705(2006.01)
A61K 35/17(2006.01)
C07K 16/30(2006.01)
C07K 14/47(2006.01)

权利要求书7页 说明书44页
序列表（电子公布） 附图38页

(54)发明名称

用于同时配体诱导的转录调节和膜近侧信号转导的多链合成受体

(57)摘要

本公开文本总体上涉及具有不同多肽链的多链嵌合多肽或受体，所述不同多肽链在翻译后缔合以使得能够在结合配体后同时激活信号传导结构域和释放转录调节因子。本公开文本还提供了包含本公开文本的多链嵌合多肽的核酸构建体、重组细胞、载体、药物组合物和治疗方法。本公开文本还提供了用于在T细胞中同时诱导T细胞信号传导和基因调节的方法。

CN 120019069 A

1.一种多链嵌合多肽,所述多链嵌合多肽包含:

(a)第一多肽,所述第一多肽包含(i)对所选配体具有结合亲和力的细胞外配体结合结构域,(ii)含有第一修饰界面的第一跨膜结构域(TMD)和(iii)含有转录调节因子的第一细胞内结构域;以及

(b)第二多肽,所述第二多肽包含(i)含有第二界面的第二TMD和(ii)含有信号传导结构域的第二细胞内结构域;

其中所述第一修饰界面和所述第二修饰界面各自包含具有相反电荷的氨基酸残基,

并且其中所述第一多肽经由所述第一修饰界面和所述第二界面与所述第二多肽偶联,并且其中所述所选配体与所述细胞外配体结合结构域的结合诱导所述信号传导结构域的活性和所述转录调节因子的释放。

2.根据权利要求1所述的多链嵌合多肽,其中所述所选配体与所述细胞外配体结合结构域的结合同时诱导所述信号传导结构域的活性和所述转录调节因子的释放。

3.根据权利要求1或2所述的多链嵌合多肽,其中所述第一多肽按从所述第一多肽的N末端到C末端的顺序包含(i)所述细胞外配体结合结构域、(ii)所述第一TMD和(iii)所述第一细胞内结构域。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的多链嵌合多肽,其中所述第一TMD包含:(i)10至25个连续缬氨酸残基,或(ii)Notch 1跨膜结构域。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的多链嵌合多肽,其中所述第二多肽按从所述第二多肽的N末端到C末端的顺序包含(i)所述第二TMD和(ii)所述第二细胞内结构域。

6.根据权利要求1至5中任一项所述的多链嵌合多肽,其中所述第一修饰界面包含带正电荷的残基,并且其中所述第二界面包含带负电荷的残基,并且其中所述第一多肽与所述第二多肽经由所述第一修饰界面与所述第二修饰界面之间的静电力偶联。

7.根据权利要求6所述的多链嵌合多肽,其中所述带正电荷的残基是赖氨酸或精氨酸。

8.根据权利要求7所述的多链嵌合多肽,其中(i)所述第一TMD包含SEQ ID NO:21或其功能变体,并且所述赖氨酸或精氨酸残基位于选自SEQ ID NO:21的位置10至14的位置;或(ii)所述第一TMD包含SEQ ID NO:18,并且所述赖氨酸或精氨酸位于选自SEQ ID NO:18的位置8至11的位置。

9.根据权利要求8所述的多链嵌合多肽,其中所述赖氨酸或精氨酸残基位于(i)SEQ ID NO:21的位置12,或(ii)SEQ ID NO:18的位置9。

10.根据权利要求1至9中任一项所述的多链嵌合多肽,其中所述细胞外结构域包含能够与细胞表面上的配体结合的抗原结合部分。

11.根据权利要求10所述的多链嵌合多肽,其中所述抗原结合部分选自抗体、纳米抗体、双抗体、三抗体、微型抗体、$F(ab')_2$片段、F(ab)片段、单链可变片段(scFv)、单结构域抗体(sdAb)及其功能片段。

12.根据权利要求1至11中任一项所述的多链嵌合多肽,其中所述配体包括蛋白质或碳水化合物。

13.根据权利要求1至12中任一项所述的多链嵌合多肽,其中所述配体是肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原。

14.根据权利要求1至13中任一项所述的多链嵌合多肽,其中所述配体包括细胞表面受

体、粘附蛋白、整合素、粘蛋白、凝集素、肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原。

15.根据权利要求14所述的多链嵌合多肽,其中所述配体包括CD1、CD1a、CD1b、CD1c、CD1d、CD1e、CD2、CD3d、CD3e、CD3g、CD4、CD5、CD7、CD8a、CD8b、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD27、CD28、CD33、CD34、CD40、CD45、CD48、CD52、CD59、CD66、CD70、CD71、CD72、CD73、CD79A、CD79B、CD80(B7.1)、CD86(B7.2)、CD94、CD95、CD134、CD140(PDGFR4)、CD152、CD154、CD158、CD178、CD181(CXCR1)、CD182(CXCR2)、CD183(CXCR3)、CD210、CD246、CD252、CD253、CD261、CD262、CD273(PD-L2)、CD274(PD-L1)、CD276(B7H3)、CD279、CD295、CD339(JAG1)、CD340(HER2)、EGFR、FGFR2、CEA、AFP、CA125、MUC-1、MAGE、胎盘碱性磷酸酶样蛋白2(ALPPL2)、B细胞成熟抗原(BCMA)、绿色荧光蛋白(GFP)、增强型绿色荧光蛋白(eGFP)或信号调节蛋白a(SIRPα)。

16.根据权利要求10至15中任一项所述的多链嵌合多肽,其中所述细胞是人细胞。

17.根据权利要求10至16中任一项所述的多链嵌合多肽,其中所述细胞是肿瘤细胞。

18.根据权利要求1至17中任一项所述的多链嵌合多肽,其中所述转录调节因子包括转录激活因子或转录阻遏因子。

19.根据权利要求1至18中任一项所述的多链嵌合多肽,其中所述转录调节因子包括Ga14-VP16、Ga14-VP64、tetR-VP64、ZFHD1-VP64、Ga14-KRAB或HAP1-VP16。

20.根据权利要求1至18中任一项所述的多链嵌合多肽,其中所述转录调节因子是人或人源化转录调节因子。

21.根据权利要求1至18中任一项所述的多链嵌合多肽,其中所述转录调节因子是HNF1a。

22.根据权利要求1至21中任一项所述的多链嵌合多肽,其中所述第二多肽包含信号传导结构域,所述信号传导结构域包括CD3ζ、TCRζ、FcRγ、FcRβ、CD3γ、CD3Δ、CD3ε、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278(ICOS)、FcεRI、DAP10、DAP12或CD66d信号传导结构域。

23.根据权利要求1至22中任一项所述的多链嵌合多肽,其中所述第一多肽还包含以下中的一种或多种:铰链结构域、配体诱导型蛋白水解切割位点、自身蛋白水解肽序列、核定位信号、近膜结构域。

24.根据权利要求23所述的多链嵌合多肽,其中所述近膜结构域是多元结构域。

25.根据权利要求24所述的多链嵌合多肽,其中所述多元结构域包括Notch-1或Notch-2近膜结构域。

26.根据权利要求23至25中任一项所述的多链嵌合多肽,其中所述自身蛋白水解肽序列来自猪捷申病毒-1 2A(P2A)、口蹄疫病毒(FMDV)2A(F2A)、马甲型鼻炎病毒(ERAV)2A(E2A)、明脉扁刺蛾β四体病毒2A(T2A)、质型多角体病毒2A(BmCPV2A)、软化病病毒2A(BmIFV2A)或其组合。

27.根据权利要求23至26中任一项所述的多链嵌合多肽,其中所述第一多肽还包含来自CD8、CD28、OX40或IgG4的铰链结构域。

28.根据权利要求27所述的多链嵌合多肽,其中所述铰链结构域包含截短的CD8α铰链结构域。

29.根据权利要求24至28中任一项所述的多链嵌合多肽,其中配体诱导型蛋白水解切割位点可被γ分泌酶切割。

30.根据权利要求1所述的多链嵌合多肽,其中所述细胞外配体结合结构域包含CD19scFv,所述第一TMD包含含有赖氨酸或精氨酸残基的连续缬氨酸残基段,所述第一多肽还包含Notch 2近膜结构域并且所述第一细胞内结构域包含Gal4VP64转录调节因子,所述第二多肽包含DNAX激活蛋白12(DAP12),并且其中所述第一多肽与所述第二多肽经由所述连续缬氨酸残基段内的赖氨酸残基偶联,并且其中CD19与所述细胞外配体结合结构域的结合同时诱导所述信号传导结构域的活性并释放所述转录调节因子。

31.根据权利要求1所述的多链嵌合多肽,其中所述细胞外配体结合结构域包含CD19scFv,所述第一TMD包含含有赖氨酸或精氨酸残基的连续缬氨酸残基段,所述第一多肽还包含Notch 2近膜结构域并且所述第一细胞内结构域包含Gal4VP64转录调节因子,所述第二多肽包含CD3z信号传导结构域,并且其中所述第一多肽与所述第二多肽经由所述连续缬氨酸残基段内的赖氨酸残基偶联,并且其中CD19与所述细胞外配体结合结构域的结合同时诱导所述信号传导结构域的活性并释放所述转录调节因子。

32.根据权利要求1所述的多链嵌合多肽,其中所述细胞外配体结合结构域包含CD19scFv,所述第一TMD包含含有赖氨酸或精氨酸残基的连续缬氨酸残基段,所述第一多肽还包含Notch 2近膜结构域并且所述第一细胞内结构域包含人或人源化转录调节因子,所述第二多肽包含DNAX激活蛋白12(DAP12)或CD3z,并且其中所述第一多肽与所述第二多肽经由所述连续缬氨酸残基段内的赖氨酸残基偶联,并且其中CD19与所述细胞外配体结合结构域的结合同时诱导所述信号传导结构域的活性并释放所述转录调节因子。

33.根据权利要求32所述的多链嵌合多肽,其中所述转录调节因子是HNF1a。

34.根据权利要求30所述的多链嵌合多肽,其中所述连续缬氨酸残基段包含5至25个缬氨酸残基,并且其中所述赖氨酸或精氨酸残基的侧翼是连续5至15个缬氨酸残基段。

35.根据权利要求1至34中任一项所述的多链嵌合多肽,其中所述多链嵌合多肽是免疫受体。

36.根据权利要求35所述的多链嵌合多肽,其中所述免疫受体是嵌合抗原受体。

37.一种多链嵌合多肽,所述多链嵌合多肽包含:

(a)第一多肽,所述第一多肽包含(i)对所选配体具有结合亲和力的细胞外配体结合结构域,(ii)含有第一修饰界面的第一跨膜结构域(TMD)和(iii)含有转录调节因子或信号传导结构域的第一细胞内结构域;以及

(b)第二多肽,所述第二多肽包含(i)含有第二界面的第二TMD和(ii)含有信号传导结构域的第二细胞内结构域;

其中所述第一修饰界面和所述第二修饰界面各自包含具有相反电荷的氨基酸残基,

并且其中所述第一多肽经由所述第一修饰界面和所述第二界面与所述第二多肽偶联,并且其中所述所选配体与所述细胞外配体结合结构域的结合诱导所述信号传导结构域的活性和所述转录调节因子的释放。

38.根据权利要求37所述的多链嵌合多肽,其中所述第一细胞内结构域包含转录调节因子。

39.根据权利要求38所述的多链嵌合多肽,其中所述转录调节因子包括Ga14-VP16、Ga14-VP64、tetR-VP64、ZFHD1-VP64、Ga14-KRAB或HAP1-VP16。

40.根据权利要求37至38中任一项所述的多链嵌合多肽,其中所述转录调节因子是人

或人源化转录调节因子。

41.根据权利要求40所述的多链嵌合多肽,其中所述转录调节因子是HNF1a。

42.根据权利要求37所述的多链嵌合多肽,其中所述第一细胞内结构域包含信号传导结构域。

43.根据权利要求42所述的多链嵌合多肽,其中所述信号传导结构域包括以下中的一种或多种:CD3ζ、TCRζ、FcRγ、FcRβ、CD3γ、CD3Δ、CD3ε、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278(ICOS)、FcεRI、DAP10、DAP12、CD66d、4-1BB或共同γ链信号传导结构域。

44.根据权利要求37至43中任一项所述的多链嵌合多肽,其中所述第二多肽的信号传导结构域包括这样的信号传导结构域,其包括CD3ζ、TCRζ、FcRγ、FcRβ、CD3γ、CD3Δ、CD3ε、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278(ICOS)、FcεRI、DAP10、DAP12、CD66d或4-1BB信号传导结构域。

45.根据权利要求37至43中任一项所述的多链嵌合多肽,其中所述第二多肽的信号传导结构域包括细胞因子信号传导结构域。

46.根据权利要求45所述的多链嵌合多肽,其中所述细胞因子信号传导结构域包括IL-2Rb、IL-4Ra、IL-7Ra、IL-9Ra、IL-13R、IL-15R或IL-21R胞内结构域。

47.根据权利要求37至46中任一项所述的多链嵌合多肽,其中所述所选配体与所述细胞外配体结合结构域的结合同时诱导所述信号传导结构域的活性和所述转录调节因子的释放。

48.根据权利要求37至47中任一项所述的多链嵌合多肽,其中所述第一多肽按从所述第一多肽的N末端到C末端的顺序包含(i)所述细胞外配体结合结构域、(ii)所述第一TMD和(iii)所述第一细胞内结构域。

49.根据权利要求37至48中任一项所述的多链嵌合多肽,其中所述第一TMD包含:(i)10至25个连续缬氨酸残基,或(ii)Notch 1跨膜结构域。

50.根据权利要求37至49中任一项所述的多链嵌合多肽,其中所述第二多肽按从所述第二多肽的N末端到C末端的顺序包含(i)所述第二TMD和(ii)所述第二细胞内结构域。

51.根据权利要求37至50中任一项所述的多链嵌合多肽,其中所述第一修饰界面包含带正电荷的残基,并且其中所述第二界面包含带负电荷的残基,并且其中所述第一多肽与所述第二多肽经由所述第一修饰界面与所述第二修饰界面之间的静电力偶联。

52.根据权利要求51所述的多链嵌合多肽,其中所述带正电荷的残基是赖氨酸或精氨酸。

53.根据权利要求52所述的多链嵌合多肽,其中(i)所述第一TMD包含SEQ ID NO:21或其功能变体,并且所述赖氨酸或精氨酸残基位于选自SEQ ID NO:21的位置10至14的位置;或(ii)所述第一TMD包含SEQ ID NO:18,并且所述赖氨酸或精氨酸位于选自SEQ ID NO:18的位置8至11的位置。

54.根据权利要求53所述的多链嵌合多肽,其中所述赖氨酸或精氨酸残基位于(i)SEQ ID NO:21的位置12,或(ii)SEQ ID NO:18的位置9。

55.根据权利要求37至54中任一项所述的多链嵌合多肽,其中所述细胞外结构域包含能够与细胞表面上的配体结合的抗原结合部分。

56.根据权利要求55所述的多链嵌合多肽,其中所述抗原结合部分选自抗体、纳米抗

体、双抗体、三抗体、微型抗体、F(ab')$_2$片段、F(ab)片段、单链可变片段(scFv)、单结构域抗体(sdAb)及其功能片段。

57.根据权利要求37至56中任一项所述的多链嵌合多肽,其中所述配体包括蛋白质或碳水化合物。

58.根据权利要求37至57中任一项所述的多链嵌合多肽,其中所述配体是肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原。

59.根据权利要求37至58中任一项所述的多链嵌合多肽,其中所述配体包括细胞表面受体、粘附蛋白、整合素、粘蛋白、凝集素、肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原。

60.根据权利要求59所述的多链嵌合多肽,其中所述配体包括CD1、CD1a、CD1b、CD1c、CD1d、CD1e、CD2、CD3d、CD3e、CD3g、CD4、CD5、CD7、CD8a、CD8b、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD27、CD28、CD33、CD34、CD40、CD45、CD48、CD52、CD59、CD66、CD70、CD71、CD72、CD73、CD79A、CD79B、CD80(B7.1)、CD86(B7.2)、CD94、CD95、CD134、CD140(PDGFR4)、CD152、CD154、CD158、CD178、CD181(CXCR1)、CD182(CXCR2)、CD183(CXCR3)、CD210、CD246、CD252、CD253、CD261、CD262、CD273(PD-L2)、CD274(PD-L1)、CD276(B7H3)、CD279、CD295、CD339(JAG1)、CD340(HER2)、EGFR、FGFR2、CEA、AFP、CA125、MUC-1、MAGE、胎盘碱性磷酸酶样蛋白2(ALPPL2)、B细胞成熟抗原(BCMA)、绿色荧光蛋白(GFP)、增强型绿色荧光蛋白(eGFP)或信号调节蛋白a(SIRPα)。

61.根据权利要求55至60中任一项所述的多链嵌合多肽,其中所述细胞是人细胞。

62.根据权利要求55至61中任一项所述的多链嵌合多肽,其中所述细胞是肿瘤细胞。

63.根据权利要求37至62中任一项所述的多链嵌合多肽,其中所述第一多肽还包含以下中的一种或多种:铰链结构域、配体诱导型蛋白水解切割位点、自身蛋白水解肽序列、核定位信号、近膜结构域。

64.根据权利要求63所述的多链嵌合多肽,其中所述近膜结构域是多元结构域。

65.根据权利要求64所述的多链嵌合多肽,其中所述多元结构域包括Notch-1或Notch-2近膜结构域。

66.根据权利要求63至65中任一项所述的多链嵌合多肽,其中所述自身蛋白水解肽序列来自猪捷申病毒-1 2A(P2A)、口蹄疫病毒(FMDV)2A(F2A)、马甲型鼻炎病毒(ERAV)2A(E2A)、明脉扁刺蛾β四体病毒2A(T2A)、质型多角体病毒2A(BmCPV2A)、软化病病毒2A(BmIFV2A)或其组合。

67.根据权利要求63至66中任一项所述的多链嵌合多肽,其中所述第一多肽还包含来自CD8、CD28、OX40或IgG4的铰链结构域。

68.根据权利要求67所述的多链嵌合多肽,其中所述铰链结构域包含截短的CD8α铰链结构域。

69.一种在5'至3'方向上包含第一盒和第二盒的重组核酸构建体,其中所述第一盒和所述第二盒通过自身蛋白水解肽连接,并且其中所述第一盒编码根据权利要求1至权利要求68所述的多链嵌合多肽中任一种的第一多肽,并且所述第二盒编码根据权利要求1至68所述的多链嵌合多肽中任一种的第二多肽。

70.一种在5'至3'方向上包含第一盒和第二盒的重组核酸构建体,其中所述第一盒和所述第二盒通过自身蛋白水解肽连接,并且其中所述第一盒编码根据权利要求1至权利要

求68所述的多链嵌合多肽中任一种的第二多肽,并且所述第二盒编码根据权利要求1至68所述的多链嵌合多肽中任一种的第一多肽。

71.一种重组核酸构建体,所述重组核酸构建体包含编码根据权利要求1至68所述的多链嵌合多肽中任一种的第一多肽的核酸序列。

72.一种重组核酸构建体,所述重组核酸构建体包含编码根据权利要求1至68所述的多链嵌合多肽中任一种的第二多肽的核酸序列。

73.根据权利要求69至72中任一项所述的核酸构建体,其中所述核酸构建体包含这样的核酸序列,所述核酸序列与SEQ ID NO:2、3、4、5、6、7、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58或其任何功能变体具有70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性。

74.根据权利要求69或权利要求70所述的核酸构建体,其中所述自身蛋白水解肽是明脉扁刺蛾β四体病毒2A(T2A)肽。

75.一种包含根据权利要求69至74所述的核酸构建体的载体。

76.根据权利要求75所述的载体,其中所述载体是表达载体。

77.根据权利要求75或76所述的载体,其中所述载体是病毒载体。

78.根据权利要求75至77中任一项所述的载体,其中所述病毒载体包含逆转录病毒、慢病毒载体、腺病毒载体和腺相关病毒载体。

79.一种重组细胞,所述重组细胞包含a)根据权利要求1-68中任一项所述的多链嵌合多肽,b)根据权利要求69至74中任一项所述的核酸构建体,和/或c)根据权利要求75至78中任一项所述的载体。

80.根据权利要求79所述的重组细胞,其中所述重组细胞是人细胞。

81.根据权利要求79或80所述的重组细胞,其中所述重组细胞是肿瘤细胞。

82.根据权利要求80所述的重组细胞,其中所述重组细胞是免疫细胞。

83.根据权利要求82所述的重组细胞,其中所述免疫细胞是B细胞、单核细胞、自然杀伤细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞、巨噬细胞、调节性T细胞、辅助性T细胞、细胞毒性T细胞或其他T细胞。

84.根据权利要求83所述的重组细胞,其中所述T细胞是CD4+T细胞或CD8+T细胞。

85.一种药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求79至84中任一项所述的重组细胞以及药学上可接受的赋形剂。

86.一种在T细胞中同时诱导T细胞信号传导和基因调节的方法,所述方法包括:(a)提供包含根据权利要求1至68中任一项所述的多链嵌合多肽的T细胞;和(b)将所述T细胞暴露于所选配体,其中所述所选配体与所述细胞外配体结合结构域的结合同时诱导细胞内信号传导和所述转录调节因子的释放。

87.一种在T细胞中同时诱导T细胞信号传导和基因调节的方法,所述方法包括:

(a)提供包含根据权利要求1至68中任一项所述的多链嵌合多肽的载体,或包含根据权利要求1至68所述的多链多肽中任一种的第一多肽的载体和包含所述多链多肽中任一种的第二多肽的第二载体;以及

(b)用一种或多种载体转导T细胞,

其中所述所选配体与所述细胞外配体结合结构域的结合同时诱导细胞内信号传导和

所述转录调节因子的释放。

88.一种在T细胞中诱导增强的T细胞信号传导的方法,所述方法包括:(a)提供包含根据权利要求1至68中任一项所述的多链嵌合多肽的T细胞;和(b)将所述T细胞暴露于所选配体,其中所述所选配体与所述细胞外配体结合结构域的结合增强了细胞内信号传导。

89.一种在T细胞中诱导增强的T细胞信号传导的方法,所述方法包括:

(a)提供包含根据权利要求1至68中任一项所述的多链嵌合多肽的载体,或包含根据权利要求1至68所述的多链多肽中任一种的第一多肽的载体和包含所述多链多肽中任一种的第二多肽的第二载体;以及

(b)用一种或多种载体转导T细胞,

其中所述所选配体与所述细胞外配体结合结构域的结合诱导增强的细胞内信号传导。

90.根据权利要求86至89中任一项所述的方法,其中所述T细胞的诱导的细胞内信号传导调节参与增殖、凋亡、非凋亡性死亡、分化、去分化、迁移、分子分泌、细胞粘附和/或细胞溶解活性的所选基因的表达。

91.根据权利要求87所述的方法,其中所释放的转录调节因子调节所述T细胞中有效载荷的表达。

92.根据权利要求91所述的方法,其中所述有效载荷包括趋化因子、趋化因子受体、嵌合抗原受体、细胞因子、细胞因子受体、分化因子、生长因子、生长因子受体、激素、代谢酶、病原体衍生的蛋白质、增殖诱导剂、受体、RNA指导的核酸酶、位点特异性核酸酶、T细胞受体、毒素、毒素衍生的蛋白质、转录调节因子、转录激活因子、转录阻遏因子、翻译调节因子、翻译激活因子、翻译阻遏因子、激活性免疫受体、抗体、凋亡抑制剂、凋亡诱导剂、工程化的T细胞受体、免疫激活因子、免疫抑制剂或抑制性免疫受体。

93.一种用于治疗有需要的受试者的健康状况的方法,所述方法包括:向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求79至权利要求84中任一项所述的重组细胞或根据权利要求85所述的药物组合物,其中所述重组细胞或所述药物组合物治疗所述受试者的健康状况。

94.根据权利要求91所述的方法,其中所施用的重组细胞调节所述个体中靶细胞的活性。

95.根据权利要求92所述的方法,其中所述靶细胞的活性包括参与增殖、凋亡、非凋亡性死亡、分化、去分化、迁移、分子分泌、细胞粘附和细胞溶解活性的所选基因的表达。

96.根据权利要求93所述的方法,其中所述靶细胞是癌细胞。

97.根据权利要求94所述的方法,其中所述癌细胞是实体瘤细胞或血液恶性肿瘤细胞。

98.根据权利要求95所述的方法,其中所述血液恶性肿瘤细胞是多发性骨髓瘤细胞。

99.一种用于调节T细胞活性的方法,所述方法包括:

(a)提供有效量的任一种根据权利要求79至84所述的重组细胞;以及

(b)使所述细胞与所选配体接触,其中所述所选配体与所述细胞外配体结合结构域的结合诱导配体诱导型蛋白水解切割位点的切割并(i)释放所述转录调节因子,其中所释放的转录调节因子调节所述重组细胞的活性;以及同时(ii)激活T细胞信号传导。

用于同时配体诱导的转录调节和膜近侧信号转导的多链合成受体

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求在2022年8月15日提交的美国临时专利申请序列号63/398,185的优先权,将其公开内容通过引用以其整体(包括任何附图)并入本文。

关于联邦资助研究的声明

[0002] 本发明是在由美国国立卫生研究院授予的授权号OD025751-01下在美国政府支持下完成的。政府拥有本发明中的某些权利。

序列表的并入

[0003] 本申请含有序列表,所述序列表通过引用以其整体并入本文。名为“2023-08-14Sequence_Listing_ST26 048536-727001WO.xml”的随附序列表文件创建于2023年8月14日,并且为345,882字节。

技术领域

[0004] 本公开文本总体上涉及免疫学和医学领域。更特别地,本公开文本涉及包含多链受体的组合物和方法。本公开文本还涉及包括此类受体的增强的CAR T细胞疗法。

背景技术

[0005] 基于淋巴细胞(例如,T细胞)过继转移的免疫疗法的开发已经取得了许多重要进展,其中最重要的是表达包括嵌合抗原受体在内的嵌合免疫受体的T细胞(CAR-T细胞)。然而,限制这些疗法的一个重要问题是无法在需要时调节或关闭CAR-T活性。CAR-T活性的调节对于减少或消除在施用嵌合抗原受体T细胞时引起显著副作用的相互作用特别重要。

[0006] 与T细胞受体(TCR)不同,诸如CAR的嵌合免疫受体包括肿瘤抗原识别和细胞内激活相结合的分子。此类免疫受体的结构和设计最低限度地包括通过TMD连接至一个或多个细胞内激活结构域的细胞外抗原识别结构域。此类免疫受体的例子包括synNotch受体,其能够结合用户定义的细胞表面展示配体,从而触发受体的蛋白水解切割和转录调节因子的释放,所述转录调节因子在细胞中诱导定制转录程序。其他例子包括这样的受体,其掺入信号传导(例如,共刺激、CD3ζ),所述信号传导可启动伴随定制转录调节的T细胞激活。免疫受体的那些例子被设计为具有共刺激、CD3ζ和转录调节结构域的连续融合的单蛋白质链。

[0007] 还需要能够同时进行信号转导和转录调节的受体,以更有效且更可靠地诱导近侧T细胞激活信号和原代T细胞中的基因调节。

发明内容

[0008] 本公开文本总体上涉及多链嵌合多肽(例如,嵌合免疫受体),其具有能够使用不同蛋白质链进行转录调节和信号转导的架构。特别地,本公开文本涉及具有不同多肽链的多链嵌合多肽,所述不同多肽链在翻译后彼此缔合(经由位于跨膜结构域内的残基)以使得能够在结合配体后同时激活信号传导结构域和释放转录调节因子。

[0009] 本文尤其提供了多链嵌合多肽,所述多链嵌合多肽包含(a)第一多肽,其具有(i)对所选配体具有结合亲和力的细胞外配体结合结构域、(ii)含有第一修饰界面的第一跨膜结构域(TMD)和(iii)含有转录调节因子的第一细胞内结构域(ICD),以及(b)第二多肽,其具有(i)含有第二界面的第二TMD和(ii)含有信号传导结构域的第二ICD,其中所述第一修饰界面和所述第二修饰界面各自包含具有相反电荷的氨基酸残基,其中所述第一多肽与所述第二多肽经由所述第一修饰界面和所述第二界面偶联,并且其中所述所选配体与所述细胞外配体结合结构域的结合诱导所述信号传导结构域的活性和所述转录调节因子的释放。在一些实施方案中,所述所选配体与所述细胞外配体结合结构域的结合同时诱导所述信号传导结构域的活性和所述转录调节因子的释放。

[0010] 在一些实施方案中,所述第一多肽按从所述第一多肽的N末端到C末端的顺序包含(i)所述细胞外配体结合结构域、(ii)所述第一TMD和(iii)所述第一细胞内结构域。在一些实施方案中,所述第一TMD包含(i)10至25个连续缬氨酸残基或(ii)Notch 1TMD。

[0011] 在所述多链嵌合多肽的一些实施方案中,所述第二多肽按从所述第二多肽的N末端到C末端的顺序包含(i)所述第二TMD和(ii)所述第二细胞内结构域。

[0012] 在所述多链嵌合多肽的一些实施方案中,所述第一修饰界面包含带正电荷的残基,所述第二界面包含带负电荷的残基,并且所述第一多肽与所述第二多肽经由所述第一修饰界面与所述第二修饰界面之间的静电力偶联。在一些实施方案中,所述带正电荷的残基是赖氨酸或精氨酸。在本公开文本的多链嵌合多肽的一些实施方案中,所述第一TMD包含SEQ ID NO:21或其功能变体,并且所述赖氨酸或精氨酸残基位于选自SEQ ID NO:21的位置10至14的位置;或(ii)所述第一TMD包含SEQ ID NO:18,并且所述赖氨酸或精氨酸位于选自SEQ ID NO:18的位置8至11的位置。在其中所述第一跨膜包含SEQ ID NO:21的一些实施方案中,所述赖氨酸或精氨酸残基位于SEQ ID NO:21的位置12。在其中所述第一跨膜包含SEQ ID NO:18的一些实施方案中,所述赖氨酸或精氨酸残基位于相对于SEQ ID NO:18的位置9。

[0013] 在本公开文本的多链嵌合多肽的一些实施方案中,细胞外结构域包括结合(或能够结合)细胞表面上的配体的抗原结合部分。在一些实施方案中,所述抗原结合部分选自抗体、纳米抗体、双抗体、三抗体、微型抗体、F(ab')$_2$片段、F(ab)片段、单链可变片段(scFv)、单结构域抗体(sdAb)及其功能片段。

[0014] 在本公开文本的多链嵌合多肽的一些实施方案中,所述配体包括蛋白质或碳水化合物。在一些实施方案中,所述配体是肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原。在一些实施方案中,所述配体包括细胞表面受体、粘附蛋白、整合素、粘蛋白、凝集素、肿瘤相关抗原和肿瘤特异性抗原。在一些实施方案中,所述配体包括CD1、CD1a、CD1b、CD1c、CD1d、CD1e、CD2、CD3d、CD3e、CD3g、CD4、CD5、CD7、CD8a、CD8b、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD27、CD28、CD33、CD34、CD40、CD45、CD48、CD52、CD59、CD66、CD70、CD71、CD72、CD73、CD79A、CD79B、CD80(B7.1)、CD86(B7.2)、CD94、CD95、CD134、CD140(PDGFR4)、CD152、CD154、CD158、CD178、CD181(CXCR1)、CD182(CXCR2)、CD183(CXCR3)、CD210、CD246、CD252、CD253、CD261、CD262、CD273(PD-L2)、CD274(PD-L1)、CD276(B7H3)、CD279、CD295、CD339(JAG1)、CD340(HER2)、EGFR、FGFR2、CEA、AFP、CA125、MUC-1、MAGE、胎盘碱性磷酸酶样蛋白2(ALPPL2)、B细胞成熟抗原(BCMA)、绿色荧光蛋白(GFP)、增强型绿色荧光蛋白(eGFP)或信号调节蛋白a(SIRPα)。

[0015] 在一些实施方案中,所述配体存在于细胞表面上。在一些实施方案中,所述细胞是

人细胞。在一些实施方案中,所述细胞是肿瘤细胞。

[0016] 在本公开文本的多链嵌合多肽的一些实施方案中,所述转录调节因子包括转录激活因子或转录阻遏因子。在一些实施方案中,所述转录调节因子包括Ga14-VP16、Ga14-VP64、tetR-VP64、ZFHD1-VP64、Ga14-KRAB或HAP1-VP16。

[0017] 在本公开文本的多链嵌合多肽的一些实施方案中,所述转录调节因子是人或人源化转录调节因子。在一些实施方案中,所述转录调节因子是HNF1a。

[0018] 在本公开文本的多链嵌合多肽的一些实施方案中,所述第二多肽包含信号传导结构域,所述信号传导结构域包括CD3ζ、TCRζ、FcRγ、FcRβ、CD3γ、CD3Δ、CD3ε、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278(ICOS)、FcεRI、DAP10、DAP12或CD66d信号传导结构域。

[0019] 在本公开文本的多链嵌合多肽的一些实施方案中,所述信号传导结构域包括DAP12、CD3ζ、TCRζ、FcRγ、FcRβ、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278(ICOS)、Fc.ε.RI、DAP10、DAP12或CD66d信号传导结构域。

[0020] 在本公开文本的多链嵌合多肽的一些实施方案中,所述第一多肽还包含以下中的一种或多种:铰链结构域、配体诱导型蛋白水解切割位点、自身蛋白水解肽序列、核定位信号、近膜结构域。在一些实施方案中,所述近膜结构域是多元结构域。在一些实施方案中,所述多元结构域包括Notch-1或Notch-2近膜结构域。在一些实施方案中,所述自身蛋白水解肽序列来自猪捷申病毒-1 2A(P2A)、口蹄疫病毒(FMDV)2A(F2A)、马甲型鼻炎病毒(ERAV)2A(E2A)、明脉扁刺蛾β四体病毒2A(T2A)、质型多角体病毒2A(BmCPV2A)、软化病病毒2A(BmIFV2A)或其组合。

[0021] 在本公开文本的多链嵌合多肽的一些实施方案中,所述第一多肽还包含来自CD8、CD28、OX40或IgG4的铰链结构域。在一些实施方案中,所述跨膜结构域源自CD8。在一些实施方案中,所述铰链结构域包括截短的CD8α铰链结构域(也称为CD8铰链或CD8铰链2)。

[0022] 在本公开文本的多链嵌合多肽的一些实施方案中,所述配体诱导型蛋白水解切割位点可被γ分泌酶切割。

[0023] 在一个方面,本文还提供了多链嵌合多肽,所述多链嵌合多肽包含(a)第一多肽,其具有(i)包含CD19scFv的细胞外配体结合结构域、(ii)包含含有赖氨酸或精氨酸残基的连续缬氨酸残基段的第一TMD、和(iii)Notch 2近膜结构域、和(iv)具有Gal4VP64转录调节因子的第一ICD;以及(b)具有DNAX激活蛋白12(DAP12)的第二多肽;其中所述第一多肽与所述第二多肽经由所述连续缬氨酸残基段内的赖氨酸或精氨酸残基偶联,并且其中CD19与所述细胞外配体结合结构域的结合同时诱导所述信号传导结构域的活性并释放所述转录调节因子。在一些实施方案中,其中所述连续缬氨酸残基段包含5至25个缬氨酸残基,并且所述赖氨酸残基的侧翼是连续5至15个缬氨酸残基段。在一些实施方案中,所述连续缬氨酸残基段包含5至25个缬氨酸残基。在一些实施方案中,所述第一TMD包含15至20个缬氨酸残基。在一些实施方案中,所述赖氨酸残基位于所述第一TMD的位置9或10。

[0024] 在一个方面,本文还提供了多链嵌合多肽,所述多链嵌合多肽包含(a)第一多肽,所述第一多肽具有(i)包含CD19scFv的所述细胞外配体结合结构域、包含含有赖氨酸或精氨酸残基的连续缬氨酸残基段的所述第一TMD,所述第一多肽还包含Notch 2近膜结构域和含有Gal4VP64转录调节因子的所述第一细胞内结构域;第二多肽,所述第二多肽包含CD3z信号传导结构域,并且其中所述第一多肽与所述第二多肽经由所述连续缬氨酸残基段内的

赖氨酸残基偶联,并且其中CD19与所述细胞外配体结合结构域的结合同时诱导所述信号传导结构域的活性并释放所述转录调节因子。

[0025] 在一个方面,本文还提供了多链嵌合多肽,所述多链嵌合多肽包含(a)第一多肽,所述第一多肽具有(i)包含CD19scFv的细胞外配体结合结构域、包含含有赖氨酸或精氨酸残基的连续缬氨酸残基段的所述第一TMD,所述第一多肽还包含Notch 2近膜结构域和含有人或人源化转录调节因子的所述第一细胞内结构域;第二多肽,所述第二多肽包含DNAX激活蛋白12(DAP12)或CD3z,并且其中所述第一多肽与所述第二多肽经由所述连续缬氨酸残基段内的赖氨酸残基偶联,并且其中CD19与所述细胞外配体结合结构域的结合同时诱导所述信号传导结构域的活性并释放所述转录调节因子。

[0026] 在一些实施方案中,所述转录调节因子是HNF1a。

[0027] 在一些实施方案中,本公开文本的多链嵌合多肽是免疫受体。在一些实施方案中,所述免疫受体是嵌合抗原受体。

[0028] 在一个方面,本文提供了多链嵌合多肽,所述多链嵌合多肽包含(a)第一多肽,所述第一多肽包含(i)对所选配体具有结合亲和力的细胞外配体结合结构域、(ii)含有第一修饰界面的第一跨膜结构域(TMD)和(iii)含有转录调节因子或信号传导结构域的第一细胞内结构域;以及(b)第二多肽,所述第二多肽包含(i)含有第二界面的第二TMD和(ii)含有信号传导结构域的第二细胞内结构域;其中所述第一修饰界面和所述第二修饰界面各自包含具有相反电荷的氨基酸残基,并且其中所述第一多肽与所述第二多肽经由所述第一修饰界面和所述第二界面偶联,并且其中所述所选配体与所述细胞外配体结合结构域的结合诱导所述信号传导结构域的活性和所述转录调节因子的释放。

[0029] 在一些实施方案中,所述第一细胞内结构域包含转录调节因子。在一些实施方案中,所述转录调节因子包括Ga14-VP16、Ga14-VP64、tetR-VP64、ZFHD1-VP64、Ga14-KRAB或HAP1-VP16。在一些实施方案中,所述转录调节因子是人或人源化转录调节因子。在一些实施方案中,所述转录调节因子是HNF1a。

[0030] 在一些实施方案中,所述第一细胞内结构域包含信号传导结构域。在一些实施方案中,所述信号传导结构域包括以下中的一种或多种:CD3ζ、TCRζ、FcRγ、FcRβ、CD3γ、CD3Δ、CD3ε、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278(ICOS)、FcεRI、DAP10、DAP12、CD66d、4-1BB或共同γ链信号传导结构域。

[0031] 在一些实施方案中,所述第二多肽的信号传导结构域包括信号传导结构域,所述信号传导结构域包括CD3ζ、TCRζ、FcRγ、FcRβ、CD3γ、CD3Δ、CD3ε、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278(ICOS)、FcεRI、DAP10、DAP12、CD66d或4-1BB信号传导结构域。

[0032] 在一些实施方案中,所述第二多肽的信号传导结构域包括细胞因子信号传导结构域。在一些实施方案中,所述细胞因子信号传导结构域包括IL-2Rb、IL-4Ra、IL-7Ra、IL-9Ra、IL-13R、IL-15R或IL-21R胞内结构域。

[0033] 在一些实施方案中,所述所选配体与所述细胞外配体结合结构域的结合同时诱导所述信号传导结构域的活性和所述转录调节因子的释放。

[0034] 在一些实施方案中,所述第一多肽按从所述第一多肽的N末端到C末端的顺序包含(i)所述细胞外配体结合结构域、(ii)所述第一TMD和(iii)所述第一细胞内结构域。

[0035] 在一些实施方案中,所述第一TMD包含:(i)10至25个连续缬氨酸残基,或(ii)

Notch 1跨膜结构域。

[0036] 在一些实施方案中,所述第二多肽按从所述第二多肽的N末端到C末端的顺序包含(i)所述第二TMD和(ii)所述第二细胞内结构域。

[0037] 在一些实施方案中,所述第一修饰界面包含带正电荷的残基,并且其中所述第二界面包含带负电荷的残基,并且其中所述第一多肽与所述第二多肽经由所述第一修饰界面与所述第二修饰界面之间的静电力偶联。在一些实施方案中,所述带正电荷的残基是赖氨酸或精氨酸。

[0038] 在一些实施方案中,(i)所述第一TMD包含SEQ ID NO:21或其功能变体,并且所述赖氨酸或精氨酸残基位于选自SEQ ID NO:21的位置10至14的位置;或(ii)所述第一TMD包含SEQ ID NO:18,并且所述赖氨酸或精氨酸位于选自SEQ ID NO:18的位置8至11的位置。在一些实施方案中,所述赖氨酸或精氨酸残基位于(i)SEQ ID NO:21的位置12,或(ii)SEQ ID NO:18的位置9。

[0039] 在一些实施方案中,所述细胞外结构域包含能够与细胞表面上的配体结合的抗原结合部分。在一些实施方案中,所述抗原结合部分选自抗体、纳米抗体、双抗体、三抗体、微型抗体、$F(ab')_2$片段、F(ab)片段、单链可变片段(scFv)、单结构域抗体(sdAb)及其功能片段。

[0040] 在一些实施方案中,所述配体包括蛋白质或碳水化合物。

[0041] 在一些实施方案中,所述配体是肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原。

[0042] 在一些实施方案中,所述配体包括细胞表面受体、粘附蛋白、整合素、粘蛋白、凝集素、肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原。

[0043] 在一些实施方案中,所述配体包括CD1、CD1a、CD1b、CD1c、CD1d、CD1e、CD2、CD3d、CD3e、CD3g、CD4、CD5、CD7、CD8a、CD8b、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD27、CD28、CD33、CD34、CD40、CD45、CD48、CD52、CD59、CD66、CD70、CD71、CD72、CD73、CD79A、CD79B、CD80(B7.1)、CD86(B7.2)、CD94、CD95、CD134、CD140(PDGFR4)、CD152、CD154、CD158、CD178、CD181(CXCR1)、CD182(CXCR2)、CD183(CXCR3)、CD210、CD246、CD252、CD253、CD261、CD262、CD273(PD-L2)、CD274(PD-L1)、CD276(B7H3)、CD279、CD295、CD339(JAG1)、CD340(HER2)、EGFR、FGFR2、CEA、AFP、CA125、MUC-1、MAGE、胎盘碱性磷酸酶样蛋白2(ALPPL2)、B细胞成熟抗原(BCMA)、绿色荧光蛋白(GFP)、增强型绿色荧光蛋白(eGFP)或信号调节蛋白a(SIRPα)。

[0044] 在一些实施方案中,所述细胞是人细胞。

[0045] 在一些实施方案中,所述细胞是肿瘤细胞。

[0046] 在一些实施方案中,所述第一多肽还包含以下中的一种或多种:铰链结构域、配体诱导型蛋白水解切割位点、自身蛋白水解肽序列、核定位信号、近膜结构域。在一些实施方案中,所述近膜结构域是多元结构域。在一些实施方案中,所述多元结构域包括Notch-1或Notch-2近膜结构域。在一些实施方案中,所述自身蛋白水解肽序列来自猪捷申病毒-1 2A(P2A)、口蹄疫病毒(FMDV)2A(F2A)、马甲型鼻炎病毒(ERAV)2A(E2A)、明脉扁刺蛾β四体病毒2A(T2A)、质型多角体病毒2A(BmCPV2A)、软化病病毒2A(BmIFV2A)或其组合。

[0047] 在一些实施方案中,所述第一多肽还包含来自CD8、CD28、OX40或IgG4的铰链结构域。在一些实施方案中,所述铰链结构域包含截短的CD8α铰链结构域。

[0048] 在一个方面,本文提供了重组核酸构建体,所述重组核酸构建体在5'至3'方向上

包含第一盒和第二盒,其中所述第一盒和所述第二盒通过自身蛋白水解肽连接,并且其中所述第一盒编码本公开文本的多链嵌合多肽的第一多肽,并且所述第二盒编码本公开文本的多链嵌合多肽的第二多肽。

[0049] 在另外的方面,本文提供了核酸构建体,所述核酸构建体在5'至3'方向上包含第一盒和第二盒,其中所述第一盒和所述第二盒通过自身蛋白水解肽连接,并且其中所述第一盒编码本公开文本的多链嵌合多肽的第二多肽,并且所述第二盒编码本公开文本的多链嵌合多肽的第一多肽。

[0050] 在另外的方面,本文提供了编码本公开文本的任一种多链嵌合多肽的第一多肽的核酸构建体。

[0051] 在另外的方面,本文提供了编码本公开文本的任一种多链嵌合多肽的第二多肽的核酸构建体。

[0052] 在一些实施方案中,所述自身蛋白水解肽是明脉扁刺蛾β四体病毒2A(T2A)肽。

[0053] 在一些实施方案中,所述核酸构建体具有这样的核酸序列,所述核酸序列与SEQ ID NO:2、3、4、5、6、7、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58或其功能变体具有70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性。

[0054] 在另外的方面,本公开文本提供了包含本公开文本的重组核酸分子的载体。在一些实施方案中,所述载体是表达载体。在一些实施方案中,所述载体是病毒载体。在一些实施方案中,所述病毒载体是逆转录病毒载体。在一些实施方案中,所述病毒载体选自慢病毒载体、腺病毒载体和腺相关病毒载体。

[0055] 在另一个方面,本文提供了重组细胞,所述重组细胞包含a)本公开文本的多链嵌合多肽,或b)本公开文本的重组核酸分子,或c)本公开文本的载体。在一些实施方案中,所述重组细胞是人细胞。在一些实施方案中,所述重组细胞是肿瘤细胞。在一些实施方案中,所述重组细胞是免疫细胞。在一些实施方案中,所述免疫细胞是B细胞、单核细胞、自然杀伤细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞、巨噬细胞、调节性T细胞、辅助性T细胞、细胞毒性T细胞和其他T细胞。在一些实施方案中,所述T细胞是CD4+T细胞或CD8+T细胞。

[0056] 本公开文本还提供了包含本公开文本的重组细胞和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0057] 本文还提供了在T细胞中同时诱导T细胞信号传导和基因调节的方法,所述方法包括(a)提供具有本公开文本的多链嵌合多肽或抗原受体的T细胞;和(b)使所述T细胞暴露于所选配体,其中所选配体与所述细胞外配体结合结构域的结合同时诱导细胞内信号传导和所述转录调节因子的释放。

[0058] 在另外的方面,本公开文本提供了在T细胞中同时诱导T细胞信号传导和基因调节的方法,所述方法包括(a)提供(i)包含本公开文本的多链嵌合多肽的载体或(ii)包含本公开文本的第一多肽的第一载体和包含本公开文本的第二多肽的第二载体;和(b)用一种或多种载体转导T细胞,其中所选配体与所述细胞外配体结合结构域的结合同时诱导细胞内信号传导和所述转录调节因子的释放。在一些实施方案中,所述T细胞的诱导的细胞内信号传导调节参与增殖、凋亡、非凋亡性死亡、分化、去分化、迁移、分子分泌、细胞粘附和/或细胞溶解活性的所选基因的表达。

[0059] 在另外的方面,本公开文本提供了在T细胞中诱导增强的T细胞信号传导的方法,所述方法包括(a)提供包含本公开文本的多链嵌合多肽的T细胞;和(b)将所述T细胞暴露于所选配体,其中所述所选配体与所述细胞外配体结合结构域的结合增强细胞内信号传导。

[0060] 在另一个方面,本公开文本提供了在T细胞中诱导增强的T细胞信号传导的方法,所述方法包括(a)提供包含本公开文本的多链嵌合多肽的载体,或包含本公开文本的任一种多链多肽的第一多肽的载体和包含本公开文本的任一种多链多肽的第二多肽的第二载体;和(b)用一种或多种载体转导T细胞,其中所述所选配体与所述细胞外配体结合结构域的结合诱导增强的细胞内信号传导。

[0061] 在一些实施方案中,所释放的转录调节因子调节所述T细胞中有效载荷的表达。在一些实施方案中,所述有效载荷包括趋化因子、趋化因子受体、嵌合抗原受体、细胞因子、细胞因子受体、分化因子、生长因子、生长因子受体、激素、代谢酶、病原体衍生的蛋白质、增殖诱导剂、受体、RNA指导的核酸酶、位点特异性核酸酶、T细胞受体、毒素、毒素衍生的蛋白质、转录调节因子、转录激活因子、转录阻遏因子、翻译调节因子、翻译激活因子、翻译阻遏因子、激活性免疫受体、抗体、凋亡抑制剂、凋亡诱导剂、工程化的T细胞受体、免疫激活因子、免疫抑制剂或抑制性免疫受体。

[0062] 在另一个方面,本文提供了用于治疗有需要的受试者的健康状况的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本公开文本的重组细胞或药物组合物,其中所述重组细胞或所述药物组合物治疗所述受试者的健康状况。在一些实施方案中,所施用的重组细胞调节个体中靶细胞的活性。在一些实施方案中,所述靶细胞的活性包括所选基因的表达、增殖、凋亡、非凋亡性死亡、分化、去分化、迁移、分子分泌、细胞粘附和细胞溶解活性。在一些实施方案中,所述靶细胞是癌细胞。在一些实施方案中,所述癌细胞是实体瘤细胞或血液恶性肿瘤细胞。在一些实施方案中,所述血液恶性肿瘤细胞是多发性骨髓瘤细胞。

[0063] 本文还提供了用于调节T细胞活性的方法,所述方法包括(a)提供有效量的任一种本公开文本的重组细胞;以及(b)使所述细胞与所选配体接触,其中所选配体与所述细胞外配体结合结构域的结合(i)诱导配体诱导型蛋白水解切割位点的切割并释放所述转录调节因子,并且同时(ii)激活T细胞信号传导,其中所释放的转录调节因子调节所述重组细胞的活性。

[0064] 前述发明内容仅是说明性的,并不旨在以任何方式进行限制。除了本文所述的说明性实施方案和特征之外,根据附图、具体实施方式和权利要求,本公开文本的其他方面、实施方案、目的和特征将变得完全清楚。

附图说明

[0065] 图1显示了根据本公开文本的多链嵌合多肽的示意图,其中第一链/第一多肽(右侧)经由转录因子递送转录调节,并且第二链/第二多肽(左侧)递送信号传导功能。第一多肽包含对所选配体具有结合亲和力的细胞外配体结合结构域、具有第一修饰界面(带正电荷的氨基酸残基)的第一TMD和具有转录调节因子的第一ICD。第二多肽包含具有第二界面(带负电荷的氨基酸残基)的第二TMD和具有信号传导结构域的第二ICD。第一多肽和第二多肽的偶联是经由带正电荷的氨基酸残基与带负电荷的氨基酸残基之间的相互作用进行的。通过配体(例如CD19)结合激活多链嵌合多肽导致转录调节因子(例如Ga14VP64)解离,然后

其进入细胞核并激活基因(在该例子中为BFP)的转录。还显示了具有BFP基因的转录调节应答盒的示意图。

[0066] 图2A-图2D示意性地总结了所进行的实验的结果,这些实验用于评价各种嵌合多链多肽/受体的功能,以便优化在配体与细胞外配体结合结构域结合后诱导信号传导结构域的活性和转录调节因子的释放的多链嵌合受体。图2A显示了被称为056的多链嵌合多肽(例如,免疫受体)的实施方案。056实施方案包含i)第一多肽,其含有CD19scFv结合结构域、具有带正电荷的第一修饰界面的TREM2第一TMD和Gal4VP64翻译调节因子,以及(ii)第二多肽链,其含有具有带负电荷的修饰界面的DAP12。编码056实施方案的核酸构建体(SEQ ID NO:2)在5'至3'方向上包含DAP12、T2A接头和编码CD19scFV-TREM2-Gal4VP64第一多肽的盒。图2B显示了表示为056C的多链嵌合多肽的另一种设计。056C实施方案包含i)第一多肽,其含有CD19scFv结合结构域、截短的CD8α-铰链结构域(标记为CD8铰链2)、具有带正电荷的第一修饰界面(包含L1747K取代)的Notch1第一TMD(Uniprot P46531编号Uniprot P46531氨基酸1736至1757,具有L1747K突变)、Notch2近膜结构域、Gal4VP64翻译调节因子;以及(ii)含有DAP12的第二多肽链。编码056C实施方案的核酸构建体(SEQ ID NO:4)在5'至3'方向上包含DAP12、T2A接头和编码第一多肽的盒,所述第一多肽含有CD19scFV、截短的CD8α铰链结构域(CD8铰链2)、具有L1747K取代的Notch 1(Uniprot P46531氨基酸1736至1757,具有L1747K突变)、Notch 2近膜结构域和Gal4VP64转录调节因子。图2C显示了多链嵌合多肽(056D)的不同设计,所述多链嵌合多肽包含i)第一多肽,其含有CD19scFv结合结构域、TREM2铰链、具有带正电荷的第一修饰界面(包含L1747K取代)的Notch1第一TMD(Uniprot P46531氨基酸1736至1757,具有L1747K突变)、Notch2近膜结构域、Gal4VP64翻译调节因子;以及(ii)含有DAP12的第二多肽链。编码056D实施方案的核酸构建体(SEQ ID NO:5)在5'至3'方向上包含DAP12、T2A自身蛋白水解肽序列和编码CD19scFV-TREM2-具有L1747K取代的Notch1(Uniprot P46531氨基酸1736至1757,具有L1747K突变)-Gal4VP64第一多肽的盒。图2D显示了表示为056B的多链嵌合多肽,所述多链嵌合多肽包含i)第一多肽,其具有CD19scFv结合结构域、TREM2铰链、具有带正电荷的第一修饰界面的Notch1第一TMD(包含γ分泌酶活性位点)、Notch2近膜结构域、Gal4VP64翻译调节因子;以及(ii)含有DAP12的第二多肽链(056B)。编码056B实施方案的核酸构建体(SEQ ID NO:3)在5'至3'方向上包含DAP12、T2A自身蛋白水解肽序列和编码CD19scFV-TREM2-具有γ分泌酶活性位点的Notch1插入物-TREM2细胞内结构域序列-Gal4VP64第一多肽的盒。还显示了四种多链受体056、056C、056D和056B的表达水平的比较。在四种设计中,056C具有最强的转录活性。图2A-图2D中每一个中的底部图显示了通过抗myc标签染色测量的四种受体的相对表达(表示第二链(y轴))与通过GFP测量的报告构建体表达(x轴)的关系。具体地,用抗CD3/抗CD28Dynabeads(Gibco)激活原代人CD3+T细胞,并用一种慢病毒构建体(也可以使用两种,其中一种慢病毒编码多链嵌合多肽的第一多肽,并且第二种慢病毒编码多链嵌合多肽的第二多肽)转导。DAP12/TREM免疫受体(056)和DAP12/铰链Notch杂交体(056C)显示一些表达,而DAP12/TREM-Notch杂交体1(056D)和DAP12/TREM-Notch杂交体2(056B)不显示表达。

[0067] 图3A-图3C描绘了在图2A中描述的056与056C多链嵌合多肽之间的设计(图3A)、激活动力学(图3B)和杀伤活性(图3C)的比较。图3B显示了使用Fortessa X-50(BD Sciences)在表达抗CD19受体的T细胞中测量的诱导型BFP报告基因的受体转录激活,其中(i)没有另

外的细胞(上迹线),(ii)K562细胞(中迹线)或(iii)CD19+K562细胞(下迹线)。图3C还显示了056和056C受体的杀伤活性的比较。056C受体具有比056受体更高的转录活性,但不产生强杀伤应答。

[0068] 图4A-图4D说明了多链嵌合多肽(056、056E、056F和056G)的另外的设计。图4A显示了受体056,其与图2A中描述的相同,图4B描绘了多链嵌合多肽(056E)的设计,其中第二多肽包含DAP12和Gal4VP64转录调节因子,并且第一多肽包含CD19scFv配体结合结构域、TREM2跨膜结构域和细胞内结构域。056E受体由具有DAP12、与具有CD19scFV、TREM2跨膜结构域和细胞内结构域的盒连接(通过T2A接头)的Gal4VP64盒的核酸构建体编码。这种设计具有有限的相对表达。图4C描绘了根据本公开文本的多链嵌合多肽的实施方案(056F),其中第一多肽包含CD19scFV配体结合结构域、截短的CD8α铰链结构域(CD8铰链2)、具有V9K取代的聚缬氨酸TMD、Notch 2近膜结构域和Gal4VP64转录调节因子,并且第二多肽包含DAP12信号传导结构域。056F实施方案由在5'至3'方向上具有DAP12、接着T2A自身蛋白水解肽序列和盒的核酸构建体编码,所述盒包含a)截短的CD8α铰链结构域(CD8铰链2),b)具有V9K取代的聚缬氨酸TMD,c)Notch 2近膜结构域和d)Gal4VP64转录调节因子。图4D显示了类似于056F实施方案的实施方案(056G),不同之处在于后者含有具有V10K取代的聚缬氨酸TMD。与其他实施方案相比,具有聚缬氨酸TMD的056F和056G实施方案展现出增加的表达。

[0069] 图5A-图5D描绘了图4A-图4D中描述的多链多肽的实施方案056、056E、056F和056G的杀伤活性(靶标清除)和激活动力学的比较。实施方案056和056E未展现出强转录激活,但能够展现出靶细胞的杀伤活性。实施方案056F和056G显示强转录激活,但仅056F实现靶标杀伤。

[0070] 图6显示了使用pRay056F作为原型的多链受体模块工程化策略的示意图。

[0071] 图7显示了具有CD3z取代的多链受体功能的测试。

[0072] 图8显示了具有人转录因子的多链受体功能的测试。

[0073] 图9显示了采用使用双载体转导的模块工程化策略的多链受体的示意图。

[0074] 图10显示了每个多链受体对的表达谱。

[0075] 图11显示了增强杀伤和存活的多链受体的筛选。该图显示了ET比率为1:1时第5、12和20天的T细胞计数。

[0076] 图12显示了增强杀伤和存活的多链受体的筛选。该图显示了ET比率为1:2时第5、12和20天的T细胞计数。

[0077] 图13显示了增强杀伤和存活的多链受体的筛选。该图显示了ET比率为1:4时第5、12和20天的T细胞计数。

[0078] 图14显示了增强杀伤和存活的多链受体的筛选。该图显示了ET比率为1:1时第5、12和20天的K562细胞计数。

[0079] 图15显示了增强杀伤和存活的多链受体的筛选。该图显示了ET比率为1:2时第5、12和20天的K562细胞计数。

[0080] 图16显示了增强杀伤和存活的多链受体的筛选。该图显示了ET比率为1:4时第5、12和20天的K562细胞计数。

具体实施方式

[0081] 在嵌合多肽(例如,受体)领域中广为人知的是,当添加信号传导结构域时,与膜接近是重要的,并且对于结构域传导信号的好坏有影响。本公开文本提供了嵌合多肽/受体,其具有与本领域中通常已知的架构不同的架构,并且允许对信号传导基序所在的位置进行更多控制。本公开文本的嵌合多肽/受体与膜的关系比先前已知的更可控。

[0082] 因此,本公开文本尤其提供了多链嵌合多肽,其具有两个不同的多肽(链),使得转录因子位于第一多肽上且靠近膜,并且信号传导结构域位于第二多肽上。第一多肽和第二多肽可以缔合以允许在所选配体与多肽之一结合后以配体依赖性方式同时进行来自一条链的信号传导(例如,T细胞信号传导)的调节和来自另一条链的转录调节。

[0083] 特别地,本公开文本涉及具有不同多肽链的多链嵌合多肽,所述不同多肽链可以经由位于第一多肽和第二多肽的TMD内的残基在翻译后缔合。配体与第一多肽的细胞外配体结合结构域(ECD)的结合可以激活细胞信号传导和转录调节因子从第一多肽的切割释放。因此,切割的转录调节因子可以在没有任何其他融合的信号传导结构域的情况下发挥作用,反之亦然。

[0084] 在一些实施方案中,本文呈现的多链嵌合多肽可以具有以下独特架构,其中第一多肽可以包含(i)对所选配体具有结合亲和力(特异性)的细胞外配体结合结构域、(ii)具有第一修饰界面的第一TMD和(iii)具有转录调节因子的第一细胞内结构域。第二多肽可以包含(i)具有第二界面的第二TMD和(ii)具有信号传导结构域的第二细胞内结构域。第一多肽和第二多肽可以经由第一修饰界面和第二界面内的带电残基缔合。所选配体与细胞外配体结合结构域的结合可以同时诱导信号传导结构域的活性和转录调节因子的释放。

[0085] 本公开文本还提供了包括嵌合抗原受体和编码其的核酸构建体在内的组合物、用核酸构建体进行基因修饰的宿主细胞、用于调节免疫应答或细胞活性的药物组合物以及方法、用于诱导T细胞信号传导的方法和用于治疗各种健康状况如疾病(例如,癌症)的方法。

[0086] 本公开文本的多链嵌合多肽构成用于将T细胞工程化的平台,其不仅可以检测和激活对肿瘤的反应,而且还可以开启一种或多种转录程序,如产生各种生物制剂、细胞因子、炎性因子、调节性RNA等。本公开文本的多链嵌合多肽允许受体能力与定义的辅助功能偶联,所述辅助功能通常不通过现有技术的合成受体中构建的信号传导结构域编码或触发。因此,本公开文本的多链嵌合多肽可以实现拓宽的方法,以不同于迄今为止已知的方式正向修饰T细胞功能。本公开文本的多链嵌合多肽还可以用于递送有效载荷(如趋化因子),以募集不同的免疫细胞用于肿瘤控制,或通过转录因子或其他控制分化的因子等的表达引导T细胞分化为更有效的亚型。

[0087] 本公开文本的多链多肽的设计可以促进和实现先前仅将抗原识别与转录应答联系起来(即没有其他信号传导效应)的受体的更即时的信号传导能力。通过以本公开文本的多链形式掺入信号传导结构域,本领域技术人员可以有效地将辅助功能与转录应答偶联,并且响应于相同的抗原而同时激活二者。辅助功能可以包括例如破坏细胞(通过使用信号传导链上的免疫受体酪氨酸激活基序(ITAM)结构域)或通过使用共刺激结构域(如41BB、CD28共刺激结构域等)促进存活信号传导。

[0088] 在以下具体实施方式中,参考形成其一部分的附图。在附图中,除非上下文另外规定,否则类似的符号通常标识类似的组分。在具体实施方式、附图和权利要求中描述的说明

性替代方案并不意在是限制性的。可以使用其他替代方案,并且可以在不背离在此呈现的主题的精神或范围的情况下进行其他改变。将容易理解,如在本文总体上描述的以及在附图中图示的方面可以以各种各样的不同配置来布置、取代、组合和设计,所有这些都被明确地考虑并构成本申请的一部分。

I.定义

[0089] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术术语、符号和其他科学术语或用辞都旨在具有本公开文本所属领域的技术人员通常理解的含义。在一些情况下,为了清楚和/或为了便于参考而在本文中定义具有通常理解的含义的术语,并且在本文中包含此类定义不必被解释为表示与本领域通常所理解的有实质性差异。本文描述或提及的许多技术和程序是本领域技术人员很好理解的并且通常由本领域技术人员使用常规方法加以采用。

[0090] 除非上下文另外明确规定,否则单数形式“一个/一种(a)”、“一个/一种(an)”和“所述”包括复数指示物。例如,术语“一种细胞”包括一种或多种细胞,包括其混合物。在本文中使用“A和/或B”来包括所有以下替代形式:“A”、“B”、“A或B”以及“A和B”。

[0091] 在提供值范围的情况下,应理解,除非上下文另外明确规定,否则在该范围的上限值与下限值之间的每个中间值(至下限值的单位的十分之一)以及所陈述的范围内的任何其他陈述的或中间值都被涵盖在本公开文本内。这些较小范围的上限和下限可独立地包括在较小范围中,并且也涵盖在本公开文本内,属于陈述的范围内的任何明确排除的界限。当陈述的范围包括一个或两个界限时,排除那些包括的界限中的任一个或两个的范围也包括在本公开文本中。某些范围在本文中以前面带有术语“约”的数值呈现,如本文所用,术语“约”具有其大约的通常含义。使用术语“约”是为了对其后的精确数字以及接近或近似于所述术语后的数字提供文字支持。在确定数字是否接近或近似于具体列举的数字时,接近或近似的未列举的数字可以是在呈现它的上下文中提供具体列举的数字的基本等效形式的数字。如果根据上下文原本不清楚近似度,则“约”意指在所提供值的±10%内,或者四舍五入到最接近的有效数字,在所有情况下都包括所提供的值。在一些实施方案中,术语“约”指示指定值±至多10%、至多±5%或至多±1%。

[0092] 如本文所用,术语“施用(administration)”和“施用(administering)”是指通过施用途径递送生物活性组合物或配制品,所述施用途径包括但不限于口服、鼻内、透皮、静脉内、动脉内、肌内、结(节)内、腹膜内、皮下和肌内施用或其组合。所述术语包括但不限于由医学专业人员施用和自我施用。

[0093] 应理解,术语如“细胞”、“细胞培养物”和“细胞系”不仅指代特定的主题细胞、细胞培养物或细胞系,而且指代这样的细胞、细胞培养物或细胞系的后代或潜在后代,而不考虑培养中的转移或传代次数。应当理解,并非所有子代都与亲代细胞完全相同。这是因为某些修饰可能由于突变(例如,故意或无意的突变)或环境影响(例如,甲基化或其他表观遗传修饰)而在后代中发生,使得后代实际上可能与亲本细胞不同,但是仍然被包括在如本文所用的术语的范围内,只要后代保留与原始细胞、细胞培养物或细胞系的功能相同的功能即可。

[0094] 应该理解,本文描述的公开文本的方面和实施方案包括“包含”方面和实施方案、“由方面和实施方案组成”和“基本上由方面和实施方案组成”。如本文所用,“包含”与“包括”、“含有”或“其特征在于”同义,并且是包含性的或开放式的,并不排除另外的未列举的要素或方法步骤。如本文所用,“由……组成”排除不在所要求保护的组合物或方法中指定

的任何要素、步骤或成分。如本文所用,“基本上由……组成”不排除不实质上影响所要求保护的组合物或方法的基本和新型特征的材料或步骤。在本文中、特别是在组合物的组分的描述中或在方法的步骤的描述中对术语“包含”的任何表述都应理解为涵盖那些基本上由所列举的组分或步骤组成和由所列举的组分或步骤组成的组合物和方法。

[0095] 术语“癌症”是指具有致癌细胞典型特征(如不受控制的增殖、永生性、转移潜能、快速的生长和增殖速率,以及某些特征性的形态特征)的细胞的存在。一些类型的癌细胞可以聚集成块,如肿瘤,但是一些癌细胞可以单独存在于受试者体内。肿瘤可以是实体瘤、软组织肿瘤或转移病灶。如本文所用,术语“癌症”还涵盖其他类型的非肿瘤癌症。非限制性例子包括血癌或血液恶性肿瘤,如白血病、淋巴瘤和骨髓瘤。癌症可以包括恶变前癌症以及恶性癌症。

[0096] 术语“核酸”在本文中用于指DNA或RNA,或含有脱氧核苷酸和/或核糖核苷酸的分子。核酸可以是天然存在的或通过合成制备,因此包括天然存在的多核苷酸的类似物,其中一个或多个核苷酸是在天然存在的核苷酸的基础上进行修饰。

[0097] 如本文所用,术语“可操作地连接”表示两个或更多个元件(例如,多肽序列或多核苷酸序列)之间的物理或功能连接,其允许它们以它们预期的方式操作。

[0098] 在两个或更多个核酸序列或蛋白质的上下文中,如本文所用的术语“同一性百分比”是指两个或更多个序列或子序列相同或具有指定百分比的相同核苷酸或氨基酸(例如,当在比较窗口或指定区域上比较和比对以获得最大对应时,在指定区域上的约50%序列同一性或更高,例如约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或更高同一性),如使用例如采用下文所述的默认参数的美国国家生物技术中心(NCBI)BLAST或BLAST 2.0序列比较算法或通过手动比对和目视检查所测量的。然后此类序列被称为“基本上相同”。此定义也涉及或可以应用于序列的互补体。此定义还包括具有缺失和/或添加的序列以及具有取代的那些序列。可以使用已公布的技术和公众可用的计算机程序来计算序列同一性,所述计算机程序如GCS程序包(Devereux等人,Nucleic Acids Res.12:387,1984)、BLASTP、BLASTN、FASTA(Atschul等人,J Mol Biol 215:403,1990)(通过引用以其整体并入本文)。可以使用序列分析软件采用其默认参数来测量序列同一性,所述序列分析软件如威斯康星大学生物技术中心(University of Wisconsin Biotechnology Center)(大学大道1710号,威斯康星州麦迪逊,53705)的遗传学计算机组(Genetics Computer Group)的序列分析软件包。例如,与参考序列“基本上相同”的氨基酸序列与参考氨基酸序列具有至少约60%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%(包括其间的所有值)的序列同一性(包括其间的所有值)。对于多肽,比较序列的长度将通常为至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少25、至少50、至少75、至少90、至少100、至少150、至少200、至少250、至少300或至少350个连续氨基酸(例如,全长序列)(包括其间的所有值)。对于核酸,比较序列的长度将通常为至少5、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24或25个连续核苷酸(例如,全长核苷酸序列)(包括其间的所有值)。

[0099] 如本文所用,“受试者”或“个体”包括动物,如人(例如,人类个体)和非人动物。在

一些实施方案中,“受试者”或“个体”是在医生的护理下的患者。因此,受试者可以是患有、有风险患上或怀疑患有目的疾病(例如,癌症)和/或疾病的一种或多种症状的人类患者或个体。受试者也可以是在诊断时或之后被诊断为有目的病症的风险的个体。术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如哺乳动物(例如,啮齿动物,例如小鼠)和非哺乳动物,如非人灵长类动物,例如绵羊、狗、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。

[0100] 当关于核酸使用时,术语“重组”意指核酸已经通过人为干预改变或产生,例如像,已经通过实验室方法修饰或是实验室方法的结果。因此,例如,重组核酸包含病毒基因组和通过实验室方法产生的核酸。由重组构建体产生的重组蛋白或重组多肽可以包含在天然(非重组或野生型)形式的蛋白质中未发现的氨基酸残基,或可以包含已被修饰(例如,标记)的氨基酸残基。所述术语可以包括对肽、蛋白质或核酸序列的任何修饰。此类修饰可以包括以下:肽、蛋白质或核酸序列的任何化学修饰,包括一个或多个氨基酸、脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸的化学修饰;在肽或蛋白质中一个或多个氨基酸的添加、缺失和/或取代;融合蛋白(例如,包含抗体片段的融合蛋白)的产生;以及在核酸序列中一个或多个核酸的添加、缺失和/或取代。

[0101] 如本文所用,术语“重组”多肽是指已经通过人为干预改变的多肽。作为非限制性例子,工程化多肽可以是这样的多肽:1)其已经体外合成或修饰,例如,使用化学或酶技术;2)其包含在自然界中不连接的连接的多肽序列;3)其已经使用分子克隆技术工程化,使得其相对于天然存在的多肽序列缺少一个或多个氨基酸;和/或4)其已经使用分子克隆技术操作,使得其相对于天然存在的多肽具有一个或多个序列变化或重排。

[0102] 如本领域普通技术人员将理解的,出于任何和所有目的,如就提供书面描述而言,本文公开的所有范围还涵盖任何和所有可能的子范围及其子范围的组合。任何所列范围都可识别为充分描述相同范围并且使得相同范围能分解为至少相等的二分之一、三分之一、四分之一、五分之一、十分之一等。作为非限制性例子,本文中论述的每个范围可容易地分解为下三分之一、中三分之一和上三分之一等。同样如本领域技术人员可理解,所有诸如“高达”、“至少”、“大于”、“小于”等言辞都包括所述数字并且涉及随后可分解为如上所述的子范围的范围。最后,如本领域技术人员应理解,范围包括每个单独的成员。因此,例如,具有1-3个物品的组是指具有1、2或3个物品的组。类似地,具有1-5个物品的组是指具有1、2、3、4或5个物品的组,等等。

[0103] 应了解,为明确起见在单独实施方案的上下文中描述的本公开文本的某些特征也可在单个实施方案中组合提供。相反,为简洁起见在单个实施方案的上下文中描述的本公开文本的各种特征也可单独地或以任何合适的子组合提供。属于本公开文本的实施方案的所有组合确切地涵盖在本公开文本中并且在本文中公开如同每个和每一种组合均单独地和明确地公开一样。此外,各种实施方案及其要素的所有子组合也确切地涵盖在本公开文本中并且在本文中公开如同每个和每一种这样的子组合均单独地和明确地在本文中公开一样。

[0104] 尽管本公开文本的各种特征可以在单个实施方案的上下文中描述,但所述特征也可以单独地或以任何合适的组合提供。相反,尽管为了清楚起见,本文可以在单独的实施方案的上下文中描述本公开文本,但本公开文本也可以在单个实施方案中实现。

II.组合物

A.多链嵌合多肽

[0105] 本公开文本尤其提供了包含两条多肽链的多链嵌合多肽。多链多肽可以是由两个或更多个离散的多肽元件(即,“链”)组成的功能性多肽,所述多肽元件通过分子缔合而非通过肽键合共价或非共价连接在一起。多链多肽的链可以在结构上不同。多链多肽的链可以在功能上不同。本公开文本提供了多链嵌合多肽,其中一个多肽(第一多肽)包含(i)对所选配体具有结合亲和力的细胞外配体结合结构域、(ii)第一TMD和(iii)具有转录调节因子的第一细胞内结构域。另一多肽(第二多肽)包含(i)TMD和(ii)具有信号传导结构域的细胞内结构域。第一多肽通过配体与细胞外配体结合结构域的结合而激活,此后导致转录调节因子从第一多肽释放以及经由第二多肽上的信号传导结构域的细胞信号传导。这两个多肽例如通过TMD中带相反电荷的残基缔合在一起。

[0106] 本文公开的多链嵌合多肽可以充当受体并在某些细胞和环境背景下促进细胞信号传导或细胞途径的扩大的激活。此类受体活性可以用于通过被工程化/转导以表达本公开文本的多链嵌合多肽或受体的细胞来增强和调节治疗性有效载荷的产生。

[0107] 因此,在一个方面,本文提供了多链嵌合多肽,所述多链嵌合多肽包含(a)第一多肽,所述第一多肽包含(i)对所选配体具有结合亲和力的细胞外配体结合结构域、(ii)含有第一修饰界面的TMD和(iii)含有转录调节因子的第一细胞内结构域;以及(b)第二多肽,所述第二多肽包含(i)含有第二界面的第二TMD和(ii)含有信号传导结构域的第二细胞内结构域;其中第一修饰界面和第二修饰界面各自包含具有相反电荷的氨基酸残基,使得第一多肽与第二多肽经由第一修饰界面和第二界面偶联,并且其中所选配体与细胞外配体结合结构域的结合诱导信号传导结构域的活性和转录调节因子的释放。在本公开文本的多链嵌合多肽的一些实施方案中,第一修饰界面包含带正电荷的残基,第二界面包含带负电荷的残基,并且第一多肽与第二多肽经由第一修饰界面与第二修饰界面之间的静电力偶联。

[0108] 在另一个方面,本文提供了多链嵌合多肽,所述多链嵌合多肽在所选配体与本公开文本的多链嵌合多肽的第一多肽的细胞外配体结合结构域结合后能够实现同时转录调节和细胞激活(例如,T细胞激活)。

[0109] 在一些实施方案中,本公开文本的多链嵌合多肽可以是免疫受体。在一些实施方案中,免疫受体是嵌合抗原受体(CAR)。

1.第一多肽

[0110] 本公开文本的多链多肽包含第一嵌合多肽,其含有对所选配体具有结合亲和力的细胞外配体结合结构域(部分)、具有第一修饰界面的第一TMD、第一细胞内结构域和一种或多种转录调节因子。如本文所述,“界面”是指第一多肽的跨膜结构域内的朝外残基,其与另一多肽的跨膜结构域内的朝外残基相互作用。在一些实施方案中,第一多肽的跨膜结构域内的朝外残基形成带电表面,其用于与显示带相反电荷的表面的来自单独蛋白质的配偶体界面相互作用。

[0111] 在一些实施方案中,本公开文本的第一多肽按从N末端到C末端的顺序包含(i)细胞外配体结合结构域、(ii)第一TMD和(iii)第一TMD。

[0112] 在一些实施方案中,本公开文本的第一多肽包含与SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:10或其功能变体具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

a.细胞外配体结合结构域(ECD)

[0113] 在一些实施方案中,本文公开的多链嵌合多肽的第一多肽的细胞外结构域(ECD)对一种或多种靶配体具有结合亲和力。靶配体可以在细胞表面上表达,或以其他方式锚定、固定或限制,从而它可以对嵌合受体施加机械力。这样,不受任何特定理论的束缚,本文提供的多链嵌合多肽的第一多肽的ECD与细胞表面配体的结合不一定从靶细胞表面去除靶配体,而是对嵌合受体产生机械拉力。例如,如果其他可溶性配体结合至表面或细胞外基质中的分子,则所述其他可溶性配体可以被靶向。

[0114] 在一些实施方案中,靶配体是细胞表面配体。合适的配体类型的非限制性例子包括细胞表面受体;粘附蛋白;表面结合的碳水化合物、脂质、糖脂、脂蛋白和脂多糖;整合素;粘蛋白;以及凝集素。在一些实施方案中,配体是蛋白质。在一些实施方案中,配体包括肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原。在一些实施方案中,配体是分化群配体(CD)并且包括但不限于CD1、CD1a、CD1b、CD1c、CD1d、CD1e、CD2、CD3d、CD3e、CD3g、CD4、CD5、CD7、CD8a、CD8b、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD27、CD28、CD33、CD34、CD40、CD45、CD48、CD52、CD59、CD66、CD70、CD71、CD72、CD73、CD79A、CD79B、CD80(B7.1)、CD86(B7.2)、CD94、CD95、CD134、CD140(PDGFR4)、CD152、CD154、CD158、CD178、CD181(CXCR1)、CD182(CXCR2)、CD183(CXCR3)、CD210、CD246、CD252、CD253、CD261、CD262、CD273(PD-L2)、CD274(PD-L1)、CD276(B7H3)、CD279、CD295、CD339(JAG1)、CD340(HER2)、EGFR、FGFR2、CEA、AFP、CA125、MUC-1、MAGE、胎盘碱性磷酸酶样蛋白2(ALPPL2)、B细胞成熟抗原(BCMA)、绿色荧光蛋白(GFP)、增强型绿色荧光蛋白(eGFP)或信号调节蛋白a(SIRPα)。

[0115] 在一些实施方案中,本公开文本的多链嵌合多肽的第一多肽的细胞外结构域包括抗原结合部分。在一些实施方案中,抗原结合部分可以结合细胞表面上的配体。在一些实施方案中,抗原结合部分可以结合一个或多个靶标。在一些实施方案中,抗原结合部分包括抗体或其功能性抗原结合片段的一种或多种抗原结合决定簇。本领域技术人员在阅读本公开文本后将容易理解的是,术语“其功能片段”或“其功能变体”是指与片段或变体所来源的野生型分子具有共同的定量和/或定性生物活性的分子。例如,抗体的功能片段或功能变体是保留与功能片段或功能变体所来源的抗体基本上相同的与相同表位结合的能力的功能片段或功能变体。例如,能够与细胞表面受体的表位结合的抗体可以在N末端和/或C末端处截短,并且可以使用本领域技术人员已知的测定评估其表位结合活性的保留。抗原结合部分可以是但不限于抗体、纳米抗体、双抗体、三抗体、微型抗体、$F(ab')_2$片段、F(ab)、单链可变片段(scFv)、单结构域抗体(sdAb)及其任何功能片段。

[0116] 抗原结合部分可以包含天然存在的氨基酸序列或者可以被工程化、设计或修饰以提供期望的和/或改善的特性,例如结合亲和力。通常,抗原结合部分(例如,抗体)对靶抗原(例如,CD19抗原)的结合亲和力可以通过Frankel等人,Mol.Immunol,16:101-06,1979描述的斯卡查德(Scatchard)方法计算。在一些实施方案中,通过抗原/抗体解离速率来测量结合亲和力。在一些实施方案中,通过竞争放射免疫测定来测量结合亲和力。在一些实施方案中,通过ELISA来测量结合亲和力。在一些实施方案中,通过流式细胞术来测量抗体亲和力。

[0117] “选择性结合”抗原(如CD19)的抗体是基本上不结合其他抗原但以高亲和力,例如以如下平衡常数(KD)结合所述抗原的抗原结合部分:100nM或更小,如60nM或更小,例如30nM或更小,如15nM或更小、或10nM或更小、或5nM或更小、或1nM或更小、或500pM或更小、或

400pM或更小、或300pM或更小、或200pM或更小、或100pM或更小。

[0118] 技术人员可以基于被基因修饰以表达本公开文本的多链嵌合多肽或第一多肽的细胞的期望定位或功能来选择ECD。例如,具有包括对HER2抗原具有特异性的抗体的ECD的第一多肽可以将细胞靶向表达HER2的乳腺癌细胞。在一些实施方案中,所公开的第一多肽的ECD能够结合肿瘤相关抗原(TAA)或肿瘤特异性抗原(TSA)。熟练技术人员将理解的是,TAA包括存在于肿瘤细胞和正常细胞上或许多正常细胞上但浓度远低于在肿瘤细胞上的浓度的分子,例如蛋白质。相比之下,TSA通常包括存在于肿瘤细胞上但不存在于正常细胞上的分子,例如蛋白质。

[0119] 在一些情况下,抗原结合部分对存在于由肿瘤细胞表达的抗原(即,肿瘤相关抗原)中的表位具有特异性。肿瘤相关抗原可以是与例如以下相关的抗原:乳腺癌细胞、B细胞淋巴瘤、胰腺癌、霍奇金淋巴瘤细胞、卵巢癌细胞、前列腺癌细胞、间皮瘤、肺癌细胞、非霍奇金B细胞淋巴瘤(B-NHL)细胞、卵巢癌细胞、前列腺癌细胞、间皮瘤细胞、黑色素瘤细胞、慢性淋巴细胞性白血病细胞、急性淋巴细胞性白血病细胞、神经母细胞瘤细胞、神经胶质瘤、胶质母细胞瘤、结直肠癌细胞等。还将理解,肿瘤相关抗原也可以由非癌细胞表达。在一些实施方案中,抗原结合结构域对存在于组织特异性抗原中的表位具有特异性。在一些实施方案中,抗原结合结构域对存在于疾病相关抗原中的表位具有特异性。

[0120] 合适的靶抗原的非限制性例子包括CD19、B7H3(CD276)、BCMA(CD269)、胎盘碱性磷酸酶样蛋白2(ALPPL2)、绿色荧光蛋白(GFP)、增强型绿色荧光蛋白(EGFP)、信号调节蛋白α(SIRPα)、CD123、CD171、CD179α、CD20、CD213A2、CD22、CD24、CD246、CD272、CD30、CD33、CD38、CD44v6、CD46、CD71、CD97、CEA、CLDN6、CLECL1、CS-1、EGFR、EGFRvIII、ELF2M、EpCAM、EphA2、肝配蛋白B2、FAP、FLT3、GD2、GD3、GM3、GPRC5D、HER2(ERBB2/neu)、IGLL1、IL-11Rα、KIT(CD117)、MUC1、NCAM、PAP、PDGFR-β、PRSS21、PSCA、PSMA、ROR1、SSEA-4、TAG72、TEM1/CD248、TEM7R、TSHR、VEGFR2、ALPI、瓜氨酸化波形蛋白、cMet和Axl。

[0121] 在一些实施方案中,靶抗原选自CD19、B7H3(CD276)、BCMA(CD269)、ALPPL2、CD123、CD171、CD179α、CD20、CD213A2、CD22、CD24、CD246、CD272、CD30、CD33、CD38、CD44v6、CD46、CD71、CD97、CEA、CLDN6、CLECL1、CS-1、EGFR、EGFRvIII、ELF2M、EpCAM、EphA2、肝配蛋白B2、FAP、FLT3、GD2、GD3、GM3、GPRC5D、HER2(ERBB2/neu)、IGLL1、IL-11Ra、KIT(CD117)、MUC1、NCAM、PAP、PDGFR-β、PRSS21、PSCA、PSMA、ROR1、SSEA-4、TAG72、TEM1/CD248、TEM7R、TSHR、VEGFR2、ALPI、瓜氨酸化波形蛋白、cMet、Axl、GPC2、人表皮生长因子受体2(Her2/neu)、CD276(B7H3)、IL-13Rα1、IL-13Rα2、甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)、癌抗原-125(CA-125)、CA19-9、钙视网膜蛋白、MUC-1、上皮膜蛋白(EMA)、上皮肿瘤抗原(ETA)、酪氨酸酶、黑色素瘤相关抗原(MAGE)、CD34、CD45、CD123、CD93、CD99、CD117、嗜铬粒蛋白、细胞角蛋白、结蛋白、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、巨囊性病液体蛋白(GCDFP-15)、ALK、DLK1、FAP、NY-ESO、WT1、HMB-45抗原、蛋白黑色素-A(T淋巴细胞识别的黑色素瘤抗原;MART-1)、myo-D1、肌特异性肌动蛋白(MSA)、神经丝、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、胎盘碱性磷酸酶、突触小泡蛋白、甲状腺球蛋白、甲状腺转录因子-1、AOC3(VAP-1)、CAM-3001、CCL11(嗜酸性粒细胞趋化因子-1)、CD125、CD147(基础免疫球蛋白)、CD154(CD40L)、CD2、CD20、CD23(IgE受体)、CD25(异二聚IL-2受体的亚基)、CD3、CD4、CD5、IFN-α、IFN-γ、IgE、IgE Fc区、IL-1、IL-12、IL-23、IL-13、IL-17、IL-17A、IL-22、IL-4、IL-5、IL-5、IL-6、IL-6受体、整合素α4、整合素α4β7、LFA-1

(CD11α)、肌生成抑制蛋白、OX-40、骨硬化蛋白(scleroscin)、SOST、TGFβ1、TNF-α、VEGF-A、丙酮酸激酶同工酶M2型(肿瘤M2-PK)、CD20、CD5、CD7、CD3、TRBC1、TRBC2、BCMA、CD38、CD123、CD93、CD34、CD1a、SLAMF7/CS1、FLT3、CD33、CD123、TALLA-1、CSPG4、DLL3、κ轻链、λ轻链、CD16/Fc γ RIII、CD64、FITC、CD22、CD27、CD30、CD70、GD2(神经节苷脂G2)、GD3、EGFRvIII(表皮生长因子变体III)、EGFR及其同种变体、TEM-8、精子蛋白17(Sp17)、间皮素。

[0122] 合适抗原的另外的非限制性例子包括PAP(前列腺酸性磷酸酶)、前列腺干细胞抗原(PSCA)、prostein、NKG2D、TARP(T细胞受体γ可变阅读框蛋白)、Trp-p8、STEAP1(前列腺六跨膜上皮抗原1)、异常ras蛋白、异常p53蛋白、整合素β3(CD61)、催乳素、K-Ras(V-Ki-ras2柯尔斯顿大鼠肉瘤病毒癌基因)、Ral-B、GPC2、CD276(B7H3)或IL-13Rα。在一些实施方案中,抗原是Her2。在一些实施方案中,抗原是ALPPL2。在一些实施方案中,抗原是BCMA。在一些实施方案中,ECD的抗原结合部分对报告蛋白如GFP和eGFP具有特异性。这样的抗原结合部分的非限制性例子包括LaG17抗GFP纳米抗体。在一些实施方案中,ECD的抗原结合部分包括抗BCMA完全人源化VH结构域(FHVH)。在一些实施方案中,抗原是信号调节蛋白α(SIRPα)。

[0123] 适合于由本文所公开的第一嵌合多肽和多链CAR靶向的另外的抗原包括但不限于GPC2、人表皮生长因子受体2(Her2/neu)、CD276(B7H3)、IL-13Rα1、IL-13Rα2、甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)、癌症抗原-125(CA-125)、CA19-9、钙视网膜蛋白、MUC-1、上皮膜蛋白(EMA)、上皮肿瘤抗原(ETA)。其他合适的靶抗原包括但不限于酪氨酸酶、黑色素瘤相关抗原(MAGE)、CD34、CD45、CD123、CD93、CD99、CD117、嗜铬粒蛋白、细胞角蛋白、结蛋白、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、巨囊性病液体蛋白(GCDFP-15)、ALK、DLK1、FAP、NY-ESO、WT1、HMB-45抗原、蛋白质黑色素-A(T淋巴细胞识别的黑色素瘤抗原;MART-1)、myo-D1、肌特异性肌动蛋白(MSA)、神经丝、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、胎盘碱性磷酸酶、突触小泡蛋白、甲状腺球蛋白、甲状腺转录因子-1。

[0124] 适合于由本文公开的多肽靶向的另外的抗原包括但不限于与炎性疾病相关的那些,如AOC3(VAP-1)、CAM-3001、CCL11(嗜酸性粒细胞趋化因子-1)、CD125、CD147(基础免疫球蛋白)、CD154(CD40L)、CD2、CD20、CD23(IgE受体)、CD25(IL-2受体的异聚体的亚单位)、CD3、CD4、CD5、IFN-α、IFN-γ、IgE、IgE Fc区、IL-1、IL-12、IL-23、IL-13、IL-17、IL-17A、IL-22、IL-4、IL-5、IL-5、IL-6、IL-6受体、整合素α4、整合素α4β7、LFA-1(CD11α)、肌生成抑制蛋白、OX-40、骨硬化蛋白、SOST、TGFβ1、TNF-α和VEGF-A。

[0125] 适合于由本文所公开的第一嵌合多肽和多链CAR靶向的其他抗原包括但不限于丙酮酸激酶同工酶M2型(肿瘤M2-PK)、CD20、CD5、CD7、CD3、TRBC1、TRBC2、BCMA、CD38、CD123、CD93、CD34、CD1a、SLAMF7/CS1、FLT3、CD33、CD123、TALLA-1、CSPG4、DLL3、κ轻链、λ轻链、CD16/Fc γ RIII、CD64、FITC、CD22、CD27、CD30、CD70、GD2(神经节苷脂G2)、GD3、EGFRvIII(表皮生长因子变体III)、EGFR及其同种变体、TEM-8、精子蛋白17(Sp17)、间皮素。合适抗原的另外的非限制性例子包括PAP(前列腺酸性磷酸酶)、前列腺干细胞抗原(PSCA)、prostein、NKG2D、TARP(T细胞受体γ可变阅读框蛋白)、Trp-p8、STEAP1(前列腺六跨膜上皮抗原1)、异常ras蛋白、异常p53蛋白、整合素β3(CD61)、催乳素、K-Ras(V-Ki-ras2柯尔斯顿大鼠肉瘤病毒癌基因)和Ral-B。在一些实施方案中,抗原是GPC2、CD19、Her2/neu、CD276(B7H3)、IL-13Rα1或IL-13Rα2。在一些实施方案中,抗原是Her2。在一些实施方案中,抗原是ALPPL2。在一些

实施方案中,抗原是BCMA。在一些实施方案中,ECD的抗原结合部分对报告蛋白如GFP和eGFP具有特异性。这样的抗原结合部分的非限制性例子包括LaG17抗GFP纳米抗体。在一些实施方案中,ECD的抗原结合部分包括抗BCMA完全人源化VH结构域(FHVH)。

[0126] 在一些实施方案中,抗原可以是由HER2阳性乳腺癌细胞产生的HER2。在一些实施方案中,抗原可以是在B细胞白血病上表达的CD19。在一些实施方案中,抗原可以是在多形性胶质母细胞瘤(GBM)上表达但在健康CNS组织上表达少得多的EGFR。在一些实施方案中,抗原可以是与成人癌症例如结肠癌相关的CEA。

[0127] 在一些实施方案中,ECD的抗原结合部分对细胞表面靶标具有特异性,其中细胞表面靶标的非限制性例子包括CD19、CD30、Her2、CD22、ENPP3、EGFR、CD20、CD52、CD11α和α-整合素。在一些实施方案中,本文公开的嵌合第一多肽和多链CAR包含具有抗原结合部分的胞外结构域,所述抗原结合部分结合CD19、CEA、HER2、MUC1、CD20、ALPPL2、BCMA或EGFR。在一些实施方案中,本文所提供的多链CAR包含含有结合CD19的抗原结合部分的细胞外结构域。在一些实施方案中,本文所提供的嵌合第一多肽包含含有结合ALPPL2的抗原结合部分的细胞外结构域。在一些实施方案中,本文所提供的嵌合第一多肽包含含有结合BCMA的抗原结合部分的细胞外结构域。在一些实施方案中,嵌合第一多肽包含含有结合Her2的抗原结合部分的细胞外结构域。

[0128] 在一些实施方案中,适合于由本文公开的嵌合第一多肽靶向的抗原包括源自病原体的配体。

b.ECD与第一跨膜结构域(TMD)之间的连接序列

[0129] 本公开文本的多链嵌合多肽和受体可以包含设置在ECD与TMD之间的连接序列。连接序列可以是天然的或合成的多肽。连接序列可以是柔性连接头,其提供结构柔性和与侧翼多肽区域的间隔。连接序列可以是在N末端插入TMD的铰链结构域。在一些实施方案中,铰链结构域是CD8铰链结构域。在一些实施方案中,CD8铰链结构域是截短的CD8α铰链结构域。在一些实施方案中,截短的CD8α由与SEQ ID NO:17具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的氨基酸序列编码。在一些实施方案中,截短的CD8α包含含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一些实施方案中,截短的CD8α由SEQ ID NO:17编码。

[0130] 适合于本公开文本的组合物和方法的铰链多肽序列可以是天然存在的铰链多肽序列(例如,来自天然存在的免疫球蛋白的那些)。可替代地,铰链多肽序列可以是对应于天然存在的铰链多肽序列的合成序列,或者可以是完全合成的铰链序列,或者可以被工程化、设计或修饰为提供期望的和/或改进的特性,例如调节转录。合适的铰链多肽序列包括但不限于源自IgA、IgD和IgG亚类的那些,如IgG1铰链结构域、IgG2铰链结构域、IgG3铰链结构域和IgG4铰链结构域或其功能变体。在一些实施方案中,铰链多肽序列含有一个或多个CXXC基序。在一些实施方案中,铰链多肽序列含有一个或多个CPPC基序。关于这一点的另外信息可以在例如Vidarsson G等人,Frontiers Immunol.2014年10月20日的近期综述中找到,所述文献特此通过引用以其整体并入。

[0131] 因此,在一些实施方案中,铰链结构域包含源自IgG1铰链结构域或其功能变体的铰链多肽序列。在一些实施方案中,铰链结构域包含源自IgG2铰链结构域或其功能变体的铰链多肽序列。在一些实施方案中,铰链结构域包含源自IgG3铰链结构域或其功能变体的

铰链多肽序列。在一些实施方案中,铰链结构域包含源自IgG4铰链结构域或其功能变体的铰链多肽序列。在一些实施方案中,铰链结构域包含源自IgA铰链结构域或其功能变体的铰链多肽序列。在一些实施方案中,铰链结构域包含源自IgD铰链结构域或其功能变体的铰链多肽序列。

[0132] 适合于本文公开的组合物和方法的另外的铰链多肽序列包括但不限于源自CD8α铰链结构域、CD28铰链结构域、CD152铰链结构域、PD-1铰链结构域、CTLA4铰链结构域、OX40铰链结构域、Fc γ RIIIα铰链结构域及其功能变体的铰链多肽序列。在一些实施方案中,铰链结构域包含源自CD8α铰链结构域或其功能变体的铰链多肽序列。在一些实施方案中,铰链结构域包含源自CD28铰链结构域或其功能变体的铰链多肽序列。在一些实施方案中,铰链结构域包含源自OX40铰链结构域或其功能变体的铰链多肽序列。在一些实施方案中,铰链结构域包含源自IgG4铰链结构域或其功能变体的铰链多肽序列。

[0133] 原则上,除了铰链结构域应赋予柔性之外,对其长度和/或氨基酸组成没有特别限制。然而,本领域技术人员将容易地理解,可以优化铰链多肽序列的长度和氨基酸组成以改变ECD和TMD相对于彼此的取向和/或接近性,以及第一多肽和第二多肽相对于彼此的取向和/或接近性,以实现本公开文本的嵌合多链多肽的期望活性。在一些实施方案中,包含约一至100个氨基酸残基(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个等的氨基酸残基)的任何任意单链肽可以用作铰链结构域。在一些实施方案中,铰链结构域包含约5至50、约10至60、约20至70、约30至80、约40至90、约50至100、约60至80、约70至100、约30至60、约20至80、约30至90个氨基酸残基。在一些实施方案中,铰链结构域包含约1至10、约5至15、约10至20、约15至25、约20至40、约30至50、约40至60、约50至70个氨基酸残基。在一些实施方案中,铰链结构域包含约40至70、约50至80、约60至80、约70至90、或约80至100个氨基酸残基。在一些实施方案中,铰链结构域包含约1至10、约5至15、约10至20、约15至25个氨基酸残基。在一些实施方案中,铰链结构域包含与SEQ ID NO:17具有至少80%序列同一性(如至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或99%序列同一性)的序列。

c.第一跨膜结构域

[0134] 本公开文本的多链嵌合多肽包含位于第一多肽中的跨膜结构域(例如,第一TMD)。在本公开文本的第一多肽的一些实施方案中,第一TMD是完全合成的。在一些实施方案中,第一TMD包含连续缬氨酸残基段。在一些实施方案中,连续缬氨酸残基段包含5至25个缬氨酸残基。在一些实施方案中,第一TMD包含连续5至25个缬氨酸残基段。在一些实施方案中,第一TMD包含连续5、或6、或7、或8、或9、或10、或11、或12、或13、或14、或15、或16、或17、或18、或19、或20、或21、或22、或23、或24、或25个缬氨酸残基段。具有连续缬氨酸残基段的第一TMD(称为聚V TMD)的例子示于图4C和图4D中,其分别描绘了本公开文本的多链嵌合多肽的实施方案056F和056G。

[0135] 在一些实施方案中,第一TMD包含带正电荷的残基。在一些实施方案中,带正电荷的残基是赖氨酸或精氨酸。在一些实施方案中,带正电荷的残基在连续缬氨酸残基段内。在一些实施方案中,带正电荷的残基位于自N末端的第一个缬氨酸残基之后。在一些实施方案中,带正电荷的残基位于自N末端的第二、或第三、或第四、或第五、或第六、或第七、或第八、或第九、或第十、或第十一、或第十二、或第十三、或第十四、或第十五、或第十六、或第十七、

或第十八、或第十九、或第二十、或第二十一、或第二十二、或第二十三个缬氨酸残基之后。在一些实施方案中,赖氨酸或精氨酸残基代替自N末端的第六、或第七、或第八、或第九、或第十、或第十一、或第十二个缬氨酸残基。在一些实施方案中,第一多肽的TMD包含与SEQ ID NO:18具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施方案中,TMD是SEQ ID NO:18。在一些实施方案中,赖氨酸或精氨酸残基是SEQ ID NO:18的残基编号8或残基编号9或残基编号10或残基编号11,或在对应于SEQ ID NO:18的残基编号8或残基编号9或残基编号10或残基编号11的位置。

[0136] 本公开文本的多链嵌合多肽的第一TMD可以包括来自Notch受体的TMD。在一些实施方案中,TMD包括Notch 1受体(图2B-图2D描绘了本公开文本的多链嵌合多肽的实施方案056C、056D和056B)。在一些实施方案中,Notch 1受体是人Notch 1受体。

[0137] 第一TMD可以包含一个或多个配体诱导型蛋白水解切割位点。Notch受体(例如,S2或S3)中的配体诱导型蛋白水解切割位点的例子描述于美国专利号11,202,801中,将所述专利通过引用以其整体并入本文。在一些实施方案中,配体诱导型蛋白水解切割位点可被γ分泌酶(一种多蛋白质酶复合物)切割,如在例如实施方案056B(图2D)中所述。

[0138] 本公开文本的多链嵌合多肽的第一多肽可以包含近膜结构域(JMD)。JMD可以位于TMD的C末端。JMD可以包含高电荷结构域。在一些实施方案中,JMD是Notch 2JMD。

[0139] 原则上,对JMD的长度和/或氨基酸组成没有特别限制。包含约4至约40个氨基酸残基(例如,4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个等的氨基酸残基)的任何任意单链肽可以用作JMD。在一些实施方案中,JMD包含约4至15、约6至20、约8至25、约10至30、约12至35、约14至40、约5至40、约10至35、约15至30、约20至25、约20至40、约10至30、约4至20、或约5至25个氨基酸残基。在一些实施方案中,JMD包含约4至10、约5至12、约6至14、约7至18、约8至20、约9至22、约10至24、或约11至26个氨基酸残基。在一些实施方案中,JMD包含约4至10个残基,如4、5、6、7、8、9或10个氨基酸残基。

[0140] 在一些实施方案中,近膜结构域是多元结构域。在一些实施方案中,多元结构域包括Notch-1或Notch-2。在一些实施方案中,多元结构域包含这样的氨基酸序列,其中大部分(即,至少55%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%)残基是赖氨酸和/或精氨酸和/或组氨酸和/或其任何组合。

[0141] JMD可以包含与来自Notch1、Notch2、Notch3、Notch4、CLSTN1、CLSTN2、CSF1R、CXCL16、DAG1、GHR、PTPRF、AGER、KL、NRG1、LRP1B、Jag2、EPCAM、KCNE3、CDH2、CDH5、NRG2、PTPRK、BTC、EPHA3、EPHA4、IL1R2或PTPRM序列具有至少70%序列同一性,如至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或99%序列同一性的序列。在一些实施方案中,JMD包含在前4个残基中仅具有Lys(K)或Arg(R)的序列。在一些实施方案中,JMD包含一个、两个、三个、四个、五个或更多个碱性残基。在一些实施方案中,JMD包含五个、四个、三个、两个、一个或零个芳族残基或具有疏水和/或庞大侧链的残基。

d.第一细胞内结构域和转录调节因子

[0142] 本公开文本的多链嵌合多肽的第一多肽的细胞内结构域可以包含转录调节因子。本公开文本的转录调节因子可以是如下多肽元件,所述多肽元件用以激活或抑制启动子驱

动的DNA序列的转录。适合于本公开文本的组合物和方法的转录调节因子可以是天然存在的转录调节因子或者可以被工程化、设计或修饰以提供期望的和/或改进的特性,例如,调节转录。如上所讨论,本公开文本的工程化受体的优点在于,它们可以提供在工程化细胞中触发定制转录程序的能力。在一些实施方案中,本公开文本的转录调节因子是驱动在工程化细胞中仅出现一次的特定序列的转录的定制转录调节因子。在一些实施方案中,本公开文本的转录调节因子包括人或人源化序列。

[0143] 在一些实施方案中,转录调节因子直接调节细胞的分化。在一些实施方案中,转录调节因子通过调节第二转录因子的表达来间接调节(例如,调节)细胞的分化。本领域普通技术人员将理解,转录调节因子可以是转录激活因子或转录阻遏因子。在一些实施方案中,转录调节因子是转录阻遏因子。在一些实施方案中,转录调节因子是转录激活因子。在一些示例性实施方案中,本公开文本的嵌合受体的转录调节因子包括转录因子DNA结合结构域(DBD)。示例性DBD可以包括Gal4、tetR、ZFHD1、Zif268和HAP1。在一些示例性实施方案中,本公开文本的嵌合受体的至少一种转录调节因子还包括反式激活结构域(TAD)。在一些实施方案中,转录调节因子还可以包括核定位信号。

[0144] 在一些实施方案中,本公开文本的嵌合受体的转录调节因子包括含锌指的转录效应子(ZTE),其包含一个或多个锌指蛋白或锌指基序(ZF)。例如,本公开文本的嵌合受体的转录调节因子可以包括含有一个或多个ZF的DBD。ZF是蛋白质中的指状折叠,允许其与核酸序列如DNA和RNA相互作用。这种指状折叠在本领域中是熟知的。折叠通常通过蛋白质中的特定氨基酸与锌原子的结合产生,并且通过锌离子在四个基本不变(取决于锌指框架类型)的Cys和/或His残基之间的配位而稳定。示例性锌指蛋白可以包括ZF3、ZF6、ZF10等。

[0145] 如本文所用,术语“基序”是指结构基序。ZF基序是具有超二级结构的相对较小的多肽结构域,并且包含约30个氨基酸和折叠以形成与反平行β-片层(称为ββα折叠)相邻的α-螺旋,并且通过锌离子而稳定。ZF结构域识别并结合双链DNA靶序列中的核酸三联体或重叠四联体(如下所述)。天然存在的锌指结构域(也称为ZF蛋白)已在文献中得到充分研究和描述。天然ZF蛋白可以调节基因的表达以及核酸识别、逆转录和病毒组装。这方面的另外的信息可以在例如美国专利号10,138,493中找到。

[0146] C2H2锌指(C2H2-ZF)是最普遍的一类脊椎动物DNA结合结构域,并且通常以串联阵列(ZFA)出现,其中连续的C2H2-ZF各自接触三个(或更多个)连续碱基。C2H2-ZF可以以模块方式组装。鉴于一组模块具有确定的三碱基特异性,模块组装也提供了一种构建具有特定DNA结合偏好的人工蛋白质的方法。

[0147] 含ZF的蛋白质通常含有ZF基序的串或链,形成ZF阵列(ZFA)。因此,ZF蛋白可以包含两个或更多个ZF,例如由2个或更多个ZF基序组成的ZFA,这些基序可以彼此直接相邻(例如,被短接头序列分隔开),或者可以被更长的、柔性的或结构化的多肽序列分隔开。例如,ZFA可以具有串联布置的六个ZF基序(6指ZFA)、七个ZF基序(7指ZFA)或八个ZF基序(8指ZFA)。通常预期直接相邻的ZF结构域与连续的核酸序列结合,例如与相邻的三核苷酸/三联体结合。在一些情况下,相邻ZF与它们各自的靶三联体之间也可能发生交联,这可能有助于加强或增强对靶序列的识别,并导致重叠的四联体序列的结合。通过比较,同一蛋白质内的远距离ZF结构域可以识别和/或结合非连续核酸序列或甚至不同分子(例如,蛋白质而不是核酸)。

[0148] 在一些实施方案中,本公开文本的多链受体包含含锌指的转录效应子(ZTE),其具有DNA结合锌指蛋白质结构域(ZF蛋白质结构域)和另一个结构域(效应子结构域),蛋白质通过所述结构域(效应子结构域)发挥其作用。如下文进一步详细描述的,适于本公开文本的多链受体的示例性效应子结构域包括但不限于转录激活结构域(例如,TAD)、表观遗传效应子结构域和DNA修饰酶。

[0149] 在一些实施方案中,本公开文本的多链受体包含转录效应子,其具有非锌指DNA结合结构域(例如,不具有锌指结构的DNA结合结构域)和另一个结构域(效应子结构域),蛋白质通过所述结构域(效应子结构域)发挥其作用。示例性非锌指DNA结合结构域包括源自PAX6的结构域。如下文进一步详细描述的,适于本公开文本的多链受体的示例性效应子结构域包括但不限于转录激活结构域(例如,TAD)、表观遗传效应子结构域和DNA修饰酶。在一些实施方案中,本公开文本的多链受体包含1至约10个DNA结合结构域,每个DNA结合结构域独立地包含与SEQ ID NO:61(PAX6)的序列具有至少约90%同一性的序列。在一些实施方案中,转录效应子的DNA结合结构域与SEQ ID NO:61(PAX6)的序列具有至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%序列同一性。

[0150] 在一些实施方案中,本公开文本的多链受体包含具有两个或更多个,例如3个或更多个,例如4个或更多个,5个或更多个,6个或更多个,7个或更多个,8个或更多个,9个或更多个,10个或更多个,11个或更多个,12个或更多个,13个或更多个,14个或更多个,15个或更多个,16个或更多个,17个或更多个,18个或更多个(例如,多达约30个或32个)ZF基序的ZTE,这些基序彼此串联相邻布置,形成ZF基序的阵列或ZFA。在一些实施方案中,ZTE包含至少3个ZF基序、至少4个ZF基序、至少5个ZF基序、或至少6个ZF基序、至少7个ZF基序、至少8个ZF基序、至少9个ZF基序、至少10个ZF基序、至少11个或至少12个ZF基序;以及在一些情况下至少18个ZF基序。在一些实施方案中,本文公开的工程化Notch受体的ZTE含有多达6、7、8、10、11、12、16、17、18、22、23、24、28、29、30、34、35、36、40、41、42、46、47、48、54、55、56、58、59或60个ZF基序。在一些实施方案中,本公开文本的ZTE结合正交靶核酸结合位点。也就是说,ZTE的ZF结构域中的ZF或ZFA结合正交靶核酸序列。在一些实施方案中,正交靶核酸结合位点是连续的。在一些实施方案中,在真核基因组中,本文公开的工程化Notch受体的ZTE结合靶正交特异性DNA序列,并且例如具有降低的或最小的功能性结合潜力。

[0151] 在本公开文本的一些实施方案中,ZTE包含:(a)包括DNA结合锌指蛋白质结构域(ZF蛋白质结构域)的第一结构域,和(b)第二结构域(效应子结构域),ZTE通过所述第二结构域(效应子结构域)发挥其作用,其中ZTE具有下式I:

[效应子结构域]a-[ZF蛋白质结构域]-[效应子结构域]b(式I)

其中a和b各自独立地是0至5的整数,并且a和b中的至少一个不是0;其中ZF蛋白质结构域包含1至约10个锌指阵列(ZFA);其中ZFA包含约1至3、约3至6或约6至约8个根据式II的锌指基序(从N末端到C末端):

XcCXdCXe-(螺旋)-HXfH-L2(式II)

其中L2是具有约4-6个氨基酸残基的接头肽,C是Cys,H是His,每个X独立地是任何氨基酸,c是0至3的整数,d是1至5的整数,e是2至7的整数,f是3至6的整数,并且(螺旋)是形成α-螺旋的约6个氨基酸的肽结构域,其中ZFA能够结合特定的核酸序列。

[0152] 在一些实施方案中,本文公开的多链受体的ZF蛋白质结构域包含1至约10个ZFA,

每个ZFA独立地包含与选自SEQ ID NO:62-67的序列具有至少约90％同一性的序列。在一些实施方案中,ZFA包含与选自SEQ ID NO:62-67的序列具有至少约90％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％序列同一性的序列。在一些实施方案中,ZFA序列与SEQ ID NO:62(ZF3)的序列具有至少约90％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％序列同一性。在一些实施方案中,ZFA序列与SEQ ID NO:63(ZF6)的序列具有至少约90％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％序列同一性。在一些实施方案中,ZFA序列与SEQ ID NO:64(ZF6/SV40NLS)的序列具有至少约90％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％序列同一性。在一些实施方案中,ZFA序列与SEQ ID NO:65(ZF6/Notch1NLS)的序列具有至少约90％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％序列同一性。在一些实施方案中,ZFA序列与SEQ ID NO:66(ZF10/SV40NLS)的序列具有至少约90％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％序列同一性。在一些实施方案中,ZFA序列与SEQ ID NO:67(ZF10/Notch1NLS)的序列具有至少约90％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％序列同一性。在一些实施方案中,ZFA序列与ZF2、ZF4或ZF11的序列具有至少约90％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％序列同一性。

[0153] 在一些实施方案中,本文公开的多链受体的ZF蛋白质结构域包含1至约10个ZFA,每个ZFA独立地包含与选自SEQ ID NO:62-67的序列具有约100％序列同一性的序列。在一些实施方案中,ZFA序列与SEQ ID NO:62(ZF3)的序列具有约100％序列同一性。在一些实施方案中,ZFA序列与SEQ ID NO:63(ZF6)的序列具有约100％序列同一性。在一些实施方案中,ZFA序列与SEQ ID NO:64(ZF6/SV40NLS)的序列具有约100％序列同一性。在一些实施方案中,ZFA序列与SEQ ID NO:65(ZF6/Notch1NLS)的序列具有约100％序列同一性。在一些实施方案中,ZFA序列与SEQ ID NO:66(ZF10/SV40NLS)的序列具有约100％序列同一性。在一些实施方案中,ZFA序列与SEQ ID NO:67(ZF10/Notch1NLS)的序列具有约100％序列同一性。在一些实施方案中,ZFA序列与SEQ ID NO:67(ZF10/Notch1NLS)的序列具有约100％序列同一性。在一些实施方案中,ZFA序列与ZF2、ZF4或ZF11的序列具有约100％序列同一性。

[0154] 在一些实施方案中,ZF蛋白质结构域包含具有相同氨基酸序列的多个ZFA。在一些实施方案中,ZF蛋白质结构域包含氨基酸序列彼此不同的多个ZFA。

[0155] 在一些实施方案中,本文公开的多链受体的ZF蛋白质结构域包含独立地能够特异性结合选自SEQ ID NO:62-67的靶核酸序列的一个或多个ZFA。在一些实施方案中,至少一个ZFA能够特异性结合具有SEQ ID NO:62的序列的靶核酸序列。在一些实施方案中,至少一个ZFA能够特异性结合具有SEQ ID NO:63的序列的靶核酸序列。在一些实施方案中,至少一个ZFA能够特异性结合具有SEQ ID NO:64的序列的靶核酸序列。在一些实施方案中,至少一个ZFA能够特异性结合具有SEQ ID NO:65的序列的靶核酸序列。在一些实施方案中,至少一个ZFA能够特异性结合具有SEQ ID NO:66的序列的靶核酸序列。在一些实施方案中,至少一个ZFA能够特异性结合具有SEQ ID NO:67的序列的靶核酸序列。在一些实施方案中,本文公开的工程化Notch受体的ZF蛋白质结构域包含独立地能够特异性结合ZF2、ZF4或ZF11的一个或多个ZFA。

[0156] 如本文所述,本文公开的多链受体的含锌指的转录效应子(ZTE)包含第二结构域

(效应子结构域),ZTE通过所述第二结构域(效应子结构域)发挥其作用。适于本公开文本的多链受体的示例性效应子结构域包括但不限于转录激活结构域(例如,TAD)、表观遗传效应子结构域和DNA修饰酶。适用于本文公开的组合物和方法中的转录激活结构域(TAD)的非限制性例子包括单纯疱疹病毒蛋白16(HSV VP16)激活结构域;由VP16的四个串联拷贝(VP64)组成的激活结构域;NFκB的p65激活结构域;EB病毒R反式激活因子激活结构域(Rta);由VP64和Rta激活结构域(VPR)组成的三组分激活因子;和人E1A相关蛋白p300的组蛋白乙酰转移酶核心结构域(p300 HAT核心激活结构域)。在一些实施方案中,ZTE的效应子结构域包括NFκB的p65激活结构域。

[0157] 在一些实施方案中,转录调节因子来自Gal4-VP16、Gal4-VP64、tetR-VP64、ZFHD1-VP64、Gal4-KRAB和HAP1-VP16。在一些实施方案中,转录调节因子是Gal4-VP64。在一些实施方案中,转录调节因子具有源自或选自VP64、p65、KRAB反式激活变体和VP16的序列。在一些示例性实施方案中,转录调节因子具有源自人或人源化p65的TAD的序列。在一些示例性实施方案中,转录调节因子具有源自人或人源化p65的序列。在其他示例性实施方案中,转录调节因子具有源自人或人源化HNF1α、HSF-1、GATA3、HIF1a、GR Tau1、ATF6、ELF3、p53、MIER3、MLXIPL、NFE2L1或PTF1A的TAD的序列。在其他示例性实施方案中,转录调节因子具有源自人或人源化HNF1α、HSF-1、GATA3、HIF1a、GR Tau1、ATF6、ELF3、p53、MIER3、MLXIPL、NFE2L1或PTF1A的序列。

[0158] 在一些实施方案中,人或人源化序列含有线性氨基酸序列基序。在一些实施方案中,本文所述的转录调节因子在有或没有接头序列的情况下直接融合在一起。

[0159] 在一些实施方案中,转录调节因子包含与SEQ ID NO:68-75中的一个或多个具有至少80%序列同一性(如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或99%序列同一性)的序列。在一些实施方案中,转录调节因子包含与SEQ ID NO:68-75中的一个或多个具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,转录调节因子包含与SEQ ID NO:68-75中的一个或多个具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,转录调节因子包含与SEQ ID NO:68-75中的一个或多个具有至少100%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,转录调节因子包含SEQ ID NO:68-75中的一个或多个的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:68-75中的一个或多个中的一个、两个、三个、四个或五个氨基酸残基被不同的氨基酸残基取代。

[0160] 在一些实施方案中,转录调节因子包含与SEQ ID NO:76-90中的一个或多个具有至少80%序列同一性(如,至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或99%序列同一性)的序列。在一些实施方案中,转录调节因子包含与SEQ ID NO:76-90中的一个或多个具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,转录调节因子包含与SEQ ID NO:76-90中的一个或多个具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,转录调节因子包含与SEQ ID NO:76-90中的一个或多个具有至少100%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,转录调节因子包含SEQ ID NO:76-90中的一个或多个的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:76-90中的一个或多个中的一个、两个、三个、四个或五个氨基酸残基被不同的氨基酸残基取代。

[0161] 在一些实施方案中,本公开文本的多链受体的转录调节因子包括ZF3、源自人或人源化p65的TAD的TAD和源自人或人源化HSF1的TAD的TAD。在一些实施方案中,本公开文本的

多链受体的转录调节因子包括ZF3、人或人源化p65和人或人源化HSF1。在其他示例性实施方案中,本公开文本的多链受体的转录调节因子包括ZF3、人或人源化p65和人或人源化GR Tau1。在一些示例性实施方案中,本公开文本的多链受体的转录调节因子包括ZF3、人或人源化p65和人或人源化p53。在其他示例性实施方案中,本公开文本的多链受体的转录调节因子包括ZF3、人或人源化p65和人或人源化ATF6。

[0162] 在一些实施方案中,本公开文本的多链受体的转录调节因子包括源自人或人源化p65的TAD的TAD和源自人或人源化HNF1α的TAD的TAD。在一些实施方案中,本公开文本的多链受体的转录调节因子包括人或人源化p65和人或人源化HNF1α。

[0163] 在一些实施方案中,本公开文本的第一多肽的细胞内结构域不包含转录因子。在一些实施方案中,细胞内结构域可以负责第一多肽链与配体结合后下游信号传导的传播。细胞内信号传导结构域可以具有至少两个不同结构域:至少一个共刺激结构域和一个激活结构域。

[0164] 在一些实施方案中,共刺激结构域包含源自信号传导分子的序列。信号传导分子可以是选自1类或3类人膜蛋白的蛋白质。在一些实施方案中,信号传导分子选自CD28、4-1BB、OX40、ICOS、CTLA4、PD1、PD1H、BTLA、B71、B7H1、CD226、CRTAM、TIGIT、CD96、TIM1、TIM2、TIM3、TIM4、CD2、SLAM、2B4、Ly108、CD84、Ly9、CRACC、BTN1、BTN2、BTN3、LAIR1、LAG3、CD160、CD27、GITR、CD30、TNFR1、TNFR2、HVEM、LT_R、DR3、DCR3、FAS、CD40、RANK、OPG、TRAILR1、TACI、BAFFR、BCMA、TWEAKR、EDAR、XEDAR、RELT、DR6、TROY、NGFR、CD22、SIGLEC-3、SIGLEC-5、SIGLEC-7、KLRG1、NKR-P1A、ILT2、KIR2DL1、KIR3DL1、CD94-NKG2A、CD300b、CD300e、TREM1、TREM2、ILT7、ILT3、ILT4、TLT-1、CD200R、CD300a、CD300f、DC-SIGN、B7-2、变应素-1、LAT、BLNK、LAYN、SLP76、EMB-LMP1、HIV-NEF、HVS-TIP、HVS-ORF5和HVS-stpC。在一些示例性实施方案中,信号传导分子选自OX40、ICOS、4-1BB、CTLA4、CD28、CD30、CD2、CD27和CD226及其衍生物、突变体、变体、片段和组合。在其他实施方案中,信号传导分子选自OX40、ICOS、4-1BB、CTLA4、CD28、CD30、CD2、CD27和CD226及其衍生物、突变体、变体、片段和组合。在一些实施方案中,信号传导分子选自4-1BB、BAFF-R、BCMA、BTLA、CD2、CD200R、CD244、CD28、CD300a、CD300f、CD40、CD7、CD72、CD96、CRACC、CRTAM、CTLA4、CXADR、DC-SIGN、GITR、HAVCR2、ICOS、ILT2、ILT3、ILT4、KIR2DL1、KIR3DL1、KLRG1、LAG3、LAIR1、NKG2D、NKR-P1A、NTB-A、PD1、Siglec-3、TACI、TIGIT、TLT-1和TNR8(CD30)及其衍生物、突变体、变体、片段和组合。在其他实施方案中,信号传导分子是CD28或4-1BB。在一个示例性实施方案中,共刺激结构域包含源自CD28的序列。在另一个示例性实施方案中,共刺激结构域包含源自4-1BB的序列。

[0165] 在一些实施方案中,激活结构域包含一个或多个保守氨基酸基序,所述一个或多个保守氨基酸基序充当磷酸化的底物(例如像,免疫受体酪氨酸激活基序(ITAM))。在一些实施方案中,激活结构域包含至少1、至少2、至少3、至少4或至少5个充当磷酸化的底物的选自以下的特定的基于酪氨酸的基序:ITAM基序、ITIM基序或相关胞内基序。在本公开文本的一些实施方案,细胞内信号传导结构域的激活结构域包含至少1、至少2、至少3、至少4或至少5个ITAM。总体上,包含ITAM的任何激活结构域都可以适当地用于如本文所述的多链受体的构建。ITAM通常包括时常存在于在许多免疫细胞中表达的信号传导分子的尾部的保守蛋白质基序。基序可以包括被6-8个氨基酸分开的两个重复的氨基酸序列YxxL/I,其中每个x独立地是任何氨基酸,产生保守基序YxxL/Ix(6-8)YxxL/I。信号传导分子内的ITAM对于细

胞内的信号转导而言很重要,细胞内的信号转导至少部分由信号传导分子激活后ITAM中的酪氨酸残基的磷酸化介导。ITAM也可以作为参与信号传导途径的其他蛋白质的停泊位点起作用。

[0166] 在一些实施方案中,激活结构域包含一个或多个免疫受体酪氨酸激活基序(ITAM)。在一些实施方案中,激活结构域源自CD3ζ、CD3σ、CD3/和CD3ε。例如,在一些实施方案中,ITAM源自CD3ζ、CD3σ、CD3/和CD3ε。在一个示例性实施方案中,ITAM源自CD3ζ。在某些实施方案中,ITAM包含与CD3ζITAM至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的序列。在一些实施方案中,激活结构域包含至少1、至少2、至少3、至少4或至少5个ITAM,其独立地选自源自以下的ITAM:CD3ζ、FcR γ 及其组合。在一些实施方案中,激活结构域包含CD3ζITAM。

[0167] 在一些实施方案中,本公开文本的第一多肽的细胞内结构域包含源自IL-2受体共同γ链的信号传导链。在一些实施方案中,源自IL-2受体共同γ链的信号传导链包含以下氨基酸序列:

ERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEIPPKGGALGE GPGASPCNQHSPYWAPPCYTLKPET(SEQ ID NO:91)。

[0168] 本公开文本的第一多肽的各种实施方案可以包括组分的以下非限制性例子。第一多肽可以包含细胞外结构域、TMD、细胞内结构域和来自已知受体的其他序列,例如像髓系细胞触发受体2(TREM 2;图2A、图2B、图2C、图2D、图3A、图4A和图4B)。TREM2可以通过解整联蛋白和金属蛋白酶(ADAM)家族的成员在氨基酸H157与S158之间经历蛋白水解切割。这种切割导致可溶性TREM2胞外域(sTREM2)释放到细胞外液中,并产生膜系留的C末端片段(CTF)。TREM2 CTF代表通过γ分泌酶进行膜内蛋白水解的底物(图2A)。在本公开文本的一些实施方案中,第一多肽可以包含没有其细胞质结构域的TREM2TMD。在一些实施方案中,第一多肽可以包含TREM2细胞外结构域和具有Notch 1γ分泌酶切割位点的TMD和/或Notch-2 JMD(图2D)。

[0169] 本公开文本的多链嵌合多肽的第一多肽可以包含第一修饰界面,第一多肽经由所述第一修饰界面与第二多肽缔合。第一修饰界面可以来自Notch 1TMD。第一修饰界面可以具有带正电荷的残基,第一多肽经由所述带正电荷的残基与本公开文本的多嵌合多肽的第二多肽缔合。带正电荷的残基可以是赖氨酸或精氨酸。在一些实施方案中,赖氨酸或精氨酸残基可以取代Notch 2JMD的位置12(参考SEQ ID NO:21,其对应于包含SEQ ID NO:8的整个构建体的残基1747)处的亮氨酸。在一些实施方案中,第一多肽包含截短的CD8α铰链结构域ECD、具有L12K突变的Notch 1TMD、Notch 2JMD和Gal4VP64转录调节因子(图2B)。在一些实施方案中,第一多肽包含TREM2 ECD、具有L1747K突变的Notch 1TMD(具有L1747K突变的Uniprot P46531氨基酸1736至1757)、Notch 2JMD和Gal4VP64转录调节因子(图2C)。在一些实施方案中,第一多肽包含TREM2 ECD、具有γ分泌酶位点的Notch 1TMD、Notch 2JMD和Gal4VP64转录调节因子(图2D)。

[0170] 在其他方面,第一多肽可以包含截短的CD8α铰链结构域(CD8-铰链2)ECD、在位置9或10处具有赖氨酸取代的聚缬氨酸TMD、Notch 2JMD和Gal4VP64转录调节因子(图4C和图4D)。

[0171] 在其他方面,第一多肽可以包含截短的CD8α铰链结构域(CD8-铰链2)ECD、在位置9

或10处具有赖氨酸取代的聚缬氨酸TMD、Notch 2JMD和人HNF1a转录调节因子(图8A和图8B)。

[0172] 在其他方面,第一多肽可以包含截短的CD8α铰链结构域(CD8-铰链2)ECD、在位置9或10处具有赖氨酸取代的聚缬氨酸TMD、Notch 2JMD和4-1BB/CD3ζ结构域(图10)。

[0173] 在其他方面,第一多肽可以包含截短的CD8α铰链结构域(CD8-铰链2)ECD、在位置9或10处具有赖氨酸取代的聚缬氨酸TMD、Notch 2JMD和共同γ链结构域(图10)。

[0174] 在其他方面,第一多肽可以包含截短的CD8α铰链结构域(CD8-铰链2)ECD、在位置9或10处具有赖氨酸取代的聚缬氨酸TMD、Notch 2JMD和共同γ链/CD3ζ结构域(图10)。如本领域技术人员可以理解的,第一多肽还可以包括本文所述组分的各种其他组合。

e.其他组分

[0175] 在本公开文本的一些实施方案中,第一多肽还可以包含以下中的一种或多种:自身蛋白水解肽序列或核定位信号。

[0176] 在一些实施方案中,细胞内结构域包含核定位序列和转录调节因子,如Gal4-VP16、Gal4-VP64、tetR-VP64、ZFHD1-VP64、Gal4-KRAB或HAP1-VP16。

[0177] 在一些实施方案中,自身蛋白水解肽序列来自猪捷申病毒-1 2A(P2A)、口蹄疫病毒(FMDV)2A(F2A)、马甲型鼻炎病毒(ERAV)2A(E2A)、明脉扁刺蛾β四体病毒2A(T2A)、质型多角体病毒2A(BmCPV2A)、软化病病毒2A(BmIFV2A)或其组合。

[0178] 第一多肽还可以包含蛋白水解切割位点。在一些实施方案中,蛋白水解切割位点可被γ分泌酶切割。在一些实施方案中,蛋白水解切割位点是配体诱导型蛋白水解切割位点。蛋白水解切割位点可以位于转录调节因子与铰链结构域之间。蛋白水解切割位点可以是配体诱导型的,其中所选配体与细胞外配体结合结构域的结合诱导在配体诱导型蛋白水解切割位点处的切割。

2.第二多肽

[0179] 本公开文本的多链嵌合多肽包含第二多肽,所述第二多肽按从第二多肽的N末端到C末端的顺序含有(i)具有第二界面的第二TMD,和(ii)第二细胞内结构域。

[0180] 在一些实施方案中,本公开文本的第一多肽包含与SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:11或其功能变体具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

a.第二跨膜结构域

[0181] 本公开文本的多链嵌合多肽的第二多肽可以包含具有第二界面的第二TMD。第二TMD可以包括如下任何结构域,所述结构域能够经由TMD中的带电残基与本公开文本的多链嵌合多肽的第一多肽缔合的任何结构域,并且具有在靶配体与第一多肽的细胞外配体结合结构域结合后被激活的信号传导结构域。第二界面是第二多肽中可包含带负电荷的残基的区域,其经由所述带负电荷的残基与本公开文本的第一多肽的TMD中带正电荷的残基缔合。在一些实施方案中,带负电荷的残基可以是精氨酸或赖氨酸。

[0182] 在一些实施方案中,第二多肽包含DAP12 TMD。在一些实施方案中,第二多肽包含DAP12结构域以及DAP12细胞内信号传导结构域(即细胞质结构域),如下面更详细解释的。

b.第二细胞内结构域

[0183] 本公开文本的多链嵌合多肽的第二多肽包含细胞内结构域。细胞内结构域可以负

责在第一多肽链与配体结合后下游信号传导的传播。细胞内信号传导结构域可以具有至少两个不同结构域:至少一个共刺激结构域和一个激活结构域。

[0184] 在一些实施方案中,共刺激结构域包含源自信号传导分子的序列。信号传导分子可以是选自1类或3类人膜蛋白的蛋白质。在一些实施方案中,信号传导分子选自CD28、4-1BB、OX40、ICOS、CTLA4、PD1、PD1H、BTLA、B71、B7H1、CD226、CRTAM、TIGIT、CD96、TIM1、TIM2、TIM3、TIM4、CD2、SLAM、2B4、Ly108、CD84、Ly9、CRACC、BTN1、BTN2、BTN3、LAIR1、LAG3、CD160、CD27、GITR、CD30、TNFR1、TNFR2、HVEM、LT_R、DR3、DCR3、FAS、CD40、RANK、OPG、TRAILR1、TACI、BAFFR、BCMA、TWEAKR、EDAR、XEDAR、RELT、DR6、TROY、NGFR、CD22、SIGLEC-3、SIGLEC-5、SIGLEC-7、KLRG1、NKR-P1A、ILT2、KIR2DL1、KIR3DL1、CD94-NKG2A、CD300b、CD300e、TREM1、TREM2、ILT7、ILT3、ILT4、TLT-1、CD200R、CD300a、CD300f、DC-SIGN、B7-2、变应素-1、LAT、BLNK、LAYN、SLP76、EMB-LMP1、HIV-NEF、HVS-TIP、HVS-ORF5和HVS-stpC。在一些示例性实施方案中,信号传导分子选自OX40、ICOS、4-1BB、CTLA4、CD28、CD30、CD2、CD27和CD226及其衍生物、突变体、变体、片段和组合。在其他实施方案中,信号传导分子选自OX40、ICOS、4-1BB、CTLA4、CD28、CD30、CD2、CD27和CD226及其衍生物、突变体、变体、片段和组合。在一些实施方案中,信号传导分子选自4-1BB、BAFF-R、BCMA、BTLA、CD2、CD200R、CD244、CD28、CD300a、CD300f、CD40、CD7、CD72、CD96、CRACC、CRTAM、CTLA4、CXADR、DC-SIGN、GITR、HAVCR2、ICOS、ILT2、ILT3、ILT4、KIR2DL1、KIR3DL1、KLRG1、LAG3、LAIR1、NKG2D、NKR-P1A、NTB-A、PD1、Siglec-3、TACI、TIGIT、TLT-1和TNR8(CD30)及其衍生物、突变体、变体、片段和组合。在其他实施方案中,信号传导分子是CD28或4-1BB。在一个示例性实施方案中,共刺激结构域包含源自CD28的序列。在另一个示例性实施方案中,共刺激结构域包含源自4-1BB的序列。

[0185] 在一些实施方案中,激活结构域包含一个或多个保守氨基酸基序,所述一个或多个保守氨基酸基序充当磷酸化的底物(例如像,免疫受体酪氨酸激活基序(ITAM))。在一些实施方案中,激活结构域包含至少1、至少2、至少3、至少4或至少5个充当磷酸化的底物的选自以下的特定的基于酪氨酸的基序:ITAM基序、ITIM基序或相关胞内基序。在本公开文本的一些实施方案,细胞内信号传导结构域的激活结构域包含至少1、至少2、至少3、至少4或至少5个ITAM。总体上,包含ITAM的任何激活结构域都可以适当地用于如本文所述的多链受体的构建。ITAM通常包括时常存在于在许多免疫细胞中表达的信号传导分子的尾部的保守蛋白质基序。基序可以包括被6-8个氨基酸分开的两个重复的氨基酸序列YxxL/I,其中每个x独立地是任何氨基酸,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而言很重要,细胞内的信号转导至少部分由信号传导分子激活后ITAM中的酪氨酸残基的磷酸化介导。ITAM也可以作为参与信号传导途径的其他蛋白质的停泊位点起作用。

[0186] 在一些实施方案中,激活结构域包含一个或多个免疫受体酪氨酸激活基序(ITAM)。在一些实施方案中,激活结构域源自CD3ζ、CD3σ、CD3/和CD3ε。例如,在一些实施方案中,ITAM源自CD3ζ、CD3σ、CD3/和CD3ε。在一个示例性实施方案中,ITAM源自CD3ζ。在某些实施方案中,ITAM包含与CD3ζITAM至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的序列。在一些实施方案中,激活结构域包含至少1、至少2、至少3、至少4或至少5个ITAM,其独立地选自源自以下的ITAM:CD3ζ、FcRγ及其组合。在一些实施方案中,激活结构域包含CD3ζITAM。

[0187] 在一些实施方案中,细胞内结构域来自DAP12(12kDa的DNAZ激活蛋白,TYROBP)。DAP12细胞内结构域(也称为DAP12的细胞质结构域)包含ITAM,其在配体结合TREM2后被磷酸化,并随即调节几种细胞内信号传导途径,这些途径控制细胞增殖和分化、存活、吞噬、细胞骨架重塑、钙动员和/或细胞因子产生。在一些实施方案中,信号传导结构域可以是CD3ζ、TCRζ、FcRγ、FcRβ、CD3γ、CD3Δ、CD3ε、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278(ICOS)、FcεRI、DAP10、DAP12或CD66d信号传导结构域。在一些实施方案中,信号传导结构域是CD3ζ信号传导结构域。

[0188] 在一些实施方案中,信号传导结构域包含细胞因子受体的胞内结构域。

[0189] 在一些实施方案中,胞内结构域来自I型细胞因子受体。I型细胞因子受体在邻近细胞膜的细胞外部分共享共同的氨基酸基序(WSXWS)。I型细胞因子受体包括(i)白介素受体,如IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-11、IL-12、IL13、IL-15、IL-21、IL-23和IL-27的受体;(ii)集落刺激因子受体,如促红细胞生成素、GM-CSF和G-CSF的受体;和(iii)激素受体/神经肽受体,如激素受体和催乳素受体。I型细胞因子受体家族的成员包含不同的链,其中一些链涉及配体/细胞因子相互作用,而另一些链涉及信号转导。例如,IL-2受体包含α链、β链和γ链。

[0190] IL-2受体共同γ链(也称为CD132)在IL-2受体、IL-4受体、IL-7受体、IL-9受体、IL-13受体、IL-15受体和IL-21受体之间共享。

[0191] 在一些实施方案中,胞内结构域来自IL-2受体β链。在一些实施方案中,IL-2受体β链胞内结构域的氨基酸序列包含RNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV SEQ ID NO:92。在一些实施方案中,IL-2受体β链胞内结构域包含与SEQ ID NO:92或其功能变体具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0192] 在一些实施方案中,胞内结构域来自IL-4受体α链。在一些实施方案中,IL-4受体α链胞内结构域的氨基酸序列包含KIKKEWWDQIPNPARSRLVAIIIQDAQGSQWEKRSRGQEPAKCPHWKNCLTKLLPCFLEHNMKRDEDPHKAAKEMPFQGSGKSAWCPVEISKTVLWPESISVVRCVELFEAPVECEEEEEVEEEKGSFCASPESSRDDFQEGREGIVARLTESLFLDLLGEENGGFCQQDMGESCLLPPSGSTSAHMPWDEFPSAGPKEAPPWGKEQPLHLEPSPPASPTQSPDNLTCTETPLVIAGNPAYRSFSNSLSQSPCPRELGPDPLLARHLEEVEPEMPCVPQLSEPTTVPQPEPETWEQILRRNVLQHGAAAAPVSAPTSGYQEFVHAVEQGGTQASAVVGLGPPGEAGYKAFSSLLASSAVSPEKCGFGASSGEEGYKPFQDLIPGCPGDPAPVPVPLFTFGLDREPPRSPQSSHLPSSSPEHLGLEPGEKVEDMPKPPLPQEQATDPLVDSLGSGIVYSALTCHLCGHLKQCHGQEDGGQTPVMASPCCGCCCGDRSSPPTTPLRAPDPSPGGVPLEASLCPASLAPSGISEKSKSSSSFHPAPGNAQSSSQTPKIVNFVSVGPTYMRVS SEQ ID NO:93。在一些实施方案中,IL-4受体α链胞内结构域包含与SEQ ID NO:93或其功能变体具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0193] 在一些实施方案中,胞内结构域来自IL-7受体α链。在一些实施方案中,IL-7受体α链胞内结构域的氨基酸序列包含KKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKNLNVSFNPESFLDCQIHRVDDIQARDEVEGFLQDTFPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSEDVVITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSL

DCRESGKNGPHVYQDLLLSLGTTNSTLPPPFSLQSGILTLNPVAQGQPILTSLGSNQEEAYVTMSSFYQNQ SEQ ID NO:94。在一些实施方案中,IL-7受体α链胞内结构域包含与SEQ ID NO:94或其功能变体具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0194] 在一些实施方案中,胞内结构域来自IL-9受体α链。在一些实施方案中,IL-9受体α链胞内结构域的氨基酸序列包含KLSPRVKRIFYQNVPSPAMFFQPLYSVHNGNFQTWMGAHGAGVLLSQD CAGTPQGALEPCVQEATALLTCGPARPWKSVALEEEQEGPGTRLPGNLSSEDVLPAGCTEWRVQTLAYLPQEDWAP TSLTRPAPPDSEGSRSSSSSSSSNNNNYCALGCYGGWHLSALPGNTQSSGPIPALACGLSCDHQGLETQQGVAWVL AGHCQRPGLHEDLQGMLLPSVLSKARSWTFSEQ ID NO:95。在一些实施方案中,IL-9受体α链胞内结构域包含与SEQ ID NO:95或其功能变体具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0195] 在一些实施方案中,胞内结构域来自IL-13受体α链。在一些实施方案中,IL-13受体α链胞内结构域的氨基酸序列包含KRLKIIIFPPIPDPGKIFKEMFGDQNDDTLHWKKYDIYEKQTKEE TDSVVLIENLKKASQ SEQ ID NO:96。在一些实施方案中,IL-13受体α链胞内结构域包含与SEQ ID NO:96或其功能变体具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0196] 在一些实施方案中,胞内结构域来自IL-15受体α链。在一些实施方案中,IL-15受体α链胞内结构域的氨基酸序列包含KSRQTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDLENCSHHL SEQ ID NO:97。在一些实施方案中,IL-15受体α链胞内结构域包含与SEQ ID NO:97或其功能变体具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0197] 在一些实施方案中,胞内结构域来自IL-21受体α链。在一些实施方案中,IL-21受体α链胞内结构域的氨基酸序列包含KTHPLWRLWKKIWAVPSPERFFMPLYKGCSGDFKKWVGAPFTGSS LELGPWSPEVPSTLEVYSCHPPRSPAKRLQLTELQEPAELVESDGVPKPSFWPTAQNSGGSAYSEERDRPYGLVSI DTVTVLDAEGPCTWPCSCEDDGYPALDLDAGLEPSPGLEDPLLDAGTTVLSCGCVSAGSPGLGGPLGSLLDRLKPP LADGEDWAGGLPWGGRSPGGVSESEAGSPLAGLDMDTFDSGFVGSDCSSPVECDFTSPGDEGPPRSYLRQWVVIPP PLSSPGPQAS SEQ ID NO:98。在一些实施方案中,IL-21受体α链胞内结构域包含与SEQ ID NO:98或其功能变体具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0198] 在一些实施方案中,胞内结构域来自II型细胞因子受体。II型细胞因子受体包括结合I型和II型干扰素的受体,以及结合白介素-10家族成员(白介素-10、白介素-20和白介素-22)的受体。

3.嵌合多肽的另外的实施方案

[0199] 本公开文本的多链嵌合多肽可以包括上述第一多肽和第二多肽的各种组合。在一些实施方案中,多链嵌合多肽包含(a)第一多肽,其含有(i)作为细胞外配体结合结构域的CD19scFV、(ii)具有连续缬氨酸残基段的第一TMD、和(iii)Notch 2近膜结构域、和(iv)具有Gal4VP64转录调节因子的第一细胞内结构域;以及(b)具有DNAX激活蛋白12(DAP12)的第二多肽,其中第一多肽与第二多肽经由连续缬氨酸残基段内的赖氨酸残基偶联,并且其中CD19与细胞外配体结合结构域的结合诱导信号传导结构域的活性并释放转录调节因子。在一些实施方案中,赖氨酸残基的侧翼是5至15个连续缬氨酸残基的连续段。赖氨酸残基可以位于第一TMD的N末端的位置6、或7、或8、或9、或10、或11、或12、或13、或14、或15。

[0200] 在一些实施方案中,多链嵌合多肽包含(a)第一多肽,其含有(i)作为细胞外配体结合结构域的CD19scFV、(ii)具有连续缬氨酸残基段的第一TMD、和(iii)Notch 2近膜结构域、和(iv)具有Gal4VP64转录调节因子的第一细胞内结构域;以及(b)具有CD3ζ信号传导结构域的第二多肽,其中第一多肽与第二多肽经由连续缬氨酸残基段内的赖氨酸残基偶联,并且其中CD19与细胞外配体结合结构域的结合诱导信号传导结构域的活性并释放转录调节因子。在一些实施方案中,赖氨酸残基的侧翼是5至15个连续缬氨酸残基的连续段。赖氨酸残基可以位于第一TMD的N末端的位置6、或7、或8、或9、或10、或11、或12、或13、或14、或15。

[0201] 在一些实施方案中,多链嵌合多肽包含(a)第一多肽,其含有(i)作为细胞外配体结合结构域的CD19scFV、(ii)具有连续缬氨酸残基段的第一TMD、和(iii)Notch 2近膜结构域、和(iv)具有人转录调节因子的第一细胞内结构域;以及(b)具有DNAX激活蛋白12(DAP12)的第二多肽,其中第一多肽与第二多肽经由连续缬氨酸残基段内的赖氨酸残基偶联,并且其中CD19与细胞外配体结合结构域的结合诱导信号传导结构域的活性并释放转录调节因子。在一些实施方案中,赖氨酸残基的侧翼是5至15个连续缬氨酸残基的连续段。赖氨酸残基可以位于第一TMD的N末端的位置6、或7、或8、或9、或10、或11、或12、或13、或14、或15。在一些实施方案中,人转录调节因子是HNF1a。

[0202] 在一些实施方案中,多链嵌合多肽包含(a)第一多肽,其含有(i)作为细胞外配体结合结构域的CD19scFV、(ii)具有连续缬氨酸残基段的第一TMD、和(iii)Notch 2近膜结构域、和(iv)具有人转录调节因子的第一细胞内结构域;以及(b)具有CD3ζ信号传导结构域的第二多肽,其中第一多肽与第二多肽经由连续缬氨酸残基段内的赖氨酸残基偶联,并且其中CD19与细胞外配体结合结构域的结合诱导信号传导结构域的活性并释放转录调节因子。在一些实施方案中,赖氨酸残基的侧翼是5至15个连续缬氨酸残基的连续段。赖氨酸残基可以位于第一TMD的N末端的位置6、或7、或8、或9、或10、或11、或12、或13、或14、或15。在一些实施方案中,人转录调节因子是HNF1a。

[0203] 在一些实施方案中,多链嵌合多肽包含(a)第一多肽,其含有(i)作为细胞外配体结合结构域的CD19scFV、(ii)具有连续缬氨酸残基段的第一TMD、和(iii)Notch 2近膜结构域、和(iv)具有人转录调节因子的第一细胞内结构域;以及(b)具有CD3ζ信号传导结构域的第二多肽,其中第一多肽与第二多肽经由连续缬氨酸残基段内的赖氨酸残基偶联,并且其中CD19与细胞外配体结合结构域的结合诱导信号传导结构域的活性并释放转录调节因子。在一些实施方案中,赖氨酸残基的侧翼是5至15个连续缬氨酸残基的连续段。赖氨酸残基可以位于第一TMD的N末端的位置6、或7、或8、或9、或10、或11、或12、或13、或14、或15。在一些实施方案中,人转录调节因子是HNF1a。

4.编码多链嵌合多肽的核酸构建体

[0204] 本公开文本还提供了重组核酸构建体,所述重组核酸构建体包含编码本公开文本的多链嵌合多肽的核苷酸序列。本公开文本还提供了具有仅编码第一多肽或仅编码第二多肽的核苷酸序列的重组核酸构建体。在重组核酸构建体编码第一多肽或第二多肽的情况下,可以用两种类型的构建体转导宿主细胞以表达本公开文本的多链嵌合多肽。

[0205] 重组核酸构建体可以包含编码本公开文本的多链嵌合多肽的第一多肽的第一盒和编码第二多肽的第二盒,其中两个盒在同一核酸分子上。在一些实施方案中,第一盒位于

第二盒的5’侧。在一些实施方案中,第一盒位于第二盒的3’侧。在一些实施方案中,第一盒和第二盒通过自身蛋白水解肽连接。在一些实施方案中,自身蛋白水解肽是明脉扁刺蛾β四体病毒2A(T2A)肽。

[0206] 在一些实施方案中,本公开文本的重组核酸构建体包含含有以下序列的核苷酸序列:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:99或其任何功能变体。

[0207] 在一些实施方案中,重组核酸构建体包含与SEQ ID NO:2、3、4、5、6、7、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、99或其任何功能变体具有70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％序列同一性的核苷酸序列。本公开文本的重组核酸构建体可以是任何长度,包括例如在约1.5Kb与约50Kb之间、在约5Kb与约40Kb之间、在约5Kb与约30Kb之间、在约5Kb与约20Kb之间或在约10Kb与约50Kb之间,例如在约15Kb to 30Kb之间、在约20Kb与约50Kb之间、在约20Kb与约40Kb之间、在约5Kb与约25Kb之间或在约30Kb与约50Kb之间。

[0208] 在一些实施方案中,重组核酸构建体包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽具有与由以下序列编码的氨基酸序列至少约80％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ IDNO:51、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60或其功能变体。

[0209] 在一些实施方案中,将核苷酸序列掺入表达盒或表达载体中。将理解的是,表达盒通常包括遗传物质的构建体,其含有编码序列和足够的调节信息以指导编码序列在体内和/或离体地在受体细胞中正确地转录和/或翻译。通常,可以将表达盒插入用于靶向所需宿主细胞的载体中和/或个体中。这样,在一些实施方案中,本公开文本的表达盒包含:如本文公开的嵌合多肽的编码序列,所述编码序列可操作地连接至表达控制元件如启动子,以及任选的影响编码序列转录或翻译的其他核酸序列中的任一个或组合。

[0210] 所提供的重组核酸构建体可以含有天然存在的序列,或与天然存在的序列不同但由于遗传密码的简并性而编码相同多肽(例如,第一多肽或第二多肽)的序列。这些核酸分子可以由RNA或DNA(例如,基因组DNA、cDNA或合成DNA(如通过基于亚磷酰胺的合成产生的DNA))或这些类型的核酸内的核苷酸的组合或修饰组成。另外,本公开文本的重组核酸分子可以是双链的或单链的(例如,有义链或反义链)。

[0211] 核酸分子不限于编码多肽的序列;也可以包括位于编码序列(例如,多链嵌合多肽或受体的编码序列)上游或下游的一些或全部非编码序列。分子生物学领域的普通技术人员熟悉用于分离核酸分子的常规程序。它们可以例如通过用限制性核酸内切酶处理基因组DNA或通过进行聚合酶链式反应(PCR)来产生。在核酸分子是核糖核酸(RNA)的情况下,分子可以例如通过体外转录产生。

B.载体

[0212] 编码本公开文本的多链多肽的重组核酸构建体可以包含在一个或多个载体中。因此,本公开文本还提供了编码或表达本公开文本的多链嵌合多肽的载体。

[0213] 本公开文本的一个或多个载体可以表达多链嵌合多肽的第一多肽链或第二多肽链或两者,即,本公开文本的多链多肽可以由一个载体或由共转导到细胞中的不同载体表达。

[0214] 在一些实施方案中,多链嵌合多肽被掺入一个表达载体中,所述表达载体被设计用于在宿主细胞之间的转移,并且可以用于转化的目的,例如将异源DNA导入宿主细胞中。因此,在一些实施方案中,载体可以是复制子,如质粒、噬菌体或粘粒,可以将另一个DNA区段插入其中以导致所插入区段的复制。在一些实施方案中,表达载体可以是整合载体。

[0215] 除了本公开文本的多链嵌合多肽或受体的组分之外,一个或多个载体还可以包含例如一种或多种选择性标记物、一个或多个复制起点(如原核和真核起点)、至少一个多克隆位点和/或促进构建体稳定地整合到细胞的基因组中的元件。

[0216] 在一些实施方案中,表达载体可以是病毒载体。如本领域技术人员将了解的,术语“病毒载体”广泛用于指代包含通常促进核酸分子的转移或整合至细胞的基因组中的病毒来源的核酸元件的核酸分子(例如,转移质粒),或者指代介导核酸转移的病毒颗粒。病毒颗粒将通常包含各种病毒组分,并且有时还包含除了一种或多种核酸之外的宿主细胞组分。术语病毒载体可以指代能够将核酸转移到细胞中的病毒或病毒颗粒或者指代所转移的核酸本身。病毒载体和转移质粒含有主要源自病毒的结构性和/或功能性遗传元件。

[0217] 本公开文本的多链嵌合多肽或嵌合抗原受体可以被掺入逆转录病毒载体中。术语“逆转录病毒载体”是指含有主要源自逆转录病毒的结构性和功能性遗传元件或其部分的病毒载体或质粒。在一些实施方案中,本公开文本的多链嵌合抗原受体可以被掺入慢病毒载体中。慢病毒载体可以包含主要源自慢病毒(其为逆转录病毒的属)的结构性和功能性遗传元件或其部分(包括LTR)。

[0218] 可以在本公开文本中使用的病毒载体包括例如腺病毒载体和腺相关病毒载体、疱疹病毒、猿猴病毒40(SV40)和牛乳头瘤病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体(参见例如,Gluzman(编辑),Eukaryotic Viral Vectors,CSH Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.)。例如,如本文公开的构建体可以在真核宿主如哺乳动物细胞(例如,K562细胞、COS细胞、NIH 3T3细胞或HeLa细胞)中产生。这些细胞可从包括美国典型培养物保藏中心(弗吉尼亚州马纳萨斯)在内的许多来源获得。在选择表达系统时,应注意确保组分彼此相容。技术人员或普通技术人员能够做出这样的决定。此外,如果在选择表达系统时需要指导,熟练技术人员可以查阅P.Jones,“Vectors:Cloning Applications”,John Wiley and Sons,New York,N.Y.,2009。

[0219] 本公开文本的多链嵌合多肽可以包含在一个或多个载体内,所述一个或多个载体能够指导所述核酸分子在例如已经用一个/多个载体转化/转导的细胞中表达。用于真核细胞和原核细胞的合适载体是本领域已知的,并且是可商购的或容易由熟练技术人员制备的。在一些实施方案中,载体是包含SEQ ID NO:1或其任何功能变体的慢病毒转移载体。

[0220] 可以经由常规转化或转染技术将DNA载体引入真核细胞中。用于转化或转染宿主细胞的合适方法可以在Sambrook等人(2012,同上)和其他标准分子生物学实验室手册中找到,如磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、转染、显微注射、阳离子脂质介导的转染、电穿

孔、转导、划痕负载(scrape loading)、弹道引入、核穿孔、流体力学冲击和感染。

C.重组细胞

[0221] 可以将本公开文本的多链嵌合多肽引入或转导到宿主细胞或重组细胞例如像人T淋巴细胞中,以产生含有核酸分子的重组细胞。因此,本公开文本的一些实施方案涉及包含本公开文本的多链嵌合多肽或CAR或重组核酸构建体或载体的重组细胞。

[0222] 将本公开文本的构建体或载体引入细胞可以通过本领域技术人员已知的方法进行,所述方法例如病毒感染、转染、缀合、原生质体融合、脂质体转染、电穿孔、核转染、磷酸钙沉淀、聚乙烯亚胺(PEI)介导的转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、脂质体介导的转染、粒子枪技术、磷酸钙沉淀、直接显微注射、纳米颗粒介导的核酸递送等。

[0223] 因此,在一些实施方案中,构建体或载体可以通过本领域已知的病毒或非病毒递送媒介物递送。例如,构建体可以稳定地整合在宿主基因组中,或者可以以附加体复制,或者作为微环表达载体存在于重组宿主细胞中以用于瞬时表达。因此,在一些实施方案中,构建体在所述重组宿主细胞中作为附加体单元维持和复制。在一些实施方案中,将构建体稳定地整合到所述重组细胞的基因组中。稳定的整合可以使用经典随机基因组重组技术或用更精确的技术来实现,所述基因组编辑技术如指导RNA引导的CRISPR/Cas9基因组编辑、或使用NgAgo(格式嗜盐碱杆菌(Natronobacterium gregoryi)Argonaute)的DNA指导的核酸内切酶基因组编辑、或TALEN基因组编辑(转录激活因子样效应核酸酶)。在一些实施方案中,本公开文本的重组核酸分子作为微环表达载体存在于重组宿主细胞中以用于瞬时表达。

[0224] 本公开文本的重组核酸构建体可以包封在病毒衣壳或脂质纳米颗粒中,或者可以通过本领域已知的病毒或非病毒递送手段和方法(如电穿孔)递送。例如,将核酸引入细胞中可以通过病毒转导来实现。在一个非限制性例子中,腺相关病毒(AAV)被工程化以经由病毒转导将构建体递送至靶细胞。已经描述了若干种AAV血清型,并且所有已知的血清型都可以感染来自多种不同组织类型的细胞。AAV能够在体内转导广泛的物种和组织,而没有毒性迹象,并且它产生相对温和的先天性和适应性免疫应答。

[0225] 慢病毒来源的载体系统也可用于经由病毒转导进行构建体递送和基因疗法。慢病毒载体作为基因递送媒介物提供了若干种有吸引力的特性,包括:(i)通过将载体稳定整合到宿主基因组中进行持续的基因递送;(ii)能够感染分裂细胞和非分裂细胞两者;(iii)具有广泛的组织嗜性,包括重要的基因疗法靶细胞类型和细胞疗法靶细胞类型;(iv)在载体转导后不表达病毒蛋白;(v)能够递送复杂遗传元件,如多顺反子序列或含内含子的序列;(vi)具有可能更安全的整合位点特征;以及(vii)为相对容易的用于载体操纵和产生的系统。

[0226] 在一些实施方案中,可以用例如本申请的载体构建体对重组宿主细胞进行基因工程化(例如,转导或转化或转染),所述载体构建体可以是例如病毒载体或用于同源重组的载体(其包含与宿主细胞基因组的一部分同源的核酸序列),或者可以是用于表达目的多肽的表达载体。宿主细胞可以是未转化的细胞或已经用至少一种核酸分子转染的细胞。

[0227] 在一些实施方案中,重组细胞是原核细胞或真核细胞。在一些实施方案中,细胞在体内。在一些实施方案中,细胞是离体的。在一些实施方案中,细胞在体外。在一些实施方案中,重组细胞是真核细胞。在一些实施方案中,重组细胞是动物细胞。在一些实施方案中,动

物细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,动物细胞是人细胞。在一些实施方案中,细胞是非人灵长类动物细胞。在一些实施方案中,哺乳动物细胞是免疫细胞、或肿瘤细胞、或干细胞。在一些实施方案中,重组细胞是免疫系统细胞,例如淋巴细胞(例如,T细胞或NK细胞)或树突细胞。在一些实施方案中,免疫细胞是B细胞、单核细胞、自然杀伤(NK)细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞、巨噬细胞、调节性T细胞、辅助性T细胞(Tx)、细胞毒性T细胞(Tcm)或其他T细胞。在一些实施方案中,免疫系统细胞是T淋巴细胞。在一些实施方案中,细胞是表达CAR的报告T(CAR-T)细胞。

[0228] 在一些实施方案中,细胞是干细胞。在一些实施方案中,细胞是造血干细胞。在细胞的一些实施方案中,细胞是淋巴细胞。在一些实施方案中,细胞是前体T细胞或T调节性(Treg)细胞。在一些实施方案中,细胞是CD34+细胞、CD8+细胞或CD4+细胞。在一些实施方案中,细胞是选自以下的CD8+T细胞毒性淋巴细胞:幼稚CD8+T细胞、中枢记忆CD8+T细胞、效应记忆CD8+T细胞和大CD8+T细胞。在细胞的一些实施方案中,细胞是选自以下的CD4+T辅助性淋巴细胞:幼稚CD4+T细胞、中枢记忆CD4+T细胞、效应记忆CD4+T细胞和大CD4+T细胞。在一些实施方案中,可以通过对从受试者获得的样品进行的白细胞单采术获得所述细胞。在一些实施方案中,受试者是人类患者。

[0229] 在另一个方面,本文提供了包含至少一种如本文所公开的重组细胞和培养基的细胞培养物。通常,培养基可以是用于培养本文所述的细胞的任何合适的培养基。用于转化各种各样的上文提及的宿主细胞和物种的技术是本领域已知的并且描述于技术和科学文献中。因此,包含如本文所公开的至少一种重组细胞的细胞培养物也在本申请的范围内。

[0230] 适用于产生和维持细胞培养物的方法和系统是本领域已知的。

D.药物组合物

[0231] 本公开文本还提供了药物组合物,所述药物组合物包含本公开文本的重组细胞和药学上可接受的赋形剂,例如载体。

[0232] 适用于注射使用的药物组合物包括无菌水性溶液(在水溶性的情况下)或分散液以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。对于静脉内施用,合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL.TM.(新泽西州帕西帕尼的BASF)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况下,所述组合物都应当是无菌的并且应当是易于注射的程度的流体。它在制造和储存条件下应当是稳定的并且必须抵抗微生物(如细菌和真菌)的污染作用而保存。载体可以是溶剂或分散介质,所述溶剂或分散介质含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适的混合物。例如,可以通过使用包衣(如卵磷脂)、通过在分散液的情况下维持所需的粒度以及通过使用表面活性剂(例如,十二烷基硫酸钠)来维持适当的流动性。防止微生物的作用可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂(例如,对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等)来实现。在许多情况下,通常在所述组合物中包含等渗剂,例如糖、多元醇(如甘露糖醇、山梨糖醇)和氯化钠。通过在组合物中包含延迟吸收的药剂(例如,单硬脂酸铝和明胶),可以实现可注射组合物的延长吸收。

[0233] 无菌可注射溶液可以通过以下方式制备:将活性化合物以所需量掺入视需要具有上文所枚举成分中的一种或其组合的适当溶剂中,然后过滤灭菌。通常,通过将活性化合物掺入无菌媒介物中来制备分散液,所述无菌媒介物含有基本分散介质和来自上文所枚举成分的所需其他成分。

[0234] 在一些实施方案中,本公开文本的多链CAR和嵌合多肽也可以使用本领域已知的方法通过转染或感染施用,包括但不限于以下文献中描述的方法:McCaffrey等人(Nature418:6893,2002)、Xia等人(Nature Biotechnol.20:1006-10,2002)或Putnam(Am.J.Health Syst.Pharm.53:151-60,1996,勘误:Am.J.Health Syst.Pharm.53:325,1996)。

III.本公开文本的方法

A.治疗方法

[0235] 本公开文本尤其提供了通过向受试者施用治疗有效量的本公开文本的重组细胞、药物组合物、多链嵌合多肽或CAR来治疗受试者的健康状况的方法。本公开文本还尤其提供了通过向受试者施用本公开文本的载体来治疗受试者的健康状况的方法。

[0236] 本公开文本还提供了通过向受试者施用治疗有效量的本公开文本的重组细胞、药物组合物或CAR在受试者中诱导免疫应答的方法。

[0237] 免疫应答的非限制性例子包括当施用于免疫功能正常的受试者时细胞毒性T淋巴细胞(CTL)应答、B细胞应答(例如,抗体的产生)、NK细胞应答或其任何组合。

[0238] 施用本文所述的载体或重组细胞或药物组合物中的任一种可以用于治疗患者的相关健康状况或疾病,如癌症或自身免疫性疾病或感染(例如慢性感染)。在一些实施方案中,本公开文本的载体或细胞可以掺入组合物(例如药物或治疗型组合物)中,以用于治疗患有、怀疑患有或有高风险患上一种或多种与检查点抑制相关的自身免疫性病症或疾病的个体的方法中。示例性的自身免疫障碍和疾病可以包括而不限于乳糜泻、I型糖尿病、格雷夫斯病、炎性肠病、多发性硬化、银屑病、类风湿性关节炎和系统性红斑狼疮。

[0239] 在一些实施方案中,所述方法包括向所述个体施用有效数量的本文公开的重组细胞,其中所述重组细胞抑制所述个体中所述靶细胞的活性。通常,所公开的方法的靶细胞可以是个体中的任何细胞类型,并且可以是例如来自血液恶性肿瘤的细胞、多发性骨髓瘤细胞、实体瘤细胞、急性骨髓瘤白血病细胞、间变性淋巴瘤细胞、星形细胞瘤细胞、B细胞癌细胞、乳腺癌细胞、结肠癌细胞、室管膜瘤细胞、食管癌细胞、胶质母细胞瘤细胞、神经胶质瘤细胞、平滑肌肉瘤细胞、脂肪肉瘤细胞、肝癌细胞、肺癌细胞、套细胞淋巴瘤细胞、黑色素瘤细胞、神经母细胞瘤细胞、非小细胞肺癌细胞、少突神经胶质瘤细胞、卵巢癌细胞、胰腺癌细胞、外周T细胞淋巴瘤细胞、肾癌细胞、肉瘤细胞、胃癌细胞、癌细胞、间皮瘤细胞或肉瘤细胞。在一些实施方案中,靶细胞是致病性细胞。

[0240] 在一些实施方案中,本公开文本的方法涉及将有效量的本公开文本的重组细胞施用于需要这种治疗的个体。此施用步骤可以使用本领域的任何植入递送方法来完成。例如,可以将本公开文本的重组细胞直接输注到个体的血流中或以其他方式施用于所述个体。

[0241] 在一些实施方案中,本文公开的方法包括将重组细胞通过导致将所引入的细胞至少部分定位在所需部位从而产生一种或多种所需作用的方法或途径施用(所述术语与术语“引入”、“植入”和“移植”可互换使用)至个体。可以通过任何适当的途径来施用重组细胞或其分化的子代,所述适当的途径导致递送至个体的所需位置,所施用的细胞或细胞组分的至少一部分在此处保持存活。在施用于个体后细胞的活力时间段可以短至数小时,例如二十四小时,至数天,至长至数年,或甚至个体的寿命,即长期移植。

[0242] 当在一些实施方案中治疗性地提供时,在疾病或病症的症状或指征发作时(或之

后),例如在疾病或病症发作时,提供重组细胞。

[0243] 治疗有效量包括重组细胞当施用于个体时足以促进特定有益作用的量,所述个体如患有、怀疑患有或有风险患上疾病的个体。在一些实施方案中,有效量包括足以预防或延迟疾病症状的发展、改变疾病症状的进程(例如但不限于减缓疾病症状的进展)或逆转疾病症状的量。应理解,对于任何给定的病例,本领域普通技术人员都可以使用常规实验确定适当的有效量。

[0244] 为了在本文所述的各种实施方案中使用,如本文所公开的重组细胞的有效量可以是至少10^2个细胞、至少5x 10^2个细胞、至少10^3个细胞、至少5x 10^3个细胞、至少10^4个细胞、至少5x 10^4个细胞、至少10^5个细胞、至少2x 10^5个细胞、至少3x 10^5个细胞、至少4x 10^5个细胞、至少5x 10^5个细胞、至少6x 10^5个细胞、至少7x 10^5个细胞、至少8x 10^5个细胞、至少9x 10^5个细胞、至少1x 10^6个细胞、至少2x 10^6个细胞、至少3x 10^6个细胞、至少4x 10^6个细胞、至少5x 10^6个细胞、至少6x 10^6个细胞、至少7x 10^6个细胞、至少8x 10^6个细胞、至少9x 10^6个细胞或其倍数。重组细胞可以源自一个或多个供体,或者可以从自体来源获得。在一些实施方案中,将重组细胞在施用至有需要的个体之前在培养中扩增。

[0245] 在一些实施方案中,通过方法或途径将重组细胞组合物或药物组合物(例如,包含根据本文所述的任何细胞的多个重组细胞的组合物)递送至个体体内导致将细胞组合物至少部分定位于期望部位。可以通过任何导致个体中的有效治疗的适当途径施用包含重组细胞的组合物,例如,施用导致递送至个体中的期望位置,在该期望位置处所递送组合物的至少一部分例如至少1x 10^4个细胞被递送至期望部位保持一段时间。施用方式包括注射、输注和滴注。“注射”包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、心室内、囊内、眼眶内、心脏内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、珠网膜下、脊柱内、脑脊髓内和胸骨内注射和输注。在一些实施方案中,途径是静脉内的。对于细胞的递送,通过注射或输注进行递送是优选的施用方式。

[0246] 在一些实施方案中,例如经由输注或注射全身施用所述重组细胞。例如,不是直接将重组细胞群体施用至靶部位、组织或器官,而是使它进入个体的循环系统,从而进行代谢和其他相似的生物过程。

[0247] 包括本文提供的任何组合物的用于治疗疾病或病症的治疗的功效可以由熟练的临床医生确定。然而,本领域技术人员将理解的是,如果疾病的任何一种或全部体征或症状或标记物得到改善或改进,则认为治疗是有效的。还可以通过如由减少住院治疗或对医疗干预的需要(例如,疾病进展停止或至少减缓)所评估的个体恶化的失败来测量疗效。测量这些指标的方法是本领域技术人员已知的和/或在本文中有描述。治疗包括对个体或动物的疾病的任何治疗(一些非限制性例子包括人或哺乳动物)并且包括:(1)抑制疾病,例如,停止或减缓症状的进展;或(2)缓解疾病,例如,导致症状消退;以及(3)预防或减少症状发展的可能性。

[0248] 适合于通过本公开文本的组合物和方法治疗的疾病包括但不限于癌症、自身免疫性疾病、炎性疾病和感染性疾病。在一些实施方案中,疾病是癌症或慢性感染。在一些实施方案中,癌症是血液恶性肿瘤。在一些实施方案中,疾病是实体瘤。

[0249] 在所公开的方法的一些实施方案中,个体是哺乳动物。在一些实施方案中,哺乳动物是人。在一些实施方案中,个体患有或怀疑患有与由细胞表面配体或抗原介导的细胞信

号传导的抑制相关的疾病。

[0250] 在本公开文本的方法的一些实施方案中,所施用的重组细胞调节个体中靶细胞的活性。在一些实施方案中,靶细胞的活性包括所选基因的表达、增殖、凋亡、非凋亡性死亡、分化、去分化、迁移、分子分泌、细胞粘附和细胞溶解活性。

[0251] 如上所讨论的,可以将本文所述的重组细胞和药物组合物与一种或多种另外的治疗剂(如例如化学治疗剂或抗癌剂或抗癌疗法)组合施用。与一种或多种另外的治疗剂"组合"施用包括以任何顺序同时(并行)和连续施用。在一些实施方案中,所述一种或多种另外的治疗剂、化学治疗剂、抗癌剂或抗癌疗法选自化学疗法、放射疗法、免疫疗法、激素疗法、毒素疗法和手术。"化学疗法"和"抗癌剂"在本文中可互换使用。可以使用各种类别的抗癌剂。非限制性例子包括:烷化剂、抗代谢物、蒽环类、植物生物碱、拓扑异构酶抑制剂、鬼臼毒素、抗体(例如,单克隆或多克隆的)、酪氨酸激酶抑制剂(例如,甲磺酸伊马替尼(Gleevec.RTM.或Glivec.RTM.))、激素治疗、可溶性受体和其他抗肿瘤药。

B.用于同时诱导T细胞信号传导和基因调节或诱导增强的T细胞信号传导的方法

[0252] 本公开文本还提供了用于在T细胞中同时诱导T细胞信号传导和基因调节的方法,所述方法包括(a)提供具有本公开文本的多链嵌合多肽或嵌合抗原受体的T细胞;和(b)使T细胞暴露于所选配体,其中所选配体与细胞外配体结合结构域的结合同时诱导细胞内信号传导和转录调节因子的释放。

[0253] 本文还提供了用于在T细胞中同时诱导T细胞信号传导和基因调节的方法,所述方法包括(a)提供包含本公开文本的多链嵌合多肽或CAR的载体;和(b)用载体转导T细胞,其中所选配体与细胞外配体结合结构域的结合同时诱导细胞内信号传导和转录调节因子的释放。

[0254] 本文还提供了在T细胞中诱导增强的T细胞信号传导的方法,所述方法包括(a)提供包含本公开文本的多链嵌合多肽的T细胞;和(b)将所述T细胞暴露于所选配体,其中所述所选配体与所述细胞外配体结合结构域的结合增强细胞内信号传导。

[0255] 本文还提供了在T细胞中诱导增强的T细胞信号传导的方法,所述方法包括(a)提供包含本公开文本的多链嵌合多肽的载体,或包含本公开文本的任一种多链多肽的第一多肽的载体和包含本公开文本的任一种多链多肽的第二多肽的第二载体;和(b)用一种或多种载体转导T细胞,其中所述所选配体与所述细胞外配体结合结构域的结合诱导增强的细胞内信号传导。

[0256] 在一些实施方案中,所述T细胞的诱导的细胞内信号传导调节参与增殖、凋亡、非凋亡性死亡、分化、去分化、迁移、分子分泌、细胞粘附和/或细胞溶解活性的所选基因的表达。在一些实施方案中,所释放的转录调节因子调节所述T细胞中有效载荷的表达。在一些实施方案中,有效载荷包括趋化因子、趋化因子受体、嵌合抗原受体、细胞因子、细胞因子受体、分化因子、生长因子、生长因子受体、激素、代谢酶、病原体衍生的蛋白质、增殖诱导剂、受体、RNA指导的核酸酶、位点特异性核酸酶、T细胞受体、毒素、毒素衍生的蛋白质、转录调节因子、转录激活因子、转录阻遏因子、翻译调节因子、翻译激活因子、翻译阻遏因子、激活性免疫受体、抗体、凋亡抑制剂、凋亡诱导剂、工程化的T细胞受体、免疫激活因子、免疫抑制剂或抑制性免疫受体。

[0257] 在一些实施方案中,与不表达本公开文本的嵌合受体的参考细胞相比,增强的T细

胞信号传导可以是T细胞信号传导的1％、5％、10％、25％、50％、75％、100％或大于100％的改善或增强。

C.用于调节细胞的活性的方法

[0258] 在另一个方面,本文提供了用于调节细胞的活性的各种方法,所述方法包括(a)提供有效量的任一种本公开文本的重组细胞;以及(b)使所述细胞与所选配体接触,其中所选配体与所述细胞外配体结合结构域的结合(i)诱导配体诱导型蛋白水解切割位点的切割并释放所述转录调节因子,并且同时(ii)激活T细胞信号传导,其中所释放的转录调节因子调节所述重组细胞的活性。本领域技术人员在阅读本公开文本后将理解的是,所公开的方法可以在体内、离体或体外进行。

[0259] 可以使用本文提供的方法调节的非限制性示例性细胞活性包括但不限于基因表达、增殖、凋亡、非凋亡性死亡、分化、去分化、迁移、基因产物的分泌、细胞粘附和细胞溶解活性。

[0260] 在一些实施方案中,所释放的转录调节因子调节所述细胞的基因产物的表达。在一些实施方案中,所释放的转录调节因子调节细胞中异源基因产物的表达。异源基因产物是通常在天然细胞中见不到的基因产物,例如通常不是由细胞产生的基因产物。例如,可以用包含编码所述异源基因产物的核苷酸序列的核酸对细胞进行基因修饰。

[0261] 在一些实施方案中,异源基因产物是分泌的基因产物。在一些实施方案中,异源基因产物是细胞表面基因产物。在一些情况下,异源基因产物是胞内基因产物。在一些实施方案中,所释放的转录调节因子同时调节细胞中两种或更多种异源基因产物的表达。

[0262] 在一些实施方案中,细胞中的异源基因产物选自趋化因子、趋化因子受体、嵌合抗原受体、细胞因子、细胞因子受体、分化因子、生长因子、生长因子受体、激素、代谢酶、病原体衍生的蛋白质、增殖诱导剂、受体、RNA指导的核酸酶、位点特异性核酸酶、T细胞受体(TCR)、嵌合抗原受体(CAR)、毒素、毒素衍生的蛋白质、转录调节因子、转录激活因子、转录阻遏因子、翻译调节因子、翻译激活因子、翻译阻遏因子、激活性免疫受体、抗体、凋亡抑制剂、凋亡诱导剂、工程化T细胞受体、免疫激活因子、免疫抑制剂和抑制性免疫受体。

[0263] 在一些实施方案中,所释放的转录调节因子调节所述细胞的分化,并且其中所述细胞是免疫细胞、干细胞、祖细胞或前体细胞。

IV.系统和试剂盒

[0264] 本文还提供了系统和试剂盒,所述系统和试剂盒包含本文提供并描述的多链嵌合多肽、CAR、重组核酸、重组细胞或药物组合物以及用于它们的制备和使用的书面说明书。例如,在一些实施方案中,本文提供了包含以下中的一种或多种的系统和/或试剂盒:本公开文本的多链嵌合多肽、如本文所述的重组核酸、如本文所述的重组细胞或如本文所述的药物组合物。在一些实施方案中,本公开文本的系统和/或试剂盒还包括一个或多个注射器(包括预填充注射器)和/或导管(包括预填充注射器),用于将任一种所提供的重组核酸、重组细胞或药物组合物施用至个体。在一些实施方案中,试剂盒可以具有一种或多种另外的治疗剂,所述另外的治疗剂可以与其他试剂盒组分同时或依序施用以用于期望目的,例如用于在有需要的个体中调节细胞的活性、抑制靶癌细胞或治疗健康状况(例如,疾病)。

[0265] 在一些实施方案中,系统或试剂盒可以进一步包含用于使用试剂盒的组分来实践所述方法的说明书。用于实践所述方法的说明书通常记录在合适的记录介质上。例如,所述

说明书可以印刷在基材如纸或塑料等上。所述说明书可以作为药品说明书存在于试剂盒中、试剂盒的容器或其组分的标签中(即,与包装或分包装相关联)等。所述说明书可以作为存在于合适的计算机可读存储介质(例如,CD-ROM、软盘、闪存驱动器等)上的电子存储数据文件而存在。在一些情形下,实际说明书不存在于所述试剂盒中,而是可以提供用于从远程源(例如,经由互联网)获得所述说明书的手段。这个实施方案的例子是包含网址的试剂盒,在其中可以查看说明书和/或可以从其下载说明书。与说明书一样,可以将这种用于获得说明书的手段记录在合适的基材上。

[0266] 本文给出的一般方法的讨论仅旨在用于说明目的。在审阅本公开文本后,其他替代方法和替代方案对于本领域技术人员而言将是清楚的,并且将被包括在本申请的精神和范围内。

[0267] 贯穿本说明书,引用了各种专利、专利申请和其他类型的出版物(例如,期刊文章、电子数据库条目等)。将本文引用的所有专利、专利申请和其他出版物的披露内容都出于所有目的通过引用以其整体特此并入。

[0268] 不承认本文引用的任何参考文献构成现有技术。参考文献的讨论陈述其著者的主张,并且发明人保留质疑所引用文献的准确性和相关性的权利。将清楚地理解,尽管在本文中提及许多信息源,包括科学期刊文章、专利文件和教科书;但此提及并不构成承认任何这些文件构成本领域公知常识的一部分。

实施例

[0269] 除非另外指示,否则本发明的实践将采用本领域技术人员熟知且在文献(如Sambrook,J.和Russell,D.W.(2012))中充分解释的分子生物学、微生物学、细胞生物学、生物化学、核酸化学和免疫学的常规技术。Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第4版).Cold Spring Harbor,NY:Cold Spring Harbor Laboratory以及Sambrook,J.和Russel,D.W.(2001).Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第3版).Cold Spring Harbor,NY:Cold Spring Harbor Laboratory(本文中合称为“Sambrook”);Ausubel,F.M.(1987).Current Protocols in Molecular Biology.New York,NY:Wiley(包括至2014年的增刊);Bollag,D.M.等人(1996).Protein Methods.New York,NY:Wiley-Liss;Huang,L.等人(2005).Nonviral Vectors for Gene Therapy.San Diego:Academic Press;Kaplitt,M.G.等人(1995).Viral Vectors:Gene Therapy and Neuroscience Applications.San Diego,CA:Academic Press;Lefkovits,I.(1997).The Immunology Methods Manual:The Comprehensive Sourcebook of Techniques.San Diego,CA:Academic Press;Doyle,A.等人(1998).Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures in Biotechnology.New York,NY:Wiley;Mullis,K.B.,Ferré,F.和Gibbs,R.(1994).PCR:The Polymerase Chain Reaction.Boston:Birkhauser Publisher;Greenfield,E.A.(2014).Antibodies:ALaboratory Manual(第2版).New York,NY:Cold Spring Harbor Laboratory Press;Beaucage,S.L.等人(2000).Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry.New York,NY:Wiley,(包括至2014年的增刊);以及Makrides,S.C.(2003).Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells.阿姆斯特丹,荷兰:Elsevier Sciences B.V.,所述文献的公开内容通过引用并入本文。

[0270] 在以下实施例中进一步详细公开了另外的实施方案,所述实施例仅通过说明的方

式提供,并不旨在以任何方式限制本公开文本或权利要求的范围。

实施例1:受体表达

[0271] 本实施例描述了受体表达的流式细胞术数据。

[0272] 用抗CD3/抗CD28 Dynabeads(Gibco)激活原代人CD3+T细胞,并用表达多链受体构建体的慢病毒构建体和含有转录报告构建体的另一慢病毒构建体转导。使用针对含有结合物(CD19scFv)的链上的myc标签的AlexaFluor647标记的抗myc抗体(Cell Signaling)测量受体表达。通过在报告质粒上发现的组成型mCitrine基因测量报告物表达。在初始T细胞刺激后第5天分选双阳性细胞,并且进一步扩增用于激活测试。在此,受体设计056(图2A)和056C(图2B)显示该队列的最高表达。

实施例2:受体激活

[0273] 本实施例描述了两个受体实施方案056和056C的受体激活和靶标杀伤(图3A)。

[0274] 将表达抗CD19受体的1E5双阳性T细胞与以下物质共培养48小时:无添加(红色,“单独的T细胞”)、1E5 K562细胞(蓝色,(+K562))或1E5 CD19+K562细胞(黄色,“+K562-CD19”)。随后使用Fortessa X-50(BD)测量诱导型BFP报告基因的转录激活(图3B)。通过DRAQ7染色和流式细胞术测量靶标杀伤(图3C)。受体056显示出比受体056C更好的杀伤,并且受体056C显示出更好的转录激活。

实施例3:受体056F和056G的受体表达

[0275] 本实施例描述了受体056F和056G的实施方案的受体表达的流式细胞术数据。

[0276] 用抗CD3/抗CD28 Dynabeads(Gibco)激活原代人CD3+T细胞,并用表达多链受体构建体的慢病毒构建体和含有转录报告构建体的另一慢病毒构建体转导。使用针对含有结合物(CD19scFV)的链上的myc标签的AlexaFluor647标记的抗myc抗体(Cell Signaling)测量受体表达。通过在报告质粒上发现的组成型mCitrine基因测量报告物表达。在初始T细胞刺激后第5天分选双阳性细胞,并且进一步扩增用于激活测试。受体设计056F(图4C)和056G(图4D)显示该队列的最高表达。

实施例4:实施方案056、056E-G的受体激活和性能

[0277] 本实施例描述了受体056、056E、056F和056G的受体激活和靶标杀伤测试。

[0278] 将表达抗CD19受体的1E5双阳性T细胞与以下物质共培养5天:无添加(红色,“单独的T细胞”)、1E5 K562细胞(蓝色,“+K562”)或1E5 CD19+K562细胞(黄色,“+K562-CD19”)。24h后,使用Fortessa X-50(BD)测量诱导型BFP报告基因的转录激活(顶部行)。通过DRAQ7染色和流式细胞术在24小时和120小时测量靶标杀伤(底部图)。在此,受体056F(图5C)显示转录活性和杀伤活性二者,受体056(图5A)和056E(图5B)显示杀伤,并且受体056G(图5D)仅显示转录激活。

实施例5:多链受体模块工程化策略

[0279] 本实施例描述了使用pRay056F作为原型的多链受体模块工程化策略。如图6所示,具有DAP12信号传导结构域的一条链(DAP12链)被ITAM和来自TCR、共刺激蛋白和细胞因子受体的信号传导结构域替代。另一条链(主链,含有转录因子Gal4-VP64)的转录因子(TF)被人转录因子或被ITAM和来自TCR、共刺激蛋白和细胞因子受体的信号传导结构域替代。

实施例6:具有CD3z取代的多链受体功能

[0280] 本实施例描述了具有CD3z取代的多链受体的测试。在此,DAP12多链受体(056F,图

7A)的DAP12 ITAM信号传导结构域被来自CD3z的ITAM信号传导结构域替代,所述CD3z含有3个ITAM(056I,图7B)。将表达抗CD19受体的1E5双阳性T细胞与以下物质共培养5天:无添加(红色,“单独的T细胞”)、1E5 K562细胞(蓝色,“+K562”)或1E5 CD19+K562细胞(黄色,“+K562-CD19”)。24h后,使用Fortessa X-50(BD)测量诱导型BFP报告基因的转录激活(顶部行)。通过DRAQ7染色和流式细胞术在24和120小时测量靶标杀伤(底部图)。这种取代显现出增加了靶细胞的杀伤(图7B,底部行)。转录激活略微降低,但仍然很强(图7B,顶部行)。来自SNIPR受体(图7C)和标准BBz CAR(图7D)的转录激活和杀伤分别作为转录激活和杀伤的阳性对照被包括在内。

实施例7:具有人转录因子的多链受体功能

[0281] 本实施例描述了对具有人转录因子的多链受体的测试。在此,在DAP12(056H,图8A)和CD3z(图8B)的上下文中,含有非人部分的Gal4-VP64被包含人部分的转录因子取代。将这些受体设计与被设计为具有在单链受体上线性构建的转录和信号传导结构域的受体(图8C)进行比较。将表达抗CD19受体的1E5双阳性T细胞与以下物质共培养5天:无添加(红色,“单独的T细胞”)、1E5 K562细胞(蓝色,“+K562”)或1E5 CD19+K562细胞(黄色,“+K562-CD19”)。24h后,使用Fortessa X-50(BD)测量诱导型BFP报告基因的转录激活(顶部行)。通过DRAQ7染色和流式细胞术在24小时和120小时测量靶标杀伤(底部图)。两种多链受体都能够介导转录激活和靶细胞的杀伤(图8A和图8B,顶部行和底部行),而单链设计则不能(图8C,顶部行和底部行)。来自标准BBz CAR的转录激活和杀伤(图8D)作为杀伤的阳性对照被包括在内。

实施例8:采用使用双载体转导的模块工程化策略的多链受体

[0282] 本实施例描述了使用双载体转导的多链受体的模块工程化策略。在此,每条链由通过所列出的DAP12链和主链构建体(图9)的转导引入的单独启动子表达。将每条侧链与每条主链成对组合,以评估将两条信号传导链配对在一起的效果。主链变体中的三种变体含有代替转录因子的信号传导组分,其被设计成递送另外的信号传导能力而不是转录激活。

实施例9:多链受体对的表达谱

[0283] 本实施例描述了每个多链受体对的表达谱。通过T2A-mCherry信号检测含有DAP-12链的细胞,而通过Myc标签染色检测含有主链受体的细胞。Myc标签染色用于评估受体表达水平。所有受体都显示出一定水平的表达,其中一些对显示出比其他对更好的表达,如更高的双阳性群体所标出的(图10)。

实施例10:增强杀伤和存活的多链受体的筛选

[0284] 本实施例描述了增强杀伤和存活的多链受体的筛选。将表达多链受体的原代人CD3+T细胞与100k个K562靶细胞以1:4、1:2和1:1的T细胞与靶标比率共培养,并随时间追踪。将共培养物维持在不含外源性细胞因子的人T细胞培养基中,每5天补料一次。在第5、12和20天,移除一半共培养物(更换培养基),针对T细胞标记物进行染色,并通过流式细胞术进行分析。对显示T细胞(图11-图13)和靶细胞(图14-图16)存活的计数进行定量。标准BBz CAR T细胞作为对照(每个图的最后一列)被包括在内。截至最后时间点(第20天),几种多链受体显现出介导比BBz CAR更优的T细胞存活和靶细胞杀伤。

实施例11:受体和应答元件构建体设计

[0285] 本实施例描述了通过将CD19 scFv{Porter:2011gr}与相应的受体支架和Gal4

DBD VP64融合而构造的多链嵌合多肽(例如,受体)家族的设计和构建。受体含有用于膜靶向的n末端CD8α信号肽(MALPVTALLLPLALLLHAARP)和用于易于用α-myc A647(cell-signaling#2233)测定表面表达的myc标签(EQKLISEEDL)。对于所有原代T细胞实验,将受体克隆至含有PGK启动子(SEQ ID NO:1)的修饰的pHR'SIN:CSW载体中。

实施例12:原代人T细胞分离和培养

[0286] 本实施例描述了原代人T细胞的分离和培养,所述原代人T细胞随后用于以下实施例3中描述的各种细胞转导实验。在这些实验中,在通过阴性选择的单采术(STEMCELL Technologies#15062和15063)后,从匿名供体血液中分离原代CD4+和CD8+T细胞。血液获自太平洋血液中心(Blood Centers of the Pacific)(加利福尼亚州旧金山市),如大学机构审查委员会(University Institutional Review Board)批准的。将T细胞冷冻保存在具有20%人AB血清(Valley Biomedical Inc.,#HP1022)和10% DMSO的RPMI-1640(UCSF细胞培养中心)中。解冻后,对于所有实验,在补充有30单位/mL IL-2(NCI BRB临床前储存库)的由X-VIVO 15(Lonza#04-418Q)、5%人AB血清和10mM中和的N-乙酰基L-半胱氨酸(Sigma-Aldrich#A9165)组成的人T细胞培养基中培养T细胞。

实施例13:人T细胞的慢病毒转导

[0287] 此实施例描述用于人T细胞的慢病毒转导的通用方案。经由以下方法产生泛嗜性VSV-G假型化慢病毒:将Lenti-X 293T细胞(Clontech#11131D)用pHR'SIN:CSW转基因表达载体和病毒包装质粒pCMVdR8.91和pMD2.G使用Mirus TransIT-Lenti(Mirus#MIR 6606)转染。将原代T细胞在同一天解冻,并且在培养24小时后,用人T激活因子CD3/CD28Dynabeads(Life Technologies#11131D)以1:3的细胞:珠比例进行刺激。在48小时,收获病毒上清液,并且将原代T细胞暴露于病毒,持续24小时。在T细胞刺激后第5天,去除Dynabeads,并扩增T细胞直至第14天,此时将其静置并可以用于测定中。用Beckton Dickinson(BD)FACs ARIA II针对测定分选T细胞。

实施例14:癌细胞系

[0288] 这个实施例描述以与Daudi肿瘤等同的水平表达CD19的髓性白血病细胞的生成。使用的癌细胞系是K562髓细胞性白血病细胞(ATCC#CCL-243)。慢病毒转导K562以与Daudi肿瘤等同的水平稳定表达人CD19,或经由多西环素诱导型系统表达HER2。通过用α-CD19 APC(Biolegend#302212)对细胞染色来测定CD19水平,并且通过用α-HER2 AF647(Biolegend#324412)对细胞染色来测定HER2水平。针对转基因的表达分选所有细胞系。

实施例15:体外刺激原代T细胞

[0289] 对于所有体外T细胞刺激,将1×10^5个T细胞与靶细胞以1:1比率在U形底96孔组织培养板中共培养。在24小时或如指示的用BD Fortessa X-50分析培养物的报告基因激活和/或靶细胞杀伤。所有流式细胞术分析都在FlowJo软件(TreeStar)中进行。

实施例16:重组构建体

[0290] 以下是编码本公开文本的多链嵌合多肽的例子的重组核酸构建体或盒的例子。如上所述,构建体包含两个盒。在本实施例中,编码第二多肽的盒位于编码第一多肽的盒的5'侧。T2A自身蛋白水解肽序列位于第二多肽与第一多肽之间。可以以类似的方式构建具有位于第二多肽5'侧的第一多肽的构建体。

构建体	其中第二多肽在第一多肽的 N 末端的实施方案中的构建体组分。
pRay056	DAP12-T2A-CD19scFv-TREM2-Gal4VP64
pRay056B	DAP12-T2A-CD19scFv-TREM2-Notch1TMD(L312K)-Notch2JMD-TREM2-Gal4VP64
pRay056C	DAP12-T2A-CD19scFv-CD8 铰链-Notch1TMD(L312K)-Notch2JMD-Gal4VP64
pRay056D	DAP12-T2A-CD19scFv-TREM2-Notch1TMD(L312K)-Notch2JMD-Gal4VP64
pRay056F	DAP12-T2A-CD19scFv-CD8 铰链-聚 VTMD-V9K-Notch2JMD-Gal4VP64
pRay056G	DAP12-T2A-CD19scFv-CD8 铰链-聚 VTMD-V10K-Notch2JMD-Gal4VP64
pRay056H	CD19scFv_DAP12-T2A-K9-HNF1a
pRay056I	DAP12-CD3z-t2a-CD19scFv-K9-Gal4VP64
pRay056J	DAP12-CD3z-t2a-CD19scFv-K9-HNF1a-p65(361)

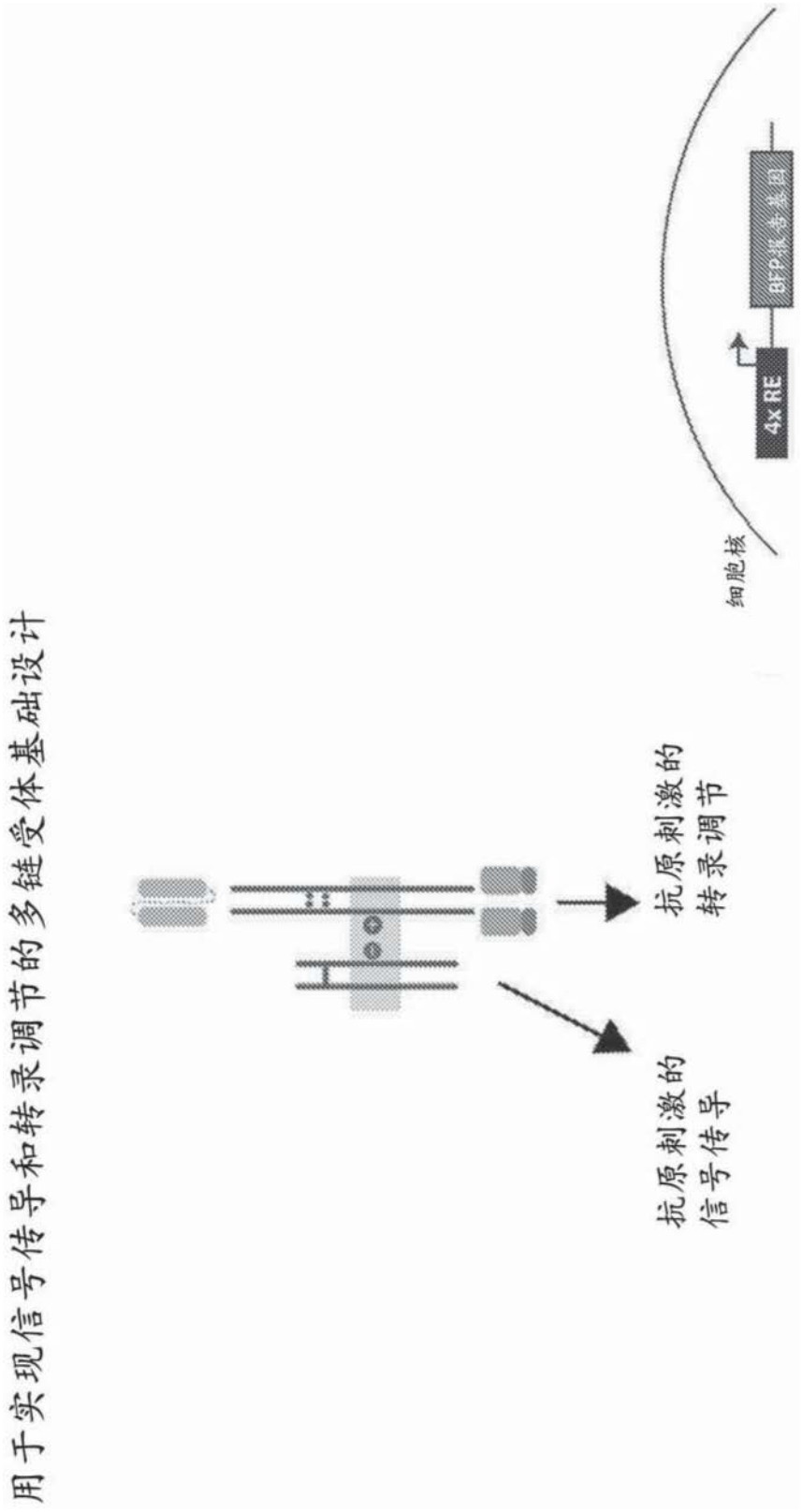
用于实现信号传导和转录调节的多链受体基础设计
抗原刺激的
信号传导
抗原刺激的
转录调节
细胞核
4x RE
BFP报告基因

图1

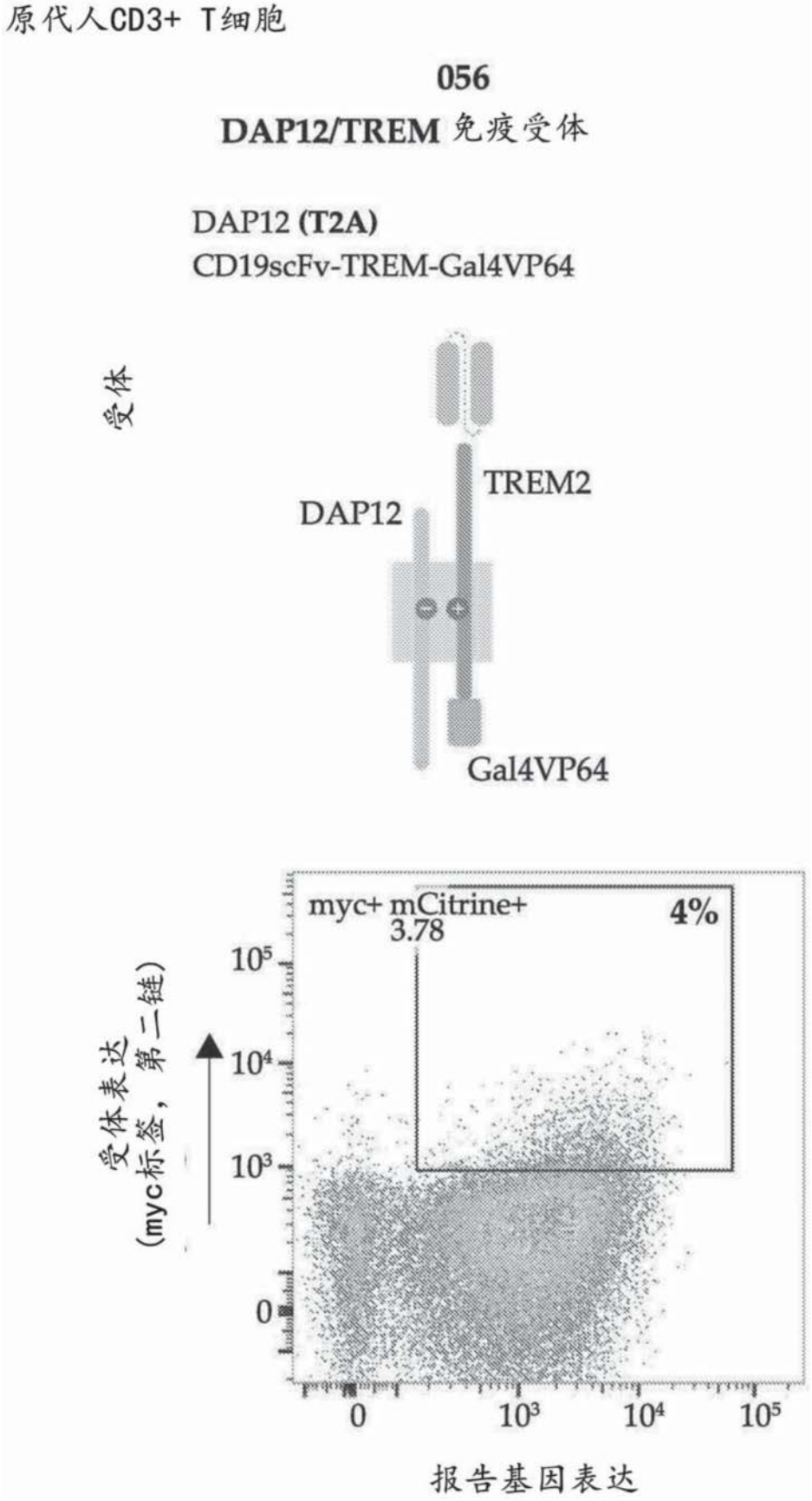
原代人CD3+ T细胞
056
DAP12/TREM 免疫受体
DAP12 (T2A)
CD19scFv-TREM-Gal4VP64
受体
TREM2
DAP12
Gal4VP64
myc+ mCitrine+
3.78
4%
受体表达
(myc标签，第二链)
报告基因表达

图2A

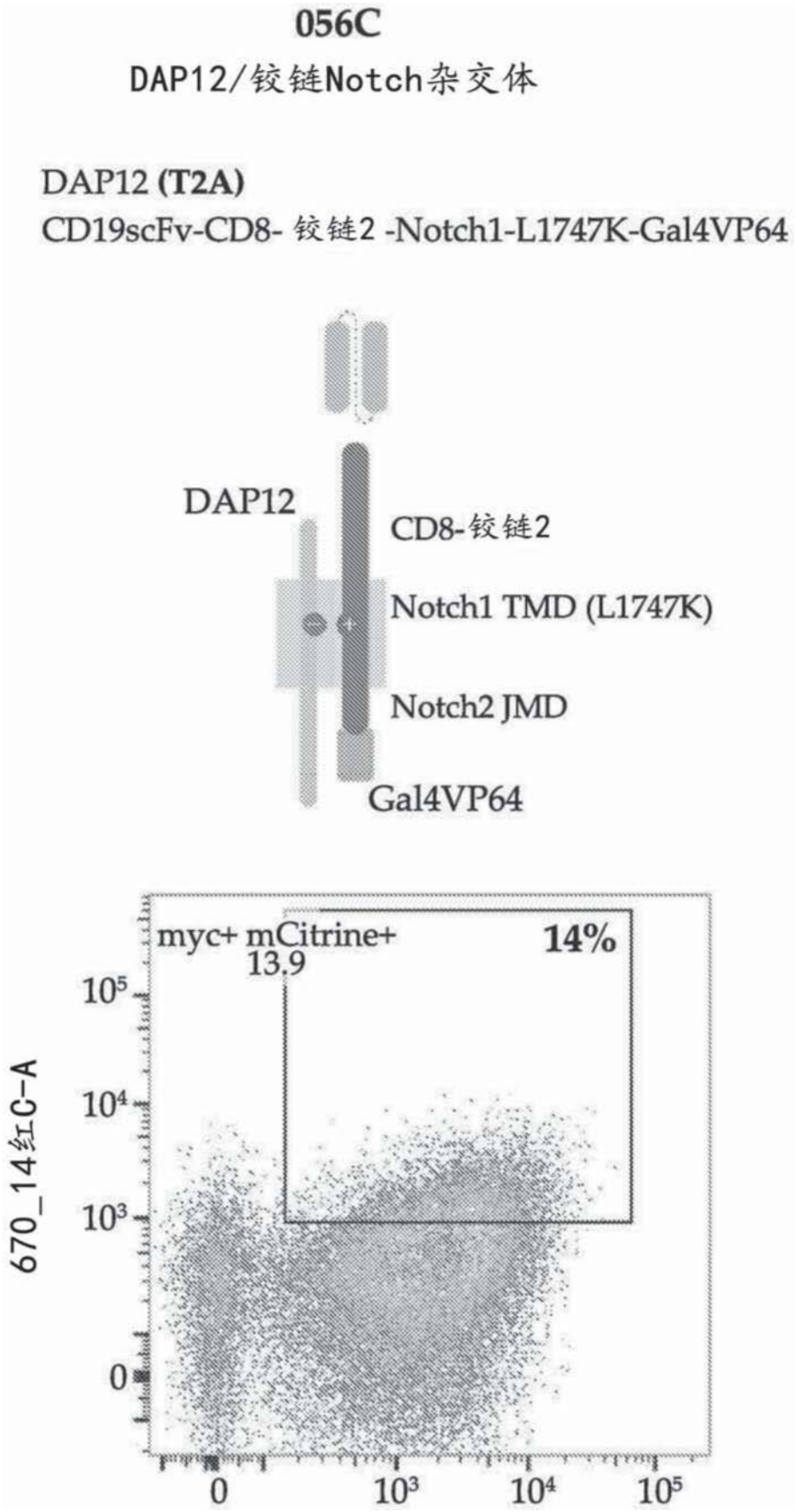
056C
DAP12/铰链Notch杂交体
DAP12 (T2A)
CD19scFv-CD8- 铰链2 -Notch1-L1747K-Gal4VP64
DAP12
CD8-铰链2
Notch1 TMD (L1747K)
Notch2 JMD
Gal4VP64
myc+ mCitrine+
13.9
14%
670_14红C-A
10^5
10^4
10^3
0
0
10^3
10^4
10^5

图2B

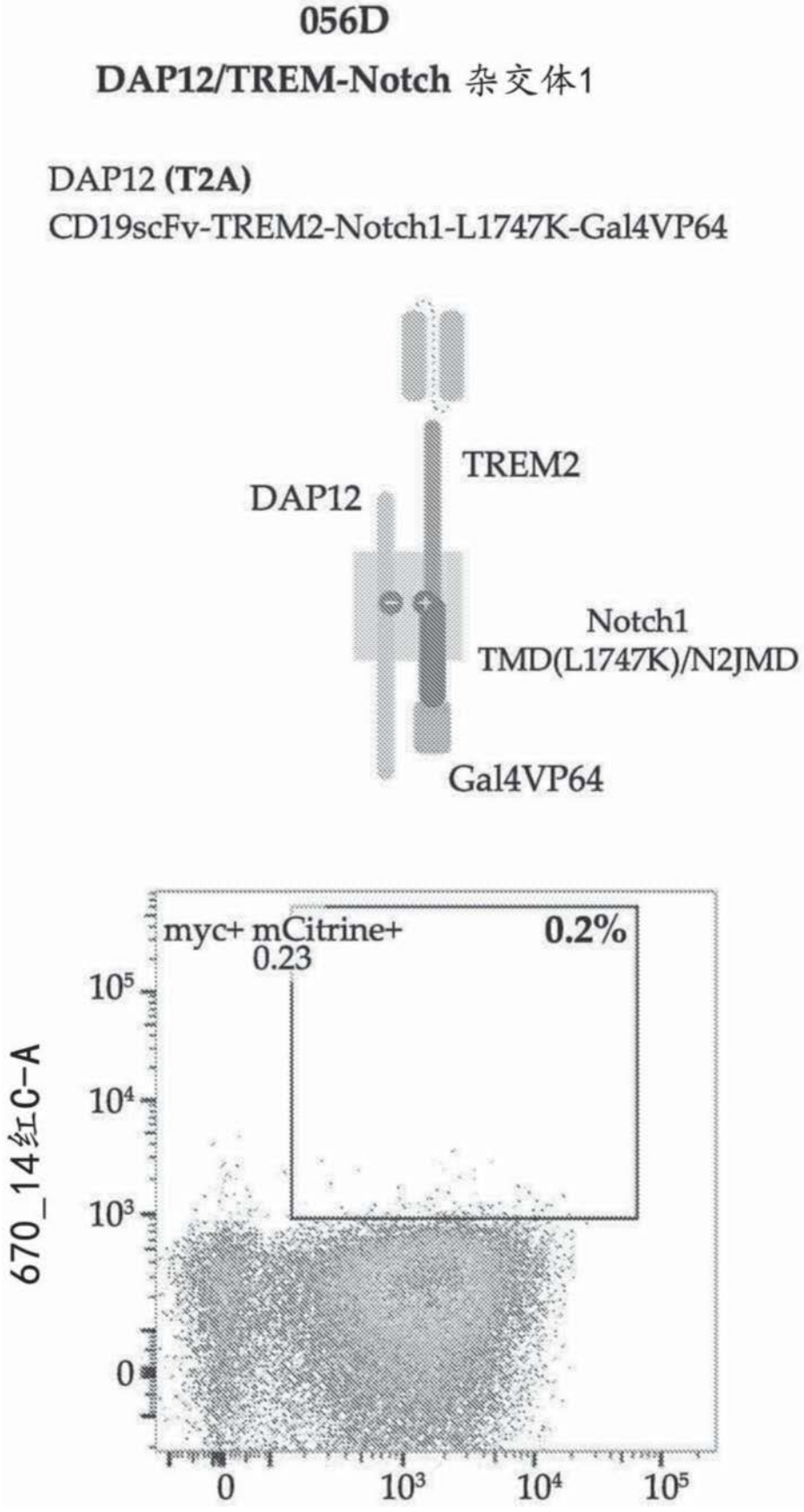
056D
DAP12/TREM-Notch 杂交体1
DAP12 (T2A)
CD19scFv-TREM2-Notch1-L1747K-Gal4VP64
TREM2
DAP12
Notch1
TMD(L1747K)/N2JMD
Gal4VP64
myc+ mCitrine+
0.23
0.2%
670_14红C-A
10⁵
10⁴
10³
0
0
10³
10⁴
10⁵

图2C

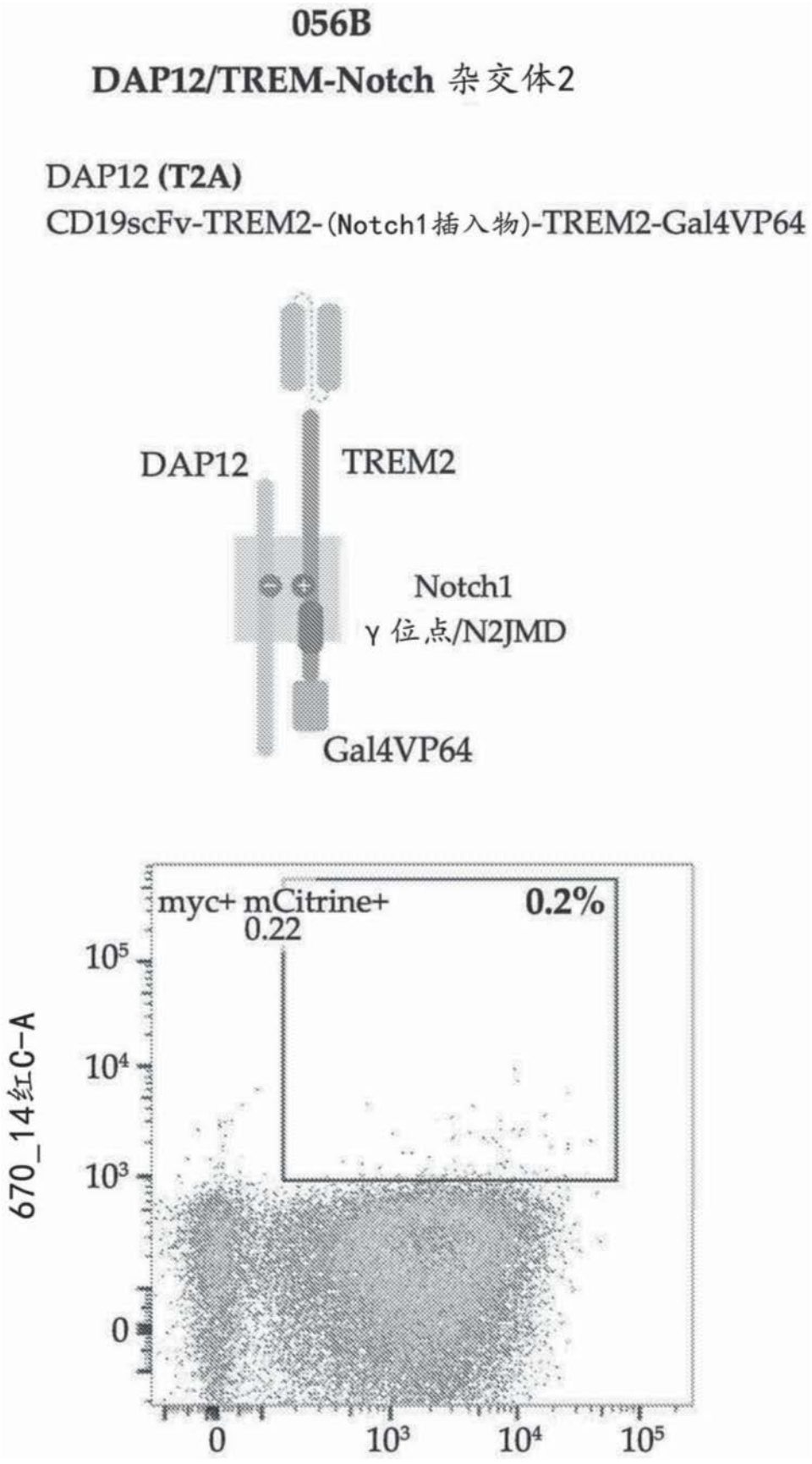
056B
DAP12/TREM-Notch 杂交体2
DAP12 (T2A)
CD19scFv-TREM2-(Notch1插入物)-TREM2-Gal4VP64
DAP12
TREM2
Notch1
γ 位点/N2JMD
Gal4VP64
myc+ mCitrine+
0.22
0.2%
670_14红C-A
10⁵
10⁴
10³
0
0
10³
10⁴
10⁵

图2D

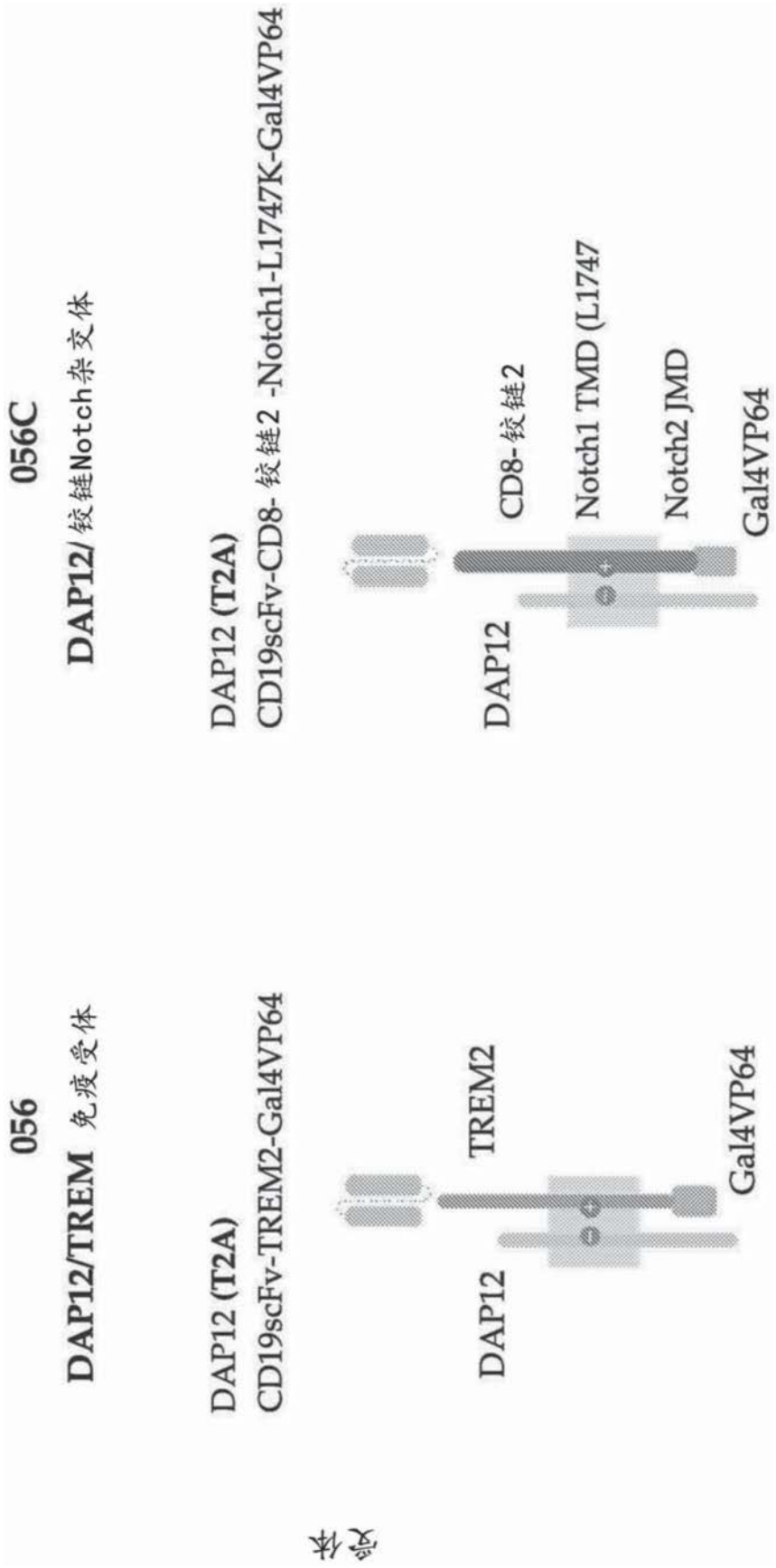
056
DAP12/TREM 免疫受体
DAP12 (T2A)
CD19scFv-TREM2-Gal4VP64
DAP12
TREM2
Gal4VP64
056C
DAP12/ 铰链Notch杂交体
DAP12 (T2A)
CD19scFv-CD8- 铰链2 -Notch1-L1747K-Gal4VP64
DAP12
CD8- 铰链2
Notch1 TMD (L1747
Notch2 JMD
Gal4VP64
细胞外

图3A

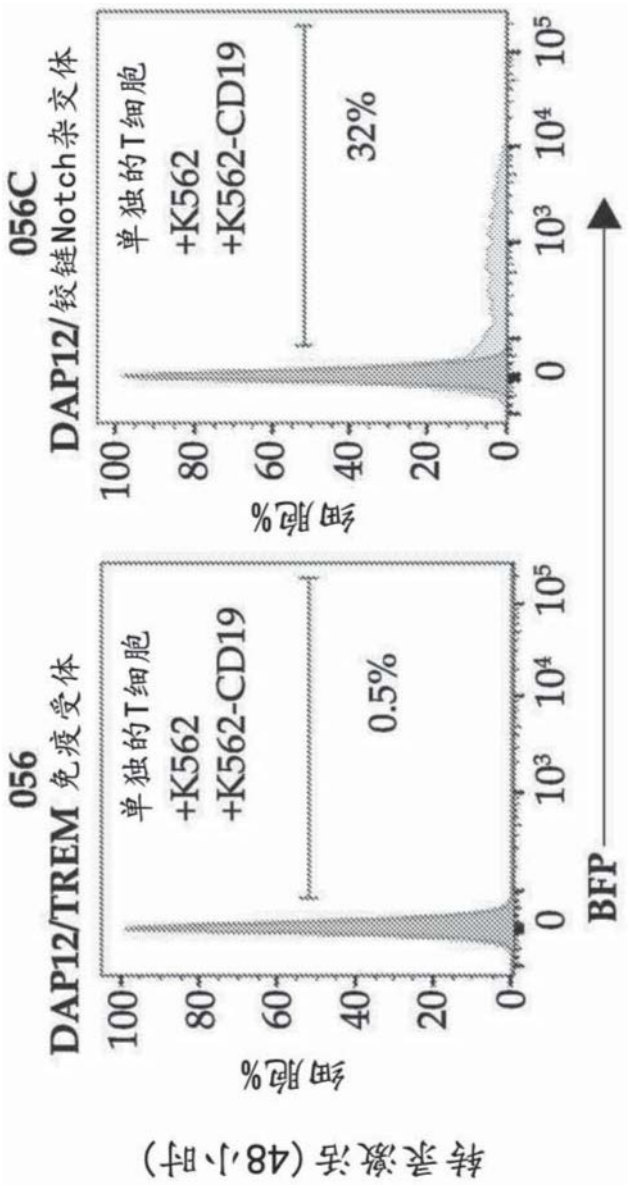
转录激活(48小时)
细胞%
DAP12/TREM 免疫受体
056
单独的T细胞
+K562
+K562-CD19
0.5%
BFP
DAP12/铰链Notch杂交体
056C
单独的T细胞
+K562
+K562-CD19
32%

图3B

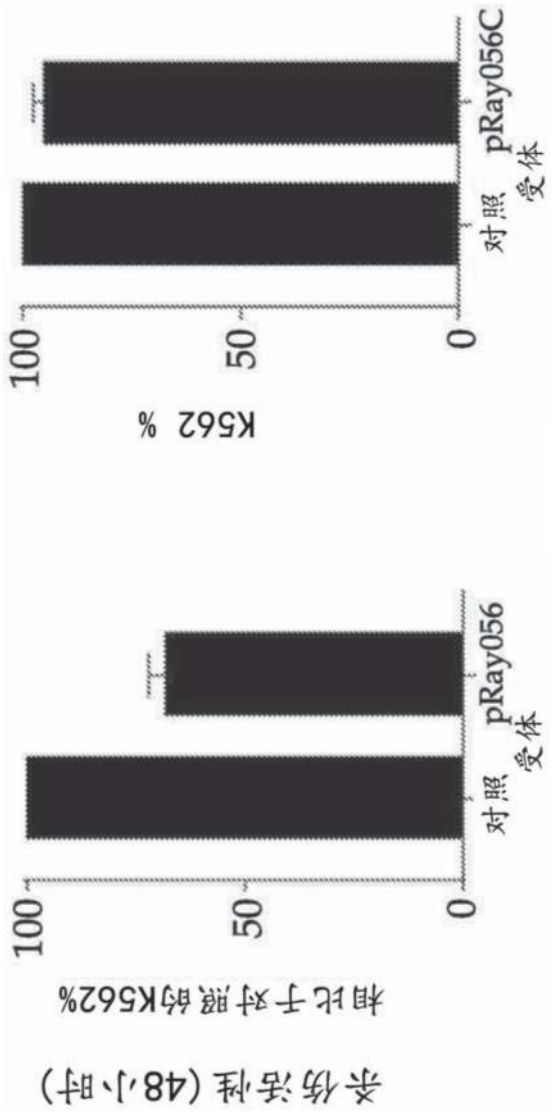
杀伤活性（48小时）
相比于对照的K562%
100
50
0
对照 受体
pRay056
K562 %
100
50
0
对照 受体
pRay056C

图3C

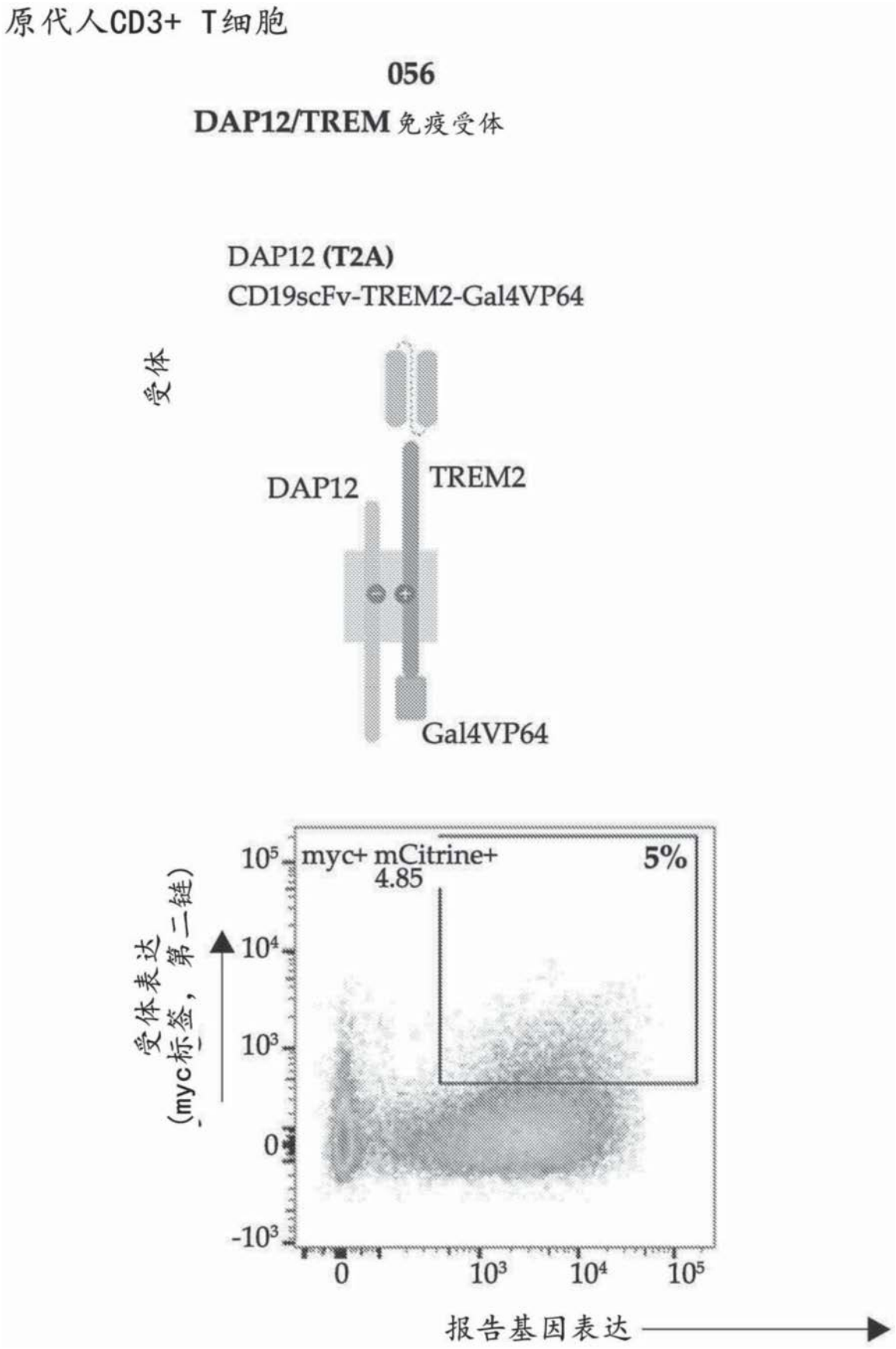
原代人CD3+ T细胞
056
DAP12/TREM 免疫受体
DAP12 (T2A)
CD19scFv-TREM2-Gal4VP64
受体
DAP12
TREM2
Gal4VP64
myc+ mCitrine+
4.85
5%
受体表达
(myc标签，第二链)
报告基因表达

图4A

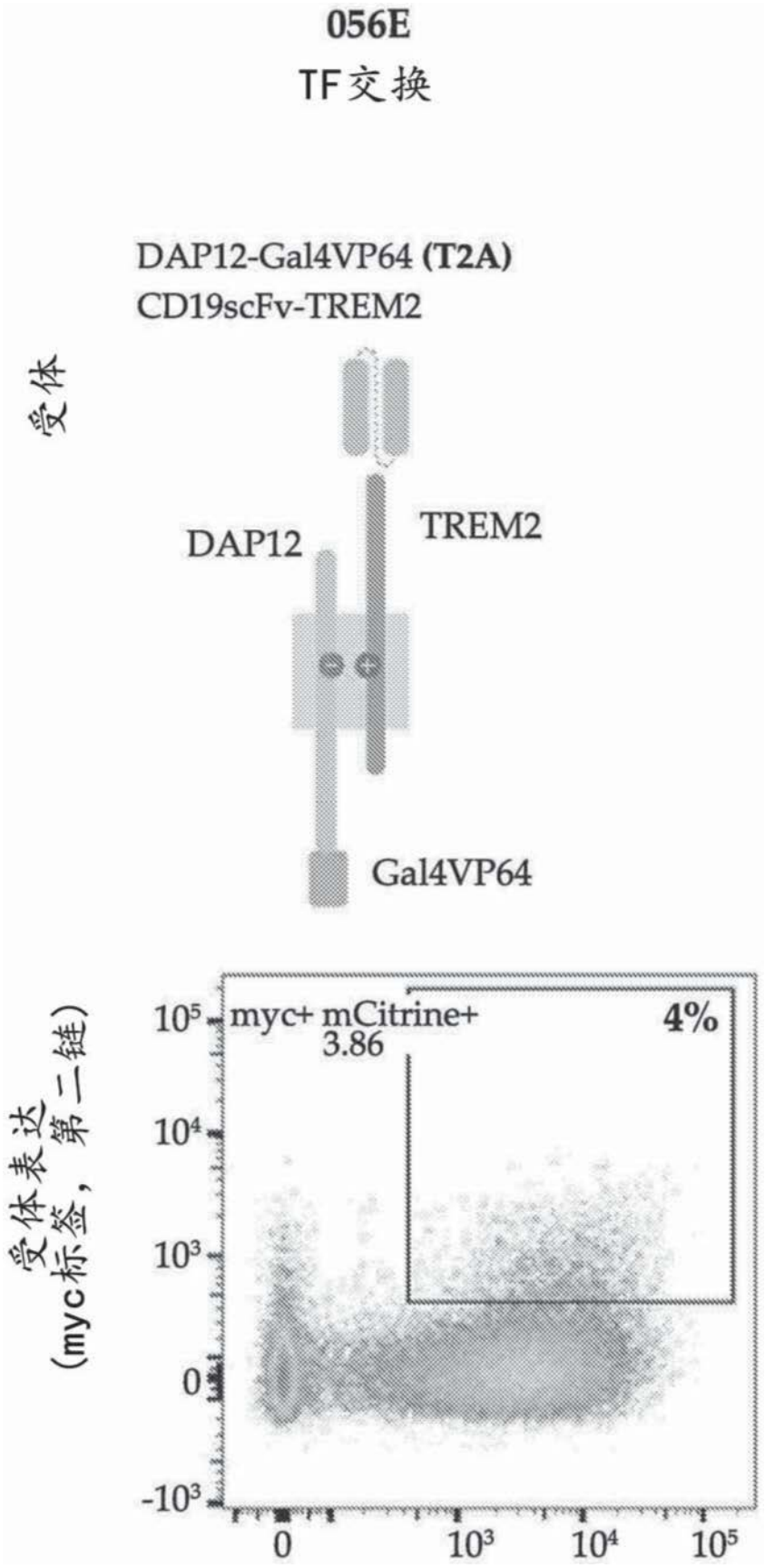
056E
TF交换
DAP12-Gal4VP64 (T2A)
CD19scFv-TREM2
受体
DAP12
TREM2
Gal4VP64
受体表达
(myc标签，第二链)
myc+ mCitrine+
3.86
4%
10⁵
10⁴
10³
0
-10³
0
10³
10⁴
10⁵

图4B

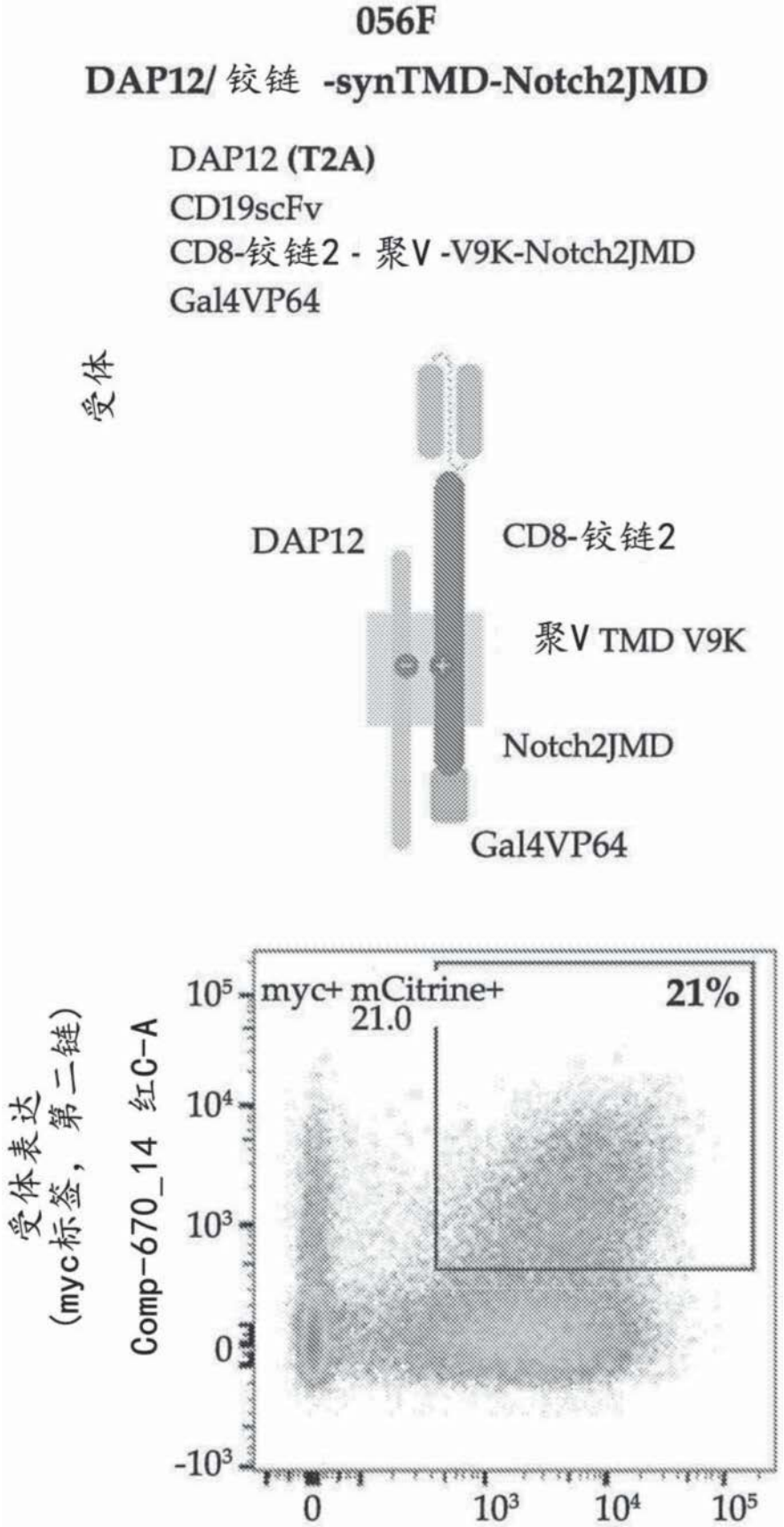
056F
DAP12/铰链 -synTMD-Notch2JMD
DAP12 (T2A)
CD19scFv
CD8-铰链2 - 聚V -V9K-Notch2JMD
Gal4VP64
受体
DAP12
CD8-铰链2
聚V TMD V9K
Notch2JMD
Gal4VP64
受体表达
(myc标签，第二链)
Comp-670_14 红C-A
myc+ mCitrine+
21.0
21%
10^5
10^4
10^3
0
-10^3
0
10^3
10^4
10^5

图4C

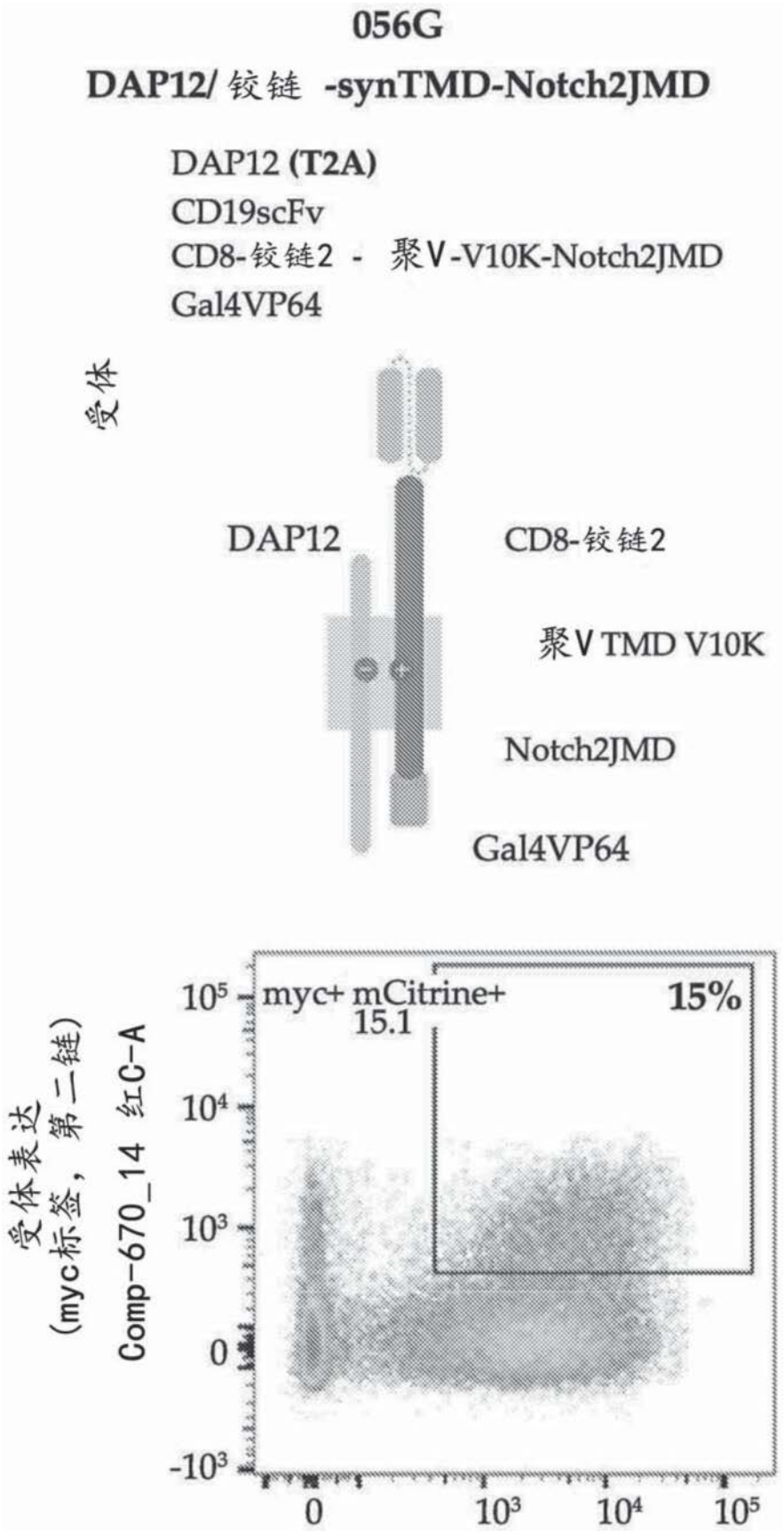
056G
DAP12/铰链 -synTMD-Notch2JMD
DAP12 (T2A)
CD19scFv
CD8-铰链2 - 聚V-V10K-Notch2JMD
Gal4VP64
受体
DAP12
CD8-铰链2
聚V TMD V10K
Notch2JMD
Gal4VP64
myc+ mCitrine+
15.1
15%
受体表达
(myc标签，第二链)
Comp-670_14 红C-A
10^5
10^4
10^3
0
-10^3
0
10^3
10^4
10^5

图4D

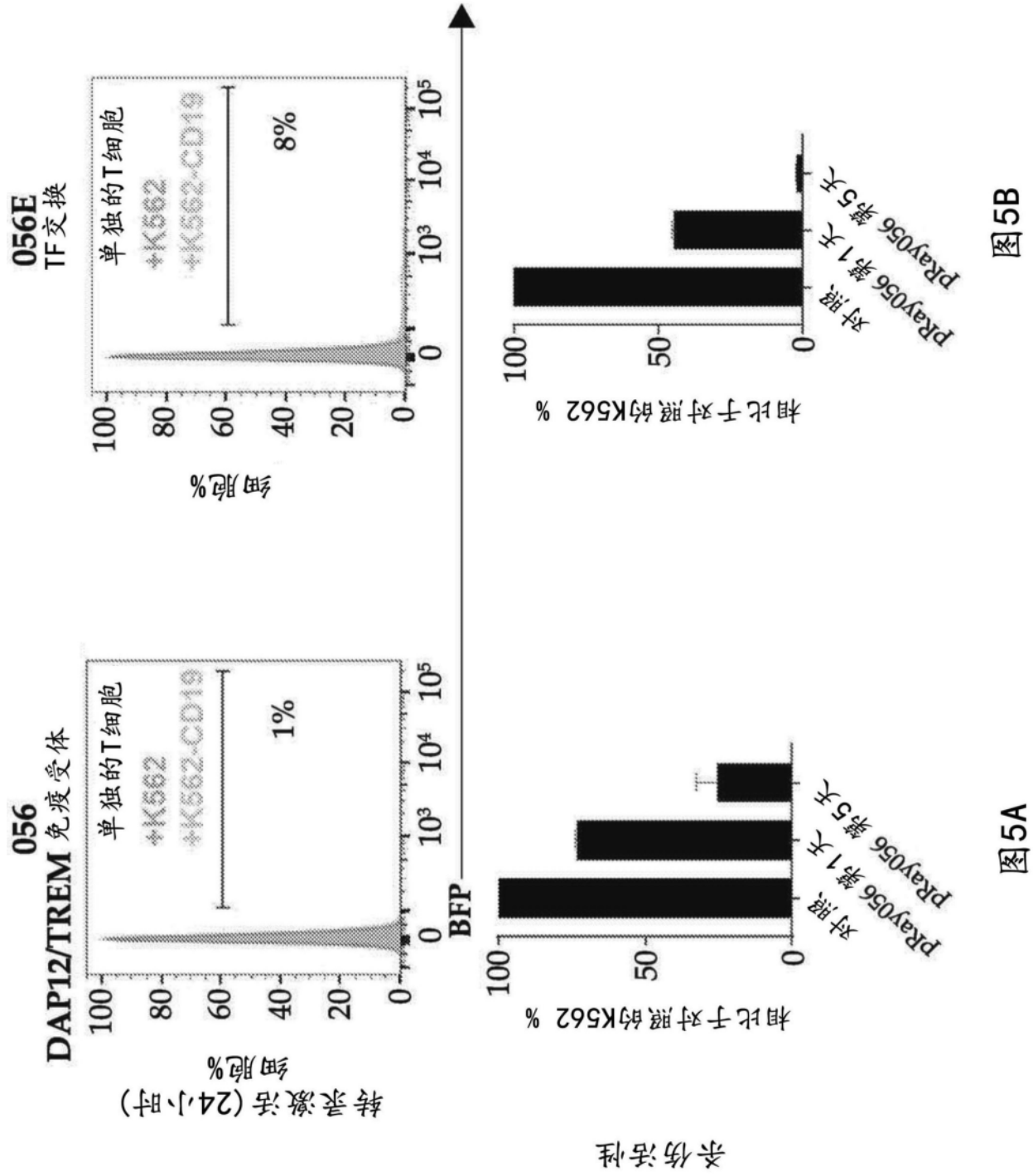
056
DAP12/TREM 免疫受体
单独的T细胞
+K562
+K562-CD19
1%
细胞%
转录激活 (24小时)
BFP
056E
TF交换
单独的T细胞
+K562
+K562-CD19
8%
细胞%
相比于对照的K562 %
对照
PRay056 第1天
PRay056 第5天
杀伤活性
相比于对照的K562 %
对照
PRay056 第1天
PRay056 第5天

图5A 图5B

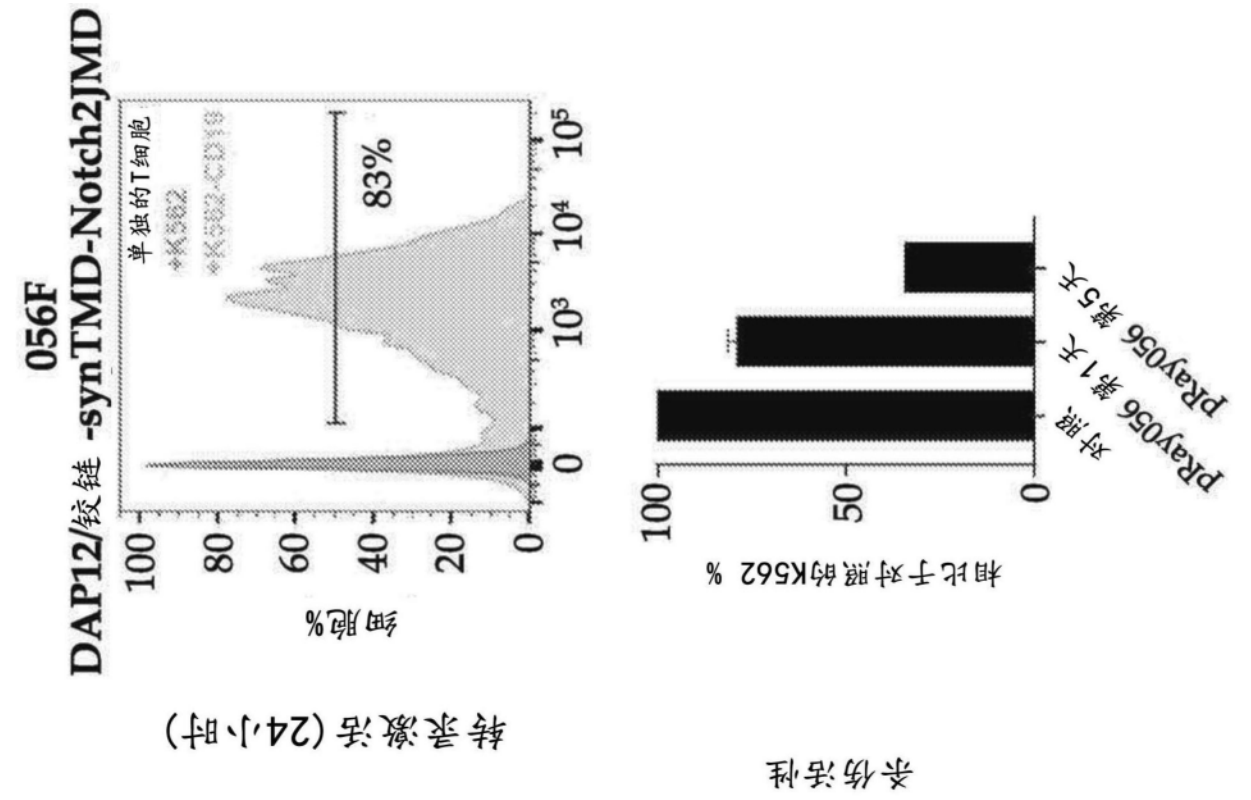
056F
DAP12/铰链 -synTMD-Notch2JMD
单独的T细胞
*K562
*K562-CD19
83%
细胞%
转录激活 (24小时)
相比于对照的K562 %
对照
PRay056 第1天
PRay056 第5天
杀伤活性

图5C

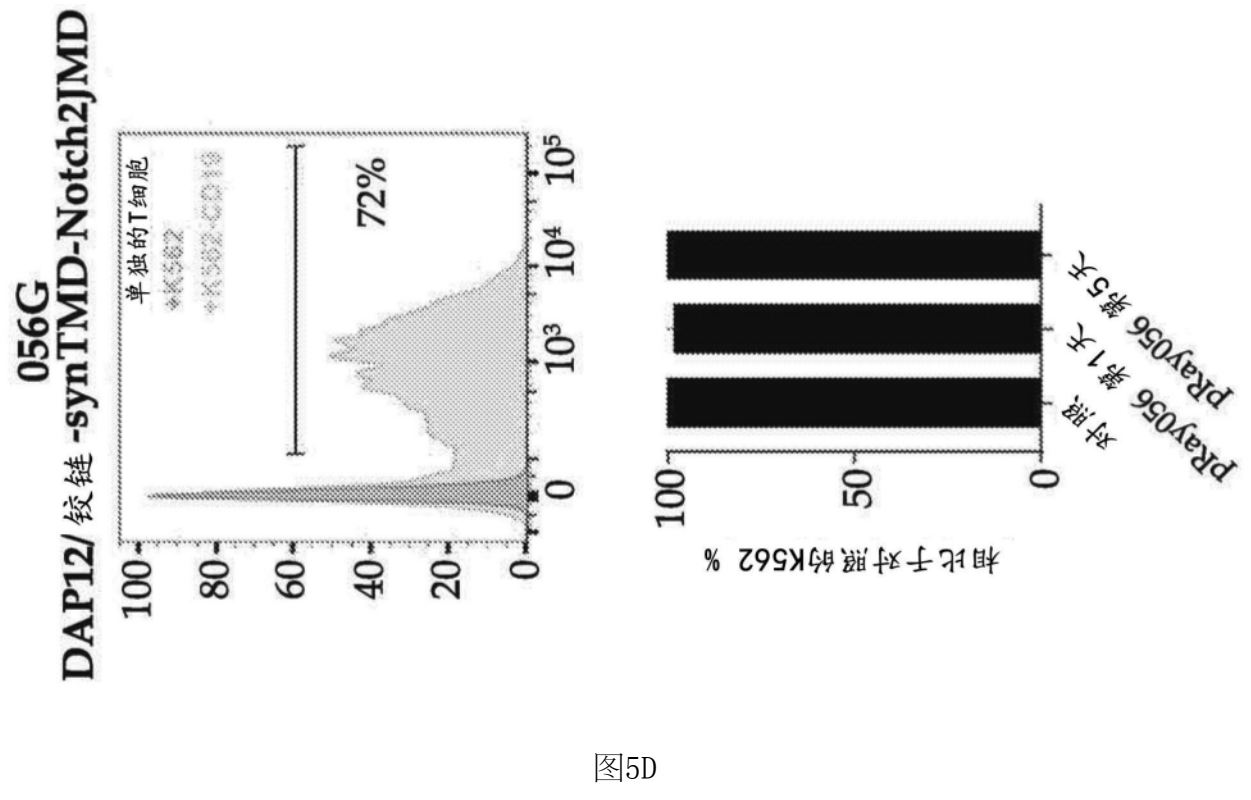
056G
DAP12/ 铰链 -synTMD-Notch2JMD
单独的T细胞
*K562
*K562-CD19
72%
相比于对照的K562 %
对照
PRay056 第1天
PRay056 第5天

图5D

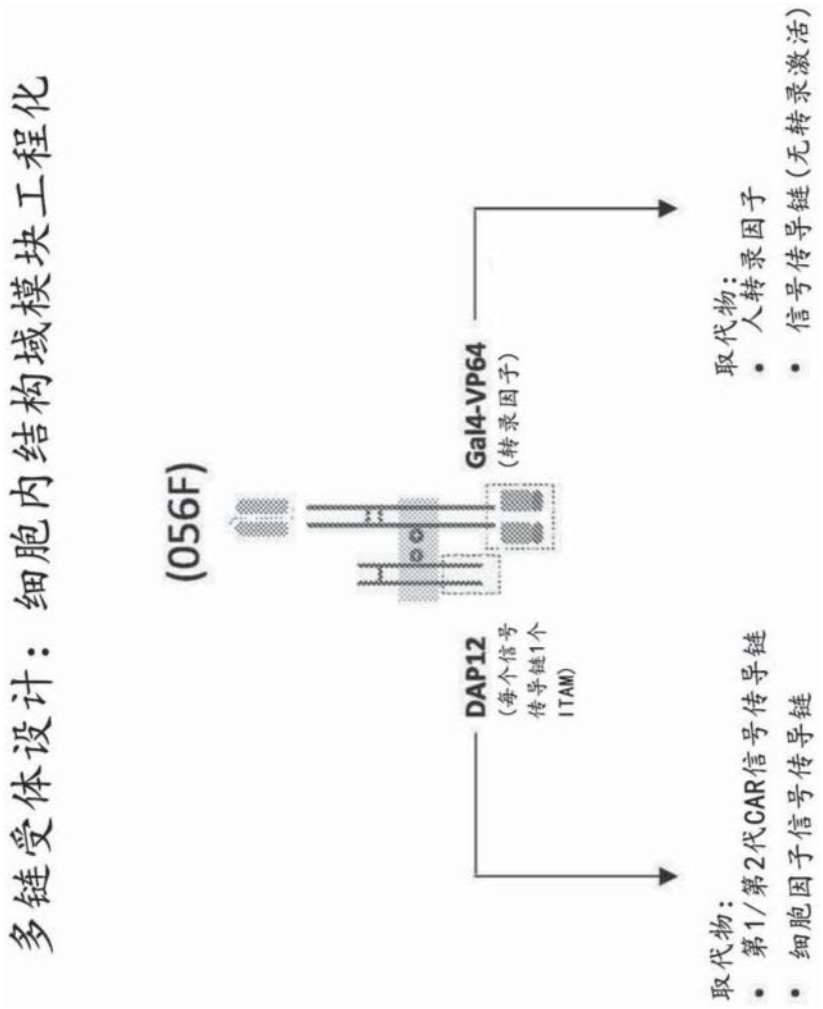
多链受体设计：细胞内结构域模块工程化
(056F)
DAP12
(每个信号传导链1个ITAM)
Gal4-VP64
(转录因子)
取代物：
• 第1/第2代CAR信号传导链
• 细胞因子信号传导链
取代物：
• 人转录因子
• 信号传导链(无转录激活)

图6

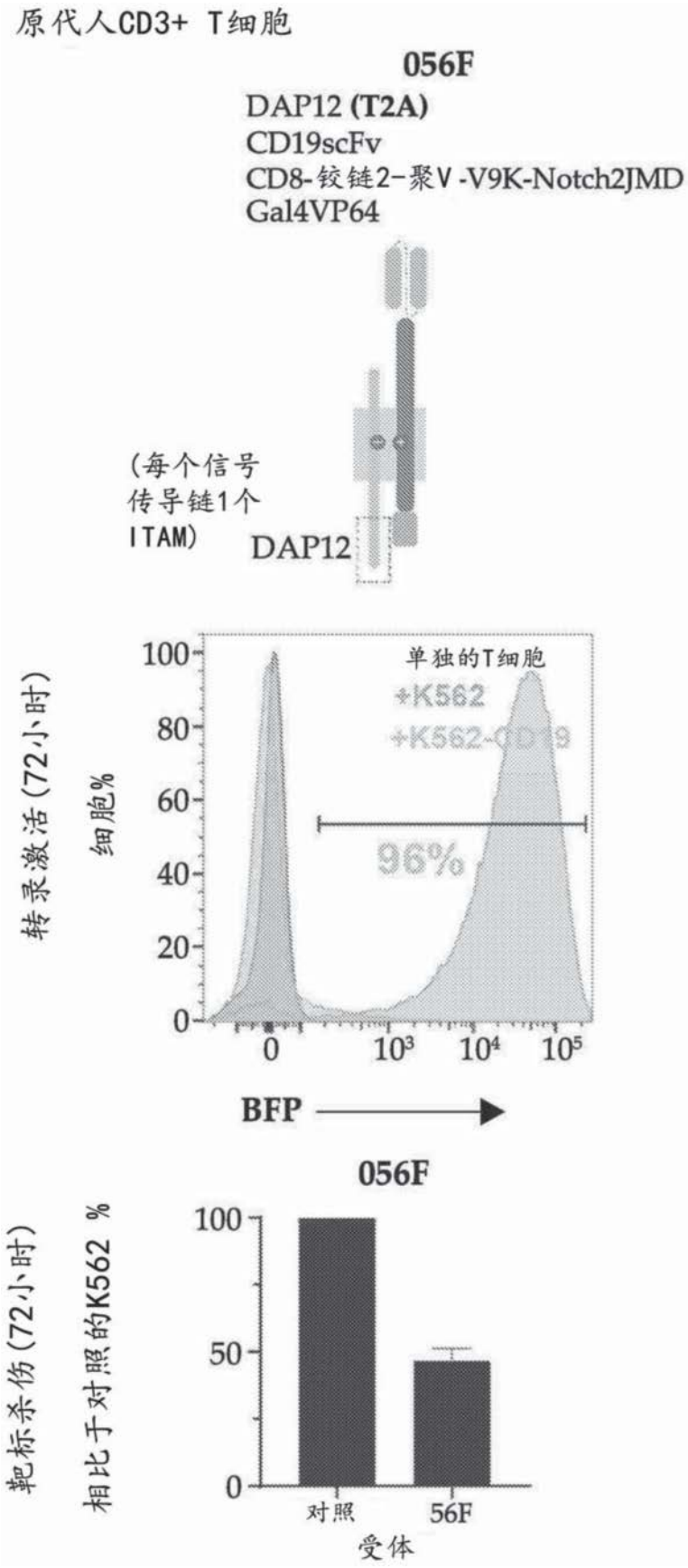
原代人CD3+ T细胞
056F
DAP12 (T2A)
CD19scFv
CD8-铰链2-聚V -V9K-Notch2JMD
Gal4VP64
(每个信号
传导链1个
ITAM)
DAP12
转录激活(72小时)
细胞%
100
80
60
40
20
0
单独的T细胞
+K562
+K562-CD19
96%
0
10³
10⁴
10⁵
BFP
056F
靶标杀伤(72小时)
相比于对照的K562 %
100
50
0
对照
56F
受体

图7A

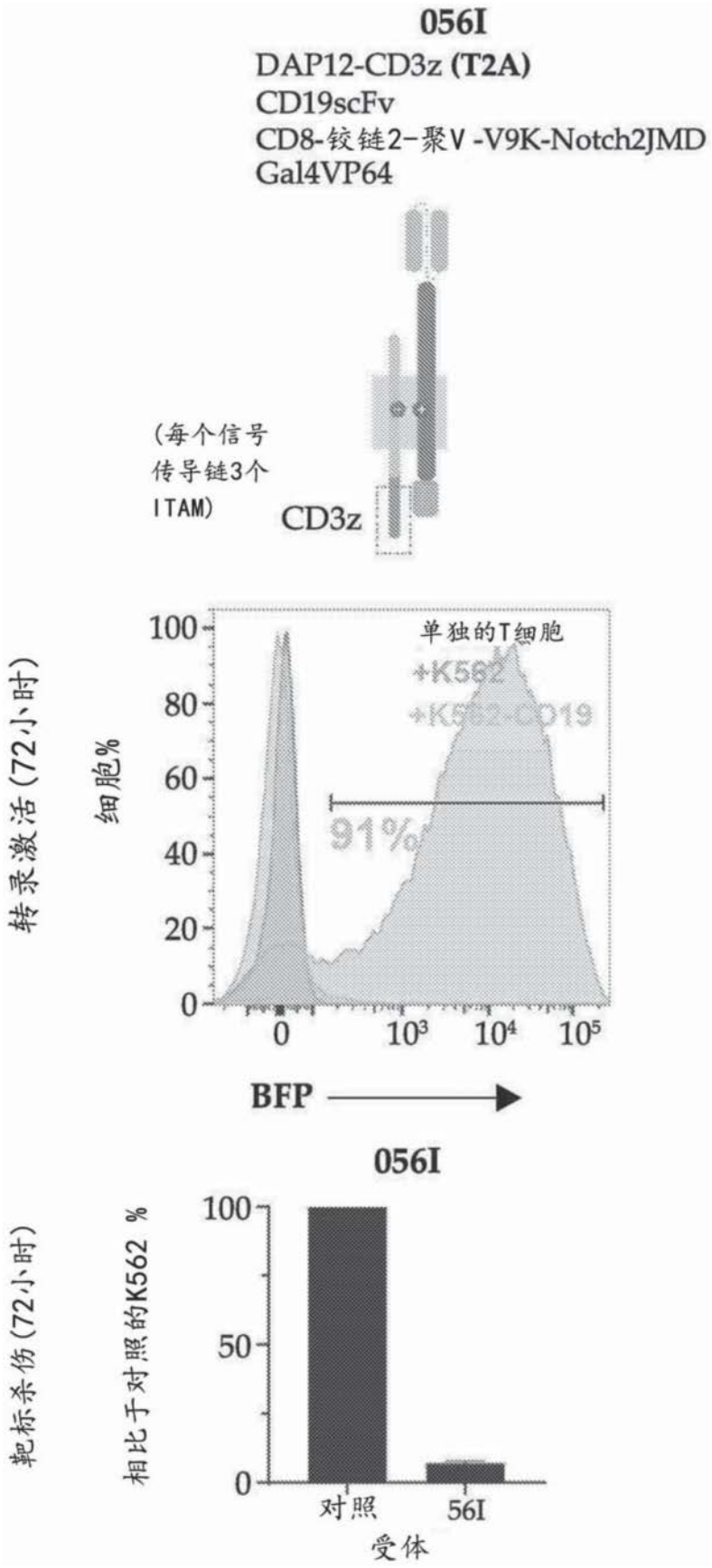
056I
DAP12-CD3z (T2A)
CD19scFv
CD8-铰链2-聚V -V9K-Notch2JMD
Gal4VP64
(每个信号
传导链3个
ITAM)
CD3z
转录激活(72小时)
细胞%
单独的T细胞
+K562
+K562-CD19
91%
BFP
056I
靶标杀伤(72小时)
相比于对照的K562 %
对照
56I
受体

图7B

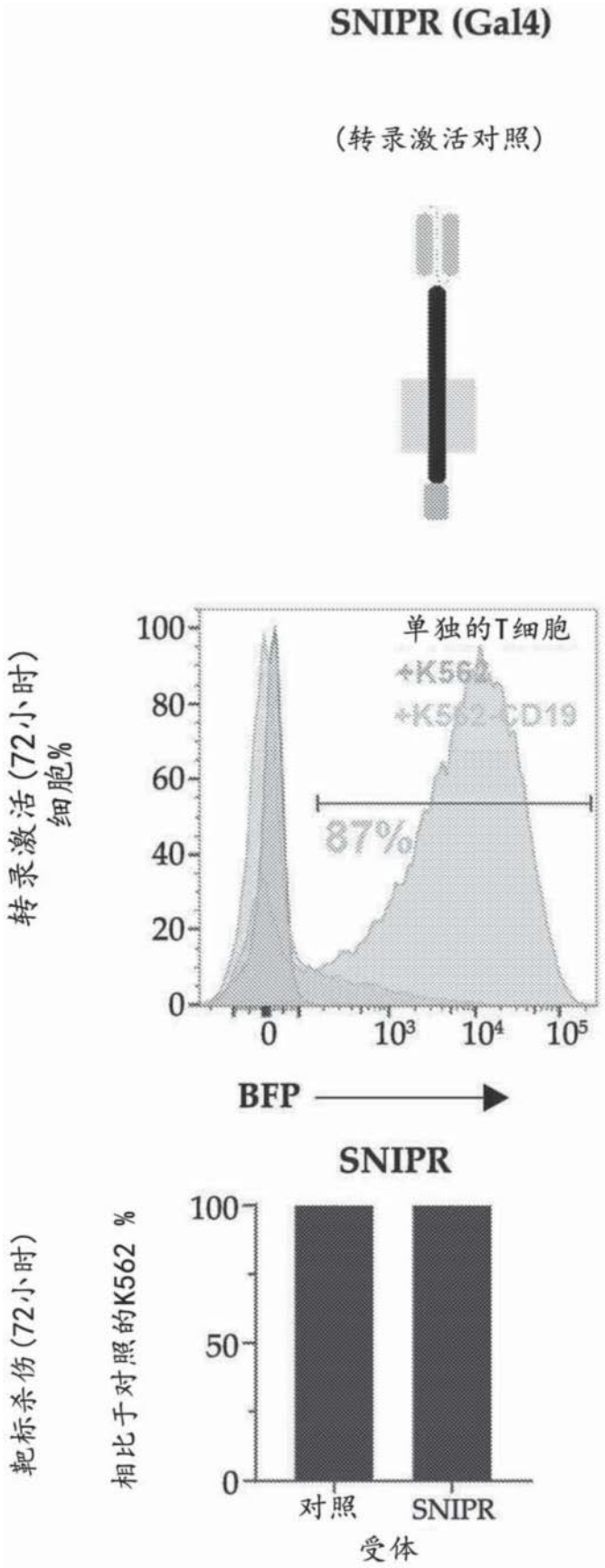
SNIPR (Gal4)
(转录激活对照)
转录激活(72小时)
细胞%
100
80
60
40
20
0
单独的T细胞
+K562
+K562-CD19
87%
0
10³
10⁴
10⁵
BFP
SNIPR
靶标杀伤(72小时)
相比于对照的K562 %
100
50
0
对照
SNIPR
受体

图7C

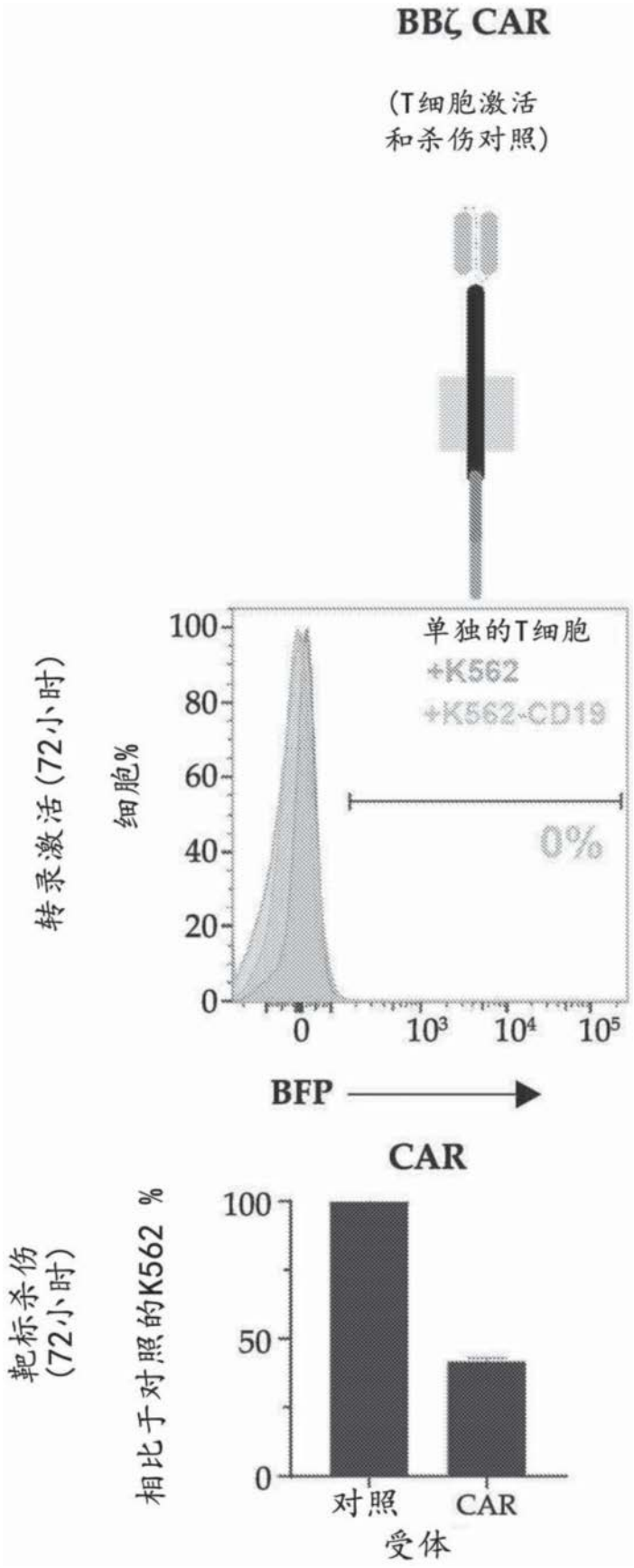
BBζ CAR
(T细胞激活
和杀伤对照)
转录激活(72小时)
细胞%
100
80
60
40
20
0
单独的T细胞
+K562
+K562-CD19
0%
0
10³
10⁴
10⁵
BFP
CAR
靶标杀伤
(72小时)
相比于对照的K562 %
100
50
0
对照
CAR
受体

图7D

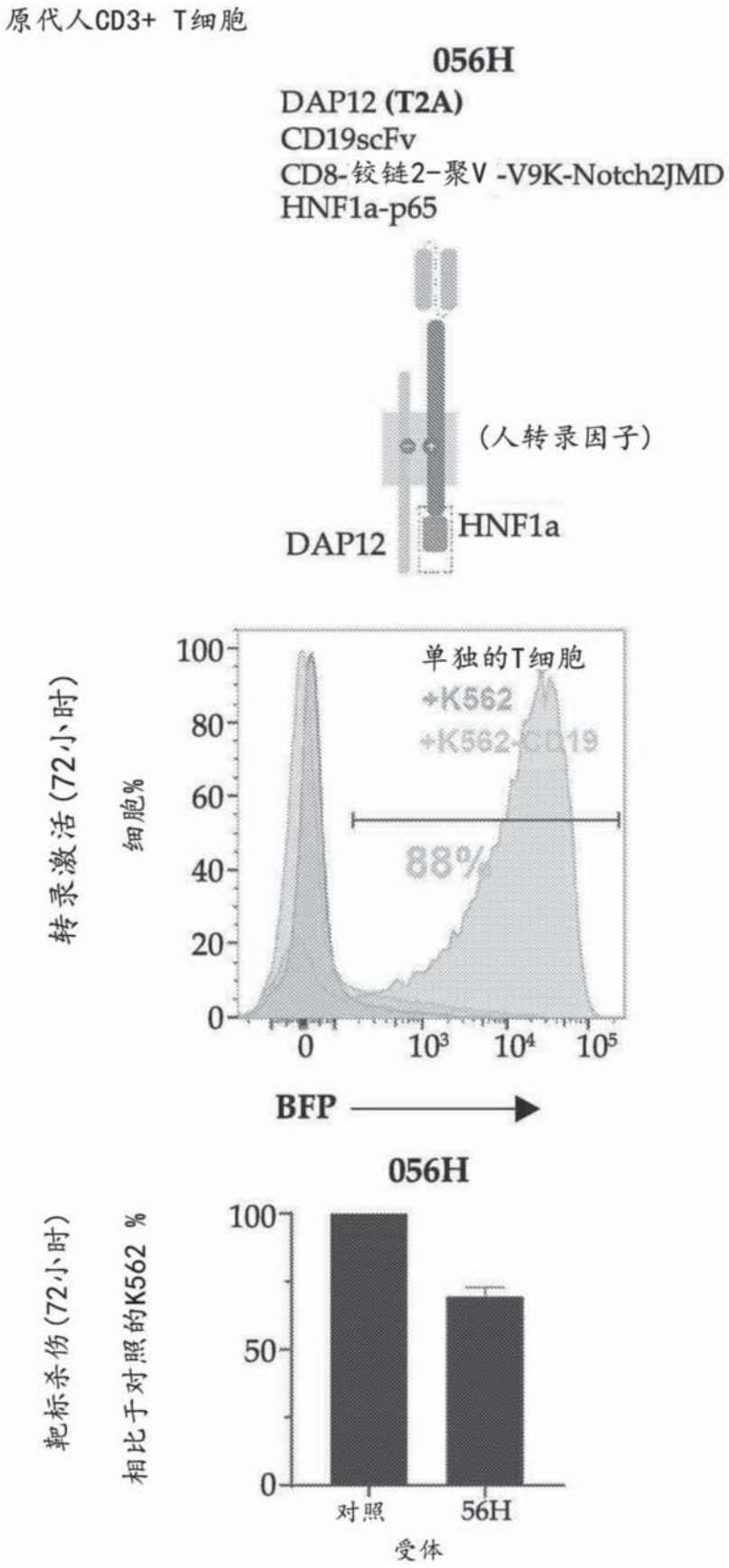
原代人CD3+ T细胞
056H
DAP12 (T2A)
CD19scFv
CD8-铰链2-聚V -V9K-Notch2JMD
HNF1a-p65
(人转录因子)
DAP12
HNF1a
转录激活 (72小时)
细胞%
单独的T细胞
+K562
+K562-CD19
88%
BFP
靶标杀伤(72小时)
相比于对照的K562 %
对照
56H
受体

图8A

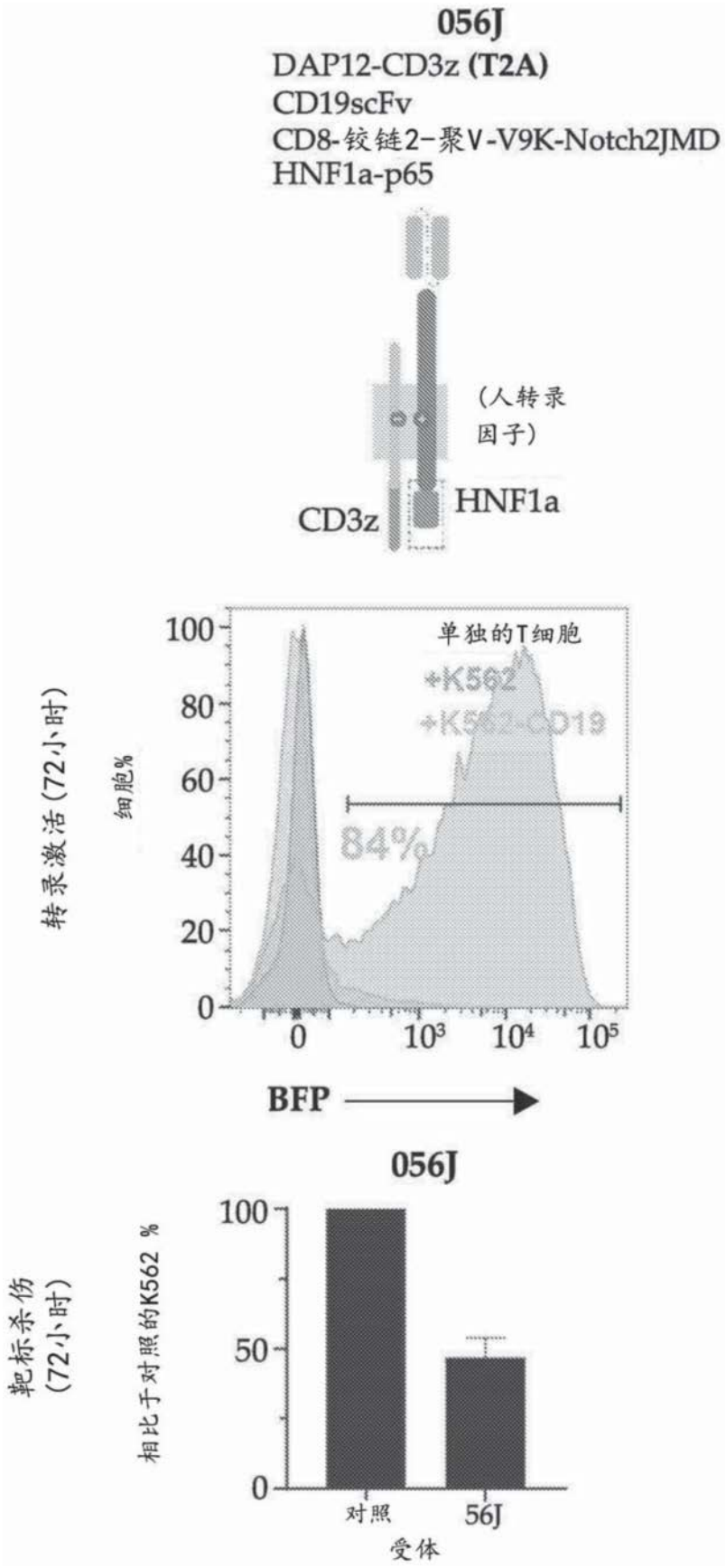
056J
DAP12-CD3z (T2A)
CD19scFv
CD8-铰链2-聚V-V9K-Notch2JMD
HNF1a-p65
(人转录因子)
CD3z
HNF1a
转录激活(72小时)
细胞%
单独的T细胞
+K562
+K562-CD19
84%
BFP
056J
靶标杀伤(72小时)
相比于对照的K562 %
对照
56J
受体

图8B

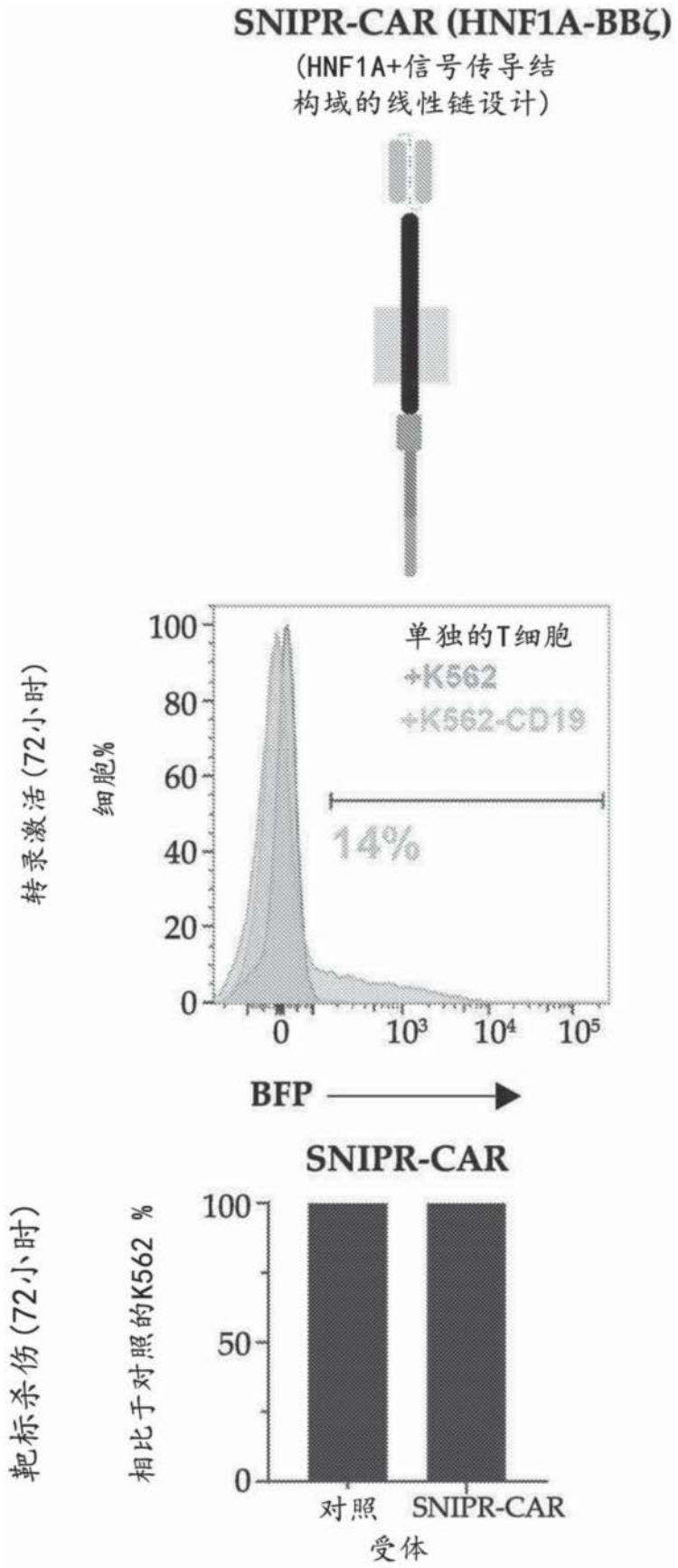
SNIPR-CAR (HNF1A-BBζ)
(HNF1A+信号传导结
构域的线性链设计)
转录激活(72小时)
细胞%
100
80
60
40
20
0
单独的T细胞
+K562
+K562-CD19
14%
0
10³
10⁴
10⁵
BFP
SNIPR-CAR
靶标杀伤(72小时)
相比于对照的K562 %
100
50
0
对照
SNIPR-CAR
受体

图8C

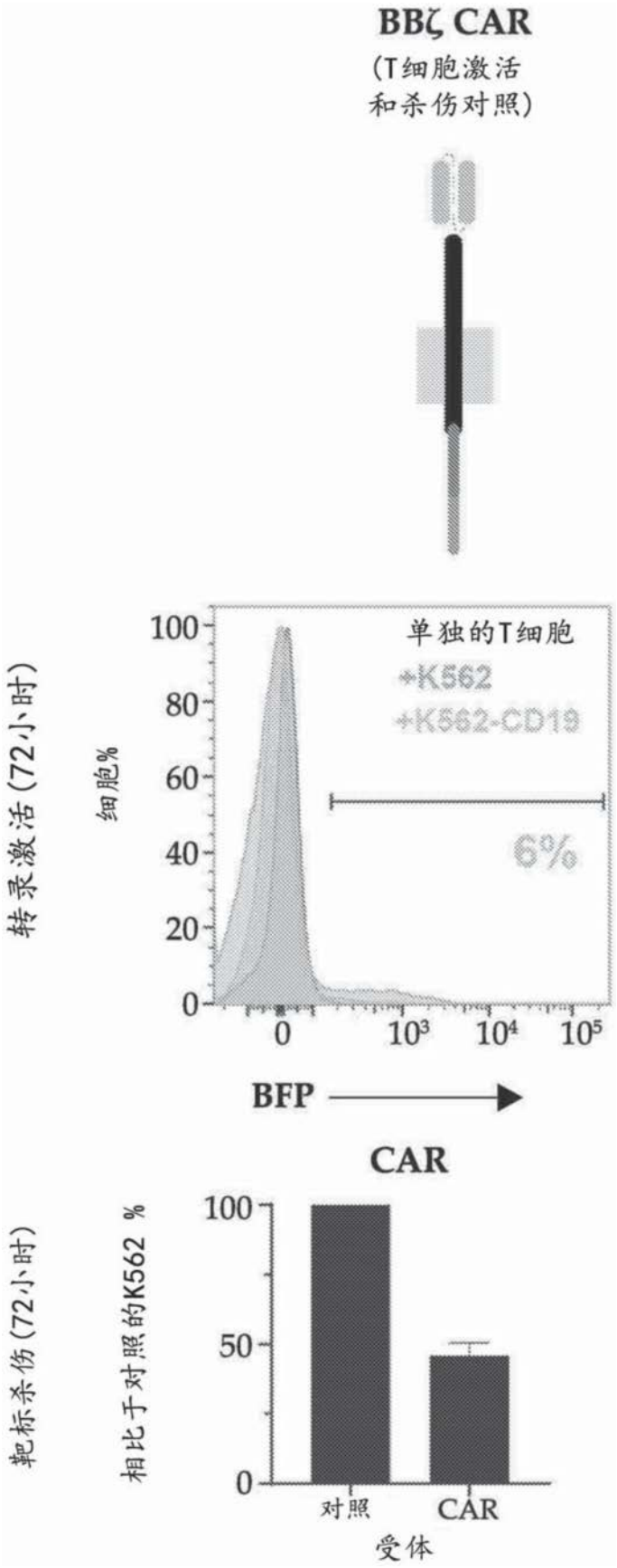
BBζ CAR
(T细胞激活
和杀伤对照)
转录激活(72小时)
细胞%
100
80
60
40
20
0
单独的T细胞
+K562
+K562-CD19
6%
0
10³
10⁴
10⁵
BFP
CAR
靶标杀伤(72小时)
相比于对照的K562 %
100
50
0
对照
CAR
受体

图8D

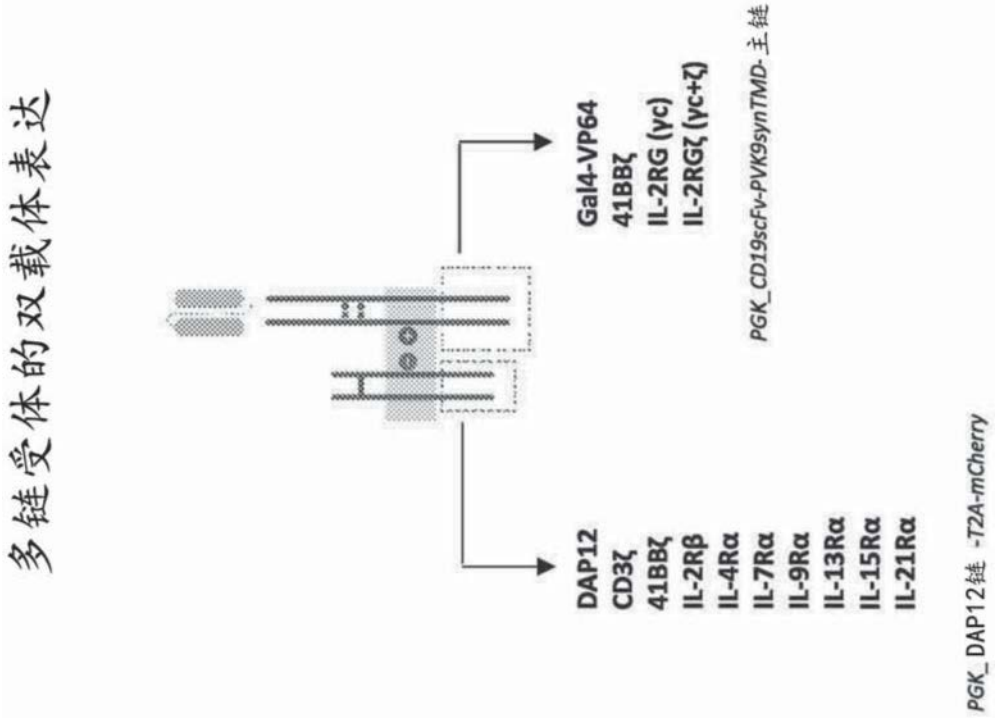
多链受体的双载体表达
Gal4-VP64
41BBζ
IL-2RG (γc)
IL-2RGζ (γc+ζ)
PGK_CD19scFv-PVK9synTMD-主链
DAP12
CD3ζ
41BBζ
IL-2Rβ
IL-4Rα
IL-7Rα
IL-9Rα
IL-13Rα
IL-15Rα
IL-21Rα
PGK_DAP12链 -T2A-mCherry

图9

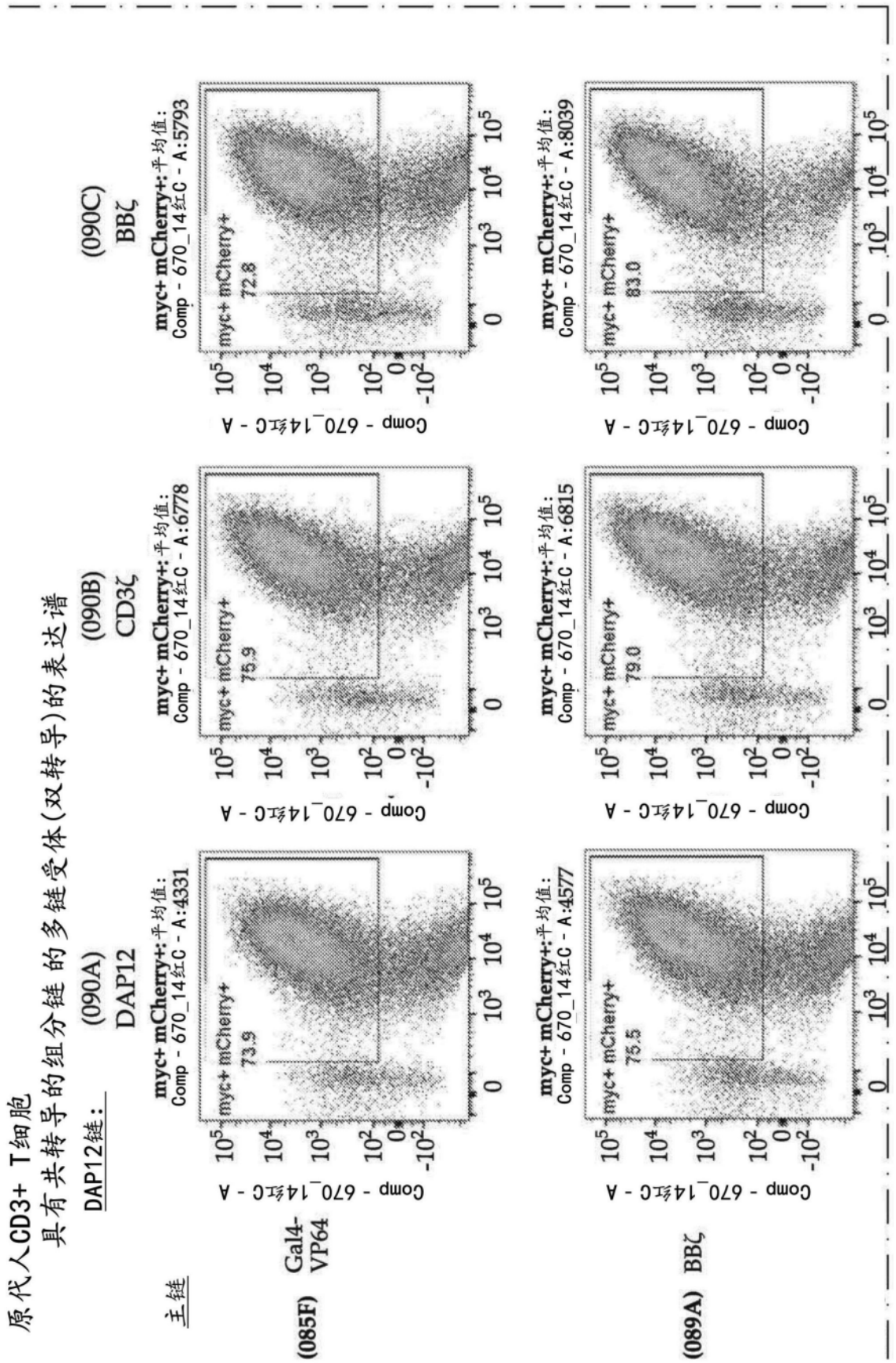
原代人CD3+ T细胞
具有共转导的组分链的多链受体(双转导)的表达谱
DAP12链：
(090A)
DAP12
(090B)
CD3ζ
(090C)
BBζ
主链
(085F) Gal4-VP64
(089A) BBζ
myc+ mCherry+: 平均值: A:4331
myc+ mCherry+: 平均值: A:6778
myc+ mCherry+: 平均值: A:5793
myc+ mCherry+: 平均值: A:4577
myc+ mCherry+: 平均值: A:6815
myc+ mCherry+: 平均值: A:8039
Comp - 670_14红C - A
myc+ mCherry+
73.9
75.9
72.8
75.5
79.0
83.0

图10

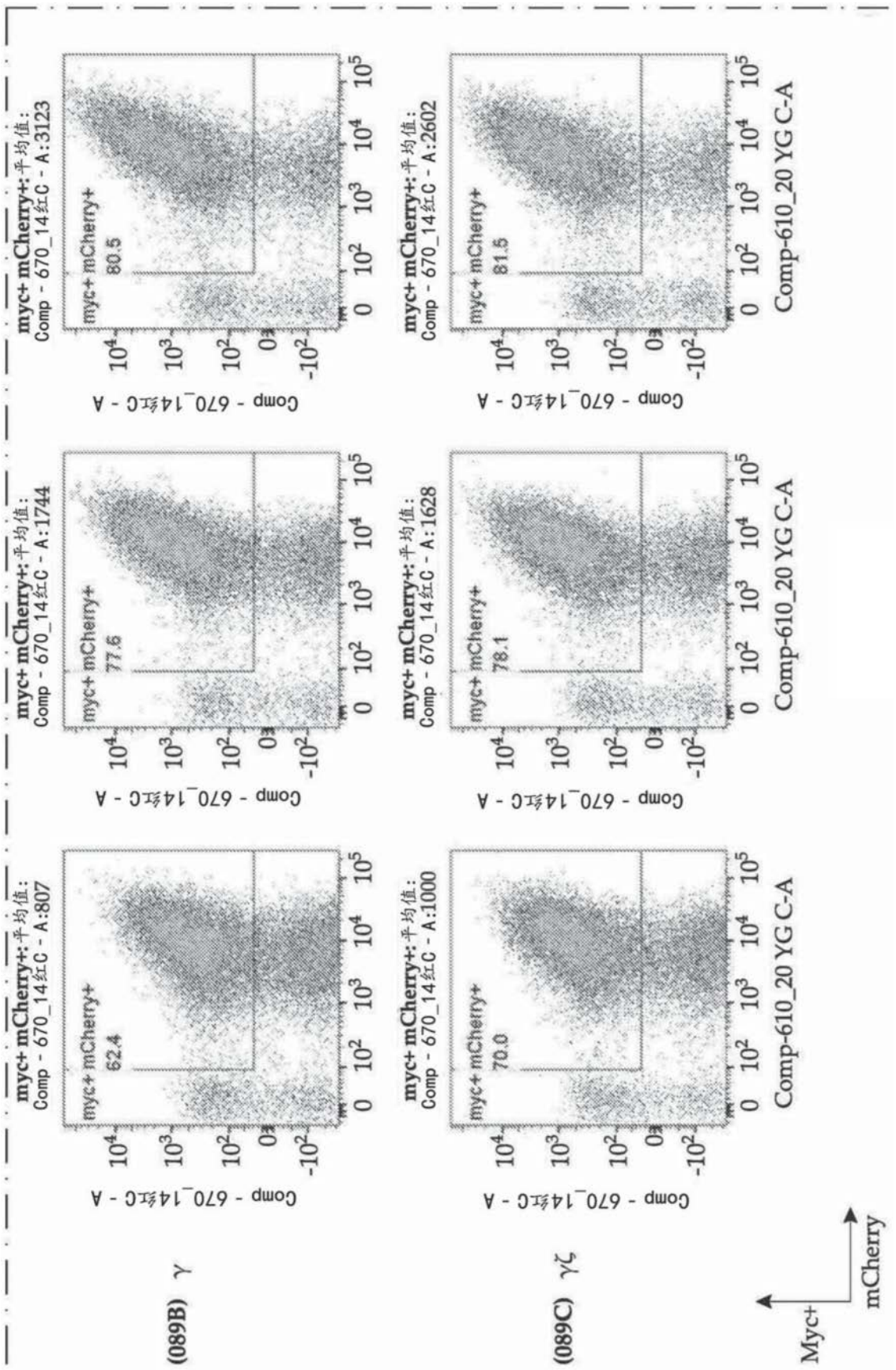
myc+ mCherry+: 平均值:
Comp - 670_14红C - A:3123
myc+ mCherry+
80.5
myc+ mCherry+: 平均值:
Comp - 670_14红C - A:2602
myc+ mCherry+
81.5
myc+ mCherry+: 平均值:
Comp - 670_14红C - A:1744
myc+ mCherry+
77.6
myc+ mCherry+: 平均值:
Comp - 670_14红C - A:1628
myc+ mCherry+
78.1
myc+ mCherry+: 平均值:
Comp - 670_14红C - A:807
myc+ mCherry+
62.4
myc+ mCherry+: 平均值:
Comp - 670_14红C - A:1000
myc+ mCherry+
70.0
Comp - 670_14红C - A
Comp-610_20 YG C-A
(089B) γ
(089C) γζ
Myc+
mCherry

图10(续)

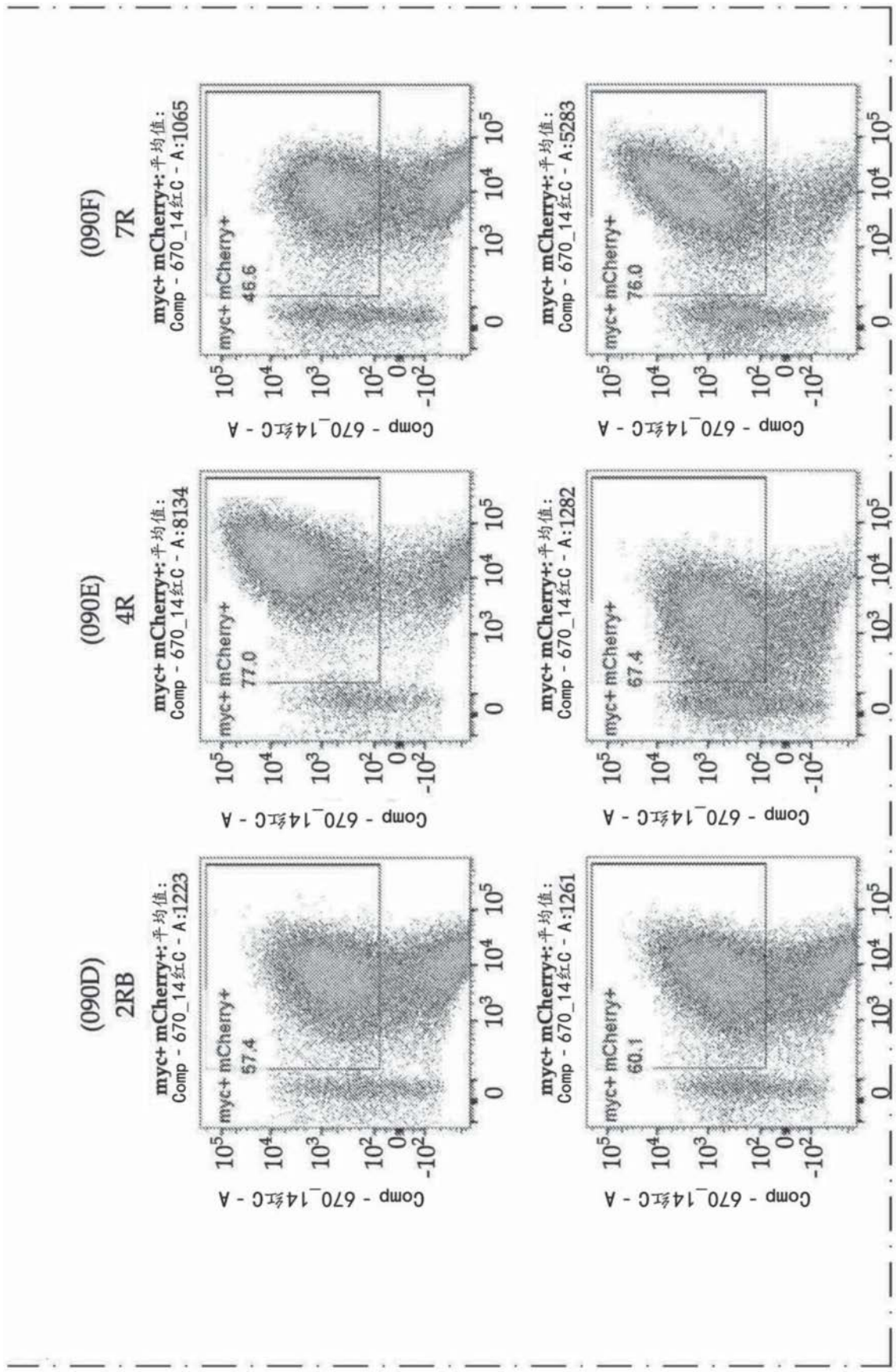
(090D)
2RB
myc+ mCherry+:平均值:
Comp - 670_14红C - A:1223
myc+ mCherry+
57.4
(090E)
4R
myc+ mCherry+:平均值:
Comp - 670_14红C - A:8134
myc+ mCherry+
77.0
(090F)
7R
myc+ mCherry+:平均值:
Comp - 670_14红C - A:1065
myc+ mCherry+
46.6
myc+ mCherry+:平均值:
Comp - 670_14红C - A:1261
myc+ mCherry+
60.1
myc+ mCherry+:平均值:
Comp - 670_14红C - A:1282
myc+ mCherry+
67.4
myc+ mCherry+:平均值:
Comp - 670_14红C - A:5283
myc+ mCherry+
76.0
Comp - 670_14红C - A

图10(续)

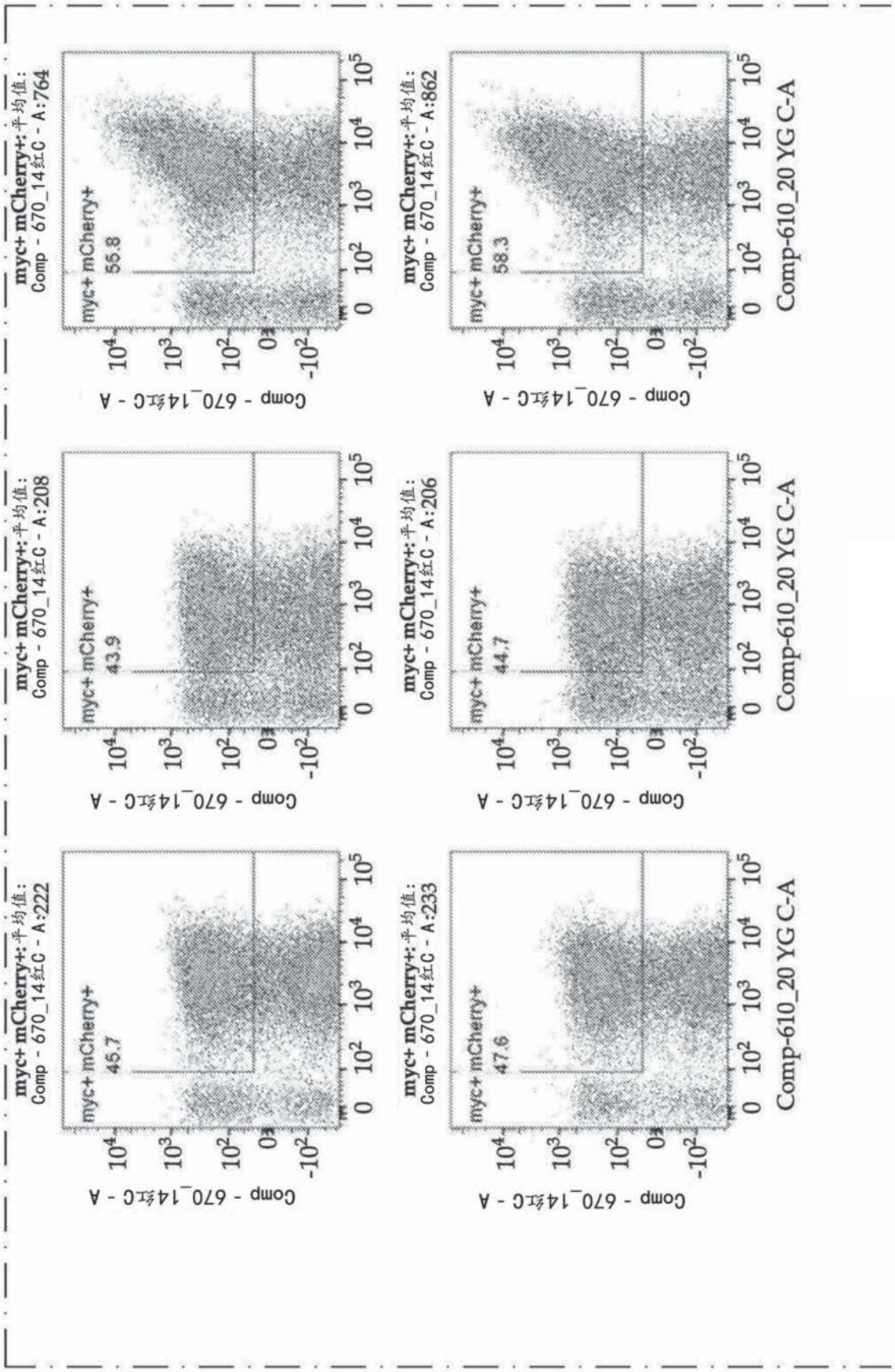
myc+ mCherry+:平均值:
Comp - 670_14红C - A:764
myc+ mCherry+
55.8
myc+ mCherry+:平均值:
Comp - 670_14红C - A:862
myc+ mCherry+
58.3
myc+ mCherry+:平均值:
Comp - 670_14红C - A:208
myc+ mCherry+
43.9
myc+ mCherry+:平均值:
Comp - 670_14红C - A:206
myc+ mCherry+
44.7
myc+ mCherry+:平均值:
Comp - 670_14红C - A:222
myc+ mCherry+
45.7
myc+ mCherry+:平均值:
Comp - 670_14红C - A:233
myc+ mCherry+
47.6
Comp - 670_14红C - A
Comp-610_20 YG C-A

图10(续)

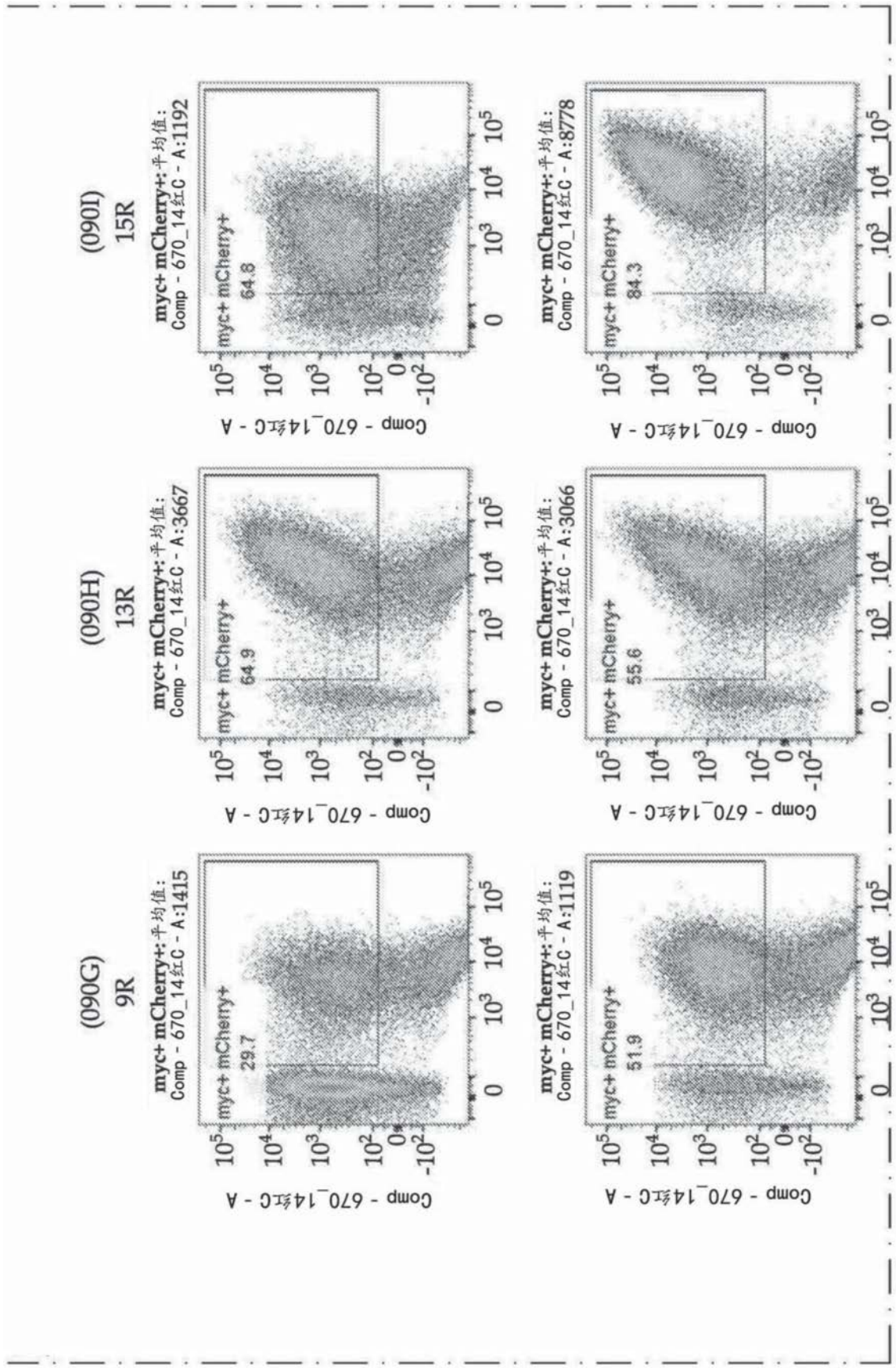
(090G)
9R
(090H)
13R
(090I)
15R
myc+ mCherry+: 平均值:
Comp - 670_14红C - A:1415
myc+ mCherry+
29.7
myc+ mCherry+: 平均值:
Comp - 670_14红C - A:1119
myc+ mCherry+
51.9
myc+ mCherry+: 平均值:
Comp - 670_14红C - A:3667
myc+ mCherry+
64.9
myc+ mCherry+: 平均值:
Comp - 670_14红C - A:3066
myc+ mCherry+
55.6
myc+ mCherry+: 平均值:
Comp - 670_14红C - A:1192
myc+ mCherry+
64.8
myc+ mCherry+: 平均值:
Comp - 670_14红C - A:8778
myc+ mCherry+
84.3
Comp - 670_14红C - A

图10(续)

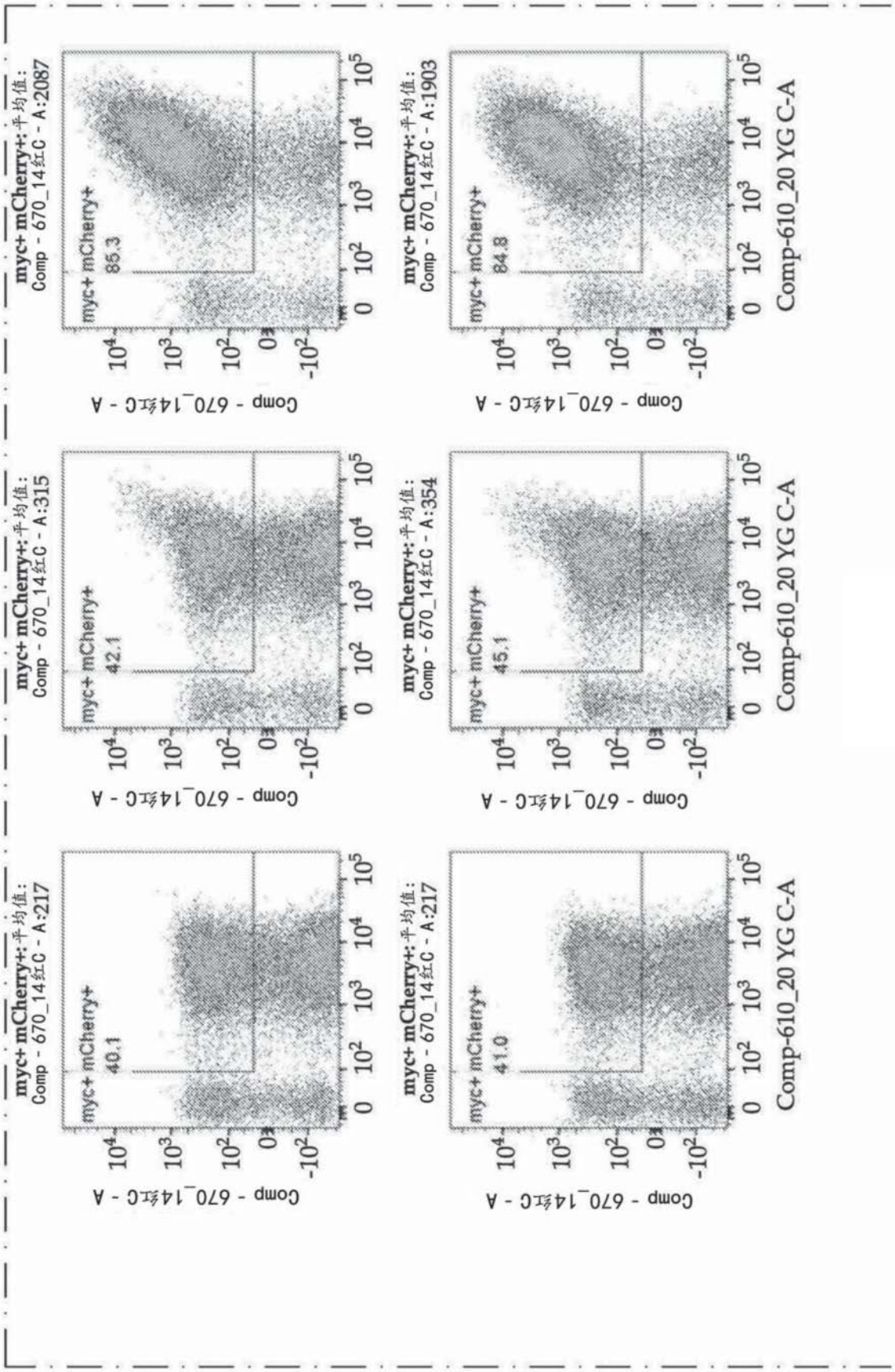
myc+ mCherry+:平均值:
Comp - 670_14红C - A:2087
myc+ mCherry+
85.3
myc+ mCherry+:平均值:
Comp - 670_14红C - A:1903
myc+ mCherry+
84.8
myc+ mCherry+:平均值:
Comp - 670_14红C - A:315
myc+ mCherry+
42.1
myc+ mCherry+:平均值:
Comp - 670_14红C - A:354
myc+ mCherry+
45.1
myc+ mCherry+:平均值:
Comp - 670_14红C - A:217
myc+ mCherry+
40.1
myc+ mCherry+:平均值:
Comp - 670_14红C - A:217
myc+ mCherry+
41.0
Comp - 670_14红C - A
Comp-610_20 YG C-A

图10(续)

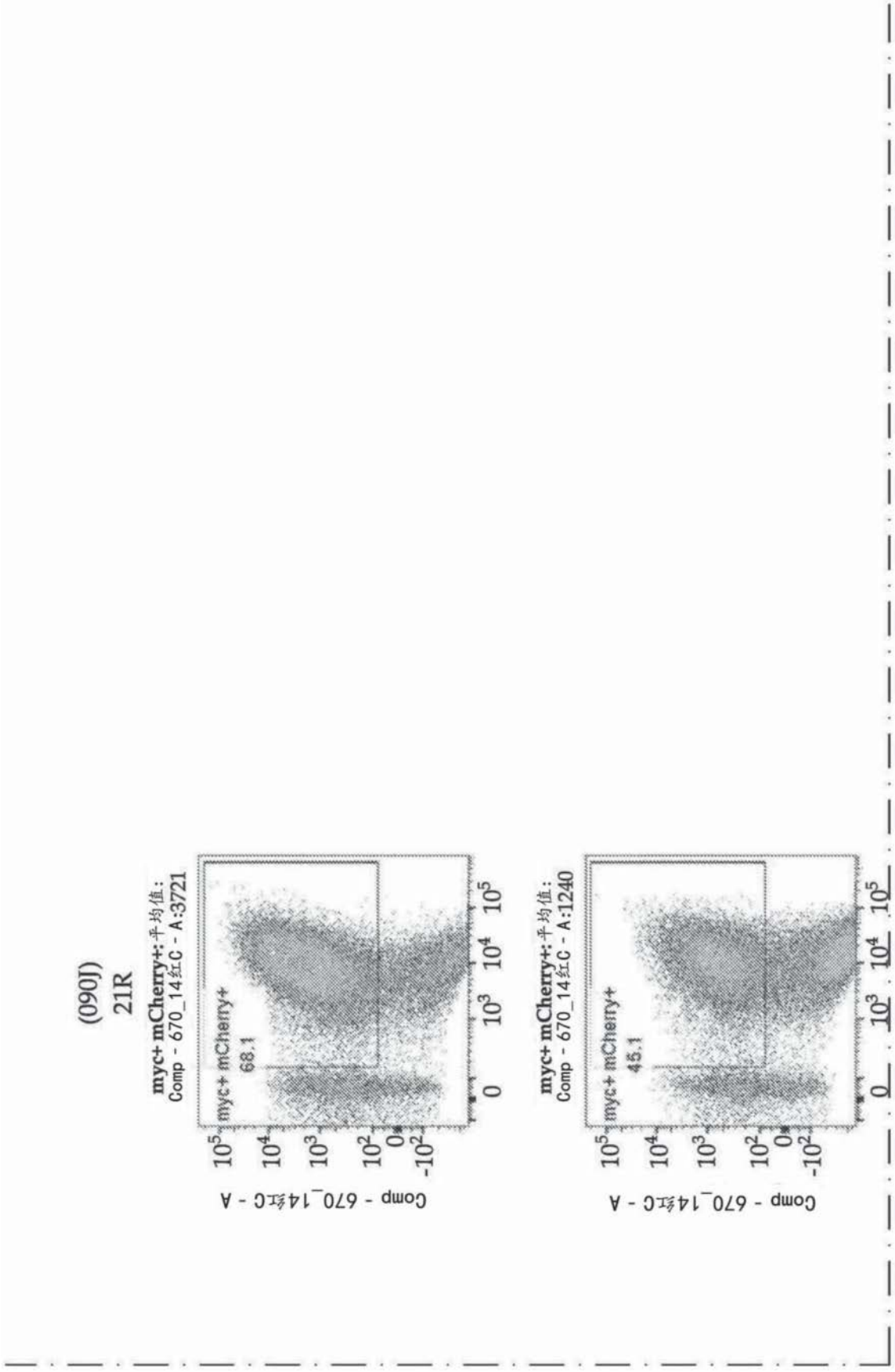
(090J)
21R
myc+ mCherry+:平均值:
Comp - 670_14红C - A:3721
myc+ mCherry+
68.1
Comp - 670_14红C - A
myc+ mCherry+:平均值:
Comp - 670_14红C - A:1240
myc+ mCherry+
45.1
Comp - 670_14红C - A

图10(续)

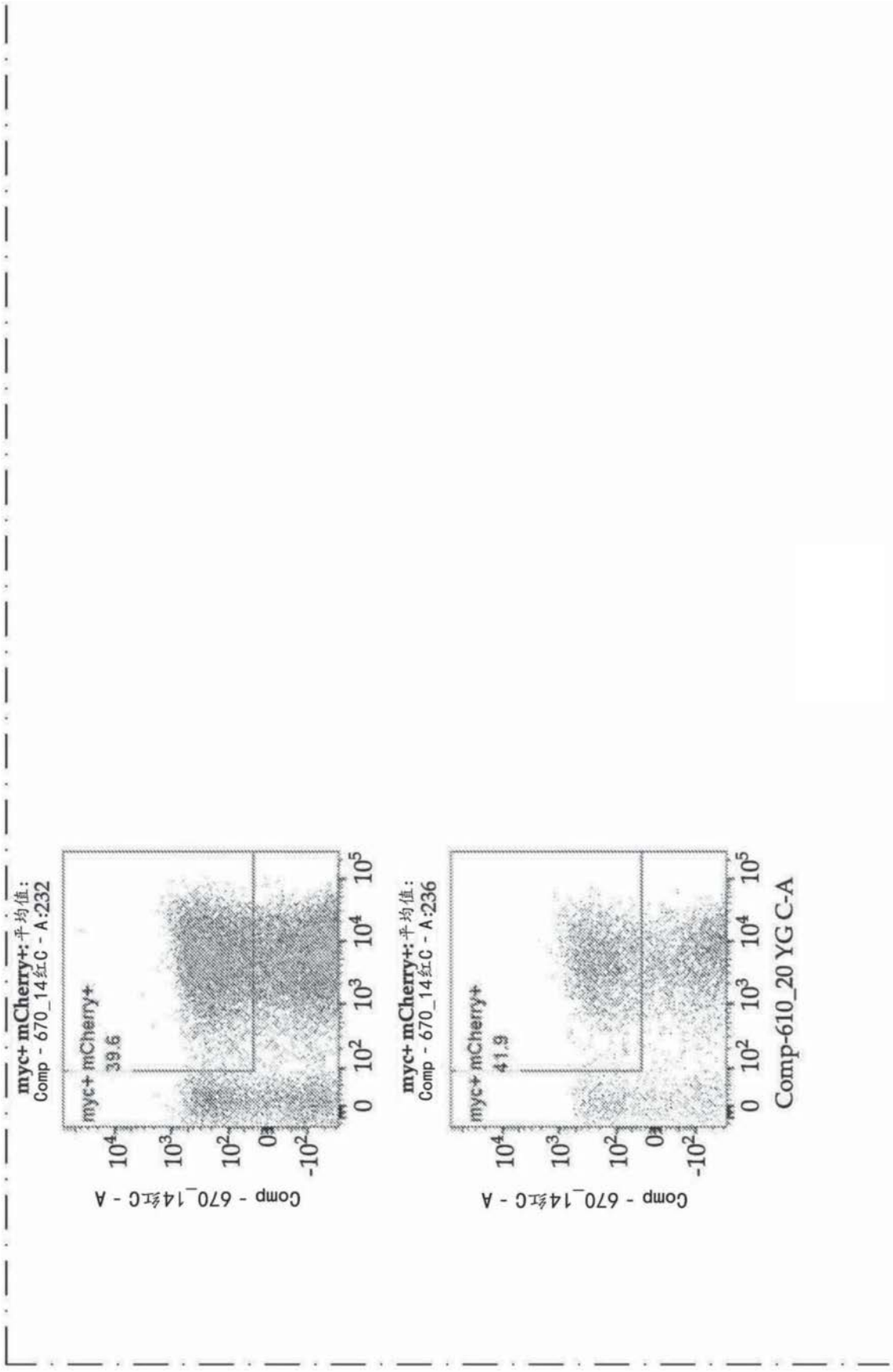
myc+ mCherry+: 平均值:
Comp - 670_14红C - A:232
myc+ mCherry+
39.6
Comp - 670_14红C - A
myc+ mCherry+: 平均值:
Comp - 670_14红C - A:236
myc+ mCherry+
41.9
Comp - 670_14红C - A
Comp-610_20 YG C-A

图10(续)

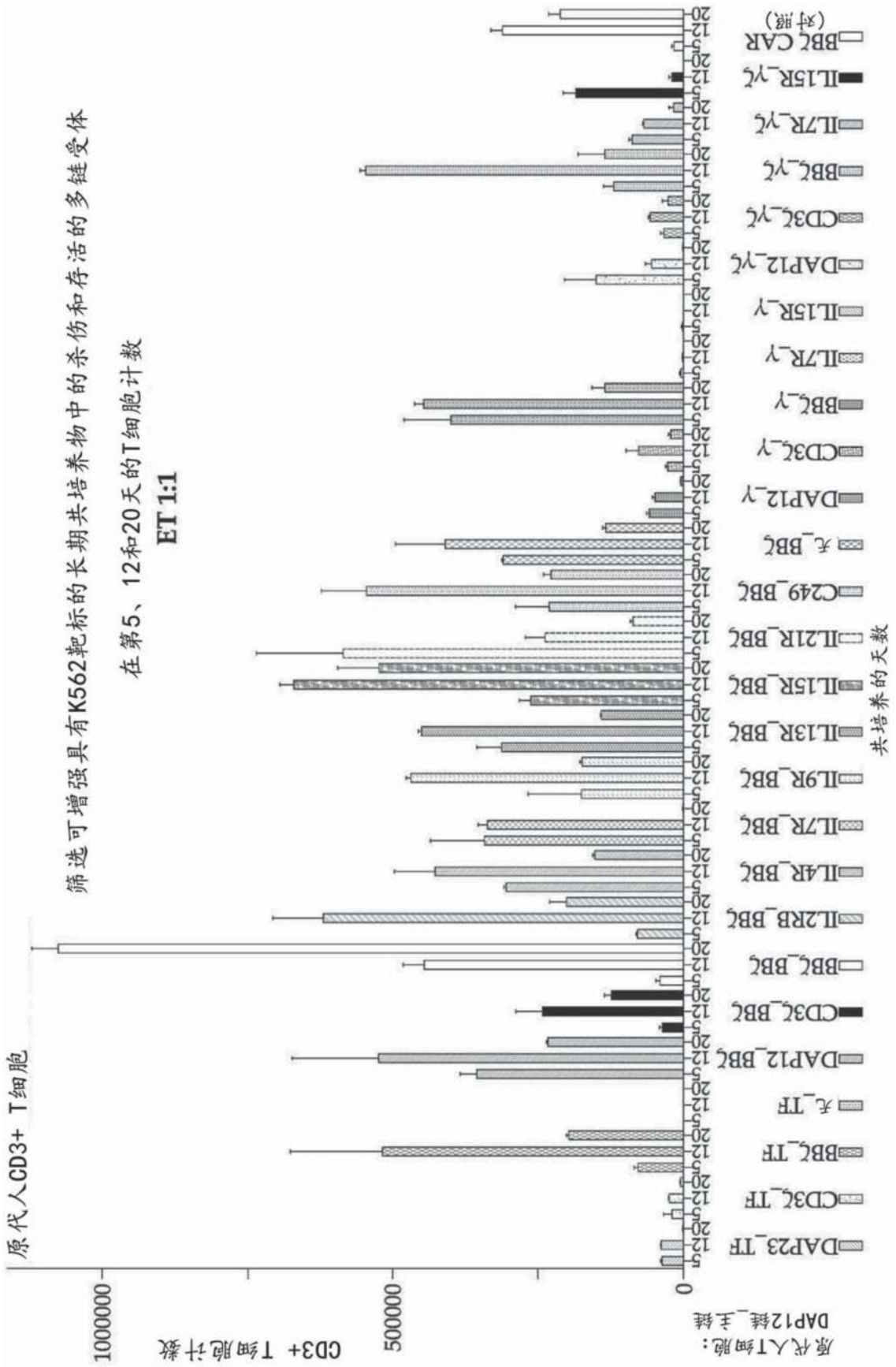
筛选可增强具有K562靶标的长期共培养物中的杀伤和存活的多链受体
在第5、12和20天的T细胞计数
ET 1:1
原代人CD3+ T细胞
CD3+ T细胞计数
1000000
500000
0
原代人T细胞：
DAP12链_主链
共培养的天数
DAP23_TF
CD3ζ_TF
BBζ_TF
ζ_TF
DAP12_BBζ
CD3ζ_BBζ
BBζ_BBζ
IL2RB_BBζ
IL4R_BBζ
IL7R_BBζ
IL9R_BBζ
IL13R_BBζ
IL15R_BBζ
IL21R_BBζ
C249_BBζ
ζ_BBζ
DAP12_γ
CD3ζ_γ
BBζ_γ
IL7R_γ
IL15R_γ
DAP12_γζ
CD3ζ_γζ
BBζ_γζ
IL7R_γζ
IL15R_γζ
BBζ CAR
(对照)

图11

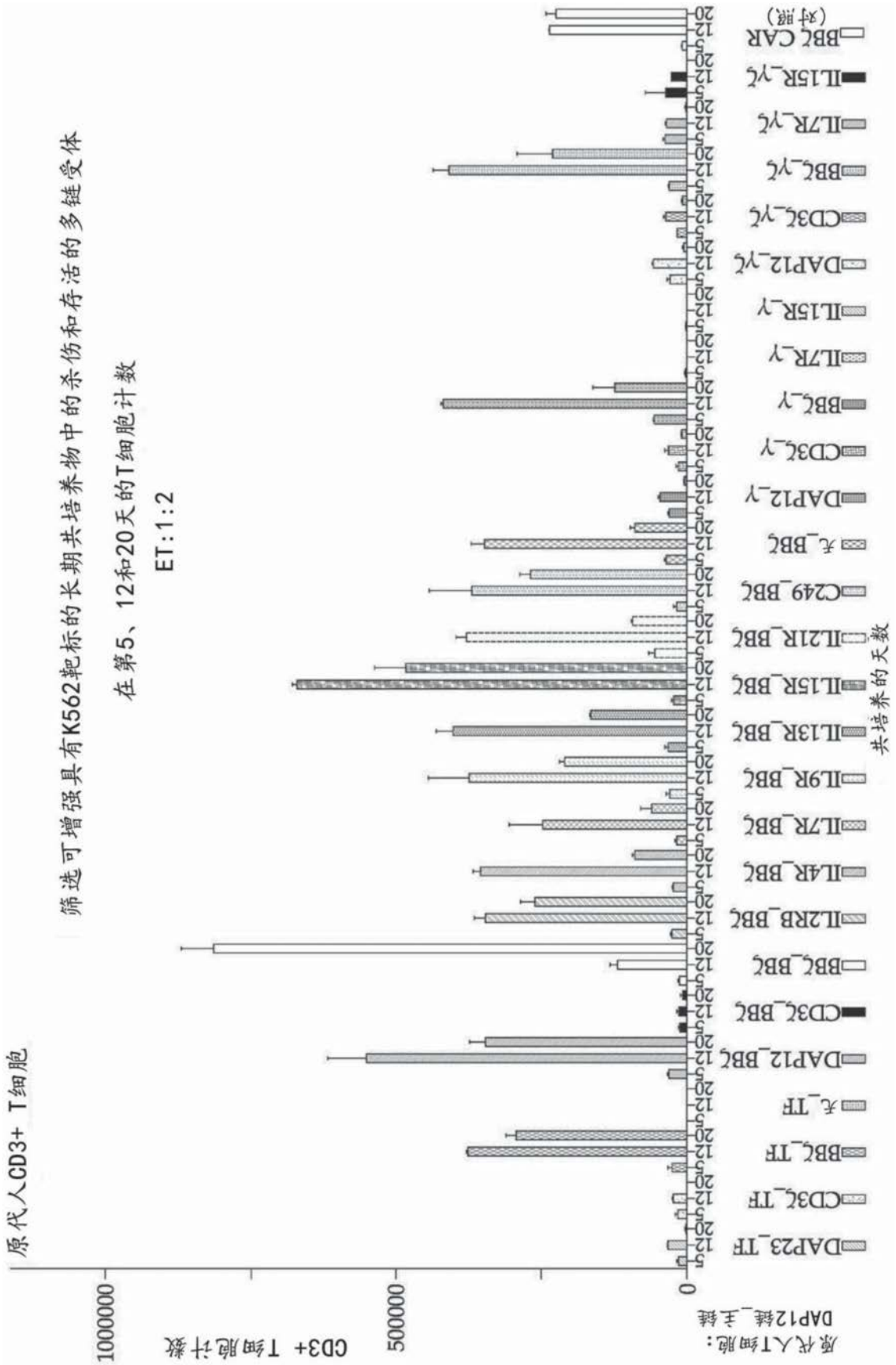
筛选可增强具有K562靶标的长期共培养物中的杀伤和存活的多链受体
在第5、12和20天的T细胞计数
ET:1:2
原代人CD3+ T细胞
CD3+ T细胞计数
1000000
500000
0
原代人T细胞：
DAP12链_主链
共培养的天数
DAP23_TF
CD3ζ_TF
BBζ_TF
ζ_TF
DAP12_BBζ
CD3ζ_BBζ
BBζ_BBζ
IL2RB_BBζ
IL4R_BBζ
IL7R_BBζ
IL9R_BBζ
IL13R_BBζ
IL15R_BBζ
IL21R_BBζ
C249_BBζ
ζ_BBζ
DAP12_γ
CD3ζ_γ
BBζ_γ
IL7R_γ
IL15R_γ
DAP12_γζ
CD3ζ_γζ
BBζ_γζ
IL7R_γζ
IL15R_γζ
BBζ CAR
(对照)

图12

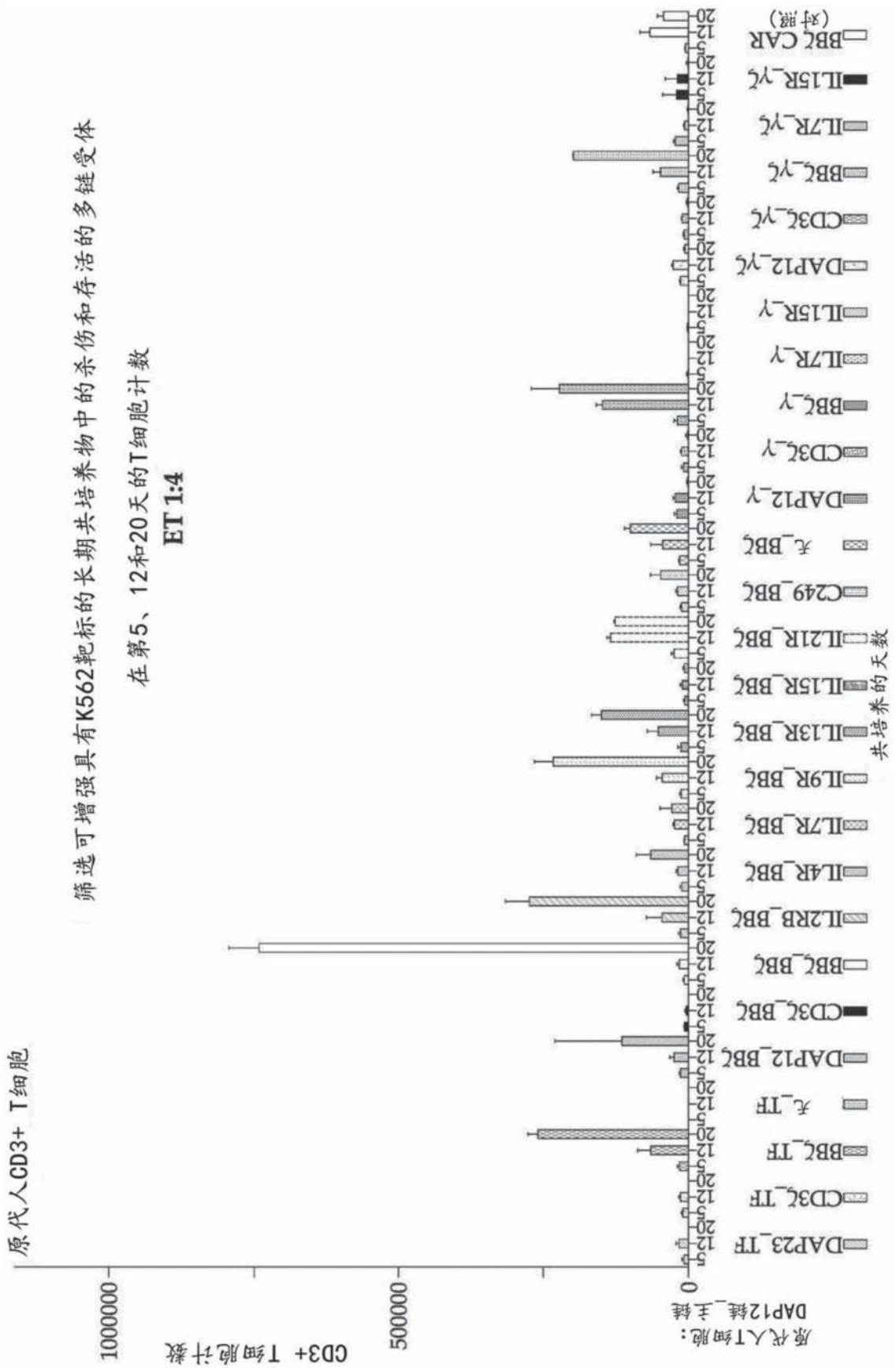
筛选可增强具有K562靶标的长期共培养物中的杀伤和存活的多链受体
在第5、12和20天的T细胞计数
ET 1:4
原代人CD3+ T细胞
CD3+ T细胞计数
1000000
500000
0
原代人T细胞：
DAP12链_共链
共培养的天数
DAP23_TF
CD3ζ_TF
BBζ_TF
ζ_TF
DAP12_BBζ
CD3ζ_BBζ
BBζ_BBζ
IL2RB_BBζ
IL4R_BBζ
IL7R_BBζ
IL9R_BBζ
IL13R_BBζ
IL15R_BBζ
IL21R_BBζ
C249_BBζ
ζ_BBζ
DAP12_γ
CD3ζ_γ
BBζ_γ
IL7R_γ
IL15R_γ
DAP12_γζ
CD3ζ_γζ
BBζ_γζ
IL7R_γζ
IL15R_γζ
BBζ CAR
(对照)

图13

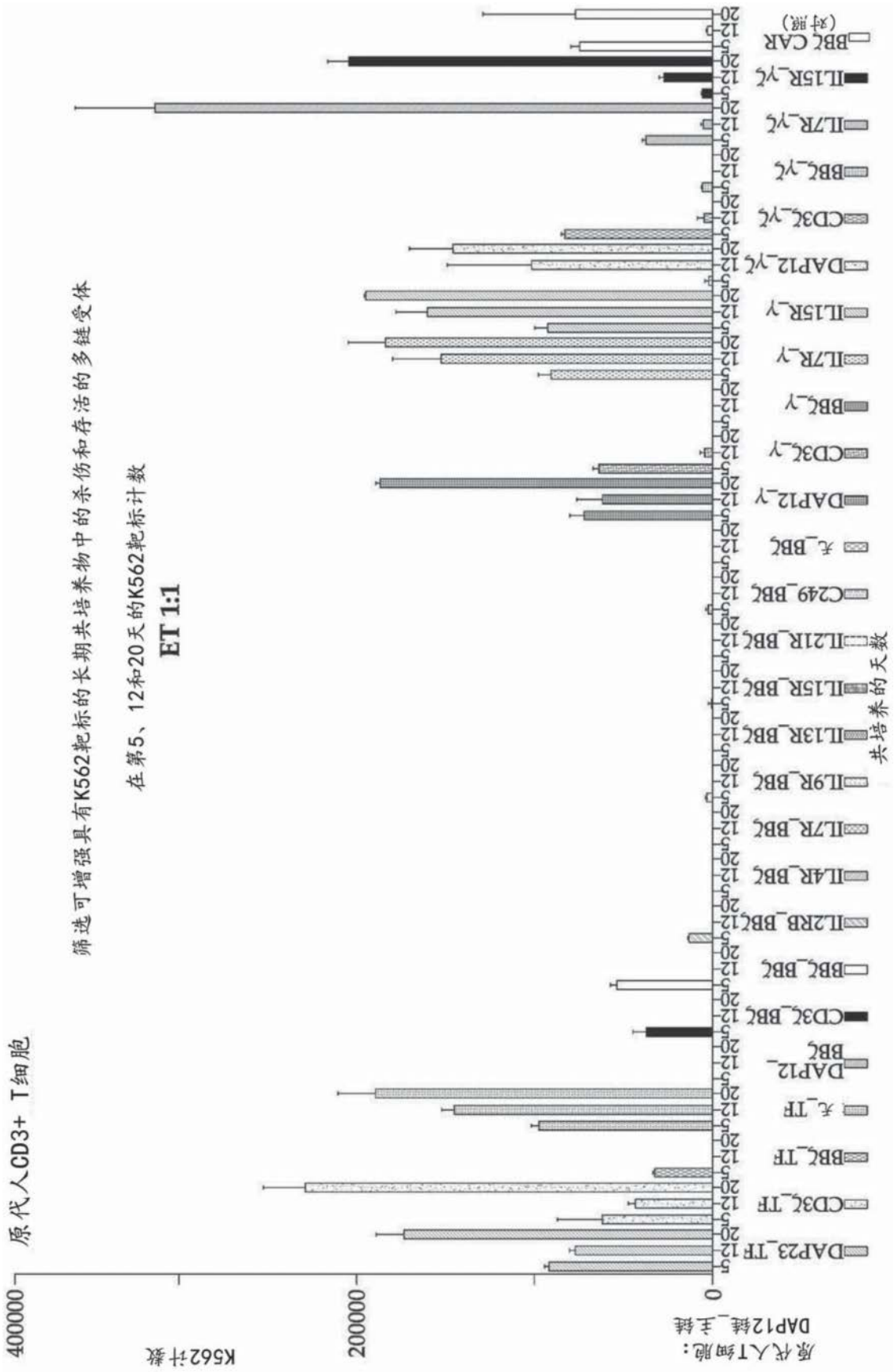
筛选可增强具有K562靶标的长期共培养物中的杀伤和存活的多链受体
在第5、12和20天的K562靶标计数
ET 1:1
原代人CD3+ T细胞
K562计数
400000
200000
0
原代人T细胞：
DAP12链_去链
共培养的天数
DAP23_TF
CD3ζ_TF
BBζ_TF
去_TF
DAP12_BBζ
CD3ζ_BBζ
BBζ_BBζ
IL2RB_BBζ
IL4R_BBζ
IL7R_BBζ
IL9R_BBζ
IL13R_BBζ
IL15R_BBζ
IL21R_BBζ
C249_BBζ
去_BBζ
DAP12_γ
CD3ζ_γ
BBζ_γ
IL7R_γ
IL15R_γ
DAP12_γζ
CD3ζ_γζ
BBζ_γζ
IL7R_γζ
IL15R_γζ
BBζ CAR
(对照)

图14

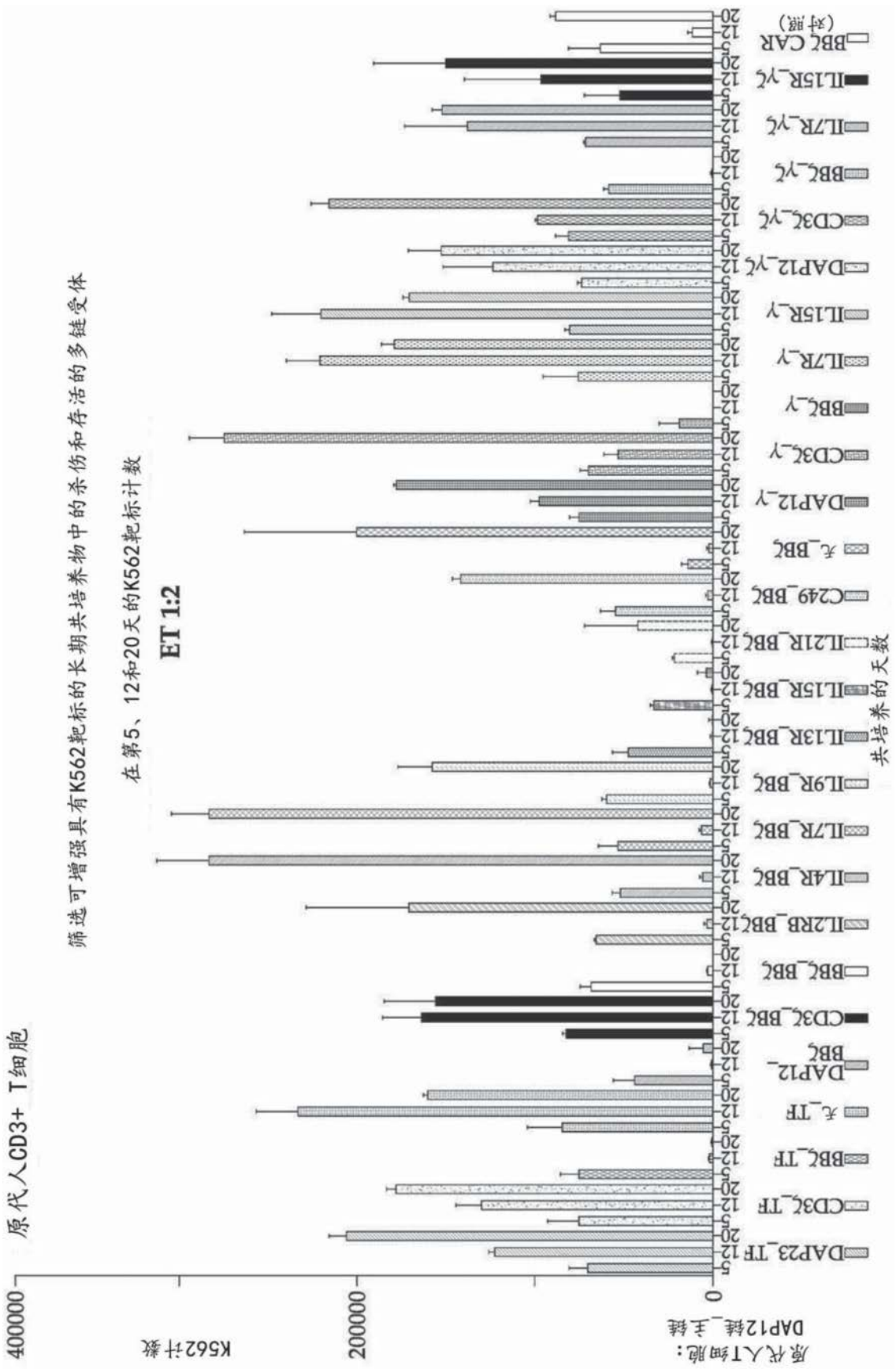
筛选可增强具有K562靶标的长期共培养物中的杀伤和存活的多链受体
在第5、12和20天的K562靶标计数
ET 1:2
原代人CD3+ T细胞
K562计数
400000
200000
0
原代人T细胞：
DAP12链_共链
共培养的天数
DAP23_TF
CD3ζ_TF
BBζ_TF
ζ_TF
DAP12_BBζ
CD3ζ_BBζ
BBζ_BBζ
IL2RB_BBζ
IL4R_BBζ
IL7R_BBζ
IL9R_BBζ
IL13R_BBζ
IL15R_BBζ
IL21R_BBζ
C249_BBζ
ζ_BBζ
DAP12_γ
CD3ζ_γ
BBζ_γ
IL7R_γ
IL15R_γ
DAP12_γζ
CD3ζ_γζ
BBζ_γζ
IL7R_γζ
IL15R_γζ
BBζ CAR
(对照)
5
12
20

图15

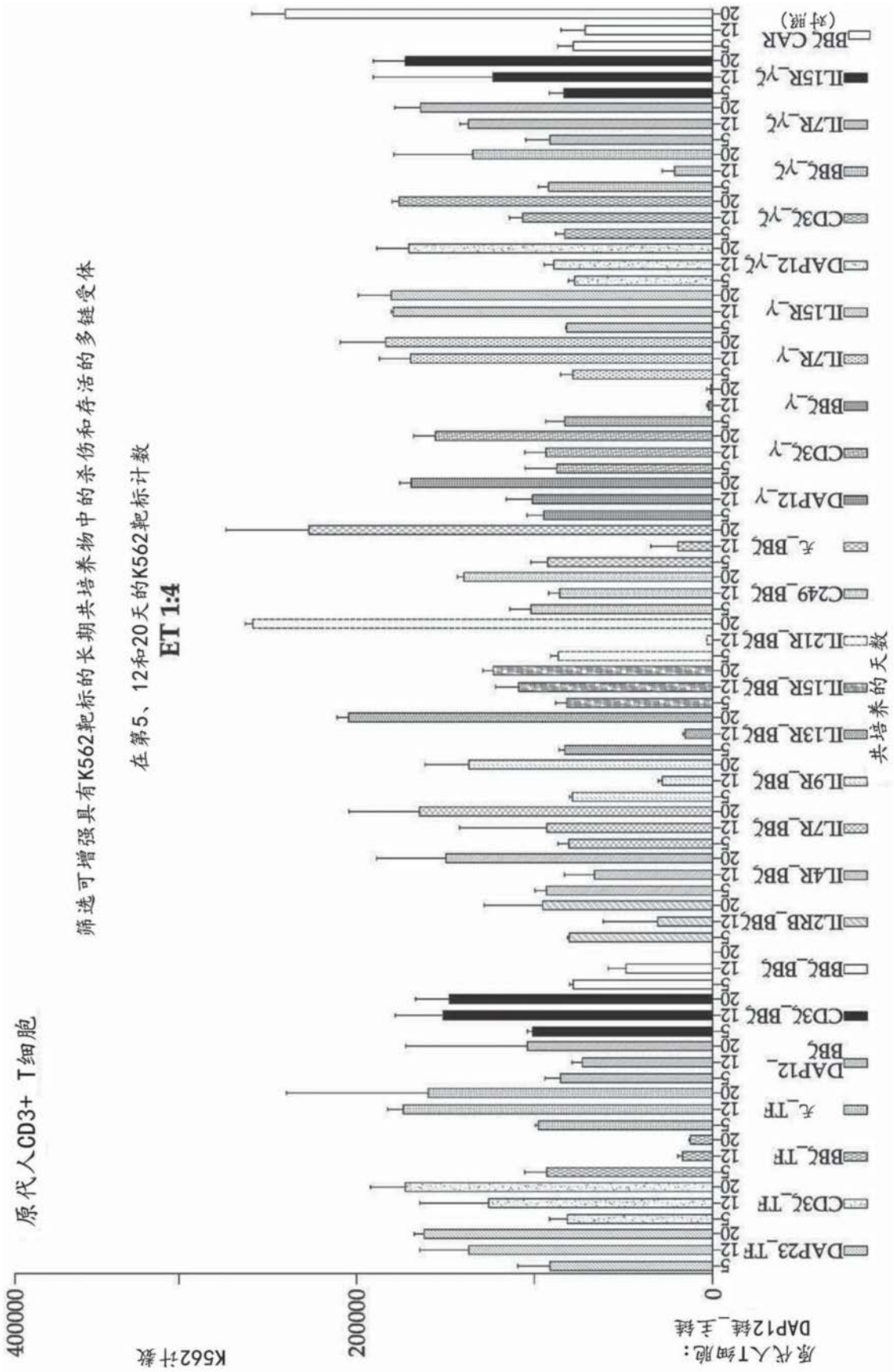
筛选可增强具有K562靶标的长期共培养物中的杀伤和存活的多链受体
在第5、12和20天的K562靶标计数
ET 1:4
原代人CD3+ T细胞
K562计数
400000
200000
0
原代人T细胞：
DAP12链_主链
共培养的天数
DAP23_TF
CD3ζ_TF
BBζ_TF
无_TF
DAP12_BBζ
CD3ζ_BBζ
BBζ_BBζ
IL2RB_BBζ
IL4R_BBζ
IL7R_BBζ
IL9R_BBζ
IL13R_BBζ
IL15R_BBζ
IL21R_BBζ
C249_BBζ
无_BBζ
DAP12_γ
CD3ζ_γ
BBζ_γ
IL7R_γ
IL15R_γ
DAP12_γζ
CD3ζ_γζ
BBζ_γζ
IL7R_γζ
IL15R_γζ
BBζ CAR
(对照)

图16