



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 118634339 B

(45) 授权公告日 2025.07.01

(21) 申请号 202410423409.8

(51) Int.CI.

(22) 申请日 2018.02.17

A61K 47/64 (2017.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

C07K 19/00 (2006.01)

申请公布号 CN 118634339 A

C12N 9/90 (2006.01)

(43) 申请公布日 2024.09.13

A61K 47/65 (2017.01)

(30) 优先权数据

A61K 47/66 (2017.01)

62/460,118 2017.02.17 US

A61K 47/54 (2017.01)

(62) 分案原申请数据

A61K 45/00 (2006.01)

201880024308.6 2018.02.17

A61K 39/00 (2006.01)

(73) 专利权人 珀杜研究基金会

A61P 43/00 (2006.01)

地址 美国印第安纳州

(56) 对比文件

WO 2016098078 A2, 2016.06.23

(72) 发明人 P.S.洛 M.斯里尼瓦萨劳 B.张

WO 2016164745 A1, 2016.10.13

(74) 专利代理机构 北京天昊联合知识产权代理

审查员 吕茂平

有限公司 11112

权利要求书2页 说明书32页

专利代理人 麦善勇 张天舒

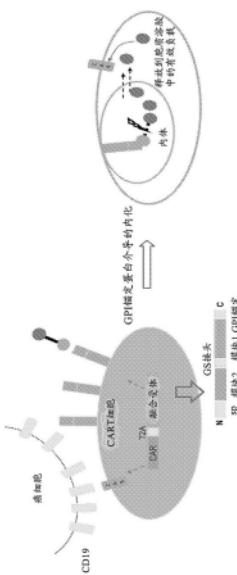
序列表(电子公布) 附图20页

(54) 发明名称

用于细胞疗法的基于靶向性配体-有效负载的药物递送

(57) 摘要

本文涉及用于细胞疗法的基于靶向性配体-有效负载的药物递送,且本文中公开了提供细胞疗法的灵活微调的药物递送平台。特别地,将工程化融合蛋白与要被移植细胞内化的携带至少一种药物有效负载的高亲和力配体偶联,以观察或调节移植的细胞疗法效果。



1. 用于细胞疗法的药物递送平台,其包含:

a. 用于移植的靶细胞上的工程化蛋白质,其中所述工程化蛋白质由第一组分和第二组分组成,所述第一组分和所述第二组分通过肽接头连接,所述第一组分是非膜蛋白,所述第二组分是膜锚定的肽或蛋白质;

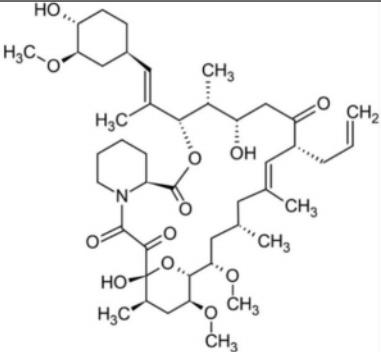
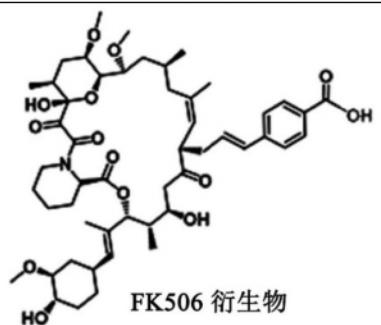
b. 与接头缀合的小配体,其中所述小配体对所述工程化蛋白质的至少一种组分具有内在的结合亲和力;和

c. 与所述接头缀合的药物有效负载,其中当所述小配体结合所述工程化蛋白质的至少一种组分时,所述药物有效负载与所述靶细胞结合;

其中所述第一组分是FK506结合蛋白FKBP,

其中所述第二组分是在所述第一组分上赋予糖基磷脂酰肌醇GPI锚定的肽,并且由叶酸受体 $\alpha$ FR $\alpha$ 或叶酸受体 $\beta$ FR $\beta$ 组成,

其中所述小配体是FK506、FK506衍生物、作为FKBP的合成配体的SLF、SLF衍生物、FA叶酸或FA衍生物:

FK506	
FK506 衍生物	 FK506 衍生物

作为FKBP的合成配体的 SLF	
SLF衍生物	
FA 叶酸	
FA衍生物	

其中所述肽接头是SGGGS的至少一个区段，

其中所述接头是选自烷基、聚乙二醇PEG、聚脯氨酸、寡-(4-哌啶羧酸)、寡哌啶、肽、糖肽及其组合的一种，并且

其中所述药物有效负载是选自罗丹明、异硫氰酸荧光素、S0456、EC20螯合头、NOTA1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸、DOTA1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸、微管溶素、DM1、DM4、奥利斯他汀、达沙替尼、MEK1/2抑制剂、PI3K抑制剂、HDAC抑制剂、激酶抑制剂、代谢抑制剂、GSK3β抑制剂、MAO-B抑制剂、Cdk5抑制剂、ROR γ t激动剂、SHP1/2抑制剂、TC-PTP抑制剂、和siRNAmi181a1。

2. 根据权利要求1所述的药物递送平台，其中所述用于移植的靶细胞是免疫细胞。
3. 根据权利要求2所述的药物递送平台，其中所述免疫细胞是嵌合抗原受体CAR T细胞。

## 用于细胞疗法的基于靶向性配体-有效负载的药物递送

[0001] 本专利申请是申请号为2018800243086、申请日为2018年2月17日、发明名称为“用于细胞疗法的基于靶向性配体-有效负载的药物递送”的专利申请的分案申请。

[0002] 交叉引用

[0003] 本申请要求2017年2月17日提交的根据35U.S.C. §119(e) 的美国临时申请62/460,118的权益。该申请的内容明确完整并入本文。

### 技术领域

[0004] 本公开提供了用于细胞疗法的药物递送平台。特别地，工程化蛋白质与携带至少一种药物有效负载的高亲和力配体偶联，以通过工程化蛋白质被移植的细胞内化，从而调节移植的细胞疗法效果。

### 背景技术

[0005] 在过去的几十年中，在本领域中已经在细胞类型、递送方法和合适的疾病模型方面取得了巨大进步。就细胞类型而言，目前的细胞疗法可大致分类为嵌合抗原受体 (CAR)、用于肿瘤模型的细胞和基于干细胞的再生医学。

[0006] CAR T，也称为嵌合T细胞受体、嵌合免疫受体或人工T细胞受体，使免疫效应细胞(通常为T细胞或NK细胞)能够识别具有相应抗原的靶细胞并行使其细胞毒性活性。CAR-T技术的出现和发展为某些类型的癌症提供了希望，这使CAR-T成为生物医学研究和临床研究两者的领域的超级明星。

[0007] 再生医学是一个改变游戏规则的医学领域，具有完全治愈受损组织和器官的潜力，为那些患有目前无法修复的状况的人提供解决方案和希望。发育和细胞生物学、免疫学和其他领域的进步为改进现有的再生疗法和开发新的疗法提供了新的机会。

[0008] 干细胞具有通过称为分化的过程发展成许多不同类型的细胞的能力，例如皮肤细胞、脑细胞、肺细胞等。干细胞是再生医学的关键组成部分，因为它们为新的临床应用打开了大门。

[0009] 多种干细胞(包括成体和胚胎干细胞)可用于再生医学。此外，在再生医学中使用各种类型的祖细胞，例如在脐带血中发现的那些祖细胞和称为诱导多能干细胞的生物工程化细胞。每种类型具有独特的特性，其中一些比其他类型更通用。

[0010] 许多正在开发的再生疗法始于特定患者自身的细胞。例如，可以收集患者自身的皮肤细胞，在实验室中重新编程以赋予它们某些特征，并递送回到患者以治疗他或她的疾病。

[0011] 尽管抗CD19 CAR T在白血病治疗的临床应用中取得了巨大成功，但致死性副作用如自肿瘤细胞快速裂解产生的细胞因子风暴，以及快速增殖的抗CD19 CAR T细胞对正常CD19+B细胞的杀伤需要CAR T细胞的更精细控制。在基于干细胞的再生疗法中，已经努力更好了解移植细胞在靶组织中的分化过程和营养作用。同时，这些过程可被一些特异性递送到干细胞的小分子药物改变，从而进一步促进靶组织的再生。

[0012] 对CAR T细胞以及其他基于干细胞的再生疗法的另一个长期关注是这些移植细胞的致瘤潜力。总之，具有控制移植细胞(CAR T细胞或干细胞)在它们被移植后的活性的私用门道会是理想的。

## 发明内容

[0013] 本公开内容提供了用于微调细胞疗法的药物递送平台。药物递送系统包含：

[0014] a. 用于移植的靶细胞上的工程化蛋白质，其中融合蛋白包含第一组分和第二组分，所述第一组分和所述第二组分通过肽接头连接，所述第一组分是非膜蛋白，所述第二组分是膜锚定的肽或蛋白质；

[0015] b. 至少一种与接头缀合的小配体，其中所述至少一种小配体对所述工程化蛋白质的至少一种组分具有内在的高亲和力；和

[0016] c. 至少一种与所述接头缀合的药物有效负载，其中当所述小配体结合所述工程化蛋白质的至少一种组分时，所述药物有效负载与所述靶细胞结合。

[0017] 在一些实施方案中，前述药物递送平台具有显像剂的药物有效负载。此类显像剂可以选自下组：荧光染料罗丹明、荧光素和S0456。或者，此类成像剂选自下组：放射性同位素螯合成像部分、EC 20螯合头、NOTA和DOTA。

[0018] 在一些实施方案中，前述药物递送平台具有细胞毒性药物的药物有效负载。此类细胞毒性药物可以选自下组：微管溶素、DM1、DM4和奥利斯他汀。

[0019] 在一些实施方案中，前述药物递送平台具有基因表达调节剂的药物有效负载。

[0020] 在一些实施方案中，前述药物递送平台具有细胞活性调节剂的药物有效负载。

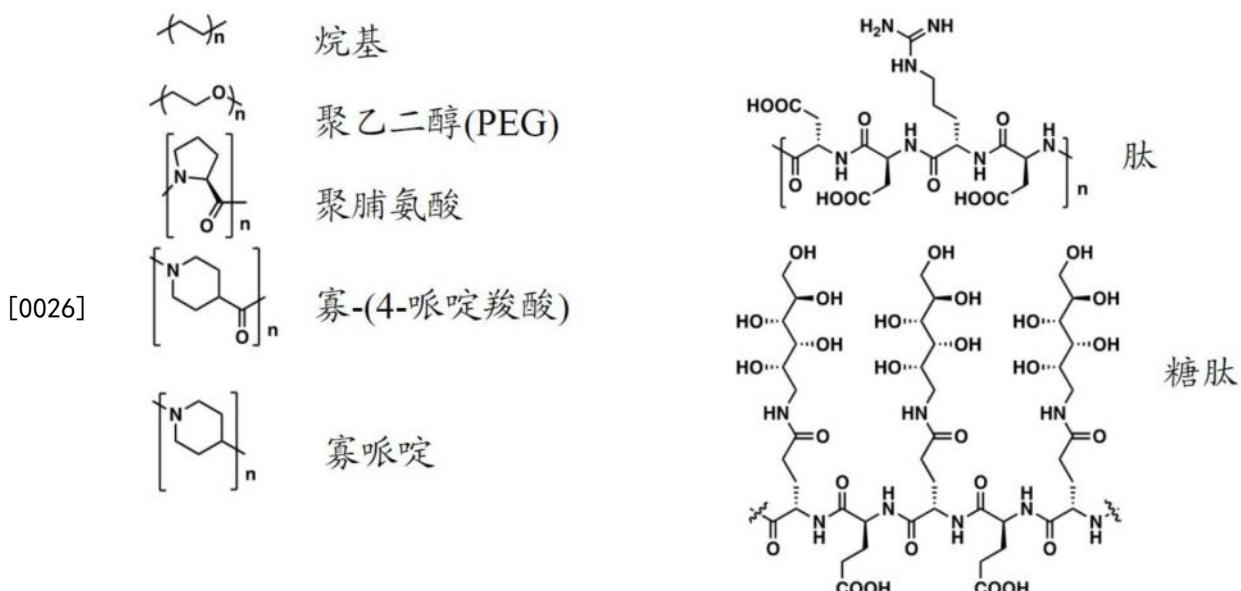
[0021] 在一些实施方案中，前述调节剂可以选自下组：达沙替尼、MEK1/2抑制剂和PI3K抑制剂；HDAC抑制剂、激酶抑制剂和代谢抑制剂；GSK3 $\beta$ 抑制剂、MAO-B抑制剂和Cdk5抑制剂的组。

[0022] 在一些实施方案中，前述调节剂是磷酸酶抑制剂、ROR $\gamma$ t激动剂或siRNA mi181a1。

[0023] 在一些实施方案中，前述药物有效负载是磷酸酶抑制剂，包括但不限于针对SHP1/2、TC-PTP的抑制剂。

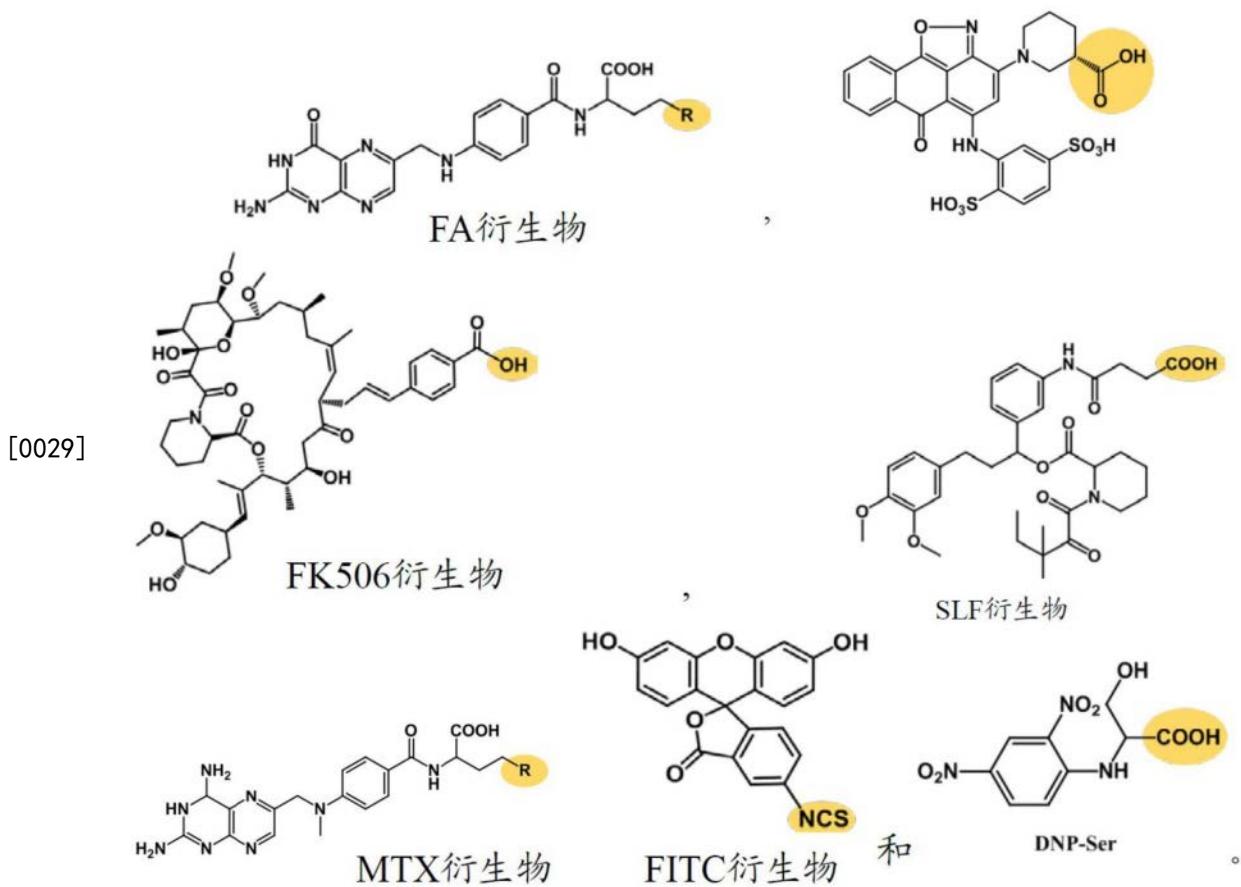
[0024] 在一些实施方案中，当小配体结合工程化蛋白质的至少一种组分时，药物递送平台中的前述药物有效负载被所述靶细胞进一步内化。

[0025] 在一些实施方案中，前述药物递送平台具有可释放的接头以连接小配体和有效负载药物。接头可以选自下组：



[0027] 在一些实施方案中,前述工程化蛋白质组分选自下组:叶酸受体 $\alpha$ (FR $\alpha$ )、叶酸受体 $\beta$ (FR $\beta$ )、尿激酶受体(uPAR)、FK506结合蛋白(FKBP)、二氢叶酸还原酶(DHFR)、针对异硫氰酸荧光素的单链可变片段(针对FITC的scFv)和针对二硝基酚的单链可变片段(针对DNP的scFv)。

[0028] 在一些实施方案中,前述小配体选自下组:



[0030] 在一些实施方案中，前述药物递送平台具有作为FKBP的第一组分，第二组分是对所述第一组分赋予糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚的肽，并且小配体是FK506或其衍生物。在一些

实施方案中,FK506衍生物消除钙神经素结合位点。

[0031] 在一些实施方案中,前述第二组分是全长或截短的叶酸受体(FR)。

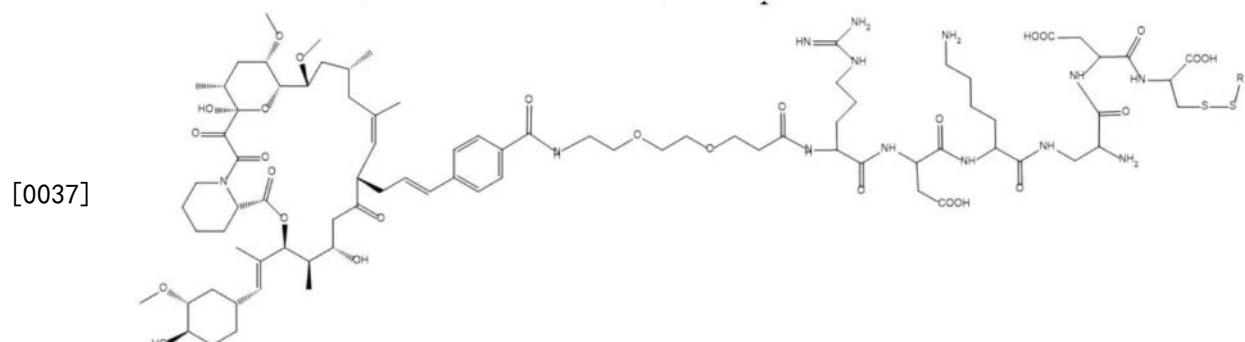
[0032] 在一些实施方案中,前述药物递送平台具有柔性肽接头SGGGS的至少一个区段以连接工程化蛋白质的第一组分和第二组分。

[0033] 在一些实施方案中,前述药物递送平台包含选自SEQ ID NO:1-2(分别为小鼠FKBP-FR $\alpha$ 的氨基酸序列和人FKBP-FR $\alpha$ 的氨基酸序列)的工程化蛋白质。

[0034] 在一些实施方案中,前述药物递送平台包含选自SEQ ID NO:12-15的工程化蛋白质。

[0035] 在一些实施方案中,前述用于移植的靶细胞是免疫细胞。例如,免疫细胞可以是NK细胞或嵌合抗原受体T(CAR T)细胞。此类CAR T细胞可以表达选自SEQ ID NO:3-4的氨基酸序列。

[0036] 在一些实施方案中,前述药物递送平台具有式I的小配体缀合物。



[0038] 在一些实施方案中,前述药物递送平台具有用于移植的靶细胞,其为表达SEQ ID NO:3(小鼠抗CD19 CAR T构建体的氨基酸序列)或SEQ ID NO:4(人抗CD19 CAR T构建体的氨基酸序列)的CAR T细胞。

[0039] 在一些实施方案中,前述小配体进一步与荧光染料或放射性探针缀合,用于追踪药物内化。

[0040] 在一些实施方案中,前述药物递送平台包含小配体,其进一步与内源基因表达的调节剂或转导的转基因表达的调节剂缀合。

[0041] 在一些实施方案中,前述药物递送平台,用于移植的靶细胞是设计用于合成患者缺乏的生物化学物质的干细胞、祖细胞或移植细胞。

[0042] 本公开内容还提供了CAR T细胞,其包含表达选自SEQ ID NO:12-15的氨基酸序列的构建体。

[0043] 本发明还提供了编码选自SEQ ID NO:12-15的氨基酸序列的DNA构建体。

[0044] 本公开内容还提供了编码FKBP-FR $\alpha$ 融合受体的DNA构建体,其包含与表达载体中的EF1a启动子可操作连接的SEQ ID NO:1-2中的任一项。在一些实施方案中,此类表达载体是具有SEQ ID NO:5的pWPI。

[0045] 本发明还提供了包含SEQ ID NO:6-8中任一项的DNA构建体。

[0046] 本公开内容还提供了包含插入基因hFKBP-FR(SEQ ID NO:7)和人抗CD19 CAR(SEQ ID NO:9)的移植的细胞。

[0047] 本公开内容还提供了包含插入基因mFKBP-FR(SEQ ID NO:8)和小鼠抗CD19 CAR

(SEQ ID NO:10)的移植细胞。

[0048] 本公开内容还提供了调节细胞疗法效果的方法。所述方法包括：

[0049] a. 鉴定用于移植的靶细胞，其中移植的靶细胞具有细胞疗法功能；

[0050] b. 在所述用于移植的靶细胞表面上提供工程化融合蛋白质，所述融合蛋白包含第一组分和第二组分，所述第一组分和所述第二组分通过柔性肽接头连接，所述第一组分是非膜蛋白质，所述第二组分是糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 锚定的肽或蛋白质；

[0051] c. 向所述靶细胞提供药物缀合物的有效负载，其中所述药物有效负载通过接头与小配体缀合，并任选与荧光染料缀合，其中所述小配体以高亲和力结合所述工程化融合蛋白质的至少一种组分，并且与所述药物有效负载一起被靶细胞内化；

[0052] d. 在所述靶细胞内释放所述药物以调节所述靶细胞的疗法功能。

[0053] 在一些实施方案中，前述细胞疗法功能是向受试者提供光学引导手术。

[0054] 在一些实施方案中，前述细胞疗法功能是控制靶细胞增殖。

[0055] 在一些实施方案中，前述细胞疗法功能是对靶细胞衔接的癌细胞执行细胞毒性。

[0056] 在一些实施方案中，前述移植的靶细胞是免疫细胞。例如，靶细胞是CAR T细胞。

[0057] 在一些实施方案中，前述移植的靶细胞是设计用于合成患者缺乏的生物化学物质的干细胞、祖细胞或移植细胞。

[0058] 在一些实施方案中，前述药物有效负载是选自罗丹明和FITC的荧光染料的成像剂，或选自EC20螯合头、NOTA和DOTA的放射性同位素成像剂。

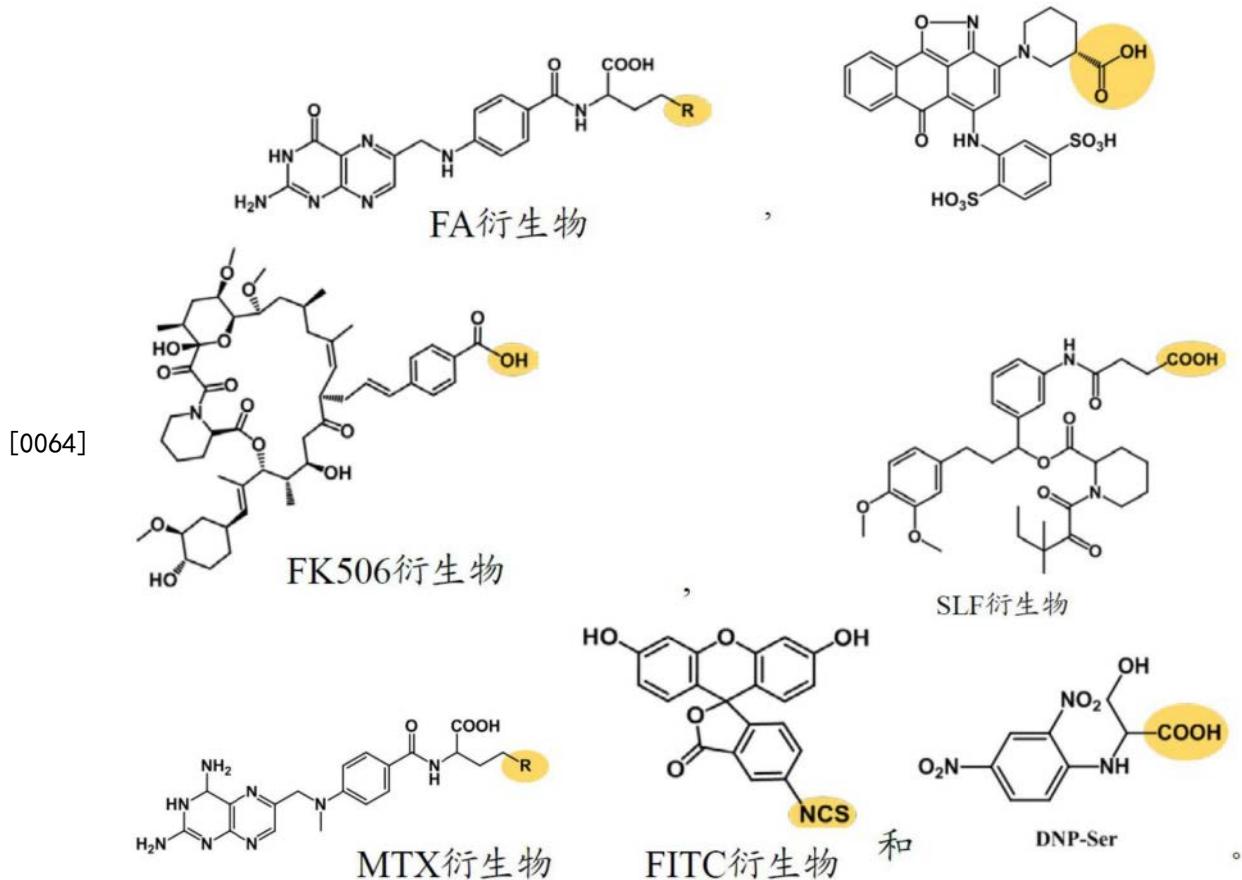
[0059] 在一些实施方案中，前述药物有效负载是选自下组的细胞毒性药物：微管溶素、DM1、DM4和奥利斯他汀。

[0060] 在一些实施方案中，前述药物有效负载是基因表达调节剂，其选自由达沙替尼、MEK1/2抑制剂和PI3激酶抑制剂组成的激酶抑制剂或mi181a1的siRNA。

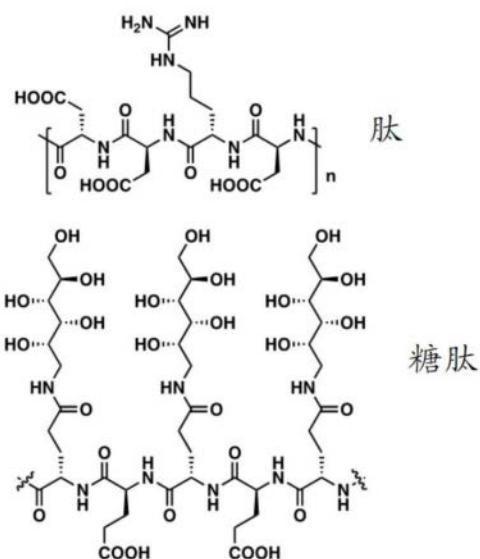
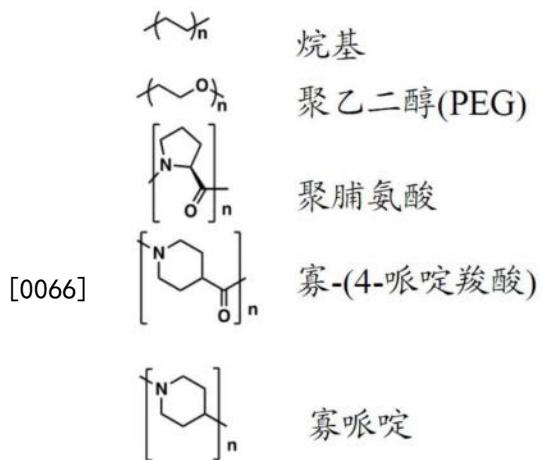
[0061] 在一些实施方案中，前述移植的靶细胞包含选自SEQ ID NO:12-15的融合蛋白。

[0062] 在一些实施方案中，前述工程化蛋白质组分选自FRa、FRb、uPAR、FKBP、DHFR、针对 FITC 的 scFv 和针对 DNP 的 scFv。

[0063] 在一些实施方案中，前述的小配体选自下组：



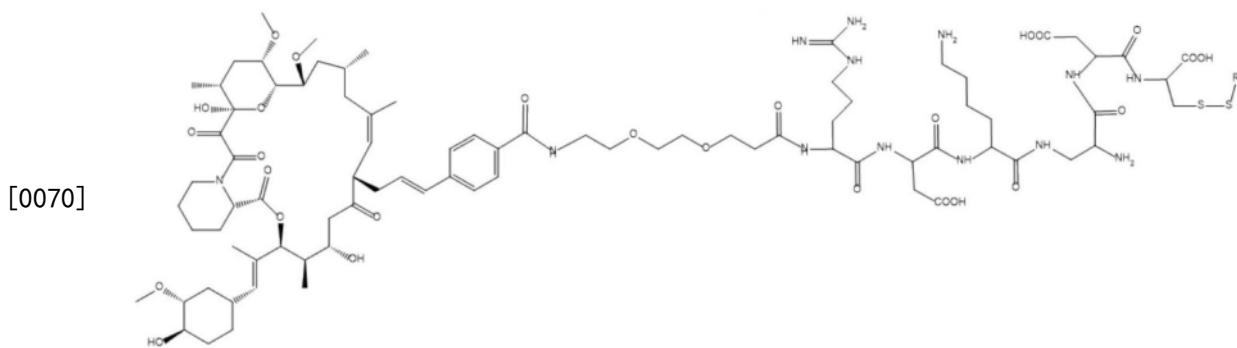
[0065] 在一些实施方案中,连接小配体和有效负载药物的前述接头选自下组:



[0067] 在一些实施方案中,前述移植的靶细胞包含选自下组的工程化FKBP-接头-FRa融合蛋白:SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2

[0068] 在一些实施方案中,前述移植的靶细胞是CAR T细胞,其包含选自SEQID NO:3和SEQ ID NO:4的工程化抗CD19 CAR T构建体。

[0069] 在一些实施方案中,前述药物缀合物是包含式I的FK506可释放接头,其中FK506的结合结构域具有约4pM至约100pM的对FKBP的亲和力。



[0071] 在一些实施方案中,前述移植的靶细胞是CAR T细胞,并且药物缀合物选自下组:GSK3b抑制剂,MAPK抑制剂以控制移植的CAR T细胞的过度细胞因子风暴。

[0072] 在一些实施方案中,前述移植的靶细胞是CAR T细胞,并且药物缀合物是设计用于控制不需要的T细胞增殖的调节剂。

[0073] 在一些实施方案中,前述移植的靶细胞是干细胞或祖细胞,并且药物缀合物是GSK3b抑制剂以加强骨折修复。

[0074] 在一些实施方案中,前述移植的靶细胞是设计用于合成患者缺乏的生物化学物质的干细胞、祖细胞或移植细胞;并且药物缀合物选自下组:MAO-B抑制剂和cdk5抑制剂,以治疗帕金森病或其他神经变性疾病。

[0075] 在一些实施方案中,前述移植的靶细胞是NK细胞,并且药物缀合物是ROR  $\gamma$  t激动剂以控制Th17细胞介导的免疫应答。

[0076] 参考以下附图、相关描述和权利要求书,将更好地理解本发明的这些和其他特征、方面和优点。

## 附图说明

[0077] 图1:A.用于细胞疗法的基于FKBP-FRa和FK506-有效负载的药物递送平台的概述;B.用于CAR T细胞有效负载递送的秘密途径平台的图示。

[0078] 图2A.左:FK506的化学结构,其中FKBP结合位点(黄色)和衍生化位点(红色)突出显示。右:钙神经素A片段(绿色)、钙神经素B(青色)、FKBP12(紫色)和FK506(黄色)的三元复合物的共晶结构,PDB:1TC0

[0079] 图2B.工程化融合蛋白中两个模块的各种组合选择及其各自的配体选择,突出显示了潜在的衍生化位点。

[0081] 图3:左:CAR T细胞活性的负和正调节,改编自The quest for spatio-temporal control of CAR T cells,Sun J.etc.2015。右:AP1903(FK506二聚体)诱导的FKBP-胱天蛋白酶9介导的凋亡机制和AP1903的结构,改编自Inducible Apoptosis as a Safety Switch for Adoptive Cell Therapy,Malcolm K.B.etc.2011

[0082] 图4:a.具有FKBP-FRa插入物的pWPI表达载体图谱(hFRa 1-24:红色,FKBP:黄色,hFRa 25-258:红色)b.与FRa阳性KB细胞和未转导的K562细胞相比,FKBP-FRa转导的K562细胞显示出更高的约50kDa的条带(FRa的37kDa加上FKBP的12kDa)。c.有效负载载体构建体和CAR T构建体设计。d.FKBPFR3GS的构建体设计(记录为FF3)。从N末端到C末端,它具有作为信号肽的人FRa的1-24aa、人FKBP蛋白、三个Gly-Ser的接头,然后是人FRa的25-258aa。在

FKBPFR1GS(记录为FF1)中,FF3的三个Gly-Ser的接头用一个Gly-Ser的接头替换,其他部分未改变。e.4m5.3FR的构建体设计。从N末端到C末端,它具有hCD8信号肽、针对FITC的4M5.3抗体的scFv、GS接头、人FR<sub>a</sub>的25-258aa。

[0083] 图5.FKBPFR1GS融合受体中FR和FKBP之间的干扰。FKBPFR1GS融合蛋白中的叶酸的结合在低至0.01nM时阻断FK506-罗丹明的结合,并在50nM时完全消除FK506-罗丹明结合。

[0084] 图6.FKBPFR1GS jurkat细胞在结合OTL38后显示降低的FK506-罗丹明强度。融合受体内自FK506-罗丹明(供体)至OTL38(FA-S0456,受体,ex/em:774/794nm)的FRET指示FR和FKBP之间的相互作用。

[0085] 图7.增加FKBP和FR之间的接头长度显著降低了两个部分之间的干扰。与FF1(FKBP和FR之间的1GS)相比,FF3(FKBP和FR之间的3GS)在10nM FA(其与人体中FA的生理浓度相当)存在下保留FK506-罗丹明的结合。

[0086] 图8.PI-PLC处理释放GPI锚定的融合受体FF3。具有FF3融合受体的Jurkat T细胞显示与20nM FA-FITC(EC17)的饱和结合,而在5mU PI-PLC或50mU PI-PLC处理后,FA-FITC丧失与细胞的结合,这指示GPI锚定的FF3融合受体的释放。

[0087] 图9.FKBPFR3GS融合受体中的FA-罗丹明结合曲线。在人T细胞上稳定表达的FKBPFR3GS融合受体可以以高亲和力( $K_d=0.95\text{nM}$ )结合叶酸衍生物(FA-罗丹明),所述亲和力与FR+KB细胞中的FA-罗丹明亲和力( $K_d$ 约1nM)相当。因此,保留了融合受体中FR的结合特性。

[0088] 图10.FKBPFR3GS融合受体中的FK506-罗丹明结合曲线。在人T细胞上稳定表达的FKBPFR3GS融合受体能够以高亲和力( $K_d=3.93\text{nM}$ )结合FK506衍生物(FK506-罗丹明),这意味着融合受体中FKBP的结合特性得以保留。

[0089] 图11.SLF-FITC以相对高的结合亲和力( $K_d=62\text{nM}$ )结合FKBPFR3GS融合受体,而与游离SLF(100x,预温育)的竞争阻断此种结合。与亲本配体FK506相比,SLF(FK506的模拟物)呈现低10倍的对FKBPFR融合受体的结合亲和力,这与先前的报道一致。

[0090] 图12.4M5.3FR融合受体中的FA-罗丹明结合曲线。FA-罗丹明可以以高亲和力( $K_d=2.25\text{nM}$ )结合人T细胞上稳定表达的4M5.3FR融合受体,所述亲和力与FR+KB细胞中的FA-罗丹明亲和力( $K_d$ 约1nM)相当。因此,FR结合特性在4M5.3FR融合受体中得到保留。

[0091] 图13.4M5.3FR融合受体中的FITC-AF647结合曲线。FITC-AF647可以以高亲和力( $K_d=8.03\text{nM}$ )结合人T细胞上稳定表达的4M5.3FR融合受体。100x comp表示游离的FITC钠。scFv 4M5.3与FITC的结合特性在4M5.3FR融合受体中得到保留。

[0092] 图14.FA-微管溶素能够介导针对FF3+人T细胞的受体特异性杀伤效果。用FA补偿(与FA的100x预温育)阻断该效果。这意味着通过FF3融合受体系统成功内化和释放游离药物微管溶素。

[0093] 图15.FA-微管溶素特异性杀伤混合人T细胞培养物中的hFF3+群体。随着FA-Tub浓度增加,hFF3+细胞的绝对数量减少,而在高浓度时hFF3-细胞也通过释放的药物和旁观者效应被杀伤。

[0094] 图16.SLF-Tub以 $IC_{50}=138\text{nM}$ 特异性杀伤hFF3+Jurkat细胞。这指示通过FKBPFR3GS融合受体成功内化SLF-Tub并在细胞内释放微管溶素。

[0095] 图17.FITC-DM4和FITC-Tub均可以特异性杀伤4M5.3FR+人T细胞,而FITC-Tub具有

更高的IC<sub>50</sub>。游离FITC钠(100x预温育)的补偿阻断受体介导的杀伤效果。这意味着通过4M5.3FR融合受体将FITC-细胞毒性药物的成功内化和释放到T细胞中。

[0096] 图18FITC-微管溶素特异性杀伤混合人T细胞培养物中的4M5.3FR+群体。随着FITC-Tub浓度增加,4M5.3FR+细胞的绝对数量减少,而在高浓度时4M5.3FR-细胞也通过释放的药物和旁观者效应被杀伤。

[0097] 图19.FITC-DM4特异性杀伤混合人T细胞培养物中的4M5.3FR+群体。随着FITC-DM4浓度增加,4M5.3FR+细胞的绝对数量减少,而在高浓度时4M5.3FR-细胞也通过释放的药物和旁观者效应被杀伤。

[0098] 图20.浓度10nM的达沙替尼(Lck抑制剂)和依鲁替尼(ITK抑制剂)降低抗CD19 CAR T细胞(FMC63 CAR T,效应器)对CD19+Raji肿瘤细胞(靶物)的裂解效果。测试了两个效应器:靶物比率(E:T)。将正常T细胞和抗CD19 CAR T与CD19-K562细胞用作阴性对照。

[0099] 图21.FITC-达沙替尼可降低FMC63+4M5.3FR+hT细胞对Raji细胞的裂解效应。这意味着通过4M5.3FR融合受体成功将FITC-达沙替尼内化和释放到T细胞中并且将达沙替尼释放到T细胞中。

[0100] 图22.100nM浓度的TC-PTP抑制剂减少耗尽的抗CD19 CAR T细胞中的共抑制剂分子群(通过用CD19+Raji细胞刺激7次产生,参见下面的详细程序)。PD-1、LAG3和双阳性群体在治疗后均降低。这意味着磷酸酶抑制剂,如TC-PTP抑制剂可以用作用于使耗尽的CAR T细胞恢复活力的秘密门道平台的有效负载。

[0101] 表1.FKBP-FRa细胞疗法平台和相应有效负载的潜在应用。

[0102] 序列表

[0103] SEQ ID NO:1小鼠FKBP-FRa的氨基酸序列

[0104] SEQ ID NO:2人FKBP-FRa的氨基酸序列

[0105] SEQ ID NO:3小鼠抗CD19 CAR T构建体的氨基酸序列

[0106] SEQ ID NO:4人抗CD19 CAR T构建体的氨基酸序列

[0107] SEQ ID NO:5用于人T细胞转导的载体pWPI

[0108] SEQ ID NO:6pMP71 gb NotIEcoRI小鼠抗CD19,用于小鼠T细胞转导

[0109] SEQ ID NO:7pWPI-FRa 1-24FKBP FRa

[0110] SEQ ID NO:8pWPI mFKBP-mFRa SGGGS

[0111] SEQ ID NO:9pHR EcorI hAnti cd19 1D3 myc铰链cd28 cd3zeta

[0112] SEQ ID NO:10pWPI pmei mAnti cd19 1D3 myc铰链cd28 cd3zeta

[0113] SEQ ID NO:11具有GPI锚氨基酸序列的FKBP-1SG-FR

[0114] SEQ ID NO:12具有GPI锚氨基酸序列的FKBP-3SG-FR

[0115] SEQ ID NO:13具有GPI锚氨基酸序列的4M5.3-FR

[0116] SEQ ID NO:14FMC63-T2A-FKBP3SGFR

[0117] SEQ ID NO:15FMC63-T2A-4M5.3SGFR

[0118] SEQ ID NO:16具有信号肽的FRb

[0119] SEQ ID NO:17具有信号肽的uPAR

[0120] SEQ ID NO:18DHFR

[0121] SEQ ID NO:19针对FITC:4M5.3的scFv (Kd=200pM)

[0122] SEQ ID NO:20针对FITC 4D5Flu的scFv ( $K_d = 10\text{nM}$ )

[0123] SEQ ID NO:21针对DNP SPE7的scFv

## 具体实施方式

[0124] 虽然在本文的附图和说明书中详细说明和描述了本公开内容的构思,但是附图中的结果及其描述应当认为是示例性的而非限制性的;应当理解,仅示出和描述了说明性实施方案,并且希望保护落入本公开内容的精神内的所有改变和修改。

[0125] 除非另外定义,否则科学和技术命名法具有属于本公开内容的领域中普通技术人员通常理解的含义相同的含义。

[0126] 本公开内容提供了通过在移植的细胞表面上遗传掺入融合受体来控制移植细胞活性的新平台。然后,使用小分子配体和移植细胞表面上的融合受体之间的内在高亲和力通过小分子配体缀合的药物有效负载特异性靶向这些移植的细胞。融合受体的一部分负责内化缀合物,并且一旦有效负载在移植的细胞内,它将通过可释放的接头释放。根据移植的细胞类型和要对移植细胞施加的期望调节,药物有效负载可以是各种功能。通过改变缀合物中的有效负载,例如作为细胞毒性药物或激酶抑制剂,药物有效负载可用于控制移植细胞的多个方面,例如增殖、分化或细胞因子释放概况。

[0127] 肽基-脯氨酸异构酶(PPI酶)家族由FK506结合蛋白(FKBP)、亲环蛋白和细蛋白(parvulin)组成。在人类中有18种FKBP、24种亲环蛋白和3种细蛋白。这些中,与FKBP12( $KD^{FK506} \approx 0.2\text{nM}$ )相比,FKBP51和FKBP52共享高至中等的FK506结合亲和力,分别为 $KD^{FK506} \approx 104\text{nM}$ 和 $KD^{FK506} \approx 23\text{nM}$ 。另外,这两种FKBP无一在细胞膜上表达,导致我们的系统中很少交叉结合活性。还努力设计对FKBP12<sup>F36V</sup>以及FKBP51<sup>F67V</sup>具有比FKB<sup>PWT</sup>更高亲和力的合成配体,其保留野生型蛋白质的整体结构。所有同源物和突变蛋白质以及它们的上述配体可以适用于本公开内容。

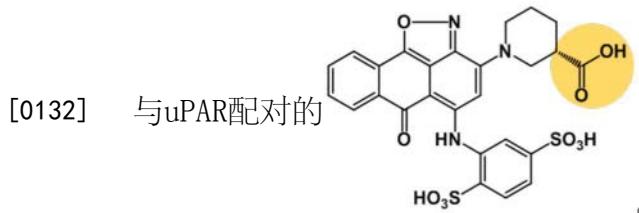
[0128] 特别地,在一个实施方案中,选择一对示例性的小分子配体和融合受体作为FK506-FKBP。整个过程可以在图1A中概括,其中FK-506-有效负载首先与FKBP-FRa工程化细胞结合;在此结合后,跨膜融合蛋白将内化有效负载-接头-FK506。接下来,内化的FK506-有效负载在接头处被切割,并且有效负载在细胞中被释放。根据细胞类型和有效负载类型,释放的有效负载药物可以发挥其期望的功能。

[0129] 在图1B中,显示了特定嵌合抗原受体T细胞介导的细胞疗法。在此模型中,将表达融合蛋白的CAR T细胞呈递给癌细胞,所述融合蛋白具有从N末端到C末端包含合适的信号肽、与GPI锚的蛋白质模块1连接的蛋白质模块2的结构。在一些实施方案中,癌细胞具有CD19表面蛋白,其在靶向配体结合融合受体的至少一个模块时将被CAR T细胞识别并衔接与CAR T细胞相关的有效负载。通常,凭借靶向配体对这些模块中任一个的高亲和力,与配体相关的有效负载可以通过嵌合抗原受体内化到靶细胞中并释放以衔接癌细胞。

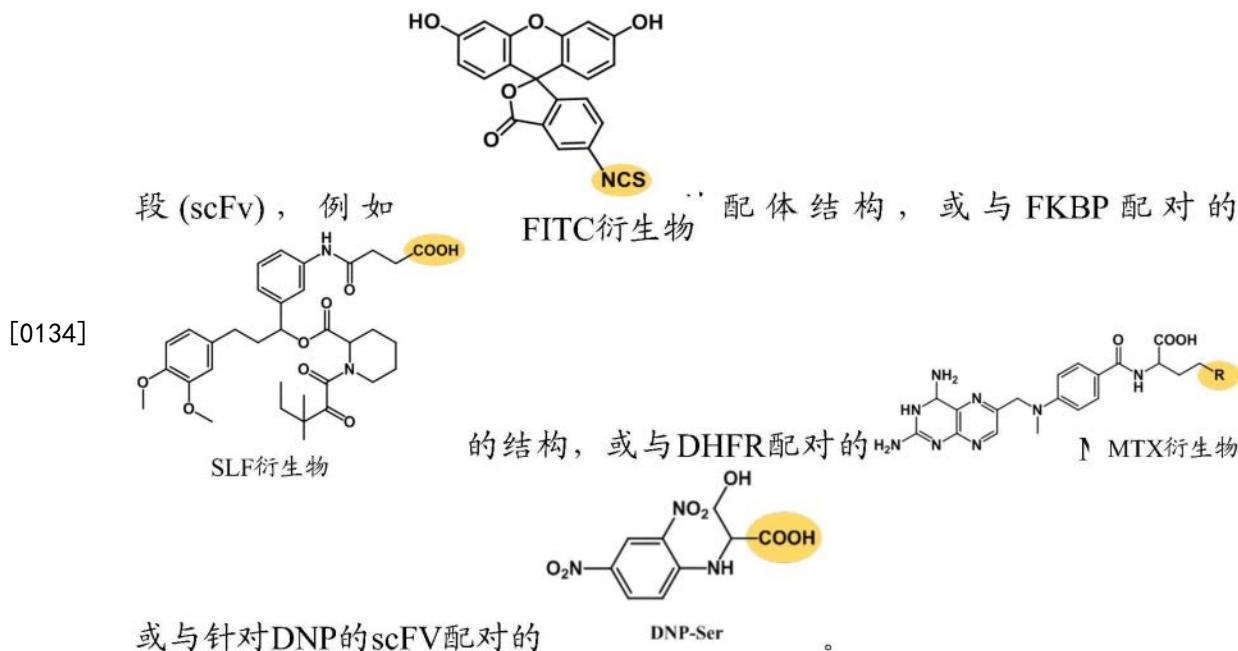
[0130] 可以存在许多不同的GPI锚定蛋白组合,表示为模块1及其配体,和模块2靶细胞表面蛋白及其各自的配体,在图2B中呈现。涵盖模块1蛋白质或模块2蛋白质或两者可以衔接高亲和力靶向配体以促进配体缀合的有效负载递送。例如,具有包含FRa-接头-FKBP结构的融合蛋白是可行的,其中FRa与FA衍生物的衔接同时FKBP与FK506衍生物衔接,FA衍生物或FK 506衍生物或两者都可以与有效负载,例如细胞毒性药物、成像剂或调节剂连接。利用携

带相同或不同有效负载的此种灵活性,可以实现不同或相同有效负载的一些出乎意料的协同效应或调节效应,或者若有效负载是成像剂则观察到靶细胞。通过更多实例将理解此系统的有效负载递送的灵活性和多样性的优点。

[0131] 类似地,与GPI锚定蛋白配对的配体的另一个实施方案可以是



[0133] 还涵盖的是,FITC或其衍生物可以结合针对FITC的抗体的单链可变片



[0135] 值得提及选择FK506-FKBP作为此递送系统中的示例性配体-蛋白质对的一些优点。1.FKBP不是天然存在于哺乳动物细胞膜上的膜蛋白,因此FK506-有效负载缀合物将特异性结合靶细胞;2.FKBP蛋白是一种具有分子量12kDa的相对较小的蛋白质,这使得它在对受体结构和内化特性的最小扰动的情况下更容易与其他受体融合。3.FK506不天然存在于人体内,因此融合受体不会被阻断;4.FK506-FKBP之间的结合亲和力为约4pM,因此有效负载药物可以以高亲和力递送;5.可获得FK506-FKBP的共晶结构,并且FK506的完善建立的衍生位点在消除FK506和钙神经素之间的不需要的结合的情况下保留FK506-FKBP的结合(参见图2A)。

[0136] 涵盖可以修饰FKBP的序列,并且可以相应地修饰相应的FK506配体,使得FKBP的修饰形式和FK506的修饰形式仍然具有如本文示例的或者优于本公开的期望亲和力。

[0137] 对于融合蛋白的其他部分,叶酸受体(FR)由于其充分理解的内化过程而选择作为单体。先前的研究显示“魔术碳酸盐”连接的叶酸结合物可以通过FR内化,并被细胞内的还原环境切割。使用此种机制,FK506-FKBP缀合的药物有效负载被FR内化,然后释放到细胞质中。

[0138] 由于CAR T疗法的巨大潜力以及严重的副作用,已经报道了几种受控的CAR T细胞

设计。它们中的大多数通过掺入Boolean门或用于T细胞激活的级联途径来关注开/关转换(参见图3,左图,其描绘了CAR T细胞活性的负调节和正调节,改编自The quest for spatio-temporal control of CAR T cells,Sun J.etc.2015)。Malcolm K.B.小组设计了FKBP-胱天蛋白酶9融合蛋白,并使用FK506二聚体诱导靶细胞凋亡(参见图3,右图,其描绘了AP1903(FK506二聚体)诱导的FKBP-胱天蛋白酶9介导的凋亡的机制和AP1903的结构,改编自Inducible Apoptosis as a Safety Switch for Adoptive Cell Therapy,Malcolm K.B.etc.2011)。

[0139] 本公开内容与这些报道的方法相比具有以下几个优点:1.替换二元开/关转换,我们的平台可以递送多个种类的调节有效负载,修饰靶细胞的许多方面,因此与二元开/关转换相比它具有大的灵活性;2.控制部分FK506-有效负载是一种小分子,其与预先工程化细胞相比可以进行线性控制和剂量优化.3.平台不仅可用于CAR T细胞,而且还可用于许多其他基于干细胞的再生疗法。

[0140] 此平台的最大的新颖性和最重要的部分是多功能有效负载,其可以进行选择以解决潜在的副作用或改善细胞疗法的效率。例如,若出现以下情况,可以将细胞毒性药物递送至移植细胞:1.细胞过度增殖并影响正常器官或系统,如抗CD19 CAR T细胞。2.细胞变得致癌,这在于基于慢病毒的基因修饰和干细胞的内在特征。

[0141] 另一方面,由于靶组织的抑制性微环境,一些细胞疗法不太成功。例如,在针对实体瘤的CAR T细胞疗法中,除低穿透率之外,CAR T的增殖和活化受到MDSC和肿瘤细胞高度抑制。这可以通过RORrt激动剂或MAP激酶抑制剂诱导的T细胞活化以及TLR8激动剂诱导的CAR T细胞中颗粒酶B的表达来潜在减轻。尽管胞内靶物(如RORrt)可更适合于我们的有效负载,但由于细胞膜上的接近性,膜受体如TLR8也可以是可接近的。

[0142] 在干细胞再生疗法中,根据疾病模型,有效负载更加多样化。替代递送已经通过使用干细胞作为基因递送平台开发的预先固定的基因,本公开为移植的细胞及其微环境提供微调,并通过多种多样的小分子有效负载获得期望的表型。由于小分子与特异性靶向FKBP-FRa过表达的移植细胞的FK506缀合,也避免了小分子的正常组织的非特异性靶向。

[0143] 许多实例之一是诱导间充质干细胞(MSC)中BMP2的过表达,用于骨骼再生疗法中的骨折修复。同时,通过经由此种药物有效负载递送系统将GSK3 $\beta$ 抑制剂引入移植的细胞中,可以提高BMP2和/或VEGF的表达水平。GSK3 $\beta$ 抑制剂是骨折修复期望的药物。因此,GSK3 $\beta$ 抑制剂作为潜在的有效负载是理想的,用于进一步调节移植的MSC的功能以及骨折部位内的微环境。

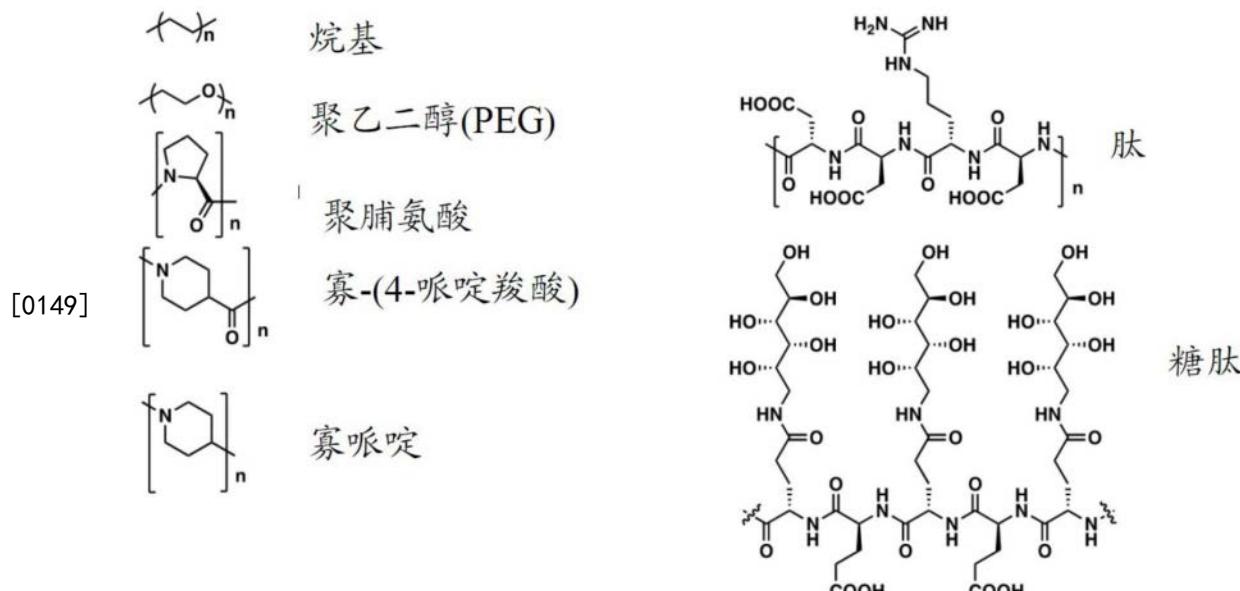
[0144] 此药物有效负载递送系统的另一个例子涉及神经变性疾病,包括阿尔茨海默病、帕金森病等,其中基于MSC的疗法拥有有希望的未来。已经修饰MSC以过表达GDNF、VEGF和许多其他细胞因子以促进神经元再生。同时,已经证实小分子如MAO-B抑制剂增加星形胶质细胞中GDNF、NGF和BDNF的表达。还提出了几种激酶抑制剂用于治疗阿尔茨海默病,例如PI3K抑制剂(BEZ235)、Cdk5抑制剂(roscovitine)和GSK3 $\beta$ 抑制剂(NP-12)。在神经变性模型中使用这些小分子对MSC的FK506-FKBP对靶向性特异性递送将在避免这些有效抑制剂和激动剂在其他非靶向组织中的副作用的情况下改善再生功效。

[0145] 材料与方法:

[0146] 化合物和合成程序:

[0147] 靶向配体通过接头与有效负载连接。接头优化选项如下列出。有效负载表征为3类:I成像、II细胞毒性药物、III调节性小分子药物。

[0148] 接头优化:

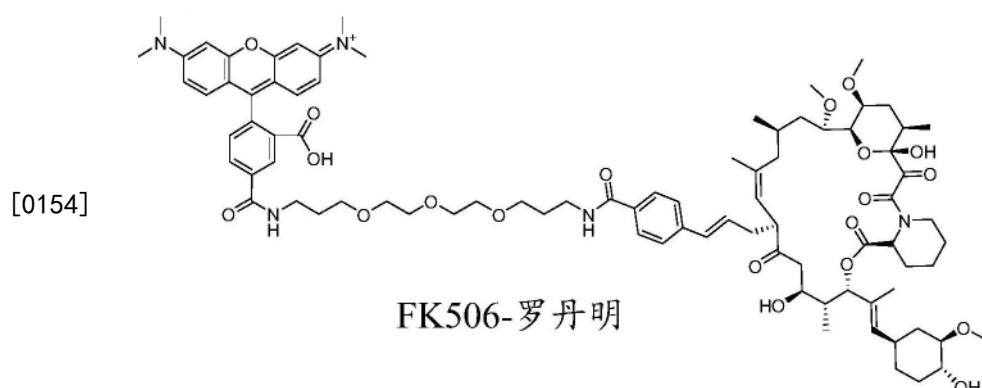


[0150] 化合物分类:

类别	功能	实例
I	成像	荧光染料: 罗丹明, FITC 放射性同位素成像: EC20螯合头、NOTA、DOTA
II		抗微管药物: 微管溶素、DM1、DM4
III		激酶抑制剂: 达沙替尼、MEK1/2i、PI3Ki siRNA: mi181a1

[0152] 详细的化合物结构和合成路径

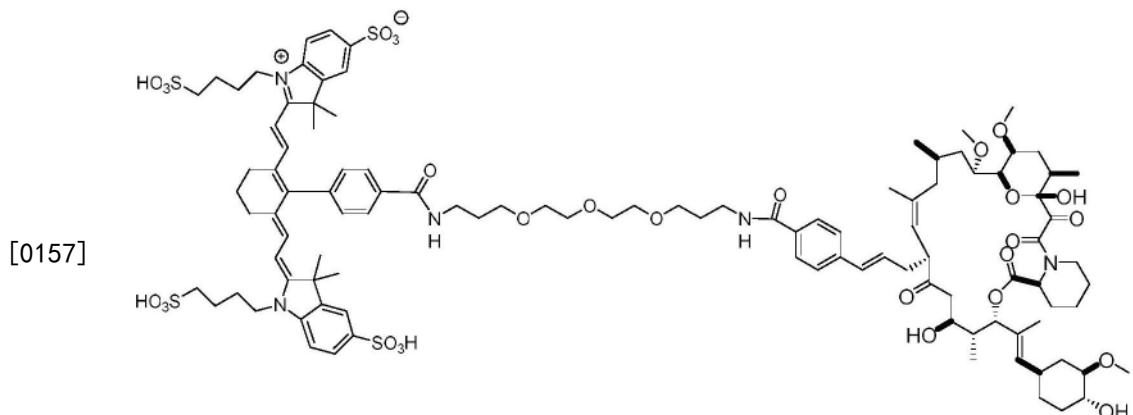
[0153] FK506-罗丹明:



[0155] 程序: 将二甲基甲酰胺中的罗丹明-NHS酯(1.0当量)与Boc-NH-PEG<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>(1.2当量)和二异丙基乙胺(3.0当量)在室温反应2小时。通过具有UV检测器的制备型反相HPLC纯化产物。通过在1:10TFA-二氯甲烷系统中搅拌2小时,将纯化的罗丹明-PEG<sub>3</sub>-NH-Boc缀合物(1.0

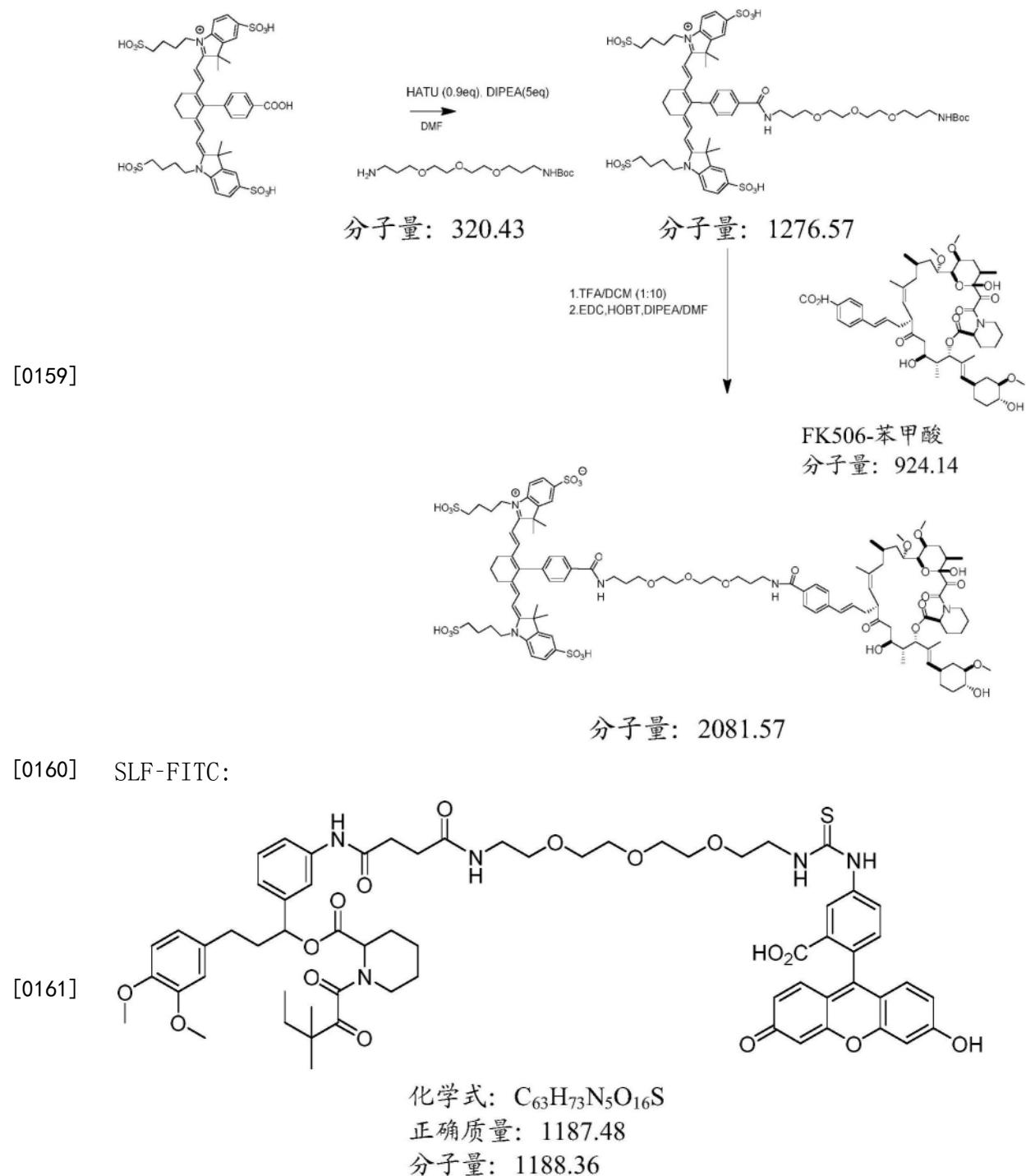
当量)进行Boc去保护。然后将粗游离胺产物溶解在二甲基甲酰胺中,并在二异丙基乙胺(3.0当量)存在下用EDC(2.0当量),HOBT(2.0当量)活化。15分钟后,加入FK506-CO<sub>2</sub>H(1.2当量,使用下述参考文献中的程序合成:Bioorg.Med.Chem.,17(2009)5763-5768)并将反应混合物搅拌过夜。在具有UV检测器(在280nm波长下监测)的制备型反相HPLC上纯化后,分离出最终的FK506-罗丹明缀合物。将粗产物加载到Xterra RP18制备型HPLC柱(Waters)上,并且用梯度条件洗脱,所述梯度条件开始于95%5mM磷酸钠(流动相A,pH7.4)和5%乙腈(流动相B),并且在35分钟内以12mL/min的流速达到0% A和50% B。在7分钟分析型HPLC-MS分析中的梯度(0-50% B)期间产物峰的保留时间=2.5分钟。ESI m/z=1539.6。缩写:PEG=聚乙二醇;EDC=1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺;HOBT=羟基苯并三唑;HPLC=高效液相色谱。

[0156] FK506-NIR染料:



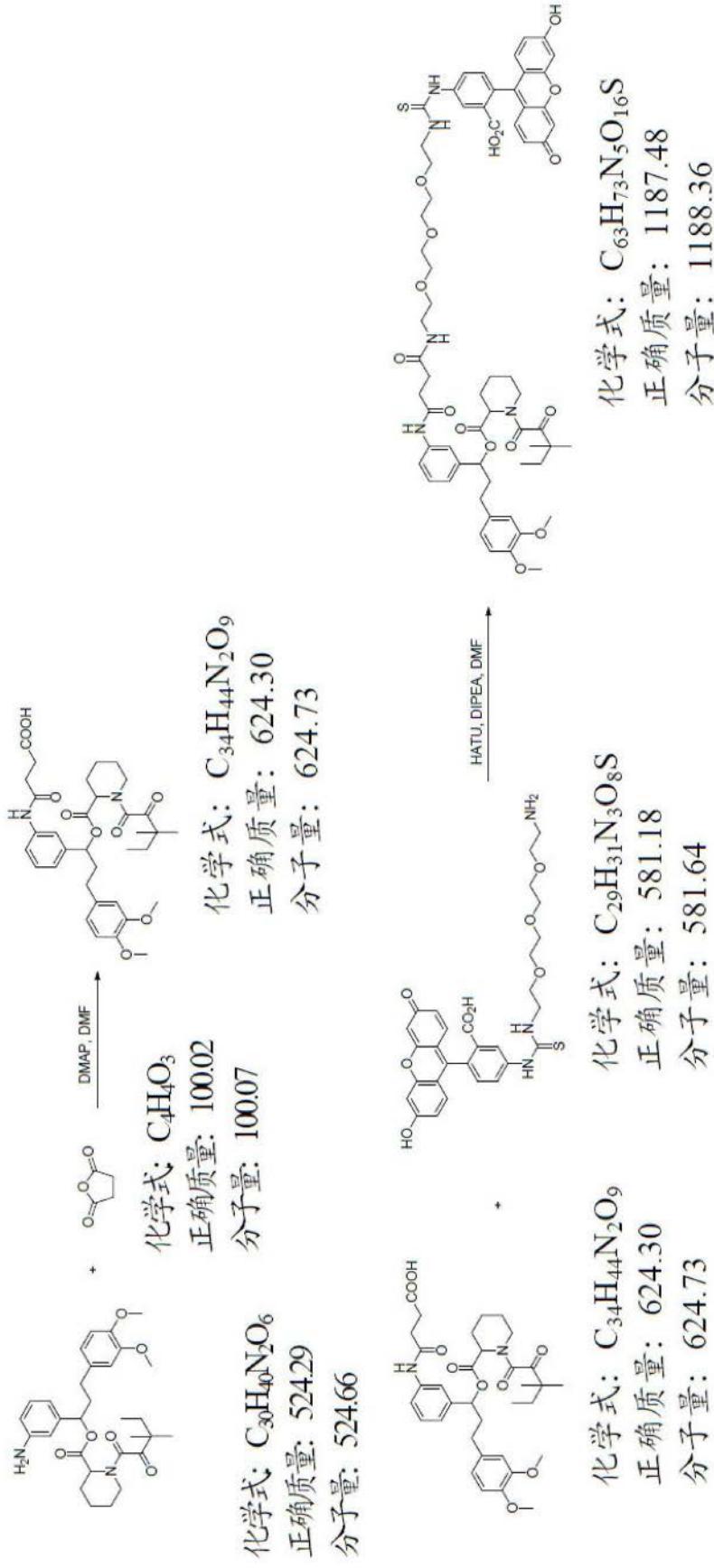
分子量 2081.57

[0158] 合成程序:

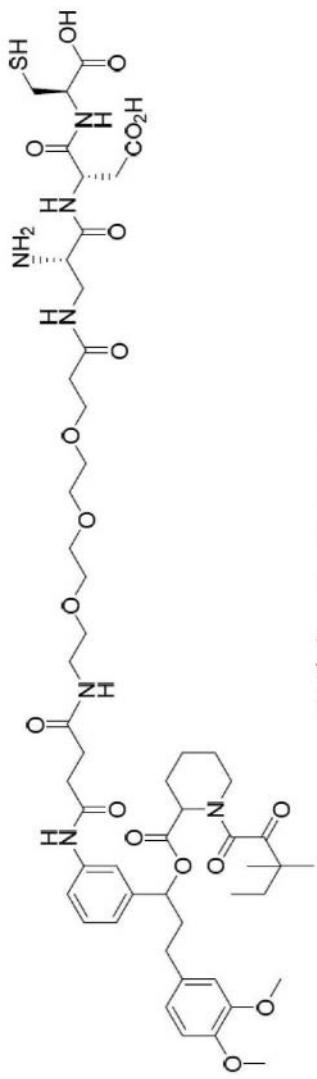


### 合成程序：

[0162]



SLF-EC20:

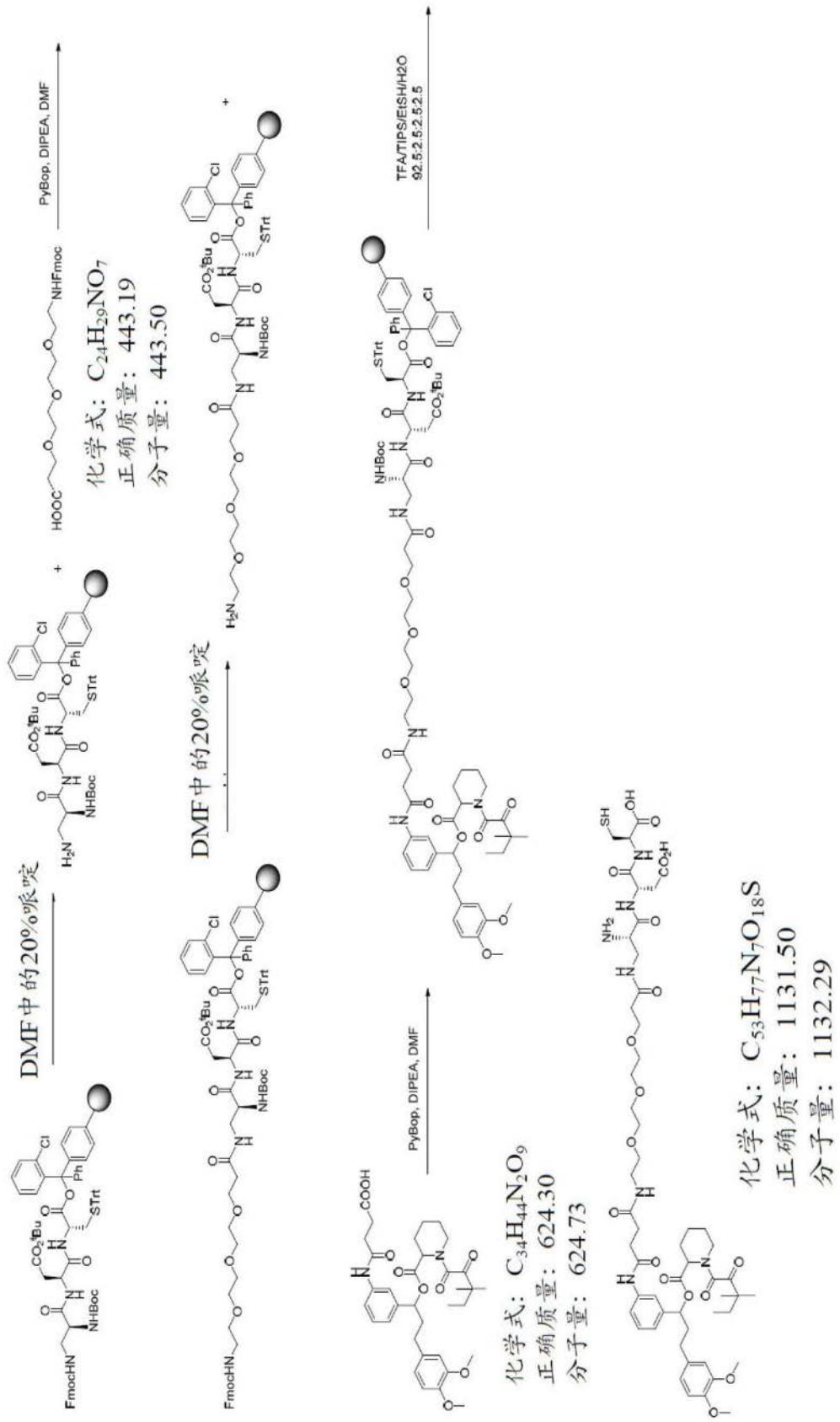


化学式: C<sub>53</sub>H<sub>77</sub>N<sub>7</sub>O<sub>18</sub>S  
正确质量: 1131.50  
分子量: 1132.29

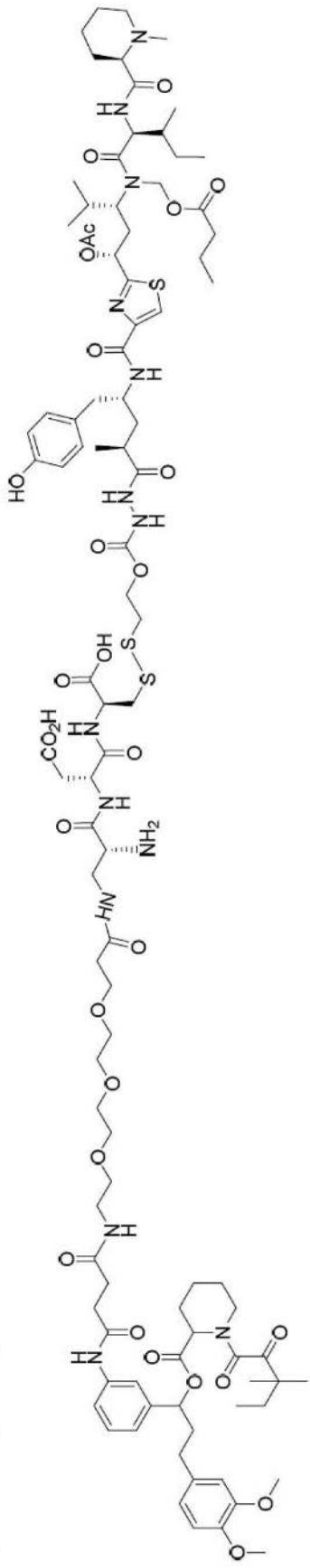
[0163]

合成程序：

[0164]



SLF-微管溶素：

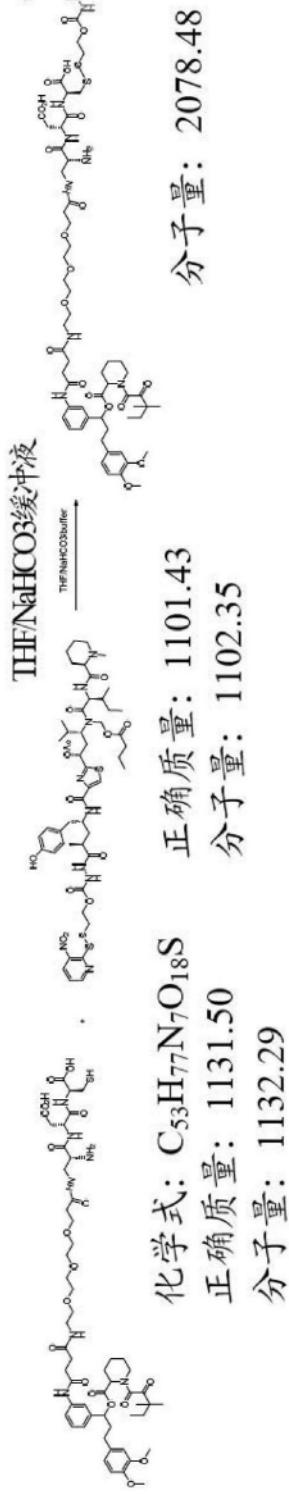


[0165]

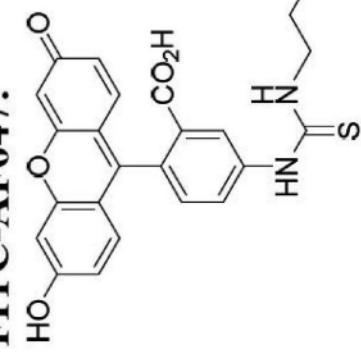
分子量： 2078.48

### 合成程序：

[0166]



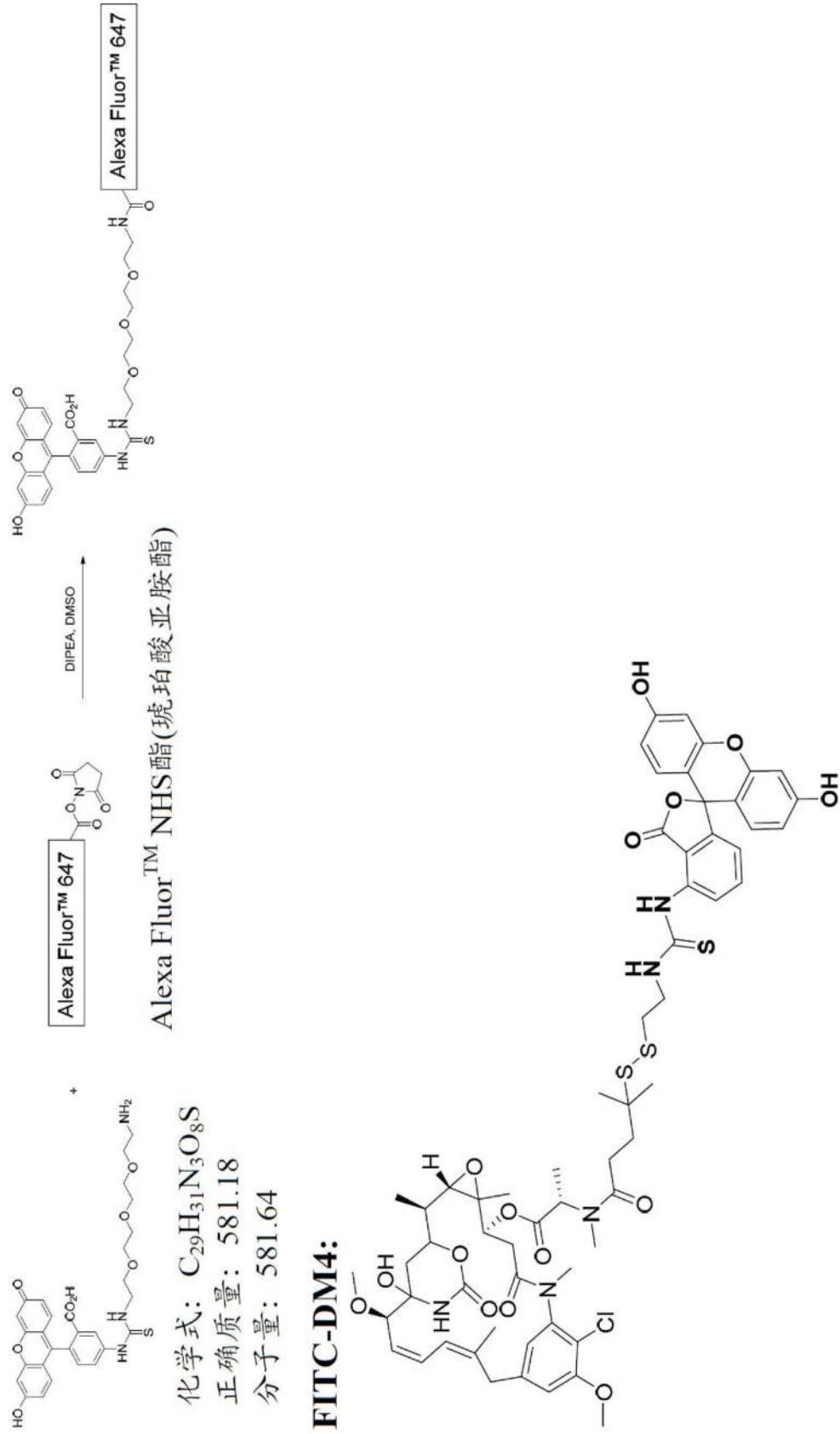
FITC-AF647:

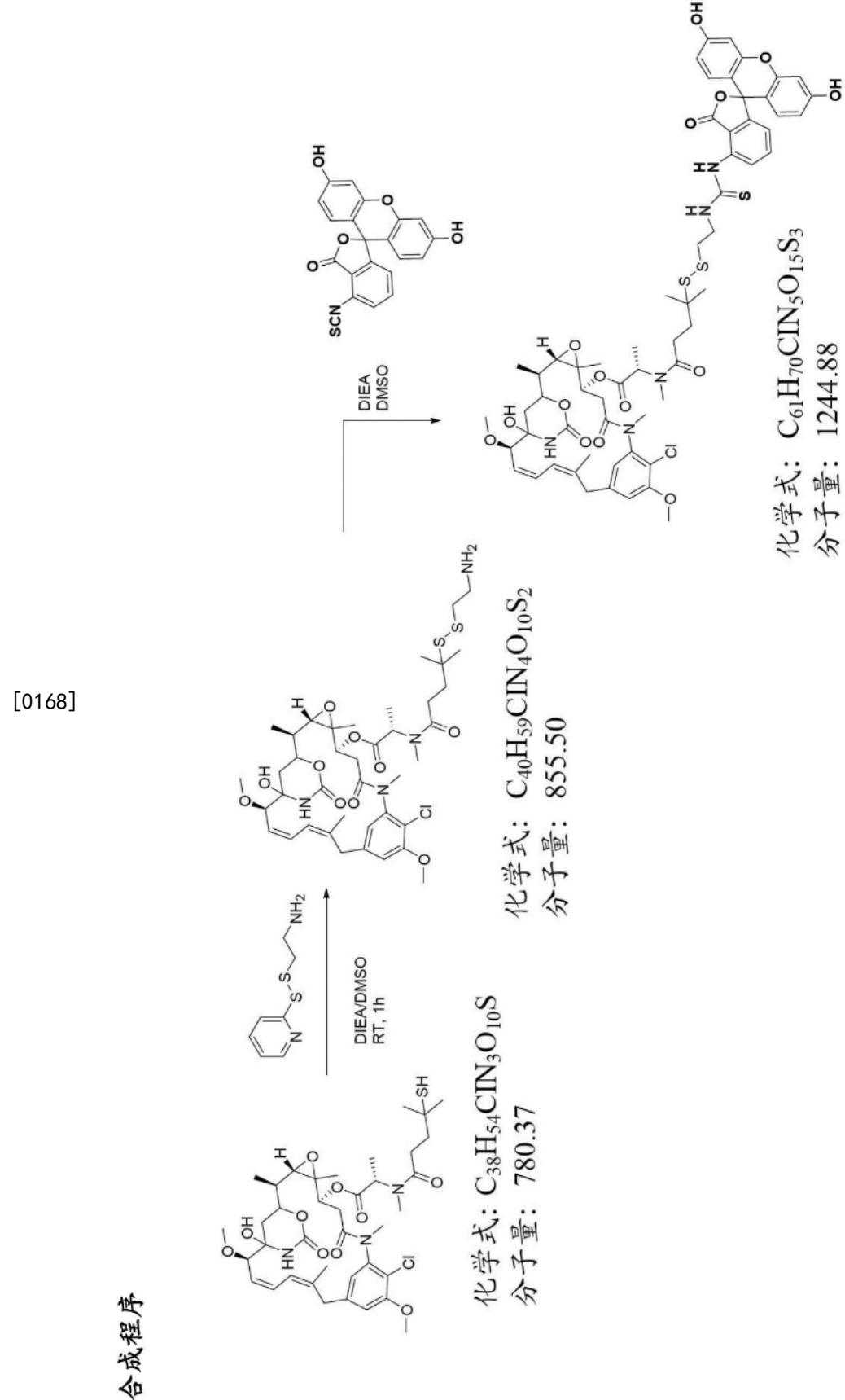


Alexa Fluor™ 647

## 合成程序：

[0167]



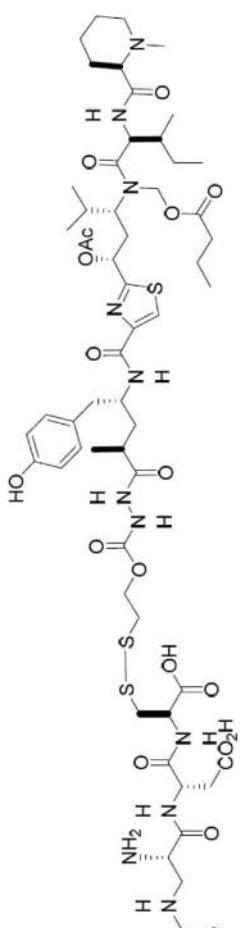
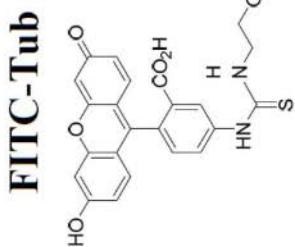


### 合成程序

[0169] 程序:在室温下使二甲亚砜中的DM4(1.0当量)与2-(吡啶-2-基二硫烷基)乙-1-胺(1.0当量)和二异丙基乙胺(3.0当量)反应1小时。然后将所得粗产物与FITC(1.0当量)反

应，并将反应混合物搅拌1小时。在具有UV检测器(在280nm波长下监测)的制备型反相HPLC上纯化后分离出最终的FITC-DM4缀合物。将粗产物加载到Xterra RP18制备型HPLC柱(Waters)上，并且用梯度条件洗脱，所述梯度条件开始于95%5mM磷酸钠(流动相A, pH7.4)和5%乙腈(流动相B)，并且在10分钟内以流速12mL/min达到0% A和100% B。在7分钟分析型HPLC-MS分析中，梯度(0-100% B)期间产物峰的保留时间=4.23分钟。ESI m/z = 1244.8。缩写：FITC=异硫氰酸荧光素；HPLC=高效液相色谱。

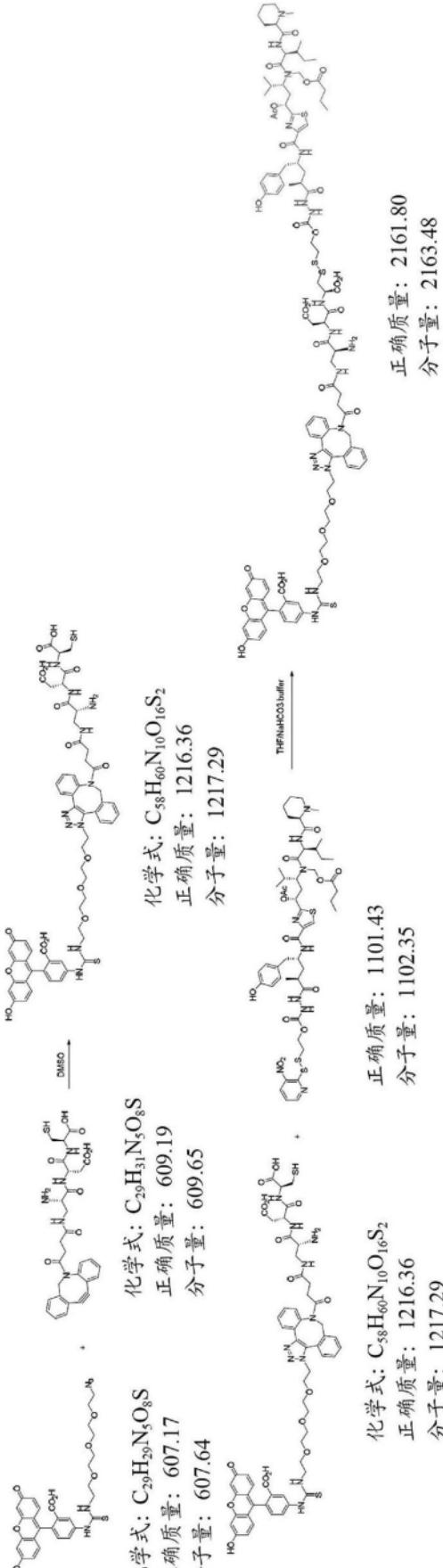
[0170]

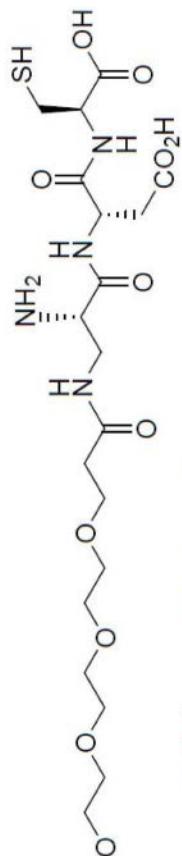


化学式： $C_{87}H_{117}N_{13}O_{27}S_4$   
正确质量：1903.71  
分子量：1905.20

**合成程序：**

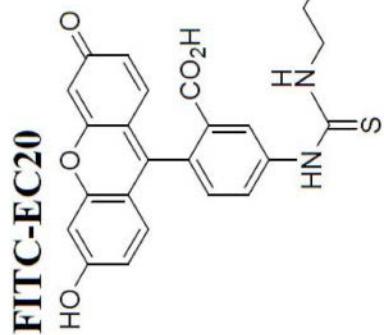
[0171]





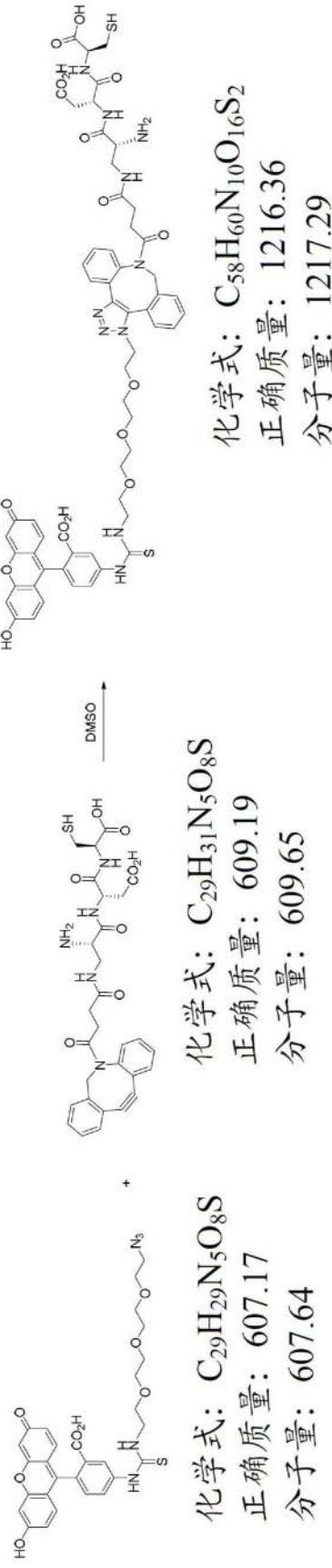
化学式: C<sub>42</sub>H<sub>50</sub>N<sub>6</sub>O<sub>16</sub>S<sub>2</sub>  
正确质量: 958.27  
分子量: 959.01

[0172]

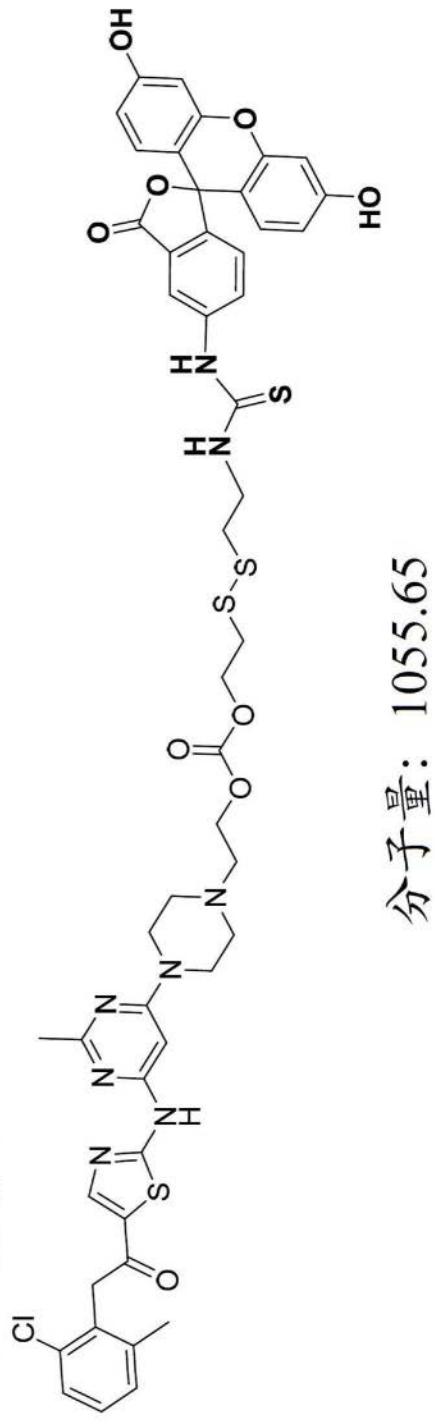


合成程序：

[0173]

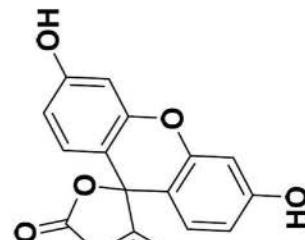


合成程序：

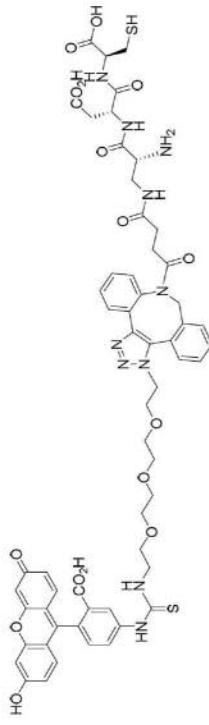


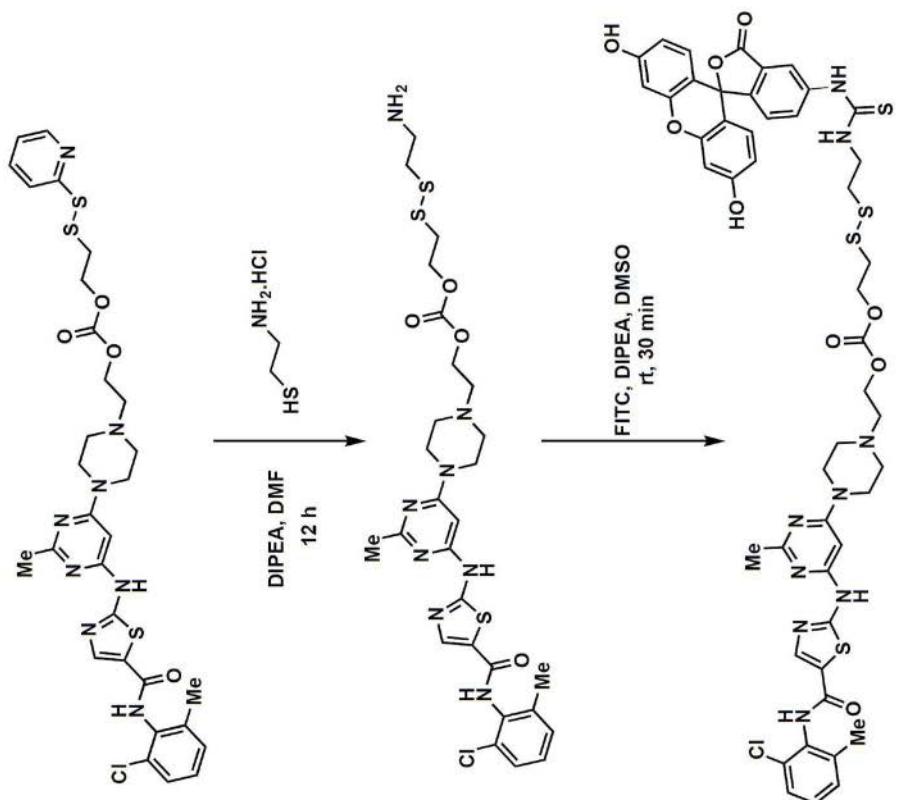
合成程序：

分子量: 1055.65

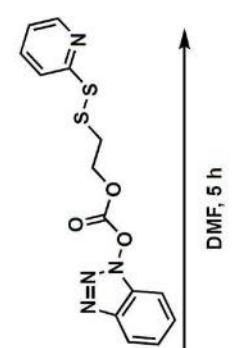


化学式: C<sub>58</sub>H<sub>60</sub>N<sub>10</sub>O<sub>16</sub>S<sub>2</sub>  
 正确质量: 1216.36  
 分子量: 1217.29

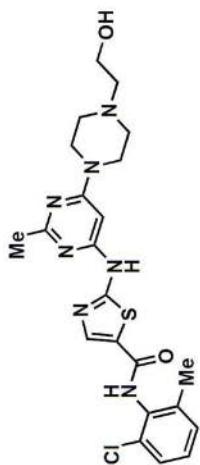




[0174]



达沙替尼



[0175] 实验程序：

[0176] 细胞培养

[0177] 将293TN细胞在含有10% FBS且没有抗生素的DMEM中培养,用于慢病毒包装。将Raji和Jurkat细胞在含有10% FBS、10%青霉素/链霉素的RPMI-1640中培养。使用ficoll从hPBMC分离原代人T细胞,通过使用EasySep<sup>TM</sup>人T细胞富集试剂盒(19051, Stemcell Tech)进行阴性选择富集,通过Dynabeads CD3/CD28(11161D, Thermo Fisher)活化1天,用补充有30IU hIL2(130-097-745, Miltenyi Biotec Inc.)的TexMACS培养基培养。将T细胞在含有20%人AB血清(HP1022, Valley Biomedical)和10% DMSO的RPMI-1640中冷冻保存。

[0178] 慢病毒包装

[0179] 通过使用Lipofectamine 2000用转基因表达载体和包装质粒混合物(CPCP-K2A, Cellecta)转染293TN细胞产生泛向性VSV-G假型化慢病毒。在24小时时,收获病毒上清液,浓缩,然后添加到在同一天解冻的某些细胞系或原代T细胞。对于T细胞转导,在添加病毒上清液和8ug/ml聚凝胺后,将细胞在37度以2500rpm离心90分钟。

[0180] 结合测定法

[0181] 对于结合测定法,在4度将细胞与单独的配体-染料或与配体-染料和游离配体(100x, 预温育30分钟)一起温育30分钟。温育后将细胞洗涤3次,并重悬于2% FBS PBS中,添加7-AAD以除去死细胞。FK506-罗丹明和FA-S0456的FRET成像:为了了解融合受体的占据,将FKBP-FR $\alpha$ +jurkat细胞与FA/FA-S0456, FK506/FK506-罗丹明以指定的顺序和浓度一起温育。FRET通过FA-罗丹明的强度损失(由于其能量转移到相同或附近受体上的FA-OTL38)显现,由BD Fortessa流式细胞仪检测。使用FlowJo软件分析结果。PI-PLC处理以释放GPI锚定蛋白

[0182] 将 $1 \times 10^5$ 个细胞与消化缓冲液(2% BSA)中5mU或50mU PI-PLC(P5542-5UN, Sigma)于37度温育30分钟;温育后,用PBS洗涤细胞三次,然后在冰上与配体-染料一起温育30分钟。

[0183] 细胞存活力测定法

[0184] 将细胞接种到96孔板中并与不同浓度的某些配体-细胞毒性药物一起温育2小时,有或没有100x预温育游离配体竞争。温育2小时后,用温热的培养基洗涤细胞3次,并补充新鲜培养基。72小时后,通过CellTiter-Glo<sup>®</sup>测定法(G7570, Promega)测试细胞数或通过受体阳性细胞的配体-染料染色定量。

[0185] CAR T细胞裂解效应

[0186] 根据E:T比率,在有或没有处理药物的情况下,将 $1 \times 10^5$  CAR T细胞和一定数量的Raji细胞在96孔板中共温育。24小时后,取出100ul上清液进行LDH测定法。裂解百分比计算为(处理组-仅CAR T)/(最大裂解-仅CAR T) % CAR T细胞的耗尽

[0187] 每12小时将 $1 \times 10^6$ 个Raji细胞重复添加到24孔板中的 $1 \times 10^6$ 个CAR T细胞,不更换培养基。耗尽状态以较低的裂解效应和共抑制分子:PD-1, LAG-3和Tim-3的较高表达为特征。

[0188] 通过配体-细胞毒性药物体内消融融合受体阳性CAR T。

[0189] 将 $4 \times 10^5$  1uc+Raji细胞静脉内注射到NSG小鼠中。6天后,静脉内注射 $1 \times 10^7$ 个融合受体阳性CAR T细胞。在第8天,静脉内注射配体-细胞毒性药物(0.5umole/kg, 1umole/kg)一次。使用在CAR T注射后每3天取得的血清样品通过ELISA测量IL2, INF $\gamma$ 。通过流式细胞术计数外周血中的CAR T细胞。

[0190] 通过配体-药物体内调节融合受体阳性CAR T

[0191] 将 $4 \times 10^5$  luc+Raji细胞静脉内注射到NSG小鼠中。6天后,静脉内注射 $1 \times 10^7$ 个融合受体阳性CAR T细胞。在第7天,静脉内注射配体-药物药物( $0.5\text{umole/kg}$ , $1\text{umole/kg}$ )一次。在CAR T耗尽模型的情况下,在第6天静脉内注射 $1 \times 10^5$  CAR T,一旦在外周血中显示CAR T群体并且肿瘤负荷不稳定并且继续增加,静脉内注射配体-药物( $0.5\text{umole/kg}$ , $1\text{umole/kg}$ )。

[0192] 融合受体阳性CAR T的体内成像和追踪。

[0193] 对NSG小鼠右体侧皮下注射 $2 \times 10^6$  Raji。14天后,静脉内注射 $1 \times 10^7$ 融合受体阳性CAR T。在第16天,通过静脉内注射给动物施用 $99\text{mTc}$ 结合的缀合物( $10\text{nmol}$ , $150\mu\text{Ci}$ )并通过SPECT成像仪成像。

[0194] 实施例

[0195] 1.融合蛋白的设计及其表达

[0196] 1.1FKBP-FR融合受体(SEQ ID N0:2)的设计

[0197] FK506衍生物的合成:FK506-罗丹明和FK506-微管溶。在材料和方法部分中描述合成。

[0198] hFR $\alpha$ 是一种GPI锚定的膜蛋白,其在N端具有24个氨基酸作为信号肽。为了保持膜呈现和内化特性,我们选择使用全长的FR $\alpha$ ,并在hFR $\alpha$ 的T24和R25之间掺入hFKBP序列以及柔性肽接头(SGGGS)(图4a)。选择柔性接头以对人体中常见的酶消化有抗性。然后将整个序列插入pWPI慢病毒表达载体中,其中EF1a作为期望启动子用于转导的T细胞中蛋白质表达。

[0199] 1.2FKBP-FR融合受体在转导细胞中的表达

[0200] 在慢病毒转导的K562中通过蛋白质印迹证实FKBP-FR $\alpha$ 的表达。针对hFR $\alpha$ 抗体与非转导细胞相比,转导的K562细胞裂解显示约50kDa的特异性条带(图4b)。

[0201] 1.3FKBPFR3GS(记录为FF3)融合蛋白的构建

[0202] 参见图4d(SEQ ID N0:12)。从N末端到C末端,它具有人FR $\alpha$ 的1-24aa作为信号肽、人FKBP蛋白、三个Gly-Ser的接头,然后是人FR $\alpha$ 的2-258aa。在FKBPFR1GS(标记为FF1)的构建体设计中,FF3的三个Gly-Ser的接头用一个Gly-Ser的接头替换,其他部分未改变。如将在结合测定法中显示,增加接头长度减少融合蛋白中两种组分之间的干扰。

[0203] 1.4具有GS接头的FITC-svFv-FR融合蛋白的构建。

[0204] 参见图4e。构建体也称为4M5.3FR(SEQ ID N0:13)。从N末端到C末端,它具有hCD8信号肽、4M5.3(针对FITC)的svFv、GS接头、人FR $\alpha$ 的25-258aa。1.5.通过FK506- $99\text{mTc}$  PET成像对FKBP-FR $\alpha$ /FKBPFtFR $\alpha$ 阳性细胞的体内非侵入性追踪

[0205] 对于CAR T细胞模型,将 $1 \times 10^6$  KB细胞皮下植入NSG(Jackson laboratory)。在肿瘤达到 $100\text{mm}^3$ 后,将1500万抗FITC CAR+FKBP-FR $\alpha$ +或抗FITC CAR+FKBP-FR $\alpha$ -人T细胞静脉内注射给小鼠。在指定的天数注射FITC-FA以诱导CAR T的增殖。通过以下程序在CAR T植入后每两天对小鼠进行成像。在成像当天,根据以前的报告,将FK506-EC20头与 $99\text{mTc}$ 进行配制。将100u溶液中的200uCi  $99\text{mTc}$ 静脉内注射到每只小鼠,并且通过MiLab PET/CT拍摄全身图像,聚焦于肿瘤区域、脾和淋巴结。通过PMOD软件重建3D图像。在CAR T植入后约第10天的最后一次成像后,对小鼠实施安乐死,并通过 $\gamma$ 计数器计数每个器官中的 $99\text{mTc}$ 分布。

[0206] 对于造血干细胞移植模型,如前报告产生人源化NSG小鼠。将1000万CD34+FKBP-FR $\alpha$ +hHSC静脉内注射到人源化NSG小鼠中。4个月后,如上所述使用FK506- $99\text{mTc}$ 拍摄全身图

像,聚焦于骨髓和脊柱。

[0207] 2.FKBP-FRa融合受体特异性结合并内化FK506-有效负载

[0208] 2.1FKBP-FRa融合受体特异性结合FK506-罗丹明

[0209] 对于结合测定法,在4度将细胞与单独的配体-染料或与配体-染料和游离配体(100x,预温育30分钟)一起温育30分钟。温育后将细胞洗涤3次,并重悬于2% FBS PBS中,添加7-AAD以除去死细胞。使用BD Fortessa流式细胞仪。使用FlowJo软件分析结果。

[0210] 2.2.FKBP-FRa融合受体对FK506-罗丹明的结合(FK506-罗丹明和FA-S0456的FRET成像)

[0211] 为了了解融合受体的占据,将FKBP-FRa+jurkat细胞与FA/FA-S0456,FK506/FK506-罗丹明以指定的顺序和浓度一起温育。FRET通过FA-罗丹明的强度损失(由于其能量转移到相同或附近受体上的FA-OTL38)显现,由BD Fortessa流式细胞仪检测。

[0212] 图5显示了FKBPFR1GS融合蛋白中叶酸的结合在低至0.01nM时阻断FK506-罗丹明的结合,并在50nM下完全消除FK506罗丹明结合。

[0213] 图6显示了FKBPFR1GS jurkat细胞在结合OTL38(叶酸受体靶向性染料)后显示降低的FK506-罗丹明强度。自FK506-罗丹明(供体)至OTL38(FA-S0456,受体,ex/em:774/794nm)的FRET指示融合受体内FR和FKBP之间的相互作用。

[0214] 图7显示了增加FKBP和FR之间的接头长度显著降低了融合蛋白的两个组分之间的干扰。与FF1(FKBP和FR之间的1GS)相比,FF3(FKBP和FR之间的3GS)在10nM FA(其与人体中FA的生理浓度相当)存在下保留FK506-罗丹明的结合。

[0215] 2.3.释放GPI锚定的FF3融合受体

[0216] 使用PI-PLC处理具有FF3融合蛋白的T细胞导致GPI锚定受体FF3的释放。具有FF3融合受体的Jurkat T细胞显示与20nM FA-FITC(EC17)的饱和结合,而在5mU PI-PLC或50mU PI-PLC处理后,FA-FITC丧失与细胞的结合,这指示GPI锚定的FF3融合受体的释放。见图8。

[0217] 2.4人T细胞中的融合蛋白FKBPFR3GS保留FR结合特性

[0218] 显示了FKBPFR3GS融合受体中的FA-罗丹明结合曲线。在人T细胞上稳定表达的FKBPFR3GS融合受体可以以高亲和力( $K_d=0.95\text{nM}$ )结合叶酸衍生物(FA-罗丹明),所述亲和力与FR+KB细胞中的FA-罗丹明亲和力( $K_d$ 约1nM)相当。因此,保留了融合受体中FR的结合特性。见图9。

[0219] 2.5人T细胞中的融合蛋白FKBPFR3GS保留FKBP结合特性

[0220] FKBPFR3GS融合受体中的FK506-罗丹明结合曲线。在人T细胞上稳定表达的FKBPFR3GS融合受体能够以高亲和力( $K_d=3.93\text{nM}$ )结合FK506衍生物(FK506-罗丹明),这意味着FKBP的结合特性在融合受体中得以保留。见图10。

[0221] 2.6SLF-FITC以相对较高的结合亲和力( $K_d=62\text{nM}$ )结合FKBPFR3GS融合受体

[0222] 游离SLF(100,预温育)的竞争阻断SLF-FITC结合。与母体配体FK506相比,SLF(FK506的模拟物)呈现低10倍的对FKBPFR融合受体的结合亲和力。参见图11并与图10进行比较。

[0223] 2.7FA-罗丹明在4M5.3FR融合受体中的结合曲线。

[0224] FA-罗丹明可以以高亲和力( $K_d=2.25\text{nM}$ )结合人T细胞上稳定表达的4M5.3FR融合受体,所述亲和力与FR+KB细胞中的FA-罗丹明的亲和力( $K_d$ 约1nM)相当。因此,FR结合特性

在4M5.3FR融合受体中得到保留。见图12。

[0225] 2.8 FITC-AF647在4M5.3FR融合受体中的结合曲线。

[0226] FITC-AF647可以以高亲和力 ( $K_d = 8.03\text{nM}$ ) 结合人T细胞上稳定表达的4M5.3FR融合受体。100x comp表示游离的FITC钠。scFv 4M5.3与FITC的结合特性在4M5.3FR融合受体中得到保留。见图13。

[0227] 3.1.FA-微管溶素对FF3+人T细胞的杀伤效果。

[0228] FA-微管溶素能够介导针对FF3+人T细胞的受体特异性杀伤效果。用FA补偿(与FA的100x预温育)阻断该效果。这意味着通过FF3融合受体系统成功内化和释放游离药物微管溶素。见图14。

[0229] 3.2FA-微管溶素对混合人T细胞培养物中hFF3+群体的杀伤效果。

[0230] FA-微管溶素特异性杀伤混合人T细胞培养物中的hFF3+群体。随着FA-Tub浓度增加,hFF3+细胞的百分比降低。见图15。

[0231] 3.3SLF-Tub以 $IC_{50} = 138\text{nM}$ 特异性杀伤hFF3+Jurkat细胞。

[0232] 将SLF-Tub与hFF3 Jurkat细胞温育2小时能够杀伤受体阳性细胞。这指示FKBPFR3GS融合受体成功内化SLF-Tub以及在细胞内释放微管溶素。见图16。

[0233] 3.4.FITC-DM4和FITC-Tub对4M5.3FR+人T细胞的杀伤效果。

[0234] FITC-DM4和FITC-Tub均可以特异性杀伤4M5.3FR+人T细胞,而FITC-Tub具有更高的 $IC_{50}$ 。游离FITC钠(100x预温育)的补偿阻断受体介导的杀伤效果。这意味着通过4M5.3FR融合受体将FITC-细胞毒性药物的成功内化和释放到T细胞中。见图17。

[0235] 3.5.FITC-微管溶素特异性杀伤混合人T细胞培养物中的4M5.3FR+群体。

[0236] 随着FITC-Tub浓度增加,4M5.3FR+细胞的绝对数量减少,而在高浓度时4M5.3FR-细胞也通过释放的药物和旁观者效应被杀伤。见图18。

[0237] 3.6.FITC-DM4特异性杀伤混合人T细胞培养物中的4M5.3FR+群体。

[0238] 随着FITC-DM4浓度增加,4M5.3FR+细胞的绝对数量减少,而在高浓度时4M5.3FR-细胞也通过释放的药物和旁观者效应被杀伤。见图19。

[0239] 3.7激酶抑制剂对针对CD19+Raji的抗CD19 CAR T细胞的调节效果

[0240] 浓度10nM的达沙替尼(Lck抑制剂)和依鲁替尼(ITK抑制剂)降低抗CD19CAR T细胞(FMC63 CAR T,效应器)对CD19+Raji肿瘤细胞(靶物)的裂解效果。测试了两个效应器:靶物比率(E:T)。将正常T细胞和抗CD19 CAR T与CD19-K562细胞用作阴性对照。见图20。

[0241] 3.8.FITC-达沙替尼可降低FMC63+4MFR+hT细胞对Raji细胞的裂解效果。

[0242] 这意味着通过4M5.3FR融合受体成功将FITC-达沙替尼内化和释放到T细胞中并且将达沙替尼释放到T细胞中。见图21。

[0243] 3.9浓度100nM的TC-PTP抑制剂降低耗尽的抗CD19 CAR T细胞中的共抑制剂分子群

[0244] 通过用CD19+Raji细胞刺激7次产生耗尽的抗CD19 CAR T细胞,参见材料和方法部分中的详细程序)。PD-1阳性、LAG3阳性和双阳性群体在处理后降低。见图22。

[0245] 4.其他FK506-有效负载以控制细胞疗法的活性

[0246] 本药物有效负载递送系统的有利特征是具有多功能性。下面列出了潜在的有效负载和相应的影响(表1)。基于以下参数选择小分子有效负载:1.体外和体内游离药物的

功能性测定法已经由已发表的文献或我们实验室中的工作确认。2. 药物的化学结构具有对于衍生化相对更易接近的游离胺。3. 以下任一种都是优选的: FDA证明的药物; 以合理的价格商购。首先测试FK506-有效负载用于体外实验, 通过多重免疫测定法监测T细胞活化和干细胞细胞因子释放。对于体内疾病模型, 我们在我们的实验室中完善建立了CAR T疗法和骨折小鼠模型, 并且几个潜在合作者建立了神经变性小鼠模型。

[0247]

疾病模型	亚型	细胞类型	细胞来源	有效负载类型
干细胞疗法	HSC 移植	BMSC	鼠BM	GSK3b抑制剂
肿瘤	肿瘤微环境	CAR T	hPBMC T 细胞	GSK3b抑制剂、HDAC抑制剂、MAPK抑制剂

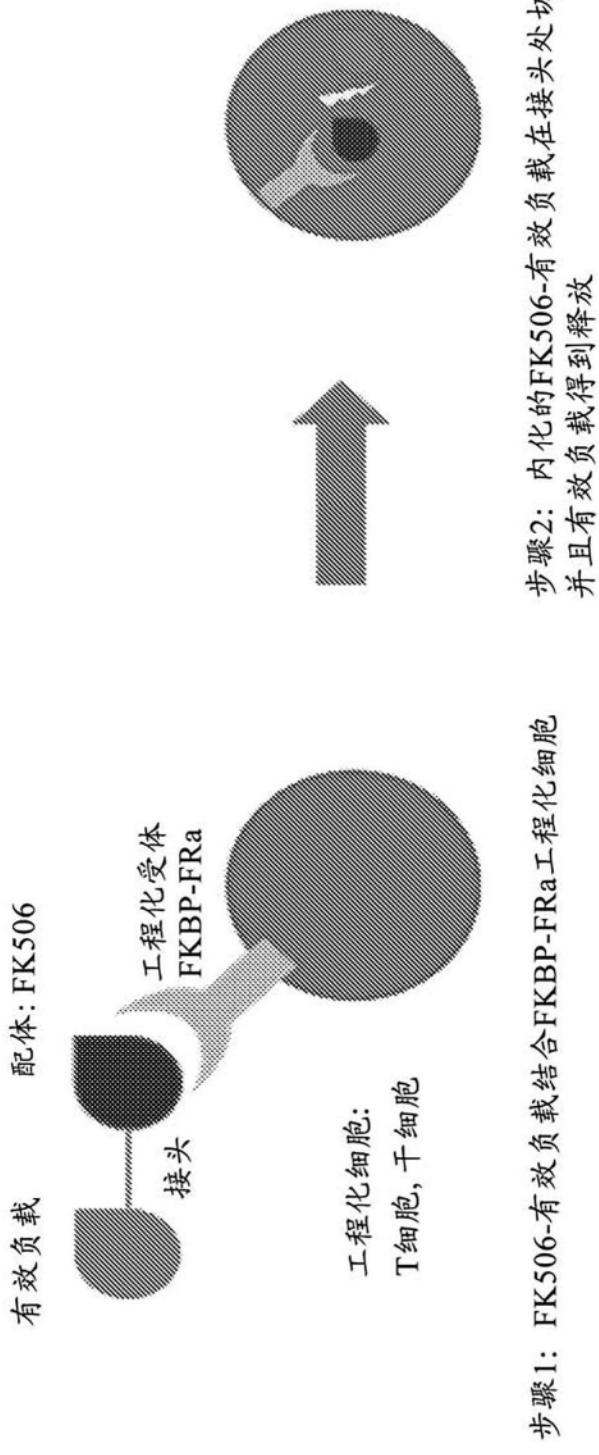


图1A

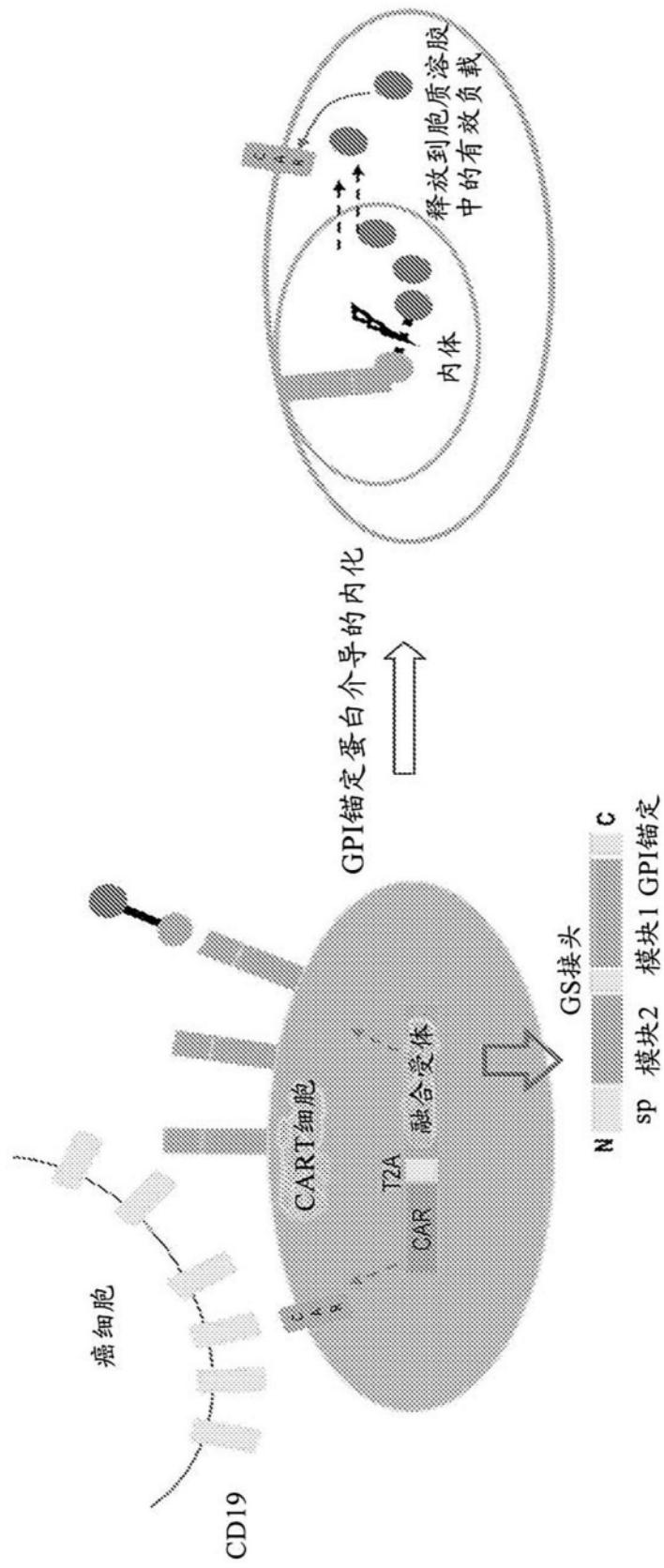


图1B

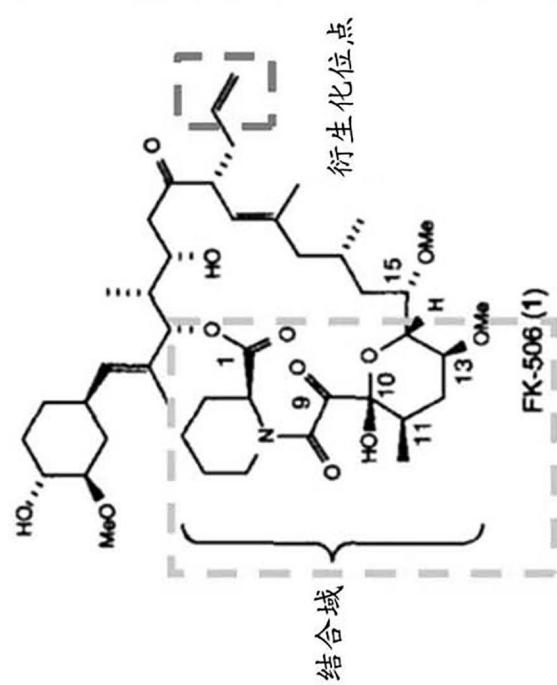
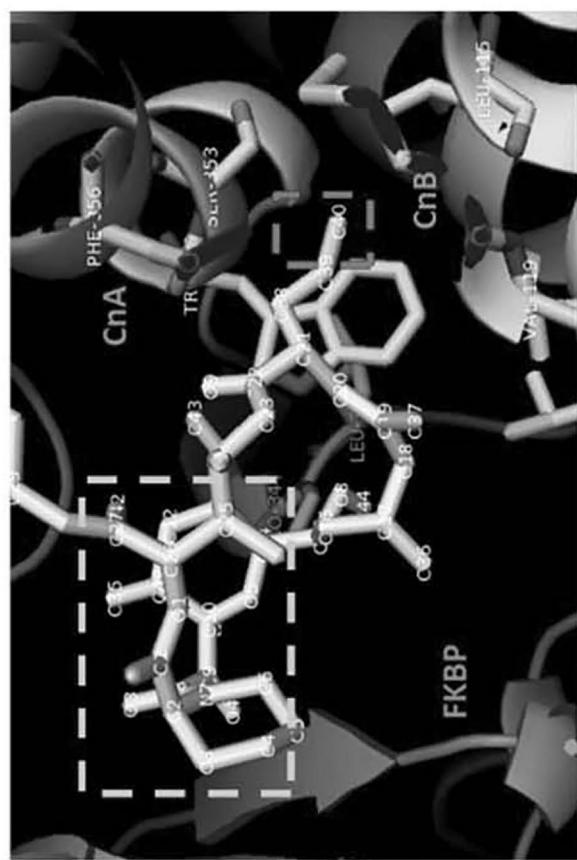


图2A

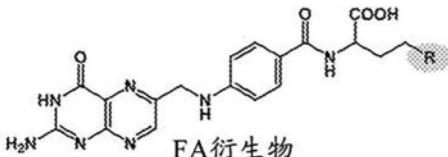
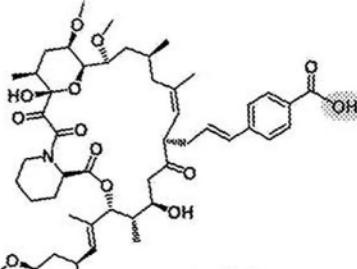
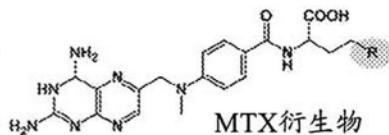
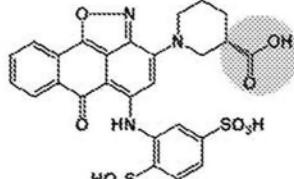
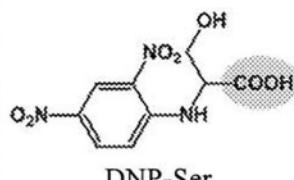
模块1: GPI锚定蛋白		模块2	
蛋白	配体	蛋白	配体
FRa	 <p>FA衍生物</p>	FKBP	 <p>FK506衍生物</p>
FRb		DHFR	 <p>MTX衍生物</p>
uPAR		针对FITC的scFv	 <p>FITC衍生物</p>
		针对DNP的scFv	 <p>DNP-Ser</p>

图2B

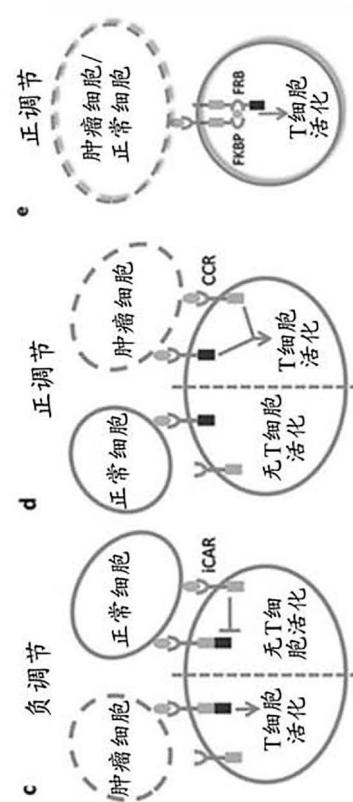
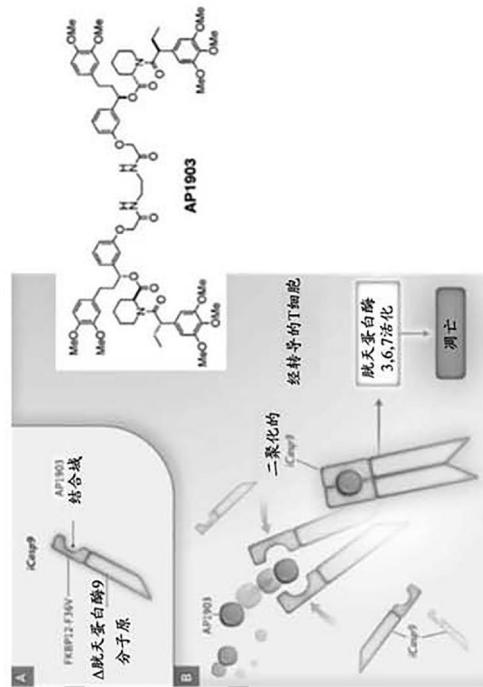
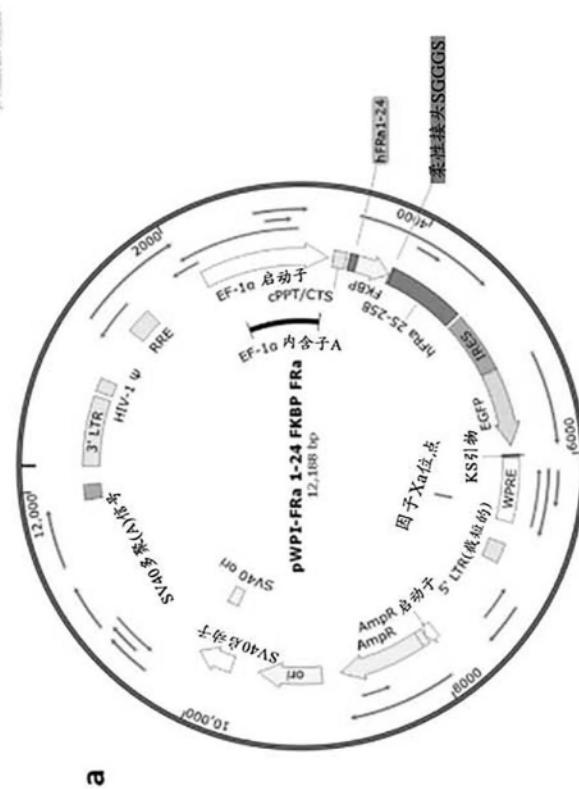


图3



a

图4A

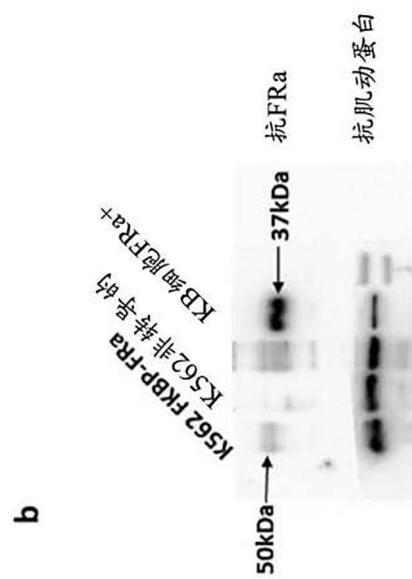


图4B

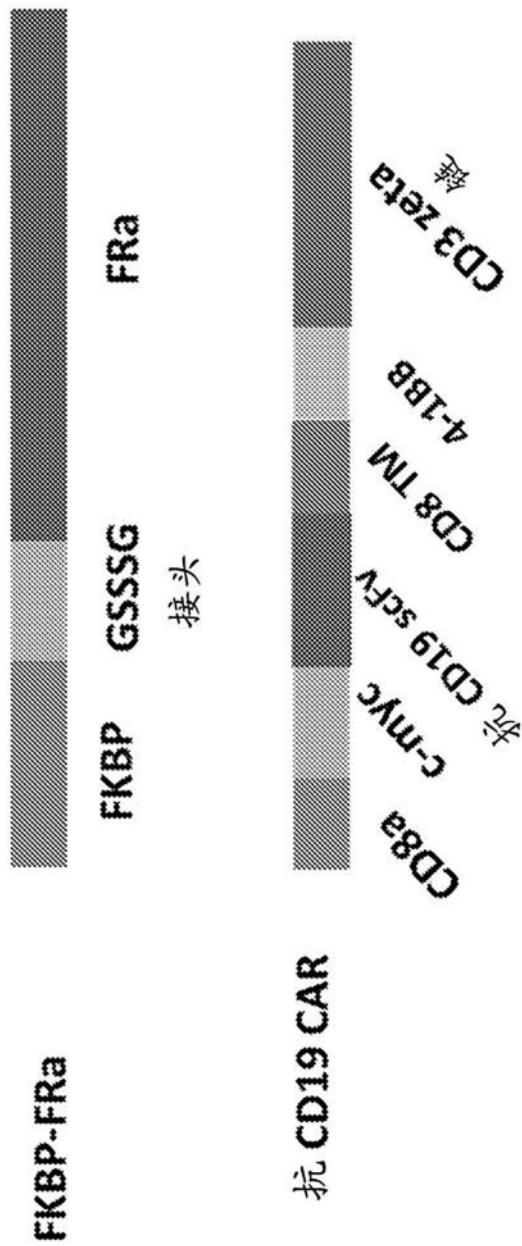


图4C

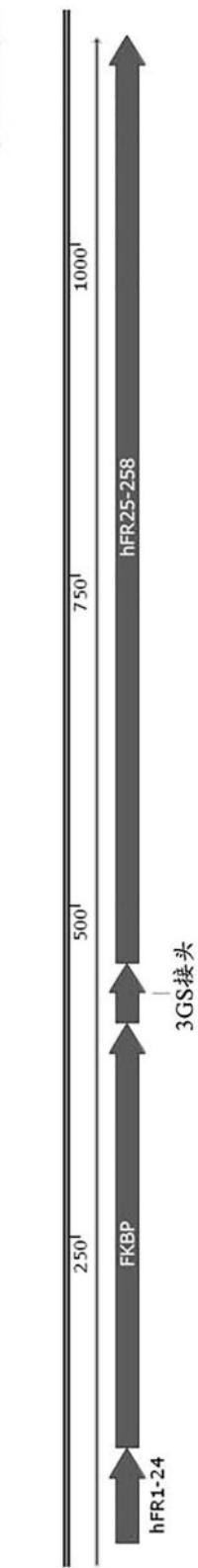


图4D

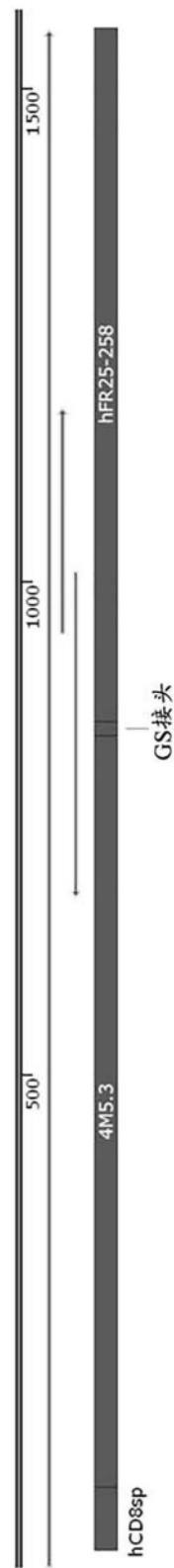


图4E

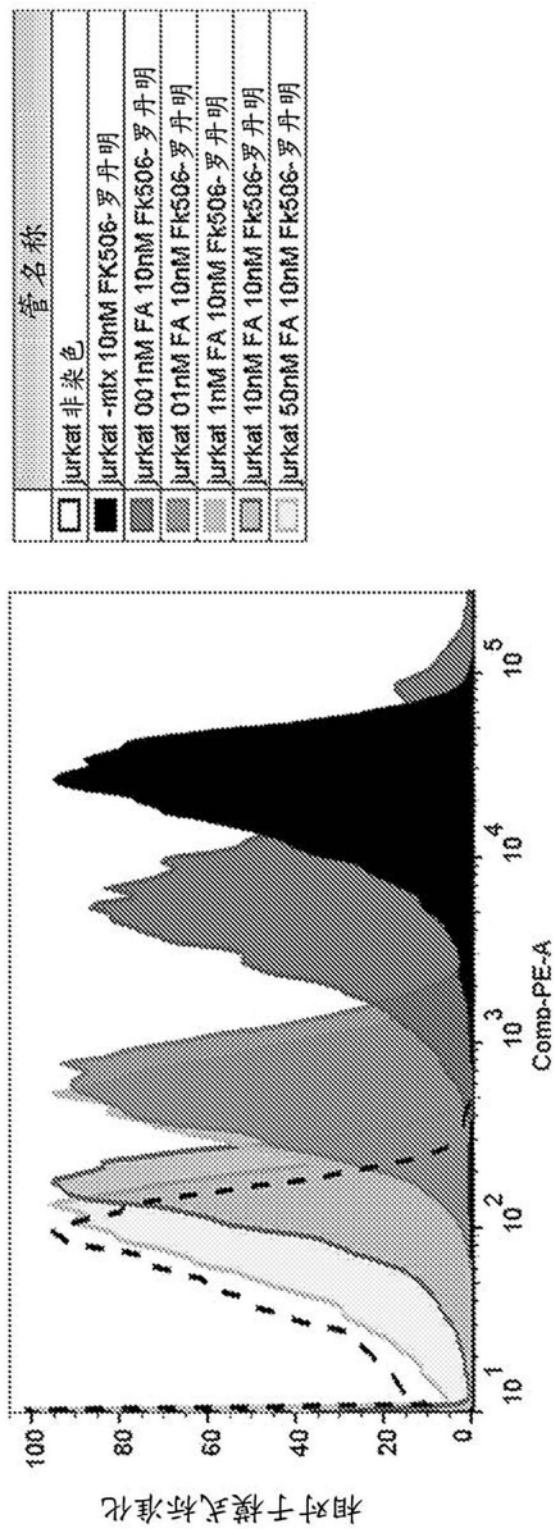


图5

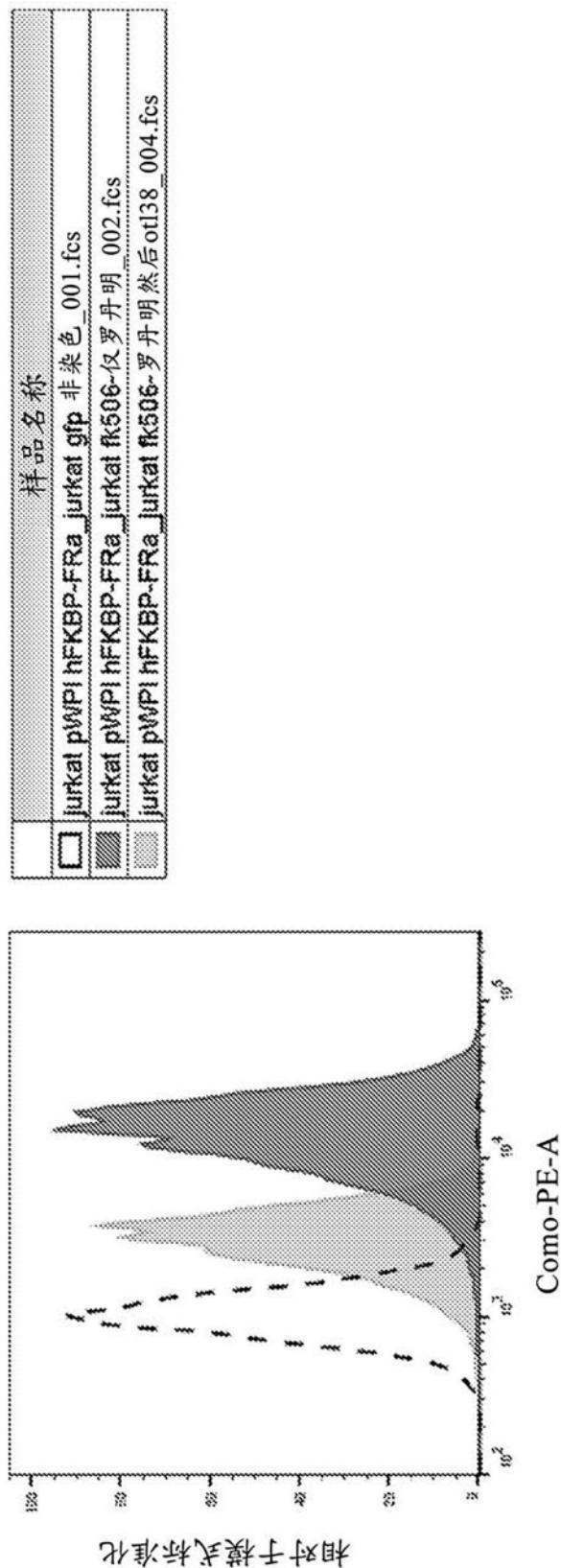


图6

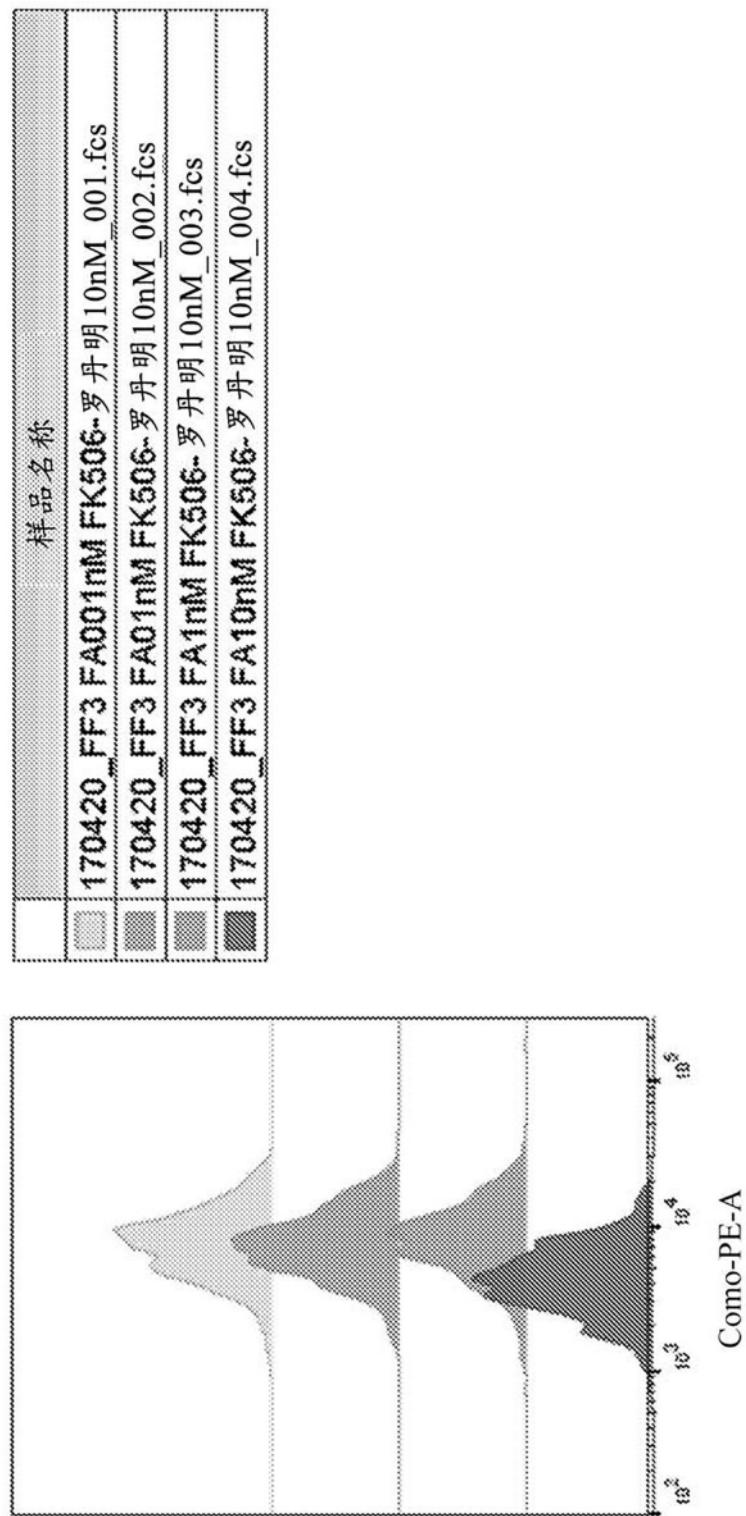


图7

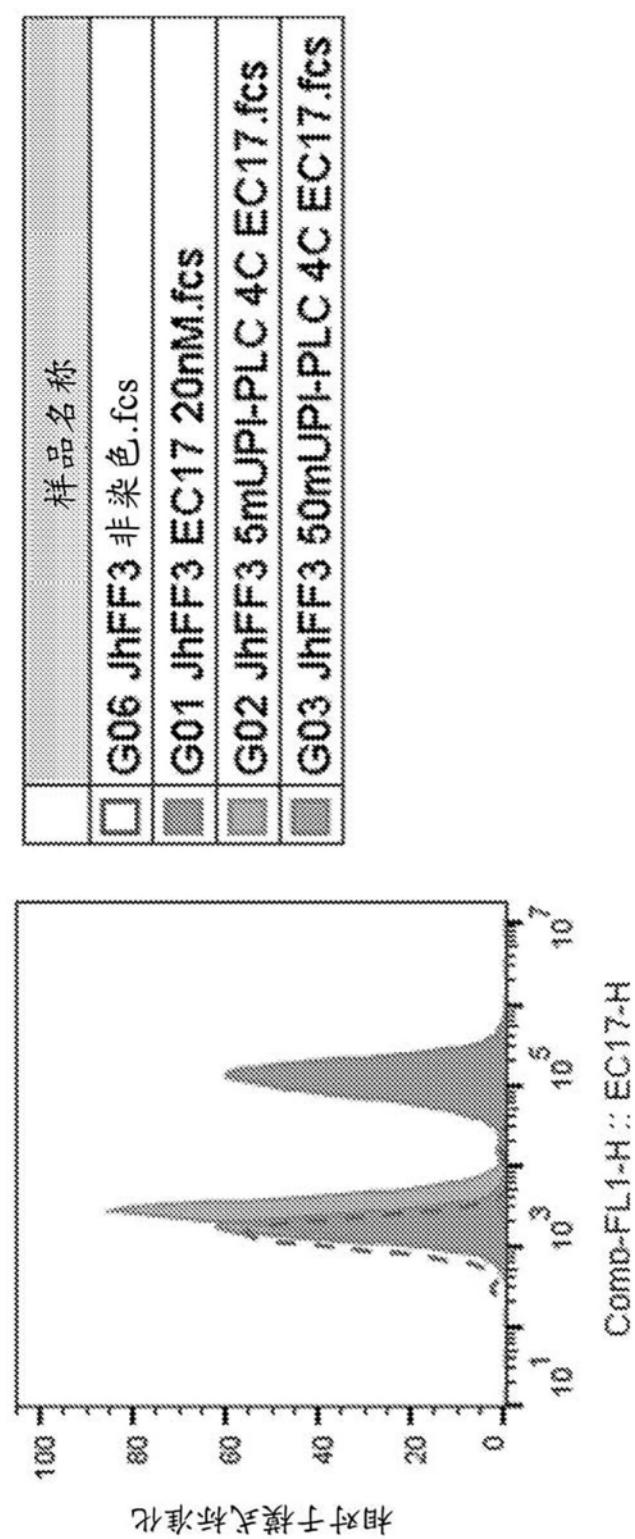


图8

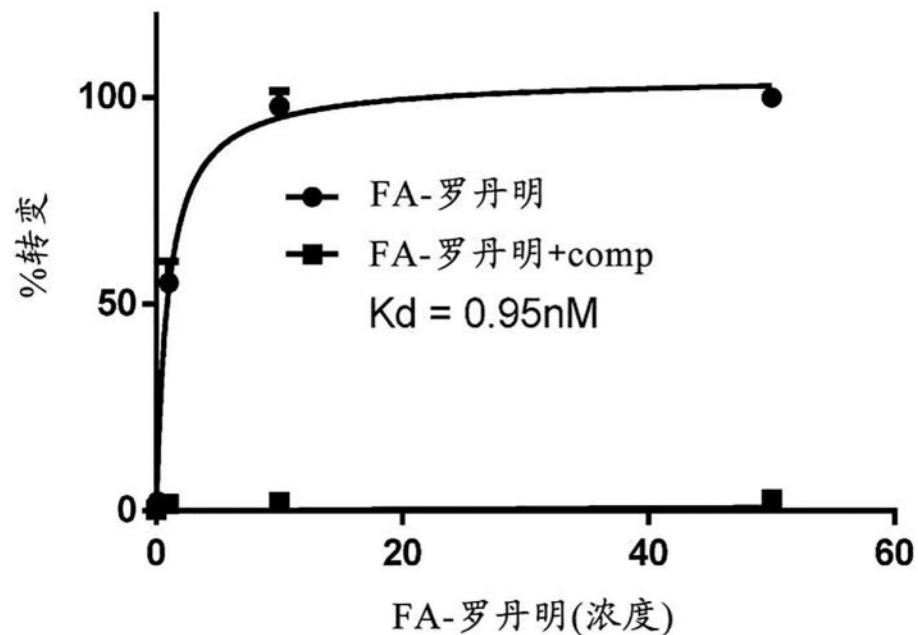


图9

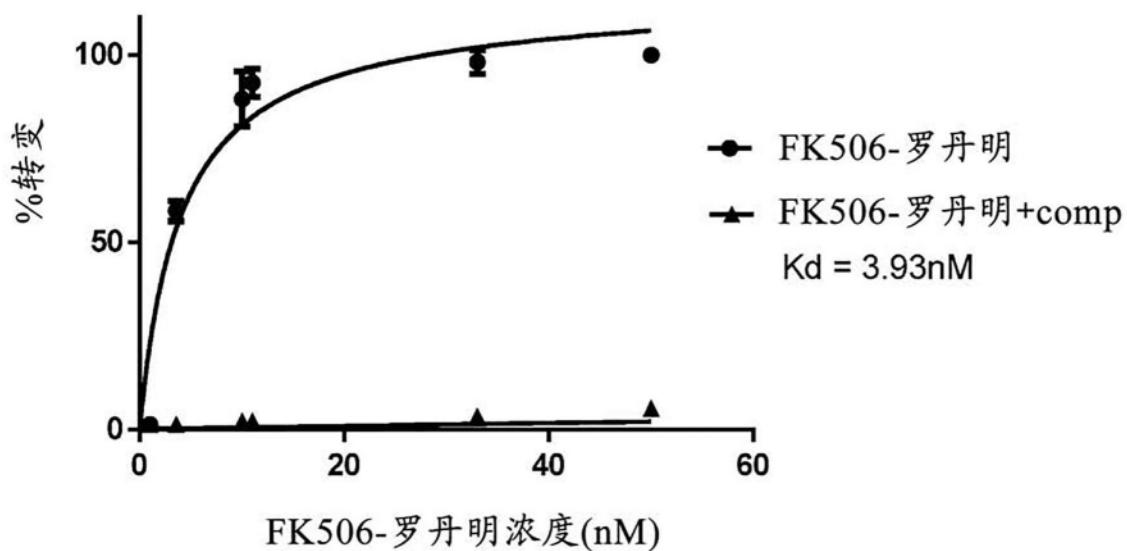


图10

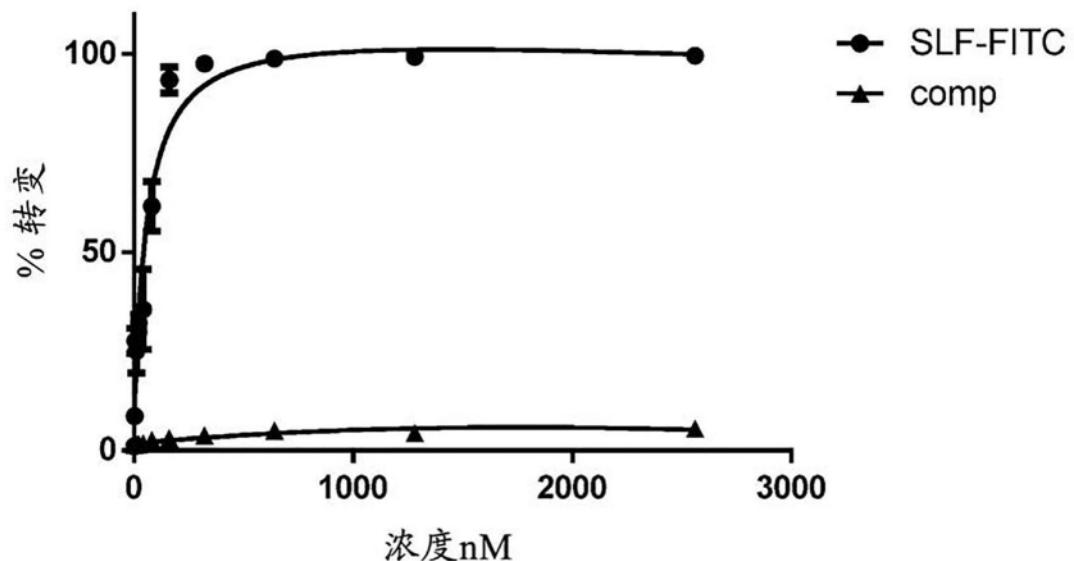


图11

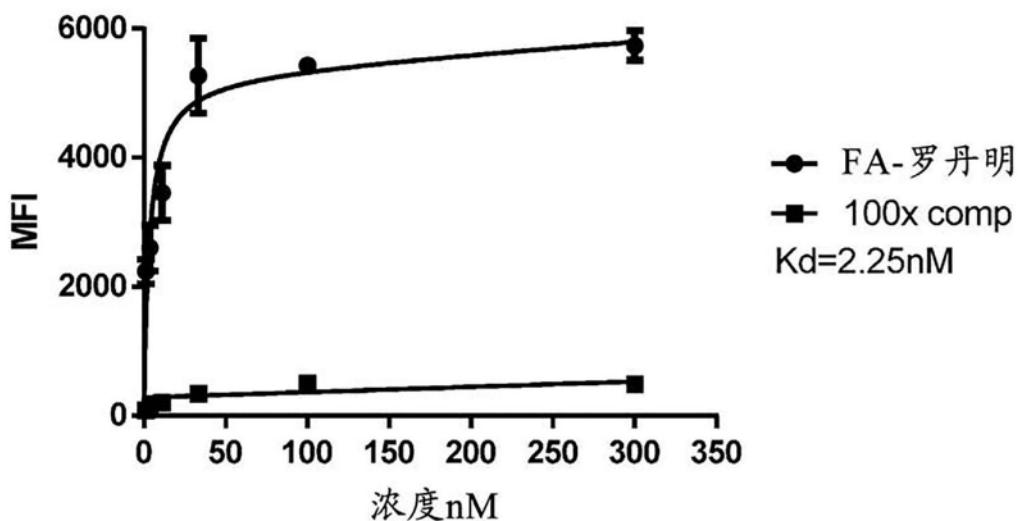


图12

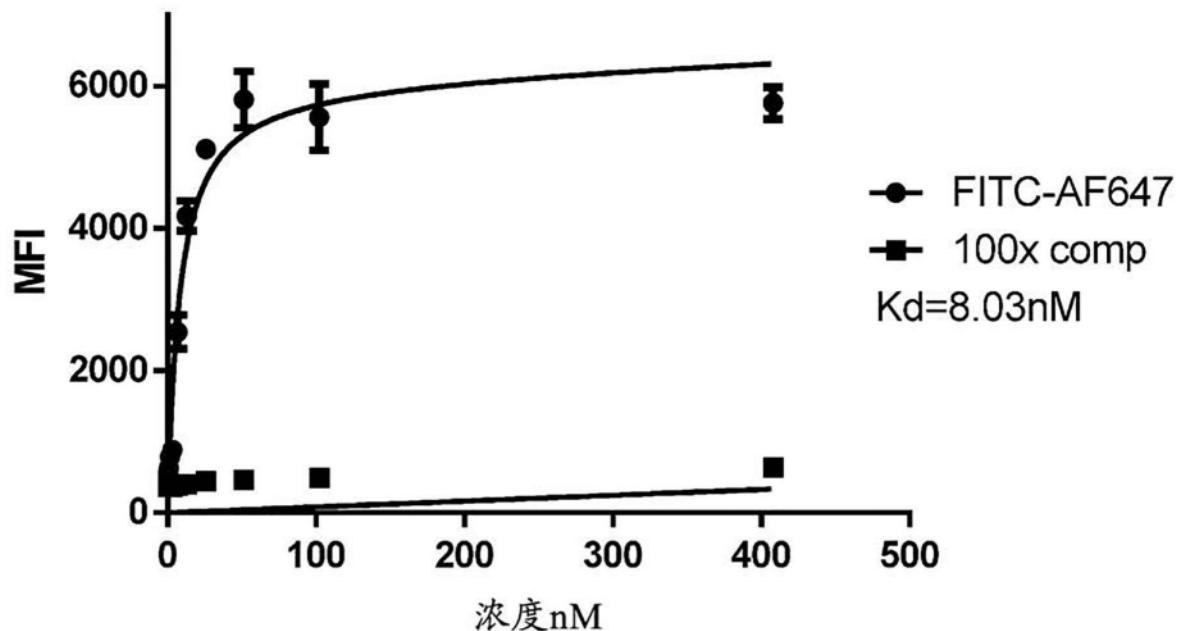


图13

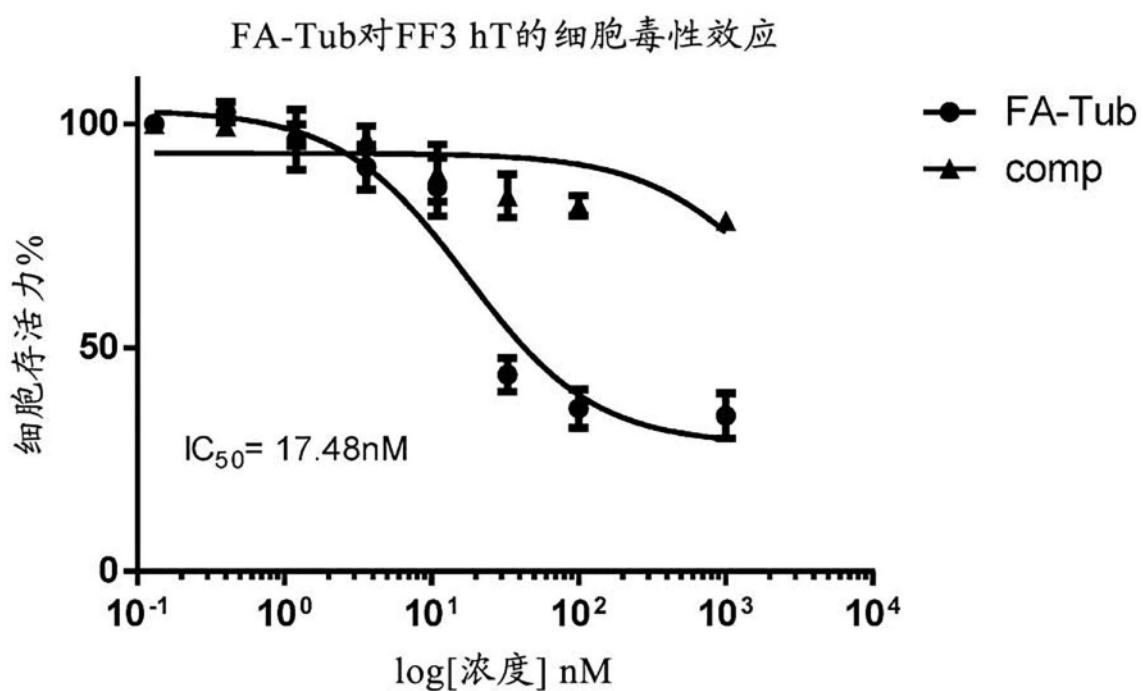


图14

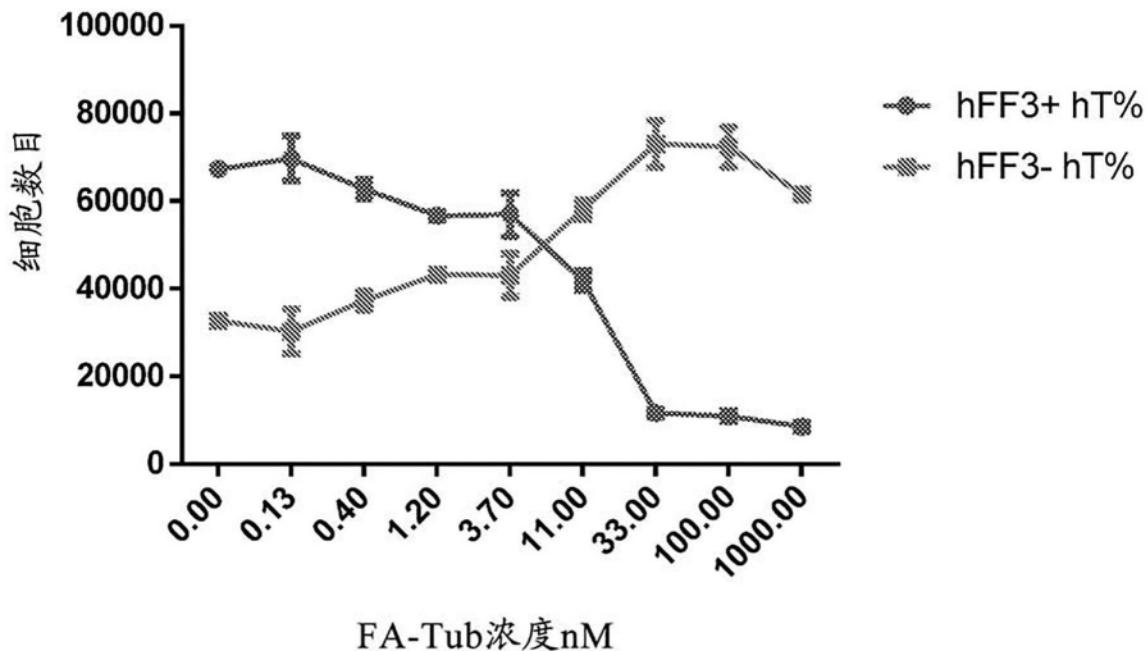


图15

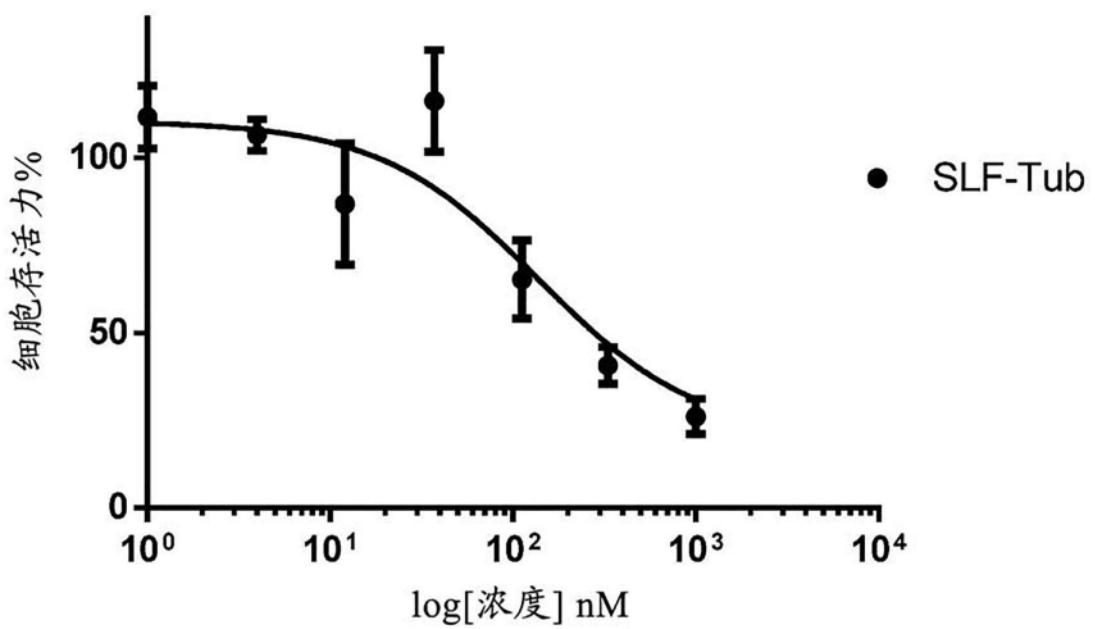


图16

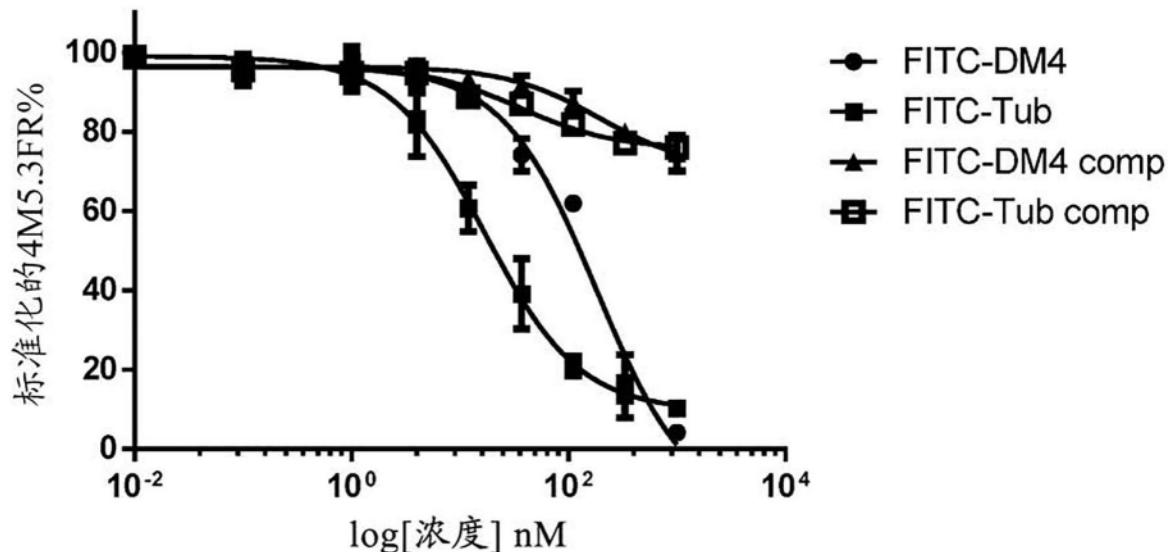


图17

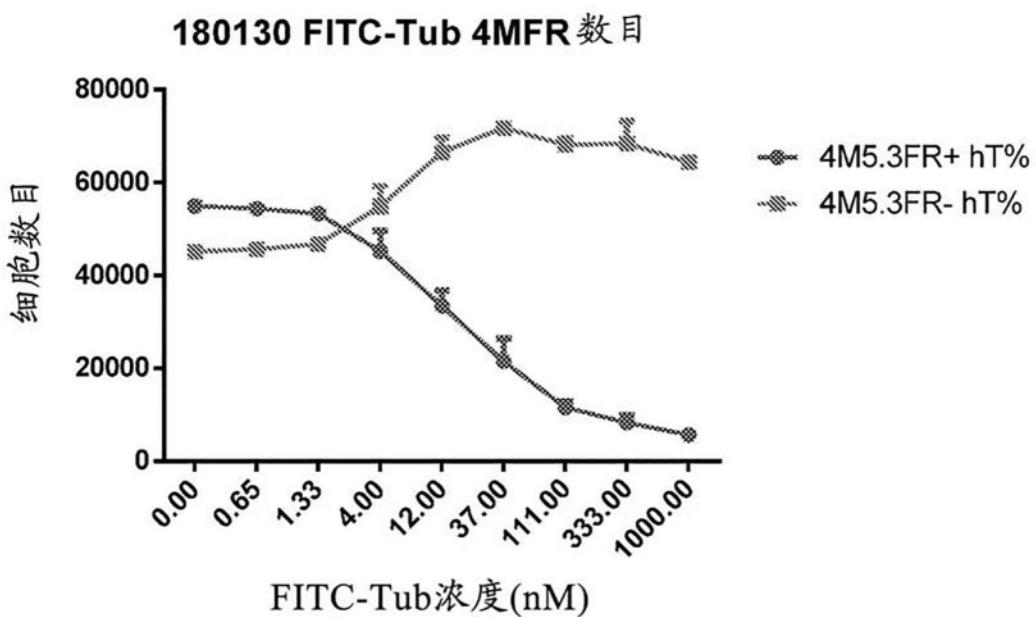


图18

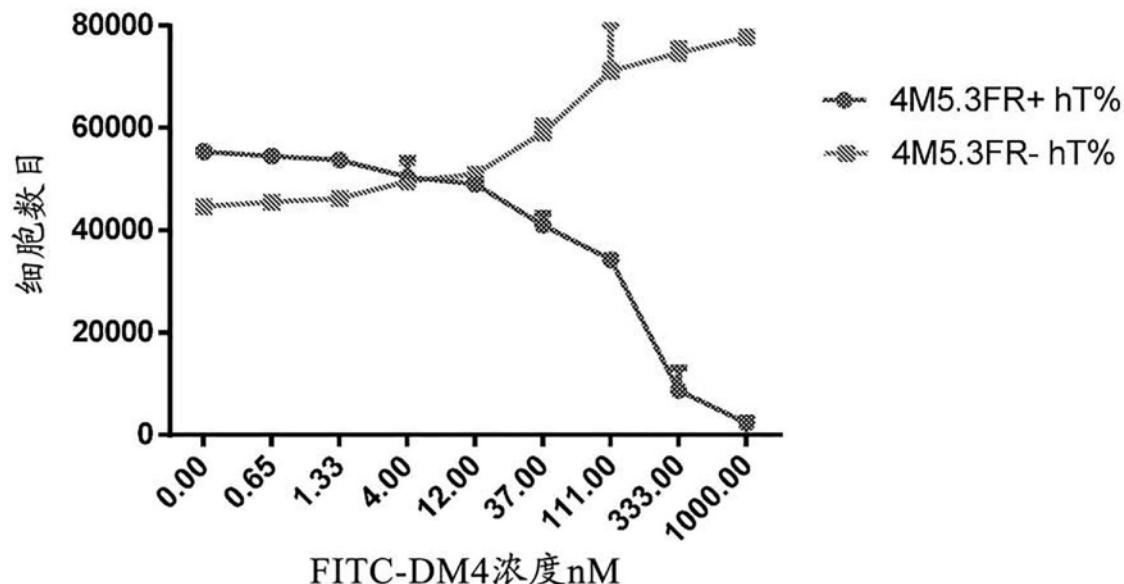


图19

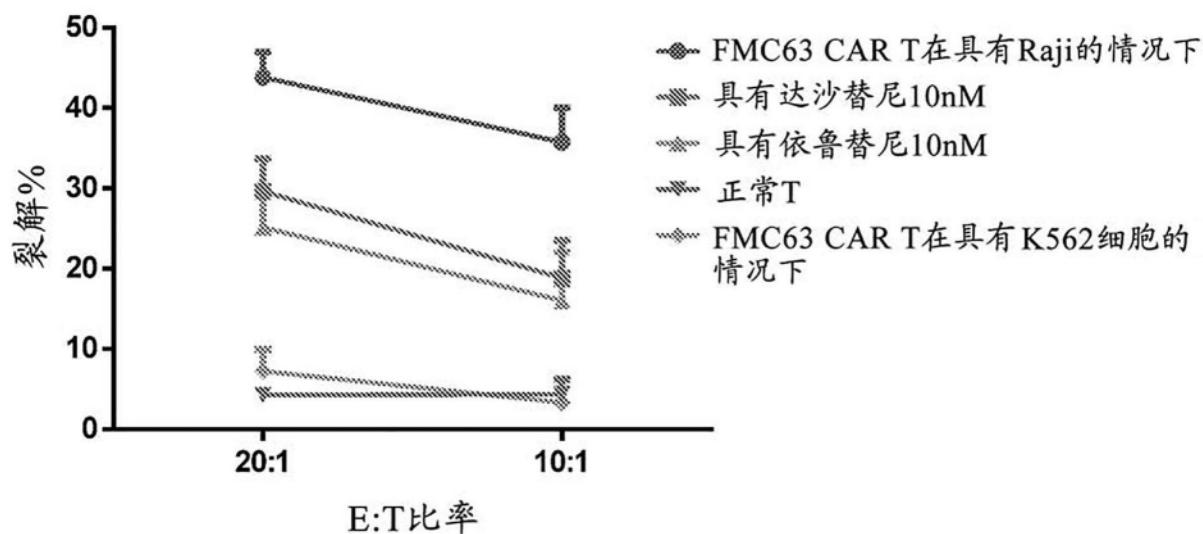


图20

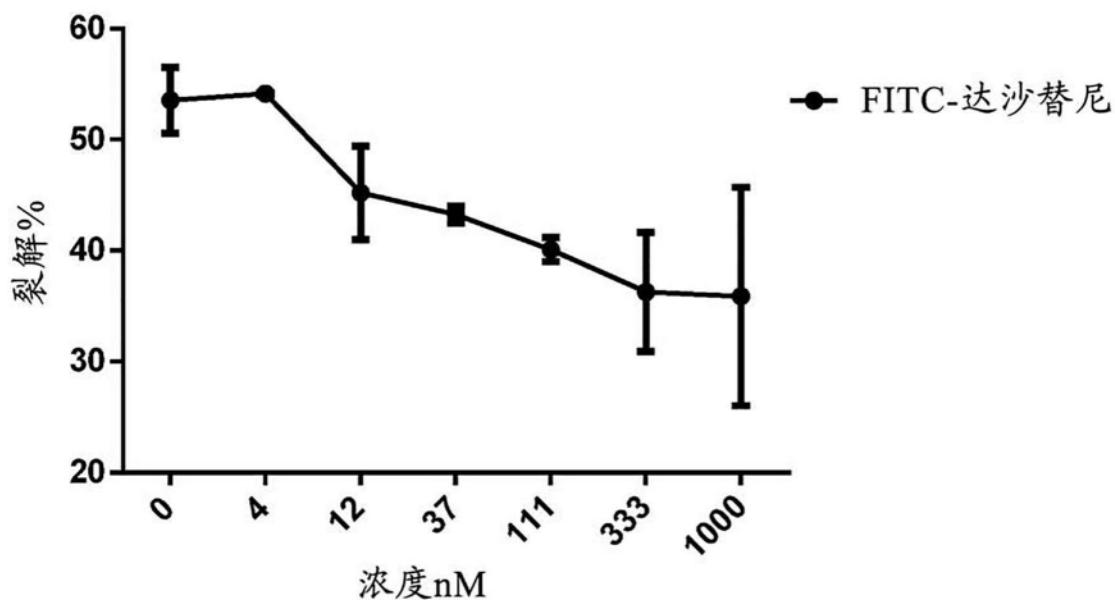


图21

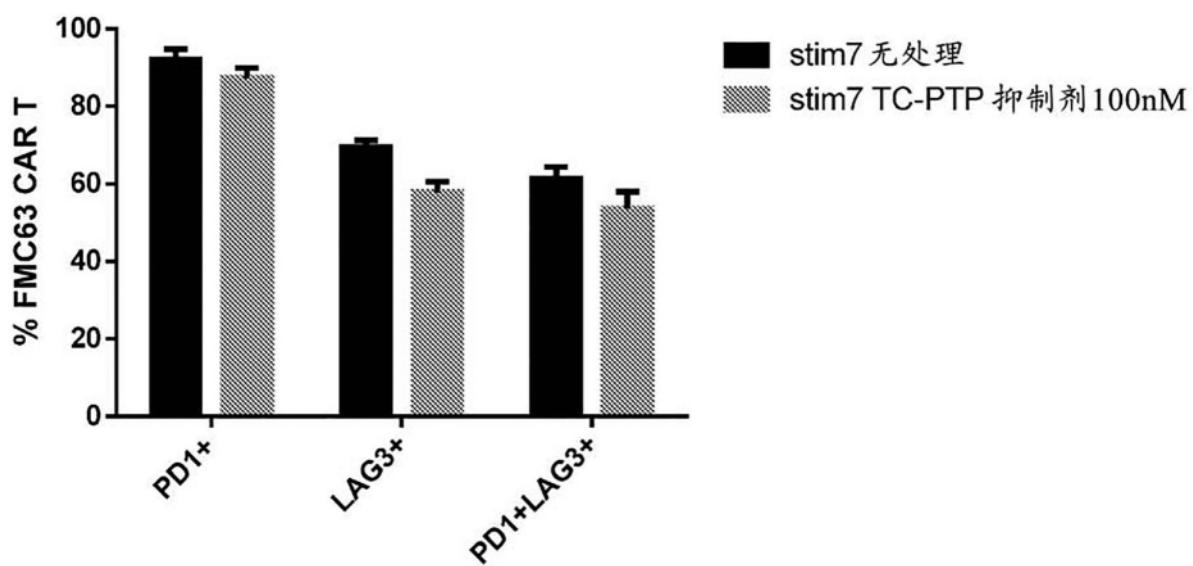


图22