



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119301159 A

(43) 申请公布日 2025. 01. 10

(21) 申请号 202380037773.4

(22) 申请日 2023.04.11

(30) 优先权数据

63/329,551 2022.04.11 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.10.31

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/065619 2023.04.11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/201221 EN 2023.10.19

(71) 申请人 杜克大学

地址 美国北卡罗来纳州

(72) 发明人 P·费奇 D·威尔金森

(74) 专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713

专利代理师 王建秀 关越

(51) Int.Cl.

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

权利要求书4页 说明书17页

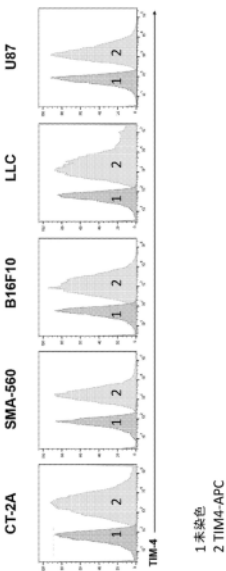
序列表(电子公布) 附图7页

(54) 发明名称

重组TIM-4蛋白、嵌合抗原受体(CAR) T细胞递送系统及其制备方法和使用方法

(57) 摘要

本发明提供了包含TIM-4结构域和CD3特异性scFv的重组TIM-4融合蛋白及其制备方法和使用方法。本文提供的融合蛋白可以与CAR T细胞联合施用。此外,还提供了经工程化来表达本文所述的TIM-4融合蛋白的CAR T细胞,这些CAR T细胞可以用于本文所述的方法中。



1. 一种TIM-4融合蛋白,其包含与CD3特异性单链可变片段(scFv)连接的TIM-4结构域,其中所述TIM-4结构域包含SEQ ID NO:3或与SEQ ID NO:3具有95%同一性的序列,并且其中所述CD3特异性scFv包含SEQ ID NO:22-27的互补决定区(CDR)或与SEQ ID NO:22-27具有至少95%同一性的序列。

2. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其中所述CD3特异性scFv包含SEQ ID NO:5或与SEQ ID NO:5具有至少95%同一性的序列。

3. 根据权利要求1或2所述的融合蛋白,其进一步包含N端信号序列,其中所述N端信号序列包含分泌信号序列。

4. 根据权利要求3所述的融合蛋白,其中所述分泌信号序列包含SEQ ID NO:2的信号序列或与SEQ ID NO:2具有至少95%同一性的序列。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的融合蛋白,其中所述TIM-4结构域通过接头肽连接到所述CD3特异性scFv,并且任选地其中所述接头为甘氨酸丝氨酸接头。

6. 根据权利要求5所述的融合蛋白,其中所述接头包含至少一个拷贝的SEQ ID NO:4。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的融合蛋白,其还包含标签。

8. 根据权利要求7所述的融合蛋白,其中所述标签能够用于所述融合蛋白的纯化、追踪或成像。

9. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其包含SEQ ID NO:1或与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的序列。

10. 根据权利要求1至8中任一项所述的融合蛋白,其包含SEQ ID NO:3的TIM-4结构域、SEQ ID NO:4的接头、SEQ ID NO:22-27的CD3特异性scFv。

11. 根据权利要求1至8中任一项所述的融合蛋白,其包含SEQ ID NO:3的TIM-4结构域、SEQ ID NO:4的接头、SEQ ID NO:5的CD3特异性scFv。

12. 根据权利要求10或11所述的融合蛋白,其进一步包含选自由His标签、FLAG标签和荧光标签组成的组的标签。

13. 根据权利要求10至12所述的融合蛋白,其进一步包含SEQ ID NO:2的信号序列。

14. 一种药物组合物,其包含根据前述权利要求中任一项的重组TIM-4融合蛋白和药学上可接受的赋形剂、载体和/或稀释剂。

15. 一种构建体,其包含编码前述权利要求中任一项所述的TIM-4融合蛋白的多核苷酸序列。

16. 根据权利要求15所述的构建体,其进一步包含启动子,所述启动子可操作地连接至编码所述TIM-4融合蛋白的多核苷酸序列。

17. 根据权利要求15或16所述的构建体,其还包含编码嵌合抗原受体(CAR)的序列,所述CAR包含胞外结构域、跨膜结构域以及胞内信号传导结构域。

18. 根据权利要求17所述的构建体,其中所述CAR包含含有抗原结合区的胞外结构域,所述抗原结合区结合野生型EGFR和EGFR VIII变体。

19. 根据权利要求18所述的构建体,其中所述抗原结合区包含SEQ ID NO:10的scFv或与SEQ ID NO:10具有至少95%同一性的序列。

20. 根据权利要求18所述的构建体,其中所述抗原结合区包含SEQ ID NO:17的scFv或与SEQ ID NO:17具有至少95%同一性的序列。

21. 根据权利要求17至20中任一项所述的构建体,其进一步包含异源启动子,所述异源启动子可操作地连接到编码所述CAR的序列。

22. 根据权利要求17至21中任一项所述的构建体,其中所述CAR和所述TIM-4融合蛋白通过自切割位点连接。

23. 根据权利要求15至22中任一项所述的构建体,其中所述构建体被包含在慢病毒、逆转录病毒或AAV载体中。

24. 一种嵌合抗原受体(CAR)-T细胞,其包含根据权利要求15至23中任一项所述的构建体。

25. 根据权利要求24所述的CAR-T细胞,其中所述构建体包含编码SEQ ID NO:10的EGFR VIIICAR、自切割位点、信号序列、SEQ ID NO:3的TIM-4结构域、接头以及SEQ ID NO:22-27的CD3特异性scFv的多核苷酸,或者其中所述构建体包含编码与SEQ ID NO:10、3、22、24、25、26和27具有至少95%同一性的多肽的多核苷酸。

26. 根据权利要求24所述的CAR-T细胞,其中所述构建体包含编码SEQ ID NO:10的EGFR VIIICAR、自切割位点、信号序列、SEQ ID NO:3的TIM-4结构域、接头以及SEQ ID NO:5的CD3特异性scFv的多核苷酸,或者其中所述构建体包含编码与SEQ ID NO:10、3和5具有至少95%同一性的多肽的多核苷酸。

27. 根据权利要求24所述的CAR-T细胞,其中所述构建体包含编码SEQ ID NO:17的D2C7 CAR、自切割位点、信号序列、SEQ ID NO:3的TIM-4结构域、接头以及SEQ ID NO:22-27的CD3特异性scFv的多核苷酸,或者其中所述构建体包含编码与SEQ ID NO:17、3、22、23、24、25、26和27具有至少95%同一性的多肽的多核苷酸。

28. 根据权利要求24所述的CAR-T细胞,其中所述构建体包含编码SEQ ID NO:17的D2C7 CAR、自切割位点、信号序列、SEQ ID NO:3的TIM-4结构域、接头以及SEQ ID NO:5的CD3特异性scFv的多核苷酸,或者其中所述构建体包含编码与SEQ ID NO:17、3和5具有至少95%同一性的多肽的多核苷酸。

29. 根据权利要求24至28中任一项所述的CAR-T细胞,其中所述自切割位点包含SEQ ID NO:11或与SEQ ID NO:11具有至少95%序列同一性的序列。

30. 根据权利要求24至29中任一项所述的CAR-T细胞,其中所述信号序列包含SEQ ID NO:2或与SEQ ID NO:2具有至少95%序列同一性的序列。

31. 根据权利要求24至30中任一项所述的CAR-T细胞,其中所述接头包含SEQ ID NO:4。

32. 根据权利要求24所述的CAR-T细胞,其中所述构建体包含编码SEQ ID NO:10的CAR、SEQ ID NO:11的自切割位点、SEQ ID NO:2的信号序列、SEQ ID NO:3的TIM-4结构域、SEQ ID NO:4的接头以及SEQ ID NO:22-27的CD3特异性scFv的多核苷酸。

33. 根据权利要求24所述的CAR-T细胞,其中所述构建体包含编码SEQ ID NO:10的CAR、SEQ ID NO:11的自切割位点、SEQ ID NO:2的信号序列、SEQ ID NO:3的TIM-4结构域、SEQ ID NO:4的接头以及SEQ ID NO:5的CD3特异性scFv的多核苷酸。

34. 根据权利要求24所述的CAR-T细胞,其中所述构建体包含编码SEQ ID NO:17的CAR、SEQ ID NO:11的自切割位点、SEQ ID NO:2的信号序列、SEQ ID NO:3的TIM-4结构域、SEQ ID NO:4的接头以及SEQ ID NO:22-27的CD3特异性scFv的多核苷酸。

35. 根据权利要求24所述的CAR-T细胞,其中所述构建体包含编码SEQ ID NO:17的CAR、

SEQ ID NO:11的自切割位点、SEQ ID NO:2的信号序列、SEQ ID NO:3的TIM-4结构域、SEQ ID NO:4的接头以及SEQ ID NO:5的CD3特异性scFv的多核苷酸。

36.一种CAR-T细胞,其包含编码SEQ ID NO:20或与SEQ ID NO:20具有至少95%序列同一性的序列的多核苷酸。

37.一种CAR-T细胞,其包含编码SEQ ID NO:21或与SEQ ID NO:21具有至少95%序列同一性的序列的多核苷酸。

38.一种用于治疗癌症的方法,所述方法包括:施用治疗有效量的根据权利要求1至13中任一项的重组TIM-4融合蛋白和药学上可接受的赋形剂、载体和/或稀释剂。

39.根据权利要求38所述的方法,其还包括:施用T淋巴细胞,其中T淋巴细胞在与所述TIM-4融合蛋白结合时被活化。

40.根据权利要求39所述的方法,其中所述T淋巴细胞是CAR T细胞。

41.根据权利要求40所述的方法,其中所述CAR T细胞包含SEQ ID NO:10的EGFR VIIICAR或SEQ ID NO:17的D2C7 CAR或者与SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:17具有至少95%同一性的序列。

42.一种用于治疗癌症的方法,所述方法包括:施用治疗有效量的根据权利要求24至37中任一项所述的CAR-T细胞和药学上可接受的赋形剂、载体和/或稀释剂。

43.一种用于治疗癌症的方法,所述方法包括:施用包含根据权利要求15至23中任一项所述的构建体的细胞。

44.根据权利要求38至43中任一项所述的方法,其中所述癌症为EGFR相关癌症。

45.根据权利要求38至43中任一项所述的方法,其中所述癌症为PS相关癌症。

46.根据权利要求44所述的方法,其中所述EGFR相关癌症包括神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、成神经管细胞瘤、室管膜瘤、弥漫型内生性脑桥神经胶质瘤(DIPG)、脑转移瘤、头颈癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌或食道癌。

47.根据权利要求44或46所述的方法,其中所述癌症的治疗导致诱导对所述EGFR相关癌症的抗肿瘤反应。

48.一种诊断癌症的方法,所述方法包括:施用根据权利要求7至8或12所述的融合蛋白,检测怀疑患有癌症的受试者中标签的存在或积累,其中所述标签允许体内检测所述癌症。

49.一种诊断癌症的方法,所述方法包括:使包含细胞或组织的样品与根据权利要求7至8或12中任一项所述的融合蛋白或与标签连接的SEQ ID NO:3的TIM-4结构域接触,并且通过检测所述标签来检测所述融合蛋白或TIM-4结构域与所述样品的结合,其中所述TIM-4与所述样品的结合指示所述样品包含癌细胞。

50.根据权利要求48或49所述的方法,其中被诊断的癌症是神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、成神经管细胞瘤、室管膜瘤、弥漫型内生性脑桥神经胶质瘤(DIPG)、脑转移瘤、头颈癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌或食道癌。

51.一种在患有癌症的受试者中诱导T细胞反应的方法,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1至13中任一项所述的融合蛋白或根据权利要求14所述的药物组合物,其中对所述癌症的抗肿瘤反应被诱导。

52.一种在患有癌症的受试者中诱导T细胞反应的方法,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24至37中任一项所述的CAR-T细胞,其中对所述癌症的抗肿瘤反应被诱导。

重组TIM-4蛋白、嵌合抗原受体(CAR) T细胞递送系统及其制备方法和使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2022年4月11日提交的美国临时申请第63/329,551号的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

[0003] 电子版序列表的引用

[0004] 本申请包括XML格式的序列表,标题为“155554.00691.xml”,大小为36,976字节,创建于2023年4月10日。该序列表通过专利中心以电子方式随本申请提交,其全部内容通过引用并入本文。

背景技术

[0005] 在过去几十年中,诸如免疫检查点阻断(ICB)和T细胞重定向策略(例如嵌合抗原受体(CAR) T细胞)等基于免疫的疗法在某些癌症亚群中取得了令人振奋的成功。然而,在实体瘤方面取得的成功却是有限的,这一缺点通常归因于实体瘤的抗原异质性。扩大免疫疗法可有效治疗的癌症种类库仍然是全世界癌症免疫学小组的主要目标。多特异性融合蛋白由两个结构域组成:一个结构域赋予针对肿瘤抗原的特异性,而另一个结构域由抗CD3单链可变片段(scFv)组成,该抗CD3单链可变片段通过T细胞的内源性T细胞受体来活化T细胞。因此,多特异性融合蛋白将T细胞重定向至选定的肿瘤抗原,而不依赖于T细胞受体特异性。当所有肿瘤细胞都表达相同的可靶向抗原时,T细胞重定向疗法将会获得成功。例如,CAR T细胞和多特异性融合蛋白已经彻底改变了B细胞癌症的治疗,这是由于恶性细胞几乎普遍表达CD19。遗憾的是,T细胞重定向疗法在实体瘤中表现不佳。这些失败通常归因于实体瘤表现出的大量抗原异质性。

[0006] 因此,本领域仍然需要一种鉴定和靶向肿瘤细胞的新手段。如本申请中所描述的,发明人能够打破常规思维,并依靠非常规的非蛋白靶标来规避肿瘤异质性带来的挑战。

发明内容

[0007] 本文描述了TIM-4融合蛋白及其制备方法和使用方法,所述TIM-4融合蛋白由与人抗CD3 scFv连接的TIM-4结构域构成。本公开的一个方面提供了一种TIM-4融合蛋白,其包含与CD3特异性单链可变片段(scFv)连接的TIM-4结构域,其中所述TIM-4结构域包含SEQ ID NO:3或与SEQ ID NO:3具有95%同一性的序列,并且其中所述CD3特异性scFv包含SEQ ID NO:22-27的互补决定区(CDR)或与SEQ ID NO:22-27具有至少95%同一性的序列。在一些实施方式中,CD3特异性scFv包含SEQ ID NO:5或与SEQ ID NO:5具有至少95%同一性的序列。一些实施方式提供了一种药物组合物,其包含本文所述的重组TIM-4融合蛋白和药学上可接受的赋形剂、载体和/或稀释剂。一些实施方式提供了一种构建体,其包含编码本文所述的TIM-4融合蛋白的多核苷酸序列。一些实施方式提供了一种嵌合抗原受体(CAR)-T细胞,其包含本文所提供的构建体。

[0008] 本公开的另一个方面提供了一种用于治疗癌症的方法,其包括:施用治疗有效量

的本文所述的重组TIM-4融合蛋白和药学上可接受的赋形剂、载体和/或稀释剂。在一些实施方式中,所述方法进一步包括:施用具有TIM4融合蛋白的T淋巴细胞,其中T淋巴细胞在与所述TIM-4融合蛋白结合时被活化。在一些实施方式中,所述T淋巴细胞是CAR T细胞。在又一个实施方式中,所述CAR T细胞可以被工程化来表达所述TIM4融合蛋白以及所述CAR。在一些实施方式中,所述癌症是PS相关癌症或EGFR相关癌症。

[0009] 本公开的另一个方面提供了一种诊断癌症的方法,其包括:施用本文所述的融合蛋白;以及检测怀疑患有癌症的受试者中标签的存在或积累。所述标签允许在体内检测癌症。所述TIM4融合蛋白还可用于通过利用所述标签检测TIM4与细胞的结合来在体外检测来自怀疑患有癌症的受试者的活检或其他样品中的癌症。

[0010] 本公开的另一个方面提供了一种在患有癌症的受试者中诱导T细胞反应的方法,其包括:向所述受试者施用治疗有效量的本文所述的融合蛋白或药物组合物,其中对癌症的抗肿瘤反应被诱导。

附图说明

[0011] 图1.TIM-4结合神经胶质瘤和非神经胶质瘤肿瘤细胞。用APC缀合的重组TIM-4对鼠神经胶质瘤(CT-2A,SMA-560)、鼠非神经胶质瘤(B16F10,Lewis肺癌)和人神经胶质瘤(U87)细胞进行染色。

[0012] 图2.照射提高TIM-4与CT-2A神经胶质瘤细胞的结合。A.将体外培养的CT-2A细胞暴露于10Gy的放射,并且在照射后0h和24h对这些细胞进行TIM-4结合测定。B,C.将 10^4 个CT-2A神经胶质瘤细胞移植到C57BL/6小鼠的颅内。14天后,小鼠接受10Gy的全身照射或不接受照射。48小时后,移植肿瘤,并且用TIM-4-APC对这些肿瘤进行染色。B中示出了TIM-4-APC与CT-2A结合的代表性重叠直方图,而C中示出了TIM-4-APC的平均荧光强度(MFI)。

[0013] 图3.重组TIM-4融合蛋白的示意图和序列。A.描绘重组TIM-4融合蛋白的肿瘤和T细胞结合结构域的模型。B.重组TIM-4融合蛋白的氨基酸序列。该融合蛋白由信号序列(SEQ ID NO:2)、与衍生自抗人CD3抗体OKT3(SEQ ID NO:5)的scFv连接(SEQ ID NO:3)的鼠TIM-4的胞外结构域(SEQ ID NO:7)和标签(SEQ ID NO:28)组成。

[0014] 图4.重组TIM-4融合蛋白结合肿瘤细胞和人T细胞。A.U87肿瘤细胞与重组TIM-4融合蛋白表达上清液或Mock表达上清液一起孵育30分钟。在与生物素化蛋白L一起孵育之前,充分洗涤细胞。在进一步充分洗涤之后,将细胞与PE标记的链霉亲和素一起孵育,然后通过流式细胞术对细胞进行分析。B,C.人(B)或小鼠(C)CD3⁺T细胞与重组TIM-4融合蛋白表达上清液或Mock表达上清液一起孵育30分钟,然后与抗小鼠TIM-4-PE一起孵育。

[0015] 图5.重组TIM-4融合蛋白在体外介导强效的肿瘤细胞毒性。将100,000个人T细胞与10,000个CellTrace Violet标记的U87肿瘤细胞(A)或5000个CTV标记的U87肿瘤细胞和5000个CTV标记的U87vIII肿瘤细胞的50:50混合物(B)共培养。将单独的重组TIM-4融合蛋白或EGFRvIII-抗CD3 scFv滴定到共培养物中。24小时后,对存活的肿瘤细胞进行计数,并且将其相对于“无融合蛋白”对照品进行归一化,以给出肿瘤存活率。

[0016] 图6.重组TIM-4融合蛋白与EGFRvIIICAR T细胞的组合延长了携带有异质肿瘤的小鼠的存活期。向NOD-SCID- γ (NSG)小鼠颅内植入U87和U87vIII肿瘤细胞的80:20混合的25,000个细胞。3天后,颅内施用VIIICAR或分泌TIM-4融合蛋白的 2×10^6 个VIIICAR,或者

不处理小鼠。跟踪老鼠的存活情况。 $*p < 0.05$ 。

[0017] 图7. 经修饰以分泌重组TIM-4融合蛋白的EGFRvIIIICAR延长了携带有EGFRvIII异质肿瘤的小鼠的存活期。向C57BL/6小鼠颅内施用CT2A:CT2A vIII的50:50混合物。7天后, 向肿瘤部位施用 2×10^6 个VIIICAR或VIIIxTIM-4CAR。重要提示: 施用CAR之前, 没有进行淋巴细胞清除预处理。

具体实施方式

[0018] 在过去几十年中, 诸如免疫检查点阻断和T细胞重定向策略 (例如嵌合抗原受体 (CAR) T细胞) 等基于免疫的疗法在某些癌症亚群中取得了令人振奋的成功。然而, 在实体瘤方面取得的成功却是有限的, 这一缺点通常归因于实体瘤的抗原异质性。需要用于鉴定和靶向肿瘤细胞的新手段, 这些新手段打破了常规思维, 并依靠非常规的非蛋白靶标来规避肿瘤异质性带来的挑战。本文描述了TIM-4融合蛋白及其制备方法和使用方法, 所述TIM-4融合蛋白由与人抗CD3 scFv连接的TIM-4结构域构成。

[0019] 融合蛋白与构建体:

[0020] 本发明的一个方面提供了一种重组TIM-4融合蛋白, 其包含任选地通过接头连接至CD3特异性单链可变片段 (scFv) 的TIM-4结构域。如本文所用, “融合蛋白”也可以称为嵌合蛋白, 是通过结合两个或更多个最初编码不同蛋白的基因或其部分而产生的蛋白。融合基因的翻译产生一种或多种多肽, 这些多肽具有源自每种原始蛋白质的功能特性。融合蛋白可以通过染色体之间的DNA转移而在体内产生, 或者通过组合基因或基因的部分从而形成框内编码来自相同或不同生物体的两种多肽的单个转录物来以重组方式制备。

[0021] T细胞膜蛋白4或TIM-4 (也可以称为T细胞膜蛋白4或T细胞免疫球蛋白和含有粘蛋白结构域的蛋白4) 是一种在人中由TIMD4基因编码的蛋白质。Tim-4是在多种免疫细胞和巨噬细胞亚群上表达的磷脂酰丝氨酸 (PS) 受体。PS是一种通常存在于质膜面向细胞质一侧 (在此处, 它对免疫系统总是不可见的) 的磷脂。细胞应激会导致保持PS面向内部的过程失调, 反而促进了PS暴露于细胞表面。肿瘤细胞常常会失去调控其质膜的能力并在其表面呈现出可检测水平的PS, 如正在经历细胞凋亡的正常细胞所可能的那样。当暴露于细胞表面时, PS可以对免疫系统产生耐受效应 (tolerizing effect)。尽管PS暴露因此可以是肿瘤适应性的 (tumor-adaptive), 但是它也给肿瘤留下了可以以免疫学方式或其他方式靶向的“致命弱点”。例如, TIM家族蛋白以不同的亲和力结合PS, 最强的结合物是TIM-4。

[0022] 本公开的重组TIM-4融合蛋白包含TIM-4结构域, 该TIM-4结构域包含SEQ ID NO:3或与SEQ ID NO:3具有95%同一性且能结合PS的序列。可以通过接头使重组TIM-4融合蛋白连接至CD3特异性scFv。肽接头是一种可以被添加来连接蛋白质结构域的短肽序列。接头通常由如甘氨酸和丝氨酸等柔性残基构成, 使得相邻的蛋白质结构域可以相对于彼此自由移动。接头的长度和内容可以根据需要而发生变化。在一些实施方式中, 接头可以包含甘氨酸和/或丝氨酸氨基酸的组合。接头可以包含SEQ ID NO:4或任意数量的SEQ ID NO:4或其各部分的连续重复。在实施例中使用SEQ ID NO:4的接头来产生图3B所示的TIM4融合蛋白。因此, SEQ ID NO:4可以用于将SEQ ID NO:3的TIM4结构域连接到CD3 scFv上, 以产生专门用于人的TIM4融合蛋白。

[0023] CD3 (分化簇3) 是一种蛋白复合物和T细胞共受体, 其参与活化细胞毒性T细胞 (CD8

+初始T细胞)和辅助T细胞(CD4+初始T细胞)。它由四条不同的链构成。在哺乳动物中,该复合物含有一条CD3 γ 链、一条CD3 δ 链和两条CD3 ϵ 链。这些链与T细胞受体(TCR)和CD3- ζ (ζ 链)缔合,以在T淋巴细胞中产生活化信号。本公开的重组TIM-4融合蛋白可以通过接头与CD3特异性单链可变片段(scFv)连接。scFv是免疫球蛋白的重链(VH)和轻链(VL)的可变区用短接头连在一起的融合蛋白。CD3特异性scFv可以包含SEQ ID NO:22(VH CDR1)、SEQ ID NO:23(VH CDR2)、SEQ ID NO:24(VH CDR3)、SEQ ID NO:25(VL CDR1)、SEQ ID NO:26(VL CDR2)和SEQ ID NO:27(VL CDR3)的互补决定区(CDR)或与SEQ ID NO:22-27具有至少95%同一性的序列。本公开的抗CD3 scFv可以包含SEQ ID NO:5或与SEQ ID NO:5具有至少95%同一性的序列。CD3特异性scFv能够通过CD3结合并活化T细胞。

[0024] TIM-4融合蛋白可以进一步包含N端信号序列。N端信号序列可以包含分泌信号序列。分泌信号序列或肽包含存在于蛋白质N端的短肽,这些蛋白质被导向分泌途径。这些蛋白质包括驻留在某些细胞器内、从细胞分泌出来或插入到细胞膜中的蛋白质。可以从融合蛋白中去除或切除信号序列。因此,当作为蛋白质施用, TIM4融合蛋白通常会缺少信号序列,但是可能需要信号序列来实现蛋白质的充分表达和分泌。编码蛋白质的核苷酸序列将通常编码信号序列。在一些实施方式中,分泌信号序列包括SEQ ID NO:2的信号序列或与SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的序列。信号序列的长度通常为15-22个氨基酸,并且本领域的技术人员应当认识到的是,可以去除一个信号序列并用另一个信号序列来代替其位置。

[0025] 本文提供的融合蛋白可以另外包含标签。出于多种目的,标签可以附接于蛋白质上。标签可以包括本领域中任何已知的标签,并且可以用于融合蛋白的纯化、追踪或成像目的。标签的类型可以包括亲和标签、增溶标签、层析标签、表位标签、荧光标签或酶促修饰标签。在一些实施方式中,标签可以包括His标签、FLAG标签、荧光标签以及Myc标签。在实施例中,采用了His标签。

[0026] 融合蛋白可以包含TIM4结构域、接头以及CD3 scFv。TIM4结构域和CD3 scFv可以相对于彼此以任何顺序存在。例如,TIM4结构域可以在融合蛋白的N端,而CD3 scFv可以在C端。可替代地,CD3 scFv可以在N端,而TIM4结构域可以在C端。例如,融合蛋白可以包含SEQ ID NO:3、4和5或与SEQ ID NO:3、4和5具有至少95%同一性的序列,其中SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:5以相对于彼此的任何顺序通过SEQ ID NO:4连接。融合蛋白可以包含SEQ ID NO:2、3、4和5或与SEQ ID NO:2、3、4和5具有至少95%同一性的序列。融合蛋白可以包含SEQ ID NO:1。融合蛋白可以包含与SEQ ID NO:3、4和5具有至少95%同一性的序列和标签、或者与SEQ ID NO:2、3、4和5具有至少95%同一性的序列和标签、或者与SEQ ID NO:1具有至少95%同一性的序列和标签。

[0027] 在替选的实施方式中,重组TIM-4融合蛋白可以包含PS特异性抗体部分或scFv。在一些实施方式中,抗体部分特异性结合细胞表面上存在的PS。当PS存在于细胞表面时,TIM4或其他能够结合PS的区域会特异性结合PS。TIM4结构域或能够结合PS的区域不会显著结合通常在其表面不表达PS的正常健康细胞。当细胞是其中PS未被恰当调控而是存在于细胞膜的细胞外侧的癌细胞时,融合蛋白的TIM4区域能够结合该细胞。PS定位失调的癌细胞可能存在于实体瘤中,如转移性癌细胞中。

[0028] TIM-4融合蛋白可以包含CD3特异性scFv或另一CD3特异性抗原结合片段。例如,选

自由Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv片段、二硫键稳定化Fv片段(dsFv)和单链抗体分子(scFv)组成的组的抗原结合片段。在一些实施方式中,重组TIM-4融合蛋白包含CD3特异性scFv。在一些实施方式中,CD3特异性scFv包含SEQ ID NO:22(VH CDR1)、SEQ ID NO:23(VH CDR2)、SEQ ID NO:24(VH CDR3)、SEQ ID NO:25(VL CDR1)、SEQ ID NO:26(VL CDR2)和SEQ ID NO:27(VL CDR3)的互补决定区(CDR)。在一些实施方式中,CD3特异性scFv包含SEQ ID NO:5。重组TIM-4融合蛋白可以是人的、人源化的或半合成的重组TIM-4融合蛋白。

[0029] 本公开提供了药物组合物,其包含一种或更多种本文所述的组合物或融合蛋白以及合适的载体、赋形剂或稀释剂。载体、赋形剂或稀释剂的确切性质将取决于组合物的预期应用,并且可以适用于兽医应用或为兽医应用可接受的、适用于人类应用或为人类应用可接受的。组合物可以任选地包含一种或更多种额外的化合物。

[0030] 当用于治疗或预防疾病(比如癌症)或疾病症状时,本文所述的组合物可以单独施用、作为一种或更多种化合物的混合物施用或者与可用于治疗这些疾病和/或与这些疾病相关的症状的其他药剂(例如,治疗剂)混合或组合施用。化合物可以以化合物(即蛋白质)本身的形式施用或者作为包含化合物的药物组合物的形式施用。

[0031] 可以通过常规的混合、溶解、制粒、糖衣丸制备、研磨、乳化、胶囊制备、包埋或冻干工艺来制备包含组合物的药物组合物。可以使用有助于将组合物加工成可药用配制物的一种或更多种生理上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或助剂以常规方式配制组合物。药物组合物可以采取适合几乎任何给药方式的形式(例如包括局部给药、眼部给药、经口给药、口腔含化给药、全身给药、经鼻给药、注射给药、经皮给药、直肠给药、阴道给药等)或者适合吸入或吹入给药的形式。

[0032] 本文所述的组合物将通常以有效实现预期结果的量(例如,以有效治疗或预防癌症的量)使用。治疗效益是指被治疗的潜在疾病得到根除或改善和/或与潜在疾病相关的一种或更多种症状得到根除或改善,使得患者报告感觉或状况有所改善,尽管患者可能仍然承受着该潜在疾病的折磨。治疗效益通常还包括中断或减缓疾病的发展,不管是否实现了改善。癌症治疗包括但不限于减少受试者中癌细胞的数量或肿瘤的大小、减缓癌症向更具侵袭性形式的发展、减少癌细胞的增殖或降低肿瘤生长的速度、杀死癌细胞、减少癌细胞的转移或者降低受试者中癌症复发的可能性。如本文所采用的对受试者的治疗是指给患有疾病或处于患病风险的受试者带来效益的任何治疗类型,包括改善受试者的状况(例如,一种或更多种症状)、延缓疾病的发展、延缓症状的发作或者减缓症状的发展等。

[0033] 组合物的施用量将取决于多种因素,例如包括被治疗的特定适应症、给药方式、预期效益是预防性的还是治疗性的、被治疗的适应症的严重程度和患者的年龄和体重、特定组合物的生物利用度、在所选给药途径下的转化率和递送效率等。

[0034] 本领域的技术人员完全有能力确定针对特定应用和给药方式的有效剂量。可以根据体外活性和代谢测定初步估算有效剂量。例如,可以配制用于动物的初始剂量,以使组合物的循环血液或血清浓度达到或高于在体外测定中测量的特定组合物的IC₅₀。技术人员完全有能力在考虑特定组合物通过期望给药途径的生物利用度的情况下计算出达到这种循环血液或血清浓度的剂量。还可以根据体内数据(比如动物模型)估算初始剂量。用于测试活性代谢物治疗或预防上述各种疾病的功效的动物模型是本领域公知的。适于测试组合物的生物利用度和/或代谢的动物模型也是公知的。普通技术人员可以常规地修改这些信息,

以确定适合施用给人类的剂量。

[0035] 剂量通常在约0.0001mg/kg/天、0.001mg/kg/天或0.01mg/kg/天至约100mg/kg/天的范围内,但可以更高或更低,这取决于活性组合物的活性、组合物的生物利用度、其代谢动力学和其他药代动力学特性、给药方式和上文讨论的多种其他因素,等等。可以单独调整剂量和给药间隔,以提供足以维持治疗或预防效果的血浆水平。例如,组合物可以每周施用一次、每周施用数次(例如,每隔一天)、每天施用一次或每天施用多次,这取决于给药方式、被治疗的特定适应症和处方医生的判断,等等。在局部给药或选择性摄取(比如局部外用给药)的情况下,组合物的有效局部浓度可能与血浆浓度无关。技术人员无需过多的实验就能优化有效剂量。

[0036] 施用给个体(比如人)的重组TIM-4融合蛋白的剂量可以随着特定组合物、给药方式和被治疗的疾病类型而变化。在一些实施方式中,组合物的量有效地产生了客观响应(比如部分响应或完全响应)。在一些实施方式中,组合物中重组TIM-4融合蛋白的量包括在例如约0.001pg至约1000pg的范围内。在任一上述方面的一些实施方式中,组合物中重组TIM-4融合蛋白的有效量在约0.1pg/kg总体重至约100mg/kg总体重的范围内。

[0037] 可以通过多种途径向个体(比如人)施用重组TIM-4融合蛋白,所述途径例如包括静脉内、动脉内、腹膜内、肺内、口服、吸入、囊内、肌内、气管内、皮下、皮内、眼内、鞘内、经粘膜和经皮途径。在一些实施方式中,可以使用组合物的持续释放配制物。

[0038] 在一些实施方式中,提供了一种构建体,其包含编码本文所述的任何重组TIM-4融合蛋白的多核苷酸序列。术语“构建体”或“多核苷酸构建体”是一种多核苷酸(DNA或RNA),其允许编码序列在靶细胞中复制和/或表达。构建体可以含有外源启动子,其可操作地连接至本文所述的任何一种多核苷酸。如本文所用,当多核苷酸与第二种多核苷酸序列处于功能关系时,该多核苷酸是“可操作地相连的”或“可操作地连接的”。术语“可操作地连接”是指调控序列与异源核酸序列之间的功能性连接,其引起后者的表达。例如,当第一核酸序列与第二核酸序列处于功能关系时,该第一核酸序列与该第二核酸序列可操作地连接。例如,如果启动子影响编码序列的转录或表达,则该启动子可操作地连接至该编码序列。通常,可操作连接的DNA序列是连续的,并且在需要将两个蛋白质编码区域结合起来时位于同一阅读框内。

[0039] 如本文所用,术语“异源启动子”、“启动子”、“启动子区”或“启动子序列”通常是指基因的转录调控区,其可以存在于本文所述的多核苷酸的5'或3'侧或者所述多核苷酸的编码区内。通常,启动子是一种DNA调控区,其能够结合细胞中的RNA聚合酶并启动下游(3'方向)编码序列的转录。典型的5'启动子序列在其3'端以转录起始位点为界且向上游(5'方向)延伸,从而包含启动高于背景的可检测水平的转录所需的最少数量的碱基或元件。启动子序列内是转录起始位点(其可通过用核酸酶S1作图而方便地定义)以及负责结合RNA聚合酶的蛋白结合结构域(共有序列)。

[0040] 在一些实施方式中,构建体处于表达构建体、载体或病毒载体中。载体是用作人工携带外来核酸序列(通常是DNA)进入另一个细胞的媒介物的任何颗粒,在该细胞中它可以被复制和/或表达。含有外来DNA的载体称为重组DNA。四种主要的载体类型是质粒、病毒载体、粘粒和人工染色体。表达构建体包含异源启动子和编码目的蛋白质(例如,重组TIM-4、CD3 scFv)的核酸序列,其能够在被引入的细胞中表达。表达构建体包括能够指导与其可操

作连接的外源基因表达的载体。这类载体在本文中被称为“重组构建体”、“表达构建体”和“重组表达载体”(或简称为“表达载体”或“载体”),并且可以互换使用。合适的载体在本领域中是已知的,并且含有必要的元件,以便载体内编码的基因在宿主细胞中被表达为蛋白质。术语“载体”是指能够转运与其连接的另一个核酸的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”,其是指另外的DNA区段(尤其是编码突变 α -gal蛋白的外源DNA区段)可以连接到其中的环状双链DNA环。另一种类型的载体是病毒载体,其中另外的DNA区段可以连接到病毒基因组中。将病毒载体结合到病毒颗粒中,然后利用这些病毒颗粒来将编码目的蛋白质的病毒多核苷酸转运到靶细胞中。某些载体能够在其所被引入的宿主细胞中自主复制。另一些载体(例如,慢病毒载体)可以在引入到宿主细胞中之后整合到宿主细胞的基因组中,从而与宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够指导与其可操作连接的外源基因的表达。通常,在重组DNA技术中有用的载体往往是质粒形式。在本说明书中,“载体”包括表达载体,比如病毒载体(例如,复制缺陷型逆转录酶病毒(包括慢病毒)、腺病毒和腺相关病毒(AAV)),它们具有等效功能。

[0041] 载体是含有来自两种或更多种不同来源的序列的异质外源构建体。合适的载体包括但不限于质粒、表达载体、慢病毒(慢病毒载体)、腺相关病毒载体(rAAV)等,并且包括能够在细胞中表达目的蛋白质的构建体。优选的载体是慢病毒载体或腺相关载体。合适的病毒颗粒制备方法在本领域中已知能够转化细胞,以便在细胞中表达目的蛋白质。这些细胞可以是T细胞,并且可以是自体T细胞或CAR T细胞,下文将对此进行更全面的描述。CAR T细胞可以是能够靶向癌症的CAR T细胞,比如可以包含SEQ ID NO:10的EGFR vIIIICAR T细胞或者可以包含SEQ ID NO:17的D2C7CAR T细胞。本领域的技术人员可以确定可与本文提供的TIM4融合蛋白和编码TIM4融合蛋白的构建体结合使用的其他CAR T细胞。

[0042] 可用于实践本发明的异源启动子包括但不限于组成型启动子、诱导型启动子、时间调控型启动子、发育调控型启动子、化学调控型启动子、组织优先型启动子、组织特异性启动子以及细胞类型特异性启动子。异源启动子可以是植物启动子、动物启动子、细菌启动子、真菌启动子或合成启动子。合适的启动子是已知的且在本领域中有所描述。在哺乳动物细胞中,典型的启动子包括但不限于劳斯氏肉瘤病毒(RSV)、人类免疫缺陷病毒(HIV-1)、巨细胞病毒(CMV)、SV40病毒的启动子以及翻译延伸因子EF-1 α 启动子或泛素启动子。

[0043] 在一些实施方式中,包含编码本文所述的任何重组TIM-4融合蛋白的多核苷酸序列的构建体可以进一步包含编码嵌合抗原受体(CAR)的序列。CAR和TIM4融合蛋白可以利用不同启动子来表达,或者如下文所述可以利用单个启动子来表达,并且可以处于单个构建体或表达载体上或者处于分别的构建体或表达载体上,以转染或被引入T细胞中。本文所用的术语“嵌合抗原受体”或“嵌合受体”或“CAR”或“CARs”是指这样的多肽:其对期望的靶标具有预定结合特异性,并且可操作地连接(例如,作为融合体或作为由一个或更多个二硫键连接的单独链等)至T细胞活化结构域的胞内部分。更具体地,CAR是工程化的受体,其在被表达时将抗原特异性移植到细胞毒性细胞上(例如,T细胞、NK细胞或巨噬细胞)。例如,CAR蛋白被工程化以赋予T细胞靶向特定蛋白质的新能力。本发明的CAR可以包含具有至少一个抗原特异性靶向区域的胞外结构域、跨膜结构域(TM)以及包含一个或更多个共刺激结构域(CSD)的胞内结构域(ID)的组合,该组合并非天然地一同存在于单一蛋白质上。这尤其包括其中胞外结构域和胞质结构域并非天然地一同存在于单一受体蛋白质上的受体。此外,嵌

合受体不同于在天然T细胞淋巴细胞中表达的TCR。

[0044] 本文所用的术语“CAR-T细胞”是指T细胞或其群体,其已经通过分子生物学方法进行了修饰,以在T细胞表面上表达嵌合抗原受体(CAR)。CAR是这样的多肽,其对被表达的期望靶标具有预定的结合特异性,并且可操作地连接(例如,作为融合体或作为由一个或更多个二硫键连接的单独链等)至T细胞活化结构域的胞内部分。通过绕过MHC I类和II类限制,CD8⁺和CD4⁺亚群二者的CAR工程化T细胞可以被募集用于重定向的靶细胞识别。最常见的CAR是免疫球蛋白结合功能性(例如,作为来源于单克隆抗体的单链可变片段(scFv))与CD3- ζ (CD3 ζ)跨膜和胞内域的融合物。这类分子会响应于通过免疫球蛋白结合功能性进行的靶标识别而引起 ζ 信号的传输。然而,还存在许多替选。例如,来自天然T细胞受体(TCR) α 和 β 单链的抗原识别结构域可以用作结合功能性。可替选地,可以采用受体胞外域(例如,CD4胞外域)或细胞因子(其会导致识别带有同源细胞因子受体的细胞)。对结合功能性的所有要求是,其以特异性方式、以高亲和力结合给定的靶标。

[0045] 跨膜结构域可以衍生自天然来源或合成来源。如果来源是天然的,则该结构域可以衍生自任何膜结合蛋白质或跨膜蛋白质。尤其用于本发明的跨膜区可以衍生自T细胞受体的a、b、d或g链、CD28、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137或CD154(即,至少包含其一个或多个跨膜区)。在一些实施方式中,跨膜结构域可以是合成的,在这种情况下,跨膜结构域可以主要包含疏水性残基,比如亮氨酸和缬氨酸。在一些实施方式中,苯基丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体可以存在于合成跨膜结构域的每一端。在一些实施方式中,长度例如为约2个至约10个(比如约2、3、4、5、6、7、8、9或10个中的任意数量)氨基酸的短寡肽或多肽接头可以形成本文提供的CAR的跨膜结构域与胞内信号传导结构域之间的连接。在一些实施方式中,接头是甘氨酸-丝氨酸双联体。

[0046] 本文提供的CAR-T细胞的胞内信号传导结构域负责激活免疫细胞(其中已经放置了本文提供的CAR-T细胞)的至少一种正常效应子功能。例如,T细胞的效应子功能可以是细胞溶解活性或辅助活性,包括细胞因子的分泌。因此,术语“胞内信号传导结构域”是指蛋白质中转导效应子功能信号并指导细胞执行特化功能的部分。尽管通常可以采用整个胞内信号传导结构域,但是在许多情况下没有必要使用整条链。就使用胞内信号传导结构域的截短部分而言,这种截短部分可用于替代完整链,只要它能转导效应子功能信号即可。因此,术语“胞内信号传导序列”意味着包含胞内信号传导结构域中足以转导效应子功能信号的任何截短部分。

[0047] 用于根据本公开的CAR-T细胞的胞内信号传导结构域的实例包括T细胞受体(TCR)和辅助受体的细胞质序列(其协同发挥作用来在抗原受体接合后启动信号转导)以及这些序列的任何衍生物或变体和具有相同功能能力的任何合成序列。

[0048] 本公开可以包括一种CAR-T细胞,其包含本文所述的任何重组TIM-4融合蛋白和具有任意特异性的CAR的构建体。因此,TIM-4重组融合蛋白可以与期望靶向PS的任何CAR组合使用。本文所述的任何重组TIM-4融合蛋白可以与CAR在一种或更多种构建体中组合。当重组TIM-4融合蛋白包含在具有CAR的单个构建体中时,该重组TIM-4融合蛋白可以包含自切割位点,比如2A自切割肽。与TIM-4融合蛋白结合的CAR可以包含胞外结构域,该结构域包含与野生型EGFR和EGFR VIII变体之一或两者结合的抗原结合区。胞外抗原结合区可以包含SEQ ID NO:10的scFv或与SEQ ID NO:10具有至少95%同一性的序列或者SEQ ID NO:17的

scFv或与SEQ ID NO:17具有至少95%同一性的序列。在一些实施方式中,CAR和TIM-4融合蛋白通过自切割位点连接。在一些实施方式中,自切割序列可以包含2A自切割肽。在一个实施方式中,2A自切割肽是SEQ ID NO:11或与SEQ ID NO:11具有至少95%同一性的序列。

[0049] 本公开可以包括一种CAR-T细胞,其包含本文所述的任何重组TIM-4融合蛋白和本文或别处所述的任何CAR的构建体。该CAR-T可以包含构建体,该构建体包含编码SEQ ID NO:10的EGFR VIIICAR、自切割位点、信号序列、SEQ ID NO:3的TIM-4结构域、接头以及SEQ ID NO:22-27的CD3特异性scFv的多核苷酸,或者其中该构建体包含编码与SEQ ID NO:10、3、22、24、25、26和27具有至少95%同一性的多肽的多核苷酸。该CAR-T可以包含构建体,该构建体包含编码SEQ ID NO:10的EGFR VIIICAR、自切割位点、信号序列、SEQ ID NO:3的TIM-4结构域、接头以及SEQ ID NO:5的CD3特异性scFv的多核苷酸,或者其中该构建体包含编码与SEQ ID NO:10、3和5具有至少95%同一性的多肽的多核苷酸。在一些实施方式中,该CAR-T可以包含构建体,该构建体包含编码SEQ ID NO:17的D2C7 CAR、自切割位点、信号序列、SEQ ID NO:3的TIM-4结构域、接头以及SEQ ID NO:22-27的CD3特异性scFv的多核苷酸,或者其中该构建体包含编码与SEQ ID NO:17、3、22、23、24、25、26和27具有至少95%同一性的多肽的多核苷酸。在一些实施方式中,该CAR-T可以包含构建体,该构建体包含编码SEQ ID NO:17的D2C7 CAR、自切割位点、信号序列、SEQ ID NO:3的TIM-4结构域、接头和SEQ ID NO:5的CD3特异性scFv的多核苷酸,或者其中该构建体包含编码与SEQ ID NO:17、3和5具有至少95%同一性的多肽的多核苷酸。这些构建体可以包含自切割位点,该自切割位点包含SEQ ID NO:11或与SEQ ID NO:11具有至少95%序列同一性的序列。这些构建体可以包含信号序列,该信号序列包含SEQ ID NO:2或与SEQ ID NO:2具有至少95%序列同一性的序列。这些构建体可以包含SEQ ID NO:4的接头。

[0050] 本公开提供了一种CAR-T细胞,其包含编码SEQ ID NO:10的CAR、SEQ ID NO:11的自切割位点、SEQ ID NO:2的信号序列、SEQ ID NO:3的TIM-4结构域、SEQ ID NO:4的接头以及SEQ ID NO:22-27的CD3特异性scFv的构建体。本公开提供了一种CAR-T细胞,其包含编码SEQ ID NO:10的CAR、SEQ ID NO:11的自切割位点、SEQ ID NO:2的信号序列、SEQ ID NO:3的TIM-4结构域、SEQ ID NO:4的接头以及SEQ ID NO:5的CD3特异性scFv的构建体。本公开提供了一种CAR-T细胞,其包含编码SEQ ID NO:17的CAR、SEQ ID NO:11的自切割位点、SEQ ID NO:2的信号序列、SEQ ID NO:3的TIM-4结构域、SEQ ID NO:4的接头以及SEQ ID NO:22-27的CD3特异性scFv的构建体。本公开提供了一种CAR-T细胞,其包含编码SEQ ID NO:17的CAR、SEQ ID NO:11的自切割位点、SEQ ID NO:2的信号序列、SEQ ID NO:3的TIM-4结构域、SEQ ID NO:4的接头以及SEQ ID NO:5的CD3特异性scFv的构建体。提供了CAR-T细胞,其包含编码SEQ ID NO:20或与SEQ ID NO:20具有至少95%序列同一性的序列的构建体。还提供了CAR-T细胞,其包含编码SEQ ID NO:21或与SEQ ID NO:21具有至少95%序列同一性的序列的构建体。

[0051] 为了评估多肽或其部分的表达,要被引入细胞的表达载体还可以含有可选择标志物基因或报告基因或两者,以便于从试图通过病毒载体转染或感染的细胞群体中鉴定和选择表达性细胞。在另一些方面中,可选择标志物可被携带在单独的DNA上,并用于共转染程序。可选择标志物和报告基因二者的侧部都可以有合适的调控序列,以实现在宿主细胞中表达。可用的可选择标志物例如包括诸如neo等抗生素抗性基因。

[0052] 报告基因用于鉴定潜在被转染的细胞和评估调控序列的功能。通常,报告基因是不存在于接收生物体或组织中或不被接受生物体或组织表达的基因,其所编码的多肽的表达可通过一些可易于检测的特性(例如,酶活性)来证实。在将DNA引入到接收细胞中后,在合适的时间测定报告基因的表达。这些报告基因还可以用作标签且可被编码为TIM4融合蛋白的一部分,并且还可以用作确保TIM4蛋白被表达的手段。合适的报告基因可以包括编码荧光素酶、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶和分泌型碱性磷酸酶的基因或者绿色荧光蛋白基因(例如,Ui-Tel等,FEBS Letters,479,2000)。这些报告基因中的几种报告基因具有拆分报告基因功能(split reporter function),其中报告基因的一部分可以被反式(in trans)提供,以显著减小标签的大小,从而实现融合蛋白的标记。这样的分裂报告基因可以从市场上购得,并且是本领域的技术人员所熟知的。合适的表达系统是众所周知的,并且可以采用已知技术制备或从市场上商购获得。通常,具有显示出最高水平报告基因表达的最小5'侧翼区的构建体被鉴定为启动子。这些启动子区域可以与报告基因连接,并可用于评估试剂调节启动子驱动的转录的能力。

[0053] 向细胞中引入基因和表达基因的方法是本领域已知的。在表达载体的情况下,可以很容易地通过本领域的任何方法将载体引入宿主细胞(例如,哺乳动物细胞、细菌细胞、酵母细胞或昆虫细胞)中。例如,可以通过物理、化学或生物手段将表达载体转移到宿主细胞中。

[0054] 用于将多核苷酸引入宿主细胞的物理方法包括磷酸钙沉淀法、脂质转染法、基因枪法、显微注射法、电穿孔法等。用于制作包含载体和/或外源核酸的细胞的方法是本领域众所周知的。例如,参见Sambrook等(2001,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,New York)。在一些实施方式中,通过磷酸钙转染法将多核苷酸引入宿主细胞中。

[0055] 用于将目的多核苷酸引入宿主细胞的生物学方法包括采用DNA和RNA载体。病毒载体(尤其是逆转录病毒载体)已经成为用于将基因插入哺乳动物(例如,人)细胞的最广泛采用的方法。其他病毒载体可以衍生自慢病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒1、腺病毒以及腺相关病毒等。例如,参见美国专利第5,350,674号和第5,585,362号。

[0056] 用于将多核苷酸引入宿主细胞的化学手段包括胶体分散系统,比如大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠以及基于脂质的系统(包括水包油乳剂、胶束、混合胶束以及脂质体)。用作体外和体内递送媒介物的示例性胶体系统是脂质体(例如,人工膜囊)。

[0057] 在使用非病毒递送系统的情况下,示例性递送媒介物是脂质体。设想了(在体外、离体或在体内)使用脂质配制物来将核酸引入宿主细胞中。在另一个方面,核酸可以与脂质缔合。与脂质缔合的核酸可以被包封在脂质体的水性内部中、散布在脂质体的脂质双层内、通过与脂质体和寡核苷酸二者均缔合的连接分子附接至脂质体、包埋在脂质体中、与脂质体复合、分散在含有脂质的溶液中、与脂质混合、与脂质结合、作为悬浮液包含在脂质中、包含在胶束中或与胶束复合或者以其他方式与脂质缔合。脂质、脂质/DNA或脂质/表达载体缔合物不限于溶液中的任何特定结构。例如,它们可以存在于双层结构中、作为胶束或以“崩塌(collapsed)”结构存在。它们还可以简单地散布在溶液中,从而可能形成大小或形状不一致的聚集体。脂质是脂肪物质,它们可以是天然存在的脂质或合成的脂质。例如,脂质包括细胞质中天然存在的脂肪滴以及含有长链脂肪烃及其衍生物(比如脂肪酸、醇、胺、氨

基醇和醛)的一类化合物。

[0058] 不管用于将外源核酸引入宿主细胞或以其他方式将细胞暴露于本发明的抑制剂的方法是怎样的,为了证实宿主细胞中存在重组DNA序列,可以进行多种测定。例如,这样的测定包括本领域的技术人员所熟知的“分子生物学”测定(比如Southern和Northern印迹法、RT-PCR和PCR);“生物化学”测定(比如,例如通过免疫学手段(ELISA和蛋白质印迹)或通过测定检测是否存在特定肽)。

[0059] 在一些实施方式中,设想了本文提供的序列变体。例如,可能期望改善抗体部分的结合亲和力和/或其他生物学特性。可以通过向编码融合蛋白的核苷酸序列中引入适当的修饰或通过肽合成来制备融合蛋白或构建体的氨基酸序列变体。例如,这样的修饰包括抗体部分的氨基酸序列中残基的缺失和/或插入和/或取代。可以进行缺失、插入和取代的任何组合来获得最终构建体,只要该最终构建体具有期望的特性(例如,抗原结合)。本文提供的组合物和序列(包括重组TIM-4融合蛋白)还可以包含物种特异性变异。例如,SEQ ID NO: 1、2、3、4、5、10和17是人序列,而SEQ ID NO: 7、8、14和17是鼠序列。根据期望的受试者物种和结果,可以采用物种特异性序列和变体。

[0060] 方法:

[0061] 本发明的第二个方面提供了一种用于治疗癌症的方法,其包括:施用治疗有效量的本文所述的任何重组TIM-4融合蛋白和药学上可接受的赋形剂、载体和/或稀释剂。

[0062] 治疗受试者中的癌症包括减少、抑制、减缓或预防癌症生长、减少肿瘤体积和/或预防、抑制、减缓或减少肿瘤转移。治疗受试者中的癌症还包括减少受试者内肿瘤细胞的数量。术语“治疗”可以由以下中的至少一项来表征:(a)减少、减缓或抑制癌症和癌细胞的生长,包括减缓或抑制转移性癌细胞的生长;(b)防止肿瘤的进一步生长;(c)减少或预防受试者内癌细胞的转移;以及(d)减少或改善至少一种癌症症状。在一些实施方式中,本领域的技术人员可以很容易地采用常规实验来确定最佳有效量。治疗的目的包括减轻或预防症状、减缓或阻止疾病、病症或病状的发展或恶化和/或减轻疾病、病症或病状。术语“有效量”或“治疗有效量”是指足以产生有益的或期望的生物学和/或临床结果的量。

[0063] 如本文所用,术语“施用”试剂(比如本文所述组合物的治疗实体)至动物或细胞意指将物质分配、递送或施用给预期靶标。就治疗剂组合物而言,术语“施用”意指通过任何合适的途径使治疗剂接触受试者或将其分配、递送或施用至受试者,以将治疗剂递送至动物中的期望位置,包括通过肠胃外或口服途径递送、肌肉注射、皮下/皮内注射、静脉内注射、鞘内给药、口腔含化给药、透皮递送、外用给药以及通过鼻内或呼吸道途径给药。

[0064] 本公开的方法可以用于治疗任何癌症及其任何转移,包括但不限于癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤以及白血病。在一些实施方式中,癌症的特征在于磷脂酰丝氨酸(PS)表达或与磷脂酰丝氨酸(PS)表达相关联(在本文中称为“PS相关癌症”)。PS是一种磷脂,其通常存在于正常细胞的内叶上。然而,凋亡细胞和非凋亡癌细胞(比如恶性黑色素瘤、白血病、成神经细胞瘤和胃癌)已表现出在其表面上广泛表达PS。暴露在肿瘤细胞表面上的PS有助于抑制T细胞活性并阻断肿瘤清除。在一些实施方式中,癌症包括在细胞表面上具有PS的癌症。在一些实施方式中,癌症包括EGFR相关癌症,即与EGFR表达相关联的癌症。这些癌症的合适实例包括但不限于乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、宫颈癌、胃肠癌、胰腺癌、成胶质细胞瘤、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、结直肠癌、宫颈癌、子宫内

膜癌、唾液腺癌、间皮瘤、肾癌、外阴癌、胰腺癌、甲状腺癌、肝癌、皮肤癌、黑色素瘤、脑癌、成神经细胞瘤、骨髓瘤、各种类型的头颈癌、急性淋巴细胞白血病、急性髓系白血病、尤文肉瘤以及外周神经上皮瘤。在一些实施方式中,癌症包括成胶质细胞瘤。

[0065] 在一些实施方式中,该方法进一步包括施用效应细胞(尤其是T淋巴细胞),其中T淋巴细胞在与TIM-4融合蛋白结合时被活化。T淋巴细胞可以是自体或异体T淋巴细胞,或者是来自干细胞或多能细胞的分化T细胞。T淋巴细胞可能对靶标或抗原是非特异性的。可用于本公开的示例性效应细胞包括但不限于树突状细胞(包括未成熟树突状细胞和成熟树突状细胞)、T淋巴细胞(比如初始T细胞、效应T细胞、记忆T细胞、细胞毒性T淋巴细胞、T辅助细胞、天然杀伤T细胞、调节性T细胞、肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)和淋巴因子活化的杀伤(LAK)细胞)、B细胞、天然杀伤(NK)细胞、单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、粒细胞及其组合。可以通过本领域已知的一种或更多种细胞表面标志物(例如,CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD11c、CD123、CD56、CD34、CD14、CD33等)的存在与否来定义效应细胞亚群。

[0066] T细胞活化是指成熟T细胞能够在其表面上表达抗原特异性T细胞受体来识别其同源抗原并通过进入细胞周期、克隆扩增和分化、分泌细胞因子或裂解酶以及启动免疫系统基于细胞的功能来做出反应的过程。细胞因子的释放是T细胞活化和功效的结果。优选的是,活化T细胞的至少一部分产生一种或更多种细胞因子,比如选自IL-1、IL-1、IL-2、IL-4、IFN-、IL-10、IL-12、TNF-和GM-CSF的细胞因子。此外,活化T细胞的至少一部分优选地表达一种或更多种表面标志物,这些表面标志物选自CD2、CD28、CTLA4、CD40配体(gp39)、CD18、CD25、CD69、CD16/CD56、MHC I类、MHC II类、CD8、CD4、CD3/TcR、CD54、LFA-1和VLA-4。可以在给药前以本领域已知的任何方式活化T细胞。T淋巴细胞还可以在TIM-4融合蛋白结合时变为活化的或被特异性活化。T淋巴细胞可以结合TIM-4融合蛋白的scFv抗CD3结构域。T淋巴细胞可以是CAR T细胞。CAR T细胞可以包含SEQ ID NO:10的EGFR VIIICAR或SEQ ID NO:17的D2C7 CAR或与SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:17具有至少95%同一性的序列。

[0067] 在一些实施方式中,重组TIM-4融合蛋白可以与T淋巴细胞或CAR-T细胞分开施用。在一些实施方式中,重组TIM-4融合蛋白可以与T淋巴细胞一起施用和/或在施用包括CAR-T细胞。可以在施用T淋巴细胞、CAR-T细胞或任何其他癌症疗法(包括其他免疫疗法、化疗、放疗、手术或任何其他标准治疗癌症疗法)之前、同时或之后施用本公开的重组TIM-4融合蛋白。本公开的重组TIM-4融合蛋白可以与具有任何特异性的CAR-T细胞一起施用。

[0068] 本公开的一些实施方式提供了一种用于治疗癌症的方法,其包括:施用治疗有效量的本文所述的任何CAR-T细胞和药学上可接受的赋形剂、载体和/或稀释剂。在一些实施方式中,癌症是PS相关癌症或EGFR相关癌症,包括本文所述的那些癌症。本公开的一些实施方式提供了一种用于治疗癌症的方法,其包括:施用包含本文所述的任何构建体的细胞。在一些实施方式中,癌症是PS相关癌症或EGFR相关癌症,包括本文所述的那些癌症。

[0069] 本公开的另一个方面提供了一种诊断癌症的方法,其包括本文提供的任何TIM-4融合蛋白,检测怀疑患有癌症的受试者中标签的存在或积累,其中该标签允许通过接触来自受试者的细胞来在体内或体外检测癌症。医学诊断是确定哪种疾病或病状可以解释一个人的症状和体征的过程。癌症可以是PS相关癌症或EGFR相关癌症,包括本文所述的那些癌症。

[0070] 在一些实施方式中,本公开证明了一种在患有癌症的受试者中诱导T细胞反应的

方法,其包括:向受试者施用治疗有效量的本文所述的任何融合蛋白或药物组合物,其中对癌症的抗肿瘤反应被诱导。

[0071] 本公开的另一个实施方式提供了一种在患有癌症的受试者中诱导T细胞反应的方法,其包括:向受试者施用治疗有效量的本文所述的任何CAR-T细胞,其中对癌症的抗肿瘤反应被诱导。

[0072] 附加定义

[0073] 除非上下文另有规定或说明,否则没有数量词修饰的名词意指“一个/种或更多个/种”。例如,“分子”应当被理解为意指“一个/种或更多个/种分子”。

[0074] 如本文所用,“about (约)”、“approximately (大约)”、“substantially (基本上)”和“significantly (显著地)”应当被本领域的普通技术人员所理解,并且应当根据使用它们的上下文而在一定程度上变化。如果术语的使用对于本领域的普通技术人员来说在使用其的上下文中是不清楚的,则“about (约)”和“approximately (大约)”将意味着特定术语的正或负 $\leq 10\%$,并且“substantially (基本上)”和“significantly (显著地)”将意味着特定术语的正或负 $> 10\%$ 。

[0075] 如本文所用,术语“include (包括/包含/含有)”和“including (包括/包含/含有)”与术语“comprise (包括/包含/含有)”和“comprising (包括/包含/含有)”具有相同的含义。术语“comprise (包括/包含/含有)”和“comprising (包括/包含/含有)”应当被理解为是“open (开放性的)”过渡术语,其允许除了权利要求书中列举的那些组分之外还包括另外的组分。术语“consist (由……组成)”和“consisting of (由...组成)”应当被理解为“closed (封闭性的)”过渡术语,其不允许除了权利要求书中列举的组分之外包括另外的组分。术语“consisting essentially of (基本上由...组成)”应当被理解为是部分封闭性的且只允许包括不会从根本上改变所要求保护的主题的性质的另外的组件。

[0076] 如本文所用,当涉及配体/受体、核酸/互补核酸、抗体/抗原或其他结合对(例如,细胞因子与细胞因子受体)时,术语“specifically (特异性地)”或“selectively (选择性地)”结合指示了一种结合反应,该结合反应决定了在蛋白质和其他生物制剂的异质群体中存在该蛋白质。因此,在指定的条件下,指定的配体与特定的受体结合,并且不会与样品中存在的其他蛋白质有显著量的结合。例如,特异性结合还可以指,所设想的方法中的结合化合物、核酸配体、抗体或衍生自抗体的抗原结合位点的结合组合物与其靶标的结合亲和力通常比与任何其他结合化合物的亲和力大至少25% (更通常大至少50%,最通常大至少100% (2倍),通常大至少10倍,更通常大至少20倍,最通常大至少100倍)。

[0077] “序列同一性百分比”或“相似性百分比”通过比较窗口内比较两个最佳对齐的序列来确定,其中与参考序列(不包含添加或缺失)相比,比较窗口内的多核苷酸或肽序列的一部分可以包含添加或缺失(即,空缺),以实现两个序列的最佳对齐。通过以下方式来计算百分比:确定在两个序列中出现相同核酸碱基或氨基酸残基的位置的数量,得到匹配位置的数量;用匹配位置的数量除以比较窗口中位置的总数;并且将结果乘以100,得到序列同一性的百分比。

[0078] 术语多核苷酸或肽序列的“substantial identity (基本相同/基本上具有同一性)”或“substantial similarity (基本相似/基本上具有相似性)”是指多核苷酸或肽包含具有至少75%序列同一性的序列。可替代地,同一性百分比可以是75%至100%之间的任何

整数。与采用本文所述程序(优选为采用所述的标准参数的BLAST)的参考序列相比,更优选的实施方式至少包括:75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。通过考虑密码子简并性、氨基酸相似性、阅读框定位等,可以适当调整这些值来确定由两个核苷酸序列编码的蛋白质的对应同一性。

[0079] 除非本文另有说明或与上下文有明显的矛盾,否则本文所述的所有方法可以以任何合适的顺序执行。除非另外提出要求,否则本文提供的任何和所有实例或示例性语言(例如,“比如”)的使用仅仅是为了更好地说明本发明,而不是对本发明的范围构成限制。说明书中的任何语言都不应被理解为表示任何未要求保护的要素对于本发明的实践是必要的。治疗人体的方法可以修改为第二医药用途或其他相关的权利要求格式,并且包括本文提供的组合物在制备用于治疗癌症或诊断癌症的药物中的用途。

[0080] 本公开不限于本文阐述的构造、组件布置或方法步骤的具体细节。本文公开的组合物和方法能够以各种方式(根据以下公开内容,这些方式对于本领域的技术人员来说将是显然的)制备、实践、使用、实施和/或形成。本文所用的措辞和术语仅仅是为了描述目的,而不应被认为是对权利要求书的范围的限制。在说明书和权利要求书中用于指示各种结构或方法步骤的顺序指示词(比如第一、第二和第三)并不意味着被解释为指示任何特定结构或步骤或者这些结构或步骤的任何特定顺序或配置。除非本文另有说明或与上下文有明显的矛盾,否则本文所述的所有方法可以以任何合适的顺序执行。除非另外提出要求,否则本文提供的任何和所有实例或示例性语言(例如,“比如”)的使用仅仅是为了便于公开,而并不意味着对本公开的范围的任何限制。说明书中的任何语言和附图中示出的任何结构都不应被解释为表示任何未要求保护的要素对于实施所公开的主题而言是必要的。本文中的“including(包括/包含/含有)”、“comprising(包括/包含/含有)”或“having(具有)”及其变体的使用意在涵盖其后列出的要素及其等效物以及附加要素。被叙述为“including(包括/包含/含有)”、“comprising(包括/包含/含有)”或“having(具有)”某些要素的实施方式也被构想为“consisting essentially of those certain elements(基本上由那些特定要素组成)”和“consisting of those certain elements(由那些特定要素组成)”。

[0081] 除非本文中另有说明,否则本文中数值范围的叙述仅旨在用作单独提及落入该范围内的每个单独数值的速写方法,并且每个单独数值都并入说明书中,如同其在本文中被单独叙述一样。例如,如果浓度范围被陈述为1%至50%,则意味着在本说明书中明确列举了诸如2%至40%、10%至30%或1%至3%等数值。这些仅仅是具体预期数值的实例,并且在所列举的最低数值和最高数值之间且包括最低数值和最高数值的所有可能的数值组合都被认为在本公开中有明确陈述。采用“约”一词来描述所记载的特定量或量的范围意在指示非常接近所记载的量的数值(比如由于制造公差、形成测量结果时产生的仪器误差和人为误差等而可能或自然会被考虑的数值)包括在该量中。除非另有说明,否则所有涉及量的百分比都是重量百分比。

[0082] 未承认任何参考文献(包括本说明书中引用的任何非专利或专利文献)构成了现有技术。尤其是,应当理解的是,除非另有说明,否则本文中对任何文献的引用并不代表承认这些文献中的任何一个构成美国或任何其他国家的本领域公知常识的一部分。对参考文献的任何讨论都陈述了其作者的主张,并且申请人保留对本文引用的任何文献的准确性和相关性提出质疑的权利。除非另有明确说明,否则本文引用的所有参考文献都通过引用完

全并入本文。如果在所引用的参考文献中出现的任何定义和/或描述之间存在任何差异,应以本公开为准。

[0083] 以下实施例仅是说明性的,而并非意味着是对本发明或所附权利要求的范围的限制。

[0084] 实施例

[0085] 在以下实施例中,发明人描述了重组TIM-4融合蛋白及其使用方法。

[0086] 为了验证用TIM-4靶向PS的策略,最初试图确定TIM-4与多种鼠和人肿瘤细胞系结合的程度。对于这些研究,采用了具有别藻蓝蛋白(APC)的荧光标记的重组TIM-4,以通过流式细胞术检测TIM-4的结合。与未染色的对照品相比,TIM-4实际上结合了所有被测肿瘤细胞系(图1)。这些肿瘤细胞系包括鼠CT-2A和SMA-560神经胶质瘤、鼠B16F10黑色素瘤、鼠Lewis肺癌(LLC)和人U87神经胶质瘤。值得注意的是,TIM-4结合与膜联蛋白V(一种已知的PS结合物)重叠,表明TIM-4确实在结合肿瘤细胞上的PS(数据未显示)。这些数据证明,TIM-4是多种癌症类型的可行靶向部分。

[0087] 任何靶向治疗都会涉及到的一种风险是毒性。PS暴露不限于肿瘤细胞,也可存在于血小板、活化T细胞和凋亡细胞中。因此,重组TIM-4可能潜在地诱导非肿瘤(off-tumor)靶向(on-target)毒性。为了限制这些毒性,利用放射来增加肿瘤细胞表面上的PS暴露。这增加了靶标负载,从而理想地使重组TIM-4融合蛋白实现了更多的肿瘤特异性杀伤。为了对此进行测试,首先在体外以10Gy的剂量照射CT-2A肿瘤细胞,然后将这些细胞接种到烧瓶中。24小时后,从培养物中取出细胞,并且用APC缀合的TIM-4对这些细胞进行染色。与未经照射的肿瘤细胞相比,经过照射的肿瘤细胞中TIM-4结合的平均荧光强度(MFI)明显更高,表明照射后的PS暴露得以增强(图2A)。接下来,试图确定体内肿瘤照射后的PS暴露和TIM-4结合是否增加。为了对此进行测试,将CT-2A移植到C57BL/6小鼠的颅内。14天后,小鼠接受10Gy全身照射,或者不进行照射。48小时后,收获并分离肿瘤,并且用APC缀合的TIM-4对这些肿瘤进行染色。与体外观察结果类似,照射后肿瘤细胞上的TIM-4结合和PS暴露增加了(图2B,C)。这些数据证明,作为癌症治疗主要手段的放射增强了PS暴露,因此应当与根据本公开的TIM-4靶向策略协同作用。

[0088] 在肿瘤抗原被均匀表达的情况下,多特异性抗体表现出强大的肿瘤细胞毒性能力。遗憾的是,均匀的抗原表达是罕见的,尤其是在实体瘤中。然而,基于本文提供的数据,PS代表一种通用的可靶向实体。因此,发明人力图开发一种基于多特异性抗体技术的新型T细胞重定向疗法,其靶向暴露于表面的PS。为此,设计并表达了一种多特异性抗体分子,其包含与激动剂抗人CD3 scFv共价连接的TIM-4胞外结构域。图3B示出了根据本公开的一个实施方式的重组TIM-4融合蛋白的结构以及重组TIM-4融合蛋白的氨基酸序列的示意图。

[0089] 首先试图确定重组TIM-4融合蛋白的每个结构域是否保持与其各自靶标的结合。将重组TIM-4融合蛋白(人)与U87肿瘤细胞一起孵育,随后用蛋白-L(其结合scFv)进行检测(图4A)。在U87细胞上可检测到重组TIM-4,表明重组TIM-4融合蛋白能够通过PS结合肿瘤细胞。接下来,将重组TIM-4融合蛋白与人T细胞一起孵育,然后用荧光标记的抗小鼠TIM-4抗体进行检测(图4B)。在人T细胞上可检测到重组TIM-4,表明重组TIM-4融合蛋白能够将T细胞重定向至肿瘤细胞上的PS。这种T细胞结合对人T细胞是特异性的,因为重组TIM-4在与小鼠T细胞孵育后检测不到(图4C)。

[0090] 有了重组TIM-4融合蛋白,接下来通过在体外细胞毒性测定中确定重组TIM-4能否高效介导肿瘤细胞杀伤来测试功能性。在这些测定中,将浓度递增的人重组TIM-4融合蛋白滴定到人T细胞和肿瘤细胞的共培养物中。用荧光染料标记肿瘤细胞,以在24小时后通过流式细胞术对肿瘤细胞进行定量。通过将每种条件下保持的肿瘤细胞数量相对于不存在重组TIM-4时的肿瘤细胞数量归一化,可以计算存活百分比。重组TIM-4展示了对U87有效的剂量依赖性杀伤(图5A)。重要的是,在由U87和被肿瘤特异性抗原EGFRvIII(U87vIII)转染的U87组成的异质肿瘤群体中,重组TIM-4比EGFRvIII靶向性重组TIM-4更有效(图5B)。这些数据表明,即使在肿瘤表现出抗原异质性时,重组TIM-4也介导了强效的肿瘤细胞毒性。同样地,这表明重组TIM-4能够实现以下目标:即使在面对蛋白质抗原异质性时也能持续的有效细胞毒性——并且它们在这方面的能力优于当前的平台。

[0091] 多特异性抗体在体内的半衰期相对较短,这意味着需要长期施用多特异性抗体来维持功效所需的全身水平。为了克服该问题并降低重组TIM-4产生非肿瘤靶向毒性的可能性,发明人工程化了肿瘤抗原(EGFRvIII)特异性CAR T细胞作为肿瘤定位媒介物,该肿瘤定位媒介物会以可再生的方式(renewable fashion)在肿瘤部位分泌重组TIM-4融合蛋白。因此,重组TIM-4融合蛋白由同样具有其自身的抗肿瘤功效的CAR T细胞局部递送,从而提供了一种组合疗法。为了验证概念,工程化了分泌重组TIM-4的VIII靶向性CAR。然后,将这些CAR T细胞施用到携带由U87和U87vIII细胞组成的异质肿瘤的小鼠的颅内(图6)。与单独的VIIIICAR相比,分泌重组TIM-4的VIIIICAR显著延长了小鼠的存活期。这些数据证明了重组TIM-4的体内功效,并证明了分泌重组TIM-4的CAR T细胞可以用作治疗的有效递送媒介物。

[0092] 本文示出的数据提供了包含重组小鼠序列以及人T细胞的异源物种组合的实例。图7示出了小鼠T细胞中的完全小鼠重组TIM-4VIIIICAR载体。该体内实验表明,在不进行淋巴细胞清除预处理的情况下,由VIIIICAR分泌的重组TIM-4延长了携带异源性肿瘤的小鼠的存活期。图7表明,当重组TIM-4融合蛋白和/或CAR与待治疗的物种相同时,可获得同样的结果。也就是说,小鼠重组TIM-4与小鼠VIIIICAR和小鼠T细胞(包括具有小鼠重组TIM-4和VIIIICAR的人T细胞)共同提高了存活率(与图6的结果相似或比起更好)。这些数据共同表明,在完全人类系统(包括那些包含SEQ ID NO:3、5、17和10的系统)中可以预期相似的结果。

[0093] 本领域的技术人员将容易认识到的是,本公开被很好地调整以实现这些目的并获得所提及的目的和优点以及其中固有的优点。本文所述的本公开目前代表了优选实施方式,其为示例性的,而并非旨在限制本公开的范围。本领域的技术人员将能想到其中的变化和其他应用,这些变化和应用包含在由权利要求书的范围所限定的本公开的精神内。

[0094] 未承认任何参考文献(包括本说明书中引用的任何非专利或专利文献)构成了现有技术。尤其是,应当理解的是,除非另有说明,否则本文中对任何文献的引用并不代表承认这些文献中的任何一个构成美国或任何其他国家的本领域公知常识的一部分。对参考文献的任何讨论都陈述了其作者的主张,并且申请人保留对本文引用的任何文献的准确性和相关性提出质疑的权利。除非另有明确说明,否则本文引用的所有参考文献都通过引入全部并入本文。如果在所引用的参考文献中出现的任何定义和/或描述之间存在任何差异,应以本公开为准。

[0095]

	全长 SEQ ID NO:	组件 SEQ ID NO:
重组人 Tim-4 融合蛋白	1	2- SS 3- hTim-4 4- 接头 5- hCD3
重组小鼠 Tim-4 融合蛋白	6	2- SS 7- mTim-4 4- 接头 8- mCD3
H/M EGFRvIII CAR 人 EGFRvIII CAR mTIM4 x hCD3	9	10- hEGFRvIII 11- P2A 12- mTIM4xhCD3 (还有7和5)
M/M EGFRvIII CAR 小鼠 EGFRvIII CAR mTIM4 x mCD3	13	14- mEGFRvIII 11- P2A 15- mTIM4xmCD3 (还有7, 4和8)
H/M D2C7 CAR 人 D2C7 CAR mTim4 x hCD3	16	17- hD2C7 11- P2A 12- mTIM4xhCD3 (还有7和5)
M/M D2C7 CAR 小鼠 D2C7 CAR mTim4 x mCD3	18	19- mD2C7 11- P2A 15- mTIM4xmCD3 (还有7, 4和8)
H/H EGFRvIII CAR 人 EGFRvIII CAR hTim4 x hCD3	20	10- hEGFRvIII 11- P2A 2- SS 3- hTim-4 4- 接头 5- hCD3
H/H D2C7 CAR 人 D2C7 CAR hTim4 x hCD3	21	17- hD2C7 11- P2A 2- SS 3- hTim-4 4- 接头 5- hCD3

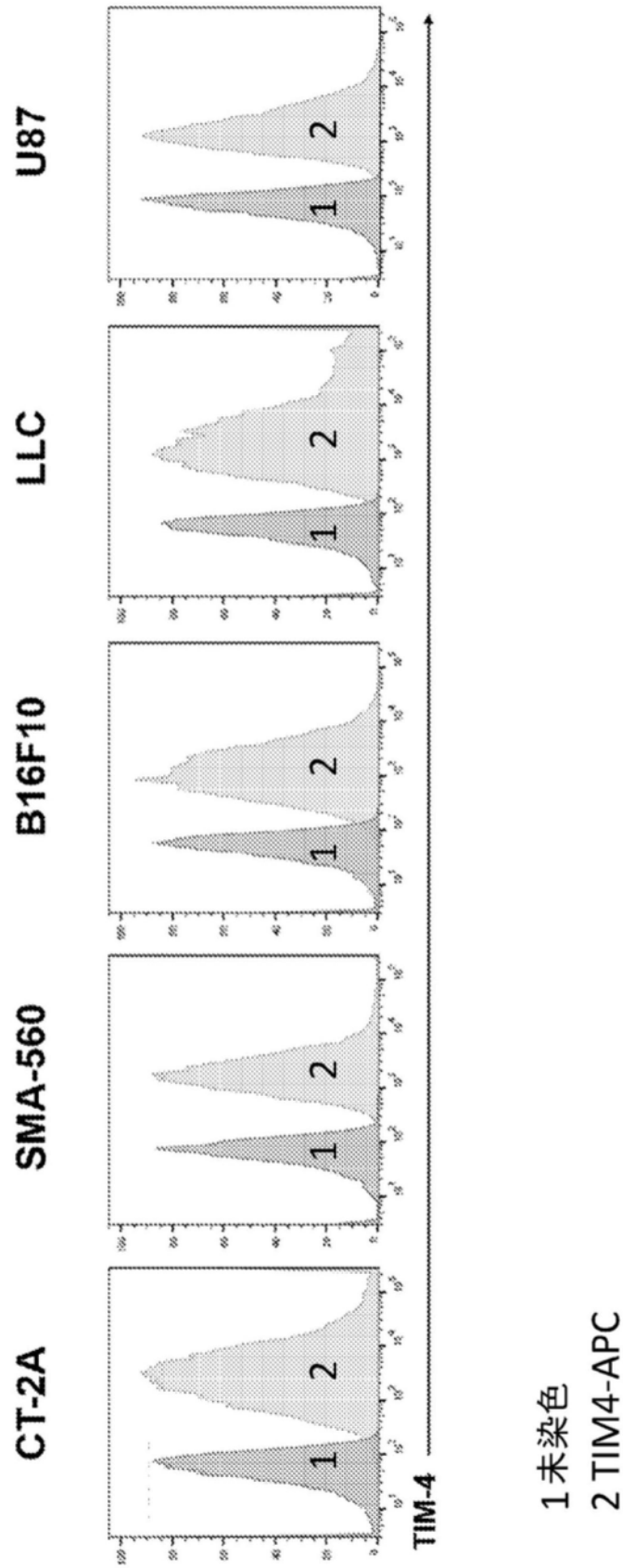


图1

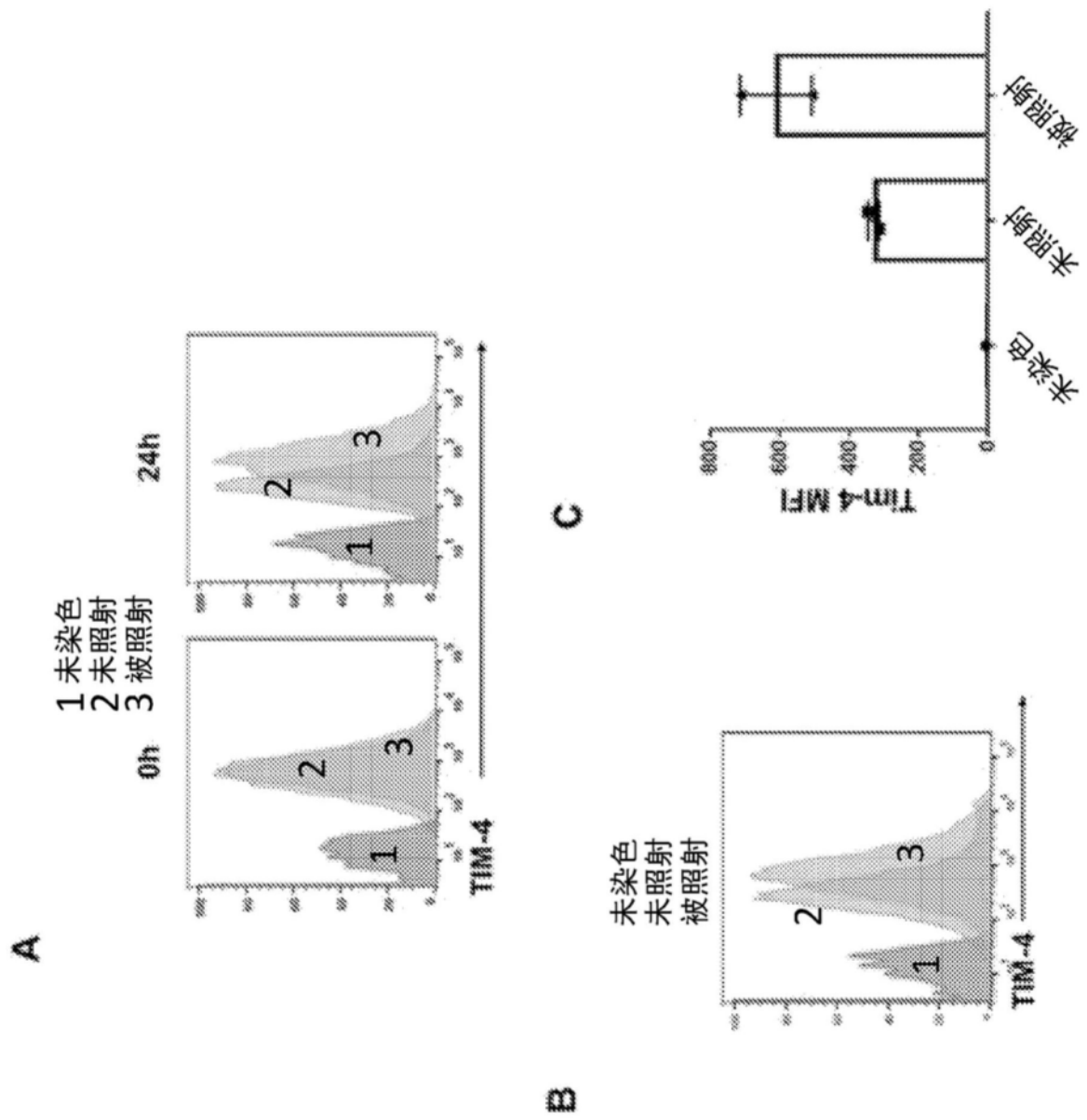
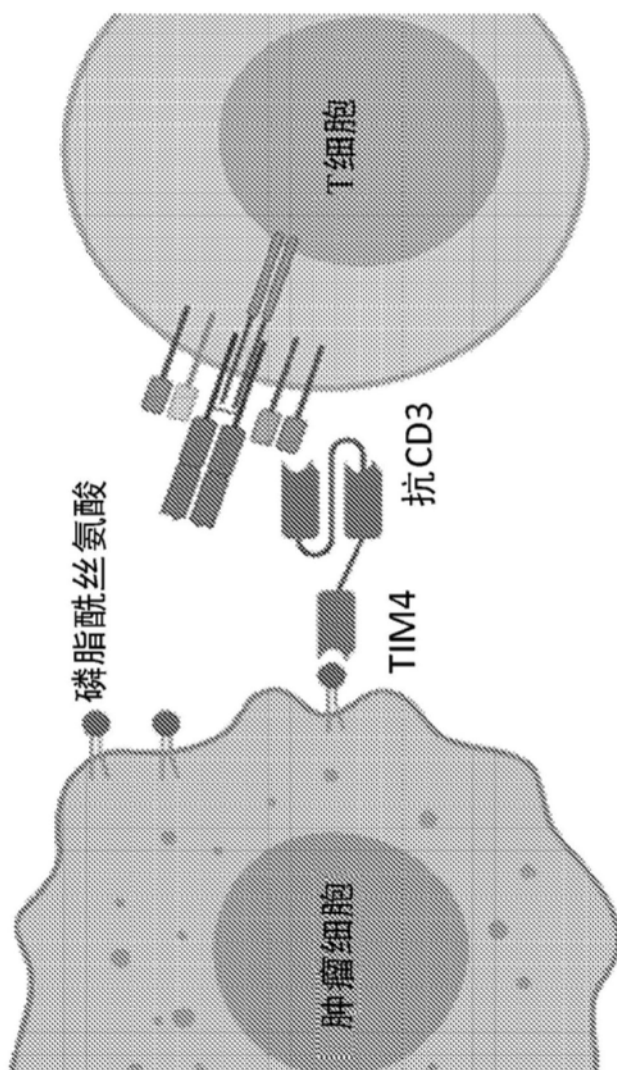


图2



A



图3

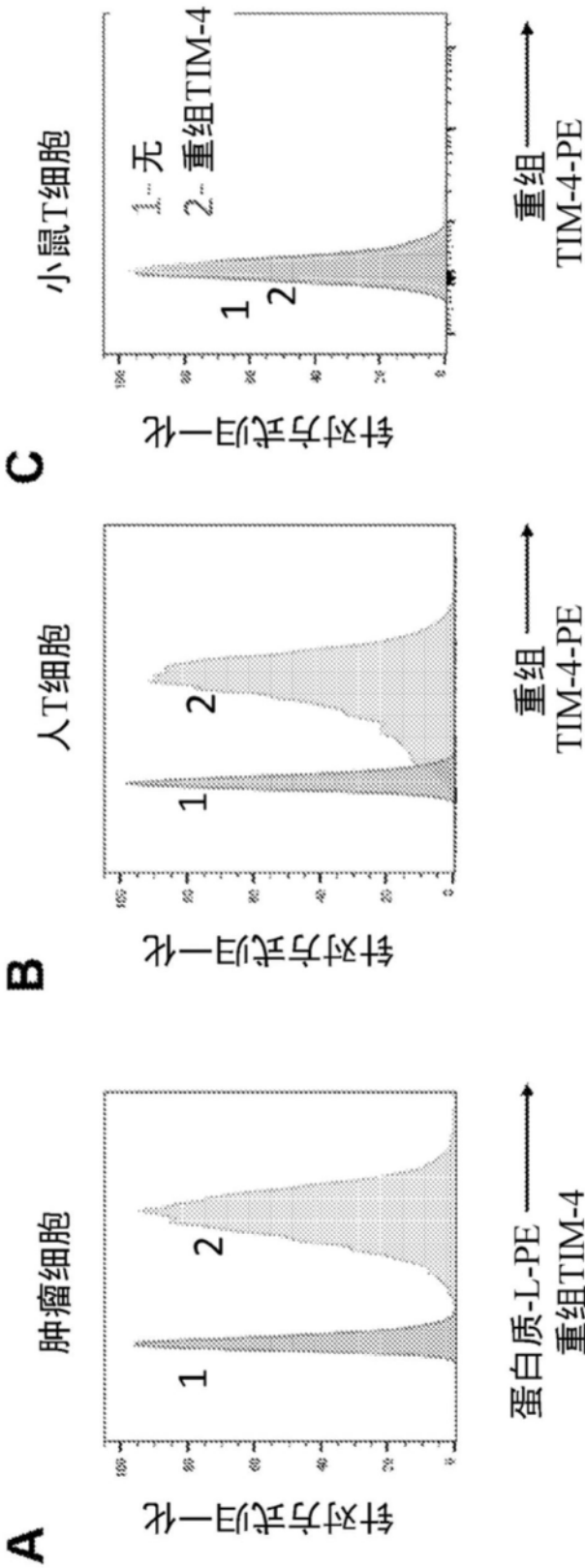


图4

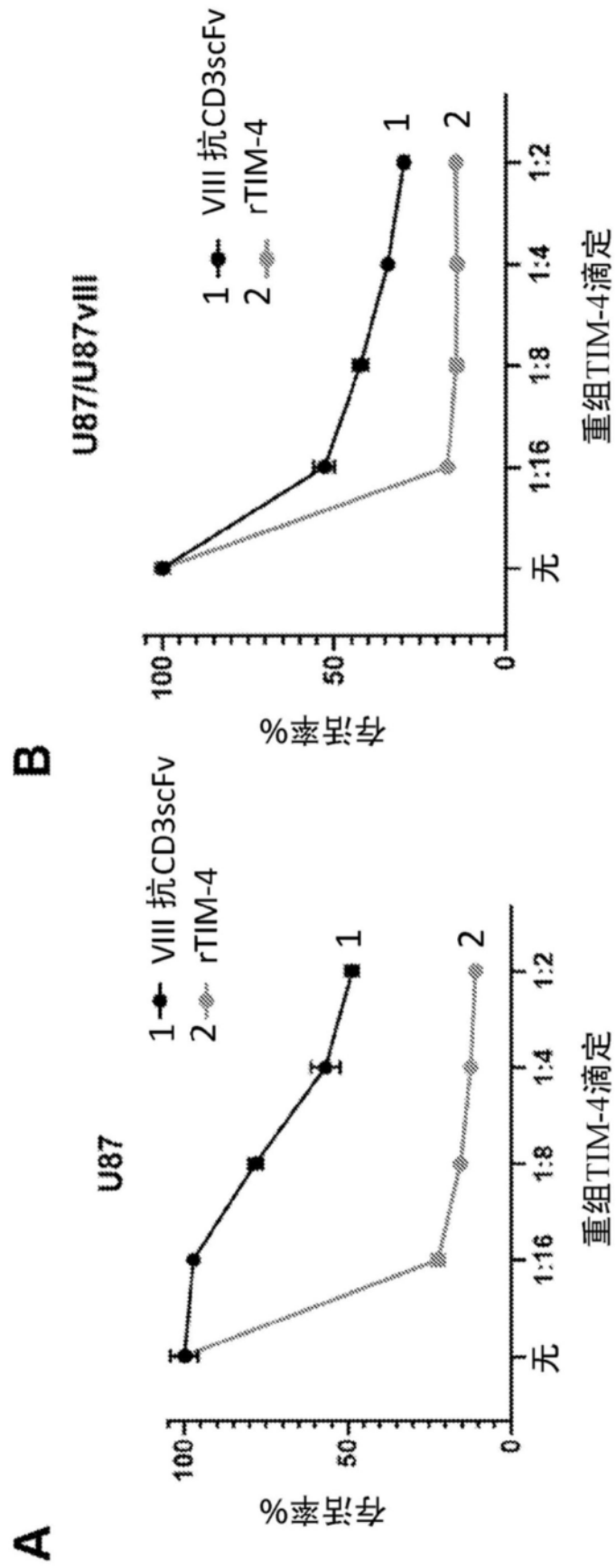


图5

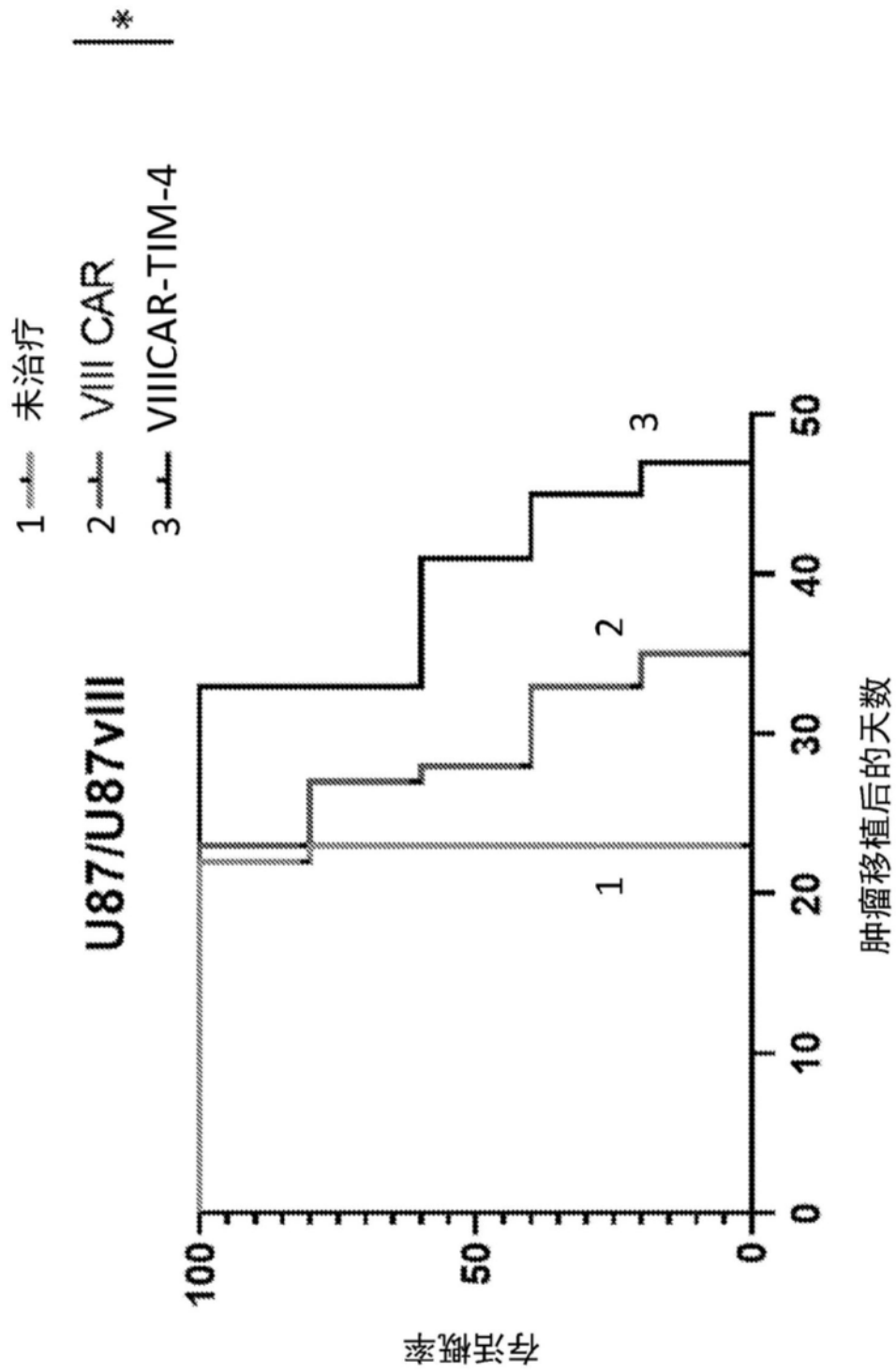


图6

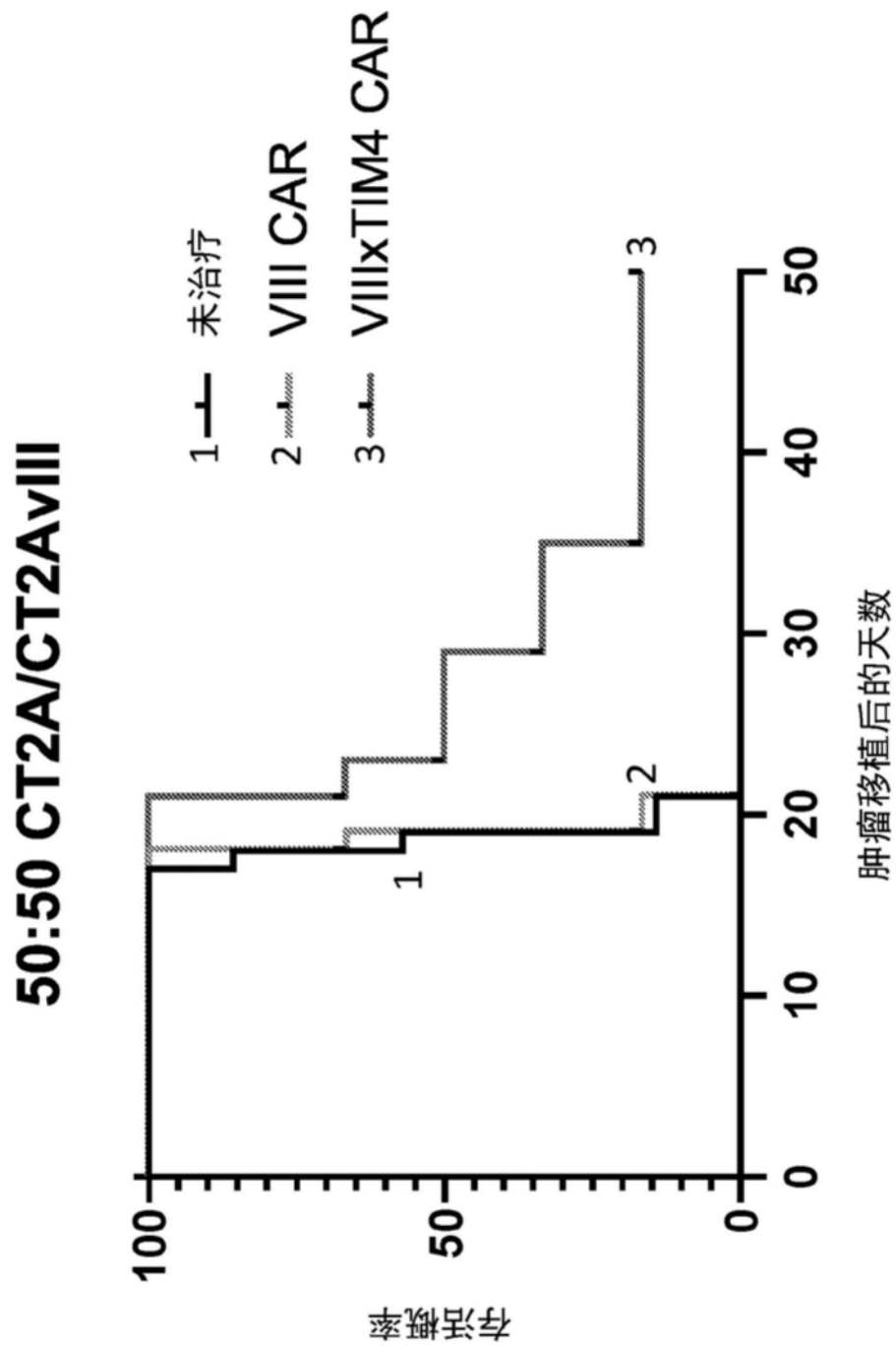


图7