(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118434761 A
(43)申请公布日 2024.08.02

(21)申请号 202280083534.8
(22)申请日 2022.12.22
(30)优先权数据
2118797.6 2021.12.22 GB
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.06.17
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/GB2022/053359 2022.12.22
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/118878 EN 2023.06.29
(71)申请人 圭尔医疗有限公司
地址 英国伦敦
(72)发明人 M·马丁内斯-洛德拉 S·童 B·麦克洛斯基
(74)专利代理机构 北京信诺创成知识产权代理有限公司 11728
专利代理师 吕鹏云 尹吉伟
(51)Int.Cl.
C07K 14/71(2006.01)
C12N 5/0783(2006.01)

权利要求书2页 说明书63页
序列表（电子公布） 附图15页

(54)发明名称

组成型细胞因子受体

(57)摘要

本文提供了一种重组蛋白,该重组蛋白包含外域,该外域的至少一部分来源于EPOR的胞外区,其中该外域包含二聚化结构域,该二聚化结构域允许在不存在信号诱导剂分子的情况下所述重组蛋白与第二蛋白质二聚化以及向所述T细胞提供信号。还提供了编码此类重组蛋白的核酸分子、含有该核酸分子的重组构建体、载体和细胞、产生此类细胞的方法及其治疗用途。

CN 118434761 A

1.一种T细胞,所述T细胞包含重组蛋白,其中所述重组蛋白包含外域,所述外域的至少一部分来源于EPOR的胞外区,其中所述外域包含二聚化结构域,所述二聚化结构域允许在不存在信号诱导剂分子的情况下所述重组蛋白与第二蛋白质二聚化以及向所述T细胞提供信号。

2.根据权利要求1所述的T细胞,其中所述外域的所述至少一部分包含与SEQ ID NO.3或SEQ ID NO.5具有至少70%序列同一性的氨基酸序列。

3.根据权利要求1或2所述的T细胞,其中来源于EPOR的胞外区的所述外域的所述至少一部分包含所述二聚化结构域。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的T细胞,其中所述二聚化结构域是亮氨酸拉链或半胱氨酸残基。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的T细胞,其中所述二聚化是二硫键连接的二聚化。

6.根据权利要求1至5中任一项所述的T细胞,其中所述二聚化是同型二聚化或异型二聚化。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的T细胞,其中所述信号诱导剂分子是EPO。

8.根据权利要求1至7中任一项所述的T细胞,其中所述外域包含SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列或与其具有至少80%序列同一性并且在第130位具有半胱氨酸残基的其变体或由其组成,或者包含SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列或与其具有至少80%序列同一性并且在第154位具有半胱氨酸残基的其变体或由其组成。

9.根据权利要求1至8中任一项所述的T细胞,其中所述T细胞是T调节性细胞或其前体。

10.根据权利要求1至9中任一项所述的T细胞,其中所述第二蛋白质不同于所述重组蛋白。

11.根据权利要求10所述的T细胞,其中所述T细胞还包含所述第二蛋白质。

12.根据权利要求1至11中任一项所述的T细胞,其中所述T细胞还包含嵌合抗原受体、异源TCR、安全开关多肽、异源FOXP3多肽和/或突变钙调磷酸酶蛋白。

13.根据权利要求1至12中任一项所述的T细胞,其中所述外域包含与EPOR异源的一个或多个结构域或序列。

14.根据权利要求13所述的T细胞,其中所述外域包含一个或多个标签肽、自杀部分和/或诱导型二聚化结构域。

15.根据权利要求1至14中任一项所述的T细胞,其中所述EPOR的胞外区能够结合EPO。

16.根据权利要求1至15中任一项所述的T细胞,其中所述重组蛋白包含内域。

17.根据权利要求1至15中任一项所述的T细胞,其中所述重组蛋白能够与包括内域的信号传导蛋白缔合。

18.根据权利要求16或17所述的T细胞,其中所述内域包含酪氨酸激酶激活结构域和酪氨酸效应子结构域,所述酪氨酸激酶激活结构域包含JAK1结合基序和/或JAK2结合基序,所述酪氨酸效应子结构域包含能够被JAK1和/或JAK2磷酸化的一个或多个酪氨酸残基。

19.根据权利要求18所述的T细胞,其中所述酪氨酸效应子结构域包含至少一个STAT缔合基序,优选STAT5缔合基序。

20.根据权利要求16至19中任一项所述的T细胞,其中所述内域还包含JAK3结合基序。

21.根据权利要求16至20中任一项所述的T细胞,其中所述内域包含SEQ ID NO.8所示

的EPOR内域或与SEQ ID NO.8具有至少40％序列同一性的EPOR内域变体或由其组成。

22.根据权利要求21所述的T细胞,其中所述EPOR内域变体包含至少一个修饰以减少SHP1与EPOR内域序列的结合,特别是其中所述修饰是针对SEQ ID NO.8的Y181和/或Y183。

23.根据权利要求21或22所述的T细胞,其中所述EPOR内域变体包含截短的EPOR内域或由其组成,所述截短的EPOR内域截短了所述EPOR内域的包含SEQ ID NO.8的Y181和/或Y183的至少一部分,例如其中所述截短的EPOR内域包含SEQ ID NO.62、SEQ ID NO.106或SEQ ID NO.107的序列或与其具有至少80％序列同一性的其变体或由其组成。

24.根据权利要求21至23中任一项所述的T细胞,其中所述变体EPOR内域变体包含至少SEQ ID NO.108的序列或与SEQ ID NO.8相差不超过两个氨基酸的序列的插入,例如其中所述变体包含至少SEQ ID NO.109、SEQ ID NO.110、SEQ ID NO.111、SEQ ID NO.112或SEQ ID NO.113的序列或分别与SEQ ID NO.109、SEQ ID NO.110、SEQ ID NO.111、SEQ ID NO.112或SEQ ID NO.113相差不超过一个或相差不超过两个氨基酸的序列的插入。

25.根据权利要求24所述的T细胞,其中所述EPOR内域变体包含SEQ ID NO.114、SEQ ID NO.115或SEQ ID NO.116的序列或与其具有至少80％序列同一性的其变体或由其组成。

26.一种T细胞,所述T细胞包含核酸分子,所述核酸分子包含编码如权利要求1至25中任一项所定义的重组蛋白的核苷酸序列。

27.一种T细胞,所述T细胞包含构建体,所述构建体包含如权利要求26中所定义的核酸分子和一种或多种另外的核苷酸序列。

28.根据权利要求27所述的T细胞,其中所述另外的核苷酸序列:(i)是调节序列;和/或(ii)编码感兴趣的蛋白质;和/或其中所述感兴趣的蛋白质是(iii)治疗性蛋白质、(iv)抗原受体、(v)CAR或TCR、(vi)安全开关多肽或(vii)FOXP3多肽。

29.一种T细胞,所述T细胞包含载体,所述载体包含如权利要求26至28中所定义的核酸分子或构建体。

30.一种细胞群,所述细胞群包含如权利要求1至29中任一项所定义的T细胞。

31.一种用于制备根据权利要求1至29中任一项所述的T细胞的方法,所述方法包括将如权利要求26至29中任一项所定义的核酸分子、构建体或载体引入所述细胞的步骤。

32.一种促进细胞存活或持久性的方法,所述方法包括将如权利要求26至29中任一项所定义的核酸分子、构建体或载体引入所述细胞。

33.根据权利要求32所述的方法,所述方法还包括在EPO存在下培养所述细胞的步骤。

34.一种药物组合物,所述药物组合物包含如权利要求1至30中任一项所定义的细胞或细胞群。

35.根据权利要求1至30中任一项所述的T细胞或细胞群或根据权利要求34所述的药物组合物,用于治疗。

36.根据权利要求1至30中任一项所述的T细胞或细胞群或根据权利要求34所述的药物组合物,用于治疗癌症、感染性疾病、神经变性疾病或炎性疾病,或用于诱导免疫抑制。

37.根据权利要求36所述的T细胞、细胞群或药物组合物,用于诱导对移植物的耐受性;治疗和/或预防移植物抗宿主病(GvHD),一种自身免疫性或过敏性疾病;促进组织修复和/或组织再生;或改善受试者的炎症,优选地其中所述细胞是Treg细胞。

组成型细胞因子受体

技术领域

[0001] 本公开和发明涉及一种重组蛋白及其在过继细胞疗法(ACT)中的用途。特别地,该重组蛋白可为表达该蛋白的细胞提供所需的组成型信号,例如组成型STAT介导的信号。该信号可赋予细胞所需的效果或性质,例如,在移植的宿主受试者中的增加的功能、活性、活力或存活,例如持久性。还提供了编码此类重组蛋白的核酸分子、含有该核酸分子的重组构建体、载体和细胞、产生此类细胞的方法及其治疗用途。

背景技术

[0002] 过继细胞疗法(ACT),即向受试者施用功能免疫细胞,已经成为一种用于各种医学病症的既定并且不断发展的免疫治疗方法,该医学病症尤其包括恶性或感染性疾病。肿瘤浸润淋巴细胞最初表明对治疗转移性黑色素瘤有效,随后开发了表达嵌合抗原受体(CAR)或异源T细胞受体(TCR)以靶向不同细胞靶分子的重定向T细胞或NK细胞,并将其用于临床用途。最初的方法使用具有细胞毒性质的免疫细胞,例如细胞毒性T细胞或NK细胞,来靶向和杀死体内不想要的或有害的细胞,但是最近开发了用于ACT的调节性T细胞(Treg)。Treg具有免疫抑制功能。它们起控制致细胞病变免疫应答的作用,并且对于维持免疫耐受是必需的。Treg的抑制性质可在治疗上加以利用,例如以改善和/或预防炎性病症、自身免疫性疾病和移植中的免疫介导的器官损伤。

[0003] 为了在ACT中有用,移植或施用的细胞需要在接受者(ACT疗法的受试者)中存活并在功能状态下持续足够长的时间以发挥有用的治疗效果。此外,为了制备足够数量的细胞用于治疗用途,需要体外生成(例如工程化)、培养和扩增细胞。

[0004] 生长因子白介素-2(IL-2)对于免疫细胞的内稳态,尤其包括Treg(生成、增殖、存活)以及对于它们的抑制功能和表型稳定性是必需的。激活的常规T细胞(Tcon)是体内IL-2的主要来源。相反,Treg不能产生IL-2,并且依赖于获得存在于微环境中的Tcon产生的IL-2的旁分泌。

[0005] IL-2的可用性对体外扩增并转移到患者体内的Treg的治疗效果具有关键影响。这是由于以下原因:1)体外扩增方案通常需要高浓度的IL-2,这使得Treg高度依赖于该细胞因子;2)由于施用免疫抑制药物,患者体内IL-2的浓度经常降低;以及3)在发炎组织的微环境中,IL-2的获得通常是有限的。肝脏移植是一个特别具有挑战性的适应症,因为已知发炎肝脏中IL-2水平会降低,而钙调磷酸酶抑制剂的常规使用进一步加剧这种降低,该抑制剂会显著降低Tcon产生IL-2的能力。施用低剂量的外源性IL-2恢复由钙调磷酸酶抑制剂诱导的Treg功能障碍,并促进Treg在肝脏中的积累。然而,低剂量IL-2的治疗使用的问题是同时激活Tcon的风险,这可能增加组织损伤。

[0006] 在WO 2020/044055中描述了一种方法来避免施用外源性IL-2的需要。在这种情况下,Treg细胞被工程化以表达CAR,该CAR已经被修饰,使得其能够在结合其靶抗原时向细胞提供生产性IL-2信号。换句话说,CAR的胞内信号传导结构域,即内域,包含来源于IL受体的序列或结构域,这些序列或结构域允许它在不存在内源性IL-2的情况下传递“IL-2信号”,

并且不需要IL-2结合。IL-2通过转录因子STAT5(信号传导子及转录激活子5)传导信号，STAT5在活性状态下被激酶JAK1和/或JAK2磷酸化，这些激酶通常在白介素(例如IL-2)结合其受体时被激活。因此，WO 2020/044055中的CAR包含内域，该内域包含STAT5缔合基序和JAK1结合基序和/或JAK2结合基序。

[0007] 类似地，用于ACT的其他免疫细胞，例如细胞毒性T细胞或其他T效应细胞，包括CAR-T细胞，也可能需要或受益于向细胞提供附加信号传导能力，以增加存活或功能持久性。因此，对附加信号传导，或更特别地工程化信号传导的需要，无论是用于增加存活或持久性，还是用于改善用于ACT的细胞的功能活性或治疗效果，都不限于Treg细胞。

[0008] 虽然WO 2020/04405提供了重要的进步，但是在ACT领域中仍然需要新的和改进的方法，特别是避免或减少为每个靶标开发修饰的CAR的需要，并且可具有更普遍的应用的方法。

[0009] 红细胞生成素(EPO)是一种由胎儿肝脏或在成人中由肾脏血管周围间质成纤维细胞产生的糖蛋白。EPO的产生主要在体内通过组织缺氧来刺激，组织缺氧导致缺氧诱导因子(HIF)-1α转录因子的稳定以及随后EPO的转录。EPO通过结合至红系前体细胞上的红细胞生成素受体(EPOR)来诱导红细胞生成，但附加地也在非造血组织中表达。EPOR是508个氨基酸的跨膜受体，包含含有WSXWS基序的胞外结构域、单个跨膜疏水区和胞质结构域。EPOR在EPO结合后形成同型二聚体，并且能够通过JAK2、MAPK和PI3激酶的激活和STAT5磷酸化而传导信号。文献中还提出EPOR可能能够与CD131异型二聚化。

[0010] WO2019/169290描述了一种使用嵌合受体将信号诱导地引入细胞的方法，该嵌合受体包含能够在试剂存在下二聚化的二聚化结构域。WO2019/169290中公开的某些构建体包含来自EPOR或来自IL2RB的结构域，但是信号传导仅可在配体存在下诱导。虽然诱导性可允许控制胞内的信号传导，并且可在某些疾病状况中具有用途，但是在配体可能不存在或以低水平存在的状况中，来自此类构建体的信号传导可能减少，从而导致细胞缺乏持久性。因此，需要开发能够向细胞提供组成型信号的细胞因子受体，该细胞因子受体在诱导性不可能和/或不理想的状况下具有用途。

发明内容

[0011] 本发明人已经鉴定了一种重组蛋白，该重组蛋白能够在不存在配体的情况下同型二聚化以及向表达该重组蛋白的细胞提供组成型信号。特别地，该重组蛋白具有来源于细胞因子受体的经修饰的胞外结构域的外域，其中该修饰在不存在细胞因子受体的天然配体的情况下促进同型二聚化和组成型信号传导。特别地，该重组蛋白可附加地包含内域，并且可用于若干细胞类型中以提供一致的信号，例如STAT信号，其可允许细胞，特别是在ACT的背景中，在细胞因子受体配体受限或可能受限的环境中存活。在此类环境中，使用诱导型蛋白质来向细胞提供存活信号可能是不合适的，本发明在此具有特别的用途，解决了这个特别的问题。

[0012] 特别地，本发明人鉴定使用的重组蛋白可包含来源于EPOR的胞外区的外域，但附加地还包含允许在不存在EPO的情况下通过受体进行组成型信号传导的修饰。如果环境中存在EPO，胞外区也可保留其结合EPO的能力，这潜在地对通过经修饰的细胞因子受体进行的信号传导提供了加强。因此，有利地，该重组蛋白能够二聚化并向细胞提供组成型信号，

并且还能够结合环境配体(当可用时),从而产生增强信号传导的可能性。然而,在没有配体的情况下,单独的组成型信号传导就足以为表达该重组蛋白的细胞提供所需功能/存活优势。在一个实施方案中,该重组蛋白可包含经修饰的人EPOR的胞外区,该人EPOR的胞外区在残基154处具有到半胱氨酸的氨基酸取代,这促进了在不存在EPO的情况下的单体重组蛋白链的同型二聚化以及组成型信号传导。

[0013] 尽管用于本发明的重组蛋白可向表达该重组蛋白的细胞提供任何信号,但是特别设想的是,可利用该重组蛋白使细胞(特别是在细胞疗法的背景中)能够在施用于受试者后存活或持续,从而为疗法在患病受试者中有效提供最佳机会。特别地,通过该重组蛋白的信号传导涉及酪氨酸激酶活性和蛋白质磷酸化,并且更特别地,信号传导涉及Janus激酶(JAK)磷酸化和活性,例如,JAK-STAT信号传导途径的激活,其涉及JAK1和/或JAK2。因此,特别地,本文讨论的重组蛋白的内域可来源于或部分地来源于与外域相同的蛋白质(EPOR,其包含JAK2结合基序和STAT5缔合基序)或可来自一种或多种不同的蛋白质(该重组蛋白可以是嵌合重组蛋白),其中不同的蛋白质允许转导与EPOR相同或类似的信号或可潜在地允许提供来自天然EPOR受体的不同的细胞信号。有利地,当该重组蛋白的内域来源于EPOR时,本发明人还鉴定了可能利用经修饰的内域,该内域结合SHP1的能力降低,SHP1一旦被激活就可抑制JAK2磷酸化,并且还具有影响其他内源性受体诸如IL2R的能力。此外,当该重组蛋白的内域来源于EPOR时,本发明人还鉴定了氨基酸序列的插入,例如在来源于EPOR内域的内域部分的C末端处插入胞质尾,可增加或稳定该重组蛋白的细胞表面表达和/或可增加对EPO的敏感性。

[0014] 本文所述的重组蛋白在施用后可能需要在受试者体内持续一段时间的T细胞中具有特别的用途,并且更特别地在需要STAT5信号传导才能存活(通常通过其内源性IL2R)并且完全依赖外源性配体的供应来触发此类信号传导的Treg中具有用途。鉴于受体的组成型信号传导能力、Treg对持续STAT5信号传导的需要以及特定疾病状况(例如1型糖尿病)中缺乏天然可用的配体(例如IL2),在Treg中使用重组蛋白是特别有利的。本发明人已经有利地表明,表达本文所述的重组蛋白的Treg维持其通常的表型和抑制功能,并且因此可保持细胞的稳定性。

[0015] 因此,本发明提供了一种T细胞,该T细胞包含重组蛋白,其中所述重组蛋白包含外域,该外域的至少一部分来源于EPOR胞外区,其中该外域包含二聚化结构域,该二聚化结构域允许在不存在信号诱导分子的情况下所述重组蛋白与第二蛋白质二聚化以及向所述T细胞提供信号。

[0016] 二聚化结构域可以是允许在不存在信号诱导分子的情况下重组分子与第二蛋白质结合以及向细胞中传导信号的任何二聚化结构域。因此,二聚化结构域应当允许向细胞提供组成型信号。二聚化结构域可在来源于EPOR的胞外区的外域部分之外(即,在外域中与该部分不同的位置),或特别地,可包含在来源于EPOR的胞外区的外域部分内。

[0017] 因此,在这方面,本发明提供了一种T细胞,该T细胞包含重组蛋白,其中所述重组蛋白包含外域,该外域的至少一部分来源于EPOR的胞外区,其中所述部分包含相对于EPOR的胞外区的修饰,该修饰允许在不存在信号诱导分子的情况下所述重组蛋白与第二蛋白质二聚化以及向所述T细胞提供信号。

[0018] 因此,存在于T细胞内的所述重组蛋白可在T细胞中由已经被转导到细胞中或前体

细胞中的核酸分子表达,或者可由已经使用基因编辑技术修饰的内源性核酸序列表达。

[0019] 在特定的实施方案中,所述重组蛋白包含外域,该外域允许所述重组蛋白与第二蛋白质的二硫键连接的二聚化。因此,所述重组蛋白包含特别允许二硫键连接的二聚化的至少一个二聚化结构域。

[0020] 技术人员还会理解,二聚化可以是同型二聚化,其中所述重组蛋白结合如本文所述的另一重组蛋白,或异型二聚化,其中所述重组蛋白与不同的蛋白质二聚化。会理解,为了发生异型二聚化,第二蛋白质应当包含同源二聚化结构域,该同源二聚化结构域能够结合重组蛋白内存在的二聚化结构域。通常是所述重组蛋白的二聚化允许向T细胞产生信号。在本发明的特定实施方案中,二聚化是同型二聚化,并且在这方面,本发明提供了一种T细胞,该T细胞包含重组蛋白,其中所述重组蛋白包含外域,该外域的至少一部分来源于EPOR的胞外区,其中所述外域包含二聚化结构域,该二聚化结构域允许在不存在信号诱导分子的情况下所述重组蛋白的同型二聚化以及向所述T细胞提供信号。特别地,如以上所讨论的,来源于EPOR的胞外区的外域的至少一部分可包含相对于EPOR的胞外区的修饰,该修饰可允许在不存在信号诱导分子的情况下所述重组蛋白的同型二聚化以及向所述T细胞提供信号。

[0021] 所述重组蛋白的二聚化在第二蛋白质的存在下自发发生,并且不需要存在信号诱导分子,例如红细胞生成素,并且更特别地是任何信号诱导分子(包括任何配体或二聚化诱导分子)。

[0022] 在这方面,本发明还提供了一种T细胞,该T细胞包含重组蛋白,其中所述重组蛋白包含外域,该外域的至少一部分来源于EPOR的胞外区,其中该外域包含二聚化结构域,该二聚化结构域允许在不存在EPO的情况下所述重组蛋白与第二蛋白质二聚化以及向所述T细胞提供信号。特别地,如以上所讨论的,来源于EPOR的胞外区的外域的至少一部分可包含相对于EPOR的胞外区的修饰,该修饰可允许在不存在EPO的情况下所述重组蛋白的同型二聚化以及向所述T细胞提供信号。

[0023] 特别地,本发明提供了一种T细胞,该T细胞包含重组蛋白,其中所述重组蛋白包含外域,该外域的至少一部分来源于EPOR的胞外区,其中该外域包含二聚化结构域,该二聚化结构域允许在不存在EPO的情况下所述重组蛋白的同型二聚化以及向所述T细胞提供信号。特别地,如以上所讨论的,来源于EPOR的胞外区的外域的至少一部分可包含相对于EPOR的胞外区的修饰,该修饰可允许在不存在EPO的情况下所述重组蛋白的同型二聚化以及向所述T细胞提供信号。

[0024] 来源于EPOR的胞外区的外域部分可包含EPOR的全长胞外区,或其一部分或变体序列。特别地,存在的EPOR胞外区序列可包含至少一个修饰,该至少一个修饰允许在不存在信号诱导分子,特别是EPO的情况下所述重组蛋白的二聚化以及组成型信号传导。因此,该至少一个修饰可以是导致所述重组蛋白的组成型信号传导的任何修饰。除了允许在不存在信号诱导分子,特别是EPO的情况下重组蛋白的二聚化以及提供组成型信号的至少一个修饰之外,所述重组蛋白内存在的EPOR胞外区序列还可包含其他修饰。特别地,来源于EPOR的胞外区的外域部分可来源于SEQ ID NO.1,更特别地来源于SEQ ID NO.1的氨基酸1-250(SEQ ID NO.5)。该至少一个修饰可以是EPOR的胞外区的氨基酸序列的突变,该突变允许二聚化,特别是二硫键连接的二聚化,和/或可以是序列的插入,该插入允许在不存在信号诱导分

子,例如亮氨酸拉链的情况下二聚化。更特别地,所述重组蛋白包含SEQ ID NO.5的第154位精氨酸到半胱氨酸(R154C)的修饰。在最特定的实施方案中,所述外域可包含SEQ ID NO.2或SEQ ID NO.4的氨基酸序列或由其组成。

[0025] 因此,在另一实施方案中,本发明提供了一种T细胞,该T细胞包含重组蛋白,其中所述重组蛋白包含外域,该外域包含EPOR的胞外区或其部分或变体,其已被修饰以允许在不存在信号诱导分子,特别是EPO的情况下所述重组蛋白与第二蛋白质二聚化以及在所述T细胞中提供信号。

[0026] 在一个实施方案中,EPOR的胞外区的部分或变体可保留EPOR胞外区的功能,并且因此能够结合EPO。这样,如先前所讨论的,有可能在EPO的存在下增加提供给细胞的信号。替代地,或附加地,此类部分或变体可与EPOR胞外区具有至少70%、80%或90%同一性。在特定的实施方案中,变体和部分可包含提供二聚化结构域的至少一个修饰,允许在不存在信号诱导分子例如EPO的情况下所述重组蛋白与第二蛋白质二聚化以及向表达细胞提供信号。

[0027] 在另外的实施方案中,本发明提供了一种T细胞,该T细胞包含重组蛋白,其中所述重组蛋白包含外域,该外域包含SEQ ID NO.2或SEQ ID NO.4,或与SEQ ID NO.2或SEQ ID NO.4具有至少90%同一性并且在SEQ ID NO.2的第130位包含半胱氨酸或在SEQ ID NO.4的第154位包含半胱氨酸的其部分或变体,其中所述重组蛋白能够在不存在信号诱导分子,特别是EPO的情况下与第二蛋白质二聚化以及在所述T细胞中提供信号。

[0028] 除了来源于EPOR的胞外区的部分之外,所述重组蛋白的外域还可包括附加的不与二聚化相关联的异源结构域或区(即野生型EPOR中不存在的非二聚化结构域或区),例如自杀基序或标签,因此该外域可不仅由来源于EPOR的胞外区的部分组成。

[0029] 如以上所讨论的,如本文所述的重组蛋白的外域包含至少一个二聚化结构域(例如至少2、3、4或5个),这些二聚化结构域允许在不存在信号诱导分子的情况下二聚化和组成型信号传导。特别地,二聚化结构域可被引入来源于EPOR的胞外区的外域部分,例如通过对氨基酸序列进行一个或多个修饰,例如至少2、3、4或5个修饰。因此,信号诱导分子(例如EPO)对于在包含如本文所述的重组蛋白的细胞中发生信号传导不是必需的。特别地,所述重组蛋白能够在不存在EPO的情况下二聚化以及提供组成型信号,EPO是EPOR的天然配体。尽管因此不是组成型信号传导所必需的,但本文所述的所述重组蛋白的外域可包含一个或多个二聚化结构域,该一个或多个二聚化结构域允许所述重组蛋白与第二蛋白质的诱导型二聚化。此类“诱导型二聚化结构域”需要二聚化诱导分子的存在以二聚化。在一个实施方案中,至少一个诱导型二聚化结构域的存在可通过所述重组蛋白提供增强或增加的信号传导,如以下详细讨论的。通常,一个或多个诱导型二聚化结构域可与EPOR异源(即可以不在野生型EPOR中出现)。技术人员将理解,一个或多个诱导型二聚化结构域可包含在所述重组蛋白内的任何地方(包括任何内域或外域内),但特别地可包括在外域内,例如在来源于EPOR的胞外区的外域部分内,或在外域内但不在来源于EPOR的胞外区的部分内,例如作为单独的结构域或区。

[0030] 本发明的所述重组蛋白可包含跨膜结构域以将外域锚定在细胞膜内。所述跨膜结构域可来源于具有跨膜结构域的任何蛋白质,包括例如EPOR、IL2RB、CD28、CD8等。在一个实施方案中,所述跨膜结构域可与另一蛋白质的跨膜结构域缔合,例如,所述跨膜结构域可来

自能够与DAP10/12缔合的TREM蛋白质。

[0031] 可由所述重组蛋白提供的信号可以是改善或增加细胞的功能性质或活性的信号。因此,细胞的功能或作用可增加,该功能或作用可以是在被制备用于ACT的细胞的生成或扩增过程中,或者一旦将细胞施用于受试者后的体外或体内的功能或作用。这可以是例如细胞存活、细胞持久性、细胞功能持久性、活力、功能效应(例如免疫抑制或细胞毒性效应)、细胞表型(包括记忆表型)、细胞的增殖能力和/或治疗功效。相对于不包含重组蛋白的细胞,在包括重组蛋白的细胞中可看到这种增加。如以上所讨论的信号特别是组成型信号。

[0032] 在特定的实施方案中,信号是促存活信号,该促存活信号帮助细胞存活并在培养期间和之后维持其功能能力,并在治疗过程中施用于受试者后持续并维持其功能能力。它可替代地被称为持久性信号。因此,所述重组蛋白可在细胞中表达,以赋予细胞诱导型促存活信号传导能力。它在制备用于ACT疗法的细胞中具有特别的用途,并且可与抗原受体,诸如TCR或CAR或任何嵌合受体一起在此类细胞中表达。因此,该蛋白质在对用于ACT的细胞的工程化中有用。

[0033] 在一个实施方案中,信号是STAT介导的信号(例如STAT3或STAT5介导的信号),并且更特别地是STAT5介导的信号,它通常可在细胞中由白介素诸如IL-2或由EPO诱导。

[0034] 本发明的所述重组蛋白特别包含内域,或者能够与包含内域的另外的信号传导蛋白缔合以向细胞提供信号。因此,内域可以是如本文所述的重组蛋白的部分,或者例如可包含在例如通过其各自的跨膜结构域与所述重组蛋白缔合的信号传导蛋白内,例如其中所述重组蛋白的跨膜结构域可来自髓样受体,并且信号传导蛋白的跨膜结构域可来源于DAP10或DAP12。

[0035] 在特定的实施方案中,所述内域包含至少一个JAK 1和/或JAK2结合基序和至少一个STAT缔合基序(例如,STAT3和/或STAT5缔合基序)。特别地,所述内域可包含至少一个JAK2结合基序和至少一个STAT5缔合基序,或至少一个JAK1结合基序和至少一个STAT5缔合基序。所述内域可包含另外的结构域,例如可包括至少一个JAK 3结合基序。

[0036] 本发明还提供了一种T细胞,该T细胞包含核酸分子(或替代地称为多核苷酸),该核酸分子包含编码如本文所定义的重组蛋白的核苷酸序列。

[0037] 核酸分子可以是构建体的形式,或更特别地,重组构建体的形式,其包含核酸分子和一个或多个其他核苷酸序列(感兴趣的核苷酸序列)。例如,所述构建体可包含核酸分子和调节序列,例如表达控制序列,和/或编码另一种功能蛋白质(或更普遍地,感兴趣的蛋白质)的序列,例如受体,例如CAR或TCR等。当内域存在于另外的信号传导蛋白中时,编码所述重组蛋白和所述信号传导蛋白的核苷酸序列可在相同的构建体中提供。替代地,可为所述重组蛋白和所述信号传导蛋白提供单独的核酸分子或构建体。所述构建体可包含一个或多个共表达序列,它们将核酸分子与一个或多个其他编码核苷酸序列连接。

[0038] 如本文所定义的核酸分子或构建体可包含在载体内。当单独的重组蛋白和其他表达的蛋白质(例如,功能蛋白或信号传导蛋白)在单独的分子或构建体中编码时,它们可各自包含在单独的载体中。因此,可有一组载体,每个载体包含编码单独的所需蛋白质的序列。

[0039] 所述载体可以是病毒或非病毒载体。在一个实施方案中,所述载体可包含如本文所定义的核酸分子和编码感兴趣的蛋白质,尤其是受体,例如CAR或TCR的另外的核苷酸序

列。

[0040] 所述细胞(T细胞)在其细胞膜上表达所述重组蛋白。

[0041] 根据本发明还提供了包含如本文所定义的细胞的细胞群,例如T细胞群。

[0042] 在一个实施方案中,所述细胞是T细胞,包括CD4+或CD8+T细胞或其任何前体。因此,所述细胞可以是干细胞,或更特别地是造血干细胞(HSC)或多能干细胞(PSC),例如诱导多能干细胞(iPSC),即分化或转化成T细胞之前的细胞。特别地,所述T细胞可以是Treg细胞。所述细胞可以是原代细胞或来自细胞系。

[0043] 本发明还提供了一种制备如本文所定义的T细胞(即包含所述重组蛋白或编码所述重组蛋白的核酸分子的细胞)的方法,所述方法包括将如本文所定义的核酸分子、构建体或载体引入T细胞(例如用其转导或转染细胞)。该方法可包括允许所述重组蛋白在细胞中表达。这可包括例如培养所述细胞。

[0044] 此类方法还可包括分离、富集、提供或生成将在该方法中使用的细胞的在先步骤。此外,在引入核酸分子的步骤之后,可分离或富集或生成细胞。例如,可将核酸分子引入前体细胞或祖细胞,例如干细胞,然后可诱导或引起细胞分化或变成T细胞。例如,iPSC细胞可分化成Treg或其他T细胞,或者Tcon细胞可转化成Treg细胞等。

[0045] 这方面还可包括制备如本文所定义的重组蛋白的方法,所述方法包括将如本文所定义的核酸分子、构建体或载体引入T细胞,允许嵌合蛋白由细胞表达,以及任选地检测和/或收集嵌合蛋白。

[0046] 本发明还提供了一种制备如本文所定义的T细胞的方法,该方法包括对编码EPOR的内源性核酸进行遗传工程化,以包含修饰,从而使表达的EPOR包含在不存在EPO的情况下同型二聚化的胞外区,由此为T细胞提供信号。特别地,该方法可使用T细胞前体诸如iPSC(在分化成T细胞之前)进行,并且更特别地,从遗传工程化的内源性核酸表达的EPOR包含第154位的从R到C的氨基酸取代。

[0047] 本发明还提供了一种促进细胞存活或持久性的方法,所述方法包括将如本文所定义的核酸分子、构建体或载体引入所述细胞,或通过对如上所述的内源性核酸进行遗传工程化。

[0048] 这方面可包括向受试者施用如本文所定义的细胞,以及任选地向所述受试者施用信号诱导分子(例如,EPO,在需要加强组成型信号时)的附加步骤。可在施用细胞之前、期间或之后施用任何诱导剂。因此,在这方面,该方法可在体内进行。替代地,该方法可在体外/离体进行。

[0049] 替代地来看,本发明还提供了如本文所述的重组分子用于促进表达所述重组分子的细胞的存活或持久性的用途。

[0050] 如上所述,在治疗的背景中,所述重组蛋白可有利地在细胞中表达。虽然所述细胞可以是未修饰的细胞,即未被进一步遗传工程化以用于治疗用途的细胞,例如从受试者分离的T细胞,或来源于此类分离的细胞的细胞(尽管当然该细胞将通过本发明的方法修饰以表达所述重组蛋白),但通常该细胞将是经额外修饰的细胞,或工程化以表达另外的分子(即另外的蛋白质),尤其是受体,例如CAR或TCR的细胞。

[0051] 因此,本发明还提供了一种制备用于过继细胞转移疗法(ACT)的细胞的方法,所述方法包括向所述细胞提供如本文所定义的重组蛋白。更特别地,该方法可包括将如本文所

定义的核酸分子、构建体或载体引入所述细胞。该方法还可包括将单独的核酸分子、构建体或载体引入所述细胞,例如该单独的核酸分子、构建体或载体包含编码单独的(例如第二)蛋白质或治疗性蛋白质,尤其是受体,例如CAR或TCR的核苷酸序列。

[0052] 另外,本发明提供了一种药物组合物,该药物组合物包含细胞、细胞群或载体以及至少一种药学上可接受的载体或赋形剂,所述细胞、细胞群或载体包含编码如本文所定义的重组蛋白的核酸分子。在一个实施方案中,所述细胞或所述载体包含编码另外的蛋白质,尤其是嵌合蛋白或受体,例如CAR或TCR的附加核苷酸序列。在另一实施方案中,所述细胞包含单独的核酸分子、构建体或载体,该单独的核酸分子、构建体或载体包含编码另外的蛋白质,尤其是嵌合蛋白或受体,例如CAR或TCR的核苷酸序列。

[0053] 此外,本发明提供了用于治疗的包含编码如本文所定义的重组蛋白的核酸分子的细胞或细胞群,或如本文所定义的药物组合物,或包含编码如本文所定义的重组蛋白的核酸分子的载体。特别地,所述细胞、细胞群或包含所述细胞或细胞群的药物组合物可用于ACT。所述载体或包含所述载体的药物组合物可用于基因治疗。ACT或基因治疗可用于治疗或预防对ACT或基因治疗有应答的任何病症,特别是用于通过ACT或基因治疗的免疫治疗。

[0054] 本发明还提供了用于治疗或预防癌症或感染性、神经变性、炎性、自身免疫性或过敏性疾病或与不想要的或有害的免疫应答相关联的任何病症的包含编码如本文所定义的重组蛋白的核酸分子的细胞、细胞群、载体或如本文所定义的药物组合物。特别地,当所述细胞是Treg或其他免疫抑制细胞时,所述细胞可用于诱导免疫抑制(即用于抑制不想要的或有害的免疫应答),例如以改善和/或预防炎性病症、自身免疫性或过敏性疾病或病症中以及移植中的免疫介导的器官损伤。

[0055] 这方面还提供了一种过继细胞转移疗法的方法,所述方法包括向需要所述疗法的受试者施用包含编码如本文所定义的重组蛋白的核酸分子的细胞或细胞群,或如本文所定义的药物组合物,特别是有效量的所述细胞、细胞群或药物组合物。

[0056] 还提供了一种治疗或预防癌症或感染性、神经变性、炎性、自身免疫性或过敏性疾病或与不想要的或有害的免疫应答相关联的病症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用包含编码如本文所定义的重组蛋白的核酸分子的细胞、细胞群或载体,或如本文所定义的药物组合物,特别是有效量的所述细胞、细胞群、载体或药物组合物。

[0057] 此外,提供了包含编码如本文所定义的重组蛋白的核酸分子的细胞、细胞群或载体在制造用于治疗或预防癌症或感染性、神经变性、炎性、自身免疫性或过敏性疾病或与不想要的或有害的免疫应答相关联的病症的药物中的用途。

[0058] 在这些治疗方面的一些实施方案中,该用途可以是诱导对移植物的耐受性;治疗和/或预防细胞和/或体液移植物排斥;治疗和/或预防移植物抗宿主病(GvHD),一种自身免疫性或过敏性疾病;促进组织修复和/或组织再生;或改善炎症。特别地,在此类实施方案中,所述细胞可以是Treg细胞。

[0059] 在上述各种治疗方面,细胞、细胞群、载体或药物组合物可与信号诱导分子(特别是EPO)组合或一起使用。

[0060] 因此,另外的方面提供了一种用于治疗,特别是ACT或基因治疗的组合产品,该组合产品包含(a)含编码如本文所定义的重组蛋白的核酸分子的细胞、细胞群或载体,或如本文所定义的药物组合物,和(b)信号诱导分子(特别是EPO)。该治疗可以是如以上所定义的

和本文进一步描述的任何治疗。

[0061] 组合产品的组分(a)和(b)可用于单独、依次或同时使用。

附图说明

[0062] 图1描绘了野生型鼠EPOR,示出了在EPO存在下EPOR链的同型二聚化。当受体已经被EPO激活时,JAK2能够与受体的内域缔合,导致Y343的磷酸化以及STAT5的募集和二聚化。SHP1提供负反馈回路,用于控制通过EPOR的信号传导,并且可直接抑制JAK2。

[0063] 图2示出了如本文所述的不同重组蛋白。图2A示出了重组蛋白,该重组蛋白包含来自EPOR的第129位被修饰为半胱氨酸(鼠序列编号)的外域、EPOR的跨膜结构域和包含Y343(鼠序列编号)的EPOR内域。该重组蛋白能够同型二聚化以及通过STAT5向细胞提供组成型信号。图2B示出了重组蛋白,该重组蛋白包含来自EPOR的第129位被修饰为半胱氨酸(鼠序列编号)的外域、EPOR的跨膜结构域和EPOR的截短的内域,该内域去除了SHP1的结合位点,并因此去除了SHP1对JAK2的负反馈,增强了STAT5信号传导。图2C示出了重组蛋白,该重组蛋白包含来自EPOR的第129位被修饰为半胱氨酸(鼠序列编号)的外域、EPOR的跨膜结构域和包括来自IL2RB的截短的内域的内域,该内域保留了JAK1结合基序和STAT5缔合基序(具有Y510)。

[0064] 图3示出了实施例5中测试的构建体。来源于EPOR外域的外域允许使用EPOR抗体鉴定表达蛋白质的细胞。

[0065] 图4A提供了示出用各种构建体转导的新鲜Treg的转导效率的FACS图。使用HLA-A2dextramer和EPOR表达测量转导效率。

[0066] 图4B提供了示出用各种构建体转导的冷冻Treg的转导效率的FACS图。使用HLA-A2dextramer和EPOR表达测量转导效率。

[0067] 图5示出了经EPO处理和未经EPO处理的转导的和未转导的细胞级分的pSTAT5MFI。

[0068] 图6A示出了在有或没有IL2的情况下,6天内细胞群中的转导的细胞的比例(%)(通过A2 CAR的存在确定)。

[0069] 图6B示出了在有或没有IL2的情况下,6天内转导的(A2 Dex+)和未转导的(A2 Dex-)细胞级分的FoxP3表达。

[0070] 图6C示出了用658或786构建体转导的Treg在5天和7天内的倍数扩增。

[0071] 图7示出了在转导的和未转导的细胞级分中以及在模拟的转导的细胞中各种Treg标志物的表达。

[0072] 图8示出了使用aCD3/CD28珠粒、HLA-A2-B细胞和HLA-A2+B细胞的不同刺激,Treg对T效应细胞增殖的抑制%。

[0073] 图9示出了死亡靶细胞的%,表明了用不同构建体转导的Treg对靶细胞的细胞毒性。

[0074] 图10示出了模拟的Treg和用658或786构建体转导的Treg(转导的和未转导的细胞级分)中各种胞内细胞因子的水平。

具体实施方式

[0075] 本文的产品、方法和用途的主题是重组蛋白,该重组蛋白可用于促进表达该重组

蛋白的细胞的功能性或存活或实际上任何性质。因此,该蛋白质在过继细胞转移中具有用途,以帮助制备用于ACT的细胞和/或帮助在转移到受试者后保持细胞存活和功能。可改善细胞的治疗功效。

[0076] 本文所述的重组蛋白基于外域的存在,该外域的至少一部分来源于EPOR的胞外区,其中该外域包含二聚化结构域(例如至少一个二聚化结构域),该二聚化结构域允许在不存在信号诱导分子,特别是EPO的情况下重组蛋白与另一蛋白质(第二蛋白质)二聚化以及向包括该重组蛋白的细胞提供信号。如本文所述的重组蛋白能够与第二蛋白质(例如另一重组蛋白)自发二聚化,并能够向表达该重组蛋白的细胞提供组成型信号。特别地,信号可通过内域转导到细胞,在一个特定的实施方案中,内域可包含在重组分子内,或者在一个替代的实施方案中,内域可在单独的蛋白质("信号传导蛋白")上提供。

[0077] 因此,本发明基于重组分子向细胞提供组成型信号的能力。特别地,本文提供的重组蛋白的二聚化激活由JAK激酶活性(尤其包括JAK1或JAK2活性)介导的信号传导途径,并且特别是JAK1-STAT或JAK2-STAT信号传导途径。这样,重组蛋白可模拟由天然细胞因子受体,例如EPOR或白介素(例如IL-2)受体的激活所诱导的信号传导。"模拟"是指由本公开的重组蛋白激活的信号传导级联与由天然细胞因子受体激活的信号传导级联类似,而由本公开的重组蛋白诱导的激活的量级可与天然细胞因子受体的不同。

[0078] 如本文所述,所述重组蛋白包含外域。如本文所用,"外域"是指所述重组蛋白的一部分,当该部分作为膜结合蛋白表达时,可在细胞外部被发现。因此,通常,外域是指在细胞外发现的并且不在细胞膜或细胞质内的蛋白质部分。技术人员将理解,所述重组蛋白的表达最初将在胞内发生,并且在该过程期间,整个蛋白质将在细胞内发现。此外,所述重组蛋白可能被内化并周期性循环(例如响应于配体诸如EPO的结合)。然而,在其表达后的通常形式中,所述重组蛋白通常是膜结合蛋白,并且作为该蛋白质的一部分的外域可在细胞膜和细胞外部被发现。术语"外域"和"胞外结构域"和"胞外区"在本文中可互换使用。

[0079] 重组蛋白的外域包含来源于EPOR的胞外区的序列。例如,重组蛋白的外域可由来源于EPOR的胞外区的序列组成。如本文所用,"来源于"是指所述重组蛋白的外域包含与EPOR的胞外区具有至少70%同一性的序列,更特别地,包含与EPOR的胞外区具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列。相对于EPOR的野生型胞外区,包含在所述重组蛋白的外域中的来源于EPOR的胞外区的序列可包含至少一个修饰(例如至少一个氨基酸取代、插入、缺失或易位)。在这方面,在一个实施方案中,所述重组蛋白的外域可能不包含EPOR的野生型胞外区,例如SEQ ID NO.3或SEQ ID NO.5所示的胞外区。因此,包含在外域内的EPOR胞外区序列可包含一个修饰,或多于一个修饰,例如至少两个、三个、四个、五个、十个、十五个或二十个修饰。特别地,修饰中的至少一个修饰可导致二聚化结构域的引入和重组蛋白在不存在任何信号诱导分子的情况下(特别是在不存在EPO的情况下)二聚化,特别是同型二聚化,以及向表达所述重组蛋白的细胞提供信号的能力。包含在外域内的EPOR胞外区序列可附加地或替代地包含修饰,该修饰不导致二聚化结构域的引入,从而不导致重组蛋白在不存在任何信号诱导分子的情况下二聚化和/或传导信号的能力。然而,当二聚化结构域在外域中的其他地方提供时(即不在来源于EPOR的胞外结构域的部分内),外域内的EPOR胞外区序列可包含野生型序列或由其组成,或可包含不导致二聚化结构域的引入的一个或多个修饰。

[0080] EPOR是以其天然构象结合红细胞生成素(EPO)的受体,其中EPO结合触发二聚化和JAK2/STAT5信号传导级联。野生型EPOR因此向表达该受体的细胞提供诱导型而不是组成型信号。野生型人EPOR包含508个氨基酸,包括信号肽(SEQ ID NO.6,来自SEQ ID NO.1的氨基酸1-24);胞外区(SEQ ID NO.3(无信号肽),来自SEQ ID NO.1的氨基酸残基25-250);跨膜结构域(SEQ ID NO.7,来自SEQ ID NO.1的氨基酸残基251-273);和胞质结构域(SEQ ID NO.8,来自SEQ ID NO.1的氨基酸残基274-508)。EPOR的人全长野生型序列如SEQ ID NO.1所示。

[0081] 如本文所用,“EPOR的胞外区”是指通常在EPOR的细胞外,即在细胞外部发现的EPOR的区。特别地,当考虑人或鼠EPOR时,“EPOR的胞外区”可指SEQ ID No 3或5(对于人)或SEQ ID NO.11(对于鼠)所示的序列。因此,EPOR的胞外区可包含或缺少信号肽。

[0082] 如先前所述,本文所述的重组蛋白的外域包含来源于EPOR的胞外区的序列,该序列可包含一个或多个修饰。特别地,至少一个修饰可使重组蛋白能够在不存在信号诱导分子的情况下与第二蛋白质二聚化以及向包括重组蛋白的细胞提供信号(更特别地,与不存在信号诱导分子(特别是EPO)的野生型EPOR相比,重组蛋白在不存在信号诱导分子(特别是EPO)的情况下与第二蛋白质二聚化的能力增加,和/或与不存在信号诱导分子(特别是EPO)的野生型EPOR相比,重组蛋白向包含该重组蛋白的细胞传导信号的能力增加)。因此,与不存在信号诱导分子(例如EPO)的野生型EPOR相比,重组蛋白的二聚化和/或提供信号的能力可增加至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。二聚化和/或信号传导的增加可如下文进一步讨论的来确定。

[0083] 通常,在本发明中,可对EPOR的胞外区进行产生所述功能(在不存在信号诱导分子的情况下传导信号,即组成型信号传导)的一个或多个修饰。此类一个或多个修饰可允许重组蛋白与第二蛋白质之间基于同源二聚化结构域的二聚化,该同源二聚化结构域在接近时以任何方式缔合(例如,结合或相互作用)。因此,EPOR的胞外区的修饰可引入二聚化结构域,该二聚化结构域允许在不存在信号诱导分子的情况下二聚化。

[0084] 在一个特定的实施方案中,一个或多个修饰可允许通过重组蛋白与第二蛋白质的二硫键结合进行二聚化(二硫键连接的二聚化),并且更特别地可允许二硫键连接的同型二聚化。通常,一个或多个非天然存在的半胱氨酸残基可插入或取代到EPOR的胞外区中以实现这种效果。在这方面,包含在来源于EPOR的胞外区的外域内的序列可能在SEQ ID NO.3的第130位、SEQ ID NO.5的第154位或SEQ ID NO.11的第129位具有氨基酸修饰。更特别地,修饰可以是精氨酸到半胱氨酸的氨基酸取代,并且因此可在SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.5(或SEQ ID NO.1)或SEQ ID NO.11(或SEQ ID NO.9)的背景中分别称为R130C、R154C或R129C。技术人员会理解,该实施方案特别提供了重组蛋白链之间的二硫键结合,提供了重组蛋白的同型二聚化。因此,重组蛋白的外域可包含在第130位具有R到C的氨基酸取代的SEQ ID NO.3的氨基酸序列或由其组成、在第154位具有R到C的氨基酸取代的SEQ ID NO.5的氨基酸序列或由其组成,或在第129位具有R到C的氨基酸取代的SEQ ID NO.11的氨基酸序列或由其组成。

[0085] 替代地来看,外域可包含SEQ ID NO.2或SEQ ID NO.4或SEQ ID NO.10的序列或由其组成。

[0086] 如本文所用,提及“二聚化结构域”是指能够结合至第二结构域的第一结构域,其

中第一结构域和第二结构域可以相同(同型二聚化结构域)或不同(异型二聚化结构域)。本发明的二聚化结构域也可称为组成型二聚化结构域,因为二聚化在不存在信号诱导分子(例如二聚化诱导分子)的情况下发生至其同源配偶体。如以上所讨论的,二聚化结构域可存在于外域的任何部分内,例如存在于来源于EPOR的胞外区的部分内或外域内的其他地方。因此,二聚化结构域可通过对如上所述的EPOR的胞外区的修饰而形成,或者可基于如以下所讨论的本领域已知的其他组成型二聚化系统(其可位于来源于EPOR的胞外区的序列内、位于EPOR的胞外区的N或C末端或位于外域中的其他地方)。

[0087] 在这方面,可特别提及亮氨酸拉链,其是本领域广泛已知和描述的。亮氨酸拉链结构域是一类通常在转录因子中发现的蛋白质-蛋白质相互作用结构域,其特征在于通过α-螺旋均匀间隔的亮氨酸残基。因此,在一个实施方案中,本文的二聚化结构域是或包含亮氨酸拉链序列。根据所使用的亮氨酸拉链序列,这些可用于异型二聚化或同型二聚化。来源于Fos或Jun蛋白质分子的亮氨酸拉链结构域描述于Patel等,1996,J.Biol.Chem.271(8),30386-30391;和Stuhlmann-Laeisz等,2006,Mol.Biol.Cell 17,2986-2995中。基于人c-Jun的代表性亮氨酸拉链序列如SEQ ID NO.20所示(这可包含N末端的GG),并且Fos亮氨酸拉链序列如SEQ ID NO.21所示。

[0088] 可使用分别包含Jun和Fos亮氨酸拉链的异型二聚化结构域。替代地,可使用包含Jun亮氨酸拉链的同型二聚化结构域。

[0089] 本领域已知的其他亮氨酸拉链二聚化结构域包括基于ZIP蛋白质的那些,ZIP蛋白质是一类转录因子。ZIP结构域是含有亮氨酸的α-螺旋区,亮氨酸排列形成亮氨酸拉链基序。ZIP结构域可与其他ZIP结构域上的亮氨酸相互作用,以可逆地将α-螺旋保持在一起(即,使它们二聚化)。因此,本文的二聚化结构域可包含bZIP或aZIP亮氨酸拉链结构域。例如,异型二聚化结构域可以是或包含BZIP(RR)结构域,其与AZIP(EE)结构域异型二聚化。亮氨酸拉链是可用于产生二聚化结构域的卷曲螺旋结构蛋白质基序的实例。基于bZIP和合成卷曲螺旋肽的异型二聚化结构域描述于Reinke等2010,J.Am.Chem.Soc.132(17),6025-6031中,并且可使用这些中的任一种。例如,合适的亮氨酸拉链结构域可包括SYNZIP 1至SYNZIP 48。亮氨酸拉链结构域的其他实例包括BATF、ATF4、ATF3、BACH1、JUND、NFE2L3和HEPTAD。BZip(RR)亮氨酸拉链结构域的序列如SEQ ID NO.22所示。AZip(EE)亮氨酸拉链结构域的序列如SEQ ID NO.23所示。

[0090] 在一些实施方案中,一对合适的亮氨酸拉链结构域具有1000nM或更小的解离常数(Kd),例如100nM或更小、10nM或更小或1nM或更小。

[0091] 另外的示例性二聚化结构域对可包括PSD95-Dlgl-zo-1(PDZ)结构域,或链霉亲和素结构域和链霉亲和素结合蛋白(SBP)结构域。其他二聚化结构域可从已知相互作用或彼此结合的其他蛋白质获得或来源。例如,异型二聚化结构域对可包含CD80和PDL-1。

[0092] 同型二聚化结构域的又一个实例是免疫球蛋白G的Fc区。Fc区已广泛用于融合蛋白,包括提供二聚化结构域,并且文献中已描述了可二聚化Fc区的各种片段和突变体,例如缺乏Fc区的前5个氨基酸的片段。

[0093] 如以上所讨论的,包含在外域内的来自EPOR的胞外区序列可包括额外修饰,该修饰可有助于或不有助于重组分子在不存在信号诱导分子的情况下二聚化和传导信号的能力。特别地,本发明人设想,EPOR的胞外区的变体或片段可用于本发明,只要重组蛋白具有

所需的自发二聚化(即当与能够二聚化的第二蛋白质定位时,在不存在信号诱导分子的情况下二聚化)以及向包含该重组蛋白(和与该重组蛋白不同的第二蛋白质)的细胞提供信号的能力即可。如上所述,特别地,此类变体或片段/部分可与EPOR的野生型胞外区(例如与SEQ ID No 3、5或11)具有至少70%序列同一性。因此,进一步修饰的EPOR的胞外区可用于本发明,例如包含额外的氨基酸取代、缺失、添加或易位,例如至少1、2、3、4或5个氨基酸取代、缺失、添加或易位。在这方面,外域可包含SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.4或SEQ ID NO.10的变体或片段(例如与SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.4或SEQ ID NO.10具有至少60%、70%、80%、90%或95%同一性的变体或片段)或由其组成,条件是重组蛋白具有在不存在信号诱导分子的情况下与第二蛋白质二聚化以及向表达该重组蛋白的细胞提供信号的期望功能。会理解,包含此类变体或片段的重组蛋白可具有与包含含有SEQ ID NO.2、4或10的外域的重组蛋白相同或类似的与第二蛋白质二聚化和/或提供信号的能力,或者可具有改进的与第二蛋白质二聚化的能力。特别地,包含所述变体或片段的重组蛋白可具有包含含有SEQ ID NO.2的外域的重组蛋白的二聚化和/或传导信号的能力的至少40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、120%、150%、170%、190%或200%。二聚化可如以下进一步所述地检测和测量。

[0094] 更特别地,所述外域可包含SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.4或SEQ ID NO.10的变体或片段(例如与SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.4或SEQ ID NO.10具有至少60%、70%、80%、90%或95%同一性的变体或片段)或由其组成,条件是SEQ ID NO.2的变体或片段包含R130C,SEQ ID NO.4的变体或片段包含R154C,并且SEQ ID NO.10的变体或片段包含R129C。此外,所述变体或片段应当为重组蛋白提供在不存在信号诱导分子的情况下与第二蛋白质二聚化以及向包括该重组蛋白的细胞提供信号的能力。

[0095] 本领域报道的对EPOR的胞外区的修饰包括T114A、S115A、S116A、F117A、F117L、F117W、F117Y、V118A、L120A、E121A、R165A、M174A、S176A、H177A和R179A。在本发明中,这些修饰中的任一种或多种可存在于来源于EPOR的胞外区的外域序列中。

[0096] 尽管在一些实施方案中是优选的,但包含在重组蛋白的外域的来源于EPOR的胞外区的序列保留其结合EPO的能力并不是必需的。因此,修饰EPOR的胞外区的EPO结合位点以降低(例如降低超过10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%)或去除结合EPO的能力在本发明的范围内。替代地,如所讨论的,在一个实施方案中,可能期望外域(以及因此EPOR的胞外区)能够结合EPO,以向细胞提供附加信号,该信号高于鉴于对该区进行修饰而提供的组成型信号。本发明还涵盖提供EPOR的胞外区,其中EPO结合位点已被特异性修饰,从而与未修饰的野生型EPOR胞外区相比,提供增强的与EPO的结合。在这方面,EPO结合位点的修饰可允许EPO对结合位点的亲和力增加至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。EPO结合位点在SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.5的第117位发现,并且因此本发明涵盖对该位置的修饰。

[0097] 除了来源于EPOR的胞外区的序列和/或任何组成型二聚化结构域之外,外域还可包含其他异源结构域或标签。因此,提及对如本文所用的外域(该外域的至少一部分来源于EPOR的胞外区)是指尽管该外域包含来源于EPOR的胞外区的氨基酸序列,但也可存在附加异源序列(即野生型EPOR中不存在的序列)。例如,外域还可包含自杀部分,以允许诱导细胞死亡,这可能是必需的或期望的(例如,在细胞疗法施用期间或之后的不良事件发生期间)。

可能的自杀部分的实例包括CD20表位,其中可通过施用利妥昔单抗(Rituximab)诱导细胞死亡。WO2013/15339描述了可以这种方式使用的CD20表位。可使用的其他结构域包括标签,这些标签可用于鉴定和分选表达重组分子的细胞,例如Strep标签或myc标签。

[0098] 另外,在一些情况下,可能期望在重组分子的外域内包括一个或多个另外的诱导型二聚化结构域,以允许可能的信号传导增强(例如,与具有相同氨基酸序列但不具有一个或多个另外的诱导型二聚化结构域的重组分子相比,信号传导增加至少10%、20%、30%、40%或50%)。替代地来看,与没有另外的诱导型二聚化结构域的重组蛋白相比,一个或多个另外的诱导型二聚化结构域的存在可允许如本文所定义的重组蛋白与第二蛋白质之间发生更大量的二聚化(例如增加至少10%、20%、30%、40%或50%)。任何附加的诱导型二聚化结构域均可允许通过任何方式二聚化,例如二聚化可以是直接或间接缔合,并且不意味着两个二聚化结构域需要结合或直接连接在一起,尽管这不排除在外。通常,诱导型二聚化结构域可各自结合二聚化诱导分子。技术人员将理解,当二聚化诱导分子需要用于任何另外的诱导型二聚化结构域之间的二聚化时,信号传导或获得的二聚体比例的增加可能仅在二聚化诱导分子存在时发生。此类另外的诱导型二聚化结构域可以是在来源于EPOR的胞外区的序列内存在的EPO结合位点的补充,或者可取代此类EPO结合位点的缺失。

[0099] 化学诱导的二聚化系统是本领域已知的,使用各种二聚化诱导分子和用于二聚化的不同蛋白质结构域,并且在下文中进一步描述。

[0100] 由小分子诱导剂介导的化学诱导的二聚化的概念已为人所知多年,并且已被用作控制融合至诱导剂结合结构域的感兴趣的蛋白质之间的二聚化的工具。此类系统已被描述为用于细胞生物学的不同应用,以使蛋白质接近,例如用于研究信号传导途径和其他生物学机制,用于药物中以降解或灭活致病蛋白质,以及用于基因和细胞疗法。典型的二聚化的化学诱导剂(CID)或本文使用的术语二聚化诱导剂具有能够与两个蛋白质或蛋白质结构域相互作用或结合的特征,该两个蛋白质或蛋白质结构域在分子的任一侧上各一个。因此,它具有两个结合位点或结合表面(或更一般地,相互作用位点)。在异型二聚化的情况下,二聚化诱导剂能够与两种不同的蛋白质或二聚化结构域相互作用或结合。在同型二聚化的情况下,二聚化诱导剂能够与相同二聚化结构域的两个拷贝或分子相互作用或结合。最初的系统基于大环内酯FK506和雷帕霉素,它们能够结合并因此诱导各种不同蛋白质或蛋白质结构域的异型二聚化,该蛋白质或蛋白质结构域包括FK506-结合蛋白(FKBP)、mTOR的FKBP-雷帕霉素结构域(FRB)、钙调磷酸酶和亲环蛋白,它们可以不同组合使用以实现异型二聚化结构域对和CID组合。此类系统可包括使用环孢菌素,该环孢菌素结合钙调磷酸酶或亲环蛋白。随后,开发了基于不同分子的其他CID异型二聚化系统,并在文献中有所描述。此外,开发了基于能够结合两个FKBP分子的FK506衍生物的同型二聚化系统,即基于对称或二聚体诱导剂,其包含用于相同二聚化结构域的两个结合位点。

[0101] 在一个实施方案中,二聚化诱导分子是雷帕霉素或其类似物,并且二聚化结构域是与其结合的蛋白质结构域。雷帕霉素和雷帕霉素类似物通过在mTOR的FRB结构域与FK506-结合蛋白(FKBP)之间生成界面而诱导异型二聚化。这种缔合导致FKBP阻断mTOR活性位点的通路,抑制其功能。虽然mTOR是非常大的蛋白质,但与雷帕霉素相互作用所需的mTOR的精确小区段是已知的并且可使用。

[0102] 大环内酯雷帕霉素和FK506通过诱导细胞蛋白质的异型二聚化而起作用。每种药

物以高亲和力结合FKBP12蛋白质,产生药物-蛋白质复合物,其随后分别结合并灭活mTOR/FRAP和钙调磷酸酶。mTOR的FKBP-雷帕霉素结合(FRB)结构域已被定义并应用为可融合至感兴趣的蛋白质的分离的89个氨基酸的蛋白质部分。然后雷帕霉素可诱导FRB融合体接近FKBP12或与FKBP12融合的蛋白质。

[0103] 术语“FRB”和“FKBP”包括其变体。此类变体可包括相对于天然序列具有一个或多个氨基酸修饰(例如取代、添加和/或缺失)的氨基酸序列。术语“FKBP”包括FKBP12。

[0104] 雷帕霉素具有理想的诱导型二聚化剂的若干性质:当结合至FKBP时,它对FRB具有高亲和力(KD＜1nM),并且对mTOR的FRB结构域具有高度特异性。雷帕霉素是一种有效的治疗性免疫抑制剂,在哺乳动物中具有有利的药代动力学和药效学特征。根据临床情况,也可使用具有不同药代动力学和动力学性质的雷帕霉素的药理学类似物,诸如依维莫司、替西罗莫司和Deforolimus(Benjamin等,Nature Reviews,Drug Discovery,2011)。

[0105] 为了防止雷帕霉素结合和灭活内源性mTOR,可修饰接触FRB的雷帕霉素表面。FRB结构域的补偿性突变形成容纳“受冲击”雷帕霉素的表面,仅恢复与FRB突变体的二聚化相互作用,而不恢复与内源性mTOR蛋白质的二聚化相互作用。

[0106] Bayle等(Chem Bio;2006;13;99-107)描述了各种雷帕霉素类似物,或“雷帕霉素及其类似物(rapalogs)”和它们对应的修饰的FRB结合结构域。例如,Bayle等(2006)描述了雷帕霉素及其类似物:如图2所示的C-20-甲基烯丙基雷帕霉素(MaRap)、C16(S)-丁基磺胺雷帕霉素(C16-BS-Rap)和C16-(S)-7-甲基吲哚雷帕霉素(AP21976/C16-AiRap),并结合了各自的互补结合结构域。其他雷帕霉素/雷帕霉素及其类似物包括西罗莫司和他克莫司(FK506)。

[0107] 因此,在此类实施方案中,如本文所述的重组蛋白内的诱导型二聚化结构域可包含FKBP,并且第二蛋白质可包含同源二聚化结构域FRB,或反之亦然。FKBP/FRB可具有或可包含如SEQ ID NO:15至SEQ ID NO:19中任一者所示的序列,或其变体。

[0108] 如本文可互换使用的“信号诱导剂分子(signal inducer molecule)”或“信号诱导分子(signal inducing molecule)”是指能够通过包含外域、跨膜结构域和内域的蛋白质或受体向包括此类蛋白质或受体的细胞诱导信号传导的分子。信号诱导剂分子可能能够诱导任何种类的信号,并且技术人员会理解,所诱导的信号将取决于蛋白质或受体内存在的内域。通常,信号诱导剂分子结合蛋白质或受体以诱导信号。在一个方面,信号诱导剂可结合蛋白质或受体并诱导二聚化或多聚化,导致通过蛋白质或受体的内域的信号的转导。在这方面,信号诱导剂分子可以是二聚化诱导剂分子。然而,信号诱导剂也可能结合受体或蛋白质并诱导构象变化,导致产生由蛋白质或受体的内域易位的信号。在这方面,信号诱导剂分子可结合已经二聚化的受体或蛋白质(例如无信号传导或弱信号传导)以通过内域在细胞中产生信号。在本发明中,重组蛋白能够在没有此类信号诱导剂分子的情况下,向细胞提供信号。因此,重组蛋白不需要信号诱导剂分子的存在来向细胞提供信号(和/或与第二蛋白质二聚化)。特别地,信号诱导剂分子可以是EPO。

[0109] 如本文所用,“EPO”是指红细胞生成素,并且包含SEQ ID NO.14的氨基酸序列。EPO通常在SEQ ID NO.1的氨基酸第117位结合EPOR。如详细讨论的,本发明的重组蛋白不需要EPO的存在来向包含该重组蛋白的细胞产生信号。

[0110] 如本文所用,“二聚化诱导剂分子”可在两个诱导型二聚化结构域之间(例如在重

组蛋白和第二蛋白质内)产生界面,以使它们作为二聚体集合在一起,或允许两个诱导型二聚化结构域之间(例如在重组蛋白和第二蛋白质内)的化学交联,从而允许形成二聚体。如本文广泛讨论的,重组蛋白能够在不存在信号诱导剂分子,包括不存在二聚化诱导剂分子的情况下,与第二蛋白质二聚化以及在包含该重组蛋白的细胞中提供信号。然而,不排除一个或多个其他诱导型二聚化结构域可存在于重组分子内。二聚化诱导剂分子的实例包括如以上所讨论的雷帕霉素。

[0111] 如本文所述的重组蛋白与第二蛋白质的二聚化(通过如本文所讨论的修饰和/或通过一个或多个诱导型二聚化结构域的存在)可通过本领域公知的非变性SDS PAGE或通过动态光散射技术来确定或测量。因此,由于蛋白质(和在本发明中的重组蛋白)的单体和二聚体形式的大小差异,通常可检测到二聚化。因此,重组蛋白与第二蛋白质二聚化(特别是同型二聚化)的能力可通过检测细胞或细胞群内重组蛋白二聚体的存在来测量(或确定)。如本文所述,重组蛋白具有在不存在信号诱导剂分子,特别是EPO的情况下,与第二蛋白质二聚化的能力。因此,这种二聚化的能力可通过检测重组蛋白在细胞内表达时的二聚体形式(单独用于同型二聚化或与不同的第二蛋白质一起用于异型二聚化)来确定。通常,本发明的重组蛋白在不存在信号诱导剂分子的情况下可二聚化至与野生型EPOR在EPO存在下二聚化相同或类似的程度。替代地,与在EPO存在下的野生型EPOR相比,重组蛋白可具有改进的与第二蛋白质二聚化的能力。因此,改进的二聚化的能力可指与参考相比,例如与在EPO存在下的野生型EPOR相比,或与SEQ ID NO.2相比对于SEQ ID NO.2的变体或片段而言,细胞或细胞群中二聚体或单体形式的重组蛋白的相对量的增加或减少(例如二聚体形式的重组蛋白增加或减少至少40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%)。技术人员会理解,与在EPO存在下的野生型EPOR相比,在不存在EPO的情况下重组蛋白的二聚化/信号传导的减少(例如减少至少10%、20%、30%、40%或50%)仍将向细胞传递足够的信号以提供所需的结果(例如持久性),并且在特定的实施方案中可能是优选的。

[0112] 如本文所指的,与“第二蛋白质”的二聚化是指重组蛋白能够与第二蛋白质形成二聚体(即,重组蛋白单体可与第二蛋白质的单体缔合以形成二聚体(包括每种单体的一个拷贝))。在一个方面,第二蛋白质是重组蛋白,因此在这种情况下,重组蛋白能够同型二聚化,例如与其自身二聚化,其中二聚体包含两个重组蛋白单体。因此,在该实施方案中,重组蛋白在细胞中的表达足以发生二聚化(不同蛋白质的表达对于二聚化不是必需的),并且如先前所讨论的,不需要信号诱导剂分子。二聚化可如上所述检测。

[0113] 替代地或附加地,如本文所定义的重组蛋白可能够与不同的第二蛋白质异型二聚化,该第二蛋白质可以不是本发明的重组蛋白。因此,第二蛋白质可包含与重组蛋白不同的结构域或部分。然而,第二蛋白质应当能够在不存在信号诱导剂分子的情况下与重组蛋白二聚化以及提供信号。因此,第二蛋白质应当包含与重组蛋白同源的二聚化结构域,其能够在不存在信号诱导剂分子的情况下缔合以及传导信号。例如,在一个实施方案中,当重组蛋白包含含有修饰的EPOR的胞外区的外域时(其中该修饰包括将氨基酸残基插入或取代为半胱氨酸(为了二硫键连接的二聚化的目的)),第二蛋白质应当在合适的位置包含同源半胱氨酸残基,以允许在不存在信号诱导剂分子的情况下二聚化。替代地(或附加地),当重组蛋白包含具有亮氨酸拉链的外域时,第二蛋白质也可包含同源亮氨酸拉链,以允许在不存在信号诱导剂分子的情况下二聚化。例如,重组蛋白可包含Jun或Fos亮氨酸拉链,并且第二蛋

白质可包含Jun亮氨酸拉链(或反之亦然)。技术人员会理解,如本文所述的重组蛋白可能能够同型二聚化和异型二聚化。因此,表达重组蛋白和第二不同蛋白质的细胞可包含重组蛋白的同型二聚体以及重组蛋白和第二不同蛋白质的异型二聚体。

[0114] 因此,在一个实施方案中,第二蛋白质可以是重组分子的变体或部分,特别地,第二蛋白质可包含这样的外域,其是重组分子的外域的变体或部分(例如可与其具有至少70%、80%、90%或95%序列同一性)。替代地,第二蛋白质可包含这样的内域,其是重组分子的内域的变体或部分(例如可与其具有至少70%、80%、90%或95%同一性)。第二蛋白质必须能够在不存在信号诱导剂分子的情况下结合重组蛋白。特别地,对于包含附加的诱导型二聚化结构域(例如诱导型异型二聚化结构域)的重组蛋白,重组蛋白内存在的附加的诱导型二聚化结构域可不同于第二蛋白质中存在的附加的诱导型二聚化结构域(例如FRB/FKBP或其功能变体—在该实施方案中,重组蛋白可附加地包含FRB,并且第二蛋白质可包含FKBP,并且反之亦然)。

[0115] 附加地或替代地,重组蛋白和第二蛋白质可包含不同的标签,例如重组蛋白可包含strep标签,并且第二蛋白质可包含myc标签,或反之亦然。技术人员会理解,第二蛋白质通常可以是重组的,并且本发明可能附加地需要所述重组第二蛋白质与本发明的重组蛋白一起在细胞中表达。因此,本发明还提供了将包含编码第二蛋白质的核苷酸序列的第二核酸分子引入细胞,例如与包含编码如本文所定义的重组蛋白的核苷酸序列的核酸一起引入。

[0116] 本文呈现的任何氨基酸序列的变体可与参考序列(即与如本文所指定的参考SEQ ID NO.)具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性,除非另有说明。特别地,此类变体保留了其所来源的亲本分子即参考序列的所需或要求的性质。因此,变体序列可具有所述的%序列同一性,条件是变体序列提供有效的二聚化系统和信号。

[0117] 如本文可互换使用的,与本发明的蛋白质或多肽相关的术语“衍生物”或“变体”包括对序列进行一个(或多个)氨基酸残基的任何取代、变化、修饰、替换、缺失和/或添加,条件是所得蛋白质或多肽保留所需功能。例如,当衍生物或变体是内域时,所需功能可以是该结构域传导信号(例如,激活或灭活下游分子)的能力,当衍生物或变体是二聚化结构域时,所需功能是与同源二聚化结构域的相互作用(直接或间接地)。替代地来看,本文所指的变体或衍生物通常是功能变体或衍生物。例如,与对应参考序列相比,变体或衍生物可具有至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%的功能。与对应参考序列相比,变体或衍生物可具有类似或相同的功能水平,或者可具有增加的功能水平(例如增加至少10%、至少20%、至少30%、至少40%或至少50%)。

[0118] 通常,可进行氨基酸取代,例如1、2或3至10或20个取代,条件是修饰的序列保留所需的活性或能力。氨基酸取代可包括使用非天然存在的类似物。例如,与对应参考序列相比,变体或衍生物可具有至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%的活性或能力。与对应参考序列相比,变体或衍生物可具有类似或相同的活性或能力水平,或者可具有增加的活性或能力水平(例如增加至少10%、至少20%、至少30%、至少40%或至少50%)。

[0119] 蛋白质或肽也可具有氨基酸残基的缺失、插入或取代,其产生沉默改变并产生功能等同的蛋白质。只要保留了内源性功能,就可基于残基的极性、电荷、溶解性、疏水性、亲

水性和/或两亲性性质的类似性进行有意的氨基酸取代。例如,带负电荷的氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸;带正电荷的氨基酸包括赖氨酸和精氨酸;并且具有类似亲水性值的带有不带电荷的极性头基的氨基酸包括天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸。

[0120] 例如,可根据下表1进行保守取代。

[0121] 表1

[0122]

脂肪族	非极性	GAP
		ILV
	极性-不带电荷	CSTM
		NQ
	极性-带电荷	DE
		KR
芳香族		HFWY

[0123] 衍生物可以是同源物。如本文所用,术语“同源物”是指与野生型氨基酸序列和野生型核苷酸序列具有一定同源性的实体。术语“同源性”可等同于“同一性”。

[0124] 同源或变体序列可包括与主题序列至少80%、85%或90%相同,优选地至少95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。通常,变体将包含与主题氨基酸序列相同的活性位点等。尽管同源性也可根据类似性(即具有类似化学性质/功能的氨基酸残基)来考虑,但在本文的背景中,优选地根据序列同一性来表达同源性。

[0125] 同源性比较可通过肉眼进行,或者更通常地,借助于容易获得的序列比较程序进行。这些可商购获得的计算机程序可计算两个或更多个序列之间的同源性或同一性百分比。

[0126] 可在连续序列上计算同源性或序列同一性百分比,即,将一个序列与另一序列比对,并且将一个序列中的每个氨基酸与另一序列中的对应氨基酸直接比较,一次一个残基。这称为“无缺口”比对。通常,此类无缺口比对仅在相对少量的残基上进行。

[0127] 尽管这是一种非常简单和一致的方法,但是它没有考虑到例如在一对相同的序列中,核苷酸序列中的一个插入或缺失可能导致后面的密码子不对齐,因此当进行全局比对时可能导致同源性百分比的大幅降低。因此,大多数序列比较方法被设计成产生最佳比对,其考虑了可能的插入和缺失,而不会过度地对整体同源性得分进行罚分。这通过在序列比对中插入“缺口”以尽量最大化局部同源性来实现。

[0128] 然而,这些更复杂的方法向比对中出现的每个缺口分配“缺口罚分”,使得对于相同数量的相同氨基酸,缺口尽可能少的序列比对(反映两个比较序列之间更高的相关性)将比具有许多缺口的序列比对实现更高的得分。通常使用“仿射缺口代价”,其对缺口的存在收取相对较高的代价,而对缺口中的每个后续残基收取较小的罚分。这是最常用的缺口评分系统。高缺口罚分当然将产生缺口更少的优化比对。大多数比对程序允许修改缺口罚分。然而,当使用此类软件进行序列比较时,优选使用默认值。例如,当使用GCGWisconsin Bestfit软件包时,对氨基酸序列的默认缺口罚分对于缺口是-12,对于每个延伸是-4。

[0129] 因此,最大同源性/序列同一性百分比的计算首先需要产生最佳比对,考虑缺口罚

分。用于进行此类比对的合适的计算机程序是GCG Wisconsin Bestfit软件包(美国威斯康星大学;Devereux等(1984)Nucleic Acids Res.12:387)。可进行序列比较的其他软件的实例包括但不限于BLAST软件包(参见Ausubel等(1999)同上-第18章)、FASTA(Atschul等(1990)J.Mol.Biol.403-410)和GENEWORKS比较工具套件。BLAST和FASTA都可用于离线和在线搜索(参见Ausubel等(1999)同上,第7-58页至第7-60页)。然而,对于一些应用,优选使用GCG Bestfit程序。另一种称为BLAST 2Sequences的工具也可用于比较蛋白质和核苷酸序列(参见FEMS Microbiol.Lett.(1999)174:247-50;FEMS Microbiol.Lett.(1999)177:187-8)。

[0130] 尽管最终同源性百分比可根据同一性来测量,但比对过程本身通常不是基于全有或全无配对比较。相反,通常使用按比例缩放的类似性得分矩阵,其基于化学类似性或进化距离为每个成对比较分配得分。常用的此类矩阵的实例是BLOSUM62矩阵,它是BLAST程序套件的默认矩阵。GCG Wisconsin程序通常使用公共默认值或自定义符号比较表(如有提供)(详见用户手册)。对于一些应用,优选使用GCG软件包的公共默认值,或者在其他软件的情况下,使用默认矩阵,诸如BLOSUM62。适当地,跨越整个参考序列和/或查询序列确定同一性百分比。

[0131] 一旦软件产生了最佳比对,就可计算同源性百分比,优选地为序列同一性百分比。软件通常将此作为序列比较的一部分来进行,并生成数值结果。

[0132] “片段”通常是指多肽或多核苷酸的选定区,其在功能上是感兴趣的,例如是功能性的或编码功能片段。因此,“片段”是指作为全长多肽或多核苷酸的一部分(或部分)的氨基酸或核酸序列。

[0133] 此类变体、衍生物和片段可使用标准重组DNA技术诸如定点诱变来制备。当要进行插入时,可制备编码插入的合成DNA以及对应于插入位点任一侧天然存在的序列的5’和3’侧翼区。侧翼区将含有对应于天然存在的序列中的位点的方便的限制性位点,使得可用适当的酶切割序列并将合成DNA连接到切口中。然后根据本发明表达DNA以制备编码的蛋白质。这些方法仅说明了本领域已知的用于操作DNA序列的许多标准技术,也可使用其他已知技术。

[0134] 如本文所述的重组蛋白特别包含跨膜结构域,该跨膜结构域通常将重组蛋白的外域锚定到细胞膜。跨膜结构域可来源于具有跨膜结构域的任意蛋白质,包括I型、II型或III型跨膜蛋白质中的任一者。

[0135] 嵌合蛋白的跨膜结构域也可包含人工疏水序列。附加的跨膜结构域对本领域技术人员将是显而易见的。TM结构域可例如选自通常用于重组跨膜蛋白质的那些结构域中的任何结构域。可使用的跨膜(TM)区的实例是:1)CD28 TM区(Pule等,Mol Ther,2005年11月;12(5):933-41;Brentjens等,CCR,2007年9月15日;13(18Pt 1):5426-35;Casucci等,Blood,2013年11月4日;122(20):3461-72.);2)OX40 TM区(Pule等,Mol Ther,2005年11月;12(5):933-41);3)41BB TM区(Brentjens等,CCR,2007年9月15日;13(18Pt1):5426-35);4)CD3ζTM区(Pule等,Mol Ther,2005年11月;12(5):933-41;Savoldo B,Blood,2009年6月18日;113(25):6392-402.);5)CD8a TM区(Maher等,Nat Biotechnol,2002年1月;20(1):70-5;Imai C,Leukemia,2004年4月;18(4):676-84;Brentjens等,CCR,2007年9月15日;13(18Pt 1):5426-35;Milone等,Mol Ther,2009年8月;17(8):1453-64.)。可使用的其他跨膜结构域包

括来自CD4、CD45、CD9、CD16、CD22、CD33、CD64、CD80、CD86或CD154的那些跨膜结构域。跨膜结构域还可来源于IL2RB或EPOR。

[0136] 例如,跨膜结构域可来源于CD28跨膜结构域,并且可包含如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:24至少80%相同的变体或由其组成。变体可与SEQ ID NO:24至少80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%相同。

[0137] 在特定的实施方案中,跨膜结构域可来源于EPOR跨膜结构域,并且可包含如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:7至少80%相同的变体或由其组成。变体可与SEQ ID NO:7至少80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%相同。

[0138] 替代地,跨膜结构域可来源于IL2RB跨膜结构域,并且可包含如SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:25至少80%相同的变体或由其组成。变体可与SEQ ID NO:25至少80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%相同。

[0139] 替代地,重组蛋白可包含来源于CD8α跨膜结构域的结构域。因此,跨膜结构域可包含如SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列(该序列代表人CD8α的第183至203位氨基酸)或与SEQ ID NO:26至少80%相同的变体或由其组成。适当地,变体可与SEQ ID NO:26至少85%、90%、95%、97%、98%或99%相同。

[0140] 跨膜结构域可替代地来源于髓系受体蛋白质的跨膜结构域,例如来源于TREM蛋白质,诸如TREM1或TREM2。因此,重组蛋白可包含跨膜结构域,该跨膜结构域包含SEQ ID NO 27或SEQ ID NO.28所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO 27或SEQ ID NO 28至少80%相同的变体或由其组成。适当地,变体可与SEQ ID NO 27或SEQ ID NO 28至少85%、90%、95%、97%、98%或99%相同。

[0141] 如本文所述的重组蛋白能够向表达该重组蛋白的细胞提供信号(在同型二聚化的情况下单独提供或在异型二聚化的情况下与第二蛋白质一起提供)。信号通常由内域提供给细胞。因此,在一个实施方案中,本发明的重组蛋白还包含内域。在替代实施方案中,内域可由信号传导蛋白提供,该信号传导蛋白是与重组蛋白分开的蛋白质。在这方面,重组蛋白和信号传导蛋白一起向细胞提供信号。因此,如本文所述的重组蛋白可直接(例如,通过其自身的内域)或间接(通过信号传导蛋白的内域)向细胞提供信号。

[0142] 因此,如本文所述的“信号传导蛋白”是指能够与如本文所定义的重组蛋白缔合并将信号转导到细胞的蛋白质。通常,信号传导蛋白因此包含跨膜结构域和内域,并且可与重组蛋白(和/或第二蛋白质)一起在细胞中表达。在该实施方案中,特别设想信号传导蛋白和重组蛋白可通过它们各自的跨膜结构域缔合,其中此类缔合可导致信号通过信号传导蛋白的内域转导。在一个具体实施方案中,信号传导结构域可包含来自如SEQ ID No所示的DAP10或DAP12或与SEQ ID NO 27或SEQ ID NO 28至少80%相同的变体的跨膜结构域。适当地,变体可与SEQ ID NO 27或SEQ ID NO 28至少85%、90%、95%、97%、98%或99%相同。技术人员会理解,当信号传导蛋白的跨膜结构域来自DAP10或DAP10时,重组蛋白的跨膜结构域可来源于髓系受体,特别是来源于如以上所讨论的TREM受体。

[0143] 如以上所讨论的,如本文所述的“内域”可在重组蛋白内或在单独的信号传导蛋白内提供。然而,特别地,重组蛋白可包含内域。内域包含酪氨酸激酶激活结构域和酪氨酸效应子结构域,酪氨酸激酶激活结构域包含至少JAK1结合基序和/或JAK2结合基序,酪氨酸效应子结构域可被JAK1和/或JAK2激酶磷酸化。酪氨酸效应子结构域的磷酸化允许实现信号

传导级联,例如允许信号传导级联中的其他蛋白质结合效应子结构域和/或被激活以在细胞中传递信号。换句话说,在磷酸化后,酪氨酸效应子结构域可募集信号转导因子。如本文所讨论的,重组蛋白能够在不存在信号诱导剂分子的情况下向包含所述重组蛋白的细胞提供信号,并因此替代地来看产生组成型信号。组成型信号是指细胞持续地接受来自重组蛋白的信号。与野生型EPOR相比,信号可增加或减少,但重组蛋白能够持续提供信号。术语"内域"、"胞内结构域或区"和"胞质结构域或区"在本文中可互换使用。

[0144] 在一些实施方案中,酪氨酸激酶激活结构域也可包含JAK3结合基序。特别地,其可包含JAK1结合基序和JAK3结合基序。

[0145] 在一个实施方案中,例如当重组蛋白在内域中不包含JAK3结合基序时,重组蛋白可与第二蛋白质联合使用,该第二蛋白质包含含有JAK3结合基序的内域结构域。

[0146] 内域可通过JAK-STAT信号传导途径传导信号,或者换句话说,信号可通过JAK-STAT信号传导途径的激活来介导。

[0147] STAT蛋白质是募集到激活受体的转录因子,并且因此,特别是酪氨酸效应子结构域可包含STAT缔合基序,即STAT的结合位点。STAT可以是STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5或STAT6或它们的任意组合。STAT缔合基序可获得自或来源于受体,包括细胞因子受体和受体酪氨酸激酶(RTK)。酪氨酸效应子结构域可含有一个或多个,例如两个或更多个,例如3、4、5或更多个STAT缔合基序,这些基序可以相同或不同。

[0148] 例如,STAT5是参与IL-2信号传导途径的转录因子,通过促进诸如FOXP3、IL2RA和BCLXL等基因的表达,其在Treg功能、稳定性和存活中起关键作用。为了具有功能并易位到细胞核中,STAT5需要被磷酸化。IL-2连接通过分别经由IL-2Rβ和IL-2Rγ链中存在的特异性信号传导结构域激活Jak1/Jak2和Jak3激酶而导致STAT5磷酸化。尽管JAK1(或JAK2)可在不需要JAK3的情况下使STAT5磷酸化,但是通过JAK1/JAK2和JAK3两者的转磷酸作用(这稳定了它们的活性)增加了STAT5活性。

[0149] 如本文所用,"STAT缔合基序"是指包含酪氨酸并且在酪氨酸的磷酸化后能够结合STAT多肽的氨基酸基序。本领域已知的用于确定蛋白质:蛋白质相互作用的任何方法都可用于确定缔合基序是否能够结合STAT。例如,免疫共沉淀后进行蛋白质印迹。

[0150] STAT缔合基序可以是例如STAT5缔合基序,其在磷酸化后能够结合STAT5多肽(对于其他STAT多肽也是类似的)。

[0151] 在一个实施方案中,STAT缔合基序是STAT5缔合基序。

[0152] 适当地,内域可包含两个(例如至少两个)或更多个如本文所定义的STAT5缔合基序。例如,信号传导结构域可包含两个、三个、四个、五个或更多个如本文所定义的STAT5缔合基序。在一个实施方案中,信号传导结构域可包含两个或三个如本文所定义的STAT5缔合基序。

[0153] 适当地,STAT5缔合基序可内源性存在于跨膜蛋白质的胞质结构域中,该胞质结构域可用于提供本文的内域。例如,STAT5缔合基序可来自白介素受体(IL)受体内域或激素受体。

[0154] 内域可包含选自白介素受体的任何链的氨基酸序列,其中STAT5是下游组分,例如,可使用包含IL-2受体β链的氨基酸编号266至551(NCBI REFSEQ:NP_000869.1,SEQ ID NO:31)、IL-9R链的氨基酸编号292至521(NCBI REFSEQ:NP_002177.2,SEQ ID NO:33)、IL-

4Rα链的氨基酸编号257至825(NCBI REFSEQ:NPJD00409.1,SEQ ID NO:34)、IL-3RB链的氨基酸编号461至897(NCBI REFSEQ:NP_000386.1,SEQ ID NO:35)和/或IL-17Rβ链的氨基酸编号314至502(NCBI REFSEQ:NP_061195.2,SEQ ID NO:36)的胞质结构域。技术人员会理解,可使用这些序列中的任一者或多者。可使用白介素受体链的胞质结构域的整个区。

[0155] 信号传导结构域可包含一个或多个STAT5缔合基序,这些基序包含如SEQ ID NO:31-SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:31-SEQ ID NO:37至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的变体。例如,变体可以能够结合STAT5至如SEQ ID NO:31-SEQ ID NO:37中的一者所示的氨基酸序列的水平的至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。变体或衍生物可以能够结合STAT5至与SEQ ID NO:31-SEQ ID NO:37中的一者类似或相同的水平,或者可以能够结合STAT5至比如SEQ ID NO:31-SEQ ID NO:37中的一者所示的氨基酸序列更高的水平(例如增加至少10%、至少20%、至少30%、至少40%或至少50%)。

[0156] 例如,STAT5缔合基序可来自IL2Rβ、IL-3Rβ(CSF2RB)、IL-9R、IL-17Rβ、红细胞生成素受体(EPOR)、血小板生成素受体、生长激素受体和催乳素受体中的任一者或多者。内域可例如包含来自IL2RB和EPOR两者的STAT缔合基序。

[0157] STAT5缔合基序可包含氨基酸基序YXXF/L(SEQ ID NO:38;其中X是任意氨基酸)。

[0158] 适当地,STAT5缔合基序可包含氨基酸基序YCTF(SEQ ID NO:39)、YFFF(SEQ ID NO:40)、YLSL(SEQ ID NO:41)或YLSLQ(SEQ ID NO:42)。

[0159] 内域可包含一个或多个STAT5缔合基序,包含氨基酸基序YCTF(SEQ ID NO:39)、YFFF(SEQ ID NO:40)、YLSL(SEQ ID NO:41)和/或YLSLQ(SEQ ID NO:42)。

[0160] 内域可包含含有氨基酸基序YLSLQ(SEQ ID NO:42)的第一STAT5缔合基序和含有氨基酸基序YCTF(SEQ ID NO:39)或YFFF(SEQ ID NO:40)的第二STAT5缔合基序。

[0161] 内域可包含以下STAT5缔合基序:YLSLQ(SEQ ID NO:42)、YCTF(SEQ ID NO:39)和YFFF(SEQ ID NO:40)。

[0162] 其他STAT多肽的缔合基序是本领域已知的,并且可以使用。例如,为了向细胞(特别是Tcon细胞)提供STAT3信号,内域的酪氨酸效应子结构域可包含YXXQ(SEQ ID NO.57),其中X是任意氨基酸,例如YRHQ(SEQ ID NO.58)。STAT3缔合基序存在于信号传导蛋白例如IL-6R、IL10R和IL21R中。在一个实施方案中,如本文所定义的内域可包含IL21Rα链的胞质结构域,例如包含IL-21Rα链的氨基酸编号256-538(NCBI RefSeq:NP_068570.1),或其截短的片段,该截短的片段包含与JAK1缔合所需的box 1基序(NCBI RefSeq:NP_068570.1的氨基酸编号266至274)和STAT1/3缔合所需的STAT缔合基序,该STAT缔合基序包含酪氨酸残基500(NCBI RefSeq:NP_000869.1的氨基酸编号519)和在酪氨酸残基500的C末端侧的侧翼3个残基,即YLRQ(SEQ ID NO.59)。替代地,可以类似的方式提供STAT1或STAT4信号传导。例如,STAT1缔合基序可在IL2Rb(亚结构域Aci2)的氨基酸335-365处发现,如以下序列所代表:

[0163] QLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYF(SEQ ID NO.60)

[0164] 如本文所用,“JAK1结合基序”是指允许酪氨酸激酶JAK1缔合的BOX基序。类似地,如本文所用,“JAK2结合基序”是指允许酪氨酸激酶JAK2缔合的BOX基序。合适的JAK1结合基序和JAK2结合基序描述于例如Ferrao和Lupardus(Frontiers in Endocrinology;2017;8

(71);该文献以引用方式并入本文)中。

[0165] 如上所述,JAK1结合基序和/或JAK2结合基序可内源性存在于跨膜蛋白质的胞质结构域中。

[0166] 例如,JAK1结合基序和/或JAK2结合基序可来自干扰素λ受体1(IFNLR1)、干扰素α受体1(IFNAR)、干扰素γ受体1(IFNGR1)、IL10RA、IL20RA、IL22RA、干扰素γ受体2(IFNGR2)或IL10RB。

[0167] JAK1结合基序可包含如SEQ ID NO:43-SEQ ID NO:49所示的氨基酸基序或其能够结合JAK1的变体或由其组成。

[0168] KVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDK(SEQ ID NO:43)

[0169] NPWFQRAKMPRALDFSGHTHPVATFQPSRPESVNDLFLCPQKELT(SEQ ID NO:44)

[0170] GYICLRNSLPKVLNFHNFLAWPFPNLPPLEAMDMVEVIYINR(SEQ ID NO:45)

[0171] PLKEKSIILPKSLISVVRSATLETKPESKYVSLITSYQPFSL(SEQ ID NO:46)

[0172] RRRKKLPSVLLFKKPSPFIFISQRPSPETQDTIHPLDEEAFLK(SEQ ID NO:47)

[0173] YIHVGKEKHPANLILIYGNEFDKRFFVPAEKIVINFITLNISDDS(SEQ ID NO:48)

[0174] RYVTKPPAPPNSLNVQRVLTFQPLRFIQEHVLIPVFDLSGP(SEQ ID NO:49)

[0175] SEQ ID NO:43-SEQ ID NO:49的变体与SEQ ID NO:21-SEQ ID NO:27中任一者相比可包含一个、两个或三个氨基酸差异,并保留结合JAK1的能力。

[0176] 变体可与SEQ ID NO:43-SEQ ID NO:49中任一者至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同,并保留结合JAK1的能力。

[0177] 在一个优选的实施方案中,JAK1结合结构域包含SEQ ID NO:43或其能够结合JAK1的变体或由其组成。

[0178] 例如,变体可以能够结合JAK1至对应参考序列的水平的至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。变体或衍生物可以能够结合JAK1至与对应参考序列类似或相同的水平,或者可以能够结合JAK1至比对应参考序列更高的水平(例如增加至少10%、至少20%、至少30%、至少40%或至少50%)。

[0179] JAK2结合基序可包含如SEQ ID NO:50-SEQ ID NO:52所示的氨基酸基序或其能够结合JAK2的变体或由其组成。

[0180] NYVFFPSLKPSSSIDEYFSEQPLKNLLLSTSEEQIEKCFIIEN(SEQ ID NO:50)

[0181] YWFHTPPSIPLQIEEYLKDPTQPILEALDKDSSPKDDVWDSVSIISFPE(SEQ ID NO:51)

[0182] YAFSPRNSLPQHLKEFLGHPHHNTLLFFSFPLSDENDVFDKLSVIAEDSES(SEQ ID NO:52)

[0183] SEQ ID NO:50-SEQ ID NO:52的变体与SEQ ID NO:50-SEQ ID NO:52中任一者相比可包含一个、两个或三个氨基酸差异,并保留结合JAK2的能力。

[0184] 例如,变体可以能够结合JAK2至对应参考序列的水平的至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。变体或衍生物可以能够结合JAK2至与对应参考序列类似或相同的水平,或者可以能够结合JAK2至比对应参考序列更高的水平(例如增加至少10%、至少20%、至少30%、至少40%或至少50%)。

[0185] 本领域已知的用于确定蛋白质:蛋白质相互作用的任何方法都可以用于确定JAK1结合基序或JAK2结合基序是否能够结合JAK1或JAK2。例如,免疫共沉淀后进行蛋白质印迹。

[0186] 适当地,内域可包含如SEQ ID NO:31所示的IL2Rβ内域;或与SEQ ID NO:31具有至少80%序列同一性的变体。

[0187] 变体可与SEQ ID NO:31至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同。

[0188] 适当地,内域可包含如SEQ ID NO:53或SEQ ID NO:54中任一者所示的截短的IL2Rβ内域或SEQ ID NO:53或SEQ ID NO:54中任一者的与其具有至少80%序列同一性的变体。SEQ ID NO:53代表具有Y510突变的IL2RB截短变体。SEQ ID NO:54代表具有Y510和Y392突变的IL2RB截短变体。

[0189] 变体可与SEQ ID NO:53或SEQ ID NO:54至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同。

[0190] 在该实施方案中,本发明提供了一种重组蛋白,其中所述重组蛋白包含(i)外域,该外域的至少一部分来源于EPOR的胞外区,其中所述部分包含相对于EPOR的胞外区的修饰,该修饰允许在不存在信号诱导剂分子的情况下所述重组蛋白与第二蛋白质二聚化以及向所述T细胞提供信号,和(ii)内域,该内域包含SEQ ID NO.53或SEQ ID NO.54的截短的IL2Rβ内域或与其具有至少80%序列同一性的其变体。

[0191] 在特定的实施方案中,重组蛋白包含内域,该内域的至少一部分来源于EPOR的内域(胞质)区(SEQ ID NO.8)。在特定的实施方案中,内域可包含如SEQ ID NO 8所示的EPOR内域;或与SEQ ID NO 8具有至少40%序列同一性的变体。例如,变体可与SEQ ID NO.8至少45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或80%相同。

[0192] 对内域的修饰可根据STAT5信号的所需水平来选择。

[0193] 变体可与SEQ ID NO.8具有至少80%序列同一性。变体可与SEQ ID NO.8至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同。任何变体都可以是功能变体,并且因此可保留向表达重组蛋白的细胞提供信号的能力。特别地,在重组蛋白的内域除了变体EPOR内域之外不包含任何其他功能(信号传导)内域的实施方案中,例如其中重组蛋白的内域由变体EPOR内域组成,变体将是功能变体并且因此将保留向表达重组蛋白的细胞提供信号的能力。信号特别可通过JAK-STAT信号传导途径,特别是JAK2-STAT5信号传导途径来传导,并且因此可包含至少一个JAK结合基序(例如JAK2结合基序)和至少一个STAT缔合基序(例如STAT5缔合基序),如本文所述。例如,变体EPOR内域可保留至少SEQ ID NO.1的第368位的酪氨酸(Y)残基(SEQ ID NO.8的Y95)和/或至少SEQ ID NO.1的第426位的酪氨酸(Y)残基(SEQ ID NO.8的Y153)。例如,变体EPOR内域可仅保留SEQ ID NO.1的第368位的酪氨酸(Y)残基(SEQ ID NO.8的Y95)和SEQ ID NO.1的第426位的酪氨酸(Y)残基(SEQ ID NO.8的Y153)中的一者或两者。

[0194] 适当地,变体可包含至少一个修饰以减少(例如消除)SHP1与EPOR内域序列的结合,从而降低SHP1对JAK2的负面影响。SHP1也可称为SHIP1,是一种含有SH2结构域的酪氨酸磷酸酶蛋白,其具有如SEQ ID NO.61所示的氨基酸序列。已知SHP1与激活的EPOR缔合,并负调节由JAK2磷酸化诱导的信号传导。SHP1可与SEQ ID NO.8的EPOR内域的Y181和Y183缔合。因此,本发明涵盖EPOR内域序列的使用,其中SEQ ID NO.8的Y181和/或Y183已经被修饰以降低SHP1的负面影响(例如降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,例如高达100%)。替代地来看,SEQ ID NO.8的Y181和/或Y183的修饰可使向细胞的信号传导增加至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%

或90％。特别地,Y181和/或Y183可以从要在本文的内域内使用的EPOR内域序列中缺失,或可被不同的氨基酸取代。例如,变体EPOR内域可包含涵盖SEQ ID NO.8的Y181和Y183的连续氨基酸序列的缺失。涵盖SEQ ID NO.8的Y181和Y183的连续氨基酸序列的长度可以是至少3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个氨基酸。例如,涵盖SEQ ID NO.8的Y181和Y183的连续氨基酸序列的长度可以是至少55个氨基酸,例如至少60、65、70或75个氨基酸。例如,涵盖SEQ ID NO.8的Y181和Y183的连续氨基酸序列的长度可以是至多140、135、130、125、120、115、110、105、100、95、90、85或80个氨基酸。例如,变体EPOR内域可包含SEQ ID NO.8的氨基酸181至235(SEQ ID NO.1的氨基酸454至508)的缺失或由其组成。例如,变体EPOR内域可包含SEQ ID NO.8的氨基酸106至235(SEQ ID NO.1的氨基酸379至508)的缺失或由其组成。例如,变体EPO内域可包含SEQ ID NO.8的氨基酸161至235(SEQ ID NO.1的氨基酸434至508)的缺失或由其组成。替代地,Y181和/或Y183可以不被修饰,特别是如果不需要增加到细胞的信号。

[0195] 替代地,内域可包含如SEQ ID NO.62所示的截短的EPOR内域或与其具有至少80％序列同一性的其变体或由其组成。变体可与SEQ ID NO:62至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％相同。因此,通常,截短的EPOR内域可以截短内域的包含SEQ ID NO.8的Y181和Y183的至少一部分。变体可以例如包括与SEQ ID NO:62相同的截短,并且因此与SEQ ID NO.62的区别仅在于SEQ ID NO.62的序列内的缺失、取代或插入。任何变体可以是如上所述的功能EPOR内域变体。

[0196] 重组蛋白的内域可包含如SEQ ID NO.106所示的截短的EPOR内域或与其具有至少80％序列同一性的其变体或由其组成。变体可以与SEQ ID NO:106至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％相同。变体可以截短内域的包含SEQ ID NO.8的Y181和Y183的至少一部分。变体可以例如包括与SEQ ID NO:106相同的截短,并且因此与SEQ ID NO.106的区别仅在于SEQ ID NO.106的序列内的缺失、取代或插入。任何变体可以是如上所述的功能EPOR内域变体。

[0197] 重组蛋白的内域可包含如SEQ ID NO.107所示的截短的EPOR内域或与其具有至少80％序列同一性的其变体或由其组成。变体可以与SEQ ID NO:107至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％相同。变体可以截短内域的包含SEQ ID NO.8的Y181和Y183的至少一部分。变体可以例如包括与SEQ ID NO:107相同的截短,并且因此与SEQ ID NO.107的区别仅在于SEQ ID NO.107的序列内的缺失、取代或插入。任何变体可以是如上所述的功能EPOR内域变体。

[0198] 变体EPOR内域可以例如包含一个或多个氨基酸的插入。在特定的实施方案中,插入可在变体EPOR内域的C末端处,如果变体EPOR内域位于重组蛋白的C末端处,则插入可在重组蛋白的C末端处。然而,插入也可以在变体EPOR内域的其他位置。例如,变体EPOR内域可包含两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个氨基酸的插入。例如,变体EPOR内域可以包含一个至三十个氨基酸的插入,例如两个至二十个,例如五个至十五个氨基酸的插入。例如,变体EPOR内域可包含至少五个、六个、七个、八个、九个或十个氨基酸的插入,例如在其C末端处插入。至少五个氨基酸可具有(包含或由其组成)序列MDTVP(SEQ ID NO.108)或与SEQ ID NO.108相差不超过一个或不超过两个氨基酸(例如缺失和/或取代)的序列。至少六个氨基酸可具有序列SMDTVP(SEQ ID NO.109)或与SEQ ID NO.109相差不超过一个或不超过两个氨基酸(例如缺失和/或取代)的序列。至少七个氨基酸可具有(包

括或由其组成)序列ASMDTVP(SEQ ID NO.110)或与SEQ ID NO.110相差不超过一个或不超过两个氨基酸(例如缺失和/或取代)的序列。至少八个氨基酸可具有(包括或由其组成)序列LASMDTVP(SEQ ID NO.111)或与SEQ ID NO.111相差不超过一个或不超过两个氨基酸(例如缺失和/或取代)的序列。至少九个氨基酸可具有(包括或由其组成)序列ALASMDTVP(SEQ ID NO.112)或与SEQ ID NO.112相差不超过一个或不超过两个氨基酸(例如缺失和/或取代)的序列。至少十个氨基酸可具有(包括或由其组成)序列PALASMDTVP(SEQ ID NO.113)或与SEQ ID NO.113相差不超过一个或不超过两个氨基酸(例如缺失和/或取代)的序列。例如,变体EPOR内域可以包含五个氨基酸(例如SEQ ID NO.108)、六个氨基酸(例如SEQ ID NO.109)、七个氨基酸(例如SEQ ID NO.110)、八个氨基酸(例如SEQ ID NO.111)、九个氨基酸(例如SEQ ID NO.112)或十个氨基酸(例如SEQ ID NO.113)的插入,例如在其C末端处。在特定的实施方案中,变体EPOR内域可以包含至少十个,例如十个氨基酸的插入,例如其中至少十个氨基酸具有SEQ ID NO.113的序列或与SEQ ID NO.113相差不超过一个或不超过两个氨基酸的序列,例如在其C末端处。所述插入的氨基酸可位于野生型EPOR内域的C末端处(即SEQ ID NO.8的C末端处),或者可以位于也具有其他修饰的EPOR内域的C末端处,例如位于如本文所述的截短的EPOR内域的C末端处(例如SEQ ID NO.62、SEQ ID NO.106或SEQ ID NO.107的C末端处)。替代地,插入可以位于EPOR内域内(否则它将是野生型EPOR内域(除了插入之外)),或者位于也具有其他修饰的EPOR内域内,例如在截短的EPOR内域内(例如在SEQ ID NO.62、SEQ ID NO.106或SEQ ID NO.107内)。

[0199] 当在细胞(例如Treg细胞)中表达时,与表达相同重组蛋白但无插入的相同细胞相比,在变体EPOR内域的C末端处插入的一个或多个氨基酸可以例如增加或稳定重组蛋白的细胞表面表达和/或可以增加对EPO的敏感性和/或可以增加JAK-STAT信号传导途径的激活。增加可以是至少10%、20%、30%、40%或50%。因此,在变体EPOR内域的C末端处插入的一个或多个氨基酸在这样的实施方案中可特别有用,其中来源于EPOR的胞外结构域的外域部分保留了其结合EPO的能力,如本文的示例性实施方案中所述。对EPO敏感性的增加可以通过测量JAK-STAT信号传导的激活来确定,如本文其他地方所述。对EPO敏感性增加的重组蛋白在相同浓度的EPO下(特别是在低浓度的EPO下,诸如等于或小于约0.1U/ml,例如等于或小于约0.01U/ml或等于或小于约0.001U/ml)将提供更大的JAK-STAT信号。

[0200] 重组蛋白的内域可以例如包含SEQ ID NO.114、SEQ ID NO.115或SEQ ID NO.116所示的变体EPOR内域或与其具有至少80%序列同一性的其变体或由其组成。变体可以分别与SEQ ID NO:114、SEQ ID NO:115或SEQ ID NO:116至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同。变体可截短内域的包含SEQ ID NO.8的Y181和Y183的至少一部分。任何变体可以是如上所述的功能EPOR内域变体。

[0201] STAT(例如STAT5)活性通过JAK1/2和JAK3两者的转磷酸作用而增加,因为这稳定了它们的活性。如上所述,内域,或更特别地,其酪氨酸激酶激活结构域,还可包含JAK3结合基序。如本文所用,“JAK3结合基序”是指允许酪氨酸激酶JAK3的BOX基序。合适的JAK3结合基序描述于例如Ferrao和Lupardus(Frontiers in Endocrinology;2017;8(71);该文献以引用方式并入本文)中。

[0202] 本领域已知的用于确定蛋白质:蛋白质相互作用的任何方法都可以用于确定基序是否能够结合JAK3。例如,免疫共沉淀后进行蛋白质印迹。

[0203] JAK3结合基序可内源性存在于跨膜蛋白质的胞质结构域中。

[0204] 例如,JAK3结合基序可以来自IL-2Rγ多肽。可在内域内使用功能截短的或变体IL2Rγ多肽,其中功能截短的或变体IL2Rγ多肽保留JAK3结合活性(例如,IL2Rγ的结合活性的至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%)。特别地,包含JAK3结合基序的截短的IL2Rγ以及包括STAT5缔合基序和JAK1结合基序的截短的IL2Rβ可包含在如本文所定义的内域中。功能截短可以提供降低用于表达的构建体大小的优点。

[0205] JAK3结合基序可以包含如SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:56所示的氨基酸基序序列或其能够结合JAK3的变体(例如与SEQ ID No 55或SEQ ID No 56具有至少80%、85%、90%、95%或99%同一性的功能变体或片段)或由其组成。

[0206] 变体可以与SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:56至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同。

[0207] 在特定的实施方案中,信号传导结构域包含一个或多个JAK1结合结构域和至少一个JAK3结合结构域/基序(例如至少2或3个JAK3结合结构域/基序)。

[0208] 技术人员会理解,编码JAK3结合结构域的多核苷酸序列可定位在编码酪氨酸效应子结构域(例如STAT(例如STAT 5)缔合基序)和JAK1结合基序和/或JAK2结合基序的多核苷酸序列的上游或下游(5'或3')。通常,JAK1结合基序和/或JAK2结合基序将在酪氨酸效应子结构域(例如STAT/STAT5)的上游(5'),但这是可以变化的。特别地,编码JAK3结合结构域的多核苷酸可定位在编码STAT缔合基序和JAK1/JAK2结合基序的多核苷酸的下游(3')。因此,替代地来看,在如本文所述的内域中,JAK3结合结构域可在酪氨酸效应子结构域(例如STAT缔合基序)和JAK1和/或JAK2结合结构域的N末端或C末端,优选在C末端。在一个实施方案中,JAK3结合结构域和STAT缔合基序/JAK1/2结合结构域直接彼此相邻地定位(即不被序列向远侧分开)。在特定的实施方案中,JAK3结合结构域以反向定向翻译,因此JAK3结合基序可以包含与SEQ ID No 55或SEQ ID No56反向定向的序列(例如,如SEQ ID NO.63所示)。编码信号传导结构域的多核苷酸因此可以包含以下顺序的核苷酸序列:5'-3'JAK1,5'-3'STAT缔合基序,3'-5'JAK3。

[0209] 在特定的实施方案中,在JAK3结合基序与STAT缔合基序/JAK1结合基序或JAK2结合基序之间可存在接头或铰链。接头或铰链可包含至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25或30个氨基酸,例如至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个甘氨酸残基,或由其组成。在最特定的实施方案中,内域包含来源于包含JAK3结合结构域的IL2Rγ的第一氨基酸序列(例如SEQ ID No 55或SEQ ID No 56)和来源于包含STAT5缔合基序和JAK1结合基序的IL2Rβ的第二氨基酸序列(例如SEQ ID NO 43或SEQ ID NO 44),其中第一氨基酸序列和第二氨基酸序列通过接头或铰链连接或接合。

[0210] 内域可以提供其他信号传导功能(例如,能够提供促存活或持久性信号的那些,该信号是一种除了提供STAT信号之外还维持细胞表型或诱导激活或功能的信号),并且因此可以包含能够提供此类信号传导功能的另外的结构域。

[0211] 例如,内域可附加地包含胞内信号传导结构域,诸如T细胞受体的ζ链内域或其任何同源物(例如,η链、FcεR1γ和β链、MB1(Igα)链、B29(Igβ)链等)、CD3多肽结构域(Δ、δ和ε)、syk家族酪氨酸激酶(Syk、ZAP 70等)、src家族酪氨酸激酶(Lck、Fyn、Lyn等)和参与T细胞转导的其他分子,诸如CD2、CD5和CD28。胞内信号传导结构域可以包含人CD3ζ链内域、

FcyRIII、FcsRI、Fc受体的胞质尾、带有胞质受体的免疫受体酪氨酸激活基序(ITAM)或它们的组合。

[0212] 因此,内域可包含人CD3ζ链的胞内信号传导结构域,在一个实施方案中,其包含以下序列或由以下序列组成:

[0213] UNIPROT:P20963,CD3Z_HUMAN,第31-143位

[0214] RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNP QEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR(SEQ ID NO:64)

[0215] 在一个实施方案中,内域包含胞内信号传导结构域,该胞内信号传导结构域包含与SEQ ID NO:64具有至少85%、90%、95%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0216] 嵌合蛋白的胞内信号传导结构域可以包含以下CD28信号传导结构域:

[0217] RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS(SEQ ID NO:65)

[0218] 在一个实施方案中,胞内信号传导结构域包含与SEQ ID NO:65具有至少85%、90%、95%、97%、98%或99%同一性的信号传导基序。

[0219] 内域的胞内信号传导结构域可以包含以下CD27信号传导结构域:

[0220] QRRKYRSNKGESPVEPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP(SEQ ID NO:66)

[0221] 在一个实施方案中,胞内信号传导结构域包含与SEQ ID NO:66具有至少85%、90%、95%、97%、98%或99%同一性的信号传导基序。

[0222] 另外的胞内信号传导结构域对于本领域技术人员将是显而易见的,并且可与本发明的替代实施方案结合使用。

[0223] 在这方面,内域可以包含向表达它的细胞提供转录因子(例如对细胞的表型或功能具有重要性的转录因子)活性的附加的结构域或序列。例如对于Treg,信号传导结构域可附加地能够为细胞提供FOXP3、c-Rel、Runx、Ets-1、CREB、NFAT和/或JunB(直接或间接地)。特别地,内域可以能够向细胞提供FOXP3激活或诱导信号。在一个方面,内域可以包含FOXP3(或其任何功能变体、截短或同种型),其中在用CID诱导时(例如,使用Notch系统),FOXP3可从嵌合蛋白中切割。在这种情况下,任何可切割部分(例如FOXP3)将存在于内域的C末端处。如上所述,各种结构域和结构域的单独部分(例如内域中的基序)可通过接头彼此连接。

[0224] 如本文所指的接头是将蛋白质的一个结构域或部分与另一结构域或部分连接起来的氨基酸序列。接头序列可以是任何氨基酸序列,其功能是将两个结构域或其部分连接或连在一起,使得它们可执行它们的功能。因此,接头可将连接起来的元件隔开。

[0225] 就接头的氨基酸组成和/或氨基酸序列而言,接头的性质是可以变化的并且不受限制。然而,接头可以是柔性接头。因此,它可以包含已知赋予接头柔性特征的氨基酸或由其组成(与刚性接头相反)。

[0226] 柔性接头是本领域公知和描述的一类接头序列。接头序列通常称为可用于将蛋白质或蛋白质结构域连接或接合在一起以产生例如融合蛋白或嵌合蛋白或多功能蛋白质或多肽的序列。它们可以具有不同的特性,并且例如可以是柔性的、刚性的或可切割的。蛋白质接头在例如Chen等,2013,Advanced Drug Delivery Reviews 65,1357-1369中进行了综述,该文献将柔性接头的类别与刚性和可切割接头的类别进行了比较。柔性接头也描述于Klein等,2014,Protein Engineering Design and Selection,27(10),325-330;van Rosmalen等,2017,Biochemistry,56,6565-6574;和Chichili等,2013,Protein Science,

22,153-167中。

[0227] 柔性接头是允许所连接的结构域或组分之间一定程度移动的接头。它们通常由小的非极性(例如Gly)或极性(例如Ser或Thr)氨基酸残基组成。氨基酸的小尺寸提供了灵活性,并允许所连接的部分(结构域或组分)具有移动性。极性氨基酸的掺入可通过与水分子形成氢键而维持接头在水性环境中的稳定性。最常用的柔性接头具有主要由Ser和Gly残基组成的序列(所谓的"GS接头")。然而,许多其他柔性接头也已经被描述(例如,参见Chen等,2013,见上文),这些接头可以含有另外的氨基酸,诸如Thr和/或Ala,和/或Lys和/或Glu,其可改善溶解性。可以使用本领域已知和已经报道的任何柔性接头。

[0228] 在接头中使用GS接头,或更特别地使用GS("Gly-Ser")结构域,可以允许通过改变GS结构域重复的数量来容易地改变接头的长度,并且因此此类接头代表一类合适的接头。然而,柔性接头不限于基于"GS"重复的那些接头,并且已经报道了(包括在Chen等人的文献中,见上文)包含分散在整个接头序列中的Ser和Gly残基的其他接头。

[0229] 在一个实施方案中,接头序列包含仅由Ser和Gly残基组成的至少一个Gly-Ser结构域。在此类实施方案中,接头可含有不超过15个其他氨基酸残基,例如不超过14、13、12、11、10、9、8、6、7、5或4个其他氨基酸残基。

[0230] Gly-Ser结构域可以具有下式:

[0231] (S)q-[(G)m-(S)m]n-(G)p

[0232] 其中q是0或1;m是1-8的整数;n是至少为1的整数(例如1至8,或更特别地1至6);并且p是0或1至3的整数。

[0233] 更特别地,Gly-Ser结构域可以具有下式:

[0234] (i)S-[(G)m-S]n;

[0235] (ii)[(G)m-S]n;或

[0236] (iii)[(G)m-S]n-(G)p

[0237] 其中m是2-8的整数(例如3-4);n是至少为1的整数(例如1至8,或更特别地1至6);并且p是0或1至3的整数。

[0238] 在代表性实例中,Gly-Ser结构域可以具有下式:

[0239] S-[G-G-G-G-S]n

[0240] 其中n是至少为1的整数(优选地为1至8或1-6、1-5、1-4或1-3)。在上式中,序列GGGGS是SEQ ID NO.70。

[0241] 然而,并不要求所有接头都是柔性的,并且在一些情况下,接头序列不是柔性接头序列。当接头将相互作用结构域或D1/Ht1或D2/Ht2连接到信号传导结构域时,其优选地为柔性接头。

[0242] 尽管接头的长度可能不是关键的,但在一些情况下,取决于所连接的结构域等,可能期望具有较短的接头序列或较长的接头序列。

[0243] 在一些情况下,接头的长度可以是2、3、4、5或6个中的任一者至24、23、22或21个氨基酸中的任一者。在其他情况下,它的长度可以是2、3、4、5或6个中的任一者至21、20、19、18、17、16或15个氨基酸中的任一者。在其他情况下,它可介于这些范围之间,例如6至21、6至20、7至20、8-20、9-20、10-20、8-18、9-18、10-18、9-17、10-17、9-16、10-16等。因此,它可以在由上面列出的整数中的任意组成的范围内。

[0244] 在其他情况下,接头可以具有更长的长度,例如,从4、5、6、7、8、9、10、12、15、20个中的任一者至100、90、80、70、60、50、45、40、30、28、25或24个氨基酸中的任一者。在其他情况下,它可介于该范围与上述范围中的任一个范围之间。因此,它可以在由上面列出的整数中的任意组成的范围内。

[0245] 在接头中使用GS接头,或更特别地使用GS("Gly-Ser")结构域,可以允许通过改变GS结构域重复的数量来容易地改变接头的长度,并且因此此类接头代表了可使用的有利接头类型。然而,柔性接头不限于基于"GS"重复的那些接头,并且已经报道了(包括在Chen等的文献中,见上文)包含分散在整个接头序列中的Ser和Gly残基的其他接头。

[0246] 接头序列可以仅由如上所述或定义的一个或多个Gly-Ser结构域组成,或者可以由如上所述或定义的一个或多个Gly-Ser结构域组成。然而,如上所述,接头序列可以包含一个或多个Gly-Ser结构域和附加的氨基酸。附加的氨基酸可在Gly-Ser结构域的一端或两端处,或者在一段重复Gly-Ser结构域的一端或两端处。因此,可以是其他氨基酸的附加的氨基酸可以位于接头序列的一端或两端处,例如它们可位于Gly-Ser结构域的侧翼。在其他实施方案中,附加的氨基酸可位于Gly-Ser结构域之间。例如,两个Gly-Ser结构域可以位于接头序列中的一段其他氨基酸的侧翼。此外,也如上所述,在其他接头中,GS结构域不需要重复,并且G和/或S残基或诸如GS等短结构域可简单地沿着长度或序列分布。

[0247] 代表性的示例性接头序列列出如下:

[0248] ETSGGGGSRL(SEQ ID NO.68)

[0249] SGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO.69)

[0250] $S(GGGGS)_{1-5}$(其中GGGGS是SEQ ID NO.70)

[0251] $(GGGGS)_{1-5}$(其中GGGGS是SEQ ID NO.70)

[0252] SGGGGSGGGGS(SEQ ID NO.71)

[0253] $S(GGGS)_{1-5}$(其中GGGS是SEQ ID NO.67)

[0254] $(GGGS)_{1-5}$(其中GGGS是SEQ ID NO.67)

[0255] SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO.72)

[0256] SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO.73)

[0257] $S(GGGGGS)_{1-5}$(其中GGGGGS是SEQ ID NO.74)

[0258] $(GGGGGS)_{1-5}$(其中GGGGGS是SEQ ID NO.74)

[0259] $S(GGGGGGS)_{1-5}$(其中GGGGGGS是SEQ ID NO.75)

[0260] $(GGGGGGS)_{1-5}$(其中GGGGGGS是SEQ ID NO.75)

[0261] G_6(SEQ ID NO.76)

[0262] G_8(SEQ ID NO.77)

[0263] KESGSVSSEQLAQFRSLD(SEQ ID NO.78)

[0264] EGKSSGSGSESKST(SEQ ID NO.79)

[0265] GSAGSAAGSGEF(SEQ ID NO.80)

[0266] SGGGGSAGSAAGSGEF(SEQ ID NO.81)

[0267] SGGGLLLLLLLLGGGS(SEQ ID NO.82)

[0268] SGGGAAAAAAAAGGGS(SEQ ID NO.83)

[0269] SGGGAAAAAAAAAAAAAAAAGGGS(SEQ ID NO.84)

[0270] SGALGGLALAGLLLAGLGLGAAGS(SEQ ID NO.85)

[0271] SLSLSPGGGGGPAR(SEQ ID NO.86)

[0272] SLSLSPGGGGGPARSLSLSPGGGGG(SEQ ID NO.87)

[0273] GSSGSS(SEQ ID NO.88)

[0274] GSSSSSS(SEQ ID NO.89)

[0275] GGSSSS(SEQ ID NO.90)

[0276] GSSSSS(SEQ ID NO.91)

[0277] SGGGGS(SEQ ID NO.92).

[0278] 对于信号传导结构域内的连接基序,可以提及以下接头:

[0279] GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO.93)

[0280] GGGGG(SEQ ID NO.94)

[0281] GGGGSGGGGS(SEQ ID NO.95)

[0282] GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO.96)

[0283] GGGGGGG(SEQ ID NO.97)

[0284] GGGGGGGGG(SEQ ID NO.98).

[0285] 如本文所用,术语“多核苷酸”和“核酸”旨在彼此同义。

[0286] 技术人员会理解,由于遗传密码的简并性,许多不同的多核苷酸和核酸可以编码相同的多肽。此外,应当理解,技术人员可以使用常规技术进行不影响由本文所述的多核苷酸编码的多肽序列的核苷酸取代,以反映要表达多肽的任何特定宿主生物体的密码子使用。编码本文所述的各种结构域和基序等的核苷酸序列是本领域已知的和可获得的,并且这些核苷酸序列中的任意都可以在本文中使用或经修饰以在本文中使用。

[0287] 根据本发明的核酸可包括DNA或RNA。它们可以是单链或双链的。它们也可以是在内部包含合成的或修饰的核苷酸的多核苷酸。许多不同类型的修饰是本领域已知的。这些修饰类型包括甲基膦酸酯和硫代磷酸酯骨架,在分子的3’端和/或5’端处添加吖啶或聚赖氨酸链。为了如本文所述的用途,应当理解,多核苷酸可以通过本领域可获得的任何方法进行修饰。可以进行此类修饰以便增强感兴趣的多核苷酸的体内活性或寿命。与核苷酸序列相关的术语“变体”、“同源物”或“衍生物”包括对序列进行一个(或多个)核酸的任何取代、变化、修饰、替换、缺失或添加。

[0288] 核酸分子/多核苷酸/核苷酸序列诸如DNA核酸分子/多核苷酸/序列可以重组、合成或通过本领域技术人员可获得的任何方法产生。它们也可以通过标准技术克隆。

[0289] 较长的核酸分子/多核苷酸/核苷酸序列通常将使用重组方法来产生,例如使用聚合酶链式反应(PCR)克隆技术。这将涉及制备一对引物(例如,约15至30个核苷酸),该一对引物位于需要克隆的靶序列的侧翼,使引物与从动物或人细胞获得的mRNA或cDNA接触,在使所需区扩增的条件下进行聚合酶链式反应,分离扩增的片段(例如,通过利用琼脂糖凝胶来纯化反应混合物)并回收扩增的DNA。引物可以被设计成含有合适的限制性酶识别位点,以便扩增的DNA可以克隆到合适的载体中。

[0290] 核酸构建体可以包含核酸分子以及一个或多个其他核苷酸序列,例如调节序列,例如表达控制序列,和/或其他编码序列。特别地,其他编码序列可编码感兴趣的蛋白质。这可以是治疗性蛋白质。

[0291] 如上所述,重组蛋白可以与另一种感兴趣的蛋白质共表达,该感兴趣的蛋白质可以是例如第二蛋白质或受体,特别是抗原受体,例如CAR或TCR或其衍生物(例如TCR-CAR构建体,或单链TCR构建体等)。此类另外的蛋白质(例如受体)的编码序列可以包含在如上所述的构建体内。

[0292] 重组蛋白也可与安全开关多肽共表达。安全开关多肽为它表达在其中或其上的细胞提供自杀部分。这作为一种安全机制是有用的,在出现需要的情况下,或者实际上更一般地,根据期望或需要,例如一旦细胞已经执行或完成其治疗效果,这种安全机制允许将已经施用于受试者的细胞删除。替代地,如以上所讨论的,重组蛋白可以包含自杀部分。

[0293] 自杀部分具有导致细胞死亡,或更一般地导致细胞的消除或删除的诱导能力。自杀部分的实例是由自杀基因编码的自杀蛋白质,其可以在细胞中或细胞上与所需转基因一起表达,在这种情况下为重组蛋白(和任选的CAR或与本发明的重组蛋白一起由细胞共表达的其他受体),当被表达时,其允许细胞被删除以关闭转基因(CAR)的表达。自杀部分在本文中是自杀多肽,该自杀多肽是在许可条件下(即被诱导或开启的条件下)能够导致细胞被删除的多肽。

[0294] 自杀部分可以是多肽或氨基酸序列,其可以通过施用于受试者的激活剂被激活以执行细胞删除活性,或者其在可以施用于受试者的底物的存在下具有执行细胞删除活性的活性。在特定的实施方案中,自杀部分可以代表施用于受试者的单独的细胞删除剂的靶标。通过结合自杀部分,细胞删除剂可以靶向待删除的细胞。特别地,自杀部分可以被抗体识别,并且抗体与安全开关多肽(当在细胞表面上表达时)的结合导致细胞被消除或删除。

[0295] 如本领域已知的,自杀部分可以是HSV-TK或iCasp9。然而,在其他实例中,自杀部分可以是或可以包含被细胞删除抗体或能够引起细胞删除的其他结合分子识别的表位。

[0296] 如本文在细胞删除的背景中所用,术语“删除”与“去除”或“消融”或“消除”同义。该术语用于涵盖细胞杀伤或细胞增殖的抑制,使得受试者体内的细胞数量可以减少。100%完全去除可能是期望的,但可能不一定实现。减少受试者体内的细胞数量或抑制其增殖可能足以具有有益效果。

[0297] 特别地,自杀部分可以是被抗体利妥昔单抗识别的CD20表位。因此,在安全开关多肽中,自杀部分可以包含基于来自被抗体利妥昔单抗识别的CD20的表位的最小表位。更特别地,多肽可以包含被接头L隔开的两个CD20表位R1和R2。

[0298] 基于利妥昔单抗表位的安全开关描述于WO2013/15339中。已经开发了模拟被利妥昔单抗识别的表位的肽(所谓的模拟表位),并且这些肽在WO2013/15339中用作组合的自杀-标志物多肽构建体中的自杀部分,该构建体还包含CD34最小表位作为标志物部分。具体地,WO2013/15339公开了一种称为RQR8的多肽,其具有SEQ ID NO.99所示的序列,该多肽包含两个CD20最小表位,这两个表位通过间隔序列和间插CD34标志物序列彼此分开,并进一步连接到茎序列,该茎序列允许多肽从它表达在其上的细胞的表面突出。安全开关多肽可以是RQR8或与其具有至少80%序列同一性的其变体,例如该变体与其具有至少85%、88%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性。可以用作安全开关结构域基础的其他安全开关多肽包括在我们的共同未决PCT专利申请号PCT/EP2021/064053(WO 2021/239812)中描述的那些多肽。

[0299] 可以与本文所述的嵌合蛋白或重组蛋白共表达的其他多肽包括转录因子、生长因

子或可以帮助增强细胞存活功能的其他因子。例如,转录因子FOXP3可以用于维持Treg细胞的抑制表型。“FOXP3”是叉头框P3蛋白质的缩写名称。FOXP3是转录因子FOX蛋白质家族的成员,并且在调节性T细胞的发育和功能中作为调节途径的主要调节子起作用。如本文所用,“FOXP3”涵盖FOXP3的变体、同种型和功能片段。“FOXP3多肽”是具有FOXP3活性的多肽,即能够结合FOXP3靶DNA并用作调节Treg的发育和功能的转录因子的多肽。FOXP3与本文所述的重组蛋白在Treg中的表达还可以帮助维持Treg表型。

[0300] FOXP3与组成型活性重组受体的共表达可以帮助增加细胞内的FOXP3表达并维持Treg细胞或具有调节表型的细胞的抑制表型。

[0301] “增加FOXP3表达”是指与未通过引入核酸分子或载体而修饰的对应细胞(或细胞群)相比,增加细胞(或细胞群)中FOXP3 mRNA和/或蛋白质的水平。例如,根据本发明修饰的细胞(或此类细胞的群)中FOXP3 mRNA和/或蛋白质的水平可以增加至比未根据本发明修饰的对应细胞(或此类细胞的群)中的水平高至少1.5倍、至少2倍、至少5倍、至少10倍、至少50倍、至少100倍、至少150倍。优选地,细胞是Treg,或者细胞群是Treg群。

[0302] 适当地,修饰的细胞(或此类细胞的群)中FOXP3 mRNA和/或蛋白质的水平可以增加至比未经如此修饰的对应细胞(或此类细胞的群)中的水平高至少1.5倍、2倍或5倍。优选地,细胞是Treg,或者细胞群是Treg群。

[0303] 用于测量特定mRNA和蛋白质的水平的技术是本领域公知的。细胞(诸如Treg)群中的mRNA水平可通过诸如Affymetrix ebioscience prime flow RNA测定、Northern印迹、基因表达系列分析(SAGE)或定量聚合酶链式反应(qPCR)等技术来测量。细胞群中的蛋白质水平可以通过诸如流式细胞术、高效液相色谱(HPLC)、液相色谱-质谱(LC/MS)、蛋白质印迹或酶联免疫吸附测定(ELISA)等技术来测量。

[0304] “FOXP3多肽”是具有FOXP3活性的多肽,即能够结合FOXP3靶DNA并用作调节Treg的发育和功能的转录因子的多肽。特别地,FOXP3多肽可以具有与野生型FOXP3(SEQ ID NO.129)相同或类似的活性,例如,可以具有野生型FOXP3多肽活性的至少40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%、110%、120%、130%、140%或150%。因此,与野生型FOXP3相比,由本文所述的核酸或载体中的核苷酸序列编码的FOXP3多肽可以具有增加或降低的活性。用于测量转录因子活性的技术是本领域公知的。例如,转录因子DNA结合活性可以通过ChIP测量。转录因子的转录调节活性可以通过对其调节的基因的表达水平进行定量来测量。基因表达可以通过使用诸如Northern印迹、SAGE、qPCR、HPLC、LC/MS、蛋白质印迹或ELISA等技术测量由基因产生的mRNA和/或蛋白质的水平来定量。受FOXP3调节的基因包括细胞因子,诸如IL-2、IL-4和IFN-γ(Siegler等,Annu.Rev.Immunol.2006,24:209-26,该文献以引用方式并入本文)。如以下详细讨论的,FOXP3或FOXP3多肽包括其功能片段、变体和同种型,例如SEQ ID NO.32的功能片段、变体和同种型。

[0305] “FOXP3的功能片段”可以指FOXP3多肽或编码FOXP3多肽的多核苷酸(即核苷酸序列)的一部分或区,该部分或区具有与全长FOXP3多肽或多核苷酸相同或类似的活性。功能片段可以具有全长FOXP3多肽或多核苷酸活性的至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或100%。本领域技术人员将能够基于FOXP3的已知结构和功能特征生成功能片段。这些内容描述于例如Song,X.等,2012.Cell reports,1(6),第665-675页;Lopes,J.E.等,2006.The Journal of Immunology,177(5),第3133-3142页;和

Lozano,T.等,2013.Frontiers in oncology,3,第294页。此外,在WO2019/241549(以引用方式并入本文)中描述了N末端和C末端截短的FOXP3片段,例如具有序列SEQ ID NO.37,如以下所讨论的。

[0306] “FOXP3变体”可以包括与FOXP3多肽或编码FOXP3多肽的多核苷酸(例如与SEQ ID NO.129)至少50%、至少55%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%或至少90%相同,优选地至少95%或至少97%或至少99%相同的氨基酸序列或核苷酸序列。FOXP3变体可以具有与野生型FOXP3多肽或多核苷酸相同或类似的活性,例如可以具有野生型FOXP3多肽或多核苷酸活性的至少40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%、110%、120%、130%、140%或150%。本领域技术人员将能够基于FOXP3的已知结构和功能特征和/或使用保守取代生成FOXP3变体。与野生型FOXP3相比,FOXP3变体在Treg细胞内可以具有类似或相同的周转时间(或降解速率),例如为Treg中野生型FOXP3的周转时间(或降解速率)的至少40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%。与野生型FOXP3相比,一些FOXP3变体可以具有降低的周转时间(或降解速率),例如,在SEQ ID NO.32的氨基酸418和/或422处具有氨基酸取代的FOXP3变体,例如S418E和/或S422A,如WO2019/241549(以引用方式并入本文)中所述。

[0307] 适当地,由如本文所述的核酸分子或载体编码的FOXP3多肽可以包括人FOXP3的多肽序列(诸如UniProtKB登录号Q9BZS1(SEQ ID NO:32))或其功能片段或变体或由其组成。

[0308] 在本发明的一些实施方案中,FOXP3多肽包含与SEQ ID NO:32至少70%相同的氨基酸序列或其功能片段或由其组成。适当地,FOXP3多肽包含与SEQ ID NO:32至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列或其功能片段或由其组成。在一些实施方案中,FOXP3多肽包含SEQ ID NO:32或其功能片段或由其组成。

[0309] 在一些实施方案中,如以上所讨论的,FOXP3多肽可以包含SEQ ID NO.32的残基418和/或422处的突变。

[0310] 在本发明的一些实施方案中,FOXP3多肽可以在N末端和/或C末端处截短,导致功能片段的产生。特别地,FOXP3的N末端和C末端截短的功能片段可以包含SEQ ID NO.37的氨基酸序列或与其具有至少80%、85%、90%、95%或99%同一性的其功能变体或由其组成。

[0311] 适当地,FOXP3多肽可以是SEQ ID NO:32的变体,例如天然变体。适当地,FOXP3多肽是SEQ ID NO:32的同种型。例如,FOXP3多肽可以包含相对于SEQ ID NO:32的氨基酸第72-106位的缺失。替代地,FOXP3多肽可以包含相对于SEQ ID NO:32的氨基酸第246-272位的缺失。

[0312] 本发明的核酸分子或构建体还可以包含编码选择性标记物的核酸序列。合适的选择性标记物是本领域公众的,并且包括但不限于荧光蛋白质—诸如GFP。适当地,选择性标记物可以是荧光蛋白质,例如GFP、YFP、RFP、tdTomato、dsRed或它们的变体。在一些实施方案中,荧光蛋白质是GFP或GFP变体。

[0313] 适当地,选择性标记物/报告分子结构域可以是基于荧光素酶的报告子、PET报告子(例如碘化钠同向转运体(NIS))或膜蛋白质(例如CD34、低亲和力神经生长因子受体(LNGFR))。

[0314] 使用选择性标记物是有利的,因为它允许使用常规方法(例如流式细胞术)从起始细胞群中选择和分离已经成功引入核酸分子、构建体或载体(使得编码的嵌合蛋白和任何

其他编码的蛋白质或多肽得以表达)的细胞(例如Treg)。

[0315] 在另外的实施方案中,重组蛋白可以与对至少一种钙调磷酸酶抑制剂具有抗性的突变钙调磷酸酶蛋白共表达,并且特别是与对至少一种钙调磷酸酶抑制剂具有抗性并且对至少一种钙调磷酸酶抑制剂敏感的突变钙调磷酸酶蛋白共表达。此类钙调磷酸酶突变体在下面进一步讨论。在此类实施方案中,核酸分子或构建体还可以包含编码此类突变钙调磷酸酶的核苷酸序列。

[0316] 当两个或更多个编码序列由单个核酸分子或构建体表达时,它们可以通过允许两个或更多个编码序列共表达的序列连接。特别地,共表达序列,或替代地称为共表达位点,可以使编码的蛋白质或多肽能够作为离散实体表达。例如,构建体可以包含内部启动子、内部核糖体进入序列(IRES)序列或编码切割位点的序列。

[0317] 特别地,共表达序列可以在编码的多肽之间编码自切割序列。特别地,自切割序列可以是自切割肽。此类序列在蛋白质产生期间自动切割。可使用的自切割肽是本领域已知和已经描述的2A肽或2A样肽,例如在Donnelly等,Journal of General Virology,2001,82,1027-1041中所述,该文献以引用方式并入本文。2A和2A样肽被认为会引起核糖体跳过,并导致一种切割形式,其中核糖体跳过2A肽的端部与下游氨基酸序列之间肽键的形成。“切割”发生在2A肽的C末端处的甘氨酸与脯氨酸残基之间,这意味着上游顺反子将在末端添加一些附加残基,而下游顺反子将以脯氨酸开始。

[0318] 合适的自切割结构域包括分别如SEQ ID NO:100-SEQ ID NO:103所示的P2A、T2A、E2A和F2A序列。可以修饰序列以在2A肽的N末端处包括氨基酸GSG。因此,作为可能的选项,还包括对应于SEQ ID NO.100-SEQ ID NO.103的序列,但在其N末端处具有GSG。此类经修饰的替代2A序列是本领域已知和已经报道的。可以使用的替代2A样序列在Donnelly等(见上文)中示出,例如TaV序列。

[0319] 核酸分子中包含的自切割序列可以相同或不同。

[0320] 自切割序列可以包含附加的切割位点,其可被细胞中存在的常见酶切割。这可以帮助在翻译后实现2A序列的完全去除。此类附加的切割位点可以例如包括弗林蛋白酶切割位点。此类切割位点是本领域已知的,并且可以包括例如RXXR(SEQ ID NO:104),例如RRKR(SEQ ID NO:105)。

[0321] 本文所用的核酸分子/多核苷酸可以是密码子优化的。密码子优化先前已经描述于WO 1999/41397和WO 2001/79518中。不同的细胞在它们对特定密码子的使用上有所不同。这种密码子偏好对应于细胞类型中特定tRNA相对丰度的偏好。通过改变序列中的密码子,使得它们适合与对应tRNA的相对丰度匹配,有可能增加表达。出于同样的原因,通过有意选择密码子(已知其对应tRNA在特定细胞类型中是稀少的),有可能降低表达。因此,可获得附加程度的平移控制。

[0322] 编码重组蛋白的核苷酸序列和任何其他编码核苷酸序列可以在构建体中提供,其中它们可操作地连接到启动子。在一些情况下,不同的核苷酸序列可以可操作地连接到相同的启动子。“启动子”是引起基因转录起始的DNA的区。启动子位于基因转录起始位点附近,在DNA上游(朝向有义链的5’区)。可以使用任何合适的启动子,其选择可以由技术人员容易地进行。启动子可以来自任何来源,并且可以是病毒启动子或真核启动子,包括哺乳动物或人启动子(即生理启动子)。在一个实施方案中,启动子是病毒启动子。特定的启动子包

括LTR启动子、EFS(或其功能截短)、SFFV、PGK和CMV。在一个实施方案中,启动子是SFFV或病毒LTR启动子。“可操作地连接到相同启动子”是指多核苷酸序列的转录可从相同启动子起始,并且核苷酸序列被定位和定向成使得转录从启动子起始。可操作地连接到启动子的多核苷酸处于启动子的转录调节下。

[0323] 载体是允许或促进实体从一个环境转移到另一环境的工具。如本文所用,例如,重组核酸技术中使用的一些载体允许实体(诸如核酸区段(例如异源DNA区段,诸如异源cDNA区段))转移到靶细胞中。载体可以是非病毒的或病毒的。重组核酸技术中使用的载体的实例包括但不限于质粒、mRNA分子(例如体外转录的mRNA)、染色体、人工染色体和病毒。载体也可以是例如裸核酸(例如DNA)。在其最简单的形式中,载体本身可以是感兴趣的核苷酸序列。

[0324] 本文所用的载体可以是例如质粒、mRNA或病毒载体,并且可以包含用于表达核酸分子/多核苷酸的启动子(如上所述)和任选的启动子的调节子。

[0325] 在一个实施方案中,载体是病毒载体,例如逆转录病毒载体,例如慢病毒载体或γ逆转录病毒载体。

[0326] 载体还可以包含附加的启动子,例如,在一个实施方案中,启动子可以是LTR,例如逆转录病毒LTR或慢病毒LTR。长末端重复序列(LTR)是重复数百或数千次的相同DNA序列,其发现于逆转录转座子或由逆转录病毒RNA逆转录形成的前病毒DNA的任一端处。病毒利用它们将其遗传物质插入宿主基因组中。在LTR中发现基因表达的信号:增强子、启动子(可以具有转录增强子或调节元件)、转录起始(诸如加帽)、转录终止子和聚腺苷酸化信号。

[0327] 适当地,载体可以包含5’LTR和3’LTR。

[0328] 载体可以包含一个或多个附加的调节序列,这些调节序列可在转录前或转录后起作用。“调节序列”是促进多肽表达的任何序列,例如,用于增加转录物的表达或增强mRNA稳定性。合适的调节序列包括例如增强子元件、转录后调节元件和聚腺苷酸化位点。适当地,附加的调节序列可以存在于LTR中。

[0329] 适当地,载体可以包含土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件(WPRE),其例如可操作地连接到启动子。

[0330] 可以使用本领域已知的多种技术(诸如转化和转导),将包含本发明的核酸分子/多核苷酸的载体引入细胞。本领域已知若干技术,例如用重组病毒载体感染,该重组病毒载体为诸如逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺相关病毒、杆状病毒和单纯疱疹病毒载体;直接注射核酸和基因枪转化。

[0331] 非病毒递送系统包括但不限于DNA转染方法。这里,转染包括使用非病毒载体将基因递送到靶细胞的过程。非病毒递送系统可以包括脂质体或两亲性细胞穿透肽,其优选地与核酸分子或构建体复合。

[0332] 典型的转染方法包括电穿孔、DNA基因枪、脂质介导的转染、压缩的DNA介导的转染、脂质体、免疫脂质体、lipofectin、阳离子剂介导的转染、阳离子表面两亲物(CFA)(Nat.Biotechnol.(1996)14:556)以及它们的组合。

[0333] 在一些情况下,本发明的核酸分子可以被设计成用作编码重组蛋白和任何其他多肽(例如受体或标志物或其他功能多肽或感兴趣的蛋白质)的单一构建体,并且这将包含在单一载体中,不排除将它们与其他载体(例如编码可能还需要引入细胞的其他多肽)一起引

入细胞。

[0334] 如上所述,重组蛋白可与CAR一起在细胞内或细胞上共表达。如本文所用,术语“嵌合抗原受体”或“CAR”是指工程化受体,其可赋予细胞(例如Treg)抗原特异性。CAR也称为人工T细胞受体、嵌合T细胞受体或嵌合免疫受体。CAR通常包含含有抗原特异性靶向区(本文称为抗原结合结构域)的胞外结构域、跨膜结构域和包含任选的一个或多个共刺激结构域以及胞内信号传导结构域的胞内结构域。抗原结合结构域通常通过铰链结构域接合到跨膜结构域。CAR的设计以及它们可能包含的各种结构域是本领域公知的。

[0335] 当CAR结合其靶抗原时,这导致激活信号传递至表达它的细胞。因此,CAR将工程化细胞的特异性引向靶抗原,特别是表达靶抗原的细胞。

[0336] CAR的抗原结合结构域可以来源于或获得自结合(即,对其具有亲和力)所需靶抗原或更一般地所需靶分子的任何蛋白质或多肽。这可以是例如配体或受体,或靶分子的生理结合蛋白或其部分,或合成或衍生的蛋白质。靶分子通常可以在细胞的表面上表达,该细胞为例如靶细胞或靶细胞附近的细胞(对于旁观者效应),但不是必须的。根据抗原结合结构域的性质和特异性,CAR可以识别可溶性分子,例如当抗原结合结构域基于或来源于细胞受体时。

[0337] 抗原结合结构域最通常来源于抗体可变链(例如其通常采取scFv的形式),但也可以由T细胞受体可变结构域或如上所述的其他分子(诸如配体的受体或其他结合分子)生成。

[0338] CAR通常表达为还包含信号序列(也称为前导序列)的多肽,并且特别是将CAR靶向细胞的质膜的信号序列。这通常将定位在抗原结合结构域的旁边或附近,通常在抗原结合结构域的上游。CAR的胞外结构域或胞外域因此可以包含信号序列和抗原结合结构域。

[0339] 抗原结合结构域为CAR提供结合预定的感兴趣的抗原的能力。抗原结合结构域优选地靶向临床感兴趣的抗原或疾病位点处的抗原。

[0340] 如上所述,抗原结合结构域可以是具有特异性识别和结合生物分子(例如细胞表面受体或其组分)的能力的任何蛋白质或肽。抗原结合结构域包括感兴趣的生物分子的任何天然存在的、合成的、半合成的或重组产生的结合配偶体。说明性的抗原特异性靶向结构域包括抗体或抗体片段或衍生物、受体的胞外结构域、细胞表面分子/受体的配体或其受体结合结构域以及肿瘤结合蛋白。尽管如以下所讨论的,抗原特异性靶向结构域可以优选地是抗体或来源于抗体,但也涵盖其他抗原特异性靶向结构域,例如由抗原肽/MHC或HLA组合形成的抗原特异性靶向结构域,其能够结合在移植、炎症或疾病的位点处有活性的Tcon细胞的TCR。

[0341] CAR可以针对任何所需的靶抗原或分子。这可以根据预期的疗法和所需治疗的病症来选择。例如,它可以是与特定病症相关联的抗原或分子,或者是与治疗病症所需靶向的细胞相关联的抗原或分子。通常,抗原或分子是细胞表面抗原或分子。

[0342] 术语“针对”与“对…具有特异性”或“抗”同义。换句话说,CAR识别靶分子。因此,这意味着CAR能够特异性结合指定或给定的抗原或靶标。特别地,CAR的抗原结合结构域能够特异性结合靶分子或抗原(更特别地当CAR在细胞,尤其是免疫效应细胞的表面上表达时)。特异性结合可以区别于与非靶分子或抗原的非特异性结合。因此,表达CAR的细胞被定向或重定向,以特异性结合表达靶分子或抗原的靶细胞,特别是在其细胞表面上表达靶抗原或

分子的靶细胞。

[0343] 可以被本发明的CAR靶向的抗原包括但不限于在与移植器官、自身免疫性疾病、过敏性疾病和炎性疾病(例如神经变性疾病)相关联的细胞上表达的抗原。技术人员会理解,当工程化成表达CAR的细胞是Treg细胞或其前体时,由于Treg细胞的旁观者效应,抗原可以简单地在移植、炎症或疾病的位点处存在和/或表达。

[0344] 在与神经变性疾病相关联的细胞上表达的抗原包括在神经胶质细胞上呈递的那些抗原,例如MOG。

[0345] 与器官移植物相关联的抗原和/或与移植器官相关联的细胞包括但不限于存在于移植器官中但不存在于患者体内的HLA抗原,或在移植物排斥期间表达上调的抗原,诸如CCL19、MMP9、SLC1A3、MMP7、HMMR、TOP2A、GPNMB、PLA2G7、CXCL9、FABP5、GBP2、CD74、CXCL10、UBD、CD27、CD48、CXCL11。

[0346] 在一个实施方案中,CAR针对HLA抗原,并且特别是HLA-A2抗原。

[0347] 针对此类抗原的抗体是本领域已知的,并且方便地,可以基于已知的或可获得的抗体获得或生成scFv。在这方面,VH和VL以及CDR序列可公开获得以帮助制备此类抗体结合结构域,例如在WO 2020/044055中,该文献的公开内容以引用方式并入本文。可以使用WO 2020/044055中公开的抗原结合结构域或CDR、VH和/或VL序列中的任一者。

[0348] 例如,CAR可以包含能够结合HLA-A2的抗原结合结构域(HLA-A2在本文中也可以称为HLA-A*02、HLA-A02和HLA-A*2)。HLA-A*02是HLA-A基因座处的一个特定的I类主要组织相容性复合物(MHC)等位基因组。

[0349] 抗原识别结构域可以结合、适当地特异性结合HLA-A2内的一个或多个区或表位。表位也称为抗原决定簇,是抗原的被抗原识别结构域(例如抗体)识别的一部分。换句话说,表位是抗体结合的抗原的特异性片段。适当地,抗原识别结构域结合、适当地特异性结合HLA-A2内的一个区或表位。

[0350] 通过多种方法(包括利用病毒载体转导和利用DNA或RNA转染)中的一种方法,可以通过引入如本文所定义的核酸分子、构建体或载体来生成工程化细胞,特别是T细胞。

[0351] 本发明的细胞可通过以下方法制备:将如本文所定义的核酸分子、构建体或载体引入细胞(例如通过转导或转染)。

[0352] 合适的细胞在下文进一步讨论,但细胞可以来自从受试者分离的样品。受试者可以是供体受试者,或治疗的受试者(即,细胞可以是自体细胞,或用于引入另一受者的供体细胞,例如同种异体细胞)。

[0353] 细胞可通过包括以下步骤的方法生成:

[0354] (i)从受试者分离含细胞样品或提供含细胞样品;以及

[0355] (ii)将如本文所定义的核酸分子、构建体或载体引入(例如通过转导或转染)含细胞样品,以提供工程化细胞群。

[0356] 待引入核酸分子、构建体或载体的细胞可以称为靶细胞。在方法的步骤(ii)之前和/或之后,可以从含细胞样品分离、富集和/或生成富含靶细胞的样品。例如,可以在步骤(ii)之前和/或之后进行Treg(或其他靶细胞)的分离、富集和/或生成,以分离、富集或生成富含Treg的样品。从含细胞样品分离和/或富集可以在步骤(ii)之后进行,以富集包含如本文所述的CAR、核酸分子/多核苷酸、构建体和/或载体的细胞和/或Treg(或其他靶细胞)。

[0357] 可以通过本领域技术人员已知的任何方法来分离或富集富含Treg的样品,例如通过FACS和/或磁珠分选。可以通过本领域技术人员已知的任何方法从含细胞样品中生成富含Treg的样品,例如通过引入编码FOXP3的DNA或RNA从Tcon细胞中生成,和/或从诱导型祖细胞或胚胎祖细胞的离体分化中生成。用于分离和/或富集其他靶细胞的方法是本领域已知的。

[0358] 靶细胞可以是Treg细胞或其前体或祖细胞。

[0359] “工程化细胞”是指已经被修饰以包括或表达非该细胞天然编码的多核苷酸的细胞。用于对细胞进行工程化的方法是本领域已知的,并且包括但不限于细胞的遗传修饰,例如通过转导(诸如逆转录病毒或慢病毒转导)、转染(诸如瞬时转染—基于DNA或RNA),包括脂质转染、聚乙二醇、磷酸钙和电穿孔,如以上所讨论的。任何合适的方法都可以用于将核酸序列引入细胞。非病毒技术诸如两亲性细胞穿透肽可以用于引入核酸。还可以对细胞进行遗传修饰,例如使用任何已知的基因编辑技术将如本文所述的核苷酸、多核苷酸或核酸序列插入基因组中,例如使用CRISPR、Talens或锌指。

[0360] 因此,如本文所述的核酸分子不是由对应的未修饰的细胞天然表达的。实际上,编码重组蛋白的核酸分子是人工构建体,并且不能天然存在或表达。适当地,工程化细胞是已经例如通过转导或通过转染被修饰的细胞。适当地,工程化细胞是已经例如通过转导或通过转染被修饰的细胞或其基因组已经例如通过转导或通过转染被修饰的细胞。适当地,工程化细胞是已经通过逆转录病毒转导被修饰的细胞或其基因组已经通过逆转录病毒转导被修饰的细胞。适当地,工程化细胞是已经通过慢病毒转导被修饰的细胞或其基因组已经通过慢病毒转导被修饰的细胞。

[0361] 如本文所用,术语“引入”是指将外源核酸,例如DNA或RNA插入细胞中的方法。如本文所用,术语引入包括转导和转染方法两者。转染是通过非病毒方法将核酸引入细胞的过程。转导是经由病毒载体将外源DNA或RNA引入细胞的过程。通过多种方法(包括利用病毒载体转导、利用DNA或RNA转染)中的一种方法,可以通过引入如本文所述的核酸来生成工程化细胞。

[0362] 可以在引入如本文所述的核酸之前或之后激活和/或扩增细胞,例如通过用抗CD3单克隆抗体或抗CD3和抗CD28单克隆抗体两者进行处理。还可以在抗CD3和抗CD28单克隆抗体与IL-2组合存在的情况下扩增细胞。适当地,IL-2可以用IL-15代替。可以用于细胞(例如Treg)扩增方案的其他组分包括但不限于雷帕霉素、全反式维甲酸(ATRA)和TGFβ。如本文所用,“激活”是指细胞已受到刺激,导致细胞增殖。如本文所用,“扩增”是指细胞或细胞群已被诱导增殖。细胞群的扩增可以通过例如对群中存在的细胞数量进行计数来测量。细胞的表型可以通过本领域已知的方法诸如流式细胞术来确定。在一个实施方案中,细胞可以在EPO存在下培养和/或激活。

[0363] 细胞可以是免疫细胞,或其前体。前体细胞可以是祖细胞。因此,代表性的免疫细胞包括T细胞,特别是细胞毒性T细胞(CTL;CD8+T细胞)、辅助性T细胞(HTL;CD4+T细胞)和调节性T细胞(Treg)。其他T细胞群也可以用于本文,例如幼稚T细胞和记忆T细胞。其他免疫细胞包括NK细胞、NKT细胞、树突细胞、MDSC、中性粒细胞和巨噬细胞。免疫细胞的前体包括多能干细胞,例如诱导型PSC(iPSC),或更定向的祖细胞,包括多潜能干细胞,或定向至谱系的细胞。前体细胞可以在体内或体外被诱导分化成免疫细胞。在一个方面,前体细胞可以是能

够转分化成感兴趣的免疫细胞的体细胞。

[0364] 最值得注意的是,免疫细胞可以是NK细胞、树突细胞、MDSC或T细胞,诸如细胞毒性T淋巴细胞(CTL)或Treg细胞。

[0365] 特别地,免疫细胞可以是Treg细胞。"调节性T细胞(Treg)或T调节性细胞"是具有免疫抑制功能的免疫细胞,其控制致细胞病变免疫应答并且对于维持免疫耐受性是必需的。如本文所用,术语Treg是指具有免疫抑制功能的T细胞。

[0366] 如本文所用,T细胞是淋巴细胞,包括任何类型的T细胞,诸如αβT细胞(例如CD8或CD4+)、γδT细胞、记忆T细胞、Treg细胞。

[0367] 适当地,免疫抑制功能可以指Treg降低或抑制由免疫系统响应于刺激物(诸如病原体、同种异体抗原或自身抗原)而促进的许多生理和细胞效应中的一种或多种效应的能力。此类效应的实例包括增加常规T细胞(Tcon)的增殖和促炎细胞因子的分泌。任何此类效应都可以用作免疫应答强度的指标。在Treg存在下,Tconv的相对较弱的免疫应答将指示Treg抑制免疫应答的能力。例如,细胞因子分泌的相对减少将指示较弱的免疫应答,并因此指示Treg抑制免疫应答的能力。Treg还可以通过调控共刺激分子在抗原呈递细胞(APC)(诸如B细胞、树突细胞和巨噬细胞)上的表达来抑制免疫应答。CD80和CD86的表达水平可以用于在共培养后体外评估激活的Treg的抑制效力。

[0368] 本领域已知用于测量免疫应答强度的指标,从而测量Treg的抑制能力的测定。特别地,抗原特异性Tconv细胞可以与Treg共培养,并将对应抗原的肽添加到共培养物中以刺激Tconv细胞的应答。Tconv细胞的增殖程度和/或它们响应于肽的添加而分泌的细胞因子IL-2的量可以用作共培养Treg的抑制能力的指标。

[0369] 如本文所指的,与Treg共培养的抗原特异性Tconv细胞的增殖可比在不存在Treg的情况下培养的相同Tconv细胞少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、90%、95%或99%。例如,与本发明的Treg共培养的抗原特异性Tconv细胞的增殖可比在非工程化Treg存在下培养的相同Tconv细胞少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、90%、95%或99%。包括如本文所定义的核酸、表达构建体或载体的细胞(例如Treg)与非工程化Treg相比,可以具有增加的抑制活性(例如增加的抑制活性为至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%)。

[0370] 与在不存在Treg的情况下(例如在非工程化Treg存在下)培养的对应Tconv细胞相比,与本文的Treg共培养的抗原特异性Tconv细胞可以表达少至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%或至少60%的效应细胞因子。效应细胞因子可以选自IL-2、IL-17、TNFα、GM-CSF、IFN-γ、IL-4、IL-5、IL-9、IL-10和IL-13。适当地,效应细胞因子可以选自IL-2、IL-17、TNFα、GM-CSF和IFN-γ。

[0371] 已经鉴定了若干不同的Treg亚群,它们可以表达不同的或不同水平的特定标志物。Treg通常是表达标志物CD4、CD25和FOXP3($CD4^+CD25^+FOXP3^+$)的T细胞。

[0372] Treg还可以表达CTLA-4(细胞毒性T淋巴细胞相关分子-4)或GITR(糖皮质激素诱导的TNF受体)。

[0373] Treg细胞存在于外周血、淋巴结和组织中,并且用于本文的Treg包括胸腺来源的天然Treg(nTreg)细胞、外周生成的Treg和诱导型Treg(iTreg)细胞。

[0374] Treg可以在不存在表面蛋白质CD127或与表面蛋白质CD127的低水平表达组合的

情况下使用细胞表面标志物CD4和CD25来鉴定(CD4$^+$CD25$^+$CD127$^-$或CD4$^+$CD25$^+$CD127^{低})。使用此类标志物鉴定Treg是本领域已知的,并且描述于例如Liu等(JEM;2006;203;7(10);1701-1711)中。

[0375] Treg可以是CD4$^+$CD25$^+$FOXP3$^+$T细胞、CD4$^+$CD25$^+$CD127$^-$T细胞或CD4$^+$CD25$^+$FOXP3$^+$CD127$^{-/低}$T细胞。

[0376] 适当地,Treg可以是天然Treg(nTreg)。如本文所用,术语"天然Treg"是指胸腺来源的Treg。天然T reg是CD4$^+$CD25$^+$FOXP3$^+$Helios$^+$神经纤毛蛋白1$^+$。与iTreg相比,nTreg具有更高的PD-1(程序性细胞死亡-1,pdcd1)、神经纤毛蛋白1(Nrp1)、Helios(Ikzf2)和CD73的表达。nTreg可以基于Helios蛋白质或神经纤毛蛋白1(Nrp1)的单独表达与iTreg区分开。

[0377] Treg可以具有去甲基化的Treg特异性去甲基化区(TSDR)。TSDR是调节Foxp3表达的重要甲基化敏感元件(Polansky,J.K.等,2008.European journal of immunology,38(6),第1654-1663页)。

[0378] 另外的合适的Treg包括但不限于Tr1细胞(其不表达Foxp3,并且具有高IL-10产生);CD8$^+$FOXP3$^+$T细胞;以及γδFOXP3$^+$T细胞。

[0379] 已知存在不同的Treg亚群,包括幼稚Treg(CD45RA$^+$FoxP3^{低})、效应/记忆Treg(CD45RA$^-$FoxP3^{高})和产生细胞因子的Treg(CD45RA$^-$FoxP3^{低})。"记忆Treg"是表达CD45RO并被认为是CD45RO$^+$的Treg。这些细胞具有与幼稚Treg相比增加的CD45RO水平(例如,多至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的CD45RO),并且优选地与幼稚Treg相比不表达或具有低水平的CD45RA(mRNA和/或蛋白质)(例如,与幼稚Treg相比少至少80%、90%或95%的CD45RA)。"产生细胞因子的Treg"是这样的Treg,其与幼稚Treg相比不表达或具有非常低水平的CD45RA(mRNA和/或蛋白质)(例如与幼稚Treg相比少至少80%、90%或95%的CD45RA),并且与记忆Treg相比具有低水平的FOXP3,例如与记忆Treg相比小于50%、60%、70%、80%或90%的FOXP3。产生细胞因子的Treg可以产生干扰素γ,并且与幼稚Treg相比在体外抑制性可能较低(例如,与幼稚Treg相比,抑制性小于50%、60%、70%、80%或90%)。本文提及的表达水平可以指mRNA或蛋白质表达。特别地,对于细胞表面标志物诸如CD45RA、CD25、CD4、CD45RO等,表达可以指细胞表面表达,即在细胞表面上表达的标志物蛋白质的量或相对量。表达水平可以通过本领域任何已知的方法来确定。例如,mRNA表达水平可以通过Northern印迹/阵列分析来确定,并且蛋白质表达可以通过蛋白质印迹来确定,或优选地通过FACS使用抗体染色来确定细胞表面表达。

[0380] 特别地,Treg可以是幼稚Treg。如本文可互换使用的,"幼稚调节性T细胞、幼稚T调节性细胞或幼稚Treg"是指表达CD45RA(特别是在细胞表面上表达CD45RA)的Treg细胞。因此,将幼稚Treg描述为CD45RA$^+$。幼稚Treg通常代表未通过其内源性TCR由肽/MHC激活的Treg,而效应/记忆Treg涉及已通过其内源性TCR刺激激活的Treg。通常,与非幼稚的Treg细胞(例如记忆Treg细胞)相比,幼稚Treg可以表达多至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的CD45RA。替代地来看,与非幼稚Treg细胞(例如记忆Treg细胞)相比,幼稚Treg细胞可以表达至少2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、50倍或100倍的量的CD45RA。CD45RA的表达水平可以通过本领域的方法容易地确定,例如通过使用可商购获得的抗体的流式细胞术来确定。通常,非幼稚Treg细胞不表达CD45RA或表达低水平的CD45RA。

[0381] 特别地,幼稚Treg可能不表达CD45RO,并且可以被认为是CD45RO$^-$。因此,与记忆

Treg相比,幼稚Treg可以表达少至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的CD45RO,或替代地来看,与记忆Treg细胞相比,幼稚Treg可表达少至少2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、50倍或100倍的CD45RO。

[0382] 尽管如以上所讨论的幼稚Treg表达CD25,但CD25表达水平可能低于记忆Treg中的表达水平,这取决于幼稚Treg的来源。例如,对于从外周血分离的幼稚Treg,CD25的表达水平可以比记忆Treg低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。此类幼稚Treg可被认为表达中等至低水平的CD25。然而,技术人员会理解,从脐带血分离的幼稚Treg可能不显示这种差异。

[0383] 通常,如本文所定义的幼稚Treg可以是$CD4^+$、$CD25^+$、$FOXP3^+$、$CD127^{低}$、$CD45RA^+$。

[0384] 如本文所用,CD127的低表达是指与来自相同受试者或供体的$CD4^+$非调节性细胞或Tcon细胞相比,CD127的较低表达水平。特别地,与来自相同受试者或供体的$CD4^+$非调节性细胞或Tcon细胞相比,幼稚Treg可以表达小于90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%或10%的CD127。CD127的水平可通过本领域标准方法来评估,包括通过用抗CD127抗体染色的细胞的流式细胞术。

[0385] 通常,幼稚Treg不表达或表达低水平的CCR4、HLA-DR、CXCR3和/或CCR6。特别地,与记忆Treg相比,幼稚Treg可以表达较低水平的CCR4、HLA-DR、CXCR3和CCR6,例如低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的表达水平。

[0386] 幼稚Treg还可以表达附加的标志物,包括$CCR7^+$和$CD31^+$。

[0387] 分离的幼稚Treg可以通过本领域已知的方法来鉴定,包括通过确定分离的细胞的细胞表面上是否存在一组以上所讨论的标志物中的任一种或多种标记物。例如,CD45RA、CD4、CD25和CD127低可以用于确定细胞是否是幼稚Treg。确定分离的细胞是否是幼稚Treg或具有所需表型的方法可以如下文关于可进行的附加步骤所讨论的进行,并且用于确定细胞标志物的存在和/或表达水平的方法是本领域公知的,并且包括例如使用可商购获得的抗体的流式细胞术。

[0388] 适当地,细胞,诸如Treg,分离自从受试者获得的外周血单核细胞(PBMC)。适当地,从其获得PBMC的受试者是哺乳动物,优选地是人。适当地,细胞与待施用工程化细胞的受试者匹配(例如HLA匹配)或者是自体的。适当地,待治疗的受试者是哺乳动物,特别是人。细胞可以从患者自身的外周血(第1方)离体生成,或在造血干细胞移植的情况下从供体外周血(第2方)离体生成,或从未连接的供体的外周血(第3方)离体生成。适当地,细胞对于待施用工程化细胞的受试者是自体的。

[0389] 适当地,Treg是细胞群的一部分。适当地,Treg群包括至少70%的Treg,诸如至少75%、85%、90%、95%、97%、98%或99%的Treg。此类群可以称为“富集的Treg群”。

[0390] 在一些方面,Treg可以来源于诱导型祖细胞(例如iPSC)或胚胎祖细胞向Treg的离体分化。如本文所述的核酸分子、构建体或载体可以在分化成Treg之前或之后引入诱导型祖细胞或胚胎祖细胞。合适的分化方法是本领域已知的,并且包括在Haque等,J Vis Exp.,2016,117,54720(以引用方式并入本文)中公开的方法。在另一方面,当重组蛋白是具有在不存在信号诱导剂分子的情况下提供二聚化和信号传导的修饰的EPOR时,内源性EPOR核酸可以通过基因编辑技术(例如CRISPR)进行修饰,以提供本发明的细胞。

[0391] 如本文所用,术语“常规T细胞”或Tcon或Tconv(本文可互换使用)是指表达αβT细

胞受体(TCR)以及可能是分化簇4(CD4)或分化簇8(CD8)的共受体并且不具有免疫抑制功能的T淋巴细胞。常规T细胞存在于外周血、淋巴结和组织中。适当地,通过引入包含编码FOXP3的序列的核酸,可以由Tcon生成工程化Treg。替代地,通过在IL-2和TGF-β存在下体外培养CD4+CD25-FOXP3-细胞,可以由Tcon生成工程化Treg。

[0392] 与没有重组蛋白的Treg细胞相比,当表达重组蛋白时,本文的Treg细胞可以具有增加的持久性。如本文所用,“持久性”定义了Treg在特定环境中,例如在体内(例如在人类患者或动物模型中)可以存活的时间长度。与不表达本文的重组蛋白的Treg相比,如本文所公开的Treg可以具有至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%增加的持久性。持久性可以通过例如确定在受试者或患者体内施用的细胞随着时间的量或数量来测量,其中将表达本发明的重组蛋白的细胞与不表达该重组蛋白的等效细胞类型进行比较,或与非工程化细胞进行比较。可以例如使用标志物蛋白质来追踪施用的细胞,例如使用CD34来追踪也表达RQR8安全开关的细胞。

[0393] 在另一实施方案中,引入核酸分子、构建体或载体的靶细胞不是旨在用于治疗的细胞。在一个实施方案中,细胞是生产宿主细胞。细胞可以用于产生核酸,例如克隆,或载体,或多肽。

[0394] 本文还提供了包含如本文所定义或描述的细胞的细胞群。会理解,细胞群可以既包含含有如本文所定义的核酸分子、构建体或载体的本发明的细胞,也包含不含核酸分子、构建体或载体的细胞,例如未转导或未转染的细胞。尽管在特定的实施方案中,群中的所有细胞可以包含核酸、表达构建体或载体,但提供了具有至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%的包含核酸、表达构建体或载体的细胞的细胞群。

[0395] 还提供了一种药物组合物,该药物组合物包含如本文所定义或描述的细胞或细胞群、如本文所定义的载体。该载体可以用于基因治疗。因此,可以施用载体而不是施用细胞,以修饰受试者体内的内源性细胞来表达所引入的核酸分子。适用于基因治疗的载体是本领域已知的,并且包括病毒载体。

[0396] 药物组合物是包含治疗有效量的药物活性剂(即细胞(例如Treg)、细胞群或载体)或由其组成的组合物。其优选地包括药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂(包括它们的组合)。用于治疗用途的可接受的载体或稀释剂是药学领域公知的,并且描述于例如Remington’s Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing Co.(A.R.Gennaro编辑.1985)中。药物载体、赋形剂或稀释剂的选择可以根据预期的施用途径和标准药学实践来选择。药物组合物可以包含作为载体、赋形剂或稀释剂的(或除载剂、赋形剂或稀释剂之外还包含)任何合适的粘合剂、润滑剂、悬浮剂、包衣剂或增溶剂。

[0397] “药学上可接受的”包括无菌和无热原的制剂。载体、稀释剂和/或赋形剂必须是“可接受的”,意思是与细胞或载体相容,并且对其受者无害。通常,载体、稀释剂和赋形剂将是无菌和无热原的盐水或输注介质,然而,也可以使用其他可接受的载体、稀释剂和赋形剂。

[0398] 药学上可接受的载体的实例包括例如水、盐溶液、醇、硅酮、蜡、凡士林、植物油、聚乙二醇、丙二醇、脂质体、糖、明胶、乳糖、直链淀粉、硬脂酸镁、滑石、表面活性剂、硅酸、粘性石蜡、香料油、脂肪酸单甘油酯和甘油二酯、石油醚脂肪酸酯(petroethral fatty acid ester)、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等。

[0399] 细胞、细胞群或药物组合物可以适于治疗和/或预防所需疾病或病症的方式施用。施用的量和频率将由诸如受试者的状况以及受试者的疾病或病症的类型和严重程度等因素来确定,但也可以通过临床试验来确定适当的剂量。药物组合物可以相应地配制。

[0400] 如本文所述的细胞、细胞群或药物组合物可以肠胃外施用,例如静脉内施用,或者它们可以通过输注技术施用。细胞、细胞群或药物组合物可以无菌水溶液的形式施用,该无菌水溶液可以含有其他物质,例如足够的盐或葡萄糖以使溶液与血液等渗。水溶液可以适当地缓冲(优选地缓冲至pH为3至9)。药物组合物可以相应地配制。在无菌条件下制备合适的肠胃外制剂可以通过本领域技术人员公知的标准制药技术容易地完成。

[0401] 药物组合物可以包含在输注介质(例如无菌等渗溶液)中的细胞。可以将药物组合物封装在安瓿、一次性注射器或由玻璃或塑料制成的多剂量小瓶中。

[0402] 细胞、细胞群或药物组合物可以单剂量或多剂量施用。特别地,细胞、细胞群或药物组合物可以以单个、一次性剂量施用。药物组合物可以相应地配制。

[0403] 药物组合物还可以包含一种或多种活性剂。药物组合物还可以包含一种或多种其他治疗剂,诸如淋巴耗竭剂(例如胸腺球蛋白、campath-1H、抗CD2抗体、抗CD3抗体、抗CD20抗体、环磷酰胺、氟达拉滨)、mTOR的抑制剂(例如西罗莫司、依维莫司)、抑制共刺激途径的药物(例如抗CD40/CD40L、CTAL4Ig)和/或抑制特定细胞因子(IL-6、IL-17、TNFα、IL18)的药物。

[0404] 根据疾病/病症和待治疗的受试者以及施用途径,细胞、细胞群或药物组合物可以以不同剂量施用(例如以细胞/kg或细胞/受试者测量)。在任何情况下,医师将确定最适合于任何个体受试者的实际剂量,并且该剂量将随特定受试者的年龄、体重和响应而变化。然而,通常,对于本文的细胞,可施用$5x10^7$至$3x10^9$个细胞或10^8至$2x10^9$个细胞/受试者的剂量。

[0405] 细胞可以被适当地修饰以用于药物组合物。例如,细胞可以在被输注到受试者体内之前被冷冻保存并在适当的时间解冻。

[0406] 本文还提供了包含本文的细胞、细胞群和/或药物组合物的试剂盒或组合产品的用途。优选地,所述试剂盒用于如本文所述的方法和用途,例如如本文所述的治疗方法。优选地,所述试剂盒包括试剂盒组分的使用说明书。试剂盒或组合物还可以包含诱导剂,例如雷帕霉素或其类似物。

[0407] 本文的细胞、细胞群、组合物和载体可以用于治疗,即治疗或预防疾病或病症。如上所述,在其中或其上表达重组蛋白的细胞通常是修饰或工程化成表达另外的分子(例如另外的蛋白质),尤其是受体,例如CAR或TCR的细胞。因此,治疗可以用于预防或治疗可以通过或用表达受体(例如CAR)的细胞治疗的疾病或病症。细胞和含有它们的组合物用于过继细胞疗法(ACT)。可以通过施用表达根据本公开的CAR的细胞(特别是包括Treg细胞)来治疗各种病症。如上所述,这可能是对免疫抑制,并且特别是Treg细胞的免疫抑制作用有响应的病症。因此,本文所述的细胞、细胞群、组合物和载体可以用于在受试者体内诱导或实现免疫抑制。所施用的或经体内修饰的Treg细胞可以通过受体(例如CAR)的表达来靶向。适于此类治疗的病症包括感染性、神经变性或炎性疾病,或更广泛地与任何不需要的或不想要的或有害的免疫应答相关联的病症。

[0408] 待治疗或预防的病症包括炎症,或替代地说,与炎症相关联或涉及炎症的病症。炎

症可以是慢性或急性的。此外,炎症可以是低水平或全身性炎症。例如,炎症可以是在代谢紊乱(例如代谢综合征)的背景中发生的炎症,或在胰岛素抵抗或II型糖尿病或肥胖症等背景中发生的炎症。

[0409] 特别地,细胞、细胞群、载体和药物组合物提供了用于以下的手段:诱导对移植物的耐受性;治疗和/或预防细胞和/或体液移植物排斥;治疗和/或预防移植物抗宿主病(GvHD),一种自身免疫性或过敏性疾病;或促进组织修复和/或组织再生;或改善炎症。细胞、细胞群、载体和药物组合物可以用于以下方法,该方法包括将如本文所述的细胞、细胞群、载体或药物组合物施用于受试者的步骤。

[0410] 如本文所用,“诱导对移植物的耐受性”是指在受者体内诱导对移植器官的耐受性。换句话说,诱导对移植的耐受性是指降低受者对供体移植器官的免疫应答水平。诱导对移植器官的耐受性可以减少移植物受者所需的免疫抑制药物的量,或者可使得能够中止免疫抑制药物。

[0411] 例如,可以将工程化细胞(例如Treg)施用于患有疾病的受试者,以便减轻、减少或改善疾病的至少一种症状,诸如黄疸、深色尿、瘙痒、腹部肿胀或触痛、疲劳、恶心或呕吐和/或食欲不振。该至少一种症状可以减轻、减少或改善至少10%、至少20%、至少30%、至少40%或至少50%,或者该至少一种症状可以完全缓解。

[0412] 可以将工程化细胞(例如Treg)施用于患有疾病的受试者,以便减缓、减少或阻断疾病的进展。与未施用工程化细胞的受试者相比,疾病的进展可以被减缓、减少或阻断至少10%、至少20%、至少30%、至少40%或至少50%,或者疾病的进展可以被完全停止。

[0413] 在一个实施方案中,受试者是接受免疫抑制治疗的移植物受者。

[0414] 适当地,受试者是哺乳动物。适当地,受试者是人。

[0415] 移植物可以选自肝脏、肾脏、心脏、肺、胰腺、肠、胃、骨髓、血管化复合组织移植物和皮肤移植物。

[0416] 适当地,细胞可以表达包含抗原结合结构域的CAR,该抗原结合结构域能够特异性结合存在于移植(移植物)供体中但不存在于移植(移植物)受者中的HLA抗原。

[0417] 适当地,移植物是肝脏移植物。在移植物是肝脏移植物的实施方案中,抗原可以是存在于移植的肝脏中但不存在于患者中的HLA抗原、肝脏特异性抗原诸如NTCP,或在排斥期间表达上调的抗原,诸如CCL19、MMP9、SLC1A3、MMP7、HMMR、TOP2A、GPNMB、PLA2G7、CXCL9、FABP5、GBP2、CD74、CXCL10、UBD、CD27、CD48、CXCL11。

[0418] 如以上所讨论的,在一个代表性和优选的实施方案中,抗原是HLA-A2。

[0419] 用于治疗疾病或病症的方法涉及本文的细胞的治疗用途。在这方面,可以将细胞施用于患有已存在的疾病或病症的受试者,以便减轻、减少或改善与疾病或病症相关联的至少一种症状和/或减缓、减少或阻断疾病的进展。

[0420] 适当地,治疗和/或预防细胞和/或体液移植物排斥可以指施用有效量的细胞(例如Treg),使得移植物受者所需的免疫抑制药物的量减少,或者可使得能够中止免疫抑制药物。

[0421] 预防疾病或病症涉及本文的细胞的预防用途。在这方面,可以将细胞施用于尚未感染或发展出疾病或病症和/或未显示疾病或病症的任何症状的受试者,以预防疾病或病症或减少或预防与疾病或病症相关联的至少一种症状的发展。受试者可能对该疾病或病症

有易感性,或被认为有发展出该疾病或病症的风险。

[0422] 自身免疫性或过敏性疾病可以选自炎性皮肤病,包括银屑病和皮炎(例如特应性皮炎);与炎性肠病(诸如克罗恩病和溃疡性结肠炎)相关联的应答;皮炎;过敏性病症,诸如食物过敏、湿疹和哮喘;类风湿性关节炎;系统性红斑狼疮(SLE)(包括狼疮性肾炎、皮肤狼疮);糖尿病(例如1型糖尿病或胰岛素依赖型糖尿病);多发性硬化;神经变性疾病,例如肌萎缩性侧索硬化症(ALS);慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病(CIPD)和青少年糖尿病。

[0423] 如上所述,重组蛋白不限于用于免疫抑制治疗的背景,并且该蛋白质可在细胞中表达以治疗病症,诸如癌症或感染。在此类背景中,可能期望杀死或消融癌症或受感染细胞,并且在此类情况下,嵌合蛋白可以在细胞毒性细胞(诸如细胞毒性T细胞或NK细胞,或其前体)中表达。在此类情况下,与嵌合蛋白共表达的受体(例如CAR或TCR)可以针对癌症抗原或来自病原体的抗原等。

[0424] 本文的医疗用途或方法可以涉及以下步骤:

[0425] (i)分离含细胞样品或提供含细胞样品;

[0426] (ii)将如本文所定义的核酸分子、构建体或载体引入所述细胞;以及

[0427] (iii)将来自(ii)的细胞施用于受试者。

[0428] 细胞可以是如本文所定义的Treg。在方法的步骤(ii)之前和/或之后,可以从含细胞样品分离和/或生成富集的Treg群。例如,可以在步骤(ii)之前和/或之后进行分离和/或生成,以分离和/或生成富集的Treg样品。可以在步骤(ii)之后进行富集,以富集包含如本文所述的重组蛋白、核酸分子、构建体和/或载体的细胞和/或Treg。

[0429] 适当地,细胞可以是自体的。适当地,细胞可以是同种异体的。

[0430] 适当地,细胞(例如工程化Treg)可以与一种或多种其他治疗剂(诸如淋巴耗竭剂)组合施用。工程化细胞(例如Treg)可以与一种或多种其他治疗剂同时或相继(即之前或之后)施用。

[0431] 可以在引入如本文所述的核酸分子之前或之后激活和/或扩增细胞(例如Treg),例如通过用抗CD3单克隆抗体或抗CD3和抗CD28单克隆抗体两者进行处理。扩增方案在上文进行了讨论。

[0432] 在该方法的每个步骤之后,特别是在扩增之后,可以洗涤细胞(例如Treg)。

[0433] 工程化细胞(例如Treg细胞)的群可以通过本领域技术人员已知的任何方法进一步富集,例如通过FACS或磁珠分选。

[0434] 生产方法的步骤可以在封闭并且无菌的细胞培养系统中进行。

[0435] 本发明还可以提供用于增加细胞的稳定性和/或抑制功能的方法,该方法包括将如本文所提供的核酸分子、表达构建体或载体引入细胞的步骤。抑制功能的增加可如以上所讨论的进行测量,例如通过将激活的抗原特异性Tconv细胞与本发明的细胞共培养,以及例如测量由Tconv细胞产生的细胞因子的水平。与非工程化Treg相比,抑制功能的增加可以是至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的增加。

[0436] 细胞(例如如本文所定义的Treg)的稳定性增加是指与非工程化Treg相比,这些细胞的持久性或存活增加,或在一定时间段内保持Treg表型的细胞(例如保持Treg标志物诸如FOXP3和Helios的细胞)的比例增加。稳定性的增加可以是稳定性增加至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%,并且可以通过本领域已知的技术测量,例如将细

胞群内的Treg细胞标志物染色,并通过FACS分析。

[0437] 本文提供的另外的方面是一种用于治疗(特别是ACT或基因治疗)的组合产品,该组合产品包含(a)如本文所定义的细胞、细胞群、载体或药物组合物,以及(b)EPO。该治疗可以是如以上所定义的和本文进一步描述的任何治疗。

[0438] 组合产品的组分(a)和(b)可以用于单独、依次或同时使用。

[0439] 组合产品的组分(a)和(b)通常将作为单独的组合物提供,即它们将单独配制。因此,组合产品可以替代地被定义或称为试剂盒。

[0440] 本公开不受本文所公开的示例性方法和材料的限制,并且与本文所述的那些方法和材料类似或等同的任何方法和材料都可以用于本公开的实施方案的实践或测试。数值范围包括定义该范围的数字。除非另有说明,否则分别来说,任何核酸序列都是以5'至3'方向从左到右书写;氨基酸序列都是以氨基至羧基方向从左到右书写。

[0441] 在提供数值范围的情况下,应当理解,除非上下文另外明确指出,否则也具体公开了该范围的上限与下限之间的每个中间值,直至下限单位的十分之一。在所述范围中的任何所述值或中间值与在该所述范围中的任何其他所述值或中间值之间的每个较小范围都涵盖在本公开内。这些较小范围的上限和下限可以独立地包括在该范围内或排除在该范围外,并且其中任一限值包括在较小范围内、两个限值都不包括在较小范围内或两个限值都包括在较小范围内的每个范围也涵盖在本公开内,但受到所述范围内的任何具体排除限值的限制。在所述范围包括限值中的一者或限值两者的情况下,排除这些包括的限值中的任一者或两者的范围也包括在本公开中。

[0442] 必须注意,如本文和所附权利要求书中所用,除非上下文另外明确指出,否则单数形式"一个"、"一种"和"该"包括复数指示物。

[0443] 如本文所用,术语"包含(comprising、comprises)"和"由…构成"与"包括(including、includes)"或"含有(containing、contains)"同义,并且是包含性的或是开放式的,并且不排除附加的未列举的成员、要素或方法步骤。术语"包含"和"由…构成"还包括术语"由…组成"。

[0444] 提供本文讨论的出版物仅由于它们的公开先于本申请的申请日。本文中的任何内容都不应当被解释为承认此类出版物构成本文所附权利要求书的现有技术。本文提及的所有出版物均以引用方式并入本文。

[0445] 序列表

[0446] SEQ ID NO.1(野生型人EPOR)

[0447] MDHLGASLWPQVGSLCLLLAGAAWAPPPNLPDPKFESKAALLAARGPEELLCFTERLEDLVCFWEEAAS
AGVGPGNYSFSYQLEDEPWKLCRLHQAPTARGAVRFWCSLPTADTSSFVPLELRVTAASGAPRYHRVIHINEVVLLD
APVGLVARLADESGHVVLRWLPPPETPMTSHIRYEVDVSAGNGAGSVQRVEILEGRTECVLSNLRGRTRYTFAVRAR
MAEPSFGGFWSAWSEPVSLLTPSDLDPLILTLSLILVVILVLLTVLALLSHRRALKQKIWPGIPSPESEFEGLFTTH
KGNFQLWLYQNDGCLWWSPCTPFTEDPPASLEVLSERCWGTMQAVEPGTDDEGPLLEPVGSEHAQDTYLVLDKWLLP
RNPPSEDLPGPGGSVDIVAMDEGSEASSCSSALASKPSPEGASAASFEYTILDPSSQLLRPWTLCPELPPTPPHLKY
LYLVVSDSGISTDYSSGDSQGAQGGLSDGPYSNPYENSLIPAAEPLPPSYVACS

[0448] SEQ ID NO.2(无信号肽的R130C修饰的人EPOR胞外区)

[0449] APPPNLPDPKFESKAALLAARGPEELLCFTERLEDLVCFWEEAASAGVGPGNYSFSYQLEDEPWKLCRL

HQAPTARGAVRFWCSLPTADTSSFVPLELRVTAASGAPRYHRVIHINEVVLLDAPVGLVACLADESGHVVLRWLPPP
ETPMTSHIRYEVDVSAGNGAGSVQRVEILEGRTECVLSNLRGRTRYTFAVRARMAEPSFGGFWSAWSEPVSLLTPSD
LDP

[0450] SEQ ID NO.3(无信号肽的野生型人EPOR胞外区)

[0451] APPPNLPDPKFESKAALLAARGPEELLCFTERLEDLVCFWEEAASAGVGPGNYSFSYQLEDEPWKLCRL
HQAPTARGAVRFWCSLPTADTSSFVPLELRVTAASGAPRYHRVIHINEVVLLDAPVGLVARLADESGHVVLRWLPPP
ETPMTSHIRYEVDVSAGNGAGSVQRVEILEGRTECVLSNLRGRTRYTFAVRARMAEPSFGGFWSAWSEPVSLLTPSD
LDP

[0452] SEQ ID NO.4(有信号肽的R154C修饰的人EPOR胞外区)

[0453] MDHLGASLWPQVGSLCLLLAGAAWAPPPNLPDPKFESKAALLAARGPEELLCFTERLEDLVCFWEEAAS
AGVGPGNYSFSYQLEDEPWKLCRLHQAPTARGAVRFWCSLPTADTSSFVPLELRVTAASGAPRYHRVIHINEVVLLD
APVGLVACLADESGHVVLRWLPPPETPMTSHIRYEVDVSAGNGAGSVQRVEILEGRTECVLSNLRGRTRYTFAVRAR
MAEPSFGGFWSAWSEPVSLLTPSDLDP

[0454] SEQ ID NO.5(有信号肽的野生型人EPOR胞外区)

[0455] MDHLGASLWPQVGSLCLLLAGAAWAPPPNLPDPKFESKAALLAARGPEELLCFTERLEDLVCFWEEAAS
AGVGPGNYSFSYQLEDEPWKLCRLHQAPTARGAVRFWCSLPTADTSSFVPLELRVTAASGAPRYHRVIHINEVVLLD
APVGLVARLADESGHVVLRWLPPPETPMTSHIRYEVDVSAGNGAGSVQRVEILEGRTECVLSNLRGRTRYTFAVRAR
MAEPSFGGFWSAWSEPVSLLTPSDLDP

[0456] SEQ ID NO.6(野生型人EPOR信号肽)

[0457] MDHLGASLWPQVGSLCLLLAGAAW

[0458] SEQ ID NO.7(野生型人EPOR跨膜结构域)

[0459] LILTLSLILVVILVLLTVLALLS

[0460] SEQ ID NO.8(野生型人EPOR胞质结构域)

[0461] HRRALKQKIWPGIPSPESEFEGLFTTHKGNFQLWLYQNDGCLWWSPCTPFTEDPPASLEVLSERCWGTM
QAVEPGTDDEGPLLEPVGSEHAQDTYLVLDKWLLPRNPPSEDLPGPGGSVDIVAMDEGSEASSCSSALASKPSPEGA
SAASFEYTILDPSSQLLRPWTLCPELPPTPPHLKYLYLVVSDSGISTDYSSGDSQGAQGGLSDGPYSNPYENSLIPA
AEPLPPSYVACS

[0462] SEQ ID NO.9(野生型鼠EPOR)

[0463] MDKLRVPLWPRVGPLCLLLAGAAWAPSPSLPDPKFESKAALLASRGSEELLCFTQRLEDLVCFWEEAAS
SGMDFNYSFSYQLEGESRKSCSLHQAPTVRGSVRFWCSLPTADTSSFVPLELQVTEASGSPRYHRIIHINEVVLLDA
PAGLLARRAEEGSHVVLRWLPPPGAPMTTHIRYEVDVSAGNRAGGTQRVEVLEGRTECVLSNLRGGTRYTFAVRARM
AEPSFSGFWSAWSEPASLLTASDLDPLILTLSLILVLISLLLTVLALLSHRRTLQQKIWPGIPSPESEFEGLFTTHK
GNFQLWLLQRDGCLWWSPGSSFPEDPPAHLEVLSEPRWAVTQAGDPGADDEGPLLEPVGSEHAQDTYLVLDKWLLPR
TPCSENLSGPGGSVDPVTMDEASETSSCPSDLASKPRPEGTSPSSFEYTILDPSSQLLCPRALPPELPPTPPHLKYL
YLVVSDSGISTDYSSGGSQGVHGDSSDGPYSHPYENSLVPDSEPLHPGYVACS

[0464] SEQ ID NO.10(有信号肽的R129C修饰的鼠EPOR胞外区)

[0465] MDKLRVPLWPRVGPLCLLLAGAAWAPSPSLPDPKFESKAALLASRGSEELLCFTQRLEDLVCFWEEAAS
SGMDFNYSFSYQLEGESRKSCSLHQAPTVRGSVRFWCSLPTADTSSFVPLELQVTEASGSPRYHRIIHINEVVLLDA
PAGLLACRAEEGSHVVLRWLPPPGAPMTTHIRYEVDVSAGNRAGGTQRVEVLEGRTECVLSNLRGGTRYTFAVRARM

AEPSFSGFWSAWSEPASLLTASDLDP

[0466] SEQ ID NO.11(有信号肽的野生型鼠EPOR胞外区)

[0467] MDKLRVPLWPRVGPLCLLLAGAAWAPSPSLPDPKFESKAALLASRGSEELLCFTQRLEDLVCFWEEAAS SGMDFNYSFSYQLEGESRKSCSLHQAPTVRGSVRFWCSLPTADTSSFVPLELQVTEASGSPRYHRIIHINEVVLLDA PAGLLARRAEEGSHVVLRWLPPPGAPMTTHIRYEVDVSAGNRAGGTQRVEVLEGRTECVLSNLRGGTRYTFAVRARM AEPSFSGFWSAWSEPASLLTASDLDP

[0468] SEQ ID NO.12(野生型鼠EPOR跨膜区)

[0469] LILTLSLILVLISLLLTVLALLS

[0470] SEQ ID NO.13(野生型鼠EPOR胞质区)

[0471] HRRTLQQKIWPGIPSPESEFEGLFTTHKGNFQLWLLQRDGCLWWSPGSSFPEDPPAHLEVLSEPRWAVT QAGDPGADDEGPLLEPVGSEHAQDTYLVLDKWLLPRTPCSENLSGPGGSVDPVTMDEASETSSCPSDLASKPRPEGT SPSSFEYTILDPSSQLLCPRALPPELPPTPPHLKYLYLVVSDSGISTDYSSGGSQGVHGDSSDGPYSHPYENSLVPD SEPLHPGYVACS

[0472] SEQ ID NO.14(EPO)

[0473] MGVHECPAWL WLLLSLLSLP LGLPVLGAPP RLICDSRVLE RYLLEAKEAE

[0474] NITTGCAEHC SLNENITVPD TKVNFYAWKR MEVGQQAVEV WQGLALLSEA

[0475] VLRGQALLVN SSQPWEPLQL HVDKAVSGLR SLTTLLRALG AQKEAISPPD

[0476] AASAAPLRTI TADTFRKLFR VYSNFLRGKL KLYTGEACRT GDR

[0477] SEQ ID NO:15—天然FKBP12结构域

[0478] MGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSV GQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE

[0479] SEQ ID NO:16—mTOR的野生型FRB区段

[0480] MASRILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWC RKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRISKLES

[0481] SEQ ID NO:17—在第2098位T被取代为L的FRB

[0482] MASRILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWC RKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISKLES

[0483] SEQ ID NO:18—在第2098位T被取代为H,并且在残基第2101位处F被取代为W的mTOR的FRB区段

[0484] MASRILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWC RKYMKSGNVKDLHQAFDLYYHVFRRISKLES

[0485] SEQ ID NO:19是在残基第2095位处K被取代为P的mTOR的FRB区段

[0486] MASRILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWC RKYMKSGNVPDLTQAWDLYYHVFRRISKLES

[0487] SEQ ID NO.20—c-Jun亮氨酸拉链

[0488] RIARLEEKVKTLKAQNSELASTANMLREQVAQLKQKVMN

[0489] SEQ ID NO.21Fos亮氨酸拉链

[0490] LTDTLQAETDQLEDKKSALQTEIANLLKEKEKLEFILAAY

[0491] SEQ ID NO:22—BZip(RR)亮氨酸拉链结构域

[0492] MDPDLEIRAAFLRQRNTALRTEVAELEQEVQRLENEVSQYETRYGPLGGGK

[0493] SEQ ID NO:23—AZip(EE)亮氨酸拉链结构域

[0494] MDPDLEIEAAFLERENTALETRVAELRQRVQRLRNRVSQYRTRYGPLGGGK

[0495] SEQ ID NO:24—CD28跨膜结构域

[0496] FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV

[0497] SEQ ID NO:25—IL2RB跨膜结构域

[0498] IPWLGHLLVGLSGAFGFIILVYLLI

[0499] SEQ ID NO.26CD8aTM结构域

[0500] IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT

[0501] SEQ ID NO.27:TREM1TM结构域

[0502] IVILLAGGFLSKSLVFSVLFA

[0503] SEQ ID NO.28:TREM2TM结构域

[0504] ILLLLACIFLIKILAASALWA

[0505] SEQ ID NO.29:DAP10TM结构域

[0506] LLAGLVAANAVASLLIVGAVF

[0507] SEQ ID NO.30:DAP12TM结构域

[0508] GVLAGIVMGNLVLTVLIALAV

[0509] SEQ ID NO.31(IL-2受体β链的氨基酸编号266至551(NCBI REFSEQ:NP_000869.1))

[0510] NCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV

[0511] SEQ ID NO:32(野生型FOXP3的氨基酸序列(UniProtKB登录号Q9BZS1)

[0512] MPNPRPGKPSAPSLALGPSPGASPSWRAAPKASDLLGARGPGGTFQGRDLRGGAHASSSSLNPMPPSQLQLPTLPLVMVAPSGARLGPLPHLQALLQDRPHFMHQLSTVDAHARTPVLQVHPLESPAMISLTPPTTATGVFSLKARPGLPPGINVASLEWVSREPALLCTFPNPSAPRKDSTLSAVPQSSYPLLANGVCKWPGCEKVFEEPEDFLKHCQADHLLDEKGRAQCLLQREMVQSLEQQLVLEKEKLSAMQAHLAGKMALTKASSVASSDKGSCCIVAAGSQGPVVPAWSGPREAPDSLFAVRRHLWGSHGNSTFPEFLHNMDYFKFHNMRPPFTYATLIRWAILEAPEKQRTLNEIYHWFTRMFAFFRNHPATWKNAIRHNLSLHKCFVRVESEKGAVWTVDELEFRKKRSQRPSRCSNPTPGP

[0513] SEQ ID NO:33—IL9R(NP_002177.2的AA292至521)

[0514] KLSPRVKRIFYQNVPSPAMFFQPLYSVHNGNFQTWMGAHGAGVLLSQDCAGTPQGALEPCVQEATALLTCGPARPWKSVALEEEQEGPGTRLPGNLSSEDVLPAGCTEWRVQTLAYLPQEDWAPTSLTRPAPPDSEGSRSSSSSSSSNNNNYCALGCYGGWHLSALPGNTQSSGPIPALACGLSCDHQGLETQQGVAWVLAGHCQRPGLHEDLQGMLLPSVLSKARSWTF

[0515] SEQ ID NO:34—IL4RA(NP_000409.1的AA257至825)

[0516] KIKKEWWDQIPNPARSRLVAIIIQDAQGSQWEKRSRGQEPAKCPHWKNCLTKLLPCFLEHNMKRDEDPHKAAKEMPFQGSGKSAWCPVEISKTVLWPESISVVRCVELFEAPVECEEEEEVEEEKGSFCASPESSRDDFQEGREGIVARLTESLFLDLLGEENGGFCQQDMGESCLLPPSGSTSAHMPWDEFPSAGPKEAPPWGKEQPLHLEPSPPASPTQSP

DNLTCTETPLVIAGNPAYRSFSNSLSQSPCPRELGPDPLLARHLEEVEPEMPCVPQLSEPTTVPQPEPETWEQILRR
NVLQHGAAAAPVSAPTSGYQEFVHAVEQGGTQASAVVGLGPPGEAGYKAFSSLLASSAVSPEKCGFGASSGEEGYKP
FQDLIPGCPGDPAPVPVPLFTFGLDREPPRSPQSSHLPSSSPEHLGLEPGEKVEDMPKPPLPQEQATDPLVDSLGSG
IVYSALTCHLCGHLKQCHGQEDGGQTPVMASPCCGCCCGDRSSPPTTPLRAPDPSPGGVPLEASLCPASLAPSGISE
KSKSSSSFHPAPGNAQSSSQTPKIVNFVSVGPTYMRVS

[0517] SEQ ID NO:35—IL3RB(NP_000386.1的AA 461至897)

[0518] RFCGIYGYRLRRKWEEKIPNPSKSHLFQNGSAELWPPGSMSAFTSGSPPHQGPWGSRFPELEGVFPVGF
GDSEVSPLTIEDPKHVCDPPSGPDTTPAASDLPTEQPPSPQPGPPAASHTPEKQASSFDFNGPYLGPPHSRSLPDIL
GQPEPPQEGGSQKSPPPGSLEYLCLPAGGQVQLVPLAQAMGPGQAVEVERRPSQGAAGSPSLESGGGPAPPALGPRV
GGQDQKDSPVAIPMSSGDTEDPGVASGYVSSADLVFTPNSGASSVSLVPSLGLPSDQTPSLCPGLASGPPGAPGPVK
SGFEGYVELPPIEGRSPRSPRNNPVPPEAKSPVLNPGERPADVSPTSPQPEGLLVLQQVGDYCFLPGLGPGPLSLRS
KPSSPGPGPEIKNLDQAFQVKKPPGQAVPQVPVIQLFKALKQQDYLSLPPWEVNKPGEVC

[0519] SEQ ID NO:36—IL17RB(NP_061195.2的AA314至502)

[0520] RHERIKKTSFSTTTLLPPIKVLVVYPSEICFHHTICYFTEFLQNHCRSEVILEKWQKKKIAEMGPVQWL
ATQKKAADKVVFLLSNDVNSVCDGTCGKSEGSPSENSQDLFPLAFNLFCSDLRSQIHLHKYVVVYFREIDTKDDYNA
LSVCPKYHLMKDATAFCAELLHVKQQVSAGKRSQACHDGCCSL

[0521] SEQ ID NO:37WO2019/241549中描述的N末端和C末端截短的FOXP3片段的氨基酸序列

[0522] GGAHASSSSL NPMPPSQLQL PTLPLVMVAP SGARLGPLPH LQALLQDRPH
FMHQLSTVDA HARTPVLQVH PLESPAMISL TPPTTATGVF SLKARPGLPP
GINVASLEWV SREPALLCTF PNPSAPRKDS TLSAVPQSSY PLLANGVCKW
PGCEKVFEEP EDFLKHCQAD HLLDEKGRAQ CLLQREMVQS LEQQLVLEKE
KLSAMQAHLA GKMALTKASS VASSDKGSCC IVAAGSQGPV VPAWSGPREA
PDSLFAVRRH LWGSHGNSTF PEFLHNMDYF KFHNMRPPFT YATLIRWAIL
EAPEKQRTLN EIYHWFTRMF AFFRNHPATW KNAIRHNLSL HKCFVRVESE

[0523] KGAVWTVDEL EF

[0524] SEQ ID NO:38STAT5缔合基序

[0525] YXXF/L

[0526] SEQ ID NO:39STAT5缔合基序

[0527] YCTF

[0528] SEQ ID NO:40STAT5缔合基序

[0529] YFFF

[0530] SEQ ID NO:41STAT5缔合基序

[0531] YLSL

[0532] SEQ ID NO:42STAT5缔合基序

[0533] YLSLQ

[0534] SEQ ID NO:43JAK1结合基序

[0535] KVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDK

[0536] SEQ ID NO:44JAK1结合基序

[0537] NPWFQRAKMPRALDFSGHTHPVATFQPSRPESVNDLFLCPQKELT

[0538] SEQ ID NO:45JAK1结合基序

[0539] GYICLRNSLPKVLNFHNFLAWPFPNLPPLEAMDMVEVIYINR

[0540] SEQ ID NO:46JAK1结合基序

[0541] PLKEKSIILPKSLISVVRSATLETKPESKYVSLITSYQPFSL

[0542] SEQ ID NO:47JAK1结合基序

[0543] RRRKKLPSVLLFKKPSPFIFISQRPSPETQDTIHPLDEEAFLK

[0544] SEQ ID NO:48JAK1结合基序

[0545] YIHVGKEKHPANLILIYGNEFDKRFFVPAEKIVINFITLNISDDS

[0546] SEQ ID NO:49JAK1结合基序

[0547] RYVTKPPAPPNSLNVQRVLTFQPLRFIQEHVLIPVFDLSGP

[0548] SEQ ID NO:50JAK2结合基序

[0549] NYVFFPSLKPSSSIDEYFSEQPLKNLLLSTSEEQIEKCFIIEN

[0550] SEQ ID NO:51JAK2结合基序

[0551] YWFHTPPSIPLQIEEYLKDPTQPILEALDKDSSPKDDVWDSVSIISFPE

[0552] SEQ ID NO:52JAK2结合基序

[0553] YAFSPRNSLPQHLKEFLGHPHHNTLLFFSFPLSDENDVFDKLSVIAEDSES

[0554] SEQ ID NO:53(IL2RB截短的—Y510)

[0555] NCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV

[0556] SEQ ID NO:54(IL2RB截短的—Y510和Y392)

[0557] NCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV

[0558] SEQ ID NO:55JAK3基序

[0559] ERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEI

[0560] SEQ ID NO:56JAK3基序

[0561] ERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEIPPKGGALGEGPGASPCNQHSPYWAPPCYTLKPET

[0562] SEQ ID NO.57:STAT3信号

[0563] YXXQ

[0564] SEQ ID NO.58:STAT3信号

[0565] YRHQ

[0566] SEQ ID NO.59—STAT3缔合基序

[0567] YLRQ

[0568] SEQ ID NO.60—STAT1缔合基序

[0569] QLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYF

[0570] SEQ ID NO.61:SHP1

[0571] MVRWFHRDLSGLDAETLLKGRGVHGSFLARPSRKNQGDFSLSVRVGDQVTHIRIQNSGDFYDLYGGEKFATLTELVEYYTQQQGVLQDRDGTIIHLKYPLNCSDPTSERWYHGHMSGGQAETLLQAKGEPWTFLVRESLSQPGDFV

LSVLSDQPKAGPGSPLRVTHIKVMCEGGRYTVGGLETFDSLTDLVEHFKKTGIEEASGAFVYLRQPYYATRVNAADI
ENRVLELNKKQESEDTAKAGFWEEFESLQKQEVKNLHQRLEGQRPENKGKNRYKNILPFDHSRVILQGRDSNIPGSD
YINANYIKNQLLGPDENAKTYIASQGCLEATVNDFWQMAWQENSRVIVMTTREVEKGRNKCVPYWPEVGMQRAYGPY
SVTNCGEHDTTEYKLRTLQVSPLDNGDLIREIWHYQYLSWPDHGVPSEPGGVLSFLDQINQRQESLPHAGPIIVHCS
AGIGRTGTIIVIDMLMENISTKGLDCDIDIQKTIQMVRAQRSGMVQTEAQYKFIYVAIAQFIETTKKKLEVLQSQKG
QESEYGNITYPPAMKNAHAKASRTSSKHKEDVYENLHTKNKREEKVKKQRSADKEKSKGSLKRK

[0572] SEQ ID NO.62:截短的EPOR内域

[0573] HRRALKQKIWPGIPSPESEFEGLFTTHKGNFQLWLYQNDGCLWWSPCTPFTEDPPASLEVLSERCWGTM
QAVEPGTDDEGPLLEPVGSEHAQDTYLVLDKWLLPRNPPSEDLPGPGGSVDIVAMDEGSEASSCSSALASKPSPEGA
SAASFEYTILDPSSQLLRPWTLCPELPPTPPHLK

[0574] SEQ ID NO.63—JAK3反向定向

[0575] IESVLCLRESYDPQLSEALGKSVGSWASFNGHYETVLDELNKLTPIRPMTRE

[0576] SEQ ID NO.64CD3ζ

[0577] RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMA
EAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0578] SEQ ID NO 65 CD28胞内信号传导

[0579] RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS

[0580] SEQ ID NO 66 CD27胞内信号传导

[0581] QRRKYRSNKGESPVEPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP

[0582] SEQ ID NO.67接头序列

[0583] GGGS

[0584] SEQ ID No68-SEQ ID No98—接头

[0585] ETSGGGGSRL(SEQ ID NO.68)

[0586] SGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO.69)

[0587] $S(GGGGS)_{1-5}$(其中GGGGS是SEQ ID NO.70)

[0588] $(GGGGS)_{1-5}$(其中GGGGS是SEQ ID NO.70)

[0589] SGGGGSGGGGS(SEQ ID NO.71)

[0590] $S(GGGS)_{1-5}$(其中GGGS是SEQ ID NO.67)

[0591] $(GGGS)_{1-5}$(其中GGGS是SEQ ID NO.67)

[0592] SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO.72)

[0593] SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO.73)

[0594] $S(GGGGGS)_{1-5}$(其中GGGGGS是SEQ ID NO.74)

[0595] $(GGGGGS)_{1-5}$(其中GGGGGS是SEQ ID NO.74)

[0596] $S(GGGGGGS)_{1-5}$(其中GGGGGGS是SEQ ID NO.75)

[0597] $(GGGGGGS)_{1-5}$(其中GGGGGGS是SEQ ID NO.75)

[0598] G_6(SEQ ID NO.76)

[0599] G_8(SEQ ID NO.77)

[0600] KESGSVSSEQLAQFRSLD(SEQ ID NO.78)

[0601] EGKSSGSGSESKST(SEQ ID NO.79)

[0602] GSAGSAAGSGEF(SEQ ID NO.80)

[0603] SGGGGSAGSAAGSGEF(SEQ ID NO.81)

[0604] SGGGLLLLLLLLGGGS(SEQ ID NO.82)

[0605] SGGGAAAAAAAAGGGS(SEQ ID NO.83)

[0606] SGGGAAAAAAAAAAAAAAAAGGGS(SEQ ID NO.84)

[0607] SGALGGLALAGLLLAGLGLGAAGS(SEQ ID NO.85)

[0608] SLSLSPGGGGGPAR(SEQ ID NO.86)

[0609] SLSLSPGGGGGPARSLSLSPGGGGG(SEQ ID NO.87)

[0610] GSSGSS(SEQ ID NO.88)

[0611] GSSSSSS(SEQ ID NO.89)

[0612] GGSSSS(SEQ ID NO.90)

[0613] GSSSSS(SEQ ID NO.91)

[0614] SGGGGS(SEQ ID NO.92)

[0615] GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO.93)

[0616] GGGGG(SEQ ID NO.94)

[0617] GGGGSGGGGS(SEQ ID NO.95)

[0618] GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO.96)

[0619] GGGGGGG(SEQ ID NO.97)

[0620] GGGGGGGGG(SEQ ID NO.98)

[0621] SEQ ID NO. 99 RQR8:

[0622] ACPYSNPSLCSGGGGSELPTQGTFSNVSTNVSPAKPTTTACPYSNPSLCSGGGGSPAPRPPTPAPTIAS QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVV

[0623] SEQ ID NO.100P2A肽—切割结构域

[0624] ATNFSLLKQAGDVEENPGP

[0625] SEQ ID NO.101T2A肽—切割结构域:

[0626] EGRGSLLTCGDVEENPGP

[0627] SEQ ID NO.102E2A肽—切割结构域:

[0628] QCTNYALLKLAGDVESNPGP

[0629] SEQ ID NO.103F2A肽—切割结构域:

[0630] VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

[0631] SEQ ID NO:104弗林蛋白酶切割位点

[0632] RXXR

[0633] SEQ ID NO:105弗林蛋白酶切割位点

[0634] RRKR

[0635] SEQ ID NO.106—截短的EPOR内域(SEQ ID NO.1的氨基酸274-378)

[0636] HRRALKQKIWPGIPSPESEFEGLFTTHKGNFQLWLYQNDGCLWWSPCTPFTEDPPASLEVLSERCWGTM QAVEPGTDDEGPLLEPVGSEHAQDTYLVLDKWLLPR

[0637] SEQ ID NO.107—截短的EPOR内域(SEQ ID NO.1的氨基酸274-433)

[0638] HRRALKQKIWPGIPSPESEFEGLFTTHKGNFQLWLYQNDGCLWWSPCTPFTEDPPASLEVLSERCWGTM

QAVEPGTDDEGPLLEPVGSEHAQDTYLVLDKWLLPRNPPSEDLPGPGGSVDIVAMDEGSEASSCSSALASKPSPEGASAASFEYTILDPSS

[0639] SEQ ID NO.108—来源于EPOR的内域的C末端尾

[0640] MDTVP

[0641] SEQ ID NO.109—来源于EPOR的内域的C末端尾

[0642] SMDTVP

[0643] SEQ ID NO.110—来源于EPOR的内域的C末端尾

[0644] ASMDTVP

[0645] SEQ ID NO.111—来源于EPOR的内域的C末端尾

[0646] LASMDTVP

[0647] SEQ ID NO.112—来源于EPOR的内域的C末端尾

[0648] ALASMDTVP

[0649] SEQ ID NO.113—来源于EPOR的内域的C末端尾

[0650] PALASMDTVP

[0651] SEQ ID NO.114—具有10个氨基酸C末端尾的WT EPOR内域

[0652] HRRALKQKIWPGIPSPESEFEGLFTTHKGNFQLWLYQNDGCLWWSPCTPFTEDPPASLEVLSERCWGTMQAVEPGTDDEGPLLEPVGSEHAQDTYLVLDKWLLPRNPPSEDLPGPGGSVDIVAMDEGSEASSCSSALASKPSPEGASAASFEYTILDPSSQLLRPWTLCPELPPTPPHLKYLYLVVSDSGISTDYSSGDSQGAQGGLSDGPYSNPYENSLIPAAEPLPPSYVACSPALASMDTVP

[0653] SEQ ID NO.115—具有10个氨基酸C末端尾的截短的EPOR内域

[0654] HRRALKQKIWPGIPSPESEFEGLFTTHKGNFQLWLYQNDGCLWWSPCTPFTEDPPASLEVLSERCWGTMQAVEPGTDDEGPLLEPVGSEHAQDTYLVLDKWLLPRPALASMDTVPSEQ ID NO.116—具有10个氨基酸C末端尾的截短的EPOR内域

[0655] HRRALKQKIWPGIPSPESEFEGLFTTHKGNFQLWLYQNDGCLWWSPCTPFTEDPPASLEVLSERCWGTMQAVEPGTDDEGPLLEPVGSEHAQDTYLVLDKWLLPRNPPSEDLPGPGGSVDIVAMDEGSEASSCSSALASKPSPEGASAASFEYTILDPSSPALASMDTVP

[0656] 实施例

[0657] 实施例1

[0658] 材料和方法

[0659] 克隆:

[0660] 内部设计如图2所示的本发明的构建体。可以在pMP71骨架中进行克隆,并且D5a高效细菌可以用质粒转化并用选择剂氨苄青霉素生长。可以使用Miniprep Kit(Qiagen)提取DNA。可以通过PCR克隆将插入物转移到慢病毒骨架中。

[0661] PBMC的收集:

[0662] 白细胞锥可以由NHS血液与移植部供应。可以使用密度离心方案分离PBMC。简而言之,血液可以用1xPBS以1:1稀释,并在Ficoll-Paque(GE Healthcare)上分层。可以对样品进行离心,将白细胞层取出并在PBS中洗涤。

[0663] Treg和Tconv分离方案:

[0664] 血液锥可以用于获得Treg和Teff群。可以使用RosetteSep™人CD4+T细胞富集混合

物,经由阴性选择对血液锥进行CD4富集。随后,可以使用密度离心分离CD4+细胞。然后,可以使用CD25微珠II(Miltenyi)经由阳性选择分离CD4+CD25+T细胞。可以保留CD4+CD25-细胞级分作为常规T细胞(Tconv)群。在FACS分选之前,可以用流式细胞术抗体CD4 FITC(OKT4,Biolegend)、CD25 PE-Cy7(BC96,Biolegend)、CD127 BV421(A019D5,Biolegend)、CD45RA BV510(HI100,Biolegend)和LIVE/DEAD™可固定近IR死亡细胞染色剂(Thermofisher)对CD4+CD25+级分进行染色。如表明的,可以分选和使用CD4+CD25+CD127低(大部分Treg)或CD4+CD25+CD127低CD45RA+(CD45RA+Treg)。

[0665] T conv培养基:

[0666] 人Tconv可以在补充有10%热灭活胎牛血清、青霉素、链霉素、左旋谷氨酰胺(Gibco)的RPMI-1640(Gibco)中生长。

[0667] T reg培养基和扩增:

[0668] 人调节性T细胞可以在补充有IL-2的Texmacs培养基(Miltenyi)中培养,并用人T-激活剂CD3/CD28 Dynabeads™(Gibco)激活。可以每2天至3天用补充有IL-2的Treg培养基重新饲养细胞。可以进行第二轮Dynabeads™刺激,以促进Treg细胞的进一步扩增。

[0669] 转染和病毒颗粒产生

[0670] 可以将HEK293T细胞接种在DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)+10%胎牛血清(FBS)中并培养24小时。转染试剂可以置于室温并与感兴趣的DNA构建体/质粒、包装质粒(pD8.91)和病毒包膜(pVSV-G)混合。PEI可以添加到稀释的DNA中,将它们混合并添加到HEK293T中。转染后48小时可以收获上清液,过滤并浓缩病毒。

[0671] T细胞的转导

[0672] Tconv可以用抗CD3和抗CD28 Dynabeads(Gibco)激活并重悬于T细胞培养基中。非组织培养处理的24孔板可以通过用纤维连接蛋白(Retronectin)(Takahara-bio—Otsu,日本)包被来制备,细胞悬液可以与慢病毒上清液一起添加。细胞可以被孵育,并且可以隔日进行培养基更换。细胞可以在转导后7天用于实验。

[0673] 流式细胞术染色

[0674] 可以从培养物中取出T细胞,并在FACS缓冲液中洗涤,首先用在PBS中的LIVE/DEAD™可固定近IR死亡细胞染色剂(Thermofisher)染色,然后用在FACS染色缓冲液中的抗CD4 AF700(RPA-T4,BD)和抗CD3 PE-Cy7染色。对于FOXP3的胞内染色,可以将细胞固定并透化,并用抗Foxp3 PE(150D/E4,Thermofisher)抗体染色。可以在BD LSRII流式细胞仪上分析细胞。

[0675] 转导的细胞的流式细胞术表型分析

[0676] 可以从培养物中取出T细胞,并使用如上所述的LIVE/DEAD™可固定近IR死亡细胞染色剂对活细胞进行染色。细胞的表面染色可以使用抗CD4 AF700、抗CD25 PE-Cy7(BC96,Biolegend)、抗CD39 PerCPCy5.5(A1,Biolegend)、抗CD62L PE-CF594(DREG-56,BD)、抗TIM3 BV786(7D3,BD)、抗TIGIT BV605(A15153G,Biolegend)、抗CD45RO BUV395(UCHL1,BD)、抗CD279 BUV737(EH12.1,BD)和抗CD223 BV711(11C3C65,Biolegend)进行。细胞可以被透化,并用抗Foxp3 PE(150D/E4,Thermofisher)染色。

[0677] 数据分析

[0678] 可以使用流式细胞术分析软件FlowJo(Flowjo,LLC)对流式细胞术数据进行分析。

所有统计分析均可以使用Graphpad Prism v.5(Graphpad软件)进行。

[0679] 实施例1a:在Jurkat中的表达

[0680] 如上所述,可以将构建体克隆到编码嘌呤霉素抗性基因的慢病毒骨架中。病毒载体可以被产生并用于Jurkat T细胞系的转导。转导后两天,可用4μg/ml嘌呤霉素选择Jurkat细胞一周。可以对细胞进行计数,并且可以用抗EPOR抗体对0.5×10^6个细胞进行染色,以确定细胞中表达的重组蛋白的水平。可以通过如上所述的流式细胞术来评估表达。

[0681] 实施例2:构建体的STAT5信号传导

[0682] 将重组蛋白的不同构建体克隆到编码嘌呤霉素抗性基因的慢病毒骨架中。病毒载体被产生并用于NFAT、NfkB和STAT5 Jurkat报告细胞系的转导。这里,NFAT、NfkB或STAT5响应元件控制luc2报告基因的活性。转导后两天,用4μg/ml嘌呤霉素选择Jurkat细胞一周。使用ONE-Glo™荧光素酶测定系统(Promega)在不同的报告细胞系中评估荧光素酶。

[0683] 实施例3:表达嵌合蛋白的调节性T细胞的生成

[0684] 从健康供体纯化调节性T细胞,并将其FACS分选为CD4+CD25+CD127-细胞。在X-Vivo培养基(Lonza)中,在白介素-2(1000IU/ml)存在下,使用人T-激活剂CD3/CD28Dynabeads™(ThermoFisher Scientific)激活细胞。在激活48小时后,用编码重组蛋白构建体的慢病毒颗粒转导细胞。细胞进一步扩增,并在不同条件之间比较扩增率。在第14天,收获细胞并计数。用抗EPOR抗体对0.5×106个细胞进行染色。通过流式细胞术观察抗EPOR抗体的百分比来评估EPOR表达水平和转导效率。通过用抗CD4、抗CD25、抗CD127、抗CD8、抗GITR、抗CD39、抗CD45RA、抗CD45RO、抗ICOS进行表面染色,以及用抗FOXP3和抗HELIOS进行胞内染色,然后进行固定和透化(转录因子染色缓冲液套装,ThermoFisher Scientific),来评估Treg表型。

[0685] 实施例4:STAT5磷酸化分析以作为IL2R信号传导的指标

[0686] 将具有嵌合蛋白的转导的Treg在没有IL2的培养基中静置过夜。在仅用培养基或雷帕霉素培养10分钟和120分钟后,通过FACS分析评估Treg的STAT5磷酸化。

[0687] 实施例5:构建体783、784、785、786、787和788的分析

[0688] 材料和方法

[0689] 克隆:

[0690] 内部设计图3所示的构建体。在慢病毒载体骨架中进行克隆,用质粒转化NEB稳定高效细菌,并用选择剂卡那霉素生长。使用Miniprep Kit和Maxiprep Kits(Qiagen)提取DNA。通过PCR克隆将插入物转移到其他慢病毒或逆转录病毒骨架中。通过定点诱变或基于PCR的方法进行克隆。

[0691] 构建体:

[0692] 构建体pQTX 783(EPOR WT)包含野生型EPO受体,该受体可操作地连接到对HLA-A2具有特异性的CAR和FoxP3(由T2A和P2A自切割结构域分开)。

[0693] 构建体pQTX 784(EPOR mut)包含突变的EPO受体,该受体可操作地连接到对HLA-A2具有特异性的CAR和FoxP3(由T2A和P2A自切割结构域分开)。突变的EPOR在外域中具有突变(SEQ ID NO.1的第154位R突变为C)。突变的EPOR的跨膜结构域和内域分别是野生型EPOR跨膜结构域和内域。

[0694] 构建体pQTX 785(EPOR trunc V1)包含突变的EPO受体,该受体可操作地连接到对

HLA-A2具有特异性的CAR和FoxP3(由T2A和P2A自切割结构域分开)。突变的EPOR在外域中具有突变(SEQ ID NO.1的第154位R突变为C),并且内域在SEQ ID NO.1的第378位之后被截短。跨膜结构域是野生型EPOR跨膜结构域。

[0695] 构建体pQTX 786(EPOR trunc V2)包含突变的EPO受体,该受体可操作地连接到对HLA-A2具有特异性的CAR和FoxP3(由T2A和P2A自切割结构域分开)。突变的EPOR在外域中具有突变(SEQ ID NO.1的第154位R突变为C),并且内域在SEQ ID NO.1的第433位之后被截短。跨膜结构域是野生型EPOR跨膜结构域。

[0696] 构建体pQTX 787(EPOR trunc V3 FS)包含突变的EPO受体,该受体可操作地连接到对HLA-A2具有特异性的CAR和FoxP3(由T2A和P2A自切割结构域分开)。突变的EPOR在外域中具有突变(SEQ ID NO.1的第154位R突变为C),内域在SEQ ID NO.1的第433位之后被截短,并且在C末端处插入了附加的10个氨基酸尾(PALASMDTVP)。跨膜结构域是野生型EPOR跨膜结构域。

[0697] 构建体pQTX 788(WT EPOR trunc V3 FS)包含突变的EPO受体,该受体可操作地连接到对HLA-A2具有特异性的CAR和FoxP3(由T2A和P2A自切割结构域分开)。外域和跨膜结构域分别是野生型EPOR外域和跨膜结构域。内域在SEQ ID NO.1的第433位之后被截短,并且在C末端处插入了附加的10个氨基酸尾(PALASMDTVP)。

[0698] PBMC的收集:

[0699] Leukopak由BioIVT供应。使用阴性选择试剂盒(StemCell Technologies)分离PBMC。简而言之,用抗体复合物和磁珠标记并靶向去除不想要的级分,并且随后使用磁体分离。

[0700] Treg和Tconv(Teff)分离方案:

[0701] Leukopak用于获得Treg和Tconv群。分别使用人CD25阳性选择混合物和人CD4+T细胞富集混合物(Stemcell Technologies),对Leukopak来源的PBMC进行CD25阳性选择,然后经由阴性选择进行CD4富集。使用磁体分离感兴趣的细胞。保留CD4+CD25-细胞级分作为Tconv群。使用CD127高耗竭混合物(Stemcell Technologies)进一步分离CD4+CD25+CD127-/低细胞群和使用磁体分离的感兴趣的细胞。在FACS分选之前,用流式细胞术抗体抗CD4 VioBlue(M-T466,Miltenyi Biotec)、抗CD25 PE(3G10,Miltenyi Biotec)、抗CD127 APC(MB15-18C9,Miltenyi Biotec)、抗CD45RA FITC(T6D11,Mitenyi Biotec)和LD 7AAD(BioLegend)对细胞级分进行染色。如表明的,分选和使用CD4+CD25+CD127-/低(大部分Treg)或CD4+CD25+CD127-/低CD45RA+(CD45RA+Treg)。

[0702] Treg培养基和扩增:

[0703] 人调节性T细胞在补充有5%人AB血清(热灭活;Merck)、IL-2(Proleukin,Clinigen Healthcare)的X-VIVO 15培养基(Lonza)中培养,并用抗CD3/CD28珠粒激活。每2天至3天用补充有IL-2的Treg培养基重新饲养细胞。进行第二轮抗CD3/CD28珠粒刺激,以促进Treg细胞的进一步扩增。

[0704] 转染和病毒颗粒产生:

[0705] 将HEK293T细胞接种在DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)+10%胎牛血清(FBS)中并培养24小时。将转染试剂置于室温并与感兴趣的DNA构建体/质粒、包装质粒(pMDLg pRRE)、调节质粒(PRSV-REV)和病毒包膜(pMD2.G)混合。将FuGENE HD转染试剂

(Promega)添加到稀释的DNA中,将它们混合并添加到HEK293T中。转染后48小时收获上清液,过滤并浓缩病毒。

[0706] T细胞的转导:

[0707] 用抗CD3/CD28珠粒激活Treg,并将其重悬于T细胞培养基(X-Vivo 15培养基(Lonza)、5%人AB血清和IL2)中。非组织培养处理的24孔板通过用纤维连接蛋白(Retronectin)(Takahara-bio—Otsu,日本)包被来制备,细胞悬液与慢病毒上清液一起添加。离心接种细胞培养物,并隔日进行培养基更换。细胞在转导后7天或更长时间用于实验。

[0708] 转导效率:

[0709] Treg首先用HLA-A2 Dextramer-APC(Immudex)在室温表面染色15分钟。然后在室温将洗涤过的细胞用在PBS中的LIVE/DEAD™可固定近IR死亡细胞染色剂(Thermofisher)染色20分钟。然后在4℃将洗涤过的细胞用在FACS染色缓冲液中的抗CD4 BV510(A161A1;BioLegend)、抗CD25 PE-Cy7(BC96;BioLegend)和抗EPOR PE(38409;Bio-Techne)染色20分钟。在Attune™NxT流式细胞仪上采集之前洗涤细胞。使用FlowJo软件分析细胞表面表达。使用以下门控策略:淋巴细胞>单细胞>活细胞>CD4+CD25+>HLA-A2 Dex+EPOR+。

[0710] pSTAT5测定:

[0711] Treg分离后十四天,通过在测定建立之前耗尽抗CD3/CD28珠粒并去除IL2来将转导的Treg静置24-48小时。在开始染色前,在37℃用或不用1IU/ml EPO(英国Stemcell Technologies)处理Treg 30分钟。Treg首先用HLA-A2 Dextramer-APC(Immudex)在室温表面染色15分钟。然后在室温将洗涤过的细胞用在PBS中的LIVE/DEAD™可固定近IR死亡细胞染色剂(Thermofisher)染色20分钟。然后在4℃将洗涤过的细胞用在FACS染色缓冲液中的抗CD4 BV510(A161A1;Biolegend)和抗CD25 PE-Cy7(BC96;Biolegend)染色20分钟。然后在用pSTAT5 PE-CF594(47/Stat5 pY694;BD Bioscience)进行胞内染色之前,使用PerFix暴露试剂盒(PerFix Expose kit)(Beckman Coulter)固定并透化细胞。在Attune™NxT流式细胞仪上采集之前,将细胞洗涤两次。使用FlowJo软件分析pSTAT5表达。使用以下门控策略:淋巴细胞>单细胞>活细胞>CD4+CD25+>HLA-A2 Dex+>pSTAT5+。不同的是,对于模拟的Treg,使用以下门控策略:淋巴细胞>单细胞>活细胞>CD4+CD25+>pSTAT5+。

[0712] 测量转导的细胞的富集和FOXP3表达:

[0713] Treg分离后十四天,通过在测定建立之前耗尽抗CD3/CD28珠粒并去除IL2来将转导的Treg静置24小时。建立由培养基、CD3/CD28珠粒、0IU/ml和300IU/ml IL2组成的各种条件,用于进行第0天、第4天和第6天的读出。Treg首先用HLA-A2 Dextramer-APC(Immudex)表面染色,然后用在PBS中的LIVE/DEAD™可固定近IR死亡细胞染色剂(Thermofisher)染色。然后在4℃将洗涤过的细胞用在FACS染色缓冲液中的抗CD4BV510(A161A1;BioLegend)和抗CD25 PE-Cy7(BC96;BioLegend)染色30分钟。然后使用FOXP3/转录因子染色缓冲液套装(英国Thermo Fisher Scientific)根据制造商的说明书来对洗涤过的细胞进行透化。用抗FoxP3 BV421(206D;BioLegend)抗体对透化的细胞进行染色。在Attune™NxT流式细胞仪上采集之前,将细胞洗涤两次。使用FlowJo软件分析FoxP3表达。使用以下门控策略:淋巴细胞>单细胞>活细胞>CD4+CD25+>HLA-A2 Dex+>FoxP3+。不同的是,对于模拟的Treg,使用以下门控策略:淋巴细胞>单细胞>活细胞>CD4+CD25+>FoxP3+。

[0714] 测量细胞活力/扩增倍数:

[0715] Treg分离后十四天,通过在测定建立之前耗尽抗CD3/CD28珠粒并去除IL2来将转导的Treg静置24小时。在不存在IL2的情况下,建立由培养基、A1+K562(其为A2-)或A2+K562细胞组成的各种条件,用于进行第0天、第5天和第7天的读出。使用1:4的K562:Treg的比例。用抗EPOR PE(38409;Bio-Techne)、抗CD34 FITC(QBEND10;Life Technologies)、抗CD4 BV510(A161A1;BioLegend)和抗CD25 PE-Cy7(BC96;BioLegend)对Treg进行表面染色。然后使用具有7-AAD的膜联蛋白V细胞凋亡检测试剂盒(Biolegend),用在膜联蛋白V结合缓冲液中的膜联蛋白V BV421和7-AAD对洗涤过的细胞进行染色。在所有孔中采集等体积的细胞悬液,以允许对每个孔中活的转导的细胞进行公平定量。在Attune™NxT流式细胞仪上采集细胞。使用FlowJo软件分析细胞活力。使用以下门控策略:淋巴细胞>单细胞>膜联蛋白V-7-AAD-(活细胞)>CD4+CD25+>CD34/QBEND+或EPOR+。

[0716] 深度表型分析:

[0717] Treg分离后十四天,通过在染色之前耗尽抗CD3/CD28珠粒并去除IL2来将转导的Treg静置24小时。Treg首先用HLA-A2 Dextramer APC(Immudex)在室温表面染色15分钟。然后在室温将洗涤过的细胞用在PBS中的LIVE/DEAD™可固定eFluor455死亡细胞染色剂(Thermofisher)染色20分钟。然后在37℃将洗涤过的细胞用在Brilliant Stain Buffer Plus中的抗CCR4 BV480(1G1;BD Biosciences)、抗CCR7 BUV395(2-L1-A;BD Biosciences)、抗CD183/CXCR3 PE-Cy7(G025H7;Biolegend)染色20分钟。然后在4℃将洗涤过的细胞用在Brilliant Stain Buffer Plus中的抗HLA-DR APC-Fire810(G46-6;BD Bioscience)、抗PD-1BV650(EH12.2H7;Biolegend)、抗ICOS BV750(DX29;BD Biosciences)、抗CD8a BUV805(SK1;BD Biosciences)、抗TIM-3/CD366 BV711(7D3;BD Biosciences)、抗CD27 PE-AF700(0323;Biolegend)、抗CCR6 BV605(G034E3;Biolegend)、抗CD95 PE-Cy5(DX2;BD Biosciences)、抗TIGIT APC-Cy7(VSTM3;Biolegend)、抗CD70 BV786(Ki-24;BD Biosciences)、抗CD4 VioBlue(M-T466;Miltenyi Biotec)、抗CD34 PE(QBEND10;Life Technologies)和抗CD25 BUV563(2A3;BD Biosciences)染色30分钟。对于细胞的胞内染色,使用FOXP3/转录因子染色缓冲液套装(英国Thermo Fisher Scientific)根据制造商的说明书固定并透化细胞。将透化的细胞用在透化缓冲液中的抗Helios PE-Dazzle594(22F6;Biolegend)、抗CTLA-4BB700(BNI3;BD Biosciences)和抗FOXP3 AF647(206D;BD Biosciences)染色。在流式细胞仪上采集之前,将细胞洗涤两次。使用FlowJo软件分析标志物表达。

[0718] 抑制测定:

[0719] Treg分离后十四天,通过在测定建立之前耗尽抗CD3/CD28珠粒并去除IL2来将转导的Treg静置24小时。根据制造商的方案,使用CellTrace™Violet(CTV)细胞增殖试剂盒(ThermoFisher)对Treg进行染色,并使用CellTrace™Yellow(CTY)细胞增殖试剂盒(ThermoFisher)对T效应细胞进行染色。CTV染色的Treg与CTY染色的T效应细胞以指定的不同比例培养。将120Gy辐射的HLA-A2+B细胞或HLA-A2-B细胞以1:3.3的B细胞:T效应细胞比例进行共培养。替代地,以1:1的珠粒:T效应细胞比例添加人T-激活剂CD3/CD28 Dynabeads™(Gibco)。染色前,将细胞培养物在37℃、5% CO_2下孵育4天。在PBS中洗涤细胞,然后在室温将细胞用在PBS中的可固定近IF死亡细胞染色剂(Thermofisher)染色20分钟。然后在4℃将洗涤过的细胞用抗EPOR PE(38409;Bio-Techne)、抗CD34 FITC(QBEND10;Life

Technologies)和HLA-A3(REA950;Miltenyi Biotec)染色20分钟。在Attune™NxT流式细胞仪上采集之前洗涤细胞。使用FlowJo软件分析数据。以下门控策略:淋巴细胞>单细胞>活细胞>HLA-A3->CTY+。

[0720] 细胞毒性测定:

[0721] 根据制造商的方案,用CellTrace™Violet(CTV)细胞增殖试剂盒(ThermoFisher)标记HLA-A2+或HLA-A2-K562的靶细胞。将指定Treg的效应细胞或自然杀伤细胞(NK)与靶细胞以各种指定比例共培养。将抗CD107a PE(H4A3;BD Biosciences)添加到培养物中,并在37℃、5% CO_2下孵育总共4小时。孵育1小时后,向培养物中添加GolgiSTOP工作溶液(BD Biosciences)。在Attune™NxT流式细胞仪上采集洗涤过的细胞。使用FlowJo软件分析数据。

[0722] 胞内细胞因子染色:

[0723] 在37℃将Treg或T细胞用含有BD GolgiPlug™的白细胞激活混合物激活5小时。然后在室温将细胞用在PBS中的LIVE/DEAD™水溶液染色20分钟。然后在4℃将洗涤过的细胞用抗CD4 PerCPCy5.5(SK3;Biolegend)、抗EPOR PE(38409;Bio-Techne)和抗CD34FITC(QBEND10;Life Technologies)染色30分钟。然后使用FOXP3/转录因子染色缓冲液套装(英国Thermo Fisher Scientific)根据制造商的说明书来对洗涤过的细胞进行固定和透化。然后将透化的细胞用抗IL-17ABV605(BL168:Biolgend)、抗TNFαAPC-Cy7(Mab11;Biolegend)和抗IFN-γPE-Cy7(4S.B3;Biolgend)和抗IL2 PE-PE/Dazzle 594(MQ1-17H12;Biolegend)染色。在流式细胞仪上采集之前洗涤细胞。

[0724] 数据分析:

[0725] 可以使用流式细胞术分析软件FlowJo(FlowJo,LLC)对流式细胞术数据进行分析。所有统计分析均可以使用Graphpad Prism v.9.4.1(Graphpad Prism软件)进行。

[0726] 结果

[0727] 图4A—构建体在转导的人Treg中表达良好

[0728] 还显示了示出用658(无技术)、783、784、785、786和模拟物的各种构建体转导的新鲜Treg的转导效率的FACS图。使用HLA-A2 dextramer和EPOR表达测量转导效率。

[0729] 对于各构建体获得了类似的转导效率。这也在下表中示出。

[0730]

构建体	转导效率(%)
658	50.6
783	40.5
784	40.3
785	50.7
786	53.3

[0731] 图4B—构建体在转导的人Treg中表达良好

[0732] 还显示了示出用783、784、785、786、787、788和模拟物的各种构建体转导的冷冻Treg的转导效率的FACS图。使用HLA-A2 dextramer和EPOR表达测量转导效率。对于各构建体获得了类似的转导效率。这也在下表中示出。

[0733]

构建体	转导效率(%)
783	29.5
784	39.9

785	52.3
786	58.5
787	39.4
788	37.2

[0734] 图5—用EPOR来源的蛋白质转导的Treg特异性上调pSTAT5水平

[0735] 转导的Treg在染色以确定pSTAT5表达水平前用或不用EPO处理。细胞在定义为HLA-A2 CAR+的转导的级分上预门控,而未转导的级分是HLA-A2 CAR-。与未转导的细胞级分相比,表达构建体783、784、785和786中的一者的转导的细胞级分具有更高MFI水平的pSTAT5,表明EPOR来源的蛋白质促进JAK-STAT信号传导。表达构建体783、784、785和786中的一者的转导的细胞级分也特异性地响应外源性EPO,如通过更高MFI水平的pSTAT5所检测的,而未转导的级分未响应外源性EPO,并且该未转导的级分保持在类似的基础MFI水平的pSTAT5。用不含EPOR来源的蛋白质的构建体658转导的细胞在转导的级分和未转导的级分中具有类似MFI水平的pSTAT5。注意到,所用的培养基(X-vivo加5%人血清)可能含有EPO,因为在血清中发现了EPO。这解释了用构建体783(WT EPOR)转导的细胞中pSTAT5增加,并且当添加更多EPO时进一步增加。然而,当不使用附加EPO时,784、785和786的转导的级分具有比783更高的pSTAT5。

[0736] 图6A—用EPOR来源的蛋白质转导的Treg随着时间富集,并且与对照Treg相比具有更好的存活优势

[0737] 转导的Treg与或不与IL2一起培养。用784、785和786的组成型EPOR技术转导的细胞示出随着时间富集的群百分比。相反,658(无EPOR来源的蛋白质)和783(WT EPOR)构建体不随着时间优先富集。当IL2不存在时,用组成型EPOR(784、785和786)转导的细胞显示出优于783(WT EPOR)和658(无技术)的存活优势。786(EPORtrunc V2)似乎具有最高的优势,因为与未转导的细胞相比,这些转导的细胞的百分比随着时间增加。当IL2存在时,未转导的细胞级分可以由于通过天然IL2R的信号传导而扩增,并且因此用组成型EPOR技术转导的细胞群不富集。

[0738] 图6B—用EPOR来源的蛋白质转导的Treg随着时间维持FoxP3表达

[0739] 转导的Treg与或不与IL2一起培养。与658相比,在783、784、785和786的转导的级分中,表达FoxP3的细胞的百分比类似。在未转导的细胞级分中,FoxP3表达的百分比略低于转导的细胞级分。用EPOR来源的蛋白质转导的细胞表达FoxP3并随着时间维持其表达水平,表明Treg维持其表型。

[0740] 图6C—786转导的Treg识别同源A2抗原,并以类似于658对照Treg的方式响应

[0741] 存活测定示出658和786转导的Treg与A2+K562或A2-K562(A1+K562)细胞共培养。数据显示,658和786转导的Treg都通过细胞扩增倍数变化识别并特异性地响应A2抗原。因此,用组成型EPOR技术(786)转导不会对细胞功能产生负面影响。

[0742] 图7—用EPOR来源的蛋白质转导的Treg维持关键Treg标志物表达

[0743] 针对各种Treg相关标志物对转导的Treg进行深度表型分析。该图示出了细胞的模拟的Treg、转导的级分(HLA-A2 Dex+)或未转导的级分(HLA-A2 DEX-)中所示标志物的表达百分比。与模拟的转导的Treg相比,EPOR转导的Treg(转导的级分和未转导的级分)维持了较高并类似的关键Treg标志物表达水平,该标志物为诸如CD25、CD27、CD95、CTLA-4、CXCR3

和FoxP3。结果表明,用EPOR来源的蛋白质转导对Treg的表型没有显著影响。

[0744] 图8—用EPOR来源的蛋白质转导的Treg维持抑制能力

[0745] 功能性测试转导的Treg的抑制能力。该图示出了转导的Treg(或模拟的Treg)对在aCD3/28珠粒、HLA-A2-B细胞和HLA-A2+B细胞的各种刺激物下T效应细胞增殖的抑制百分比。结果表明,采用EPOR技术的Treg具有与模拟的Treg类似的抑制能力。

[0746] 图9—用EPOR来源的蛋白质转导的Treg不杀伤靶细胞

[0747] 测试转导的Treg对靶细胞的细胞毒性。将HLA-A2-或HLA-A2+K562细胞与转导的Treg以各种比例共培养。作为阳性对照,使用HLA-A2+自然杀伤(NK)细胞。结果表明,模拟的和EPOR转导的Treg不杀伤靶细胞或非靶细胞,并且因此维持了调节表型。

[0748] 图10—用EPOR来源的蛋白质转导的Treg具有与对照Treg类似的胞内细胞因子分布型

[0749] 测试658和786转导的Treg的胞内细胞因子存在。在检测胞内细胞因子之前,用PMA/离子霉素刺激细胞。T效应细胞用作阳性对照。786转导的Treg(转导的和未转导的级分)具有与658转导的Treg类似的和低水平的胞内细胞因子IL2、TNFαIL-17和IFNγ。这表明786构建体不引起细胞中的炎性应答,并且细胞维持其调节表型。

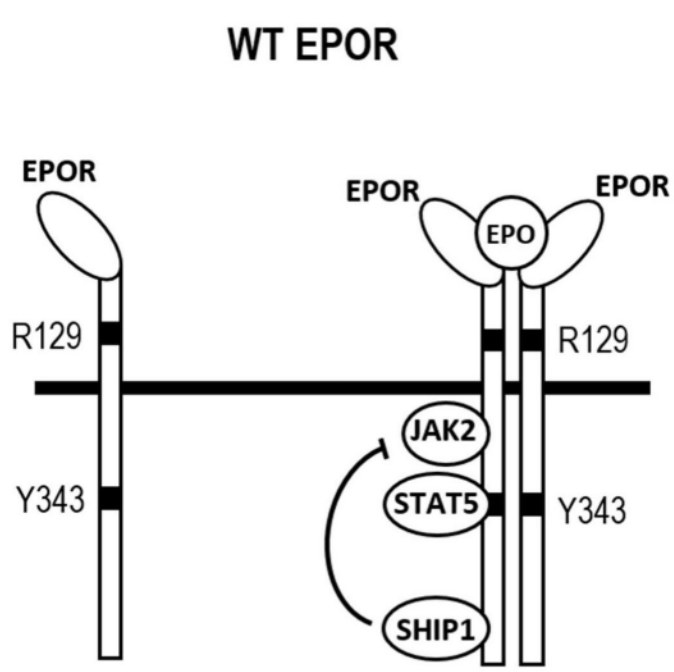

WT EPOR
EPOR
EPOR
EPOR
EPO
R129
R129
JAK2
Y343
STAT5
Y343
SHIP1

图1

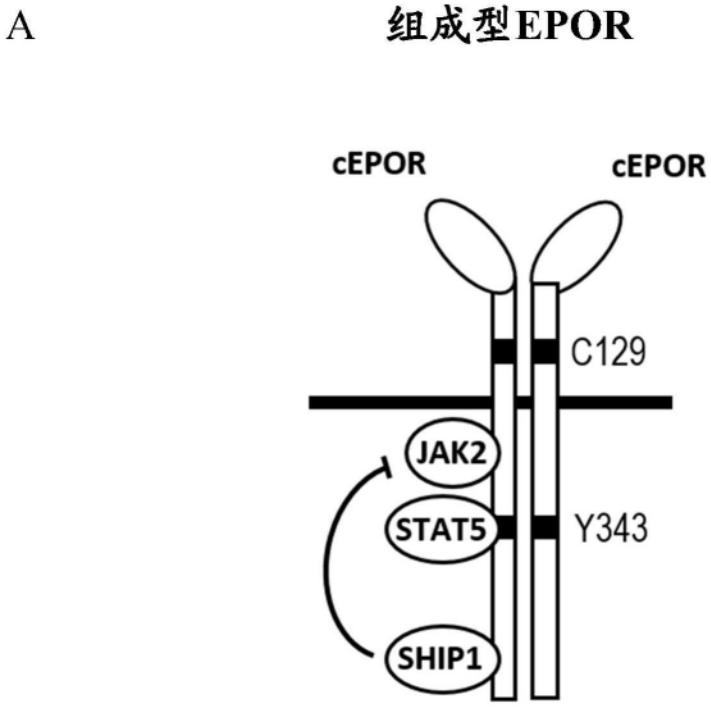
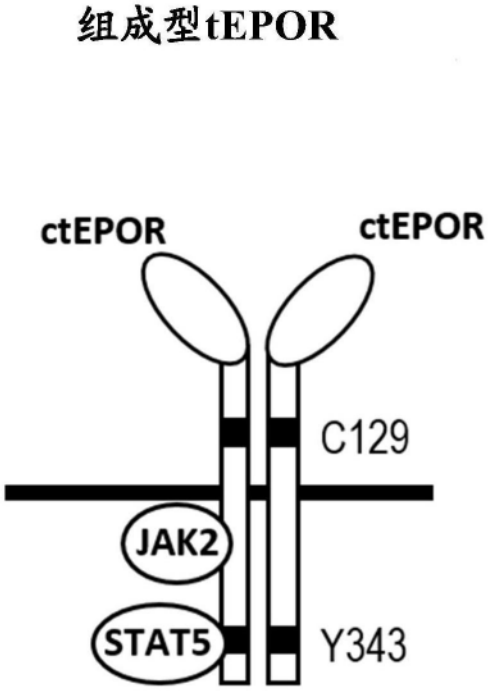

A
组成型EPOR
cEPOR
cEPOR
C129
JAK2
STAT5
Y343
SHIP1

图2

B


组成型tEPOR
ctEPOR
ctEPOR
C129
JAK2
STAT5
Y343

C

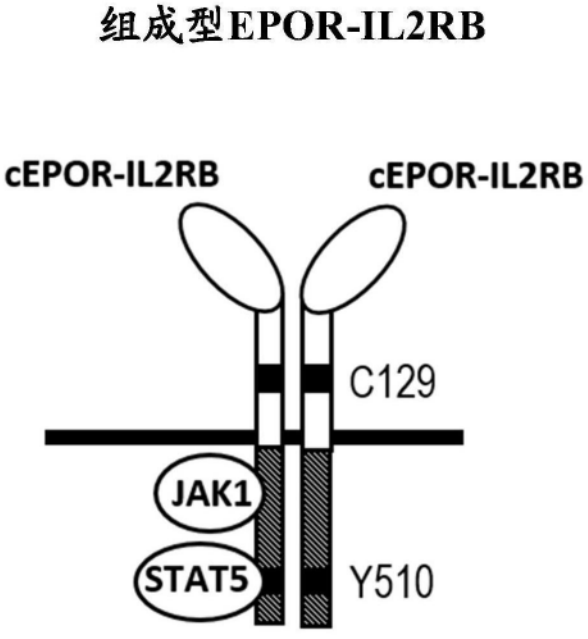

组成型EPOR-IL2RB
cEPOR-IL2RB
cEPOR-IL2RB
C129
JAK1
STAT5
Y510

图2续

氨基酸的编号/位置包括信号肽编号
pQTX 783 (EPOR WT)
EPOR信号肽（1-24aa）
EPOR胞外结构域（25-250aa）
EPOR TM (251-273aa)
EPOR胞质结构域（274-508aa）
T2A
A2 CAR
P2A
FoxP3
pQTX 784（EPOR mut）
EPOR信号肽（1-24aa）
EPOR胞外结构域（25-153aa）
EPOR胞外结构域R到C突变（154aa）
EPOR胞外结构域（155-250aa）
EPOR TM (251-273aa)
EPOR胞质结构域（274-508aa）
T2A
A2 CAR
P2A
FoxP3
pQTX 785（EPOR trunc V1）
EPOR信号肽（1-24aa）
EPOR胞外结构域（25-153aa）
EPOR胞外结构域R到C突变（154aa）
EPOR胞外结构域（155-250aa）
EPOR TM (251-273aa)
EPOR胞质结构域（274-378aa）
T2A
A2 CAR
P2A
FoxP3

图3

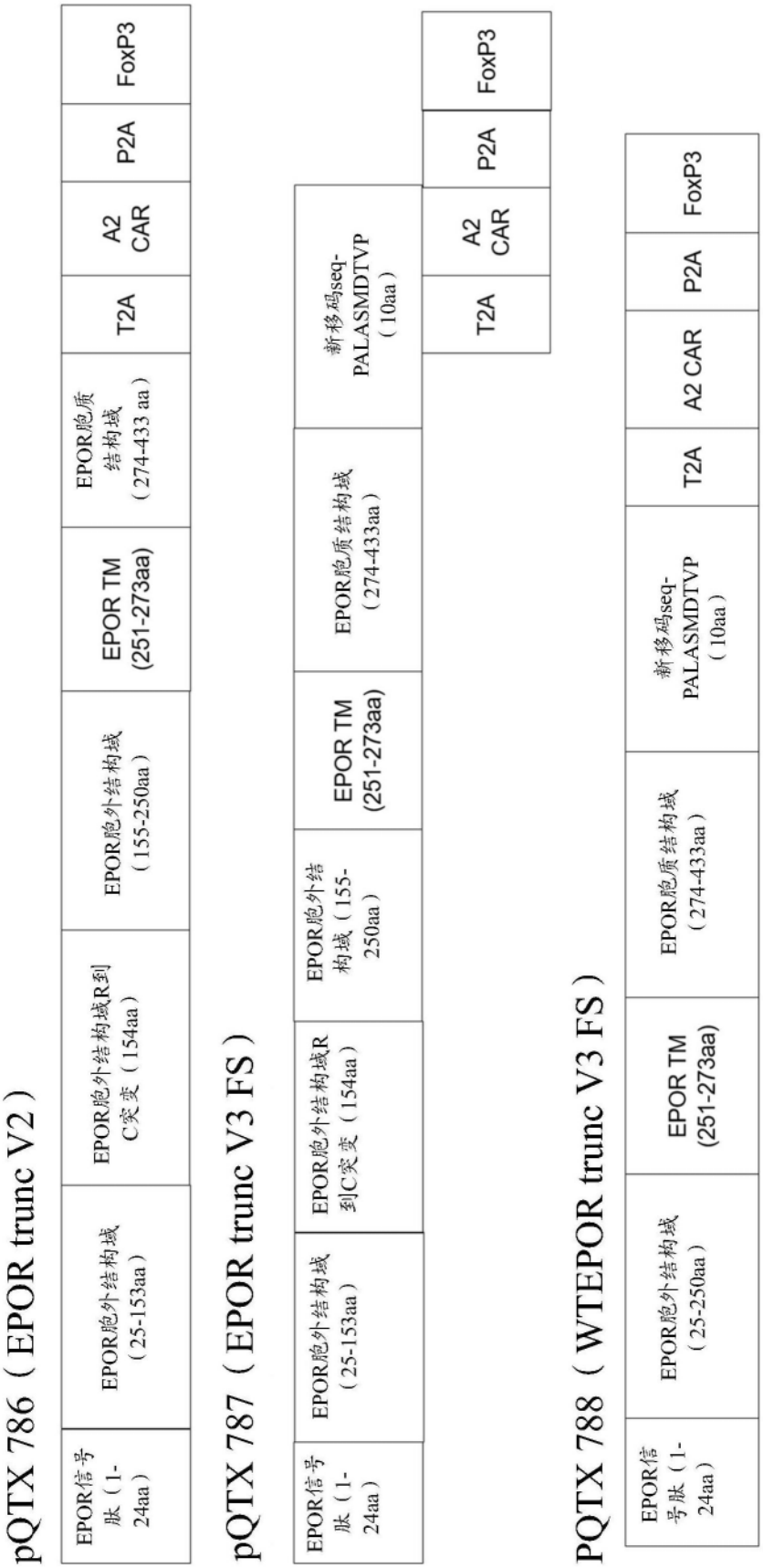

pQTX 786（EPOR trunc V2）
EPOR信号肽（1-24aa）
EPOR胞外结构域（25-153aa）
EPOR胞外结构域R到C突变（154aa）
EPOR胞外结构域（155-250aa）
EPOR TM (251-273aa)
EPOR胞质结构域（274-433 aa）
T2A
A2 CAR
P2A
FoxP3
pQTX 787（EPOR trunc V3 FS）
EPOR信号肽（1-24aa）
EPOR胞外结构域（25-153aa）
EPOR胞外结构域R到C突变（154aa）
EPOR胞外结构域（155-250aa）
EPOR TM (251-273aa)
EPOR胞质结构域（274-433aa）
新移码seq-PALASMDTVP（10aa）
T2A
A2 CAR
P2A
FoxP3
PQTX 788（WTEPOR trunc V3 FS）
EPOR信号肽（1-24aa）
EPOR胞外结构域（25-250aa）
EPOR TM (251-273aa)
EPOR胞质结构域（274-433aa）
新移码seq-PALASMDTVP（10aa）
T2A
A2 CAR
P2A
FoxP3

图3续

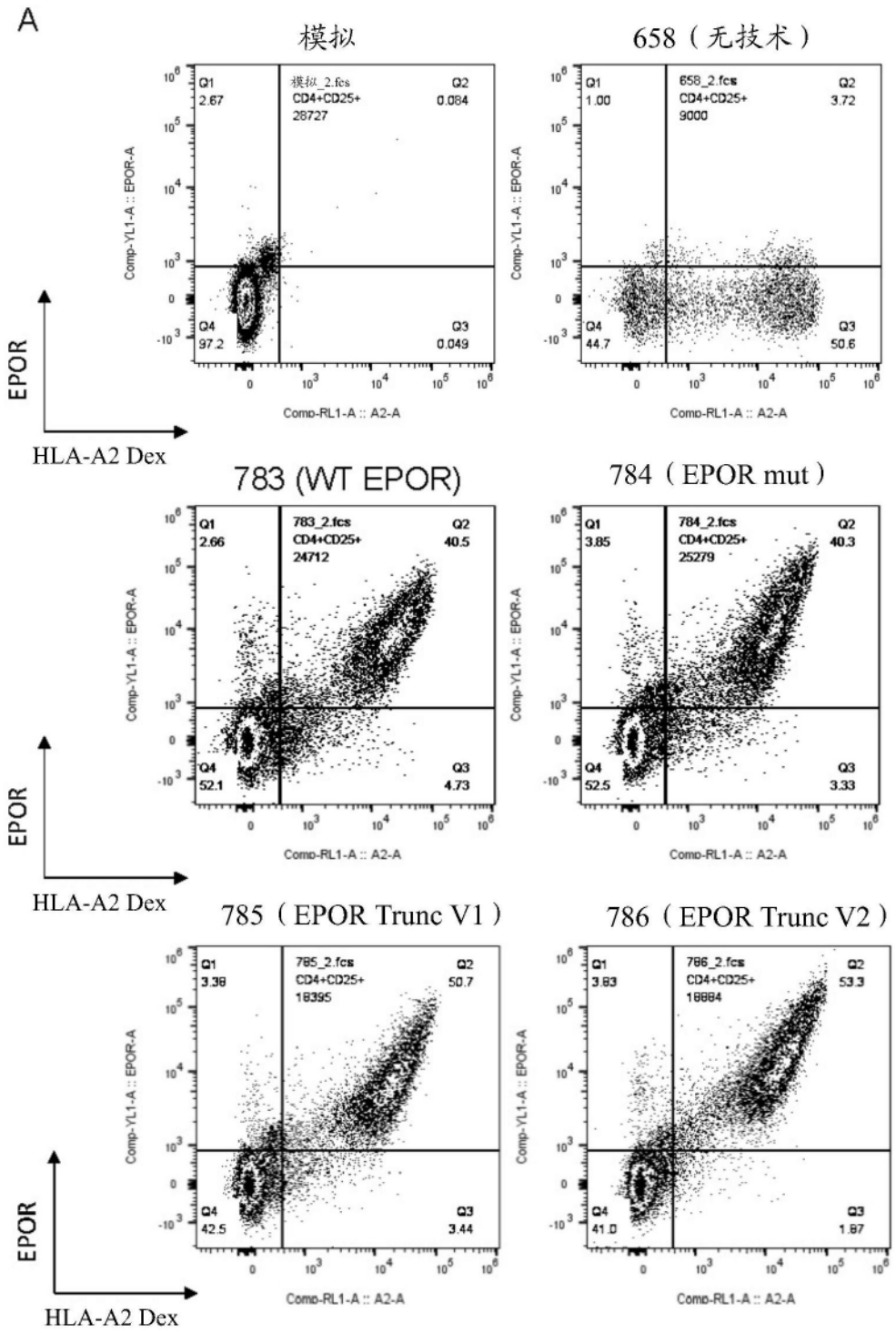

A
模拟
658（无技术）
783 (WT EPOR)
784（EPOR mut）
785（EPOR Trunc V1）
786（EPOR Trunc V2）
EPOR
HLA-A2 Dex
Comp-YL1-A :: EPOR-A
Comp-RL1-A :: A2-A
模拟_2.fcs
CD4+CD25+
28727
Q1 2.67
Q2 0.084
Q4 97.2
Q3 0.049
658_2.fcs
CD4+CD25+
9000
Q1 1.00
Q2 3.72
Q4 44.7
Q3 50.6
783_2.fcs
CD4+CD25+
24712
Q1 2.66
Q2 40.5
Q4 52.1
Q3 4.73
784_2.fcs
CD4+CD25+
25279
Q1 3.85
Q2 40.3
Q4 52.5
Q3 3.33
785_2.fcs
CD4+CD25+
18395
Q1 3.38
Q2 50.7
Q4 42.5
Q3 3.44
786_2.fcs
CD4+CD25+
18884
Q1 3.83
Q2 53.3
Q4 41.0
Q3 1.87

图4

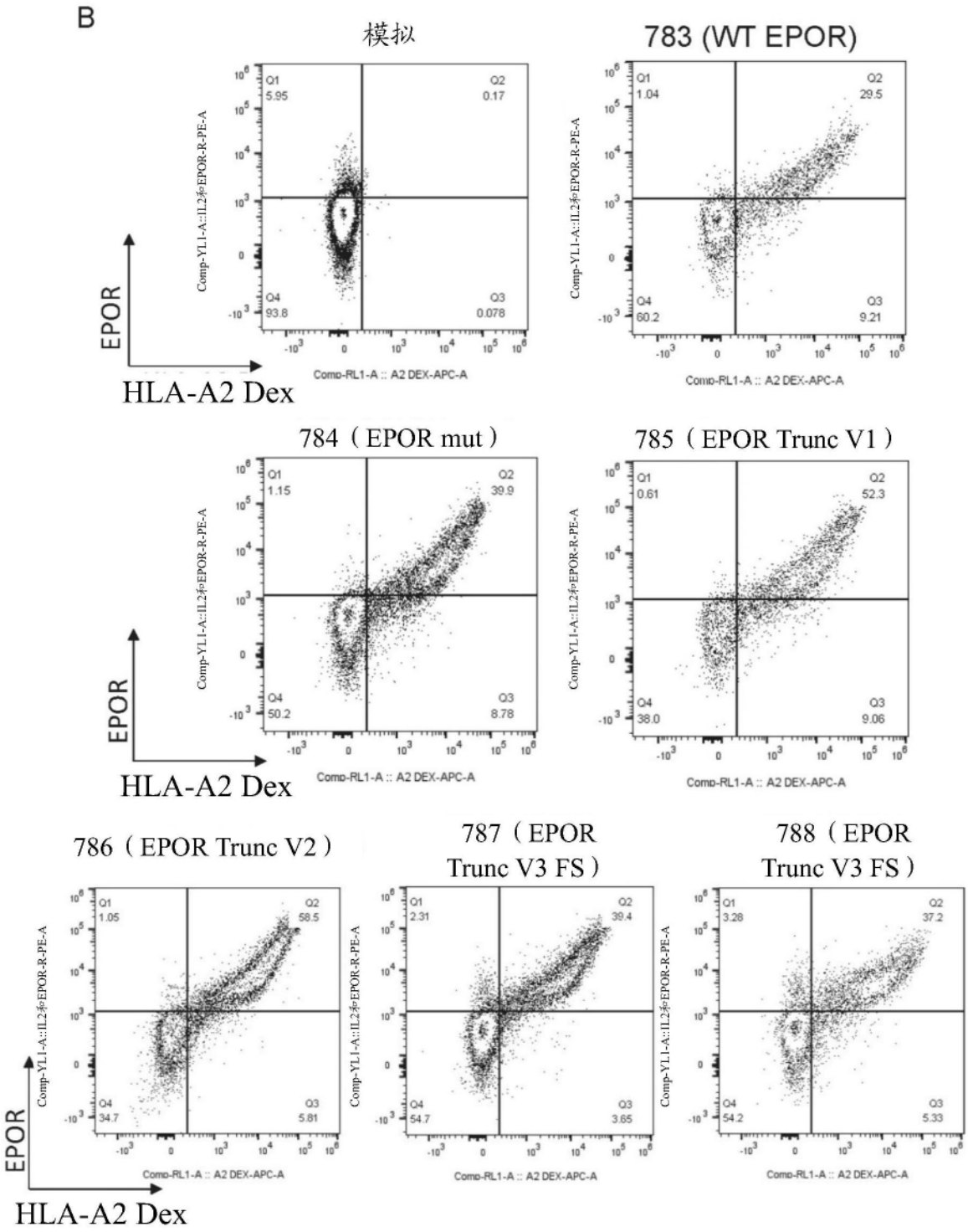

B
模拟
783 (WT EPOR)
784（EPOR mut）
785（EPOR Trunc V1）
786（EPOR Trunc V2）
787（EPOR Trunc V3 FS）
788（EPOR Trunc V3 FS）
EPOR
HLA-A2 Dex
Comp-YL1-A::IL2Rβ-EPOR-R-PE-A
Comp-RL1-A :: A2 DEX-APC-A
Q1 5.95
Q2 0.17
Q4 93.8
Q3 0.078
Q1 1.04
Q2 29.5
Q4 60.2
Q3 9.21
Q1 1.15
Q2 39.9
Q4 50.2
Q3 8.78
Q1 0.61
Q2 52.3
Q4 38.0
Q3 9.06
Q1 1.05
Q2 58.5
Q4 34.7
Q3 5.81
Q1 2.31
Q2 39.4
Q4 54.7
Q3 3.65
Q1 3.28
Q2 37.2
Q4 54.2
Q3 5.33

图4续

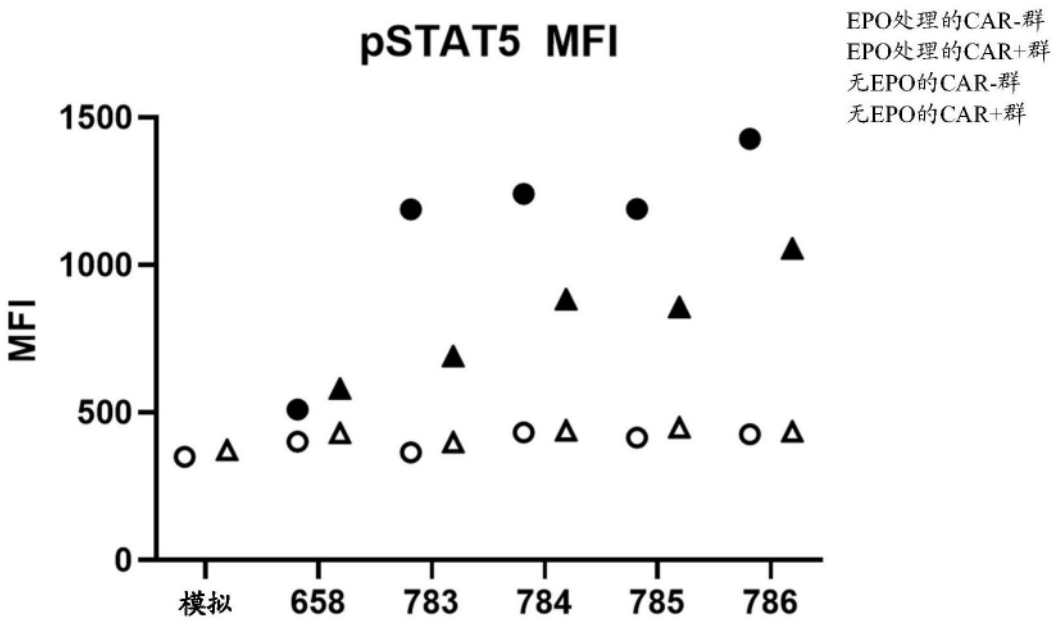

pSTAT5 MFI
EPO处理的CAR-群
EPO处理的CAR+群
无EPO的CAR-群
无EPO的CAR+群
MFI
1500
1000
500
0
模拟
658
783
784
785
786

图5

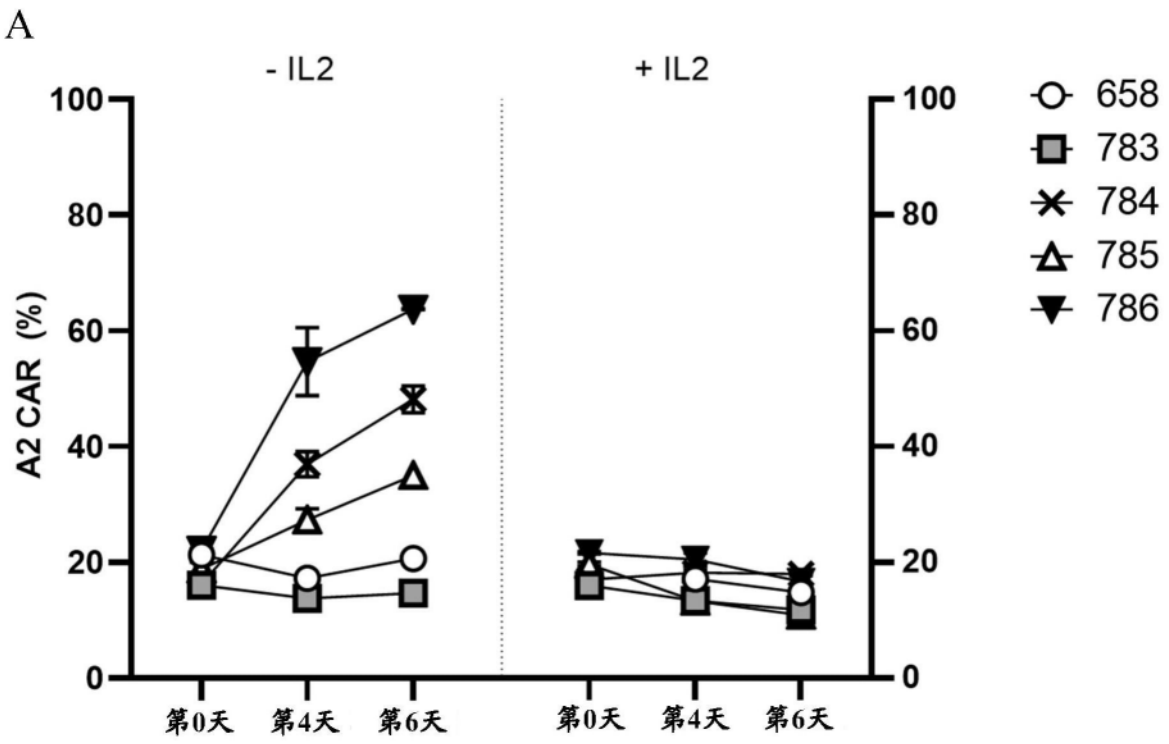

A
- IL2
+ IL2
A2 CAR (%)
100
80
60
40
20
0
第0天
第4天
第6天
658
783
784
785
786

图6

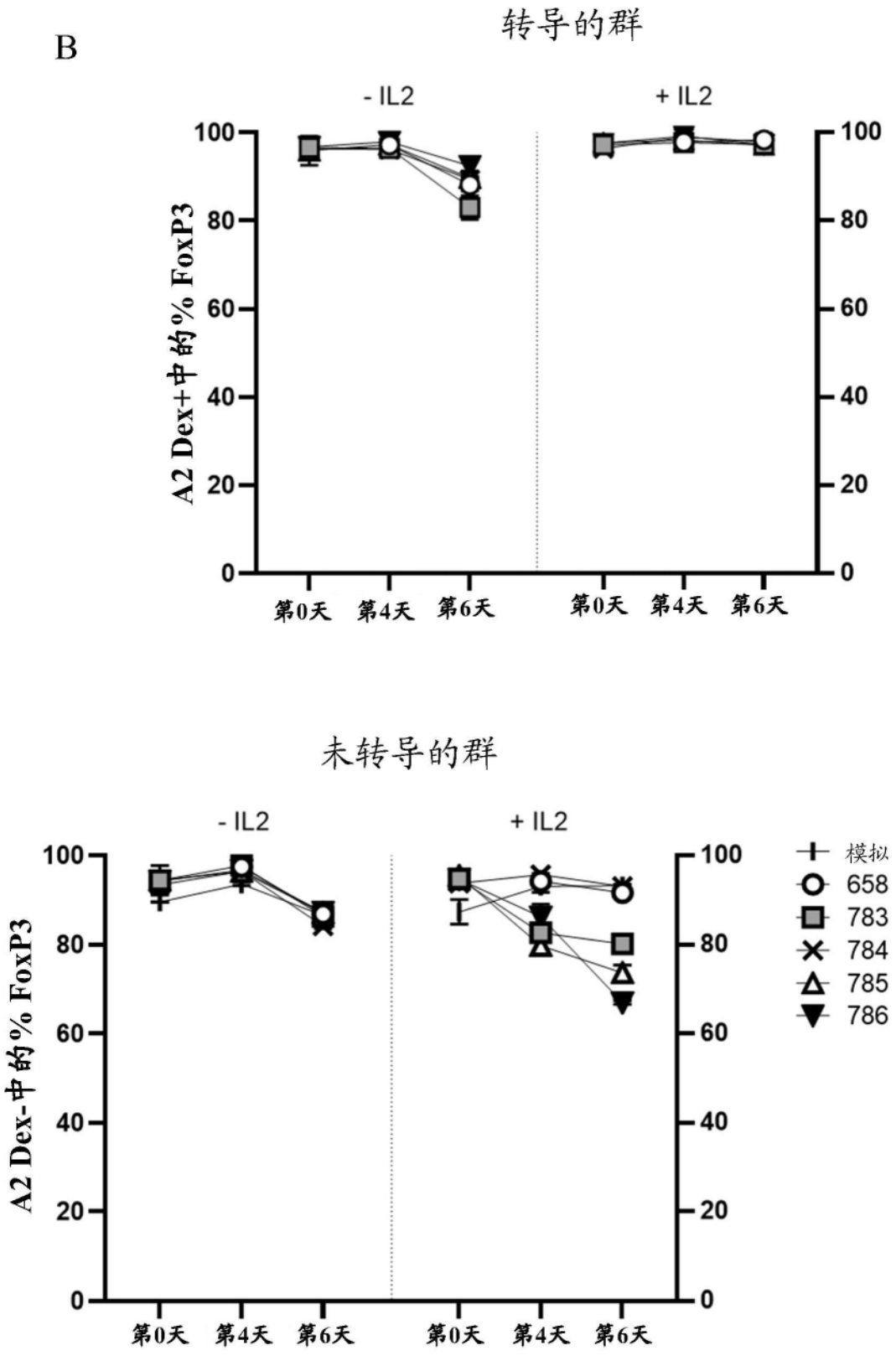

B
转导的群
- IL2
+ IL2
A2 Dex+中的% FoxP3
100
80
60
40
20
0
第0天
第4天
第6天
未转导的群
A2 Dex-中的% FoxP3
模拟
658
783
784
785
786

图6续

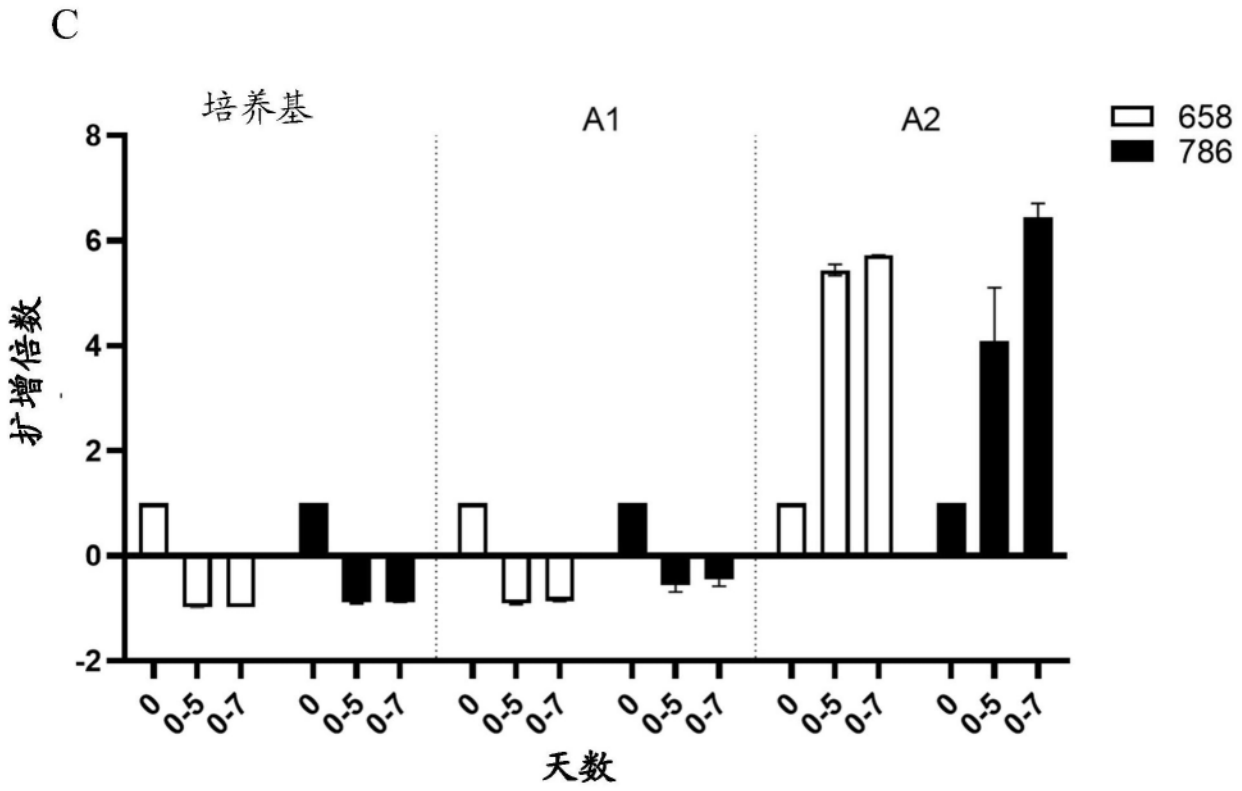

C
培养基
A1
A2
658
786
扩增倍数
8
6
4
2
0
-2
0
0-5
0-7
天数

图6续

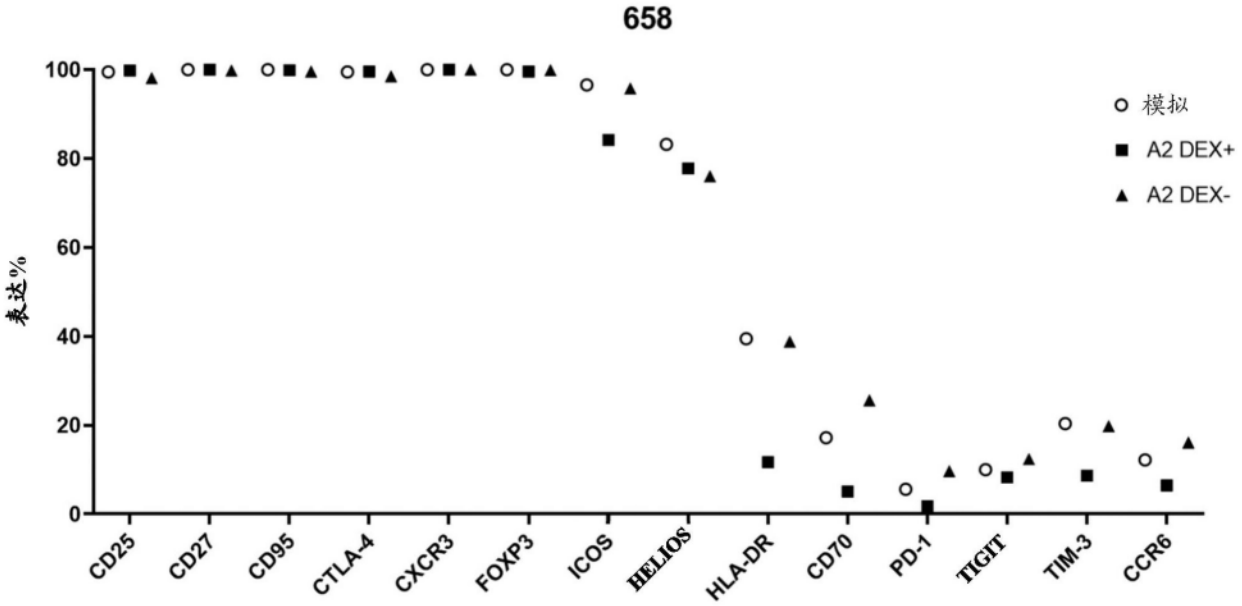

658
表达%
100
80
60
40
20
0
模拟
A2 DEX+
A2 DEX-
CD25
CD27
CD95
CTLA-4
CXCR3
FOXP3
ICOS
HELIOS
HLA-DR
CD70
PD-1
TIGIT
TIM-3
CCR6

图7

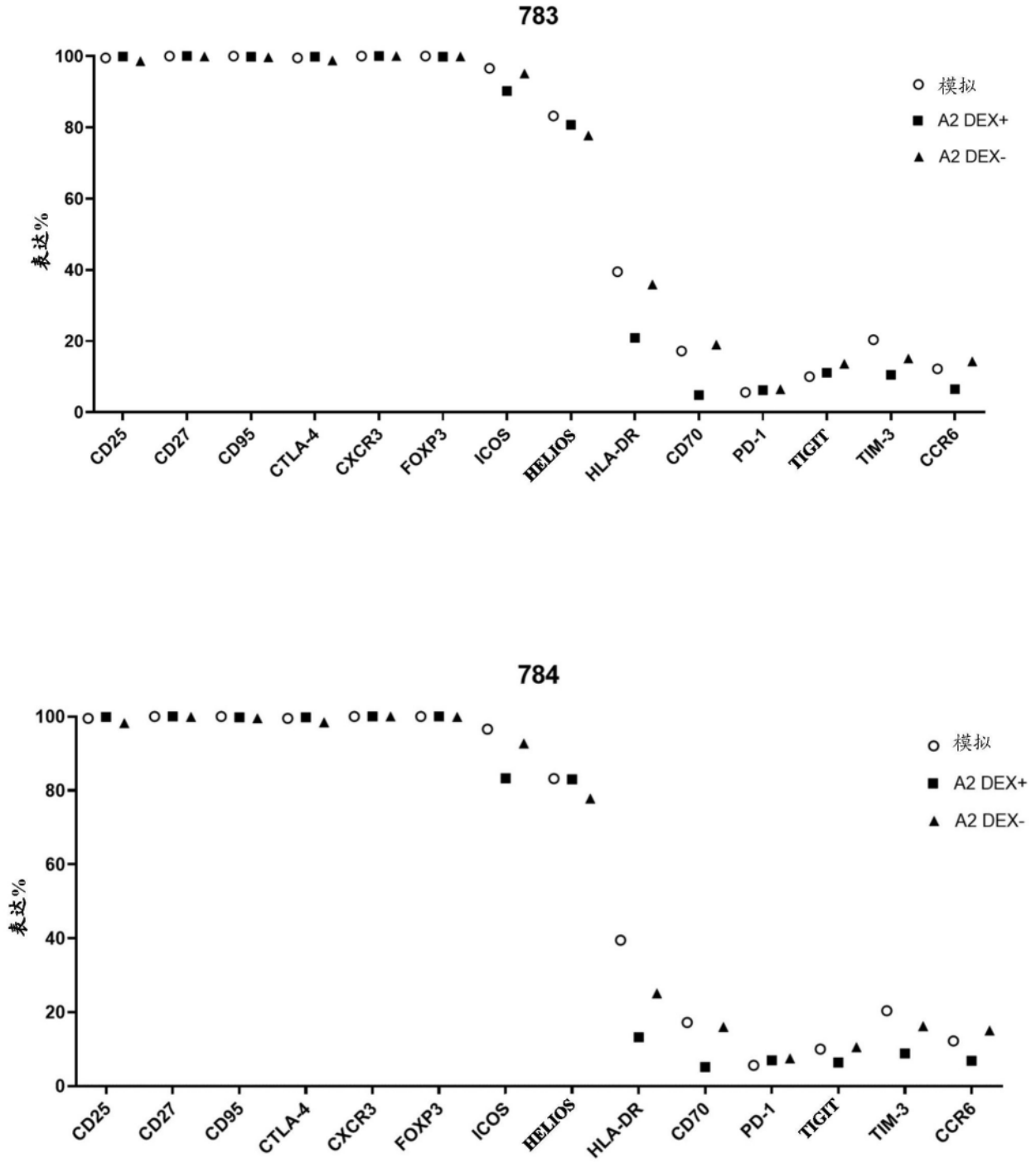

783
100
80
60
40
20
0
表达%
模拟
A2 DEX+
A2 DEX-
CD25
CD27
CD95
CTLA-4
CXCR3
FOXP3
ICOS
HELIOS
HLA-DR
CD70
PD-1
TIGIT
TIM-3
CCR6
784
100
80
60
40
20
0
表达%
模拟
A2 DEX+
A2 DEX-
CD25
CD27
CD95
CTLA-4
CXCR3
FOXP3
ICOS
HELIOS
HLA-DR
CD70
PD-1
TIGIT
TIM-3
CCR6

图7续

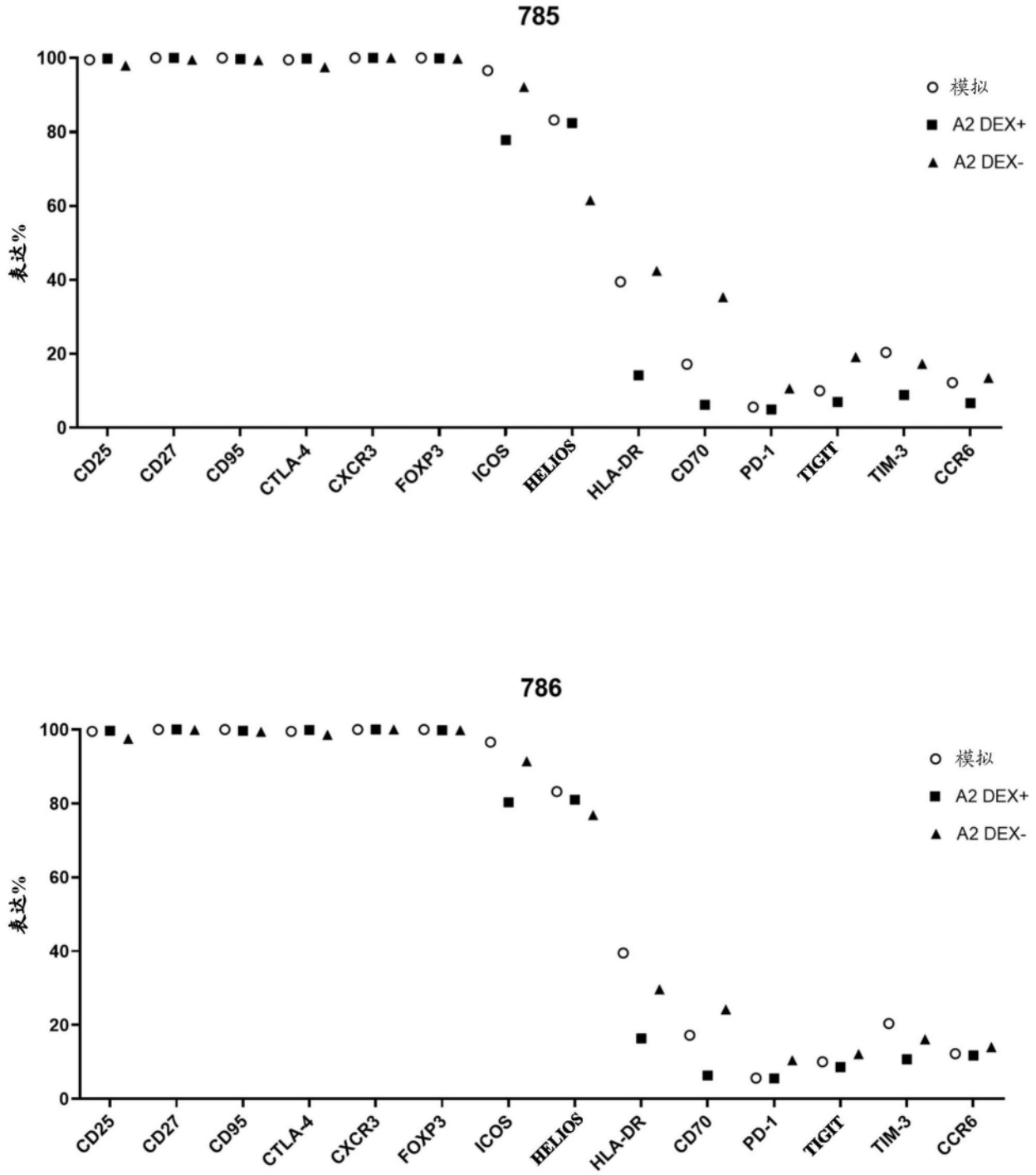

785
表达%
100
80
60
40
20
0
模拟
A2 DEX+
A2 DEX-
CD25
CD27
CD95
CTLA-4
CXCR3
FOXP3
ICOS
HELIOS
HLA-DR
CD70
PD-1
TIGIT
TIM-3
CCR6
786
表达%
100
80
60
40
20
0
模拟
A2 DEX+
A2 DEX-
CD25
CD27
CD95
CTLA-4
CXCR3
FOXP3
ICOS
HELIOS
HLA-DR
CD70
PD-1
TIGIT
TIM-3
CCR6

图7续

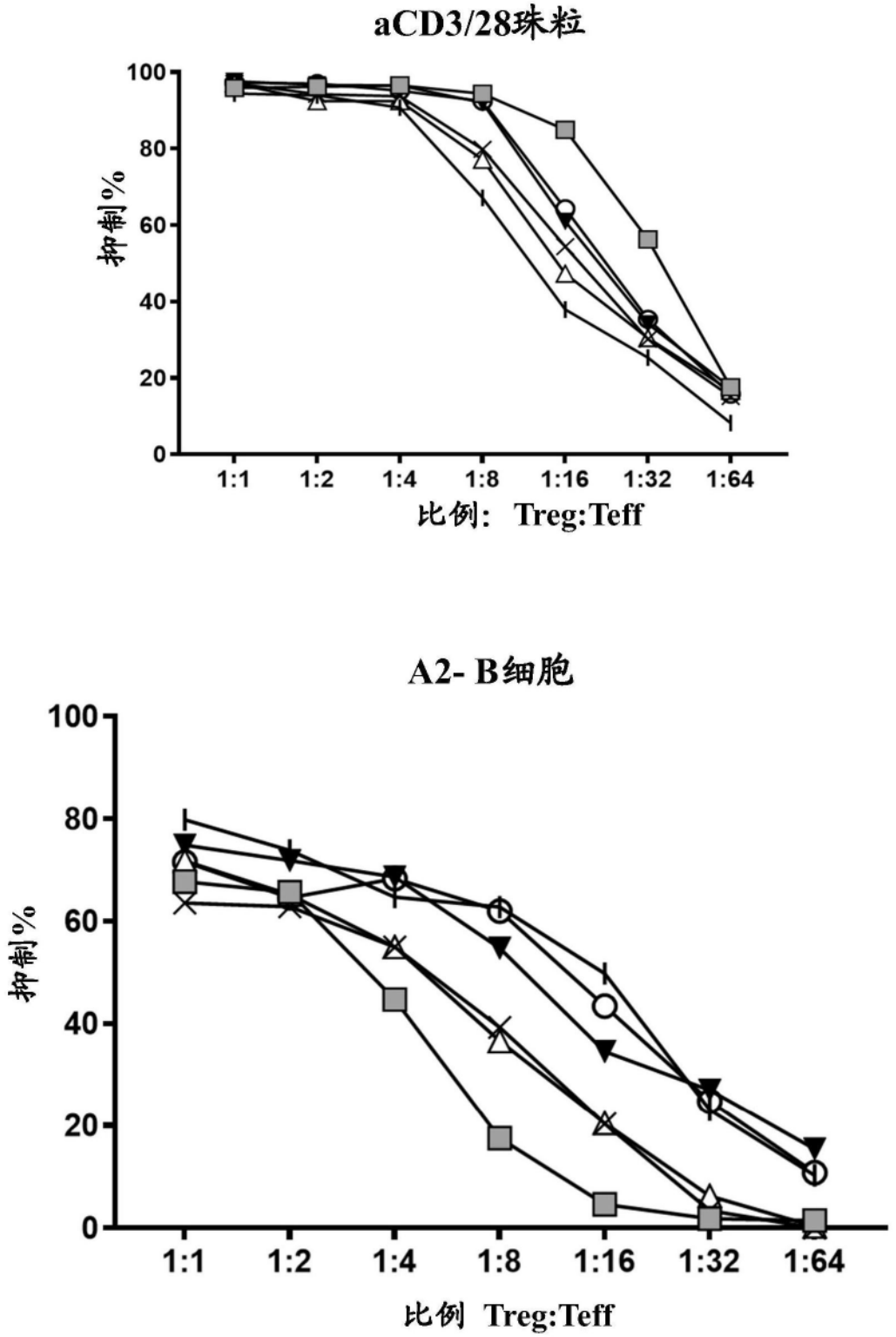

aCD3/28珠粒
抑制%
100
80
60
40
20
0
1:1
1:2
1:4
1:8
1:16
1:32
1:64
比例: Treg:Teff
A2- B细胞
抑制%
100
80
60
40
20
0
1:1
1:2
1:4
1:8
1:16
1:32
1:64
比例 Treg:Teff

图8

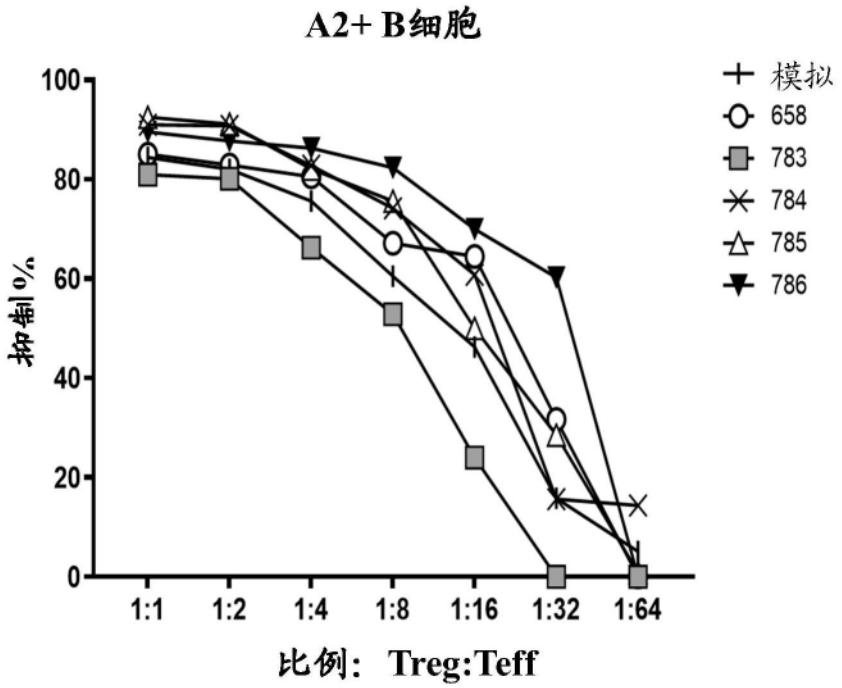

A2+ B细胞
100
80
60
40
20
0
抑制%
1:1
1:2
1:4
1:8
1:16
1:32
1:64
比例: Treg:Teff
模拟
658
783
784
785
786

图8续

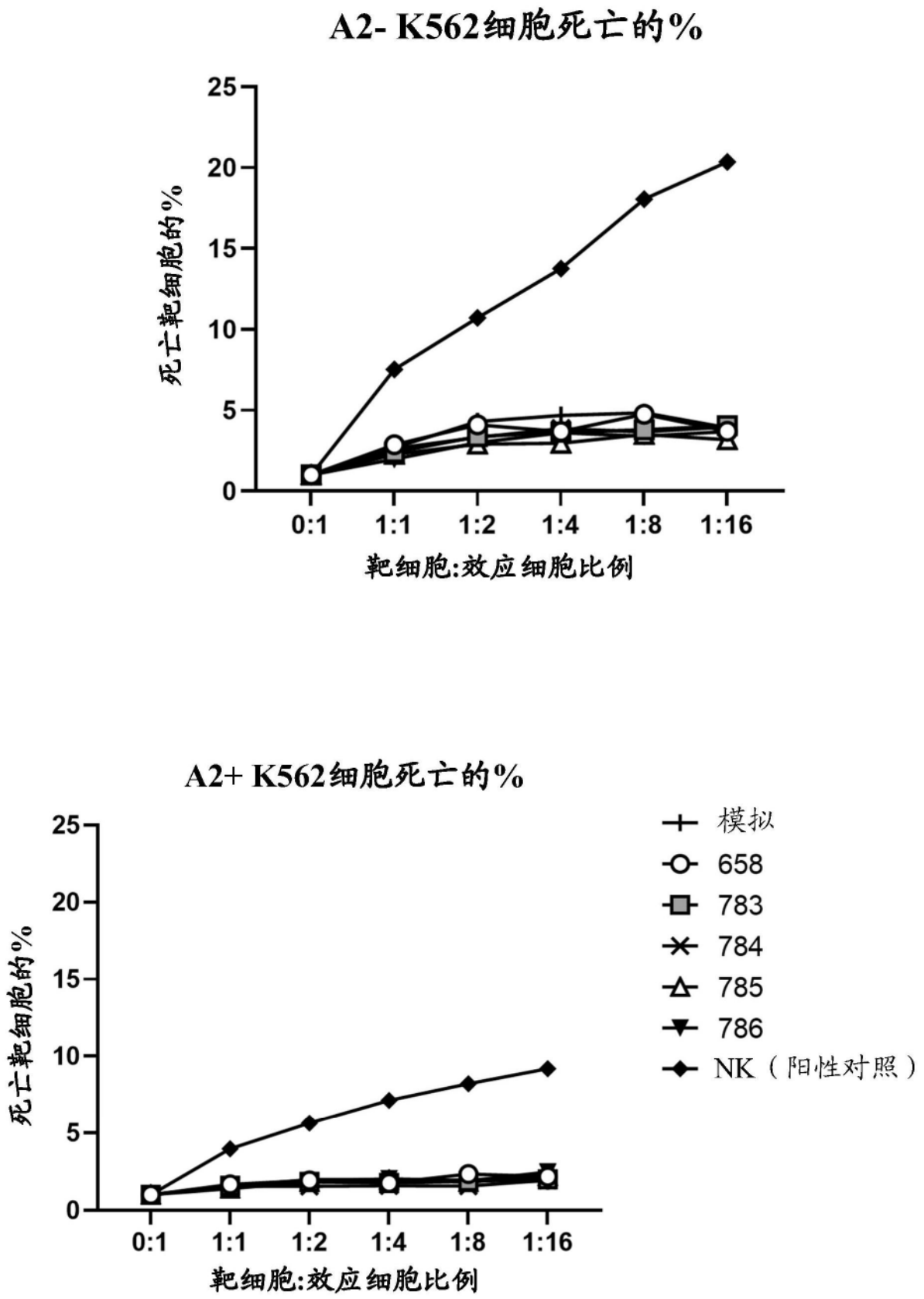

A2- K562细胞死亡的%
死亡靶细胞的%
25
20
15
10
5
0
0:1
1:1
1:2
1:4
1:8
1:16
靶细胞:效应细胞比例
A2+ K562细胞死亡的%
死亡靶细胞的%
25
20
15
10
5
0
0:1
1:1
1:2
1:4
1:8
1:16
靶细胞:效应细胞比例
模拟
658
783
784
785
786
NK（阳性对照）

图9

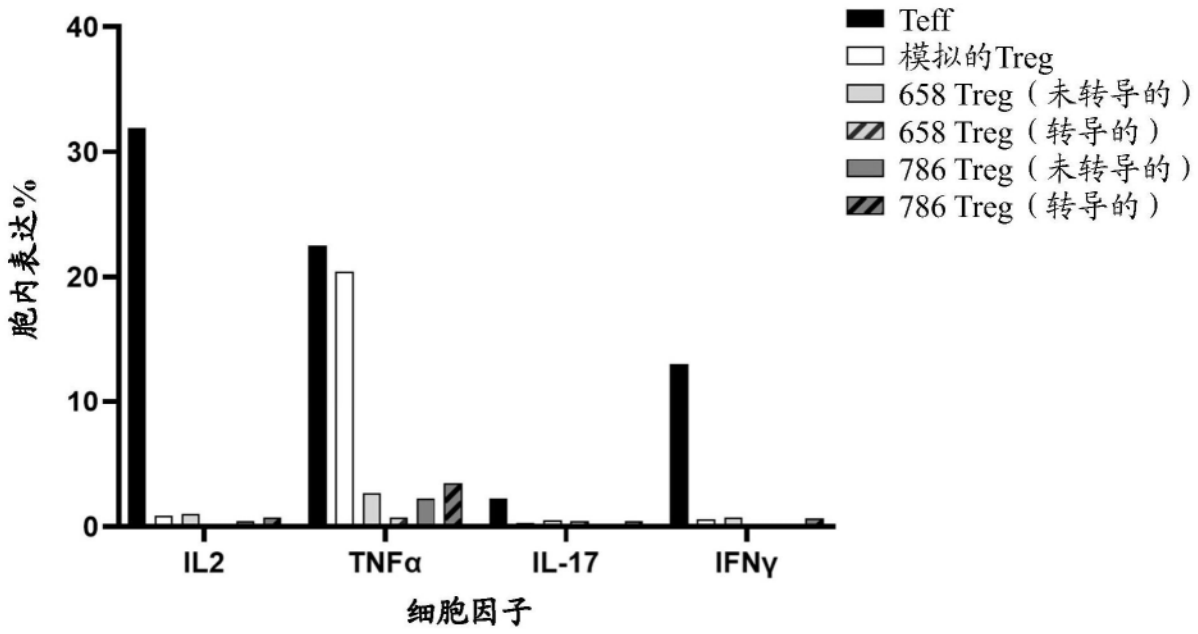

Teff
模拟的Treg
658 Treg（未转导的）
658 Treg（转导的）
786 Treg（未转导的）
786 Treg（转导的）
胞内表达%
40
30
20
10
0
IL2
TNFα
IL-17
IFNγ
细胞因子

图10