



(12) 发明专利申请

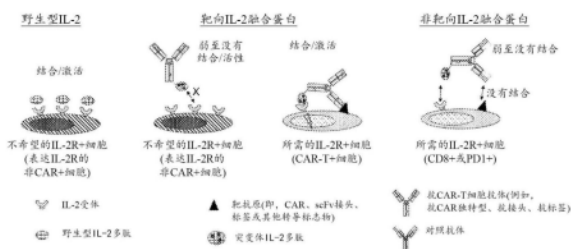
(10) 申请公布号 CN 116829194 A

(43) 申请公布日 2023. 09. 29

(21) 申请号 202180093384.4
(22) 申请日 2021.12.08
(30) 优先权数据
63/123,281 2020.12.09 US
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2023.08.09
(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/062484 2021.12.08
(87) PCT国际申请的公布数据
W02022/125711 EN 2022.06.16
(71) 申请人 亚设生物治疗公司
地址 美国加利福尼亚州
(72) 发明人 I·朱勒蒂 凯利·莫伊尼汉
陈薇 保罗·贝塞特
克里斯托弗·金柏林
(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
专利代理师 刘晓杰 武晶晶
(51) Int.Cl.
A61K 47/68 (2006.01)
纳森·马修森 杨翊
权利要求书16页 说明书96页 附图22页

(54) 发明名称
用于工程化细胞疗法的靶向细胞因子构建体

(57) 摘要
本文提供了靶向细胞因子构建体和通过将靶向细胞因子构建体与工程化细胞疗法组合施用以用于治疗疾病,例如增殖性疾病,例如癌症的工程化细胞疗法的方法。



1. 一种具有工程化细胞的靶向细胞因子构建体,所述靶向细胞因子构建体包含:
 - 细胞结合结构域,所述细胞结合结构域靶向以下中的至少一种:(i) 外源性地引入所述工程化细胞中的嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)的结构域;(ii) 选择性地所述工程化细胞的表面上表达的标签分子;(iii) 作为外源性地引入所述工程化细胞中的CAR的一部分的多肽标签;(iv) 作为外源性地引入所述工程化细胞中的TCR的一部分的多肽标签;或(vi) (i) - (v)的任何组合;以及
 - 细胞因子蛋白或其功能片段或变体。
2. 如权利要求1所述的靶向细胞因子构建体,其中与非工程化细胞的激活相比,所述靶向细胞因子构建体以10倍或更大的效力选择性地激活所述工程化细胞。
3. 如权利要求2所述的靶向细胞因子构建体,其中所述效力通过pSTAT5或pSTAT3激活测定来测量。
4. 如权利要求1-3中任一项所述的靶向细胞因子构建体,其中所述CAR的所述结构域是scFv。
5. 如权利要求2-4中任一项所述的靶向细胞因子构建体,其中所述非工程化细胞在其表面上不表达所述CAR、所述TCR或所述标签分子。
6. 如权利要求1-5中任一项所述的靶向细胞因子构建体,其中所述细胞结合结构域包含抗体或其抗原结合片段。
7. 如权利要求6所述的靶向细胞因子构建体,其中所述抗体或其抗原结合片段是二价的或单价的。
8. 如权利要求1-7中任一项所述的靶向细胞因子构建体,其中所述细胞因子选自:IL-2、IL-7、IL-10、IL-15和IL-21、或其功能片段、或其变体或其任何组合。
9. 如权利要求8所述的靶向细胞因子构建体,其中所述细胞因子是IL-2多肽、或其功能片段或其变体。
10. 如权利要求9所述的靶向细胞因子构建体,其中与具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的野生型IL-2多肽的结合亲和力相比,所述IL-2多肽表现出的对于具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的IL-2R α 多肽的结合亲和力降低至少约50%。
11. 如权利要求10所述的靶向细胞因子构建体,其中与具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的野生型IL-2多肽的结合亲和力相比,所述IL-2多肽表现出的对于具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2R β 多肽的结合亲和力降低至少约50%,和/或对于具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的IL-2R γ 多肽的结合亲和力降低至少约50%。
12. 如权利要求9-11中任一项所述的靶向细胞因子构建体,其中所述IL-2多肽包含SEQ ID NO:1的序列,具有相对于SEQ ID NO:1的一个或多个氨基酸取代,并且其中所述一个或多个取代包括在选自以下的SEQ ID NO:1的位置处的一个或多个取代:Q11、H16、L18、L19、D20、Q22、R38、F42、K43、Y45、E62、P65、E68、V69、L72、D84、S87、N88、V91、I92、T123、Q126、S127、I129和S130。
13. 如权利要求12所述的靶向细胞因子构建体,其中所述一个或多个取代包括相对于SEQ ID NO:1的F42A或F42K氨基酸取代。
14. 如权利要求13所述的靶向细胞因子构建体,其中所述一个或多个取代还包括相对于SEQ ID NO:1的R38A、R38D、R38E、E62Q、E68A、E68Q、E68K或E68R氨基酸取代。

15. 如权利要求14所述的靶向细胞因子构建体,其中所述一个或多个取代还包括相对于SEQ ID NO:1的H16E、H16D、D20N、M23A、M23R、M23K、S87K、S87A、D84L、D84N、D84V、D84H、D84Y、D84R、D84K、N88A、N88G、N88S、N88T、N88R、N88I、N88D、V91A、V91T、V91E、I92A、E95S、E95A、E95R、T123A、T123E、T123K、T123Q、Q126A、Q126S、Q126T、Q126E、S127A、S127E、S127K或S127Q氨基酸取代。

16. 如权利要求15所述的靶向细胞因子构建体,其中所述一个或多个取代还包括与SEQ ID NO:1相比的氨基酸突变C125A。

17. 如权利要求9所述的靶向细胞因子构建体,其中所述IL-2多肽包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,具有以下氨基酸取代(相对于SEQ ID NO:1的序列)组中的一个:R38E和F42A;R38D和F42A;F42A和E62Q;R38A和F42K;R38E、F42A和N88S;R38E、F42A和N88A;R38E、F42A和N88G;R38E、F42A和N88D;R38E、F42A和V91E;R38E、F42A和D84H;R38E、F42A和D84K;R38E、F42A和D84R;H16D、R38E和F42A;H16E、R38E和F42A;R38E、F42A和Q126S;R38D、F42A和N88S;R38D、F42A和N88A;R38D、F42A和N88G;R38D、F42A和N88D;R38D、F42A和V91E;R38D、F42A和D84H;R38D、F42A和D84K;R38D、F42A和D84R;H16D、R38D和F42A;H16E、R38D和F42A;R38D、F42A和Q126S;R38A、F42K和N88S;R38A、F42K和N88A;R38A、F42K和N88G;R38A、F42K和N88D;R38A、F42K和V91E;R38A、F42K和D84H;R38A、F42K和D84K;R38A、F42K和D84R;H16D、R38A和F42K;H16E、R38A和F42K;R38A、F42K和Q126S;F42A、E62Q和N88S;F42A、E62Q和N88A;F42A、E62Q和N88G;F42A、E62Q和N88D;F42A、E62Q和V91E;F42A、E62Q和D84H;F42A、E62Q和D84K;F42A、E62Q和D84R;H16D、F42A和E62Q;H16E、F42A和E62Q;F42A、E62Q和Q126S;R38E、F42A和C125A;R38D、F42A和C125A;F42A、E62Q和C125A;R38A、F42K和C125A;R38E、F42A、N88S和C125A;R38E、F42A、N88A和C125A;R38E、F42A、N88G和C125A;R38E、F42A、N88D和C125A;R38E、F42A、V91E和C125A;R38E、F42A、D84H和C125A;R38E、F42A、D84K和C125A;R38E、F42A、D84R和C125A;H16D、R38E、F42A和C125A;H16E、R38E、F42A和C125A;R38E、F42A、C125A和Q126S;R38D、F42A、N88S和C125A;R38D、F42A、N88A和C125A;R38D、F42A、N88G和C125A;R38D、F42A、N88D和C125A;R38D、F42A、V91E和C125A;R38D、F42A、D84H和C125A;R38D、F42A、D84K和C125A;R38D、F42A、D84R和C125A;H16D、R38D、F42A和C125A;H16E、R38D、F42A和C125A;R38D、F42A、C125A和Q126S;R38A、F42K、N88S和C125A;R38A、F42K、N88G和C125A;R38A、F42K、N88D和C125A;R38A、F42K、N88A和C125A;R38A、F42K、V91E和C125A;R38A、F42K、D84H和C125A;R38A、F42K、D84K和C125A;R38A、F42K、D84R和C125A;H16D、R38A、F42K和C125A;H16E、R38A、F42K和C125A;R38A、F42K、C125A和Q126S;F42A、E62Q、N88S和C125A;F42A、E62Q、N88A和C125A;F42A、E62Q、N88G和C125A;F42A、E62Q、N88D和C125A;F42A、E62Q、V91E和C125A;F42A、E62Q和D84H和C125A;F42A、E62Q和D84K和C125A;F42A、E62Q和D84R和C125A;H16D、F42A和E62Q和C125A;H16E、F42A、E62Q和C125A;F42A、E62Q、C125A和Q126S;F42A、N88S和C125A;F42A、N88A和C125A;F42A、N88G和C125A;F42A、N88D和C125A;F42A、V91E和C125A;F42A、D84H和C125A;F42A、D84K和C125A;F42A、D84R和C125A;H16D、F42A和C125A;H16E、F42A和C125A;以及F42A、C125A和Q126S。

18. 如权利要求9所述的靶向细胞因子构建体,其中所述IL-2多肽包含与选自SEQ ID No:11-90的序列具有至少约85%同一性的氨基酸序列。

19. 如权利要求9所述的靶向细胞因子构建体,其中所述IL-2多肽包含与选自SEQ ID

No. 43、48、52、49和156的序列具有至少约75%同一性的序列。

20. 如权利要求8所述的靶向细胞因子构建体,其中所述细胞因子是IL-7多肽、或其功能片段或其变体。

21. 如权利要求20所述的靶向细胞因子构建体,其中与包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的野生型IL-7多肽对于包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的IL-7Ra多肽的结合亲和力相比,所述IL-7多肽表现出的对于所述IL-7Ra多肽的结合亲和力降低至少约50%。

22. 如权利要求21所述的靶向细胞因子构建体,其中与包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的野生型IL-7多肽对于包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的IL-2Rg多肽的结合亲和力相比,所述IL-7多肽表现出的对于所述IL-2Rg多肽的结合亲和力降低至少约50%。

23. 如权利要求20-22中任一项所述的靶向细胞因子构建体,其中所述IL-7多肽包含SEQ ID NO:91的序列,具有相对于SEQ ID NO:91的一个或多个取代。

24. 如权利要求23所述的靶向细胞因子构建体,其中所述一个或多个取代在选自以下位置的位置处:K10、Q11、S14、V15、V18、Q22、L35、N36、D74、L77、L80、K81、E84、I88、R133、Q136、E137、T140和N143以及K144。

25. 如权利要求24所述的靶向细胞因子构建体,其中位置K81中的所述取代是K81A,并且位置T140中的所述取代是K140A。

26. 如权利要求8所述的靶向细胞因子构建体,其中所述细胞因子是IL-10多肽、或其功能片段或其变体。

27. 如权利要求26所述的靶向细胞因子构建体,其中与包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的野生型IL-10多肽对于包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列的IL-10RA多肽的结合亲和力相比,所述IL-10多肽表现出的对于所述IL-10RA多肽的结合亲和力降低至少约50%。

28. 如权利要求27所述的靶向细胞因子构建体,其中与包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的野生型IL-10多肽对于包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列的IL-10RB多肽的结合亲和力相比,所述IL-10多肽表现出的对于所述IL-10RB多肽的结合亲和力增加至少约50%。

29. 如权利要求26所述的靶向细胞因子构建体,其中所述IL-10多肽包含SEQ ID NO:95的序列,具有相对于SEQ ID NO:95的一个或多个取代。

30. 如权利要求29所述的靶向细胞因子构建体,其中所述IL-10多肽包含选自SEQ ID 99-112的氨基酸序列。

31. 如权利要求8所述的靶向细胞因子构建体,其中所述细胞因子是IL-21多肽、或其功能片段或其变体。

32. 如权利要求31所述的靶向细胞因子构建体,其中与包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的野生型IL-21多肽对于包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的IL-21R多肽的结合亲和力相比,所述IL-21多肽表现出的对于所述IL-21R多肽的结合亲和力降低至少约50%。

33. 如权利要求32所述的靶向细胞因子构建体,其中与包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的野生型IL-21多肽对于包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的IL-2Rg多肽的结合亲和力相比,所述IL-21多肽表现出的对于所述IL-2Rg多肽的结合亲和力降低至少约50%。

34. 如权利要求31所述的靶向细胞因子构建体,其中所述IL-21多肽包含SEQ ID NO:115的序列,具有相对于SEQ ID NO:115的一个或多个取代。

35. 如权利要求34所述的靶向细胞因子构建体,其中一个或多个位置中的所述取代选

自以下位置：R5、I8、R9、R11、Q12、I14、D15、D18、Q19、Y23、R65、S70、K72、K73、K75、R76、K77、S80、Q116和K117，其中位置编号是根据SEQ ID NO:115的氨基酸序列的编号。

36. 如权利要求1-35中任一项所述的靶向细胞因子构建体，其中所述工程化细胞包括以下中的至少一种：表达T细胞受体的T细胞（TCR-T细胞）、 $\gamma\delta$ T细胞、多能干细胞衍生的T细胞或诱导多能干细胞衍生的T细胞、自然杀伤细胞（NK细胞）、多能干细胞衍生的NK细胞或诱导多能干细胞（iPSC）衍生的NK细胞、被工程化以表达嵌合抗原受体的T细胞（CAR-T细胞）、CD8阳性T细胞、CD4阳性T细胞、细胞毒性T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞、CAR-NK细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、髓细胞、造血谱系细胞、造血干祖细胞（HSC）、造血多能祖细胞（MPP）、前T细胞祖细胞、T细胞祖细胞、NK细胞祖细胞。

37. 如权利要求1-36中任一项所述的靶向细胞因子构建体，其中所述靶向细胞因子构建体适用于与包括所述工程化细胞的疗法组合施用于对象。

38. 如权利要求37所述的靶向细胞因子构建体，其中所述工程化细胞是所述对象自体的。

39. 如权利要求38所述的靶向细胞因子构建体，其中所述工程化细胞对于所述对象是同种异体的。

40. 如权利要求37-39中任一项所述的靶向细胞因子构建体，其中所述对象是人。

41. 如权利要求40所述的靶向细胞因子构建体，其中所述对象患有癌症。

42. 如权利要求41所述的靶向细胞因子构建体，其中所述癌症是急性成淋巴细胞性白血病（ALL）（包括非T细胞ALL）、急性髓系白血病、B细胞幼淋巴细胞白血病、B细胞急性淋巴细胞白血病（“BALL”）、母细胞性浆细胞样树突状细胞肿瘤、伯基特淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病（CLL）、慢性髓细胞性白血病（CML）、慢性髓系白血病、慢性或急性白血病、弥漫大B细胞淋巴瘤（DLBCL）、滤泡性淋巴瘤（FL）、毛细胞白血病、霍奇金病、恶性淋巴增殖性疾病、MALT淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、意义未明的单克隆丙种球蛋白病（MGUS）、多发性骨髓瘤、脊髓发育不良和骨髓增生异常综合征、非霍奇金淋巴瘤（NHL）、浆细胞增殖性疾病（包括无症状骨髓瘤（冒烟型多发性骨髓瘤或惰性骨髓瘤）、浆母细胞淋巴瘤、浆细胞样树突状细胞肿瘤、浆细胞瘤（包括浆细胞病；孤立性骨髓瘤；孤立性浆细胞瘤；髓外浆细胞瘤；和多发性浆细胞瘤）、POEMS综合征（还被称为克罗-深濑综合征；Takatsuki病；和PEP综合征）、原发性纵隔大B细胞淋巴瘤（PMBC）、小细胞或大细胞滤泡性淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤（SMZL）、系统性淀粉状蛋白轻链淀粉样变性、T细胞急性淋巴性白血病（“TALL”）、T细胞淋巴瘤、转化型滤泡性淋巴瘤、或华氏巨球蛋白血症、套细胞淋巴瘤（MCL）、转化型滤泡性淋巴瘤（TFL）、原发性纵隔B细胞淋巴瘤（PMBCL）、多发性骨髓瘤、毛细胞淋巴瘤/白血病、肺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌（NSCL）、细支气管肺泡细胞肺癌、鳞状细胞癌、肺腺癌、肺鳞癌、腹膜癌、头颈癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头部或颈部癌、皮肤或眼内黑色素瘤、甲状腺癌、子宫癌、胃肠癌、卵巢癌、直肠癌、肛门区癌、胃癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、子宫内膜癌、子宫癌、输卵管癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金病、食管癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、膀胱癌、肾癌或输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、间皮瘤、膀胱癌、肝癌、肝癌、肝细胞癌、子宫颈癌、唾液腺癌、胆管癌、中枢神经系统（CNS）肿瘤、脊椎轴肿瘤、脑干胶质瘤、多形性胶质母细胞瘤、星形细胞瘤、神经鞘瘤、室管膜瘤、髓母细胞瘤、脑膜瘤、鳞状细胞癌、垂体腺瘤和尤文肉瘤，包括以上癌症中任一种的难治

性形式或以上癌症中一种或多种的组合。

43. 一种药物组合物:其包含根据权利要求1-42中任一项所述的靶向细胞因子构建体,以及药学上可接受的赋形剂、载剂、或稀释剂或其任何组合中的至少一种。

44. 如权利要求43所述的药物组合物,其还包含工程化细胞群体。

45. 一种细胞疗法试剂盒,其包括包含根据权利要求1-42中任一项所述的靶向细胞因子构建体的药物组合物以及指定用于向对象施用所述靶向细胞因子构建体的说明书。

46. 如权利要求45所述的细胞疗法试剂盒,其还包括包含所述工程化细胞群体的药物组合物以及指定用于向所述对象施用所述工程化细胞群体的说明书。

47. 如权利要求46所述的细胞疗法试剂盒,其中包含所述靶向细胞因子构建体的所述药物组合物和包含所述工程化细胞群体的所述药物组合物用于顺序或同时施用。

48. 一种治疗对象的病状的方法,所述方法包括向所述对象施用治疗方案,所述治疗方案包括:(a)工程化细胞和(b)靶向细胞因子构建体,所述靶向细胞因子构建体包含:

- (i) 结合外源性地引入所述工程化细胞中的受体或结构域的细胞结合结构域;和
- (ii) 细胞因子蛋白或其功能片段或变体。

49. 如权利要求48所述的方法,其中与非工程化细胞群体的激活相比,所述靶向细胞因子构建体以10倍或更大的效力选择性地激活工程化细胞群体。

50. 如权利要求49所述的方法,其中与非工程化细胞群体的激活相比,施用所述靶向细胞因子构建体导致工程化细胞群体的激活增加。

51. 如权利要求50所述的方法,其中所述激活通过pSTAT5或pSTAT3激活测定来测量。

52. 如权利要求48所述的方法,其中与非工程化细胞群体的扩增和/或增殖相比,施用所述靶向细胞因子构建体导致工程化细胞群体的扩增和/或增殖增加。

53. 如权利要求48所述的方法,其中与非工程化细胞群体的体内持久性相比,施用所述靶向细胞因子构建体导致工程化细胞群体的体内持久性增加。

54. 如权利要求50-53中任一项所述的方法,其中所述非工程化细胞不表达CAR、TCR或标签分子。

55. 如权利要求48所述的方法,其中与不施用所述靶向细胞因子构建体时工程化细胞群体的激活、扩增和/或增殖相比,施用所述靶向细胞因子构建体导致所述工程化细胞群体的激活、扩增和/或增殖增加。

56. 如权利要求55所述的方法,其中所述扩增和/或增殖是在体内或体外。

57. 如权利要求48所述的方法,其中与不施用所述靶向细胞因子构建体时工程化细胞群体的体内持久性相比,施用所述靶向细胞因子构建体导致所述工程化细胞群体的体内持久性增加。

58. 如权利要求57所述的方法,其中所述工程化细胞群体的体内持久性包括约15天、约30天至约一年的时间段。

59. 如权利要求48所述的方法,其中与不施用所述靶向细胞因子构建体时工程化细胞群体的耗竭速率和/或程度相比,施用所述靶向细胞因子构建体降低所述工程化细胞群体的耗竭速率和/或程度。

60. 如权利要求48所述的方法,其中与施用非靶向细胞因子或其功能片段或变体时工程化细胞群体的特异性富集相比,施用所述靶向细胞因子构建体导致所述工程化细胞的选

择性强化,从而允许增强所述工程化细胞群体的特异性富集。

61.如权利要求48所述的方法,其中与从施用非靶向细胞因子或其功能片段或变体的对象分离的生物样品中Treg细胞的计数相比,施用所述靶向细胞因子构建体不增加从所述对象分离的生物样品中Treg细胞的计数。

62.如权利要求61所述的方法,其中所述生物样品是肿瘤活检或外周血中的至少一种。

63.如权利要求48-62中任一项所述的方法,其中所述对象先前已经施用了预调理方案。

64.如权利要求63所述的方法,其中施用所述靶向细胞因子构建体允许降低所述预调理方案的严重程度或持续时间中的至少一种。

65.如权利要求64所述的方法,其中预调理方案用于减少内源性淋巴细胞群体,以便允许所述工程化细胞群体扩增。

66.如权利要求63-65中任一项所述的方法,其中所述预调理方案包括施用淋巴清除剂。

67.如权利要求66所述的方法,其中施用所述靶向细胞因子构建体降低用于植入所述工程化细胞所需的淋巴清除的程度。

68.如权利要求63-67中任一项所述的方法,其中所述预调理方案涉及向所述对象施用化疗剂。

69.如权利要求68所述的方法,其中所述化疗剂是氟达拉滨和环磷酰胺中的至少一种。

70.如权利要求63-69中任一项所述的方法,其中所述预调理方案包括辐射处理。

71.如权利要求63-70中任一项所述的方法,其中所述预调理方案包括施用清除抗体。

72.如权利要求71所述的方法,其中所述清除抗体是阿仑单抗。

73.如权利要求48-62中任一项所述的方法,其中所述对象未施用预调理方案。

74.一种消除对于在施用工程化细胞疗法之前施用预调理方案或最小化所述预调理方案的严重程度的需要的方法,所述方法包括向对象施用治疗方案,所述治疗方案包括:

(a)工程化细胞;和

(b)靶向细胞因子构建体,所述靶向细胞因子构建体包含:(i)结合外源地引入所述工程化细胞中的受体或结构域的细胞结合结构域;和(ii)细胞因子蛋白或其功能片段或变体。

75.如权利要求74所述的方法,其中所述对象未施用预调理方案。

76.如权利要求75所述的方法,其中与非工程化细胞的激活相比,所述靶向细胞因子构建体以10倍或更大的效力选择性地激活工程化细胞。

77.如权利要求76所述的方法,其中所述激活通过pSTAT5或pSTAT3激活测定来测量。

78.如权利要求76或77所述的方法,其中所述非工程化细胞不包含外源地引入所述细胞中的受体或结构域。

79.如权利要求48-78中任一项所述的方法,其中所述靶向细胞因子构建体在施用所述工程化细胞后在或在约2天、3天、6天、12天、15天、30天、60天或90天或更长时间内施用。

80.如权利要求48-79中任一项所述的方法,其中所述靶向细胞因子构建体与施用所述工程化细胞同时施用。

81.如权利要求48-80中任一项所述的方法,其中所述治疗方案中所述工程化细胞的有

效剂量低于包括施用所述工程化细胞但不包括施用所述靶向细胞因子构建体的参考治疗方案中所述工程化细胞的有效剂量。

82. 如权利要求81所述的方法, 其中所述治疗方案中所述工程化细胞的有效剂量比所述参考治疗方案中所述工程化细胞的有效剂量低至少约1.5倍至约1000倍。

83. 一种增加工程化细胞疗法在对象中的功效的方法, 所述方法包括向对象施用治疗方案, 从而增加所述工程化细胞疗法在所述对象中的功效, 所述治疗方案包括:

(a) 工程化细胞; 和

(b) 靶向细胞因子构建体, 所述靶向细胞因子构建体包含: (i) 结合外源地引入所述工程化细胞中的受体或结构域的细胞结合结构域; 和(ii) 细胞因子蛋白或其功能片段或变体。

84. 如权利要求83所述的方法, 其中与非工程化细胞的激活相比, 所述靶向细胞因子构建体以10倍或更大的效力选择性地激活工程化细胞。

85. 如权利要求83或84所述的方法, 其中所述非工程化细胞不包含外源地引入所述细胞中的受体或结构域。

86. 如权利要求76-85中任一项所述的方法, 其中所述效力通过pSTAT5或pSTAT3激活测定来测量。

87. 一种治疗经历B细胞发育不全的损失的对象的方法, 所述方法包括向所述对象施用靶向细胞因子构建体, 所述靶向细胞因子构建体包含:

(i) 结合外源地引入工程化细胞中的受体或结构域的细胞结合结构域; 和

(ii) 细胞因子蛋白或其功能片段或变体。

88. 一种治疗病状或疾病的方法, 所述方法包括向所述对象施用治疗方案, 所述治疗方案包括: (a) 工程化细胞; 和 (b) 靶向细胞因子构建体, 所述靶向细胞因子构建体包含:

(i) 结合外源地引入所述工程化细胞中的受体或结构域的细胞结合结构域; 和

(ii) 细胞因子蛋白或其功能片段或变体, 其中所述施用所述靶向细胞因子构建体允许相对于包括施用所述工程化细胞但不包括所述靶向细胞因子构建体的参考治疗方案中所述工程化细胞的有效剂量, 降低所述治疗方案中所述工程化细胞的有效剂量。

89. 如权利要求88所述的方法, 其中所述治疗方案中所述工程化细胞的有效剂量比所述参考治疗方案中所述工程化细胞的有效剂量低至少约1.5倍至约1000倍。

90. 如权利要求48-89中任一项所述的方法, 其中所述工程化细胞在组合物中提供, 并且其中所述组合物在即时医护时生成并且在不培养细胞群体的情况下施用于患者。

91. 一种靶向对象中的工程化细胞的方法, 所述方法包括向所述对象施用靶向细胞因子构建体, 所述靶向细胞因子构建体包含细胞结合结构域和经修饰的细胞因子或其功能片段或变体, 其中所述工程化细胞表达 (i) 所述经修饰的细胞因子或其功能片段或变体的受体和 (ii) 所述细胞结合结构域的靶抗原。

92. 一种富集对象中的工程化细胞群体的方法, 所述方法包括向所述对象施用靶向细胞因子构建体, 所述靶向细胞因子构建体包含细胞结合结构域和经修饰的细胞因子或其功能片段或变体, 其中所述工程化细胞表达 (i) 所述经修饰的细胞因子或其功能片段或变体的受体和 (ii) 所述细胞结合结构域的靶抗原。

93. 如权利要求91或92所述的方法, 其中所述工程化细胞在所述对象体内生成。

94. 如权利要求93所述的方法,其中所述对象先前已经施用了核酸载剂,所述核酸载剂包含表达嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体蛋白(TCR)的核酸。

95. 如权利要求94所述的方法,其中所述核酸载剂是以下中的至少一种:线性多核苷酸、与离子或两亲性化合物缔合的多核苷酸、质粒和病毒。

96. 如权利要求94所述的方法,其中所述核酸载剂是纳米载剂。

97. 如权利要求94所述的方法,其中所述核酸载剂是病毒载体,其中所述病毒载体是以下中的至少一种:仙台病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体或慢病毒载体。

98. 如权利要求94-97中任一项所述的方法,其中所述核酸是DNA或RNA。

99. 如权利要求98所述的方法,其中所述RNA是信使RNA(mRNA)。

100. 如权利要求94-99中任一项所述的方法,其中所述核酸载剂还包含用于靶向免疫细胞的靶向部分。

101. 如权利要求100所述的方法,其中所述免疫细胞包括髓细胞、T细胞或NK细胞。

102. 如权利要求101所述的方法,其中所述T细胞包括T淋巴细胞。

103. 如权利要求101或102所述的方法,其中所述T细胞或所述NK细胞由所述载体或所述核酸载剂诱导,以在所述对象体内生成所述工程化细胞。

104. 如权利要求92-103中任一项所述的方法,其中与所述对象不施用所述靶向细胞因子构建体时体内生成的工程化细胞群体的激活、扩增和/或增殖相比,所述施用所述靶向细胞因子构建体导致体内生成的所述工程化细胞群体的激活、扩增和/或增殖增加。

105. 如权利要求92-104中任一项所述的方法,其中与所述对象不施用所述靶向细胞因子构建体时体内生成的工程化细胞群体的持久性相比,所述施用所述靶向细胞因子构建体导致体内生成的所述工程化细胞群体的持久性增加。

106. 如权利要求92-105中任一项所述的方法,其中与不施用所述靶向细胞因子构建体时体内生成的工程化细胞群体的耗竭速率和/或程度相比,施用所述靶向细胞因子构建体降低体内生成的所述工程化细胞群体的耗竭速率和/或程度。

107. 如权利要求92-106中任一项所述的方法,其中与施用非靶向细胞因子或其功能片段或变体时工程化细胞群体的特异性富集相比,施用所述靶向细胞因子构建体导致体内生成的工程化细胞的选择性强化,从而允许增强体内生成的所述工程化细胞群体的特异性富集。

108. 如权利要求92-107中任一项所述的方法,其中与从施用非靶向细胞因子或其功能片段或变体的对象分离的生物样品中Treg细胞的计数相比,施用所述靶向细胞因子构建体不增加从所述对象分离的生物样品中Treg细胞的计数。

109. 如权利要求108所述的方法,其中所述生物样品是肿瘤活检或外周血中的至少一种。

110. 如权利要求105-109中任一项所述的方法,其中所述工程化细胞群体的持久性包括至少约30天至约一年的时间段。

111. 一种富集工程化细胞群体的方法,所述方法包括使所述工程化细胞群体与靶向细胞因子构建体接触,所述靶向细胞因子构建体包含细胞结合结构域和经修饰的细胞因子或其功能片段或变体,其中所述工程化细胞表达(i)所述经修饰的细胞因子或其功能片段或

变体的受体和(ii)所述细胞结合结构域的靶抗原。

112. 如权利要求48-111中任一项所述的方法,其中所述细胞因子选自:IL-2、IL-7、IL-10、IL-15和IL-21、或其功能片段、或其变体或其任何组合。

113. 如权利要求48-112中任一项所述的方法,其中所述细胞因子是以下中的至少一种:(i)结合和/或激活包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2R β 多肽的IL-2R γ 激动剂多肽;和(ii)结合和/或激活包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的IL-2R γ 多肽的IL-2R β 多肽激动剂多肽。

114. 如权利要求112或113所述的方法,其中所述细胞因子是IL-2多肽、或其功能片段或其变体。

115. 如权利要求114所述的方法,其中与包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的野生型IL-2多肽对于包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的IL-2R α 多肽的结合亲和力相比,所述IL-2多肽表现出的对于所述IL-2R α 多肽的结合亲和力降低至少约50%。

116. 如权利要求115所述的方法,其中与包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的野生型IL-2多肽对于包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2R β 多肽的结合亲和力相比,所述IL-2多肽表现出的对于所述IL-2R β 多肽的结合亲和力降低至少约50%,和/或对于包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的IL-2R γ 多肽的结合亲和力降低至少约50%。

117. 如权利要求112所述的方法,其中所述细胞因子是IL-7多肽,与包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的野生型IL-7多肽对于包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的IL-7R α 多肽的结合亲和力相比,所述IL-7多肽表现出的对于所述IL-7R α 多肽的结合亲和力降低至少约50%。

118. 如权利要求117所述的方法,其中与包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的野生型IL-7多肽对于包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的IL-2R γ 多肽的结合亲和力相比,所述IL-7多肽表现出的对于所述IL-2R γ 多肽的结合亲和力降低50%或更多。

119. 如权利要求112所述的方法,其中所述细胞因子是IL-10多肽,与包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的野生型IL-10多肽对于包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列的IL-10R α 多肽的结合亲和力相比,所述IL-10多肽表现出的对于所述IL-10R α 多肽的结合亲和力降低至少约50%。

120. 如权利要求119所述的方法,其中与包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的野生型IL-10多肽对于包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列的IL-10R β 多肽的结合亲和力相比,所述IL-10多肽表现出的对于所述IL-10R β 多肽的结合亲和力增加至少约50%。

121. 如权利要求120所述的方法,其中所述细胞因子是IL-21多肽,与包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的野生型IL-21多肽对于包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的IL-21R多肽的结合亲和力相比,所述IL-21多肽表现出的对于所述IL-21R多肽的结合亲和力降低50%或更多。

122. 如权利要求121所述的方法,其中与包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的野生型IL-21多肽对于包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的IL-2R γ 多肽的结合亲和力相比,所述IL-21多肽表现出的对于所述IL-2R γ 多肽的结合亲和力降低至少约50%。

123. 如权利要求112所述的方法,其中所述细胞因子是IL-2多肽,所述IL-2多肽包含SEQ ID NO:1的序列,具有相对于SEQ ID NO:1的一个或多个氨基酸取代,并且其中所述一

个或多个取代包括在选自以下的SEQ ID NO:1的位置处的一个或多个取代:Q11、H16、L18、L19、D20、Q22、R38、F42、K43、Y45、E62、P65、E68、V69、L72、D84、S87、N88、V91、I92、T123、Q126、S127、I129和S130。

124. 如权利要求123所述的方法,其中所述一个或多个取代包括相对于SEQ ID NO:1的F42A或F42K氨基酸取代。

125. 如权利要求124所述的方法,其中所述一个或多个取代还包括相对于SEQ ID NO:1的R38A、R38D、R38E、E62Q、E68A、E68Q、E68K或E68R氨基酸取代。

126. 如权利要求125所述的方法,其中所述一个或多个取代还包括相对于SEQ ID NO:1的H16E、H16D、D20N、M23A、M23R、M23K、S87K、S87A、D84L、D84N、D84V、D84H、D84Y、D84R、D84K、N88A、N88G、N88S、N88T、N88R、N88I、N88D、V91A、V91T、V91E、I92A、E95S、E95A、E95R、T123A、T123E、T123K、T123Q、Q126A、Q126S、Q126T、Q126E、S127A、S127E、S127K或S127Q氨基酸取代。

127. 如权利要求126所述的方法,其中所述一个或多个取代还包括与SEQ ID NO:1相比的氨基酸突变C125A。

128. 如权利要求112所述的方法,其中所述细胞因子是IL-2多肽,所述IL-2多肽包含与选自SEQ ID No:11-90的序列具有至少约85%同一性的氨基酸序列。

129. 如权利要求112所述的方法,其中所述细胞因子是IL-2多肽,所述IL-2多肽包含与选自SEQ ID NO:43、48、52、49和156的序列具有至少约85%同一性的氨基酸序列。

130. 如权利要求112所述的方法,其中所述细胞因子是IL-2多肽,所述IL-2多肽包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,具有以下氨基酸取代(相对于SEQ ID NO:1的序列)组中的一个:R38E和F42A;R38D和F42A;F42A和E62Q;R38A和F42K;R38E、F42A和N88S;R38E、F42A和N88A;R38E、F42A和N88G;R38E、F42A和N88D;R38E、F42A和V91E;R38E、F42A和D84H;R38E、F42A和D84K;R38E、F42A和D84R;H16D、R38E和F42A;H16E、R38E和F42A;R38E、F42A和Q126S;R38D、F42A和N88S;R38D、F42A和N88A;R38D、F42A和N88G;R38D、F42A和N88D;R38D、F42A和V91E;R38D、F42A和D84H;R38D、F42A和D84K;R38D、F42A和D84R;H16D、R38D和F42A;H16E、R38D和F42A;R38D、F42A和Q126S;R38A、F42K和N88S;R38A、F42K和N88A;R38A、F42K和N88G;R38A、F42K和N88D;R38A、F42K和V91E;R38A、F42K和D84H;R38A、F42K和D84K;R38A、F42K和D84R;H16D、R38A和F42K;H16E、R38A和F42K;R38A、F42K和Q126S;F42A、E62Q和N88S;F42A、E62Q和N88A;F42A、E62Q和N88G;F42A、E62Q和N88D;F42A、E62Q和V91E;F42A、E62Q和D84H;F42A、E62Q和D84K;F42A、E62Q和D84R;H16D、F42A和E62Q;H16E、F42A和E62Q;F42A、E62Q和Q126S;R38E、F42A和C125A;R38D、F42A和C125A;F42A、E62Q和C125A;R38A、F42K和C125A;R38E、F42A、N88S和C125A;R38E、F42A、N88A和C125A;R38E、F42A、N88G和C125A;R38E、F42A、N88D和C125A;R38E、F42A、V91E和C125A;R38E、F42A、D84H和C125A;R38E、F42A、D84K和C125A;R38E、F42A、D84R和C125A;H16D、R38E、F42A和C125A;H16E、R38E、F42A和C125A;R38E、F42A、C125A和Q126S;R38D、F42A、N88S和C125A;R38D、F42A、N88A和C125A;R38D、F42A、N88G和C125A;R38D、F42A、N88D和C125A;R38D、F42A、V91E和C125A;R38D、F42A、D84H和C125A;R38D、F42A、D84K和C125A;R38D、F42A、D84R和C125A;H16D、R38D、F42A和C125A;H16E、R38D、F42A和C125A;R38D、F42A、C125A和Q126S;R38A、F42K、N88S和C125A;R38A、F42K、N88G和C125A;R38A、F42K、N88D和C125A;R38A、F42K、N88A和C125A;R38A、F42K、V91E和C125A;R38A、F42K、D84H和C125A;R38A、F42K、D84K和C125A;R38A、F42K、D84R和C125A;H16D、R38A、F42K和

C125A;H16E、R38A、F42K和C125A;R38A、F42K、C125A和Q126S;F42A、E62Q、N88S和C125A;F42A、E62Q、N88A和C125A;F42A、E62Q、N88G和C125A;F42A、E62Q、N88D和C125A;F42A、E62Q、V91E和C125A;F42A、E62Q和D84H和C125A;F42A、E62Q和D84K和C125A;F42A、E62Q和D84R和C125A;H16D、F42A和E62Q和C125A;H16E、F42A、E62Q和C125A;F42A、E62Q、C125A和Q126S;F42A、N88S和C125A;F42A、N88A和C125A;F42A、N88G和C125A;F42A、N88D和C125A;F42A、V91E和C125A;F42A、D84H和C125A;F42A、D84K和C125A;F42A、D84R和C125A;H16D、F42A和C125A;H16E、F42A和C125A;以及F42A、C125A和Q126S。

131. 如权利要求112所述的方法,其中所述细胞因子是IL-7多肽、或其功能片段或变体。

132. 如权利要求131所述的方法,其中所述IL-7多肽包含SEQ ID NO:91的序列,具有相对于SEQ ID NO:91的一个或多个取代。

133. 如权利要求132所述的方法,其中一个或多个位置中的所述取代选自以下位置:K10、Q11、S14、V15、V18、Q22、L35、N36、D74、L77、L80、K81、E84、I88、R133、Q136、E137、T140和N143以及K144。

134. 如权利要求133所述的方法,其中位置K81中的所述取代是K81A,并且位置T140中的所述取代是K140A。

135. 如权利要求112所述的方法,其中所述细胞因子是IL-10多肽、或其功能片段或变体。

136. 如权利要求135所述的方法,其中所述IL-10多肽包含SEQ ID NO:95的序列,具有相对于SEQ ID NO:95的一个或多个取代。

137. 如权利要求136所述的方法,其中所述突变体IL-10多肽包含选自SEQ ID 99-112的氨基酸序列。

138. 如权利要求112中任一项所述的方法,其中所述细胞因子是IL-21多肽、或其功能片段或其变体。

139. 如权利要求138所述的方法,其中所述IL-21多肽包含SEQ ID NO:115的序列,具有相对于SEQ ID NO:115的一个或多个取代。

140. 如权利要求139所述的方法,其中一个或多个位置中的所述取代选自以下位置:R5、I8、R9、R11、Q12、I14、D15、D18、Q19、Y23、R65、S70、K72、K73、K75、R76、K77、S80、Q116和K117,其中位置编号是根据SEQ ID NO:115的氨基酸序列的编号。

141. 如权利要求48-140中任一项所述的方法,其中所述工程化细胞包括以下中的至少一种:表达T细胞受体的T细胞(TCR-T细胞)、 $\gamma\delta$ T细胞、多能干细胞衍生的T细胞或诱导多能干细胞衍生的T细胞、自然杀伤细胞(NK细胞)、多能干细胞衍生的NK细胞或诱导多能干细胞(iPSC)衍生的NK细胞、被工程化以表达嵌合抗原受体的T细胞(CAR-T细胞)、CD8阳性T细胞、CD4阳性T细胞、细胞毒性T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞、CAR-NK细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、髓细胞、造血谱系细胞、造血干祖细胞(HSC)、造血多能祖细胞(MPP)、前T细胞祖细胞、T细胞祖细胞、NK细胞祖细胞。

142. 如权利要求141所述的方法,其中所述工程化细胞是所述对象自体的。

143. 如权利要求142所述的方法,其中所述工程化细胞对于所述对象是同种异体的。

144. 如权利要求48-143中任一项所述的方法,其中所述对象是人。

145. 如权利要求48-144中任一项所述的方法,其中所述对象患有癌症。

146. 如权利要求145所述的方法,其中所述癌症是急性成淋巴细胞性白血病(ALL)(包括非T细胞ALL)、急性髓系白血病、B细胞幼淋巴细胞白血病、B细胞急性淋巴性白血病(“BALL”)、母细胞性浆细胞样树突状细胞肿瘤、伯基特淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性髓细胞性白血病(CML)、慢性髓系白血病、慢性或急性白血病、弥漫大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、毛细胞白血病、霍奇金病、恶性淋巴增殖性疾病、MALT淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、意义未明的单克隆丙种球蛋白病(MGUS)、多发性骨髓瘤、脊髓发育不良和骨髓增生异常综合征、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、浆细胞增殖性疾病(包括无症状骨髓瘤(冒烟型多发性骨髓瘤或惰性骨髓瘤)、浆母细胞淋巴瘤、浆细胞样树突状细胞肿瘤、浆细胞瘤(包括浆细胞病;孤立性骨髓瘤;孤立性浆细胞瘤;髓外浆细胞瘤;和多发性浆细胞瘤)、POEMS综合征(还被称为克罗-深濑综合征;Takatsuki病;和PEP综合征)、原发性纵隔大B细胞淋巴瘤(PMBCL)、小细胞或大细胞滤泡性淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤(SMZL)、系统性淀粉状蛋白轻链淀粉样变性、T细胞急性淋巴性白血病(“TALL”)、T细胞淋巴瘤、转化型滤泡性淋巴瘤、或华氏巨球蛋白血症、套细胞淋巴瘤(MCL)、转化型滤泡性淋巴瘤(TFL)、原发性纵隔B细胞淋巴瘤(PMBCL)、多发性骨髓瘤、毛细胞淋巴瘤/白血病、肺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌(NSCL)、细支气管肺泡细胞肺癌、鳞状细胞癌、肺腺癌、肺鳞癌、腹膜癌、头颈癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头部或颈部癌、皮肤或眼内黑色素瘤、甲状腺癌、子宫癌、胃肠癌、卵巢癌、直肠癌、肛门区癌、胃癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、子宫内膜癌、子宫癌、输卵管癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金病、食管癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、膀胱癌、肾癌或输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、间皮瘤、膀胱癌、肝癌、肝癌、肝细胞癌、子宫颈癌、唾液腺癌、胆管癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、脊椎轴肿瘤、脑干胶质瘤、多形性胶质母细胞瘤、星形细胞瘤、神经鞘瘤、室管膜瘤、髓母细胞瘤、脑膜瘤、鳞状细胞癌、垂体腺瘤和尤文肉瘤,包括以上癌症中任一种的难治性形式或以上癌症中一种或多种的组合。

147. 一种用于在与工程化细胞的组合疗法中使用的靶向细胞因子构建体,所述融合蛋白包含(i)细胞结合结构域,和(ii)细胞因子蛋白或其功能片段或变体,其中所述细胞结合结构域:

(a) 包含对于外源性地在所述工程化细胞的表面上表达的受体或结构域具有特异性的抗体或其抗原结合片段;

(b) 包含对于在所述工程化细胞上表达的抗原结合蛋白的结构域具有特异性的抗体或其抗原结合片段;

(c) 对于标签具有特异性,其中所述标签由所述工程化细胞共表达或者是由所述工程化细胞表达的受体的一部分;

(d) 是来自被所述工程化细胞靶向的抗原的结构域;或

(e) 包含(a) - (d)的任何组合。

148. 如权利要求147所述的靶向细胞因子构建体,其中由所述工程化细胞表达的所述受体是嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)。

149. 如权利要求148所述的靶向细胞因子构建体,其中所述细胞因子选自:IL-2、IL-7、IL-10、IL-15和IL-21、或其功能片段、或其变体或其任何组合。

150. 如权利要求149所述的靶向细胞因子构建体,其中所述细胞因子是IL-2多肽、或其功能片段或其变体。

151. 如权利要求150所述的靶向细胞因子构建体,其中所述IL-2多肽包含SEQ ID NO:1的序列,具有相对于SEQ ID NO:1的一个或多个氨基酸取代,并且其中所述一个或多个取代包括在选自以下的SEQ ID NO:1的位置处的一个或多个取代:Q11、H16、L18、L19、D20、Q22、R38、F42、K43、Y45、E62、P65、E68、V69、L72、D84、S87、N88、V91、I92、T123、Q126、S127、I129和S130。

152. 如权利要求151所述的靶向细胞因子构建体,其中所述一个或多个取代包括相对于SEQ ID NO:1的F42A或F42K氨基酸取代。

153. 如权利要求151或152所述的靶向细胞因子构建体,其中所述一个或多个取代还包括相对于SEQ ID NO:1的R38A、R38D、R38E、E62Q、E68A、E68Q、E68K或E68R氨基酸取代。

154. 如权利要求151-153中任一项所述的靶向细胞因子构建体,其中所述一个或多个取代还包括相对于SEQ ID NO:1的H16E、H16D、D20N、M23A、M23R、M23K、S87K、S87A、D84L、D84N、D84V、D84H、D84Y、D84R、D84K、N88A、N88G、N88S、N88T、N88R、N88I、N88D、V91A、V91T、V91E、I92A、E95S、E95A、E95R、T123A、T123E、T123K、T123Q、Q126A、Q126S、Q126T、Q126E、S127A、S127E、S127K或S127Q氨基酸取代。

155. 如权利要求151-154中任一项所述的靶向细胞因子构建体,其中所述一个或多个取代还包括与SEQ ID NO:1相比的氨基酸突变C125A。

156. 如权利要求151-155中任一项所述的靶向细胞因子构建体,其中所述IL-2多肽包含与选自SEQ ID No:11-90的序列具有至少约85%同一性的氨基酸序列。

157. 如权利要求150所述的靶向细胞因子构建体,其中所述IL-2多肽包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,具有以下氨基酸取代(相对于SEQ ID NO:1的序列)组中的一个:R38E和F42A;R38D和F42A;F42A和E62Q;R38A和F42K;R38E、F42A和N88S;R38E、F42A和N88A;R38E、F42A和N88G;R38E、F42A和N88D;R38E、F42A和V91E;R38E、F42A和D84H;R38E、F42A和D84K;R38E、F42A和D84R;H16D、R38E和F42A;H16E、R38E和F42A;R38E、F42A和Q126S;R38D、F42A和N88S;R38D、F42A和N88A;R38D、F42A和N88G;R38D、F42A和N88D;R38D、F42A和V91E;R38D、F42A和D84H;R38D、F42A和D84K;R38D、F42A和D84R;H16D、R38D和F42A;H16E、R38D和F42A;R38D、F42A和Q126S;R38A、F42K和N88S;R38A、F42K和N88A;R38A、F42K和N88G;R38A、F42K和N88D;R38A、F42K和V91E;R38A、F42K和D84H;R38A、F42K和D84K;R38A、F42K和D84R;H16D、R38A和F42K;H16E、R38A和F42K;R38A、F42K和Q126S;F42A、E62Q和N88S;F42A、E62Q和N88A;F42A、E62Q和N88G;F42A、E62Q和N88D;F42A、E62Q和V91E;F42A、E62Q和D84H;F42A、E62Q和D84K;F42A、E62Q和D84R;H16D、F42A和E62Q;H16E、F42A和E62Q;F42A、E62Q和Q126S;R38E、F42A和C125A;R38D、F42A和C125A;F42A、E62Q和C125A;R38A、F42K和C125A;R38E、F42A、N88S和C125A;R38E、F42A、N88A和C125A;R38E、F42A、N88G和C125A;R38E、F42A、N88D和C125A;R38E、F42A、V91E和C125A;R38E、F42A、D84H和C125A;R38E、F42A、D84K和C125A;R38E、F42A、D84R和C125A;H16D、R38E、F42A和C125A;H16E、R38E、F42A和C125A;R38E、F42A、C125A和Q126S;R38D、F42A、N88S和C125A;R38D、F42A、N88A和C125A;R38D、F42A、N88G和C125A;R38D、F42A、N88D和C125A;R38D、F42A、V91E和C125A;R38D、F42A、D84H和C125A;R38D、F42A、D84K和C125A;R38D、F42A、D84R和C125A;H16D、R38D、F42A和C125A;H16E、R38D、F42A和C125A;R38D、

F42A、C125A和Q126S;R38A、F42K、N88S和C125A;R38A、F42K、N88G和C125A;R38A、F42K、N88D和C125A;R38A、F42K、N88A和C125A;R38A、F42K、V91E和C125A;R38A、F42K、D84H和C125A;R38A、F42K、D84K和C125A;R38A、F42K、D84R和C125A;H16D、R38A、F42K和C125A;H16E、R38A、F42K和C125A;R38A、F42K、C125A和Q126S;F42A、E62Q、N88S和C125A;F42A、E62Q、N88A和C125A;F42A、E62Q、N88G和C125A;F42A、E62Q、N88D和C125A;F42A、E62Q、V91E和C125A;F42A、E62Q和D84H和C125A;F42A、E62Q和D84K和C125A;F42A、E62Q和D84R和C125A;H16D、F42A和E62Q和C125A;H16E、F42A、E62Q和C125A;F42A、E62Q、C125A和Q126S;F42A、N88S和C125A;F42A、N88A和C125A;F42A、N88G和C125A;F42A、N88D和C125A;F42A、V91E和C125A;F42A、D84H和C125A;F42A、D84K和C125A;F42A、D84R和C125A;H16D、F42A和C125A;H16E、F42A和C125A;以及F42A、C125A和Q126S。

158. 如权利要求149所述的靶向细胞因子构建体,其中所述细胞因子是IL-7多肽,所述IL-7多肽包含SEQ ID NO:91的序列,具有相对于SEQ ID NO:91的一个或多个取代。

159. 如权利要求158所述的靶向细胞因子构建体,其中一个或多个位置中的所述取代选自以下位置:K10、Q11、S14、V15、V18、Q22、L35、N36、D74、L77、L80、K81、E84、I88、R133、Q136、E137、T140和N143以及K144。

160. 如权利要求159所述的靶向细胞因子构建体,其中位置K81和T140中的所述取代是K81A和T140A。

161. 如权利要求149所述的靶向细胞因子构建体,其中所述细胞因子是IL-10多肽,所述IL-10多肽包含SEQ ID NO:95的序列,具有相对于SEQ ID NO:95的一个或多个取代。

162. 如权利要求161所述的靶向细胞因子构建体,其中所述IL-10多肽包含选自SEQ ID 99-112的氨基酸序列。

163. 如权利要求149所述的靶向细胞因子构建体,其中所述细胞因子是IL-21多肽、或其功能片段或其变体。

164. 如权利要求163所述的靶向细胞因子构建体,其中所述IL-21多肽包含SEQ ID NO:115的序列,具有相对于SEQ ID NO:115的一个或多个取代。

165. 如权利要求164所述的靶向细胞因子构建体,其中所述IL-21多肽包含SEQ ID NO:115的序列,或在选自以下位置的一个或多个位置处包含氨基酸取代的序列:R5、I8、R9、R11、Q12、I14、D15、D18、Q19、Y23、R65、S70、K72、K73、K75、R76、K77、S80、Q116和K117,其中位置编号是根据SEQ ID NO:115的氨基酸序列的编号。

166. 如权利要求147-165中任一项所述的靶向细胞因子构建体,其中由所述工程化细胞共表达的所述标签是EGFR_t标签。

167. 如权利要求147-166中任一项所述的靶向细胞因子构建体,其中被所述工程化细胞靶向的所述抗原选自:来自肿瘤相关抗原的新表位、TSHR、CD19、CD123、CD22、CD30、CD171、CS-1、CLL-1、CD33、EGFR_{v111}、GD2、GD3、BCMA、Tn Ag、PSMA、ROR1、FLT3、FAP、TAG72、CD38、CD44_{v6}、CEA、EPCAM、B7H3、KIT、IL-13Ra2、间皮素、IL-11Ra、PSCA、PRSS21、VEGFR2、LewisY、CD24、PDGFR-β、SSEA-4、CD20、叶酸受体α、ERBB2 (Her2/neu)、MUC1、EGFR、NCAM、前列腺酶、PAP、ELF2M、Ephrin B2、IGF-I受体、CAIX、LMP2、gp100、bcr-abl、酪氨酸酶、EphA2、岩藻糖基GM1、sLe^x、GM3、TGS5、HMMAA、o-乙酰基-GD2、叶酸受体β、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、GPCR5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、聚唾液酸、PLAC1、GloboH、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、

ADRB3、PANX3、GPR20、LY6K、OR51 E2、TARP、WT1、NY-ESO-1、LAGE-1a、MAGE-A1、豆荚蛋白、HPV E6、E7、MAGE A1、ETV6-AML、精子蛋白17、XAGE1、Tie 2、MAD-CT-1、MAD-CT-2、Fos相关抗原1、p53、p53突变体、prostet、存活素和端粒酶、PCTA-1/半乳凝素8、MelanA/MART1、Ras突变体、hTERT、肉瘤易位断点、ML-IAP、ERG (TMPRSS2 ETS融合基因)、NA17、PAX3、雄性激素受体、细胞周期蛋白B1、MYCN、RhoC、TRP-2、CYP1 B1、BORIS、SART3、PAX5、OY-TES1、LCK、AKAP-4、SSX2、RAGE-1、人端粒酶逆转录酶、RU1、RU2、肠道羧基酯酶、mut hsp70-2、CD79a、CD79b、CD72、LAIR1、FCAR、LILRA2、CD300LF、CLEC12A、BST2、EMR2、LY75、GPC3、FCRL5或IGLL1。

168. 如权利要求147-167中任一项所述的靶向细胞因子构建体,其中所述工程化细胞包括以下中的至少一种:表达 $\alpha\beta$ T细胞受体的T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、NK T细胞、调节性T细胞、多能干细胞衍生的T细胞或诱导多能干细胞衍生的T细胞、自然杀伤细胞(NK细胞)、多能干细胞衍生的NK细胞或诱导多能干细胞(iPSC)衍生的NK细胞、被工程化以表达嵌合抗原受体的T细胞(CAR-T细胞)、被工程化以表达T细胞受体的T细胞(TCR-T细胞)、CD8阳性T细胞、CD4阳性T细胞、细胞毒性T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞、被工程化以表达嵌合抗原受体的NK细胞(CAR-NK细胞)、被工程化以表达嵌合抗原受体的NK T细胞(CAR-NK T细胞)、髓细胞、造血谱系细胞、造血干祖细胞(HSC)、造血多能祖细胞(MPP)、前T细胞祖细胞、T细胞祖细胞、NK细胞祖细胞。

169. 一种治疗癌症的方法,所述方法包括施用根据权利要求147-168中任一项所述的靶向细胞因子构建体与所述工程化细胞的组合疗法。

170. 如权利要求169所述的方法,其还包括施用另外的治疗剂。

171. 如权利要求169或170所述的方法,其中所述癌症是急性成淋巴细胞性白血病(ALL)(包括非T细胞ALL)、急性髓系白血病、B细胞幼淋巴细胞白血病、B细胞急性淋巴性白血病(“BALL”)、母细胞性浆细胞样树突状细胞肿瘤、伯基特淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性髓细胞性白血病(CML)、慢性髓系白血病、慢性或急性白血病、弥漫大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、毛细胞白血病、霍奇金病、恶性淋巴增殖性疾病、MALT淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、意义未明的单克隆丙种球蛋白病(MGUS)、多发性骨髓瘤、脊髓发育不良和骨髓增生异常综合征、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、浆细胞增殖性疾病(包括无症状骨髓瘤(冒烟型多发性骨髓瘤或惰性骨髓瘤)、浆母细胞淋巴瘤、浆细胞样树突状细胞肿瘤、浆细胞瘤(包括浆细胞病;孤立性骨髓瘤;孤立性浆细胞瘤;髓外浆细胞瘤;和多发性浆细胞瘤)、POEMS综合征(还被称为克罗-深濑综合征;Takatsuki病;和PEP综合征)、原发性纵隔大B细胞淋巴瘤(PMBC)、小细胞或大细胞滤泡性淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤(SMZL)、系统性淀粉状蛋白轻链淀粉样变性、T细胞急性淋巴性白血病(“TALL”)、T细胞淋巴瘤、转化型滤泡性淋巴瘤、或华氏巨球蛋白血症、套细胞淋巴瘤(MCL)、转化型滤泡性淋巴瘤(TFL)、原发性纵隔B细胞淋巴瘤(PMBCL)、多发性骨髓瘤、毛细胞淋巴瘤/白血病、肺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌(NSCL)、细支气管肺泡细胞肺癌、鳞状细胞癌、肺腺癌、肺鳞癌、腹膜癌、头颈癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头部或颈部癌、皮肤或眼内黑色素瘤、甲状腺癌、子宫癌、胃肠癌、卵巢癌、直肠癌、肛门区癌、胃癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、子宫内膜癌、子宫癌、输卵管癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金病、食管癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、膀胱癌、肾癌或输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、间皮瘤、膀胱癌、肝癌、肝癌、肝细胞癌、子宫颈癌、唾液腺癌、胆管癌、中枢神经系统

(CNS) 肿瘤、脊椎轴肿瘤、脑干胶质瘤、多形性胶质母细胞瘤、星形细胞瘤、神经鞘瘤、室管膜瘤、髓母细胞瘤、脑膜瘤、鳞状细胞癌、垂体腺瘤和尤文肉瘤, 包括以上癌症中任一种的难治性形式或以上癌症中一种或多种的组合。

172. 一种药物组合物: 其包含根据权利要求147-168中任一项所述的靶向细胞因子构建体, 以及药学上可接受的赋形剂、载剂、或稀释剂或其任何组合中的至少一种。

173. 如权利要求172所述的药物组合物, 其还包含工程化细胞群体。

174. 一种细胞疗法试剂盒, 其具有包含根据权利要求147-168中任一项所述的靶向细胞因子构建体的药物组合物以及指定用于向对象施用所述靶向细胞因子构建体的说明书。

175. 如权利要求174所述的细胞疗法试剂盒, 其还包括包含工程化细胞群体的药物组合物以及指定用于向所述对象施用所述工程化细胞群体的说明书。

176. 如权利要求175所述的细胞疗法试剂盒, 其中包含所述靶向细胞因子构建体的所述药物组合物和包含所述工程化细胞群体的所述药物组合物用于顺序或同时施用。

用于工程化细胞疗法的靶向细胞因子构建体

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2020年12月9日提交的美国临时申请号63/123,281的权益,所述临时申请通过引用整体并入本文。

发明内容

[0003] 一个实施方案提供了一种具有工程化细胞的靶向细胞因子构建体,所述靶向细胞因子构建体包含:细胞结合结构域,所述细胞结合结构域靶向以下中的至少一种:(i) 外源性地引入所述工程化细胞中的嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)的结构域;(ii) 选择性地地在所述工程化细胞的表面上表达的标签分子;(iii) 作为外源性地引入所述工程化细胞中的CAR的一部分的多肽标签;(iv) 作为外源性地引入所述工程化细胞中的TCR的一部分的多肽标签;或(vi) (i) - (v)的任何组合;以及细胞因子蛋白或其功能片段或变体。

[0004] 在一些实施方案中,与非工程化细胞的激活相比,所述靶向细胞因子构建体以10倍或更大的效力选择性地激活所述工程化细胞。在一些实施方案中,所述效力通过pSTAT5或pSTAT3激活测定来测量。在一些实施方案中,所述CAR的所述结构域是scFv。在一些实施方案中,所述非工程化细胞在其表面上不表达所述CAR、所述TCR或所述标签分子。在一些实施方案中,所述细胞结合结构域包含抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段是二价的或单价的。在一些实施方案中,所述细胞因子选自:IL-2、IL-7、IL-10、IL-15和IL-21、或其功能片段、或其变体或其任何组合。在一些实施方案中,所述细胞因子是IL-2多肽、或其功能片段或其变体。在一些实施方案中,与具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的野生型IL-2多肽的结合亲和力相比,所述IL-2多肽表现出的对于具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的IL-2R α 多肽的结合亲和力降低至少约50%。在一些实施方案中,与具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的野生型IL-2多肽的结合亲和力相比,所述IL-2多肽表现出的对于具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2R β 多肽的结合亲和力降低至少约50%,和/或对于具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的IL-2R γ 多肽的结合亲和力降低至少约50%。在一些实施方案中,所述IL-2多肽包含SEQ ID NO:1的序列,具有相对于SEQ ID NO:1的一个或多个氨基酸取代,并且其中所述一个或多个取代包括在选自以下的SEQ ID NO:1的位置处的一个或多个取代:Q11、H16、L18、L19、D20、Q22、R38、F42、K43、Y45、E62、P65、E68、V69、L72、D84、S87、N88、V91、I92、T123、Q126、S127、I129和S130。在一些实施方案中,所述一个或多个取代包括相对于SEQ ID NO:1的F42A或F42K氨基酸取代。在一些实施方案中,所述一个或多个取代还包括相对于SEQ ID NO:1的R38A、R38D、R38E、E62Q、E68A、E68Q、E68K或E68R氨基酸取代。在一些实施方案中,所述一个或多个取代还包括相对于SEQ ID NO:1的H16E、H16D、D20N、M23A、M23R、M23K、S87K、S87A、D84L、D84N、D84V、D84H、D84Y、D84R、D84K、N88A、N88G、N88S、N88T、N88R、N88I、N88D、V91A、V91T、V91E、I92A、E95S、E95A、E95R、T123A、T123E、T123K、T123Q、Q126A、Q126S、Q126T、Q126E、S127A、S127E、S127K或S127Q氨基酸取代。在一些实施方案中,所述一个或多个取代还包括与SEQ ID NO:1相比的氨基酸突变C125A。在一些实施方案中,所述IL-2多肽包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,具有以下氨基酸取代(相对于

SEQ ID NO:1的序列)组中的一个:R38E和F42A;R38D和F42A;F42A和E62Q;R38A和F42K;R38E、F42A和N88S;R38E、F42A和N88A;R38E、F42A和N88G;R38E、F42A和N88D;R38E、F42A和V91E;R38E、F42A和D84H;R38E、F42A和D84K;R38E、F42A和D84R;H16D、R38E和F42A;H16E、R38E和F42A;R38E、F42A和Q126S;R38D、F42A和N88S;R38D、F42A和N88A;R38D、F42A和N88G;R38D、F42A和N88D;R38D、F42A和V91E;R38D、F42A和D84H;R38D、F42A和D84K;R38D、F42A和D84R;H16D、R38D和F42A;H16E、R38D和F42A;R38D、F42A和Q126S;R38A、F42K和N88S;R38A、F42K和N88A;R38A、F42K和N88G;R38A、F42K和N88D;R38A、F42K和V91E;R38A、F42K和D84H;R38A、F42K和D84K;R38A、F42K和D84R;H16D、R38A和F42K;H16E、R38A和F42K;R38A、F42K和Q126S;F42A、E62Q和N88S;F42A、E62Q和N88A;F42A、E62Q和N88G;F42A、E62Q和N88D;F42A、E62Q和V91E;F42A、E62Q和D84H;F42A、E62Q和D84K;F42A、E62Q和D84R;H16D、F42A和E62Q;H16E、F42A和E62Q;F42A、E62Q和Q126S;R38E、F42A和C125A;R38D、F42A和C125A;F42A、E62Q和C125A;R38A、F42K和C125A;R38E、F42A、N88S和C125A;R38E、F42A、N88A和C125A;R38E、F42A、N88G和C125A;R38E、F42A、N88D和C125A;R38E、F42A、V91E和C125A;R38E、F42A、D84H和C125A;R38E、F42A、D84K和C125A;R38E、F42A、D84R和C125A;H16D、R38E、F42A和C125A;H16E、R38E、F42A和C125A;R38E、F42A、C125A和Q126S;R38D、F42A、N88S和C125A;R38D、F42A、N88A和C125A;R38D、F42A、N88G和C125A;R38D、F42A、N88D和C125A;R38D、F42A、V91E和C125A;R38D、F42A、D84H和C125A;R38D、F42A、D84K和C125A;R38D、F42A、D84R和C125A;H16D、R38D、F42A和C125A;H16E、R38D、F42A和C125A;R38D、F42A、C125A和Q126S;R38A、F42K、N88S和C125A;R38A、F42K、N88G和C125A;R38A、F42K、N88D和C125A;R38A、F42K、N88A和C125A;R38A、F42K、V91E和C125A;R38A、F42K、D84H和C125A;R38A、F42K、D84K和C125A;R38A、F42K、D84R和C125A;H16D、R38A、F42K和C125A;H16E、R38A、F42K和C125A;R38A、F42K、C125A和Q126S;F42A、E62Q、N88S和C125A;F42A、E62Q、N88A和C125A;F42A、E62Q、N88G和C125A;F42A、E62Q、N88D和C125A;F42A、E62Q、V91E和C125A;F42A、E62Q和D84H和C125A;F42A、E62Q和D84K和C125A;F42A、E62Q和D84R和C125A;H16D、F42A和E62Q和C125A;H16E、F42A、E62Q和C125A;F42A、E62Q、C125A和Q126S;F42A、N88S和C125A;F42A、N88A和C125A;F42A、N88G和C125A;F42A、N88D和C125A;F42A、V91E和C125A;F42A、D84H和C125A;F42A、D84K和C125A;F42A、D84R和C125A;H16D、F42A和C125A;H16E、F42A和C125A;以及F42A、C125A和Q126S。在一些实施方案中,所述IL-2多肽包含与选自SEQ ID No:11-90的序列具有至少约85%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述IL-2多肽包含与选自SEQ ID No.43、48、52、49和156的序列具有至少约75%同一性的序列。

[0005] 在一些实施方案中,所述细胞因子是IL-7多肽、或其功能片段或其变体。在一些实施方案中,与包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的野生型IL-7多肽对于包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的IL-7Ra多肽的结合亲和力相比,所述IL-7多肽表现出的对于所述IL-7Ra多肽的结合亲和力降低至少约50%。在一些实施方案中,与包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的野生型IL-7多肽对于包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的IL-2Rg多肽的结合亲和力相比,所述IL-7多肽表现出的对于所述IL-2Rg多肽的结合亲和力降低至少约50%。在一些实施方案中,所述IL-7多肽包含SEQ ID NO:91的序列,具有相对于SEQ ID NO:91的一个或多个取代。在一些实施方案中,所述一个或多个取代在选自以下位置的位置处:K10、Q11、S14、V15、V18、Q22、L35、N36、D74、L77、L80、K81、E84、I88、R133、Q136、E137、T140和N143以及K144。在

一些实施方案中,位置K81中的取代是K81A,并且位置T140中的取代是K140A。在一些实施方案中,所述细胞因子是IL-10多肽、或其功能片段或其变体。在一些实施方案中,与包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的野生型IL-10多肽对于包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列的IL-10RA多肽的结合亲和力相比,所述IL-10多肽表现出的对于所述IL-10RA多肽的结合亲和力降低至少约50%。在一些实施方案中,与包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的野生型IL-10多肽对于包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列的IL-10RB多肽的结合亲和力相比,所述IL-10多肽表现出的对于所述IL-10RB多肽的结合亲和力增加至少约50%。在一些实施方案中,所述IL-10多肽包含SEQ ID NO:95的序列,具有相对于SEQ ID NO:95的一个或多个取代。在一些实施方案中,所述IL-10多肽包含选自SEQ ID 99-112的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述细胞因子是IL-21多肽、或其功能片段或其变体。在一些实施方案中,与包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的野生型IL-21多肽对于包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的IL-21R多肽的结合亲和力相比,所述IL-21多肽表现出的对于所述IL-21R多肽的结合亲和力降低至少约50%。在一些实施方案中,与包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的野生型IL-21多肽对于包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的IL-2Rg多肽的结合亲和力相比,所述IL-21多肽表现出的对于所述IL-2Rg多肽的结合亲和力降低至少约50%。在一些实施方案中,所述IL-21多肽包含SEQ ID NO:115的序列,具有相对于SEQ ID NO:115的一个或多个取代。在一些实施方案中,一个或多个位置中的所述取代选自以下位置:R5、I8、R9、R11、Q12、I14、D15、D18、Q19、Y23、R65、S70、K72、K73、K75、R76、K77、S80、Q116和K117,其中位置编号是根据SEQ ID NO:115的氨基酸序列的编号。

[0006] 在一些实施方案中,所述工程化细胞包括以下中的至少一种:表达T细胞受体的T细胞(TCR-T细胞)、 $\gamma\delta$ T细胞、多能干细胞衍生的T细胞或诱导多能干细胞衍生的T细胞、自然杀伤细胞(NK细胞)、多能干细胞衍生的NK细胞或诱导多能干细胞(iPSC)衍生的NK细胞、被工程化以表达嵌合抗原受体的T细胞(CAR-T细胞)、CD8阳性T细胞、CD4阳性T细胞、细胞毒性T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞、CAR-NK细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、髓细胞、造血谱系细胞、造血干祖细胞(HSC)、造血多能祖细胞(MPP)、前T细胞祖细胞、T细胞祖细胞、NK细胞祖细胞。在一些实施方案中,所述靶向细胞因子构建体适用于与包括所述工程化细胞的治疗组合施用于对象。在一些实施方案中,所述工程化细胞是所述对象自体的。在一些实施方案中,所述工程化细胞对于所述对象是同种异体的。在一些实施方案中,所述对象是人。在一些实施方案中,所述对象患有癌症。在一些实施方案中,所述癌症是急性成淋巴细胞性白血病(ALL)(包括非T细胞ALL)、急性髓系白血病、B细胞幼淋巴细胞白血病、B细胞急性淋巴性白血病(“BALL”)、母细胞性浆细胞样树突状细胞肿瘤、伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性髓细胞性白血病(CML)、慢性髓系白血病、慢性或急性白血病、弥漫大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、毛细胞白血病、霍奇金病(Hodgkin's Disease)、恶性淋巴增殖性疾病、MALT淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、意义未明的单克隆丙种球蛋白病(MGUS)、多发性骨髓瘤、脊髓发育不良和骨髓增生异常综合征、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、浆细胞增殖性疾病(包括无症状骨髓瘤(冒烟型多发性骨髓瘤或惰性骨髓瘤)、浆母细胞淋巴瘤、浆细胞样树突状细胞肿瘤、浆细胞瘤(包括浆细胞病;孤立性骨髓瘤;孤立性浆细胞瘤;髓外浆细胞瘤;和多发性浆细胞瘤)、POEMS综合征(还被称为克罗-深濑综合征(Crow-Fukase syndrome);Takatsuki病;和PEP综合征)、原发性纵隔大B细胞淋巴瘤(PMBCL)、小细

胞或大细胞滤泡性淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤 (SMZL)、系统性淀粉状蛋白轻链淀粉样变性、T 细胞急性淋巴性白血病 (“TALL”)、T 细胞淋巴瘤、转化型滤泡性淋巴瘤、或华氏巨球蛋白血症、套细胞淋巴瘤 (MCL)、转化型滤泡性淋巴瘤 (TFL)、原发性纵隔 B 细胞淋巴瘤 (PMBCL)、多发性骨髓瘤、毛细胞淋巴瘤/白血病、肺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌 (NSCL)、细支气管肺泡细胞肺癌、鳞状细胞癌、肺腺癌、肺鳞癌、腹膜癌、头颈癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头部或颈部癌、皮肤或眼内黑色素瘤、甲状腺癌、子宫癌、胃肠癌、卵巢癌、直肠癌、肛门区癌、胃癌 (stomach cancer)、胃癌 (gastric cancer)、结肠癌、乳腺癌、子宫内膜癌、子宫癌、输卵管癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金病、食管癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、膀胱癌、肾癌或输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、间皮瘤、膀胱癌、肝癌 (liver cancer)、肝癌 (hepatoma)、肝细胞癌、子宫颈癌、唾液腺癌、胆管癌、中枢神经系统 (CNS) 肿瘤、脊椎轴肿瘤、脑干胶质瘤、多形性胶质母细胞瘤、星形细胞瘤、神经鞘瘤、室管膜瘤、髓母细胞瘤、脑膜瘤、鳞状细胞癌、垂体腺瘤和尤文肉瘤 (Ewings sarcoma), 包括以上癌症中任一种的难治性形式或以上癌症中一种或多种的组合。

[0007] 一个实施方案提供了一种药物组合物: 其包含根据本公开的靶向细胞因子构建体, 以及药学上可接受的赋形剂、载剂、或稀释剂或其任何组合中的至少一种。在一些实施方案中, 所述药物组合物还包含工程化细胞群体。一个实施方案提供了一种细胞疗法试剂盒, 其包括包含根据本公开的靶向细胞因子构建体的药物组合物以及指定用于向对象施用所述靶向细胞因子构建体的说明书。在一些实施方案中, 所述细胞疗法试剂盒还包括包含所述工程化细胞群体的药物组合物以及指定用于向所述对象施用所述工程化细胞群体的说明书。在一些实施方案中, 包含所述靶向细胞因子构建体的所述药物组合物和包含所述工程化细胞群体的所述药物组合物用于顺序或同时施用。

[0008] 一个实施方案提供了一种治疗对象的病状的方法, 所述方法包括向所述对象施用治疗方案, 所述治疗方案包括: (a) 工程化细胞和 (b) 靶向细胞因子构建体, 所述靶向细胞因子构建体包含: (i) 结合外源性地引入所述工程化细胞中的受体或结构域的细胞结合结构域; 和 (ii) 细胞因子蛋白或其功能片段或变体。

[0009] 在一些实施方案中, 与非工程化细胞群体的激活相比, 所述靶向细胞因子构建体以 10 倍或更大的效力选择性地激活工程化细胞群体。在一些实施方案中, 与非工程化细胞群体的激活相比, 施用所述靶向细胞因子构建体导致工程化细胞群体的激活增加。在一些实施方案中, 所述激活通过 pSTAT5 或 pSTAT3 激活测定来测量。在一些实施方案中, 与非工程化细胞群体的扩增和/或增殖相比, 施用所述靶向细胞因子构建体导致工程化细胞群体的扩增和/或增殖增加。在一些实施方案中, 与非工程化细胞群体的体内持久性相比, 施用所述靶向细胞因子构建体导致工程化细胞群体的体内持久性增加。在一些实施方案中, 所述非工程化细胞不表达 CAR、TCR 或标签分子。在一些实施方案中, 与不施用所述靶向细胞因子构建体时工程化细胞群体的激活、扩增和/或增殖相比, 施用所述靶向细胞因子构建体导致所述工程化细胞群体的激活、扩增和/或增殖增加。在一些实施方案中, 所述扩增和/或增殖是在体内或体外。在一些实施方案中, 与不施用所述靶向细胞因子构建体时工程化细胞群体的体内持久性相比, 施用所述靶向细胞因子构建体导致所述工程化细胞群体的体内持久性增加。在一些实施方案中, 所述工程化细胞群体的体内持久性包括约 15 天、约 30 天至约一

年的时间段。在一些实施方案中,与不施用所述靶向细胞因子构建体时工程化细胞群体的耗竭速率和/或程度相比,施用所述靶向细胞因子构建体降低所述工程化细胞群体的耗竭速率和/或程度。在一些实施方案中,与施用非靶向细胞因子或其功能片段或变体时工程化细胞群体的特异性富集相比,施用所述靶向细胞因子构建体导致所述工程化细胞的选择性强化,从而允许增强所述工程化细胞群体的特异性富集。在一些实施方案中,与从施用非靶向细胞因子或其功能片段或变体的对象分离的生物样品中Treg细胞的计数相比,施用所述靶向细胞因子构建体不增加从所述对象分离的生物样品中Treg细胞的计数。在一些实施方案中,所述生物样品是肿瘤活检或外周血中的至少一种。在一些实施方案中,所述对象先前已经施用了预调理方案。在一些实施方案中,施用所述靶向细胞因子构建体允许降低所述预调理方案的严重程度或持续时间中的至少一种。在一些实施方案中,所述预调理方案用于减少内源性淋巴细胞群体,以便允许所述工程化细胞群体扩增。在一些实施方案中,所述预调理方案包括施用淋巴清除剂(lymphodepletion agent)。在一些实施方案中,施用所述靶向细胞因子构建体降低用于植入所述工程化细胞所需的淋巴清除的程度。在一些实施方案中,所述预调理方案涉及向所述对象施用化疗剂。在一些实施方案中,所述化疗剂是氟达拉滨和环磷酰胺中的至少一种。在一些实施方案中,所述预调理方案包括辐射处理。在一些实施方案中,所述预调理方案包括施用清除抗体。在一些实施方案中,所述清除抗体是阿仑单抗(alemtuzumab)。在一些实施方案中,所述对象未施用预调理方案。

[0010] 一个实施方案提供了一种消除对于在施用工程化细胞疗法之前施用预调理方案或最小化所述预调理方案的严重程度的需要的方法,所述方法包括向对象施用治疗方案,所述治疗方案包括:(a)工程化细胞;和(b)靶向细胞因子构建体,所述靶向细胞因子构建体包含:(i)结合外源地引入所述工程化细胞中的受体或结构域的细胞结合结构域;和(ii)细胞因子蛋白或其功能片段或变体。

[0011] 在一些实施方案中,所述对象未施用预调理方案。在一些实施方案中,与非工程化细胞的激活相比,所述靶向细胞因子构建体以10倍或更大的效力选择性地激活工程化细胞。在一些实施方案中,所述激活通过pSTAT5或pSTAT3激活测定来测量。在一些实施方案中,所述非工程化细胞不包含外源地引入所述细胞中的受体或结构域。在一些实施方案中,所述靶向细胞因子构建体在施用所述工程化细胞后在或在约2天、3天、6天、12天、15天、30天、60天或90天或更长时间内施用。在一些实施方案中,所述靶向细胞因子构建体与施用所述工程化细胞同时施用。在一些实施方案中,所述治疗方案中工程化细胞的有效剂量低于包括施用工程化细胞但不包括施用靶向细胞因子构建体的参考治疗方案中工程化细胞的有效剂量。

[0012] 在一些实施方案中,所述治疗方案中工程化细胞的有效剂量比参考治疗方案中工程化细胞的有效剂量低至少约1.5倍至约1000倍。

[0013] 一个实施方案提供了一种增加工程化细胞疗法在对象中的功效的方法,所述方法包括向对象施用治疗方案,从而增加所述工程化细胞疗法在所述对象中的功效,所述治疗方案包括:(a)工程化细胞;和(b)靶向细胞因子构建体,所述靶向细胞因子构建体包含:(i)结合外源地引入所述工程化细胞中的受体或结构域的细胞结合结构域;和(ii)细胞因子蛋白或其功能片段或变体。

[0014] 在一些实施方案中,与非工程化细胞的激活相比,所述靶向细胞因子构建体以10

倍或更大的效力选择性地激活工程化细胞。在一些实施方案中,所述非工程化细胞不包含外源性地引入所述细胞中的受体或结构域。在一些实施方案中,其中所述效力通过pSTAT5激活测定来测量。

[0015] 一个实施方案提供了一种治疗经历B细胞发育不全的损失的对象的方法,所述方法包括向所述对象施用靶向细胞因子构建体,所述靶向细胞因子构建体包含:(i)结合外源性地引入工程化细胞中的受体或结构域的细胞结合结构域;和(ii)细胞因子蛋白或其功能片段或变体。

[0016] 一个实施方案提供了一种治疗病状或疾病的方法,所述方法包括向所述对象施用治疗方案,所述治疗方案包括:(a)工程化细胞;和(b)靶向细胞因子构建体,所述靶向细胞因子构建体包含:(i)结合外源性地引入所述工程化细胞中的受体或结构域的细胞结合结构域;和(ii)细胞因子蛋白或其功能片段或变体,其中施用所述靶向细胞因子构建体允许相对于包括施用工程化细胞但不包括靶向细胞因子构建体的参考治疗方案中工程化细胞的有效剂量,降低所述治疗方案中工程化细胞的有效剂量。

[0017] 在一些实施方案中,所述治疗方案中工程化细胞的有效剂量比参考治疗方案中工程化细胞的有效剂量低至少约1.5倍至约1000倍。在一些实施方案中,所述工程化细胞在组合物中提供,并且其中所述组合物在即时医护时生成并且在不培养细胞群体的情况下施用于患者。一个实施方案提供了一种靶向对象中的工程化细胞的方法,所述方法包括向所述对象施用靶向细胞因子构建体,所述靶向细胞因子构建体包含细胞结合结构域和经修饰的细胞因子或其功能片段或变体,其中所述工程化细胞表达(i)所述经修饰的细胞因子或其功能片段或变体的受体和(ii)所述细胞结合结构域的靶抗原。一个实施方案提供了一种富集对象中的工程化细胞群体的方法,所述方法包括向所述对象施用靶向细胞因子构建体,所述靶向细胞因子构建体包含细胞结合结构域和经修饰的细胞因子或其功能片段或变体,其中所述工程化细胞表达(i)所述经修饰的细胞因子或其功能片段或变体的受体和(ii)所述细胞结合结构域的靶抗原。

[0018] 在一些实施方案中,所述工程化细胞在所述对象体内生成。在一些实施方案中,所述对象先前已经施用了核酸载剂,所述核酸载剂包含表达嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体蛋白(TCR)的核酸。在一些实施方案中,所述核酸载剂是以下中的至少一种:线性多核苷酸、与离子或两亲性化合物缔合的多核苷酸、质粒和病毒。在一些实施方案中,所述核酸载剂是纳米载剂。在一些实施方案中,所述核酸载剂是病毒载体,其中所述病毒载体是以下中的至少一种:仙台病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体或慢病毒载体。在一些实施方案中,所述核酸是DNA或RNA。在一些实施方案中,所述RNA是信使RNA(mRNA)。在一些实施方案中,所述核酸载剂还包含用于靶向免疫细胞的靶向部分。在一些实施方案中,所述免疫细胞包括髓细胞、T细胞或NK细胞。在一些实施方案中,所述T细胞包括T淋巴细胞。在一些实施方案中,所述T细胞或所述NK细胞由所述载体或所述核酸载剂诱导,以在所述对象体内生成工程化细胞。在一些实施方案中,与所述对象不施用所述靶向细胞因子构建体时体内生成的工程化细胞群体的激活、扩增和/或增殖相比,施用所述靶向细胞因子构建体导致体内生成的工程化细胞群体的激活、扩增和/或增殖增加。

[0019] 在一些实施方案中,与所述对象不施用所述靶向细胞因子构建体时体内生成的工程化细胞群体的持久性相比,施用所述靶向细胞因子构建体导致体内生成的工程化细胞群

体的持久性增加。在一些实施方案中,与不施用所述靶向细胞因子构建体时体内生成的工程化细胞群体的耗竭速率和/或程度相比,施用所述靶向细胞因子构建体降低体内生成的工程化细胞群体的耗竭速率和/或程度。在一些实施方案中,与施用非靶向细胞因子或其功能片段或变体时工程化细胞群体的特异性富集相比,施用所述靶向细胞因子构建体导致体内生成的工程化细胞的选择性强化,从而允许增强体内生成的工程化细胞群体的特异性富集。在一些实施方案中,与从施用非靶向细胞因子或其功能片段或变体的对象分离的生物样品中Treg细胞的计数相比,施用所述靶向细胞因子构建体不增加从所述对象分离的生物样品中Treg细胞的计数。在一些实施方案中,所述生物样品是肿瘤活检或外周血中的至少一种。在一些实施方案中,所述工程化细胞群体的持久性包括至少约30天至约一年的时间段。

[0020] 一个实施方案提供了一种富集工程化细胞群体的方法,所述方法包括使所述工程化细胞群体与靶向细胞因子构建体接触,所述靶向细胞因子构建体包含细胞结合结构域和经修饰的细胞因子或其功能片段或变体,其中所述工程化细胞表达 (i) 所述经修饰的细胞因子或其功能片段或变体的受体和 (ii) 所述细胞结合结构域的靶抗原。在一些实施方案中,所述细胞因子选自: IL-2、IL-7、IL-10、IL-15和IL-21、或其功能片段、或其变体或其任何组合。在一些实施方案中,所述细胞因子是以下中的至少一种: (i) 结合和/或激活包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2R β 多肽的IL-2R γ 激动剂多肽;和(ii) 结合和/或激活包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的IL-2R γ 多肽的IL-2R β 激动剂多肽。在一些实施方案中,所述细胞因子是IL-2多肽、或其功能片段或其变体。在一些实施方案中,如权利要求114所述的方法,其中与包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的野生型IL-2多肽对于包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的IL-2R α 多肽的结合亲和力相比,所述IL-2多肽表现出的对于所述IL-2R α 多肽的结合亲和力降低至少约50%。在一些实施方案中,与包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的野生型IL-2多肽对于包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2R β 多肽的结合亲和力相比,所述IL-2多肽表现出的对于所述IL-2R β 多肽的结合亲和力降低至少约50%,和/或对于包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的IL-2R γ 多肽的结合亲和力降低至少约50%。在一些实施方案中,所述细胞因子是IL-7多肽,与包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的野生型IL-7多肽对于包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的IL-7R α 多肽的结合亲和力相比,所述IL-7多肽表现出的对于所述IL-7R α 多肽的结合亲和力降低至少约50%。在一些实施方案中,与包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的野生型IL-7多肽对于包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的IL-2R γ 多肽的结合亲和力相比,所述IL-7多肽表现出的对于所述IL-2R γ 多肽的结合亲和力降低50%或更多。在一些实施方案中,所述细胞因子是IL-10多肽,与包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的野生型IL-10多肽对于包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列的IL-10R α 多肽的结合亲和力相比,所述IL-10多肽表现出的对于所述IL-10R α 多肽的结合亲和力降低至少约50%。在一些实施方案中,与包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列的野生型IL-10多肽对于包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列的IL-10R β 多肽的结合亲和力相比,所述IL-10多肽表现出的对于所述IL-10R β 多肽的结合亲和力增加至少约50%。在一些实施方案中,所述细胞因子是IL-21多肽,与包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的野生型IL-21多肽对于包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的IL-21R多肽的结合亲和力相比,所述IL-21多肽表现出的对于所述IL-21R多肽的结合亲和力降低50%或更多。在一些实施方案中,与包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的野

生型IL-21多肽对于包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的IL-2R α 多肽的结合亲和力相比,所述IL-21多肽表现出的对于所述IL-2R α 多肽的结合亲和力降低至少约50%。在一些实施方案中,所述细胞因子是IL-2多肽,所述IL-2多肽包含SEQ ID NO:1的序列,具有相对于SEQ ID NO:1的一个或多个氨基酸取代,并且其中所述一个或多个取代包括在选自以下的SEQ ID NO:1的位置处的一个或多个取代:Q11、H16、L18、L19、D20、Q22、R38、F42、K43、Y45、E62、P65、E68、V69、L72、D84、S87、N88、V91、I92、T123、Q126、S127、I129和S130。在一些实施方案中,所述一个或多个取代包括相对于SEQ ID NO:1的F42A或F42K氨基酸取代。在一些实施方案中,所述一个或多个取代还包括相对于SEQ ID NO:1的R38A、R38D、R38E、E62Q、E68A、E68Q、E68K或E68R氨基酸取代。在一些实施方案中,所述一个或多个取代还包括相对于SEQ ID NO:1的H16E、H16D、D20N、M23A、M23R、M23K、S87K、S87A、D84L、D84N、D84V、D84H、D84Y、D84R、D84K、N88A、N88G、N88S、N88T、N88R、N88I、N88D、V91A、V91T、V91E、I92A、E95S、E95A、E95R、T123A、T123E、T123K、T123Q、Q126A、Q126S、Q126T、Q126E、S127A、S127E、S127K或S127Q氨基酸取代。在一些实施方案中,所述一个或多个取代还包括与SEQ ID NO:1相比的氨基酸突变C125A。在一些实施方案中,所述细胞因子是IL-2多肽,所述IL-2多肽包含与选自SEQ ID No:11-90的序列具有至少约85%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述细胞因子是IL-2多肽,所述IL-2多肽包含与选自SEQ ID NO:43、48、52、49和156的序列具有至少约85%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述细胞因子是IL-2多肽,所述IL-2多肽包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,具有以下氨基酸取代(相对于SEQ ID NO:1的序列)组中的一个:R38E和F42A;R38D和F42A;F42A和E62Q;R38A和F42K;R38E、F42A和N88S;R38E、F42A和N88A;R38E、F42A和N88G;R38E、F42A和N88D;R38E、F42A和V91E;R38E、F42A和D84H;R38E、F42A和D84K;R38E、F42A和D84R;H16D、R38E和F42A;H16E、R38E和F42A;R38E、F42A和Q126S;R38D、F42A和N88S;R38D、F42A和N88A;R38D、F42A和N88G;R38D、F42A和N88D;R38D、F42A和V91E;R38D、F42A和D84H;R38D、F42A和D84K;R38D、F42A和D84R;H16D、R38D和F42A;H16E、R38D和F42A;R38D、F42A和Q126S;R38A、F42K和N88S;R38A、F42K和N88A;R38A、F42K和N88G;R38A、F42K和N88D;R38A、F42K和V91E;R38A、F42K和D84H;R38A、F42K和D84K;R38A、F42K和D84R;H16D、R38A和F42K;H16E、R38A和F42K;R38A、F42K和Q126S;F42A、E62Q和N88S;F42A、E62Q和N88A;F42A、E62Q和N88G;F42A、E62Q和N88D;F42A、E62Q和V91E;F42A、E62Q和D84H;F42A、E62Q和D84K;F42A、E62Q和D84R;H16D、F42A和E62Q;H16E、F42A和E62Q;F42A、E62Q和Q126S;R38E、F42A和C125A;R38D、F42A和C125A;F42A、E62Q和C125A;R38A、F42K和C125A;R38E、F42A、N88S和C125A;R38E、F42A、N88A和C125A;R38E、F42A、N88G和C125A;R38E、F42A、N88D和C125A;R38E、F42A、V91E和C125A;R38E、F42A、D84H和C125A;R38E、F42A、D84K和C125A;R38E、F42A、D84R和C125A;H16D、R38E、F42A和C125A;H16E、R38E、F42A和C125A;R38E、F42A、C125A和Q126S;R38D、F42A、N88S和C125A;R38D、F42A、N88A和C125A;R38D、F42A、N88G和C125A;R38D、F42A、N88D和C125A;R38D、F42A、V91E和C125A;R38D、F42A、D84H和C125A;R38D、F42A、D84K和C125A;R38D、F42A、D84R和C125A;H16D、R38D、F42A和C125A;H16E、R38D、F42A和C125A;R38D、F42A、C125A和Q126S;R38A、F42K、N88S和C125A;R38A、F42K、N88G和C125A;R38A、F42K、N88D和C125A;R38A、F42K、N88A和C125A;R38A、F42K、V91E和C125A;R38A、F42K、D84H和C125A;R38A、F42K、D84K和C125A;R38A、F42K、D84R和C125A;H16D、R38A、F42K和C125A;H16E、R38A、F42K和C125A;R38A、F42K、C125A和Q126S;F42A、E62Q、N88S和C125A;F42A、E62Q、N88A和

C125A;F42A、E62Q、N88G和C125A;F42A、E62Q、N88D和C125A;F42A、E62Q、V91E和C125A;F42A、E62Q和D84H和C125A;F42A、E62Q和D84K和C125A;F42A、E62Q和D84R和C125A;H16D、F42A和E62Q和C125A;H16E、F42A、E62Q和C125A;F42A、E62Q、C125A和Q126S;F42A、N88S和C125A;F42A、N88A和C125A;F42A、N88G和C125A;F42A、N88D和C125A;F42A、V91E和C125A;F42A、D84H和C125A;F42A、D84K和C125A;F42A、D84R和C125A;H16D、F42A和C125A;H16E、F42A和C125A;以及F42A、C125A和Q126S。

[0021] 在一些实施方案中,所述细胞因子是IL-7多肽、或其功能片段或变体。在一些实施方案中,所述IL-7多肽包含SEQ ID NO:91的序列,具有相对于SEQ ID NO:91的一个或多个取代。在一些实施方案中,一个或多个位置中的所述取代选自以下位置:K10、Q11、S14、V15、V18、Q22、L35、N36、D74、L77、L80、K81、E84、I88、R133、Q136、E137、T140和N143以及K144。在一些实施方案中,位置K81中的取代是K81A,并且位置T140中的取代是K140A。在一些实施方案中,所述细胞因子是IL-10多肽、或其功能片段或变体。在一些实施方案中,所述IL-10多肽包含SEQ ID NO:95的序列,具有相对于SEQ ID NO:95的一个或多个取代。在一些实施方案中,所述突变体IL-10多肽包含选自SEQ ID 99-112的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述细胞因子是IL-21多肽、或其功能片段或其变体。在一些实施方案中,所述IL-21多肽包含SEQ ID NO:115的序列,具有相对于SEQ ID NO:115的一个或多个取代。在一些实施方案中,一个或多个位置中的所述取代选自以下位置:R5、I8、R9、R11、Q12、I14、D15、D18、Q19、Y23、R65、S70、K72、K73、K75、R76、K77、S80、Q116和K117,其中位置编号是根据SEQ ID NO:115的氨基酸序列的编号。

[0022] 在一些实施方案中,所述工程化细胞包括以下中的至少一种:表达T细胞受体的T细胞(TCR-T细胞)、 γ δ T细胞、多能干细胞衍生的T细胞或诱导多能干细胞衍生的T细胞、自然杀伤细胞(NK细胞)、多能干细胞衍生的NK细胞或诱导多能干细胞(iPSC)衍生的NK细胞、被工程化以表达嵌合抗原受体的T细胞(CAR-T细胞)、CD8阳性T细胞、CD4阳性T细胞、细胞毒性T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞、CAR-NK细胞、 γ δ T细胞、髓细胞、造血谱系细胞、造血干祖细胞(HSC)、造血多能祖细胞(MPP)、前T细胞祖细胞、T细胞祖细胞、NK细胞祖细胞。

[0023] 在一些实施方案中,所述工程化细胞是所述对象自体的。在一些实施方案中,所述工程化细胞对于所述对象是同种异体的。在一些实施方案中,所述对象是人。在一些实施方案中,所述对象患有癌症。在一些实施方案中,所述癌症是急性成淋巴细胞性白血病(ALL)(包括非T细胞ALL)、急性髓系白血病、B细胞幼淋巴细胞白血病、B细胞急性淋巴性白血病(“BALL”)、母细胞性浆细胞样树突状细胞肿瘤、伯基特淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性髓细胞性白血病(CML)、慢性髓系白血病、慢性或急性白血病、弥漫大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、毛细胞白血病、霍奇金病、恶性淋巴增殖性疾病、MALT淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、意义未明的单克隆丙种球蛋白病(MGUS)、多发性骨髓瘤、骨髓发育不良和骨髓增生异常综合征、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、浆细胞增殖性疾病(包括无症状骨髓瘤(冒烟型多发性骨髓瘤或惰性骨髓瘤)、浆母细胞淋巴瘤、浆细胞样树突状细胞肿瘤、浆细胞瘤(包括浆细胞病;孤立性骨髓瘤;孤立性浆细胞瘤;髓外浆细胞瘤;和多发性浆细胞瘤)、POEMS综合征(还被称为克罗-深濂综合征;Takatsuki病;和PEP综合征)、原发性纵隔大B细胞淋巴瘤(PMBCL)、小细胞或大细胞滤泡性淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤(SMZL)、系统性淀粉状蛋白轻链淀粉样变性、T细胞急性淋巴性白血病(“TALL”)、T细胞淋巴瘤、转化型滤泡

性淋巴瘤、或华氏巨球蛋白血症、套细胞淋巴瘤(MCL)、转化型滤泡性淋巴瘤(TFL)、原发性纵隔B细胞淋巴瘤(PMBCL)、多发性骨髓瘤、毛细胞淋巴瘤/白血病、肺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌(NSCL)、细支气管肺泡细胞肺癌、鳞状细胞癌、肺腺癌、肺鳞癌、腹膜癌、头颈癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头部或颈部癌、皮肤或眼内黑色素瘤、甲状腺癌、子宫癌、胃肠癌、卵巢癌、直肠癌、肛门区癌、胃癌(stomach cancer)、胃癌(gastric cancer)、结肠癌、乳腺癌、子宫内膜癌、子宫癌、输卵管癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金病、食管癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、膀胱癌、肾癌或输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、间皮瘤、膀胱癌、肝癌(liver cancer)、肝癌(hepatoma)、肝细胞癌、子宫颈癌、唾液腺癌、胆管癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、脊椎轴肿瘤、脑干胶质瘤、多形性胶质母细胞瘤、星形细胞瘤、神经鞘瘤、室管膜瘤、髓母细胞瘤、脑膜瘤、鳞状细胞癌、垂体腺瘤和尤文肉瘤(Ewings sarcoma),包括以上癌症中任一种的难治性形式或以上癌症中一种或多种的组合。

[0024] 一个实施方案提供了一种用于在与工程化细胞的组合疗法中使用的靶向细胞因子构建体,所述融合蛋白包含(i)细胞结合结构域,和

[0025] (ii)细胞因子蛋白或其功能片段或变体,其中所述细胞结合结构域:

[0026] (a)包含对于外源性地在所述工程化细胞的表面上表达的受体或结构域具有特异性的抗体或其抗原结合片段;

[0027] (b)包含对于在所述工程化细胞上表达的抗原结合蛋白的结构域具有特异性的抗体或其抗原结合片段;

[0028] (c)对于标签具有特异性,其中所述标签由所述工程化细胞共表达或者是由所述工程化细胞表达的受体的一部分;

[0029] (d)是来自被所述工程化细胞靶向的抗原的结构域;或

[0030] (e)包含(a)-(d)的任何组合。

[0031] 在一些实施方案中,由所述工程化细胞表达的受体是嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)。在一些实施方案中,所述细胞因子选自:IL-2、IL-7、IL-10、IL-15和IL-21、或其功能片段、或其变体或其任何组合。在一些实施方案中,所述细胞因子是IL-2多肽、或其功能片段或其变体。在一些实施方案中,所述IL-2多肽包含SEQ ID NO:1的序列,具有相对于SEQ ID NO:1的一个或多个氨基酸取代,并且其中所述一个或多个取代包括在选自以下的SEQ ID NO:1的位置处的一个或多个取代:Q11、H16、L18、L19、D20、Q22、R38、F42、K43、Y45、E62、P65、E68、V69、L72、D84、S87、N88、V91、I92、T123、Q126、S127、I129和S130。在一些实施方案中,所述一个或多个取代包括相对于SEQ ID NO:1的F42A或F42K氨基酸取代。在一些实施方案中,所述一个或多个取代还包括相对于SEQ ID NO:1的R38A、R38D、R38E、E62Q、E68A、E68Q、E68K或E68R氨基酸取代。在一些实施方案中,所述一个或多个取代还包括相对于SEQ ID NO:1的H16E、H16D、D20N、M23A、M23R、M23K、S87K、S87A、D84L、D84N、D84V、D84H、D84Y、D84R、D84K、N88A、N88G、N88S、N88T、N88R、N88I、N88D、V91A、V91T、V91E、I92A、E95S、E95A、E95R、T123A、T123E、T123K、T123Q、Q126A、Q126S、Q126T、Q126E、S127A、S127E、S127K或S127Q氨基酸取代。在一些实施方案中,所述一个或多个取代还包括与SEQ ID NO:1相比的氨基酸突变C125A。在一些实施方案中,所述IL-2多肽包含与选自SEQ ID No:11-90的序列具有至少约85%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有以下氨基

酸取代(相对于SEQ ID NO:1的序列)组中的一个:R38E和F42A;R38D和F42A;F42A和E62Q;R38A和F42K;R38E、F42A和N88S;R38E、F42A和N88A;R38E、F42A和N88G;R38E、F42A和N88D;R38E、F42A和V91E;R38E、F42A和D84H;R38E、F42A和D84K;R38E、F42A和D84R;H16D、R38E和F42A;H16E、R38E和F42A;R38E、F42A和Q126S;R38D、F42A和N88S;R38D、F42A和N88A;R38D、F42A和N88G;R38D、F42A和N88D;R38D、F42A和V91E;R38D、F42A和D84H;R38D、F42A和D84K;R38D、F42A和D84R;H16D、R38D和F42A;H16E、R38D和F42A;R38D、F42A和Q126S;R38A、F42K和N88S;R38A、F42K和N88A;R38A、F42K和N88G;R38A、F42K和N88D;R38A、F42K和V91E;R38A、F42K和D84H;R38A、F42K和D84K;R38A、F42K和D84R;H16D、R38A和F42K;H16E、R38A和F42K;R38A、F42K和Q126S;F42A、E62Q和N88S;F42A、E62Q和N88A;F42A、E62Q和N88G;F42A、E62Q和N88D;F42A、E62Q和V91E;F42A、E62Q和D84H;F42A、E62Q和D84K;F42A、E62Q和D84R;H16D、F42A和E62Q;H16E、F42A和E62Q;F42A、E62Q和Q126S;R38E、F42A和C125A;R38D、F42A和C125A;F42A、E62Q和C125A;R38A、F42K和C125A;R38E、F42A、N88S和C125A;R38E、F42A、N88A和C125A;R38E、F42A、N88G和C125A;R38E、F42A、N88D和C125A;R38E、F42A、V91E和C125A;R38E、F42A、D84H和C125A;R38E、F42A、D84K和C125A;R38E、F42A、D84R和C125A;H16D、R38E、F42A和C125A;H16E、R38E、F42A和C125A;R38E、F42A、C125A和Q126S;R38D、F42A、N88S和C125A;R38D、F42A、N88A和C125A;R38D、F42A、N88G和C125A;R38D、F42A、N88D和C125A;R38D、F42A、V91E和C125A;R38D、F42A、D84H和C125A;R38D、F42A、D84K和C125A;R38D、F42A、D84R和C125A;H16D、R38D、F42A和C125A;H16E、R38D、F42A和C125A;R38D、F42A、C125A和Q126S;R38A、F42K、N88S和C125A;R38A、F42K、N88G和C125A;R38A、F42K、N88D和C125A;R38A、F42K、N88A和C125A;R38A、F42K、V91E和C125A;R38A、F42K、D84H和C125A;R38A、F42K、D84K和C125A;R38A、F42K、D84R和C125A;H16D、R38A、F42K和C125A;H16E、R38A、F42K和C125A;R38A、F42K、C125A和Q126S;F42A、E62Q、N88S和C125A;F42A、E62Q、N88A和C125A;F42A、E62Q、N88G和C125A;F42A、E62Q、N88D和C125A;F42A、E62Q、V91E和C125A;F42A、E62Q和D84H和C125A;F42A、E62Q和D84K和C125A;F42A、E62Q和D84R和C125A;H16D、F42A和E62Q和C125A;H16E、F42A、E62Q和C125A;F42A、E62Q、C125A和Q126S;F42A、N88S和C125A;F42A、N88A和C125A;F42A、N88G和C125A;F42A、N88D和C125A;F42A、V91E和C125A;F42A、D84H和C125A;F42A、D84K和C125A;F42A、D84R和C125A;H16D、F42A和C125A;H16E、F42A和C125A;以及F42A、C125A和Q126S。在一些实施方案中,所述细胞因子是IL-7多肽,所述IL-7多肽包含SEQ ID NO:91的序列,具有相对于SEQ ID NO:91的一个或多个取代。在一些实施方案中,一个或多个位置中的所述取代选自以下位置:K10、Q11、S14、V15、V18、Q22、L35、N36、D74、L77、L80、K81、E84、I88、R133、Q136、E137、T140和N143以及K144。在一些实施方案中,位置K81和T140中的取代是K81A和T140A。在一些实施方案中,所述细胞因子是IL-10多肽,所述IL-10多肽包含SEQ ID NO:95的序列,具有相对于SEQ ID NO:95的一个或多个取代。在一些实施方案中,所述IL-10多肽包含选自SEQ ID 99-112的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述细胞因子是IL-21多肽、或其功能片段或其变体。在一些实施方案中,所述IL-21多肽包含SEQ ID NO:115的序列,具有相对于SEQ ID NO:115的一个或多个取代。在一些实施方案中,所述IL-21多肽包含SEQ ID NO:115的序列,或在选自以下位置的一个或多个位置处包含氨基酸取代的序列:R5、I8、R9、R11、Q12、I14、D15、D18、Q19、Y23、R65、S70、K72、K73、K75、R76、K77、S80、Q116和K117,其中位置编号是根据SEQ ID NO:115的氨基酸序列的编号。在一些实施方案中,由所

述工程化细胞共表达的所述标签是EGFR_t标签。在一些实施方案中,被所述工程化细胞靶向的抗原选自:来自肿瘤相关抗原的新表位、TSHR、CD19、CD123、CD22、CD30、CD171、CS-1、CLL-1、CD33、EGFRv111、GD2、GD3、BCMA、Tn Ag、PSMA、ROR1、FLT3、FAP、TAG72、CD38、CD44v6、CEA、EPCAM、B7H3、KIT、IL-13Ra2、间皮素、IL-11Ra、PSCA、PRSS21、VEGFR2、LewisY、CD24、PDGFR-β、SSEA-4、CD20、叶酸受体α、ERBB2 (Her2/neu)、MUC1、EGFR、NCAM、前列腺酶、PAP、ELF2M、Ephrin B2、IGF-I受体、CAIX、LMP2、gp100、bcr-abl、酪氨酸酶、EphA2、岩藻糖基GM1、sLe^x、GM3、TGS5、HMWMAA、o-乙酰基-GD2、叶酸受体β、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、GPC5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、聚唾液酸、PLAC1、GloboH、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、GPR20、LY6K、OR51 E2、TARP、WT1、NY-ESO-1、LAGE-1a、MAGE-A1、豆荚蛋白 (legumain)、HPV E6、E7、MAGE A1、ETV6-AML、精子蛋白17、XAGE1、Tie 2、MAD-CT-1、MAD-CT-2、Fos相关抗原1、p53、p53突变体、prostein、存活素和端粒酶、PCTA-1/半乳凝素8、MelanA/MART1、Ras突变体、hTERT、肉瘤易位断点、ML-IAP、ERG (TMPRSS2 ETS融合基因)、NA17、PAX3、雄性激素受体、细胞周期蛋白B1、MYCN、RhoC、TRP-2、CYP1 B1、BORIS、SART3、PAX5、OY-TES1、LCK、AKAP-4、SSX2、RAGE-1、人端粒酶逆转录酶、RU1、RU2、肠道羧基酯酶、mut hsp70-2、CD79a、CD79b、CD72、LAIR1、FCAR、LILRA2、CD300LF、CLEC12A、BST2、EMR2、LY75、GPC3、FCRL5或IGLL1。

[0032] 在一些实施方案中,所述工程化细胞包括以下中的至少一种:表达αβT细胞受体的T细胞、γδT细胞、NK T细胞、调节性T细胞、多能干细胞衍生的T细胞或诱导多能干细胞衍生的T细胞、自然杀伤细胞(NK细胞)、多能干细胞衍生的NK细胞或诱导多能干细胞(iPSC)衍生的NK细胞、被工程化以表达嵌合抗原受体的T细胞(CAR-T细胞)、被工程化以表达T细胞受体的T细胞(TCR-T细胞)、CD8阳性T细胞、CD4阳性T细胞、细胞毒性T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞、被工程化以表达嵌合抗原受体的NK细胞(CAR-NK细胞)、被工程化以表达嵌合抗原受体的NK T细胞(CAR-NK T细胞)、髓细胞、造血谱系细胞、造血干祖细胞(HSC)、造血多能祖细胞(MPP)、前T细胞祖细胞、T细胞祖细胞、NK细胞祖细胞。

[0033] 一个实施方案提供了一种治疗癌症的方法,所述方法包括施用根据权利要求147-168中任一项所述的靶向细胞因子构建体与工程化细胞的组合疗法。在一些实施方案中,还包括施用另外的治疗剂。在一些实施方案中,所述癌症是急性成淋巴细胞性白血病(ALL)(包括非T细胞ALL)、急性髓系白血病、B细胞幼淋巴细胞白血病、B细胞急性淋巴性白血病(“BALL”)、母细胞性浆细胞样树突状细胞肿瘤、伯基特淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性髓细胞性白血病(CML)、慢性髓系白血病、慢性或急性白血病、弥漫大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、毛细胞白血病、霍奇金病、恶性淋巴增殖性疾病、MALT淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、意义未明的单克隆丙种球蛋白病(MGUS)、多发性骨髓瘤、脊髓发育不良和骨髓增生异常综合征、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、浆细胞增殖性疾病(包括无症状骨髓瘤(冒烟型多发性骨髓瘤或惰性骨髓瘤)、浆母细胞淋巴瘤、浆细胞样树突状细胞肿瘤、浆细胞瘤(包括浆细胞病;孤立性骨髓瘤;孤立性浆细胞瘤;髓外浆细胞瘤;和多发性浆细胞瘤)、POEMS综合征(还被称为克罗-深濑综合征;Takatsuki病;和PEP综合征)、原发性纵隔大B细胞淋巴瘤(PMBCL)、小细胞或大细胞滤泡性淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤(SMZL)、系统性淀粉状蛋白轻链淀粉样变性、T细胞急性淋巴性白血病(“TALL”)、T细胞淋巴瘤、转化型滤泡性淋巴瘤、或华氏巨球蛋白血症、套细胞淋巴瘤(MCL)、转化型滤泡性淋巴瘤(TFL)、原发性纵隔B细胞淋巴瘤(PMBCL)、多发性骨髓瘤、毛细胞淋巴瘤/白血病、肺癌、小细胞肺癌、非小

细胞肺癌(NSCL)、细支气管肺泡细胞肺癌、鳞状细胞癌、肺腺癌、肺鳞癌、腹膜癌、头颈癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头部或颈部癌、皮肤或眼内黑色素瘤、甲状腺癌、子宫癌、胃肠癌、卵巢癌、直肠癌、肛门区癌、胃癌(stomach cancer)、胃癌(gastric cancer)、结肠癌、乳腺癌、子宫内膜癌、子宫癌、输卵管癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金病、食管癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、膀胱癌、肾癌或输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、间皮瘤、膀胱癌、肝癌(liver cancer)、肝癌(hepatoma)、肝细胞癌、子宫颈癌、唾液腺癌、胆管癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、脊椎轴肿瘤、脑干胶质瘤、多形性胶质母细胞瘤、星形细胞瘤、神经鞘瘤、室管膜瘤、髓母细胞瘤、脑膜瘤、鳞状细胞癌、垂体腺瘤和尤文肉瘤(Ewings sarcoma),包括以上癌症中任一种的难治性形式或以上癌症中一种或多种的组合。

[0034] 一个实施方案提供了一种药物组合物:其包含根据本公开的靶向细胞因子构建体,以及药学上可接受的赋形剂、载剂、或稀释剂或其任何组合中的至少一种。在一些实施方案中,还包含工程化细胞群体。一个实施方案提供了一种细胞疗法试剂盒,其具有包含根据本公开的靶向细胞因子构建体的药物组合物以及指定用于向对象施用所述靶向细胞因子构建体的说明书。在一些实施方案中,所述细胞疗法试剂盒还包括包含工程化细胞群体的药物组合物以及指定用于向所述对象施用所述工程化细胞群体的说明书。在一些实施方案中,包含所述靶向细胞因子构建体的所述药物组合物和包含所述工程化细胞群体的所述药物组合物用于顺序或同时施用。

[0035] 援引并入

[0036] 本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请都通过引用并入本文,如同每个单独的出版物、专利或专利申请被明确且单独地指示通过引用并入。

附图说明

[0037] 本公开的新颖特征在所附权利要求书中特别地阐述。通过参考阐述了利用本公开的原理的说明性实施方案的以下详细描述和附图将获得对本公开的特征和优点的更好的理解,在附图中:

[0038] 图1示出了含有细胞因子多肽(例如,野生型细胞因子蛋白或其片段或变体,诸如突变蛋白细胞因子,其在一些实例中是突变的IL-2(还被称为突变的IL2或突变蛋白IL-2或突变蛋白IL2))与识别选择性地在工程化细胞(例如,CAR转导T细胞)上表达的靶抗原(结构域或受体)的细胞结合结构域的靶向细胞因子构建体或非靶向细胞因子多肽如何作用以刺激表达靶抗原的工程化细胞或不表达靶抗原的其他细胞的一般机制。

[0039] 图2描绘了证明含有作为抗CAR抗体的细胞结合结构域的示例性靶向细胞因子构建体的优选活性的测定的结果,具体地,采用由与以下指示构建体一起培养的一个供体生成的工程化细胞(CAR-T细胞)进行的磷-STAT5测定的结果:与IL-2R β γ 结合多肽IL2m1融合的非CAR结合抗体(对照IL2m1),与IL-2R β γ 结合多肽IL2m1融合的CAR结合抗体(抗CAR IL2m1),或作为对照的非靶向细胞因子(IL-2)。描绘了指示浓度下CAR+或CAR-T细胞的pSTAT5表达细胞的百分比。

[0040] 图3描绘了证明含有作为抗CAR抗体的细胞结合结构域的示例性靶向细胞因子构建体的优选活性的测定的结果,具体地,采用由与以下指示构建体一起培养的如图2的单独

供体生成的工程化细胞(CAR-T细胞)进行的磷-STAT5测定的结果:与IL-2R β γ 结合多肽IL2m2融合的非CAR结合抗体(对照IL2m2),与IL-2R β γ 结合多肽IL2m2融合的CAR结合抗体(抗CAR IL2m2),或作为对照的非靶向细胞因子(IL-2)。描绘了指示浓度下CAR+或CAR-T细胞的pSTAT5表达细胞的百分比。

[0041] 图4示出了采用非靶向细胞因子(IL-2)或含有作为抗CAR抗体的细胞结合结构域和IL-2R β γ 结合多肽(IL2m1或IL2m2)的靶向细胞因子构建体的延长培养实现的培养物中CAR+T细胞的频率(左图)和数量(右图)。将抗CAR IL2m1、抗CAR IL2m2、对照IL-2或作为没有细胞因子的细胞结合结构域的抗CAR抗体在0.1nM的浓度下在培养物中培养长达10天。在指示时间点通过流式细胞术测量CAR+T细胞数量和频率。

[0042] 图5A示出了根据本公开的靶向CAR转导工程化T细胞的CAR靶向细胞因子构建体的示例性设计。

[0043] 图5B示出了根据本公开的靶向TCR转导工程化T细胞的TCR靶向细胞因子构建体的示例性设计。

[0044] 图6A-6D示出了成熟IL-2(图6A;SEQ ID NO:1)、IL-2R α (图6B;SEQ ID NO:2)、IL-2R β (图6C;SEQ ID NO:3)和IL-2R γ (图6D;SEQ ID NO:4)多肽的氨基酸序列。

[0045] 图7示出了野生型成熟IL-2多肽的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)。“X”代表野生型IL-2多肽的序列中被另一个氨基酸取代以生成本公开的突变体IL-2多肽的氨基酸。

[0046] 图8A-8C分别示出了根据本公开的三种不同的示例性CAR靶向细胞因子构建体的示意图。图8A示出了突变体IL-2多肽与一条重链的C末端融合的二价抗体。图8B示出了突变体IL-2多肽与缺乏可变区的重链的C末端融合的单价抗体。图8C示出了突变体IL-2多肽与缺乏可变区的重链的N末端融合的单价抗体。

[0047] 图9A-1D示出了以下多肽的氨基酸序列:成熟IL-10(图9A;SEQ ID NO:95)、IL-10RA(图9B;SEQ ID NO:96)、IL-10RB(图9C;SEQ ID NO:97)和成熟单体IL-10(图9D;SEQ ID NO:98)。

[0048] 图10A-10B示出了野生型成熟IL-10多肽(图10A;SEQ ID NO:95)和成熟单体IL-10(图10B;SEQ ID NO:98)的氨基酸序列。“X”代表野生型IL-10多肽的序列中被另一个氨基酸取代以生成本公开的突变体IL-10多肽的氨基酸。

[0049] 图11A-11B示出了野生型成熟IL-10多肽(图11A;SEQ ID NO:95)和成熟单体IL-10(图11B;SEQ ID NO:98)的氨基酸序列。白色框代表被取代以降低IL-10对于IL-10RA的亲合力的残基,灰色阴影框代表被取代以改变IL-10对于IL-10RB的亲合力的残基。示出了野生型残基中每个位置被取代的氨基酸。

[0050] 图12A-12F描绘了证明含有作为抗scFv抗体(靶向由CAR T细胞表达的scFv)的细胞结合结构域和IL-2突变蛋白(m1图12B;m2图12C;m3图12D;m4图12E;m5图12F)的若干示例性靶向细胞因子构建体的优选活性的测定的结果,具体地,采用由与指示构建体一起培养的一个供体生成的工程化细胞(CAR-T细胞(CAR+)与非CAR表达T细胞(CAR-)的混合物)进行的磷-STAT5测定的结果。描绘了指示浓度下CAR+或CAR-T细胞的pSTAT5表达细胞的百分比。图12A示出了此测定中测试的构建体的说明。

[0051] 图13A-13F描绘了证明含有作为抗标签抗体(靶向选择性地由CAR T细胞表达的标签分子)的细胞结合结构域和IL-2突变蛋白(m1图13B;m2图13C;m3图13D;m4图13E;m5图

13F)的若干示例性靶向细胞因子构建体的优选活性的测定的结果,具体地,采用由与指示构建体一起培养的一个供体生成的工程化细胞(CAR-T细胞(CAR+)与非CAR表达T细胞(CAR-)的混合物)进行的磷-STAT5测定的结果。描绘了指示浓度下CAR+或CAR-T细胞的pSTAT5表达细胞的百分比。图13A示出了此测定中测试的构建体的说明。

[0052] 图14A-14F描绘了证明含有作为抗标签抗体(靶向由CAR T细胞表达的标签)的细胞结合结构域和IL-2突变蛋白(m1图14B;m2图14C;m3图14D;m4图14E;m5图14F)的若干示例性靶向细胞因子构建体的优选活性的测定的结果,具体地,采用由与指示构建体一起培养的一个供体生成的工程化细胞(CAR-T细胞)进行的磷-STAT5测定的结果。描绘了指示浓度下CAR+或CAR-T细胞的pSTAT5表达细胞的百分比。图14A示出了此测定中测试的构建体的说明。

[0053] 图15A-15B描绘了证明含有作为抗标签抗体(靶向由TCR转导T细胞表达的标签)的细胞结合结构域的示例性靶向细胞因子构建体的优先结合的测定的结果。图15A示出了含有在图15B中使用的抗标签抗体与IL-2突变蛋白的靶向细胞因子构建体的说明。

具体实施方式

[0054] 某些定义

[0055] 除非上下文另外明确指示,否则如说明书和权利要求中所用,单数形式“一个/种(a/an)”和“所述”包括复数个指示物。例如,术语“嵌合跨膜受体多肽”包括多个嵌合跨膜受体多肽。

[0056] 术语“约”或“大约”意指由本领域普通技术人员确定的具体值处于可接受的误差范围内,这将部分取决于所述值的测量或确定方式,即测量系统的限制性。例如,根据本领域的实践,“约”可以意指在1个或多于1个标准偏差内。可替代地,“约”可以意指给定值的至多20%、至多10%、至多5%或至多1%的范围。可替代地,特别是关于生物系统或过程,所述术语可以意指在值的一个数量级以内、优选地在值的5倍以内及更优选地在值的2倍以内。在本申请和权利要求书中描述具体值的情况下,除非另外说明,否则应假设术语“约”意指所述具体值在可接受的误差范围内。

[0057] 如本文所用,“细胞”一般是指生物细胞。细胞可以是活生物体的基本结构、功能和/或生物单元。细胞可以源自具有一个或多个细胞的任何生物体。一些非限制性实例包括:原核细胞、真核细胞、细菌细胞、古细菌细胞、单细胞真核生物体的细胞、原生动物细胞、来自植物的细胞(例如,来自植物作物、水果、蔬菜、谷物、大豆、玉米、玉蜀黍、小麦、种子、番茄、水稻、木薯、甘蔗、南瓜、干草、土豆、棉花、大麻、烟草、开花植物、针叶树、裸子植物、蕨类植物、石松、金鱼藻、地钱、苔藓的细胞)、藻细胞(例如,布朗葡萄藻(*Botryococcus braunii*)、莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)、微拟球藻(*Nannochloropsis gaditana*)、蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)、展枝马尾藻(*Sargassum patens* C.Agardh)等)、海藻类(例如,海带)、真菌细胞(例如,酵母细胞、来自蘑菇的细胞)、动物细胞、来自无脊椎动物(例如,果蝇、刺胞动物、棘皮动物、线虫等)的细胞、来自脊椎动物(例如,鱼、两栖动物、爬行动物、鸟类、哺乳动物)的细胞、来自哺乳动物(例如,猪、奶牛、山羊、绵羊、啮齿动物、大鼠、小鼠、非人灵长类动物、人等)的细胞等等。有时,细胞并非源自天然生物体(例如,细胞可以是合成的,有时被称为人工细胞)。

[0058] 如本文所用,术语“抗原”是指能够被选择性结合剂结合的分子或其片段。作为一个实例,抗原可以是能够被选择性结合剂(诸如受体)结合的配体。作为另一个实例,抗原可以是能够被选择性结合剂(诸如免疫蛋白(例如,抗体))结合的抗原分子。抗原也可以是指能够在动物中用于产生能够与此抗原结合的抗体的分子或其片段。

[0059] “细胞因子”是免疫调节多肽的一种形式,其可以介导起始/原代细胞和靶细胞/效应细胞之间的串扰。它可以充当与结合靶免疫细胞上的“细胞因子受体”以激活信号传导相关联的可溶性形式或细胞表面。如在此所用,“细胞因子受体”是细胞表面上的多肽,其在结合细胞外细胞表面上的细胞因子时激活细胞内信号传导。细胞因子可以包括但不限于趋化因子、干扰素、白介素、淋巴因子和肿瘤坏死因子。细胞因子由多种细胞产生,包括免疫细胞、内皮细胞、成纤维细胞和基质细胞。给定的细胞因子可以由多于一种细胞类型产生。细胞因子具有多效性;因为受体在多个免疫细胞亚群上表达,因此一种细胞因子可以激活多个细胞中的信号传导通路。然而,根据细胞类型,细胞因子的信号传导事件可以导致不同的下游细胞事件,诸如激活、增殖、存活、凋亡、效应功能和其他免疫调节蛋白的分泌。在一些实施方案中,给定的细胞因子是野生型细胞因子多肽、其片段或其变体,诸如突变的细胞因子多肽(在本文中还被称为突变蛋白细胞因子,例如突变蛋白IL-2、突变蛋白IL-7)。

[0060] 如在此所用,“抗原结合结构域”是指特异性结合抗原决定簇的分子。靶向部分或抗原结合结构域可以是蛋白质、碳水化合物、脂质或其他化合物。它可以包括但不限于抗体、抗体片段(Chames等人,2009;Chan和Carter,2010;Leavy,2010;Holliger和Hudson,2005)、支架抗原结合蛋白(Gebauer和Skerra,2009;Stumpp等人,2008)、单结构域抗体(sdAb)、微型抗体(Tramontano等人,1994)、重链抗体(纳米抗体,VHH)的可变结构域、新抗原受体的可变结构域(VNAR)、碳水化合物结合结构域(CBD)(Blake等人,2006)、胶原蛋白结合结构域(Knight等人,2000)、凝集素结合蛋白(四联凝集素)、胶原蛋白结合蛋白、adnectin/纤连蛋白(Lipovšek,2011)、血清转铁蛋白(转铁蛋白)、Evibody、蛋白A衍生分子诸如蛋白A的Z结构域(亲和体)(Nygren等人,2008)、A结构域(Avimer/Maxibody)、阿尔法体(WO2010066740)、Avimer/Maxibody、设计的锚蛋白重复结构域(DARPin)(Stumpp等人,2008)、抗运载蛋白(Skerra等人,2008)、人 γ 晶体蛋白或泛素蛋白(Affilin分子)、人蛋白酶抑制剂的库尼型结构域、扭结菌素(Kolmar等人,2008)、具有或不具有融合以延长半衰期的线性或限制性肽(例如,Fc融合-肽体)(Rentero Rebollo和Heinis,2013;EP 1144454 B2;Shimamoto等人,2012;US 7205275 B2)、限制性双环肽(US 2018/0200378A1)、适配体、工程化CH2结构域(纳米抗体;Dimitrov,2009)和工程化CH3结构域“Fcab”结构域(Wozniak-Knopp等人,2010)。

[0061] 如本文所用,术语“抗体”是指具有免疫球蛋白样功能的蛋白质结合分子。术语抗体包括抗体(例如,单克隆和多克隆抗体)以及其衍生物、变体和片段。抗体包括但不限于不同类别(即,IgA、IgG、IgM、IgD和IgE)和亚类(诸如IgG1、IgG2等)的免疫球蛋白(Ig)。其衍生物、变体或片段是指保留对应抗体的结合特异性(例如,完全和/或部分)的功能衍生物或片段。抗原结合片段包括Fab、Fab'、F(ab')₂、可变片段(Fv)、单链可变片段(scFv)、微型抗体、双抗体和单结构域抗体(“sdAb”或“纳米抗体”或“骆驼科动物抗体”)。术语抗体包括经优化、工程化或化学缀合的抗体和抗体的抗原结合片段。经优化的抗体的实例包括亲和力成熟抗体。经工程化的抗体的实例包括Fc优化的抗体(例如,在片段可结晶区中优化的抗体)

和多特异性抗体(例如,双特异性抗体)。

[0062] 如本文所用,术语“Fc受体”或“FcR”通常是指可以与抗体的Fc区结合的受体或其任何衍生物、变体或片段。在某些实施方案中,FcR是结合IgG抗体的受体(γ 受体,Fc γ R),并且包括Fc γ RI(CD64)、Fc γ RII(CD32)和Fc γ RIII(CD16)亚类的受体,包括这些受体的等位基因变体和可变剪接形式。Fc γ RII受体包括Fc γ RIIA(“激活受体”)和Fc γ RIIB(“抑制受体”),所述受体具有主要在其细胞质结构域方面不同的类似氨基酸序列。术语“FcR”还包括新生儿受体FcRn,它负责将母体IgG转移到胎儿身上。

[0063] 如本文所用,“效应功能”意指由抗体Fc区与Fc受体或配体相互作用引起的生化事件,其随抗体同种型而变化。效应功能包括但不限于抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)、补体依赖性细胞毒性(CDC)、细胞因子分泌、免疫复合物介导的抗原呈递细胞的抗原摄取、细胞表面受体(例如,B细胞受体)的下调和B细胞激活。“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”是指细胞介导的反应,其中表达FcR的非特异性细胞毒性细胞(诸如自然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞)识别靶细胞上结合的抗体并且随后引起靶细胞的裂解。ADCC与Fc γ RIIIa的结合相关;与Fc γ RIIIa结合的导致ADCC活性的增加。为了评估感兴趣的分子的ADCC活性,可以进行体外ADCC测定,诸如美国专利号5,500,362或5,821,337中描述的测定。如本文所用,“ADCP”或抗体依赖性细胞介导的吞噬作用意指细胞介导的反应,其中表达Fc γ R的非特异性细胞毒性细胞识别靶细胞上结合的抗体并且随后引起靶细胞的吞噬作用。

[0064] “Fc null”和“Fc null变体”可互换使用,并且在本文中用于描述效应功能减少或消除的经修饰的Fc。这种Fc null或Fc null变体已减少或消除为Fc γ R和/或补体受体。优选地,这种Fc null或Fc null变体具有消除的效应功能。用于修饰的示例性方法包括但不限于化学改变、氨基酸残基取代、插入和删除。Fc分子上的示例性氨基酸位置,其中在以下位置处引入了一种或多种修饰以降低所得变体的效应功能(基于EU编号方案进行编号): i) IgG1:C220、C226、C229、E233、L234、L235、G237、P238、S239、D265、S267、N297、L328、P331、K322、A327和P329, ii) IgG2:V234、G237、D265、H268、N297、V309、A330、A331、K322以及 iii) IgG4:L235、G237、D265和E318。具有降低的效应功能的示例性Fc分子包括具有以下取代中的一个或多个的那些: i) IgG1:N297A、N297Q、D265A/N297A、D265A/N297Q、C220S/C226S/C229S/P238S、S267E/L328F、C226S/C229S/E233P/L234V/L235A、L234F/L235E/P331S、L234A/L235A、L234A/L235A/G237A、L234A/L235A/G237A/K322A、L234A/L235A/G237A/A330S/A331S、L234A/L235A/P329G、E233P/L234V/L235A/G236del/S239K、E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、E233P/L234V/L235A/G236del/S239K/A327G、E233P/L234V/L235A/G236del/S267K/A327G 和E233P/L234V/L235A/G236del、L234A/L235A/G237del; ii) IgG2:A330S/A331S、V234A/G237A、V234A/G237A/D265A、D265A/A330S/A331S、V234A/G237A/D265A/A330S/A331S和H268Q/V309L/A330S/A331S; iii) IgG4:L235A/G237A/E318A、D265A、L235A/G237A/D265A和L235A/G237A/D265A/E318A。

[0065] 如本文所用,“表位”是指能够与被成为互补位的抗体分子的可变区特异性结合的决定簇。表位是成组的诸如氨基酸或糖侧链的分子,并且通常具有特定结构特征,以及特定电荷特征。单一抗原可以具有超过一个表位。表位可以包含直接参与结合的氨基酸残基以及不直接参与结合的其他氨基酸残基,诸如被抗原结合肽有效阻断的氨基酸残基(换言之,

氨基酸残基在抗原结合肽的足迹内)。表位可以是构象的抑或线性的。表位通常包含至少3个、并且更通常至少5个或8-10个氨基酸。识别相同表位的抗体可以在简单的免疫测定中进行验证,所述免疫测定示出一种抗体阻断另一种抗体结合至靶抗原的能力,例如“分级(binining)”。

[0066] 如本文所用,“接头”是指连接两个多肽链的分子。接头可以是多肽接头或合成化学接头(例如,参见Protein Engineering, 9(3), 299-305, 1996中的公开内容)。多肽接头的长度和序列没有特别限制,并且可以根据本领域技术人员的目的进行选择。多肽接头包含一种或多种氨基酸。优选地,多肽接头是长度为至少5个氨基酸、优选地长度为5至100个、更优选为10至50个氨基酸的肽。在一个实施方案中,所述肽接头是G、S、GS、SG、SGG、GGS和GSG(其中G=甘氨酸并且S=丝氨酸)。在另一个实施方案中,所述肽接头是(GGGG)xGn (SEQ ID NO:5)或(GGGG)xGn (SEQ ID NO:6)或(GGGGG)xGn (SEQ ID NO:7),其中x=1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12并且n=0、1、2或3。优选地,所述接头是(GGGG)xGn,其中x=2、3或4并且n=0 (SEQ ID NO:8);更优选地,所述接头是(GGGG)xGn,其中x=3并且n=0 (SEQ ID NO:9)。合成化学接头包括常规用于交联肽的交联剂,例如N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、二琥珀酰亚胺基辛二酸酯(DSS)、双(琥珀酰亚胺基)辛二酸酯(BS3)、二硫代双(琥珀酰亚胺基丙酸酯)(DSP)、二硫代双(琥珀酰亚胺基丙酸酯)(DTSSP)、乙二醇双(琥珀酰亚胺基琥珀酸酯)(EGS)、乙二醇双(磺基琥珀酰亚胺基琥珀酸酯)(磺基-EGS)、二琥珀酰亚胺基酒石酸酯(DST)、二磺基琥珀酰亚胺基酒石酸酯(磺基-DST)、双[2-(琥珀酰亚胺氧羰基氧基)乙基]砒(BSOCOES)和双[2-(琥珀酰亚胺氧羰基氧基)乙基]砒(磺基-BSOCOES)。

[0067] 如本文所用,术语“核苷酸”通常是指碱基-糖-磷酸组合。核苷酸可以包括合成核苷酸。核苷酸可以包括合成核苷酸类似物。核苷酸可以是核酸序列(例如,脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA))的单体单元。术语核苷酸可以包括核糖核苷三磷酸腺苷三磷酸(ATP)、尿苷三磷酸(UTP)、胞嘧啶三磷酸(CTP)、鸟苷三磷酸(GTP)和脱氧核糖核苷三磷酸,诸如dATP、dCTP、dITP、dUTP、dGTP、dTTP或其衍生物。此类衍生物可以包括例如[αS]dATP、7-脱氮-dGTP和7-脱氮-dATP,以及赋予含有它们的核酸分子以核酸酶抗性的核苷酸衍生物。如本文所用,在一些实例中,术语核苷酸是指双脱氧核糖核苷三磷酸(ddNTP)及其衍生物。双脱氧核糖核苷三磷酸的说明性实例可以包括但不限于ddATP、ddCTP、ddGTP、ddITP和ddTTP。核苷酸可以是未标记的或通过熟知技术可检测标记的。也可以用量子点进行标记。可检测标记可以包括例如放射性同位素、荧光标记、化学发光标记、生物发光标记和酶标记。核苷酸的荧光标记可以包括但不限于荧光素、5-羧基荧光素(FAM)、2'7'-二甲氧基-4',5-二氯-6-羧基荧光素(JOE)、罗丹明、6-羧基罗丹明(R6G)、N,N,N',N'-四甲基-6-羧基罗丹明(TAMRA)、6-羧基-X-罗丹明(ROX)、4-(4'二甲基氨基苯偶氮基)苯甲酸(DABCYL)、Cascade Blue、Oregon Green、Texas Red、青色素和5-(2'-氨基乙基)氨基萘-1-磺酸(EDANS)。荧光标记的核苷酸的具体实例可以包括[R6G]dUTP、[TAMRA]dUTP、[R110]dCTP、[R6G]dCTP、[TAMRA]dCTP、[JOE]ddATP、[R6G]ddATP、[FAM]ddCTP、[R110]ddCTP、[TAMRA]ddGTP、[ROX]ddTTP、[dR6G]ddATP、[dR110]ddCTP、[dTAMRA]ddGTP和[dROX]ddTTP,获自Perkin Elmer, Foster City, Calif; FluoroLink脱氧核苷酸、FluoroLink Cy3-dCTP、FluoroLink Cy5-dCTP、FluoroLink Fluor X-dCTP、FluoroLink Cy3-dUTP和FluoroLink Cy5-dUTP,获自Amersham, Arlington Heights, Ill.; 荧光素-15-dATP、荧光素-12-dUTP、四甲基-罗丹明-

6-dUTP、IR770-9-dATP、荧光素-12-ddUTP、荧光素-12-UTP和荧光素-15-2'-dATP,获自Boehringer Mannheim,Indianapolis,Ind.;以及染色体标记的核苷酸、BODIPY-FL-14-UTP、BODIPY-FL-4-UTP、BODIPY-TMR-14-UTP、BODIPY-TMR-14-dUTP、BODIPY-TR-14-UTP、BODIPY-TR-14-dUTP、Cascade Blue-7-UTP、Cascade Blue-7-dUTP、荧光素-12-UTP、荧光素-12-dUTP、Oregon Green 488-5-dUTP、罗丹明绿-5-UTP、罗丹明绿-5-dUTP、四甲基罗丹明-6-UTP、四甲基罗丹明-6-dUTP、Texas Red-5-UTP、Texas Red-5-dUTP和Texas Red-12-dUTP,获自Molecular Probes,Eugene,Oreg.。核苷酸也可以通过化学修饰来标记或标志。化学修饰的单核苷酸可以是生物素-dNTP。生物素化dNTP的一些非限制性实例可以包括生物素-dATP(例如,生物素-N6-ddATP、生物素-14-dATP)、生物素-dCTP(例如,生物素-11-dCTP、生物素-14-dCTP)和生物素-dUTP(例如,生物素-11-dUTP、生物素-16-dUTP、生物素-20-dUTP)。

[0068] 术语“多核苷酸”、“寡核苷酸”和“核酸”可互换使用,是指任何长度的核苷酸的聚合形式(脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸)或其类似物,无论是呈单链、双链抑或多链形式。多核苷酸对于细胞可以是外源的或内源的。多核苷酸可以存在于无细胞环境中。多核苷酸可以是基因或其片段。多核苷酸可以是DNA。多核苷酸可以是RNA。多核苷酸可以具有任何三维结构,并且可以执行任何已知或未知的功能。多核苷酸可以包含一种或多种类似物(例如,改变的骨架、糖或核碱基)。如果存在,则可以在聚合物组装之前或之后赋予对核苷酸结构的修饰。类似物的一些非限制性实例包括:5-溴尿嘧啶、肽核酸、异种核酸、吗啉代、锁核酸、乙二醇核酸、苏阿糖核酸、双脱氧核苷酸、虫草素、7-脱氮-GTP、荧光团(例如,与糖连接的罗丹明或荧光素)、含硫醇的核苷酸、生物素连接的核苷酸、荧光碱基类似物、CpG岛、甲基-7-鸟苷、甲基化核苷酸、肌苷、硫尿苷、假尿苷、二氢尿苷、癸苷和怀俄苷。多核苷酸的非限制性实例包括基因或基因片段的编码或非编码区、由连锁分析所定义的基因座、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转移RNA(tRNA)、核糖体RNA(rRNA)、短干扰RNA(siRNA)、短发夹RNA(shRNA)、微RNA(miRNA)、核酶、cDNA、重组多核苷酸、支链多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离的DNA、任何序列的分离的RNA、无细胞的多核苷酸包括无细胞DNA(cfDNA)和无细胞RNA(cfRNA)、核酸探针和引物。核苷酸的序列可以被非核苷酸组分中断。

[0069] 如本文所用,术语“基因”是指核酸(例如,DNA,诸如基因组DNA和cDNA)及其对应的核苷酸序列,所述核苷酸序列参与编码RNA转录物。如本文所用,关于基因组DNA的术语包括介入的非编码区以及调控区并且可以包括5'和3'端。在一些用途中,所述术语涵盖转录序列,包括5'和3'非翻译区(5'-UTR和3'-UTR)、外显子和内含子。在一些基因中,转录区将含有编码多肽的“开放阅读框”。在所述术语的一些用途中,“基因”仅包含编码多肽所必需的编码序列(例如,“开放阅读框”或“编码区”)。在一些情况下,基因不编码多肽,例如核糖体RNA基因(rRNA)和转移RNA(tRNA)基因。在一些情况下,术语“基因”不仅包括转录序列,而且还包括非转录区,包括上游和下游调控区、增强子和启动子。在一些情况下,基因是指“内源性基因”或在生物体基因组中其天然位置处的天然基因。在一些情况下,基因是指“外源性基因”或非天然基因。在一些情况下,非天然基因是指通常不见于宿主生物体中但通过基因转移引入宿主生物体中的基因。在一些情况下,非天然基因是指不在生物体基因组中其天然位置处的基因。在一些情况下,非天然基因还是指包含突变、插入和/或缺失的天然存在的核酸或多肽序列(例如,非天然序列)。

[0070] 如本文所用,关于表达或活性的术语“调节”是指改变表达或活性的水平。调节可以在转录水平和/或翻译水平下发生。

[0071] 术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”在本文中可互换,是指通过一个或多个肽键连接的至少两个氨基酸残基的聚合物。此术语不意味聚合物的特定长度,也不旨在暗示或区分肽是使用重组技术、化学或酶合成产生的,抑或天然存在的。所述术语适用于天然存在的氨基酸聚合物以及包含至少一个修饰氨基酸的氨基酸聚合物。在一些情况下,聚合物可以被非氨基酸中断。所述术语包括任何长度的氨基酸链,包括全长蛋白质,以及具有或没有二级和/或三级结构(例如,结构域)的蛋白质。所述术语还涵盖已例如通过二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化、氧化和任何其他操纵,诸如与标记组分的缀合来修饰的氨基酸聚合物。如本文所用,术语“氨基酸(amino acid)”和“氨基酸(amino acids)”通常是指天然氨基酸和非天然氨基酸,包括但不限于修饰氨基酸和氨基酸类似物。修饰氨基酸可以包括天然氨基酸和非天然氨基酸,它们被化学修饰成包括非天然存在于氨基酸上的基团或化学部分。氨基酸类似物可以是指氨基酸衍生物。术语“氨基酸”包括D-氨基酸和L-氨基酸两者。

[0072] 术语“衍生物”、“变体”和“片段”,当在本文中关于多肽使用时,是指例如通过氨基酸序列、结构(例如,二级和/或三级)、活性(例如,酶活性)和/或功能与野生型多肽相关的多肽。与野生型多肽相比,多肽的衍生物、变体和片段可以包含一个或多个氨基酸变异(例如,突变、插入和缺失)、截短、修饰或其组合。

[0073] 如本文所用,术语“残基”是指蛋白质中的位置及其相关联的氨基酸身份。例如,Leu 234(也被称为Leu234或L234)是人抗体IgG1中位置234处的残基。

[0074] 如本文所用,术语“野生型”意指自然界中所见的氨基酸序列或核苷酸序列,包括等位基因变异。野生型蛋白具有未被有意修饰的氨基酸序列或核苷酸序列。

[0075] 术语“取代”或“突变”是指对多肽骨架的改变,其中在多肽的野生型序列中天然存在的氨基酸被取代为在所述多肽中相同位置处非天然存在的另一种氨基酸。在一些情况下,引入一个或多个突变来改变多肽对于其受体的亲和力,从而改变其活性,使得其与野生型同源多肽的亲和力和活性不同。突变还可以改善多肽的生物物理特性。氨基酸突变可以使用本领域熟知的遗传或化学方法来生成。遗传方法可以包括定点诱变、PCR、基因合成等。设想通过基因工程化以外的方法(诸如化学修饰)改变氨基酸的侧链基团的方法也可以是有用的。

[0076] 术语“亲和力”或“结合亲和力”是指分子(例如,抗体)的单一结合位点与其结合配偶体(例如,抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另外指示,否则如本文所用,“结合亲和力”是指反映结合对的成员(例如,抗体与抗原)之间的1:1相互作用的固有结合亲和力。亲和力通常可以通过解离常数(K_D)表示,它是解离速率常数和缔合速率常数(分别为 k_{off} 和 k_{on})的比率。因此,等效亲和力可以包括不同的速率常数,只要速率常数的比率保持不变即可。亲和力可以通过本领域已知的常见方法进行测量,诸如酶联免疫吸附测定(ELISA)、表面等离子体共振(SPR)技术(例如,BIAcore)、生物层干涉(BLI)技术(例如,Octet)和其他传统的结合测定(Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002))。

[0077] 如在此所用,术语“结合”或“特异性结合”可以是指多肽或抗原结合结构域分别选择性地与多肽或靶抗原的受体相互作用的能力,并且这种特异性相互作用可以与非靶向或不希望的或非特异性的相互作用区分开来。特异性结合的实例可以包括但不限于IL-2细胞

因子与其特异性受体(例如,IL-2R α 、IL-2R β 和IL-2R γ)结合以及抗原结合结构域与特定抗原(例如,CD8或PD-1)结合。

[0078] 术语“对象”、“个体”和“患者”在本文中可互换使用,是指指脊椎动物,优选地哺乳动物,诸如人。哺乳动物包括但不限于鼠类、猿、人、农场动物、运动动物和宠物。还涵盖在体内获得或在体外培养的生物实体的组织、细胞及其后代。

[0079] 如本文所用,术语“治疗(treatment/treating)”是指用于获得有益或所需结果(包括但不限于治疗益处和/或预防益处)的方法。例如,治疗可以包括施用本文公开的系统或细胞群体。治疗益处意指对正在治疗的一种或多种疾病、病状或症状的任何治疗相关的改善或影响。对于预防益处,可以向处于发展特定疾病、病状或症状风险中的对象或向报告疾病的一种或多种生理症状的对象(即使所述疾病、病状或症状可能还未表现出来)施用组合物。

[0080] 术语“有效量”或“治疗有效量”或“有效剂量(effective dose)”或“有效剂量(effective dosage)”是指足以在施用于有需要的对象时产生所需活性的组合物的量,例如包含免疫细胞诸如淋巴细胞(例如,T淋巴细胞和/或NK细胞)的组合物,其可以与本公开的靶向细胞因子构建体组合。在本公开的上下文中,术语“治疗有效”是指足以延迟通过本公开的方法治疗的病症的至少一种症状的表现、阻止其进展、缓解或减轻所述至少一种症状的组合物的量。

[0081] 概述

[0082] 作为概述,本公开涉及用于通过使用工程化细胞(例如,用于工程化细胞疗法的工程化细胞群体)和靶向细胞因子构建体治疗疾病或病状,例如增殖性疾病,例如癌症的方法、组合物、试剂盒、系统、方案。在一些实施方案中,本文提供了一种组合方法,例如,施用工程化细胞和靶向细胞因子构建体两者,其可以提高工程化细胞针对疾病(例如增殖性疾病,例如癌症)的治疗功效。在一些方面,提供了用于通过将工程化细胞群体与如本文所述的靶向细胞因子构建体接触来提高工程化细胞的治疗功效的体外方法。

[0083] 在一些实施方案中,靶向细胞因子构建体在工程化细胞中引起一种或多种以下效应:增强这种工程化细胞的增殖;改变工程化细胞进行的细胞因子分泌;降低工程化细胞存活和增殖对于外源性细胞因子的依赖性;增强这种工程化细胞的细胞毒性;增强这种工程化细胞的存活率;阻断这种工程化细胞的凋亡;延迟这种工程化细胞的衰老;防止或延迟这种工程化细胞的耗竭;在向对象施用时增强这种工程化细胞在体内的持久性;在向对象施用时增强工程化细胞在体内的功效;增强工程化细胞对患病器官或组织(例如,肿瘤)的渗透;或任何组合。

[0084] 在一些实施方案中,本公开提供了用于提高工程化细胞的体内持久性和治疗功效的方法和组合物。在一些实施方案中,与单独施用工程化细胞群体相比,施用包括工程化细胞群体和靶向细胞因子构建体的治疗方案使工程化细胞群体的体内持久性提高至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%。在一些实施方案中,与施用工程化细胞群体与非靶向细胞因子或其功能片段或变体的组合相比,施用包括工程化细胞群体和靶向细胞因子构建体的治疗方案使工程化细胞群体的体内持久性提高至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%。在一些实施方案中,与施用工程化细胞群体与不与细胞因子蛋白融合的细胞结合结构域的组合相比,施用包括工程化细胞群体和靶向细胞因子构建

体的治疗方案使工程化细胞的体内持久性提高至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%。在一些实施方案中,当工程化细胞群体与本公开的靶向细胞因子构建体接触时,所述靶向细胞因子构建体使工程化细胞群体的体外持久性提高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%。

[0085] 在一些实施方案中,本公开提供了用于提高工程化细胞的体内持久性和治疗功效的方法和组合物。在一些实施方案中,与单独施用工程化细胞群体相比,施用包括工程化细胞群体和靶向细胞因子构建体的治疗方案使工程化细胞群体的体内持久性提高至少约2倍。在一些实施方案中,与施用工程化细胞群体与非靶向细胞因子或其功能片段或变体的组合相比,施用包括工程化细胞群体和靶向细胞因子构建体的治疗方案使工程化细胞群体的体内持久性提高至少2倍。在一些实施方案中,与施用工程化细胞群体与不与细胞因子蛋白融合的细胞结合结构域的组合相比,施用包括工程化细胞群体和靶向细胞因子构建体的治疗方案使工程化细胞的体内持久性提高至少2倍。

[0086] 在一些实施方案中,本公开涉及一种减少工程化细胞疗法中工程化细胞的有效剂量的方法,所述方法包括施用工程化细胞群体和如本文所述的靶向细胞因子构建体。在一些实施方案中,与包含工程化细胞群体但不包含靶向细胞因子构建体的参考组合物中的量相比,包含工程化细胞群体和靶向细胞因子构建体的组合物包含更低量的工程化细胞,其中两种组合物表现出类似的功效。

[0087] 在一些实施方案中,与包含工程化细胞群体和非靶向细胞因子或其功能片段或变体的参考组合物中的量相比,包含工程化细胞群体和靶向细胞因子构建体的组合物包含更低量的工程化细胞。在一些实施方案中,与包含工程化细胞群体和细胞结合结构域但不包含细胞因子蛋白的参考组合物中的量相比,包含工程化细胞群体和靶向细胞因子构建体的组合物含有更低量的工程化细胞。在一些实施方案中,相对于参考组合物中的如上所述的有效剂量或量,所述组合物中的如上所述的有效剂量或量低约1.5倍至约1000倍,诸如约2倍、约4倍、约8倍、约16倍、约32倍、约50倍、约64倍、约70倍、约75倍、约80倍、约90倍、约91倍、约92倍、约93倍、约94倍、约95倍、约96倍、约97倍、约98倍、约99倍或约1000倍。

[0088] 研究显示,CAR-T细胞的损失与T细胞(防止扩增的内在问题)或T细胞(外在免疫排斥反应)相关联。在CAR T细胞诱导的缓解之后经历复发的患者具有非常早期的CAR T细胞损失或B细胞发育不全的损失(绝对B细胞通常通过流量上升至高于50至100/ μ L来测量)-这种损失通常与复发(例如,CD19+B细胞复发)相关联。参见例如Nie等人“Mechanisms underlying CD19-positive ALL relapse after anti-CD19 CAR T cell therapy and associated strategies,”Biomarker Research第8卷,文章编号:18(2020)。在用工程化细胞治疗(例如,CAR-T细胞疗法,诸如CD19 CAR-T细胞疗法)之后复发的患者中,施用本公开的靶向细胞因子构建体可以充当挽救疗法。因此,在本公开的一些实施方案中,提供了通过在进行工程化细胞疗法后向经历B细胞发育不全的损失的患者施用靶向细胞因子构建体进行治疗的方法。

[0089] 在一些实施方案中,提供了一种治疗方案,其包括向对象施用工程化细胞群体和如本文所述的靶向细胞因子构建体,并且所述方法允许以下中的至少一种发生:(a)避免事先向对象施用淋巴清除剂,或(b)降低扩增、植入工程化细胞所需的先前淋巴细胞耗竭的程度。淋巴清除剂的非限制性实例包括化疗剂诸如氟达拉滨、环磷酰胺,以及清除抗体诸如阿

仑单抗。

[0090] 在一些实施方案中,施用靶向细胞因子构建体以靶向在对象体内生成的工程化细胞。通过施用靶向细胞因子构建体可以实现对此类体内生成的工程化细胞的各种改善,例如,增加持久性、降低耗竭速率和/或程度、增加扩增和/或增殖、不增加Treg细胞计数、选择性强化和工程化细胞的特异性富集。用于在体内生成工程化细胞(例如,CAR-T或TCR-T细胞)的示例性技术包括向对象施用包含CAR或TCR基因的核酸载剂。在一些实施方案中,核酸载剂是非病毒载体、线性多核苷酸、与离子或两亲性化合物缔合的多核苷酸、质粒或病毒(诸如病毒载体)。在一些实施方案中,病毒载体是以下中的至少一种:仙台病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体或慢病毒载体。在一些情况下,核酸载剂包含对于免疫细胞(例如,T细胞、NK细胞、T淋巴细胞、髓细胞)具有特异性的靶向部分。在一些实施方案中,被核酸载剂靶向的免疫细胞被诱导以生成体内工程化细胞,所述体内工程化细胞被本公开的靶向细胞因子构建体靶向。

[0091] 组合疗法

[0092] 在一方面,本公开提供了一种用于治疗疾病或病症,例如癌症或增殖性疾病的组合疗法,例如治疗方法和方案,其包括向对象施用治疗方案,所述治疗方案包括(1)工程化细胞,例如CAR表达细胞,例如T细胞,其群体;和(2)靶向细胞因子构建体。在一方面,本公开提供了一种通过使工程化细胞群体与如本文所述的靶向细胞因子构建体接触来改善工程化细胞群体的体外激活和/或扩增的方法,并且在一些实施方案中,还提供了一种工程化细胞疗法,其包括施用工程化细胞群体,以用于治疗疾病或病症,例如癌症或增殖性疾病。如上所述的施用可以与本公开的靶向细胞因子构建体组合。

[0093] 在一些实施方案中,所述工程化细胞特异性识别和/或靶向与疾病或病症,例如癌症或增殖性疾病相关联的抗原。在一些实施方案中,所述工程化细胞表达被靶向细胞因子构建体的细胞因子识别的结构域或受体。还提供了组合和制品,诸如试剂盒,所述组合和制品含有包含工程化细胞群体的组合物和/或包含靶向细胞因子构建体的组合物;以及此类组合物和组合用于治疗疾病、病状和病症(包括癌症)的用途。此类方法可以包括在施用(例如,启动施用)包含工程化细胞(例如,CAR表达T细胞)的疗法之前、同时、期间、过程期间(包括在过程期间一次和/或周期性地)和/或随后施用靶向细胞因子构建体。在一些实施方案中,所述施用可以涉及顺序或间歇性施用靶向细胞因子构建体和/或工程化细胞群体(施用工程化细胞群体在本文中也被称为工程化细胞疗法)。

[0094] 施用剂量和方案

[0095] 在一些实施方案中,本公开提供了一种治疗方案,其包括包含工程化细胞群体的第一药物组合物;和包含靶向细胞因子构建体的第二药物组合物。在一些实施方案中,所述第二药物组合物包含足以增强工程化细胞群体的治疗作用的量的靶向细胞因子构建体。

[0096] 在一些实施方案中,包含工程化细胞群体的第一组合物和包含靶向细胞因子构建体的第二药物组合物同时或顺序地施用于对象。在一些实施方案中,对象首先接受包括工程化细胞群体的疗法的施用,例如,首先完成包括工程化细胞群体的疗法,并且然后接受靶向细胞因子构建体的施用。

[0097] 在一些实施方案中,包括工程化细胞群体和靶向细胞因子构建体的疗法根据预先确定的方案,例如同时、间歇或顺序地施用于对象。在一些实施方案中,所述对象根据处方

施用方案接受包括工程化细胞群体的疗法的施用,例如每周一次、两次、3次、4次、5次、6次或7次,持续连续多周,或每1、2、3、4、5、6或7天一次,持续给定的时间段,例如一周、一个月或一年。在一些实施方案中,所述对象还根据与包括工程化细胞群体的疗法相同的施用方案,或者在一些情况下,根据与包括工程化细胞群体的疗法的施用方案重叠的施用方案来接受靶向细胞因子构建体的施用。例如,对象可以同时接受包括工程化细胞群体的疗法(例如,T细胞输注)和靶向细胞因子构建体两者,例如两者均经由静脉内输注。在其他情况下,对象可以在同一天接受包括工程化细胞群体的疗法(例如,T细胞输注)和靶向细胞因子构建体两者。在一些情况下,当两种施用方案重叠时,对象可以在第一天接受包括工程化细胞群体的疗法,并且然后在第二天或者在接受包括工程化细胞群体的疗法的下一次施用之后和之前2、3、4、5、6、7天或更长时间接受靶向细胞因子构建体。可替代地,在一些情况下,与靶向细胞因子构建体相比,可以更多次地向对象施用包括工程化细胞群体的疗法,或者反之亦然。

[0098] 在一些实施方案中,包括工程化细胞群体的疗法与靶向细胞因子构建体的施用同时或者在开始或启动靶向细胞因子构建体的施用之后进行施用。在一些实施方案中,包括工程化细胞群体的疗法在开始或启动靶向细胞因子构建体的施用之后0至90天,诸如0至30天、0至15天、0至6天、0至96小时、0至24小时、0至12小时、0至6小时、或0至2小时、2小时至30天、2小时至15天、2小时至6天、2小时至96小时、2小时至24小时、2小时至12小时、2小时至6小时、6小时至90天、6小时至30天、6小时至15天、6小时至6天、6小时至96小时、6小时至24小时、6小时至12小时、12小时至90天、12小时至30天、12小时至15天、12小时至6天、12小时至96小时、12小时至24小时、24小时至90天、24小时至30天、24小时至15天、24小时至6天、24小时至96小时、96小时至90天、96小时至30天、96小时至15天、96小时至6天、6天至90天、6天至30天、6天至15天、15天至90天、15天至30天或30天至90天进行施用。在一些实施方案中,包括工程化细胞群体的疗法在开始或启动靶向细胞因子构建体的施用之后至少或约至少或约1小时、2小时、6小时、12小时、24小时、2天、3天、6天、12天、15天、30天、60天或90天进行施用。

[0099] 在一些实施方案中,包括工程化细胞群体的疗法与靶向细胞因子构建体的施用同时或者在开始或启动靶向细胞因子构建体的施用之前进行施用。在一些实施方案中,包括工程化细胞群体的疗法在开始或启动靶向细胞因子构建体的施用之前0至90天,诸如0至30天、0至15天、0至6天、0至96小时、0至24小时、0至12小时、0至6小时、或0至2小时、2小时至30天、2小时至15天、2小时至6天、2小时至96小时、2小时至24小时、2小时至12小时、2小时至6小时、6小时至90天、6小时至30天、6小时至15天、6小时至6天、6小时至96小时、6小时至24小时、6小时至12小时、12小时至90天、12小时至30天、12小时至15天、12小时至6天、12小时至96小时、12小时至24小时、24小时至90天、24小时至30天、24小时至15天、24小时至6天、24小时至96小时、96小时至90天、96小时至30天、96小时至15天、96小时至6天、6天至90天、6天至30天、6天至15天、15天至90天、15天至30天或30天至90天进行施用。在一些实施方案中,包括工程化细胞群体的疗法在开始或启动靶向细胞因子构建体的施用之前至少或约至少或约1小时、2小时、6小时、12小时、24小时、2天、3天、6天、12天、15天、30天、60天或90天进行施用。

[0100] 在一些实施方案中,在初始施用靶向细胞因子构建体和工程化细胞群体后,向对

象施用靶向细胞因子构建体的后续剂量,以维持体内工程化细胞。在一些实施方案中,在初始施用之后,后续施用是每周一次、每两周一次、每三周一次或每月一次。

[0101] 在一些实施方案中,靶向细胞因子构建体的剂量和时间是基于在施用包括工程化细胞群体的疗法之后在来自对象的样品中测量与包括工程化细胞群体的疗法的施用相关联的一种或多种治疗作用来调整的。在一些情况下,包含工程化细胞群体的组合物和包含靶向细胞因子构建体的组合物的施用方案由对象的主治医师确定。医师的决定可以是基于多种因素,包括但不限于对象的医学史和对对象的其他医学检查结果,例如肿瘤的病理学检查结果。靶向细胞因子构建体的具体剂量将根据所选的细胞因子和细胞结合结构域的特定组合、待遵循的给药方案、对象的健康状况、施用的组织以及携带它的物理递送系统而变化。在一些实施方案中,在治疗周期的过程中,平均每周向对象施用在约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、75、80、85、90、95、100、150、200、300、400、500、600、700、800、900或1000mg范围内的靶向细胞因子构建体。例如,每周向对象施用在约35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54或55mg范围内的靶向细胞因子构建体。在一些实施方案中,每周向对象施用在约40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54或55mg范围内的靶向细胞因子构建体。

[0102] 在一些实施方案中,在治疗周期的过程中,平均每天向对象施用大于1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5或10mg的量的靶向细胞因子构建体。例如,在治疗周期的过程中,平均每天向对象施用约6与10mg之间、约6.5与9.5mg之间、约6.5与8.5mg之间、约6.5与8mg之间或约7与9mg之间的量的靶向细胞因子构建体。

[0103] 在一些实施方案中,每天向对象施用在约0.01mg/kg-50mg/kg范围内,诸如每天约、小于约或超过约0.01mg/kg、0.02mg/kg、0.03mg/kg、0.04mg/kg、0.05mg/kg、0.06mg/kg、0.07mg/kg、0.08mg/kg、0.09mg/kg、0.1mg/kg、0.2mg/kg、0.3mg/kg、0.4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg、10mg/kg、11mg/kg、12mg/kg、13mg/kg、14mg/kg、15mg/kg、16mg/kg、17mg/kg、18mg/kg、19mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、35mg/kg、40mg/kg、45mg/kg或50mg/kg的靶向细胞因子构建体。在一些实施方案中,每周向对象施用在约0.1mg/kg-400mg/kg范围内,诸如每周约、小于约或超过约0.1mg/kg、0.2mg/kg、0.3mg/kg、0.4mg/kg、0.5mg/kg、0.6mg/kg、0.7mg/kg、0.8mg/kg、0.9mg/kg、1mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、35mg/kg、40mg/kg、45mg/kg、50mg/kg、100mg/kg、150mg/kg、200mg/kg、250mg/kg、300mg/kg、350mg/kg或400mg/kg的靶向细胞因子构建体。在一些实施方案中,每周或每两周向对象施用约1mg/kg剂量的靶向细胞因子构建体。

[0104] 在一些实施方案中,每月向对象施用在约0.4mg/kg-1500mg/kg范围内,诸如每月约、小于约或超过约0.4mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、35mg/kg、40mg/kg、45mg/kg、50mg/kg、100mg/kg、150mg/kg、200mg/kg、250mg/kg、300mg/kg、350mg/kg、400mg/kg、450mg/kg、500mg/kg、550mg/kg、600mg/kg、650mg/kg、700mg/kg、750mg/kg、800mg/kg、850mg/kg、900mg/kg、950mg/kg或1000mg/kg的靶向细胞因子构建体。在一些实施方案中,每周向对象施用在约0.1mg/m²-200mg/m²范围内,诸如每周约、小于约或超过约1mg/m²、5mg/m²、10mg/m²、15mg/m²、20mg/m²、25mg/m²、30mg/m²、

35mg/m²、40mg/m²、45mg/m²、50mg/m²、55mg/m²、60mg/m²、65mg/m²、70mg/m²、75mg/m²、100mg/m²、125mg/m²、150mg/m²、175mg/m²或200mg/m²的靶向细胞因子构建体。可以在单个剂量中施用靶标剂量。可替代地,可以在约或超过约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30个或更多个剂量中施用靶标剂量。例如,可以在周程内以每周约1mg/kg、每两周施用约2mg/kg或每四周施用约4mg/kg的剂量每周递送约1mg/kg/周的剂量。施用时间表可以根据如本文所述的任何方案重复进行,包括本文所述的任何施用时间表。在一些实施方案中,向对象施用在约0.1mg/m²-500mg/m²范围内,诸如约、小于约或超过约1mg/m²、5mg/m²、10mg/m²、15mg/m²、20mg/m²、25mg/m²、30mg/m²、35mg/m²、40mg/m²、45mg/m²、50mg/m²、55mg/m²、60mg/m²、65mg/m²、70mg/m²、75mg/m²、100mg/m²、130mg/m²、135mg/m²、155mg/m²、175mg/m²、200mg/m²、225mg/m²、250mg/m²、300mg/m²、350mg/m²、400mg/m²、420mg/m²、450mg/m²或500mg/m²的靶向细胞因子构建体。

[0105] 在一些实施方案中,靶向细胞因子构建体的剂量是约、至少约或至多约0.1、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、525、550、575、600、625、650、675、700、725、750、775、800、825、850、875、900、925、950、975、1000mg或mg/kg或其中可推导的任何范围。设想mg/kg的剂量是指mg靶向细胞因子构建体的量/kg对象的总体重。设想在向患者给予多个剂量时,剂量的量可以变化或者它们可以是相同的。

[0106] 治疗作用

[0107] 在一些实施方案中,本文所述的方法能够调控施用于对象的工程化细胞群体(工程化细胞疗法)的体内扩增和/或增殖速率或工程化细胞群体的体外增殖。在一些实施方案中,相对于在靶向细胞因子构建体不存在的情况下施用于对象的工程化细胞,本文所述的治疗方法增加所施用的工程化细胞的体内扩增和/或增殖。在一些实施方案中,相对于在靶向细胞因子构建体不存在的情况下施用于对象的工程化细胞,本文所述的治疗方法使所施用的工程化细胞的体内扩增和/或增殖增加至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90或100倍。在一些实施方案中,相对于不与如本文所述的靶向细胞因子构建体接触的工程化细胞,本公开的靶向细胞因子构建体使工程化细胞的体外扩增和/或增殖增加至少约2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90或100倍。在一些情况下,当工程化细胞群体与靶向细胞因子构建体组合施用时,工程化细胞群体的扩增和/或增殖增加至少约2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90或100倍是相对于将工程化细胞与以下中的至少一种组合施用:(a)没有细胞因子的细胞结合结构域;(b)没有细胞结合结构域的非靶向细胞因子或其功能片段或变体。类似地,当与靶向细胞因子构建体接触时,工程化细胞群体的体外扩增和/或增殖增加至少约2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90或100倍是相对于使工程化细胞群体与以下中的至少一种接触:(a)没有细胞因子的细胞结合结构域;(b)没有细胞结合结构域的非靶向细胞因子或其功能片段或变体。

[0108] 在一些实施方案中,相对于将工程化细胞群体单独施用或与没有细胞结合结构域的非靶向细胞因子或其功能片段或变体组合施用,本文所述的方法能够增强施用于对象的工程化细胞群体的特异性富集。在一些实施方案中,所述工程化细胞表达细胞因子蛋白的受体,并且与不表达CAR的受体的细胞的外生相反,本文所述的方法导致工程化细胞(例如,表达CAR的细胞)的选择性外生。在一些实施方案中,相比于将工程化细胞群体单独施用或

与没有细胞结合结构域的非靶向细胞因子或其功能片段或变体组合施用Treg细胞增加,在施用工程化细胞群体与靶向细胞因子构建体的组合后,本文所述的方法不导致Treg细胞增加。在一些实施方案中,相对于将工程化细胞群体单独施用或与没有细胞结合结构域的非靶向细胞因子或其功能片段或变体组合或与没有细胞因子的细胞结合结构域组合施用,本文所述的方法降低施用于对象的工程化细胞群体的耗竭速率和/或程度。

[0109] 在一些实施方案中,相对于施用工程化细胞群体而没有靶向细胞因子构建体或在与没有细胞因子的细胞结合结构域一起施用,本文所述的方法增加施用于对象的工程化细胞群体的体内持久性。在一些实施方案中,相对于不与靶向细胞因子构建体接触时或与没有细胞因子的细胞结合结构域接触时的工程化细胞群体的体外持久性,本文所述的方法增加与如本文所述的靶向细胞因子构建体接触时的工程化细胞群体的体外持久性。在一些实施方案中,所述体内或体外持久性增加是以上所述的比较物的至少约2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90或100倍。在一些实例中,在与靶向细胞因子构建体组合施用于对象时,工程化细胞群体的体内持久性是至少约30天至约一年或更长,诸如约45天、约60天、约90天、约120天、约6个月、约7个月、约8个月、约9个月、约10个月、约11个月、约12个月、约18个月或更长。

[0110] 在一些方面,本文提供的方法、组合物、组合、试剂盒和方案可以允许降低用于有效植入工程化细胞所需的预调理方案(例如,淋巴清除方案)的严重程度。因此,在一种情况下,在施用(例如,输注)工程化细胞群体之前,对象已进行淋巴清除。在其他情况下,不需要淋巴清除,并且将工程化细胞群体快速输注到对象中。

[0111] 在一些实施方案中,所述方法包括在启动工程化细胞疗法之前向对象施用预调理剂诸如淋巴清除剂或化疗剂,诸如环磷酰胺、氟达拉滨或其组合,或作为清除抗体的抗体,诸如阿仑单抗。在一些实施方案中,在施用工程化细胞疗法与靶向细胞因子构建体的组合之前,本文提供的方法、组合物、组合、试剂盒和方案可以消除向对象施用预调理剂/方案(例如,淋巴清除剂/方案)的需要。

[0112] 在施用预调理剂的对象中,可以在启动细胞疗法之前至少2天,诸如之前至少3、4、5、6或7天,向对象施用预调理剂。在一些实施方案中,在启动细胞疗法之前不超过7天,诸如如之前不超过6、5、4、3或2天,向对象施用预调理剂。

[0113] 在一些实施方案中,以低于100mg/kg对象体重,诸如低于约20mg/kg、低于约40mg/kg或低于约80mg/kg的剂量用例如环磷酰胺对所述对象进行预调理。因此,相对于在单独或与以下中的至少一种组合施用工程化细胞疗法时,在工程化细胞疗法与靶向细胞因子构建体组合施用,以更高的剂量施用预调理剂。(a)没有细胞因子的细胞结合结构域,或(b)没有细胞结合结构域的非靶向细胞因子或其功能片段或变体。在一些实施方案中,在单个剂量中或在多个剂量中(诸如每天、每隔一天或每三天给予),用预调理剂(诸如环磷酰胺)对所述对象进行预调理或向所述对象施用预调理剂。在一些实施方案中,以小于约500mg/m²对象体表面积,诸如小于约400mg/m²、小于约300mg/m²、小于约250mg/m²、小于约200mg/m²或小于约100mg/m²的剂量向对象施用预调理剂(诸如环磷酰胺)。

[0114] 示例性淋巴清除方案在下表中列出:

[0115] 表1:示例性淋巴清除方案

[0116]	D-6 输注	接收入院/IV 补水
	D-5 输注	氟达拉滨 25 mg/m ² , 环磷酰胺 250 mg/m ²
	D-4 输注	氟达拉滨 25 mg/m ² , 环磷酰胺 250 mg/m ²
	D-3 输注	氟达拉滨 25 mg/m ² IV, 环磷酰胺 250 mg/m ²
	D-2 输注	其余
	D-1 输注	其余
	D (D0)输注	工程化细胞输注(例如, CAR+ T 细胞输注)

[0117] 表2:示例性淋巴清除方案

[0118]	D-6 输注	接收入院/IV 补水
	D-5 输注	氟达拉滨 30 mg/m ² , 环磷酰胺 500 mg/m ²
[0119]	D-4 输注	氟达拉滨 30 mg/m ² , 环磷酰胺 500 mg/m ²
	D-3 输注	氟达拉滨 30 mg/m ² IV, 环磷酰胺 500 mg/m ²
	D-2 输注	其余
	D-1 输注	其余
	D (D0)输注	工程化细胞输注(例如, CAR+ T 细胞输注)

[0120] 本文提供的方法、组合物、组合、试剂盒和方案可以治疗增殖性疾病,诸如癌症。在一些实施方案中,本文提供的组合疗法在治疗增殖性疾病,诸如癌症方面具有有利的治疗作用。

[0121] 在本文提供的方法、组合物、组合、试剂盒和用途的一些实施方案中,所提供的组合疗法产生一种或多种治疗结局,诸如与任何一种或多种与疗法或治疗相关联的参数相关联的特征,如下所述。

[0122] 在一些实施方案中,与疗法或治疗结局相关联的参数(其包括可以评估用于筛选步骤和/或评估治疗结局和/或监测治疗结局的参数)包括肿瘤或疾病负荷。施用包括工程化细胞(诸如T细胞疗法(例如,CAR表达T细胞))和/或如上所述的靶向细胞因子构建体的疗

法可以降低或防止对象的疾病或病状的扩增或负荷。例如,在疾病或病状是肿瘤的情况下,所述方法通常可以降低肿瘤大小、体积、转移、骨髓中原始细胞的百分比或可分子检测的癌症,和/或改善预后或存活或与肿瘤负荷相关联的其他症状。

[0123] 在一些实施方案中,与在不施用靶向细胞因子构建体的情况下给予工程化细胞疗法(例如,CAR表达T细胞)的替代方法相比,所提供的组合疗法导致所治疗对象的肿瘤负荷降低。肿瘤负荷不一定在接受组合疗法的所有对象中都实际上降低,但是诸如基于临床数据,所治疗对象的平均肿瘤负荷降低,其中大多数用这种组合疗法治疗的对象表现出降低的肿瘤负荷,诸如至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多用组合疗法治疗的对象表现出降低的肿瘤负荷。

[0124] 疾病负荷可以涵盖所述对象中或所述对象的器官、组织或体液(诸如肿瘤或例如指示转移的另一位置的器官或组织)中所述疾病的总细胞数。例如,在某些血液恶性肿瘤的情境下,可以在血液、淋巴或骨髓中检测和/或定量肿瘤细胞。在一些实施方案中,疾病负荷可以包括肿瘤的质量、转移的数量或程度和/或骨髓中存在的原始细胞的百分比。

[0125] 在一些实施方案中,对象患有骨髓瘤、淋巴瘤或白血病。在一些实施方案中,对象患有非霍奇金淋巴瘤(NHL)、急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、弥漫大B细胞淋巴瘤(DLBCL)或骨髓瘤(例如,多发性骨髓瘤(MM))。在一些实施方案中,对象患有MM或DBCBL。在一些实施方案中,对象患有实体瘤。

[0126] 在多发性骨髓瘤的情况下,评估疾病负荷程度的示例性参数包括诸如以下等参数:克隆血浆细胞数量(例如,在骨髓活检中>10%或在来自其他组织的活检中的任何量;浆细胞瘤)、单克隆蛋白(副蛋白)在血清或尿液中的存在、感觉与浆细胞病症相关的终末器官损害的证据(例如,高钙血症(校正钙>2.75mmol/l);骨髓瘤引起的肾功能不全;贫血(血红蛋白<10g/dl);和/或骨病灶(溶解性病灶或具有压缩性骨折的骨质疏松症))。在弥漫大B细胞淋巴瘤的情况下,评估疾病负荷程度的示例性参数包括诸如以下等参数:细胞形态(例如,中心母细胞、免疫母细胞和间变细胞)、基因表达、miRNA表达和蛋白质表达(例如,BCL2、BCL6、MUM1、LM02、MYC和p21的表达)。在白血病的情况下,疾病负荷程度可以通过评估血液或骨髓中残留的白血病来确定。在一些实施方案中,如果例如通过光学显微镜检查检测的,在骨髓中存在大于或等于5%的原始细胞,则对象表现出形态学疾病。在一些实施方案中,如果骨髓中存在少于5%原始细胞,则对象表现出完全或临床缓解。在一些实施方案中,对于白血病,对象可以表现出完全缓解,但是存在小部分形态学不可检测(通过光学显微镜检查技术)的残留白血病细胞。如果对象表现出骨髓中小于5%的原始细胞并且表现出可分子检测的癌症,则称所述对象表现出微小残留疾病(MRD)。在一些实施方案中,可以使用允许灵敏检测少量细胞的各种分子技术中的任何一种来评估可分子检测的癌症。在一些方面,此类技术包括PCR测定,其可以确定通过染色体易位产生的独特Ig/T细胞受体基因重排或融合转录物。在一些实施方案中,可以使用流式细胞术基于白血病特异性免疫表型鉴定癌细胞。在一些实施方案中,癌症的分子检测可以检测100,000个正常细胞中的少至1个白血病细胞。在一些实施方案中,如果通过PCR或流式细胞术检测到100,000个细胞中的至少或大于1个白血病细胞,则对象表现出可分子检测的MRD。在一些实施方案中,对象的疾病负荷是不可分子检测的或者对象表现出微小残留疾病(MRD),使得在一些情况下使用PCR或流式细胞术技术不能检测到对象体内的白血病细胞。

[0127] 在一些实施方案中,与即将施用本文提供的组合疗法之前的时间处的疾病负荷相比,所述组合疗法降低疾病负荷。在一些方面,施用所述组合疗法防止疾病负荷增加,并且这可以通过疾病负荷没有变化来证明。在一些实施方案中,与使用替代疗法的可比较方法(诸如其中在不施用靶向细胞因子构建体的情况下对象仅接受工程化细胞疗法的一种方法)观察到的降低相比,所述方法以更大的程度和/或在更长的时间段内减少疾病或病状的负荷,例如,肿瘤细胞的数量、肿瘤的大小、患者存活或无事件存活的持续时间。在一些实施方案中,与通过仅施用药剂中的每一种,例如向不接受工程化细胞疗法的对象施用靶向细胞因子构建体;或向不接受靶向细胞因子构建体的对象施用工程化细胞疗法实现的降低相比,在施用工程化细胞疗法和靶向细胞因子构建体的组合疗法后,疾病负荷以更大的程度降低或在更长的持续时间内降低。

[0128] 在一些实施方案中,检测、评估或测量对象中疾病或病状的负荷。在一些方面,可以通过检测对象中或对象的器官、组织或体液(诸如血液或血清)中的疾病细胞或疾病相关细胞(例如,肿瘤细胞)的总数来检测疾病负荷。在一些实施方案中,通过测量实体瘤的质量和/或转移的数量或程度来评估疾病负荷,例如肿瘤负荷。在一些方面,评估对象的存活、在某一时间段内的存活、存活程度、无事件或无症状存活的存在或持续时间或无复发存活。在一些实施方案中,评估疾病或病状的任何症状。在一些实施方案中,指定疾病或病状负荷的量度。在一些实施方案中,用于确定的示例性参数包括指示疾病或病状(例如,肿瘤)的减轻或改善的特定临床结局。此类参数包括:疾病控制的持续时间,所述疾病控制包括完全应答(CR)、部分应答(PR)或稳定疾病(SD)(参见例如,实体瘤中的应答评价标准(Response Evaluation Criteria In Solid Tumors, RECIST)指南)、客观应答率(ORR)、无进展存活(PFS)和总体存活(OS)。可以设定参数的具体阈值以确定本文提供的组合疗法方法的功效。

[0129] 在一些方面,在施用工程化细胞疗法之前,在施用工程化细胞疗法后但在施用靶向细胞因子构建体之前,或在施用靶向细胞因子构建体后但在施用工程化细胞疗法之前,和/或在施用工程化细胞疗法和靶向细胞因子构建体两者后测量或检测疾病负荷。在多次施用组合疗法的一个或多个步骤的情境下,在一些实施方案中,可以在施用任何步骤、剂量和/或施用周期之前或之后,或者在施用任何步骤、剂量和/或施用周期之间的时间,测量疾病负荷。

[0130] 在一些实施方案中,与即将施用靶向细胞因子构建体和工程化细胞疗法之前相比,通过所提供的方法,负荷降低或降低至少或至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。在一些实施方案中,与即将施用工程化细胞疗法和/或靶向细胞因子构建体之前相比,在施用工程化细胞疗法和靶向细胞因子构建体后,疾病负荷、肿瘤大小、肿瘤体积、肿瘤质量和/或肿瘤负担或体积减少至少或至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多。

[0131] 在一些实施方案中,通过所述方法降低疾病负荷包括诱导形态学完全缓解,例如,如在施用(例如,启动)组合疗法之后1个月、2个月、3个月或超过3个月时评估的。在一些方面,例如如通过多参数流式细胞术测量的,对微小残留疾病的测定是阴性的,或微小残留疾病的水平小于约0.3%、小于约0.2%、小于约0.1%或小于约0.05%。

[0132] 在一些实施方案中,与其他方法相比,所述方法提高对象的无事件存活率或总体存活率。例如,在一些实施方案中,在本文提供的组合疗法方法后6个月时,通过所述方法治

疗的对象无事件存活率或概率大于约40%、大于约50%、大于约60%、大于约70%、大于约80%、大于约90%或大于约95%。在一些方面,总体存活率大于约40%、大于约50%、大于约60%、大于约70%、大于约80%、大于约90%或大于约95%。在一些实施方案中,用所述方法治疗的对象表现出无事件存活、无复发存活或存活至少6个月或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10年。在一些实施方案中,至进展时间得到改善,诸如至进展时间大于或大于约6个月,或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10年。

[0133] 在一些实施方案中,与其他方法相比,在通过所述方法治疗后,复发概率有所减小。例如,在一些实施方案中,在组合疗法方法后6个月时,复发概率小于约80%、小于约70%、小于约60%、小于约50%、小于约40%、小于约30%、小于约20%或小于约10%。

[0134] 在一些实施方案中,本文所述的工程化细胞在即时医护现场进行修饰(例如,与本公开的靶向细胞因子构建体接触)。在一些情况下,即时医护现场是在医院或在需要治疗的对象附近的设施(例如,医疗设施)。所述对象接受单采术,并且获得的外周血单核细胞(PBMC)可以通过例如淘析富集。在一种情况下,使用含有人血清白蛋白的缓冲溶液进行淘析过程。工程化细胞,例如CAR+T细胞、TCR转导T细胞,可以通过本文所述的选择方法进行分离。在一种情况下,工程化细胞的选择方法包括对于工程化细胞(例如,CAR+T细胞)上的标志物(诸如CD3和CD8)具有特异性的珠。在一种情况下,所述珠可以是顺磁珠。收获和修饰的细胞可以在修饰之前在任何适当的冷冻保存溶液中进行冷冻保存。细胞可以在输注前解冻长达24小时、36小时、48小时、72小时或96小时。解冻的细胞可以置于细胞培养缓冲液中,例如在补充有胎牛血清(FBS)的细胞培养缓冲液(例如,RPMI)中,或在修饰之前置于包括IL-2和IL-21的缓冲液中。在另一方面,收获的细胞可以立即进行修饰,而无需冷冻保存。

[0135] 在一些情况下,通过工程化/引入嵌合受体、一个或多个细胞标签和/或与本公开的靶向细胞因子构建体接触,并且然后快速输注到对象中来修饰收获的细胞。在一些情况下,细胞来源可以包括同种异体和自体来源两者。在一种情况下,细胞可以是T细胞或NK细胞。在一种情况下,嵌合受体可以是CAR或TCR。在一些情况下,通过与包含细胞因子或功能片段或变体的靶向细胞因子构建体接触来修饰细胞,所述细胞因子或功能片段或变体包含选自SEQ ID NO:11-90的序列或与选自SEQ ID NO:11-90的序列具有至少约75%至约99%同一性的序列。

[0136] 在某些情况下,通过在细胞表面上表达与CAR或TCR分子分开的细胞标签,诸如截短表皮生长因子EGFRt来修饰工程化细胞。在一些情况下,细胞标签例如经由西妥昔单抗(cetuximab)被激活,用于有条件地体内消融经修饰的包含细胞标签(诸如如本文所述的截短表皮生长因子受体标签)的工程化细胞。在一些实施方案中,通过表达嵌合抗原受体或T细胞受体或其部分来修饰细胞,所述受体包含多肽标签序列,诸如具有以下序列的myc标签:EQKLISEEDL。在一些情况下,本公开的靶向细胞因子构建体包含细胞结合结构域(诸如抗体或其抗原结合片段),其对于如上所述的此类标签具有特异性,所述标签由细胞表达或表达为由细胞表达的CAR或TCR分子的一部分。实例是可以用于与在工程化细胞上表达的EGFRt标签结合的抗EGFR抗体,或可以用于与在工程化细胞上表达为CAR或TCR分子的一部分的myc标签结合的抗myc抗体。

[0137] 在一些实施方案中,收获的细胞通过电穿孔通过靶向细胞因子构建体进行修饰。在一种情况下,电穿孔是用电穿孔器进行的,诸如Lonza的Nucleofector™电穿孔器。在其他

实施方案中,包含上述构建体的载体是非病毒载体或病毒载体。在一种情况下,非病毒载体包括睡美人转座子转座酶系统。在一种情况下,使用特定序列对细胞进行电穿孔。例如,细胞可以用一个转座子进行电穿孔,接着用编码转座酶的DNA进行电穿孔,接着用第二个转座子进行电穿孔。在另一种情况下,免疫效应细胞可以同时用所有转座子和转座酶进行电穿孔。在另一种情况下,细胞可以用转座酶进行电穿孔,接着用两个转座子或一次用一个转座子进行电穿孔。在进行顺序电穿孔时,细胞可以在下一个电穿孔步骤之前休息一段时间。

[0138] 在一些情况下,经修饰的细胞不经历繁殖和激活步骤。在一些情况下,经修饰的细胞不经历温育或培养步骤(例如,离体繁殖)。在其他情况下,将修饰的免疫效应细胞在输注之前置于或静置在细胞培养缓冲液中,例如在补充有胎牛血清(FBS)的细胞培养缓冲液(例如,RPMI)中。在输注之前,可以收获经修饰的细胞,洗涤并在盐水缓冲液中配制,以准备输注到对象中。

[0139] 靶向细胞因子构建体

[0140] 在一些实施方案中,本公开提供了一种靶向细胞因子构建体,其包含:靶向以下中的至少一种的细胞结合结构域:(i)外源性地引入所述工程化细胞中的嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)的结构域;(ii)选择性地所述工程化细胞的表面上表达的标签分子;(iii)作为外源性地引入所述工程化细胞中的CAR的一部分的多肽标签;(iv)作为所述TCR的一部分的多肽标签;或(vi)(i)-(v)的任何组合;以及细胞因子蛋白或其功能片段或变体。

[0141] 一个实施方案提供了一种用于在与工程化细胞的组合疗法中使用的靶向细胞因子构建体,所述融合蛋白包含(i)细胞结合结构域,和(ii)细胞因子蛋白或其功能片段或变体,其中所述细胞结合结构域:(a)包含对于在所述工程化细胞上表达的抗原受体(例如,CAR或TCR)的结构域具有特异性的抗体或其抗原结合片段;(c)对于标签具有特异性,其中所述标签是由所述工程化细胞共表达(“单独表达”)的表面分子或者是由所述工程化细胞表达的抗原受体(例如,CAR或TCR)的一部分(“CAR的一部分”或“TCR的一部分”);(d)是来自被所述工程化细胞靶向的抗原的结构域;或(e)包含(a)-(d)的任何组合。在一些实施方案中,由所述工程化细胞表达的受体是嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)。

[0142] 在一些实施方案中,靶向细胞因子构建体包含两个部分,其中:i)第一部分是多肽,其包含抗体重链VH-CH1-铰链-CH2-CH3单体,其中VH是可变重链并且CH2-CH3是Fc结构域;抗体轻链VL-CL,其中VL是可变轻链,并且CL是恒定轻链;以及突变体细胞因子多肽,其中所述突变体细胞因子多肽的N末端经由接头与所述Fc结构域的C末端融合;ii)第二部分是多肽,其包含抗体重链VH-CH1-铰链-CH2-CH3单体和抗体轻链VL-CL;并且其中第一部分和第二部分两者与工程化细胞上选择性表达的结构域结合,对于非工程化细胞则并非如此。

[0143] 在一些实施方案中,靶向细胞因子构建体包含两个部分,其中:i)第一部分是多肽,其包含抗体铰链-CH2-CH3单体,其中CH2-CH3是Fc结构域;和突变体细胞因子多肽,其中所述突变体细胞因子多肽的N末端经由接头与所述Fc结构域的C末端融合;ii)第二部分是多肽,其包含抗体重链VH-CH1-铰链-CH2-CH3单体和抗体轻链VL-CL;并且其中第二部分与工程化细胞上选择性表达的结构域结合,对于非工程化细胞则并非如此。

[0144] 在一些实施方案中,靶向细胞因子构建体包含两个部分,其中:i)第一部分是多

肽,其包含抗体铰链-CH2-CH3单体,其中CH2-CH3是Fc结构域;和突变体细胞因子多肽,其中所述突变体细胞因子多肽的C末端经由接头与所述Fc结构域的N末端融合;ii)第二部分是多肽,其包含抗体重链VH-CH1-铰链-CH2-CH3单体和抗体轻链VL-CL;并且其中第二部分与工程化细胞上选择性表达的结构域结合,对于非工程化细胞则并非如此。

[0145] 在一些实施方案中,本公开提供了一种靶向细胞因子构建体,其包含(i)细胞结合结构域,和(ii)细胞因子蛋白或其功能片段或变体,其中所述细胞结合结构域:(a)包含对于外源性地在所述工程化细胞的表面上表达的受体或结构域具有特异性的抗体或其抗原结合片段;(b)包含对于在所述工程化细胞上表达的抗原结合蛋白的结构域具有特异性的抗体或其抗原结合片段;(c)对于由所述工程化细胞共表达的标签或由所述工程化细胞表达的受体(例如,嵌合抗原受体-CAR;或T细胞受体-TCR)上的标签具有特异性;(d)是来自被所述工程化细胞靶向的抗原的结构域;或(e)包含(a)-(d)的任何组合。

[0146] 在一些实例中,所述细胞结合结构域是对于外源性地在所述工程化细胞的表面上表达的受体或结构域具有特异性的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述细胞结合结构域包含对于所述工程化细胞具有特异性的独特型抗体。在一些实施方案中,所述细胞结合结构域对于在所述工程化细胞上表达的抗原结合蛋白的结构域,例如在所述工程化细胞上表达的scFv具有特异性,其中所述细胞结合结构域对于VH-VL界面、VH、VL或scFv的接头具有特异性。在一些实施方案中,所述细胞结合结构域对于由所述工程化细胞共表达的标签,诸如EGFRt标签具有特异性。在一些实施方案中,所述细胞结合结构域对于由所述工程化细胞表达的CAR构建体上的标签具有特异性。实例在图5A中示出。在一些实施方案中,CAR构建体上的这种标签是以下结构的一部分:scFv-标签-跨膜结构域-额外结构域,诸如CD3 ζ 信号结构域、共刺激结构域(例如,CD28结构域、41-BB结构域)

[0147] 在一些实施方案中,所述细胞结合结构域包含来自被所述工程化细胞靶向的抗原的结构域,所述抗原的非限制性实例包括来自肿瘤相关抗原的新表位、TSHR、CD19、CD123、CD22、CD30、CD171、CS-1、CLL-1、CD33、EGFRv111、GD2、GD3、BCMA、Tn Ag、PSMA、ROR1、FLT3、FAP、TAG72、CD38、CD44v6、CEA、EPCAM、B7H3、KIT、IL-13Ra2、间皮素、IL-11Ra、PSCA、PRSS21、VEGFR2、LewisY、CD24、PDGFR- β 、SSEA-4、CD20、叶酸受体 α 、ERBB2 (Her2/neu)、MUC1、EGFR、NCAM、前列腺酶、PAP、ELF2M、Ephrin B2、IGF-I受体、CAIX、LMP2、gp100、bcr-abl、酪氨酸酶、EphA2、岩藻糖基GM1、sLe^x、GM3、TGS5、HMWMAA、o-乙酰基-GD2、叶酸受体 β 、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、GPC5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、聚唾液酸、PLAC1、GloboH、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、GPR20、LY6K、OR51 E2、TARP、WT1、NY-ESO-1、LAGE-1a、MAGE-A1、豆荚蛋白、HPV E6、E7、MAGE A1、ETV6-AML、精子蛋白17、XAGE1、Tie 2、MAD-CT-1、MAD-CT-2、Fos相关抗原1、p53、p53突变体、prostein、存活素和端粒酶、PCTA-1/半乳凝素8、MelanA/MART1、Ras突变体、hTERT、肉瘤易位断点、ML-IAP、ERG (TMPRSS2 ETS融合基因)、NA17、PAX3、雄性激素受体、细胞周期蛋白B1、MYCN、RhoC、TRP-2、CYP1 B1、BORIS、SART3、PAX5、OY-TES1、LCK、AKAP-4、SSX2、RAGE-1、人端粒酶逆转录酶、RU1、RU2、肠道羧基酯酶、mut hsp70-2、CD79a、CD79b、CD72、LAIR1、FCAR、LILRA2、CD300LF、CLEC12A、BST2、EMR2、LY75、GPC3、FCRL5或IGLL1

[0148] 所述细胞因子的非限制性实例包括IL-2、IL-7、IL-10、IL-15和IL-21、或其功能片段、或其变体或其任何组合。在一些实施方案中,所述细胞因子是IL-2多肽、其片段或变体。

在一些实施方案中,所述细胞因子是IL-7多肽、其片段或变体。在一些实施方案中,所述细胞因子是IL-10多肽、其片段或变体。在一些实施方案中,所述细胞因子是IL-21多肽、其片段或变体。对原始细胞因子肽,例如野生型IL-2、IL-7、IL-10、IL-15或IL-21的多种修饰可以组合以实现所需的活性修饰,诸如亲和力降低或生物物理特性改善。作为非限制性实例,用于共有N-连接糖基化的氨基酸序列可以并入多肽中以允许糖基化。另一个非限制性实例是赖氨酸可以并入到多肽上以实现聚乙二醇化。在一些实施方案中,将一个或多个突变引入多肽中,以通过降低其对于它的受体的亲和力来改变其活性。

[0149] 白介素-2(IL-2)

[0150] 在一些实施方案中,所述IL-2多肽是如本文所述的突变体IL-2多肽。在一些实施方案中,本文提供了突变体细胞因子(例如,IL-2多肽),所述突变体细胞因子对于其受体(例如,IL-2R α (例如,包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列,或如图6B中所描绘))表现出小于50%的结合亲和力。

[0151] 除非另外指示,否则如在本文中可互换使用的“白介素-2”或“IL-2”可以是指任何天然IL-2。“IL-2”可以涵盖未加工IL-2(诸如前体IL-2)以及“成熟IL-2”,其可以是细胞中通过加工产生的IL-2的一种形式。人“成熟IL-2”的序列提供为SEQ ID NO:1。未加工人IL-2的一种示例性形式可以包含附接到成熟IL-2的额外N末端氨基酸信号肽。“IL-2”还可以包括但不限于IL-2的天然存在变体,例如一种或多种等位基因或剪接变体。示例性人IL-2的氨基酸序列在UniProt P60568(IL2_人)下描述。“突变体IL-2多肽”可以是指IL-2多肽,所述多肽对于其受体可以具有改变的亲和力,诸如对于其受体的亲和力降低,其中这种降低的亲和力将导致突变体的生物活性降低。亲和力的改变,诸如亲和力降低并且因此活性降低可以通过引入少量氨基酸突变或取代来获得。突变体IL-2多肽还可以具有对于肽骨架的其他修饰,包括但不限于多肽的氨基酸缺失、置换、环化、二硫键或翻译后修饰(例如,糖基化或改变的碳水化合物),对于多肽的化学或酶促修饰(例如,将PEG附接到多肽骨架上),添加肽标签或标记,或与蛋白质或蛋白质结构域融合以生成具有所需特征的最终构建体,诸如对于IL-2R β γ 的亲和力降低。所需活性还可以包括与野生型IL-2多肽相比改善的生物物理特性。可以组合多种修饰以实现所需的活性改变,诸如降低或增加亲和力或改善生物物理特性。作为非限制性实例,用于共有N-连接糖基化的氨基酸序列可以并入多肽中以允许糖基化。另一个非限制性实例是赖氨酸可以并入到多肽上以实现聚乙二醇化。在一些情况下,将一个或多个突变引入多肽中以改变其活性。

[0152] 在一些实施方案中,野生型IL-2多肽包含以下序列:APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI
LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYM PKKATELKHLQCLEEELKPLEEVNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIV LELKG
SETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT(SEQ ID NO:1)。

[0153] 在一些实施方案中,突变体IL-2多肽对于IL-2R β (例如,包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列)还表现出小于50%的结合亲和力。在一些实施方案中,与野生型IL-2多肽(例如,包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列)相比,突变体IL-2多肽对于IL-2R α 表现出小于50%的结合亲和力并且对于IL-2R β (例如,包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列或如图6C中所描绘)表现出小于50%的结合亲和力。在一些实施方案中,与野生型IL-2多肽(例如,包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列)相比,突变体IL-2多肽对于IL-2R α 表现出小于50%的结合亲和力并且对于IL-2R γ (例如,包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列或如图6D中所描绘)表现出小于50%的结合亲和

力。在一些实施方案中,与野生型IL-2多肽相比,突变体IL-2多肽对于IL-2R α 表现出小于50%的结合亲和力,对于IL-2R β 表现出小于50%的结合亲和力,并且对于IL-2R γ 表现出小于50%的结合亲和力。可以例如在本领域技术人员熟悉的测量蛋白质-蛋白质相互作用的亲和力的标准表面等离子体共振 (SPR) 测定中测量野生型和所公开的突变体多肽对于IL-2R α 和IL-2R β 的结合亲和力的差异。野生型和所公开的突变体多肽对于IL-2R γ 的结合亲和力的差异不能通过SPR测定可靠地测量,因为野生型IL-2多肽对于IL-2R γ 的亲和力非常低。相反,它们对于IL-2R γ 的亲和力降低可以通过进行体外测定来推断,所述测定测量pSTAT5并比较在IL-2R表达细胞上具有和没有降低IL-2R γ 亲和力的取代的IL-2多肽的活性。

[0154] 在一些实施方案中,所述细胞因子是以下中的至少一种:(i) 结合和/或激活包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2R β 多肽的IL-2R β γ 激动剂多肽;和(ii) 结合和/或激活包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的IL-2R γ 多肽的IL-2R β γ 多肽激动剂多肽。

[0155] 在一些实施方案中,IL-2R β 多肽包含以下序列:MAAPALSWRLPLLILLPLATSWASAAVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDQALQDTSCQVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRMAPISLQVVHVETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLPDTQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTKPAALGKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFIIILVYLLINCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGSPSPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLRAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPHTLV (SEQ ID NO:3)。

[0156] 在一些实施方案中,IL-2R α 多肽包含以下序列:MDSYLLMWGLLTFIMVPGCQAECLDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTM LNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEKPKQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQVAVAGCVFLLISVLLL SGLTWQRRQRKSRRTI (SEQ ID NO:2)。

[0157] 在一些实施方案中,所述细胞因子是IL-2多肽、或其功能片段或其变体。在一些实施方案中,所述细胞因子是突变体IL-2多肽,与包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的野生型IL-2多肽对于包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的IL-2R α 多肽的结合亲和力相比,所述突变体IL-2多肽表现出的对于所述IL-2R α 多肽的结合亲和力降低50%或更多。在一些实施方案中,所述细胞因子是突变体IL-2多肽,与包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的野生型IL-2多肽对于包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的IL-2R β 多肽的结合亲和力相比,所述突变体IL-2多肽还表现出的对于所述IL-2R β 多肽的结合亲和力降低50%或更多。

[0158] 在一些实施方案中,所述细胞因子是突变体IL-2多肽,与包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的野生型IL-2多肽对于包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的IL-2R γ 多肽的结合亲和力相比,所述突变体IL-2多肽表现出的对于IL-2R α 多肽的结合亲和力降低50%或更多,并且对于包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的IL-2R γ 多肽的结合亲和力降低50%或更多。

[0159] 在一些实施方案中,IL-2R γ 多肽包含以下序列:MLKPSLPFTSLLFLQLPLLGVLNTTILTPNGNEDTTADFFLTMTDLSVSTLPLPEVQCFVFNVEYMNCTWNSSSEPQPTNLTHYWKNSDNDKVQKCS

HYLFSEEITSGCQLQKKEIHLVYQTFVVLQDPREPRRQATQMLKLQNLVIPWAPENLT LHKLSSESQLELNWNNRFL
NHCLEHLVQYRTDWDHSWTEQSVDIRHKFSLPSVDGQKRYTFRVRSRFPNPLCGSAQHWSEWSHP IHWGSNTSKENP
FLFALEAVVISVSGMGLIISLLCVYFWLERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCL
VSEIPPKGGALGEGPGASPCNQHSPIYWAPPCYTLKPET (SEQ ID NO:4)。

[0160] 在一些实例中,相对于具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的野生型成熟IL-2多肽,本公开的突变体IL-2多肽具有一个或多个、两个或更多个或者三个或更多个降低亲和力的氨基酸取代,其中一个或多个、两个或更多个或者三个或更多个经取代的残基选自下组:Q11、H16、L18、L19、D20、Q22、R38、F42、K43、Y45、E62、P65、E68、V69、L72、D84、S87、N88、V91、I92、T123、Q126、S127、I129和S130。野生型成熟IL-2多肽的序列中可能氨基酸取代的位置。与IL-2R α 的降低亲和力可以通过取代野生型成熟IL-2多肽的序列中以下残基中的一个或多个来获得:R38、F42、K43、Y45、E62、P65、E68、V69和L72。与IL-2R β 的降低亲和力可以通过取代以下残基中的一个或多个来获得:E15、H16、L19、D20、D84、S87、N88、V91和I92。与IL-2R γ 的降低亲和力可以通过取代野生型成熟IL-2多肽的序列中以下残基中的一个或多个来获得:Q11、L18、Q22、T123、Q126、S127、I129和S130。

[0161] 在一些实施方案中,相对于野生型成熟IL-2氨基酸序列(例如,SEQ ID NO:1,如图6A中所描绘),所述突变体IL-2多肽包含F42A或F42K氨基酸取代。在一些实施方案中,相对于野生型成熟IL-2氨基酸序列,所述突变体IL-2多肽包含F42A或F42K氨基酸取代和R38A、R38D、R38E、E62Q、E68A、E68Q、E68K或E68R氨基酸取代。例如,在一些实施方案中,相对于野生型成熟IL-2氨基酸序列(例如,如SEQ ID NO:1中所示),所述突变体IL-2多肽包含F42A;R38A和F42A;R38D和F42A;R38E和F42A;F42A和E62Q;F42A和E68A;F42A和E68Q;F42A和E68K;F42A和E68R;或R38A和F42K氨基酸取代。在一些实施方案中,相对于野生型IL-2氨基酸序列,所述突变体IL-2多肽包含R38E和F42A氨基酸取代。在一些实施方案中,相对于野生型IL-2氨基酸序列,所述突变体IL-2多肽包含R38D和F42A氨基酸取代。在一些实施方案中,相对于野生型IL-2氨基酸序列,所述突变体IL-2多肽包含F42A和E62Q氨基酸取代。在一些实施方案中,相对于野生型IL-2氨基酸序列,所述突变体IL-2多肽包含R38A和F42K氨基酸取代。在一些实施方案中,相对于野生型IL-2氨基酸序列,所述突变体IL-2多肽包含R38D和F42A氨基酸取代。在一些实施方案中,相对于野生型IL-2氨基酸序列,所述突变体IL-2多肽包含R38A和F42K氨基酸取代。在一些实施方案中,相对于野生型IL-2氨基酸序列,所述突变体IL-2多肽包含F42A和E62Q氨基酸取代。在一些实施方案中,相对于野生型IL-2氨基酸序列,所述突变体IL-2多肽包含H16E、H16D、D20N、M23A、M23R、M23K、D84L、D84N、D84V、D84H、D84Y、D84R、D84K、S87K、S87A、N88A、N88D、N88G、N88S、N88T、N88R、N88I、V91A、V91T、V91E、I92A、E95S、E95A、E95R、T123A、T123E、T123K、T123Q、Q126A、Q126S、Q126T、Q126E、S127A、S127E、S127K或S127Q氨基酸取代。在一些实施方案中,相对于野生型成熟IL-2氨基酸序列,所述突变体IL-2多肽包含F42A;R38A和F42A;R38D和F42A;R38E和F42A;F42A和E62Q;F42A和E68A;F42A和E68Q;F42A和E68K;F42A和E68R;或R38A和F42K氨基酸取代,并且相对于野生型成熟IL-2氨基酸序列(例如,如SEQ ID NO:1中所示),包含H16E、H16D、D20N、M23A、M23R、M23K、D84L、D84N、D84V、D84H、D84Y、D84R、D84K、S87K、S87A、N88A、N88D、N88G、N88S、N88T、N88R、N88I、V91A、V91T、V91E、I92A、E95S、E95A、E95R、T123A、T123E、T123K、T123Q、Q126A、Q126S、Q126T、Q126E、S127A、S127E、S127K或S127Q氨基酸取代。例如,在一些实施方案中,相

对于野生型IL-2氨基酸序列,所述突变体IL-2多肽包含R38E、F42A和H16E氨基酸取代。在一些实施方案中,相对于野生型IL-2氨基酸序列,所述突变体IL-2多肽包含R38E、F42A和H16D氨基酸取代。在一些实施方案中,相对于野生型IL-2氨基酸序列,所述突变体IL-2多肽包含R38E、F42A和D84K氨基酸取代。在一些实施方案中,相对于野生型IL-2氨基酸序列,所述突变体IL-2多肽包含R38E、F42A和D84R氨基酸取代。在一些实施方案中,相对于野生型IL-2氨基酸序列,所述突变体IL-2多肽包含R38E、F42A和N88S氨基酸取代。在一些实施方案中,相对于野生型IL-2氨基酸序列,所述突变体IL-2多肽包含R38E、F42A和N88A氨基酸取代。在一些实施方案中,相对于野生型IL-2氨基酸序列,所述突变体IL-2多肽包含R38E、F42A和N88G氨基酸取代。在一些实施方案中,相对于野生型IL-2氨基酸序列,所述突变体IL-2多肽包含R38E、F42A和N88R氨基酸取代。在一些实施方案中,相对于野生型IL-2氨基酸序列,所述突变体IL-2多肽包含R38E、F42A和N88T氨基酸取代。在一些实施方案中,相对于野生型IL-2氨基酸序列,所述突变体IL-2多肽包含R38E、F42A和N88D氨基酸取代。在一些实施方案中,相对于野生型IL-2氨基酸序列,所述突变体IL-2多肽包含R38E、F42A和V91E氨基酸取代。在一些实施方案中,相对于野生型IL-2氨基酸序列,所述突变体IL-2多肽包含R38E、F42A和Q126S氨基酸取代。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,具有以下氨基酸取代(相对于SEQ ID NO:1的序列)组中的一个:R38E和F42A;R38D和F42A;F42A和E62Q;R38A和F42K;R38E、F42A和N88S;R38E、F42A和N88A;R38E、F42A和N88G;R38E、F42A和N88R;R38E、F42A和N88T;R38E、F42A和N88D;R38E、F42A和V91E;R38E、F42A和D84H;R38E、F42A和D84K;R38E、F42A和D84R;H16D、R38E和F42A;H16E、R38E和F42A;R38E、F42A和Q126S;R38D、F42A和N88S;R38D、F42A和N88A;R38D、F42A和N88G;R38D、F42A和N88R;R38D、F42A和N88T;R38D、F42A和N88D;R38D、F42A和V91E;R38D、F42A和D84H;R38D、F42A和D84K;R38D、F42A和D84R;H16D、R38D和F42A;H16E、R38D和F42A;R38D、F42A和Q126S;R38A、F42K和N88S;R38A、F42K和N88A;R38A、F42K和N88G;R38A、F42K和N88R;R38A、F42K和N88T;R38A、F42K和N88D;R38A、F42K和V91E;R38A、F42K和D84H;R38A、F42K和D84K;R38A、F42K和D84R;H16D、R38A和F42K;H16E、R38A和F42K;R38A、F42K和Q126S;F42A、E62Q和N88S;F42A、E62Q和N88A;F42A、E62Q和N88G;F42A、E62Q和N88R;F42A、E62Q和N88T;F42A、E62Q和N88D;F42A、E62Q和V91E;F42A、E62Q和D84H;F42A、E62Q和D84K;F42A、E62Q和D84R;H16D、F42A和E62Q;H16E、F42A和E62Q;F42A、E62Q和Q126S;R38E、F42A和C125A;R38D、F42A和C125A;F42A、E62Q和C125A;R38A、F42K和C125A;R38E、F42A、N88S和C125A;R38E、F42A、N88A和C125A;R38E、F42A、N88G和C125A;R38E、F42A、N88R和C125A;R38E、F42A、N88T和C125A;R38E、F42A、N88D和C125A;R38E、F42A、V91E和C125A;R38E、F42A、D84H和C125A;R38E、F42A、D84K和C125A;R38E、F42A、D84R和C125A;H16D、R38E、F42A和C125A;H16E、R38E、F42A和C125A;R38E、F42A、C125A和Q126S;R38D、F42A、N88S和C125A;R38D、F42A、N88A和C125A;R38D、F42A、N88G和C125A;R38D、F42A、N88R和C125A;R38D、F42A、N88T和C125A;R38D、F42A、N88D和C125A;R38D、F42A、V91E和C125A;R38D、F42A、D84H和C125A;R38D、F42A、D84K和C125A;R38D、F42A、D84R和C125A;H16D、R38D、F42A和C125A;H16E、R38D、F42A和C125A;R38D、F42A、C125A和Q126S;R38A、F42K、N88S和C125A;R38A、F42K、N88A和C125A;R38A、F42K、N88G和C125A;R38A、F42K、N88R和C125A;R38A、F42K、N88T和C125A;R38A、F42K、N88D和C125A;R38A、F42K、V91E和C125A;R38A、F42K、D84H和C125A;R38A、F42K、D84K和C125A;R38A、F42K、D84R和C125A;H16D、

R38A、F42K和C125A;H16E、R38A、F42K和C125A;R38A、F42K、C125A和Q126S;F42A、E62Q、N88S和C125A;F42A、E62Q、N88A和C125A;F42A、E62Q、N88G和C125A;F42A、E62Q、N88R和C125A;F42A、E62Q、N88T和C125A;F42A、E62Q、N88D和C125A;F42A、E62Q、V91E和C125A;F42A、E62Q和D84H和C125A;F42A、E62Q和D84K和C125A;F42A、E62Q和D84R和C125A;H16D、F42A和E62Q和C125A;H16E、F42A、E62Q和C125A;F42A、E62Q、C125A和Q126S;F42A、N88S和C125A;F42A、N88A和C125A;F42A、N88G和C125A;F42A、N88R和C125A;F42A、N88T和C125A;F42A、N88D和C125A;F42A、V91E和C125A;F42A、D84H和C125A;F42A、D84K和C125A;F42A、D84R和C125A;H16D、F42A和C125A;H16E、F42A和C125A;以及F42A、C125A和Q126S。在一些实施方案中,所述IL-2多肽包含SEQ ID NO:1的序列,具有相对于SEQ ID NO:1的一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代,并且其中所述一个、两个、三个、四个或五个取代包括在选自以下的SEQ ID NO:1的位置处的一个或多个取代:Q11、H16、L18、L19、D20、Q22、R38、F42、K43、Y45、E62、P65、E68、V69、L72、D84、S87、N88、V91、I92、T123、Q126、S127、I129和S130。在一些实施方案中,所述IL-2多肽包含SEQ ID NO:1的序列,具有以下氨基酸取代(相对于SEQ ID NO:1的序列)组中的一个:R38E和F42A;R38D和F42A;F42A和E62Q;R38A和F42K;R38E、F42A和N88S;R38E、F42A和N88A;R38E、F42A和N88G;R38E、F42A和N88R;R38E、F42A和N88T;R38E、F42A和N88D;R38E、F42A和V91E;R38E、F42A和D84H;R38E、F42A和D84K;R38E、F42A和D84R;H16D、R38E和F42A;H16E、R38E和F42A;R38E、F42A和Q126S;R38D、F42A和N88S;R38D、F42A和N88A;R38D、F42A和N88G;R38D、F42A和N88R;R38D、F42A和N88T;R38D、F42A和N88D;R38D、F42A和V91E;R38D、F42A和D84H;R38D、F42A和D84K;R38D、F42A和D84R;H16D、R38D和F42A;H16E、R38D和F42A;R38D、F42A和Q126S;R38A、F42K和N88S;R38A、F42K和N88A;R38A、F42K和N88G;R38A、F42K和N88R;R38A、F42K和N88T;R38A、F42K和N88D;R38A、F42K和V91E;R38A、F42K和D84H;R38A、F42K和D84K;R38A、F42K和D84R;H16D、R38A和F42K;H16E、R38A和F42K;R38A、F42K和Q126S;F42A、E62Q和N88S;F42A、E62Q和N88A;F42A、E62Q和N88G;F42A、E62Q和N88R;F42A、E62Q和N88T;F42A、E62Q和N88D;F42A、E62Q和V91E;F42A、E62Q和D84H;F42A、E62Q和D84K;以及F42A、E62Q和D84R。

[0162] 在一些实施方案中,所述IL-2多肽包含SEQ ID NO:1的序列,在位置C125处具有相对于SEQ ID NO:1的另一个氨基酸取代。在一些实施方案中,所述IL-2多肽包含SEQ ID NO:1的序列,具有以下氨基酸取代(相对于SEQ ID NO:1的序列)组中的一个:R38E、F42A和C125A;R38D、F42A和C125A;F42A、E62Q和C125A;R38A、F42K和C125A;R38E、F42A、N88S和C125A;R38E、F42A、N88A和C125A;R38E、F42A、N88G和C125A;R38E、F42A、N88R和C125A;R38E、F42A、N88D和C125A;R38E、F42A、N88T和C125A;R38E、F42A、V91E和C125A;R38E、F42A、D84H和C125A;R38E、F42A、D84K和C125A;R38E、F42A、D84R和C125A;H16D、R38E、F42A和C125A;H16E、R38E、F42A和C125A;R38E、F42A、C125A和Q126S;R38D、F42A、N88S和C125A;R38D、F42A、N88A和C125A;R38D、F42A、N88G和C125A;R38D、F42A、N88R和C125A;R38D、F42A、N88T和C125A;R38D、F42A、N88D和C125A;R38D、F42A、V91E和C125A;R38D、F42A、D84H和C125A;R38D、F42A、D84K和C125A;R38D、F42A、D84R和C125A;H16D、R38D、F42A和C125A;H16E、R38D、F42A和C125A;R38D、F42A、C125A和Q126S;R38A、F42K、N88S和C125A;R38A、F42K、N88G和C125A;R38A、F42K、N88R和C125A;R38A、F42K、N88T和C125A;R38A、F42K、N88D和C125A;R38A、F42K、N88A和C125A;R38A、F42K、V91E和C125A;R38A、F42K、D84H和C125A;R38A、F42K、D84K和

C125A;R38A、F42K、D84R和C125A;H16D、R38A、F42K和C125A;H16E、R38A、F42K和C125A;R38A、F42K、C125A和Q126S;F42A、E62Q、N88S和C125A;F42A、E62Q、N88A和C125A;F42A、E62Q、N88G和C125A;F42A、E62Q、N88R和C125A;F42A、E62Q、N88T和C125A;F42A、E62Q、N88D和C125A;F42A、E62Q、V91E和C125A;F42A、E62Q和D84H和C125A;F42A、E62Q和D84K和C125A;F42A、E62Q和D84R和C125A;H16D、F42A和E62Q和C125A;H16E、F42A、E62Q和C125A;F42A、E62Q、C125A和Q126S;F42A、N88S和C125A;F42A、N88A和C125A;F42A、N88G和C125A;F42A、N88R和C125A;F42A、N88T和C125A;F42A、N88D和C125A;F42A、V91E和C125A;F42A、D84H和C125A;F42A、D84K和C125A;F42A、D84R和C125A;H16D、F42A和C125A;H16E、F42A和C125A;以及F42A、C125A和Q126S。

[0163] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTEMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT(SEQ ID NO:11)的氨基酸序列。

[0164] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTDMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT(SEQ ID NO:12)的氨基酸序列。

[0165] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINV IVLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT(SEQ ID NO:13)的氨基酸序列。

[0166] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTAMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT(SEQ ID NO:14)的氨基酸序列。

[0167] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTEMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISSINVI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT(SEQ ID NO:15)的氨基酸序列。

[0168] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTEMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISAINVI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT(SEQ ID NO:16)的氨基酸序列。

[0169] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTEMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINEI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT(SEQ ID NO:17)的氨基酸序列。

[0170] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTEMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRHLISNINVI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT(SEQ ID NO:18)的氨基酸序列。

[0171] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEDLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTEMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT(SEQ ID NO:19)的氨基酸序列。

[0172] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEELLLDLQMILNGIN NYKNPKLTEMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIV VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT(SEQ ID NO:20)的氨基酸序列。

[0173] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTEM LTAKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFCSSIISTLT (SEQ ID NO:21)的氨基酸序列。

[0174] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTDMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISSINVI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:22)的氨基酸序列。

[0175] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTDMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISAINVI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:23)的氨基酸序列。

[0176] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTDMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINEI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:24)的氨基酸序列。

[0177] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTDMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRHLISNINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:25)的氨基酸序列。

[0178] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEDLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTDMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:26)的氨基酸序列。

[0179] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEELLLDLQMILNGIN NYKNPKLTDMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:27)的氨基酸序列。

[0180] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTDMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFCSSIISTLT (SEQ ID NO:28)的氨基酸序列。

[0181] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTAMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISSININVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:29)的氨基酸序列。

[0182] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTAMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISAINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:30)的氨基酸序列。

[0183] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTAMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINEI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:31)的氨基酸序列。

[0184] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTAMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRHLISNINVI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:32)的氨基酸序列。

[0185] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEDLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTAMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:33)的氨基酸序列。

[0186] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEELLLDLQMILNGIN NYKNPKLTAMLTKKFY MPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:34)的氨基酸序列。

[0187] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTAMLTKKFY MPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFCSSIIISTLT (SEQ ID NO:35)的氨基酸序列。

[0188] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISSINVI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:36)的氨基酸序列。

[0189] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISAINV IVLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:37)的氨基酸序列。

[0190] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINEI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:38)的氨基酸序列。

[0191] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRHLISNINV IVLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:39)的氨基酸序列。

[0192] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEDLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINV IVLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:40)的氨基酸序列。

[0193] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEELLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINV IVLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:41)的氨基酸序列。

[0194] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINV IVLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFCSSIIISTLT (SEQ ID NO:42)的氨基酸序列。

[0195] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTEMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:43)的氨基酸序列。

[0196] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTDMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:44)的氨基酸序列。

[0197] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINV IVLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:45)的氨基酸序列。

[0198] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTAMLTKKFY MPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:46)的氨基酸序列。

[0199] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTEMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISSINVI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:47)的氨基酸序列。

[0200] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTEMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISAINVI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:48)的氨基酸序列。

[0201] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTEMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINEI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:49)的氨基酸序列。

[0202] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTEMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRHLISNINVI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:50)的氨基酸序列。

[0203] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEDLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTEMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:51)的氨基酸序列。

[0204] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEELLLDLQMILNGIN NYKNPKLTEMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIV LELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:52)的氨基酸序列。

[0205] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTEMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFASSIISTLT (SEQ ID NO:53)的氨基酸序列。

[0206] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTDMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISSINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:54)的氨基酸序列。

[0207] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTDMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISAINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:55)的氨基酸序列。

[0208] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTDMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINEIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:56)的氨基酸序列。

[0209] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTDMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRHLISNINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:57)的氨基酸序列。

[0210] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEDLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTDMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:58)的氨基酸序列。

[0211] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEELLLDLQMILNGIN NYKNPKLTDMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:59)的氨基酸序列。

[0212] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTDMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFASSIISTLT(SEQ ID NO:60)的氨基酸序列。

[0213] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTAMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISSINVI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT(SEQ ID NO:61)的氨基酸序列。

[0214] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTAMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISAINVI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT(SEQ ID NO:62)的氨基酸序列。

[0215] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTAMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINEI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT(SEQ ID NO:63)的氨基酸序列。

[0216] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTAMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRHLISNINVI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT(SEQ ID NO:64)的氨基酸序列。

[0217] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEDLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTAMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT(SEQ ID NO:65)的氨基酸序列。

[0218] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEELLLDLQMILNGIN NYKNPKLTAMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT(SEQ ID NO:66)的氨基酸序列。

[0219] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTAMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFASSIISTLT(SEQ ID NO:67)的氨基酸序列。

[0220] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISSINVI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT(SEQ ID NO:68)的氨基酸序列。

[0221] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISAINV IVLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT(SEQ ID NO:69)的氨基酸序列。

[0222] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINEI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT(SEQ ID NO:70)的氨基酸序列。

[0223] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRHLISNINV IVLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT(SEQ ID NO:71)的氨基酸序列。

[0224] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEDLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINV IVLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT(SEQ ID NO:72)的氨基酸序列。

[0225] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEELLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEEQLKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINV IVLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:73)的氨基酸序列。

[0226] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEEQLKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINV IVLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFASSIISTLT (SEQ ID NO:74)的氨基酸序列。

[0227] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISSINVI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:75)的氨基酸序列。

[0228] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISAINVI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:76)的氨基酸序列。

[0229] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINEI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:77)的氨基酸序列。

[0230] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRHLISNINVI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:78)的氨基酸序列。

[0231] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEDLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:79)的氨基酸序列。

[0232] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEELLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:80)的氨基酸序列。

[0233] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFASSIISTLT (SEQ ID NO:81)的氨基酸序列。

[0234] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTEMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISGINVI VLELKGSETTF MCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:82)的氨基酸序列。

[0235] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTDMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISGINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:83)的氨基酸序列。

[0236] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTAMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISGINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:84)的氨基酸序列。

[0237] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEQLKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISGINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:85)的氨基酸序列。

[0238] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTEMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISGINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:86)的氨基酸序列。

[0239] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTDMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISGINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:87)的氨基酸序列。

[0240] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTAMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISGINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:88)的氨基酸序列。

[0241] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISGINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:89)的氨基酸序列。

[0242] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISGINVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:90)的氨基酸序列。

[0243] 在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTEMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRKLISNINIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:137)的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTEMLTAKFYMPKKATELKHLQC LEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRRLISNINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:138)的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKK TQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTDMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRKL ISNINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:139)的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLT DMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRRLISNINIVLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:140)的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体 IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTAMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELK PLEEVLNLAQSKNFHLRPRKLISNINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:141)的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHL LLDLQMILNGINNYKNPKLTAMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRRLISNINIV LELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:142)的氨基酸序列。在一些实 施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRKLISNINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRW ITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:143)的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包 含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQ SKNFHLRPRRLISNINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:144)的 氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILN GINNYKNPKLTEMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRKLISNINIVLELKGSETT FMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:145)的氨基酸序列。在一些实施方案中,

所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTEMLTAKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRRLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:146) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTDMLTAKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRKLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:147) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTDMLTAKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRRLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:148) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTAMLTAKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRRLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:149) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTAMLTAKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRRLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:150) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRKLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:151) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRRLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:152) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRKLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:153) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRRLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:154) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTEMLTAKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:156) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTEMLTAKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:157) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTEMLTAKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:158) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTEMLTAKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:159) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTEMLTAKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:160) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTEMLTAKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:161) 的氨基酸序列。

的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTDMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:162) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTDMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:163) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTDMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:164) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTAMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:165) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTAMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:166) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTAMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:167) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:168) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:169) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO:170) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTDMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:174) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTDMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:175) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTAMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:176) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTAMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:177) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTAMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:178) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTAMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:179) 的氨基酸序列。

RWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:179) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEQLKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:180) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEQLKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISTINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:181) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEQLKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:182) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:183) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISTINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:184) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO:185) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-2多肽包含表7中列出的IL-2多肽的氨基酸序列。

[0244] 表7. 示例性IL-2多肽序列

[0245]	IL-2I D	序列	SEQ ID NO
	m1	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLT EMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLA QSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADE TATIVEFLNRWITFAQSIISTLT	43
	m2	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLT EMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLA QSKNFHLRPRDLISAINVIVLELKGSETTFMCEYADE TATIVEFLNRWITFAQSIISTLT	48
	m3	APTSSSTKKTQLQLEELLLDLQMILNGINNYKNPKLT EMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLA QSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADE TATIVEFLNRWITFAQSIISTLT	52
	m4	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLT EMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLA QSKNFHLRPRDLISNINEIVLELKGSETTFMCEYADET ATIVEFLNRWITFAQSIISTLT	49
	m5	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLT EMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLA QSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMCEYADE	156
[0246]		TATIVEFLNRWITFAQSIISTLT	

[0247] 在一些实施方案中,本公开的突变体IL-2多肽还含有其他修饰,包括但不限于突变和缺失,其提供额外的优点,诸如改善的生物物理特性。改善的生物物理特性包括但不限于在哺乳动物或细菌或酵母细胞中的改善的热稳定性、聚集倾向、酸可逆性、粘度和产量。例如,残基C125可以被中性氨基酸,诸如丝氨酸、丙氨酸、苏氨酸或缬氨酸替换;并且N末端A1残基可以缺失,两者均在美国专利号4,518,584中描述。突变体IL-2多肽还可以包含残基M104的突变,诸如M104A,如在美国专利号5,206,344中描述。因此,在某些实施方案中,本公开的突变体IL-2多肽包含氨基酸取代C125A。在其他实施方案中,一个、两个或三个N末端残基缺失。

[0248] 白介素-10 (IL-10)

[0249] 白介素-10 (IL-10) 是一种细胞因子,其调节许多免疫细胞亚群,其中一些包括单

核细胞、巨噬细胞、树突状细胞、B细胞、T细胞、NK细胞等。IL-10与异源二聚体受体(IL-10受体, IL-10R)结合,所述受体由两个亚基组成,对于IL-10具有特异性并且主要在免疫细胞上表达的IL-10RA,和与其他细胞因子共享并且更广泛地表达的IL-10RB。IL-10与其受体的结合诱导受体相关的Janus激酶JAK1和酪氨酸激酶TYK2的磷酸化,这促进STAT3转录因子的磷酸化(pSTAT3),所述转录因子调节淋巴细胞中许多基因的转录。

[0250] 如在本文中可互换使用的术语“白介素-10”或“IL-10”可以是指来自任何脊椎动物来源的任何天然IL-10,所述脊椎动物来源包括哺乳动物诸如灵长类动物(例如,人)和啮齿动物(例如,小鼠和大鼠),除非另外指示。IL-10可以作为同源二聚体存在。“IL-10”可以涵盖未加工IL-10以及“成熟IL-10”,其是细胞中通过加工产生的IL-10的一种形式。“成熟IL-10”的序列在图9A中描绘。未加工IL-10的一种示例性形式包含附接到成熟IL-10的额外N末端氨基酸信号肽。“IL-10”还可以包括IL-10的天然存在变体,例如一种或多种等位基因或剪接变体。示例性人IL-10的氨基酸序列在UniProt P22301(IL10_人)下描述。

[0251] 如在本文中可互换使用的“IL-10同源二聚体”或“IL-10二聚体”可以是指野生型IL-10多肽的天然对称同源二聚体形式,其与细胞上的四聚体IL-10受体(IL-10R)复合物结合,所述复合物由2个IL-10R α 链分子(IL-10RA)和2个IL-10R β 链分子(IL-10RB)组成。来自每个IL-10多肽链的 α -螺旋交织在一起,使得一条链的前四个螺旋(A-D)与另一条链的最后两个螺旋(E和F)缔合,从而在二聚化时维持每个结构域的结构完整性(Walter和Nagabhushan, *Biochemistry*. 1995年9月26日;34(38):12118-25)。“IL-10单体”可以是指IL-10的单体形式,其可以通过扩展连接交换的二级结构元件的环来生成。如在Josephson等人, *Biochemistry* 1995年9月26日;34(38):12118-25中所描述,将6个氨基酸插入所述环中足以防止二聚化并诱导IL-10单体形成。所得的IL-10单体具有生物活性,并且能够与单个IL-10RA分子结合,并将单个IL-10RB分子募集到信号传导复合物中以引发IL-10介导的细胞应答。因此,将短氨基酸序列或短接头插入D环(以残基C114结束)与E环(以残基V121开始)之间的IL-10多肽(例如,野生型IL-10或本公开的任何突变体IL-10多肽)的序列中,生成所述IL-10多肽的“单体异构体”。这种添加的氨基酸序列或接头可以紧邻C114、E115、N116、K117、S118、K119或A120之后插入。如本文所述,IL-10单体多肽的氨基酸编号是基于SEQ ID NO:95(即,IL-10二聚体多肽)的数量,使得接头序列/氨基酸不被计数。

[0252] “突变体IL-10多肽”可以是指具有不同于野生型IL-10的氨基酸序列的IL-10多肽。例如,突变体IL-10多肽可以具有氨基酸取代、缺失和插入。在一些实施方案中,突变体IL-10多肽对于其受体具有降低的亲和力,其中这种降低的亲和力导致突变体的生物活性降低。亲和力降低并且因此活性降低可以通过引入少量氨基酸突变或取代来获得。突变体IL-10多肽还可以具有对于肽骨架的其他修饰,包括但不限于多肽的氨基酸缺失、置换、环化、二硫键或翻译后修饰(例如,糖基化或改变的碳水化合物),对于多肽的化学或酶促修饰(例如,将PEG附接到多肽骨架上),添加肽标签或标记,或与蛋白质或蛋白质结构域融合以生成具有所需特征的最终构建体,诸如对于IL-10R的亲和力降低。所需活性还可以包括与野生型IL-10多肽相比改善的生物物理特性。

[0253] 在一些实施方案中,本公开涉及突变体IL-10多肽,以及包含突变体IL-10多肽的靶向细胞因子。在一些实施方案中,所述突变体IL-10多肽包含一种或多种增加对于IL-10RB多肽(例如,包含SEQ ID NO:97的序列)的结合亲和力的突变(例如,相对于SEQ ID NO:

95)。在一些实施方案中,所述突变体IL-10多肽包含一种或多种降低对于IL-10RA多肽(例如,包含SEQ ID NO:96的序列)的结合亲和力的突变(例如,相对于SEQ ID NO:95)。在一些实施方案中,所述突变体IL-10多肽包含一种或多种增加对于IL-10RB多肽(例如,包含SEQ ID NO:97的序列)的结合亲和力的突变(例如,相对于SEQ ID NO:95),并且包含一种或多种降低对于IL-10RA多肽(例如,包含SEQ ID NO:96的序列)的结合亲和力的突变(例如,相对于SEQ ID NO:95)。在一些实施方案中,所述突变体IL-10多肽包含与野生型成熟IL-10(例如,图9A中描绘的SEQ ID NO:95)或所描绘的成熟单体IL-10(例如,图9D中描绘的SEQ ID NO:98)的氨基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0254] 在一些实施方案中,所述突变体IL-10多肽包含与野生型成熟IL-10(例如,图9A中描绘的SEQ ID NO:95)或成熟单体IL-10(例如,图9D中描绘的SEQ ID NO:98)的氨基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-10多肽:i)对于具有如通过图9B中描绘的SEQ ID NO:96列出的氨基酸序列的IL-10RA多肽表现出降低的结合亲和力;并且ii)相对于如通过图9A中描绘的SEQ ID NO:95列出的野生型IL-10多肽或如通过图9D中描绘的SEQ ID NO:98列出的成熟单体IL-10的氨基酸序列具有一个或多个氨基酸取代,所述氨基酸取代选自:P20、L23、R24、R27、D28、K34、T35、Q38、M39、D41、L43、D44、N45、L46、K49、I87、V91、L94、L98、K138、S141、E142、D144、N148、E151和I158,如图10A-11B中描绘。在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代选自:R24A、R27A、K34A、K34D、K34E、K34S、K34P、K34G、K34T、K34H、K34L、K34N、K34F、K34R、K34Q、K34V、K34Y、Q38A、Q38D、Q38P、Q38G、Q38H、Q38I、Q38L、Q38R、Q38K、Q38N、Q38F、Q38T、Q38E、Q38S、Q38V、Q38Y、D44A、D44E、D44S、D44V、D44G、D44H、D44I、D44K、D44P、D44L、D44N、D44F、D44T、D44R、D44Q、I87A、K138A、E142A、E142G、E142N、E142L、E142F、E142I、E142V、E142K、E142R、E142P、E142Q、E142T、E142S、E142Y、D144A、D144E、D144G、D144H、D144R、D144I、D144K、D144N、D144Q、D144P、D144S、D144L、D144T、D144V、D144Y、N148G、N148P、N148S、N148D、N148T、N148K、N148V、N148I、N148E、N148F、E151A、E151G、E151H、E151I、E151N、E151F、E151L、E151V、E151R、E151K、E151P、E151Q、E151S、E151T和E151Y。在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代选自:R24A、R27A、K34A、K34D、K34E、K34S、K34P、K34G、K34T、K34H、K34L、K34N、K34F、K34V、K34Y、Q38A、Q38D、Q38P、Q38G、Q38I、Q38L、Q38R、Q38K、Q38F、Q38T、Q38E、Q38S、Q38V、Q38Y、I87A、K138A、E142A、E142G、E142N、E142L、E142F、E142I、E142V、E142K、E142R、E142P、E142Q、E142T、E142S、E142Y、D144A、D144E、D144G、D144H、D144R、D144I、D144K、D144N、D144Q、D144P、D144S、D144L、D144T、D144V、D144Y、N148P、N148D、N148I、E151A、E151G、E151H、E151I、E151N、E151F、E151L、E151V、E151R、E151K、E151P、E151Q、E151S、E151T和E151Y。在一些实施方案中,本公开的突变体IL-10多肽对于具有如通过图9B中描绘的SEQ ID NO:96列出的氨基酸序列的IL-10RA多肽表现出降低50%或更多的结合亲和力。在本领域技术人员熟悉的测量蛋白质-蛋白质相互作用的亲和力的标

准SPR测定中测量野生型和突变体IL-10多肽对于IL-10RA的结合亲和力的差异。在一些实施方案中,所述突变体IL-10多肽包含与野生型成熟IL-10(例如,图9A中描绘的SEQ ID NO:95)或成熟单体IL-10(例如,图9D中描绘的SEQ ID NO:98)的氨基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-10多肽:i)对于具有如通过图9C中描绘的SEQ ID NO:97列出的氨基酸序列的IL-10RB多肽表现出增加的结合亲和力;并且ii)相对于如通过图9A中描绘的SEQ ID NO:95列出的野生型成熟IL-10多肽的氨基酸序列具有一个或多个氨基酸取代,所述氨基酸取代选自:N18、N21、M22、R24、D25、S31、R32、D55、M68、I69、L73、E74、M77、P78、Q79、E81、N82、K88、A89、H90、N92、S93、G95、E96、N97、K99、T100、L101、L103、R104、R107、R110和F111(图10A-11B)。在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代是在选自以下的一个或多个位置处:N18、D28、N92、K99和L103,根据SEQ ID NO:95进行编号。在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代选自:N18F、N18L、N18Y、D28Q、D28R、N92F、N92H、N92I、N92K、N92L、N92R、N92S、N92T、N92V、N92Y、K99N、L103N和L103Q,根据SEQ ID NO:95进行编号。在又其他实施方案中,所述突变体IL-10多肽对于具有如通过图9C中描绘的SEQ ID NO:97列出的氨基酸序列的IL-10RB多肽表现出增加150%或更多的结合亲和力。

[0255] 野生型成熟IL-10多肽的序列中可能氨基酸取代的位置在图10A-10B中描绘。在一些实施方案中,在野生型成熟IL-10多肽的序列中表示的氨基酸被丙氨酸或另一个氨基酸取代,如图11A-11B中描绘。

[0256] 在一些实施方案中,所述突变体IL-10多肽还含有其他修饰,包括但不限于突变和缺失,其提供额外的优点,诸如改善的生物物理特性。改善的生物物理特性包括但不限于在哺乳动物或细菌或酵母细胞中的改善的热稳定性、聚集倾向、酸可逆性、粘度和产量。

[0257] 在一些实施方案中,所述突变体IL-10多肽在R107位置处还包含相对于SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸取代。在一些实施方案中,所述突变体IL-10多肽还包含R107A突变,根据SEQ ID NO:95进行编号。

[0258] 在一些实施方案中,所述突变体IL-10多肽是单体,例如在N116与K117之间包含氨基酸或肽插入(例如,如在图9D中描绘),以使得能够折叠并表达为单体。在一些实施方案中,所述插入的长度是1-15个氨基酸。在一些实施方案中,所述插入的长度是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸。在一些实施方案中,所述插入的长度是6个氨基酸。在一些实施方案中,所述突变体IL-10单体多肽包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列,具有在1与15个之间的氨基酸的氨基酸或肽插入,紧接着是残基C114、E115、N116、K117、S118、K119或A120,基于SEQ ID NO:95进行编号。插入的实例可以包括但不限于G、GG、GGG、GGGG、GGGSG、GGGGG、GGGGGG和GGGSGG。在一些实施方案中,所述突变体IL-10单体多肽包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列。在一些实施方案中,本公开的突变体单体IL-10多肽对于具有在图1B中描绘的氨基酸序列的IL-10RA多肽具有降低的结合亲和力,并且具有选自以下的氨基酸取代:P20、L23、R24、R27、D28、K34、T35、Q38、M39、D41、L43、D44、N45、L46、K49、I87、V91、L94、L98、K138、S141、E142、D144、N148、E151和I158(或选自:R24、R27、K34、Q38、D44、I87、K138、E142、D144、N148和E151),其中氨基酸编号是指没有6个接头插入的野生型IL-10多肽中的

对应氨基酸。在一些实施方案中,本公开的突变体单体IL-10多肽对于具有在图1C中描绘的氨基酸序列的IL-10RB多肽还具有增加的结合亲和力,并且具有选自以下的氨基酸取代:N18、N21、M22、R24、D25、D28、S31、R32、D55、M68、I69、L73、E74、M77、P78、Q79、E81、N82、K88、A89、H90、N92、S93、G95、E96、N97、K99、T100、L101、L103、R104、R107、R110和F111(或选自:N18、D28、N92、K99和L103)。

[0259] 表3描绘了本公开的IL-10单体多肽的示例性氨基酸插入和插入位置(插入位置带有下划线)。在一些实施方案中,所述突变体IL-10单体多肽包含表3中列出的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述突变体IL-10单体多肽包含如表3中列出的和/或在如表3中列出的位置处的氨基酸插入。在一些实施方案中,所述插入的长度是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸。在一些实施方案中,所述突变体IL-10单体多肽包含本公开的突变体IL-10单体多肽的氨基酸序列,具有在1与15个之间的氨基酸的氨基酸或肽插入,紧接着是残基C114、E115、N116、K117、S118、K119或A120,基于SEQ ID NO:95进行编号。插入的实例可以包括但不限于G、GG、GGG、GGGG、GGGSG、GGGGG、GGGGGG和GGGSGG。

[0260] 表3. 突变体单体IL-10多肽的示例性插入和插入位置

[0261]

构建体名称	氨基酸序列	SEQ ID NO.
IL10 单_插入 C114_E115	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAF SRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYL GCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAH VNSLGENLKTLLRLRLRRCHRFLPC <u>GGGSGG</u> ENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEF DIFINYIEAYMTMKIRN	187
IL10 单_插入	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAF	189

[0262]

构建体 名称	氨基酸序列	SEQ ID NO.
入 E115_N11 6	SRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYL GCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAH VNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCEGGGSG GNKSKAVEQVKNAFNKLQEKG IYKAMSEF DIFINYIEAYMTMKIRN	
IL10 单_插 入 K117_S118	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRD L RDAF SRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYL GCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAH VNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKGGG SGGSKAVEQVKNAFNKLQEKG IYKAMSEF DIFINYIEAYMTMKIRN	190
IL10 单_插 入 S118_K119	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRD L RDAF SRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYL GCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAH VNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSGG GSGGKAVEQVKNAFNKLQEKG IYKAMSEF DIFINYIEAYMTMKIRN	191
IL10 单_插 入 K119_A12 0	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRD L RDAF SRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYL GCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAH VNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKG GGSGGAVEQVKNAFNKLQEKG IYKAMSEF DIFINYIEAYMTMKIRN	192
IL10 单_1G 插 入	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRD L RDAF SRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYL	193

[0263]

构建体 名称	氨基酸序列	SEQ ID NO.
K117_S118	GCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAH VNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENK <u>G</u> SK AVEQVKNAFNKLQEKGIIYKAMSEFDIFINYI EAYMTMKIRN	
IL10 单_2G 插 入	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAF SRVKTFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYL GCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAH VNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENK <u>G</u> GS KAVEQVKNAFNKLQEKGIIYKAMSEFDIFIN YIEAYMTMKIRN	194
IL10 单_3G 插 入	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAF SRVKTFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYL GCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAH VNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENK <u>G</u> GG SKAVEQVKNAFNKLQEKGIIYKAMSEFDIFI NYIEAYMTMKIRN	195
IL10 单_4G 插 入	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAF SRVKTFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYL GCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAH VNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENK <u>G</u> GG GSKAVEQVKNAFNKLQEKGIIYKAMSEFDIF INYIEAYMTMKIRN	196
IL10 单_5G 插 入	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAF SRVKTFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYL GCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAH	197

[0264]

构建体名称	氨基酸序列	SEQ ID NO.
	VNSLGENLKTLLRLRLRRCHRFLPCENKGGG GGSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDI FINYIEAYMTMKIRN	
IL10 单_6G 插入 K117_S118	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAF SRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYL GCQALSEMIQFYLEEVMQAENQDPDIKAH VNSLGENLKTLLRLRLRRCHRFLPCENKGGG GGGSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEF DIFINYIEAYMTMKIRN	198

[0265] 在一些实施方案中,所述突变体IL-10多肽包含选自如表4中提供的SEQ ID No: 99-112的氨基酸序列。

[0266] 表3. 示例性突变体单体IL-10多肽的氨基酸序列。

[0267]

构建体名称	氨基酸序列	SEQ ID NO.
IL10 单_ RBenh2_m 15	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLADLADAF SRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYL GCQALSEMIQFYLEEVMQAENQDPDIKAH VISLGENLKTLLRLRLRRCHRFLPCENG GGGSG GKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDI FINYIEAYMTMKIRN	99
IL10 单_ _RBenh2_ m10	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAF SRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYL GCQALSEMIQFYLEEVMQAENQDPDIKAH VISLGENLKTLLRLRLRRCHRFLPCENG GGGSG GKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFAI	100

[0268]

构建体名称	氨基酸序列	SEQ ID NO.
	FINYIEAYMTMKIRN	
IL10 单 _RBenh7_ m10	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAF SRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYL GCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAH VLSLGENLKTLLRLRLRRCHRFLPCENGGGS GGKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEF AIFINYIEAYMTMKIRN	101
IL10 单 _RBenh2.1 -m10	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAF SRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYL GCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAH VISLGENLKTLLRLRLRRCHRFLPCENKGGGS GGSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFAI FINYIEAYMTMKIRN	102
IL10 单 _RBenh7.1 -m10	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAF SRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYL GCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAH VLSLGENLKTLLRLRLRRCHRFLPCENKGGG SGGSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEF AIFINYIEAYMTMKIRN	103
IL10 单 _RBenh2.1 -m15	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLADLADAF SRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYL GCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAH VISLGENLKTLLRLRLRRCHRFLPCENKGGGS	104

构建体 名称	氨基酸序列	SEQ ID NO.
	GGSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDI FINYIEAYMTMKIRN	
IL10 单 _RBenh2_ m117	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAF SRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYL GCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAH VISLGENLKTLLRLRLRACHRFLPCENGGS GGKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEF DIFINYIEAYMTMKIRN	105
IL-10 单 _RBenh2- m10 m117	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAF SRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYL GCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAH VISLGENLKTLLRLRLRACHRFLPCENGGS GGKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEF AIFINYIEAYMTMKIRN	106
IL-10 单 _RBenh7- m10 m117	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAF SRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYL GCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAH VLSLGENLKTLLRLRLRACHRFLPCENGGS GGKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEF AIFINYIEAYMTMKIRN	107
IL-10 单 _RBenh2- m15 m117	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLADLADAF SRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYL GCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAH VISLGENLKTLLRLRLRACHRFLPCENGGS GGKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEF	108

[0269]

[0270]

构建体名称	氨基酸序列	SEQ ID NO.
	DIFINYIEAYMTMKIRN	
IL-10 单 _RBenh2.1 -m10 m117	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAF SRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYL GCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAH VISLGENLKTLLRLRLRACHRFLPCENKGGG SGGSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEF AIFINYIEAYMTMKIRN	109
IL-10 单 _RBenh7.1 -m10 m117	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAF SRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYL GCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAH VLSLGENLKTLLRLRLRACHRFLPCENKGGG SGGSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEF AIFINYIEAYMTMKIRN	110
IL-10 单 _RBenh2.1 -m15 m117	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLADLADAF SRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYL GCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAH VISLGENLKTLLRLRLRACHRFLPCENKGGG SGGSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEF DIFINYIEAYMTMKIRN	111
IL10 单_ RBenh2	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAF SRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYL GCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAH VISLGENLKTLLRLRLRRCHRFLPCENGSGGSG GKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDI FINYIEAYMTMKIRN	112

[0271] 白介素-7 (IL-7)

[0272] 以下提供了 IL-7 多肽的示例性氨基酸序列 (SEQ ID NO: 91), 其中位置 K10、Q11、S14、V15、V18、Q22、L35、N36、D74、L77、L80、K81、E84、I88、R133、Q136、E137、T140 和 N143 以及

K144中的至少一个可以发生突变(例如,K81A和T140A)。DCDIEGKDGKQYESVLMVSIQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALG EAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLEIKTCWNKILMGTEH(SEQ ID NO:91)。

[0273] 例如,示例性突变体IL-7肽包含氨基酸取代物K81A和T140A。在一些实施方案中,所述突变体IL-7多肽包含以下序列:DCDIEGKDGKQYESVLMVSIQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLAVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALG EAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLEIKACWNKILMGTEH(SEQ ID NO:113)。

[0274] 在一些实施方案中,所述细胞因子是突变体IL-7多肽,与包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的野生型IL-7多肽对于包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的IL-7R α 多肽的结合亲和力相比,所述突变体IL-7多肽表现出的对于所述IL-7R α 多肽的结合亲和力降低50%或更多。在一些实施方案中,与包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的野生型IL-7多肽对于包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的IL-7R γ 多肽的结合亲和力相比,所述突变体IL-7多肽表现出的对于所述IL-7R γ 多肽的结合亲和力降低50%或更多。

[0275] 在一些实施方案中,所述IL-7R α 多肽包含以下序列:MTILGTTFGMVFSLLQVVSAGESGYAQNGLDEAELDDYSFSCYSQLEVNQSQHS LTCAFEDPDVNITNLEFEICGALVEVKCLNFRKLQEIYFIETKKFL LIGKSNICVKVGEKSLTCKKIDLTITIVKPEAPFDLSVVYREGANDFVVTFTNTSHLQKKYVKVLMHDVAYRQEKDEN KWTHTVNLSSTKLTLLQRKLQPAAMYEIKVRSIPDHYFKGFSEWSPSYFRTPEINNSSGEMDPILLTISILSFFS VALLVILACVLWKKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKLNLSFNPESFLDCQIHRVDDIQRARDEVEGFLQDTF PQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSEDVITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLDCRESGKNGPHVYQDL LLSLGTNTSTLPPPSLQSGILTLPNVAQGQPILTSLSGNQEEAYVTMSSFYQNQ(SEQ ID NO:94)。

[0276] 白介素-21(IL-21)

[0277] 在一些实施方案中,所述细胞因子是突变体IL-21多肽,与包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的野生型IL-21多肽对于IL-21R多肽的结合亲和力相比,所述突变体IL-21多肽表现出的对于包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的IL-21R γ 多肽的结合亲和力降低50%或更多。在一些实施方案中,与包含SEQ ID NO:92或SEQ ID NO:115的氨基酸序列的野生型IL-21多肽对于包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的IL-21R γ 多肽的结合亲和力相比,所述突变体IL-21多肽表现出的对于所述IL-21R γ 多肽的结合亲和力降低50%或更多。

[0278] 除非另外指示,否则如在本文中可互换使用的“白介素-21”或“IL-21”可以是指任何天然IL-21。“IL-21”可以涵盖未加工IL-21(诸如前体IL-21)以及“成熟IL-21”,其可以是细胞中通过加工产生的IL-21的一种形式。人“成熟IL-21”的序列提供为SEQ ID NO:92或SEQ ID NO:115。“IL-21”还可以包括但不限于IL-21的天然存在变体,例如一种或多种等位基因或剪接变体。示例性人IL-21的氨基酸序列在UniProt Q9HBE4(IL21_人)下描述。“突变体IL-2多肽”可以是指IL-2多肽,所述多肽对于其受体可以具有改变的亲和力,诸如对于其受体的亲和力降低,其中这种降低的亲和力将导致突变体的生物活性降低。亲和力的改变,诸如亲和力降低并且因此活性降低可以通过引入少量氨基酸突变或取代来获得。突变体IL-21多肽还可以具有对于肽骨架的其他修饰,包括但不限于多肽的氨基酸缺失、置换、环化、二硫键或翻译后修饰(例如,糖基化或改变的碳水化合物),对于多肽的化学或酶促修饰(例如,将PEG附接到多肽骨架上),添加肽标签或标记,或与蛋白质或蛋白质结构域融合以生成具有所需特征的最终构建体,诸如对于IL-21R的亲和力降低。所需活性还可以包括与

野生型IL-21多肽相比改善的生物物理特性。可以组合多种修饰以实现所需的活性改变,诸如降低或增加亲和力或改善生物物理特性。作为非限制性实例,用于共有N-连接糖基化的氨基酸序列可以并入多肽中以允许糖基化。另一个非限制性实例是赖氨酸可以并入到多肽上以实现聚乙二醇化。在一些情况下,将一个或多个突变引入多肽中以改变其活性。

[0279] IL-21具有四螺旋束结构,并且作为单体存在。在人类中,已知IL-21的两种同种型,每种同种型都来源于前体分子。第一种IL-21同种型包含162个氨基酸(aa),其中前29个氨基酸构成信号肽;并且第二种IL-21同种型包含153个aa,其中前29个氨基酸构成信号肽,与在第一种同种型中一样。

[0280] IL-21与异源二聚体IL-21受体复合物结合,所述复合物由IL-21受体(IL-21R)和普通 γ 链(γc)组成。IL-21受体复合物在T、B和NK细胞的表面上表达。IL-21受体复合物在结构上与IL-2受体复合物类似,因为这些细胞因子受体复合物中的每一个都包含 γc 。

[0281] 当IL-21与IL-21受体复合物结合时,JAK/STAT信号传导通路被激活以激活靶基因。虽然IL-21诱导的信号传导在治疗上可能是希望的,但鉴于IL-21的广泛表达谱,并且由于IL-21具有强化CD8+T细胞应答以及抑制抗原呈递和T细胞启动的能力,因此需要仔细考虑信号传导的时间和位置。

[0282] 在一些实施方案中,所述IL-21包含以下序列:HKSSSQGQDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLVP EFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVS IKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS (SEQ ID NO:92)。

[0283] 在一些实施方案中,所述IL-21包含以下序列:QGQDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLVP EFLPAPEDVETNCEWS AFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVS IKKLKRKPPSTNAGRRQKHRL TCPSCDSYEKKPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS (SEQ ID NO:115)。

[0284] 在一些实施方案中,所述IL-21R多肽包含以下序列:MPRGWAAPLLLLLLQGGWGCPDLV CYTDYLQTVICILEMWNLHPSTLTLTWQDQYEELKDEATSCSLHRSAHNATHATYTCHMDVFHFMADDIFS VNITD QSGNYSQECGSFLLAESIKPAPPFNVTVTFSGQYNISWRSDYEDPAFYMLKGKLQYELQYRNRGDPWAVSPRRKLI SVDSRSVSLLPLEFRKDSSYELQVRAGPMPGSSYQGTWSEWSDPVIFQTQSEELKEGWNPHLLLLLLLVIVFIPAF WSLKTHPLWRLWKKIWAVSPSPERFFMPLYKGC SGDFKKWVGAPFTGSSLELGPWSPEVPSTLEVYSCHPPRSPAKR LQLTELQEPALVESDGVPKPSFWPTAQNSGGSAYSEERDRPYGLVSI DTVTVLDAEGPCTWPCSCEDDGYPALDL DAGLEPSPGLEDPLLDAGTTVLSCGCVSAGSPGLGGPLGSLLDRLKPPLADGEDWAGGLPWGGRSPGGVSESEAGS PLAGLDMDTFDSGFGSDCSPVECDFTSPGDEGPPRSYLRQWVVI PPPLSSPGPQAS (SEQ ID NO:93)。

[0285] 在一些实施方案中,本公开提供了IL-21多肽或其功能片段或变体,相对于在本文中作为SEQ ID NO:92或SEQ ID NO:115提供的野生型IL-21氨基酸序列,所述多肽或其功能片段或变体包含至少一个氨基酸取代。相对于SEQ ID NO:92或SEQ ID NO:115包含至少一个氨基酸取代的此类IL-21多肽在本文中还被称为IL-21突变蛋白。在示例性方面,如本文所述的IL-21多肽或其功能片段或变体包含至少一个且不超过X个氨基酸取代,其中X是2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34或更大。在一些实施方案中,与SEQ ID NO:115相比,如本文所述的IL-21多肽或其功能片段或变体包含至少35个氨基酸取代。在示例性实施方案中,如本文所述的IL-21多肽或其功能片段或变体包含与人IL-21(例如,SEQ ID NO:115)的氨基酸序列相差10个氨基酸、15个氨基酸、20个氨基酸或25个氨基酸的氨基酸序列。在示例性实施方案中,如本文

所述的IL-21多肽或其功能片段或变体包含与人IL-21(例如,SEQ ID NO:115)的氨基酸序列相差不超过7个氨基酸或不超过5个氨基酸的氨基酸序列。在示例性实施方案中,如本文所述的IL-21多肽或其功能片段或变体包含与人IL-21(例如,SEQ ID NO:115)的氨基酸序列相差3、4、5或6个氨基酸的氨基酸序列。在示例性实施方案中,如本文所述的IL-21多肽或其功能片段或变体包含与人IL-21(例如,SEQ ID NO:115)的氨基酸序列相差3至6个氨基酸或1至5个氨基酸的氨基酸序列。在示例性实施方案中,如本文所述的IL-21多肽或其功能片段或变体包含与人IL-21(例如,SEQ ID NO:115)的氨基酸序列相差一个或两个氨基酸的氨基酸序列。

[0286] 减少的IL-21R结合

[0287] 在一些实施方案中,IL-21多肽或其功能片段或变体包含至少一个降低其对于IL-21R的结合亲和力的突变。在一些实施方案中,此类突变在选自以下的一个或多个位置中:R5、I8、R9、R11、Q12、I14、D15、D18、Q19、Y23、R65、S70、K72、K73、K75、R76、K77、S80、Q116和K117,其中位置编号是根据SEQ ID NO:115的氨基酸序列的编号。

[0288] 在一些实施方案中,位置R5处的突变包含选自A、D、E、S、T、N、Q、V、I、L、Y或F的氨基酸取代。在一些实施方案中,位置I8处的突变包含选自Q、H、E的氨基酸取代。在一些实施方案中,位置R9处的突变包含选自A、D、E、S、T、N、Q、V、I、L、Y或F的氨基酸取代。在一些实施方案中,位置R11处的突变包含选自D或E的氨基酸取代。在一些实施方案中,位置Q12处的突变包含选自L、I或Y的氨基酸取代。在一些实施方案中,位置I14处的突变包含选自D或E的氨基酸取代。在一些实施方案中,位置D15处的突变包含选自R、K、H、L、Y或F的氨基酸取代。在一些实施方案中,位置D18处的突变包含选自A、K或R的氨基酸取代。在一些实施方案中,位置Q19处的突变包含选自L或Y的氨基酸取代。在一些实施方案中,位置Y23处的突变包含E的氨基酸取代。在一些实施方案中,位置R65处的突变包含选自G、S、E、D或A的氨基酸取代。在一些实施方案中,位置S70处的突变包含选自H、Y、L、V或F的氨基酸取代。在一些实施方案中,位置K72处的突变包含选自G、S、E、D或A的氨基酸取代。在一些实施方案中,位置K73处的突变包含选自A、Y、L、F、G、S、T、E或D的氨基酸取代。在一些实施方案中,位置K75处的突变包含选自G、S、E、D或A的氨基酸取代。在一些实施方案中,位置R76处的突变包含选自A、D、E、S、T、N、Q、V、I、L、Y或F的氨基酸取代。在一些实施方案中,位置K77处的突变包含选自G、S、E、D或A的氨基酸取代。在一些实施方案中,位置S80处的突变包含H、A、G、E或D的氨基酸取代。在一些实施方案中,位置Q116处的突变包含Y的氨基酸取代。在一些实施方案中,位置K117处的突变包含选自A、D或E的氨基酸取代。

[0289] 本公开的IL-21多肽或其功能片段或变体的示例性序列如下提供:QGQDX₁HMX₂X₃MX₄X₅LX₆X₇IVX₈X₉LKNX₁₀VNDLVPEFLPAPEDV ETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNEX₁₁I INVX₁₂IX₁₃X₁₄LX₁₅X₁₆X₁₇PPX₁₈TNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLX₁₉X₂₀MIH QHLSSRTHGSEDS(SEQ ID NO:136)。在一些实施方案中,X₁=R、A、D、E、S、T、N、Q、V、I、L、Y或F。在一些实施方案中,X₂=I、Q、H、E。在一些实施方案中,X₃=R、A、D、E、S、T、N、Q、V、I、L、Y或F。在一些实施方案中,X₄=R、D或E。在一些实施方案中,X₅=Q、L、I或Y。在一些实施方案中,X₆=I、D或E。在一些实施方案中,X₇=D、R、K、H、L、Y或F。在一些实施方案中,X₈=D、A、K或R。在一些实施方案中,X₉=Q、L或Y。在一些实施方案中,X₁₀=Y或E。在一些实施方案中,X₁₁=R、G、S、E、D或A。在一些实施方案中,X₁₂=S、H、Y、L、V或F。在一些实施方案中,X₁₃=K、G、S、E、D或A。在一些实施方案中,X₁₄

=K、A、Y、L、F、G、S、T、E、A或D。在一些实施方案中，X₁₅=K、G、S、E、D或A。在一些实施方案中，X₁₆=R、A、D、E、S、T、N、Q、V、I、L、Y或F。在一些实施方案中，X₁₇=K、G、S、E、D或A。在一些实施方案中，X₁₈=S、H、A、G、E或D。在一些实施方案中，X₁₉=Q或Y。在一些实施方案中，X₂₀=K、A、D或E。

[0290] 表5: 示例性IL-21序列

[0291]

SEQ ID NO:	名称	序列
115	野生型 IL-21	QGQDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLV PEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKS ANTGNNERIINVSIIKKLKRKPPSTNAGR RQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLL QKMIHQHLSSRTHGSEDS
136	示例性 IL-21 支架序列	QGQDX ₁ HMX ₂ X ₃ MX ₄ X ₅ LX ₆ X ₇ IVX ₈ X ₉ LKN X ₁₀ VNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCF QKAQLKSANTGNNE X ₁₁ IINVX ₁₂ IX ₁₃ X ₁₄ LX 15X ₁₆ X ₁₇ PPX ₁₈ TNAGR RQKHRLTCPSCDSY EKKPPKEFLERFKSLLX ₁₉ X ₂₀ MIHQHLSSR THGSEDS

[0292] 本公开的某些方面涉及治疗癌症或慢性感染的方法。在一些实施方案中，所述方法包括向患者施用有效量的靶向细胞因子构建体或包含靶向细胞因子构建体和药学上可接受的载剂的药物组合物。在一些实施方案中，需要所述治疗的患者已被诊断为患有癌症。

[0293] 在一些实施方案中，所述靶向细胞因子构建体或组合物与工程化细胞疗法（例如，T细胞疗法）、癌症疫苗、化疗剂或免疫检查点抑制剂（ICI）组合施用。在一些实施方案中，所述化疗剂是激酶抑制剂、抗代谢物、细胞毒素或细胞抑制剂、抗激素剂、基于铂的化疗剂、甲基转移酶抑制剂、抗体或抗癌肽。在一些实施方案中，所述免疫检查点抑制剂靶向PD-L1、PD-1、CTLA-4、CEACAM、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、CD276、VTCN1、HVEM、KIR、A2AR、MHC I类、MHC II类、GALS、腺苷、TGFR、OX40、CD137、CD40、IDO、CSF1R、TIM-3、BTLA、VISTA、LAG-3、TIGIT、IDO、MICA/B、LILRB4、SIGLEC-15或精氨酸酶，包括但不限于PD-1（例如，抗PD-1抗体）、PD-L1（例如，抗PD-L1抗体）或CTLA-4（例如，抗CTLA-4抗体）的抑制剂。T细胞疗法的实例包括但不限于基于CD4+或CD8+T细胞的疗法、过继性T细胞疗法、基于嵌合抗原受体（CAR）的T细胞疗法、基于肿瘤浸润淋巴细胞（TIL）的疗法、自体T细胞疗法和同种异体T细胞疗法。示例性癌症疫苗包括但不限于树突状细胞疫苗、包含一种或多种编码一种或多种癌症抗原的多核苷酸的疫苗以及包含一种或多种癌症抗原肽的疫苗。

[0294] 在一些实施方案中，本公开的靶向细胞因子构建体是药物组合物的一部分，例如所述药物组合物包含靶向细胞因子构建体和一种或多种药学上可接受的载剂。如本文所述

的药物组合物和制剂可以通过将具有所需纯度的活性成分(诸如靶向细胞因子构建体或多肽)与一种或多种任选的药理学上可接受的载剂(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版, Osol, A. 编(1980))混合以冻干制剂或水溶液形式来制备。药理学上可接受的载剂通常在所用剂量和浓度下对接受者无毒,并且包括但不限于:缓冲液,诸如磷酸盐、柠檬酸盐及其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂;低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸;单糖、二糖及其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖,诸如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子,诸如钠;金属复合物(例如, Zn-蛋白质复合物);和/或非离子表面活性剂,诸如聚乙二醇(PEG)。在一些实施方案中,本公开的靶向细胞因子构建体是冻干的。

[0295] 工程化细胞疗法

[0296] 在一些实施方案中,本公开涉及向有需要的对象施用工程化细胞疗法,例如工程化细胞疗法。工程化细胞疗法可以是一种类型的免疫疗法,其中将细胞(例如, T细胞)施用于对象以帮助身体对抗疾病,诸如癌症。在癌症疗法中, T细胞通常取自患者自身的血液或肿瘤组织,在实验室中大量生长,并且然后回馈给患者以帮助免疫系统对抗癌症。有时, T细胞在实验室中被改变,以生成工程化细胞,所述工程化细胞具有改善的靶向对象的癌细胞并杀死它们的能力。工程化细胞疗法的类型包括但不限于嵌合抗原受体T细胞(CAR T细胞)疗法、T细胞受体(TCR)疗法和肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)疗法。

[0297] 在一些实施方案中,用于在如本文所述的组合疗法中使用的工程化细胞疗法包括施用表达重组受体的工程化细胞,所述重组受体被设计用于识别和/或特异性结合至与疾病或病状相关联的分子并引起应答,诸如在与此类分子结合后针对此类分子的免疫应答。受体可以包括嵌合受体(例如,嵌合抗原受体(CAR))和其他转基因抗原受体(包括转基因T细胞受体(TCR))。在一些实施方案中,具有识别和/或特异性结合至与疾病或病状相关联的分子的内源性T细胞受体的T细胞被分离用于T细胞疗法。

[0298] 在一些实施方案中,细胞含有或经工程化以含有受体,例如工程化抗原受体(诸如嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR))。还提供了此类细胞群体、含有此类细胞和/或富含此类细胞的组合物,诸如其中富集或选择某种类型的细胞(诸如T细胞或CD8⁺或CD4⁺细胞)。还提供了用于向对象(例如,患者)施用细胞和组合物的治疗方法。在一些实施方案中,所述细胞包含经由基因工程化引入的一个或多个核酸,并且从而表达此类核酸的重组或基因工程化产物。在一些实施方案中,通过如下方式完成基因转移:首先刺激细胞,诸如通过将其与诱导应答(诸如增殖、存活和/或激活,例如通过细胞因子或激活标志物的表达测量的)的刺激物组合,接着转导激活的细胞,并且在培养中扩增至足以用于临床应用的数目。

[0299] 在一些实施方案中,在本文所述的细胞疗法中使用的细胞可以表达受体,诸如天然或重组受体,诸如抗原受体(包括功能性非TCR抗原受体,例如嵌合抗原受体(CAR))和其他抗原结合受体,诸如转基因T细胞受体(TCR)。所述受体还可以是其他嵌合受体。在一些实施方案中,所述细胞可以表达对于如本文所述的靶向细胞因子构建体的细胞因子具有特异性的受体。

[0300] 嵌合抗原受体(CAR)

[0301] 示例性抗原受体(包括CAR)、示例性CAR-T细胞和用于工程化并将此类受体引入细

胞中的方法包括例如在国际专利申请公开号W02000/14257、W02013/126726、W02012/129514、W02014/031687、W02013/166321、W02013/071154、W02013/123061,美国专利申请公开号US2002131960、US2013287748、US20130149337,美国专利号6,451,995、7,446,190、8,252,592、8,339,645、8,398,282、7,446,179、6,410,319、7,070,995、7,265,209、7,354,762、7,446,191、8,324,353和8,479,118,以及欧洲专利申请号EP2537416中所述的那些;和/或由Sadelain等人,Cancer Discov.,3(4):388-398(2013);Davila等人,PLoS ONE 8(4):e61338(2013);Turtle等人,Curr.Opin.Immunol,24(5):633-39(2012);Wu等人,Cancer,18(2):160-75(2012)描述的那些。在一些方面,抗原受体包括如美国专利号7,446,190中描述的CAR,以及国际专利申请公开号W0/2014055668A1中描述的那些。CAR的实例包括如在任何前述出版物中公开的CAR,所述出版物诸如W02014031687、US 8,339,645、US 7,446,179、US2013/0149337,美国专利号7,446,190、美国专利号8,389,282,Kochenderfer等人,Nature Reviews Clinical Oncology,10,267-276(2013);Wang等人,J.Immunother.35(9):689-701(2012);以及Brentjens等人,Sci Transl Med.5(177)(2013)。还参见W02014031687、US 8,339,645、US 7,446,179、US2013/0149337、美国专利号7,446,190和美国专利号8,389,282。嵌合受体(诸如CAR)可以包括细胞外抗原结合结构域,诸如抗体分子的一部分,通常是抗体的可变重(V_H)链区和/或可变轻(V_L)链区,例如scFv抗体片段。可以在本文提供的方法或组合物中使用的CAR或CAR-T细胞的非限制性实例包括tisagenlecleucel、阿基仑赛(aticabtagene ciloleucel)、利基迈仑赛(lisocabtagene maraleucel)和被工程化以靶向抗原,如CD19、CD22、WT1、CD171(L1CAM)、MUC16、ROR1或Lewis Y(LeY)血型抗原的CAR-T细胞。

[0302] 嵌合跨膜受体多肽的抗原结合结构域可以包含任何可以与抗原结合的蛋白质或分子。本文公开的嵌合跨膜受体多肽的抗原结合结构域可以是单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体或其功能衍生物、变体或片段,包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、单链Fv(scFv)、微型抗体、双抗体和单结构域抗体,诸如骆驼科动物衍生的纳米抗体的重链可变结构域(VH)、轻链可变结构域(VL)和可变结构域(VHH)。在一些实施方案中,抗原结合结构域是Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv和scFv中的至少一种。在一些实施方案中,抗原结合结构域包含抗体模拟物。抗体模拟物是指能够以与抗体相当的亲和力结合靶分子的分子,并且包括单链结合分子、基于细胞色素b562的结合分子、纤连蛋白或纤连蛋白样蛋白支架(例如,adnectins)、脂质运载蛋白支架、杯芳烃支架、A结构域和其他支架。在一些实施方案中,抗原结合结构域包含跨膜受体或其任何衍生物、变体或片段。例如,抗原结合结构域可以至少包含跨膜受体的配体结合结构域。

[0303] 在一些实施方案中,抗原结合结构域包含人源化抗体。可以使用各种技术产生人源化抗体,所述技术包括但不限于CDR移植、镶面(veneering)或重塑(resurfacing)、链改组和其他技术。可以选择人可变结构域,包括轻链和重链,以降低人源化抗体的免疫原性。在一些实施方案中,嵌合跨膜受体多肽的抗原结合结构域包含人源化抗体的片段,所述片段以高亲和力结合抗原并具有其他有利的生物特性,诸如降低的和/或最小的免疫原性。人源化抗体或抗体片段可以保留与对应的非人源化抗体类似的抗原特异性。

[0304] 在一些实施方案中,抗原结合结构域包含单链可变片段(scFv)。scFv分子可以通过使用柔性接头(诸如多肽接头)将免疫球蛋白的重链(V_H)区和轻链(V_L)区连接在一起而产

生。scFv可以根据各种方法制备。

[0305] 在一些实施方案中,抗原结合结构域被工程化以结合特定靶抗原。例如,抗原结合结构域可以是工程化scFv。包含scFv的抗原结合结构域可以使用各种方法进行工程化,包括但不限于展示文库,诸如噬菌体展示文库、酵母展示文库、基于细胞的展示文库(例如,哺乳动物细胞)、蛋白质-核酸融合、核糖体展示文库和/或大肠杆菌周质展示文库。在一些实施方案中,被工程化的抗原结合结构域可以比类似抗体或未经历工程化的抗体更高的亲和力与抗原结合。

[0306] 在一些实施方案中,抗原结合结构域结合多种抗原,例如,至少2、3、4、5、6、7、8、9或10种抗原。抗原结合结构域可以结合两种相关抗原,诸如肉毒杆菌毒素的两种亚型(例如,肉毒杆菌神经毒素亚型A1和亚型A2)。抗原结合结构域可以结合两种不相关的蛋白质,诸如受体酪氨酸激酶erbB-2(也被称为Neu、ERBB2和HER2)和血管内皮生长因子(VEGF)。能够结合两种抗原的抗原结合结构域可以包含被工程化以在抗体的不同但重叠的位点处结合两种不相关的蛋白质靶标的抗体。在一些实施方案中,结合多种抗原的抗原结合结构域包含双特异性抗体分子。双特异性抗体分子可以具有对于第一表位具有结合特异性的第一免疫球蛋白可变结构域序列,和对于第二表位具有结合特异性的第二免疫球蛋白可变结构域序列。在一些实施方案中,第一表位和第二表位在相同的抗原,例如相同的蛋白质(或多聚体蛋白质的亚基)上。第一表位和第二表位可以重叠。在一些实施方案中,第一表位和第二表位不重叠。在一些实施方案中,第一表位和第二表位在不同的抗原,例如不同的蛋白质(或多聚体蛋白质的不同亚基)上。在一些实施方案中,双特异性抗体分子包含对于第一表位具有结合特异性的重链可变结构域序列和轻链可变结构域序列,以及对于第二表位具有结合特异性的重链可变结构域序列和轻链可变结构域序列。在一些实施方案中,双特异性抗体分子包含对于第一表位具有结合特异性的半抗体和对于第二表位具有结合特异性的半抗体。在一些实施方案中,双特异性抗体分子包含对于第一表位具有结合特异性的半抗体或其片段,和对于第二表位具有结合特异性的半抗体或其片段。

[0307] 在一些实施方案中,嵌合跨膜受体多肽的细胞外区包含多个抗原结合结构域,例如至少2个抗原结合结构域(例如,至少3、4、5、6、7、8、9或10个抗原结合结构域)。多个抗原结合结构域可以表现出与相同或不同抗原的结合。在一些实施方案中,细胞外区包含至少两个抗原结合结构域,例如至少两个串联连接的scFv。在一些实施方案中,两个scFv片段通过肽接头连接。

[0308] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)可以结合的抗原是多肽。在一些实施方案中,所述抗原是碳水化合物或其他分子。在一些实施方案中,与正常或非靶向细胞或组织相比,所述抗原在所述疾病或病状的细胞(例如,肿瘤或致病细胞)上选择性表达或过表达。在其他实施方案中,所述抗原在正常细胞上表达和/或在工程化细胞上表达。

[0309] 在一些实施方案中,在工程化细胞上表达的抗原结合结构域结合选自以下的抗原:来自肿瘤相关抗原的新表位、TSHR、CD19、CD123、CD22、CD30、CD171、CS-1、CLL-1、CD33、EGFRv111、GD2、GD3、BCMA、Tn Ag、PSMA、ROR1、FLT3、FAP、TAG72、CD38、CD44v6、CEA、EPCAM、B7H3、KIT、IL-13Ra2、间皮素、IL-11Ra、PSCA、PRSS21、VEGFR2、LewisY、CD24、PDGFR- β 、SSEA-4、CD20、叶酸受体 α 、ERBB2(Her2/neu)、MUC1、EGFR、NCAM、前列腺酶、PAP、ELF2M、Ephrin B2、IGF-I受体、CAIX、LMP2、gp100、bcr-abl、酪氨酸酶、EphA2、岩藻糖基GM1、sLe^x、GM3、TGS5、

HMWMAA、o-乙酰基-GD2、叶酸受体 β 、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、GPCR5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、聚唾液酸、PLAC1、GloboH、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、GPR20、LY6K、OR51E2、TARP、WT1、NY-ESO-1、LAGE-1a、MAGE-A1、豆荚蛋白、HPV E6、E7、MAGE A1、ETV6-AML、精子蛋白17、XAGE1、Tie 2、MAD-CT-1、MAD-CT-2、Fos相关抗原1、p53、p53突变体、prostein、存活素和端粒酶、PCTA-1/半乳凝素8、MelanA/MART1、Ras突变体、hTERT、肉瘤易位断点、ML-IAP、ERG (TMPRSS2 ETS融合基因)、NA17、PAX3、雄性激素受体、细胞周期蛋白B1、MYCN、RhoC、TRP-2、CYP1 B1、BORIS、SART3、PAX5、OY-TES1、LCK、AKAP-4、SSX2、RAGE-1、人端粒酶逆转录酶、RU1、RU2、肠道羧基酯酶、mut hsp70-2、CD79a、CD79b、CD72、LAIR1、FCAR、LILRA2、CD300LF、CLEC12A、BST2、EMR2、LY75、GPC3、FCRL5、IGLL1、1-40- β -淀粉状蛋白、4-1BB、5AC、5T4、激活素受体样激酶1、ACVR2B、腺癌抗原、AGS-22M6、甲胎蛋白、血管生成素2、血管生成素3、炭疽毒素、AOC3 (VAP-1)、B7-H3、炭疽杆菌、BAFF、 β -淀粉状蛋白、B-淋巴瘤细胞、C242抗原C5、CA-125、家犬IL31、碳酸酐酶9 (CA-IX)、心肌肌球蛋白、CCL11 (嗜酸性粒细胞趋化因子-1)、CCR4、CCR5、CD11、CD18、CD125、CD140a、CD147 (大鼠基础免疫球蛋白)、CD15、CD152、CD154 (CD40L)、CD19、CD2、CD20、CD200、CD22、CD221、CD23 (IgE受体)、CD25 (IL-2受体的 α 链)、CD27、CD274、CD28、CD3、CD3 ϵ 、CD30、CD33、CD37、CD38、CD4、CD40、CD40配体、CD41、CD44v6、CD5、CD51、CD52、CD56、CD6、CD70、CD74、CD79B、CD80、CEA、CEA相关抗原、CFD、ch4D5、CLDN18.2、艰难梭菌、凝聚因子A、CSF1R、CSF2、CTLA-4、C-X-C趋化因子受体4型、巨细胞病毒、巨细胞病毒糖蛋白B、达比加群、DLL4、DPP4、DR5、大肠杆菌志贺毒素1型、大肠杆菌志贺毒素2型、EGFL7、EGFR、内毒素、EpCAM、上皮唾液蛋白 (episialin)、ERBB3、大肠杆菌、呼吸道合胞病毒的F蛋白、FAP、纤维蛋白IIB链、纤连蛋白额外结构域-B、叶酸水解酶、叶酸受体1、叶酸受体 α 、卷曲受体、神经节苷脂GD2、GD2、GD3神经节苷脂、磷脂酰肌醇蛋白聚糖3、GMCSF受体 α -链、GPNMB、生长分化因子8、GUCY2C、血凝素、乙型肝炎表面蛋白、乙型肝炎病毒、HER1、HER2/neu、HER3、HGF、HHGFR、组蛋白复合物、HIV-1、HLA-DR、HNGF、Hsp90、人分散因子受体激酶、人TNF、人 β -淀粉状蛋白、ICAM-1 (CD54)、IFN- α 、IFN- γ 、IgE、IgE Fc区、IGF-1受体、IGF-1、IGHE、IL 17A、IL 17F、IL 20、IL-12、IL-13、IL-17、IL-1 β 、IL-22、IL-23、IL-31RA、IL-4、IL-5、IL-6、IL-6受体、IL-9、ILGF2、甲型流感血凝素、甲型流感病毒血凝素、胰岛素样生长因子I受体、整合素 α 4 β 7、整合素 α 4、整合素 α 5 β 1、整合素 α 7 β 7、整合素 α IIb β 3、整合素 α v β 3、干扰素 α / β 受体、干扰素 γ 诱导蛋白、ITGA2、ITGB2 (CD18)、KIR2D、Lewis-Y抗原、LFA-1 (CD11a)、LINGO-1、脂磷壁酸、LOXL2、L-选择素 (CD62L)、LTA、MCP-1、间皮素、MIF、MS4A1、MSLN、MUC1、粘蛋白CanAg、髓鞘相关糖蛋白、肌生成抑制蛋白、NCA-90 (粒细胞抗原)、神经细胞凋亡调节的蛋白酶1、NGF、N-羟乙酰神经氨酸、NOMO-A、刻痕受体、NRP1、穴兔、OX-40、oxLDL、PCSK9、PD-1、PDCD1、PDGF-R α 、磷酸钠共转运蛋白、磷脂酰丝氨酸、血小板衍生生长因子受体 β 、前列腺癌细胞、铜绿假单胞菌、狂犬病病毒糖蛋白、RANKL、呼吸道合胞病毒、RHD、恒河猴因子、RON、RTN4、硬骨素、SDC1、选择素P、SLAMF7、SOST、鞘氨醇-1-磷酸、金黄色葡萄球菌、STEAP1、TAG-72、T细胞受体、TEM1、肌腱蛋白C、TFPI、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 、TNF- α 、TRAIL-R1、TRAIL-R2、肿瘤抗原CTAA16.88、MUC1的肿瘤特异性糖基化、肿瘤相关钙信号转导因子2、TWEAK受体、TYRP1 (糖蛋白75)、VEGFA、VEGFR1、VEGFR2、波形蛋白和VWF。

[0310] 在一些实施方案中，嵌合抗原受体 (CAR) 可以结合的抗原选自以下：707-AP、生物素化分子、 α -辅肌动蛋白-4、abl-bcr alb-b3 (b2a2)、abl-bcr alb-b4 (b3a2)、脂肪分化相

关蛋白、AFP、AIM-2、膜联蛋白II、ART-4、BAGE、b-连环素、bcr-abl、bcr-abl p190 (e1a2)、bcr-abl p210 (b2a2)、bcr-abl p210 (b3a2)、BING-4、CAG-3、CAIX、CAMEL、胱天蛋白酶-8、CD171、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44v7/8、CDC27、CDK-4、CEA、CLCA2、Cyp-B、DAM-10、DAM-6、DEK-CAN、EGFRvIII、EGP-2、EGP-40、ELF2、Ep-CAM、EphA2、EphA3、erb-B2、erb-B3、erb-B4、ES-ESO-1a、ETV6/AML、FBP、胎儿乙酰胆碱受体、FGF-5、FN、G250、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7B、GAGE-8、GD2、GD3、GnT-V、Gp100、gp75、Her-2、HLA-A*0201-R170I、HMW-MAA、HSP70-2 M、HST-2 (FGF6)、HST-2/neu、hTERT、iCE、IL-11R α 、IL-13R α 2、KDR、KIAA0205、K-RAS、L1-细胞粘附分子、LAGE-1、LDLR/FUT、Lewis Y、MAGE-1、MAGE-10、MAGE-12、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-6、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A6、MAGE-B1、MAGE-B2、苹果酸酶、乳腺球蛋白-A、MART-1/Melan-A、MART-2、MC1R、M-CSF、间皮素、MUC1、MUC16、MUC2、MUM-1、MUM-2、MUM-3、肌球蛋白、NA88-A、Neo-PAP、NKG2D、NPM/ALK、N-RAS、NY-ESO-1、OA1、OGT、癌胚抗原 (h5T4)、OS-9、P多肽、P15、P53、PRAME、PSA、PSCA、PSMA、PTPRK、RAGE、ROR1、RU1、RU2、SART-1、SART-2、SART-3、SOX10、SSX-2、存活素、存活素-2B、SYT/SSX、TAG-72、TEL/AML1、TGF α R1I、TGF β R1I、TP1、TRAG-3、TRG、TRP-1、TRP-2、TRP-2/INT2、TRP-2-6b、酪氨酸酶、VEGF-R2、WT1、 α -叶酸受体和 κ -轻链。在一些实施方案中，抗原结合结构域与肿瘤相关抗原结合。

[0311] 在一些实施方案中，抗原结合结构域与抗体(例如，与细胞表面蛋白或多肽结合的抗体)结合。细胞表面上与抗体结合的蛋白质或多肽可以包含与疾病，诸如病毒、细菌和/或寄生虫感染；炎性和/或自身免疫性疾病；或赘生物，诸如癌症和/或肿瘤相关联的抗原。在一些实施方案中，抗体结合肿瘤相关抗原(例如，蛋白质或多肽)。在一些实施方案中，本文公开的嵌合跨膜受体多肽的抗原结合结构域可以结合单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体或其功能衍生物、变体或片段，包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂、Fc、Fv、scFv、微型抗体、双抗体和单结构域抗体，诸如骆驼科动物衍生的纳米抗体的重链可变结构域(VH)、轻链可变结构域(VL)和可变结构域(VHH)。在一些实施方案中，抗原结合结构域可以结合Fab、Fab'、F(ab')₂、Fc、Fv和scFv中的至少一种。在一些实施方案中，抗原结合结构域结合抗体的Fc结构域。

[0312] 在一些实施方案中，抗原结合结构域结合选自以下的抗体：20- (74) - (74) (米拉组单抗(milatumuzumab)；维妥组单抗(velatumuzumab))、20-2b-2b、3F8、74- (20) - (20) (米拉组单抗；维妥组单抗)、8H9、A33、AB-16B5、阿巴伏单抗(abagovomab)、阿昔单抗(abciximab)、阿比妥珠单抗(abituzumab)、ABP 494 (西妥昔单抗生物类似药)、阿利鲁单抗(abrilumab)、ABT-700、ABT-806、阿克提单抗-A (铜Ac-225林妥珠单抗)、阿克托舒单抗(actoxumab)、阿达木单抗(adalimumab)、ADC-1013、ADCT-301、ADCT-402、阿德木单抗(adecatumumab)、阿杜那单抗(aducanumab)、阿非莫单抗(afelimomab)、AFM13、阿夫土珠(afutuzumab)、AGEN1884、AGS15E、AGS-16C3F、AGS67E、培戈-阿拉赛珠单抗(alacizumab pegol)、ALD518、阿仑单抗(alemtuzumab)、阿莫罗布单抗(alirocumab)、喷替酸阿妥莫单抗(altumomab pentetate)、阿麦妥单抗(amatuximab)、AMG 228、AMG 820、马安那莫单抗(anatumomab mafenatox)、雷星-阿奈妥单抗(anetumab ravtansine)、阿尼鲁单抗(anifrolumab)、安芦珠单抗(anrukinzumab)、APN301、APN311、阿泊珠单抗(apolizumab)、APX003/SIM-BD0801 (贝伐单抗(sevacizumab))、APX005M、阿西莫单抗(arcitumomab)、ARX788、阿伐苏单抗

(ascrinvacumab)、阿塞珠单抗(aselizumab)、ASG-15ME、阿特珠单抗(atezolizumab)、阿替奴单抗(atinumab)、ATL101、阿特利单抗(atlizumab)(还被称为托西利珠单抗(tocilizumab))、阿托木单抗(atorolimab)、阿维鲁单抗(Avelumab)、B-701、巴匹珠单抗(bapineuzumab)、巴利昔单抗(basiliximab)、巴维昔单抗(bavituximab)、BAY1129980、BAY1187982、贝妥莫单抗(bectumomab)、贝戈洛单抗(begelomab)、贝利木单抗(belimumab)、贝那利珠单抗(benralizumab)、柏替木单抗(bertilimumab)、贝索单抗(besilesomab)、Blutin(177Lu-tetraxetan-tetulomab)、贝伐珠单抗(bevacizumab)、BEVZ92(贝伐珠单抗生物类似药)、贝洛托舒单抗(bezlotoxumab)、BGB-A317、BHQ880、BI 836880、BI-505、比西单抗(biciromab)、比玛卢单抗(bimagrumab)、比美吉珠单抗(bimekizumab)、比伐单抗美登素(bivatuzumab mertansine)、BIW-8962、博纳吐单抗(blinatumomab)、布索组单抗(blosozumab)、BMS-936559、BMS-986012、BMS-986016、BMS-986148、BMS-986178、BNC101、伯考赛珠单抗(bococizumab)、本妥昔单抗(brentuximab vedotin)、BrevaRex、布雷奴单抗(briakinumab)、布罗达单抗(brodalumab)、布洛赛珠单抗(brolucizumab)、布隆妥珠单抗(brontictuzumab)、C2-2b-2b、卡那奴单抗(canakinumab)、莫坎妥珠单抗(cantuzumab mertansine)、雷坎妥珠单抗(cantuzumab ravtansine)、卡帕珠单抗(caplacizumab)、卡罗单抗喷地肽(capromab pendetide)、卡芦单抗(carlumab)、卡妥索单抗(catumaxomab)、CBR96-阿霉素免疫缀合物、CBT124(贝伐珠单抗(bevacizumab))、CC-90002、CDX-014、CDX-1401、西利珠单抗(cedelizumab)、赛妥珠单抗(certolizumab pegol)、西妥昔单抗(cetuximab)、CGEN-15001T、CGEN-15022、CGEN-15029、CGEN-15049、CGEN-15052、CGEN-15092、Ch.14.18、泊西他珠单抗(citatumab bogatox)、西妥木单抗(cixutumumab)、克拉扎珠单抗(clazakizumab)、克立昔单抗(clenoliximab)、泰坦-克利妥珠单抗(clivatuzumab tetraxetan)、CM-24、考曲妥珠单抗(codrituzumab)、雷星-考妥昔单抗(coltuximab ravtansine)、可那木单抗(conatumumab)、康赛珠单抗(concizumab)、Cotara(碘I-131地洛妥单抗生物素)、cR6261、克瑞珠单抗(crenezumab)、DA-3111(曲妥珠单抗生物类似药)、达西珠单抗(dacetuzumab)、达克珠单抗(daclizumab)、达洛珠单抗(dalotuzumab)、培戈-达匹利珠单抗(dapirolizumab pegol)、达雷木单抗(daratumumab)、Daratumumab Enhance(达雷木单抗)、Darleukin、德屈库单抗(dectrekumab)、登赛珠单抗(demcizumab)、玛汀-地宁妥珠单抗(denintuzumab mafodotin)、地诺单抗(denosumab)、迪妥昔珠单抗(Debatuxizumab)、玛汀-迪妥昔珠单抗(Debatuxizumab mafodotin)、地洛妥单抗生物素(derlotuximab biotin)、地莫单抗(detumomab)、DI-B4、迪妥昔单抗(dinutuximab)、地利伏单抗(diridavumab)、DKN-01、DM0T4039A、阿托度单抗(dorlimomab aritox)、曲齐妥单抗(drozitumab)、DS-1123、DS-8895、杜力戈图单抗(duligotumab)、度匹鲁单抗(dupilumab)、度伐利尤单抗(durvalumab)、度司妥单抗(dusigitumab)、依美昔单抗(ecromeximab)、依库珠单抗(eculizumab)、埃巴单抗(edobacomab)、依决洛单抗(edrecolomab)、依法利珠单抗(efalizumab)、依芬古单抗(efungumab)、埃迪鲁单抗(eldelumab)、依更妥单抗(elgemtumab)、埃罗妥珠单抗(elotuzumab)、艾西莫单抗(elsilimomab)、依米妥珠单抗(emactuzumab)、依玛妥珠单抗(emibetuzumab)、依那妥珠单抗(enavatuzumab)、维汀-恩氟妥单抗(enfortumab vedotin)、培戈赖莫单抗(enlimomab pegol)、依诺妥珠单抗(enoblituzumab)、依诺凯组单抗(enokizumab)、依诺苏单抗

(enoticumab)、恩妥昔单抗(ensituximab)、西伊匹莫单抗(epitumomab cituxetan)、依帕珠单抗(epratuzumab)、厄利珠单抗(erlizumab)、厄妥索单抗(ertumaxomab)、埃达珠单抗(etaracizumab)、依曲利组单抗(etrolizumab)、依维苏单抗(evinacumab)、依洛尤单抗(evolocumab、exbivirumab)、法索单抗(fanolesomab)、法拉莫单抗(faralimomab)、法妥组单抗(farletuzumab)、法司努单抗(fasinumab)、FBTA05、泛维珠单抗(felvizumab)、非扎奴单抗(fezakinumab)、FF-21101、FGFR2抗体药物缀合物、Fibromun、非拉妥组单抗(ficlatuzumab)、芬妥木单抗(figuretumumab)、非利伏单抗(firivumab)、法兰妥单抗(flanvotumab)、夫来库单抗(fletikumab)、芳妥珠单抗(fontolizumab)、福雷芦单抗(foralumab)、福拉韦单抗(foravirumab)、FPA144、非苏木单抗(fresolimumab)、FS102、福拉奴单抗(fulranumab)、伏妥昔单抗(futuximab)、加利昔单抗(galiximab)、加尼妥单抗(ganitumab)、更汀芦单抗(gantenerumab)、加维莫单抗(gavilimomab)、吉妥单抗(gemtuzumab ozogamicin)、Gerilimumab、吉伏组单抗(gevokizumab)、吉妥昔单抗(girentuximab)、维汀-格巴妥木单抗(glembatumumab vedotin)、GNR-006、GNR-011、戈利木单抗(golimumab)、戈利昔单抗(gomiliximab)、GSK2849330、GSK2857916、GSK3174998、GSK3359609、古塞库单抗(guselkumab)、Hu14.18K322A MAb、hu3S193、Hu8F4、HuL2G7、HuMab-5B1、伊巴珠单抗(ibalizumab)、替伊莫单抗(ibritumomab tiuxetan)、艾芦库单抗(icrucumab)、依达赛珠单抗(idarucizumab)、IGN002、IGN523、伊戈伏单抗(igovomab)、IMAB362、IMAB362(克劳昔单抗(claudiximab))、伊玛鲁单抗(imalumab)、IMC-CS4、IMC-D11、英西单抗(imciromab)、伊马曲单抗(imgatuzumab)、IMGN529、IMMU-102(钇Y-90依帕珠单抗泰坦)、IMMU-114、ImmuTune IMP701拮抗剂抗体、INCAGN1876、伊克拉单抗(inclacumab)、INCSHR1210、雷英妥昔单抗(indatuximab ravtansine)、维汀-英度妥单抗(indusatumab vedotin)、英夫利西单抗(infliximab)、伊诺莫单抗(inolimomab)、奥英妥珠单抗(inotuzumab ozogamicin)、英妥木单抗(intetumumab)、Ipafricept、IPH4102、伊匹单抗(ipilimumab)、伊妥木单抗(iratumumab)、艾沙妥昔单抗(isatuximab)、艾司妥单抗(Istiratumab)、伊利组单抗(itolizumab)、依克珠单抗(ixekizumab)、JNJ-56022473、JNJ-61610588、凯利昔单抗(keliximab)、KTN3379、L19IL2/L19TNF、拉贝珠单抗(Labetuzumab)、戈维替康-拉贝珠单抗(Labetuzumab Govitecan)、LAG525、兰洛利珠单抗(lambrolizumab)、兰帕珠单抗(lampalizumab)、L-DOS47、来瑞组单抗(lebrikizumab)、来马索单抗(lemalesomab)、仑兹鲁单抗(lenzilumab)、乐德木单抗(lerdelimumab)、Leukotuximab、来沙木单抗(lexatumumab)、利韦单抗(libivirumab)、维汀-利法妥珠单抗(lifastuzumab vedotin)、利格利珠单抗(ligelizumab)、沙泰坦-利洛托单抗(lilotomab satetraxetan)、林妥珠单抗(lintuzumab)、利鲁单抗(lirilumab)、LKZ145、洛迪赛珠单抗(lodelcizumab)、洛吉维单抗(lokiwetmab)、莫星-洛沃妥珠单抗(lorvotuzumab mertansine)、卢卡木单抗(lucatumumab)、培戈-鲁利珠单抗(lulizumab pegol)、鲁昔单抗(lumiliximab)、鲁妥珠单抗(lumretuzumab)、LY3164530、马帕木单抗(mapatumumab)、玛格妥昔单抗(margetuximab)、马司莫单抗(maslimomab)、马妥珠单抗(matuzumab)、玛弗利木单抗(mavrilimumab)、MB311、MCS-110、MEDI0562、MEDI-0639、MEDI0680、MEDI-3617、MEDI-551(伊奈利珠单抗(inebilizumab))、MEDI-565、MEDI6469、美泊利单抗(mepolizumab)、美替木单抗(metelimumab)、MGB453、MGD006/S80880、MGD007、MGD009、MGD011、米拉组单抗、米

拉组单抗-SN-38、明瑞莫单抗(minretumomab)、索星-米妥昔单抗(mirvetuximab soravtansine)、米妥莫单抗(mitumomab)、MK-4166、MM-111、MM-151、MM-302、莫格利珠单抗(mogamulizumab)、MOR202、MOR208、MORAb-066、莫罗木单抗(morolimomab)、莫维组单抗(motavizumab)、鲁磨西替(moxetumomab pasudotox)、莫罗单抗-CD3(muromonab-CD3)、他那可单抗(nacolumab tafenatox)、那美芦单抗(namilumab)、埃托-那普妥莫单抗(naptumomab estafenatox)、纳奈妥单抗(narnatumab)、那他珠单抗(natalizumab)、奈巴库单抗(nebacumab)、耐昔妥珠单抗(necitumumab)、奈莫利珠单抗(nemolizumab)、奈瑞莫单抗(nerelimomab)、奈伐苏单抗(nesvacumab)、尼妥珠单抗(nimotuzumab)、纳武单抗(nivolumab)、疏诺莫单抗(nofetumomab merpentan)、NOV-10、奥托萨昔单抗(obiltoxaximab)、奥比妥珠单抗(obinutuzumab)、奥卡妥珠单抗(ocaratuzumab)、奥瑞珠单抗(ocrelizumab)、奥度莫单抗(odulimomab)、奥法木单抗(ofatumumab)、奥拉单抗(olaratumab)、奥洛组单抗(olokizumab)、奥马珠单抗(omalizumab)、OMP-131R10、OMP-305B83、奥那妥组单抗(onartuzumab)、昂妥昔珠单抗(ontuxizumab)、奥匹努单抗(opicinumab)、莫妥组单抗(oportuzumab monatox)、奥戈伏单抗(oregovomab)、奥替苏单抗(orticumab)、奥昔组单抗(otelixizumab)、奥乐妥珠单抗(otlertuzumab)、OX002/MEN1309、奥塞芦单抗(oxelumab)、奥扎奈珠单抗(ozanezumab)、奥利组单抗(ozoralizumab)、帕昔单抗(pagibaximab)、帕利珠单抗(palivizumab)、帕尼单抗(panitumumab)、潘科曼单抗(pankomab)、PankoMab-GEX、帕巴库单抗(panobacumab)、帕萨妥珠单抗(parsatuzumab)、帕考珠单抗(pascolizumab)、帕妥昔珠单抗(pasotuxizumab)、帕替组单抗(pateclizumab)、帕曲妥单抗(patritumab)、PAT-SC1、PAT-SM6、派姆单抗(pembrolizumab)、帕尼单抗(pemtumomab)、培拉凯珠单抗(perakizumab)、帕妥珠单抗(pertuzumab)、培克珠单抗(pexelizumab)、PF-05082566(乌托鲁单抗(utumilumab))、PF-06647263、PF-06671008、PF-06801591、匹地利珠单抗(pidilizumab)、维汀-匹那妥珠单抗(pinatuzumab vedotin)、平妥莫单抗(pintumomab)、普拉鲁单抗(placulumab)、泊洛妥珠单抗(polatuzumab vedotin)、泊奈组单抗(ponezumab)、普立昔单抗(priliximab)、瑞托萨昔单抗(pritoxaximab)、普托木单抗(pritumumab)、PRO 140、Proxinium、PSMA ADC、奎利珠单抗(quilizumab)、雷妥莫单抗(racotumomab)、雷曲妥单抗(radretumab)、雷韦单抗(rafivirumab)、雷泮赛珠单抗(ralpancizumab)、雷莫芦单抗(ramucirumab)、雷珠单抗(ranibizumab)、雷昔库单抗(raxibacumab)、瑞法奈珠单抗(refanezumab)、瑞加韦单抗(regavirumab)、REGN1400、REGN2810/SAR439684、瑞利珠单抗(reslizumab)、RFM-203、RG7356、RG7386、RG7802、RG7813、RG7841、RG7876、RG7888、RG7986、利妥木单抗(rilotumumab)、利努苏单抗(rinucumab)、利妥昔单抗(rituximab)、RM-1929、R07009789、罗妥木单抗(robatumumab)、罗来度单抗(roledumab)、罗莫单抗(romosozumab)、隆利组单抗(rontalizumab)、罗维珠单抗(rovelizumab)、卢利珠单抗(ruplizumab)、戈沙妥组单抗(sacituzumab govitecan)、沙马组单抗(samalizumab)、SAR408701、SAR566658、萨瑞鲁单抗(sarilumab)、SAT 012、沙妥莫单抗喷地肽(satumomab pendetide)、SCT200、SCT400、SEA-CD40、苏金单抗(secukinumab)、瑟瑞妥单抗(seribantumab)、瑟托萨昔单抗(setoxaximab)、司韦单抗(sevirumab)、SGN-CD19A、SGN-CD19B、SGN-CD33A、SGN-CD70A、SGN-LIV1A、西罗珠单抗(sibrotuzumab)、西法木单抗(sifalimumab)、司妥昔单抗

(siltuximab)、辛妥珠单抗(simtuzumab)、西利珠单抗(siplizumab)、西鲁库单抗(sirukumab)、维汀-索非妥珠单抗(sofituzumab vedotin)、苏兰珠单抗(solanezumab)、索利托单抗(solitomab)、索耐珠单抗(sonepcizumab)、松妥珠单抗(sontuzumab)、司他芦单抗(stamulumab)、硫索单抗(sulesomab)、舒维组单抗(suvizumab)、SYD985、SYM004(伏妥昔单抗(futuximab)和莫多妥昔单抗(modotuximab))、Sym015、TAB08、他贝芦单抗(tabalumab)、替他珠单抗(tacatuzumab tetraxetan)、他度珠单抗(tadocizumab)、他利珠单抗(talizumab)、他尼组单抗(tanezumab)、Tanibirumab、帕他莫单抗(taplitumomab paptox)、他瑞妥单抗(tarextumab)、TB-403、替非组单抗(tefibazumab)、特勒金单抗(Teleukin)、阿替莫单抗(telimomab aritox)、替妥莫单抗(tenatumomab)、替奈昔单抗(teneliximab)、替利组单抗(teplizumab)、替妥木单抗(teprotumumab)、特度鲁单抗(tesidolumab)、特土洛单抗(tetulomab)、TG-1303、TGN1412、钽-227-依帕珠单抗缀合物、替昔单抗(ticilimumab)、替加妥单抗(tigatuzumab)、替拉珠单抗(tildrakizumab)、维蒂索单抗(Tisotumab vedotin)、TNX-650、塔西单抗(tocilizumab)、托拉珠单抗(toralizumab)、托沙单抗(tosatoxumab)、托西单抗(tositumomab)、托维单抗(tovetumab)、曲洛单抗(tralokinumab)、曲妥珠单抗(trastuzumab)、恩美曲妥珠单抗(trastuzumab emtansine)、TRBS07、TRC105、曲丽珠单抗(tregalizumab)、替西木单抗(tremelimumab)、曲弗单抗(trevogrumab)、TRPH 011、TRX518、TSR-042、TTI-200.7、西莫白介素单抗(tucotuzumab celmoleukin)、妥韦单抗(tuvirumab)、U3-1565、U3-1784、乌妥昔单抗(ublituximab)、乌洛鲁单抗(ulocuplumab)、乌瑞芦单抗(urelumab)、乌珠单抗(urtoxazumab)、乌司奴单抗(ustekinumab)、他立林-伐达妥昔单抗(Vadastuximab Talirine)、维汀-万多妥珠单抗(vandortuzumab vedotin)、万替妥单抗(vantictumab)、伐努赛珠单抗(vanucizumab)、伐利昔单抗(vapaliximab)、伐立鲁单抗(varlilumab)、伐利组单抗(vatelizumab)、VB6-845、维多珠单抗(vedolizumab)、维妥组单抗(veltuzumab)、维帕莫单抗(vepalimomab)、维森库单抗(vesencumab)、维西珠单抗(visilizumab)、伏洛昔单抗(volociximab)、玛汀-沃索妥珠单抗(vorsetuzumab mafodotin)、伏妥莫单抗(votumumab)、YYB-101、扎芦木单抗(zalutumumab)、扎木单抗(zanolimumab)、扎妥昔单抗(zatuximab)、齐拉木单抗(ziralimumab)和阿佐莫单抗(zolimomab aritox)。在某些实施方案中,抗原结合结构域结合前述抗体的Fc结构域。

[0313] 在一些实施方案中,抗原结合结构域与抗体模拟物结合。如本文其他部分所述,抗体模拟物可以与抗体相当的亲和力结合靶分子。在一些实施方案中,抗原结合结构域结合本文其他地方所述的人源化抗体。在一些实施方案中,嵌合跨膜受体多肽的抗原结合结构域可以结合人源化抗体的片段。在一些实施方案中,抗原结合结构域可以结合单链可变片段(scFv)。

[0314] 在一些实施方案中,抗原结合结构域还与合适的哺乳动物(例如,人、小鼠、大鼠、山羊、绵羊或猴)的免疫球蛋白(例如,IgG、IgA、IgM或IgE)的Fc部分结合。合适的Fc结合结构域可以来源于天然存在的蛋白质,诸如哺乳动物Fc受体或某些细菌蛋白(例如,蛋白质A和蛋白质G)。另外,Fc结合结构域可以是合成多肽,其被特别地工程化,以便以所需的亲和力和特异性结合本文所述的任何Ig分子的Fc部分。例如,这种Fc结合结构域可以是特异性结合免疫球蛋白的Fc部分的抗体或其抗原结合片段。实例包括但不限于单链可变片段

(scFv)、结构域抗体和纳米抗体。可替代地,Fc结合结构域可以是特异性结合Fc部分的合成肽,诸如库尼结构域、小模块免疫药物(SMIP)、adnectin、avimer、亲和体、DARPin或抗运载蛋白,其可以通过筛选肽库与Fc的结合活性来鉴定。

[0315] 在一些实施方案中,抗原结合结构域包括包含哺乳动物Fc受体的细胞外配体结合结构域的Fc结合结构域。Fc受体通常是在许多免疫细胞(包括B细胞、树突状细胞、自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、肥大细胞和嗜酸性粒细胞)的表面上表达的细胞表面受体,并且表现出与抗体的Fc结构域的结合特异性。在一些情况下,Fc受体与抗体的Fc部分的结合可以触发抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)作用。用于构建本文所述的嵌合跨膜受体多肽的Fc受体可以是天然存在的多态性变体,诸如与野生型对应物相比,可以具有对于Fc结构域的改变(例如,增加或降低)的亲合力的变体。可替代地,Fc受体可以是野生型对应物的功能变体,携带一个或多个突变(例如,多达10个氨基酸残基取代),其改变与Ig分子的Fc部分的结合亲和力。在一些实施方案中,突变可以改变Fc受体的糖基化模式,并且从而改变与Fc结构域的结合亲和力。

[0316] Fc受体可以基于其能够结合的抗体的同种型进行分类。例如,Fc- γ 受体(Fc γ R)通常与IgG抗体(例如,IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)结合;Fc- α 受体(Fc α R)通常与IgA抗体结合;并且Fc- ϵ 受体(Fc ϵ R)通常与IgE抗体结合。在一些实施方案中,抗原结合结构域包含Fc γ 受体或其任何衍生物、变体或片段。在一些实施方案中,抗原结合结构域包含Fc结合结构域,其包含选自以下的FcR:Fc γ RI(CD64)、Fc γ RIa、Fc γ RIb、Fc γ RIc、Fc γ RIIA(CD32)(包括同种异型H131和R131)、Fc γ RIIB(CD32)(包括Fc γ RIIB-1和Fc γ RIIB-2)、Fc γ RIIIA(CD16a)(包括同种异型V158和F158)、Fc γ RIIIB(CD16b)(包括同种异型Fc γ RIIIB-NA1和Fc γ RIIIB-NA2)以及其任何衍生物、其任何变体及其任何片段。Fc γ R可以来自任何生物体,包括但不限于人、小鼠、大鼠、兔和猴。小鼠Fc γ R包括但不限于Fc γ RI(CD64)、Fc γ RII(CD32)、Fc δ RIII(CD16)和Fc γ RIII-2(CD16-2)。在一些实施方案中,抗原结合结构域包含Fc ϵ 受体或其任何衍生物、变体或片段。在一些实施方案中,抗原结合结构域包含选自Fc ϵ RI、Fc ϵ RII(CD23)、其任何衍生物、其任何变体及其任何片段的FcR。在一些实施方案中,抗原结合结构域包含Fc α 受体或其任何衍生物、变体或片段。在一些实施方案中,抗原结合结构域包含选自Fc α RI(CD89)、Fc α / μ R、其任何衍生物、其任何变体及其任何片段的FcR。在一些实施方案中,抗原结合结构域包含选自FcRn、其任何衍生物、其任何变体及其任何片段的FcR。选择用于嵌合跨膜受体多肽的Fc受体的配体结合结构域可能取决于各种因素,诸如需要Fc结合结构域的结合的抗体的同种型以及所需的结合相互作用的亲和力。

[0317] 对象系统的嵌合跨膜受体多肽的细胞内区的免疫细胞信号传导结构域可以包括初级信号传导结构域。初级信号传导结构域可以是参与免疫细胞信号传导的任何信号传导结构域或其衍生物、变体或片段。例如,信号传导结构域以刺激性方式或以抑制性方式参与调节TCR复合物的初级激活。初级信号传导结构域可以包含以下的信号传导结构域:Fc γ 受体(Fc γ R)、Fc ϵ 受体(Fc ϵ R)、Fc α 受体(Fc α R)、新生儿Fc受体(FcRn)、CD3、CD3 ζ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD4、CD5、CD8、CD21、CD22、CD28、CD32、CD40L(CD154)、CD45、CD66d、CD79a、CD79b、CD80、CD86、CD278(还被称为ICOS)、CD247 ζ 、CD247 η 、DAP10、DAP12、FYN、LAT、Lck、MAPK、MHC复合物、NFAT、NF- κ B、PLC- γ 、iC3b、C3dg、C3d和Zap70。在一些实施方案中,初级信号传导结构域包含基于免疫受体酪氨酸的激活基序或ITAM。包含ITAM的初级信号传导结构域可以包

含由6-8个氨基酸分隔的氨基酸序列YxxL/I的两个重复序列,其中每个x独立地是任何氨基酸,从而产生保守基序YxxL/Ix₍₆₋₈₎YxxL/I。当抗原结合结构域与抗原结合时,包含ITAM的初级信号传导结构域可以例如通过磷酸化来修饰。磷酸化的ITAM可以充当其他蛋白质的对接位点,例如参与各种信号传导通路的蛋白质。在一些实施方案中,初级信号传导结构域包含修饰的ITAM结构域,例如与天然ITAM结构域相比具有改变的(例如,增加或降低)活性的突变、截短和/或优化ITAM结构域。

[0318] 在一些实施方案中,初级信号传导结构域包含Fc γ R信号传导结构域(例如,ITAM)。Fc γ R信号传导结构域可以选自Fc γ RI(CD64)、Fc γ RIIA(CD32)、Fc γ RIIB(CD32)、Fc γ RIIIA(CD16a)和Fc γ RIIIB(CD16b)。在一些实施方案中,初级信号传导结构域包含Fc ϵ R信号传导结构域(例如,ITAM)。Fc ϵ R信号传导结构域可以选自Fc ϵ RI和Fc ϵ RII(CD23)。在一些实施方案中,初级信号传导结构域包含Fc α R信号传导结构域(例如,ITAM)。Fc α R信号传导结构域可以选自Fc α RI(CD89)和Fc α / μ R。在一些实施方案中,初级信号传导结构域包含CD3 ζ 信号传导结构域在一些实施方案中,初级信号传导结构域包括CD3 ζ 的ITAM。

[0319] 在一些实施方案中,初级信号传导结构域包含基于免疫受体酪氨酸的抑制基序或ITIM。包含ITIM的初级信号传导结构域可以包含氨基酸的保守序列(S/I/V/LxYxxI/V/L),所述序列存在于免疫系统的一些抑制受体的细胞质尾中。包含ITIM的初级信号传导结构域可以被修饰,例如通过酶,诸如Src激酶家族成员(例如,Lck)磷酸化。在磷酸化后,其他蛋白质(包括酶)可以被募集到ITIM中。这些其他蛋白质包括但不限于酶诸如磷酸酪氨酸磷酸酶SHP-1和SHP-2,被称为SHIP的肌醇-磷酸酶,以及具有一个或多个SH2结构域的蛋白质(例如,ZAP70)。初级信号传导结构域可以包含以下的信号传导结构域(例如,ITIM):BTLA、CD5、CD31、CD66a、CD72、CMRF35H、DCIR、EPO-R、Fc γ RIIB(CD32)、Fc受体样蛋白2(FCRL2)、Fc受体样蛋白3(FCRL3)、Fc受体样蛋白4(FCRL4)、Fc受体样蛋白5(FCRL5)、Fc受体样蛋白6(FCRL6)、蛋白质G6b(G6B)、白介素4受体(IL4R)、免疫球蛋白超家族受体易位相关蛋白1(IRTA1)、免疫球蛋白超家族受体易位相关蛋白2(IRTA2)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体2DL1(KIR2DL1)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体2DL2(KIR2DL2)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体2DL3(KIR2DL3)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体2DL4(KIR2DL4)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体2DL5(KIR2DL5)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体3DL1(KIR3DL1)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体3DL2(KIR3DL2)、白细胞免疫球蛋白样受体亚家族B成员1(LIR1)、白细胞免疫球蛋白样受体亚家族B成员2(LIR2)、白细胞免疫球蛋白样受体亚家族B成员3(LIR3)、白细胞免疫球蛋白样受体亚家族B成员5(LIR5)、白细胞免疫球蛋白样受体亚家族B成员8(LIR8)、白细胞相关免疫球蛋白样受体1(LAIR-1)、肥大细胞功能相关抗原(MAFA)、NKG2A、天然细胞毒性触发受体2(NKp44)、NTB-A、程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)、PILR、SIGLECL1、唾液酸结合Ig样凝集素2(SIGLEC2或CD22)、唾液酸结合Ig样凝集素3(SIGLEC3或CD33)、唾液酸结合Ig样凝集素5(SIGLEC5或CD170)、唾液酸结合Ig样凝集素6(SIGLEC6)、唾液酸结合Ig样凝集素7(SIGLEC7)、唾液酸结合Ig样凝集素10(SIGLEC10)、唾液酸结合Ig样凝集素11(SIGLEC11)、唾液酸结合Ig样凝集素4(SIGLEC4)、唾液酸结合Ig样凝集素8(SIGLEC8)、唾液酸结合Ig样凝集素9(SIGLEC9)、血小板与内皮细胞粘附分子1(PECAM-1)、信号调节蛋白(SIRP 2)和信号传导阈值调节跨膜衔接因子1(SIT)。在一些实施方案中,初级信号传导结构域包含修饰的ITIM结构域,例如与天然ITIM结构域相比具有改变的(例如,增加或降低)活性的突变、截

短和/或优化ITIM结构域。

[0320] 在一些实施方案中,免疫细胞信号传导结构域包含多个初级信号传导结构域。例如,免疫细胞信号传导结构域可以包含至少2个初级信号传导结构域,例如,至少2、3、4、5、7、8、9或10个初级信号传导结构域。在一些实施方案中,免疫细胞信号传导结构域包含至少2个ITAM结构域(例如,至少3、4、5、6、7、8、9或10个ITAM结构域)。在一些实施方案中,免疫细胞信号传导结构域包含至少2个ITIM结构域(例如,至少3、4、5、6、7、8、9或10个ITIM结构域)(例如,至少2个初级信号传导结构域)。在一些实施方案中,免疫细胞信号传导结构域包含ITAM和ITIM结构域两者。

[0321] 嵌合跨膜受体多肽的细胞内区的免疫细胞信号传导结构域可以包括共刺激结构域。在一些实施方案中,共刺激结构域(例如,来自共刺激分子)可以为免疫细胞信号传导(诸如来自ITAM和/或ITIM结构域的信号传导)提供共刺激信号,例如,用于免疫细胞的激活和/或失活。在一些实施方案中,免疫细胞信号传导结构域包含初级信号传导结构域和至少一个共刺激结构域。在一些实施方案中,共刺激结构域可操作以调节免疫细胞中的增殖和/或存活信号。在一些实施方案中,共刺激信号传导结构域包含MHC I类蛋白、MHC II类蛋白、TNF受体蛋白、免疫球蛋白样蛋白、细胞因子受体、整合素、信号传导淋巴细胞激活分子(SLAM蛋白)、激活NK细胞受体、BTLA或Toll配体受体的信号传导结构域。在一些实施方案中,共刺激结构域包含选自以下的分子的信号传导结构域:2B4/CD244/SLAMF4、4-1BB/TNFSF9/CD137、B7-1/CD80、B7-2/CD86、B7-H1/PD-L1、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H6、B7-H7、BAFF R/TNFRSF13C、BAFF/BLyS/TNFSF13B、BLAME/SLAMF8、BTLA/CD272、CD100 (SEMA4D)、CD103、CD11a、CD11b、CD11c、CD11d、CD150、CD160 (BY55)、CD18、CD19、CD2、CD200、CD229/SLAMF3、CD27配体/TNFSF7、CD27/TNFRSF7、CD28、CD29、CD2F-10/SLAMF9、CD30配体/TNFSF8、CD30/TNFRSF8、CD300a/LMIR1、CD4、CD40配体/TNFSF5、CD40/TNFRSF5、CD48/SLAMF2、CD49a、CD49D、CD49f、CD53、CD58/LFA-3、CD69、CD7、CD8 α 、CD8 β 、CD82/Kai-1、CD84/SLAMF5、CD90/Thy1、CD96、CDS、CEACAM1、CRACC/SLAMF7、CRTAM、CTLA-4、DAP12、树凝素-1/CLEC7A、DNAM1 (CD226)、DPPIV/CD26、DR3/TNFRSF25、EphB6、GADS、Gi24/VISTA/B7-H5、GITR配体/TNFSF18、GITR/TNFRSF18、HLA I类、HLA-DR、HVEM/TNFRSF14、IA4、ICAM-1、ICOS/CD278、Ikaros、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、整合素 α 4/CD49d、整合素 α 4 β 1、整合素 α 4 β 7/LPAM-1、IPO-3、ITGA4、ITGA6、ITGAD、ITGAE、ITGAL、ITGAM、ITGAX、ITGB1、ITGB2、ITGB7、KIRDS2、LAG-3、LAT、LIGHT/TNFSF14、LTBR、Ly108、Ly9 (CD229)、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、淋巴毒素- α /TNF- β 、NKG2C、NKG2D、NKp30、NKp44、NKp46、NKp80 (KLRF1)、NTB-A/SLAMF6、OX40配体/TNFSF4、OX40/TNFRSF4、PAG/Cbp、PD-1、PDCD6、PD-L2/B7-DC、PSGL1、RELT/TNFRSF19L、SELPLG (CD162)、SLAM (SLAMF1)、SLAM/CD150、SLAMF4 (CD244)、SLAMF6 (NTB-A)、SLAMF7、SLP-76、TACI/TNFRSF13B、TCL1A、TCL1B、TIM-1/KIM-1/HAVCR、TIM-4、TL1A/TNFSF15、TNF RII/TNFRSF1B、TNF- α 、TRANCE/RANKL、TSLP、TSLP R、VLA1和VLA-6。在一些实施方案中,免疫细胞信号传导结构域包含多个共刺激结构域,例如至少两个,例如至少3、4或5个共刺激结构域。

[0322] T细胞受体 (TCR)

[0323] 在一些实施方案中,在工程化细胞疗法中,提供了工程化细胞(诸如T细胞),其表达识别靶多肽(诸如肿瘤、病毒或自身免疫蛋白的抗原)的肽表位或T细胞表位的T细胞受体 (TCR)或其抗原结合部分。

[0324] 在一些实施方案中,“T细胞受体”或“TCR”是如下分子,所述分子含有可变 α 和 β 链(也分别称为TCR α 和TCR β)或可变 γ 和 δ 链(也分别称为TCR γ 和TCR δ)或其抗原结合部分,并且能够特异性结合与MHC分子结合的肽。在一些实施方案中,TCR呈 $\alpha\beta$ 形式。以 $\alpha\beta$ 和 $\gamma\delta$ 形式存在的TCR可以在结构上相似,但是表达它们的T细胞可以具有不同的解剖学位置或功能。TCR可以在细胞的表面上发现或以可溶形式发现。

[0325] 可以在T细胞(或T淋巴细胞)的表面上发现TCR,在此处它可以负责识别与主要组织相容性复合物(MHC)分子结合的抗原。

[0326] 除非另外说明,否则术语“TCR”应理解为涵盖完整的TCR以及其抗原结合部分或抗原结合片段。在一些实施方案中,TCR是完整或全长TCR,包括呈 $\alpha\beta$ 形式或 $\gamma\delta$ 形式的TCR。在一些实施方案中,通过将广泛的肿瘤反应性 $\gamma\delta$ T细胞受体转移到 $\alpha\beta$ T细胞中来将 $\alpha\beta$ T细胞重定向到癌细胞,例如, $\gamma 9\delta 2$ TCR转导的 $\alpha\beta$ T细胞。在一些实施方案中,TCR是小于全长TCR但与MHC分子中所结合的特定肽结合(诸如与MHC-肽复合物结合)的抗原结合部分。在一些情况下,TCR的抗原结合部分或片段可以仅含有全长或完整TCR的结构性结构域的一部分,但是仍能够结合与完整TCR结合的肽表位(诸如MHC-肽复合物)。在一些情况下,抗原结合部分含有TCR的可变结构域(诸如TCR的可变 α 链和可变 β 链),足以形成用于与特定MHC-肽复合物结合的结合位点。TCR的可变链可以含有参与对肽、MHC和/或MHC-肽复合物的识别的互补决定区。

[0327] 在一些实施方案中,TCR的可变结构域含有高变环或互补决定区(CDR),其可以是抗原识别和结合能力和特异性的主要贡献者。在一些实施方案中,TCR的CDR或其组合形成给定TCR分子的全部或基本上全部的抗原结合位点。TCR链的可变区内的各种CDR可以通过框架区(FR)分隔,与CDR相比,TCR分子之间可能展示的变异性较小(参见例如Jores等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.U.S.A.87:9138,1990;Chothia等人,EMBO J.7:3745,1988;还参见Lefranc等人,Dev.Comp.Immunol.27:55,2003)。在一些实施方案中,CDR3是负责抗原结合或特异性的主要CDR,或者在给定TCR可变区上在三个CDR中对于抗原识别和/或对于与肽-MHC复合物的经加工肽部分的相互作用最重要。在一些情况下, α 链的CDR1可以与某些抗原肽的N末端部分相互作用。在一些情境下, β 链的CDR1可以与肽的C末端部分相互作用。在一些情境下,CDR2对与MHC-肽复合物的MHC部分的相互作用或识别具有最强的作用或者是主要的负责CDR。在一些实施方案中, β 链的可变区含有另外的高变区(CDR4或HVR4),所述高变区可以参与超抗原结合而非抗原识别。

[0328] 在一些实施方案中,TCR还含有恒定结构域、跨膜结构域和/或短细胞质尾。在一些情况下,TCR的每条链具有一个N末端免疫球蛋白可变结构域、一个免疫球蛋白恒定结构域、跨膜区和位于C末端的短细胞质尾。在一些实施方案中,TCR与参与介导信号转导的CD3复合物的不变蛋白质缔合。

[0329] 在一些实施方案中,TCR链含有一个或多个恒定结构域。例如,给定TCR链(例如, α 链或 β 链)的细胞外部分可以含有与细胞膜相邻的两个免疫球蛋白样结构域,诸如可变结构域(例如,V α 或V β ;通常为基于Kabat编号的氨基酸1至116,Kabat等人,“Sequences of Proteins of Immunological Interest,USDept.Health and Human Services,Public Health Service National Institutes of Health,1991,第5版)和恒定结构域(例如, α 链恒定结构域或C α ,通常为基于Kabat编号的链的位置117至259;或 β 链恒定结构域或C β ,通常

为基于Kabat的链的位置117至295)。例如,在一些情况下,由两条链形成的TCR的细胞外部分含有两个膜近端恒定结构域和两个膜远端可变结构域,所述可变结构域各自含有CDR。TCR的恒定结构域可以含有短连接序列,其中半胱氨酸残基形成二硫键,从而连接TCR的两条链。在一些实施方案中,TCR在 α 链和 β 链中的每一个中具有另外的半胱氨酸残基,使得TCR在恒定结构域中含有两个二硫键。

[0330] 在一些实施方案中,TCR链含有跨膜结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域带正电荷。在一些情况下,TCR链含有细胞质尾。在一些情况下,所述结构允许TCR与其他分子(像CD3)及其亚基缔合。例如,含有恒定结构域与跨膜区的TCR可以将蛋白质锚定在细胞膜中并与CD3信号传导设备或复合物的不变亚基缔合。CD3信号传导亚基(例如,CD3 γ 、CD35、CD3s和CD3 ζ 链)的细胞内尾含有TCR复合物的信号传导能力中所涉及的一个或多个基于免疫受体酪氨酸的激活基序或ITAM。

[0331] 在一些实施方案中,TCR可以是两条链 α 和 β (或者任选地 γ 和 δ)的异源二聚体,或者它是单链TCR构建体。在一些实施方案中,TCR是含有诸如通过一个或多个二硫键连接的两条单独链(α 和 β 链或 γ 和 δ 链)的异源二聚体。

[0332] 在一些实施方案中,TCR从一个或多个已知的TCR序列(诸如V α 、V β 链的序列)生成,所述一个或多个已知的TCR序列的基本上全长的编码序列是可容易获得的。用于从细胞来源获得全长TCR序列(包括V链序列)的方法是熟知的。在一些实施方案中,编码TCR的核酸是从多种来源获得,诸如通过一种或多种给定细胞内的或从所述一种或多种给定细胞中分离的编码TCR的核酸的聚合酶链式反应(PCR)扩增获得,或者通过公众可获得的TCR DNA序列的合成获得。在一些实施方案中,TCR是从生物来源获得,诸如来自细胞(诸如来自T细胞(例如,细胞毒性T细胞))、T细胞杂交瘤或其他公众可获得的来源。在一些实施方案中,T细胞从体内分离的细胞获得。在一些实施方案中,T细胞从活检肿瘤样品获得。在一些实施方案中,TCR是胸腺选择的TCR。在一些实施方案中,TCR是新表位限制性TCR。在一些实施方案中,T细胞是培养的T细胞杂交瘤或克隆。在一些实施方案中,TCR或其抗原结合部分根据对所述TCR序列的知识以合成方式生成。

[0333] 在一些实施方案中,TCR是从通过针对靶多肽抗原或其靶T细胞表位筛选候选TCR文库而鉴定或选择的TCR生成的。TCR文库可以通过扩增来自T细胞的V α 和V β 库来生成,所述T细胞是从对象中分离的,包括存在于PBMC、脾或其他淋巴器官中的细胞。在一些情况下,T细胞从肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)扩增。在一些实施方案中,TCR文库从CD4 $^{+}$ 或CD8 $^{+}$ 细胞生成。在一些实施方案中,TCR从正常或健康对象的T细胞来源扩增,例如正常TCR文库。在一些实施方案中,TCR从患病对象的T细胞来源扩增,例如患病TCR文库。在一些实施方案中,使用简并引物扩增V α 和V β 的基因库,诸如在从人获得的样品(诸如T细胞)中通过RT-PCR扩增。在一些实施方案中,scFv文库从幼稚V α 和V β 文库组装,其中经扩增的产物被克隆或组装以通过接头分隔。根据对象和细胞的来源,所述文库可以是HLA等位基因特异性的。可替代地,在一些实施方案中,TCR文库通过亲本或支架TCR分子的诱变或多样化产生。在一些方面,使TCR经历例如 α 或 β 链的定向进化,诸如通过诱变来进行。在一些情况下,TCR的CDR内的特定残基被改变。在一些实施方案中,通过亲和力成熟来修饰选择的TCR。可以诸如通过筛选以评估针对肽的CTL活性来选择抗原特异性T细胞。在一些方面,可以选择例如存在于抗原特异性T细胞上的TCR,诸如通过结合活性,例如对于抗原的特定亲和力或亲合力来选择。

[0334] 在一些实施方案中,TCR或其抗原结合部分是已经被修饰或工程化的。在一些实施方案中,使用定向进化方法来生成具有改变的特性(诸如对于特定MHC-肽复合物具有较高亲和力)的TCR。在一些实施方案中,定向进化是通过展示方法实现的,包括但不限于酵母展示(Holler等人,(2003)Nat Immunol,4,55-62;Holler等人,(2000)Proc Natl Acad Sci U S A,97,5387-92)、噬菌体展示(Li等人,(2005)Nat Biotechnol,23,349-54)或T细胞展示(Chervin等人,(2008)Immunol Methods,339,175-84)。在一些实施方案中,展示方法涉及工程化或修饰已知的亲本或参考TCR。例如,野生型TCR可以用作模板以用于产生经诱变的TCR,其中CDR的一个或多个残基被突变,并且选择具有所需改变的特性(诸如对于所需的靶抗原具有更高的亲和力)的突变体。

[0335] 在一些实施方案中,用于产生或生成感兴趣的TCR的靶多肽的肽是已知的或由熟练技术人员容易地鉴定。在一些实施方案中,适用于生成TCR或抗原结合部分的肽基于感兴趣的靶多肽中HLA限制性基序的存在来确定。在一些实施方案中,使用本领域技术人员已知的计算机预测模型来鉴定肽。

[0336] 在一些实施方案中,TCR或其抗原结合部分可以是重组产生的天然蛋白或其突变形式,其中一种或多种特性(诸如结合特征)已发生改变。在一些实施方案中,TCR可以来源于多个动物物种之一,诸如人、小鼠、大鼠或其他哺乳动物。TCR可以是细胞结合的或呈可溶形式。在一些实施方案中,出于所提供的方法的目的,TCR呈在细胞表面上表达的细胞结合形式。

[0337] 在一些实施方案中,TCR是全长TCR。在一些实施方案中,TCR是抗原结合部分。在一些实施方案中,TCR是二聚体TCR(dTCR)。在一些实施方案中,TCR是单链TCR(sc-TCR)。在一些实施方案中,dTCR或scTCR具有如WO 03/020763、WO 04/033685或WO2011/044186中所述的结构。在一些实施方案中,TCR含有对应于跨膜序列的序列。在一些实施方案中,TCR确实含有对应于细胞质序列的序列。在一些实施方案中,TCR能够与CD3形成TCR复合物。在一些实施方案中,任何TCR(包括dTCR或scTCR)可以与信号传导结构域连接,从而在T细胞表面上产生活性TCR。在一些实施方案中,TCR在细胞表面上表达。

[0338] 在一些实施方案中,dTCR含有第一多肽(其中对应于TCR α 链可变区序列的序列与对应于TCR α 链恒定区细胞外序列的序列的N末端融合)和第二多肽(其中对应于TCR β 链可变区序列的序列与对应于TCR β 链恒定区细胞外序列的序列的N末端融合),所述第一和第二多肽通过二硫键连接。在一些实施方案中,所述键可以对应于天然二聚体 $\alpha\beta$ TCR中存在的天然链间二硫键。在一些实施方案中,所述链间二硫键不存在于天然TCR中。例如,在一些实施方案中,可以将一个或多个半胱氨酸并入dTCR多肽对的恒定区细胞外序列中。在一些情况下,可能需要天然和非天然二硫键两者。在一些实施方案中,所述TCR含有跨膜序列以锚定至膜。

[0339] 在一些实施方案中,dTCR含有TCR α 链,所述TCR α 链含有可变 α 结构域、恒定 α 结构域和附接至恒定 α 结构域C末端的第一二聚化基序;以及TCR β 链,所述TCR β 链包含可变 β 结构域、恒定 β 结构域和附接至恒定 β 结构域C末端的第一二聚化基序,其中所述第一和第二二聚化基序易于相互作用以在第一二聚化基序的氨基酸与第二二聚化基序的氨基酸之间形成共价键,从而将TCR α 链与TCR β 链连接在一起。

[0340] 在一些实施方案中,TCR是scTCR。scTCR可以使用本领域技术人员已知的方法生

成,参见例如Soo Hoo,W.F.等人,PNAS(USA) 89,4759(1992);Wiilfing,C.和Pliickthun,A.,J.Mol.Biol.242,655(1994);Kurucz,I.等人,PNAS(USA) 90 3830(1993);国际公开PCT号W0 96/13593、W0 96/18105、W099/60120、W099/18129、W0 03/020763、W02011/044186;以及Schlueter,C.J.等人,J.Mol.Biol.256,859(1996)。在一些实施方案中,scTCR含有引入的非天然链间二硫键以促进TCR链的缔合(参见例如,国际公开PCT号W0 03/020763)。在一些实施方案中,scTCR是非二硫键连接的截短的TCR,其中与其C末端融合的异源亮氨酸拉链促进链缔合(参见例如,国际公开的PCT号W099/60120)。在一些实施方案中,scTCR含有经由肽接头与TCR β 可变结构域共价连接的TCR α 可变结构域(参见例如,国际公开PCT号W099/18129)。

[0341] 在一些实施方案中,scTCR含有第一区段(其由对应于TCR α 链可变区的氨基酸序列构成)、第二区段(其由与对应于TCR β 链恒定结构域细胞外序列的氨基酸序列的N末端融合的对应该于TCR β 链可变区序列的氨基酸序列构成)和接头序列(其将第一区段的C末端连接至第二区段的N末端)。

[0342] 在一些实施方案中,scTCR含有第一区段(其由与 α 链细胞外恒定结构域序列的N末端融合的 α 链可变区序列构成)和第二区段(其由与序列 β 链细胞外恒定和跨膜序列的N末端融合的 β 链可变区序列构成)以及任选地接头序列(其将第一区段的C末端连接至第二区段的N末端)。

[0343] 在一些实施方案中,scTCR含有第一区段(其由与 β 链细胞外恒定结构域序列的N末端融合的TCR β 链可变区序列构成)和第二区段(其由与序列 α 链细胞外恒定和跨膜序列的N末端融合的 α 链可变区序列构成)以及任选地接头序列(其将第一区段的C末端连接至第二区段的N末端)。

[0344] 在一些实施方案中,scTCR的连接第一和第二TCR区段的接头是能够在保留TCR结合特异性的同时形成单条多肽链的任何接头。在一些实施方案中,接头序列可以例如具有式-P-AA-P-,其中P是脯氨酸并且AA代表氨基酸序列,其中所述氨基酸是甘氨酸和丝氨酸。在一些实施方案中,第一区段和第二区段配对,使得其可变区序列定向用于这种结合。因此,在一些情况下,接头具有足够的长度以跨越第一区段的C末端与第二区段的N末端之间的距离,或反之亦然,但是不能太长而阻断或减少scTCR与靶配体的结合。在一些实施方案中,接头含有或含有约10至45个氨基酸,诸如10至30个氨基酸或26至41个氨基酸残基,例如29、30、31或32个氨基酸。在一些实施方案中,接头具有式-PGGG-(SGGGG)5-P-,其中P是脯氨酸,G是甘氨酸并且S是丝氨酸。在一些实施方案中,所述接头具有序列GSADDAKKDAKKDGKS。在一些实施方案中,scTCR含有共价二硫键,其将 α 链的恒定结构域的免疫球蛋白区的残基连接至 β 链的恒定结构域的免疫球蛋白区的残基。在一些实施方案中,天然TCR中不存在链间二硫键。例如,在一些实施方案中,可以将一个或多个半胱氨酸并入scTCR多肽的第一和第二区段的恒定区细胞外序列中。在一些情况下,可能需要天然和非天然二硫键两者。在dTCR或scTCR含有引入的链间二硫键的一些实施方案中,不存在天然二硫键。在一些实施方案中,形成天然链间二硫键的一个或多个天然半胱氨酸被取代为另一种残基,诸如丝氨酸或丙氨酸。在一些实施方案中,引入的二硫键通过使第一和第二区段上的非半胱氨酸残基突变为半胱氨酸来形成。TCR的示例性非天然二硫键在公开的国际PCT号W02006/000830中描述。

[0345] 在一些实施方案中,TCR或其抗原结合片段对于靶抗原以平衡结合常数表现出亲和力和力,所述平衡结合常数是在或在约 10^{-5} 与 10^{-12} M之间以及其中的所有单独值和范围。在一些实施方案中,靶抗原是MHC-肽复合物或配体。

[0346] 在一些实施方案中,工程化细胞疗法涉及多靶向策略,诸如在细胞(例如,T细胞)上表达两种或更多种基因工程化受体,每种受体识别相同或不同的抗原,并且通常各自包括不同的细胞内信号传导组分。此类多靶向策略例如描述于PCT公开号WO 2014055668 A1(描述激活和共刺激CAR的组合,例如,靶向单独存在于脱靶细胞,例如正常细胞上,但一起仅存在于待治疗的疾病或病状的细胞上的两种不同的抗原)以及Fedorov等人, *Sci.Transl.Medicine*,5(215) (2013) (描述表达激活和抑制性CAR的细胞,诸如激活CAR与在正常或非患病细胞和待治疗的疾病或病状的细胞两者上表达的一种抗原结合,并且抑制性CAR与仅在正常细胞或不需要治疗的细胞上表达的另一种抗原结合的那些细胞)中。

[0347] 例如,在一些实施方案中,细胞(例如,T细胞)包含表达第一基因工程化抗原受体(例如,CAR或TCR)的受体,其通常在与由第一受体识别的抗原(例如,第一抗原)特异性结合后能够诱导激活信号至所述细胞。在一些实施方案中,细胞还包含第二基因工程化抗原受体(例如,CAR或TCR),例如嵌合共刺激受体,其通常在与由第二受体识别的第二抗原特异性结合后能够诱导共刺激信号至免疫细胞。在一些实施方案中,第一抗原与第二抗原是相同的。在一些实施方案中,第一抗原与第二抗原是不同的。

[0348] 在一些实施方案中,单独的第一受体的连接和单独的第二受体的连接都不会诱导稳健的免疫应答。在一些方面,如果仅连接一个受体,则细胞变得耐受抗原或对抗原无应答,或被抑制,和/或不被诱导增殖或分泌因子或实现效应功能。然而,在一些此类实施方案中,在连接多个受体时,诸如在遇到表达第一和第二抗原的细胞时,实现所需应答,诸如完全免疫激活或刺激,例如通过一种或多种细胞因子的分泌、增殖、持久性和/或执行免疫效应功能(诸如靶细胞的细胞毒性杀伤)所指示的。

[0349] 在一些实施方案中,两种受体分别将激活和抑制信号诱导至细胞,使得一种受体与其抗原的结合激活细胞或诱导应答,但是第二抑制性受体与其抗原的结合诱导了抑制或减弱所述应答的信号。实例是激活CAR与抑制性CAR或iCAR的组合。例如,可以使用这种策略,其中激活CAR结合在疾病或病状中表达但也在正常细胞上表达的抗原,并且抑制性受体与在正常细胞上表达但不在疾病或病状的细胞上表达的单独抗原结合。

[0350] 在一些实施方案中,多靶向策略用于以下情况:其中与特定疾病或病状相关联的抗原在非患病细胞上表达和/或在工程化细胞本身上表达,所述表达为瞬时表达(例如,在与基因工程化相关联的刺激后)或永久表达。在此类情况下,通过需要连接两个分开的和单独特异性抗原受体,可以改善特异性、选择性和/或功效。

[0351] 在一些实施方案中,T细胞被工程化为重定向到抗原非限制性细胞因子启动杀伤(TRUCK)的T细胞,其编码用于细胞因子产生以增强CAR-T活性的基因或自杀基因以防止毒性,诸如在Chmielewski M等人Expert Opin Biol Ther.2015;15(8):1145-54中所述的那些,所述文献通过引用整体并入本文。

[0352] 在一些实施方案中,多种抗原(例如,第一和第二抗原)在所靶向的细胞、组织或疾病或病状上(诸如在癌细胞上)表达。在一些方面,细胞、组织、疾病或病状是多发性骨髓瘤或多发性骨髓瘤细胞。在一些实施方案中,多种抗原中的一种或多种通常也在不需要用细

胞疗法靶向的细胞(诸如正常或非患病细胞或组织,和/或工程化细胞本身)上表达。在此类实施方案中,通过需要连接多个受体以实现细胞的应答,实现特异性和/或功效。

[0353] 在一些实施方案中,例如用于使用如本文所述的方法治疗癌症的工程化TCR包括响应于癌症相关抗原而具有免疫细胞激活功能的那些TCR。非限制性实例包括抗原特异性TCR、单克隆TCR(MTCR)、单链MTCR、高亲和力CDR2突变体TCR、CDI结合MTCR、高亲和力NY-ESO TCR、VYG HLA-A24端粒酶TCR,包括例如在以下中描述的那些:PCT公开号WO 2003/020763、WO 2004/033685、WO2004/044004、WO 2005/114215、WO 2006/000830、WO 2008/038002、WO 2008/039818、WO 2004/074322、WO 2005/113595、WO 2006/125962;Strommes等人Immunol Rev.2014;257(1):145-64;Schmitt等人Blood.2013;122(3):348-56;Chapulc等人Sci Transl Med.2013;5(174):174ra27;Thaxton等人Hum Vaccin Immunother.2014;10(11):3313-21(PMID:25483644);Gschweng等人Immunol Rev.2014;257(1):237-49(PMID:24329801);Hinrichs等人Immunol Rev.2014;257(1):56-71(PMID:24329789);Zoete等人Front Immunol.2013;4:268(PMID:24062738);Marr等人Clin Exp Immunol.2012;167(2):216-25(PMID:22235997);Zhang等人Adv Drug Deliv Rev.2012;64(8):756-62(PMID:22178904);Chhabra等人Scientific World Journal.2011;11:121-9(PMID:21218269);Boulter等人Clin Exp Immunol.2005;142(3):454-60(PMID:16297157);Sami等人Protein Eng Des Sel.2007;20(8):397-403;Boulter等人Protein Eng.2003;16(9):707-11;Ashfield等人IDrugs.2006;9(8):554-9;Li等人Nat Biotechnol.2005;23(3):349-54;Dunn等人Protein Sci.2006;15(4):710-21;Liddy等人Mol Biotechnol.2010;45(2);Liddy等人Nat Med.2012;18(6):980-7;Oates等人Oncoimmunology.2013;2(2):e22891;McCormack等人Cancer Immunol Immunother.2013年4月;62(4):773-85;Bossi等人Cancer Immunol Immunother.2014;63(5):437-48以及Oates等人Mol Immunol.2015年10月;67(2Pt A):67-74;其公开内容通过引用整体并入本文。在一些情况下,可用的TCR包括靶向以下抗原之一的TCR:NY-ESO-1、MART-1、MAGE-A3、MAGE-A3、CEA、gp100、WT1、HBV、gag(WT和/或a/6)、P53、与DR4结合的TRAIL、HPV-16(E6和/或E7)、存活素、KRAS突变体、SSX2、MAGE-A10、MAGE-A4、AFP等。

[0354] 工程化细胞疗法中的细胞和细胞工程化

[0355] 表达受体并在如本文所述的工程化细胞疗法中施用的细胞中是工程化细胞。细胞工程化可以涉及将编码重组或工程化组分的核酸诸如通过逆转录病毒转导、转染或转化引入含有所述细胞的组合物中。

[0356] 所述细胞可以是真核细胞,诸如哺乳动物细胞,并且通常是人细胞。在一些实施方案中,所述细胞来源于血液、骨髓、淋巴或淋巴器官,是免疫系统的细胞,诸如先天免疫或适应性免疫的细胞,例如骨髓或淋巴样细胞(包括树突状细胞(DC)、单核细胞、巨噬细胞和淋巴细胞(例如,T细胞、B细胞和/或自然杀伤(NK)细胞))。其他示例性细胞包括干细胞,诸如多潜能干细胞和多能干细胞,包括诱导多能干细胞(iPSC)。所述细胞可以是原代细胞,诸如直接从对象分离和/或从对象分离并冷冻的那些。在一些实施方案中,所述细胞包括T细胞或其他细胞类型的一个或多个子集,诸如整个T细胞群体、CD4+细胞、CD8+细胞及其亚群,诸如由以下所定义的那些亚群:功能、激活状态、成熟度、分化的可能性、扩增、再循环、定位和/或持久能力、抗原特异性、抗原受体类型、在特定器官或区室中的存在、标志物或细胞因

子分泌谱和/或分化程度。关于待治疗的对象,所述细胞可以是同种异体的和/或自体的。所述方法包括现成的方法。在一些方面,诸如对于现成的技术,所述细胞是多能的和/或多潜能的,诸如干细胞,诸如诱导多能干细胞(iPSC)。在一些实施方案中,所述方法包括从所述对象分离细胞、将其制备、加工、培养和/或工程化,并在冷冻保存之前或之后将它们重新引入同一对象体内。T细胞和/或CD4⁺和/或CD8⁺T细胞的亚型和亚群包括幼稚T(TN)细胞、效应T细胞(TEFF)、记忆T细胞及其亚型(诸如干细胞记忆T(TSCMX)中枢记忆T(TCMX)效应记忆T(TEM))或终末分化的效应记忆T细胞)、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、不成熟T细胞、成熟T细胞、辅助T细胞、细胞毒性T细胞、粘膜相关不变T(MAIT)细胞、天然存在的和适应性调节T(Treg)细胞、辅助T细胞(诸如TH1细胞、TH2细胞、TH3细胞、TH17细胞、TH9细胞、TH22细胞、滤泡辅助T细胞)、 α/β T细胞和 δ/γ T细胞。

[0357] 在一些实施方案中,所述细胞是自然杀伤(NK)细胞。在一些实施方案中,细胞包括单核细胞或粒细胞,例如髓细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树突状细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞和/或嗜碱性粒细胞。

[0358] 在一些实施方案中,核酸是异源的,例如通常不存在于细胞或从细胞获得的样品中,诸如从另一种生物或细胞获得的核酸,例如,所述核酸通常不在被工程化的细胞和/或这种细胞所来源的生物中发现。在一些实施方案中,核酸不是天然存在的,诸如自然界中未发现的核酸,包括包含编码来自多种不同细胞类型的各种结构域的核酸的嵌合组合的核酸。

[0359] 在一些实施方案中,所述工程化细胞的制备包括一个或多个培养和/或制备步骤。用于引入编码转基因受体(诸如CAR)的核酸的细胞可以从样品(诸如生物样品,例如,从对象获得或来源的生物样品)中分离。在一些实施方案中,分离出所述细胞的对象是患有疾病或病状或需要细胞疗法或将其施用细胞疗法的对象。在一些实施方案中,所述对象是需要特定治疗性干预(诸如所分离、加工和/或工程化的细胞所用于的工程化细胞疗法)的人。

[0360] 因此,在一些实施方案中,细胞是原代细胞,例如原代人细胞。样品可以包括直接取自所述对象的组织、流体和其他样品,以及从一个或多个加工步骤(诸如分离、离心、基因工程化(例如,用病毒载体转导)、洗涤和/或温育)得到的样品。生物样品可以是直接从生物来源获得的样品或经过加工的样品。生物样品包括但不限于体液(诸如血液、血浆、血清、脑脊液、滑液、尿液和汗液)、组织和器官样品,包括由其衍生的经加工样品。

[0361] 在一些方面,细胞所来源的或分离出细胞的样品是血液或血液来源的样品,或者是或来源于单采术或白细胞单采术产物。非限制性的示例性样品包括全血、外周血单核细胞(PBMC)、白细胞、骨髓、胸腺、组织活检、肿瘤、白血病、淋巴瘤、淋巴结、肠相关淋巴组织、粘膜相关淋巴组织、脾脏、其他淋巴组织、肝脏、肺、胃、肠、结肠、肾脏、胰腺、乳房、骨、前列腺、宫颈、睾丸、卵巢、扁桃体或其他器官和/或由其衍生的细胞。在工程化细胞疗法(例如,过继性细胞疗法)的情境下,样品包括来自自体 and 同种异体来源的样品。

[0362] 在一些实施方案中,所述细胞来源于细胞系,例如T细胞系。在一些实施方案中,所述细胞从异种来源(例如,从小鼠、大鼠、非人灵长类动物和猪)获得。

[0363] 在一些实施方案中,所述细胞的分离包括一个或多个制备和/或基于非亲和力的细胞分离步骤。在一些实例中,将细胞在一种或多种试剂存在下洗涤、离心和/或温育,例如以去除不需要的组分、针对所需组分进行富集、裂解或去除对特定试剂敏感的细胞。在一些

实例中,基于一种或多种特性(诸如密度、粘附特性、尺寸、对特定组分的敏感性和/或抗性)分离细胞。

[0364] 在一些实施方案中,诸如通过基于与相应亚群相关联的表面抗原进行阳性或阴性选择,将CD8⁺细胞针对幼稚、中枢记忆、效应记忆和/或中枢记忆干细胞进一步富集或耗竭。在一些实施方案中,针对中枢记忆T (TCM) 细胞进行富集以增加功效,诸如以改善施用后的长期存活、扩增和/或植入,这在一些方面中在此类亚群中特别稳健。参见Terakura等人, Blood.1:72-82 (2012); Wang等人, J Immunother.35 (9):689-701 (2012)。在一些实施方案中,组合富含TCM的CD8⁺T细胞与CD4⁺T细胞进一步增强功效。

[0365] 在实施方案中,记忆T细胞存在于CD8⁺外周血淋巴细胞的CD62L⁺和CD62L⁻两个子集中。可以例如使用抗CD8和抗CD62L抗体将PBMC针对CD62L⁻CD8⁺和/或CD62L⁺CD8⁺级分进行富集或耗竭。

[0366] 在一些实施方案中,中枢记忆T (TCM) 细胞的富集是基于CD45RO、CD62L、CCR7、CD28、CD3和/或CD127的阳性或高表面表达;在一些方面,它是基于对表达或高度表达CD45RA和/或颗粒酶B的细胞的阴性选择。在一些方面,通过去除表达CD4、CD14、CD45RA的细胞以及对表达CD62L的细胞进行阳性选择或富集来进行富含TCM细胞的CD8⁺群体的分离。在一个方面,中枢记忆T (TCM) 细胞的富集从基于CD4表达所选择阴性细胞级分开始进行,对所述阴性细胞级分基于CD14和CD45RA的表达进行阴性选择且基于CD62L进行阳性选择。在一些方面,此类选择是同时进行的,并且在其他方面,是以任何顺序依序进行的。在一些方面,用于制备CD8⁺细胞群体或亚群的相同的基于CD4表达的选择步骤也用于生成CD4⁺细胞群体或亚群,使得来自基于CD4的分离的阳性和阴性级分被保留并用于所述方法的后续步骤中,任选地在一个或多个其他阳性或阴性选择步骤之后。

[0367] 在一些实施方案中,经由流式细胞术收集并富集(或耗竭)本文所述的细胞群体,其中流体流中携带针对多种细胞表面标志物染色的细胞。在一些实施方案中,经由制备规模(FACS)分选收集和富集(或耗竭)本文所述的细胞群体。在某些实施方案中,通过使用微机电系统(MEMS)芯片结合基于FACS的检测系统来收集和富集(或耗竭)本文所述的细胞群体(参见例如,WO 2010/033140, Cho等人, Lab Chip 10,1567-1573 (2010);以及Godin等人, J Biophoton.1 (5):355—376 (2008))。在两种情况下,可以用多种标志物来标记细胞,从而允许以高纯度分离明确限定的T细胞亚群。

[0368] 在一些实施方案中,在基因工程化之前或结合基因工程化温育和/或培养所述细胞。所述温育步骤可以包括培养、培育、刺激、激活和/或繁殖。温育和/或工程化可以在培养容器中进行,所述培养容器是诸如单元、室、孔、柱、管、管组、阀、小瓶、培养皿、袋或其他用于培养或培育细胞的容器。在一些实施方案中,在刺激条件或刺激剂存在下温育所述组合物或细胞。此类条件包括设计用于以下的那些条件:诱导群体中的细胞的增殖、扩增、激活和/或存活,模拟抗原暴露,和/或引发细胞用于基因工程化(诸如用于引入重组抗原受体)。

[0369] 条件可以包括以下中的一种或多种:特定培养基、温度、氧含量、二氧化碳含量、时间、药剂(例如,营养素、氨基酸、抗生素、离子和/或刺激因子(诸如细胞因子、趋化因子、抗原、结合配偶体、融合蛋白、重组可溶性受体和任何其他旨在激活细胞的药剂))。

[0370] 在一些实施方案中,刺激条件或药剂包括一种或多种药剂(例如,配体),其能够激活TCR复合物的细胞内信号传导结构域。在一些方面,药剂在T细胞中开启或启动TCR/CD3细

胞内信号传导级联。此类药剂可以包括例如结合至固体支持物(诸如珠)的抗体,诸如对于TCR组分和/或共刺激受体具有特异性的抗体(例如抗CD3、抗CD28);和/或一种或多种细胞因子。任选地,扩增方法还可以包括向培养基中添加抗CD3和/或抗CD28抗体(例如,以至少约0.5ng/ml的浓度)的步骤。在一些实施方案中,刺激剂包括IL-2和/或IL-15,例如,IL-2浓度为至少约10单位/mL。

[0371] 在一些实施方案中,通过以下方式扩增T细胞:向培养起始组合物中添加饲养细胞(诸如非分裂外周血单核细胞(PBMC))(例如,使得对于待扩增的初始群体中的每个T淋巴细胞,所得细胞群含有至少约5、10、20或40个或更多个PBMC饲养细胞);以及温育培养物(例如,持续足以扩增所述T细胞数量的时间)。在一些方面,非分裂饲养细胞可以包含 γ 照射的PBMC饲养细胞。在一些实施方案中,用在约3000至3600拉德范围内的 γ 射线来照射所述PBMC以防止细胞分裂。在一些方面,在添加所述T细胞群体之前将所述饲养细胞添加到培养基中。

[0372] 在一些实施方案中,刺激条件包括适合于人T淋巴细胞生长的温度,例如至少约25摄氏度,通常至少约30摄氏度,并且通常为或为约37摄氏度。任选地,温育还可以包括添加非分裂EBV转化的类淋巴母细胞(LCL)作为饲养细胞。可以用约6000至10,000拉德范围内的 γ 射线照射LCL。在一些方面,所述LCL饲养细胞以任何合适的量(诸如LCL饲养细胞与初始T淋巴细胞的比率为至少约10:1)提供。

[0373] 在实施方案中,通过用抗原刺激幼稚或抗原特异性T淋巴细胞获得抗原特异性T细胞,诸如抗原特异性CD4+和/或CD8+T细胞。例如,可以通过从受感染的对象中分离T细胞并用相同的抗原在体外刺激细胞,针对巨细胞病毒抗原生成抗原特异性T细胞系或克隆。

[0374] 在一些实施方案中,本文提供的工程化细胞疗法包括肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)疗法。TIL疗法的治疗剂可以包括肿瘤浸润淋巴细胞。肿瘤过滤淋巴细胞可以是指离开血流并迁移到肿瘤的淋巴细胞(例如,白细胞)。可以用于工程化细胞疗法的肿瘤浸润淋巴细胞可以包括单核和多形核免疫细胞,例如T细胞、B细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树突状细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞。TIL可以在肿瘤基质和肿瘤自身内发现。对于治疗用途,TIL可以从对象的肿瘤中获得,例如,从切除的肿瘤组织中分离。在一些实施方案中,TIL从手术切除的肿瘤离体扩增。对于分离,切除的肿瘤组织可以被片段化或解离到单细胞悬浮液中,可以经由熟知的分离技术从中分离TIL。可以建立多个单独的培养物,单独生长并针对特异性肿瘤识别进行测定。TIL可以在几周内于24孔板中用高剂量的IL-2进行扩增,与如上所述的细胞扩增类似。然后可以针对它们的肿瘤反应性呈现将TIL系经历选择,并且然后可以进一步扩增所选的TIL系。在一些实施方案中,将所选的TIL在快速扩增方案(REP)中进一步扩增,所述快速扩增方案使用抗CD3激活,持续约两周的时间段。然后,可以将最终的REP后TIL输注回到肿瘤患者体内。

[0375] 工程化细胞疗法的施用

[0376] 在一些实施方案中,工程化细胞疗法通过自体转移进行,其中从接受细胞疗法的对象或从来源于这种对象的样品中分离和/或以其他方式制备细胞。因此,在一些方面,所述细胞来源于需要治疗的对象(例如,患者),并且在分离和加工后将所述细胞施用于同一对象。

[0377] 在一些实施方案中,工程化细胞疗法通过同种异体转移进行,其中从将要接受或

最终接受细胞疗法的对象以外的对象(例如,第一对象)中分离和/或以其他方式制备细胞。在此类实施方案中,然后将所述细胞施用至相同物种的不同对象,例如第二对象。在一些实施方案中,所述第一和第二对象在遗传上是相同的。在一些实施方案中,所述第一和第二对象在遗传上是相似的。在一些实施方案中,所述第二对象与所述第一对象表达相同的HLA类别或超类型。

[0378] 所述细胞可以通过任何合适的方式施用。所述细胞以给药方案施用以实现治疗作用,诸如降低肿瘤负荷。给药和施用可以部分取决于免疫检查点蛋白的激动剂的施用时间表,所述免疫检查点蛋白的激动剂可以在工程化细胞疗法施用启动之前、之后和/或同时施用。工程化细胞疗法的各种给药时间表包括但不限于在不同时间点的单次或多次施用、团注施用和脉冲输注。

[0379] 在一些实施方案中,将工程化细胞疗法的细胞(诸如用重组抗原受体(例如,CAR或TCR)工程化的T细胞)或肿瘤浸润细胞作为组合物或制剂(诸如药物组合物或制剂)来提供。此类组合物可以根据所提供的方法,诸如在治疗疾病、病状和病症中使用。

[0380] 在一些实施方案中,用药学上可接受的载剂配制工程化细胞疗法(诸如工程化T细胞(例如,CAR T细胞))。在一些方面,载剂的选择部分取决于特定细胞或药剂和/或施用方法。因此,存在多种合适的制剂。例如,药物组合物可以含有防腐剂。合适的防腐剂可以包括例如对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸钠和苯扎氯铵。在一些方面中,使用两种或更多种防腐剂的混合物。防腐剂或其混合物通常以总组合物重量的约0.0001%至约2%的量存在。载剂描述于例如Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编(1980)中。药学上可接受的载剂在所用的剂量和浓度下通常对接受者无毒,并且包括但不限于:缓冲液,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲氯铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苄醇;烷基对羟基苯甲酸酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖类,诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子,如钠;金属络合物(例如,锌-蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂,诸如聚乙二醇(PEG)。

[0381] 在一些方面,所述组合物中包含缓冲剂。合适的缓冲剂包括例如柠檬酸、柠檬酸钠、磷酸、磷酸钾以及各种其他酸和盐。在一些方面,使用两种或更多种缓冲剂的混合物。所述缓冲剂或其混合物通常以按总组合物的重量计约0.001%至约4%的量存在。用于制备可施用的药物组合物的方法是已知的。示例性方法更详细地描述于例如Remington:The Science and Practice of Pharmacy,Lippincott Williams&Wilkins;第21版(2005年5月1日)中。

[0382] 制剂可以包括水性悬浮溶液。制剂或组合物还可以含有可用于用细胞或药剂治疗的特定适应症、疾病或病状的超过一种活性成分,其中各自的活性不会相互产生不利影响。此类活性成分以有效用于既定目的量以合适的方式组合存在。因此,在一些实施方案中,药物组合物还包含其他药物活性药剂或药物,诸如化疗剂,例如,天冬酰胺酶、白消安、卡铂、顺铂、柔红霉素、多柔比星、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、甲氨蝶呤、紫杉醇、利妥昔单抗、长

春碱、长春新碱等。

[0383] 在一些实施方案中,药物组合物含有有效治疗疾病或病状的量(诸如治疗有效量或预防有效量)的细胞。在一些实施方案中,通过定期评估所治疗的对象来监测治疗或预防功效。对于数天或更长时间的重复施用,取决于病状,重复所述治疗,直至出现所需疾病症状的抑制。然而,其他剂量方案可能是有用的并且可以被确定。所需剂量可以通过单次团注施用所述组合物、通过多次团注施用所述组合物或通过连续输注施用所述组合物来递送。

[0384] 可以使用标准施用技术、制剂和/或装置来施用细胞。提供了用于储存和施用所述组合物的制剂和装置(诸如注射器和小瓶)。关于细胞,施用可以是自体的或异源的。例如,免疫应答细胞或祖细胞可以获得自一名对象,并且施用于同一对象或不同的相容对象。外周血衍生的免疫应答细胞或其后代(例如,体内、离体或体外衍生的)可以经由局部注射(包括导管施用)、全身注射、局部注射、静脉内注射或肠胃外施用来施用。在施用治疗性组合物(例如,含有遗传修饰的免疫应答细胞的药物组合物)时,可以将其配制成单位剂量可注射形式(溶液、悬浮液、乳液)。

[0385] 制剂包括用于口服、静脉内、腹膜内、皮下、经肺、透皮、肌内、鼻内、经颊、舌下或栓剂施用的那些。在一些实施方案中,所述药剂或细胞群体是肠胃外施用的。如本文所用,术语“肠胃外”包括静脉内、肌内、皮下、直肠、阴道和腹膜内施用。在一些实施方案中,使用通过静脉内、腹膜内或皮下注射的外周全身递送向对象施用所述药剂或细胞群体。

[0386] 在一些实施方案中,组合物是作为无菌液体制剂来提供,所述无菌液体制剂例如,等渗水溶液、悬浮液、乳液、分散体或粘性组合物,其在一些方面可以被缓冲至所选的pH。液体制剂通常比凝胶、其他粘性组合物和固体组合物制备起来更容易。另外,液体组合物稍微更方便施用,特别是通过注射。在另一方面,粘性组合物可以配制在适当的粘度范围内,以提供与特定组织的更长的接触时间。液体或粘性组合物可以包含载剂,所述载剂可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、多元醇(例如,甘油、丙二醇、液体聚乙二醇)及其合适的混合物。

[0387] 无菌可注射溶液可以通过将细胞并入溶剂中来制备,例如与合适的载剂、稀释剂或赋形剂(诸如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等)混合。组合物也可以是冻干的。组合物可以含有辅助物质,诸如润湿剂、分散剂或乳化剂(例如,甲基纤维素)、pH缓冲剂、胶凝或粘度增强添加剂、防腐剂、调味剂、着色剂等,这取决于施用途径和所需的制剂。在一些方面,可以查阅标准文本来制备合适的制剂。

[0388] 可以添加各种增强所述组合物的稳定性和无菌性的添加剂,包括抗微生物防腐剂、抗氧化剂、螯合剂和缓冲液。可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂(例如,对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、抗坏血酸等)来确保防止微生物的作用。

[0389] 用于体内施用的制剂通常是无菌的。可以例如通过经无菌滤膜过滤容易地实现无菌。

[0390] 对于疾病的治疗,适当的剂量可以取决于待治疗的疾病类型、一种或多种药剂的类型、细胞或重组受体的类型、疾病的严重程度和病程、施用药剂或细胞是用于预防目的还是治疗目的、先前疗法、对象的临床病史和对药剂或细胞的应答以及主治医师的决断。在一些实施方案中,所述组合物适合一次或在一系列治疗中施用于对象。

[0391] 在一些情况下,细胞疗法作为包含细胞的单一药物组合物施用。在一些实施方案

中,给定剂量通过细胞或药剂的单次团注施用来施用。在一些实施方案中,其是通过例如在不超过3天的时间段内对细胞或药剂的多次团注施用或通过细胞或药剂的连续输注施用来施用。

[0392] 在一些实施方案中,根据所提供的方法向对象施用一定剂量的细胞。在一些实施方案中,剂量的大小或时间根据对象的特定疾病或病状确定。

[0393] 在某些实施方案中,向对象施用约10万至约1000亿个细胞和/或每千克对象体重的所述细胞量的范围的细胞或单独细胞亚型群体,例如10万至约500亿个细胞(例如,约500万个细胞、约2500万个细胞、约5亿个细胞、约10亿个细胞、约50亿个细胞、约200亿个细胞、约300亿个细胞、约400亿个细胞或由前述任何两个值限定的范围)、100万至约500亿个细胞(例如,约500万个细胞、约2500万个细胞、约5亿个细胞、约10亿个细胞、约50亿个细胞、约200亿个细胞、约300亿个细胞、约400亿个细胞或由前述任何两个值限定的范围),诸如约1000万至约1000亿个细胞(例如,约2000万个细胞、约3000万个细胞、约4000万个细胞、约6000万个细胞、约7000万个细胞、约8000万个细胞、约9000万个细胞、约100亿个细胞、约250亿个细胞、约500亿个细胞、约750亿个细胞、约900亿个细胞或由前述任何两个值限定的范围),并且在一些情况下约1亿个细胞至约500亿个细胞(例如,约1.2亿个细胞、约2.5亿个细胞、约3.5亿个细胞、约4.5亿个细胞、约6.5亿个细胞、约8亿个细胞、约9亿个细胞、约30亿个细胞、约300亿个细胞、约450亿个细胞)或在这些范围和/或每千克对象体重的这些范围之间的任何值。剂量可以根据疾病或病症和/或患者和/或其他治疗特有的属性而变化。在一些实施方案中,此类值是指重组受体表达细胞的数量;在其他实施方案中,它们是指所施用的T细胞或PBMC或总细胞的数量。

[0394] 在一些实施方案中,工程化细胞疗法包括施用包含至少或至少约或者为或为约 0.1×10^6 个细胞/kg对象体重、 0.2×10^6 个细胞/kg、 0.3×10^6 个细胞/kg、 0.4×10^6 个细胞/kg、 0.5×10^6 个细胞/kg、 1×10^6 个细胞/kg、 2.0×10^6 个细胞/kg、 3×10^6 个细胞/kg或 5×10^6 个细胞/kg的细胞数量的剂量。在一些实施方案中,所述细胞疗法包括施用包含在或在约 0.1×10^6 个细胞/kg对象体重与 1.0×10^7 个细胞/kg之间、在或在约 0.5×10^6 个细胞/kg与 5×10^6 个细胞/kg之间、在或在约 0.5×10^6 个细胞/kg与 3×10^6 个细胞/kg之间、在或在约 0.5×10^6 个细胞/kg与 2×10^6 个细胞/kg之间、在或在约 0.5×10^6 个细胞/kg与 1×10^6 个细胞/kg之间、在或在约 1.0×10^6 个细胞/kg对象体重与 5×10^6 个细胞/kg之间、在或在约 1.0×10^6 个细胞/kg与 3×10^6 个细胞/kg之间、在或在约 1.0×10^6 个细胞/kg与 2×10^6 个细胞/kg之间、在或在约 2.0×10^6 个细胞/kg对象体重与 5×10^6 个细胞/kg之间、在或在约 2.0×10^6 个细胞/kg与 3×10^6 个细胞/kg之间、在或在约 3.0×10^6 个细胞/kg对象体重与 5×10^6 个细胞/kg之间(各自包括端值)的细胞数量的剂量。

[0395] 在一些实施方案中,细胞的所述剂量包含在 2×10^5 或约 2×10^5 个细胞/kg与 2×10^6 或约 2×10^6 个细胞/kg之间,诸如在 4×10^5 或约 4×10^5 个细胞/kg与 1×10^6 或约 1×10^6 个细胞/kg之间或在 6×10^5 或约 6×10^5 个细胞/kg与 8×10^5 或约 8×10^5 个细胞/kg之间。在一些实施方案中,细胞的所述剂量包含不超过 2×10^5 个细胞(例如,抗原表达细胞,诸如CAR表达细胞)/千克对象体重(细胞/kg),诸如不超过或不超过约 3×10^5 个细胞/kg、不超过或不超过约 4×10^5 个细胞/kg、不超过或不超过约 5×10^5 个细胞/kg、不超过或不超过约 6×10^5 个细胞/kg、不超过或不超过约 7×10^5 个细胞/kg、不超过或不超过约 8×10^5 个细胞/kg、不超过或

不超过约 9×10^5 个细胞/kg、不超过或不超过约 1×10^6 个细胞/kg、或不超过或不超过约 2×10^6 个细胞/kg。在一些实施方案中,细胞的所述剂量包含至少或至少约或者为或为约 2×10^5 个细胞(例如,抗原表达细胞,诸如CAR表达细胞)/千克对象体重(细胞/kg),诸如至少或至少约或者为或为约 3×10^5 个细胞/kg、至少或至少约或者为或为约 4×10^5 个细胞/kg、至少或至少约或者为或为约 5×10^5 个细胞/kg、至少或至少约或者为或为约 6×10^5 个细胞/kg、至少或至少约或者为或为约 7×10^5 个细胞/kg、至少或至少约或者为或为约 8×10^5 个细胞/kg、至少或至少约或者为或为约 9×10^5 个细胞/kg、至少或至少约或者为或为约 1×10^6 个细胞/kg、或至少或至少约或者为或为约 2×10^6 个细胞/kg。

[0396] 在某些实施方案中,所述细胞或单独的细胞亚型群体以约100万至约1000亿个细胞和/或按每千克体重所述细胞量的范围施用于对象,例如100万至约500亿个细胞(例如,约500万个细胞、约2500万个细胞、约5亿个细胞、约10亿个细胞、约50亿个细胞、约200亿个细胞、约300亿个细胞、约400亿个细胞或由前述任何两个值限定的范围),诸如约1000万至约1000亿个细胞(例如,约2000万个细胞、约3000万个细胞、约4000万个细胞、约6000万个细胞、约7000万个细胞、约8000万个细胞、约9000万个细胞、约100亿个细胞、约250亿个细胞、约500亿个细胞、约750亿个细胞、约900亿个细胞或由前述任何两个值限定的范围),并且在一些情况下约1亿个细胞至约500亿个细胞(例如,约1.2亿个细胞、约2.5亿个细胞、约3.5亿个细胞、约4.5亿个细胞、约6.5亿个细胞、约8亿个细胞、约9亿个细胞、约30亿个细胞、约300亿个细胞、约450亿个细胞)或在这些范围和/或每千克体重的这些范围之间的任何值。细胞的剂量可以根据疾病或病症和/或患者和/或其他治疗特有的属性而变化。

[0397] 在一些实施方案中,细胞的剂量是细胞的平剂量(flat dose)或细胞的固定剂量,使得细胞的剂量不依赖于或不基于对象的体表面积或体重。在一些实施方案中,例如,在所述对象是人的情况下,所述剂量包括少于约 1×10^8 个总重组受体(例如,CAR)表达细胞、T细胞或外周血单核细胞(PBMC),例如在约 1×10^6 至 1×10^8 个此类细胞的范围内,诸如 2×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 或 1×10^8 个总此类细胞,或前述任何两个值之间的范围内。在一些实施方案中,在所述对象是人的情况下,所述剂量包括在约 1×10^6 与 3×10^8 个之间的总重组受体(例如,CAR)表达细胞,例如在约 1×10^7 至 2×10^8 个此类细胞的范围内,诸如 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 或 1.5×10^8 个总此类细胞,或前述任何两个值之间的范围内。在一些实施方案中,向患者施用多个剂量,并且每个剂量或总剂量可以在任何前述值内。在一些实施方案中,细胞的剂量包括施用从或从约 1×10^5 至 5×10^8 个总重组受体表达T细胞或总T细胞、 1×10^5 至 1×10^8 个总重组受体表达T细胞或总T细胞、从或从约 5×10^5 至 1×10^7 个总重组受体表达T细胞或总T细胞或者从或从约 1×10^6 至 1×10^7 个总重组受体表达T细胞或总T细胞,各自包括端值。

[0398] 在一些实施方案中,所述剂量的T细胞包括CD4+T细胞、CD8+T细胞或CD4+和CD8+T细胞。在一些实施方案中,例如,在所述对象是人的情况下,所述剂量的CD8+T细胞(包括在包括CD4+和CD8+T细胞的剂量中)包括在约 1×10^6 与 1×10^8 个之间的总重组受体(例如,CAR)表达CD8+细胞,例如在约 5×10^6 至 1×10^8 个此类细胞的范围内,诸如 1×10^7 、 2.5×10^7 、 5×10^7 、 7.5×10^7 或 1×10^8 个总此类细胞,或前述任何两个值之间的范围内。在一些实施方案中,向患者施用多个剂量,并且每个剂量或总剂量可以在任何前述值内。在一些实施方案中,细胞的剂量包括施用从约 1×10^7 至 7.5×10^7 个总重组受体表达CD8+T细胞、 1×10^7 至

2.5×10^7 个总重组受体表达CD8+T细胞、从或从约 1×10^7 至 7.5×10^7 个总重组受体表达CD8+T细胞,各自包括端值。在一些实施方案中,细胞的剂量包括施用或施用约 1×10^7 、 2.5×10^7 、 5×10^7 、 7.5×10^7 或 1×10^8 个总重组受体表达CD8+T细胞。

[0399] 在一些实施方案中,细胞(例如,重组受体表达T细胞)的剂量作为单一剂量施用于对象,或者在两周、一个月、三个月、六个月、1年或更长的时段内仅施用一次。

[0400] 在工程化细胞疗法的情境下,施用给定“剂量”的细胞涵盖施用作为单一组合物和/或单次不间断施用(例如,作为单次注射或连续输注)的给定量或数量的细胞,并且还涵盖在指定时间段中(诸如不超过3天)施用在多种单独组合物或输注中提供的作为分割剂量的给定量或数量的细胞。因此,在一些情境下,所述剂量是在单一时间点给予或起始的指定数量的细胞的单次或连续施用。然而,在一些情况下,所述剂量是在不超过三天的时间段内以多次注射或输注来施用,诸如每天一次持续三天或持续两天,或者在单日时间段内多次输注。

[0401] 因此,在一些方面,所述剂量的细胞以单一药物组合物施用。在一些实施方案中,所述剂量的细胞以共同含有所述剂量的细胞的多种组合物施用。

[0402] 在一些实施方案中,术语“分割剂量”是指这样分割的剂量,使其在超过一天的时间内施用。这种类型的给药包括在本方法中并且被认为是单一剂量。在一些实施方案中,分割剂量的细胞以共同包含所述剂量的细胞的多种组合物在不超过三天的时间段内施用。因此,细胞的剂量可以作为分割剂量施用,例如随时间施用的分割剂量。例如,在一些实施方案中,剂量可以在2天或3天内施用于对象。用于分割给药的示例性方法包括在第一天施用25%的剂量并在第二天施用剩余的75%的剂量。在其他实施方案中,可以在第一天施用33%的剂量,并且在第二天施用剩余的67%。在一些方面,在第一天施用10%的剂量,在第二天施用30%的剂量,并且在第三天施用60%的剂量。在一些实施方案中,所述分割剂量的分布不超过3天。在一些实施方案中,细胞的所述剂量可以足够大以有效降低疾病负荷。

[0403] 在一些实施方案中,将所述细胞以所需剂量施用,所述所需剂量在一些方面包括细胞或一种或多种细胞类型的所需剂量或数量和/或细胞类型的所需比率。因此,在一些实施方案中,细胞剂量是基于总细胞数量(或每kg体重的数量)和所需的单独群体或亚型的比率,诸如CD4⁺与CD8⁺的比率。在一些实施方案中,细胞剂量基于单独群体中或单独细胞类型的细胞的所需总数量(或每kg体重的数量)。在一些实施方案中,剂量是基于此类特征的组合,此类特征是诸如所需的总细胞数量、所需比率和单独群体中的所需总细胞数量。

[0404] 在一些实施方案中,以所需剂量的总细胞(诸如所需剂量的T细胞)的容忍差异或在所述容忍差异之内施用细胞的群体或亚型诸如CD8⁺和CD4⁺T细胞。在一些方面,所需剂量是所需细胞数量或被施用所述细胞的对象的每单位体重的所需细胞数量(例如,细胞/kg)。在一些方面,所需剂量等于或高于最小细胞数量或每单位体重的最小细胞数量。在一些方面,在以所需剂量施用的总细胞中,单独群体或亚型以等于或接近所需输出比率(诸如CD4⁺与CD8⁺比率)存在,例如在这种比率的一定容忍差异或误差内。在一些实施方案中,细胞是以细胞的一种或多种单独群体或亚型的所需剂量(诸如CD4⁺细胞的所需剂量和/或CD8⁺细胞的所需剂量)来施用,或在所述所需剂量的容忍差异内施用。在一些方面,所需剂量是所需的亚型或群体的细胞数量或被施用所述细胞的对象的每单位体重的所需此类细胞数量(例如,细胞/kg)。在一些方面,所需剂量等于或高于最小的群体或亚型的细胞数量或每单

位体重的最小的群体或亚型的细胞数量。因此,在一些实施方案中,剂量是基于总细胞的所需固定剂量和所需比率,和/或是基于一种或多种(例如,每种)单独亚型或亚群的所需固定剂量。因此,在一些实施方案中,所述剂量是基于所需的T细胞的固定或最小剂量和所需的CD4⁺与CD8⁺细胞的比率,和/或是基于所需的CD4⁺和/或CD8⁺细胞的固定或最小剂量。

[0405] 在一些实施方案中,细胞在多种细胞群体或亚型(诸如CD4⁺和CD8⁺细胞或亚型)的所需输出比率的容忍范围下或容忍范围内施用。在一些方面,所需比率是特定比率或是比率范围,例如,在一些实施方案中,所述所需比率(例如,CD4⁺与CD8⁺细胞的比率)在为或约5:1与为或约5:1之间(或大于约1:5且小于约5:1),或在为或约1:3与为或约3:1之间(或大于约1:3且小于约3:1),诸如在为或约2:1与为或约1:5之间(或大于约1:5且小于约2:1),诸如为或为约5:1、4.5:1、4:1、3.5:1、3:1、2.5:1、2:1、1.9:1、1.8:1、1.7:1、1.6:1、1.5:1、1.4:1、1.3:1、1.2:1、1.1:1、1:1、1:1.1、1:1.2、1:1.3、1:1.4、1:1.5、1:1.6、1:1.7、1:1.8、1:1.9、1:2、1:2.5、1:3、1:3.5、1:4、1:4.5或1:5。在一些方面,容忍差异在所需比率的约1%、约2%、约3%、约4%、约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%(包括这些范围之间的任何值)内。

[0406] 在特定实施方案中,细胞的数量和/或浓度是指重组受体(例如,CAR)表达细胞的数量。在其他实施方案中,细胞的数量和/或浓度是指施用的所有细胞、T细胞或外周血单核细胞(PBMC)的数量或浓度。

[0407] 在一些方面,剂量的大小基于诸如以下的一个或多个标准来确定:对象对于先前治疗(例如,化疗)的应答、对象的疾病负荷(诸如肿瘤负担、体积、大小或程度)、转移的程度或类型、分期和/或对象发展毒性结局(例如,CRS、巨噬细胞激活综合征、肿瘤溶解综合征、神经毒性和/或针对所施用的细胞和/或重组受体的宿主免疫应答)的可能性或发生率。

[0408] 在一些实施方案中,向对象施用一个或多个后续剂量的细胞。在一些实施方案中,后续剂量的细胞在第一剂量的细胞施用启动后大于或大于约7天、14天、21天、28天或35天施用。细胞的后续剂量可以大于、近似等于或小于第一剂量。在一些实施方案中,可以重复施用T细胞疗法,诸如施用细胞的第一和/或第二剂量。

[0409] 使用方法

[0410] 本公开的系统和组合物可用于各种应用。可以使用本公开的工程化细胞治疗的疾病和病症包括炎性病状、癌症和传染病。在一些实施方案中,本文提供的组合物的系统用于治疗癌症。

[0411] 可以通过本公开的方法、组合物和方案治疗的癌症的非限制性实例包括急性成淋巴细胞性白血病(ALL)(包括非T细胞ALL)、急性髓系白血病、B细胞幼淋巴细胞白血病、B细胞急性淋巴性白血病(“BALL”)、母细胞性浆细胞样树突状细胞肿瘤、伯基特淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、慢性髓细胞性白血病(CML)、慢性髓系白血病、慢性或急性白血病、弥漫大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、毛细胞白血病、霍奇金病、恶性淋巴增殖性疾病、MALT淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、意义未明的单克隆丙种球蛋白病(MGUS)、多发性骨髓瘤、脊髓发育不良和骨髓增生异常综合征、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、浆细胞增殖性疾病(包括无症状骨髓瘤(冒烟型多发性骨髓瘤或惰性骨髓瘤)、浆母细胞淋巴瘤、浆细胞样树突状细胞肿瘤、浆细胞瘤(包括浆细胞病;孤立性骨髓瘤;孤立性浆细胞瘤;髓外浆细胞瘤;和多发性浆细胞瘤)、POEMS综合征(还被称为克罗-深濑综合征;Takatsuki病;和PEP综

合征)、原发性纵隔大B细胞淋巴瘤(PMBC)、小细胞或大细胞滤泡性淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤(SMZL)、系统性淀粉状蛋白轻链淀粉样变性、T细胞急性淋巴性白血病(“TALL”)、T细胞淋巴瘤、转化型滤泡性淋巴瘤、或华氏巨球蛋白血症、套细胞淋巴瘤(MCL)、转化型滤泡性淋巴瘤(TFL)、原发性纵隔B细胞淋巴瘤(PMBCL)、多发性骨髓瘤、毛细胞淋巴瘤/白血病或其组合。

[0412] 用本文中的方法、组合物和方案治疗的肿瘤可以导致稳定的肿瘤生长(例如,一个或多个肿瘤的大小增加不超过1%、5%、10%、15%或20%,和/或不转移)。在一些实施方案中,肿瘤稳定至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更多周。在一些实施方案中,肿瘤稳定至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更多个月。在一些实施方案中,肿瘤稳定至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多年。在一些实施方案中,肿瘤的大小或肿瘤细胞的数量减少至少约5%、10%、15%、20%、25、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多。在一些实施方案中,肿瘤被完全消除,或降低至低于检测水平。在一些实施方案中,对象在治疗后至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更多周维持无肿瘤(例如,处于缓解期)。在一些实施方案中,对象在治疗后至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更多个月维持无肿瘤。在一些实施方案中,对象在治疗之后至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多年维持无肿瘤。肿瘤细胞的死亡可以通过任何合适的方法来确定,包括但不限于在治疗之前和之后对细胞进行计数,或测量与活细胞或死细胞(例如,活的或死的靶细胞)相关联的标志物的水平。细胞死亡的程度可以通过任何合适的方法来确定。在一些实施方案中,细胞死亡的程度是相对于起始条件来确定的。例如,个体可以具有已知起始量的靶细胞,诸如已知大小的起始细胞质量或已知浓度的循环靶细胞。在此类情况下,细胞死亡程度可以表示为治疗之后存活细胞与起始细胞群体的比率。在一些实施方案中,可以通过合适的细胞死亡测定来确定细胞死亡的程度。多种细胞死亡测定是可用的,并且可以利用多种检测方法。检测方法的实例包括但不限于使用细胞染色、显微镜、流式细胞术、细胞分选以及这些的组合。

[0413] 当肿瘤在治疗期结束后进行手术切除时,可以通过测量切除的坏死(即,死亡)组织的百分比来确定治疗在减小肿瘤大小方面的功效。在一些实施方案中,如果切除组织的坏死百分比大于约20%(例如,至少约30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%),则治疗是治疗有效的。在一些实施方案中,切除组织的坏死百分比为100%,即不存在或检测不到活的肿瘤组织。

[0414] 实施例

[0415] 提供以下实施例来进一步说明本公开的一些实施方案,但不旨在限制本公开的范围;通过其示例性性质应理解,可以替代性地使用其他程序、方法或本领域技术人员已知的技术。

[0416] 实施例1:靶向细胞因子构建体的克隆和纯化

[0417] 重组DNA技术

[0418] 涉及重组DNA操纵的技术先前在以下中进行描述: Sambrook等人, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989。所有试剂均根据制造商的说明书进行使用。DNA序列通过双链测序来确定。

[0419] 基因合成

[0420] 使用适当的模板通过PCR生成所需的基因区段,或者在Thermo Scientific (Pleasanton, CA)、ATUM (Newark, CA)、Genewiz (South Plainfield, NJ) 或GeneScript (Piscataway, NJ) 由合成寡核苷酸合成。将与设计的限制性核酸内切酶切割位点侧接的基因区段消化掉,并且之后将其克隆到它们各自的表达载体中。从转化的细菌中纯化DNA,并且通过紫外-可见光谱确定浓度。使用DNA测序来确认亚克隆基因片段的DNA序列。

[0421] 抗体基因的分离

[0422] 使用体外展示系统或体内免疫接种生成靶向由工程化细胞表达的结构域或受体的抗体(例如,靶向由工程化细胞表达的scFv,或由工程化细胞表达的标签,或作为由工程化细胞表达的CAR或TCR的一部分的标签的抗体)。对于体外展示方法,对非免疫性人抗体噬菌体文库进行5至6轮淘洗,以分离针对靶抗原的抗体。在淘洗之后,鉴定了在ELISA中表现出相对于非特异性抗原与靶抗原的特异性结合的个体噬菌体克隆。随后对特异性结合物的重链和轻链V结构域的DNA片段进行克隆并测序。同时,通过用重组形式的抗原对小鼠和美洲驼进行免疫,也生成了抗体。从小鼠免疫接种,使用杂交瘤方法分离抗体。简而言之,在免疫接种之后,将来自脾脏和/或淋巴结的B细胞与骨髓瘤细胞系融合以生成杂交瘤细胞。然后使用ELISA单个地筛选杂交瘤克隆,以鉴定表达对于抗原具有特异性的抗体的克隆。最后,从特异性杂交瘤中克隆抗体的重链和轻链V结构域的DNA片段,并随后进行测序。对于美洲驼免疫接种,从外周B细胞中克隆抗体基因,并将其连接到噬菌体载体中以生成噬菌体展示抗体文库。然后通过淘洗噬菌体文库来分离针对感兴趣的抗原的抗体。在淘洗之后,使用ELISA鉴定了表现出相对于非特异性抗原与靶抗原的特异性结合的个体噬菌体克隆。然后对特异性结合物的重链和轻链V结构域的DNA片段进行克隆并测序。然后将来自非人类来源(小鼠和美洲驼)的抗体进行人源化,以去除非人类框架和互补决定区突变。

[0423] 靶向细胞因子构建体的克隆

[0424] 关于人免疫球蛋白轻链和重链的核苷酸序列的一般信息在以下中给出: **IMGT®** (the international ImMunoGeneTics information system®), 来自Lefranc等人**IMGT®**, the international ImMunoGeneTics information system® 25 years on. Nucleic Acids Res. 2015年1月;43。将重链和轻链V结构域的扩增DNA片段在框架内插入到含有人IgG1的哺乳动物表达载体中。对于含有IL-2细胞因子或其功能片段或变体的示例性靶向细胞因子构建体,使用IgG重链的C末端与IL-2的N末端之间的(G4S)₃ 15聚体接头将构建体的IL-2部分在框架内与重链一起克隆。在融合IL-2部分之后,将IgG重链的C末端赖氨酸残基消除。为了生成其中单个IL-2基因与完整IgG融合的构建体,需要构建并转染两个重链质粒,以用于通过IgG CH3结构域中的杆臼修饰促进的异二聚化。与IL-2部分连接的“臼”重链在CH3结构域中携带Y349C、T366S、L368A和Y407V突变,而未融合的“杆”重链则在CH3结构域中携带S354C和T366W突变(EU编号)。为了消除FcγR结合/效应功能并防止FcR共激活,将以下突变引入每个IgG重链的CH2结构域中:L234A/L235A/G237A(EU编号)。抗体-IL-2融合构建体的表达通过CMV启动子驱动,并且转录通过位于编码序列下游的合成polyA信号序列终止。

[0425] 具有IL-2多肽的示例性靶向细胞因子构建体的制备

[0426] 通过使用聚乙烯亚胺(PEI)将指数生长的Expi293细胞与哺乳动物表达载体共转

染,制备如实施例中所使用的编码具有IL-2多肽的靶向细胞因子构建体的构建体。简而言之,首先使用蛋白A基质通过亲和色谱法纯化含有IL-2的靶向细胞因子构建体。将蛋白A柱平衡并在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中洗涤。用20mM柠檬酸钠、50mM氯化钠、pH 3.6洗脱靶向细胞因子构建体。将洗脱的级分合并并透析到pH 6的10mM MES、25mM氯化钠中。使用离子交换色谱法(Mono-S,GE Healthcare)进一步纯化蛋白质,以相对于同源二聚体纯化异源二聚体。在加载蛋白质之后,用pH 6的10mM MES、25mM氯化钠洗涤柱。然后在10mM MES pH 6缓冲液中使用从25mM至500mM增加梯度的氯化钠洗脱蛋白质。收集对应于异源二聚体的主洗脱液峰并浓缩。然后通过PBS中的尺寸排阻色谱法(Superdex 200,GE Healthcare)对纯化的蛋白质进行抛光。

[0427] 使用基于氨基酸序列计算的摩尔消光系数,通过测量280nm处的光学密度(OD)来确定纯化的含有IL-2的靶向细胞因子构建体的蛋白质浓度。在存在和不存在还原剂(5mM 1,4-二巯基苏糖醇)的情况下,通过SDS-PAGE分析靶向细胞因子构建体的纯度、完整性和单体状态,并用考马斯蓝(SimpleBlue™SafeStain,Invitrogen)染色。根据制造商的说明书(4%-20% Tris-甘氨酸凝胶或3%-12% Bis-Tris)使用NuPAGE®预制凝胶系统(Invitrogen)。使用Superdex 200 10/300GL分析尺寸排阻柱(GE Healthcare)分析免疫缀合物样品的聚集物含量。

[0428] 慢病毒载体构建体的克隆

[0429] 此研究中使用的慢病毒载体(LVV)是从质粒pALD-LentiGFP(Aldevron)修饰而来的。具体地,将pALD-LentiGFP的启动子区用EF1a启动子序列替换。在框架内克隆表达FMC63 scFv的CAR基因,从而生成pLVV-FMC63质粒。另外,将myc多肽(EQKLISEEDL)插入FMC63的N末端区或C末端区中,分别产生pLVV-FMC63-N-myc或pLVV-FMC63-C-myc。为了共表达EGFRt,将由P2A(ATNFSLLKQAGDVEENPGP)和EGFRt转基因组成的序列插入FMC63 scFv区的下游以生成pLVV-FMC63-EGFRt。对于TCR构建体,在框架内克隆由N-myc-TCRα链-P2A-HA标签-TCRβ链组成的5'至3'序列以生成pLVV-TCR。

[0430] EGFTt标签的序列如下:

[0431] RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEIT
GFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGGFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNLCYANTINWKK
LFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGECVDKCNLLEGEPREFVENSECI
QCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGL
EGCPTNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM

[0432] 慢病毒颗粒的产生

[0433] 使用3-质粒包装系统生成慢病毒。具体地,将三个质粒pALD-VSV-G、pALD-GagPol和pALD-Rev(Aldevron)与pLVV载体共转染到239个细胞中以生成病毒。使用Gibco™LV-MAX™慢病毒生产系统(目录号A35684)按照制造商的方案产生慢病毒。简而言之,将293个细胞作为50万个细胞/ml接种,并在37℃培养箱中培养,潮湿环境为8% CO2并振荡(125rpm)3天。在细胞密度达到500-600万个细胞/mL之后,然后将培养物稀释至350万个细胞/mL以进行过夜培养。第二天,按照制造商的方案用质粒转染细胞。在转染后48-55小时收获培养物。然后将细胞以1300xg下旋转15min。然后收集含有慢病毒的培养物上清液并过滤,之后储存在-80℃下。

[0434] 实施例2:证明CAR工程化T细胞相对于非工程化T细胞的优选激活和增殖的体外测定

[0435] CAR T细胞的生成和培养

[0436] 使用RosetteSep™人T细胞富集鸡尾酒(干细胞)分离T细胞,并以 1×10^6 /mL重悬浮于AIM-V培养基(Gibco)和制造商推荐浓度的T细胞TransAct™人抗CD3/抗CD28(Miltenyi)(补充有5ng/mL rhIL-2(R&D)或1ng/mL的rhIL-7和rhIL-15(Peprotech))中,持续36-48小时。然后将细胞洗涤1x并重悬浮于Opti-MEM(Gibco)中,并且在96孔平底板中以 50×10^3 个细胞/孔以25μl铺板。在5μg/ml硫酸鱼精蛋白(MP biomedical)的存在下,用1/8稀释的预制备FMC63-41BB-3z慢病毒颗粒(ProMab)在1000g、30℃下通过旋转接种(spinoculation)90分钟来转导T细胞。在旋转接种之后6至8小时,添加200μl的AIM-V培养基(Gibco),其补充有5ng/ml rhIL-2(R&D)或1ng/ml rhIL-7和rhIL-15(Peprotech)。在添加培养基之后48小时,使用抗FMC63(FM63,Acro bio)通过流式细胞术检查细胞的CAR表达。每隔一天向细胞补充含有相应细胞因子的AIM-V或RPMI培养基(+FBS和Glutamax),并且将细胞保持在 $0.2 - 2 \times 10^6$ /mL密度之间,长达28天。

[0437] 用于测量CAR工程化T细胞相对于非工程化T细胞的选择性激活的STAT5激活测定

[0438] 通常,将CAR T细胞洗涤3x,并以 2×10^6 个细胞/mL重悬浮于无血清RPMI1640或AIM-V培养基中,并且等分到96孔U底板(50μL/孔)中并静置过夜(18-24小时)。将含有IL-2的靶向细胞因子构建体和对照蛋白(诸如重组人IL-2和对照(HA靶向)融合蛋白)稀释至所需浓度并添加到孔中(50μL,作为2x刺激物添加)。温育通常在37℃下进行30min。然后用针对表面标志物的抗体对细胞染色:CD8α(SK1,Biolegend;RPA-T8,Biolegend)和FMC63scFv(FM63,Acrobio),并在室温下用4% PFA固定10min。在固定之后,根据制造商的方案,将细胞在预冷却的Phosflow Perm缓冲液III(BD Biosciences)中透化。在透化之后,用针对细胞内pSTAT5[pY694]、克隆47(BD Biosciences)和表面标志物CD3(UCHT1,BD Biosciences)、CD4(RPA-T4,Biolegend)和CD25(M-A251,Biolegend)的抗体对细胞染色,并在流式细胞仪上进行分析。通过FMC63 scFv结合确定CAR+细胞。数据表示为pSTAT5阳性百分比,并且在一些情况下表示为pSTAT5平均荧光强度(MFI),并导入GraphPad Prism中以确定每种构建体的EC₅₀值。

[0439] 包含抗CAR抗体和细胞因子IL2m1的构建体的结果在图2中示出,并且包含抗CAR抗体和细胞因子IL2m2的构建体的结果在图3中示出。

[0440] 使用图12A、13A、14A和15A中所示的额外构建体进行STAT5激活测定。图13A中所示的构建体包含抗scFv抗体(例如,用于CAR的抗独特型抗体,其包含靶向CD19的scFv(FMC63scFv)) 和IL-2细胞因子变体(IL2m1、ILm2、IL2m3、IL2m4或ILm5);图14A中所示的构建体包含靶向在CAR T细胞表面上单独表达的标签的抗标签抗体(例如,标签是EGFRt,并且抗体是抗EGFRt) 和IL-2细胞因子变体(IL2m1、ILm2、IL2m3、IL2m4或ILm5);图15A中所示的构建体包含靶向在CAR分子内表达的嵌入标签的抗标签抗体(例如,标签是myc,并且抗体是抗myc抗体) 和IL-2细胞因子变体(IL2m1、ILm2、IL2m3、IL2m4或ILm5);图16A中所示的构建体包含靶向在TCR内表达的嵌入标签的抗标签抗体(例如,标签是myc,并且抗体是抗myc抗体) 和细胞因子(IL2m1、ILm2、IL2m3、IL2m4或ILm5)。

[0441] 结果在图12B-12F(对于图12A的构建体);图13B-13F(对于图13A的构建体);图

14B-14F(对于图14A的构建体);和图15B(对于图15A的构建体)中示出。对于每种构建体,与CAR-细胞的STAT5激活相比,CAR+细胞的STAT5激活显著增强,这指示在本公开的若干示例性靶向构建体存在下CAR工程化T细胞相对于非工程化T细胞的选择性激活。

[0442] 结果在图15B中示出(对于图15A的构建体的细胞结合结构域)。所描绘的构建体的细胞结合结构域结合在TCR内表达的嵌入标签。

[0443] 在体外靶向细胞因子治疗的情况下CAR工程化T细胞相对于非工程化T细胞的选择性外生

[0444] 将如上所述生成和维持的CAR T细胞用RPMI1640(Gibco)+10%FBS(Gibco)和1% Glutamax(Gibco)洗涤3x,并以 0.5×10^6 /mL重悬浮,并且以0.5mL/48孔板孔在相应的CAR定向细胞因子浓度下接种。每隔一天测量CAR+细胞的频率和数量,其中取出100 μ L细胞以用于表面和细胞内流式细胞术,并且补充100 μ L 5x浓度的CAR靶向构建体。在增殖密度增加到大于 2×10^6 个细胞/ml的情况下,将孔分成2个。针对以下标志物CD3(UCHT1,BD Biosciences)、CD4(RPA-T4,Biolegend)、CD8 α (SK1,Biolegend;RPA-T8,Biolegend)、FMC63 scFv(FM63, Acrobio)、CD62L(DREG-56,Biolegend)、CD45RO(UCHL1,Biolegend)、CD45RA(HI100, Biolegend)、CCR7(150503,BD)和TCF1(7F11A10,Biolegend)对细胞染色,并在流式细胞仪上进行分析。根据通过流式细胞仪在固定体积上收集的事件数反向计算总数。图4中所示的结果证明了与对照IL2或不与细胞因子融合的抗CAR抗体相比,在本公开的示例性CAR定向构建体(抗CAR-IL2m1和抗CARIL2m2)的存在下,CAR工程化T细胞(通过%CAR+细胞(左图)或CAR+细胞的总数(右图)测量)的选择性外生。

[0445] 实施例3:证明在靶向细胞因子治疗的情况下CAR工程化T细胞的更好植入、持久性和特征的体内小鼠模型

[0446] 对于皮下NSG模型,当肿瘤直径达到5-8mm时,在侧腹上向NSG小鼠皮下注射 1×10^6 个NALM6或Raji肿瘤,接着输注 $0.1-0.5 \times 10^6$ 个如实施例2中所述产生的CAR-T细胞。然后在CAR-T输注之后的指示的时间点用PBS或CAR靶向IL-2对小鼠进行处理。经由卡尺每周至少两次测量肿瘤大小,并且在指示的时间点采集外周血并通过流式细胞术进行分析,以表征CAR-T频率和表型。当肿瘤负荷超过1000mm³时,将小鼠处死。

[0447] 对于i.v.NSG模型,向NSG小鼠静脉内注射 0.5×10^6 个荧光素酶转导的NALM6或Raji肿瘤,接着输注0.5M如实施例2所述产生的CAR-T细胞。然后在CAR-T输注之后的指示的时间点用PBS或CAR靶向IL-2对小鼠进行处理。在指示的时间点采集外周血并通过流式细胞术进行分析,以表征CAR-T频率和表型。使用体内成像系统(IVIS)每周至少两次对小鼠进行成像,以经由发光测量肿瘤负荷。

[0448] 对于s.c.同系模型,向C57BL6/J小鼠皮下注射 1×10^6 个hCD19转导的B16F10、MC38或EL4肿瘤。在肿瘤直径达到5-8mm之后,静脉内输注 1×10^6 个hCD19-CAR-T转导的小鼠T细胞。在CAR-T输注后,如图所示用CAR靶向的IL-2或PBS对小鼠进行处理。在指示的时间点采集外周血并通过流式细胞术进行分析,以表征CAR-T频率和表型。在一些情况下,在转移之前使用环磷酸胺对小鼠进行预调理。对于TIL分析,在处理之后采集肿瘤,解聚并通过流式细胞术进行分析,以表征功能和表型。对于这些实验,小鼠hCD19-CAR-T细胞由CD3+T细胞产生,所述细胞选自使用CD3/CD28珠在体外激活,并使用编码具有41BB/CD3z或CD28/CD3z细胞内结构域的hCD19-CAR-T构建体的逆转录病毒转导的C57BL6/J脾细胞。

[0449] 实施例4工程化细胞中STAT3激活的评价

[0450] 通过流式细胞术测量STAT3的磷酸化来确定IL-10或IL-21激活工程化细胞的能力。将工程化细胞以 40×10^6 个细胞/mL重悬浮于无血清RPMI1640培养基中,并等分到96孔U底板(50 μ L/孔)中。将靶向融合蛋白和对照蛋白(包括重组野生型细胞因子和对照融合蛋白)稀释至所需浓度并添加到孔中(50 μ L,作为2x刺激物添加)。温育通常在37 $^{\circ}$ C下进行10-20min。将甲醇透化后无法应用的抗体-CD8a(SK1,Biolegend)、CD4(RPA-T4,Biolegend)、CD62L(DREG-56,Biolegend)和CD19(HIB19,Biolegend)-在刺激后立即直接添加到孔中并在冰上温育10min。用100 μ L冰冷的8% PFA(4%最终)在冰上停止染色10min。用洗涤缓冲液(PBS中的2% FBS)洗涤细胞。将细胞在冰上在100 μ L预冷却的Phosflow Perm缓冲液III(BD Biosciences)中透化45分钟。用洗涤缓冲液洗涤细胞,并且在4 $^{\circ}$ C下用相对于非工程化细胞与工程化细胞结合的抗体染色30-45min。数据表示为pSTAT3阳性百分比,并且在一些情况下表示为pSTAT3平均荧光强度(MFI),并导入GraphPad Prism中。

[0451] 虽然本文已经示出并描述了本公开的优选实施方案,但对于本领域技术人员显而易见的是,此类实施方案仅以示例的方式提供。在不脱离本公开内容的情况下,本领域技术人员将会想到许多变化、改变和替换。应理解,在实施本公开时可以采用本公开的实施方案的各种替代方案。旨在以所附权利要求书限定本公开的范围,并且由此涵盖这些权利要求范围内的方法和结构及其等同方案。

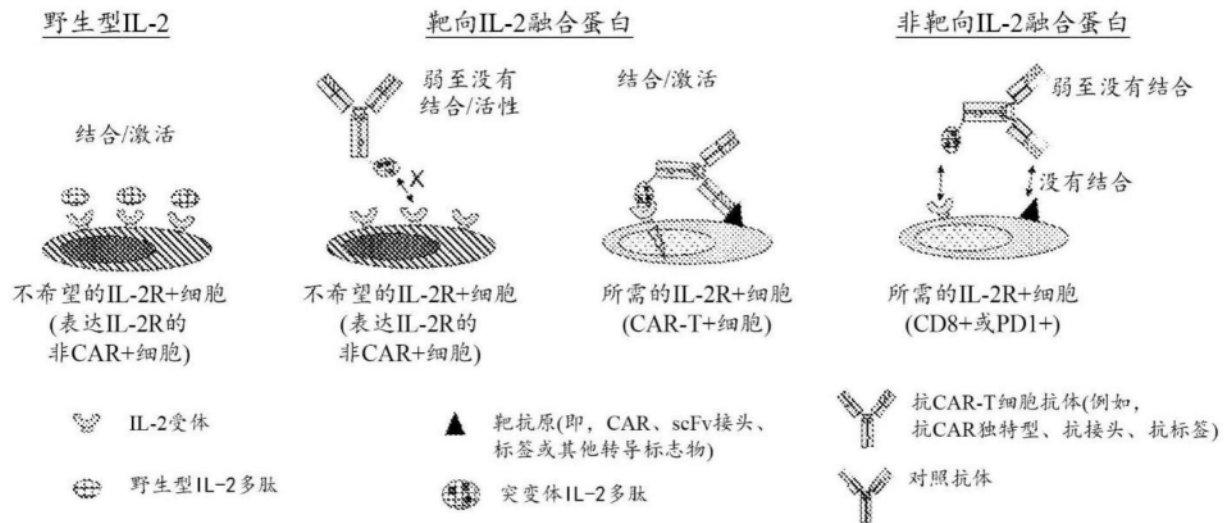


图1

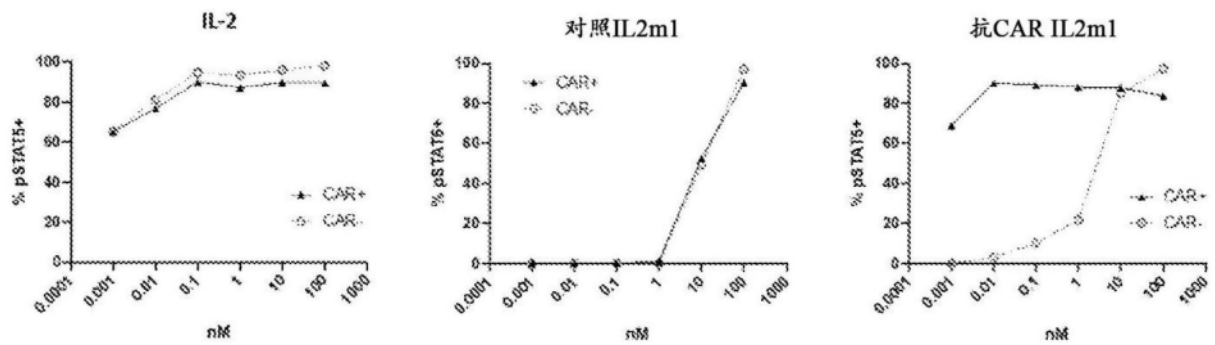


图2

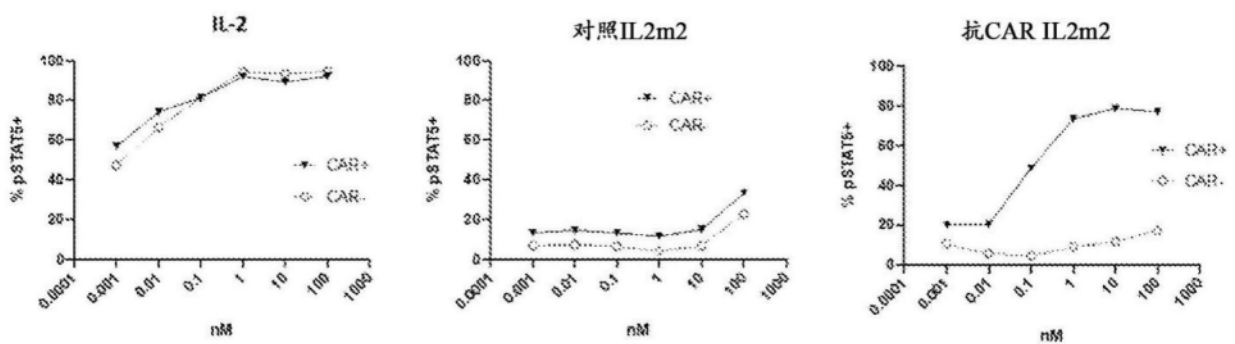


图3

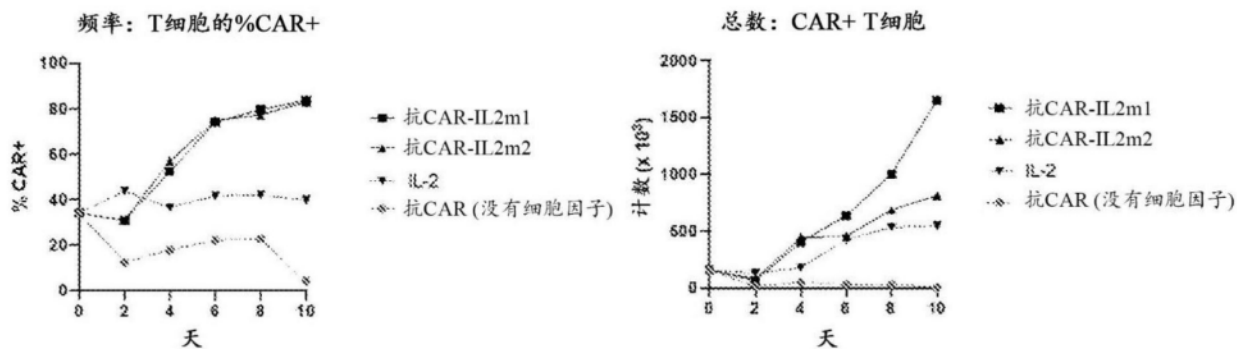


图4

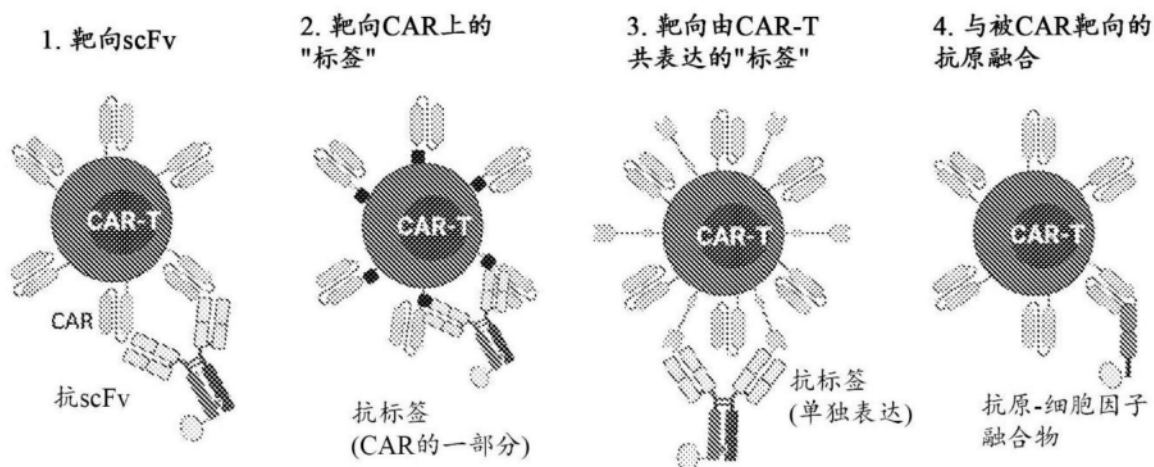


图5A

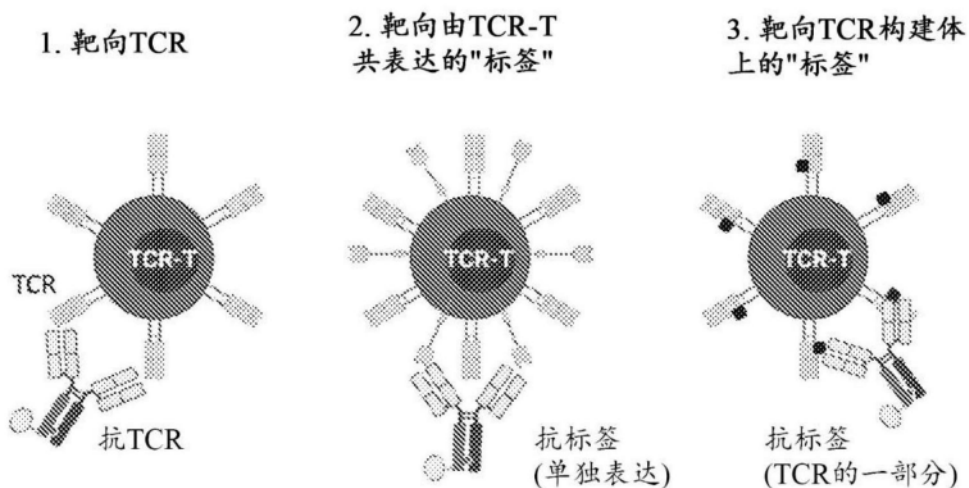


图5B

成熟IL-2的氨基酸序列(1-133)

APTSSSTKKTQLQLHLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFMPPKKATELKHLCLEELKPLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINNVVLEL
KGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSHSTLT

图6A

IL-2R α 的氨基酸序列(残基1-272)

MDSYLLMWGLLTFIMVPGCQAEICDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSH55WDNQCCQTSSATRNTT
KQVTPQPEEQKERKTTMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVVYQCVCQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQ
PQUCTGEMETSQFPGEKPPQASPEGRPESETSLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTEYQVAVAGCVFLISVLLLSGLTWQRQRKSRRTI

图6B

IL-2R β 的氨基酸序列(残基1-551)

MAAPALSWRLPILLILLPLATSWASAAVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDGAIQDTSQVHAWPDRRRWNQTCCELLPVSQASWACNLL
GAPDSQKLTTFVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRMAPISLQVVHVETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPL
ITLKQKQEWICLETITPDQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTKPAALGKDTIPWLGHLVGLSGAFGFHLYVLLINCRNTGPWLKKVL
KCNTPDPSKFFSCLSSSEHGDDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFHLPDAL
EIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGGSPQPLQPLSGEDDAYCTFFSRDILLFSPSLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRD
WDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVIREAGEEVPDAGPREGVSPWSPRPPGQGEFRALNARLPINTDAYLSLQELQGGQDPHTLV

图6C

IL-2R γ 的氨基酸序列(残基1-369)

MLKPSLPFTSLFLQLPLLGVLNTTILTPNGNEDTTADFFLTMTDLSVSTLPLPEVQCFVFNVEYMNCTWNSSSEPQPTNLTLYWYKNS
DNDKVQKCSHYLFSEETSGCQLQKKEIHLYQTFVVQLQDPREPRRQATQMLKIQNLVIPWAPENITLHKLSE5QLELNWNNRFLNHCHLV
QYRTDWDHNSWTEQSVQYRHKFSLPSVDGQKRYTFRVRSRFPNLCGSAQHWSSEWSPHPIHWG5NTSKENPFLFALEAVVISVGSMLHSLC
VYFWLERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCVSEIPKGGALGEGPGASPCNQHSPPYWAPPCTLPET

图6D

氨基酸编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
野生型残基	A	P	T	S	S	S	T	K	K	T	Q	L	Q	L	E	H	L	L	L	D
突变位置											X				X	X		X	X	X
氨基酸编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
野生型残基	L	Q	M	I	L	N	G	I	N	N	Y	K	N	P	K	L	T	R	M	L
突变位置		X																X		
氨基酸编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
野生型残基	T	F	K	F	Y	M	P	K	K	A	T	E	L	K	H	L	Q	C	L	E
突变位置		X	X		X															
氨基酸编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
野生型残基	E	E	L	K	P	L	E	E	V	L	N	L	A	Q	S	K	N	F	H	L
突变位置		X			X			X	X			X								
氨基酸编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
野生型残基	R	P	R	D	L	I	S	N	I	N	V	I	V	L	E	L	K	G	S	E
突变位置				X			X	X			X	X								
氨基酸编号	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
野生型残基	T	T	F	M	C	E	Y	A	D	E	T	A	T	I	V	E	F	L	N	R
突变位置																				
氨基酸编号	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133							
野生型残基	W	I	T	F	C	Q	S	I	I	S	T	L	T							
突变位置			X		X	X	X		X	X										

图7

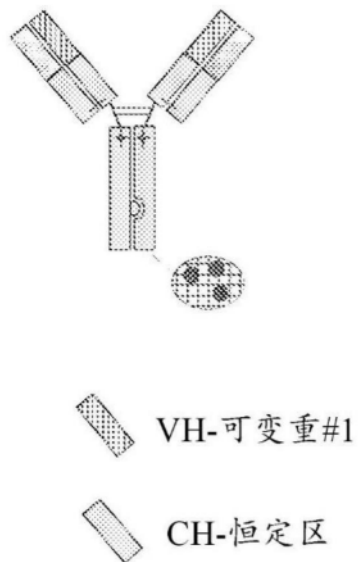
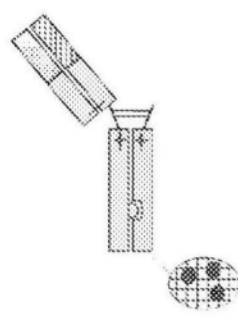


图8A

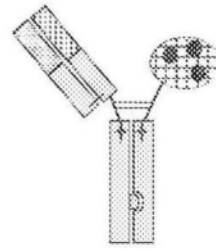


VL-可变轻#1



突变体IL-2多肽

图 8B



Fc突变

图 8C

成熟IL-10的氨基酸序列(残基1 - 160)

SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTTFFQMKDQLDNLLKESLLEDFKGYLGCCQALSEMIQFYLEEVMMPQAENQDP
DIKAHVNSLGENLKTLLRLRRCHRFPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN

图9A

IL-10RA的氨基酸序列(残基1 - 578)

HGTELPSPPSVWFEEAEFFHHILHWTPIPNQSESTCYEVALLRYGIESWNISNCSQTLSDLTAVTLDLYHSNGYRARVRVRAVDGSRHSN
WTVTNTRFSDVTLTVGSVNLEIHNGFILGKIQLPRPKMAPANDTYESIFSHFREYEIAIRKVPGNFTFTHKKVKHENSLLTSGEVGE
FCVQVKPSVASRSNKGMSKEECISLTRQYFTVTNVIIFFAFVLLSGALAYCLALQLYVRRRKKLPVLLFKKPSPFIFISQRPSPETQDTI
HPLDEEAFKVSPELKNLDLHGSTDGSGFGSTKPSLQTEEPQFLLPDPHPQADRTLGNREPPVLGDCSSGSSNSTDSGICLQEPSLSPST
GPTWEQQVGSNSRGQDDSGIDLQNSEGRAGDTQGGGALGHHSPPEPEVPGGEEDPAAVAFQGYLRQTRCAEEKATKTGCLEEEESPL
TDGLGPKFGRCLVDEAGLHPPALAKGYLKQDPLEMTLASSGAPTQWNQPTTEEWSLALSSCSDLGISDWSFAHDLAPLGCVAAPG
GLLGSFNSDLVTLPLISSLSSE

图9B

IL-10RB的氨基酸序列(残基1 - 325)

MVPPPENVRMNSVNFKNILQWESPAPAFKGNLTFTAQYLSYRIFQDKCMNTTTLTECDFSSLSKYGDHTLRVRAEFADHSDWVNIITFC
PVDDTIIGPPGMQVEVLADSLHMRFLAPKIENEYETWTMKNVYNSWTYNVQYWKNGTDEKFQITPQYDFEVLRLNLEPWTTYCVQ
VRGFLPDRNKAGEWSEPVCETTHDETVP SWMVAVILMASVFMVCLALLGCFALLWCYKTKYAFSPRNSLPQHLKEFLGHPHH
NTLLFFSPLSDENDVFDKLSVIAEDSESGKQNP GDSCSLGTPPGQG PQS

图9C

成熟单体IL-10的氨基酸序列(残基1 - 166)

SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNLLKESLLEDFKGYLGCOALSEMIQFYLEEVMPPQAEHQDP
DIKAHVNSLGENLKTLRRLRRCHRFPCENGSGGSGGSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEDFINIEAYMTMKIRN

图9D

氨基酸编号 野生型残基 突变位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	S	P	G	Q	G	T	Q	S	E	N	S	C	T	H	F	P	G	N	L	P
																		X		X
氨基酸编号 野生型残基 突变位置	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
	N	M	L	R	D	L	R	D	A	F	S	R	V	K	T	F	F	Q	M	K
	X	X	X	X	X		X	X			X	X		X	X			X		X
氨基酸编号 野生型残基 突变位置	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
	D	Q	L	D	N	L	L	L	K	E	S	L	L	E	D	F	K	G	Y	L
	X		X	X	X	X			X						X					
氨基酸编号 野生型残基 突变位置	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
	G	C	Q	A	L	S	E	M	I	Q	F	Y	L	E	E	V	M	P	Q	A
								X	X				X				X	X		
氨基酸编号 野生型残基 突变位置	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
	E	N	Q	D	P	D	I	K	A	H	V	N	S	L	G	E	N	L	K	T
	X	X					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
氨基酸编号 野生型残基 突变位置	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
	L	R	L	R	L	R	R	C	H	R	F	L	P	C	E	N	K	S	K	A
	X		X	X			X			X										
氨基酸编号 野生型残基 突变位置	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
	V	E	Q	V	K	N	A	F	N	K	L	Q	E	K	G	I	Y	K	A	M
																		X		
氨基酸编号 野生型残基 突变位置	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160
	S	E	F	D	I	F	I	N	Y	I	E	A	Y	M	T	M	K	I	R	N
	X	X		X				X			X							X		

图 10A
二聚体

图10A

氨基酸编号 野生型残基 突变位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	S	P	G	Q	G	T	Q	S	E	N	S	C	T	H	F	P	G	N	L	P
																		X		X
氨基酸编号 野生型残基 突变位置	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
	N	M	L	R	D	L	R	D	A	F	S	R	V	K	T	F	F	Q	M	K
	X	X	X	X	X		X	X			X	X		X	X			X		X
氨基酸编号 野生型残基 突变位置	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
	D	Q	L	D	N	L	L	L	K	E	S	L	L	E	D	F	K	G	Y	L
	X		X	X	X	X			X						X					
氨基酸编号 野生型残基 突变位置	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
	G	C	Q	A	L	S	E	M	I	Q	F	Y	L	E	E	V	M	P	Q	A
								X	X			X	X				X	X		
氨基酸编号 野生型残基 突变位置	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
	E	N	Q	D	P	D	I	K	A	H	V	N	S	L	G	E	N	L	K	T
	X	X					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
氨基酸编号 野生型残基 突变位置	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	116a	116b	116c	116d
	L	R	L	R	L	R	R	C	H	R	F	L	P	C	E	N	G	G	G	S
	X		X	X			X			X	X									
氨基酸编号 野生型残基 突变位置	116e	116f	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134
	G	G	K	S	K	A	V	E	Q	V	K	N	A	F	N	K	L	Q	E	K
氨基酸编号 野生型残基 突变位置	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154
	G	I	Y	K	A	M	S	E	F	D	I	F	I	N	Y	I	E	A	Y	M
				X			X	X		X				X						
氨基酸编号 野生型残基 突变位置	155	156	157	158	159	160														
	T	M	K	I	R	N														
				X																

单体

图10B

氨基酸编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
野生型残基	S	P	G	Q	G	T	Q	S	E	N	S	C	T	H	F	P	G	N	L	P
突变位置																		A		A
																		V		
																		I		
																		L		
																		M		
																		F		
																		Y		
																		S		
																		T		
																		Q		
																		G		
																		R		
																		H		
																		K		
																		O		
																		E		
																		P		
氨基酸编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
野生型残基	N	M	L	R	D	L	R	D	A	F	S	R	V	K	T	F	F	Q	M	K
突变位置	A	A	A	A	A		A	A			T	A		A	A			A	A	
	F	I	V	S			S	S			Y	H		S	Q			S	L	
	Y	L	I	Q			Q	Q			D	S		Q	H			H	H	
	T	V		E			E					K		E	E			E		
		F		H			H							H	K			K		
氨基酸编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
野生型残基	D	Q	L	D	N	L	L	L	K	E	S	L	L	E	D	F	K	G	Y	L
突变位置	A		A	A	A	A			A					E						
	S		V	S	S	V			S					Y						
	Q		I	Q	H	I			Q					S						
					E				E					T						
					K				H					V						
氨基酸编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
野生型残基	G	C	Q	A	L	S	E	M	I	Q	F	Y	L	E	E	V	M	P	Q	A
突变位置								A	L				I	Q			I	I	N	
								L	V				V	N			V	V	S	
								M					F	S			F	F		

二聚体

图11A

氨基酸编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
野生型残基	E	N	Q	D	P	D	I	K	A	H	V	N	S	L	G	E	N	L	K	T
突变位置	Q	Q					A	I	G	A	A	A	A	A	I	A	A	A	A	A
	N	E					V	V	I		L	V	I	V	V	V	K	V	V	V
	S	S					S	F	V			I	L	I	F	I		I	I	I
							Q		F			L	Y						L	
												M	F						M	
												F							F	
												Y							Y	
												S							S	
												T							T	
												Q							Q	
												G							G	
												R							R	
												H							H	
												K							K	
												D							D	
												E							E	
												P							P	

氨基酸编号	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
野生型残基	L	R	L	R	L	R	R	C	H	R	F	L	P	C	E	N	K	S	K	A
突变位置	A		V	A			A			F	W									
	V		I	H			H			Y	Y									
	I			S			S			W	L									
										L										
										I										
										V										

氨基酸编号	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
野生型残基	V	E	Q	V	K	N	A	F	N	K	L	Q	E	K	G	I	Y	K	A	M
突变位置																		A		
																		L		
																		I		
																		V		

氨基酸编号	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160
野生型残基	S	E	F	D	I	F	I	N	Y	I	E	A	Y	M	T	M	K	I	R	N
突变位置	A	A		A				A			A							A		
		L		H				S			L									
		I		R				H			I									
		V		K				E			V									
								K			F									

二聚体

图11A(续)

氨基酸编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
野生型残基	S	P	G	Q	G	T	Q	S	E	N	S	C	T	H	F	P	G	N	L	P
突变位置																		A		A
																		V		
																		I		
																		L		
																		M		
																		F		
																		Y		
																		S		
																		T		
																		Q		
																		G		
																		R		
																		H		
																		K		
																		D		
																		E		
																		P		
氨基酸编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
野生型残基	N	M	L	R	D	L	R	D	A	F	S	R	V	K	T	F	F	Q	M	K
突变位置	A	A	A	A	A		A	A			T	A		A	A			A	A	
	F	I	V	S			S	S			Y	H		S	Q			S	L	
	Y	L	I	Q			Q	Q			D	S		Q	H			H	H	
	T	V		E			E					K		E	E			E		
		F		H			H							H	K			K		
氨基酸编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
野生型残基	D	Q	L	D	N	L	L	L	K	E	S	L	L	E	D	F	K	G	Y	L
突变位置	A		A	A	A	A			A					E						
	S		V	S	S	V			S					Y						
	Q		I	Q	H	I			Q					S						
					E				E					T						
					K				H					V						
氨基酸编号	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
野生型残基	G	C	Q	A	L	S	E	M	I	Q	F	Y	L	E	E	V	M	P	Q	A
突变位置								A	L				I	Q			I	I	N	
								L	V				V	N			V	V	S	
								M					F	S			F	F		

单体

图11B

氨基酸编号	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
野生型残基	E	N	Q	D	P	D	I	K	A	H	V	N	S	L	G	E	N	L	K	T
突变位置	Q	Q					A	I	G	A	A	A	A	A	I	A	A	A	A	A
	N	E					V	V	I		L	V	I	V	V	V	K	V	V	V
	S	S					S	F	V			I	L	I	F	I		I	I	I
							Q		F			L	Y						L	
												M	F						M	
												F							F	
												Y							Y	
												S							S	
												T							T	
												Q							Q	
												G							G	
												R							R	
												H							H	
												K							K	
												D							D	
												E							E	
												P							P	

氨基酸编号	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116a	116b	116c	116d
野生型残基	L	R	L	R	L	R	R	C	H	R	F	L	P	C	E	N	G	G	S
突变位置	A		V	A			A			F	W								
	V		I	H			H			Y	Y								
	I			S			S			W	L								
										L									
										I									
										V									

氨基酸编号	116e	116f	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134
野生型残基	G	G	K	S	K	A	V	E	Q	V	K	N	A	F	N	K	L	Q	E	K
突变位置																				

氨基酸编号	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154
野生型残基	G	I	Y	K	A	M	S	E	F	D	I	F	I	N	Y	I	E	A	Y	M
突变位置				A			A	A		A				A			A			
				L				L		H				S			L			
				I				I		R				H			I			
				V				V		K				E			V			
														K			F			

氨基酸编号	155	156	157	158	159	160
野生型残基	T	M	K	I	R	N
突变位置				A		

单体

图11B(续)

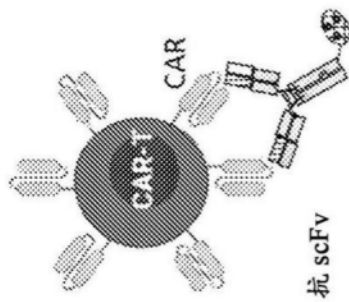


图12A

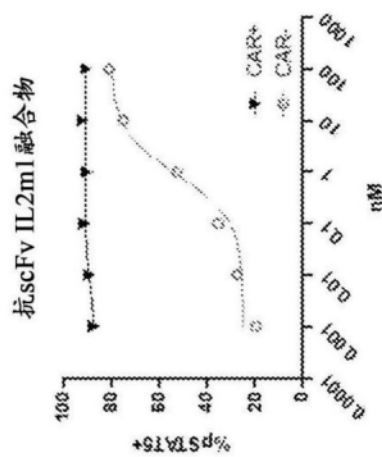


图12B

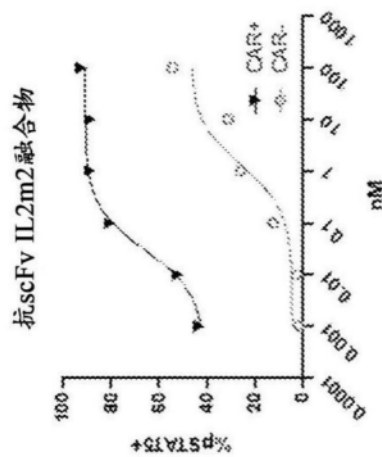


图12C

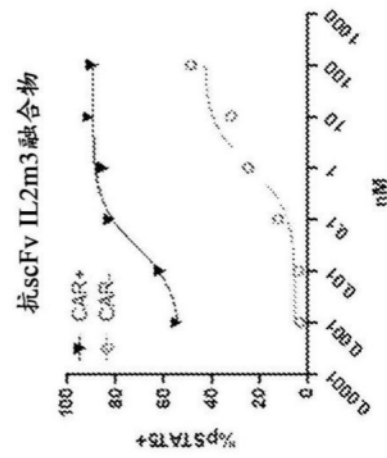


图12D

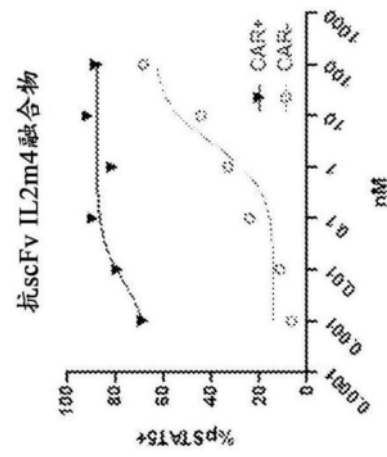


图12E

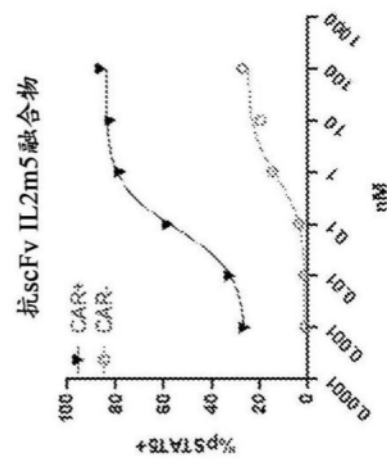


图12F

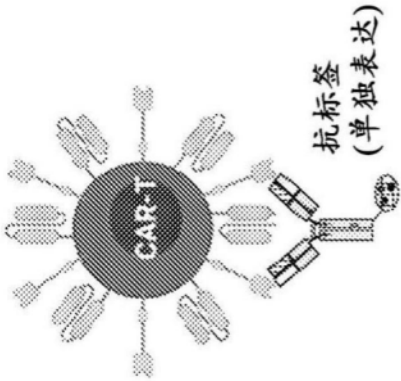


图13A

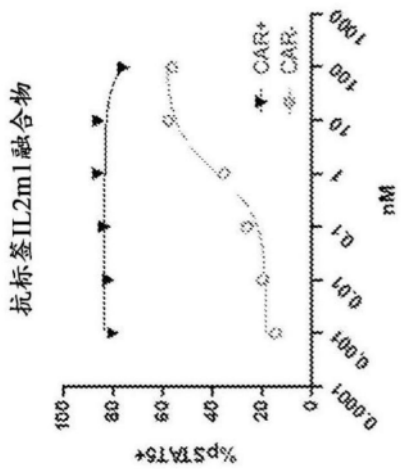


图13B

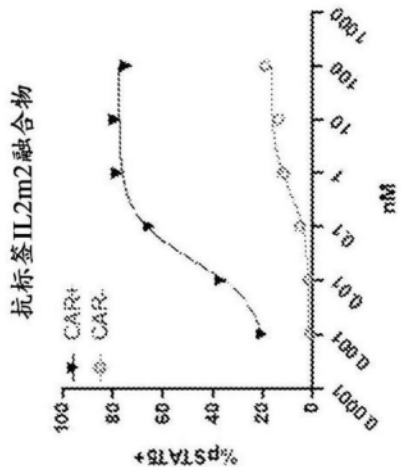


图13C

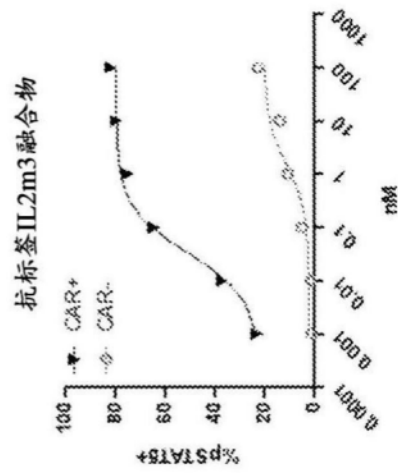


图13D

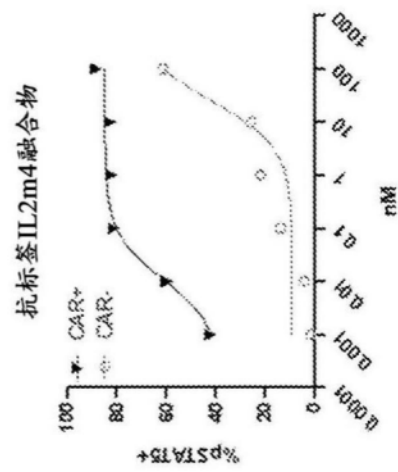


图13E

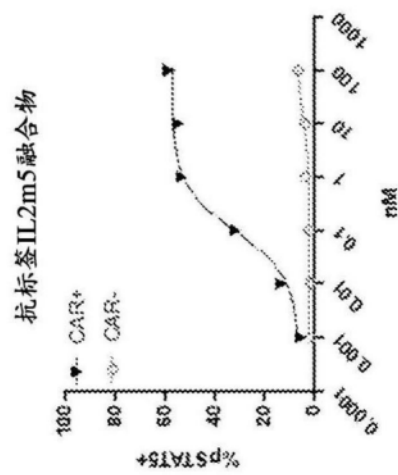


图13F

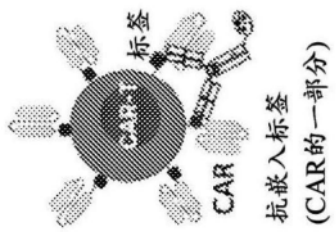


图14A

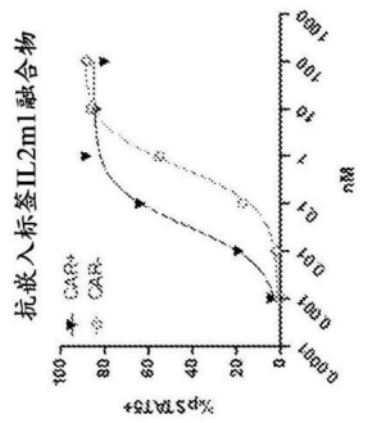


图14B

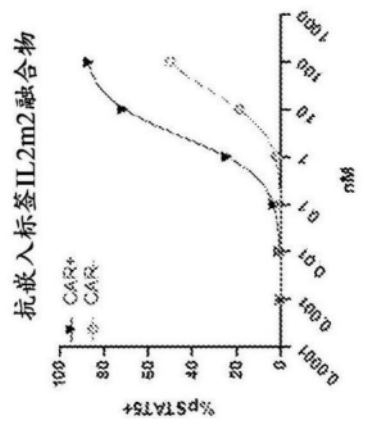


图14C

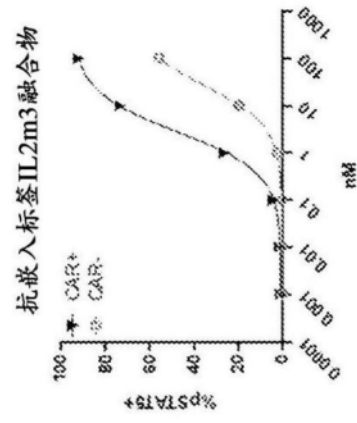


图14D

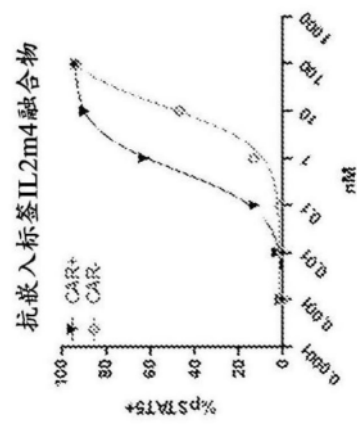


图14E

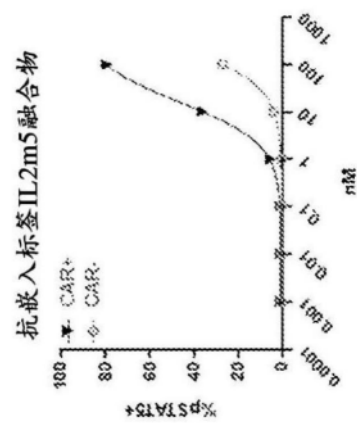


图14F

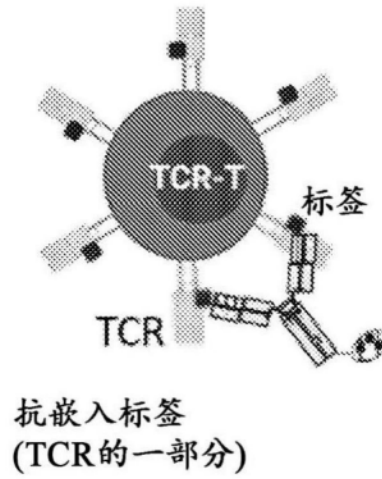


图15A

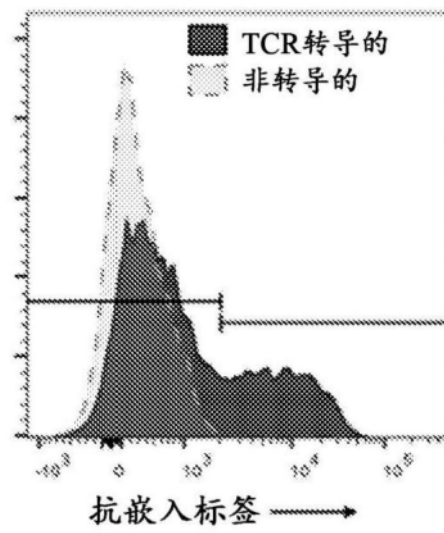


图15B