



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110997710 A

(43)申请公布日 2020.04.10

(21)申请号 201880057133.9

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22)申请日 2018.07.02

代理人 翟建伟 李唐

(30)优先权数据

1710620.4 2017.07.03 GB

(51)Int.Cl.

C07K 14/725(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.03.03

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2018/067741 2018.07.02

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/007869 EN 2019.01.10

(71)申请人 葛兰素史克知识产权开发有限公司

地址 英国米德尔塞克斯郡

(72)发明人 L.L.布雷绍 M.M.汉 C.赫林

C.马丁内斯弗莱特斯 M.A.奎瑟

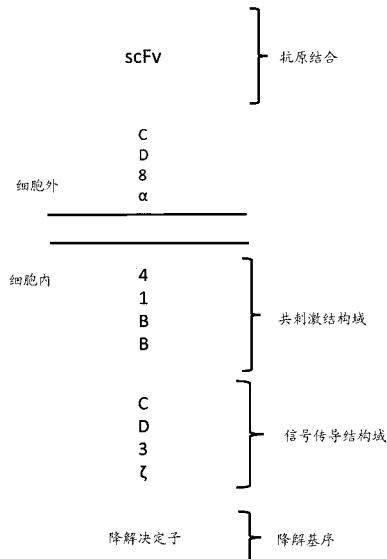
权利要求书2页 说明书37页 附图7页

(54)发明名称

靶向的蛋白降解

(57)摘要

本发明涉及控制多肽序列的水平的方法，其包括施用融合至包含最小降解决定子结构基序的泛素靶向蛋白的多肽序列。具体而言，所述多肽序列包含嵌合抗原受体，因此本发明可用于其中需要控制嵌合抗原受体的活性的细胞和基因疗法的方法中。



1. 控制多肽序列的方法,其包括:

a) 施用包含所述多肽序列和由长度小于135个氨基酸组成的泛素靶向蛋白的融合蛋白,所述泛素靶向蛋白包含cereblon结合位点的发夹基序,和

b) 通过施用介导所述泛素靶向蛋白和cereblon的结合的化合物来控制所述多肽序列的水平。

2. 权利要求1的方法,其中所述发夹基序包含选自以下的序列:SEQ ID NO:2-5或其功能变体,其中可以取代、添加或缺失一个或两个氨基酸,除了存在于每个氨基酸序列中的GLY残基。

3. 权利要求1至2中任一项的方法,其中所述发夹基序包含选自以下的序列:SEQ ID NO:2-5。

4. 权利要求1至3中任一项的方法,其中所述泛素靶向蛋白是由长度小于100个氨基酸组成的多肽序列。

5. 权利要求1至4中任一项的方法,其中所述泛素靶向蛋白包含充当泛素化位点的赖氨酸残基。

6. 权利要求1至5中任一项的方法,其中所述泛素靶向蛋白包含选自以下的序列:SEQ ID NO:6-14和27。

7. 权利要求1至6中任一项的方法,其中通过施用介导所述泛素靶向蛋白和cereblon的结合的化合物控制的多肽序列是跨膜蛋白。

8. 权利要求1至7中任一项的方法,其中通过施用介导所述泛素靶向蛋白和cereblon的结合的化合物控制的多肽序列是嵌合抗原受体(CAR)。

9. 权利要求1至8中任一项的方法,其中所述化合物是免疫调节性酰亚胺药物(IMiD)。

10. 权利要求9的方法,其中所述IMiD选自沙利度胺、来那度胺、泊马度胺或其功能衍生物或类似物。

11. 嵌合抗原受体(CAR),其包含:

细胞外配体结合结构域;

跨膜结构域;

细胞内信号传导结构域;和,

如权利要求1至6中任一项中所述的泛素靶向蛋白,其能够在化合物存在的情况下被泛素连接酶结合。

12. 权利要求11的CAR,其中所述细胞外配体结合结构域是抗B细胞成熟抗原(BCMA)单链Fv氨基酸序列。

13. 权利要求12的CAR,其中所述抗BCMA单链Fv氨基酸序列包含SEQ ID NO: 29。

14. 权利要求11至13中任一项的CAR,其中所述跨膜结构域选自CD4、CD8、CD3或CD28的跨膜结构域。

15. 权利要求14的CAR,其中CD8a跨膜结构域包含SEQ ID NO:17。

16. 权利要求11至15中任一项的CAR,其中所述细胞内信号传导结构域是免疫受体基于酪氨酸的活化基序(ITAM)。

17. 权利要求16的CAR,其中所述ITAM选自CD3 ζ 、FcR γ 、FcR β 、FcR ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b或CD66d的ITAM。

18. 权利要求17的CAR,其中CD3ζ信号传导结构域包含SEQ ID NO:20。
19. 权利要求11至18中任一项的CAR,其另外包含共刺激结构域。
20. 权利要求19的CAR,其中所述共刺激结构域选自CD28、CD27、4-1BB (CD137)、OX40 (CD134)、ICOS (CD278)、CD30、CD40、PD-1 (CD279)、CD2、CD7、NKG2C (CD94) 或B7-H3 (CD276) 的共刺激结构域。
21. 权利要求19至20中任一项的CAR,其中所述共刺激结构域包含SEQ ID NO:21。
22. 权利要求11至21中任一项的CAR,其中所述泛素靶向蛋白在所述CAR的C-末端上。
23. 权利要求11至22中任一项的CAR,其中所述泛素靶向蛋白通过接头与所述细胞内信号传导结构域分开。
24. 权利要求23的CAR,其中所述接头包含(GS)_n和/或(GGGGS)_p,其中n = 1-10且p = 1-3。
25. 权利要求24的CAR,其中所述接头包含SEQ ID NO:23-26中的任一者。
26. 权利要求11至25中任一项的CAR,其中所述化合物是免疫调节性酰亚胺药物(ImiD)。
27. 权利要求26的CAR,其中所述ImiD选自沙利度胺、来那度胺、泊马度胺或其功能衍生物或类似物。
28. 融合蛋白,其包含多肽序列和由长度小于135个氨基酸组成的泛素靶向蛋白,所述泛素靶向蛋白包含cereblon结合位点的发夹基序。
29. 根据权利要求28所述的融合蛋白,其中所述泛素靶向蛋白由选自以下的序列组成: SEQ ID NO:6-14和27。
30. 分离的多核苷酸,其编码权利要求1至10中任一项的泛素靶向蛋白、权利要求11至27中任一项的CAR或权利要求28至29中任一项的融合蛋白。
31. 表达载体,其包含权利要求30的多核苷酸。
32. 细胞,其包含权利要求30的多核苷酸或权利要求31的表达载体。
33. 权利要求32的细胞,其为免疫调节性细胞。
34. 根据权利要求33所述的细胞,其为T-细胞。
35. 权利要求32至34中任一项的细胞,其用于疗法中。
36. 药物组合物,其包含多种权利要求32至34中任一项的细胞。
37. 权利要求36的药物组合物,其另外包含药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。
38. 权利要求36或权利要求37的药物组合物,其用于疗法中。
39. 权利要求38的药物组合物,其中所述疗法是基因疗法的方法。
40. 工程改造免疫调节性细胞的方法,其包括:
 - (a) 提供免疫调节性细胞;
 - (b) 将权利要求30的多核苷酸或权利要求31的表达载体转导或转染至所述免疫调节性细胞中;和
 - (c) 在所述免疫调节性细胞中表达所述多核苷酸或所述表达载体。

靶向的蛋白降解

发明领域

[0001] 本发明涉及控制已引入宿主细胞中的异源蛋白的水平和/或活性的方法。

发明背景

先前已经通过利用泛素蛋白酶体系统(UPS)的策略实现蛋白的靶向降解。具体而言，在本领域中已经描述了蛋白水解靶向嵌合分子(PROTAC)，其为由靶标蛋白结合配体和E3泛素连接酶配体(其经由其募集E3泛素连接酶和随后的泛素化来诱导蛋白酶体介导的靶标蛋白的降解)构成的异双功能化合物。此类化合物在添加至细胞或施用于动物或人后能够诱导靶标蛋白的失活，且因此已提出其通过除去致病性或致癌性靶标蛋白来治疗疾病。

[0003] 嵌合抗原受体(CAR)是人工T-细胞受体，其处于现代个性化疗法的最前沿(Lee等人(2012) *Clin. Cancer Res.*, 18(10): 2780-90)。它们正开发以治疗对传统可用的疗法有抗性的患者中的癌症，并使用患者自身的免疫细胞来抗击该疾病。对免疫细胞进行离体基因工程改造，以表达对于肿瘤抗原特异性的CAR(CAR-T细胞)，且随后将细胞转移回患者。CAR位于T细胞的表面上，并且由通过跨膜结构域分开的细胞内和细胞外结构域组成。细胞外结构域具有靶标结合区域(例如单链可变片段)，其针对仅在患病细胞上表达的抗原。抗原结合至细胞的表面上的靶标结合区之后，细胞内结构域(通常是CD3ζ-CD28或CD3ζ-41BB)面对胞质溶胶并向T细胞传递活化信号。CAR-T细胞的活性信号传导进一步导致患病细胞的杀伤。

[0004] 迄今为止，CAR的开发已经包含三代。第一代CAR包含与衍生自CD3ζ或Fc受体γ链的细胞质区域的信号传导结构域衔接的靶标结合结构域。显示第一代CAR将T细胞杀伤成功地重新靶向至选择的靶标，然而，它们无法在体内提供延长的扩增和抗肿瘤活性。第二代和第三代CAR已聚焦于通过包括来自共刺激分子(诸如CD28、OX-40(CD134)和4-1BB(CD137))的另外的信号传导结构域而增强修饰的T细胞存活和增加增殖。

[0005] 然而，通过与至关重要的器官诸如肺的潜在交叉反应，已经出现这种有前途的疗法的安全性担忧。实际上，在临床试验期间，在用CAR-T细胞治疗的患者中已观察到中靶以及脱靶的肿瘤外毒性两者，并且已经用CAR研究报道了死亡(Morgan等人(2010) *Mol. Ther.*, 18(4): 843-51)。这些毒性难以在动物模型或非灵长类动物模型中预测，并且与小分子和生物制剂相反，CAR-T细胞是具有独特药代动力学(PK)概况和药效动力学作用的活药物。因此，正开发安全开关以关闭或调低CAR-T细胞杀伤，并允许更可控和更安全的疗法。

[0006] 自杀开关是安全开关的一个实例，其中CAR-T细胞被进一步工程改造以表达“自杀基因”或“消除基因”，其允许在施用外部药物后选择性破坏CAR-T细胞。例如，并入单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-TK)意味着通过将GCV-三磷酸酯并入复制中的DNA中，前药更昔洛韦的施用导致细胞死亡。然而，参与该开关的元件是免疫原性的，并且有新出现的证据证明针对HSV-TK的免疫应答限制转导细胞的持久性。Berger等人，(2006) *Blood Mar* 15:107(6): 2294-302)。

[0007] WO2017024318描述了通过附接结合异双功能化合物(其进而导致泛素化)的dTAG来调节嵌合抗原受体免疫效应细胞疗法的组合物和方法。

[0008] 为了使细胞疗法变得更广泛地采用,本领域中仍需要开发用于控制这些疗法以确保可以防止任何不良事件的方法。

[0009] 发明概述

根据本发明的第一个方面,提供了控制多肽序列的水平的方法,其包括:

a) 施用包含所述多肽序列和由长度小于135个氨基酸组成的泛素靶向蛋白的融合蛋白,所述泛素靶向蛋白包含cereblon结合位点的发夹基序,和

b) 通过施用介导所述泛素靶向蛋白和cereblon的结合的化合物来控制所述多肽序列的水平。

[0010] 在本发明的另一个方面,提供了控制多肽序列的水平的方法,其包括:

a) 施用融合蛋白,其包含:

A - B

其中A是多肽序列;且

其中B是由长度小于135个氨基酸组成、包含结构基序的泛素靶向蛋白,所述结构基序当比对时具有在如表1中所列的氨基酸残基各自之间的骨架原子的约6.0Å的rmsd内的一组结构坐标,且其中所述结构基序在对应于表1的GLY56的位置处包含甘氨酸残基;和

b) 通过施用介导a) 所述泛素靶向蛋白和b) 泛素连接酶以使所述多肽序列接近所述泛素连接酶的方式结合的化合物控制所述多肽序列的水平,其中所述多肽序列在所述化合物存在的情况下能够被泛素化。

[0011] 根据本发明的一个进一步方面,提供了嵌合抗原受体(CAR),其包含:

细胞外配体结合结构域;

跨膜结构域;

细胞内信号传导结构域;和,

如本文所述的泛素靶向蛋白,其能够在化合物存在的情况下被泛素连接酶结合。

[0012] 根据本发明的一个进一步方面,提供了融合蛋白,其包含由长度小于135个氨基酸组成的多肽序列,所述多肽序列包含cereblon结合位点的发夹基序。

[0013] 在本发明的另一个方面,提供了融合蛋白,其包含

A - B

其中A是多肽序列;且

其中B是泛素靶向蛋白,其由选自以下的序列组成:SEQ ID NO:6-14。

[0014] 附图描述

图1. 并入降解决定子元件的嵌合抗原受体构建体的示意图组织

图2. 编码与衍生自人Ikaros 1蛋白(Uniprot Q13422)的降解决定子信号融合的GFP的质粒图。

[0015] 图3. 来那度胺处理对HEK293T细胞中与降解决定子融合的绿色荧光蛋白(GFP)的表达水平的影响。(A) 具有用递增量的来那度胺处理的GFP阳性细胞的中值荧光强度值的表格。图中包括的构建体仅在GFP和降解决定子序列之间的(甘氨酸-丝氨酸) \times N接头的长度不同,其中构建体1 N = 1,构建体2 N = 3,且构建体3 N = 5。(B) 相对于未处理(无来那度胺)值的中值荧光强度(MFI)值。

[0016] 图4. 编码用作来那度胺诱导的CAR降解的对照的嵌合抗原受体(CAR)构建体的质

粒图。ZsGreen用作转染/转导的报告子。

[0017] 图5. 来那度胺处理对Jurkat细胞中与降解决定子融合的抗BCMA CAR的表达水平的影响。(A) 用DMSO或10μM来那度胺处理之后的转染的(ZsGreen阳性的) Jurkat细胞中的抗BCMA-CAR构建体的中值荧光强度。构建体4代表没有降解决定子信号的CAR,而构建体5含有构建体4的相同元件加上衍生自人Ikaros 3 (Uniprot Q9UKT9) 蛋白的序列。(B) (A) 中的Jurkat细胞的流式细胞术柱状图,其显示DMSO和10μM来那度胺对抗BCMA CAR表达的影响。

[0018] 图6. 来那度胺处理对原代T-细胞中与降解决定子融合的抗BCMA CAR的表达水平的影响。(A) 用DMSO或10μM来那度胺处理之后的转导的(ZsGreen阳性的) T-细胞中的抗BCMA CAR的中值荧光强度。构建体4代表没有降解决定子信号的CAR,而构建体5含有构建体4的相同元件加上衍生自人Ikaros 3 (Uniprot Q9UKT9) 蛋白的序列。数据代表三次生物重复。(B) (A) 中的T-细胞的流式细胞术柱状图,其显示DMSO和10μM来那度胺对抗BCMA CAR表达的影响。

[0019] 图7. 来那度胺处理对来自表达与降解决定子融合的抗BCMA CAR的原代T-细胞的细胞因子释放的影响。原代T-细胞用构建体4或5转导,并且在DMSO或10μM来那度胺存在的情况下与表达BCMA的ARH-77-10B5细胞共培养。构建体4代表没有降解决定子信号的CAR,而构建体5含有构建体4的该相同元件加上衍生自人Ikaros 3 (Uniprot Q9UKT9) 蛋白的序列。数据代表三次生物重复。

[0020] 发明详述

本文描述了靶标蛋白的有效泛素化所需的基本结构基序。这可用于控制施用于靶标细胞的异源蛋白的水平和/或活性,特别是当所述异源蛋白是需要严格控制以避免任何不利影响的风险的治疗性蛋白时。使有效泛素化所需的基序的大小最小化具有优势,特别是在异源蛋白经由其中空间是稀缺的病毒载体引入的情况下。

[0021] 定义

除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语与本领域中(例如,在细胞培养、分子遗传学、核酸化学、杂交技术和生物化学中)的技术人员通常理解的具有相同含义。将标准技术用于分子、遗传和生物化学方法(通常参见Sambrook等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版 (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 和Ausubel等人, Short Protocols in Molecular Biology (1999) 第4版, John Wiley & Sons, Inc., 其通过引用以其整体并入本文)和化学方法。本文提及的所有专利和出版物都以其整体通过引用并入本文。

[0022] 术语“包含”涵盖“包括”或“由...组成”,例如“包含”X的组合物可以仅由X组成,或者可以包括另外的物质,例如X + Y。

[0023] 术语“基本上由…组成”将特征的范围限制为指定的材料或步骤以及不实质性影响请求保护的特征的一种或多种基本特征的那些。

[0024] 术语“由...组成”排除任何另外的一种或多种组分的存在。

[0025] 当是指可测量的值诸如量、时间持续时间等时,如本文所用的术语“约”意指涵盖距指定值的±20%或±10%(包括±5%、±1%和±0.1%)的变异。

[0026] 术语“安全开关”是指可以根据需要活化以便控制可引起伤害的生物过程的生物化学机制。安全开关可以与CAR-T疗法一起使用,使得它们可以外部控制(即经由从细胞外

部施用),以增强基因疗法的安全性。

[0027] 如本文所用的术语“嵌合抗原受体”(“CAR”)是指由细胞外靶标结合结构域(其通常衍生自单克隆抗体或其片段)、任选地间隔区、跨膜区和一个或多个细胞内效应子结构域组成的工程改造的受体。CAR也已被称为嵌合T细胞受体或嵌合免疫受体(CIR)。将CAR基因引入造血细胞(诸如T细胞)中,以重定向对于期望的细胞-表面抗原的特异性。更近来,CAR也被引入非免疫细胞(Kojima等人, 2018 *Nature Chem. Bio.* Jan; 14(1):42-49)。

[0028] 对“CAR信号传导”的提及是指通过CAR的信号传导结构域的信号传导,其导致免疫调节性细胞活化(例如触发靶标细胞杀伤和T细胞活化)。

[0029] 如本文所用的术语“T细胞受体”(“TCR”)是指存在于T细胞的表面上的受体,其将抗原的片段识别为与主要组织相容性复合物(MHC)分子结合的肽。天然TCR以 $\alpha\beta$ 和 $\gamma\delta$ 形式存在,其结构相似,但存在于不同的位置,并被认为具有不同的功能。TCR的细胞外部分具有两个恒定结构域和两个可变结构域。可变结构域含有多态环,其形成TCR的结合位点,且类似于抗体中的互补决定区(CDR)。在基因疗法的背景下,通常对TCR进行基因修饰以改变或改善其抗原识别,因此在一个实施方案中,对TCR进行基因修饰。例如,通过引用并入本文的W001/055366和W02006/000830描述用于用异源TCR转染T细胞的基于逆转录病毒的方法。

[0030] 如本文所用的术语“靶标结合结构域”被定义为能够结合特定靶标、诸如抗原或配体的寡肽或多肽。具体而言,所述靶标可以是细胞表面分子。例如,可以选择靶标结合结构域以识别充当与特定疾病状态相关的致病性细胞(包括致病性人细胞)上的细胞表面标志物的靶标。所述靶标结合结构域可以是例如结合抗原的任何类型的蛋白。

[0031] 如本文所用的术语“间隔区”是指发挥功能以将跨膜结构域连接至靶标结合结构域的寡肽或多肽。该区域也可以被称为“铰链区域”或“茎区域(stalk region)”。间隔区的大小可以根据靶标表位的位置而变化,以便在CAR:靶标结合后维持活化免疫突触(immune synapse)的最佳距离(例如14nm)。

[0032] 术语“结构域”是指折叠的蛋白结构,其保留其三级结构而不依赖于蛋白的剩余部分。通常,结构域负责蛋白的离散功能特性,并且在许多情况下,可以被添加、除去或转移至其他蛋白,而不损失蛋白的剩余部分和/或结构域的功能。

[0033] 如本文所用的术语“跨膜结构域”是指横穿细胞膜的结构域。

[0034] 如本文所用的术语“细胞内效应子结构域”是指CAR中的结构域,其负责在靶标结合结构域与靶标结合后的细胞内信号传导。细胞内效应子结构域负责活化其中表达CAR的免疫细胞的正常效应子功能中的至少一种。例如,T细胞的效应子功能可以是细胞裂解活性或辅助活性,包括细胞因子的分泌。

[0035] 术语“抗体”在本文中以最广义使用,是指具有免疫球蛋白样结构域的分子(例如IgG、IgM、IgA、IgD或IgE),且包括单克隆、重组、多克隆、嵌合、人、人源化、多特异性抗体,包括双特异性抗体和异源缀合抗体;单一可变结构域(例如,VH、VHH、VL、结构域抗体(dAb))、抗原结合抗体片段、Fab、F(ab')₂、Fv、二硫化物连接的Fv、单链Fv、二硫化物连接的scFv、双抗体、TANDABS等,以及前述中的任一种的修饰版本。

[0036] 术语“单一可变结构域”是指包含抗体可变结构域特征性的序列的折叠的多肽结构域。因此,其包括完整的抗体可变结构域,诸如VH、VHH和VL以及修饰的抗体可变结构域(例如,其中一个或多个环已被不是抗体可变结构域特征性的序列替换),或者已经被截短

或包含N-或C-末端延伸的抗体可变结构域,以及至少保留全长结构域的结合活性和特异性的可变结构域的折叠片段。单一可变结构域能够不依赖于不同的可变区或结构域而结合抗原或表位。“结构域抗体”或“dAb”可以被认为与“单一可变结构域”相同。单一可变结构域可以是人单一可变结构域,但也包括来自其他物种、诸如啮齿动物(例如,如WO 00/29004中所公开)、铰口鲨和骆驼科VHH dAb的单一可变结构域。骆驼科VHH是免疫球蛋白单一可变结构域多肽,其衍生自骆驼科物种,包括双峰骆驼和单峰骆驼、美洲驼、骆马、羊驼和大羊驼,其产生天然缺乏轻链的重链抗体。可以根据本领域中可用的标准技术将此类VHH结构域人源化,并且将此类结构域视为“单一可变结构域”。如本文所用,VH包括骆驼科VHH结构域。

[0037] 为了避免疑问,将理解的是,术语“多核苷酸”、“核苷酸”和“核酸”在本文可互换使用。

[0038] 为了避免疑问,将理解的是,术语“多肽”、“寡肽”、“肽”和“氨基酸”在本文可互换使用。

[0039] 为了避免疑问,将理解的是,术语“结构基序”和“发夹基序”在本文可互换使用。

[0040] 对“融合蛋白”的提及是指从融合基因翻译的蛋白,所述融合基因通过连接两个不同基因/核酸序列的部分而产生。多肽序列A和泛素靶向蛋白B相互缔合,优选通过基因融合(即,融合蛋白通过翻译核酸而产生,在所述核酸中,编码A的全部或部分的多核苷酸与编码B的全部或部分的多核苷酸同框连接)或与彼此的化学缀合。

[0041] 对“功能片段”的提及是指完整的野生型序列的片段,其仍保留衍生出所述片段的野生型蛋白的结合功能(例如,泛素靶向蛋白的功能片段仍能够结合介导与泛素连接酶的相互作用的化合物)。片段可以合适地包含至少10个氨基酸长度,例如25、50、75、80、90、100、110、120或130个氨基酸长度。片段也可以包含C-末端截短或N-末端截短。

[0042] 对“功能变体”的提及包括这样的变体,其具有与原始(例如野生型)序列相似的氨基酸或核苷酸序列、但具有一个或多个氨基酸或核苷酸改变,其产生仍保留衍生出所述变体的原始蛋白的功能的变体。例如,本文所述的泛素靶向蛋白的功能变体包括这样的变体,其仍便于与化合物充分结合,其使得能够经由泛素连接酶的多肽序列的泛素化。

[0043] “亲和力”是一个分子(例如靶标结合蛋白)与另一个(例如其靶标蛋白)在单一结合位点的结合的强度。靶标结合蛋白与其靶标的结合亲和力可以通过平衡方法(例如酶联免疫吸附测定(ELISA)或放射免疫测定(RIA))或动力学(例如BIACORE分析)测定。

[0044] 如本文所用的序列同一性是如通过比较序列确定的两个或更多个氨基酸序列或两个或更多个核酸序列之间的相关性程度。序列的比较和序列同一性的测定可以使用数学算法来完成;本领域技术人员将意识到可用于比对两个序列并测定它们之间的百分比同一性的计算机程序。技术人员将理解,不同的算法可以产生略微不同的结果。

[0045] 因此,查询核酸序列和主题核酸序列之间的“百分比同一性”是表示为百分比的“同一性”值,当主题核酸序列在进行成对BLASTN比对之后与查询核酸序列具有100%查询覆盖率时,所述“同一性”值通过BLASTN算法来计算。查询核酸序列和主题核酸序列之间的此类成对BLASTN比对通过使用National Center for Biotechnology Institute的网站上可得的BLASTN算法的默认设置来进行,其中关闭低复杂性区域的过滤器。重要的是,查询核酸序列可以通过本文的一项或多项权利要求中鉴定的核酸序列来描述。

[0046] 类似地,查询氨基酸序列和主题氨基酸序列之间的“百分比同一性”是表示为百分

比的“同一性”值，当主题氨基酸序列在进行成对BLASTP比对之后与查询氨基酸序列具有100%查询覆盖率时，所述“同一性”值通过BLASTP算法来计算。查询氨基酸序列和主题氨基酸序列之间的此类成对BLASTP比对通过使用National Center for Biotechnology Institute的网站上可得的BLASTP算法的默认设置来进行，其中关闭低复杂性区域的过滤器。重要的是，查询氨基酸序列可以通过本文的一项或多项权利要求中鉴定的氨基酸序列来描述。

[0047] 查询序列可以与主题序列具有100%同一性，或者其与主题序列相比可以包括最多达特定整数的氨基酸或核苷酸改变，使得%同一性小于100%。例如，查询序列与主题序列具有至少50、60、70、75、80、85、90、95、96、97、98或99%同一性。此类改变包括至少一个氨基酸缺失、取代(包括保守和非保守取代)或插入，并且其中所述改变可以发生在查询序列的氨基或羧基末端位置或那些末端位置之间的任何位置，其单独散布在查询序列中的氨基酸或核苷酸之间或查询序列内的一个或多个连续组中。

[0048] 术语“泛素靶向蛋白”是指能够通过在化合物存在的情况下结合泛素连接酶来诱导多肽序列的泛素化的蛋白/结构域/片段。

[0049] 术语“泛素连接酶”，也称为E3连接酶，是指这样的蛋白家族，其便于将单独或呈复合物的泛素转移至特定底物蛋白，因此靶向底物蛋白用于降解。例如，cereblon是E3泛素连接酶复合物Cu14A/B的一部分，其与E2泛素-缀合酶组合引起泛素附接至靶标蛋白上的赖氨酸，且随后靶向特定蛋白用于通过蛋白酶体降解。泛素连接酶可以参与多泛素化，使得多于一种泛素附接至靶标蛋白。例如，第二泛素附接至第一泛素；第三泛素附接至第二泛素，等等。多泛素化可以标记蛋白用于通过蛋白酶体降解。

[0050] 术语“泛素化位点”是指泛素与其附接的氨基酸残基，尤其是赖氨酸残基。为了制成链，泛素本身含有泛素化位点。E3可以靶向泛素上的不同赖氨酸来制成链，但最常见的赖氨酸是Lys48。该赖氨酸-48可用于制成多聚泛素，其然后被蛋白酶体识别。

[0051] 如本文所用的术语“自体的”是指来自同一受试者的细胞。如本文所用的术语“同种异体的”是指相同物种的与所述细胞相比在遗传上不同的细胞。

[0052] 术语“个体”、“受试者”和“患者”在本文中可互换使用。在一个实施方案中，所述受试者是哺乳动物，诸如灵长类动物，例如狨猴或猴，或人。在一个进一步实施方案中，所述受试者是人。

[0053] 术语“药物组合物”是指在药学上可接受或生理学上可接受的溶液中配制的用于施用于细胞或受试者的组合物。本发明的组合物同样可以与其他药剂组合施用，条件是另外的药剂不会不利地影响所述组合物递送意欲疗法的能力。

[0054] 术语“癌症”(有时也称为“瘤形成”)是指由机体的部分中由异常细胞的不受控制的分裂引起的疾病。不受控制的分裂经常可以导致肿块，通常被称为“肿瘤”或“赘生物”。

[0055] 如本文所用的术语“肿瘤相关抗原”或“肿瘤抗原”是指在肿瘤细胞上表达的抗原。当与正常(即非癌)细胞相比时，该抗原可以在肿瘤细胞上独特或差异表达。

[0056] 本文所述的发明还可用于治疗有此需要的受试者的方法中。治疗可以是治疗性、预防性或防止性的。治疗涵盖疾病的至少一个方面或症状的减轻、减少或预防，且涵盖本文所述的疾病的预防或治愈。

[0057] 控制蛋白水平的方法

对于CK1和GSTP1,已经观察到cereblon结合位点的结构保守性。对于Ikaros 1和3,已经通过与结构表征的蛋白(诸如Eos (Ikaros 4、PDB 2MA7)或来自PDB iD2I13的锌指蛋白)的同源性推断结构保守性。本发明人已提出将这种保守的结构基序融合至异源蛋白,以提供控制所述蛋白的水平和/或活性的方法。与本领域中目前使用的PROTAC方法相反,本方法涉及将泛素靶向蛋白(其也可以称为泛素靶向结构域)直接融合至待控制的蛋白,使得可以简单地添加外部化合物以诱导与泛素连接酶的结合,其导致泛素化。

[0058] 此外,通过使用所需的最小降解决定子,存在潜在的生产优势。例如,载体经常是大小受限的,因此具有小的泛素靶向蛋白有助于使可用于编码其他多肽序列的空间量最大化。

[0059] 最小的降解决定子也不太可能干扰异源蛋白的活性。因此,根据本发明的第一个方面,提供了控制多肽序列的水平的方法,其包括:

a) 施用包含所述多肽序列和由长度小于135个氨基酸组成的泛素靶向蛋白的融合蛋白,所述泛素靶向蛋白包含cereblon结合位点的发夹基序,和

b) 通过施用介导所述泛素靶向蛋白和cereblon的结合的化合物来控制所述多肽序列的水平。

[0060] 在本发明的另一个方面,提供了控制多肽序列的水平和/或活性的方法,其包括:

a) 施用融合蛋白,其包含:

A - B

其中A是多肽序列;且

其中B是由长度小于135个氨基酸组成、包含结构基序的泛素靶向蛋白,所述结构基序当比对时具有在如表1中所列的氨基酸残基各自之间的骨架原子的约6.0Å的均方根偏差(rmsd)内的一组结构坐标,且其中所述结构基序在对应于表1的GLY56的位置处包含甘氨酸残基;和

b) 通过施用介导a) 所述泛素靶向蛋白和b) 泛素连接酶以使所述多肽序列接近所述泛素连接酶的方式结合的化合物控制所述多肽序列的水平,其中所述多肽序列在所述化合物存在的情况下能够被泛素化。

[0061] 不受理论的束缚,一旦多肽序列已被泛素化,其就可以被蛋白酶体降解或泛素(具体而言多聚泛素链)的附接引起多肽序列在空间上被抑制。因此,在一个实施方案中,所述多肽序列能够被泛素化,且然后被蛋白酶体降解。在一个替代实施方案中,所述多肽序列能够被泛素化,且然后在空间上被抑制。

[0062] 泛素是小的(约8.5 kDa)蛋白,其已在真核生物的大多数组织中发现。泛素添加至底物蛋白被称为泛素化(ubiquitination)或泛素化(ubiquitylation)。泛素化可以许多方式(包括信号传导用于其经由蛋白酶体的降解)影响蛋白。泛素通过E1(泛素活化酶)、E2(泛素缀合酶)和E3(泛素连接酶)酶级联的活性与底物赖氨酸共价偶联。E3泛素RING连接酶是这样的蛋白,其募集已装载有泛素的E2泛素-缀合酶,因此E3泛素RING连接酶与靶标蛋白和E2酶两者均相互作用。E3泛素连接酶的一个实例是cereblon (CRBN),其与受损的DNA结合蛋白1 (DDB1)、Cullin 4 (CUL4) 和RING-盒蛋白1 (RBX1) 相互作用以形成复合物CUL4-RBX1-DDB1-CRBN。然后,该复合物将蛋白底物泛素化,所述蛋白底物随后被蛋白酶体降解。

[0063] 本发明的方法允许通过将多肽序列融合至结构域来控制多肽序列的水平(例如细胞内、细胞外或膜水平)和/或活性,所述结构域允许在引入介导化合物后进行靶向泛素化。化合物的添加可以引起多肽序列的水平被降低,因为所述化合物将诱导通过泛素连接酶的多肽的泛素化,并且可以导致随后的降解。可以使用本领域中已知的方法测量水平和/或活性的变化。

[0064] 将理解的是,对如本文所用的“泛素连接酶”的提及包括泛素连接酶和/或作为连接酶复合物的一部分的蛋白,例如cereblon。因此,在一个实施方案中,所述泛素连接酶是cereblon。

[0065] 已显示某些蛋白底物通过免疫调节性药物(例如IMIDs)(诸如沙利度胺)与E3泛素连接酶相互作用。这些蛋白底物包括Ikaros3、Ikaros1、GSTP1和CK1 α 。近来,ZFP91被显示为cereblon的IMID-依赖性底物(参见An等人(2017) *Nat. Commun.* 8: 15398)。

[0066] 本文描述了“最小”降解决定子,其呈小蛋白结构域(约30个氨基酸)的形式,其可以添加至目标蛋白用于降解。在IMID化合物存在的情况下,将诱导降解。然而,所述降解决定子不由线性肽序列限定,而是由在转弯的顶点的三个骨架氢键受体(位置i、i+1和i+2)(其中甘氨酸残基在关键位置(i+3)处)的几何排列限定。这种几何排列形成本发夹基序。

[0067] 当使用主链原子将来自三种cereblon底物的发夹基序叠加时,发现总rmsd为约2.0 \AA 。具体而言,在所有三个基序之间保守的中央甘氨酸残基周围看到最接近的结构重叠。在作为Ikaros3 ZFN(具有50%的百分比同一性)的结构代表的PDB条目2I13中测量拉马钱德兰(Ramachandran)角,并且发现如下:

表1:cereblon结合发夹基序的拉马钱德兰角

Ikaros3 (2I13)		
残基	Psi (ψ)	Phi (ϕ)
LYS 51	151.5	-102.8
CYS 52	127.8	-83.5
PRO 53	-7.5	-66
GLU 54	-52.5	-111.7
CYS 55	-16.9	-105.2
GLY 56	-4.9	91.2
LYS 57	127.9	-60.6
SER 58	148.5	-97.5
PHE 59	155.5	-131.2
SER 60	-32.1	-73.3

[0068] 在一个实施方案中,结构坐标在如表1中所列的氨基酸残基各自之间的骨架原子的约5.0 \AA 、诸如约4.5 \AA 的rmsd内。

[0069] 对“拉马钱德兰角”和“rmsd”的提及是本领域技术人员众所周知的。拉马钱德兰角用于描述肽主链的构象。多肽链中的两个扭转角(也称为拉马钱德兰角)描述了多肽骨架围绕N-Ca(称为Phi, ϕ)和Ca-C(称为Psi, ψ)之间的键的旋转,参见Ramachandran等人(1963) *J. Mol. Biol.*, 7:95-99。因此, ϕ 和 ψ 描述了多肽链围绕Ca原子两侧的两个键的旋转。可以在拉马钱德兰图中绘制角度,以提供查看蛋白结构中的扭转角的分布的方式。

[0070] 在生物信息学中,原子位置的均方根偏差(rmsd)是叠加蛋白的原子(通常是骨架

原子)之间的平均距离的量度。通常,rmsd用作两个或更多个蛋白结构之间的相似性的定量量度。rmsd越低,两个结构之间的相似性越高。

[0071] 确定结构基序是否落在距表1中所示的基序的5Å的rmsd内是本领域技术人员众所周知的。这种计算通过优化给定结构基序的碳 α 原子的坐标和表1中含有的结构基序中的那些原子的坐标的叠加来实施。这种优化将产生两个结构基序的最小平均rmsd。在该权利要求的范围中所提及的叠加中,中央甘氨酸两侧的残基上的碳原子被认为是等效的,并且它们的rmsd值是待包括在计算中的rmsd值。合适的蛋白建模计算机程序可以用于这些计算中并且是本领域中已知的,例如*Molecular Operating Environment (MOE)*, 2013.08; Chemical Computing Group ULC。

[0072] 在一个实施方案中,所述泛素靶向蛋白衍生自锌指蛋白。

[0073] 在一个实施方案中,所述结构基序包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列:

$X_1X_2X_3X_4X_5GX_7X_8X_9X_{10}$

其中X代表任何氨基酸或不存在。在一个进一步实施方案中,SEQ ID NO:1的结构基序另外包含一个、两个、三个或更多个氨基酸。在又一个进一步实施方案中,所述结构基序包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列:

$X_1X_2X_3X_4X_5GX_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}$

其中X代表任何氨基酸或不存在。

[0074] 在一个实施方案中,以下中的一项或多项适用:

X_1 代表缬氨酸(V)、异亮氨酸(I)或不存在;

X_2 代表天冬氨酸(D)、天冬酰胺(N)或不存在;

X_3 代表赖氨酸(K)、异亮氨酸(I)或不存在;

X_4 代表谷氨酰胺(Q)、赖氨酸(K)或苏氨酸(T);

X_5 代表半胱氨酸(C)、丝氨酸(S)或天冬酰胺(N);

X_7 代表丙氨酸(A)或谷氨酸(E);

X_8 代表丝氨酸(S)、赖氨酸(K)或谷氨酸(E);

X_9 代表苯丙氨酸(F)、丝氨酸(S)或缬氨酸(V);

X_{10} 代表苏氨酸(T)、赖氨酸(K)或丙氨酸(A);

X_{11} 代表谷氨酰胺(Q)、苏氨酸(T)或缬氨酸(V);和/或

X_{12} 代表赖氨酸(K)或精氨酸(R)。

[0075] 在一个实施方案中,所述结构基序衍生自哺乳动物蛋白,诸如人蛋白。

[0076] 在一个实施方案中,所述结构基序衍生自Ikaros3、Ikaros1、酪蛋白激酶1 α (CK1 α)、真核肽链释放因子GTP-结合亚基ERF3A(GSTP1)或锌指蛋白91(ZFP91)。在一个进一步实施方案中,所述结构基序获得自Ikaros3的锌指核酸酶2基序。在一个替代实施方案中,所述结构基序获得自CK1 α 。这些蛋白的序列信息是本领域中可得的,例如参见UniProt ID号:对于Ikaros3为Q9UKT9,对于GSTP1为P15170,对于ZFP91为Q96JP5,且对于CK1 α 为P48729。这些蛋白的结构信息也是本领域中可得的,例如参见PDB条目:可用作Ikaros3的结构代表的2MA7或2I13,对于GSTP1为5HXB,且对于CK1 α 为5FQD。

[0077] 在一个实施方案中,所述结构基序包含与选自以下的序列具有至少80%、85%、90%、

95%或97%同源性/同一性的序列:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5。在一个进一步实施方案中,所述结构基序包含与选自以下的序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%或99%同一性的序列:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4。在又一个进一步实施方案中,所述结构基序包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%或99%同一性的序列。

[0078] 在一个实施方案中,所述结构基序包含选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5或其变体的序列。例如,所述变体序列可以具有最多达5、4、3、2或1个氨基酸取代、添加或缺失。通常,变异是取代,尤其是保守取代。所述变体序列可以基本上保留未修饰蛋白的生物特征。

[0079] 在一个实施方案中,所述结构基序包含选自以下的序列:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5。在一个进一步实施方案中,所述结构基序包含选自以下的序列:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4。在又一个进一步实施方案中,所述结构基序包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

[0080] 在一个实施方案中,所述泛素靶向蛋白是由长度小于130个氨基酸、诸如长度小于125、120、115、110、105、100、90、80、70、60或50个氨基酸组成的多肽序列。在一个进一步实施方案中,所述泛素靶向蛋白是由长度小于100个氨基酸组成的多肽序列。

[0081] 在一个实施方案中,所述泛素靶向蛋白包含泛素化诱饵,即包含可以充当泛素化位点的赖氨酸残基的序列。例如,当所述多肽序列本身不含适合于泛素化的位点时,可以使用该实施方案,因此在泛素靶向蛋白内可以包括含有泛素化位点的泛素化诱饵。在一个实施方案中,所述泛素化位点包含赖氨酸残基。

[0082] 在一个实施方案中,所述泛素化诱饵包含与SEQ ID NO:16具有至少80%、85%、90%、95%或97%同源性/同一性的序列。在一个实施方案中,所述泛素化位点包含SEQ ID NO:16或其变体。例如,所述变体序列可以具有最多达10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸取代、添加或缺失。通常,变异是取代,尤其是保守取代。所述变体序列可以基本上保留未修饰蛋白的生物特征。

[0083] 在一个实施方案中,所述泛素靶向蛋白由选自以下的序列组成:SEQ ID NO:6-14或其功能片段或功能变体。

[0084] 在一个实施方案中,所述泛素靶向蛋白由选自以下的序列组成:SEQ ID NO:6-14、27或其功能片段或功能变体。

[0085] 在一个实施方案中,所述泛素靶向蛋白由与选自以下的序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%或99%同一性的序列组成:SEQ ID NO:6-14。在一个实施方案中,所述泛素靶向蛋白由选自以下的序列组成:SEQ ID NO:6-14。

[0086] 在一个实施方案中,所述结构基序衍生自Ikaros3,且包含SEQ ID NO:6、7、8、9或10。在一个替代实施方案中,所述结构基序衍生自GSTP1,且包含SEQ ID NO:11或12。在另一个替代实施方案中,所述结构基序衍生自CK1 α ,且包含SEQ ID NO:13或14。

[0087] 如果根据本发明的结构基序分离自较大的IMiD-依赖性的cereblon底物,则它们可含有氨基酸残基,所述氨基酸残基形成可诱导聚集的疏水性斑块。可以对此类斑块进行突变,以减弱任何聚集。被认为疏水性的氨基酸包括:丙氨酸(Ala)、半胱氨酸(Cys)、缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile)、苯丙氨酸(Phe)、甲硫氨酸(Met)、酪氨酸(Tyr)和色氨

酸(Trp)。如果这些残基存在于疏水性斑块中,则它们可以被突变为另一种类型的氨基酸残基,诸如中性或亲水性残基,例如丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)、组氨酸(His)、精氨酸(Arg)、赖氨酸(Lys)、天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、天冬酰胺(Asn)、甘氨酸(Gly)、脯氨酸(Pro)或谷氨酰胺(Gln),以使聚集最小化。

[0088] 例如,与cereblon和CC-885(一种cereblon调节剂化合物)复合的GSTP1的结构由Matyskiela等人((2016) *Nature* 535 (7611) :252–257)报道,并通过PDB代码5HXB用至3.6 Å分辨率的数据保藏。可以分离GSTP1的C-末端结构域(残基388–499)并用作降解决定子,因为其含有cereblon结合基序和泛素化位点。因此,在一个实施方案中,所述结构基序可以包含SEQ ID NO:11(即GSTP1的残基388至499)。

[0089] 通过除去N-末端结构域而暴露的面积为385Å²,且涉及的残基为:

表 2:除去N-末端结构域后GSTP1的暴露残基

残基	位置	全长中的表面积 (Å ²)	作为C末端结构域 的表面积 (Å ²)	疏水性斑块中的 残基
HIS	388	53.3	91.1	
SER	389	30.1	47.9	
HIS	417	47.6	80.5	x
THR	418	21.1	75.4	
CYS	419	12	34.1	
ILE	420	75.3	76.3	
THR	462	44.7	62.5	
ILE	463	25.4	32.5	
CYS	464	9.8	62.7	
LEU	465	9.5	10.8	
GLU	466	10.4	31.3	
PHE	471	36.5	72.9	x
GLN	473	41.1	73.4	x
MET	474	16.2	67.3	x

[0090] 其中粗体的残基参与90 Å²的疏水性斑块。因此,残基His417、Phe471、Gln473和/或Met474可以突变为极性或中性残基,诸如丝氨酸,以减少疏水性斑块。在一个实施方案中,所述结构基序包含SEQ ID NO:11的变体,其中残基His417、Phe471、Gln473和/或Met474被突变为另一种氨基酸,诸如中性氨基酸。

[0091] 在一个实施方案中,所述结构基序可以包含SEQ ID NO:12(即具有突变F471S和M474S的GSTP1的残基388至499)。在该实施方案中,Gly437代表关键的中央甘氨酸,且Lys493充当泛素化位点。

[0092] 在另一个实例中,与cereblon和来那度胺复合的CK1α的结构由Petzold等人((2016) *Nature* 532 (7597) :127–130)报道,并通过PDB代码5FQD用至2.45Å分辨率的数据保藏。再次,N-末端和/或C-末端结构域的除去将暴露疏水性斑块。具体而言,残基Leu63、Leu67和Ile73参与疏水性斑块,因此,这些可以是用于突变以降低疏水性斑块的面积的候选物。因此,在一个实施方案中,所述结构基序包含SEQ ID NO:13的变体,其中残基Leu63、Leu67和/或Ile73突变为另一种氨基酸,诸如中性氨基酸。在一个进一步实施方案中,所述结构基序可以包含SEQ ID NO:14(即具有突变L63H、L67Q和I73Q的CK1α的残基8至94)。在该实施方案中,Gly40代表关键的中央甘氨酸,且Lys62和Lys65充当泛素化位点。

[0093] 在一个实施方案中,A是编码哺乳动物蛋白的多肽序列。在一个进一步实施方案

中,所述哺乳动物是人或小鼠。

[0094] 在一个实施方案中,A编码在细胞中未天然发现的多肽序列(即非天然蛋白)。

[0095] 在一个实施方案中,A编码嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)。

[0096] 在一个实施方案中,通过施用介导泛素靶向蛋白和cereblon的结合的化合物控制的多肽序列编码哺乳动物蛋白。在一个进一步实施方案中,所述哺乳动物是人或小鼠。

[0097] 在一个实施方案中,通过施用介导泛素靶向蛋白和cereblon的结合的化合物控制的多肽序列编码在细胞中未天然发现的蛋白(即非天然蛋白)。

[0098] 在一个实施方案中,通过施用介导泛素靶向蛋白和cereblon的结合的化合物控制的多肽序列是跨膜蛋白。

[0099] 在一个实施方案中,通过施用介导泛素靶向蛋白和cereblon的结合的化合物控制的多肽序列编码嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)。

[0100] 融合蛋白可以使用本领域中已知的标准技术(包括化学缀合)来制备。例如,编码多肽组分(A和B)的DNA序列可以分开组装,并连接至适当的表达载体中。将编码一种多肽组分的DNA序列的3'末端用或不用肽接头连接至编码第二多肽组分的DNA序列的5'末端,使得所述序列的阅读框同相。这允许翻译成保留两种组分多肽的生物活性的单一融合蛋白。

[0101] 所述融合蛋白可以另外包含膜靶向结构域,使得融合蛋白定位至细胞膜。在一个实施方案中,所述多肽序列另外包含膜靶向结构域。

[0102] 所述膜靶向结构域可以是将分子附接至细胞膜的化学修饰或特定蛋白序列。因此,在一个实施方案中,所述膜靶向区域选自:肉豆蔻酰化靶向序列、棕榈酰化靶向序列、异戊二烯基化序列(即,法呢基化、香叶基-香叶基化、CAAX盒)、蛋白-蛋白相互作用基序或跨膜序列(例如来自受体)。

[0103] 在一个实施方案中,所述融合蛋白是基因融合物。在一个替代实施方案中,所述融合蛋白使用化学缀合、例如使用用于融合组分A和B的常规化学交联剂生成。

[0104] 在一个实施方案中,所述融合蛋白包含所述多肽序列和由长度小于135个氨基酸组成的泛素靶向蛋白,所述泛素靶向蛋白包含cereblon结合位点的发夹基序。

[0105] 在一个实施方案中,所述融合蛋白包含所述多肽序列和泛素靶向蛋白,其中所述泛素靶向蛋白由选自以下的序列组成:SEQ ID NO:6-14和27。

[0106] 免疫调节性酰亚胺药物

在一个实施方案中,所述化合物是免疫调节性酰亚胺药物(IMiD)。此类药物是含有酰亚胺基团的免疫调节性药物的类别。目前,IMiD主要用于治疗癌症和自身免疫性疾病。

[0107] 在一个实施方案中,所述IMiD是沙利度胺、来那度胺或泊马度胺或其功能衍生物或类似物。在一个进一步实施方案中,所述IMiD选自:沙利度胺、来那度胺和泊马度胺或其功能衍生物或类似物。

[0108] 嵌合抗原受体

根据本发明的一个进一步方面,提供了嵌合抗原受体(CAR),其包含:

细胞外配体结合结构域;

跨膜结构域;

细胞内信号传导结构域;和,

如本文所述的泛素靶向蛋白,其能够在化合物存在的情况下被泛素连接酶结合。

[0109] 在一个实施方案中,所述泛素化靶向结构域由选自以下的序列组成:SEQ ID NO: 6-14或其功能片段或功能变体。

[0110] 在一个实施方案中,所述泛素化靶向结构域由选自以下的序列组成:SEQ ID NO: 6-14、27或其功能片段或功能变体。

[0111] 如本文所述,所述化合物(例如IMiD)能够结合泛素连接酶,并使得泛素连接酶能够结合泛素靶向蛋白,由此使嵌合抗原受体接近泛素连接酶,使得嵌合抗原受体能够被泛素化。一旦泛素化,所述嵌合抗原受体可被蛋白酶体降解,或者其信号传导活性可通过泛素链的存在而受损。

[0112] 本发明的CAR包括细胞内泛素靶向蛋白,其在化合物存在的情况下可被泛素连接酶结合。通过在CAR构建体中包括泛素靶向蛋白,由宿主细胞表达的CAR在暴露于介导泛素靶向蛋白和泛素连接酶之间的结合并利用泛素蛋白酶体途径以降解CAR的化合物后可以被容易且快速地降解。以此方式,施用靶向CAR内的泛素靶向蛋白的化合物允许调节CAR表达细胞的活化,因为CAR表达细胞内的CAR或其部分的降解阻止活化信号传导发生。该策略可用于调节CAR表达细胞的活化,例如,减轻CAR表达细胞的活化,以减少不良的炎性应答。此外,通过利用该策略,宿主细胞被豁免,并且仅降解CAR。

[0113] 此外,如本文所述的最小降解决定子的使用意味着其不太可能干扰CAR构建体的信号传导。

[0114] 标准嵌合抗原受体是本领域中已知的,并且通常包含靶标结合结构域、跨膜结构域和细胞内效应子结构域。

[0115] 所述靶标结合结构域(也称为细胞外配体结合结构域)结合靶标,具体而言其中所述靶标是肿瘤特异性分子、病毒分子或在靶标细胞群体上表达的适合于介导通过淋巴细胞的识别和消除的任何其他分子。在一个实施方案中,所述靶标结合结构域包含抗体、抗原结合片段或配体。在一个实施方案中,所述靶标结合结构域包含抗体或其片段。在一个实施方案中,所述靶标结合结构域是配体(例如靶标抗原的天然配体)。在一个替代实施方案中,所述靶标结合结构域是抗原结合片段。在一个进一步实施方案中,所述抗原结合片段是单链可变片段(scFv)或dAb。在又一个进一步实施方案中,所述scFv包含通过柔性接头连接的靶标抗原特异性单克隆抗体的轻(VL)和重(VH)可变片段。

[0116] 在一个实施方案中,所述靶标结合结构域可以结合多于一种靶标,例如两种不同的靶标。这种靶标结合结构域可以衍生自双特异性单链抗体。例如,博纳吐单抗(Blinatumomab)(也称为AMG 103或MT103)是一种重组CD19和CD3双特异性scFv抗体,其由组装成单一多肽链的四个免疫球蛋白可变结构域组成。所述可变结构域中的两个形成CD19的结合位点,所述CD19是在大多数正常和恶性B细胞上表达的细胞表面抗原。其他两个可变结构域形成CD3的结合位点,所述CD3是T细胞上的T细胞-受体复合物的一部分。这些可变结构域可以串联排列在CAR中,即,栓系至间隔区的两个单链抗体可变片段(scFv),以及跨膜和信号传导结构域。四个可变结构域可以以任何特定顺序排列于CAR分子内(例如VL(第一靶标)-VH(第一靶标)-VH(第二靶标)-VL(第二靶标)或VL(第二靶标)-VH(第二靶标)-VH(第一靶标)-VL(第一靶标)等),其用本领域中已知的任何合适的接头连接。

[0117] 所述靶标结合结构域可以结合各种细胞表面抗原,但在一个实施方案中,所述靶标结合结构域结合肿瘤相关抗原。在一个进一步实施方案中,所述肿瘤相关抗原选自:

BCMA、癌胚抗原(CEA)、癌抗原-125、CA19-9、CD5、CD13、CD19、CD20、CD22、CD27、CD30、CD33、CD34、CD45、CD52、CD70、CD117、CD138、CD160、表皮生长因子受体(EGFR)、叶酸结合蛋白、神经节苷脂G2(GD2)、HER2、间皮素、MUC-1、神经细胞粘附分子(NCAM)、前列腺干细胞抗原(PSCA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、前列腺酸磷酸酶(phosphatase)(PAP)、蛋白黑素-A(melan-A)、synaptophysin、前列腺的六跨膜上皮抗原I(STEAP1)、TARP、Trp-p8、酪氨酸酶或波形蛋白。在又一个进一步实施方案中，所述肿瘤相关抗原是BCMA。

[0118] 在一个实施方案中，所述细胞外配体结合结构域是抗B细胞成熟抗原(BCMA)单链Fv氨基酸序列。

[0119] 在一个实施方案中，所述细胞外配体结合结构域是抗BCMA单链Fv氨基酸序列，其包含SEQ ID NO:29。

[0120] 在一个实施方案中，所述靶标结合结构域具有以下结合亲和力：小于约500纳摩尔浓度(nM)，诸如小于约400 nM、350 nM、300 nM、250 nM、200 nM、150 nM、100 nM、90 nM、80 nM、70 nM、60 nM、50 nM、40 nM、30 nM、20 nM、10 nM、9 nM、8 nM、7 nM、6 nM、5 nM、4 nM、3 nM、2 nM、1 nM、0.5 nM或0.25 nM。在一个实施方案中，所述靶标结合结构域具有约10 nM至约0.25 nM的结合亲和力。在一个进一步实施方案中，所述靶标结合结构域具有约1 nM至约0.5 nM(即约1000 pM至约500 pM)的结合亲和力。

[0121] 在一个实施方案中，所述CAR另外包含在所述靶标结合结构域和所述跨膜结构域之间的间隔区结构域。间隔区允许所述靶标结合结构域以不同方向取向以便于结合，并且可用于提高靶标结合相互作用。在一个实施方案中，所述间隔区包含衍生自IgG(例如IgG1 Fc区或IgG1铰链区)、CD8或CD4的序列。

[0122] 在一个实施方案中，所述跨膜结构域可以衍生自天然或合成来源。在一个实施方案中，所述跨膜结构域可以衍生自任何膜结合或跨膜蛋白。或者，所述跨膜结构域可以是合成的，并且可以主要包含疏水性残基，诸如亮氨酸和缬氨酸。

[0123] 例如，所述跨膜结构域可以是以下的跨膜结构域：CD蛋白，诸如CD4、CD8、CD3或CD28，T细胞受体的亚基，诸如 α 、 β 、 γ 或 δ ，IL-2受体的亚基(α 链)，或Fc受体的亚基链。在一个实施方案中，所述跨膜结构域包含CD4、CD8或CD28的跨膜结构域。在一个进一步实施方案中，所述跨膜结构域包含CD4或CD8(例如，CD8 α 链，如NCBI参考序列：NP_001139345.1(其通过引用并入本文)中所述)的跨膜结构域。

[0124] 在一个实施方案中，所述跨膜结构域包含SEQ ID NO:17。

[0125] 所述CAR可以另外在跨膜结构域旁边(例如，在所述靶标结合结构域和所述跨膜结构域之间)包含铰链序列。因此，在一个实施方案中，所述铰链序列包含SEQ ID NO:18。在一个进一步实施方案中，所述铰链和跨膜结构域包含SEQ ID NO:19的完整序列。

[0126] 在一些实施方案中，所述跨膜结构域由以下构成：CD8 α 跨膜螺旋，紧接着是4-1BB的全长细胞内结构域，其含有与膜界面相容的序列的延伸段。如果跨膜结构域旁边的结构域不具有与膜界面相容的序列，则可以使用接头。

[0127] 用于本文所述的CAR中的细胞内效应子结构域的优选实例可以是协同起作用以在抗原结合后起始信号转导的天然T细胞受体和共受体的细胞质序列，以及这些序列的任何衍生物或变体，和任何合成序列，其具有相同功能能力。这些结构域可以分为两类：起始抗原依赖性一级活化的那些，和以抗原非依赖性方式起作用以提供次级或共刺激信号的那

些。一级活化效应子结构域可以包含信号传导基序,其被称为免疫受体基于酪氨酸的活化基序(ITAM)。ITAM是良好定义的信号传导基序,通常在各种受体的胞质内尾部中发现,并且充当syk/zap70类酪氨酸激酶的结合位点。作为非限制性实例,本发明中使用的ITAM的实例可以包括衍生自以下的那些:CD3 ζ 、FcR γ 、FcR β 、FcR ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d。在一个实施方案中,所述细胞内效应子结构域包含CD3 ζ 信号传导结构域(也称为CD247)。在一个进一步实施方案中,所述CD3 ζ 信号传导结构域包含SEQ ID NO:20。该序列也在Uniprot P20963,残基51-164中发现。天然TCR含有CD3 ζ 信号传导分子,因此该效应子结构域的使用最接近于在自然界中存在的TCR构建体。

[0128] 在一个实施方案中,所述CAR的细胞内效应子结构域包含CD3 ζ 信号传导结构域,其具有与SEQ ID NO:20具有至少70%、优选至少80%、更优选至少85%、90 %、95 %、97 %或99 %序列同一性的氨基酸序列。在一个进一步实施方案中,所述CAR的细胞内效应子结构域包含CD3 ζ 信号传导结构域,其包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列。

[0129] 所述CAR还可以提供次级或共刺激信号。T细胞另外包含共刺激分子,其结合抗原呈递细胞上的同源共刺激配体,以增强T细胞应答,例如通过增加增殖活化、分化等。因此,在一个实施方案中,所述CAR另外包含共刺激结构域。在一个进一步实施方案中,所述共刺激结构域包含选自以下的共刺激分子的细胞内结构域:CD28、CD27、4-1BB (CD137)、OX40 (CD134)、ICOS (CD278)、CD30、CD40、PD-1 (CD279)、CD2、CD7、NKG2C (CD94)、B7-H3 (CD276) 或其任何组合。在又一个进一步实施方案中,所述共刺激结构域包含选自CD28、CD27、4-1BB、OX40、ICOS或其任何组合的共刺激分子的细胞内结构域,尤其是4-1BB的细胞内结构域。

[0130] 在一个实施方案中,所述共刺激结构域包含4-1BB信号传导结构域,其具有与SEQ ID NO:21具有至少70%、优选至少80%、更优选至少85%、90 %、95 %、97 %或99 %序列同一性的氨基酸序列。在一个进一步实施方案中,所述共刺激结构域包含SEQ ID NO:21的4-1BB信号传导结构域。该序列也在Uniprot Q07011,残基214-255中发现。使用该共刺激结构域的优势在于其含有充当泛素化位点的赖氨酸残基(Lys219),因此,与含有4-1BB共刺激结构域的CAR构建体一起使用的泛素靶向蛋白不需要含有泛素化位点自身以便诱导泛素化。

[0131] 应理解,CAR上的细胞内组分(即信号传导结构域、共刺激结构域和泛素靶向蛋白)可以在CAR构建体内以任何顺序排列,只要它们位于细胞内即可。因此,在一个实施方案中,所述CAR构建体以如下顺序包含结构域:细胞外配体结合结构域 - 跨膜结构域 - 细胞内信号传导结构域 - 泛素靶向蛋白;细胞外配体结合结构域 - 跨膜结构域 - 泛素靶向蛋白 - 细胞内信号传导结构域;细胞外配体结合结构域 - 跨膜结构域 - 细胞内信号传导结构域 - 泛素靶向蛋白 - 共刺激结构域;细胞外配体结合结构域 - 跨膜结构域 - 共刺激结构域 - 细胞内信号传导结构域 - 泛素靶向蛋白;或细胞外配体结合结构域 - 跨膜结构域 - 共刺激结构域 - 共刺激结构域 - 泛素靶向蛋白 - 细胞内信号传导结构域。在一个进一步实施方案中,所述CAR构建体以如下顺序包含结构域:细胞外配体结合结构域 - 跨膜结构域 - 共刺激结构域 - 泛素靶向蛋白 - 细胞内信号传导结构域。

[0132] 在一个实施方案中,所述泛素靶向蛋白在CAR的C-末端上。

[0133] 编码CAR的核酸序列还可以包含在所述CAR构建体的结构域中的一个或多个之间的分隔子/接头序列。根据本发明的接头可以单独包含一组或多组G、S或GS残基或除了其他

接头以外还包含一组或多组G、S或GS残基。在一个实施方案中，所述接头包含(GS)_n和/或(GGGGS)_p，其中n = 1-10且p = 1-3。在一个实施方案中，所述接头包含GSGSGS (SEQ ID NO:23)、GSGSGSGSGS (SEQ ID NO:24)或GGGGS (SEQ ID NO:25)。

[0134] 根据本发明的一个进一步方面，提供了控制嵌合抗原受体细胞疗法的活性的方法，其包括：

- (a) 用编码如本文所述的嵌合抗原受体的多核苷酸转导或转染免疫调节性细胞；
- (b) 在所述免疫调节性细胞中表达所述多核苷酸；
- (c) 通过添加化合物来控制所述嵌合抗原受体的活化；

其中所述化合物介导a) 所述泛素靶向蛋白和b) 泛素连接酶以使所述嵌合抗原受体接近所述泛素连接酶的方式结合，其中所述嵌合抗原受体在所述化合物存在的情况下能够被泛素化。

[0135] 不受理论的束缚，认为所述化合物的添加导致CAR的降解，由此降低(即关闭)CAR水平和活性。通过降解所述CAR的至少一部分，所述CAR活化免疫效应细胞、例如CAR T-细胞的能力降低。如本文中所预期，发生CAR的充分降解，其中所述CAR的信号传导功能被破坏。或者，多聚泛素链的附接可引起空间位阻，其通过空间位阻导致活性降低。

[0136] 信号肽

本文所述的融合蛋白的组分可以包含信号肽，使得当组分在细胞中表达时，新生蛋白被引导至内质网，且随后被引导至其中可以表达它的细胞表面。

[0137] 信号肽的核心可以含有疏水性氨基酸的长延伸段，其具有形成单个 α 螺旋的倾向。所述信号肽可以以氨基酸的短的带正电荷的延伸段开始，所述延伸段有助于强化所述多肽在易位期间的适当拓扑学。在所述信号肽的末端，通常存在被信号肽酶识别和切割的氨基酸的延伸段。信号肽酶可以在完成易位期间或之后切割，以生成游离信号肽和成熟蛋白。然后，所述游离信号肽被特定蛋白酶消化。所述信号肽可以在所述分子的氨基末端。

[0138] 在一个实施方案中，所述信号肽衍生自CD8(参见UniProt P01732)。在一个进一步实施方案中，所述信号肽包含SEQ ID NO:22或其具有5、4、3、2或1个氨基酸突变(插入、缺失、取代或添加)的变体，条件是所述信号肽仍发挥功能以引起所述组分(即功能变体)的细胞表面表达。

[0139] 多核苷酸和表达载体

根据本发明的一个进一步方面，提供了编码本文所述的泛素靶向蛋白的分离的多核苷酸。根据本发明的一个进一步方面，提供了编码本文所述的融合蛋白的多核苷酸。根据本发明的又一个进一步方面，提供了编码本文所述的嵌合抗原受体的多核苷酸。

[0140] 本文所述的多核苷酸序列可以是密码子优化的。在遗传密码中发现的简并性允许每个氨基酸由一个至六个同义密码子编码，允许许多替代核酸序列编码相同的蛋白(Gustafsson等人. (2004) *Trends Biotechnol.* 22(7) : 346-53)。密码子优化是一种用于修饰基因序列的技术，其旨在增加异源表达系统中的基因的表达速率；通常，将编码目标蛋白的核苷酸序列密码子优化，使得密码子使用更密切类似于宿主细胞的密码子偏好，同时仍编码相同的氨基酸序列。

[0141] 本文所述的核酸可以包含DNA或RNA。它们可以是单链或双链的。它们也可以是其中包括合成或修饰的核苷酸的多核苷酸。许多不同类型的修饰是本领域中众所周知的，诸

如甲基膦酸酯和硫代磷酸酯骨架，或添加吖啶或聚赖氨酸链。可以使用此类修饰以增强本发明的多核苷酸的体内活性或寿命。

[0142] 所述多核苷酸可以存在于表达盒或表达载体(例如用于引入细菌宿主细胞的质粒，或用于转染哺乳动物宿主细胞的病毒载体、诸如慢病毒)中。因此，根据本发明的一个进一步方面，提供了包含本文所述的任何多核苷酸的表达载体。

[0143] 术语“载体”是指能够将外来遗传物质人工携带至另一细胞中(其可以在另一细胞中复制和/或表达)的媒介物。在一个实施方案中，所述载体是质粒、病毒载体、基于转座子的载体或合成的mRNA。

[0144] 在一个实施方案中，所述表达载体是逆转录病毒载体。在一个进一步实施方案中，所述逆转录病毒载体衍生自或选自慢病毒、 α -逆转录病毒、 γ -逆转录病毒或泡沫-逆转录病毒，诸如慢病毒或 γ -逆转录病毒，尤其是慢病毒。在一个进一步实施方案中，所述逆转录病毒载体颗粒是选自HIV-1、HIV-2、SIV、FIV、EIAV和绵羊髓鞘脱落病毒的慢病毒。慢病毒能够感染未分裂的(即静止的)细胞，这使其成为用于基因疗法的有吸引力的载体。在又一个进一步实施方案中，所述逆转录病毒载体颗粒是HIV-1或衍生自HIV-1。一些逆转录病毒的基因组结构可以在本领域中找到。例如，可以从NCBI Genbank (基因组登录号AF033819)找到关于HIV-1的详情。HIV-1是最佳理解的逆转录病毒之一，且因此经常被用作病毒载体。

[0145] 宿主细胞

根据本发明的一个进一步方面，提供了包含本文所述的融合蛋白的细胞。根据本发明的另一个方面，提供了包含如本文所述的多核苷酸或表达载体的细胞。

[0146] 在一个实施方案中，所述细胞是免疫调节性细胞。术语“免疫调节性细胞”是指功能上参与先天和/或适应性免疫应答的调节(例如起始和/或执行)的造血来源的细胞。根据本发明的所述免疫调节性细胞可以衍生自干细胞。所述干细胞可以是成体干细胞、非人胚胎干细胞，更具体地是非人干细胞、脐带血干细胞、祖细胞、骨髓干细胞、诱导的多能干细胞、全能干细胞或造血干细胞。所述免疫调节性细胞也可以是树突细胞、杀伤性树突细胞、肥大细胞、NK-细胞、B-细胞或T-细胞。所述T-细胞可以选自炎性T-淋巴细胞、细胞毒性T-淋巴细胞、调节性T-淋巴细胞或辅助性T-淋巴细胞或其组合。因此，在一个实施方案中，所述免疫调节性细胞衍生自炎性T-淋巴细胞、细胞毒性T-淋巴细胞、调节性T-淋巴细胞或辅助性T-淋巴细胞。在另一个实施方案中，所述细胞可以衍生自由CD4⁺ T-淋巴细胞和CD8⁺ T-淋巴细胞组成的组。

[0147] 在一个实施方案中，所述免疫调节性细胞可以是人免疫调节性细胞。

[0148] 在一个实施方案中，所述免疫调节性细胞是同种异体的或自体的。应理解的是，“自体的”是指获得自患者本身的细胞，而“同种异体的”是指获得自供体的细胞。自体细胞具有它们与患者相容的优势，且因此避免导致移植物抗宿主病(GvHD)的任何免疫相容性问题。为了防止同种异体细胞被患者排斥，它们或者需要衍生自相容的供体，或者进行修饰以确保在细胞表面上不存在会起始不想要的免疫应答的抗原。

[0149] 在扩增和基因修饰本发明的细胞之前，可以通过各种非限制性方法从受试者获得细胞来源。细胞可以获得自许多非限制性来源，包括外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、来自感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾脏组织和肿瘤。在本发明的某些实施方案中，可以使用本领域技术人员可得和已知的任何数目的T细胞系。在另一个实施方

案中,所述细胞可以衍生自健康供体或患病供体,诸如被诊断具有癌症或感染的患者。在另一个实施方案中,所述细胞是呈现不同表型特征的细胞的混合群体的部分。

[0150] 在用编码本文所述的融合蛋白的多核苷酸或表达载体转导之前,可以活化和/或扩增免疫调节性细胞。例如,可以用抗CD3单克隆抗体处理细胞以引起活化。

[0151] 应理解的是,所述免疫调节性细胞可以瞬时或稳定/永久表达本文所述的融合蛋白(取决于所用的转染方法以及编码所述融合蛋白的多核苷酸是否已经整合至免疫调节性细胞基因组中)。

[0152] 在引入融合蛋白之后,可以纯化免疫调节性细胞。

[0153] 用途

本文所述的发明提供了最小泛素靶向蛋白作为安全开关的一部分的用途。因此,根据本发明的一个方面,提供了本文所述的泛素靶向蛋白作为安全开关的用途。

[0154] 在一个实施方案中,所述安全开关用于基因疗法(或其方法)中。在一个进一步实施方案中,所述基因疗法是细胞基因疗法。

[0155] 如本文所述,术语“安全开关”是指可以根据需要活化以便控制可引起伤害的生物过程的生物化学机制。因此,在一个实施方案中,所述安全开关用于控制嵌合抗原受体(CAR)或异源T-细胞受体(TCR)的信号传导。

[0156] 在一个实施方案中,所述TCR是基因修饰的。在一个进一步实施方案中,所述T细胞受体的亲和力被改变为通常在所述受体的自然环境中不存在的亲和力和/或特异性。在又一个进一步实施方案中,所述T细胞受体的亲和力被改变为对自身抗原、肿瘤抗原和/或病原体衍生的抗原的亲和力。

[0157] 根据本发明的一个进一步方面,提供了本文所述的细胞,其用于疗法中。在一个实施方案中,疗法包括将所述细胞施用于需要这种疗法的人受试者。

[0158] 根据本发明的一个进一步方面,提供了本文所述的融合蛋白在基因疗法的方法中的用途。

[0159] 在一个实施方案中,所述疗法是过继细胞疗法。“过继细胞疗法”(或“过继免疫疗法”)是指人T淋巴细胞的过继转移,所述人T淋巴细胞通过基因转移工程改造以表达对于靶标细胞上表达的表面分子特异性的CAR或TCR。这可用于治疗多种疾病,这取决于选择的靶标、例如肿瘤特异性抗原(以治疗癌症)。过继细胞疗法涉及使用称为白细胞分离术的方法除去患者的白血细胞的一部分。然后可以将T细胞扩增并与本文所述的表达载体混合,以将融合蛋白永久转移至T细胞。再次扩增T细胞,并且在扩增结束时,将T细胞洗涤,浓缩,且然后冷冻以留出时间用于测试,运输和储存,直至所述患者准备好接受工程改造的T细胞的输入。

[0160] 药物组合物

根据本发明的一个进一步方面,提供了包含多种如本文所定义的细胞的药物组合物。在一个实施方案中,所述细胞包含多核苷酸序列,所述多核苷酸序列编码所述多肽序列和由长度小于135个氨基酸组成的泛素靶向蛋白,所述泛素靶向蛋白包含cereblon结合位点的发夹基序。在一个实施方案中,所述细胞包含表达载体,所述表达载体编码所述多肽序列和由长度小于135个氨基酸组成的泛素靶向蛋白,所述泛素靶向蛋白包含cereblon结合位点的发夹基序。在一个实施方案中,包含编码所述多肽序列和由长度小于135个氨基酸组成

的泛素靶向蛋白(其包含cereblon结合位点的发夹基序)的多核苷酸序列或表达载体的细胞是免疫调节性细胞。在一个实施方案中,包含编码所述多肽序列和由长度小于135个氨基酸组成的泛素靶向蛋白(其包含cereblon结合位点的发夹基序)的多核苷酸序列或表达载体的细胞是T-细胞。

[0161] 另外的药物组合物成分的实例包括但不限于任何佐剂、载体、赋形剂、助流剂、甜味剂、稀释剂、防腐剂、染料/着色剂、增味剂、表面活性剂、润湿剂、分散剂、混悬剂、稳定剂、等张剂、溶剂、表面活性剂、乳化剂、缓冲剂(诸如磷酸盐缓冲盐水(PBS))、碳水化合物(诸如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或右旋糖酐)、氨基酸、抗氧化剂或螯合剂(诸如EDTA或谷胱甘肽)。

[0162] 在一个实施方案中,所述药物组合物另外包含药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。所述载体、赋形剂或稀释剂在与所述组合物的其他成分相容且对其受体无害的意义上必须是“可接受的”。根据本发明,使用的任何赋形剂、媒介物、稀释剂或添加剂必须与本文所述的融合蛋白相容。可以查阅本领域中已知的标准文本,诸如“Remington's Pharmaceutical Science”,第17版,1985(通过引用并入本文),以制备合适的制剂。

[0163] 药物组合物可以通过注射或连续输注(实例包括但不限于静脉内、肿瘤内、腹膜内、皮内、皮下、肌内和门静脉内)来施用。在一个实施方案中,所述组合物适合于静脉内施用。当施用本发明的治疗组合物(例如,含有如本文所述的基因修饰的细胞的药物组合物)时,通常将其配制为单位剂量可注射形式(溶液、混悬剂、乳剂)。药物组合物可以适合于局部施用(其包括,但不限于,表皮、吸入、鼻内或眼部施用)或经肠施用(其包括,但不限于,经口或直肠施用)。

[0164] 用于制备此类药物组合物的方法是本领域技术人员众所周知的。可以将其他赋形剂添加至所述组合物中,以适合于施用模式和所使用的特定蛋白。

[0165] 用于施用本发明的组合物的有效剂量和治疗方案可以取决于诸如患者的年龄、重量和健康状态以及待治疗的疾病的因素。此类因素在主治医师的权限范围内。

[0166] 根据本发明的一个进一步方面,提供了如本文所定义的药物组合物,其用于治疗或预防疾病。

[0167] 在一个实施方案中,所述疾病选自:癌症、致病性免疫应答和感染。

[0168] 根据本发明的一个进一步方面,提供了如本文所述的药物组合物在制备用于治疗和/或预防疾病的药物中的用途。

[0169] 试剂盒

根据本发明的一个进一步方面,提供了试剂盒,其包含如本文所述的融合蛋白、嵌合抗原受体、多核苷酸、表达载体、细胞和/或药物组合物。

[0170] 方法

根据本发明的一个进一步方面,提供了工程改造免疫调节性细胞(即以表达本文所述的融合蛋白)的方法,其包括:

- (a) 提供免疫调节性细胞;
- (b) 将如本文所定义的多核苷酸或表达载体转导或转染至所述免疫调节性细胞中;和
- (c) 在所述免疫调节性细胞中表达所述多核苷酸或所述表达载体。

[0171] 在一个实施方案中,所述免疫调节性细胞获得自从患者分离的样品(即自体的)。在一个替代实施方案中,所述免疫调节性细胞获得自供体(即同种异体的)。

[0172] 作为一个非限制性实例,所述融合蛋白可以作为由如本文所述的表达载体编码的转基因引入。所述表达载体还可以含有选择标记,所述选择标记提供接受所述载体的细胞的鉴定和/或选择。

[0173] 作为将编码所述融合蛋白的多核苷酸引入细胞的结果,可以在细胞中原位合成多肽。或者,所述多肽可以在细胞外部产生,且然后向其中引入。用于将多核苷酸构建体引入细胞的方法是本领域中已知的,并且包括,作为非限制性实例,其中将多核苷酸构建体整合至细胞的基因组中的稳定转化方法,或其中未将多核苷酸构建体整合至细胞的基因组中的瞬时转化方法,以及病毒介导的方法。所述多核苷酸可以通过例如重组病毒载体(例如逆转录病毒、腺病毒)、脂质体等引入细胞中。例如,瞬时转化方法包括例如显微注射、电穿孔或颗粒轰击。考虑到在细胞中表达,所述多核苷酸可以包含在载体、更具体地质粒或病毒中。

[0174] 如本文所用的术语“转染”、“转化”和“转导”可用于描述表达载体插入靶标细胞中。载体的插入通常被称为细菌细胞的转化和真核细胞的转染,尽管病毒载体的插入也可以被称为转导。技术人员还将意识到通常使用的不同的非病毒转染方法,其包括但不限于使用物理方法(例如电穿孔、细胞挤压、声穿孔、光学转染、原生质体融合、穿刺转染(imperfection)、磁转染、基因枪或颗粒轰击)、化学试剂(例如磷酸钙、高度分支的有机化合物或阳离子聚合物)或阳离子脂质(例如脂质转染)。许多转染方法要求质粒DNA的溶液与细胞接触,然后使其生长并针对标记基因表达进行选择。

[0175] 一旦融合蛋白已经被引入免疫调节性细胞,则所述细胞可以被称为“转导的细胞”。因此,根据本发明的一个进一步方面,提供了通过本文所述的方法获得的细胞。根据本文所述的方法的从转导的细胞获得的细胞系也在本发明的范围内。

[0176] 根据本发明的一个进一步方面,提供了在包含本文定义的免疫调节性细胞的受试者中抑制CAR系统的方法,其包括向所述受试者施用介导泛素靶向蛋白和泛素连接酶之间的结合的化合物。这种化合物将使CAR接近泛素连接酶,使得CAR能够被泛素化。然后,泛素化的CAR可以被蛋白酶体降解。

[0177] 可以通过改变存在的化合物的量或存在所述化合物的时间量来调节通过本文所述的系统的CAR信号传导的水平。因此,在一个实施方案中,可以通过减少施用于受试者的化合物的剂量或降低其施用的频率来增加CAR细胞活化的水平。在一个替代实施方案中,可以通过增加化合物的剂量或施用于受试者的频率来降低CAR细胞活化的水平。

[0178] 不受理论的束缚,较高水平的CAR信号传导可能与疾病进展减少、但毒性活性可能增加相关,而较低水平的CAR信号传导可能与疾病进展增加、但毒性活性可能降低相关。

[0179] 根据本发明的一个进一步方面,提供了治疗和/或预防疾病的方法,其包括向受试者施用如本文所定义的细胞或药物组合物。

[0180] 在一个实施方案中,所述疾病是癌症。在一个进一步实施方案中,所述癌症选自:血液癌、骨髓癌、淋巴癌、淋巴系统癌、膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、宫颈癌、食道癌、肾癌、大肠癌、肺癌、口腔癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、直肠癌、皮肤癌或胃癌。在又一个进一步实施方案中,所述癌症是血液癌,例如选自:B细胞白血病、多发性骨髓瘤(MM)、急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)和非霍奇金氏淋巴瘤。

[0181] 当本文所述的方法用于治疗癌症时,在一个实施方案中,所述方法在受试者中减少肿瘤细胞的数目,减少肿瘤大小和/或根除肿瘤。

[0182] 在一个实施方案中,所述疾病是致病性免疫应答,诸如自身免疫性疾病、变态反应或移植物抗宿主排斥。自身免疫性疾病源于机体针对体内正常存在的物质和组织的异常免疫应答。这可以导致组织的损害或破坏,或器官生长或功能改变。自身免疫性疾病的实例包括,但不限于:1型糖尿病、关节炎(包括青少年、牛皮癣性、反应性和类风湿性关节炎)、牛皮癣、多发性硬化症、血管炎、斑秃、恶性贫血、肾小球肾炎、自身免疫性肝炎、自身免疫性胰腺炎、溃疡性结肠炎、系统性红斑狼疮、格雷夫斯氏病、格林-巴利综合征、肖格伦氏综合征、乳糜泻、克罗恩氏病和韦格纳氏综合征。

[0183] 在一个实施方案中,所述疾病是感染。感染可以由病原体、诸如细菌、病毒、寄生虫、原生动物或真菌引起。在一个进一步实施方案中,所述感染是病毒或细菌感染。

[0184] 在一个实施方案中,所述受试者是哺乳动物。在一个进一步实施方案中,所述哺乳动物选自:人、小鼠、灵长类动物、牛、猪、马、绵羊、猫和狗。在又一个进一步实施方案中,所述受试者是人。

[0185] 治疗和/或预防的方法可以包括以下步骤:

- (a) 提供一种或多种细胞;
- (b) 将如本文所定义的多核苷酸或表达载体转导或转染至所述一种或多种细胞中;
- (c) 在所述一种或多种细胞中表达所述多核苷酸或所述表达载体;和
- (d) 将所述一种或多种细胞施用于患者。

[0186] 在一个实施方案中,所述方法另外包括:(e) 施用介导泛素靶向蛋白和泛素连接酶之间的结合的化合物。这可以用于控制由所述多核苷酸或所述表达载体表达的多肽序列的水平和/或活性。可以在所述多核苷酸或所述表达载体之前或其同时(即,在上文概述的治疗步骤的方法中的步骤(d)之前或期间)将所述化合物施用于所述患者。在如本文所述的CAR的背景下,在所述多肽/表达载体之前/其同时施用所述化合物允许CAR以“无活性”或“低活性”(即OFF)状态施用。然后可以减少药剂的量以活化CAR。以其非活性状态施用CAR允许实现免疫调节性细胞的均匀分布,因此防止活化细胞的局部积累。

[0187] 或者,可以在施用所述多核苷酸或所述表达载体之后(即,在上文概述的治疗步骤的方法中的步骤(d)之后)将所述化合物施用于所述患者,使得以其“活性”(即ON)状态施用CAR。

[0188] 可以将本文所述的细胞或药物组合物施用于已经具有疾病的患者,以减轻、减少或改善与所述疾病相关的至少一种症状和/或减慢、减少或阻断所述疾病的进展(即治疗性地)。本文所述的细胞或药物组合物可以施用于尚未患有所述疾病和/或未显示所述疾病的任何症状的患者,以预防所述疾病的原因(即,预防性地)。所述患者可具有发展所述疾病的倾向,或被认为处于发展所述疾病的风险中。

[0189] 所述化合物可以药物组合物的形式施用。在该实施方案中,所述组合物可以另外包含如本文概述的药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0190] 本发明提供了待与CAR-T细胞疗法一起使用的合适的OFF开关。所述方法可以涉及监测患者中的毒性活性。因此,如果毒性活性的水平变得太高,则所述方法可以涉及施用化合物以使得泛素连接酶能够结合泛素靶向蛋白,且因此使所述多肽序列/CAR泛素化,以减少不良的毒性副作用。毒性活性包括,例如,免疫毒性、胆毒性和呼吸窘迫综合征。

[0191] 类似地,所述方法可以涉及监测疾病的进展,且然后当达到可接受水平的疾病进

展时,施用化合物,所述化合物介导泛素靶向蛋白和泛素连接酶之间的结合,且因此使所述多肽序列/CAR泛素化(例如改善)。确定为“可接受”的疾病进展的特定水平将根据特定环境而不同,并且应在此基础上进行评价。

[0192] 监测所述疾病的进展意指随着时间评价与疾病相关的症状,以确定它们是否正在减少/改善或增加/恶化。

[0193] 根据本发明的一个进一步方面,提供了用于抑制如本文定义的CAR的化合物。

[0194] 可以参考以下非限制性实施例更详细地描述本发明:

实施例1:设计并入cereblon结合基序的嵌合抗原受体作为建立分子关闭-开关的策略

已经设计构建体,以使用人cereblon靶标(诸如Ikaros3、酪蛋白激酶1 α 和GSTP1)中存在的cereblon结合基序来建立嵌合抗原受体关闭开关。此类构建体目的在于:1)通过添加小分子诸如来那度胺来降解,b)通过在化合物不存在的情况下活化NFAT途径来作为嵌合抗原受体而信号传导,和c)通过添加化合物来关闭。

[0195] 已设计实验来测量含有Ikaros3 ZnF cereblon结合区域的GFP蛋白的降解以及在三种蛋白底物Ikaros3 ZNF2、CK1 α 和GSTP1的cereblon结合位点上观察到的结构保守性:

表 3:Cereblon结合位点

底物	UniProt ID	结构参考(PDB ID)
Ikaros3 ZNF2	Q9UKT9	PDB条目2MA7和2I13将用作Ikaros3 ZnF的结构代表:当与Ikaros 3残基131-175 (SEQ ID NO:8)比对时,2MA7具有95%的结构同一性,且当与Ikaros 3残基131-175 (SEQ ID NO:8)比对时,2I13具有53%的结构同一性。2I13将用作Ikaros3的模型,因为该结构由单个实验模型代表。
GSTP1	P15170	5HXB
CK1 α	P48729	5FQD

[0196] 观察在三种底物:Ikaros3、酪蛋白激酶I和GSTP1中的cereblon结合位点的结构保守性。然而,这不存在序列保守性(参见SEQ ID NO:2-4)。当使用主链原子将来自底物的三个发夹基序叠加时,总rmsd为约1.7 \AA :

表 4:成对RMSD矩阵

链	GSTP1	CK1 α	Ikaros3 (来自 2I13)
GSTP1		2.04	1.81
CK1 α	2.04		1.38
Ikaros3 (来自 2I13)	1.81	1.38	

[0197] 在中央甘氨酸残基周围看到最接近的结构重叠,并且当残基距中央甘氨酸更远定位(尤其是在C-末端方向上)时,rmsd开始增加:

表5:个别残基RMSD

GSTP1 vs CK1		GSTP1 vs Ikaros3		CK1 vs Ikaros3	
对	rmsd	对	rmsd	对	rmsd
ILE 35 - VAL 570 :	0.758	LYS 51 - VAL 570 :	0.595	LYS 51 - ILE 35 :	0.348
ASN 36 - ASP 571 :	0.629	CYS 52 - ASP 571 :	0.65	CYS 52 - ASN 36 :	0.386
ILE 37 - LYS 572 :	0.166	PRO 53 - LYS 572 :	0.608	PRO 53 - ILE 37 :	0.556
THR 38 - LYS 573 :	0.22	GLU 54 - LYS 573 :	0.328	GLU 54 - THR 38 :	0.443
ASN 39 - SER 574 :	0.435	CYS 55 - SER 574 :	0.429	CYS 55 - ASN 39 :	0.37
GLY 40 - GLY 575 :	0.208	GLY 56 - GLY 575 :	0.63	GLY 56 - GLY 40 :	0.426
GLU 41 - GLU 576 :	0.245	LYS 57 - GLU 576 :	0.562	LYS 57 - GLU 41 :	0.39
GLU 42 - LYS 577 :	0.477	SER 58 - LYS 577 :	0.431	SER 58 - GLU 42 :	0.051
VAL 43 - SER 578 :	0.733	PHE 59 - SER 578 :	0.974	PHE 59 - VAL 43 :	0.947
ALA 44 - LYS 579 :	4.683	SER 60 - LYS 579 :	4.139	SER 60 - ALA 44 :	2.335
ALA 44 - LYS 579 :	4.683	ASP 61 - THR 580 :	3.15	ASP 61 - VAL 45 :	2.624
LYS 46 - ARG 581 :	5.507	LYS 62 - ARG 581 :	6.03	LYS 62 - LYS 46 :	4.847

[0198] 结构相似性的一种替代代表是拉马钱德兰角,因为它们描述肽主链的构象。当在这些cereblon结合基序中测量拉马钱德兰角时,我们具有(中央甘氨酸以粗体突出):

表6:Cereblon结合发夹基序的拉马钱德兰角

CK1			GSTP1			Ikaros3 (2MA7)		
残基	Psi	Phi	残基	Psi	Phi	残基	Psi	Phi
ILE 35	129.7	-125.5	VAL 570	132.4	-149.2	LYS 51	151.5	-102.8
ASN 36	106.9	-70.6	ASP 571	141	-82.1	CYS 52	127.8	-83.5
ILE 37	-14.2	-60.3	LYS 572	-42.5	-79.4	PRO 53	-7.5	-66
THR 38	-18.3	-89.2	LYS 573	-47.1	-52.6	GLU 54	-52.5	-111.7
ASN 39	-3	-152	SER 574	-65.9	-90.8	CYS 55	-16.9	-105.2
GLY 40	-4.3	91.8	GLY 575	-4.8	123.6	GLY 56	-4.9	91.2
GLU 41	131.7	-56.5	GLU 576	104.1	-75.1	LYS 57	127.9	-60.6
GLU 42	133.3	-96.6	LYS 577	169	-52.5	SER 58	148.5	-97.5
VAL 43	169.4	-136.4	SER 578	168.1	-108.3	PHE 59	155.5	-131.2
ALA 44	139.7	-106.3	LYS 579	-59.1	-91.6	SER 60	-32.1	-73.3
VAL 45	112	-127.1	THR 580	169.3	-86.4	ASP 61	161.1	-132.6
LYS 46	125.4	-87.9	ARG 581	156.7	-64.6	LYS 62	-35.3	-69

[0199] 可以通过计算角差的模数来便于差异的直接比较,因此,如果差异为0,则构象相同,并且正值越高,构象的总体差异越大。代表为角差(角1 - 角2)的模数的拉马钱德兰角差(Δ)的成对比较显示于表7中:

表7:拉马钱德兰角之间的比较

残基	CK1 vs GSTP1		CK1 vs Ikaros		GSTP1 vs Ikaros	
	Δ Psi	Δ Phi	Δ Psi	Δ Phi	Δ Psi	Δ Phi
-5	2.7	23.7	21.8	22.7	19.1	46.4
-4	34.1	11.5	20.9	12.9	13.2	1.4
-3	28.3	19.1	6.7	5.7	35	13.4
-2	28.8	36.6	34.2	22.5	5.4	59.1
-1	62.9	61.2	13.9	46.8	49	14.4
1 (Gly)	0.5	31.8	0.6	0.6	0.1	32.4
2	27.6	18.6	3.8	4.1	23.8	14.5
3	35.7	44.1	15.2	0.9	20.5	45
4	1.3	28.1	13.9	5.2	12.6	22.9
5	198.8	14.7	171.8	33	27	18.3
6	57.3	40.7	49.1	5.5	8.2	46.2
7	31.3	23.3	160.7	18.9	192	4.4

[0200] 残基1是中央甘氨酸残基。在该比较中,CK1和Ikaros3在残基1至4周围的构象相似性是明显的,其中Psi角差为 $< 20^\circ$,且Phi角差为 $< 5^\circ$ 。CK1和Ikaros3两者与GSTP1在该区域

中的比较显示相同的构象趋势,但角的变异较大,其中Psi变异为< 35°,且Phi变异为< 45°。在所有情况下,结构差异在位置5周围变得明显,并且这与rmsd差异一致。

[0201] 基于可得的数据和结构分析,提出Ikaros3的第2个锌指应提供小蛋白结构域(约30个氨基酸)的形式的“最小”降解决定子,可将其添加至目标蛋白用于降解,并且在免疫调节性酰亚胺药物(IMiD)存在的情况下,将诱导降解。因此,可以使用本领域中已知的方法将该降解决定子/泛素靶向蛋白并入CAR架构中,以产生具有“关闭开关”的CAR构建体。

[0202] 实施例2. HeLa细胞中的邻近诱导的融合至Ikaros 1衍生的降解决定子序列的绿色荧光蛋白(GFP)蛋白的降解

该实施例举例说明在来那度胺存在的情况下GFP的选择性降解。GFP构建体由与长度为N = 1、3、5的(甘氨酸-丝氨酸)x N接头、随后的衍生自人Ikaros 1的降解决定子序列同框的GFP编码序列构成。用在HeLa细胞中转染的构建体进行实验,并且降解,随后进行流式细胞术。

[0203] 材料和方法

构建体的生成:将GFP构建体克隆至pTT5载体(图2)中,其与长度为N = 1、3、5的(甘氨酸-丝氨酸)x N接头和含有残基141至168 (SEQ ID NO: 27)的Ikaros 1 (IKFZ1, Uniprot Q13422)序列融合。下面给出构建体的完整序列详情。

[0204] 构建体1 (SEQ ID NO 30)

MSKGEELFTGVVPILVLDGDVNNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTGVQCFSRYP
DHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHN
VYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQALSKDNEKRDHMVLLEF
VTAAGITLGMDELYKGSGERPFQCNQCGASFTQKGNILLRHIKLHS

说明:

GFP

接头4 (SEQ ID NO 26)

Ikaros 1 残基 141-168 (Uniprot Q13422) (SEQ ID NO 27)

构建体1 DNA序列 (SEQ ID NO 31)

ATGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCTGCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGG
 CCACAAGTTAGCGTGCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTCATCT
 GCACCACCGCAAGCTGCCGTGCCCTGGCCCACCCCTCGTGUCCACCCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTC
 GCCGCTACCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCAAGTCCGCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGC
 GCACCATCTCTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTGG
 TGAACCGCATCGAGCTGAAGGCATCGACTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTAC
 AACTACAACAGCCACAACGTCTATCATGGCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATC
 CGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAAGCAGAACACCCCCATGGCGACGGC
 CCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAACGCG
 GATCACATGGCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGATCACTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGG
 TTCAGGAGAACGGCCCTTCCAGTGCAATCAGTGCAGGCCTCATTCAACCAAGGGCAACCTGCTCCGGCA
 CATCAAGCTGCATTCC

构建体2 (SEQ ID NO 32)

MSKGEELFTGVVPILVLDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFSRYP
DHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGLTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHN
VYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDNEKRDHMVLEF
VTAAGITLGMDELYKGSSGSGERPFQCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHS

说明：

GFP

接头 1 (SEQ ID NO 23)

Ikaros 1 残基 141-168 (Uniprot Q13422) (SEQ ID NO 27)

构建体2 DNA序列 (SEQ ID NO 33)

ATGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCAGCTGGACGGCGACGTAAACGG
 CCACAAGTTAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTCATCT
 GCACCACCGCAAGCTGCCGTGCCCTGGCCCACCCCTCGTGACCACCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTC
 GCCGCTACCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCAAGTCCGCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGC
 GCACCATCTCTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCCGCCGAGGTGAAGTTGAGGGCGACACCCCTGG
 TGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTAC
 AACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATC
 CGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATGGCGACGGC
 CCCGTGCTGCTGCCGACAACCAACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAACGCG
 GATCACATGGCCTGCTGGAGTTGACCGCCGCCGGATCACTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGG
 TTCAGGTTCAAGGTTCAAGGAGAACGGCCCTTCAGTGAATCAGTGCAGGGCCTCATTCAACCAGAAGGGCAA
 CCTGCTCCGGCACATCAAGCTGCATTCC

构建体3 (SEQ ID NO 34)

MSKGEELFTGVVPILVLDGDVNGHKFVSVGEGEGLDATYKLTLKFIC
TGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFSRYP
DHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHN
VYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQALSKDNEKRDHMVLLEF
VTAAGITLGMDELYKGSSGSGSGSERPFQCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHS

说明：

GFP

接头 2 (SEQ ID NO 24)

Ikaros 1 残基 141-168 (Uniprot Q13422) (SEQ ID NO 27)

构建体3 DNA序列 (SEQ ID NO 35)

ATGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCAGCTGGACGGCGACGTAAACGG
 CCACAAGTTAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTCATCT
 GCACCACCGCAAGCTGCCGTGCCCTGGCCCACCCCTCGTGACCACCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTC
 GCCGCTACCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCAAGTCCGCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGC
 GCACCATCTCTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCCGCCGAGGTGAAGTTGAGGGCGACACCCCTGG
 TGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTAC

AACTACAACAGCCACAACGTCTATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATC
CGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTCAGCTGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGCGACGGC
CCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCACGAGAACGCG
GATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGATCACTCTGGCATGGACGAGCTGTACAAGGG
TTCAGGTTCAGGTTCAGGTTCAGGAGAACGGCCCTCCAGTGCAATCAGTGCAGGGCCTCATTCAC
CCAGAAGGGCAACCTGCTCCGGCACATCAAGCTGCATTCC

[0205] 用构建体1、2和3转染HeLa细胞以及来那度胺处理：将在补充有10%热灭活的胎牛血清(Gibco)和50U/mL青霉素+50μg/mL链霉素(Gibco)的EMEM(EBSS)+2mM谷氨酰胺+1%非必需氨基酸(NEAA)+10%胎牛血清(FBS)中生长的HeLa Ohio细胞使用Lipofectamine 2000试剂(Thermofisher)用0.5μg构建体质粒转染。在转染之后，将细胞在37℃下在CO₂孵育箱中孵育24小时。将来那度胺在100% DMSO中重构至10 mM，并在100% DMSO中稀释至1 mM、0.5 mM、0.1 mM和0.05 mM。将来那度胺添加至细胞培养基中至10 μM、1 μM、0.5 μM、0.1 μM和0.01 μM的最终浓度，并且对于无化合物对照，添加相应量的DMSO。在所有条件下的最终DMSO浓度均为0.1%。在来那度胺处理之后，将细胞在37℃、5% CO₂下孵育24小时。用iQue(Intellicyt)通过流式细胞术测量GFP表达，并使用ForeCyt(Intellicyt)分析数据。

[0206] 结果

通过测量GFP阳性细胞的中值荧光强度(MFI)来评价来那度胺诱导的构建体1、2和3中编码的GFP的降解。来那度胺对GFP的表达水平的影响展示于图3。

[0207] 实施例3：Jurkat细胞中的邻近诱导的转染的嵌合抗原受体(CAR)构建体的降解

该实施例举例说明在来那度胺存在的情况下CAR构建体的选择性降解。通过在Jurkat细胞中转染CAR构建体进行实验。

[0208] 材料和方法

构建体的生成：生成两种构建体以评估来那度胺对受体(CAR)的表达水平的调节的影响。构建体4是具有抗原识别scFv的常规CAR，所述抗原识别scFv结合B-细胞成熟抗原BCMA(Uniprot Q02223)并被其活化。scFv随后为人CD8α铰链和跨膜结构域、人4-1BB共刺激结构域和人CD3ζ细胞内结构域(图1)。构建体5含有构建体4的相同元件，加上C-末端添加人Ikaros 3蛋白(Uniprot Q9UKT9)的两个部分。第一部分包含残基131-175(SEQ ID NO:27)，且随后为含有残基231-249(SEQ ID NO:28)的部分。下面给出构建体的完整序列详情。

[0209] 构建体4 (SEQ ID NO 36)

MALPV TALLPLA LL HAARP QVQL VQSGAEVKPGSSVK SCKGSGYTF NYWMHW VRQAPGQGLEWIGATY
RGHSDTYYNQKFKGRATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRGAIYDGYDVLDNW GQGTLVTVSSGGGG
SGGGGSGGGSGGGS DIQM TQSPSSLSASVGDRV TITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLI YYTSNLHSG
VPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQYRKLPWTFGQGT KLEIKRFV PVFLPAKPTTPAPR PPTPAPT
ASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLS LVI TLYCNHRNKRGRKLLYIFKQPFMRP
VQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGONOLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKP
RRKNPQEGLYNE LQKD KMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDAL HMQA LPPR

说明：

CD8 α (Uniprot P01732) 信号肽 (SEQ ID NO 22)

抗 BCMA 单链 Fv (SEQ ID NO 29)

CD8 α (Uniprot P01732) 铰链和跨膜区 (SEQ ID NO 19)

4-1BB 共刺激结构域 (SEQ ID NO 21)

CD3Z (Uniprot P20963) 结构域 (SEQ ID NO 20)

构建体 4 DNA 序列 (SEQ ID NO 37)

ATGGCCCTGCCGTGACCGCCCTCCTGCTGCCCTGGCCCTGCTGCACGCCAGGGCCCAGGTCCAG
 CTGGTGCAGAGCGGGGCCGAGGTGAAGAAGCCCGCAGCTCGTAAAGTGAGCTGAAGGCAGCGCTA
 CACCTTCACCAACTACTGGATGCACTGGGTGAGGCAGGGCCCCGGACAGGGACTGGAGTGGATCGGCCA
 CCTACAGGGGCCACAGCGACACCTACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAGGGCACCCCTGACCGCCGACACTA
 GCACCAGCACCGCCTACATGGAAC TGAGCTCACTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGACTACTGCACCAGGG
 GCGCCATCTACGACGGCTACGACGTGCTGGACA ACTGGGCCAGGGCACCCCTGGTACAGTGAGCTCTGGC
 GGCGCGGGAGCGCGCGCGGAAGCGCGCGGAGGAAGCGCGCGCGGAAGCGATATCCAGATGA
 CCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGCGACAGGGTACCATCACCTGAGCGCAAGCCAGGAC
 ATCAGCAACTACCTGAAC TGGTACCA CGCAGAAGCCCGAAGGCCCTAAGTGCTGATCTACTACACCTCT
 AACCTGCACAGCGCGTGC CCAGCAGGTTCTGGCAGCGCTCCGGCACCGACTTCACTTGACCATCAGC
 AGCCTCCAGCCCCAGGAGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGGAAGCTCCCTGGACCTCGGCCAG
 GGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGCTCGTGCCTGGACTTCCCTCCCCGAAAACCCACCACCTCCGCCCC
 AGACCCCCCACTCCGCCCAACAATTGCCAGCCAGCCCCCTGAGCCTGAGGCCGAGGCTTAGGCCCCG
 GCTGGCGCGCCGTCCACACCAGGGCCTGGACTTCGCTGCGACATCTATATCTGGCCCCCTGGCCGG
 AACCTGCGCGTGTGCTGCTGAGCCTGGTACCTGACTGCAACCACAGGAACAAGAGGGGAGGA
 AGAAGCTCCTGTACATCTCAAGCAGCCCTCATGAGGCCGTGCAGACCACCCAGGAGGAGGACGGCTGCA
 GCTGCAGGTTCCAGAGGAAGAGGAGGGCGGTGCGACTGAGAGTGAAATTAGCAGGAGCGCCGACGCC
 CCCGCCTATCAGCAAGGCCAGAACCGAGCTGTACAACGAGCTAACCTGGCAGGAGGAGGAGTACGACGT
 GCTGGACAAGCGGAGGGCAGAGATCCCGAGATGGCCGAGGAGTACGACCTGGCAGGAGGAGGAGTACGACGT
 CTGTACAACGAGCTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGAGTACGACCTGGCAGGAGGAGGAGTACGACGT
 GAGGGCAAGGCCACGACGCCGTACAGGCCCTGAGCACCACCAAGGACACCTACGACGCCCTGC
 ACATGCAGGCCCTGCCCTGAGG

构建体5 (SEQ ID NO 38)

MALPVTLIPLALLHAARPQVQLVQSGAEVKPGSSVKVSKGSYFTNYWMHWVRQAPQGLEWIGATY
RGHSDTYYNQKFGRATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRGAIFYDGYDVLDNWGQGTLVTSSGGGG
SGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLASVGDRVITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSNLHSG
VPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYRKLPWTFGQGTKLEIKRFVPVFLPAKPTTPAPRPPPTPAPTI
ASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCNHRNKRGRKKLLYIFKQPFMRP
VQTQEEDGCSRFPEEEggCELGGGSRVKESRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPE
MGKGPRRKNPQEGLYNELODKMAEAYSEIGMKGERRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGGGG
SNVLMVHKRSHTGERPFQCNQCGASFTQKGNNLRHIKLHTGEKPKDPGDTASAEARHIKAEMG

说明：

CD8 α (Uniprot P01732) 信号肽 (SEQ ID NO 22)

抗 BCMA 单链 Fv (SEQ ID NO 29)

CD8 α (Uniprot P01732) 铰链和跨膜区 (SEQ ID NO 19)

4-1BB 共刺激结构域 (SEQ ID NO 21)

CD3 ζ (Uniprot P20963) 结构域 (SEQ ID NO 20)

接头 3 (SEQ ID NO 25)

Ikaros 3 残基 131-175 (Uniprot Q9UKT9) (SEQ ID NO 8)

Ikaros 3 残基 231-249 (Uniprot Q9UKT9) (SEQ ID NO 28)

构建体 5 DNA 序列 (SEQ ID NO 39)

```

ATGGCTCTCCTGTAACCGCACTCTGCTTCCTCTTGCTCTGCTGCTCATGCTGCTAGACCTCAGGTGCAGT
TAGTGCAATCTGGAGCTGAGGTGAAGAACCTGGCTTCCGTGAAAGTGAGCTGTAAGGGAAGCGGCTAC
ACCTTTACCAACTACTGGATGCATTGGGTGAGACAGGCCCTGGACAGGGATTAGAGTGGATTGGAGCCACA
TATAGAGGACACAGCGATACTACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAGGGCACCCCTACAGCCGATACAAGC
ACATCTACCGCCTACATGGAACTGTCTCTGAGAAGCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCACAAGAGGA
GCCATCTACGACGGCTATGATGTTCTGGACAATTGGGGACAGGGCACACTGGTGACAGTGCTTCTGGTGGT
GGCGGGTCCGGTGGAGGCGGATCTGGCGTGGGGCTCCGGAGGAGGAGGTTCAGATATTCAAATGACAC
AGAGCCCAAGCAGCCTGCTGCTGCTTCTGTGGCGATAGAGTGACCATCACCTGTTCTGCTTCAGGATATCA
GCAACTACCTGAACTGGTACCGAGCAGAAGCCCGCAAAGCCCCTAAACTGCTGATCTACTACACCAGCAATCT
GCACTCTGGAGTTCCCTAGCAGATTAGCGGAAGCGGCTCTGGCACCGATTTACACTGACCATCTCTTCTCT
GCAGCCTGAGGATTTGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACCGGAAATTGCCTGGACCTTGGACAGGGAAC
CAAGCTGGAGATCAAGAGGTTGTGCCGTGTTCTGCCTGCTAAGCCTACAACAACACCTGCCCTAGACC
ACCTACACCTGCTCCTACAATTGCCTCTCAGCCTCTTCTGAGACCTGAAGCTTGAGACCTGCTGCTGG
GGAGCTGTGCATAAGAGGACTGGATTTGCCTGCGATATCTACATTGGGCTCCACTGCCGGCACATGT

```

GGAGTTCTCTGCTCTGGTATCACCCGTACTGTAATCACAGGAACAAGCGGGGCCGGAAAAAGCTG
 CTGTACATCTCAAGCAGCCCTCATGAGACCAGTTAGACAACACAGGAGGAGGACGGCTGTAGCTGCAGA
 TTCCTGAGGAAGAGGAAGGAGGATGTGAATTAGGTGGTGGCGGAGCAGGGTGAAGTTCTCACGCAGCGC
 AGATGCTCCTGCCTATCAGCAAGGCCAGAACATCAGCTGTACAACGAGCTGAATCTGGCAGAAGAGAGGAGTA
 CGATGTGCTGGACAAGAGAAGGGCAGAGATCCTGAAATGGGAGGAAAGCCCAGAAGGAAGAACCTCAAG
 AAGGCCTGTACAATGAGCTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTATAGCGAGATTGGCATGAAAGGAGAG
 AGGAGAAGAGGAAAGGCCATGATGGCCTGTATCAGGCCGTCTACAGCCACCAAGGATAACATATGATGCC
 CTGCATATGCAGGCTTACCCCCTAGAGGAGGAGGCCATCACGTGCTGATGGTCATAAAAGAACCCAC
 ACAGGAGAGAGACCATTCCAGTGCAACCAGTGTGGAGCCAGCTTACCCAGAAGGGAAATCTGCTGAGACAC
 ATCAAAC TGCAACAGGCGAGAAGGCCCTCAAGGACCCCTGGCGATACAGCCTCTGCTGAAGCTAGACACATT
 AAAGCCGAAATGGGC

[0210] 构建体在Jurkat细胞中的表达:将至 2×10^5 个细胞/ml的密度的NFAT-luc2 Jurkat细胞(Promega)在没有L-谷氨酰胺且具有酚红(Gibco)、10% (v/v)热灭活的胎牛血清(FBS)(Gibco)、1% (v/v)最小基本培养基非必需氨基酸(MEM NEAA)(ThermoFisher)、1% (v/v)丙酮酸钠(Sigma)、1% (v/v) L-谷氨酰胺(Gibco)的RPMI培养基1640 (1x)中培养。将20μg质粒DNA与 8×10^6 个NFAT-luc2 Jurkat细胞混合,并将细胞使用4D-Nucleofector (Lonza)用细胞系SE Nucleofector试剂盒(Lonza)通过遵循制造商说明用程序CL-120进行转染。将细胞在37℃与5% CO₂下孵育48h。将100% DMSO中的10μM的储备浓度的来那度胺在Jurkat培养基中稀释,以达到250μM的储备浓度。使用250μM储备物,将NFAT-luc2 Jurkat细胞在10μM或0μM(在培养基中的DMSO)的最终化合物浓度下在37℃与5% CO₂下孵育24小时。在所有孔中,最终DMSO浓度为0.1%。然后将细胞用AlexaFluor 647缀合的BCMA-Fc染色以标记抗BCMA CAR。使用Cytoflex S (Beckman Coulter)进行测量,并使用FlowJo分析数据。

[0211] 结果

图5展示来那度胺处理对Jurkat细胞表面上的CAR分子的表达水平的影响。不含任何降解决定子序列的构建体4不受所述化合物的影响,而通过添加10μM来那度胺则降低构建体5表达。

[0212] 实施例4. 原代T-细胞中的邻近诱导的嵌合抗原受体(CAR)构建体的降解。来那度胺对细胞因子释放的影响。

[0213] 该实施例证实,含有降解决定子序列的CAR在原代T-细胞中有功能,并且通过来那度胺的添加而降解。

[0214] 材料和方法

对于慢病毒载体产生,将 3.0×10^7 个LentiX 293T (HEK 293T) 细胞接种在20 mL DMEM (Gibco) 中,并在37℃与5% CO₂下孵育过夜。LentiX细胞通过混合例如21 μg含有构建体的转移载体、3.75 μg ViraSafe pRSV-Rev、5.25 μg ViraSafe pCMV-VSVG、7.5 μg ViraSafe pCgp V- (gag-pol)、75 μg jetPRIME (Polyplus) 和1500 μg jetPRIME缓冲液(Polyplus)而转染。2天之后,将上清液澄清,并将病毒浓缩,并通过在50 ml Oak Ridge PPCO超速离心

管(ThermoFisher)中使用Ultrapure蔗糖(ThermoFisher)在20%蔗糖垫上超速离心来纯化。使用上述方法针对构建体4和构建体5产生慢病毒载体。

[0215] 通过在含有15mL Histopaque-1077 (Sigma) 的Accuspin管(Sigma) 中通过密度梯度离心且遵循制造商的说明,从三个健康人供体的新鲜血液分离外周血单核细胞(PBMC)。将细胞以 1×10^6 个细胞/mL重悬浮于含有100单位/mL IL-2 (Sigma) 和TransAct珠粒(Miltenyi Biotec) 的TEXMacs培养基(Miltenyi Biotec) 中,并在37°C与5% CO₂下孵育48h。

[0216] 然后用编码构建体4和构建体5的慢病毒载体转导来自三个供体的T-细胞。制备转导反应以达到5的MOI。将T-细胞在具有100单位/mL IL-2的TEXMacs培养基中培养,每3天添加新鲜培养基。将表达高水平的BCMA抗原的ARH-77-10B5细胞在加上1 mg/mL G418 (Gibco) 的Jurkat培养基(实施例3中所述) 中在37°C与5% CO₂下培养。

[0217] 转导后7天,将100% DMSO中的10mM的储备浓度的来那度胺在TEXMacs培养基中稀释,以达到250μM的储备浓度,并且将 5×10^4 个T-细胞以10μM或0μM (在培养基中的DMSO) 的最终化合物浓度在37°C与5% CO₂下孵育16h。然后将T-细胞与ARH-77-10B5细胞(BCMA阳性细胞)或培养基在含有10μM或0μM (在培养基中的DMSO) 的TEXMacs培养基中在37°C与5% CO₂下共培养(每孔 5×10^5 个细胞,1:1效应子:靶标比率)24h。在所有孔中,最终DMSO浓度为0.1%。沉淀细胞(1200 rpm, 5 min)并收集上清液。使用MSD V-重促炎组1人试剂盒(MSD) 和MSD Sector Imager (MSD) 分析上清液的细胞因子水平。

[0218] 结果

来那度胺处理对转导的原代T-细胞中的构建体4和5的表达水平的影响显示于图6中。抗原呈递之后,分析T-细胞上清液的TNFα、IL2和IFN-γ水平。当与无来那度胺处理相比时,对于构建体4(无降解决定子结构域的CAR构建体)的上清液显示细胞因子浓度水平升高,与发表的数据一致(Otahal P等人 2016 Oncoimmunology Vol. 5, No. 4),图7。对于用构建体5(CAR加上降解决定子元件)转导的细胞,也观察到这种效果,但当与对照CAR(构建体4)相比时,程度降低,图7。

[0219] 将理解的是,本文所述的实施方案可以应用于本发明的所有方面。此外,在本说明书中引用的所有出版物,包括但不限于专利和专利申请,都如同完全阐述的一样通过引用并入。

序列

结构	序列	SEQ ID NO.
结构结合基序 共有序列	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ GX ₇ X ₈ X ₉ X ₁₀	1
Ikaros 3 (ZFN2) 结合环	QCGASFT	2
GSPT1 结合环	VDKKSGEKSK	3
CK1 <i>a</i> 结合环	INITNGEEVA	4
ZFP91 结合环	LQCEICGFTCR	5
Ikaros3 (141-173)	TGERPFCNCQCGASFTQKGNLLRHILHSTGEKP	6
Ikaros3 (141-173) 加上Ub标签	TGERPFCNCQCGASFTQKGNLLRHILHSTGEKPSTDGP DTASAEARHIKAEMG	7
Ikaros3 (131-175) (Uniprot Q9UKT9)	NVLMVHKRSHTGERPFCNCQCGASFTQKGNLLRHILH TGEKPK	8
Ikaros3 (131-175) 加上 Ub标签(Ikaros 3 残基 231-249 (Uniprot Q9UKT9))	NVLMVHKRSHTGERPFCNCQCGASFTQKGNLLRHILH TGEKPKDPGDTASAEARHIKAEMG	9
Ikaros3 (117-249)	KMNCDVCGLSCISFNVLVMVHKRSHTGERPFCNCQCGAS FTQKGNLLRHILHSTGEKPKCHLCNYACQRRAALTGHL RTHSVEKPYKCEFCGRSYKQRSSLEEHKERCRTFLQSTD PGDTASAEARHIKAEMG	10
GSTP1 (388-499)	HSGRTFDAQIVIEHKSIICPGYNAVLIHTCIEEVEITALI CLVDKKSGEKSCTRPRFVKQDQVCIARLRTAGTICLETF KDPPQMGRFTLRDEGKTIAGKVVLVPEKD	11
GSTP1 (388-499) F471S/M474S	HSGRTFDAQIVIEHKSIICPGYNAVLIHTCIEEVEITALI CLVDKKSGEKSCTRPRFVKQDQVCIARLRTAGTICLETF KDSPQSGRFTLRDEGKTIAGKVVLVPEKD	12
CK1 <i>a</i> (8-94)	KAEIFVGGKYKLVRKIGSGSFGDIYLAINITNGEEAVKLE SQKARHPQLLYESKLYKILQGGVGIPHIRWYGQEKDYNV LVMDLLG	13
CK1 <i>a</i> (8-94) L63H/L67Q/I73Q	KAEIFVGGKYKLVRKIGSGSFGDIYLAINITNGEEAVKLE SQKARHPQLLYESKHYKIQQQGGVGQPHIRWYGQEKDYNV NVLVMDLLG	14
扩展的结构结合基序 共有序列	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ GX ₇ X ₈ X ₉ X ₁₀ X ₁₁ X ₁₂	15
泛素化标签	STDPGDTASAEARHIKAEMG	16
CD8 <i>a</i> 跨膜序列	TRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCNHRN	17
CD8 <i>a</i> 铰链序列 (Uniprot P01732)	FVPVFLPAKPTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP AAGGA VH	18
CD8 <i>a</i> 铰链和 跨膜序列 (Uniprot P01732)	FVPVFLPAKPTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP AAGGA VH TRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITL YCNHRN	19
CD3 <i>ζ</i> 结构域 (Uniprot P20963)	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	20
4-1BB 共刺激结构域	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEEDGCSCRFPEEE EGG CEL	21
CD8 <i>a</i> 信号序列 (Uniprot P01732)	MALPVTALLPLALLHAARP	22
接头1	GSGSGS	23

接头2	GSGSGSGSGS	24
接头3	GGGGS	25
接头4	GS	26
Ikaros 1 残基 141-168 (Uniprot Q13422)	GERPFQCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHS	27
Ikaros 3 残基 231-249 (Uniprot Q9UKT9)	DPGDTASAEARHIKAEMG	28
抗BCMA单链Fv氨基酸序列 (Uniprot Q02223)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKSGSYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWIGATYRGHSDTYYNQKFGRATLTADTS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRGAIYDGYDVLDNWGQ GTLVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGGSDIQMTQSPS SLSASVGDRVITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLI YYTSNLHSGVPFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQYRKLPWTFGQGTLEIKR	29
构建体1氨基酸序列	MSKGEELFTGVVPILVLEDGDVNGHKFSVSGEGEGE DATY GKLTGFCTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEG DTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNNSHNVYIMAD KQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPV LLPDNHYLSTQSALKDPNEKRDMVLLEFVTAAGITLG MDELYKGSGSERPFQCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHS	30
构建体1 DNA序列	ATGAGCAAGGGCGAGGA GAGCTGTT CACCGGGGTGGTGC CCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCA CAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCC ACCTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTCATCTGCACCAAC CGGCAAGCTGCCGTGCCCTGGCCCACCCCTCGTGA ACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACC CCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCC ATGCCCGAAGGCTACGTC CAGGAGCGCACCATTTCT TCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCCGCGCCGAGGT GAAGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAG CTGAAGGGCATTGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC TGGGGCACAAGCTGGAGTACA ACTACAACAGCCACAA CGTCTATATCATGGCGACAAGCAGAAGAACGGCATT AAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAAACATCGAGGACG GCAGCGTGCAGCTCGCCGACCAACTACCAGCAGAACAC CCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAAC CACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCC CAACGAGAACGCGGATCACATGGTCTGCTGGAGTT GTGACCGCCGCCGGATCACTCTCGGCATGGACGAGC TGACAAGGGTTCAAGGAGAACGGCCCTTCAAGTGCAA TCAGTGCAGGCCCTATTCAACCCAGAACGGCAACCTG CTCCGGCACATCAAGCTGCATTCC	31
构建体2氨基酸序列	MSKGEELFTGVVPILVLEDGDVNGHKFSVSGEGEGE DATY GKLTGFCTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEG DTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNNSHNVYIMAD KQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPV LLPDNHYLSTQSALKDPNEKRDMVLLEFVTAAGITLG MDELYKGSGSGSERPFQCNQCGASFTQKGNLLRHIKL HS	32
构建体2 DNA序列	ATGAGCAAGGGCGAGGA GAGCTGTT CACCGGGGTGGTGC CCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCA CAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCC	33

	ACCTACGGCAAGCTGACCTGAAAGTTCATCTGCACCAC CGGCAAGCTGCCGTGCCCTGGCCCACCCCTGTGACC ACCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGTACCC CCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCC ATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCT TCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGT GAAGTTCGAGGGCGACACCTGGTGAACCGCATCGAG CTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC TGGGGCACAAGCTGGAGTACAACATACAACAGCCACAA CGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATC AAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACG GCAGCGTGCAGCTCGCCGACCAACTACCAGCAGAACAC CCCCATCGGCACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAAC CACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCC CAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTC GTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGC TGTACAAGGGTTCAAGGTTCAAGGTTCAAGGTTCAAGGTT AGGAGAACGGCCCTTCAAGTGCATCAAGTGCAGGGCC TCATTCAACCCAGAAGGGCAACCTGCTCCGGCACATCAA GCTGCATTCC	
构建体3氨基酸序列	MSKGEELFTGVVPILVLDGDVNNGHKFSVSGEGEGDATY GKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFSRYPDHM KQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEG DTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYIMAD KQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPV LLPDNHYLSTQSALKDPNEKRDHMVLLFVTAAGITLG MDELYKGSGSGSGSGSGSERPFQCNQCGASFTQKGNLLR HIKLHS	34
构建体3 DNA序列	ATGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGTGC CCATCTGGTCAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCA CAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCC ACCTACGGCAAGCTGACCTGAAAGTTCATCTGCACCAC CGGCAAGCTGCCGTGCCCTGGCCCACCCCTGTGACC ACCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGTACCC CCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCC ATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCT TCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGT GAAGTTCGAGGGCGACACCTGGTGAACCGCATCGAG CTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC TGGGGCACAAGCTGGAGTACAACATACAACAGCCACAA CGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATC AAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACG GCAGCGTGCAGCTCGCCGACCAACTACCAGCAGAACAC CCCCATCGGCACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAAC CACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCC CAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTC GTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGC TGTACAAGGGTTCAAGGTTCAAGGTTCAAGGTTCAAGGTT AGGAGAACGGCCCTTCAAGTGCATCAAGTGCAGGGCC TCATTCAACCCAGAAGGGCAACCTGCTCCGGCACATCAA GCTGCATTCC	35
构建体4氨基酸序列	MALPV TALLLPL ALLLHAARPQVQLVQSGAEVKPGSSV KVSKKGSGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWIGATYRG HSDTYYNQKFKGRATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTV YYCTRGAIYDGYDVLDNWQGQGTLTVSSGGGGGGGG SGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSAVGDRVTITCSASQ DISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSNLHSGVPSRFSGSG	36

	SGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYRKLPWTFQGQTKLE IKRFPVFLPAKPTTPAPRPPPTPAPTIASQPLSLRPEACR PAAGGAHVTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLY CNHRNKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEEggcelrvkfsrsadapayqqgqnqlynelnlgrr EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRNPNQEGLYNELQDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR	
构建体4 DNA序列	ATGCCCTGCCGTGACCGCCCTCCTGCTGCCCTGG CCCTGCTGCTGCACGCCGCCAGGCCAGGTCCAGCT GGTGAGAGCGGGGCCAGGTGAAGAAGCCGGCAG CTCCGTGAAAGTGAGCTGCAAGGGCAGCGGCTACACC TTCACCAACTACTGGATGCACTGGGTGAGGCAGGCC CCGGACAGGGACTGGAGTGGATCGGCACCTACAG GGGCACAGCGACACCTACTACAACCAGAAGTTCAAG GGCAGGGCACCCCTGACCGCCGACACTAGCACCAGCA CCGCCTACATGGAACGTGAGCTCACTGCGGAGCGAGGA CACCGCCGTGTACTACTGCAACCAGGGCGCCATCTAC GACGGCTACGACGTGCTGGACAACCTGGGCCAGGGCA CCCTGGTACAGTGAGCTCTGGCGGCGGGAGCG GCGCGGGCGGAAGCGGGCGGAGGAAGCGGGCGCG GCGGAAGCGATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAG CCTGAGCGCCAGCGTGGCGACAGGGTGACCATCACC TGCAGCGCAAGCCAGGACATCAGCAACTACCTGAAC GGTACCAAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCTAACGCTGCT GATCTACTACACCTCTAACCTGCAACAGCGCGTGC GCAGGGTTCTGGCAGCGCTCCGGCACCGACTTCAC TCTGACCATCAGCAGCCTCCAGCCGAGGACTTC CCTACTACTGCCAGCAGTACAGGAAGCTCCC TTCCGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCG TGCCCGTGTCTCCCCGAAAACCAACCACCACTCCC GCCCGCAGACCCCCCACTCCGCCCCAACAAATTGCCAG CCAGCCCCCTGAGCCTGAGGCCCGAGGCTTGTAGGCC GCCGCTGGCGGCCGTCACACCAGGGCGCTGGACT TCGCCTGCGACATCTATATCTGGGCCCTGGCG AACCTCGGGCGTGTGCTGCTGAGCCTGGTATCACC CTGACTGCAACCACAGGAACAAGAGGGCGAGGAAGA AGCTCCTGTACATCTCAAGCAGCCCTCATGAGGCC GTGCAGACCAACCCAGGAGGGAGGACGGCTGAGCTGCA GGTCCCAGAGGAAGAGGGAGGGCGGGTGC GAGTGAATTAGCAGGAGCGCCAGCAGCTG TCAGCAAGGCCAGAACAGCTGTACAACGAGCTAAC CTGGCAGGAGGGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAG CGGAGGGCAGAGATCCCGAGATGGCGGCCAGGCC GGAGGAAGAATCCCCAGGAGGGCGCTGTACAAGGAGCT GCAGAAGGACAAGATGGCGAGGCCCTACAGCGAGATC GGCATGAAGGGGGAGAGGGAGGGAGGGCAAGGCC GACGGCCTGTACCAAGGGCCTGAGCACC ACACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCC AGG	37
构建体5氨基酸序列	MALPVTALLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKPGSSV KVSKGSYTFNYWMHWVRQAPGQGLEWIGATYRG HSDTYYNQKFGRATLTADTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCTRGAIYDGYDVLDNWQGQTLTVSSGGGGGG SGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQ DISNYLNWYQQKPGKAPKLIYYTSNLHSGVPSRFSGSG	38

	SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYRKLPWTFGQGTKE IKRFPVFLPAKPTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACR PAAGGAHVTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLY CNHRNKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCELGGGSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL NLGRREEYDVLKDRLGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QDKDMAEAYSEIGMKGERRGKGHDGLYQGLSTATKD TYDALHMQLPPRGGGSNVLMVHKSHTGERPFQCN QCGASFTQKGNNLLRHILHTGEKPKDPGDTASAERHI KAEMG	
构建体5 DNA序列	ATGGCTTCCGTAAACCGACTTCTGCTTCCCTTGC TCTGCTGCTTCATGCTGCTAGACCTCAGGTGCAGTTA GTGCAATCTGGAGCTGAGGTGAAGAAAACCTGGCTCTT CCGTGAAAGTGAGCTGTAAGGGAAGCGGCTACACCTT TACCAACTACTGGATGCATTGGGTGAGACAGGCCCT GGACAGGGATTAGAGTGAGTTGGAGGCCATATAGAG GACACAGCGATACTACTACAACCAGAAGTTCAAGGGC AGGGCCACCCCTTACAGCCGATACAAGCACATCTACCGC CTACATGGAACGTGCTTCTCTGAGAACAGCGAGGATACC GCCGTGTACTACTGCACAAGAGGAGCCATCTACGACG GCTATGATGTTCTGGACAATTGGGACAGGGCACACT GGTACAGTGTCTTCTGGTGGTGGGGCTCCGGAGGAGGAGT GGCGGATCTGGCGGTGGGGCTCCGGAGGAGGAGG TCAGATATTCAAATGACACAGAGGCCAAGCAGCCTGTC TGCTTCTGTGGCGATAGAGTGACCATCACCTGTTCT GCTTCTCAGGATATCAGCAACTACCTGAACGTGATCTACT GCAGAACGCCGGCAAAGCCCCCTAAACTGCTGATCTACT ACACCAGCAATCTGCACTCTGGAGTTCTAGCAGATT AGCGGAAGCGGCTCTGGCACCGATTTACACTGACCA TCTTCTCTGCAAGCCTGAGGATTTGCCACCTACTAC TGCCAGCAGTACCGGAAATTGCCCTGGACCTTGGAC AGGAAACCAAGCTGGAGATCAAGAGGTTGTGCCGT GTTTCTGCCTGCTAACGCCTACAACAAACACCTGCCCTA GACCACCTACACCTGCTCCTACAATTGCCCTCAGCCT CTTCTCTGAGACCTGAAGCTTGAGACCTGCTGCTG GAGAGCTGTGCATACAAGAGGACTGGATTTGCCCTG CGATATCTACATTGGGCTCCACTGGCCGGACATGT GGAGTTCTCTGCTGTCTGGTGTACCCCTGACTG TAATCACAGGAACAAGCGGGGCCGAAAAAGCTGCTG TACATCTTCAAGCAGCCCTCATGAGACCAAGTTCT AACACAGGAGGAGGACGCTGTAGCTGAGATT GAGGAAGAGGAAGGAGGATGTGAATTAGGTGGC GGGAGCAGGGTGAAGTTCTCACGAGCGCAGATGCTC CTGCCTATCAGCAAGGCCAGAACATCAGCTGTACAACGA GCTGAATCTGGCAGAAGAGAGGAGTACGATGTGCTG GACAAGAGAAGGGGCAGAGATCTGAAATGGGAGGAA AGCCCAGAAGGAAGAACCTCAAGAAGGCCTGTACAA TGAGCTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTATAGC GAGATTGGCATGAAAGGAGAGAGGAGAAGAGGAAAG GGCATGATGCCCTGTATCAGGGCCTGTACAGCCA CCAAGGATACATATGATGCCCTGCATATGAGCTT CCCCCTAGAGGAGGAGGCGGATCTAACGTGCTGATGG TGCAAAAAAGAACGCCACACAGGAGAGAGACCATTCA GTGCAACCAGTGTGGAGCCAGTTCACCCAGAACGGGA AATCTGCTGAGACACATCAAACGTGACATACAGGCGAGAA	39
	GCCCTTCAAGGACCTGGCGATACAGCCTCTGCTGAA GCTAGACACATTAAGCCGAAATGGGC	

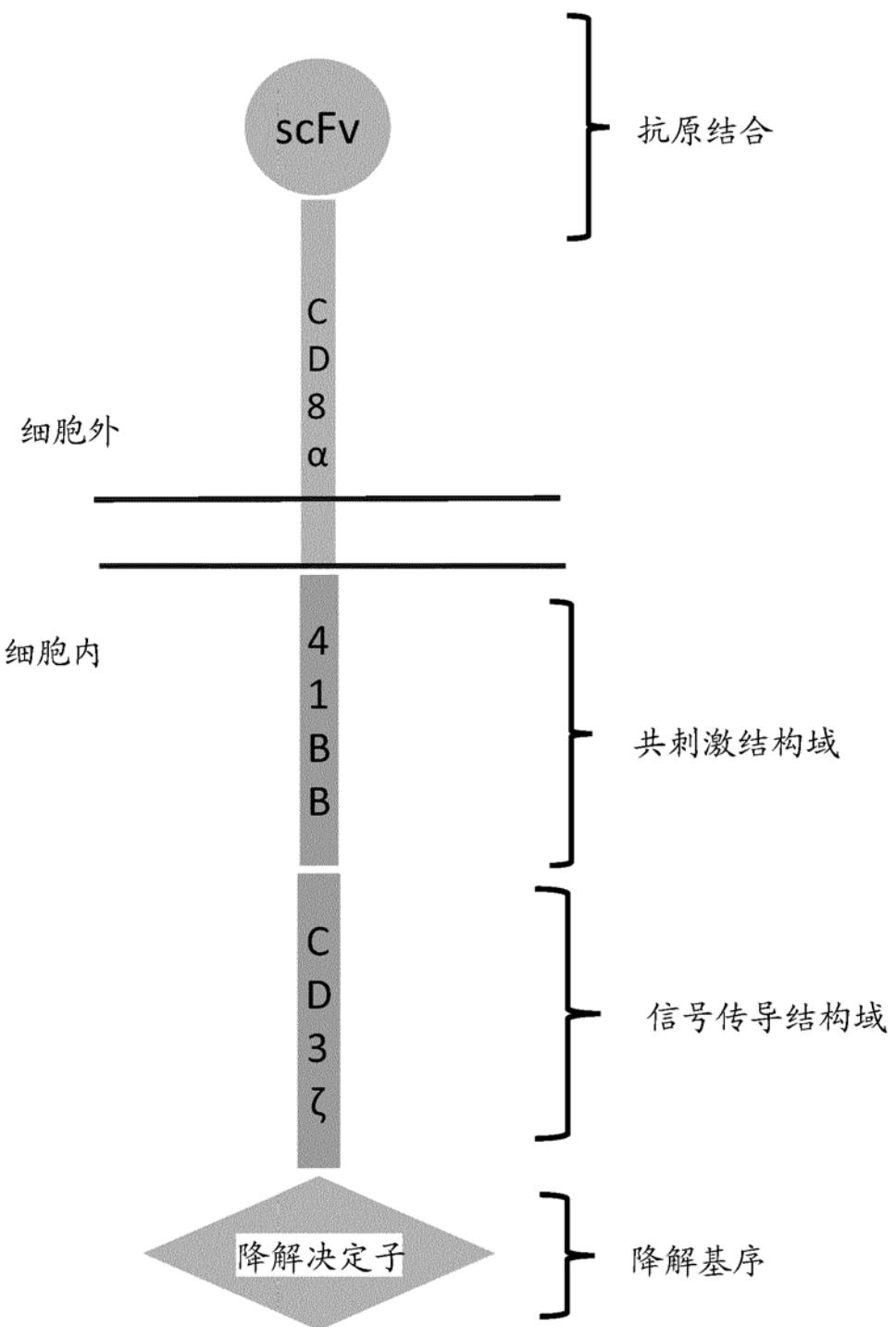


图 1

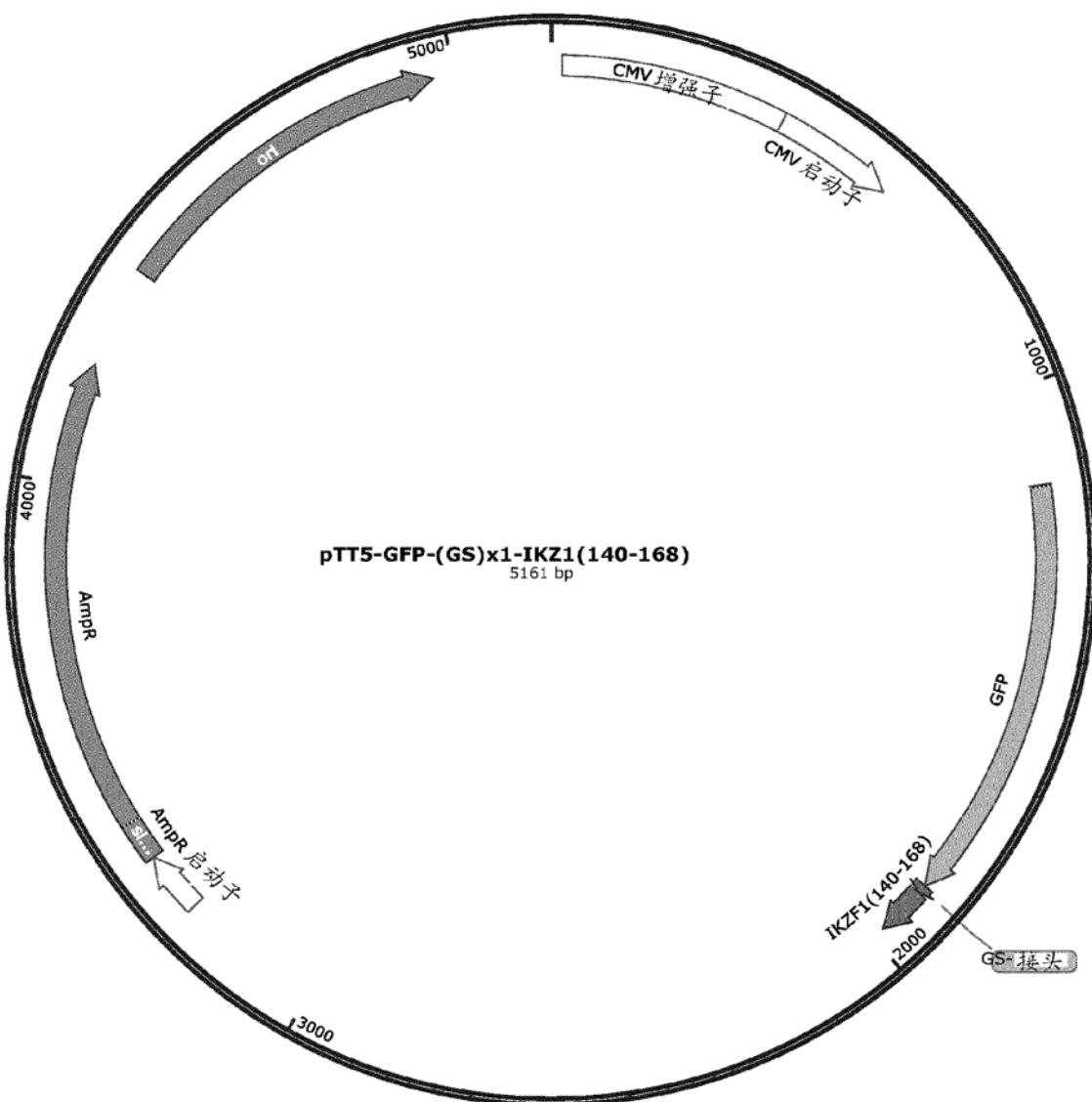


图 2

A)

来那度胺浓度 [nM]	GFP+ 中值荧光强度 (MFI)		
	构建体1	构建体2	构建体3
0	18,216	56,091	42,043
10	15,778	47,132	32,130
100	13,987	26,745	22,361
500	13,284	26,126	22,263
1,000	14,673	22,173	19,370
10,000	14,024	18,771	19,521

B)

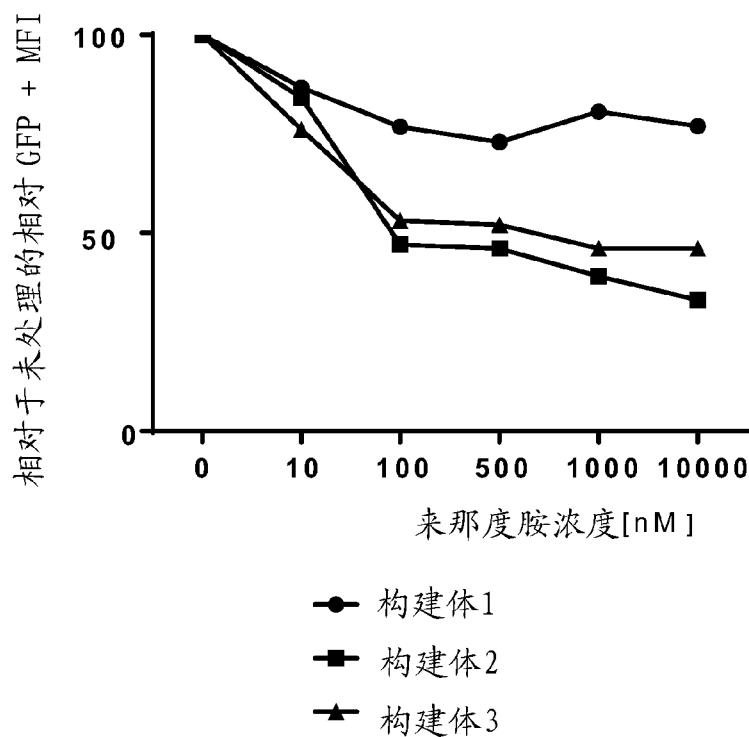


图 3

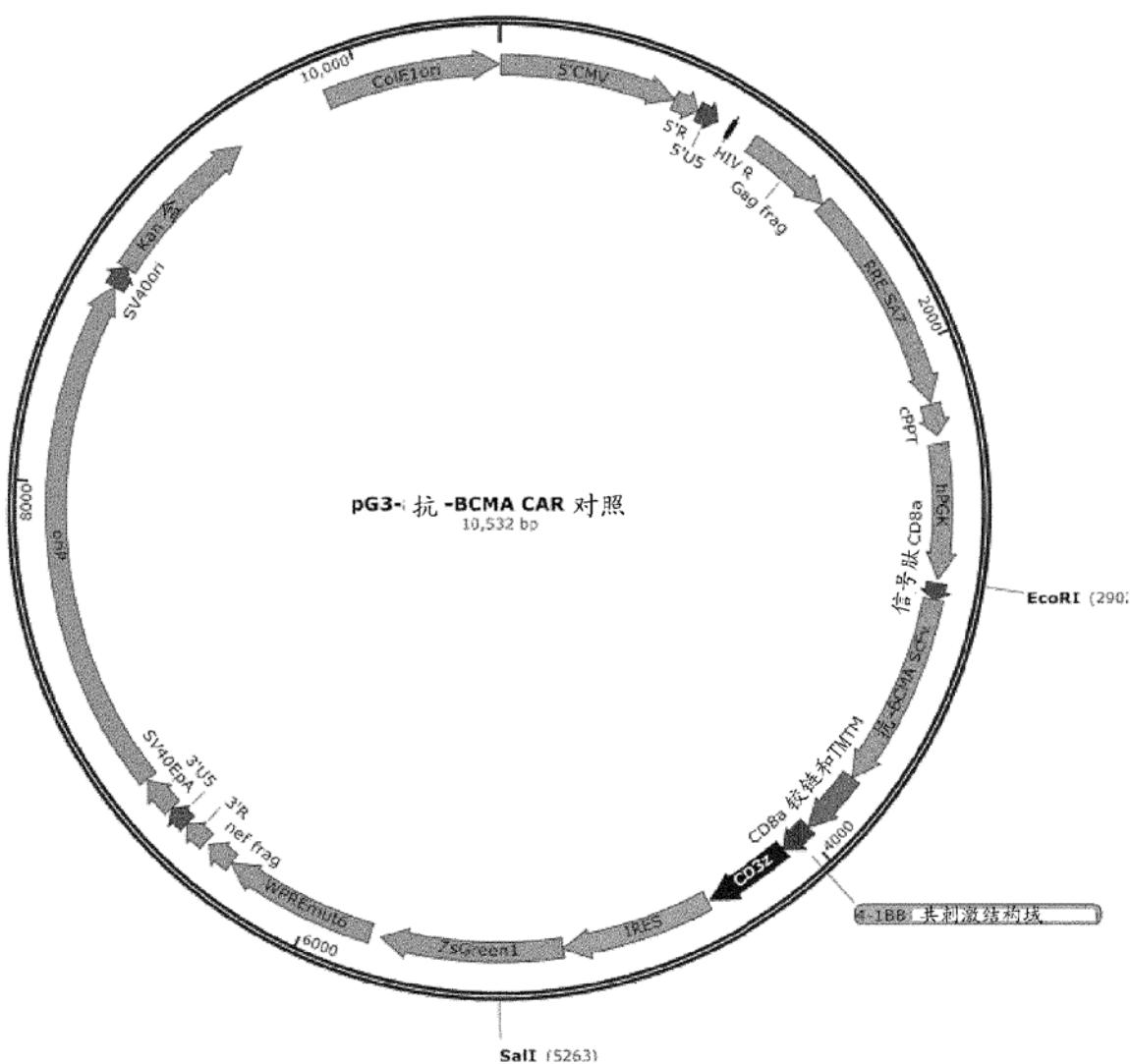


图 4

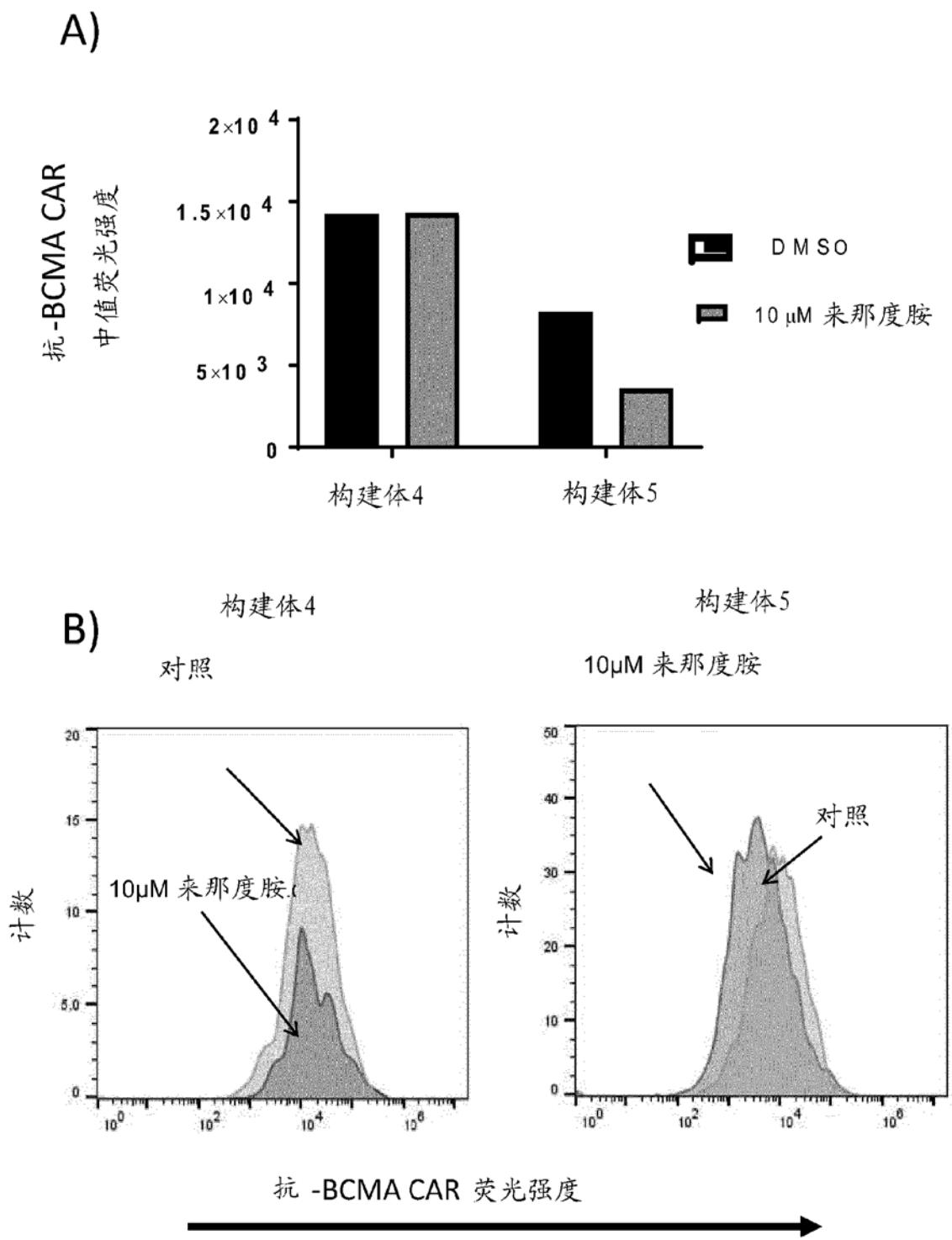
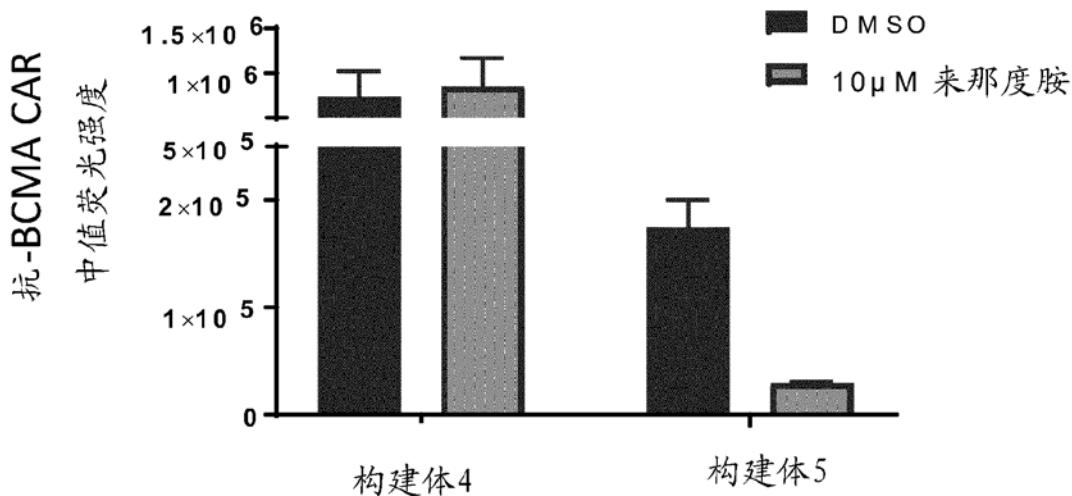


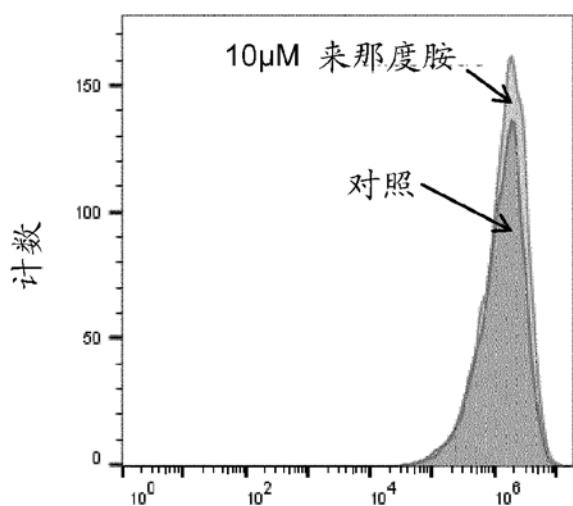
图 5

A)

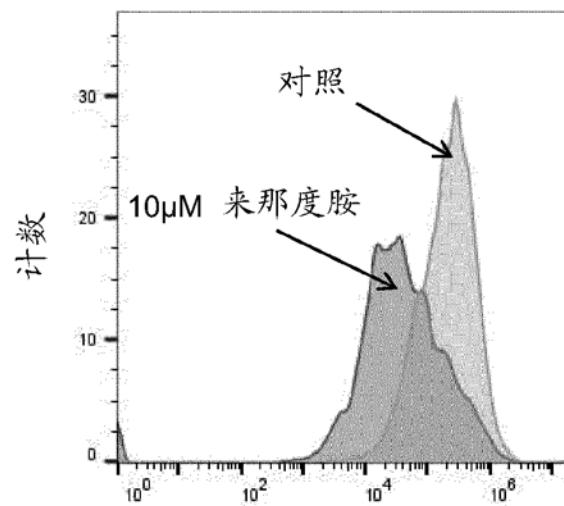


B)

构建体4

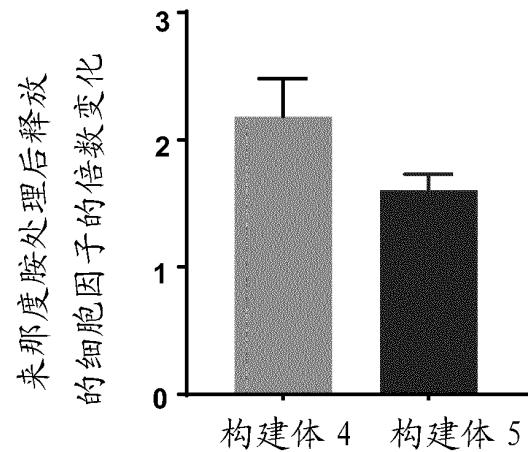


构建体5



抗-BCMA CAR 荧光强度

冬 6

T N F- α (+ARH-7 7-10B5)

IL-2 (+ARH-77-10B5)

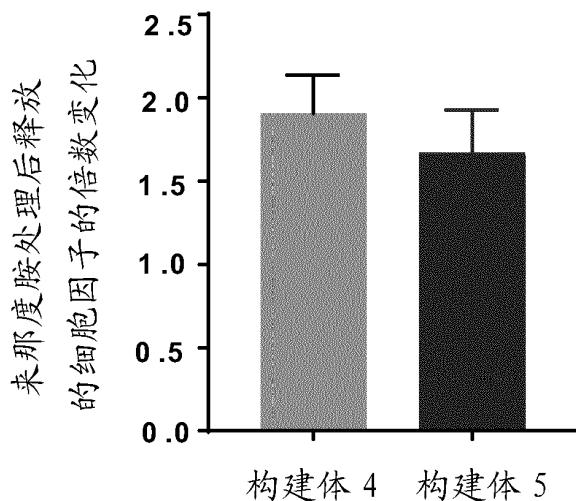
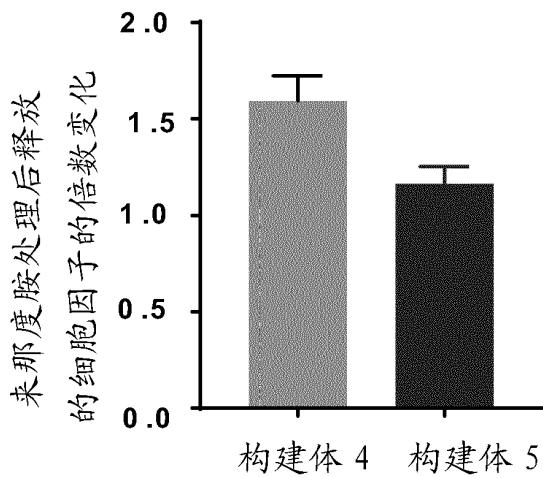
IFN- γ (+ARH-7 7-10B5)

图 7