(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117363636 A
(43)申请公布日 2024.01.09

(21)申请号 202311334332.9
(22)申请日 2018.03.27
(30)优先权数据
62/477,335 2017.03.27 US
62/628,774 2018.02.09 US
(62)分案原申请数据
201880029848.3 2018.03.27
(71)申请人 新加坡国立大学
地址 新加坡新加坡市
申请人 恩卡尔塔公司
(72)发明人 梁峻豪 岛崎纪子 萧思文
D·坎帕纳 J·B·特拉格尔
A·L·L·拉泽迪克 郭超
路旋·郭·布伦 S·S·马斯拉尼
(74)专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127
专利代理师 李栋修 庞东成
(51)Int.Cl.
C12N 15/62(2006.01)

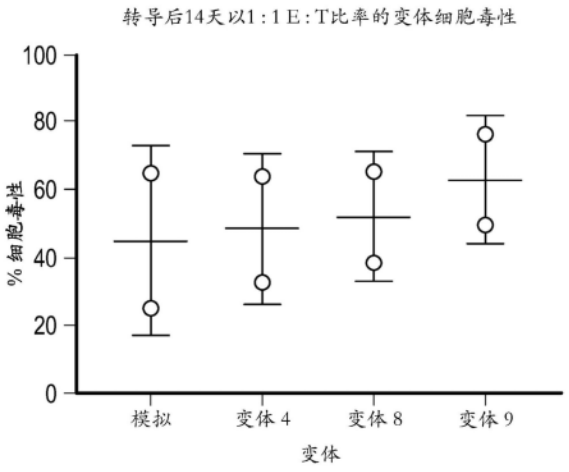
权利要求书1页 说明书45页
序列表（电子公布） 附图44页

(54)发明名称

一种编码嵌合受体的多核苷酸

(57)摘要

本发明涉及一种编码嵌合受体的多核苷酸，该嵌合受体包含：(a)胞外受体结构域，其中所述胞外受体结构域包含与自然杀伤组2成员D(NKG2D)的天然配体结合的肽，其中与NKG2D的天然配体结合的该肽是NKG2D片段，其中该NKG2D片段由包含SEQ ID NO.2的多核苷酸编码；以及(b)包含跨膜区和胞内信号传导结构域的效应子结构域，其中该胞内信号传导结构域包含CD3ζ，并且其中该CD3ζ由包含SEQ ID NO.13的多核苷酸编码。



CN 117363636 A

1.一种编码嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含:

(a)胞外受体结构域,

其中所述胞外受体结构域包含与自然杀伤组2成员D(NKG2D)的天然配体结合的肽,

其中与NKG2D的天然配体结合的该肽是NKG2D片段,

其中该NKG2D片段由包含SEQ ID NO.2的多核苷酸编码;以及

(b)包含跨膜区和胞内信号传导结构域的效应子结构域,

其中该胞内信号传导结构域包含CD3ζ,并且

其中该CD3ζ由包含SEQ ID NO.13的多核苷酸编码。

2.如权利要求1所述的多核苷酸,其中该效应子结构域的跨膜区包含CD8a跨膜结构域。

3.如权利要求1所述的多核苷酸,其中该效应子结构域的跨膜区还包含CD8a铰链区。

4.如权利要求3所述的多核苷酸,其中该CD8a铰链区由包含SEQ ID NO:5的多核苷酸编码。

5.如权利要求1所述的多核苷酸,其中该胞内信号传导结构域还包含4-1BB。

6.如权利要求5所述的多核苷酸,其中该4-1BB由包含SEQ ID NO.12的多核苷酸编码。

7.如权利要求1所述的多核苷酸,其中该嵌合受体包含与CD8a偶联的NKG2D片段、4-1BB和CD3ζ。

8.如权利要求7所述的多核苷酸,其中该嵌合受体由SEQ ID NO.18的核酸序列编码。

9.如权利要求7所述的多核苷酸,其中该嵌合受体由SEQ ID NO.108的核酸序列编码。

10.如权利要求7所述的多核苷酸,其中该嵌合受体包含SEQ ID NO.19的氨基酸序列。

一种编码嵌合受体的多核苷酸

[0001] 本申请是分案申请,其原申请的国际申请号为PCT/US2018/024650,中国国家申请号为201880029848.3,申请日为2018年3月27日,发明名称为“截短的NKG2D嵌合受体及其在自然杀伤细胞免疫疗法中的用途”。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求于2017年3月27日提交的美国临时申请号62/477,335以及于2018年2月9日提交的美国临时申请号62/628,774的权益。将以上列出的每个申请的全部内容通过引用结合在此。

[0004] ASCII文本文件中的材料通过引用结合在此。

[0005] 本申请将包含在以下ASCII文本文件中的序列表通过引用结合,该序列表在此同时提交:

[0006] a)文件名称:44591144002SequenceListing.txt;2018年3月27日创建,186KB大小。

背景技术

[0007] 许多疾病的出现和持续存在的特征是对异常细胞(包括恶性的和病毒感染的细胞)的免疫应答不足。免疫疗法是使用和操纵患者的免疫系统来治疗各种疾病。

发明内容

[0008] 免疫疗法在疾病的治疗中呈现出新的技术进步,其中免疫细胞被工程改造以表达特定的靶向和/或效应分子,其特异性识别患病的或受损的细胞并与之反应。这代表了有希望的进步,至少部分是由于针对特异性靶向患病的或受损的细胞的潜力,这与更传统的方法(例如化学治疗)相反,所述更传统的方法中所有细胞都受到影响,而期望的结果是足够的健康细胞存活以容许患者生存。一种免疫疗法是在免疫细胞中重组表达嵌合受体,以实现靶向识别和破坏目标异常细胞。

[0009] 为了解决针对特异性靶向和破坏患病的或感染的细胞、使其失效或以其他方式致其惰性的这种需要,本文提供了编码嵌合受体的多核苷酸、氨基酸和载体,这些嵌合受体赋予细胞(例如自然杀伤细胞)增强的靶向和细胞毒性。还提供了用于产生这些细胞的方法,以及使用这些细胞靶向和破坏患病的或受损的细胞的方法。在若干实施例中,提供了编码嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含胞外受体结构域和含有跨膜区和胞内信号传导结构域的效应子结构域,其中该胞外受体结构域包含与自然杀伤组2成员D(NKG2D)的天然配体结合的肽,其中与NKG2D天然配体结合的肽是NKG2D片段。

[0010] 在若干实施例中,提供了编码嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含以下一种或两种:(a)胞外受体结构域和(b)包含跨膜区和胞内信号传导结构域的效应子结构域。在若干实施例中,胞外受体结构域包含与自然杀伤组2成员D(NKG2D)的天然配体结合的肽。在若干实施例中,与NKG2D的天然配体结合的肽是NKG2D片段,例如,NKG2D片段由包含SEQ ID NO.2的多核苷酸编码。如本文所披露的,取决于实施例,还使用了另外的NKG2D片段。在若干

实施例中,胞内信号传导结构域包含CD3ζ。在一个实施例中,CD3ζ由包含SEQ ID NO.13的多核苷酸编码,但是,如本文所披露的,取决于实施例,还可以使用与CD3ζ不同但具有相似功能的序列。

[0011] 在若干实施例中,效应子结构域的跨膜区包含CD8a跨膜结构域。在一个实施例中,效应子结构域的跨膜区还包含CD8a铰链区。在若干实施例中,CD8a铰链区由包含SEQ ID NO:5的多核苷酸编码。在若干实施例中,胞内信号传导结构域还包含4-1BB。在一个实施例中,4-1BB由包含SEQ ID NO.12的多核苷酸编码,但是,如本文所披露的,取决于实施例,还可以使用与4-1BB不同但具有相似功能的序列。

[0012] 在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a偶联的NKG2D片段、4-1BB和CD3ζ。在若干实施例中,这种嵌合受体由SEQ ID NO.18的核酸序列编码。在另外的实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO.108的核酸序列编码,但是,如本文所披露的,取决于实施例,也可以使用与SEQ ID NO.108不同但具有相似功能的序列。在若干实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO.19的氨基酸序列。

[0013] 在若干实施例中,本文披露的任一嵌合受体也可与膜结合白细胞介素15(mbIL15)共表达。在一些实施例中,mbIL15由包含SEQ ID NO.16的多核苷酸编码。在一些实施例中,mbIL15包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。取决于实施例,也可以使用mbIL15的其他序列。在一些实施例中,mbIL15在与嵌合受体相同的多核苷酸上双顺反子表达。在其他实施例中,mbIL15在单独的构建体上共表达。在若干实施例中,通过将胞内信号传导结构域的表达与膜结合白细胞介素15(mbIL15)的表达偶联,进一步使胞内信号传导结构域增强。

[0014] 在若干实施例中,效应子结构域还包含OX-40结构域。在若干实施例中,OX-40结构域代替mbIL15或者是除了mbIL15之外另有的。在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、OX-40结构域和CD3ζ。在一些实施例中,将多核苷酸构建体配置为双顺反子地共表达mbIL15。在一些此类实施例中,多核苷酸构建体包含由例如细胞基质蛋白酶识别和切割的一个或多个切割位点(例如,T2A、P2A、E2A和/或F2A切割位点)。在一些实施例中,mbIL15通过细胞基质蛋白酶切割位点与嵌合受体偶联。在一些实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:90的核酸序列编码,所述核酸序列通过细胞基质蛋白酶切割位点与SEQ ID NO.16编码的mbIL15偶联。在一些实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:109的核酸序列编码,所述核酸序列通过细胞基质蛋白酶切割位点与SEQ ID NO.16编码的mbIL15偶联。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列,并与包含SEQ ID NO.17的氨基酸序列的mbIL15共表达。如本文所公开的,取决于实施例,也可以使用与SEQ ID NO:90、91、109、16和/或16不同但具有相似功能的序列。

[0015] 在若干实施例中,嵌合受体包含与IgG4铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、OX-40结构域和CD3ζ。在一些实施例中,将多核苷酸构建体配置为与嵌合受体双顺反子地共表达mbIL15。在一些此类实施例中,多核苷酸构建体包含由细胞基质蛋白酶识别和切割的一个或多个切割位点(例如,T2A、P2A、E2A和/或F2A切割位点)。在一些实施例中,mbIL15通过细胞基质蛋白酶切割位点与嵌合受体偶联。在一些实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:100的核酸序列编码,所述核酸序列通过细胞基质蛋白酶切割位点与SEQ ID NO.16编码的mbIL15偶联。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO:101的氨基酸序列,并与包含SEQ ID NO.17的氨基酸序列的mbIL15共表达。如本文所公开的,取决于实施例,也可以使用与

SEQ ID NO:100、101和/或16不同但具有相似功能的序列。

[0016] 在若干实施例中,提供了用于治疗癌症的方法,该方法包括向患有癌症的受试者给予组合物,该组合物包含自然杀伤(NK)细胞,该自然杀伤细胞表达由以上或或本文其他地方所述的多核苷酸编码的嵌合受体。

[0017] 在一个实施例中,NK细胞是从患有癌症或传染病的患者中分离的自体细胞。在另外的实施例中,NK细胞是从供体分离的同种异体细胞。

[0018] 本文还提供了如以上或本文其他地方所述的多核苷酸在制备用于增强有需要的哺乳动物中NK细胞的细胞毒性的药物中的用途。在若干实施例中,提供了如以上或本文其他地方所述的多核苷酸在制备药物中的用途,该药物用于治疗或预防有需要的哺乳动物的癌症或传染病。

[0019] 根据若干实施例,提供了编码嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含胞外受体结构域、包含跨膜区和胞内信号传导结构域的效应子结构域。如本文更详细讨论的,胞外受体结构域用于识别和结合靶细胞上的配体。效应子结构域用于传递信号(在由胞外结构域结合靶细胞后),所述信号使信号级联运作,该导致针对靶细胞的细胞毒活性。根据若干实施例,多核苷酸编码嵌合受体,与非工程改造的NK细胞相比,该嵌合受体提供了出人意料地增强的细胞毒性。

[0020] 在若干实施例中,胞外受体结构域包含与自然杀伤组2成员D(NKG2D)的天然配体结合的肽。根据若干实施例,与NKG2D的天然配体结合的肽是NKG2D的功能片段(例如,全长NKG2D的截短、片段或部分)。如本文所用,术语“片段”、“截短”和“部分”应给出它们的普遍含义,并且也应可彼此互换。例如,在若干实施例中,NKG2D片段由包含SEQ ID NO:1序列的片段的多核苷酸编码。在若干实施例中,NKG2D片段包含SEQ ID NO:2的序列,而在另外的实施例中,编码NKG2D的片段是经密码子优化的,并且包含例如SEQ ID NO:3的序列。在另外的实施例中,编码NKG2D的片段是经密码子优化的,并且包含例如SEQ ID NO:68的序列。

[0021] 在若干实施例中,效应子结构域包含CD16、NCR1、NCR2、NCR3、4-1BB、NKp80、CD3ζ和2B4中的一个或多个。在若干实施例中,这些效应子结构域与CD8α偶联。

[0022] 在若干实施例中,嵌合受体包含与CD16偶联的NKG2D片段。如本文所用,偶联应给出其普遍含义,并且还应指核苷酸序列的直接(例如,第一核苷酸接着直接是第二核苷酸)或间接(例如,序列彼此在读框内但通过插入的核苷酸分开)连接,所述连接以一种容许在例如体外转录/翻译系统、宿主细胞(例如,体外和/或体内)中表达核苷酸序列的方式。如本文所用,“连接”和“偶联”可互换使用。在若干实施例中,NKG2D/CD16嵌合受体由SEQ ID NO:23的核酸序列编码。在若干实施例中,NKG2D/CD16嵌合受体包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在若干实施例中,嵌合受体包含与NCR1偶联的NKG2D片段。在若干实施例中,这种嵌合受体由SEQ ID NO.27的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.28的氨基酸序列。

[0023] 如上文所讨论的,在若干实施例中,NKG2D片段与NCR2偶联,并且所得嵌合受体包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的至少一部分。若干实施例提供嵌合受体,其包含与NCR3偶联的NKG2D片段。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO.29的核酸序列编码,并且嵌合受体包含SEQ ID NO.30的氨基酸序列。

[0024] 如下文更详细讨论的,将跨膜结构域和胞内结构域的组合用于若干实施例中,其

提供嵌合受体组分之间的协同相互作用并产生增强的细胞毒性作用。在若干实施例中,嵌合受体包含与CD16跨膜/胞内结构域偶联的NKG2D片段和4-1BB。在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD16跨膜/胞内结构域和4-1BB。在若干实施例中,这种嵌合受体由SEQ ID NO:25的核酸序列编码。在若干实施例中,所得嵌合受体包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

[0025] 在若干实施例中,将NCR1与NKG2D片段结合使用。在若干实施例中,NKG2D片段仅与NCR1连接。在另外的实施例中,嵌合受体包含与NCR1偶联的NKG2D片段和4-1BB。在一些这样的实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO:20的NCR1氨基酸序列。

[0026] 在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a偶联的NKG2D片段、4-1BB和CD3ζ。在若干实施例中,这种NKG2D/CD8a/4-1bb/CD3ζ嵌合受体由SEQ ID NO.18的核酸序列编码。在若干实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO.19的氨基酸序列。

[0027] 在若干实施例中,NCR3包含在嵌合受体中。例如,在若干实施例中提供了NKG2D/NCR3构建体。由此所得的嵌合受体包含SEQ ID NO:22的NCR3氨基酸序列。在若干实施例中,嵌合受体包含NKG2D/NCR2/4-1BB构建体或NKG2D/NCR3/4-1BB构建体。

[0028] 在若干实施例中,在嵌合受体构建体中提供了接头、铰链或其他“间隔”元件。例如,在若干实施例中,效应子结构域包含接头。在若干实施例中,多核苷酸编码构建体的各部分之间(例如在4-1BB、CD16、NCR1、NCR3、2B4或NKp80中的任意两个之间)的GS接头。在若干实施例中,提供一个或多个GS接头,例如,1、2、3、4、5、6或更多个。在若干实施例中,提供了包含铰链区的嵌合受体。根据在特定构建体内的位置,铰链区可以与接头区同义,反之亦然。在若干实施例中,铰链区由SEQ ID NO:5的核酸序列编码。在一些实施例中,可以将铰链区截短至所需长度,因此其由SEQ ID NO:5的核酸序列的片段编码。在若干实施例中,使用甘氨酸-丝氨酸基序作为铰链。在若干实施例中,铰链区包含甘氨酸-丝氨酸重复基序,其具有(GGGGS)n(SEQ ID NO:31)的氨基酸序列,其中n是重复数。在若干实施例中,使用9个重复,产生包含SEQ ID NO:33氨基酸序列的铰链区。在若干实施例中,使用3个重复,产生包含SEQ ID NO:34氨基酸序列的铰链区。

[0029] 在若干实施例中,可以使用两个单独的分子作为铰链或接头,例如SEQ ID NO:32的氨基酸序列(CD8a/GS3)。在若干实施例中,使用β肾上腺素能受体的部分作为铰链或接头。在若干实施例中,使用β-2肾上腺素能受体的部分。在一个实施例中,使用β-2肾上腺素能受体的胞外结构域,其由SEQ ID NO:40的核酸序列编码。在一些实施例中,使用β-2肾上腺素能受体的第一跨膜螺旋,其由SEQ ID NO:42的核酸序列编码。根据实施例,在嵌合受体中将这两个β-2肾上腺素能受体的部分一起使用。在若干实施例中,胞外受体结构域还包含CD8a信号肽,其中信号肽包含SEQ ID NO.4的核酸序列。取决于实施例,任选地使用其他信号肽。根据一些实施例,可以以多聚体形式使用信号肽。

[0030] 在若干实施例中,效应子结构域包含一个或多个半-ITAM序列。在一些这样的实施例中,半-ITAM包含氨基酸基序DGYXXL(其中X是任何氨基酸;SEQ ID NO:14)。在一些实施例中使用多个半-ITAM。在若干实施例中,半-ITAM包含NKp80。在若干实施例中,效应子结构域包含一个或多个ITSM序列。在若干实施例中,将ITSM序列与半-ITAM基序结合使用。在若干实施例中,ITSM包含氨基酸基序S/TXYXXL/I(其中X是任何氨基酸;SEQ ID NO.15)。在若干实施例中,效应子包含2B4结构域。

[0031] 在若干实施例中,嵌合受体包含与GS3接头偶联的NKG2D片段、CD8a铰链、CD16跨膜/胞内结构域和4-1BB。在若干实施例中,嵌合受体包含与GS3接头偶联的NKG2D片段、CD16跨膜/胞内结构域和4-1BB。在若干实施例中,嵌合受体包含与CD16跨膜/胞内结构域偶联的NKG2D片段和4-1BB。在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、4-1BB和2B4。在若干实施例中,嵌合受体包含与β-肾上腺素能胞外结构域偶联的NKG2D片段、β-肾上腺素能跨膜结构域、4-1BB和2B4。在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、4-1BB、2B4、GS3接头和NKp80。在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、4-1BB、GS3接头和NKp80。在若干实施例中,嵌合受体包含与GS3接头偶联NKG2D片段(其中该片段由经密码子优化的序列编码)、另外的NKG2D片段、β-肾上腺素能胞外结构域、β-肾上腺素能跨膜结构域、4-1BB、另外的GS3接头和NKp80。在若干实施例中,嵌合受体包含与GS3接头偶联的NKG2D片段(其经密码子优化)、另外的NKG2D片段、CD8a铰链、CD8a跨膜结构域、4-1BB、另外的GS3接头和NKp80。在若干实施例中,嵌合受体包含经密码子优化的与GS3接头偶联的NKG2D片段、另外的NKG2D片段、CD8a铰链、CD16跨膜/胞内结构域和4-1BB。在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD16跨膜/胞内结构域、4-1BB和2B4。在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD16跨膜/胞内结构域、4-1BB、GS3接头和NKp80。在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段和CD8a跨膜结构域。在若干实施例中,效应子包含4-1BB。在一些这样的实施例中,效应子包含任选地与NKp80、2B4、CD3ζ、Dap10、Dap12、CD28或本文提供的其他信号传导结构域中的一个或多个结合的4-1BB。在若干实施例中,效应子结构域还包含CD3ζ。在若干实施例中,效应子结构域包含2B4的胞内结构域。在若干实施例中,效应子结构域还包含DAP10的胞内结构域。

[0032] 在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、4-1BB、2B4和CD3ζ。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:58的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.59的氨基酸序列。

[0033] 另外,本文披露的任一嵌合受体也可与膜结合白细胞介素15(mbIL15)共表达。例如,在若干实施例中提供了编码包含胞外受体结构域的嵌合受体的多核苷酸,其中该胞外受体结构域包含与NKG2D的天然配体结合的肽,其中与NKG2D天然配体结合的肽是NKG2D片段、跨膜区、效应子结构域,该多核苷酸与另外的编码膜结合白细胞介素15(mbIL15)的构建体共表达。在若干实施例中,如本文所讨论的嵌合受体与mbIL-15共表达。在若干实施例中,效应子结构域包含4-1BB和CD3ζ,并且跨膜区包含CD8a。

[0034] 在若干实施例中,对嵌合受体进行工程改造使得它们不包含DNAX活化蛋白10(DAP10)。另外,在若干实施例中,对嵌合受体进行工程改造使得它们不包含ITAM基序。

[0035] 在若干实施例中,提供了编码嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含以下一种、两种或全部:(a)胞外受体结构域,其包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段,(b)跨膜区,其中该跨膜区包含CD8a,和(c)效应子结构域,其中该效应子结构域包含4-1BB和2B4或DAP10的胞内结构域。在若干实施例中,效应子结构域包含2B4,其后是4-1BB。在另外的实施例中,效应子结构域包含4-1BB,其后是2B4。在若干实施例中,效应子结构域包含DAP10,其后是4-1BB。在另外的实施例中,效应子结构域包含4-1BB,其后是DAP10。在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、4-1BB和DAP10。在若干实施

例中,嵌合受体由SEQ ID NO:60的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.61的氨基酸序列。在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、4-1BB、2B4和DAP10。在若干实施例中,效应子结构域包含4-1BB,其后是DAP10,之后是2B4。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:62的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.63的氨基酸序列。在若干实施例中,效应子结构域包含4-1BB,其后是2B4,之后是DAP10。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:64的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.65的氨基酸序列。

[0036] 在若干实施例中,嵌合受体包含经密码子优化的与胞内效应子结构域偶联的NKG2D片段。在若干实施例中,使用了NKG2D的多个片段,例如,另外的NKG2D片段(任选地经密码子优化)通过例如GS3接头与第一片段偶联。在若干实施例中,此类嵌合受体还包含CD8a铰链、CD8a跨膜结构域、4-1BB和CD3ζ。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:66的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.67的氨基酸序列。在若干实施例中,多核苷酸与另外的编码膜结合白细胞介素15(mbIL15)的构建体共表达。

[0037] 在若干实施例中,提供了编码嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含胞外受体结构域(其包含结合NKG2D天然配体的NKG2D片段并且由SEQ ID NO:1的片段编码)、包含CD3ζ跨膜区的跨膜区、和效应子结构域。在若干实施例中,提供了编码嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含胞外受体结构域(其包含结合NKG2D天然配体的NKG2D片段并且由SEQ ID NO:2编码)、包含CD3ζ跨膜区的跨膜区、和效应子结构域。在若干实施例中,提供了编码嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含胞外受体结构域(其包含结合NKG2D天然配体的NKG2D片段并且由SEQ ID NO:3编码)、包含CD3ζ跨膜区的跨膜区、和效应子结构域。在若干实施例中,提供了编码嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含胞外受体结构域(其包含结合NKG2D天然配体的NKG2D片段并且由SEQ ID NO:68编码)、包含CD3ζ跨膜区的跨膜区、和效应子结构域。在若干实施例中,使用了由SEQ ID NO.2、3或68中的任一个编码的NKG2D片段。在若干实施例中,CD3ζ跨膜区包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列。也使用了SEQ ID NO:69序列的片段,在若干实施例中,所述片段保留转导至少约65%、约75%、约85%或约95%的天然CD3ζ亚基(包括二聚体)信号转导的能力。在若干实施例中,胞外受体结构域还包含与CD3ζ跨膜区相邻的另外的残基。在若干实施例中,另外的氨基酸是天然CD3ζ序列的胞外残基。在其他实施例中,随机地选择所述另外的氨基酸。在若干实施例中,存在2、3、4、5、6、8、10、15或20个另外的氨基酸。在若干实施例中,嵌合受体结构域包含铰链区,在若干实施例中,该铰链区是由SEQ ID NO:5的核酸序列编码的CD8a铰链。在若干实施例中,铰链区是由SEQ ID NO:5的核酸序列的片段编码的CD8a铰链。根据实施例,该片段是SEQ ID NO:5的核酸序列长度的约75%、约80%、约85%、约90%、约95%。根据实施例,该片段与SEQ ID NO:5的核酸序列至少约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约98%或约99%同源。在若干实施例中,胞外受体结构域还包含CD8a信号肽,取决于实施例,该CD8a信号肽可包含SEQ ID NO.4的核酸序列。在若干实施例中,效应子结构域包含4-1BB。在若干实施例中,效应子结构域包含CD16胞内结构域。在若干实施例中,效应子结构域包含4-1BB和CD16(在构建体中任一部分作为“第一”相比于“第二”)。在若干实施例中,使用4-1BB和/或CD16的一个或多个的重复。

[0038] 在若干实施例中,嵌合受体包含经密码子优化并与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3ζ跨膜区和包含4-1BB的效应子结构域。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:78的核

酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.79的氨基酸序列。

[0039] 在若干实施例中,嵌合受体包含经密码子优化的与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3ζ跨膜区和效应子结构域(包含CD16,其后是4-1BB)。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.71的氨基酸序列。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:70的核酸序列编码。

[0040] 在若干实施例中,嵌合受体包含经密码子优化并与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3ζ跨膜区、和效应子结构域(包含4-1BB,其后是任选地通过GS3接头偶联的CD16)。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.85的氨基酸序列。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:84的核酸序列编码。

[0041] 在若干实施例中,嵌合受体包含经密码子优化并与GS3接头偶联的NKG2D片段、另外的NKG2D片段、CD8a铰链、CD3ζ跨膜区和包含CD16和4-1BB的效应子结构域。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:72的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.73的氨基酸序列。

[0042] 在若干实施例中,效应子结构域包括NKp80。在若干实施例中,效应子结构域是NKp80。在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3ζ跨膜区和效应子结构域(包含CD16、4-1BB和NKp80,并任选地包括GS3接头)。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:74的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.75的氨基酸序列。在若干实施例中,嵌合受体包含经密码子优化并与GS3接头偶联的NKG2D片段、另外的NKG2D片段(任选地经密码子优化)、CD8a铰链、CD3ζ跨膜区和效应子结构域(包含CD16、4-1BB和NKp80,并任选地包括GS3接头)。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:76的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.77的氨基酸序列。在若干实施例中,嵌合受体包含经密码子优化并与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3ζ跨膜区和效应子结构域(包含4-1BB和NKp80,并且任选地包括GS3接头)。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:82的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.83的氨基酸序列。

[0043] 在若干实施例中,效应子结构域包含CD3ζ。在若干实施例中,嵌合受体包含经密码子优化并与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3ζ跨膜区和包含4-1BB和CD3ζ的效应子结构域。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:80的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.81的氨基酸序列。

[0044] 在若干实施例中,效应子结构域包含FcRγ。在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3ζ跨膜区和包含4-1BB和FcRγ的效应子结构域。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:86的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.87的氨基酸序列。

[0045] 在若干实施例中,效应子结构域包含CD28。在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3ζ跨膜区和包含CD28和CD3ζ的效应子结构域。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:102的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.103的氨基酸序列。

[0046] 在若干实施例中,效应子结构域包含GS接头。

[0047] 在若干实施例中,本文披露的多核苷酸与膜结合白细胞介素15(mbIL15)共表达。

[0048] 在若干实施例中,多核苷酸编码嵌合受体,该嵌合受体包含胞外受体结构域、包含跨膜区和胞内信号传导结构域的效应子结构域,所述胞外受体结构域包含NKG2D片段,其能

够与NKG2D的天然配体结合,并由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3或SEQ ID NO.68中的任一序列的片段编码。在若干实施例中,提供了编码嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含胞外受体结构域、包含跨膜区和胞内信号传导结构域的效应子结构域,所述胞外受体结构域包含NKG2D片段,其能够与NKG2D的天然配体结合,并由(i)SEQ ID NO:1的序列的片段、(ii)SEQ ID NO.2的序列、(iii)SEQ ID NO.3的序列或(iv)SEQ ID NO.68的序列编码。在若干实施例中,多核苷酸编码嵌合受体,该嵌合受体包含胞外受体结构域、包含跨膜区和胞内信号传导结构域的效应子结构域,所述胞外受体结构域包含NKG2D片段,其能够与NKG2D的天然配体结合,并由SEQ ID NO.2的序列编码。在若干实施例中,多核苷酸编码嵌合受体,该嵌合受体包含胞外受体结构域、包含跨膜区和胞内信号传导结构域的效应子结构域,所述胞外受体结构域包含NKG2D片段,其能够与NKG2D的天然配体结合,并由SEQ ID NO.3的序列编码。在若干实施例中,多核苷酸编码嵌合受体,该嵌合受体包含胞外受体结构域、包含跨膜区和胞内信号传导结构域的效应子结构域,所述胞外受体结构域包含NKG2D片段,其能够与NKG2D的天然配体结合,并由SEQ ID NO.68的序列的片段编码。在若干实施例中,胞外受体结构域包含铰链区。在若干实施例中,铰链区是由SEQ ID NO:5的核酸序列或任选地SEQ ID NO:5的核酸序列的片段(例如,与SEQ ID NO:5具有约75%、约85%、约95%的同源性的片段)编码的CD8a铰链。在若干实施例中,铰链区是由SEQ ID NO:104的核酸序列编码的免疫球蛋白G4(IgG4)铰链。在若干实施例中,铰链区是由SEQ ID NO:104的核酸序列的片段(例如,与SEQ ID NO:104具有约75%、约85%、约95%同源性的片段)编码的免疫球蛋白G4(IgG4)铰链。在若干实施例中,胞外受体结构域还包含CD8a信号肽,其中信号肽包含SEQ ID NO.4的核酸序列。在若干实施例中,效应子结构域包含至少一个选自以下组的信号传导结构域,该组由以下组成:OX40(CD134)、CD3ζ、4-1BB、CD28和DAP12。在若干实施例中,嵌合受体跨膜结构域包含CD8跨膜结构域。在若干实施例中,嵌合受体包含与偶联于CD8a铰链的NKG2D片段连接(任选地通过GS3接头)的IL-15、CD8a跨膜结构域、4-1BB和CD3ζ。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:88的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.89的氨基酸序列。

[0049] 在若干实施例中,嵌合受体包含与IgG4铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、4-1BB和CD3ζ。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:96的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.97的氨基酸序列。

[0050] 在若干实施例中,效应子结构域包含OX40。在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、OX40和CD3ζ。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:90的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:109的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.91的氨基酸序列。在若干实施例中,嵌合受体包含与IgG4铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、OX40和CD3ζ。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:100的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.101的氨基酸序列。

[0051] 在若干实施例中,嵌合受体包含CD28跨膜/胞内结构域。在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD28跨膜/胞内结构域和CD3ζ。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:92的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.93的氨基酸序列。

[0052] 在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD28跨膜/胞内结构域、4-1BB和CD3ζ。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:94的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.95的氨基酸序列。

[0053] 在若干实施例中,嵌合受体包含与IgG4铰链偶联的NKG2D片段、CD28跨膜/胞内结构域和CD3ζ。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:98的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.99的氨基酸序列。

[0054] 在若干实施例中,效应子结构域包含GS接头。在若干实施例中,本文披露的多核苷酸被配置为与膜结合白细胞介素15(mbIL15)共表达(在同一多核苷酸或另一多核苷酸上)。

[0055] 任何嵌合受体可任选地包括胞外受体结构域,其包含与NKG2D的天然配体结合的第二肽。在若干实施例中,第二肽与NKG2D是同源的,而在其他实施例中,第二肽相对于NKG2D是异源的。无论嵌合受体是否包含二聚化的胞外受体结构域,胞外受体结构域都能至少识别以下的NKG2D的天然配体:MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5或ULBP6。

[0056] 如下文更详细讨论的,在若干实施例中使用了NKG2D配体结合结构域的功能性变体。例如,在若干实施例中,与NKG2D的天然配体结合的肽与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:68具有至少80%的同源性。在若干实施例中,与NKG2D的天然配体结合的肽与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:68具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的同源性。

[0057] 本文在若干实施例中另外提供的是用于表达嵌合受体的载体。在若干实施例中,本文提供的多核苷酸是mRNA,并且可包括与至少一种调节元件的可操作连接以表达嵌合受体。在若干实施例中,多核苷酸还包含一个或多个内部核糖体进入位点(IRES)。在若干实施例中,载体是逆转录病毒。

[0058] 在若干实施例中,还提供了工程改造的自然杀伤细胞,其表达本文披露的任何嵌合受体构建体,所述工程改造的NK细胞表现出针对靶细胞的增强的细胞毒性作用。增强的细胞毒性作用包括但不限于,与正常(例如,非癌)细胞相比对靶(例如,癌)细胞的更高亲和力、针对靶细胞的更大杀伤作用、降低的脱靶效应、增加的细胞毒性作用持续时间、更有效的细胞毒性等。可以通过使用各种体外细胞毒性测定(例如,细胞因子产生的测量等)、靶细胞死亡的测量、或通过各种临床结果(例如,肿瘤负荷减少)来鉴定这种增强的作用。在若干实施例中,工程改造的NK细胞是从患者分离的自体细胞。在另外的实施例中,工程改造的NK细胞由分离自供体的同种异体细胞产生。在若干实施例中,如本文所披露的此类工程改造的NK细胞用于通过给予所述NK细胞来增强有需要的哺乳动物中的NK细胞细胞毒性。在若干实施例中,这些工程改造的NK细胞用于治疗或预防哺乳动物中的癌症或传染病。在一些实施例中,编码本文披露的各种嵌合受体的多肽、运载其的载体和表达其的NK细胞也可以用于制备用以增强NK细胞细胞毒性的药物(例如,用于治疗或预防癌症或传染病)。在若干实施例中,本文披露的嵌合受体构建体不显著增加工程改造的NK细胞对正常细胞的细胞毒性,并且如本文所述,与非工程改造的NK细胞相比其有利地得到改善。在若干实施例中,提供了编码嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含胞外受体结构域、跨膜区和效应子结构域。在若干实施例中,胞外受体结构域包含与自然杀伤组2成员D(NKG2D)的天然配体结合的肽,其中与NKG2D的天然配体结合的肽是NKG2D片段。若干实施例涉及编码嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含:(a)胞外受体结构域,其中所述胞外受体结构域包含与自然杀伤组2成

员D(NKG2D)的天然配体结合的肽,其中与NKG2D的天然配体结合的该肽是NKG2D片段,其中该NKG2D片段由多核苷酸编码,该多核苷酸包含:(i)SEQ ID NO:1的序列的片段、(ii)SEQ ID NO.2的序列、(iii)SEQ ID NO.3的序列或(iv)SEQ ID NO.68的序列,(b)跨膜区,和(c)效应子结构域。

[0059] 在若干实施例中,提供了编码嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含:(a)胞外受体结构域,其中所述胞外受体结构域包含与自然杀伤组2成员D(NKG2D)的天然配体结合的肽,其中与NKG2D的天然配体结合的该肽是NKG2D片段,其中该NKG2D片段由多核苷酸编码,该多核苷酸包含:(i)SEQ ID NO:1的序列的片段、(ii)SEQ ID NO.2的序列、(iii)SEQ ID NO.3的序列、(iv)或SEQ ID NO.68的序列;和(b)包含跨膜区和胞内信号传导结构域的效应子结构域。

[0060] 在若干实施例中,跨膜区包含CD3ζ跨膜区。在若干实施例中,CD3ζ跨膜区包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列。在若干实施例中,跨膜区包含CD8a。在若干实施例中,效应子结构域包含4-1BB、2B4的胞内结构域、NKp80、CD16胞内结构域、自然细胞毒性触发受体1(NCR1)、自然细胞毒性触发受体2(NCR2)、自然细胞毒性触发受体3(NCR3)和/或DAP10的胞内结构域。在一个实施例中,效应子结构域包含4-1BB和CD16。在若干实施例中,效应子结构域包含4-1BB和CD3ζ。在若干实施例中,效应子结构域包含4-1BB以及2B4或DAP10的胞内结构域。在若干实施例中,效应子结构域包含2B4,其后是4-1BB,而在其他实施例中,效应子结构域包含4-1BB,其后是2B4。在若干实施例中,效应子结构域包含DAP10,其后是4-1BB。在若干实施例中,效应子结构域包含4-1BB,其后是DAP10。在若干实施例中,效应子结构域还包含CD3ζ。在若干实施例中,效应子结构域包含至少一个选自以下组的信号传导结构域,该组由以下组成:OX40(CD134)、CD3ζ、4-1BB、CD28和DAP12。在若干实施例中,效应子结构域包含一个或多个半-ITAM序列。在若干实施例中,半-ITAM包含SEQ ID NO.14的氨基酸序列。在若干实施例中,半-ITAM包含SEQ ID NO.37的氨基酸序列。在若干实施例中,效应子结构域包含一个或多个ITSM序列。在若干实施例中,ITSM包含SEQ ID NO.15的氨基酸序列或SEQ ID NO.35的氨基酸序列

[0061] 在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、4-1BB、2B4和CD3ζ。在一个实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:58的核酸序列编码。在一个实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列。在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、4-1BB和DAP10。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:60的核酸序列编码,并包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列。

[0062] 在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、4-1BB、2B4和DAP10。在若干实施例中,效应子结构域包含4-1BB,其后是DAP10,之后是2B4。在一些实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO.62的核酸序列编码,并且嵌合受体包含SEQ ID NO.63的氨基酸序列。在若干实施例中,效应子结构域包含4-1BB,其后是2B4,之后是DAP10。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:64的核酸序列编码,并且嵌合受体包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列。

[0063] 在若干实施例中,嵌合受体包含经密码子优化的与GS3接头偶联的NKG2D片段、另外的NKG2D片段、CD8a铰链、CD8a跨膜结构域、4-1BB和CD3ζ。在一个实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:66的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO.67的氨基酸序

列。

[0064] 在若干实施例中,嵌合受体包含经密码子优化的与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3ζ跨膜区和包含4-1BB的效应子结构域,由SEQ ID NO:78的核酸序列编码和/或包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列。

[0065] 在若干实施例中,嵌合受体包含经密码子优化的与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3ζ跨膜区和效应子结构域(包含CD16,其后是4-1BB)。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:70的核酸序列编码,和/或包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列。

[0066] 在若干实施例中,嵌合受体包含经密码子优化的与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3ζ跨膜区和效应子结构域(包含4-1BB,其后是GS3接头和CD16)。在一个实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列和/或由SEQ ID NO:84的核酸序列编码。

[0067] 在若干实施例中,嵌合受体包含经密码子优化的与GS3接头偶联的NKG2D片段、外的NKG2D片段、CD8a铰链、CD3ζ跨膜区和包含CD16和4-1BB的效应子结构域。在一个实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:72的核酸序列编码和/或包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列。

[0068] 在若干实施例中,嵌合受体包含通过GS3接头与偶联至CD8a铰联的NKG2D片段连接的IL-15、CD8a跨膜结构域、4-1BB和CD3ζ,由SEQ ID NO:88的核酸序列编码和/或包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列。

[0069] 在若干实施例中,嵌合受体包含与IgG4铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、4-1BB和CD3ζ,由SEQ ID NO:96的核酸序列编码,和/或包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列。

[0070] 在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、OX40和CD3ζ,由SEQ ID NO:90的核酸序列编码,和/或包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列。

[0071] 在若干实施例中,嵌合受体包含与IgG4铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、OX40和CD3ζ,由SEQ ID NO:100的核酸序列编码,和/或包含SEQ ID NO:101的氨基酸序列。

[0072] 在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD28跨膜/胞内结构域和CD3ζ,由SEQ ID NO:92的核酸序列编码,和/或包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列。

[0073] 在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD28跨膜/胞内结构域、4-1BB和CD3ζ,由SEQ ID NO:94的核酸序列编码,和/或包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列。

[0074] 在若干实施例中,嵌合受体包含与IgG4铰链偶联的NKG2D片段、CD28跨膜/胞内结构域和CD3ζ,由SEQ ID NO:98的核酸序列编码,和/或包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列。

[0075] 在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3ζ跨膜区和包含CD16、4-1BB、GS3接头和NKp80的效应子结构域。在一个实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:74的核酸序列编码和/或包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列。

[0076] 在若干实施例中,嵌合受体包含经密码子优化的与GS3接头偶联的NKG2D片段、另外的NKG2D片段、CD8a铰链、CD3ζ跨膜区和包含CD16、4-1BB、GS3和NKp80的效应子结构域。在一个实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:76的核酸序列编码和/或包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列。在若干实施例中,嵌合受体包含经密码子优化的与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3ζ跨膜区和包含4-1BB、GS3接头和NKp80的效应子结构域。在一个实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:82的核酸序列编码和/或包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列。

[0077] 在若干实施例中,嵌合受体包含经密码子优化的与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、

CD3ζ跨膜区和包含4-1BB和CD3ζ的效应子结构域。在一个实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:80的核酸序列编码和/或包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列。

[0078] 根据实施例,效应子结构域还可包含FcRγ。例如,在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3ζ跨膜区和包含4-1BB和FcRγ的效应子结构域。在一个实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:86的核酸序列编码和/或包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列。

[0079] 根据实施例,效应子结构域还可包含CD28。例如,在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3ζ跨膜区和包含CD28和CD3ζ的效应子结构域。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:102的核酸序列编码,和/或包含SEQ ID NO:103的氨基酸序列。

[0080] 在若干实施例中,效应子结构域包含GS接头。

[0081] 在若干实施例中,胞外受体结构域还包含CD8a信号肽,其中信号肽包含SEQ ID NO.4的核酸序列。在若干实施例中,胞外受体结构域还包含与CD3ζ跨膜区直接相邻的CD3ζ的2个胞外残基。在若干实施例中,胞外受体结构域包含CD8a信号肽,其中信号肽包含SEQ ID NO.4的核酸序列。

[0082] 在若干实施例中,嵌合受体包含一个或多个GS3接头。在若干实施例中,嵌合受体结构域包含铰链区。在若干实施例中,铰链区由SEQ ID NO:5的核酸序列编码,而在一些实施例中,铰链区由SEQ ID NO:5的核酸序列的片段编码。在若干实施例中,铰链区是CD8a铰链。在若干实施例中,铰链区包含具有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的甘氨酸-丝氨酸重复基序。在若干实施例中,铰链区包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列,并且在一些实施例中,铰链区包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列。在另外的实施例中,铰链区由SEQ ID NO:34的核酸序列编码。在若干实施例中,铰链区包含β-肾上腺素能受体的一部分。在一些这样的实施例中,铰链区由SEQ ID NO:40的核酸序列编码。在另外的实施例中,铰链区由SEQ ID NO:42的核酸序列编码。在若干实施例中,铰链区是由SEQ ID NO:104的核酸序列编码的免疫球蛋白G4(IgG4)铰链。在若干实施例中,铰链区是由SEQ ID NO:104的核酸序列的片段编码的免疫球蛋白G4(IgG4)铰链。在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段和CD8a跨膜结构域。

[0083] 在一个实施例中,嵌合受体包含与CD16偶联的NKG2D片段,由SEQ ID NO:23的核酸序列编码,和/或包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在一个实施例中,嵌合受体包含与NCR1偶联的NKG2D片段。在一些这样的实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:27的核酸序列编码和/或包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列。在若干实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的至少一部分。在若干实施例中,嵌合受体包含与NCR3偶联的NKG2D片段,在若干实施例中由SEQ ID NO.29的核酸序列编码和/或包含SEQ ID NO.30的氨基酸序列。

[0084] 在若干实施例中,嵌合受体包含与CD16跨膜/胞内结构域偶联的NKG2D片段和4-1BB。在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD16跨膜/胞内结构域和4-1BB,由SEQ ID NO:25的核酸序列编码,和/或包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

[0085] 在若干实施例中,嵌合受体包含与NCR1偶联的NKG2D片段和4-1BB,其中嵌合受体包含SEQ ID NO:20的NCR1氨基酸序列。

[0086] 在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a偶联的NKG2D片段、4-1BB和CD3ζ,由SEQ ID NO.18的核酸序列编码和/或包含SEQ ID NO.19的氨基酸序列。

[0087] 在若干实施例中,嵌合受体包含与NCR3偶联的NKG2D片段和4-1BB,并且其中NCR3包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列。在一个实施例中,嵌合受体包含SEQ ID NO:20的NCR1跨膜/胞内结构域或SEQ ID NO:22的NCR3跨膜/胞内结构域中的一个或多个。

[0088] 在若干实施例中,嵌合受体包含与GS3接头偶联的NKG2D片段、CD8a铰链、CD16跨膜/胞内结构域和4-1BB。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:43的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体包含与GS3接头偶联的NKG2D片段、CD16跨膜/胞内结构域和4-1BB。在一个实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:44的核酸序列编码。

[0089] 在若干实施例中,嵌合受体包含与CD16跨膜/胞内结构域偶联的NKG2D片段和4-1BB,并由SEQ ID NO:45的核酸序列编码。

[0090] 在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、4-1BB和2B4,并由SEQ ID NO:46的核酸序列编码。

[0091] 在若干实施例中,嵌合受体包含与β-肾上腺素能胞外结构域偶联的NKG2D片段、β-肾上腺素能跨膜结构域、4-1BB和2B4,并由SEQ ID NO:47的核酸序列编码。

[0092] 在一些实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、4-1BB、2B4、GS3接头和NKp80,并由SEQ ID NO:48的核酸序列编码。

[0093] 在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD8a跨膜结构域、4-1BB、GS3接头和NKp80,并由SEQ ID NO:49的核酸序列编码。

[0094] 在若干实施例中,嵌合受体包含经密码子优化的与GS3接头偶联的NKG2D片段、另外的NKG2D片段、β-肾上腺素能胞外结构域、β-肾上腺素能跨膜结构域、4-1BB、另外的GS3接头和NKp80并由SEQ ID NO:50的核酸序列编码。

[0095] 在若干实施例中,嵌合受体包含经密码子优化的与GS3接头偶联的NKG2D片段、另外的NKG2D片段、CD8a铰链、CD8a跨膜结构域、4-1BB、另外的GS3接头和NKp80并由SEQ ID NO:51的核酸序列编码。

[0096] 在若干实施例中,嵌合受体包含经密码子优化的与GS3接头偶联的NKG2D片段、另外的NKG2D片段、CD8a铰链、CD16跨膜/胞内结构域和4-1BB并由SEQ ID NO:52的核酸序列编码。

[0097] 在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD16跨膜/胞内结构域、4-1BB和2B4,并由SEQ ID NO:53的核酸序列编码。

[0098] 在若干实施例中,嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD16跨膜/胞内结构域、4-1BB、GS3接头和NKp80,并由SEQ ID NO:54的核酸序列编码。

[0099] 在若干实施例中,嵌合受体构建体由编码嵌合受体的多核苷酸编码,其中胞外受体结构域包含与NKG2D的天然配体结合的第二肽(例如,MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5或ULBP6中的一种或多种)。根据实施例,与NKG2D的天然配体结合的肽与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO.3具有至少80%的同源性。

[0100] 在若干实施例中,多核苷酸与另外的编码膜结合白细胞介素15(mbIL15)的构建体共表达。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:18的核酸序列编码。在若干实施例中,嵌合受体由SEQ ID NO:19的氨基酸序列编码。

[0101] 根据若干实施例,嵌合受体不包含DNAX活化蛋白10(DAP10)和/或嵌合受体不编码基于免疫受体酪氨酸的活化(ITAM)基序。

[0102] 在若干实施例中,本文披露的多核苷酸是mRNA。另外,在若干实施例中,本文披露的多核苷酸与至少一种调节元件可操作地连接以表达嵌合受体。

[0103] 本文还提供了包含本文披露的多核苷酸的载体。在若干实施例中,多核苷酸与至少一个用于表达嵌合受体的调节元件可操作地连接。在若干实施例中,载体是逆转录病毒。

[0104] 本文还提供了基因工程改造的自然杀伤细胞,其包含本文披露的任何一种或多种多核苷酸。在若干实施例中,自然杀伤细胞用于自体使用,而在一些实施例中,它们用于同种异体用途。

[0105] 本文还提供了增强有需要的哺乳动物中NK细胞细胞毒性的方法,该方法包括向哺乳动物给予NK细胞,其中所述NK细胞表达由本文披露的多核苷酸编码的嵌合受体。

[0106] 另外,提供了治疗或预防有需要的哺乳动物中癌症或传染病的方法,所述方法包括向所述哺乳动物给予治疗有效量的NK细胞,其中所述NK细胞表达由本文所披露的多核苷酸编码的嵌合受体。如上所述,NK细胞可以是同种异体的或自体的。

[0107] 提供了本文披露的多核苷酸在制备用于增强有需要的哺乳动物中NK细胞细胞毒性的药物中的用途。此外,提供了多核苷酸在制备用于治疗或预防有需要的哺乳动物中癌症或传染病的药物中的用途。

[0108] 还提供了包含本文披露的多核苷酸的载体在制备用于增强有需要的哺乳动物中NK细胞细胞毒性的药物中的用途。还提供了包含本文披露的多核苷酸的载体在制备用于治疗或预防有需要的哺乳动物中癌症或传染病的药物中的用途。

[0109] 还提供了分离的、基因工程改造的、表达本文披露的嵌合受体的自然杀伤细胞用于增强有需要的哺乳动物中NK细胞细胞毒性的用途。还提供了分离的、基因工程改造的、表达本文披露的嵌合受体的自然杀伤细胞用于治疗或预防有需要的哺乳动物中癌症或传染病的用途。

[0110] 以上概述并在下面进一步详细阐述的组合物和相关方法描述了专业人员采取的某些行为;但是,应该理解的是,它们还可以包括另一方对这些行为的指示。因此,例如“给予表达嵌合受体的NK细胞群”的行为包括“指示给予表达嵌合受体的NK细胞群”。

附图说明

[0111] 以下附图的描述涉及代表本文披露的发明的非限制性实施例的实验和结果。

[0112] 图1A-图1C描绘根据本文披露的若干实施例的嵌合受体的示意图。图1A描绘内源性NKG2D,图1B描绘NKG2D-DAP10-CD3ζ,及图1C描绘NKG2D-41BB-CD3ζ。

[0113] 图2A-图2B描绘根据本文披露的若干实施例的嵌合受体的示意图。图2A描绘NKG2D-CD16及图2B描绘NKG2D-CD16-41BB。

[0114] 图3A-图3B描绘质粒图,其说明了根据若干实施例的某些构建体插入质粒中的点,示出了鼠干细胞病毒(MSCV)质粒。图3A显示NKG2D-DAP10-CD3ζ和NKG2D-41BB-CD3ζ的基因构建体,它们插入载体中的EcoRI和NotI限制性位点,同时去除IRES-GFP序列。图3B描绘NKG2D-CD16和NKG2D-CD16-41BB的质粒,它们插入位于多克隆位点(MCS)中的EcoRI和XhoI限制性位点。载体中的IRES-GFP序列允许追踪转导效率。

[0115] 图4A-图4C描绘数据,该数据涉及NK细胞中NKG2D-DAP10-CD3ζ和NKG2D-41BB-CD3ζ的表达。图4A显示流式细胞术数据,示出转导后NKG2D阳性NK细胞的百分比。图4B显示概述

NKG2D阳性NK细胞百分比的点图。图4C显示数据,该数据涉及转导后不同NK细胞组中的平均荧光强度(MFI)。

[0116] 图5A-图5C描绘数据,该数据涉及各种构建体的从供体1、供体2和供体3(分别为图5A、图5B和图5C)的NK细胞产生的针对培养的REH细胞的细胞毒性。

[0117] 图6A-图6C描绘数据,该数据涉及各种构建体的从供体1、供体2和供体3(分别为图6A、图6B和图6C)的NK细胞产生的针对培养的U-2OS细胞的细胞毒性。

[0118] 图7A-图7B描绘数据,该数据涉及在存在和不存在用REH细胞刺激的情况下,表达各种NKG2D构建体的NK细胞的干扰素-γ产生。图7A描绘在有或没有REH细胞刺激的情况下,不同NK细胞组中IFNγ的相对量。图7B描绘了刺激后不同NK细胞组之间IFNγ的水平(中值表示)。

[0119] 图8A-图8C描绘数据,该数据涉及NK细胞中NKG2D-DAP10-CD3ζ和NKG2D-CD16的表达。图8A显示流式细胞术数据,示出转导后NKG2D阳性NK细胞的百分比。图8B显示概述NKG2D阳性NK细胞百分比的点图。图8C显示数据,该数据涉及转导后不同NK细胞组中的平均荧光强度(MFI)。

[0120] 图9A-图9C描绘数据,该数据涉及各种构建体的从3个供体(分别为图9A、图9B和图9C)的NK细胞产生的针对培养的REH细胞的细胞毒性。

[0121] 图10A-图10C描绘数据,该数据涉及各种构建体的从3个供体(分别为图10A、图10B和图10C)的NK细胞产生的针对培养的U-2OS细胞的细胞毒性。

[0122] 图11描绘数据,该数据涉及在存在和不存在用REH细胞刺激的情况下,表达各种NKG2D构建体的NK细胞的干扰素-γ产生。

[0123] 图12A-图12B描绘数据,该数据涉及NK细胞中NKG2D-DAP10-CD3ζ和NKG2D-CD16-41BB的表达。图12A显示流式细胞术数据,示出转导后NKG2D阳性NK细胞的百分比。图12B显示直方图,该直方图涉及NK细胞上各种构建体的表面表达的相对量。

[0124] 图13A-图13B描绘数据,该数据涉及各种NKG2d构建体的细胞毒性程度。图13A描绘针对培养的REH细胞的细胞毒性程度。图13B描绘针对培养的U2OS细胞的细胞毒性程度。

[0125] 图14示意性地描绘了根据本文披露的一些实施例的若干种NKG2D构建体的构建图。

[0126] 图15示意性地描绘了根据本文披露的一些实施例的另外NKG2D构建体的构建图。

[0127] 图16A-图16C描绘数据,该数据涉及NK细胞中各种NKG2D构建体的表达。图16A显示数据,该数据涉及NK细胞中各种NKG2D构建体的平均荧光强度(MFI)。图16B显示流式细胞术数据,示出将各种NKG2D构建体转导入两个供体的NK细胞(505和870)后,NKG2D阳性和CD56阳性NK细胞的百分比。图16C显示数据,该数据涉及转导后七天来自2个供体的NK细胞中的平均荧光强度(MFI)。

[0128] 图17描绘数据,该数据涉及在以1:1的E:T比率下转导入NK细胞后14天,各种NKG2D构建体的细胞毒性。

[0129] 图18A-图18B描绘数据,该数据涉及转导入NK细胞后,各种NKG2D构建体的表达。图18A显示数据,该数据涉及转导后七天NK细胞中的平均荧光强度(MFI)。图18B显示数据,该数据涉及各种NKG2D构建体相对于空白转导的NK细胞的MFI倍数变化。

[0130] 图19A-图19B描绘数据,该数据涉及各种NKG2D构建体的细胞毒性。图19A显示数

据,该数据涉及在1:1的E:T比率下,转导入NK细胞的各种NKG2D构建体的细胞毒性。图19B显示数据,该数据涉及各种NKG2D构建体相对于空白转导的NK细胞的细胞毒性百分比变化。

[0131] 图20描绘数据,该数据涉及在以1:1的E:T比率下转导入NK细胞后14天,各种NKG2D构建体的细胞毒性。在分析之前,将NK细胞在补充有40IU IL-2/mL的培养基中培养。

[0132] 图21描绘数据,该数据涉及在转导进入供体238NK细胞10天(其中在每2天以40IU IL-2/mL进行补充的培养基中培养4天)后,在1:1和1:2的E:T比率进行两小时的情况下,各种NKG2D构建体针对培养的REH细胞的细胞毒性。

[0133] 图22示意性地描绘了根据本文披露的实施例的另外NKG2D构建体的构建图。

[0134] 图23A-图23B描绘数据,该数据涉及各种NKG2D构建体的从两个不同供体(供体61和供体103,分别于图23A和图23B中)的NK细胞产生的持久性。在补充有40IU IL-2/mL的培养基中培养NK细胞。

[0135] 图24描绘数据,该数据涉及各种NKG2D构建体的表达。从4个健康供体(224、225、362和363)的外周血单核细胞(PBMC)扩增NK细胞,并用指导所示构建体表达的病毒进行转导。转导后3天,用荧光标记的抗-NKG2D抗体对NK细胞染色,并使用流式细胞仪分析。通过经标记的细胞的平均荧光强度(MFI)评估相对的NKG2D表达。

[0136] 图25A-图25B描绘数据,该数据涉及用各种NKG2D构建体转导的NK细胞的细胞毒性。NK细胞从4个供体的PBMC扩增;转导后8天,在1:1的E:T比率下测量针对培养的REH和HL60细胞(分别为图25A和图25B)的NK细胞毒性。在分析之前,将NK细胞在补充有40IU IL-2/mL的培养基中培养。

[0137] 图26A-图26C描绘数据,该数据涉及在使用REH肿瘤细胞过夜刺激后,表达各种NKG2D构建体的NK细胞的干扰素-γ(IFNγ)、肿瘤坏死因子-α(TNFα)和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的产生。在用指定的构建体转导后8天,在96孔圆底板的各个孔中用1x 10^5个REH细胞刺激1x 10^5个NK细胞;过夜孵育后,收获上清液,并使用Meso Scale Discovery装置参照相关标准对细胞因子水平进行测量。图26A描绘刺激后不同NK细胞组中IFNγ的累积水平,图26B描绘刺激后不同NK细胞组中TNFα的水平,以及图26C描绘刺激后不同NK细胞组中GM-CSF的水平。在分析之前,将NK细胞在补充有40IU IL-2/mL的培养基中培养。

[0138] 图27A-图27B描绘数据,该数据涉及转导后7、14和21天,表达各种NKG2D构建体的来自两个供体(供体224和225,分别于图27A和图27B中)的NK细胞的持久性。在分析之前,将NK细胞在补充有40IU IL-2/mL的培养基中培养。

[0139] 图28A-图28B描绘数据,该数据涉及用所述指定的NKG2D构建体转导的NK细胞的细胞毒性。测量了针对稳定转导以表达红色荧光蛋白的U2OS细胞得NK细胞毒性;将U2OS细胞与NK细胞以1:4和1:2(分别为图28A和图28B)的E:T比率进行培养。使用Incucyte S3活细胞分析系统(Live-Cell Analysis System)在72小时中每60分钟对活U2OS细胞计数。在分析之前,将NK细胞在补充有40IU IL-2/mL的培养基中培养。

具体实施方式

[0140] 概述

[0141] 许多疾病的异常细胞(包括病毒感染的细胞和恶性细胞)的出现和持续是通过对

所述异常细胞的免疫应答不足而达到的。免疫疗法的目标是启动或增强患者的免疫系统应答,例如,增强免疫细胞(例如自然杀伤(NK)细胞)破坏、杀伤或以其他方式抑制受损细胞或患病细胞的能力。一种免疫疗法是在免疫细胞中重组用于靶向识别和破坏异常细胞表达嵌合受体。通常,嵌合受体包含识别靶细胞上的配体的胞外受体结构域、锚定跨膜结构域和在配体结合后转导活化信号的效应子结构域。本文公开的一些实施例利用具有该一般结构的嵌合受体,或具有该一般结构的变体的嵌合受体。另外,在若干实施例中,跨膜结构域和效应子结构域是单独的肽,其融合在一起。在若干其他实施例中,跨膜结构域和效应子结构域衍生自相同的肽。在一些这样的实施例中,跨膜结构域和效应子结构域包含单个肽(例如,一个肽,其穿过膜并且还准备启动信号级联)。如下面更详细讨论的,使用截短、突变、额外的连接子/间隔子元件、二聚体等产生嵌合受体构建体,其在免疫细胞(例如,NK细胞)中表现出所需程度的表达,诱导来自NK细胞的细胞毒性活性,与一定程度的靶标亲合力平衡(这避免对非靶细胞的不利影响)。本文披露的嵌合受体在免疫细胞表面上的重组表达可以将免疫细胞的靶向重定向至目标异常细胞,并且在接合后增强免疫活化。

[0142] 用于免疫疗法的NK细胞

[0143] 一种免疫疗法包括向患者给予工程改造以表达嵌合受体的T细胞以引发阳性免疫应答。然而,该方法的缺点是其需要使用自体细胞来预防患者中移植物抗宿主病的诱导。如本文披露的若干实施例中所提供,包含工程改造的NK细胞的组合物具有若干优点。例如,自体或供体衍生的同种异体细胞可以与NK细胞方法一起使用。另外,根据若干实施例,如本文提供的工程改造的NK细胞不显著增加针对正常细胞的细胞毒性。此外,NK细胞一旦被活化,就具有显著的细胞毒性作用。鉴于此,出人意料的是,本文提供的工程改造的NK细胞能够进一步提高细胞毒性作用,从而提供选择性杀死患病靶细胞的更有效的手段。因此,在若干实施例中,提供了治疗或预防癌症或传染病的方法,其包括给予治疗有效量的表达本文嵌合受体的NK细胞。在一个实施例中,给予的NK细胞是自体细胞。在进一步的实施例中,给予的NK细胞是供体衍生的(同种异体的)细胞。

[0144] 在若干实施例中,表达嵌合受体的重组NK细胞的接合和活化(例如,通过结合靶细胞上的配体)导致通过细胞溶解直接杀伤应激细胞和/或异常细胞(例如,肿瘤细胞、病毒感染的细胞等)。因此,在若干实施例中,提供了增强NK细胞细胞毒性的方法,该方法包括给予经工程改造以表达本文所述的嵌合受体的NK细胞。在一个实施例中,给予的NK细胞是自体细胞。在进一步的实施例中,所述NK细胞是供体衍生的(同种异体的)细胞。在若干实施例中,工程改造的NK细胞导致应激细胞和/或异常细胞(例如,肿瘤细胞、病毒感染的细胞等)的间接破坏或抑制。

[0145] 配体结合结构域

[0146] 如上所述,在若干实施例中,NK细胞识别并破坏异常细胞(包括肿瘤细胞和病毒感染的细胞)。这些先天免疫细胞的细胞毒活性分别受抑制受体和活化受体(位于细胞表面)的信号传导平衡调节。前者结合健康细胞表面上表达的自身分子,而后者结合异常细胞上表达的配体。活化受体相对于抑制受体的接合增加导致NK细胞活化和靶细胞裂解。自然杀伤组2成员D(NKG2D)是一种重要的NK细胞活化受体,其识别在应激细胞和异常细胞上表达的许多配体。各种NKG2D配体的表面表达在健康细胞中通常较低,但在恶性转化或病毒感染时上调。NKG2D识别的配体的非限制性实例包括但不限于:MICA、MICB、ULBP1、ULBP2,ULBP3、

ULBP4、ULBP5和ULBP6、以及在靶细胞上表达的控制NK细胞细胞溶解或细胞毒性功能的其他分子。

[0147] NKG2D识别细胞应激和感染的多种表面标志物的能力使其成为基于嵌合受体的免疫疗法的潜在有用组分。然而,使NKG2D用作嵌合受体复杂化的是其与伴侣DAP10的关系。NKG2D是II型跨膜糖蛋白,其形成同二聚体并与DNAX活化蛋白10(DAP10)的两个同二聚体组装,以在膜表面上产生六聚体复合物。该NKG2D-DAP10缔合对于内源性NKG2D的表面膜表达以及在配体结合后活化信号的转导都是必需的。在若干实施例中,使用全长NKG2D。在一个实施例中,全长NKG2D具有SEQ ID NO.1的核酸序列。根据本文披露的若干实施例,提供了编码嵌合受体的多核苷酸,其中胞外受体结构域是NKG2D片段,其缺乏其天然跨膜结构域或胞内结构域,但仍有利地保留其与NKG2D的天然配体结合、以及在配体结合后转导活化信号的能力。因此,在若干实施例中,由本文披露的多肽编码的嵌合受体不包含DAP10。在若干实施例中,NKG2D片段由SEQ ID NO.2编码。在若干实施例中,NKG2D片段与全长野生型NKG2D具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的同源性。在若干实施例中,片段可具有来自SEQ ID NO.2的一个或多个另外的突变,但保留配体结合功能、或在一些实施例中具有增强的配体结合功能。在若干实施例中,NKG2D片段以二聚体、三聚体或其他多联体形式提供,这些实施例提供增强的配体结合活性。在若干实施例中,编码NKG2D片段的序列任选地完全或部分经密码子优化。在一个实施例中,编码经密码子优化的NKG2D片段的序列包含SEQ ID NO.3的序列。另外,在若干实施例中,使用信号肽。信号肽的种类或序列可随构建体而变化。然而,在若干实施例中,使用衍生自CD8的信号肽。在一个实施例中,信号肽来自CD8a并具有SEQ ID NO.4的序列。在一个实施例中,编码经密码子优化的NKG2D片段的序列包含SEQ ID NO.68的序列。在若干实施例中,片段可具有来自SEQ ID NO.68的一个或多个另外的突变,但保留配体结合功能。在若干实施例中,片段可具有来自SEQ ID NO.68的一个或多个另外的突变,但具有改善的配体结合功能。

[0148] 跨膜结构域、信号传导结构域和组合结构域

[0149] 如上所述,一般的嵌合抗原受体结构包含至少一个跨膜结构域,将配体结合结构域连接至一个或多个信号结构域。然而,在若干实施例中,跨膜结构域还可用于提供信号传导功能。

[0150] 在若干实施例中,NKG2D片段保留其正常跨膜结构域的至少一部分。在若干实施例中,跨膜结构域包含CD8的至少一部分,CD8是通常在T细胞和NK细胞上表达的跨膜糖蛋白。在若干实施例中,跨膜结构域包含CD8α,而在一些实施例中,使用CD8β。在若干实施例中,CD8α的“铰链”具有SEQ ID NO.5的序列。在一些实施例中,CD8α可以被截短或修饰,使得其与具有SEQ ID NO.5的序列的CD8α具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%的同源性。在若干实施例中,CD8β具有SEQ ID NO.6的序列。在一些实施例中,CD8β可以被截短或修饰,使得其与具有SEQ ID NO.6的序列的CD8β具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%的同源性。在若干实施例中,使用CD8α和CD8β的二聚体。

[0151] 在若干实施例中,跨膜结构域包含CD16,其也用作信号传导结构域。CD16以两种同种型存在,a和b(也分别称为Fcγ受体IIIa和IIIb)。这些受体通常与IgG抗体的Fc部分结合,转而活化NK细胞。因此,在若干实施例中,跨膜结构域包含CD16a,而在一些实施例中,使

用CD16b。在若干实施例中,CD16a具有SEQ ID NO.7的序列。在一些实施例中,CD16a可以被截短或修饰,使得其与具有SEQ ID NO.7的序列的CD16a具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％的同源性。在若干实施例中,CD16b具有SEQ ID NO.8的序列。在一些实施例中,CD16b可以被截短或修饰,使得其与具有SEQ ID NO.8的序列的CD16b具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％的同源性。在若干实施例中,使用CD16a和CD16b的二聚体。在若干实施例中,对CD16跨膜结构域的修饰包含额外的核酸残基以增加该结构域的长度。可替代地,可以缩短CD16。对CD16长度的修饰可以有利地促进增强的配体-受体相互作用。

[0152] 在若干实施例中,嵌合受体包含自然杀伤受体2B4结构域(在本文中称为“2B4”,也称为CD244),其也用作信号传导结构域。2B4在NK细胞上表达,并通过该受体与其靶细胞上的配体之间的相互作用调节非主要组织相容性复合物(MHC)限制性杀伤。在若干实施例中,跨膜结构域包含2B4,而在若干实施例中,2B4结构域是胞内信号传导结构域。在若干实施例中,2B4具有SEQ ID NO.9的序列。在一些实施例中,2B4可以被截短或修饰,使得其与具有SEQ ID NO.9的序列的2B4具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％的同源性。在若干实施例中,2B4用作构建体中的唯一跨膜/信号传导结构域,然而,在若干实施例中,2B4可与一个或多个其他结构域一起使用。例如,在一些实施例中使用CD16、4-1BB和/或2B4的组合。

[0153] 在一些实施例中,如上所述,通过DAP10实现信号传导。在若干实施例中,NKG2D片段与DAP10缔合以向NK细胞提供前细胞毒性信号。在若干实施例中,使用DAP10的二聚体。在若干实施例中,跨膜结构域包含DAP10。在若干实施例中,DAP10具有SEQ ID NO.10的序列。在一些实施例中,DAP10可以被截短或修饰,使得其与具有SEQ ID NO.10的序列的DAP10具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％的同源性。类似地,在一些实施例中,可以使用DAP12,因为它也可以转导这些信号。在若干实施例中,DAP12具有SEQ ID NO.11的序列。在一些实施例中,DAP12可以被截短或修饰,使得其与具有SEQ ID NO.11的序列的DAP12具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％的同源性。在若干实施例中,使用DAP10和DAP12的异二聚体。

[0154] 在若干实施例中,通过4-1BB(也称为CD137和肿瘤坏死因子受体超家族成员9(TNFRSF 9))提供信号传导。4-1BB是共刺激免疫检查点分子,通常用作活化的T细胞的刺激分子(例如,4-1BB的交联增强T细胞增殖和细胞溶解活性)。然而,在若干实施例中,4-1BB的功能有利地与NK细胞结合使用。在若干实施例中,4-1BB具有SEQ ID NO.12的序列。在一些实施例中,4-1BB可以被截短或修饰,使得其与具有SEQ ID NO.12的序列的4-1BB具有至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％的同源性。在若干实施例中,4-1BB是唯一的信号传导结构域,但如上所述,在若干实施例中,4-1BB与本文披露的一种或多种其他跨膜结构域/信号传导结构域组合时出人意料地作用良好。例如,在若干实施例中,CD16与4-1BB结合提供协同刺激作用,产生特别有效(例如细胞毒性)的NK细胞。在若干实施例中,DAP10与4-1BB结合提供协同刺激作用,产生特别有效(例如细胞毒性)的NK细胞。在若干实施例中,DAP10与4-1BB和/或2B4结合提供协同刺激作用,产生特别有效(例如细胞毒性)的NK细胞。在若干实施例中,其他改善的特性导致诸如改善的表达、改善的持久性等。

[0155] 在若干实施例中,信号传导结构域包含CD3 T细胞受体复合物的至少一部分。T细

胞受体复合物包含多个亚基,包括ζ、α、β、γ、δ和ε亚基。在若干实施例中,根据本文披露的若干实施例工程改造的NK细胞包含这些亚基中的至少一个(或其片段)。在若干实施例中,信号传导结构域包含CD3ζ亚基。在若干实施例中,CD3ζ具有SEQ ID NO.13的序列。在一些实施例中,CD3ζ可以被截短或修饰,使得其与具有SEQ ID NO.13的序列的CD3ζ具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%的同源性。在若干实施例中,CD3ζ突变(例如,氨基酸突变、插入或缺失),使得该结构域不再与基于经典免疫受体酪氨酸的活化基序或ITAM基序一致。因此,在若干实施例中,NK细胞包含不含有ITAM基序的工程改造的受体。在一些实施例中,所得的工程改造的NK细胞对靶细胞表现出特别增强的细胞毒性,同时具有有限的或减少的不良副作用。在若干实施例中,这是由在给定实施例中使用的嵌合受体的各个部分的协同相互作用造成。在若干实施例中,CD3ζ与4-1BB结合提供协同刺激作用,产生特别有效(例如细胞毒性)的NK细胞。在若干实施例中,CD3ζ与2B4结合提供协同刺激作用,产生特别有效(例如细胞毒性)的NK细胞。在若干实施例中,CD3ζ与2B4和4-1BB组合提供协同刺激作用,产生特别有效(例如细胞毒性)的NK细胞。在若干实施例中,嵌合受体利用通过其跨膜结构域的CD3ζ二聚化。因此,在若干实施例中,跨膜结构域包含CD3ζ跨膜结构域(或其片段)。在一些实施例中,1、2、3、4、5、6或更多个胞外CD3ζ残基(所述"近膜部分")与CD3ζ跨膜结构域直接相邻。在一些实施例中,CD3ζ跨膜结构域具有SEQ ID NO.69的序列。在一些实施例中,CD3ζ跨膜结构域可以被截短或修饰,使得其与具有SEQ ID NO.69的序列的CD3ζ跨膜结构域具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%的同源性。在若干实施例中,对CD3ζ跨膜结构域的修饰包含额外的核酸残基以增加该结构域的长度。在若干实施例中,CD3ζ跨膜结构域和CD3ζ近膜部分将全长CD3ζ分子募集至突触。在若干实施例中,取决于实施例,天然CD3ζ向工程改造的受体的募集(与不具有CD3ζ跨膜结构域的受体相比)增加约20%、约30%、约40%、约50%或更多。在若干实施例中,CD3ζ跨膜结构域与效应子结构域偶联,效应子结构域包含CD16、NCR1、NCR2、NCR3、4-1BB、NKp80、FcRγ、CD3ζ和2B4中的一个或多个。

[0156] 在若干实施例中,嵌合受体包含CD28结构域。在若干实施例中,跨膜结构域包含CD28,而在一些实施例中,CD28结构域是胞内信号传导结构域,而在一些实施例中,CD28结构域是跨膜/胞内信号传导结构域。在若干实施例中,CD28跨膜结构域具有SEQ ID NO.105的序列。在一些实施例中,CD28跨膜结构域可以被截短或修饰,使得其与具有SEQ ID NO.105的序列的CD28具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%的同源性。在若干实施例中,CD28胞内信号传导结构域具有SEQ ID NO.106的序列。在一些实施例中,CD28胞内信号传导结构域可以被截短或修饰,使得其与具有SEQ ID NO.106的序列的CD28具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%的同源性。在若干实施例中,CD28用作构建体中的唯一跨膜/信号传导结构域,然而,在若干实施例中,CD28可与一个或多个其他结构域一起使用。例如,在一些实施例中使用CD28、OX40、4-1BB和/或CD3ζ的组合。

[0157] 在若干实施例中,嵌合受体包含OX40结构域。在若干实施例中,OX40结构域是胞内信号传导结构域。在若干实施例中,OX40胞内信号传导结构域具有SEQ ID NO.107的序列。在一些实施例中,OX40胞内信号传导结构域可以被截短或修饰,使得其与具有SEQ ID NO.107的序列的OX40具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%的

同源性。在若干实施例中,OX40用作构建体中的唯一跨膜/信号传导结构域,然而,在若干实施例中,OX40可与一个或多个其他结构域一起使用。例如,在一些实施例中使用CD28、OX40、4-1BB和/或CD3ζ的组合。

[0158] 在更进一步的实施例中,嵌合受体的信号传导部分包含ITAM的部分,例如半-tam。在若干实施例中,这些部分不构成经典的ITAM序列,但是包含仍然可以传递NK细胞细胞毒性所需信号的部分。在若干实施例中,半-tam具有SEQ ID NO.14的序列(其中X可以是任何残基)。在一些实施例中,半-tam可以被截短或修饰,使得其与具有SEQ ID NO.14的序列的半-tam具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%的同源性。在一些实施例中,嵌合受体构建体包含SEQ ID NO.14的半-tam。在若干实施例中,可以使用多个半-tam,例如以头对尾、尾对头、头对头或尾对尾的配置。在一些实施例中,至少一个半-tam的存在使得包含使用至少一个半-tam的嵌合受体的NK细胞的信号传导和细胞毒性增强。如下文更详细讨论的,在若干嵌合受体中包含NKp80,其是半-tam的一个非限制性实例。

[0159] 在若干实施例中,使用另外的信号传导区域,包括例如衍生自信号传导淋巴细胞活化分子(SLAM)家族的受体的信号传导区域。这些受体包括但不限于2B4(如上所述)。SLAM家族的受体在其细胞质尾部中具有基于酪氨酸的共有基序。该基序是S/TxYxxL/I,其被称为基于免疫受体酪氨酸的开关基序(ITSM)(SEQ ID NO.15)。这些受体通过SLAM相关蛋白(SAP,由基因SH2D1A编码)传递活化信号,SAP募集酪氨酸激酶Fyn。因此,根据若干实施例,信号传导区域包含含有ITSM基序的多肽序列(或编码其的核酸)。在若干实施例中,ITSM基序不需要完全编码,但信号传导区域能够通过SAP(或另一种类似途径)传递活化信号。在若干实施例中,ITSM基序具有SEQ ID NO.15的序列(其中X可以是任何氨基酸残基)。在若干实施例中,ITSM基序可被截短或修饰,使得其与具有SEQ ID NO.15的序列的ITSM基序具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%的同源性。在若干实施例中,ITSM基序包含SEQ ID NO.15的序列。

[0160] 除了NKG2D受体、跨膜结构域和信号传导结构域(和组合跨膜/信号传导结构域)的这些变异之外,在一些实施例中,还可以提供另外的共活化分子。例如,在若干实施例中,NK细胞经工程改造以表达膜结合的白细胞介素15(mbIL15)。在此类实施例中,NK细胞上mbIL15的存在通过协同增强NK细胞的增殖和寿命而进一步增强NK细胞的细胞毒性作用。在若干实施例中,mbIL15具有SEQ ID NO.16的核酸序列。在一些实施例中,mbIL15可以被截短或修饰,使得其与SEQ ID NO.16的序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%的同源性。在若干实施例中,mbIL15具有SEQ ID NO.17的氨基酸序列。结合本文公开的嵌合受体,这些实施例提供了特别有效的NK细胞组合物,用于靶向和破坏特定的靶细胞。

[0161] 嵌合受体构建体

[0162] 鉴于本文提供的披露,存在多种嵌合受体,其可以在NK细胞中产生和表达,以靶向和破坏特定的靶细胞,例如患病细胞或癌细胞。下文更详细地讨论了此类嵌合受体的非限制性实例。

[0163] 如上所述,T细胞受体复合物的部分,特别是CD3ζ,充当免疫信号级联的有效活化剂。同样,受体4-1BB(肿瘤坏死因子超家族成员)在配体结合后活化NK细胞。在若干实施例中,这两种信号传导组分在配体与嵌合受体结合后以协同方式起作用活化NK细胞。因此,在

若干实施例中,提供了编码NKG2D/CD8a/4-1BB/CD3ζ嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段胞外受体结构域、CD8跨膜区和包含4-1BB和CD3ζ的信号传导结构域的效应子结构域。在一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:18的核酸序列编码。在一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:108的核酸序列编码。在另一个实施例中,NKG2D-CD8a-4-1BB-CD3ζ嵌合受体包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。在若干实施例中,当NK细胞同时表达mbIL15时,该构建体特别有效,mbIL15对NK细胞的活化和细胞毒性提供进一步的协同效应。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.18(例如,SEQ ID NO:108),但取决于实施例,与SEQ ID NO.18保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.18(例如,SEQ ID NO:108),嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。

[0164] 受体2B4具有若干种基于免疫受体酪氨酸的开关基序(ITSM),并具有转导活化信号的潜力。同样,通过受体4-1BB(肿瘤坏死因子超家族成员)的信号传导也在配体结合后活化NK细胞。因此,在一些实施例中,利用这些信号传导分子协同产生出人意料地有效的细胞毒性NK细胞的能力,提供了编码NKG2D/CD8a/2B4/4-1BB嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段胞外受体结构域、CD8a跨膜区和包含4-1BB和2B4的信号传导结构域的效应子结构域。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。

[0165] 在若干实施例中,2B4与CD3ζ的组合与NK细胞一起使用以产生针对靶细胞的增强的细胞毒性。因此,在若干实施例中,提供了编码NKG2D/CD8a/2B4/CD3ζ嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段胞外受体结构域、CD8a跨膜区和包含CD3ζ和2B4的信号传导结构域的效应子结构域。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。如上所述,4-1BB与CD3ζ和2B4一样可以作为免疫信号级联的有效活化剂起作用。在若干实施例中,这三种信号传导组分在配体与嵌合受体结合后以协同方式起作用活化NK细胞。因此,在若干实施例中,提供了编码NKG2D/CD8a/4-1BB/2B4/CD3ζ嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段胞外受体结构域、CD8跨膜区和包含4-1BB、2B4和CD3ζ的信号传导结构域的效应子结构域。在一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:58的核酸序列编码。在另一个实施例中,NKG2D-CD8a-4-1BB-CD3ζ嵌合受体包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列。在若干实施例中,当NK细胞同时表达mbIL15时,该构建体特别有效,mbIL15对NK细胞的活化和/或细胞毒性提供进一步的协同效应。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.58,但取决于实施例,与SEQ ID NO.58保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.58,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。

[0166] 在若干可替代的实施例中,提供了编码NKG2D/CD8a/DAP10/4-1BB嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段胞外受体结构域、CD8a跨膜区和包含4-1BB和DAP10的信号传导结构域的效应子结构域。在一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:60的核酸序列编码。在另一个实施例中,NKG2D-CD8a-4-1BB-DAP10嵌合受体包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表

达。在若干实施例中,当NK细胞同时表达mbIL15时,该构建体特别有效,mbIL15对NK细胞的活化和细胞毒性提供进一步的协同效应。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.60,但取决于实施例,与SEQ ID NO.60保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.60,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。此外,如上所述,2B4与DAP10和4-1BB一样是免疫信号级联的有效活化剂。在若干实施例中,这三种信号传导组分在配体与嵌合受体结合后以协同方式起作用活化NK细胞。因此,在若干实施例中,提供了编码NKG2D/CD8a/4-1BB/DAP10/2B4嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段胞外受体结构域、CD8跨膜区和包含4-1BB、2B4和DAP10的信号传导结构域的效应子结构域,其中4-1BB之后是DAP10,DAP10之后是2B4。在一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:62的核酸序列编码。在另一个实施例中,NKG2D-CD8a-4-1BB-CD3ζ嵌合受体包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列。在若干实施例中,当NK细胞同时表达mbIL15时,该构建体特别有效,mbIL15对NK细胞的活化和细胞毒性提供进一步的协同效应。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.62,但取决于实施例,与SEQ ID NO.62保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.62,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。在若干其他实施例中,提供了编码NKG2D/CD8a/4-1BB/2B4/DAP10嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段胞外受体结构域、CD8跨膜区和包含4-1BB、2B4和DAP10的信号传导结构域的效应子结构域,其中4-1BB之后是2B4,2B4之后是DAP10。在一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:64的核酸序列编码。在另一个实施例中,NKG2D-CD8a-4-1BB-CD3ζ嵌合受体包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列。在若干实施例中,当NK细胞同时表达mbIL15时,该构建体特别有效,mbIL15对NK细胞的活化和细胞毒性提供进一步的协同效应。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.64,但取决于实施例,与SEQ ID NO.64保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.64,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。

[0167] 在若干另外的实施例中,嵌合受体的跨膜和效应子结构域(和相关功能)衍生自相同的肽。CD16是在NK细胞表面上表达的有效活化受体。因此,在若干实施例中,提供了编码NKG2D/CD16嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段胞外受体结构域和包含跨膜区和胞内效应子结构域的CD16肽。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:23的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:24的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.23,但取决于实施例,与SEQ ID NO.23保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.23,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。

[0168] 在若干另外的实施例中,提供了编码NKG2D/CD16/4-1BB嵌合受体的多核苷酸,其中4-1BB的信号传导结构域作为效应子结构域中活化信号的第二传感器。另外,在若干实施

例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。

[0169] CD3ζ通过其跨膜结构域二聚化。因此,在若干实施例中,提供了嵌合受体,其中CD3ζ跨膜结构域将全长CD3ζ分子募集至突触。在若干实施例中,提供了编码嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段,CD8a铰链,与CD3ζ跨膜结构域直接相邻的0、1、2、3、4、5、6或更多个胞外CD3ζ残基(“近膜部分”),和包含CD16、NCR1、NCR2、NCR3、4-1BB、NKp80、FcRγ、CD3ζ和2B4中的一个或多个的效应子结构域。

[0170] 在若干实施例中,提供了嵌合受体,其中CD3ζ跨膜结构域与包含4-1BB和CD16中的一者或两者的效应子结构域偶联。因此,在若干实施例中,提供了编码NKG2D/CD3ζTM/4-1BB嵌合受体的多核苷酸,其包含密码子优化的与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3ζ跨膜区和包含4-1BB的效应子结构域。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:78的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:79的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.78,但取决于实施例,与SEQ ID NO.78保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.78,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。

[0171] 在若干实施例中,提供了编码NKG2D/CD3ζTM/CD16/4-1BB嵌合受体的多核苷酸,其包含密码子优化的与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3ζ跨膜区和包含CD16随后是4-1BB的效应子结构域。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:70的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:71的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.70,但取决于实施例,与SEQ ID NO.70保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.70,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。此外,在若干实施例中,提供了编码NKG2D/CD3ζTM/4-1BB/CD16嵌合受体的多核苷酸,其包含密码子优化的与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3ζ跨膜区和包含4-1BB随后是CD16的效应子结构域。在一些实施例中,效应子结构域还包含GS3接头。在一些实施例中,GS3接头位于4-1BB和CD16之间。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:84的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:85的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.84,但取决于实施例,与SEQ ID NO.84保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.84,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。此外,在若干实施例中,提供了编码NKG2Dx2/CD3ζTM/CD16/4-1BB嵌合受体的多核苷酸,其包含密码子优化的与GS3接头偶联的NKG2D片段、另外的NKG2D片段、CD8a铰链、CD3ζ跨膜区和包含CD16和4-1BB的效应子结构域。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:72的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:73的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.72,但取决于实施例,与SEQ ID NO.72保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受

体可以不同于SEQ ID NO.72,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。

[0172] 在若干实施例中,提供了嵌合受体,其中CD3ζ跨膜结构域与包含NKp80的效应子结构域偶联。因此,在若干实施例中,提供了编码NKG2D/CD3ζTM/CD16/4-1BB/NKp80嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3ζ跨膜区和包含CD16、4-1BB和NKp80的效应子结构域。在一些实施例中,效应子结构域还包含GS3接头。在一些实施例中,GS3接头位于4-1BB和NKp80之间。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:74的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:75的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.74,但取决于实施例,与SEQ ID NO.74保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.74,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。此外,在若干实施例中,提供了编码2xNKG2D/CD3ζTM/CD16/4-1BB/NKp80嵌合受体的多核苷酸,其包含密码子优化的与GS3接头偶联的NKG2D片段、另外的NKG2D片段、CD8a铰链、CD3ζ跨膜区和包含CD16、4-1BB和NKp80的效应子结构域。在一些实施例中,效应子结构域还包含GS3接头。在一些实施例中,GS3接头位于4-1BB和NKp80之间。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:76的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:77的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.76,但取决于实施例,与SEQ ID NO.76保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.76,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。此外,在若干实施例中,提供了编码NKG2D/CD3ζTM/4-1BB/NKp80嵌合受体的多核苷酸,其包含密码子优化的与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3ζ跨膜区和包含4-1BB和NKp80的效应子结构域。在一些实施例中,效应子结构域还包含GS3接头。在一些实施例中,GS3接头位于4-1BB和NKp80之间。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:82的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:83的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.82,但取决于实施例,与SEQ ID NO.82保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.82,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。

[0173] 在若干实施例中,提供了嵌合受体,其中CD3ζ跨膜结构域与包含CD3ζ的效应子结构域偶联。因此,在若干实施例中,提供了编码NKG2D/CD3ζTM/4-1BB/CD3ζ嵌合受体的多核苷酸,其包含密码子优化的与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3ζ跨膜区和包含4-1BB和CD3ζ的效应子结构域。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:80的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:81的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.80,但取决于实施例,与SEQ ID NO.80保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ

ID NO.80,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。

[0174] 在若干实施例中,提供了嵌合受体,其中CD3ζ跨膜结构域与包含FcRγ的效应子结构域偶联。因此,在若干实施例中,提供了编码NKG2D/CD3ζTM/4-1BB/FcRγ嵌合受体的多核苷酸,其包含与CD8a铰链偶联的NKG2D片段、CD3ζ跨膜区和包含4-1BB和FcRγ的效应子结构域。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:86的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:87的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.86,但取决于实施例,与SEQ ID NO.86保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.86,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。

[0175] 在若干实施例中,提供了嵌合受体,其中CD3ζ跨膜结构域与包含CD28的效应子结构域偶联。因此,在若干实施例中,提供了编码NKG2D/CD3ζTM/CD28/CD3ζ嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段胞外受体结构域、CD8a铰链、CD3ζ跨膜区和包含CD28和CD3ζ的胞内效应子结构域。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:102的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:103的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.102,但取决于实施例,与SEQ ID NO.102保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.102,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。

[0176] 在若干实施例中,提供了嵌合受体,其中胞外结构域包含偶联IL15的NKG2D片段。因此,在若干实施例中,提供了编码IL15/NKG2D/CD8a/4-1BB/CD3ζ嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体(其与IL-15连接)结合的NKG2D片段胞外受体结构域、CD8a铰链、CD8a跨膜结构域、和包含4-1BB和CD3ζ的胞内效应子结构域。在一些实施例中,胞外结构域还包含GS3接头。在一些实施例中,GS3接头位于IL15和NKG2D片段胞外受体结构域之间。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:88的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:89的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.88,但取决于实施例,与SEQ ID NO.88保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.88,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。

[0177] 在若干实施例中,提供了嵌合受体,其中胞外结构域包含偶联IgG4短铰链的NKG2D片段。因此,在若干实施例中,提供了编码NKG2D/IgG4/CD8a/4-1BB/CD3ζ嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段胞外受体结构域、IgG4短铰链、CD8a跨膜结构域和包含4-1BB和CD3ζ的胞内效应子结构域。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:96的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:97的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.96,但取决于实施例,与SEQ ID NO.96保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在

若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.96,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。

[0178] 在若干实施例中,提供了嵌合受体,其中效应子结构域包含OX40。因此,在若干实施例中,提供了编码NKG2D/CD8a/OX40/CD3ζ嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段胞外受体结构域、CD8a铰链、CD8a跨膜结构域和包含OX40和CD3ζ的胞内效应子结构域。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:90的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:91的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.90,但取决于实施例,与SEQ ID NO.90保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.90,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。在若干实施例中,提供了编码NKG2D/IgG4/CD8a/OX40/CD3ζ嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段胞外受体结构域、IgG4铰链、CD8a跨膜结构域和包含OX40和CD3ζ的胞内效应子结构域。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:100的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:101的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.100,但取决于实施例,与SEQ ID NO.100保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.100,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。

[0179] 在若干实施例中,提供了包含CD28肽的嵌合受体,该CD28肽包含跨膜区和胞内效应子结构域。因此,在若干实施例中,提供了编码NKG2D/CD28/CD3ζ嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段胞外受体结构域、CD8a铰链、CD28跨膜/胞内结构域和CD3ζ。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:92的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:93的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.92,但取决于实施例,与SEQ ID NO.92保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.92,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。在进一步的实施例中,提供了编码NKG2D/CD28/CD3ζ/4-1BB嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段胞外受体结构域、CD8a铰链、CD28跨膜/胞内结构域和4-1BB与CD3ζ。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:94的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:95的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.94,但取决于实施例,与SEQ ID NO.94保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.94,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。在进一步的实施例中,提供了编码NKG2D/IgG4/CD28/CD3ζ嵌合受体的多核苷酸,该

嵌合受体包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段胞外受体结构域、IgG4铰链、CD28跨膜/胞内结构域和CD3ζ。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:98的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:99的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.98,但取决于实施例,与SEQ ID NO.98保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.98,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。

[0180] NCR1(NKp46)、NCR2(NKp44)和NCR3(NKp30)是NK细胞上的受体,其在配体结合后转导活化信号。因此,在若干实施例中,提供了编码NKG2D/NCR1嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段胞外受体结构域和包含跨膜区和胞内效应子结构域的NCR1肽。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:27的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:28的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.30,但取决于实施例,与SEQ ID NO.27保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.27,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。

[0181] 在若干另外的实施例中,提供了编码NKG2D/NCR1/4-1BB嵌合受体的多核苷酸,其中4-1BB的信号传导结构域作为效应子结构域中活化信号的第二传感器,导致协同增强的NK细胞活化和细胞毒性。在若干另外的实施例中,提供了编码NKG2D/NCR2嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段胞外受体结构域和包含跨膜区和胞内效应子结构域的NCR2肽。如具有NCR1一样,在若干实施例中,这些构建体特别适合用于产生表达嵌合受体的NK细胞,因为它们的序列相对较小且简单。然而,在若干实施例中,它们保留了产生高效NK细胞的能力,尽管构建体明显简单。另外,在若干实施例中,这些构建体可任选地与mbIL15共表达。

[0182] 在若干另外的实施例中,提供了编码NKG2D/NCR3嵌合受体的多核苷酸,该嵌合受体包含与NKG2D的天然配体结合的NKG2D片段胞外受体结构域和包含跨膜区和胞内效应子结构域的NCR3肽。如具有NCR1和/或NCR2一样,在若干实施例中,这些构建体特别适合用于产生表达嵌合受体的NK细胞,因为它们的序列相对较小且简单。然而,在若干实施例中,它们保留了产生高效NK细胞的能力,尽管构建体明显简单。在一个实施例中,该嵌合受体包含SEQ ID NO:29的核酸序列。在另一个实施例中,该嵌合受体由SEQ ID NO:30的氨基酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体的序列可以不同于SEQ ID NO.29,但取决于实施例,与SEQ ID NO.29保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.29,嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。

[0183] 在若干另外的实施例中,提供了编码NKG2D/NCR2/4-1BB嵌合受体的多核苷酸,其中4-1BB的信号传导结构域作为效应子结构域中活化信号的第二传感器,从而导致信号传导结构域之间的协同效应,并出乎意料地有效地导致细胞毒性NK细胞。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。

[0184] 在若干另外的实施例中,提供了编码NKG2D/NCR3/4-1BB嵌合受体的多核苷酸,其中4-1BB的信号传导结构域作为效应子结构域中活化信号的第二传感器,从而导致信号传导结构域之间的协同效应,并出乎意料地有效地导致细胞毒性NK细胞。另外,在若干实施例中,该构建体可任选地与mbIL15共表达。

[0185] 在一些实施例中,本文披露的嵌合受体的表面表达和功效通过间隔区(铰链)的变化而增强,该隔区(铰链)在一些实施例中位于NKG2D片段和跨膜结构域之间的胞外结构域中。在一些实施例中,铰链区可以包含在嵌合受体的其他部分之间(例如,在胞内结构域和跨膜结构域之间,或在多个胞内结构域之间)。在一些实施例中,用于本文其他地方披露的某些目的的结构域可以提供额外的功能。例如,在若干实施例中,CD8a被重新目的化以用作铰链区(在若干实施例中,由SEQ ID NO:5的核酸序列编码)。在另一个实施例中,铰链区包含N末端截短形式的CD8a和/或C末端截短形式的CD8a。取决于实施例,这些截短可以与SEQ ID NO.5编码的铰链至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%或至少约90%同源。在若干另外的实施例中,铰链包含甘氨酸和丝氨酸残基的跨度(本文称为"GS接头"),其中GSn代表序列(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)n(SEQ ID NO.42)。在一个实施例中,铰链包含CD8a和GS3,并且由SEQ ID NO:32的氨基酸序列编码,例如,其中n=3。在另外的实施例中,取决于实施例,n的值可以等于1、2、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或更大。在若干实施例中,铰链也可以构造为GSn/CD8a。或者,GS接头可包含整个铰链区。在一个这样的实施例中,铰链区由SEQ ID NO:33的核酸序列编码。在另一个这样的实施例中,铰链区由SEQ ID NO:34的核酸序列编码。在若干实施例中,IgG4被重新目的化用作铰链区(在若干实施例中,由SEQ ID NO:104的核酸序列编码)。在另一个实施例中,铰链区包含N末端截短形式的IgG4和/或C末端截短形式的IgG4。取决于实施例,这些截短可以与SEQ ID NO.104编码的铰链至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%或至少约90%同源。

[0186] 在若干实施例中,嵌合受体构建体使用2B4胞内信号传导结构域。在若干实施例中,该结构域由SEQ ID NO.35的氨基酸序列编码。在一些实施例中,2B4结构域由SEQ ID NO.36的核酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体中使用的2B4胞内结构域的序列可以不同于SEQ ID NO.36,但取决于实施例,与SEQ ID NO.36保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,虽然嵌合受体的信号传导结构域可以不同于SEQ ID NO.36,但嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。同样地,在若干实施例中,在若干实施例中使用NKp80胞内结构域。在一些实施例中,NKp80结构域是唯一的胞内信号传导结构域,而在一些实施例中,该结构域与一个或多个另外的结构域结合使用。在若干实施例中,NKp80由SEQ ID NO.37的氨基酸序列编码。在一些实施例中,NKp80结构域由SEQ ID NO.38的核酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体中使用的NKp80胞内结构域的序列可以不同于SEQ ID NO.38,但取决于实施例,与SEQ ID NO.38保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,虽然嵌合受体的信号传导结构域可以不同于SEQ ID NO.38,但嵌合受体保留NK细胞活化和/或细胞毒性功能或在一些实施例中具有增强的NK细胞活化和/或细胞毒性功能。

[0187] 在一些实施例中,嵌合受体使用β-肾上腺素能受体的一部分作为跨膜结构域。在若干实施例中,该部分包含β-肾上腺素能胞外结构域的一部分。在若干实施例中,该部分是

β-肾上腺素能受体跨膜结构域的一部分。在若干实施例中,使用β肾上腺素能受体的胞外结构域和跨膜结构域的组合。根据实施例,所述部分来自β-1和/或β-2肾上腺素能受体。在若干实施例中,使用β-2肾上腺素能受体的N-末端胞外区域的一部分。在若干实施例中,该部分具有SEQ ID NO.39的氨基酸序列。在一些实施例中,胞外β-2肾上腺素能结构域由SEQ ID NO.40的核酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体中使用的胞外β-2肾上腺素能结构域的序列可以不同于SEQ ID NO.39,但取决于实施例,与SEQ ID NO.39保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,使用β-2肾上腺素能受体的第一跨膜螺旋,任选地与胞外β-2肾上腺素能结构域结合。在若干实施例中,β-2肾上腺素能受体的第一跨膜螺旋具有SEQ ID NO.41的氨基酸序列。在一些实施例中,β-2肾上腺素能受体的第一跨膜螺旋由SEQ ID NO.42的核酸序列编码。在一些实施例中,嵌合受体中使用的β-2肾上腺素能受体的第一跨膜螺旋的序列可以不同于SEQ ID NO.41,但取决于实施例,与SEQ ID NO.41保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。

[0188] 在一个实施例中,嵌合受体包含CD8、截短的NKG2D、CD8a、跨膜结构域、CD16胞内结构域和作为共刺激分子的4-1BB。在若干实施例中,此类构建体由SEQ ID NO.25编码。在一些实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.25,但取决于实施例,与SEQ ID NO.25保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,通过非限制性实例通过添加GS接头(本文披露的),例如GS3,增加了围绕CD8的铰链区。在此类实施例中,构建体由SEQ ID NO.43的核酸编码。在一些实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.43,但取决于实施例,与SEQ ID NO.43保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,通过添加更长的GS接头,例如GS12或其他接头,增加了围绕CD8的铰链区。在若干实施例中,通过截短CD8减少铰链区。例如,在若干实施例中,CD8a的N-末端区域截短至少20%、至少30%、至少40%或至少50%。在若干实施例中,CD8铰链被GS接头替代。例如,在若干实施例中,铰链区包含GS3接头,由此构建体包含NKG2D-GS3-CD16-4-1BB。在一个实施例中,此类构建体由SEQ ID NO.44的核酸编码。在一些实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.44,但取决于实施例,与SEQ ID NO.44保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,既不使用CD8也不使用GSn。在一个实施例中,这种构建体由SEQ ID NO.45的核酸编码。在一些实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.45,但取决于实施例,与SEQ ID NO.45保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。

[0189] 如上所述,在若干实施例中,使用密码子优化的序列。例如,在若干实施例中,对嵌合受体的NKG2D结构域进行密码子优化(完全或部分)。然而,在若干实施例中,不进行密码子优化。在若干实施例中,向嵌合受体构建体提供未优化的NKG2D胞外结构域、CD8a铰链和4-1BB信号传导结构域。在若干实施例中,向嵌合受体构建体提供未优化的NKG2D胞外结构域、CD8a铰链和跨膜结构域、和4-1BB信号传导结构域。在若干实施例中,向嵌合受体构建体提供未优化的NKG2D胞外结构域、CD8a铰链和跨膜结构域、4-1BB信号传导结构域和2B4信号传导结构域。在若干实施例中,此类构建体具有SEQ ID NO.46的核酸序列。在一些实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.46,但取决于实施例,与SEQ ID NO.46保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。

[0190] 在若干实施例中,向嵌合受体构建体提供未优化的NKG2D胞外结构域、β-肾上腺素能衍生的跨膜结构域、和4-1BB信号传导结构域。在一些实施例中,嵌合受体构建体具有未优化的NKG2D胞外结构域、β-肾上腺素能衍生的跨膜结构域(由β-2肾上腺素能受体的胞外区和β-2肾上腺素能受体的第一跨膜螺旋构成)和4-1BB信号传导结构域。在一些实施例中,嵌合受体构建体具有未优化的NKG2D胞外结构域、β-肾上腺素能衍生的跨膜结构域(由β-2肾上腺素能受体的胞外区和β-2肾上腺素能受体的第一跨膜螺旋构成)、4-1BB信号传导结构域和2B4信号传导结构域。在若干实施例中,此类构建体具有SEQ ID NO.47的核酸序列。在一些实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.47,但取决于实施例,与SEQ ID NO.47保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。

[0191] 在若干实施例中,向嵌合受体构建体提供未优化的NKG2D胞外结构域、CD8a铰链和2B4信号传导结构域。在若干实施例中,向嵌合受体构建体提供未优化的NKG2D胞外结构域、CD8a铰链和跨膜结构域、以及2B4和4-1BB信号传导结构域。在若干实施例中,向嵌合受体构建体提供未优化的NKG2D胞外结构域、CD8a铰链和跨膜结构域、4-1BB信号传导结构域和2B4信号传导结构域,以及NKp80结构域。在若干实施例中,GS接头(例如GS3接头)连接2B4和NKp80结构域。在若干实施例中,此类构建体具有SEQ ID NO.48的核酸序列。在一些实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.48,但取决于实施例,与SEQ ID NO.48保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。

[0192] 在若干实施例中,向嵌合受体构建体提供未优化的NKG2D胞外结构域、CD8a铰链和NKp80信号传导结构域。在若干实施例中,向嵌合受体构建体提供未优化的NKG2D胞外结构域、CD8a铰链和跨膜结构域、和NKp80信号传导结构域。在若干实施例中,向嵌合受体构建体提供未优化的NKG2D胞外结构域、CD8a铰链和跨膜结构域、4-1BB信号传导结构域和NKp80结构域。在若干实施例中,GS接头(例如GS3接头)连接4-1BB和NKp80结构域。在若干实施例中,此类构建体具有SEQ ID NO.49的核酸序列。在一些实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.49,但取决于实施例,与SEQ ID NO.49保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。

[0193] 在若干实施例中,CD8跨膜结构域与2B4胞内结构域偶联。在若干实施例中,CD8跨膜结构域被跨膜和胞内的2B4结构域替代。在若干实施例中,CD8跨膜结构域被2B4替代,并且4-1BB以近端构型表达。

[0194] 在若干实施例中,CD16胞内信号传导结构域与CD3ζ或γ亚基偶联,所述CD3ζ或γ亚基相对于本文所述的嵌合受体反式地外源表达。如上所述,此类构建体可导致意外增强的信号转导,并因此导致NK细胞的细胞毒性作用的出人意料地增加。

[0195] 在若干实施例中,嵌合受体被配置为二聚化,如本文另外详细讨论的。在若干实施例中,根据本文披露的若干实施例的截短的NKG2D受体任选地二聚化。取决于实施例,二聚化可包括同源二聚体或异二聚体。在一些实施例中,二聚化导致嵌合受体(以及因此表达受体的NK细胞)的亲合力转变为在协调平衡减少(或缺乏)不利毒性作用情况下更好的配体识别。在更进一步的实施例中,胞外受体结构域还包含CD8a信号肽。在若干实施例中,嵌合受体使用内部二聚体或一个或多个组分亚基的重复。例如,在若干实施例中,嵌合受体包含与第二NKG2D胞外结构域偶联的NKG2D胞外结构域,和跨膜/信号传导区(或单独的跨膜区连同单独的信号传导区)。在若干实施例中,NKG2D胞外结构域中的一个或多个是密码子优化的。

在若干实施例中,两个NKG2D胞外结构域通过接头(例如GSn接头)分开。在一个实施例中,使用GS3接头。在若干实施例中,跨膜结构域包含β-肾上腺素能受体的胞外区域。在一些实施例中,跨膜结构域跨膜结构域包含β-2肾上腺素能受体的胞外区域,并且还包含β-2肾上腺素能受体的第一跨膜结构域。在若干实施例中,信号传导区包含4-1BB。在若干实施例中,信号传导区包含NKp80。在一些实施例中,信号传导区包含CD16跨膜-胞内结构域。在若干实施例中,信号传导区包含4-1BB结合NKp80或CD16跨膜-胞内结构域。在一些实施例中,嵌合受体具有SEQ ID NO.50的核酸序列。在一些实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.50,但取决于实施例,与SEQ ID NO.50保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在一些实施例中,嵌合受体具有SEQ ID NO.51的核酸序列。在一些实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.51,但取决于实施例,与SEQ ID NO.51保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在一些实施例中,嵌合受体具有SEQ ID NO.52的核酸序列。在一些实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.52,但取决于实施例,与SEQ ID NO.52保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体包含铰链区。在若干实施例中,CD8a被重新目的化以用作铰链区(在若干实施例中,由SEQ ID NO:5的核酸序列编码)。在若干实施例中,嵌合受体包含CD8a跨膜结构域。在若干实施例中,信号传导区包含4-1BB结合2B4和CD3ζ。在一些实施例中,嵌合受体包含密码子优化的与GS3接头偶联的NKG2D片段、另外的NKG2D片段、CD8a铰链、CD8a跨膜结构域和包含4-1BB和CD3ζ的效应子结构域。在一些实施例中,嵌合受体具有SEQ ID NO.66的核酸序列。在一些实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.66,但取决于实施例,与SEQ ID NO.50保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。在若干实施例中,嵌合受体嵌合受体包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列。在一些实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.66,但取决于实施例,与SEQ ID NO.50保留至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同源。

[0196] 在若干实施例中,嵌合受体被配置为双特异性的,如本文另外详细讨论的。在若干实施例中,根据本文披露的若干实施例的截短的NKG2D受体由于第二肽(例如非-NKG2D配体)结合而是双特异性的。在一些实施例中,双特异性导致嵌合受体(以及因此表达受体的NK细胞)的靶向转变为在协调平衡减少(或缺乏)不利毒性作用情况下更好的靶细胞识别。在更进一步的实施例中,胞外受体结构域还包含CD8a信号肽。例如,在若干实施例中,嵌合受体包含与结合其他(非NKG2D)配体的第二胞外结构域偶联的NKG2D胞外结构域,和跨膜/信号传导区(或单独的跨膜区连同单独的信号传导区)。在若干实施例中,两个胞外结构域通过接头(例如GSn接头)分开。在一个实施例中,使用GS3接头。

[0197] 根据本文披露的若干实施例,提供了使用密码子优化的NKG2D结构域的另外的嵌合受体(任选地,这些构建体也可以用非优化的或部分优化的结构域进行重复)。例如,在若干实施例中,密码子优化的胞外结构域与铰链和至少两个跨膜/信号传导结构域偶联。在若干实施例中,多个信号传导结构域提供NK细胞的增强的细胞毒性功效,因为多个非冗余信号级联在运作。虽然在一些实施例中,这些多个途径可以会聚在单个信号传导分子(例如,IFNγ)上,但由于驱动细胞毒性终点的信号分子的总体量级,总体细胞毒性效应出乎意料地增加。作为非限制性实例,在若干实施例中,NKG2D与CD8a铰链偶联,CD8a之后是CD16跨膜-胞内信号传导结构域和4-1BB信号传导结构域。在若干实施例中,该构建体还包含2B4信

号传导结构域。在一些实施例中,此类嵌合受体具有SEQ ID NO.53的核酸序列。在一些实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.53,但取决于实施例,与SEQ ID NO.53保留至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％或至少95％同源。在另外的实施例中,NKG2D-CD8a-CD16IC/TM构建体还包含NKp80信号传导结构域。在若干实施例中,此类构建体还包含4-1BB和NKp80结构域之间的GS3接头。在一些实施例中,此类嵌合受体具有SEQ ID NO.54的核酸序列。在一些实施例中,嵌合受体可以不同于SEQ ID NO.54,但取决于实施例,与SEQ ID NO.54保留至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％或至少95％同源。

[0198] 在另外的实施例中,嵌合受体的某些组分可以被一个或多个另外的亚基替代,这些亚基导致增强的功效(例如,NK细胞的活化或细胞毒性)。例如,在一个实施例中,CD16胞内信号传导结构域可以用DAP10的四重复序列(例如,4xDAP10)替代。在另外的实施例中,CD16胞内信号传导结构域可以用Zap70亚基替代。某些此类实施例导致出人意料地增强的NK细胞细胞毒性。

[0199] 在若干另外的实施例中,效应子结构域包含一个或多个共有半-ITAM序列,以增强配体结合后活化信号传导的转导。在另外的实施例中,在4-1BB、CD16、NCR1、NCR2和/或NCR3的信号传导结构域之间包含GS接头增强了信号转导。此外,在一些实施例中,CD3ζ和FcRγ中的一者或两者与本文所述的嵌合受体一起(在相同或不同的构建体上)另外表达,这导致出人意料地增强的信号转导,并因此出人意料地增加NK细胞的细胞毒性作用。根据实施例,CD3ζ和FcRγ中的一种或多种的工程化表达补充NK细胞对这些分子的内源表达,从而进一步增强NK细胞的信号传导和最终细胞毒性效力。

[0200] 任选地,取决于实施例,本文披露的任何多核苷酸还可编码嵌合受体的一个或多个组成亚基的截短和/或变体,但仍保留其将NK细胞导向靶细胞的能力,并且在若干实施例中出人意料地增强结合后的细胞毒性。此外,本文披露的任何多核苷酸还可任选地包括编码嵌合受体的各种组成亚基的密码子优化的核苷酸序列。如本文所用,术语“片段”和“截短的”应给出它们的普通含义,并且还应包括蛋白质的N-和C-末端缺失变体。

[0201] 可以将编码本文所述嵌合受体的多核苷酸插入载体中以在NK细胞中实现重组蛋白表达。在一个实施例中,多核苷酸与至少一个用于表达嵌合受体的调节元件可操作地连接。在具体的实施例中,与本文公开的肽异源的转录调节元件(例如内部核糖体进入位点(IRES)或增强子元件)用于指导嵌合受体的转录。在一些实施例中,多核苷酸包含一个或多个胞质蛋白酶切割位点。在一些实施例中,切割位点被胞质蛋白酶识别和切割。在一些实施例中,该切割位点选自下组,该组包括T2A切割位点、P2A切割位点、E2A切割位点和F2A切割位点。根据实施例,嵌合受体的各种组成部分可以在单个载体中递送至NK细胞,或者可替代地在多个载体中递送。在一些实施例中,嵌合受体构建体在单一载体中递送,而另一种增强嵌合受体功效的因子(例如mbIL15)在分开的载体中递送。在若干实施例中,嵌合受体和增强嵌合受体功效的因子(例如mbIL15)在单一载体中递送。无论使用多少载体,任何多核苷酸可任选地包括标签序列,该标签序列允许鉴定表达该构建体的NK细胞的存在。例如,在若干实施例中,使用FLAG标签(DYKDDDDK,SEQ ID NO.55)被。还可用其他标签序列,例如多组氨酸标签(His标签)(HHHHHH,SEQ ID NO.56),HA标签或myc标签(EQKLISEEDL;SEQ ID NO:57)。可替代地,使用绿色荧光蛋白或其他荧光部分。还可以使用标签类型的组合来单独识别嵌合受体的亚组分。

[0202] 在若干实施例中,编码嵌合受体的多核苷酸是可以通过电穿孔引入NK细胞的mRNA。在另一个实施例中,载体是病毒,优选逆转录病毒,其可以通过转导引入NK细胞。在若干实施例中,载体是鼠干细胞病毒(MSCV)。在另外的实施例中,可以使用其他载体,例如可以使用慢病毒、腺病毒、腺相关病毒等。在若干实施例中,使用非HIV衍生的逆转录病毒。选择的载体取决于多种因素,包括但不限于转录调节元件的强度和用于表达蛋白质的细胞。载体可以是质粒、噬菌粒、粘粒、病毒载体、噬菌体、人工染色体等。在另外的实施例中,载体可以是游离载体、非同源地或同源地整合的载体,其可以通过任何合适的方式(转化、转染、接合、原生质体融合、电穿孔、磷酸钙沉淀、直接显微注射等)引入适当的细胞中以转化它们。在若干实施例中使用诱导NK细胞中嵌合受体表达的其他方法,包括例如SV40早期启动子区、劳斯肉瘤病毒的3'长末端重复序列中包含的启动子、疱疹胸苷激酶启动子、金属硫蛋白基因的调控序列、腺病毒(ADV)启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子、牛乳头瘤病毒(BPV)启动子、细小病毒B19p6启动子、β-内酰胺酶启动子、tac启动子、胭脂碱合成酶启动子区或花椰菜花叶病毒35S RNA启动子、核酮糖二磷酸羧化酶启动子、Gal 4启动子、ADC(醇脱氢酶)启动子、PGK(磷酸甘油激酶)启动子、含有修饰MoMuLV LTR的U3区和骨髓增生性肉瘤病毒增强子的合成MND启动子和碱性磷酸酶启动子。

[0203] 可以改造自然杀伤细胞以表达本文披露的嵌合受体。可以使用本领域技术人员已知的任何技术将嵌合受体表达构建体引入NK细胞中。在一个实施例中,嵌合受体在NK细胞中瞬时表达。在另一个实施例中,嵌合受体在NK细胞中稳定表达。在另一个实施例中,NK细胞是自体细胞。在另一个实施例中,NK细胞是供体来源的(同种异体的)细胞。

[0204] 本文进一步提供了治疗患有癌症或传染病的受试者的方法,该方法包括向受试者给予包含经工程改造以表达如本文披露的嵌合受体的NK细胞的组合物,该嵌合受体设计成靶向在受损或患病细胞或组织上差异表达(例如,与正常细胞或组织相比表达程度不同)的标志物或配体。如本文所用,术语"进行表达","表达的"和"表达"应给出其普通含义,并且应指允许或使基因或多核苷酸序列中的信息得以表现,例如通过激活与相应基因或DNA序列的转录和翻译有关的细胞功能来产生蛋白质。表达产物本身,例如所得蛋白质,也可以说成是由细胞"表达"的。表达产物可以表征为胞内、胞外或跨膜。术语"胞内"应给出其普通含义,并且应指细胞内部。术语"胞外"应给出其普通含义,并且应指细胞外部。术语"跨膜"应给出其普通含义,并且应指多肽的包埋在细胞膜中的至少一部分。术语"细胞质"应具有其普通含义,并且应指位于细胞核外、细胞膜内。如本文所用,在对受试者给予治疗的背景下,术语"治疗(treat)"、"进行治疗(treating)"和"治疗(treatment)"应给予其普通含义,并且应指受试者源自治疗的有益效果。在某些实施例中,用本文所述的一种或多种基因工程改造的细胞治疗受试者实现以下效果中的一种、两种、三种、四种或更多种,这些效果包括例如:(i)减少或改善疾病或与其相关的症状的严重程度;(ii)减少与疾病相关的症状的持续时间;(iii)防止疾病或与其相关的症状的进展;(iv)疾病或与其相关的症状的消退;(v)防止与疾病相关的症状的发展或发作;(vi)防止与疾病相关的症状再次发生;(vii)减少受试者的住院治疗;(viii)减少住院治疗时长;(ix)患有疾病的受试者的存活增加;(x)减少与疾病相关的症状的数目;(xi)另一种疗法的一个或多个预防效果或治疗效果的增强、改善、补充、互补或增大。可以通过多种途径给药,包括但不限于静脉内、动脉内、皮下、肌肉内、肝内、腹膜内和/或局部递送至受影响的组织。对于给定受试者基于他们的体重、疾病类

型和状态以及所需的治疗积极性可以容易地确定的NK细胞剂量,但取决于实施例,范围从约10^5个细胞/kg至约10^{12}细胞/kg(例如,10^5-10^7、10^7-10^{10}、10^{10}-10^{12}及其中的重叠范围)。在一个实施例中,使用剂量递增方案。在一些实施例中,给予一个范围的NK细胞,例如约1×10^6个细胞/kg与约1×10^8个细胞/kg之间。根据实施例,可以治疗各种类型的癌症或传染病。本文提供的各种实施例包括治疗或预防癌症的以下非限制性实例,包括但不限于急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)、肾上腺皮质癌、卡波西肉瘤、淋巴瘤、胃肠癌、阑尾癌、中枢神经系统癌、基底细胞癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脑肿瘤(包括但不限于星形细胞瘤、脊髓肿瘤、脑干胶质瘤、颅咽管瘤、室管膜母细胞瘤、室管膜瘤、成神经管细胞瘤、髓质上皮瘤)、乳腺癌、支气管肿瘤、伯基特淋巴瘤、宫颈癌、结肠癌、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性髓细胞性白血病病(CML)、慢性骨髓增生性障碍、导管癌、子宫内膜癌、食道癌、胃癌、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、毛细胞白血病、肾细胞癌、白血病、口腔癌、鼻咽癌、肝癌、肺癌(包括但不限于非小细胞肺癌(NSCLC)和小细胞肺癌)、胰腺癌、肠癌、淋巴瘤、黑色素瘤、眼癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、垂体癌、子宫癌和阴道癌。

[0205] 此外,本文提供的各种实施例包括治疗或预防传染病的以下非限制性实例,包括但不限于细菌来源的感染,该细菌来源的感染可包括例如来自以下一个或多个属的细菌感染:包特菌属(Bordetella)、疏螺旋体属(Borrelia)、布鲁杆菌属(Brucella)、弯曲杆菌属(Campylobacter)、衣原体属(Chlamydia)和嗜衣原体属(Chlamydophila)、梭状芽胞杆菌属(Clostridium)、棒状杆菌属(Corynebacterium)、肠球菌属(Enterococcus)、埃希氏菌属(Escherichia)、弗朗西斯氏菌属(Francisella)、嗜血杆菌属(Haemophilus)、螺杆菌属(Helicobacter)、军团菌属(Legionella)、钩端螺旋体属(Leptospira)、李斯特菌属(Listeria)、分枝杆菌属(Mycobacterium)、支原体属(Mycoplasma)、奈瑟菌属(Neisseria)、假单胞菌属(Pseudomonas)、立克次体属(Rickettsia)、沙门菌属(Salmonella)、志贺菌属(Shigella)、葡萄球菌属(Staphylococcus)、链球菌属(Streptococcus)、密螺旋体属(Treponema)、弧菌属(Vibrio)和耶尔森菌属(Yersinia),以及突变体或其组合。在一些实施例中,提供了治疗多种病毒感染的方法,这些病毒感染是例如由一种或多种病毒引起的病毒感染,该一种或多种病毒是例如腺病毒、柯萨奇病毒(Coxsackievirus)、爱泼斯坦-巴尔病毒(Epstein-Barr virus)、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、单纯疮疹病毒1型、单纯疱疹病毒2型、巨细胞病毒、埃博拉病毒、人疱疹病毒8型、HIV、流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、人乳头瘤病毒、副流感病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、呼吸道合胞病毒、风疹病毒和水痘-带状疱疹病毒。

[0206] 在一些实施例中,本文还提供了核酸和氨基酸序列,该核酸和氨基酸序列与SEQ ID NO.1-68的对应核酸或氨基酸序列相比具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%(及其中的范围)的同源性并且与对应的SEQ ID NO.1-68相比还表现出一种或多种功能:包括但不限于,(i)增强的增殖,(ii)增强的活化,(iii)中的呈递配体的细胞的增强的细胞毒性活性,该配体与携带由这些核酸和氨基酸序列编码的受体的NK细胞结合,(iv)增强的归巢至肿瘤或感染部位,(v)减少的脱靶细胞毒性作用,(vi)增强的免疫刺激细胞因子和趋化因子(包括但不限于IFNg、TNFα、IL-22、CCL3、CCL4和CCL5)的分泌,(vii)增强的刺激进一步先天性和适应性免疫应答的能力,和(viii)其组合。

[0207] 另外,在若干实施例中,提供了对应于本文披露的任何核酸的氨基酸序列,同时考

虑了核酸编码的简并性。此外,与本文明确披露的那些不同但具有功能相似性或等同性的那些序列(无论是核酸还是氨基酸)也涵盖在本披露的范围内。前述包括突变体、截短、取代或其他类型的修饰。

[0208] 根据若干实施例,本文提供了编码嵌合受体的多核苷酸,这些嵌合受体包含胞外受体结构域,其中该胞外受体结构域包含与自然杀伤组2成员D(NKG2D)的天然配体结合的肽,其中与NKG2D的天然配体结合的肽是NKG2D片段,其是包含跨膜区和胞内信号传导结构域的效应子结构域。在若干实施例中,NKG2D片段由包含SEQ ID NO.2或3或68的序列的多核苷酸或其功能等效物编码。在若干实施例中,多核苷酸编码包含CD16的效应子结构域。在若干实施例中,多核苷酸编码包含NCR1的效应子结构域。在若干实施例中,多核苷酸编码包含NCR2的效应子结构域。在若干实施例中,多核苷酸编码包含NCR3的效应子结构域。在一些实施例中,多核苷酸编码包含4-1BB的另外的效应子结构域部分。在若干实施例中,多核苷酸编码由NKG2D和CD16构成的嵌合受体。在若干实施例中,多核苷酸编码由NKG2D和NCR1构成的嵌合受体。在若干实施例中,多核苷酸编码由NKG2D和NCR2构成的嵌合受体。在另外的实施例中,多核苷酸编码嵌合受体,其由与CD16偶联的NKG2D和任选的4-1BB构成。在若干实施例中,取决于实施例,CD16被NCR1替代,并且在一些实施例中,被NCR2或甚至NCR3替代。在若干实施例中,效应子结构域还包含在例如4-1BB与CD16、NCR1、NCR2或NCR3之一之间的GS接头。

[0209] 在若干实施例中,胞外受体结构域还包含铰链区。在若干实施例中,铰链区包含CD8a。然而,在另外的实施例中,铰链区还包含一个或多个接头,在一些实施例中,这些接头包含GS9、CD8a/GS3、截短的CD8a、GS3等。

[0210] 在若干实施例中,胞外受体结构域还包含CD8a信号肽。在若干实施例中,效应子结构域包含一个或多个半-ITAM序列。在若干实施例中,嵌合受体不包含DNAX活化蛋白10(DAP10)。在若干实施例中,嵌合受体不包含ITAM基序,而是使用替代的信号传导区,例如ITSM、半tam或其他共刺激区。

[0211] 在一个实施例中,提供了编码包含胞外受体结构域的嵌合受体的多核苷酸,其中该胞外受体结构域包含与自然杀伤组2成员D(NKG2D)的天然配体结合的肽,其中与NKG2D天然配体结合的肽是NKG2D片段,跨膜区,其中该跨膜区包含CD8a和效应子结构域,其中该效应子结构域包含4-1BB和CD3ζ,其中该多核苷酸与编码膜结合的白细胞介素15(mbIL15)的另外的构建体共表达。

[0212] 在若干实施例中还提供了编码包含胞外受体结构域的嵌合受体的多核苷酸,其中该胞外受体结构域包含与自然杀伤组2成员D(NKG2D)的天然配体结合的肽,其中与NKG2D天然配体结合的肽是NKG2D片段,跨膜区,其中该跨膜区包含CD8a和效应子结构域,其中该效应子结构域包含4-1BB和2B4或DAP10的胞内结构域。编码如本文所述的嵌合受体的多核苷酸包含与NKG2D的天然配体结合的第二肽。在若干实施例中,NKG2D的天然配体包括但不限于MICA、MICB、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4、ULBP5或ULBP6。在若干实施例中,与NKG2D的天然配体结合的嵌合受体部分与SEQ ID NO:1、2、3、或68具有至少80%的同源性。

[0213] 在若干实施例中,提供的多核苷酸是mRNA。在一些实施例中,多核苷酸与至少一个用于表达嵌合受体的调节元件可操作地连接。如本文所用,术语“核酸”,“核苷酸”和“多核苷酸”应给出它们的普通含义,并且应包括脱氧核糖核苷酸、脱氧核糖核酸、核糖核苷酸和

核糖核酸及其聚合形式,并且包括单链形式或双链形式。核酸包括天然存在的核酸,例如脱氧核糖核酸(“DNA”)和核糖核酸(“RNA”)以及核酸类似物。核酸类似物包括以下那些,其包括非天然存在的碱基、与天然磷酸二酯键以外的其他核苷酸连接的核苷酸,或包括通过磷酸二酯键以外的连接而附接的碱基。因此,核酸类似物包括,例如但不限于,硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基磷酸酯、硼磷酸酯、甲基膦酸酯、手性甲基膦酸酯、2-O-甲基核糖核苷酸、肽-核酸(PNA)、锁核酸(LNA)等。如本文所用,术语“可操作地连接”,例如在调节核酸序列与异源核酸序列“可操作地连接”的情况下,应给出其普通含义,并且应表示调节核酸序列是与异源核酸序列处于功能关系。在IRES的情况下,“可操作地连接”是指含有内部核糖体进入位点的核酸序列和在mRNA序列中间的异源编码序列起始位点(其导致异源编码序列的翻译)之间的功能性连接。如本文所用,术语“载体”应给出其普通含义,并且是应指以下载体,其可以将DNA或RNA序列(例如,外源基因)引入基因工程改造细胞中,从而转化基因工程改造的细胞并促进导入的序列的表达(例如转录和/或翻译)。载体包括病毒、质粒、噬菌体等。本文所用的术语“嵌合受体”应给出其普通含义,并且应指包含至少两个不是天然一起存在于单个蛋白质上的多肽结构域的细胞表面受体。如本文所用的术语“嵌合受体复合物”是指第一多肽,其可以包含组合的至少两个不是天然一起存在于单个蛋白质上的多肽结构域,该第一多肽与第二多肽(例如衔接子多肽、信号分子或刺激分子)相关联。本文披露的与嵌合受体的产生和使用有关的另外的术语是本领域普通技术人员容易理解的,并且也可以在国际公开WO 2014/117121和美国专利号7,994,298(在此通过引用将其每一个的全部内容并入本文)中找到。

[0214] 另外,根据若干实施例,提供了包含编码本文提供的任何多核苷酸的多核苷酸的载体,其中这些多核苷酸任选地与至少一个用于表达嵌合受体的调节元件可操作地连接。在若干实施例中,载体是逆转录病毒。

[0215] 本文进一步提供了工程改造的自然杀伤细胞,其包含本文披露的多核苷酸、载体或嵌合受体。在若干实施例中,这些NK细胞适用于治疗或预防疾病,例如癌症和/或传染病。

[0216] 实例

[0217] 方法

[0218] 以下实验方法和材料用于下面披露的非限制性实验实例中。

[0219] 细胞系和培养条件

[0220] 人急性淋巴细胞白血病细胞系REH、人骨肉瘤细胞系U-2OS和人胚肾成纤维细胞293T(HEK 293T)细胞获自美国典型培养物保藏中心(ATCC;马纳萨斯,弗吉尼亚州)。将REH细胞维持并在补充有10%胎牛血清(FBS;Hyclone公司,洛根(Logan),犹他州)和1%青霉素-链霉素的Roswell Park Memorial Institute系列1640(RPMI-1640;Gibco公司,卡尔斯巴德(Carlsbad),加利福尼亚州)中生长。将HEK 293T和U-2OS细胞维持并在补充有10%FBS和1%青霉素-链霉素的杜氏改良伊戈尔培养基(DMEM;Hyclone公司)中生长。将所有哺乳动物细胞在37℃在5% CO2下孵育。

[0221] DNA质粒

[0222] 如前所述制备含有嵌合受体NKG2D-DAP10-CD3ζ的DNA质粒(参见Chang等人Cancer Research[癌症研究],卷73(6):2013)。将通过重叠延伸聚合酶链式反应(SOE-PCR)的剪接用于融合形成NKG2D-41BB-CD3ζ构建体的各个结构域。然后将该构建体插入鼠干细胞病毒

(MSCV)逆转录病毒载体中(图3A)。通过金斯瑞公司(GenScript)(南京,中国)对NKG2D-CD16和NKG2D-CD16-41BB的构建体进行密码子优化并插入MSCV载体(图3B)。通过DNA测序验证构建体的序列。

[0223] 人NK细胞的扩增

[0224] 通过来自健康成年供体的血液样品的Ficoll密度离心来获得人外周血单核细胞(PBMC)。为了扩增NK细胞,将PBMC与用膜结合的IL-15和4-1BB配体进行遗传修饰的K562(K562-mb15-41BBL)一起培养。细胞在干细胞生长培养基(SCGM;Cell Genix公司,弗莱堡,德国)中培养,每两天补充40IU IL-2/ml。

[0225] 培养7天后,使用抗CD3 Dynabeads(英杰公司(Invitrogen),卡尔斯巴德,加利福尼亚州)将NK细胞进行T细胞消耗。然后在SCGM(每两天补充40-200IU IL-2/ml)中培养NK细胞。

[0226] 逆转录病毒的产生和NK细胞的转导

[0227] 通过用逆转录病毒包装质粒瞬时转染HEK 293T细胞进行逆转录病毒的产生。首先在转染前18小时将HEK 293T细胞在12ml DMEM中接种到2.5×10^6细胞浓度。然后用3.5μg含有对应的NKG2D嵌合受体的MSCV载体(非限制性构建体在图1B-图1C和图2A-图2B中示意性说明)、3.5μg pEQ-PAM3和3.0μg pRDF转染细胞。为了对照,使用含有GFP的空MSCV载体。使用X-tremeGENE 9DNA转染试剂(罗氏公司(Roche),巴塞尔,瑞士)进行转染。转染后24小时,用条件RPMI-1640替换DMEM。

[0228] 在更换培养基后18小时,将NKG2D嵌合受体转基因转导到NK细胞中。首先将NK细胞以0.25×10^6个细胞的浓度悬浮于2ml的条件RPMI-1640中。随后将细胞接种到RetroNectin(宝生物公司(TaKaRa),大津,日本)包被的管中。从HEK 293T细胞培养物中收获含有逆转录病毒的RPMI-1640(病毒上清液),并将新鲜的条件培养基加回到培养物中。向病毒上清液中补充200IU IL-2/ml,并将3ml病毒上清液分配到每个RetroNectin包被的管(含有接种的NK细胞)中。根据产生NK细胞的某些实施例,用新鲜病毒培养基转导接种的NK细胞六次,每12小时一次。然后在最后一次转导后48小时收获转导的NK细胞,并在SCGM中培养,每两天加入200IU IL-2/ml。转化的NK细胞在扩增后14至28天用于实验。

[0229] 流式细胞术检测嵌合受体的表达

[0230] 用含有白蛋白的磷酸盐缓冲盐水洗涤转导的NK细胞一次,并添加2μl兔血清。然后将细胞用多甲藻素叶绿素(PerCP)缀合的抗人NKG2D抗体(克隆149810;R&D系统公司,明尼阿波利斯,美国)在黑暗中染色10分钟。对于对照,用对应的PerCP-缀合的IgG同种型抗体染色转导的NK细胞。将所有NK细胞再次洗涤并用300μl 0.5%甲醛固定,然后使用Accuri C6流式细胞仪(BD公司,富兰克林湖,新泽西州)进行分析。使用配对t检验分析数据。

[0231] 细胞毒性测定

[0232] 用钙黄绿素AM红橙(赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific),沃尔瑟姆(Waltham),马萨诸塞州)染色REH细胞。将REH细胞接种到96孔圆底板(科斯塔公司(CoStar),康宁公司(Corning),纽约)中。然后以各种效应子:靶(E:T)比率添加转导的NK细胞。将细胞培养物在37℃和5% CO_2下孵育4小时。使用Accuri C6流式细胞仪计数染色的活靶细胞。将U-2OS细胞接种到96孔平底白板(科斯塔公司)中并孵育4小时。然后根据不同的E:T比率添加转导的NK细胞。然后将细胞培养物再培养四小时。在分析之前,将Bright-Glo

底物(普洛麦格公司(Promega),麦迪逊(Madison),威斯康星州)加入细胞中。使用FLx800荧光读数器(宝特公司(Bio Tek),威努斯基(Winooski),佛蒙特州)测量来自活靶细胞的发光强度。将发光强度和对照之间的差异转换为细胞毒性百分比。

[0233] 干扰素γ(IFNγ)生产测定

[0234] 为了确定NK细胞产生的IFNγ的量,首先在96孔圆底板中用(E:T为1:1)或不用REH培养效应细胞和靶细胞。将细胞孵育一小时,然后添加GolgiPlug(布雷菲德菌素A;BD生物科学公司(BD Biosciences))。再培养5小时后,用藻红蛋白(PE)缀合的抗人CD56抗体(克隆MY31,BD生物科学公司)标记细胞。使用专有的透化试剂使细胞透化,并在黑暗中孵育40分钟。然后用专利洗涤缓冲液洗涤细胞。用别藻蓝蛋白(APC)-缀合的IFNγ抗体(克隆25723.11;BD生物科学公司)检测细胞内IFNγ45分钟。然后固定细胞并使用Accuri C6流式细胞仪分析。

[0235] 实例1-含有NKG2D构建体的CD3-ζ

[0236] 如本文所公开的,提供了包含与各种跨膜和/或信号传导结构域偶联的NKG2D和/或NKG2D变体的各种构建体。进行本实验以评估包含CD3-ζ信号传导结构域的构建体的表达和细胞毒活性。根据上述方法和材料制备和测试两种CD3-ζ构建体。取决于构建体,可以容易地调整所使用的方法以解释产生、表达和测试构建体所需的变化。两种构建体是NKG2D-DAP10-CD3ζ和NKG2D-41BB-CD3ζ。作为参考,图1A示意性地描绘了内源NKG2D。在NK细胞中,NKG2D的跨膜区之间的离子相互作用允许与其衔接蛋白DAP10缔合(Wu等人,1999)。在配体结合后,通过在DAP10上发现的信号基序YxNM转导NKG2D信号。CD3ζ通过其基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM;Lanier,2008)转导信号。两个实验构建体分别在图1B和图1C中示意性地示出。图1B显示NKG2D-DAP10-CD3ζ,其中通过YxNM和ITAM基序发生信号传导。图1C显示了NKG2D-41BB-CD3ζ构建体,其使用CD8a铰链区作为跨膜结构域,并使用4-1BB和CD3ζ作为信号传导结构域。

[0237] 首先评估NK细胞有效表达这些构建体的能力。用两种嵌合受体之一转导从健康成年供体的PBMC扩增的NK细胞。模拟转导的NK细胞用作对照(仅用含有GFP的空MSCV载体转导)。通过用Per-CP缀合的抗-NKG2D抗体染色NK细胞来确定嵌合受体的存在和相对丰度。图4A描绘了与模拟(左图)、NKG2D-DAP10-CD3ζ(中图)或NKG2D-41BB-CD3ζ(右图)构建体转导后与NKG2D阳性NK细胞百分比相关的代表性流式细胞术数据。模拟转导的NK细胞显示在使用的抗体情况下没有NKG2D表达(尽管在活化的NK细胞上NKG2D表达天然地高,但未显示染色超过同型匹配的非反应性抗体),而不到60%的用NKG2D-DAP10-CD3ζ构建体转导的细胞以及超过80%的用NKG2D-41BB-CD3ζ构建体转导的细胞显示NKG2D表达超过同种型匹配的非反应性抗体对照。来自所有供体的NKG2D阳性NK细胞百分比的池化数据显示在图4B中。与模拟相比,两种工程改造的NKG2D构建体都导致NKG2D表达的显著增加,尽管这两种构建体的表达百分比之间没有显著差异。图4C描绘了基于平均荧光强度(MFI)的表达数据,其表示在表达NKG2D构建体的群体内,细胞表达构建体的程度(例如,多个拷贝的构建体/细胞将产生更大的MFI)。通过该测量,NKG2D-41BB-CD3ζ的表达显著大于NKG2D-DAP10-CD3ζ构建体的表达。

[0238] 总之,这些数据表明,根据本文披露的若干实施例,工程改造的构建体可以成功地在NK细胞上表达。在若干实施例中,可以通过用特定构建体重复转导NK细胞来实现构建体

的增强表达。在若干实施例中,构建体的组分可以在单个载体中递送至细胞,或者可替代地使用多个载体递送至细胞。取决于实施例,构建体本身可以导致增强的表达,例如线性构建体或头对尾构建体可以产生增加的表达,因为多亚基构建体需要较低程度的细胞内组装。

[0239] 进一步在NK细胞上成功表达NKG2D构建体,需要NK细胞的有效信号传导作用于靶细胞。为了评估两个转导的NK细胞群的效力,使用对NK细胞活性敏感的两个细胞系(REH(悬浮细胞)和U-2OS(贴壁细胞))进行细胞毒性测定。数据显示在图5A-图5C中(误差棒代表标准偏差;所有实验一式三份;n=3(P<0.001)),该数据总结不同组NK细胞针对REH细胞并且跨以两个E:T比率的独立供体的细胞毒性百分比。如图5A-图5C所示,与模拟NK细胞(用标记为(c)的箭头显示)相比,表达任一NKG2D嵌合受体(用标记为(a)的箭头显示NKG2D-DAP10-CD3ζ,用标记为(b)的箭头显示NKG2D-41BB-CD3ζ)的NK细胞针对所有三个供体的REH均具有明显更高的细胞毒性。表达NKG2D-DAP10-CD3ζ的NK细胞的平均细胞毒性百分比为91.8%±5.8%(1:1E:T比率)和83.9%±5.6%(1:2E:T比率)。用NKG2D-41BB-CD3ζ转导的那些NK细胞显示出相似的效力-在1:1E:T比率下为87.4%±6.1%,在1:2E:T比率下为76.2%±4.8%。与模拟转导的NK细胞相比,表达嵌合受体的NK细胞还表现出针对U-2OS的高细胞毒性(参见图6A-图6C,图6A描绘了用标记为(a)的箭头显示NKG2D-DAP10-CD3ζ,图6B描绘了用标记为(b)的箭头显示NKG2D-41BB-CD3ζ,并且图6C描绘了用标记为(c)的箭头显示模拟NK细胞)。

[0240] 这些数据提供证据表明NK细胞不仅可以被工程改造以表达嵌合受体构建体,而且那些表达嵌合受体的细胞能够被活化并成功地产生针对靶细胞的增强的细胞毒性作用。重要的是,这些数据还表明,当存在更多数量(在该实验中加倍)的靶细胞时,NK细胞的效力仅略微降低。这表明即使当工程改造的NK细胞相对于靶细胞以较少数量存在时(这可能是临床使用的情况),仍可以实现工程改造的NK细胞的所需细胞毒性作用。此外,这些数据表明,根据一些实施例,给定NK细胞上较低密度或程度的嵌合受体表达不一定导致协同降低的细胞毒性作用,并且鉴于它们的较低的构建体表达可能与NK细胞的出人意料的功效相关联。另外,这些数据体现了根据若干实施例实现的出人意料地增强的细胞毒性。虽然非工程改造的NK细胞具有细胞毒性,并且在活化后表达显著量的NKG2D,但是出人意料的是,本文披露的工程改造的细胞可以使细胞毒性作用显著超过可被认为已经是升高的上限(例如,天然NK细胞的细胞毒性)。

[0241] 除了细胞毒性数据之外,通过评估表达各种NKG2D构建体的NK细胞的干扰素-γ(IFNγ)的是否产生,检查NK细胞发挥这些作用的机制。IFNγ是由NK细胞产生和释放的关键细胞因子(通常在先天免疫应答期间),其募集巨噬细胞并具有免疫刺激作用。图7A显示了在有或没有REH细胞刺激情况下,模拟(左图),表达NKG2D-DAP10-CD3ζ的NK细胞(中图)和表达NKG2D-41BB-CD3ζ的NK细胞(右图)中IFNγ产生的相对量(通过MFI测量)。NK细胞用针对胞内IFNγ的APC缀合抗-IFNγ抗体染色。通过配对t检验分析数据。这些数据显示,观察到三组NK细胞中的每一组在没有刺激的情况下具有相似水平的IFNγ产生,在REH细胞刺激后观察到增加。如在若干实施例中所提供的,表达NKG2D构建体的工程改造的NK细胞可导致稳健的细胞因子产生。工程改造的NK细胞应答的靶细胞(此处为REH细胞)的存在使生化级联运行,该生化级联导致IFNγ产生并最终导致细胞毒性作用。如图7A所示,表达NKG2D-41BB-CD3ζ的NK细胞在刺激性REH细胞存在下显示出稳健的IFNγ产生。有趣的是,表达

NKG2D-DAP10-CD3ζ的NK细胞未显示出相似程度的应答。这在图7B中进一步证实,其中评估了用REH细胞刺激后不同组NK细胞之间的IFNγ水平(示出中值;通过非配对t检验分析数据)。所有IFNγ实验一式三份进行,具有三个独立供体,n=9。图7B显示表达NKG2D-DAP10-CD3ζ的NK细胞的IFNγ产生与模拟转导的NK细胞没有显著差异。相反,与模拟转导的NK细胞相比,表达NKG2D-41BB-CD3ζ的NK细胞显示出IFNγ产生的显著增加。这些数据是有趣的,因为它们证明,如本文所讨论的,嵌合受体应答配体结合的信号传导是产生针对目标靶细胞的细胞毒性作用的必要步骤。然而,不存在各种构建体发出信号的单一途径,因为用两种不同的嵌合受体转导的NK细胞都表现出相对相似的细胞毒性,但没有反映IFNγ产生的水平。因此,根据一些实施例,提供了与正常NK细胞相比通过IFNγ或其他免疫刺激细胞因子的产生增加而实现细胞毒性作用的构建体。然而,在若干实施例中,不一定实现或检测到IFNγ的增加的产生,而是可以通过给定的嵌合构建体利用另一种免疫刺激途径来实现升高的细胞毒性作用。

[0242] 实例2-含有CD16和CD16-4-1BB的NKG2D构建体

[0243] 产生另外的构建体以评估表达、细胞毒性和细胞因子产生。如本文所提供的,若干实施例涉及包含截短的NKG2D(在一些实施例中经密码子优化)的构建体,其使用CD16跨膜和/或信号传导结构域。在该实验中产生用于评估的构建体示意性地显示在图2A-图2B中,其显示A)NKG2D-CD16和B)NKG2D-CD16-41BB嵌合受体的结构。两种嵌合受体都依赖于CD16的跨膜区与CD3ζ或FcRγ缔合。用于产生这些构建体的质粒显示在图3B中。如上所述,在若干实施例中,所用的构建体依赖于CD3ζ或FcRγ的内源表达,然而,在若干实施例中,编码嵌合受体的质粒(或单独的质粒)被配置为提高NK细胞的CD3ζ和/或FcRγ的表达,从而增强细胞的效力。

[0244] 如上所述,评估构建体的表达水平。图8A描绘了模拟(左图)、表达NKG2D-DAP10-CD3ζ的NK细胞(中图)和表达NKG2D-CD16的NK细胞的代表性流式细胞术数据(使用来自由不同符号表示的三个独立供体的细胞进行实验。通过配对t检验分析数据)。图8B显示了与表达NKG2D(以及因此构建体)的细胞百分比有关的总结数据。如所预期的,在所用抗体情况下,模拟转染的NK细胞显示低水平的NKG2D表达。相反,两种工程改造的构建体表现出显著增强的表达,其中与模拟转导的NK细胞相比,NKG2D-CD16-转导的NK细胞表达35.8%±6.9%更高的表达。另外,如通过MFI评估的(图8C),NKG2D-CD16-转导的NK细胞也表现出构建体的表达增加。这些数据对于证明构建体可以有效地引入NK细胞并表达是重要的。

[0245] 已经建立了构建体的表达,评估了它们表现出细胞毒性作用的能力。如上所述,测试来自三个供体的NK细胞针对REH细胞和U-2OS细胞的细胞毒性作用,其各自具有三个E:T比率(所有实验一式三份进行,n=3)。有趣的是,与模拟NK细胞相比,NKG2D-CD16构建体的增强表达不导致细胞毒性增加(参见图9A-图9C,误差棒代表标准偏差)。与前面的实例一样,表达NKG2D-DAP10-CD3ζ的NK细胞(用标记为(a)的箭头显示)确实表现出增加的细胞毒性。关于针对U-2OS细胞的细胞毒性,与模拟NK细胞(用标记为(c)的箭头显示)相比,NKG2D-CD16(用标记为(b)的箭头显示)确实表现出增加的细胞毒性(参见图10A-图10C)。这些数据表明,对特定给定靶细胞类型的细胞毒性影响程度可随所用NK构建体而变化。在一些实施例中,特定构建体可能不那么有效,然而,在若干实施例中,可以使用NK细胞群的组合并显示出协同效应。换言之,具有表达NKG2D-CD16的部分和表达NKG2D-DAP10-CD3ζ(或本文披露

的任何构建体的其他组合)的部分的NK细胞群与任一单独的子群相比可以表现出出人意料地增强的细胞毒性。

[0246] 接下来测量干扰素-γ的产生,以确认转染的NK细胞的作用机制。表达各种构建体的NK细胞或者通过REH细胞刺激,或者不通过REH细胞刺激,并测量IFNγ的产生。这些数据显示在图11中(数据通过配对t检验分析)。所有NK细胞组在没有刺激的情况下具有相似水平的IFNγ,并且在与REH细胞孵育后增加。表达NKG2D-CD16的NK细胞显示出IFNγ产生增加634±211MFI,这大于模拟转导的NK细胞显示的增加(423±70MFI)。然而,该增加低于对表达NKG2D-DAP10-CD3ζ的NK细胞观察到的增加(其增加2041±411MFI)。与数据一致,根据若干实施例,IFNγ的产生与表达某些构建体的NK细胞表现出的细胞毒性作用相关。

[0247] 根据本文披露的若干实施例,可以使用多个信号传导区。进行另外的实验以评估扩增的NK细胞中NKG2D-CD16-41BB的表达(使用来自一个供体的细胞进行实验)。表达数据显示在图12A-12B中。图12A显示原始流式细胞术数据,其证明与NKG2D-CD16构建体相比,添加4-1BB信号传导区不会显著损害NK细胞对构建体的表达。这也反映在图12B的总结直方图中,其显示了在测试的每个NK细胞组的表面上NKG2D受体的相对量。与NKG2D-CD16相比,NKG2D-CD16-41BB显示略微降低的MFI,但两种构建体均显示出与模拟物相比升高的表达。

[0248] 如上所述评估细胞毒性作用,使用REH和U-2OS细胞作为靶标。图13A-图13B描绘了所得数据(误差棒代表标准偏差;所有实验一式三份进行,n=3)。图13A显示了构建体针对REH细胞的细胞毒性作用。与上述实验类似,与用标记为(a)的箭头所示的模拟NK细胞相比,用标记为(b)的箭头所示的表达NKG2D-CD16的细胞未显示显著升高的细胞毒性作用。相反,表达NKG2D-CD16-41BB的NK细胞(用标记为(c)的箭头显示)显示出针对REH细胞的增强的细胞毒性。关于针对U-2OS细胞的功效,表达NKG2D-CD16的细胞和表达NKG2D-CD16-41BB的细胞均显示出增强的细胞毒性,其中表达NKG2D-CD16-41BB的细胞表现出更稳健的细胞毒性作用。这表明,根据若干实施例,使用信号传导结构域的组合可导致转导的NK细胞功效的出人意料的增强。因此,如上所述,若干实施例采用两个或更多个跨膜/信号传导结构域,它们协同作用以产生针对靶细胞的增强的细胞毒性。

[0249] 实例3-另外的NKG2D构建体

[0250] 产生具有不同胞外结构域、跨膜结构域和胞内效应子结构域的另外构建体以评估它们的表达和细胞毒性。在该实验中生成的用于评估的12种构建体示意性地显示在图14中。这些变体嵌合受体中的一些依赖于CD16跨膜区与CD3ζ或FcRγ缔合。如上所述,在若干实施例中,所用的构建体依赖于CD3ζ或FcRγ的内源表达,然而,在若干实施例中,编码嵌合受体的质粒(或单独的质粒)被配置为提高NK细胞的CD3ζ和/或FcRγ的表达,从而增强细胞的效力。如上所述,评估构建体的表达水平。如通过MFI评估的,模拟转染的NK细胞显示低水平的NKG2D表达(图16A)。相反,用上述变体NKG2D构建体转导的NK细胞显示不同水平的NKG2D表达,其中工程改造的变体构建体4和9在NK细胞中表现出显著增强的表达。图16B描绘了在转导入两个供体的NK细胞后变体NKG2D构建体1、4、8、9的代表性流式细胞术数据。相对于模拟转导的NK细胞,变体8和变体9转导的NK细胞特别显示出嵌合受体的强表达。转导后7天,变体构建体表达在两个供体的NK细胞中持续存在,其中如通过MFI评估,变体8和9特别显示出高水平(图16C)。这些数据对于证明构建体可以有效地引入NK细胞并表达是重要的。已经建立了构建体的表达,还评估了它们在转导的NK细胞中传递细胞毒性作用的能力。

在以1:1E:T比率转导入NK细胞后14天评估NKG2D变体构建体4、8和9的细胞毒性(图17)。

[0251] 产生了另外的变体构建体并且在图15中示意性地显示,其显示了包含各种胞外结构域、跨膜结构域和胞内效应子结构域的嵌合受体的结构。这些变体嵌合受体中的一些依赖于包含CD3ζ和/或另一信号传导结构域的效应子结构域以在配体结合后转导信号传导,而其他变体嵌合受体包含CD3ζ跨膜结构域,其通过二聚化将全长CD3ζ分子募集至突触。如上所述,评估构建体的表达水平。如通过MFI评估的(图18A-图18B),用工程改造的构建体转导的NK细胞相对于模拟转导的细胞表现出嵌合受体的表达增加。如上所述使用效应物:靶标比率为1:1评估细胞毒性作用。如图19A-图19B所示,用工程改造的构建体(特别是变体18)转导的NK细胞相对于模拟对照具有增强的细胞毒性。

[0252] 由于变体18在NK细胞中表现出稳健的表达,伴随着增强的细胞毒性作用,因此产生了包含CD3ζ跨膜结构域的一系列变体NKG2D构建体。这些变体被称为"NK39"并且在图15中示意性地示出。转染进入供体NK细胞后14天(在低IL-2条件下培养4天),评估转导的NK细胞的细胞毒性。图21显示了构建体针对1:1和1:2E:T比率的培养的REH细胞的细胞毒性作用。与对照NK细胞在1:1E:T比率下相比,表达工程改造的NK39构建体的所有NK细胞显示出显著升高的细胞毒性作用。当以1:2E:T比率评估时,相对于模拟对照,嵌合构建体16-7、39-1、39-2、39-3和39-5各自增强了它们各自转导的NK细胞的细胞毒性作用。由于活化受体的外源表达可导致NK细胞无反应性和细胞死亡,因此将工程改造的构建体转导至两个供体NK细胞中,并在21天后评估存活。如图23A-图23B所示,在两个测试的供体中,NK39-5和NK39-10转导的细胞显示出比NK16更好的存活。

[0253] 实例4-NK45 NKG2D构建体的评估

[0254] 根据本文公开的实施例的具有不同胞外结构域、铰链、跨膜结构域和胞内效应子结构域的其他构建体示意性显示于图22中。在该实例中,相对于实例3中描述的三种NK39构建体(NK39-5、NK39-6、NK39-10)以及双顺反子地表达膜结合白细胞介素15(NK26-8)的NK16版本,评估了这7种构建体介导的表达、细胞毒性、持久性和细胞因子产生。根据本文披露的若干实施例,可以使用多个信号传导区。这些变体嵌合受体中的一些依赖于包含CD3ζ和/或另一信号传导结构域(例如,OX40、CD28和/或4-1BB共刺激结构域)的效应子结构域以在配体结合后转导信号传导,而其他变体嵌合受体包含CD3ζ跨膜结构域,其通过二聚化将全长CD3ζ分子募集至突触。如本文所披露的,这些构建体进一步配置为共表达膜结合的IL15。

[0255] 如上所述,首先评估NK细胞有效表达这些构建体的能力。用变体构建体(或仅包含GFP的空MSCV对照载体)转导从四个供体的PBMC扩增的NK细胞,并在3天后通过MFI评估NKG2D表达。如图24所示,模拟转染的NK细胞显示相对低水平的NKG2D表达。相反,工程改造的构建体表现出显著增强的表达,其中NK45-4(NKG2D-OX40-CD3ζ)在所有供体中表现出出人意料的稳健表达。OX40在活化的NK细胞中表达,但其作用尚未确定。具有包含CD28共刺激结构域(NK45-2;NKG2D-CD28-CD3ζ)的效应子结构域的变体嵌合受体也在转导后3天显示出稳健表达。

[0256] 已经建立了变体构建体的表达,使用REH和HL60细胞作为靶标如上评估了它们发挥细胞毒性作用的能力。在转导后14天,以1:1E:T比率检测来自四个供体的NK细胞针对REH细胞(图25A)和HL60细胞(图25B)的效力。如图25A-图25B所示,与模拟NK细胞相比,工程改造的构建体针对所有四个供体中的REH和HL60细胞均发挥增强的细胞毒性。除了其显著的

表达谱之外,表达NK45-4(NKG2D-OX40-CD3ζ)的细胞相对于模拟对照和测试的其他构建体也表现出出人意料的升高的细胞毒性。表达NK45-1和NK45-2的NK细胞在这些测定中也显示出显著的细胞毒性。这些数据表明,根据若干实施例,使用信号传导结构域(特别是OX40共刺激结构域)的组合可导致转导的NK细胞功效的出人意料的增强。图28A-图28B描绘了在不同的E:T比率(1:2和1:4)下用若干种变体构建体转导的NK细胞针对U2OS细胞的细胞毒活性,并在更长的时间内评估。出人意料的是,用45-4构建体转导的NK细胞似乎在整个时间过程中保持细胞毒活性。有利地,这些实验表明,根据本文公开的若干实施例,NKG2D变体构建体在延长的时间段内提供出人意料地增强的细胞毒性,取决于实施例,该延长的时间段可以在范围在从2-3天、3-5天、5-7天、7-8天、8-10天、10-14天、14-21天或21-50天(以及列出的那些之间的任何范围,包括端值)。在若干实施例中,甚至实现了更长的细胞毒性作用持续时间。

[0257] 除了细胞毒性数据之外,通过评估在用REH细胞刺激后NK细胞的IFNγ、TNFα和GM-CSF的产生来检查NK细胞发挥这些作用的机制。如图26A-图26C所示,相对于表达GFP的对照NK细胞表现出的IFNγ、TNFα和GM-CSF的产生,每种变体构建体的表达产生增强的细胞因子分泌。嵌合受体NK45-1始终如一地介导高细胞因子产生,这是出人意料的,因为该构建体表达的水平显著低于NK26-8(其仅在铰链区有所不同)。因此,这些数据证明了本文披露的铰链区对于介导应答刺激的稳健细胞因子产生的出人意料的重要性。另外,表达NKG2D-OX40-CD3ζ的NK细胞也显示出IFNγ、TNFα和GM-CSF的产生增加。

[0258] 由于活化受体的外源表达可导致NK细胞无反应性和细胞死亡,因此将工程改造的构建体转导至两个供体NK细胞中,并在转导后7、14和21天评估总细胞计数。出人意料的是,NK45-4的出人意料的稳健表达不以降低培养物中NK细胞持久性为代价,因为总细胞计数保持在与表达GFP的对照细胞相当的水平(图27A和图27B)。同样地,表达高水平变体构建体的其他NK细胞在转导后在2个供体中继续增殖至少3周。总的来说,这些数据表明,根据本文披露的若干实施例,工程改造的构建体可以在NK细胞中以高水平成功表达并介导细胞毒性作用,并且进一步地,这种增强的表达不会具有以下损害:NK细胞增殖减少和/或存活率降低。

[0259] 预期可以进行上面披露的实施例的特定特征和方面的各种组合或子组合,并且仍然落入本发明中的一个或多个中。此外,与实施例相关的任何特定特征、方面、方法、特性、特征性、质量、属性、元件等的披露内容可以用于本文阐述的所有其他实施例中。因此,应该理解的是,所披露的实施例的各种特征和方面可以彼此组合或替换,以便形成所披露的发明的不同模式。因此,意图是本文披露的本发明的范围不应受上述具体披露的实施例的限制。此外,尽管本发明易于进行各种修改和替代形式,但是其具体实例已在附图中示出并在本文中详细描述。然而,应该理解,本发明不限于所披露的特定形式或方法,相反,本发明将覆盖落入各种实施例描述和所附权利要求的精神和范围内的所有修改、等同物和替代物。本文披露的任何方法不需要按照所述顺序进行。本文披露的方法包括从业者采取的某些行为;但是,他们也可以明确地或暗示地包括这些行为的任何第三方指示。例如,诸如“给予扩增的NK细胞群”的行为包括“指导扩增的NK细胞群的给予”。此外,当本披露的特征或方面以马库什组(Markush group)描述时,本领域技术人员应意识到本披露还由此描述马库什组的任何单个个体或亚组个体。

[0260] 本文披露的范围还涵盖任何和所有重叠、子范围及其组合。诸如“至多”、“至少”、

“大于”、“小于”、“之间”等语言包括所叙述的数字。在诸如“约”或“大约”之类的术语之后的数字包括所叙述的数字。例如,“约90％”包括“90％”。在一些实施例中,至少95％同源包括与参考序列96％、97％、98％、99％和100％同源。此外,当序列被披露为“包含”核苷酸或氨基酸序列时,除非另有说明,否则这样的参考还应包括序列“包含所述序列”、“由所述序列组成”或“基本上由所述序列组成”。

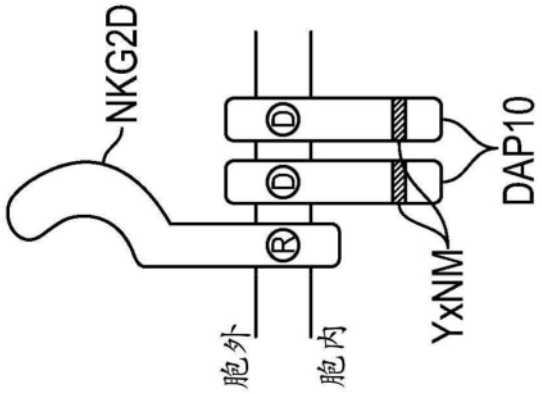


图1A

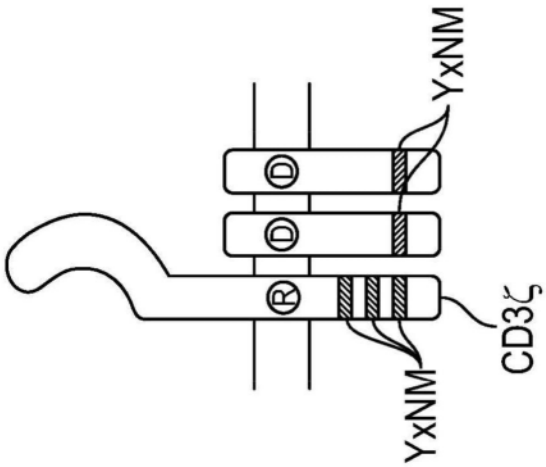


图1B

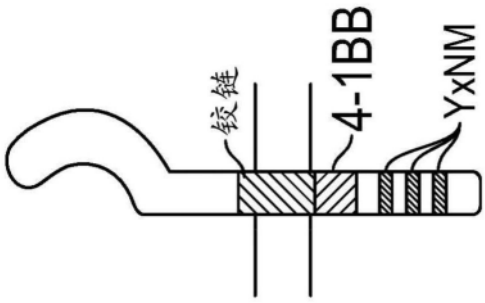


图1C

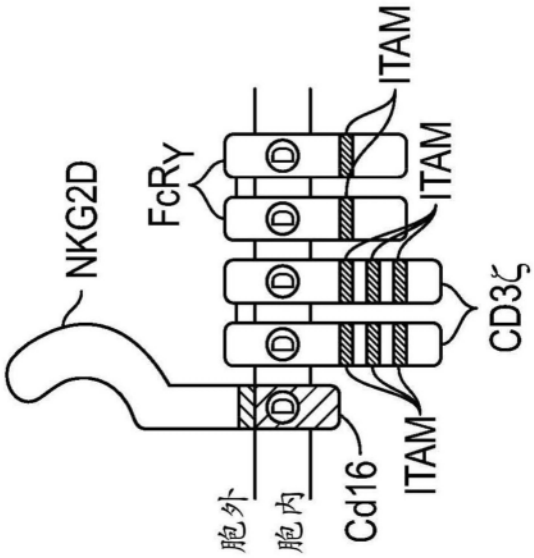

NKG2D
FcRγ
ITAM
ITAM
CD3ζ
ITAM
Cd16
胞外
胞内

图2A

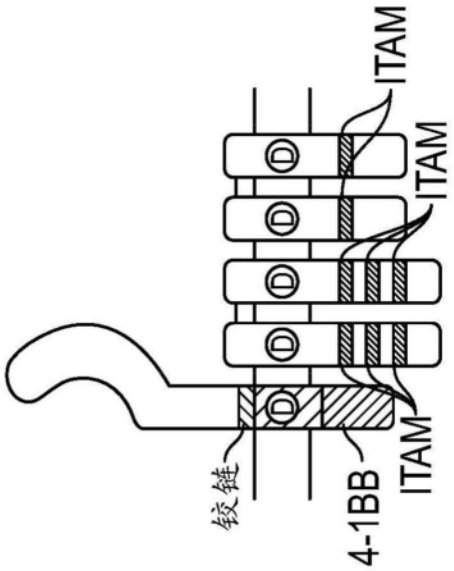

ITAM
ITAM
ITAM
铰链
4-1BB

图2B

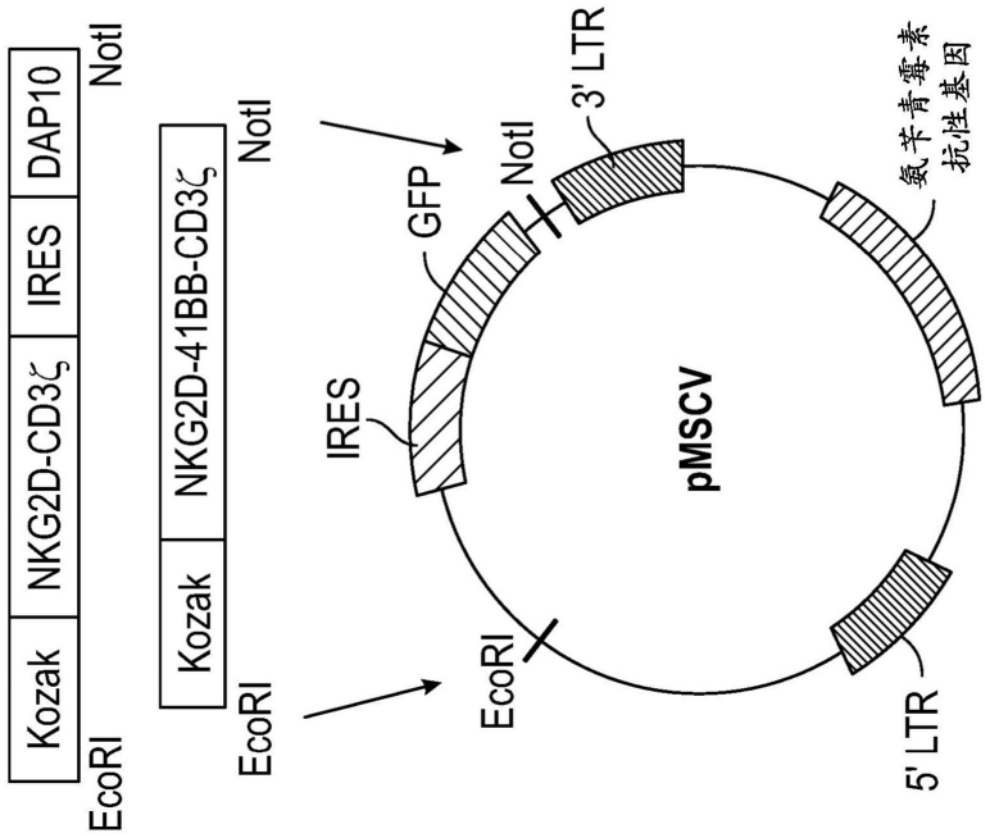

Kozak
NKG2D-CD3ζ
IRES
DAP10
NotI
EcoRI
Kozak
NKG2D-41BB-CD3ζ
NotI
EcoRI
IRES
GFP
NotI
3' LTR
pMSCV
EcoRI
5' LTR
氨苄青霉素
抗性基因

图3A

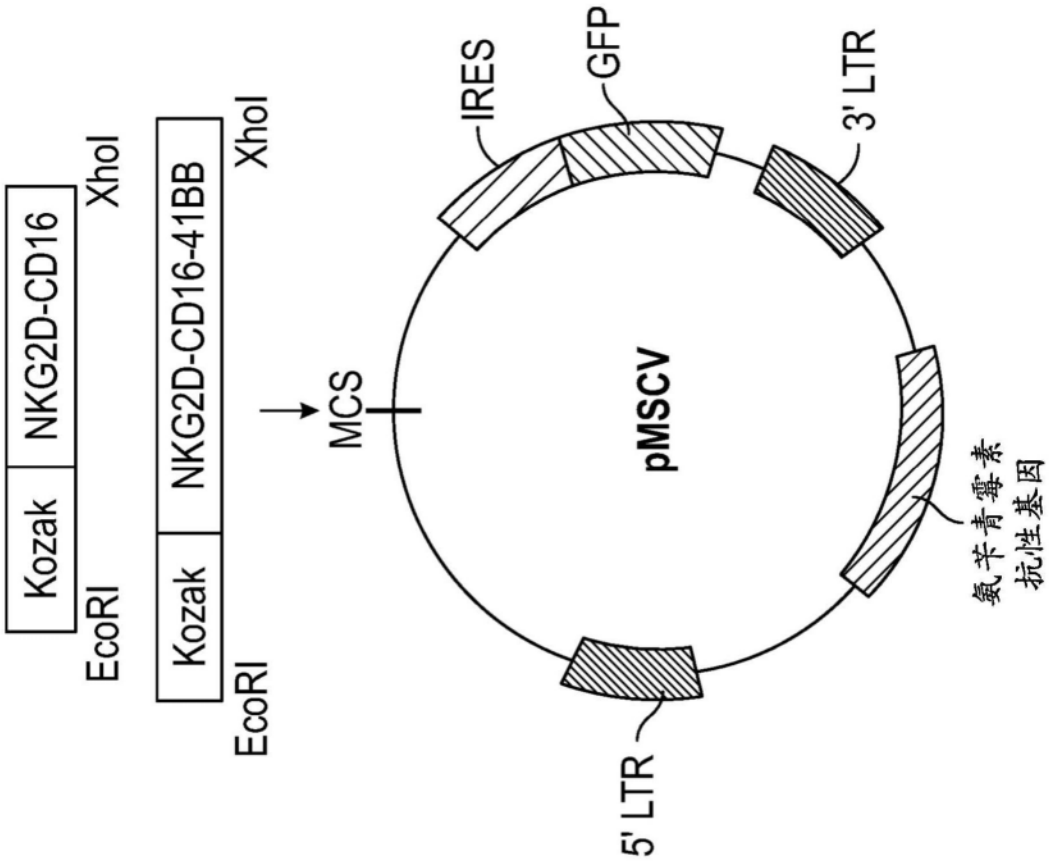

Kozak
NKG2D-CD16
XhoI
EcoRI
Kozak
NKG2D-CD16-41BB
XhoI
EcoRI
MCS
IRES
GFP
3' LTR
pMSCV
氨苄青霉素
抗性基因
5' LTR

图3B

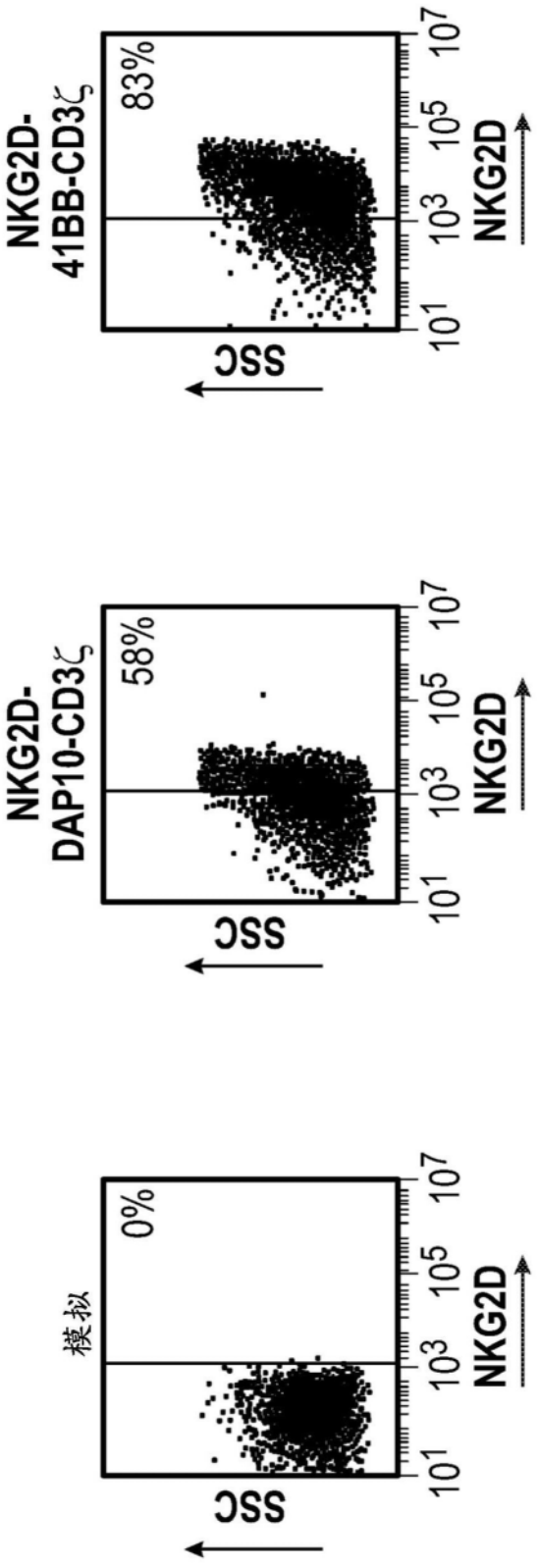

NKG2D-41BB-CD3ζ
83%
NKG2D-DAP10-CD3ζ
58%
模拟
0%
SSC
NKG2D
10^1
10^3
10^5
10^7

图4A

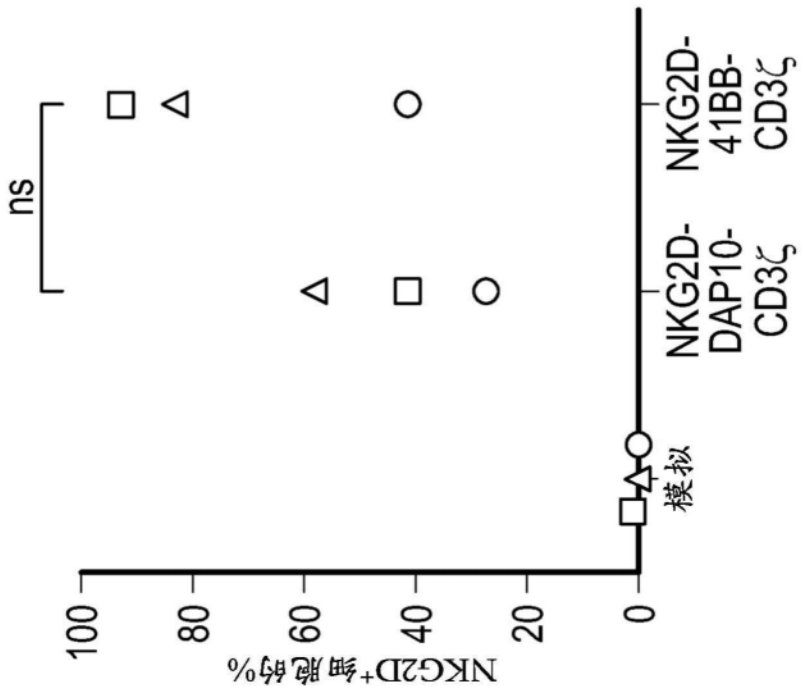

NKG2D+细胞的%
100
80
60
40
20
0
模拟
NKG2D-DAP10-CD3ζ
NKG2D-41BB-CD3ζ
ns

图4B

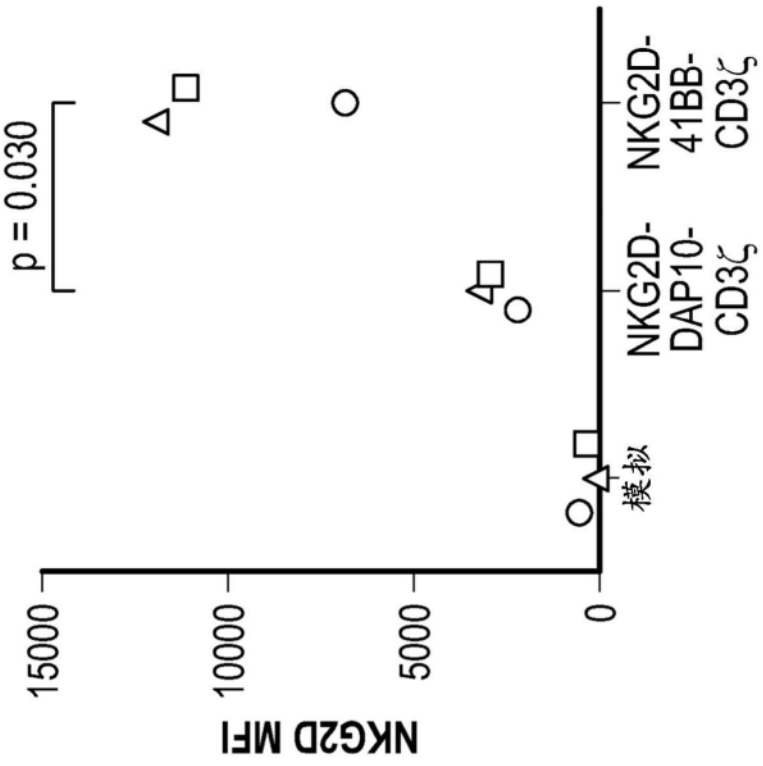

NKG2D MFI
15000
10000
5000
0
模拟
NKG2D-DAP10-CD3ζ
NKG2D-41BB-CD3ζ
p = 0.030

图4C

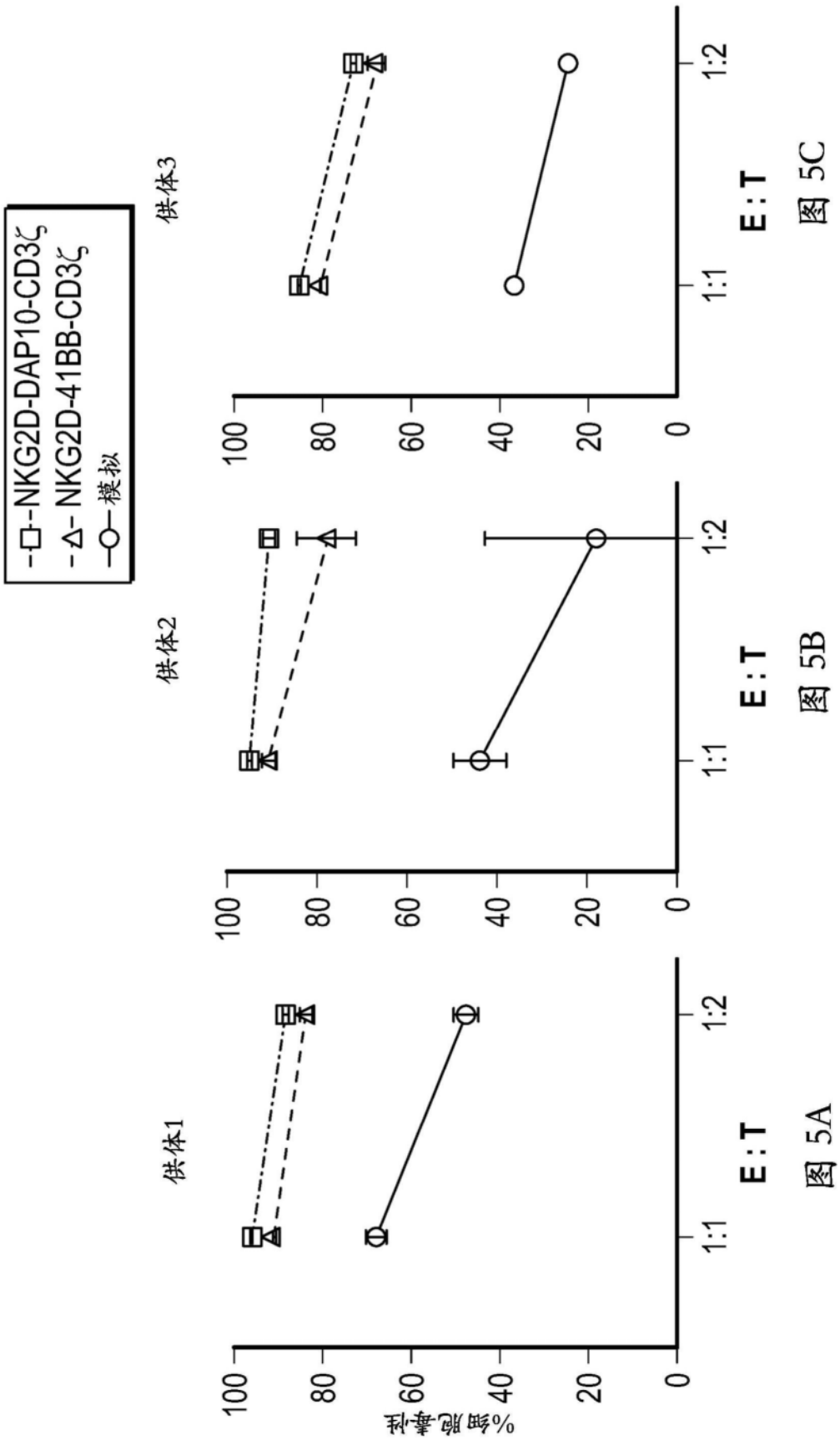

-□-NKG2D-DAP10-CD3ζ
-△- NKG2D-41BB-CD3ζ
-○- 模拟
供体1
供体2
供体3
%细胞毒性
100
80
60
40
20
0
1:1
1:2
E:T

图 5A 图 5B 图 5C

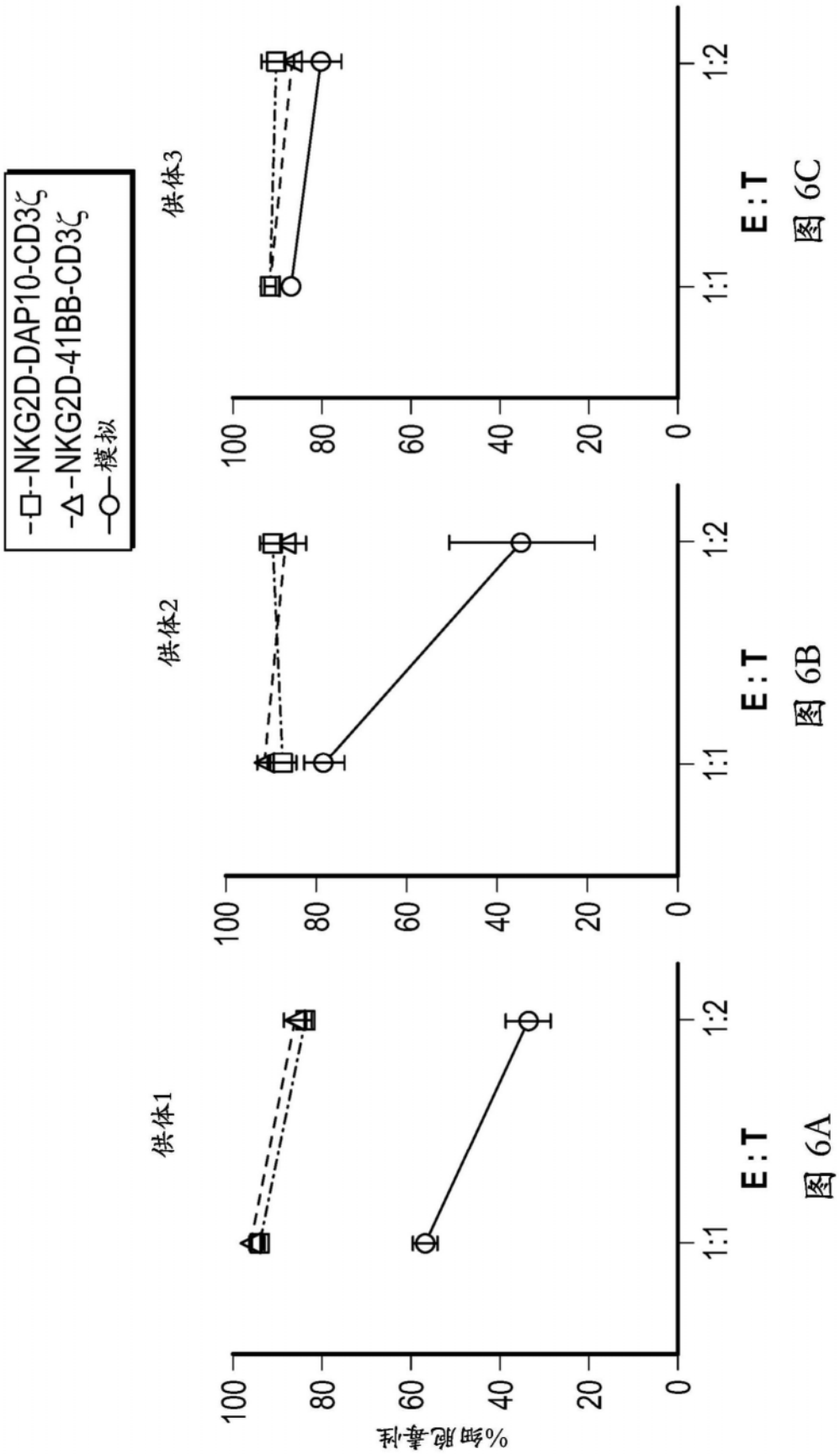

-□-NKG2D-DAP10-CD3ζ
-△-NKG2D-41BB-CD3ζ
-○-模拟
供体1
供体2
供体3
%细胞毒性
100
80
60
40
20
0
1:1
1:2
E:T

图 6A 图 6B 图 6C

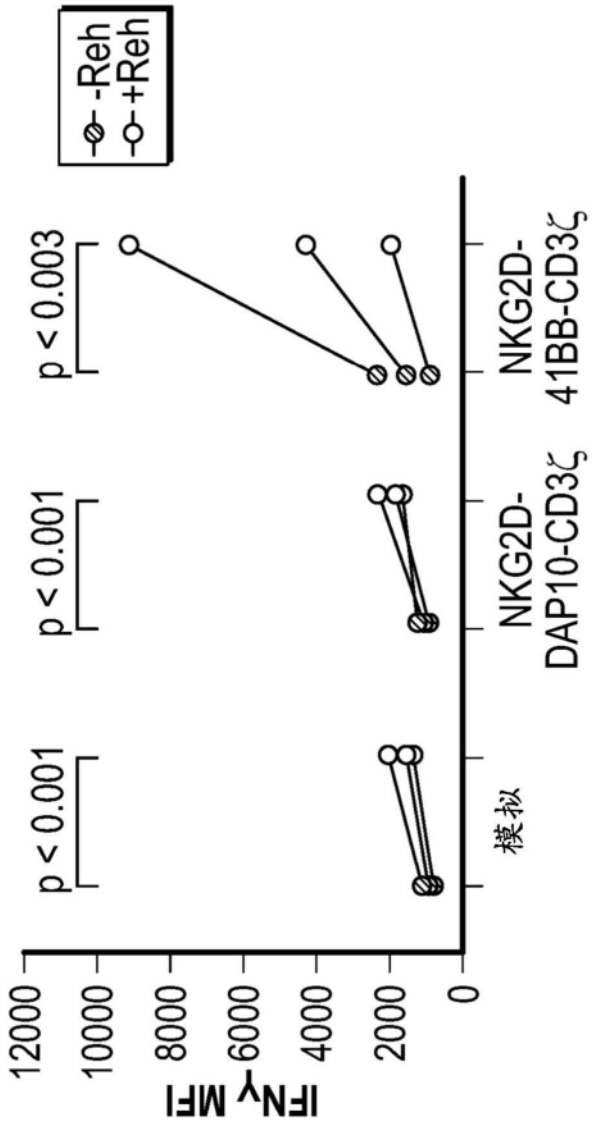

-Reh
+Reh
IFNγ MFI
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
p < 0.001
p < 0.001
p < 0.003
模拟
NKG2D-DAP10-CD3ζ
NKG2D-41BB-CD3ζ

图7A

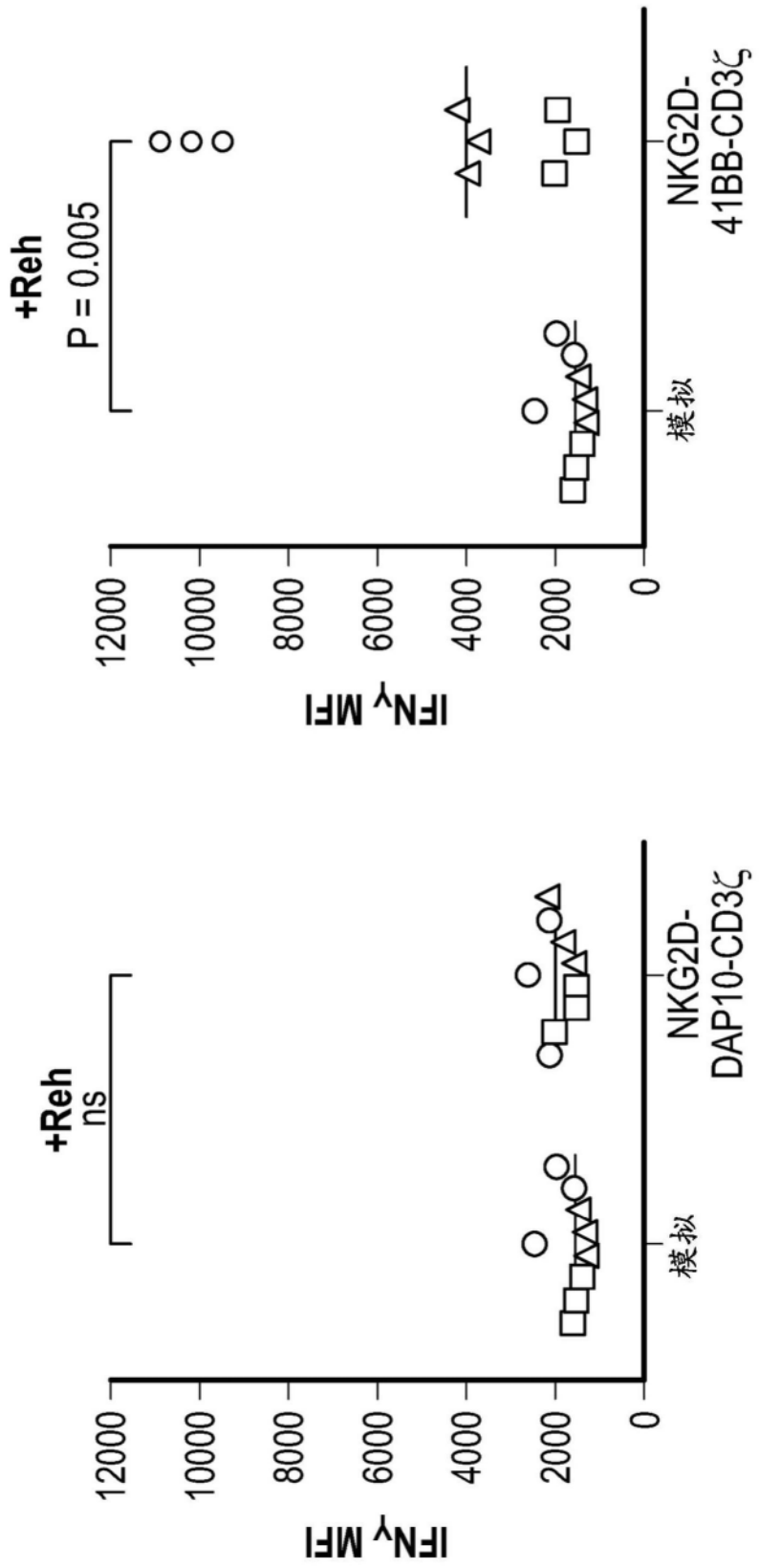

+Reh
P = 0.005
IFNγ MFI
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
模拟
NKG2D-41BB-CD3ζ
+Reh
ns
IFNγ MFI
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
模拟
NKG2D-DAP10-CD3ζ

图7B

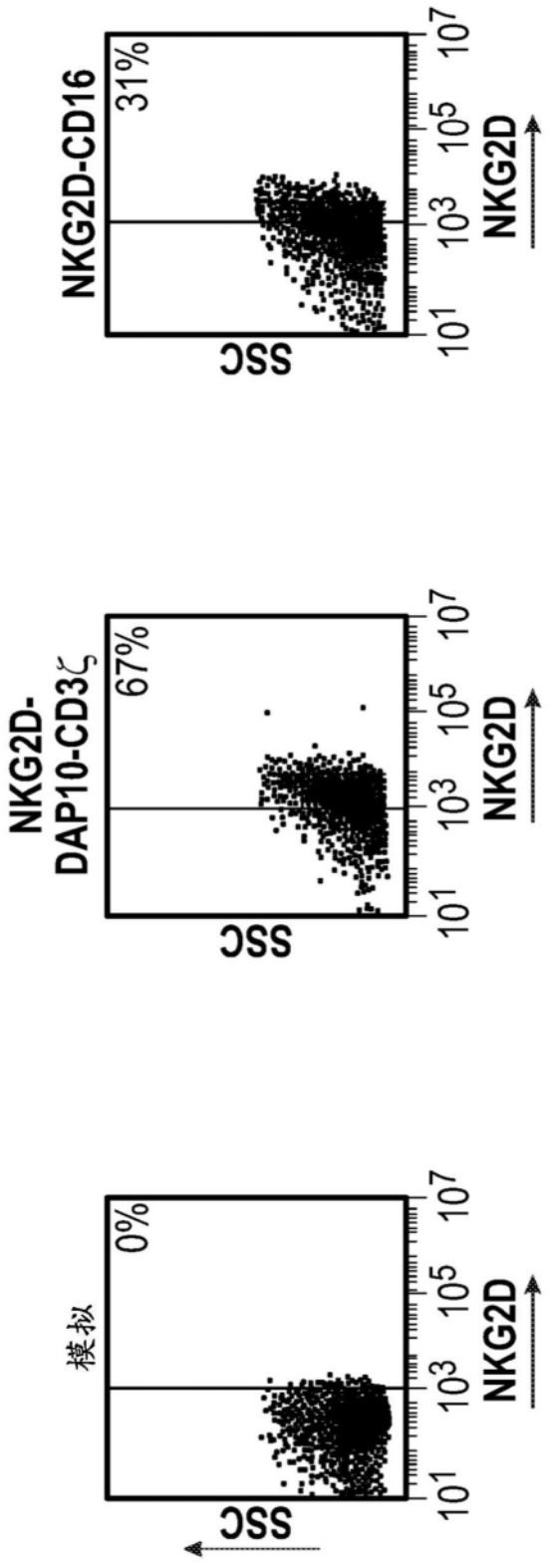

NKG2D-CD16
31%
SSC
NKG2D
NKG2D-
DAP10-CD3ζ
67%
SSC
NKG2D
模拟
0%
SSC
NKG2D

图8A

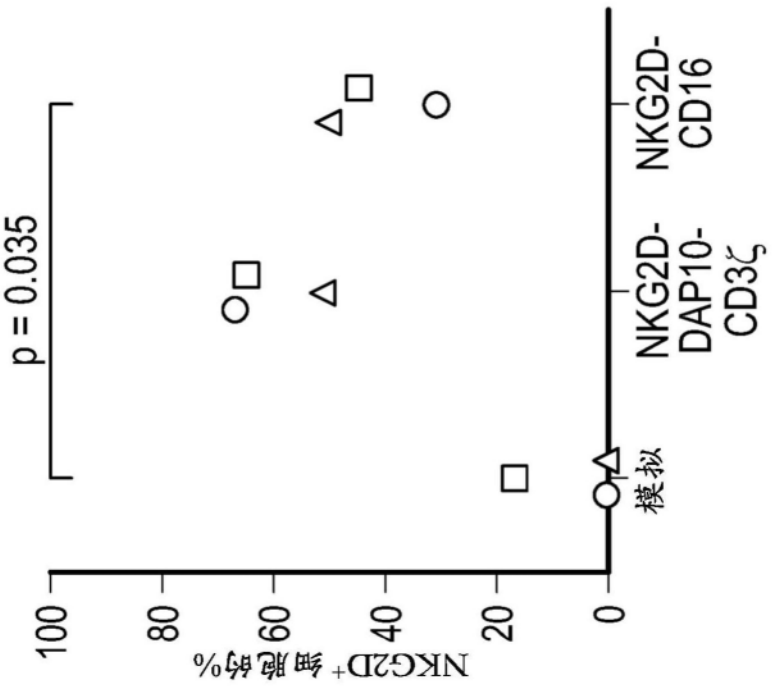

p = 0.035
NKG2D+ 细胞的%
100
80
60
40
20
0
模拟
NKG2D-DAP10-CD3ζ
NKG2D-CD16

图8B

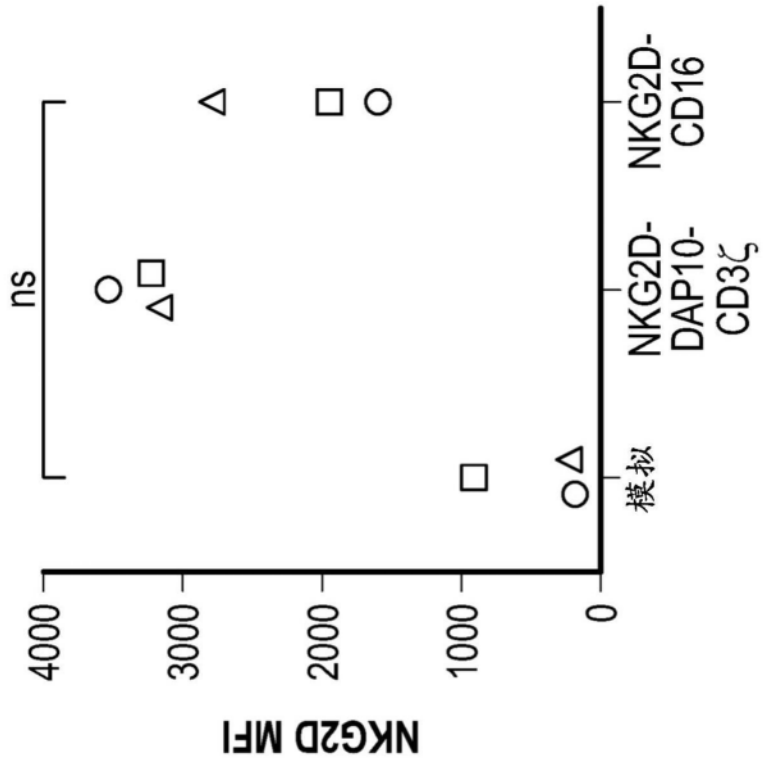

ns
NKG2D MFI
4000
3000
2000
1000
0
模拟
NKG2D-DAP10-CD3ζ
NKG2D-CD16

图8C

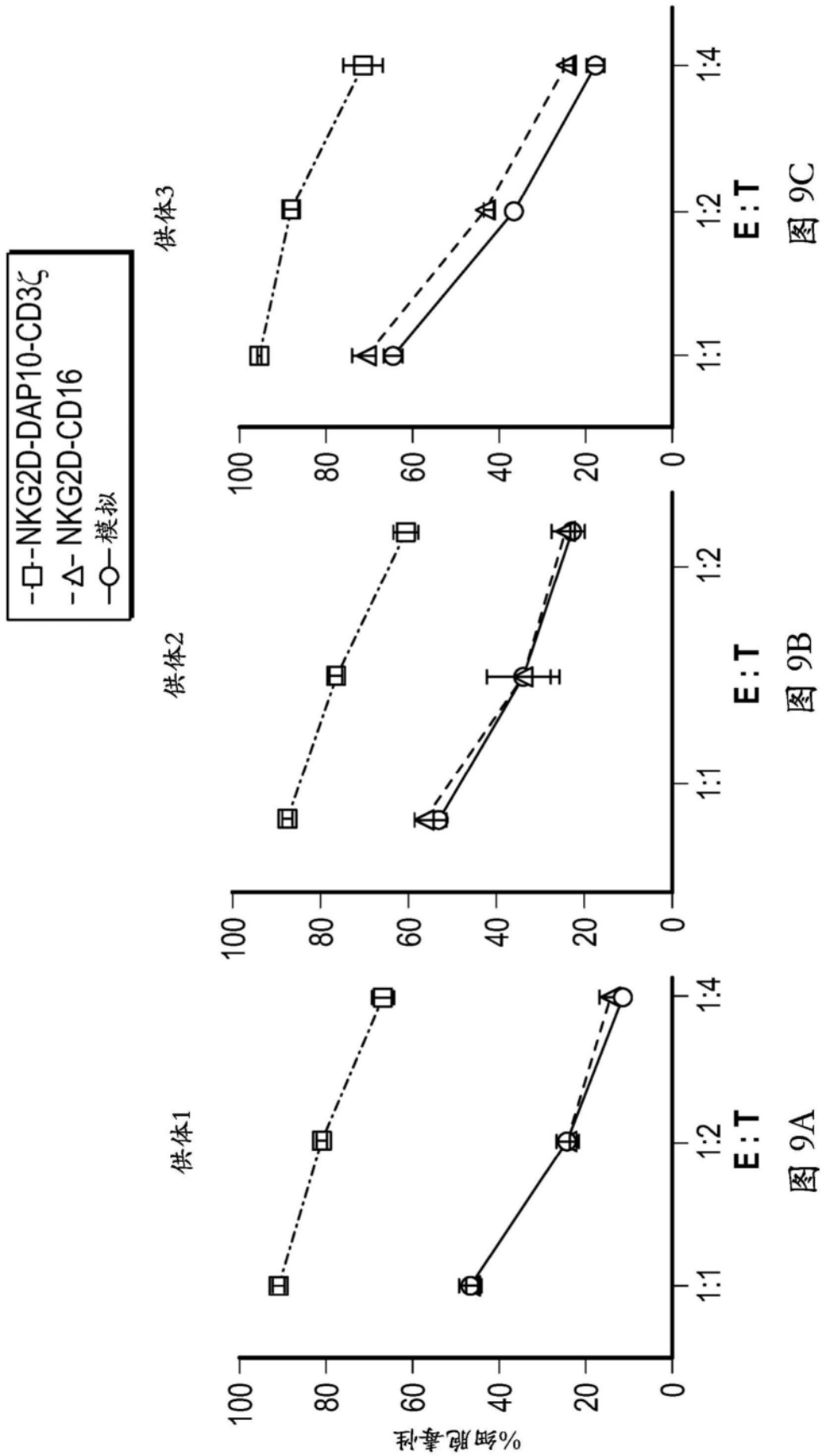

-□-NKG2D-DAP10-CD3ζ
-△- NKG2D-CD16
-○- 模拟
供体1
供体2
供体3
%细胞毒性
100
80
60
40
20
0
1:1
1:2
1:4
E:T

图 9A 图 9B 图 9C

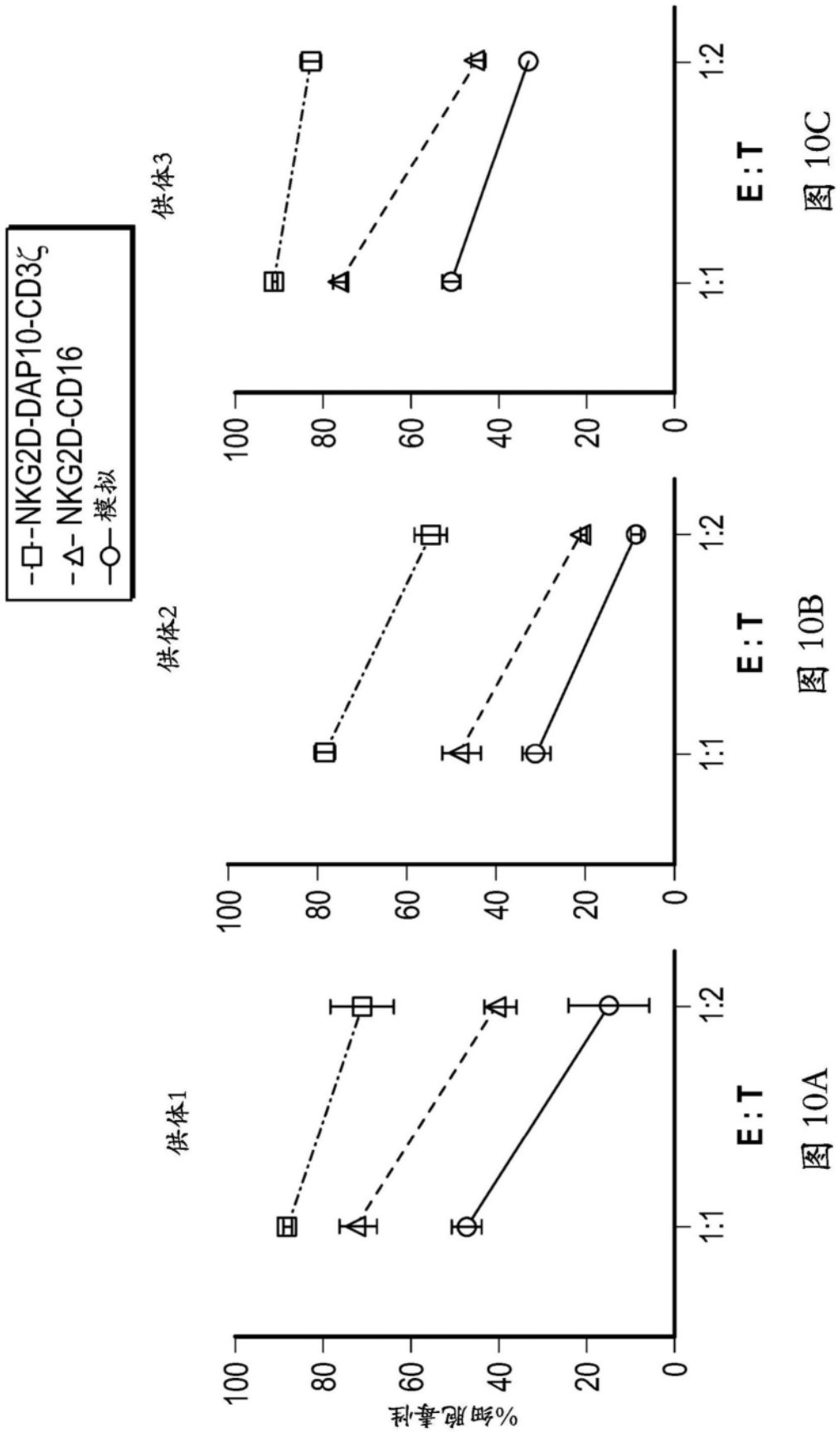


图 10A

图 10B

图 10C

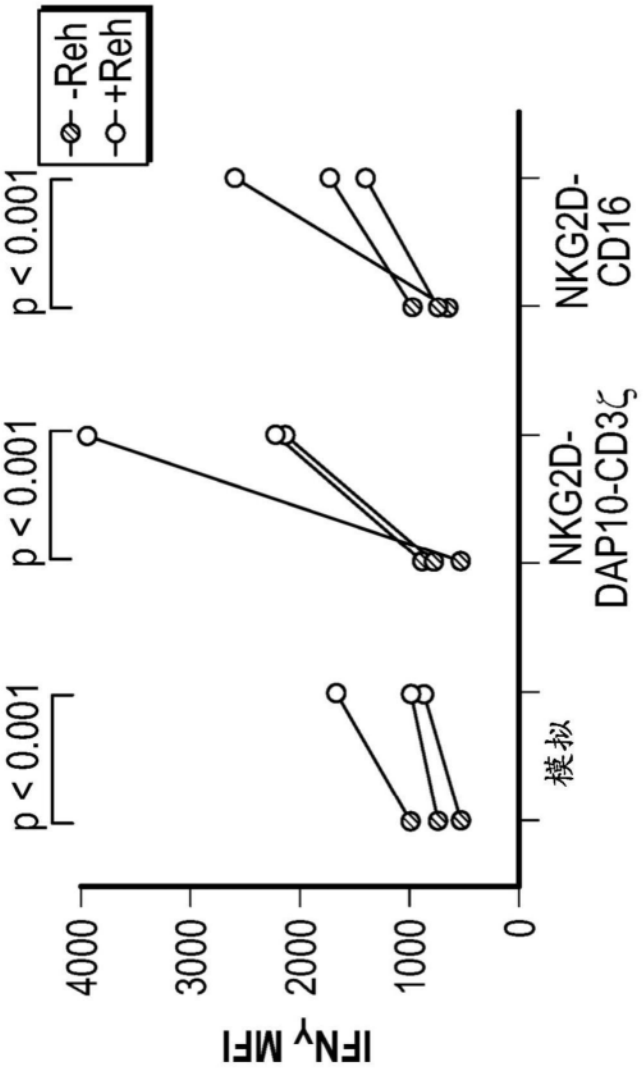

-Reh
+Reh
p < 0.001
p < 0.001
p < 0.001
NKG2D-CD16
NKG2D-DAP10-CD3ζ
模拟
4000
3000
2000
1000
0
IFNγ MFI

图11

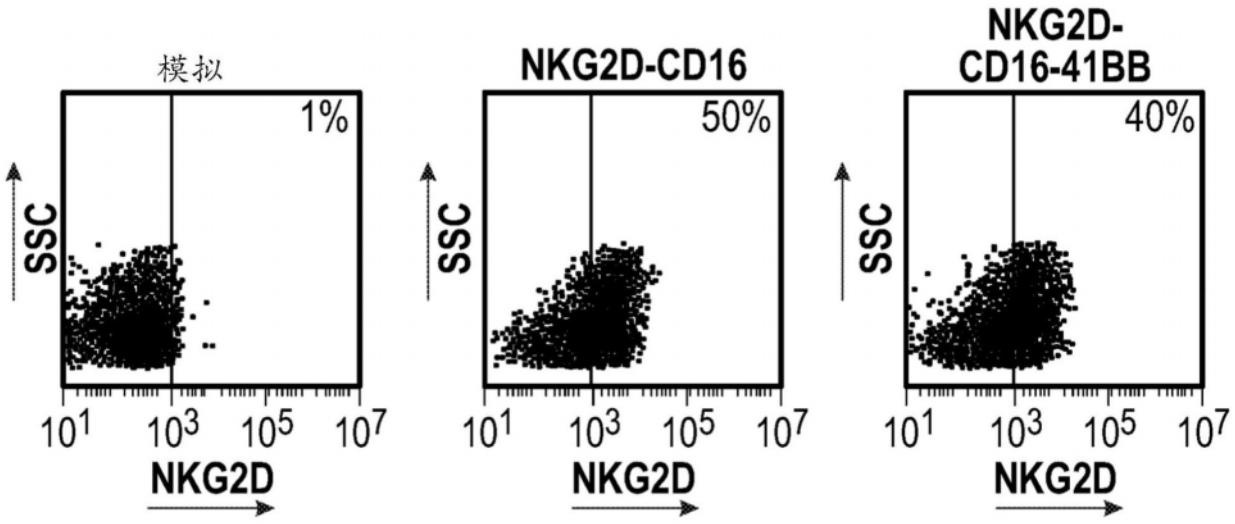

模拟
1%
SSC
NKG2D
NKG2D-CD16
50%
SSC
NKG2D
NKG2D-CD16-41BB
40%
SSC
NKG2D

图12A

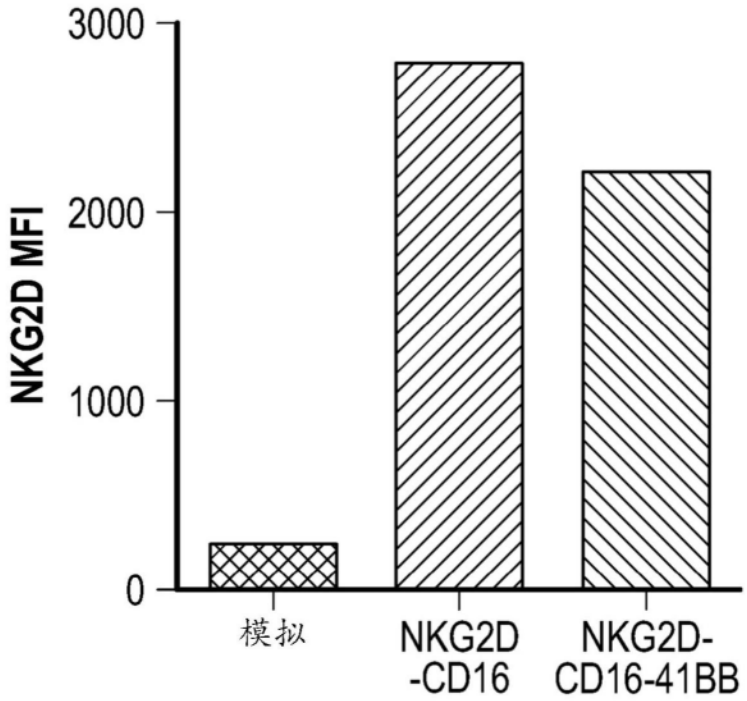


图12B

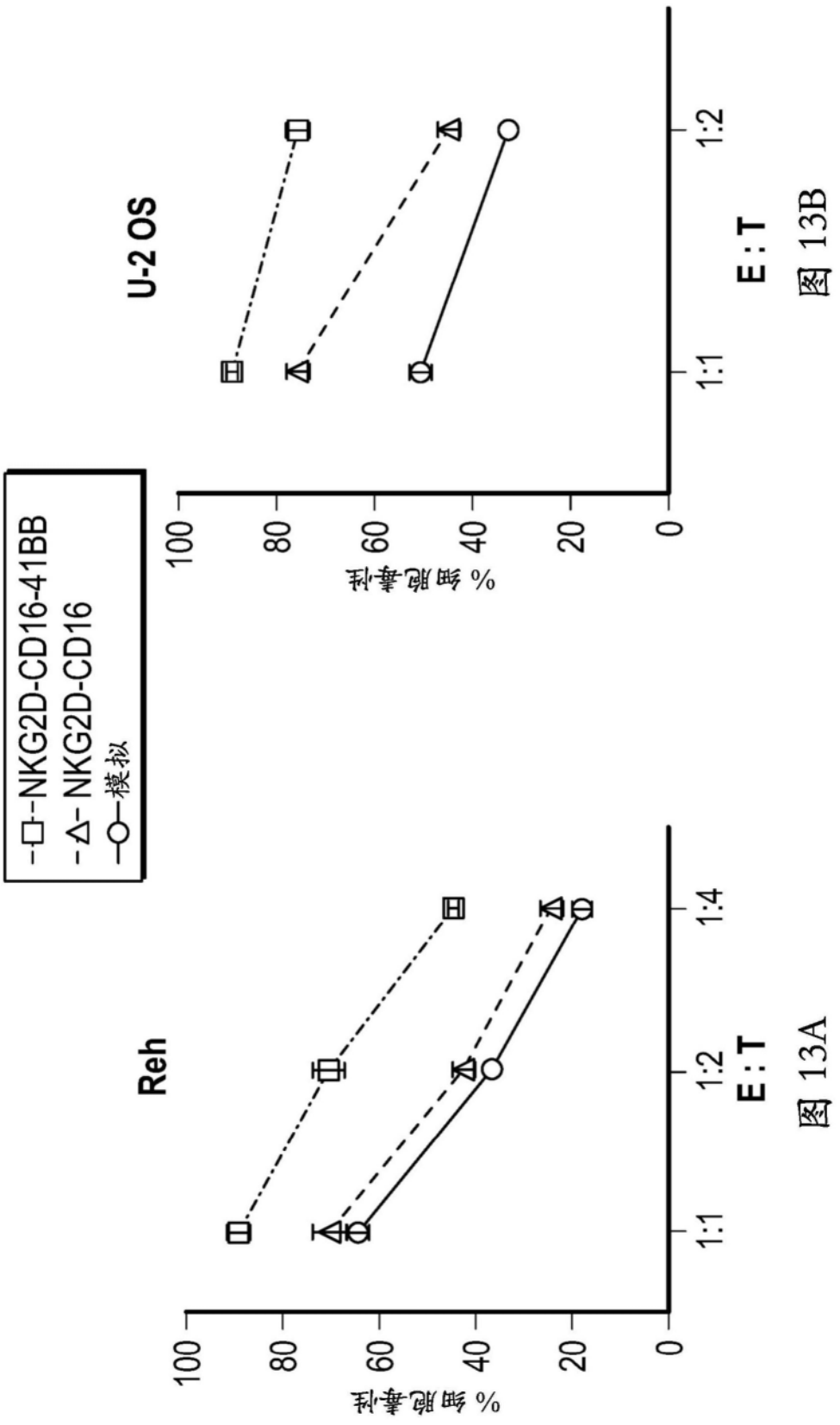

-□-NKG2D-CD16-41BB
-△- NKG2D-CD16
—○—模拟
Reh
U-2 OS
% 细胞毒性
0
20
40
60
80
100
1:1
1:2
1:4
E : T

图 13A

图 13B

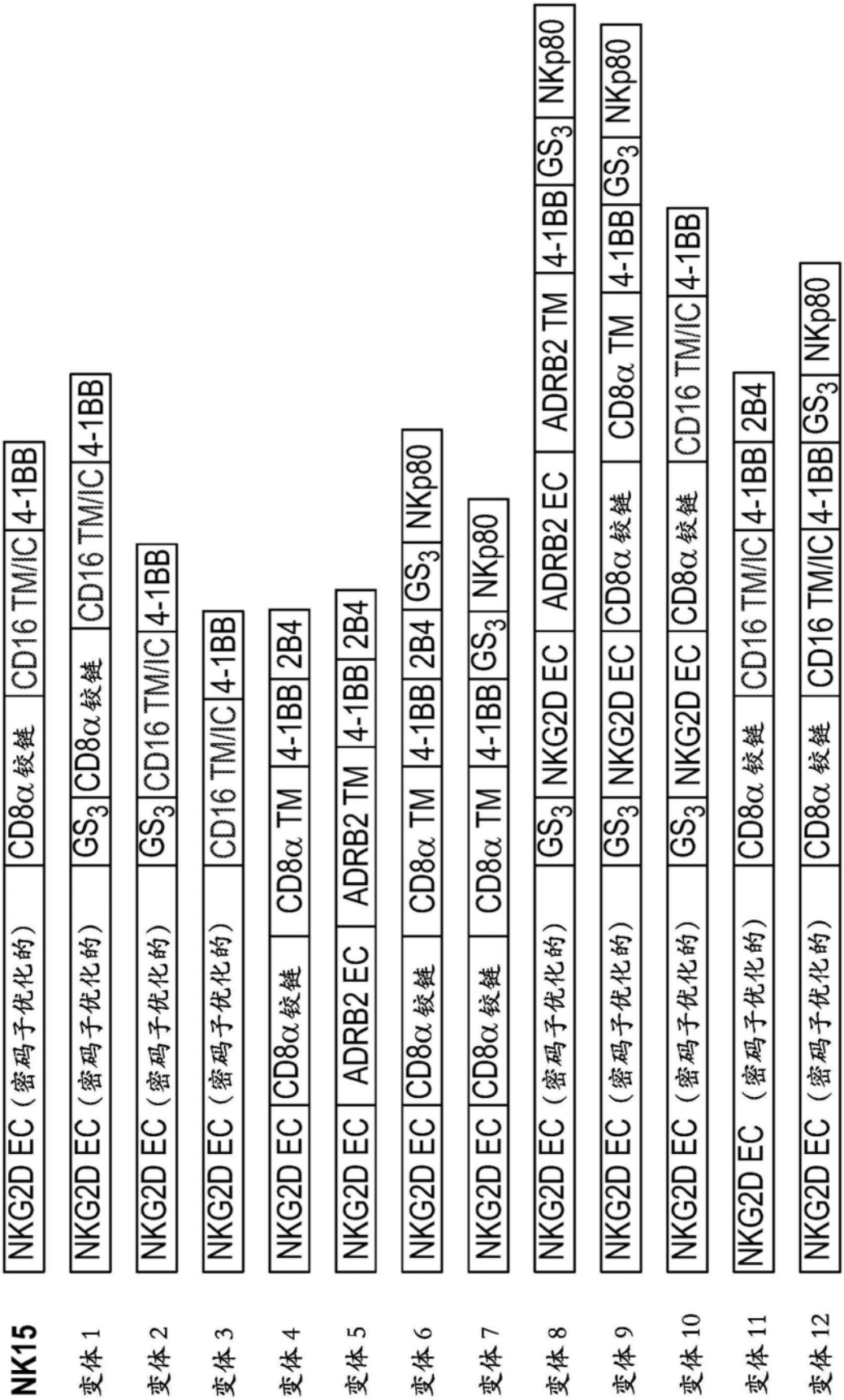

NK15
NKG2D EC（密码子优化的） CD8α 铰链 CD16 TM/IC 4-1BB
变体 1 NKG2D EC（密码子优化的） GS3 CD8α 铰链 CD16 TM/IC 4-1BB
变体 2 NKG2D EC（密码子优化的） GS3 CD16 TM/IC 4-1BB
变体 3 NKG2D EC（密码子优化的） CD16 TM/IC 4-1BB
变体 4 NKG2D EC CD8α 铰链 CD8α TM 4-1BB 2B4
变体 5 NKG2D EC ADRB2 EC ADRB2 TM 4-1BB 2B4
变体 6 NKG2D EC CD8α 铰链 CD8α TM 4-1BB 2B4 GS3 NKp80
变体 7 NKG2D EC CD8α 铰链 CD8α TM 4-1BB GS3 NKp80
变体 8 NKG2D EC（密码子优化的） GS3 NKG2D EC ADRB2 EC ADRB2 TM 4-1BB GS3 NKp80
变体 9 NKG2D EC（密码子优化的） GS3 NKG2D EC CD8α 铰链 CD8α TM 4-1BB GS3 NKp80
变体 10 NKG2D EC（密码子优化的） GS3 NKG2D EC CD8α 铰链 CD16 TM/IC 4-1BB
变体 11 NKG2D EC （密码子优化的） CD8α 铰链 CD16 TM/IC 4-1BB 2B4
变体 12 NKG2D EC（密码子优化的） CD8α 铰链 CD16 TM/IC 4-1BB GS3 NKp80

图14

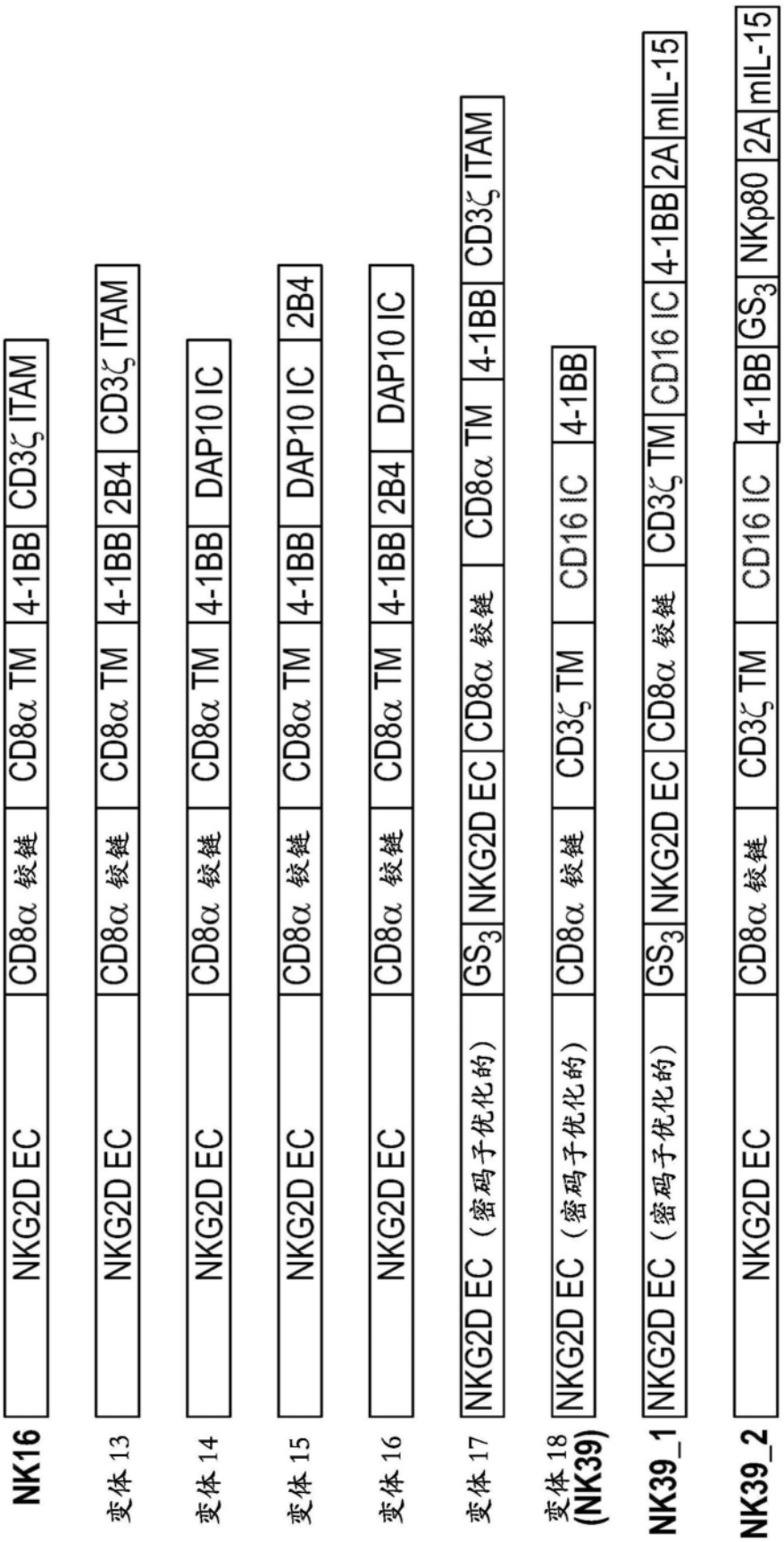

NK16
NKG2D EC
CD8α 铰链
CD8α TM
4-1BB
CD3ζ ITAM
变体 13
NKG2D EC
CD8α 铰链
CD8α TM
4-1BB
2B4
CD3ζ ITAM
变体 14
NKG2D EC
CD8α 铰链
CD8α TM
4-1BB
DAP10 IC
变体 15
NKG2D EC
CD8α 铰链
CD8α TM
4-1BB
DAP10 IC
2B4
变体 16
NKG2D EC
CD8α 铰链
CD8α TM
4-1BB
2B4
DAP10 IC
变体 17
NKG2D EC（密码子优化的）
GS3
NKG2D EC
CD8α 铰链
CD8α TM
4-1BB
CD3ζ ITAM
变体 18 (NK39)
NKG2D EC（密码子优化的）
CD8α 铰链
CD3ζ TM
CD16 IC
4-1BB
NK39_1
NKG2D EC（密码子优化的）
GS3
NKG2D EC
CD8α 铰链
CD3ζ TM
CD16 IC
4-1BB
2A
mIL-15
NK39_2
NKG2D EC
CD8α 铰链
CD3ζ TM
CD16 IC
4-1BB
GS3
NKp80
2A
mIL-15

图15

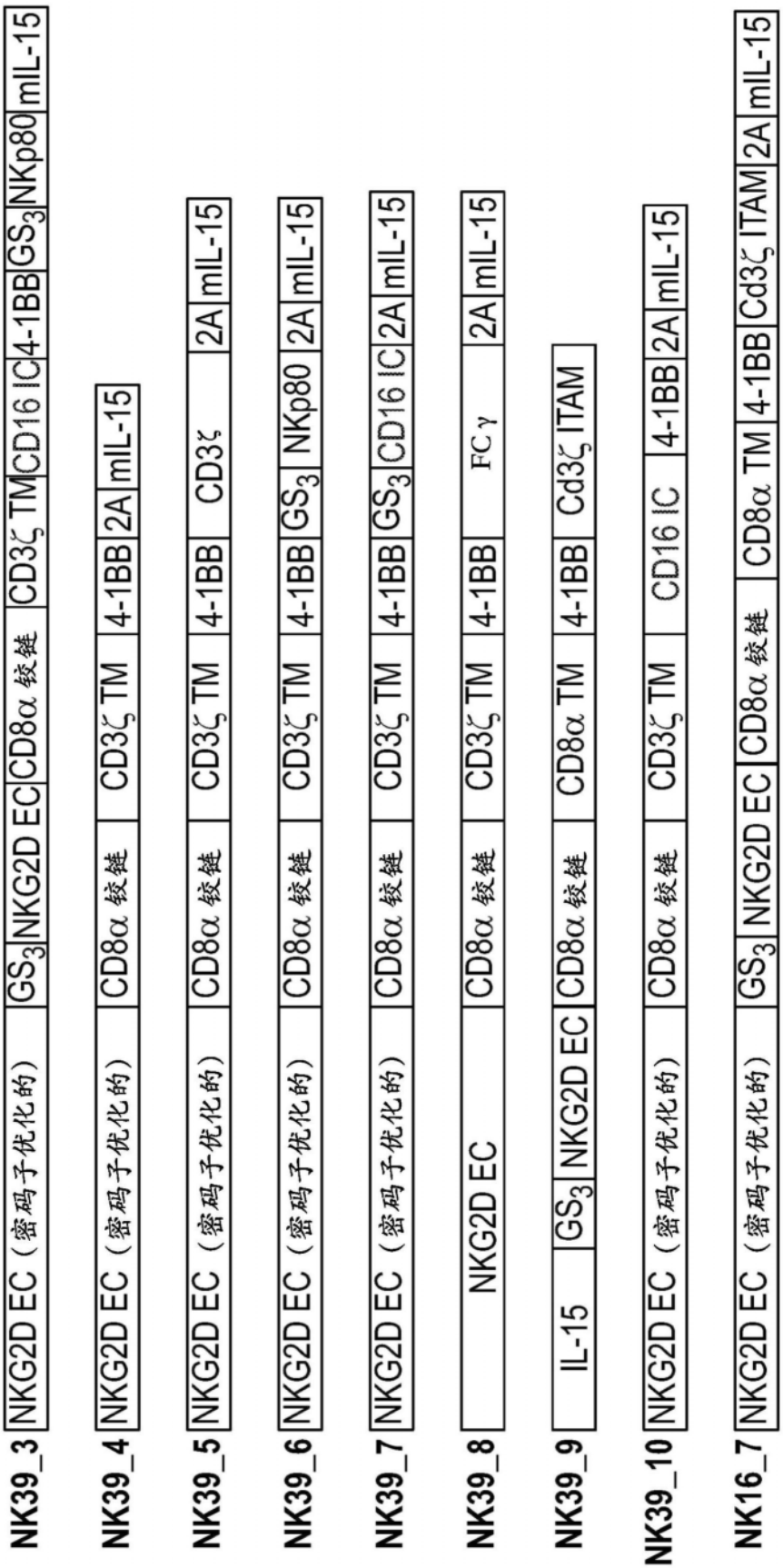

NK39_3
NKG2D EC（密码子优化的）
GS3
NKG2D EC
CD8α 铰链
CD3ζ TM
CD16 IC
4-1BB
GS3
NKp80
mIL-15
NK39_4
NKG2D EC（密码子优化的）
CD8α 铰链
CD3ζ TM
4-1BB
2A
mIL-15
NK39_5
NKG2D EC（密码子优化的）
CD8α 铰链
CD3ζ TM
4-1BB
CD3ζ
2A
mIL-15
NK39_6
NKG2D EC（密码子优化的）
CD8α 铰链
CD3ζ TM
4-1BB
GS3
NKp80
2A
mIL-15
NK39_7
NKG2D EC（密码子优化的）
CD8α 铰链
CD3ζ TM
4-1BB
GS3
CD16 IC
2A
mIL-15
NK39_8
NKG2D EC
CD8α 铰链
CD3ζ TM
4-1BB
FC γ
2A
mIL-15
NK39_9
IL-15
GS3
NKG2D EC
CD8α 铰链
CD8α TM
4-1BB
Cd3ζ ITAM
NK39_10
NKG2D EC（密码子优化的）
CD8α 铰链
CD3ζ TM
CD16 IC
4-1BB
2A
mIL-15
NK16_7
NKG2D EC（密码子优化的）
GS3
NKG2D EC
CD8α 铰链
CD8α TM
4-1BB
Cd3ζ ITAM
2A
mIL-15

图15(续)

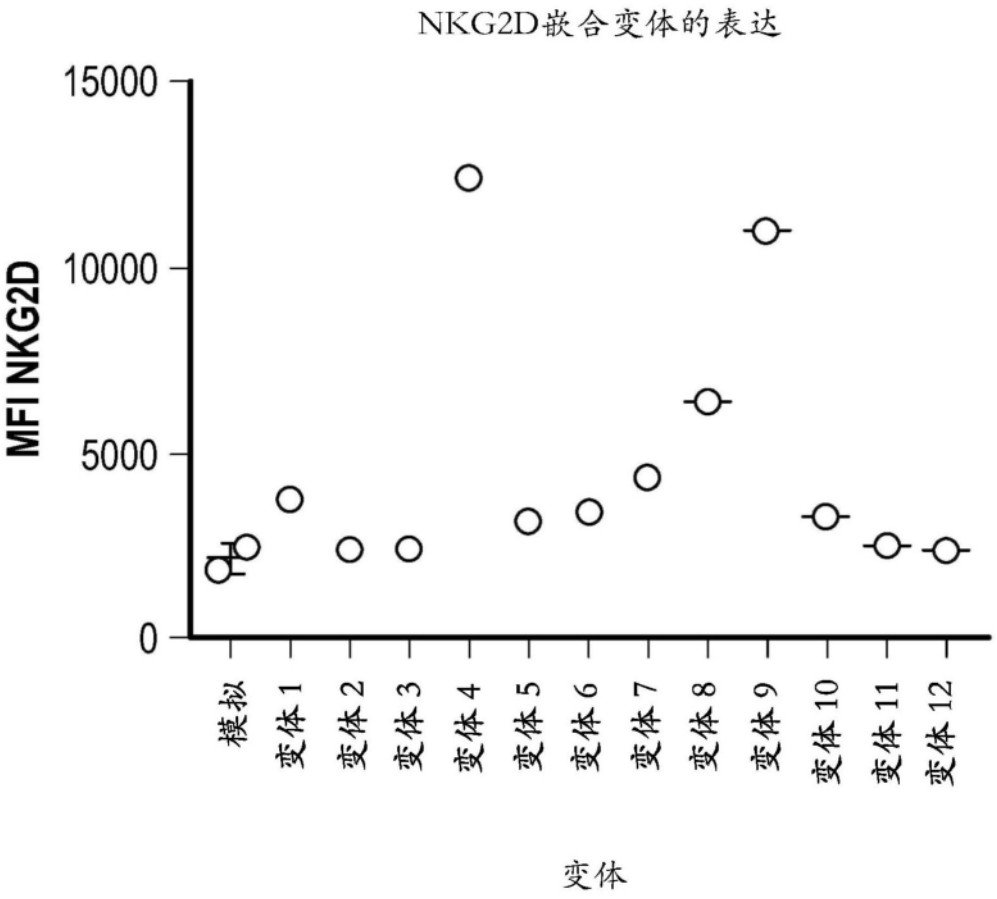

NKG2D嵌合变体的表达
MFI NKG2D
15000
10000
5000
0
模拟
变体 1
变体 2
变体 3
变体 4
变体 5
变体 6
变体 7
变体 8
变体 9
变体 10
变体 11
变体 12
变体

图16A

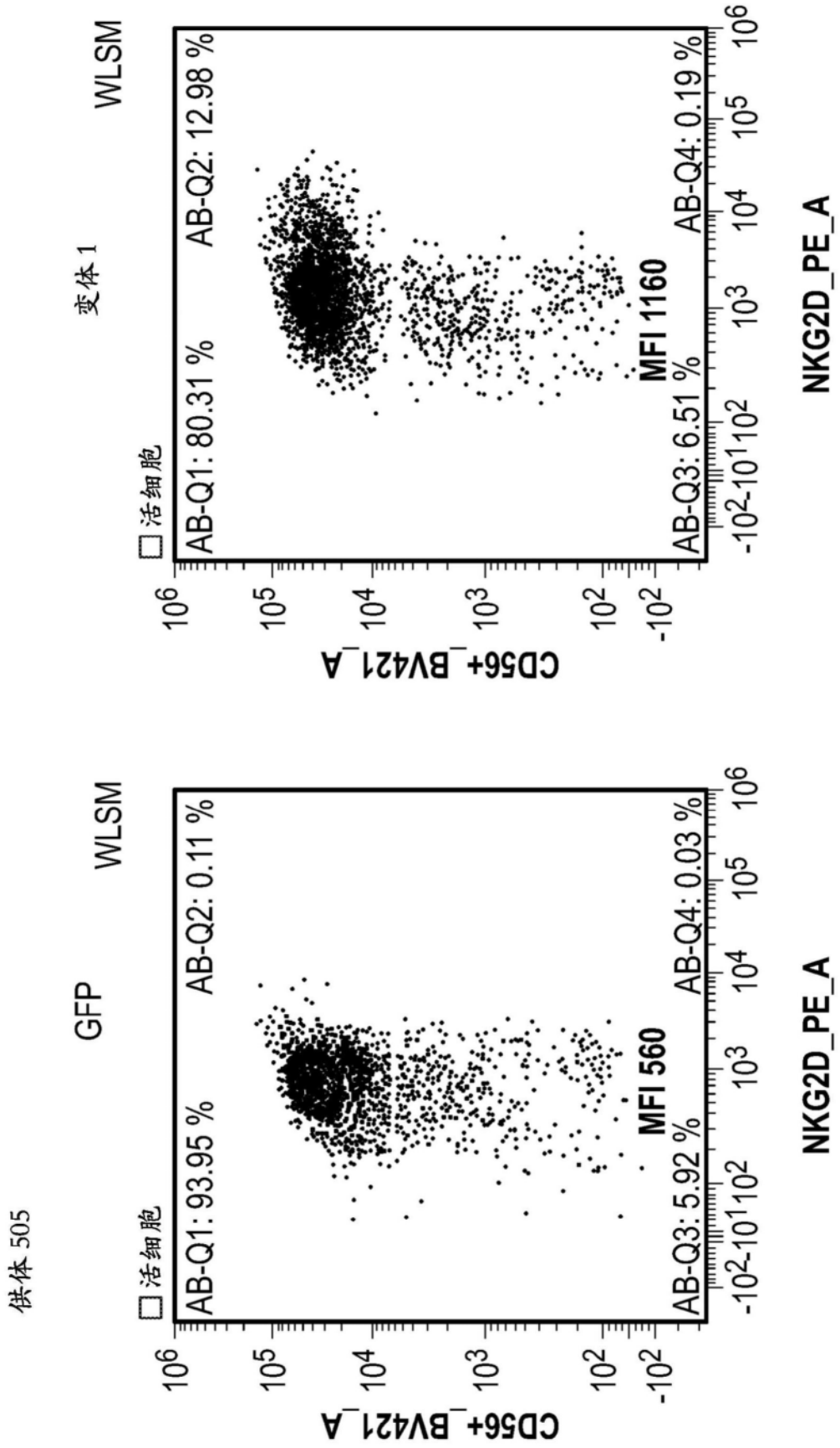

供体 505
GFP
WLSM
活细胞
AB-Q1: 93.95 %
AB-Q2: 0.11 %
AB-Q3: 5.92 %
AB-Q4: 0.03 %
MFI 560
CD56+_BV421_A
NKG2D_PE_A
变体 1
WLSM
活细胞
AB-Q1: 80.31 %
AB-Q2: 12.98 %
AB-Q3: 6.51 %
AB-Q4: 0.19 %
MFI 1160
CD56+_BV421_A
NKG2D_PE_A

图16B

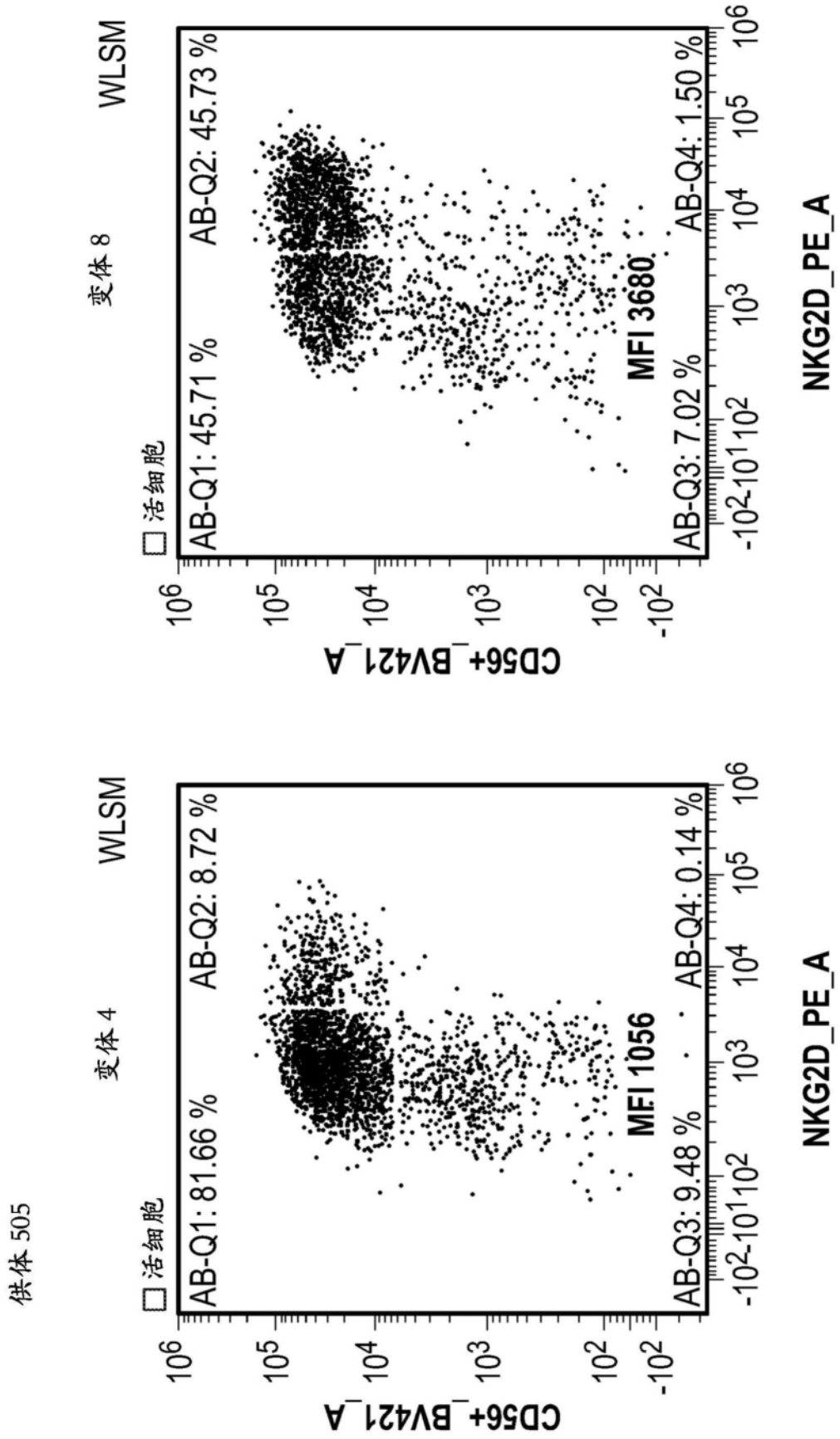

供体 505
变体 4
WLSM
活细胞
AB-Q1: 81.66 %
AB-Q2: 8.72 %
AB-Q3: 9.48 %
AB-Q4: 0.14 %
MFI 1056
CD56+_BV421_A
NKG2D_PE_A
变体 8
WLSM
活细胞
AB-Q1: 45.71 %
AB-Q2: 45.73 %
AB-Q3: 7.02 %
AB-Q4: 1.50 %
MFI 3680
CD56+_BV421_A
NKG2D_PE_A

图16B(续)

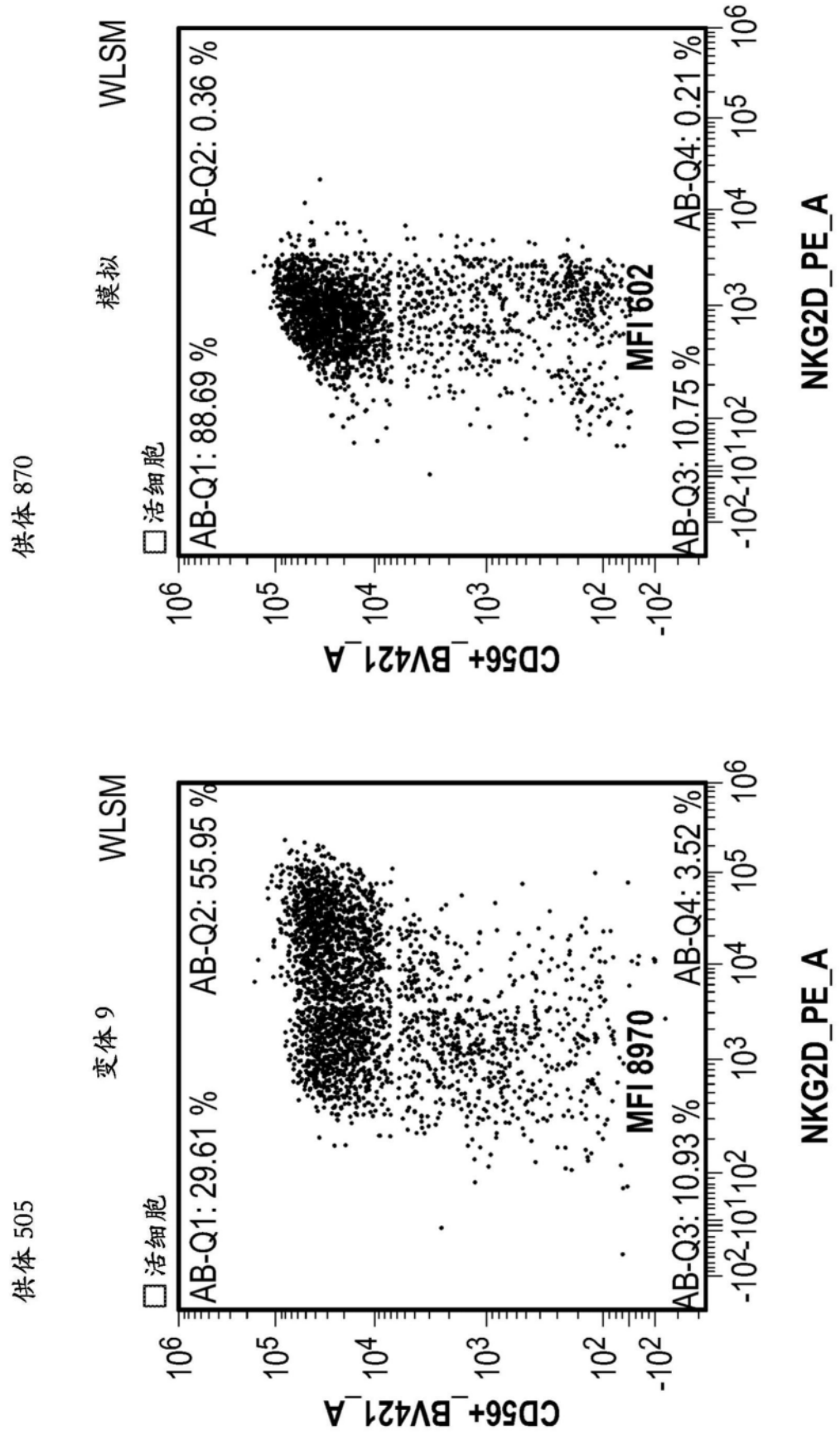

供体 505
变体 9
WLSM
活细胞
AB-Q1: 29.61 %
AB-Q2: 55.95 %
AB-Q3: 10.93 %
AB-Q4: 3.52 %
MFI 8970
CD56+_BV421_A
NKG2D_PE_A
供体 870
模拟
WLSM
活细胞
AB-Q1: 88.69 %
AB-Q2: 0.36 %
AB-Q3: 10.75 %
AB-Q4: 0.21 %
MFI 602
CD56+_BV421_A
NKG2D_PE_A

图16B(续)

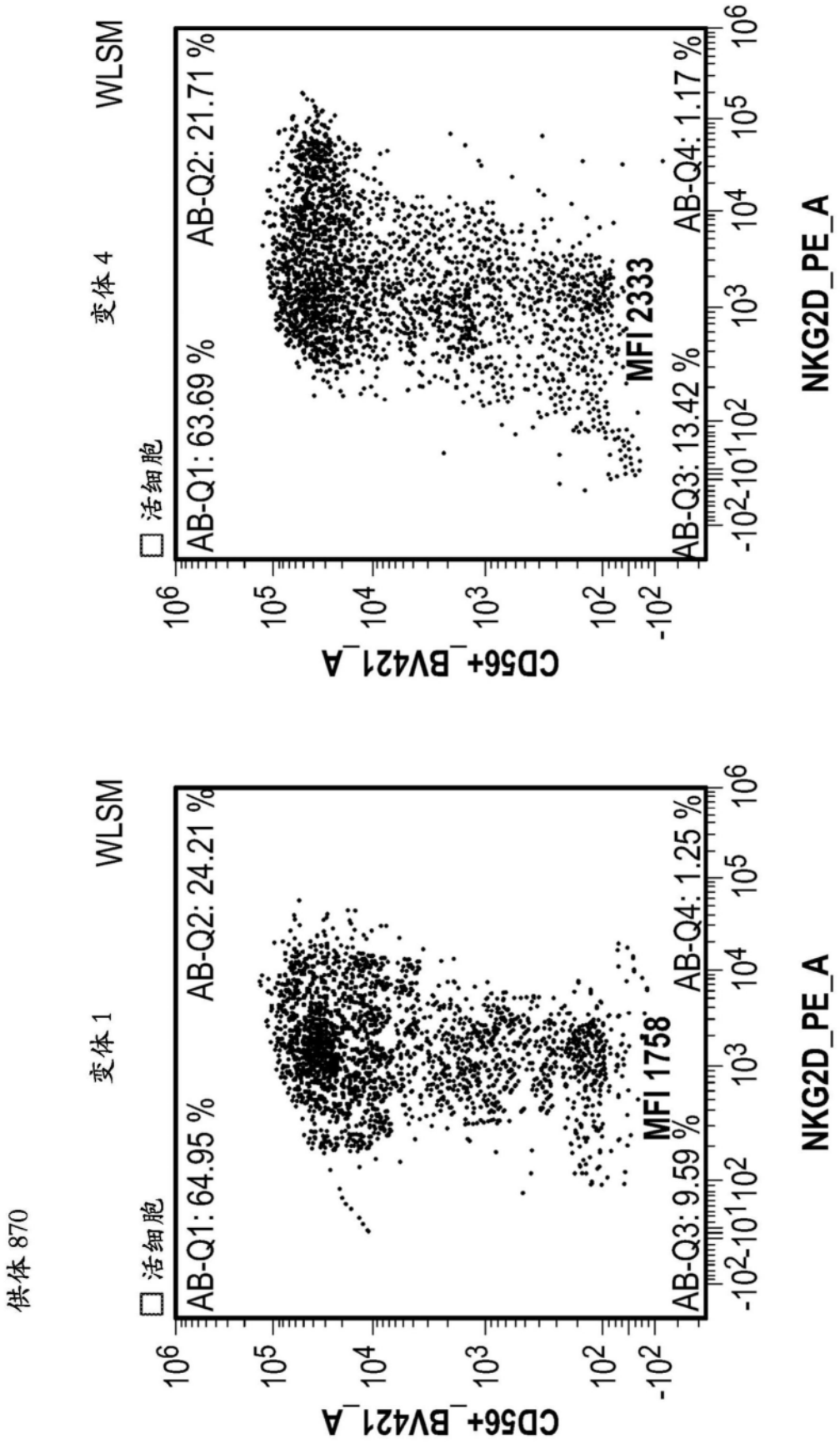

供体 870
变体 1
WLSM
活细胞
AB-Q1: 64.95 %
AB-Q2: 24.21 %
AB-Q3: 9.59 %
AB-Q4: 1.25 %
MFI 1758
CD56+_BV421_A
NKG2D_PE_A
变体 4
WLSM
活细胞
AB-Q1: 63.69 %
AB-Q2: 21.71 %
AB-Q3: 13.42 %
AB-Q4: 1.17 %
MFI 2333
CD56+_BV421_A
NKG2D_PE_A

图16B(续)

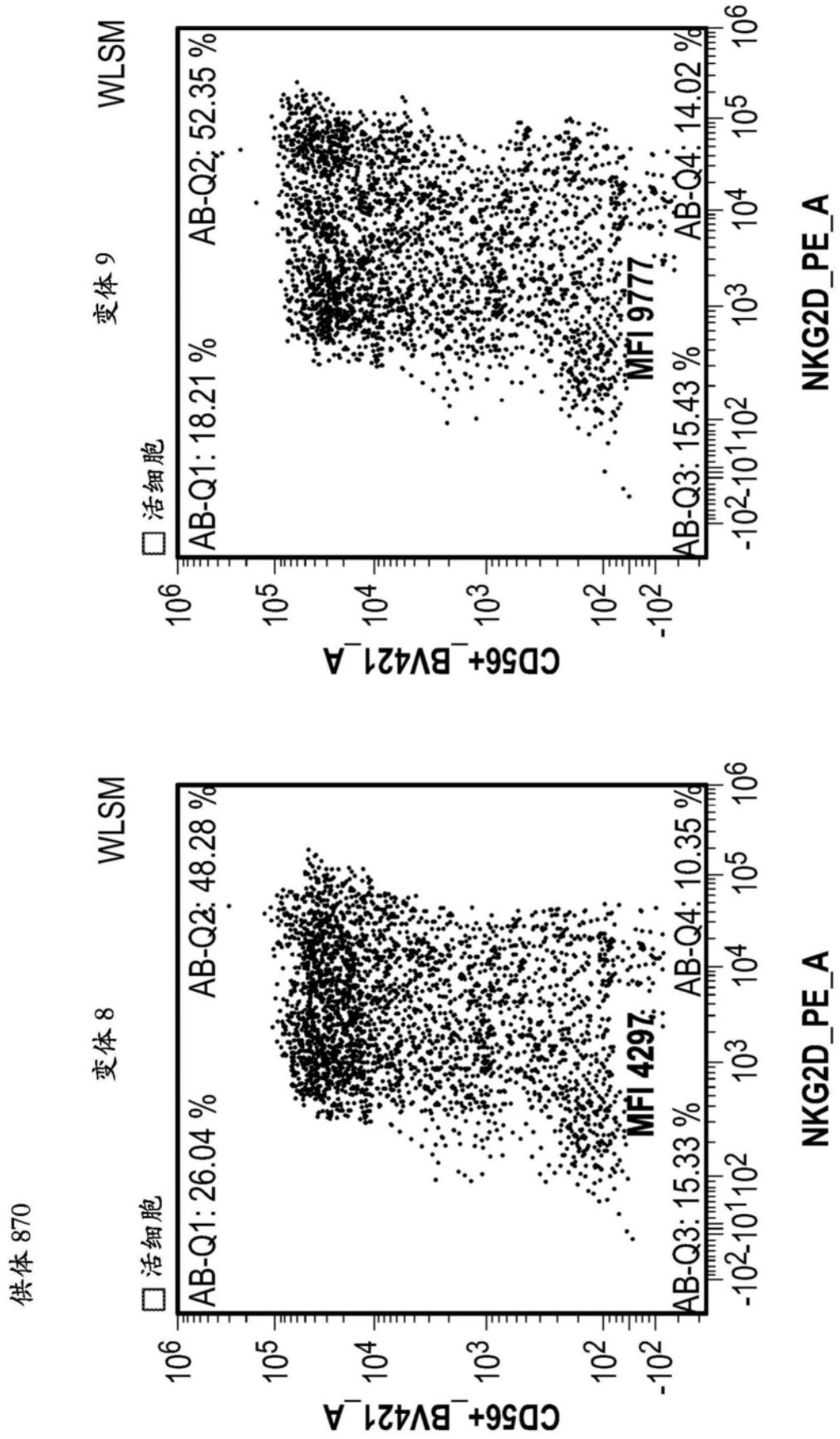

供体 870
变体 8
WLSM
□ 活细胞
AB-Q1: 26.04 %
AB-Q2: 48.28 %
AB-Q3: 15.33 %
AB-Q4: 10.35 %
MFI 4297
CD56+_BV421_A
NKG2D_PE_A
变体 9
WLSM
□ 活细胞
AB-Q1: 18.21 %
AB-Q2: 52.35 %
AB-Q3: 15.43 %
AB-Q4: 14.02 %
MFI 9777
CD56+_BV421_A
NKG2D_PE_A

图16B(续)

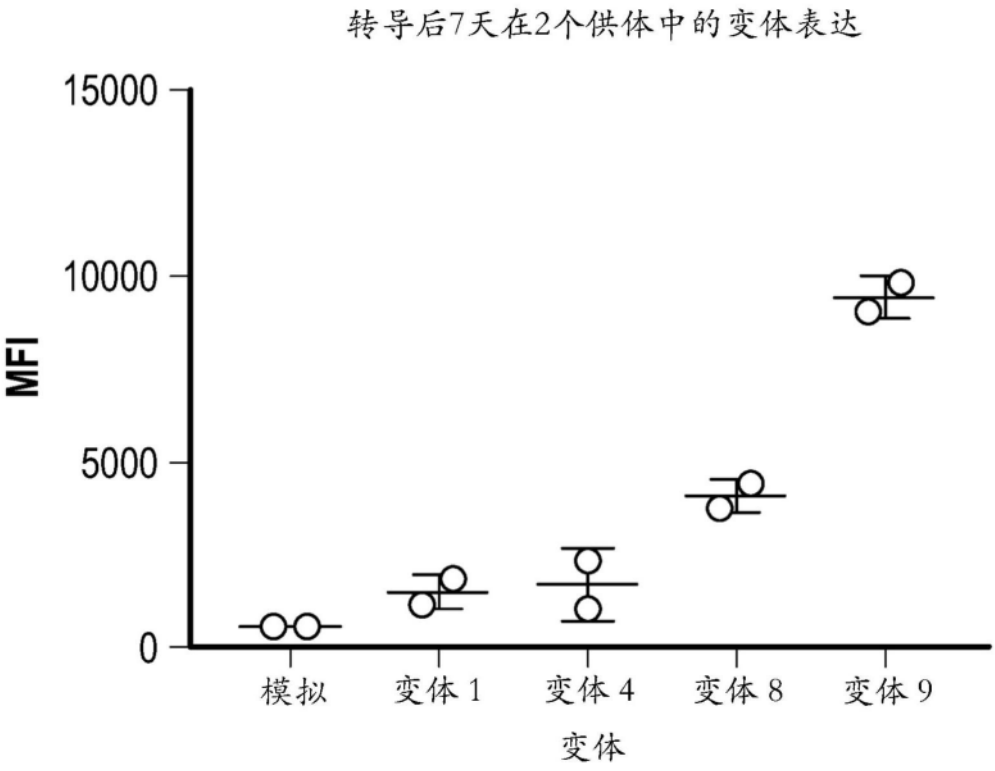

转导后7天在2个供体中的变体表达
15000
10000
5000
0
MFI
模拟
变体 1
变体 4
变体 8
变体 9
变体

图16C

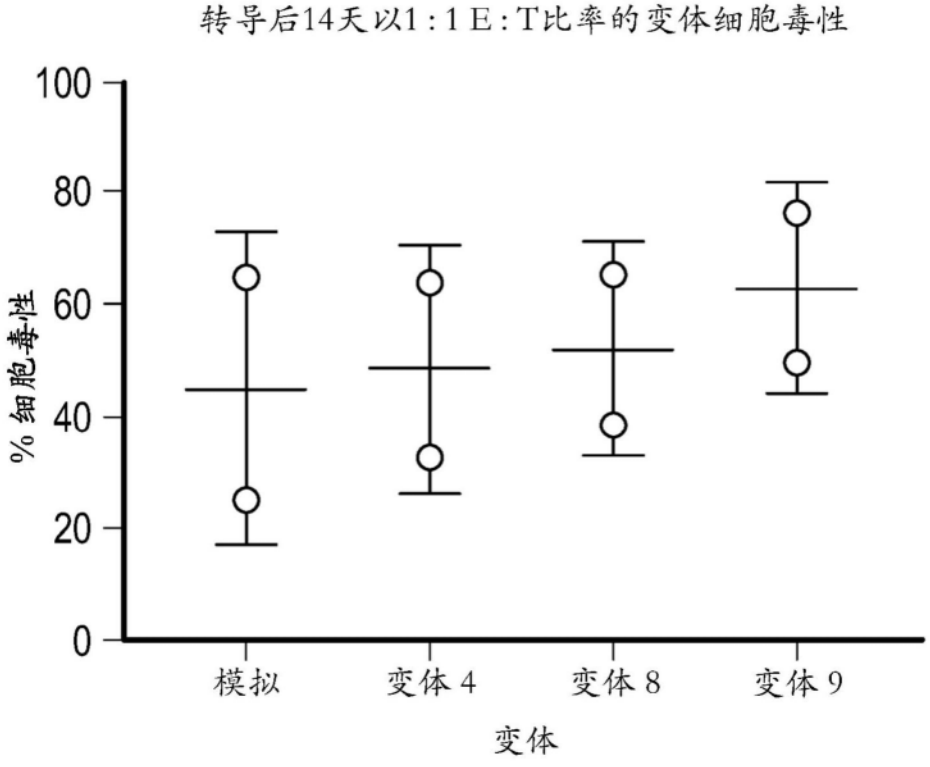

转导后14天以1:1 E:T比率的变体细胞毒性
100
80
60
40
20
0
% 细胞毒性
模拟
变体 4
变体 8
变体 9
变体

图17

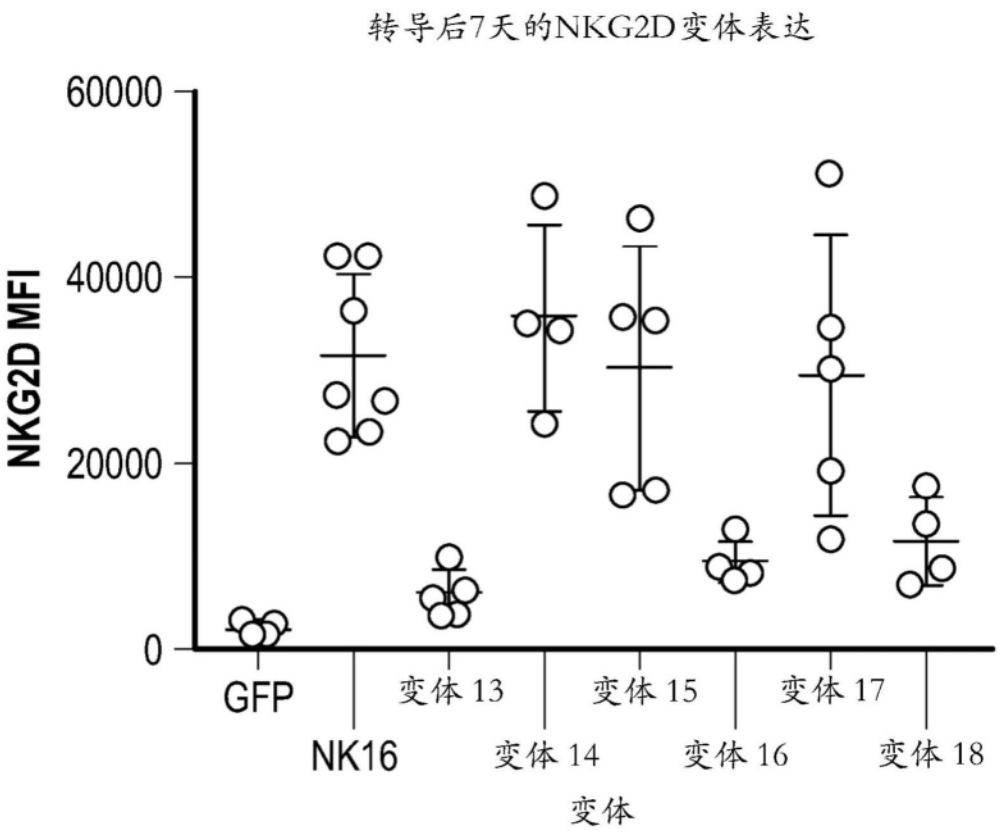

转导后7天的NKG2D变体表达
NKG2D MFI
60000
40000
20000
0
GFP
NK16
变体 13
变体 14
变体 15
变体 16
变体 17
变体 18
变体

图18A

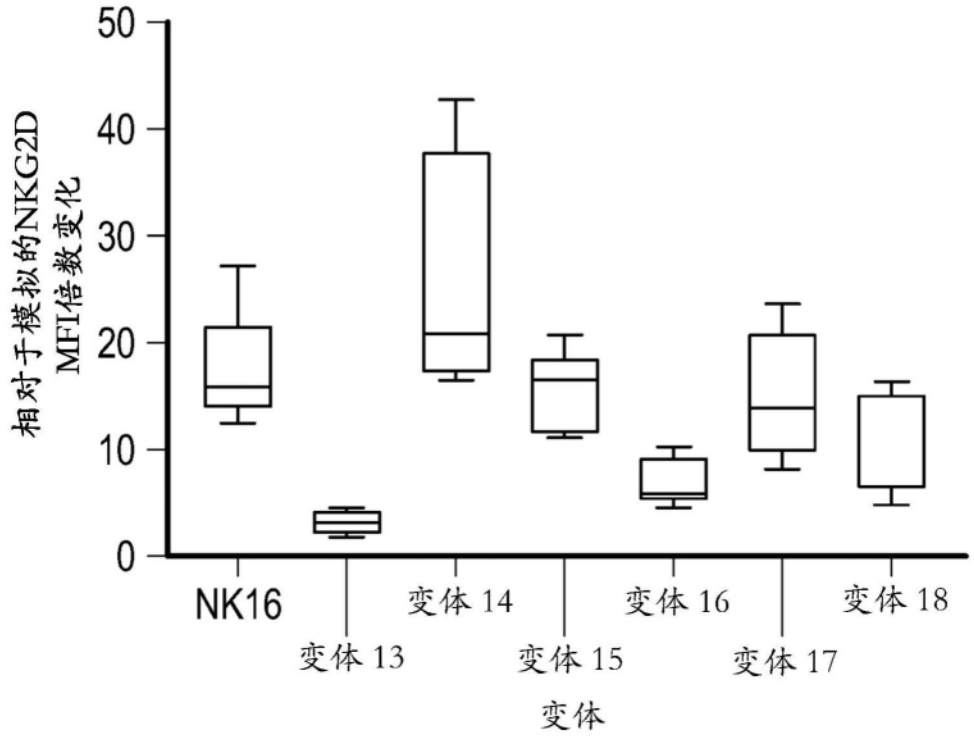

相对于模拟的NKG2D MFI倍数变化
50
40
30
20
10
0
NK16
变体 13
变体 14
变体 15
变体 16
变体 17
变体 18
变体

图18B

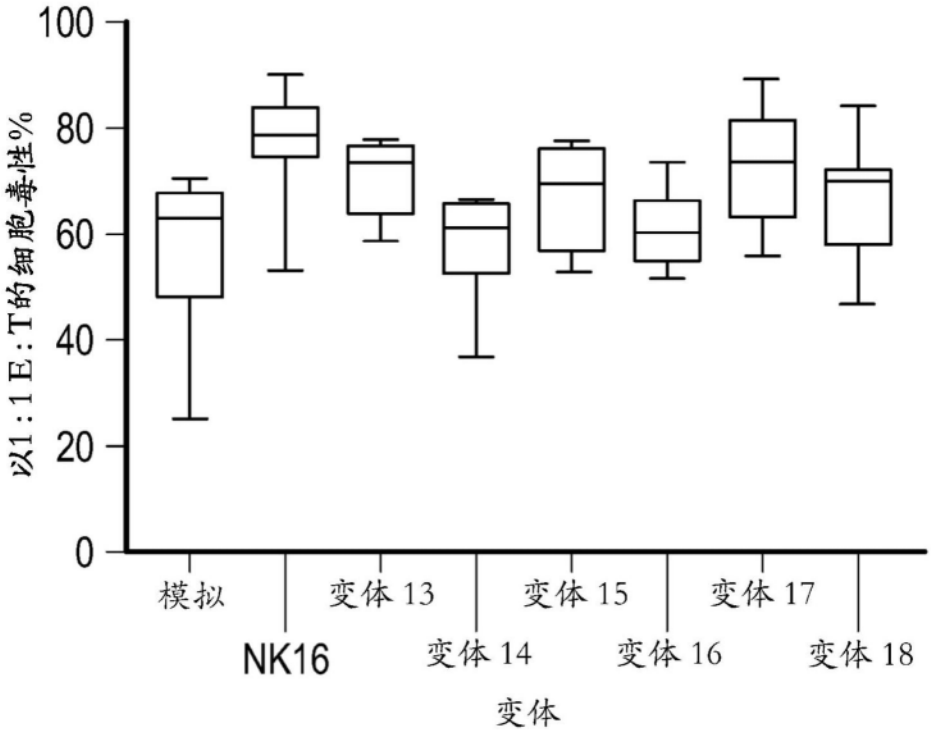

100
80
60
40
20
0
以1:1E:T的细胞毒性%
模拟
NK16
变体 13
变体 14
变体 15
变体 16
变体 17
变体 18
变体

图19A

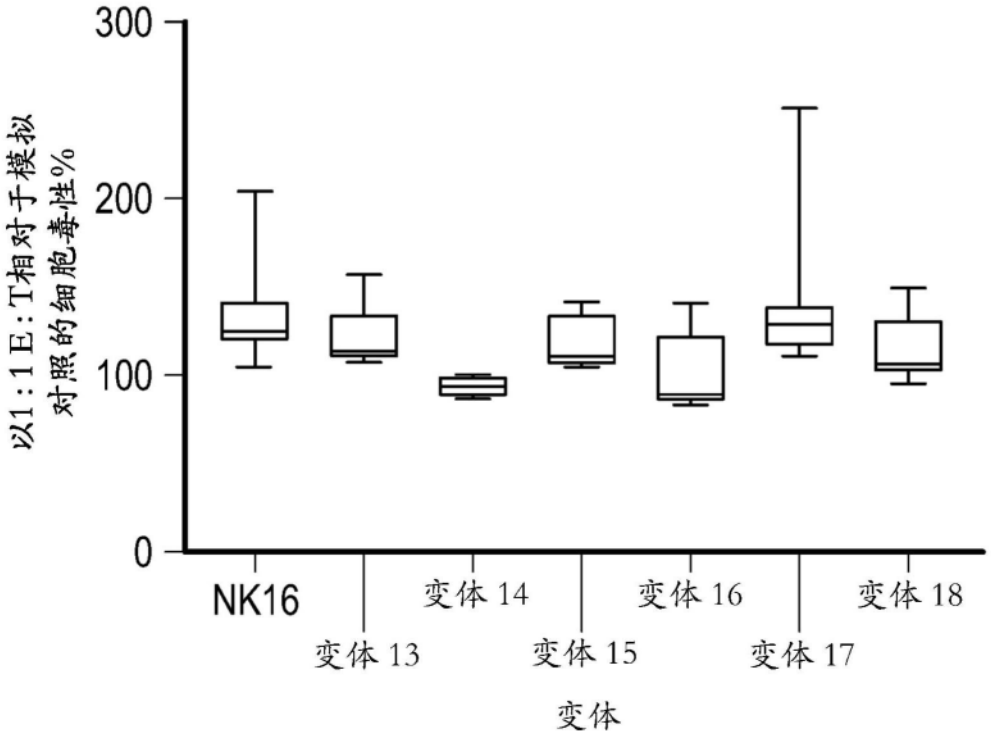

300
200
100
0
以1:1E:T相对于模拟
对照的细胞毒性%
NK16
变体 13
变体 14
变体 15
变体 16
变体 17
变体 18
变体

图19B

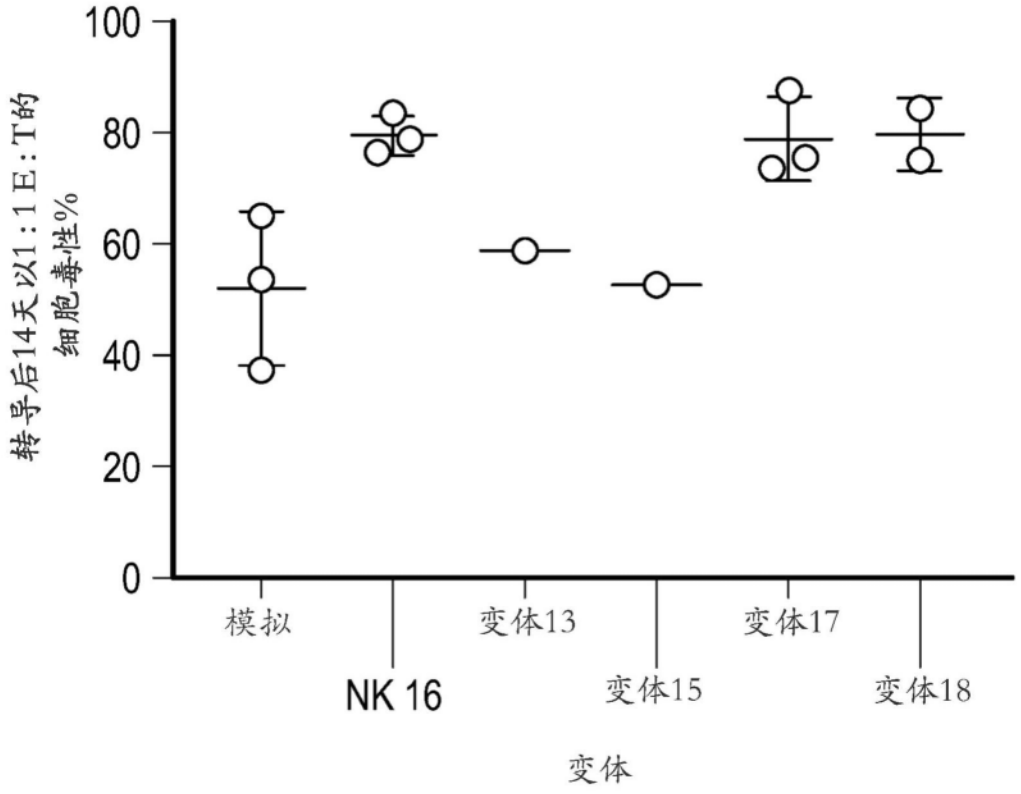

100
80
60
40
20
0
转导后14天以1:1 E:T的细胞毒性%
模拟
NK 16
变体13
变体15
变体17
变体18
变体

图20

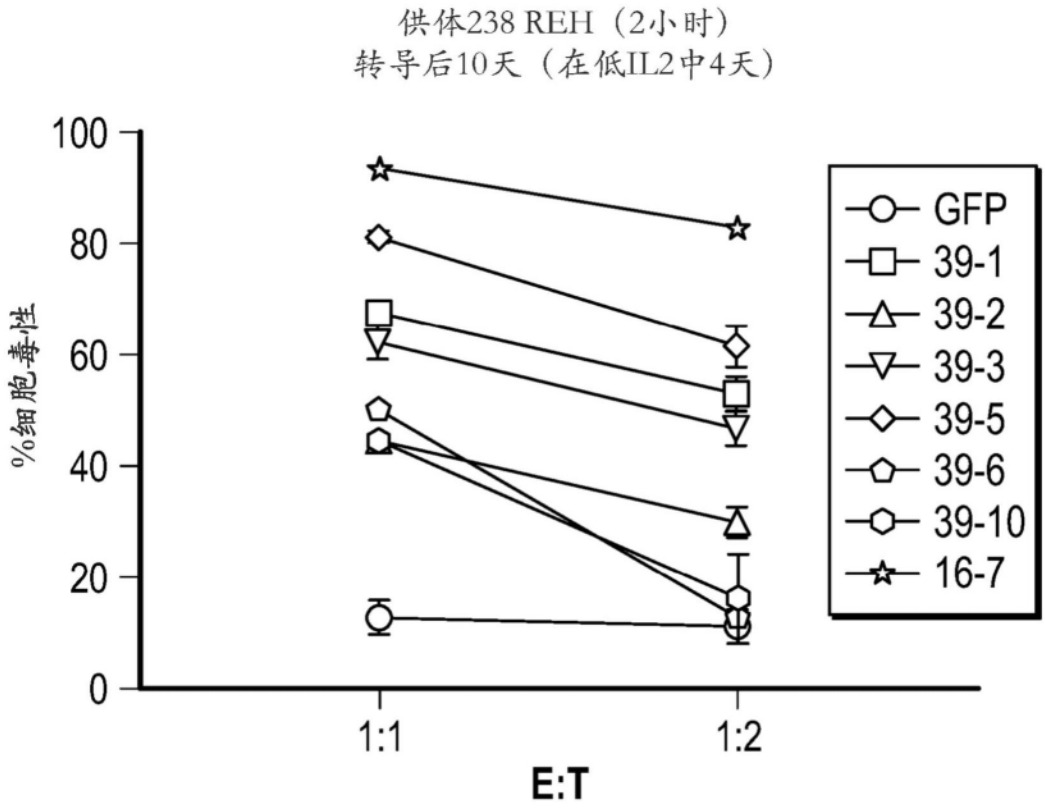

供体238 REH（2小时）
转导后10天（在低IL2中4天）
%细胞毒性
100
80
60
40
20
0
1:1
1:2
E:T
GFP
39-1
39-2
39-3
39-5
39-6
39-10
16-7

图21

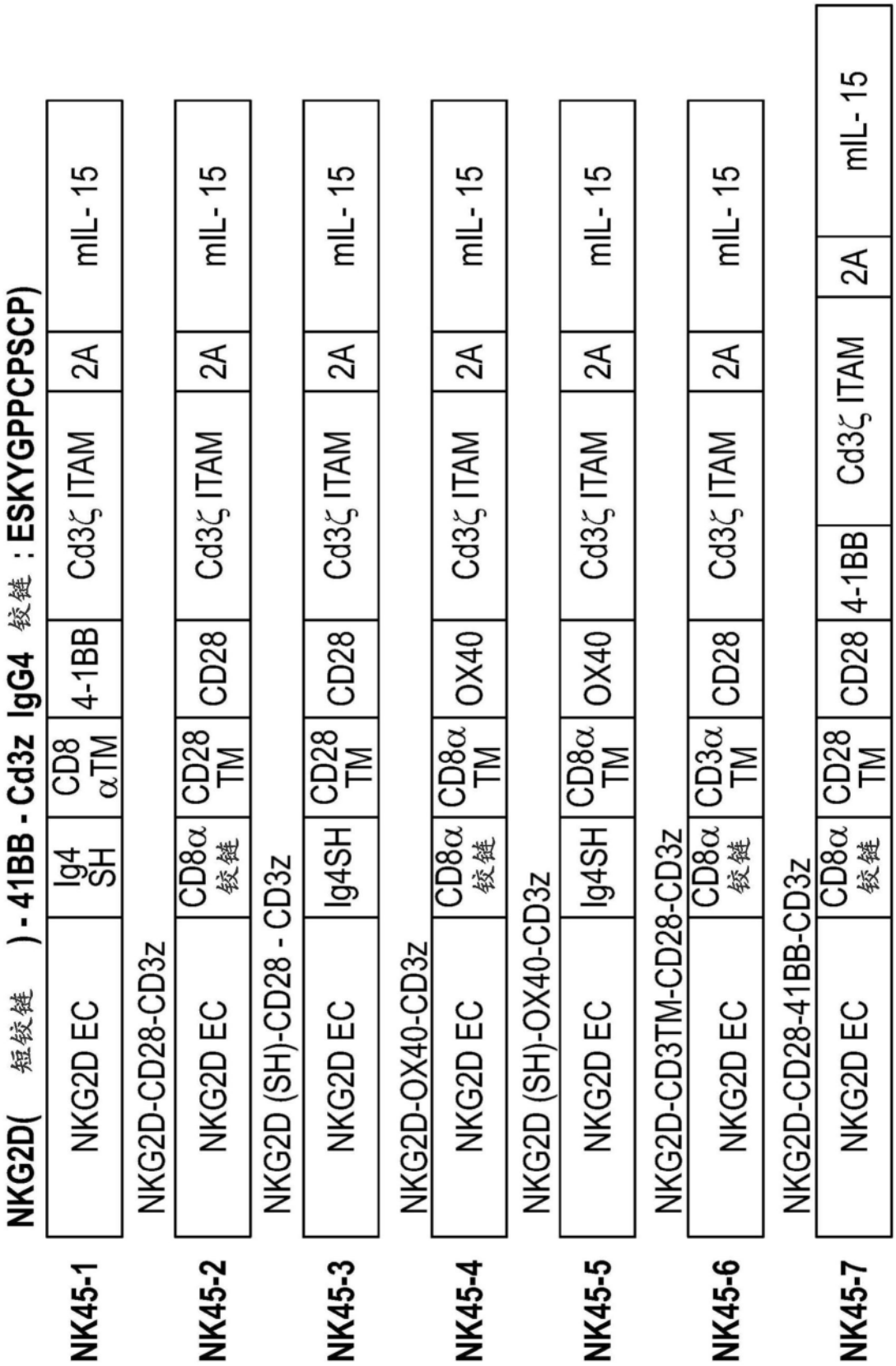

NKG2D(短铰链) - 41BB - Cd3z IgG4 铰链 : ESKYGPPCPSCP)
NK45-1
NKG2D EC
Ig4 SH
CD8 αTM
4-1BB
Cd3ζ ITAM
2A
mIL- 15
NKG2D-CD28-CD3z
NK45-2
NKG2D EC
CD8α 铰链
CD28 TM
CD28
Cd3ζ ITAM
2A
mIL- 15
NKG2D (SH)-CD28 - CD3z
NK45-3
NKG2D EC
Ig4SH
CD28 TM
CD28
Cd3ζ ITAM
2A
mIL- 15
NKG2D-OX40-CD3z
NK45-4
NKG2D EC
CD8α 铰链
CD8α TM
OX40
Cd3ζ ITAM
2A
mIL- 15
NKG2D (SH)-OX40-CD3z
NK45-5
NKG2D EC
Ig4SH
CD8α TM
OX40
Cd3ζ ITAM
2A
mIL- 15
NKG2D-CD3TM-CD28-CD3z
NK45-6
NKG2D EC
CD8α 铰链
CD3α TM
CD28
Cd3ζ ITAM
2A
mIL- 15
NKG2D-CD28-41BB-CD3z
NK45-7
NKG2D EC
CD8α 铰链
CD28 TM
CD28
4-1BB
Cd3ζ ITAM
2A
mIL- 15

图22

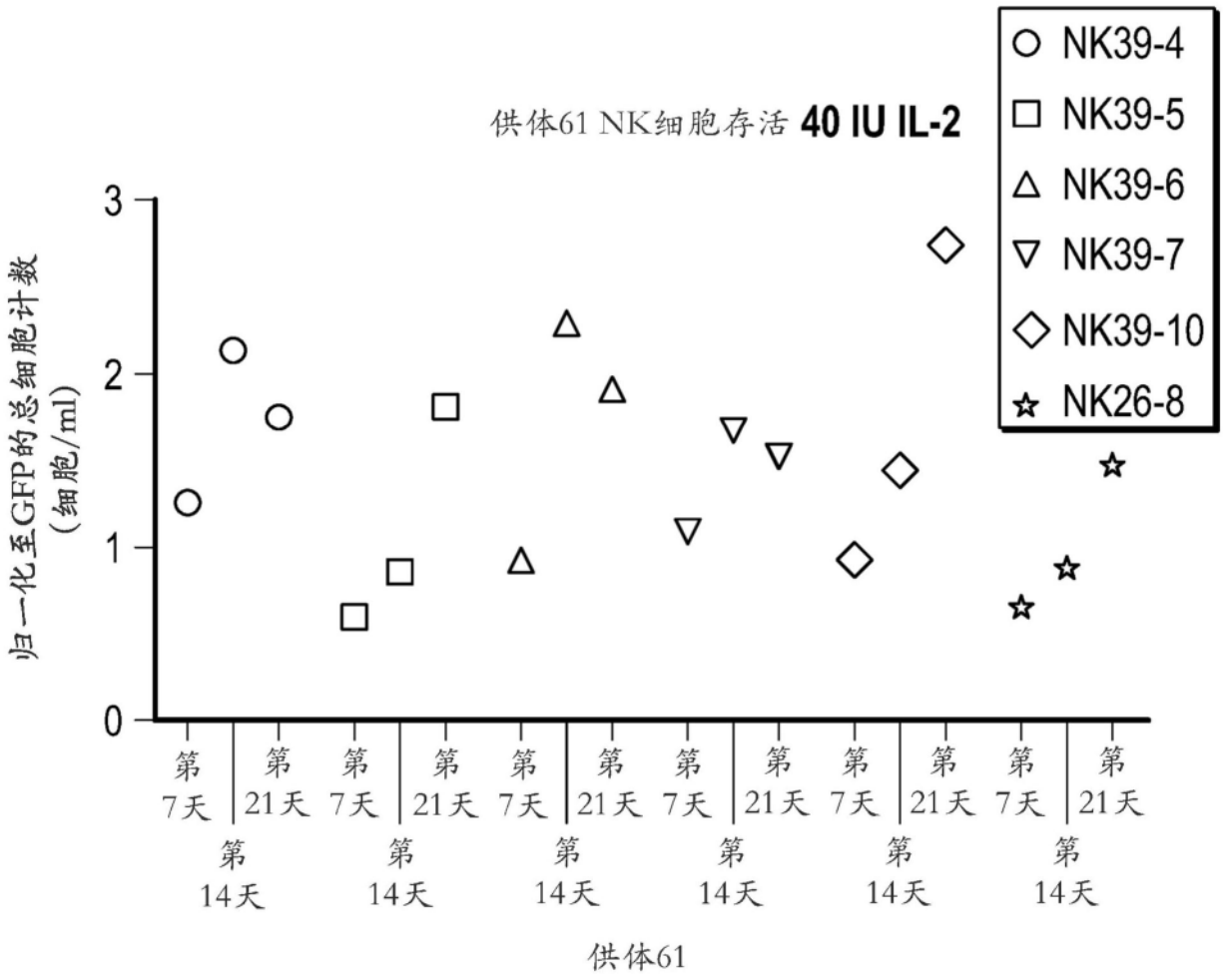

供体61 NK细胞存活 40 IU IL-2
NK39-4
NK39-5
NK39-6
NK39-7
NK39-10
NK26-8
归一化至GFP的总细胞计数
(细胞/ml)
3
2
1
0
第7天
第21天
第14天
供体61

图23A

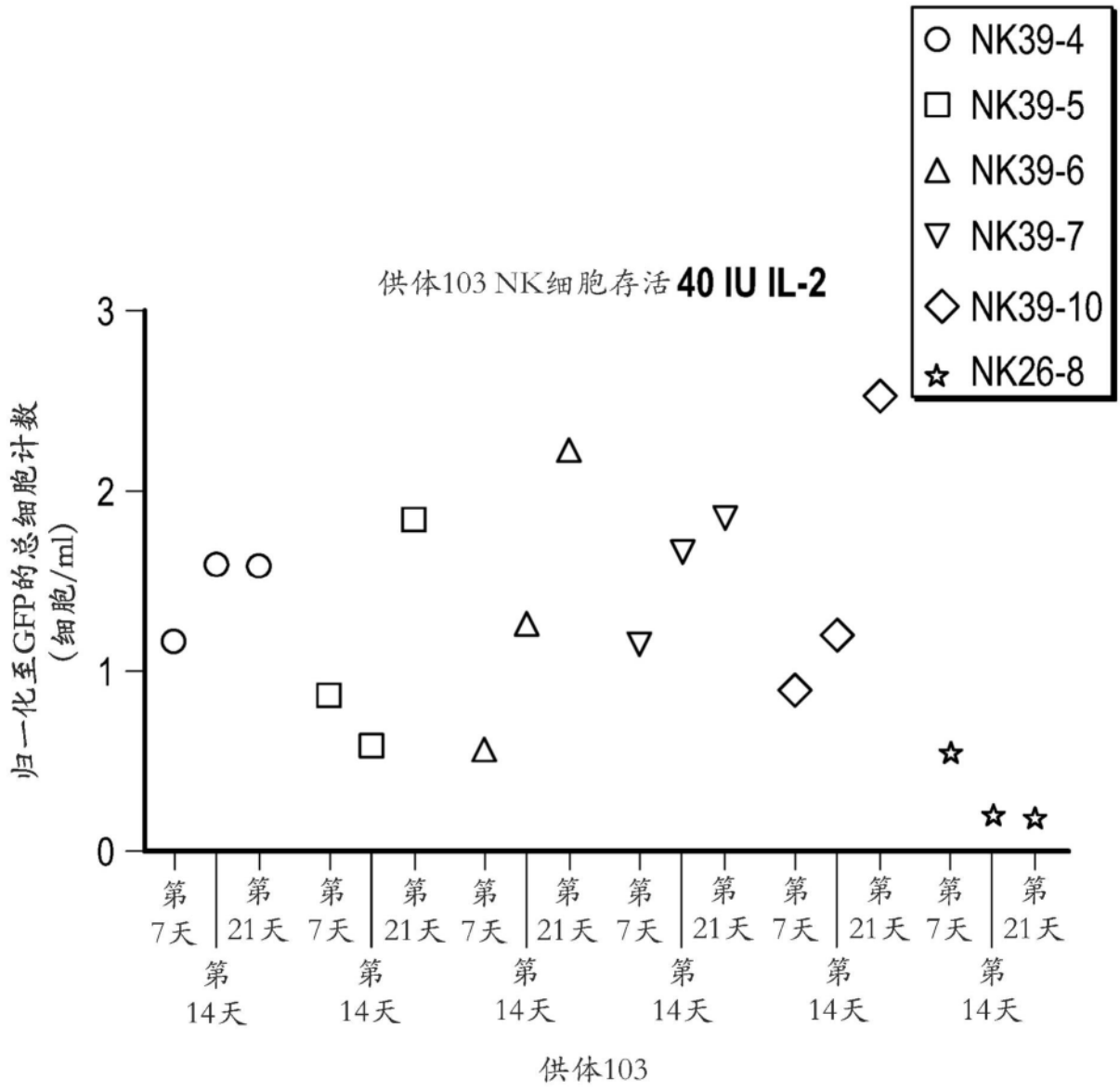

NK39-4
NK39-5
NK39-6
NK39-7
NK39-10
NK26-8
供体103 NK细胞存活 40 IU IL-2
归一化至GFP的总细胞计数
(细胞/ml)
3
2
1
0
第7天
第21天
第14天
供体103

图23B

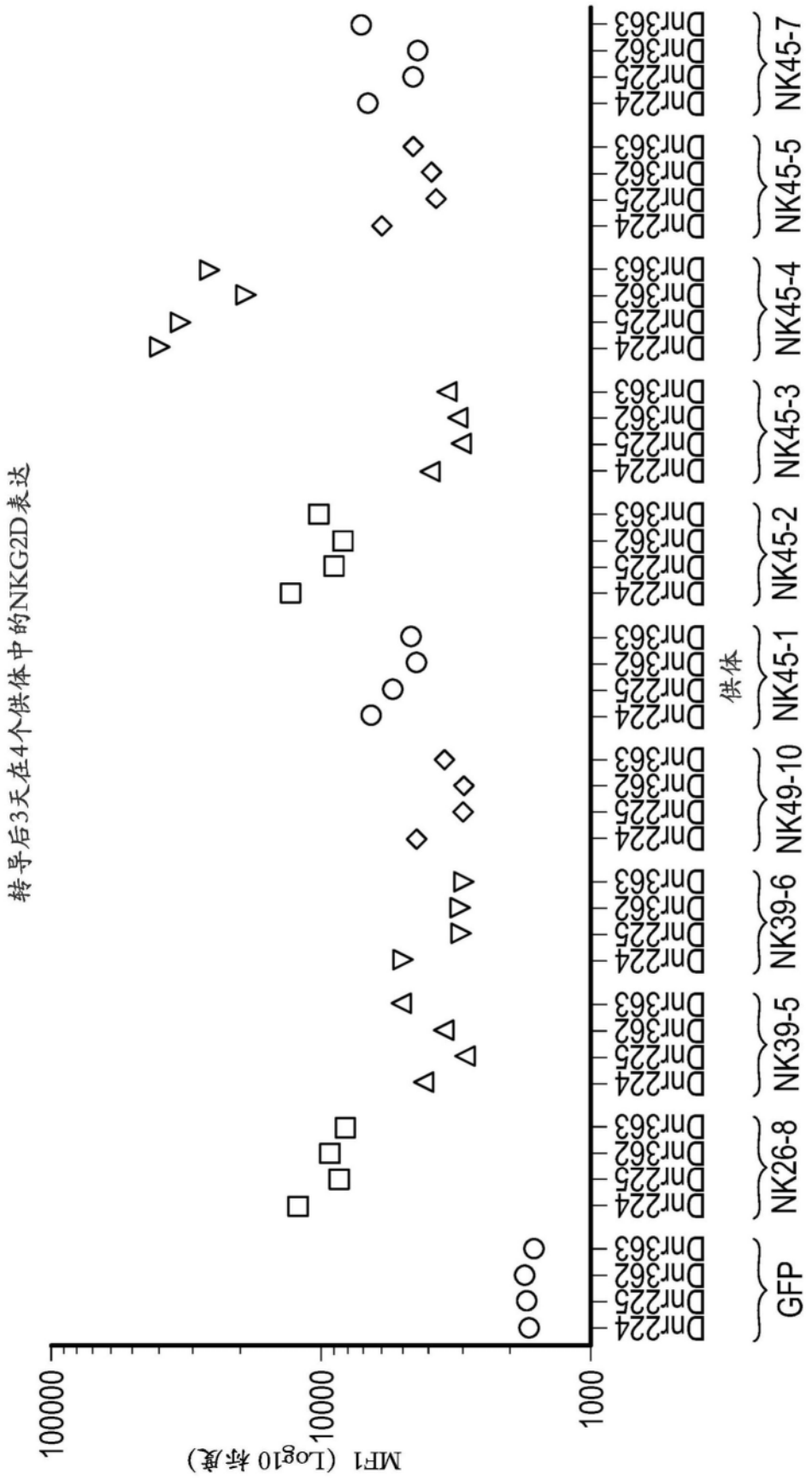

转导后3天在4个供体中的NKG2D表达
MFI (Log10 标度)
100000
10000
1000
供体
GFP
NK26-8
NK39-5
NK39-6
NK49-10
NK45-1
NK45-2
NK45-3
NK45-4
NK45-5
NK45-7
Dnr224
Dnr225
Dnr362
Dnr363

图24

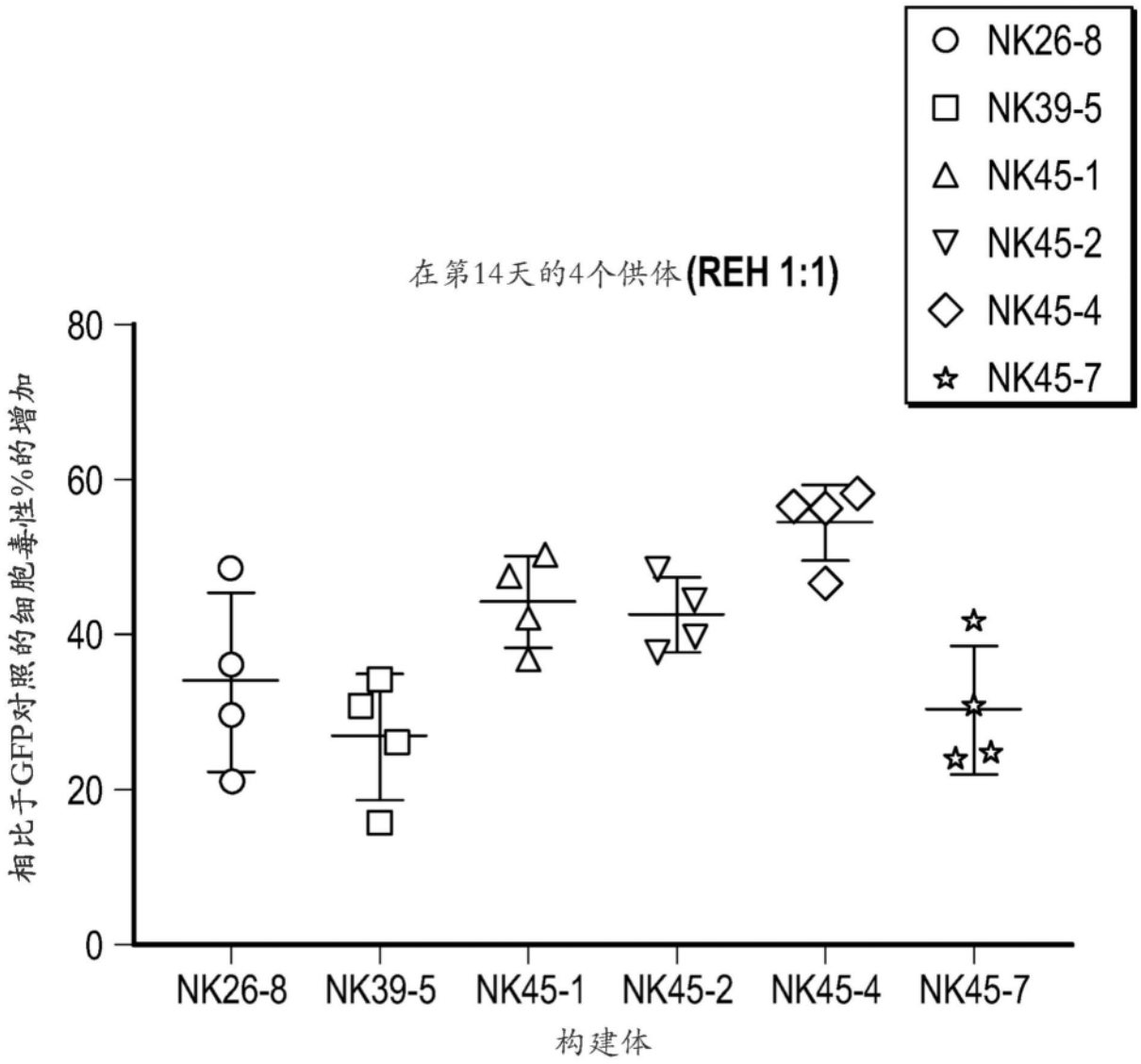

NK26-8
NK39-5
NK45-1
NK45-2
NK45-4
NK45-7
在第14天的4个供体(REH 1:1)
相比于GFP对照的细胞毒性%的增加
80
60
40
20
0
NK26-8
NK39-5
NK45-1
NK45-2
NK45-4
NK45-7
构建体

图25A

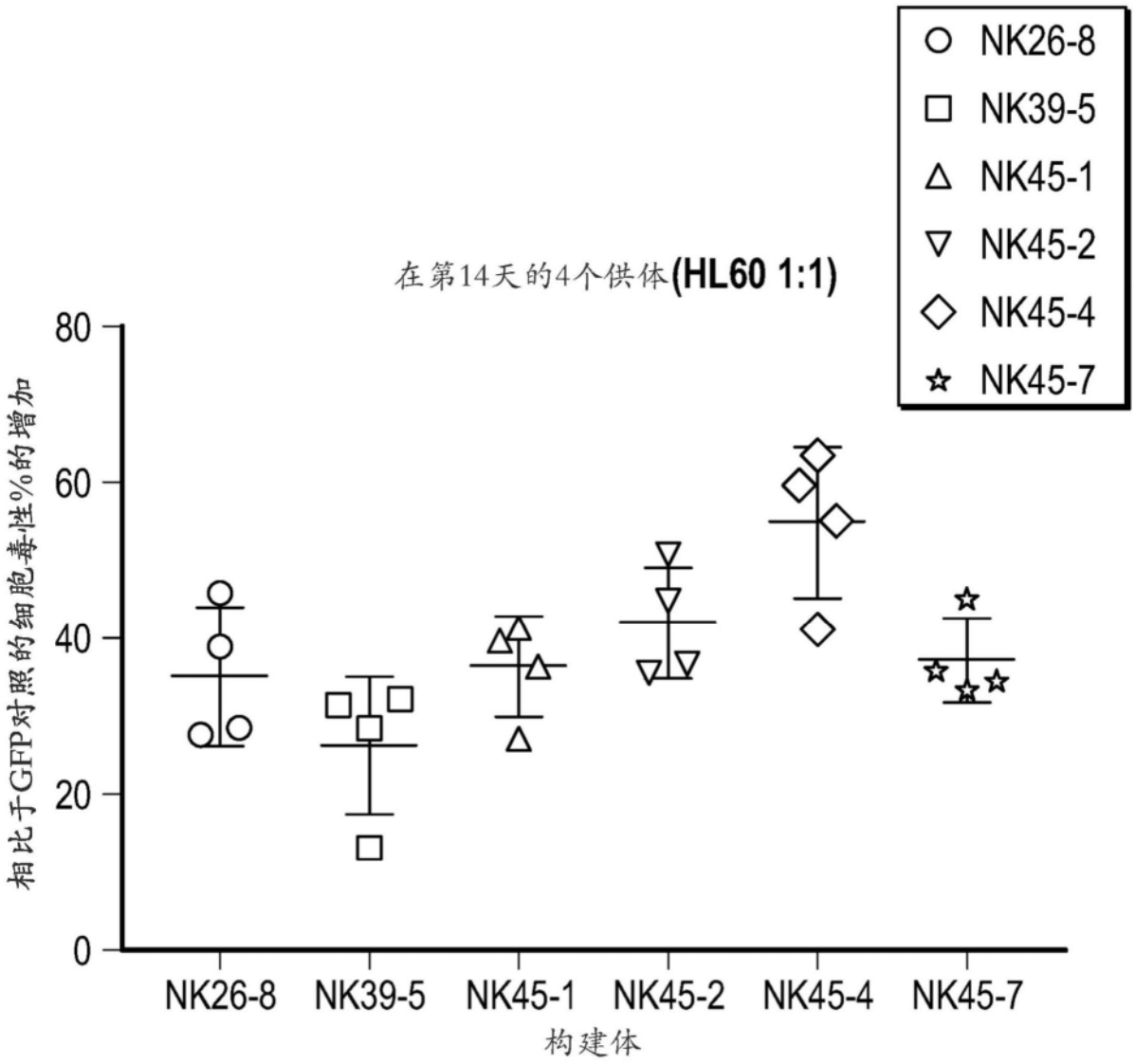

NK26-8
NK39-5
NK45-1
NK45-2
NK45-4
NK45-7
在第14天的4个供体(HL60 1:1)
相比于GFP对照的细胞毒性%的增加
80
60
40
20
0
NK26-8
NK39-5
NK45-1
NK45-2
NK45-4
NK45-7
构建体

图25B

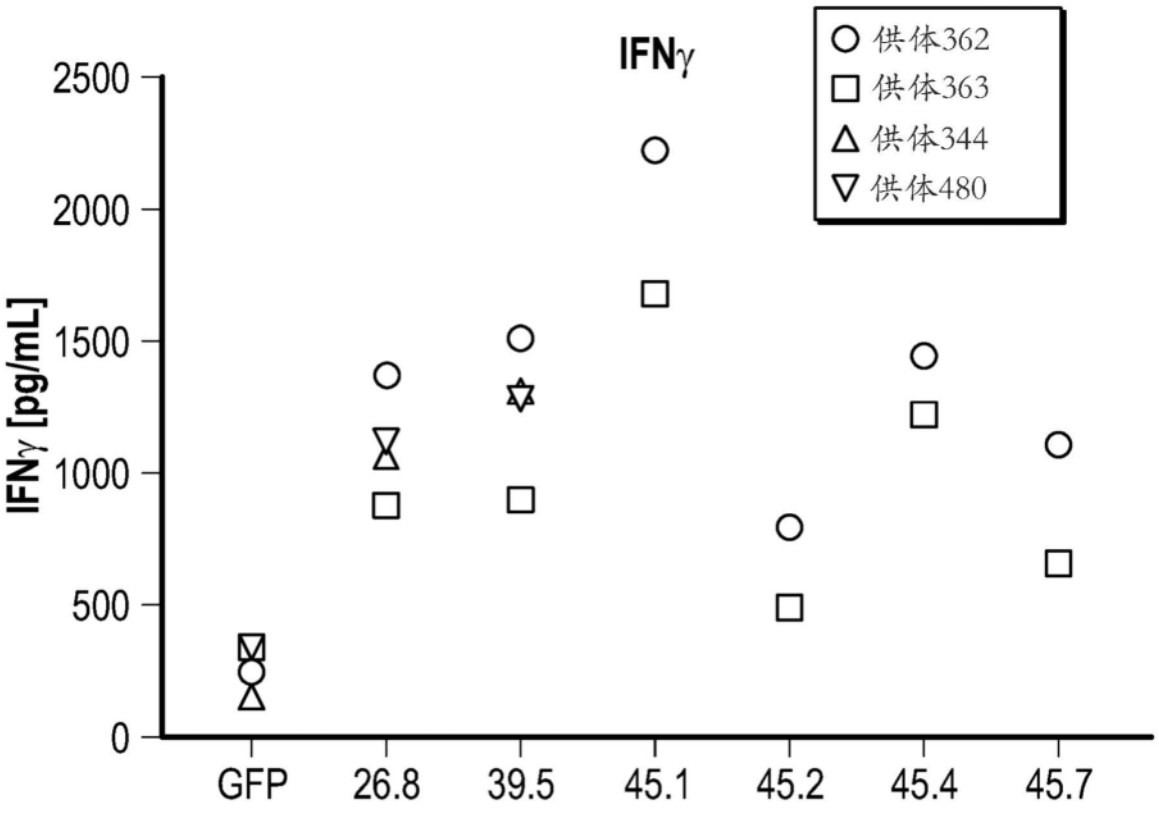

IFNγ
供体362
供体363
供体344
供体480
IFNγ [pg/mL]
2500
2000
1500
1000
500
0
GFP
26.8
39.5
45.1
45.2
45.4
45.7

图26A

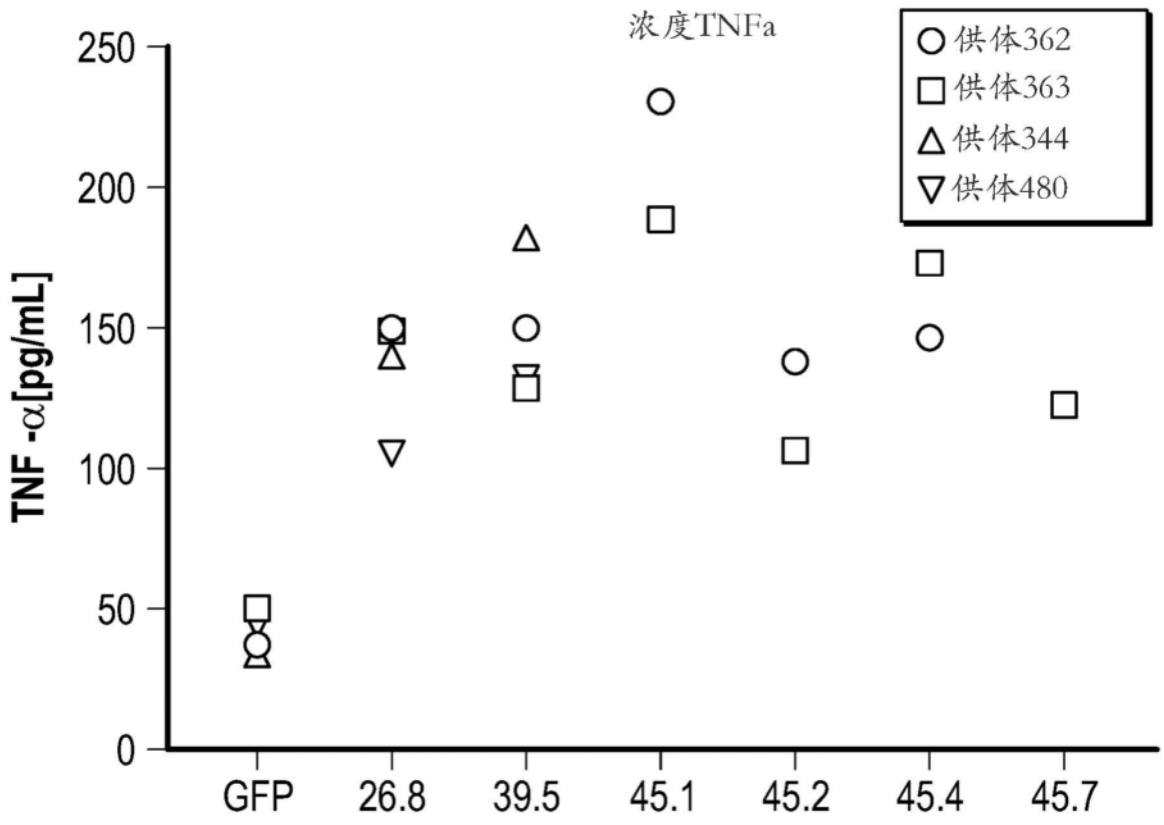

浓度TNFa
供体362
供体363
供体344
供体480
TNF -α[pg/mL]
250
200
150
100
50
0
GFP
26.8
39.5
45.1
45.2
45.4
45.7

图26B

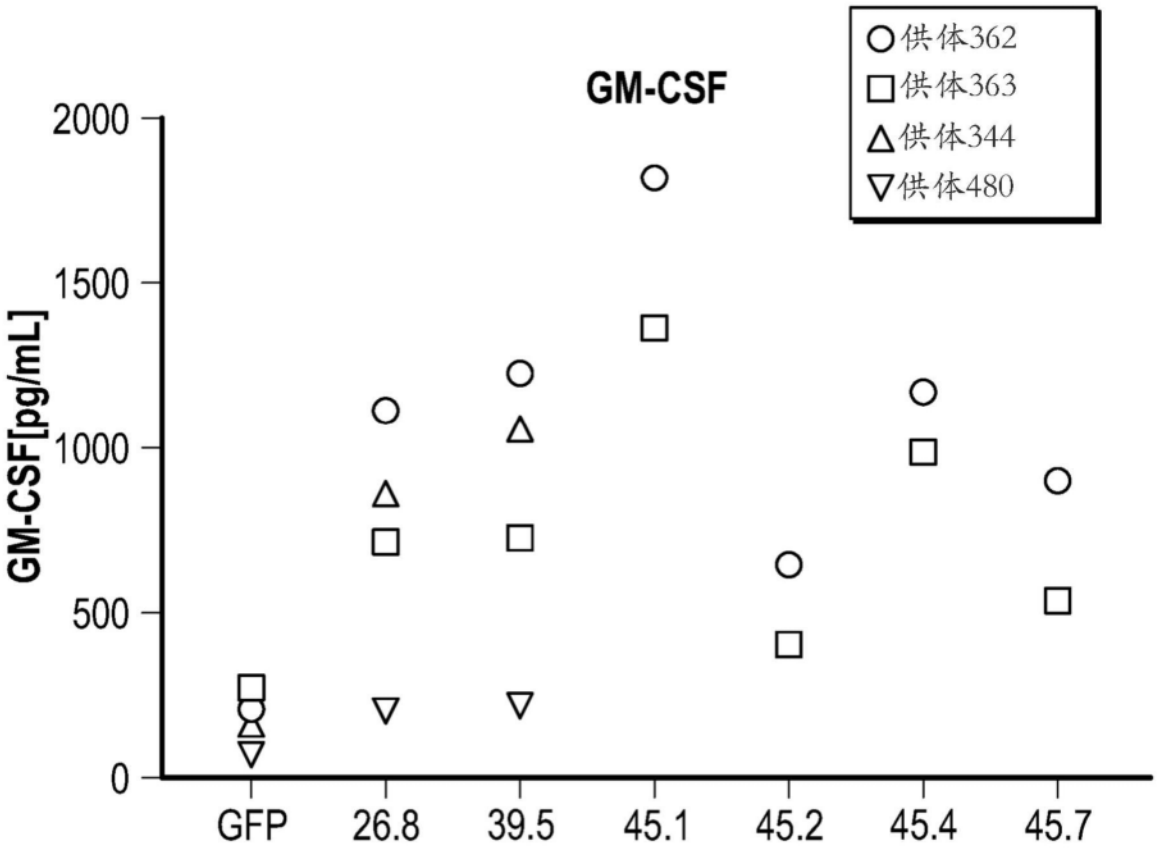

GM-CSF
供体362
供体363
供体344
供体480
GM-CSF[pg/mL]
2000
1500
1000
500
0
GFP
26.8
39.5
45.1
45.2
45.4
45.7

图26C

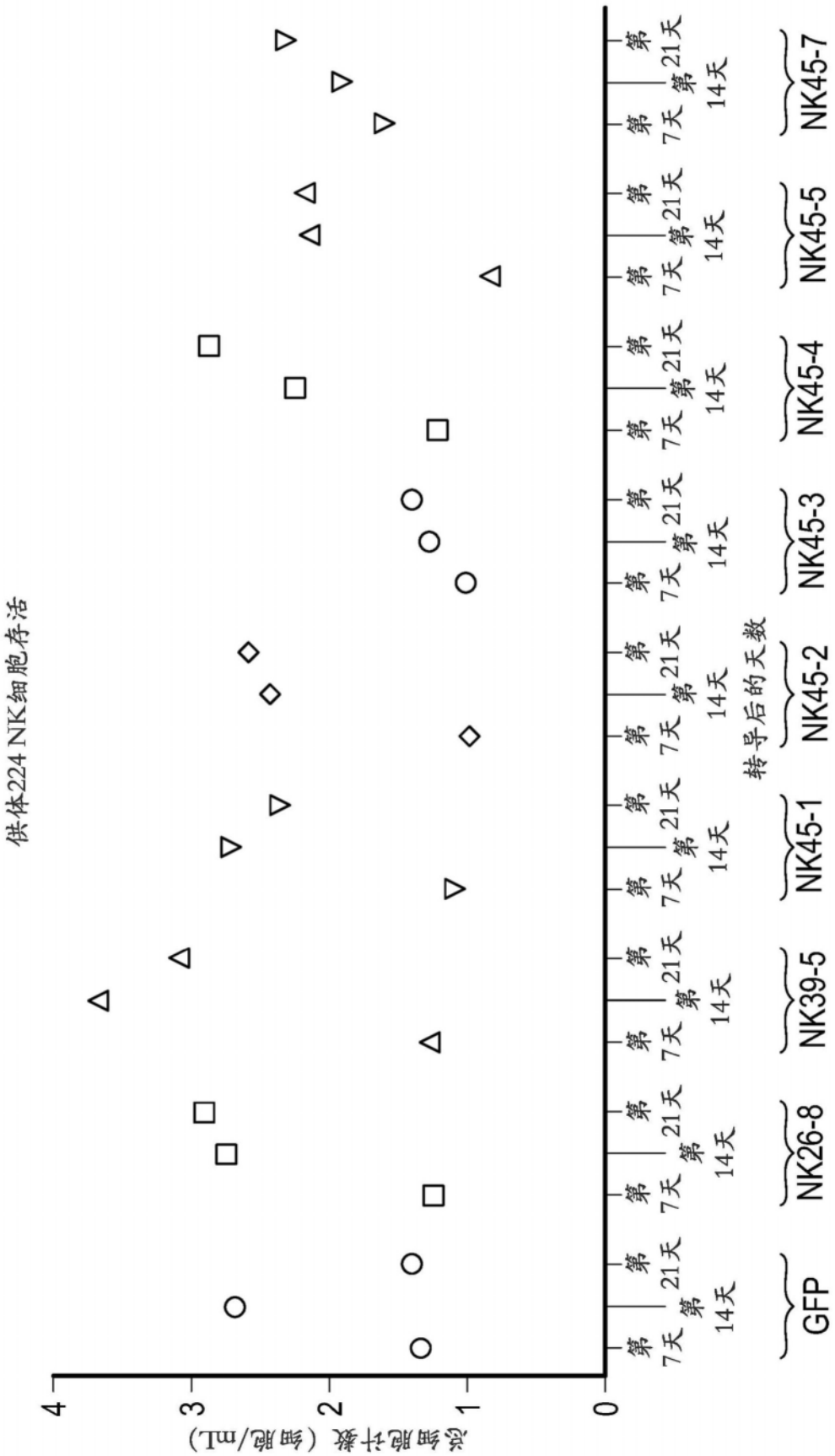

供体224 NK细胞存活
总细胞计数 (细胞/mL)
0
1
2
3
4
第7天
第14天
第21天
GFP
NK26-8
NK39-5
NK45-1
NK45-2
NK45-3
NK45-4
NK45-5
NK45-7
转导后的天数

图27A

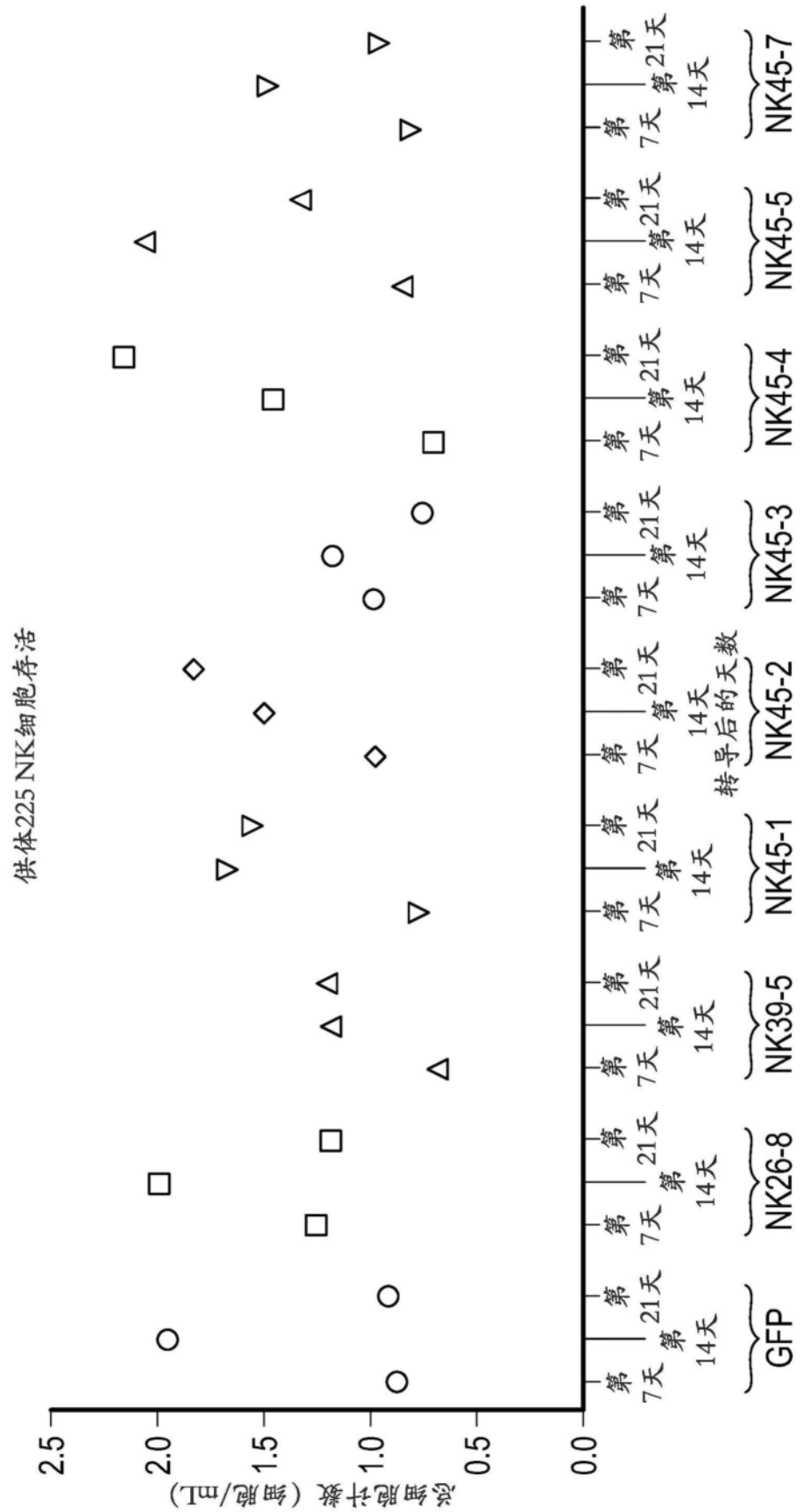

供体225 NK细胞存活
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
第7天
第14天
第21天
GFP
NK26-8
NK39-5
NK45-1
NK45-2
NK45-3
NK45-4
NK45-5
NK45-7
转导后的天数

图27B

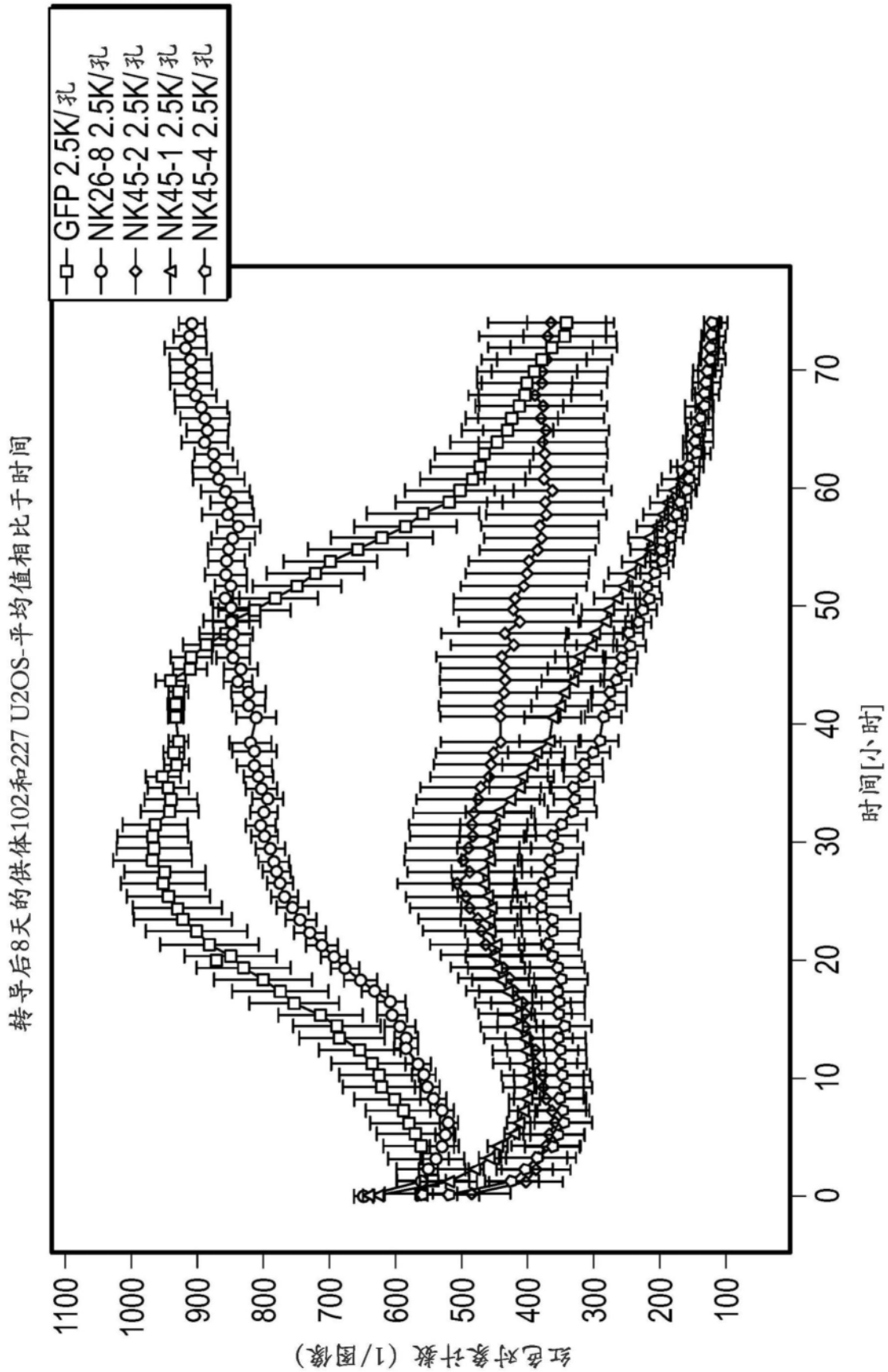

GFP 2.5K/孔
NK26-8 2.5K/孔
NK45-2 2.5K/孔
NK45-1 2.5K/孔
NK45-4 2.5K/孔
转导后8天的供体102和227 U2OS-平均值相比于时间
红色对象计数 (1/图像)
时间[小时]
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
1100
0
10
20
30
40
50
60
70

图28A

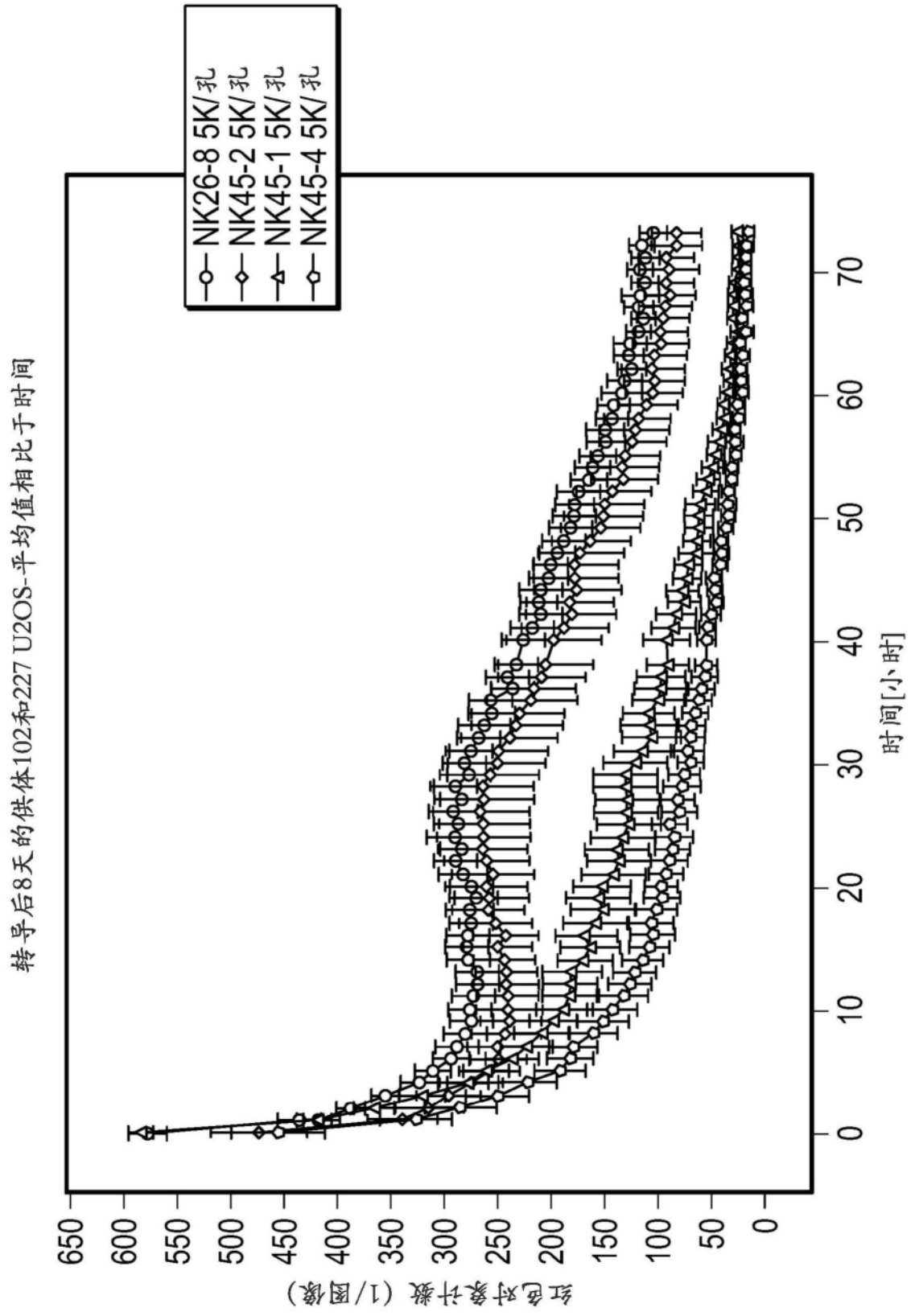

NK26-8 5K/孔
NK45-2 5K/孔
NK45-1 5K/孔
NK45-4 5K/孔
转导后8天的供体102和227 U2OS-平均值相比于时间
红色对象计数 (1/图像)
时间[小时]
650
600
550
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0
10
20
30
40
50
60
70

图28B