



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119053618 A

(43) 申请公布日 2024. 11. 29

(21) 申请号 202380026753.7

(22) 申请日 2023.02.03

(30) 优先权数据

63/306,514 2022.02.04 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.09.10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/061966 2023.02.03

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2023/150698 EN 2023.08.10

(71) 申请人 恩基尔特医疗有限公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 J·H·贝利 M·T·唐

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

专利代理师 孙占华 张广育

(51) Int.Cl.

G07K 14/705 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

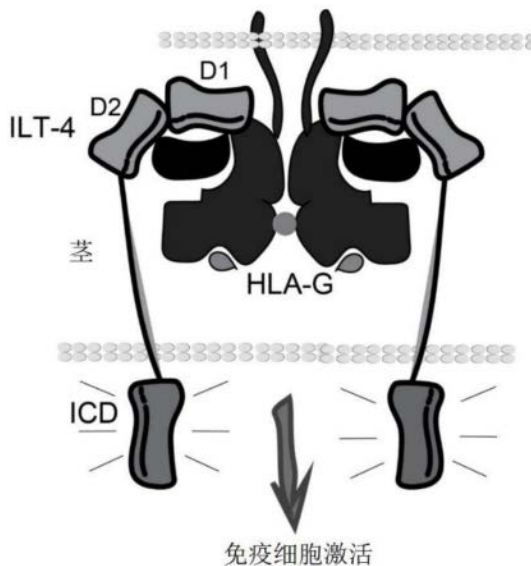
权利要求书3页 说明书67页
序列表(电子公布) 附图17页

(54) 发明名称

嵌合ILT受体组合物和方法

(57) 摘要

提供了嵌合ILT受体(CIR),其包括来自ILT2或ILT4的靶向区域、跨膜结构域和胞内结构域(ICD)。所述ICD包括信号传导区域(例如,CD3 ζ(CD3z)) 和任选地共刺激区域(例如,CD28、4-1BB、OX40等)。还提供了编码主题CIR的核酸(例如,表达载体)和表达主题CIR的经遗传修饰的细胞(例如,免疫细胞,诸如NK细胞、T细胞、iNKT细胞、巨噬细胞等)。例如,提供了经遗传修饰的免疫细胞,诸如NK细胞,其包括编码ILT2或ILT4CIR的核酸。所述主题CIR被设计为激活免疫细胞诸如NK细胞、T细胞、iNKT细胞和巨噬细胞对表达HLA-G的癌症的细胞毒性。



1. 一种嵌合受体蛋白,其包含:
 - (a) 靶向区域,其靶向HLA-G,包含免疫球蛋白样转录物2 (ILT2) 或免疫球蛋白样转录物4 (ILT4) 的D1-D2胞外结构域;
 - (b) 跨膜(TM) 区域,其包含跨膜氨基酸序列;以及
 - (c) 胞内结构域(ICD),其包含能够在所述靶向区域与HLA-G结合后将信号转导到免疫效应细胞内部以引发效应细胞功能的信号传导区域。
2. 根据权利要求1所述的嵌合受体蛋白,其中所述靶向区域包含在对应于SEQ ID NO: 57中所示的ILT4氨基酸序列的Y96或SEQ ID NO:31中所示的ILT2氨基酸序列的Y96的位置处的氨基酸突变。
3. 根据权利要求1或权利要求2所述的嵌合受体蛋白,其中所述D1-D2胞外结构域为ILT2 D1-D2胞外结构域。
4. 根据权利要求1或权利要求2所述的嵌合受体蛋白,其中所述D1-D2胞外结构域为ILT4 D1-D2胞外结构域。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的嵌合受体蛋白,其中所述靶向区域包含ILT2或ILT4的D3-D4胞外结构域。
6. 根据权利要求5所述的嵌合受体蛋白,其中所述靶向区域包含在对应于SEQ ID NO: 55中所示的ILT4氨基酸序列的Y394或SEQ ID NO:31中所示的ILT2氨基酸序列的Y395的位置处的氨基酸突变。
7. 根据权利要求1至4中任一项所述的嵌合受体蛋白,其中所述靶向区域缺乏ILT2或ILT4 D3-D4胞外结构域。
8. 根据权利要求5所述的嵌合受体蛋白,其包含茎结构域。
9. 根据权利要求8所述的嵌合受体蛋白,其中所述茎结构域包含ILT2、ILT4、CD28、CH2/CH3、CH3或CD8茎结构域。
10. 根据权利要求1至9中任一项所述的嵌合受体蛋白,其中TM结构域为ILT2、ILT4、CD28或CD8 TM结构域。
11. 根据权利要求1至10中任一项所述的嵌合受体蛋白,其中所述信号传导区域包含免疫受体酪氨酸激活基序(ITAM)。
12. 根据权利要求1至10中任一项所述的嵌合受体蛋白,其中所述信号传导区域包含CD3 ζ 信号传导结构域、DAP10信号传导结构域、DAP12信号传导结构域或其任何组合。
13. 根据权利要求1至10中任一项所述的嵌合受体蛋白,其中所述信号传导区域包含CD3 ζ 信号传导结构域。
14. 根据权利要求1至13中任一项所述的嵌合受体蛋白,其中所述ICD进一步包含共刺激区域,所述共刺激区域包含至少一个共刺激结构域。
15. 根据权利要求14所述的嵌合受体蛋白,其中所述至少一个共刺激结构域包含CD28共刺激结构域。
16. 根据权利要求14或权利要求15所述的嵌合受体蛋白,其中所述至少一个共刺激结构域包含4-1BB共刺激结构域。
17. 根据权利要求14所述的嵌合受体蛋白,其中所述至少一个共刺激结构域包含4-1BB、OX40、CD28、ICOS、RANK、DAP10、DAP12、CD27、MyD88、IL-1R α 、HVEM、TRANCE、IL-1R β 、

CD70、IL-18R α 、CD40、IL-18R β 、IL-33R α 、CD30或IL-33R β 共刺激结构域或其任何组合。

18. 根据权利要求1所述的嵌合受体蛋白,其中:

所述D1-D2胞外结构域为ILT2 D1-D2胞外结构域,

所述胞外结构域缺乏ILT2 D3-D4胞外结构域,

所述嵌合受体蛋白包含CD8茎结构域,

所述TM区域为CD TM,

所述信号传导区域包含CD3 ζ 信号传导结构域,并且

所述嵌合受体蛋白包含4-1BB共刺激结构域。

19. 根据权利要求1所述的嵌合受体蛋白,其中:

所述D1-D2胞外结构域为ILT4 D1-D2胞外结构域,

所述胞外结构域缺乏ILT4 D3-D4胞外结构域,

所述嵌合受体蛋白包含CD8茎结构域,

所述TM区域为CD TM,

所述信号传导区域包含CD3 ζ 信号传导结构域,并且

所述嵌合受体蛋白包含4-1BB共刺激结构域。

20. 根据权利要求1所述的嵌合受体蛋白,其中:

所述D1-D2胞外结构域为ILT2 D1-D2胞外结构域,

所述胞外结构域包含ILT2 D3-D4胞外结构域,

所述嵌合受体蛋白包含CD8茎结构域,

所述TM区域为CD TM,

所述信号传导区域包含CD3 ζ 信号传导结构域,并且

所述嵌合受体蛋白包含4-1BB共刺激结构域。

21. 根据权利要求1所述的嵌合受体蛋白,其中:

所述D1-D2胞外结构域为ILT4 D1-D2胞外结构域,

所述胞外结构域包含ILT4 D3-D4胞外结构域,

所述嵌合受体蛋白包含CD8茎结构域,

所述TM区域为CD TM,

所述信号传导区域包含CD3 ζ 信号传导结构域,并且

所述嵌合受体蛋白包含4-1BB共刺激结构域。

22. 一种核酸,其包含编码根据权利要求1至21中任一项所述的嵌合受体蛋白的核苷酸序列。

23. 根据权利要求22所述的核酸,其中所述核苷酸序列可操作地连接到组成型启动子。

24. 根据权利要求22所述的核酸,其中所述核苷酸序列可操作地连接到诱导型启动子。

25. 根据权利要求22至24中任一项所述的核酸,其中所述核酸为表达载体。

26. 根据权利要求25所述的核酸,其中所述表达载体为逆转录病毒载体、慢病毒载体或质粒载体。

27. 一种经遗传修饰的细胞,其表达根据权利要求1至22中任一项所述的嵌合受体蛋白。

28. 根据权利要求27所述的经遗传修饰的细胞,其中所述经遗传修饰的细胞为免疫细

胞。

29. 根据权利要求28所述的经遗传修饰的细胞,其中所述免疫细胞为自然杀伤(NK)细胞、T细胞、iNKT细胞或巨噬细胞。

30. 根据权利要求28所述的经遗传修饰的细胞,其中所述免疫细胞为自然杀伤(NK)细胞。

31. 根据权利要求28所述的经遗传修饰的细胞,其中所述免疫细胞为T细胞。

32. 根据权利要求27至31中任一项所述的经遗传修饰的细胞,其中所述经遗传修饰的细胞表达安全开关。

33. 根据权利要求32所述的经遗传修饰的细胞,其中所述安全开关是诱导型的。

34. 根据权利要求33所述的经遗传修饰的细胞,其中所述安全开关由利米多赛或雷帕霉素或雷帕霉素的类似物触发。

35. 根据权利要求27至34中任一项所述的经遗传修饰的细胞,其中所述经遗传修饰的细胞进一步表达嵌合抗原受体。

36. 根据权利要求27至35中任一项所述的经遗传修饰的细胞,其中所述经遗传修饰的细胞进一步表达未与所述嵌合受体蛋白融合的共刺激多肽。

37. 根据权利要求36所述的经遗传修饰的细胞,其中未与所述嵌合受体蛋白融合的所述共刺激多肽包含4-1BB、OX40、CD28、ICOS、RANK、DAP10、DAP12、CD27、MyD88、IL-1R α 、HVEM、TRANCE、IL-1R β 、CD70、IL-18R α 、CD40、IL-18R β 、IL-33R α 、CD30或IL-33R β 共刺激结构域或其任何组合。

38. 一种治疗方法,其包括向有需要的个体施用根据权利要求27至37中任一项所述的经遗传修饰的细胞。

39. 根据权利要求38所述的方法,其中所述经遗传修饰的细胞对所述个体是自体的。

40. 根据权利要求38所述的方法,其中所述经遗传修饰的细胞对所述个体是同种异体的。

41. 根据权利要求38至40中任一项所述的方法,其中所述个体患有癌症。

42. 根据权利要求41所述的方法,其中所述个体患有实体瘤。

43. 一种产生经遗传修饰的细胞的方法,所述方法包括:

将根据权利要求22至26中任一项所述的核酸引入到细胞中,从而产生经遗传修饰的细胞。

44. 根据权利要求43所述的方法,其中所述经遗传修饰的细胞为免疫细胞。

45. 根据权利要求44所述的方法,其中所述免疫细胞为自然杀伤(NK)细胞、T细胞、iNKT细胞或巨噬细胞。

46. 根据权利要求44所述的方法,其中所述免疫细胞为自然杀伤(NK)细胞。

47. 根据权利要求44所述的方法,其中所述免疫细胞为T细胞。

嵌合ILT受体组合物和方法

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2022年2月4日提交的美国临时专利申请第63/306,514号的权益,该申请通过引用以其整体并入本文。

[0003] 通过引用并入作为XML文件提供的序列列表

[0004] 序列列表据此作为序列列表XML,“NKLT-001WO_SEQ_LIST.xml”提供,其创建于2023年2月3日并且大小为142,627字节。序列列表XML的内容通过引用以其整体并入本文。

[0005] I. 引言

[0006] 免疫细胞疗法可用于特异性地靶向病变细胞。这种治疗对恶性病状和非恶性病状两者均是潜在地治愈性的。例如,供体淋巴细胞输注、同种异体T细胞和同种异体自然杀伤(NK)细胞可以用于控制白血病的生长。此外,基因修饰可以将包括T细胞、自然杀伤(NK)细胞、 γ δ T细胞、诱导型NKT细胞和巨噬细胞在内的免疫细胞的特异性导向用于治疗目的的给定靶细胞群体。例如,嵌合抗原受体(CAR)T细胞可以用于将T细胞特异性重新定向至肿瘤相关细胞表面分子,而不依赖于人类白细胞抗原(HLA)。临床试验已经表明,CAR-T疗法通过靶向用于多发性骨髓瘤的抗原诸如CD19或B细胞成熟抗原(BCMA),特别是在血液学恶性肿瘤诸如B细胞白血病和淋巴瘤中的功效。这些靶标在B细胞和浆细胞以及它们相应的肿瘤类型中具有离散的表达,并且由CD19和BCMA CAR-T细胞的脱肿瘤靶向(off-tumor targeting)导致的发育不全可以被免疫球蛋白替代疗法所替代。美国FDA已经批准了三种自体CD19 CAR-T细胞疗法产品。最近,治疗功效已经通过针对CD19的表达CAR的NK(CAR-NK)细胞被证实。

[0007] 急性髓细胞白血病(AML),也称为急性髓性白血病,是一种转化的髓系祖细胞和更加朝向单核细胞谱系分化的细胞的疾病。针对在AML母细胞上表达的靶标诸如CD33和CD123的CAR-T疗法受到正常髓系祖细胞上的靶标的表达的挑战,对于正常髓系祖细胞,来自疗法的消融导致高度不利的血细胞减少。需要针对AML上更离散表达的靶标的CAR或其它定向细胞疗法。一个此类靶标是1B类(或非经典的)MHC-1蛋白HLA-G。

[0008] HLA-G在胎儿胎盘的滋养层的表面上大量表达,通过其对大多数类别的淋巴样细胞和髓样细胞的有效抑制,为胎儿提供免受母亲免疫攻击的屏障。HLA-G在包括AML在内的多种肿瘤类型中过表达,作为逃避免疫攻击的机制,从而促进肿瘤生长,而造血祖细胞由于其对来自免疫攻击的先天耐受性而不表达HLA-G。

[0009] HLA-G基因经由替代的mRNA剪接产生多种不同的RNA转录物,其进而产生至少七种不同的蛋白产物。这些蛋白产物可以存在于肿瘤细胞的质膜上,或者以分泌形式存在于肿瘤微环境中,与 β 2-微球蛋白(β 2-M)形成或不形成复合物。此外,HLA-G可以作为具有改变的三级结构的单体或二硫键连接的同型二聚体存在。传统的CAR-T产品利用嵌合受体中来源于抗体或骆驼科动物来源的VhH结构域的单链片段(scFv)来靶向抗原。由HLA-G上的给定scFv靶向的表位可能在若干种HLA-G同种型中被消除或封闭,这为表达同种型的肿瘤细胞提供了选择,所述同种型消除了含有该表位的同种型的表达,但保留了HLA-G的免疫抑制活性。需要一种用于针对HLA-G的细胞疗法的靶向剂,其包括能够免疫抑制的所有同种型。

[0010] II. 发明内容

[0011] 本公开提供了经遗传修饰的细胞,其被工程化以表达具有亲和力和特异性的嵌合受体蛋白,使得经修饰的细胞可以刺激受试者中的免疫应答。例如,嵌合受体蛋白可以靶向相对于未转化的正常组织在肿瘤组织中以高水平表达的蛋白,并且产生针对肿瘤的细胞毒性或炎性应答。基于抗体-抗原相互作用所允许的亲和力和特异性,CAR经常被用于产生肿瘤组织的抗原特异性识别。对于本公开的组合物和方法,亲和力和特异性不是通过使用抗体关系或VhH关系或通过随机产生的肽与靶抗原的结合来维持的,而是通过使用配体:受体相互作用来维持的,其中亲和力和特异性通过进化来维持。

[0012] 例如,在一个优选的实施方案中,经遗传修饰的细胞表达对HLA-G具有高亲和力的嵌合受体,HLA-G是一种靶蛋白,其可以通过替代的mRNA剪接和翻译后修饰产生的七种已知形式中的一种或多种存在于肿瘤组织上。HLA-G通过与免疫细胞的表面上的阴性信号传导免疫球蛋白样转录物2(ILT2)和ILT4受体接合,天然地充当抑制免疫应答的药剂。在这些优选的实施方案中,T细胞、NK细胞、iNKT细胞或巨噬细胞被工程化,使得ILT2或ILT4对活性形式HLA-G的识别反而产生激活信号。在这些优选的实施方案中,ILT2或ILT4的胞内信号传导元件被切除,并且用驱动免疫细胞激活和细胞毒性的CD3 ζ 链的含ITAM的信号传导结构域替代。此类蛋白被称为“嵌合ILT受体”或“CIR”。

[0013] 因此,提供了嵌合ILT受体(CIR)[加上编码它们的核酸和表达它们的经遗传修饰的细胞,诸如免疫细胞],其包括来自ILT2或ILT4的靶向区域、跨膜结构域和胞内结构域(ICD),该胞内结构域包括信号传导区域(例如,CD3 ζ (CD3 ζ))和任选地共刺激区域(例如,CD28、4-1BB、OX40等)。发明人意识到这种方法提供了优于使用基于抗体的靶向区域(诸如scFv)的优势。基于抗体的靶向方法可能导致对表达缺乏靶向的表位的HLA-G同种型的肿瘤细胞的选择,从而允许癌症逃避治疗。相反,基于主题ILT2或ILT4的嵌合ILT受体应当靶向更多的HLA-G同种型,并且也许是所有的HLA-G同种型,因为ILT2和ILT4天然地结合这些同种型。这将极大地降低,并且可能消除癌细胞通过选择特定的HLA-G同种型来逃避治疗的能力。

[0014] ILT2和ILT4在胞外区域中在结构上相似,并且由相对于细胞的质膜以远端到近端方式排列的四个折叠结构域(D1、D2、D3和D4)组成。HLA-G与ILT2和ILT4的D1和D2结构域相互作用,并且这些D1和D2结构域可以与ILT蛋白的其余部分分离,同时保持与HLA-G的相互作用。除HLA-G以外的细胞蛋白可以与ILT4的D3和D4结构域相互作用。为了防止可能在治疗环境中产生毒性的与这些蛋白的脱靶(off-target)相互作用,需要消除此类脱靶HLA-G(off-HLA-G)相互作用。因此,在一些实施方案中,ILT2或ILT4 D3-D4在嵌合受体融合体中被另一胞外结构域替代,该另一胞外结构域用作茎和跨膜结构域以将ILT2或ILT4 D1-D2呈递给表达HLA-G的靶细胞。呈递D1-D2的茎蛋白的实例来源于CD28、CD8 α 、IgG4的CH2-CH3区域、HER2膜近端和mGluR2。在其它实施方案中,ILT2和ILT4的D3-D4结构域被简单地删除。因此,在一些实施方案中,主题嵌合ILT受体包括ILT2的D1-D2,但缺少ILT2的D3-D4。在一些实施方案中,主题嵌合ILT受体包括ILT4的D1-D2,缺少ILT4的D3-D4。

[0015] 一些蛋白可以与ILT4的D1和D4区域进行结合相互作用。在去除D4的情况下,单独与D1的此类相互作用可能很弱。为了进一步减少与HLA-G的其它细胞蛋白的不必要的相互作用,在一些实施方案中,产生了编码ILT4的D1中氨基酸替换的突变。例如,酪氨酸96可以

被包括丙氨酸在内的任何氨基酸替换。

[0016] 在又另外的实施方案中,作为免疫应答的一部分,改善生存力、持久性、细胞毒性和分泌细胞因子的能力的共刺激元件作为嵌合受体的胞内部分的一部分被包括在内,并且在其它实施方案中,共刺激元件被工程化用于与嵌合受体分离的表达。这些共刺激元件可以来源于这些蛋白中的任何一种或任何的组合:4-1BB、OX40、ICOS、CD28、CD27、MyD88、IL-1R α 、HVEM、TRANCE、IL-1R β 、IL-18R α 、CD40、IL-18R β 、CD30、IL-33R α 、BCMA或IL-33 β 。

[0017] 在一些实施方案中,安全开关可以与嵌合受体蛋白在同一细胞中共表达。该开关的目的是降低由含有CIR的基因修饰细胞可能产生的毒性。此类毒性可能是由引起细胞因子释放综合征(CRS)的过度活跃、免疫细胞激活的神经毒性综合征(ICANS)、脱靶、脱肿瘤(off-tumor)相互作用或针对可以表达HLA-G的正常组织的靶向引起的。在一个此类实施方案中,安全开关是诱导型半胱氨酸蛋白酶-9(iC9),变体FKBP12与截短型半胱氨酸蛋白酶-9的融合体,使得半胱氨酸蛋白酶的促凋亡活性处于合成的二聚体配体利米多赛(rimiducid)的控制下。

[0018] 提供了与嵌合ILT受体相关的试剂、组合物、试剂盒/系统和方法。例如,提供了制备经遗传修饰的细胞的方法和治疗方法(例如,向个体施用表达主题CIR的免疫细胞,诸如NK细胞、T细胞或巨噬细胞)。

[0019] III.附图说明

[0020] 以下本发明的实施方案的详细说明在结合附图阅读时将会被更好地理解。应当理解,本发明不限于附图中示出的实施方案的精确安排和工具。附图示出了该技术的某些实施方案,并且不是限制性的。为了清楚和易于说明,附图没有按比例绘制,并且在一些情况下,各个方面可能被夸大或放大显示,以便于理解特定实施方案。

[0021] 图1A至图1B.HLA-G和HLA-G的抑制性受体。(图1A)栓系到肿瘤细胞的质膜的与 β 2-M复合的HLA-G1的示意性图示。还描绘了HLA-G的受体,即主要在淋巴细胞上表达的ILT2蛋白和主要在来源于髓样谱系的细胞上表达的ILT4。ILT2和ILT4蛋白上的四个独立折叠的胞外结构域根据其接近程度被标记为D1-D4。还描绘了胞内信号传导结构域(ICD)。(图1B)与HLA-G复合的ILT4(左)或ILT2的描绘。与通过肽结合槽的经典MHC-I相互作用不同,ILT蛋白与HLA-G的膜近端 α 3结构域并且与 β 2-M相互作用。复合物的形成启动来自ILT2或ILT4的ICD的信号传导并且抑制免疫细胞激活。

[0022] 图2.与二聚体HLA-G形成ILT4复合物。HLA-G蛋白的亚群在 α 1或 α 3结构域中形成二硫键连接的二聚体。二聚体HLA-G对ILT2/4具有更高的亲和力,这可能是通过导致增强的ILT信号传导和免疫细胞抑制的亲合力效应。

[0023] 图3A至图3B.用于免疫细胞激活的嵌合ILT蛋白。(图3A)嵌合ILT4受体(CIR)的示意性描绘,其中ILT4的天然ICD被来源于免疫细胞激活受体或激活衔接蛋白的信号传导结构域替代。CIR与二聚体HLA-G的接合启动了激活免疫细胞的信号传导。(图3B)与单体HLA-G复合的嵌合ILT4受体的图示。

[0024] 图4A至图4B.ILT2和ILT4 D1和D2结构域与HLA-G同种型的相互作用。(图4A)与HLA-G1同种型复合的分离的ILT4(左)和ILT2(右)的卡通描绘。ILT蛋白的D3和D4结构域对于与HLA-G的相互作用不是必需的。(图4B)与HLA-G1同种型复合的分离的ILT4(左)和ILT2(右)的卡通描绘。

[0025] 图5A至图5B: ILT4 D1D2 CIR与HLA-G的相互作用。(图5A) ILT4的D1和D2结构域作为嵌合杂合体与来源于单独的蛋白的茎和跨膜结构域融合并且进一步与激活的胞内信号传导部分融合的卡通描绘。D1D2与HLA-G的相互作用启动激活免疫细胞的信号传导。(图5B) 含有ILT4 D1D2 CIR的茎与二聚体HLA-G的相互作用。

[0026] 图6A至图6E: 来自构建的 γ 逆转录病毒载体的CIR蛋白的转导和表达。(图6A) 表达被称为嵌合ILT受体(CIR)的ILT2和ILT4融合蛋白的逆转录病毒构建体的示意图。D1至D4表示来源于天然ILT2或ILT4的胞外结构域D1至D4的编码。STM是指茎(S)——连接胞外D结构域与跨膜结构域(TM)的接头结构域,这些结构域来源于ILT2、ILT4或CD8 α (CD8a)。FL是指天然ILT2和ILT4的全长形式。ILT2和ILT4 ICD是指ILT2和ILT4的天然胞内结构域,其促进对免疫细胞的抑制信号。BB. ζ 是指来源于与4-1BB的共刺激结构域和CD3- ζ 的信号传导结构域(它们各自促进对免疫细胞的激活信号)的融合体的胞内结构域。这些 γ 逆转录病毒构建体中的每一个也编码单独的标志物蛋白 Δ CD19,以确定转导的效率。还参见表13B、15B、16B、20B、21B、23B、24B、28B、36和37。(图6B) 逆转录病毒构建体向原代人T细胞的转导。流式细胞仪图显示了与CIR构建体的表达相关的 Δ CD19标志物蛋白的表达,以及编码Orangenanolantenn rennila荧光素酶(ONL)的单独共转导的标志物病毒的表达。所示出的图代表来自两个健康血液供体之一的T细胞。阴性对照表明ILT2和ILT4全长构建体的转导,所述构建体表达抑制T细胞功能的ILT2和ILT4的全长(FL)蛋白并且用作阴性对照(阴性对照(Neg.Ct1.))。(图6C) 逆转录病毒转导到原代人T细胞(N=2)供体中的效率的定量。(图6D) 通过经由流式细胞术确定的抗体染色的平均荧光强度确定的转导后第7天转导的人T细胞中ILT4胞外结构域的表达。(图6E) 通过经由流式细胞术确定的抗体染色的平均荧光强度确定的转导后第7天转导的人T细胞中ILT2胞外结构域的表达。

[0027] 图7A至图7B: THP1急性髓细胞白血病细胞中HLA-G同种型的转基因表达。(图7A) 在缺乏内源性HLA-G蛋白表达的THP1细胞中表达HLA-G1、HLA-G2和HLA-G5的 γ 逆转录病毒构建体的稳定表达。转导效率以由逆转录病毒构建体共表达的 Δ EGFR的表达为标志。HLA-G1的表达通过流式细胞术用对HLA-G1具有特异性的MEM-G/9抗体被容易地检测。(图7B) 也稳定地表达HLA-G1的THP1细胞中GFP-ffluciferase的稳定表达。

[0028] 图8: 用CIR-T细胞控制THP1-HLA-G1细胞扩增。将用所示出的ILT2和ILT4 CIR构建体或全长ILT2或ILT4(阴性对照)转导的原代人T细胞(N=2个供体)与用HLA-G1同种型和GFP-ffluc标志物稳定转导的THP1细胞共培养。在48小时内,通过GFP荧光在Incucyte显微镜培养箱中定期测量THP1的扩增或杀伤。表达T细胞并且对HLA-G1具有特异性的嵌合抗原受体(HLA-G CAR)或靶向AML的CD33特异性CAR(CD33CAR)用作阳性对照。NT=未转导。

[0029] 图9: CIR T细胞的短期细胞毒性。将用所示出的ILT2和ILT4 CIR构建体或全长ILT2或ILT4(阴性对照)转导的原代人T细胞(N=2个供体)与用HLA-G1同种型和GFP-ffluc标志物稳定转导的THP1细胞共培养持续24小时。通过肿瘤靶标的荧光素酶活性的损失来测量THP1的杀伤。表达T细胞并且对HLA-G1具有特异性的嵌合抗原受体(HLA-G CAR)或靶向AML的CD33特异性CAR(CD33 CAR)用作阳性对照。NT=未转导。

[0030] 图10: CIR逆转录病毒构建体的茎和跨膜结构域的改变。呈现了示意性表格,其显示了编码ILT4的HLA-G结合结构域D1和D2的CIR4衍生物,所述结构域与CD8 α 的铰链/茎和跨膜结构域以及来自4-1BB和CD3 ζ 的胞内结构域连接。CIR构建体6至10编码人免疫球蛋白

IgG4的茎、IgG4的CH3结构域或来源于CD28的茎的替换。这些与CD8 α 或CD28的跨膜结构域融合,如所描绘的。还参见表28B和表38-42。

[0031] 图11A至图11C:编码具有衍生茎和跨膜结构域的CIR蛋白的 γ 逆转录病毒构建体的表达。(图11A)转导后第7天(黑色)和第14天(灰色)逆转录病毒构建体的转导效率,所述逆转录病毒构建体编码通过由相同逆转录病毒构建体表达的 Δ CD19标志物所标记的所示出的茎和跨膜衍生物。(图11B)用由同型对照的基线门控的ILT4抗体通过流式细胞术确定的具有替代的茎和跨膜结构域的CIR构建体的表达。(图11C)通过流式细胞术由ILT4特异性抗体的平均荧光强度(MFI)确定的具有替代的茎和跨膜结构域的CIR构建体的表达。

[0032] 图12:人AML细胞系中HLA-G的表达。用对HLA-G具有特异性的荧光标记的抗体对Mo1m13-GFP和Mo1m14-GFP细胞进行染色,并且经受流式细胞术。通过用标记的同型对照抗体染色来设置门。

[0033] 图13A至图13B:CIR构建体针对Mo1m-14肿瘤靶标的抗肿瘤功效。(图13A)将用GFPffluc稳定转导的HLA-G阳性Mo1m14细胞与未转导的原代人T细胞、CIR-T细胞或HLA-G导向的CAR-T细胞以5:1的效应子与靶标比率共培养(N=2个供体)。在48小时时,在Incucyte显微镜培养箱中通过GFP-荧光来确定Mo1m14的生长。(图13B)CIR-T细胞对Mo1m14肿瘤靶标的短期细胞毒性。将用ILT4 CIR构建体或HLA-G CAR转导的原代人T细胞(N=2个供体)与Mo1m14-GFPffluc细胞共培养持续24小时。通过肿瘤靶标的荧光素酶活性的损失来测量Mo1m14的杀伤。

[0034] 图14A至图14B:ILT4 CIR针对表达HLA-G同种型的THP1细胞的共培养物。(图14A)将原代人T细胞(NT)、ILT4 CIR-T细胞或HLA-G CAR-T细胞与用HLA-G1同种型稳定转导的THP1细胞一起培养。通过将干扰素- γ (IFN- γ)分泌到培养基中来监测通过CIR或CAR的参与对T细胞的激活。(图14B)在CIR-T和CAR-T细胞与稳定转导以表达HLA-G2的THP1细胞的共培养物中产生的干扰素- γ 分泌。

[0035] IV. 具体实施方式

[0036] 提供了嵌合ILT受体(CIR),其包括来自ILT2或ILT4的靶向区域、跨膜结构域和胞内结构域(ICD)。ICD包括信号传导区域(例如,CD3 ζ (CD3 ζ))和任选地共刺激区域(例如,CD28、4-1BB、OX40等)。还提供了编码主题CIR的核酸(例如,表达载体)和表达主题CIR的经遗传修饰的细胞(例如,免疫细胞,诸如NK细胞、T细胞、iNKT细胞、巨噬细胞等)。例如,提供了经遗传修饰的免疫细胞,诸如NK细胞,其包括编码ILT2或ILT4 CIR的核酸。还提供了制备经遗传修饰的细胞的方法和治疗方法(例如,向个体施用表达主题CIR的免疫细胞,诸如NK细胞、T细胞或巨噬细胞)。

[0037] 在进一步描述本发明之前,应当理解,本发明不限于所描述的特定实施方案,因此当然可以变化。还应当理解,本文使用的术语仅仅是为了描述特定实施方案的目的,而非旨在进行限制,因为本发明的范围仅由所附权利要求来限定。

[0038] 在提供数值范围的情况下,应当理解,除非上下文另有明确规定,否则该范围的上限和下限之间的每个中间值(至下限单位的十分之一)以及所陈述的范围内的任何其它规定值或中间值都涵盖在本发明内。这些较小范围的上限和下限可以独立地包括在较小范围内,并且也涵盖在本发明内,受所陈述的范围中任何具体排除的限值的约束。在所陈述的范围包括一个或两个限值的情况下,排除这些所包括的限值中的任一个或两个的范围也包括

在本发明中。

[0039] 本文中呈现了某些范围,其中数值前面带有术语“约”。术语“约”在本文中用于为其后面的精确数字以及接近或近似该术语后面的数字提供字面支持。在确定数字是否接近或近似具体列举的数字时,接近或近似的未列举的数字可以是在其出现的上下文中提供具体列举的数字的基本等同物的数字。

[0040] 除非另有定义,否则本文所用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义。尽管与本文所述的方法和材料类似或等同的任何方法和材料也可以用于本发明的实践或测试中,但现在描述代表性的说明性方法和材料。

[0041] 本说明书中引用的所有公开和专利均通过引用并入本文,如同每个单独的公开或专利被具体且单独地指示为通过引用并入并且通过引用并入本文以公开和描述与所引用的公开相关的方法和/或材料。任何公开的引用是由于其公开在申请日期之前,并且不应当被解释为承认本发明无权由于先前的发明而早于此类公开。此外,所提供的公开日期可能与实际公开日期不同,这可能需要单独确认。

[0042] 应当注意,如本文和所附权利要求中所用,除非上下文另外明确指示,否则单数形式“一个(a)”、“一种(an)”和“所述(the)”包括复数指示物。因此,冠词“一个”和“一种”在本文中指代冠词的一个/种或多于一个/种(即,至少一个/种)语法宾语。举例来说,“元件”意指一个元件或多于一个元件。因此,例如,提及“一个细胞”包括多个此类细胞,并且提及“所述多肽”包括提及一种或多种本领域技术人员已知的多肽及其等同物,等等。还应当注意,权利要求可以被起草成排除任何任选的要素。因此,该陈述旨在用作使用诸如“唯一地”、“仅”等与权利要求要素的叙述有关的此类专用术语或使用“负”限制的前置基础。

[0043] 如本领域技术人员在阅读本公开内容后将明显的是,在不脱离本发明的范围或精神的情况下,本文描述和示出的每个单独的实施方案都具有离散的部件和特征,这些部件和特征可以容易地与任何其它若干个实施方案的特征分离或组合。任何列举的方法都可以按照列举的事件的顺序或按照逻辑上可能的任何其它顺序进行。例如,应当理解,为了清楚起见,在单独实例的上下文中描述的本发明某些特征也可以在单个实例中以组合形式提供。相反,为了简洁起见,在单个实例的上下文中描述的本公开的各种特征也可以单独地或以任何合适的子组合来提供。属于本发明的实施方案的所有组合都具体包含在本发明中,并且在本文中公开,就好像每个组合都被单独和明确地公开一样。此外,各种实施方案及其要素的所有子组合也具体包含在本发明中,并且在本文中公开,就好像每个此类子组合在本文中被单独和明确地公开。

[0044] 虽然为了语法流畅性和功能性解释,已经描述或将要描述该设备和方法,但是应当明确地理解,除非根据35U.S.C.§112明确表述,否则权利要求不应被解释为必然以任何方式受到“装置”或“步骤”限制的限制,而是应当符合根据等同物的司法原则由权利要求提供的定义的含义和等同物的全部范围,并且在权利要求根据35U.S.C.§112明确表述的情况下,将根据35U.S.C.§112给予完全的法定等同物。

[0045] 本文据此引用的每个专利、专利申请、公开和文件的全部内容通过引用并入本文。专利、专利申请、公开和文件的引用并不承认前述中的任何一个相关的现有技术,也不构成对这些公开或文件的内容或日期的任何承认。它们的引用并不表示对相关公开内容的搜索。所有关于文件的日期或内容的陈述都是基于可用的信息,并且不承认其准确性或正确

性。

[0046] 在不脱离该技术的基本方面的情况下,可以对前述进行修改。尽管已经参考一个或多个具体实施方案非常详细地描述了该技术,但是本领域普通技术人员将认识到,可以对本申请中具体公开的实施方案进行改变,然而这些修改和改进在该技术的范围和精神内。

[0047] 本文说明性地描述的技术可以在缺少本文未具体公开的任何要素的情况下适当地实践。因此,例如,在本文的每个实例中,术语“包括 (comprising)”、“基本上由……组成 (consisting essentially of)”和“由……组成 (consisting of)”中的任何一个都可以用其它两个术语中的任何一个来替换。已经采用的术语和表达用作描述性术语而非限制性术语,并且此类术语和表达的使用不排除所示出和描述的特征或其部分的任何等同物,并且在所要求保护的技术范围内各种修改是可能的。术语“一个”或“一种”可以指它所修饰的一个/种或多个/种要素(例如,“试剂”可以意指一种或多种试剂),除非上下文清楚地描述了一个要素或多于一个要素。如本文使用的术语“约”是指基础参数的10%以内(即,加或减10%)的值,并且在一串值的开头使用术语“约”修饰每个值(即,“约1、2和3”是指约1、约2和约3)。例如,“约100克”的重量可以包括在90克与110克之间的重量。此外,当在本文中描述值的列表时(例如,约50%、60%、70%、80%、85%或86%),该列表包括其所有中间值和分数值(例如,54%、85.4%)。因此,应当理解,尽管本技术已经通过代表性实施方案和任选的特征被具体地公开,但是本领域技术人员可以采用对本文公开的概念的修改和变化,并且此类修改和变化被认为在本技术的范围内。

[0048] 1. MHC I类(“MHC-I”)分子

[0049] 人类中的MHC-I分子包括经典的HLA-A、HLA-B或HLA-C α 链以及非经典的HLA-E、HLA-F、HLA-G和HLA-H α 链。经典的MHC-I分子显示从细胞内到细胞毒性T细胞的肽片段。当非自身抗原显示在MHC-I复合物中时,对MHC:肽复合物具有特异性的细胞毒性T细胞可以识别并杀伤MHC-I呈递细胞。这些细胞毒性信号也与共刺激信号传导组合来激活T细胞的生长潜能。

[0050] MHC I类分子是由两条多肽链(α 和 β_2 -微球蛋白 β_2 -M)组成的异二聚体。两条链经由 β_2 -M和 α_3 结构域的相互作用非共价连接。 α 链(由HLA基因编码)是高度多态性的,而 β_2 -M亚基(由 β_2 -微球蛋白基因编码)不是高度多态性的。 α_3 结构域是跨越质膜的,并且与T细胞的CD8+共受体相互作用。 α_3 -CD8相互作用将MHC-I分子保持在原位,而细胞毒性T细胞的表面上的T细胞受体(TCR)结合其 α_1 - α_2 异二聚体配体,并且检查偶联肽的抗原性。 α_1 和 α_2 结构域折叠以形成 α 螺旋沟用于肽结合[Bjorkman等人,(1987)《自然(Nature)》329:506]。

[0051] 虽然可以基于供体和受体的HLA亚型(例如,A、B或C)匹配供体和受体,但是在细胞表面展示的MHC I:肽复合物仍可以被识别为非自身。对于同种异体T细胞疗法,匹配经典的HLA类型是有益的,以防止正常宿主组织的同种异体识别导致移植物抗宿主病(GvHD),并且通过减轻宿主抗移植物(HvG)应答来改善移植细胞的持久性。然而,针对癌症的同种异体自然杀伤细胞疗法受益于经典的HLA亚型错配,特别是在包含等位基因的HLA-C1、HLA-C2和HLA-Bw4上,这些等位基因可以促进NK细胞对KIR识别的错配并增强它们的先天细胞毒性应答。

[0052] 非经典的MHC-I蛋白(也称为MHC Ib类蛋白)也由类似的结构域结构组成,并且通

常与 $\beta 2$ -M结合[Clements等人,(2005)《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci)》102:3360]。它们也结合来自细胞内部的肽片段,但是结合的肽的多样性有限,并且它们不将这些肽呈递给CD3-TCR复合物以指导细胞毒性。相反,这些蛋白与在免疫细胞的亚群上表达的抑制性受体接合,以抑制或削弱免疫细胞功能。HLA-E与细胞毒性T细胞和NK细胞上的CD94/NKG2A复合物接合,并且HLA-G与多种免疫效应子的组上的ILT蛋白相互作用。

[0053] 2.HLA-G

[0054] 非经典的MHC-I蛋白HLA-G是维持对母体-胎儿发育的免疫耐受性的主要因素[Kovats等人《科学(Science)》(1990)248:220,Ferreira等人(2017)I 38:272]。其正常表达在胎儿胎盘的绒毛外滋养层中最高,在所述绒毛外滋养层中其功能是阻断大多数类型的母体免疫细胞,但特别是来自具有单倍体相合的MHC单倍体的胎儿的T细胞和NK细胞的激活和浸润。它在其它免疫特权组织中维持在低得多的水平,所述免疫特权组织包括角膜、间充质干细胞的亚群[Chapel等人(2006)《血液(Blood)》108:4257,Selmani等人(2008)《干细胞(Stem Cells)》26:212]和内分泌腺[Le Discorde等人(2003)《人类免疫学(Human Immunology)》64:1039,Cirulli等人(2006)《糖尿病(Diabetes)》55:1214]。HLA-G在多种实体瘤类型和白血病的集合中表达[在Lin和Yan(2018)《免疫学前沿(Front Imm.)》9:Art 2164中综述],包括黑色素瘤[Paul等人,(1998)《美国国家科学院院刊》95:4510]、结肠直肠癌、AML、ALL、肾细胞癌[Tronik-Le Roux等人,(2017)《分子肿瘤学(Mol.Oncol.)》11:1561]、乳腺癌和肺癌。它在癌症中的功能是直接逃避免疫攻击,但HLA-G也在耐受原性DC-10树突细胞中表达,所述耐受原性DC-10树突细胞通过抑制性细胞因子分泌来抑制淋巴细胞应答并且激活Treg细胞和髓源性抑制细胞(MDSC)以创建免疫抑制肿瘤微环境[在Carosella等人,《血液》(2011)118:6499,Gao等人,(2018)BBA 1869:278中综述]。HLA-G因此可以被认为是肿瘤促进的重要的检查点介质。

[0055] HLA-G基因产生编码至少七种不同蛋白产物的多种mRNA转录物[Ishitani等人(1992)《美国国家科学院院刊》89:3947,(Seq ID No:9、15、17、19、21)。HLA-G1包含具有 α 螺旋肽结合槽和跨膜结构域以及短胞内羧基末端结构域的 $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ 结构域结构(参见图1)。这种结构域结构与MHC-I产品是完全相同的。其它表达的剪接产物删除了整个结构域,例如HLA-G2编码 $\alpha 1$ 、 $\alpha 3$ 和跨膜结构域,删除了 $\alpha 2$ 。HLA-G4删除了 $\alpha 3$ 结构域,并且HLA-G3仅编码 $\alpha 1$ 结构域。当在M8细胞中作为转基因表达时,据报道这些形式的HLA-G中的每一种都表现出针对NK细胞攻击的免疫抑制活性[Riteau等人(2001)《免疫学杂志(J.Immunology)》166:5018]。由替代的剪接产生的分泌形式包括HLA-G5和HLA-G6,它们分别保持HLA-G1和G2的结构域结构,但不使用内含子4的剪接供体位点,而是编码来源于内含子4的短分泌肽。类似地,HLA-G7使用来源于内含子2的三个氨基酸的肽。通过经由基质金属蛋白酶在跨膜结构域的切割来产生另外的HLA-G1的分泌形式,以使一些HLA-G1的细胞表面脱落[Rizzo等人(2012)《分子与细胞生物化学(Mol Cell Biochem)》381:243]。

[0056] HLA-G以单体形式和寡聚体形式存在。寡聚体主要是由Cys42(在 $\alpha 1$ 中)或Cys 147(在 $\alpha 2$ 中)处的二硫键引导的二聚体[Gonen-Gross等人,(2005)《免疫学杂志(J.Imm.)》175:4866,Boyson等人,《美国国家科学院院刊》99:16180]。存在这样的证据,即,HLA-G的二聚体形式是主要的免疫抑制形式,并且相对于天然单体,它采用扭曲的四级结构[Shiroishi等人(2006)《美国国家科学院院刊》103:10095,Clements等人(2005)《美国国家科学院院刊》

102:3360, Wang等人(2020)《细胞和分子免疫学(Cel and Mol.Imm.)》17:966]。

[0057] 不同的HLA-G形式一起形成对基于CAR的疗法的挑战,所述基于CAR的疗法依赖于抗体来源的scFv或VhH结构域作为靶向剂的结合。因为不同的剪接形式删除了给定抗体的表位,因此CAR疗法选择仅表达不被CAR的结合物识别的表位,同时保留免疫抑制活性。此外,由于结构变化,寡聚化可以掩盖scFv的表位。同样,HLA-G 4H84和87G的两种常用抗体试剂显示出与其它HLA物种的交叉反应性,这可能导致CAR-T或CAR-NK细胞的脱靶、脱肿瘤靶向[Attia等人(2021)《国际分子科学杂志(Int.J.Mol.Sci)》21:8678, Polakova等人(2004)《人类免疫学(Hum.Imm.)》65:157, Swets等人(2018)《临床免疫学(Clin.Imm)》194:80, Furukawa等人(2019)《国际分子科学杂志》20:5947]。

[0058] 3. ILT2和ILT4

[0059] HLA-G作为靶免疫细胞上抑制性受体免疫球蛋白样转录物2(ILT2)和ILT4(也分别称为LIRB1和LIRB2或CD85j和CD85d)的膜结合配体,指导其免疫抑制活性[Colonna等人(1998)《免疫学杂志》160:3096,在Gao等人(2018)BBA 1869:278中综述]。ILT2(Seq ID NO:29)在自然杀伤细胞、iNKT细胞、T细胞、B细胞和树突细胞的亚群中表达。ILT4(Seq ID NO:53)主要在髓样细胞和干细胞,包括巨噬细胞、髓源性抑制细胞(单核细胞谱系上更少分化的细胞群)、粒细胞,包括嗜中性粒细胞、单核细胞、造血干细胞和一些神经元中具有更广泛的表达模式。

[0060] ILT2具有由四个结构域组成的胞外结构域结构,所述四个结构域与免疫球蛋白结构域(Ig结构域)具有序列和结构同源性,所述免疫球蛋白结构域(Ig结构域)排列在从远离膜的D1到最靠近膜的D4的列中,其后是跨膜结构域和包括四个迭代的免疫受体酪氨酸抑制基序(ITIM)的胞内信号传导结构域。ILT4具有相似的胞外和跨膜架构,但在其胞内结构域中仅具有三个ITIM。

[0061] ILT2(参见,例如Seq ID NO:37和71)和ILT4(参见,例如Seq ID NO:57和75)的D1和D2结构域控制与HLA-G的相互作用,并且可以与D3和D4结构域分离[Donadi等人(2011)《细胞和分子生命科学(Cell.Mol.Life Sci.)》68:369, Morales(2007)122:179, HoWanYin等人(2012)《细胞和分子生命科学》69:4041, Shiroishi等人(2006)《美国国家科学院院刊》103:10095, Wang等人(2020)《细胞和分子免疫学》17:966]。与由CD3复合物与经典的MHC-I产生的激活相互作用以及由NK细胞的KIR蛋白产生的抑制性和激活相互作用不同,ILT2和ILT4不与含有肽结合槽的 $\alpha 1$ - $\alpha 2$ 结构域结合,而是与膜近端 $\alpha 3$ 结构域和 $\beta 2$ -微球蛋白相互作用(参见图1B)。使ILT2与 $\beta 2$ -M进行广泛接触,而与HLA-G的 $\alpha 3$ 相对较少地接触,并且需要 $\beta 2$ -M与HLA-G缔合以维持甚至低亲和力的相互作用。相反,使ILT4与 $\alpha 3$ 广泛接触,并且可以与所有已知的活性免疫抑制形式的HLA-G(可能不包括仅包含 $\alpha 1$ 结构域的HLA-G3/G7)保持相互作用。

[0062] ILT2和ILT4可以与其它MHC-I和MHCI样蛋白,特别是HLA-A2、HLA-B、HLA-C和HLA-F、CD1d和UL18相互作用。除了UL18——来自巨细胞病毒的诱饵MHC-I[Wilcox等人(2002)《BMC结构生物学(BMC Struct.Biol)》2:6],这些是解离常数(K_D) 在 $2\mu\text{M}$ 与 $40\mu\text{M}$ 之间的低亲和力相互作用。在如此弱的亲和力下,免疫抑制信号传导的相关性尚未得到证实。类似地,ILT2和ILT4与HLA-G的单体形式之间的相互作用很弱,在 μM 范围内。然而,二聚体HLA-G形式显示出与ILT2和ILT4的高亲和力($2\text{-}4\text{nM}$)相互作用,这可能是由于显示了另外的接触位点,

或者可替代地是由于亲合力效应降低了ILT解离的解离速率[Shiroishi等人,(2006)《生物化学杂志(J.Biol.Chem)》281:10440,Gao等人,(2020)《细胞和分子免疫学(Cell Mol Imm)》17:966]。因此,HLA-G的二聚体形式最有可能具有生物活性[Gonen-Gross等人,(2005)《免疫学杂志》175:4866]并且在肿瘤环境中具有免疫抑制功能,并且此外,最有可能作为通过嵌合受体的基于细胞的免疫疗法的靶向分子。

[0063] ILT4是包括血管生成素样蛋白2和5的非MHC配体的受体[Zheng等人(2012)《自然》485:656,Deng等人(2014)《血液》124:924]。通过可溶性ANGPTL2和ANGPTL5的调节被认为提供了来自骨髓基质的保护信号,用于表达ILT4的造血干细胞的自我更新和存活。ILT4和ANGLP之间的相互作用由ILT4的D1结构域和D4结构域共同指导,并且D1或D4中的特定残基对于维持高亲和力相互作用是必需的。值得注意的是,酪氨酸96突变为丙氨酸减少了ANGPTL2/5结合,但是没有减少HLA-G1与全长ILT4的相互作用[Deng等人(2014)《血液》124:924]。

[0064] ILT4以中等亲和力与来源于髓磷脂的抑制性Nogo受体配体相互作用[Atwal等人(2008)《科学》322:967,Matsushita等人,(2014)《生物化学杂志》286:25739]。ILT蛋白的小鼠直向同源物PIRB也在神经元的亚群中发现,并且可以通过与基于髓磷脂的MAG、Nogo和OMgp[美国专利20100047232]以及Sema4a[Lu等人(2018)《自然通讯(Nat.Comm.)》7:742]的相互作用来调节轴突的生长。在ILT4、PIRB的小鼠直向同源物中表征了高亲和力相互作用,并且没有映射到HLA-G结合D1和D2结构域,而是映射到PIRB的膜近端结构域[Matsushita等人,(2014)《生物化学杂志》286:25739]。

[0065] 4.嵌合抗原受体

[0066] 嵌合抗原受体(或CAR)是被设计为向细胞传递抗原特异性的人工受体。它们通常包括抗原特异性组分、跨膜组分和被选择以激活细胞的胞内组分。表达CAR的细胞可以用于各种疗法,包括癌症疗法。

[0067] CAR是例如嵌合多肽,其包含识别与跨膜多肽连接的靶抗原(抗原识别结构域)的多肽序列和被选择以激活细胞从而提供特异性免疫的胞内结构域多肽。抗原识别结构域可以是单链可变片段(scFv),或者可以例如来源于其它分子,诸如例如T细胞受体或骆驼科动物VhH结构域。胞内结构域包含至少一种引起细胞的激活的多肽(“信号传导区域”),诸如例如但不限于CD3 ζ (CD3 ζ)(参见,例如SEQ ID NO:33),以及任选地共刺激分子(“共刺激区域”)(例如但不限于CD28(参见,例如SEQ ID NO:49)、OX40和4-1BB(参见,例如SEQ ID NO:35))。

[0068] 因此,在CAR使用的典型实例中,细胞被修饰以表达CAR,所述CAR包含与跨膜结构域融合的单链抗体可变片段(scFv),所述跨膜结构域包含接头区域和来源于CD3 ζ 组分的胞内结构域(参见,例如SEQ ID NO:33)。在自然T细胞和NK细胞中,来自CD3 ζ 的信号通过向NF-ATc转录因子发送信号来驱动T细胞的初始激活。这些信号驱动细胞毒性T淋巴细胞中的靶向细胞杀伤,并且与共刺激信号传导途径协同以驱动T细胞免疫应答的稳健细胞增殖。可以通过用表达CAR的核酸和包含编码嵌合信号传导多肽的多核苷酸的核酸(相同或不同)进行转导或转染来修饰经遗传修饰的细胞(参见下文)。在其它实施方案中,CAR在也不表达嵌合信号传导多肽的情况下表达。

[0069] 嵌合抗原受体可以在NK细胞、iNKT细胞或巨噬细胞中表达,以产生抗原特异性细

胞毒性。

[0070] CAR包括来源于抗体的嵌合受体,但也包括嵌合T细胞受体。这些嵌合T细胞受体可以包含识别靶抗原的多肽序列,其中识别序列可以是例如但不限于,来源于T细胞受体或scFv的识别序列。胞内结构域多肽是那些起作用以激活T细胞的多肽。嵌合T细胞受体在例如Gross和Eshar《美国实验生物学会联合会会志 (FASEB Journal)》(1992)6:3370-3378和Zhang等人,(2010)《公共科学图书馆-病原体 (PLOS Pathogens)》6:1-13中讨论。

[0071] 5.由ILT蛋白靶向的嵌合受体(即,“嵌合ILT受体”或“CIR”)

[0072] T细胞或NK细胞的细胞毒性特异性的重新定向可以通过抗原-scFv(或TCR)相互作用的参与来控制,但也可以通过受体-配体配对来控制,使得靶向的配体的受体可以形成嵌合蛋白,所述嵌合蛋白可以维持与细胞的高亲和力相互作用,同时能够维持信号转导以激活免疫细胞(下文中我们使用T细胞和NK细胞作为实例)。使用此类受体作为CAR样蛋白的结合剂的关键是与靶蛋白的高亲和力相互作用($<50\text{nM}$),以允许免疫细胞与靶蛋白的稳定粘附和激活T细胞或NK细胞的稳定信号传导。此外,在高度优选的实施方案中,用于与靶标接合的受体或受体部分仅对靶标具有特异性,以防止脱肿瘤靶向。第三,类似于scFv和类似的结合物,相对于正常组织,在靶组织(例如,肿瘤)上维持靶蛋白或配体的高水平表达是至关重要的。

[0073] (i) 靶向区域

[0074] ILT2的胞外结构域(D1-D4)(参见,例如SEQ ID NO:31,其包括D1-D4加上ILT2的跨膜区域)可以被工程化以靶向表达HLA-G的肿瘤细胞,并且在表达ILT2的嵌合形式的免疫细胞中产生激活信号转导,所述ILT2的嵌合形式用驱动激活信号的信号传导组分(例如,CD3 ζ 和4-1BB的ICD)替代天然抑制性的含ITIM的ILT2胞内结构域(ICD)。

[0075] 类似地,ILT4的胞外结构域(D1-D4)(参见,例如SEQ ID NO:55,其包括D1-D4加上ILT4的跨膜区域)可以被工程化以通过用激活信号传导部分(例如,CD3 ζ 和4-1BB的ICD)替换ILT4 ICD而在免疫细胞中产生激活信号。使用ILT2或ILT4的D1-D4胞外结构域用于靶向区域将产生ILT2 D1-D4嵌合受体(即,ILT2 D1-D4 CIR)或ILT4 D1-D4嵌合受体(即,ILT4 D1-D4 CIR)(参见图4A)。因此,在一些情况下,主题嵌合ILT受体(CIR)的靶向区域包括ILT2或ILT4 D1-D4结构域(其因此靶向HLA-G)。

[0076] ILT4与HLA重链上的 $\alpha 3$ 保持更多接触,并且可以与HLA-G的游离重链形式相互作用,而ILT2 D1/D2需要与 $\beta 2\text{-M}$ 和 $\alpha 3$ 接触,以保持与HLA-G的相互作用(图4B)。

[0077] 因为ILT2和ILT4保持与二聚体HLA-G的高亲和力(K_D 低nM)相互作用和低亲和力(对于与包括单体HLA-G和CD1d在内的其它MHC-I蛋白的相互作用, K_D 为 μM),所以对携带高水平的HLA-G的肿瘤的特异性成比例地增加了二聚体形式的HLA-G的量,并且允许相对于表达高水平的经典MHC-I但很少或没有HLA-G的正常组织选择肿瘤组织。HLA-G1在位置Cys42到Ser或Cys147到Ser的突变阻断了HLA-G1二聚化,并且严重地降低了ILT2或ILT4 CIR-T细胞或CIR-NK细胞的靶向性。

[0078] 发明人认识到HLA-G存在于若干种不同的同种型中。包括基于抗体的靶向区域(诸如scFv)的CAR只能靶向包括由抗原结合区域(例如,scFv)靶向的表位的HLA-G同种型。这可以选择表达缺乏靶向的表位的HLA-G同种型的肿瘤细胞,从而允许癌症逃避治疗。相反,基于主题ILT2或ILT4的嵌合受体蛋白(其靶向HLA-G)应当靶向更多的(并且也许是所有)HLA-

G同种型,因为ILT2和ILT4天然地结合这些同种型。ILT2 D1/D2 CIR和ILT4 D1/D2 CIR的构建

[0079] D1和D2结构域足以指导ILT2和ILT4与HLA-G的结合,而D3和D4结构域可能用作支架以将D1和D2展示给HLA-G[Shiroishi等人,(2006)《生物化学杂志》4月14日;281(15):10439-47]。在一些实施方案中,D3和D4结构域可以从ILT2 CIR或/和ILT4CIR中删除,并且通过来自ILT2(参见,例如Seq ID NO:71)或ILT4(参见,例如Seq ID NO:75)的D1-D2结构域与HLA-G形式保持功能性相互作用(参见图4A)。因此,在一些情况下,主题ILT2或ILT4嵌合受体的靶向区域将包括ILT2或ILT4的D1-D2结构域(参见,例如ILT2的D1-D2的SEQ ID NO:71和ILT4的D1-D2的SEQ ID NO:75),并且在一些此类情况下,靶向区域将不包括(即,将缺乏)D3-D4结构域。

[0080] 在一些实施方案中,主题ILT2嵌合受体的靶向区域(包括D1-D2结构域的区域)包括与SEQ ID No:37、70、71和72中的任一者中所示的ILT2序列具有80%或更高序列同一性(例如,85%或更高、90%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高或100%)的氨基酸序列,所述序列如下:

[0081] MHLPKPTLWAEPGSVITQGSPVTLRCQGGQETQEYRLYREKKTAPWITRIPQELVKKGQFPPIPSITWEHTGRYRCYYGSDTAGRSESSDPLELVVTGAYIKPTLSAQSPVVNSGGNVTLQCDSQVAFDGFILCKEGEDEHPQC LNSQPHARGSSRAIFSVGPVSPSRRWWYRCYAYDSNSPYEWLPSDLLELLVLG(SEQ ID NO:37)

[0082] MHLPKPTLWAEPGSVITQGSPVTLRCQGGQETQEYRLYREKKTALWITRIPQELVKKGQFPPIPSITWEHAGRYRCYYGSDTAGRSESSDPLELVVTGAYIKPTLSAQSPVVNSGGNVILQCDSQVAFDGFSLCKEGEDEHPQC LNSQPHARGSSRAIFSVGPVSPSRRWWYRCYAYDSNSPYEWLPSDLLELLVLG(SEQ ID NO:70)

[0083] PKPTLWAEPGSVITQGSPVTLRCQGGQETQEYRLYREKKTAPWITRIPQELVKKGQFPPIPSITWEHTGRYRCYYGSDTAGRSESSDPLELVVTGAYIKPTLSAQSPVVNSGGNVTLQCDSQVAFDGFILCKEGEDEHPQCLNSQP HARGSSRAIFSVGPVSPSRRWWYRCYAY

[0084] DSNSPYEWLPSDLLELLVLG(SEQ ID NO:71)

[0085] PKPTLWAEPGSVITQGSPVTLRCQGGQETQEYRLYREKKTALWITRIPQELVKKGQFPPIPSITWEHAGRYRCYYGSDTAGRSESSDPLELVVTGAYIKPTLSAQSPVVNSGGNVI

[0086] LQCDSQVAFDGFSLCKEGEDEHPQCLNSQPHARGSSRAIFSVGPVSPSRRWWYRCYAY

[0087] DSNSPYEWLPSDLLELLVLG(SEQ ID NO:72)

[0088] 在一些情况下,靶向区域包括与SEQ ID No:37、70、71和72中的任一者中所示的序列具有90%或更高序列同一性(例如,95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高或100%)的氨基酸序列。在一些情况下,靶向区域包括与SEQ ID No:37、70、71和72中的任一者中所示的序列具有95%或更高序列同一性(例如,96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高或100%)的氨基酸序列。在一些情况下,靶向区域包括SEQ ID No:37、70、71和72中的任一者中所示的氨基酸序列。

[0089] 在一些情况下,ILT2嵌合受体的靶向区域(包括D1-D2结构域的区域)包括与如SEQ ID No:37所示的序列具有80%或更高序列同一性(例如,85%或更高、90%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高或100%)的氨基酸序列。在一些情况下,靶向区域包括与如SEQ ID No:37所示的序列具有90%或更高序列同一性(例如,95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高或100%)的氨基酸序列。在一些

情况下,靶向区域包括与如SEQ ID No:37所示的序列具有95%或更高序列同一性(例如,96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高或100%)的氨基酸序列。在一些情况下,靶向区域包括如SEQ ID No:37所示的氨基酸序列。

[0090] 在一些实施方案中,主题ILT4嵌合受体的靶向区域(包括D1-D2结构域的区域)包括与SEQ ID No:57、74和75中的任一者中所示的ILT4序列具有80%或更高序列同一性(例如,85%或更高、90%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高或100%)的氨基酸序列,所述序列如下:

[0091] MTPIVTVL ICLGSLGPRTHVQTGTIPKPTLWAE PDSVITQGSPVTLSCQGSLEAQEYRLYREKKSASW
ITRIRPELVKNGQFHIPSITWEHTGRYGCQYYSRARWSELSDPLVLV

[0092] MTGAYPKPTLSAQSPVVTSGGRVTLQCESQVAFGGF ILCKEGEDEHPQCLNSQPHAR

[0093] GSSRAIFSVGPVSPNRRWSHRCYGYDLNSPYVWSSPSDLELLVPG (SEQ ID NO:57)

[0094] MTPIVTVL ICLGSLGPRTRVQTGTIPKPTLWAE PDSVITQGSPVTLSCQGSLEAQEYRLYREKKSASW
ITRIRPELVKNGQFHIPSITWEHTGRYGCQYYSRARWSELSDP

[0095] LVLVMTGAYPKPTLSAQSPVVTSGGRVTLQCESQVAFGGF ILCKEGEDEHPQCLNS

[0096] QPHARGSSRAIFSVGPVSPNRRWSHRCYGYDLNSPYVWSSPSDLELLVPG (SEQ ID NO:74)

[0097] PKPTLWAE PDSVITQGSPVTLSCQGSLEAQEYRLYREKKSASWITRIRPELVKNGQFHIPSITWEHTG
RYGCQYYSRARWSELSDPLVLVMTGAYPKPTLSAQSPVVTSGGRVTLQCESQVAFGGF ILCKEGEDEHPQCLNSQ
PHARGSSRAIFSVGPVSPNRRWSHRCYGYDLNSPYVWSSPSDLELLVPG (SEQ ID NO:75)

[0098] 在一些情况下,靶向区域包括与SEQ ID No:57、74和75中的任一者中所示的序列具有90%或更高序列同一性(例如,95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高或100%)的氨基酸序列。在一些情况下,靶向区域包括与SEQ ID No:57、74和75中的任一者中所示的序列具有95%或更高序列同一性(例如,96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高或100%)的氨基酸序列。在一些情况下,靶向区域包括SEQ ID No:57、74和75中的任一者中所示的氨基酸序列。

[0099] 在一些情况下,ILT4嵌合受体的靶向区域(包括D1-D2结构域的区域)包括与如SEQ ID No:57所示的序列具有80%或更高序列同一性(例如,85%或更高、90%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高或100%)的氨基酸序列。在一些情况下,靶向区域包括与如SEQ ID No:57所示的序列具有90%或更高序列同一性(例如,95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高或100%)的氨基酸序列。在一些情况下,靶向区域包括与如SEQ ID No:57所示的序列具有95%或更高序列同一性(例如,96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高或100%)的氨基酸序列。在一些情况下,靶向区域包括如SEQ ID No:57所示的氨基酸序列。

[0100] 对于本节中讨论的任何上述实施方案,在一些情况下,主题ILT2或ILT4嵌合受体缺乏D3和D4结构域(即,缺乏分别对应于ILT2(SEQ ID NO:73)或ILT4(SEQ ID NO:76)的D3-D4结构域的区域)。对于ILT2,具有D3-D4结构域的区域为:

[0101] PLDILIAGQFYDRVLSVQPGPTVASGENVTLLCQSQGWMTFLLTKEGAADDPW RLRSTYQSQKYQ
AEFPMGPV TSAHAGTYRCYGSQSSKPYLLT (SEQ ID NO:73)。

[0102] 对于ILT4,具有D3-D4结构域的区域为:

[0103] QPGPVMAPGESLTLQCVSDVGYDRFVLYKEGERDLRQLPGRQPQAGLSQANFTLGPVSRSYGGQYRCY

GAHNLSSECSAPSDPLDILITGQIRGTPFISVQPGPTVASGENVTLLCQSWRQFHTFLLTKAGAADAPLRLRSIHEYPKYQAEFPMPVTSAHAGTYRCYGLNSDPYLLSHPSEPLEL (SEQ ID NO:76)。

[0104] 在一些情况下,主题CIR缺乏与如SEQ ID NO:73所示的序列具有85%或更高(例如,90%或更高、95%或更高、98%或更高、99%或更高或100%)序列同一性的氨基酸序列。在一些情况下,主题CIR缺乏与如SEQ ID NO:76所示的序列具有85%或更高(例如,90%或更高、95%或更高、98%或更高、99%或更高或100%)序列同一性的氨基酸序列。在一些情况下,主题CIR缺乏与SEQ ID No:73和76中的任一者中所示的序列具有85%或更高(例如,90%或更高、95%或更高、98%或更高、99%或更高或100%)序列同一性的氨基酸序列。

[0105] 在一些实施方案中,接头可以作为嵌合体与来自ILT2或ILT4的D1-D2结构域融合至质膜,并且用作替代D3和D4结构域的茎。在这些实施方案中,D3-D4的缺失可以防止CIR与除HLA-G以外的蛋白的相互作用,所述蛋白通过D3或D4结构域与天然ILT2或ILT4相互作用,例如ANGPTL2和ANGPTL5与ILT4 D4的相互作用以及nogo、Omgp和MAG与ILT4 D3-D4的相互作用。防止此类相互作用可以减少表达CIR的细胞与非肿瘤组织诸如骨髓基质、髓磷脂和内皮的潜在毒性错误靶向。

[0106] 茎结构域

[0107] 在上述实施方案中,D3-D4的替换可以用在单独细胞上表达的HLA-G的背景下适当展示ILT2或ILT4 D1-D2结合物的任何蛋白或蛋白部分来进行。在某些实施方案中,短多肽接头可以在嵌合ILT受体的跨膜结构域和胞内结构域之间形成连接。因此,嵌合ILT受体可以进一步包含茎,即胞外结构域和跨膜结构域之间的氨基酸的胞外区域。茎结构域的目的是将D1/D2结构域远离质膜并朝向靶蛋白HLA-G延伸。例如,茎可以是与选定的跨膜结构域天然相关的氨基酸序列。在一些实施方案中,嵌合ILT受体包含CD8跨膜结构域,在某些实施方案中,嵌合ILT受体包含CD8跨膜结构域以及跨膜结构域的胞外部分上的另外的氨基酸。在某些实施方案中,CAR包含CD8跨膜结构域和CD8茎。在一个具体的实施方案中,CD8跨膜结构域包含本文公开的序列(或由本文公开的序列组成)(参见表4-42)。在另一个具体实施方案中,CD8茎包含本文公开的序列(或由本文公开的序列组成)(参见表4-42)。嵌合ILT受体可以进一步包含在跨膜结构域和胞质结构域之间的氨基酸区域,该区域与跨膜结构域来源于的多肽天然相关。

[0108] 在转导后,细胞现在在其表面上表达CIR,并且在与HLA-G接触和连接时,通过CD3 ζ 链发出信号,诱导细胞毒性和细胞激活。重要的是,此类结构域不与其它蛋白具有亲和力,从而导致表达CIR的免疫细胞的潜在错误靶向。此类嵌合茎部分的实例包括但不限于CD8 α 的膜近端部分(参见,例如SEQ ID NO:43和107)、IgG的CH2/CH3结构域(例如,IgG1、IgG4)(参见,例如SEQ ID NO:51和98)、IgG的CH3结构域(例如,IgG1、IgG4)(参见,例如SEQ ID NO:102)、HER2、mGluR2、CD28(参见,例如SEQ ID NO:47和106)和CTLA4(参见图5A)。

[0109] 例如,在一些情况下,主题CIR的茎结构域选自:ILT2、ILT4、CD28、CH2/CH3、CH3和CD8茎结构域。参见,例如:

[0110] VVSGPSGGPSSPTTGPTSTSGPEDQPLTPTGSDPQSGLGRHLGVVIGILVAVILL LLLLLLFLILRHRRQ (SEQ ID NO:39),其包括ILT2茎和TM结构域;

[0111] PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO:107),其包括CD8茎结构域;

[0112] PAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTTCGVLL LSLVITLYCNHRNRRRVCKCPR (SEQ ID NO:43), 其包括CD8茎和TM结构域;

[0113] IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLFPGPSKP (SEQ ID NO:106), 其包括CD28茎;

[0114] IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLFPGPSKPFWVLLVVVGGVLACYSLL VTVAFIIFWV (SEQ ID NO:47), 其包括CD28茎和TM结构域;

[0115] VDKRVESKYGPPCPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHN HYTQKSLSLSELEL (SEQ ID NO:98), 其包括CH2CH3茎;

[0116] VDKRVESKYGPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNH YTQKSLSLSELEL (SEQ ID NO:102), 其包括CH3茎;

[0117] DPAEPKSPDKTHTCPPCPAPELLGGSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMEALHNHNYTQKSLSLSPGKKDPFWVLLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO:51), 其包括CH2CH3茎和CD28 TM结构域;

[0118] VVSGPSMGSSPPPTGPISTPAGPEDQPLTPTGSDPQSGLGRHLGVVIGILVAVVLLLLLLLLFLILRHRHQ (SEQ ID NO:59), 其包括ILT4茎和TM结构域。

[0119] 在一些实施方案中,主题CIR的结构域的茎包括与SEQ ID NO:39、43、47、51和59中的任一者中所示的氨基酸序列的茎序列部分具有80%或更高序列同一性(例如,85%或更高、90%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高或100%)的氨基酸序列。在一些实施方案中,主题CIR的结构域的茎包括与SEQ ID NO:39、43、47、51和59中的任一者中所示的氨基酸序列的茎序列部分具有95%或更高序列同一性(例如,96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高或100%)的氨基酸序列。在一些实施方案中,主题CIR的结构域的茎包括SEQ ID NO:39、43、47、51和59中的任一者中所示的氨基酸序列的茎序列部分。

[0120] 在一些实施方案中,主题CIR的结构域的茎包括与SEQ ID NO:98、102、106和107中的任一者中所示的茎序列具有80%或更高序列同一性(例如,85%或更高、90%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高或100%)的氨基酸序列。在一些实施方案中,主题CIR的结构域的茎包括与SEQ ID NO:98、102、106和107中的任一者中所示的茎序列具有95%或更高序列同一性(例如,96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高或100%)的氨基酸序列。在一些实施方案中,主题CIR的结构域的茎包括SEQ ID NO:98、102、106和107中的任一者中所示的茎序列。

[0121] 含D1/D2茎的CIR与二聚体HLA-G的相互作用将具有使胞内信号传导结构域二聚化的效果,在某些实施方案中,胞内信号传导结构域可以刺激ICD激活和细胞信号传导(图5B)。

[0122] ILT2 D1/D2 CIR或ILT4 D1/D2 CIR的突变形式

[0123] 在另外的实施方案中,可以在包含在CIR内的ILT2或ILT4 D1或D2结构域内进行突

变,以增加CIR相对于其它潜在相互作用蛋白对HLA-G的特异性。例如,可以进行突变以在ILT4 SEQ ID NO:57)或ILT2(SEQ ID NO:31)的天然氨基酸96(Y96)的相关位置处编码除酪氨酸以外的氨基酸(例如,Y96A)。此类突变形式的作用是减少与ANGPTL2和ANGPTL5的潜在相互作用,同时保持对HLA-G的结合亲和力。在又一个另外的实施方案中,类似的突变可以与在结构域D4中的突变(在对应于SEQ ID NO:55的酪氨酸394(Y394)的位置处)一起放置在含有D1-D4结构域的全长ILT4 CIR中,所述在结构域D4中的突变进一步破坏与ANGPTL2和ANGPTL5的相互作用(例如Y394A突变,参见SEQ ID NO:61)。ILT2的对应位置是SEQ ID NO:31的酪氨酸395(Y395)。

[0124] 因此,在一些情况下,主题ILT4 CIR包括在对应于SEQ ID NO:57的Y96的氨基酸位置处的突变(例如,Y96A)。在一些情况下,主题ILT2 CIR包括在对应于SEQ ID NO:31的Y96的氨基酸位置处的突变(例如,Y96A)。在一些情况下,主题ILT4 CIR包括在对应于SEQ ID NO:55的Y394的氨基酸位置处的突变(例如,Y394A)。在一些情况下,主题ILT2 CIR包括在对应于SEQ ID NO:31的Y395的氨基酸位置处的突变(例如,Y395A)。在一些情况下,主题ILT4 CIR包括在对应于SEQ ID NO:55的Y96的氨基酸位置处的突变(例如,Y96A)和在对应于SEQ ID NO:55的Y394的氨基酸位置处的突变(例如,Y394A)(例如,Y96A/Y394A)。在一些情况下,主题ILT2 CIR包括在对应于SEQ ID NO:31的Y96的氨基酸位置处的突变(例如,Y96A)和在对应于SEQ ID NO:31的Y395的氨基酸位置处的突变(例如,Y395A)(例如,Y96A/Y395A)。

[0125] 沿着类似路线的其它实施方案可以限制与经典HLA蛋白或CD1的相互作用,同时保留对HLA-G的结合。这些突变可以用对这些HLA的重链具有特异性或在与 β 2-M结合的表面的 α 3结构域替换相互作用位点。

[0126] (ii) 跨膜(TM) 区域

[0127] CIR可以包括单程或多程跨膜序列(例如,在嵌合蛋白的N末端或C末端,或在蛋白内,例如,将胞外靶向区域连接到胞内结构域)。在某些CD分子、酪氨酸激酶受体、丝氨酸/苏氨酸激酶受体、TGF β 、BMP、激活素和磷酸酶中发现了单程跨膜区域。单程跨膜区域通常包括信号肽区域和约20至约25个氨基酸的跨膜区域,其中许多氨基酸是疏水性氨基酸,并且可以形成 α 螺旋。带正电荷的氨基酸的短轨迹通常沿着跨膜跨度,以将蛋白锚定在膜中。多程蛋白包括离子泵、离子通道和转运蛋白,并且包括两个或更多个跨越膜多次的螺旋。所有或基本上所有的多程蛋白有时被并入到嵌合蛋白中。单程和多程跨膜区域的序列是已知的,并且可以被选择用于并入到嵌合蛋白分子中。

[0128] 在一些实施方案中,跨膜结构域与CIR的胞外结构域融合。在一些实施方案中,跨膜结构域与胞外区域和胞内区域融合,从而将胞外区域和胞内区域彼此连接。在一个实施方案中,使用了与CIR中的结构域中的一个天然相关的跨膜结构域。在其它实施方案中,使用了与CIR中的结构域中的一个不天然相关的跨膜结构域。在一些情况下,可以通过氨基酸取代(例如,通常改变为疏水性残基)来选择或修饰跨膜结构域,以避免此类结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合,从而使与受体复合物的其它成员的相互作用最小化。

[0129] 跨膜(TM)结构域可以例如来源于T细胞受体的 α 链、 β 链或 ζ 链,并且可以使用CD3- ϵ 、CD3 ζ 、CD4、CD5、CD8、CD8 α 、CD9、CD16、CD22、CD28、CD33、CD38、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、ILT2、HER2、ILT4或含有其功能性变体的CD154或跨膜区域,诸如保留其大部分结构

(例如,跨膜)性质的那些。参见,例如Kahlon等人(2004)《癌症研究(Cancer Res.)》64:9160-9166;Schambach等人(2009)《分子生物学方法(Methods Mol.Biol.)》506:191-205;Jensen等人(1998)《血液和骨髓移植生物学杂志(Biol.Blood Marrow Transplant)》4:75-83;Patel等人(1999)《基因疗法(Gene Ther.)》6:412;Song等人(2012)《血液》119:696-706;Carpenito等人(2009)《美国国家科学院院刊》106:3360-5;Hombach等人(2012)《肿瘤免疫学(Oncoimmunology)》1:458-66)和Geiger等人(2001)《血液》98:2364-71。

[0130] 或者,在一些实例中,跨膜结构域可以从头合成,包含大部分疏水性残基,诸如例如亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸和缬氨酸。用于本发明的合适的CD8茎序列、跨膜序列和CD3 ζ 序列在表4-42中公开。

[0131] 例如,在一些情况下,主题CIR的TM结构域选自:ILT2(参见,例如SEQ ID NO:39)、ILT4(参见,例如SEQ ID NO:59)、CD28(参见,例如SEQ ID NOs:47和104)以及CD8(参见,例如SEQ ID NOs:43和100)TM结构域。参见,例如:

[0132] VVSGPSGGPSSPTTGPTSTSGPEDQPLTPTGSDPQSGLGRHLGVVIGILVAVILLLLL
LLLLFLILRHRRQ(SEQ ID NO:39),其包括ILT2茎和TM结构域;

[0133] IYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPR(SEQ ID NO:100),其包括CD8 TM结构域;

[0134] PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLL
LSLVITLYCNHRNRRRVCKCPR(SEQ ID NO:43),其包括CD8茎和TM结构域;

[0135] FWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV(SEQ ID NO:104),其包括CD28 TM结构域;

[0136] IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWLVVVGGVLACYS LLVTVAFIIFWV
(SEQ ID NO:47),其包括CD28茎和TM结构域;

[0137] DPAEPKSPDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGKKDPFWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV(SEQ ID NO:51),其包括CH2CH3茎和
CD28 TM结构域;以及

[0138] VVSGPSMGSSPPPTGPISTPAGPEDQPLTPTGSDPQSGLGRHLGVVIGILVAVVLLLL
LLLLFLILRHRRQ(SEQ ID NO:59),其包括ILT4茎和TM结构域。

[0139] 在一些实施方案中,主题CIR的TM结构域包括与SEQ ID NO:39、43、47、51和59中的任一者中所示的氨基酸序列的TM结构域序列部分具有80%或更高序列同一性(例如,85%或更高、90%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高或100%)的氨基酸序列。在一些实施方案中,主题CIR的TM结构域包括与SEQ ID NO:39、43、47、51和59中的任一者中所示的氨基酸序列的TM结构域序列部分具有95%或更高序列同一性(例如,96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高或100%)的氨基酸序列。在一些实施方案中,主题CIR的TM结构域包括SEQ ID NO:39、43、47、51和59中的任一者中所示的氨基酸序列的TM结构域序列部分。

[0140] 在一些实施方案中,主题CIR的茎结构域加上TM结构域(茎/TM结构域)包括与SEQ ID NO:39、43、47、51和59中的任一者中所示的氨基酸序列具有80%或更高序列同一性(例如,85%或更高、90%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更

高或100%)的氨基酸序列。在一些实施方案中,主题CIR的茎结构域加上TM结构域(茎/TM结构域)包括与SEQ ID NO:39、43、47、51和59中的任一者中所示的氨基酸序列具有95%或更高序列同一性(例如,96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高或100%)的氨基酸序列。在一些实施方案中,主题CIR的茎结构域加上TM结构域(茎/TM结构域)包括具有SEQ ID NO:39、43、47、51和59中的任一者中所示的氨基酸序列的氨基酸序列。

[0141] 在一些实施方案中,主题CIR的TM结构域包括与SEQ ID NO:100和104中的任一者中所示的TM结构域序列具有80%或更高序列同一性(例如,85%或更高、90%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高或100%)的氨基酸序列。在一些实施方案中,主题CIR的TM结构域包括与SEQ ID NO:100和104中的任一者中所示的TM结构域序列具有95%或更高序列同一性(例如,96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高或100%)的氨基酸序列。在一些实施方案中,主题CIR的TM结构域包括SEQ ID NO:100和104中的任一者中所示的TM结构域序列。

[0142] (iii) 胞内结构域(ICD)

[0143] 如上所述,主题嵌合ILT受体(基于ILT2或ILT4)包括胞内区域(胞内结构域或ICD),所述胞内区域用CAR的ICD替代ILT2或ILT4的天然胞内部分,所述胞内部分是抑制性的,所述ICD是激活性的。因此,主题CIR的ICD(ILT2形式或ILT4形式)包括“信号传导区域”,所述信号传导区域具有至少一个引起细胞激活的信号传导结构域,并且可以任选地包括“共刺激区域”,所述共刺激区域可以包括一个或多个共刺激结构域。

[0144] 信号传导区域

[0145] CIR的“信号传导区域”(或“胞内信号传导结构域”)是指CIR的一部分,其参与将来与靶分子(在主题CIR的情况下为HLA-G)结合的CIR的信号转导到免疫效应细胞的内部,以引发效应细胞功能,例如,激活、细胞因子产生、增殖和/或细胞毒性活性,包括将细胞毒性因子释放到CIR结合的靶细胞,或由与胞外CIR结构域结合的靶分子引发的其它细胞应答。因此,术语“信号传导区域”(“胞内信号传导结构域”)是指蛋白中转导效应子功能信号并指导细胞执行特定功能的部分。就使用胞内信号传导结构域的截短的部分而言,此类截短的部分可以用来代替全长胞内信号传导结构域,只要它转导效应子功能信号。术语信号传导区域意指包括足以用于转导效应子功能信号的胞内信号传导结构域的任何截短的部分。在一些情况下,信号传导区域包括被称为免疫受体酪氨酸激活基序(或“ITAM”)的信号传导基序。

[0146] 可以用于主题CIR的信号传导区域的胞内结构域序列的实例包括来源于淋巴细胞受体链的胞内信号传导结构域、TCR/CD3复合蛋白、Fc受体亚基、IL-2受体亚基、CD3 ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、CD278(ICOS)、Fc ϵ R1、DAP10和DAP12的那些。

[0147] 在一些实施方案中,主题CIR的信号传导区域包括CD3 ζ (CD3 ζ)信号传导结构域(参见,例如SEQ ID NO:33)。因此,在一些情况下,主题嵌合ILT受体(ILT2形式或ILT4形式)的ICD包括这样的信号传导区域,所述信号传导区域包括与SEQ ID NO:33具有80%或更高序列同一性(例如,85%或更高、90%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高或100%)的氨基酸序列。在一些实施方案中,信号传导区域包括与SEQ ID NO:33具有90%或更高序列同一性(例如,95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更

高、99%或更高或100%)的氨基酸序列。在一些实施方案中,信号传导区域包括与SEQ ID NO:33具有95%或更高序列同一性(例如,96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高或100%)的氨基酸序列。在一些实施方案中,信号传导区域包括如SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列。

[0148] 在一些实施方案中,主题CIR的信号传导区域包括DAP10信号传导结构域。在一些实施方案中,主题CIR的信号传导区域包括DAP12信号传导结构域。

[0149] 共刺激区域

[0150] 在一些实施方案中,主题CIR的ICD还包括共刺激区域。共刺激区域包括至少一个共刺激结构域(例如,一个、两个、三个、一个或多个、两个或更多个、或三个或更多个共刺激结构域)。共刺激结构域的实例包括但不限于:CD40、CD27、CD28、4-1BB、HVEM、TRANCE、RANK、OX40、DAP10和ICOS共刺激结构域。共刺激结构域的实例包括但不限于:4-1BB、OX40、ICOS、CD28、CD27、MyD88、IL-1R α 、HVEM、TRANCE、IL-1R β 、CD70、IL-18R α 、CD40、IL-18R β 、IL-33R α 、CD30和IL-33R β 。共刺激结构域的实例包括但不限于:4-1BB、OX40、ICOS、RANK、DAP10、DAP12、CD28、CD27、MyD88、IL-1R α 、HVEM、TRANCE、IL-1R β 、CD70、IL-18R α 、CD40、IL-18R β 、IL-33R α 、CD30和IL-33R β 。在一些情况下,共刺激区域包括一个或多个(例如,一个、两个、三个、一个或多个、或两个或更多个)共刺激结构域,所述共刺激结构域选自由以下组成的组:CD28(参见,例如SEQ ID NO:49)、4-1BB(参见,例如SEQ ID NO:35)和OX40或其任何组合。在一些情况下,使用CD28共刺激结构域。在一些情况下,使用4-1BB共刺激结构域。在一些情况下,使用CD28共刺激结构域和4-1BB共刺激结构域两者(即,它们都被使用)。在一些情况下,使用CD28共刺激结构域和OX40共刺激结构域。

[0151] 在一些情况下,共刺激区域包括与共刺激的受体介质的信号传导结构域融合的截短的MyD88多肽,诸如例如CD40、CD27、CD28、4-1BB、HVEM、TRANCE、RANK、OX40或ICOS。在一些情况下,共刺激区域包括MyD88多肽或截短的MyD88多肽和选自由CD27、ICOS、RANK、TRANCE、CD28、4-1BB、OX40和DAP10组成的组的共刺激结构域。

[0152] 在一些实施方案中,主题嵌合ILT受体(ILT2形式或ILT4形式)的ICD包括共刺激区域,所述共刺激区域包括与SEQ ID NO:49具有80%或更高序列同一性(例如,85%或更高、90%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高或100%)的氨基酸序列。在一些实施方案中,信号传导区域包括与SEQ ID NO:49具有90%或更高序列同一性(例如,95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高或100%)的氨基酸序列。在一些实施方案中,信号传导区域包括与SEQ ID NO:49具有95%或更高序列同一性(例如,96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高或100%)的氨基酸序列。在一些实施方案中,信号传导区域包括如SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列。

[0153] 在一些实施方案中,主题嵌合ILT受体(ILT2形式或ILT4形式)的ICD包括共刺激区域,所述共刺激区域包括与SEQ ID NO:35具有80%或更高序列同一性(例如,85%或更高、90%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高或100%)的氨基酸序列。在一些实施方案中,信号传导区域包括与SEQ ID NO:35具有90%或更高序列同一性(例如,95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高或100%)的氨基酸序列。在一些实施方案中,信号传导区域包括与SEQ ID NO:35具有95%或更高序列同一性(例如,96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高或100%)的氨基酸序列。在

一些实施方案中,信号传导区域包括如SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列。

[0154] 在一些实施方案中,主题嵌合ILT受体(ILT2形式或ILT4形式)的ICD包括共刺激区域,所述共刺激区域包括与SEQ ID NO:35具有80%或更高序列同一性(例如,85%或更高、90%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高或100%)的氨基酸序列以及与SEQ ID NO:49具有80%或更高序列同一性(例如,85%或更高、90%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高或100%)的氨基酸序列。在一些实施方案中,信号传导区域包括与SEQ ID NO:35具有90%或更高序列同一性(例如,95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高或100%)的氨基酸序列以及与SEQ ID NO:49具有90%或更高序列同一性(例如,95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高或100%)的氨基酸序列。在一些实施方案中,信号传导区域包括与SEQ ID NO:35具有95%或更高序列同一性(例如,96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高或100%)的氨基酸序列以及与SEQ ID NO:49具有95%或更高序列同一性(例如,96%或更高、97%或更高、98%或更高、99%或更高或100%)的氨基酸序列。在一些实施方案中,信号传导区域包括如SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列以及如SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列。

[0155] 在一些实施方案中,主题CIR的信号传导区域包括CD3 ζ (CD3 ζ)信号传导结构域,并且共刺激区域包括CD28共刺激结构域。在一些实施方案中,主题CIR的信号传导区域包括CD3 ζ (CD3 ζ)信号传导结构域,并且共刺激区域包括4-1BB共刺激结构域。在一些实施方案中,主题CIR的信号传导区域包括CD3 ζ (CD3 ζ)信号传导结构域,并且共刺激区域包括4-1BB共刺激结构域和CD28共刺激结构域。在一些实施方案中,主题CIR的信号传导区域包括CD3 ζ (CD3 ζ)信号传导结构域,并且共刺激区域包括CD28共刺激结构域和OX40共刺激结构域。

[0156] 4-1BB、CD28和OX40共刺激信号传导结构域的非限制性实例可以在U.S.20130266551、美国专利号5,686,281;Geiger,T.L.等人,《血液》98:2364-2371(2001);Hombach A.等人,《免疫学杂志》167:6123-6131(2001);Maher J.等人,《自然生物技术(Nat Biotechnol)》20:70-75(2002);Haynes N.M.等人,《免疫学杂志》169:5780-5786(2002);Haynes N.M.等人,《血液》100:3155-3163(2002);和U.S.2012/20148552中找到,所有这些文献的与共刺激结构域相关的教导通过引用并入本文。

[0157] 可用于诱导细胞激活的嵌合多肽,以及用于诱导治疗性细胞激活的相关方法,包括,例如,表达构建体、用于构建载体的方法以及用于活性或功能的测定的非限制性实例也可以在以下专利和专利申请中找到:US2014-0286987-A1;W02014/151960;US2016/0046700;W02015/123527;US2004/0209836;美国专利号7,404,950;W02004/073641;US2011/0033388;美国专利号8,691,210;W02008/049113;US2014/0087468;美国专利号9,315,559;W02010/033949;US2011/0287038;W02011/130566;US2016/0175359;W02016/036746;W02016/100241;US2017/0166877;W02017/106185;和W02018/208849—出于所有目的,包括出于与描述细胞激活结构域(例如,细胞信号传导结构域和共刺激结构域)相关的目的,这些文献中的每一篇都通过引用以其整体(包括所有文本、表格和附图)并入本文。

[0158] 示例性的CIR

[0159] 主题CIR的不同区域/结构域是模块化的,并且可以方便地混合和匹配。图6A和图10提供了主题CIR可以采取的各种形式的实例,并且在整个实施例部分中的各种测定中产

生并测试了图中描绘的那些实例。例如,图6A介绍了格式CIR1、CIR2、CIR3和CIR4,而图10介绍了格式CIR6、CIR7、CIR8、CIR9和CIR10。图10仅描绘了ILT4的这些格式,但是本领域的普通技术人员将会理解,如果需要,可以使用相同的格式来产生ILT2CIR。

[0160] 在一些情况下,主题CIR将是ILT2 CIR4或ILT4 CIR4(即,ILT2或ILT4 D1-D2靶向结构域、CD8茎和TM、CD3 ζ (CD3 ζ)信号传导结构域和4-1BB共刺激结构域(T2A- Δ -CD19区域是任选的,即,在一些情况下将不存在)。参见,例如图6A。

[0161] 在一些情况下,主题CIR将是ILT2 CIR3或ILT4 CIR3(即,ILT2或ILT4 D1-D4靶向结构域、CD8茎和TM、CD3 ζ (CD3 ζ)信号传导结构域和4-1BB共刺激结构域(T2A- Δ -CD19区域是任选的,即,在一些情况下将不存在)。参见,例如图6A。

[0162] 在一些情况下,主题CIR将是ILT2 CIR2或ILT4 CIR2(即,ILT2或ILT4 D1-D2靶向结构域、ILT2或ILT4茎和TM、CD3 ζ (CD3 ζ)信号传导结构域和4-1BB共刺激结构域(T2A- Δ -CD19区域是任选的,即,在一些情况下将不存在)。参见,例如图6A。

[0163] 在一些情况下,主题CIR将为ILT2 CIR1或ILT4 CIR1(即,ILT2或ILT4 D1-D4靶向结构域、ILT2或ILT4茎和TM、CD3 ζ (CD3 ζ)信号传导结构域和4-1BB共刺激结构域(T2A- Δ -CD19区域是任选的,即,在一些情况下将不存在)。参见,例如图6A。

[0164] CIR变型

[0165] 包括在本发明的范围中的是本文所述的本发明的CIR的功能性部分。术语“功能性部分”当用于提及CIR时是指本发明的CIR的任何部分或片段,该部分或片段保留了它是一部分的CIR(亲本CIR)的生物活性。功能性部分涵盖例如与亲本CIR在相似程度、相同程度或更高程度上保留识别靶(HLA-G)或靶细胞,或检测、治疗或预防疾病的能力的CIR的那些部分。关于亲本CIR,功能性部分可以包含例如亲本CIR的约10%、25%、30%、50%、68%、80%、90%、95%或更多。

[0166] 功能性部分可以在该部分的氨基或羧基末端或在两个末端包含另外的氨基酸,所述另外的氨基酸没有在亲本CIR的氨基酸序列中发现。期望地,另外的氨基酸不干扰生物功能,例如识别靶细胞、检测癌症、治疗或预防癌症等。更期望地,与亲本CIR的生物活性相比,另外的氨基酸增强了生物活性。

[0167] 包括在本发明范围内的是本文公开的本发明的CIR的功能性变体或生物等同物。例如,功能性变体可以包含具有至少一个保守氨基酸取代的亲本多肽的氨基酸序列。可替代地或另外地,功能性变体可以包含具有至少一个非保守氨基酸取代的亲本多肽的氨基酸序列。在这种情况下,优选非保守氨基酸取代不干扰或不抑制功能性变体的生物活性。非保守氨基酸取代可以增强功能性变体的生物活性,使得与亲本多肽相比,功能性变体的生物活性增加。

[0168] 此类生物变体(包括其功能性部分)可以包含合成氨基酸来代替一种或多种天然存在的氨基酸。

[0169] 此类生物变体(包括其功能性部分)可以经由例如二硫键被糖基化、酰胺化、羧基化、磷酸化、酯化、N-酰化、环化,或者被转化为酸加成盐和/或任选地被二聚化或聚合,或缀合。

[0170] 此类生物变体(包括其功能性部分)可以通过本领域中已知的方法获得。多肽可以通过任何合适的制备多肽或蛋白的方法制备。从头合成多肽和蛋白的合适的方法描述于参

考文献,诸如Chan等人,《Fmoc固相肽合成(Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis)》,牛津大学出版社(Oxford University Press),英国牛津(Oxford,United Kingdom),2000;《肽和蛋白药物分析(Peptide and Protein Drug Analysis)》,编辑Reid,R.,Marcel Dekker公司,2000;《表位作图(Epitope Mapping)》,编辑Westwood等人,牛津大学出版社,英国牛津,2001和美国专利号5,449,752中。此外,可以使用标准重组方法,使用本文所述的核酸重组地产生多肽和蛋白。参见,例如Sambrook等人,《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:ALaboratory Manual)》,第3版,冷泉港出版社(Cold Spring Harbor Press),纽约市冷泉港(Cold Spring Harbor,N.Y.)2001;和Ausubel等人,《分子生物学的当前协议(Current Protocols in Molecular Biology)》,格林出版联合公司和约翰·威利父子公司(Greene Publishing Associates and John Wiley&Sons),纽约,1994。

[0171] 6. 共刺激多肽

[0172] 表达主题嵌合ILT受体(CIR)的经遗传修饰的细胞可以进一步表达共刺激多肽(例如,除表达CIR以外)。共刺激多肽的表达可以是诱导型的或组成型的。

[0173] 共刺激多肽可以包含一种或多种共刺激信号传导区域,诸如CD27、ICOS、RANK、IL-18R、DAP12、HVEM、TRANCE、CD28、4-1BB、IL-1R、OX40、DAP10、IL-33R、MyD88或CD40,或例如其胞质区域。共刺激多肽可以包含一个或多个合适的共刺激信号传导区域,其激活由CD27、ICOS、RANK、IL-18R、DAP-12、HVEM、TRANCE、CD28、4-1BB、IL-1R、OX40、DAP10、IL-33R、MyD88或CD40激活的信号传导途径。共刺激多肽包括激活肿瘤坏死因子受体(TNFR)家族(即,CD40、RANK/TRANCE-R、OX40、4-1BB)和CD28家族成员(CD28、ICOS)的NF- κ B途径、MyD88途径、STAT5途径、STAT1途径、Akt途径和/或p38途径的任何分子或多肽。在经修饰的细胞中可以表达多于一种的共刺激多肽或共刺激多肽胞质区域。

[0174] 用于本发明的合适的CD28、OX40、4-1BB和ICOS序列在表4d-36中公开。

[0175] 细胞可以包括嵌合信号传导多肽,包括例如其中截短的MyD88多肽也已经与共刺激的受体介质的信号传导结构域融合的嵌合信号传导多肽,诸如例如CD40、CD27、CD28、4-1BB、OX40或ICOS。

[0176] 7. 安全开关

[0177] 表达主题嵌合ILT受体(CIR)的经遗传修饰的细胞也可以表达安全开关,也称为诱导型自杀基因或自杀开关,如果需要,例如如果GvHD发展,则安全开关可以用于在体内根除治疗性细胞。在一些实例中,治疗性细胞可能触发不利事件,诸如由于CIR导致的脱靶毒性,或者患者可能在使用经修饰的细胞的疗法期间经历负面症状,或者可能由于对健康组织的非特异性攻击而存在副作用;或者,有时,可能不再需要治疗性细胞,或者疗法旨在持续规定的时间,例如,治疗性细胞可能起到减小肿瘤细胞或肿瘤大小的作用,并且可能不再需要。因此,如果经遗传修饰的细胞也可以诱导性地表达导致细胞死亡的多肽(诸如诱导型半胱氨酸蛋白酶-9多肽),这可以是有益的。例如,如果需要减少治疗性细胞的数量,则可以触发开关。

[0178] 这些开关响应于触发物,诸如药物剂(pharmacological agent),该药物剂在需要根除治疗性细胞时提供并且导致细胞死亡(例如,通过触发坏死或凋亡)。这些药剂可以导致毒性基因产物的从头表达,但是如果经遗传修饰的细胞已经表达了响应于药剂被转变成毒性形式的蛋白,则可以获得更快速的应答。

[0179] 在一些实施方案中,安全开关基于可以通过向受试者施用触发分子(也称为配体诱导剂)而触发的促凋亡蛋白。如果促凋亡蛋白与结合至触发分子的多肽序列融合,则该触发分子的递送可以使两种促凋亡蛋白接近,使得它们触发凋亡。例如,半胱氨酸蛋白酶-9可以与经修饰的人FK结合蛋白融合,所述经修饰的人FK结合蛋白可以响应于药物剂利米多赛(AP1903)而被诱导以二聚化。使用基于人促凋亡蛋白(诸如例如半胱氨酸蛋白酶-9)的安全开关使表达该开关的细胞被人类受试者的免疫系统识别为外来物的风险最小化。因此,向受试者递送利米多赛可以触发表达半胱氨酸蛋白酶-9开关的细胞的凋亡。

[0180] 可用于诱导细胞死亡或凋亡的嵌合多肽的另外的非限制性实例可以在以下专利和专利申请中找到,出于所有目的,它们中的每一个通过引用以其整体并入本文。美国专利申请US2011/0286980;美国专利9,089,520;美国专利申请US2014/0255360;美国专利号9,434,935;W02014/16438;US2016/0151465;W02014/197638;US2015/0328292;W02015/134877;US2016/0166613;W02016/100236;US2016/0175359;W02016/100241;US2017/0166877;W02017/106185;出于所有目的,它们中的每一个通过引用以其整体(包括所有文本、表格和附图)并入本文。关于一些特定开关和方法的细节也在下面给出:

[0181] 诱导型半胱氨酸蛋白酶9(iC9):该促凋亡开关包括半胱氨酸蛋白酶-9与FKBP12或衍生物的融合体。它在不存在配体的情况下是潜伏的,但会从细胞凋亡的内在途径中驱动起始子(initiator)半胱氨酸蛋白酶,半胱氨酸蛋白酶-9的二聚化。二聚化导致半胱氨酸蛋白酶-9激活、效应半胱氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶-3的切割和激活以及通过凋亡的快速细胞死亡。诱导型半胱氨酸蛋白酶-9在细胞疗法中作为阻断毒性应答的安全开关具有特殊用途。

[0182] 半胱氨酸蛋白酶-9开关:实例描述于Di Stasi等人(2011)(同上)中;还参见Yagyu等人(2015)《分子疗法(Mol Ther)》23(9):1475-85;Rossiglioni等人(2018)《癌症基因疗法(Cancer Gene Ther)》doi.org/10.1038/s41417-018-0034-1;Jones等人(2014)《药理学前沿(Front Pharmacol)》doi.org/10.3389/fphar.2014.00254;美国专利9,434,935;美国专利9,913,882;美国专利9,393,292;以及专利申请US2015/0328292。

[0183] 安全开关可以包含具有修饰的活性的经修饰的半胱氨酸蛋白酶-9多肽,诸如例如,在不存在同型二聚体配体的情况下降低的基础活性。经修饰的半胱氨酸蛋白酶-9多肽在例如美国专利9,913,882和US2015/0328292(同上)中讨论,并且可以包括例如在位置330处的氨基酸取代(例如D330E或D330A)或例如在位置450处的氨基酸取代(例如N405Q)或其组合,包括例如D330E-N405Q和D330A-N405Q。具有较低基础活性的半胱氨酸蛋白酶-9多肽先前已经例如在美国专利号9,434,935、9,932,572和9,913,882以及美国专利申请号62/668,223、62/756,442、62/816,799、15/901,556、15/888,948中描述。

[0184] 在一些实施方案中,安全开关可以是,例如,Di Stasi等人(2011)(同上)中讨论的iCasp9,其由具有F36V突变的人FK506结合蛋白(FKBP12)(基因库AH002 818)的序列组成,通过SGGS接头连接至缺乏其内源性半胱氨酸蛋白酶激活和募集结构域的经修饰的人半胱氨酸蛋白酶9(CASP9)。F36V突变增加了FKBP12对合成同型二聚体AP20187和利米多赛的结合亲和力。

[0185] 利米多赛对FKBP12等位基因的特异性结合:利米多赛以高亲和力(~0.1nM)结合至FKBP12的缬氨酸36等位基因,但以低亲和力(~500nM)结合至野生型苯丙氨酸36FKBP12

等位基因。雷帕霉素和雷帕霉素类似物 (rapalogs) 可以结合至任一FKBP等位基因。利米多赛具有两个相同的、尾对尾排列的蛋白结合表面,每个蛋白结合表面对缬氨酸36形式(不同地称为FKBP12 (F36V)、FKBP12v36、FKBPV、F_{v36}或简称为F_v) 具有高亲和力和特异性。参见Jemal等人,《临床医师癌症杂志 (CACancer J.Clinic.)》58,71-96 (2008);Scher和Kelly《临床肿瘤学杂志 (Journal of Clinical Oncology)》11,1566-72 (1993))。该蛋白的两个串联拷贝也可以用于构建体中,以便在由利米多赛交联时诱导更高阶的寡聚体。一个或多个F_v结构域附着到一个或多个通常依赖于同源二聚化的细胞信号传导分子上可以将该蛋白转化为利米多赛控制的开关。也可以使用FKBP12变体。变体可以结合至雷帕霉素或雷帕霉素类似物,但与例如FKBP12v36相比,以更低的亲和力结合至利米多赛。FKBP12变体的实例包括来自许多物种(包括例如酵母)的那些。在一个实施方案中,FKBP12变体为FKBP12.6(钙通道稳定蛋白(calstabin))。

[0186] 自杀开关可以由包含触发分子(诸如二聚化或多聚化配体)的药物组合物控制。包含触发分子的药物组合物的有效量是达到杀伤经遗传修饰的细胞的期望结果的量。杀伤的程度可以是高的(例如,超过60%、70%、80%、85%、90%、95%或97%)或完全的;相反,有时仅部分去除将是期望的(例如,杀伤80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%或10%以下的经遗传修饰的细胞)。因此,遗传修饰可能显示出对触发分子的一系列敏感性。因此,触发分子可以用于仅根除一部分细胞(例如,至少10%),同时允许一些细胞(例如,至少10%)存活。可以根据细胞死亡和存活的所需平衡来选择触发分子的浓度,例如,如果需要更高比例的细胞根除(或完全根除),则更高的浓度将被递送。

[0187] 这些浓度可以通过简单的剂量范围实验来确定,监测响应于触发分子的细胞死亡水平。可以使用任何合适的测定来确定被杀伤的经遗传修饰的细胞的百分比。测定可以包括以下步骤:在施用触发分子之前从受试者获得第一样品,并在施用触发分子之后从受试者获得第二样品,以及比较第一样品和第二样品中治疗性细胞的数量或浓度,以确定被杀伤的治疗性细胞的百分比。人们可以凭经验确定本文呈现的特定组合物的有效量,而无需过度的实验。

[0188] 细胞可以包括嵌合信号传导多肽,包括例如其中截短的MyD88多肽也已经与共刺激的受体介质的信号传导结构域融合的嵌合信号传导多肽,诸如例如,CD40、CD27、CD28、4-1BB、HVEM、TRANCE、RANK、OX40或ICOS。

[0189] 在一些实施方案中,嵌合信号传导多肽包含来自两种共刺激多肽的胞质信号传导区域(诸如例如,4-1BB和CD28),或一种、或两种或更多种选自由CD27、ICOS、RANK、TRANCE、CD28、4-1BB、OX40、DAP10组成的组的共刺激多肽胞质信号传导区域。在一些实施方案中,嵌合信号传导多肽包含MyD88多肽或截短的MyD88多肽以及选自由CD27、ICOS、RANK、TRANCE、CD28、4-1BB、OX40和DAP10组成的组的共刺激多肽胞质信号传导区域。

[0190] 如上所述,可用于诱导细胞激活的嵌合多肽,以及用于诱导治疗性细胞激活(包括例如表达构建体)的相关方法、用于构建载体的方法和用于活性或功能的测定的非限制性实例,也可以在以下专利和专利申请中找到,出于所有目的,它们中的每一个通过引用以其整体并入本文:US2014-0286987-A1;W02014/151960;US2016/0046700;W02015/123527;US2004/0209836;美国专利号7,404,950;W02004/073641;US2011/0033388;美国专利号8,691,210;W02008/049113;US2014/0087468;美国专利号9,315,559;W02010/033949;

US2011/0287038;W02011/130566;US2016/0175359;W02016/036746;W02016/100241;US2017/0166877;W02017/106185;和W02018/208849—出于所有目的,它们中的每一个通过引用以其整体(包括所有文本、表格和附图)并入本文。

[0191] 在一些实施方案中,细胞被设计为提供组成型活性疗法。在一些实施方案中,经遗传修饰的细胞包含核酸,所述核酸包含编码嵌合ILT2或ILT4受体(或CIR)的第一多核苷酸,和编码嵌合信号传导多肽的第二多核苷酸。在一些实施方案中,第二多核苷酸位于第一多核苷酸的5'。在一些实施方案中,第二多核苷酸位于第一多核苷酸的3'。在一些实施方案中,编码接头多肽的第三多核苷酸位于第一多核苷酸和第二多核苷酸之间。在第三多核苷酸位于第一多核苷酸的3'和第二多核苷酸的5'时,接头多肽可以在翻译后保持完整,或者可以在翻译期间或在翻译之后将由第一多核苷酸和第二多核苷酸编码的多肽分开。在一些实施方案中,接头多肽是2A多肽(参见本文别处),其可以在翻译期间或在翻译之后将由第一多核苷酸和第二多核苷酸编码的多肽分开。高水平的共刺激通过一种替代的机制组成性地提供,在所述替代的机制中,使用渗漏的2A共翻译序列(参见本文别处)从嵌合信号传导多肽中分离CIR。在2A分离不完全的情况下,例如从渗漏的2A序列中,大多数表达的嵌合信号传导多肽分子与嵌合抗原受体多肽分离,并且可能保留在胞质中,而嵌合信号传导多肽分子的一些部分保持附着或连接到CIR。

[0192] “组成型活性”意指嵌合刺激多肽的细胞激活活性即使在不存在诱导物的情况下也是活性的。产生组成型活性信号传导的一种方法是经由跨膜结构域或脂质靶向部分将激活蛋白因子栓系到质膜上。

[0193] 免疫细胞疗法也可以被设计为提供组成型活性疗法,诸如组成型活性T细胞或NK细胞,但提供诱导型安全开关,以在需要时停止治疗或降低疗法的水平(参见上文)。在一些实施方案中,免疫细胞,诸如CIR-T细胞或CIR-NK细胞,表达嵌合抗原受体和嵌合信号传导多肽。

[0194] 8. 接头多肽

[0195] 在期望在单个基因中编码两种多肽,使得它们在单个转录物上编码的情况下,这两种多肽可以通过接头多肽连接。例如,这些可能包含在MyD88-CD40嵌合多肽中的MyD88和CD40之间,或共刺激多肽胞质信号传导区域和CAR或CIR的CD3 ζ 部分之间。如果需要,接头可以位于本文所述的任何区域/结构域之间。例如,在一些情况下,接头位于:TM结构域和信号传导区域或共刺激区域之间,ILT2或ILT4靶向区域(例如,D1-D2结构域)和茎之间,信号传导区域和共刺激区域之间,两个共刺激结构域之间,共刺激或信号传导区域和T2A序列之间,或其任何组合。

[0196] 接头多肽包括可切割的接头多肽和不可切割的接头多肽。接头的实例包括但不限于:SGR、GS、VD和PRGSG(SEQ ID NO:67)。另外的接头将是本领域普通技术人员已知的,并且可以使用任何方便的接头。

[0197] 接头多肽包括例如由约2至约30个氨基酸组成的那些,例如弗林蛋白酶切割位点,(GGGS)_n。在一些实施方案中,接头多肽由约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸组成。在一些实施方案中,接头多肽由约18至22个氨基酸组成。在一些实施方案中,接头多肽由20个氨基酸组成。

[0198] 可切割的接头包括在经修饰的细胞中被酶切割的接头。酶对细胞可以是外源性

的,例如,与编码接头的多核苷酸同时或在不同时间由通过转染或转导被引入到细胞中的多核苷酸编码的酶。在一些实施方案中,可切割的接头包括由对群体中经修饰的细胞内源性的酶切割的接头,包括例如在细胞中天然表达的酶,和由对细胞天然的多核苷酸编码的酶,诸如例如溶菌酶。术语“可切割的接头”也扩展到通过任何手段(包括例如非酶促手段,诸如肽跳跃)切割的接头。

[0199] 可切割的接头的优点是,它允许两种多肽的表达式的基本上固定的化学计量比率(如果两种成熟多肽通过单个可切割的接头连接,则1:1比率)。

[0200] 接头多肽可以是2A样序列,其可以来源于许多不同的病毒,包括,例如,来源于明脉扁刺蛾(*Thosea asigna*)昆虫病毒。这些序列有时也被称为“肽跳跃序列”。当这种类型的序列被放置在顺反子中,在两个旨在被分离的多肽之间时,在明脉扁刺蛾序列的情况下,核糖体似乎跳过了肽键;省略了羧基末端“P-G-P”处Gly和Pro氨基酸之间的键。这可能留下两到三种多肽,例如,诱导型嵌合促凋亡多肽和嵌合抗原受体,或者,例如,标志物多肽和诱导型嵌合促凋亡多肽。当使用该序列时,编码2A序列的5'的多肽可能在羧基末端以另外的氨基酸结束,包括Gly残基和2A序列中的任何上游残基。编码2A序列的3'的肽可能在氨基末端以另外的氨基酸结束,包括Pro残基和2A序列之后的任何下游残基。

[0201] 在一些实施方案中,可切割的接头是来源于猪捷申病毒-1的2A多肽(P2A)。在一些实施方案中,2A共翻译序列为2A样序列。在一些实施方案中,2A共翻译序列为T2A(明脉扁刺蛾病毒2A)、F2A(口蹄疫病毒2A)、P2A(猪捷申病毒-1 2A)、BmCPV 2A(胞质多角体病毒2A)、BmIFV 2A(家蚕软化病病毒2A)或E2A(马鼻炎A病毒2A)。在一些实施方案中,2A共翻译序列为T2A-GSG、F2A-GSG、P2A-GSG或E2A-GSG。在一些实施方案中,2A共翻译序列选自由T2A、P2A和F2A组成的组。在一个特定实施方案中,2TA包含本文公开的序列(或由本文公开的序列组成)。包括本文公开的序列(例如,在以下实例中公开的序列)(由本文公开的序列(例如,在以下实例中公开的序列)组成)。

[0202] 2A样序列有时是“渗漏的”,因为一些多肽在翻译期间没有分离,而是在翻译后保持为一条长多肽。关于渗漏的接头的原因的一种理论是,短2A序列偶尔可能不折叠成促进核糖体跳跃的所需结构(“2A折叠”)。在这些情况下,核糖体可能不会错过脯氨酸肽键,从而产生融合蛋白。为了降低渗漏的水平,从而减少形成的融合蛋白的数量,可以向2A多肽的氨基末端侧添加GSG(或类似的)接头;GSG接头阻断新翻译的多肽的二级结构自发折叠并破坏“2A折叠”。例如,可以使用渗漏的2A序列,使得相同的编码多肽有时可以被引导至细胞表面,但其它时间保留在胞质溶胶中。

[0203] 在某些实施方案中,2A接头包括SEQ ID NO:11的氨基酸序列。在某些实施方案中,2A接头进一步包括在多肽的氨基末端处的GSG氨基酸序列,在其它实施方案中,2A接头包括在多肽的氨基末端处的GSGPR(SEQ ID NO:68)氨基酸序列。因此,对于“2A”序列,该术语可以指本文所述的实例中的2A序列,或者也可以指如本文所列出的2A序列,其在接头的氨基末端进一步包含GSG或GSGPR(SEQ ID NO:68)序列。

[0204] 在一些实施方案中,接头(例如,2A接头)在约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%的翻译的多肽中被切割。

[0205] 用于本发明的合适的接头多肽(包括T2A接头)在表4-42中公开(包括“flex”接头多肽序列)。

[0206] 9.膜靶向序列

[0207] 膜靶向序列提供了嵌合蛋白向细胞表面膜的转运。与细胞膜缔合的分子包含某些促进膜缔合的区域,并且此类区域可以被整合到嵌合蛋白分子中以产生膜靶向的分子。在一些实施方案中,CIR可以通过ILT2或ILT4的天然信号肽,通过进入内质网的腔中的信号依赖性翻译而被转运至细胞表面。在其它实施方案中,这种天然信号肽可以被其它分泌蛋白的信号肽替代。在这些实施方案中,信号肽可以来源于GM-CSF或免疫球蛋白轻链,但不限于来源于这些蛋白。

[0208] 例如,一些蛋白在N末端或C末端包含被酰化的序列,并且这些酰基部分促进膜缔合。此类序列被酰基转移酶识别,并且通常符合特定的序列基序。某些酰化基序能够被单个酰基部分修饰(通常后面是若干个带正电荷的残基(例如,人c-Src:MGSNKSFKPKDASQRRR,SEQ ID NO:69)以改善与阴离子脂质首基团的缔合),并且其它酰化基序能够被多个酰基部分修饰。例如,蛋白酪氨酸激酶Src的N末端序列可以包含单个肉豆蔻酰基部分。双重酰化区域位于某些蛋白激酶的N末端区域中,诸如Src家族成员的亚型(例如,Yes、Fyn、Lck)和G蛋白 α 亚基。此类双重酰化区域通常位于此类蛋白的前18个氨基酸内,并且符合序列基序Met-Gly-Cys-Xaa-Cys,其中Met被切割,Gly被N-酰化,并且Cys残基之一被S-酰化。Gly通常被肉豆蔻酰化,并且Cys可以被棕榈酰化。也可以利用符合序列基序Cys-Ala-Ala-Xaa(所谓的“CAAX盒”)的酰化区域,其可以用C15或C10异戊二烯基部分从G蛋白 γ 亚基和其它蛋白的C末端进行修饰(例如,<https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/InterPro/IPR031771/>或<https://prosite.expasy.org/PS00294>)。这些和其它酰化基序包括,例如,在Gauthier-Campbell等人,《细胞的分子生物学(Molecular Biology of the Cell)》15:2205-2217(2004);Glabati等人,《生物化学杂志(Biochem.J.)》303:697-700(1994)和Zlakine等人,《细胞科学杂志(J.Cell Science)》110:673-679(1997)中讨论的那些;并且可以并入嵌合分子中以诱导膜定位。

[0209] 在一些实施方案中,膜靶向区域包含肉豆蔻酰化区域。在一些实施方案中,膜靶向区域选自由肉豆蔻酰化靶向序列、棕榈酰化靶向序列、异戊二烯化序列(即,法尼基化、香叶基-香叶基化、CAAX盒)、蛋白-蛋白相互作用基序或来自受体的跨膜序列(利用信号肽)组成的组。实例包括在例如ten Klooster等人,《细胞生物学(Biology of the Cell)》(2007) 99,1-12,或Vincent等人,《自然生物技术(Nature Biotechnology)》21:936-40,1098(2003)中讨论的那些。

[0210] 在多肽不包括膜靶向区域或缺乏膜靶向区域的情况下,诸如本文提供的某些嵌合多肽,该多肽不包括提供嵌合蛋白向细胞膜转运的区域。多肽可以例如不包括将多肽转运至细胞表面膜的序列,或者多肽可以例如包括不将多肽转运至细胞表面膜的功能障碍的膜靶向区域,例如包括破坏肉豆蔻酰化靶向区域的功能的脯氨酸的肉豆蔻酰化区域。(参见,例如Resh,M.D.,《生物化学和生物物理学报(Biochim.Biophys.Acta.)》1451:1-16(1999))。不转运至膜的多肽被认为是胞质多肽。

[0211] 用于本发明的合适的肉豆蔻酰化序列在表4-42中公开。

[0212] 10.经遗传修饰的细胞

[0213] 经遗传修饰的细胞(细胞,诸如表达,例如,包括编码主题嵌合ILT受体的核酸的免疫细胞)可以是可用于细胞疗法的任何细胞,例如免疫细胞。细胞可以是例如T细胞、自然杀

伤(NK)细胞、B细胞、巨噬细胞、外周血细胞、造血祖细胞或骨髓细胞。在优选的实施方案中,经修饰的细胞是T细胞、自然杀伤细胞或自然杀伤T细胞。

[0214] 如本文所公开被遗传修饰的细胞(细胞,诸如表达,例如,包括编码主题嵌合ILT受体的核酸的免疫细胞)可用于向受试者施用,所述受试者可以受益于接受它们,例如,可以受益于供体淋巴细胞施用。这些受试者通常将是人类,因此本发明通常将使用人类细胞进行。

[0215] 细胞的来源

[0216] 待遗传修饰的细胞可以是自体的、同基因的或同种异体的。同种异体细胞可以来源于任何健康的供体,并且同基因细胞可以来源于任何与预期受体适当相关的健康供体。供体通常将是成人(至少18岁),但是儿童也适合作为细胞供体(例如,参见Styczynski2018,《输血与单采学(Transfus Apher Sci)》57(3):323-330)。

[0217] 术语“自体的”意指来源于同一个体的细胞,随后它被施用于该个体。术语“同种异体的”是指在宿主细胞和供体细胞之间抗原性不同的HLA或MHC基因座。因此,来自同一物种的细胞可以是抗原性不同的。术语“同基因的”是指具有足以允许组织移植的相同或密切相关的基因型的细胞,或者是免疫学相容的细胞。例如,同卵双胞胎或近亲可能是同基因的。

[0218] 细胞可以是血细胞。例如,细胞的来源可以是例如脐带血、骨髓或外周血,并且它们可以是外周血单核细胞(PBMC)。这些包括淋巴细胞(例如,T细胞、B细胞、NK细胞)或单核细胞。如本文所用的术语“外周血”是指血液的细胞组分(例如,红细胞、白细胞和血小板),其从血液循环池中获得或制备,并且没有被隐藏在淋巴系统、脾、肝或骨髓中。脐带血不同于外周血和被隐藏在淋巴系统、脾、肝或骨髓中的血液,并且它是指在婴儿出生之后保留在胎盘和附着的脐带中的血液。脐带血通常含有干细胞,包括造血细胞。

[0219] 在Di Stasi等人(2011)《新英格兰医学杂志(N Engl J Med)》365:1673-83所附的公布方案(“方案”)中描述了用于从人类获得T细胞的合适的工艺。一般来说,获得T细胞,使其经受遗传修饰和选择,然后可以施用于受体受试者。T细胞的有用来源是人的外周血。外周血液样品通常将经受白细胞去除术,以提供富含白细胞的样品。这种富集的样品(也称为leukopak)可以由多种血细胞组成,包括单核细胞、淋巴细胞、血小板、血浆和红细胞。与静脉穿刺或血沉棕黄层产品相比,leukopak通常含有更高浓度的细胞。

[0220] 尽管样品可以经受同种异体耗竭(allodepletion)(如在方案中所讨论的),但优选的是样品不经受同种异体耗竭。因此,优选的样品是同种异体的(alloplete),如在Zhou等人(2015)《血液》125:4103-13中所讨论的。这些群体可以为治疗目的提供更稳健的T细胞库。因此,本发明的优选的组合物没有T细胞同种异体耗竭,并且没有经受同种异体耗竭的步骤。

[0221] 在被遗传修饰之前,通常培养T细胞(通常在激活条件下,例如使用抗CD3和/或抗CD28抗体,任选地与IL-2一起)。该步骤在修饰过程结束时提供更高的T细胞产量。

[0222] 在Cho和Campana(2009)《韩国实验室医学杂志(Korean J Lab Med)》29:89-96, Somanchi等人(2011)《可视化实验杂志(J Vis Exp)》48:2540和Wang等人(2020)《血液进展(Blood Adv.)》4:1950中描述了用于从人类获得和扩增NK细胞的工艺。

[0223] CD4+T细胞和CD8+T细胞

[0224] 主题组合物可以包括CD4+T细胞和CD8+T细胞。尽管leukopak中CD4+细胞与CD8+细

胞的比率通常高于2,但是在一些实施方案中,本发明的组合中经遗传修饰的CD4+细胞与经遗传修饰的CD8+细胞的比率小于2,例如小于1.5。理想地,在组合中存在的经遗传修饰的CD8+T细胞比经遗传修饰的CD4+T细胞多,即比率小于1,例如小于0.9,小于0.8,小于0.7,小于0.6,或优选地甚至小于0.5。因此,从供体细胞开始并产生经遗传修饰的T细胞的整个程序理想地相对于CD4+T细胞富集了CD8+细胞T细胞。优选地,至少60%的经遗传修饰的T细胞为CD8+T细胞,并且更优选地至少65%。在经遗传修饰的CD3+T细胞的群体中,CD8+T细胞的优选的范围在55%-75%之间,例如63%-73%。CD8+和CD4+T细胞的比例可以通过流式细胞术容易地评估,并且用于对CD4+和CD8+T细胞进行分选和计数的方法是本领域中常规的。

[0225] 记忆T细胞亚群(参见Mahnke等人(2013)《欧洲免疫学杂志(Eur J Immunol)》43:2797-809)

[0226] 经遗传修饰的T细胞的群体可以包括末端效应记忆T细胞(定义为CD45RA+CD45RO-CCR7-细胞;“TEMRA”)、T效应记忆细胞(定义为CD45RA-CD45RO+CCR7-细胞;“EM”)、T中枢记忆细胞(定义为CD45RA-CD45RO+CCR7+细胞;“CM”)和初始T细胞(定义为CD45RA+CD45RO-CCR7+细胞)。这些细胞可以使用CD45RA/RO和CCR7标志物通过流式细胞术来评估。识别CCR7并且可以区分CD45RA和CD45RO同种型的标记的试剂从商业供应商容易地获得。

[0227] 平均leukopak通常包含约20%的末端效应记忆细胞和T效应记忆细胞中的每一种。从供体细胞到经遗传修饰的T细胞的整个程序可以相对于T效应记忆细胞富集末端效应记忆T细胞。

[0228] 在一些实施方案中,少于60%的经遗传修饰的T细胞为初始T细胞,例如少于58%,优选地少于55%,并且更优选地少于50%。在经遗传修饰的CD3+T细胞的群体中,初始T细胞的优选的范围在30%-60%之间,更优选地42%-49%,并且最优选地43%-46%。这一比例的初始T细胞被认为与T细胞受体中的良好结果相关。初始EM细胞可以使用CD45RA/RO和CCR7标志物通过流式细胞术来评估。

[0229] 在经遗传修饰的T细胞的群体中,除了TEMRA、EM和初始T细胞之外,T中枢记忆细胞的比例通常<10%。

[0230] 在一些实施方案中,组合中经遗传修饰的T细胞的群体包含约10%至约40%的CD4+T细胞和约60%至约90%的CD8+T细胞。经遗传修饰的CD3+T细胞的群体可以包含约15%至约40%的CD4+T细胞和约60%至约85%的CD8+T细胞,更优选地约20%至约40%的CD4+T细胞和约60%至约80%的CD8+T细胞。

[0231] NK细胞

[0232] NK细胞,也称为自然杀伤细胞或大颗粒淋巴细胞(LGL),是对先天免疫系统至关重要的细胞毒性淋巴细胞。NK细胞的作用类似于细胞毒性T细胞在脊椎动物适应性免疫应答中的作用。NK细胞对病毒感染的细胞提供快速应答,并且对肿瘤形成做出应答。

[0233] T细胞依赖于靶细胞上的T细胞受体(TCR)和MHC-肽复合物之间的引发相互作用,作为T细胞激活中必要的第一步。因此,T细胞可以识别单一抗原,并且肿瘤细胞可以通过显著减少抗原呈递的突变来避免T细胞识别。相比之下,NK细胞能够识别大量转化和感染的细胞,而不依赖于单一抗原的呈递。因此,用NK细胞治疗可以绕过对基于T细胞的疗法的一些抗性机制。

[0234] 作为先天细胞,NK细胞可以分泌促炎性趋化因子和细胞因子,以募集和激活由T细

胞和B细胞组成的机体适应性免疫系统,产生第二波持久的抗肿瘤应答。此外,NK细胞与CAR-T细胞疗法相关的某些毒性(诸如细胞因子释放综合征和中枢神经系统毒性)无关。

[0235] 由于其先天细胞毒性机制,NK细胞可用作基于抗原或受体的定向细胞疗法的来源。NK细胞构成典型供体的外周血中淋巴细胞的约10%-15%并且可以被容易地纯化、扩增和病毒转导。在肿瘤内细胞上的定向细胞疗法(例如,HLA-G)的靶标丧失的情况下,激活的NK细胞具有替代的先天机制以定向细胞毒性功能,包括NKG2D、p46、p44、p30、DNAM和CD16。

[0236] 细胞的遗传修饰

[0237] 通过将表达构建体(编码主题嵌合ILT受体)转移到细胞中来对细胞进行遗传修饰。此类转移可以采用基因转移的病毒方法或非病毒方法。本节提供了对基因转移的方法和组合物的讨论。

[0238] 可以通过各种手段将表达载体引入到细胞中。术语“转染”和“转导”是可互换的,并且是指将外源核酸序列引入到真核宿主细胞中的过程。转染(或转导)可以通过许多手段中的任何一种手段来实现,包括电穿孔、显微注射、基因枪递送、逆转录病毒感染、脂质转染、超级转染等。

[0239] 可以使用任何合适的方法来转染或转化细胞(例如,T细胞或NK细胞)。本文给出了某些非限制性实例。在一些实施方案中,病毒载体是基于SFG的病毒载体,如在Tey等人(2007)《血液和骨髓移植生物学(Biol Blood Marrow Transpl)》13:913-24和Di Stasi等人,(2011)《新英格兰医学杂志》365:1673-83中所讨论的。

[0240] 可以使用编码本文所述的多肽的病毒载体来转导细胞。合适的转导技术可以涉及纤连蛋白片段CH-296。作为使用病毒载体转导的替代方案,可以用本领域中已知的任何合适的方法来转染细胞,诸如用编码相关多肽的DNA,例如使用磷酸钙、阳离子聚合物(诸如PEI)、磁珠、电穿孔和市售的基于脂质的试剂诸如Lipofectamine™和Fugene™。转导/转染步骤的一个结果是,各种供体细胞现在将是表达CIR和任何其它所需多肽的经遗传修饰的细胞。

[0241] 在一些实施方案中,用于转导的病毒载体是由Tey等人(2007)《血液和骨髓移植生物学》13:913-24和Di Stasi等人(2011)(同上)所公开的逆转录病毒载体。该载体基于长臂猿白血病病毒(Gal V)假型逆转录病毒,其编码iCasp9自杀开关和 Δ CD19细胞表面转基因标志物(进一步参见下文)。它可以在PG13包装细胞系中产生,如Tey等人(2007)(同上)所讨论的。也可以使用编码所需蛋白的其它病毒载体。在一些实施方案中,可以为每个细胞提供高拷贝数的前病毒整合体(proviral integrants)的逆转录病毒载体被用于转导。

[0242] 在转导/转染之后,可以从转导/转染材料中分离细胞并且再次培养,以允许经遗传修饰的细胞扩增。可以扩增细胞,以便获得所需最小数量的经遗传修饰的细胞。

[0243] 经遗传修饰的细胞然后可以从已经获得的细胞的群体中选择。CIR可能不适于所需细胞的阳性选择,因此一些实施方案中,经遗传修饰的细胞应当表达感兴趣的细胞表面转基因标志物(参见下文)。表达这种表面标志物的细胞可以例如使用免疫磁性技术进行选择。例如,可以使用与识别感兴趣的细胞表面转基因标志物的单克隆抗体缀合的顺磁珠,例如,使用CliniMACS系统(可从Miltenyi Biotec获得)。

[0244] 在替代的程序中,在转导步骤之后选择经遗传修饰的细胞,培养,然后饲养。因此,转导、饲养和选择的顺序可以改变。

[0245] 这些程序的结果是包含细胞的组合物,所述细胞已经被遗传修饰,因此可以表达嵌合ILT受体(和任何其它所需多肽,例如共刺激多肽、自杀开关、细胞表面转基因标志物等)。这些经遗传修饰的细胞可以被施用于受体,但是在被施用之前,它们可能首先被保存(例如,冷冻保存),任选地在进一步扩增之后。

[0246] 选择性标志物

[0247] 细胞可以被修饰以表达多肽,多肽的表达可以在体外或体内鉴定,从而允许选择经遗传修饰的细胞,例如以将它们与未经修饰的细胞分离。此类标志物赋予细胞可识别的变化,允许容易地鉴定包含所需表达构建体的细胞。

[0248] 包含药物选择标志物有助于克隆和转化体的选择。例如,赋予对新霉素、嘌呤霉素、潮霉素、DHFR、GPT、博来霉素和组氨醇抗性的基因是有用的选择性标志物。可替代地,使用酶诸如单纯疱疹病毒胸苷激酶(tk)。

[0249] 也可以使用包含胞外非信号传导结构域或各种蛋白(例如,CD34、CD19、LNGFR)的免疫表面标志物,从而允许用于磁性或荧光抗体介导的分选的直接方法。这些标志物可以例如使用与蛋白结合的标记的抗体来检测。

[0250] 所使用的选择性标志物据信并不重要,只要它能够与编码所需基因产物(例如主题CIR)的核酸同时表达。此外,理想地,标志物应当是未由初始(供体)细胞表达的多肽,尽管在标志物确实对初始细胞是内源性的情况下可以使用表达水平的差异。

[0251] 理想地,标志物基于人类蛋白,因为这使表达标志物的细胞被人类受试者的免疫系统识别为外来物的风险最小化(例如,在它们被治疗性施用之后)。例如,在T细胞是期望的细胞类型的情况下,未被T细胞天然表达的人CD蛋白可以用于此目的。

[0252] 本文提供的经遗传修饰的细胞可以表达细胞表面转基因标志物,所述细胞表面转基因标志物存在于表达主题CIR的表达载体上,和/或在一些实施方案中,存在于编码除CIR以外的蛋白的表达载体上,诸如例如CAR、促凋亡多肽安全开关或共刺激多肽。

[0253] 在一个实施方案中,细胞表面转基因标志物是截短的CD19(Δ CD19)多肽(Di Stasi等人(2011)(同上)),其包含在氨基酸333处截短的人CD19,以去除大部分胞质内结构域(参见,例如SEQ ID No.12(核苷酸)和13(蛋白))。胞外CD19结构域仍然可以被识别(例如,在流式细胞术、FACS或MACS中),但是触发胞内信号传导的潜力被最小化。CD19通常由B细胞表达,而不是由T细胞或NK细胞表达,因此CD19+细胞的选择允许经遗传修饰的细胞(例如,T细胞、NK细胞或NKT细胞)与未经修饰的细胞分离。

[0254] 另一种有用的标志物是CD34,其具有可用作标志物的16个氨基酸的最小表位(SEQ ID NO 41)。

[0255] 通过在编码基因的5'端处编码所需蛋白,并且在3'端处编码标志物,选择不具有所需多肽(例如,由于翻译过早终止)的细胞的风险被最小化。以这种方式,标志物和所需多肽的表达平行运行。

[0256] 用于本发明的合适的CD34标志物序列在表4-42中公开。

[0257] 11. 工程化表达构建体

[0258] 提供了包括编码主题嵌合ILT受体(CIR)的核苷酸序列的核酸。在一些情况下,此类核酸是表达构建体。本文提供了用于表达嵌合ILT受体(以及任选地,其它所需多肽,诸如嵌合抗原受体、信号传导多肽、安全开关等)的表达构建体。在一些实例中,一种或多种多肽

被称为“可操作地连接”到启动子,这表明启动子序列功能性地连接到第二序列,其中启动子序列相对于该第二序列处于正确的位置和取向,以控制RNA聚合酶的起始和对应于第二序列的DNA的转录,由此所得到的转录物编码感兴趣的多肽。

[0259] “启动子”是启动基因的特异性转录所需的由细胞的合成机制或引入的合成机制识别的DNA序列。在一些实施方案中,启动子是发育调节的启动子,即充当RNA聚合酶转录基因的初始结合位点的启动子,所述基因在由发育程序或途径控制、启动或影响的某些条件下表达。

[0260] 术语“表达构建体”是包含编码基因产物的核酸的任何类型的遗传构建体,其中部分或全部核酸编码序列能够被转录。转录物可以被翻译成蛋白,但它不是必须的。在某些实施方案中,表达包括基因的转录和mRNA翻译成基因产物两者。在其它实施方案中,表达仅包括编码感兴趣的基因的核酸的转录。表达载体可以包含多种控制序列,控制序列是指在特定宿主生物体中转录和可能翻译可操作地连接的编码序列所必需的核酸序列。

[0261] “载体”能够将核酸序列转移到靶细胞(例如,病毒载体、非病毒载体、颗粒载剂和脂质体)。通常,“载体构建体”、“表达载体”、“表达构建体”和“基因转移载体”意指能够指导感兴趣的核酸的表达并且可以将核酸序列转移到靶细胞的任何核酸构建体。因此,该术语包括克隆和表达载体,以及病毒载体。

[0262] 在某些实例中,编码CIR的多核苷酸与编码第二多肽的多核苷酸包含在同一载体(诸如例如病毒或质粒载体)中。该第二多肽可以是,例如(并且如本文别处所述),内源蛋白的下调子、抑制性受体的封闭抗体或scFv、信号传导多肽、诱导型自杀开关或标志物多肽。在其它实例中,添加的表达的转录产物可能不编码蛋白,而是产生短发夹RNA产物,所述短发夹RNA产物被设计为去除在细胞产物中编码不需要的蛋白的某些内源RNA的表达。

[0263] 构建体可以被设计为具有一个启动子,所述启动子可操作地连接到包含编码多肽的融合蛋白的多核苷酸的核酸,由接头多肽(例如,可切割的接头多肽,诸如2A多肽)连接。在该实例中,第一多肽和第二多肽在单个翻译事件期间产生,但是它们可以随后被分离。在其它实例中,两种多肽可以从同一载体中分别表达,其中包含编码多肽之一的多核苷酸的每种核酸可操作地连接到单独的启动子。在又其它实例中,一个启动子可以可操作地连接到两种多核苷酸,指导两种单独的RNA转录物以及因此两种多肽的产生;在一个实例中,启动子可以是双向的,并且编码区域可以在相反的方向5' -3'。因此,本文讨论的表达构建体可以包含至少一个或至少两个启动子。

[0264] 在又其它实例中,可以使用两种单独的载体在细胞中表达两种多肽(诸如例如,CIR和标志物蛋白)。可以用载体共转染或共转化细胞,或者可以在不同时间将载体引入到细胞中。

[0265] 可以使用这些方法的任何组合,以便在经遗传修饰的细胞中实现所需多肽的表达。

[0266] 在一些实施方案中,核酸构建体包含在病毒载体内。在某些实施方案中,病毒载体是逆转录病毒载体。在某些实施方案中,病毒载体是腺病毒载体或慢病毒载体。应当理解,在一些实施方案中,细胞与病毒载体离体接触,并且在一些实施方案中,细胞在体内与病毒载体接触。因此,可以将表达构建体插入到载体(例如,病毒载体或质粒)中。所提供的方法的步骤可以使用任何合适的方法来执行;这些方法包括但不限于本文所述的转导、转化或

以其它方式向细胞提供核酸的方法。

[0267] 用于控制感兴趣的多核苷酸序列的表达的特定启动子通常并不特别重要,只要它能够指导多核苷酸在所需细胞中表达。因此,在靶向人类细胞的情况下,多核苷酸序列编码区域可以例如位于能够在人类细胞中表达的启动子附近并处于其控制下。一般来说,此类启动子可以包括人类或病毒启动子。可以选择适合用于表达本文提供的CIR和其它多肽的载体的启动子。

[0268] 在各种实施方案中,例如,在表达载体为逆转录病毒的情况下,合适的启动子的实例为莫洛尼氏鼠白血病病毒启动子。在其它实施方案中,启动子可以是,例如,CMV立即早期基因启动子、SV40早期启动子、劳斯肉瘤病毒长末端重复序列、 $\beta 2$ -微球蛋白、核糖体蛋白31、磷酸甘油酸激酶、EF1 α 、 β -肌动蛋白、大鼠胰岛素启动子和甘油醛-3-磷酸脱氢酶,其可以用于获得感兴趣的编码序列的高水平表达。也预期使用本领域中熟知的其它病毒或哺乳动物细胞启动子来实现感兴趣的编码序列的表达,只要表达的水平足以达到给定的目的。通过使用具有熟知性质的启动子,可以优化转染或转化后感兴趣的多肽的表达的水平 and 模式。

[0269] 在其它实施方案中,表达载体是转座子,使得编码CIR和相关标志物蛋白、共激活蛋白或内源性因子的抑制剂或肿瘤微环境的遗传元件携带在携带由瞬时共表达的转座酶识别的元件的质粒载体上。转座酶的作用在于催化由转座酶识别的重复元件之间携带的转基因与细胞基因组的融合。可以用于这些实施方案的转座子系统的实例是Sleeping Beauty系统和Piggyback系统。在转座子中携带的启动子元件指导转基因表达。启动子可以是例如CMV立即早期基因启动子、SV40早期启动子、劳斯肉瘤病毒长末端重复序列、 $\beta 2$ -微球蛋白、核糖体蛋白31、磷酸甘油酸激酶、EF1 α 、 β -肌动蛋白、大鼠胰岛素启动子和甘油醛-3-磷酸脱氢酶。用于将用于转座子和转座酶的质粒引入到细胞中的方法是转染而不是病毒转导。

[0270] 选择启动子和其它调节元件,使得它们在所需细胞或组织中具有功能。此外,该启动子列表不应当被解释为穷举的或限制性的;与本文公开的启动子和方法结合使用的其它启动子。

[0271] 应当理解,多核苷酸的顺序可以变化,并且可以测试以确定构建体对于任何特定方法的适用性,因此,核酸可以包括不同顺序的多核苷酸,这也考虑了组分(a)至(d)的顺序的变化。并且,核酸可以包括以以下顺序中的任何顺序的第一多核苷酸至第四多核苷酸,其中1、2、3和4(代表例如胞内区域中组分的排列,例如(1)信号传导区域,(2)第一共刺激结构域,(3)第二共刺激结构域,和(4)表面标志物)表示核酸中从5'至3'方向的第一、第二、第三和第四顺序的多核苷酸。应当理解,其它多核苷酸,诸如编码2A多肽的那些多核苷酸,在适当的时候可以存在于所列出的多核苷酸之间。

[0272] 表1

[0273]

(a)	(b)	(c)	(d)	(a)	(b)	(c)	(d)	(a)	(b)	(c)	(d)	(a)	(b)	(c)	(d)
1	2	3	4	2	1	3	4	3	1	2	4	4	1	2	3
1	2	4	3	2	1	4	3	3	1	4	2	4	1	3	2
1	3	2	4	2	3	1	4	3	2	1	4	4	2	1	3
1	3	4	2	2	3	4	1	3	2	4	1	4	2	3	1
1	4	2	3	2	4	1	3	3	4	1	2	4	3	1	2
1	4	3	2	2	4	3	1	3	4	2	1	4	3	2	1

[0274] 类似地,核酸可以仅包括编码在上表中提供的三种多肽的三种多核苷酸。在一些实例中,用包含上表1中包括的四种多核苷酸的核酸转染或转导细胞。在其它实例中,用编码三种多核苷酸的核酸转染或转导细胞,所述三种多核苷酸编码三种多肽,如例如表2中提供的。

[0275] 表2

(a)	(b)	(c)	(d)		(a)	(b)	(c)	(d)		(a)	(b)	(c)	(d)
1	2	3			2	1	3			3	1	2	
1	2		3		2	1		3		3	1		2
1	3	2			2	3	1			3	2	1	
1	3		2		2	3		1		3	2		1
1		2	3		2		1	3		3		1	2
1		3	2		2		3	1		3		2	1

[0277] 类似地,核酸可以仅包括两种多核苷酸,其编码上表中提供的两种多肽。

[0278] 表3

(a)	(b)	(c)	(d)
1	2		
1		2	
1			2

[0280] 修饰各种多肽元素的顺序例如在表4-42中是可见的。

[0281] 在一些实施方案中,用编码两种多核苷酸的核酸转染或转导细胞,并且细胞还包含含有包含编码第三多肽的多核苷酸的核酸和/或细胞还包含含有包含编码第四多肽的多核苷酸的核酸。在一些实施方案中,用编码三种多核苷酸的核酸转染或转导细胞,并且细胞还包含含有包含编码第四多肽的多核苷酸的核酸。例如,细胞可以包含含有包含第一多核苷酸、第二多核苷酸和第三多核苷酸的核酸,并且细胞还可以包含含有包含编码嵌合半胱氨酸蛋白酶-9多肽的多核苷酸的核酸。此外,细胞可以包含含有包含第一多核苷酸、第二多核苷酸和第四多核苷酸的核酸,并且细胞还可以包含含有包含编码嵌合ILT受体、天然ILT2功能的scFv调节剂或白介素-15的多核苷酸的核酸。

[0282] 12. 用于治疗疾病的方法

[0283] 还提供了治疗或预防疾病的方法,其中通过例如输注施用细胞(例如,表达主题CIR的细胞)可能是有益的。例如,细胞可以用于再生,例如,以替代患病的细胞的功能。本文所述的经遗传修饰的细胞可以用于细胞疗法。

[0284] 如本文所用,术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”等是指获得所需的药理学和/或生理学效果。就完全或部分预防疾病或其症状而言,该效果可以是预防性的,和/或就部分或完全治愈疾病和/或可归因于该疾病的副作用而言,该效果可以是治疗性的。如本文所用的“治疗”涵盖对哺乳动物、尤其是人类的疾病的任何治疗,并且包括:(a) 预防在易患疾病或处于患疾病的风险但尚未被诊断为患有疾病的受试者中发生该疾病;(b) 抑制疾病,即阻止其发展;和(c) 缓解疾病,即引起疾病的消退。

[0285] 术语“个体”、“受试者”和“患者”在本文中可互换使用,并且是指哺乳动物,包括但不限于人类和非人灵长类动物,包括猿猴和人类;哺乳动物运动动物(例如,马);哺乳动物

农场动物(例如,绵羊、山羊等);哺乳动物宠物(狗、猫等);和啮齿动物(例如,小鼠、大鼠等)。

[0286] “有效量”或“足够量”是指在单剂量或多剂量中,单独或与一种或多种其它组合物(治疗剂,诸如药物)、治疗、方案或治疗方案组合,提供任何持续时间(长期或短期)的可检测应答、任何可测量或可检测程度或持续任何持续时间(例如,持续数分钟、数小时、数天、数月、数年或治愈的)的受试者的预期或所需结果或益处的量(例如,细胞的有效量)。

[0287] 用于治疗(例如,以改善或提供治疗益处或改善)的“有效量”或“足够量”的剂量通常可有效地对疾病的一种、多种或所有不良症状、后果或并发症、一种或多种不良症状、病症、疾病、病理或并发症(例如,由疾病引起或与疾病相关)提供可测量程度的应答,尽管降低、减轻、抑制、压制、限制或控制疾病的进展或恶化也是令人满意的结果。

[0288] 本文提供的经遗传修饰的细胞(即,表达主题CIR的细胞)可以用于治疗有此需要的人类受试者的方法中,并且可以用于制备用于治疗此类受试者的药物。通常通过输注将细胞递送给受体受试者。

[0289] 经遗传修饰的细胞可以是T细胞、iNKT细胞、巨噬细胞或NK细胞。用于受试者的疗法的T细胞或NK细胞的典型剂量在 10^5 - 10^7 个细胞/kg之间。儿科患者通常将接受约 10^6 个细胞/kg的剂量,而成人患者将接受更高的剂量,例如 3×10^6 个细胞/kg。

[0290] 一般而言,本发明的经遗传修饰的T细胞和NK细胞可以以与已知供体白细胞输注(DLI)相同的方式使用,但它们具有CIR的额外益处。

[0291] 接受经遗传修饰的T细胞或NK细胞的受试者通常也将接受来自同种异体供体的其它组织,例如,他们可以接受造血细胞和/或造血干细胞(例如,CD34+细胞)。这种同种异体移植组织和经遗传修饰的T细胞理想地来源于同一供体,使得它们在遗传上将匹配的。此外,供体和受体优选地是单倍体相合的,例如匹配的非血缘供体,或合适的家庭成员。例如,供体可以是受体的父母或子女。因此,在受试者被鉴定为需要经遗传修饰的T细胞的情况下,合适的供体可以被鉴定为T细胞供体。

[0292] 在接受经遗传修饰的T细胞之前(以及在接受同种异体移植之前),受体可以经历淋巴细胞耗竭条件。因此,受体自身的 α/β T细胞(和B细胞)可以在接受经遗传修饰的T细胞或NK细胞之前被耗尽。

[0293] 受体可能患有血液学癌症(诸如治疗难治性血液学癌症)或遗传性血液病症。例如,受体可能患有急性淋巴细胞性白血病(ALL)、急性髓细胞白血病(AML)、严重联合免疫缺陷(SCID)、Wiskott-Aldrich综合征(WA)、范可尼贫血(Fanconi Anemia)、慢性髓性白血病(CML)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、霍奇金淋巴瘤(HL)或多发性骨髓瘤。

[0294] 表达CIR的T细胞或NK细胞的受体可能患有表达HLA-G的非血液学癌症。例如,受体可能患有肾细胞癌(RCC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、结肠直肠癌(CRC)、乳腺癌、神经母细胞瘤、肝细胞癌(HCC)。

[0295] 其它细胞类型也可以用于疗法中,并且包括为获得所需治疗结果而施用于患者的任何细胞。治疗性细胞可以为例如免疫细胞,诸如例如T细胞、自然杀伤细胞、B细胞、肿瘤浸润性淋巴细胞或巨噬细胞或其组合;治疗性细胞可以为例如外周血细胞、造血祖细胞、骨髓细胞或肿瘤细胞。为了进一步改善肿瘤微环境使其更具免疫原性,治疗可以与一种或多种佐剂(例如,IL-12、TLR、IDO抑制剂等)组合。在一些实施方案中,可以递送细胞以治疗实体

瘤,诸如例如将细胞递送至肿瘤床。

[0296] 在一些实施方案中还提供了核酸,所述核酸可以施用于受试者,从而在体内转化或转导靶细胞以原位形成经遗传修饰的细胞。

[0297] 施用有效量的经遗传修饰的细胞。为了确定是否施用了有效量的配体或经修饰的细胞,可以使用测定或测量靶细胞的数量、靶抗原的量或肿瘤的大小的任何手段来确定靶细胞的数量、靶抗原的量或肿瘤的大小是否增加、减少或保持不变。在施用经修饰的细胞或配体之前采集的样品、图像或其它测量手段可以用于与在施用经修饰的细胞或配体之后采集的样品、图像或其它测量手段进行比较。因此,例如,为了确定表达靶抗原的细胞的量或浓度是否增加、减少或保持不变,可以在施用配体或经修饰的细胞之前从受试者获得第一样品,并且可以在施用配体或经修饰的细胞之后从受试者获得第二样品。可以将第一样品中表达靶抗原的细胞的量或浓度与第二样品中表达靶抗原的细胞的量或浓度进行比较,以便确定在施用配体或经修饰的细胞后,表达靶抗原的细胞的量或浓度是否增加、减少或保持不变。

[0298] 任何特定应用的有效量可以根据诸如所治疗的疾病或病状、所施用的特定组合物、受试者的大小和/或疾病或病状的严重程度等因素而变化。人们可以凭经验确定本文所呈现的特定组合物的有效量。

[0299] 为了增加本文所呈现的经修饰的细胞的有效性,可能需要将这些组合物和方法与有效治疗疾病的药剂组合。

[0300] 药物组合物的施用可以在其它药剂之前、与其它药剂同时和/或在其它药剂之后进行,间隔时间范围为数分钟至数周。在将药物组合物和其它药剂分别应用于细胞、组织或生物体的实施方案中,通常会确保每次递送的时间之间不会经过很长一段时间,使得药物组合物和药剂仍然能够对细胞、组织或生物体发挥有利的组合效果。例如,在此类情况下,预期可以用两种、三种、四种或更多种形式使细胞、组织或生物体与药物组合物基本上同时(即,在少于约一分钟内)接触。在其它方面,在施用表达载体之前和/或之后,可以基本上同时,约1分钟,至约24小时至约7天至约1至约8周或更长,以及其中可推导出的任何范围,施用一种或多种药剂。此外,可以采用本文所呈现的药物组合物和一种或多种药剂的各种组合方案。

[0301] 可以治疗或预防的疾病包括由病毒、细菌、酵母、寄生虫、原生动物、癌细胞等引起的疾病。可以治疗和/或预防的示例性疾病包括但不限于病毒病因学的感染,诸如HIV、流感、疱疹、病毒性肝炎、EB病毒(Epstein Barr)、脊髓灰质炎(polio)、病毒性脑炎、麻疹、水痘、乳头瘤病毒等;或细菌病因学的感染,诸如肺炎、肺结核、梅毒等;或寄生虫病因学的感染,诸如疟疾、锥虫病、利什曼病、滴虫病、阿米巴病等。可以使用药物组合物(转导的细胞、表达载体、表达构建体等)治疗或预防的肿瘤前或增生状态包括但不限于肿瘤前或增生状态,诸如结肠息肉、克罗恩病、溃疡性结肠炎、乳腺病变等。

[0302] 可以使用细胞治疗的癌症(包括实体瘤)包括但不限于原发性或转移性黑色素瘤、腺癌、鳞状细胞癌、腺鳞状细胞癌、胸腺瘤、淋巴瘤、肉瘤、肺癌、肝癌、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、白血病、子宫癌、乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、胰腺癌、结肠癌、多发性骨髓瘤、神经母细胞瘤、NPC、膀胱癌、宫颈癌等。

[0303] 可以使用本文所呈现的治疗性细胞和其它治疗性细胞激活系统治疗的其它过度

增殖性疾病(包括实体瘤)包括但不限于类风湿性关节炎、炎性肠病、骨关节炎、平滑肌瘤、腺瘤、脂肪瘤、血管瘤、纤维瘤、血管闭塞、再狭窄、动脉粥样硬化、肿瘤前病变(诸如腺瘤性增生和前列腺上皮内瘤病)、原位癌、口腔毛状白斑或银屑病。

[0304] 可以使用本发明的方法治疗来自任何组织或器官的实体瘤,包括例如在脉管系统中表达靶抗原(例如,HLA-G)的任何肿瘤,例如,存在于例如肺、骨、肝、前列腺或脑中的实体瘤,以及例如存在于乳房、卵巢、肠、睾丸、结肠、胰腺、肾、膀胱、神经内分泌系统、软组织、骨质和淋巴系统中的实体瘤。可以治疗的其它实体瘤包括例如胶质母细胞瘤和恶性多发性骨髓瘤。

[0305] 受试者可以被给予锌补充,以确保CIR中包含的任何锌依赖性因子或在细胞疗法产品(包括CIR)中表达的辅因子具有充足的该离子来源,以允许其充分的活性。

[0306] 还提供了制备本公开的细胞的方法。在一些实施方案中,此类方法包括用本公开的核酸或表达载体(例如,编码主题CIR的核酸或表达载体)转染或转导细胞。术语“转染”用于指通过细胞摄取外源DNA。当外源DNA被引入到细胞膜内时,细胞已经被“转染”。许多转染技术是本领域中公知的,参见,例如Sambrook等人(2001)《分子克隆,实验室手册(Molecular Cloning, a laboratory manual)》,第3版,冷泉港实验室,纽约,Davis等人(1995)《分子生物学基本方法(Basic Methods in Molecular Biology)》,第2版,McGraw-Hill和Chu等人(1981)《基因》13:197。此类技术可以用于将一个或多个外源DNA部分引入到合适的宿主细胞中。该术语是指遗传材料的稳定摄取和瞬时摄取两者。

[0307] 在一些实施方案中,本公开的细胞通过用编码CIR的病毒载体转导细胞来产生。在某些方面,多肽包括CIR,并且细胞为T细胞,因此提供了产生CIR T细胞的方法。在一些实施方案中,此类方法包括激活T细胞的群体(例如,从将施用CIR T细胞疗法的个体获得的T细胞),刺激T细胞的群体增殖,并且用编码包括CIR的多肽的病毒载体转导T细胞。在一些实施方案中,免疫细胞(例如,T细胞、NK细胞、巨噬细胞)用逆转录病毒载体,例如 γ 逆转录病毒载体或慢病毒载体或编码CIR的AAV转导。在某些方面,免疫细胞T细胞用编码多肽的慢病毒载体转导。在某些方面,多肽包括CIR,并且细胞为NK细胞,因此提供了产生CIR NK细胞的方法(例如,通过使用病毒载体诸如AAV、慢病毒载体或逆转录病毒载体)。

[0308] 13. 总则

[0309] 术语“包含”涵盖“包括”以及“由……组成”,例如,“包含”X的组合物可以仅由X组成,或者可以包括附加的组分,例如X+Y。

[0310] 与数值x相关的术语“约”是任选的,并且意指例如 $x \pm 10\%$ 。

[0311] 词语“基本上”不排除“完全地”,例如“基本上不含”Y的组合物可以完全不含Y。必要时,词语“基本上”可以从本发明的定义中省略。

[0312] 涉及两个值的术语“在……之间”包括这两个值,例如在10mg和20mg之间的范围尤其涵盖10mg、15mg和20mg。

[0313] 除非特别说明,否则包括将两种或更多种组分混合的步骤的方法不要求任何特定的混合顺序。因此,组分可以以任何顺序混合。在存在三种组分的情况下,那么两种组分可以彼此组合,然后该组合可以与第三种组分组合,等等。

[0314] 方法的各种步骤可以在相同或不同的时间、在相同或不同的地理位置(例如,国家)并且由相同或不同的人或实体执行。

[0315] 术语“药学上可接受的”是指当施用于动物或人类时,不会产生不想要的不良反应、过敏反应或其它异常反应的分子实体和组合物。

[0316] 两个序列之间的相似性程度可以基于序列同一性百分比。“序列同一性”在本文中意指两个核苷酸或氨基酸序列不变的程度。“序列比对”意指出于评估相似性程度的目的,将两个或更多个序列排列起来以实现最大水平的同一性的过程。本领域中已知许多用于比对序列和评估相似性/同一性的方法,例如聚类方法,其中相似性基于MEGALIGN算法,以及BLASTN、BLASTP和FASTA。当使用这些程序中的任何程序时,可以选择导致最高序列相似性的设置。

[0317] 14. 特定核酸和氨基酸序列的实例

[0318] 以下章节和表格包括多肽和编码嵌合信号传导多肽的核苷酸序列的实例。应当理解,在这些实例中提供的单个多肽的序列,诸如例如截短的ILT2和ILT4多肽、共刺激多肽胞质信号传导区域、安全开关,可以用于构建编码本发明实施方案的嵌合信号传导多肽的其它表达载体。

[0319] 表4包括用于递送包含HLA-G1序列和标志物蛋白 Δ CD19的 γ 逆转录病毒的完整载体序列的实例。表5-20仅包括由相同的示例性 γ 逆转录病毒载体表达的转基因。

[0320] 表4:质粒A:pNT101-SFG-HLAG1-T2A- Δ CD19

[0321]

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
5'LTR	1			
接头	2			
MMLV psi	3			
接头	4			
Gag	5			
接头		CCATATGG		
Pol	6			
接头	7			
HLA-G1	8		9	
接头		GGCAGTGA		GSG
T2A	10		11	
Δ CD19	12		13	
STOP		TAA		STOP
3'病毒载体序列	64			
3' UTR	65			

[0322] 表5:质粒B:pNT102-SFG-HLAG2-T2A- Δ CD19

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
HLA-G2	14		15	
[0323] 接头		GGCAGTG GA		GSG
T2A	10		11	
Δ CD19	12		13	
STOP		TAA		STOP

[0324] 表6:质粒C:pNT103-SFG-HLAG3-T2A- Δ CD19

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
HLA-G3	16		17	
[0325] 接头		GGCAGTG GA		GSG
T2A	10		11	
Δ CD19	12		13	
STOP		TAA		STOP

[0326] 表7:质粒D:pNT104-SFG-HLAG4-T2A- Δ CD19

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
HLA-G4	18		19	
[0327] 接头		GGCAGTG GA		GSG
T2A	10		11	
Δ CD19	12		13	
STOP		TAA		STOP

[0328] 表8:质粒E:pNT105-SFG-HLAG5-T2A- Δ CD19

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
HLA-G5	20		21	
[0329] 接头		GGCAGTG GA		GSG
T2A	10		11	
Δ CD19	12		13	
STOP		TAA		STOP

[0330] 表9:质粒F:pNT106-SFG-HLAG5C42S-T2A- Δ CD19

[0331]

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
HLA-G5 (C42S)	22		23	
接头		GGCAGTG GA		GSG
T2A	10		11	
Δ CD19	12		13	
STOP		TAA		STOP

[0332] 表10:质粒G:pNT107-SFG-HLAG1C42S-T2A- Δ CD19

[0333]

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
HLA-G1 (C42S)	24		25	
接头		GGCAGTG GA		GSG
T2A	10		11	
Δ CD19	12		13	
STOP		TAA		STOP

[0334] 表11:质粒H:pNT108-SFG-HLAG1C42SC147S-T2A- Δ CD19

[0335]

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
HLA-G1 (C42S/ C147S)	44		45	
接头		GGCAGTG GA		GSG
T2A	10		11	
Δ CD19	12		13	
STOP		TAA		STOP

[0336] 表12:质粒I:pNT109-SFG-HLAG1C147S-T2A- Δ CD19

[0337]

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
HLA-G1 (C147S)	26		27	
接头		GGCAGTG GA		GSG
T2A	10		11	
Δ CD19	12		13	
STOP		TAA		STOP

[0338] 表13A:质粒K:pNT-110SFG-ILT2-T2A- Δ CD19

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
ILT2	28		29	
[0339] 接头		GGCAGTG GA		GSG
T2A	10		11	
Δ CD19	12		13	
STOP		TAA		STOP

[0340] 表13B:质粒K:pNT-110SFG-ILT2-T2A- Δ CD19

[0341] [ILT2 FL;参见图6A]

[0342] *注:该表与上表相似,但核苷酸序列被密码子优化。该表中的序列是实施例部分中使用的序列。密码子优化的ILT2序列还将QT氨基酸序列插入到ILT2蛋白中(出于克隆效率的目的)。

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
ILT2	77		78	
[0343] 接头		GGCTCTGG A		GSG
T2A	79		11	
Δ CD19	80		13	
STOP		TGA		STOP

[0344] 表14:质粒L:pNT-111 SFG-ILT2. ζ -T2A- Δ CD19

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
ILT2 (D1-D4-TM)	30		31	
[0345] 接头		GTCGAC		VD
CD3 ζ	32		33	
接头		GGCAGTG GA		GSG
T2A	10		11	
Δ CD19	12		13	
STOP		TAA		STOP

[0346] 表15A:质粒M:pNT-112SFG-ILT2.BB. ζ -T2A- Δ CD19

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
ILT2 (D1-D4-TM)	30		31	
接头		GGATCC		GS
41BB	34		35	
接头		GTCGAC		VD
CD3 ζ	32		33	
接头		GGCAGTGA		GSG
T2A	10		11	
Δ CD19	12		13	
[0348]	STOP	TAA		STOP

[0349] 表15B:质粒M:pNT-112SFG-ILT2.BB. ζ -T2A- Δ CD19

[0350] [ILT2 CIR1;参见图6A]

[0351] *注:该表与上表相似,但核苷酸序列被密码子优化。该表中的序列是实施例部分中使用的序列。密码子优化的ILT2序列还将QT氨基酸序列插入到ILT2蛋白序列中(出于克隆效率的目的)。

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
ILT2 (D1-D4-TM)	81		82	
接头		GGATCC		GS
41BB	83		35	
接头		GTCGAC		VD
CD3 ζ	32		33	
接头		GGCTCTGGA		GSG
T2A	79		11	
Δ CD19	80		13	
STOP		TGA		STOP

[0353] 表16A:质粒N:pNT-113SFG-ILT2D1D2STM.BB. ζ -T2A- Δ CD19

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
ILT2 (D1-D2)	36		37	
接头		AGCGGCCGC		SGR
ILT2 茎 TM	38		39	

[0355]	接头		GGATCC		GS
	41BB	34		35	
	接头		GTCGAC		VD
	CD3 ζ	32		33	
	接头	66	CCGCGGG GCAGTGG A	67	PRGSG
	T2A	10		11	
	Δ CD19	12		13	
	STOP		TAA		STOP

[0356] 表16B:质粒N:pNT-113 SFG-ILT2D1D2STM.BB. ζ -T2A- Δ CD19

[0357] [ILT2 CIR2;参见图6A]

[0358] *注:该表与上表相似,但核苷酸序列被密码子优化。该表中的序列是实施例部分中使用的序列。

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
ILT2 (D1-D2)	84		37	
接头		AGCGGCC GC		SGR
ILT2 茎 TM	85		39	
接头		GGATCC		GS
41BB	83		35	
接头		GTCGAC		VD
CD3 ζ	32		33	
接头	66	CCGCGGG GCAGTGG A	67	PRGSG
T2A	79		11	
Δ CD19	80		13	
STOP		TGA		STOP

[0360] 表17:质粒O:pNT-114 SFG-ILT2D1D2.Q.8STM.BB. ζ -T2A- Δ CD19

[0361]

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
ILT2 (D1-D2)	36		37	
接头		AGCGGCC GC		SGR
Q 表位	40		41	
CD8 茎 TM	42		43	
接头		GGATCC		GS
41BB	34		35	
接头		GTCGAC		VD
CD3 ζ	32		33	
接头		GGCAGTG GA		GSG
T2A	10		11	
Δ CD19	12		13	
STOP		TAA		STOP

[0362] 表18:质粒P:pNT-115 SFG-ILT2D1D2.Q.28STM.CD28. ζ -T2A- Δ CD19

[0363]

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
ILT2 (D1-D2)	36		37	
接头		AGCGGCC GC		SGR
Q 表位	40		41	
CD28 茎 TM	46		47	
接头		GGATCC		GS
CD28	48		49	
接头		GTCGAC		VD
CD3 ζ	32		33	
接头		GGCAGTG GA		GSG
T2A	10		11	
Δ CD19	12		13	
STOP		TAA		STOP

[0364] 表19:质粒R:pNT-116 SFG-ILT2D1D2.Q.CH2CH3.8TM.BB. ζ -T2A- Δ CD19

[0365]

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
----	------------	-----	------------	---

[0366]	ILT2 (D1-D2)	36		37	
	接头		AGCGGCC GC		SGR
	Q 表位	40		41	
	CH2CH3 CD28TM	50		51	
	接头		GGATCC		GS
	41BB	34		35	
	接头		GTCGAC		VD
	CD3ζ	32		33	

[0367] 表20A:质粒S:pNT-117 SFG-ILT2D1D2.CD8STM.BB.ζ-T2A-ΔCD19

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
ILT2 (D1-D2)	36		37	
接头		AGCGGCC GC		SGR
CD8 茎 TM	42		43	
接头		GGATCC		GS
41BB	34		35	
接头		GTCGAC		VD
CD3ζ	32		33	
接头		GGCAGTG GA		GSG
T2A	10		11	
ΔCD19	12		13	
STOP		TAA		STOP

[0369] 表20B:质粒S:pNT-117SFG-ILT2D1D2.CD8STM.BB.ζ-T2A-ΔCD19

[0370] [ILT2 CIR4;参见图6A]

[0371] *注:该表与上表相似,但核苷酸序列被密码子优化。该表中的序列是实施例部分中使用的序列。

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
ILT2 (D1-D2)	84		37	
接头		AGCGGCC GC		SGR
CD8 茎 TM	86		43	
接头		GGATCC		GS
41BB	83		35	
接头		GTCGAC		VD
CD3 ζ	32		33	
接头		GGCAGTG GA		GSG
T2A	79		11	
Δ CD19	80		13	
STOP		TGA		STOP

[0372] 表21A:质粒T:pNT-118SFG-ILT4-T2A- Δ CD19

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
ILT4	52		53	
接头		GGCAGTGG A		GSG
T2A	10		11	
Δ CD19	12		13	
STOP		TAA		STOP

[0374] 表21B:质粒T:pNT-118 SFG-ILT4-T2A- Δ CD19

[0375] [ILT4 FL;参见图6A]

[0376] *注:该表与上表相似,但核苷酸序列被密码子优化。该表中的序列是实施例部分中使用的序列。密码子优化的ILT4序列还将QT氨基酸序列插入到ILT4蛋白中(出于克隆效率的目的)。

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
ILT4	87		88	
接头		GGCTCTGG A		GSG
T2A	79		11	
Δ CD19	80		13	
STOP		TGA		STOP

[0377] 表22:质粒U:pNT-119SFG-ILT4. ζ -T2A- Δ CD19

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
ILT4 (D1-D4-TM)	54		55	
接头	35	GTCGAC	36	VD
CD3 ζ	32		33	
接头		GGCAGTGA		GSG
T2A	10		11	
Δ CD19	12		13	
STOP		TAA		STOP

[0381] 表23A:质粒V:pNT-120SFG-ILT4.BB. ζ -T2A- Δ CD19

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
ILT4 (D1-D4-TM)	54		55	
接头		GGATCC		GS
41BB	34		35	
接头		GTCGAC		VD
CD3 ζ	32		33	
接头		GGCAGTGG A		GSG
T2A	10		11	
Δ CD19	12		13	
STOP		TAA		STOP

[0383] 表23B:质粒V:pNT-120SFG-ILT4.BB. ζ -T2A- Δ CD19

[0384] [ILT4 CIR1;参见图6A]

[0385] *注:该表与上表相似,但核苷酸序列被密码子优化。该表中的序列是实施例部分中使用的序列。密码子优化的ILT4序列还将QT氨基酸序列插入到ILT4蛋白序列中(出于克隆效率的目的)。

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
ILT4 (D1-D4-TM)	89		90	
接头		GGATCC		GS
41BB	83		35	
接头		GTCGAC		VD
CD3 ζ	32		33	
接头		GGCAGTGG A		GSG
T2A	79		11	
Δ CD19	80		13	
STOP		TGA		STOP

[0387] 表24A:质粒W:pNT-121SFG-ILT4D1D2STM.BB. ζ -T2A- Δ CD19

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
ILT4 (D1-D2)	56		57	
接头		AGCGGCCGC		SGR
ILT4 茎 TM	58		59	
接头		GGATCC		GS
41BB	34		35	
接头		GTCGAC		VD
CD3 ζ	32		33	
接头	66	CCGCGGGGCAGTG GA	67	PRGSG
T2A	10		11	
Δ CD19	12		13	
STOP		TAA		STOP

[0389] 表24B:质粒W:pNT-121SFG-ILT4D1D2STM.BB. ζ -T2A- Δ CD19

[0390] [ILT4 CIR2;参见图6A]

[0391] *注:该表与上表相似,但核苷酸序列被密码子优化。该表中的序列是实施例部分中使用的序列。

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
ILT4 (D1-D2)	91		57	
接头		AGCGGCCGC		SGR
ILT4 茎 TM	58		59	
接头		GGATCC		GS
41BB	34		35	
接头		GTCGAC		VD
CD3 ζ	32		33	
接头	66	CCGCGGGGCAGTGA	67	PRGSG
T2A	79		11	
Δ CD19	80		13	
STOP		TGA		STOP

[0393] 表25:质粒X:pNT-122 SFG-ILT4D1D2.Q.8STM.BB. ζ -T2A- Δ CD19

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
ILT4 (D1-D2)	56		57	
接头		AGCGGCCGC		SGR
Q 表位	40		41	
CD8 茎 TM	42		43	
接头		GGATCC		GS
41BB	34		35	
接头		GTCGAC		VD
CD3 ζ	32		33	
接头		GGCAGTGG A		GSG
T2A	10		11	
Δ CD19	12		13	
STOP		TAA		STOP

[0396] 表26:质粒Y:pNT-123SFG-ILT4D1D2.Q.28STM.CD28. ζ -T2A- Δ CD19

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
ILT4 (D1-D2)	56		57	
接头		AGCGGCCG C		SGR
Q 表位	40		41	
CD28 茎 TM	46		47	
接头		GGATCC		GS
CD28	48		49	
接头		GTCGAC		VD
CD3 ζ	32		33	
接头		GGCAGTGG A		GSG
T2A	10		11	
Δ CD19	12		13	
STOP		TAA		STOP

[0398] 表27:质粒Z:pNT-124SFG-ILT4D1D2.Q.CH2CH3.8TM.BB. ζ -T2A- Δ CD19

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
ILT4 (D1-D2)	56		57	
接头		AGCGGCCG C		SGR
Q 表位	40		41	
CH2CH3 CD28TM	50		51	
接头		GGATCC		GS
41BB	34		35	
接头		GTCGAC		VD
CD3 ζ	32		33	

[0401] 表28A:质粒AA:pNT-124 SFG-ILT4D1D2.CD8STM.BB. ζ -T2A- Δ CD19

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
ILT4 (D1-D2)	56		57	
接头		AGCGGCCGC		SGR
CD8 茎 TM	42		43	
接头		GGATCC		GS
41BB	34		35	
接头		GTCGAC		VD
CD3 ζ	32		33	
接头		GGCAGTGGA		GSG
T2A	10		11	
Δ CD19	12		13	
STOP		TAA		STOP

[0403] 表28B:质粒AA:pNT-124 SFG-ILT4D1D2.CD8STM.BB. ζ -T2A- Δ CD19

[0404] [ILT4 CIR4;参见图6A]

[0405] *注:该表与上表相似,但核苷酸序列被密码子优化。该表中的序列是实施例部分中使用的序列。

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
ILT4 (D1-D2)	91		57	
接头		AGCGGCCGC		SGR
CD8 茎 TM	86		43	
接头		GGATCC		GS
41BB	83		35	
接头		GTCGAC		VD
CD3 ζ	32		33	
接头		GGCAGTGGA		GSG
T2A	79		11	
Δ CD19	80		13	
STOP		TGA		STOP

[0407] 表29:质粒U:pNT-119SFG-ILT4Y394A. ζ -T2A- Δ CD19

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
ILT4 Y394A (D1-D4- TM)	60		61	
[0408] 接头	35	GTCGAC	36	VD
CD3 ζ	32		33	
接头		GGCAGTGGA		GSG
T2A	10		11	
Δ CD19	12		13	
STOP		TAA		STOP

[0409] 表30:质粒AC:pNT-126 SFG-ILT4Y394A.BB. ζ -T2A- Δ CD19

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
ILT4 Y394A (D1-D4- TM)	60		61	
[0410] 接头		GGATCC		GS
41BB	34		35	
接头		GTCGAC		VD
CD3 ζ	32		33	
接头		GGCAGTGGA		GSG
T2A	10		11	
Δ CD19	12		13	
STOP		TAA		STOP

[0411] 表31:质粒AD:pNT-128 SFG-ILT4D1D2Y96A.STM.BB. ζ -T2A- Δ CD19

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
ILT4 (D1-D2)	62		63	
[0412] 接头		AGCGGCCGC		SGR
ILT4 茎 TM	58		59	
接头		GGATCC		GS
41BB	34		35	
接头		GTCGAC		VD
CD3 ζ	32		33	
接头	66		67	
T2A	10		11	
Δ CD19	12		13	
STOP		TAA		STOP

[0413] 表32:质粒AE:pNT-129SFG-ILT4D1D2Y96A.Q.8STM.BB.ζ-T2A-ΔCD19

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
ILT4 (D1-D2)	62		63	
接头		AGCGGCCGC		SGR
Q 表位	40		41	
CD8 茎 TM	42		43	
接头		GGATCC		GS
41BB	34		35	
接头		GTCGAC		VD
CD3ζ	32		33	
接头		GGCAGTGGA		GSG
T2A	10		11	
ΔCD19	12		13	
STOP		TAA		STOP

[0415] 表33:质粒AF:pNT-130 SFG-ILT4D1D2Y96A.Q.28STM.CD28.ζ-T2A-ΔCD19

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
ILT4 (D1-D2)	62		63	
接头		AGCGGCCGC		SGR
Q 表位	40		41	
CD28 茎 TM	46		47	
接头		GGATCC		GS
CD28	48		49	
接头		GTCGAC		VD
CD3ζ	32		33	
接头		GGCAGTGGA		GSG
T2A	10		11	
ΔCD19	12		13	
STOP		TAA		STOP

[0417] 表34:质粒AG:pNT-131 FG-ILT4D1D2Y96A.Q.CH2CH3.8TM.BB.ζ-T2A-ΔCD19

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
ILT4 (D1-D2)	62		63	
接头		AGCGGCCGC		SGR
Q 表位	40		41	
CH2CH3 CD28TM	50		51	
接头		GGATCC		GS
41BB	34		35	
接头		GTCGAC		VD
CD3 ζ	32		33	

[0418] 表35:质粒AH:pNT-132 SFG-ILT4D1D2Y96A.CD8STM.BB. ζ -T2A- Δ CD19

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
ILT4 (D1-D2)	62		63	
接头		AGCGGCCGC		SGR
CD8 茎 TM	42		43	
接头		GGATCC		GS
41BB	34		35	
接头		GTCGAC		VD
CD3 ζ	32		33	
接头		GGCAGTGGA		GSG
T2A	10		11	
Δ CD19	12		13	
STOP		TAA		STOP

[0420] 表36:pNT133-pSFG-ILT2(D1-D4).CD8茎TM.BB.z.T2A-dCD19

[0421] [ILT2 CIR3;参见图6A]

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
ILT2 (D1-D4)	93		94	
接头		AGCGGCCGC		SGR
CD8 茎 TM	86		43	
接头		GGATCC		GS
41BB	83		35	
接头		GTCGAC		VD
CD3 ζ	32		33	
接头		GGCAGTGGA		GSG
T2A	79		11	
Δ CD19	80		13	
STOP		TGA		STOP

[0423] 表37:pNT134-pSFG-ILT4(D1-D4).CD8茎TM.BB.z.T2A-dCD19

[0425] [ILT4 CIR3;参见图6A]

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
ILT4 (D1-D4)	95		96	
接头		AGCGGCCGC		SGR
CD8 茎 TM	86		43	
接头		GGATCC		GS
41BB	83		35	
接头		GTCGAC		VD
CD3 ζ	32		33	
接头		GGCAGTGGA		GSG
T2A	79		11	
Δ CD19	80		13	
STOP		TGA		STOP

[0426] 表38:pNT138 SFG-ILT4(D1-D2).CH2CH3(4-2NQ).CD8TM.BB.z.T2A-dCD19

[0428] [ILT4 CIR6;参见图6A]

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
ILT4 (D1-D2)	91		57	
接头		AGCGGCCGC		SGR
IgG4 CH2CH3	97		98	
CD8a TM	99		100	
接头		GGATCC		GS
41BB	83		35	
接头		GTCGAC		VD
CD3 ζ	32		33	
接头	66	CCGCGGGGCAGTGA	67	PRGSG
T2A	79		11	
Δ CD19	80		13	
STOP		TGA		STOP

[0429] 表39:pNT139 SFG-ILT4(D1-D2).CH3.CD8tm.BB.z.T2A-dCD19

[0430] [ILT4 CIR7;参见图6A]

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
ILT4 (D1-D2)	91		57	
接头		AGCGGCCGC		SGR
IgG4 CH3	101		102	
CD8a TM	99		100	
接头		GGATCC		GS
41BB	83		35	
接头		GTCGAC		VD
CD3 ζ	32		33	
接头	66	CCGCGGGGCA GTGGA	67	PRGSG
T2A	79		11	
Δ CD19	80		13	
STOP		TGA		STOP

[0431] 表40:pNT-159 SFG-ILT4(D1-D2).CH2CH3(4-2NQ)s.CD28tm.BB.z.T2A-dCD19

[0432] [ILT4 CIR8;参见图6A]

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
ILT4 (D1-D2)	91		57	
接头		AGCGGCCGC		SGR
IgG4 CH2CH3	97		98	
CD28 TM	103		104	
接头		GGATCC		GS
41BB	83		35	
接头		GTCGAC		VD
CD3 ζ	32		33	
接头	66	CCGCGGGGCA GTGGA	67	PRGSG
T2A	79		11	
Δ CD19	80		13	
STOP		TGA		STOP

[0436] 表41:pNT-160 SFG-ILT4(D1-D2).CH3s.CD28tm.BB.z.T2A-dCD19

[0437] [ILT4 CIR9;参见图6A]

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
ILT4 (D1-D2)	91		57	
接头		AGCGGCCGC		SGR
IgG4 CH3	101		102	
CD28 TM	103		104	
接头		GGATCC		GS
41BB	83		35	
接头		GTCGAC		VD
CD3 ζ	32		33	
接头	66	CCGCGGGGCA GTGGA	67	PRGSG
T2A	79		11	
Δ CD19	80		13	
STOP		TGA		STOP

[0439] 表42:pNT-158 SFG-ILT4(D1-D2).CD28s.CD28tm.BB.z.T2A-dCD19

[0440] [ILT4 CIR10;参见图6A]

片段	SEQ ID NO:	核苷酸	SEQ ID NO:	肽
ILT4 (D1-D2)	91		57	
接头		AGCGGCCGC		SGR
CD28 茎	105		106	
CD28 TM	103		104	
接头		GGATCC		GS
41BB	83		35	
接头		GTCGAC		VD
CD3 ζ	32		33	
接头	66	CCGCGGGGCA GTGGA	67	PRGSG
T2A	79		11	
Δ CD19	80		13	
STOP		TGA		STOP

[0442] 本公开的示例性的非限制性方面

[0443] 上述本发明主题的各方面(包括实施方案)单独或与一个或多个其它方面或实施方案组合可能是有益的。在不限制前述描述的情况下,下文提供了本公开的某些非限制性方面(参见集合A和集合B)。如本领域普通技术人员在阅读本公开后将显而易见的是,每个单独编号的方面可以与前面或后面单独编号的方面中的任何一个方面一起使用或组合。这旨在为方面的所有此类组合提供支持,并且不限于下面明确提供的方面的组合。对于本领域普通技术人员将显而易见的是,在不脱离本发明的精神或范围的情况下,可以进行各种变化和修改。

[0444] 集合A

[0445] 1. 一种组合物,其中经遗传修饰的细胞表达嵌合受体蛋白,所述嵌合受体蛋白特异性地靶向具有结合结构域蛋白或碳水化合物,所述结合结构域不是来源于抗体、VhH结构域或合成来源的多肽。

[0446] 2. 根据1所述的组合物,其中所述嵌合受体蛋白利用识别或结合结构域来靶向HLA-G,所述HLA-G不是来源于抗体、VhH结构域或合成来源的多肽。

[0447] 3. 根据1或2所述的组合物,其中所述嵌合受体蛋白利用天然识别靶蛋白(包括HLA-G)的人类受体蛋白作为其生物作用机制的一部分。

[0448] 4. 根据3所述的组合物,其中所述嵌合受体蛋白利用来源于人类或猿猴序列的ILT2。

[0449] 5. 根据3所述的组合物,其中所述嵌合受体蛋白利用来源于人类或猿猴序列的ILT4。

[0450] 6. 根据4所述的组合物,其中所述嵌合受体蛋白利用来源于人类或猿猴序列的ILT2的天然多态形式。

[0451] 7. 根据5所述的组合物,其中所述嵌合受体蛋白利用来源于人类或猿猴序列的ILT4的天然多态形式。

[0452] 8. 根据4和6所述的组合物,其中所述嵌合受体蛋白利用来源于ILT2的D1和D2结构

域。

[0453] 9. 根据5和7所述的组合物,其中所述嵌合受体蛋白利用来源于ILT4的D1和D2结构域。

[0454] 10. 根据任一前述项所述的组合物,其中ILT2或ILT4的所述D1或D2结构域被突变以编码替代的氨基酸,目的是降低除HLA-G以外的蛋白的亲合力,同时保持对HLA-G的亲合力足以激活所述嵌合受体。

[0455] 11. 根据10所述的组合物,其中所述突变在对应于ILT4中氨基酸96或394的位置处产生氨基酸取代。

[0456] 12. 根据任一前述权利要求所述的组合物,其中所述经遗传修饰的细胞进一步表达安全开关。

[0457] 13. 根据12所述的组合物,其中所述安全开关是诱导型的。

[0458] 14. 根据12所述的组合物,其中所述安全开关由利米多赛或雷帕霉素或雷帕霉素的类似物触发。

[0459] 15. 根据任一前述权利要求所述的组合物,其中所述经遗传修饰的细胞进一步表达第二嵌合抗原受体。

[0460] 16. 根据1至11中任一项所述的组合物,其中所述经遗传修饰的细胞进一步表达胞质信号传导结构域,所述胞质信号传导结构域作为具有根据1至11所述的组合物的融合元件驱动对NK细胞或T细胞的细胞毒性的激活。

[0461] 17. 根据16所述的组合物,其中所述融合的细胞毒性信号传导元件包含ITAM序列。

[0462] 18. 根据16或17所述的组合物,其中所述融合的信号传导元件来源于CD3 ζ 、DAP10或DAP12。

[0463] 19. 根据任一前述权利要求所述的组合物,其中所述经遗传修饰的细胞进一步表达作为所述嵌合受体的一部分的共刺激多肽。

[0464] 20. 根据任一前述权利要求所述的组合物,其中所述经遗传修饰的细胞进一步表达作为与所述嵌合受体蛋白分离的单位的共刺激多肽。

[0465] 21. 根据19和20所述的组合物,其中所述共刺激多肽包含来源于4-1BB、OX40、ICOS、CD28、CD27、MyD88、IL-1R α 、HVEM、TRANCE、IL-1R β 、CD70、IL-18R α 、CD40、IL-18R β 、IL-33R α 、CD30或IL-33R β 的信号传导元件。

[0466] 22. 根据任一前述权利要求所述的组合物,其中所述经遗传修饰的细胞为(i) T细胞, (ii) NK细胞, (iii) iNKT细胞或(iv) 巨噬细胞。

[0467] 23. 一种治疗人类受试者的方法,其包括向患者施用根据任一前述权利要求所述的组合物。

[0468] 24. 一种治疗人类受试者的方法,其包括当所述受试者是癌症患者时,向所述患者施用根据任一前述项所述的组合物。

[0469] 25. 一种表达构建体,其包含编码根据1至21中任一项所述的嵌合受体蛋白的多核苷酸。

[0470] 26. 一种载体,其包含根据25所述的表达构建体,其中所述载体为逆转录病毒载体、慢病毒载体或质粒载体。

[0471] 集合B

- [0472] 1. 一种嵌合受体蛋白,其包含:
- [0473] (a) 靶向区域,其靶向HLA-G,包含免疫球蛋白样转录物2(ILT2)或免疫球蛋白样转录物4(ILT4)的D1-D2胞外结构域;
- [0474] (b) 跨膜(TM)区域,其包含跨膜氨基酸序列;以及
- [0475] (c) 胞内结构域(ICD),其包含能够在所述靶向区域与HLA-G结合后将信号转导到免疫效应细胞内部以引发效应细胞功能的信号传导区域。
- [0476] 2. 根据1所述的嵌合受体蛋白,其中所述靶向区域包含在对应于SEQ ID NO:57中所示的ILT4氨基酸序列的Y96或SEQ ID NO:31中所示的ILT2氨基酸序列的Y96的位置处的氨基酸突变。
- [0477] 3. 根据1或2所述的嵌合受体蛋白,其中所述D1-D2胞外结构域为ILT2 D1-D2胞外结构域。
- [0478] 4. 根据1或2所述的嵌合受体蛋白,其中所述D1-D2胞外结构域为ILT4 D1-D2胞外结构域。
- [0479] 5. 根据1至4中任一项所述的嵌合受体蛋白,其中所述靶向区域包含ILT2或ILT4的D3-D4胞外结构域。
- [0480] 6. 根据5所述的嵌合受体蛋白,其中所述靶向区域包含在对应于SEQ ID NO:55中所示的ILT4氨基酸序列的Y394或SEQ ID NO:31中所示的ILT2氨基酸序列的Y395的位置处的氨基酸突变。
- [0481] 7. 根据1至4中任一项所述的嵌合受体蛋白,其中所述靶向区域缺乏ILT2或ILT4D3-D4胞外结构域。
- [0482] 8. 根据5所述的嵌合受体蛋白,其包含茎结构域。
- [0483] 9. 根据8所述的嵌合受体蛋白,其中所述茎结构域包含ILT2、ILT4、CD28、CH2/CH3、CH3或CD8茎结构域。
- [0484] 10. 根据1至9中任一项所述的嵌合受体蛋白,其中TM结构域为ILT2、ILT4、CD28或CD8 TM结构域。
- [0485] 11. 根据1至10中任一项所述的嵌合受体蛋白,其中所述信号传导区域包含免疫受体酪氨酸激活基序(ITAM)。
- [0486] 12. 根据1至10中任一项所述的嵌合受体蛋白,其中所述信号传导区域包含CD3 ζ 信号传导结构域、DAP10信号传导结构域、DAP12信号传导结构域或其任何组合。
- [0487] 13. 根据1至10中任一项所述的嵌合受体蛋白,其中所述信号传导区域包含CD3 ζ 信号传导结构域。
- [0488] 14. 根据1至13中任一项所述的嵌合受体蛋白,其中所述ICD进一步包含共刺激区域,所述共刺激区域包含至少一个共刺激结构域。
- [0489] 15. 根据14所述的嵌合受体蛋白,其中所述至少一个共刺激结构域包含CD28共刺激结构域。
- [0490] 16. 根据14或15所述的嵌合受体蛋白,其中所述至少一个共刺激结构域包含4-1BB共刺激结构域。
- [0491] 17. 根据14所述的嵌合受体蛋白,其中所述至少一个共刺激结构域包含4-1BB、OX40、CD28、ICOS、RANK、DAP10、DAP12、CD27、MyD88、IL-1R α 、HVEM、TRANCE、IL-1R β 、CD70、IL-

18R α 、CD40、IL-18R β 、IL-33R α 、CD30或IL-33R β 共刺激结构域或其任何组合。

[0492] 18. 根据1所述的嵌合受体蛋白,其中:

[0493] 所述D1-D2胞外结构域为ILT2 D1-D2胞外结构域,

[0494] 所述胞外结构域缺乏ILT2 D3-D4胞外结构域,

[0495] 所述嵌合受体蛋白包含CD8茎结构域,

[0496] 所述TM区域为CD TM,

[0497] 所述信号传导区域包含CD3 ζ 信号传导结构域,并且

[0498] 所述嵌合受体蛋白包含4-1BB共刺激结构域。

[0499] 19. 根据1所述的嵌合受体蛋白,其中:

[0500] 所述D1-D2胞外结构域为ILT4 D1-D2胞外结构域,

[0501] 所述胞外结构域缺乏ILT4 D3-D4胞外结构域,

[0502] 所述嵌合受体蛋白包含CD8茎结构域,

[0503] 所述TM区域为CD TM,

[0504] 所述信号传导区域包含CD3 ζ 信号传导结构域,并且

[0505] 所述嵌合受体蛋白包含4-1BB共刺激结构域。

[0506] 20. 根据1所述的嵌合受体蛋白,其中:

[0507] 所述D1-D2胞外结构域为ILT2 D1-D2胞外结构域,

[0508] 所述胞外结构域包含ILT2 D3-D4胞外结构域,

[0509] 所述嵌合受体蛋白包含CD8茎结构域,

[0510] 所述TM区域为CD TM,

[0511] 所述信号传导区域包含CD3 ζ 信号传导结构域,并且

[0512] 所述嵌合受体蛋白包含4-1BB共刺激结构域。

[0513] 21. 根据1所述的嵌合受体蛋白,其中:

[0514] 所述D1-D2胞外结构域为ILT4 D1-D2胞外结构域,

[0515] 所述胞外结构域包含ILT4 D3-D4胞外结构域,

[0516] 所述嵌合受体蛋白包含CD8茎结构域,

[0517] 所述TM区域为CD TM,

[0518] 所述信号传导区域包含CD3 ζ 信号传导结构域,并且

[0519] 所述嵌合受体蛋白包含4-1BB共刺激结构域。

[0520] 22. 一种核酸,其包含编码根据1至21中任一项所述的嵌合受体蛋白的核苷酸序列。

[0521] 23. 根据22所述的核酸,其中所述核苷酸序列可操作地连接到组成型启动子。

[0522] 24. 根据22所述的核酸,其中所述核苷酸序列可操作地连接到诱导型启动子。

[0523] 25. 根据22至24中任一项所述的核酸,其中所述核酸为表达载体。

[0524] 26. 根据25所述的核酸,其中所述表达载体为逆转录病毒载体、慢病毒载体或质粒载体。

[0525] 27. 一种经遗传修饰的细胞,其表达根据1至22中任一项所述的嵌合受体蛋白。

[0526] 28. 根据27所述的经遗传修饰的细胞,其中所述经遗传修饰的细胞为免疫细胞。

[0527] 29. 根据28所述的经遗传修饰的细胞,其中所述免疫细胞为自然杀伤(NK)细胞、T

细胞、iNKT细胞或巨噬细胞。

[0528] 30. 根据28所述的经遗传修饰的细胞,其中所述免疫细胞为自然杀伤(NK)细胞。

[0529] 31. 根据28所述的经遗传修饰的细胞,其中所述免疫细胞为T细胞。

[0530] 32. 根据27至31中任一项所述的经遗传修饰的细胞,其中所述经遗传修饰的细胞表达安全开关。

[0531] 33. 根据32所述的经遗传修饰的细胞,其中所述安全开关是诱导型的。

[0532] 34. 根据33所述的经遗传修饰的细胞,其中所述安全开关由利米多赛或雷帕霉素或雷帕霉素的类似物触发。

[0533] 35. 根据27至34中任一项所述的经遗传修饰的细胞,其中所述经遗传修饰的细胞进一步表达嵌合抗原受体。

[0534] 36. 根据27至35中任一项所述的经遗传修饰的细胞,其中所述经遗传修饰的细胞进一步表达未与所述嵌合受体蛋白融合的共刺激多肽。

[0535] 37. 根据36所述的经遗传修饰的细胞,其中未与所述嵌合受体蛋白融合的所述共刺激多肽包含4-1BB、OX40、CD28、ICOS、RANK、DAP10、DAP12、CD27、MyD88、IL-1R α 、HVEM、TRANCE、IL-1R β 、CD70、IL-18R α 、CD40、IL-18R β 、IL-33R α 、CD30或IL-33R β 共刺激结构域或其任何组合。

[0536] 38. 一种治疗方法,其包括向有需要的个体施用根据27至37中任一项所述的经遗传修饰的细胞。

[0537] 39. 根据38所述的方法,其中所述经遗传修饰的细胞对所述个体是自体的。

[0538] 40. 根据38所述的方法,其中所述经遗传修饰的细胞对所述个体是同种异体的。

[0539] 41. 根据38至40中任一项所述的方法,其中所述个体患有癌症。

[0540] 42. 根据41所述的方法,其中所述个体患有实体瘤。

[0541] 43. 一种产生经遗传修饰的细胞的方法,所述方法包括:

[0542] 将根据22至26中任一项所述的核酸引入到细胞中,从而产生经遗传修饰的细胞。

[0543] 44. 根据43所述的方法,其中所述经遗传修饰的细胞为免疫细胞。

[0544] 45. 根据44所述的方法,其中所述免疫细胞为自然杀伤(NK)细胞、T细胞、iNKT细胞或巨噬细胞。

[0545] 46. 根据44所述的方法,其中所述免疫细胞为自然杀伤(NK)细胞。

[0546] 47. 根据44所述的方法,其中所述免疫细胞为T细胞。

[0547] 实验性实施例

[0548] 提供以下实施例仅用于说明目的,并且除非另有说明,否则不旨在进行限制。因此,本发明不应以任何方式被解释为仅限于以下实施例,而是,应被解释为涵盖由于本文提供的教导而变得明显的任何和所有变化。

[0549] 无需进一步说明,据信本领域的普通技术人员可通过利用前面的描述和下面的说明性实施例,制备和利用本发明并实践所要求保护的方法。因此,以下工作实施例不应被解释为以任何方式限制本公开的其余部分。

[0550] 分子和细胞生物化学中的一般方法可以在诸如以下的标准教科书中找到:《分子克隆:实验室手册》,第3版(Sambrook等人,海港实验室出版社(HaRBoR Laboratory Press) 2001);《分子生物学简明方案(Short Protocols in Molecular Biology)》,第4版

(Ausubel等人编辑,约翰·威利父子公司(John Wiley&Sons)1999);《蛋白质方法(Protein Methods)》(Bollag等人,约翰·威利父子公司1996);《用于基因疗法的非病毒载体(Nonviral Vectors for Gene Therapy)》(Wagner等人编辑,学术出版社(Academic Press)1999);《病毒载体(Viral Vectors)》(Kaplif和Loewy编辑,学术出版社1995);《免疫学方法手册(Immunology Methods Manual)》(I.Lefkovits编辑,学术出版社1997);以及《细胞和组织培养:生物技术中的实验室程序(Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures in Biotechnology)》(Doyle和Griffiths,约翰·威利父子公司1998),其公开内容通过引用并入本文。用于本公开中提及或涉及的方法的试剂、克隆载体、细胞和试剂盒可从商业供应商诸如伯乐(BioRad)、安捷伦科技(Agilent Technologies)、赛默飞世尔科技(Thermo Fisher Scientific)、西格玛奥德里奇(Sigma-Aldrich)、新英格兰生物实验室(New England Biolabs(NEB))、宝生物工程美国公司(Takara Bio USA, Inc.)等,以及储库诸如例如Addgene公司、美国典型培养物保藏中心(ATCC)等获得。

[0551] 实施例1:工程化的CIR构建体在原代人T细胞中的表达

[0552] 为了证明嵌合受体的表达的效用(所述嵌合受体通过与HLA-G的天然受体结合而靶向HLA-G,所述天然受体被改变以产生激活免疫功能的信号而非抑制性信号传导),在SFG γ 逆转录病毒载体中工程化重组DNA构建体(参见图6A上的示意图)。在一个实例中,将编码ILT4的全长基因克隆到编码CD19的胞外结构域(Δ CD19)的基因的5' (参见表21B)。全长 Δ CD19可用于标记用该载体引入的转基因的表达。编码ILT4和CD19的顺反子被来源于明脉扁刺蛾病毒的T2A共翻译切割位点分离,以允许从单个mRNA分子中分离蛋白表达。所有其它的实例都类似地标记了由T2A序列分离的 Δ CD19。

[0553] 表达构建体的另一实例编码嵌合ILT受体(CIR),其编码ILT4的D1至D4结构域和跨膜结构域,但用来源于人4-1BB的共刺激结构域和来源于人CD3 ζ (BB. ζ)的信号传导结构域替换ILT4的天然胞内结构域。在本实例中,该构建体编码称为CIR1的CIR蛋白(参见表23B)。另外的实例编码CIR2,CIR2包含仅编码直接与HLA-G相互作用的D1和D2结构域而不编码D3和D4结构域的序列。这些序列与编码ILT4跨膜结构域和4-1BB的共刺激结构域以及CD3 ζ 信号传导结构域的序列融合(参见表24B)。另外的实例用编码CD8 α 的茎和跨膜结构域的序列替换编码ILT4茎和跨膜结构域的序列。这些构建体编码ILT4 CIR3(参见表37)和CIR4(参见表28B)。

[0554] 又另外的实例用编码ILT2的序列或仅编码ILT2的D1和D2结构域的序列替换编码ILT4的D1至D4结构域的序列。这些构建体编码ILT2 CIR1、CIR2、CIR3和CIR4(分别参见表15B、16B、36和20B)。在ILT2 CIR1和CIR2中,利用了编码ILT2的茎和跨膜结构域的序列,并且CIR3和CIR4用编码CD8 α 茎和跨膜结构域的序列替换这些序列。产生两个另外的构建体作为用于进一步实验的阳性对照。它们编码HLA-G特异性抗体15E7的结合元件(参见美国专利11312774B2),该结合元件与CD8 α 的CD8 α 茎和跨膜结构域以及BB. ζ 胞内结构域融合。这一起编码HLA-G嵌合抗原受体(HLA-G CAR)。第二阳性对照构建体编码针对CD33的CAR(Duong等人,《分子疗法-溶瘤药物(Mol. Ther. Onc.)》12:124),CD33是通常由急性髓细胞白血病细胞(AML)表达的靶蛋白。

[0555] 通过与编码逆转录酶和病毒衣壳以及包膜蛋白的辅助质粒一起转染到HEK293细胞中,从这些DNA构建体中产生 γ 逆转录病毒。这些逆转录病毒载体用于转导来源于2个健

康供体的原代人T细胞。通过由流式细胞术检测的 Δ CD19标志物蛋白的表达来标记转导的效率(参见图6B)。对于每种重组逆转录病毒,转导的效率大于80%(图6C)。含有ILT4和ILT2的胞外结构域的CIR构建体的表达通过流式细胞术确定,其中对ILT4(图6D)和ILT2(图6E)具有特异性的抗体通过染色的转导的细胞群体的平均荧光强度来定量。CIR蛋白的稳定表达很容易检测到,尽管ILT2 CIR4的表达水平相对于其它CIR蛋白明显降低。

[0556] 本实施例中描述的实验证明,可以产生编码来源于ILT2和ILT4的CIR蛋白的重组逆转录病毒,并且可以用这些逆转录病毒转导原代人免疫细胞,以产生稳定地表达CIR蛋白的免疫细胞。

[0557] 方法:用SnapGene软件设计DNA构建体,并且由IDT实验室从GB10ck片段合成DNA序列。用于重组DNA组装的标准克隆技术将合成的DNA片段克隆到SFG DNA载体中,用于生产基于莫洛尼鼠白血病病毒的逆转录病毒。

[0558] 实施例2:通过CIR-T细胞的抗肿瘤功效。

[0559] 为了产生稳定地表达HLA-G的不同同种型的肿瘤细胞系,产生了编码HLA-G同种型HLA-G1、HLA-G2和HLA-G5的重组逆转录病毒。这些逆转录病毒中的每一种也编码一种用T2A共翻译切割元件从HLA-G中分离的标志物蛋白 Δ EGFR,以检测病毒转导的效率。这些 γ 逆转录病毒用于转导THP1 AML细胞,以获得稳定、高水平表达的HLA-G同种型。通过流式细胞术检测由用针对EGFR的抗体染色标记的转导效率,并且对于每种重组逆转录病毒都是高的。还用对HLA-G1而非HLA-G2具有特异性的MEM-G/9抗体通过流式细胞术来确定转导的THP1细胞中HLA-G的表达,并且在转导的细胞中表达处于高水平。

[0560] 也表达HLA-G1的THP1-GFP细胞中GFP-ffluc标志物蛋白的表达处于高水平(图7B)。GFPffluciferase表达可用于在与CIR-T细胞的共培养实验中,通过绿色荧光随时间的减少或荧光素酶促活性的丧失,来间接测量THP1细胞的生存力的丧失。因此,表达HLA-G的THP1细胞是用于确定表达CIR的T细胞的细胞毒性的合适的靶细胞。

[0561] 来自两个健康供体的原代人T细胞用实施例1中描述的编码CIR和CAR的逆转录病毒的不同队列进行转导。将CIR-T、CAR-T或模拟转导的(NT)T细胞与表达HLA-G1的THP1-GFP细胞以5:1的效应子与靶标的比率一起共培养,并且置于配备有能够在2天内周期性成像的显微镜的Incucyte培养箱中。在共培养时间段期间,每12小时对来自THP1-HLAG1 GFP细胞的绿色荧光进行定量,作为肿瘤生长或肿瘤细胞杀伤的间接测量(图8)。与模拟转导的T细胞或与被转导以表达全长ILT2或ILT4的T细胞共培养显示GFP在肿瘤靶标中的稳定表达,这些T细胞含有天然的抑制信号传导结构域(阴性对照,阴性对照(Neg ct1))。与HLA-G CAR-T细胞或CD33 CAR-T细胞共培养显示,从前12小时时间点开始,GFP荧光减少,表明肿瘤得到控制。这些CAR-T细胞在本实验中用作阳性对照。来源于每个供体的ILT2 CIR-T细胞也显示出降低的GFP荧光和有效的肿瘤控制。应当注意,CIR4构建体的抗肿瘤功效降低,可能是由于该构建体的表达水平降低(参见图6E)。ILT4 CIR-T细胞也表现出对THP-1HLA-G1扩增的有效控制。

[0562] 通过在与转导的人T细胞的共培养物中测量与肿瘤靶标中GFP-荧光素酶表达相关的荧光素酶活性,来确定在短24小时时间过程中针对相同THP-1HLA-G1的抗肿瘤功效(图9)。与表达全长ILT2(阴性对照)的T细胞(E:T-5:1和1:1)的共培养物具有超过100,000光单位的可测量的荧光素酶活性,并且用作其它ILT2 CIR构建体杀伤THP1-HLA-G1-GFPffluc靶

标的能力的参考。ILT2 CIR-T细胞共培养物显著降低了荧光素酶活性,证明了ILT2 CIR-T细胞的杀伤能力。再次应当注意,相对于其它CIR-T细胞和CAR-T细胞阳性对照,ILT2 CIR4细胞显示出降低的抗肿瘤细胞毒性,这可能是由于CIR表达降低。与ILT4 CIR-T细胞的共培养物也证明了相对于全长ILT4(Neg Ct1)增强的抗THP1-HLAG1细胞毒性。应当注意,在这种情况下,CIR4-T细胞相对于其它CIR-T细胞和CD33CAR-T细胞具有优异的抗肿瘤细胞毒性。

[0563] 本实施例中描述的实验证明,CIR蛋白在人免疫细胞(在该特定示例性实施方案中为T细胞)中的表达可以将免疫细胞(例如,T细胞)的特异性重定向至表达HLA-G的肿瘤靶标。此外,这些实验证明HLA-G和ILT2或ILT4序列之间的结合相互作用不足以获得抗肿瘤功效,而是需要用激活T细胞功能的结构域替换天然ILT2或ILT4胞内信号传导结构域来增强细胞毒性。此外,证明了ILT2或ILT4的D1和D2结构域足以靶向嵌合ILT受体(CIR)构建体中的HLA-G。

[0564] 实施例3:在CIR构建体中茎和跨膜结构域的改变

[0565] 在被设计为促进与靶细胞的结合相互作用和在接合时的胞内信号转导的工程化的嵌合蛋白中,最佳接头结构域的选择对于获得增加的效率可能是重要的。茎结构域从细胞膜延伸出靶特异性结合元件,并且在不抑制与靶蛋白接合的情况下呈递结合元件。跨膜结构域在接合时促进信号转导至胞内结构域,并且维持在质膜中的稳定表达。

[0566] 实施例1和2证明了ILT4 CIR4在人T细胞中转导后表现出适当的表达水平,并且相对于其它CIR构建体增强了抗肿瘤细胞毒性。这种包含ILT4的D1和D2结构域以及BB.ζ信号传导元件的构建体设计用于“混合和匹配”实验,用其它信号传导受体的茎和跨膜结构域替换CD8α茎和跨膜结构域。创建的构建体在图10中描绘。作为实例,CIR6用来源于人免疫球蛋白IgG4的CH2和CH3结构域替代CD8α茎。第二个实例通过仅编码也与CD8α跨膜结构域融合的人IgG4的CH3结构域来减少茎的长度。另一个实例将CH3CH2茎与来源于人CD28的跨膜结构域融合,其中第四个实例也将茎的长度减少到仅与CD28_{TM}融合的CH3结构域。又另外的实例编码了与CD28跨膜结构域融合的短CD28来源的茎。这些CIR构建体被命名为CIR6、CIR7、CIR8、CIR9和CIR10(分别参见表38-42)。编码这些替代的ILT4 CIR衍生物的逆转录病毒构建体也编码由T2A共翻译切割位点分开的ΔCD19标志物蛋白。

[0567] 产生编码ILT4 CIR构建体的γ逆转录病毒,并且转导原代人T细胞。对于低感染复数和高感染复数,用2或8毫升(mL)的逆转录病毒上清液进行转导。通过流式细胞术监测总转导效率,以检测在转导后第7天和第14天的ΔCD19标志物表达(图11A)。对于编码ILT2 CIR4、ILT4 CIR4(亲本构建体)和HLA-G CAR的对照构建体,转导效率大于60%。对于含有CD28跨膜结构域的ILT4 CIR衍生物,转导效率相当。然而,对于编码与CH2CH3或CH3茎匹配的CD8α跨膜结构域的CIR构建体,转导效率相对较差。用ILT4特异性抗体通过流式细胞术来检查ILT4 CIR衍生物的表达水平(图11B,图11C)。当作为高于背景门控的细胞的%(图11B)或作为信号的平均荧光强度(MFI)检查时,含有CD8α茎和跨膜结构域的CIR4的表达是稳健的。相反,具有替代的茎或跨膜结构域的ILT4 CIR衍生物的MFI未升高到高于在用对照构建体(诸如不表达ILT4 CIR的HLA-G CAR或ILT2 CIR4)转导的T细胞中观察到的背景信号。

[0568] 本实施例中描述的实验表明,ILT4的D1和D2结构域呈现背景对于CIR的稳定表达以及(通过扩展)CIR-T细胞的最佳功能性可能是重要的。

[0569] 实施例4:对于HLA-G同种型的CIR-T细胞靶向的广泛特异性

[0570] 嵌合抗原受体 (CAR) 通过通常来源于抗体的结合结构域、类似于抗体的VhH结构域或不太常见的针对靶亲和力选择并针对靶特异性筛选的合成肽与它们的大分子靶标接合。在这些情况中的每一种中,结合结构域随机地实现特异性和亲和力,并且结合物从广泛多样性的潜在结合物库中选择。重要的是,被结合物接合的靶标上的表位最常见地是一组线性氨基酸,其可以通过改变由替代的mRNA剪接或翻译后修饰产生的靶蛋白的不同功能同种型的序列同一性被去除或重构。在HLA-G的情况下,HLA-G2同种型去除了整个 $\alpha 2$ 结构域,并且任何使用需要暴露 $\alpha 2$ 的表位的抗体都将被掩盖而无法与HLA-G2相互作用。我们认识到,相反,蛋白之间的受体-配体相互作用倾向于具有将被自然选择的广泛结合相互作用区域。在HLA-G与ILT2和ILT4相互作用的实例中,我们认识到HLA-G作为胎儿胎盘或肿瘤细胞免疫逃避剂的功能表现可能需要每种功能同种型与ILT2和ILT4相互作用。因此设计了实验以测试这种广泛特异性的自然选择是否意味着嵌合ILT受体 (CIR) 比典型的HLA-G靶向嵌合抗原受体 (CAR) 对HLA-G同种型具有更广泛的特异性。

[0571] Mo1m13-GFPffluc和Mo1m14-GFPffluc细胞来源于AML肿瘤,并且各自被稳定地转导以表达作为与萤火虫荧光素酶的融合体的GFP。通过流式细胞术评估每个细胞的HLA-G表达,并且发现Mo1m14细胞为HLA-G阳性(图12)。来自两个供体的原代人T细胞用ILT4 CIR4、CIR6和CIR7构建体转导,所述构建体编码ILT4 D1和D2结构域,作为具有CD8 α 跨膜结构域和CD8 α 茎(CIR4)、CH2CH3茎(CIR6)或CH3茎(CIR7)的HLA-G结合物。在这些实验中还产生了HLA-G CAR-T细胞。

[0572] 以5:1的E:T比率进行转导的T细胞和表达HLA-G的Mo1m14靶标的共培养。通过在Incucyte培养箱/显微镜中监测GFP荧光来评估共培养物中CIR-T或CAR-T细胞控制肿瘤扩增的能力(图13A)。不表达CIR或CAR的模拟转导的T细胞在48小时内不能控制Mo1m14的扩增,但ILT4 CIR4-T共培养物显示出相对于模拟转导的细胞GFP荧光大大降低。鉴于实施例3中显示的这些构建体的较差表达,CIR 6和CIR7-T细胞显示出对Mo1m14细胞的较差控制,如所预期的。令人惊讶的是,HLA-G CAR-T细胞也表现出控制Mo1m14-GFPffluc细胞生长的较差能力。

[0573] 进行类似的共培养,以通过降低荧光素酶活性来确定在24小时内CIR-T和HLA-GCAR-T细胞对Mo1m14-GFPffluc细胞的细胞毒性(图13B)。由与模拟转导的T细胞共培养的Mo1m14-GFPffluc细胞产生的荧光素酶活性与单独培养的肿瘤细胞的荧光素酶活性相同。与产生的HLA-G CAR-T细胞的共培养物具有与模拟转导的T细胞的共培养物非常相似的荧光素酶活性,表明HLA-G CAR-T细胞在独立的细胞毒性测定中未能靶向Mo1m14 AML细胞。相反,ILT4 CIR4-T细胞对Mo1m14-GFPffluc靶标具有显著的细胞毒性。这些结果导致了一种假设,即HLA-G CAR-T细胞可能不识别Mo1m14细胞上存在的HLA-G同种型,而其被ILT4 D1D2 CIR识别和靶向。

[0574] 为了确定ILT4 CAR-T细胞是否表现出靶向HLA-G同种型的广泛特异性,将表达最佳茎和跨膜结构域(CIR4)或降低表达的次优结构域(CIR6、CIR7)的ILT4 CIR-T细胞或HLA-G CAR-T细胞的共培养物与被转导以仅表达HLA-G1(图14A)或仅表达HLA-G2(图14B)的THP1-GFP1uc细胞共培养。当结合物与靶蛋白接合并激活信号转导时,会诱导促炎细胞因子的产生。分泌到培养基中的干扰素- γ (IFN- γ) 被用作共培养物中T细胞的激活状态的代表。如从实施例2中显示的结果所预期的,表达HLA-G1的靶细胞与ILT4 CIR4-T细胞和HLA-G

CAR-T细胞的共培养物都显示出增强的IFN- γ 的产生(图14A)。有趣的是,仅用与THP1-HLA-G2-GFPffluc靶细胞共培养的ILT4 CIR4-T细胞刺激IFN- γ 的产生,并且在HLA-G CAR-T细胞与仅表达HLA-G2的靶细胞的共培养物中不支持IFN- γ 分泌(图14B)。

[0575] 本实施例中呈现的结果表明,与经典嵌合抗原受体(CAR)中的抗体衍生的结合物相比,通过使用含ILT D1和D2的结合剂(在该特定示例性实施方案中使用ILT4 D1-D2)可以增强HLA-G同种型的靶向特异性(例如,可以靶向的同种型的范围可以被拓宽)。

[0576] 尽管为了清楚理解的目的,已经通过图示和实例的方式对前述发明进行了一些详细描述,但是鉴于本发明的教导,对于本领域普通技术人员显而易见的是,在不脱离所附权利要求的精神或范围的情况下,可以对其进行某些改变和修改。

[0577] 因此,上文仅说明了本发明的原理。应当理解,本领域技术人员将能够设计出多种布置,这些布置尽管没有在本文明确地描述或示出,但体现了本发明的原理并且被包括在本发明的精神和范围内。此外,本文陈述的所有实例和条件性语言主要旨在帮助读者理解本发明的原理和本发明人为推进现有技术而贡献的概念,并且应被解释为不限于此类具体陈述的实例和条件。此外,本文陈述本发明的原理、方面和实施方案以及其具体实例的所有陈述旨在涵盖其结构等同物和功能等同物两者。另外,意图在于此类等同物包括当前已知的等同物和未来所开发的等同物两者,即,执行相同功能的开发的任何元件,而不论结构如何。此外,本文公开的任何内容都不旨在奉献给公众,无论此类公开内容是否在权利要求中明确陈述。

[0578] 因此,本发明的范围不旨在限于本文示出和描述的示例性实施方案。相反,本发明的范围和精神由所附权利要求来体现。在权利要求中,仅当在权利要求中的限制的开头引用确切短语“用于……的装置”或确切短语“用于……的步骤”时,35U.S.C. §112(f)或35U.S.C. §112(6)被明确定义为被援引用于权利要求中的此类限制;如果在权利要求的限制中没有使用此类确切短语,则35U.S.C. §112(f)或35U.S.C. §112(6)未被援引。

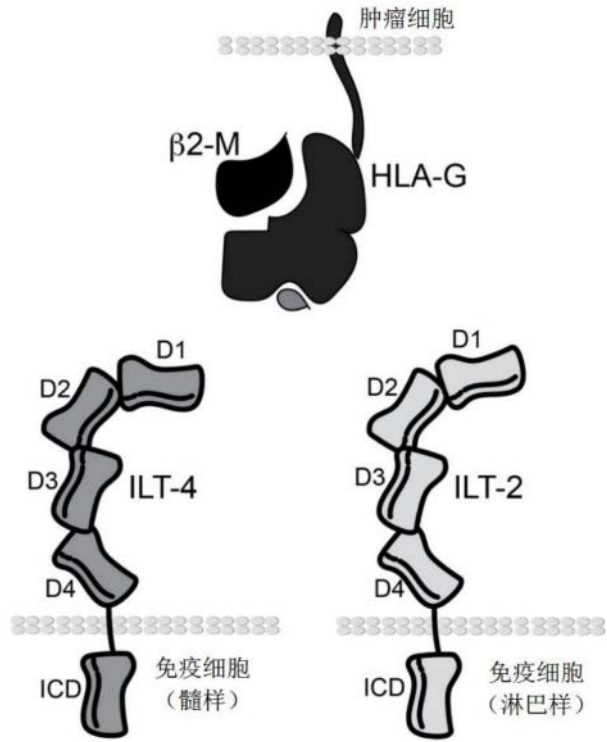


图1A

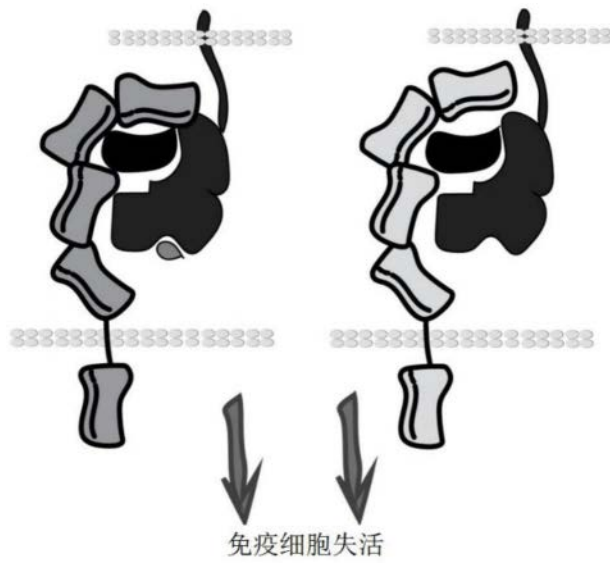


图1B

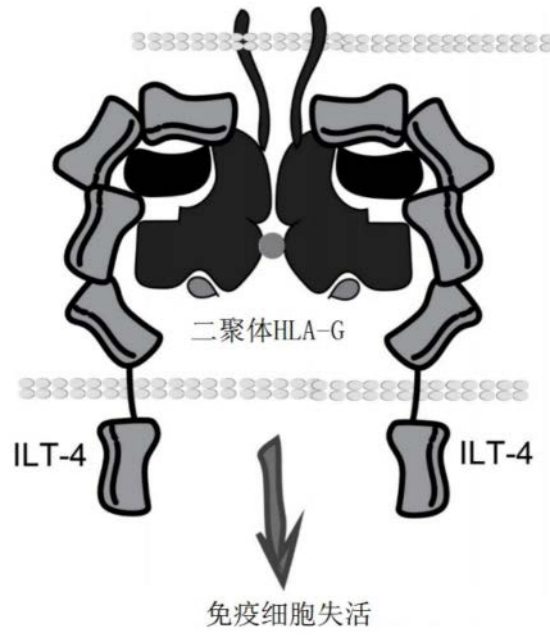


图2

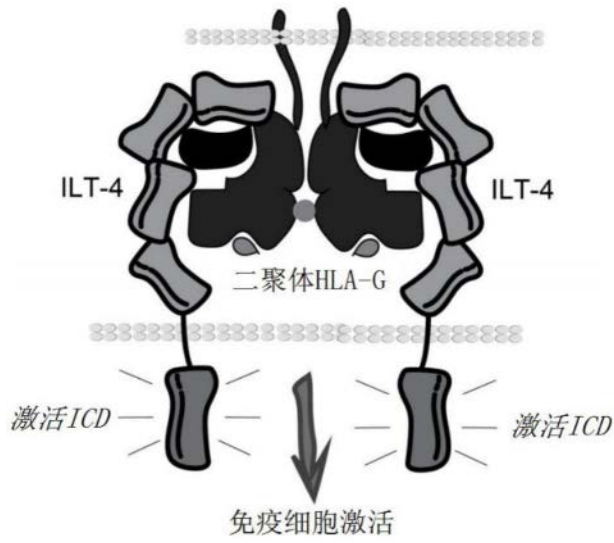


图3A

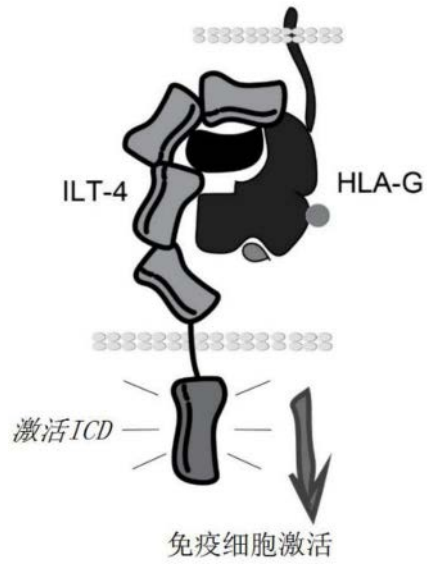


图3B

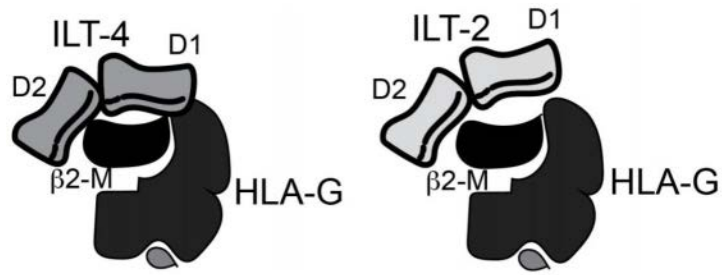


图4A

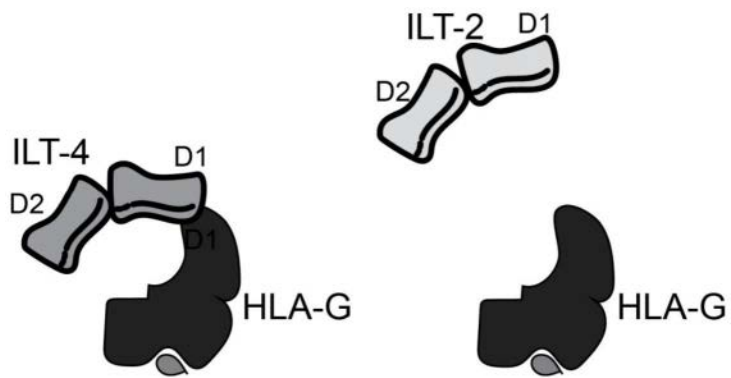


图4B

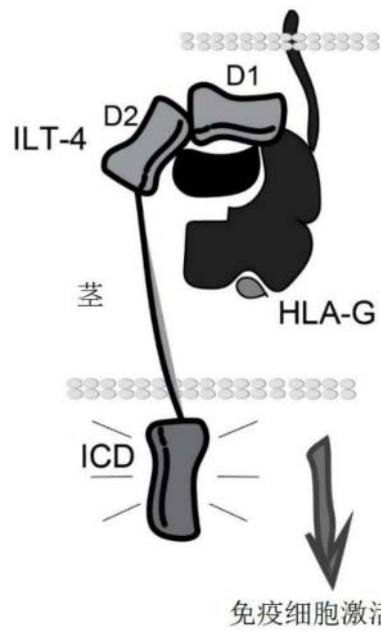


图5A

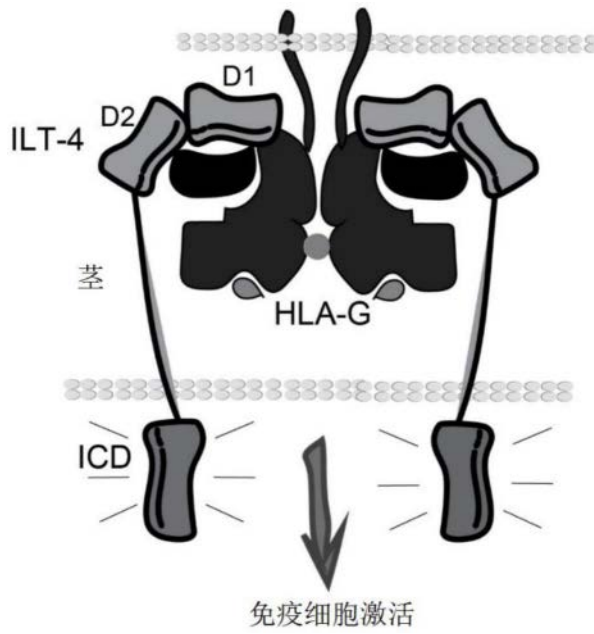


图5B

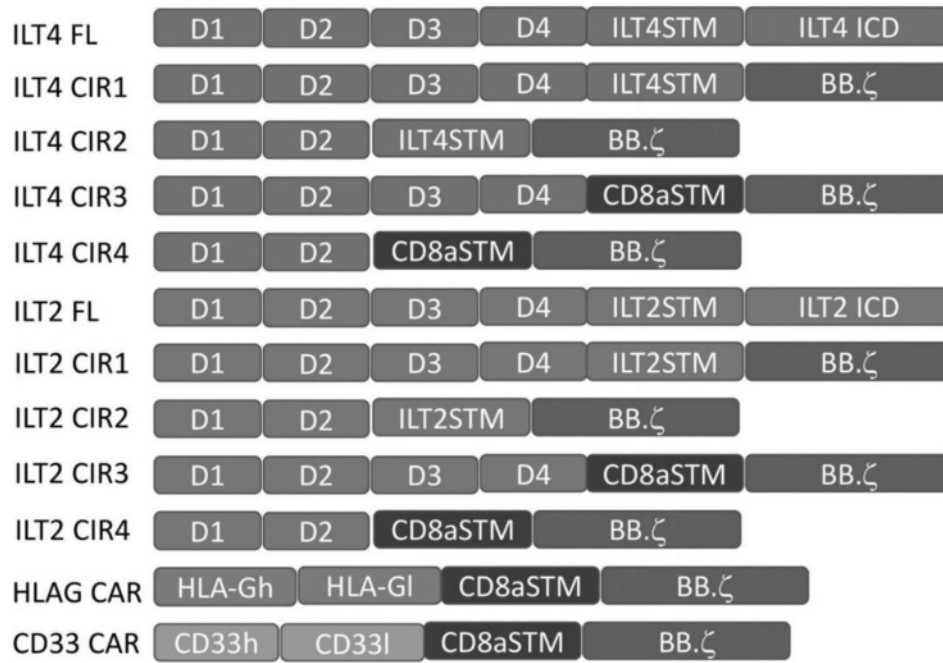


图6A

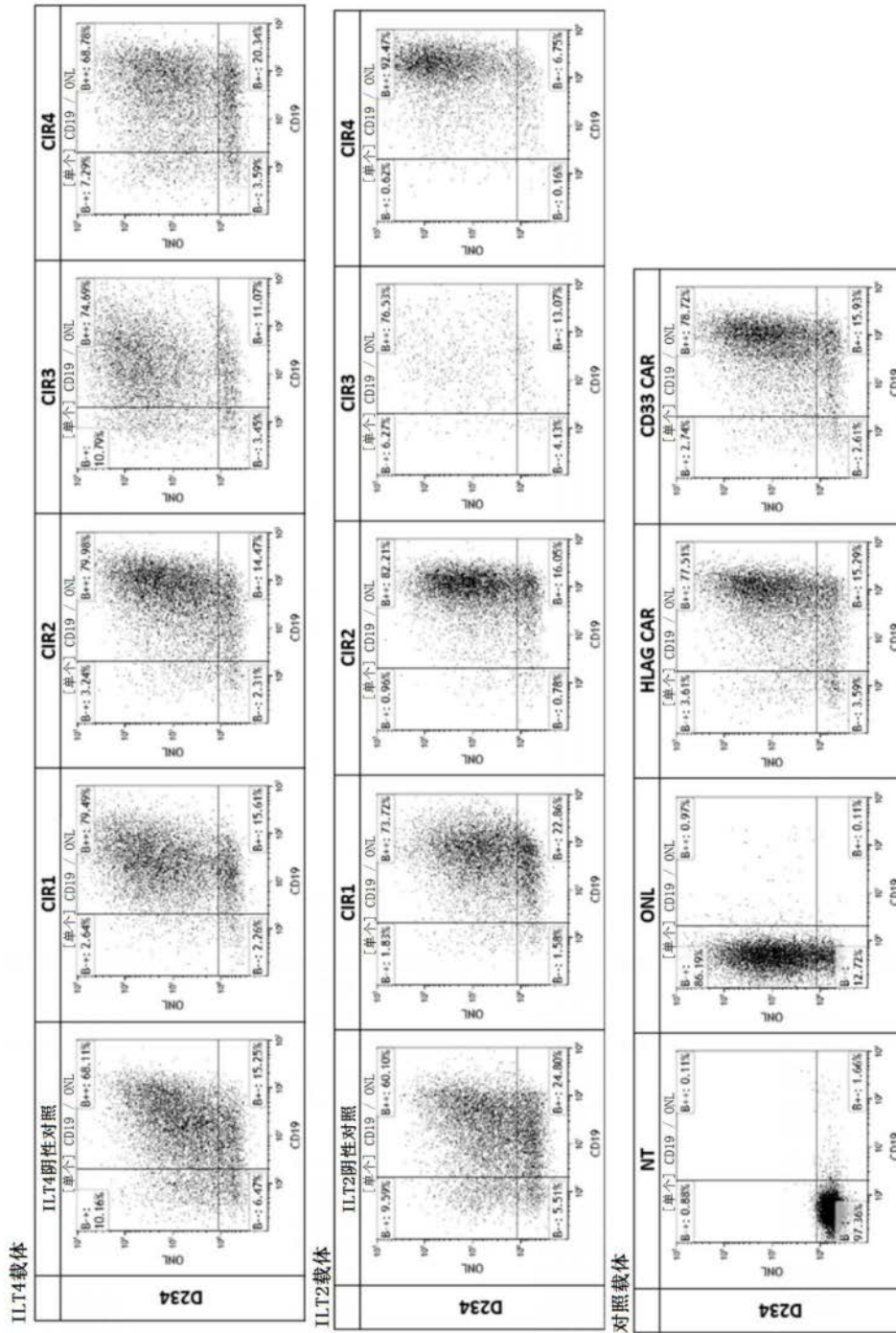


图6B

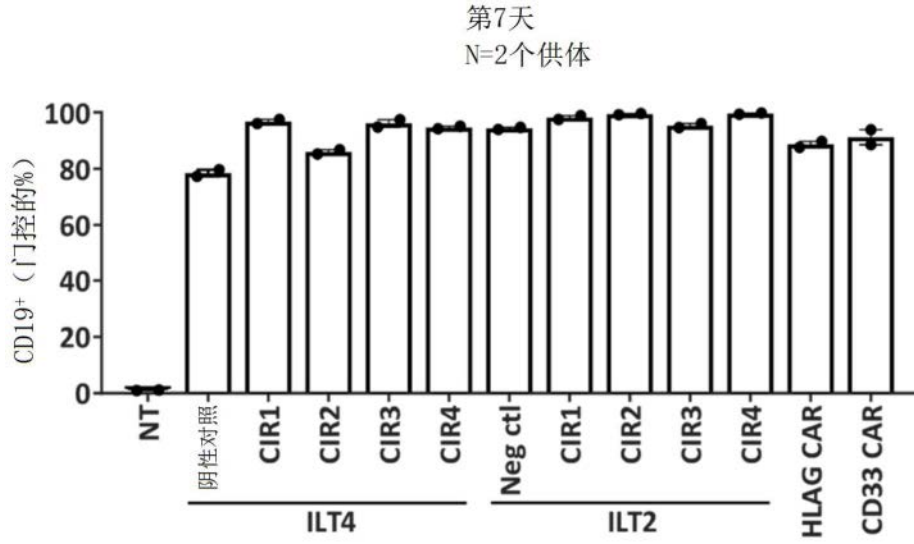


图6C

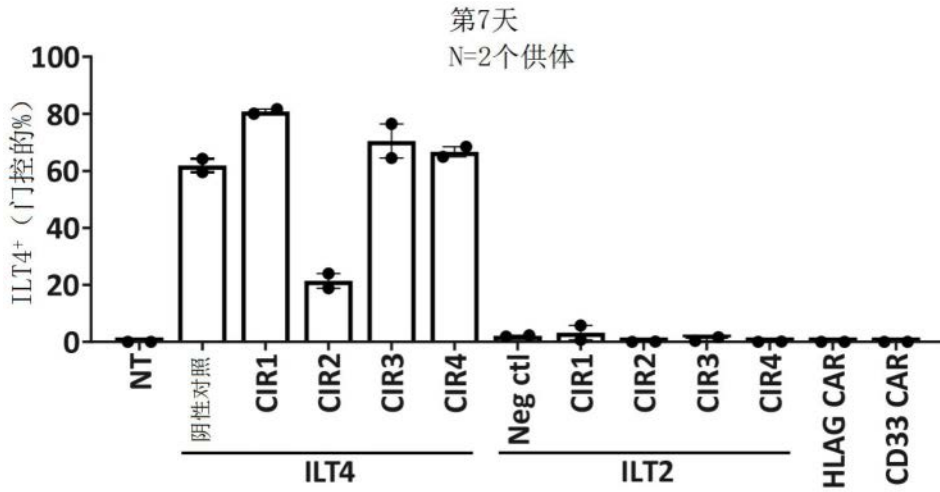


图6D

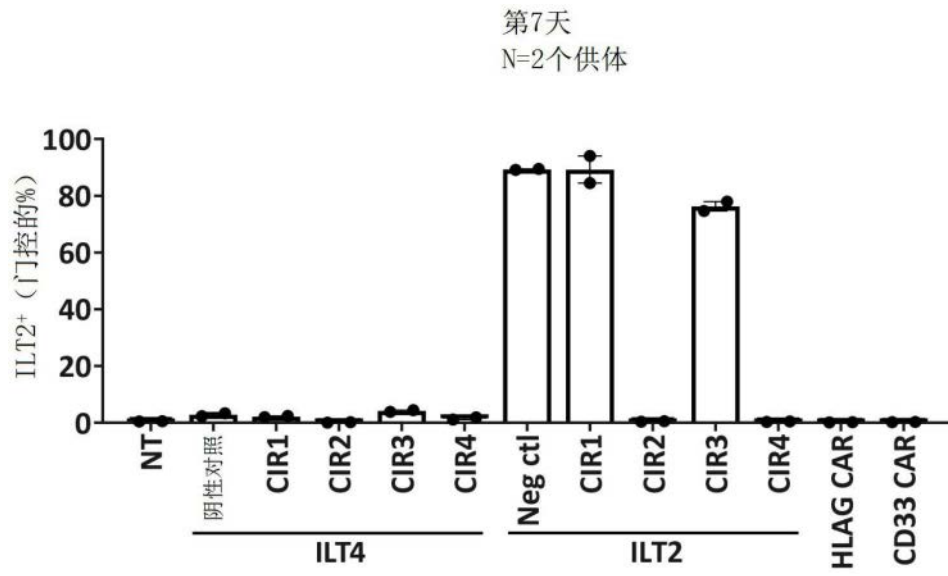


图6E

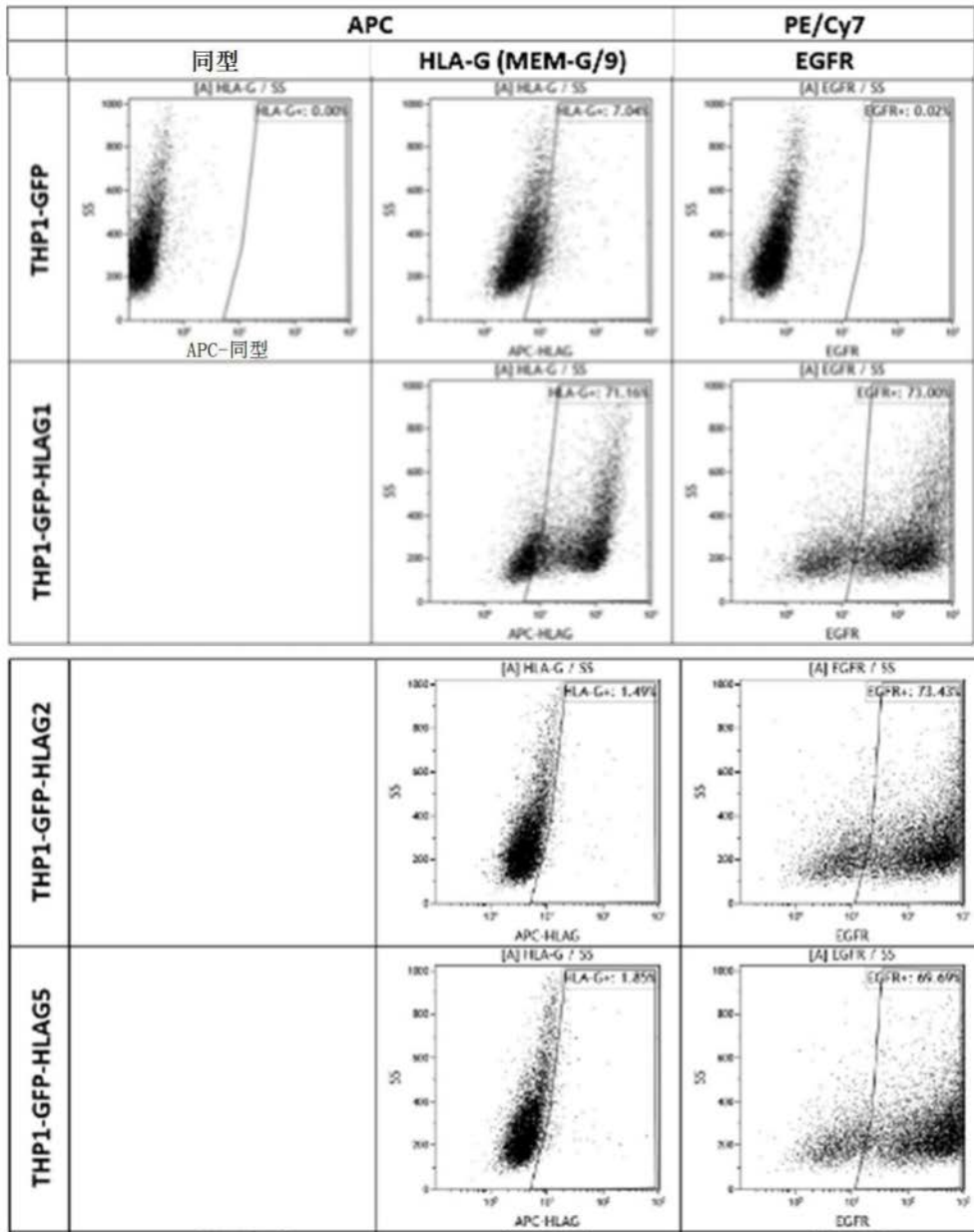


图7A

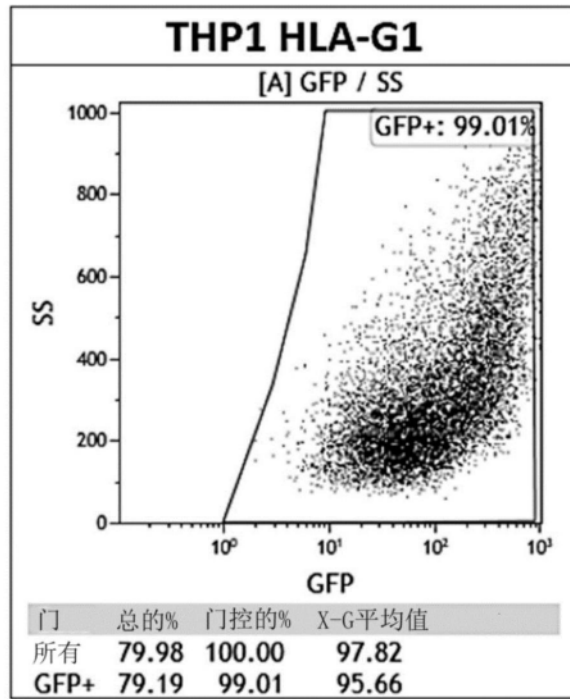


图7B

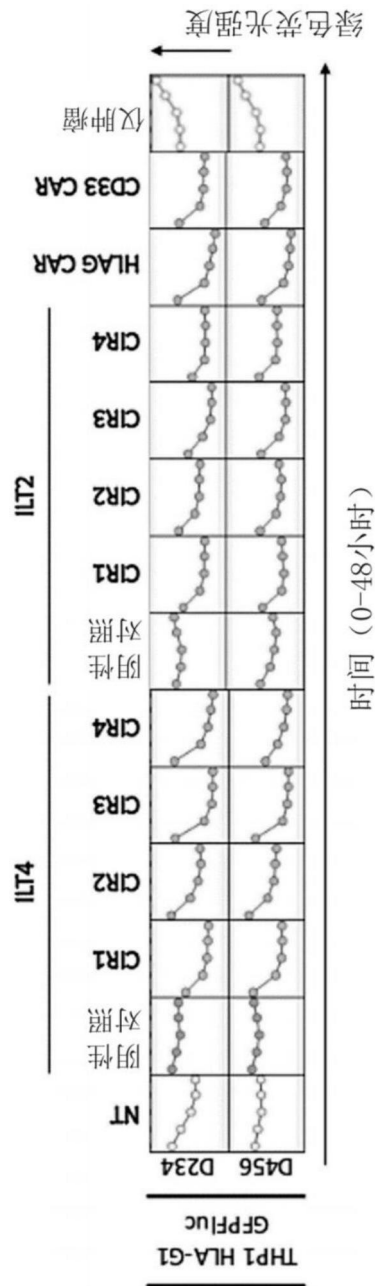


图8

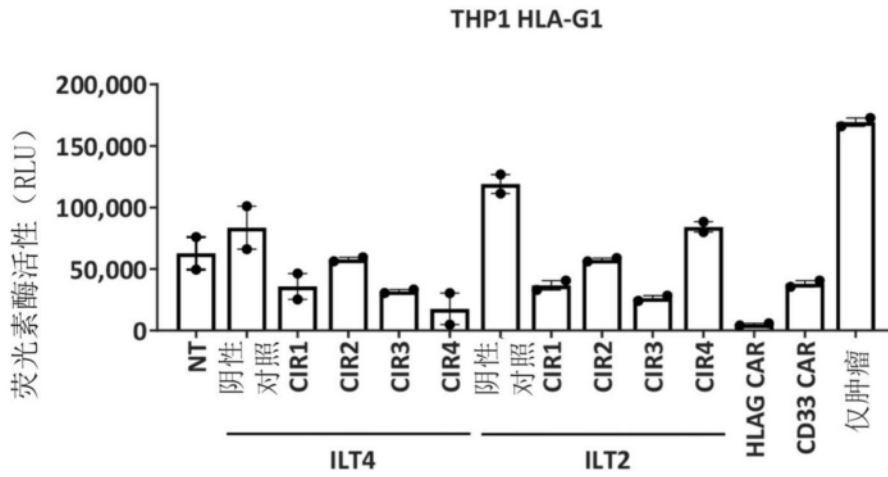


图9

组分		简称
ILT4 (D1-D2). CD8茎 tm . BB. z. T2A-dCD19		ILT4 CD8s.CD8 tm CIR4
ILT4(D1-D2).CH2CH3s.CD8 tm .BB.z.T2A-dCD19		ILT4 CH2CH3s.CD8 tm CIR6
ILT4(D1-D2).CH3s.CD8 tm .BB.z.T2A-dCD19		ILT4 CH3s.CD8 tm CIR7
ILT4(D1-D2).CH2CH3s.CD28 tm .BB.z.T2A-dCD19		ILT4 CH2CH3s.CD28 tm CIR8
ILT4(D1-D2).CH3s.CD28 tm .BB.z.T2A-dCD19		ILT4 CH3s.CD28 tm CIR9
ILT4(D1-D2).CD28s.CD28 tm .BB.z.T2A-dCD19		ILT4 CD28s.CD28 tm CIR10
HLAG (15E7). CD8茎 TM . BB. z. T2A-dCD19		HLAG CAR

NT	CD8	CH2CH3	CH3	CH2CH3	CH3	CD28	茎 跨膜
	CD8	CD8	CD8	CD28	CD28	CD28	
	CIR4	CIR6	CIR7	CIR8	CIR9	CIR10	

图10

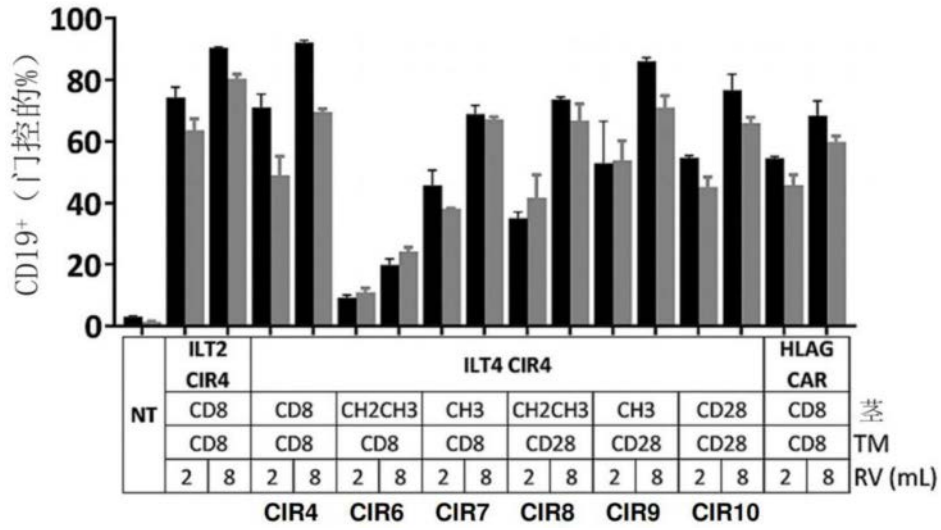


图11A

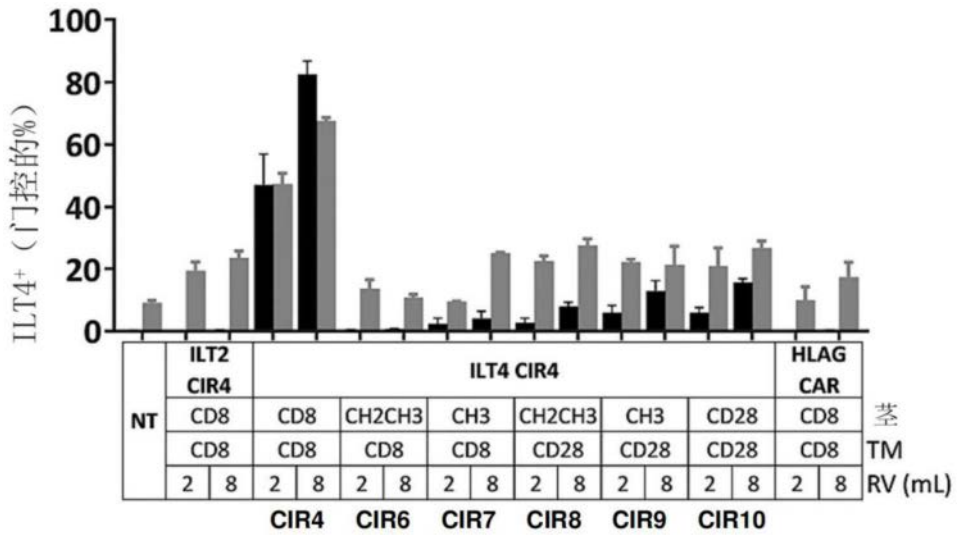


图11B

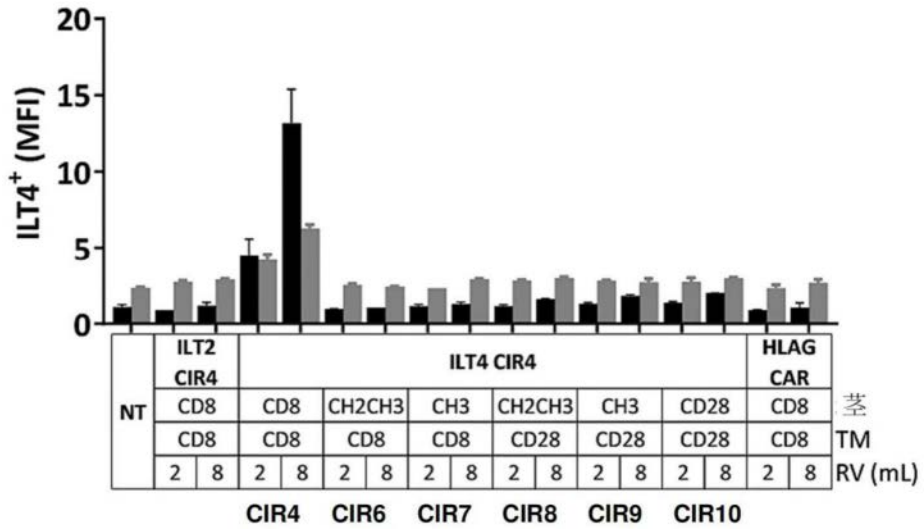


图11C

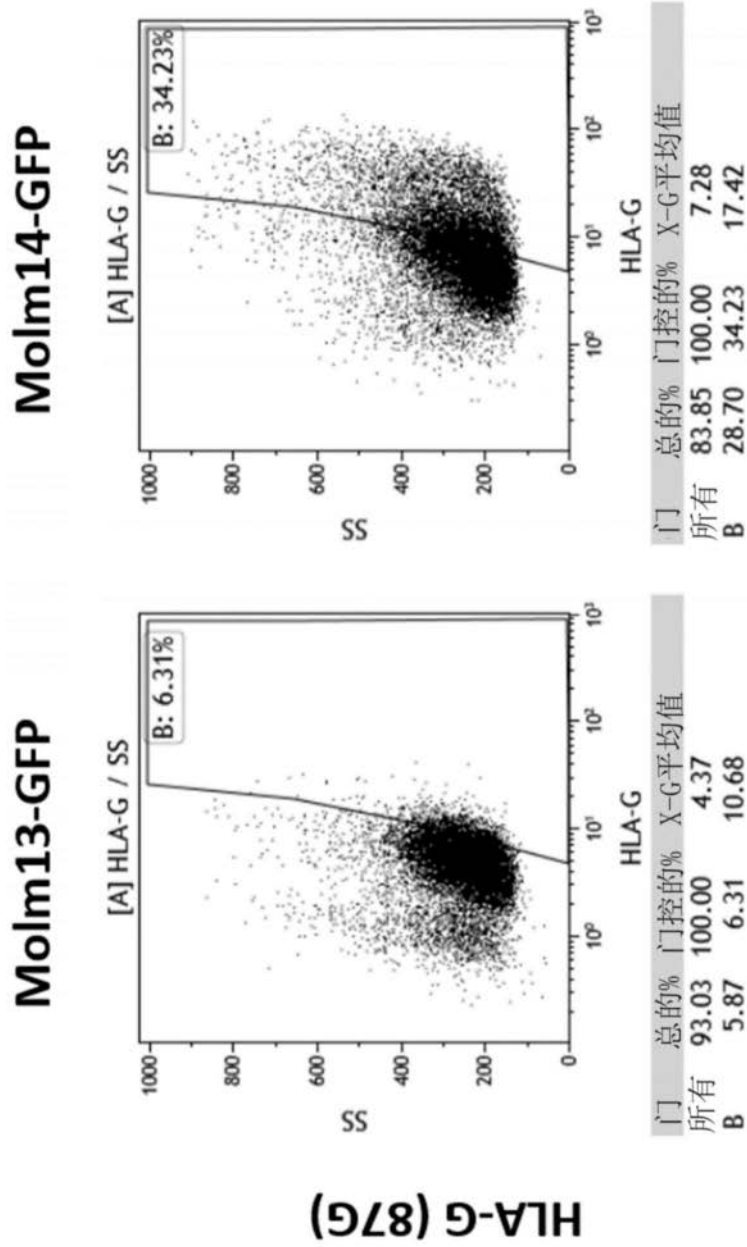


图12

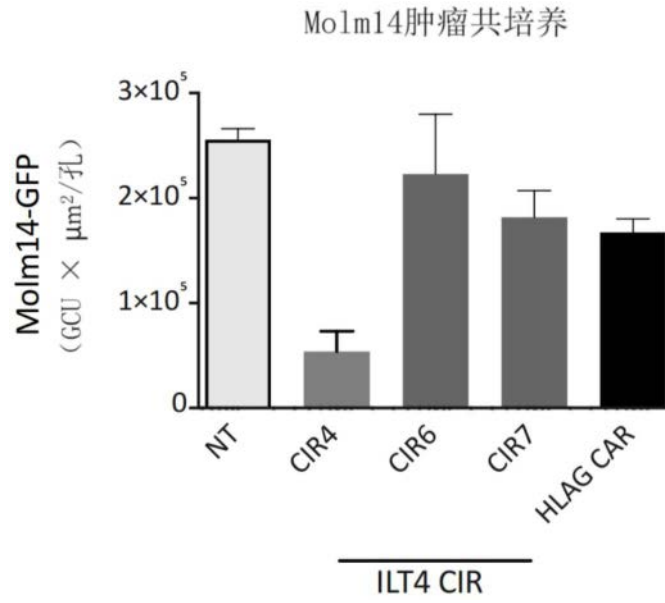


图13A

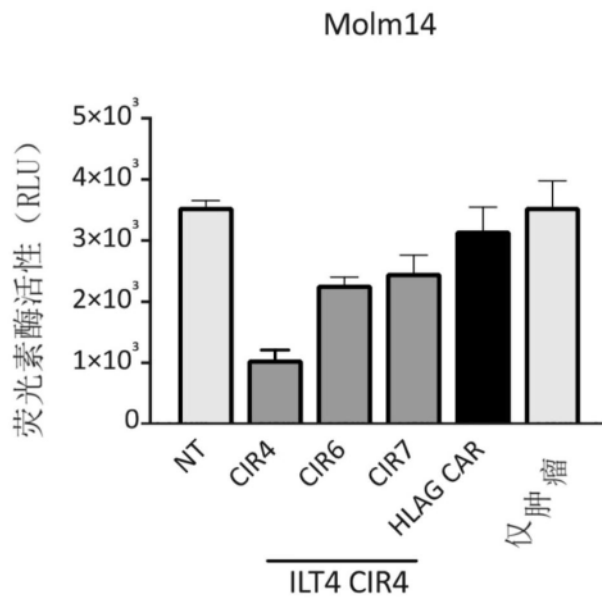


图13B

IFN- γ - ILT4 CIR相对于THP1-HLA-G1

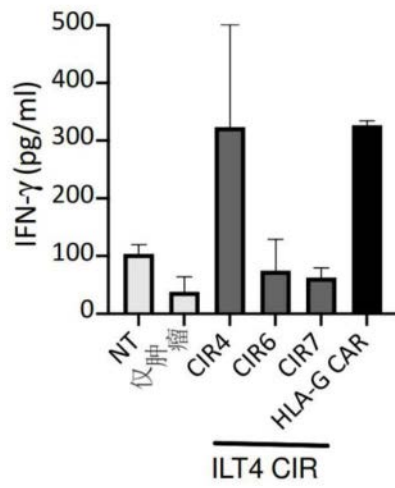


图14A

IFN- γ - ILT4 CIR相对于THP1-HLA-G1

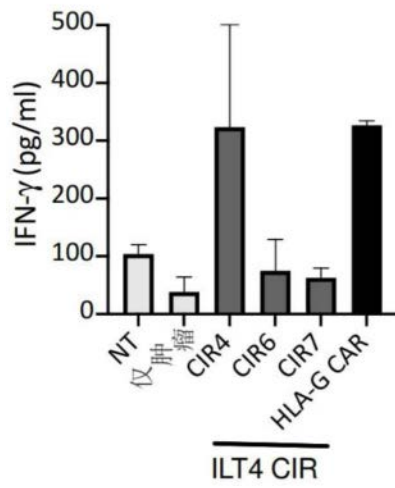


图14B