



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117683082 A

(43) 申请公布日 2024. 03. 12

(21) 申请号 202311188653.2

(22) 申请日 2019.04.09

(30) 优先权数据

1805918.8 2018.04.10 GB

(62) 分案原申请数据

201980025067.1 2019.04.09

(71) 申请人 奥托路斯有限公司

地址 英国伦敦

(72) 发明人 M·普勒 S·科多巴 S·奥诺哈

A·W·基纳 S·托马斯 R·贾

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

专利代理师 涂滔

(51) Int. Cl.

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 35/17 (2015.01)

C07K 14/54 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书38页

序列表(电子公布) 附图7页

(54) 发明名称

工程化细胞溶解性免疫细胞

(57) 摘要

本发明涉及工程化细胞溶解性免疫细胞,其包括:i)可释放蛋白,其包含感兴趣的多肽(POI)和第一相互作用结构域;和ii)保留蛋白,其保留在所述细胞的胞内区隔中,且包含与所述第一蛋白相互作用结构域结合的第二相互作用结构域,其中所述第一蛋白相互作用结构域和第二蛋白相互作用结构域之间的结合被试剂的存在破坏,使得在不存在所述试剂的情况下,所述第一蛋白相互作用结构域和第二蛋白相互作用结构域结合并导致POI保留在胞内区隔中;而在存在所述试剂的情况下,所述第一蛋白相互作用结构域和第二蛋白相互作用结构域不结合,并且POI从所述胞内区隔释放并在所述细胞表面表达或由所述细胞分泌。



第一相互作用结构域
感兴趣的蛋白



第二相互作用结构域
保留结构域

1.选自下组的肽:ACPGWARAFC(SEQ ID NO:34);ACPHWAQ AFC(SEQ ID NO:35);ACPQWAMMFC(SEQ ID NO:36)和ACPPWAYSFC(SEQ ID NO:37)。

2.可置换的结合系统,其包含:

a)结合米诺环素并具有以下互补决定区的结构域抗体(dAb):具有氨基酸序列GRTFSSYN(SEQ ID NO:38)的CDR1,具有氨基酸序列ISWSGART(SEQ ID NO:39)的CDR2;具有氨基酸序列AAGRGGWGTEAILDY(SEQ ID NO:40)的CDR3;和

b)根据权利要求1的肽,其结合dAb并且通过米诺环素与dAb的结合而被置换。

3.嵌合抗原受体(CAR)系统,其包含:

(i)受体组分,其包含抗原结合结构域、跨膜结构域和结合米诺环素并具有以下互补决定区的结构域抗体(dAb):具有氨基酸序列GRTFSSYN(SEQ ID NO:38)的CDR1,具有氨基酸序列ISWSGART(SEQ ID NO:39)的CDR2;具有氨基酸序列AAGRGGWGTEAILDY(SEQ ID NO:40)的CDR3;和

(ii)细胞内信号传导组分,其包含信号传导结构域和选自下组的肽:ACPGWARAFC(SEQ ID NO:34);ACPHWAQ AFC(SEQ ID NO:35);结合受体组分的dAb的ACPQWAMMFC(SEQ ID NO:36)和ACPPWAYSFC(SEQ ID NO:37),所述肽结合受体组分的dAb;

其中,所述dAb和所述肽的结合被靶标化合物的存在而破坏,使得在不存在靶标化合物的情况下,受体组分和信号传导组分异二聚化并且抗原结合结构域与抗原的结合导致通过信号传导结构域的信号传导;而在靶标化合物的存在下,受体组分和信号传导组分不发生异二聚化,并且抗原结合结构域与抗原的结合不导致通过信号传导结构域的信号传导。

4.嵌合抗原受体(CAR)系统,其包含:

(i)细胞内信号传导组分,其包含信号传导结构域和结合米诺环素并具有以下互补决定区的结构域抗体(dAb):具有氨基酸序列GRTFSSYN(SEQ ID NO:38)的CDR1,具有氨基酸序列ISWSGART(SEQ ID NO:39)的CDR2;具有氨基酸序列AAGRGGWGTEAILDY(SEQ ID NO:40)的CDR3;

(ii)受体组分,其包含抗原结合结构域、跨膜结构域和选自下组的肽:ACPGWARAFC(SEQ ID NO:34);ACPHWAQ AFC(SEQ ID NO:35);结合细胞内信号传导组分的dAb的ACPQWAMMFC(SEQ ID NO:36)和ACPPWAYSFC(SEQ ID NO:37),所述肽结合细胞内信号传导组分的dAb;和

其中,所述dAb和所述肽的结合被靶标化合物的存在而破坏,使得在不存在靶标化合物的情况下,受体组分和信号传导组分异二聚化并且抗原结合结构域与抗原的结合导致通过信号传导结构域的信号传导;而在靶标化合物的存在下,受体组分和信号传导组分不发生异二聚化,并且抗原结合结构域与抗原的结合不导致通过信号传导结构域的信号传导。

5.细胞,其包含根据权利要求3或4的CAR系统。

6.编码根据权利要求3或4的CAR系统的核酸构建体,其包含编码所述受体组分的第一核酸序列和编码细胞内信号传导组分的第二核酸序列。

7.载体,其包含根据权利要求6的核酸构建体。

8.用于制备根据权利要求5的细胞的方法,其包括用根据权利要求6的核酸构建体体外转导或转染细胞。

9.药物组合物,其包含多个根据权利要求5的细胞。

10.治疗癌症的方法,其包括将根据权利要求9的药物组合物施用于受试者的步骤。

11. 根据权利要求5的细胞在制备用于治疗癌症的药物组合物中的用途。
12. 根据权利要求9的药物组合物,其用于治疗癌症。
13. 用于在根据权利要求5的细胞中抑制CAR信号传导的方法,其包括向所述细胞施用米诺环素或其衍生物的步骤。
14. 用于在包含根据权利要求5的细胞的受试者中抑制CAR信号传导的方法,其包括向所述受试者施用米诺环素或其衍生物的步骤。

工程化细胞溶解性免疫细胞

[0001] 本申请是申请号为201980025067.1,申请日为2019年4月9日,发明名称为“工程化细胞溶解性免疫细胞”的专利申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及工程化细胞溶解性免疫细胞,其分泌感兴趣的蛋白;特别涉及用于可控制地诱导所述感兴趣的蛋白的分泌的方法。

[0003] 发明背景

[0004] 工程化细胞疗法已经成功地治疗了许多淋巴样恶性肿瘤,例如B细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)和多发性骨髓瘤(MM),但是相对较少在实体瘤的治疗中取得成功。实体瘤已被证明比淋巴样癌更难成为工程化细胞疗法的靶标,原因很多,包括进入肿瘤、面对抑制性信号和细胞的持久性以及肿瘤抗原表达的异质性。为了成功治疗其他癌症,例如实体瘤,需要增加工程化细胞疗法效力的方法。

[0005] 工程化细胞面临不利的微环境。调节肿瘤微环境可以将微环境转换为更有利的环境,其使工程化免疫细胞毒性细胞能够增殖、存活和/或移植,从而提供更有效的工程化细胞疗法。

[0006] 白介素12(IL-12)是一种特别令人感兴趣的强力免疫调节细胞因子,其用于调节肿瘤微环境,从而重定向针对癌症的免疫反应。IL-12是全身毒性的,因此局部产生IL-12的方法已经产生(例如Chmielewski等人,Cancer Res.71,5697-5706(2011))。转基因T细胞IL-12的产生可导致高毒性系统性水平。Zhang等人产生了自体黑素瘤肿瘤浸润淋巴细胞(TIL),该细胞被编码由NFAT启动子驱动的单链IL-12的基因转导。尽管功能性控制的IL-12释放,但仍发生严重的临床和不可预测的临床毒性,包括IL-12和干扰素 γ 的高血清水平,临床毒性包括肝功能障碍,高烧和散发的危及生命的血流动力学不稳定。

[0007] 因此,仍然需要可控制地调节肿瘤微环境的方法,其可以改善工程化细胞溶解性免疫细胞在微环境中增殖、存活和/或移植的效果。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明人已经开发了工程化细胞溶解性免疫细胞,其能够可控地分泌感兴趣的蛋白质(例如免疫调节性细胞因子)。这种方法允许蛋白可控制的分泌,而使用其他方法进行组成性或系统性水平分泌是不希望的或不安全的。

[0010] 本发明的工程化细胞溶解性免疫细胞可用于控制免疫调节蛋白向肿瘤微环境的施用,从而避免了可能与此类蛋白的全身用药相关的毒性作用。

[0011] 如本文所述,第一蛋白相互作用结构域可操作地连接至感兴趣的蛋白,并且第二蛋白相互作用结构域可操作地连接至胞内保留结构域。在不存在试剂的情况下,感兴趣的蛋白通过第一和第二蛋白相互作用结构域之间的蛋白:蛋白相互作用保留在细胞内。在存在试剂的情况下,该试剂破坏第一和第二蛋白相互作用结构域之间的蛋白:蛋白相互作用,并且感兴趣的蛋白从胞内区隔释放并从本发明的工程化细胞溶解性免疫细胞分泌。

[0012] 因此,在一方面,本发明提供工程化细胞溶解性免疫细胞,其包含:

[0013] i) 可释放蛋白,其包含感兴趣的多肽 (POI) 和第一相互作用结构域;和

[0014] ii) 保留蛋白,其保留在细胞的胞内区隔中,且包含第二相互作用结构域,

[0015] 其中第一蛋白相互作用结构域和第二蛋白相互作用结构域能够根据试剂的存在或不存在而进行条件性相互作用。

[0016] 工程化细胞溶解性免疫细胞可包含:

[0017] (i) 第一核酸序列,其编码可释放蛋白,所述可释放蛋白包含感兴趣的蛋白 (POI)、第一蛋白相互作用结构域和信号肽;和

[0018] (ii) 第二核酸序列,其编码保留蛋白,所述保留蛋白包含第二蛋白相互作用结构域、胞内保留结构域和信号肽;

[0019] 其中第一蛋白相互作用结构域和第二蛋白相互作用结构域能够根据试剂的存在或不存在而进行条件性相互作用。

[0020] 第一蛋白相互作用结构域和第二蛋白相互作用结构域之间的相互作用可被试剂的存在所破坏,使得在不存在试剂的情况下,第一蛋白相互作用结构域和第二蛋白相互作用结合并导致POI保留在胞内区隔中;而在存在试剂的情况下,第一蛋白相互作用结构域和第二蛋白相互作用不结合,并且POI不保留在胞内区隔中。

[0021] 在这方面,本申请提供了工程化细胞溶解性免疫细胞,其包含:

[0022] i) 可释放蛋白,其包含感兴趣的多肽 (POI) 和第一相互作用结构域;和

[0023] ii) 保留蛋白,其保留在细胞的胞内区隔中,且包含与第一蛋白相互作用结构域结合的第二相互作用结构域,

[0024] 其中第一蛋白相互作用结构域和第二蛋白相互作用结构域之间的结合被试剂的存在破坏,使得在不存在试剂的情况下,第一蛋白相互作用结构域和第二蛋白相互作用结构域结合并导致POI保留在胞内区隔中;而在存在试剂的情况下,第一蛋白相互作用结构域和第二蛋白相互作用结构域不结合,并且POI从胞内区隔释放并在细胞表面表达或由细胞分泌。

[0025] 在不存在试剂的情况下,POI可以输出至细胞表面并在细胞表面表达。

[0026] 或者,在存在试剂的情况下,POI可以由细胞分泌。

[0027] 第一蛋白相互作用结构域和第二蛋白相互作用结构域之间的相互作用可以被竞争性结合第一蛋白相互作用结构域或第二蛋白相互作用结构域之一的试剂降低或破坏。

[0028] 第一蛋白相互作用结构域和所述第二蛋白相互作用结构域之间的相互作用可以被试剂破坏,该试剂以比第一蛋白相互作用结构域和第二蛋白相互作用结构域之间的相互作用更高的亲和力结合第一蛋白相互作用结构域或第二蛋白相互作用结构域之一。

[0029] 第一蛋白相互作用结构域或第二蛋白相互作用结构域之一可包含Tet阻遏蛋白 (TetR) 或其变体,并且第一蛋白相互作用结构域或第二蛋白相互作用结构域中的另一个可包含TetR诱导肽 (TiP) 或其变体。在这种情况下,该试剂选自四环素、强力霉素 (doxycycline)、米诺环素或其类似物。

[0030] 适当地,第一蛋白相互作用结构域可以包含Tet阻遏蛋白 (TetR) 或其变体,并且第二蛋白相互作用结构域可以包含TetR诱导肽 (TiP) 或其变体。适当地,第一蛋白相互作用结构域可以包含TetR诱导肽 (TiP) 或其变体,并且第二蛋白相互作用结构域可以包含Tet阻遏蛋白 (TetR) 或其变体。

[0031] 第一蛋白质相互作用结构域或第二蛋白相互作用结构域之一可以是试剂的肽模拟物。

[0032] 第一蛋白质相互作用结构域或第二蛋白相互作用结构域之一可以是试剂的肽模拟物,并且第一蛋白质相互作用结构域或第二蛋白相互作用结构域中的另一个可以能够结合试剂和肽模拟物,其中蛋白相互作用结构域以比其结合试剂低的亲和力结合肽模拟物。

[0033] 适当地,第一蛋白相互作用结构域可以是试剂的肽模拟物,并且第二蛋白相互作用结构域可以能够与试剂和肽模拟物结合,其中第二蛋白相互作用结构域以比其结合试剂低的亲和力结合肽模拟物。适当地,第一蛋白相互作用结构域可以能够与试剂和肽模拟物结合,并且第二蛋白相互作用结构域可以是试剂的肽模拟物,其中第一蛋白相互作用结构域以比其结合试剂低的亲和力结合肽模拟物。

[0034] 适当地,第一蛋白相互作用结构域或第二蛋白相互作用结构域之一可以包含抗体、单结构域抗体(sdAb)、VHH/纳米抗体、纳米抗体、亲合体(affibody)、纤连蛋白人工抗体支架、anticalin、affilin、DARPin、VNAR、iBody、affimer、fynomer、结构域抗体(DAb)、abdurin/纳米抗体、centyrin、alphabody或nanofitin,其能够结合试剂,且第一或第二蛋白相互作用结构域中的另一个可以是试剂的肽模拟物。

[0035] 适当地,第一蛋白相互作用结构域或第二蛋白相互作用结构域之一可以是模拟米诺环素的肽,且第一蛋白相互作用结构域或第二蛋白相互作用结构域中的另一个可以是与米诺环素结合的VHH,并且试剂可选自米诺环素、四环素、强力霉素或其类似物。

[0036] 该试剂可以是小分子。

[0037] 胞内保留结构域可以是高尔基体保留结构域。适当地,保留结构域可以选自包括以下的组:SEKDEL(SEQ ID NO:28)序列、KDEL(SEQ ID NO:29)序列、KKXX(SEQ ID NO:30)基序、KXKXX(SEQ ID NO:31)基序,包含序列KYKSRRSFIDEKKMP(SEQ ID NO:32)的腺病毒E19蛋白的尾部,或包含序列MHRRRSRSCR(SEQ ID NO:33)的HLA恒定链的片段或其变体。

[0038] 胞内保留结构域可以是内质网保留结构域。适当地,内质网保留结构域可以选自核糖体结合糖蛋白I、核糖体结合糖蛋白II、SEC61或细胞色素b5或其变体。

[0039] 胞内保留结构域可以是质膜保留结构域。适当地,质膜保留结构域可以选自Thy-1和PRNP或其变体。

[0040] 胞内保留结构域可以位于保留蛋白的C-末端或N-末端。

[0041] POI可以是免疫系统调节剂。

[0042] POI可以是细胞因子或趋化因子。适当地,细胞因子或趋化因子可以由活化T细胞核因子(NFAT)响应元件调节。

[0043] 适当地,POI可以选自:IL12、flexiIL12、GM-CSF、IL7、IL15、IL21和CCL19。

[0044] POI可以是抗体、抗体片段或dAb。

[0045] POI可以是毒素。适当地,毒素可以是白喉毒素或假单胞菌毒素。

[0046] POI可以是分泌蛋白。POI可以是膜蛋白(例如,细胞表面膜蛋白或质膜蛋白)。

[0047] 可释放蛋白可以编码两种或更多种POI。

[0048] 工程化细胞溶解性免疫细胞可以是 α - β T细胞、NK细胞、 γ - δ T细胞或细胞因子诱导的杀伤细胞。

[0049] 工程化细胞溶解性免疫细胞可以进一步包含嵌合抗原受体(CAR)或转基因T细胞

受体 (TCR)。

[0050] 在一方面,本发明提供了核酸序列试剂盒,其包含:

[0051] (i) 第一核酸序列,其编码如本文定义的可释放蛋白;

[0052] (ii) 第二核酸序列,其编码如本文定义的保留蛋白;和

[0053] (iii) 第三核酸序列,其编码CAR或转基因TCR。

[0054] 在另一方面,本发明提供了核酸构建体,其包含:

[0055] (i) 第一核酸序列,其编码如本文定义的可释放蛋白;

[0056] (ii) 第二核酸序列,其编码如本文定义的保留蛋白;和

[0057] (iii) 第三核酸序列,其编码CAR或转基因TCR。

[0058] 在一方面,本发明提供了载体,其包含根据本发明的核酸构建体。

[0059] 在一方面,本发明提供了载体的试剂盒,其包含:

[0060] i) 第一载体,其包含编码如本文定义的可释放蛋白的第一核酸序列;

[0061] (ii) 第二载体,其包含编码如本文定义的保留蛋白的第二核酸序列;和

[0062] (iii) 第三载体,其包含编码CAR或转基因TCR的第三核酸序列。

[0063] 在另一方面,本发明提供了制备根据本发明的工程化细胞溶解性免疫细胞的方法,其包括以下步骤:将根据本发明的核酸构建体、如本文定义的第一、第二和第三核酸序列;根据本发明的载体或如本文定义的第一、第二和第三载体引入细胞溶解性免疫细胞。

[0064] 在一方面,本发明提供了控制POI从细胞中分泌的方法,其包括以下步骤:将根据本发明的核酸构建体、如本文定义的第一、第二和第三核酸序列;根据本发明的载体或如本文定义的第一、第二和第三载体引入细胞和向所述细胞施用如本文定义的试剂。

[0065] 在另一方面,本发明提供了控制POI从细胞中分泌的方法,其包括将如本文定义的试剂施用于根据本发明的工程化细胞溶解性免疫细胞或通过本发明的方法可获得的细胞。

[0066] 细胞可以来自从受试者分离的样品。

[0067] 在另一方面,本发明提供了药物组合物,其包含根据本发明的细胞溶解性免疫细胞、根据本发明的核酸构建体、如本文定义的第一、第二和第三核酸序列、根据本发明的载体、如本文定义的第一、第二和第三载体。

[0068] 在一方面,本发明提供了药物组合物,其包含根据本发明的细胞或通过根据本发明的方法可获得的细胞。

[0069] 在另一方面,本发明提供了根据本发明的药物组合物,其用于治疗 and/或预防疾病。

[0070] 本发明还涉及治疗和/或预防疾病的方法,其包括将根据本发明的药物组合物施用于有此需要的受试者的步骤。

[0071] 在一方面,本发明提供了治疗和/或预防疾病的方法,其包括以下步骤:将如本文定义的试剂施用于已被施用了根据本发明的工程化细胞溶解性免疫细胞的受试者。

[0072] 该方法可以包括以下步骤:

[0073] (i) 分离含有细胞的样品;

[0074] (ii) 将根据本发明的核酸构建体、如本文定义的第一、第二和第三核酸序列、根据本发明的载体或如本文定义的第一、第二和第三载体引入细胞;和

[0075] (iii) 将来自(ii)的细胞施用于受试者。

- [0076] 核酸构建体或载体可以通过转导或转染来引入。
- [0077] 细胞可以是自体的。细胞可以是同种异体的。
- [0078] 该方法可包括监测受试者的毒性活性和/或抗肿瘤活性,并且任选地进一步包括以下步骤:停止或降低向受试者施用如本文定义的试剂,以降低不良毒性作用;或增加向受试者施用如本文定义的试剂以增加抗肿瘤作用。
- [0079] 在另一方面,本发明涉及根据本发明的药物组合物在制备用于治疗和/或预防疾病的药物中的用途。
- [0080] 该疾病可以是癌症。癌症可以是神经母细胞瘤。该癌症可以是前列腺癌。
- [0081] 本发明还涉及如本文定义的试剂在增加根据本发明的工程化细胞溶解性免疫细胞的POI的分泌中的用途。
- [0082] 本发明还包括以下实施方案:
- [0083] 1. 工程化细胞溶解性免疫细胞,其包含:
- [0084] i) 可释放蛋白,其包含感兴趣的多肽(POI)和第一相互作用结构域;和
- [0085] ii) 保留蛋白,其保留在所述细胞的胞内区隔中,且包含与所述第一蛋白相互作用结构域结合的第二相互作用结构域,
- [0086] 其中所述第一蛋白相互作用结构域和第二蛋白相互作用结构域之间的结合被试剂的存在破坏,使得在不存在所述试剂的情况下,所述第一蛋白相互作用结构域和第二蛋白相互作用结构域结合,并导致POI保留在胞内区隔中;而在存在所述试剂的情况下,所述第一蛋白相互作用结构域和第二蛋白相互作用不结合,并且POI从所述胞内区隔释放并在所述细胞表面表达或由所述细胞分泌。
- [0087] 2. 根据实施方案1的工程化细胞溶解性免疫细胞,其中在存在所述试剂的情况下,所述POI输出至所述细胞表面并在所述细胞表面表达。
- [0088] 3. 根据实施方案1的工程化细胞溶解性免疫细胞,其中在存在所述试剂的情况下,所述POI由所述细胞分泌。
- [0089] 4. 根据前述实施方案中任一项的工程化细胞溶解性免疫细胞,其中所述第一蛋白相互作用结构域和所述第二蛋白相互作用结构域之间的结合被竞争性结合所述第一蛋白相互作用结构域或所述第二蛋白相互作用结构域之一的试剂破坏。
- [0090] 5. 根据前述实施方案中任一项的工程化细胞溶解性免疫细胞,其中所述第一蛋白相互作用结构域和所述第二蛋白相互作用结构域之间的结合被所述试剂破坏,所述试剂以比所述第一蛋白相互作用结构域和所述第二蛋白相互作用结构域之间的相互作用更高的亲和力结合所述第一蛋白相互作用结构域或所述第二蛋白相互作用结构域之一。
- [0091] 6. 根据实施方案1-5中任一项的工程化细胞溶解性免疫细胞,其中所述第一蛋白相互作用结构域或所述第二蛋白相互作用结构域之一包含Tet阻遏蛋白(TetR)或其变体,并且所述第一蛋白相互作用结构域或第二蛋白相互作用结构域中的另一个包含TetR诱导肽(TiP)或其变体,并且所述试剂选自四环素、强力霉素(doxycycline)、米诺环素或其类似物。
- [0092] 7. 根据实施方案1至5中任一项的工程化细胞溶解性免疫细胞,其中所述第一蛋白质相互作用结构域或所述第二蛋白相互作用结构域之一是所述试剂的肽模拟物。
- [0093] 8. 根据实施方案6的工程化细胞溶解性免疫细胞,其中所述第一或第二蛋白相互

作用结构域之一是所述试剂的肽模拟物,并且所述第一或第二蛋白相互作用结构域中的另一个能够结合所述试剂和所述肽模拟物,其中所述蛋白相互作用结构域以比其结合所述试剂低的亲和力结合所述肽模拟物。

[0094] 9.根据实施方案7或实施方案8的工程化细胞溶解性免疫细胞,其中所述第一或第二蛋白相互作用结构域之一包含抗体、单结构域抗体(sdAb)、VHH/纳米抗体、纳米抗体、亲合体(affibody)、纤连蛋白人工抗体支架、anticalin、affilin、DARPin、VNAR、iBody、affimer、fynomer、结构域抗体(DAb)、abdurin/纳米抗体、centyrin、alphabody或nanofitin,其能够结合所述试剂,且所述第一或第二蛋白相互作用结构域中的另一个是所述试剂的肽模拟物。

[0095] 10.根据实施方案7或实施方案8的工程化细胞溶解性免疫细胞,其中所述第一或第二蛋白相互作用结构域之一是模拟米诺环素的肽,所述第一或第二蛋白相互作用结构域中的另一个是与米诺环素结合的VHH,并且所述试剂选自米诺环素、四环素、强力霉素或其类似物。

[0096] 11.根据前述实施方案中任一项的工程化细胞溶解性免疫细胞,其中所述试剂是小分子。

[0097] 12.根据前述实施方案中任一项的工程化细胞溶解性免疫细胞,其中所述胞内保留结构域是高尔基体保留结构域,优选选自包括以下的组:SEKDEL(SEQ ID NO:28)序列、KDEL(SEQ ID NO:29)序列、KKXX(SEQ ID NO:30)基序、KXKXX(SEQ ID NO:31)基序,包含序列KYKSRRSFIDEKKMP(SEQ ID NO:32)的腺病毒E19蛋白的尾部,或包含序列MHRRRSRSCR(SEQ ID NO:33)的HLA恒定链的片段。

[0098] 13.根据实施方案1至11中任一项的工程化细胞溶解性免疫细胞,其中所述胞内保留结构域是内质网保留结构域,优选选自核糖体结合糖蛋白I、核糖体结合糖蛋白II、SEC61或细胞色素b5。

[0099] 14.根据前述实施方案中任一项的工程化细胞溶解性免疫细胞,其中所述胞内保留结构域位于所述保留蛋白的C-末端或N-末端。

[0100] 15.根据前述实施方案中任一项的工程化细胞溶解性免疫细胞,其中所述POI是免疫系统调节剂。

[0101] 16.根据前述实施方案中任一项的工程化细胞溶解性免疫细胞,其中所述POI是细胞因子或趋化因子。

[0102] 17.根据实施方案16的工程化细胞溶解性免疫细胞,其中所述细胞因子或趋化因子由活化T细胞核因子(NFAT)响应元件调节。

[0103] 18.根据实施方案16或实施方案17的工程化细胞溶解性免疫细胞,其中所述POI选自:IL12、flexiIL12、GM-CSF、IL7、IL15、IL21和CCL19。

[0104] 19.根据实施方案1至17中任一项的工程化细胞溶解性免疫细胞,其中所述POI是抗体、抗体片段或dAb。

[0105] 20.根据实施方案1至17中任一项的工程化细胞溶解性免疫细胞,其中所述POI是毒素。

[0106] 21.根据前述实施方案中任一项的工程化细胞溶解性免疫细胞,其中所述POI是分泌蛋白。

[0107] 22. 根据实施方案1至20中任一项的工程化细胞溶解性免疫细胞, 其中所述P0I是膜蛋白(例如, 细胞表面膜蛋白或质膜蛋白)。

[0108] 23. 根据前述实施方案中任一项的工程化细胞溶解性免疫细胞, 其中所述可释放蛋白包含两种或更多种P0I。

[0109] 24. 根据前述实施方案中任一项的工程化细胞溶解性免疫细胞, 其中所述细胞是 α - β T细胞、NK细胞、 γ - δ T细胞或细胞因子诱导的杀伤细胞。

[0110] 25. 根据前述实施方案中任一项的工程化细胞溶解性免疫细胞, 其中所述细胞进一步包含嵌合抗原受体(CAR)或转基因T细胞受体(TCR)。

[0111] 26. 核酸构建体, 其包含:

[0112] (i) 第一核酸序列, 其编码如实施方案1至25中任一项所定义的可释放蛋白;

[0113] (ii) 第二核酸序列, 其编码如实施方案1至25中任一项所定义的保留蛋白; 和

[0114] (iii) 第三核酸序列, 其编码CAR或转基因TCR。

[0115] 27. 核酸序列试剂盒, 其包含:

[0116] (i) 第一核酸序列, 其编码如实施方案1至25中任一项所定义的可释放蛋白;

[0117] (ii) 第二核酸序列, 其编码如实施方案1至25中任一项所定义的保留蛋白; 和

[0118] (iii) 第三核酸序列, 其编码CAR或转基因TCR。

[0119] 28. 载体, 其包含根据实施方案26的核酸构建体。

[0120] 29. 载体的试剂盒, 其包含:

[0121] i) 第一载体, 其包含编码如实施方案1至25中任一项所定义的可释放蛋白的第一核酸序列;

[0122] (ii) 第二载体, 其包含编码如实施方案1至25中任一项所定义的保留蛋白的第二核酸序列; 和

[0123] (iii) 第三载体, 其包含编码CAR或转基因TCR的第三核酸序列。

[0124] 30. 制备根据实施方案1至25中任一项的工程化细胞溶解性免疫细胞的方法, 其包括以下步骤: 将根据实施方案26的核酸构建体、如实施方案27中所定义的第一、第二和第三核酸序列、根据实施方案28的载体或如实施方案29中所定义的第一、第二和第三载体引入细胞溶解性免疫细胞。

[0125] 31. 控制P0I从细胞中分泌的方法, 其包括以下步骤: 将根据实施方案26的核酸构建体、如实施方案27中所定义的第一、第二和第三核酸序列、根据实施方案28的载体或如实施方案29中所定义的第一、第二和第三载体引入细胞和向所述细胞施用如实施方案1至25中任一项所定义的试剂。

[0126] 32. 控制P0I从细胞中分泌的方法, 其包括将如实施方案1至25中任一项所定义的试剂施用于根据实施方案1至25中任一项的工程化细胞溶解性免疫细胞或通过实施方案30或实施方案31的方法可获得的细胞。

[0127] 33. 根据实施方案30至32中任一项的方法, 其中所述细胞来自分离自受试者的样品。

[0128] 34. 药物组合物, 其包含根据实施方案1至25中任一项的工程化细胞溶解性免疫细胞、根据实施方案26的核酸构建体、如实施方案27中所定义的第一、第二和第三核酸序列、根据实施方案28的载体、如实施方案29中所定义的第一、第二和第三载体。

[0129] 35. 药物组合物,其包含根据实施方案1至25中任一项的细胞或通过根据实施方案30至32中任一项的方法可获得的细胞。

[0130] 36. 根据实施方案34或35的药物组合物,其用于治疗 and/或预防疾病。

[0131] 37. 治疗和/或预防疾病的方法,其包括将根据实施方案34或35的药物组合物施用于有此需要的受试者的步骤。

[0132] 38. 治疗和/或预防疾病的方法,其包括以下步骤:将实施方案1至25中任一项所定义的试剂施用于已被施用了根据实施方案1至25中任一项的工程化细胞溶解性免疫细胞的受试者。

[0133] 39. 根据实施方案37的方法,其包括以下步骤:

[0134] (i) 分离含有细胞的样品;

[0135] (ii) 将根据实施方案25的核酸构建体、如实施方案26中所定义的第一、第二和第三核酸序列、根据实施方案27的载体或如实施方案28中所定义的第一、第二和第三载体引入所述细胞;和

[0136] (iii) 将来自(ii)的所述细胞施用于受试者。

[0137] 40. 根据实施方案39的方法,其中所述核酸构建体或载体通过转导或转染引入。

[0138] 41. 根据实施方案37至40的方法,其中所述细胞是自体的。

[0139] 42. 根据实施方案37至40的方法,其中所述细胞是同种异体的。

[0140] 43. 根据实施方案37至42中任一项的方法,其包括监测所述受试者的毒性活性和/或抗肿瘤活性,并且任选地进一步包括以下步骤:停止或降低向所述受试者施用如实施方案1至25中任一项所定义的试剂,以降低不良毒性作用;或增加向所述受试者施用如实施方案1至25中任一项所定义的试剂以增加抗肿瘤作用。

[0141] 44. 根据实施方案34或35的药物组合物在制备用于治疗 and/或预防疾病的药物中的用途。

[0142] 45. 根据实施方案36使用的药物组合物,根据实施方案37至43中任一项的方法,或根据实施方案44的用途,其中所述疾病是癌症。

[0143] 46. 如实施方案1至25中任一项所定义的试剂在增加根据实施方案1至25中任一项的工程化细胞溶解性免疫细胞的POI的分泌中的用途。

[0144] 附图简要说明

[0145] 图1-说明本发明的实施方案的示意图,其中可释放蛋白包含第一蛋白相互作用结构域和感兴趣的蛋白,并且保留蛋白包含第二相互作用结构域和保留结构域。第一蛋白相互作用结构域和第二蛋白相互作用结构域能够进行条件性相互作用。

[0146] 图2-说明根据本发明的构建体的示意图。该构建体包含编码可释放蛋白(从左至右包含信号肽、第一蛋白相互作用结构域和感兴趣的蛋白)的核酸序列以及编码保留蛋白(从左至右包含信号肽、第二蛋白相互作用结构域和胞内保留结构域)的核酸序列。编码自切割肽(2A结构域)的核酸序列位于编码可释放蛋白和保留蛋白的核酸序列之间。

[0147] 图3-根据本发明的工程化细胞溶解性免疫细胞的说明性实例。第一蛋白相互作用结构域包含TetR相互作用蛋白(TiP),并且感兴趣的蛋白是IL-12。第二蛋白相互作用结构域包含Tet阻遏物(TetR)和内质网保留结构域KDEL(SEQ ID NO:29)。A)在不存在试剂的情况下,第一蛋白相互作用结构域和第二蛋白相互作用结构域结合并导致IL-12保留在内质

网内。B) 在存在试剂的情况下, TetR和TiP之间的蛋白:蛋白相互作用被破坏, 并且TiP从TetR置换。IL-12不被保留在内质网中。

[0148] 图4-显示相对于对照抗体 (SEQ ID NO:13), 肽SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36和SEQ ID NO:37与米诺环素dAb (SEQ ID NO:8) 的米诺环素可置换结合的图。

[0149] 图5-米诺环素诱导的ER保留的IL12的分泌

[0150] 用表达胞内KDEL标记的抗-米诺环素dAb和dAb特异性肽 (GWARA或PWAYS) 标记的IL-12的构建体瞬时转染HEK293T细胞。通过染色HA标记物表达确定转染效率, 其中转染效率范围从50-70% (B)。去除培养基, 并用含有不同浓度的米诺环素 (0、1uM和10uM) 的新鲜培养基代替。在添加米诺环素后2和4小时收集上清液, 并进行IL12 ELISA读出 (C)。

[0151] 图6-显示了包含抑制剂 (dampener) 的本发明的实施例的示意图。

[0152] 图7-显示了包含增强剂的本发明的实施例的示意图。

[0153] 发明详述

[0154] 蛋白相互作用结构域

[0155] 本发明的第一蛋白相互作用结构域、第二蛋白相互作用结构域和试剂可以是分子/肽/结构域的任意组合, 其能够根据试剂的存在或不存在进行蛋白相互作用结构域的条件性相互作用。

[0156] 第一和第二蛋白相互作用结构域可能彼此特异性结合。

[0157] 第一和第二蛋白相互作用结构域之间的蛋白-蛋白相互作用可以自发发生, 但在试剂的存在下被破坏, 即充当结合的“破坏者”的单独分子。

[0158] 第一蛋白相互作用结构域和第二蛋白相互作用之间的相互作用可被试剂的存在所破坏, 使得在不存在试剂的情况下, 第一蛋白相互作用结构域和第二蛋白相互作用结合并导致POI保留在胞内区隔中; 而在存在试剂的情况下, 第一蛋白相互作用结构域和第二蛋白相互作用不结合, 并且POI不保留在胞内区隔中。

[0159] 如本文所用, “被破坏”是指通过添加试剂而降低或完全消除了第一和第二蛋白相互作用结构域之间的结合。适当地, 第一蛋白相互作用结构域和第二蛋白相互作用结构域之间的结合通过添加试剂可以降低至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99%。

[0160] 第一蛋白相互作用结构域和第二蛋白相互作用结构域之间的相互作用可被竞争性结合第一蛋白相互作用结构域或第二蛋白相互作用结构域之一的试剂破坏。

[0161] 如本文所用, “试剂的竞争性结合”是指试剂的结合防止第一和第二蛋白相互作用结构域之间结合。试剂可通过直接结合至蛋白质结构域的结合位点而竞争性结合, 该结合位点与另一蛋白结构域上的相互结合位点相互作用。或者, 该试剂可以通过与蛋白结构域的结合位点重叠的区域结合而竞争性结合, 该区域与另一蛋白结构域上的相互结合位点相互作用。

[0162] 试剂可能以比第一蛋白相互作用结构域和第二蛋白相互作用结构域之间的结合更高的亲和力特异性结合第一蛋白相互作用结构域或第二蛋白相互作用结构域。

[0163] 如本文所用, “更高的亲和力”是指试剂以比第一蛋白相互作用结构域和第二蛋白相互作用结构域之间的结合亲和力大至少5、10、20、50、100、1000或10000倍的亲和力与第一或第二蛋白相互作用结构域之一结合。

[0164] 用于测量结合亲和力和竞争性结合的测定法是本领域已知的,例如放射性配体结合测定法(包括饱和结合,scatchard作图)、非放射性配体结合测定法(包括荧光偏振,荧光共振能量转移和表面等离子共振/Biacore),和固相配体结合测定法。

[0165] 例如,结合系统可以基于任何肽:肽蛋白相互作用结构域系统。

[0166] 第一或第二蛋白相互作用结构域可以是试剂的肽模拟物。

[0167] 适当地,第一或第二蛋白质相互作用结构域中的任何一个可以包含结合肽的肽结合结构域,而另一个蛋白相互作用结构域可以包含以比肽更低的亲和力结合肽结合结构域的肽模拟物。在这些实施方案中,使用肽作为试剂可通过竞争性结合破坏肽模拟物与肽结合结构域的结合。该肽模拟物可以具有与“野生型”肽相似的氨基酸序列,但是具有多个氨基酸改变之一以降低对肽结合结构域的结合亲和力。

[0168] 试剂可以以比第一蛋白相互作用结构域和第二蛋白相互作用结构域之间的亲和力大至少5、10、20、50、100、1000或10000倍的亲和力与第一蛋白相互作用结构域或第二蛋白相互作用结构域结合。

[0169] 长期以来,已经开发出了用于制药目的的破坏蛋白-蛋白相互作用的小分子试剂(Vassilev等人综述;Small-Molecule Inhibitors of Protein-Protein Interactions ISBN:978-3-642-17082-9,通过参考并入本文)。相互作用被破坏的蛋白或肽(或这些蛋白的相关片段)可以用作第一和/或第二蛋白相互作用结构域,而小分子可以用作试剂。

[0170] 下表列出了使用试剂(例如小分子)可破坏相互作用的蛋白/肽的列表。这些可破坏的(disputable)蛋白-蛋白相互作用(PPI)可用于本发明。关于这些PPI的进一步信息可从White等人2008获得(Expert Rev.Mol.Med.10:e8,其通过引用并入本文)。

[0171]	相互作用蛋白1	相互作用蛋白 2	PPI抑制剂
	p53	MDM2	Nutlin
	抗细胞凋亡Bcl2成员	细胞凋亡Bcl2成员	GX015和ABT-737
	Caspase-3, -7或-9	X连锁细胞凋亡蛋白抑制剂(XIAP)	DIABLO 和DIABLO 模拟物
	RAS	RAF	咪喃并茚衍生物
	FR2-7	DVL的PD2 结构域	FJ9
	T-细胞因子 (TCF)	环状AMP反应元件结合蛋白(CBP)	ICG-001
	Avadin / 链霉亲和素	生物素	生物素模拟物

[0172] 除了上述示例性的PPI系统之外,将理解的是,可以使用噬菌体展示肽序列来产生其他PPI系统,以产生模拟与蛋白结合的小分子相互作用的肽。

[0173] 在其他实施方案中,可以产生结合小分子的抗体,以用作根据本发明的蛋白相互作用结构域。产生抗体的合适方法是本领域众所周知的。

[0174] 本文所述的可释放和保留蛋白可包含接头。接头(或间隔子)是短序列,其分开蛋白质中的多个结构域。接头可包含柔性残基,例如甘氨酸和丝氨酸重复,其允许相邻的蛋白结构域相对于彼此移动。适当地,可释放和/或保留蛋白可包含一个或更多个丝氨酸-甘氨酸接头结构域。接头可以具有提供足够的柔性的任何长度。适当地,接头可以是2、3、4、5、

10、15、20、25、30或更多个残基长度。

[0175] Tet阻遏物(TetR)系统

[0176] 用于控制多肽共定位的小分子系统是本领域已知的,例如Tet阻遏物(TetR)、TetR相互作用蛋白(TiP)、四环素系统。

[0177] Tet操纵子是一种众所周知的生物操纵子,其已经适合用于哺乳动物细胞。TetR以同二聚体的形式结合四环素,并发生构象变化,其进而调节TetR分子的DNA结合。Klotzsche等人(Nucleic Acids Res.2009Apr;37(6):1778-88,通过引用并入本文)描述了激活TetR的噬菌体展示衍生肽。该蛋白(TetR相互作用蛋白/TiP)在TetR中具有结合位点,其与四环素结合位点重叠但不相同。因此,TiP和四环素竞争结合TetR。

[0178] 在本发明的细胞中,第一或第二蛋白相互作用结构域之一可以包含TetR或TiP(或由其组成),并且第一或第二蛋白相互作用结构域中的另一个可以是相应的互补结合配偶体或其变体。

[0179] TetR和TiP的氨基酸序列如下所示:

[0180] TetR的氨基酸序列在SEQ ID NO:1中列出。

[0181] MSRLDKSKVINSALELLNEVGIEGLTTRKLAQKLGVEQPTLYWHVKNKRALLDALAIEMLD RHHTHFC PLEGESWQDFLRNNAKSFRCALLSHRDGAKVHLGTRPTEKQYETLENQLAFLCQQGFSLENALYALS AVGHFTLGC VLEDQEHQVAKEERETPTTDSMPPLLRQAIELFDHQGAEP AFLFGLELIICGLEKQLKCESGS (SEQ ID NO:1)

[0182] TiP的氨基酸序列在SEQ ID NO:2-MWTWNAYAF AAP (SEQ ID NO:2)中列出。

[0183] 在一些实施方案中,接头(例如丝氨酸-甘氨酸接头)可用于将TiP与另一种蛋白质分开。接头可以允许TiP柔性地正确定向自身和/或从与其连接的蛋白质分开TiP。

[0184] 例如,SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列包含TiP和丝氨酸-甘氨酸接头的氨基酸序列((SGGGS)-MWTWNAYAF AAPSGGGS (SEQ ID NO:3))。

[0185] 当第一和第二蛋白相互作用结构域是TetR或TiP时,试剂可以是四环素、强力霉素、米诺环素或其类似物。类似物是指四环素、强力霉素或米诺环素的变体,其保留特异性结合TetR的能力或与四环素、强力霉素或米诺环素相比,具有增加或更高的与TetR的亲和力。

[0186] TetR和/或TiP的变体序列与SEQ ID NO:1-3可以具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%的序列同一性,条件是这些序列提供了有效的结合系统,其在四环素、强力霉素、米诺环素或其类似物存在的情况下被破坏。即,只要该序列促进本发明的蛋白相互作用结构域的共定位,其可以在四环素、强力霉素、米诺环素或其类似物存在的情况下被破坏。

[0187] 两个多肽序列之间的同一性百分比可以容易地通过例如BLAST的程序来确定,该程序可在<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>免费获得。适当地,在整个参考和/或查询序列中确定同一性百分比。

[0188] 在一个实施方案中,第一或第二蛋白相互作用结构域之一可以包含TetR或TiP或其变体(或由其组成),并且第一或第二蛋白相互作用结构域中的另一个可以是相应的互补结合配偶体或其变体,该试剂可以是四环素、强力霉素、米诺环素或其类似物,并且感兴趣的蛋白可以是本文所述的任何POI。

[0189] 在一个实施方案中,第一或第二蛋白相互作用结构域之一可以包含TetR或TiP或其变体(或由其组成),并且第一或第二蛋白相互作用结构域中的另一个可以是相应的互补

结合配偶体或其变体,感兴趣的蛋白质可以是flexi IL-12。

[0190] 在一个实施方案中,第一核酸序列可编码包含flexiIL-12、TiP蛋白相互作用结构域和信号肽的可释放蛋白。适当地,编码flexiIL-12、TiP(或其变体)和信号肽的核酸序列可操作地连接。适当地,信号肽可以是鼠Igκ链V-III区信号肽序列。在该实施方案中,第二核酸序列可以编码保留蛋白,其包含TetR(或其变体)、胞内保留结构域和信号肽。适当地,编码TetR、胞内保留结构域和信号肽的核酸序列可操作地连接。适当地,胞内保留结构域可以是SEKDEL(SEQ ID NO:28)。

[0191] 在一个实施方案中,可释放蛋白可包含SEQ ID NO:5所示的序列或其变体。

[0192] METDTLLLWVLLLWVPGSTGM***WTWNAYAF******AA******PSGGGSIWELKKDVYVV***
ELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFG
DAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEA
KNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGD
NKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKP
DPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREK
KDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPC***SGGGGSG***
[0193] ***GGGSGGGGSRNLPLATPDPGMFPC******LHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPC***
TSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFM
MALCLSSIIYEDSKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALN
FNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (SEQ ID
NO:5).

[0194] SEQ ID NO:5依次包含鼠Igκ链V-III区信号肽序列(其以下划线显示)、TIP序列(其以斜体显示)、人IL-12β亚基(其以正常文本显示)、丝氨酸甘氨酸接头(其以粗体显示)和人IL-12α亚基(其以斜体显示)。

[0195] 在一个实施方案中,可释放蛋白可包含SEQ ID NO:6所示的序列或其变体。

[0196] METDTLLLKVLLLVPGSTG***MWTWNAYAF******AA******PSGGG***SIWELKKDVYVV
ELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFG
DAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEA
KNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVGRD
NKEYEYSVEQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIHKP
DPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREK
KDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPC***SGGGGSG***
GGGSGGGGSRNLPLATPD***PGMFCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPC***
TSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFM
MALCLSSIEDSKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALN
FNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (SEQ ID NO: 6).

[0197] SEQ ID NO:6依次包含鼠Igκ链V-III区信号肽序列,该序列在第9个氨基酸位置具有赖氨酸突变(其以下划线显示)、TIP序列(其以粗斜体显示)、人IL-12β亚基(其以正常文本显示)、丝氨酸甘氨酸接头(其以粗体显示)和人IL-12α亚基(其以斜体显示)。

[0198] 氨基酸第9位的赖氨酸取代会降低信号肽的效率,从而降低进入ER并可以从细胞分泌的TiP-IL-12的量。

[0199] 在一个实施方案中,保留蛋白可包含SEQ ID NO:7所示的序列或其变体。

MGWSCILFLVATATGVHSMSRLDKSKVINSALELLNEVGIEGLTTRKLAQ
KLGVEQPTLYWHVKNKRALLDALAIEMLDNRHHTHFCPLEGESWQDFLRN
[0200] NAKSFRCALLSHRDGAKVHLGTRPTEKQYETLENQLAFLCQQGFSLENAL
YALSAVGHFTLGCVLEDQEHQVAKEERETPTTDSMPLLRQAIELFDHQG
AEP AFLGLELIICGLEKQLKCESGSS***GGGGSEKDEL*** (SEQ ID NO:7).

[0201] SEQ ID NO:7依次包含鼠Ig重链V区102信号肽序列(其以下划线显示)、TetR序列(其以正常文本显示)、丝氨酸-甘氨酸接头(其以粗体显示)和SEKDEL (SEQ ID NO:28)ER保留结构域(其以斜体显示)。

[0202] SEQ ID NO:5-7的变体序列可以与SEQ ID NO:5-7具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%的序列同一性,只要这些序列提供了有效的结合系统,其在四环素、强力霉素、米诺环素或其类似物存在的条件下被破坏。即,只要该序列促进本发明的蛋白相互作用结构域的共定位,其在四环素、强力霉素、米诺环素或其类似物存在的条件下可能被破坏。

[0203] 在另一实施方案中,第一或第二蛋白相互作用结构域之一可以包含抗体,例如结构域抗体,其结合试剂例如小分子。

[0204] 在一个实施方案中,第一或第二蛋白相互作用结构域之一包含抗体、单结构域抗体(sdAb)、VHH/纳米抗体、纳米抗体、亲合体(affibody)、纤连蛋白人工抗体支架、anticalin、affilin、DARPin、VNAR、iBody、affimer、fynomer、结构域抗体(DAb)、abdurin/

纳米抗体、centyrin、alphabody或nanofitin,其能够结合试剂,且第一或第二蛋白相互作用结构域中的另一个是试剂的肽模拟物。

[0205] 在一个实施方案中,第一或第二蛋白相互作用结构域之一是模拟米诺环素的肽,第一或第二蛋白相互作用结构域中的另一个是与米诺环素结合的抗体,并且试剂选自米诺环素、四环素、强力霉素或其类似物。

[0206] 米诺环素肽模拟物可以包含SEQ ID NO:41:ACPXWAXXFC(SEQ ID NO:41)所示的氨基酸序列,其中X是任意氨基酸。

[0207] 模拟米诺环素的第一或第二蛋白相互作用结构域可以是选自下组的肽:

[0208] ACPGWARAFC(SEQ ID NO:34);ACPHWAQ AFC(SEQ ID NO:35);ACPQWAMMFC(SEQ ID NO:36)和ACPPWAYSFC(SEQ ID NO:37)。

[0209] 适当地,模拟米诺环素的第一或第二蛋白相互作用结构域可以包含SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列(或由其组成)。适当地,模拟米诺环素的第一或第二蛋白相互作用结构域可以包含SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列(或由其组成)。适当地,模拟米诺环素的第一或第二蛋白相互作用结构域可以包含SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列(或由其组成)。适当地,模拟米诺环素的第一或第二蛋白相互作用结构域可以包含SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列(或由其组成)。

[0210] 结合米诺环素的抗体(例如结构域抗体)可以具有如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列或其变体。

[0211] MKYLLPTAAAGLLLLLAAQPAMAQVQLQESGGGLVQPGSSRLSCAASGRTFSSYNIGWFRQAPGKERE FVAAISWSGARTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYSCAAGRGGWTEAILDYWGQGTQVTVSSA AAHHHHHHHGAAEQKLISEEDLNGAA(SEQ ID NO:8)。

[0212] 结合米诺环素(或其变体)的抗体(例如结构域抗体)可以具有如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列或其变体。

[0213] MKYLLPTAAAGLLLLLAAQPAMAQVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCSASGRSLSSYVMGWFRQAPGKERE FVAAISWSGARTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYRCAAGRGGWTEAILDYWGQGTQVTVSSA AAHHHHHHHGAAEQKLISEEDLNGAA(SEQ ID NO:9)。

[0214] 结合米诺环素(或其变体)的抗体(例如结构域抗体)可以具有如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列或其变体。

[0215] MKYLLPTAAAGLLLLLAAQPAMAQVQLQESGGGLVQAGGSLRLACVASGNIGLVSMWYRQVPGKERE LVATITGGGRTNYADSVKGRFTISMDYAKATVYLQMNNLPEDTAVYYCRLVSSGRAFWGQGTQVTVSSAAHHHHH HHGAAEQKLISEEDLNGAA(SEQ ID NO:10)。

[0216] 结合米诺环素(或其变体)的抗体(例如结构域抗体)可以具有如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列或其变体。

[0217] MKYLLPTAAAGLLLLLAAQPAMAQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYNIGWFRQAPGKERE FVAAISWSGARTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCVAGRGGWTEAILDYWGQGTQVTVSSA AAHHHHHHHGAAEQKLISEEDLNGAA(SEQ ID NO:11)。

[0218] 结合米诺环素(或其变体)的抗体(例如结构域抗体)可以具有如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列或其变体。

[0219] MKYLLPTAAAGLLLLLAAQPAMAQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSRYNIGWFRQAPGKERE

FVAAISWSGARTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGRGWGTEAILDYWGQGTQVTVSSAAHHHHHHGAAEQKLISEEDLNGAA (SEQ ID NO:12) .

[0220] 结合米诺环素 (或其变体) 的抗体 (例如结构域抗体) 可以具有如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列或其变体。

[0221] MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAQVQLQESGGLVQAGGSLRLACVASGNIGLVSVMDWYRQVPGKERELVATITGGGSTNYSDSVKGRFTISMDYAKSTIYLMNSLKPEDTAVYYCRLVNNGRPFWGQGTQVTVSSAAHHHHHHGAAEQKLISEEDLNGAA (SEQ ID NO:13) .

[0222] SEQ ID NO:8-13的变体序列与SEQ ID NO:8-13可以具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%的序列同一性,条件是序列能够结合米诺环素或其类似物。

[0223] 本发明提供了分泌POI的工程化细胞溶解性免疫细胞,其中所述POI的分泌是“可调的”。如本文所用,“可调的”是指可以增加,减少或关闭由工程化细胞溶解性免疫细胞对POI的分泌。

[0224] 可以以多种方式调节分泌。例如,可调整可释放蛋白和保留蛋白的比例以增加或减少分泌。可调整POI和胞内保留结构域的比例以增加或减少分泌。适当地为了增加分泌,可以使用POI对胞内保留结构域的较高比例,或反之亦然。

[0225] 可以通过调节两种蛋白上一种或更多种信号肽的效率来调整蛋白的比例。调节信号肽效率的方法描述于W02016/174409,其通过引用并入本文。

[0226] 在另一实施方案中,可以通过调整蛋白相互作用结构域对试剂的亲合力来调节分泌。或者,可以通过使用对蛋白相互作用结构域具有较高或较低亲和力的试剂来调节分泌。

[0227] 可释放蛋白

[0228] 如本文所用,“可释放蛋白”是指能够与保留蛋白分离的蛋白质。可释放的蛋白能够从一个区隔转运到另一个,例如,可释放蛋白可以能够从细胞分泌或转运到质膜。

[0229] 适当地,可释放的蛋白可以包含将蛋白引导至分泌途径的信号肽。适当地,可释放蛋白可以是例如包含锚定或跨膜结构域的膜蛋白。

[0230] 感兴趣的蛋白 (POI)

[0231] 如本文所用,“感兴趣的蛋白”、“POI”是指细胞溶解性免疫细胞已经被改造成表达和分泌的蛋白。

[0232] POI可以是希望控制其分泌的任何蛋白,例如,希望控制其在肿瘤微环境中的分泌的任何蛋白。适当地,POI是免疫系统调节剂。适当地,POI可以能够调节肿瘤微环境。

[0233] 如本文所用,“免疫系统调节剂”是指POI能够影响免疫系统。

[0234] POI可通过增加免疫应答来调节免疫系统。

[0235] 如本文所用,“能够调节肿瘤微环境”是指POI能够影响或改变肿瘤的微环境。

[0236] POI可以改变肿瘤微环境以抑制肿瘤生长或肿瘤存活。

[0237] 适当地,POI可以是细胞因子、趋化因子、抗体或其片段 (例如scFv或Fab片段) 或毒素。

[0238] 适当地,POI可以是免疫调节的。POI可以阻断抑制信号 (例如程序性细胞死亡蛋白1 (PD1))。POI可以是PD1阻断抗体。POI可以激活免疫系统 (例如肿瘤坏死因子受体超家族成员4 (TNFRSF4或OX40) 激动剂、41BB激动剂或诱导型共刺激分子 (ICOS) 激动剂) 。POI可以是OX40激动剂。POI可以是41BB激动剂。POI可以是ICOS激动剂。

[0239] PD1阻断抗体(克隆5C4)的序列在SEQ ID NO:14中列出。适当地,POI可以包含在SEQ ID NO:14中列出的序列或其变体。

[0240] MALPVTALLLPLALLHAARPEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTIEDFAVYYCQQSTFGQGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGVYLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKLEWVALIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMTSLRVEDTAVYYCASVDHWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:14) .

[0241] OX40激动剂的序列(三聚体卷曲螺旋OX40L)在SEQ ID NO:15中列出。适当地,POI可以包含在SEQ ID NO:15中列出的序列或其变体。

ACGCAAAPDVKDLSRLEELEGLVSSLREQQVSHRYPRIQSIKVQFTEYKK
EKGFI L TSQKEDEIMKVQNN SVI NC DGFYLI SLKGYFSQEVNISLHYQKDE
[0242] **EPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLNVT TDNTSLDDFHVNGGELILI**
HQNPGEFCVL (SEQ ID NO: 15).

[0243] 卷曲螺旋序列以粗体显示。

[0244] 41BB激动剂(三聚体卷曲螺旋41BBL)的序列在SEQ ID NO:16中列出。适当地,POI可以包含在SEQ ID NO:16中列出的序列或其变体。

ACGCAAAPDVKDLSRLEELEGLVSSLREQACPWAVSGARASPGSAASPR
LREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVS
[0245] **LTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQ**
PLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN S AFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHT
EARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE (SEQ ID NO: 16).

[0246] 卷曲螺旋序列以粗体显示。

[0247] POI可以是细胞因子。POI可以是趋化因子。

[0248] POI可以选自白介素-12(IL-12)、flexiIL-12、白介素-7(IL-7)、白介素-15(白介素-15)、白介素-21,粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和趋化因子(C-C基序)配体19(CCL19)。

[0249] 适当地,POI可以是IL-12。

[0250] 适当地,POI可以是IL-12。适当地,POI可以包含IL-12 α 亚基和IL-12 β 亚基。适当地,IL-12 α 亚基和/或IL-12 β 亚基可包含分别在UniProt登录号P29459和/或P29460中列出的氨基酸序列。

[0251] 来自UniProt登录号P29459的IL-12 α 亚基的氨基酸序列在SEQ ID NO:17中列出。适当地,POI可以包含SEQ ID NO:17列出的序列或其变体。MCPARSLLLVATLVLLDHL SLARNLPVATPDGMPCLHHSQNLLRAVS NMLQKARQTLEFY PCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSS IYEDL KMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNM LAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (SEQ ID NO:17) .

[0252] 来自UniProt登录号P29460的IL-12 β 亚基的氨基酸序列在SEQ ID NO:18中列出。适当地,POI可以包含SEQ ID NO:18列出的序列或其变体。MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELK KDVYVVELDWYPDAPGEMVVL TCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLL LHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAER

VRGDNKEYEYSVEQCQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVS
WEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRA QDRYYSSSWSEWASVPCS
(SEQ ID NO:18) .

[0253] 适当地,POI可以是flexi IL-12。Flexi IL-12包含通过柔性接头(例如包含丝氨酸-甘氨酸重复的接头)连接的人IL-12p35和p40亚基。

[0254] flexi IL-12的氨基酸序列在SEQ ID NO:19中列出。适当地,POI可以包含SEQ ID NO:19中列出的序列或其变体。

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGS
GKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQK
EPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWTITISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCG
AATLSAERVVRGDNKEYEYSVEQCQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKY
ENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT
[0255] FCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEW
ASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPLATPDPGMFPC LHHSQNLLRAVSNM
LQKARQTLEFYPTCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFIT
NGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDSKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQN
MLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVM
SYLNAS (SEQ ID NO: 19).

[0256] 人IL-12 β 亚基以正常文本显示,丝氨酸甘氨酸接头以粗体显示,人IL-12 α 亚基以斜体显示。

[0257] IL-7的氨基酸序列在SEQ ID NO:20中列出。适当地,POI可以包含SEQ ID NO:20中列出的序列或其变体。

[0258] MFHVSFRYIFGLPPLILVLLPVASSDCDIEGKDQKQYESVLMVSIQQLDSMKEIGSNCLNNEFNFFK
RHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSL
KEQKKLNDLCFLKRLLEIKTCWNKILMGTKEH (SEQ ID NO:20) .

[0259] IL-15的氨基酸序列在SEQ ID NO:21中列出。适当地,POI可以包含SEQ ID NO:21中列出的序列或其变体。

[0260] MRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMH
IDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNI
KEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:21) .

[0261] IL-21的氨基酸序列在SEQ ID NO:22中列出。适当地,POI可以包含SEQ ID NO:22中列出的序列或其变体。

[0262] MERIVICLMVIFLGLTVHKSSSQGQDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSA
FSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIIKKLRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQH
LSSRTHGSEDS (SEQ ID NO:22) .

[0263] CCL19的氨基酸序列在SEQ ID NO:23中列出。适当地,POI可以包含SEQ ID NO:23中列出的序列或其变体。

[0264] MALLLALLSLVLWTSPAPTLSGTNDACCLSVTKPIPGYIVRNFHYLLIK DGCRVPAVVFTTLRG RQLCAPDQPWVERIIQRLQRTSAKMKRRSS (SEQ ID NO:23) .

[0265] POI可以是抗体。适当地,POI可以是抗体、抗体片段(例如scFv、F(ab))、单结构域抗体(sdAb)、VHH/纳米抗体、纳米抗体、亲合体、纤连蛋白人工抗体支架、anticalin、affilin、设计的锚蛋白重复蛋白(DARPin)、VNAR、iBody、affimer、fynomer、结构域抗体(DAb)、abdurin/纳米抗体、centyrin、alphabody或nanofitin。

[0266] POI可以是毒素。适当地,毒素可以是白喉毒素。适当地,毒素可以是假单胞菌毒素。适当地,毒素可以是志贺氏菌毒素。

[0267] 白喉毒素的氨基酸序列在SEQ ID NO:24中列出。适当地,POI可以包含SEQ ID NO:24中列出的序列或其变体。

[0268] MLVRGYVVSRLKFASILIGALLGIGAPPSAHAGADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQ KPKSGTQGNYYYYDKGFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTE PLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRGQDAMYEYMAQACAG NRVRRSVGSSLSCINLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMSSEPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELK TVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMV AQAIPLVGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFLHDGYAVSWNTVEDSIIRTGFQGESGH DIKITAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDVNKSKTHISVNGRKIRMCRRAIDGDVTFCRPKSPVYVGNGVHANLHVAFH RSSSEKIHSNEISSDSIGVLGYQKTVDHKVNKSLSLFFEIKS (SEQ ID NO:24) .

[0269] SEQ ID NO:14-24的变体序列可以与SEQ ID NO:14-24具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%的序列同一性,条件是该序列能够作为感兴趣的蛋白起作用。变体序列保留了SEQ ID NO:14-24的至少一种功能,例如充当免疫系统调节剂的能力或调节肿瘤环境的能力。

[0270] POI可以通过活化T细胞核因子(NFAT)响应元件来调节。

[0271] NFAT响应元件可以包含SEQ ID NO:4:GGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGT (SEQ ID NO:4) 中列出的序列氨基酸序列。

[0272] NFAT响应元件可以包含重复单元例如3、4、5或6个重复单元。适当地,NFAT响应元件可以包含SEQ ID NO:4的3、4、5或6个重复单元。NFAT响应元件可以位于启动子(例如CMV启动子)的前面。

[0273] 工程化细胞溶解性免疫细胞可以包含编码两种或更多种POI(例如两种POI、三种POI、四种POI或五种或更多种POI)的核酸序列。适当地,可释放蛋白可以包含两种或更多种POI。

[0274] 两种或更多种POI可以是细胞因子、趋化因子、抗体和/或毒素的组合。适当地,POI的组合可以是协同的。适当地,该组合可以是细胞因子和趋化因子的组合,例如IL-7和CCL19。

[0275] POI可以可操作地连接至本文定义的第一蛋白相互作用结构域。POI可以可操作地连接至本文所定义的信号肽和第一蛋白相互作用结构域二者。

[0276] 在一个实施方案中,本文所定义的可释放蛋白和保留蛋白由同一核酸分子编码。该实施方案如图2所示。

[0277] 如本文所用,“融合蛋白”是通过两个或更多个编码分离的蛋白的核酸序列的连接

而产生的蛋白。

[0278] 适当地,本文所定义的可释放蛋白可以是融合蛋白,并且可以包含与第一蛋白相互作用结构域融合的POI。适当地,本文所定义的可释放蛋白可以是融合蛋白,其可以包含与第一蛋白相互作用结构域和信号肽二者都融合的POI。

[0279] POI可以是分泌蛋白。适当地,本发明提供了控制分泌的蛋白从细胞中释放的方法,其中在POI中是分泌性蛋白。

[0280] 如本文所用,“膜蛋白”是指包含膜栓系组分的蛋白,其充当锚定物,将所述蛋白栓系至细胞膜。

[0281] 膜栓系组分可包含膜定位结构域。这可以是使蛋白附着或保持在质膜近端的任何序列。

[0282] 膜定位结构域可以是或包含使新生多肽最初附着于ER膜的序列。当膜材料从ER“流”到高尔基体和最后到质膜时,蛋白在合成/转运过程结束时仍与膜结合。

[0283] 膜定位结构域可以例如包含跨膜结构域或跨膜序列、终止转移序列、GPI锚或豆蔻酰化/异戊烯化/棕榈酰化位点。

[0284] 或者,膜定位结构域可以例如通过结合膜近端实体将膜栓系成分引导至位于细胞膜上的蛋白或其他实体。膜栓系成分可以例如包含与免疫突触有关的分子(例如TCR/CD3, CD4或CD8)结合的结构域。

[0285] 豆蔻酰化是一种脂化修饰,其中衍生自肉豆蔻酸的肉豆蔻酰基通过酰胺键共价连接至N末端甘氨酸残基的 α -氨基。肉豆蔻酸是一种14碳的饱和脂肪酸,也称为正十四烷酸。可以共翻译或翻译后添加修饰。N-肉豆蔻酰基转移酶(NMT)催化细胞的细胞质中肉豆蔻酸加成反应。由于疏水性豆蔻酰基与细胞膜中的磷脂相互作用,豆蔻酰基导致与其连接的蛋白质的膜靶向。

[0286] 本发明的膜栓系组分可以包含能够被NMT酶豆蔻酰化的序列。当在细胞中表达时,本发明的细胞的膜栓系组分可包含肉豆蔻酰基。

[0287] 膜栓系组分可以包含共有序列,例如:NH₂-G1-X2-X3-X4-S5-X6-X7-X8,其被NMT酶识别。

[0288] 棕榈酰化是脂肪酸(例如棕榈酸)与半胱氨酸的共价结合,和以较低的频率与蛋白质的丝氨酸和苏氨酸残基共价结合。增强蛋白质的疏水性的棕榈酰化可用于诱导膜缔合。与异戊烯化和豆蔻酰化相反,棕榈酰化通常是可逆的(因为棕榈酸和蛋白质之间的键通常是硫酯键)。逆反应由棕榈酰蛋白硫酯酶催化。

[0289] 在通过G蛋白进行信号转导时, α 亚基的棕榈酰化、 γ 亚基的异戊烯化和肉豆蔻酰化参与将G蛋白栓系在质膜的内表面,以便G蛋白可以与其受体相互作用。

[0290] 膜栓系组分可以包含能够被棕榈酰化的序列。当在细胞中表达时,膜栓系组分可以包含额外的脂肪酸,其引起膜定位。

[0291] 异戊烯化(也称为异戊二烯化或脂化)是将疏水性分子添加到蛋白质或化合物中。异戊二烯基(3-甲基-丁-2-烯-1-基)有助于附着在细胞膜上,类似于脂质锚(如GPI锚)。

[0292] 蛋白质异戊烯化涉及将法呢基或香叶基-香叶基部分转移至靶蛋白的C端半胱氨酸。在细胞中有三种酶进行异戊烯化,法呢基转移酶、Caax蛋白酶和香叶基香叶基转移酶I。

[0293] 膜栓系组分可以包含能够被异戊二烯化的序列。当在引起膜定位的细胞中表达

时,膜栓系组分可以包含一个或多个异戊二烯基。

[0294] 如本文所用,“跨膜结构域”是跨膜的蛋白质的序列。跨膜结构域可以是在膜中热力学稳定的任何蛋白质结构。这通常是包含几个疏水残基的 α 螺旋。根据本发明,任何跨膜蛋白的跨膜结构域可用于提供膜蛋白的跨膜部分。

[0295] 本领域技术人员使用TMHMM算法(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)可以确定蛋白质的跨膜结构域的存在和跨越。此外,鉴于蛋白质的跨膜结构域是相对简单的结构,即预测形成足够长的疏水性 α 螺旋以跨膜的多肽序列,也可以使用人工设计的TM结构域(US 7052906 B1描述了合成的跨膜组分)。

[0296] POI可以是膜蛋白(例如,包含膜栓系组分的蛋白,包含跨膜结构域的蛋白)。合适地,POI可以是任何类型的膜蛋白,包括但不限于:I、II和III型(单跨膜分子)和IV型(多跨膜分子)膜蛋白。合适地,本发明提供了用于控制膜蛋白从细胞内部释放以使其移位到细胞质膜的方法,其中POI是膜蛋白。

[0297] 可用于本发明的膜蛋白的实例包括但不限于:Src家族激酶(例如,Fyn、Src、Lck)、4-1BBL、CD40L、OX40、CD148、CD45、SHP-1或SHP-2、CTLA4、PD-1、LAG-3、2B4、BTLA1、CD28、ICOS、CD33、CD31、CD27、CD30、GITR或HVEM或Siglec-5、6、7、8、9、10或11和嵌合肿瘤坏死因子(TNF)受体。可用于本发明的膜蛋白的其他实例包括膜结合的细胞因子,例如IL2、IL17和IL15。

[0298] 如本文所用,“增强剂”是指能够增强根据本发明的细胞溶解性免疫细胞的活性(例如,信号传导)和/或持久性的蛋白质。例如,增强剂可以能够增强根据本发明的细胞溶解性免疫细胞的细胞活化、抗原响应性、增殖和/或持久性。

[0299] 合适地,增强剂可以包含膜栓系组分和增强剂结构域。

[0300] “膜栓系组分”充当锚,将信号增强组分或信号抑制组分栓系至细胞膜的细胞内表面。

[0301] 合适地,增强剂结构域可以是磷酸化放大结构域(例如激酶)的信号。

[0302] 磷酸化放大结构域可以是磷酸化放大内结构域,其可以直接或间接地放大ITAM的磷酸化。例如,磷酸化放大内结构域可以能够直接或间接地放大一种或多种ITAM的磷酸化。

[0303] 磷酸化的直接放大的实例是激酶的磷酸化。SRC家族激酶(SRK)蛋白的酪氨酸激酶结构域可以直接磷酸化ITAM上的酪氨酸残基。

[0304] 磷酸化间接放大的一个实例是通过募集激酶。例如,CD4和CD8共受体的胞内域通过与CAR T细胞抗原复合物聚集而间接放大ITAM的磷酸化,募集更多的SRK蛋白,然后直接磷酸化ITAM。这些共受体还进一步稳定了CAR T细胞抗原复合物,从而通过T细胞活化所需的CAR T细胞受体复合物而优化信号传导。

[0305] 磷酸化放大结构域可包含SRK蛋白的酪氨酸激酶结构域的全部或一部分。

[0306] 可替换地或另外,磷酸化放大结构域可以包含CD4共受体或CD8共受体的胞内域的全部或一部分。

[0307] 增强剂结构域可以是保护细胞不受肿瘤微环境影响的因子,例如4-1BBL或CD40L。

[0308] 增强剂结构域可以是嵌合肿瘤坏死因子(TNF)受体。

[0309] 合适地,嵌合TNF受体可以包含能够结合TNFR配体的结合结构域;和TNFR信号传导结构域。合适地,抗原结合结构域可以包含D3R、HVEM、CD27、CD40、RANK或Fn14的配体结合结

构域。合适地,信号传导结构域可以包含4-1BB、OX40或GITR内结构域的信号传导部分。

[0310] 在一个实施方案中,POI(例如膜POI)可以是增强剂。

[0311] 如本文所用,“抑制剂”或“信号抑制”是指当位于细胞膜的细胞内侧时抑制信号传导的蛋白质。

[0312] 例如,当抑制剂位于CAR或TCR内结构域的近端时,其可以抑制CAR介导的或TCR介导的信号传导。

[0313] 信号抑制剂可以完全抑制CAR或TCR介导的细胞信号传导,有效“关闭”CAR介导的细胞活化。或者,信号抑制剂可引起部分抑制,有效地“调低”CAR介导的细胞信号传导。

[0314] 信号抑制剂的存在可能导致通过信号传导组分的信号传导比不存在信号抑制剂时发生的信号传导低2、5、10、50、100、1,000或10,000倍。

[0315] CAR或TCR介导的信号传导可以通过本领域已知的多种方法来确定。此类方法包括测定信号传导,例如测定特定蛋白酪氨酸激酶(PTK)的水平、磷脂酰肌醇4,5-二磷酸(PIP2)的分解、蛋白激酶C(PKC)的活化和细胞内钙离子浓度的升高。还可以利用功能性读出,例如T细胞的克隆扩增,细胞表面上活化标记物的上调,分化成效应细胞以及诱导细胞毒性或细胞因子(例如IL-2)的分泌。

[0316] 合适地,抑制剂可以包含膜栓系组分和信号抑制结构域。

[0317] 信号抑制结构域可以包含磷酸酶,例如能够使ITAM去磷酸化的磷酸酶。

[0318] 信号抑制剂的信号抑制结构域可以包含受体样酪氨酸磷酸酶的全部或一部分。磷酸酶可以干扰T细胞信号传导中涉及的元素(例如PLC γ 1和/或LAT)的磷酸化和/或功能。

[0319] 信号抑制结构域可包含一种或多种参与控制T细胞活化的磷酸酶的磷酸酶结构域,例如CD148、CD45、SHP-1或SHP-2。

[0320] 合适地,从胞内区隔向膜的释放抑制剂(例如磷酸酶)可抑制CAR或TCR介导的细胞信号传导。

[0321] 信号抑制组分的信号抑制结构域可包含抑制T细胞信号传导的免疫调节分子的内结构域的全部或一部分。例如,信号抑制结构域可包含来自抑制T细胞活化的免疫抑制受体的内结构域。抑制受体可以是CD28或Siglec家族的成员,例如CTLA4、PD-1、LAG-3、2B4、BTLA1、CD28、ICOS、CD33、CD31、CD27、CD30、GITR或HVEM或Siglec-5、6、7、8、9、10或11。

[0322] 信号抑制结构域可包含一个或多个基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)。

[0323] ITIM是存在于免疫系统的许多抑制性受体的细胞质尾部中的氨基酸的保守序列(S/I/V/LxYxxI/V/L)。具有ITIM的抑制性受体与其配体相互作用后,其ITIM基序被酶Src激酶磷酸化。

[0324] 免疫抑制受体,例如PD1、PDCD1、BTLA4、LILRB1、LAIR1、CTLA4、2B4、GP49B、Pir-B、PECAM-1、CD22、Siglec 7、Siglec 9、KLRG1、ILT2、CD94-NKG2A、CD5和杀伤抑制受体家族(KIR)包括KIR2DL1、KIR2DL4、KIR2DL5、KIR3DL1和KIR3DL3含有ITIM。

[0325] 酪氨酸蛋白激酶CSK(C端Src激酶)是一种酶(UniProt ID:P41240[<http://www.uniprot.org/uniprot/P41240>]),其可磷酸化位于Src家族激酶的C末端的酪氨酸残基。信号抑制结构域可包含CSK的酪氨酸激酶结构域。

[0326] 在一个实施方案中,POI(例如膜POI)可以是抑制剂。

[0327] 合适地,当根据本发明的工程化细胞溶解性免疫细胞包含CAR或转基因TCR时,POI

可以是抑制剂。

[0328] 信号肽

[0329] 经典的蛋白质分泌途径是通过内质网(ER)。本文所述的可释放蛋白和保留蛋白可包含信号序列,使得当蛋白质在细胞内表达时,新生蛋白质被导向ER。

[0330] 术语“信号肽”与“信号序列”同义。

[0331] 信号肽是一种短肽,通常长5-30个氨基酸,通常存在于大多数新合成的蛋白质的N末端,这些蛋白质注定要朝向分泌途径。这些蛋白质包括那些在某些细胞器内的(例如,内质网、高尔基体或内体)、从细胞分泌的以及跨膜蛋白。

[0332] 信号肽通常含有核心序列,其是一长段疏水性氨基酸,具有形成单个 α -螺旋的趋势。信号肽可以以短的带正电荷的氨基酸段开始,这有助于在移位过程中实施多肽的正确拓扑。在信号肽的末端,典型地存在一段由信号肽酶识别和切割的氨基酸。信号肽酶可在移位过程中或完成后切割,以生成游离信号肽和成熟蛋白。然后,游离信号肽被特异性蛋白酶消化。

[0333] 尽管已知某些羧基端信号肽,但信号肽通常位于分子的氨基末端。

[0334] 信号序列通常具有三部分结构,由疏水核心区(h区)两侧n区和c区组成。后者含有信号肽酶(SPase)共有切割位点。通常,信号序列被共翻译地切除,所得的切割的信号序列被称为信号肽。

[0335] 可以使用软件技术来检测或预测信号序列(例如,参见<http://www.predisi.de/>)。

[0336] 大量的信号序列是已知的,并且在数据库中可用。例如,<http://www.signalpeptide.de>,在其数据库中列出了2109个已确认的哺乳动物信号肽。

[0337] 在一个实施方案中,蛋白质可以可操作地与信号肽连接,该信号肽能够使蛋白质移位进入ER。蛋白质可被工程化改造为可操作地与信号肽连接,该信号肽使得蛋白质能够移位进入ER。合适地,该蛋白质可以可操作地与信号肽连接,该信号肽事实上通常不可操作地连接。合适地,蛋白质和信号肽的组合可以是合成的(例如不存在于自然界中)。

[0338] 在一些实施方案中,可以使用改变的信号肽(例如效率较低的信号肽)。改变的信号肽的使用可以允许根据临床需要调整系统。例如,在一些实施方案中,使用效率较低的信号肽减少了从系统的泄漏(leak),例如,在没有试剂的情况下较少的分泌或移位。

[0339] 可以通过调节两种蛋白质上一种或多种信号肽的效率来改变蛋白质的比例。在W02016/174409中描述了调节信号肽效率的方法(其通过引用并入本文)。

[0340] 合适地,信号肽可以是鼠Ig κ 链V-III区信号肽或其变体。鼠Ig κ 链V-III区信号肽的氨基酸序列在SEQ ID NO:25中列出。合适地,该信号肽可以包含SEQ ID NO 25或其变体。

[0341] METDTLLLWVLLLWVPGSTG(SEQ ID NO:25)。

[0342] 合适地,变体鼠Ig κ 链V-III区信号肽的氨基酸序列可包含在SEQ ID NO:26中列出的序列。

[0343] METDTLLKLVLLWVPGSTG(SEQ ID NO:26)。

[0344] 相对于SEQ ID NO:26中列出的野生型序列,该变体鼠Ig κ 链V-III区信号肽序列在第9个氨基酸位置(有下划线)包含赖氨酸突变。合适地,信号肽包含SEQ ID NO 26或其变体。

[0345] 在第9位氨基酸处的赖氨酸突变的该取代降低了信号肽的效率,从而降低了进入ER的蛋白质的量,并降低了分泌或移位至膜的蛋白质的总量。

[0346] 合适地,信号肽可以是鼠Ig重链V区信号肽序列。鼠Ig重链V区信号肽的氨基酸序列在SEQ ID NO:27中列出。合适地,该信号肽可包含SEQ ID NO:27中列出的序列或其变体。

[0347] MGWSCIIILFLVATATGVHS (SEQ ID NO:27)。

[0348] SEQ ID NO:25-27的变体序列与SEQ ID NO:25-27可以具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%的序列同一性,条件是该序列能够作为信号肽起作用。该变体序列保留了将新生蛋白质引导至ER的能力。

[0349] 在另一实施方案中,蛋白质可以可操作地连接至信号肽,该信号肽使蛋白质能够移位到ER中。合适地,该蛋白质可以可操作地连接至信号肽,该信号肽通常实际上可操作地连接至该信号肽。合适地,该蛋白质可以包含野生型信号肽,例如,蛋白质和信号肽的组合是天然存在的。

[0350] 在一些实施方案中,POI是膜蛋白,并用终止转移锚序列锚定到脂质膜。在其他实施方案中,POI是膜蛋白,并用信号锚序列锚定到脂质膜。在其他实施方案中,POI是膜蛋白,并且其N端结构域靶向胞质溶胶。在另一个实施方案中,POI是膜蛋白,其N端结构域靶向内腔。

[0351] 试剂

[0352] 第一和第二蛋白相互作用结构域之间的相互作用是根据试剂存在或不存在的条件性相互作用。

[0353] 该试剂能够被递送到细胞的细胞质或胞内区隔并且可用于胞内结合。

[0354] 合适地,该试剂可以是小分子。药剂可以是小分子,例如:类固醇、甲氨蝶呤、咖啡因、苯甲酰基甲基芽子碱或抗生素。

[0355] 类固醇是具有四个“稠合”碳环的有机化合物。类固醇的实例包括饮食中的脂质胆固醇、性激素雌二醇和睾丸素以及抗炎药地塞米松。

[0356] 类固醇的核心结构由17个碳原子组成,其键合在四个“稠合”环中:三个六元环己烷环(第一个图示中的环A、B和C)和一个五元环戊烷环(D环)。类固醇因附着在该四环核上的官能团和环的氧化状态而异。甾醇是类固醇的形式,其在第3位具有一个羟基,和一个衍生自胆甾烷的骨架。

[0357] 甲氨蝶呤(MTX),以前称为氨甲蝶呤,是抗代谢药和抗叶酸药物。

[0358] 咖啡因是嘌呤,一种甲基黄嘌呤生物碱。它是中枢神经系统的一种刺激物,但被食品和药品管理局(FDA)公认是安全的(GRAS)。对于成年人来说,每天超过10克的有毒剂量远远高于每天少于500毫克的典型剂量。一杯咖啡含有80-175mg咖啡因。

[0359] 苯甲酰基甲基芽子碱,也称为古柯碱或可乐,是一种强兴奋剂。已知苯甲酰基甲基芽子碱(甲基(1R,2R,3S,5S)-3-(苯甲酰氧基)-8-甲基-8-氮杂双环[3.2.1]辛烷-2-羧酸酯)的各种类似物包括立体异构体;3 β -苯环取代的类似物;2 β -取代的类似物;N-修饰的苯甲酰基甲基芽子碱类似物;3 β -氨基甲酰基类似物;3 β -烷基-3-苄基托烷;6/7取代的苯甲酰基甲基芽子碱;6-烷基-3-苄基托烷;和哌啶同系物。

[0360] 抗生素或抗菌药是用于治疗 and 预防细菌感染的抗菌剂类型。抗菌抗生素通常根据其作用机理、化学结构或活性谱进行分类。大多数靶向细菌功能或生长过程。那些靶向细菌

细胞壁(青霉素和头孢菌素)或细胞膜(多粘菌素),或干扰基本细菌酶(利福霉素、脂霉素、喹诺酮和磺酰胺)具有杀菌活性。

[0361] 那些靶向蛋白质合成(大环内酯类、林可酰胺类和四环素)通常是抑制细菌的(除了杀菌的氨基糖类)。进一步的分类基于它们的靶标特异性。“窄谱”抗菌抗生素靶向特定类型的细菌,例如革兰氏阴性或革兰氏阳性细菌,而广谱抗生素会影响大范围的细菌。在过去的十年中,四种新种类抗菌抗生素已纳入临床使用:环状脂肽(如达托霉素)、甘氨酸环素(glycylcycline)(如替加环素)、恶唑烷酮类(如利奈唑胺)和脂霉素(如非达索霉素)。

[0362] 该药剂可以是例如抗生素,例如四环素,或其衍生物,例如强力霉素或米诺环素。

[0363] 胞内保留结构域

[0364] 如本文所用,“保留蛋白”是指包含胞内保留结构域的蛋白。

[0365] 合适地,保留蛋白可以包含细胞内保留结构域和第二蛋白相互作用结构域。

[0366] 胞内保留结构域可以是给定胞内区隔常驻的任何蛋白质或蛋白结构域。这意味着所述蛋白质或结构域大部分位于给定的区隔中。至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的所述蛋白质或结构域位于细胞中的所述区隔中。保留结构域防止在不存在试剂的情况下根据本发明的感兴趣的蛋白质从细胞分泌或移位至质膜。

[0367] 如本文所用,“区隔”或“亚细胞区隔”是指细胞的给定亚结构域。区隔可以是细胞器(例如内质网、高尔基体、内体、溶酶体)或细胞器的元件(例如内体的多囊泡体、高尔基体的顺式-或反式潴泡(cisternae)等)或质膜或质膜的亚结构域(例如顶端、基底外侧、轴突结构域)或微结构域,例如粘着斑或紧密连接)。

[0368] “胞内区隔”是指细胞内的区隔。

[0369] 根据本发明,可以通过第一和第二蛋白相互作用结构域之间的条件性相互作用将POI保留在细胞内或特定的胞内区隔中,其中所述蛋白质相互作用域之一包含胞内保留结构域。

[0370] 经典的蛋白分泌途径是通过ER。分泌的蛋白质通常具有信号肽,其导致蛋白质移位到ER中。分泌的蛋白质不具有跨膜结构域,并通过ER继续到达细胞表面,在那里它们没有保留在膜上。

[0371] I型膜结合蛋白通常包含信号肽,并利用终止转移锚序列锚定在脂质膜上。II型、III型和多跨膜结合蛋白可以通过跨膜结构域靶向分泌途径,其与信号序列相似,不同之处在于它不被切割且通常被信号锚定序列锚定。

[0372] 一些信号肽含有高尔基体保留基序。这些蛋白质进入ER,但由于识别了高尔基体保留基序,被穿梭回到高尔基体且未被分泌。

[0373] 保留结构域可以是驻留在高尔基体中的蛋白质或结构域。合适地,高尔基体保留结构域可以选自包含以下的群组:巨蛋白(Golgb1, GenBank登录号NM+004487.3)、TGN38/46、Menkes受体和高尔基体酶,例如ManII(α -1,3-1,6甘露糖苷酶, Genbank登录号NM_008549)、唾液酸转移酶(β -半乳糖酰胺(galactosamide) α 2,6-唾液酸转移酶1, NM_003032)、GalT(β -1,4-半乳糖基转移酶1, NM_001497)腺病毒E19、HLA恒定链或包含其定位结构域的片段。

[0374] 胞内保留结构域可以是高尔基体保留结构域。高尔基体保留结构域可以选自包含以下的群组:SEKDEL(SEQ ID NO:28)序列、KDEL(SEQ ID NO:29)序列、KKXX(SEQ ID NO:30)

基序、KXKXX (SEQ ID NO:31) 基序、包含序列KYKSRRSFIDEKKMP (SEQ ID NO:32) 的腺病毒E19的尾部,或包含序列MHRRRSRSCR (SEQ ID NO:33) 的人白细胞抗原 (HLA) 恒定链片段。

[0375] 合适地,保留结构域可以是KDEL (SEQ ID NO:29) 序列。KDEL序列防止蛋白质从ER分泌。具有KDEL序列的蛋白质将通过逆行移位至ER内腔而从高尔基体中恢复。蛋白质仅在KDEL序列被切割后才离开ER。因此,只要其含有KDEL序列,驻留在ER中的蛋白质将保留在ER中。

[0376] 合适地,保留结构域可以是KKXX (SEQ ID NO:30) 基序。合适地,KKXX结构域可以位于蛋白质的C末端。KKXX通过与包被蛋白 (COPI) 复合物的相互作用,通过逆行移位从高尔基体的顺式末端恢复ER膜蛋白。

[0377] 合适地,保留结构域可以是KXKXX (SEQ ID NO:31) 基序。

[0378] 合适地,保留结构域可以是包含序列KYKSRRSFIDEKKMP (SEQ ID NO:32) 的腺病毒E19蛋白的尾部。

[0379] 合适地,保留结构域可以是包含序列MHRRRSRSCR (SEQ ID NO:33) 的HLA恒定链的N-末端片段。

[0380] 保留结构域可以是驻留在ER中的蛋白质或结构域。

[0381] ER保留结构域可以选自包含以下的群组:驻留在ER中的恒定链的同种型 (Ii33)、核糖体结合糖蛋白I、核糖体结合糖蛋白II、SEC61或细胞色素b5或包含其定位结构域的片段。ER定位结构域的一个实例是核糖体结合糖蛋白II的ER定位,Genbank登录号BC060556.1。

[0382] 胞内保留结构域可以是ER保留结构域。

[0383] 保留结构域可以是驻留在质膜中的蛋白质或结构域。胞内保留结构域可以是质膜保留结构域。

[0384] 质膜保留结构域可以选自糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 锚定的蛋白质,例如Thy-1细胞表面抗原 (Thy-1) 和病毒蛋白 (PRNP)。

[0385] 保留结构域可以在蛋白相互作用结构域的C末端。

[0386] 保留结构域可以在蛋白相互作用结构域的N末端。

[0387] 合适地,本文定义的保留蛋白可以包含与本文定义的第二蛋白相互作用结构域可操作地连接的胞内保留结构域。胞内保留结构域可以与本文定义的信号肽和第二蛋白相互作用结构域二者可操作地连接。

[0388] 合适地,本文定义的保留蛋白可以是融合蛋白,并且可以包含与第二蛋白相互作用结构域融合的胞内保留结构域。合适地,本文定义的保留蛋白可以是融合蛋白,其可以包含与第二蛋白相互作用结构域和信号肽二者融合的胞内保留结构域和/或跨膜结构域。合适地,本文定义的保留蛋白可以是融合蛋白,并且可以包含与胞内域和信号肽二者融合的第二蛋白相互作用结构域和/或跨膜结构域。

[0389] 细胞

[0390] 本发明涉及工程化细胞溶解性免疫细胞,其包含:可释放蛋白,其包含感兴趣的多肽 (POI) 和第一相互作用结构域;和保留蛋白,其保留在细胞的胞内区隔中,且包含第二相互作用结构域;其中第一蛋白相互作用结构域和第二蛋白相互作用结构域能够根据试剂的存在或不存在而进行条件性相互作用。

[0391] 细胞可包含编码可释放蛋白的第一核酸序列,所述可释放蛋白包含感兴趣的多肽(POI)、第一蛋白相互作用结构域和信号肽;和

[0392] 第二核酸序列,其编码保留蛋白,所述保留蛋白包含第二蛋白相互作用结构域、胞内保留结构域和信号肽;其中第一蛋白相互作用结构域和第二蛋白相互作用结构域能够根据试剂的存在或不存在而进行条件性相互作用。

[0393] 在一些实施方案中,POI是分泌蛋白,并且在试剂存在下由细胞分泌。

[0394] 在一些实施方案中,POI是膜蛋白,并且在试剂存在下被输出到质膜。本发明还涉及可通过本发明的方法可获得(或获得)的工程化细胞溶解性免疫细胞。

[0395] 在一些实施方案中,根据本发明的工程化细胞溶解性免疫细胞还包含嵌合抗原受体(CAR)或转基因T细胞受体(TCR)。

[0396] 如本文所用,“工程化细胞”是指已被修饰以包含或表达该细胞非天然编码的核酸序列的细胞。用于工程化改造细胞的方法是本领域已知的,包括但不限于细胞的遗传修饰,例如通过转导(例如逆转录或慢病毒转导)、转染(例如基于DNA或RNA的瞬时转染),包括脂质、聚乙二醇、磷酸钙和电穿孔的转染。可以使用任何合适的方法将核酸序列引入细胞。

[0397] 因此,分别编码可释放蛋白和保留蛋白的第一和第二核酸序列不会被相应的未修饰细胞天然表达,例如未修饰的 α - β T细胞、NK细胞、 γ - δ T细胞或细胞因子诱导的杀伤细胞。

[0398] 合适地,工程化细胞是其基因组已被修饰的细胞,例如,通过转导或转染。合适地,工程化细胞是其基因组已被逆转录病毒转导修饰的细胞。合适地,工程细胞是其基因组已被慢病毒转导修饰的细胞。

[0399] 如本文所用,术语“引入”是指用于将外源DNA或RNA插入细胞中的方法。如本文所用,术语引入包括转导和转染方法。转染是通过非病毒方法将核酸引入细胞的过程。转导是通过病毒载体将外源DNA或RNA引入细胞的过程。

[0400] 根据本发明的工程化细胞可以通过多种方式之一引入编码可释放蛋白和保留蛋白的DNA或RNA来产生,所述方式包括用病毒载体转导,用DNA或RNA转染。

[0401] 可以在引入编码可释放蛋白和保留蛋白的核酸序列之前活化和/或扩增细胞,例如通过用抗CD3单克隆抗体或抗CD3和抗CD28单克隆抗体两者进行处理。如本文所用,“活化的”是指细胞已被刺激,导致细胞增殖、分化或启动效应子功能。

[0402] 测量细胞活化的方法是本领域已知的,并且包括例如通过流式细胞术测量活化标志物的表达,例如CD69、CD25、CD38或HLA-DR的表达或测量胞内细胞因子。

[0403] 如本文所用,“扩增”是指细胞或细胞群体经诱导增殖。

[0404] 细胞群体的扩增可以例如通过计数群体中存在的细胞数量来测量。细胞的表型可以通过本领域已知的方法例如流式细胞术确定。

[0405] 如本文所用,“细胞溶解性免疫细胞”是直接杀死其他细胞的细胞。细胞溶解性细胞可以杀死癌细胞;病毒感染的细胞或其他受损细胞。细胞溶解性免疫细胞包括T细胞和自然杀伤(NK)细胞。

[0406] 细胞溶解性免疫细胞可以是T细胞或T淋巴细胞,它们是在细胞介导的免疫中起关键作用的一种类型的淋巴细胞。通过在它们的细胞表面上存在TCR,可以将T细胞与其他淋巴细胞(例如B细胞和NK细胞)区分开。

[0407] 细胞溶解性T细胞(TC细胞或CTL)会破坏病毒感染的细胞和肿瘤细胞,并且也与移

植排斥有关。CTL在其表面表达CD8。CTL可称为CD8⁺ T细胞。这些细胞通过结合与MHC I类(存在于所有有核细胞表面)相关的抗原来识别其靶标。通过调节性T细胞分泌的IL-10、腺苷和的其他分子,CD8⁺细胞可以失活为一种免疫无能性状态,从而预防自身免疫性疾病,例如实验性自身免疫性脑脊髓炎。

[0408] 合适地,本发明的细胞可以是T细胞。合适地,T细胞可以是 α - β T细胞。合适地,T细胞可以是 γ - δ T细胞。

[0409] 天然杀伤细胞(或NK细胞)是一种类型的细胞溶解性细胞,其形成先天免疫系统的一部分。NK细胞以MHC独立的方式对来自病毒感染细胞的先天信号提供快速响应。

[0410] NK细胞(属于先天性淋巴细胞群)被定义为大颗粒淋巴细胞(LGL),构成第三类细胞,其不同于产生B和T淋巴细胞的常见淋巴样前体细胞。已知NK细胞在骨髓、淋巴结、脾脏、扁桃体和胸腺中分化并成熟,然后它们进入循环。

[0411] 合适地,本发明的细胞可以是野生型杀伤(NK)细胞。合适地,本发明的细胞可以是细胞因子诱导的杀伤细胞。

[0412] 细胞可以衍生自患者自己的外周血(第一方),或在来自供体外周血的造血干细胞移植(第二方)环境中,或来自不相关供体的外周血(第三方)。例如在用编码本发明的多肽的核酸分子转导之前,可以例如通过用抗CD3单克隆抗体处理来活化和/或扩增T或NK细胞。

[0413] 或者,细胞可以衍生自诱导型祖细胞或胚胎祖细胞向T细胞的离体分化。或者,可以使用保留其裂解功能的永生化T细胞系。

[0414] 细胞可以是造血干细胞(HSC)。可以在通过施用药理剂量的细胞因子如G-CSF进行活动化(mobilization)后通过外周血的白细胞单采术(leukopheresis)从合适匹配的供体的骨髓中[外周血干细胞(PBSC)],或者从分娩后从胎盘收集的脐带血(UCB)获得用于移植的HSC。骨髓、PBSC或UCB可以不经处理而移植,或者可以通过用针对CD34表面抗原的单克隆抗体进行免疫选择来富集HSC。

[0415] 嵌合抗原受体(CAR)

[0416] 经典CAR是嵌合I型跨膜蛋白质,其将细胞外抗原识别结构域(结合物)连接至细胞内信号传导结构域(胞内域)。结合物通常是衍生自单克隆抗体(mAb)的单链可变片段(scFv),但其可以基于包含抗体样抗原结合位点的其他形式或靶抗原的配体。间隔区结构域可以是必要的以将结合物与膜分离并允许其呈合适的定向。使用的常见间隔区结构域是IgG1的Fc。取决于抗原,更紧凑的间隔区可以满足,例如来自CD8 α 的茎部和甚至仅仅是IgG1铰链。跨膜结构域将蛋白质锚定在细胞膜中并将间隔区连接至胞内域。

[0417] 早期的CAR设计具有衍生自Fc ϵ R1或CD3 ζ 的 γ 链的细胞内部分的胞内域。结果,这些第一代受体传输免疫信号1,其足够触发T细胞对关联靶细胞的杀伤,但不能完全活化T细胞以增殖或存活。为了克服这一限制,构建了复合胞内域:将T细胞共刺激分子的细胞内部分融合至CD3 ζ 的细胞内部分,产生了第二代受体,其能够在抗原识别后同时传输活化和共刺激信号。最通常使用的共刺激结构域是CD28的共刺激结构域。这提供了最强力的共刺激信号-即免疫信号2,其触发T细胞增殖。还已经描述了一些受体,其包括TNF受体家族胞内域,例如紧密相关的OX40和4-1BB,其传输存活信号。现在已经描述甚至更强力的第三代CAR,其具有能够传输活化、增殖和存活信号的胞内域。

[0418] 可以使用例如逆转录病毒载体将编码CAR的核酸转移至T细胞。以这种方式,可以生成大量抗原特异性T细胞用于过继细胞转移。当CAR结合靶抗原时,这导致活化信号传输至上面有其表达的T细胞。因此CAR将T细胞的特异性和细胞毒性引向表达靶向抗原的细胞。

[0419] 抗原结合结构域

[0420] 抗原结合结构域是经典CAR的识别抗原的部分。

[0421] 本领域已知许多抗原结合结构域,包括基于抗体、抗体模拟物和T细胞受体的抗原结合位点的那些。例如,抗原结合结构域可以包含:衍生自单克隆抗体的单链可变片段(scFv);靶抗原的野生型配体;对靶标具有足够亲和力的肽;单结构域结合物例如骆驼科动物的;人工结合物例如Darpin;或衍生自T细胞受体的单链。

[0422] 各种肿瘤相关抗原(TAA)是已知的,如下表1所示。用于本发明的抗原结合结构域可以是能够结合如本文中所示的TAA的结构域。

[0423] 表1

癌症类型	TAA
弥漫性大B细胞淋巴瘤	CD19、CD20
乳腺癌	ErbB2、MUC1
AML	CD13、CD33
神经母细胞瘤	GD2、NCAM、ALK、GD2
B-CLL	CD19、CD52、CD160
结直肠癌	叶酸结合蛋白、CA-125
慢性淋巴细胞性白血病	CD5、CD19
胶质瘤	EGFR、波形蛋白
多发性骨髓瘤	BCMA、CD138
肾细胞癌	碳酸酐酶IX、G250
前列腺癌	PSMA
肠癌	A33

[0425] 跨膜结构域

[0426] 跨膜结构域是经典CAR的跨越膜的序列。其可以包含疏水性 α 螺旋。跨膜结构域可以衍生自CD28,其提供良好的受体稳定性。

[0427] CAR或TCR信号肽

[0428] 用于本发明的CAR或转基因TCR可包含信号肽,使得当其在细胞(例如T细胞)中表达时,新生蛋白质被引导至内质网并随后被引导至其得以表达的细胞表面。

[0429] 信号肽的核心可以含有长段的疏水性氨基酸,其倾向于形成单个 α -螺旋。信号肽可以以短的带正电荷的氨基酸段开始,该氨基酸段有助于在移位期间实施多肽的正确拓扑。在信号肽的末端处,典型地存在一段由信号肽酶识别并切割的氨基酸。信号肽酶可以在移位期间或移位完成后切割以生成游离信号肽和成熟蛋白质。然后通过特异性蛋白酶消化游离信号肽。

[0430] 间隔区结构域

[0431] 受体可以包含间隔区序列以连接抗原结合结构域和跨膜结构域。柔性间隔区允许抗原结合结构域在不同方向上定向以促进结合。

[0432] 间隔区序列可以例如包含IgG1 Fc区、IgG1铰链或人CD8茎部或小鼠CD8茎部。或者,间隔区可以包含备选接头序列,其具有与IgG1 Fc区、IgG1铰链或CD8茎部相似的长度和/或结构域间隔特性。可以改变人IgG1间隔区以去除Fc结合基序。

[0433] 细胞内信号传导结构域

[0434] 细胞内信号传导结构域是经典CAR的信号传输部分。

[0435] 最常用的信号传导结构域组分是CD3- ζ 胞内域,其含有3个ITAM。这在抗原结合后向T细胞传输活化信号。CD3- ζ 可以不提供完全有能力的活化信号并因此可以需要其他共刺激信号。例如,嵌合的CD28和OX40可以与CD3- ζ 一起使用,以传输增殖/存活信号,或者可以将所有三种一起使用。

[0436] 细胞内信号传导结构域可以是或包含T细胞信号传导结构域。

[0437] 细胞内信号传导结构域可以包含一个或多个基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)。ITAM是四个氨基酸的保守序列,其在免疫系统的某些细胞表面蛋白的细胞质尾中重复两次。该基序含有由两个其他氨基酸从亮氨酸或异亮氨酸分开的酪氨酸,产生签名YxxL/I。在分子的尾部这些签名中的两个通常由6至8个氨基酸分开(YxxL/I₍₆₋₈₎YxxL/I)。

[0438] ITAM对于免疫细胞中的信号转导是重要的。因此,它们存在于重要的细胞信号传导分子(如T细胞受体复合物的CD3和 ζ 链,B细胞受体复合物的CD79 α 和 β 链以及某些Fc受体)的尾部中。这些基序中的酪氨酸残基在受体分子与其配体相互作用后被磷酸化,并形成参与细胞的信号传导通路的其他蛋白质的停靠位点。

[0439] 细胞内信号传导结构域组分可以包含含有三个ITAM的CD3- ζ 胞内域,基本上由之组成,或由之组成。经典地,在抗原结合后,CD3- ζ 胞内域将激活信号传输至T细胞。

[0440] 细胞内信号传导结构域可以包含另外的共刺激信号传导。例如,4-1BB(也称为CD137)可以与CD3- ζ 一起使用,或者CD28和OX40可以与CD3- ζ 一起使用以传输增殖/存活信号。

[0441] 合适地,CAR可以具有以下通式:抗原结合结构域-TCR元件。

[0442] 如本文所用,“TCR元件”是指TCR受体复合物的组分的结构域或其部分。TCR元件可包含(例如具有)细胞外结构域和/或跨膜结构域和/或细胞内结构域,例如,TCR元件的细胞内信号传导结构域。

[0443] TCR元件可以选自TCR α 链、TCR β 链、CD3 ϵ 链、CD3 γ 链、CD3 δ 链、CD3 ϵ 链。

[0444] 合适地,TCR元件可包含TCR α 链、TCR β 链、CD3 ϵ 链、CD3 γ 链、CD3 δ 链或CD3 ϵ 链的细胞外结构域。合适地,TCR元件可包含TCR α 链、TCR β 链、CD3 ϵ 链、CD3 γ 链、CD3 δ 链或CD3 ϵ 链的跨膜结构域。合适地,TCR元件可以包含TCR α 链、TCR β 链、CD3 ϵ 链、CD3 γ 链、CD3 δ 链或CD3 ϵ 链的细胞内结构域。合适地,TCR元件可包含TCR α 链、TCR β 链、CD3 ϵ 链、CD3 γ 链、CD3 δ 链或CD3 ϵ 链。

[0445] 转基因T细胞受体(TCR)

[0446] T细胞受体(TCR)是存在于T细胞的表面上的分子,其负责识别作为与主要组织相容性复合物(MHC)分子结合的肽的抗原的片段。

[0447] TCR是由两个不同的蛋白质链组成的异二聚体。在人类中,95%的T细胞中,TCR由alpha(α)链和beta(β)链组成(分别由TRA和TRB编码),而在5%的T细胞中,TCR由gamma和delta(γ/δ)链组成(分别由TRG和TRD编码)。

[0448] 当TCR与抗原肽和MHC(肽/MHC)衔接时,T淋巴细胞通过信号转导活化。

[0449] 与常规的抗体针对的靶抗原不同,TCR识别的抗原可以包括潜在的细胞内蛋白质的整个阵列,所述蛋白质作为肽/MHC复合物得以加工并递送到细胞表面。

[0450] 通过使用载体人工将TRA和TRB基因;或TRG和TRD基因引入到细胞中,可以工程化改造细胞以表达异源(即非天然)TCR分子。例如,可以将经工程化改造的TCR的基因重新引入到自体T细胞中,并转移回患者中进行T细胞过继疗法。此类“异源”TCR在本文中也可以称为“转基因TCR”。

[0451] 核酸构建体/核酸序列的试剂盒

[0452] 本发明提供了核酸构建体,其包含:

[0453] (i) 第一核酸序列,其编码如本文定义的可释放蛋白,所述可释放蛋白包含感兴趣的蛋白(POI)和第一蛋白相互作用结构域;和

[0454] (ii) 第二核酸序列,其编码保留蛋白,所述保留蛋白包含第二蛋白相互作用结构域和胞内保留结构域;

[0455] 其中第一蛋白相互作用结构域和第二蛋白相互作用结构域能够根据试剂的存在或不存在而进行条件性相互作用;和

[0456] (iii) 第三核酸序列,其编码CAR或转基因TCR。

[0457] 本发明还提供了包含根据本发明的核酸序列的试剂盒。例如,试剂盒可包含:

[0458] (i) 第一核酸序列,其编码如本文定义的可释放蛋白,所述可释放蛋白包含感兴趣的蛋白(POI)和第一蛋白相互作用结构域;和

[0459] (ii) 第二核酸序列,其编码保留蛋白,所述保留蛋白可包含第二蛋白相互作用结构域和胞内保留结构域;

[0460] 其中第一蛋白相互作用结构域和第二蛋白相互作用结构域能够根据试剂的存在或不存在而进行条件性相互作用;和

[0461] (iii) 第三核酸序列,其编码CAR或转基因TCR。

[0462] 合适地,试剂盒可另外包含本文定义的试剂。

[0463] 如本文所用,术语“多核苷酸”、“核苷酸”和“核酸”旨在彼此同义。

[0464] 合适地,核酸构建体可以包含多个核酸序列,其编码本发明的组分,例如本发明提供的POI、第一和第二蛋白质相互作用结构域、胞内保留结构域和CAR或转基因TCR。例如,核酸构建体可以包含两个、三个、四个或更多个编码本发明不同组分的核酸序列。合适地,多个核酸序列可以被如本文定义的共表达位点分开。

[0465] 本领域技术人员将理解,由于遗传密码的简并性,许多不同的多核苷酸和核酸可以编码相同的多肽。另外,应当理解,技术人员可以使用常规技术进行不影响本文所述多核苷酸编码的多肽序列的核苷酸取代,以反映要在其中表达多肽的任何具体宿主生物体的密码子使用。合适地,对本发明的多核苷酸进行密码子优化,以使其能够在哺乳动物细胞,特别是如本文所述的细胞溶解性免疫细胞中表达。

[0466] 根据本发明的核酸可以包含DNA或RNA。它们可以是单链或双链的。它们也可以是其中包括合成或修饰的核苷酸的多核苷酸。对寡核苷酸的许多不同类型的修饰是本领域已知的。这些包括甲基磷酸酯和硫代磷酸酯主链,在分子的3'和/或5'末端处添加吡啶或聚赖氨酸链。出于本文所述用途的目的,应理解,可以通过本领域可用的任何方法修饰多核苷酸。可以进行此类修饰以增强感兴趣的多核苷酸的体内活性或寿命。

[0467] 关于核苷酸序列的术语“变体”、“同源物”或“衍生物”包括从该序列或对该序列的一个(或多个)核酸进行的任何取代、变化、修饰、替换、缺失或添加。

[0468] 共表达位点

[0469] 在本文中使用的共表达位点是指使得编码本发明的可释放蛋白和保留蛋白的核酸序列能够共表达的核酸序列。

[0470] 合适地,在第一核酸序列和第二核酸序列之间可以存在共表达位点。合适地,在编码可释放蛋白的核酸序列与编码保留蛋白的核酸序列以及编码CAR或转基因TCR的核酸序列之间可能存在共表达位点。

[0471] 共表达位点可以是编码切割位点的序列,使得工程化多核苷酸编码通过切割位点接合的转基因合成生物学途径的酶。通常,共表达位点位于编码转基因合成生物学途径的单独的酶的相邻多核苷酸序列之间。

[0472] 合适地,在其中多个共表达位点存在于工程化多核苷酸中的实施方案中,使用相同的共表达位点。

[0473] 优选地,共表达位点是切割位点。切割位点可以是能够使两个多肽分开的任何序列。切割位点可以是自切割的,从而当产生多肽时,其立即切割成单独的肽而不需要任何外部切割活性。

[0474] 术语“切割”在本文中为了方便而使用,但是切割位点可以通过除经典切割外的机制将肽分离成单独的实体。例如,对于口蹄疫病毒(FMDV)2A自身切割肽(参见下文),已经提出了各种模型来解释“切割”活性:由宿主-细胞蛋白酶蛋白水解,自体蛋白水解或翻译效应(Donnelly et al (2001) J.Gen.Virol.82:1027-1041)。只要当位于编码蛋白质的核酸序列之间的切割位点导致蛋白质作为单独的实体表达时,此类“切割”的确切机制对于本发明的目的并不重要。

[0475] 切割位点可以是弗林蛋白酶切割位点。弗林蛋白酶是属于枯草杆菌蛋白酶样前蛋白转化酶家族的酶。该家族的成员是将潜在的前体蛋白加工成其生物学活性产物的前蛋白转化酶。弗林蛋白酶是钙依赖性丝氨酸内切蛋白酶,其可以在它们配对的碱性氨基酸加工位点有效切割前体蛋白。弗林蛋白酶底物的实例包括甲状旁腺激素原、转化生长因子 β 1前体、白蛋白原、 β -分泌酶原、膜1型基质金属蛋白酶、神经生长因子原的 β 亚基和Willebrand因子。弗林蛋白酶正好在基本氨基酸靶序列(典型地为Arg-X-(Arg/Lys)-Arg')的下游切割蛋白,并且在高尔基体中富集。

[0476] 切割位点可以是烟草蚀刻病毒(TEV)切割位点。

[0477] TEV蛋白酶是高度序列特异性的半胱氨酸蛋白酶,其是糜蛋白酶样蛋白酶。它非常特异于其靶切割位点,因此经常用于体外和体内融合蛋白的受控切割。共有TEV切割位点为ENLYFQ\S(其中“\”表示被切割的肽键)。哺乳动物细胞,如人类细胞,不表达TEV蛋白酶。因此,在本核酸构建体包含TEV切割位点并且在哺乳动物细胞中表达的实施方案中,必须在哺乳动物细胞中也表达外源TEV蛋白酶。

[0478] 切割位点可编码自切割肽。“自切割肽”是指下述肽,该肽发挥功能使得当包含蛋白质和自切割肽的多肽产生时,其立即被“切割”或分离成不同的且离散的第一和第二多肽,而不需要任何外部切割活性。

[0479] 自切割肽可以是来自口蹄病毒或心脏病毒的2A自切割肽。口蹄病毒和心脏病毒的

主要2A/2B切割由在其自身C端“切割”的2A介导。在口蹄病毒例如口蹄疫病毒(FMDV)和马鼻炎A型病毒中,2A区域是约18个氨基酸的短区段,其与蛋白2B的N端残基(保守的脯氨酸残基)一起代表了能够在其自身C端介导“切割”的自主元件(Donnelly et al(2001),如上文)。

[0480] 已经在除口蹄病毒或心脏病毒外的小核糖核酸病毒,“小核糖核酸病毒样”昆虫病毒,C型轮状病毒,锥虫属物种中的重复序列和细菌序列中发现了“2A样”序列(Donnelly et al.,2001),如上所述。

[0481] 共表达序列可以是内部核糖体进入序列(IRES)。共表达序列可以是内部启动子。

[0482] 载体

[0483] 本发明还提供了包含本发明的一个或多个核酸序列或核酸构建体的载体或载体的试剂盒。此类载体可用于将核酸序列或构建体引入宿主细胞,以使其表达如本文定义的可释放蛋白、保留蛋白和CAR或转基因TCR。

[0484] 合适地,载体可包含编码本发明提供的不同组分的多个核酸序列。例如,载体可以包含两个、三个、四个或更多个编码本发明的不同核酸序列,例如P0I、蛋白相互作用结构域、胞内保留结构域和CAR或转基因TCR。合适地,多个核酸序列可以被如本文定义的共表达位点分开。

[0485] 载体可以例如是质粒或病毒载体,如逆转录病毒载体或慢病毒载体,或基于转座子的载体或合成的mRNA。

[0486] 载体可以能够转染或转导细胞。

[0487] 药物组合物

[0488] 本发明还涉及药物组合物,其包含根据本发明的工程化细胞溶解性免疫细胞或可通过根据本发明的方法可获得(例如获得)的细胞。

[0489] 本发明还提供了药物组合物,其包含根据本发明的核酸构建体,如本文定义的第一、第二和第三核酸序列;根据本发明的载体或本文所述的第一、第二和第三载体。特别地,本发明涉及含有根据本发明的细胞的药物组合物。

[0490] 药物组合物可以另外包含药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。药物组合物可以任选地包含一种或多种另外的药学活性多肽和/或化合物。此类剂型可以是例如适合用于静脉内输注的形式。

[0491] 治疗方法

[0492] 本发明提供了用于治疗和/或预防疾病的方法,该方法包括以下步骤:向受试者施用根据本发明的工程化细胞溶解性免疫细胞、或者通过根据本发明的方法可获得的(例如获得的)工程化细胞溶解性免疫细胞、或根据本发明的核酸构建体、或如本文定义的第一、第二和第三核酸序列;根据本发明的载体或本文所述的第一、第二和第三载体(例如,在如上所述的药物组合物中)。

[0493] 合适地,本发明用于治疗和/或预防疾病的方法可以包括向受试者施用根据本发明的工程化细胞溶解性免疫细胞(例如,在如上所述的药物组合物中)。

[0494] 本发明还提供了用于治疗和/或预防受试者疾病的方法,该受试者包含本发明的细胞,该方法包括向该受试者施用试剂的步骤。这样,该方法包括向已经包含本发明细胞的受试者施用试剂。

[0495] 合适地,本发明用于治疗和/或预防疾病的方法可以包括向已经施用了根据本发

明的工程化细胞溶解性免疫细胞的受试者施用本文定义的试剂。

[0496] 治疗疾病的方法涉及本发明细胞的治疗性用途。在这方面,可以对患有现有疾病或病况的受试者施用细胞以减轻、降低或改善至少一种与疾病相关的症状和/或减缓、降低或阻断疾病的进展。

[0497] 预防疾病的方法涉及本发明的细胞的预防性用途。在这方面,可以对尚未感染疾病和/或未显示任何疾病症状的受试者施用此类细胞,以预防或削弱疾病的起因,或减少或预防至少一种与此类病有关的症状的形成。受试者可以具有疾病的素因,或认为有形成疾病的风险。

[0498] 该方法可以包括以下步骤:

[0499] (i) 分离含有细胞的样品;

[0500] (ii) 将根据本发明的核酸构建体、如本文定义的第一、第二和第三核酸序列、根据本发明的载体或如本文定义的第一、第二和第三载体引入细胞;和

[0501] (v) 将来自(ii)的细胞施用于受试者。

[0502] 合适地,核酸构建体、载体或核酸可以通过转导引入。合适地,核酸构建体、载体或核酸可以通过转染引入。

[0503] 合适地,细胞可以是自体的。合适地,细胞可以是同种异体的。

[0504] 本发明提供的用于治疗疾病的方法可以包括监测疾病和/或任何毒性活性的进展。

[0505] 合适地,该方法可以包括停止或减少向受试者施用如本文定义的试剂,以减少不良毒性作用;或该方法可以包括增加向受试者施用如本文定义的试剂以增加抗肿瘤作用。

[0506] 该药剂可以是小分子。在一些实施方案中,该试剂可以选自米诺环素、四环素、强力霉素或其类似物。

[0507] 本发明提供的用于治疗疾病的方法可以包括监测疾病的进展和监测任何毒性活性,以及调节施用于受试者的试剂的剂量以提供可接受的疾病进展和毒性活性水平。

[0508] “监测疾病的进展”是指随着时间的推移评估与疾病相关的症状,以确定它们是否正在减轻/改善或增加/恶化。

[0509] “毒性活性”涉及本发明的细胞施用于受试者后引起的不良反应。毒性活动可包括例如免疫学毒性、胆汁毒性和呼吸窘迫综合征。

[0510] 这样,可以改变向受试者施用的药剂的剂量或施用频率,以提供可接受的水平的疾病进展和毒性活性。被确定为“可接受的”的疾病进展和毒性活性的具体水平将根据具体情况而改变,应在此基础上进行评估。

[0511] 试剂可以以药物组合物的形式施用。药物组合物可以另外包含药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。药物组合物可以任选地包含一种或多种另外的药学活性多肽和/或化合物。此类剂型可以是例如适合用于静脉内输注的形式。

[0512] 本发明提供了根据本发明的工程化细胞溶解性免疫细胞、根据本发明的核酸构建体、如本文定义的第一、第二和第三核酸序列、根据本发明的载体或根据本发明的第一、第二和第三载体在治疗和/或预防疾病中的用途。特别地,本发明提供了本发明的工程化细胞溶解性免疫细胞在治疗和/或预防疾病中的用途。

[0513] 本发明还涉及根据本发明的工程化细胞溶解性免疫细胞、根据本发明的核酸构建

体、如本文定义的第一、第二和第三核酸序列、根据本发明的载体或根据本发明的第一、第二和第三载体在制备用于治疗 and/或预防疾病的药物中的用途。特别地,本发明涉及使用本发明的工程化细胞溶解性免疫细胞在制备用于治疗 and/或预防疾病的药物中的用途。

[0514] 通过本发明的方法治疗和/或预防的疾病可以是癌症。

[0515] 癌症可以是例如神经母细胞瘤、前列腺癌、膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、子宫内膜癌、肾癌(肾细胞)、白血病、肺癌、黑素瘤、非霍奇金淋巴瘤、胰腺癌和甲状腺癌等癌症。

[0516] 本发明的细胞可能能够杀死靶细胞,例如癌细胞。可以通过TAA的表达来识别靶细胞,例如以上表1中提供的TAA的表达。癌症可以是表1中列出的癌症。

[0517] 制备细胞的方法

[0518] 可以通过许多方式之一引入编码如本文定义的POI、蛋白相互作用结构域和胞内保留结构域的DNA或RNA以产生本发明的工程化细胞溶解性免疫细胞,所述方式包括用病毒载体转导,用DNA或RNA转染。

[0519] 本发明的细胞可以通过以下方法制备:

[0520] (ii) 将根据本发明的核酸构建体或载体,或如上文所定义的第一、第二和第三核酸序列,或如上文所定义的第一、第二和第三载体引入到细胞中(例如通过转导或转染)。

[0521] 合适地,细胞可以来自分离自受试者的样品。

[0522] 控制分泌的方法

[0523] 本发明还提供了控制细胞中POI的分泌的方法。

[0524] 该方法可以包括以下步骤:

[0525] 向细胞中引入根据本发明的核酸构建体,如上文所定义的第一、第二和第三核酸序列,根据本发明的载体或如上文所定义的第一、第二和第三载体,并向细胞施用如本文定义的试剂。

[0526] 控制细胞中POI的分泌的方法可包括将如本文定义的试剂施用于根据本发明的工程化细胞溶解性免疫细胞或可通过本发明的方法可获得的细胞。

[0527] 本发明进一步涉及如本文定义的试剂在增加根据本发明的工程化细胞溶解性免疫细胞中POI的分泌的用途。

[0528] 发明的其他方面

[0529] 以下编号的段落涉及本发明的其他方面。

[0530] 1. 选自下组的肽: ACPGWARAFC (SEQ ID NO:34); ACPHWAQAFC (SEQ ID NO:35); ACPQWAMMFC (SEQ ID NO:36) 和ACPPWAYSFC (SEQ ID NO:37)。

[0531] 2. 可置换的结合系统,其包含:

[0532] a) 结合米诺环素并具有以下互补决定区的结构域抗体(dAb): 具有氨基酸序列GRTFSSYN (SEQ ID NO:38) 的CDR1, 具有氨基酸序列ISWSGART (SEQ ID NO:39) 的CDR2; 具有氨基酸序列AAGRGWGTEAILDY (SEQ ID NO:40) 的CDR3; 和

[0533] b) 根据段落1的肽,其结合dAb并且通过米诺环素与dAb的结合而被置换。

[0534] 3. 嵌合抗原受体(CAR) 系统,其包含:

[0535] (i) 受体组分,其包含抗原结合结构域、跨膜结构域和结合米诺环素并具有以下互补决定区的结构域抗体(dAb): 具有氨基酸序列GRTFSSYN (SEQ ID NO:38) 的CDR1, 具有氨基酸序列ISWSGART (SEQ ID NO:39) 的CDR2; 具有氨基酸序列AAGRGWGTEAILDY (SEQ ID NO:40)

的CDR3;和

[0536] (ii) 细胞内信号传导组分,其包含信号传导结构域和选自下组的肽:ACPGWARAFC (SEQ ID NO:34);ACPHWAQAFC (SEQ ID NO:35);结合受体组分的dAb的ACPQWAMMFC (SEQ ID NO:36)和ACPPWAYSFC (SEQ ID NO:37),其结合受体组分的dAb;

[0537] 其中,dAb和环肽的结合被靶标化合物的存在而破坏,使得在不存在靶标化合物的情况下,受体组分和信号传导组分异二聚化并且抗原结合结构域与抗原的结合导致通过信号传导结构域的信号传导;而在靶标化合物的存在下,受体组分和信号传导组分不会异二聚化,并且抗原结合结构域与抗原的结合不会导致通过信号传导结构域的信号传导。

[0538] 4. 嵌合抗原受体 (CAR) 系统,其包括:

[0539] (i) 细胞内信号传导组分,其包含信号传导结构域和结合米诺环素并具有以下互补决定区的结构域抗体 (dAb):具有氨基酸序列GRTFSSYN (SEQ ID NO:38)的CDR1,具有氨基酸序列ISWSGART (SEQ ID NO:39)的CDR2;具有氨基酸序列AAGRGGWGTEAILDY (SEQ ID NO:40)的CDR3;

[0540] (ii) 受体组分,其包含抗原结合结构域、跨膜结构域和选自下组的肽:ACPGWARAFC (SEQ ID NO:34);ACPHWAQAFC (SEQ ID NO:35);结合细胞内信号传导组分的dAb的ACPQWAMMFC (SEQ ID NO:36)和ACPPWAYSFC (SEQ ID NO:37),其结合细胞内信号传导组分的dAb;和

[0541] 其中,dAb和环肽的结合被靶标化合物的存在而破坏,使得在不存在靶标化合物的情况下,受体组分和信号传导组分异二聚化并且抗原结合结构域与抗原的结合导致通过信号传导结构域的信号传导;而在靶标化合物的存在下,受体组分和信号传导组分不会异二聚化,并且抗原结合结构域与抗原的结合不会导致通过信号传导结构域的信号传导。

[0542] 5. 细胞,其包含根据段落3或4的CAR系统。

[0543] 6. 编码根据段落3或4的CAR系统的核酸构建体,其包含编码所述受体组分的第一核苷酸序列和编码细胞内信号传导组分的第二核苷酸序列。

[0544] 7. 载体,其包含根据段落6的核酸构建体。

[0545] 8. 用于制备根据段落5的细胞的方法,其包括用根据段落6的核酸构建体体外转导或转染所述细胞。

[0546] 9. 药物组合物,其包含多种根据段落5的细胞。

[0547] 10. 治疗癌症的方法,其包括将根据段落9的药物组合物施用于受试者的步骤。

[0548] 11. 根据段落5的细胞,其在制备用于治疗癌症的药物组合物。

[0549] 12. 根据段落9的药物组合物,其用于治疗癌症。

[0550] 13. 根据段落5的在细胞中抑制CAR信号传导的方法,其包括向所述细胞施用米诺环素或其衍生物的步骤。

[0551] 14. 用于在包含根据段落5的细胞的受试者中抑制CAR信号传导的方法,其包括向所述受试者施用米诺环素或其衍生物的步骤。

[0552] 本公开不受本文公开的示例性方法和材料的限制,并且与本文描述的那些方法或材料相似或等同的任何方法和材料都可以用于本公开的实施方式的实践或测试中。数字范围包括定义范围的数字。除非另有说明,否则任何核苷酸序列均以5'至3'的方向从左至右书写;氨基酸序列分别以氨基至羧基的方向从左至右书写。

[0553] 在提供值的范围的情况下,应理解的是,除非上下文另外明确指出,否则每个中间值至下限的单位的十分之一,也具体公开了该范围的上限和下限之间。在本公开中涵盖在规定范围内的任何规定值或中间值与该规定范围内的任何其他规定值或中间值之间的每个较小范围。这些较小范围的上限和下限可以独立地包括在该范围中或排除在该范围内,并且其中一个范围中的一个或两个都不包含或包含在较小范围中的每个范围也包括在本公开内容之内,但以本发明中任何明确排除的限制为准。在规定范围包括一个或两个限制的情况下,排除那些包括的限制中的一个或两个的范围也包括在本公开中。

[0554] 必须注意的是,如本文和所附权利要求书中所使用的,单数形式“一个”,“一种”和“该”包括复数指示物,除非上下文另外明确指出。

[0555] 本文所用的术语“包含”,“包含”和“包含”与“包括”,“包括”或“含有”,“含有”同义,并且是包括性的或开放式的,并且不排除其他的、非列举的成员、元素或方法步骤。术语“包含”,“包含”和“包括”也包括术语“由……组成”。

[0556] 提供本文讨论的出版物仅是为了在本申请的提交日期之前进行公开。本文中的任何内容均不应解释为承认此类出版物构成了所附权利要求的现有技术。

[0557] 现在将通过实施例的方式进一步描述本发明,所述实施例旨在帮助本领域的普通技术人员实施本发明,而无意于以任何方式限制本发明的范围。

实施例

[0558] 实施例1-与米诺环素dAb结合的肽的产生

[0559] 将米诺环素dAb-Fc固定在珠子上。米诺环素dAb由SEQ ID NO:8编码。在具有和不具有1 μ M米诺环素的情况下进行噬菌体-肽菌落筛选。

[0560] 肽文库淘选鉴定对由SEQ ID NO:8编码的米诺环素dAb具有可置换特异性的肽。将包含SEQ ID NO:13的抗体用作对照抗体(对照抗体包含与SEQ ID NO:8不同的CDR)。

[0561] 鉴定了对米诺环素dAb具有可置换特异性的四种肽。所述肽为:ACPGWARAFC (SEQ ID NO:34);ACPHWAQ AFC (SEQ ID NO:35);ACPQWAMMFC (SEQ ID NO:36)和ACPPWAYSFC (SEQ ID NO:37)。

[0562] 使用这些肽中的每一种进行结合实验的结果如图4所示。

[0563] 实施例2-由KDEL标记的dAb和米诺环素-解离肽控制的IL12的分泌

[0564] 产生了对米诺环素具有亲和力的dAb和可以结合至dAb但在米诺环素存在下将解离的几种肽 (SEQ ID NO:34-SEQ ID NO:37) 组成的平台。

[0565] KDEL氨基酸序列用于将蛋白质保留在ER/高尔基体中。用KDEL序列标记米诺环素特异性dAb,从而将其锚定在ER/高尔基体中,然后用与dAb具有亲和力的肽标记感兴趣的分子(IL12),从而使其保留。加入米诺环素后,dAb-肽复合物解离,从而能够分泌肽标记的分子。

[0566] 设计了一组构建体,以使用与米诺环素肽模拟物融合的IL12检验该假设。IL12本身就是感兴趣的分子,因为它对T细胞的增殖作用,并且是分泌蛋白的便捷模型,其可以通过ELISA分析从细胞上清液中进行分析。

[0567] 方法

[0568] 将HEK293T细胞以 3×10^6 的密度接种在96孔板中,以获得50-60%的汇合度

(confluency),用于第二天转染。通过将30 μ L GeneJuice转染试剂添加到470 μ L普通IMDM中,孵育5分钟,来制备转染预混液(master mix)。对于每个孔,然后将0.13 μ g质粒DNA添加到5.2 μ L IMDM-Genejuice预混液中,并孵育15分钟。然后将含有GeneJuice-DNA复合物的转染混合物添加到细胞中。所有孵育均在室温下进行。

[0569] 测试了以下构建体:

[0570] • 对照(NT):无构建体(即IL12的背景水平)。

[0571] • 标记为“WARA-IL12+aMinoKDEL”的构建体:编码具有KDEL序列的米诺环素肽模拟物(SEQ ID NO:34)和Flexi-IL12(SEQ ID NO:19)和米诺环素dAB(SEQ ID NO:8)。

[0572] • 标记为“WAYS-IL12+aMinoKDEL”的构建体:编码具有KDEL序列的米诺环素肽模拟物(SEQ ID NO:37)和Flexi-IL12(SEQ ID NO:19)和米诺环素dAB(SEQ ID NO:8)。

[0573] • 标记为“WARA-IL12+aMino”的构建体:编码没有KDEL序列的米诺环素肽模拟物(SEQ ID NO:34)和Flexi-IL12(SEQ ID NO:19)和米诺环素dAB(SEQ ID NO:8)。

[0574] • 标记为“WAYS-IL12+aMino”的构建体:编码没有KDEL序列的米诺环素肽模拟物(SEQ ID NO:37)和Flexi-IL12和米诺环素dAB(SEQ ID NO:8)。

[0575] 转染后48小时,通过使用FITC抗HA抗体(Biolegend,901507)染色细胞,测试了含有转染细胞的牺牲孔(sacrificial well)的转染效率。确认转染后,从细胞中去除培养基,并添加新鲜的,补充了不同浓度米诺环素的培养基。在添加米诺环素后的2和4小时,按照制造商的说明(BioLegend,431704)进行IL12ELISA。

[0576] 结果

[0577] 使用作为ELISA试剂盒一部分提供的IL12标准曲线将所有结果标准化。

[0578] 结果(如图5所示)表明,由于其高表达,IL12的分泌不受肽标签的存在的影响。未转导的细胞在任何条件或时间点均不产生IL12,从而消除了计算和减去IL12背景的需要,并显示了测定中的噪音最小。

[0579] 在存在KDEL锚定的米诺环素dAb的情况下,与两种肽WARA SEQ ID NO:34(高亲和力)和WAYS SEQ ID NO:37(低亲和力)融合的IL12表现出在所有时间点,IL12分泌从0 μ M到100 μ M的浓度依赖性增加。

[0580] 实施例3-通过保留来控制分泌的体外测定

[0581] 转导T细胞以表达CD19 CAR、CD19CAR-2A-flexiIL-12(其提供IL-12的组成型表达)和CD19CAR-2A-TiP-FlexiIL12-2A-S-TetR-sekdel(其提供IL-12的可调节性表达)。在不同浓度的米诺环素中培养T细胞。48小时后收获上清液,并使用酶联免疫吸附测定(ELISA)对IL-12进行定量。

[0582] 使用具有CD19靶标的标准共培养方法对不同CAR T细胞的功能特性进行定量,并在不同浓度的米诺环素存在下,通过流式细胞术和细胞因子释放来确定其功能。

[0583] 实施例4-通过保留来控制分泌的体内测定

[0584] 通过尾静脉注射将Raji细胞植入NOD重症联合免疫缺陷 γ (NSG)小鼠。通过尾静脉注射将实施例1中转导的T细胞施用于小鼠。除了接受不同的CAR T细胞外,还通过腹膜内注射将小鼠进一步分组,接受不同浓度的米诺环素。通过尾静脉注射使小鼠放血,并使用ELISA定量血清IL-12。

[0585] 以上说明书中提及的所有出版物均通过引用并入本文。在不脱离本发明的范围和

精神的情况下,本发明的所描述的方法和系统的各种修改和变化对于本领域技术人员将是显而易见的。尽管已经结合具体的优选实施方案描述了本发明,但是应当理解,要求保护的发明不应不适当地限制于此类具体的实施方案。实际上,对于分子生物学或相关领域的技术人员来说显而易见的是描述的用于实施本发明的方式的各种修改旨在落入所附权利要求的范围内。

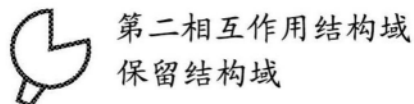
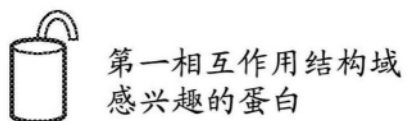


图1

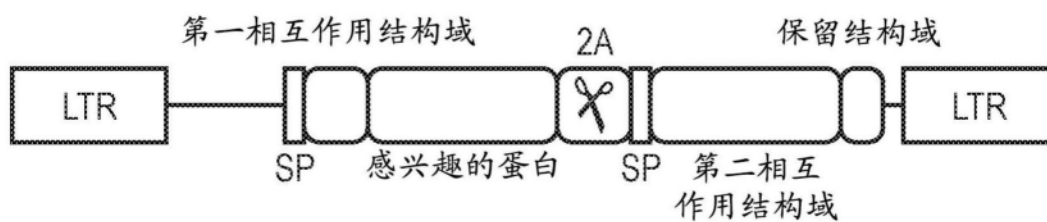


图2

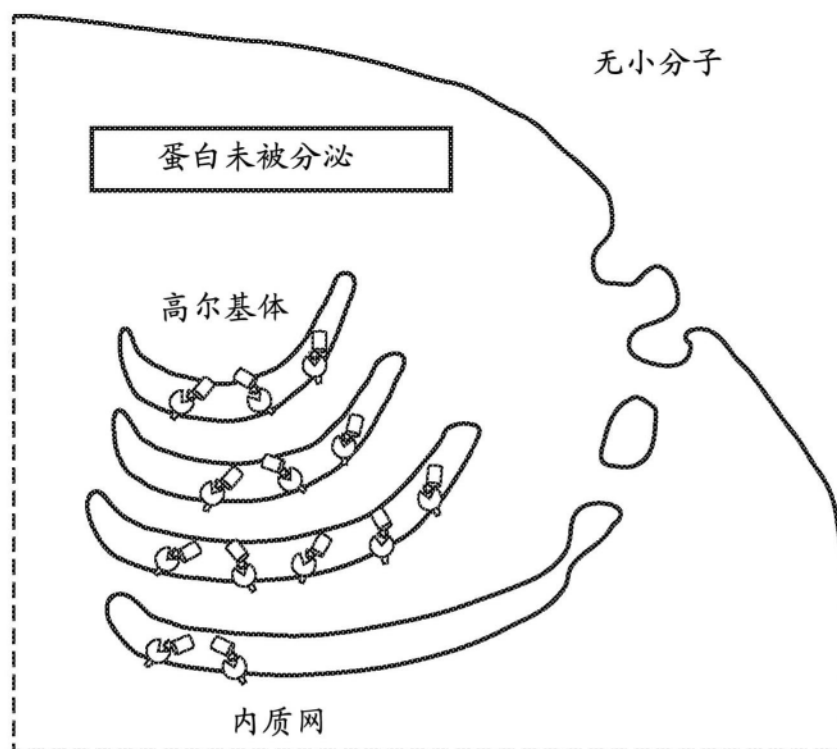


图3A

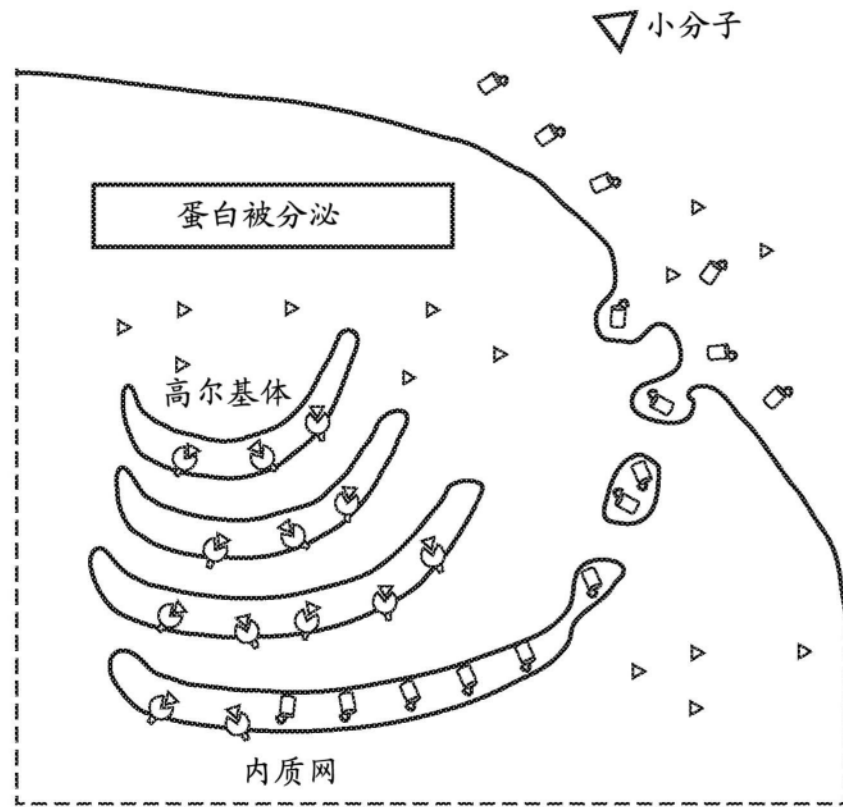


图3B

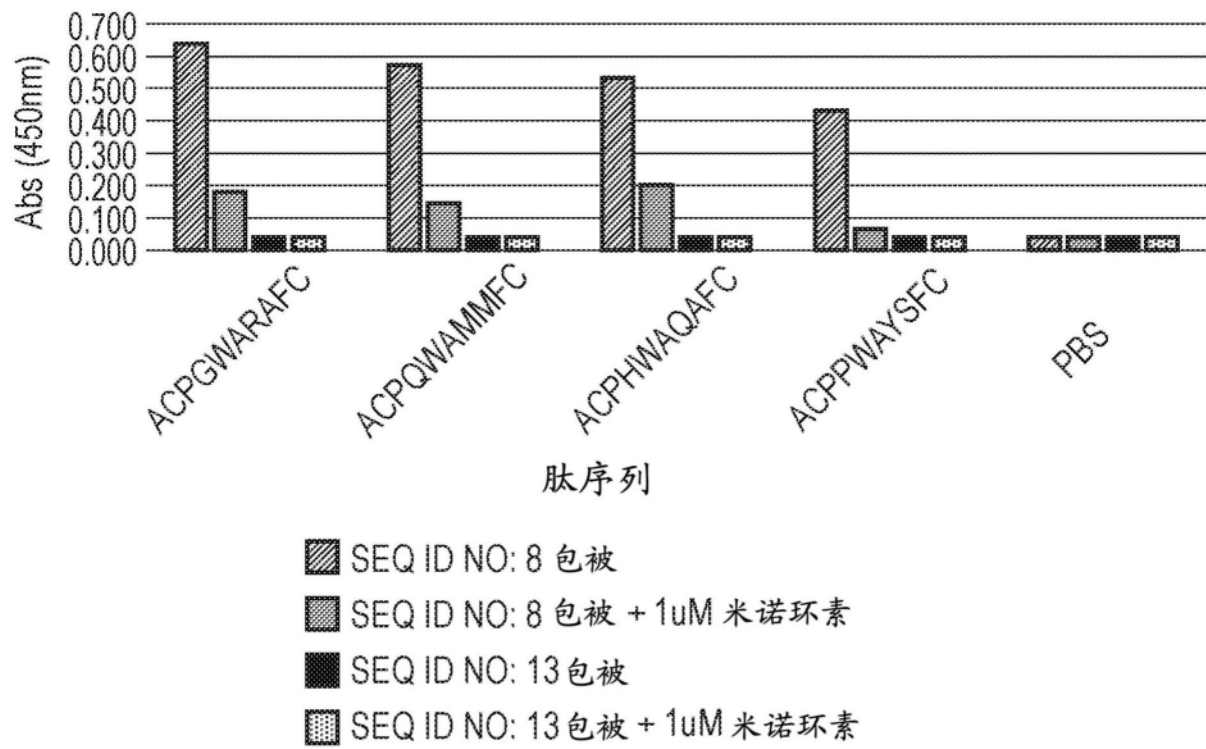


图4

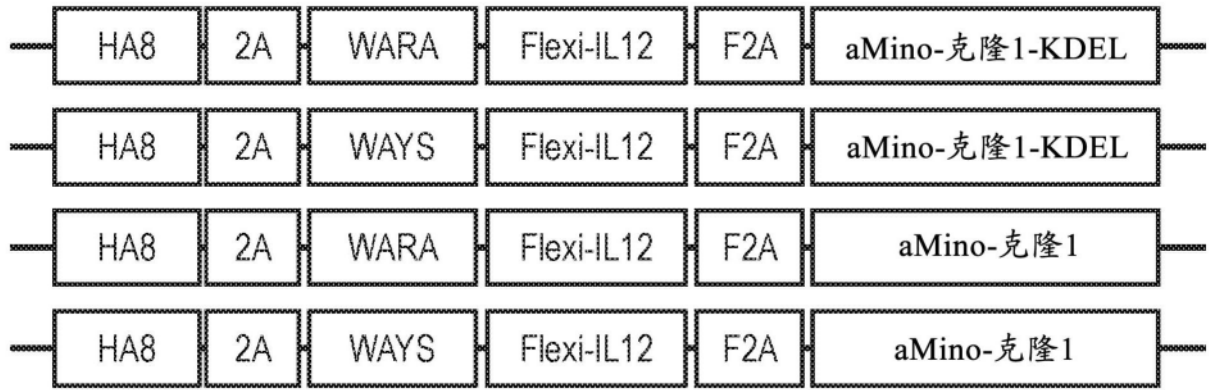


图5A

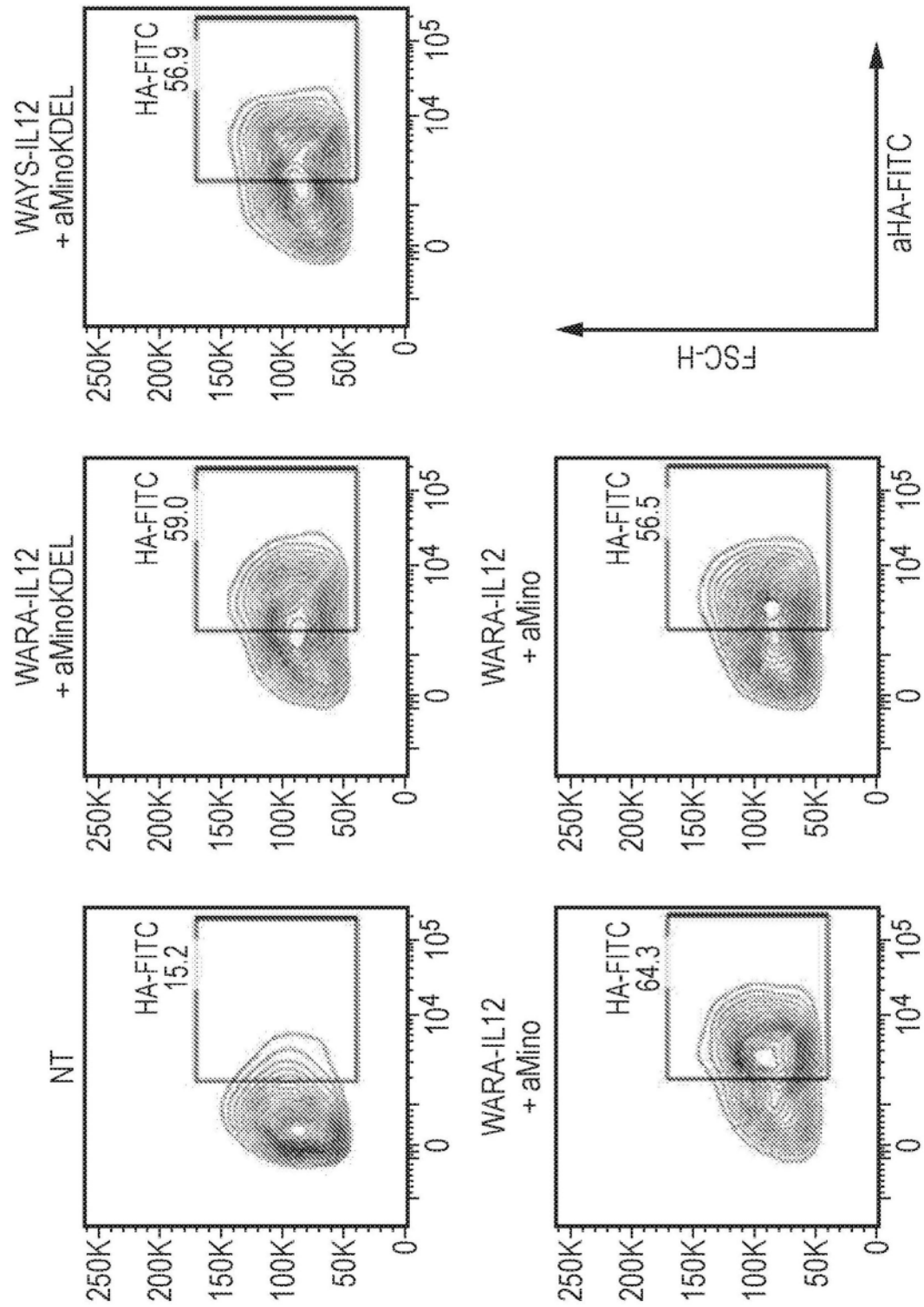


图5B

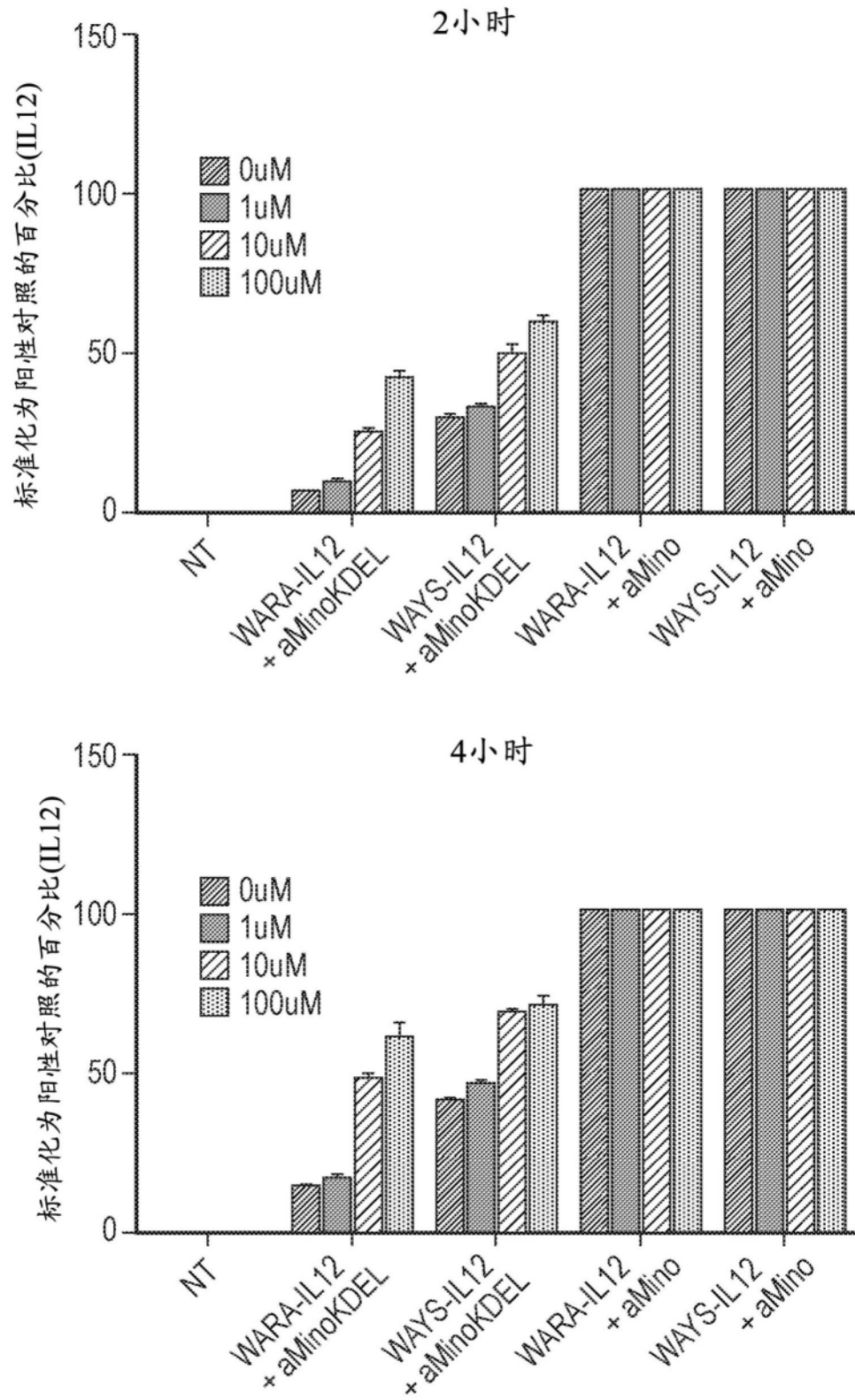


图5C

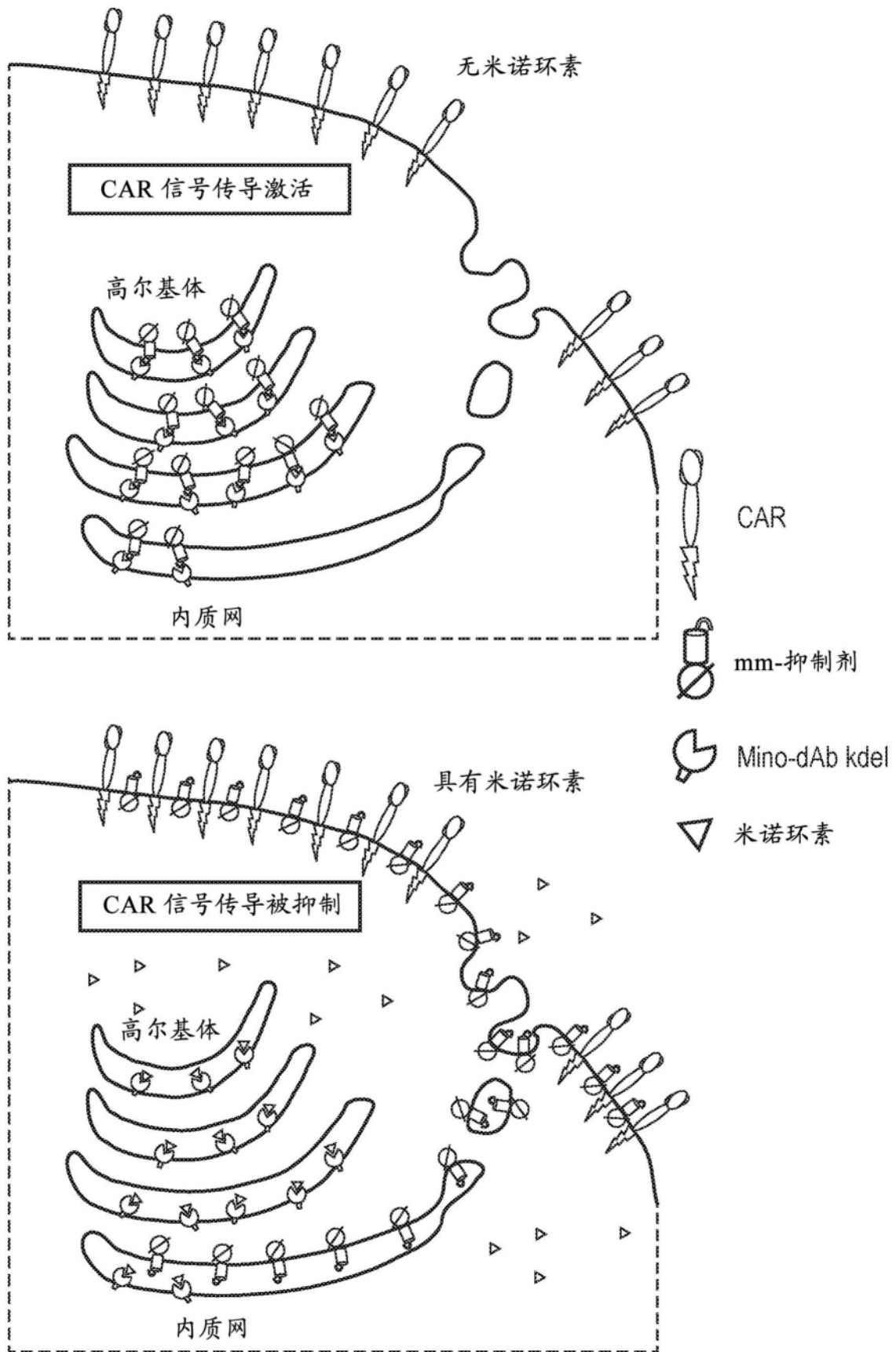


图6

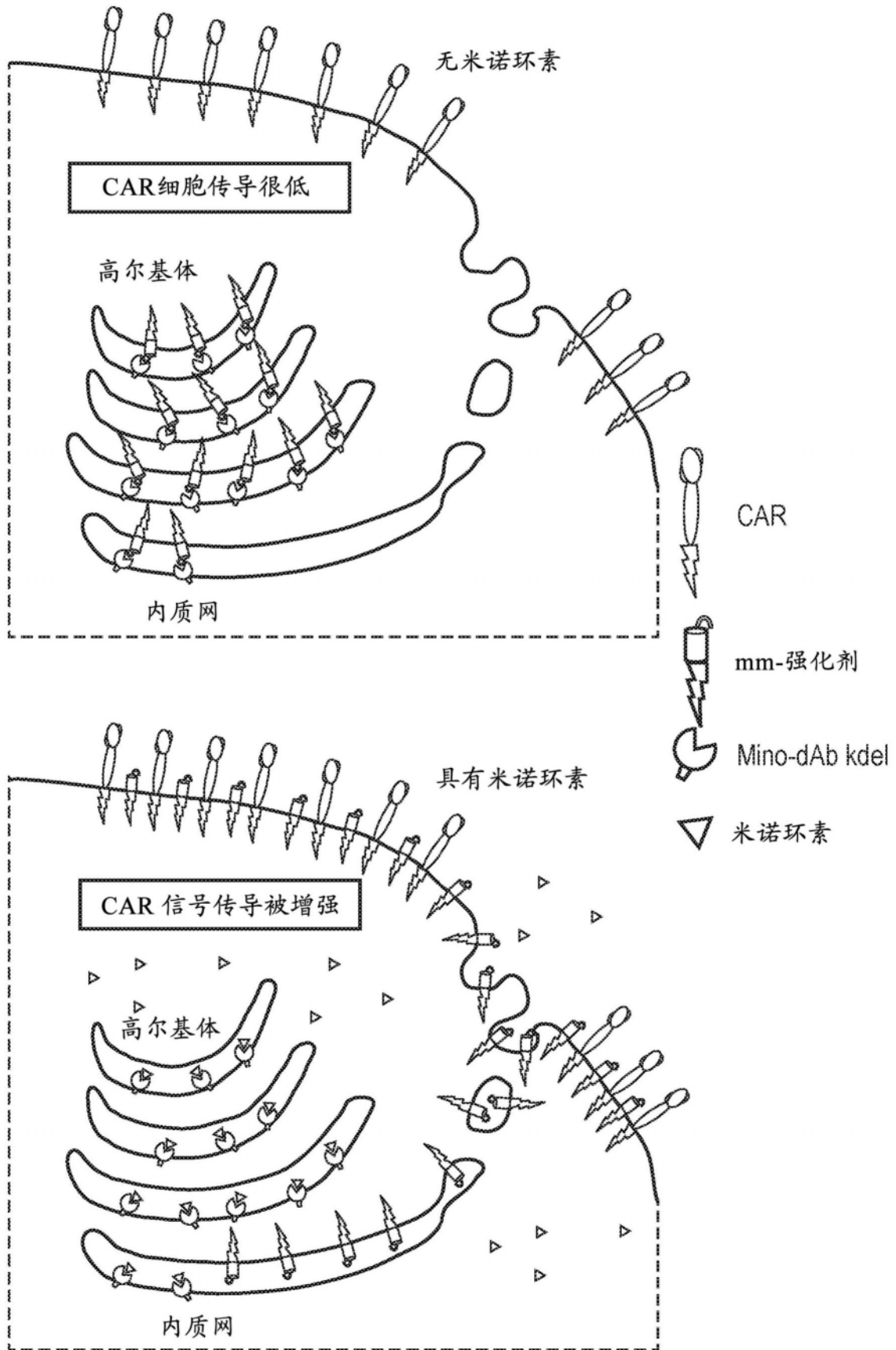


图7