



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119409836 A

(43) 申请公布日 2025.02.11

(21) 申请号 202411496477.3

(51) Int.Cl.

(22) 申请日 2018.03.16

C07K 19/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

C12N 15/62 (2006.01)

62/473,282 2017.03.17 US

C12N 5/10 (2006.01)

62/629,663 2018.02.12 US

A61K 40/11 (2025.01)

(62) 分案原申请数据

A61K 40/22 (2025.01)

201880030106.2 2018.03.16

A61K 40/30 (2025.01)

(71) 申请人 弗雷德哈钦森癌症中心

A61K 40/42 (2025.01)

地址 美国华盛顿州

A61K 39/00 (2006.01)

(72) 发明人 S·K·奥达 P·D·格林伯格

A61P 35/00 (2006.01)

T·M·施米特

A61P 35/02 (2006.01)

(74) 专利代理机构 深圳市百瑞专利商标事务所

权利要求书2页 说明书62页

(普通合伙) 44240

序列表(电子公布) 附图99页

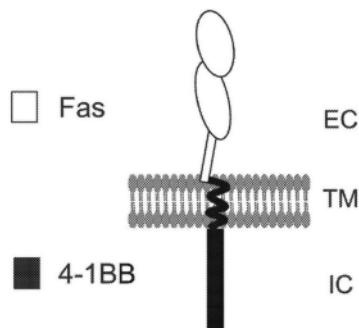
专利代理人 金辉

(54) 发明名称

免疫调节融合蛋白及其用途

(57) 摘要

本公开涉及包含细胞外结合结构域和细胞内信号传导结构域的免疫调节融合蛋白，其中靶的结合可以在宿主细胞例如T细胞中产生调节信号。本公开还涉及表达此类免疫调节融合蛋白的免疫细胞在治疗某些疾病中的用途，例如癌症或传染病。



1.融合蛋白,包含(a)包括特异性结合靶的结合结构域的细胞外组分,(b)包括细胞内信号传导结构域的细胞内组分,以及(c)连接细胞外和细胞内组分的疏水组分,

其中通过融合蛋白与靶(融合蛋白::靶复合物)的特异性结合形成的复合物的细胞外部分具有以下的大小或跨越以下的距离:(i)多达免疫突触的两个细胞膜之间的距离,(ii)多达与复合物的细胞外部分跨越的距离大约或基本相同距离,所述复合物在T细胞受体(TCR)和通过TCR特异性结合的MHC-肽复合物之间,(iii)多达与复合物的细胞外部分跨越的距离大约或基本相同距离,所述复合物在包含结合结构域的天然分子与其同源结合配偶体之间,(iv)小于或多达大约40nm、25nm、20nm、15nm或14nm;或(iv)其任何组合;

其中细胞外组分是或包含CD95(Fas)胞外域或其功能片段,并且细胞内组分是或包含CD137(4-1BB)细胞内信号传导结构域或其功能部分。

2.融合蛋白,包含(a)包括特异性结合靶的结合结构域的细胞外组分,(b)包括细胞内信号传导结构域的细胞内组分,以及(c)连接细胞外和细胞内组分的疏水组分,

其中结合结构域是抑制性分子结合结构域或者与抑制性分子结合结构域具有至少95%的同一性,并且细胞内信号传导结构域是共刺激或刺激分子结合结构域或者包含与共刺激或刺激分子结合结构域至少95%的同一性,并且

其中抑制性分子是或包含CD95(Fas)胞外域或其功能片段,并且共刺激或刺激分子是或包含来自CD137(4-1BB)的细胞内信号传导结构域或其功能部分。

3.根据权利要求1或2所述的融合蛋白,其中疏水组分包含CD2、CD3 ϵ 、CD3 δ 、CD3 ζ 、CD25、CD27、CD28、CD40、CD79A、CD79B、CD80、CD86、CD95(Fas)、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD150(SLAMF1)、CD152(CTLA4)、CD200R、CD223(LAG3)、CD270(HVEM)、CD272(BTLA)、CD273(PD-L2)、CD274(PD-L1)、CD278(ICOS)、CD279(PD-1)、CD300、CD357(GITR)、A2aR、DAP10、FcR α 、FcR β 、FcR γ 、Fyn、GAL9、KIR、Lck、LAT、LRP、NKG2D、NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3、NOTCH4、PTCH2、ROR2、Ryk、S1p76、SIRP α 、pT α 、TCR α 、TCR β 、TIM3、TRIM、LPA5或Zap70的跨膜结构域。

4.根据权利要求3所述的融合蛋白,其中疏水组分包含CD95(Fas)的跨膜结构域或CD137(4-1BB)的跨膜结构域。

5.根据权利要求1或2所述的融合蛋白,其中靶是或包含CD95L(FasL)。

6.根据权利要求1或2所述的融合蛋白,其中,(a)细胞外组分包含CD95(Fas)胞外域或其功能片段,(b)疏水组分包含CD137(4-1BB)的跨膜结构域,以及(c)细胞内组分包含CD137(4-1BB)的细胞内信号传导结构域或其功能片段。

7.根据权利要求1或2所述的融合蛋白,其中CD95(Fas)胞外域包含CD95(Fas)的整个细胞外结构域。

8.根据权利要求1或2所述的融合蛋白,其中CD95(Fas)是人CD95(Fas)。

9.根据权利要求1或2所述的融合蛋白,其中(a)细胞外组分包含由SEQ ID NO:71所示的核酸分子编码的氨基酸序列,(b)疏水组分包含由SEQ ID NO:197所示的核酸分子编码的氨基酸序列,和(c)细胞内组分包含由SEQ ID NO:13所示的核酸分子编码的氨基酸序列。

10.根据权利要求1或2所述的融合蛋白,其中(a)细胞外组分包含SEQ ID NO:72所示的氨基酸序列,(b)疏水组分包含SEQ ID NO:198所示的氨基酸序列,和(c)细胞内组分包含SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列。

11.融合蛋白,包括:

(1) (a) 细胞外组分,其包含由SEQ ID NO:71所示的核酸分子编码的氨基酸序列,(b) 疏水组分,其包含由SEQ ID NO:197所示的核酸分子编码的氨基酸序列,和(c) 细胞内组分,其包含由SEQ ID NO:13所示的核酸分子编码的氨基酸序列;或

(2) (a) 细胞外组分,其包含具有SEQ ID NO:72所示的氨基酸序列的结合结构域;(b) 疏水组分,其包含SEQ ID NO:198所示的氨基酸序列;和(c) 细胞内组分,其包含SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列。

12. 编码根据权利要求1-11中任意一项所述的融合蛋白的核酸分子。

13. 载体,包含根据权利要求12所述的核酸分子。

14. 宿主细胞,包含编码根据权利要求1-11中任意一项所述的融合蛋白。

15. 宿主细胞,包含根据权利要求12所述的核酸分子。

16. 根据权利要求1-11中任意一项所述的融合蛋白在治疗受试者的疾病的用途。

17. 根据权利要求14所述的宿主细胞在治疗受试者的疾病的用途。

18. 根据权利要求15所述的宿主细胞在治疗受试者的疾病的用途。

19. 表达融合蛋白的CD8⁺或CD4⁺人T细胞,所述融合蛋白包含以下组分:

(a) 细胞外结合结构域组分,其具有SEQ ID NO:72所示的氨基酸序列;

(b) 疏水组分,其具有SEQ ID NO:198所示的氨基酸序列;和

(c) 细胞内组分,其具有SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列,

其中所述融合蛋白结合FasL并提供4-1BB细胞内信号。

20. 根据权利要求19所述的CD8⁺或CD4⁺人T细胞在制备用于治疗其中癌症细胞表达FasL的实体瘤的癌症的药物中的用途,所述癌症选自卵巢癌或胰腺癌或急性骨髓性白血病。

免疫调节融合蛋白及其用途

[0001] 本申请是申请号为201880030106.2,申请日为2018年3月16日,发明名称为“免疫调节融合蛋白及其用途”的分案申请。

[0002] 关于序列表的陈述

[0003] 与本申请相关的序列表以文本格式提供以替代纸质副本,并通过引用结合于本文说明书中。包含序列表的文本文件的名称是360056_447W0_SEQUENCE_LISTING.txt。该文本文件为322KB,创建于2018年3月5日,并通过EFS-Web以电子方式提交。

背景技术

[0004] 当在肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)群体中发现肿瘤反应性T细胞时,开始开发基于T细胞的免疫疗法(Clark et al., Cancer Res. 29:705, 1969)。一种被称为过继性T细胞转移的策略,在某些情况下涉及预先选择用于肿瘤反应性的肿瘤浸润性淋巴细胞的分离,在IL-2存在下由抗CD3和抗CD28抗体诱导的肿瘤反应性T细胞的克隆扩增,最后将扩增的细胞群回输给带有肿瘤的患者(与化学疗法和IL-2的重复给药一起)(Dudley et al., Science 298:850, 2002)。这种形式的使用肿瘤浸润性淋巴细胞的过继性T细胞疗法在技术上可能是麻烦的,并且仅在一小部分患有黑素瘤的患者中导致完全缓解,并且在其他癌症中很少有效(Besser et al., Clin. Cancer Res. 16:2646, 2010)。

[0005] 肿瘤反应性T细胞克隆的分离导致另一种免疫治疗方法的发展-特定抗原特异性的重组T细胞受体(TCR)的产生,其可以例如使用载体递送系统引入T细胞中以赋予对于所需靶的特异性,例如由肿瘤细胞上表达的主要组织相容性复合物(MHC)分子呈现的肿瘤相关肽(在人类中称为人白细胞抗原(HLA)分子)。另一种方法引入合成受体,称为嵌合抗原受体(CAR),其通常含有抗原结合结构域,其例如在抗肿瘤治疗的情况下可结合肿瘤特异性或相关抗原,连接于一个或多个包含效应子结构域的细胞内组分,例如主要信号传导结构域,例如TCR信号传导结构域,或在一些上下文中是共刺激信号传导结构域。与TIL的施用不同,工程化TCR或CAR T细胞免疫疗法的基本程序通常是用编码肿瘤靶向部分的转基因来遗传修饰人T细胞,离体扩增重组T细胞和将扩增的重组T细胞回输患者。

[0006] 使用表达重组TCR的T细胞的过继性T细胞疗法已显示具有有希望的临床益处,尤其是在某些B细胞癌中。然而,有效的T细胞活化通常需要或通过并发的共刺激信号增强(Chen and Flies, Nat. Rev. Immunol. 13:227-242, 2013)。在肿瘤微环境中,共刺激分子通常被下调。结果,对于表达对癌抗原特异的重组TCR的T细胞,通常需要通过IL-2的外源刺激。

[0007] 当TCR在抗原呈递细胞(APC)上接合MHC中呈递的特定肽时,启动T细胞的活化(Rossy et al., Frontiers in Immunol. 3:1-12, 2012)。T细胞和APC的相互作用点成为免疫突触,其包括三个同心超分子激活簇(SMAC),包含中心cSMAC、外周pSMAC和远端dSMAC(Rossy et al., Frontiers in Immunol. 3:1-12, 2012)。在cSMAC内,共刺激受体可以募集信号传导分子以扩增TCR信号。此类共刺激受体可包括CD28,并且在一些情况下形成具有TCR的微团簇以降低活化阈值(Chen and Flies, Nat. Rev. Immunol. 13:227-242, 2013)。通

过T细胞表达的跨膜蛋白进入cSMAC可能受细胞外结构域大小的限制。例如,CD45具有大的胞外域并且通常被排除在免疫突触之外,从而阻止其抑制TCR信号传导的能力(James and Vale,Nature487:64-69,2012)。

[0008] 在免疫疗法领域仍然需要向宿主细胞提供免疫调节信号以治疗各种疾病(例如癌症或感染)的替代组合物和方法。目前公开的实施例解决了这些需求并提供了其他相关优点。

发明内容

[0009] 在某些方面,本公开涉及融合蛋白,其包含含有特异性结合靶的结合结构域的细胞外组分、包括细胞内信号传导结构域组成的细胞内组分、和连接细胞外和细胞内组分的疏水组分,条件是融合蛋白::靶复合物的长度跨越类似于免疫突触中的膜之间距离的距离。

[0010] 在一些实施例中,在融合蛋白和靶之间形成的复合物或这种融合蛋白::靶复合物的一部分(通常是这种复合物的细胞外部分)的长度或空间距离是或跨越特定距离,例如,在一些实施例中,是小于或等于约一定距离的一距离。在一些方面,融合蛋白::靶复合物(或通常其细胞外部分)的距离小于或约为50nm、小于或约为40nm、小于或约为30nm、或者小于或约为20nm或等于或小于或约为15nm。在一些实施例中,其为或大约10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20nm,例如为或大约14或15nm。在一些方面,该距离是与免疫突触中的膜之间的距离相似的距离,或者是与相对于TCR-肽/MHC复合物的最近膜部分(例如TCR的细胞外结构域的残基)和最近膜部分(MHC的残基,例如HLA的残基,诸如MHC I或MHC II的残基)之间的距离相同、大约相同或基本相同的距离,或这种复合物的细胞外部分所跨越的距离(或已知包含在突触内的细胞外部分跨越的空间距离,例如含有CD8、CD4、CD28及其各自的结合配偶体或配体的复合物)。在一些实施例中,复合物的空间距离是指两个不同细胞的膜之间的距离,其中第一细胞和第二细胞各自在其表面上表达结合配偶体,当细胞彼此接近时,所述结合配偶体可在膜之间形成复合物。在一些方面,距离是与TCR和与MHC分子的同源相互作用之间形成的复合物的细胞外部分跨越的距离相同、大致相同或基本相同的距离。在一些方面,例如当融合蛋白包含来自通常能够进入免疫突触或与抗原受体共定位的分子的结合结构域时,该距离与由在分子(具有融合蛋白中使用的结合结构域)及其天然结合配偶体之间形成的复合物所跨越的距离相似或相同。在一些方面,例如当融合蛋白包含来自通常不能够进入免疫突触或通常不能够与抗原受体共定位的分子的结合结构域时,该距离不同于,例如,小于或基本上小于由在分子(具有融合蛋白中使用的结合结构域或其功能部分)及其天然结合配偶体之间形成的复合物所跨越的距离。

[0011] 在一些实施例中,本公开的融合蛋白的细胞外组分内的结合结构域包含能够递送抑制信号的分子(例如抑制性分子、诸如免疫抑制性分子、例如免疫抑制受体或免疫检查点分子)的靶结合部分。在一些方面,这种分子是糖蛋白、检查点家族成员。在某些实施例中,包含来自糖蛋白、检查点家族成员的融合蛋白或不是B7或B7结合分子或不是CD28-B7-超家族成员(例如,不是CD28、CTLA4、ICOS、或其他B7家族结合分子)示例性糖蛋白,检查点家族成员包括CD200R、SIRPa、CD279(PD-1)、CD2、CD95(Fas)、CTLA4(CD152)、CD223(LAG3)、CD272(BTLA)、A2aR、KIR、TIM3、CD300或LPA5,或任何此类分子的结合变体。在一些实施例中,本公

开的融合蛋白的细胞外组分内的结合结构域包含前述任一项的结合配偶体、或任何此类分子的结合变体。在这样的实施例的一些方面，融合蛋白的细胞内部分包括能够将刺激信号(例如共刺激信号)传递至淋巴细胞(例如T细胞、例如CD28、4-1BB、ICOS或其他共刺激分子的共刺激区)的信号传导结构域。在一些方面，当细胞外结合部分来自检查点或免疫抑制性分子时，融合蛋白的细胞内部分不包括抑制性分子例如检查点或免疫抑制性分子的细胞内信号传导结构域。在一些方面，融合蛋白不包括主要信号传导结构域，例如CD3 ζ 信号传导结构域或能够将主要信号传递至T细胞的其他结构域。

[0012] 在一些方面，细胞外组分或其结合部分含有或为能够特异性结合CD200的分子或胞外域的结合结构域，例如CD200R或其变体的结合部分。在一些实施例中，结合结构域是或包括能够特异性结合CD47的分子或胞外域的结合区，例如SIRP胞外域或其CD47结合区，例如SIRP α 胞外域或其CD47结合区。在一些实施例中，结合结构域能够结合至PD-L1或PD-L2或LAG3分子。示例性靶可以是一种或多种蛋白质，其表达在某些细胞或组织中增加或上调，所述某些细胞或组织与用本文提供的融合蛋白和组合物治疗或改善的疾病或病症相关，例如肿瘤细胞或肿瘤微环境，或与通常在免疫细胞(例如浸润患病组织如肿瘤的淋巴细胞)上上调的受体结合。

[0013] 在一些实施例中，细胞外组分进一步包括一个或多个另外的区或结构域，例如，来自这样的分子：不同于衍生的结合结构域的分子或不同于与结合结构域共有同一性的分子。一个或多个另外的细胞外结构域可以包括间隔区，例如来自免疫球蛋白分子的间隔区，其可以包含全部或部分铰链，或恒定区结构域例如CH2或CH3结构域，或来自另一细胞表面分子如共刺激受体，如CD28。在一些方面，另外的细胞外结构域可以包括多聚化结构域，例如可以促进与另一分子的同二聚化或异二聚化的二聚化结构域或序列，例如两种或更多种融合蛋白的多聚化。在一些实施例中，此类结构域包括CD28分子的细胞外结构域的一部分，其至少包括最近跨膜端半胱氨酸，并且通常是这种半胱氨酸和膜之间的细胞外部分，或其修饰变体。在一些方面，此类结构域包括SEQ ID NO:32中所示的氨基酸序列、或其部分、或例如与其具有至少90%、95%或99%的同一性的变体。在一些方面，可以包括这样的结构域以帮助或促进多聚化。在一些实施例中，融合蛋白含有包括CD200结合结构域的细胞外组分，例如CD200R的细胞外部分(或其部分，例如其结合结构域)、例如具有如SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列的CD200R的细胞外部分、或由SEQ ID NO:2所示的核酸分子编码的CD200R的细胞外部分、或其CD200结合部分或其变体或其结合部分。在此类实施例的一些方面，融合蛋白的细胞外部分还包括CD28细胞外结构域的一部分，例如其最多约9至约12个氨基酸(例如，9个氨基酸或12个氨基酸)，以及在一些方面，包括CD28细胞外区的最近膜半胱氨酸残基。在一些这样的实施例中，细胞外区的CD200R部分的长度在长度上减少，对应于CD28衍生部分中的额外残基的数量，例如减少约9至约12个氨基酸(例如，9个氨基酸或12个氨基酸)，或减少充足的氨基酸数目，使得融合蛋白和CD200分子之间的复合物的细胞外部分所跨越的距离与人CD200R(例如CD200R)与CD200之间的复合物的细胞外部分所跨越的距离、或者在与同源肽-MHC复合物结合中与MHC分子(例如MHC I或MHCII)同源相互作用中的TCR之间的复合物的细胞外部分所跨越的距离、或免疫突触的距离相似、基本相似或相同。在一些方面，融合蛋白还包括跨膜结构域，例如CD28跨膜，例如由SEQ ID NO:4所示序列编码的跨膜结构域或其部分、或其修饰版本例如变体，所述变体经修饰以包含额外的带电区或残

基或亲水残基以促进分子间相互作用。在一些实施例中，蛋白还包括CD28细胞内信号传导结构域，例如CD28的共刺激结构域，例如能够响应于连接而将一个或多个衔接分子募集到CD28的结构域。在一些方面，CD28细胞内结构域包括或是由SEQ ID NO:5的核苷酸序列或其部分或功能变体编码的序列。

[0014] 在一些实施例中，本公开涉及融合蛋白，其包含包括特异性结合靶的结合结构域的细胞外组分、包括细胞内信号传导结构域的细胞内组分、和连接细胞外和细胞内组分的疏水组分，条件是融合蛋白：靶复合物的长度跨越类似于免疫突触中的膜之间距离的距离。其中，(a) 所述细胞外组分包含CD200R的细胞外部分，(b) 所述疏水组分包含CD28的跨膜结构域，以及 (c) 所述细胞内组分包含CD28的细胞内信号传导结构域。

[0015] 在一些实施例中，本公开涉及融合蛋白，其包含包括特异性结合靶的结合结构域的细胞外组分、包括细胞内信号传导结构域的细胞内组分、和连接细胞外和细胞内组分的疏水组分，条件是融合蛋白：靶复合物的长度跨越类似于免疫突触中的膜之间距离的距离。其中，(a) 所述细胞外组分包含CD200R的细胞外部分，(b) 所述疏水组分包含CD28的跨膜结构域，以及 (c) 所述细胞内组分包含CD28的细胞内信号传导结构域和CD137 (4-1BB) 的细胞内信号传导结构域。

[0016] 在一些实施例中，本公开涉及融合蛋白，其包含包括特异性结合靶的结合结构域的细胞外组分、包括细胞内信号传导结构域的细胞内组分、和连接细胞外和细胞内组分的疏水组分，条件是融合蛋白：靶复合物的长度跨越类似于免疫突触中的膜之间距离的距离。其中，(a) 所述细胞外组分包含CD200R的细胞外部分，(b) 所述疏水组分包含CD28的跨膜结构域，以及 (c) 所述细胞内组分包含CD137 (4-1BB) 的细胞内信号传导结构域。

[0017] 在一些实施例中，本公开涉及融合蛋白，其包含包括特异性结合靶的结合结构域的细胞外组分、包括细胞内信号传导结构域的细胞内组分、和连接细胞外和细胞内组分的疏水组分，条件是融合蛋白：靶复合物的长度跨越类似于免疫突触中的膜之间距离的距离。其中，(a) 所述细胞外组分包含SIRPa的细胞外部分，(b) 所述疏水组分包含CD28的跨膜结构域，以及 (c) 所述细胞内组分包含CD28的细胞内信号传导结构域。

[0018] 在一些实施例中，本公开涉及融合蛋白，其包含包括特异性结合靶的结合结构域的细胞外组分、包括细胞内信号传导结构域的细胞内组分、和连接细胞外和细胞内组分的疏水组分，条件是融合蛋白：靶复合物的长度跨越类似于免疫突触中的膜之间距离的距离。其中，(a) 所述细胞外组分包含CD279 (PD-1) 的细胞外部分，(b) 所述疏水组分包含CD28的跨膜结构域，以及 (c) 所述细胞内组分包含CD28的细胞内信号传导结构域。

[0019] 在一些实施例中，本公开涉及融合蛋白，其包含包括特异性结合靶的结合结构域的细胞外组分、包括细胞内信号传导结构域的细胞内组分、和连接细胞外和细胞内组分的疏水组分，条件是融合蛋白：靶复合物的长度跨越类似于免疫突触中的膜之间距离的距离。其中，(a) 所述细胞外组分包含CD279 (PD-1) 的细胞外部分，(b) 所述疏水组分包含CD28的跨膜结构域，以及 (c) 所述细胞内组分包含CD28的细胞内信号传导结构域。

[0020] 在一些实施例中，本公开涉及融合蛋白，其包含包括特异性结合靶的结合结构域的细胞外组分、包括细胞内信号传导结构域的细胞内组分、和连接细胞外和细胞内组分的疏水组分，条件是融合蛋白：靶复合物的长度跨越类似于免疫突触中的膜之间距离的距离。其中，(a) 所述细胞外组分包含TIM3的细胞外部分，(b) 所述疏水组分包含CD28的跨膜结构

域,以及(c)所述细胞内组分包含CD28的细胞内信号传导结构域。

[0021] 在一些实施例中,本公开涉及融合蛋白,其包含包括特异性结合靶的结合结构域的细胞外组分、包括细胞内信号传导结构域的细胞内组分、和连接细胞外和细胞内组分的疏水组分,条件是融合蛋白:靶复合物的长度跨越类似于免疫突触中的膜之间距离的距离。其中,(a)所述细胞外组分包含LAG3的细胞外部分,(b)所述疏水组分包含CD28的跨膜结构域,以及(c)所述细胞内组分包含CD28的细胞内信号传导结构域。

[0022] 在一些实施例中,本公开涉及融合蛋白,其包含包括特异性结合靶的结合结构域的细胞外组分、包括细胞内信号传导结构域的细胞内组分、和连接细胞外和细胞内组分的疏水组分,条件是融合蛋白:靶复合物的长度跨越类似于免疫突触中的膜之间距离的距离。其中,(a)所述细胞外组分包含CD2的细胞外部分,(b)所述疏水组分包含CD28的跨膜结构域,以及(c)所述细胞内组分包含CD28的细胞内信号传导结构域。

[0023] 在一些实施例中,本公开内容涉及融合蛋白,其包含(a)包括特异性结合靶的结合结构域的细胞外组分、(b)包括细胞内信号传导结构域的细胞内组分、以及(c)连接细胞外和细胞内组分的疏水组分,其中通过融合蛋白与靶(融合蛋白::靶复合物)的特异性结合形成的复合物的细胞外部分具有以下的大小或跨越以下的距离:(i)多达免疫突触的两个细胞膜之间的距离,(ii)多达与复合物的细胞外部分跨越的距离大约或基本相同距离,所述复合物在T细胞受体(TCR)和由TCR特异性结合的MHC-肽复合物之间,(iii)多达与复合物的细胞外部分跨越的距离大约或基本相同距离,所述复合物在包含结合结构域的天然分子与其同源结合配偶体之间,(iv)小于或多达大约40nm、25nm、20nm、15nm或14nm;或(iv)其任何组合;其中细胞外组分是或包含CD95(Fas)胞外域或其功能片段,并且细胞内组分是或包含CD137(4-1BB)细胞内信号传导结构域或其功能部分。

[0024] 在一些实施例中,本公开内容涉及融合蛋白,其包含(a)包括特异性结合靶的结合结构域的细胞外组分、(b)包括细胞内信号传导结构域的细胞内组分、以及(c)连接细胞外和细胞内组分的疏水组分,其中结合结构域是抑制性分子结合结构域或者与抑制性分子结合结构域具有至少95%的同一性,并且细胞内信号传导结构域是共刺激或刺激分子结合结构域或者包含与抑制性分子结合结构域至少95%的同一性,并且其中抑制性分子是或包含CD95(Fas)胞外域或其功能片段,并且共刺激或刺激分子是或包含来自CD137(4-1BB)的细胞内信号传导结构域或其功能部分。

[0025] 在一些实施例中,本公开内容涉及融合蛋白,其包含:(a)细胞外组分,其包含由SEQ ID NO.:71所示的核酸分子编码的氨基酸序列,(b)疏水组分,其包含由SEQ ID NO.:197所示的核酸分子编码的氨基酸序列,和(c)细胞内组分,其包含由SEQ ID NO.:13所示的核酸分子编码的氨基酸序列。

[0026] 在一些实施例中,本公开内容涉及融合蛋白,其包含:(a)细胞外组分,其包含具有SEQ ID NO.:72所示的氨基酸序列的结合结构域,(b)疏水组分,其包含SEQ ID NO.:198所示的氨基酸序列,和(c)细胞内组分,其包含SEQ ID NO.:36所示的氨基酸序列。

[0027] 在某些方面中,本公开涉及编码如本文所描述的融合蛋白的核酸分子。

[0028] 在某些方面中,本公开涉及一载体,所述载体包含编码如本文所描述的融合蛋白的核酸分子。

[0029] 在某些其他方面中,本公开涉及一宿主细胞,所述宿主细胞包含编码如本文所描

述的融合蛋白、核酸分子或载体。

[0030] 在某些其他方面,提供了增加免疫细胞活性的方法,其包括向需要增加免疫细胞活性的受试者给予有效量的如本文所述的宿主细胞。

[0031] 在其他方面,本公开涉及增强或延长免疫应答的方法,其包括向需要增强或延长的免疫细胞活性的受试者给予有效量的本文所述的宿主细胞。

[0032] 在另外的其他方面,本公开提供了刺激抗原特异性T细胞应答的方法,该方法包括向需要增强的免疫细胞活性的受试者给予有效量的本文所述的宿主细胞。

[0033] 在其他方面,本公开涉及抑制免疫抑制信号传导途径的方法,包括向有此需要的受试者给予有效量的本文所述的宿主细胞。

[0034] 在其他方面,本公开涉及治疗癌症的方法,包括向患有癌症的受试者给予治疗有效量的本文所述的宿主细胞。

[0035] 在其他方面,本公开涉及抑制癌细胞的免疫抗性的方法,包括向有此需要的受试者给予有效量的本文所述的宿主细胞。

[0036] 在其他方面,本公开涉及治疗癌症的方法,包括向患有癌症的受试者给予治疗有效量的本文所述的宿主细胞,其中所给予的宿主细胞能够在免疫抑制性肿瘤微环境中增殖。

[0037] 本公开还提供了治疗感染的方法,该方法包括向患有该感染的受试者给予治疗有效量的本文所述的宿主细胞。

[0038] 参考以下详细描述和附图,本发明的这些和其他方面将变得显而易见。

附图说明

[0039] 图1A和1B显示了在原代鼠CD8⁺T细胞上高水平表达的CD200R-CD28构建体。(A)示例性CD200R-CD28构建体的示意图。构建体“I”包含CD200R细胞外(“EC”)和跨膜(“TM”)结构域和CD28细胞内(“IC”)信号传导结构域(CD200R_{tm}-CD28)。构建体“II”包含CD200R的细胞外结构域和CD28(CD200R-CD28_{tm})的跨膜和细胞内结构域。构建体“III-V”也将CD28的细胞外结构域的一部分合并至近跨膜端半胱氨酸以促进多聚化并增强CD28的信号传导。为了说明任何额外的细胞外氨基酸(例如,从一个至约50个氨基酸;例如本文公开的示例性鼠构建体包含额外的九(9)个氨基酸,本文公开的示例性人构建体包含十二(12)个氨基酸),一些构建体具有细胞外或细胞内结构域的截短部分(例如,保留N连接糖基化位点的CD200R)。例如,构建体IV具有截短3个氨基酸的CD200R的截短部分。例如,构建体V具有截短9个氨基酸的CD200R的截短部分。构建体“I”、“II”和“V”保持细胞之间的较短空间距离(例如,T细胞和抗原呈递细胞之间),并且可以与cSMAC中的TCR共定位并传递强力共刺激信号。(B)通过抗CD200R抗体检测到的鼠CD200R-CD28构建体在TCR_{gag} T细胞上的转基因表达。对照载体包含绿色荧光蛋白(GFP)。

[0040] 图2A至2G显示,CD200R-CD28构建体在体外响应于CD200⁺肿瘤靶细胞而促进增殖、积累和效应子功能,并在免疫突触中积累。用抗CD3、抗CD28和重组人IL-2(100U/ml)在体外刺激来自幼稚TCR_{gag}小鼠的脾细胞,并用逆转录病毒上清液转导2天。每7天用辐照的FBL和脾细胞对细胞进行再刺激,并用rhIL-2(50U/mL)培养,用于最多3次刺激。在最后一次刺激后5-7天,将T细胞用于测定。(A)通过CellTrace紫稀释来测量的CD200R-CD28和GFP对照

TCR_{gag} T细胞的增殖。用CD200⁻FBL(上图)或CD200⁺FBL(下图)刺激T细胞3天。(B)在每周用辐照的CD200⁺FBL和脾细胞刺激的周期中,与未转导的TCR_{gag} T细胞共培养期间,转导的TCR_{gag} T细胞的优先扩增/存活。(C)转导的T细胞的富集。与用空的GFP对照载体转导的野生型T细胞相比,用经辐照的CD200⁺肿瘤细胞的重复再刺激富集了用CD200R-9aas-CD28Cys转导的细胞。(D)在T细胞:FBL突触处增加的CD200R和CD200信号强度。脂质筏在免疫突触处增加(I)。CD200R-9aas-CD28Cys融合蛋白与脂质筏共定位,表明融合蛋白集中在免疫突触内(III、IV)。(E)CD200R-CD28⁺CD8⁺T细胞显示出更高的体外裂解CD200⁺FBL细胞能力。如所指示的,用不同稀释度的荧光染料5,6-羧基荧光素二乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)标记靶肿瘤细胞。用指示的CD200R-CD28融合蛋白或空载体对照转导的效应子TCR_{gag} T细胞与CD200⁺FBL(CFSE^{hi})和非特异性EL4(CFSE^{lo})对照靶的1:1混合物以指示的效应子对靶的比例温育5个小时。通过流式细胞术确定FBL占FBL和对照肿瘤细胞的总和的FBL百分比。通过用T细胞温育的FBL的百分比除以没有T细胞温育的FBL的百分比来确定裂解百分比。(F)在(G)中用于CFSE测定的靶肿瘤细胞。用不同稀释度的荧光染料CellTrace紫(CTV)或CFSE标记靶肿瘤细胞。生成了EL4细胞(CTV⁺)、CD200⁺FBL(CFSE^{hi})和非特异性EL4(CFSE^{lo})对照靶的1:1:1混合物。(G)CFSE细胞毒性测定。用CD200R-CD28受体或GFP对照载体转导TCR_{gag} T细胞。将效应子TCR_{gag} T细胞与CD200⁻FBL或CD200⁺FBL和非特异性EL4对照靶的1:1混合物以指示的效应子与靶的比例温育4小时。通过流式细胞术确定FBL占FBL和对照肿瘤细胞的总和的FBL百分比。通过用T细胞温育的FBL的百分比除以没有T细胞温育的FBL的百分比来确定裂解百分比。

[0041] 图3A至3D显示,用CD200R-9aas-CD28Cys转导的T细胞在体内对肿瘤攻击应答时优先积累,并在注射入环磷酰胺处理的带有FBL的小鼠中后表达与效应子表型一致的表面蛋白。如实例2所述产生转导的TCR_{gag} T细胞。(A)实验原理图。给C57BL/6小鼠注射 4×10^6 CD200⁺FBL细胞。五天后,将CD200R-9aas-CD28Cys(Thy1.1纯合子)和eGFP对照(Thy1.1杂合子)TCR_{gag} T细胞以每只小鼠 4×10^6 个细胞的浓度共注射到经环磷酰胺处理的带有FBL的B6小鼠中。每2天给予IL-2(2×10^4 U/剂量)。T细胞转移后第8天,对小鼠实施安乐死,并收集脾脏和腹股沟淋巴结。(B)响应FBL,CD200R-9aas-CD28Cys TCR_{gag} T细胞在脾脏中积累。(LN=淋巴结;Sp1=脾)。(C)对转导以表达CD200R-9aas-CD28Cys的T细胞、用空载体转导的T细胞、以及内源性T细胞转移后3天的表面蛋白的比较。与对照TCR_{gag} T细胞相比,CD200R-9aas-CD28Cys TCR_{gag} T细胞表达的CD62L减少,提示效应子T细胞表型。(D)对转导以表达CD200R-9aas-CD28Cys⁺T细胞的细胞、用空载体转导的T细胞、以及内源性T细胞转移后15天的表面蛋白的比较。与对照TCR_{gag} T细胞相比,CD200R-9aas-CD28Cys TCR_{gag} T细胞表达相似水平的细胞表面蛋白。

[0042] 图4A至4D显示了用CD200R-CD28转导的T细胞的过继免疫疗法可以根除播散性白血病。(A)实验原理图。给C57BL/6小鼠注射 4×10^6 CD200⁺FBL细胞。五天后,以 10^5 个细胞/小鼠的剂量腹膜内注射CD200R-CD28tm、CD200R-CD28Cys、CD200R-9aas-CD28Cys或eGFP TCR_{gag} T细胞给Cy处理的带FBL的小鼠。如所示,在一组小鼠中每2天给予IL-2(2×10^4 U/剂量)。(B)如注射流式细胞术测定的,在IL-2注射日,在CD200R-CD28tm转导的T细胞和未转导的T细胞中细胞表面蛋白的表达的代表性实例。(C)在IL-2注射存在下处理的小鼠的存活率。(C)在无IL-2注射下处理的小鼠的存活率。在不注射IL-2的情况下,CD200R-9aas-

CD28Cys TCR_{gag} T细胞的转移显著提高了存活率($P<0.05$,对数秩Mantel-Cox检验)。

[0043] 图5A至5C显示表达CD200R-9aas-CD28Cys的T细胞不诱导可检测的自身免疫性肝损伤或浸润正常组织。(A) 实验原理图。给环磷酰胺处理的Alb/_{Gag}小鼠注射 4×10^6 CD200⁺FBL细胞。五天后,以 10^5 个细胞/小鼠的剂量腹膜内注射CD200R-9aas-CD28Cys和eGFP TCR_{gag} T细胞给环磷酰胺处理的带FBL的小鼠。如所示,在一组小鼠中每2天给予IL-2 (2×10^4 U/剂量)。转移后三天和第七天,通过定量肝酶天冬氨酸氨基转移酶(ALT)和丙氨酸氨基转移酶(ALT)的血清水平来评估肝损伤。(B) 对于不接受T细胞、接受表达GFP的对照T细胞或接受表达CD200R-9aas-CD28Cys的T细胞的小鼠,在转移后3天和7天测量的AST和ALT水平没有因处理而变化。(C) 评估正常组织的T细胞浸润。使用对T细胞标志CD3特异的抗体,观察到肝脏组织中T细胞的存在有限(左图),而CD200R-9aas-CD28Cys TCR_{gag} 或对照TCR_{gag} T细胞(右图)的接受者之间无显著差异。

[0044] 图6A至6D显示4-1BB共刺激性信号传导结构域在体外促进转导的T细胞的积累和效应子功能,并促进转导的T细胞的荷瘤接受者响应CD200⁺肿瘤靶细胞的存活。(A) CD200R-CD28(“V”)、-4-1BB(“VI”)和-CD28-4-1BB(“VII”)构建体示意图。(B) 在每周用辐照的CD200⁺FBL和脾细胞刺激之后,转导的TCR_{gag} T细胞相对于未转导的TCR_{gag} T细胞的扩增。CD200R-4-1BB和CD200R-CD28-4-1BB还在体外促进转导的T细胞积聚。(C) 使用标准基于CFSE的细胞毒性测定,CD200R-9aas-4-1BB⁺CD8⁺T细胞相对于对照显示出更高的体外裂解CD200⁺FBL细胞的能力。通过流式细胞术确定FBL占FBL和对照肿瘤细胞的总和的FBL百分比。通过用T细胞温育的FBL的百分比除以没有T细胞温育的FBL的百分比来确定裂解百分比。(D) CD200R-41BB转导的T细胞还促进相对于对照的存活。给C57BL/6小鼠注射 4×10^6 CD200⁺FBL细胞。五天后,以 10^5 个细胞/小鼠的剂量腹膜内注射CD200R-9aas-CD28、CD200R-9aas-4-1BB、CD200R-9aas-CD28-4-1BB或eGFP TCR_{gag} T细胞给环磷酰胺处理的带FBL的小鼠。

[0045] 图7A至7D显示,转导以表达WT1特异性TCR和CD200Rtm-CD28融合蛋白的人原代T细胞对表达CD200的靶细胞显示出增强的增殖,并显示了增加的细胞因子的产生,其响应于表达CD200的肿瘤细胞。(A) WT1₁₂₆特异性TCR、C4和CD200Rtm-CD28的表达。(B) CD200在T2和K562细胞中的表达。T2细胞表现出低水平的内源性CD200表达。(C) 如CFSE所示的T细胞的增殖。响应抗原而增殖的细胞显示降低的CFSE荧光强度。与仅用C4转导的T细胞相比,用C4和IFP两者转导的T细胞对表达低水平CD200的靶细胞显示出增强的增殖。(D) 通过流式细胞术测量,响应于暴露于CD200dim肿瘤细胞的细胞因子产生。相对于单独用TCR C4转导的对照T细胞,用C4和IFPCD200Rtm-CD28两者转导的T细胞显示出增加的细胞因子产生。

[0046] 图8A至8E显示,包含SIRP α 细胞外组分和CD28共刺激信号传导结构域的融合蛋白促进转导的T细胞在体外的积累和增殖。(A) 示例性SIRP α -CD28构建体的示意图。构建体“I”包含SIRP α 细胞外(“EC”)和跨膜(“TM”)结构域和CD28细胞内(“IC”)信号传导结构域(SIRP α tm-CD28)。构建体“II”包含SIRP α 的细胞外结构域和CD28(SIRP α -CD28tm)的跨膜和细胞内结构域。构建体“III-VI”也将CD28的细胞外结构域的一部分合并至近跨膜端半胱氨酸以促进多聚化并增强CD28的信号传导。为了说明额外的细胞外氨基酸(例如,鼠构建体的额外的九(12)个氨基酸,或者人构建体的十二(12)个氨基酸),一些构建体具有细胞外或细胞内结构域的截短部分(例如,保留N连接糖基化位点的SIRP α)。构建体IV具有截短6个氨基酸的SIRP α 的截短部分,以保留N连接糖基化位点。例如,构建体V具有截短9个氨基酸的SIRP α 的

截短部分。例如,构建体VI具有截短23个氨基酸的SIRP α 的截短部分。构建体“I”、“II”和“V”保持细胞之间的较短空间距离(例如,T细胞和抗原呈递细胞之间),并且可以与cSMAC中的TCR共定位并传递强力共刺激信号。(B)在每周用辐照的SIRP α^+ FBL和脾细胞刺激之后,转导的TCR_{gag} T细胞相对于未转导的TCR_{gag} T细胞的扩增。SIRP α -CD28构建体在体外促进转导的T细胞累积,其中SIRP α -9aas-CD28Cys表现出增强的累积。(C)在CellTrace紫(CTV)稀释增殖测定中,用SIRP α -CD28构建体转导的T细胞的增殖。相对于未转导的T细胞,表达SIRP α -CD28构建体的T细胞经过工程改造以维持T细胞与肿瘤细胞的距离,表现出增强的增殖。(D)与被转导以表达SIRP α tm-CD28或SIRP α -9aas-CD28Cys构建体的SIRP α -CD28 $^+$ T细胞共培养后,杀伤CD47 $^+$ 肿瘤细胞。相反,当与接受空载体的T细胞或缺少其胞内结构域的截短的SIRP α 培养时,肿瘤细胞没有被根除。(E)用于定量杀伤CD47 $^+$ 肿瘤细胞的杀伤的IncuCyte[®]测定的结果。用mCherry转导CD47 $^+$ FBL肿瘤细胞。红色信号的丢失表示肿瘤细胞的杀伤。以效应子:靶为10:1、2:1和0.4:1的比测试了肿瘤细胞的杀伤。即使以最低的效应子与靶的比,SIRP α -CD28 $^+$ T细胞也会杀伤CD47 $^+$ 肿瘤细胞。

[0047] 图9A和9B显示了包含PD-1细胞外组分和CD28共刺激信号传导结构域的融合蛋白在体外促进细胞因子的产生。(A)示例性PD-1-CD28构建体的示意图。构建体“I”包含PD-1细胞外(“EC”)和跨膜(“TM”)结构域和CD28细胞内(“IC”)信号传导结构域(PD1tm-CD28)。构建体“II”包含PD-1的细胞外结构域和CD28(PD1-CD28tm)的跨膜和细胞内结构域。构建体“III-VII”还合并CD28的细胞外结构域的一部分,该部分与近跨膜端半胱氨酸相邻,以促进多聚化并增强CD28信号传导。为了说明额外的细胞外氨基酸(例如,鼠构建体的额外的九(12)个氨基酸,或者人构建体的十二(12)个氨基酸),构建体IV-VII具有PD-1的截短部分。构建体IV具有截短9个氨基酸的PD-1的截短部分。构建体V具有截短12个氨基酸的PD-1的截短部分。构建体VI具有截短15个氨基酸的PD-1的截短部分。构建体VII具有截短21个氨基酸的PD-1的截短部分。构建体“I”、“II”和“V”保持细胞之间的较短空间距离(例如,T细胞和抗原呈递细胞之间),并且可以与cSMAC中的TCR共定位并传递强力共刺激信号。(B)响应于在布雷菲德菌素A存在下,用内源性表达PD-1配体、PD-L1和PD-L2的FBL细胞刺激5小时,PD1-CD28 $^+$ T细胞显示出增加的细胞因子产生。通过流式细胞术评估了刺激的T细胞的效应子细胞因子IFN γ 和TNF α 的细胞内表达。

[0048] 图10显示了TCR C4和PD-1 IFP(PD1-12aas-CD28Cys、PD1-15aas-CD28Cys或PD1-21aas-CD28Cys)的共表达。用C4和PD1-12aas-CD28Cys或PD1-15aas-CD28Cys转导的T细胞表现出高转导效率和两种蛋白的表达。

[0049] 图11A至11C显示,在用辐照过的FBL细胞刺激后,包含Fas细胞外组分和CD28共刺激信号传导结构域的融合蛋白在体外积累。(A)示例性Fas-CD28构建体的示意图。构建体“I”包含Fas细胞外(“EC”)和跨膜(“TM”)结构域和CD28细胞内(“IC”)信号传导结构域(Fastm-CD28)。构建体“II”包含Fas的细胞外结构域和CD28(Fas-CD28tm)的跨膜和细胞内结构域。构建体“III”和“IV”还合并CD28的细胞外结构域的一部分(该部分与近跨膜端半胱氨酸相邻),以促进多聚化并增强CD28信号传导。为了说明额外的细胞外氨基酸(例如,鼠构建体的额外的九(12)个氨基酸,或者人构建体的十二(12)个氨基酸),构建体IV具有Fas的截短部分,其中Fas细胞外结构域截短9个氨基酸。构建体“I”、“II”和“V”保持细胞之间的较短空间距离(例如,T细胞和抗原呈递细胞之间),并且可以与cSMAC中的TCR共定位并传递强

力共刺激信号。(B) 用Fas构建体转导的TCR_{gag} T细胞在辐照的FBL细胞的多次刺激下的积累。相对于对照T细胞,所有构建体均促进了T细胞的积累。(C) 表达Fas-CD28构建体而不是全长(FL) Fas在体外多次刺激后促进T细胞的存活或扩增。

[0050] 图12A和12B显示了包含LAG3细胞外组分和CD28共刺激信号传导结构域的融合蛋白的结构和表达。(A) 示例性LAG3-CD28构建体的示意图。构建体“I”包含LAG3细胞外(“EC”)和跨膜(“TM”)结构域和CD28细胞内(“IC”)信号传导结构域(LAG3tm-CD28)。构建体“II”包含LAG3的细胞外结构域和CD28(LAG3-CD28tm)的跨膜和细胞内结构域。构建体“III”和“IV”还合并CD28的细胞外结构域的一部分(该部分与跨膜近半胱氨酸相邻),以促进多聚化并增强CD28信号传导。为了说明额外的细胞外氨基酸(例如,鼠构建体的额外的九(12)个氨基酸,或者人构建体的十二(12)个氨基酸),构建体IV具有LAG3的截短部分,其中LAG3细胞外结构域截短9个氨基酸。构建体“I”、“II”和“V”保持细胞之间的较短空间距离(例如,T细胞和抗原呈递细胞之间),并且可以与cSMAC中的TCR共定位并传递强力共刺激信号。(B) 如通过抗LAG3抗体染色和流式细胞术确定的,鼠CD8⁺T细胞表达LAG3-CD28构建体。与接受空载体的对照T细胞相反,被转导以表达LAG3-CD28构建体(LAG3tm-CD28、LAG3-CD28tm、LAG3-CD28Cys、LAG3-9aas-CD28Cys)的T细胞显示出该构建体的表达。

[0051] 图13A和13B显示了包含TIM3细胞外组分和CD28共刺激信号传导结构域的融合蛋白的结构和表达。(A) 示例性TIM3-CD28构建体的示意图。构建体“I”包含TIM3细胞外(“EC”)和跨膜(“TM”)结构域和CD28细胞内(“IC”)信号传导结构域(TIM3tm-CD28)。构建体“II”包含TIM3的细胞外结构域和CD28(TIM3-CD28tm)的跨膜和细胞内结构域。构建体“III”和“IV”还合并CD28的细胞外结构域的一部分(该部分与跨膜近半胱氨酸相邻),以促进多聚化并增强CD28信号传导。为了说明额外的细胞外氨基酸(例如,鼠构建体的额外的九(12)个氨基酸,或者人构建体的十二(12)个氨基酸),构建体IV具有TIM3的截短部分,其中TIM3细胞外结构域截短9个氨基酸。构建体“I”、“II”和“V”保持细胞之间的较短空间距离(例如,T细胞和抗原呈递细胞之间),并且可以与cSMAC中的TCR共定位并传递强力共刺激信号。(B) 通过抗TIM3抗体染色和流式细胞术确定的,鼠CD8⁺T细胞表达TIM3-CD28构建体。与接受空载体的对照T细胞相反,被转导以表达TIM3-CD28构建体(TIM3tm-CD28; TIM3-CD28tm; TIM3-CD28Cys; TIM3-9aas-CD28Cys)的T细胞通常显示出该构建体的表达。

[0052] 图14A和14B显示了在原代小鼠CD8⁺T细胞上高水平表达的CD200R-CD28构建体。(A) 代表性CD200R-CD28构建体的示意图。构建体“I”包含CD200R细胞外(“EC”)和跨膜(“TM”)结构域和CD28细胞内(“IC”)信号传导结构域(CD200Rtm-CD28)。构建体“II”包含CD200R的细胞外结构域和CD28(CD200R-CD28tm)的跨膜和细胞内结构域。构建体“III-V”也将CD28的细胞外结构域的一部分合并至近跨膜端半胱氨酸以促进多聚化并增强CD28的信号传导。为了说明由合并CD28的细胞外结构域的一部分所产生的任何额外的细胞外氨基酸(例如,从一个至约50个氨基酸;例如本文公开的示例性鼠构建体包含额外的三(3)或九(9)个氨基酸,本文公开的示例性人构建体包含额外的九(9)或十二(12)个氨基酸),一些构建体具有细胞外或细胞内结构域的截短部分(例如,保留N连接糖基化位点的CD200R)。例如,构建体IV具有截短3个氨基酸的CD200R的截短部分。例如,构建体V具有截短的9个氨基酸的CD200R的截短部分。构建体“I”、“II”和“V”保持细胞之间的空间距离(例如,T细胞和抗原呈递细胞之间),并且如虚线所指示的,可以与cSMAC中的TCR共定位并传递强力共刺激信号。

(B) 通过抗CD200R抗体检测到的鼠CD200R-CD28构建体在TCR_{gag} T细胞上的转基因表达。

[0053] 图15A至15N显示,CD200R-CD28构建体在体外促进由CD200⁺肿瘤靶细胞刺激的T细胞的增殖、积累和效应子功能,并在免疫突触中积累。除非另有所指,所有结果都是具有类似结果的至少2个实验的代表。用抗CD3、抗CD28和重组人IL-2(rhIL-2, 100U/ml)在体外刺激来自幼稚TCR_{gag}小鼠的脾细胞,并用逆转录病毒上清液转导2天。每7天用辐照的FBL和脾细胞对细胞进行再刺激,并用rhIL-2(50U/ml)培养,用于最多3次刺激。在最后一次刺激后5-7天,将T细胞用于测定。(A) 通过CellTrace紫(CTV)稀释来测量的CD200R-CD28和GFP对照TCR_{gag} T细胞的增殖,相对于未刺激的细胞(阴影)。用CD200⁻FBL(上图)或CD200⁺FBL(下图)刺激T细胞3天。(B) 截短的CD200R(trCD200R)的示意图。(C) 共刺激需要CD28信号传导结构域。通过抗CD200R抗体检测到的trCD200R构建体在TCR_{gag} T细胞上的转基因表达。(D) 通过CellTrace紫稀释来测量的trCD200R(蓝线)和GFP对照(红线)TCR_{gag} T细胞的增殖。用CD200⁺FBL刺激T细胞3天。(E) 用CD200⁺FBL再刺激使CD200R IFP转导的T细胞富集。在用辐照的CD200⁻(左图)或CD200⁺(右图)FBL和脾细胞再刺激的一个周期中,转导的TCR_{gag} T细胞在包括未转导的TCR_{gag} T细胞的混合群中的富集。用CD200R-CD28(上图)或GFP对照(下图)转导TCR_{gag} T细胞。(F、G) 在每周用辐照的CD200⁺FBL和脾细胞刺激的周期中,转导的TCR_{gag} T细胞在包括未转导的TCR_{gag} T细胞的混合群中的富集。*P<0.05, **P<0.01(t test)。(H) CD200R-9aas-CD28Cys⁺CD8⁺T细胞显示出更高的体外裂解CD200⁺FBL细胞能力。用荧光染料5,6-羧基荧光素二乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)标记靶肿瘤细胞。用CD200R-9aas-CD28Cys或mock-转导的细胞(黑色符号)转导TCR_{gag} T细胞。将效应子TCR_{gag} T细胞与CD200⁺FBL和非特异性EL4对照靶的1:1混合物以指示的效应子与靶的比例温育4小时。通过流式细胞术确定FBL占FBL和对照肿瘤细胞的总和的FBL百分比。通过用T细胞温育的FBL的百分比除以没有T细胞温育的FBL的百分比来确定裂解百分比。(I) 饼图描绘了以1:1的比例响应FBL刺激,TCR_{gag} T细胞中细胞因子产生的模式。饼图中的每个切片表示细胞因子染色的组合,包括IFN γ 、TNF α 和IL-2。(J) 如通过流式细胞术测量的(I)中所示的细胞因子产生的直方图。阴影直方图代表GFP对照转导的细胞。(K-M) CD200R-9aas-CD28Cys融合蛋白与脂质筏共定位,表明融合蛋白集中在T细胞:靶接触区,表明融合蛋白的大小可以容纳在免疫突触中。将载体转导的TCR_{gag}体外扩增的效应子T细胞与FBL在E:T为10:1、37°C的条件下合并20分钟。将缀合物加载到μ-Slide VI.4室(Ibidi)上,再放置15分钟。将固定的细胞染色并通过显微镜观察。在图15K中,上图示出了接触的细胞,而下图示出了未接触的细胞。(N) 用CD200R-9aas-CD28Cys(红线)、CD200R-CD28Cys(蓝线)和GFP对照(黑线)转导的TCR_{gag} T细胞的LCK Y394表达,其如标记的那样刺激10分钟。

[0054] 图16A至16E显示,在体内响应肿瘤攻击,用CD200R-9aas-CD28Cys转导的T细胞优先积累,并增强了播散性白血病的过继免疫疗法。如实施例15所述产生转导的TCR_{gag} T细胞。给C57BL/6小鼠注射 4×10^6 个CD200⁺FBL细胞。五天后,将CD200R-9aas-CD28Cys(Thy1.1纯合子)和eGFP(Thy1.1杂合子)TCR_{gag} T细胞以每只小鼠 4×10^6 个细胞的浓度共注射到Cy处理的带有FBL的B6小鼠中。每2天给予IL-2(2×10^4 U/剂量)。T细胞转移后第8天,对小鼠实施安乐死,并收集脾脏和腹股沟淋巴结。(A) 相对于空载体对照TCR_{gag} T细胞,响应于FBL,CD200R-9aas-CD28Cys TCR_{gag} T细胞积聚在脾脏中。(B) IFP转导的T细胞的表型与对照相似。在体外刺激后5天,用CD200R-CD28转导(红色线)或未转导(蓝色线)的TCR_{gag} T细胞上的表面

标志的表达。(C)响应FBL,CD200R-9aas-CD28Cys和空载体对照TCR_{gag} T细胞在淋巴结(LN)和脾脏(Spl)中积累。通过除以空载体对照(Thy1.1⁺Thy1.2⁺)TCR_{gag} T细胞的百分比来计算CD200R-9aas-CD28Cys TCR_{gag} T细胞(Thy1.1纯合子)的倍数增加。(D,E)在第8天(D)和15天(E),CD200R-9aas-CD28Cys TCR_{gag} T细胞(蓝线)、对照TCR_{gag} T细胞(红线)和内源性T细胞(阴影)上的表面标志表达。转移后15天,与对照TCR_{gag} T细胞相比,CD200R-9aas-CD28Cys TCR_{gag} T细胞表达相似水平的细胞表面蛋白。

[0055] 图17A和17B显示了在存在(A)或不存在(B)IL-2注射的情况下处理的小鼠的存活率。给C57BL/6小鼠注射 4×10^6 个CD200⁺FBL细胞。五天后,以 10^5 个细胞/小鼠的剂量腹膜内注射CD200R-9aas-CD28Cys和eGFP TCR_{gag} T细胞给Cy处理的带FBL的小鼠(如箭头所示)。在一组小鼠中每2天给予IL-2,总共给予10天(2×10^4 U/剂量)。在不注射IL-2的情况下,CD200R-9aas-CD28Cys TCR_{gag} T细胞的转移显著提高了存活率($P < 0.05$,对数秩Mantel-Cox检验)(B)。在(A)中,数据来自实验1($n=3-4$ 只小鼠/组)。在(B)中,数据总共来自3个独立实验($n=6-10$ 只小鼠/组)。

[0056] 图18A至18E显示,被转导以表达WT1特异性TCR和CD200Rtm-CD28融合蛋白的人原代T细胞对表达CD200的靶细胞显示出增强的增殖,并显示了增加的细胞因子的产生,其响应于表达CD200的肿瘤细胞。(A)来自健康供体白细胞分离术(上图)或白血病母细胞(下图)的CD34⁺细胞上的CD200的表达。(B)WT1₁₂₆特异性TCR、TCR_{C4}和CD200Rtm-CD28在原代人T细胞中的表达。该图显示了结合了IFP、TCR α 和TCR β 链的构建体。(C,D)如CFSE所示的T细胞的增殖。响应抗原而增殖的细胞显示降低的CFSE荧光强度。用WT1₁₂₆冲击的T2细胞,刺激用TCR_{C4}、或用TCR_{C4}和CD200Rtm-CD28转导的T细胞。(E)通过流式细胞术测量,响应于暴露于T2细胞的细胞因子产生。如所示,用WT1₁₂₆冲击的T2细胞的滴度刺激单独用TCR_{C4}转导的T细胞(上图)或用TCR_{C4}和靶向CD200的IFP两者转导的T细胞(下图)。相对于单独用TCR_{C4}转导的对照T细胞,用TCR_{C4}和IFPCD200Rtm-CD28两者转导的T细胞显示出增加的细胞因子产生。

[0057] 图19A至19C显示了在原代人T细胞中与WT1特异性TCR共表达的CD200R-CD28构建体。(A)代表性CD200R-CD28构建体的示意图。(B)显示结合IFP、TCR α 和TCR β 链的构建体的图。(C)WT1₁₂₆特异性TCR、TCR_{C4}和CD200R-CD28融合蛋白在原代人T细胞中的表达。

[0058] 图20A至20D显示了表达CD200R-CD28构建体的T细胞的富集的测定结果。

[0059] 图21A至21K显示了表达CD200R-CD28构建体的T细胞的效应子功能测定(细胞因子产生、细胞毒性)。

[0060] 图22A至22D显示了用表达Fas IFP构建体的T细胞进行免疫疗法的体内研究结果。(A)研究设计。(B-C)在腹膜内接种 4×10^6 个肿瘤细胞后(第0天)并在环磷酰胺处理后,在指定的时间点在C57BL/6小鼠中进行萤火虫荧光素酶⁺FBL肿瘤的体内生物发光成像,之后没有进一步的处理或过继转移 10^6 GFP转导或Fas-CD28转导的TCR_{gag}转基因CD8⁺T细胞(第5天)。图22C所示的两只小鼠代表 $n=4$ 只小鼠。(D)通过IVIS成像定量的FBL肿瘤细胞的生物分布。在腹腔内接种 4×10^6 个肿瘤细胞后(第0天)并在环磷酰胺处理后,在指定的时间点在C57BL/6小鼠中的FBL肿瘤,之后不进行其他处理(白圈)或过继转移 10^6 个GFP转导(黑圈)或Fas-CD28转导的(红圈)TCR_{gag}转基因CD8⁺T细胞(第5天)。

[0061] 图23A至23D显示,包含Fas细胞外组分和4-1BB共刺激信号传导结构域的融合蛋白在用肿瘤细胞刺激后在体外积累和增殖,并且还减少了Fas诱导的细胞死亡。(A)示例性

Fas-4-1BB构建体的示意图。该构建体包含Fas细胞外 (“EC”) 结构域和4-1BB跨膜 (“TM”) 和细胞内 (“IC”) 信号传导结构域 (“Fas-4-1BBtm”)。(B) 在鼠T细胞中转基因TCR和Fas-4-1BB IFP (Fas-4-1BBtm) 的共表达。通过用仅编码TCR_{gag}、或编码TCR_{gag}和Fas-4-1BBtm (SEQ ID NO.: 187) 的DNA构建体转染Plat-E细胞，产生逆转录病毒上清液。幼稚P14 T细胞用抗CD3和抗CD28刺激，然后用逆转录病毒上清液转导2天。刺激后五天，将转导的T细胞用针对TCR和Fas的特异性抗体进行染色，并通过流式细胞术进行分析。(C) 如用CellTrace紫 (CTV) 稀释法测量的，单独用TCR_{gag}、或用TCR_{gag}和Fas-4-1BBtm转导的T细胞的增殖。将转导的P14 T细胞用CellTrace紫 (CTV) 增殖染料染色，并不刺激(左) 或以效应子与靶为8:1的比例用FBL肿瘤细胞刺激6天(右)。然后收获T细胞并通过流式细胞术进行分析。(D) 细胞死亡Fas信号传导通路在以下中的活性：(i) 表达转基因TCR_{gag}但缺乏Fas表达的T细胞；(ii) 表达转基因TCR_{gag}的野生型T细胞；和(iii) 表达转基因TCR_{gag}和Fas-4-1BBtm的T细胞。用TCR_{gag}或TCR_{gag}+Fas-4-1BBtm IFP刺激和转导P14 T细胞。7天后，使用FLICA方法对T细胞的活性胱天蛋白酶-8表达进行染色，以通过Fas途径测量细胞死亡。

[0062] 图24A至24B显示在卵巢癌的ID8模型中Fas-4-1BB T细胞控制肿瘤生长并促进存活。(A) 用于定量杀伤ID8卵巢肿瘤细胞的杀伤的IncuCyte®测定的结果。将鼠转导的T细胞(抗间皮素TCR或抗间皮素TCR+Fas-4-1BBtm)与红色荧光ID8卵巢肿瘤细胞共温育2天，并通过IncuCyte®分析定量ID8细胞的生长。红色信号的丢失表示肿瘤细胞的杀伤。(B) 用(i) 抗间皮素TCR细胞或(ii) 抗间皮素TCR+Fas-4-1BBtm细胞处理的ID8小鼠的存活。在ID8鼠卵巢癌模型中，植入了 5×10^6 个ID8肿瘤细胞，并进行了6周的播散。环磷酰胺处理后，小鼠接受 10^7 个T细胞和 5.0×10^8 个间皮素冲击的脾细胞，然后注射IL-2，共注射10天。每两周对小鼠进行处理直至安乐死。

[0063] 图25A至25D显示在胰腺癌的KPC小鼠模型中Fas-4-1BB T细胞显示更大的持久性并促进存活。(A) 具有正常胰腺的健康小鼠(左)和在“登入”的小鼠(KPC基因工程小鼠)中的胰腺肿瘤(右)的超声图像。(B) 实验示意图。通过超声筛选KPC小鼠以确定何时出现肿瘤，并在大约8周龄，在发现肿瘤时登入研究。将小鼠随机分配至治疗组，用环磷酰胺处理小鼠，并在环磷酰胺后向接受TCR-T细胞的小鼠分别注射间皮素特异性T细胞和间皮素肽冲击的脾细胞，每种 10^7 个。登入后14天开始，每2周重复T细胞/APC输注(但不加环磷酰胺)，共3次输注，不注射IL-2。在研究结束时，评估小鼠的存活率。(C) 将最后的T细胞输注后存活28天的小鼠放血，并通过流式细胞术检测先天标志的T细胞来评估转移的T细胞的持久性。(D) 用(i) 抗间皮素TCR细胞或(ii) 抗间皮素TCR+Fas-4-1BBtm细胞处理的KPC小鼠的存活。

[0064] 图26显示了用(i) TCR_{gag} T细胞或(ii) 用TCR_{gag}+Fas-4-1BBtm T细胞处理的AML模型(注射FBL) 小鼠的存活。给小鼠注射FBL细胞。五天后，在给予或不给予 10^6 个T细胞的情况下，用环磷酰胺处理小鼠。

具体实施方式

[0065] 本公开提供了调节宿主细胞如免疫细胞中的信号传导的融合蛋白。例如，本公开的融合蛋白可以在人T细胞中提供激活或共刺激信号，其中可以可选地将T细胞改造成具有优选的抗原特异性TCR。这些免疫调节融合蛋白(IFP) 可与普遍表达的靶或与在非正常细胞(例如癌细胞) 中通常上调或过表达的靶相互作用。这样的IFP具有细胞外结合结构域和细

胞内信号传导结构域。通过用工程改造的TCR(例如,高亲和力的TCR)和产生激活信号的本公开的融合蛋白转导T细胞,T细胞的某些实施例在与例如肿瘤细胞相互作用时可能不再需要外源共刺激。

[0066] 在某些方面,本公开提供了包含IFP、编码IFP的载体的宿主细胞(例如,诸如T细胞、树突细胞、NK细胞等的免疫细胞),以及激活包含IFP的T细胞的方法,用于各种治疗应用,包括治疗受试者的疾病(例如,癌症、传染病)。

[0067] 在更详细地阐述本发明之前,提供本文中使用的某些术语的定义可能有助于理解本发明。在整个本发明中阐述了其他的定义。

[0068] 在本说明书中,任何浓度范围、百分比范围、比率范围或整数范围应理解为包括所述范围内的任何整数的值,并且在适当时,包括其分数(例如,整数的十分之一和百分之一),除非另有说明。此外,除非另有说明,否则本文所述的与任何物理特征相关的任何数字范围,例如聚合物亚单元、尺寸或厚度,应理解为包括所述范围内的任何整数。除非另有说明,本文所用的术语“约”是指所示范围、值或结构的±20%。应当理解,本文所用的术语“一”和“一个”是指所列举的组分中的“一个或多个”。替代方案(例如,“或”)的使用应理解为意指替代方案中的一个、两个或其任何组合。如本文所用,术语“包括”、“具有”和“包含”同义使用,其术语和变体旨在解释为非限制性的。

[0069] 术语“基本上由……组成”将权利要求的范围限制于指定的材料或步骤,或者实质上不影响要求保护的发明的基本特征的那些材料或步骤。例如,蛋白结构域、区、模块(例如,结合结构域、铰链区、接头模块)或蛋白质(其可具有一个或多个结构域、区、模块)基本上由当结构域、区、模块或蛋白质的氨基酸序列包括延伸、缺失、突变或其组合时的特定氨基酸序列(例如,氨基或羧基末端或结构域之间的氨基酸)组成,所述延伸、缺失、突变组合起来,对结构域、区、模块或蛋白质的长度贡献至多20%(例如,至多15%、10%、8%、6%、5%、4%、3%、2%或1%),并没有实质性影响(即,没将活性降低50%以上,例如不超过40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%或1%)结构域、区、模块或蛋白质的活性(例如,结合蛋白的靶结合亲和力)。

[0070] 如本文所用,“异源的”或“非内源的”或“外源的”是指非原于宿主细胞或受试者的任何基因、蛋白质、化合物、分子或活性,或者是原于宿主或宿主细胞但是已改变或突变使得结构、活性或两者在原生和突变分子之间不同的任何基因、蛋白质、化合物、分子或活性。在某些实施例中,异源、非内源或外源分子(例如,受体、配体)可能对宿主细胞或受试者不是内源的,而是编码此类分子的核酸可以通过缀合、转化、转染、电穿孔等已经添加到宿主细胞中,其中添加的核酸分子可以整合到宿主细胞基因组中或可以作为染色体外遗传物质存在(例如,作为质粒或其他自我复制载体)。术语“同源的”或“同源”是指在宿主细胞、物种或菌株中发现,或衍生自宿主细胞、物种或菌株的分子或活性。例如,编码该分子的异源或外源分子或基因可以分别与编码该分子的天然宿主或宿主细胞分子或基因同源,但可以具有改变的结构、序列、表达水平或其组合。非内源分子可以来自相同物种、不同物种或其组合。

[0071] 如本文所用,术语“内源的”或“天然的”是指通常存在于宿主或宿主细胞中并且不具有工程化改变的基因、蛋白质、化合物、分子或活性。

[0072] 如本文所用,“结合结构域”(也称为“结合区”或“结合部分”)是指具有与靶分子

(例如CD200、CD47、CD19、CD20、CD22、ROR1、间皮素、PD-L1、PD-L2、PSMA、WT-1、细胞周期蛋白-A1)特异性和非共价缔合、联合或组合的能力的分子,例如肽、寡肽、多肽或蛋白质。结合结构域包括生物分子或其他感兴趣的靶或其结合蛋白的任何天然存在的、合成的、半合成的或重组产生的结合配偶体。在一些实施例中,结合结构域是抗原结合结构域,例如抗体或T细胞受体(TCR),或功能性结合结构域或其抗原结合片段。示例性结合结构域包括受体胞外域(例如CD200R、PD-1、CTLA4、BTLA、CD2、Fas中的那些)或其结合部分、配体(例如细胞因子如IL35、趋化因子)或其结合部分,单链抗体可变区(例如,结构域抗体、sFv、scFv、Fab)或其结合部分,T细胞受体(TCR)的抗原结合区,例如单链TCR(scTCR)或合成多肽,选择其特异性结合于生物分子的能力。

[0073] 如本文所用,“特异性结合”是指结合结构域或其融合蛋白与靶分子以亲和力或Ka的缔合或联合(即,特定结合相互作用的平衡结合常数,单位 $1/M$),亲和力或Ka等于或大于 $10^5 M^{-1}$,或结合于这样的靶分子,而不与样品中的任何其他分子或组分显著结合或联合。结合结构域(或其融合蛋白)可以分类为“高亲和力”结合结构域(或其融合蛋白)或“低亲和力”结合结构域(或其融合蛋白)。“高亲和力”结合结构域是指具有至少 $10^7 M^{-1}$ 、至少 $10^8 M^{-1}$ 、至少 $10^9 M^{-1}$ 、至少 $10^{10} M^{-1}$ 、至少 $10^{11} M^{-1}$ 、至少 $10^{12} M^{-1}$ 、或至少 $10^{13} M^{-1}$ 的Ka的那些结合结构域。“低亲和力”结合结构域是指具有高达 $10^7 M^{-1}$ 、高达 $10^6 M^{-1}$ 、高达 $10^5 M^{-1}$ 的Ka的那些结合结构域。或者,亲和力可以定义成单位为M(例如, $10^{-5} M$ 至 $10^{-13} M$)的特定结合相互作用的平衡解离常数(Kd)。在某些实施例中,结合结构域可具有“增强的亲和力”,其是指选择的或工程化的结合结构域,与靶抗原的结合比野生型(或亲本)结合结构域更强。例如,增强的亲和力可能是由于靶抗原的Ka(平衡结合常数)高于野生型结合结构域,或者是由于靶抗原的Kd(解离常数)小于野生型结合结构域的Kd(解离常数),或由于靶抗原的解离速率(Koff)小于野生型结合结构域的解离速率(Koff)。已知多种测定法用于鉴定特异性结合特定靶的本发明的结合结构域,以及确定结合结构域或融合蛋白亲和力,例如Western blot、ELISA和Biacore® analysis(也参见,例如,Scatchard et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 51:660, 1949; 和美国专利第5,283,173, 5,468,614号,或其等同物)。

[0074] 如本文所用,“融合蛋白”是指在单链中具有至少两个不同结构域的多肽,其中所述结构域不是天然一起存在于蛋白质中的。可以使用PCR、重组工程等来构建编码融合蛋白的核酸分子,或者可以使用蛋白质合成方法来制备这样的融合蛋白。融合蛋白可进一步包含其他组分(例如,共价结合),例如标签或生物活性分子。在某些实施例中,由宿主细胞(例如,T细胞)表达或产生的融合蛋白位于细胞表面,其中融合蛋白锚定至细胞膜,而融合蛋白的一部分位于细胞外(例如,含有结合结构域)并且融合蛋白的一部分位于细胞内(例如,包含信号传导结构域)。

[0075] 如本文所用,“疏水组分”是指具有在细胞膜中热力学稳定的三维结构的任何氨基酸序列,并且通常在约15个氨基酸至约30个氨基酸的长度范围内。疏水组分的结构可包括α螺旋、β桶、β折叠、β螺旋或其任何组合。在某些实施例中,疏水组分包括来自已知跨膜蛋白的“跨膜结构域”,其是可以插入或跨过细胞膜的跨膜蛋白的一部分。在进一步的实施例中,疏水组分或跨膜结构域可置于融合蛋白的细胞外和细胞内部分之间并与其连接。另外,可以将疏水组分改性以包含带电区或亲水性残基以促进分子间相互作用。

[0076] 如本文所用,“细胞内信号传导结构域”是分子的细胞内部分,例如用于本发明的

融合蛋白中的一个分子,当收到适当的信号时,可以直接或间接地促进应答,例如共刺激的、阳性的或在细胞中激活生物学或生理应答。在某些实施例中,细胞内信号传导结构域是蛋白质或蛋白质复合物的一部分,其在结合时会接收信号,或者其自身可以直接与靶分子结合以将信号传递至细胞中的其他组分。当细胞内信号传导结构域包含一个或多个信号传导结构域或基序,例如基于免疫受体酪氨酸的活化基序 (ITAM)、激酶域、共刺激域等时,其可以直接促进细胞应答。在其他实施例中,细胞内信号传导结构域将通过与一种或多种其他蛋白相缔合而间接地促进细胞应答,所述其他蛋白又直接促进细胞应答。在一些实施例中,细胞内信号传导结构域或其功能片段可以来自CD3 ϵ 、CD3 δ 、CD3 ζ 、CD25、CD27、CD28、CD40、CD47、CD79A、CD79B、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD150 (SLAMF1)、CD278 (ICOS)、CD357 (GITR)、CARD11、DAP10、DAP12、FcR α 、FcR β 、FcR γ 、Fyn、Lck、LAT、LRP、NKG2D、NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3、NOTCH4、ROR2、Ryk、S1p76、pT α 、TCR α 、TCR β 、TRIM、Zap70、PTCH2或其任何组合。在一些实施例中,细胞内信号传导结构域或其功能片段不包含CD3 ζ 。

[0077] 如本文所用,“多聚化结构域”是指直接或间接与另一多肽分子或区域优先相互作用或缔合的多肽分子或区域,其中多聚化结构域的相互作用基本上有助于或有效地促进多聚化(即,形成二聚体、三聚体、四聚体或更高阶的多聚体,其可以是同二聚体、异二聚体、同三聚体、异三聚体、同多聚体、异多聚体等)。例如,多聚可能归因于一种或多种类型的分子力,包括共价键(例如,二硫键或桥键)、离子键、金属键、静电相互作用、盐桥、偶极-偶极力、氢键、范德华力、疏水相互作用或它们的任意组合。多聚体在适当条件下(例如,生理条件,在适于表达、纯化或存储重组或工程蛋白的水溶液中,或在非变性或非还原性电泳条件下)是稳定的。示例性的多聚化结构域可包含一个或多个二硫键、锌指基序、亮氨酸拉链基序、螺旋-转角-螺旋、螺旋-环-螺旋等。

[0078] 在某些实施例中,融合蛋白可包含“接头”,其可提供间隔子功能以促进两个单链融合蛋白的相互作用或一个或多个结合结构域的定位,从而使得所得的多肽结构保持对靶分子的特异性结合亲和力或维持信号传导活性(例如,效应子结构域活性)或两者。示例性的接头包括Gly_xSer_y的1至约十个重复,其中x和y独立地为1至5的整数。

[0079] “连接氨基酸”或“连接氨基酸残基”是指融合蛋白的两个相邻基序、区或结构域之间的一个或多个(例如,约2-20个)氨基酸残基,例如在结合结构域和相邻的疏水组分之间,或在疏水组分的一端或两端上。连接氨基酸可以由融合蛋白的构建体设计产生(例如,在编码融合蛋白的核酸分子的构建过程中使用限制酶位点而产生的氨基酸残基)。在某些实施例中,连接氨基酸形成接头,例如具有1至约十个重复的Gly_xSer_y的那些,其中x和y独立地为1至5的整数。

[0080] 如本文所用,“免疫系统细胞”是指源自骨髓中的造血干细胞的免疫系统的任何细胞,其产生两个主要谱系,即髓系祖细胞(其产生髓样细胞,诸如单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、巨核细胞和粒细胞)和淋巴系祖细胞(其产生淋巴细胞,诸如T细胞、B细胞和自然杀伤(NK)细胞)。示例性免疫系统细胞包括CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、CD4-CD8-双阴性T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、调节性T细胞、自然杀伤细胞和树突细胞。巨噬细胞和树突细胞可称为“抗原呈递细胞”或“APC”,它们是专门的细胞,当与肽复合的APC表面的主要组织相容性复合体(MHC)受体与T细胞表面的TCR相互作用时,可以激活T细胞。

[0081] “T细胞”是在胸腺中成熟并产生T细胞受体(TCR)的免疫系统细胞。T细胞可以是幼

稚的(不暴露于抗原;与T_{CM}相比,CD62L、CCR7、CD28、CD3、CD127和CD45RA的表达增加,而CD45R0的表达减少)、记忆T细胞(T_M)(经历过抗原并且长期存活的细胞)和效应子细胞(经历过抗原,细胞毒性)。T_M可进一步分为中央记忆T细胞(与幼稚T细胞相比,TCD62L、CCR7、CD28、CD127、CD45R0和CD95的表达增加以及CD54RA的表达减少)和效应子记忆T细胞(T_{EM},与幼稚T细胞或T_{CM}相比,CD62L、CCR7、CD28、CD45RA的表达减少,而CD127的表达增加)的亚群。效应子T细胞(T_E)是指经历过抗原的CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞,与T_{CM}相比,其CD62L、CCR7、CD28的表达降低,并且对颗粒酶和穿孔素呈阳性。其他示例性T细胞包括调节性T细胞,例如CD4⁺CD25⁺(Foxp3⁺)调节性T细胞和Treg17细胞,以及Tr1、Th3、CD8⁺CD28-和Qa-1限制性T细胞。

[0082] “T细胞受体”(TCR)是指在T细胞(或T淋巴细胞)表面上发现的分子,其与CD3结合,通常负责识别与主要组织相容性复合物(MHC)分子结合的抗原。TCR在大多数T细胞中具有高度可变的α和β链(也分别称为TCRα和TCRβ)的二硫键连接的异二聚体。在一小亚群T细胞中,TCR由可变γ链和δ链的异二聚体组成(也分别称为TCR γ 和TCRδ)。TCR的每个链是免疫球蛋白超家族的成员,并且在C末端具有一个N末端免疫球蛋白可变结构域、一个免疫球蛋白恒定结构域、跨膜区和短细胞质尾(参见Janeway et al., Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 4:33, 1997)。如在本发明中使用的,TCR可以来自各种动物物种,包括人、小鼠、大鼠、猫、狗、山羊、马或其他哺乳动物。TCR可以是细胞结合的(即,具有跨膜区或结构域)或可溶形式。

[0083] 可互换使用并理解为也指人类对应的人类白细胞抗原(HLA分子)的“主要组织相容性复合物分子”(MHC分子),是指将肽抗原递送至细胞表面的糖蛋白。MHC I类分子是异二聚体,由跨膜α链(具有三个α结构域)和非共价结合的β2微球蛋白组成。MHC II类分子由两种跨膜糖蛋白α和β组成,两者都跨膜。每个链都有两个结构域。MHC(HLA)I类分子将源自胞质溶胶的肽递送至细胞表面,其中肽:MHC复合物(或肽:人类HLA)由CD8⁺T细胞识别。MHC(HLA)II类分子将起源于囊泡系统的肽递送至细胞表面,在那里它们由CD4⁺T细胞识别。MHC分子可以来自各种动物物种,包括人、小鼠、大鼠或其他哺乳动物。

[0084] “核酸分子”或“多核苷酸”可以是RNA或DNA的形式,其包括cDNA、基因组DNA和合成DNA。核酸分子可以是双链或单链的,并且如果是单链的,可以是编码链或非编码链(反义链)。编码分子可以具有与本领域已知的编码序列相同的编码序列,或者可以具有不同的编码序列,由于遗传密码的冗余或简并或者通过剪接,编码分子可以编码相同的多肽。

[0085] 还考虑了本公开内容的核酸分子或多核苷酸的变体。变体多核苷酸与本文所述的限定序列的多核苷酸中的一种具有至少80%、优选至少85%、90%、95%、99%或99.9%的同一性,或与限定序列中的那些多核苷酸之一在严格的杂交条件下(大约65-68°C的0.015M氯化钠、0.0015M的柠檬酸钠,或在大约42°C的0.015M氯化钠、0.0015M柠檬酸钠和50%甲酰胺)进行杂交。多核苷酸变体保留了编码具有本文所述功能的结合结构域或其融合蛋白的能力。

[0086] 术语“严格”用于指本领域通常理解为严格的条件。杂交严格性主要由温度、离子强度和变性剂(如甲酰胺)的浓度决定。杂交和洗涤的严格条件的实例是在约65-68°C的0.015M氯化钠、0.0015M柠檬酸钠,或在约42°C的0.015M氯化钠、0.0015M柠檬酸钠和50%甲酰胺(参见Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold

Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)。

[0087] 也可以使用更严格的条件(例如更高的温度、更低的离子强度、更高的甲酰胺或其他变性剂);但是,杂交率会受到影响。在涉及脱氧寡核苷酸杂交的情况下,其他示例性严格杂交条件包括6x SSC, 0.05% 焦磷酸钠中,在37°C下(对于14个碱基的寡核苷酸)、48°C下(对于17个碱基的寡核苷酸)、55°C下(对于20个碱基的寡核苷酸)和60°C下(对于23个碱基的寡核苷酸)洗涤。

[0088] “载体”是能够转运另一种核酸的核酸分子。载体可以是例如质粒、粘粒、病毒或噬菌体。“表达载体”是这样的载体:当存在于适当环境中时能够指导由该载体携带的一个或多个基因编码的蛋白质的表达。

[0089] “逆转录病毒”是具有RNA基因组的病毒。“ γ 逆转录病毒(Gammaretrovirus)”是指逆转录病毒科的一个属。示例性的 γ 逆转录病毒包括小鼠干细胞病毒、鼠白血病病毒、猫白血病病毒、猫肉瘤病毒和禽网状内皮细胞增多症病毒。

[0090] “慢病毒”是指能够感染分裂和非分裂细胞的逆转录病毒属。慢病毒的几个例子包括HIV(人类免疫缺陷病毒:包括HIV 1型和HIV 2型)、马传染性贫血病毒、猫免疫缺陷病毒(FIV)、牛免疫缺陷病毒(BIV)、和猿猴免疫缺陷病毒(SIV)。

[0091] 在两个或两个以上多肽或核酸分子序列的上下文中,术语“相同”或“同一性百分比”是指,当进行比较并在比较窗上或指定区上比对到最大对应性,如使用本领域已知的方法(例如序列比较算法)、通过手动比对或通过目视检查,两个或多个序列或亚序列在指定区上相同或具有相同的指定百分比的氨基酸残基或核苷酸(例如60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性)。例如,适合于确定百分比序列同一性和序列相似性的优选算法是BLAST和BLAST 2.0算法,其分别在Altschul et al. (1977) Nucleic Acids Res. 25:3389 and Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403中描述。

[0092] “治疗”或“治疗”或“改善”是指受试者的疾病、失调或病症(例如,人或非人哺乳动物,诸如灵长类动物、马、狗、小鼠、大鼠)的医学管理。通常,以足够量给予包含表达本公开的融合蛋白的宿主细胞以及可选的佐剂或辅助治疗的适当剂量或治疗方案,以引发治疗或预防性益处。治疗或预防/防备性益处包括改善临床结果、减轻或缓解与疾病相关的症状、降低症状发生率、提高生活质量、更长的无病状态、减轻疾病程度、稳定疾病状态、延迟疾病进展、缓解、存活、延长存活期、或其任何组合。

[0093] 表达本公开内容的融合蛋白的细胞或融合蛋白的“治疗有效量”或“有效量”(例如,CD200R-CD28、SIRP α -CD28、CD200R-41BB、SIRP α -41BB、CD200R-CD28-41BB、SIRP α -CD28-4-1BB或其他此类融合蛋白)在上下文所治疗的疾病或病症中是指,以具有统计学意义的方式(例如,减少感染、减小肿瘤大小、抑制癌症生长等),足以减轻所治疗疾病的一种或多种症状的融合蛋白的量或细胞数量。

[0094] 免疫调节融合蛋白(IFP)

[0095] 在某些方面,本公开提供了融合蛋白,其包含细胞外组分、疏水组分和细胞内组分。在一些实施例中,细胞外组分包括结合结构域,例如特异性结合靶的结合结构域。在一些实施例中,结合结构域来自通常在例如其自然环境中当结合至其结合配偶体或配体或受体(例如免疫抑制受体或检查点分子)时能够递送负性或抑制信号的分子,或靶是抑制性受

体或配体或检查点分子或其他抑制性配体。在一些实施例中，细胞内组分包括信号传导结构域，例如共刺激信号传导结构域或通常能够向免疫细胞传递共刺激信号或正信号的分子的信号传导结构域。因此，在一些方面，融合蛋白能够响应于在自然环境中会导致抑制信号的结合事件而递送阳性或共刺激信号。

[0096] 在一些实施例中，融合蛋白使得达到特定距离。例如，在一些实施例中，融合蛋白::靶复合物(例如包括融合蛋白和靶之间通过特异性结合形成的复合物的细胞外部分的复合物)具有特定长度或跨特定距离，例如，达到在免疫突触中膜之间的距离、或TCR和MHC分子之间的同源复合物的胞外部分所跨越的距离的距离，例如，在TCR对其进行特异性识别之后，或天然分子与其天然结合配偶体之间形成的复合物的细胞外部分所跨越的距离。在一些实施例中，当在免疫细胞例如T细胞中表达或进入免疫突触时，该距离或长度足以促进融合蛋白与抗原受体或其他信号传导分子的共定位。

[0097] 作为背景，免疫突触是细胞之间的界面，可以在多种细胞之间形成，例如在免疫细胞之间形成(Rossy et al., *Frontiers in Immunol.* 3:1-12, 2012; Hatherley et al., *Structure* 21:820, 2013)。例如，在T细胞与抗原呈递细胞(APC)接触的情况下，可以通过将TCR(位于T细胞表面)与HLA肽(MHC肽结合为非人类肽)复合物(例如在APC的表面上发现；HLA I类分子可以在所有有核细胞的表面上发现，而HLA II类分子可以在所有细胞类型上有条件表达，但通常在APC上发现)结合形成免疫突触。另外，免疫突触可组织成超分子激活簇(SMAC)，其可影响淋巴细胞激活、抗原-HLA(或抗原-MHC)复合物给淋巴细胞的直接呈递、以及细胞之间的细胞因子或裂解颗粒的直接分泌。SMAC可以包括排列成同心圆的三个结构：包含大量TCR以及共同刺激和抑制性分子的中央区(cSMAC)、LFA-1和踝蛋白聚集的外围区(pSMAC)、和富含CD43和CD45分子的远端区(dSMAC)。在某些实施例中，免疫突触将跨越约10nm至约15nm。例如，在免疫突触中发现的蛋白质相互作用，例如TCR::HLA肽相互作用或融合蛋白-靶相互作用，通常在膜之间跨越约14nm。在某些实施例中，免疫突触中的SMAC的宽度不超过15nm。

[0098] 在一些实施例中，融合蛋白::靶复合物的细胞外跨度使得其可以定位于免疫突触的特定区室。一些认为位于免疫突触的各个区室的复合物就其细胞外跨度的长度而言，具有很好的特征。例如，MHC-TCR复合物被认为具有约10-15nm的细胞外跨度，而更多基于整合素的复合物被认为具有约40nm量级的细胞外跨度(Alakoskela et al., *Biophys J* 100: 2865, 2011)。另外的示例性复合物包括CD2-CD48复合物，其认为具有约12.8nm的细胞外跨度(Milstein等人, *J Biol Chem* 283:34414, 2008)。另外，认为定位于cSMAC的示例性配体结合分子包括TCR和MHC复合物，CD2、CD4、CD8、CD28及其配体(Dustin et al., *CSH Perspectives in Biology* 2:a002311, 2010)；因此，预期这些与它们的天然配体复合的分子具有合适的大小以定位于cSMAC。

[0099] 在一些方面，可以确定或通过已知方法建模特定构建体或其工程改造的细胞外部分(例如融合蛋白的细胞外部分，或前述任一项的复合物(例如与其结合配偶体复合))的长度或距离或近似长度或距离。在某些示例性模型中，可以使用输入的氨基酸或核酸序列来估算蛋白的三级结构、结合结构域和其他特征。蛋白的三级结构可用于估算细胞外部分的大小、灵活性和可用于确定蛋白或其复合物的细胞外部分的近似长度的其他特征。通常，已知用于建模或估算蛋白的细胞外部分的长度的方法。例如，molbiol-tools.ca和Swiss-

Model包含多个可用于预测蛋白结构的工具(另请参见Schwede,T.,Structure 21:1531,2013)。

[0100] 在某些实施例中,与靶复合、缔合或相互作用的本公开的融合蛋白能够位于免疫突触内。在一些实施例中,融合蛋白::靶复合物的细胞外部分跨越免疫突触。在其他实施例中,融合蛋白::靶复合物位于超分子激活簇(SMAC),例如cSMAC中。在进一步的实施例中,融合蛋白::靶复合物的细胞外部分跨越由TCR::HLA-肽相互作用的细胞外部分限定的免疫突触。在其他实施例中,融合蛋白::靶复合物的细胞外部分的长度为约12nm至约15nm,或为约14nm。

[0101] 可以通过本领域已知的任何方法来测量在免疫突触中相互作用的细胞的细胞膜之间的距离。例如,在特定实施例中,可以通过亚衍射分辨率方法或电子显微镜来测量距离(James and Vale,Nature 487:64-69,2012)。

[0102] 在特定的实施例中,本文公开的融合蛋白包含从细胞膜延伸小于40nm的细胞外部分。在一些的实施例中,本文公开的融合蛋白包含从细胞膜延伸小于30nm的细胞外部分。在一些的实施例中,本文公开的融合蛋白包含从细胞膜延伸小于20nm的细胞外部分。在一些的实施例中,本文公开的融合蛋白包含从细胞膜延伸小于15nm的细胞外部分。

[0103] 在一些实施例中,与允许进入突触或与抗原受体共定位或模拟天然蛋白质中存在的长度或距离的细胞膜之间的距离相比,所提供的融合蛋白提供了具有细胞外长度或空间距离的优点。在一些实施例中,当融合蛋白的细胞外部分包括来自另外分子的结构域,所述另外分子来自获得结合结构域的不同分子时,包含结合结构域的细胞外组分的长度减少,例如与天然分子的细胞外区相比截短,以提供类似的长度或距离。在一些实施例中,本文所述的融合蛋白包含细胞外组分,所述细胞外组分包含细胞表面受体的细胞外结构域和第二结构域(例如,第二细胞表面受体的接头或细胞外结构域)。在一些这样的实施例中,为了维持当与靶分子复合时能够留在免疫突触内或跨越免疫突触的细胞外组分,可以将细胞外组分的一个或多个结构域截短。

[0104] 在某些疾病(例如癌症)中,由于共刺激信号和抑制信号之间的不平衡,由T细胞受体(TCR)识别抗原引起的T细胞反应的幅度和质量可能会失调(例如降低),这会导致免疫抵抗。本公开的某些融合蛋白的一个优点是可以将第一信号转化为性质不同的第二信号。例如,在一些实施例中,融合蛋白使得负性或抑制信号可以有效地转化为阳性或共刺激信号,从而减轻或最小化与疾病例如癌症相关的免疫抵抗。例如,在与靶的结合中,如果被其天然结合配偶体结合,将导致抑制或递送负信号,在一些实施例中,本文提供的融合蛋白能够代替地递送阳性,例如,共刺激信号,传递给将其表达的细胞,例如T细胞。在某些实施例中,本发明的融合蛋白包含与负信号相关的细胞外组分和与正信号相关的细胞内组分。在T细胞表面发现的一种示例性受体,细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4(CTLA4或CD152),当与APC上发现的配体CD80或CD86之一结合时,可以接收抑制信号。CTLA4通过抵消T细胞共刺激受体CD28来调节早期T细胞活化的幅度(参见Rudd et al., Immunol. Rev. 229:12,2009)。在T细胞表面发现的另一种示例性受体,程序性细胞死亡蛋白1(PD-1或CD279),当与APC上发现的其配体PD-L1(B7-H1、CD274)或PD-L2(B7-DC、CD73)之一结合时,可以接收抑制信号。PD-1限制了炎症期间外周组织中T细胞的活性,并使自身免疫减至最小(参见Keir et al., Annu. Rev. Immunol. 26:677,2008)。包含与负信号相关的细胞外组分(例如,CTLA4或PD-1)

和与正信号相关的细胞内组分(例如,CD28、CD137)的本公开的代表性融合蛋白包括CTLA4-CD28融合蛋白、CTLA4-CD137融合蛋白、CTLA4-CD28-CD137融合蛋白,PD1-CD28融合蛋白、PD1-CD137融合蛋白或PD1-CD28-CD137融合蛋白。

[0105] 本公开的融合蛋白可以阻断或减少免疫细胞接收的抑制信号的数量。例如,在一些实施例中,本文公开的融合蛋白将抑制信号转化为正信号,从而减少了免疫细胞接收的抑制信号的总数或将通常的负性或抑制信号转化为正信号。在其他实施例中,本文公开的融合蛋白阻断野生型受体的信号传导。例如,显性负性融合蛋白包括在本公开的范围内。在一些实施例中,本文公开的融合蛋白通过与野生型受体形成寡聚物而结合至野生型受体并阻断野生型受体的信号传导。

[0106] 本公开的某些融合蛋白的又一个优点是细胞可以表达不止一个这样的融合蛋白,从而提供多种刺激信号。已经观察到具有多个共刺激结构域的重组TCR可能不会产生足够的共刺激信号。共表达多种免疫调节融合蛋白,尤其是那些能够留在免疫突触中的那些融合蛋白,可以提供T细胞所必需的共刺激信号传导,以避免无反应和增殖。

[0107] 在一些实施例中,本公开的融合蛋白相对于TCR或嵌合抗原受体(CAR)或其他抗原受体以反式起作用。在一些实施例中,本文公开的融合蛋白在免疫突触外部起作用。

[0108] 在另一方面,本公开的融合蛋白允许通过用肿瘤细胞再刺激而富集转导的T细胞,无需分选,所述肿瘤细胞表达结合至融合蛋白的配体。

[0109] 在一个示例性的实施例中,提供了融合蛋白,其包含(a)CD200R的细胞外部分、(b)CD28的跨膜结构域、和(c)CD28的细胞内信号传导结构域。在一些实施例中,细胞外部分还包含从CD28跨膜结构域延伸的CD28的细胞外部分。在进一步的实施例中,CD200R的细胞外部分包含从CD200R的N末端的至少约231个氨基酸。在其他实施例中,融合蛋白还包含CD137(4-1BB)的细胞内信号传导结构域。

[0110] 在另一个示例性的实施例中,提供了融合蛋白,其包含(a)SIRP α 的细胞外部分、(b)CD28的跨膜结构域、和(c)CD28的细胞内信号传导结构域。在一些实施例中,融合蛋白还包含从CD28跨膜结构域延伸的CD28的细胞外部分。在进一步的实施例中,SIRP α 的细胞外部分包含来自SIRP α 的N末端的至少约361个氨基酸。在其他实施例中,融合蛋白还包含CD137(4-1BB)的细胞内信号传导结构域。

[0111] 在另一个示例性的实施例中,提供了融合蛋白,其包含(a)CD95(Fas)的细胞外部分、(b)CD137(4-1BB)的跨膜结构域、和(c)CD137(4-1BB)的细胞内信号传导结构域。

[0112] 在另一个示例性的实施例中,提供了融合蛋白,其包含(a)CD95(Fas)的细胞外部分、(b)CD28的跨膜结构域、和(c)CD137(4-1BB)的细胞内信号传导结构域。在一些实施例中,融合蛋白还包含从CD28跨膜结构域延伸的CD28的细胞外部分。

[0113] 在另一个示例性实施例中,本公开提供了融合蛋白,其包含(a)包括特异性结合靶的结合结构域的细胞外组分、(b)包括细胞内信号传导结构域的细胞内组分、和(c)连接细胞外和细胞内组分的疏水组分,其中通过融合蛋白与靶(融合蛋白::靶复合物)的特异性结合形成的复合物的细胞外部分具有以下的大小或跨越以下的距离:(i)多达免疫突触的两个细胞膜之间的距离,(ii)多达与复合物的细胞外部分跨越的距离大约或基本相同的距离,所述复合物在T细胞受体(TCR)和通过TCR特异性结合的MHC-肽复合物之间,(iii)多达与复合物的细胞外部分跨越的距离大约或基本相同的距离,所述复合物在包含结合结构域

的天然分子与其同源结合配偶体之间, (iii) 小于或多达大约40nm、25nm、20nm, 15nm或14nm; 或 (iv) 其任何组合; 其中细胞外组分是或包含CD95 (Fas) 胞外域或其功能片段, 并且细胞内组分是或包含CD137 (4-1BB) 细胞内信号传导结构域或其功能部分。

[0114] 在另一个示例性实施例中, 本公开提供了融合蛋白, 其包含 (a) 包括特异性结合靶的结合结构域的细胞外组分、(b) 包括细胞内信号传导结构域的细胞内组分、和 (c) 连接细胞外和细胞内组分的疏水组分, 其中结合结构域与抑制性分子结合结构域有或具有至少95%的同一性, 而细胞内信号传导结构域与共刺激或刺激分子结合结构域有或包含至少95%的同一性, 并且其中抑制性分子是或包含CD95 (Fas) 胞外域或其功能片段, 并且该共刺激或刺激分子是或包含来自CD137 (4-1BB) 的细胞内信号传导结构域或其功能部分。

[0115] 在另一个示例性实施例中, 本公开内容提供融合蛋白, 其包含: (a) 细胞外组分, 其包含由SEQ ID NO.: 71所示的核酸分子编码的氨基酸序列、(b) 疏水组分, 其包含由SEQ ID NO.: 197所示的核酸分子编码的氨基酸序列、和 (c) 细胞内组分, 其包含由SEQ ID NO.: 13所示的核酸分子编码的氨基酸序列。

[0116] 在另一个示例性实施例中, 本公开内容提供融合蛋白, 其包含: (a) 细胞外组分, 其包含具有SEQ ID NO.: 72所示的氨基酸序列的结合结构域、(b) 疏水组分, 其包含SEQ ID NO.: 198所示的氨基酸序列、和 (c) 细胞内组分, 其包含SEQ ID NO.: 36所示的氨基酸序列。

[0117] 本文进一步详细描述本公开的融合蛋白的组成部分。

[0118] 细胞外组分

[0119] 如本文所述, 本发明的融合蛋白通常包含细胞外组分, 所述细胞外组分包含特异性结合靶的结合结构域。融合蛋白结合结构域与靶的结合可 (1) 阻断靶与另一种分子的相互作用 (例如, 阻断或干扰受体-配体相互作用), (2) 干扰、减少或消除靶的某些功能 (例如抑制信号传导) (3) 在结合靶时诱导那些通常不被诱导的某些生物学途径 (例如, 将抑制或负信号转换为刺激或正信号) 例如在表达融合蛋白所在的细胞中, 或其任何组合。在一些实施例中, 本文所述的融合蛋白包含细胞外部分, 其中细胞外部分包含与负信号相关的蛋白的细胞外部分。

[0120] 本公开的示例性结合结构域可以是细胞表面受体的胞外域或其结合部分、细胞表面配体的胞外域、细胞因子 (例如IL35)、趋化因子、基于抗体的结合结构域、基于TCR的结合结构域、非常规结合结构域或其任何组合。例如, 包括CD200R、SIRP α 、CD279 (PD-1)、CD2、CD95 (Fas)、CTLA4 (CD152)、CD223 (LAG3)、CD272 (BTLA)、A2aR、KIR、TIM3、CD300或LPA5的胞外域的结合结构域在本公开的范围内。如本文所用, 来自细胞表面受体或配体的“胞外域”包括完整的细胞外结构域或其功能 (结合) 片段。在某些实施例中, 胞外域包含突变的细胞外结构域或其功能 (结合) 片段, 与野生型或参考蛋白相比, 对靶具有更高的亲和力。在某些实施例中, 胞外域包含可变样域或可变样域的CDR。

[0121] 在一些实施例中, 融合蛋白包含含有CD200结合结构域的细胞外组分, 例如CD200R胞外域或其CD200结合部分。作为背景, CD200R是与免疫球蛋白超家族的1型膜蛋白CD200结合的受体 (Tonks et al., Leukemia 21:566-568, 2007)。据报道, CD200在各种恶性肿瘤, 包括白血病、多发性骨髓瘤和各种实体瘤 (例如, 黑素瘤、乳腺癌和鳞状细胞癌) 中上调。事实上, 高水平的CD200表达与急性骨髓性白血病 (AML) 的预后不良有关, 并且CD200R信号已显示对T细胞具有抑制作用 (Coles et al., Leukemia 26:2148-2151, 2012)。在某些实施例

中,CD200R胞外域包括CD200R蛋白的全长细胞外部分、CD200R蛋白的全长成熟细胞外部分、CD200R蛋白的细胞外部分的结合片段或带有CD200R跨膜结构域的一部分的CD200R蛋白细胞外部分的结合片段、或其任何组合。

[0122] 在进一步的实施例中,CD200R由SEQ ID NO.:2所示的核酸分子编码。在某些其他实施例中,CD200R胞外域包含从CD200R的N末端的至少200个氨基酸。在一些其他实施例中,CD200R由SEQ ID NO.:11所示的核酸分子编码。在另外一些实施例中,CD200R的细胞外部分包含从CD200R的N末端的至少约180、190、200、210、220、230、231、234或243个氨基酸。例如,CD200R由SEQ ID NO.:8所示的核酸分子编码。在任何前述实施例中,在本公开的融合蛋白中使用的CD200R、CD200R胞外域或其任何CD200R片段是人CD200R。在进一步的实施例中,提供了CD200R胞外域,其与具有由SEQ ID NO.:2所示的核酸分子编码的氨基酸序列的分子的胞外域至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或至少100%相同。

[0123] 在一些实施例中,CD200R包含如SEQ ID NO.:25所示的氨基酸序列。在一些实施例中,CD200R包含如SEQ ID NO.:34所示的氨基酸序列。在某些实施例中,CD200R包含如SEQ ID NO.:31所示的氨基酸序列。在任何前述实施例中,在本公开的融合蛋白中使用的CD200R、CD200R胞外域或其任何CD200R片段是人CD200R。在进一步的实施例中,提供了CD200R胞外域,其与具有如SEQ ID NO.:25所示的氨基酸序列的分子的胞外域至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或至少100%相同。

[0124] 在一些实施例中,融合蛋白包含含有CD47结合结构域的细胞外组分,例如SIRP α 胞外域或其结合部分。作为背景,CD47是一种广泛表达的跨膜蛋白,在保护细胞免于吞噬作用中起作用(Willingham et al., PNAS109:6662-6667, 2012)。CD47与SIRP α 的结合会启动SIRP α 信号传导,从而抑制巨噬细胞的吞噬作用。因此,SIRP α 的下调将导致巨噬细胞的吞噬作用增加。SIRP α 在多种人类肿瘤类型中表达,包括AML、慢性粒细胞性白血病(CML)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、多发性骨髓瘤(MM)、肺、膀胱和其他实体瘤。在某些实施例中,SIRP α 胞外域包括SIRP α 蛋白的全长细胞外部分、SIRP α 蛋白的全长成熟细胞外部分、SIRP α 蛋白的细胞外部分的结合片段、和带有SIRP α 跨膜结构域的一部分的SIRP α 蛋白细胞外部分的结合片段、或其任何组合。

[0125] 在进一步的实施例中,SIRP α 胞外域或其结合部分由SEQ ID NO.:17所示的核酸分子编码。在某些实施例中,SIRP α 胞外域包含从SIRP α 的N末端的至少约300、310、320、330、340、350、360、361、370、373或更多个氨基酸。在一些其他实施例中,SIRP α 由SEQ ID NO.:21所示的核酸分子编码。在任何前述实施例中,在本公开的融合蛋白中使用的SIRP α 、SIRP α 胞外域或其任何SIRP α 片段是人SIRP α 。在进一步的实施例中,提供了SIRP α 胞外域,其与具有由SEQ ID NO.:17所示的核酸分子编码的氨基酸序列的分子的胞外域至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或至少100%相同。

[0126] 在进一步的实施例中,SIRP α 胞外域包含SEQ ID NO.:40所示的氨基酸序列。在一些实施例中,SIRP α 包含SEQ ID NO.:44所示的氨基酸序列。在任何前述实施例中,在本公开的融合蛋白中使用的SIRP α 、SIRP α 胞外域或其任何SIRP α 片段是人SIRP α 。在进一步的实施

例中,提供了SIRP α 胞外域,其与具有SEQ ID NO.:40所示的氨基酸序列的分子的胞外域至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或至少100%相同。

[0127] 在一些实施例中,融合蛋白包含细胞外组分,所述细胞外组分包含结合于PD-L1、PD-L2或两者的结合结构域。在一些实施例中,融合蛋白包含细胞外组分,所述细胞外组分包含PD-1胞外域或其配体结合部分。在某些实施例中,PD-1胞外域包括PD-1蛋白的全长细胞外部分、PD-1蛋白的全长成熟细胞外部分、PD-1蛋白的细胞外部分的结合片段、或带有PD-1跨膜结构域的一部分的PD-1蛋白细胞外部分的结合片段、或其任何组合。在某些实施例中,PD-1胞外域包含从PD-1的N末端的至少80、90、100、110、120、125、130、132、135、137、140、149、150、155、158、160或170个氨基酸。例如,在某些实施例中,PD-1胞外域由SEQ ID NO.:91、93或95所示的核酸分子编码。在进一步的实施例中,PD-1胞外域包含至少从约90个氨基酸至至少约130个氨基酸,如SEQ ID NO.:60所示的。在更进一步的实施例中,PD-1胞外域包含从PD-1胞外域N末端的170个氨基酸序列,如SEQ ID NO.:90所示。在一些实施例中,PD-1由SEQ ID NO.:89所示的核酸分子编码。在任何前述实施例中,在本公开的融合蛋白中使用的PD-1、PD-1胞外域或其任何PD-1片段是人PD-1。在进一步的实施例中,提供了PD-1胞外域,其与具有SEQ ID NO.:60所示的氨基酸序列的分子的胞外域至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或至少100%相同。在进一步的实施例中,提供了PD-1胞外域,其与具有如SEQ ID NO.:90所示的氨基酸序列的分子的胞外域至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或至少100%相同。在进一步的实施例中,提供了PD-1胞外域,其与具有由SEQ ID NO.:89所示的核酸分子编码的氨基酸序列的分子的胞外域至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或至少100%相同。

[0128] 在某些实施例中,PD-1胞外域包含SEQ ID NO.:92、94或96所示的氨基酸序列。在进一步的实施例中,提供了PD-1胞外域,其与具有SEQ ID NO.:92、94或96所示的氨基酸序列的分子的胞外域至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或至少100%相同。在任何前述实施例中,在本公开的融合蛋白中使用的PD-1、PD-1胞外域或其任何PD-1片段是人PD-1。

[0129] 在一些实施例中,融合蛋白包含含有CD2胞外域的细胞外组分。在某些实施例中,CD2由SEQ ID NO.:61所示的核酸分子编码。在某些实施例中,CD2胞外域包括CD2蛋白的全长细胞外部分、CD2蛋白的全长成熟细胞外部分、CD2蛋白的细胞外部分的结合片段、或带有CD2跨膜结构域的一部分的CD2蛋白细胞外部分的结合片段、或其任何组合。在任何前述实施例中,在本公开的融合蛋白中使用的CD2、CD2胞外域或其任何CD2片段是人CD2。在进一步的实施例中,提供了CD2胞外域,其与具有GenBank登录号NM_001767.3所示的核酸分子编码的氨基酸序列的分子的胞外域至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或至少100%相同。在进一步的实施例中,提供了GenBank登录号NM_001767.3胞外域,其与具有由

SEQ ID NO.:61所示的核酸分子编码的氨基酸序列的分子的胞外域至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或至少100%相同。

[0130] 在一些实施例中,CD2胞外域包含SEQ ID NO.:62所示的氨基酸序列。在进一步的实施例中,提供了CD2胞外域,其与具有SEQ ID NO.:62所示的氨基酸序列的分子的胞外域至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或至少100%相同。在任何前述实施例中,在本公开的融合蛋白中使用的CD2、CD2胞外域或其任何CD2片段是人CD2。

[0131] 在一些实施例中,融合蛋白包含细胞外组分,所述细胞外组分包含结合于FasL的结合结构域。在一些实施例中,融合蛋白包含含有Fas (CD95) 胞外域的细胞外组分。Fas在肿瘤相关的血管上表达,并通过诱导细胞死亡来阻止CD8细胞浸润。FasL在AML、胰腺癌、卵巢癌和其他癌症中表达(Kornmann et al., Annals of Surgery 231:368-379, 2000; Contini et al., Leukemia 21:253-260, 2007; Motz et al., Nature Medicine 20:607-615, 2014)。另外,已经报道了许多化学疗法引起肿瘤上FasL的上调,并且FasL也可以响应于CD44的参与在T细胞上上调。在某些实施例中,Fas胞外域包括Fas蛋白的全长细胞外部分、Fas蛋白的全长成熟细胞外部分、Fas蛋白的细胞外部分的结合片段、或带有Fas跨膜结构域的一部分的Fas蛋白细胞外部分的结合片段、或其任何组合。在一些实施例中,Fas胞外域由SEQ ID NO.:71所示的核酸分子编码。在另外一些实施例中,Fas胞外域包含从Fas的N末端的至少150、160、161、166、170或173个氨基酸。例如,在某些实施例中,Fas由SEQ ID NO.:73所示的核酸分子编码。在某些其他实施例中,Fas由SEQ ID NO.:75所示的核酸分子编码。在任何前述实施例中,在本公开的融合蛋白中使用的Fas、Fas胞外域或其任何Fas片段是人Fas。在进一步的实施例中,提供了Fas胞外域,其与具有GenBank登录号NM_000043.4所示的核酸分子编码的氨基酸序列的分子的胞外域至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或至少100%相同。在进一步的实施例中,提供了Fas胞外域,其与具有由SEQ ID NO.:71所示的核酸分子编码的氨基酸序列的分子的胞外域至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或至少100%相同。

[0132] 在一些实施例中,Fas胞外域包含SEQ ID NO.:72所示的氨基酸序列。在一些实施例中,Fas胞外域包含SEQ ID NO.:74所示的氨基酸序列。在某些实施例中,Fas胞外域包含SEQ ID NO.:76所示的氨基酸序列。在任何前述实施例中,在本公开的融合蛋白中使用的Fas、Fas胞外域或其任何Fas片段是人Fas。在进一步的实施例中,提供了Fas胞外域,其与具有SEQ ID NO.:72所示的氨基酸序列的分子的胞外域至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或至少100%相同。

[0133] 在一些实施例中,融合蛋白包含含有LAG3 (CD223) 胞外域的细胞外组分。在某些实施例中,LAG3胞外域包含LAG3蛋白的全长细胞外部分、LAG3蛋白的全长成熟细胞外部分、LAG3蛋白的细胞外部分的结合片段、或带有LAG3跨膜结构域的一部分的LAG3蛋白细胞外部分的结合片段、或其任何组合。例如,在一些实施例中,LAG3胞外域包含从LAG3的N末端的大

约420、416、415、413或410个氨基酸。在任何前述实施例中，在本公开的融合蛋白中使用的LAG3、LAG3胞外域或其任何LAG3片段是人LAG3。在进一步的实施例中，提供了LAG3胞外域，其与具有GenBank登录号NM_002286.5所示的核酸分子编码的氨基酸序列的分子的胞外域至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或至少100%相同。

[0134] 在进一步的实施例中，LAG3由SEQ ID NO.:153所示的核酸分子编码。在某些其它实施例中，LAG3胞外域包含从LAG3的N末端的至少430、435、438、440、445或450个氨基酸。例如，在某些实施例中，LAG3由SEQ ID NO.:161所示的核酸分子编码。在任何前述实施例中，在本公开的融合蛋白中使用的LAG3、LAG3胞外域或其任何LAG3片段是人LAG3。在进一步的实施例中，提供了LAG3胞外域，其与具有由SEQ ID NO.:153所示的核酸分子编码的氨基酸序列的分子的胞外域至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或至少100%相同。

[0135] 在一些实施例中，LAG3包含SEQ ID NO.:154所示的氨基酸序列。在一些实施例中，LAG3包含SEQ ID NO.:162所示的氨基酸序列。在任何前述实施例中，在本公开的融合蛋白中使用的LAG3、LAG3胞外域或其任何LAG3片段是人LAG3。在进一步的实施例中，提供了LAG3胞外域，其与具有SEQ ID NO.:154所示的氨基酸序列的分子的胞外域至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或至少100%相同。

[0136] 在一些实施例中，融合蛋白包含含有TIM3胞外域的细胞外组分。在某些实施例中，TIM3胞外域包含TIM3蛋白的全长细胞外部分、TIM3蛋白的全长成熟细胞外部分、TIM3蛋白的细胞外部分的结合片段、或带有TIM3跨膜结构域的一部分的TIM3蛋白细胞外部分的结合片段、或其任何组合。在任何前述实施例中，在本公开的融合蛋白中使用的TIM3、TIM3胞外域或其任何TIM3片段是人TIM3。在进一步的实施例中，提供了TIM3胞外域，其与具有GenBank登录号NM_032782.4所示的核酸分子编码的氨基酸序列的分子的胞外域至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或至少100%相同。

[0137] 在进一步的实施例中，TIM3由SEQ ID NO.:167所示的核酸分子编码。在某些其它实施例中，TIM3胞外域包含从TIM3的N末端的至少180、185、190、195或200个氨基酸。例如，在某些实施例中，TIM3由SEQ ID NO.:177所示的核酸分子编码。在任何前述实施例中，在本公开的融合蛋白中使用的TIM3、TIM3胞外域或其任何TIM3片段是人TIM3。在进一步的实施例中，提供了TIM3胞外域，其与具有由SEQ ID NO.:167所示的核酸分子编码的氨基酸序列的分子的胞外域至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或至少100%相同。

[0138] 在一些实施例中，TIM3包含SEQ ID NO.:168所示的氨基酸序列。在一些实施例中，TIM3包含SEQ ID NO.:178所示的氨基酸序列。在任何前述实施例中，在本公开的融合蛋白中使用的TIM3、TIM3胞外域或其任何TIM3片段是人TIM3。在进一步的实施例中，提供了TIM3胞外域，其与具有SEQ ID NO.:168所示的氨基酸序列的分子的胞外域至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或至少100%相同。

[0139] 结合结构域可以是特异性结合感兴趣的靶的任何肽。结合结构域的来源包括来自不同物种的抗体可变区(其可以是抗体、sFv、scFv、Fab、基于scFv的grabobody或可溶性VH结构域或结构域抗体的形式),包括人、啮齿动物、禽类或羊。结合结构域的其他来源包括来自其他物种的抗体的可变区,例如骆驼科动物(来自骆驼、单峰骆驼或美洲驼;Ghahroudi et al., FEBS Lett. 414:521, 1997; Vincke et al., J. Biol. Chem. 284:3273, 2009; Hamers-Casterman et al., Nature 363:446, 1993和Nguyen et al., J. Mol. Biol. 275:413, 1998)、护士鲨(Roux et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 95:11804, 1998)、斑点鲶鱼(Nguyen et al., Immunogen. 54:39, 2002),或七鳃鳗(Herrin et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 105:2040, 2008和Alder et al. Nat. Immunol. 9:319, 2008)。这些抗体仅使用重链可变区可以形成抗原结合区,即这些功能性抗体仅是重链的同源二聚体(称为“重链抗体”)(Jespers et al., Nat. Biotechnol. 22:1161, 2004; Cortez-Retamozo et al., Cancer Res. 64:2853, 2004; Baral et al., Nature Med. 12:580, 2006和Barthelemy et al., J. Biol. Chem. 283:3639, 2008)。

[0140] 本发明内容的非常规结合结构域的替代来源包括编码随机肽文库的序列或编码可替代非抗体骨架的环区域中的工程化多样性氨基酸的序列,例如scTCR(参见例如Lake et al., Int. Immunol. 11:745, 1999; Maynard et al., J. Immunol. Methods 306:51, 2005; 美国专利号8,361,794)、纤维蛋白原结构域(参见例如Weisel et al., Science 230:1388, 1985)、Kunitz结构域(参见例如美国专利号6,423,498)、设计的锚蛋白重复蛋白(DARPins)(Binz et al., J. Mol. Biol. 332:489, 2003和Binz et al., Nat. Biotechnol. 22:575, 2004)、纤连蛋白结合结构域(adnectins或monobodies)(Richards et al., J. Mol. Biol. 326:1475, 2003; Parker et al., Protein Eng. Des. Selec. 18:435, 2005和Hackel et al. (2008) J. Mol. Biol. 381:1238-1252)、半胱氨酸结小蛋白(Vita et al. (1995) Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 92:6404-6408; Martin et al. (2002) Nat. Biotechnol. 21:71, 2002和Huang et al. (2005) Structure 13:755, 2005)、四十肽重复结构域(Main et al., Structure 11:497, 2003和Cortajarena et al., ACS Chem. Biol. 3:161, 2008)、富亮氨酸重复结构域(Stumpp et al., J. Mol. Biol. 332:471, 2003)、脂质运载蛋白结构域(参见,例如,WO 2006/095164, Beste et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 96:1898, 1999和Schönfeld et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 106:8198, 2009)、V-样结构域(参见,例如,美国专利申请公开号2007/0065431)、C-型凝集素结构域(Zelensky and Gready, FEBS J. 272:6179, 2005; Beavil et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 89:753, 1992和Sato et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 100:7779, 2003)、mAb²或FcabTM(参见,例如,PCT专利申请公开号WO 2007/098934; WO 2006/072620)、犰狳重复蛋白(参见,例如, Madhurantakam et al., Protein Sci. 21:1015, 2012; PCT专利申请公号W02009/040338)、affilin(Ebersbach et al., J. Mol. Biol. 372:172, 2007)、affibody、avimers、knottins、fynomer、atrimers、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白-4(Weidle et al., Cancer Gen. Proteo. 10:155, 2013)等(Nord et al., Protein Eng. 8:601, 1995; Nord et al., Nat. Biotechnol. 15:772, 1997; Nord et al., Euro. J. Biochem. 268:4269, 2001; Binz et al., Nat. Biotechnol. 23:1257, 2005; Boersma and Plückthun, Curr. Opin. Biotechnol. 22:849, 2011)。

[0141] 在一些实施例中,结合结构域是单链T细胞受体(scTCR),其包含 $V_{\alpha/\beta}$ 和 $C_{\alpha/\beta}$ 链(例如, $V_{\alpha}-C_{\alpha}$ 、 $V_{\beta}-C_{\beta}$ 、 $V_{\alpha}-V_{\beta}$)或包含对感兴趣的靶特异的 $V_{\alpha}-C_{\alpha}$ 、 $V_{\beta}-C_{\beta}$ 、 $V_{\alpha}-V_{\beta}$ 对(例如,肽-MHC复合物或肽-HLA复合物)。

[0142] 在某些实施例中,结合结构域包含或为以下序列:与具有TCRV α 、V β 、C α 或C β 氨基酸序列的分子的胞外域至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%相同,其中每个CDR包含与特异性结合感兴趣靶的TCR或其片段或衍生物0个变化或至多一个、两个或三个变化。

[0143] 在某些实施例中,当与已知TCR的 V_{α} 、 V_{β} 、 C_{α} 或 C_{β} 比较时,本公开的结合结构域 V_{α} 、 V_{β} 、 C_{α} 或 C_{β} 区可以衍生自或基于已知TCR(例如,高亲和力TCR)的 V_{α} 、 V_{β} 、 C_{α} 或 C_{β} ,并且包含一个或多个(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10)插入、一个或多个(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10)缺失、一个或多个(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10)个氨基酸取代(例如,保守氨基酸取代或非保守氨基酸取代)、或以上所举的变化的组合。插入、缺失或取代可以在 V_{α} 、 V_{β} 、 C_{α} 或 C_{β} 区中的任何位置,包括在氨基或羧基末端或这些区的两端,条件是每个CDR包含零个变化或至多一个、两个或三个变化,并且提供了包含修饰的 V_{α} 、 V_{β} 、 C_{α} 或 C_{β} 区的结合结构域仍然可以与野生型相似的亲和性特异性结合其靶。在某些实施例中,TCR对肽-HLA复合物具有约10 μ M至约500 μ M的范围的亲和性。在某些实施例中,TCR对肽-HLA复合物具有约10nM至约200pM的范围的高亲和性。

[0144] 在某些方面,根据本发明的融合蛋白具有包括特异性结合靶(例如,配体或受体)的结合结构域的细胞外组分,其中所述细胞外组分可选地包含一种或多种其他功能性亚组分或结构域,例如多聚化结构域、接头、连接氨基酸或其任何组合。

[0145] 在某些实施例中,本文公开的融合蛋白除结合结构域或衍生自结合结构域所源自的分子的部分之外,还包含额外的细胞外区,例如间隔区或多聚化结构域。例如,在一些方面,多聚化结构域包含在融合蛋白的细胞外组分中或作为其一部分。例如,可以通过改变(例如突变)细胞外组分来产生多聚化结构域,或者可以通过向细胞外组分中添加1至约50个氨基酸残基来产生多聚化结构域。多聚化结构域可以位于本公开的融合蛋白的细胞外组分的结合结构域和疏水组分之间。在某些实施例中,在细胞表面上表达的融合蛋白在细胞外组分内包含多聚化结构域并且接近细胞膜,在距疏水组分1至50个氨基酸之内。例如,融合蛋白多聚化结构域可包含位于从融合蛋白疏水组分30、25、20、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1或0中个氨基酸内的一个或多个半胱氨酸残基,其中来自一种融合蛋白的这样一个或多个半胱氨酸残基可以与一种或多种其他融合蛋白形成一个或多个二硫键。在一些实施例中,额外的细胞外部分衍生自融合蛋白的跨膜或刺激区所源自的相同分子。

[0146] 在进一步的实施例中,与融合蛋白单体相比,两个或更多个融合蛋白的多聚化结构域之间的相互作用基本上有助于或有效地促进了信号传导(例如,免疫细胞刺激或激活)。在某些实施例中,与融合蛋白单体相比,融合蛋白的多聚化以统计学上显著的方式促进宿主细胞中的信号传导。在进一步的实施例中,在宿主细胞中促进或增强信号传导的融合蛋白的多聚化是通过二硫桥。

[0147] 示例性的多聚体是“二聚体”,其是指包含彼此关联的两个分子(例如两个融合蛋白)的生物实体。当两个相关的融合蛋白具有基本上相似或相同的氨基酸序列时,这种二聚体被认为是“同二聚体”。类似地,三个基本或完全相同的融合蛋白的多聚体被称为“同三聚

体”。在一些实施例中，多聚化结构域包含至少一个半胱氨酸残基，其中来自第一融合蛋白的多聚化结构域半胱氨酸残基可以与来自第二融合蛋白的多聚化结构域半胱氨酸残基形成二硫桥。在某些实施例中，通过二硫桥形成融合蛋白二聚体。在其他实施例中，通过两个或更多个二硫桥形成融合蛋白三聚体。或者，二聚体、同二聚体、三聚体或同三聚体可以经由锌指基序或亮氨酸拉链基序而多聚。在另外的实施例中，融合蛋白包含多个多聚化结构域，其可以位于细胞外、细胞内或两者。

[0148] 在一些实施例中，融合蛋白的细胞外组分中包含的多聚化结构域包含从疏水组分延伸的细胞外部分。例如，在一些实施例中，融合蛋白的细胞外组分中包含的多聚化结构域包含从CD28跨膜结构域延伸的CD28的细胞外部分。在一些实施例中，CD28的细胞外部分包含邻接跨膜结构域的约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或多达约25个氨基酸。在一些实施例中，CD28的细胞外部分包含邻接跨膜结构域的9个氨基酸或12个氨基酸。在一些实施例中，CD28的细胞外部分包含由SEQ ID NO.:9所示的核酸分子编码的氨基酸序列。在一些实施例中，CD28的细胞外部分包含SEQ ID NO.:32所示的氨基酸序列。在另一些实施例中，融合蛋白的细胞外组分中包含的多聚化结构域包含从CD137(4-1BB)跨膜结构域延伸的CD137(4-1BB)的细胞外部分(例如，从1个至约50个氨基酸的范围)。在某些实施例中，多聚化结构域和疏水组分来自不同的蛋白质。例如，融合蛋白的细胞外组分中包含的多聚化结构域包含从CD137跨膜结构域延伸的CD28的细胞外部分、或包含从CD28跨膜结构域延伸的CD137的细胞外部分。在任何上述实施例中，多聚化结构域可进一步包含糖基化位点。

[0149] 在一些实施例中，融合蛋白可包含接头或连接氨基酸，该接头或连接氨基酸例如将细胞外组分与多聚化结构域连接、或将细胞外组分与疏水组分连接、或将疏水组分与胞内组分连接。在一些实施例中，接头是G₁y_xSer_y，其中x和y独立地为1至5的整数。

[0150] 在一些实施例中，细胞外组分是或包含形成多聚体的分子或其部分，并且细胞内组分是或包含形成相同数目的多聚体的分子或其部分。例如，在一些实施例中，细胞外组分是或包含形成二聚体的分子或其部分，并且细胞内组分是或包含也形成二聚体的分子或其部分。在一些实施例中，细胞外组分是或包含形成三聚体的分子或其部分，并且细胞内组分是或包含也形成三聚体的分子或其部分。

[0151] 可以在感兴趣的细胞(“靶细胞”)上或与之相关发现靶分子，所述靶分子由本公开的融合蛋白中包含的结合结构域特异性结合。示例性靶细胞包括免疫细胞、癌细胞、与自身免疫性疾病或病症或炎性疾病或病症相关的细胞、以及感染性生物体或细胞(例如细菌、病毒、病毒感染的细胞)、或任何与MHC或人类白细胞抗原(HLA)复合的呈递抗原的细胞。传染性生物的细胞，例如哺乳动物的寄生虫，也被认为是靶细胞。在一些实施例中，靶是免疫抑制配体。在一些实施例中，靶选自CD47、CD58、CD80、CD86、CD95L(FasL)、CD200、CD270(HVEM)、CD274(PD-L1)或GAL9。

[0152] 细胞外组分

[0153] 本公开的融合蛋白中包含的细胞内组分将具有能够将功能信号传递至细胞的细胞内信号传导结构域，例如活化域或共刺激域。在某些实施例中，细胞内信号传导结构域将通过与一种或多种其他蛋白相缔合而间接地促进细胞应答，所述其他蛋白直接促进细胞应答。细胞内信号传导结构域可以包括一个、两个、三个或更多个受体信号传导结构域、共刺激域或其组合。包含来自多种信号传导分子(例如，信号传导受体)中的任一种的激活域、共

刺激域或两者的任何细胞内组分可以用于本公开的融合蛋白中。

[0154] 如本文所用,来自细胞表面受体或配体的“细胞内信号传导结构域”包括完整的细胞内结构域、包含细胞内信号传导结构域的部分、或其功能(信号传导)片段。在某些实施例中,细胞内信号传导结构域包含突变的细胞内结构域或其功能(信号传导)片段,与野生型或参考细胞内信号传导结构域相比,其具有更高的信号传导活性。

[0155] 如本文所用,“共刺激分子”是指可以将信号传导至T细胞以正向调节T细胞活化的受体或细胞表面分子(Chen and Flies,Nat.Rev.Immunol.13:227-242,2013)。作为背景,T细胞的活化和增殖需要通过T细胞抗原特异性受体(TCR)的结合介导的两个信号和共刺激信号,最典型的是CD80和CD86结合CD28(Ledbetter et al.,Blood 75:1531,1990)。

[0156] 本公开的融合蛋白中可用的细胞内信号传导结构域或其功能片段可以来自CD3 ϵ 、CD3 δ 、CD3 ζ 、CD25、CD27、CD28、CD40、CD47、CD79A、CD79B、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD150(SLAMF1)、CD278(ICOS)、CD357(GITR)、CARD11、DAP10、DAP12、FcR α 、FcR β 、FcR γ 、Fyn、Lck、LAT、LRP、NKG2D、NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3、NOTCH4、ROR2、Ryk、S1p76、pT α 、TCR α 、TCR β 、TRIM、Zap70、PTCH2或其任何组合。在一些实施例中,细胞内信号传导结构域或其功能片段不包含初级信号。在一些实施例中,细胞内信号传导结构域不包含CD3 ζ 。

[0157] 在一些实施例中,本公开的融合蛋白的细胞内信号传导结构域包含CD28。CD28信号传导促进经由TCR刺激的T细胞的增殖(Chen and Flies,Nat.Rev.Immunol.13:227-242,2013)。由于跨膜结构域附近的半胱氨酸残基,CD28形成了二硫键连接的同二聚体(Lazar-Molnar et al.,Cell Immunol.244:125-129,2006)。在某些实施例中,CD28信号传导结构域包含CD28蛋白的全长细胞内部分、CD28蛋白的全长成熟细胞内部分、CD28蛋白的细胞内部分的信号传导片段、或带有CD28跨膜结构域或其片段的CD28蛋白细胞内部分的信号传导片段、或其任何组合。

[0158] 在一些实施例中,融合蛋白的细胞内信号传导结构域包含CD137(4-1BB)的细胞内信号传导结构域。CD137是共刺激分子,其中CD137与其配体(4-1BBL或CD137L)的结合与T细胞活化和增殖有关(Cheuk et al.,Cancer Gene Therapy 11:215-226,2004)。在某些实施例中,CD137信号传导结构域包含CD137蛋白的全长细胞内部分、CD137蛋白的全长成熟细胞内部分、CD137蛋白的细胞内部分的信号传导片段、或带有CD137跨膜结构域或其片段的CD137蛋白细胞内部分的信号传导片段、或其任何组合。

[0159] 在某些实施例中,细胞内信号传导结构域包含淋巴细胞受体信号传导结构域、或包含具有一个或多个基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)的氨基酸序列。在另外的实施例中,细胞内信号传导结构域包含与细胞质信号传导蛋白缔合的细胞质部分,其中所述细胞质信号传导蛋白是淋巴细胞受体或其信号传导结构域,即包含多个ITAM、共刺激因子或其任何组合的蛋白。

[0160] 在一些示例性实施例中,本公开提供了融合蛋白,所述融合蛋白具有:细胞外组分,其包含与CD200特异性结合的CD200R的细胞外部分;细胞内组分,其包含CD28的细胞内部分;以及疏水组分,其连接细胞外和细胞内组分,规定融合蛋白::靶复合物跨越类似于免疫突触中的膜之间的距离的距离。

[0161] 在特定实施例中,本公开的融合蛋白的细胞内组分包含CD28、CD137(4-1BB)或两者。例如,在一些实施例中,细胞内组分包含由SEQ ID NO.:5所示的核酸分子编码的氨基酸

序列。在一些其他实施例中，细胞内组分包含由SEQ ID NO.:13所示的核酸分子编码的氨基酸序列。在一些实施例中，细胞内组分包含两个细胞内信号传导结构域，例如CD28和CD137(4-1BB)。在一些其他实施例中，细胞内组分包含由SEQ ID NO.:5所示的核酸分子编码的氨基酸序列和由SEQ ID NO.:13所示的核苷酸序列编码的氨基酸序列。

[0162] 疏水组分

[0163] 本公开内容的单链融合蛋白中包含的疏水部分将允许本公开内容的融合蛋白与细胞膜结合，使得该融合蛋白的一部分将位于细胞外并且一部分将位于细胞内（例如，细胞内信号传导结构域）。疏水组分通常将置于细胞膜磷脂双层内。在某些实施例中，一个或多个连接氨基酸可以置于细胞内信号传导结构域与疏水部分之间并连接细胞内信号传导结构域与疏水部分。

[0164] 在某些实施例中，疏水性结构域是跨膜结构域，例如衍生自完整膜蛋白（例如，受体、分化簇(CD)分子、酶、转运蛋白、细胞粘附分子等）的跨膜结构域。在一些实施例中，疏水性结构域包含发现于或衍生自完整膜蛋白的跨膜结构域，其中该跨膜结构域已经通过用至少一种不同的氨基酸添加、缺失或替换一个或多个氨基酸来修饰，或其任何组合，例如促进分子间相互作用的带电荷或亲水性残基。因此，术语“疏水结构域”包括具有例如可降低疏水性的修饰的跨膜结构域。

[0165] 在一些实施例中，跨膜结构域包括CD2、CD3 ε 、CD3 δ 、CD3 ζ 、CD25、CD27、CD28、CD40、CD47、CD79A、CD79B、CD80、CD86、CD95(Fas)、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD150(SLAMF1)、CD152(CTLA4)、CD200R、CD223(LAG3)、CD270(HVEM)、CD272(BTLA)、CD273(PD-L2)、CD274(PD-L1)、CD278(ICOS)、CD279(PD-1)、TIM3、CD300、CD357(GITR)、A2aR、DAP10、FcR α 、FcR β 、FcR γ 、Fyn、GAL9、KIR、Lck、LAT、LPA5、LRP、NKG2D、NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3、NOTCH4、PTCH2、ROR2、Ryk、S1p76、SIRP α 、pT α 、TCR α 、TCR β 、TIM3、TRIM或Zap70的跨膜结构域。在特定实施例中，疏水部分是来自CD28、CD4、CD8、CD27或CD137(4-1BB)的跨膜结构域。

[0166] 在某些实施例中，跨膜结构域包含CD28跨膜结构域。在一些实施例中，跨膜结构域包含或由CD28跨膜结构域组成，所述CD28跨膜结构域具有由与SEQ ID NO.:4的多核苷酸至少80%、85%、90%、95%或更高的序列同一性的多核苷酸编码的氨基酸序列。在进一步的实施例中，跨膜结构域是CD28跨膜结构域，其包含或由如SEQ ID NO.:4所示的核酸分子编码的氨基酸序列组成。在另外的实施例中，跨膜结构域是CD28跨膜结构域，其具有与SEQ ID NO.:27的氨基酸序列至少90%、95%或更高的序列同一性。在另外的实施例中，跨膜结构域是CD28跨膜结构域，其包含或由SEQ ID NO.:27所示的氨基酸序列组成。

[0167] 在某些实施例中，跨膜结构域包含CD137(4-1BB)跨膜结构域。在进一步的实施例中，跨膜结构域包含或由CD137跨膜结构域组成，所述CD137跨膜结构域具有由与SEQ ID NO.:197的多核苷酸至少80%、85%、90%、95%或更高的序列同一性的多核苷酸编码的氨基酸序列。在特定实施例中，跨膜结构域是CD137跨膜结构域，其包含或由如SEQ ID NO.:197所示的核酸分子编码的氨基酸序列组成。

[0168] 在某些其他实施例中，跨膜结构域包含CD200R跨膜结构域。在一些实施例中，跨膜结构域包含或由CD200R跨膜结构域组成，所述CD200R跨膜结构域具有由与SEQ ID NO.:3的多核苷酸至少80%、85%、90%、95%或更高的序列同一性的多核苷酸编码的氨基酸序列。在进一步的实施例中，跨膜结构域是CD200R跨膜结构域，其包含或由如SEQ ID NO.:3所示

的核酸分子编码的氨基酸序列组成。

[0169] 在某些实施例中，跨膜结构域包含SIRPa跨膜结构域。在一些实施例中，跨膜结构域包含或由SIRPa跨膜结构域组成，所述SIRPa跨膜结构域具有由与SEQ ID NO.:18的多核苷酸至少80%、85%、90%、95%或更高的序列同一性的多核苷酸编码的氨基酸序列。在进一步的实施例中，跨膜结构域是SIRPa跨膜结构域，其包含或由如SEQ ID NO.:18所示的核酸分子编码的氨基酸序列组成。

[0170] 在某些实施例中，跨膜结构域包含CD2跨膜结构域。在一些实施例中，跨膜结构域包含或由CD2跨膜结构域组成，所述CD2跨膜结构域具有由与SEQ ID NO.:63的多核苷酸至少80%、85%、90%、95%或更高序列同一性的多核苷酸编码的氨基酸序列。在进一步的实施例中，跨膜结构域是CD2跨膜结构域，其包含或由如SEQ ID NO.:63所示的核酸分子编码的氨基酸序列组成。

[0171] 在某些实施例中，跨膜结构域包含Fas跨膜结构域。在一些实施例中，跨膜结构域包含或由Fas跨膜结构域组成，所述Fas跨膜结构域具有由与SEQ ID NO.:77的多核苷酸至少80%、85%、90%、95%或更高序列同一性的多核苷酸编码的氨基酸序列。在进一步的实施例中，跨膜结构域是Fas跨膜结构域，其包含或由如SEQ ID NO.:77所示的核酸分子编码的氨基酸序列组成。

[0172] 在某些实施例中，跨膜结构域包含TIM3跨膜结构域。在一些实施例中，跨膜结构域包含或由TIM3跨膜结构域组成，所述TIM3跨膜结构域具有由与SEQ ID NO.:169的多核苷酸至少80%、85%、90%、95%或更高序列同一性的多核苷酸编码的氨基酸序列。在进一步的实施例中，跨膜结构域是TIM3跨膜结构域，其包含或由如SEQ ID NO.:169所示的核酸分子编码的氨基酸序列组成。

[0173] 在某些实施例中，跨膜结构域包含LAG3跨膜结构域。在一些实施例中，跨膜结构域包含或由LAG3跨膜结构域组成，所述LAG3跨膜结构域具有由与SEQ ID NO.:155的多核苷酸至少80%、85%、90%、95%或更高序列同一性的多核苷酸编码的氨基酸序列。在进一步的实施例中，跨膜结构域是LAG3跨膜结构域，其包含或由如SEQ ID NO.:155所示的核酸分子编码的氨基酸序列组成。

[0174] 核酸和宿主细胞

[0175] 在某些方面，本发明提供了编码本文所述的一个或多个融合蛋白的核酸分子，其可以是免疫调节融合蛋白(IFPs)。可将此类核酸分子插入合适的载体(例如，病毒载体或非病毒质粒载体)中以引入感兴趣宿主细胞(例如，造血祖细胞、T细胞)。

[0176] 如本文所用，术语“重组”或“非天然的”是指包括至少一个遗传改变或通过引入外源核酸分子而被修饰的生物、微生物、细胞、核酸分子或载体，其中通过遗传工程引入这种改变或修饰。遗传改变包括，例如，引入编码蛋白质、融合蛋白或酶的可表达核酸分子的修饰，或细胞遗传物质的其他核酸分子添加、缺失、取代或其他功能性破坏。另外的修饰包括，例如，非编码调节区，其中修饰改变基因或操纵子的表达。在某些实施例中，通过引入编码本文所述的融合蛋白的核酸，可以将从受试者获得的细胞，例如T细胞转化为非天然或重组细胞(例如，非天然或重组T细胞)，并且由此细胞表达融合蛋白。

[0177] 在某些实施例中，可以对编码融合蛋白的核酸分子进行密码子优化，以增强或最大化在某些类型的细胞如T细胞中的表达(Scholten et al., Clin. Immunol. 119:135-145,

2006)。

[0178] 在一个示例性的实施例中,本公开提供了编码CD200R-CD28构建体(huCD200R_{tm}-CD28)的核酸分子,其中细胞外组分包含CD200R胞外域,疏水组分包含CD200R的跨膜结构域,以及细胞内组分包含CD28的细胞内信号传导结构域。例如,在一个实施例中,提供了由SEQ ID NO.:1所示的核酸分子。在某些实施例中,本公开提供了huCD200R_{tm}-CD28,其包含与SEQ ID NO.:1的多核苷酸序列至少80%或至少90%相同的多核苷酸。在其他实施例中,本公开提供了huCD200R_{tm}-CD28,其包含或由SEQ ID NO.:1的多核苷酸序列组成。

[0179] 在另一个示例性的实施例中,本公开提供了编码CD200R-CD28构建体(huCD200R-CD28_{tm})的核酸分子,其中疏水组分包含CD28的跨膜域。例如,在一个实施例中,提供了由SEQ ID NO.:6所示的核酸分子。在某些实施例中,本公开提供了huCD200R-CD28_{tm},其包含与SEQ ID NO.:6的多核苷酸序列至少80%或至少90%相同的多核苷酸。在其他实施例中,本公开提供了huCD200R-CD28_{tm},其包含或由SEQ ID NO.:6的多核苷酸序列组成。在进一步的实施例中,提供了huCD200R-CD28_{tm}胞外域,其具有与SEQ ID No.:29所示的氨基酸序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%相同的氨基酸序列。

[0180] 在另一个示例性的实施例中,本公开提供了编码CD200R-CD28构建体的核酸分子,其中细胞外包含CD200R的截短的细胞外结构域和CD28的细胞外部分。例如,CD200R细胞外结构域截短约9至约15个氨基酸。本公开的示例性CD200R-CD28构建体包括截短9个氨基酸(例如,huCD200R-9aas-CD28Cys,SEQ ID NO.:7)、截短12个氨基酸(例如,huCD200R-12aas-CD28Cys,SEQ ID NO:10)、或截短15个氨基酸(例如huCD200R-15aas-CD28Cys,SEQ ID NO.:183)的那些。在一些实施例中,CD28的细胞外部分包含由SEQ ID NO.:9所示核酸分子编码的氨基酸序列。在某些实施例中,CD28_{tm}的细胞外部分包括与SEQ ID NO.:32所示的氨基酸序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%相同的氨基酸序列。在进一步的实施例中,CD28的跨膜部分包含或由SEQ ID NO.:32所示的氨基酸序列组成。在某些其他实施例中,huCD200R-9aas-CD28Cys蛋白包括与SEQ ID NO.:30所示的氨基酸序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%相同的氨基酸序列。示例性的huCD200R-9aas-CD28Cys蛋白包含或由SEQ ID NO.:30所示的氨基酸序列组成。在某些其他实施例中,huCD200R-12aas-CD28Cys蛋白包括与SEQ ID NO.:33所示的氨基酸序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%相同的氨基酸序列。示例性的huCD200R-12aas-CD28Cys蛋白包含或由SEQ ID NO.:33所示的氨基酸序列组成。在某些其他实施例中,huCD200R-15aas-CD28Cys蛋白包括与SEQ ID NO.:184所示的氨基酸序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%相同的氨基酸序列。示例性的huCD200R-15aas-CD28Cys蛋白包含或由SEQ ID NO.:184所示的氨基酸序列组成。

[0181] 在一个示例性的实施例中,本公开提供了编码CD200R-CD28-4-1BB构建体(huCD200R-9aas-CD28Cystm-41BBic或huCD200R-12aas-CD28Cystm-41BBic)的核酸分子,其中细胞内组分包含CD137(4-1BB)的细胞内信号传导结构域。例如,在一个实施例中,核酸

分子具有SEQ ID NO.:12或SEQ ID NO.:14所示的核苷酸序列。

[0182] 在另一个示例性的实施例中,本公开提供了编码CD200R-CD28-4-1BB构建体(huCD200R-9aas-CD28Cys tm ic 41BBic或huCD200R-12aas-CD28Cys tm ic-41BBic)的核酸分子,其中细胞内组分包含CD28和CD137(4-1BB)的细胞内信号传导结构域。例如,在一个实施例中,本公开的核酸具有SEQ ID NO.:9或SEQ ID NO.:15所示的核苷酸序列。

[0183] 在另一个示例性的实施例中,本公开提供了编码SIRP α -CD28构建体的核酸分子。例如,本公开包括SEQ ID NO.:16(huSIRP α tm-CD28)或SEQ ID NO.:19(huSIRP α -CD28tm)所示的核酸分子。

[0184] 在另一个示例性的实施例中,本公开提供了编码SIRP α -CD28构建体的核酸分子,其中细胞外组分包含SIRP α 的截短的细胞外结构域和CD28的细胞外部分。例如,SIRP α 细胞外结构域截短约8至约15个氨基酸。示例性SIRP α -CD28构建体具有截短12个氨基酸的CD95(Fas)细胞外结构域(例如,huSIRP α -12aas-CD28Cys,SEQ ID NO.:20)。

[0185] 在一个示例性的实施例中,本公开提供了编码SIRP α -CD28-4-1BB构建体(huSIRP α -12aas-CD28Cystm-41BBic)的核酸分子,其中细胞内组分包含CD137(4-1BB)的细胞内信号传导结构域。例如,在一个实施例中,本公开的核酸具有SEQ ID NO.:22所示的核苷酸序列。

[0186] 在另一个示例性的实施例中,本公开提供了编码SIRP α -CD28-4-1BB构建体(huSIRP α -12aas-CD28Cys tm ic-41BBic)的核酸分子,其中细胞内组分包含CD28和CD137(4-1BB)的细胞内信号传导结构域。例如,在一个实施例中,本公开的核酸具有SEQ ID NO.:23所示的核苷酸序列。

[0187] 在另一个示例性的实施例中,本公开提供了编码PD-1-CD28构建体的核酸分子。例如,本公开包括SEQ ID NO.:97(huPD1-CD28Cys)所示的核酸分子。

[0188] 在另一个示例性的实施例中,本公开提供了编码PD-1-CD28构建体的核酸分子,其中细胞外组分包含PD-1的截短的细胞外结构域和CD28的细胞外部分。例如,PD-1细胞外结构域可截短约10至约25个氨基酸。示例性PD-1-CD28构建体具有截短12个氨基酸(例如,huPD1-12aas-CD28Cys,SEQ ID NO.:99)、15个氨基酸(例如,huPD1-15aas-CD28Cys,SEQ ID NO.:101)、或21个氨基酸(例如huPD1-21aas-CD28Cys,SEQ ID NO.:103)的PD-1细胞外结构域。

[0189] 在另一个示例性的实施例中,本公开提供了编码CD2-CD28构建体的核酸分子。例如,本公开包括SEQ ID NO.:69(huCD2-CD28Cys)所示的核酸分子。

[0190] 在其他示例性的实施例中,本公开提供了编码Fas-CD28构建体的核酸分子。例如,本公开包括SEQ ID NO.:83(huFas-CD28Cys)所示的核酸分子。

[0191] 在其他示例性的实施例中,本公开提供了编码Fas-CD28构建体的核酸分子,其中细胞外组分包含Fas的截短的细胞外结构域和CD28的细胞外部分。例如,Fas细胞外结构域可截短约7至约15个氨基酸。示例性Fas-CD28构建体具有截短7个氨基酸(例如,huFas-7aas-CD28Cys,SEQ ID NO.:85)或12个氨基酸(例如huFas-12aas-CD28Cys,SEQ ID NO.:87)的CD95(Fas)细胞外结构域。

[0192] 在另一个示例性的实施例中,本公开提供了编码Fas-4-1BB构建体的核酸分子,其中细胞外组分包含CD95(Fas)的完整的细胞外结构域或截短的细胞外结构域,并且细胞内

组分包含CD137 (4-1BB) 的信号传导结构域。在进一步的实施例中,核酸分子编码Fas-4-1BB构建体,其中疏水组分还包含CD95 (Fas) 或CD137 (4-1BB) 的跨膜部分。例如,在某些实施例中,Fas-4-1BB构建体由与SEQ ID NO.:185的多核苷酸序列具有至少80%、85%、90%、95%或更高序列同一性的核酸分子编码。在一些实施例中,Fas-4-1BB构建体由包括或由SEQ ID NO.:185的多核苷酸序列组成的多核苷酸编码。在其他实施例中,Fas-4-1BB构建体由与SEQ ID NO.:187的多核苷酸序列具有至少80%、85%、90%、95%或更高序列同一性的核酸分子编码。在一些实施例中,Fas-4-1BB构建体由包括或由SEQ ID NO.:187的多核苷酸序列组成的多核苷酸编码。在某些其它实施例中,Fas-4-1BB构建体为huFast^m-41BB蛋白,所述huFast^m-41BB蛋白包括与SEQ ID NO.:186所示的氨基酸序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%相同的氨基酸序列。示例性的huFast^m-41BB蛋白包含或由SEQ ID NO.:186所示的氨基酸序列组成。在某些其它实施例中,Fas-4-1BB构建体为huFas-41BB^m蛋白,所述huFas-41BB^m蛋白包括与SEQ ID NO.:188所示的氨基酸序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%相同的氨基酸序列。示例性的huFas-41BB^m蛋白包含或由SEQ ID NO.:188所示的氨基酸序列组成。

[0193] 在另一个示例性的实施例中,本公开提供了编码Fas-CD28-41BB构建体的核酸分子,其中细胞外组分包含CD95 (Fas) 细胞外结构域,疏水组分包含CD28的跨膜结构域,并且细胞内组分包含CD137 (4-1BB) 的信号传导结构域。在一些实施例中,细胞外组分包含CD95 (Fas) 的截短的细胞外结构域和CD28的细胞外部分。例如,CD95 (Fas) 细胞外结构域截短约7至约15个氨基酸。示例性的Fas-CD28-41BB构建体具有截短7、9、12或15个氨基酸的CD95 (Fas) 细胞外结构域。例如,在一些实施例中,CD95 (Fas) 细胞外结构域可以包含由SEQ ID NO.:73或SEQ ID NO.:75所示的核酸分子编码的氨基酸序列。CD28的细胞外部分可以包含多聚化结构域。例如,CD28的细胞外部分可以包含由SEQ ID NO.:9所示核酸序列编码的氨基酸序列。

[0194] 在另一个示例性的实施例中,本公开提供了编码TIM3-CD28构建体的核酸分子。例如,本公开包括SEQ ID NO.:173 (huTIM3-CD28Cys) 所示的核酸分子。也包括在本公开的范围内的是TIM3-CD28融合蛋白,其中细胞外组分包含TIM3的截短的细胞外结构域和CD28的细胞外部分。例如,TIM3细胞外结构域可截短约8至约15个氨基酸(例如,huTIM3-12aas-CD28Cys,SEQ ID NO.:175,截短12个氨基酸)。

[0195] 在另一个示例性的实施例中,本公开提供了编码LAG3-CD28构建体的核酸分子。例如,本公开包括SEQ ID NO.:163 (huLAG3-CD28Cys) 所示的核酸分子。也包括在本公开的范围内的是LAG3-CD28融合蛋白,其中细胞外组分包含LAG3的截短的细胞外结构域和CD28的细胞外部分。例如,LAG3细胞外结构域可截短约8至约15个氨基酸(例如,huLAG3-12aas-CD28Cys,SEQ ID NO.:159,截短12个氨基酸)。

[0196] 编码核心病毒的载体在本文中称为“病毒载体”。存在大量适用于本发明组合物的可用病毒载体,包括鉴定用于人基因治疗应用的那些(参见Pfeifer and Verma, Ann. Rev. Genomics Hum. Genet. 2:177, 2001)。合适的病毒载体包括基于RNA病毒的载体,诸如逆转录病毒衍生的载体,例如莫洛尼鼠白血病病毒(MLV)衍生的载体,并且包括更复杂的

逆转录病毒衍生的载体，例如慢病毒衍生的载体。HIV-1衍生的载体属于这一类。其他实例包括衍生自HIV-2、FIV、马传染性贫血病毒、SIV和梅迪-维斯纳(羊慢病毒)的慢病毒载体。使用逆转录病毒和慢病毒病毒载体和包装细胞，用含有嵌合抗原受体转基因的病毒颗粒转导哺乳动物宿主细胞的方法是本领域已知的，并且先前已例如描述于美国专利8,119,772; Walchli et al., PLoS One 6:327930, 2011; Zhao et al., J. Immunol. 174:4415, 2005; Engels et al., Hum. Gene Ther. 14:1155, 2003; Frecha et al., Mol. Ther. 18:1748, 2010; Verhoeven et al., Methods Mol. Biol. 506:97, 2009。逆转录病毒和慢病毒载体构建体和表达系统也是可商购的。

[0197] 在某些实施例中，病毒载体用于引入编码融合蛋白的非内源核酸序列或编码对靶特异的融合蛋白的非内源核酸序列。病毒载体可以是逆转录病毒载体或慢病毒载体。病毒载体还可包括编码转导标志的核酸序列。用于病毒载体的转导标志是本领域已知的，包括可赋予药物抗性的筛选标志，或可通过诸如流式细胞术等方法检测的可检测标志诸如荧光标志或细胞表面蛋白。在特定的实施例中，病毒载体还包含用于转导的基因标志，其包含绿色荧光蛋白(GFP)、人CD2的胞外结构域或截短的人EGFR(huEGFRt；参见Wang et al., Blood 118:1255, 2011)。当病毒载体基因组包含多个待在宿主细胞中表达的核酸序列作为单独的转录本时，病毒载体还可以包含两个(或更多个)转录本之间的额外序列，从而允许双顺反子或多顺反子表达。用于病毒载体的此类序列的实例包括内部核糖体进入位点(IRES)、弗林蛋白酶切割位点、病毒2A肽或其任何组合。

[0198] 其他载体也可用于多核苷酸递送，包括DNA病毒载体，包括例如基于腺病毒的载体和基于腺相关病毒(AAV)的载体；衍生自单纯疱疹病毒(HSV)的载体，包括扩增子载体、复制缺陷型HSV和减毒HSV(Krisky et al., Gene Ther. 5:1517, 1998)。

[0199] 最近开发用于基因治疗用途的其他载体也可以与本发明的组合物和方法一起使用。这些载体包括源自杆状病毒和 α -病毒的载体(Jolly, D. J. 1999. Emerging Viral Vectors. pp. 209-40 in Friedmann T. ed. The Development of Human Gene Therapy. New York: Cold Spring Harbor Lab)、或质粒载体(如睡美人或其他转座子载体)。在一些实施例中，病毒或质粒载体还包含用于转导的基因标志(例如绿色荧光蛋白，huEGFRt)。

[0200] 在一些实施例中，编码如本文公开的融合蛋白的载体可以编码不止一种融合蛋白。例如，载体可以编码两种不同的融合蛋白(例如，包含PD-1胞外域的第一融合蛋白和包含TIM3胞外域的第二融合蛋白)。

[0201] 在一些实施例中，编码如本文公开的融合蛋白的载体可进一步包含抗原特异性TCR。在一些实施例中，抗原特异性TCR是外源的。在一些实施例中，抗原特异性TCR对HLA(MHC) I类限制性抗原具有特异性。在一些实施例中，抗原是癌症特异性抗原。其中癌症特异性抗原包含WT-1、间皮素或细胞周期蛋白A1的实施例也在本公开的范围内。在另一些实施例中，编码如本文公开的融合蛋白的载体还编码配体，其可以是CD200、CD47、PD-L1或CD58。在另一些实施例中，编码如本文公开的融合蛋白的载体还编码用于减少内源性受体表达的siRNA。在一些特定实施例中，内源性受体是CD200R、SIRPa、CD279(PD-1)、CD95(Fas)或CD2。

[0202] 在一些实施例中，能够在细胞表面表达本公开的融合蛋白的宿主细胞是免疫细胞。在一些实施例中，能够在细胞表面上表达本公开的融合蛋白的宿主细胞是T细胞，包括源自人、小鼠、大鼠或其他哺乳动物的原代细胞或细胞系。如果从哺乳动物获得，则T细胞可

以从许多来源获得,包括血液、骨髓、淋巴结、胸腺或其他组织或体液。可以富集或纯化T细胞。T细胞系是本领域熟知的,其中一些描述于Sandberg et al., Leukemia 21:230, 2000中。在某些实施例中,使用缺乏TCR α 和 β 链的内源表达的T细胞。此类T细胞可能天然缺乏TCR α 和 β 链的内源性表达,或者可能已被修饰以阻断表达(例如,来自不表达TCR α 和 β 链的转基因小鼠的T细胞或已被操纵以抑制TCR α 和 β 链表达的细胞)或敲除TCR α 链、TCR β 链或两者基因。在一些实施例中,可以改造T细胞以表达对特定抗原特异的TCR。

[0203] 在某些实施例中,被转染以表达本公开的融合蛋白的宿主细胞是功能性T细胞,例如病毒特异性T细胞、肿瘤抗原特异性细胞毒性T细胞、幼稚T细胞、记忆干T细胞、中枢或效应子记忆T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞或CD4+CD25+调节性T细胞。在进一步的实施例中,将编码本公开的融合蛋白的核酸分子引入批量CD8+T细胞、幼稚CD8+T细胞、CD8+T_{CM}细胞、CD8+T_{EM}细胞或其任何组合。在更进一步的实施例中,将编码本公开的融合蛋白的核酸分子引入批量CD4+T细胞、幼稚CD4+T细胞、CD4+T_{CM}细胞、CD4+T_{EM}细胞或其任何组合。在其他实施例中,将编码本公开的融合蛋白的核酸分子引入富集了幼稚CD8+T细胞和CD8+T_{CM}细胞的T细胞群。在另一些其他实施例中,将编码本公开的融合蛋白的核酸分子引入富集了幼稚CD4+T细胞和CD4+T_{CM}细胞的T细胞群。在任何上述实施例中,T细胞还包含编码工程化抗原特异性T细胞受体(TCR)、工程化抗原特异性高亲和力TCR、外源共刺激分子、嵌合抗原受体(CAR)、或其任意组合的核酸分子。

[0204] 在某些实施例中,被转染以表达本公开的融合蛋白的宿主细胞是功能性自然杀伤细胞。

[0205] 可将一种或多种促进表达本公开内容的融合蛋白的T细胞增殖的生长因子细胞因子添加至用于扩增T细胞的培养物中。细胞因子可以是人类或非人类的。可用于促进T细胞增殖的示例性生长因子细胞因子包括IL2、IL15等。

[0206] 在某些实施例中,被转染以表达本公开内容的融合蛋白的宿主T细胞是CD4⁺T细胞,其还表达对HLA(MHC) I类限制性抗原具有特异性的抗原特异性高亲和力TCR(参见Soto et al., Cancer Immunol Immunother. 62:359-369, 2013)。

[0207] 在某些实施例中,被转染以表达本公开的融合蛋白的宿主T细胞还表达对癌症抗原特异的重组TCR。在一些实施例中,癌症抗原是WT1。“WT1”是指Wilms肿瘤1,一种转录因子,在C端含有四个锌指基序、在N端含有富含脯氨酸/谷氨酰胺的DNA结合结构域。WT1在泌尿生殖系统的正常发育中起着至关重要的作用,并且在一小部分患有Wilms肿瘤的患者中发生了突变。WT1的高表达已在多种癌症中观察到,包括乳腺癌、卵巢癌、急性白血病、血管瘤、黑色素瘤、结肠癌、肺癌、甲状腺癌、骨和软组织肉瘤以及食道癌。已经注意到WT1的选择性剪接。

[0208] 在某些实施例中,被转染以表达本公开的融合蛋白的宿主T细胞还表达对间皮素特异的重组TCR。“间皮素”(MSLN)是指编码前体蛋白的基因,该前体蛋白被切割成两种产物,巨核细胞增强因子和间皮素。巨核细胞增强因子起细胞因子的作用,可以刺激骨髓巨核细胞中的集落形成。间皮素是糖基磷脂酰肌醇锚定的细胞表面蛋白,可以起细胞粘附蛋白的作用。该蛋白在上皮间皮瘤、卵巢癌和特定的鳞状细胞癌中过表达。选择性剪接导致多个转录物变体。

[0209] 在某些实施例中,被转染以表达本公开的融合蛋白的宿主T细胞还表达对细胞周期蛋白-A1特异的重组TCR。

[0210] 在某些实施例中,被转染以表达本公开的融合蛋白的宿主T细胞还表达CAR。

[0211] 在另一些实施例中,表达如本文公开的融合蛋白的宿主细胞还包括配体,其可以是CD200、CD47、PD-L1或CD58。在又一些实施例中,表达如本文公开的融合蛋白的宿主细胞还表达用于减少内源性受体表达的siRNA。在一些特定实施例中,内源性受体是CD200R、SIRPa、CD279(PD-1)、CD95(Fas)或CD2。

[0212] 在一些实施例中,表达如本文公开的融合蛋白的宿主细胞可以表达不止一种融合蛋白。例如,宿主细胞可以表达两种不同的融合蛋白(例如,包含PD-1胞外域的第一融合蛋白和包含TIM3胞外域的第二融合蛋白)。

[0213] 用途

[0214] 可以用表达如本公开中所述的融合蛋白的细胞治疗的疾病包括癌症、传染性疾病(病毒、细菌、原生动物感染)、免疫性疾病(例如自身免疫)或与老龄化相关的疾病(例如衰老)。过继性免疫和基因治疗对于各种类型的癌症(Morgan et al., Science 314:126, 2006; Schmitt et al., Hum. Gene Ther. 20:1240, 2009; June, J. Clin. Invest. 117:1466, 2007)和传染病(Kitchen et al., PLoS One 4:38208, 2009; Rossi et al., Nat. Biotechnol. 25:1444, 2007; Zhang et al., PLoS Pathog. 6:e1001018, 2010; Luo et al., J. Mol. Med. 89:903, 2011)是有希望的治疗方法。

[0215] 包括实体瘤和白血病在内的多种癌症适合于本文公开的组合物和方法。可以治疗的示例性癌症类型包括乳腺癌、前列腺癌和结肠癌;所有形式的肺支气管肺癌;骨髓性白血病;黑色素瘤;肝癌;神经母细胞瘤;乳头状瘤;APUD瘤;迷芽瘤;鳃原瘤;恶性类癌综合征;类癌心脏病;和癌(例如Walker、基底细胞、基底鳞状的、Brown-Pearce、导管、Ehrlich肿瘤、Krebs 2、Merkel细胞、粘液性、非小细胞肺、燕麦细胞、乳头状、硬化、细支气管、支气管、鳞状细胞和过渡细胞)。可以治疗的其他类型的癌症包括组织细胞病症;恶性组织细胞病;白血病;霍奇金病;免疫增殖性小;非霍奇金淋巴瘤;浆细胞瘤;网状内皮组织增殖;黑色素瘤;软骨母细胞瘤;软骨瘤;软骨肉瘤;纤维瘤;纤维肉瘤;巨细胞瘤;组织细胞瘤;脂肪瘤;脂肪肉瘤;间皮瘤;粘液瘤;粘液肉瘤;骨瘤;骨肉瘤;脊索瘤;颅咽管瘤;无性细胞瘤;错构瘤;间叶瘤;中肾瘤;肌肉瘤;成釉细胞瘤;牙骨质瘤;牙瘤;畸胎瘤;胸腺瘤;滋养细胞肿瘤。此外,还考虑以下能够治疗的癌症类型:腺瘤;胆管癌;胆脂瘤;圆柱瘤;囊腺癌;囊腺瘤;颗粒细胞瘤;卵巢两性母细胞瘤;肝癌;汗腺瘤;胰岛细胞瘤;睾丸间质细胞瘤;乳头状瘤;睾丸支持细胞瘤;卵泡膜细胞瘤;平滑肌瘤;平滑肌肉瘤;成肌细胞瘤;肌瘤;肌肉瘤;横纹肌瘤;横纹肌肉瘤;室管膜瘤;神经节细胞瘤;胶质瘤;髓母细胞瘤;脑膜瘤;神经鞘瘤;神经母细胞瘤;神经上皮瘤;神经纤维瘤;神经瘤;副神经节瘤;副神经节瘤非嗜铬细胞瘤。可以治疗的癌症类型还包括血管角化瘤;血管淋巴样增生伴嗜酸性粒细胞增多;血管瘤硬化;血管瘤病;血管球瘤;血管内皮细胞瘤;血管瘤;血管外皮细胞瘤;血管肉瘤;淋巴管瘤;淋巴管肌瘤;淋巴管肉瘤;松果体瘤;肉瘤;软骨肉瘤;叶状囊肉瘤;纤维肉瘤;血管肉瘤;平滑肌肉瘤;白血病性肉瘤;脂肪肉瘤;淋巴管肉瘤;肌肉瘤;粘液肉瘤;卵巢癌;横纹肌肉瘤;肉瘤;肿瘤;多发性神经纤维瘤和宫颈发育不良。

[0216] 示例性的说明适合融合蛋白T细胞疗法的各种过度增殖性疾病是B细胞癌,包括B细胞淋巴瘤(如各种形式的霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤(NHL)或中枢神经系统淋巴瘤)、白血病(如急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、毛细胞白血病、慢性骨髓性

白血病的B细胞母细胞转化和急性骨髓性白血病(AML)和骨髓瘤(如多发性骨髓瘤)。另外的B细胞癌包括小淋巴细胞淋巴瘤、B细胞幼淋巴细胞白血病、淋巴浆细胞淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、浆细胞骨髓瘤、骨的孤立性浆细胞瘤、骨外浆细胞瘤、粘膜相关的节外边缘区B细胞淋巴瘤(MALT)淋巴组织、结边缘区B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、原发性积液淋巴瘤、Burkitt淋巴瘤/白血病、不确定恶性潜能的B细胞增殖、淋巴瘤样肉芽肿病和移植后淋巴组织增生性疾病。

[0217] 炎症和自身免疫疾病包括关节炎、类风湿性关节炎、幼年类风湿性关节炎、骨关节炎、多软骨炎、银屑病关节炎、银屑病、皮炎、多发性肌炎/皮肌炎、包涵体肌炎、炎性肌炎、中毒性表皮坏死松解症、系统性硬皮病和硬化症、CREST综合征、炎症性肠病疾病、克罗恩病、溃疡性结肠炎、呼吸窘迫综合征、成人呼吸窘迫综合征(ARDS)、脑膜炎、脑炎、葡萄膜炎、结肠炎、肾小球肾炎、过敏性病况、湿疹、哮喘、涉及T细胞浸润和慢性炎症反应的病况、动脉粥样硬化、自身免疫性心肌炎、白细胞粘附缺陷、系统性红斑狼疮(SLE)、亚急性皮肤红斑狼疮、盘状红斑狼疮、狼疮性脊髓炎、狼疮性脑炎、青少年糖尿病、多发性硬化、过敏性脑脊髓炎、视神经脊髓炎、风湿热、Sydenham舞蹈病、细胞因子和T淋巴细胞介导的与急性和迟发性过敏反应相关的免疫应答、结核病、结节病、肉芽肿病包括韦格纳肉芽肿病和Churg-Strauss病、粒细胞缺乏症、血管炎(包括过敏性血管炎/脉管炎、ANCA和类风湿性血管炎)、再生障碍性贫血、Diamond Blackfan贫血、免疫性溶血性贫血包括自身免疫性溶血性贫血(AIHA)、恶性贫血、纯红细胞再生障碍(PRCA)、因子VIII缺乏、血友病A、自身免疫性中性粒细胞减少症、全血细胞减少症、白细胞减少症、涉及白细胞渗出的疾病、中枢神经系统(CNS)炎性失调、多器官损伤综合征、重症肌无力、抗原-抗体复合物介导的疾病、抗肾小球基底膜疾病、抗磷脂抗体综合征、过敏性神经炎、Behcet病、Castleman综合征、Goodpasture综合征、Lambert-Eaton肌无力综合征、Reynaud综合征、Sjögren综合征、Stevens-Johnson综合征、实体器官移植排斥反应、移植物抗宿主病(GVHD)、大疱性类天疱疮、天疱疮、自身免疫性多发性内分泌病、血清阴性脊柱关节病、Reiter病、僵硬综合征、巨细胞动脉炎、免疫复合性肾炎、IgA肾病、IgM多发性神经病或IgM介导的神经病变、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、血栓性血小板减少性紫癜(TTP)、过敏性紫癜、自身免疫性血小板减少症、睾丸和卵巢自身免疫性疾病包括自身免疫性睾丸炎和卵巢炎、原发性甲状腺功能减退症；自身免疫性内分泌疾病包括自身免疫性甲状腺炎、慢性甲状腺炎(桥本氏甲状腺炎)、亚急性甲状腺炎、特发性甲状腺功能减退症、艾迪生病、格雷夫斯病、自身免疫性多腺体综合征(或多腺内分泌综合征)、I型糖尿病也称为胰岛素依赖型糖尿病(IDDM)和Sheehan综合征；自身免疫性肝炎、淋巴间质性肺炎(HIV)、闭塞性细支气管炎(非移植)、非特异性间质性肺炎(NSIP)、格林-巴利综合征、大血管炎(包括风湿性多肌痛和巨细胞(大动脉)动脉炎)、中血管血管炎(包括川崎病和结节性多动脉炎)、结节性多动脉炎(PAN)强直性脊柱炎、伯格氏病(IgA肾病)、急进性肾小球肾炎、原发性胆汁性肝硬化、腹腔口炎性腹泻(麸质肠病)、冷球蛋白血症、与肝炎相关的冷球蛋白血症、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、冠状动脉疾病、家族性地中海热、显微镜下多血管炎、Cogan综合征、Whiskott-Aldrich综合征和血栓闭塞性脉管炎。

[0218] 在特定的实施例中，用本文公开的融合蛋白治疗受试者的方法包括治疗急性骨髓性白血病、急性淋巴细胞性白血病、急性骨髓性白血病(AML)和慢性骨髓性白血病。

- [0219] 在特定实施例中,用本文公开的融合蛋白治疗受试者的方法包括治疗胰腺癌。
- [0220] 在特定实施例中,用本文公开的融合蛋白治疗受试者的方法包括治疗卵巢癌。
- [0221] 在特定的实施例中,提供了用本文所述的融合蛋白治疗疾病的方法,其中所述疾病包括表达CD200的实体瘤或被CD200⁺的髓样细胞浸润的肿瘤,并且所述融合蛋白具有包含CD200R的细胞外部分的细胞外组分。
- [0222] 在特定的实施例中,提供了用本文公开的融合蛋白治疗疾病的方法,其中所述疾病包括急性骨髓性白血病(AML),并且所述融合蛋白具有包含CD200R、SIRP α 、CD95(Fas)、CD279(PD-1)或CD2的细胞外部分的细胞外组分。
- [0223] 在特定的实施例中,提供了用本文公开的融合蛋白治疗疾病的方法,其中所述疾病包括实体瘤,并且所述融合蛋白具有包含TIM3、CD223(LAG3)、CD95(Fas)、CD279(PD-1)或CD2的细胞外部分的细胞外组分。
- [0224] 在特定的实施例中,提供了用本文公开的融合蛋白治疗疾病的方法,其中所述疾病包括乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、前列腺癌或多发性骨髓瘤,并且所述融合蛋白具有包含CD200R的细胞外部分的细胞外组分。在一些此类实施例中,CD200R-9aas-CD28Cys融合蛋白由与SEQ ID NO.:7所示的多核苷酸序列至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%相同的多核苷酸编码。在某些实施例中,CD200R-9aas-CD28Cys融合蛋白由包含或由SEQ ID NO:7所示的多核苷酸序列组成的多核苷酸编码。在其他实施例中,CD200R-9aas-CD28Cys融合蛋白包括与SEQ ID NO.:30所示的氨基酸序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%相同的氨基酸序列。在进一步的实施例中,CD200R-9aas-CD28Cys融合蛋白包含或由SEQ ID NO.:30所示的氨基酸序列组成。
- [0225] 在特定的实施例中,提供了用本文公开的融合蛋白治疗疾病的方法,其中所述疾病包括卵巢癌、胰腺癌或AML,并且所述融合蛋白具有包含CD95(Fas)的细胞外部分的细胞外组分。在一些此类实施例中,Fastm-4-1BB融合蛋白由与SEQ ID NO.:185所示的多核苷酸序列至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%相同的多核苷酸编码。在某些实施例中,Fastm-4-1BB融合蛋白由包含或由SEQ ID NO:185所示的多核苷酸序列组成的多核苷酸编码。在其他实施例中,Fastm-4-1BB融合蛋白包括与SEQ ID NO.:186所示的氨基酸序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%相同的氨基酸序列。在进一步的实施例中,Fastm-4-1BB融合蛋白包含或由SEQ ID NO.:186所示的氨基酸序列组成。
- [0226] 在特定的实施例中,提供了用本文公开的融合蛋白治疗疾病的方法,其中所述疾病包括卵巢癌、胰腺癌或AML,并且所述融合蛋白具有包含CD95(Fas)的细胞外部分的细胞外组分。在一些此类实施例中,Fas-4-1BBtm融合蛋白由与SEQ ID NO.:187所示的多核苷酸序列至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%相同的多核苷酸编码。在某些实施例中,Fas-4-1BBtm融合蛋白由包含或由SEQ ID NO:187所示的多核苷酸序列组成的多核苷酸编码。在其他实施例中,Fas-4-1BBtm融合蛋白包括与SEQ ID NO.:188所示的氨基酸序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%相同的氨基酸序列。在

进一步的实施例中,Fas-4-1BBtm融合蛋白包含或由SEQ ID NO.:188所示的氨基酸序列组成。

[0227] 传染病包括与传染物相关的疾病,包括任何的各种细菌(例如致病性大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、铜绿假单胞菌、炭疽芽孢杆菌、肉毒杆菌、艰难梭菌、产气荚膜梭菌、幽门螺杆菌、霍乱弧菌、李斯特菌属、立克次氏体属、衣原体属等)、分枝杆菌和寄生虫(包括原生动物的任何已知寄生成员)。传染性病毒包括真核病毒,例如腺病毒、布尼亚病毒、疱疹病毒、乳头多瘤空泡病毒、乳头瘤病毒(例如HPV)、副粘病毒、小核糖核酸病毒、弹状病毒(例如狂犬病病毒)、正粘病毒(例如流感病毒)、痘病毒(例如牛痘病毒)、呼肠孤病毒、逆转录病毒、慢病毒(例如HIV)、黄病毒(例如HCV、HBV)等。在某些实施例中,用本公开的融合蛋白处理用HLA(MHC) I类分子加工和展示其抗原的胞质病原体感染。

[0228] 本公开的融合蛋白可以以细胞结合形式(例如,靶细胞群的基因治疗(成熟T细胞(例如CD8⁺或CD4⁺T细胞)或T细胞谱系的其他细胞))给予受试者。在一个具体实施例中,给予受试者的表达融合蛋白的T细胞谱系的细胞是同基因的、同种异体的或自体细胞。

[0229] 包括本公开的融合蛋白的药物组合物可以以适合待治疗(或预防)的疾病或病症的方式(由医学领域的技术人员所确定)给予。组合物的合适剂量、合适的持续时间和给药频率将通过诸如患者的症状,疾病的大小、类型和严重程度,活性成分的特定形式和给药方法等因素来确定。本公开提供了药物组合物,其包含表达如本文公开的融合蛋白的细胞和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。合适的赋形剂包括水、盐水、右旋糖、甘油等及其组合。

[0230] 在一些实施例中,本公开内容涉及增加免疫细胞活性、增强或延长免疫应答、刺激抗原特异性T细胞应答、抑制免疫抑制信号传导途径、治疗癌症或肿瘤、抑制癌细胞免疫抵抗、或治疗感染的方法,包括向有此需要的受试者给予有效量的表达如本文所述的融合蛋白的宿主细胞。在进一步的实施例中,用于任何上述方法的宿主细胞进一步表达工程化抗原特异性TCR、工程化抗原特异性高亲和力TCR、CAR、共刺激分子或其任何组合。在具体的实施例中,提供了治疗白血病的方法,包括共表达如本文公开的融合蛋白和重组抗原特异性TCR。

[0231] 在一些实施例中,提供了CD4⁺T细胞的诱导或增强的I类HLA应答方法,包括向有此需要的受试者给予有效量的表达如本文所述的融合蛋白的CD4⁺T细胞。在进一步的实施例中,用于诱导或增强CD4⁺T细胞的I类HLA应答的宿主细胞,进一步表达工程化抗原特异性TCR、工程化抗原特异性高亲和力TCR、CAR、共刺激分子、或其任何组合。

[0232] 在任何上述实施例中,该方法在不给予外源IL-2的情况下是有效的。

[0233] 在一些实施例中,提供了用于增加受试者的免疫细胞(例如,CD4⁺T细胞或CD8⁺T细胞)中细胞因子产生的方法,其包括向有需要的受试者给予有效量的如本文所公开的融合蛋白或编码融合蛋白的载体。

[0234] 在一些实施例中,提供了用于增加免疫细胞(例如,CD4⁺T细胞或CD8⁺T细胞)中细胞因子产生的方法,其包括将免疫细胞与如本文所公开的融合蛋白或编码融合蛋白的载体接触。在进一步的实施例中,免疫细胞进一步表达工程化抗原特异性TCR、工程化抗原特异性高亲和力TCR、CAR、共刺激分子或其任何组合。在一些实施例中,增加的细胞因子包括干扰素(IFN γ)、肿瘤坏死因子(TNF α)或白介素-2(IL-2)

[0235] 在其他实施例中,任何上述方法的受试者进一步用辅助疗法治疗,例如化学疗法。示例性化学治疗剂包括,例如,烷化剂诸如塞替派和环磷酰胺;烷基磺酸盐诸如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡;氮丙啶诸如苯并多巴(benzodopa)、卡巴醌、美妥替哌(meturedopa)和uredopa;乙烯亚胺类和甲基蜜胺类(methylamelamines),包括六甲蜜胺、三亚乙基三聚氰胺、三乙烯基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酰胺和三羟甲基胺;氮芥类例如苯丁酸氮芥、氯苯哒嗪、氯磷酰胺、雌莫司汀、异环磷酰胺、氮芥、盐酸氧氮芥、美法仑(Melphalan)、新氮芥、苯芥胆甾醇、泼尼莫司汀、曲磷胺、尿嘧啶芥;亚硝基脲类如卡莫司汀、氯嗪菌素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀、马来酰汀;抗生素如阿克拉霉素(aclacinomysins)、放线菌素、安曲霉素(authramycin)、重氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素、卡奇霉素(calicheamicin)、carabicin、洋红霉素(caminomycin)、嗜癌菌素(carzinophilin)、色霉素(chromomycins)、放线菌素D、柔红霉素、地托比星(detorubicin)、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸、阿霉素、表阿霉素、依索比星(esorubicin)、伊达比星(idarubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素、霉酚酸(mycophenolic acid)、诺加霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycins)、派来霉素(peplomycin)、泊非霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星(rodoxorubicin)、链黑霉素(streptonigrin)、链脲霉素、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin);抗代谢物,如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物如二甲叶酸(denopterin)、甲氨蝶呤、蝶罗呤、三甲氧蝶呤(trimetrexate);嘌呤类似物,如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫胺素、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、多西氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷、5-FU;卡鲁睾酮(calusterone)、2-甲氧睾酮丙酸酯(dromostanolone propionate)、环硫雄醇、美雄烷、睾内脂等雄激素;抗肾上腺素,如氨鲁米特、米托坦,曲洛斯坦(trilostane);叶酸补充剂如亚叶酸;醋葡萄糖内酯;醛磷酰胺糖苷;氨基乙酰丙酸;安吖啶;bestrabucil;比生群;依达曲沙(edatraxate);地磷酰胺(defofamine);地美可辛;地吖啶(diaziquone);依氟鸟氨酸(elformithine);醋酸乙烯酯;乙环氧啶(etoglucid);硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;氯尼达明;米托胍腙(mitoguazone);米托蒽醌;单哌潘生丁(mopidamol);二胺硝吖啶(nitracrine);喷司他丁;蛋氨氮芥(phemamet);吡柔比星;鬼臼毒素;二乙基酰肼(2-ethylhydrazide);甲基苄肼;PSKT;雷佐生(razoxane);西佐;螺环堵;细交链孢菌酮酸;三亚胺;2,2',2"-三氯三乙胺;氨基甲酸乙酯;长春地辛;达卡巴嗪;甘露醇氮芥;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌泊溴烷;gacytosine;阿拉伯糖昔("Ara-C");环磷酰胺;塞替派;紫杉烷,例如紫杉醇(TaxolTM, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)和多西紫杉醇(TaxotereTM, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France);苯丁酸氮芥;吉西他滨;6-巯基嘌呤;巯基嘌呤;甲氨蝶呤;铂类似物,如顺铂和卡铂;长春碱;铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;丝裂霉素C;米托蒽醌;长春新碱;长春瑞滨;去甲长春碱;诺消灵;替尼泊苷;柔红霉素;氨喋呤;希罗达;伊班膦酸钠;CPT-11;拓扑异构酶抑制剂RFS2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);维甲酸;埃斯波霉素(esperamicins)、卡培他滨;和任何上述的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0236] 在一些实施例中,辅助疗法是疫苗、免疫抑制信号的抑制剂、B-Raf抑制剂、MEK抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、细胞毒性剂、化学治疗剂或其任何组合。在一些实施例中,免疫抑制信号的抑制剂是抗体或siRNA。在一些实施例中,抗体或siRNA特异于PD-1、PD-L1、PD-L2、

CTLA4、LAG3、KIR、CD244、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、GAL9、TIM3、A2aR或其组合。

[0237] 实例

[0238] 实例1

[0239] CD200R-CD28融合蛋白构建体

[0240] 使用图1A中的示意图说明了本文所述的示例性融合蛋白。示例性融合蛋白包括免疫调节融合蛋白(IFP),其包括CD200R的细胞外结构域或其部分和CD28的细胞内信号传导结构域或其部分(图1A,构建体I-V)。疏水组分可以包括CD200R(图1A,构建体I)或CD28(图1A,构建体II-V)的跨膜结构域或其部分。在一些示例性的CD200R-CD28融合蛋白中,疏水组分包括CD28的跨膜结构域,而细胞外组分还包括CD28的细胞外部分,尤其是与疏水组分相邻的细胞外半胱氨酸残基(例如,图1A构建体III,CD200R-CD28Cys;构建体IV,CD200R-3aas-CD28Cys;以及构建体V,CD200R-9aas-CD28Cys)。细胞外组分可包含CD200R的细胞外结构域的全部或部分。在一些实施例中,细胞外组分包含CD200R的整个细胞外结构域(图1A,构建体I-III)。在其他实例中,细胞外组分包含从CD200R的N-末端的前235个氨基酸(保留N-连接的糖基化位点)(例如,图1A,构建体IV,CD200R-3aas-CD28Cys)或前229个氨基酸(例如,图1A,构建体V,CD200R-9aas-CD28Cys)。可以通过调节融合蛋白构建体来操纵的细胞外组分的大小,可能会影响融合蛋白进入免疫突触并与cSMAC中的TCR共定位以传递强共刺激信号的能力。另外,CD200R-CD28构建体具有将通常来自CD200R与其靶结合的抑制信号转变成由CD28细胞内信号传导结构域产生的正信号的能力。

[0241] 编码CD200R-CD28融合蛋白的示例性核酸分子包含以下元件(5'至3'):细胞外组分(CD200R)-多聚化结构域(CD28半胱氨酸)-疏水组分(CD28跨膜)-细胞内组分(CD28细胞内)。在一些实施例中,编码CD200R-CD28融合蛋白的核酸分子包含SEQ ID NO:47-51或1、6、7、10、12、14或15中任一项所示的核酸分子。

[0242] 编码构建体的核酸从Invitrogen订购或通过PCR在实验室中生成,然后定向TOPO克隆到pENTRTM/D-TOPO[®]载体(Invitrogen)中,并使用Gateway[®]技术(Invitrogen)转移到逆转录病毒载体pMP71-attR中。在某些实施例中,在克隆到pMP71-attR逆转录病毒载体中之前,对编码本公开的IFP的核酸分子进行了密码子优化。

[0243] 实例2

[0244] CD200R-CD28构建体的转基因表达

[0245] 基于鼠C57BL/6Friend病毒诱导的红白血病(FBL)和TCR_{gag}转基因小鼠的临床前播散性白血病小鼠模型用于确定CD200R-CD28嵌合受体是否可以改善T细胞功能。

[0246] 产生TCR转基因小鼠以产生对gag表位(TCR_{gag})特异性的CD8⁺T细胞。C57BL/6(B6)小鼠购自Jackson实验室.TCR_{gag}转基因小鼠在CD8⁺T细胞中表达对Friend病毒gag表位具有特异性的TCR转基因(Ohlén et al., J. Immunol. 166:2863-2870, 2001)。进行的所有动物研究均已获得华盛顿大学动物保护与使用委员会协议(协议编号2013-01)的批准。鼠B6 Friend病毒诱导的红白血病(FBL)表达F-MuLV编码的gag表位(肽CCLCLTVFL (SEQ ID NO.: 213))。

[0247] 将基于鼠基因的CD200R-CD28嵌合构建体插入pMP71逆转录病毒载体中,并用于转导抗CD3和抗CD28抗体刺激的原代小鼠脾细胞。如实例1中所述设计构建体,并从Invitrogen订购或通过PCR在实验室中产生。然后将构建体定向TOPO克隆到pENTRTM/

D-TOPO[®]载体 (Invitrogen) 中,并使用Gateway[®]技术 (Invitrogen) 将其转移到逆转录病毒载体pMP71-attR中。使用效应子转导试剂 (Qiagen) 用逆转录病毒载体转导逆转录病毒包装细胞系Plat-E (Morita et al., 2000, Gene Therapy 7:1063-1066, 2000; Cell Biolabs, Inc.)。在第2天和第3天收集病毒上清液,然后用于转导TCR_{gag} T细胞。

[0248] 转染前一天,用抗CD3/CD28和100U/mL rhIL-2刺激TCR_{gag} T细胞。在存在IL-2和凝聚胺的情况下,在12孔板中以1000g离心转染 (spinfection) 90分钟,进行TCR_{gag} T细胞的转导。与T细胞转导类似,用CD200用凝聚胺离心转染来转染FBL细胞,然后进行分选以产生同质群体。

[0249] 转导后五天,通过抗CD200R抗体染色和流式细胞术分析CD8⁺T细胞的构建体表达 (图1B)。编码绿色荧光蛋白 (GFP) 的载体用作对照。转导效率范围为4-36%,构建体之间的转导细胞平均荧光强度 (MFI) 相似。

[0250] 实例3

[0251] CD200R-CD28构建体促进转导的T细胞在体外的增殖、积累、以及效应子功能

[0252] 评价实例1和2中描述的CD200R-CD28构建体促进TCR_{gag} T细胞增殖、积累和效应子功能的能力。

[0253] 效应子细胞在体外的扩增

[0254] 如之前所述,效应子细胞在体外产生 (Stromnes et al., J.Clin.Invest.120: 3722-34, 2010)。在10mL培养基 (补充有非必需氨基酸的IMDM, 2μM谷氨酰胺, 100U/mL青霉素/链霉素, 10%FBS和50μM 2-巯基乙醇) 中将辐照的抗原呈递脾细胞 (5×10^6)、辐照的FBL (3×10^6) 和TCR_{gag} tg细胞 (10^6) 与IL-2 (50U/mL) 一起培养。在最后一次刺激后5-7天,每周再刺激T细胞并通过流式细胞术评估。

[0255] 体外T细胞增殖测定

[0256] 如在实例2中转导的TCR_{gag} T细胞。为了评估体外T细胞增殖,根据制造商的方案,使用CellTrace紫 (CTV, Life Technologies) 对TCR_{gag} T细胞进行染色。用滴定数量的CD200⁻FBL或CD200⁺FBL细胞刺激CTV标记的Tg T细胞 (10^5) 和GFP对照T细胞。3天后,通过流式细胞术评估TCR_{gag} T细胞的CTV稀释度。

[0257] 流式细胞术结果表明用滴定数量的CD200-FBL细胞 (上部) 或CD200⁺FBL (下部) 刺激后的TCR_{gag} T细胞数量如图2A所示。与GFP对照转导的T细胞 (红线) 相比,测试的五种CD200R-CD28构建物中有四个可显著改善TCR_{gag} T细胞响应于CD200⁺FBL的增殖 (蓝线)。

[0258] 体外T细胞积累测定

[0259] 为了确定增强的增殖是否还导致转导细胞的积累增加,测量了在用辐照的CD200⁺FBL进行的多个刺激周期中,总TCR_{gag} 群中转导细胞的比例。

[0260] 一些构建体促进了转导的T细胞的积累,包括CD200R-CD28tm、CD200R-CD28Cys、CD200R-3aas-CD28Cys和CD200R-9aas-CD28Cys (图2B)。在这些构建体中,CD200R-9aas-CD28Cys在多次刺激中表现出最大的转导T细胞增加,导致在3次刺激中扩增超过3倍。

[0261] 体外T细胞富集测定

[0262] 用CD200⁺或CD200⁻辐照的FBL细胞对转导的和未转导的CD8⁺T细胞的混合群进行再刺激,以确定再刺激是否会富集转导的CD200R-9aas-CD28Cys IFP⁺T细胞群。与野生型T细胞相比,用辐照过的CD200⁺肿瘤细胞进行的重复再刺激富集了用IFP转导的细胞,这表明识

别表达CD200R-9aas-CD28Cys IFP的配体的靶可增强反应(图2C)。

[0263] 体外共定位测定

[0264] 通过显微镜对转导的T细胞进行成像,以确定CD200R-9aas-CD28Cys IFP是否在T细胞活化过程中与免疫突触(IS)中的同源配体共定位。CTxB用于染色细胞膜中的脂质,所述脂质在突触处富集(图2D,图I)。靶向由FBL细胞表达的CD200(图2D,图II)或由T细胞表达的CD200R(图2D,图III)的标记的抗体用于可视化分子相对于IS的位置。CD200配体和CD200R在IS内共定位(图2D,图IV),表明构建体大小适当,以由免疫突触容纳。

[0265] 基于CFSE的细胞毒性测定。

[0266] CD28信号传导的增加也促进效应子功能(Chen and Flies, Nat. Rev. Immunol. 13: 227-242, 2013)。测试了CD200R-CD28融合蛋白转导的T细胞对靶肿瘤细胞杀伤力的增加。将FBL和对照EL4肿瘤在室温分别与PBS中的 $2.5\mu\text{M}$ (CFSE^{hi}) 或 $0.25\mu\text{M}$ (CFSE^{lo}) CFSE温育10分钟。通过在含血清的培养基中洗涤肿瘤细胞来去除过量的染料。将EL4和FBL肿瘤细胞的1:1混合物与用滴定数量的CD200R-CD28或GFP载体转导的TCR_{gag} 体外扩增的效应子T细胞在96孔圆底平板中于37°C和5% CO₂下温育4小时。通过流式细胞术分析孔中剩余的总CFSE阳性细胞(FBL+EL4) 中的%CFSE^{hi} (FBL), 来确定了特定的FBL裂解。

[0267] 与用空载体转导的TCR_{gag} T细胞相比,用CD200R-CD28构建体转导的TCR_{gag} T细胞显示出更高的体外裂解FBL肿瘤的能力(图2E、2G)。用不同稀释度的荧光染料CellTrace紫(CTV)或CFSE标记靶肿瘤细胞,以产生EL4细胞(CTV⁺)、CD200⁺FBL(CFSE^{hi}) 和非特异性EL4(CFSE^{lo}) 对照靶的1:1:1混合物(图2F)。此外,对照GFP转导的TCR_{gag} T细胞以相等的效率裂解CD200⁻FBL和CD200⁺FBL(图2G)。相比之下,与对照T细胞相比,用CD200R-9aas-CD28Cys转导的TCR_{gag} T细胞显示了对CD200⁺FBL细胞的杀伤的增加,以最低的测试E:T比裂解了40%以上的CD200⁺FBL(图2G)。

[0268] 综上所述,这些数据表明CD200R-CD28构建体起到响应肿瘤细胞刺激而增加转导的T细胞的积累和裂解活性的作用。

[0269] 实例4

[0270] CD200R-9AAS-CD28CYS转导的T细胞显示了响应于FBL的识别的增强的体内积累

[0271] 如前所述,B6小鼠腹膜内(i.p.)注射了 4×10^6 个活FBL白血病细胞(Stromnes et al., J.Clin.Invest. 120:3722-34, 2010)。在让FBL播散5天后,在转移效应子T细胞前至少6小时,小鼠接受了180mg/kg的环磷酰胺(Cy, 可作为Cytoxan®而商购)腹腔注射。为了进行存活研究,将先前在体外进行了1-3次刺激的 10^5 个TCR_{gag} T细胞转移至荷瘤小鼠中。为了评估短期增殖和积累,将融合蛋白转导的T细胞和GFP对照转导的T细胞各 2×10^6 共同注射到荷瘤小鼠中,并在8天后对小鼠进行安乐死以进行分析。定期监测小鼠的肿瘤负荷,如果肿瘤进展的证据表明会在24-48小时之内死亡,则将其安乐死。

[0272] 为了评估CD200R-9aas-CD28Cys融合蛋白转导的T细胞是否响应FBL的识别而在体内表现出更大的增殖和积累,将融合蛋白转导和对照细胞的混合群体转移到荷瘤小鼠中,并在转移后8天通过离体分析比较细胞的比率(图3A)。通过使用同源标志,相对于注射的比例,在脾和淋巴结中检测到的转导T细胞比对照细胞高1.2-1.4倍(图3B)。转导的CD200R-9aas-CD28Cys⁺TCR_{gag} T细胞在转移至荷瘤小鼠后3天表现出降低的CD62L表达,表明了效应T细胞表型(图3C)。到第15天,转导的T细胞和对照T细胞表现出相似的表型,包括耗竭标

志的缺乏(图3D)。与体外发现相似,表达CD200R-9aas-CD28Cys的T细胞在体内响应于肿瘤刺激而显示出增加的累积。此外,它们在转移至荷瘤小鼠后至少3天表现出与效应子T细胞表型一致的蛋白质表达模式。

[0273] 实例5

[0274] CD200R-CD28⁺T细胞的过继免疫疗法在播散性白血病的治疗中表现出更大的活性

[0275] CD200R-CD28转导的T细胞的过继免疫疗法在播散性白血病的临床前小鼠模型中介导了提高的治疗活性。

[0276] 给小鼠注射了致死剂量的CD200⁺FBL白血病,五天后,接受Cy治疗的小鼠群体接受了10⁵个T细胞的额外治疗(图4A)。如图1A所示,通过比较用CD200R-CD28tm、CD200R-9aas-CD28Cys和GFP对照构建体转导的T细胞,评估了CD28半胱氨酸键对由CD200R-CD28构建体介导的功效的贡献。将IL-2作为另外的治疗剂给予一组小鼠10天以促进T细胞的活性(Stromnes et al., J.Clin.Invest.120:3722-34,2010)。注射前,通过流式细胞术评估T细胞的各种表面蛋白。转导的和对照的TCR_{gag} T细胞表现出相似的表型,表明转导不会改变注射前细胞的表型(图4B)。

[0277] 在接受IL-2注射的小群小鼠中,T细胞提高了存活率,但未检测到接受不同组T细胞的小鼠的存活率有显著差异(图4C)。但是,在未接受IL-2注射的小鼠群体中,接受了CD200R-CD28构建体转导的T细胞的小鼠的存活率有了显著提高,所述CD200R-CD28构建体的大小适合在免疫突触内(图4D)。不接受T细胞而接受GFP对照载体转导的T细胞或经最大胞外域(CD200R-CD28Cys IFP)转导的T细胞的大多数小鼠都无法存活到30天以上(图4C和4D,分别为黑色实线、虚线、和橙色线)。相比之下,接受CD200R-CD28tm⁺T细胞的小鼠中的71%和接受CD200R-9aas-CD28Cys⁺T细胞的小鼠中的83%在治疗后存活了100天以上(图4C和4D,分别为绿线和红线)。这些数据表明,用CD200R-CD28构建体转导T细胞提供足够的协同刺激,以克服T细胞免疫疗法对外源IL-2注射的依赖性,所述CD200R-CD28构建体跨越类似于免疫突触中的膜之间的距离的距离。此外,尽管在未接受外源性IL-2注射的小鼠中测试的CD200Rtm-CD28和CD200R-9aas-CD28Cys构建体之间在增殖和积累方面存在差异,但两种IFP均有效增强了T细胞免疫疗法,从而显著改善了从其它进行性白血病中获得的临床结果。

[0278] 实例6

[0279] CD200R-9AAS-CD28CYS⁺T细胞不会引起与内源性组织的自发反应,并且在体内不会表现出正常组织的浸润

[0280] 为了确定TCR_{gag} T细胞的转导是否能充分降低激活阈值以导致与内源性组织的自身反应,在白蛋白启动子的控制下,在转基因小鼠中评估了自身免疫毒性,该转基因小鼠经改造可在肝细胞中表达FBL gag肿瘤Ag,作为自身抗原(图5A)。体外产生了TCR_{gag} 效应子,并将10⁶株转移至环磷酰胺治疗的患有播散性白血病的A1b:_{Gag} 小鼠中。转移后三天和第七天,通过定量肝酶天冬氨酸氨基转移酶(AST)和丙氨酸氨基转移酶(ALT)的血清水平来评估肝损伤。小鼠用对照或CD200R-9aas-CD28Cys⁺TCR_{gag} 细胞的过继治疗在转移后第3或7天不会影响AST或ALT的血清水平,表明CD200R-9aas-CD28Cys不会在A1b:Gag小鼠中诱导可检测到的自身免疫性肝损伤(图5B)。

[0281] 与对照T细胞相比,IFP转导的T细胞未显示出正常组织浸润的增加。转移后第7天

对小鼠实施安乐死，并用针对T细胞标志CD3的抗体对肝脏切片进行染色，以定量T细胞浸润。观察到肝组织中T细胞的受限存在，CD200R-9aas-CD28Cys⁺或对照TCR_{gag}受体之间无显著差异，这表明由于IFP表达而导致的淋巴细胞浸润没有增加(图5C)。

[0282] 实例7

[0283] 4-1BB共刺激信号传导结构域促进转导的T细胞在体外的积累

[0284] 共刺激受体4-1BB在激活的T细胞上被上调，这促进T细胞存活和细胞因子产生(Chen and Flies, Nat. Rev. Immunol. 13:227-242, 2013)。为了评估带有或不带有CD28的细胞内信号传导结构域的4-1BB的细胞内信号传导结构域是否可以诱导T细胞增殖和积累增加，使用4-1BB(CD200R-9aas-4-1BB)、或结合4-1BB和CD28(CD200R-9aas-CD28-4-1BB)，用实例2中所述的方法产生IFP(图6A)。如实例2中那样转导TCR_{gag} T细胞，并且如实例3中那样在体外产生TCR_{gag}效应子细胞。

[0285] 如用CD200R-9aas-CD28Cys所观察到的，用4-1BB构建体转导的T细胞在体外多轮刺激中积累(图6B)。这些数据表明4-1BB IFP也促进T细胞的增殖和存活。

[0286] 使用实例3中所述的基于CFSE的细胞毒性测定法，用CD200R-4-1BB转导的TCR_{gag} T细胞表现出增强的体外裂解FBL肿瘤的能力(图6C)。CD200R-41BB转导的T细胞还促进存活(图6D)。

[0287] 实例8

[0288] CD200RTM-CD28的共表达增强了WT1特异性TCR原代T细胞的功能

[0289] 产生人CD200Rtm-CD28构建体(SEQ ID NO.:1)，以确定IFP表达是否增强了人原代T细胞的功能。通过将基因与P2A元件连接，将构建体与HLA-A2限制性WT1₁₂₆特异性TCR“C4”的β和α链结合(图7A)。对第一P2A序列进行密码子优化，以防止与第二P2A序列基因重组。为了产生慢病毒，使用Effectene(Qiagen)用pRRSIN和包装载体pMDLg/pRRE、pMD2-G和pRSV-REV中的人构建体转导293T/17细胞(3×10^6 细胞/板)。转染后第1天更换培养基，第2天和第3天收集含病毒的上清液，将等分试样冷冻以备用。

[0290] 缺乏内源性TCR的Jurkat人T细胞系用于测试IFP和TCR的表达。这些Jurkat T细胞通过在32°C下用2m1逆转录病毒上清液以1000g离心转染 2×10^6 个细胞90分钟进行转导。Jurkat人T细胞系的三基因构建体转导导致IFP的高表达和TCR的表达，所述TCR的表达与仅用TCR转导的T细胞的MFI相似(图7A)。

[0291] 为了转导原代人T细胞，从HLA-A2⁺供体中收获外周血单核细胞(PBMC)。使用Miltenyi磁珠纯化CD8⁺T细胞，并用人T细胞Expander CD3/CD28 Dynabeads(Life Technologies)和50IU/ml IL-2刺激。刺激后四小时，如上文针对Jurkat T细胞所述那样转导T细胞。如先前所述，用快速扩增方案(REP)每10-14天再刺激T细胞(Ho et al., J Immunol Methods 310:40-52, 2006)。

[0292] 人类细胞系T2用作APC，因为它缺乏TAP，因此不能呈递内源肽，而MHCI的低水平表达则允许呈递外源负载的肽。通过流式细胞术评估T2细胞CD200的表达(图7B)。T2细胞表现出低水平的内源性CD200表达(图7B)。

[0293] 用WT1₁₂₆冲击的T2细胞刺激转导的T细胞。尽管在靶细胞上CD200表达水平较低，但与仅用C4 TCR进行转导的T细胞相比，CD200Rtm-CD28转导的T细胞显示出增强的增殖(图7C)。另外，当暴露于CD200dim肿瘤细胞时，与对照T细胞相比，经刺激的CD200Rtm-CD28转导

的T细胞(即IFP⁺T细胞)产生的IFN γ 和IL-2水平升高(图7D)。

[0294] 总体而言,这些结果表明,被转导以表达人CD200R_{TM}-CD28构建体的原代T细胞和WT1₁₂₆特异性TCR的 β 和 α 链相对于单独用TCR构建体转导的T细胞表现出增强的增殖和增加的细胞因子产生。

[0295] 实例9

[0296] SIRP α -CD28融合蛋白构建体在体外促进转导的T细胞积聚。

[0297] 如本文所述的示例性融合蛋白还包括IFP,其包括SIRP α 的细胞外结构域或其部分和CD28的细胞内信号传导结构域(图8A)。疏水组分可以包括SIRP α 或CD28的跨膜结构域或其部分。在一些示例性的SIRP α -CD28融合蛋白中,疏水组分包括CD28的跨膜结构域,而细胞外组分还包括CD28的细胞外部分,尤其是与疏水组分相邻的细胞外半胱氨酸残基(例如,SIRP α -CD28Cys、SIRP α -6aas-CD28Cys、SIRP α -9aas-CD28Cys和SIRP α -9aas-CD28Cys)。细胞外组分可包含SIRP α 的细胞外结构域的全部或部分。在一些实施例中,细胞外组分包含SIRP α 的整个细胞外结构域。在其他实例中,细胞外组分包含从SIRP α 的N-末端的前367个氨基酸(例如,SIRP α -6aas-CD28Cys)或前364个氨基酸(例如,SIRP α -9aas-CD28Cys)或前350个氨基酸(SIRP α -23aas-CD28Cys)。细胞外组分的大小可能会影响融合蛋白进入免疫突触并与cSMAC中的TCR共定位以传递强共刺激信号的能力。在一些实例中,细胞外组分包含截短的SIRP α ,其可以改变细胞外组分的大小。例如,为了考虑融合蛋白的细胞外结构域的另外的细胞外氨基酸(例如,另外的9或12个氨基酸),SIRP α -6aas-CD28具有保留天然N-连接糖基化位点的SIRP α 的截短部分。在另一个实例中,SIRP α -23aas-CD28具有SIRP α 的截短部分,其缺少SIRP α 细胞外结构域的整个茎区。另外,SIRP α -CD28构建体具有将由SIRP α 与其靶结合引发的信号转换成由CD28细胞内信号传导结构域产生的正(例如,共刺激性)信号的能力。

[0298] 使用实例2中描述的方法产生使用SIRP α 细胞外组分的IFP(图8A)。如实例2中那样转导TCR_{gag} T细胞,并且如实施例3中那样在体外产生TCR_{gag}效应子细胞。与T细胞转导类似,用CD47或mCherry通过凝聚胺离心转染来转导FBL细胞,然后进行分选以产生同质群体。

[0299] 如用CD200R-9aas-CD28Cys所观察到的,用SIRP α 构建体转导的T细胞在体外多轮刺激中积累(图8B)。这些数据表明SIRP α -CD28 IFP也促进T细胞的增殖和存活。

[0300] 为了评估T细胞在体外增殖,如实例2中所述进行CTV稀释增殖测定。如用CD200R-9aas-CD28Cys所观察到的,与对照T细胞相比,用工程改造以维持T细胞-肿瘤细胞突触距离的SIRP α 构建体转导的T细胞显示出增强的增殖(图8C)。此外,在与SIRP α -CD28⁺T细胞共培养3天后,有效杀伤CD47⁺肿瘤细胞,但没有杀伤对照T细胞或缺少细胞内信号传导结构域的SIRP α 构建体转导的T细胞(图8D)。为了进一步评估SIRP α -CD28⁺T细胞的裂解能力,使用了IncuCyte[®]检测方法来定量杀伤CD47⁺FBL的杀伤。将总共10⁵m的Cherry⁺CD47⁺FBL在24孔板中用SIRP α -CD28构建体转导的人T细胞的滴度共培养。将板在细胞培养箱内的IncuCyte[®](Essen BioScience)中温育70小时。每小时捕获一次图像,以监测肿瘤细胞的杀伤情况,这由红色信号的丢失来确定。即使以最低的效应子与靶的比来测试,SIRP α -CD28⁺T细胞也会杀伤CD47⁺肿瘤细胞。

[0301] 实例10

[0302] PD-1-CD28融合蛋白构建体在体外促进转导的T细胞中细胞因子产生

[0303] 如本文所述的示例性融合蛋白还包括IFP,其包含PD-1的细胞外结构域或其部分

和CD28的细胞内信号传导结构域(图9A)。跨膜组分可以包括PD-1或CD28的跨膜结构域或其部分。在一些示例性的PD-1-CD28融合蛋白中,跨膜组分包括CD28的跨膜结构域,而细胞外组分还包括CD28的细胞外部分,尤其是与跨膜组分相邻的细胞外半胱氨酸残基,以促进链间的二聚化(例如PD1-CD28Cys、PD1-9aas-CD28Cys和PD1-21aas-CD28Cys)。细胞外组分可以包含PD-1的全部或部分细胞外结构域,或可以被截短(例如,在鼠构建体中为-9aas,在人构建体中为-12aas或-15aas;缺少PD-1的茎区,-21aas),以维持细胞之间的较短空间距离,促进接受了配体的受体进入免疫突触。另外,PD1-CD28构建体具有将通常来自PD1与其靶结合的抑制信号转变成由CD28细胞内信号传导结构域产生的正(例如,共刺激)信号的能力。

[0304] 使用实例2中描述的方法产生包括SIRPa细胞外组分的IFP(图9A)。如实例2中那样转导TCR_{gag} T细胞,并且如实例3中那样在体外产生TCR_{gag}效应子细胞。

[0305] 使用构建体I-IV和VII产生小鼠PD1-CD28 IFP(图9A)。在布雷菲德菌素A(保留产生的细胞因子)的存在下,用内源性表达PD-1配体(PD-L1和PD-L2)的FBL细胞再刺激PD1-CD28⁺T细胞。5小时后,将细胞固定并用BD Cytofix/Cytoperm试剂盒处理,以允许细胞内染色效应子细胞因子(IFN γ 和TNF α)。与对照T细胞相比,用五个PD1-CD28构建体中的每一个进行的转导都增强了细胞内细胞因子的产生(图9B)。

[0306] 使用构建体I-III和V-VII产生人PD1-CD28 IFP(图9A)。如上所述产生了包含PD1-CD28IFP和C4 TCR的载体。如上所述转导Jurkat T细胞。用TCR和PD1-12aas-CD28Cys或PD1-15aas-CD28Cys转导的T细胞表现出高转导效率和两种蛋白的表达(图10)。

[0307] 实例11

[0308] FAS-CD28融合蛋白构建体在体外促进转导的T细胞积聚和增强的功能。

[0309] 如本文所述的示例性融合蛋白还包括IFP,其包含Fas的细胞外结构域或其部分和CD28的细胞内信号传导结构域(图11A)。跨膜组分可以包括Fas或CD28的结构域或其部分。在一些示例性的Fas-CD28融合蛋白中,跨膜组分包括CD28的跨膜结构域,而细胞外组分还包括CD28的细胞外部分,尤其是与跨膜组分相邻的细胞外半胱氨酸残基(例如,Fas-CD28Cys和Fas-9aas-CD28Cys)。细胞外组分可以包含Fas的全部或部分细胞外结构域,或者可以截短,以在受体-配体相互作用时保持细胞之间的短空间距离(-9aas)。另外,Fas-CD28构建体具有将由Fas与其靶结合引发的信号转换成由CD28细胞内信号传导结构域产生的正(例如,共刺激性)信号的能力。

[0310] 使用实例2中描述的方法产生包括Fas细胞外组分的IFP(图11A)。如实例2中那样转导TCR_{gag} T细胞,并且如实例3中那样在体外产生TCR_{gag}效应子细胞。

[0311] 为了确定Fas-CD28 IFP的表达是否导致转导细胞积聚的增加,如实例3所述,在多个用辐照的FBL刺激的周期中测量了混合群中转导的细胞在总TCR_{gag}群中的比例。相对于对照T细胞,所有构建体均促进了转导的T细胞的积累(图11B)。Fas-CD28构建体但是不全长(FL) Fas的表达在体外多次刺激后促进T细胞的存活或扩增(图11C)。

[0312] 实例12

[0313] LAG3-CD28融合蛋白构建体

[0314] 如本文所述的示例性融合蛋白还包括IFP,其包含LAG3的细胞外结构域或其部分和CD28的细胞内信号传导结构域(图12A)。跨膜组分可以包括LAG3或CD28的结构域或其部分。在一些示例性的LAG3-CD28融合蛋白中,跨膜组分包括CD28的跨膜结构域,而细胞外组

分还包括CD28的细胞外部分,尤其是与跨膜组分相邻的细胞外半胱氨酸残基(例如,LAG3-CD28Cys和LAG3-9aas-CD28Cys)。细胞外组分可以包含LAG3的全部或部分细胞外结构域,或者可以截短,以在受体-配体相互作用时保持细胞之间的短空间距离(例如,-9aas)。另外,LAG3-CD28构建体具有将通常来自LAG3与其靶结合的抑制信号转变成由CD28细胞内信号传导结构域产生的正(例如,共刺激)信号的能力。

[0315] 使用实例2中描述的方法产生使用LAG3细胞外组分的IFP(图12A)。如所述,用LAG3-eGFP转导T细胞。转导后五天,通过抗LAG3抗体染色和流式细胞术分析CD8⁺T细胞的构建体表达(图12B)。编码仅绿色荧光蛋白(GFP)的载体用作对照。所有构建体表现出LAG3的表达(图12B)。

[0316] 实例13

[0317] TIM3-CD28融合蛋白构建体

[0318] 如本文所述的示例性融合蛋白还包括IFP,其包含TIM3的细胞外结构域或其部分和CD28的细胞内信号传导结构域(图13A)。跨膜组分可以包括TIM3或CD28的结构域或其部分。在一些示例性的TIM3-CD28融合蛋白中,跨膜组分包括CD28的跨膜结构域,而细胞外组分还包括CD28的细胞外部分,尤其是与跨膜组分相邻的细胞外半胱氨酸残基(例如,TIM3-CD28Cys和TIM3-9aas-CD28Cys)。细胞外组分可以包含TIM3的全部或部分细胞外结构域,或者可以截短,以在细胞之间保持短空间距离(例如,-9aas)。另外,TIM3-CD28构建体具有将通常来自TIM3与其靶结合的抑制信号转变成由CD28细胞内信号传导结构域产生的正信号的能力。

[0319] 使用实例2中描述的方法产生使用TIM3细胞外组分的新IFP(图13A)。如所述,用GFP-TIM3构建体转导T细胞。转导后五天,通过抗TIM3抗体染色和流式细胞术分析CD8⁺T细胞的构建体表达(图13B)。编码仅绿色荧光蛋白(GFP)的载体用作对照。大多数构建体表现出相似的TIM3的表达(图13B)。

[0320] 实例14

[0321] CD200R-CD28融合蛋白构建体可由原代T细胞表达

[0322] 在进一步的实例中,使用图14A中的示意图说明了本文所述的示例性融合蛋白。示例性融合蛋白包括免疫调节融合蛋白(IFP),其包含CD200R的细胞外结构域或其部分和CD28的细胞内信号传导结构域或其部分(图14A,构建体I-V)。疏水组分可以包括CD200R(图14A,构建体I)或CD28(图14A,构建体II-V)的跨膜结构域或其部分。在一些示例性的CD200R-CD28融合蛋白中,疏水组分包括CD28的跨膜结构域,而细胞外组分还包括CD28的细胞外部分,尤其是与疏水组分相邻的细胞外半胱氨酸残基(例如,图14A构建体III,CD200R-CD28Cys;构建体IV,CD200R-3aas-CD28Cys;以及构建体V,CD200R-9aas-CD28Cys)。细胞外组分可包含CD200R的细胞外结构域的全部或部分。在一些实例中,细胞外组分包含CD200R的整个细胞外结构域(图14A,构建体I-III)。在其他实例中,细胞外组分包含从CD200R的N-末端的前235个氨基酸(保留N-连接的糖基化位点)(例如,图14A,构建体IV,CD200R-3aas-CD28Cys)或前229个氨基酸(例如,图14A,构建体V,CD200R-9aas-CD28Cys)。本文公开的CD200R-CD28构建体具有将通常来自CD200R与其靶结合的抑制信号转变成由CD28细胞内信号传导结构域产生的正信号的能力。

[0323] 可以通过调节融合蛋白构建体来操纵的细胞外组分的大小,这可能会影响融合蛋

自进入免疫突触并与cSMAC中的TCR共定位以传递强共刺激信号的能力。CD28信号传导自然发生在免疫突触中,其中募集了CD28来放大TCR信号并降低了激活阈值(Chen and Flies, Nat. Rev. Immunol. 13:227-242, 2013; Yokosuka et al., Immunity 29:589-601, 2008)。在免疫突触中,T细胞与APC之间的空间距离最短,并且排除了具有大胞外域的分子。因此,最接近免疫突触的细胞间间隔的构建体可能能够与在免疫突触内的TCR共定位并传递有效的共刺激信号。构建体III和IV将CD28跨膜结构域延伸到细胞外空间,以合并近膜半胱氨酸(CD28Cys),其促进CD28均二聚化并增强天然CD28信号传导(Lazar-Molnar et al., Cell Immunol. 244:125-129, 2006)。为了说明细胞外CD28结构域的九个氨基酸所增加的长度,CD200R-9aas-CD28Cys的CD200R细胞外结构域部分截短九个氨基酸,这等同于由CD28细胞外结构域添加的数目。同样,CD200R-3aas-CD28Cys的细胞外CD200R截短3个氨基酸。截短的细胞外CD200R从C末端截短,以保留N-连接的糖基化位点。因此,从理论上讲,鼠构建体CD200Rtm-CD28、CD200R-CD28tm和CD200R-9aas-CD28Cys最佳地维持了T细胞与APC之间的所需短空间距离,以在免疫突触中与TCR共定位。

[0324] 编码CD200R-CD28融合蛋白的示例性核酸分子包含以下元件(5'至3') : 细胞外组分(CD200R)-多聚化结构域(CD28半胱氨酸)-疏水组分(CD28跨膜)-细胞内组分(CD28细胞内)。在一些实施例中,编码CD200R-CD28融合蛋白的核酸分子包含SEQ ID NO:47-51或1、6、7、10、12、14、15或183中任一项所示的核酸分子。

[0325] 将编码构建体的核酸插入到pMP71逆转录病毒载体中,以转导用抗CD3和抗CD28抗体刺激的原代小鼠脾细胞。C57BL/6(B6)小鼠购自Jackson实验室。TCR_{gag}转基因小鼠在CD8⁺T细胞中表达对Friend病毒gag表位具有特异性的TCR转基因(Ohlen et al., J. Exp. Med. 195:1407-1418, 2002)。B6 Friend病毒诱导的红白血病(FBL)表达Friend病毒gag表位(肽CCLCLTVFL(SEQ ID NO.:213)) (Teague et al., Nat. Med. 12:335-341, 2006)。从Invitrogen订购DNA构建体或通过PCR在实验室中产生。使用Gateway®技术将定向TOPO克隆到载体pENTR/D-TOPO中的构建体转移至逆转录病毒载体(RV)pMP71-attR。使用效应子转导试剂(Qiagen)用RV转导逆转录病毒包装细胞系P1plat-E(Cell-Bio Labs)。在第2天和第3天收集病毒上清液。转染前一天,用抗CD3/CD28和100U/mL rhIL-2刺激TCR_{gag} T细胞。在存在IL-2和凝聚胺的情况下,在12孔板中以1000g离心转染90分钟,来进行TCR_{gag} T细胞的转导。刺激后第7天,在受辐照的脾细胞(5×10^6)、受辐照的FBL(3×10^6)和IL-2(IU/mL)的存在下,对转导的细胞进行再刺激。

[0326] 转导后五天,通过流式细胞术分析CD8⁺T细胞的IFP表达(图14B)。荧光染料偶联的抗体购自eBioscience或Biolegend。转导效率范围为5-43%,构建体之间的转导细胞平均荧光强度相似,表明IFP表达相似。

[0327] 实例15

[0328] CD200R-CD28构建体可在体外促进转导的T细胞的增殖、积累、以及效应子功能

[0329] 评价实例14中描述的CD200R-CD28构建体促进TCR_{gag} T细胞增殖、积累和效应子功能的能力。

[0330] 体外T细胞增殖测定

[0331] CD28信号传导促进经由TCR刺激的T细胞的增殖和存活(Chen and Flies, Nat. Rev. Immunol. 13:227-242, 2013)。为了确定CD200R-CD28 IFP是否能改善增殖,可对来

自Friend鼠白血病病毒转化的FBL白血病的表位特异的幼稚CD8⁺TCR转基因T细胞 (TCR_{gag} 细胞) (Stromnes et al., J Clin Invest. 120:3722-3734, 2010)) (如实例14所述) 用抗原转导并在体外IL-2存在下扩增2-3个刺激周期,以生成效应子T细胞并模拟人类过继免疫疗法方案。用CellTrace紫 (CTV) 标记效应子T细胞,并用天然不表达CD200的FBL (CD200⁻FBL) (图15A, 上图) 或被转导以表达CD200 (CD200⁺FBL) 的FBL细胞系刺激CTV标记的Tg T细胞 (10⁵) 3天,然后通过流式细胞术评估 (图15A, 下图)。

[0332] 在低的25:1的T细胞与FBL比率下,GFP对照转导的T细胞(图15A, 蓝线)显示出响应于CD200⁻或CD200⁺FBL的最小增殖。相反,五个测试的构建体中的四个(图15A, 红线)显著改善了响应于CD200⁺FBL的增殖,但响应于CD200⁻FBL的增殖没有改善。用最大的胞外域CD200R-CD28Cys转导的T细胞不能改善增殖。

[0333] 为了测试CD200R与白血病表达的CD200相互作用所传递的增殖增加是否反映增强了粘附和/或诱骗结合而不是共刺激,产生了仅带有CD200R细胞外和CD28跨膜结构域的截短的非信号传导版本的构建体 (“trCD200R”;图15B)。表达构建体的转导的TCR_{gag} T细胞(图15C)没有表现出对CD200⁺FBL增强的增殖(图15D),表明CD28共刺激信号的必要作用。

[0334] 体外T细胞富集测定

[0335] 预期在用CD200⁺FBL刺激后,靶向CD200的IFP的表达将导致IFP⁺T细胞相对于IFP⁻T细胞的富集。评估了用辐照的CD200⁻或CD200⁺FBL进行多个刺激周期后,总TCR_{gag}群中的转导细胞比例。用CD200⁻或CD200⁺FBL刺激3个周期后的细胞组成分析显示,表达GFP对照的TCR_{gag} T细胞的分数没有变化(图15E)。相反,在用CD200⁺刺激后,表达IFP的TCR_{gag} T细胞富集,而在CD200⁻FBL刺激下却不富集(CD200R-9aas-CD28Cys,图15F)。如预测的那样,尽管几种构建体促进了转导的T细胞的积累,但该构建体的大小适合于免疫突触,并包括二聚半胱氨酸基序CD200R-9aas-CD28Cys,在3个单独的实验中在3个刺激后产生了最大的相对增加,得到平均>3倍的富集(P<0.05)(图15G,显示倍数富集,刺激3次/刺激1次,对于eGFP、CD200Rtm-CD28、CD200R-CD28tm、CD200R-3aas-CD28cys和CD200R-9aas-CD28cys转导的T细胞)。

[0336] 基于CFSE的细胞毒性测定。

[0337] CD28信号传导促进效应子功能(Chen and Flies, Nat. Rev. Immunol. 13:227-242, 2013)。测试被转导以表达CD200R-9aas-CD28Cys的T细胞对肿瘤靶细胞的杀伤增加。

[0338] 将FBL和对照EL4肿瘤在室温下分别在PBS中与2.5μM (hi) 或0.25μM (lo) CFSE温育10分钟。通过在含血清的培养基中洗涤肿瘤细胞来去除过量的染料。将非特异性EL4对照靶和CD200⁺FBL肿瘤细胞的1:1混合物与滴定数量的CD200R-9aas-CD28Cys转导或GFP转导的TCR_{gag}效应子T细胞(即,效应子与靶(E:T)比率的范围)在37°C和5%CO₂的96孔圆底平板中温育5小时。通过流式细胞术分析孔中剩余的总CFSE阳性细胞(FBL⁺EL4)中的%CFSE^{hi}(FBL),来确定了特定的FBL裂解。

[0339] 用CD200R-9aas-CD28Cys转导的TCR_{gag} T细胞杀伤CD200⁺FBL好于对照T细胞,以低的E:T比(0.3:1)裂解了40%以上的CD200⁺FBL(图15H)。

[0340] 体外细胞因子产生测定

[0341] 为了确定用CD200R-9aas-CD28Cys IFP转导的T细胞是否产生增加量和多样性的细胞因子,这代表了其他的共刺激功能,通过流式细胞术评估了多功能细胞因子的产生。在用CD200⁺FBL刺激后,产生的IFNγ、IL-2和TNFα的CD200R IFP⁺T细胞百分比高于对照组T细

胞。较低百分比的CD200R IFP⁺T细胞是不产生细胞因子的细胞(27%比51%,图15I,蓝色),而较高百分比的CD200R IFP⁺T细胞是能产生所有3种细胞因子的多功能细胞(22%比7%,图15I,紫色)。基于平均荧光强度(MFI),用CD200⁺FBL刺激的CD200R IFP⁺T细胞具有增加的细胞因子/细胞(图15J)。

[0342] 体外共定位测定

[0343] 为了更仔细地检查增强T细胞的IFP表达功能的机制,通过显微镜观察CD200R IFP在T细胞表面的位置。结合CD80/86后,天然CD28定位于免疫突触,募集了放大TCR信号的信号传导分子(Chen and Flies,Nat.Rev.Immunol.13:227-242,2013)。为了评估刺激后IFP的运动,使用FITC偶联的霍乱毒素B亚基(CTxB)染色细胞膜内的脂筏(图15K,图III),该筏在免疫突触处富集(Stephan et al.,Nat Med.13:1440-1449,2007),并用于定义免疫突触组件的位点。然后使用结合FBL上的CD200(图15K,图II)或T细胞上的CD200R(CD200R-9aas-CD28Cys,图15K,图I)的抗体,将与免疫突触相关的这些分子可视化。将CD200R IFP转导的、体外扩增的效应子TCR_{gag}细胞与FBL以15:1的E:T混合在15mL中,然后在37°C温育20分钟,然后加载到μ-SlideVI.4室(伊比迪)中15分钟。用PBS洗涤玻片,并用2%多聚甲醛固定4分钟。然后将细胞洗涤、染色、使用Deltavision Elite荧光显微镜以60x成像,并使用Image J(NIH)分析。

[0344] CD200R与增强的脂质筏染色位于T细胞:靶接触区(图15K至15M,图IV),这表明IFP的大小可以由免疫突触调节。

[0345] LCK磷酸化

[0346] 酪氨酸激酶LCK对于TCR信号传导至关重要,LCK到TCR信号传导复合物的募集会导致CD3复合物中基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)序列的磷酸化,从而启动TCR信号传导级联反应(Chen and Flies,Nat.Rev.Immunol.13:227-242,2013)。LCK通过CD28信号传导尾部中的脯氨酸基序与CD28缔合,并且CD28的T细胞表达对于LCK残基Y394的持续磷酸化是必需的(Holdorf et al.,Nat Immunol.3:259-264,2002)。为了确定CD200R-CD28IFP表达是否提供或增强CD28信号传导,在GFP对照、先导构建体(CD200R-9aas-CD28Cys)或不促进增殖的无效构建体(CD200R-CD28Cys)转导的T细胞中评价pLCK Y394(图15A)。将转导的T细胞用PMA/离子霉素、FBL或CD200⁺FBL刺激或不刺激10分钟、固定并染色细胞内pLCK Y394,并通过流式细胞术进行分析。磷酸LCK(Tyr394)抗体购自R&D Systems,并通过用BioLegend的抗小鼠PE进行二次标记检测了细胞内染色。

[0347] 响应强烈刺激(PMA/离子霉素)和CD200⁻FBL刺激,这三个T细胞群实现了类似的LCK Y394磷酸化(图15N)。用GFP对照或具有较大胞外域CD200R-CD28Cys的IFP转导的T细胞响应于CD200⁻FBL和CD200⁺FBL表现出相似的低水平的pLCK Y394表达。但是,当用CD200⁺FBL刺激时,CD200R-9aas-CD28Cys转导的T细胞在10分钟时显示LCK Y394的磷酸化水平持续升高,这表明CD200R-9aas-CD28cys的表达提供了CD28共刺激的必要功能。

[0348] 总结

[0349] 综上所述,这些数据表明CD200R-CD28构建体起到响应肿瘤细胞刺激而增加转导的T细胞的积累和裂解活性的作用。一组CD200R-CD28 IFP构建体的分析表明,在包含二聚体基序和有助于定位至免疫突触的肿瘤-T细胞距离的IFP中,最有效地实现了共刺激。用此类CD200R-CD28 IFP转导的T细胞在体外响应于CD200⁺靶细胞表现出增强的增殖和效应子

功能。

[0350] 实例16

[0351] CD200R-9AAS-CD28CYS转导的T细胞显示了响应于FBL的识别的增强的体内积累

[0352] 在恶性肿瘤的过继性T细胞疗法中,肿瘤通常提供有限或没有共刺激信号,而是表达用于抑制性受体的配体。在白血病中,CD200是通常表达的抑制性配体,并且与不良的预后相关(Tonks et al., Leukemia 21:566-568, 2007)。因此,评估了在体外出现最有效的表达CD200R-9aas-CD28Cys IFP的TCR_{gag} T细胞在体内遇到CD200⁺FBL白血病时增殖和积累的能力。

[0353] 如实例15所述产生转导的TCR_{gag} T细胞。给B6小鼠腹膜内(i.p.)注射 4×10^6 个活CD200⁺FBL白血病,允许FBL播散5天后,在转移效应子T细胞前6小时,小鼠腹膜内接受180mg/kg环磷酰胺(Cy),以减少肿瘤负担并诱导淋巴细胞减少,类似于人为过继性免疫疗法方案。为了评估短期增殖和积累,将 2×10^6 IFP转导的Thy1.1⁺T细胞与相等数量的先天不同的GFP对照转导的Thy1.1⁺ × Thy1.2⁺T细胞共注射到荷瘤小鼠中,这样每只小鼠都可以作为内部对照(图16A)。两种T细胞群体均在体外产生,并通过相同的方法用三个刺激周期扩增,并且在注射当天,第三次刺激后5天出现表型相似(图16B)。每2天给予IL-2(2×10^4 U/剂量)。T细胞转移后第8天,对小鼠实施安乐死,并收集脾脏和腹股沟淋巴结。

[0354] 对于一些研究,通过负选择,使用EasySepTM Mouse CD8⁺T细胞富集试剂盒(STEMCELL)分离CD8⁺T细胞。定期监测小鼠的增加的肿瘤负荷,如果肿瘤进展的证据表明会在24-48小时之内发生死亡,则将其安乐死。

[0355] 与对照细胞相比,表达IFP的T细胞在脾脏和淋巴结中富集了1.2至1.4倍(图16C)。为了评估由转移的T细胞获得的可能的表型差异,在早(d3)和晚(d15)时间点对一组小鼠实施安乐死,以鉴定效应子、记忆和耗竭标志。通过未接触的CD8⁺T细胞富集从脾脏中分离T细胞,并通过流式细胞术进行评估。转导的CD200R-9aas-CD28Cys⁺TCR_{gag} 和对照T细胞在转移后3天表达与效应子T细胞表型一致的相似表面分子(图16D)。到第15天时,持久性IFP⁺和对照T细胞在表型上再次相似,并且不表达耗竭标志PD-1或Lag-3(图16E),表明这两种细胞在此期间可能仍保持功能。

[0356] 总之,在对播散性白血病的过继治疗的体内研究中,CD200R-CD28转导的白血病特异性T细胞比野生型细胞更有效地根除了其他致命性疾病,并绕过了IL-2给药以维持体内活性的要求。

[0357] 实例17

[0358] CD200R-CD28⁺T细胞的过继免疫疗法在播散性白血病的治疗中表现出更大的活性

[0359] 在播散性白血病的临床前小鼠模型中评价了向表达CD200R-9aas-CD28Cys IFP的细胞提供的共刺激是否导致了治疗性T细胞的增强活性,该模型要求T细胞应答持续>25天以能根除白血病(Cheever et al., J Immunol. 125: 711-714, 1980)。如前所述,向B6小鼠腹腔注射致死剂量(4×10^6)CD200⁺FBL白血病细胞(Stromnes et al., J Clin Invest. 120: 3722-3734, 2010)。五天后,小鼠组群腹膜内接受180mg/kg环磷酰胺(Cy),并在6小时后接受 10^5 个TCR_{gag} 效应子T细胞,以使药物代谢(Cheever et al., 1980)。先前在体外刺激TCR_{gag} T细胞1-3次。将用CD200R-9aas-CD28Cys转导的T细胞的治疗功效与表达GFP对照的T细胞进行比较(图17A、17B)。该方法最初是针对在T细胞转移后接受IL-2 10天以增强和维持T细胞

活性的一小群小鼠进行测试的(Stromnes et al., J Clin Invest. 120:3722-3734, 2010) (图17A)。

[0360] 注射IL-2, 使用对照T细胞的免疫疗法治愈了67%的小鼠, 而CD200R-9aas-CD28Cys⁺T细胞治愈了100%的小鼠, 其没有统计显著性(图17A)。用更大的组群进行随后的研究, 并省略了IL-2注射。在这些研究中, 仅40%的用GFP对照载体转导的T细胞治疗的小鼠存活超过30天(图17B, 蓝线)。相比之下, 接受CD200R-9aas-CD28Cys⁺T细胞的小鼠的89%在FBL转移后存活了100天(图17B, 红线, P<0.05)。这些结果表明, 具有CD200R的IFP提供共刺激信号, 不仅可以增强进行性白血病的T细胞免疫疗法, 而且可以大大绕过给予IL-2的需求。

[0361] 实例18

[0362] CD200RTM-CD28的共表达增强了WT1特异性TCR原代T细胞的功能

[0363] 用工程化的T细胞进行过继疗法已显示出令人鼓舞的临床益处, 特别是在急性淋巴细胞性白血病中, 在该病中T细胞表达对细胞表面蛋白CD19特异的嵌合抗原受体(CAR)(Turtle et al., J Clin Invest. 126:2123-2138, 2016; Kalos et al., Sci Transl Med. 3:95ra73, 2011)。可以可选地转导T细胞以表达肿瘤特异性T细胞受体(TCR), 该受体通过包含细胞内蛋白质(例如通常驱动致癌表型的转录因子)极大地扩展靶抗原的广度。WT1特异的CD8⁺T细胞在转移给患者后表现出抗白血病作用的活性(Chapuis et al., Sci Transl Med. 5:174ra127, 2013), 并且正在患有白血病、肺癌或间皮瘤患者中用高亲和力WT1特异性TCR转导的CD8⁺T细胞进行试验(clinicaltrials.gov NCT01640301, NCT02408016), 所述WT1是在许多恶性肿瘤中过表达的转录因子(Yang et al., Leukemia 21:868-876, 2007; Qi et al., Sci Rep. 5:8924, 2015)。具有相关增殖和存活的T细胞激活需要与触发抗原受体同时的共刺激信号(Chen et al., Nat Rev Immunol. 13:227-242, 2013)。与在嵌合信号蛋白中包含共刺激结构域的CAR不同, 具有引入的TCR的细胞需要共刺激受体的独立触发。然而, 肿瘤细胞通常不仅很少(如果有的话)表达共刺激受体的配体, 而且通常上调抑制性受体配体, 这些受体配体可干扰共刺激并阻断T细胞激活(Driessens et al., Immunol Rev. 229:126-144, 2009)。因此, 积极寻求克服抑制性信号传导和增加共刺激/激活信号传导的策略以促进T细胞抗肿瘤活性(Mellman et al., Nature 480:480-489, 2011)。

[0364] 急性骨髓性白血病(AML)在当前疗法下的5年存活率为26% (Society AC, Cancer Facts&Figures 2016. Atlanta: American Cancer Society, 2016)。由于T细胞自然地流向AML所在的造血部位, 因此T细胞疗法具有治疗这种疾病的巨大潜力, 但是AML细胞过度表达抑制性分子代表了对成功的实质性障碍(Geiger&Rubnitz, Discov Med. 19:275-284, 2015)。作为免疫球蛋白超家族成员的1型膜蛋白CD200与T细胞抑制受体CD200R结合(Hatherley et al., Structure 21:820-832, 2013), 并且在AML和其他恶性肿瘤(包括多发性骨髓瘤、卵巢癌和前列腺癌)中观察到CD200表达增加(Siva et al., Cancer Immunol Immunother. 57:987-996, 2008; Stumpfova et al., Cancer Res. 70:2962-2972, 2010; Kawasaki et al., Trends Immunol. 29:464-468, 2008)。对于靶向治疗而言重要的是, 据报道在癌症干细胞(CSC)和白血病干细胞(LSC)中的CD200表达增加, 这是一小部分细胞, 这些细胞以高增殖能力以及对放射和化学疗法的抵抗力引发和维持疾病(Snauwaert et al.,

Oncobiology 2:e22943, 2013; Tonks et al., Leukemia 21:566-568, 2007; Ho et al., 58th ASH Annual Meeting, San Diego, CA, 2016; Kawasaki et al., Biochem Biophys Res Commun. 364:778-782, 2007)。CD200R信号传导抑制T细胞功能 (Coles et al., Leukemia 26:2148-2151, 2012; Kretz-Rommel et al., The Journal of Immunology 178:5595-5605, 2007)以及其他免疫细胞,包括自然杀伤剂(NK)细胞 (Coles et al., Leukemia 25:792-799, 2011) 和与AML患者预后不良有关的高水平的CD200表达 (Tonks et al., Leukemia 21:566-568, 2007)。

[0365] 合成生物学提供了不仅用肿瘤反应性受体改造T细胞的机会,而且还提供了消除负信号并用激活信号代替它们的分子的机会。为了克服与AML相关的抑制性CD200R信号传导并同时向CD8⁺T细胞提供缺失的共刺激信号,设计了免疫调节融合蛋白(IFP),该蛋白由与细胞内T细胞共刺激信号传导结构域融合的CD200R胞外域组成,以便IFP可以通过结合这种抑制性配体但产生共刺激信号而利用表达CD200的白血病细胞。已经显示包含PD-1胞外域的融合蛋白能够提供共刺激信号 (Prosser et al., Mol Immunol. 51:263-272, 2012),但是尚未定义设计用于产生或甚至优化共刺激信号的分子的原理。

[0366] 在AML临床试验(在Clinicaltrials.org中注册为NCT01640301)中研究了使用TCR转导的T细胞的疗法。所有临床研究均根据赫尔辛基宣言原则进行。协议2498已由弗雷德哈钦森癌症研究中心(FHCRC)机构审查委员会(IRB)和美国食品药品管理局(FDA)批准。用TCR转导的T细胞治疗AML患者。从4名在T细胞治疗后进展/复发的患者中获得了外周原始细胞。AML维持亚群LSC位于白血病母细胞的CD45^{dim}CD34⁺CD38-群中 (Bachas et al., Leukemia 26:1313-1320, 2012; Ho et al., 58th ASH Annual Meeting, San Diego, CA, 2016),将CD200表达与从3名健康供体的动员白血球获得的CD34⁺细胞(用来产生用于输注的T细胞)进行比较。尽管在正常的CD34⁺细胞上未检测到CD200表达,但CD200在每个受试患者的部分AML母细胞中表达(范围42-97%)⁺(图18A),与以前的报道一致 (Tonks et al., Leukemia 21:566-568, 2007; Coles et al., Leukemia 29:1952-1954, 2015)。

[0367] 基于先前的鼠类实验结果(参见实例14-17),生成了人CD200Rtm-CD28构建体(SEQ ID NO.:1),以在免疫突触中维持人T细胞与肿瘤细胞之间的空间距离(图18B)。转导人原代T细胞以确定该IFP的表达是否可以增强功能。通过将每个基因与P2A元件连接,将构建体插入具有HLA-A2限制的WT1₁₂₆-特异性TCR_{C4}的β和α链的单个慢病毒载体构建体中 (Stromnes et al., Immunol Rev. 257:145-164, 2014),用于转导用在治疗AML的临床试验中的T细胞(图18B)。对第一P2A序列进行密码子优化,以防止与第二P2A序列基因重组。

[0368] 为了产生慢病毒,使用Effectene (Qiagen) 用pRRSIN质粒和包装质粒pMDLg/pRRE、pMD2-G和pRSV-REV中的人构建体转导293T/17细胞(3×10^6 细胞/板)。转染后第1天更换培养基,第2天和第3天收集含病毒的上清液,将等分试样冷冻以备用。在获得知情同意后,从正常的HLA-A2⁺供体中收获外周血单核细胞(PBMC)。使用Miltenyi磁珠纯化CD8⁺T细胞,并用人T细胞Expander CD3/CD28 Dynabeads (Life Technologies) 和50IU/ml IL-2刺激。刺激后四小时,用2mL慢病毒上清液通过在32°C以1000g离心转染 $5-10 \times 10^6$ 个细胞90分钟来转导T细胞。如先前所述,以快速扩增方案(REP)每10-14天对T细胞进行再刺激(参见Ho et al., J. Immunol. Methods 310:40-52, 2006)。

[0369] 相对于单独用TCR_{C4}转导的T细胞,被转导表达TCR_{C4}和CD200R-CD28融合蛋白的人

原代T细胞表现出高水平的CD200R表达和同等水平的TCR_{C4}表达。

[0370] 为了确定CD200R-CD28 IFP是否能改善转导的人T细胞的功能,用肽冲击的T2淋巴母细胞刺激细胞,相对于原发性AML(图18A)和CD200⁻CML细胞系K562(Coles et al., Leukemia 25:792-799, 2011),T2淋巴母细胞自然表达低水平的内源性CD200(图18C)。响应于WT1₁₂₆冲击的T2细胞,用TCR_{C4}加CD200R-CD28 IFP转导的T细胞表现出增强的增殖(图18D)和增加的细胞因子生成,特别是在低E:T比下(图18E),这表明肿瘤细胞表达可以提供共刺激的CD200表达非常少。

[0371] 总之,用人IFP转导人原代T细胞还增加了响应于CD200⁺白血病细胞的增殖和细胞因子的产生。这项研究的重点是产生IFP以靶向抑制性分子CD200,该分子通常在癌细胞(尤其是AML和LSC细胞)上调,并且已知能抑制T细胞免疫应答。除AML外,据报道其他血红素恶性肿瘤和实体瘤(如乳腺癌、结肠癌、卵巢癌和前列腺癌)的CD200表达也增加。在某些实施例中,CD200 IFP可用于治疗血红素恶性肿瘤和实体瘤,包括乳腺癌、结肠癌、卵巢癌和前列腺癌。这些结果表明,用含有CD200R胞外域的IFP进行肿瘤特异性T细胞的基因工程改造,可以有效地将由白血病细胞传递的抑制信号以细胞固有的方式转化为共刺激信号,从而避免了整体阻断这种抑制受体的要求,以及避免促进内源性自身反应性T细胞活化的相关风险。此外,IFP可用于提高灵敏度而无需操纵TCR。

[0372] 实例19

[0373] CD200RTM-CD28或具有WT1特异性TCR的CD200R-9AAS-CD28CYS的共表达增强了原代T细胞的功能

[0374] 在进一步的实例中,使用图19A中的示意图说明了本文所述的示例性融合蛋白。示例性融合蛋白包括IFP,其包含人CD200R的细胞外结构域或其部分和人CD28的细胞内信号传导结构域或其部分(图19A,构建体II-VII)。疏水组分可以包括CD200R(图19A,构建体I、II和VIII)或人CD28(图19A,构建体III-VII)的跨膜结构域或其部分。在一些示例性的CD200R-CD28融合蛋白中,疏水组分包括CD28的跨膜结构域,而细胞外组分还包括人CD28的细胞外部分,尤其是与疏水组分相邻的细胞外半胱氨酸残基(例如,图19A构建体IV,CD200R-CD28Cys;构建体V,CD200R-9aas-CD28Cys;构建体VI,CD200R-12aas-CD28Cys;以及构建体VII,CD200R-15aas-CD28Cys)。构建体“VIII”包含细胞外结构域和跨膜结构域,但不包含细胞内信号传导结构域(图19A)。细胞外组分可包含人CD200R的细胞外结构域的全部或部分。在一些实施例中,细胞外组分包含CD200R的整个细胞外结构域(图19A,构建体II-IV和VIII)。在一些其他实例中,细胞外组分包含从CD200R的N-末端的前234个氨基酸(例如,图19A,构建体V,CD200R-9aas-CD28Cys)、前231个氨基酸(例如,图19A,构建体VI,CD200R-12aas-CD28Cys)、或前228个氨基酸(例如,图19A,构建体VII,CD200R-15aas-CD28Cys)。本文公开的人CD200R-CD28构建体具有将通常来自CD200R与其靶结合的抑制信号转变成由CD28细胞内信号传导结构域产生的正信号的能力。

[0375] 可以通过调节融合蛋白构建体来操纵的细胞外组分的大小,这可能会影响融合蛋白进入免疫突触并与cSMAC中的TCR共定位以传递强共刺激信号的能力。CD28信号传导自然发生在免疫突触中,其中募集了CD28来放大TCR信号并降低了激活阈值(Chen and Flies, Nat. Rev. Immunol. 13:227-242, 2013; Yokosuka et al., Immunity 29:589-601, 2008)。在免疫突触中,T细胞与APC之间的空间距离最短,并且排除了具有大胞外域的分子。因此,最

接近免疫突触的细胞间间隔的构建体可能能够与在免疫突触内的TCR共定位并传递有效的共刺激信号。构建体IV-VII将CD28跨膜结构域延伸到细胞外空间,以合并近膜半胱氨酸(CD28Cys),其促进CD28均二聚化并增强天然CD28信号传导((Lazar-Molnar et al., Cell Immunol. 244:125-129, 2006)。在一些实施例中,为了说明细胞外CD28结构域的附加氨基酸所增加的长度,CD200R细胞外结构域部分截短相等数目,例如,CD200R-9aas-CD28Cys的CD200R细胞外结构域部分截短9个氨基酸,这等同于由CD28细胞外结构域添加的数目。同样,CD200R-12aas-CD28Cys的细胞外CD200R截短12个氨基酸,CD200R-15aas-CD28Cys的细胞外CD200R截短15个氨基酸。在构建体V-VII中,截短的细胞外CD200R从C末端截短,以保留N-连接的糖基化位点。为了代表图19A中所示的融合蛋白,从理论上讲,CD200R_{tm}-CD28、CD200R-CD28_{tm}和CD200R-12aas-CD28cys最佳地维持了T细胞与APC之间所需的短空间距离,以在免疫突触中与TCR共定位。

[0376] 所有临床研究均根据赫尔辛基宣言原则进行。协议2498已由弗雷德哈钦森癌症研究中心(FHCRC)机构审查委员会(IRB)和美国食品药品管理局(FDA)批准。该实验在clinicaltrials.org中注册为NCT01640301。

[0377] 为了产生慢病毒,使用Effectene(Qiagen)用pRLSIN质粒和包装质粒pMDLg/pRRE、pMD2-G和pRSV-REV中的人构建体(图19B)转导293T/17细胞(3×10^6 细胞/板)。转染后第1天更换培养基,第2天和第3天收集含病毒的上清液,将等分试样冷冻以备用。

[0378] 生成了人CD200R-CD28 IFP构建体,以在理论上在免疫突触处维持人T细胞与肿瘤细胞之间的空间距离(图19B)。通过将每个基因与P2A元件连接,将构建体插入具有HLA-A2限制的WT_{1¹²⁶}-特异性TCR_{C4}的β和α链的单个慢病毒载体构建体中(Stromnes et al., Immunol Rev. 257:145-164, 2014),其用于转导用在治疗AML的临床试验中的T细胞。对第一P2A序列进行密码子优化,以防止与第二P2A序列基因重组。

[0379] 在获得知情同意后,从正常的HLA-A2⁺供体中收获外周血单核细胞(PBMC)。使用Miltenyi磁珠纯化CD8⁺T细胞,并用人T细胞Expander CD3/CD28 Dynabeads(Life Technologies)和50IU/ml IL-2刺激。刺激后四小时,用2mL慢病毒上清液通过在32°C以1000g离心转染5-10 $\times 10^6$ 个细胞90分钟来转导T细胞。如先前所述,以快速扩增方案(REP)每10-14天对T细胞进行再刺激(Ho et al., J Immunol Methods 310:40-52, 2006)。

[0380] 通过流式细胞术分析转导CD8⁺T细胞的IFP表达(图19C)。结果显示,当用编码IFP和WT1特异性TCR的构建体转导时,原代人T细胞共表达CD200R-CD28 IFP和WT1特异性TCR。

[0381] 实例20

[0382] 在用CD200⁺细胞刺激后,表达CD200靶向IFP的T细胞相对于IFP⁻T细胞富集

[0383] 为了测试用CD200⁺细胞刺激后表达靶向CD200的IFP是否会导致IFP⁺T细胞相对于IFP⁻T细胞富集,在用CD200⁺LCL细胞刺激之前和之后测量CD200R⁺细胞的相对比例。

[0384] 如图20A所示,IFPCD200R-CD28_{tm}的表达(图19A中的结构III)导致在用CD200转导的LCL再刺激后,IFP⁺T细胞(CD200R⁺)相对于IFP⁻T细胞(CD200R⁻)富集。

[0385] 用trCD200R(图19A中的结构VIII)和CD200R-15aas-CD28Cys(图19A中的结构VII)转导的T细胞未富集,表明缺乏共刺激(图20B和20C)。然而,表达几种其他构建体的T细胞在CD200⁺LCL REP之后,尤其是在CD200R-CD28_{tm}(图19A中的构建体III)和CD200R-9aas-CD28Cys(图19A中的构建体V)之后的比率增加(图20C和20D)。

[0386] 实例21

[0387] 表达CD200R-CD28TM和CD200R-9AAS-CD28CYS IFP的人T细胞表现更大的效应子功能

[0388] 相对于IFP⁻细胞,表达靶向CD200的IFPCD200R-9aas-CD28Cys的人T细胞具有增加的细胞因子产生。TAP缺陷型肿瘤细胞系T2表达内源性CD200(图21A)。相对于未刺激的细胞和表达TCR但不表达IFP的经刺激的细胞,CD200R-9aas-CD28Cys表达增强了肽冲击的T2细胞(用1ug/mL WT₁₋₁₂₆冲击)的细胞因子产生(图21B)。

[0389] 为了测试与CD200R-9aas-CD28Cys表达相关的增强的效应子功能是否反映了增强了粘附和/或诱骗结合而不是共刺激,生成了仅具有CD200R细胞外和CD28跨膜结构域的截短的非信号传导形式的构建体(“trCD200R”;图19A,构建体VIII;图21C)。相对于仅表达TCR_{C4}的细胞,表达该构建体的转导T细胞没有表现出增强的细胞因子产生(图21D),表明CD200R-9aas-CD28Cys提供了共刺激信号。

[0390] 图21E中显示了其他靶向CD200R的构建体增加细胞因子产生的能力。CD200R-CD28tm(图21F和21G,标记“B”)和CD200R-9aas-CD28Cys(图21F和21G,标记“-9”)显著提高了细胞因子的产生。靶向CD200的IFP表现出增加的多功能细胞因子产生(图21I)。

[0391] 还在类似于实例15中所述的基于流式细胞术的细胞毒性测定中评估了效应子功能(图21J)。用CD200R-CD28构建体转导的T细胞比对照T细胞更有效地裂解靶(图21K,CD200R-CD28tm,标记“B”,CD200R-9aas-CD28Cys,标记“-9”)。

[0392] 实例22

[0393] FAS IFP的体内测试

[0394] 按照实例11设计Fas-CD28构建体,并在白血病的小鼠模型中进行体内测试(图22A)。向C57BL/6小鼠腹腔内接种4×10⁶个肿瘤细胞(第0天),并用环磷酰胺处理,随后提供(1)没有其他处理,(2)过继转移10⁶个GFP转化的TCR_{gag}转基因CD8⁺T细胞(第5天),或(3)过继转移10⁶个Fas-CD28转导的TCR_{gag}转基因CD8⁺T细胞(第5天)。萤火虫荧光素酶⁺FBL肿瘤的体内生物发光成像用于测量小鼠在各个时间点的白血病。

[0395] 用Fas IFP转导的T细胞倾向于更快地根除疾病(图22B)并随时间提供保护(图22B、22C)。

[0396] 实例23

[0397] FAS-4-1BB融合蛋白构建体

[0398] 如本文所述的示例性融合蛋白还包括IFP,其包含Fas的细胞外结构域或其部分和4-1BB的细胞内信号传导结构域。细胞外组分可包含Fas的细胞外结构域的全部或部分。在一些实施例中,跨膜组分可以包括Fas、4-1BB或CD28的结构域或其部分。在一些示例性的Fas-4-1BB融合蛋白中,跨膜组分包括CD28的跨膜结构域,而细胞外组分还包括CD28的细胞外部分,尤其是与跨膜组分相邻的细胞外半胱氨酸残基(例如,Fas-CD28Cys-4-1BBic和Fas-9aas-CD28Cys-4-1BBic)。细胞外组分可以包含Fas的全部或部分细胞外结构域,或者可以截短,以在受体-配体相互作用时保持细胞之间的短空间距离(-9aas)。在一些其他的示例性的Fas-4-1BB融合蛋白中,跨膜组分包括4-1BB的跨膜结构域(例如,Fas-4-1BBtm;图23A)。另外,Fas-4-1BB构建体具有将由Fas与其靶结合引发的信号转换成由4-1BB细胞内信号传导结构域产生的正(例如,共刺激性)信号的能力。

[0399] Fas-4-1BB IFP和转基因TCR可以在转导的鼠T细胞中共表达。使用实例2中描述的一般方法产生包含Fas细胞外组分的IFP。转导P14 T细胞以共表达Fas-4-1BBtm IFP和转基因TCR (TCR_{gag} , 特异于从Friend鼠白血病病毒转化的FBL白血病衍生的表位 (Stromnes et al., J Clin Invest. 120:3722-3734, 2010))。通过用仅编码 TCR_{gag} 或 TCR_{gag} 和 Fas-4-1BBtm 的 DNA 构建体转染 Plat-E 细胞, 产生逆转录病毒上清液。幼稚 P14 T 细胞用抗 CD3 和抗 CD28 刺激, 然后用逆转录病毒上清液转导 2 天。刺激后五天, 将转导的 T 细胞用针对 TCR 和针对 Fas 的特异性抗体进行染色, 并通过流式细胞术进行分析。用编码 TCR_{gag} 和 Fas-4-1BBtm 的构建体转导的 P14 T 细胞表达相似水平的 TCR, 并且还表达高水平的 Fas-4-1BBtm IFP 构建体 (图 23B)。

[0400] 发现 Fas-4-1BB⁺ T 细胞在体外表现出增强的增殖。将转导的 P14 T 细胞用 CellTrace 紫 (CTV) 增殖染料染色, 并以效应子与靶为 8:1 的比例用 FBL 肿瘤细胞刺激 6 天。然后收获 T 细胞并通过流式细胞术进行分析。没有刺激, 用 TCR_{gag} 转导的 T 细胞仅表现出缺乏增殖, 如同 TCR_{gag} 和 Fas-4-1BBtm 两者转导的 T 细胞 ($\text{TCR}^+ \text{Fas}-4-1\text{BBtm}$) (图 23C, 左)。当 E:T 为 8:1 时, 一些仅 TCR 的 T 细胞表现出增殖; 但是, 所有 TCR+Fas-4-1BB⁺ T 细胞均表现出强劲的增殖, 从而支持增加的刺激和增殖能力 (图 23C, 右)。

[0401] 另外, Fas-4-1BB⁺ T 细胞表现出减少的细胞死亡 Fas 途径信号传导, 表明 Fas 胞外结构域的结合不会导致 Fas 信号传导途径的激活, 正如 IFP 所期望的那样, 其中 Fas 胞内结构域被 4-1BB 细胞内结构域取代。图 23D 中示出了细胞死亡 Fas 信号传导通路在以下中的激活: (i) 表达转基因 TCR_{gag} 但缺乏 Fas 表达的 T 细胞; (ii) 表达转基因 TCR_{gag} 的野生型 T 细胞; 和 (iii) 表达转基因 TCR_{gag} 和 Fas-4-1BBtm 的 T 细胞。用 TCR_{gag} 或 $\text{TCR}_{\text{gag}} + \text{Fas}-4-1\text{BB}$ IFP 刺激和转导 P14 T 细胞。7 天后, 使用胱天蛋白酶 (FLICA) 的荧光抑制剂对 T 细胞的活性胱天蛋白酶-8 表达进行染色, 以通过 Fas 途径测量细胞死亡。Fas 缺陷型 T 细胞 (灰色) 不显示活跃的胱天蛋白酶-8 表达, 而 TCR 转导的 T 细胞则显示表达升高。相对于仅 TCR 的 T 细胞, TCR+Fas-4-1BB T 细胞的胱天蛋白酶-8 表达活性较低, 表明通过 Fas 途径的细胞死亡较少 (图 23D)。

[0402] 总体而言, 这些数据表明, Fas-4-1BBtm 融合蛋白能够将与 Fas 结合相关的负/细胞死亡信号传导转换为正共刺激信号。

[0403] 实例 24

[0404] FAS-4-1BB 融合蛋白在 ID8 卵巢癌模型中增强对肿瘤生长的控制并改善存活。

[0405] Fas-4-1BBtm 转导的 T 细胞在卵巢癌 ID8 模型中控制肿瘤生长并促进存活。

[0406] ID8 模型是卵巢癌的可移植鼠模型 (Walton et al., Cancer Res 76:6118-29, 2016)。IncuCyte® 测定用于 ID8 卵巢肿瘤细胞的杀伤的定量。将鼠转导的 T 细胞 (TCR 或 TCR+4-1BB) 与红色荧光 ID8 卵巢肿瘤细胞共温育 2 天, 并通过 IncuCyte® 分析定量 ID8 细胞的生长。红色信号的丢失表示肿瘤细胞的杀伤。相对于仅 TCR 的 T 细胞, TCR+Fas-4-1BB T 细胞显示出对 ID8 肿瘤细胞生长的增强控制, 如较少的红色信号所示 (图 24A)。

[0407] 另外, 相对于仅用抗间皮素 TCR 转导的 T 细胞治疗的小鼠, 用抗间皮素 TCR+Fas-4-1BBtm 转导的 T 细胞治疗的小鼠具有提高的存活。在 ID8 鼠卵巢癌模型中, 植入了 5×10^6 个 ID8 肿瘤细胞, 并进行了 6 周的播散。环磷酰胺处理后, 接受 10^7 个 T 细胞和 5.0×10^8 个间皮素冲击的脾细胞的小鼠然后注射 IL-2, 共注射 10 天。每两周对小鼠进行一次处理, 直到根据 IACUC 批准的终点标准将其安乐死。相对于仅 TCR 的 T 细胞, 用 TCR+Fas-4-1BBtm 转导的 T 细胞

可提高存活(图24B)。

[0408] 实例25

[0409] 表达FAS-4-1BB融合蛋白的T细胞在胰腺癌的KPC小鼠模型中表现出T细胞持久性以及提高的存活率

[0410] 先前已经表明,用靶向间皮素的TCR-T细胞进行免疫治疗可以显著延长鼠胰腺KPC肿瘤模型的存活。在这项研究中,KPC模型用于确定使用表达Fas-4-1BB融合蛋白的T细胞的免疫疗法是否可以提高存活。

[0411] 使用自体KPC胰腺癌模型来模拟人类疾病(Lee et al., Curr. Protoc. Pharmacol. 73:14.39.1-14.39.20, 2016)。在患者中,>90%的胰腺导管腺瘤(PDA)病例在KRAS中显示出激活突变,而>75%的患者在p53中具有突变。KPC模型使用胰腺特异性Cre重组酶("C")在胰腺上皮的Kras("K")和p53("P")中产生突变。KPC模型(i)再现了人PDA中观察到的免疫微环境的许多关键特征,包括强烈的炎症反应和效应子T细胞的排斥,(ii)是研究最广泛的PDA遗传模型,用于评估免疫疗法,并且(iii)再现了用几种免疫肿瘤药物治疗的PDA患者中的临床观察结果,这些药物包括CD40激动剂和抗PDL1抗体。该模型也已用于筛选药物,作为患者治疗效果的预测指标。

[0412] 通过超声筛选KPC小鼠以确定何时出现肿瘤,并在大约8周龄,在发现肿瘤时登入研究。图25A显示了具有正常胰腺的健康小鼠和在“登入”的小鼠(KPC基因工程小鼠)中的胰腺肿瘤的超声图像。将小鼠随机分配至处理组。用环磷酰胺处理小鼠,在用环磷酰胺后,向接受TCR-T细胞的小鼠注射间皮素特异性T细胞(用抗间皮素TCR转导的细胞或抗间皮素TCR+Fas-4-1BBtm转导)和间皮素肽冲击脾细胞,每种 10^7 个。登入后14天开始,每2周重复T细胞/APC输注(但不加环磷酰胺),共3次输注,不注射IL-2。将最后的T细胞输注后存活28天的小鼠放血,并通过使用流式细胞术检测先天标志的T细胞来评估转移的T细胞的持久性。在研究结束时,根据IACUC批准的终点标准评估小鼠的存活并对其实施安乐死。本实例中使用的实验设计的摘要如图25B所示。

[0413] 第三次输注T细胞后28天,Fas-4-1BB⁺T细胞在血液中表现出更大的持久性(图25C)。接受Fas-4-1BB⁺T细胞的所有小鼠(100%)表现出T细胞持久性,而仅TCR的T细胞没有持久性(图25C)。用间皮素特异性TCR和Fas-4-1BB⁺T细胞治疗的小鼠的存活率明显高于仅间皮素特异性TCR的T细胞免疫疗法(Mantel-Cox试验,P<0.05;图25D)。

[0414] 实例26

[0415] 在AML的小鼠模型中FAS-4-1BB表达增强了过继免疫疗法

[0416] 如对于实体瘤的实例24所示,用Fas-4-1BB⁺T细胞的治疗改善了液体肿瘤的存活。在鼠AML模型中(Teague et al., Nature Medicine 12:335-341, 2006; Oda et al., Blood 130:2410-2419, 2017),注射FBL细胞并使其播散5天。在第五天,在给予或不给予 10^6 个T细胞的情况下,用环磷酰胺处理小鼠。相对于仅TCR的T细胞,用TCR+Fas-4-1BBtm转导的T细胞可提高存活(图26)。

[0417] 尽管已经示出和描述了本发明的特定实施例,但是将容易理解,可以将上述各种实施例组合以提供其他实施例,并且可以在其中进行各种改变而不脱离本发明的精神和范围。

[0418] 本说明书中提及或在申请数据表中列出的所有美国专利、美国专利申请公开、美

国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物，包括但不限于美国临时专利申请第62/128,979、62/473,282和62/629,663号以及PCT国际申请第PCT/US2016/021064号，其全部内容通过引用并入本文。如果需要采用各种专利、申请和出版物的概念以提供其他实施例，则可以修改实施例的各方面。

[0419] 可以根据以上详细描述对实施例进行这些和其他改变。通常，在以下权利要求中，所使用的术语不应解释为将权利要求限制为说明书和权利要求书中公开的特定实施例，而应解释为包括所有可能的实施例以及这些授权的权利要求的等同物的全部范围。因此，权利要求不受本公开的限制。

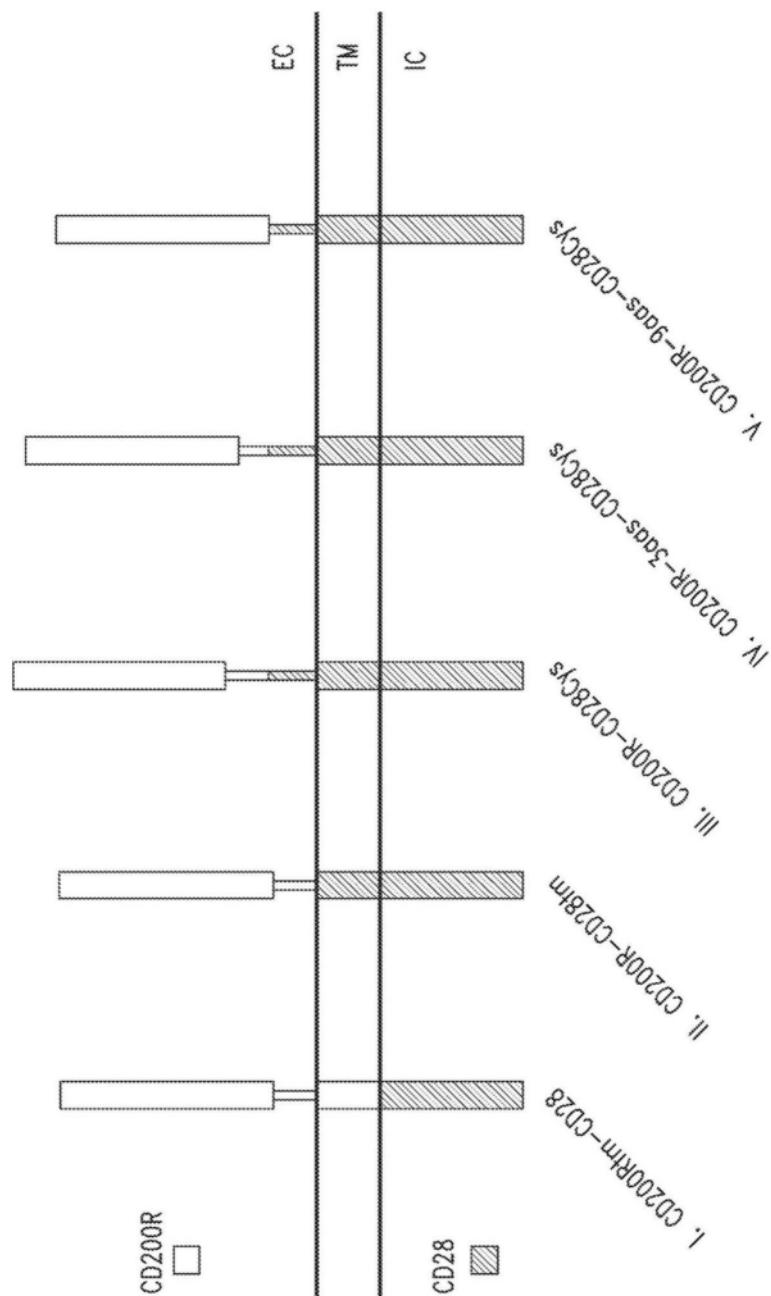


图1A

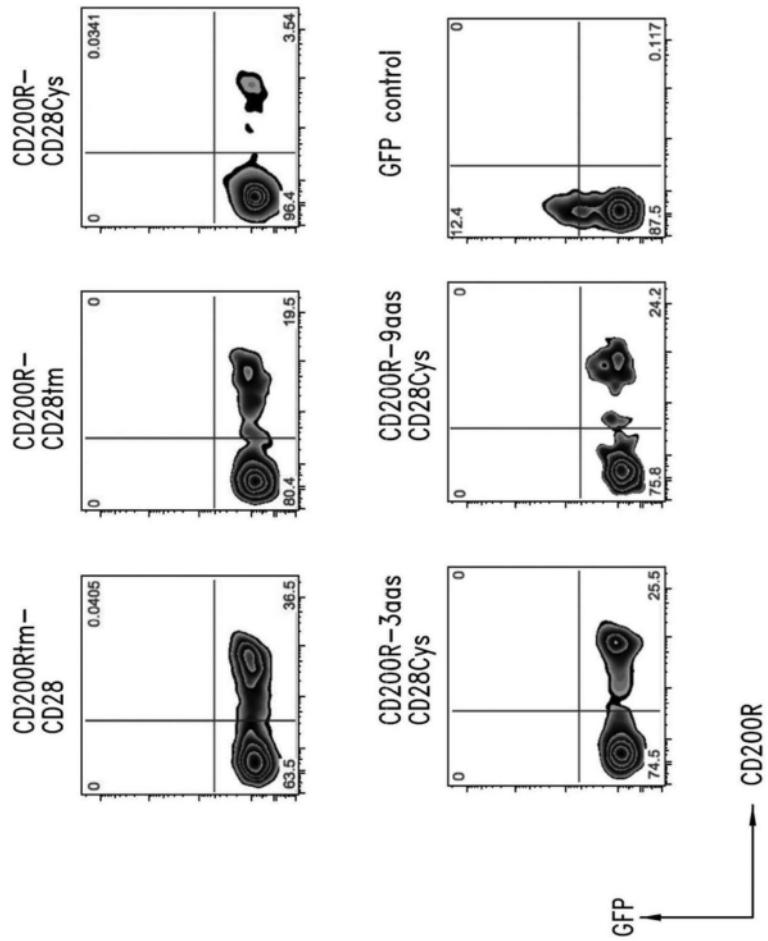


图1B

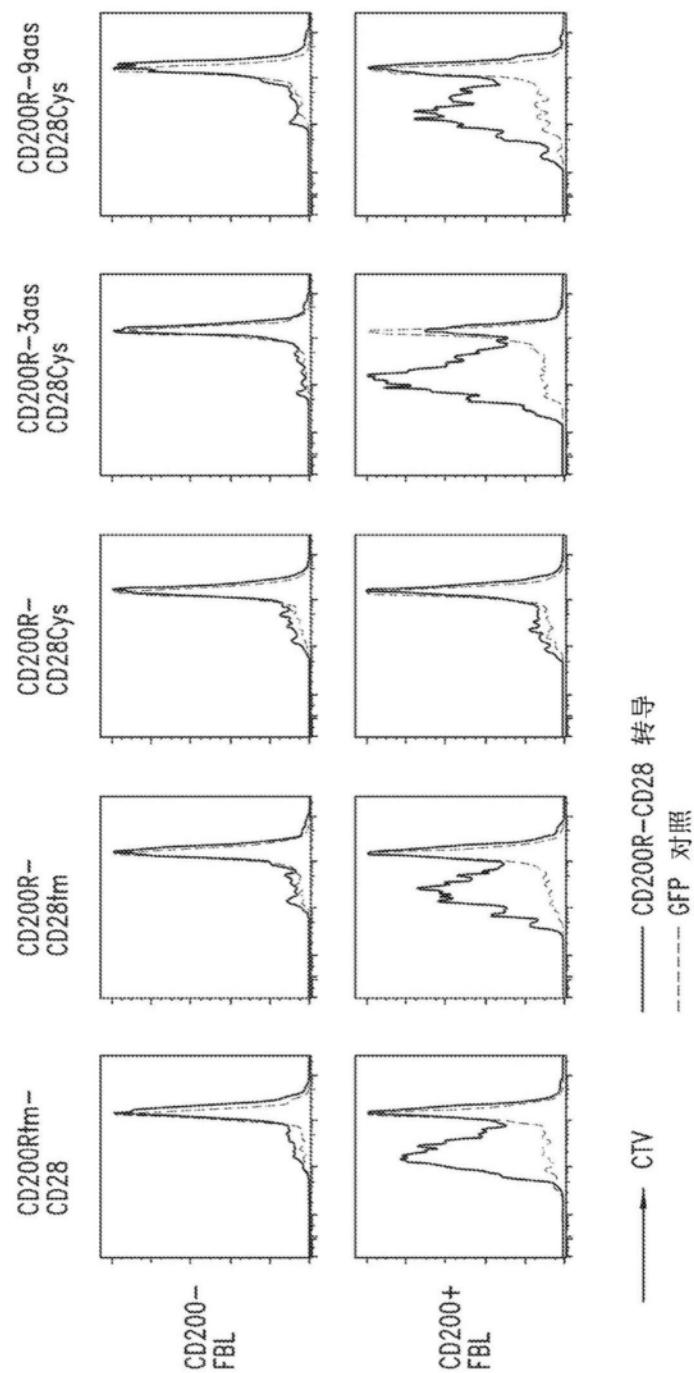


图2A

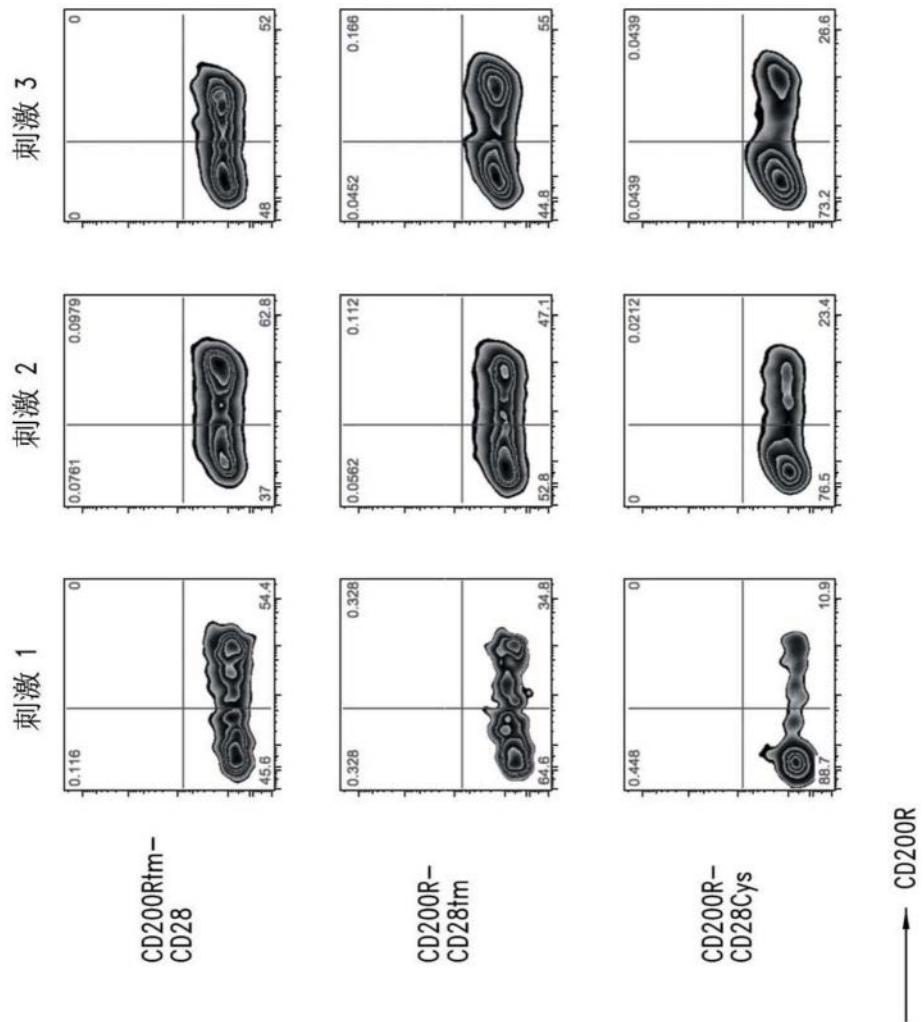


图2B

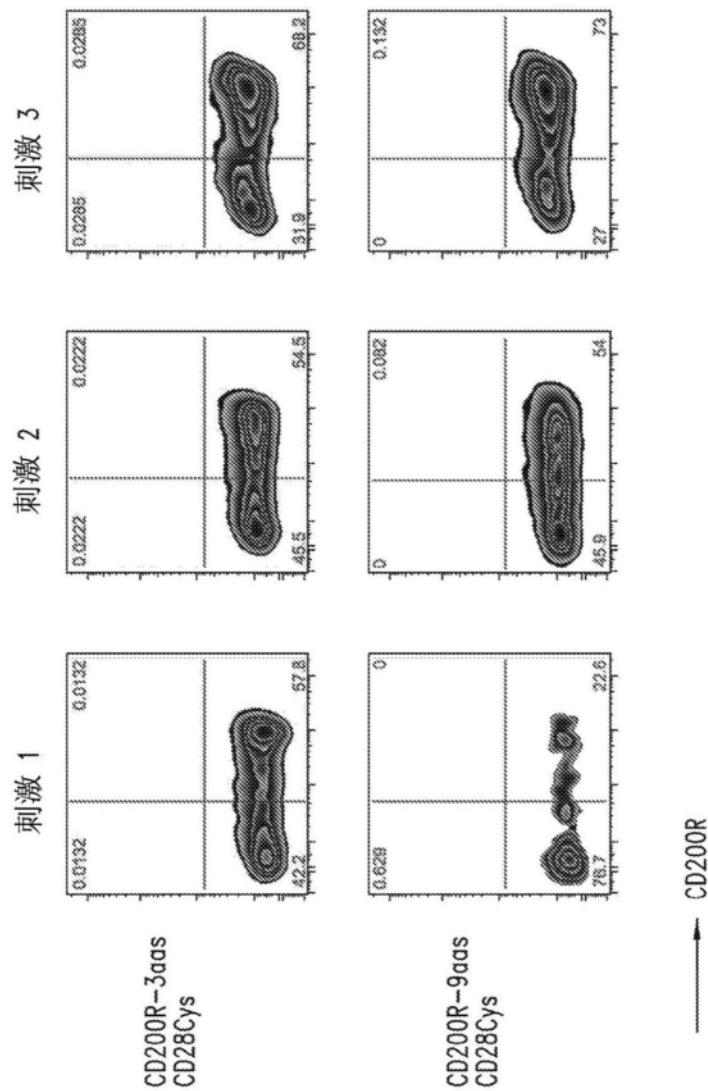


图2B(续)

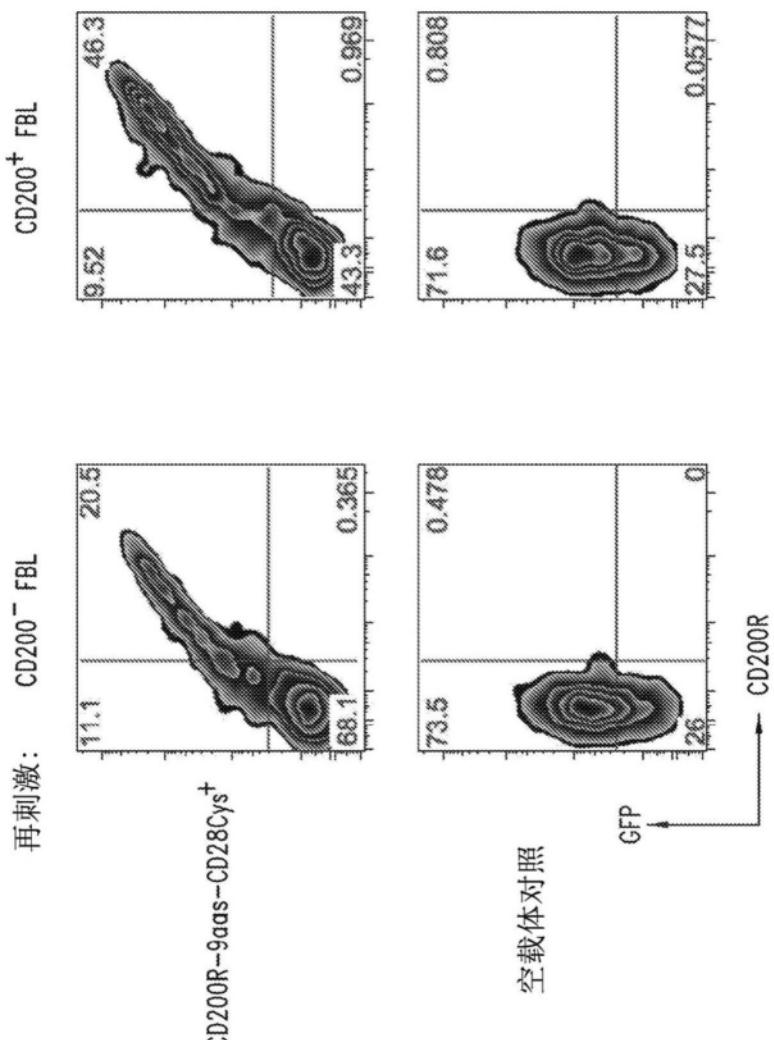


图2C

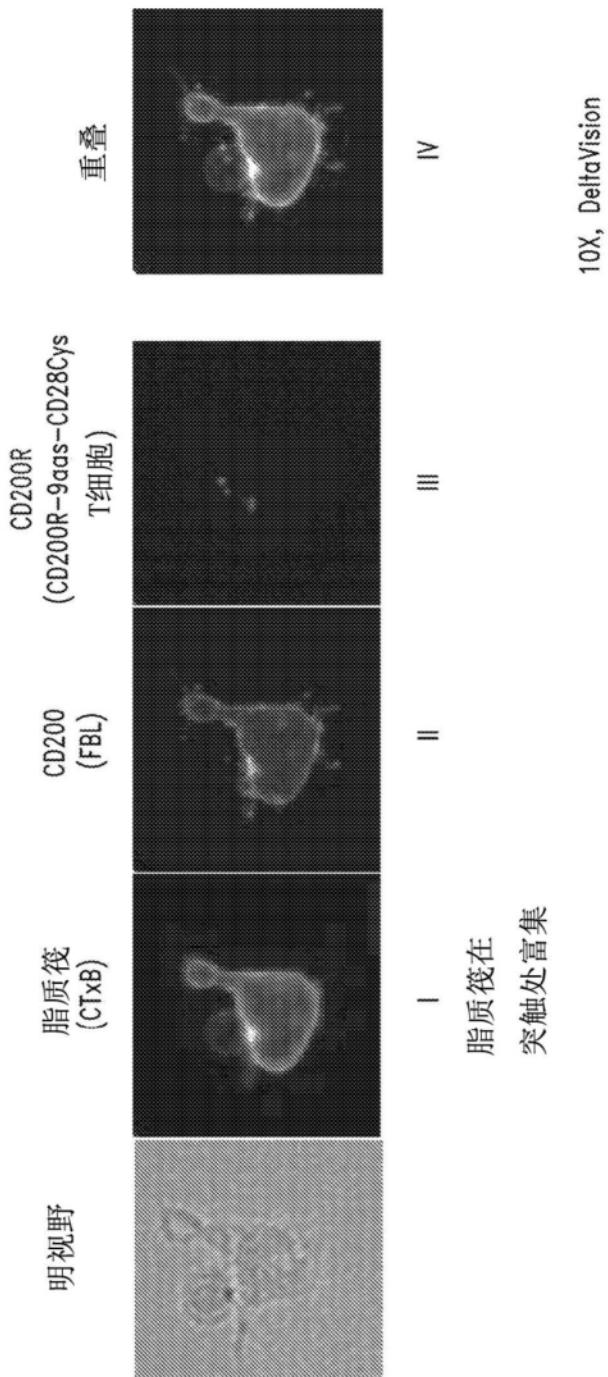


图2D

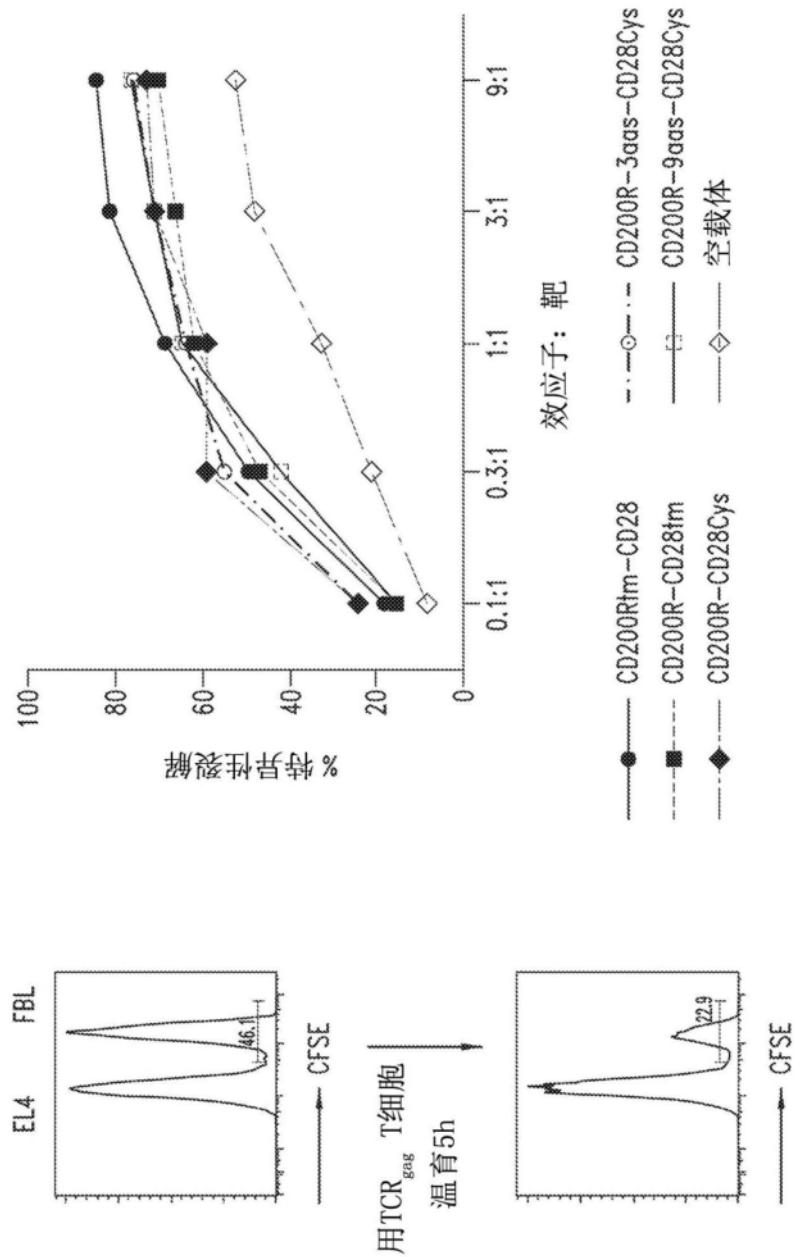


图2E

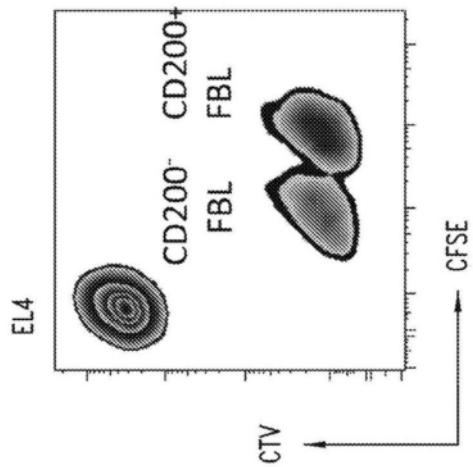


图2F

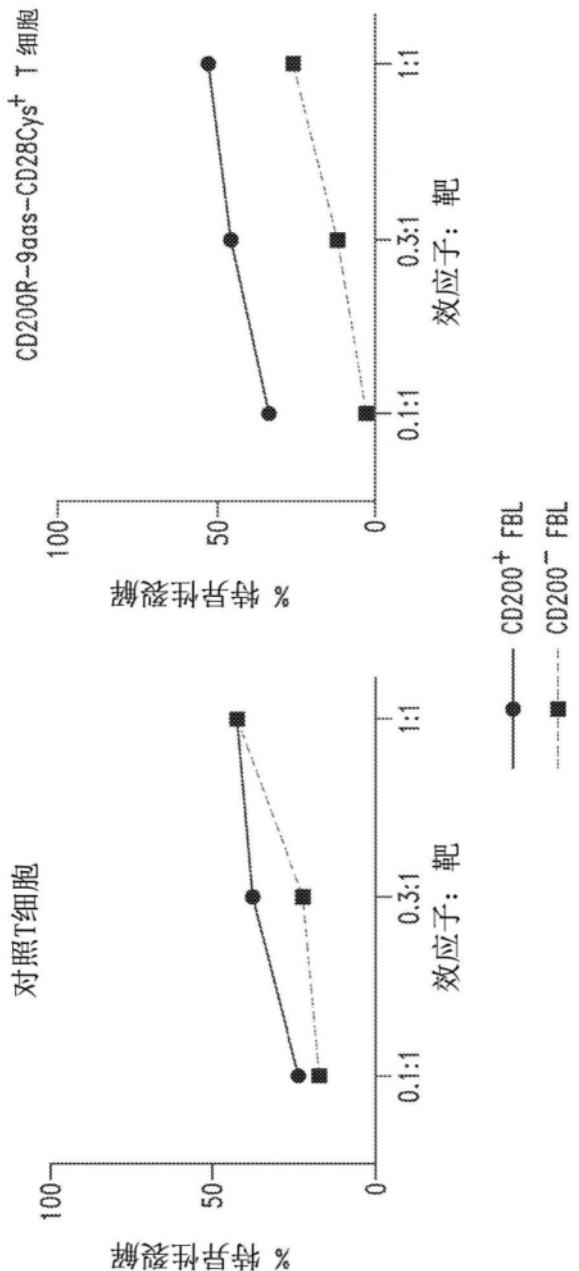
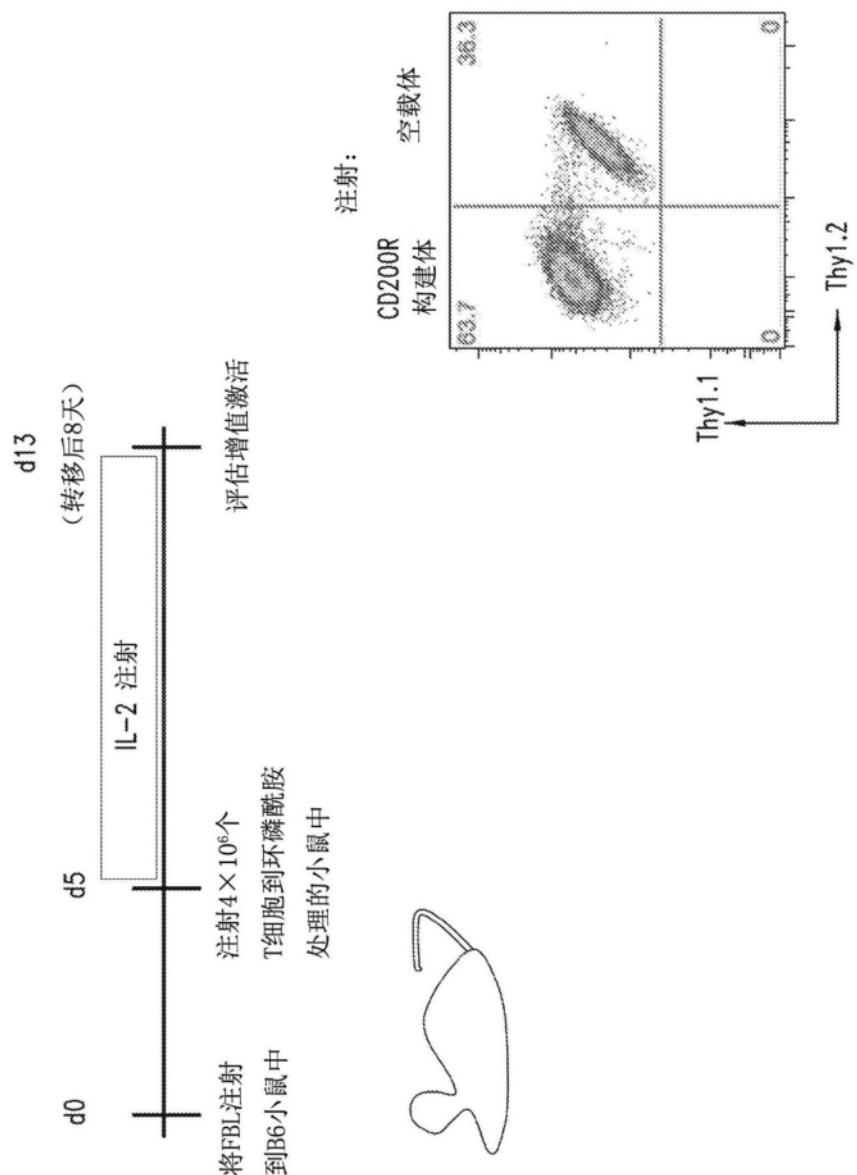


图2G



图|3A

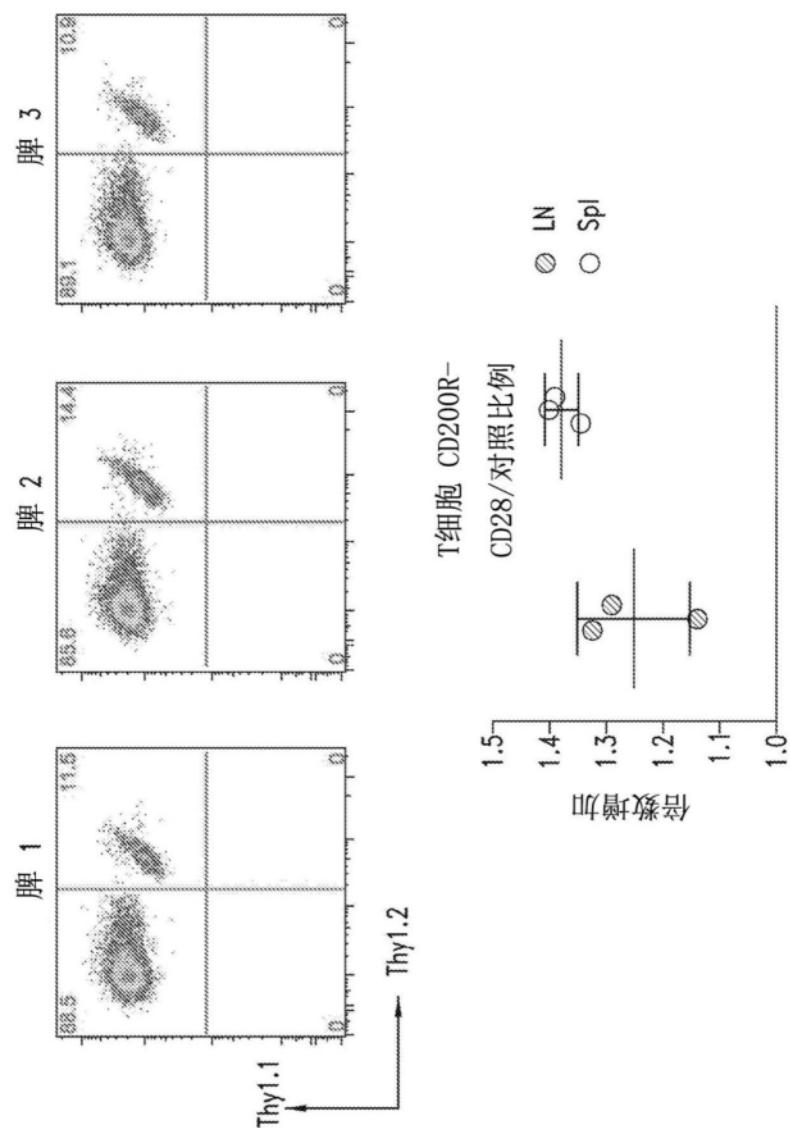


图3B

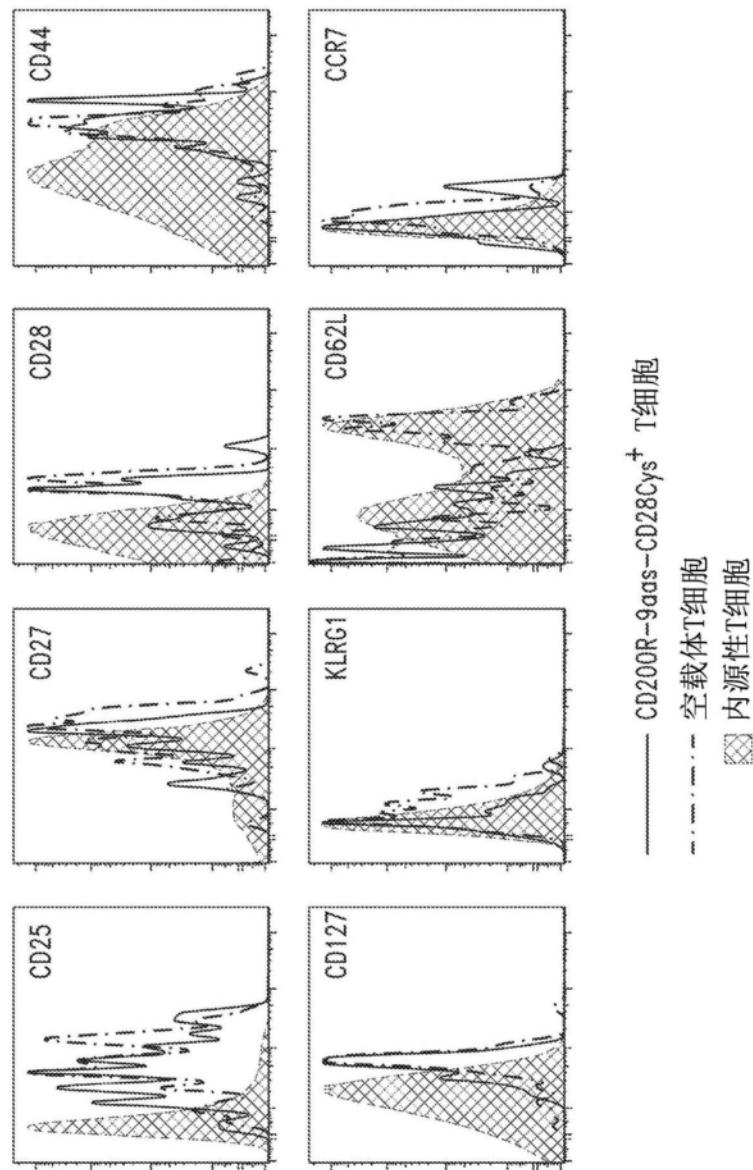


图3C

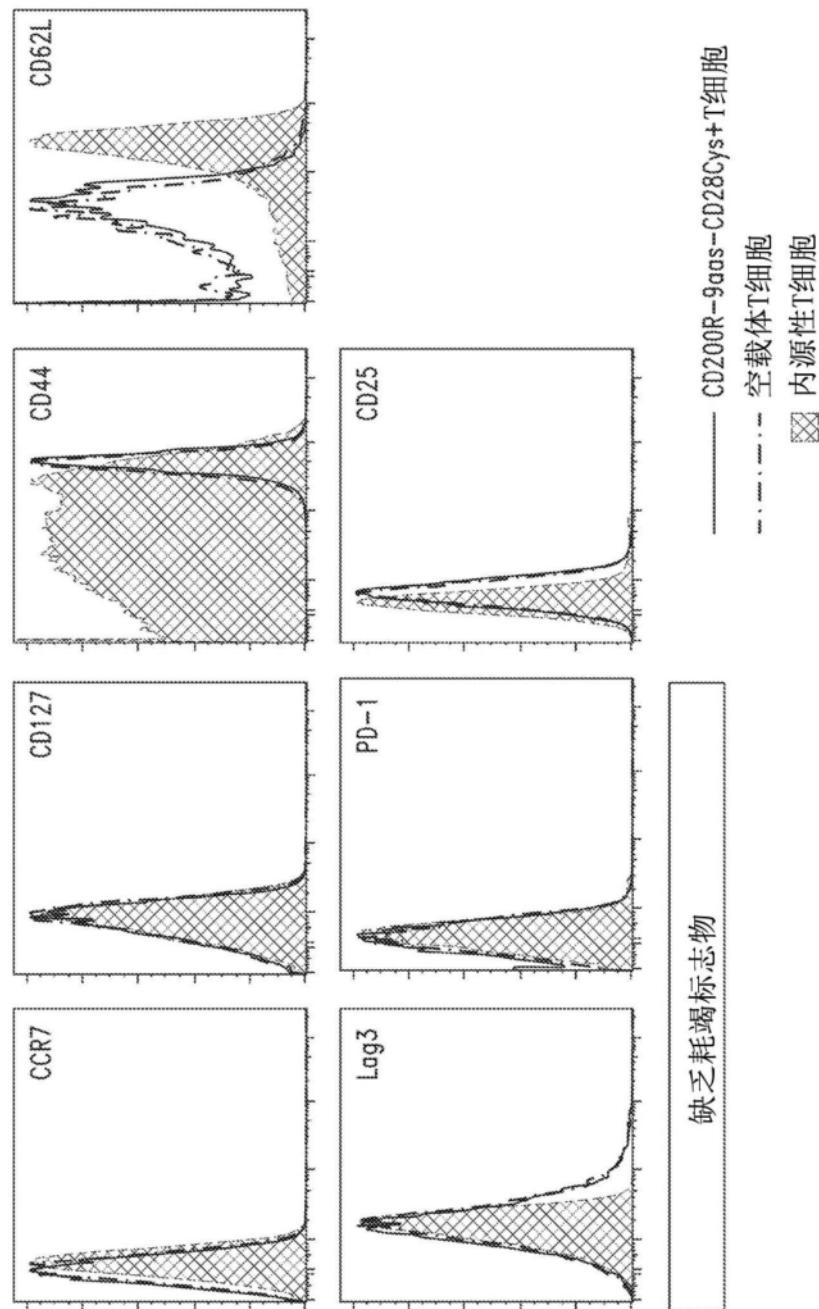


图3D

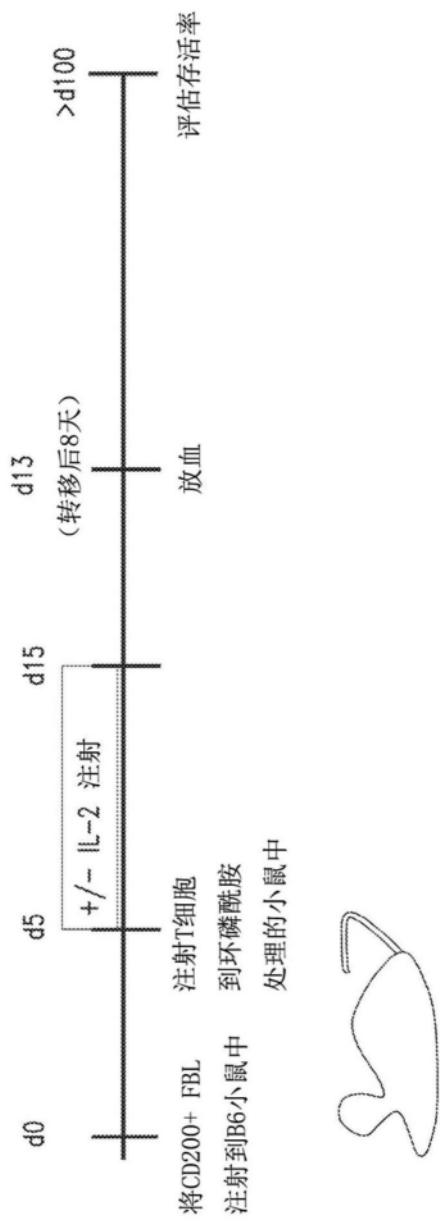


图4A

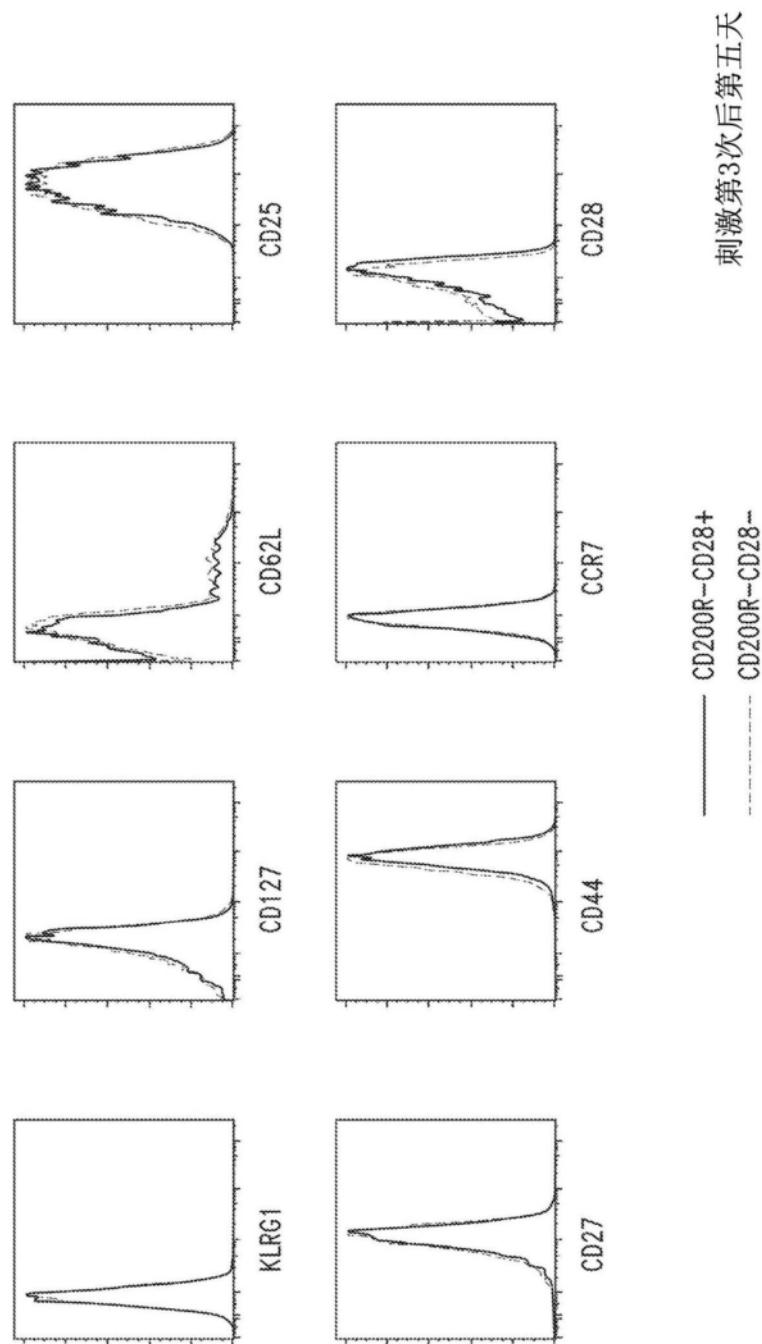


图4B

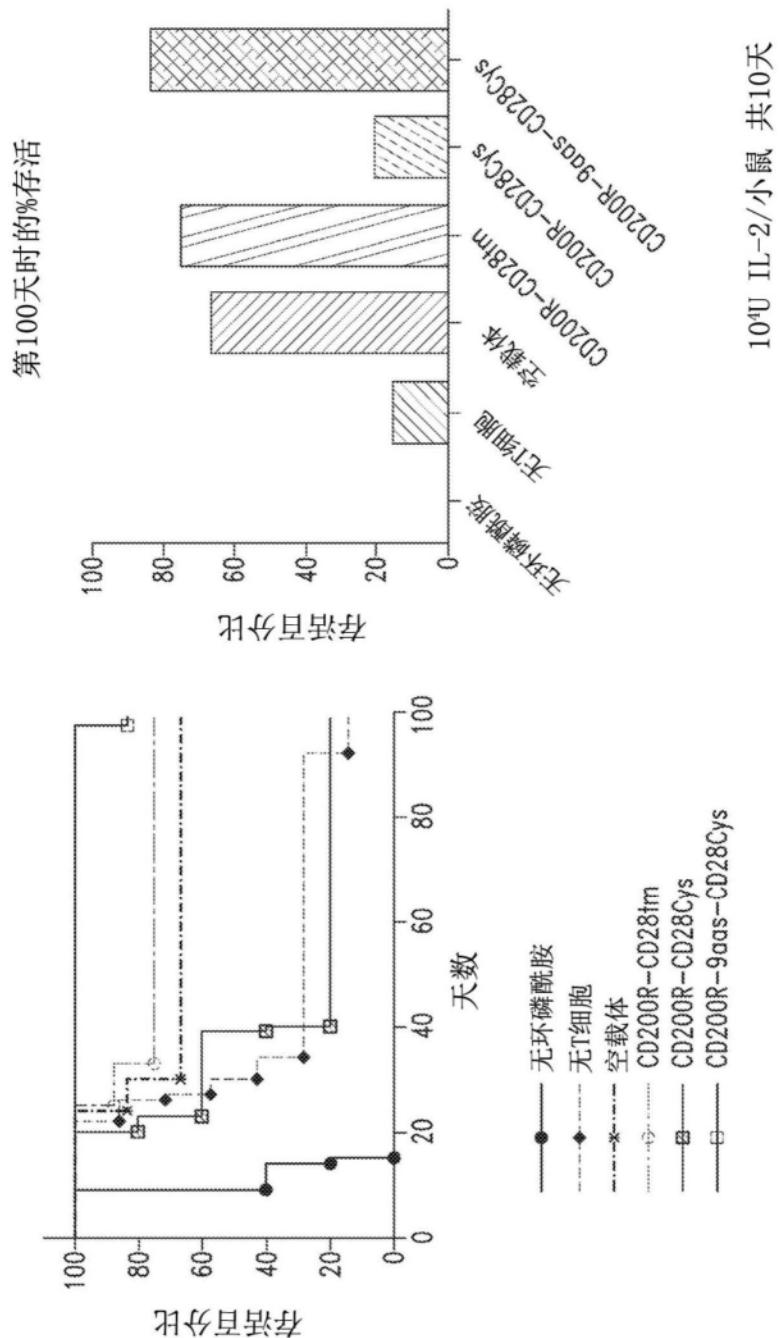


图4C

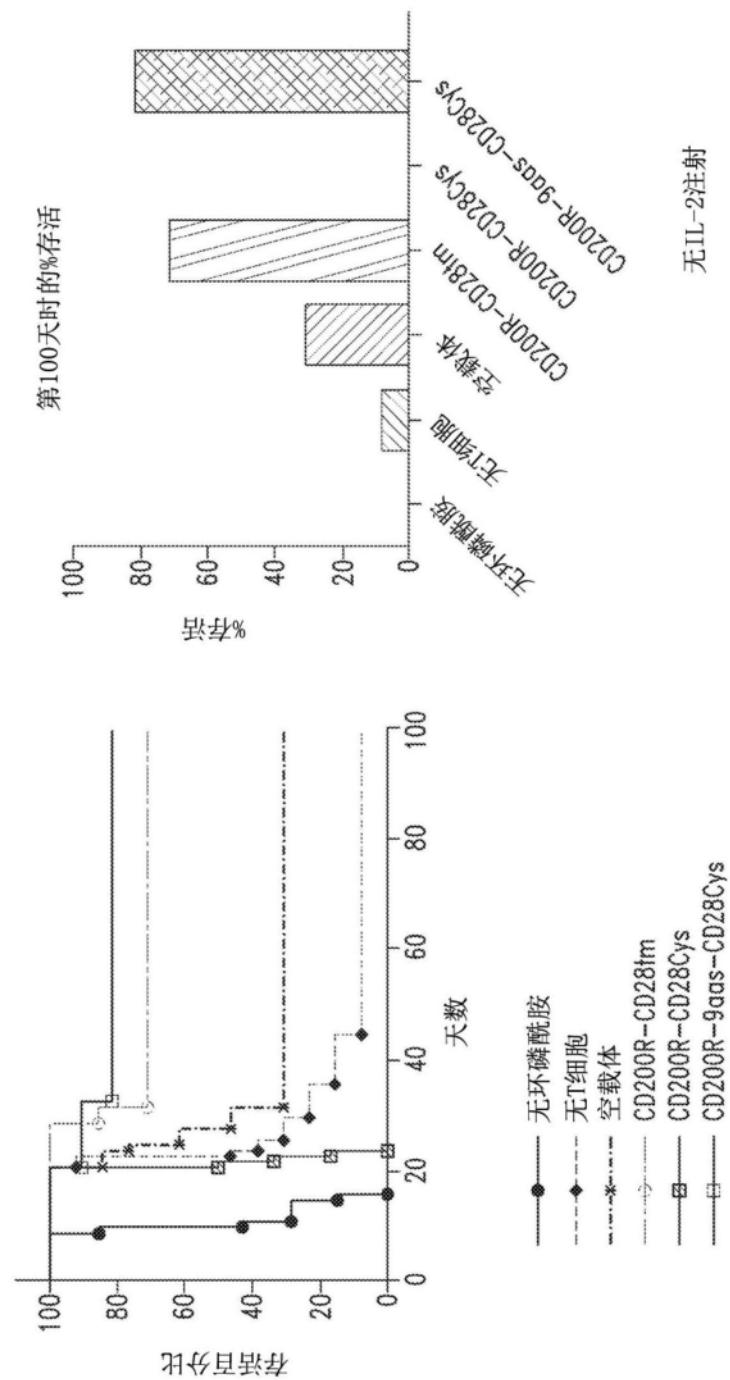


图4D

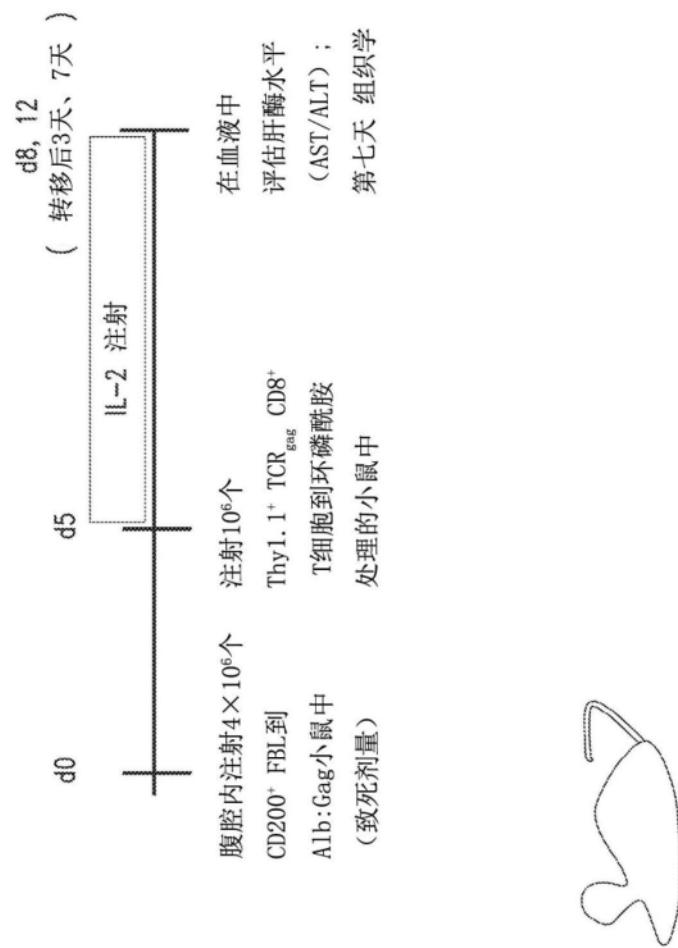


图5A

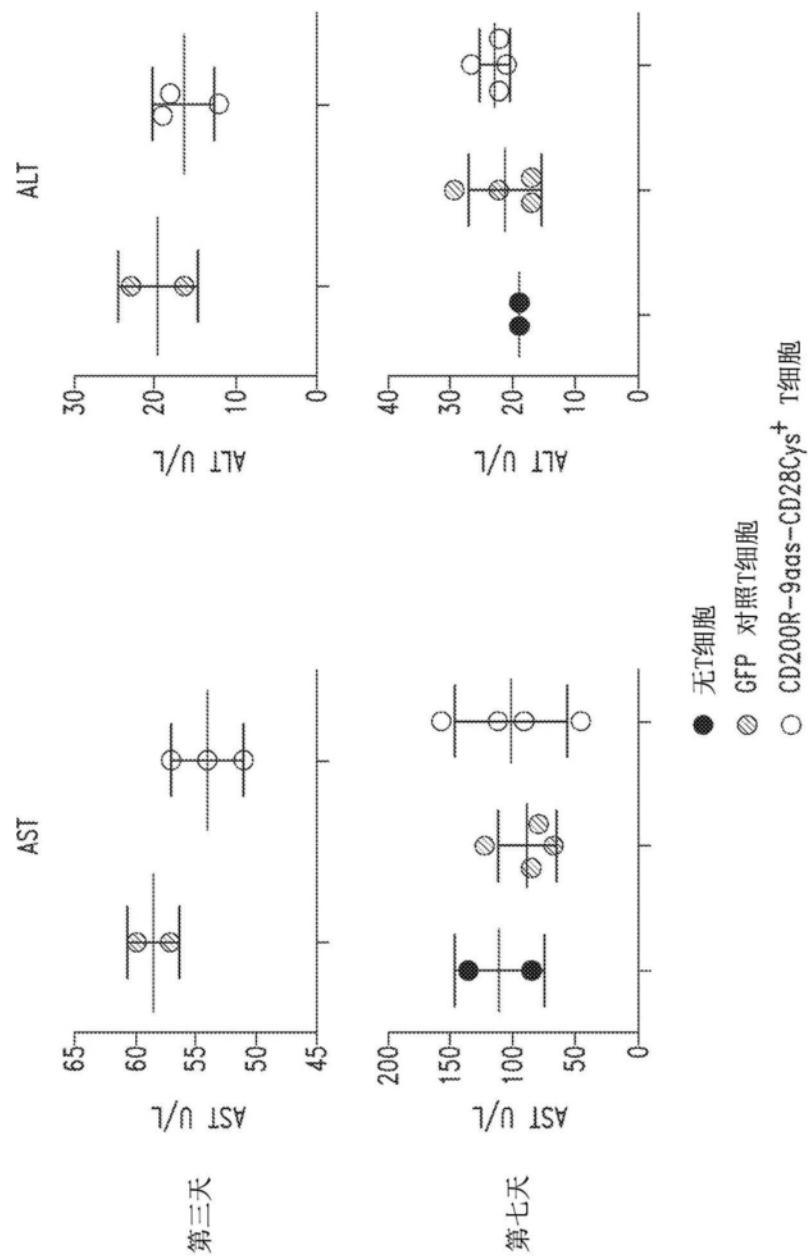


图5B

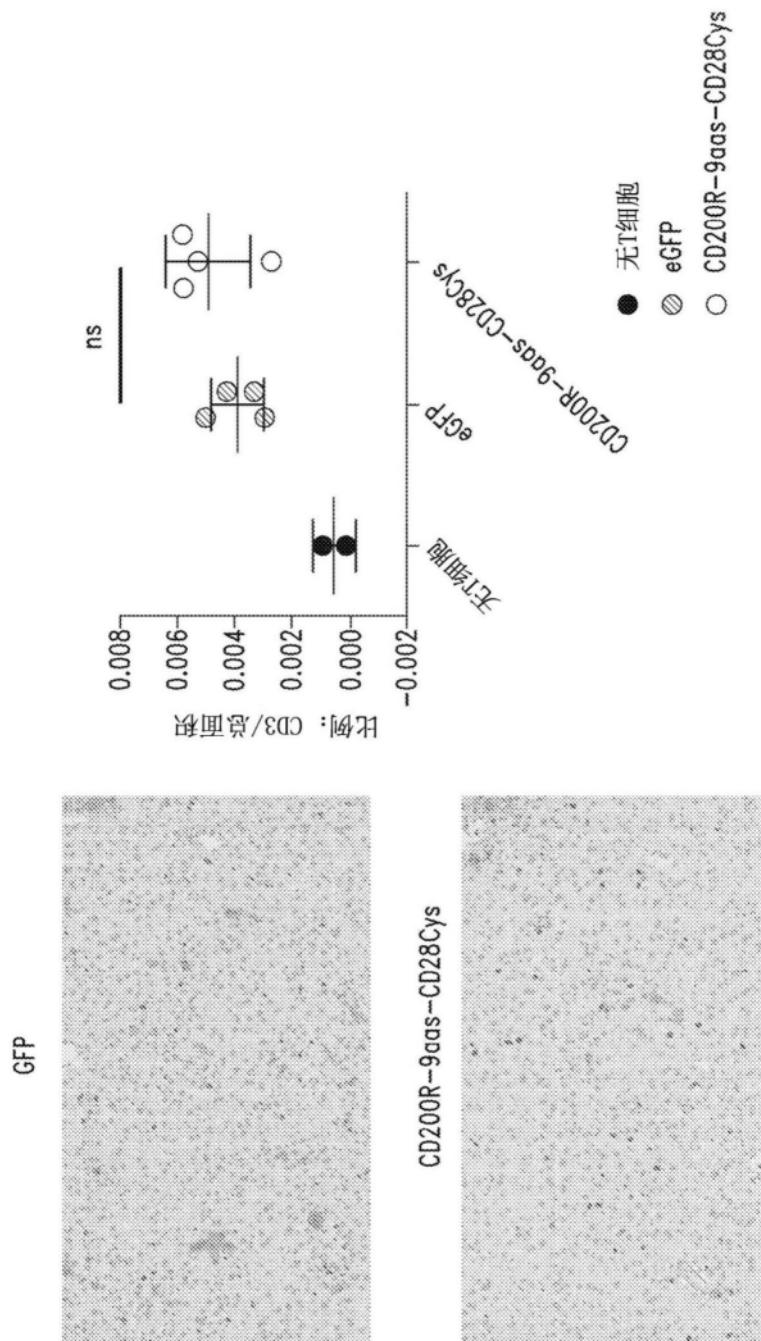


图5C

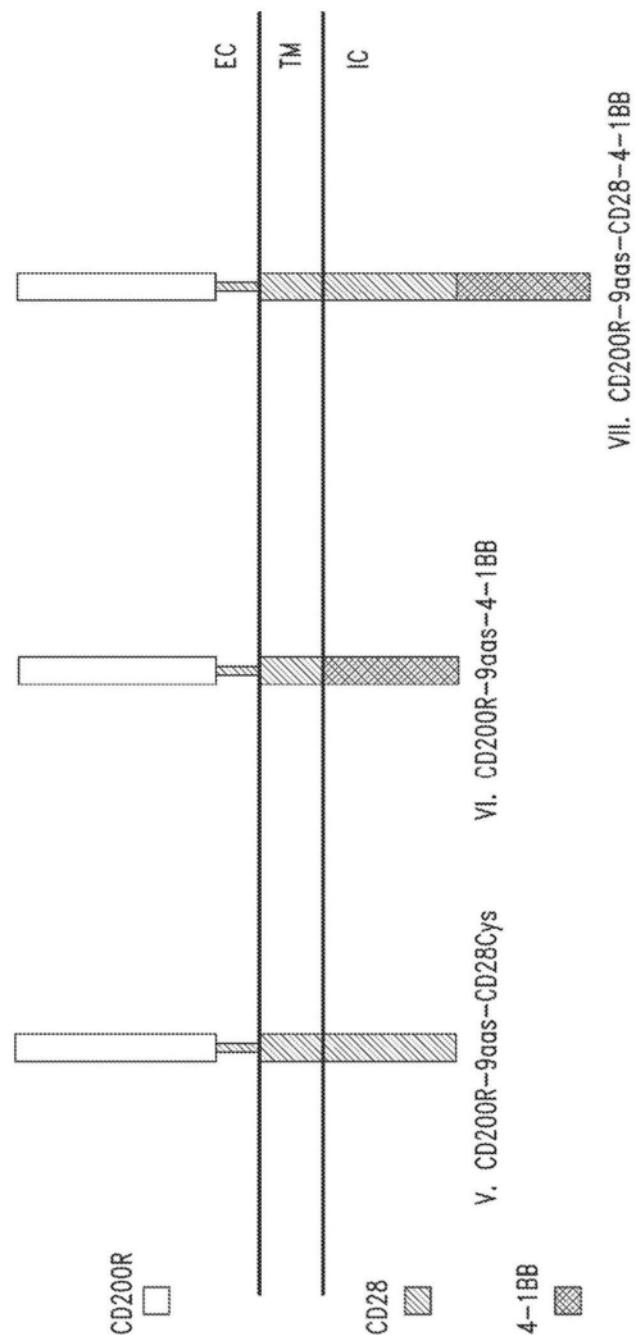


图6A

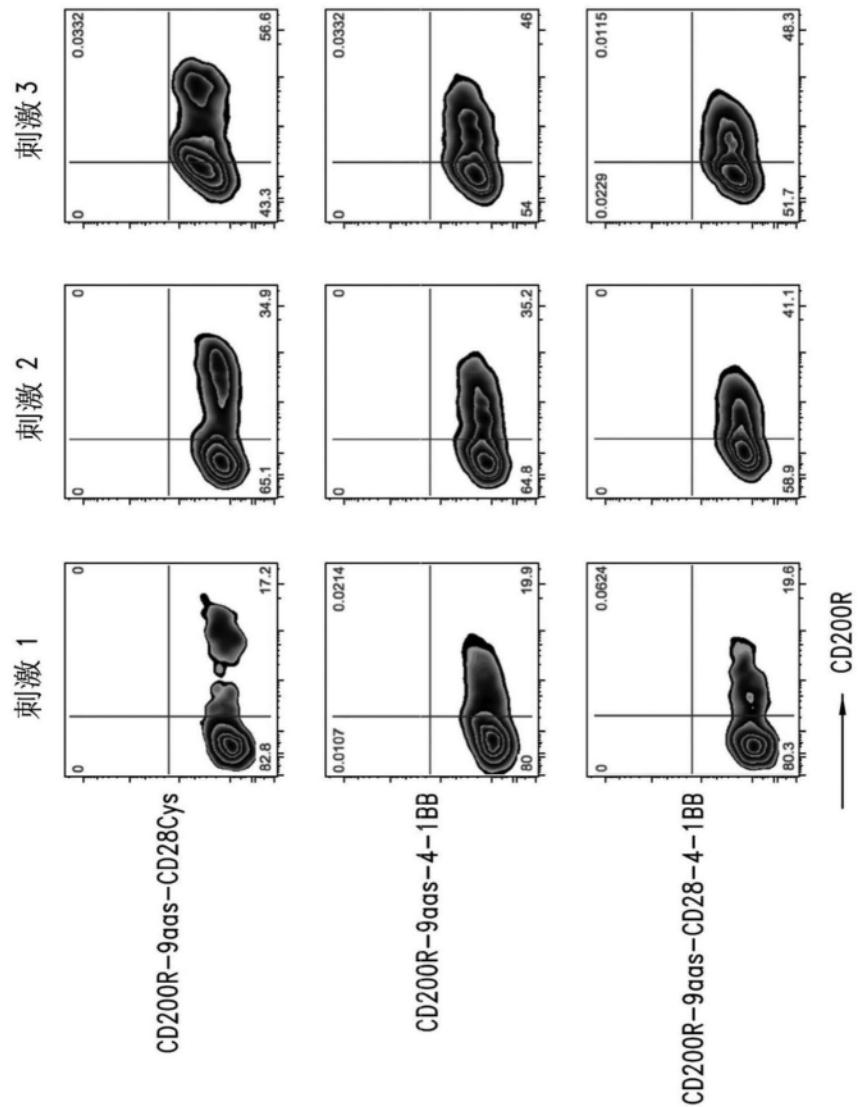


图6B

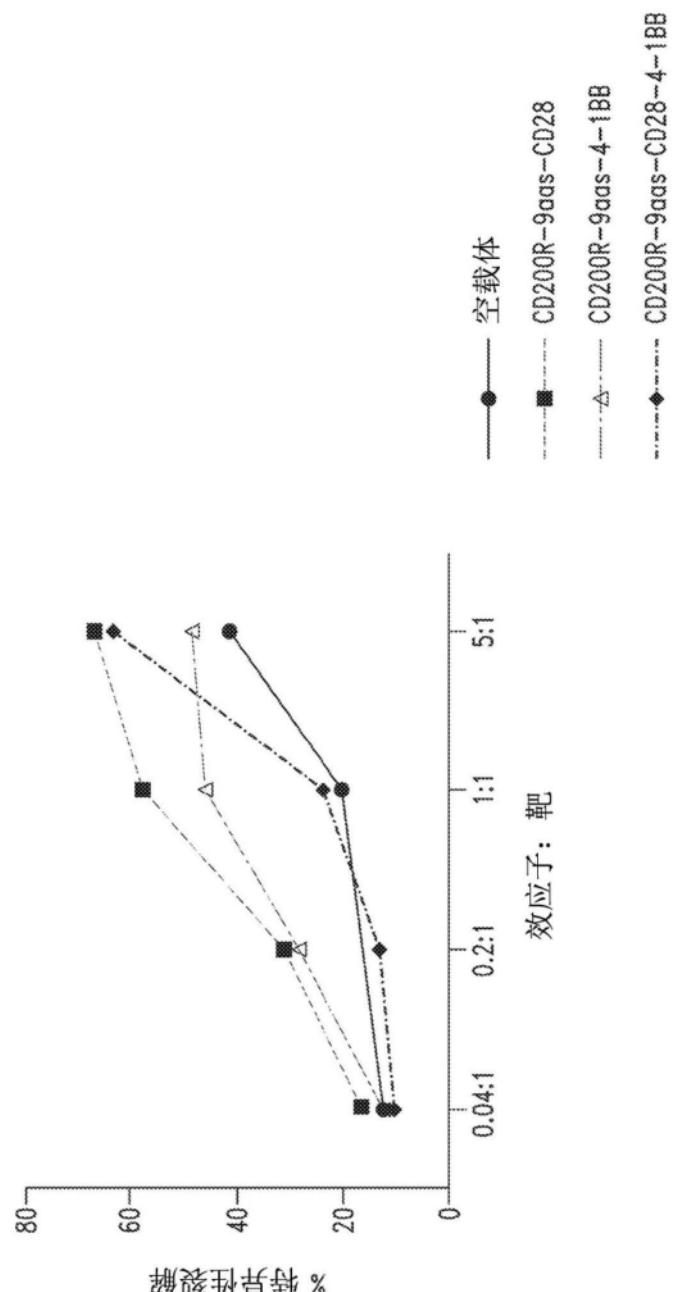


图6C

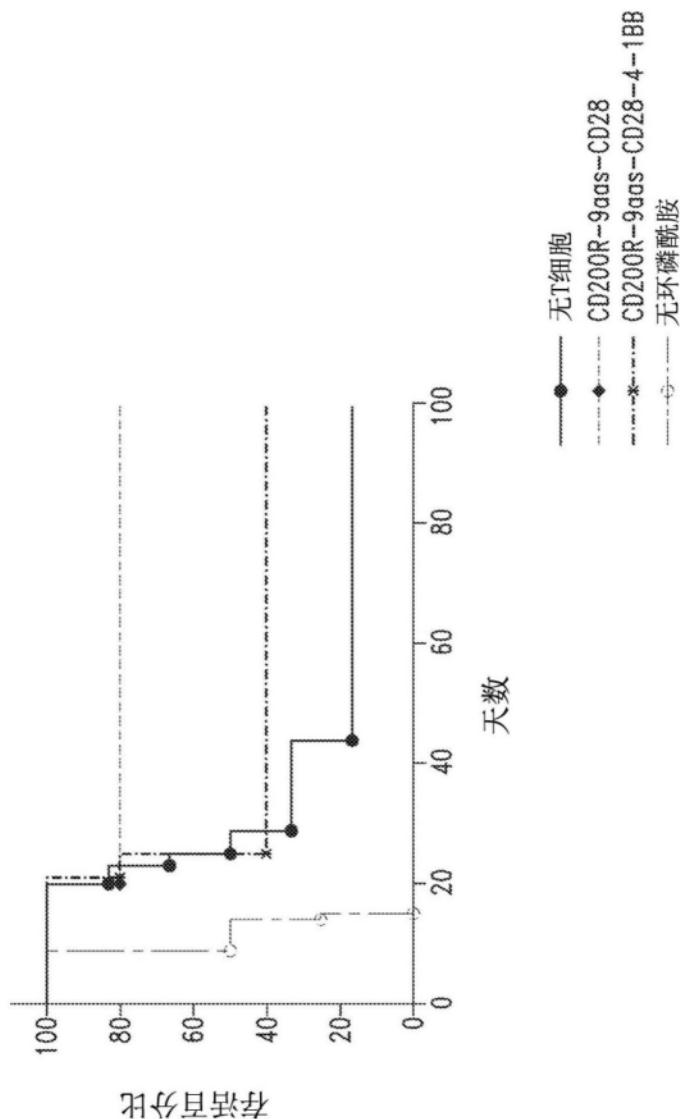


图6D

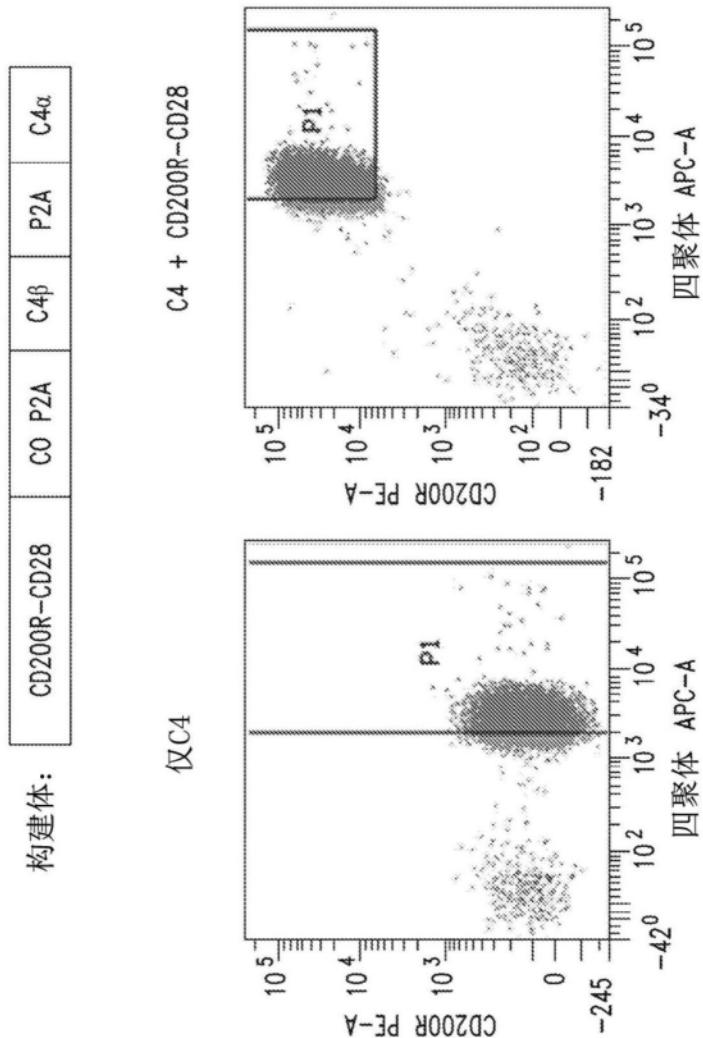


图7A

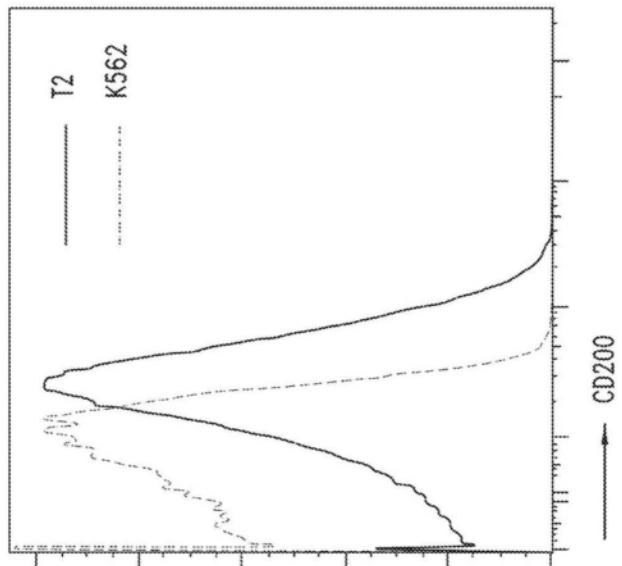


图7B

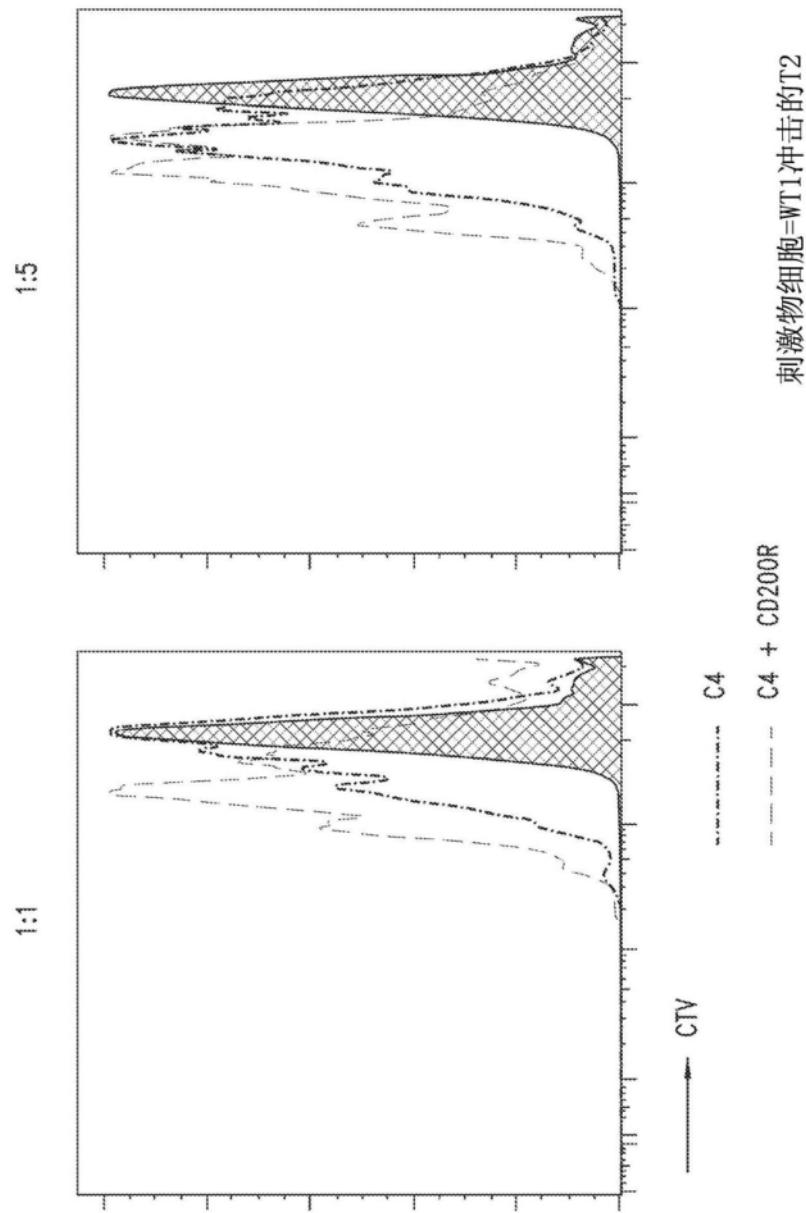


图7C

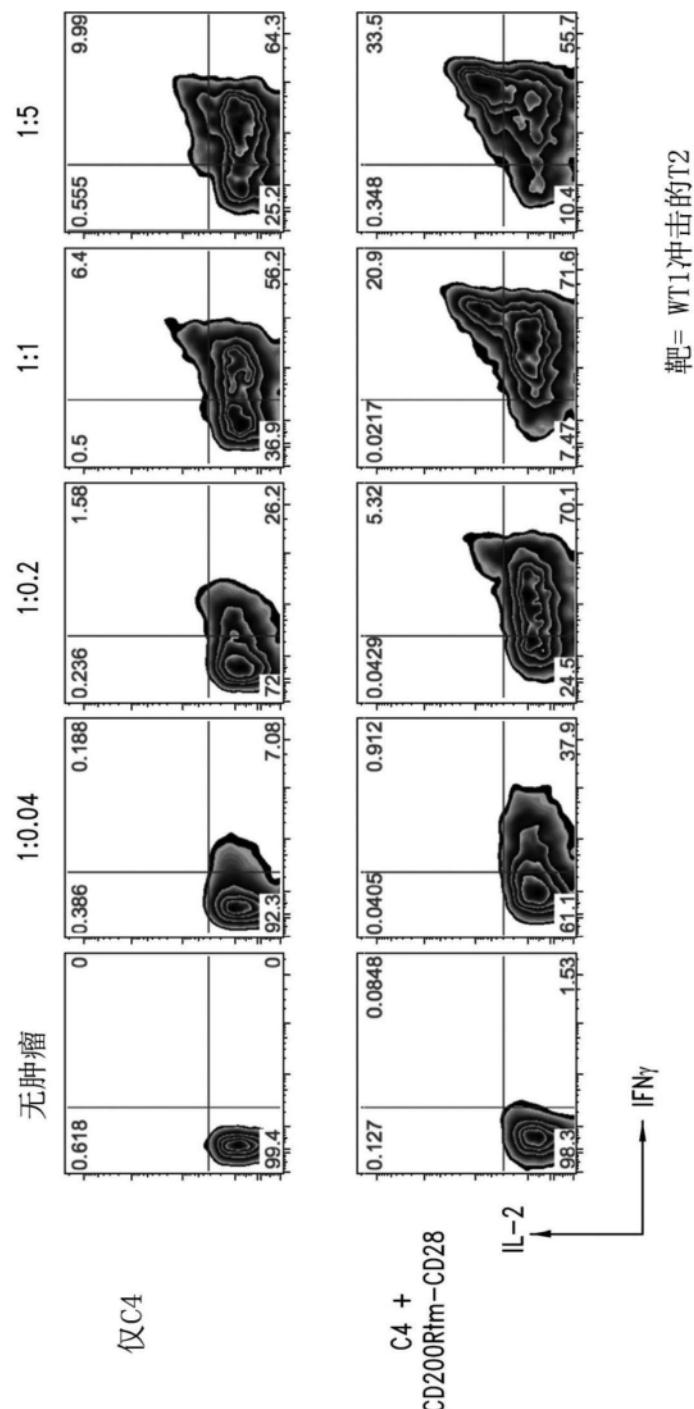


图7D

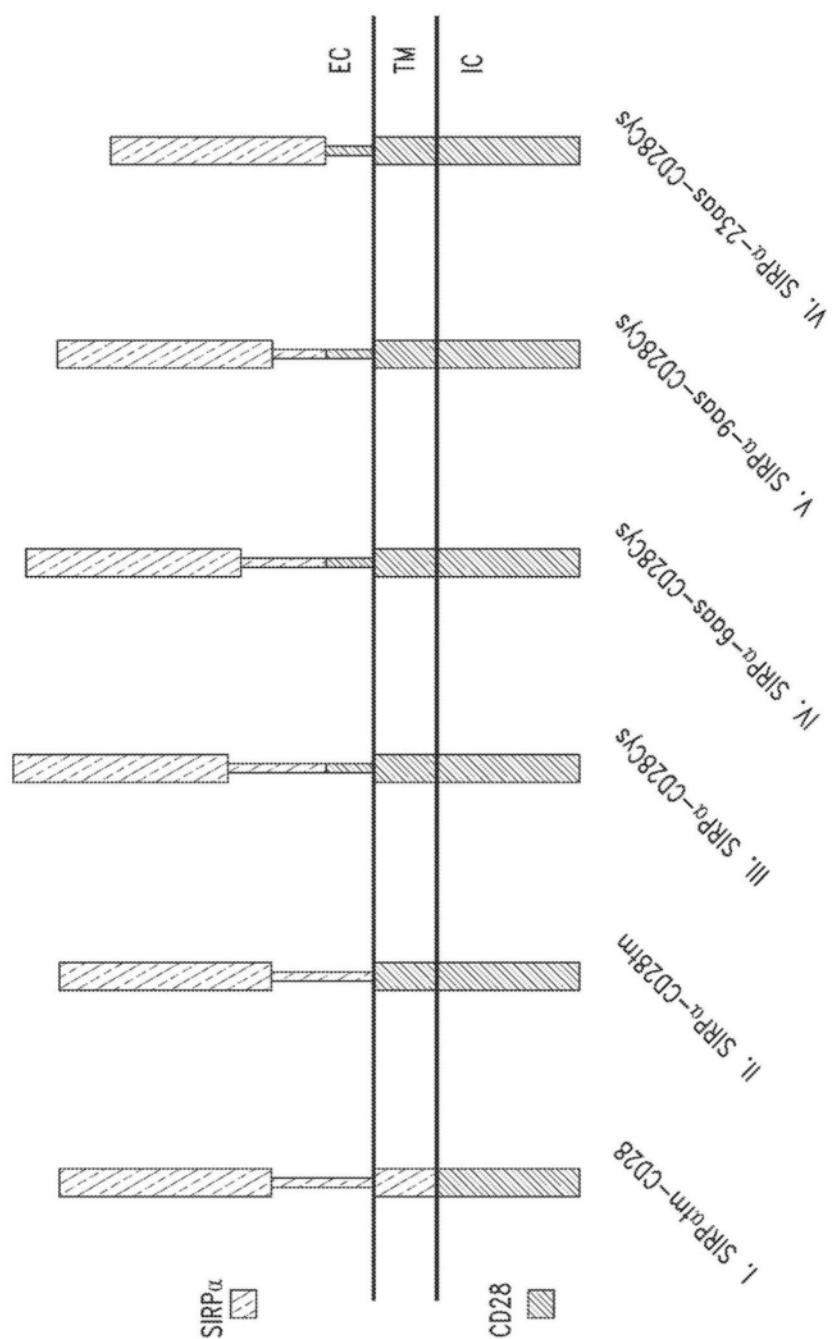


图8A

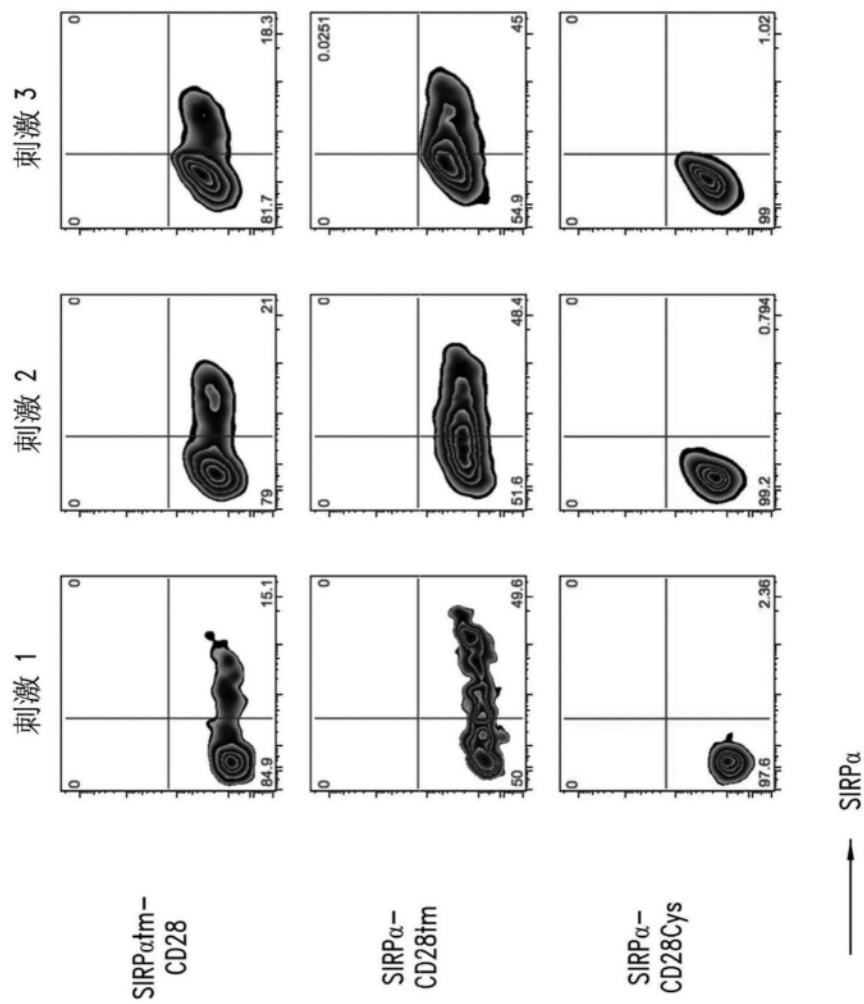


图8B

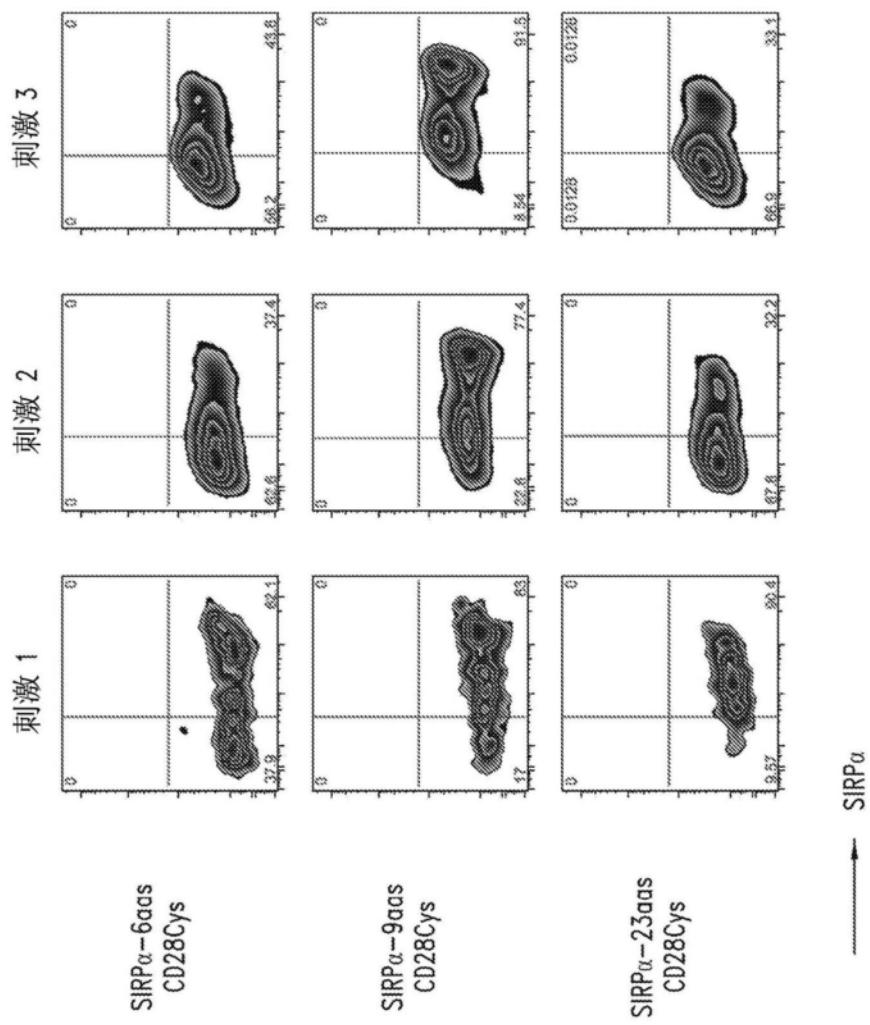


图8B(续)

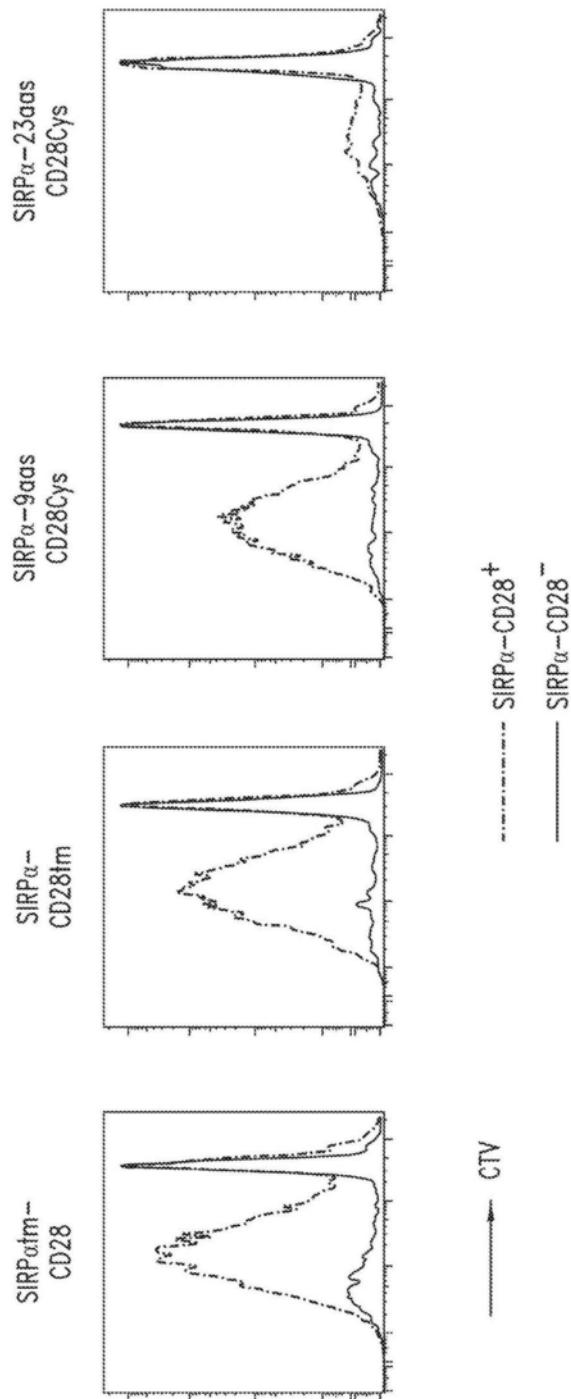


图8C

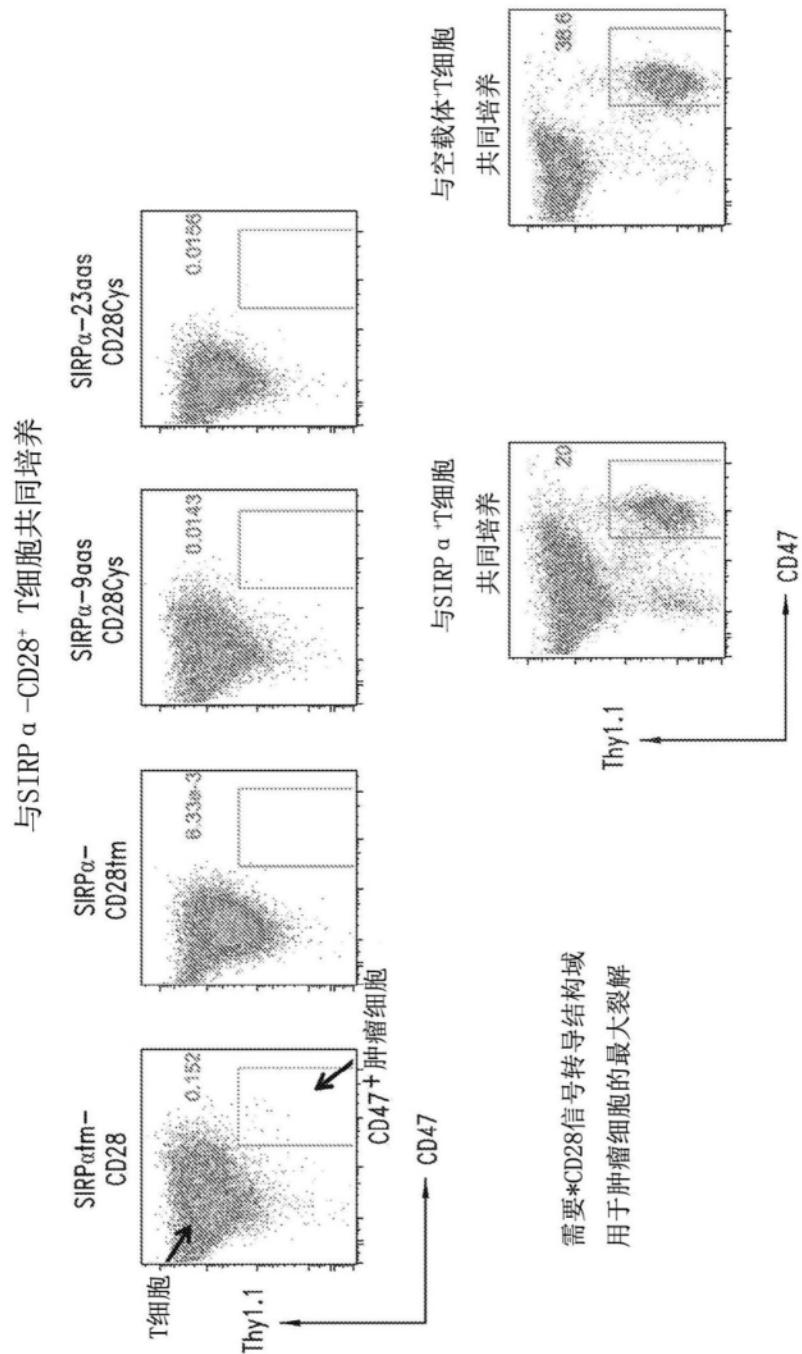


图8D

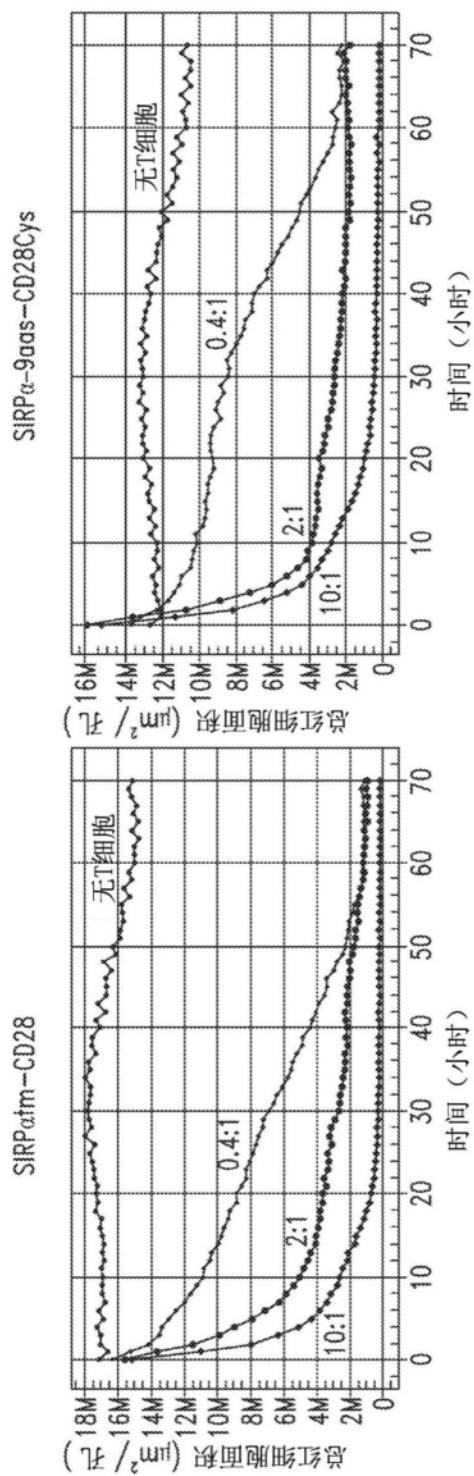
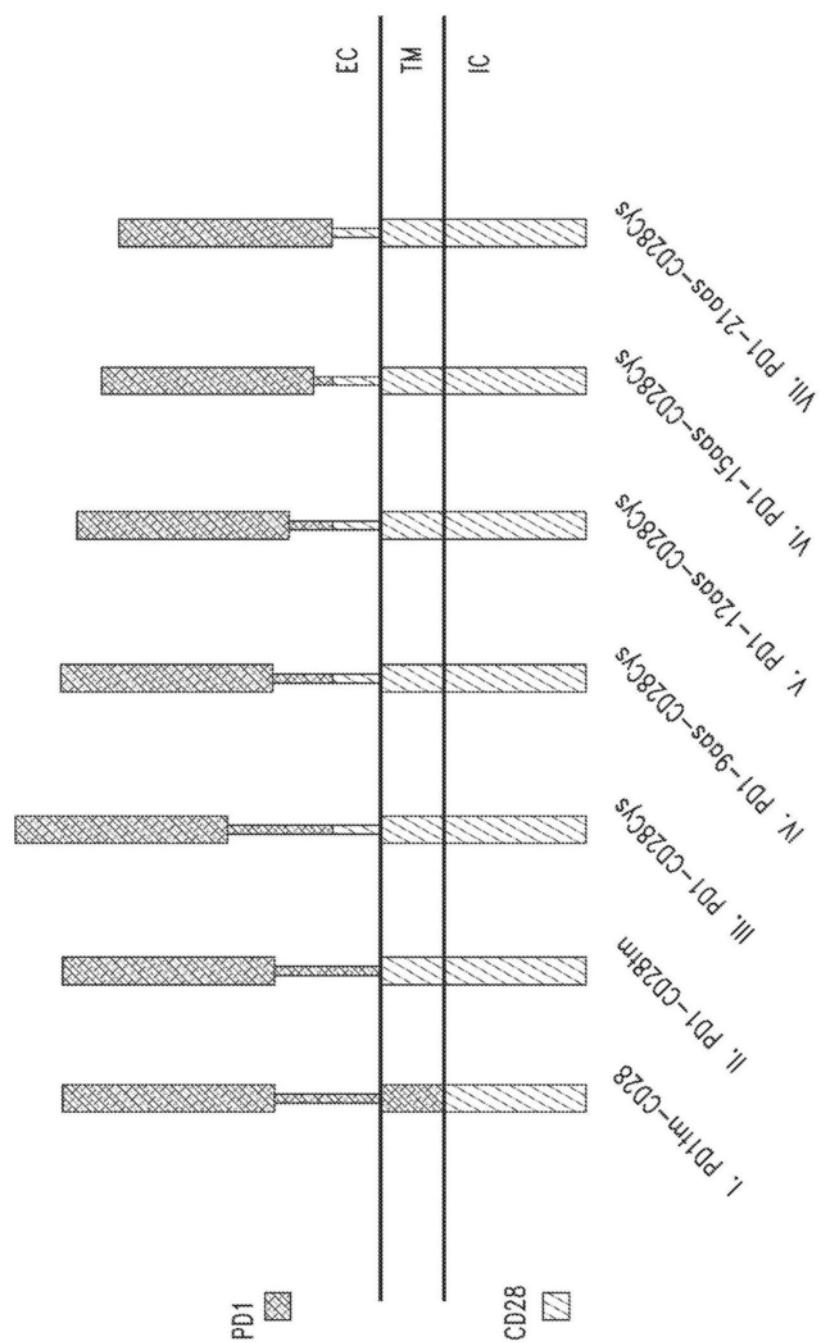


图8E



图A6

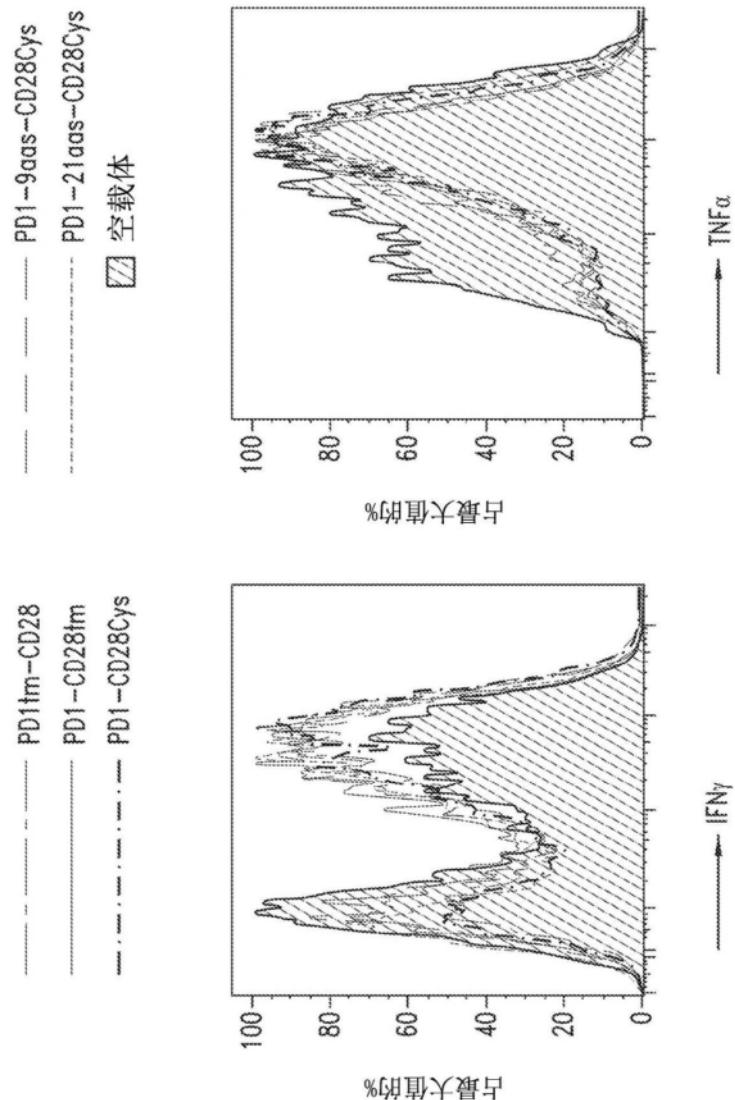


图9B

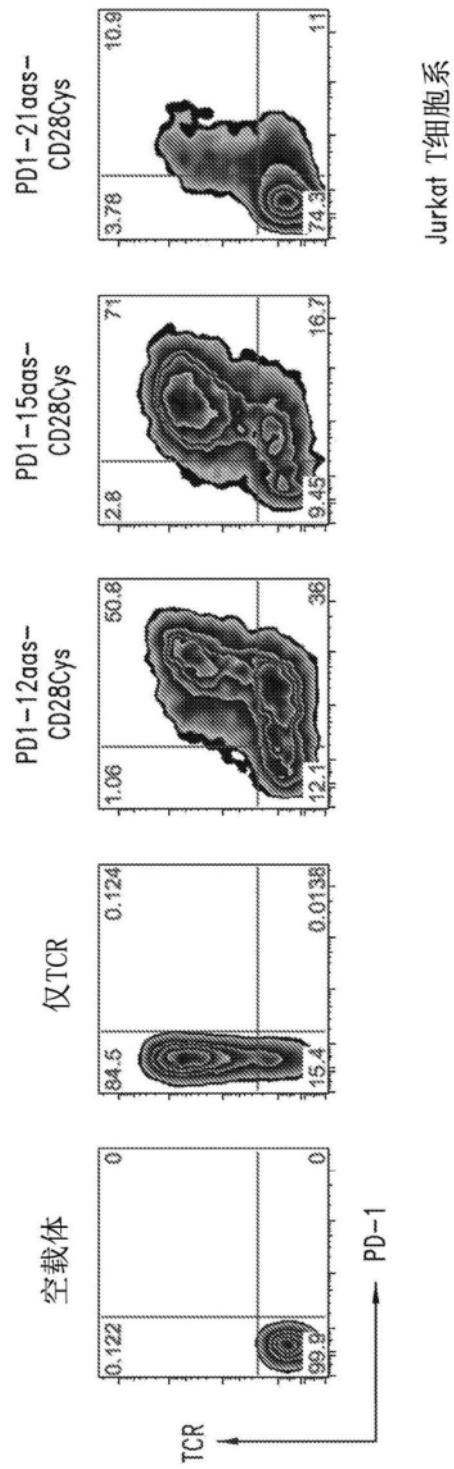


图10

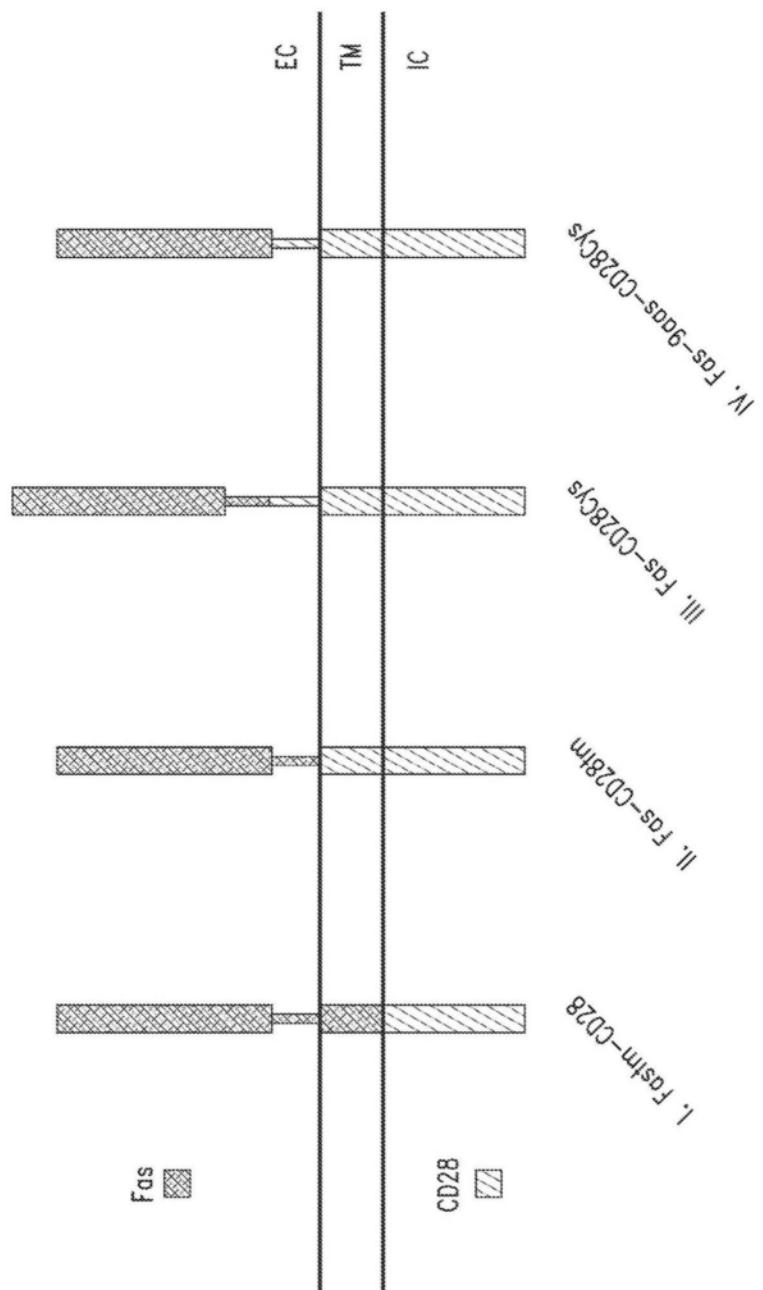


图11A

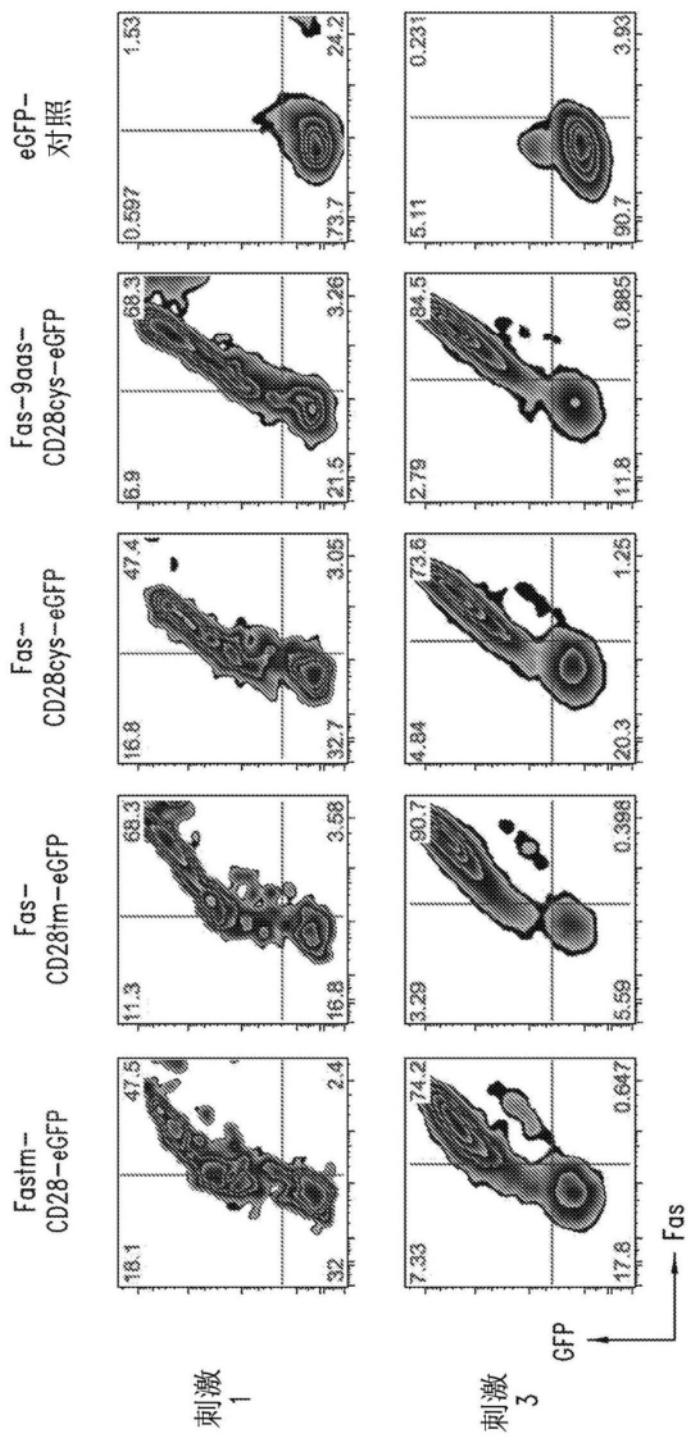


图11B

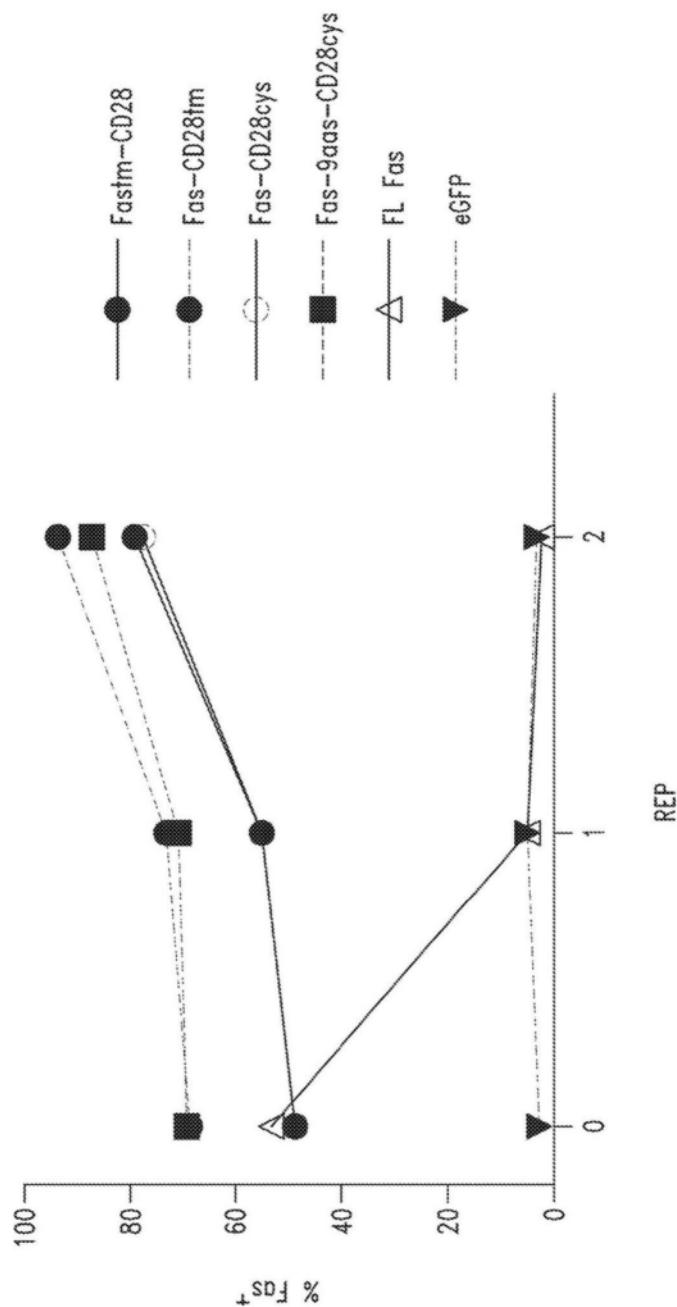


图11C

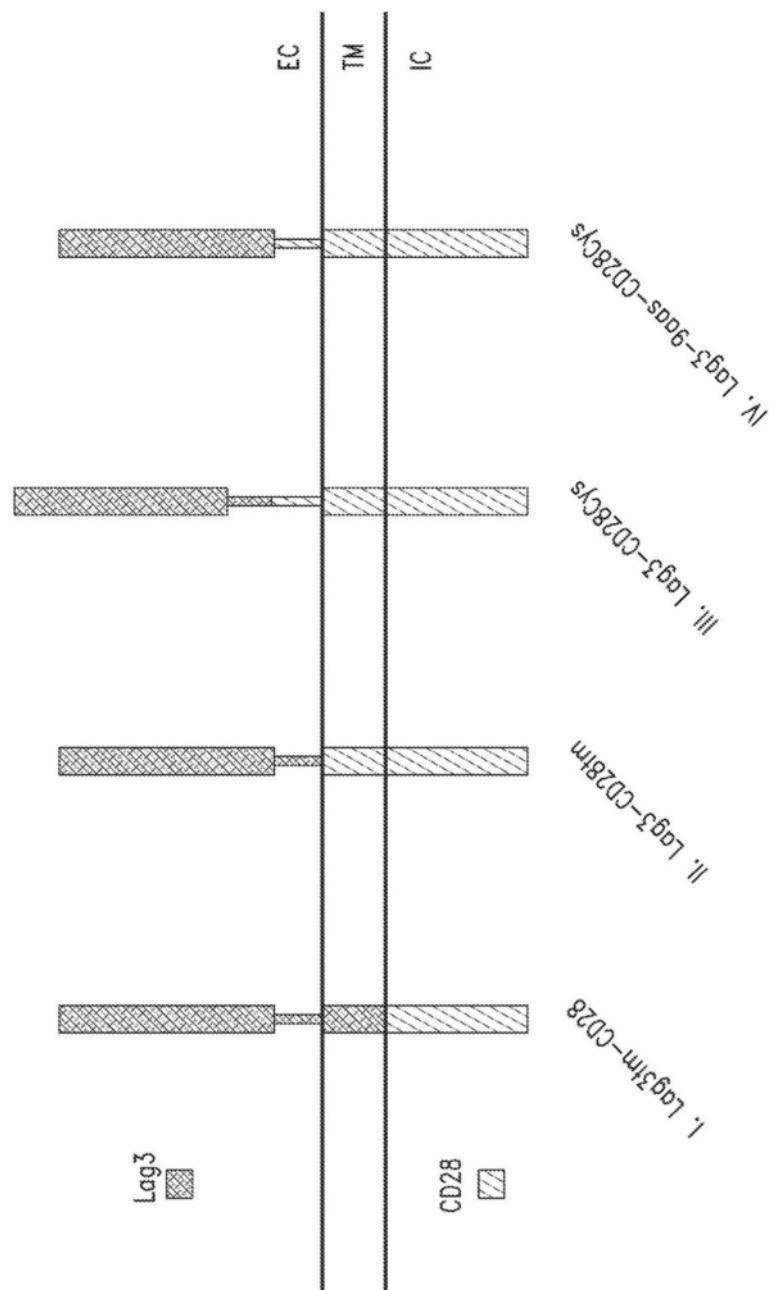


图12A

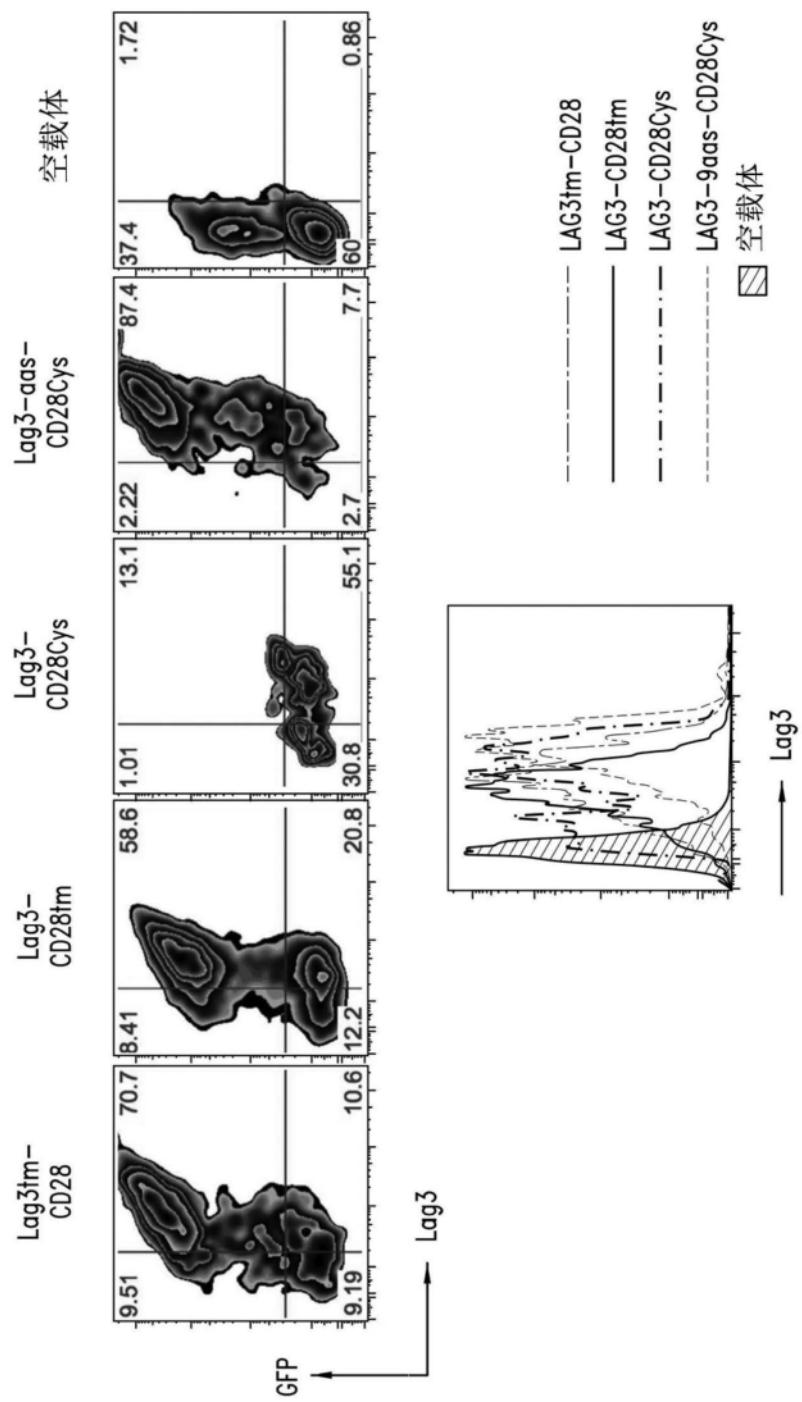


图12B

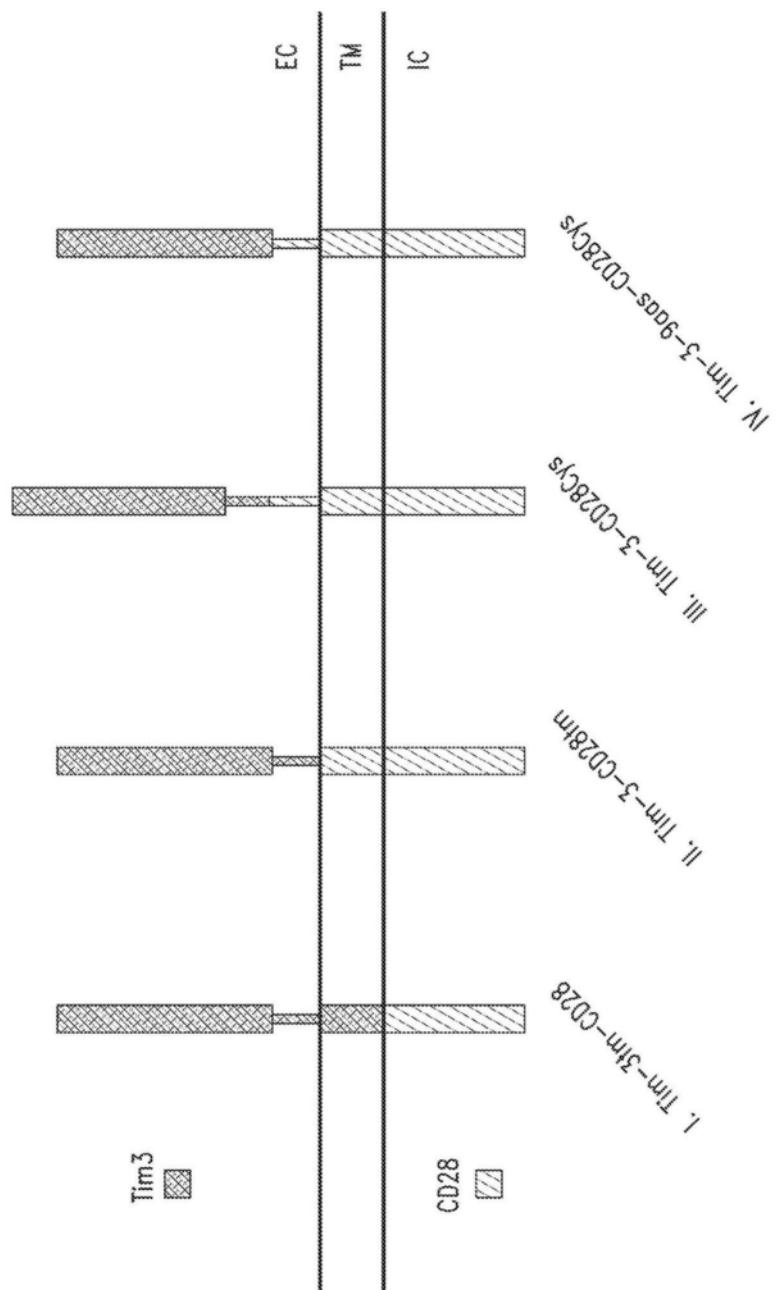


图13A

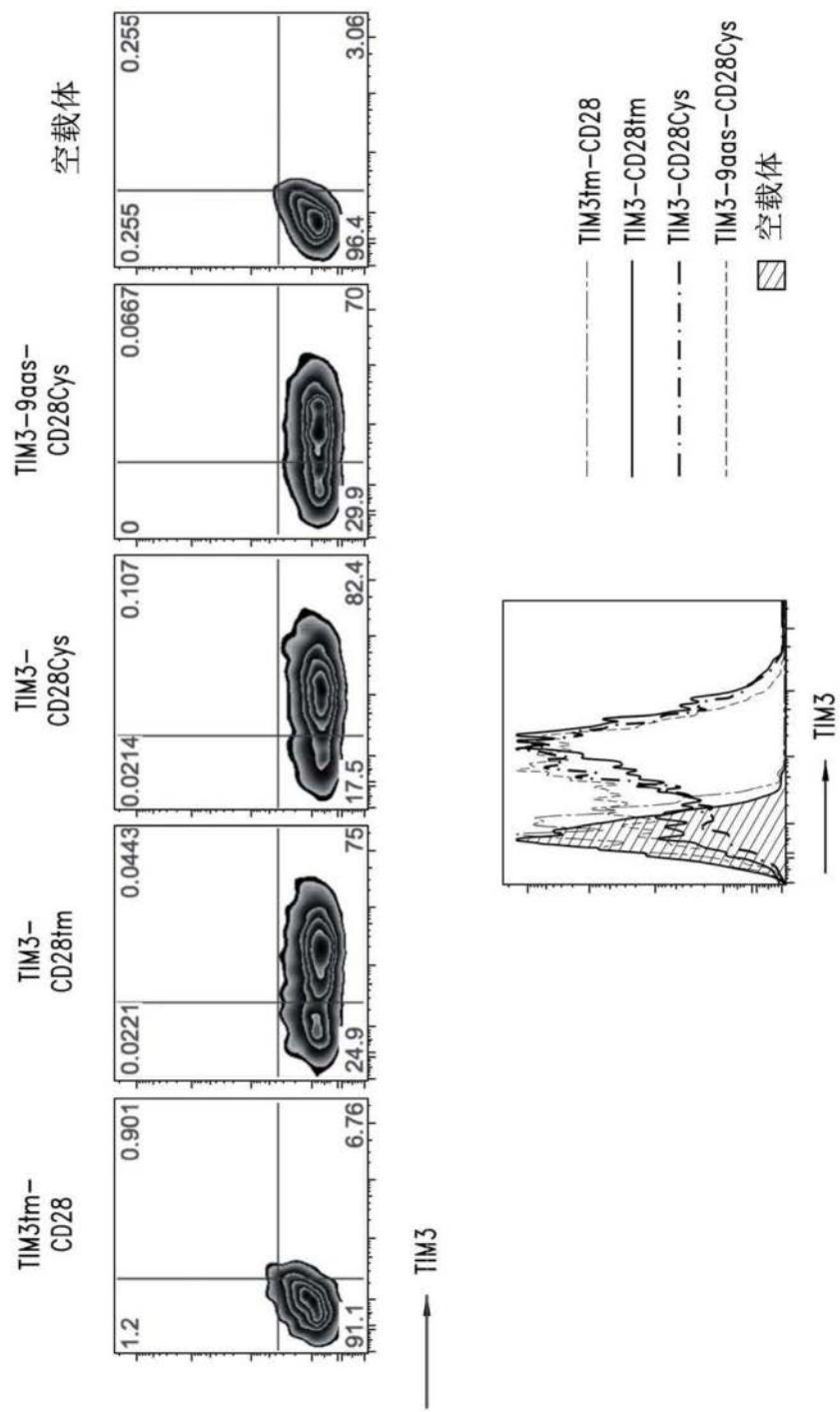


图13B

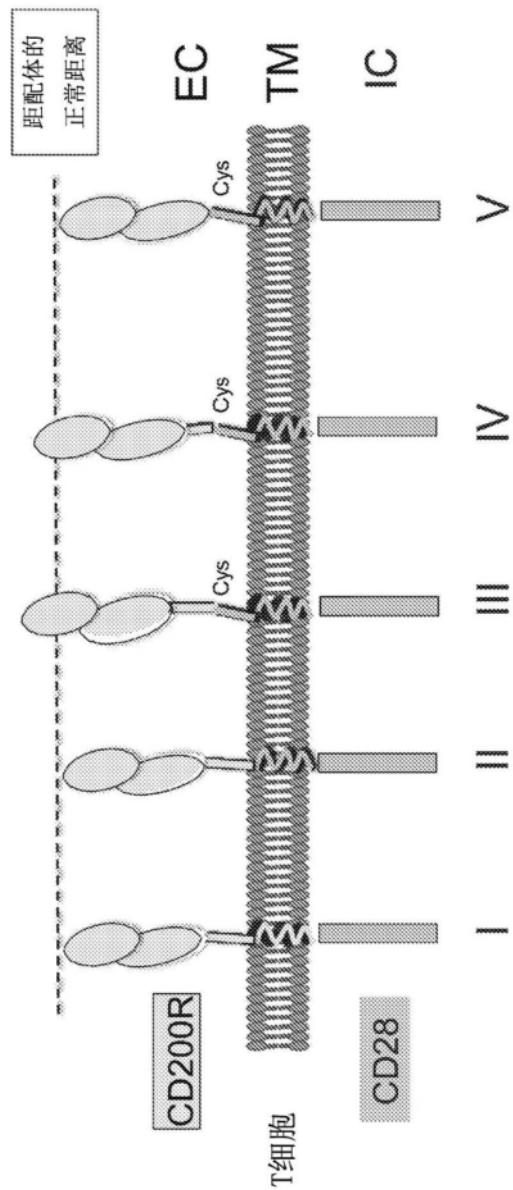


图14A

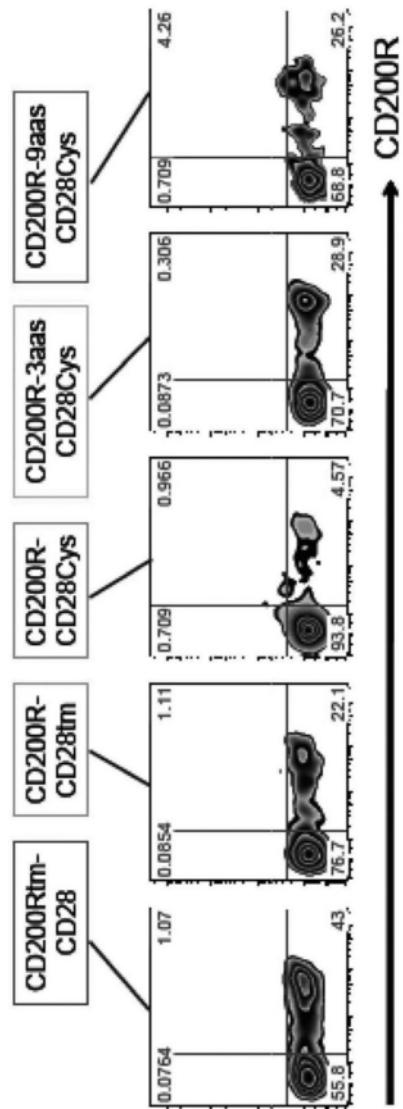


图14B

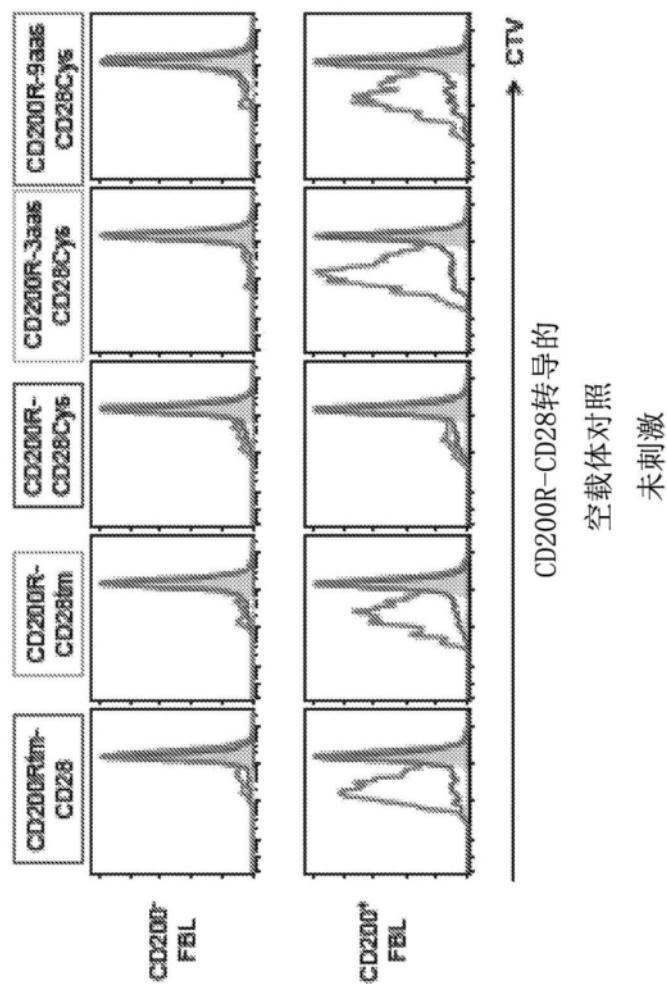


图15A

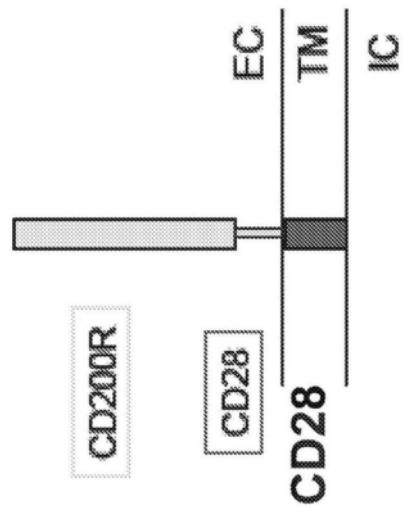


图15B

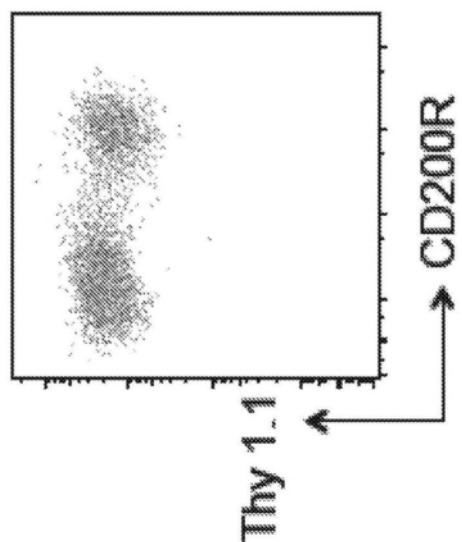


图15C

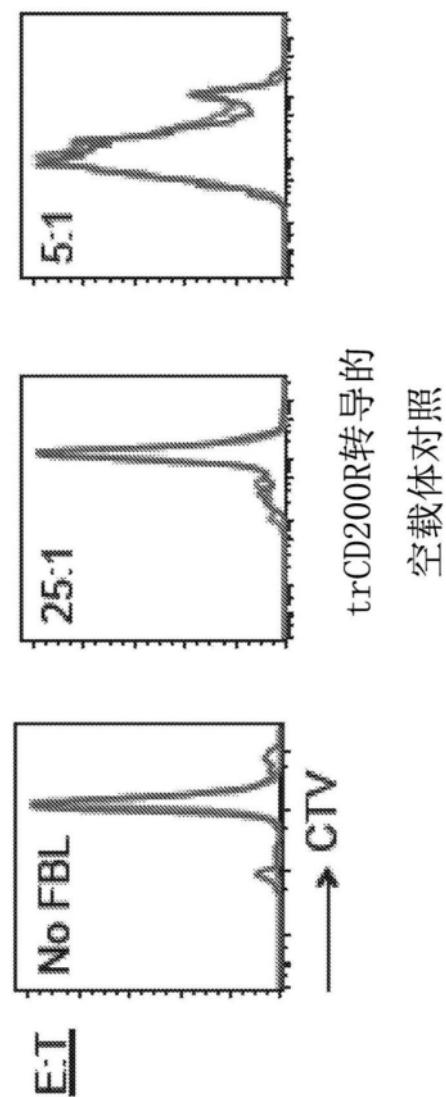


图15D

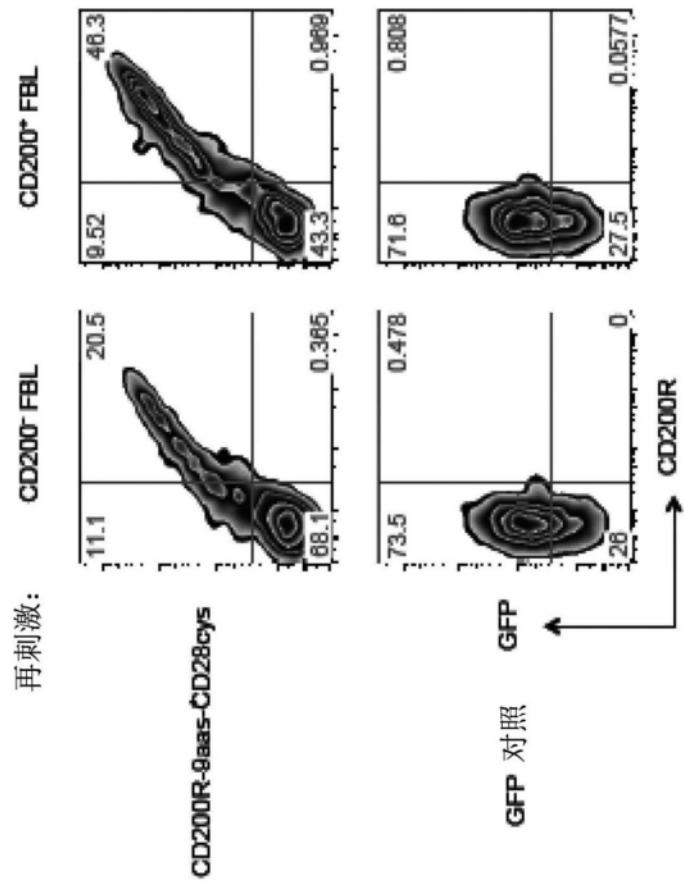


图15E

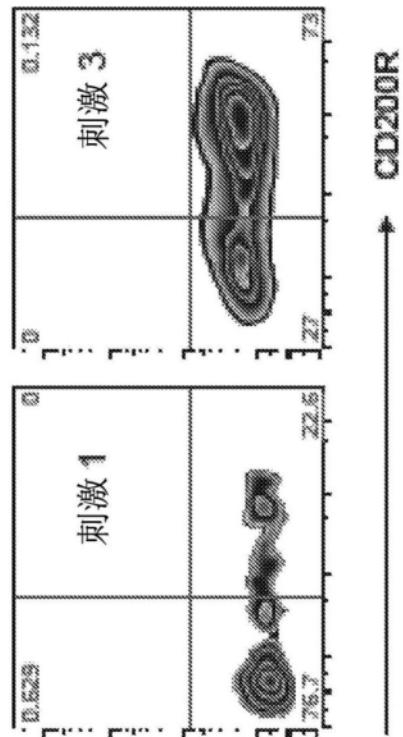


图15F

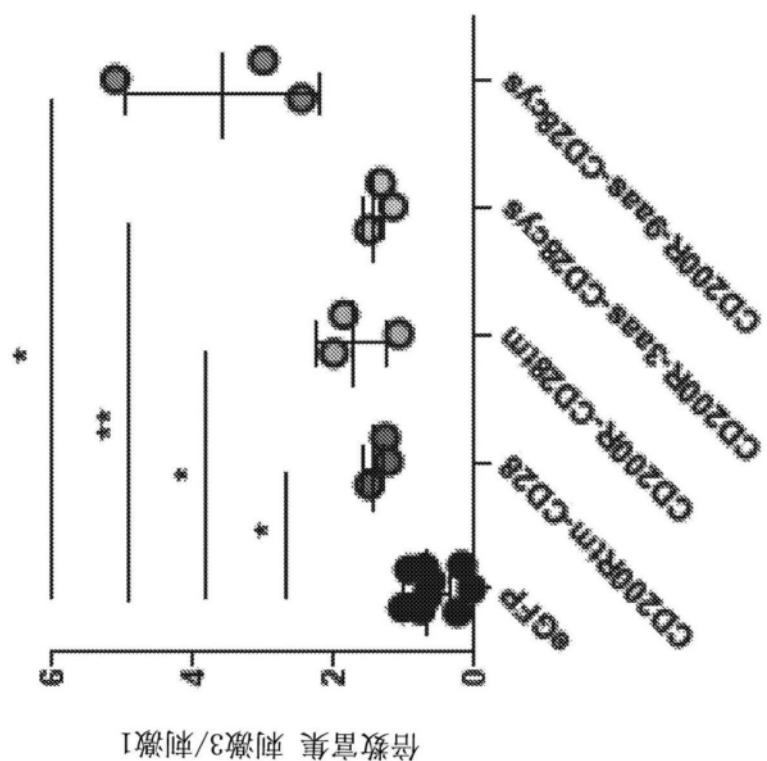


图15G

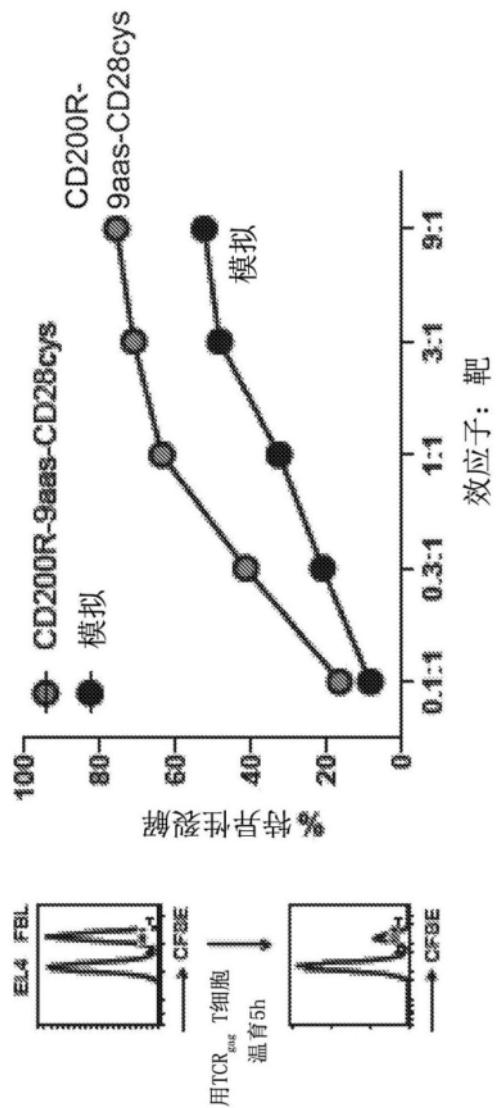


图15H

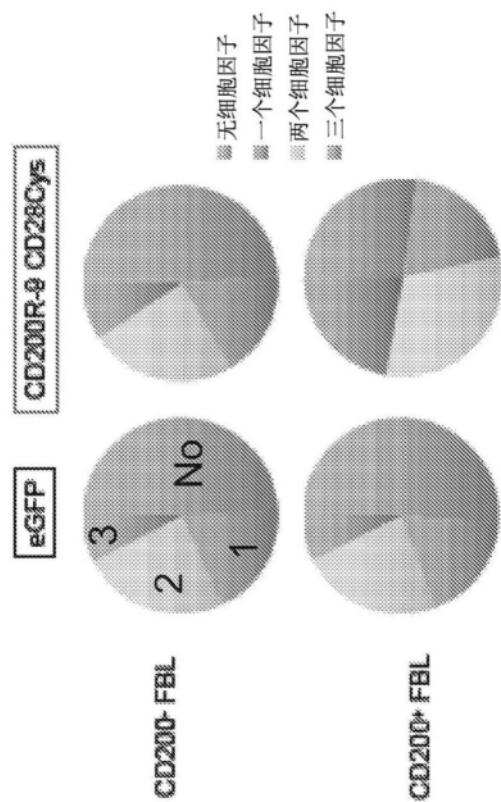


图15I

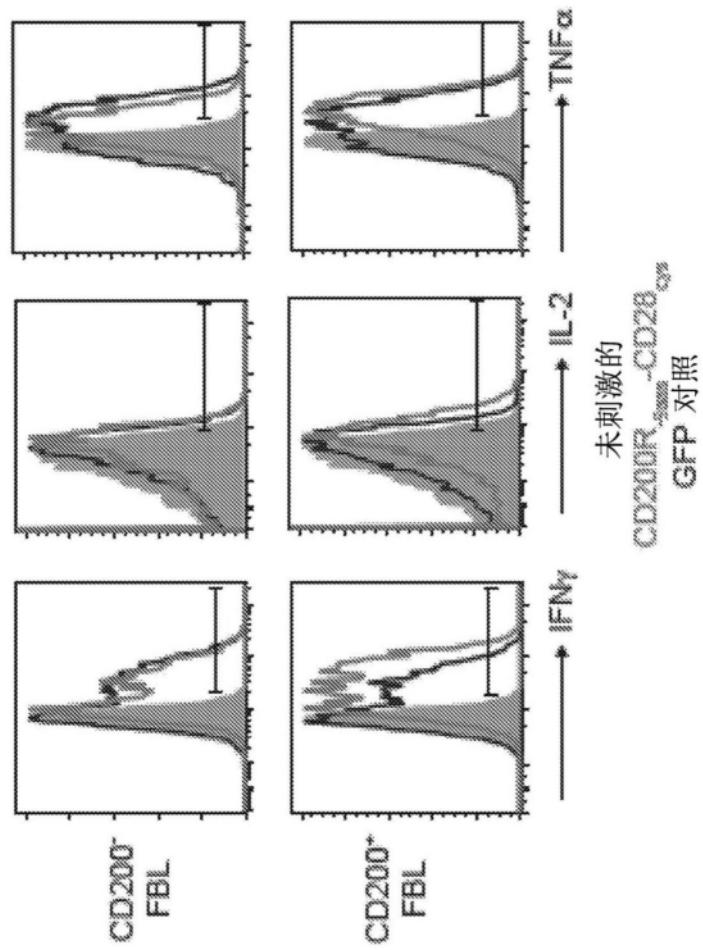


图15J

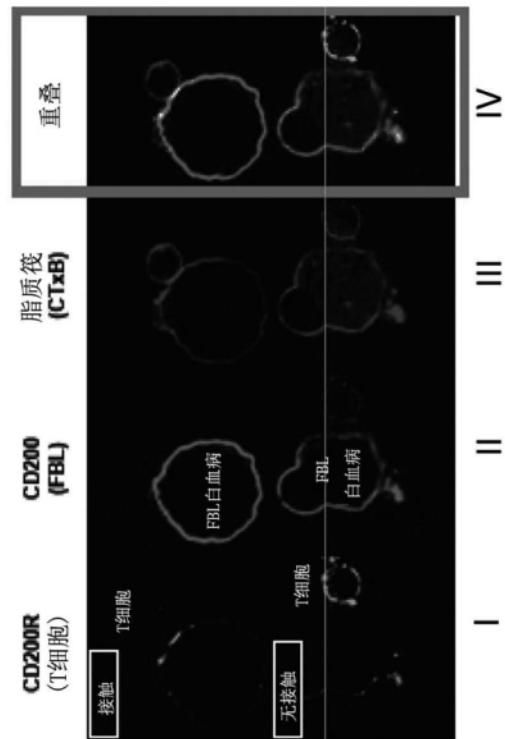


图15K

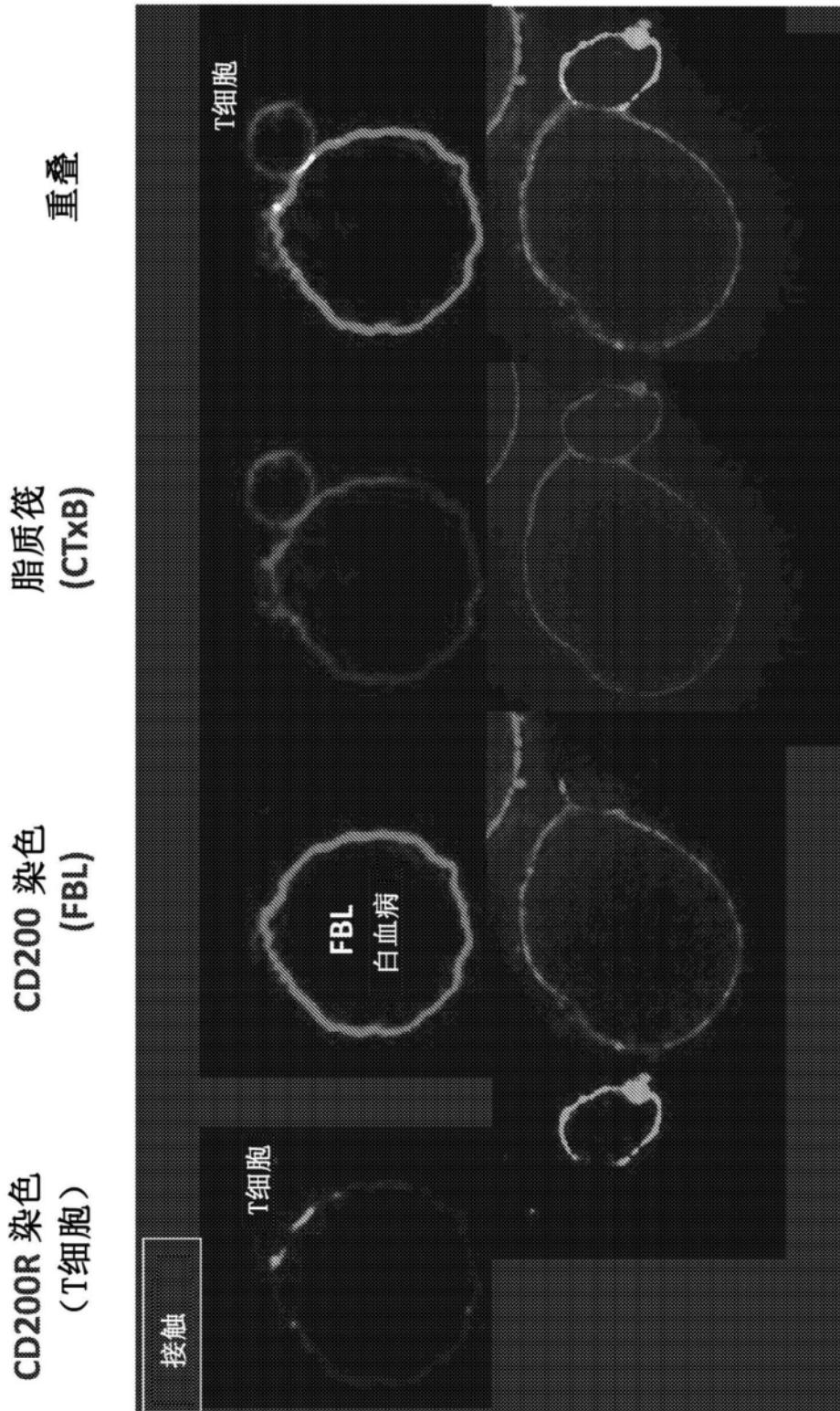


图15L

CD200R 染色
(T细胞)
CD200 染色
(FBL)
脂质筏
(CTxB)
重叠

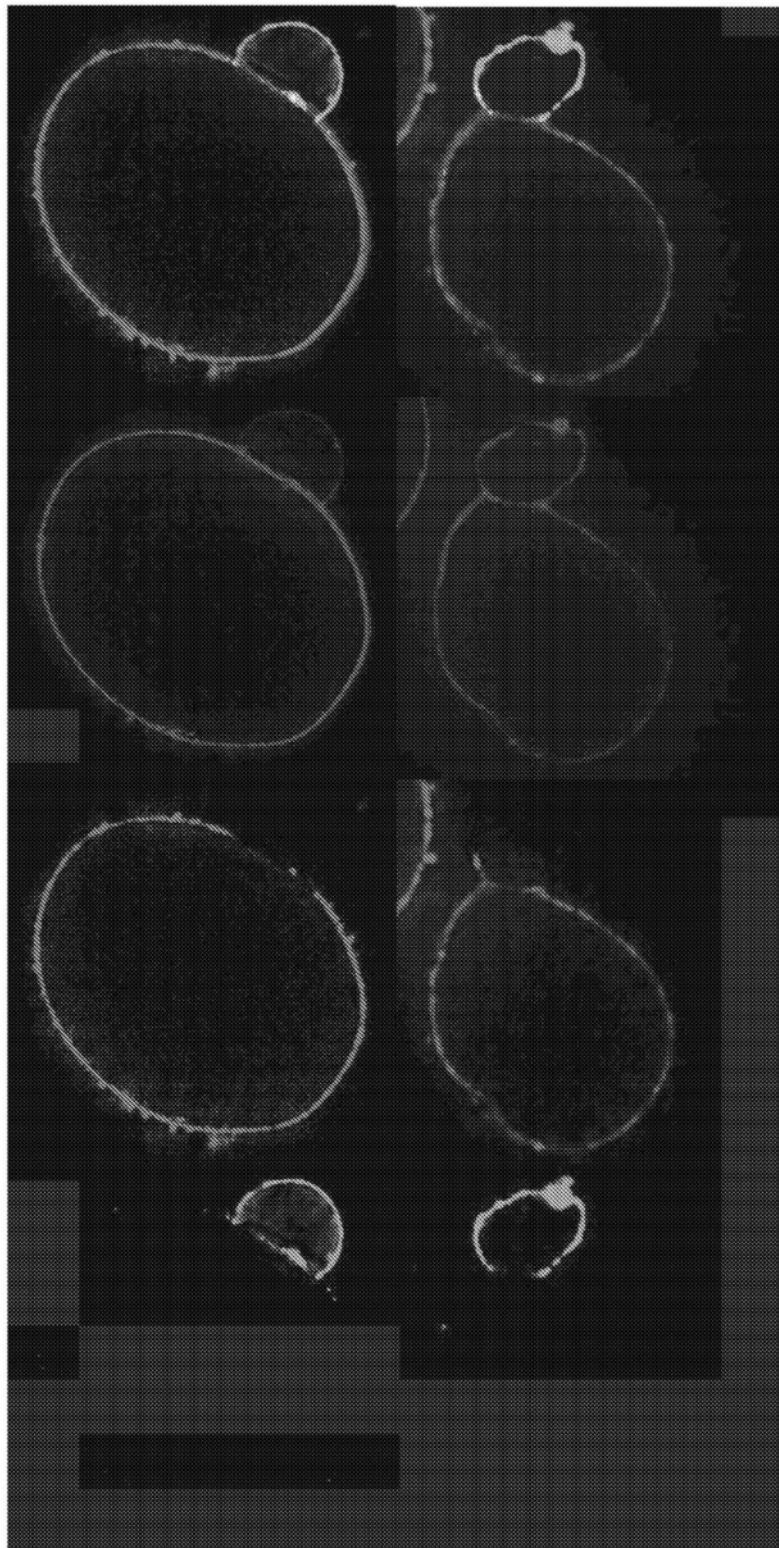


图15M

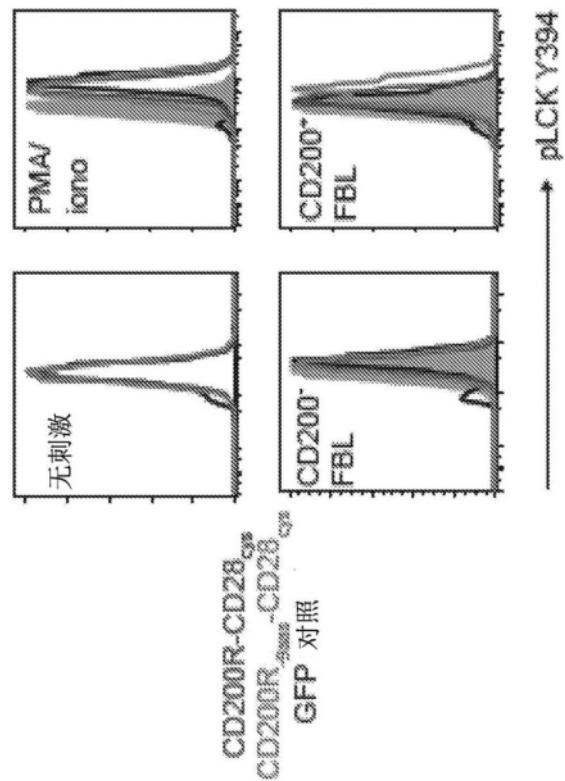


图15N

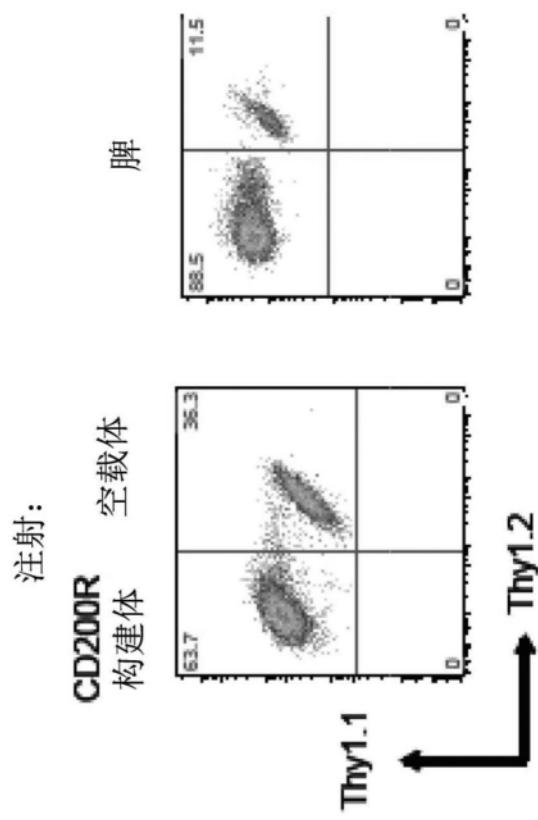


图16A

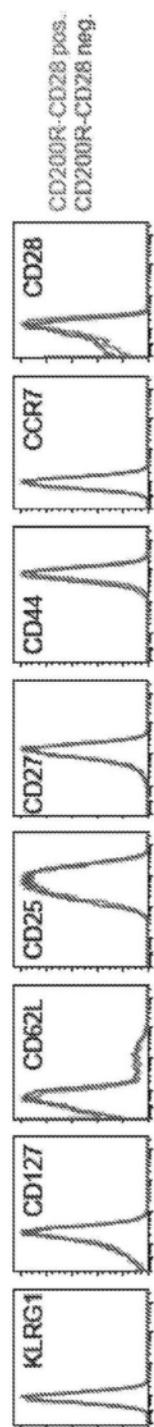


图16B

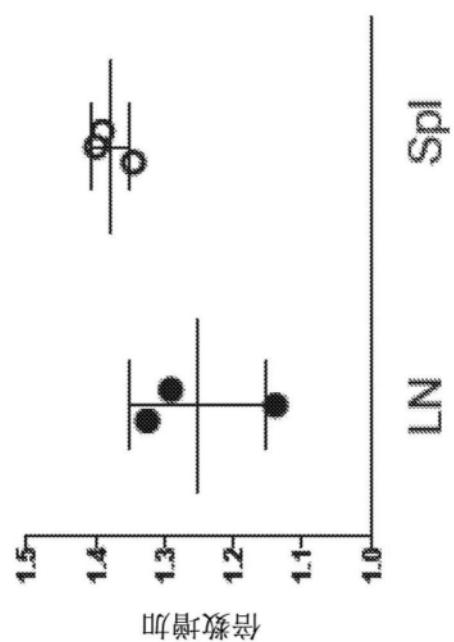


图16C

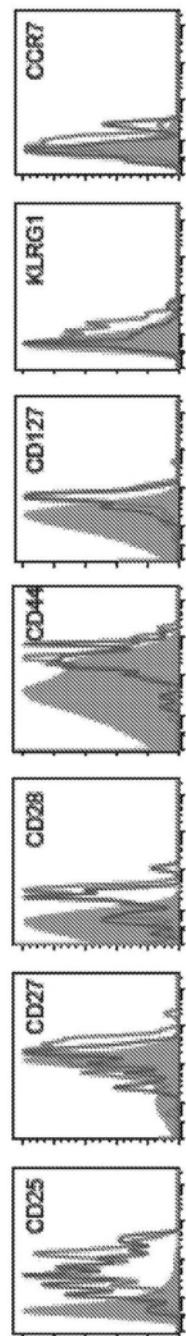
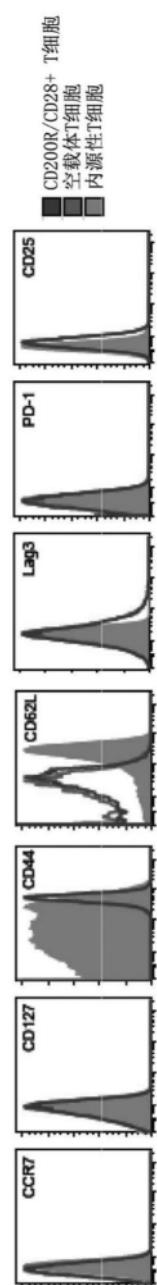


图16D



图|16E

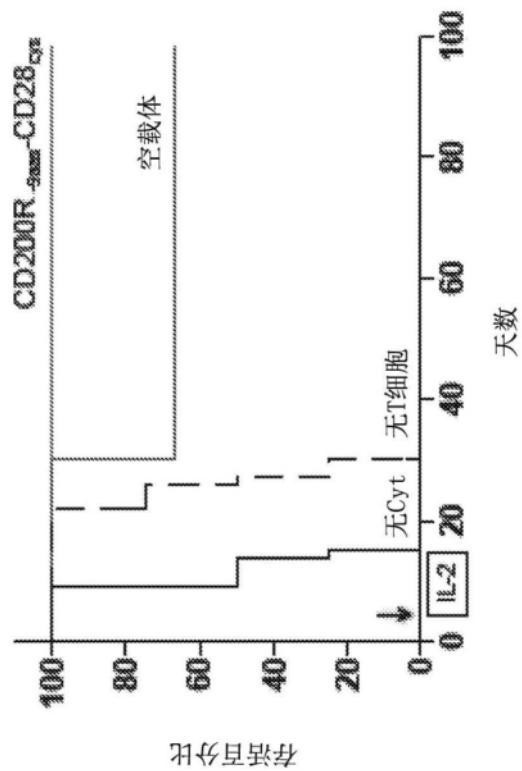


图17A

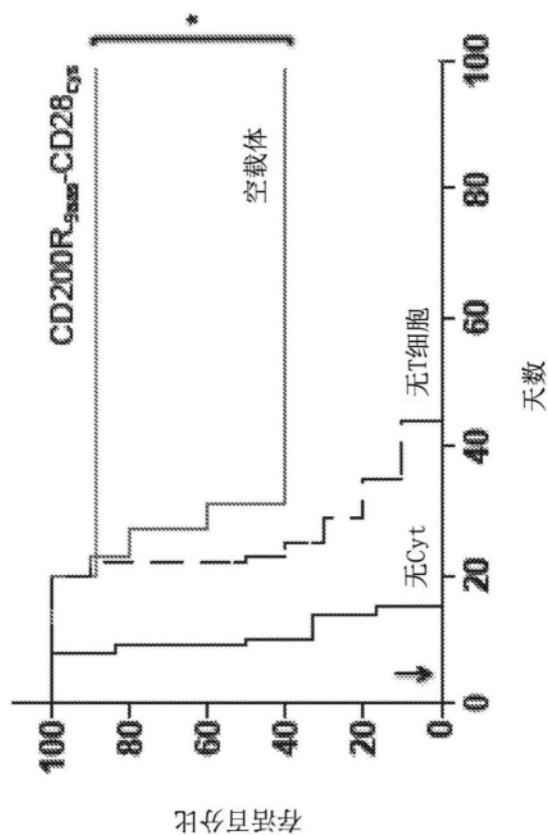


图17B

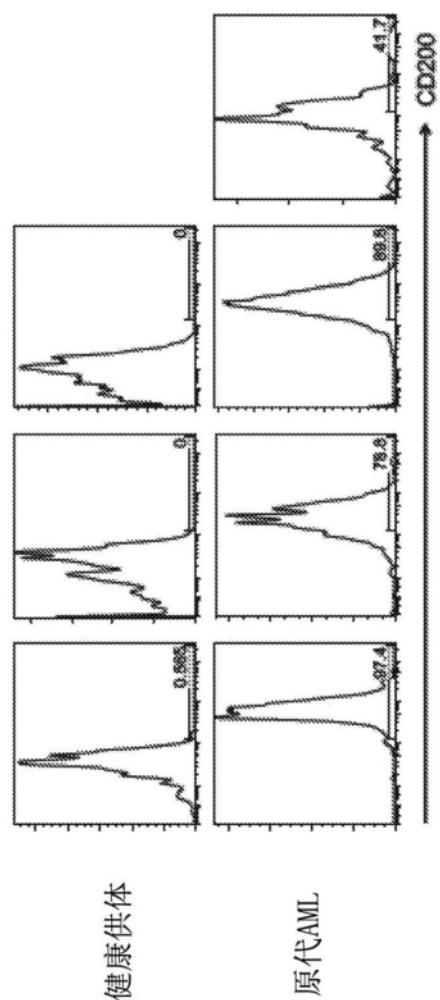


图18A

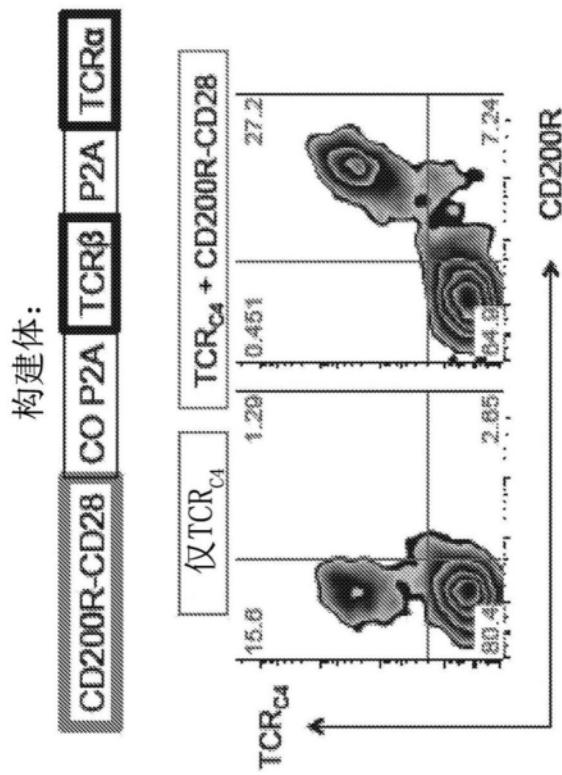


图18B

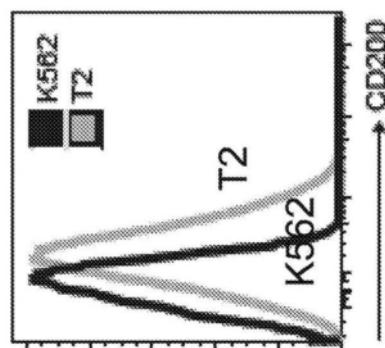


图18C

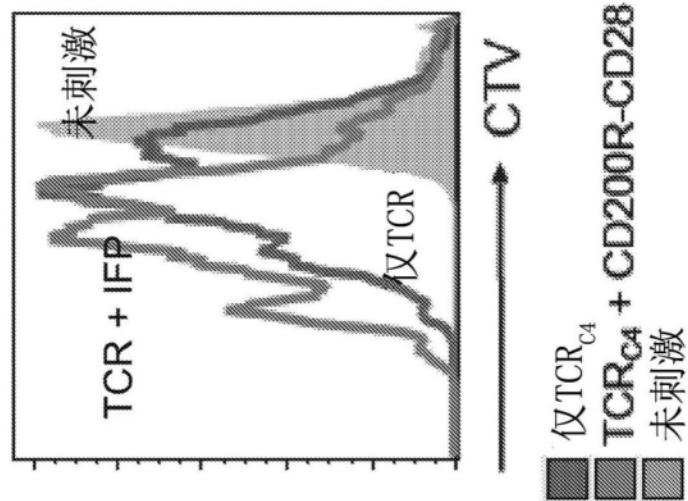


图18D

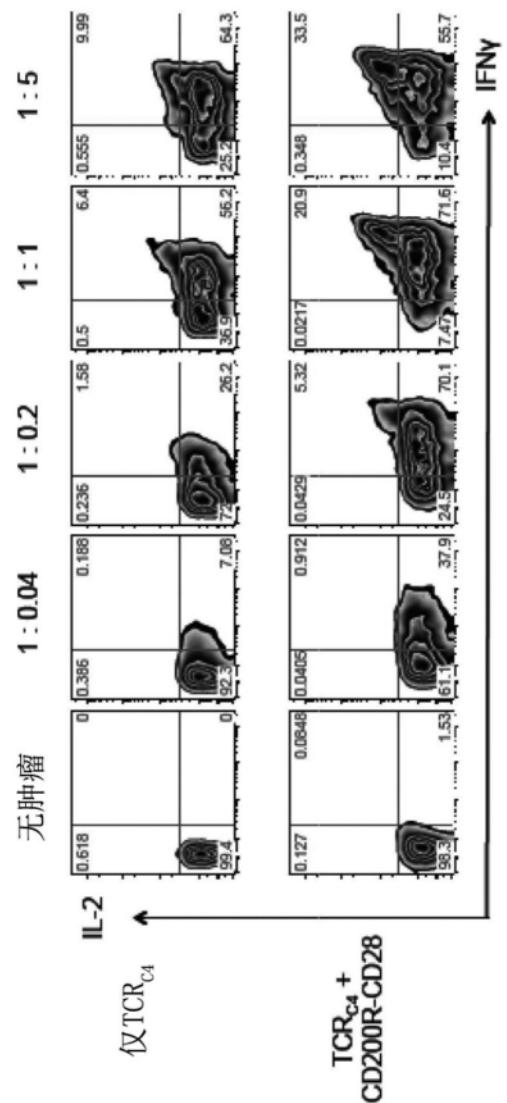


图18E

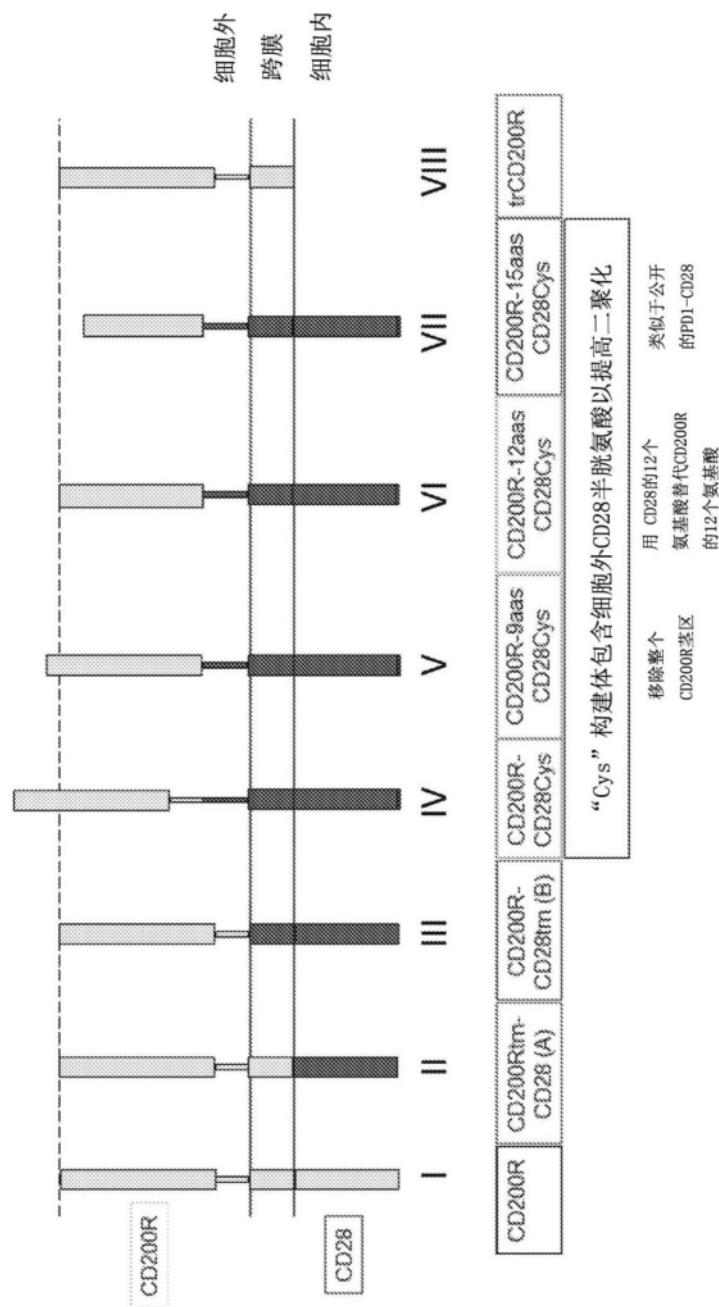


图19A



图19B

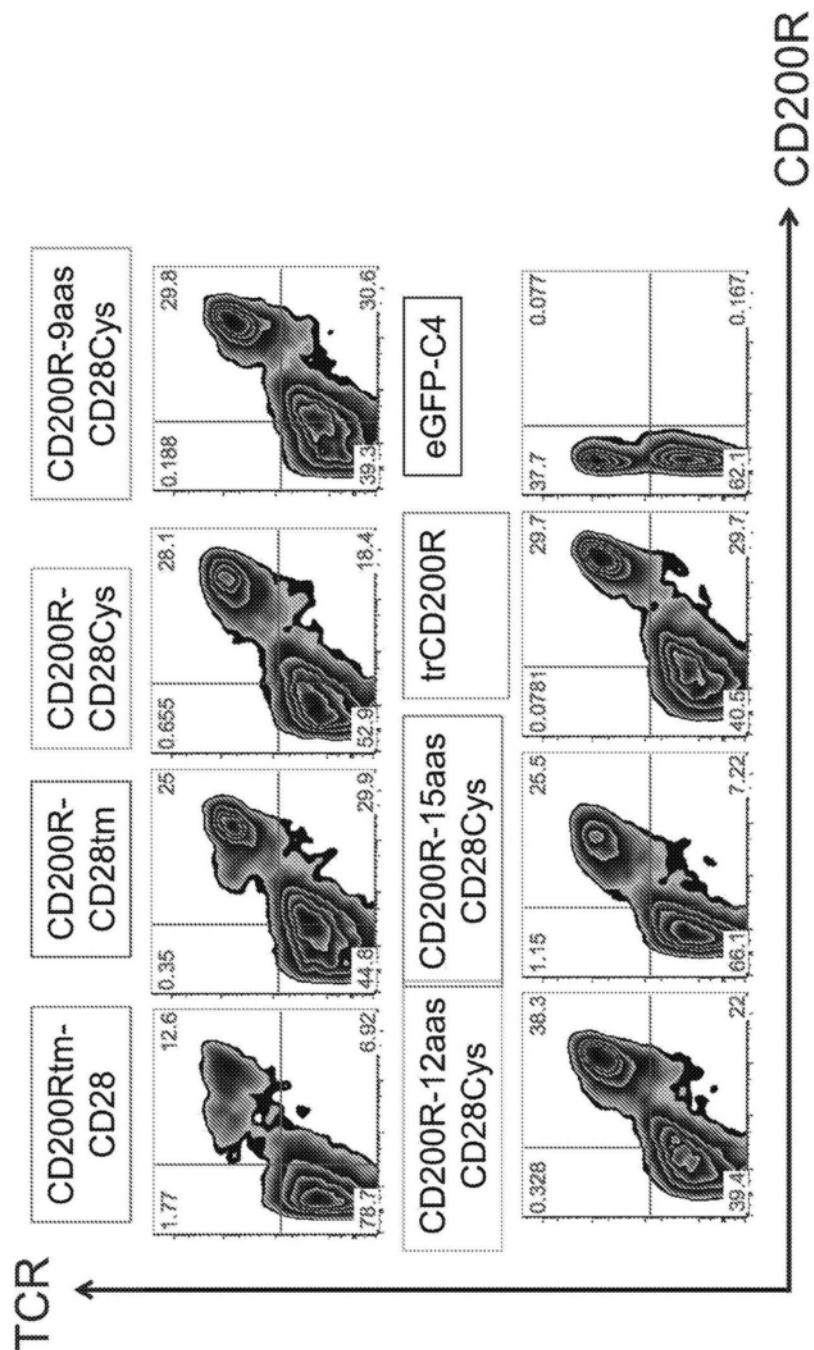


图19C

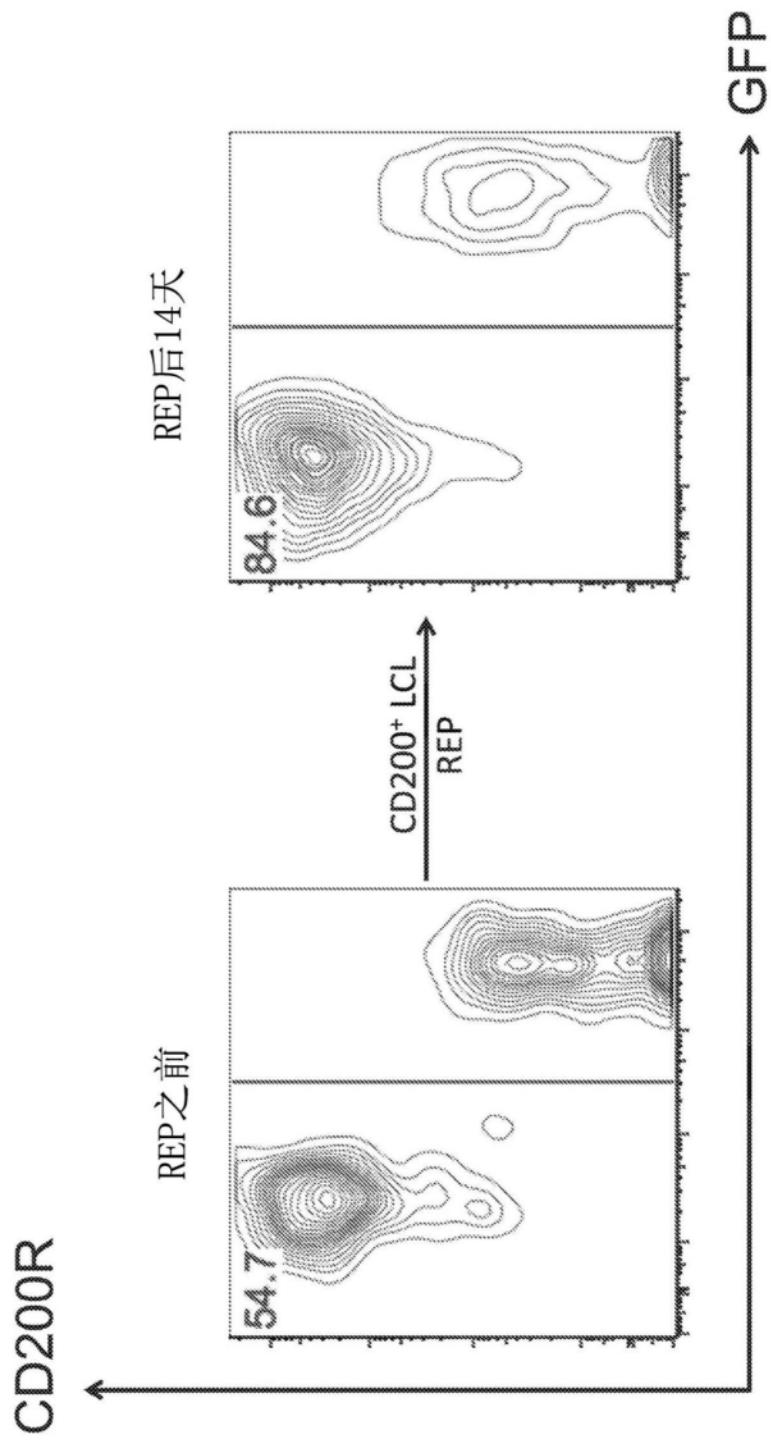


图20A

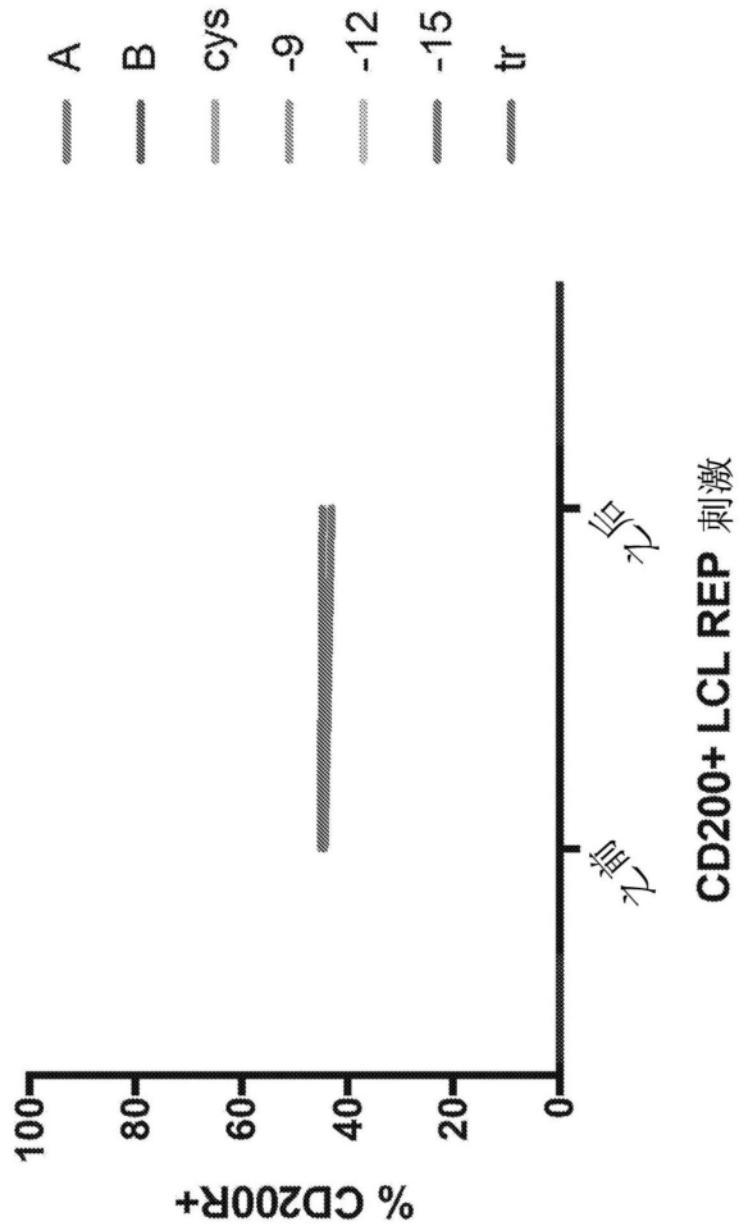


图20B

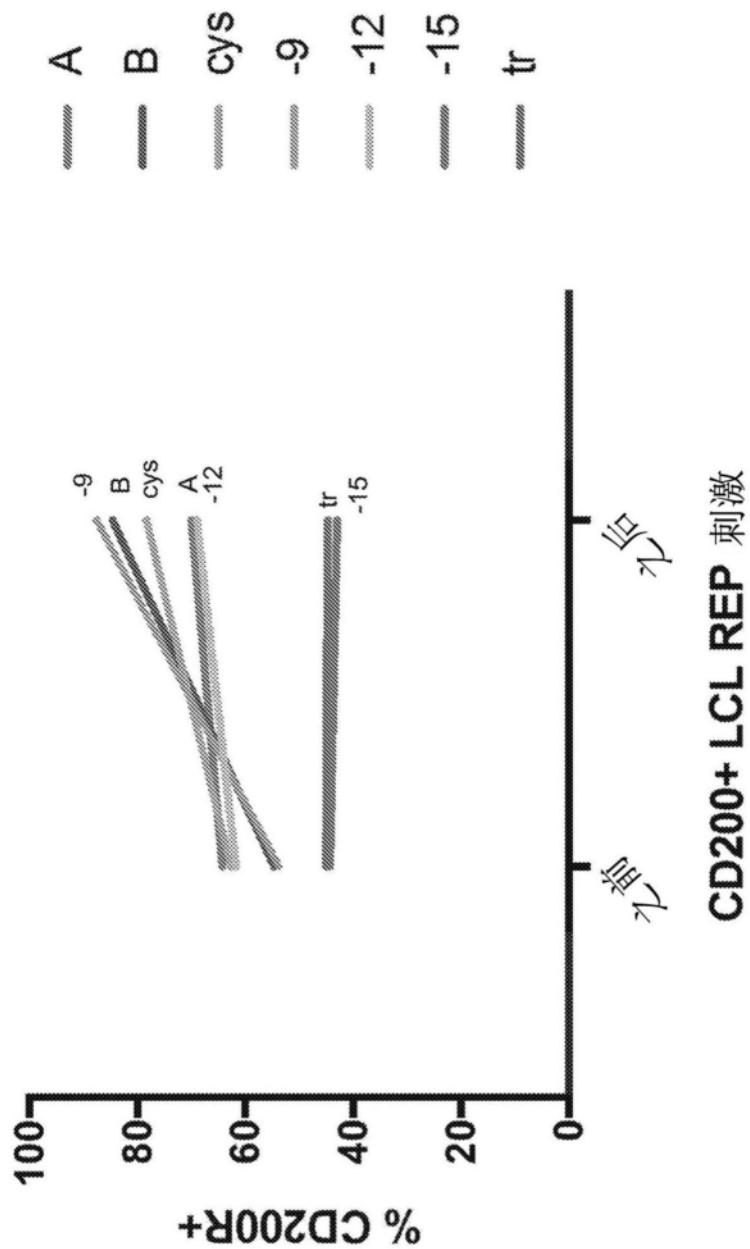


图20C

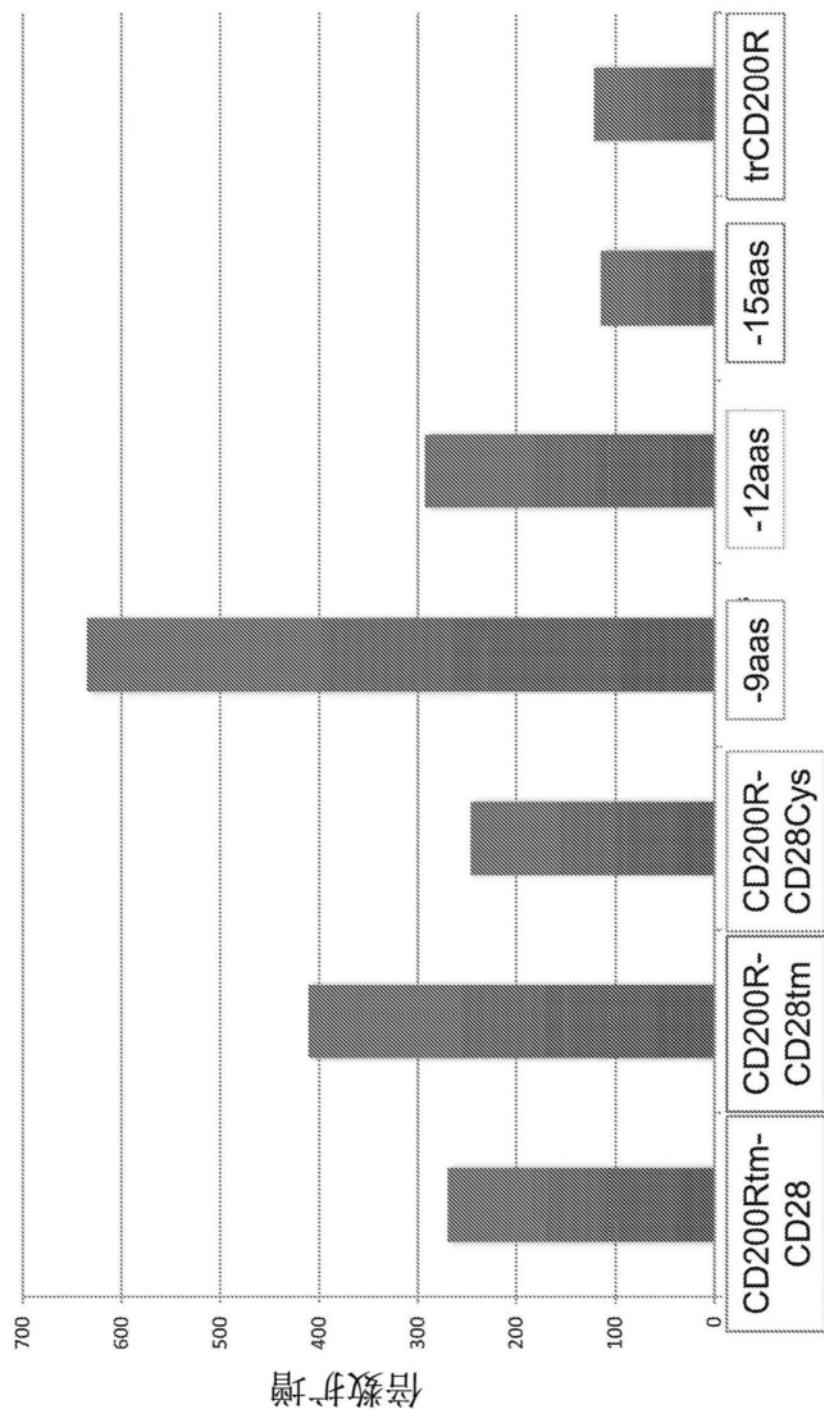


图20D

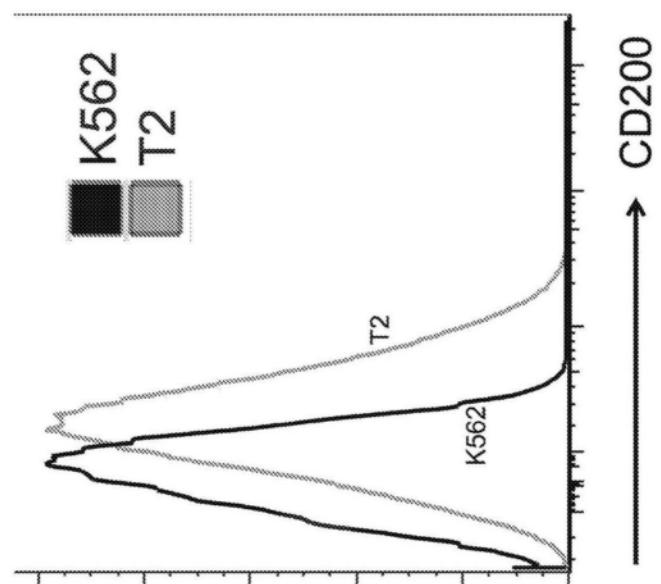


图21A

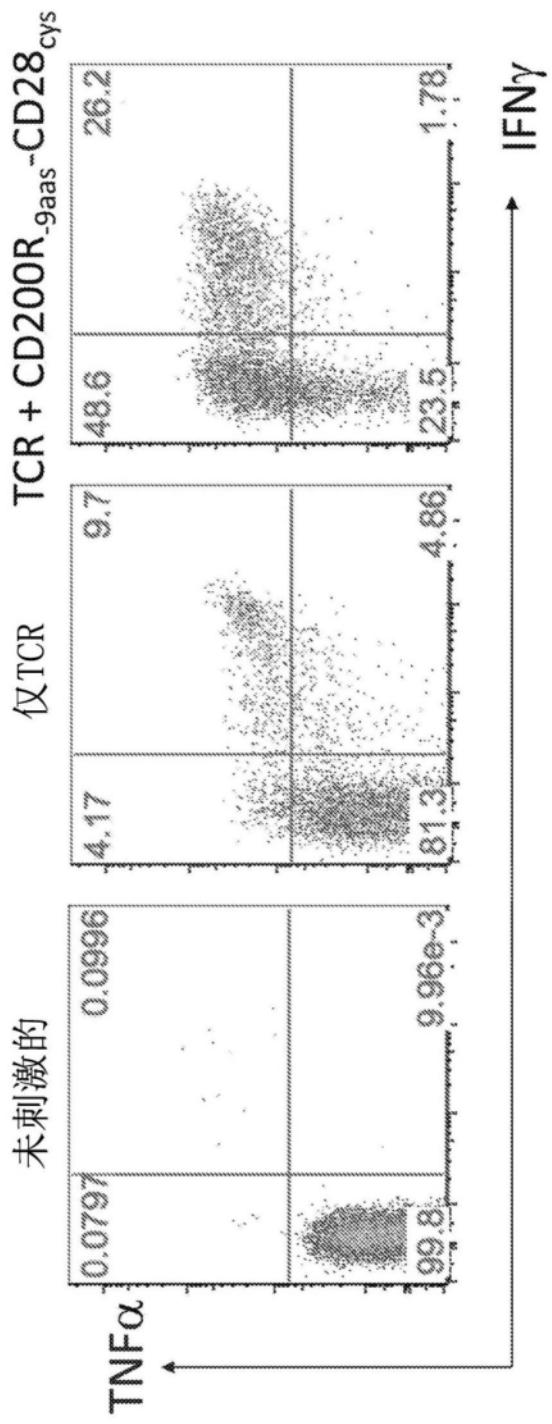


图21B

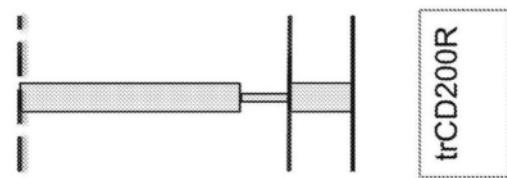


图21C

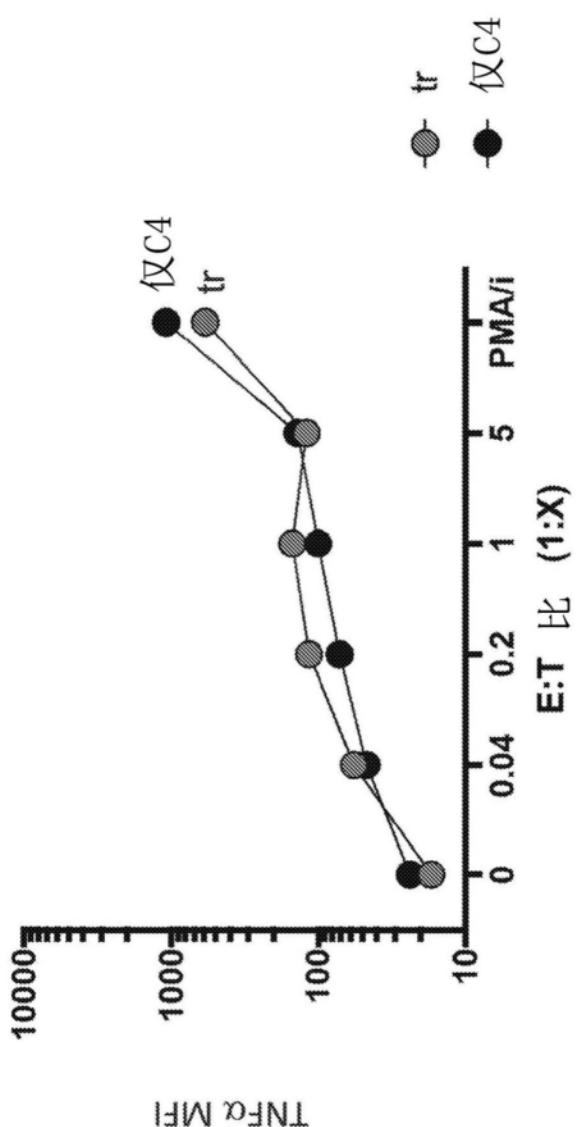


图21D

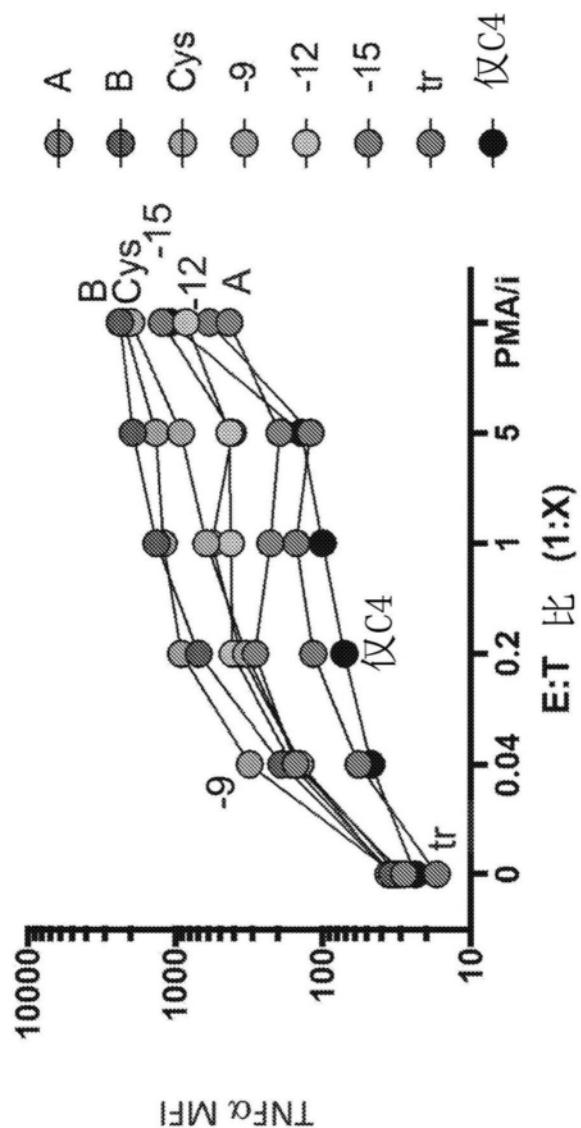


图21E

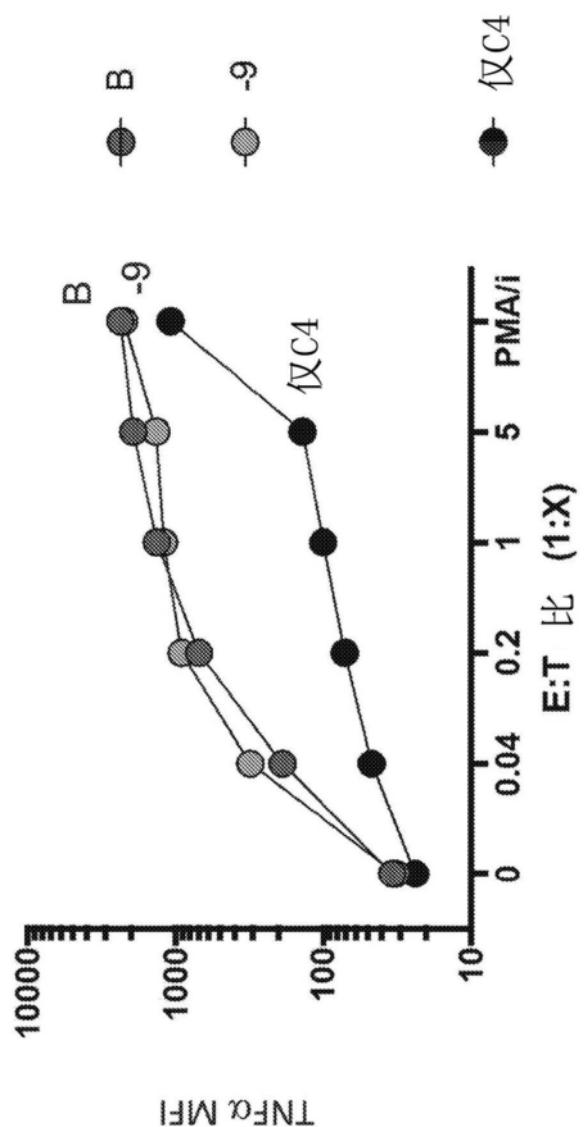


图21F

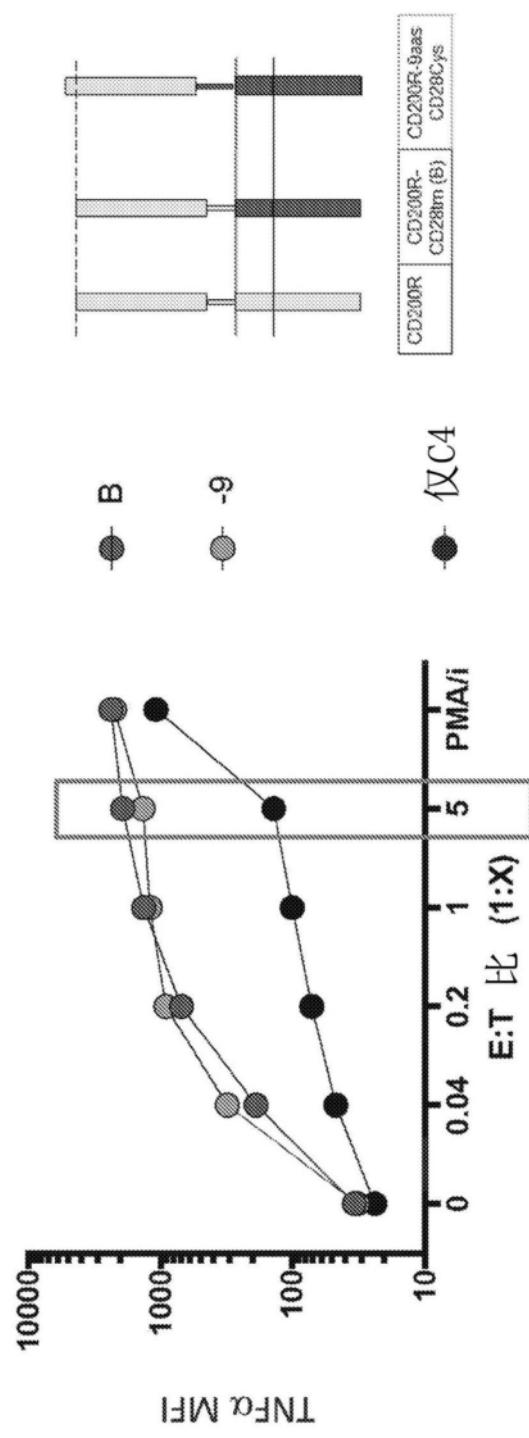


图21G

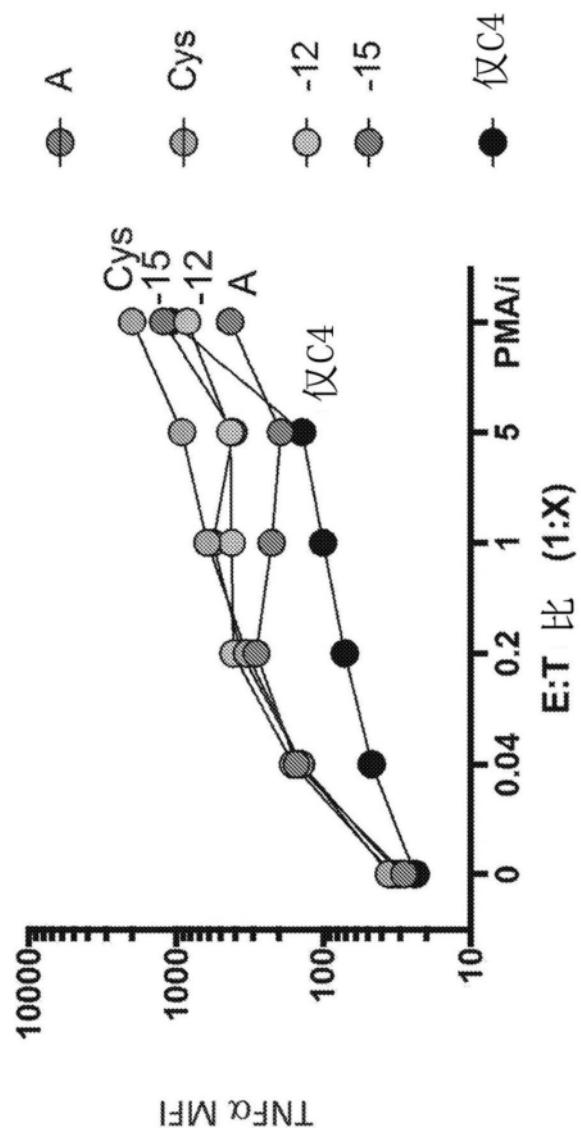


图21H

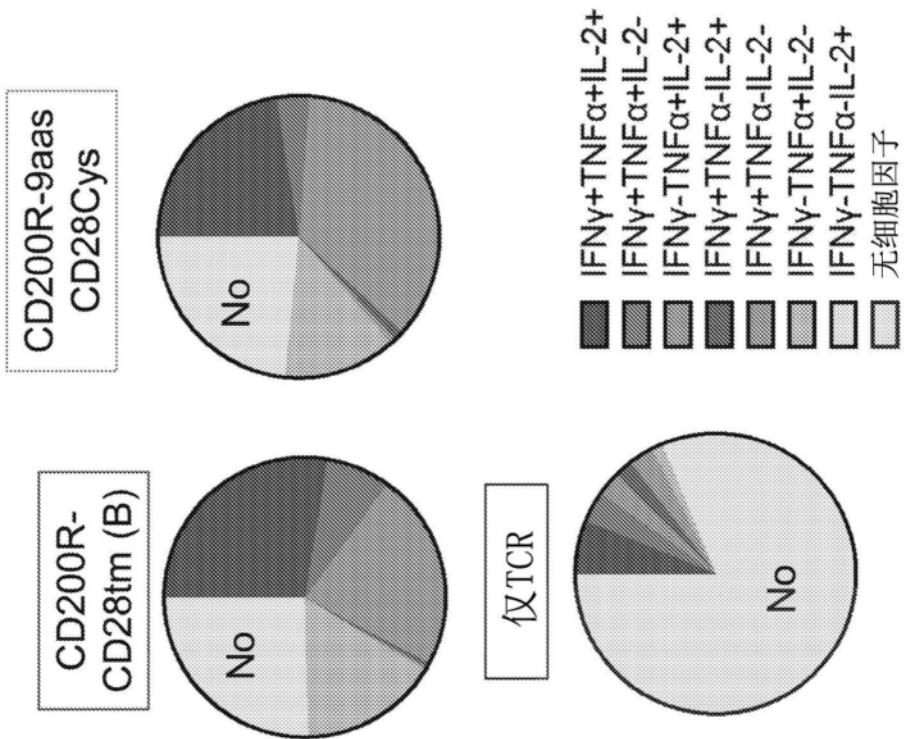


图21I

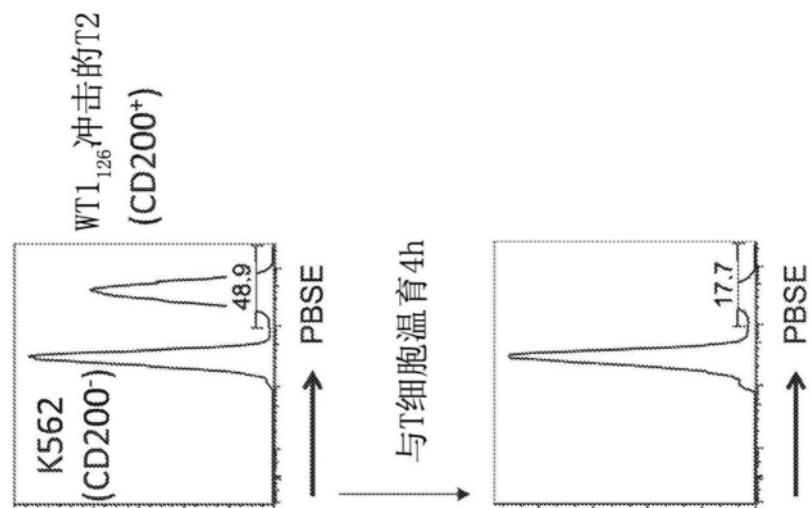


图21J

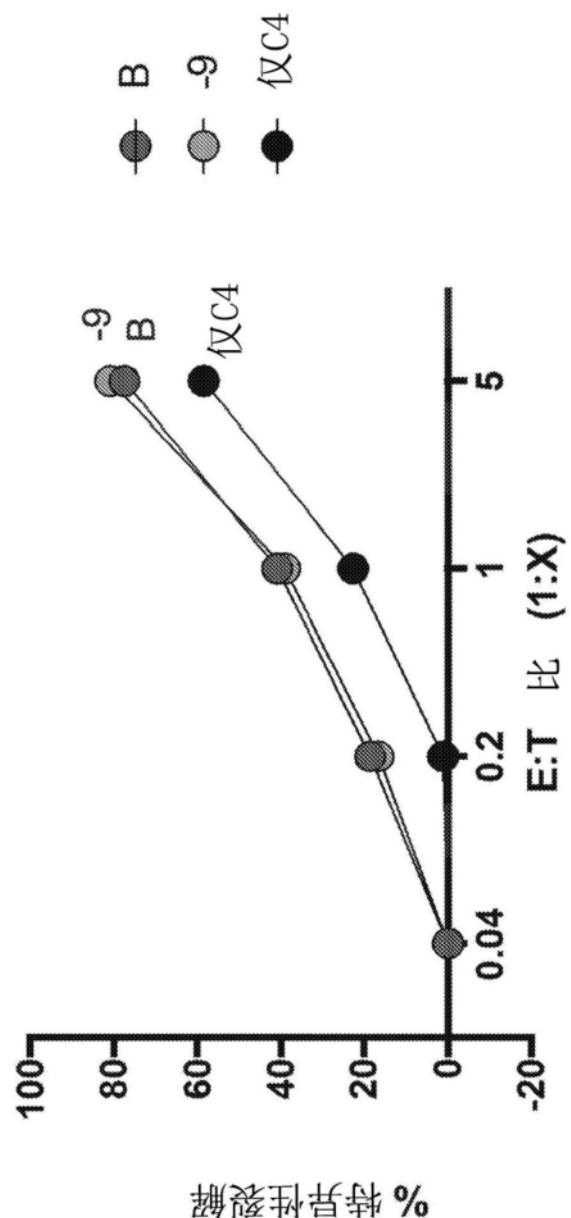
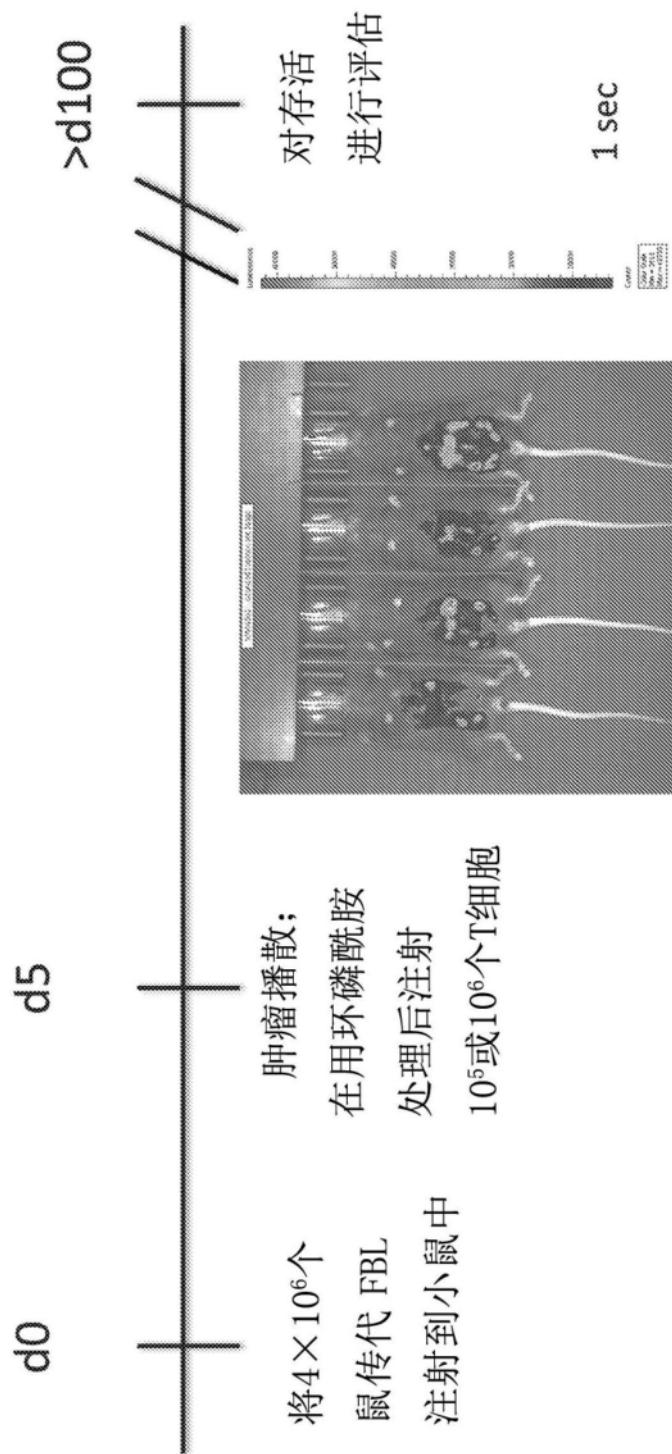


图21K



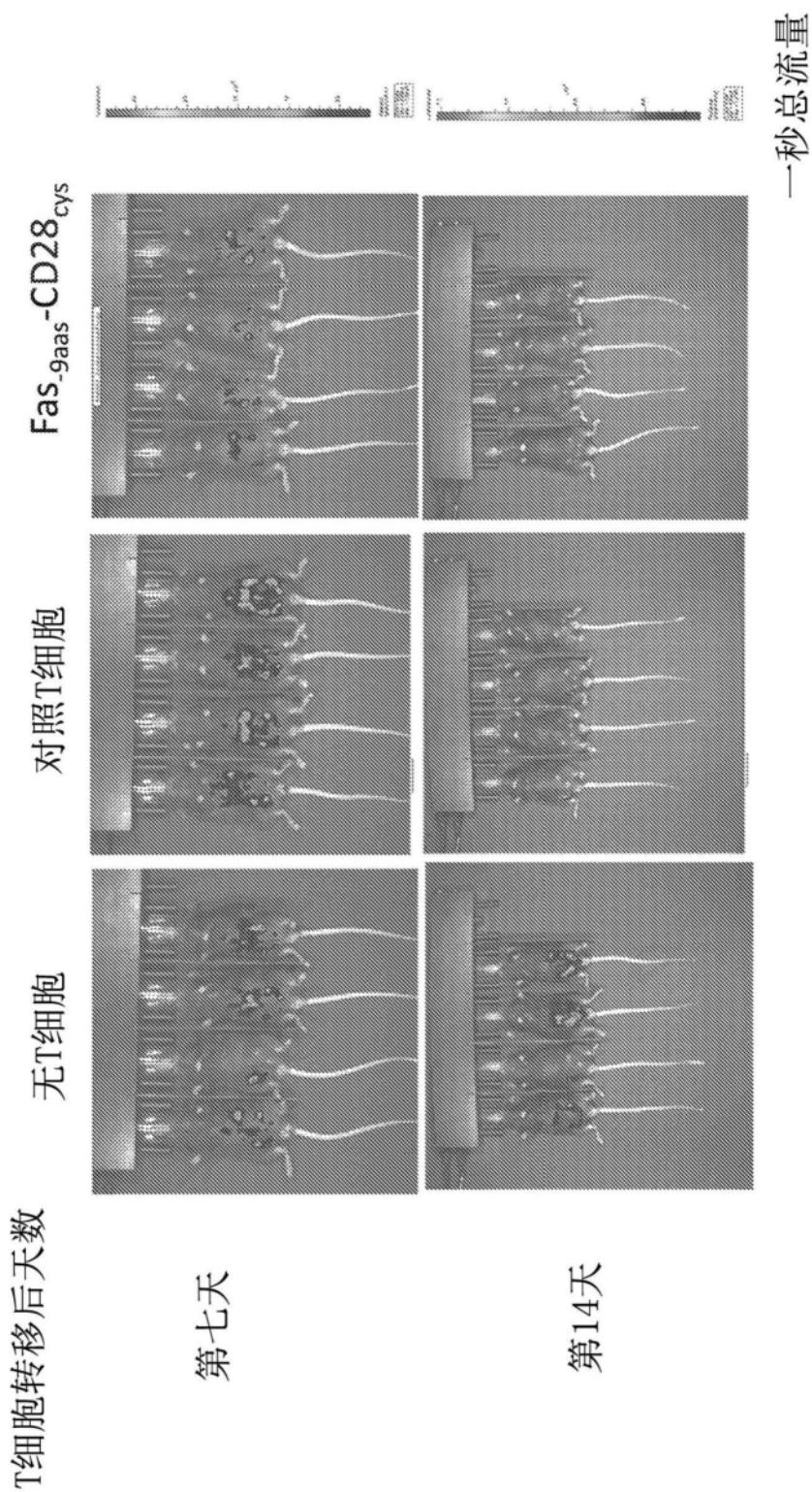


图22B

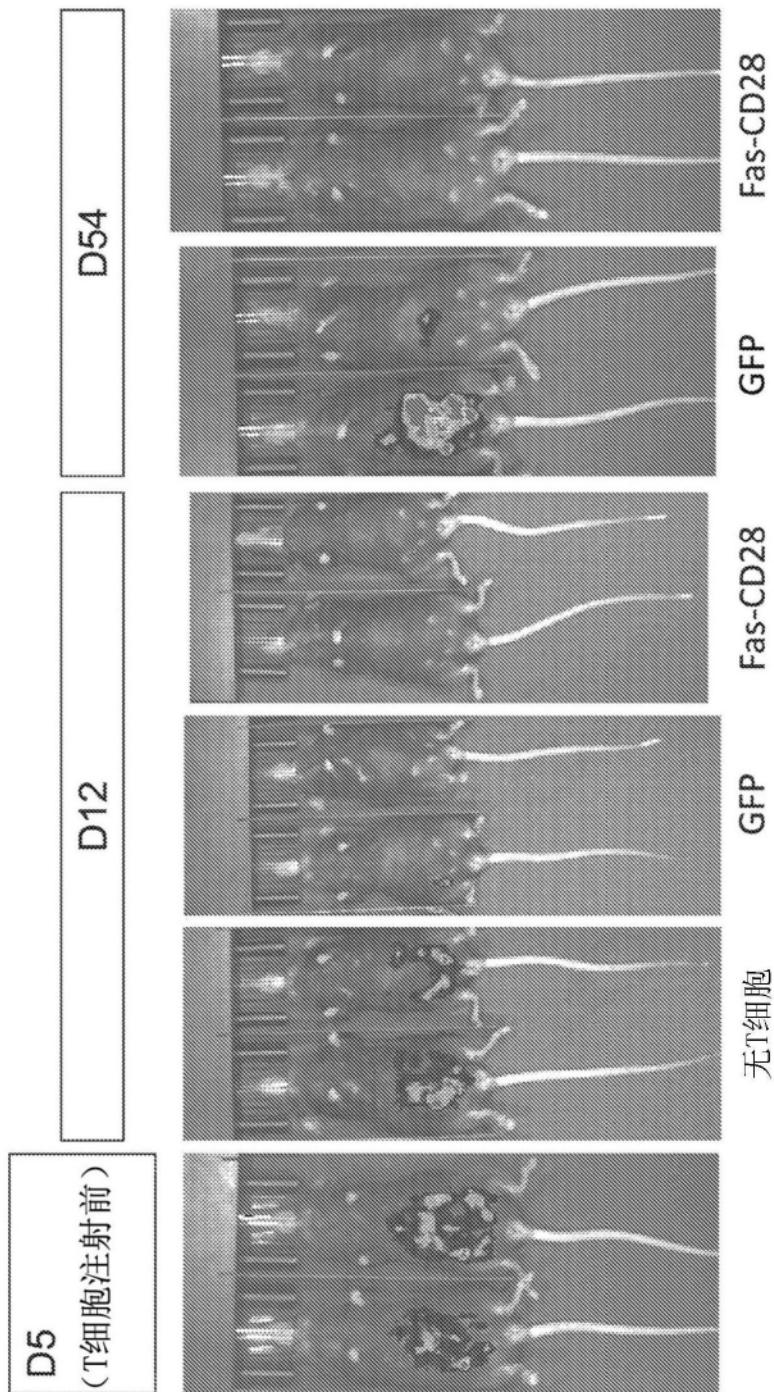


图22C

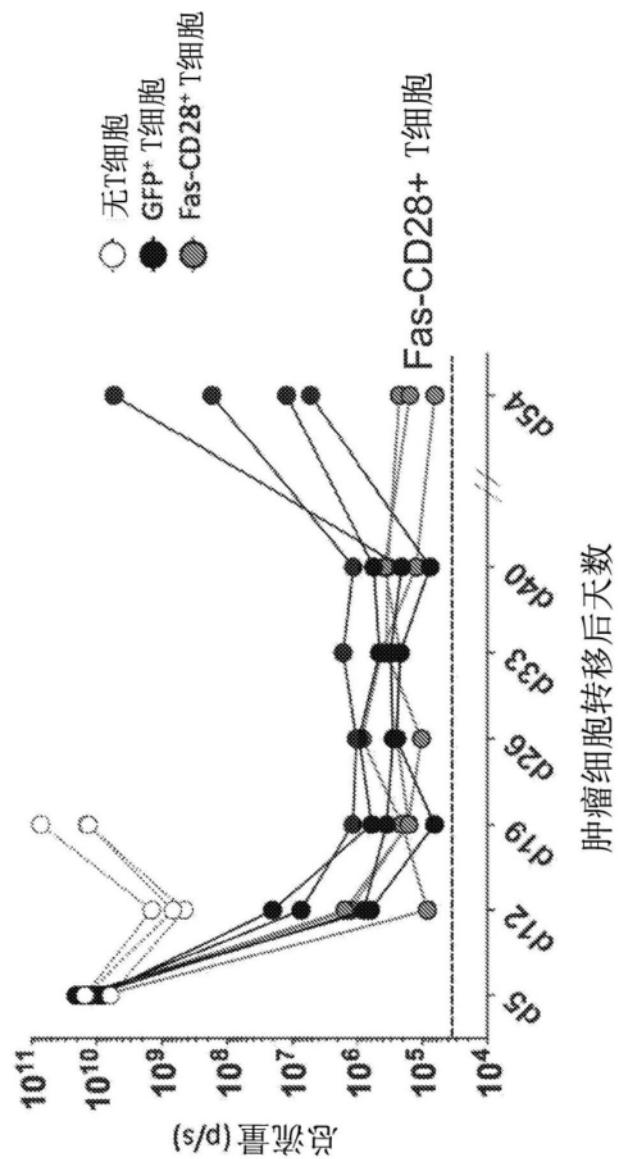


图22D

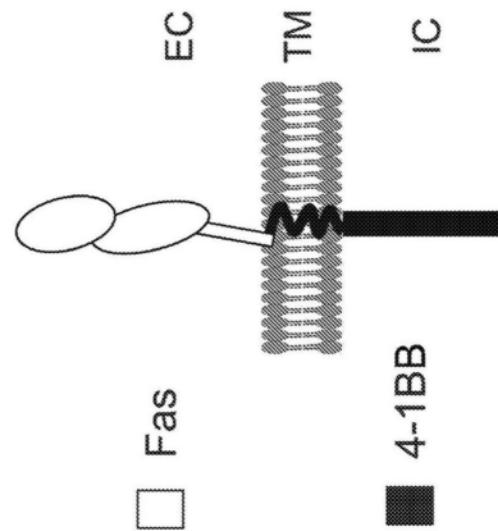


图23A

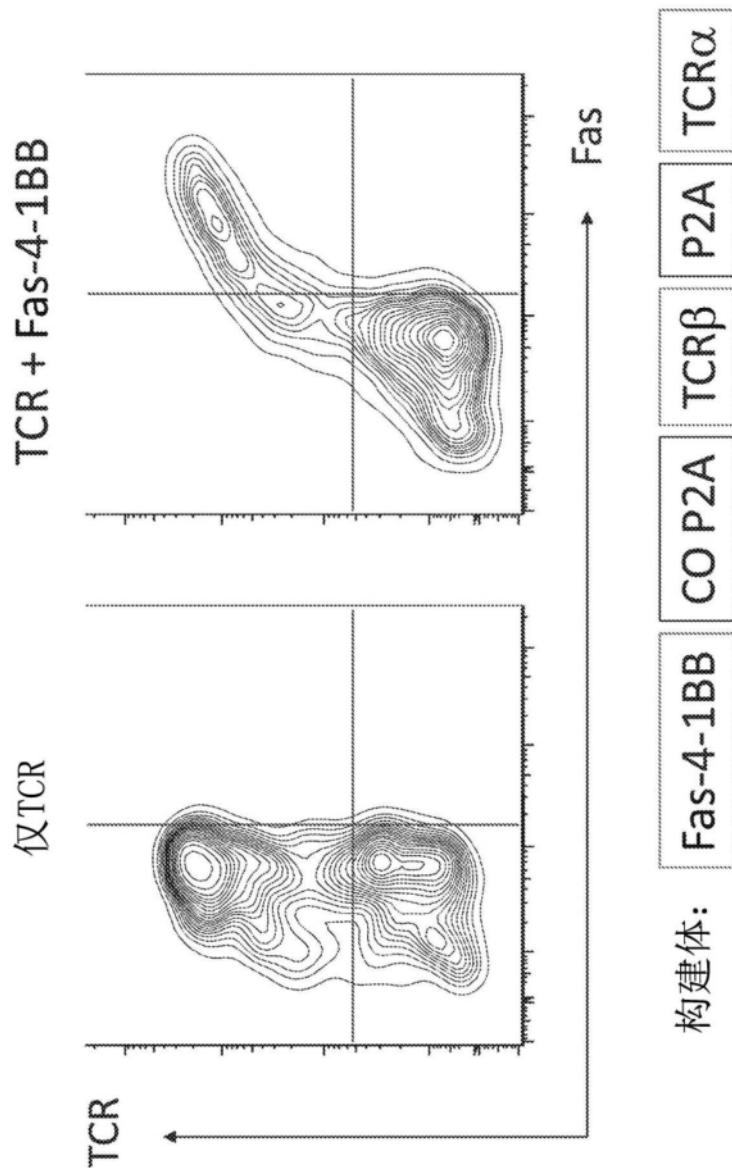


图23B

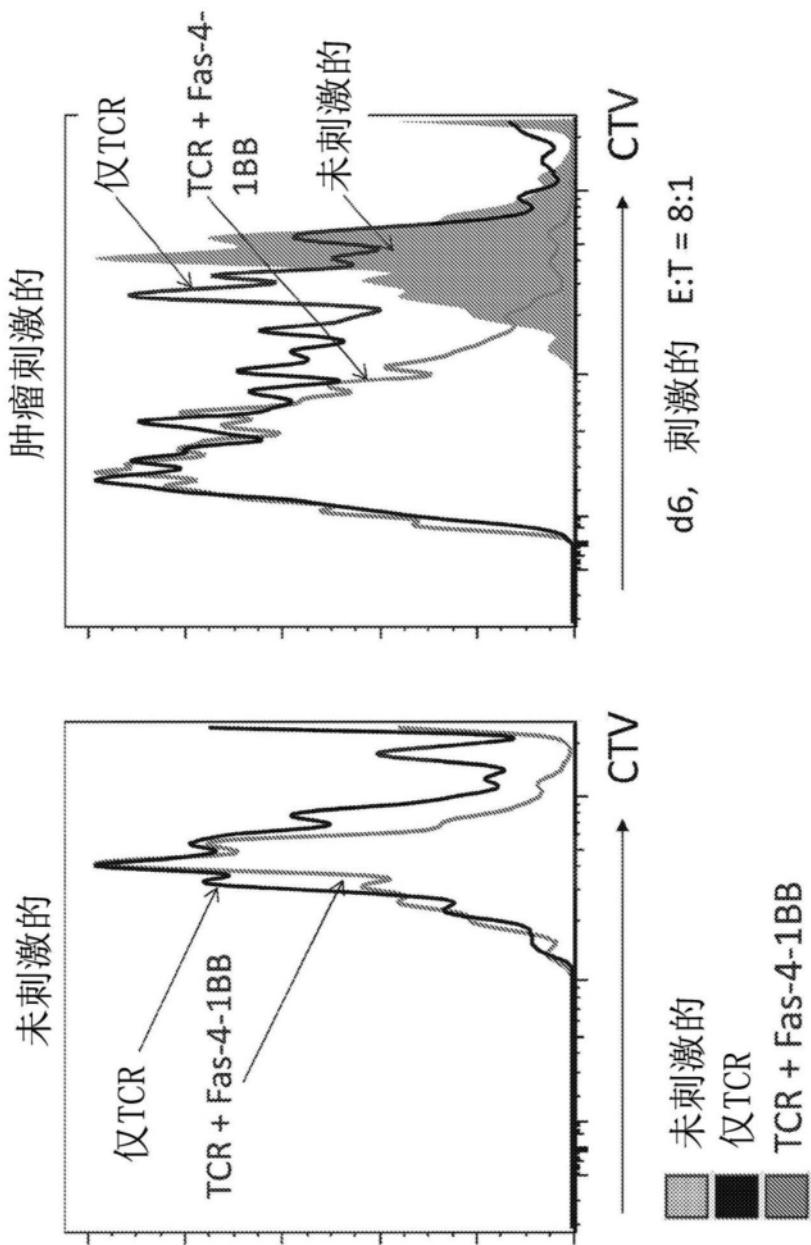


图23C

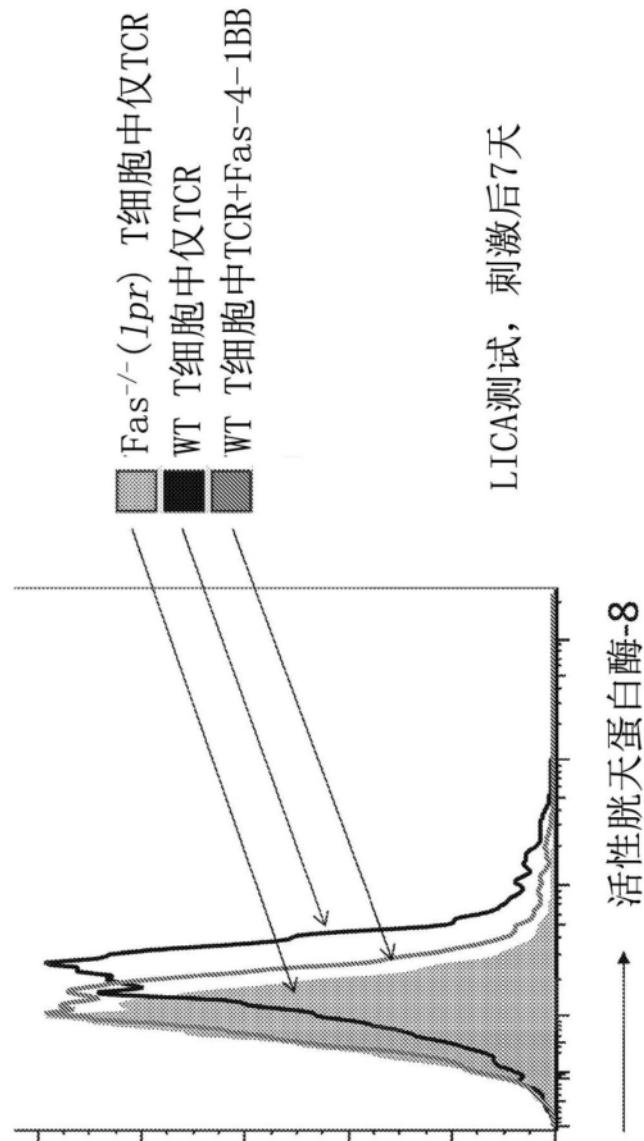


图23D

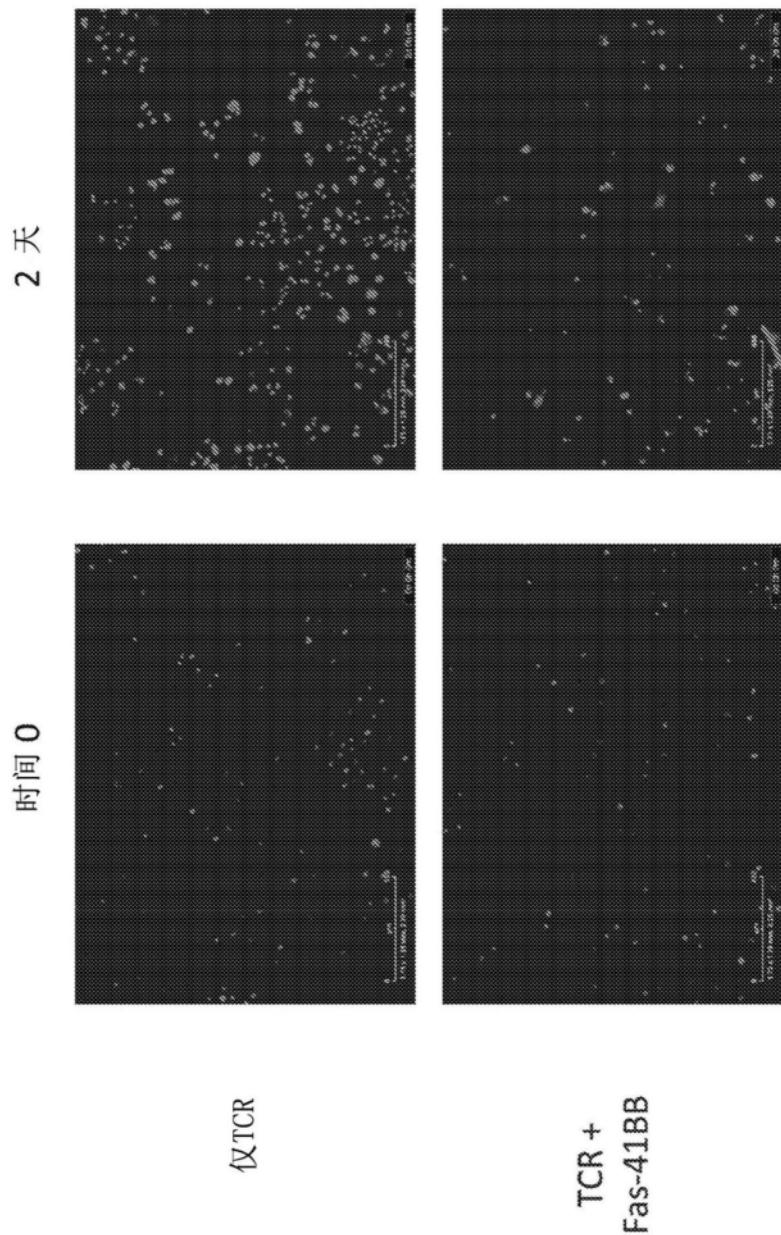


图24A

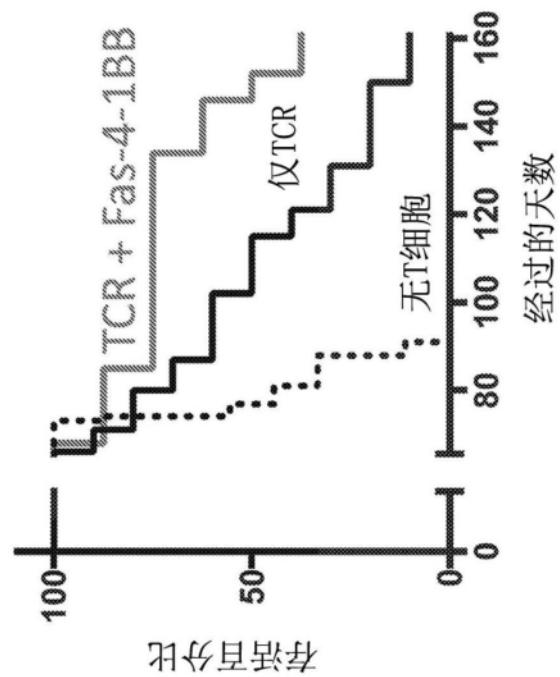


图24B

登入的小鼠
健康小鼠

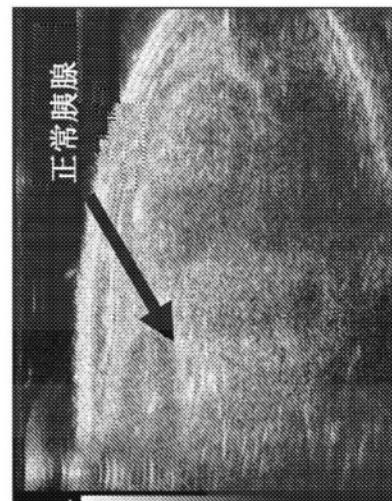
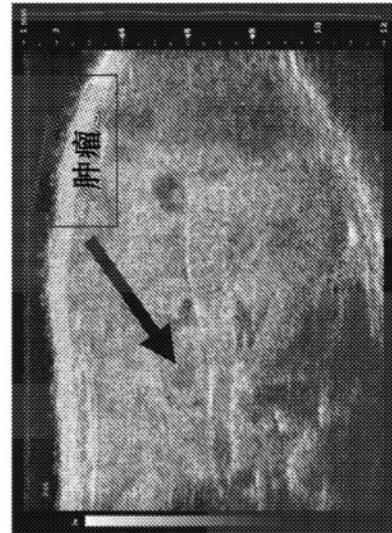
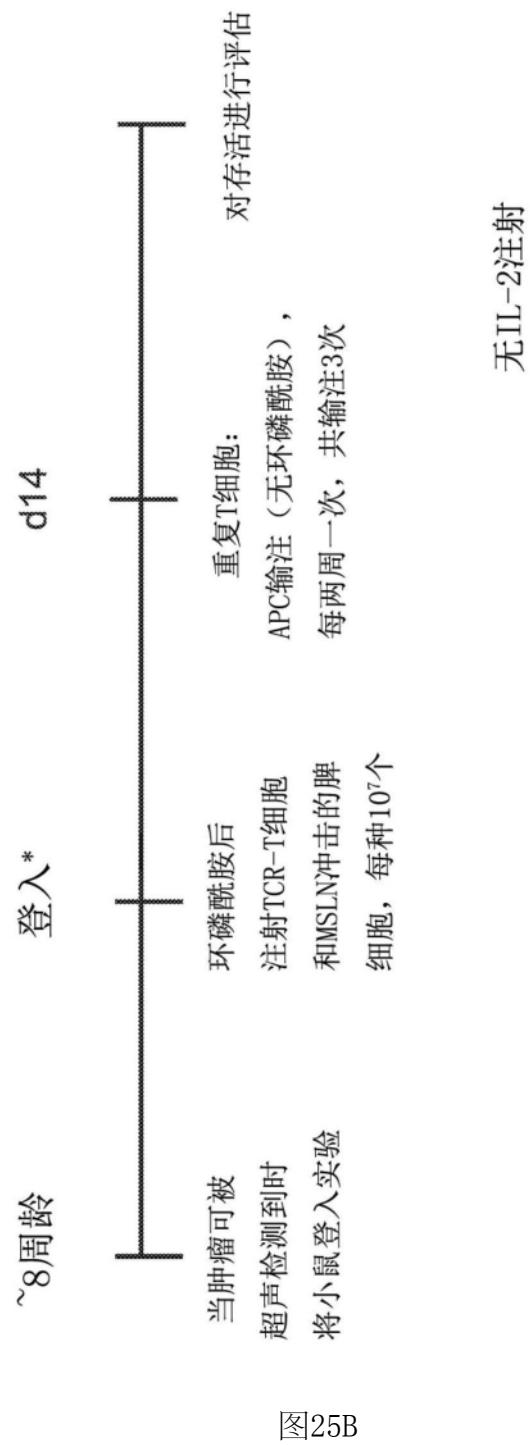


图25A



*将小鼠随机分配到处理组

图25B

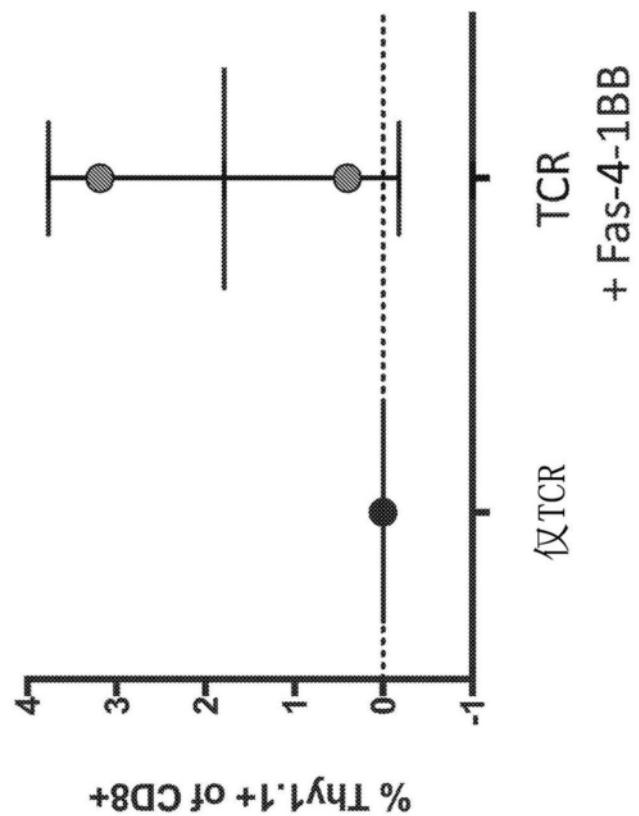
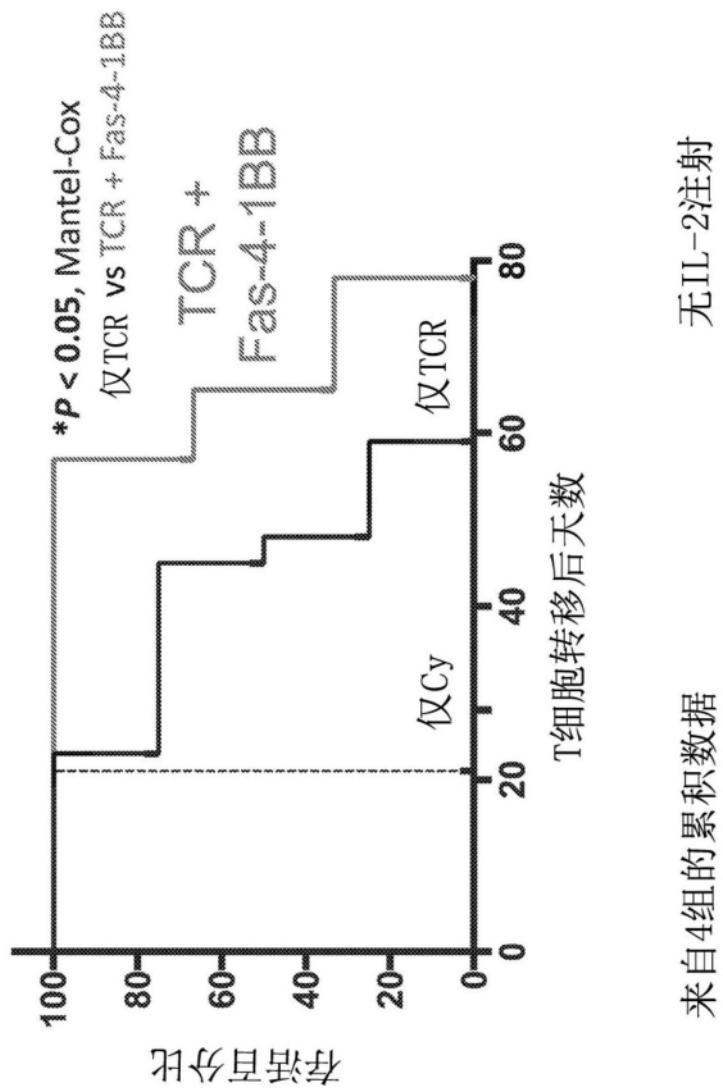


图25C



来自4组的累积数据

无IL-2注射

图25D

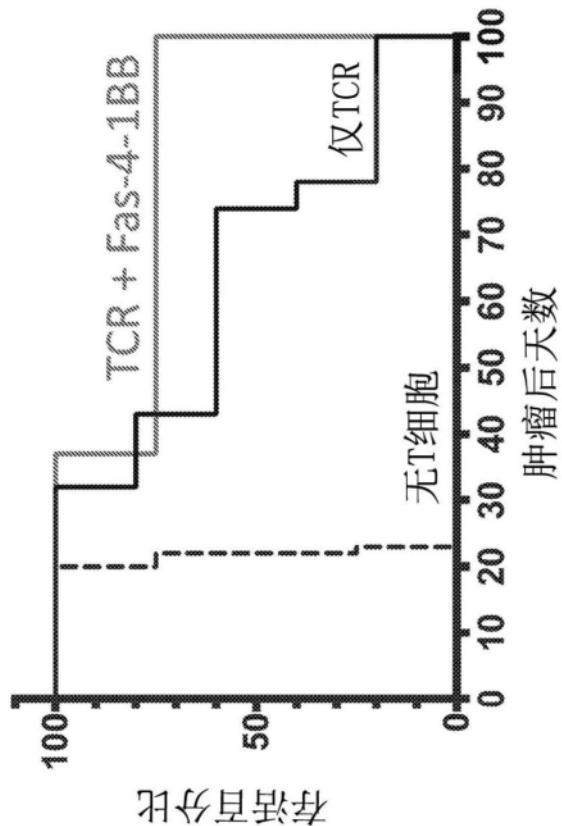


图26