



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112243442 A

(43) 申请公布日 2021.01.19

(21) 申请号 201980038222.3

(22) 申请日 2019.04.10

(30) 优先权数据

18166498.8 2018.04.10 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.12.07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/NL2019/050212 2019.04.10

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2019/199165 EN 2019.10.17

(71) 申请人 桑昆血液供给基金会

地址 荷兰阿姆斯特丹

(72) 发明人 德克·阿姆森

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240

代理人 陈知宇

(51) Int.Cl.

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 5/0783 (2006.01)

A61K 35/17 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书20页 附图14页

(54) 发明名称

嵌合Notch受体

(57) 摘要

本发明涉及包含Notch受体的细胞内结构域和跨膜结构域以及异源细胞外配体结合结构域的嵌合受体及其用途,具体地是用于改善T细胞功能和/或T细胞存活的用途,更特别地是在癌症疗法中的用途。

1. 一种嵌合受体, 包含Notch受体的细胞内结构域、跨膜结构域、异源二聚结构域和Lin-12-Notch (LNR) 重复结构域, 以及异源细胞外配体结合结构域。

2. 根据权利要求1所述的嵌合受体, 其中, 所述受体能够Notch信号传导。

3. 根据权利要求1或2所述的嵌合受体, 其中, 所述异源细胞外配体结合结构域选自以下各项组成的组:

- 对可溶性配体具有特异性的配体结合结构域;
- 对细胞表面抗原具有特异性的配体结构域, 如ScFv抗体结构域, 优选对肿瘤细胞表面抗原具有特异性的ScFv抗体结构域;
- Fc受体的细胞外配体结合结构域或其配体结合片段;
- 包含用于抗体的表位的细胞外结构域, 该抗体可以在没有表面分子参与的情况下交联所述嵌合受体;
- 包含如生物素等部分的细胞外结构域, 该部分可以被具有针对该部分的多个结合位点的试剂如链霉亲和素交联。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的嵌合受体, 还包含位于所述LNR结构域和所述异源细胞外配体结合结构域之间的连接序列。

5. 一种核酸分子, 包含编码根据权利要求1至4中任一项所述的嵌合受体的序列。

6. 一种载体, 包含根据权利要求5所述的核酸分子。

7. 一种分离细胞, 包含根据权利要求5所述的核酸分子或权利要求6所述的载体。

8. 根据权利要求7所述的细胞, 其中, 所述细胞是T细胞, 如肿瘤来源的T细胞或肿瘤浸润性淋巴细胞 (TIL)。

9. 根据权利要求7或8所述的细胞, 其中, 所述T细胞是从患有癌症的患者分离的自体T细胞。

10. 根据权利要求8或9所述的细胞, 其中, 所述T细胞表达嵌合抗原受体。

11. 一种基因修饰的T细胞, 其是由根据权利要求5或6所述的核酸分子或载体转导的。

12. 一种药物组合物, 包含根据权利要求5所述的核酸分子、根据权利要求6所述的载体或根据权利要求7至11中任一项所述的细胞以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

13. 一种在有需要的受试者中改善T细胞功能和/或T细胞存活的方法, 所述方法包括向所述受试者给予治疗有效量的根据权利要求1至11中任一项所述的嵌合受体、核酸分子、载体或细胞。

14. 根据权利要求1至11中任一项的嵌合受体、核酸分子、载体或细胞, 用于在改善受试者中T细胞功能和/或T细胞存活的方法中使用。

15. 根据权利要求13或14所述的方法或用于使用的嵌合受体、核酸分子、载体或细胞, 其中, 所述方法包括预防或抑制T细胞耗尽。

16. 一种在有需要的受试者中进行免疫疗法的方法, 所述方法包括向所述受试者给予治疗有效量的根据权利要求1至11中任一项所述的嵌合受体、核酸分子、载体或细胞。

17. 根据权利要求1至11中任一项所述的嵌合受体、核酸分子、载体或细胞, 用于在疗法中使用, 所述疗法优选为免疫疗法。

18. 根据权利要求16或17所述的方法或用于使用的嵌合受体、核酸分子、载体或细胞, 其中, 所述疗法或免疫疗法还包括基于抗体的免疫疗法。

19. 根据权利要求13至18中任一项所述的方法或用于使用的嵌合受体、核酸分子、载体或细胞,其中,所述受试者患有癌症。

20. 一种增强基于抗体的免疫疗法在患有癌症并且正在接受所述抗体治疗的受试者中的功效的方法,所述方法包括向所述受试者给予治疗有效量的表达根据权利要求1至4中任一项所述的嵌合受体的T细胞。

21. 表达根据权利要求1至4中任一项所述的嵌合受体的T细胞,用于在增强基于抗体的免疫疗法在患有癌症并且正在接受所述抗体治疗的受试者中的功效的方法中使用。

22. 一种在有需要的受试者中治疗癌症的方法,所述方法包括向所述受试者给予有效量的包含编码根据权利要求1至4中任一项所述的嵌合受体的核酸序列的T细胞。

23. 包含编码根据权利要求1至4中任一项所述的嵌合受体的核酸序列的T细胞,用于在受试者中治疗癌症的方法中使用。

24. 根据权利要求22或23所述的方法或用于使用的T细胞,其中所述方法包括:

-从所述受试者分离T细胞;

-通过向所述T细胞提供编码根据权利要求1至4中任一项所述的嵌合受体的核酸序列来修饰所述T细胞;

-将经修饰的T细胞返回给所述受试者。

25. 一种生产根据权利要求7至11中任一项所述的细胞的群的方法,包括:

-提供细胞,优选人类T细胞,

-向所述细胞提供根据权利要求5或6所述的核酸分子或载体,和

-允许表达根据权利要求1至4中任一项所述的嵌合抗原受体。

嵌合Notch受体

技术领域

[0001] 本发明涉及疗法(治疗, therapy)领域,特别是癌症疗法,更具体地是过继性T细胞免疫疗法。

背景技术

[0002] 已经通过体外扩增的肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)或表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞的过继性转移在肿瘤疗法中取得了显著成功。CAR含有对在肿瘤上发现的抗原具有特异性的、与CD3 ζ 的信号传导结构域和共刺激受体(如CD28或4-1BB)连接的胞外结构域(抗体的一部分)(图1)。CAR在T细胞中的表达导致其被肿瘤抗原激活。在某些血液恶性肿瘤中,CAR T细胞获得了高达90%的完全缓解。在实体瘤的治疗中获得的成功更少得多。因此,仍然有许多患者不能通过这种疗法治愈。主要障碍是转移的T细胞的持久性欠佳以及多种抑制性受体对T细胞功能的阻碍(这种现象称为耗尽),所有这些都必须被针对以发挥最大的治疗效果。理想情况下,抗肿瘤T细胞可以在很大程度上不受抑制机制的影响,并且其寿命长到足以实现彻底根除肿瘤。

[0003] Notch是一种细胞表面受体,其响应膜结合的配体。它通过引人注目的直接途径进行信号传导,在该途径中,细胞内结构域被 γ 分泌酶从质膜上切割下来,并迁移到细胞核以充当转录因子(图2)。Notch是CD4和CD8 T细胞效应子分化的主要调节剂。它还可以促进CD4记忆T细胞以及组织驻留记忆CD8 T细胞的长期存活,CD4记忆T细胞和组织驻留记忆CD8 T细胞是对抗实体瘤最有效的T细胞类型。此外,Notch是CD8效应子T细胞基因表达程序的主要调节剂。它的直接靶基因是编码IFN γ 、粒酶B和穿孔素的那些基因,以及编码转录因子T-bet和脱中胚蛋白(Eomesodermin)的那些基因。Notch通路中T细胞特异性缺陷的小鼠无法排斥模型肿瘤。反之亦然,Notch的故意激活促进了小鼠的肿瘤排斥。肿瘤相关的髓样源性抑制细胞(MDSC)下调T细胞中的Notch表达,大概可以帮助肿瘤逃脱有效的T细胞介导的排斥。活性的Notch等位基因的表达使CD8 T细胞对MDSC介导的抑制不敏感。

[0004] 最近的研究(Morsut et al.2016和Roybal et al.2016)创建了含有Notch的跨膜区域以及细胞外区域的一小部分的嵌合受体。这些与不相关的表面受体的配体结合结构域连接,同时,Notch的细胞内部分被不相关的反式激活因子(Ga14)替换。这些受体与配体的结合导致 γ 分泌酶介导的Ga14释放,其然后激活人工响应基因的转录。因此,在这些受体中,Notch的细胞内效应子结构域和Notch的细胞外配体结合结构域均不再存在,并由导致Notch信号传导也不再存在。

[0005] 在本领域中仍然需要用于肿瘤免疫疗法的新的组合物和方法,所述新的组合物和方法可以与现有的免疫疗法组合使用或不组合使用。

发明内容

[0006] 本发明的一个目的是提供总体上改善T细胞功能的方法,并且特别是在肿瘤免疫疗法中。

[0007] 因此,本发明提供了包含Notch受体的细胞内结构域和跨膜结构域以及异源细胞外配体结合结构域的嵌合受体。嵌合受体还优选包含Notch受体的异源二聚结构域和Lin-12-Notch (LNR) 重复结构域。

[0008] 当异源细胞外配体结合结构域结合配体时,根据本发明的嵌合受体能够进行Notch信号传导,优选Notch1、Notch2、Notch3和/或Notch4信号传导,更优选Notch1和/或Notch2信号传导。

[0009] 在进一步的方面,本发明提供了一种核酸分子,其包含编码根据本发明的嵌合受体的序列。

[0010] 在进一步的方面,本发明提供了一种载体,其包含根据本发明的核酸分子。

[0011] 在进一步的方面,本发明提供了一种分离细胞,其包括根据本发明的核酸分子。在进一步的方面,本发明提供了一种此类细胞的群。

[0012] 在进一步的方面,本发明提供了一种分离细胞,其表达根据本发明的嵌合受体。在进一步的方面,本发明提供了一种此类细胞的群。

[0013] 在进一步的方面,本发明提供了一种基因修饰的T淋巴细胞,其是由本发明的核酸分子或载体转导的。

[0014] 在进一步的方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含根据本发明的核酸分子、载体或细胞以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0015] 在进一步的方面,本发明提供了一种在有需要的受试者中改善T细胞功能和/或T细胞存活的方法,该方法包括向所述受试者给予治疗有效量的根据本发明的嵌合受体、核酸分子、载体或细胞。

[0016] 在进一步的方面,本发明提供了根据本发明的嵌合受体、核酸分子、载体或细胞,用于在改善受试者的T细胞功能和/或T细胞存活的方法中使用。

[0017] 在进一步的方面,本发明提供了在有需要的受试者中进行免疫疗法的方法,该方法包括向所述受试者给予治疗有效量的根据本发明的嵌合受体、核酸分子、载体或细胞。

[0018] 在进一步的方面,本发明提供了根据本发明的嵌合受体、核酸分子、载体或细胞,用于在疗法(优选免疫疗法)中使用。

[0019] 在进一步的方面,本发明提供了一种增强受试者中基于抗体的免疫疗法的功效的方法,受试者患有癌症并且正在接受所述抗体的治疗,方法包括向所述受试者给予治疗有效量根据本发明的表达嵌合受体的T细胞。

[0020] 在进一步的方面,本发明提供了根据本发明的表达嵌合受体的T细胞,用于在受试者中增强基于抗体的免疫疗法的功效的方法中使用,受试者患有癌症并且正在接受所述抗体的治疗。

[0021] 在进一步的方面,本发明提供了一种在有需要的受试者中治疗癌症的方法,方法包括向所述受试者给予有效量的T细胞,该T细胞包含编码根据本发明的嵌合受体的核酸序列。

[0022] 在进一步的方面,本发明提供了包含编码根据本发明的嵌合受体的核酸序列的T细胞,用于在受试者中治疗癌症的方法中使用。

[0023] 在进一步的方面,本发明提供了一种生产根据本发明的细胞群的方法,包括:

[0024] -提供细胞,优选人类T细胞,

- [0025] -向所述细胞提供根据本发明的核酸分子或载体,和
[0026] -允许表达根据本发明的嵌合抗原受体。

具体实施方式

[0027] 本发明涉及一种在配体结合后具有功能性Notch信号传导的嵌合受体,该受体由Notch的细胞内效应子和跨膜结构域与异源细胞外配体结合结构域的组合产生。本发明人发现,Notch信号传导抑制T细胞特异性抑制受体如PD1(程序性死亡蛋白1)和LAG3(淋巴细胞激活基因3)在T细胞上的表达。肿瘤通常通过上调此类抑制性分子来降低抗肿瘤T细胞响应,从而逃避免疫破坏。因此,Notch的治疗性激活是用于在人类患者中增强针对肿瘤的T细胞响应的有吸引力的靶标。到目前为止,Notch的治疗性用途已被两个问题排除。首先,Notch在许多细胞类型中均起作用,并且其系统性激活很可能引起许多副作用。其次,过多的Notch信号传导可能是致癌的。由于本发明人发现,当将Notch的细胞内效应子结构域与异源细胞外结合结构域结合时,Notch信号传导得以维持,因为可以在体内同时在时间和位置上调节Notch信号传导的激活,得以避免这些缺点。这是因为本发明的嵌合受体对选择的异源配体进行响应。在实施例中,描述了由融合至人类NOTCH1蛋白的5'末端、针对人类CD19的ScFv抗体结构域组成的嵌合Notch受体的制备。

[0028] 因此,本发明提供了一种嵌合受体,其包含Notch受体的细胞内结构域和跨膜结构域以及异源细胞外配体结合结构域。嵌合受体优选还包含异源二聚结构域和Notch受体的Lin-12-Notch(LNR)重复结构域。

[0029] Notch受体Notch1、Notch2、Notch3和Notch4及其序列在本领域中是众所周知的,并且这些受体的不同结构域及其序列,包括Notch细胞内结构域、跨膜结构域、异源二聚结构域、Lin-12-Notch(LNR)重复结构域和负调控区(NRR),也都是众所周知的。因此,在制备或使用根据本发明的嵌合受体时,本领域技术人员完全能够选择适合的结构域。

[0030] 如本文所使用的“Notch受体的细胞内结构域”是指能够启动Notch1、Notch2、Notch3或Notch4信号传导(优选Notch1或Notch2信号传导)的细胞内结构域。因此,根据本发明的嵌合受体能够Notch信号传导,优选Notch1、Notch2、Notch3和/或Notch4信号传导,更优选Notch1和/或Notch2信号传导。当所述异源细胞外配体结合结构域结合配体时,诱导了Notch传导,优选Notch1、Notch2、Notch3和/或Notch4信号传导,更优选Notch1和/或Notch2信号传导。因此,“能够Notch信号传导”是指当嵌合受体的异源细胞外配体结合结构域与配体结合时,Notch信号传导被诱导。Notch细胞内结构域是本领域技术人员众所周知的。优选地,其包含Notch细胞内结构域(NICD),这是在配体结合完整Notch受体的Notch细胞外结构域后被 γ 分泌酶切割下的结构域,优选Notch1或Notch2的NICD,更优选人类Notch1的NICD,或NICD的Notch信号途径启动部分。所述部分能够启动Notch信号传导。在优选的实施方式中,嵌合受体还包含Notch1的整个细胞内结构域,包括C末端反式激活结构域、RAM结构域和锚蛋白重复。

[0031] 可以使用包括或缺少C末端PEST区域的NICD。截短该区域会产生更稳定的NICD蛋白,其引发更强且更持久的信号。因此,在特别优选的实施方式中,Notch受体的细胞内结构域包含图8所示序列的氨基酸1744至2424的序列、或除Notch 1以外的Notch受体的相应序列、或与所述序列至少90%同一的序列。所述序列优选地能够启动Notch信号传导。所述序

列优选与图8所示的所述序列的氨基酸1744至2424具有至少95%的同一性,更优选至少97%,更优选至少98%,更优选至少99%。在特别优选的实施方式中,Notch受体的细胞内结构域包含图8所示序列的氨基酸1744至2424,更优选其由图8所示序列的氨基酸1744至2424组成。优选的是,所述细胞内结构域包含Notch1的指示序列,并因此包含图8所示序列的氨基酸1744至2424。

[0032] 在另一优选的实施方式中,使用了整个NICD,并且Notch受体的细胞内结构域包含图8所示序列的氨基酸1744至2555的序列、或除Notch 1以外的Notch受体的相应序列、或与所述序列具有至少90%同一性的序列。所述序列优选地能够启动Notch信号传导。所述序列优选与图8所示的所述序列的氨基酸1744至2555具有至少95%的同一性,更优选至少97%,更优选至少98%,更优选至少99%。在特别优选的实施方式中,Notch受体的细胞内结构域包含图8所示序列的氨基酸1744至2555,更优选其由图8所示序列的氨基酸1744至2555组成。优选的是,所述细胞内结构域包含Notch1的指示序列,并因此包含图8所示序列的氨基酸1744至2555。

[0033] 如本文所用的“Notch受体的跨膜结构域(TMD)”是指指Notch1、Notch2、Notch3或Notch4的跨膜结构域,优选Notch1或Notch2的跨膜结构域。Notch跨膜结构域是本领域技术人员众所周知的。在特别优选的实施方式中,Notch受体的跨膜结构域包含图8所示序列的氨基酸1736至1743的序列、或除Notch 1以外的Notch受体的相应序列、或与该序列具有至少90%同一性的序列。该序列优选能够启动 γ 分泌酶对NICD的切割。该序列优选进一步与图8所示的该序列的氨基酸1736至1743具有至少95%的同一性,更优选至少97%,更优选至少98%,更优选至少99%。在特别优选的实施方式中,Notch受体的跨膜结构域包含图8所示序列的氨基酸1736至1743,更优选地,其由图8所示序列的氨基酸1736至1743组成。优选的是,TMD包含Notch1的指示序列,并因此包含图8所示序列的氨基酸1736至1743。

[0034] 异源二聚结构域和Notch受体的Lin-12-Notch(LNR)重复结构域一起形成受体的负调控区(NRR)。Notch LNR结构域、异源二聚结构域和NRR是本领域技术人员众所周知的。异源二聚结构域和LNR重复序列位于本发明的嵌合受体中的异源细胞外配体结合结构域和跨膜结构域之间。顺序或结构域优选如下:异源细胞外配体结合结构域-LNR结构域-异源二聚结构域-跨膜结构域。当配体结合到Notch受体时,就启动了典型的Notch信号传导。这导致ADAM金属蛋白酶介导的异二聚体的细胞外片段的裂解。然后由 γ 分泌酶切割膜系链的片段以释放Notch的细胞内片段(NICD)。异源二聚结构域和LNR结构域位于Notch受体的NRR中,其位于配体结合结构域和跨膜结构域之间。LNR参与在没有配体结构的情况下维持受体保持静止构象,即防止或抑制ADAM金属蛋白酶的切割。在优选的实施方式中,嵌合受体包含Notch受体的整个负调控区(NRR)。优选地,这种NRR包含图8所示序列的氨基酸1447至1735、或除Notch 1以外的Notch受体的相应序列、或与该序列具有至少90%同一性的序列。该序列优选进一步与图8所示的该序列的氨基酸1447至1735具有至少95%的同一性,更优选至少97%,更优选至少98%,更优选至少99%。在进一步优选的实施方式中,这一NRR包含图8中所示序列的氨基酸1396至1735、或除Notch 1以外的Notch受体的相应序列、或与该序列具有至少90%同一性的序列。该序列优选进一步与图8所示的该序列的氨基酸1447至1735具有至少95%的同一性,更优选至少97%,更优选至少98%,更优选至少99%。在这一序列中,Notch序列的细胞外部分一直延伸到脯氨酸1396(请参见图8),因为这会产生一个受体,

该受体在没有配体结合的情况下比较短的构建体更可靠地沉默。本发明的嵌合受体还可选地包含将受体导向细胞膜的信号肽。优选的是，NRR包含Notch1的指示序列，并因此包含图8所示序列的氨基酸1447至1735或1396至1735。

[0035] 在特别优选的实施方式中，本发明的嵌合受体优选以所示的序列包含Notch受体的细胞内结构域、跨膜结构域、异源二聚结构域和Lin-12-Notch (LNR) 重复结构域以及异源细胞外配体结合结构域。因此，本发明的优选嵌合受体包含图8所示序列的氨基酸1447至2424、或除Notch 1以外的Notch受体的相应序列。在进一步特别优选的实施方式中，本发明的嵌合受体包含图8该序列的氨基酸1447至2555、或除Notch 1以外的Notch受体的相应序列。在进一步特别优选的实施方式中，本发明的嵌合受体包含图8所示序列的1396至2424、或除Notch 1以外的Notch受体的相应序列。在进一步特别优选的实施方式中，本发明的嵌合受体包含图8所示序列的氨基酸1396至2555、或除Notch 1以外的Notch受体的相应序列。优选的是，嵌合受体包含Notch1的该序列并由此包含图8所示的序列。

[0036] 如本文所使用的术语“异源配体结合结构域”是指除Notch受体的配体结合结构域以外的结构域，即除Notch1、Notch2、Notch3或Notch4的细胞外配体结合结构域以外的结构域。异源配体结合结构域是可以被所选配体结合的任何结构域。特别地，所述配体结合结构域可以是任何细胞表面抗原或任何可溶性配体的结合伴侣。异源配体结合结构域的多功能性允许为任何特定应用选择合适的配体。这样，可以在选定的时间、选定的位置/细胞类型或同时两者通过本发明的嵌合受体诱导对Notch信号传导的激活。合适的细胞外配体结合结构域的优选实例是对可溶性配体特异的配体结合结构域、对细胞表面抗原特异的配体结合结构域及其组合。更优选的例子是：

[0037] • 对细胞表面抗原具有特异性的抗体或抗体的抗原结合部分，如单链可变片段(scFv)；

[0038] • 对抗体中的表位具有特异性的抗体或抗体的抗原结合部分，如单链可变片段(scFv)、Fab片段、针对细胞表面抗原的F(ab)2片段；

[0039] • Fc受体的细胞外Fc结合结构域或其配体结合片段；

[0040] • 包含用于抗体的表位的细胞外结构域，该表位可以在无表面分子参与的情况下交联嵌合受体；

[0041] • 包含部分(如生物素)的细胞外结构域，该部分可以被对该部分具有多个结合位点的试剂(例如链霉亲和素)交联(导致在添加所述试剂后，多个嵌合受体的聚簇)。

[0042] 原则上，根据本发明可以使用以下类型的表面抗原：

[0043] 1. 肿瘤特异性抗原；

[0044] 2. 与非肿瘤细胞上的表达水平相比，在肿瘤细胞上具有更高表达水平的抗原；

[0045] 3. 在肿瘤细胞和非肿瘤细胞上均表达的抗原，但其中由非肿瘤细胞诱导表达本发明嵌合受体的T细胞的活化会产生可接受的副作用，例如CD19和CD20；

[0046] 4. 在肿瘤细胞和非肿瘤细胞上均表达但与一种或多种其它抗原组合而对肿瘤细胞具有特异性的抗原，如T细胞表位；和

[0047] 5. 在肿瘤周围的细胞上表达的抗原，例如PDL1和PDL2。

[0048] 在优选的实施方式中，细胞表面抗原是肿瘤抗原并且异源细胞外配体结合结构域是对所述肿瘤抗原具有特异性的抗体或抗体的抗原结合部分。肿瘤抗原的优选例子是TAG-

72、钙激活氯通道2、9D7、Ep-CAM、EphA3、Her2/neu、间皮素、SAP-1、BAGE家族、MC1R、前列腺特异性抗原、CML66、TGF- β R11、MUC1、CD5、CD19、CD20、CD30、CD33、CD47、CD52、CD152 (CTLA-4)、CD274 (PD-L1)、CD273 (PD-L2)、CD340 (ErbB-2)、GD2、TPBG、CA-125、MUC1、不成熟的层粘连蛋白受体和ErbB-1。

[0049] 本领域技术人员完全能够识别可以在根据本发明的嵌合抗原受体中使用的可溶性配体及其结合伴侣。合适的可溶性配体的例子是针对嵌合Notch受体的细胞外结构域中的表位的抗体、或与嵌合Notch受体的生物素化的细胞外结构域组合的如链霉亲和素等分子。对可溶性配体具有特异性的配体结合结构域与对细胞表面抗原具有特异性的配体结合结构域的组合也是可以的。在那种情况下,仅当可溶性配体和细胞表面抗原同时存在时,才会诱导Notch信号传导。例如,胞外结构域可以由针对肽新表位或针对生物素或FITC部分的抗体组成,该抗体本身被掺入到针对肿瘤上表面抗原的抗体(“开关”抗体)中。因此,只有在除了被开关抗体靶向的细胞表面抗原之外,该开关抗体本身也存在的情况下,才会发生嵌合Notch受体的激活。Ma et al 2016(通过引用将其并入本文)中描述了这种设置并且允许临时控制受体(仅在需要时将其打开和关闭)以及定量控制(通过增加或降低所述开关抗体的浓度)。

[0050] 本发明的嵌合受体进一步可选地包含位于跨膜结构域和异源细胞外配体结合结构域之间的连接序列。此类连接序列优选地包含至多30个氨基酸,如2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸。

[0051] 氨基酸序列或核酸序列的同一性百分比或术语“%序列同一性”在本文中定义为:在将氨基酸序列或核酸序列与参考氨基酸序列或核酸序列进行比对并引入空位(如有必要)以实现最大百分比同一性后,所述氨基酸序列或核酸序列的全长中与参考氨基酸序列或核酸序列中的残基相同的残基占该全长的百分比。用于比对的方法和计算机程序是本领域众所周知的,例如“Align 2”。

[0052] 在本文所述的氨基酸序列中,氨基酸由单字母符号表示。这些单字母符号和三字母符号对于本领域技术人员是众所周知的,并且具有以下含义:A (Ala) 是丙氨酸,C (Cys) 是半胱氨酸,D (Asp) 是天冬氨酸,E (Glu) 是谷氨酸,F (Phe) 是苯丙氨酸,G (Gly) 是甘氨酸,H (His) 是组氨酸,I (Ile) 是异亮氨酸,K (Lys) 是赖氨酸,L (Leu) 是亮氨酸,M (Met) 是甲硫氨酸,N (Asn) 是天冬酰胺,P (Pro) 是脯氨酸,Q (Gln) 是谷氨酰胺,R (Arg) 是精氨酸,S (Ser) 是丝氨酸,T (Thr) 是苏氨酸,V (Val) 是缬氨酸,W (Trp) 是色氨酸,Y (Tyr) 是酪氨酸。

[0053] 如本文所用,术语“对……特异/对……具有特异性”和“特异性结合”或“能够特异性结合”是指配体和配体结合结构域之间的非共价相互作用,如抗体或其抗原结合部分与其抗原的非共价相互作用或可溶性配体与其结合伴侣的非共价相互作用。其指示着配体优先结合所述配体结合结构域,而不是其它结构域。

[0054] “抗体的抗原结合部分”在本文中定义为抗体的一部分,其能够特异性结合与所述抗体相同的抗原,但不一定达到相同的程度。该部分不必需要如在所述抗体中一样原样存在并且包括所述抗体的不同片段,它们一起能够结合所述抗原,如抗体的单链可变片段(ScFv)、重链与轻链可变区的融合蛋白。

[0055] 如本文所用的“细胞表面抗原”是指在细胞的细胞外表面表达的抗原或分子。

[0056] 如本文所用的“肿瘤抗原”是指在肿瘤细胞上表达的抗原。肿瘤抗原也称为肿瘤相

关抗原 (TAA)。

[0057] 如本文所用的“可溶性配体”是指水溶性配体,该水溶性配体的结合伴侣可用作本发明的嵌合受体的细胞外结构域。优选的是,可以例如通过注射(如静脉内注射)或口服向受试者给予所述可溶性配体。

[0058] 还提供了一种核酸分子,其包含编码根据本发明的嵌合受体的序列。还提供了一种载体,其包含根据本发明的核酸分子。在优选的实施方式中,所述载体是病毒载体,例如慢病毒载体或逆转录病毒载体。在另一优选实施方式中,所述载体包含或为转座子。所述核酸分子或载体可以附加地包含在引用所述载体的特定细胞中指导表达的其它组分,如用于高表达水平的手段,如强启动子(例如病毒来源的)和信号序列。在优选的实施方式中,所述核酸分子或载体包含一种或多种以下组分:驱动T细胞表达的启动子,如EF1a启动子或MSCV的5' LTR,用于靶向质膜的C末端信号肽(例如来自GMCSF蛋白或CD8蛋白的C末端信号肽)和聚腺苷酸化信号。

[0059] 还提供了一种分离细胞,其包含根据本发明的核酸分子或载体。该分离细胞优选是免疫细胞,例如天然杀伤细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞或T细胞。可以通过本领域已知的任何方法,例如通过慢病毒转导、逆转录病毒转导、DNA电穿孔或RNA电穿孔,将所述核酸分子或载体引入所述细胞,优选免疫细胞。所述核酸分子或载体被瞬时地或优选地稳定地提供给所述细胞。用核酸转导或电穿孔细胞的方法是技术人员已知的。

[0060] 一般而言,本发明的嵌合受体被有利地用于改善T细胞功能和/或T细胞存活,优选对肿瘤具有反应性的T细胞的功能和/或存活。因此,提供了一种在有需要的受试者改善T细胞功能和/或T细胞存活的方法,该方法包括向所述受试者给予治疗有效量的根据本发明的嵌合受体、核酸分子、载体或细胞,优选T细胞。改善T细胞功能和/或T细胞存活优选地包含预防或抑制T细胞耗尽。在优选的方面,所述受试者患有癌症。所述细胞优选是T细胞,优选是患有癌症的受试者的自体T细胞,如肿瘤来源的T细胞或肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)或分离自受试者的血液的T细胞。

[0061] 还提供了用于在疗法中使用的根据本发明的嵌合受体、核酸分子或载体,或包含根据本发明的核酸分子或载体的细胞。优选地,所述疗法是免疫疗法,更优选肿瘤免疫疗法。在优选的实施方式中,所述肿瘤免疫疗法包括过继性细胞转移,更优选过继性T细胞转移。

[0062] 因此,还提供了一种在有需要的受试者中进行免疫疗法的方法,该方法包括向受试者给予治疗有效量的根据本发明的嵌合受体、核酸分子、载体或细胞。在优选的实施方式中,此方法包括给予根据本发明的细胞或细胞群。

[0063] “过继性细胞转移”是指将细胞转移到患者体内。特别地,“过继性T细胞转移”是指将T细胞转移至患者体内。所述细胞可以来源于该患者本身或者可以来自另一个体。过继性T细胞转移优选包含转移从优选源自待治疗的受试者或患者的血液中分离的肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)或T细胞。如果使用从血液中分离的T细胞,则该T细胞进一步优选表达嵌合抗原受体(CAR)或肿瘤特异性T细胞受体。

[0064] “TIL”是指在待治疗患者的肿瘤中或周围发现的自体T细胞。将T细胞在体外扩增,例如用白介素2(IL-2)和抗CD3抗体等细胞因子培养,然后转移回患者体内。在体内给予后,TIL重新浸润肿瘤并靶向肿瘤细胞。在进行TIL治疗之前,患者可以接受非清髓性化疗,以耗

尽可抑制肿瘤杀伤死的天然淋巴细胞。一旦完成淋巴结清除,则向患者输注TIL,可选地与IL-2组合。采用包括TIL在内的过继性T细胞转移的免疫疗法的程序在本领域中是众所周知的。在优选的实施方式中,从患者分离后,向根据本发明的TIL提供根据本发明的核酸分子或载体。进一步优选的是,所述TIL表达根据本发明的嵌合受体。

[0065] 如本文所用的“免疫疗法”是指通过在患有疾病或病症的个体中诱导或增强免疫响应来治疗所述个体。肿瘤免疫疗法涉及诱导或增强个体对肿瘤和/或所述肿瘤的细胞的免疫响应。根据本发明的免疫疗法可以用于治疗或预防。“治疗”是指由免疫疗法成分诱导或增强的免疫响应改善或抑制现有的肿瘤。“预防”是指免疫疗法成分诱导保护性免疫响应,从而保护个体免于发展癌症。

[0066] 还提供了一种在有需要的受试者中治疗癌症的方法,该方法包括向所述受试者给予有效量的包含编码根据本发明的嵌合受体的核酸序列的T细胞。所述T细胞优选是自体T细胞,如TIL或从受试者血液中分离的T细胞。

[0067] 使用基于根据本发明的嵌合受体和/或提供有编码根据本发明的嵌合抗原受体的核酸分子或表达根据本发明的嵌合抗原受体的细胞(优选T细胞,更优选自体T细胞,如TIL或从血液分离的T细胞)的疗法可以治疗或预防的肿瘤可以是任何类型的肿瘤,包括原发性肿瘤、继发性肿瘤、晚期肿瘤和转移瘤。根据本发明可以治疗或预防的肿瘤的非限制性例子是急性髓系白血病(AML),慢性髓系白血病(CML),慢性淋巴细胞白血病(CLL),急性淋巴细胞白血病(ALL),慢性骨髓单核细胞性白血病(CMML),淋巴瘤,多发性骨髓瘤,嗜酸性粒细胞白血病,毛细胞白血病,霍奇金淋巴瘤,非霍奇金淋巴瘤,大细胞免疫母细胞淋巴瘤,浆细胞瘤,肺肿瘤,小细胞肺癌,非小细胞肺癌,胰腺肿瘤,乳腺肿瘤,肝肿瘤,脑肿瘤,皮肤肿瘤,骨骼肿瘤,结肠肿瘤,直肠肿瘤,肛门肿瘤,小肠肿瘤,胃肿瘤,神经胶质瘤,内分泌系统肿瘤,甲状腺肿瘤,食道肿瘤,胃肿瘤,子宫肿瘤,尿路肿瘤和膀胱肿瘤,肾脏肿瘤,肾细胞癌,前列腺肿瘤,胆囊肿瘤,头部或颈部肿瘤,卵巢肿瘤,宫颈肿瘤,胶质母细胞瘤,黑素瘤,软骨肉瘤,纤维肉瘤,子宫内膜、食道、眼或胃肠道间质肿瘤,脂肪肉瘤,鼻咽、甲状腺、阴道和外阴肿瘤。

[0068] 本文所用的“受试者”优选是哺乳动物,更优选是人类。

[0069] 本文所指的“T细胞”或“TIL”可以是CD4⁺或CD8⁺T细胞或TIL或者CD4⁺或CD8⁺T细胞或TIL的组合。在优选的实施方式中,T细胞或TIL是CD8⁺T细胞或TIL。

[0070] 本发明还提供了一种基因修饰的T细胞,其是由本发明的核酸分子或载体转导的。所述修饰的T细胞优选是肿瘤来源的T细胞或肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)。另外,根据本发明的分离细胞优选为T细胞,更优选为肿瘤来源的T细胞或TIL。在特别优选的实施方式中,T细胞是从患有癌症的患者中分离出的自体T细胞,即自体TIL或从血液中分离出的自体T细胞。进一步优选的是,所述T细胞表达根据本发明的嵌合抗原受体。

[0071] 在一个方面,根据本发明的基于嵌合受体的治疗与至少一种其它免疫疗法成分组合。这种进一步的免疫疗法成分可以是本领域已知的任何免疫疗法成分。优选地,所述进一步的免疫疗法成分选自细胞免疫疗法、抗体疗法、细胞因子疗法、疫苗接种和/或小分子免疫疗法或其组合。

[0072] 在优选的实施方式中,将使用嵌合受体的治疗与基于抗体的免疫疗法组合,优选包含使用针对共抑制性T细胞分子的抗体进行治疗。共抑制性T细胞分子也称为免疫检查

点。共抑制性T细胞分子的优选实例是细胞毒性T淋巴细胞抗原-4 (CTLA-4)、程序性死亡1 (PD-1)、PD-配体1 (PD-L1)、PD-L2、信号调节蛋白 α (SIRP α)、含T细胞免疫球蛋白和粘蛋白结构域3的分子3 (TIM3)、淋巴细胞激活基因3 (LAG3)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (KIR)、CD276、CD272、A2AR、VISTA和吡啶胺2,3双加氧酶 (IDO)。因此,与本发明的嵌合受体或包含本发明的嵌合受体的细胞组合的针对共抑制性T细胞分子的抗体优选地选自抗CTLA4抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体、抗SIRP α 抗体、抗TIM3抗体、抗LAG3抗体、抗CD276抗体、抗CD272抗体、抗KIR抗体、抗A2AR抗体、抗VISTA抗体、抗TIGIT抗体和抗IDO抗体。用作进一步免疫疗法成分的合适抗体是纳武单抗、派姆单抗、兰博单抗、伊匹单抗和lirilumab。

[0073] 如实施例所示,Notch信号传导降低共抑制性T细胞分子的表达。因此,还提供了一种用于增强如本文定义的基于抗体的免疫疗法在患有癌症并正用所述抗体治疗的受试者中的功效的方法,该方法包括向所述受试者给予治疗有效量的表达根据本发明的嵌合受体的T细胞。所述T细胞优选是自体T细胞,例如自体TIL或从受试者血液中分离的T细胞。

[0074] 在进一步优选的实施方式中,将使用嵌合受体的治疗与涉及嵌合抗原受体 (CAR) 或肿瘤特异性T细胞受体的治疗组合。优选地,使用还包含嵌合抗原受体 (CAR) 的包括和/或表达根据本发明的嵌合受体的细胞。如果使用除TIL以外的T细胞,如从血液中分离的自体T细胞,则这是特别优选的。CAR是融合至细胞外肿瘤结合部分的细胞内T细胞信号传导结构域组成的抗原靶向受体,主要是来自单克隆抗体的单链可变片段 (scFv)。CAR特异性地识别 (肿瘤) 细胞表面抗原,独立于MHC介导的抗原呈递。CAR优选含有对肿瘤相关抗原具有特异性的胞外结构域 (例如抗体的抗原结合部分) 和共刺激受体 (例如CD28或4-1BB), 该胞外结构域连接至信号传导结构域 (优选CD3 ζ 的信号传导结构域)。所述细胞优选是T细胞,更优选是来自待治疗的受试者例如血液或肿瘤自体T细胞。

[0075] 为了清楚和简洁的描述,在本文中可将特征描述为本发明的相同或不同方面或实施方式的一部分。本领域技术人员可以理解,本发明的范围可以包括具有在本文中作为相同或不同实施方式的一部分而描述的特征的全部或一些的组合的实施方式。

[0076] 在以下非限制性实施例中更详细地解释本发明。

附图说明

[0077] 图1:嵌合抗原受体 (CAR) 的示意图

[0078] 示出了抗体的scFv (单链) 配体结合部分,其4-1BB或CD28共刺激受体的细胞内信号传导结构域并且连接至CD3 ζ 链。

[0079] 图2:Notch信号传导途径

[0080] 以浅蓝色和红色示出的是Jagged和Delta,是Notch的两个膜结合配体。Notch受体本身以橙色表示。在配体结合后,Notch的细胞内结构域 (NICD) 被从膜上切割下来并且易位至细胞核,在其中与CSL和MAML蛋白复合形成转录激活因子。

[0081] 图3:Notch缺乏会导致抗病毒CD8⁺ T细胞中效应子功能降低。(A) 实验流程图。使野生型 (Notch1^{flox/flox}Notch2^{flox/flox}) 或T细胞特异性Notch1/2敲除小鼠 (Notch1^{flox/flox}Notch2^{flox/flox}CD4-Cre) 鼻内感染HkX31流感病毒,10天后分离T细胞 (示出了来自脾的结果) 并且染色CD8并结合到D^bNP₃₆₆₋₃₇₄MHC四聚体 (B)。(C) 野生型 (黑条) 或Notch1/2KO小鼠 (开放条) 中D^bNP₃₆₆₋₃₇₄-特异性CD8⁺T细胞的数量。D^bNP₃₆₆₋₃₇₄-特异性CD8⁺T细胞中,产生IFN γ (D)

或粒酶B的细胞的百分比 (E-蓝色直方图-野生型;红色直方图N1/2ko)。(F) FACSsorted D^bNP₃₆₆₋₃₇₄-特异性CD8⁺T细胞中颗粒酶B和穿孔素的相对mRNA水平。(G) HkX31病毒载量,(H) 小鼠体重曲线和(I) 感染小鼠血液中的流感中和抗体滴度。所有结果均来自Backer et al. 2014。

[0082] 图4:在有效记忆的产生中CD8⁺T细胞对Notch的固有需求。首先使野生型或Notch1/2敲除小鼠鼻内感染HkX31流感病毒,然后在43天后再次感染PR8流感。(A) 再感染的8天后,血液中D^bNP₃₆₆₋₃₇₄ MHC四聚体结合CD8⁺T细胞的数量。(B) 脾和肺中D^bNP₃₆₆₋₃₇₄ MHC四聚体结合CD8⁺T细胞的数量。(C) 用与CD45.2⁺WT BM(黑条)混合或与CD45.2⁺Notch1/2KO BM(白条)混合的CD45.1⁺WT骨髓(BM)重组Rag1缺陷小鼠。然后如A中所示进行感染和再感染。左侧示出了CD45.1⁺CD8⁺T细胞的响应且右侧示出了CD45.2⁺CD8⁺T细胞的响应。还示出了公用CD45.2⁺KO BM重组的小鼠的响应(灰色条)。将结果相对于相应的WT对照进行归一化。(D) 从肺分离并且在体外用NP₃₆₆₋₃₇₄肽和野生型脾抗原呈递细胞重新刺激的产生IFN γ 、TNF α 和颗粒酶B的CD8⁺T细胞的百分比(注意:肺中流感特异性T细胞的数量相似-见图4B)。

[0083] 图5:Notch缺乏会导致抗病毒CD8⁺T细胞中效应子功能降低。(A) 来自野生型或T细胞特异性Notch1/2敲除小鼠的流感特异性效应子CD8⁺T细胞之间的差异表达基因(通过RNAseq获得)的基因集富集分析。(B) 野生型或Notch1/2ko效应子T细胞中PD1和Lag3的mRNA水平。(C) 将10⁴个CD45.2野生型或Notch1/2ko OT1 T细胞转移到CD45.1野生型同系小鼠中,随后使其感染表达卵清蛋白NP₃₆₆₋₃₇₄肽的流感。感染后30天,肺中流感特异性记忆CD8⁺T细胞上PD1的代表性FACS直方图(左)和MFI(右)。(D) 实验流程图:使用空载体或编码NICD(Notch细胞内结构域)的逆转录病毒载体转导CD45.2 OT1 T细胞,并且转移到如(C)中感染的CD45.1野生型小鼠中。7天后,分离T细胞并通过FACS分析PD1水平(E)。

[0084] 图6:生理性Notch响应对NICD非常敏感。(A) 不同水平的mER-NICD1或组成型NICD1表达的核释放诱导Notch响应性HES1-荧光素酶报告基因的激活。分别使用表达萤火虫荧光素酶的报告质粒、组成型表达海肾荧光素酶的质料和空载体对照、mER-NICD或NICD1来转染U2OS细胞。以指示浓度添加他莫昔芬(4-HT)。将萤火虫荧光素酶活性相对于来自相同样品的海肾荧光素酶活性进行归化并且显示为空载体对照样品的倍数(平均值+SD)。注意,在没有4-HT的情况下,ME-R-NICD引起了15.2倍的泄漏诱导。(B,C) 在对照OP9细胞上共培养2周后胸腺细胞的流式细胞仪分析。在共培养之前,使用NICD1、mERNICD1或空载体对照转导CD34⁺CD1a⁻祖细胞。以指示浓度向mER-NICD1和空载体转导的培养物中添加他莫昔芬。(B) 分析转导细胞的CD4和CD8的表面表达以评估T细胞分化。(C) 通过转导的谱系细胞上CRTH2的表达确定ILC2分化。

[0085] 图7:抗TA-chNotch受体。将Notch的LNR、异源二聚化结构、跨膜结构域和细胞内结构域整合至针对邻近细胞表面分子(例如肿瘤抗原(TA))的抗体新胞外结构域。该抗体新胞外结构域与相对细胞(例如肿瘤细胞)上的配体的结合会诱导TACE和 γ 分泌酶的切割,导致NICD易位至细胞核中以及内源性Notch靶基因的反式激活。在缺乏激活表面抗原的情况下,抗TA-chNotch受体没有活性。

[0086] 图8:Notch1受体的氨基酸序列。UniProtKB/Swiss-Prot的序列:P46531.4。

[0087] 图9:Notch可以保护CD8⁺T细胞免于发展耗尽的标志。

[0088] (A) 使用表达EV或连接至IRES-Thy1.1的病毒激活和转导OT-1CD8⁺T细胞,并且静

置5天。随后,使细胞与B16-F10黑色素瘤细胞共培养过夜(不表达卵清蛋白),然后进行Thy1.1(以识别转导的细胞)和颗粒酶B染色,并通过流式细胞仪进行分析。需要注意的是,Thy1.1⁻细胞被排除在分析之外。还需注意的是,由于NICD插入片段的大小,EV和NICD构建体之间的Thy1.1的表达水平有所不同。(B)如(A)中所示激活并转导OT-1 T细胞。转导五天后,将细胞再培养6天,并且每天添加表达卵清蛋白(B16-0va)的新鲜B16-F10黑色素瘤细胞以反复进行TCR刺激,导致耗尽。然后对细胞进行Thy1.1和PD1染色,并通过流式细胞仪进行分析。(C)如(B)中所示处理OT-1CD8⁺T细胞,如图所示,在与B16-0va共培养不同的时间之后,通过流式细胞仪分析Thy1.1⁺细胞的百分比。(D)使用表达EV或mER-NICD(他莫昔芬诱导版本的NICD)激活并转导OT-1CD8⁺T细胞,并且在不具有或具有0.05mM(+)或0.5mM(++)他莫昔芬的条件下如(C)所示与B16-0va培养。然后通过流式细胞仪分析Thy1.1⁺细胞的IFN γ 、IL10、颗粒酶B和PD1表达。

[0089] 图10:针对CD19的嵌合Notch受体(CNR)的产生和表达。(A)实验示意图。CNR含有对人类CD19具有特异性的细胞外ScFv结构域。使用融合至IgG1 Fc部分的人类CD19蛋白检测CNR的表面表达。然后使用荧光标记的抗人类抗体来检测hCD19-Ig融合蛋白。PEST=Notch PEST结构域;AF647=Alexa Fluor 647。(B)用CNR表达构建体或对照转染HEK293T细胞,然后不使用或使用不同浓度的hCD19-Ig进行染色,然后使用荧光标记的抗人类抗体进行染色。

[0090] 实施例

[0091] 实施例1

[0092] 结果

[0093] 为了检查Notch在CD8 T细胞响应中的作用,在Backer et al.2014中,使用在Notch1和Notch2基因中携带T细胞特异性缺失的(Notch1/2ko)小鼠感染流感病毒。在响应的峰值处,使用负载有流感的免疫优势肽的D^b四聚体检测流感特异性CD8 T细胞(图3a,b)。尽管野生型(WT)和Notch1/2ko小鼠中流感特异性CD8 T细胞响应的量级相似(图3c和未示出),但与WT CD8 T细胞相比,Notch1/2缺陷型T细胞产生了较少的IFN γ 和颗粒酶B(图3d,e,f)。Notch1/2ko小鼠清除流感病毒的能力也较弱,并且表现出延迟的恢复(图3g,h)。Notch1/2ko小鼠中中和抗体(如果有)的滴度升高(图3i),表明它们无法清除病毒是由于其无效的CD8 T细胞响应引起的。

[0094] 在所检查的所有解剖部位,Notch1/2缺乏对流感的记忆响应的影响甚至更为严重(图4a,b)。如Notch1/2ko CD8 T细胞即使在混合的骨髓嵌合体中也无法扩增所示,缺陷的记忆活性是Notch的CD8 T细胞固有功能的结果(图4c)。令人惊讶的是,在肺中发现了正常数量的Notch1/2ko记忆CD8 T细胞(图4b),但是这些细胞几乎不产生效应分子(图4d)。

[0095] Notch1/2ko CD8 T细胞的严重无响应性使人联想到“耗尽”:由于抑制性受体(例如PD1和Lag3)的表达而无法完全响应(Wherry and Kurachi,2015)。Notch1/2ko CD8效应T细胞的完整转录组分析加强了这一见解。在Notch1/2ko和WT效应T细胞之间差异表达的基因中,最显著富集的基因集来源于LCMV急性和慢性感染之间的比较(图5a),这是用于研究T细胞耗尽的原型模型(Wherry and Kurachi,2015)。实际上,Notch1/2ko CD8效应T细胞中PD1和Lag3的mRNA水平均升高(图5b)。

[0096] 重要的是,在转移到感染了流感-0va(OT1 T细胞受体会对其进行响应)的WT同系

受体小鼠中的Notch1/2缺陷型OT1 T细胞表面上,PD1的表达升高(图5c)。T和B细胞的内源库有效地清除了这些小鼠中的流感病毒,排除了病毒持续感染,这可以解释Notch1/2ko T细胞上PD1表达的选择性升高。另外,Notch1/2ko OT1 T细胞中激活的Notch1等位基因(NICD)的特异性表达强烈抑制了PD1表达(图5e)。这表明Notch以CD8 T细胞固有的方式抑制PD1的表达。

[0097] Notch的细胞内结构域(NICD)的表达模拟了CD4 T细胞和CD8 T细胞中Notch的激活(Helbig et al.2012;Backer et al.2014;Amsen et al.2007)。Notch信号传导非常敏感,并且通过过表达NICD构建体获得的核NICD分子的数量可能大大超过在配体介导的激活后获得的分子数量。通过在胸腺祖细胞中使用他莫昔芬诱导型MER-NICD等位基因进行的实验说明了这一点。如果表达NICD,在OP9基质细胞上培养CD34⁺CD1a⁻人类胸腺祖细胞只会导致分化(图6b)。令人惊讶的是,在不存在他莫昔芬(图6b),导致萤光素酶报告基因构建体非常弱的反式激活的条件下(图6a),通过MER-NICD的泄漏活性已经获得了CD4⁺CD8⁺双阳性细胞的最大分化。另外,通过添加他莫昔芬提高MER-NICD的活性导致分化逐渐从双阳性胸腺细胞转化为CRTH2⁺ILC2细胞(图6c)。这些结果强调了内源性响应程序对NICD的出色敏感性。另外,它们表明,Notch信号传导的强度有时会定性地影响对这一受体的生物学响应。(这些结果已经发表于Gentek et al.2013)

[0098] 材料和方法

[0099] 小鼠。所有小鼠均处于C57BL/6背景。使用Notch1^{flox/flox}Notch2^{flox/flox}Cd4-Cre小鼠(Amsen et al.2014;Amsen et al.2004)。在所有实验中均使用Cre-阴性同窝仔。表达OT-I TCR(003831)的转基因小鼠可从Jackson Laboratories获得。在学术医学中心(AMC, Amsterdam, The Netherlands)的动物中心在特定的无病原体条件下繁殖和安置小鼠。实验开始时,小鼠(雄性和雌性)的年龄在8-16周之间。在感染实验过程中,将野生型和Notch1-2-KO小鼠安置在一起以避免笼偏。没有使用故意的随机方法。除了确定病毒载量和血凝测定(操作员不了解小鼠基因型)外,没有使用正式的致盲方法。通过将5-10×10⁶个供体BM细胞静脉注射至致死剂量照射的RAG1缺陷型小鼠中,产生了以1:1比率含有野生型和Notch1-2-KO BM的混合骨髓(BM)嵌合体。用同系CD45.1/2标志物识别了供体来源的野生型和Notch1-2-KO细胞。在植入12周后使用BM嵌合体。按照机构和国家动物实验指南使用所有小鼠。所有程序均经当地动物伦理委员会批准。

[0100] 用于小鼠研究的培养基、试剂和mAb。培养基是补充有10%热灭活的FCS(Lonza)、200U/ml青霉素、200μg/ml链霉素(Gibco)、GlutaMAX(Gibco)和50μMβ-巯基乙醇(Invitrogen)(IMDMc)的Iscove氏修改后的Dulbecco培养基(IMDM;Lonza)。除非另有说明,用于流式细胞术的所有直接缀合的单克隆抗体均购自eBioscience, San Diego, CA:抗CD3ε(克隆145-2C11)、抗CD4(克隆GK1.5)、抗CD8α(Ly-2,克隆53-6.7)、抗CD28(克隆37.51)、抗CD44(克隆IM7)、抗CD45.1(克隆A20, BD Biosciences)、抗CD45.2(克隆104)、抗CD127(抗IL7Rα,克隆A7R34)、抗颗粒酶B(克隆GB-11, Sanquin PeliCluster)、抗IL-2(克隆JES6-5H4)、抗IFN-γ(克隆XMG1.2)、抗KLRG-1(克隆2F1)和抗TNFα(克隆MP6-XT22),同型对照(cat.#3900S)(Cell Signaling Technology)。

[0101] 流感感染。使用小鼠鼻内感染100-200×50%组织培养有效剂量(TCID₅₀)的H3N2流感A病毒HKx31(Belz et al.2000)、流感A/WSN/33、A/WSN/33-OVA(I)(Topham et

al.2001)、A/PR/8/34(H1N1)或表达LCMV gp33-41表位的重组A/PR/8/34(Mueller et al.2010)。如先前所述通过感染MDCK或LLC-MK2细胞来获得储液和病毒滴度(Van der Sluijs et al.2004)。在指定的时间间隔,从尾静脉抽取血样或处死小鼠并收集器官以确定流感特异性CD8⁺T细胞的数量。使用抗CD8(53-6.7)和含有流感-A-来源的核衣壳蛋白(NP)肽NP₃₆₆₋₃₇₄ ASNENMETM的PE-或APC-缀合的H-2D^b的四聚体(由Sanquin血液研究实验室生产)对流感特异性CD8⁺T细胞进行计数。通过分离肺mRNA并且使用特异于A/PR/8/34M基因的以下引物和探针通过定量PCR检测病毒mRNA,以确定感染小鼠肺中的A/PR/8/34病毒载量。正义引物:5'-CAAAGCGTCTACGCTGCAGTCC-3';反义引物:5'-TTTGTGTTACGCTCACCGTGCC-3';探针:5'-AAGACCAATCCTGTCACTCTGA-3'。

[0102] 如前所述,通过使用四个血凝单位的病毒和火鸡红细胞,通过血凝抑制(HI)测定检测血清中是否存在针对该病毒的中和抗体(Palmer et al.1975)。数值代表完全抑制凝集时的最大血清稀释度。

[0103] 流式细胞仪和细胞分选。为了细胞内细胞因子和颗粒酶B染色,在存在10 μ g/ml布雷菲德菌素A(Sigma)的条件下,使用1 μ g/ml的MHC I类限制性流感源性肽NP₃₆₆₋₃₇₄ ASNENMETM脾细胞和总肺样品刺激4h以防止细胞因子释放。在4 $^{\circ}$ C下在含有0.5%BSA和0.02%NaN₃的PBS中,使用相关的荧光染料缀合的mAb将细胞染色30分钟。为了细胞内染色,使用Cytotfix/Cytoperm(BD Biosciences)将细胞固定和透化。数据采集和分析是在FACSCanto(Becton Dickinson)和FlowJo软件上完成的。

[0104] 为了从流感感染的小鼠中分离H-2Db-NP四聚体阳性CD8⁺T细胞,用流感特异性四聚体和各种标志物对脾脏的单细胞悬液进行染色。使用FACS Aria细胞分选仪(BD Biosciences)分选细胞。

[0105] 为了分析人类胸腺细胞,基于使用7-氨基放线菌素D(7-AAD,eBiosciences)或可固定的活/死染料(Invitrogen)的染色区分活细胞和死细胞。在LSR Fortessa流式细胞仪(BD Bioscience)上获取数据并且使用FlowJo软件(TreeStar)进行分析。使用直接用异硫氰酸荧光素(FITC)、藻红蛋白(PE)、藻红蛋白-花菁5(PE-Cy5)、PE-Cy5.5、PE-Cy7、PerCP-Cy5.5、别藻蓝蛋白(APC)/Alexa Fluor 647、APC-Cy7、AF700(所有均来自BD Bioscience, Biologend或MACS Miltenyi)、Horizon V500(HV500,BD Bioscience)、Brilliant Violet 421(BV421)、BV711和BV785(均来自Biologend)标记的抗体对单细胞悬液进行染色。使用了对下列人类抗原具有特异性的抗体:CD1a,CD3,CD4,CD7,CD8,CD11c,CD14,CD19,CD25,CD34,CD45,CD56,CD94,CD117(cKit),CD123,CD127(IL-7R α),CD161,CD294(CRTH2),CD303(BDCA2),CD336(Nkp44),CD278(ICOS),TCR $\alpha\beta$,TCR $\gamma\delta$ 和FcER1。使用抗小鼠CD90.1(Thy1.1)-FITC、-PE或-APC-eFluor 780(eBioscience)来检测用MSCV-IRES-Thy1.1逆转录病毒转导的细胞。

[0106] 小鼠CD8⁺T细胞的逆转录病毒转导和过继性转移。按描述在PlatE细胞中生产病毒(Amsen et al.2004)。使用1nM OVA₂₅₇₋₂₆₄肽温育来自CD45.2⁺OT-I野生型或OT-I Notch1-2-KO小鼠的总脾细胞,次日,使用病毒上清液(具有8 μ g/ml聚凝胺)旋转感染(700 \times g,在37 $^{\circ}$ C下90min)细胞,随后在37 $^{\circ}$ C下5h。更换培养基,次日,通过密度离心(淋巴细胞分离剂(Lymphoprep),Axis-shield PoC)分离活T细胞,并且将7.5 \times 10²至5 \times 10⁴个细胞转移到定时流感-OVA感染的CD45.1⁺小鼠中。转移后5-10天检测到供体OT-1T细胞,为CD45.2⁺CD8⁺和

Thy1.1或GFP三阳性细胞。

[0107] 病毒生产和人类胸腺细胞的转导。为了病毒生产,使用FuGene HD (Promega)瞬时转染Phoenix GALV包装细胞。转染48h后收获含病毒的上清液,在干冰上速冻并保存在-80℃直至使用。为了转导,次日,在包被有比较纤维连接蛋白(Retronectin) (Takara Biomedicals)的平板中在37℃下将细胞与病毒上清液温育6-8h。

[0108] 用于人类胸腺细胞实验的逆转录病毒构建体。先前已经描述了人类NICD1-IRES-Thy1.1-MSCV构建体(Amsen et al.2004)。为了产生MER-NICD融合,使用以下引物PCR扩增N-末端mER结构域:GATCAGGAATTCCACACCATGGGAGATCCACGAAATGAA和GATCAGGATATCCACCTTCCTCTTCTTCTTGG,并且克隆到pBluescript (pBS)的EcoRI和EcoRV位点以创建mER-pBS。使用下列引物PCR扩增缺少翻译起始信号的人类NICD1:ATCGGAGTTCTCGCAAGCGCCGGCGGCAGCAT和GATCAGAAGCTTGAATTCTTACTTGAAGGCCCTCCGAATG,并且随后克隆到mER-pBS的EcoRV和HindIII位点。然后使用BamHI和ClaI将mER-NICD1融合插入物克隆到IRES-Thy1.1-MSCV中。

[0109] 基因表达谱小鼠研究。通过流式细胞术从感染流感的小鼠的脾脏中分离出H-2D^b-NP₃₆₆₋₃₇₄⁺CD8⁺T细胞。使用TRIzol试剂(Invitrogen)根据制造商的协议提取总RNA。为了进行深层测序分析,通过nucleospin RNAII柱(Macherey-Nagel)进一步纯化总RNA,使用Superscript RNA扩增系统(Invitrogen)扩增RNA并且用ULS系统(Kreatech)使用Cy3或Cy5染料(Amersham)进行标记。通过将10个样品合并到HiSeq2000机器上的一个泳道中来获得序列。每个样品获得17至2700万次读取。

[0110] 如(Anders et al.2013)中所述进行测序短序列匹配(read mapping)(TopHat)并确定差异表达基因(DESeq)。使用TopHat(版本1.4.0)相对于小鼠参考基因组(构建mm9)匹配测序短序列,这允许跨越外显子-外显子连接。为TopHat提供了一组已知的基因模型(NCBI构建37,版本64)。为了获得每个样品的基因计数,使用了HTSeq-计数。该工具为提供的基因转移格式(GTF)文件中存在的每个基因生成基因计数。从数据集中删除所有样本中计数均为零的基因。使用R软件包DESeq进行统计分析。确定了SLEC和MPEC样品之间以及野生型和敲除样品之间差异表达的基因。DESeq假设可以通过负二项分布来模拟基因计数。对于样本归一化,从计数数据确定“大小因数”。经验分散是通过‘合并’方法确定的,该方法使用重复所有条件下的样品进行计算,以估计单个合并的分散值。随后,参数拟合确定表达值的分散-均值关系,从而为每个基因产生两个分散估计(经验估计和拟合值)。使用‘最大共享模式’,我们选择了这两个值中的最大值以更保守。最后,计算p值和FDR校正的p值。

[0111] 为了突出在差异表达基因集中过度代表的生物过程,我们使用了Bioconductor软件包G0seq(Young et al.2010),其是为分析RNA-seq数据而开发的。首先,我们从SLEC-MPEC和WT-KO比较中选择了FDR<0.5的所有基因。随后,G0‘生物过程’基因集被用来确定过度代表的过程。此外,我们使用来自Molecular Signatures Database(MSigDB;<http://www.broadinstitute.org/gsea>)的‘C7’基因集,这是带注释的基因集的集合。基因集C7包含由代表免疫系统内细胞类型、状态和扰动的基因集组成的免疫学签名。所述签名是通过人工策划已发表的人类和小鼠免疫学微阵列研究产生的。该基因集是作为人类免疫学项目联盟(HIPC;<http://www.immuneprofiling.org>)的一部分而生成的。开发了内部R脚本以将C7基因集转换为G0seq可以使用的格式。

[0112] 统计分析。数字表示平均值且误差线表示平均值的标准误差(s.e.m.)。使用

GraphPadPrism软件应用标准学生t检验(未配对的双尾)。如果比较3组或更多组,则使用单因素方差分析(ANOVA)和Bonferroni校正。 $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

[0113] 人胸腺造血祖细胞的分离。从正接受心脏直视手术的儿童获得出生后胸腺(PNT)组织样本(LUMC, Leiden, Netherlands);根据赫尔辛基的声明,它们的使用已获得AMC道德委员会的批准。使用Stomacher 80Biomaster (Seward)通过机械破坏制备细胞悬浮液。在4℃下温育过夜后,从Ficoll-Hypaque(淋巴细胞分离剂;Nycomed Pharma)密度梯度中分离胸腺细胞。通过MACS(Miltenyi Biotec)使单细胞悬浮液富集CD34⁺细胞,使用荧光标记抗体进行染色并且随后在FACS Aria (BD Bioscience)上FACS分别分选为CD34⁺CD1a⁻CD3⁻CD56⁻BDCA2⁻或CD34⁺CD1a⁺CD3⁻CD56⁻BDCA2⁻(在本项研究中称为CD34⁺CD1a⁻和CD34⁺CD1a⁺)。分选群的纯度>99%。

[0114] 胸腺祖细胞的体外分化。在含有5%正常人类血清、SCF(20ng/ml)和IL-7(10ng/ml,均来自PeproTech)的Yssel氏培养基过夜培养分选的胸腺祖细胞。在开始共培养的前一天,通过用30Grey照射使OP9细胞有丝分裂失活,并以 $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ 的密度接种。转导后,将胸腺祖细胞添加到预接种的OP9细胞中。在具有FCS(20%Fetal Clone I, Hyclone)和IL-7(5ng/ml)的MEM α (Invitrogen)进行共培养。在某些情况下,向培养基中添加Flt3l(5ng/ml, PeproTech)。每3-4天更新一次培养物。除非另有说明,否则通常在1周后分析先天淋巴样细胞的分化测定。通过强力移液收获细胞,并使其通过70mm尼龙筛网过滤器(Spectrum Labs)。

[0115] 报告基因测定。使用FuGene HD转染试剂(Promega)瞬时转染U2OS细胞。使用NOTCH-响应启动子与NICD1-MSCV Th1.1、mER-NICD1-MSCV Th1.1或空载体对照共转染细胞。为了校正转染效率的差异,共转染了pRL-CMV对照载体,由其组成型表达海肾荧光素酶。转染行一式三份。在适用的情况下,在过夜温育后添加4-羟基他莫昔芬(Sigma)以诱导mER-NICD1的核易位。转染48小时后裂解细胞并且在Synergy HT酶标仪(Syntek)上使用双重萤光素酶报告基因测定系统(Promega)测量萤光素酶活性。使用了两种不同的Notch响应性报告基因构建体,之前已经对其进行了描述(Nam et al.2007)。

[0116] 嵌合Notch受体(ChNR)系统。为了产生嵌合Notch受体,通过由融合至Notch的异源二聚结构域的scFv抗体结构域组成的异源配体结合结构域替换除了异源二聚结构域之外的Notch的细胞外结构域。该受体将通过与相邻细胞表面上scFv抗体的同源配体结合而被激活,但是当该表面抗原不存在时会保持沉默(图7)。ChNR可以通过逆转录病毒转导或其它方法在CD4⁺T细胞中表达。如果将这种修饰的T细胞过继性转移到患者体内,则只能在这些T细胞中特异性地打开Notch。

[0117] 通常,ChNR本身不足以完全激活T细胞。为此,需要额外的T细胞受体信号(或其模拟物)。例如,T细胞可以来源于进行肿瘤反应性选择之后的原发性肿瘤(肿瘤浸润性淋巴细胞-TIL)。此外,ChNR可以与针对肿瘤抗原的重组T细胞受体组合使用,也可以在经过工程化的T细胞中使用以表达传统的嵌合抗原受体(CAR)。

[0118] 这一基本构思的许多变化都是可以的。作为胞外结构域,原则上可以使用识别表面抗原的任何抗体,并且原则上可以靶向在肿瘤细胞表面表达的任何表面抗原。最后,甚至由可溶性配体激活的胞外结构域也是一种选择。例如,胞外结构域可以由针对肽新表位(如Rodgers et al.2016所述)或针对生物素或FITC部分(如Ma et al.2016所述)的抗体组成,

该抗体本身被掺入到针对肿瘤上表面抗原的另一抗体(开关抗体)中。因此,只有在除了所述开关抗体所靶向的细胞表面抗原之外,该开关抗体本身也存在的情况下,才会激活嵌合Notch受体。这种设置可允许临时控制受体(仅在需要时将其打开和关闭)以及定量控制(通过增加或降低所述开关抗体的浓度)。然而,在所有这些情形下,将Notch的细胞内结构域从嵌合Notch受体中释放出来仍然是中心目标。

[0119] 实施例2中描述了示例性嵌合Notch受体的制备。

[0120] 实施例2

[0121] 结果

[0122] 当通过T细胞受体慢性刺激T细胞时,会发生T细胞耗尽。实施例1中的结果表明,Notch保护了响应于流感病毒感染的CD8⁺T细胞免于激活这一耗尽程序。但是,流感感染通常不会引起T细胞的慢性刺激。因此,我们问刻意激活Notch是否也能在通常确实导致耗尽的条件下防止耗尽。为此,我们采用了一种体外系统,其中可以将活化的Notch等位基因(NICD)引入T细胞,然后对其进行反复的TCR刺激。使用逆转录病毒表达系统在OT-1CD8⁺T细胞(其识别H2-K^b中卵清蛋白的SIINFEKL肽)中表达NICD。这种逆转录病毒构建体中的IRES-Thy1.1序列可以区分转导的T细胞(Thy1.1⁺)和未转导的T细胞(Thy1.1⁻)。例如如由细胞溶解效应蛋白颗粒酶B的自发产生所证明的,CD8⁺OT-1T细胞中NICD的表达强烈地增强了效应子功能(图9A)。然后通过每日添加表达卵清蛋白的B16F10黑色素瘤细胞(B16-Ova)反复刺激转导的OT-1细胞。这些条件导致在使用对照病毒(空载体-EV)转导的OT-1T细胞表面上突出表达检查点分子(和耗尽标志)PD1(图9B,左)。然而,NICD的表达几乎完全阻止了PD1的表达(图9B,右)。NICD的表达也为OT-1T细胞提供了竞争优势:随着时间的推移,用NICD转导的群中Th1.1⁺细胞的比例逐渐增加,而在用空载体转导细胞时,Th1.1⁺群保持稳定(图9C)。

[0123] 表达NICD等位基因后获得的活性Notch分子的浓度可能在非生理性上较高。此外,使用ChNR可能无法实现类似高水平的此类活性Notch分子。为了测试使用较弱的Notch刺激是否也可以获得对CD8⁺T细胞的保护效应,我们使用了他莫昔芬诱导型NICD(也在实施例1中使用,图6)。这一构建体由在N末端连接至雌激素受体(ER)的配体结合结构域的NICD组成,该雌激素受体(ER)已被突变以便仅响应他莫昔芬而不再响应雌激素。这种突变的ER结构域(mER)通过与热激蛋白结合而将NICD分子隔离在细胞质中,从而使其保持失活状态。加入他莫昔芬后,mER-NICD融合蛋白与这些热激蛋白解离,从而使NICD变得活跃。如荧光素酶报告基因测定所示(图6A)该融合蛋白的Notch活性最高水平远低于NICD本身,并且可通过滴定他莫昔芬来定量控制其活性。最后,即使在没有他莫昔芬的情况下,该mER-NICD仍具有一些“泄漏”的Notch活性,其在荧光素酶报告基因测定中几乎无法检测到,但可以引发Notch的生理功能,例如诱导胸腺前体细胞分化为CD4⁺CD8⁺胸腺细胞(图6B)。因此,我们再次使用以B16-Ova黑色素瘤细胞的重复刺激模型(如A-C中),使用此mER-NICD构建体检查了防止CD8⁺T细胞耗尽的信号强度要求。用0.5或甚至0.05mM他莫昔芬刺激mER-NICD确实导致PD1表达降低和致耐受性细胞因子IL10的产生(图9D)。其还动员了效应分子如IFN γ 和颗粒酶B的产生。值得注意的是,这些效应中的一些甚至是通过在不存在他莫昔芬的条件下由mER-NICD引起的极低渗漏NICD活性所获得的。因此,我们得出结论,即使在相对适度水平的Notch活性下,Notch仍可以保护CD8⁺T细胞免于发展耗尽的标志(PD1的表达,效应分子产生的丧失)。

[0124] 嵌合Notch受体的生成

[0125] 生成了由针对人类CD19的ScFv抗体结构域组成的嵌合Notch受体(如Molecular Immunology 1997;34:1157-1165中描述的ScFv并且用于J Immunother.2009Sep;32(7):689-702描述的CAR构建体中)。将该ScFv在框架内融合至在细胞外异源二聚结构域上游截断的人类NOTCH1蛋白的5'末端(图10A)。

[0126] 具体地,GMCSF前导序列(MLLLVTSLLL CELPHPAFL)在框架内融合至Ig κ 轻链可变结构域,之后是FMC63-28Z抗CD19 ScFv的Ig重链可变结构域(IPDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPQRKGLEWLVIIWGSETTYNSALKSRLTI IKDNSKSQVFLKMNSLQTD DDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAA),其与起始于(图8所示的序列)异亮氨酸1427至赖氨酸2555的人类全长NOTCH1蛋白的C-末端在框架内融合。

[0127] 在替代性构建体中,所用的人类NOTCH1序列的C末端始于脯氨酸1390。两种变体(以Ile 1427或脯氨酸1390开始,参见图8的序列)也都通过缺失人类NOTCH1的C末端PEST结构域而制得(终止于人类NOTCH1蛋白的丙氨酸2424,见图8的序列)。

[0128] 然后,转染入HEK293T细胞后,从pHEFTIG慢病毒表达载体(在J Immunol 2009;183:7645-7655中描述为“修饰的pCDH1”并且在PNAS,2011年8月9日108(32)13224-13229中描述为“pHEF”)表达所述融合蛋白,并用重组人类CD19-Ig蛋白染色证明其在细胞表面的存在(图10B)。

[0129] 材料和方法

[0130] 小鼠。在荷兰癌症研究所(NKI,Amsterdam,Netherlands)的动物设施中饲养和维持雌性或雄性OT-1TCR转基因小鼠(C57BL/6株),所述小鼠具有专门设计用于靶向H2-Kb呈递的卵白蛋白残基257-264的TCR α -V2和TCR β -V5基因的转基因插入片段。所有动物实验均按照符合机构指南的协议进行并经NKI动物伦理委员会批准。

[0131] 细胞系和试剂。在具有补充有10%热灭活胎牛血清(Bodingo BV)、5%L-谷氨酰胺(Lonza,Belgium)和5%青霉素/链霉素(Sigma,10.000U青霉素和10mg链霉素)的HEPES的Iscove氏改良Dulbecco氏培养基(IMDM)中培养中培养B16-F10和B16-OVA肿瘤细胞系。在具有补充有10%热灭活胎牛血清(Bodingo BV)和5%L-谷氨酰胺(Lonza,Belgium)的HEPES的Dulbecco氏改良Eagle培养基(DMEM)中培养Platinum-Eco细胞和HEK293T细胞。所有细胞均在37°C,5%CO₂下温育。

[0132] 细胞纯化。从OT-1小鼠的脾脏和淋巴结中获得单细胞悬液。通过磁激活细胞分选(MACS)富集和纯化CD8⁺T细胞。将CD8⁺T细胞分离试剂盒,小鼠(Miltenyi Biotech)用于CD8⁺T细胞的负选择。在补充有10%热灭活胎牛血清(Bodingo BV)、5%L-谷氨酰胺(Lonza,Belgium)、5%青霉素/链霉素(Sigma,10.000U青霉素和10mg链霉素)和50 μ M β -巯基乙醇(Sigma Aldrich)的IMDM中将所述细胞培养至多两周。

[0133] 鼠CD8⁺T细胞的逆转录病毒转导。使用FuGENE[®]HD试剂(Promega)根据制造商的说明用所述构建体转染Platinum-Eco细胞以产生逆转录病毒储库。在转染前一天将3x10⁶个细胞接种在100mm培养皿。将56 μ l FuGENE[®]HD试剂添加至879 μ l质粒溶液(0.020 μ g/ μ l在OptiMEM中(Life Technologies的Gibco)),随后在RT下温育10分钟。然后将复合物溶液

添加至细胞中并且在37°C下温育过夜(o/n)。收集病毒上清液,并用0.45μM注射器过滤器过滤以除去细胞碎片。由pMSCV-EV和pMSCV-NICD制备病毒上清液。逆转录病毒载体含有能够非帽依赖性翻译(cap-independent translation)的IRES序列和Thy1.1(CD90.1)选择标志物,该标志物用于正转导选择。在24孔板中,在添加10μg/ml聚凝胺(Merck)的条件下使用病毒感染从OT-1小鼠纯化的激活的CD8⁺T细胞(1x10⁶个细胞/孔)。在RT下将细胞以2000RPM旋转90分钟,随后在37°C和5%CO₂下温育4小时。

[0134] 转染HEK293T细胞。在6孔板中使用Fugene HD试剂遵循制造商的说明用CNR-pHEFTIG或pHEFTIG空载体转染细胞。48小时后,通过流式细胞术分析表达。

[0135] CD8⁺T细胞激活和再刺激。为了有效地激活T细胞,使用编码OVA257-264(SIINFEKL)肽的工程化的APC细胞系MEC.B7.SigOVA(SAMBcd8+OK)。在CD8⁺T细胞纯化后,在24孔板中将10⁶个CD8⁺T细胞与10⁵个SAMBOK细胞共培养24小时。然后收集细胞并进行转导。将细胞保持在±1.5x10⁶个细胞/ml的细胞密度下直到再刺激。转导五天后,96平底孔板中将300,000个CD8⁺T细胞与50,000个B16-F10/B16-OVA共培养(图5)。每24小时,从粘附的B16细胞中取出T细胞,并接种到新的B16细胞中。每个所需的再刺激时间点四小时前,加入布雷菲德菌素A(1000x, Invitrogen, USA)。通过流式细胞术评估细胞因子的产生和抑制性受体的表达。

[0136] 流式细胞术和抗体。所有样品均在BD FACSymphony A5(BD Biosciences)上测量。在流式细胞术测量之前,将细胞进行细胞外染色(在4°C下在含有1.5%FCS的PBS中)并且使用Cytotfix/Cytoperm(BD Pharmingen)进行固定和透化。然后将细胞进行细胞内染色(在4°C下在1X PermWash中)。将与人类IgG1 Fc部分融合的人类CD19蛋白(R&D Systems)用于检测CNR的表面表达。然后使用荧光标记的抗人类抗体(Invitrogen)检测hCD19-Ig融合蛋白。

[0137] 参考文献

[0138] • Amsen, D., Blander, J.M., Lee, G.R., Tanigaki, K., Honjo, T., and Flavell, R.A. (2004) Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell* 117, 515-526

[0139] • Amsen, D., Antov, A., Jankovic, D., Sher, A., Radtke, F., Souabni, A., Busslinger, M., McCright, B., Gridley, T., and Flavell, R.A. (2007) Direct regulation of Gata3 expression determines the T helper differentiation potential of Notch. *Immunity* 27, 89-99

[0140] • Anders, S., McCarthy, D.J., Chen, Y., Okoniewski, M., Smyth, G.K., Huber, W., and Robinson, M.D. (2013) Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor. *Nat Protoc* 8, 1765-1786

[0141] • Backer, R.A., Helbig, C., Gentek, R., Kent, A., Laidlaw, B.J., Dominguez, C.X., de Souza, Y.S., van Trierum, S.E., van Beek, R., Rimmelzwaan, G.F., ten Brinke, A., Willemsen, A.M., van Kampen, A.H., Kaeck, S.M., Blander, J.M., van Gisbergen, K., and Amsen, D. (2014) A central role for Notch in effector CD8(+) T cell differentiation. *Nat Immunol* 15, 1143-1151

[0142] • Belz, G.T., Xie, W., Altman, J.D., and Doherty, P.C. (2000) A previously unrecognized H-2D(b)-restricted peptide prominent in the primary influenza A

virus-specific CD8(+) T-cell response is much less apparent following secondary challenge. *J Virol* 74,3486-3493

[0143] • Gentek R, Munneke JM, Helbig C, Blom B, Hazenberg MD, Spits H, Amsen D. Modulation of Signal Strength Switches Notch from an Inducer of T Cells to an Inducer of ILC2. *Front Immunol*. 2013 Oct 22;4:334.

[0144] • Helbig, C., Gentek, R., Backer, R.A., de Souza, Y., Derks, I.A., Eldering, E., Wagner, K., Jankovic, D., Gridley, T., Moerland, P.D., Flavell, R.A., and Amsen, D. (2012) Notch controls the magnitude of T helper cell responses by promoting cellular longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109,9041-9046

[0145] • Kochenderfer JN. et al. Construction and preclinical evaluation of an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *J Immunother*. 2009 Sep;32(7):689-702.

[0146] • Legrand N. et al. Functional CD47/signal regulatory protein alpha (SIRP α) interaction is required for optimal human T- and natural killer- (NK) cell homeostasis in vivo. *J Immunol* 2009;183:7645-7655

[0147] • Ma, J.S., Kim, J.Y., Kazane, S.A., Choi, S.H., Yun, H.Y., Kim, M.S., Rodgers, D.T., Pugh, H.M., Singer, O., Sun, S.B., Fonslow, B.R., Kochenderfer, J.N., Wright, T.M., Schultz, P.G., Young, T.S., Kim, C.H., and Cao, Y. (2016) Versatile strategy for controlling the specificity and activity of engineered T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E450-458

[0148] • Mueller, S.N., Langley, W.A., Carnero, E., Garcia-Sastre, A., and Ahmed, R. (2010) Immunization with live attenuated influenza viruses that express altered NS1 proteins results in potent and protective memory CD8+ T-cell responses. *J Virol* 84, 1847-1855

[0149] • Morsut, L., Roybal, K.T., Xiong, X., Gordley, R.M., Coyle, S.M., Thomson, M., and Lim, W.A. (2016) Engineering Customized Cell Sensing and Response Behaviors Using Synthetic Notch Receptors. *Cell* 164, 780-791

[0150] • Nam, Y., Sliz, P., Pear, W.S., Aster, J.C., and Blacklow, S.C. (2007) Cooperative assembly of higher-order Notch complexes functions as a switch to induce transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 2103-2108.

[0151] • Nicholson, I.C. et al. Construction and characterisation of a functional CD19 specific single chain Fv fragment for immunotherapy of B lineage leukaemia and lymphoma. *Molecular Immunology* 1997;34:1157-1165

[0152] • Palmer, D.F., Dowdle, W.R., Coleman, M.T., and Schild, G.C. (1975) Advanced laboratory techniques for influenza diagnosis: procedural guide. Haemagglutination inhibition test. in Atlanta: US Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, US Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service. pp 25-62

- [0153] • Rodgers, D.T., Mazagova, M., Hampton, E.N., Cao, Y., Ramadoss, N.S., Hardy, I.R., Schulman, A., Du, J., Wang, F., Singer, O., Ma, J., Nunez, V., Shen, J., Woods, A.K., Wright, T.M., Schultz, P.G., Kim, C.H., and Young, T.S. (2016) Switch-mediated activation and retargeting of CAR-T cells for B-cell malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E459-468
- [0154] • Roybal, K.T., Rupp, L.J., Morsut, L., Walker, W.J., McNally, K.A., Park, J.S., and Lim, W.A. (2016) Precision Tumor Recognition by T Cells With Combinatorial Antigen-Sensing Circuits. *Cell* 164, 770-779
- [0155] • Topham, D.J., Castrucci, M.R., Wingo, F.S., Belz, G.T., and Doherty, P.C. (2001) The role of antigen in the localization of naive, acutely activated, and memory CD8(+) T cells to the lung during influenza pneumonia. *J Immunol* 167, 6983-6990
- [0156] • Van der Sluijs, K.F., van Elden, L.J., Nijhuis, M., Schuurman, R., Pater, J.M., Florquin, S., Goldman, M., Jansen, H.M., Lutter, R., and van der Poll, T. (2004) IL-10 is an important mediator of the enhanced susceptibility to pneumococcal pneumonia after influenza infection. *J Immunol* 172, 7603-7609
- [0157] • van Lent AU, et al. IL-7 enhances thymic human T cell development in "human immune system" Rag2^{-/-}IL-2R^{gammac}^{-/-} mice without affecting peripheral T cell homeostasis. *J Immunol*. 2009; 183:7645-7655
- [0158] • Wherry, E.J., and Kurachi, M. (2015) Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* 15, 486-499
- [0159] • Young, M.D., Wakefield, M.J., Smyth, G.K., and Oshlack, A. (2010) Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome biology* 11, R14.

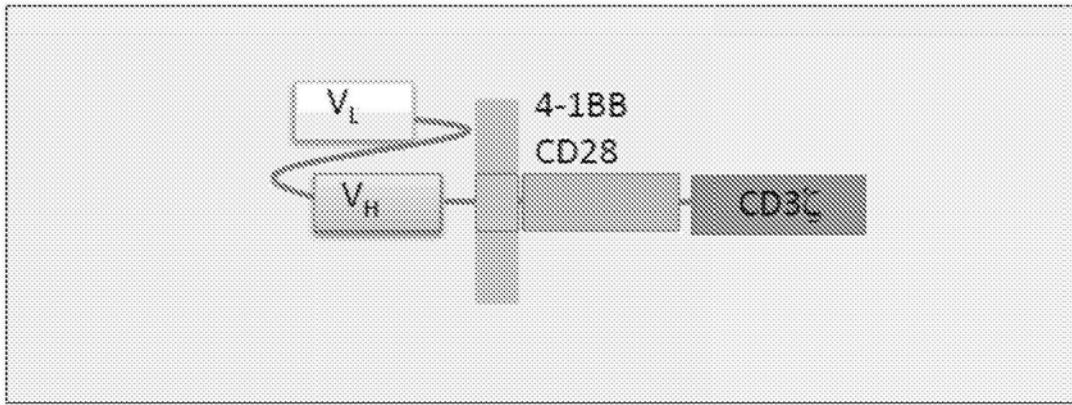


图1

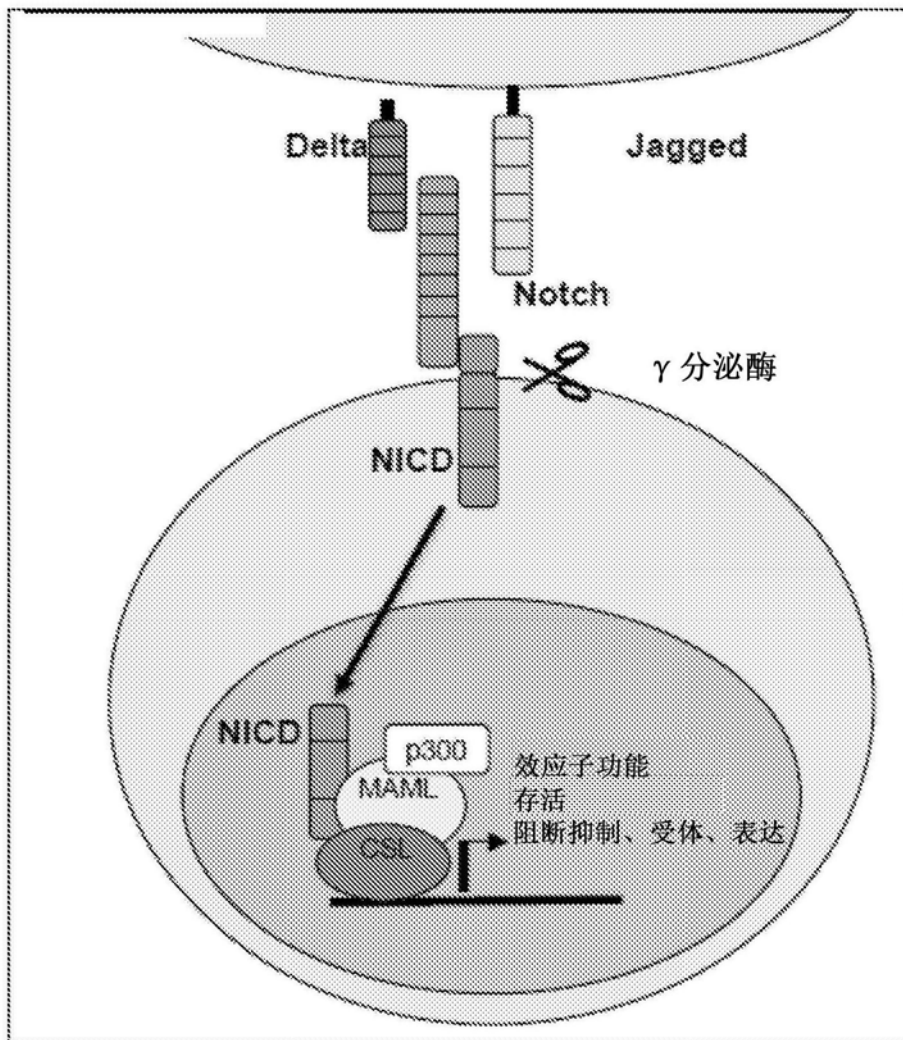


图2

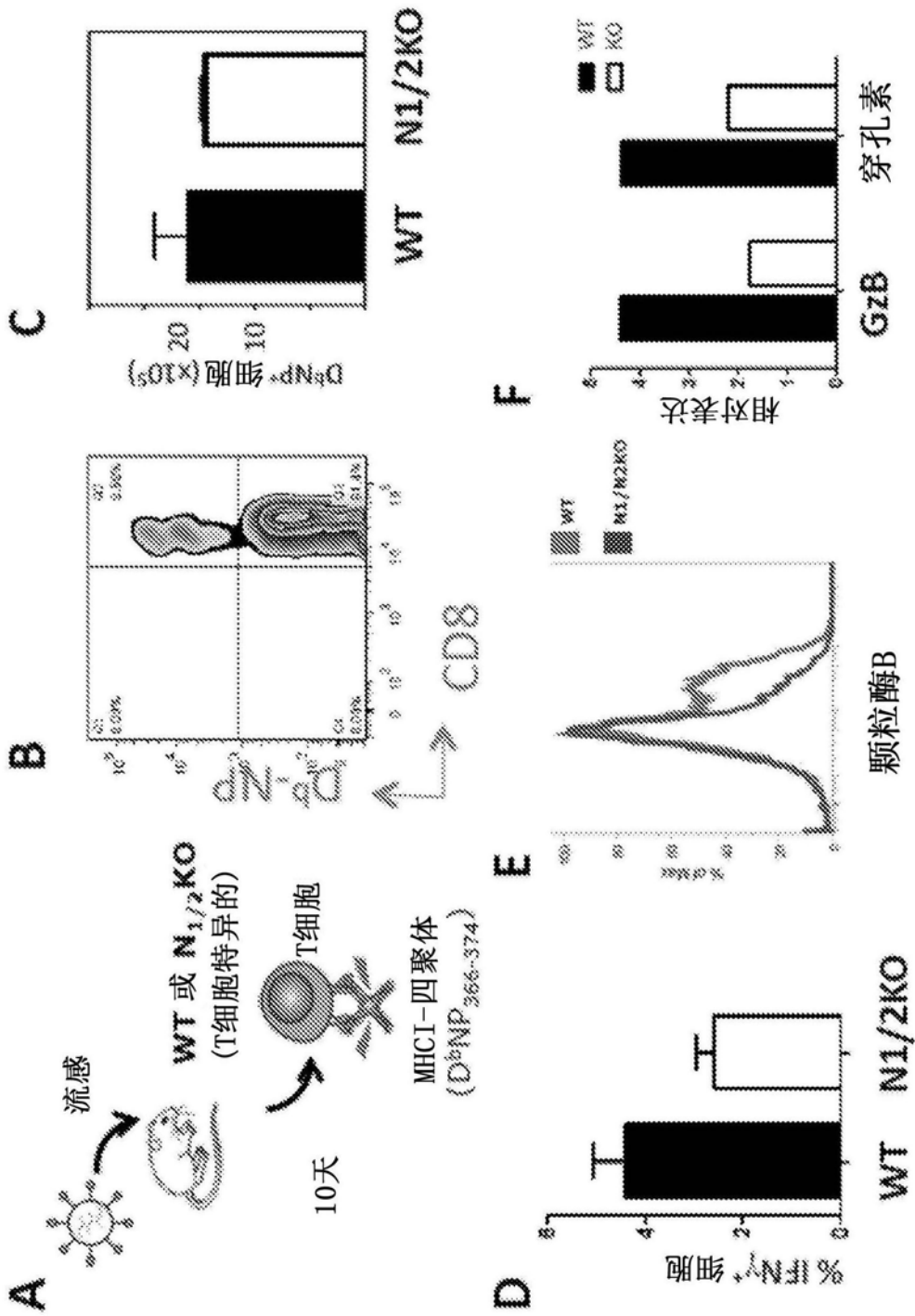


图3

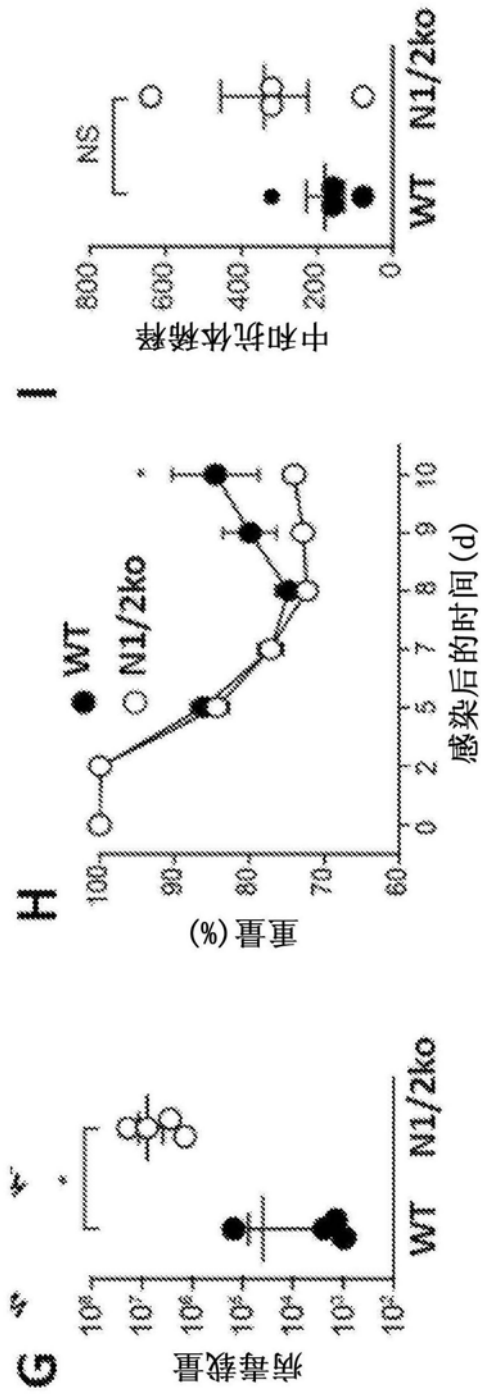


图3续

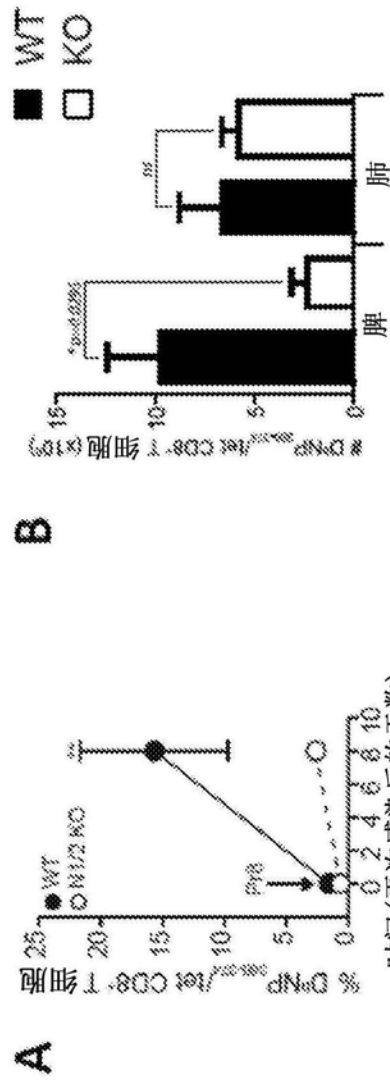


图4

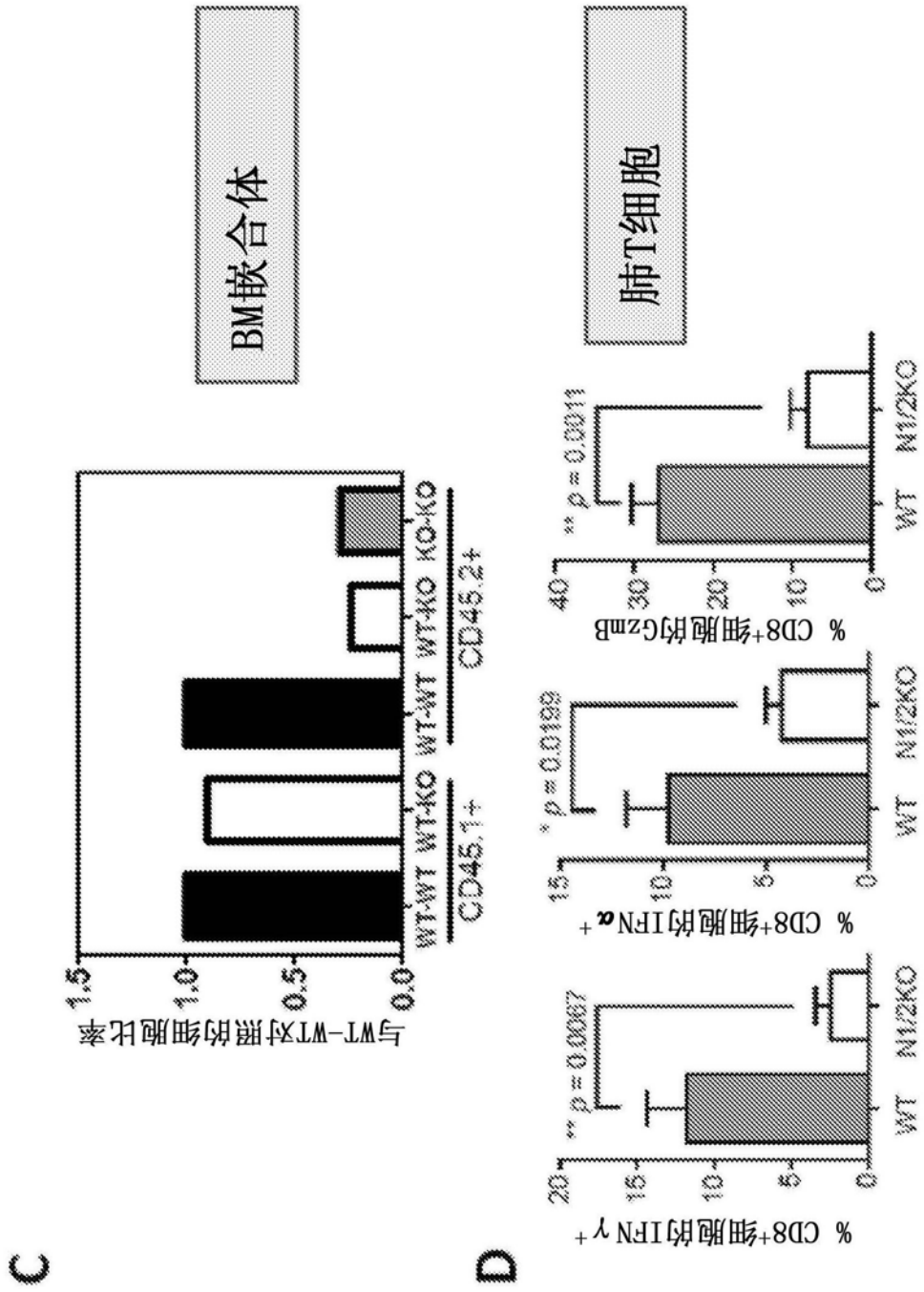


图4续

类别	url	过度代表的p值	suminCq	padj	生物体c7
1					
2	GO:0002402 ACUTE VS CHRONIC CD8+ TCELL UP	1.39E-37	195	2.69E-36	小鼠
3	GO:00678 K70 LOW VS HIGH EFF CD8 TCELL UP	7.71E-40	188	7.27E-37	小鼠
4	GO:008474 NAIVE VS MEMORY CD8+ TCELL DN	1.67E-33	233	1.89E-30	小鼠
5	KAECH NAIVE VS DAVES EFF CD8+ TCELL DN	5.39E-32	187	2.53E-29	小鼠
6	KAECH NAIVE VS MEMORY CD8+ TCELL DN	5.24E-30	190	1.93E-27	小鼠
7	GO:00650 NAIVE VS MEMORY CD4+ TCELL DN	6.45E-24	190	3.65E-25	小鼠
8	GO:00062 ACUTE VS CHRONIC CD8+ TCELL UP	1.23E-27	195	3.41E-25	小鼠
9	GO:00764 NKCELL VS LYMPHOCYTE UP	4.98E-27	190	5.95E-25	小鼠
10	GO:00650 NAIVE VS EFF CD8+ TCELL DN	5.43E-27	192	2.89E-24	小鼠
11	KAECH NAIVE VS DAVES EFF CD8+ TCELL DN	1.09E-25	197	2.09E-23	小鼠
12	GO:00023 SP1 VS SP4 LYMPHOCYTE DN	2.83E-2	194	3.53E-20	小鼠
13	GO:00023 SP1 VS SP4 LYMPHOCYTE DN	5.47E-2	201	3.51E-17	小鼠
14	GO:006495 NAIVE VS MEMORY CD8+ TCELL DN	2.49E-1	177	2.57E-17	小鼠
15	GO:0014350 B.200 KO VS WFT TBEG DN	2.79E-1	181	1.13E-18	小鼠
16	GO:007887 TBEG VS TBEGG TB TH	1.43E-1	196	1.81E-15	小鼠

A

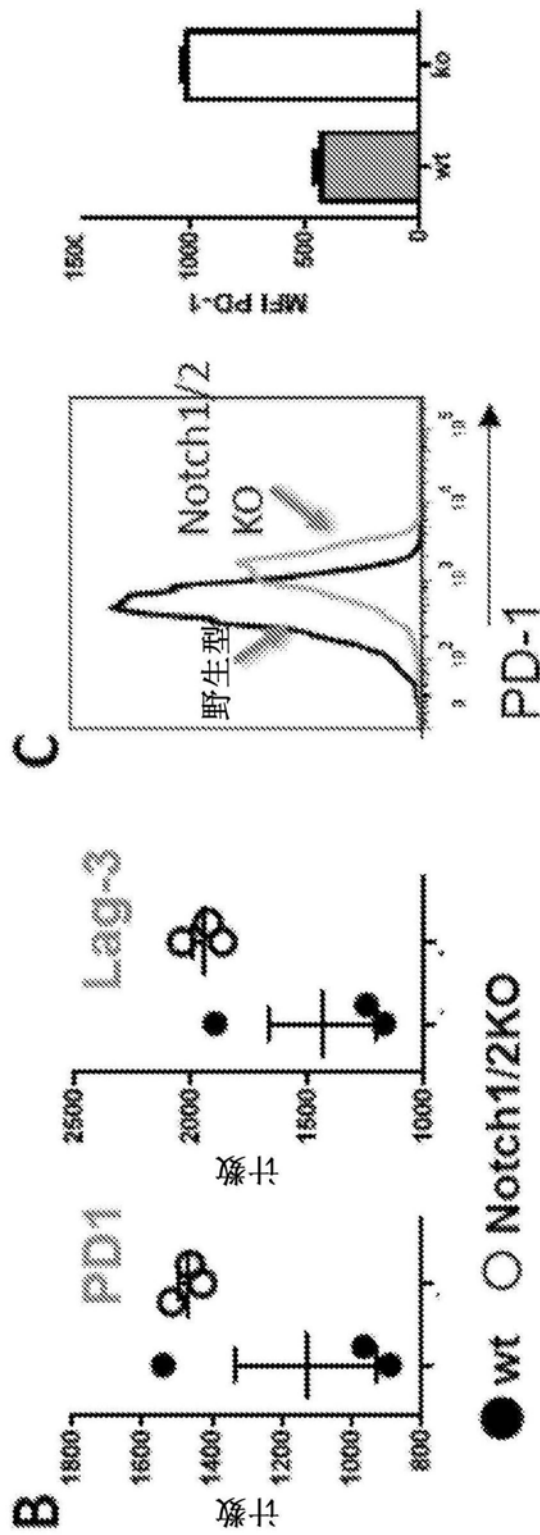


图5

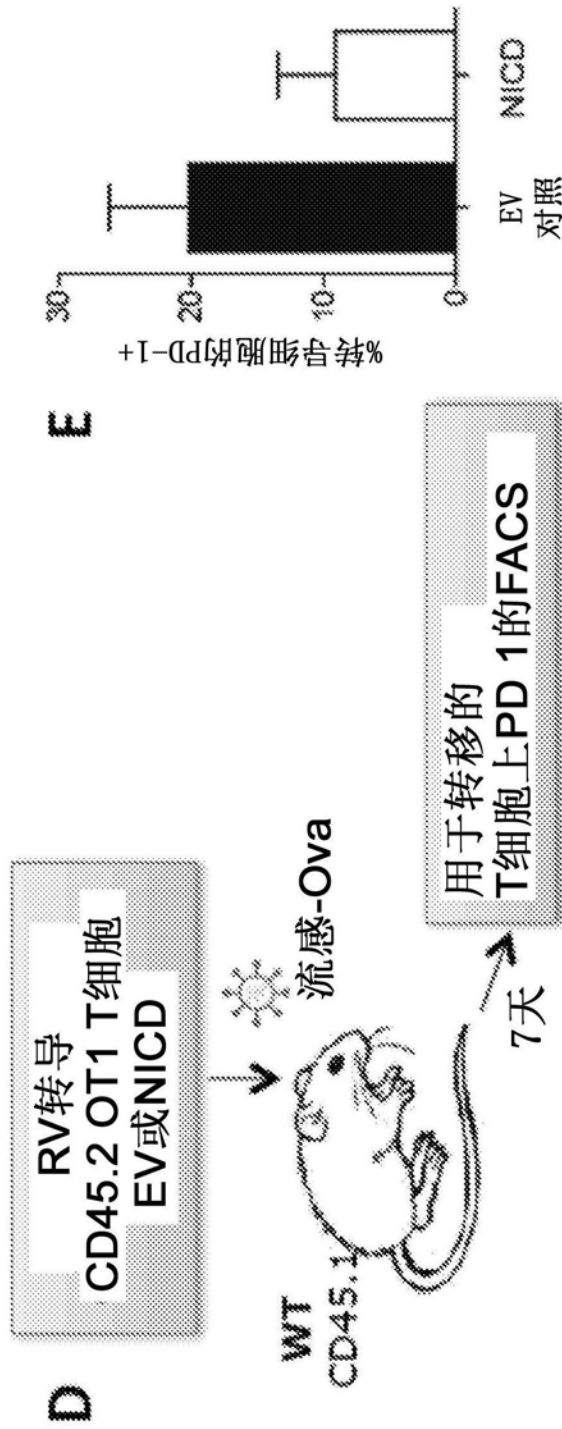


图5续

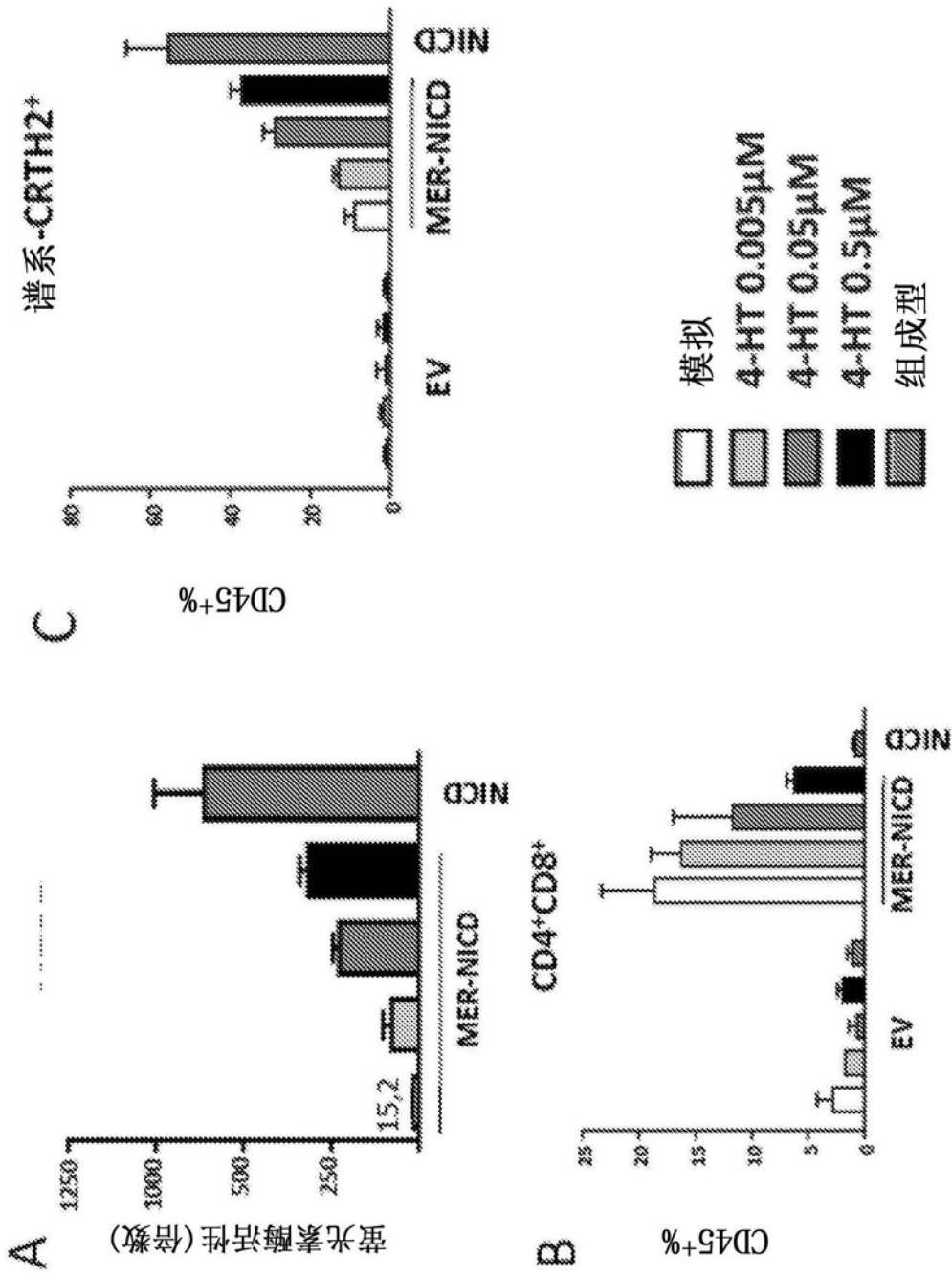


图9

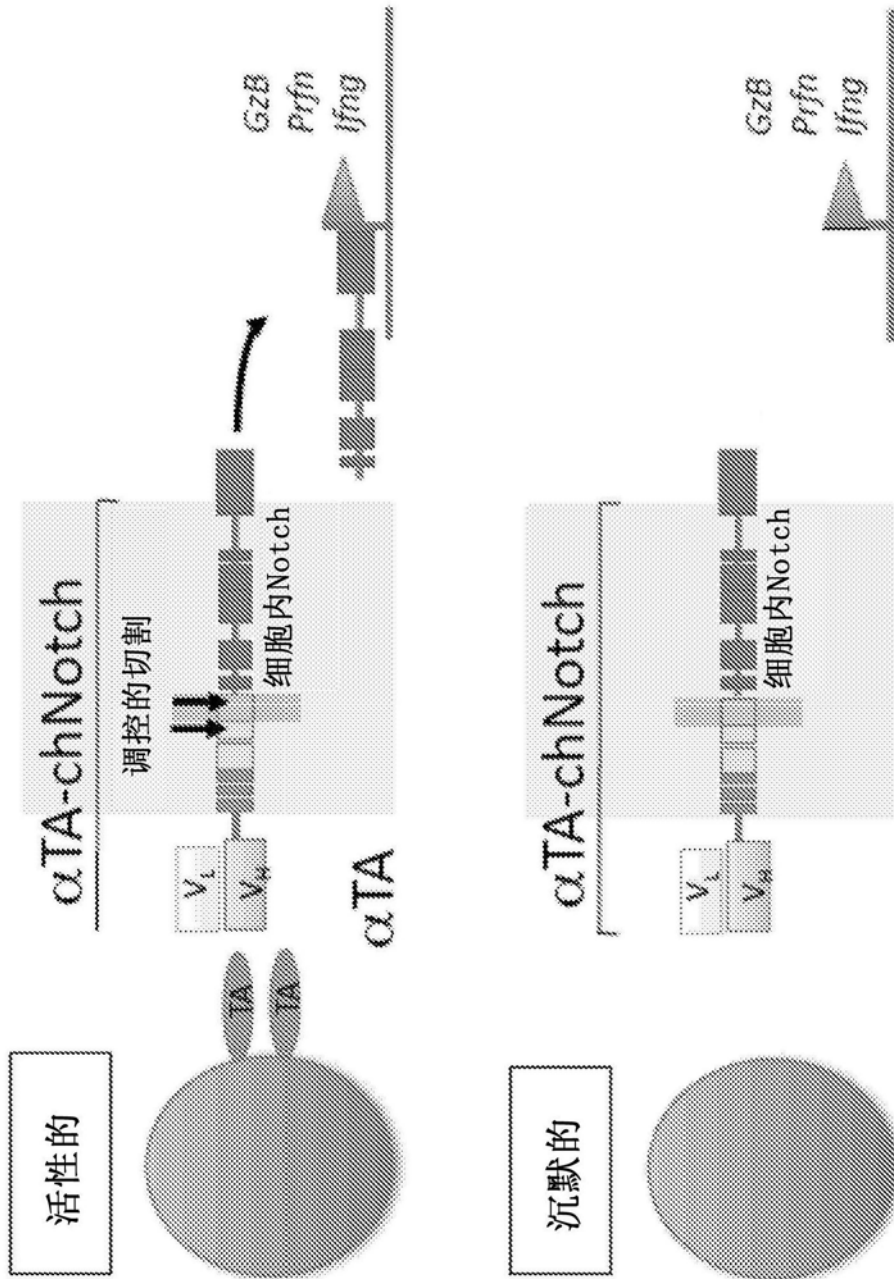


图7

```

1   mppllapllc lallpalaar gprcsqpget clnggkceaa ngteacvcgg afvgprcqdp
61  npclstpckn agtchvvdrr gvadyacsca lgfsgplclt pldnacltnp crnggtcdll
121 tlteykrccp pgwsgkscqq adpcasnpca nggqclpfea syichcpps f hgptcrqdv n
181 ecgqkpglcr hgg tchnevg syrcvrath tgpncerpyv pcspspcng g tcrptgdvt
241 hecaclp gft gqnceenidd cp gnckngg acvdgvntyn crcppewtgq yctedvdecq
301 lmpnacqngg tchnthggyn cvcvngwtge dcseniddca saacfhgac hdrvasfyce
361 cphgrtgllc hlndacisnp cnegsnctdn pvngkaictc psgytpacs qdvdecslga
421 npcehagkci ntlgsfecqc lqgytgprce idvnecvsnp cqndatcldq igefqciemp
481 gyegvhcevn tdecasspcl hngrcl dkin efqceceptgf tghlcqydvd ecastpckng
541 akcldgpnty tcvctegytg thcevdidec dpdpchygsc kdgvatftcl crpgygtghc
601 etninecssq pcrhggtcqd rdnaylcfcl kgttgpncei nl ddcasspc dsgtcl dkid
661 gyecacepgy tgs mcninid ecagnpchn g gtcedgingf tcrcepyhd ptclsevne c
721 nsnpcvhgac rds lngykcd cdp gws gtn c din ncesn pcvnggtckd mtsgyvctcr
781 egfsgpncqt ninecasnpc lnqgtciddv agykcncllp ytgatcevv l apcasporn
841 ggecrqsedy esfscvcptg wgggtcevd i necv l spcrh gascqnthgg yrchcagys
901 grncetdidd crpnpcnng sctdgintaf cdclpgfrgt fceedineca sdpcrnganc
961 tdcvdsytct cpagfsgihc enntpdctes scfnggtcvd ginsftclcp pgftgsycqh
1021 dvnecsqpc lhggtcq dgc gsyrc t cpqg ytgpncqnlv hwc dsspckn ggkcowqhtq
1081 yrcecpsgwt glycdvpsvs cevaaqrqgv dvarlcqhgg lcvdagnthh crcqagyts
1141 ycedlvdecs pspcngatc tdylggysck cvagyhg vnc seeideclsh pcqnggtcl d
1201 lpntykscsp rgtqgvhcei nvddcnppvd pvsrspkcf n ngtcvdqvgg ysctcppgfv
1261 gercegdvne clsnpcdarg tqncvqrvnd fhcecraght grrcesving ck gkpc kngg
1321 tcavasntar gfickcpagf egatcendar tcgslrclng gtcisgprsp tclclgpftg
1381 pecqfpassp clggnp cynq gtceptsesp fyrclcpakf ngllchily sfgggagr di
1441 ppplieeace lpecqedagn kvcs lqcnh acgwdggdcs lnfn dpwkn tqlsqwkyf
1501 sdghcdsqcn sagclfdgfd cqraegqcn lydqyckdhf sdghcdqcn saecewdgl d
1561 caehvperla agtlvvvvlm ppeqlrnsf hflrelsvl ht n v fkrda hqqmifpyy
1621 greeelrkhp ikraaegwaa pdallgqvka sllpggseg g rrrreldpmd vrgsivylei
1681 dnrqcvqass qcfqsatdva aflgalaslg slnipykiea vqsetveppp paqlhfmyva
1741 aaafvllffv gcgvllsrkr rrqhglwfp egfkvseask kkrreplged svglkplkna
1801 sdgalmdnq newgdedlet kkfrfeepv lpdlldqtdh r qwtqghlda adlrmsamap
1861 tppqgevdad cmdvnvrgpd gftplmiasc sgggletgns eeedapavi sdfiyqgasl
1921 hnqtdrtget alhlaarysr sdaakrlea sadaniqdnm grtplhaavs adaqgvf qil
1981 irnratdlda rmhdgttpli laarlavegm ledlinshad vnavddl gks alhwaavnn
2041 vdaavvllkn gankdmqnr eetplflaar egsetakvl ldhfanrdit dhmdrlprdi
2101 aqermhdiv rlldeynlvr spqlhgapl g tptlspplc spngylgslk pgvqgkvrk
2161 psskglacgs keakdlkarr kksqdgkcl ldssgmlspv dslesphgyl sdvasppll p
2221 spfqqspsvp lnhlp gmpdt hlgighlnva akpemaalgg ggrlafetgp prlshlpvas
2281 gtstvl gsss ggalnftvgg stslngqcew lsrlqsgmvp nqynplrgsv apgpplstqap
2341 slqhgvmvpl hsslaasals qmmsyqglps trlatqphlv qtqqvqpqn l qmqqqnlqpa
2401 niqqqslq pppppqphlg vssaasghlg rsflsgepsq advqplg pss lavhtilp qe
2461 spalptslps slvppvtaaq fltpps qhsy sspvdntpsh qlqvpehpfl tpspespdqw
2521 ssspsphnvs dwsegvsspp tsmqsiari peafk

```

图8

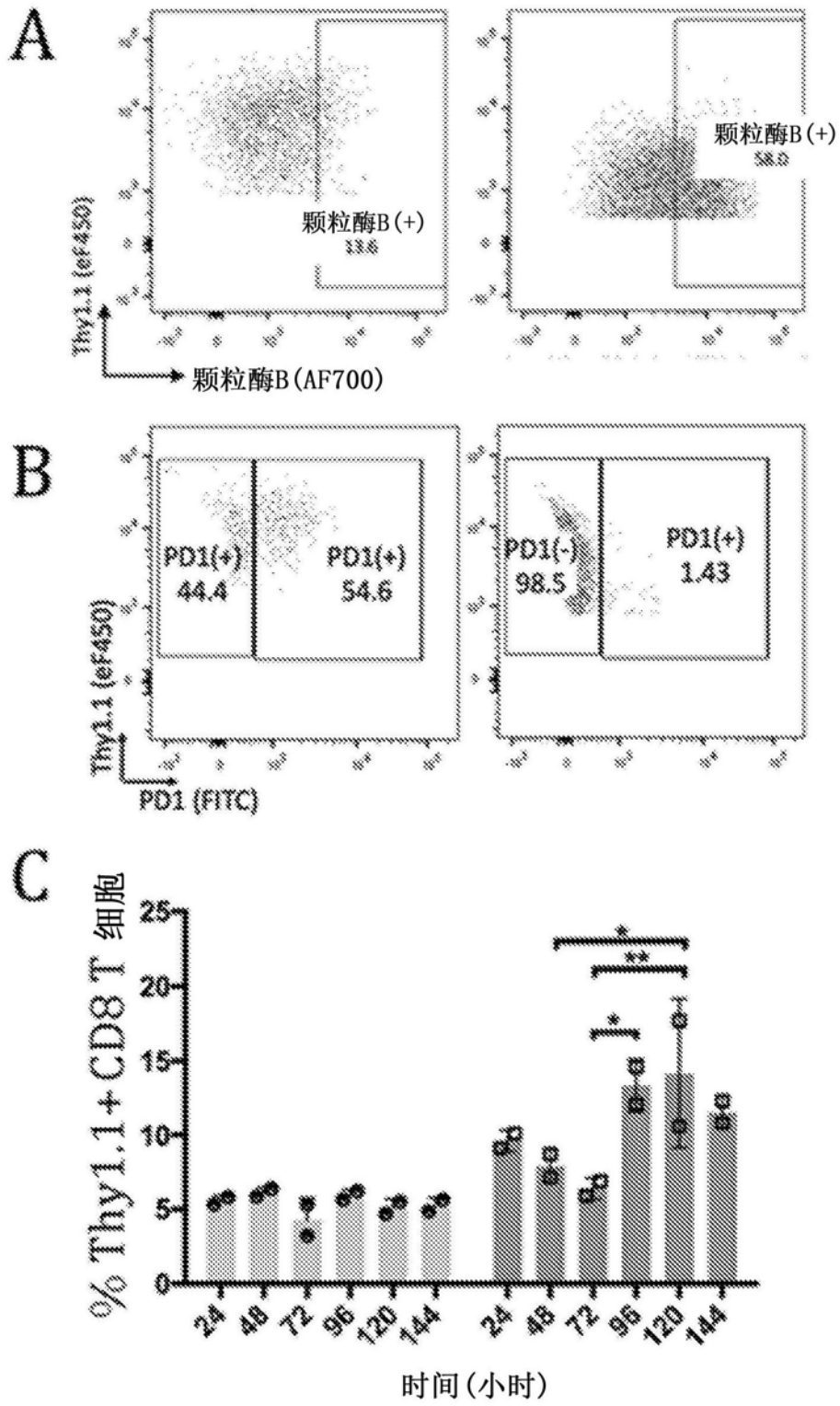


图9

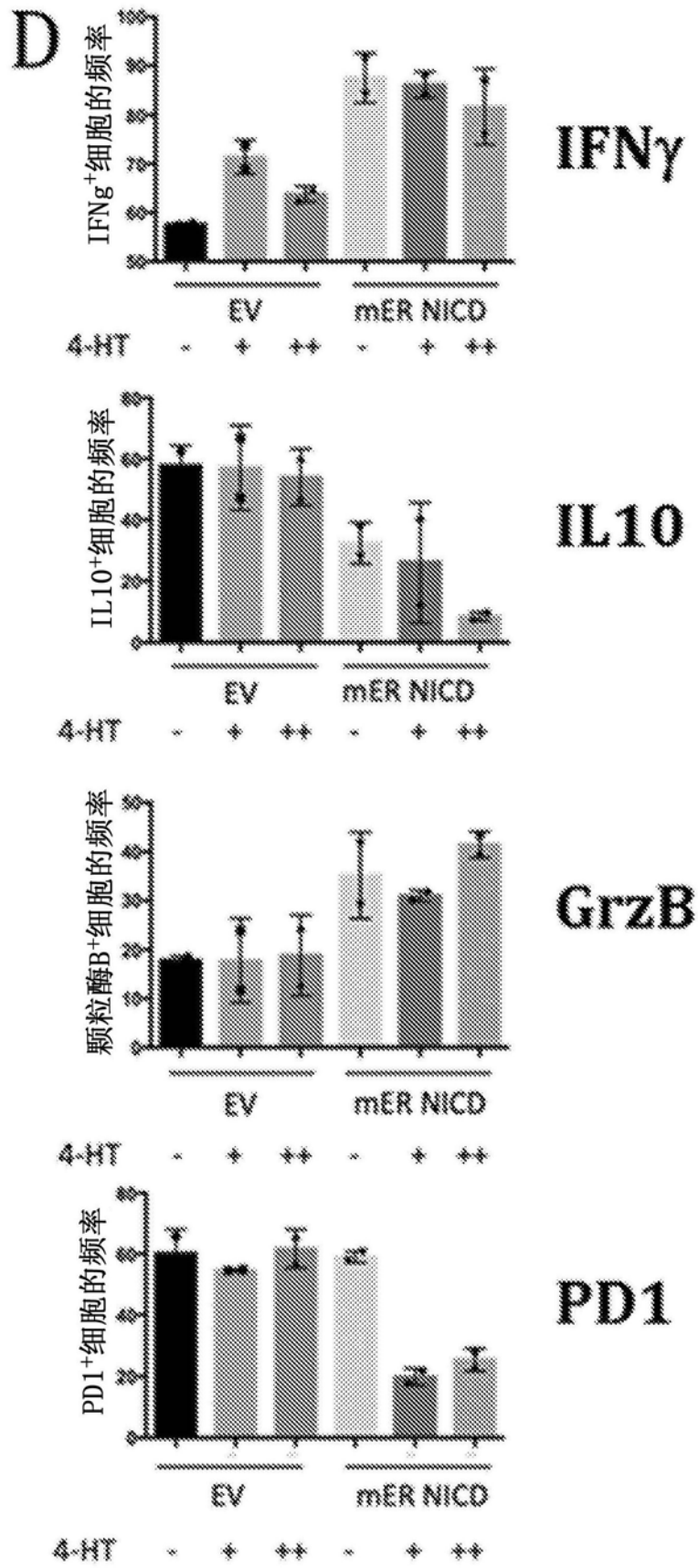


图9续

A

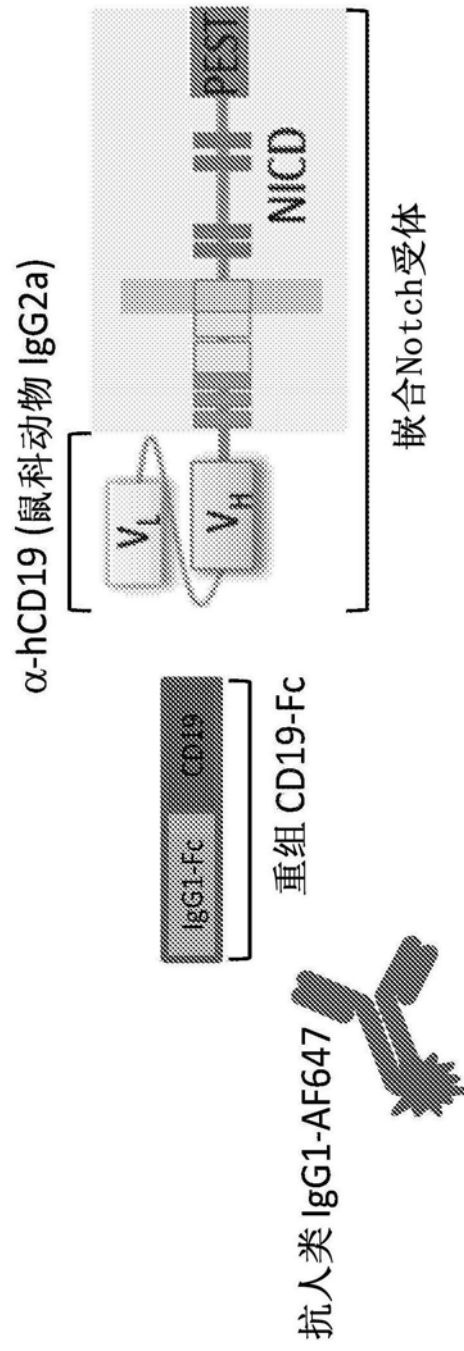


图10

CD19-Ig

B

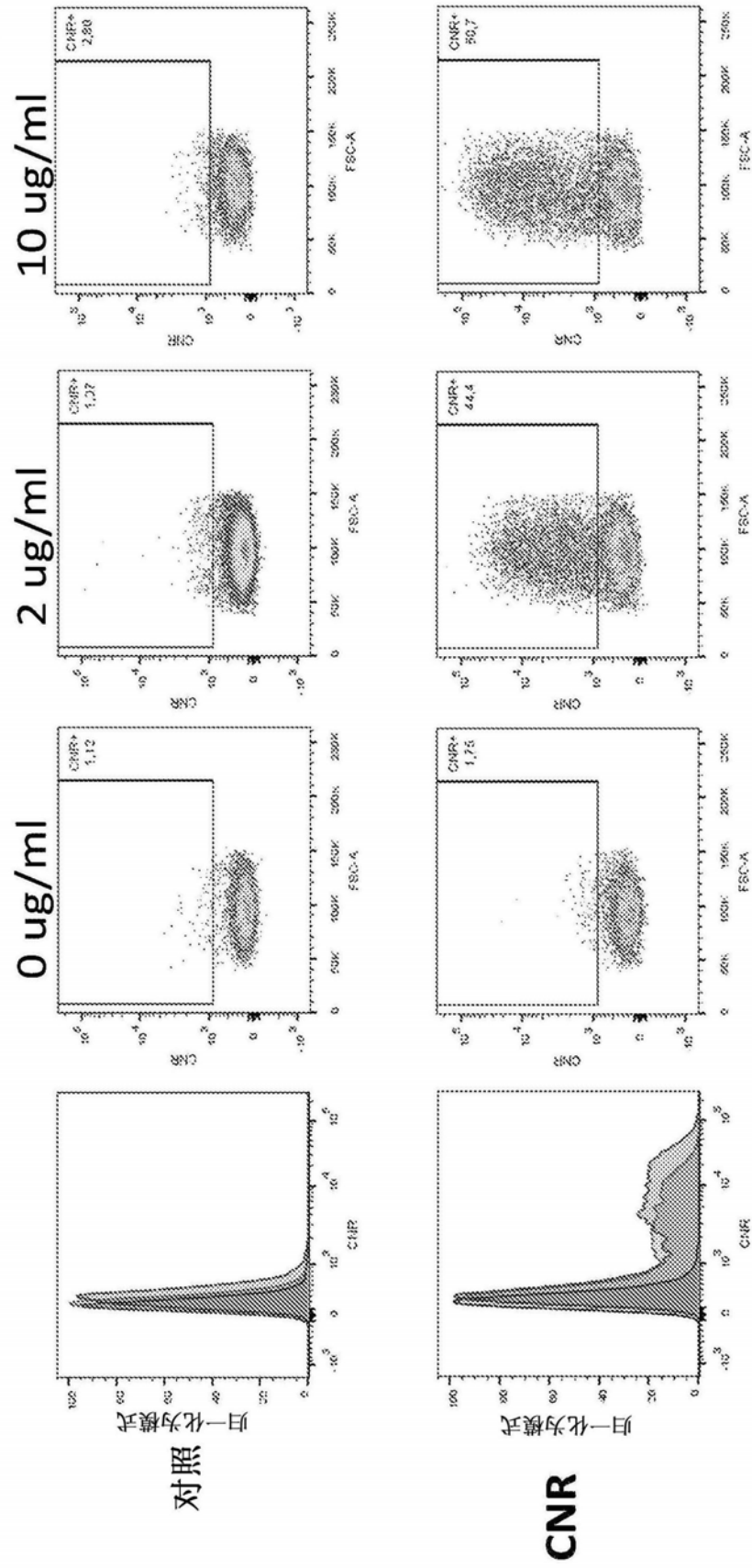


图10续