



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117794554 A

(43) 申请公布日 2024. 03. 29

(21) 申请号 202280054544.9

(22) 申请日 2022.08.05

(30) 优先权数据

63/230,225 2021.08.06 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.02.04

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/074589 2022.08.05

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/015283 EN 2023.02.09

(71) 申请人 细胞基因公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 C·W·卡洛尔 L·A·达戈斯蒂诺

刘海波 V·山穆加孙达拉姆

B·巴拉加斯

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.

A61K 35/17 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07D 401/14 (2006.01)

C07D 417/14 (2006.01)

C07D 471/04 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01)

C12N 5/0783 (2006.01)

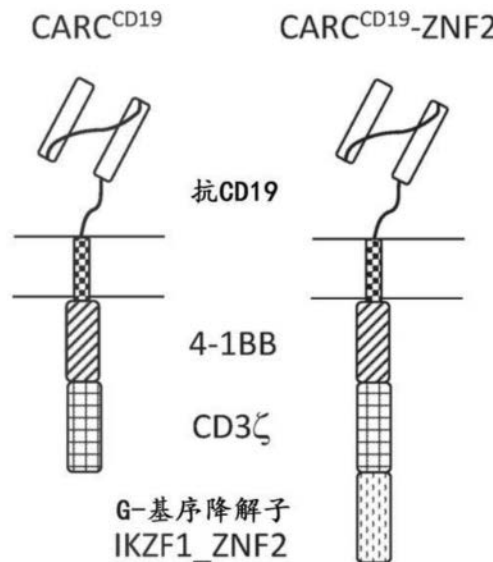
权利要求书8页 说明书28页  
序列表(电子公布) 附图39页

(54) 发明名称

用于选择性降解工程化蛋白质的组合物和方法

(57) 摘要

本发明涉及包含降解域的工程化多肽、化合物、组合物,及其制备方法,以及用于降解细胞中的工程化蛋白质的用途。所述降解域包含序列FCX1X2CGX3X4,优选FCNQCGAS。所述多肽优选包含此类降解域或降解子的CAR,且通过降解剂进行降解。所述降解剂是结合所述降解域且还结合cereblon的小分子。



1. 一种包含降解域的工程化多肽,其中该降解域包含氨基酸序列FCX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>CGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub> (SEQ ID NO:1),其中:

X<sub>1</sub>选自天冬酰胺、天冬氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、甲硫氨酸、组氨酸、色氨酸、异亮氨酸、精氨酸、亮氨酸、缬氨酸、苏氨酸及苯丙氨酸,

X<sub>2</sub>选自谷氨酰胺、精氨酸、组氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、异亮氨酸、缬氨酸及甲硫氨酸,

X<sub>3</sub>选自丙氨酸、丝氨酸、半胱氨酸、精氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸及甘氨酸,及

X<sub>4</sub>选自丝氨酸、甲硫氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、组氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、苯丙氨酸及色氨酸。

2. 如权利要求1的工程化多肽,其中:

X<sub>1</sub>选自天冬酰胺、谷氨酰胺、甲硫氨酸、组氨酸、色氨酸、异亮氨酸、精氨酸、亮氨酸、缬氨酸、苏氨酸及苯丙氨酸,

X<sub>2</sub>选自谷氨酰胺、精氨酸、组氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、异亮氨酸及甲硫氨酸,

X<sub>3</sub>选自丙氨酸、丝氨酸、半胱氨酸及甘氨酸,及

X<sub>4</sub>选自丝氨酸、甲硫氨酸、组氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、苯丙氨酸及色氨酸。

3. 如权利要求1或权利要求2的工程化多肽,其中该降解域包含氨基酸序列FCX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>CGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub> (SEQ ID NO:2),其中:

X<sub>5</sub>选自苯丙氨酸、色氨酸、甲硫氨酸、精氨酸、组氨酸、亮氨酸、酪氨酸、半胱氨酸及谷氨酰胺。

4. 如权利要求3的工程化多肽,其中X<sub>5</sub>选自苯丙氨酸、色氨酸、甲硫氨酸、精氨酸、组氨酸、亮氨酸、酪氨酸及谷氨酰胺。

5. 如权利要求3或权利要求4的工程化多肽,其中X<sub>5</sub>选自苯丙氨酸、色氨酸、甲硫氨酸、亮氨酸、酪氨酸及谷氨酰胺。

6. 如权利要求3的工程化多肽,其中X<sub>5</sub>为苯丙氨酸。

7. 如权利要求1至6中任一项的工程化多肽,其中X<sub>1</sub>为天冬酰胺。

8. 如权利要求1至7中任一项的工程化多肽,其中X<sub>2</sub>为谷氨酰胺。

9. 如权利要求1至8中任一项的工程化多肽,其中X<sub>3</sub>为丙氨酸或丝氨酸。

10. 如权利要求9的工程化多肽,其中X<sub>3</sub>为丙氨酸。

11. 如权利要求1至10中任一项的工程化多肽,其中X<sub>4</sub>为丝氨酸。

12. 如权利要求1的工程化多肽,其中该降解域包含氨基酸序列FCNQCGAS (SEQ ID NO:3)。

13. 如权利要求1至12中任一项的工程化多肽,其中该降解域包含至少一个锌指域。

14. 如权利要求13的工程化多肽,其中该降解域包含两个锌指域。

15. 如权利要求1至13中任一项的工程化多肽,其中至少一个或各锌指域独立地包含与选自SEQ ID NO:20-47及58的氨基酸序列至少85%、至少90%或至少95%一致的氨基酸序列。

16. 如权利要求1至15中任一项的工程化多肽,其中该降解域包含与人类Ikaros、Helios、Aiolos或Eos的锌指2 (ZNF2) 至少85%、至少90%或至少95%一致的氨基酸序列。

17. 如权利要求16的工程化多肽,其中该降解域包含第二锌指域,其中该第二锌指域与人类Ikaros、Helios、Aiolos或Eos的锌指1(ZNF1)或ZNF3至少85%、至少90%或至少95%一致。

18. 如权利要求1至17中任一项的工程化多肽,其中该降解域包含与人类Ikaros、Helios、Aiolos或Eos的锌指2(ZNF2)及锌指3(ZNF3)至少85%、至少90%或至少95%一致的氨基酸序列。

19. 如权利要求1至18中任一项的工程化多肽,其中该降解域包含与选自SEQ ID NO: 21、27、32及38的氨基酸序列至少85%、至少90%或至少95%一致的氨基酸序列。

20. 如权利要求1至19中任一项的工程化多肽,其中该降解域包含与选自SEQ ID NO: 15、60、61及62的氨基酸序列至少85%、至少90%或至少95%一致的氨基酸序列。

21. 如权利要求1至20中任一项的工程化多肽,其中该降解域包含与选自SEQ ID NO: 6、63、64及65的氨基酸序列至少85%、至少90%或至少95%一致的氨基酸序列。

22. 如权利要求1至21中任一项的工程化多肽,其中该降解域包含选自以下的氨基酸序列:

GERPFFCX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>CGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>TQKGNLLRHIKLSGKPFKCHLCNYACRRRDALTGHLRTHS (SEQ ID NO: 5);

GERPFFCX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>CGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>TQKGNLLRHIKLSGKPFKCPFCYACRRRDALTGHLRTHS (SEQ ID NO: 66);

GERPFFCX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>CGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>TQKGNLLRHIKLHTGKPFKCHLCNYACQRRDALTGHLRTHS (SEQ ID NO: 67);及

GERPFFCX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>CGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>TQKGNLLRHIKLSGKPFKCPFCNYACRRRDALTGHLRTHS (SEQ ID NO: 68)。

23. 如权利要求1至22中任一项的工程化多肽,其中该降解域包含选自以下的氨基酸序列:

GERPFFCNQCGASFTQKGNLLRHIKLSGKPFKCHLCNYACRRRDALTGHLRTHS (SEQ ID NO: 7);

GERPFFCNQCGASFTQKGNLLRHIKLSGKPFKCPFCYACRRRDALTGHLRTHS (SEQ ID NO: 69);

GERPFFCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHTGKPFKCHLCNYACQRRDALTGHLRTHS (SEQ ID NO: 70);及

GERPFFCNQCGASFTQKGNLLRHIKLSGKPFKCPFCNYACRRRDALTGHLRTHS (SEQ ID NO: 71)。

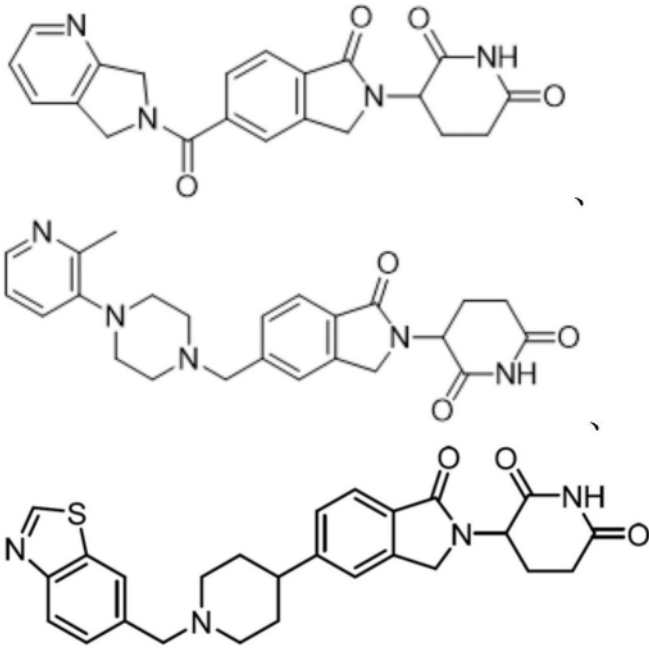
24. 如权利要求1至23中任一项的工程化多肽,其中该工程化多肽在降解剂存在下泛素化,其中该降解剂是结合至该降解域的小分子。

25. 如权利要求1至24中任一项的工程化多肽,其中该工程多肽在降解剂存在下降解,其中该降解剂为结合至该降解域的小分子。

26. 如权利要求24或权利要求25的工程化多肽,其中该降解剂还结合至cereblon。

27. 如权利要求26的工程化多肽,其中该降解剂介导包含该降解域、降解剂及cereblon的复合物。

28. 如权利要求24至27中任一项的工程化多肽,其中该降解剂为选自以下的化合物:



及其互变异构体、其药学上可接受的盐、及其互变异构体的药学上可接受的盐。

29. 如权利要求24至28中任一项的工程化多肽,其中该工程化多肽在该降解剂存在下在细胞中泛素化及/或降解。

30. 如权利要求29的工程化多肽,其中该细胞在体外。

31. 如权利要求29的工程化多肽,其中该细胞在体内。

32. 如权利要求1至31中任一项的工程化多肽,其中该工程化多肽在细胞中基本上为细胞质或细胞核的,或其中该工程化多肽包含跨膜域。

33. 如权利要求1至32中任一项的工程化多肽,其中该降解域融合至内源蛋白或位于该内源蛋白内。

34. 如权利要求33的工程化多肽,其中该内源蛋白为哺乳动物蛋白。

35. 如权利要求33的工程化多肽,其中该内源蛋白为人类蛋白。

36. 如权利要求33至35中任一项的工程化多肽,其中该内源蛋白为PRDM1、TGFB2、CASP8、CBLB、CD5、CISH、CGKA、DGKz、MAP4K1、ARID2、BACH2、CHX37、KLF2、KLF3、KLF6、MAF、SIGLEC9、TOX、ZBTB32、PTPN2、AKT1、PIK3CD、MT1E、MT2A、CSK、ITK、PAG1、PDCD4、ZC3H12A、DNMT1、DNMT3A、PRBM1、STK4、TET2、BNIP3、FAS、CBL、BGAT5、RNF128、STK17B、TRIB1、TXNIP、UBASH3A、BATF、FLI1、IKZF1、IKZF2、IRF4、NFATC1、NR4A1、MAP2K1、MAP2K2、MAP4K4、PPARGC1A、RELB、TMEM173、USP10、MT1A、PP2A家族成员、RASA2、NR4A2、NR4A3、AHR、CD70、LHALS1、SOCS1、SOCS2、SOCS3、TAZ、USP21或YAP1。

37. 如权利要求33至36中任一项的工程化多肽,其中该内源蛋白的生物活性基本上保留在该工程化多肽中。

38. 如权利要求1至37中任一项的工程化多肽,其中该工程化多肽包含跨膜域。

39. 如权利要求38的工程化多肽,其中该跨膜域为选自以下的蛋白质的跨膜域:T细胞受体的 $\alpha$ 链、T细胞受体的 $\beta$ 链、T细胞受体的 $\zeta$ 链、CD28、CD3s、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、ICOS、TIM3、LAB3、TIGIT、PD1或CTLA4。

40. 如权利要求38或权利要求39的工程化多肽,其中该工程化多肽包含细胞外域、跨膜域及细胞内域。

41. 如权利要求40的工程化多肽,其中该细胞外域包含配体、配体结合域或抗原结合域。

42. 如权利要求41的工程化多肽,其中该细胞外域包含抗原结合域。

43. 如权利要求42的工程化多肽,其中该抗原结合域结合癌症抗原。

44. 如权利要求42或权利要求43的工程化多肽,其中该抗原结合域结合选自以下的抗原:4-1BB、5T4、8H9、B7-H6、腺癌抗原、 $\alpha$ -胎蛋白、B细胞成熟抗原(BCMA)、BAFFR、B淋巴瘤细胞、C242抗原、CA9、癌胚抗原、CA-125、碳酸酐酶9(CA-IX)、CCR4、CD3、CD4、CD19、CD20、CD22、CD23(IgE受体)、CD28、CD30(TFRSF8)、CD33、CD38、CD40、CD44v6、CD44v7/8、CD51、CD52、CD56、CD70、CD74、CD80、CD123、CD152、CD171、CD200、CD221、CE7、CEA、C-MET、CLAUDIN6、CLAUDIN18.3、CNT0888、CTLA-4、DRS、EpCAM、ErbB2、ErbB3/4、EGFR、EGFR  $\gamma$  III、EphA2、EGP2、EGP40、FAP、胎儿AChR、纤连蛋白(fibronectin)超域-B、叶酸受体-a、叶酸受体1、G250/CAIX、GD2、GD3、糖蛋白75、GPMB、HER2/neu、HGF、HLA-AI、MAGE A1、HLA-A2、NY-ESO-1、HMW-MAA、人类分散因子(scatter factor)受体激酶、IGF-1受体、IGF-I、IgG1、IL-6、IL-13、IL-13受体a2、IL-11受体a、胰岛素样生长因子I受体、整合素 $\alpha$ 5I31、整合素 $\alpha$ vI33、 $\kappa$ 轻链、L1-CAM、 $\lambda$ 轻链、Lewis Y、间皮素、MORAb-009、MS4A1、MUC1、MUC16、黏液素CanAg、NCAM、N-羟乙酰基(glycolyl)神经氨酸、NKG2D配体、NPC-1C、PDGF-Ra、PDL192、磷脂酰丝氨酸、前列腺特异性癌症抗原(PSCA)、前列腺癌细胞、PSMA、PSC1、RANKL、RON、ROR1、SCH 900105、SDC1、SLAMF7、sp17、TAG72、腱生蛋白(tenascin)C、TGF $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 3、TL1A、TRAIL-R1、TRAIL-R2、肿瘤抗原CTAA16.88、UPK1B、VEGF-A、VEGF受体、VEGFR-1、VEGFR2、TEM1、TEM8,及/或波形蛋白(vimentin)。

45. 如权利要求42至44中任一项的工程化多肽,其中该抗原结合域包含抗体重链可变区及抗体轻链可变区。

46. 如权利要求42至45中任一项的工程化多肽,其中该抗原结合域包含scFv。

47. 如权利要求42至44中任一项的工程化多肽,其中该抗原结合域包含单域抗体抗原结合域。

48. 如权利要求42至47中任一项的工程化多肽,其中该细胞内域包含至少一个共刺激域。

49. 如权利要求48的工程化多肽,其中该细胞内域包含两个共刺激域。

50. 如权利要求48或权利要求49的工程化多肽,其中至少一个共刺激域为选自以下的受体蛋白的共刺激域:4-1BB(CD137)、CD28、OX40、活化K细胞受体、BTLA、Toll配体受体、CD2、CD7、CD27、CD30、CD40、CDS、ICAM-L、LFA-1(CD11a/CD18)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS(CD278)、RANK、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、Kp80(KLRP1)、Kp44、Kp30、Kp46、CD19、CD4、CD8a、CD8p、IL2Rp、IL2Ry、IL7Ra、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、IL15Ra、IL7R、CD18、CD132、LFA-1、ITGB7、KG2D、KG2C、TFR2、TRANCE/RAKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-

A, Ly108)、SLAM (SLAMF1, CD 150, IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD 162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、DAP10、DAP 12、CD83的配体、MHC I类分子、TNF受体蛋白质、免疫球蛋白样蛋白质、细胞因子受体、整合素, 及/或信号传导淋巴细胞活化分子。

51. 如权利要求48或权利要求49的工程化多肽, 其中该工程化多肽包含4-1BB共刺激域。

52. 如权利要求40至51中任一项的工程化多肽, 其中该细胞内域包含至少一个信号传导域。

53. 如权利要求52的工程化多肽, 其中至少一个信号传导域为基于免疫受体酪氨酸的活化基序 (ITAM) 信号传导域。

54. 如权利要求52或权利要求53的工程化多肽, 其中至少一个信号传导域为选自以下的受体蛋白的信号传导域: CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\zeta$ 、CD3 $\eta$ 、FcR  $\gamma$ 、FcR $\beta$ 、CD3 $\delta$ 、CD3  $\gamma$ 、CD5、CD22、CD20、CD79a、CD79b、CD278 (ICOS)、FcERI、CD66d、DAP10及DAP12。

55. 如权利要求54的工程化多肽, 其中该细胞内域包含CD3 $\zeta$ 信号传导域。

56. 如权利要求40至55中任一项的工程化多肽, 其中该工程化多肽自氨基端至羧基端包含 (i) 细胞外域 [ECD]-跨膜域 [TM]-共刺激域 [CoD]-信号传导域 [SigD]-降解域 [DD]; 或 (2) ECD-TM-CoD-DD-SigD; 或 (3) ECD-TM-DD-CoD-SigD。

57. 如权利要求40至56中任一项的工程化多肽, 其中该工程化多肽为嵌合抗原受体 (CAR)。

58. 如权利要求1至57中任一项的工程化多肽, 其中该工程化多肽在一或多个域之间包含一或多个肽接头。

59. 如权利要求1至58中任一项的工程化多肽, 其中该工程多肽包含于细胞中。

60. 如权利要求59的工程化多肽, 其中该细胞为人类效应细胞。

61. 如权利要求60的工程化多肽, 其中该细胞为T细胞或NK细胞。

62. 一种经分离的核酸分子, 其包含编码如权利要求1至61中任一项的工程化多肽的多核苷酸序列。

63. 一种载体, 其包含如权利要求62的核酸分子。

64. 一种细胞, 其包含如权利要求62的核酸分子或如权利要求63的载体。

65. 一种细胞, 其包含如权利要求1至61中任一项的工程化多肽。

66. 如权利要求64或权利要求65的细胞, 其中该细胞为人类效应细胞。

67. 如权利要求64至66中任一项的细胞, 其中该细胞为T细胞或NK细胞。

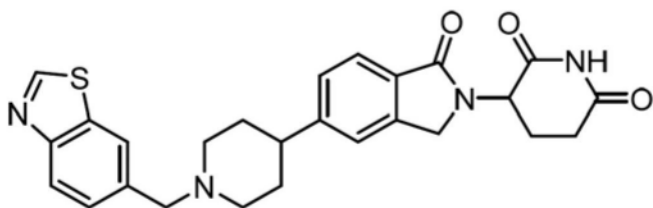
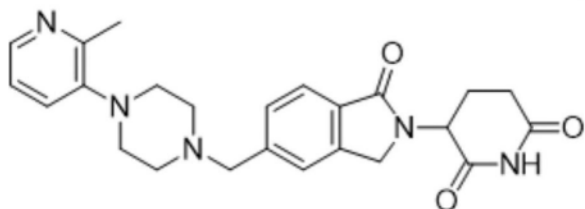
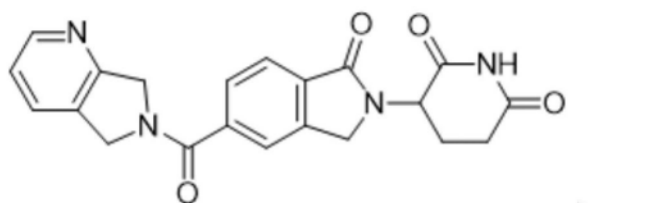
68. 如权利要求67的细胞, 其中该细胞为T细胞。

69. 如权利要求68的细胞, 其中该细胞为T效应细胞。

70. 如权利要求68的细胞, 其中该细胞为CD4+T细胞或CD8+T细胞。

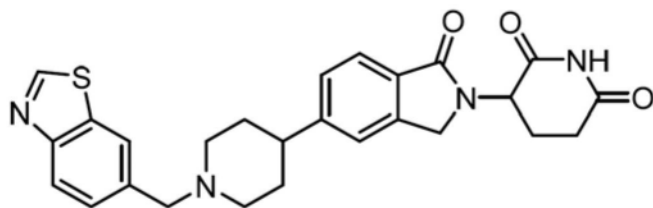
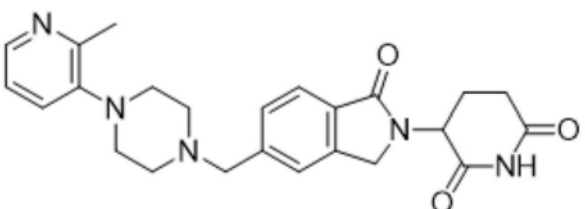
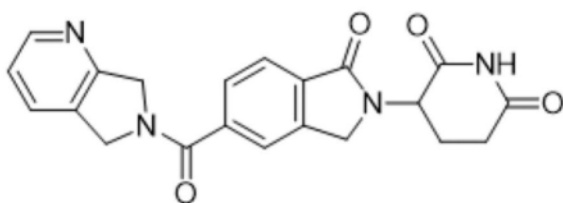
71. 一种药物组合物, 其包含如权利要求64至70中任一项的细胞。

72. 一种降低如权利要求1至61中任一项的工程化多肽的水平的方法, 其包括使该工程化多肽与选自以下的降解剂接触:



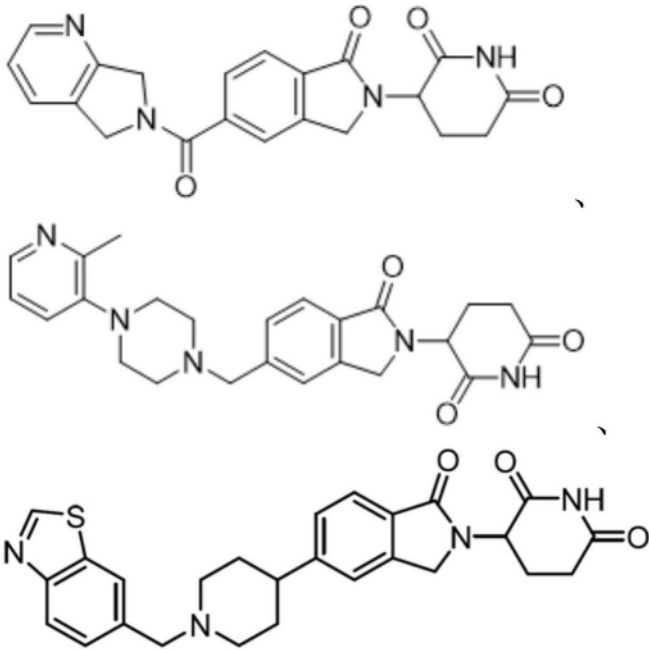
及其互变异构体、及其药学上可接受的盐、及其互变异构体的药学上可接受的盐。

73. 一种降低细胞中的工程化多肽的含量的方法,其包含使如权利要求64至70中任一项的细胞与选自以下的降解剂接触:



及其互变异构体、及其药学上可接受的盐、及其互变异构体的药学上可接受的盐。

74. 一种降低受试者的细胞中工程化多肽的水平的方法,其包括向该受试者施用选自以下的降解剂:



及其互变异构体、及其药学上可接受的盐、及其互变异构体的药学上可接受的盐,其中该细胞包含如权利要求1至61中任一项的工程化多肽。

75. 如权利要求74的方法,其中该细胞为人类效应细胞。

76. 如权利要求74或权利要求75的方法,其中该细胞为T细胞或NK细胞。

77. 如权利要求72至76中任一项的方法,其中该工程化多肽在该降解剂存在下泛素化。

78. 如权利要求72至77中任一项的方法,其中该工程化多肽在该降解剂存在下降解。

79. 如权利要求72至78中任一项的方法,其中该降解剂结合至该降解域。

80. 如权利要求72至79中任一项的方法,其中该降解剂还结合至cereblon。

81. 如权利要求80的方法,其中该降解剂介导包含该降解域、降解剂及cereblon的复合物。

82. 一种治疗受试者的疾病或病症的方法,其包括向该受试者施用如权利要求64至70中任一项的细胞。

83. 如权利要求82的方法,其中该细胞为T细胞。

84. 如权利要求83的方法,其中该细胞为T效应细胞。

85. 如权利要求83的方法,其中该细胞为CD4+T细胞或CD8+T细胞。

86. 如权利要求82至85中任一项的方法,其中该细胞包含如权利要求57的工程化多肽。

87. 如权利要求82至86中任一项的方法,其中该疾病或病症为癌症。

88. 如权利要求87的方法,其中该癌症选自血液癌症或实体癌症。

89. 如权利要求88的方法,其中该血液癌症为急性骨髓性白血病(AML)、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、慢性骨髓性白血病(CML)、淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、霍奇金氏疾病、多发性骨髓瘤,或骨髓增生异常综合征。

90. 如权利要求88的方法,其中该实体癌症为脑癌、前列腺癌、乳腺癌、肺癌、结肠癌、子宫癌、皮肤癌、肝癌、骨癌、胰脏癌、卵巢癌、睾丸癌、膀胱癌、肾癌、头颈癌、胃癌、子宫颈癌、直肠癌、喉癌,及食道癌。

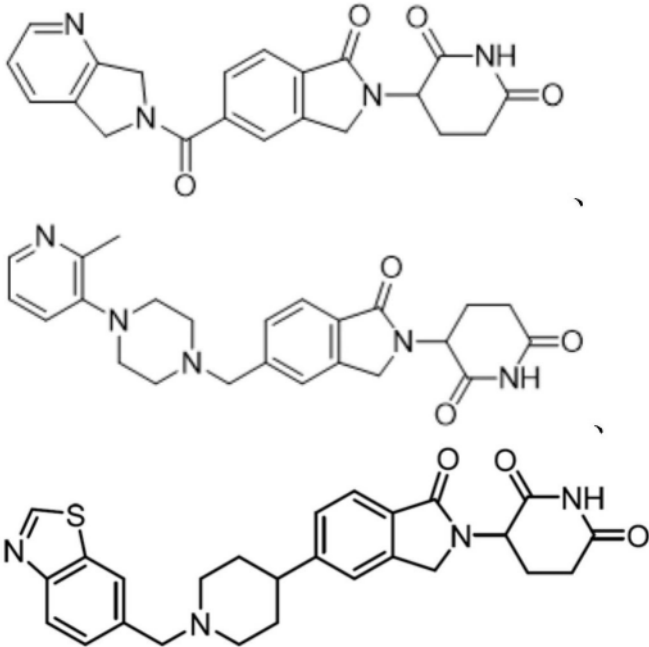
91. 如权利要求82至90中任一项的方法,其中在向该受试者施用该细胞之前,该细胞与

降解剂离体接触,其中该降解剂为结合至该降解域的小分子。

92. 如权利要求82至90中任一项的方法,其中该方法包含向该受试者施用该细胞及降解剂,其中该降解剂为结合至该降解域的小分子。

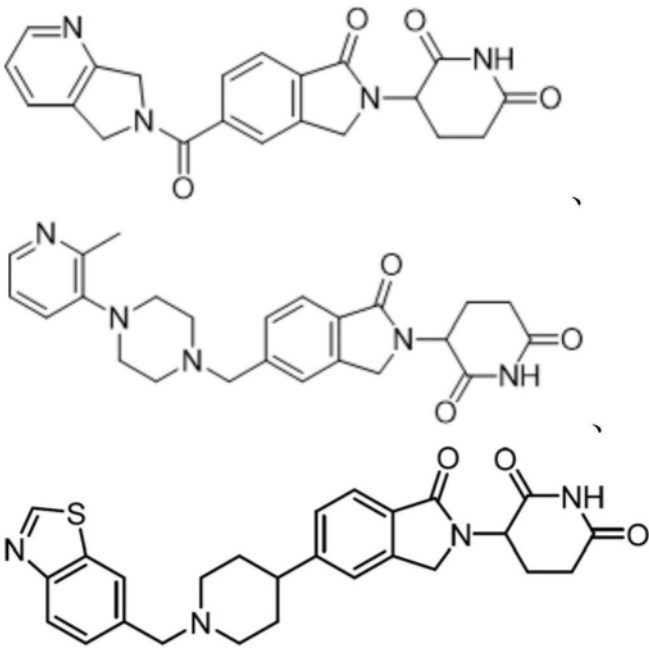
93. 如权利要求82至90中任一项的方法,其中在向该受试者施用该细胞之后,该方法包括施用降解剂,其中该降解剂为结合至该降解域的小分子。

94. 如权利要求91至93中任一项的方法,其中该降解剂为选自以下的化合物:



及其互变异构体、其药学上可接受的盐、及其互变异构体的药学上可接受的盐。

95. 一种化合物,其选自:



及其互变异构体、其药学上可接受的盐、及其互变异构体的药学上可接受的盐。

96. 一种药物组合物,其包含如权利要求95的化合物及至少一种药学上可接受的载剂。

## 用于选择性降解工程化蛋白质的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求保护2021年8月6日提交的美国临时申请号63/230,255的优先权权益,该临时申请通过引用以其整体并入本文用于任何目的。

发明领域

[0003] 本发明涉及包含降解域的工程化多肽、化合物、组合物及其制备方法以及用于降解细胞中的工程化蛋白质的用途。

[0004] 背景

[0005] 已研发出包含经工程改造的异源多肽的工程化细胞,诸如嵌合抗原受体T(CAR-T)细胞以用于治疗用途。调节此类经工程改造的异源多肽的表达水平可通过例如减少副作用及/或增强工程化细胞的功效来提高工程化细胞的治疗效益。

[0006] 因此,在一个方面中,本文提供工程化多肽及降解剂,其中所述工程化多肽包含降解域,该降解域在降解域结合至降解剂时介导细胞中的泛素化。

### 发明内容

[0007] 在某些实施方案中,本文描述用于调节细胞中的异源多肽水平的化合物及其组合物。在各种实施方案中,所述化合物及其组合物可用于降低细胞中的异源多肽水平。

[0008] 参考详述内容及实施例可更全面理解本发明实施方案,详述内容及实施例旨在示例非限制性实施方案。

[0009] 附图简述

[0010] 图1A展示人类IKZF家族蛋白质IKZF1- IKZF5 (SEQ ID NOS:48-52) 的序列比对。图1B展示人类IKZF1- IKZF5的假定含G-基序锌指序列的表格。G-基序序列带有下划线。

[0011] 图2为包含C端IKZF1 ZNF2降解子(degron)的嵌合抗原受体(CAR)的图示。

[0012] 图3为研究CAR活性及降解的基于Jurkat细胞报告子的模型系统的示意图。

[0013] 图4A至图4C展示经IKZF1 ZNF2标记的CAR保留功能(图4A),但仅被高浓度化合物A部分降解(图4C)。化合物A的结构展示于图4B中。

[0014] 图5A展示包含C端IKZF1 ZNF1、2个及/或3个降解子的CAR的示意图。CAR中的每个还包含N端CD19结合scFv。图5B展示具有C端IKZF1降解子的CAR保留活性。图5C展示在渐增浓度的化合物A存在下的具有C端IKZF1降解子的CAR的降解。图5D展示降解对野生型IKZF1降解子具有特异性。

[0015] 图6A至图6C展示在Jurkat报告子系统中降解之后的CAR水平减少及CAR活性抑制。

[0016] 图7展示通过CAR降解减弱内源性Erk信号传导。

[0017] 图8展示某些人类IKZF家族成员的含有G-基序的C2H2锌指(SEQ ID NO:21、32、27、38、40、29、47、31、23、20、26及37)的比对。

[0018] 图9展示所预测的来自多种人类蛋白的C2H2锌指降解子(SEQ ID NO:72-109)。

[0019] 图10A展示化合物B的结构。图10B展示使用体外泛素化测定的来自Ikaros ZNF2的经修饰G-基序的泛素化。

[0020] 图11A展示化合物C的结构。图11B至图11C展示经IKZF1 ZNF2\_3 Q1F降解子标记的CAR的降解为CRBN及泛素-蛋白酶体途径(UPP)依赖性的。

[0021] 图12A至图12B展示经IKZF1 ZNF2\_3 Q1F标记的CAR降解降低CAR水平及Jurkat报导测定中的信号传导。

[0022] 图13A展示经IKZF1 ZNF2\_3 Q1F标记的CAR的结构。图13B展示初级T细胞中经IKZF1 ZNF2\_3 Q1F标记的CAR的表达可用化合物C滴定。

[0023] 图14A至图14D展示初级T细胞中经IKZF1 ZNF2\_3 Q1F标记的CAR的功能可用化合物C滴定。

[0024] 图15为用于测试功能持久性的长期抗原刺激测定的示意图。

[0025] 图16A展示化合物D的结构。图16B至图16C展示瞬时静息的CAR T细胞通过长期抗原暴露的活化较少,且维持更幼稚样表型。

[0026] 图17A至图17B展示瞬时静息的CAR T细胞相比未静息细胞在长期抗原暴露之后产生更多促炎性细胞因子,且展现更佳抗肿瘤活性。

[0027] 图18A至图18C展示经Q1F降解子标记的CAR可在体内可逆地下调。

[0028] 图19A至图19D展示经Q1F降解子标记的CAR的下调减少体内肿瘤反应性扩增。

[0029] 图20A至图20D展示框内降解子标记嵌入至内源性AURKA或TOX基因座允许化合物介导的蛋白质水平控制。

[0030] 发明详述

[0031] 如本文所使用,术语“包含”及“包括”可互换使用。术语“包含”及“包括”应解释为指定所提及的所陈述特征或组分的存在,但不排除一或多个特征或组分或其组的存在或添加。另外,术语“包含”及“包括”旨在包括术语“由……组成”所涵盖的实例。因此,术语“由……组成”可用于代替术语“包含”及“包括”,以提供本发明的更特定实施方案。

[0032] 术语“由……组成”意指一主题具有组成其的所陈述特征或组分的至少90%、95%、97%、98%或99%。在另一实施方案中,除对将实现的技术效果而言并非必不可少的特征或组分之外,术语“由……组成”自任何随后列举的范围中排除任何其他特征或组分。

[0033] 如本文所用,术语“或”应解释为包括性的“或”,意指任一者或任何组合。因此,“A、B或C”意指以下中的任一者:“A;B;C;A及B;A及C;B及C;A、B及”。此定义的例外将仅在要素、功能、步骤或动作的组合以一些方式固有地相互排斥时出现。

[0034] 在本说明书中,除非另有指明,否则任何浓度范围、百分比范围、比率范围或整数范围应理解为包括在所列举范围内的任何整数值及(在适当时)其分数(诸如整数的十分之一及百分之一)。此外,除非另有指示,否则本文所叙述的与诸如聚合物亚基、大小或厚度的任何物理特征相关的任何数值范围应理解为包括所叙述范围内的任何整数。如本文所用,除非另外指明,否则术语“约”及“大致”意指所指示范围、值或结构的 $\pm 20\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 或 $\pm 1\%$ 。

[0035] 如本文所用,“工程化多肽”为具有在自然界中不存在的氨基酸序列的多肽。尽管工程化多肽的部分可在自然界中存在,但作为整体,该工程化多肽不存在。在一些实施方案中,工程化多肽包含经修饰的天然存在的氨基酸序列,该修饰例如通过将其融合至降解域或将其插入降解域中。在一些此类实施方案中,所得工程化多肽基本上保持原始天然存在的多肽的活性。在一些实施方案中,工程化多肽包含两个或更多个,或三个或更多个,或四

个或多个域,其来源于两个或更多个,或三个或更多个,或四个或更多个天然存在的多肽。在一些实施方案中,该工程化多肽包含降解域。

[0036] 如本文所用,“降解子”及“降解域”可互换使用且意指氨基酸序列,其在存在于细胞中的多肽中时,在结合至降解域及泛素连接酶的化合物存在下,产生通过泛素连接酶的多肽的泛素化。在一些实施方案中,化合物结合至降解域且与cereblon结合。在一些实施方案中,工程化多肽包含降解域。在利用泛素连接酶泛素化之后,包含降解域的多肽可发生降解。

#### [0037] 示例性工程化多肽

[0038] 本文提供包含降解域的工程化多肽。在一些实施方案中,工程化多肽为CAR。在一些实施方案中,此类多肽包含跨膜域、细胞外域及细胞内域。在一些此类实施例中,降解域位于工程化多肽的细胞内域中。在一些实施方案中,细胞外域包含配体、配体结合域或抗原结合域。在一些实施方案中,抗原结合域结合癌症抗原。在一些实施方案中,抗原结合域包含抗体轻链或重链可变区,或scFv。在一些实施方案中,抗原结合域包含单域抗体抗原结合域。在一些实施方案中,细胞内域包含至少一个共刺激域。在一些实施方案中,细胞内域包含至少一个信号传导域,诸如ITAM信号传导域。在一些实施方案中,如下文进一步描述,工程化多肽为包含降解域的CAR。

[0039] 在一些实施方案中,工程化多肽是基于天然存在的蛋白质,已通过基因工程改造将降解域插入该蛋白质,或降解域已融合至该蛋白质。所得工程化多肽可包含额外天然存在或非天然存在的氨基酸序列。在一些实施方案中,工程化多肽是基于天然存在的细胞核或细胞质蛋白。在一些实施方案中,工程化多肽基本上保留天然存在的蛋白质的活性。工程化多肽的降解可通过诸如施用降解剂来接触表达工程化多肽的细胞而实现。在一些此类实施方案中,降解域来源于Ikaros家族锌指(ZNF)氨基酸序列,且降解剂为结合至泛素连接酶(诸如E3连接酶)的小分子。将该降解剂施用至表达包含降解域的工程化多肽的细胞使得包含降解域的工程化多肽由E3连接酶泛素化以及工程化多肽降解。在一些实施方案中,降解剂为结合cereblon及降解域的化合物。

[0040] 在一些实施方案中,工程化多肽包含天然存在的蛋白质,及融合至或插入在天然存在的蛋白质的降解域。当降解域“融合至”蛋白质时,工程化多肽可包含将降解域连接至蛋白质的接头,诸如氨基酸接头。此类氨基酸接头可为任何长度,且例如1至50、1至40、1至30、1至20、1至10或1至5个氨基酸。在一些实施方案中,氨基酸接头由甘氨酸及丝氨酸组成。

[0041] 降解域可融合至或降解域可插入至的非限制性示例性蛋白质包括PRDM1、TGFBR2、CASP8、CBLB、CD5、CISH、CGKA、DGKz、MAP4K1、ARID2、BACH2、CHX37、KLF2、KLF3、KLF6、MAF、SIGLEC9、TOX、ZBTB32、PTPN2、AKT1、PIK3CD、MT1E、MT2A、CSK、ITK、PAG1、PDCD4、ZC3H12A、DNMT1、DNMT3A、PRBM1、STK4、TET2、BNIP3、FAS、CBL、BGAT5、RNF128、STK17B、TRIB1、TXNIP、UBASH3A、BATF、FLI1、IKZF1、IKZF2、IRF4、NFATC1、NR4A1、MAP2K1、MAP2K2、MAP4K4、PPARGC1A、RELB、TMEM173、USP10、MT1A、PP2A家族成员、RASA2、NR4A2、NR4A3、AHR、CD70、LHALS1、SOCS1、SOCS2、SOCS3、TAZ、USP21或YAP1。在一些实施方案中,蛋白质为哺乳动物蛋白,诸如人类蛋白。

[0042] 在一些实施方案中,降解域融合至或插入至细胞中的内源性蛋白。在一些此类实施方案中,编码降解域的序列可插入至表达内源性蛋白的细胞的基因组中,使得工程化多

肽被表达,其包含融合至或插入至内源性蛋白的降解域。将核酸序列,诸如编码降解域的序列插入至细胞基因组中的各种方法为本领域中已知的,包括例如经由CRISPR/Cas的腺相关病毒(AAV)介导或非病毒同源定向重组、慢病毒转导或转座子递送。在一些实施方案中,编码降解域的核酸序列融合至或插入至免疫细胞(诸如T淋巴细胞)中的内源性蛋白。在一些此类实施方案中,T细胞经分离、经工程改造以表达工程化多肽,且向患者施用。在向患者施用之后,可随后在需要工程化多肽降解时施用降解剂。

[0043] 在一些实施方案中,将编码工程化多肽的核酸序列引入细胞中。将核酸引入细胞中的方法为本领域中已知,且包括含有编码本文所描述的工程化多肽的核酸(多核苷酸)的合成载体、慢病毒或反转录病毒载体、自主复制质粒、病毒(例如反转录病毒、慢病毒、腺病毒或疱疹病毒)或其类似者。

[0044] 示例性降解域

[0045] 本文所提供的工程化多肽包含降解域。在一些实施方案中,降解域包含结合至降解剂的氨基酸序列。降解剂与降解域及泛素连接酶结合,使得工程化多肽泛素化。

[0046] 在一些实施方案中,降解域包含衍生自Ikaros家族蛋白质诸如Ikaros、Helios、Aiolos、Eos或Pegasus的G-基序的氨基酸序列。非限制性示例性G-基序在图1B中所示的序列中加下划线。在一些实施方案中,本文提供的降解域包含通过用苯丙氨酸(F)置换第一位中的氨基酸而从天然G-基序序列修饰而得的氨基酸序列。在一些实施方案中,降解域来源于天然地在第一位中包含Q的G-基序,因此降解域包含Q1F取代。

[0047] 在一些实施方案中,降解域包含氨基酸序列FCX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>CGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>(SEQ ID NO:1)。在一些实施方案中,X<sub>1</sub>选自天冬酰胺、天冬氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、甲硫氨酸、组氨酸、色氨酸、异亮氨酸、精氨酸、亮氨酸、缬氨酸、苏氨酸及苯丙氨酸;X<sub>2</sub>选自谷氨酰胺、精氨酸、组氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、异亮氨酸、缬氨酸及甲硫氨酸;X<sub>3</sub>选自丙氨酸、丝氨酸、半胱氨酸、精氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸及甘氨酸;且X<sub>4</sub>选自丝氨酸、甲硫氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、组氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、苯丙氨酸及色氨酸。在一些实施方案中,X<sub>1</sub>选自天冬酰胺、谷氨酰胺、甲硫氨酸、组氨酸、色氨酸、异亮氨酸、精氨酸、亮氨酸、缬氨酸、苏氨酸及苯丙氨酸。在一些实施方案中,X<sub>2</sub>选自谷氨酰胺、精氨酸、组氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、异亮氨酸及甲硫氨酸。在一些实施方案中,X<sub>3</sub>选自丙氨酸、丝氨酸、半胱氨酸及甘氨酸。在一些实施方案中,X<sub>4</sub>选自丝氨酸、甲硫氨酸、组氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、苯丙氨酸及色氨酸。在一些实施方案中,X<sub>1</sub>为天冬酰胺。在一些实施方案中,X<sub>2</sub>为谷氨酰胺。在一些实施方案中,X<sub>3</sub>为丙氨酸或丝氨酸。在一些实施方案中,X<sub>3</sub>为丙氨酸。在一些实施方案中,X<sub>4</sub>为丝氨酸。在一些实施方案中,工程化多肽的降解域包含氨基酸序列FCNQCAS(SEQ ID NO:3)。

[0048] 在一些实施方案中,降解域包含氨基酸序列FCX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>CGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>(SEQ ID NO:2),其中X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>及X<sub>4</sub>如上文所定义。在一些实施方案中,X<sub>5</sub>选自苯丙氨酸、色氨酸、甲硫氨酸、精氨酸、组氨酸、亮氨酸、酪氨酸、半胱氨酸及谷氨酰胺。在一些实施方案中,X<sub>5</sub>选自苯丙氨酸、色氨酸、甲硫氨酸、精氨酸、组氨酸、亮氨酸、酪氨酸及谷氨酰胺。在一些实施方案中,X<sub>5</sub>选自苯丙氨酸、色氨酸、甲硫氨酸、亮氨酸、酪氨酸及谷氨酰胺。在一些实施方案中,X<sub>5</sub>为苯丙氨酸。

[0049] 在各种实施方案中,降解域包含至少一个锌指域,其包含上文所述的经修饰G-基序。在一些实施方案中,至少一个锌指域衍生自Ikaros家族蛋白质,诸如Ikaros、Helios、

Aiolos、Eos或Pegasus。包含G-基序的非限制性示例性锌指展示在图1B中。在各种实施方案中,降解域包含一个、两个、三个或四个锌指域。在一些实施方案中,降解域包含一个包含G-基序的锌指域及至少一个不包含G-基序的锌指域。所述锌指域可或可不衍生自相同蛋白质。在一些实施方案中,降解域包含两个锌指域。

[0050] 在一些实施方案中,降解域包含与人类Ikaros的锌指2(ZNF2)至少85%、至少90%或至少95%一致的氨基酸序列。在一些实施方案中,降解域包含与人类Ikaros的锌指2(ZNF2),及至少一个额外锌指域,诸如Ikaros家族蛋白质的至少一个额外锌指域至少85%、至少90%或至少95%一致的氨基酸序列。在一些实施方案中,降解域包含与人类Ikaros的锌指2(ZNF2)及人类Ikaros的ZNF1或ZNF3至少85%、至少90%或至少95%一致的氨基酸序列。在一些实施方案中,降解域包含与人类Ikaros的锌指2(ZNF2)及锌指3(ZNF3)至少85%、至少90%或至少95%一致的氨基酸序列。

[0051] 在一些实施方案中,降解域包含与人类Ikaros的氨基酸145-167(FQCNQCGASFTQKGNLLRHIKLNH;SEQ ID NO:21)至少85%、至少90%或至少95%一致的氨基酸序列。在一些实施方案中,降解域包含与人类Helios的氨基酸140-162(FHCNQCGASFTQKGNLLRHIKLNH;SEQ ID NO:27)至少85%、至少90%或至少95%一致的氨基酸序列。在一些实施方案中,降解域包含与人类Aiolos的氨基酸146-168(FQCNQCGASFTQKGNLLRHIKLNH;SEQ ID NO:32)至少85%、至少90%或至少95%一致的氨基酸序列。在一些实施方案中,降解域包含与人类Eos的氨基酸187-209(FHCNQCGASFTQKGNLLRHIKLNH;SEQ ID NO:38)至少85%、至少90%或至少95%一致的氨基酸序列。

[0052] 在一些实施方案中,降解域包含与人类Ikaros的氨基酸141-168(GERPFQCNQCGASFTQKGNLLRHIKLNH;SEQ ID NO:15)至少85%、至少90%或至少95%一致的氨基酸序列。在一些实施方案中,降解域包含与人类Helios的氨基酸136-163(GERPFHCNQCASFTQKGNLLRHIKLNH;SEQ ID NO:60)至少85%、至少90%或至少95%一致的氨基酸序列。在一些实施方案中,降解域包含与人类Aiolos的氨基酸142-169(GERPFQCNQCGASFTQKGNLLRHIKLNH;SEQ ID NO:61)至少85%、至少90%或至少95%一致的氨基酸序列。在一些实施方案中,降解域包含与人类Eos的氨基酸183-210(GERPFHCNQCASFTQKGNLLRHIKLNH;SEQ ID NO:62)至少85%、至少90%或至少95%一致的氨基酸序列。

[0053] 在一些实施方案中,降解域包含与人类Ikaros的氨基酸141-196(GERPFQCNQCASFTQKGNLLRHIKLNHSGEKPFKCHLCNYACRRRDALTGHLRTHS;SEQ ID NO:6)至少85%、至少90%或至少95%一致的氨基酸序列。在一些实施方案中,降解域包含与人类Helios的氨基酸136-191(GERPFHCNQCASFTQKGNLLRHIKLNHSGEKPFKCPFCYACRRRDALTGHLRTHS;SEQ ID NO:63)至少85%、至少90%或至少95%一致的氨基酸序列。在一些实施方案中,降解域包含与人类Aiolos的氨基酸142-197(GERPFQCNQCASFTQKGNLLRHIKLNHSGEKPFKCHLCNYACRRRDALTGHLRTHS;SEQ ID NO:64)至少85%、至少90%或至少95%一致的氨基酸序列。在一些实施方案中,降解域包含与人类Eos的氨基酸183-238(GERPFHCNQCASFTQKGNLLRHIKLNHSGEKPFKCPFCYACRRRDALTGHLRTHS;SEQ ID NO:65)至少85%、至少90%或至少95%一致的氨基酸序列。

[0054] 在一些实施方案中,降解域包含氨基酸序列:GERPFFCX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>CGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>TQGNLLRHIKLSGEKPFKCHLCNYACRRRDA LTGHLRTHS (SEQ ID NO:5),其中X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>及X<sub>4</sub>以及X<sub>5</sub>如上文所定义。在一些实施方案中,降解域包含氨基酸序列:GERPFFCX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>CGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>TQGNLLRHIKLSGEKPFKCPFCSYACRRRDA LTGHLRTHS (SEQ ID NO:66),其中X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>及X<sub>4</sub>以及X<sub>5</sub>如上文所定义。在一些实施方案中,降解域包含氨基酸序列:GERPFFCX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>CGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>TQGNLLRHIKLSHTGEKPFKCHLCNYACQRRD ALTGHLRTHS (SEQ ID NO:67),其中X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>及X<sub>4</sub>以及X<sub>5</sub>如上文所定义。在一些实施方案中,降解域包含氨基酸序列:GERPFFCX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>CGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>TQGNLLRHIKLSGEKPFKCPFCNYACRRRDA LTGHLRTHS (SEQ ID NO:68),其中X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>及X<sub>4</sub>以及X<sub>5</sub>如上文所定义。

[0055] 在一些实施方案中,降解域包含氨基酸序列:GERPFFCNQCGASFTQKGNLLRHIKLSGEKPFKCHLCNYACRRRDAL TGHLRTHS (SEQ ID NO:7)。在一些实施方案中,降解域包含氨基酸序列:GERPFFCNQCGASFTQKGNLLRHIKLSGEKPFKCPFCSYACRRRDAL TGHLRTHS (SEQ ID NO:69)。在一些实施方案中,降解域包含氨基酸序列:GERPFF CNQCGASFTQK GNLLRHIKLSHTGEKPFKCHLCNYACQ RRDAL TGHLRTHS (SEQ ID NO:70)。在一些实施方案中,降解域包含氨基酸序列:GERPFF CNQCGASFTQ KGNLLRHIKLSGEKPFKCPFC NYACRRRDAL TGHLRTHS (SEQ ID NO:71)。

[0056] 示例性嵌合抗原受体构建体

[0057] 通过使CAR在降解剂存在下降解来调节CAR表达的能力相比于缺乏调节CAR表达的能力时具有许多优势。例如,可通过降解CAR而减少或消除由表达CAR的治疗性免疫细胞介导的可能导致毒性的非肿瘤靶向分布 (on-target but off-tumor) 效果。可通过降解CAR来减少或消除太强的CAR介导的免疫反应。可通过循环CAR的表达及/或滴定CAR的表达来避免由检查点的长期活化及过表达引起的T细胞功能障碍。此类CAR降解在本文中通过表达包含本文所提供的降解域的CAR及视需要施用降解剂来实现。在一些此类实施方案中,降解剂为结合至泛素连接酶 (诸如E3连接酶) 的小分子。将该降解剂施用至表达包含降解域的CAR多肽的细胞,使得包含降解域的CAR多肽通过E3连接酶泛素化且CAR多肽降解。在一些实施方案中,降解剂为结合cereblon及降解域的化合物。

[0058] 本文提供包含嵌合抗原受体 (CAR) 或由其组成的工程化多肽,所述嵌合抗原受体包含 (a) CAR的组分,诸如抗原结合域、跨膜域、细胞信号传导域及/或共刺激域,及 (b) 降解域。当融合至降解域的CAR在降解剂 (诸如cereblon结合化合物)、E3连接酶 (诸如cereblon) 存在下表达于免疫细胞中 (例如,在T淋巴细胞或自然杀伤细胞中) 时,CAR中的降解域结合降解剂,使得形成泛素化降解域的E3连接酶复合物。因此,本文所描述的CAR的活性 (例如,体内活性) 可通过使表达包含降解域的CAR的细胞 (例如,经工程改造以表达所述CAR多肽的T淋巴细胞) 与降解剂 (诸如cereblon结合化合物) 接触来控制。

[0059] 在一些实施方案中,本文提供一种工程化多肽,其为包含抗原结合域、跨膜域、细胞内初级信号传导域及降解域的CAR。在一些实施方案中,降解域包含本文所提供的氨基酸序列。

[0060] 在一些实施方案中,工程化多肽为CAR,其按自氨基端至羧基端的顺序包含抗原结合域、跨膜域、初级T细胞信号传导域及/或共刺激域及降解域。在一些实施方案中,降解域位于CAR的C端。在一些实施方案中,降解域包含本文所提供的氨基酸序列。在一些实施方案中,CAR包含共刺激域。

[0061] 在一些实施方案中,工程化多肽为CAR,其按自氨基端至羧基端的顺序包含 (i) 细

胞外域[ECD]-跨膜域[TM]-共刺激域[CoD]-信号传导域[SigD]-降解域[DD]。在一些实施方案中,工程化多肽为CAR,其按自氨基端至羧基端的顺序包含ECD-TM-CoD-DD-SigD。在一些实施方案中,工程化多肽为CAR,其按自氨基端至羧基端的顺序包含ECD-TM-DD-CoD-SigD。降解域还可被插入在一域内,诸如共刺激域内或信号传导域内,优选使得保留所述域的所需活性。

[0062] 示例性抗原结合域

[0063] 本文所提供的CAR的抗原结合域可以为任何多肽域、基序或结合至抗原的序列。

[0064] 在某些实施方案中,本文所描述的CAR的抗原结合域为受体的抗原结合部分。在一些实施方案中,本文所描述的CAR的抗原结合域为由肿瘤细胞产生的配体的受体。

[0065] 在某些实施方案中,本文所描述的CAR的抗原结合域为抗体的抗原结合部分。在一些实施方案中,本文所描述的CAR的抗原结合域为抗体、抗体链、单链抗体或其抗原结合部分、Fc域、糖磷脂酰肌醇锚定域或scFv抗体片段。

[0066] 在某些实施方案中,本文所描述的CAR的抗原结合域为基于肽的巨分子抗原结合剂,例如,噬菌体展示蛋白。

[0067] 在某些实施方案中,本文所描述的CAR的抗原结合域的抗原结合受限于与主要组织相容性复合体(MHC)相关的抗原呈递。在某些实施方案中,本文所描述的CAR的抗原结合域的抗原结合不受MHC限制。

[0068] 通过本文所描述的CAR的抗原结合域结合/识别的抗原可以为任何感兴趣的抗原。在一些实施方案中,抗原为表达于细胞(例如肿瘤细胞,诸如实体肿瘤细胞或血癌肿瘤细胞)的表面上的抗原。

[0069] 在一些实施方案中,本文所描述的CAR的抗原结合域所结合/识别的抗原为肿瘤细胞上的抗原,例如,抗原为肿瘤特异性抗原(TSA)或肿瘤相关抗原(TAA)。可由本文所描述的CAR识别(即,由CAR的抗原结合域结合)的示例性肿瘤细胞抗原包括但不限于4-1BB、5T4、8H9、B7-H6、腺癌抗原、 $\alpha$ -胎儿蛋白、B细胞成熟抗原(BCMA)、BAFFR、B淋巴瘤细胞、C242抗原、CA9、癌胚抗原、CA-125、碳酸酐酶9(CA-IX)、CCR4、CD3、CD4、CD19、CD20、CD22、CD23(IgE受体)、CD28、CD30(TFRSF8)、CD33、CD38、CD40、CD44v6、CD44v7/8、CD51、CD52、CD56、CD70、CD74、CD80、CD123、CD152、CD171、CD200、CD221、CE7、CEA、C-MET、CLAUDIN6、CLAUDIN18.3、CNT0888、CTLA-4、DRS、EpCAM、ErbB2、ErbB3/4、EGFR、EGFR $\gamma$  III、EphA2、EGP2、EGP40、FAP、胎儿AchR、纤连蛋白超域-B、叶酸受体-a、叶酸受体1、G250/CAIX、GD2、GD3、糖蛋白75、GP MB、HER2/neu、HGF、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2 NY-ESO-1、HMW-MAA、人类分散因子受体激酶、IGF-1受体、IGF-I、IgG1、IL-6、IL-13、IL-13受体a2、IL-11受体a、胰岛素样生长因子I受体、整合素 $\alpha$ 5I31、整合素 $\alpha$ vI33、 $\kappa$ 轻链、L1-CAM、 $\lambda$ 轻链、Lewis Y、间皮素、MORAb-009、MS4A1、MUC1、MUC16、黏液素CanAg、NCAM、N-羟乙酰基神经氨酸、NKG2D配体、NPC-1C、PDGF-R $\alpha$ 、PDL192、磷脂酰丝氨酸、前列腺特异性癌症抗原(PSCA)、前列腺癌细胞、PSMA、PSC1、RANKL、RON、ROR1、SCH 900105、SDC1、SLAMF7、sp17、TAG72、腱生蛋白(tenascin)C、TGF $\beta$ 2、TGF-I3、TL1A、TRAIL-R1、TRAIL-R2、肿瘤抗原CTAA16.88、UPK1B、VEGF-A、VEGF受体、VEGFR-1、VEGFR2、TEM1、TEM8及/或波形蛋白(vimentin)。

[0070] 在一些实施方案中,本文所描述的CAR的抗原结合域所结合/识别的抗原为在以下的肿瘤细胞上表达或与其相关的抗原:淋巴瘤/白血病、肺癌、乳癌、前列腺癌、肾上腺皮质

癌、甲状腺癌、鼻咽癌、黑色素瘤(例如恶性黑色素瘤)、皮肤癌、结肠直肠癌、硬纤维瘤、结缔组织增生性小圆细胞肿瘤、内分泌瘤、尤文氏肉瘤(Ewing sarcoma)、外围原始神经外胚层瘤、实体生殖细胞肿瘤、肝母细胞瘤、成神经细胞瘤、非横纹肌肉瘤软组织肉瘤、骨肉瘤、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、威尔姆斯氏肿瘤(Wilms tumor)、成胶质细胞瘤、黏液瘤、纤维瘤、脂肪瘤或其类似者。

[0071] 在一些实施方案中,本文所描述的CAR的抗原结合域所结合/识别的抗原为在以下的肿瘤细胞上表达或与其相关的抗原:慢性淋巴细胞性白血病(小淋巴细胞性淋巴瘤)、B细胞前淋巴细胞性白血病、淋巴浆细胞淋巴瘤、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症(Waldenstrom macroglobulinemia)、脾边缘区淋巴瘤、浆细胞骨髓瘤、浆细胞瘤、结外边缘区B细胞淋巴瘤、MALT淋巴瘤、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、原发性渗出液淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、T淋巴细胞前淋巴细胞性白血病、T淋巴细胞大颗粒淋巴细胞性白血病、攻击性NK细胞白血病、成人T淋巴细胞白血病/淋巴瘤、结外NK/T淋巴细胞淋巴瘤、鼻病型/肠病型T淋巴细胞淋巴瘤、肝脾T淋巴细胞淋巴瘤、母细胞NK细胞淋巴瘤、蕈样霉菌病、塞扎里综合征(Sezary syndrome)、原发性皮肤退行性大细胞淋巴瘤、类淋巴瘤丘疹病、血管免疫母细胞T淋巴细胞淋巴瘤、外周T淋巴细胞淋巴瘤(非特定)、退行性大细胞淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤或非霍奇金氏淋巴瘤。

[0072] 在一些实施方案中,本文所描述的CAR的抗原结合域所结合/识别的抗原为非肿瘤相关抗原或非肿瘤特异性抗原。在某些实施方案中,抗原涉及肿瘤的一方面,例如,肿瘤环境。举例而言,肿瘤可在包围该肿瘤的组织中诱导发炎性状态,且可将促进血管生成的血管生成生长因子、白介素及/或细胞因子释放至肿瘤中及肿瘤的周边处。因此,在某些实施方案中,抗原为生长因子、细胞因子或白介素(例如,与血管生成(angiogenesis)或血管形成(vasculogenesis)相关联的生长因子、细胞因子或白介素)。此类生长因子、细胞因子及白介素可包括但不限于血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、肝细胞生长因子(HGF)、胰岛素样生长因子(IGF)及白介素-8(IL-8)。

[0073] 在一些实施方案中,通过本文所描述的CAR的抗原结合域结合/识别的抗原为响应于肿瘤所引起的局部损伤,由正常组织释放的损伤相关分子模式分子(DAMP;也称为警报素)。本文所描述的CAR的抗原结合域可结合的示例性DAMP包括但不限于热休克蛋白、染色质相关蛋白高迁移率族蛋白1(chromatin-associated protein high mobility group box 1, HMGB1)、S100A8(MRP8, 钙粒蛋白A)、S100A9(MRP 14, 钙粒蛋白B)、血清淀粉样蛋白A(SAA)、脱氧核糖核酸、三磷酸腺苷、尿酸及硫酸肝素。

[0074] 示例性跨膜域

[0075] 如本文中所使用,“跨膜域”包括透通(pass-through)跨膜域,其中包含跨膜域的多肽包含细胞内域及细胞外域两者,以及膜锚定域,其中包含跨膜域的多肽包含细胞内域但不包含细胞外域。

[0076] 本文所描述的工程化多肽的跨膜域可包含本领域中已知充当跨膜域的任何分子,例如本领域技术人员已知在其使用情况下,诸如在CAR中起作用的任何分子。本文所描述的跨膜域工程化多肽可获自或衍生自任何跨膜蛋白的跨膜域,且可包括此类跨膜域的全部或一部分。

[0077] 在一些实施方案中,本文所描述的工程化多肽(诸如CAR)的跨膜域获自或衍生自T细胞受体,例如本文所描述的工程化多肽的跨膜域获自或衍生自T细胞受体的 $\alpha$ 链、T细胞受体的 $\beta$ 链、T细胞受体的 $\zeta$ 链。

[0078] 在一些实施方案中,本文所描述的工程化多肽的跨膜域获自或衍生自CD28、CD3s、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、ICOS、TIM3、LAB3、TIGIT、PD1或CTLA4、细胞因子受体、白介素受体或生长因子受体。

[0079] 示例性信号传导域

[0080] 本文所描述的CAR的初级细胞信号传导域可包含本领域中已知充当细胞信号传导域的任何分子,例如本领域技术人员已知在CAR背景下起作用的任何分子。在一些实施方案中,本文所描述的CAR的细胞信号传导域包含初级T细胞信号传导域。

[0081] 在一些实施方案中,本文所描述的CAR的初级细胞信号传导域为或包含ZAP-70或其信号转导变体。

[0082] 在一些实施方案中,本文所描述的CAR的初级细胞信号传导域为或包含ITAM。在一些实施方案中,所述ITAM为CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\zeta$ 、CD3 $\eta$ 、FcR $\gamma$ 、FcR $\beta$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD5、CD22、CD20、CD79a、CD79b、CD278(ICOS)、FcERI、CD66d、DAP10或DAP12的ITAM。

[0083] 示例性共刺激域

[0084] 在某些实施方案中,本文所描述的CAR包含共刺激域。本文所描述的CAR的共刺激域可包含本领域中已知充当共刺激域的任何分子,例如本领域技术人员已知在CAR背景下起作用的任何分子。

[0085] 在一些实施方案中,本文所描述的CAR的共刺激域获自或衍生自共刺激性CD27多肽序列、共刺激性CD28多肽序列、共刺激性OX40(CD134)多肽序列、共刺激性4-1BB(CD137)多肽序列,或共刺激性诱导性T细胞共刺激性(ICOS)多肽序列。

[0086] 在一些实施方案中,本文所描述的CAR的共刺激域为或包含4-1BB(CD137)、CD28、OX40、活化K细胞受体、BTLA、Toll配体受体、CD2、CD7、CD27、CD30、CD40、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、CD278(ICOS)、CD28、CD286、CD288、CD289、CD290、CD291、CD292、CD293、CD294、CD295、CD296、CD297、CD298、CD299、CD300、CD301、CD302、CD303、CD304、CD305、CD306、CD307、CD308、CD309、CD310、CD311、CD312、CD313、CD314、CD315、CD316、CD317、CD318、CD319、CD320、CD321、CD322、CD323、CD324、CD325、CD326、CD327、CD328、CD329、CD330、CD331、CD332、CD333、CD334、CD335、CD336、CD337、CD338、CD339、CD340、CD341、CD342、CD343、CD344、CD345、CD346、CD347、CD348、CD349、CD350、CD351、CD352、CD353、CD354、CD355、CD356、CD357、CD358、CD359、CD360、CD361、CD362、CD363、CD364、CD365、CD366、CD367、CD368、CD369、CD370、CD371、CD372、CD373、CD374、CD375、CD376、CD377、CD378、CD379、CD380、CD381、CD382、CD383、CD384、CD385、CD386、CD387、CD388、CD389、CD390、CD391、CD392、CD393、CD394、CD395、CD396、CD397、CD398、CD399、CD400、CD401、CD402、CD403、CD404、CD405、CD406、CD407、CD408、CD409、CD410、CD411、CD412、CD413、CD414、CD415、CD416、CD417、CD418、CD419、CD420、CD421、CD422、CD423、CD424、CD425、CD426、CD427、CD428、CD429、CD430、CD431、CD432、CD433、CD434、CD435、CD436、CD437、CD438、CD439、CD440、CD441、CD442、CD443、CD444、CD445、CD446、CD447、CD448、CD449、CD450、CD451、CD452、CD453、CD454、CD455、CD456、CD457、CD458、CD459、CD460、CD461、CD462、CD463、CD464、CD465、CD466、CD467、CD468、CD469、CD470、CD471、CD472、CD473、CD474、CD475、CD476、CD477、CD478、CD479、CD480、CD481、CD482、CD483、CD484、CD485、CD486、CD487、CD488、CD489、CD490、CD491、CD492、CD493、CD494、CD495、CD496、CD497、CD498、CD499、CD500、CD501、CD502、CD503、CD504、CD505、CD506、CD507、CD508、CD509、CD510、CD511、CD512、CD513、CD514、CD515、CD516、CD517、CD518、CD519、CD520、CD521、CD522、CD523、CD524、CD525、CD526、CD527、CD528、CD529、CD530、CD531、CD532、CD533、CD534、CD535、CD536、CD537、CD538、CD539、CD540、CD541、CD542、CD543、CD544、CD545、CD546、CD547、CD548、CD549、CD550、CD551、CD552、CD553、CD554、CD555、CD556、CD557、CD558、CD559、CD560、CD561、CD562、CD563、CD564、CD565、CD566、CD567、CD568、CD569、CD570、CD571、CD572、CD573、CD574、CD575、CD576、CD577、CD578、CD579、CD580、CD581、CD582、CD583、CD584、CD585、CD586、CD587、CD588、CD589、CD590、CD591、CD592、CD593、CD594、CD595、CD596、CD597、CD598、CD599、CD600、CD601、CD602、CD603、CD604、CD605、CD606、CD607、CD608、CD609、CD610、CD611、CD612、CD613、CD614、CD615、CD616、CD617、CD618、CD619、CD620、CD621、CD622、CD623、CD624、CD625、CD626、CD627、CD628、CD629、CD630、CD631、CD632、CD633、CD634、CD635、CD636、CD637、CD638、CD639、CD640、CD641、CD642、CD643、CD644、CD645、CD646、CD647、CD648、CD649、CD650、CD651、CD652、CD653、CD654、CD655、CD656、CD657、CD658、CD659、CD660、CD661、CD662、CD663、CD664、CD665、CD666、CD667、CD668、CD669、CD670、CD671、CD672、CD673、CD674、CD675、CD676、CD677、CD678、CD679、CD680、CD681、CD682、CD683、CD684、CD685、CD686、CD687、CD688、CD689、CD690、CD691、CD692、CD693、CD694、CD695、CD696、CD697、CD698、CD699、CD700、CD701、CD702、CD703、CD704、CD705、CD706、CD707、CD708、CD709、CD710、CD711、CD712、CD713、CD714、CD715、CD716、CD717、CD718、CD719、CD720、CD721、CD722、CD723、CD724、CD725、CD726、CD727、CD728、CD729、CD730、CD731、CD732、CD733、CD734、CD735、CD736、CD737、CD738、CD739、CD740、CD741、CD742、CD743、CD744、CD745、CD746、CD747、CD748、CD749、CD750、CD751、CD752、CD753、CD754、CD755、CD756、CD757、CD758、CD759、CD760、CD761、CD762、CD763、CD764、CD765、CD766、CD767、CD768、CD769、CD770、CD771、CD772、CD773、CD774、CD775、CD776、CD777、CD778、CD779、CD780、CD781、CD782、CD783、CD784、CD785、CD786、CD787、CD788、CD789、CD790、CD791、CD792、CD793、CD794、CD795、CD796、CD797、CD798、CD799、CD800、CD801、CD802、CD803、CD804、CD805、CD806、CD807、CD808、CD809、CD810、CD811、CD812、CD813、CD814、CD815、CD816、CD817、CD818、CD819、CD820、CD821、CD822、CD823、CD824、CD825、CD826、CD827、CD828、CD829、CD830、CD831、CD832、CD833、CD834、CD835、CD836、CD837、CD838、CD839、CD840、CD841、CD842、CD843、CD844、CD845、CD846、CD847、CD848、CD849、CD850、CD851、CD852、CD853、CD854、CD855、CD856、CD857、CD858、CD859、CD860、CD861、CD862、CD863、CD864、CD865、CD866、CD867、CD868、CD869、CD870、CD871、CD872、CD873、CD874、CD875、CD876、CD877、CD878、CD879、CD880、CD881、CD882、CD883、CD884、CD885、CD886、CD887、CD888、CD889、CD890、CD891、CD892、CD893、CD894、CD895、CD896、CD897、CD898、CD899、CD900、CD901、CD902、CD903、CD904、CD905、CD906、CD907、CD908、CD909、CD910、CD911、CD912、CD913、CD914、CD915、CD916、CD917、CD918、CD919、CD920、CD921、CD922、CD923、CD924、CD925、CD926、CD927、CD928、CD929、CD930、CD931、CD932、CD933、CD934、CD935、CD936、CD937、CD938、CD939、CD940、CD941、CD942、CD943、CD944、CD945、CD946、CD947、CD948、CD949、CD950、CD951、CD952、CD953、CD954、CD955、CD956、CD957、CD958、CD959、CD960、CD961、CD962、CD963、CD964、CD965、CD966、CD967、CD968、CD969、CD970、CD971、CD972、CD973、CD974、CD975、CD976、CD977、CD978、CD979、CD980、CD981、CD982、CD983、CD984、CD985、CD986、CD987、CD988、CD989、CD990、CD991、CD992、CD993、CD994、CD995、CD996、CD997、CD998、CD999、CD1000。

[0087] 其他示例性组分

[0088] 在某些实施方案中,本文所描述的工程化多肽,诸如CAR,进一步包含T细胞存活基序。T细胞存活基序可为在抗原刺激之后有助于T淋巴细胞存活的任何氨基酸序列或基序。在某些实施方案中,T细胞存活基序为或衍生自CD3、CD28、IL-7受体(IL-7R)的细胞内信号传导域、IL-12受体的细胞内信号传导域、IL-15受体的细胞内信号传导域、IL-21受体的细

胞内信号传导域,或转化生长因子 $\beta$  (TGFB) 受体的胞内信号传导域。

[0089] 示例性修饰

[0090] 在某些实施方案中,本文所提供的工程化多肽是通过例如酰化、酰胺化、糖基化、甲基化、磷酸化、硫酸化、类小泛素化(sumoylation)及/或泛素化(或其他蛋白质修饰)修饰。

[0091] 在某些实施方案中,本文提供的工程化多肽经能够提供可检测信号的标记物(例如放射性同位素或荧光化合物)标记。

[0092] 在某些实施方案中,本文所提供的工程化多肽的一或多个侧链经衍生化,例如赖氨酰基及氨基端残基用丁二酸或其他羧酸酐衍生化,或用例如酰亚胺酯(诸如吡啶亚胺甲酸甲酯);吡哆醛磷酸酯;吡哆醛;氯硼氢化物;三硝基苯磺酸;0-甲基异脲;2,4戊二酮;及与乙醛酸酯的转胺酶催化反应衍生化。在某些实施方案中,羧基侧基、天冬氨酰基或谷氨酰基可通过与碳二酰亚胺(R-N=C=N-),诸如1-环己基-3-(2-吗啉基-4-乙基)碳化二亚胺或1-乙基-3-(4-氮鎓-4,4-二甲基戊基)碳化二亚胺反应来选择性修饰。

[0093] 示例性核酸

[0094] 本文提供编码本文所描述的工程化多肽的核酸。可用于产生本文所描述的工程化多肽的核酸包括DNA、RNA及核酸类似物。核酸类似物可在碱基部分、糖部分或磷酸酯骨架处进行修饰,且可包括以脱氧尿苷取代脱氧胸苷,以5-甲基-2'-脱氧胞苷或5-溴-2'-脱氧胞苷取代脱氧胞苷。糖部分的修饰可包括核糖的2'羟基的修饰,以形成2'-O-甲基或2'-O-烯丙基糖。脱氧核糖磷酸酯骨架可经修饰以制备吗啉基核酸,其中各碱基部分连接至六元吗啉基环,或肽核酸,其中脱氧磷酸酯骨架链由假肽主链置换且保留四个碱基。参见例如Summerton及Weller(1997) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7:187-195;及Hyrup等人(1996) *Bioorgan. Med. Chain.* 4:5-23。此外,脱氧磷酸酯骨架可经(例如)硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯骨架、氨基亚磷酸酯(phosphoroamidite)或烷基磷酸三酯骨架置换。

[0095] 在某些实施方案中,本文所描述的编码工程化多肽的核酸包含在核酸载体中。例如,感兴趣的细胞,例如T淋巴细胞,可使用含有编码本文所描述的工程化多肽的核酸(多核苷酸)的合成载体、慢病毒或反转录病毒载体、自主复制质粒、病毒(例如反转录病毒、慢病毒、腺病毒或疱疹病毒)或其类似物来转化。在一些实施方案中,包含本文所描述的工程化多肽的载体为反转录病毒载体。在一些实施方案中,包含编码本文所描述的工程化多肽的核酸的载体为慢病毒载体。适用于细胞(例如,T淋巴细胞)的转化的慢病毒载体包括但不限于美国专利号5,994,136;6,165,782;6,428,953;7,083,981;及7,250,299中所描述的慢病毒载体。适用于细胞(例如,T淋巴细胞)的转化的HIV载体包括但不限于美国专利号5,665,577中所描述的载体。

[0096] 在某些实施方案中,本文所描述的编码工程化多肽的核酸可操作地连接至启动子。在一些实施方案中,所述启动子为T细胞特异性启动子、自然杀手(NK)细胞特异性启动子、在T细胞或NK细胞内发挥功能的诱导型启动子或组成型启动子。

[0097] 示例性细胞

[0098] 本文所提供的工程化多肽可在可用于工程化多肽(诸如CAR)表达的细胞中表达,即细胞经工程改造以包含编码本文所提供的工程化多肽的核酸,从而在细胞中表达核酸时,细胞表达本文所描述的工程化多肽。举例而言,本文所描述的工程化多肽可在T淋巴细

胞或自然杀伤细胞中表达。表达本文所描述的CAR的本文所提供的细胞可被称作“CAR细胞”。

[0099] 在某些实施方案中,本文提供一种细胞(例如T淋巴细胞或自然杀伤细胞),其已经修饰以表达包含本文所提供的降解域的工程化多肽。在一些实施方案中,细胞已经修饰以表达工程化多肽,该多肽为包含以下的CAR:(a) CAR组分,诸如抗原结合域、跨膜域、细胞信号传导域及/或共刺激域;及(b)降解域。在一些实施方案中,细胞已经修饰以表达包含融合至或插入至另一蛋白中的降解域的工程化多肽。使经修饰的细胞与本文所提供的降解剂接触,使得工程化多肽泛素化及降解。

[0100] 在一些实施方案中,本文提供的工程化多肽在T淋巴细胞中表达。T淋巴细胞可为初始T淋巴细胞或MHC受限的T淋巴细胞。在某些实施方案中,T淋巴细胞为肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)。在某些实施方案中,T淋巴细胞已自肿瘤活检中分离或已由自肿瘤活检中分离的T淋巴细胞扩增。在某些其他实施方案中,T淋巴细胞已自扩增自外周血液、脐带血或淋巴的T淋巴细胞分离或扩增。

[0101] 在一些实施方案中,经工程改造以包含/表达本文所描述的工程化多肽的细胞(例如,T淋巴细胞)对于所述细胞(例如,T淋巴细胞)作为本文所描述的治疗方法的一部分将被施用至的受试者而言为自体的。在其他实施方案中,经工程改造以包含/表达本文所描述的工程化多肽的细胞(例如,T淋巴细胞)对于所述细胞(例如,T淋巴细胞)将被施用至的受试者而言为同种异体的。在同种异体细胞(例如,T淋巴细胞)用于制备经修饰细胞,诸如CAR细胞的情况下,优选选择将降低个体中的移植物抗宿主病(GVHD)可能性的细胞(例如,T淋巴细胞)。举例而言,在某些实施方案中,选择病毒特异性T淋巴细胞来制备CAR T淋巴细胞;此类淋巴细胞将预期具有与任何接受体抗原结合且因此被其活化的大大降低的天然能力。在某些实施方案中,接受体介导的同种异体细胞(例如T淋巴细胞)的排斥反应可通过向宿主共施用一或多种免疫抑制剂,例如环孢霉素(cyclosporine)、他克莫司(tacrolimus)、雷帕霉素(sirolimus)、环磷酰胺(cyclophosphamide)或其类似物来降低。

[0102] 在一些实施方案中,T淋巴细胞获自受试者,任选地扩增,然后用编码本文所提供的工程化多肽的载体转化,且任选地然后扩增。在一些实施方案中,T淋巴细胞获自受试者,任选地扩增,然后用编码工程化多肽(其为本文所描述的CAR)的载体转化,且任选地然后扩增。在一些实施方案中,可使用可选标记物获得含有载体的细胞。在一些实施方案中,T淋巴细胞获自个体,任选地扩增,且然后经修饰以将降解域插入所需内源性蛋白基因中,从而表达包含降解域的工程化多肽,该降解域融合至或插入内源性蛋白内。经修饰T淋巴细胞可任选地进一步扩增。

[0103] 在某些实施方案中,用于表达本文提供的工程化多肽的T淋巴细胞包含天然TCR蛋白,例如能够形成天然TCR复合物的TCR- $\alpha$ 及TCR- $\beta$ 。在某些其他实施方案中,T淋巴细胞中编码TCR- $\alpha$ 及TCR- $\beta$ 的天然基因中的任一者或两者经修饰为无功能性的,例如部分或全部缺失或插入突变。

[0104] 在某些实施方案中,本文所描述的CAR的信号传导域可用于促进包含/表达CAR的细胞(例如,T淋巴细胞)的增殖及扩增。举例而言,使用针对CD3及CD28的抗体,例如附接至珠粒的抗体,可扩增未经修饰的T淋巴细胞及包含含有CD3 $\zeta$ 信号传导域及CD28共刺激域的多肽的T淋巴细胞;参见例如美国专利号5,948,893;6,534,055;6,352,694;6,692,964;6,

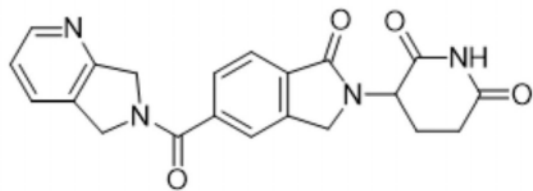
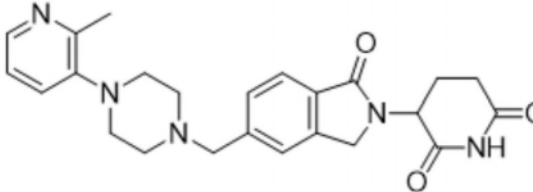
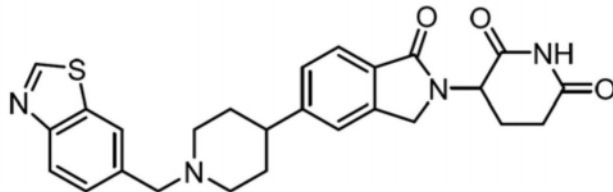
887,466;及6,905,681。类似地,针对信号传导基序的抗体可用于刺激包含本文所描述的CAR的细胞(例如,T淋巴细胞)的增殖。

[0105] 在某些实施方案中,工程化多肽可用作“自杀基因”或“安全开关”,其使得能够在需要时杀死基本上所有表达工程化多肽的细胞。举例而言,降解域可被插入至表达细胞存活及/或特定活性所需的内源性蛋白的基因中。使细胞与降解剂接触,使得内源性蛋白泛素化及降解(即,包含降解域及内源性蛋白的工程化多肽泛素化及降解),从而使细胞无活性或杀死细胞。

#### [0106] 示例性降解剂

[0107] 如本文所用,术语“降解剂”指能够结合本文所提供的降解域与泛素连接酶(诸如E3连接酶)的分子(例如,小分子)。在一些实施方案中,降解剂结合至降解域且结合至cereblon。在一些实施方案中,降解剂结合降解域和泛素连接酶,引起E3连接酶与降解域之间的结合。在一些此类实施方案中,包含降解域的工程化多肽在通过降解剂介导的结合之后通过泛素连接酶泛素化。

[0108] 在一些实施方案中,降解剂为cereblon结合化合物。在一些实施方案中,降解剂为3-(5-(6,7-二氢-5H-吡咯并[3,4-b]吡啶-6-羰基)-1-侧氧基异吲哚啉-2-基)哌啶-2,6-二酮(化合物B)、3-(5-((4-(2-甲基吡啶-3-基)哌嗪-1-基)甲基)-1-侧氧基异吲哚啉-2-基)哌啶-2,6-二酮(化合物C),或3-[5-[1-(1,3-苯并噻唑-6-基甲基)-4-哌啶基]-1-侧氧基-异吲哚啉-2-基]哌啶-2,6-二酮(化合物D)。

化合物	结构	名称
B		3-(5-(6,7-二氢-5H-吡咯并[3,4-b]吡啶-6-羰基)-1-侧氧基异吲哚啉-2-基)哌啶-2,6-二酮
C		3-(5-((4-(2-甲基吡啶-3-基)哌嗪-1-基)甲基)-1-侧氧基异吲哚啉-2-基)哌啶-2,6-二酮
D		3-[5-[1-(1,3-苯并噻唑-6-基甲基)-4-哌啶基]-1-侧氧基-异吲哚啉-2-基]哌啶-2,6-二酮

[0110] 在一些实施方案中,降解剂为WO 2019/038717 A1中所公开的化合物,其以全文引用的方式并入本文中。

[0111] 根据本文所描述的方法使用的降解剂,或其对映异构体或对映异构体的混合物;或其药学上可接受的盐、溶剂合物、水合物、共晶体、笼形物或多晶型物,可以以单剂量,诸如单次推注注射或口服片剂或丸剂形式递送;或随时间推移,诸如以随时间推移连续输注或随时间推移分次推注剂量递送。

[0112] 根据本文所描述的方法使用的降解剂可经配制用于静脉内、动脉内、非肠胃、肌肉内、皮下、鞘内或眼内施用,或在特定器官或组织内施用。

#### [0113] 示例性方法

[0114] 在一些实施方案中,提供一种降低包含降解域的工程化多肽的水平的方法,其包括使工程化多肽与降解剂接触。在一些实施方案中,所述接触在细胞中进行,且降解剂结合至降解域及泛素连接酶,引起工程化多肽的泛素化及降解。在一些实施方案中,工程化多肽的降解使得细胞的至少一种活性降低及/或细胞的至少一种活性增加及/或细胞死亡。非限制性示例性效应包括降低细胞(诸如T细胞)活化的临界值、增加细胞(诸如T细胞)的功能持久性、促进细胞存活及增加细胞增殖。在一些实施方案中,降解剂为化合物B、化合物C或化合物D。在一些实施方案中,所述方法包含向受试者施用降解剂,其中该受试者包含含有工程化多肽的细胞。

[0115] 在一些实施方案中,工程化多肽在降解剂存在下降解。在一些实施方案中,降解剂与降解域及与泛素连接酶(诸如cereblon)相互作用。在一些实施方案中,降解剂介导包含降解域、降解剂及泛素连接酶的复合物,使得工程化多肽泛素化。

[0116] 本文所提供的经修饰细胞,诸如经修饰以包含/表达工程化多肽的T淋巴细胞(即T细胞)(例如CAR细胞)可用于治疗将得益于经修饰细胞的个体,例如因为所述个体患有表达CAR的靶标的癌症。在一些实施方案中,细胞为T效应细胞。在一些实施方案中,细胞为CD4+T细胞或CD8+T细胞。在一些实施方案中,T细胞、T效应细胞、CD4+T细胞或CD8+T细胞包含工程化多肽。

[0117] 在一些实施方案中,本文提供杀死表达本文所描述的CAR的抗原结合域所结合的抗原的靶标细胞的方法,其中所述方法包括使所述靶标细胞与包含/表达本文所描述的CAR的本文所提供的经修饰细胞(例如,T细胞或NK细胞)接触。在一些实施方案中,该靶标细胞为癌细胞,例如,血癌细胞或实体肿瘤细胞。在一些实施方案中,本文提供治疗癌症的方法,所述方法包括向受试者施用包含/表达本文所描述的CAR的本文所描述的经修饰细胞,例如T细胞或NK细胞的群体,其中该CAR包含对癌症抗原(例如TSA或TAA)具有特异性的抗原结合域。

[0118] 在一些实施方案中,靶标细胞或癌细胞表达一或多种以下抗原或其片段:4-IBB、5T4、8H9、B7-H6、腺癌抗原、 $\alpha$ -胎儿蛋白、B细胞成熟抗原(BCMA)、BAFFR、B淋巴瘤细胞、C242抗原、CA9、癌胚抗原、CA-125、碳酸酐酶9(CA-IX)、CCR4、CD3、CD4、CD19、CD20、CD22、CD23(IgE受体)、CD28、CD30(TFRSF8)、CD33、CD38、CD40、CD44v6、CD44v7/8、CD51、CD52、CD56、CD74、CD80、CD123、CD152、CD171、CD200、CD221、CE7、CEA、C-MET、CNT0888、CTLA-4、DRS、EpCAM、ErbB2、ErbB3/4、EGFR、EGFRvIII、EphA2、EGP2、EGP40、FAP、胎儿AChR、纤连蛋白超域-B、叶酸受体-a、叶酸受体1、G250/CAIX、GD2、GD3、糖蛋白75、GPMB、HER2/neu、HGF、HLA-A1、MAGE A1、HLA-A2、NY-ESO-1、HMW-MAA、人类分散因子受体激酶、IGF-1受体、IGF-I、IgG1、IL-6、IL-13、IL-13受体 $\alpha$ 2、IL-11受体 $\alpha$ 、胰岛素样生长因子I受体、整合素 $\alpha$ 5I31、整合素 $\alpha$ vI33、 $\kappa$ 轻链、L1-CAM、 $\lambda$ 轻链、Lewis Y、间皮素、MORAb-009、MS4A1、MUC1、MUC16、黏液素CanAg、NCAM、N-羟乙酰基神经氨酸、NKG2D配体、NPC-1C、PDGF-R $\alpha$ 、PDL192、磷脂酰丝氨酸、前列腺特异性癌症抗原(PSCA)、前列腺癌细胞、PSMA、PSC1、RANKL、RON、ROR1、SCH 900105、SDC1、SLAMF7、sp17、TAG72、腱生蛋白C、TGF $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 3、TL1A、TRAIL-R1、TRAIL-R2、肿瘤抗原

CTAA16.88、VEGF-A、VEGF受体、VEGFR-1、VEGFR2、TEM1、TEM8及/或波形蛋白。

[0119] 在一些实施方案中,在施用本文所提供的经修饰细胞(诸如CAR细胞)后,可能需要减少或消除CAR表达且因此减少或消除靶向的细胞杀伤。在一些此类实施方法中,所述方法可进一步包含向受试者施用本文提供的降解剂。施用降解剂使得工程化多肽(例如CAR)降解,且减少或消除经修饰细胞对表达由CAR的抗原结合域结合的抗原的细胞的靶向。以此方式,可调节用CAR细胞治疗的活性,且可提高安全性。

[0120] 在一些实施方案中,首先向受试者施用该经修饰细胞群体,随后在施用该经修饰细胞群体之后的特定时段,例如在施用该细胞群体的后的30分钟、1小时、6小时、12小时、1天、2天、3天、4天、5天、6天或1周时,施用降解剂。

[0121] 在一些实施方案中,降解剂为化合物B、化合物C或化合物D。

[0122] 可根据本文所描述的治疗方法所治疗的癌症的非限制性清单包括淋巴瘤、白血病、肺癌、乳癌、前列腺癌、肾上腺皮质癌、甲状腺癌、鼻咽癌、黑色素瘤、皮肤癌、结肠直肠癌、硬纤维瘤、结缔组织增生性小圆细胞肿瘤、内分泌肿瘤、尤文氏肉瘤、外围原始神经外胚层瘤、实体生殖细胞肿瘤、肝母细胞瘤、成神经细胞瘤、非横纹肌肉瘤软组织肉瘤、骨肉瘤、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、威尔姆斯氏肿瘤、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、黏液瘤、纤维瘤及脂肪瘤。示例性淋巴瘤及白血病包括但不限于慢性淋巴细胞性白血病(小淋巴细胞性淋巴瘤)、B细胞前淋巴细胞性白血病、淋巴浆细胞淋巴瘤、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症、脾边缘区淋巴瘤、浆细胞骨髓瘤、浆细胞瘤、结外边缘区B细胞淋巴瘤、MALT淋巴瘤、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、原发性渗出液淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤、T淋巴细胞前淋巴细胞性白血病、T淋巴细胞大颗粒淋巴细胞性白血病、攻击性NK细胞白血病、成人T淋巴细胞白血病/淋巴瘤、结外NK/T淋巴细胞淋巴瘤、鼻病型/肠病型T淋巴细胞淋巴瘤、肝脾T淋巴细胞淋巴瘤、母细胞NK细胞淋巴瘤、蕈样霉菌病、塞扎里综合征、原发性皮肤退行性大细胞淋巴瘤、类淋巴瘤丘疹病、血管免疫母细胞T淋巴细胞淋巴瘤、外周T淋巴细胞淋巴瘤(非特定)、退行性大细胞淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤或非霍奇金氏淋巴瘤。

[0123] 本文所描述的经修饰细胞(诸如CAR细胞)在治疗疾病或病症中,例如在治疗患有癌症的个体中的功效可通过本领域技术人员已知的对特定疾病或病症具有特异性的用于指示疾病或病症的进展的一或多个标准评估。通常,当该标准中的一或多个者可检测地(例如显著地)自疾病病况值或范围移动至正常值或范围或朝向其移动时,向患有疾病/病症(例如癌症)的个体施用CAR细胞(例如,CAR T淋巴细胞)为有效的。

[0124] 本文中所描述的经修饰细胞可在任何药学上可接受的溶液中配制,优选为适用于递送活细胞的溶液,例如生理盐水溶液(诸如林格氏溶液(Ringer's solution))、明胶、糖类(例如乳糖、直链淀粉、淀粉或其类似物)、脂肪酸酯、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯啉等。此类制剂优选在添加CAR细胞之前灭菌,且可与辅助剂,诸如润滑剂、防腐剂、稳定剂、乳化剂、影响渗透压的盐、缓冲剂及着色剂混合。适用于配制CAR细胞的药物载剂为本领域中已知的且描述于例如W0 96/05309中。

[0125] 在某些实施方案中,本文所描述的经修饰细胞(例如CAR细胞)被配置为个别剂量,其中所述个别剂量包含至少、至多或约 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 或 $1 \times 10^{11}$ 个细胞。

[0126] 在某些实施方案中,本文所描述的经修饰细胞(例如,CAR细胞)经配置用于静脉内、动脉内、非肠胃、肌内、皮下、鞘内或眼内施用,或在特定器官或组织内施用。

#### 实施例

[0127] 7.1. 实施例1:IKZF1 ZNF2 G-基序标记的CAR保留功能

[0128] IKZF1 ZNF2标记的CD19 CAR T细胞(图2,SEQ ID NO:15的ZNF2氨基酸序列)的功能在报告子测定中评估,其中Jurkat细胞已经工程改造以在与CAR及TCR活化相关的Nur77基因主动转录时表达tdTomato(图3)。将编码ZNF标记的CD19 CAR、未标记的CD19 CAR或未标记的BCMA CAR阴性对照的慢病毒载体转导至Jurkat报告细胞系中。经转导的细胞然后在37°C下与表达CD19的K562靶标细胞系共培养。通过流式细胞测量术每2小时一次持续12小时以平均荧光强度(MFI)及总阳性细胞百分比形式来测定tdTomato的水平。结果显示CAR活化的时间及水平在经标记及未经标记的CD19 CAR之间皆相同,而BCMA CAR T在CD19目标细胞系存在下无法活化(图4A)。

[0129] 为测定在不同浓度的化合物A下实现的CAR降解水平,在经IKZF1 ZNF2标记或未标记的CD19 CAR转导的Jurkat上进行化合物A(图4B)的药物滴定。化合物A示于美国公开号2019/0008852 A1中第42页表4(化合物A)中。细胞与化合物A一起在37°C下孵育24小时,其后通过流式细胞测量术测定CAR水平。数据显示在高化合物A浓度下,IKZF1 ZNF2 G-基序降解子介导了约55%的CAR降解(图4C)。当用表达由CAR识别的抗原的K562进行挑战时,此CAR降解水平可能不足以抑制CAR活性(数据未示出)。此结果促使寻求修饰降解子蛋白序列,以使得其能够对化合物A更有力地作出反应。

[0130] 7.2. 实施例2:IKZF1锌指的替代性构型的评估

[0131] IKZF1-ZNF2降解子经进一步修饰以促进CAR降解改善。未标记的CAR及以原始IKZF1-ZNF2降解子标记的CAR与IKZF1 ZNF1、ZNF2及ZNF3的替代性取向及组合一起进行测试(图5A)。各CAR包括CD28跨膜域、4-1BB共刺激域及CD3 $\zeta$ (CD3z)信号传导域。IKZF1降解子融合至C端。参见SEQ ID NO:53至57。将编码未标记的CD19 CAR或用不同构型的IKZF1-ZNF标记的CAR的慢病毒载体转导至Jurkat细胞系中。经转导的细胞首先与表达CD19的K562靶标细胞系在37°C下共培养7.5小时,且通过流式细胞测量术测定tdTomato报告子的归一化水平。结果证明,相对于未标记的CAR,降解子标记中无一者在抗原存在下降低CAR活性(图5B)。随后,经CAR转导的Jurkat细胞在37°C下在化合物A滴定存在下培养24小时以测定各降解子的Y-max及EC50值。自此实验,确定ZNF2\_3标记在化合物A的最低浓度下引起增强的降解(图5C)。排除ZNF1\_2标记,因为ZNF1含有G-基序且对串联降解子添加额外复杂度。因此选择此构型用于进一步测试。

[0132] 为了证明此降解取决于功能性降解子,以WT ZNF2\_3(SEQ ID NO:13)标记的CAR,以及以在G-基序中含有G6N突变的ZNF2\_3(QCNQCNASF;SEQ ID NO:17)标记的CAR一起,如上所描述用化合物A滴定来测试(图5D)。虽然在较高化合物A浓度下,WT降解子驱动深度CAR降解,但G6N突变体标记的CAR未能对任何剂量的化合物A起反应。这些结果表明,G-基序的G6残基有助于化合物A与优化的ZNF2\_3降解子的相互作用。

[0133] 7.3. 实施例3:IKZF1 ZNF2\_3标记的CAR降解抑制活性

[0134] 在Jurkat报告子测定中,评估通过降解IKZF1 ZNF2\_3标记的CD19 CAR T细胞来废除CAR T信号传导的能力。将编码ZNF2\_3标记或未标记的CD19 CAR的慢病毒载体(参见实施

例2) 转导至报告子细胞系中。然后用100nM化合物A预处理经转导的细胞48小时,随后与表达CD19的K562靶标细胞系在37℃下共培养8小时。通过流式细胞测量术(图6A)测定呈平均荧光强度(MFI)(图6B),及总阳性细胞百分比,以及归一化CAR水平(图6C)形式的tdTomato的水平。在此化合物A浓度下,在用表达同源抗原的K562细胞挑战时,含有ZNF2\_3降解子的CAR发生足够深的降解以强有力地抑制CAR活性。

[0135] 通过测量下游MAPK信号传导途径的活化来评估通过CAR降解废除的信号传导。用如上文所描述的未标记、WT降解子标记或G6N降解子标记的CAR转导Jurkat细胞。细胞在37℃下经1mM化合物A预处理12小时,然后与亲本或表达CD19的K562细胞共培养30分钟。随后细胞沉淀,裂解,在变性蛋白质凝胶上操作,转移至膜,用抗体探测且用薄膜观测(图7)。这些结果表明在向含有WT IKZF1 ZNF2\_3标记的CAR的细胞施用化合物A之后,在抗原存在下,由Erk磷酸化(pErk)表示的由CAR活化的内源信号传导途径减弱。

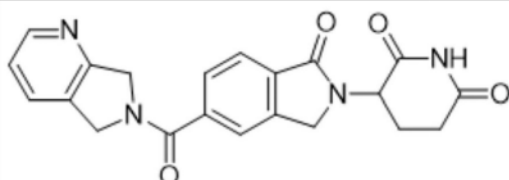
[0136] 7.4. 实施例4:用于鉴定新颖降解子-化合物对的降解子突变诱发

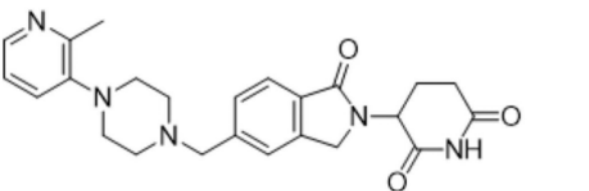
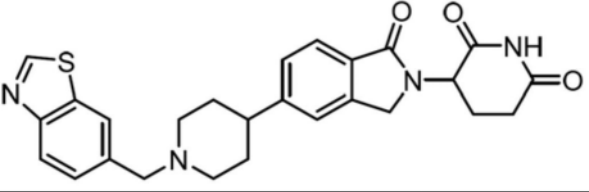
[0137] 结构研究显示当底物结合至cereblon/化合物复合物时,G-基序的位置1邻近化合物(图中未显示)。IKZF家族中的G-基序降解子序列的比对(图8)及其他C2H2锌指内所预测的降解子(图9)显示在此位置处的一组不同氨基酸。因此,为鉴定额外化合物:降解子对,在IKZF1 ZNF2的Q1位置中进行突变,且针对这些突变体针对活性筛选潜在化合物。构建含有Ikaros MBP-ZNF2(aa141-196)的质粒,其在Q1位置处具有替代氨基酸,且使用包括化合物B(图10A)的多种化合物进行体外泛素化筛选。在处理之后,细胞随后沉淀,裂解,在变性蛋白质凝胶上操作,转移至膜,用抗体探测且用薄膜观测(图10B)。如图10B中所示,IKZF1 ZNF2 Q1F在化合物B存在下重度泛素化。

[0138] 7.5. 实施例5:小分子筛选以鉴定具有针对Q1F降解子的强效活性的化合物

[0139] 针对Q1F降解子筛选一组潜在的降解子靶向化合物,产生一组强效降解子/小分子对。含有以IKZF1 ZNF2\_ZNF3 Q1F Nluc标记的CD19 CAR的慢病毒载体转导至Jurkat细胞中。该CD19 CAR类似于实施例2中的CD19 CAR,但包含ZNF2\_ZNF3 Q1F降解子(SEQ ID NO: 19)。经转导的细胞用各小分子的滴定处理或无药物处理,且然后在37℃下孵育18小时。洗涤细胞且用适当染色试剂染色以测量CAR水平。细胞在4℃下在染色试剂中孵育20min,且随后洗涤3次,随后在流式细胞仪上读取。CAR水平相对于未用药物处理的细胞归一化。EC50及Ymin值使用所得滴定曲线进行计算。此鉴别出强效降解Q1F降解子标记的CAR的小分子(表1)。

[0140] 表1:Q1F特异性化合物

化合物	结构	EC50 (Q1F降解子)	Ymin (Q1F降解子)
[0141] B		0.0048 μM	1.7%

[0142]		0.023 $\mu$ M	12%
		0.0007 $\mu$ M	4.2%

[0143] 7.6. 实施例6: IKZF1 ZNF2\_3 Q1F标记的CAR在化合物C存在下以CRBN及泛素蛋白酶体途径依赖性方式降解

[0144] 测定Q1F降解子标记的CAR降解对CRBN及泛素蛋白酶体途径的依赖性。CD19靶向CAR用IKZF1 ZNF2\_3 Q1F (SEQ ID NO:19) 或Q1F/G6N (SEQ ID NO:59) 标记。含有这些经标记的CAR的慢病毒载体随后转导至野生型 (WT) 或cereblon (CRBN) 基因敲除 (KO) Jurkat细胞中。

[0145] 为了确定Q1F标记的CAR是否可以以CRBN依赖性方式用化合物C降解, 在37°C下用DMSO或1mM化合物C (图11A) 处理经转导的Jurkat WT或Jurkat CRBN KO细胞1小时, 其后通过流式细胞测量术评估CAR水平。在此浓度的化合物C下, WT Jurkat细胞中经标记的CAR被降解至剩余20%以下, 而Jurkat CRBN KO细胞中经标记的CAR的水平与未标记的CAR一致 (图11B)。随后, 通过用单独的DMSO、20nM或200nM化合物C, 或者连同2 $\mu$ M NEDD8 E1酶抑制剂MLN4924或2 $\mu$ M蛋白酶体阻断剂硼替佐米 (Bortezomib) 一起, 处理经标记的CAR转导的WT Jurkat 2小时, 来测试CAR降解对泛素蛋白酶体途径的依赖性 (图11C)。在任一抑制剂存在下未用化合物C降解经标记的CAR表明, 功能性泛素蛋白酶体途径 (UPP) 对于Q1F标记的CAR降解而言为必需的。

[0146] 7.7. 实施例7: IKZF1 ZNF2\_3 Q1F标记的CAR降解抑制活性

[0147] 在Jurkat报告子测定中, 评估通过降解IKZF1 ZNF2\_3 Q1F标记的CD19 CAR T细胞来废除CAR T信号传导的能力 (图2及图3)。将编码ZNF2\_3 Q1F标记或Q1F/G6N标记的CD19 CAR的慢病毒载体转导至报告细胞系中。随后用1mM化合物C或化合物B预处理经转导细胞12小时, 随后在37°C下与亲本或表达CD19的K562靶细胞系共培养8小时。通过流式细胞测量术测定呈总阳性细胞百分比 (图12A), 以及平均荧光强度 (MFI, 图12B) 形式的tdTomato的水平。含有ZNF2\_3 Q1F降解子的CAR的降解在使用1mM化合物C时使信号传导降低约30%, 且使用化合物B时使信号传导降低约75%; 此相对差异与各者所见的降解强度相关。此外, 活性降低取决于具有完整G-基序, 这是由于G6N突变阻止抑制。

[0148] 7.8. 实施例8: IKZF1 ZNF2\_3 Q1F标记的CAR降解抑制初级T细胞中的活性

[0149] 评估使用化合物通过降解IKZF1 ZNF2\_3 Q1F标记的抗ROR1 CAR (图13A) 来滴定初级CAR T效应功能的能力。CAR包括与CD19 CAR类似的跨膜域、共刺激域及信号传导域, 但具有抗ROR1 scFv。将编码ZNF2\_3 Q1F标记或未标记的抗ROR1 CAR的慢病毒载体转导至活化的初级T细胞中。经转导的细胞在补充有IL2、IL7及IL15的培养基中扩增10天, 随后冷冻。在实验之前, 解冻细胞且使其在化合物C的剂量滴定或无药物下静置在培养基中。通过流式细

胞测量术测量CAR水平(图13B),表明ZNF2\_3 Q1F标记的CAR的表面水平可以用一定范围的化合物C浓度滴定。为了确定CAR降解对CAR T活性的影响,随后将细胞与表达Nuclight红标记的H-1975R0R1的靶标细胞系一起,以1:4的效应子:靶标细胞比共培养。将共培养物置放于Incucyte中24小时,以经由Nuclight红信号监测肿瘤杀伤(图14A),且收集上清液以通过MSD测量促炎性细胞因子产量(图14B至图14D;IL-2、TNF $\alpha$ 及IFN  $\gamma$ )。这些实验证实,如通过杀伤作用及细胞因子产量所测量的,初级CAR T细胞的效应功能可以通过靶向ZNF2\_3 Q1F标记的CAR在不同浓度的化合物C下降解来滴定。

[0150] 7.9. 实施例9:在体外长期抗原暴露期间经由Q1F降解子的CAR降解保持CAR功能

[0151] 在经由ZNF2\_3 Q1F标记的CD19 CAR降解,长期抗原暴露期间,体外测试为初级T细胞提供瞬时静息的功能影响。通过涂布有针对CAR scFv的抗体的平板提供刺激,且评估各种静息持续时间(图15)。用3.9nM化合物D(图16A)处理细胞,然后洗涤且在所含培养基中静置以允许CAR在再挑战前充分恢复。利用流式细胞测量术分析静息的细胞以评估CD27及CD28水平作为幼稚样群体的代表(图16B及图16C)。随后用球状体(3D)形式的Nuclight红标记的肿瘤细胞系挑战CAR T细胞,且收集上清液以使用Meso Scale Discovery ELISA测定来测量促炎性细胞因子产量。这些实验表明,与经历连续抗原暴露的CAR T细胞相比,为CAR T细胞提供瞬时静息时段引起较少活化且维持较幼稚样群体。在产生促炎性细胞因子,如IL-2、TNF $\alpha$ 及IFN  $\gamma$ (图17A)及抗肿瘤功能(图17B)方面,此瞬时静息时段还提供了功能性益处;这些细胞因子及细胞毒性的逐渐损失为T细胞耗竭的标志。

[0152] 7.10. 实施例10:在体外长期抗原暴露期间经由Q1F降解子的CAR降解保持CAR功能

[0153] 评估体内降解ZNF2\_3 Q1F标记的CAR的能力。将编码ZNF2\_3 Q1F标记的抗CD19 CAR的慢病毒载体转导至活化的初级T细胞中。经转导细胞在补充有IL2、IL7及IL15的培养基中扩增10天,随后冷冻。

[0154] 为了测定在无肿瘤存在下体内降解经降解子标记的CAR的能力,将CAR T细胞解冻,静置24小时且以每只动物 $2 \times 10^6$ 个细胞的剂量授受转移至不携带肿瘤的雌性NSG<sup>TM</sup>免疫缺陷小鼠中。24小时后,小鼠经口给予媒介物,0.85或8.5mg/kg的化合物D(图18B)。8、24、48及72小时后抽取血液(图18A),且通过流式法评估用抗scFv及抗CD3抗体染色所测定的CAR+T细胞的比例。在两种剂量下,在8小时保留少于5%的CD3+CAR+细胞,且甚至在24小时CAR仍保持显著降解(图18C),证明Q1F降解子标记的CAR可在体内有效降解。给药后48小时,CAR表达基本上恢复(图18C)。

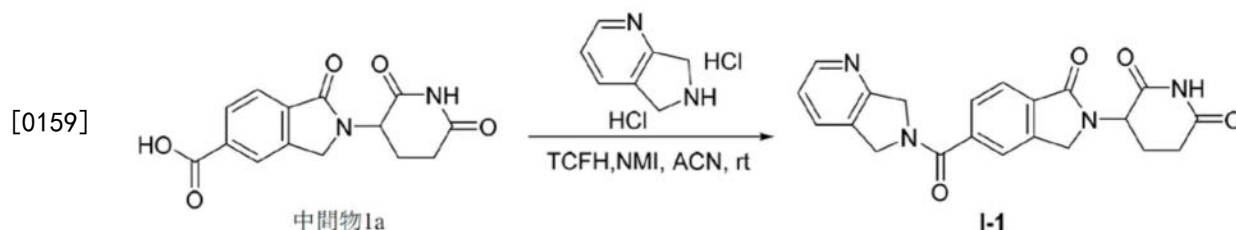
[0155] 为了检验异种移植癌症模型中体内降解子标记的CAR的下调及对CAR T功能的影响,雌性NSG<sup>TM</sup>小鼠注射 $5 \times 10^5$ 个稳定表达海肾(renilla)荧光素酶的Raji肿瘤细胞。六天后,将CAR T细胞解冻,静置24小时且以每只动物 $2 \times 10^6$ 个细胞的剂量过继性转移至小鼠中。在第0天及第1天BID向小鼠经口给与媒介物或6.85mg/kg化合物D(图19A)。在D1、D3及D10抽取血液及测量肿瘤荧光(图19A),且通过流式法评估用抗scFv及抗CD3抗体染色所测定的CAR+T细胞的比例。CAR降解降低经降解子标记的CAR T细胞的扩增及溶解细胞功能(图19B至图19D),显示CAR循环使CAR T细胞在功能上静息的能力。

[0156] 7.11. 实施例11:框内降解子标记敲入允许化合物介导控制内源性蛋白水平

[0157] 探索降解子标记框内敲入基因组基因座中以允许化合物介导调节内源性蛋白水平的能力。设计腺相关病毒载体以递送IKZF1 ZNF2\_3-V5标记-T2A-muThy1.1标记框内敲入

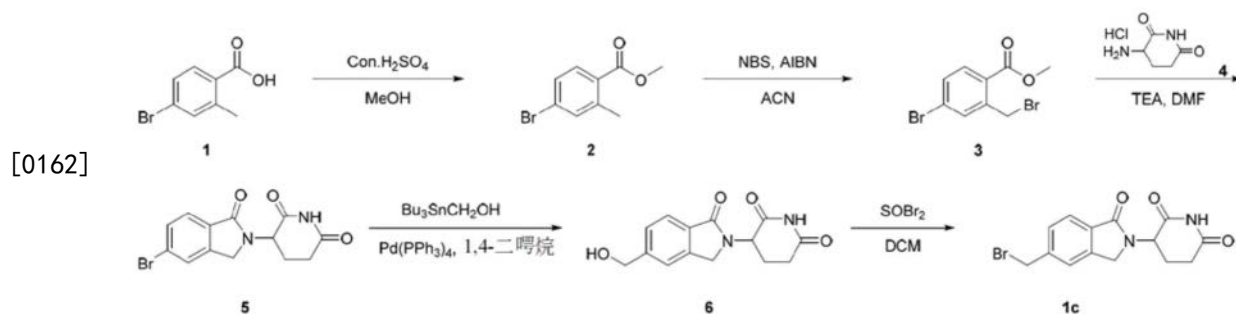
Jurkat细胞中的AURA (图20A至图20B) 或TOX基因座 (图20C至图20D) 在N端及C端取向。然后Jurkat用Cas9/引导RNA核糖核蛋白电穿孔。在5天之后,将经敲入的细胞与 $1\mu\text{M}$ 化合物A或DMSO一起孵育16小时。然后使细胞沉淀,裂解,在变性蛋白质凝胶上操作,转移至膜,用抗体探测,及用薄膜观测。Western印迹法显示Aurora A (图20A至图20B) 及经标记TOX (图20D) 的水平均在化合物A存在下降低,这表明用降解子标记内源性蛋白允许小分子控制蛋白质水平。

[0158] 7.12. 实施例12: 合成3- (5- (6,7-二氢-5H-吡咯并[3,4-b]吡啶-6-羰基) -1-侧氧基异吲哚啉-2-基) 哌啶-2,6-二酮 (化合物B)

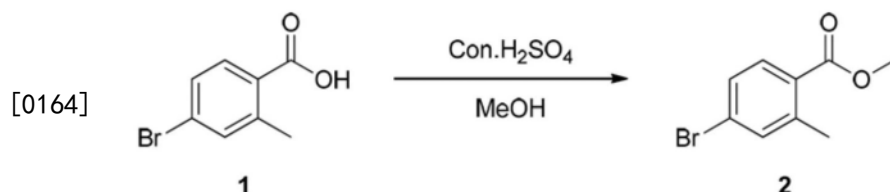


[0160] 向2- (2,6-二侧氧基-3-哌啶基) -1-侧氧基-异吲哚啉-5-羧酸 (400mg, 1.4mmol) 于 $\text{CH}_3\text{CN}$  (ACN) (5mL) 中的溶液中添加N,N,N',N'-四甲基氯甲脒六氟磷酸盐 (TCFH) (779mg, 2.8mmol)、N-甲基咪唑 (NMI) (1.2g, 14mmol) 及6,7-二氢-5H-吡咯并[3,4-b]吡啶; 二盐酸盐 (349mg, 1.8mmol)。然后将混合物在室温下搅拌1小时。通过LCMS监测反应。通过过滤来收集沉淀的固体。粗产物通过制备型HPLC纯化,得到呈灰色固体状的3- [5- (5,7-二氢吡咯并[3,4-b]吡啶-6-羰基) -1-侧氧基-异吲哚啉-2-基]哌啶-2,6-二酮 (438.7mg, 79%产率)。分析型LC/MS (方法5): MS [ $\text{M}^+\text{H}^+$ ] 391.1。 $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  11.03 (s, 1H), 8.54-8.43 (m, 1H), 7.94-7.65 (m, 4H), 7.41-7.23 (m, 1H), 5.23-5.11 (m, 1H), 5.00-4.75 (m, 4H), 4.62-4.36 (m, 2H), 3.04-2.84 (m, 1H), 2.69-2.56 (m, 1H), 2.50-2.36 (m, 1H), 2.12-2.00 (m, 1H)。

[0161] 7.13. 实施例13: 合成3- [5- (溴甲基) -1-侧氧基-异吲哚啉-2-基]哌啶-2,6-二酮 (中间物1c)



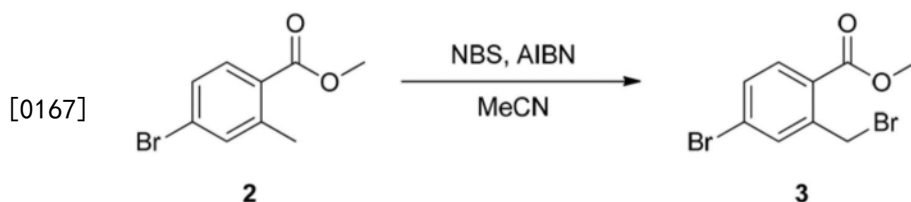
[0163] 合成化合物2



[0165] 在20至 $40^\circ\text{C}$ 之间向4-溴-2-甲基-苯甲酸 (120g, 558mmol) 于甲醇 (1.0L) 中的溶液中添加浓硫酸 (109g, 1.12mol, 60mL), 随后将混合物加热至 $65^\circ\text{C}$ 持续18h。TLC (石油醚/乙酸乙酯=3:1,  $R_f$  (反应物)=0.1,  $R_f$  (产物)=0.4) 指示该反应完成。浓缩反应混合物; 残余物在水相与有机层之间分离。用乙酸乙酯 (1L $\times$ 3) 萃取水相。合并的有机层通过碳酸氢钠饱和

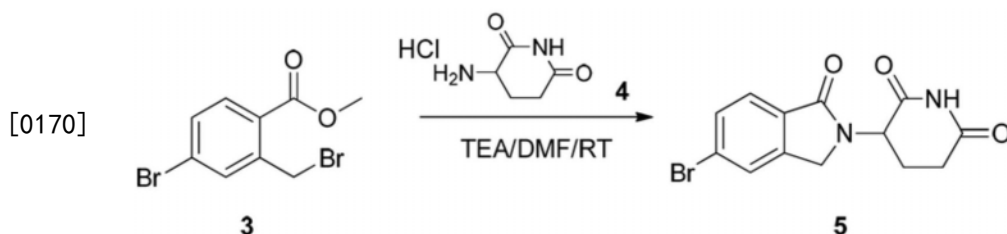
水溶液 (500mL)、盐水 (500mL) 洗涤且经无水硫酸钠干燥。过滤混合物,且浓缩滤液,得到呈黄色油状的4-溴-2-甲基-苯甲酸甲酯 (122g, 95%产率)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ7.76 (d, J = 8.4Hz, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.35 (dd, J = 8.4Hz, 1.6Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 2.56 (s, 3H)

[0166] 合成化合物3



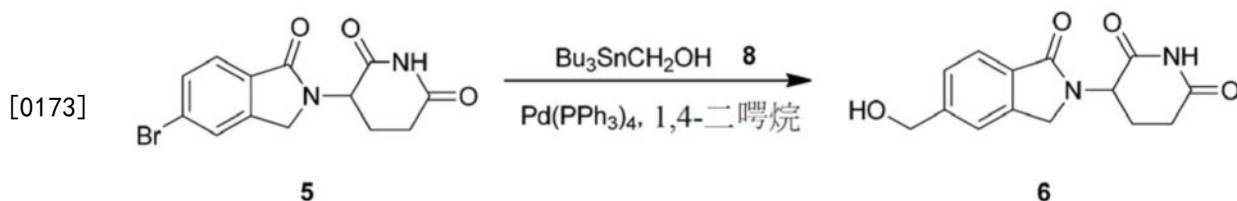
[0168] 向4-溴-2-甲基-苯甲酸甲酯 (122g, 533mmol) 于乙腈 (1.20L) 中的溶液中添加2, 2'-偶氮双(2-甲基丙腈) (6.12g, 37.3mmol), 将反应混合物加热至82°C, 逐份添加N-溴代丁二酰亚胺 (142g, 799mmol) 且搅拌3小时。LCMS指示该反应完成。在真空 (50°C) 下浓缩反应物。将残余物悬浮于石油醚/二氯甲烷 (20:1, 100mL) 中, 过滤且浓缩滤液, 得到150g粗产物, 其未经进一步纯化即直接用于下一步骤中。

[0169] 合成化合物5



[0171] 向4-溴-2-(溴甲基)苯甲酸甲基甲酯 (115g, 375mmol) 及3-氨基吡啶-2,6-二酮 (61.7g, 375mmol, HCl盐) 于N,N-二甲基甲酰胺 (80mL) 中的溶液中添加N,N-二异丙基乙胺 (145g, 1.13mol)。在50°C下搅拌混合物16小时。HPLC展示大部分起始材料耗尽。向反应混合物中添加乙酸 (150mL) 且在50°C下搅拌1小时。HPLC展示中间物完全耗尽。将反应物冷却至20°C并过滤, 用水 (200mL) 及乙醚乙酸酯 (200mL) 洗涤滤饼, 得到呈淡蓝色固体状的3-(5-溴-1-侧氧基-异吲哚啉-2-基)吡啶-2,6-二酮 (91g, 75.1%产率)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ11.01 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.73-7.66 (m, 2H), 5.14-5.09 (m, 1H), 4.47 (d, J = 16Hz, 1H), 4.34 (d, J = 16Hz, 1H), 2.92-2.89 (m, 1H), 2.73-2.58 (m, 1H), 2.41-2.37 (m, 1H), 2.03-1.99 (m, 1H)。

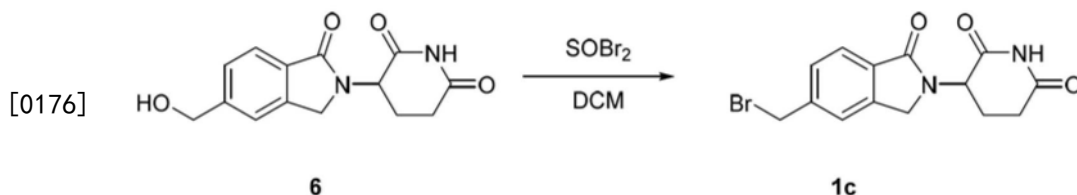
[0172] 合成化合物6



[0174] 向3-(5-溴-1-侧氧基-异吲哚啉-2-基)吡啶-2,6-二酮 (80g, 248mmol) 于无水二氧己环 (20mL) 中的溶液中添加三丁基锡烷基甲醇 (87g, 272mmol), 在25°C下搅拌混合物, 在氮气下向反应物中添加四(三苯基膦)钯 (0) (28.6g, 24.8mmol)。在100°C下搅拌反应混合物16小时。LCMS指示该反应完成。反应物经浓缩且通过二氯甲烷/甲醇 (10:1, 250mL × 2) 洗涤, 得到呈棕色固体状的3-[5-(羟甲基)-1-侧氧基-异吲哚啉-2-基]吡啶-2,6-二酮 (62g, 91.3%)

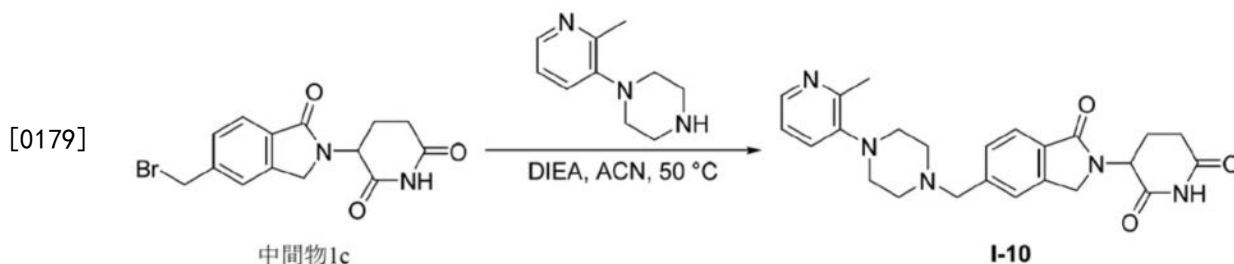
产率)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) : δ10.96 (s, 1H), 7.64 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.42 (d, J=7.6Hz, 1H), 5.73 (s, 1H), 5.10-5.06 (m, 1H), 4.59 (d, J=6.0Hz, 2H), 4.35 (dd, J=17.2Hz, 54Hz, 2H), 2.91-2.85 (m, 1H), 2.59-2.55 (m, 1H), 2.38-2.35 (m, 1H), 2.02-1.99 (m, 1H)

[0175] 合成化合物1c



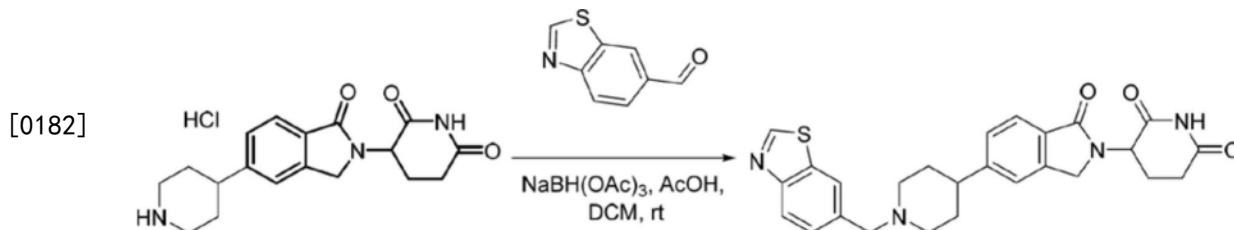
[0177] 向3-[5-(羟甲基)-1-侧氧基-异吲哚啉-2-基]哌啶-2,6-二酮(62g, 226mmol)于二氯甲烷(1.5L)中的悬浮液中添加亚磺酰溴(70.5g, 339mmol)。在18℃下搅拌反应混合物16小时。HPLC指示该反应完成。过滤反应混合物,用甲醇(150mL×2)洗涤固体,得到呈淡棕色固体状的3-[5-(溴甲基)-1-侧氧基-异吲哚啉-2-基]哌啶-2,6-二酮(45.0g, 59.0%产率)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) : δ10.97 (s, 1H), 7.70-7.66 (m, 2H), 7.56 (d, J=8.0Hz, 1H), 5.10-5.06 (m, 1H), 4.80 (s, 2H), 4.36 (dd, J=54Hz, 17.2Hz, 2H), 2.91-2.85 (m, 1H), 2.59-2.49 (m, 1H), 2.47-2.35 (m, 1H), 2.00-1.98 (m, 1H)

[0178] 7.14. 实施例14:合成3-(5-((4-(2-甲基吡啶-3-基)哌嗪-1-基)甲基)-1-侧氧基异吲哚啉-2-基)哌啶-2,6-二酮(化合物C)



[0180] 向3-[5-(溴甲基)-1-侧氧基-异吲哚啉-2-基]哌啶-2,6-二酮(400mg, 1.2mmol)于MeCN (ACN) (5mL)中的搅拌溶液中添加1-(2-甲基-3-吡啶基)哌嗪(315mg, 1.8mmol)及DIEA (460mg, 3.6mmol)。在50℃下搅拌混合物3小时。通过LCMS监测反应。浓缩混合物且通过制备型HPLC纯化残余物,得到呈灰色固体状的3-[5-[[4-(2-甲基-3-吡啶基)哌嗪-1-基]甲基]-1-侧氧基-异吲哚啉-2-基]哌啶-2,6-二酮(187.9mg, 34%产率)。分析型LC/MS(方法1): MS [M<sup>+</sup>H<sup>+</sup>] 434.2。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, 甲醇-d<sub>4</sub>) : δ8.40 (d, J=5.5Hz, 1H), 8.18 (d, J=8.2Hz, 1H), 7.93 (d, J=7.8Hz, 1H), 7.83-7.76 (m, 2H), 7.72 (d, J=7.6Hz, 1H), 5.23-5.12 (m, 1H), 4.90-4.80 (m, 4H), 4.65-4.50 (m, 4H), 3.54 (s, 4H), 2.98-2.85 (m, 1H), 2.84-2.75 (m, 1H), 2.74 (s, 3H), 2.60-2.44 (m, 1H), 2.24-2.14 (m, 1H)

[0181] 7.15. 实施例15:合成3-[5-[1-(1,3-苯并噻唑-6-基甲基)-4-哌啶基]-1-侧氧基-异吲哚啉-2-基]哌啶-2,6-二酮(化合物D)



[0183] 向3-[1-侧氧基-5-(4-哌啶基)异吲哚啉-2-基]哌啶-2,6-二酮;盐酸盐(1.5g, 4.12mmol)于DCM(20mL)中的搅拌溶液中添加1,3-苯并噻唑-6-甲醛(1.35g, 8.25mmol)及NaBH(OAc)3(2.62g, 12.37mmol)。将混合物在室温下搅拌过夜。浓缩混合物且通过制备型HPLC纯化,得到呈白色固体状的3-[5-[1-(1,3-苯并噻唑-6-基甲基)-4-哌啶基]-1-侧氧基-异吲哚啉-2-基]哌啶-2,6-二酮(968.9mg, 2.0233mmol, 49.076%产率)。LCMS: 475.1[M+1]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR(300MHz, 甲醇-d<sub>4</sub>): δ9.40(s, 1H), 8.33(s, 1H), 8.22(d, J=8.4Hz, 1H), 7.81-7.71(m, 2H), 7.55-7.36(m, 2H), 5.24-5.09(m, 1H), 4.62-4.39(m, 4H), 3.76-3.62(m, 2H), 3.33-3.19(m, 2H), 3.13-2.99(m, 1H), 2.95-2.73(m, 2H), 2.60-2.38(m, 1H), 2.24-1.95(m, 5H)。

[0184] 7.16. 实施例16: 化合物A、化合物B、化合物C及化合物D的选择性。

[0185] DF15多发性骨髓瘤细胞稳定表达ePL标记的Aiolos、Ikaros或GSPT1, 及MDS-L细胞稳定表达ePL标记的CK1a, 这些细胞系经由慢病毒感染pLOC-ePL-Aiolos(或Ikaros、GSPT1或CK1a)产生。表达融合至ePL标记(DiscoverX)的Ikaros、Aiolos及GSPT1的DF15多发性骨髓瘤细胞, 及表达融合至ePL标记的CK1a的MDS-L细胞分配于用化合物(化合物A、化合物B、化合物C及化合物D)预点样的384孔盘(Corning编号3570)中。使用以10μM开始且降至0.0005μM的3倍稀释液, 以10点剂量反应曲线, 将化合物由声波分配器(来自EDC Biosystems的ATS声波转移系统)分配至384孔盘中。随后, 每孔分配含有5000个DF15或MSD-L细胞的25μL培养基(RPMI-1640+10%热不活化FBS+25mM Hepes+1mM丙酮酸钠+1×NEAA+1×青霉素链霉素谷氨酰胺)。测定平板在37℃与5%CO<sub>2</sub>下孵育4小时, 除了GSPT1孵育20小时。在孵育之后, 将25μL InCELL Hunter检测试剂工作溶液(DiscoverX, 目录号96-0002, Fremont, CA)添加至各孔中且在室温下避光孵育60分钟。60分钟后, 在Envision或PHERAstar发光读取器上读取发光。

[0186] 对于Helios, 使用CRISPR/Cas9工程改造稳定Jurkat细胞系, 以将框内HiBit标记插入IKZF2基因的羧基端阅读框架中。使用声波分配器将测试化合物转移至1536孔盘, 且以5μl最终体积的10,000个细胞/孔涂布DMEM/10%FCS中的Jurkat/Helios/HiBit细胞。细胞在37℃、95% RH下孵育18小时。通过添加2μl/孔的Nano-Glo试剂(Promega), 在室温下孵育30min且在微量滴定平板读取器上读取发光来测量荧光素酶活性。

[0187] 为测定用于给定底物的降解的化合物的EC<sub>50</sub>值(实现所观测到的最大降解的一半的化合物浓度), 使用四参数逻辑模型(S形剂量-反应模型)(FIT = (A + {(B-A) / (1 + [(C/x)<sup>D</sup>])})), 其中C为转折点(EC<sub>50</sub>), D为相关系数, 且A及B分别为拟合的上限及下限)。使用ActivityBase(IDBS)(一种数据分析软件包)处理及评估所有底物降解曲线。Y<sub>min</sub>为剩余蛋白质的最小百分比。

[0188] 结果展示于表2至表5中。

[0189] 表2: 化合物A

[0190]

降解子	Y <sub>min</sub> (%)	EC <sub>50</sub> (μM)
Q1F	NA	NA
Helios	1.5	0.0018
Aiolos	2.7	0.0064
Ikaros	3.2	0.022

GSPT1	91	0.039
CK1a	50	0.19

[0191] 表3:化合物B

降解子	Ymin (%)	EC50 ( $\mu\text{M}$ )
Q1F(来自表1)	1.7	0.0048
Helios	65	>10
Aiolos	93	>10
Ikaros	91	>10
GSPT1	72	0.054
CK1a	82	>10

[0193] 表4:化合物C

降解子	Ymin (%)	EC50 ( $\mu\text{M}$ )
Q1F(来自表1)	12	0.023
Helios	86	>10
Aiolos	83	>10
Ikaros	92	>10
GSPT1	89	>10

CK1a	98	>10
------	----	-----

[0196] 表5:化合物D

降解子	Ymin (%)	EC50 ( $\mu\text{M}$ )
Q1F(来自表1)	4.2	0.0007
Helios	24	0.46
Aiolos	87	>10
Ikaros	93	>10
GSPT1	96	>10
CK1a	81	>10

[0198] 如表2中所示,化合物A降解Helios、Aiolos及Ikaros,其中EC50为0.022 $\mu\text{M}$ 或更低。化合物A也以显著程度降解CK1a。相比之下,在实施例5中所描述的Jurkat分析中,化合物B以小于5nM的EC50降解Q1F降解子。尽管化合物B展示一些针对Helios的降解活性,但EC50>10 $\mu\text{M}$ ,其比Q1F降解子的EC50高超过3个数量级(表3)。化合物B也展示一些针对GSPT1的降解活性(表3)。实施例5中所描述的Jurkat分析中化合物C对Q1F降解子具有高选择性,其EC50小于25nM(表4)。实施例5中所描述的Jurkat分析中化合物D也对Q1F降解子具有选择性,其EC50小于1nM(表5),但其也展示一些Helios降解,其EC50为0.46 $\mu\text{M}$ (表5)。

[0199] 等效物

[0200] 本发明的范围不受本文所描述的特定实施方案限制。实际上,除了所描述的修改,本文提供的主题的各种修改将由以上描述而变得对本领域技术人员显而易见。此类修改旨在落入随附权利要求的范畴内。

[0201] 本文列举各种公开出版物、专利及专利申请,其公开内容以全文引用的方式并入。

[0202] 某些序列的表格

SEQ ID NO	描述	序列
1	X1F G-基序一致1	FCX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> CGX <sub>3</sub> X <sub>4</sub>
2	X1F G-基序一致2	FCX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> CGX <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub>
3	IKZF1 ZNF2 Q1F G-基序	FCNQCGAS
4	IKZF1 ZNF2 Q1F	GERPFFCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHS
5	IKZF1 ZNF2_ZNF3 Q1F一致	GERPFFCX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> C GX <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> TQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCHLCNY ACRRRDALTG HLRTHS
66	IKZF2 ZNF2_ZNF3 Q1F一致	GERPFFCX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> C GX <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> TQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCPFCY ACRRRDALTG HLRTHS
67	IKZF3 ZNF2_ZNF3 Q1F一致	GERPFFCX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> C GX <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> TQKGNL LRHIKLHTGE KPFKCHLCNY ACRRRDALTG HLRTHS
68	IKZF4 ZNF2_ZNF3 Q1F一致	GERPFFCX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> C GX <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> TQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCPFCNY ACRRRDALTG HLRTHS
6	IKZF1 ZNF2_ZNF3	GERPFQCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCHLCNY ACRRRDALTG HLRTHS
63	IKZF2 ZNF2_ZNF3	GERPFHCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCPFCY ACRRRDALTG HLRTHS
64	IKZF3 ZNF2_ZNF3	GERPFQCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHTGE KPFKCHLCNY ACRRRDALTG HLRTHS
65	IKZF4 ZNF2_ZNF3	GERPFHCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCPFCNY ACRRRDALTG HLRTHS
7	IKZF1 ZNF2_ZNF3 Q1F	GERPFFCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCHLCNY ACRRRDALTG HLRTHS
69	IKZF2 ZNF2_ZNF3 Q1F	GERPFFCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCPFCY ACRRRDALTG HLRTHS
70	IKZF3 ZNF2_ZNF3 Q1F	GERPFFCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHTGE KPFKCHLCNY ACRRRDALTG HLRTHS
71	IKZF4 ZNF2_ZNF3 Q1F	GERPFFCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCPFCNY ACRRRDALTG HLRTHS
8	IKZF1 ZNF1_ZNF2核苷酸序列	ggcattcgac ttcctaacgg aaaactaaag tgtgatatct gtgggatcat ttgcatcggg cccaatgtgc tcatggttca caaaagaagc cacactGGAG AACGGCCCTT CCAGTGCAAT CAGTGCGGGG CCTCATTCAC CCAGAAGGGC AACCTGCTCC GGCACATCAA GCTGCATTCC
9	IKZF1 ZNF1_ZNF2	GIRLPNGKLK CDICGIICIG PNVLMVHKRS HTGERPFQCN QCGASFTQKG NLLRHIKLHS
10	IKZF1 ZNF1_ZNF2_ZNF3核苷酸序列	ggcattcgac ttcctaacgg aaaactaaag tgtgatatct gtgggatcat ttgcatcggg cccaatgtgc tcatggttca caaaagaagc cacactGGAG AACGGCCCTT CCAGTGCAAT CAGTGCGGGG CCTCATTCAC CCAGAAGGGC AACCTGCTCC GGCACATCAA GCTGCATTCC ggggagaagc cttcaaatg ccacctctgc aactacgcoct gccgccggag ggacgcctc actggccacc tgaggacgca ctcc
11	IKZF1 ZNF1_ZNF2_ZNF3	GIRLPNGKLK CDICGIICIG PNVLMVHKRS HTGERPFQCN QCGASFTQKG NLLRHIKLHS GEKPFKCHLC NYACRRRDAL TGHLRTHS
12	IKZF1 ZNF2_ZNF3核苷酸序列	GGAGAACGGC CCTTCCAGTG CAATCAGTGC GGGGCCTCAT TCACCCAGAA GGGCAACCTG CTCCGGCACA TCAAGCTGCA TTCCggggag aagcccttca aatgccacct ctgcaactac gcctgccgcc ggagggagcgc cctcaactggc cacctgagga cgcactcc
13	IKZF1 ZNF2_ZNF3	GERPFQCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCHLCNY ACRRRDALTG HLRTHS
14	IKZF1 ZNF2核苷酸序列	GGAGAACGGC CCTTCCAGTG CAATCAGTGC GGGGCCTCAT TCACCCAGAA GGGCAACCTG CTCCGGCACA TCAAGCTGCA TTCC

[0203]

[0204]

15	IKZF1 ZNF2	GERPFQCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHS
60	IKZF2 ZNF2	GERPFHCNQCASFTQKGNLLRHIKLHS
61	IKZF3 ZNF2	GERPFQCNQCASFTQKGNLLRHIKLHT
62	IKZF4 ZNF2	GERPFHCNQCASFTQKGNLLRHIKLHS
16	IKZF1 ZNF2_ZNF3 G6N核苷酸序列	GGAGAACGGC CCTTCCAGTG CAATCAGTGC aacGCCTCAT TCACCCAGAA GGGCAACCTG CTCCGGCACA TCAAGCTGCA TTCCggggag aagcccttca aatgccacct ctgcaactac gcctgccgcc ggagggagcgc cctcaactggc cacctgagga cgactcc
17	IKZF1 ZNF2_ZNF3 G6N	GERPFQCNQC NASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCHLCNY ACRRRDALTG HLRTHS
18	IKZF1 ZNF2_ZNF3 Q1F核苷酸序列	ggagaacggc ccttctcttg caatcagtgc ggggcctcat tcaccagaa gggcaacctg ctccggcaca tcaagctgca ttccggggag aagcccttca aatgccacct ctgcaactac gcctgccgcc ggagggagcgc cctcaactggc cacctgagga cgactcc
19	IKZF1 ZNF2_ZNF3 Q1F	GERPFQCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCHLCNY ACRRRDALTG HLRTHS
59	IKZF1 ZNF2_ZNF3 Q1F/G6N	GERPFQCNQC NASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCHLCNY ACRRRDALTG HLRTHS
20	IKZF1 ZNF1 (氨基酸117-139)	LKCDICGIICIGPNVLMVHKRSH
21	IKZF1 ZNF2 (氨基酸145-167)	FQCNQCASFTQKGNLLRHIKLH
22	IKZF1 ZNF3 (氨基酸173-195)	FKCHLCNYACRRRDALTGHLRTH
23	IKZF1 ZNF4 (氨基酸201-224)	HKCGYCGRSYKQRSSLEEHKERCH
24	IKZF1 ZNF5 (氨基酸462-484)	YKCEHCRVFLFDHVMYTIHMGCH
25	IKZF1 ZNF6 (氨基酸490-514)	FECNMCGYHSQDRYEFSSHITRGEH
26	IKZF2 ZNF1 (氨基酸112-134)	LKCDVCGMVCIGPNVLMVHKRSH
27	IKZF2 ZNF2 (氨基酸140-162)	FHCNQCASFTQKGNLLRHIKLH
28	IKZF2 ZNF3 (氨基酸168-190)	FKCPFCYACRRRDALTGHLRTH
29	IKZF2 ZNF4 (氨基酸196-219)	HKCNFCYCGRSYKQRSSLEEHKERCH
30	IKZF2 ZNF5 (氨基酸471-493)	FKCEHCRVFLFDHVMYTIHMGCH
58	IKZF2 ZNF6 (氨基酸499-523)	LECNICGYRSQDRYEFSSHIVRGEH
31	IKZF3 ZNF1 (氨基酸118-140)	MNCDVCGLSICISFNVLMVHKRSH
32	IKZF3 ZNF2 (氨基酸146-168)	FQCNQCASFTQKGNLLRHIKLH
33	IKZF3 ZNF3 (氨基酸174-196)	FKCHLCNYACRRRDALTGHLRTH
34	IKZF3 ZNF4 (氨基酸202-224)	YKCEFCGRSYKQRSSLEEHKERC
35	IKZF3 ZNF5 (氨基酸452-474)	YRCDHCRVFLFDYVMFTIHMGC
36	IKZF3 ZNF6 (氨基酸480-504)	FECNMCGYRSHDRYEFSSHIARGEH
37	IKZF4 ZNF1 (氨基酸159-181)	LKCDVCGMVCIGPNVLMVHKRSH
38	IKZF4 ZNF2 (氨基酸187-209)	FHCNQCASFTQKGNLLRHIKLH
39	IKZF4 ZNF3 (氨基酸215-237)	FKCPFCNYACRRRDALTGHLRTH
40	IKZF4 ZNF4 (氨基酸248-271)	YKCNFCGRSYKQOSTLEEHKERCH
41	IKZF4 ZNF5 (氨基酸530-552)	FKCEHCRIFLFDHVMFTIHMGC
42	IKZF4 ZNF6 (氨基酸558-582)	FECNICGYHSQDRYEFSSHIVRGEH
43	IKZF5 ZNF1 (氨基酸82-104)	LKCRYCNYASKGTARLIEHIRIH
44	IKZF5 ZNF2 (氨基酸110-132)	HRCHLCPFASAYERHLEAHMRSH
45	IKZF5 ZNF3 (氨基酸138-161)	YKCELCFSFRCSDRSNLSHRRRKH
46	IKZF5 ZNF4 (氨基酸364-386)	HHCQHCDMYFADNILYTIHMGC
47	IKZF5 ZNF5 (氨基酸392-416)	FQCNICGCKCKNKYDFACHFARGQH

[0205]

48	人类Ikaros氨基酸序列	MDADEGQDMS QVSGKESPPV SDTPDEGDEP MPIPEDLSTT SGGQQSSKSD RVVASNVKVE TQSDEENGRA CEMNGEECAE DLRMLDASGE KMNGSHRDQG SSALSGVGGI RLPNGKCLKCD ICGIICIGPN VLMVHKRSHT GERPFQCNQC GASFTQKGNL LRHIKLSHGE KPFKCHLCNY ACRRRDALTG HLRTHSVGKPF HKCGYCGRSY KQRSLEEHK ERCHNYLESM GLPGTLYPVI KEETNHSEMA EDLCKIGSER SLVLDRLASN VAKRKSSMPQ KFLGDKGLSD TPYDSSASYE KENEMMKSHV MDQAINNAIN YLGAESLRPL VQTPPGGSEV VPVISPMYQL HKPLAEGTPR SNHSAQDSAV ENLLLSKAK LVPSEREASP SNSCQDSTDT ESNNEEQRSR LIYLTNHIAP HARNGLSLKE EHRAYDLLRA ASENSQDALR VVSTSGEQMK VYKCEHCRVL FLDHVMYTIH MGCHGFRDPF ECNMCYHSQ DRYEFSSHIT RGEHREHMS
49	人类Aiolos氨基酸序列	MEDIQTNAEL KSTQEQSVPA ESAAVLNDYS LTKSHEMENV DSGEGPANED EDIGDDSMKV KDEYSERDEN VLKSEPMGNA EEPEIPYSYS REYNEYENIK LERHVVSFDS SRPTSGKMNC DVCGLSCISF NVLMVHKRSH TGERPFQCNQ CGASFTQKGN LLRHIKLHTG EKPFKCHLCN YACQRRDALT GHLRTHSVEK PYKCEFCGRS YKQRSLEEH KERCRTFLQS TDPGDTASAE ARHIKAEMGS ERALVLDRLA SNVAKRKSSM PQKFIGEKRH CFDVNYNSSY MYEKESELIQ TRMMDQAINN AISYLGAEAL RPLVQTPPAP TSEMVPVISS MYPIALTRAE MSGAPQOELE KKSIIHLPEKS VPSEERGLSPN NSGHDSTDT SNHEERQNH YQONHMLSR ARNGMPLLKE VPRSVELLKP PPICRDHSV VINKEGEVMD VYRCDHCRVL FLDYVMFTIH MGCHGFRDPF ECNMCYRSH DRYEFSSHIA RGEHRALLK
50	人类Helios氨基酸序列	METEAIDGYI TCDNELSPER EHSNMAIDL T SSTPNGQHAS PSHMTSTNSV KLEMQSDEEC DRKPLSREDE IRGHDEGSSL EEPLIESSEV ADNRKVQELQ GEGGIRLPNG KLKCDVCGMV CIGNVLMVH KRSHTGERPF HCNQCGASFT QKGNLLRHIK LHSGEKPFKC PFCSYACRRR DALTGHLRTH SVGKPHKCN CGRSYKQRSS LEEHKERCHN YLQNVSMEEA GQVMSSHVPP MEDCKEQEPI MDNNISLVPF ERPAVIEKLT GNMGKRKSS PQKFVGEKLM RFSYPIHFD MNLTYEKEAE LMQSHMMDQA INNAITYLGA EALHPLMQHP PSTIAEVAPV ISSAYSQVYH PNRIERPISR ETADSHENNM DGPISLIRPK SRPQEREASP SNSCLDSTDS ESSHDDHQS Y QGHPALNPKR KQSPAYMKED VKALDTTKAP KGSLKDIYKV FNGEGEQIRA FKCEHCRVLF LDHVMYTIHM GCHGYRDPLE CNICGYRSQD RYEFSSHIVR GEHTFH
51	人类Eos氨基酸序列	MHTPPALPRR FQGGGRVTRP GSHRQKDNL ERDPSGGCVP DFLPQAQDSN HFIMESLFCF SSGDSSLEKE FLGAPVGPVS STPNSQHSSP SRSLANSIK VEMYDEESS RLLGPDERRLL EKDDSVIVED SLSEPLGYCD GSGPEPHSPG GIRLPNGKLG CDVCGMVCIG PNVLMVHKRS HTGERPFHCN QCGASFTQKG NLLRHIKLSH GEKPFKCFPC NYACRRRDAL TGHLRTHSVS SPTVKGPKYC NYCGRSYKQQ STLEEHKERC HNYLQSLSTE AQALAGQPGD EIRDLEMVPD SMLHSSSERP TFIIDLANS TKRKRSTPQK FVGEKQMRFS LSDLPYDVNS GGYEKDVELV AHHSLEPGFG SSLAFVGAEH LRPLRLPPTN CISELTPVIS SVYTQMQLP GRLELPGSRE AGEPELAD GGPLYRPRG PLTDPGASPS NGCQDSTDE SNHEDRVAGV VSLPQGPPPQ PPPTIVVGRH SPAYAKEDPK PQEGLLRGTP GPSKVLRVV GESGEPVKAF KCEHCRILFL DHVMFTIHMG CHGFRDPFEC NICGYHSQDR YEFSSHIVRG EHKVG
52	人类Pegasus氨基酸序列	MGEKKPEPLD FVKDFQEYLT QQTHHVNMIS GSVSGDKEAE ALQAGTDGD QNGLDHPSVE VSLDENSGML VDGERTFDG KLKCRYCNYA SKGTARLIEH IRIHTGEKPH RCHLCPFASA YERHLEAHR SHTGEKPYKC ELCSEFRCSDR SNLSHRRRK HKMVPKIGTR SSLSSKKMWG VLQKTSNLG YSRRALINLS PPSMVVQKPD YLNDFTHEIP NIQTDSYESM AKTTPGGLP RDPQELMVDN PLNQLSTLAG QLSSLPPENQ NPASPDVVPC

[0206]

		PDEKPFMIQQ PSTQAVVSAV SASIPQSSSP TSPEPRPSSH QRNYSFVAGP SSEPSAHTST PSIGNSQPST PAPALPVQDP QLLHHCQHCD MYFADNILYT IHMGCHGYEN PFQCNICGCK CKNKYDFACH FARGQHNQH
53	CAR CD19 CD28TM 41BB CD3z	DIQMTQTT SLSASLGDR VTISCRASQD ISKYLWYQQ KPDGTVKLLI YHTSRLHSGV PSRFSGSGSG TDYSLTISNL EQEDIATYFC QQGNTLPYTF GGGTKLEITG STSGSGKPGS GEGSTKGEVK LQESGPGPLVA PSQSLSVTCT VSGVSLPDYG VSWIRQPPRK GLEWLGVWIG SETTYNSAL KSRLTIKDN SKSQVFLKMN SLQDDTAIY YCAKHYYGG SYAMDYWGQG TSVTVSSESK YGPPCPPCPM FWVLVVVGGV LACYSLLVTV AFIIFWVKRG RKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQ EEDGCSCRFP EEEEGGCELR VKFSRSADAP AYQQGQNQLY NELNLGRREE YDVLDKRRGR DPEMGGKPRR KNPQEGLYNE LQDKMAEAY SEIGMKGERR RGKGDGLYQ GLSTATKDTY DALHMQUALPP RGGEGRGSLL LTCGDVEENP G
54	CD28TM 41BB CD3z ZNF2	DIQMTQTT SLSASLGDR VTISCRASQD ISKYLWYQQ KPDGTVKLLI YHTSRLHSGV PSRFSGSGSG TDYSLTISNL EQEDIATYFC QQGNTLPYTF GGGTKLEITG STSGSGKPGS GEGSTKGEVK LQESGPGPLVA PSQSLSVTCT VSGVSLPDYG VSWIRQPPRK GLEWLGVWIG SETTYNSAL KSRLTIKDN SKSQVFLKMN SLQDDTAIY YCAKHYYGG SYAMDYWGQG TSVTVSSESK YGPPCPPCPM FWVLVVVGGV LACYSLLVTV AFIIFWVKRG RKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQ EEDGCSCRFP EEEEGGCELR VKFSRSADAP AYQQGQNQLY NELNLGRREE YDVLDKRRGR DPEMGGKPRR KNPQEGLYNE LQDKMAEAY SEIGMKGERR RGKGDGLYQ GLSTATKDTY DALHMQUALPP RTGERPFQCN QCGASFTQKG NLLRHIKLS GGGEGRGSLL TCGDVEENPG
55	CD28TM 41BB CD3z ZNF1_2	DIQMTQTT SLSASLGDR VTISCRASQD ISKYLWYQQ KPDGTVKLLI YHTSRLHSGV PSRFSGSGSG TDYSLTISNL EQEDIATYFC QQGNTLPYTF GGGTKLEITG STSGSGKPGS GEGSTKGEVK LQESGPGPLVA PSQSLSVTCT VSGVSLPDYG VSWIRQPPRK GLEWLGVWIG SETTYNSAL KSRLTIKDN SKSQVFLKMN SLQDDTAIY YCAKHYYGG SYAMDYWGQG TSVTVSSESK YGPPCPPCPM FWVLVVVGGV LACYSLLVTV AFIIFWVKRG RKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQ EEDGCSCRFP EEEEGGCELR VKFSRSADAP AYQQGQNQLY NELNLGRREE YDVLDKRRGR DPEMGGKPRR KNPQEGLYNE LQDKMAEAY SEIGMKGERR RGKGDGLYQ GLSTATKDTY DALHMQUALPP RGIRLPNGKL KCDICGIICI GPNVLMVHKR SHTGERPFQC NQCASFTQK GNLLRHIKLS GGGEGRGSLL LTCGDVEENP G
56	CD28TM 41BB CD3z ZNF2_3	DIQMTQTT SLSASLGDR VTISCRASQD ISKYLWYQQ KPDGTVKLLI YHTSRLHSGV PSRFSGSGSG TDYSLTISNL EQEDIATYFC QQGNTLPYTF GGGTKLEITG STSGSGKPGS GEGSTKGEVK LQESGPGPLVA PSQSLSVTCT VSGVSLPDYG VSWIRQPPRK GLEWLGVWIG SETTYNSAL KSRLTIKDN SKSQVFLKMN SLQDDTAIY YCAKHYYGG SYAMDYWGQG TSVTVSSESK YGPPCPPCPM FWVLVVVGGV LACYSLLVTV AFIIFWVKRG RKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQ EEDGCSCRFP EEEEGGCELR VKFSRSADAP AYQQGQNQLY NELNLGRREE YDVLDKRRGR DPEMGGKPRR KNPQEGLYNE LQDKMAEAY SEIGMKGERR RGKGDGLYQ GLSTATKDTY DALHMQUALPP RGERPFQCN CGASFTQKGN LLRHIKLSG EKPFKCHLCN YACRRRDALT GHLRTHSGGG EGRGSLLTCG DVEENPG
57	CD28TM 41BB CD3z ZNF1_2_3	DIQMTQTT SLSASLGDR VTISCRASQD ISKYLWYQQ KPDGTVKLLI YHTSRLHSGV PSRFSGSGSG TDYSLTISNL EQEDIATYFC QQGNTLPYTF GGGTKLEITG STSGSGKPGS GEGSTKGEVK LQESGPGPLVA PSQSLSVTCT VSGVSLPDYG VSWIRQPPRK GLEWLGVWIG SETTYNSAL KSRLTIKDN SKSQVFLKMN SLQDDTAIY YCAKHYYGG SYAMDYWGQG TSVTVSSESK YGPPCPPCPM FWVLVVVGGV LACYSLLVTV

[0207]

		AFIIFWVKRG RKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQ EEDGCSCRFP EEEEGGCELR VKFSRSADAP AYQQGQNQLY NELNLGRREE YDVLDKRRGR DPEMGGKPRR KNPQEGLYNE LQKDKMAEAY SEIGMKGERR RGKGDGLYQ GLSTATKDTY DALHMQUALPP RGIRLPNGKL KCDICGIICI GPNVLMVHKR SHTGERPFQC NQCASFTQK GNLLRHIKHL SGEKPFKCHL CNYACRRRDA LTGHLRTHSG GGEGRGSLLT CGDVEENPG
72	Q9UKT9_IKZF3_146_168_23	FQCNQCGASFTQKGNLLRHIKHL
73	Q66K89_E4F1_220_242_23	HECKLCGASFRTKGSLIRHHRRH
74	Q6ZMY9_ZN517_205_227_23	FQCTECGKAFKQSSILLRHQLIH
75	Q6DD87_ZN787_178_200_23	FVCPRCGRGFSQPKSLARHLRLH
76	Q6ZMY9_ZN517_396_418_23	FECAECGKAFGRKSNLTLHQKIH
77	Q96JP5_ZFP91_400_422_23	LQCEICGFTCRQKASLNWHMKKH
78	Q6DD87_ZN787_150_172_23	YTCPDCGRSFTQSKSLAKHRRSH
79	Q96CK0_ZN653_528_550_23	FTCETCGKSFKRKNHLEVHRRTH
80	Q17R98_ZN827_817_839_23	FPCDVCVKVFGRRQQLSRHLSLH
81	Q6DD87_ZN787_317_339_23	HICVECGEGFVQGAALRRHKKIH
82	Q6DD87_ZN787_66_88_23	YICNECGKSFSSHWSKLRHQHRT
83	Q6ZMY9_ZN517_233_255_23	FQCGECGKAFRQSTQLAAHHRVH
84	Q96CK0_ZN653_556_578_23	LQCEICGYQCRQRASLNWHMKKH
85	Q9BU19_ZN692_417_439_23	LQCEICGFTCRQKASLNWHQRKH
86	Q6ZMY9_ZN517_317_339_23	YRCLRCGQRFIRGSSLLKHHRLH
87	Q6ZMY9_ZN517_261_283_23	YACGECGKAFFSRSSRLQHQKFH
88	Q8IZM8_ZN654_25_47_23	FACVICGRKFRNRGLMQKHLKNH
89	Q17R98_ZN827_374_396_23	FQCPICGLVIKRSYWKRMVVIH
90	Q6ZMY9_ZN517_368_390_23	HECPVCGRPFRRHNSLLLHLRLH
91	Q8N554_ZN276_496_518_23	YICDECGQTFKQRKHLVHQMRH
92	Q66K89_E4F1_463_485_23	FACAQCGKAFPKAYLLKKHQEVH
93	Q6ZMY9_ZN517_424_446_23	FACTECGKAFRRSYTLNEHYRLH
94	Q96NG8_ZN582_339_361_23	YECKEKGAFNQGSTLIRHQRIH
95	Q8N554_ZN276_524_546_23	LQCEVCGFQCRQRASLKHYHMTKH
96	Q6DD87_ZN787_94_116_23	NACADCCKTFSQSSHLVQHRRIH
97	Q6DD87_ZN787_122_144_23	YACLECGKRFSWSSNLMQHQRH
98	Q6ZMY9_ZN517_289_311_23	FACTECGKAFRRFTLNEHGRIH
99	Q96NG8_ZN582_283_305_23	YQCKEKGAFNRISHLKVHYRIH
100	Q96NG8_ZN582_395_417_23	YQCKVCGRAFKRVSHTLVHYRIH
101	Q6ZMY9_ZN517_452_474_23	YRCRACGRACSRSLTLIQHQKVH
102	Q9UKT9_IKZF3_118_140_23	MNCDVCGLSLCSIFNVLVHKRSH
103	Q96NG8_ZN582_367_389_23	YECKVCGKAFRVSSQLKQHQRH
104	Q96NG8_ZN582_311_333_23	YACKECGKTFSHRSQLIQHQTVH
105	Q96NG8_ZN582_423_445_23	YECKEKGAFSHCSQLIHHQVIH
106	Q96NG8_ZN582_199_221_23	YKCKEKGAFKYGSRLIQHENIH
107	Q96NG8_ZN582_227_249_23	YECKEKGAFNSGSNFIQHQRVH
108	Q66K89_E4F1_491_513_23	FRCGDCGKLYKTIHVGRHRRVH
109	Q66K89_E4F1_519_541_23	YPCPKCGKRYKTKNAQQVHFRT

名称	CHN	10	20	30	40	50	60	70	80	90	ID%	SEQ ID No
IKZF1_Ikaros	CHN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	100	48
IKZF1_Aiolos	CHN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	52	49
IKZF1_Hellos	CHN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	52	50
IKZF1_Eos	CHN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	49	51
IKZF1_Pegasus	CHN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	22	52

名称	CHN	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	ID%	SEQ ID No
IKZF1_Ikaros	CHN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	100	48
IKZF1_Aiolos	CHN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	52	49
IKZF1_Hellos	CHN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	52	50
IKZF1_Eos	CHN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	49	51
IKZF1_Pegasus	CHN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	22	52

名称	CHN	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	ID%	SEQ ID No
IKZF1_Ikaros	CHN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	100	48
IKZF1_Aiolos	CHN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	52	49
IKZF1_Hellos	CHN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	52	50
IKZF1_Eos	CHN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	49	51
IKZF1_Pegasus	CHN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	22	52

图1A

名称	CHN	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	ID%	SEQ ID No
IKZF1_ikaros	EETNHSEMPEDICKIGSERSLVLDRLASNVAKRKSSMPQKFLGDKGLSDLPYDSSA-----SYEKENEMKSHVMDQAINNAIYVIGAESLRPLVQTPP											100	48
IKZF1_Aiolos	-----HIKAEMGSERALVIDRLASNVAKRKSSMPQKFIGEKRHCFDWNVNSSY-----MYEKESELICTRMMDQAINNAISVIGAEALRPLVQTPP											52	49
IKZF1_Hellos	CKEQEPIMNINISLVPFERPAVIEKLTGMGRKSSTPQKVFGEKIMRFSPYDIHFDMLNLTYEKEAFIMQSHMDQAINNAITVIGAEALHPIHQHPP											52	50
IKZF1_Eos	EIRDLEWVPDSMLHSSSERPTFIDRLANSLITKRKRSTPQKVFGEKQMRFSLDLPYDVNSGGYKQVDELVAHHSLEPFGSSIAFVGAELHRLRPLPPT											49	51
IKZF1_Pegasus	-----WGVLOKKTSNLGYRRRALINLSPSMVQKPDYINDFTHEIPNIQTDSYESMAKITI--FTGGLPDRPQELMVDNPLNQLSTLAGQLSSLPPENQNP											22	52

名称	CHN	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	ID%	SEQ ID No
IKZF1_ikaros	GG-SEWVPISEMVOHLHKP-----LAEGTPRSHNSAQDSAVENLLILLSKAKIVPSEREAPSPNSQDSDTDESNNEEQRSGLLIYLJNHIAPHARNGLS-L											100	48
IKZF1_Aiolos	APTSEMVPVISSMVPALIT-----RAEVSNGAPQOLEKKSIIHLPEKSVPSERGLSPNNSGHDSTIDSNHEERQNHIIYQQNHMVLRRARNGMFL											52	49
IKZF1_Hellos	STIAEVAVPVISSAVSQVYH-PNRIERPISRETADSHENMDGPTSLIRPKSRPQREAPSPNSCLDSDSESSHDDHQSYQGHFALNPKRKQSPAY--M											52	50
IKZF1_Eos	NCISELITPVLISSVYTQMQLFGRLELFGSREAGEGPELADGGPILLYRPRGLITDPGASPSNGQDSDTDESNNHEDRVAGVWSLFGPPFPPTIVVG											49	51
IKZF1_Pegasus	ASPDWVFCPEKPFMIQQF-----STQAVVSAVSASIFQSSSPTSPEPRPSHSQRNYSPVAGFSPSESAHTSTPSSIGNSQPSTPAPALP											22	52

名称	CHN	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	ID%	SEQ ID No
IKZF1_ikaros	KEHFRAYD-----LLRAAENSQDALRVVSTSGEQMKVYKCEHCRVFLDHWVMTIHMCGHGFDPFECNMGYHSQDRYEFSSHITRGEHRFTMS											100	48
IKZF1_Aiolos	KEVPRSYE-----LLKPEPICPRDSVKVINKEGEVMDVYRCDCRVLFLDYVMFTIHMCGHGFDPFECNMGYRSHDRYEFSSHIFARGEHALLK											52	49
IKZF1_Hellos	KEIDVKALD-----TTKAPKGLKDIYKVRNKEGEQIRAFKCEHCRVFLDHWVMTIHMCGHGYRDPLECNIOGYRSQDRYEFSSHIVRGEHTFH---											52	50
IKZF1_Eos	RHSPAYAKEDPKQEGLLRGTGFGSKEVLRVVGESGEVPAKFKCEHCRILFLDHWVMTIHMCGHGFDPFECNIOGYHSQDRYEFSSHIVRGEHKVG---											49	51
IKZF1_Pegasus	VQDFQLL-----HHQOHCIDMYFADNIIYTIHMCGHYENPFCQNIQCGCKKNKYDFACHEFARGQHNQH---											22	52

图1A(续)

Uniprot	基因	蛋白质	起始	终止	长度	序列	SEQ ID NO
Q13422	IKZF1	Ikaros	117	139	23	LKCDICGIIICIGPNVLMVHKRSH	20
Q13422	IKZF1	Ikaros	145	167	23	FQCNQCGASFTQKGNLLRHIKHLH	21
Q13422	IKZF1	Ikaros	201	224	24	HKCGYGRSYKQRSSLEEHKERCH	23
Q13422	IKZF1	Ikaros	490	514	25	FECNMGYHSQDRYEFSSHIIRGEH	25
Q9UKS7	IKZF2	Helios	112	134	23	LKCDVCGMVICIGPNVLMVHKRSH	26
Q9UKS7	IKZF2	Helios	140	162	23	FHCNOCGASFTQKGNLLRHIKHLH	27
Q9UKS7	IKZF2	Helios	196	219	24	HKCNVYGRSYKQRSSLEEHKERCH	29
Q9UKS7	IKZF2	Helios	499	523	25	LECNICGYRSQDRYEFSSHIIVRGEH	58
Q9UKT9	IKZF3	Aiolos	118	140	23	MNCDVCGLSICISFNVLMVHKRSH	31
Q9UKT9	IKZF3	Aiolos	146	168	23	FQCNQCGASFTQKGNLLRHIKHLH	32
Q9UKT9	IKZF3	Aiolos	202	224	23	YKCEFCGRSYKQRSSLEEHKERC	34
Q9UKT9	IKZF3	Aiolos	480	504	25	FECNMGYRSHDRYEFSSHIARGEH	36
Q9H2S9	IKZF4	Eos	159	181	23	LKCDVCGMVICIGPNVLMVHKRSH	37
Q9H2S9	IKZF4	Eos	187	209	23	FHCNOCGASFTQKGNLLRHIKHLH	38
Q9H2S9	IKZF4	Eos	248	271	24	YKCNVYGRSYKQQSTLEEHKERCH	40
Q9H2S9	IKZF4	Eos	558	582	25	FECNICGYHSQDRYEFSSHIIVRGEH	42
Q9H5V7	IKZF5	Pegasus	392	416	25	FQCNICGCKCKNKYDFACHFARGQH	47

图1B

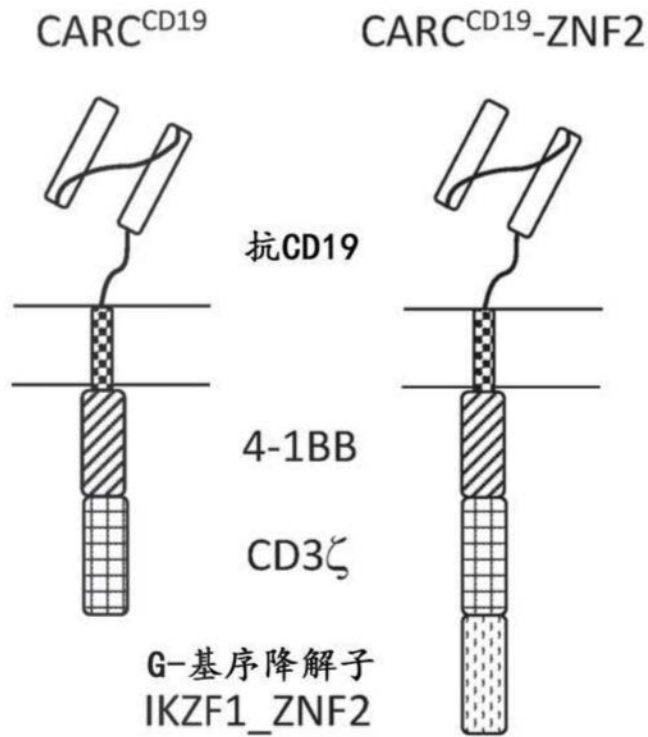


图2

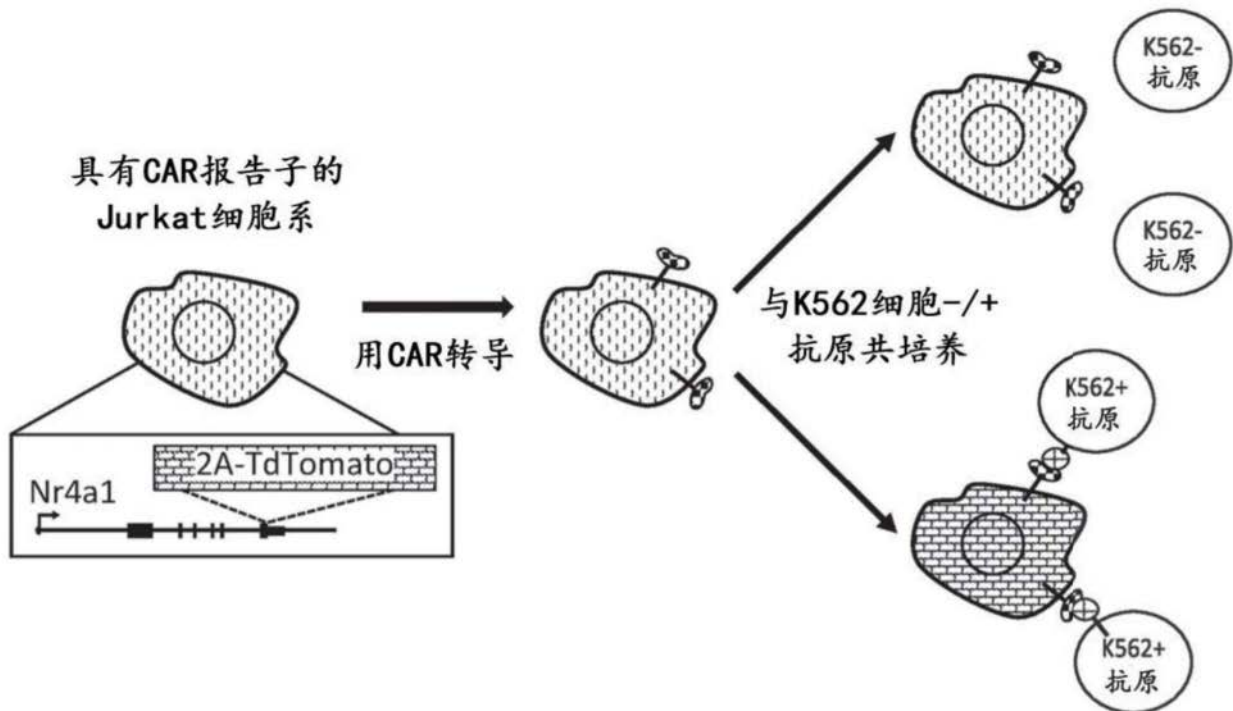


图3

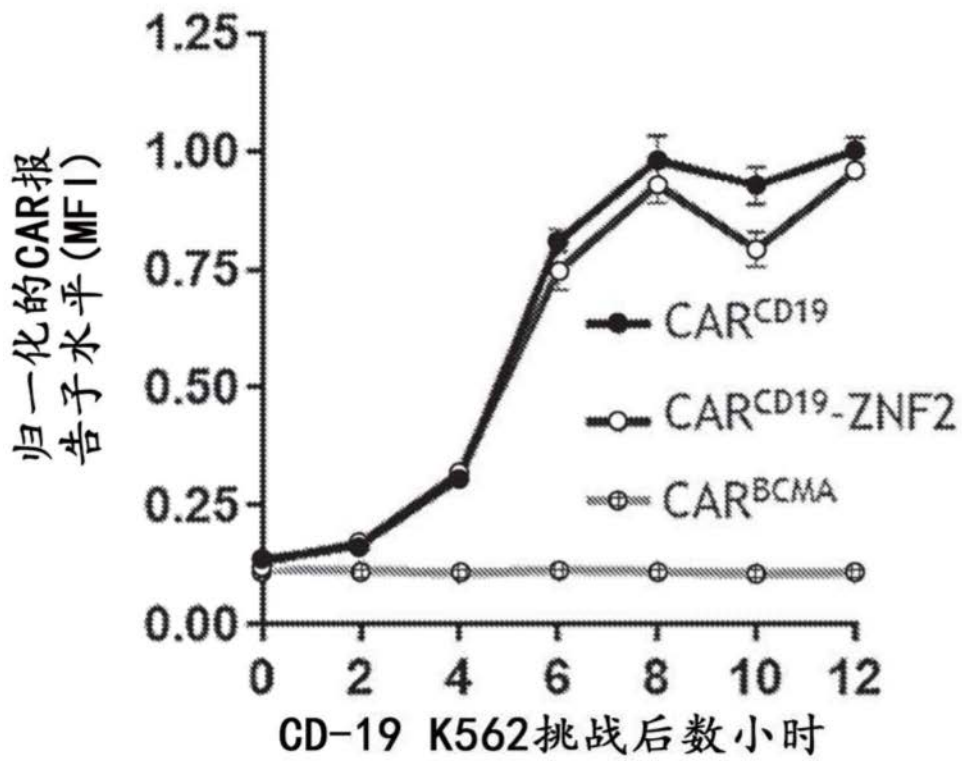
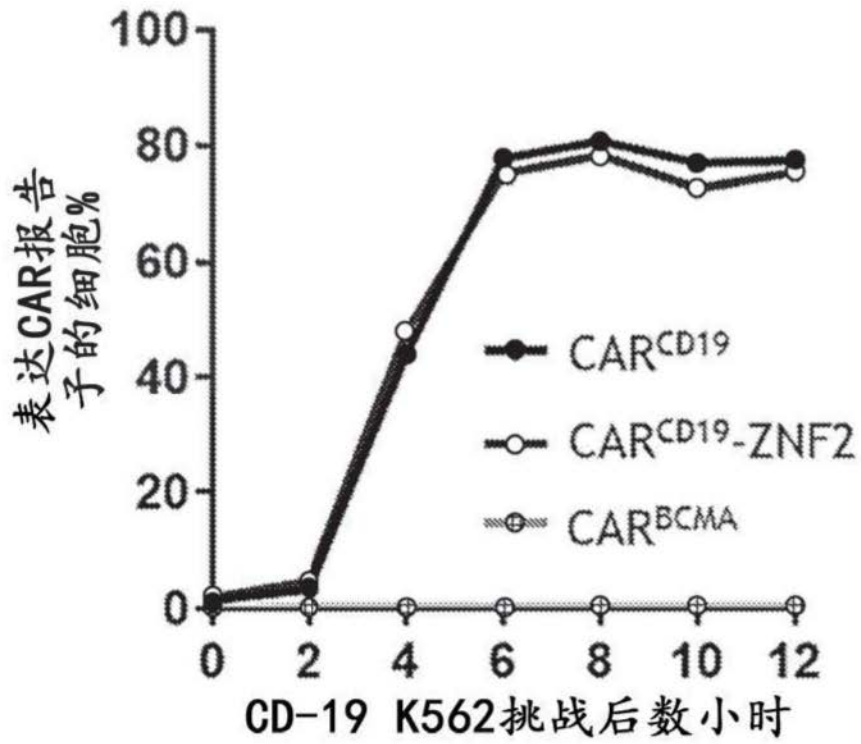


图4A



CAR <sup>CD19</sup> :	4-1BB	CD3z	构建体	IC50 (nM)	Y常数
ZNF2:	4-1BB	CD3z	ZNF2	30	44
ZNF1_2:	4-1BB	CD3z	ZNF1_2	.12	1
<b>ZNF2_3:</b>	<b>4-1BB</b>	<b>CD3z</b>	<b>ZNF2_3</b>	<b>.15</b>	<b>.9</b>
ZNF1_2_3:	4-1BB	CD3z	ZNF1_2_3	.30	2.4

图5A

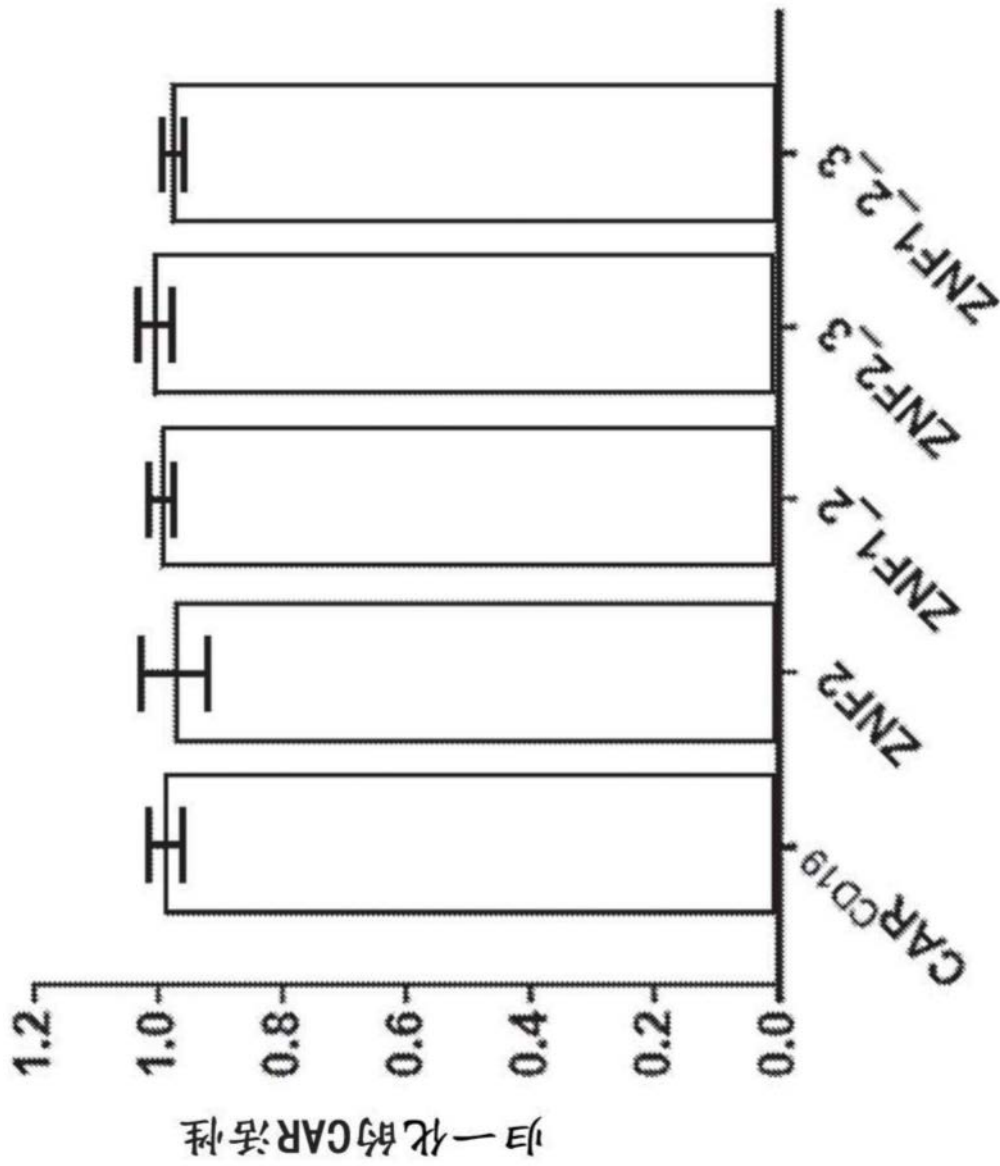


图5B

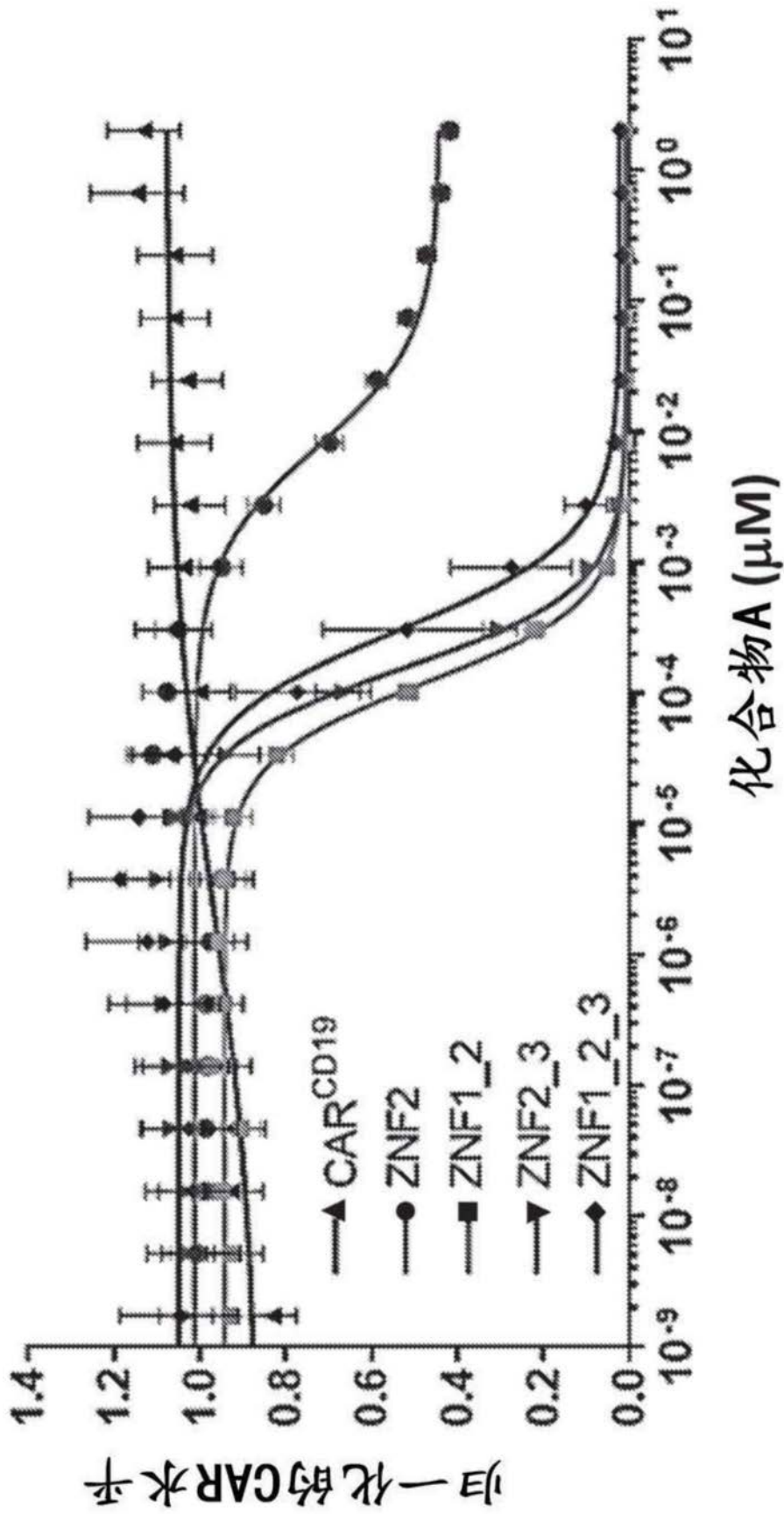


图5C

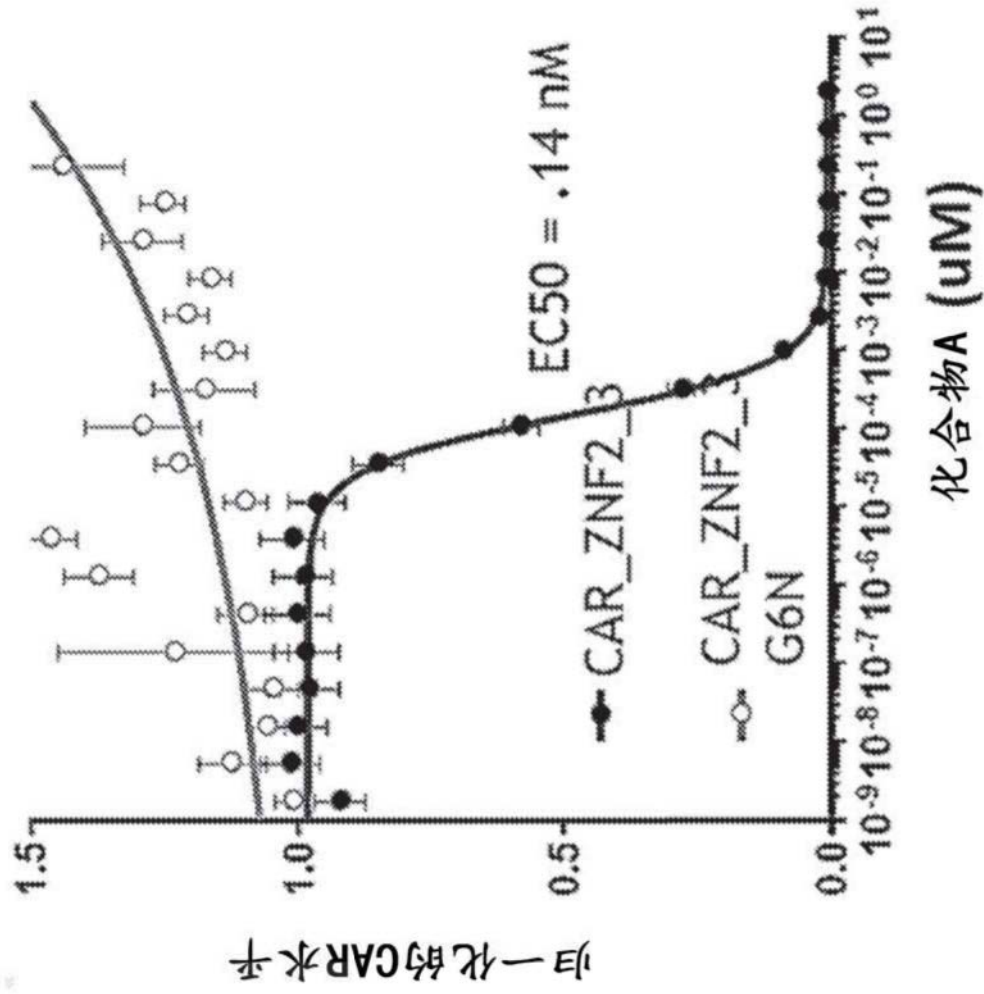


图5D

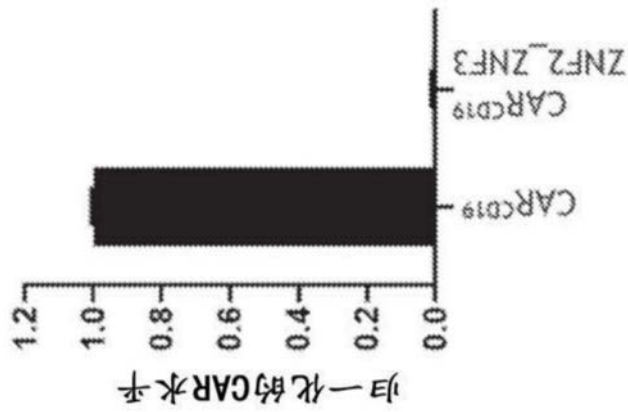


图6A

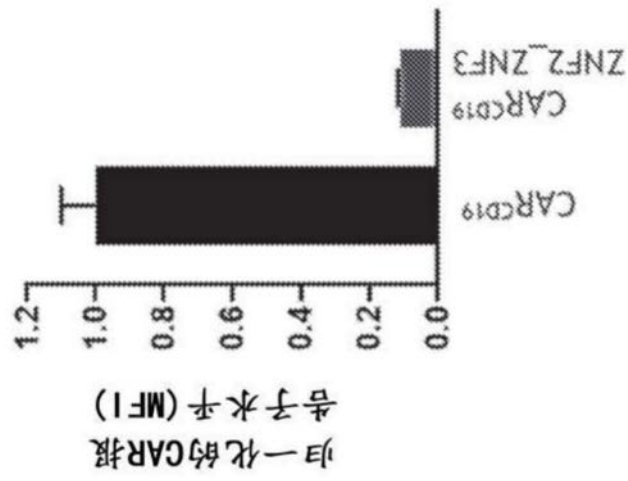


图6B

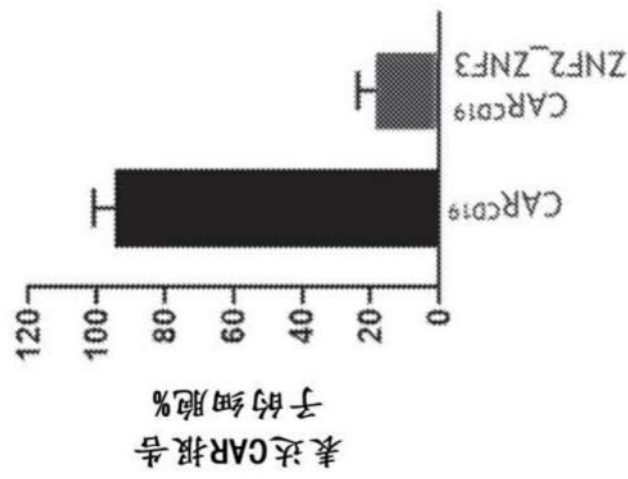


图6C

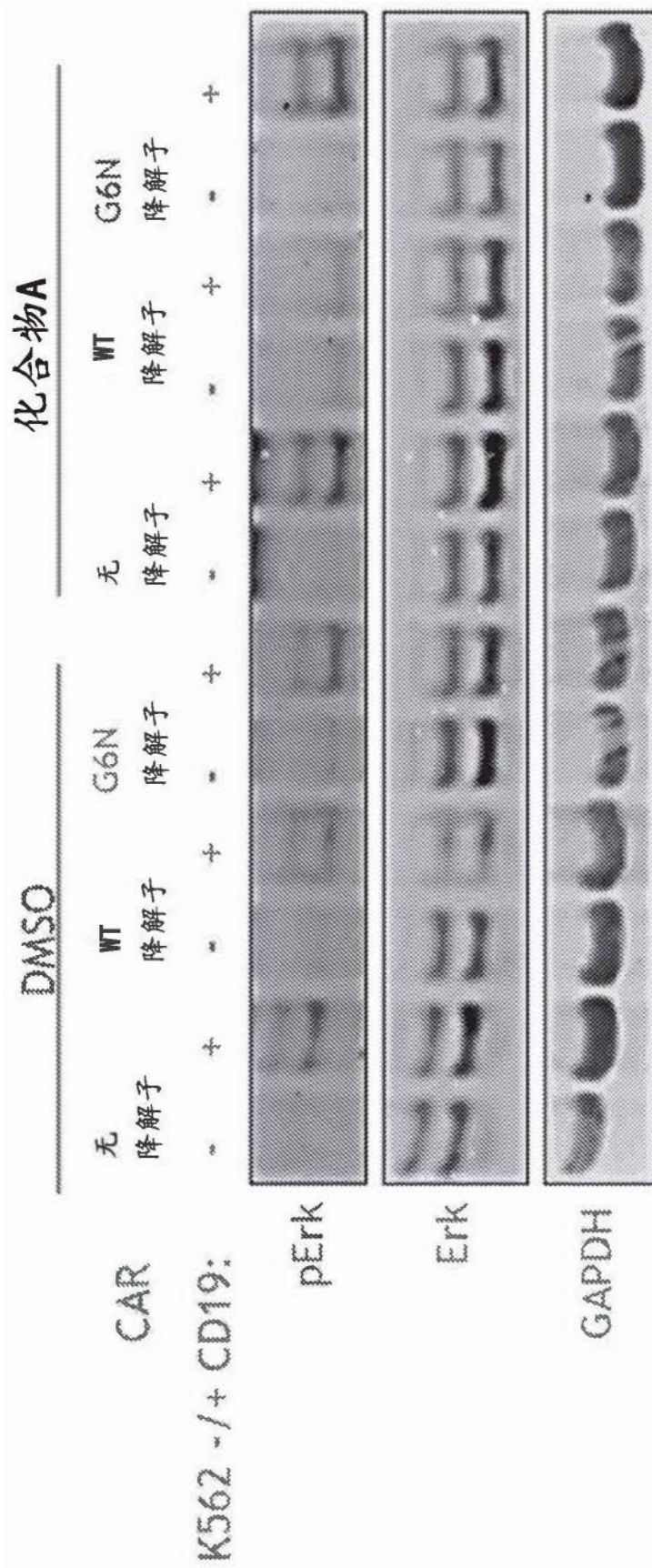


图7



名称	CHN	10	20	ID%	SEQ.ID NO
共有标志	C	CG	L	H	H
序列标识	Q9UKT9_IKZF3_146_168_23	F	L	H	H
	Q66K89_E4F1_220_242_23	H	L	H	H
	Q6ZMY9_ZN517_205_227_23	F	L	H	H
	Q6DD87_ZN787_178_200_23	F	L	H	H
	Q6ZMY9_ZN517_396_418_23	F	L	H	H
	Q96JP5_ZFP91_400_422_23	L	L	H	H
	Q6DD87_ZN787_150_172_23	Y	L	H	H
	Q96CK0_ZN653_528_550_23	F	L	H	H
	Q17R98_ZN827_817_839_23	F	L	H	H
	Q6DD87_ZN787_317_339_23	H	L	H	H
	Q6DD87_ZN787_66_88_23	Y	L	H	H
	Q6ZMY9_ZN517_233_255_23	F	L	H	H
	Q96CK0_ZN653_556_578_23	L	L	H	H
	Q9BU19_ZN692_417_439_23	L	L	H	H
	Q6ZMY9_ZN517_317_339_23	Y	L	H	H
	Q6ZMY9_ZN517_261_283_23	Y	L	H	H
	Q8IZM8_ZN654_25_47_23	F	L	H	H
	Q17R98_ZN827_374_396_23	F	L	H	H
	Q6ZMY9_ZN517_368_390_23	H	L	H	H
	Q8N554_ZN276_496_518_23	Y	L	H	H
	Q66K89_E4F1_463_485_23	F	L	H	H

图9



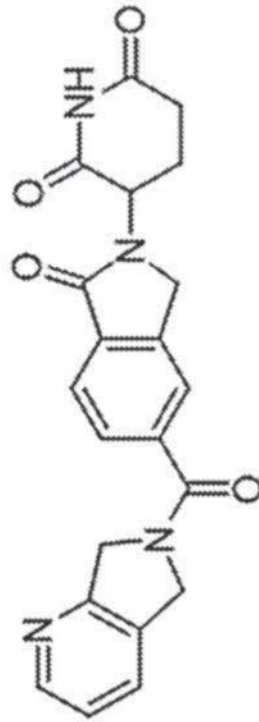


图10A

Ikaros MBP-ZNF2的体外泛素化

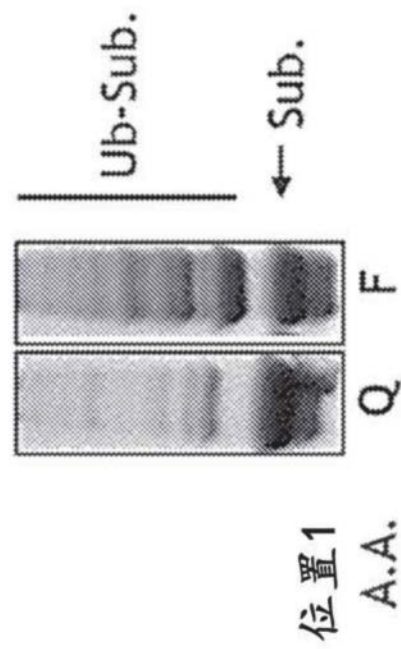


图10B

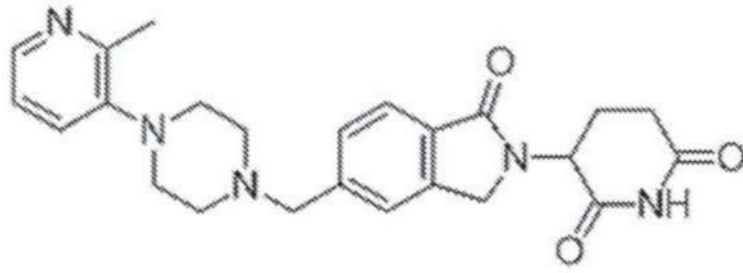


图11A

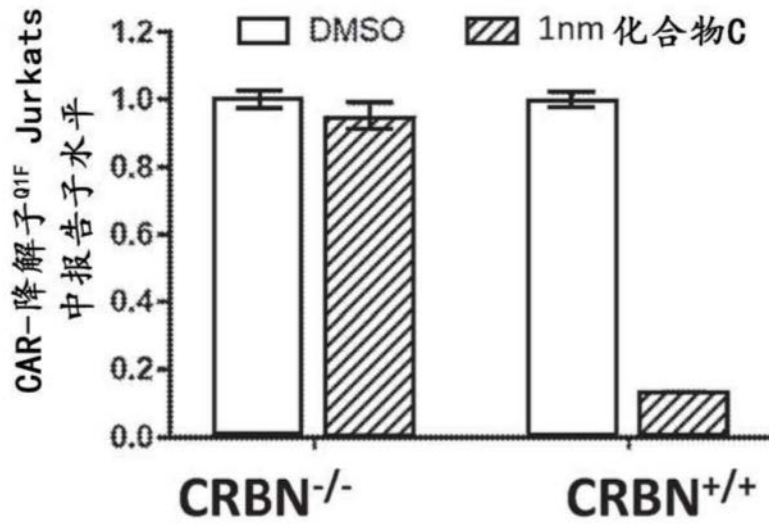


图11B

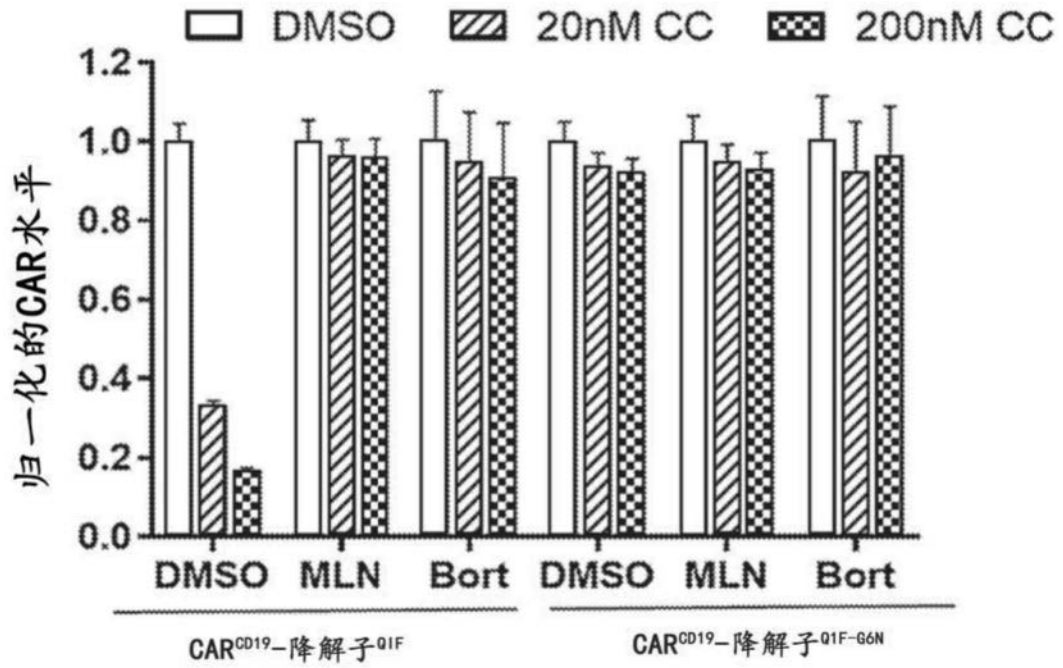


图11C

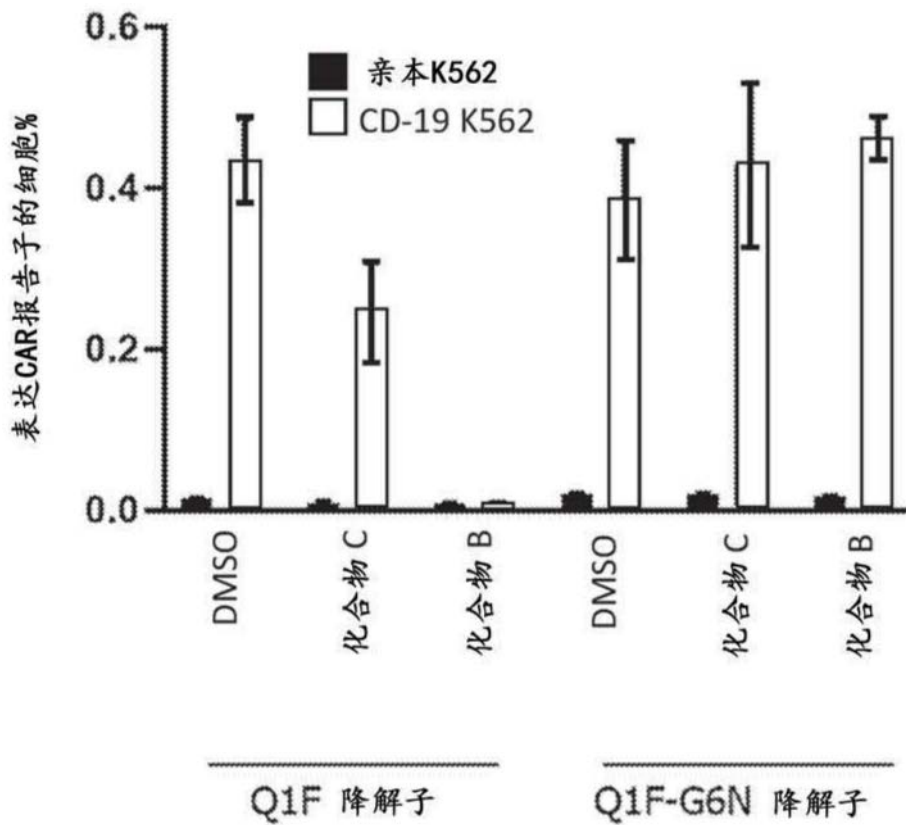


图12A

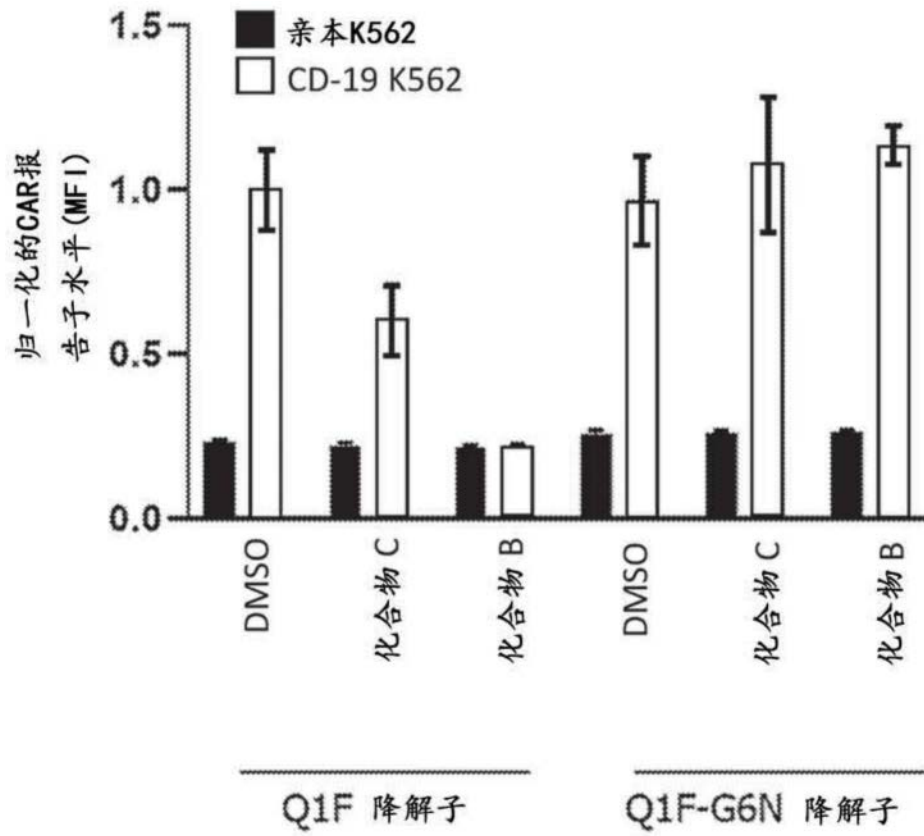


图12B

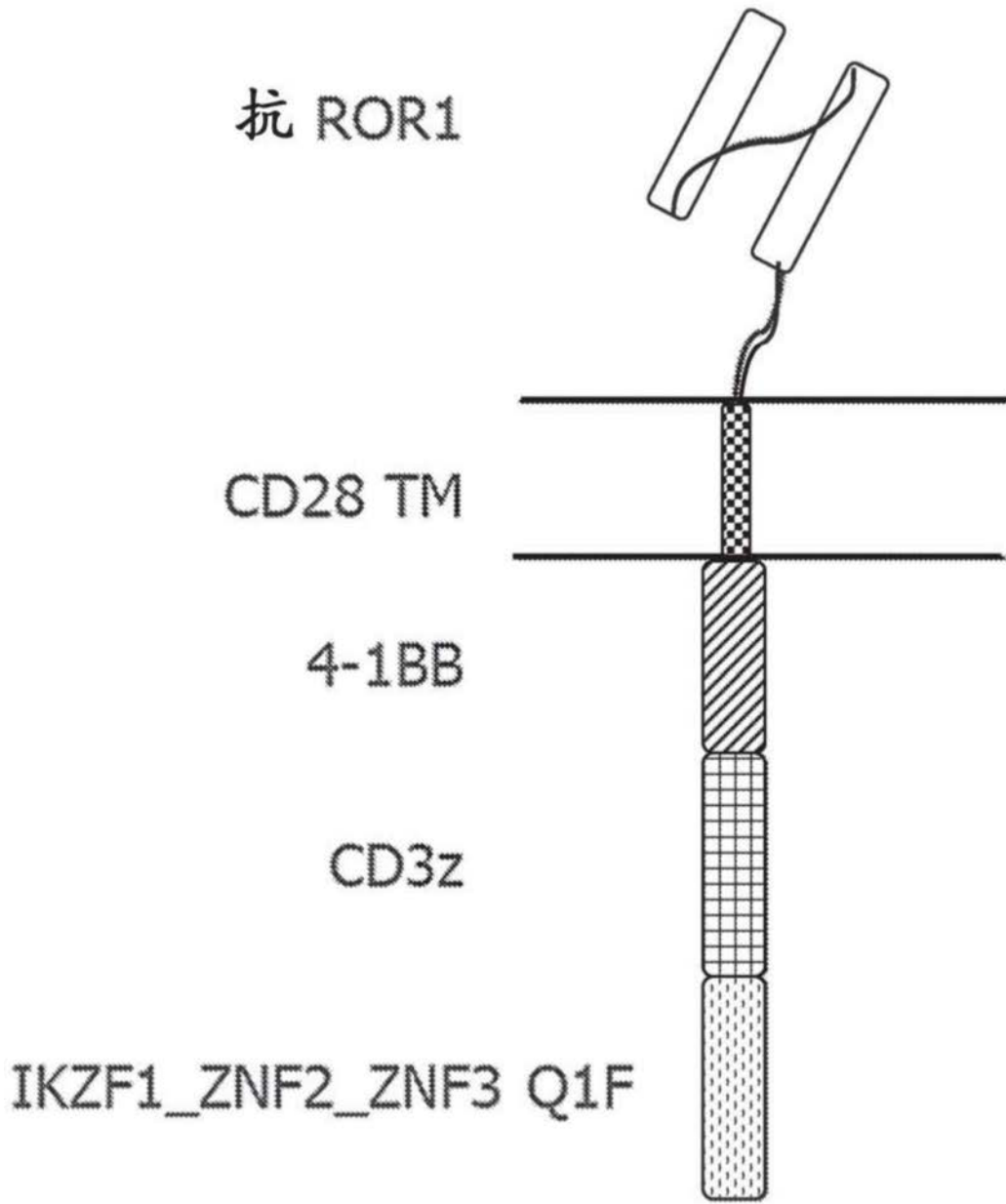


图13A

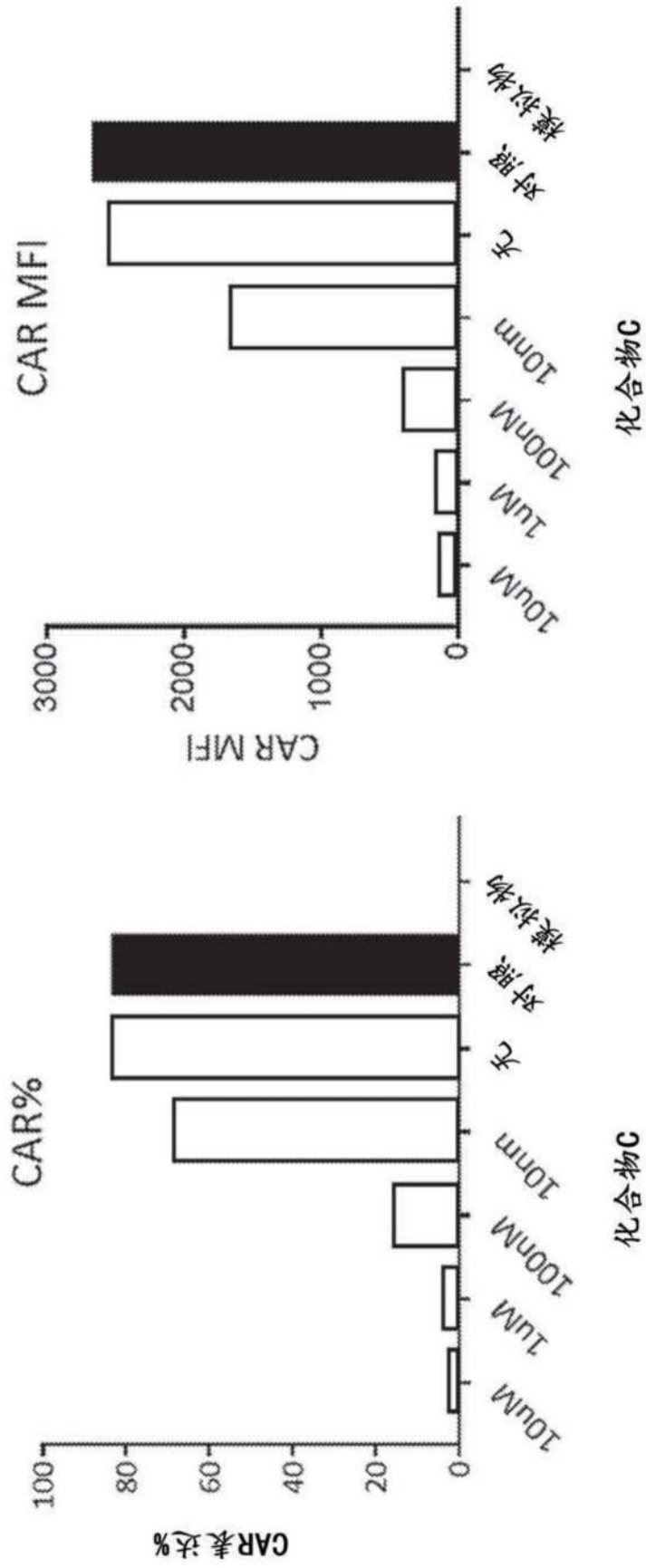


图13B

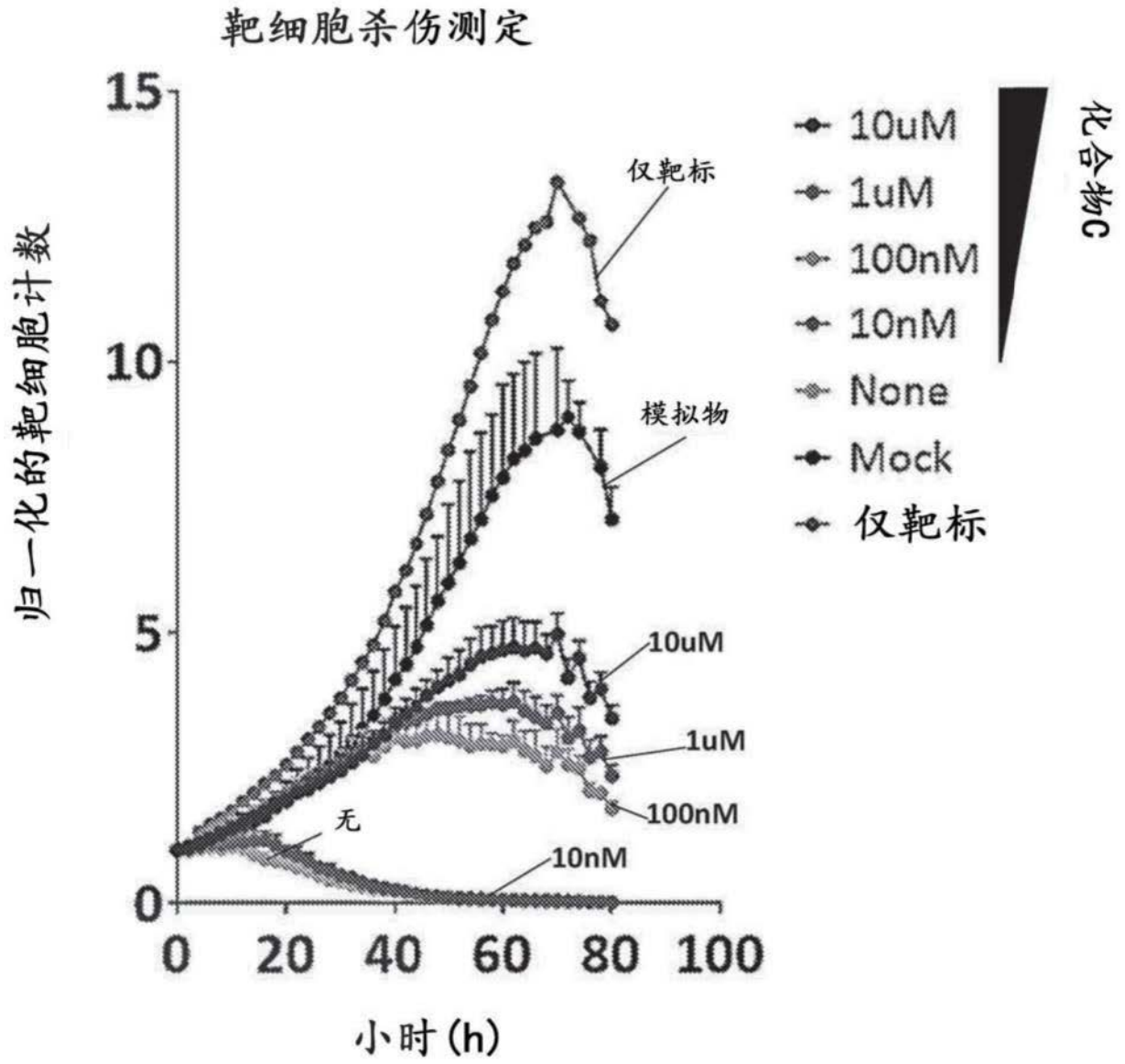


图14A

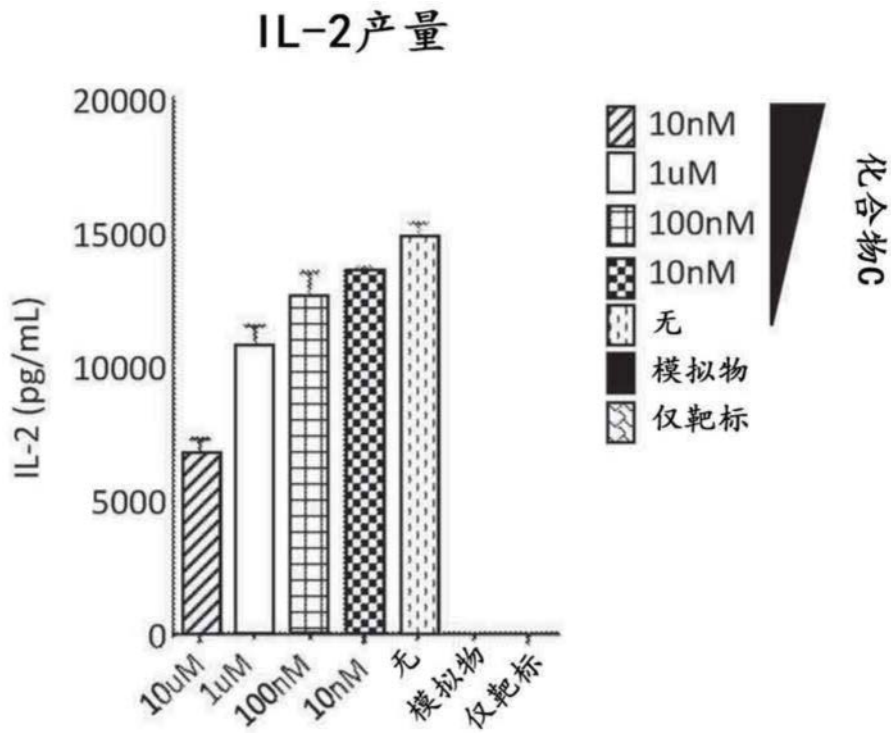


图14B

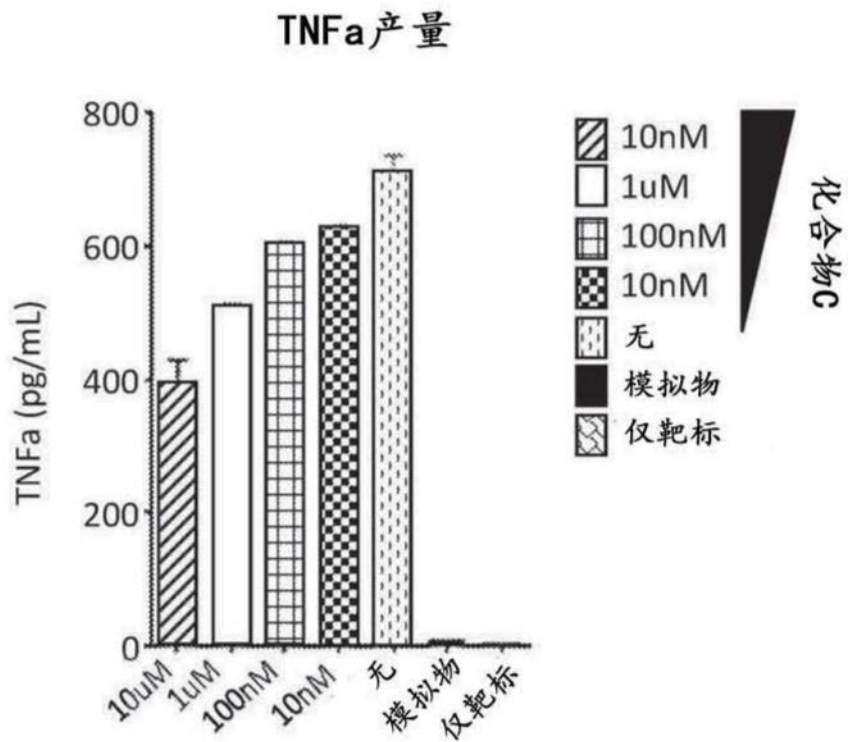


图14C

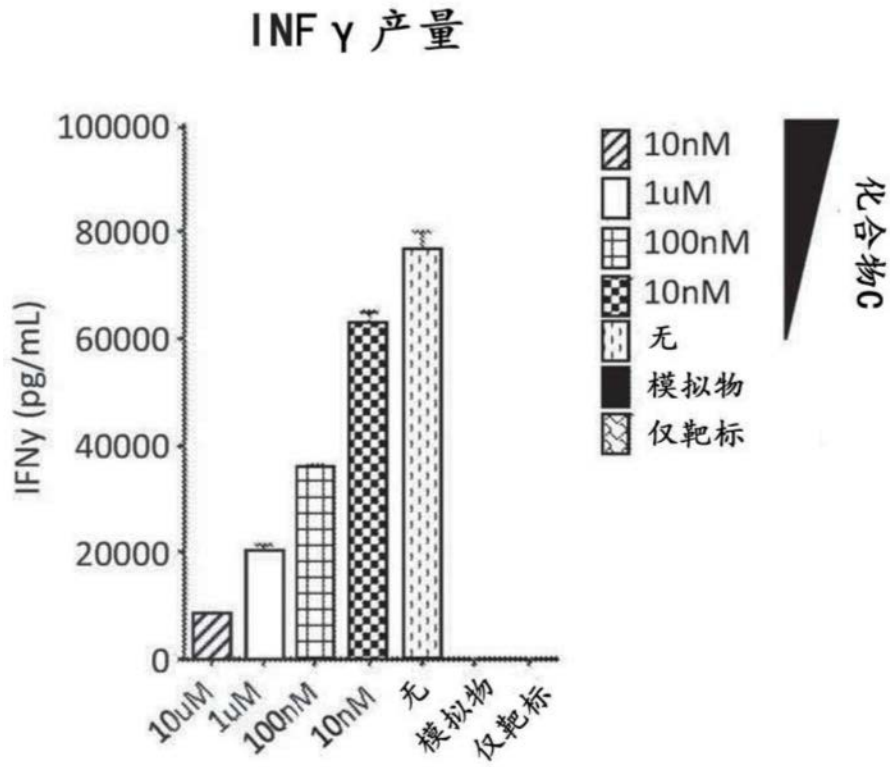


图14D



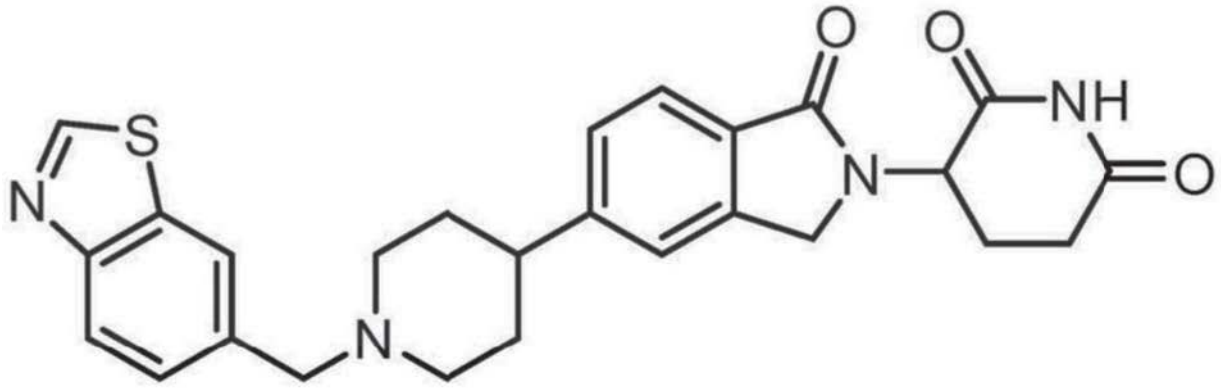


图16A

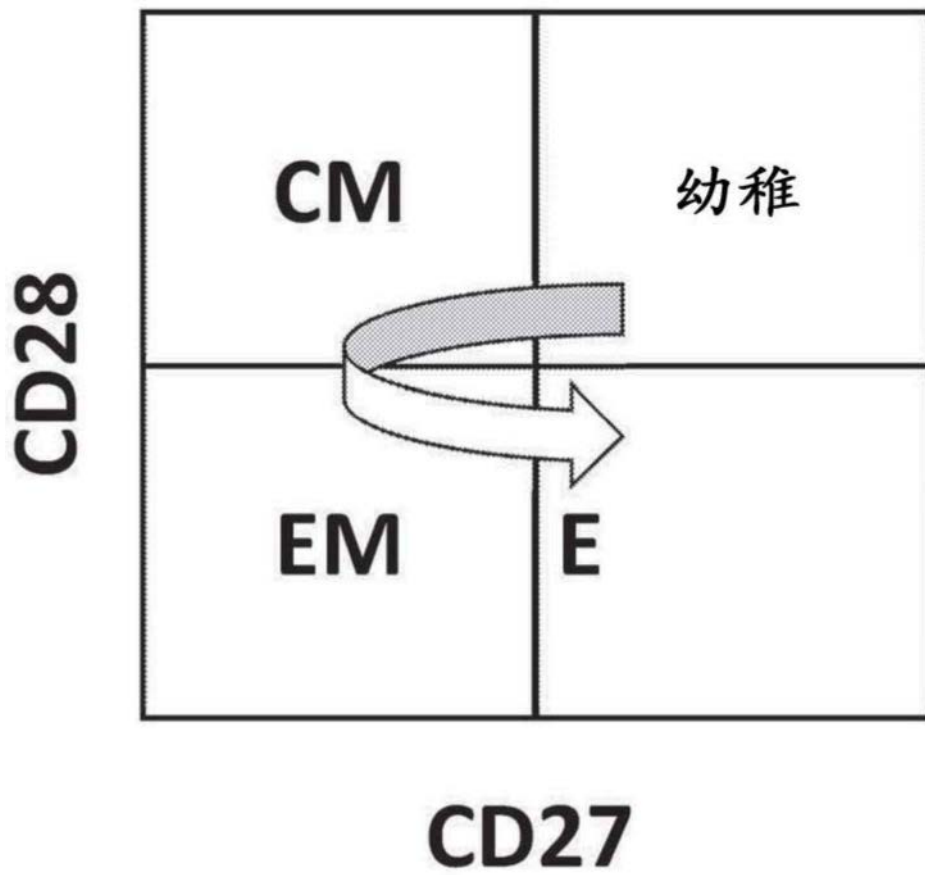


图16B

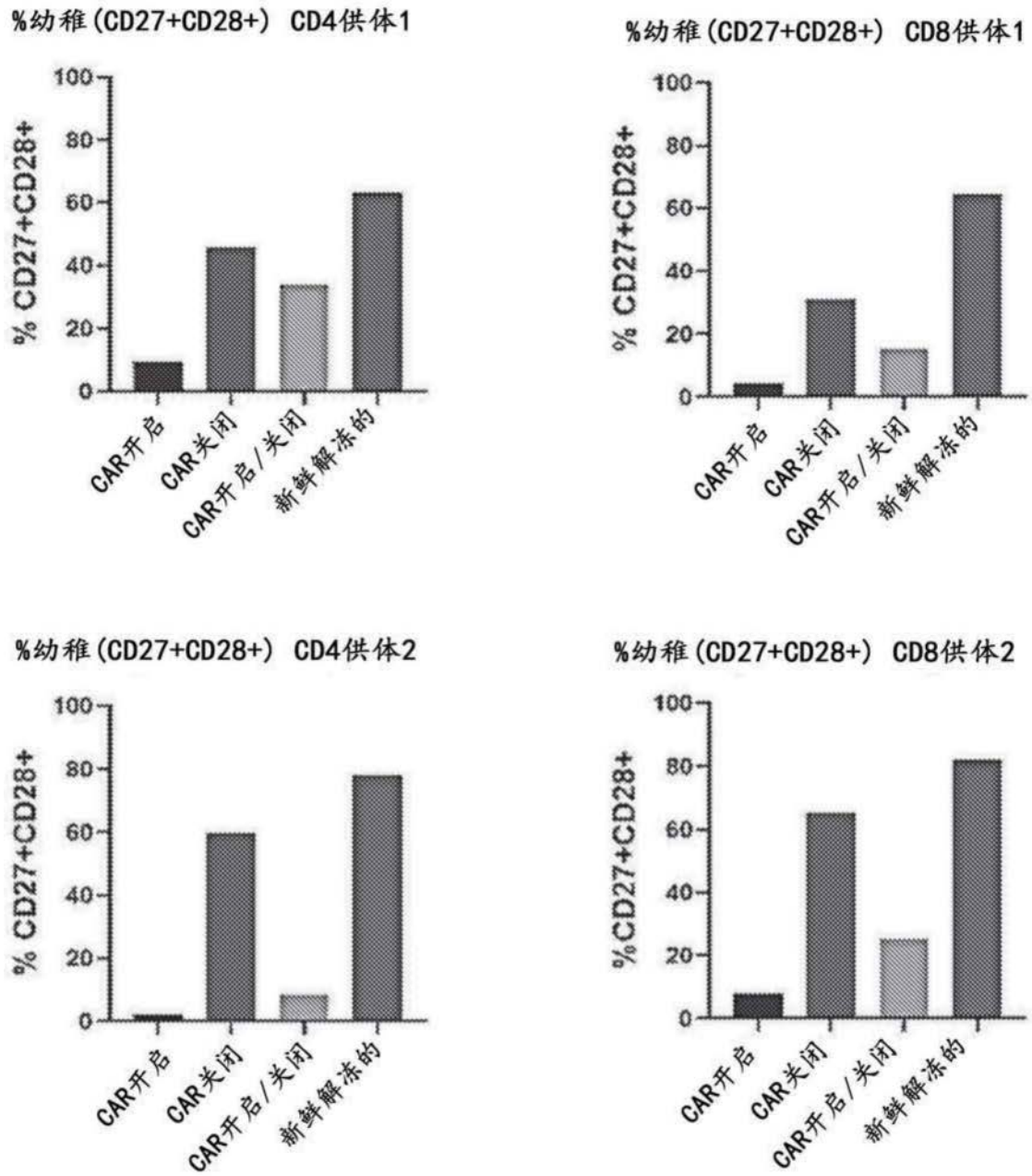


图16C

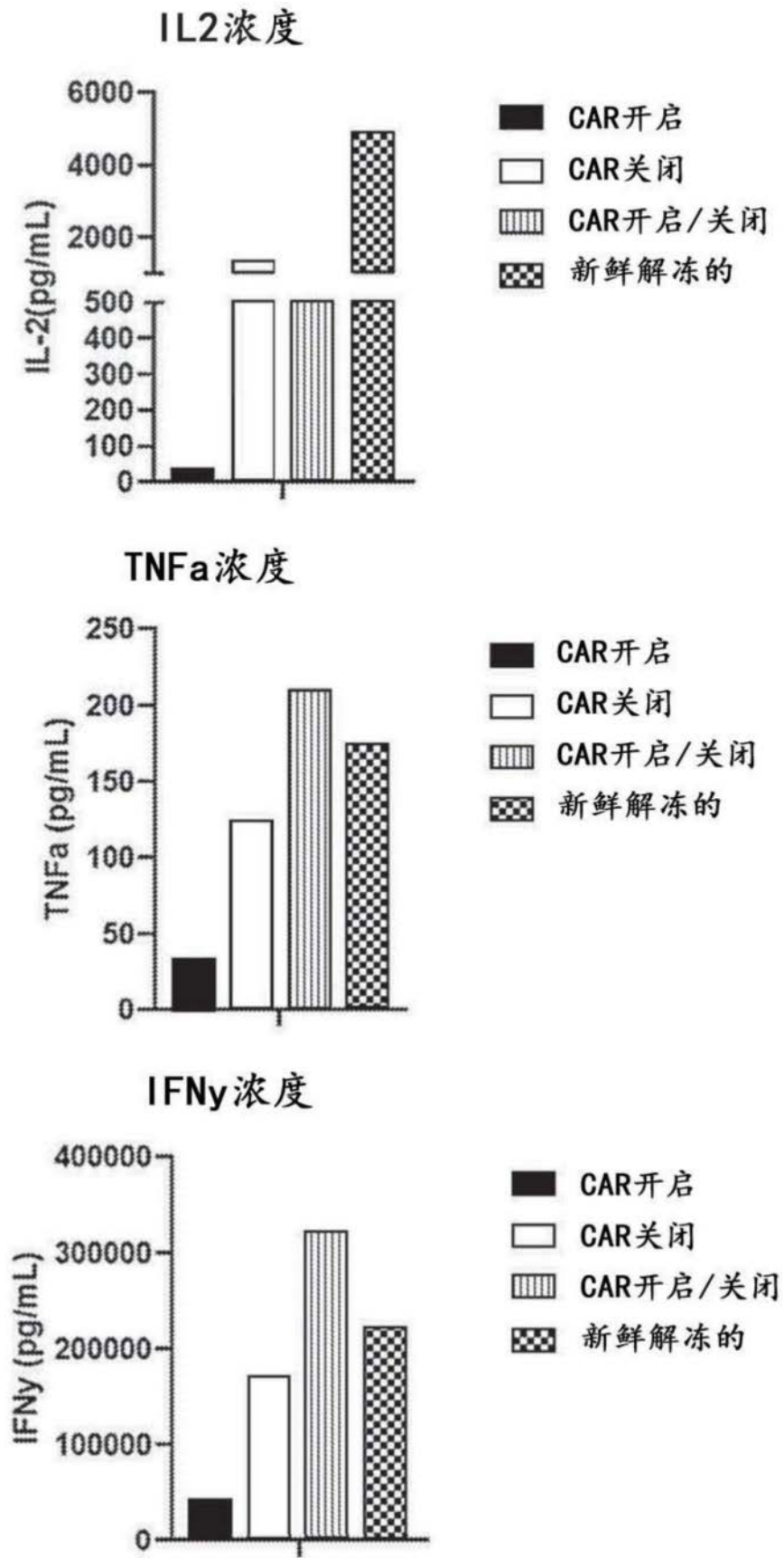


图17A

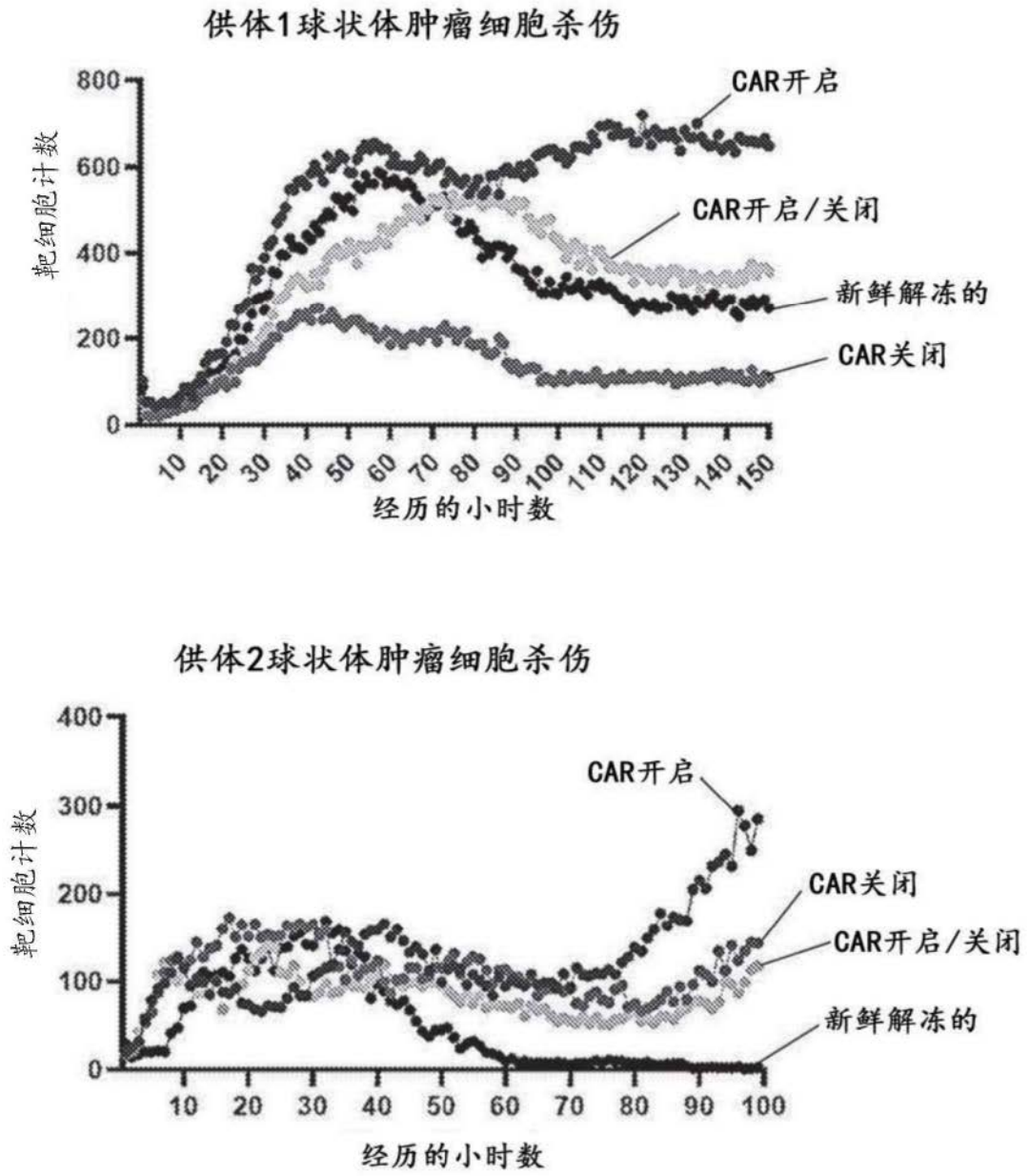


图17B

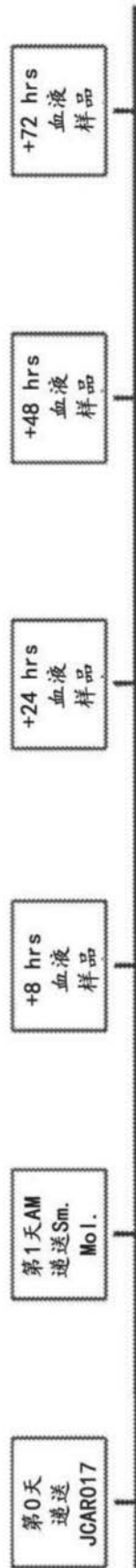


图18A

组别	N	JCAR017-Gdeg#	SM 剂量 (mpk)	剂量 (mg/小鼠)	Mg/组 (x1.5)
JCAR017Gdeg + VEH	12	2E6	0	0	0
JCAR017Gdeg + 化合物D	12	2E6	0.85	0.017	0.306
JCAR017Gdeg + 化合物D	12	2E6	8.5	0.17	3.06

图18B

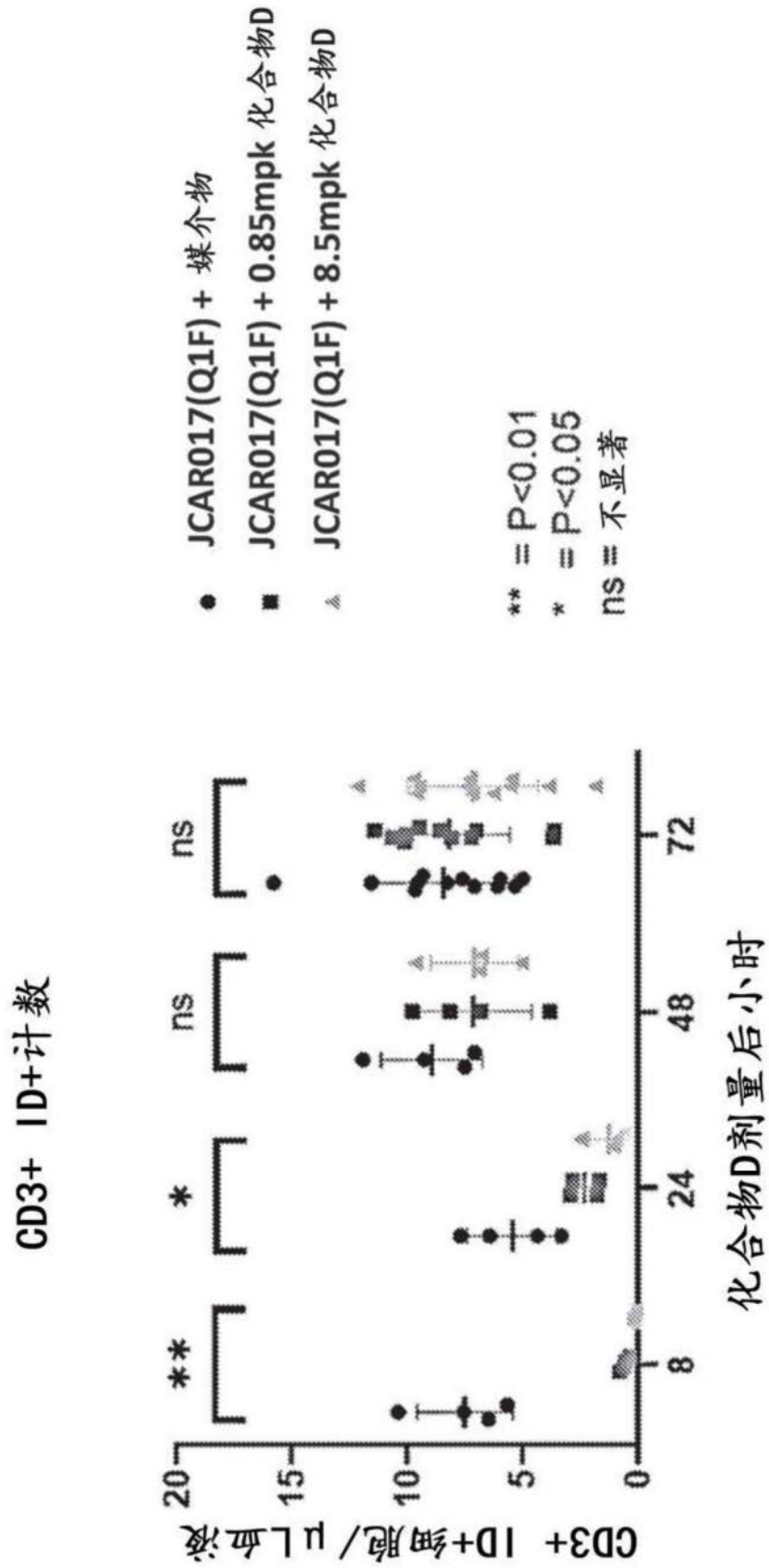


图18C

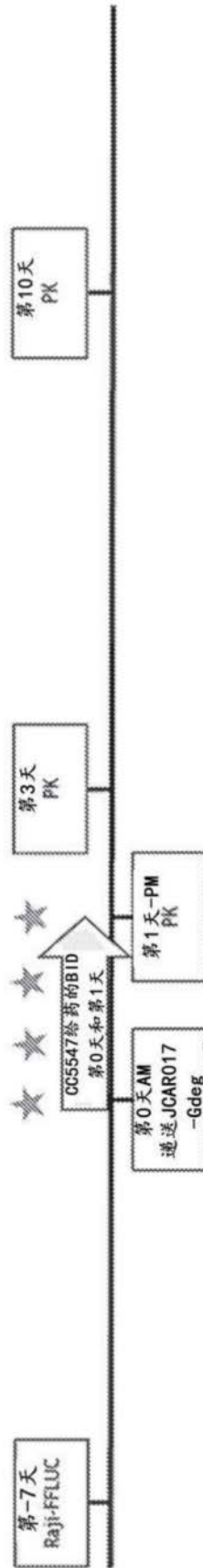


图19A

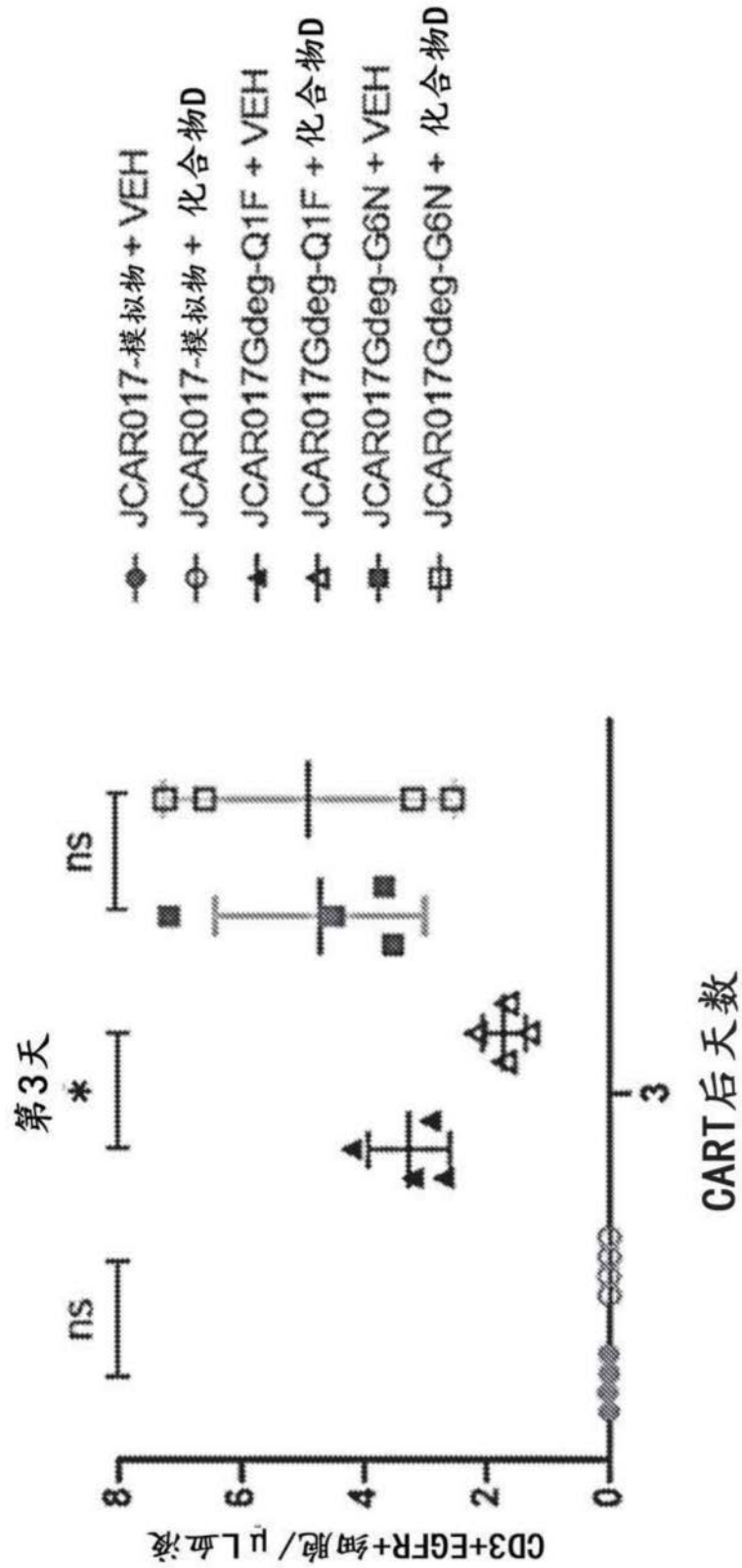


图19B

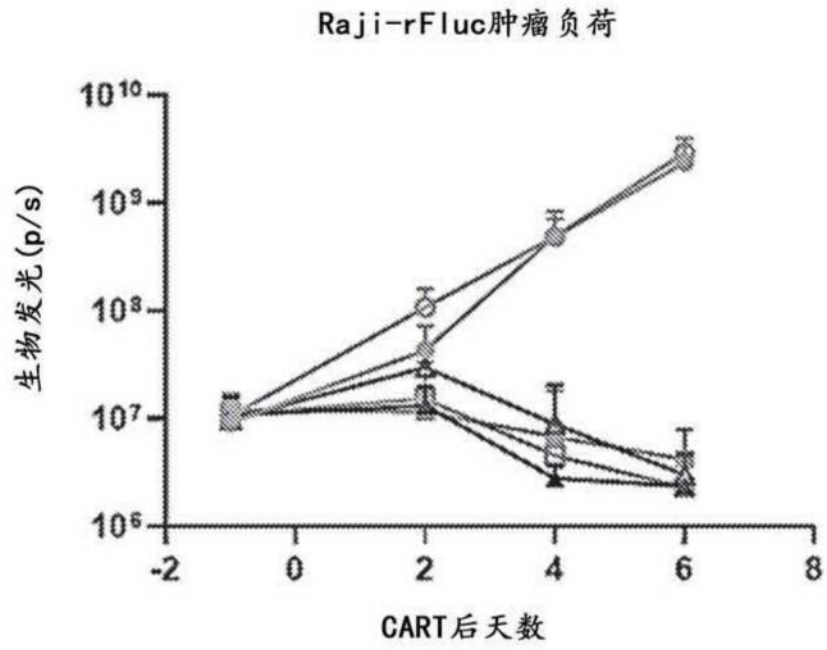


图19C

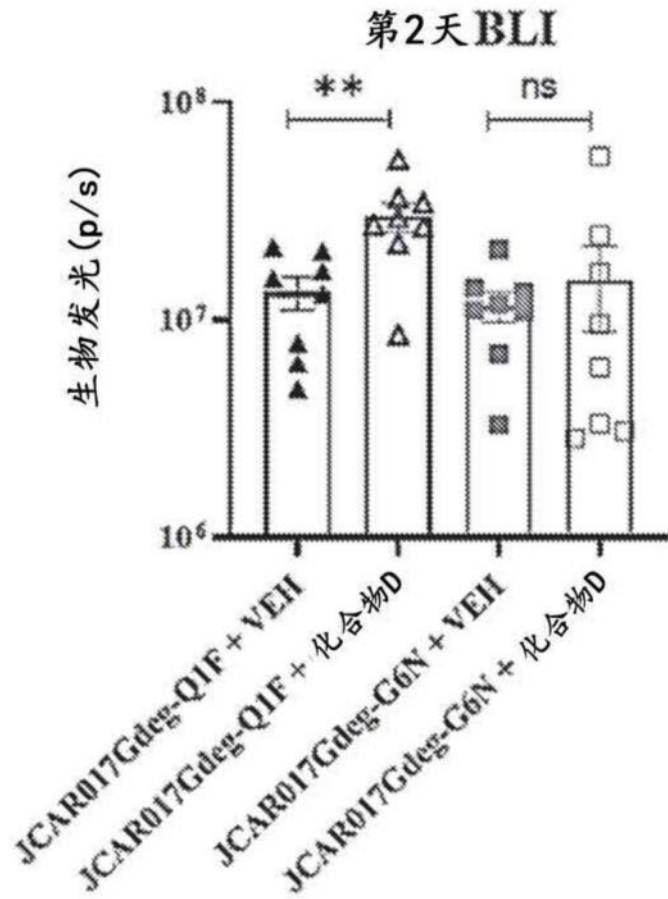


FIG. 19D

图19D

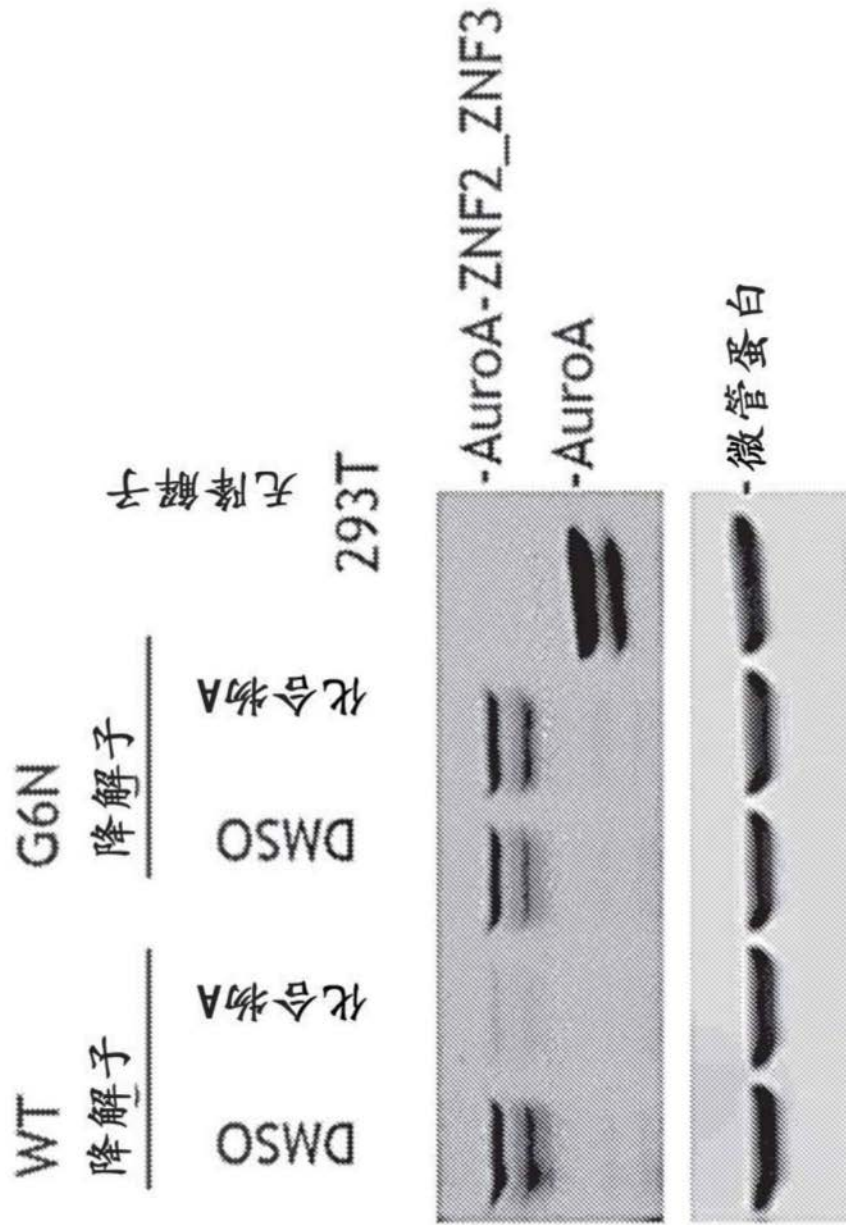


图20A

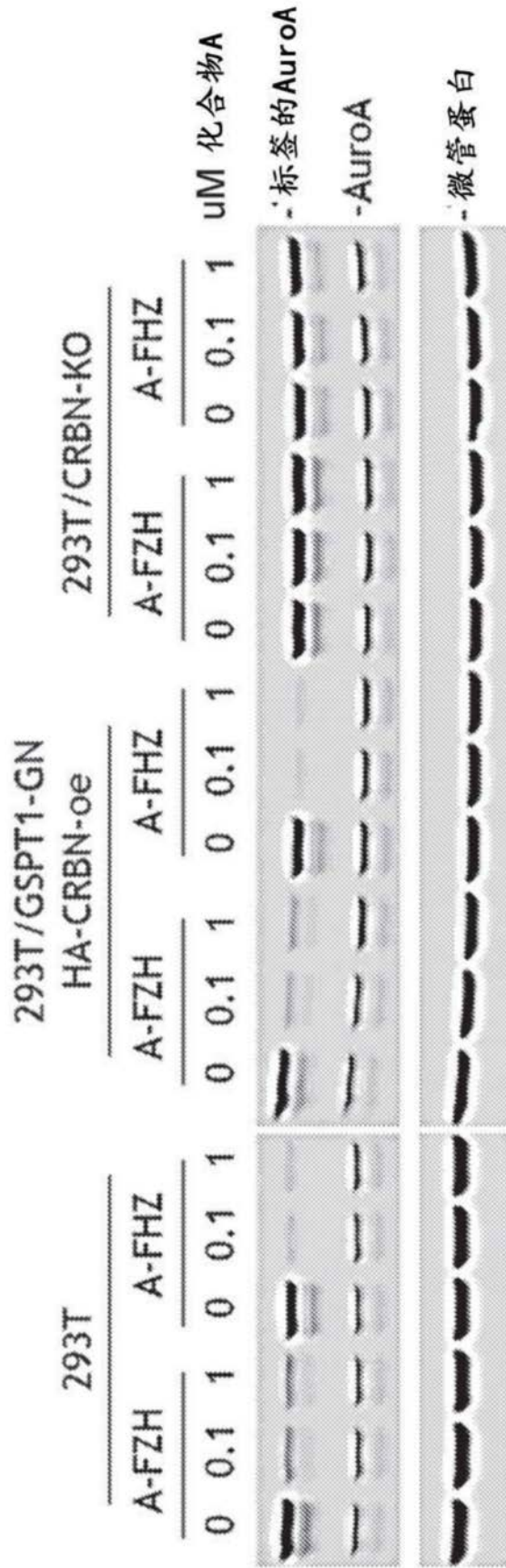


图20B

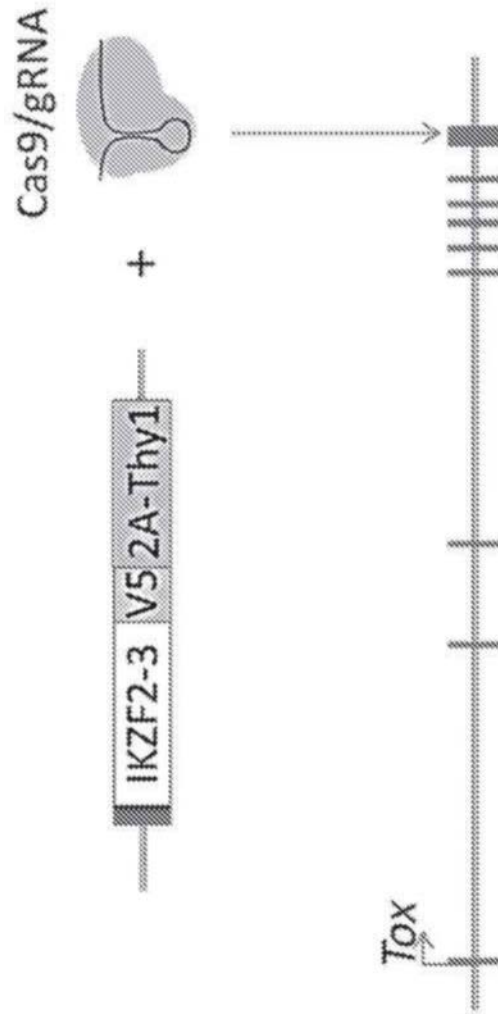


图20C

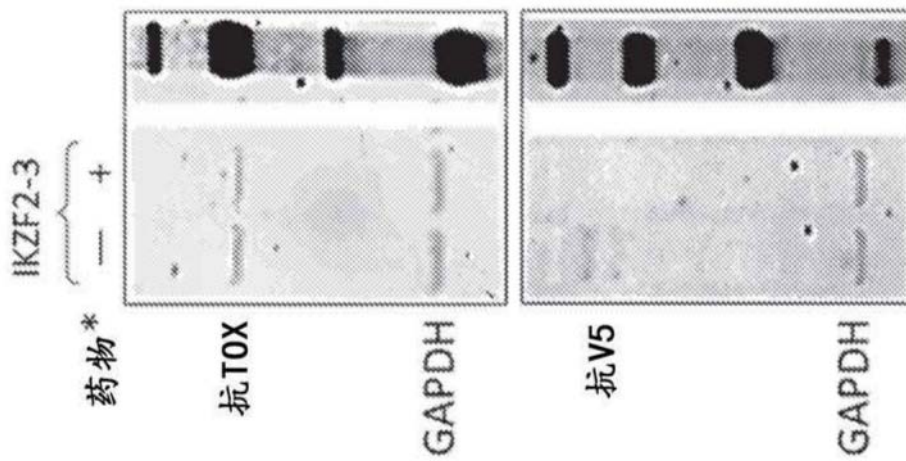


图20D