



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115397845 A

(43) 申请公布日 2022. 11. 25

(21) 申请号 202180028773.9

(22) 申请日 2021.02.19

(30) 优先权数据

62/979,309 2020.02.20 US

63/044,597 2020.06.26 US

63/136,134 2021.01.11 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.10.14

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/018868 2021.02.19

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/168317 EN 2021.08.26

(71) 申请人 森迪生物科学公司

地址 美国加利福尼亚州

申请人 波士顿大学托管委员会

(72) 发明人 W·王 S·李 R·M·戈德莱

M·古兹曼·阿亚拉 G·李

N·弗兰克尔 康曦

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

专利代理师 陈文平

(51) Int.Cl.

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

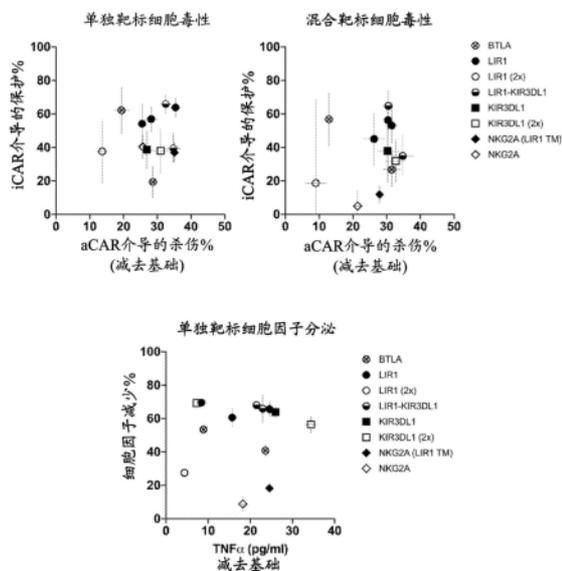
权利要求书5页 说明书135页 附图23页

(54) 发明名称

抑制性嵌合受体架构

(57) 摘要

本文提供了抑制性嵌合抗原受体组合物和包含此类组合物的细胞。还提供了使用抑制性嵌合抗原受体和细胞的方法。



1. 一种嵌合抑制性受体,其包含:

(a) 胞外蛋白结合结构域,

(b) 跨膜结构域,其中所述跨膜结构域可操作地连接至所述胞外蛋白结合结构域,和

(c) 一个或多个胞内信号传导结构域,其中所述一个或多个胞内信号传导结构域可操作地连接至所述跨膜结构域;并且

其中所述一个或多个胞内信号传导结构域中的每个衍生自选自以下组成的组的蛋白: BTLA、PD-1、CTLA4、TIM3、KIR3DL1、LIR1、NKG2A、TIGIT和LAG3;并且其中所述一个或多个胞内信号传导结构域中的至少一个能够防止、减弱或抑制在免疫调节细胞上表达的肿瘤靶向嵌合受体的激活。

2. 如权利要求1所述的嵌合抑制性受体,其中:

(a) 所述跨膜结构域和所述一个或多个胞内信号传导结构域之一衍生自相同蛋白,任选地其中所述跨膜结构域还包含相同蛋白的胞外结构域的至少一部分;或

(b) 所述跨膜结构域衍生自第一蛋白,并且所述一个或多个胞内信号传导结构域之一衍生自与所述第一蛋白不同的第二蛋白。

3. 如权利要求1或权利要求2所述的嵌合抑制性受体,其中:

(a) 所述一个或多个胞内信号传导结构域之一衍生自BTLA,任选地其中所述胞内信号传导结构域包含与RRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASLNHSVIGPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS (SEQ ID NO:3) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列,或其中所述胞内信号传导结构域包含氨基酸序列RRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASLNHSVIGPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS (SEQ ID NO:3);或

(b) 所述一个或多个胞内信号传导结构域之一衍生自LIR1,任选地其中所述胞内信号传导结构域包含与LRHRRQGKHWSTQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPAADAQEENLYAAVKHTQPEDGVEMDTRSPHDEDPQAVTYAEVKHSRPRREMASPPSPLSGEFLDTKDRQAEEDRQMDTEAAASEAPQDVTYAQLHSLTLRREATEPPPSQEGPSPAVPSIYATLAIH (SEQ ID NO:50) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列,或其中所述胞内信号传导结构域包含氨基酸序列LRHRRQGKHWSTQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPAADAQEENLYAAVKHTQPEDGVEMDTRSPHDEDPQAVTYAEVKHSRPRREMASPPSPLSGEFLDTKDRQAEEDRQMDTEAAASEAPQDVTYAQLHSLTLRREATEPPPSQEGPSPAVPSIYATLAIH (SEQ ID NO:50);或

(c) 所述一个或多个胞内信号传导结构域之一衍生自KIR3DL1,任选地其中所述胞内信号传导结构域包含与HLWCSNKKNAAVMDQEPAGNRTANSEDSDEQDPEEVTYAQLDHCVFTQRKITRPSQRPKTPPTDTILYTELPNAKPRSKVVSCP (SEQ ID NO:66) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列,或其中所述胞内信号传导结构域包含氨基酸序列HLWCSNKKNAAVMDQEPAGNRTANSEDSDEQDPEEVTYAQLDHCVFTQRKITRPSQRPKTPPTDTILYTELPNAKPRSKVVSCP (SEQ ID NO:66);或

(d) 所述一个或多个胞内信号传导结构域之一衍生自PD-1, 任选地其中所述胞内信号传导结构域包含与CSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSMGMTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL (SEQ ID NO:1) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列, 或其中所述胞内信号传导结构域包含氨基酸序列CSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSMGMTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL (SEQ ID NO:1); 或

(e) 所述一个或多个胞内信号传导结构域之一衍生自CTLA4, 任选地其中所述胞内信号传导结构域包含与AVLSKMLKKRSPLTTGVGVKMPPTPEPECEKQFQPYFIPIN (SEQ ID NO:67) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列, 或其中所述胞内信号传导结构域包含氨基酸序列AVLSKMLKKRSPLTTGVGVKMPPTPEPECEKQFQPYFIPIN (SEQ ID NO:67); 或

(f) 所述一个或多个胞内信号传导结构域之一衍生自NKG2A, 任选地其中所述胞内信号传导结构域包含与KEPASPLDKCHYTKDNGQFDQSAKQLNLEAYTIEQETALISNKNGKPKRQQRKPNPPLNLD SYIVGQNDM (SEQ ID NO:93) 或MDNQGVIIYSDLNLPNPKRQQRKPKGNKNSILATEQEITYAELNLQKASQDFQGNDKTYHCKDLPSAPEK (SEQ ID NO:100) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列, 或其中所述胞内信号传导结构域包含氨基酸序列KEPASPLDKCHYTKDNGQFDQSAKQLNLEAYTIEQETALISNKNGKPKRQQRKPNPPLNLD SYIVGQNDM (SEQ ID NO:93) 或MDNQGVIIYSDLNLPNPKRQQRKPKGNKNSILATEQEITYAELNLQKASQDFQGNDKTYHCKDLPSAPEK (SEQ ID NO:100)。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的嵌合抑制性受体, 其中:

(a) 所述跨膜结构域衍生自选自自由以下组成的组的蛋白: BTLA、CD8、CD28、CD3 ζ 、CD4、4-1BB、OX40、ICOS、2B4、CD25、CD7、LAX、LAT、PD-1、CTLA4、TIM3、KIR3DL1、LIR1、NKG2A、TIGIT和LAG3; 或

(b) 所述跨膜结构域衍生自BTLA, 任选地其中所述跨膜结构域包含与LLPLGGLPLLITTCFCLFCCL (SEQ ID NO:12) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列, 或其中所述跨膜结构域包含氨基酸序列LLPLGGLPLLITTCFCLFCCL (SEQ ID NO:12), 并且任选地其中所述跨膜结构域还包含所述BTLA胞外结构域的至少一部分; 或

(c) 所述跨膜结构域衍生自PD-1, 任选地其中所述跨膜结构域包含与VGVVGGLLGSLLVWVLA VI (SEQ ID NO:60) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列, 或其中所述跨膜结构域包含氨基酸序列VGVVGGLLGSLLVWVLA VI (SEQ ID NO:60), 并且任选地其中所述跨膜结构域还包含所述PD-1胞外结构域的至少一部分; 或

(d) 所述跨膜结构域衍生自CTLA4, 任选地其中所述跨膜结构域包含与

DFLLWILAAVSSGLFFYSFLLT (SEQ ID NO:68) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列,或其中所述跨膜结构域包含氨基酸序列DFLLWILAAVSSGLFFYSFLLT (SEQ ID NO:68),并且任选地其中所述跨膜结构域还包含所述CTLA4胞外结构域的至少一部分;或

(e) 所述跨膜结构域衍生自KIR3DL1,任选地其中所述跨膜结构域包含与ILIGTSVVIILFILLFFLL (SEQ ID NO:69) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列,或其中所述跨膜结构域包含氨基酸序列ILIGTSVVIILFILLFFLL (SEQ ID NO:69),并且任选地其中所述跨膜结构域还包含所述KIR3DL1胞外结构域的至少一部分;或

(f) 所述跨膜结构域衍生自LIR1,任选地其中所述跨膜结构域包含与VIGILVAVILLLLLLLLLLFLI (SEQ ID NO:59) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列,或其中所述跨膜结构域包含氨基酸序列VIGILVAVILLLLLLLLLLFLI (SEQ ID NO:59),并且任选地其中所述跨膜结构域还包含所述LIR1胞外结构域的至少一部分;或

(g) 所述跨膜结构域衍生自CD28,任选地其中所述跨膜结构域包含与FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO:11) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列,或其中所述跨膜结构域包含氨基酸序列FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO:11),并且任选地其中所述跨膜结构域还包含所述CD28胞外结构域的至少一部分。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中:

(a) 所述蛋白结合结构域结合不在靶肿瘤上表达的蛋白,或所述蛋白结合结构域结合在非肿瘤细胞上表达的蛋白,任选地其中所述非肿瘤细胞衍生自选自以下组成的组的组织:脑、神经元组织、内分泌、内皮、骨、骨髓、免疫系统、肌肉、肺、肝、胆囊、胰腺、胃肠道、肾脏、膀胱、雄性生殖器、雌性生殖器、脂肪、软组织和皮肤;并且

(b) 所述胞外蛋白结合结构域包含配体结合结构域,或所述胞外蛋白结合结构域包含受体结合结构域,或所述胞外蛋白结合结构域包含抗原结合结构域,任选地其中当所述胞外蛋白结合结构域包含抗原结合结构域时,所述抗原结合结构域包含抗体、抗体的抗原结合片段、F(ab)片段、F(ab')片段、单链可变片段(scFv)或单结构域抗体(sdAb),并且任选地其中当所述抗原结合结构域包含scFv时,所述scFv包含重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL),并且所述VH和VL由肽接头分开,并且任选地其中所述肽接头包含选自以下组成的组的氨基酸序列:GGG (SEQ ID NO:15)、GGSGGS (SEQ ID NO:16)、GGSGGSGGS (SEQ ID NO:17)、GGSGGSGGSGGS (SEQ ID NO:18)、GGSGGSGGSGGSGGS (SEQ ID NO:19)、GGGS (SEQ ID NO:20)、GGGSGGGS (SEQ ID NO:21)、GGGSGGSGGGS (SEQ ID NO:22)、GGGSGGSGGSGGSGGS (SEQ ID NO:23)、GGGSGGSGGSGGSGGSGGS (SEQ ID NO:24)、GGGGS (SEQ ID NO:25)、GGGSGGSGGS (SEQ ID NO:26)、GGGSGGSGGSGGSGGS (SEQ ID NO:27)、GGGSGGSGGSGGSGGSGGS

(SEQ ID NO:28)和GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:29)。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体还包含定位在所述胞外蛋白结合结构域与所述跨膜结构域之间并且可操作地连接或物理连接至所述胞外蛋白结合结构域和所述跨膜结构域中的每个的间隔区,

任选地其中所述嵌合抑制性受体还包含定位在所述跨膜结构域与所述一个或多个胞内信号传导结构域之一之间并且可操作地连接或物理连接至所述跨膜结构域和所述一个或多个胞内信号传导结构域之一的每个的胞内间隔区,并且

任选地其中所述间隔区衍生自选自自由以下组成的组的蛋白:CD8 α 、CD4、CD7、CD28、IgG1、IgG4、Fc γ RIII α 、LNGFR和PDGFR,或其中所述间隔区包含选自自由以下组成的组的氨基酸序列:AAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKP (SEQ ID NO:31)、ESKYGPPCPSCP (SEQ ID NO:32)、ESKYGPPAPSAP (SEQ ID NO:33)、ESKYGPPPCPCP (SEQ ID NO:34)、EPKSCDKTHTCP (SEQ ID NO:35)、AAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN (SEQ ID NO:36)、TTTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO:37)、ACPTGLYTHSGECKACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTECVGLQSMSAPVEADDAVCRCAHYGYQDETTGRCEACRVCEAGSGLVFSCQDKQNTVCEECPDGTYSDEADAEC (SEQ ID NO:38)、ACPTGLYTHSGECKACNLGEGVAQPCGANQTV (SEQ ID NO:39)、AVGQDTQEVIVVPHSLPFKV (SEQ ID NO:40)和TTTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDQTTTPGERSSLPAYFPGTSGSCSGCGLSLP (SEQ ID NO:70)。

7. 如权利要求1-6中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述肿瘤靶向嵌合受体是肿瘤靶向嵌合抗原受体(CAR)或工程化T细胞受体(TCR)。

8. 如权利要求1-7中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述免疫调节细胞选自自由以下组成的组:T细胞、CD8+T细胞、CD4+T细胞、 γ δ T细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、调节性T细胞、病毒特异性T细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、自然杀伤(NK)细胞、B细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、先天性淋巴样细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、髓系细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突状细胞、ESC衍生细胞和iPSC衍生细胞。

9. 如权利要求1-8中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中:

(a) 所述嵌合抑制性受体包含衍生自LIR1的第一胞内信号传导结构域和衍生自BTLA的第二胞内信号传导结构域;或

(b) 所述嵌合抑制性受体包含衍生自LIR1的第一胞内信号传导结构域和衍生自PD-1的第二胞内信号传导结构域;或

(c) 所述嵌合抑制性受体包含衍生自LIR1的第一胞内信号传导结构域和衍生自KIR3DL1的第二胞内信号传导结构域;或

(d) 所述嵌合抑制性受体包含衍生自LIR1的第一胞内信号传导结构域和衍生自LIR1的第二胞内信号传导结构域;或

(e) 所述嵌合抑制性受体包含衍生自BTLA的第一胞内信号传导结构域和衍生自LIR1的第二胞内信号传导结构域;或

(f) 所述嵌合抑制性受体包含衍生自BTLA的第一胞内信号传导结构域和衍生自PD-1的第二胞内信号传导结构域;或

(g) 所述抑制性受体包含衍生自PD-1的第一胞内信号传导结构域和衍生自LIR1的第二

胞内信号传导结构域;或

(h) 所述嵌合抑制性受体包含衍生自PD-1的第一胞内信号传导结构域和衍生自BTLA的第二胞内信号传导结构域;或

(i) 所述嵌合抑制性受体包含衍生自KIR3DL1的第一胞内信号传导结构域和衍生自LIR1的第二胞内信号传导结构域;或

(j) 所述嵌合抑制性受体包含衍生自KIR3DL1的第一胞内信号传导结构域和衍生自KIR3DL1的第二胞内信号传导结构域。

10. 一种工程化核酸,其编码如权利要求1-9中任一项所述的嵌合抑制性受体。

11. 一种表达载体,其包含如权利要求10所述的工程化核酸。

12. 一种分离的免疫调节细胞,其包含如权利要求1-9中任一项所述的嵌合抑制性受体、如权利要求10所述的工程化核酸或如权利要求11所述的表达载体,任选地其中所述细胞还包含在所述细胞的表面上表达的肿瘤靶向嵌合受体,并且任选地其中相对于缺乏嵌合抑制性受体的其他方面相同的细胞,在所述蛋白与所述嵌合抑制性受体结合之后,所述嵌合抑制性受体防止、减弱或抑制所述肿瘤靶向嵌合受体的激活。

13. 一种组合物,其包含:

(a) 如权利要求1-9中任一项所述的嵌合抑制性受体、如权利要求10所述的工程化核酸、如权利要求11所述的表达载体或如权利要求12所述的分离的细胞;和

(b) 药学上可接受的载体、药学上可接受的赋形剂或它们的组合。

14. 一种防止、减弱或抑制由在免疫调节细胞的表面上表达的肿瘤靶向嵌合受体诱导的细胞介导的免疫反应的方法,其包括:

将所述免疫调节细胞工程化成在所述免疫调节细胞的表面上表达如权利要求1-9中任一项所述的嵌合抑制性受体,

其中在同源蛋白与所述嵌合抑制性受体结合之后,所述胞内信号传导结构域防止、减弱或抑制所述肿瘤靶向嵌合受体的激活,

任选地其中所述肿瘤靶向嵌合受体是嵌合抗原受体(CAR)或工程化T细胞受体(TCR),并且任选地其中所述CAR结合一种或多种在肿瘤细胞的表面上表达的抗原。

15. 一种防止、减弱或抑制在免疫调节细胞的表面上表达的肿瘤靶向嵌合受体的激活的方法,其包括:

将如权利要求12所述的分离的细胞或如权利要求13所述的组合物与所述嵌合抑制性受体的同源蛋白在适于所述嵌合抑制性受体结合所述同源蛋白的条件下接触,

其中在所述蛋白与所述嵌合抑制性受体结合之后,所述胞内信号传导结构域防止、减弱或抑制所述肿瘤靶向嵌合受体的激活,

任选地其中所述肿瘤靶向嵌合受体是嵌合抗原受体(CAR)或工程化T细胞受体(TCR),并且任选地其中所述CAR结合一种或多种在肿瘤细胞的表面上表达的抗原。

抑制性嵌合受体架构

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年2月20日提交的美国临时申请号62/979,309、2020年6月26日提交的美国临时申请号63/044,597和2021年1月11日提交的美国临时申请号63/136,134的权益,出于所有目的,所述申请中的每个都特此以引用的方式整体并入。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有序列表,其已经由EFS-Web提交并特此以引用的方式整体并入。所述ASCII复本创建于20XX年X月X日,命名为XXXXXUS_sequences_listing.txt并且大小为X,XXX,XXX字节。

背景技术

[0005] 嵌合抗原受体(CAR)实现免疫调节细胞(诸如T细胞)的靶向体内激活。这些重组膜受体具有抗原结合结构域和一个或多个信号传导结构域(例如,T细胞激活结构域)。这些特殊的受体使T细胞识别肿瘤细胞上的特定蛋白抗原,并诱导T细胞激活和信号传导通路。使用表达嵌合受体的T细胞进行的临床试验的最近结果为其作为癌症免疫疗法的剂的实用性提供了令人信服的支持。然而,尽管取得了这些有前景的结果,但仍发现了许多与CAR T细胞疗法相关的副作用,产生重大的安全问题。一种副作用是来自TCR和CAR工程化T细胞的“在靶但脱组织(on-target but off-tissue)”不良事件,在所述不良事件中CAR T细胞与其靶肿瘤组织之外的配体结合并诱导免疫反应。因此,鉴定适当的CAR靶标的的能力对于有效地靶向和治疗肿瘤而不损害表达相同靶抗原的正常细胞来说是重要的。

[0006] 抑制性嵌合抗原受体(也称为iCAR)是在结合靶细胞上的其同源配体之后抑制或减少免疫调节细胞活性的蛋白构造。当前的iCAR设计利用PD-1胞内结构域进行抑制,但已证明难以再现。因此,需要用于iCAR的替代抑制性结构域。

发明内容

[0007] 本文提供了嵌合抑制性受体,其包含:胞外蛋白结合结构域;跨膜结构域,其中所述跨膜结构域可操作地连接至所述胞外蛋白结合结构域;和胞内信号传导结构域,其中所述胞内信号传导结构域可操作地连接至所述跨膜结构域,并且其中所述胞内信号传导结构域能够防止、减弱或抑制在免疫调节细胞上表达的肿瘤靶向嵌合受体的激活。

[0008] 在一些方面,胞内信号传导结构域衍生自选自自由以下组成的组的蛋白:BTLA、PD-1、CTLA4、TIM3、KIR3DL1、LIR1、NKG2A、TIGIT和LAG3。

[0009] 在一些方面,跨膜结构域和胞内信号传导结构域衍生自相同蛋白。

[0010] 在一些方面,跨膜结构域还包含蛋白胞外结构域的至少一部分。

[0011] 在一些方面,跨膜结构域衍生自第一蛋白,并且胞内信号传导结构域衍生自与第一蛋白不同的第二蛋白。

[0012] 在一些方面,胞内信号传导结构域衍生自BTLA。在一些方面,胞内信号传导结构域包含与RRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCL

EENKPGIVYASLNHSVIGPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS (SEQ ID NO:3) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些方面,胞内信号传导结构域包含氨基酸序列RRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASLNHSVIGPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS (SEQ ID NO:3)。

[0013] 在一些方面,胞内信号传导结构域衍生自LIR1。在一些方面,胞内信号传导结构域包含与LRHRRQGKHWSTSTQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPAADAQEENLYAAVKHTQPEDGVEMDTRSPHDEDPQAVTYAEVKHSRPRREMASPPSPLSGEFLDTKDRQAEEDRQMDTEAAASEAPQDVTYAQLHSLTLRREATEPPPSQEGPSPAVPSIYATLAIH (SEQ ID NO:50) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些方面,胞内信号传导结构域包含氨基酸序列LRHRRQGKHWSTSTQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPAADAQEENLYAAVKHTQPEDGVEMDTRSPHDEDPQAVTYAEVKHSRPRREMASPPSPLSGEFLDTKDRQAEEDRQMDTEAAASEAPQDVTYAQLHSLTLRREATEPPPSQEGPSPAVPSIYATLAIH (SEQ ID NO:50)。

[0014] 在一些方面,胞内信号传导结构域衍生自PD-1。在一些方面,胞内信号传导结构域包含与CSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFVSDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFSPGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL (SEQ ID NO:1) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些方面,胞内信号传导结构域包含氨基酸序列CSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFVSDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFSPGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL (SEQ ID NO:1)。

[0015] 在一些方面,胞内信号传导结构域衍生自KIR3DL1。在一些方面,胞内信号传导结构域包含与有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些方面,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含与HLWCSNKKNAAVMDQEPAGNRTANSEDSDEQDPEEVTYAQLDHCVFTRKQITRPSQRPKTPPTDTILYTELPAKPRSKVVSCP (SEQ ID NO:66) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些方面,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含氨基酸序列HLWCSNKKNAAVMDQEPAGNRTANSEDSDEQDPEEVTYAQLDHCVFTRKQITRPSQRPKTPPTDTILYTELPAKPRSKVVSCP (SEQ ID NO:66)。

[0016] 在一些方面,胞内信号传导结构域衍生自CTLA4。在一些方面,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含与AVSLSKMLKKRSPLTTGVGVKMPPEPECEKQFQPYFIPIN (SEQ ID NO:67) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些方面,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含氨基酸序列AVSLSKMLKKRSPLTTGVGVKMPPEPECEKQFQPYFIPIN (SEQ ID NO:67)。

[0017] 在一些方面,跨膜结构域衍生自选自以下组成的组的蛋白:BTLA、CD8、CD28、CD3

δ 、CD4、4-IBB、OX40、ICOS、2B4、CD25、CD7、LAX、LAT、PD-1、CTLA4、TIM3、KIR3DL1、LIR1、NKG2A、TIGIT和LAG3。

[0018] 在一些方面,嵌合抑制性受体包含衍生自BTLA的跨膜结构域。在一些方面,跨膜结构域包含与LLPLGGLPLLITTCFCLFCCL (SEQ ID NO:12) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些方面,跨膜结构域包含氨基酸序列LLPLGGLPLLITTCFCLFCCL (SEQ ID NO:12)。在一些方面,跨膜结构域还包含BTLA胞外结构域的至少一部分。

[0019] 在一些方面,嵌合抑制性受体包含衍生自LIR1的跨膜结构域。在一些方面,跨膜结构域包含与VIGILVAVILLLLLLLLLLFLI (SEQ ID NO:59) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些方面,跨膜结构域包含氨基酸序列VIGILVAVILLLLLLLLLLFLI (SEQ ID NO:59)。在一些方面,跨膜结构域还包含LIR1胞外结构域的至少一部分。

[0020] 在一些方面,嵌合抑制性受体包含衍生自PD-1的跨膜结构域。在一些方面,跨膜结构域包含与VGVVGGLLGSLVLLVWVLAVI (SEQ ID NO:60) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些方面,跨膜结构域包含氨基酸序列VGVVGGLLGSLVLLVWVLAVI (SEQ ID NO:60)。在一些方面,跨膜结构域还包含PD1胞外结构域的至少一部分。

[0021] 在一些方面,嵌合抑制性受体包含衍生自CTLA4的跨膜结构域。在一些方面,跨膜结构域包含与DFLLWILAAVSSGLFFYSFLLT (SEQ ID NO:68) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些方面,跨膜结构域包含氨基酸序列DFLLWILAAVSSGLFFYSFLLT (SEQ ID NO:68)。在一些方面,跨膜结构域还包含CTLA4胞外结构域的至少一部分。

[0022] 在一些方面,嵌合抑制性受体包含衍生自KIR3DL1的跨膜结构域。在一些方面,跨膜结构域包含与ILIGTSVVIILFILLFFLL (SEQ ID NO:69) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些方面,跨膜结构域包含氨基酸序列ILIGTSVVIILFILLFFLL (SEQ ID NO:69)。在一些方面,跨膜结构域还包含KIR3DL1胞外结构域的至少一部分。

[0023] 在一些方面,嵌合抑制性受体包含衍生自CD28的跨膜结构域。在一些方面,跨膜结构域包含与FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO:11) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些方面,跨膜结构域包含氨基酸序列FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO:11)。在一些方面,跨膜结构域还包含CD28胞外结构域的至少一部分。

[0024] 在一些方面,蛋白不在靶肿瘤上表达。

- [0025] 在一些方面,蛋白在非肿瘤细胞上表达。
- [0026] 在一些方面,蛋白在衍生自选自以下组成的组的组织的非肿瘤细胞上表达:脑、神经元组织、内分泌、内皮、骨、骨髓、免疫系统、肌肉、肺、肝、胆囊、胰腺、胃肠道、肾脏、膀胱、雄性生殖器、雌性生殖器、脂肪、软组织和皮肤。
- [0027] 在一些方面,胞外蛋白结合结构域包含配体结合结构域。
- [0028] 在一些方面,胞外蛋白结合结构域包含受体结合结构域。
- [0029] 在一些方面,胞外蛋白结合结构域包含抗原结合结构域。
- [0030] 在一些方面,抗原结合结构域包含抗体、抗体的抗原结合片段、F(ab)片段、F(ab')片段、单链可变片段(scFv)或单结构域抗体(sdAb)。
- [0031] 在一些方面,抗原结合结构域包含单链可变片段(scFv)。
- [0032] 在一些方面,每个scFv包含重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)。
- [0033] 在一些方面,VH和VL由肽接头分开。
- [0034] 在一些方面,肽接头包含选自以下组成的组的氨基酸序列:GGS(SEQ ID NO:15)、GGS GGS(SEQ ID NO:16)、GGS GGS GGS(SEQ ID NO:17)、GGS GGS GGS GGS(SEQ ID NO:18)、GGS GGS GGS GGS GGS(SEQ ID NO:19)、GGS GGS(SEQ ID NO:20)、GGS GGS GGS(SEQ ID NO:21)、GGS GGS GGS GGS GGS(SEQ ID NO:22)、GGS GGS GGS GGS GGS GGS(SEQ ID NO:23)、GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS(SEQ ID NO:24)、GGS GGS(SEQ ID NO:25)、GGS GGS GGS GGS(SEQ ID NO:26)、GGS GGS GGS GGS GGS GGS(SEQ ID NO:27)、GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS(SEQ ID NO:28)和GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS(SEQ ID NO:29)。
- [0035] 在一些方面,scFv包含结构VH-L-VL或VL-L-VH,其中VH是重链可变结构域,L是肽接头,并且VL是轻链可变结构域。
- [0036] 在一些方面,跨膜结构域物理连接至胞外蛋白结合结构域。
- [0037] 在一些方面,胞内信号传导结构域物理连接至跨膜结构域。
- [0038] 在一些方面,跨膜结构域物理连接至胞外蛋白结合结构域,并且胞内信号传导结构域物理连接至跨膜结构域。
- [0039] 在一些方面,蛋白结合结构域具有高结合亲和力。
- [0040] 在一些方面,蛋白结合结构域具有低结合亲和力。
- [0041] 在一些方面,嵌合抑制性受体能够压制经激活的免疫调节细胞产生细胞因子。
- [0042] 在一些方面,嵌合抑制性受体能够压制对靶细胞的细胞介导的免疫反应,其中免疫反应通过免疫调节细胞的激活来诱导。
- [0043] 在一些方面,靶细胞是肿瘤细胞。
- [0044] 在一些方面,胞内信号传导结构域包含一个或多个修饰。
- [0045] 在一些方面,相对于其他方面相同的未修饰受体,一个或多个修饰调节嵌合抑制性受体的敏感性。
- [0046] 在一些方面,相对于其他方面相同的未修饰受体,一个或多个修饰增加嵌合抑制性受体的敏感性。
- [0047] 在一些方面,相对于其他方面相同的未修饰受体,一个或多个修饰降低嵌合抑制性受体的敏感性。
- [0048] 在一些方面,相对于其他方面相同的未修饰受体,一个或多个修饰调节嵌合抑制

性受体的效力。

[0049] 在一些方面,相对于其他方面相同的未修饰受体,一个或多个修饰增加嵌合抑制性受体的效力。

[0050] 在一些方面,相对于其他方面相同的未修饰受体,一个或多个修饰降低嵌合抑制性受体的效力。

[0051] 在一些方面,相对于其他方面相同的未修饰受体,当在免疫调节细胞上表达时,一个或多个修饰调节肿瘤靶向嵌合受体的激活的基础防止、减弱或抑制。

[0052] 在一些方面,相对于其他方面相同的未修饰受体,一个或多个修饰降低基础防止、减弱或抑制。

[0053] 在一些方面,相对于其他方面相同的未修饰受体,一个或多个修饰增加基础防止、减弱或抑制。

[0054] 在一些方面,嵌合抑制性受体还包含定位在蛋白结合结构域与跨膜结构域之间并且可操作地连接至蛋白结合结构域和跨膜结构域中的每个的间隔区。

[0055] 在一些方面,嵌合抑制性受体还包含定位在蛋白结合结构域与跨膜结构域之间并且物理连接至蛋白结合结构域和跨膜结构域中的每个的间隔区。

[0056] 在一些方面,间隔区衍生自选自自由以下组成的组的蛋白:CD8 α 、CD4、CD7、CD28、IgG1、IgG4、Fc γ RIII α 、LNGFR和PDGFR。

[0057] 在一些方面,间隔区包含选自自由以下组成的组的氨基酸序列:AAAIEVMYPPPYLDNEK SNGTIIHVKGKHLCP SFLPFGPSKP (SEQ ID NO:31)、ESKYGPPCPSCP (SEQ ID NO:32)、ESKYGPPAPSAP (SEQ ID NO:33)、ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:34)、EPKSCDKTHTCP (SEQ ID NO:35)、AAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCNHRN (SEQ ID NO:36)、TTTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO:37)、ACPTGLYTHSGECKACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTECVGLQSMSAPCVEADDAVCRCAYGYQDETTGRCEACRVCEAGSGLVFSCQDKQNTVCEECPDGTYSDEADAEC (SEQ ID NO:38)、ACPTGLYTHSGECKACNLGEGVAQPCGANQTV C (SEQ ID NO:39)、AVGQDTQEVIIVPHSLPFKV (SEQ ID NO:40)和TTTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDQTTPGERSLPAFYPGTSGSCSGCSLSLP (SEQ ID NO:70)。

[0058] 在一些方面,相对于缺乏间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,间隔区调节嵌合抑制性受体的敏感性。

[0059] 在一些方面,相对于缺乏间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,间隔区增加嵌合抑制性受体的敏感性。

[0060] 在一些方面,相对于缺乏间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,间隔区降低嵌合抑制性受体的敏感性。

[0061] 在一些方面,相对于缺乏间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,间隔区调节嵌合抑制性受体的效力。

[0062] 在一些方面,相对于缺乏间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,间隔区增加嵌合抑制性受体的效力。

[0063] 在一些方面,相对于缺乏间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,间隔区降低嵌合抑制性受体的效力。

- [0064] 在一些方面,相对于缺乏间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,当在免疫调节细胞上表达时,间隔区调节肿瘤靶向嵌合受体的激活的基础防止、减弱或抑制。
- [0065] 在一些方面,相对于缺乏间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,间隔区降低基础防止、减弱或抑制。
- [0066] 在一些方面,相对于缺乏间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,间隔区增加基础防止、减弱或抑制。
- [0067] 在一些方面,嵌合抑制性受体还包含定位在跨膜结构域与胞内信号传导结构域之间并且可操作地连接至跨膜结构域和胞内信号传导结构域中的每个的胞内间隔区。
- [0068] 在一些方面,嵌合抑制性受体还包含定位在跨膜结构域与胞内信号传导结构域之间并且物理连接至跨膜结构域和胞内信号传导结构域中的每个的胞内间隔区。
- [0069] 在一些方面,相对于缺乏胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,胞内间隔区调节嵌合抑制性受体的敏感性。
- [0070] 在一些方面,相对于缺乏胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,胞内间隔区增加嵌合抑制性受体的敏感性。
- [0071] 在一些方面,相对于缺乏胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,胞内间隔区降低嵌合抑制性受体的敏感性。
- [0072] 在一些方面,相对于缺乏胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,胞内间隔区调节嵌合抑制性受体的效力。
- [0073] 在一些方面,相对于缺乏胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,胞内间隔区增加嵌合抑制性受体的效力。
- [0074] 在一些方面,相对于缺乏胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,胞内间隔区降低嵌合抑制性受体的效力。
- [0075] 在一些方面,相对于缺乏胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,当在免疫调节细胞上表达时,胞内间隔区调节肿瘤靶向嵌合受体的激活的基础防止、减弱或抑制。
- [0076] 在一些方面,相对于缺乏胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,胞内间隔区降低基础防止、减弱或抑制。
- [0077] 在一些方面,相对于缺乏胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,胞内间隔区增加基础防止、减弱或抑制。
- [0078] 在一些方面,抑制性嵌合受体还包含酶促抑制性结构域。
- [0079] 在一些方面,相对于缺乏酶促抑制性结构域的其他方面相同的嵌合抑制性受体,当在免疫调节细胞上表达时,酶促抑制性结构域能够防止、减弱或抑制肿瘤靶向嵌合受体的激活。
- [0080] 在一些方面,酶促抑制性结构域包含酶催化结构域。
- [0081] 在一些方面,酶催化结构域衍生自选自自由以下组成的组的酶:CSK、SHP-1、PTEN、CD45、CD148、PTP-MEG1、PTP-PEST、c-CBL、CBL-b、PTPN22、LAR、PTPH1、SHIP-1和RasGAP。
- [0082] 在一些方面,酶促抑制性结构域包含一个或多个修饰,相对于缺乏一个或多个修饰的其他方面相同的酶促抑制性结构域,一个或多个修饰调节基础防止、减弱或抑制。
- [0083] 在一些方面,相对于缺乏酶促抑制性结构域的其他方面相同的嵌合抑制性受体,一个或多个修饰降低嵌合抑制性受体的基础防止、减弱或抑制。

[0084] 在一些方面,相对于缺乏酶促抑制性结构域的其他方面相同的嵌合抑制性受体,一个或多个修饰增加嵌合抑制性受体的基础防止、减弱或抑制。

[0085] 在一些方面,肿瘤靶向嵌合受体是肿瘤靶向嵌合抗原受体(CAR)或工程化T细胞受体(TCR)。

[0086] 在一些方面,免疫调节细胞选自由以下组成的组:T细胞、CD8+T细胞、CD4+ T细胞、 γ δ T细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、调节性T细胞、病毒特异性T细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、自然杀伤(NK)细胞、B细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、先天性淋巴样细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、髓系细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突状细胞、ESC衍生细胞和iPSC衍生细胞。

[0087] 本文还提了供嵌合抑制性受体,其包含:胞外蛋白结合结构域;跨膜结构域,其中所述跨膜结构域可操作地连接至胞外蛋白结合结构域;和两个或更多个胞内信号传导结构域,其中所述两个或更多个胞内信号传导结构域可操作地连接至跨膜结构域;并且其中所述两个或更多个胞内信号传导结构域中的至少一个能够防止、减弱或抑制在免疫调节细胞上表达的肿瘤靶向嵌合受体的激活。

[0088] 在一些方面,两个或更多个胞内信号传导结构域各自衍生自选自由以下组成的组的蛋白:BTLA、PD-1、CTLA4、TIM3、KIR3DL1、LIR1、NKG2A、TIGIT和LAG3。

[0089] 在一些方面,跨膜结构域衍生自与两个或更多个胞内信号传导结构域之一相同的蛋白。

[0090] 在一些方面,跨膜结构域还包含相同蛋白的胞外结构域的至少一部分。

[0091] 在一些方面,跨膜结构域衍生自第一蛋白,并且两个或更多个胞内信号传导结构域衍生自与所述第一蛋白不同的蛋白。

[0092] 在一些方面,两个或更多个胞内信号传导结构域中的至少一个衍生自BTLA。在一些方面,两个或更多个胞内信号传导结构域中的至少一个包含与RRHQGKQNELSDTAGREINLV DAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASLNHSVIGPNSRLARNV KEAPTEYASICVRS (SEQ ID NO:3) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些方面,两个或更多个胞内信号传导结构域中的至少一个包含氨基酸序列RRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDP DLCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASLNHSVIGPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS (SEQ ID NO:3)。

[0093] 在一些方面,两个或更多个胞内信号传导结构域中的至少一个衍生自LIR1。在一些方面,两个或更多个胞内信号传导结构域中的至少一个包含与LRHRRQGKHWSTQRKADFQH PAGAVGPEPTDRGLQWRSSPAADAQEENLYAAVKHTQPEDGVEMDTRSPHDEDPQAVTYAEVKHSRPRREMASPPS PLSGFEFLDTKDRQAEEDRQMDTEAAASEAPQDVTYAQLHSLTLRREATEPPPSQEGPSPAVPSIYATLAIH (SEQ ID NO:50) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些方面,两个或更多个胞内信号传导结构域中的至少一个包含氨基酸序列LRHRRQGKHWSTQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPAADAQEENLYAAVKHTQPEDGVEMDTR SPHDEDPQAVTYAEVKHSRPRREMASPPSPLSGFEFLDTKDRQAEEDRQMDTEAAASEAPQDVTYAQLHSLTLRREA TEPPPSQEGPSPAVPSIYATLAIH (SEQ ID NO:50)。

[0094] 在一些方面,两个或更多个胞内信号传导结构域中的至少一个衍生自PD-1。在一些方面,两个或更多个胞内信号传导结构域中的至少一个包含与CSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFSPSGMTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL (SEQ ID NO:1) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些方面,两个或更多个胞内信号传导结构域中的至少一个包含氨基酸序列CSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFSPSGMTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL (SEQ ID NO:1)。

[0095] 在一些方面,两个或更多个胞内信号传导结构域中的至少一个衍生自KIR3DL1。在一些方面,两个或更多个胞内信号传导结构域中的至少一个包含与HLWCSNKKNAAVMDQEPAGNRTANSEDSDEQDPEEVTYAQLDHCVFTRKQITRPSQRPKTPPTDTILYTELPNAKPRSKVVSCP (SEQ ID NO:66) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些方面,两个或更多个胞内信号传导结构域中的至少一个包含氨基酸序列HLWCSNKKNAAVMDQEPAGNRTANSEDSDEQDPEEVTYAQLDHCVFTRKQITRPSQRPKTPPTDTILYTELPNAKPRSKVVSCP (SEQ ID NO:66)。

[0096] 在一些方面,两个或更多个胞内信号传导结构域中的至少一个衍生自CTLA4。在一些方面,两个或更多个胞内信号传导结构域中的至少一个包含与AVSLSKMLKKRSPLTTGVGVKMPPTPECEKQFQPYFIPIN (SEQ ID NO:67) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些方面,两个或更多个胞内信号传导结构域中的至少一个包含氨基酸序列AVSLSKMLKKRSPLTTGVGVKMPPTPECEKQFQPYFIPIN (SEQ ID NO:67)。

[0097] 在一些方面,跨膜结构域衍生自选自以下组成的组的蛋白:BTLA、CD8、CD28、CD3δ、CD4、4-1BB、OX40、ICOS、2B4、CD25、CD7、LAX、LAT、PD-1、CTLA4、TIM3、KIR3DL1、LIR1、NKG2A、TIGIT和LAG3。

[0098] 在一些方面,嵌合抑制性受体包含衍生自BTLA的跨膜结构域。在一些方面,跨膜结构域包含与LLPLGGLPLLITTCFLFCCL (SEQ ID NO:12) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些方面,跨膜结构域包含氨基酸序列LLPLGGLPLLITTCFLFCCL (SEQ ID NO:12)。在一些方面,跨膜结构域还包含BTLA胞外结构域的至少一部分。

[0099] 在一些方面,嵌合抑制性受体包含衍生自LIR1的跨膜结构域。在一些方面,跨膜结构域包含与VIGILVAVILLLLLLLLLLFLI (SEQ ID NO:59) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些方面,跨膜结构域包含氨基酸序列VIGILVAVILLLLLLLLLLFLI (SEQ ID NO:59)。在一些方面,跨膜结构域还包含LIR1胞外结构域的至少一部分。

[0100] 在一些方面,嵌合抑制性受体包含衍生自PD-1的跨膜结构域。在一些方面,跨膜结

构域包含与VGVVGGLLGSLVLLVWVLAVI (SEQ ID NO:60) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些方面,跨膜结构域包含氨基酸序列VGVVGGLLGSLVLLVWVLAVI (SEQ ID NO:60)。在一些方面,跨膜结构域还包含PD-1胞外结构域的至少一部分。

[0101] 在一些方面,嵌合抑制性受体包含衍生自CTLA4的跨膜结构域。在一些方面,跨膜结构域包含与DFLLWILAAVSSGLFFYSFLLT (SEQ ID NO:68) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些方面,跨膜结构域包含氨基酸序列DFLLWILAAVSSGLFFYSFLLT (SEQ ID NO:68)。在一些方面,跨膜结构域还包含CTLA4胞外结构域的至少一部分。

[0102] 在一些方面,嵌合抑制性受体包含衍生自KIR3DL1的跨膜结构域。在一些方面,跨膜结构域包含与ILIGTSVVIILFILLFFLL (SEQ ID NO:69) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些方面,跨膜结构域包含氨基酸序列ILIGTSVVIILFILLFFLL (SEQ ID NO:69)。在一些方面,跨膜结构域还包含KIR3DL1胞外结构域的至少一部分。

[0103] 在一些方面,嵌合抑制性受体包含衍生自CD28的跨膜结构域。在一些方面,跨膜结构域包含与FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO:11) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些方面,跨膜结构域包含氨基酸序列FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO:11)。在一些方面,跨膜结构域还包含CD28胞外结构域的至少一部分。

[0104] 在一些方面,嵌合抑制性受体包含衍生自LIR1的第一胞内信号传导结构域和衍生自BTLA的第二胞内信号传导结构域。

[0105] 在一些方面,嵌合抑制性受体包含衍生自LIR1的第一胞内信号传导结构域和衍生自PD-1的第二胞内信号传导结构域。

[0106] 在一些方面,嵌合抑制性受体包含衍生自LIR1的第一胞内信号传导结构域和衍生自KIR3DL1的第二胞内信号传导结构域。

[0107] 在一些方面,嵌合抑制性受体包含衍生自LIR1的第一胞内信号传导结构域和衍生自LIR1的第二胞内信号传导结构域。

[0108] 在一些方面,嵌合抑制性受体包含衍生自LIR1的第一胞内信号传导结构域和衍生自KIR3DL1的第二胞内信号传导结构域。

[0109] 在一些方面,第一胞内信号传导结构域还包含衍生自LIR1的跨膜结构域。

[0110] 在一些方面,嵌合抑制性受体包含衍生自BTLA的第一胞内信号传导结构域和衍生自LIR1的第二胞内信号传导结构域。

[0111] 在一些方面,嵌合抑制性受体包含衍生自BTLA的第一胞内信号传导结构域和衍生自PD-1的第二胞内信号传导结构域。

[0112] 在一些方面,第一胞内信号传导结构域还包含衍生自BTLA的跨膜结构域。

- [0113] 在一些方面,嵌合抑制性受体包含衍生自PD-1的第一胞内信号传导结构域和衍生自LIR1的第二胞内信号传导结构域。
- [0114] 在一些方面,嵌合抑制性受体包含衍生自PD-1的第一胞内信号传导结构域和衍生自BTLA的第二胞内信号传导结构域。
- [0115] 在一些方面,第一胞内信号传导结构域还包含衍生自PD-1的跨膜结构域。
- [0116] 在一些方面,蛋白不在靶肿瘤上表达。
- [0117] 在一些方面,蛋白在非肿瘤细胞上表达。
- [0118] 在一些方面,蛋白在衍生自选自自由以下组成的组的组织的非肿瘤细胞上表达:脑、神经元组织、内分泌、内皮、骨、骨髓、免疫系统、肌肉、肺、肝、胆囊、胰腺、胃肠道、肾脏、膀胱、雄性生殖器、雌性生殖器、脂肪、软组织和皮肤。
- [0119] 在一些方面,胞外蛋白结合结构域包含配体结合结构域。
- [0120] 在一些方面,胞外蛋白结合结构域包含受体结合结构域。
- [0121] 在一些方面,胞外蛋白结合结构域包含抗原结合结构域。
- [0122] 在一些方面,抗原结合结构域包含抗体、抗体的抗原结合片段、F(ab)片段、F(ab')片段、单链可变片段(scFv)或单结构域抗体(sdAb)。
- [0123] 在一些方面,抗原结合结构域包含单链可变片段(scFv)。
- [0124] 在一些方面,每个scFv包含重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)。
- [0125] 在一些方面,VH和VL由肽接头分开。
- [0126] 在一些方面,肽接头包含选自自由以下组成的组的氨基酸序列:GGS (SEQ ID NO: 15)、GGS GGS (SEQ ID NO: 16)、GGS GGS GGS (SEQ ID NO: 17)、GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO: 18)、GGS GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO: 19)、GGS GGS (SEQ ID NO: 20)、GGS GGS GGS (SEQ ID NO: 21)、GGS GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO: 22)、GGS GGS GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO: 23)、GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO: 24)、GGS GGS (SEQ ID NO: 25)、GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO: 26)、GGS GGS GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO: 27)、GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO: 28)和GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO: 29)。
- [0127] 在一些方面,scFv包含结构VH-L-VL或VL-L-VH,其中VH是重链可变结构域,L是肽接头,并且VL是轻链可变结构域。
- [0128] 在一些方面,跨膜结构域物理连接至胞外蛋白结合结构域。
- [0129] 在一些方面,两个或更多个胞内信号传导结构域之一物理连接至跨膜结构域。
- [0130] 在一些方面,跨膜结构域物理连接至胞外蛋白结合结构域,并且两个或更多个胞内信号传导结构域之一物理连接至跨膜结构域。
- [0131] 在一些方面,蛋白结合结构域具有高结合亲和力。
- [0132] 在一些方面,蛋白结合结构域具有低结合亲和力。
- [0133] 在一些方面,嵌合抑制性受体能够压制经激活的免疫调节细胞产生细胞因子。
- [0134] 在一些方面,嵌合抑制性受体能够压制对靶细胞的细胞介导的免疫反应,其中免疫反应通过免疫调节细胞的激活来诱导。
- [0135] 在一些方面,靶细胞是肿瘤细胞。
- [0136] 在一些方面,两个或更多个胞内信号传导结构域中的至少一个包含一个或多个修饰。

[0137] 在一些方面,相对于其他方面相同的未修饰受体,一个或多个修饰调节嵌合抑制性受体的敏感性。

[0138] 在一些方面,相对于其他方面相同的未修饰受体,一个或多个修饰增加嵌合抑制性受体的敏感性。

[0139] 在一些方面,相对于其他方面相同的未修饰受体,一个或多个修饰降低嵌合抑制性受体的敏感性。

[0140] 在一些方面,相对于其他方面相同的未修饰受体,一个或多个修饰调节嵌合抑制性受体的效力。

[0141] 在一些方面,相对于其他方面相同的未修饰受体,一个或多个修饰增加嵌合抑制性受体的效力。

[0142] 在一些方面,相对于其他方面相同的未修饰受体,一个或多个修饰降低嵌合抑制性受体的效力。

[0143] 在一些方面,相对于其他方面相同的未修饰受体,当在免疫调节细胞上表达时,一个或多个修饰调节肿瘤靶向嵌合受体的激活的基础防止、减弱或抑制。

[0144] 在一些方面,相对于其他方面相同的未修饰受体,一个或多个修饰降低基础防止、减弱或抑制。

[0145] 在一些方面,相对于其他方面相同的未修饰受体,一个或多个修饰增加基础防止、减弱或抑制。

[0146] 在一些方面,嵌合抑制性受体还包含定位在蛋白结合结构域与跨膜结构域之间并且可操作地连接至蛋白结合结构域和跨膜结构域中的每个的间隔区。

[0147] 在一些方面,嵌合抑制性受体还包含定位在蛋白结合结构域与跨膜结构域之间并且物理连接至蛋白结合结构域和跨膜结构域中的每个的间隔区。

[0148] 在一些方面,间隔区衍生自选自自由以下组成的组的蛋白:CD8 α 、CD4、CD7、CD28、IgG1、IgG4、Fc γ RIII α 、LNGFR和PDGFR。

[0149] 在一些方面,间隔区包含选自自由以下组成的组的氨基酸序列:AAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKP (SEQ ID NO:31)、ESKYGPPCPSCP (SEQ ID NO:32)、ESKYGPPAPSAP (SEQ ID NO:33)、ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:34)、EPKSCDKTHTCP (SEQ ID NO:35)、AAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN (SEQ ID NO:36)、TTTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO:37)、ACPTGLYTHSGECKACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTECVGLQSMSAPCVEADDAVCRCAYGYYQDETTGRCEACRVCEAGSGLVFSCQDKQNTVCEECPDGTYSDEADAEC (SEQ ID NO:38)、ACPTGLYTHSGECKACNLGEGVAQPCGANQTV (SEQ ID NO:39)、AVGQDTQEVIVVPHSLPFKV (SEQ ID NO:40)和TTTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDQTTTPGERSSLPAYPGTSGSCSGCGLSLP (SEQ ID NO:70)。

[0150] 在一些方面,相对于缺乏间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,间隔区调节嵌合抑制性受体的敏感性。

[0151] 在一些方面,相对于缺乏间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,间隔区增加嵌合抑制性受体的敏感性。

[0152] 在一些方面,相对于缺乏间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,间隔区降低

嵌合抑制性受体的敏感性。

[0153] 在一些方面,相对于缺乏间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,间隔区调节嵌合抑制性受体的效力。

[0154] 在一些方面,相对于缺乏间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,间隔区增加嵌合抑制性受体的效力。

[0155] 在一些方面,相对于缺乏间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,间隔区降低嵌合抑制性受体的效力。

[0156] 在一些方面,相对于缺乏间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,当在免疫调节细胞上表达时,间隔区调节肿瘤靶向嵌合受体的激活的基础防止、减弱或抑制。

[0157] 在一些方面,相对于缺乏间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,间隔区降低基础防止、减弱或抑制。

[0158] 在一些方面,相对于缺乏间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,间隔区增加基础防止、减弱或抑制。

[0159] 在一些方面,嵌合抑制性受体还包含定位在跨膜结构域与两个或更多个胞内信号传导结构域之一之间并且可操作地连接至跨膜结构域和胞内信号传导结构域中的每个的胞内间隔区。

[0160] 在一些方面,嵌合抑制性受体还包含定位在跨膜结构域与两个或更多个胞内信号传导结构域之一之间并且物理连接至跨膜结构域和胞内信号传导结构域中的每个的胞内间隔区。

[0161] 在一些方面,相对于缺乏胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,胞内间隔区调节嵌合抑制性受体的敏感性。

[0162] 在一些方面,相对于缺乏胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,胞内间隔区增加嵌合抑制性受体的敏感性。

[0163] 在一些方面,相对于缺乏胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,胞内间隔区降低嵌合抑制性受体的敏感性。

[0164] 在一些方面,相对于缺乏胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,胞内间隔区调节嵌合抑制性受体的效力。

[0165] 在一些方面,相对于缺乏胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,胞内间隔区增加嵌合抑制性受体的效力。

[0166] 在一些方面,相对于缺乏胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,胞内间隔区降低嵌合抑制性受体的效力。

[0167] 在一些方面,相对于缺乏胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,当在免疫调节细胞上表达时,胞内间隔区调节肿瘤靶向嵌合受体的激活的基础防止、减弱或抑制。

[0168] 在一些方面,相对于缺乏胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,胞内间隔区降低基础防止、减弱或抑制。

[0169] 在一些方面,相对于缺乏胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,胞内间隔区增加基础防止、减弱或抑制。

[0170] 在一些方面,抑制性嵌合受体还包含酶促抑制性结构域。

[0171] 在一些方面,相对于缺乏酶促抑制性结构域的其他方面相同的嵌合抑制性受体,

当在免疫调节细胞上表达时,酶促抑制性结构域能够防止、减弱或抑制肿瘤靶向嵌合受体的激活。

[0172] 在一些方面,酶促抑制性结构域包含酶催化结构域。

[0173] 在一些方面,酶催化结构域衍生自选自自由以下组成的组的酶:CSK、SHP-1、PTEN、CD45、CD148、PTP-MEG1、PTP-PEST、c-CBL、CBL-b、PTPN22、LAR、PTPH1、SHIP-1和RasGAP。

[0174] 在一些方面,酶促抑制性结构域包含一个或多个修饰,相对于缺乏一个或多个修饰的其他方面相同的酶促抑制性结构域,一个或多个修饰调节基础防止、减弱或抑制。

[0175] 在一些方面,相对于缺乏酶促抑制性结构域的其他方面相同的嵌合抑制性受体,一个或多个修饰降低嵌合抑制性受体的基础防止、减弱或抑制。

[0176] 在一些方面,相对于缺乏酶促抑制性结构域的其他方面相同的嵌合抑制性受体,一个或多个修饰增加嵌合抑制性受体的基础防止、减弱或抑制。

[0177] 在一些方面,肿瘤靶向嵌合受体是肿瘤靶向嵌合抗原受体(CAR)或工程化T细胞受体(TCR)。

[0178] 在一些方面,免疫调节细胞选自自由以下组成的组:T细胞、CD8+T细胞、CD4+ T细胞、 γ δ T细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、调节性T细胞、病毒特异性T细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、自然杀伤(NK)细胞、B细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、先天性淋巴样细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、髓系细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突状细胞、ESC衍生细胞和iPSC衍生细胞。在一些方面,免疫调节细胞是自然杀伤(NK)细胞。

[0179] 本文还提供了包含如本文所述的嵌合抑制性受体和药学上可接受的载体的组合物。

[0180] 本文还提供了编码如本文所述的嵌合抑制性受体的工程化核酸。

[0181] 本文还提供了包含如本文所述的工程化核酸的表达载体。

[0182] 本文还提供了包含编码如本文所述的嵌合抑制性受体的工程化核酸或如本文所述的表达载体的分离的免疫抑制细胞。

[0183] 本文还提供了包含如本文所述的工程化核酸或如本文所述的表达载体和药学上可接受的载体的组合物。

[0184] 本文还提供了包含如本文所述的嵌合抑制性受体的分离的免疫调节细胞。

[0185] 在一些方面,细胞还包含在细胞的表面上表达的肿瘤靶向嵌合受体。

[0186] 在一些方面,相对于缺乏嵌合抑制性受体的其他方面相同的细胞,在蛋白与嵌合抑制性受体结合之后,嵌合抑制性受体防止、减弱或抑制肿瘤靶向嵌合受体的激活。

[0187] 本文还提供了包含嵌合抑制性受体的分离的免疫调节细胞,其中嵌合抑制性受体包含:胞外蛋白结合结构域;跨膜结构域,其中所述跨膜结构域可操作地连接至胞外蛋白结合结构域;和胞内信号传导结构域,其中胞内信号传导结构域可操作地连接至跨膜结构域,并且其中相对于缺乏嵌合抑制性受体的其他方面相同的细胞,在蛋白与嵌合抑制性受体结合之后,嵌合抑制性受体防止、减弱或抑制在细胞的表面上表达的肿瘤靶向嵌合受体的激活。

[0188] 在一些方面,细胞还包含在细胞的表面上表达的肿瘤靶向嵌合受体。

[0189] 本文还提供了分离的免疫调节细胞,其包含:嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体包含:胞外蛋白结合结构域;跨膜结构域,其中所述跨膜结构域可操作地连接至胞外

蛋白结合结构域;和胞内信号传导结构域,其中胞内信号传导结构域可操作地连接至跨膜结构域;以及在细胞的表面上表达的肿瘤靶向嵌合抗体,其中相对于缺乏嵌合抑制性受体的其他方面相同的细胞,在蛋白与嵌合抑制性受体结合之后,嵌合抑制性受体防止、减弱或抑制肿瘤靶向嵌合受体的激活。

[0190] 在一些方面,嵌合抑制性受体经重组表达。

[0191] 在一些方面,嵌合抑制性受体由载体或细胞基因组中的选定基因座表达。

[0192] 在一些方面,肿瘤靶向嵌合受体是嵌合抗原受体 (CAR) 或工程化T细胞受体。

[0193] 在一些方面,在蛋白与嵌合抑制性受体结合之前,肿瘤靶向嵌合受体能够激活细胞。

[0194] 在一些方面,在蛋白与嵌合抑制性受体结合之后,嵌合抑制性受体压制激活细胞产生细胞因子。

[0195] 在一些方面,在蛋白与嵌合抑制性受体结合之后,嵌合抑制性受体压制对靶细胞的细胞介导的免疫反应,其中免疫反应通过免疫调节细胞的激活来诱导。

[0196] 在一些方面,跨膜结构域物理连接至胞外蛋白结合结构域。

[0197] 在一些方面,胞内信号传导结构域物理连接至跨膜结构域。

[0198] 在一些方面,跨膜结构域物理连接至胞外蛋白结合结构域,并且胞内信号传导结构域物理连接至跨膜结构域。

[0199] 本文还提供了包含嵌合抑制性受体的分离的免疫调节细胞,其中嵌合抑制性受体包含:胞外蛋白结合结构域;跨膜结构域,其中所述跨膜结构域可操作地连接至胞外蛋白结合结构域;和两个或更多个胞内信号传导结构域,其中所述两个或更多个胞内信号传导结构域可操作地连接至跨膜结构域;并且其中相对于缺乏嵌合抑制性受体的其他方面相同的细胞,在蛋白与嵌合抑制性受体结合之后,嵌合抑制性受体防止、减弱或抑制在细胞的表面上表达的肿瘤靶向嵌合受体的激活。

[0200] 在一些方面,细胞还包含在细胞的表面上表达的肿瘤靶向嵌合受体。

[0201] 本文还提供了分离的免疫调节细胞,其包含:(a) 嵌合抑制性受体,其中嵌合抑制性受体包含:胞外蛋白结合结构域;跨膜结构域,其中所述跨膜结构域可操作地连接至胞外蛋白结合结构域;和两个或更多个胞内信号传导结构域,其中所述两个或更多个胞内信号传导结构域可操作地连接至跨膜结构域;以及(b) 在细胞的表面上表达的肿瘤靶向嵌合受体,其中相对于缺乏嵌合抑制性受体的其他方面相同的细胞,在蛋白与嵌合抑制性受体结合之后,嵌合抑制性受体防止、减弱或抑制肿瘤靶向嵌合受体的激活。

[0202] 在一些方面,嵌合抑制性受体经重组表达。

[0203] 在一些方面,嵌合抑制性受体由载体或细胞基因组中的选定基因座表达。

[0204] 在一些方面,肿瘤靶向嵌合受体是嵌合抗原受体 (CAR) 或工程化T细胞受体。

[0205] 在一些方面,在蛋白与嵌合抑制性受体结合之前,肿瘤靶向嵌合受体能够激活细胞。

[0206] 在一些方面,在蛋白与嵌合抑制性受体结合之后,嵌合抑制性受体压制激活细胞产生细胞因子。

[0207] 在一些方面,在蛋白与嵌合抑制性受体结合之后,嵌合抑制性受体压制对靶细胞的细胞介导的免疫反应,其中免疫反应通过免疫调节细胞的激活来诱导。

- [0208] 在一些方面,跨膜结构域物理连接至胞外蛋白结合结构域。
- [0209] 在一些方面,两个或更多个胞内信号传导结构域之一物理连接至跨膜结构域。
- [0210] 在一些方面,跨膜结构域物理连接至胞外蛋白结合结构域,并且两个或更多个胞内信号传导结构域之一物理连接至跨膜结构域。
- [0211] 在一些方面,靶细胞是肿瘤细胞。
- [0212] 在一些方面,细胞选自由以下组成的组:T细胞、CD8⁺ T细胞、CD4⁺ T细胞、 γ δ T细胞、细胞毒性T淋巴细胞 (CTL)、调节性T细胞、病毒特异性T细胞、自然杀伤T (NKT) 细胞、自然杀伤 (NK) 细胞、B细胞、肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL)、先天性淋巴样细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、髓系细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突状细胞、ESC衍生细胞和iPSC衍生细胞。在一些方面,免疫调节细胞是自然杀伤 (NK) 细胞。
- [0213] 在一些方面,细胞是自体的。
- [0214] 在一些方面,细胞是同种异体的。
- [0215] 本文还提供了包含如本文所述的分离的细胞和药学上可接受的载体的组合物。
- [0216] 本文还提供了防止、减弱或抑制由在免疫调节细胞的表面上表达的肿瘤靶向嵌合受体诱导的细胞介导的免疫反应的方法,其包括:将免疫调节细胞工程化成在免疫调节细胞的表面上表达如本文所述的嵌合受体,其中在同源蛋白与嵌合抑制性受体结合之后,胞内信号传导结构域防止、减弱或抑制肿瘤靶向嵌合受体的激活。
- [0217] 本文还提供了防止、减弱或抑制在免疫调节细胞的表面上表达的肿瘤靶向嵌合受体的激活的方法,其包括:将如本文所述的分离的细胞或如本文所述的组合物与嵌合抑制性受体的同源蛋白在适于嵌合抑制性受体结合同源蛋白的条件下接触,其中在蛋白与嵌合抑制性受体结合之后,胞内信号传导结构域防止、减弱或抑制肿瘤靶向嵌合受体的激活。
- [0218] 在一些方面,肿瘤靶向嵌合受体是嵌合抗原受体 (CAR) 或工程化T细胞受体 (TCR)。
- [0219] 在一些方面,CAR结合一种或多种在肿瘤细胞的表面上表达的抗原。
- [0220] 在一些方面,相对于缺乏嵌合抑制性受体的其他方面相同的细胞,在蛋白与嵌合抑制性受体结合之后,嵌合抑制性受体防止、减弱或抑制肿瘤靶向嵌合受体的激活。
- [0221] 本文还提供了包含嵌合抑制性受体的分离的免疫调节细胞,其中所述嵌合抑制性受体包含:胞外蛋白结合结构域;跨膜结构域,其中所述跨膜结构域可操作地连接至胞外蛋白结合结构域;和胞内信号传导结构域,其中胞内信号传导结构域可操作地连接至跨膜结构域;并且其中相对于缺乏嵌合抑制性受体的其他方面相同的细胞,在蛋白与嵌合抑制性受体结合之后,嵌合抑制性受体防止、减弱或抑制在细胞的表面上表达的肿瘤靶向嵌合受体的激活。
- [0222] 在一些方面,细胞还包含在细胞的表面上表达的肿瘤靶向嵌合受体。
- [0223] 本文还提供分离的免疫调节细胞,其包含:(a) 嵌合抑制性受体,其中嵌合抑制性受体包含:胞外蛋白结合结构域;跨膜结构域,其中所述跨膜结构域可操作地连接至胞外蛋白结合结构域;和胞内信号传导结构域,其中胞内信号传导结构域可操作地连接至跨膜结构域;以及(b) 在细胞的表面上表达的肿瘤靶向嵌合抗体,其中相对于缺乏嵌合抑制性受体的其他方面相同的细胞,在蛋白与嵌合抑制性受体结合之后,嵌合抑制性受体防止、减弱或抑制肿瘤靶向嵌合受体的激活。
- [0224] 在一些方面,嵌合抑制性受体经重组表达。

- [0225] 在一些方面,嵌合抑制性受体由载体或细胞基因组中的选定基因座表达。
- [0226] 在一些方面,肿瘤靶向嵌合受体是嵌合抗原受体 (CAR) 或工程化T细胞受体。
- [0227] 在一些方面,在蛋白与嵌合抑制性受体结合之前,肿瘤靶向嵌合受体能够激活细胞。
- [0228] 在一些方面,在蛋白与嵌合抑制性受体结合之后,嵌合抑制性受体压制激活细胞产生细胞因子。
- [0229] 在一些方面,在蛋白与嵌合抑制性受体结合之后,嵌合抑制性受体压制对靶细胞的细胞介导的免疫反应,其中免疫反应通过免疫调节细胞的激活来诱导。
- [0230] 在一些方面,跨膜结构域物理连接至胞外蛋白结合结构域。
- [0231] 在一些方面,胞内信号传导结构域物理连接至跨膜结构域。
- [0232] 在一些方面,跨膜结构域物理连接至胞外蛋白结合结构域,并且胞内信号传导结构域物理连接至跨膜结构域。
- [0233] 本文还提供了包含嵌合抑制性受体的分离的免疫调节细胞,其中嵌合抑制性受体包含:-胞外蛋白结合结构域;跨膜结构域,其中所述跨膜结构域可操作地连接至胞外蛋白结合结构域;和-两个或更多个胞内信号传导结构域,其中两个或更多个胞内信号传导结构域可操作地连接至跨膜结构域;并且其中相对于缺乏嵌合抑制性受体的其他方面相同的细胞,在蛋白与嵌合抑制性受体结合之后,嵌合抑制性受体防止、减弱或抑制在细胞的表面上表达的肿瘤靶向嵌合受体的激活。
- [0234] 在一些方面,细胞还包含在细胞的表面上表达的肿瘤靶向嵌合受体。
- [0235] 本文还提供了分离的免疫调节细胞,其包含:(a) 嵌合抑制性受体,其中嵌合抑制性受体包含:-胞外蛋白结合结构域;-跨膜结构域,其中所述跨膜结构域可操作地连接至胞外蛋白结合结构域;和-两个或更多个胞内信号传导结构域,其中两个或更多个胞内信号传导结构域可操作地连接至跨膜结构域;以及 (b) 在细胞的表面上表达的肿瘤靶向嵌合受体,其中相对于缺乏嵌合抑制性受体的其他方面相同的细胞,在蛋白与嵌合抑制性受体结合之后,嵌合抑制性受体防止、减弱或抑制肿瘤靶向嵌合受体的激活。
- [0236] 在一些方面,嵌合抑制性受体经重组表达。
- [0237] 在一些方面,嵌合抑制性受体由载体或细胞基因组中的选定基因座表达。
- [0238] 在一些方面,肿瘤靶向嵌合受体是嵌合抗原受体 (CAR) 或工程化T细胞受体。
- [0239] 在一些方面,在蛋白与嵌合抑制性受体结合之前,肿瘤靶向嵌合受体能够激活细胞。
- [0240] 在一些方面,在蛋白与嵌合抑制性受体结合之后,嵌合抑制性受体压制激活细胞产生细胞因子。
- [0241] 在一些方面,在蛋白与嵌合抑制性受体结合之后,嵌合抑制性受体压制对靶细胞的细胞介导的免疫反应,其中免疫反应通过免疫调节细胞的激活来诱导。
- [0242] 在一些方面,跨膜结构域物理连接至胞外蛋白结合结构域。
- [0243] 在一些方面,两个或更多个胞内信号传导结构域之一物理连接至跨膜结构域。
- [0244] 在一些方面,跨膜结构域物理连接至胞外蛋白结合结构域,并且两个或更多个胞内信号传导结构域之一物理连接至跨膜结构域。
- [0245] 在一些方面,靶细胞是肿瘤细胞。

[0246] 在一些方面,细胞选自由以下组成的组:T细胞、CD8⁺ T细胞、CD4⁺ T细胞、 γ δ T细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、调节性T细胞、病毒特异性T细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、自然杀伤(NK)细胞、B细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、先天性淋巴样细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、髓系细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突状细胞、ESC衍生细胞和iPSC衍生细胞。在一些方面,免疫调节细胞是自然杀伤(NK)细胞。

[0247] 在一些方面,细胞是自体的。

[0248] 如本文所述的分离的细胞,其中细胞是同种异体的。

[0249] 本文还提供了包含如本文所述的分离的细胞和药学上可接受的载体的组合物。

[0250] 本文还提供了防止、减弱或抑制由在免疫调节细胞的表面上表达的肿瘤靶向嵌合受体诱导的细胞介导的免疫反应的方法,其包括:将免疫调节细胞工程化成在免疫调节细胞的表面上表达如本文所述的嵌合受体,其中在同源蛋白与嵌合抑制性受体结合之后,胞内信号传导结构域防止、减弱或抑制肿瘤靶向嵌合受体的激活。

[0251] 本文还提供了防止、减弱或抑制在免疫调节细胞的表面上表达的肿瘤靶向嵌合受体的激活的方法,其包括:将如本文所述的分离的细胞或如本文所述的组合物与嵌合抑制性受体的同源蛋白在适于嵌合抑制性受体结合同源蛋白的条件下接触,其中在蛋白与嵌合抑制性受体结合之后,胞内信号传导结构域防止、减弱或抑制肿瘤靶向嵌合受体的激活。

[0252] 在一些方面,肿瘤靶向嵌合受体是嵌合抗原受体(CAR)或工程化T细胞受体(TCR)。

[0253] 在一些方面,CAR结合一种或多种在肿瘤细胞的表面上表达的抗原。

附图说明

[0254] 本发明的这些和其他特征、方面和优势将关于以下描述和附图得到更好的理解,在附图中:

[0255] 图1A示出了共表达抗CD19-BTLA iCAR和抗CD19-CD28/CD3 δ aCAR的T细胞接触表达CD19的靶细胞的示例性图解。图1B示出了无任一CAR构建体表达的阴性对照细胞。图1C示出了转导的T细胞中的抗CD19-CD28/CD3 δ aCAR表达。图1D示出了转导的T细胞中的抗CD19-CD28/CD3 δ aCAR和抗CD19-BTLA iCAR表达。

[0256] 图2A示出了与单独抗CD19 aCAR相比,抗CD19 aCAR和抗CD19 iCAR的共表达减少T细胞的TNF- α 产生。图2B示出了与单独抗CD19 aCAR相比,抗CD19 aCAR和抗CD19 iCAR的共表达减少T细胞的IFN- γ 产生。图2C示出了与单独CD19 aCAR相比,抗CD19 aCAR和抗CD19 iCAR的共表达减少T细胞的IL-2产生。

[0257] 图3示出了与单独抗CD19 aCAR相比,抗CD19 aCAR和抗CD19iCAR的共表达减少T细胞细胞毒性。

[0258] 图4A示出了共表达抗CD19-BTLA iCAR和抗CD20-CD28/CD3 δ aCAR的T细胞接触表达CD19和CD20的靶细胞的示例性图解。图4B示出了无任一CAR构建体表达的阴性对照细胞。图4C示出了转导的T细胞中的抗CD20-CD28/CD3 δ aCAR表达。图4D示出了转导的T细胞中的抗CD20-CD28/CD3 δ aCAR和抗CD19-BTLA iCAR表达。

[0259] 图5A示出了与单独抗CD20 aCAR相比,抗CD20 aCAR和抗CD19 iCAR的共表达减少T细胞的TNF- α 产生。图5B示出了与单独抗CD20 aCAR相比,抗CD20 aCAR和抗CD19 iCAR的共表达减少T细胞的IFN- γ 产生。图5C示出了与单独CD20 aCAR相比,抗CD20 aCAR和抗CD19

iCAR的共表达减少T细胞的IL-2产生。

[0260] 图6示出了共表达所指示的抗Her2抑制性结构域iCAR的嘌呤霉素选择T细胞中的抗Ax1-CD3 δ -mCherry aCAR表达。

[0261] 图7A示出了共表达抗Ax1-CD3 δ aCAR和抗Her2抑制性结构域iCAR的T细胞接触表达Ax1、Her2、Ax1与Her2蛋白或两种蛋白均不表达的靶细胞的示例性图解。图7B示出了在接触所指示的靶细胞之后,共表达抗Ax1-CD3 δ aCAR和所指示的抗Her2抑制性结构域iCAR的T细胞的IL-2分泌。图7C示出了在接触所指示的靶细胞之后,共表达抗Ax1-CD3 δ aCAR和所指示的抗Her2抑制性结构域iCAR的T细胞的IFN- γ 分泌。

[0262] 图8A示出了未转导的NK细胞以及转导的NK细胞中抗Her2-BTLA-GFP iCAR的表达。图8B示出了单一或双重转导的NK细胞中抗Her2-BTLA-GFP iCAR和抗Ax1-CD3 δ -mCherry aCAR的表达的荧光显微镜图像。

[0263] 图9A示出了与表达抗Ax1 aCAR、抗Her2 iCAR或aCAR与iCAR的NK细胞一起孵育4小时之后靶细胞的裂解百分比。图9B示出了与表达抗Ax1 aCAR、抗Her2 iCAR或aCAR与iCAR的NK细胞一起孵育8小时之后靶细胞的裂解百分比。

[0264] 图10示出了如通过流式细胞术所评估,在NK细胞的转导之后,aCAR和各种iCAR形式的表达,包括共表达。

[0265] 图11示出了亲代靶细胞(柱1)、仅表达aCAR抗原的靶细胞(柱2)或表达aCAR抗原和iCAR抗原的靶细胞(柱3)的NK细胞介导的杀伤。示出了被工程化成仅表达aCAR或被工程化成共表达aCAR和所指示的iCAR的各种NK细胞的杀伤。

[0266] 图12示出了混合群体中仅表达aCAR抗原的靶细胞(柱1)或混合群体中表达aCAR抗原和iCAR抗原的靶细胞(柱2)的NK细胞介导的杀伤。示出了被工程化成仅表达aCAR或被工程化成共表达aCAR和所指示的iCAR的各种NK细胞的杀伤。

[0267] 图13示出了在与亲代靶细胞(柱1)、仅表达aCAR抗原的靶细胞(柱2)、表达aCAR抗原和iCAR抗原的靶细胞(柱3)或仅表达aCAR抗原或表达aCAR抗原和iCAR抗原的靶细胞的混合群体共培养之后TNF α (左上)、颗粒酶B(左下)和IFN γ (右上)的NK细胞介导的产生。示出了被工程化成仅表达aCAR或被工程化成共表达aCAR和所指示的iCAR的各种NK细胞的细胞因子产生。

[0268] 图14示出了亲代靶细胞(柱1)、仅表达aCAR抗原的靶细胞(柱2)、表达aCAR抗原和iCAR抗原的靶细胞(柱3)、混合群体中仅表达aCAR的靶细胞(柱4)或混合群体中表达aCAR抗原和iCAR抗原的靶细胞(柱5)的NK细胞介导的杀伤。示出了被工程化成仅表达aCAR或被工程化成共表达aCAR和所指示的iCAR的各种NK细胞的杀伤。

[0269] 图15示出了如通过流式细胞术所评估,在NK细胞的转导之后,aCAR和各种iCAR形式的表达,包括共表达。

[0270] 图16示出了亲代靶细胞(柱1)、仅表达aCAR抗原的靶细胞(柱2)或表达aCAR抗原和iCAR抗原的靶细胞(柱3)的NK细胞介导的杀伤。示出了被工程化成仅表达aCAR或被工程化成共表达aCAR和所指示的iCAR的各种NK细胞的杀伤。

[0271] 图17示出了如通过流式细胞术所评估,在T细胞的转导之后,aCAR和各种iCAR形式的表达,包括共表达。

[0272] 图18示出了亲代靶细胞(柱1)、仅表达iCAR抗原的靶细胞(柱2)、仅表达aCAR抗原

的靶细胞(柱3)或表达aCAR抗原和iCAR抗原的靶细胞(柱4)的T细胞介导的杀伤。示出了被工程化成仅表达aCAR或被工程化成共表达aCAR和所指示的iCAR的各种T细胞的杀伤。

[0273] 图19示出了亲代靶细胞(柱1)、仅表达iCAR抗原的靶细胞(柱2)、仅表达aCAR抗原的靶细胞(柱3)或表达aCAR抗原和iCAR抗原的靶细胞(柱4)的T细胞介导的IL-2分泌。示出了被工程化成仅表达aCAR或被工程化成共表达aCAR和所指示的iCAR的各种T细胞的杀伤。

[0274] 图20示出了如通过流式细胞术所评估,在NK细胞的转导之后,aCAR和各种iCAR形式的表达概况,包括共表达。每个条件有1至3个的生物重复(指示为单独的点)。

[0275] 图21示出了NK细胞介导的杀伤(上图)和细胞因子分泌(下图)。示出了被工程化成共表达aCAR和所指示的iCAR的各种NK细胞。“单独的”=每种类型的SEM细胞单独呈现。“混合的”=两种类型的SEM细胞一起混合在同一培养物中。每个条件有1至3个的生物重复(指示为单独的点)。每次测量有3个技术重复,在相关处绘制X和Y SEM。

具体实施方式

[0276] 定义

[0277] 除非另外指定,否则权利要求和说明书中所使用的术语均如下文所示进行定义。

[0278] 如本文所用的术语“抑制性嵌合受体”或“嵌合抑制性受体”是指以下多肽或多肽集合,当在免疫效应细胞中表达时,其为细胞提供针对靶细胞的特异性以及抑制性胞内信号产生。抑制性嵌合受体通常包括胞外蛋白结合结构域(例如,配体结合结构域、受体结合结构域、抗原结合结构域、呈抗原结合结构域的抗体片段)、间隔结构域、跨膜结构域和一个或多个胞内信号传导/共信号传导结构域。抑制性嵌合受体也可称为“iCAR”。

[0279] 如本文所用的术语“抑制性嵌合抗原受体”或“iCAR”是指多肽或多肽组,当在免疫效应细胞中表达时,其为细胞提供针对靶细胞的特异性以及抑制性胞内信号产生。抑制性嵌合抗原受体通常包括胞外抗原结合结构域(例如,抗体或其抗原结合结构域或片段)、间隔结构域、跨膜结构域和一个或多个胞内信号传导/共信号传导结构域。

[0280] 术语“肿瘤靶向嵌合受体”是指激活嵌合受体、肿瘤靶向嵌合抗原受体(CAR)或工程化T细胞受体。肿瘤靶向嵌合受体也可称为“aCAR”或“激活性CAR”。

[0281] 如本文所用的术语“嵌合抗原受体”或可选地“CAR”是指多肽或多肽组,当在免疫效应细胞中表达时,其为细胞提供针对靶细胞的特异性以及胞内信号产生。CAR通常包括胞外抗原结合结构域(例如,呈抗原结合结构域的抗体片段)、间隔结构域、跨膜结构域和一个或多个胞内信号传导/共信号传导结构域。在一些实施方案中,CAR至少包含胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和细胞质信号传导结构域(本文也称为“胞内信号传导结构域”),其包含衍生自抑制性分子或刺激性分子和/或共刺激性分子的功能性信号传导结构域。在一些方面,包含抑制性嵌合受体或肿瘤靶向嵌合受体的一组多肽彼此邻接。在一些实施方案中,抑制性嵌合受体或肿瘤靶向嵌合受体还包含在胞外抗原结合结构域与跨膜结构域之间间隔结构域。在一些实施方案中,多肽组包括募集结构域,诸如二聚化或多聚化域结构,其可以使多肽彼此偶联。在一些实施方案中,抑制性嵌合受体包含有包含胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内信号传导结构域的嵌合融合蛋白,胞内信号传导结构域包含衍生自抑制性分子或刺激性分子的功能性信号传导结构域。在一个方面,抑制性嵌合受体包含有包含胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内信号传导结构域的嵌合融合蛋白,胞内信号

传导结构域包含衍生自抑制性分子的功能性抑制性结构域。在一个方面,肿瘤靶向嵌合受体包含有包含胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内信号传导结构域的嵌合融合蛋白,胞内信号传导结构域包含衍生自共刺激性分子的功能性信号传导结构域和衍生自刺激性分子的功能性信号传导结构域。

[0282] 如本文所用的术语“胞内信号传导结构域”是指位于细胞内部的抑制性嵌合受体或肿瘤靶向嵌合受体的功能结构域。在一些实施方案中,胞内信号传导结构域是抑制性信号传导结构域。在分子结合结构域与蛋白(诸如抗原或配体)结合之后,例如,抑制性信号传导结构域阻遏受体信号传导,而激活信号传导结构域将信号(例如,增殖/存活信号)传输至细胞。

[0283] 如本文所用的术语“跨膜结构域”是指跨越细胞膜的结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域包含疏水性 α 螺旋。

[0284] 如本文所用的术语“胞外蛋白结合结构域”是指一种分子结合结构域,其通常是配体或配体结合结构域、细胞受体的胞外结构域或抗体的抗原结合结构域并且位于细胞外部,暴露于胞外空间。胞外抗原结合结构域可包括能够与蛋白或肽结合的任何分子(例如,蛋白或肽),包括配体、配体结合结构域、受体结合结构域或者抗原结合结构域或作为抗原结合结构域的抗体片段。在一些实施方案中,胞外蛋白或抗原结合结构域包含配体、配体结合结构域或受体结合结构域。在一些实施方案中,胞外蛋白或抗原结合结构域包含抗体、其抗原结合片段、F(ab)、F(ab')、单链可变片段(scFv)或单结构域抗体(sdAb)。在一些实施方案中,胞外蛋白或抗原结合结构域与细胞表面配体(例如,抗原,诸如癌症抗原,或在细胞的表面上表达的蛋白)结合。

[0285] 如本文所用的术语“胞外抗原结合结构域”是指一种分子抗原结合结构域,其通常是抗体的抗原结合结构域并且位于细胞外部,暴露于胞外空间。胞外抗原结合结构域可包括能够与抗原蛋白或肽结合的任何分子(例如,蛋白或肽)。在一些实施方案中,胞外蛋白或抗原结合结构域包含抗体、其抗原结合片段、F(ab)、F(ab')、单链可变片段(scFv)或单结构域抗体(sdAb)。在一些实施方案中,胞外抗原结合结构域与细胞表面配体(例如,抗原,诸如癌症抗原或在细胞的表面上表达的蛋白)结合。

[0286] 术语“肿瘤”是指肿瘤细胞和相关的肿瘤微环境(TME)。在一些实施方案中,肿瘤是指肿瘤细胞或肿瘤肿块。在一些实施方案中,肿瘤是指肿瘤微环境。

[0287] 术语“未表达的”是指与非肿瘤细胞中导致肿瘤靶向嵌合抗原受体的激活的表达水平相比低至少2倍的表达。在一些实施方案中,与非肿瘤细胞中导致肿瘤靶向嵌合抗原受体的激活的表达水平相比,表达低至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍或至少10倍或更多。

[0288] 术语“改善”是指在疾病状态(例如,癌症疾病状态)的治疗中的任何治疗有益的结果,包括其预防、严重性或进展减轻、缓解或治愈。

[0289] 术语“原位”是指在与活体分开生长(例如在组织培养物中生长)的活细胞中发生的过程。

[0290] 术语“体内”是指在活体中发生的过程。

[0291] 本文所用的术语“哺乳动物”包括人和非人,并且包括但不限于人、非人灵长类、犬、猫、鼠、牛、马和猪。

[0292] 在两个或更多个核酸或多肽序列的情形下,术语百分比“同一性”是指如使用下文所述的序列比较算法之一(例如,BLASTP和BLASTN或技术人员可用的其他算法)或通过目视检查所测量,当针对最大对应进行比较和比对时,具有指定百分比的相同核酸或氨基酸残基的两个或更多个序列或子序列。根据应用,百分比“同一性”可存在于正比较的序列的区域上,例如功能结构域,或可选地存在于要比较的两个序列的全长上。

[0293] 对于序列比较,通常一个序列充当与测试序列相比较的参考序列。当使用序列比较算法时,将测试序列和参考序列输入至计算机中,必要时指定子序列坐标,并且指定序列算法程序参数。然后,序列比较算法基于所指定的程序参数,计算一个或多个测试序列相对于参考序列的百分比序列同一性。

[0294] 用于比较的序列的最佳比对可例如通过以下进行:Smith和Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981) 的局部同源性算法;Needleman和Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970) 的同源性比对算法;Pearson和Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988) 的相似性搜索方法;这些算法的计算机化实施(Wisconsin Genetics软件包Genetics Computer Group中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA,575Science Dr.,Madison,Wis.);或目视检查(一般参见Ausubel等人,见下文)。

[0295] 适于确定百分比序列同一性和序列相似性的算法的一个实例是BLAST算法,其描述于Altschul等人, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990) 中。用于进行BLAST分析的软件可通过美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)(www.ncbi.nlm.nih.gov/) 公开获得。

[0296] 术语“足够量”意指足以产生期望效果的量,例如足以调节细胞中蛋白聚集的量。

[0297] 术语“治疗有效量”是指有效改善疾病症状的量。治疗有效量可以是“预防有效量”,因为可将预防视为治疗。

[0298] 必须注意,除非上下文另外明确指出,否则如说明书和随附权利要求中所用,单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数个指示物。

[0299] 嵌合抑制性受体

[0300] 在一个方面,本文提供了嵌合抑制性受体,其包含:(i) 胞外蛋白结合结构域(例如,抗原结合结构域、配体结合结构域、受体结合结构域等);(ii) 跨膜结构域,其中所述跨膜结构域可操作地连接至胞外蛋白结合结构域;和(iii) 一个或多个胞内信号传导结构域,其中所述一个或多个胞内信号传导结构域可操作地连接至跨膜结构域;并且其中所述一个或多个胞内信号传导结构域中的至少一个能够防止、减弱或抑制在免疫调节细胞上表达的肿瘤靶向嵌合受体的激活。在一些实施方案中,本公开的嵌合抑制性受体包含两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个或五个或更多个胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,本公开的嵌合抑制性受体包含一个胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,本公开的嵌合抑制性受体包含两个胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,本公开的嵌合抑制性受体包含三个胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,本公开的嵌合抑制性受体包含四个胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,本公开的嵌合抑制性受体包含五个胞内信号传导结构域。

[0301] 所述两个、三个、四个、五个或更多个胞内信号传导结构域可以是相同胞内结构域或不同胞内结构域。例如,一个胞内结构域可衍生自一种蛋白(例如,BTLA),并且第二个胞

内结构域可衍生自不同的蛋白(例如,LIR1)。在具有三个或更多个胞内结构域的情况下,三个胞内结构域中的每个可衍生自相同蛋白、三种不同蛋白或两种蛋白。例如,在胞内结构域衍生自两种蛋白的情况下,嵌合抑制性受体可具有两个来自BTLA的结构域和一个来自LIR1的结构域,或本文所公开的胞内结构域的任一其他组合。在另一个实例中,在胞内结构域衍生自三种蛋白的情况下,嵌合抑制性受体可以是一个来自BTLA的结构域、一个来自LIR1的结构域和一个来自PD-1的结构域。

[0302] 一般而言,抑制性或肿瘤靶向嵌合受体是针对T细胞或NK细胞进行设计的,并且是胞内信号传导结构域和蛋白识别结构域(例如,受体结合结构域、配体结合结构域或抗原结合结构域,诸如抗体的单链片段(scFv))的嵌合体(Enblad等人,Human Gene Therapy.2015;26(8):498-505)。表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞在本领域称为CAR T细胞。激活性或肿瘤靶向的CAR通常在经由胞内信号传导结构域与其同源配体结合之后诱导T细胞信号传导通路,导致T细胞激活和免疫反应。激活CAR、激活性CAR和肿瘤靶向的CAR是可互换的术语。

[0303] 一般而言,抑制性嵌合受体是被工程化成识别蛋白(诸如抗原、配体或细胞表达的受体)并与其结合的人工免疫细胞受体。抑制性嵌合受体一般识别在肿瘤细胞上不表达的蛋白(例如,抗原、配体、受体等),而激活性或肿瘤靶向嵌合受体(例如,aCAR)一般识别在肿瘤细胞上表达的抗原。嵌合受体一般通常包括作为抗原结合结构域的抗体片段、间隔或铰链结构域、疏水性 α 螺旋跨膜结构域和一个或多个胞内信号传导/共信号传导结构域。

[0304] 抑制性嵌合受体一般遵循激活性CAR(aCAR)结构,但使用针对胞内信号传导结构域的抑制性结构域,而不是衍生自T细胞受体(TCR)的激活信号传导结构域。胞内信号传导/共信号传导结构域是减少或抑制同一细胞中其他受体蛋白信号传导的抑制性结构域。抑制性嵌合受体细胞可含有蛋白特异性抑制性受体(例如,抗原特异性抑制性受体、配体特异性抑制性受体、受体特异性抑制性受体等)例如以阻断可能由肿瘤外靶标表达所引起的非特异性免疫激活。在一些实施方案中,抑制性嵌合受体阻断T细胞中由其内源性T细胞受体或激活性或肿瘤靶向CAR所激活的T细胞反应。例如,免疫调节细胞可表达识别非肿瘤抗原靶标的抑制性嵌合受体和识别肿瘤抗原的肿瘤靶向嵌合受体。当此类免疫调节细胞接触肿瘤细胞时,仅肿瘤靶向受体识别并结合其同源配体并被激活,从而导致细胞信号传导通路的诱导和免疫细胞激活。相比之下,当免疫调节细胞接触非肿瘤靶标时,抑制性嵌合受体与其同源蛋白(例如,同源配体、受体、抗原等)结合并阻遏或抑制通过肿瘤靶向嵌合受体的激活诱导的任何信号传导。因此,可构建免疫调节细胞,使得仅当细胞接触肿瘤细胞时发生免疫信号传导。

[0305] 在一些实施方案中,抑制性嵌合受体所结合的蛋白(例如,配体、受体、抗原等)不在靶肿瘤上表达。在一些实施方案中,与非肿瘤细胞中导致肿瘤靶向嵌合抗原受体的激活的表达水平相比,表达低至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍或至少10倍或更多。

[0306] 在一些实施方案中,抑制性嵌合受体所结合的蛋白(例如,配体、受体、抗原等)在非肿瘤细胞上表达。

[0307] 在一些实施方案中,抑制性嵌合受体所结合的蛋白(例如,配体、受体、抗原等)在衍生自选自以下组成的组的组织的非肿瘤细胞上表达:脑、神经元组织、内分泌、内皮、

骨、骨髓、免疫系统、肌肉、肺、肝、胆囊、胰腺、胃肠道、肾脏、膀胱、雄性生殖器、雌性生殖器、脂肪、软组织和皮肤。

[0308] 在一些实施方案中,抑制性嵌合受体包含SEQ ID NO:56中所示出的序列。

[0309] 胞内信号传导结构域

[0310] 本公开的抑制性嵌合受体包含一个或多个能够防止、减弱或抑制在免疫调节细胞上表达的肿瘤靶向嵌合受体的激活的胞内信号传导结构域。

[0311] 在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域包含一个或多个修饰。在一些实施方案中,相对于其他方面相同的未修饰受体,一个或多个修饰调节嵌合抑制性受体的敏感性。在一些实施方案中,相对于其他方面相同的未修饰受体,一个或多个修饰增加嵌合抑制性受体的敏感性。在一些实施方案中,相对于其他方面相同的未修饰受体,一个或多个修饰降低嵌合抑制性受体的敏感性。在一些实施方案中,相对于其他方面相同的未修饰受体,一个或多个修饰调节嵌合抑制性受体的效力。在一些实施方案中,相对于其他方面相同的未修饰受体,一个或多个修饰增加嵌合抑制性受体的效力。在一些实施方案中,相对于其他方面相同的未修饰受体,一个或多个修饰降低嵌合抑制性受体的效力。

[0312] 在一些实施方案中,相对于其他方面相同的未修饰受体,一个或多个修饰调节在免疫调节细胞上表达的肿瘤靶向嵌合受体的激活的基础防止、减弱或抑制。在一些实施方案中,相对于其他方面相同的未修饰受体,一个或多个修饰降低基础防止、减弱或抑制。在一些实施方案中,相对于其他相同的未修饰受体,一个或多个修饰增加了基础防止、减弱或抑制。

[0313] 抑制性结构域

[0314] 在一些实施方案中,本文所述的CAR包含一个或多个抑制性胞内结构域。在一些实施方案中,本文所述的CAR包含两个或更多个抑制性胞内结构域。在一些实施方案中,本文所述的CAR包含三个或更多个抑制性胞内结构域。在一些实施方案中,本文所述的CAR包含四个或更多个抑制性胞内结构域。在一些实施方案中,本文所述的CAR包含五个或更多个抑制性胞内结构域。在一些实施方案中,本文所述的CAR包含一个抑制性胞内结构域。在一些实施方案中,本文所述的CAR包含两个抑制性胞内结构域。在一些实施方案中,本文所述的CAR包含三个抑制性胞内结构域。在一些实施方案中,本文所述的CAR包含四个抑制性胞内结构域。在一些实施方案中,本文所述的CAR包含五个抑制性胞内结构域。

[0315] 在一些实施方案中,对于具有两个或更多个抑制性胞内结构域的CAR,抑制性胞内结构域中的两个或更多个是不同的结构域。在一些实施方案中,对于具有两个或更多个抑制性胞内结构域的CAR,抑制性胞内结构域中的每个为不同的结构域。作为说明性非限制性实例,CAR可具有连接至LIR1抑制性胞内结构域的KIR3DL1抑制性胞内结构域。在一些实施方案中,对于具有两个或更多个抑制性胞内结构域的CAR,抑制性胞内结构域中的两个或更多个是相同的结构域(即,相同的结构域的串联体(concatemer))。在一些实施方案中,对于具有两个或更多个抑制性胞内结构域的CAR,抑制性胞内结构域中的每个都是相同的结构域。作为说明性非限制性实例,CAR可具有第一KIR3DL1抑制性胞内结构域,其连接至第二KIR3DL1抑制性胞内结构域,或具有第一LIR1抑制性胞内结构域,其连接至第二LIR1抑制性胞内结构域。

[0316] 在一些实施方案中,一个或多个抑制性胞内结构域之一是B和T淋巴细胞弱化子

(BTLA) 结构域。在一些实施方案中,一个或多个抑制性胞内结构域之一是BTLA胞内结构域。BTLA (UNIPROTQ7Z6A9) 是在B细胞、树突状细胞和初始T细胞以及激活的CD4⁺ T细胞上表达的跨膜蛋白。BTLA受体的胞内结构域含有可与SHP-1和SHP-2结合的基于免疫受体酪氨酸的抑制性基序 (ITIM) 序列。当BTLA的胞外结构域结合其配体HVEM时, SHP-1和SHP-2磷酸酶抑制通过TCR的信号传导并且还可阻断共激活蛋白诸如CD28。

[0317] 在一些实施方案中,一个或多个抑制性胞内结构域之一是LIR1结构域。在一些实施方案中,一个或多个抑制性胞内结构域之一是LIR1胞内结构域。LIR1也称为白细胞免疫球蛋白样受体亚家族B成员1 (LILRB1, UNIPROT Q8NHL6)。LIR1是在免疫细胞上表达的跨膜蛋白并且与抗原呈现细胞上的MHC I类分子结合。LIR1与其同源MHC I配体的结合诱导抑制免疫反应的刺激的抑制性信号传导。LIR家族受体含有二至四个胞外免疫球蛋白结构域、一个跨膜结构域和二至四个具有ITIM序列的胞内结构域。

[0318] 在一些实施方案中,一个或多个抑制性胞内结构域之一是PD-1结构域。在一些实施方案中,一个或多个抑制性胞内结构域之一是PD-1胞内结构域。PD-1 (程序性细胞死亡蛋白1, UNIPROT Q15116) 在T细胞、B细胞和巨噬细胞上表达, 并且是T细胞调节蛋白的CD28/CTLA-4家族和免疫球蛋白超家族的成员。PD-1是具有胞外IgV配体结合结构域和胞内结构域的跨膜蛋白, 胞内结构域具有ITIM序列和基于免疫受体酪氨酸的开关基序序列。在PD-1的两种配体之一PD-L1或PD-L2结合之后, SHP-1和SHP-2与PD-1的胞内结构域结合并负调节TCR信号传导。

[0319] 在一些实施方案中,一个或多个抑制性胞内信号传导结构域中的每个都衍生自选自以下组成的组的蛋白: BTLA、PD-1、CTLA4、TIM3、KIR3DL1、LIR1、NKG2A、TIGIT和LAG3。在一些实施方案中, 本文所述的抑制性嵌合受体包含一个或多个抑制性胞内信号传导结构域。在一些实施方案中, 一个或多个抑制性胞内信号传导结构域之一是BTLA结构域。在一些实施方案中, 一个或多个胞内信号传导结构域之一衍生自BTLA。在一些实施方案中, 一个或多个胞内信号传导结构域之一是CTLA4结构域。在一些实施方案中, 一个或多个胞内信号传导结构域之一衍生自CTLA4。在一些实施方案中, 一个或多个胞内信号传导结构域之一是PD-1结构域。在一些实施方案中, 一个或多个胞内信号传导结构域之一衍生自PD-1。在一些实施方案中, 一个或多个胞内信号传导结构域之一是TIM3结构域。在一些实施方案中, 一个或多个胞内信号传导结构域之一衍生自TIM3。在一些实施方案中, 一个或多个胞内信号传导结构域之一是KIR3DL1结构域。在一些实施方案中, 一个或多个胞内信号传导结构域之一衍生自KIR3DL1。在一些实施方案中, 所述一个或多个胞内信号传导结构域之一是LIR1结构域。在一些实施方案中, 一个或多个胞内信号传导结构域之一衍生自LIR1。在一些实施方案中, 一个或多个胞内信号传导结构域之一是NKG2A结构域。在一些实施方案中, 一个或多个胞内信号传导结构域之一衍生自NKG2A。在一些实施方案中, 一个或多个胞内信号传导结构域之一是TIGIT结构域。在一些实施方案中, 一个或多个胞内信号传导结构域之一衍生自TIGIT。在一些实施方案中, 一个或多个胞内信号传导结构域之一为LAG3结构域。在一些实施方案中, 一个或多个胞内信号传导结构域之一衍生自LAG3。

[0320] 示例性抑制性胞内信号传导结构域氨基酸序列示于表1中。示例性抑制性胞内信号传导结构域核酸序列示于表2中。

表 1-示例性抑制性胞内信号传导结构域氨基酸序列

氨基酸序列	SEQ ID NO:	描述
CSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVP VFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVP EQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSAD GPRSAQPLRPEDGHCSWPL	1	PD-1 胞内信号传导 结构域
AVLSKMLKKRSPLTTGVYVKMPPT EPECEKQFQPYFIPIN	2	CTLA4 胞内信号传 导结构域
RRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHL KSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDND PDLCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGI VYASLNHSVIGPNSRLARNVKEAPTE YASICVRS	3	BTLA 胞内信号传 导结构域
LRHRRQGKHWSTSTQRKADFQHPAG AVGPEPTDRGLQWRSSPAADAQEEN LYAAVKHTQPEDGVEMDTRSPHDED PQAVTYAEVKHSRPRREMASPPSPLS GEFLDTKDRQAEEDRQMDTEAAASE APQDVTYAQLHSLTLRREATEPPPSQ EGPSPAVPSIYATLAIH	50	LIR1 胞内信号传 导结构域
HLWCSNKKNAAVMDQEPAGNRTAN SEDSDEQDPEEVTYAQLDHCVFTQR KITRPSQRPKTPPTDTILYTELPNAKP RSKVVSCP	66	KIR3DL1 胞内信号 传导结构域
AVLSKMLKKRSPLTTGVGVKMPPT EPECEKQFQPYFIPIN	67	CTLA4 胞内信号传 导结构域
KEPASPLDKCHYTKDNGQFDQSAKQ LNLEAYTIEQETALISNKNKPKRQQ RKPNPPLNLDSYIVGQNDM	93	NKG2A (反向)胞内 信号传导结构域
LTRKKKALRIHSVEGDLRRKSAGQEE WSPSAPSPPGSCVQAEAAPAGLCGEQ RGEDCAELHDYFNVLSYRSLGNCSEFF TETG	95	TIGIT 胞内信号传 导结构域
MDNQGVIIYSDLNLPPNPKRQQRKPK GNKNSILATEQEITYAELNLQKASQD FQGNDKTYHCKDLPSAPEK	105	NKG2A 胞内信号传 导结构域

[0321]

表 2-示例性抑制性胞内信号传导结构域核酸序列

核酸序列	SEQ ID NO:	描述
TGTAGCAGAGCCGCCAGAGGAAC AATCGGCGCCAGAAGAACAGGCC AGCCTCTGAAAGAGGACCCCTCTG CCGTTCTGTGTTTCAGCGTGGACT ATGGCGAGCTGGATTTCCAGTGGC GGGAAAAGACACCCGAGCCTCCA GTGCCTTGTGTGCCTGAGCAGACA GAGTACGCCACCATCGTGTTCCCT AGCGGCATGGGCACATCTAGCCCT GCCAGAAGAGGATCTGCCGACGG ACCTAGATCTGCCCAGCCTCTTAG ACCTGAGGACGGCCACTGTTCTTG GCCTCTT	4	PD-1 胞内信号传导 结构域
TGTAGCCGAGCGGCCAGAGGCAC AATCGGGGCAAGACGAACAGGAC AGCCGCTCAAAGAGGACCCCACT GCGGTCCCCGTTTTCTCCGTGGATT ACGGAGAACTGGATTTCCAGTGGC GGGAGAAGACACCAGAGCCCCCG GTGCCCTGCGTGCCGGAGCAGACT GAGTACGCCACGATTGTGTTTCCC TCTGGAATGGGGACTTCATCCCCC GCTAGGCGCGGCTCAGCTGATGGC CCAAGATCCGCTCAACCGTTGCGG CCAGAGGACGGGCATTGCAGTTGG CCTCTG	51	PD-1 胞内信号传导 结构域
GCCGTGTCTCTGAGCAAGATGCTG AAGAAGCGGAGCCCTCTGACCACC GGCGTGTACGTGAAAATGCCTCCT ACCGAGCCTGAGTGCGAGAAGCA GTTCCAGCCTTACTTCATCCCCATC AAC	5	CTLA4 胞内信号传 导结构域
AGGAGACATCAGGGGAAGCAGAA TGAAGTACGCGATACAGCAGGGC GAGAAATTAATTTGGTAGACGCGC ATCTGAAGTCCGAACAGACAGAG GCTTCTACTAGACAGAACTCCCAA GTTTTGTTGAGTGAGACGGGGATC TATGATAATGATCCCGATCTGTGT TTTAGAATGCAGGAGGGTAGTGAA GTCTACTCAAACCCGTGCCTGGAA GAAAATAAGCCCGGCATTGTTTAC GCTAGTTTGAATCATTCTGTAATA GGCCCGAACTCCAGACTGGCTCGC AATGTGAAGGAGGCCCAACTGA	6	BTLA 胞内信号传导 结构域

[0322]

表 2-示例性抑制性胞内信号传导结构域核酸序列

核酸序列	SEQ ID NO:	描述
GTATGCGTCCATTTGCGTGCGGTC T		
AGAAGACATCAGGGGAAGCAGAA TGA ACTCAGCGATACAGCAGGGC GAGAAATTAATTTGGTAGACGCGC ATCTGAAGTCCGAACAGACAGAG GCTTCTACTAGACAGAACTCCCAA GTTTTGTTGAGTGAGACGGGGATC TATGATAATGATCCCGATCTGTGT TTTAGAATGCAGGAGGGTAGTGAA GTCTACTCAAACCCGTGCCTGGAA GAAAATAAGCCCGGCATTGTTTAC GCTAGTTTGAATCATTCTGTAATA GGCCCGAACTCCAGACTGGCTCGC AATGTGAAGGAGGCCCAACTGA GTATGCGTCCATTTGCGTGCGGTC T	52	BTLA 胞内信号传导 结构域
AGAAGGCACCAGGGAAAGCAGAA CGAGCTGAGCGATACCGCCGGCA GAGAAATCAACCTGGTGGACGCC ACCTGAAAAGCGAGCAGACAGAG GCCAGCACCAGACAGAATAGCCA GGTGCTGCTGAGCGAGACAGGCAT CTACGACAACGACCCCGACCTGTG CTCCGGATGCAAGAGGGAAAGCG AGGTGTACAGCAACCCCTGCCTGG AAGAGAACAAGCCCGGCATCGTG TACGCTAGCCTGAACCACTCTGTG ATCGGCCCAATTCCAGACTGGCC CGGAACGTGAAAGAGGCCCTAC AGAGTACGCCAGCATCTGCGTCAG AAGC	53	BTLA 胞内信号传导 结构域
TTGCGCCACAGACGGCAGGGAAA GCACTGGACTAGTACGCAGAGGA AAGCGGACTTCCAGCATCCCGCAG GAGCCGTGGGGCCTGAACCCACTG ATCGCGGCCTTCAATGGAGGTCTA GCCCGGCGGCAGACGCACAAGAG GAAA ACTTGTACGCAGCCGTTAAG CACACCAACCGGAGGACGGCGTT GAGATGGATACCCGCTCCCCTCAC GATGAAGACCCTCAAGCAGTCACT TACGCGGAAGTAAAGCATAGCCG CCCCAGACGGGAAATGGCTAGCCC GCCGTCCCCCTTAGCGGGGAATT TCTGGACACTAAAGATAGGCAGGC GGAAGAGGACCGCCAAATGGATA CAGAGGCGGCGGCAAGTGAAGCA	54	LIR1 胞内信号传导 结构域

[0323]

表 2-示例性抑制性胞内信号传导结构域核酸序列

核酸序列	SEQ ID NO:	描述
CCTCAAGACGTTACTTACGCTCAA CTTCACAGCCTTACCCTCAGGCGA GAAGCGACTGAACCACCCCCTTCC CAAGAAGGGCCAAGCCCAGCGGT TCCTTCTATCTATGCTACTCTTGCT ATTCAC		
CTGCGGCACAGACGGCAGGGCAA GCACTGGACAAGCACACAGAGAA AGGCCGACTTTCAGCACCCCTGCTG GTGCCGTTGGACCTGAGCCTACAG ATAGAGGACTGCAGTGGCGGTCTA GCCCTGCCGCTGATGCTCAAGAGG AAAACCTGTACGCCGCCGTGAAGC ACACCAACCTGAAGATGGCGTGG AAATGGACACCAGATCTCCCCACG ATGAGGACCCTCAGGCCGTGACAT ATGCCGAAGTGAAGCACTCCCGGC CTCGGAGAGAAATGGCTAGCCCTC CAAGTCCTCTGAGCGGCGAGTTCC TGGACACCAAGGATAGACAGGCC GAAGAGGACCGGCAGATGGATAC AGAAGCTGCCGCATCTGAGGCCCC ACAGGATGTGACTTATGCCCAGCT GCACAGCCTGACACTGCGGAGAG AAGCCACAGAGCCTCCACCTTCTC AAGAGGGCCCATCTCCAGCCGTGC CTAGCATCTATGCCCACTGGCCA TCCAC	55	LIR1 胞内信号传导 结构域
GCCGTGTCACTTAGTAAGATGCTG AAGAAGAGGTCACCACTGACGAC AGGGGTTGGAGTGAAGATGCCAC CCACAGAACCCGAATGTGAGAAG CAATTCCAGCCTTATTTTATTCCAA TAAAT	84	CTLA4 胞内信号传 导结构域
CATCTGTGGTGTTCTAATAAGAAG AATGCTGCTGTGATGGATCAAGAG CCCGCTGGTAACAGAACGGCCAAC AGTGAAGATAGCGATGAGCAGGA CCCAGAAGAAGTGACCTACGCCCA ACTCGACCACTGTGTTTTTACGCA GCGGAAAATCACTCGACCCTCTCA ACGACCCAAAACGCCGCCTACGG ACACCATACTCTACACCGAACTGC CGAACGCCAAACCACGGTCCAAG GTGGTATCATGTCCG	85	KIR3DL1 胞内信号 传导结构域
CTGCGGCACAGAAGGCAGGGCAA GCACTGGACAAGCACCCAGAGAA AGGCCGATTTTCAGCACCCCTGCTG	86	LIR1 胞内信号传导 结构域

[0324]

表 2-示例性抑制性胞内信号传导结构域核酸序列

核酸序列	SEQ ID NO:	描述
GCGCCGTTGGACCTGAGCCTACAG ATAGAGGACTGCAGTGGCGGTCTA GCCCTGCTGCCGATGCTCAAGAGG AAAACCTGTACGCCCGCGTGAAGC ACACCCAACCTGAAGATGGCGTGG AAATGGACACCAGATCTCCCCACG ATGAGGACCCTCAGGCCGTGACAT ACGCTGAAGTGAAGCACTCCCGGC CTCGGAGAGAAATGGCTAGCCCTC CAAGTCCTCTGAGCGGCGAGTTCC TGGACACCAAGGATAGACAGGCC GAAGAGGACCGGCAGATGGATAC AGAAGCTGCCGCCTCTGAAGCCCC ACAGGATGTGACATATGCCAGCT GCATAGCCTGACACTGCGGAGAG AAGCCACAGAGCCTCCACCTTCTC AAGAGGGCCCATCTCCAGCCGTGC CTAGCATCTATGCCCACTGGCCA TTCAC		
AAGGAGCCTGCGTCCCCGTTGGAT AAATGCCACTATACTAAGGATAAC GGTCAGTTCGATCAGAGTGCAAAG CAACTTAACTTGGAGGCTTACACT ATAGAGCAAGAAACAGCGCTGAT AAGTAATAAGAACGGTAAGCCAA AGCGACAGCAGAGGAAACCCAAT CCTCCGCTTAACTTGGATAGCTAC ATCGTCGGGCAAATGACATG	94	NKG2A (反向)胞内 信号传导结构域
CTGACCAGAAAGAAGAAGGCCCT GAGAATCCACAGCGTGGAAGGCG ACCTGCGGAGAAAGTCTGCCGGAC AAGAAGAGTGGTCCCCTAGCGCTC CATCTCCACCTGGATCTTGTGTGC AGGCCGAAGCAGCTCCTGCTGGAC TGTGTGGCGAACAGAGAGGCGAA GATTGCGCCGAGCTGCACGACTAC TTCAACGTGCTGAGCTACAGAAGC CTGGGCAACTGCAGCTTCTTACC GAGACAGGA	96	TIGIT 胞内信号传导 结构域
ATGGACAACCAGGGCGTGATCTAC AGCGACCTGAACCTGCCTCCTAAT CCTAAGCGGCAGCAGAGAAAGCC CAAGGGCAACAAGAACAGCATCC TGGCCACCGAGCAAGAGATCACCT ACGCCGAGCTGAATCTGCAGAAG GCCAGCCAGGACTTCCAGGGCAAC GACAAGACCTACCACTGCAAGGA CCTGCCTAGCGCTCCCGAGAAG	106	NKG2A 胞内信号传 导结构域

[0325]

表 2-示例性抑制性胞内信号传导结构域核酸序列

核酸序列	SEQ ID NO:	描述
[0326] ATGGACAACCAGGGCGTCATCTAC AGCGACCTGAACCTGCCTCCTAAT CCAAAGCGGCAGCAGCGGAAGCC CAAGGGCAACAAGAATAGCATCC TGGCCACCGAGCAAGAGATCACCT ACGCCGAGCTGAATCTGCAGAAG GCCAGCCAGGATTTCCAGGGCAAC GACAAGACCTACCACTGCAAGGA CCTGCCTAGCGCTCCTGAGAAA	130	NKG2A 胞内信号传导结构域(密码子最佳化)

[0327] 在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含与RRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASLNHSVIGPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS (SEQ ID NO:3) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含氨基酸序列RRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASLNHSVIGPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS (SEQ ID NO:3)。

[0328] 在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含与SEQ ID NO:1有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述一个或多个胞内信号传导结构域之一包含氨基酸序列SEQ ID NO:1。

[0329] 在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含与SEQ ID NO:2有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含氨基酸序列SEQ ID NO:2。

[0330] 在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含与LRHRRQGKHWSTQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPAADAQEENLYAAVKHTQPEDGVEMDTRSPHDEDPQAVTYAEVKHSRPRREMASPPSPLSGEFLDTKDRQAEEDRQMDTEAAASEAPQDVTYAQLHSLTLRREATEPPPSQEGPSPAVPSIYATLAIH (SEQ ID NO:50) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含氨基酸序列LRHRRQGKHWSTQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPAADAQEENLYAAVKHTQPEDGVEMDTRSPHDEDPQAVTYAEVKHSRPRREMASPPSPLSGEFLDTKDRQAEEDRQMDTEAAASEAPQDVTYAQLHSLTLRREATEPPPSQEGPSPAVPSIYATLAIH (SEQ ID NO:50)。

[0331] 在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含与HLWCSNKKNAAVMDQEPAGNRTANSEDSDEQDPEEVTYAQLDHCVFTQRK ITRPSQRPKTPPTDTILYTELPNAKPRS KVVSCP (SEQ ID NO:66) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、

至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含氨基酸序列HLWCSNKKNAAVMDQEPAGNRTANSEDSDEQDPEEVTYAQLDHCVFTRKTRPSQRPKTPPTDTILYTELPAKPRSKVVSCP (SEQ ID NO:66)。

[0332] 在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含与AVSLSKMLKKRSP LTTGVGVKMPPTPEPECEKQFQPYFIPIN (SEQ ID NO:67) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含氨基酸序列AVSLSKMLKKRSP LTTGVGVKMPPTPEPECEKQFQPYFIPIN (SEQ ID NO:67)。

[0333] 在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含与SEQ ID NO:93有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含氨基酸序列SEQ ID NO:93。

[0334] 在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含与SEQ ID NO:95有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含氨基酸序列SEQ ID NO:95。

[0335] 在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含与SEQ ID NO:105有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含氨基酸序列SEQ ID NO:105。

[0336] 在一些实施方案中,跨膜结构域和一个或多个胞内信号传导结构域中的至少一个衍生自相同蛋白。在一些实施方案中,跨膜结构域衍生自第一蛋白,并且一个或多个胞内信号传导结构域中的每个都衍生自与第一蛋白不同的蛋白。

[0337] 在一些实施方案中,本公开的抑制性嵌合受体包含两个胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,第一胞内信号传导结构域衍生自LIR1,并且第二胞内信号传导结构域衍生自BTLA。在一些实施方案中,第一胞内信号传导结构域衍生自LIR1,并且第二胞内信号传导结构域衍生自PD-1。在一些实施方案中,第一胞内信号传导结构域还包含衍生自LIR1的跨膜结构域。

[0338] 在一些实施方案中,本公开的抑制性嵌合受体包含两个胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,第一胞内信号传导结构域衍生自BTLA,并且第二胞内信号传导结构域衍生自LIR1。在一些实施方案中,第一胞内信号传导结构域衍生自BTLA,并且第二胞内信号传导结构域衍生自PD-1。在一些实施方案中,第一胞内信号传导结构域还包含衍生自BTLA的跨膜结构域。

[0339] 在一些实施方案中,本公开的抑制性嵌合受体包含两个胞内信号传导结构域。在

一些实施方案中,两个胞内信号传导结构域选自由以下组成的组:BTLA、PD-1、CTLA4、TIM3、KIR3DL1、LIR1、NKG2A、TIGIT和LAG3。在一些实施方案中,第一胞内信号传导结构域衍生自PD-1,并且第二胞内信号传导结构域衍生自LIR1。在一些实施方案中,第一胞内信号传导结构域衍生自PD-1,并且第二胞内信号传导结构域衍生自BTLA。在一些实施方案中,第一胞内信号传导结构域还包含衍生自PD-1的跨膜结构域。第一和第二胞内信号传导结构域可以是任何顺序。

[0340] 在一些实施方案中,本公开的抑制性嵌合受体包含三个胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,三个胞内信号传导结构域选自由以下组成的组:BTLA、PD-1、CTLA4、TIM3、KIR3DL1、LIR1、NKG2A、TIGIT和LAG3。在一些实施方案中,第一胞内信号传导结构域衍生自PD-1,第二胞内信号传导结构域衍生自LIR1,并且第三胞内信号传导结构域衍生自BTLA。在一些实施方案中,第一胞内信号传导结构域还包含衍生自PD-1的跨膜结构域。在一些实施方案中,第一胞内信号传导结构域还包含衍生自LIR1的跨膜结构域。在一些实施方案中,第一胞内信号传导结构域还包含衍生自BTLA的跨膜结构域。第一、第二和第三胞内信号传导结构域可以是任何顺序。例如,在包含三个来自PD-1、LIR1和BTLA的信号传导结构域的抑制性嵌合受体中,胞内信号传导结构域的顺序可以是PD-1—LIR1—BTLA、或PD-1—BTLA—LIR1、或LIR1—PD-1—BTLA、或LIR1—BTLA—PD-1、或BTLA—PD-1—LIR1、或BTLA—LIR1—PD-1。

[0341] 在一些实施方案中,本公开的抑制性嵌合受体包含四个胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,四个胞内信号传导结构域选自由以下组成的组:BTLA、PD-1、CTLA4、TIM3、KIR3DL1、LIR1、NKG2A、TIGIT和LAG3。第一、第二、第三和第四胞内信号传导结构域可以是任何顺序。

[0342] 在一些实施方案中,本公开的抑制性嵌合受体包含五个胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,五个胞内信号传导结构域选自由以下组成的组:BTLA、PD-1、CTLA4、TIM3、KIR3DL1、LIR1、NKG2A、TIGIT和LAG3。第一、第二、第三、第四和第五胞内信号传导结构域可以是任何顺序。在一些实施方案中,本公开的抑制性嵌合受体包含超过五个胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,超过五个胞内信号传导结构域选自由以下组成的组:BTLA、PD-1、CTLA4、TIM3、KIR3DL1、LIR1、NKG2A、TIGIT和LAG3。第一、第二、第三、第四、第五和额外胞内信号传导结构域可以是任何顺序。

[0343] 在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含有包含SEQ ID NO: 4的核酸。在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域多肽中的一者包含与SEQ ID NO: 4有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的核酸序列。

[0344] 在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含有包含SEQ ID NO: 5的核酸。在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含与SEQ ID NO: 5有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的核酸序列。

[0345] 在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含有包含SEQ ID NO:

6的核酸。在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含与SEQ ID NO:6有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的核酸序列。

[0346] 在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含有包含SEQ ID NO:51的核酸。在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含与SEQ ID NO:51有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的核酸序列。

[0347] 在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含有包含SEQ ID NO:52的核酸。在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含与SEQ ID NO:52有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的核酸序列。

[0348] 在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含有包含SEQ ID NO:53的核酸。在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含与SEQ ID NO:53有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的核酸序列。

[0349] 在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含有包含SEQ ID NO:54的核酸。在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含与SEQ ID NO:54有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的核酸序列。

[0350] 在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含有包含SEQ ID NO:55的核酸。在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含与SEQ ID NO:55有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的核酸序列。

[0351] 在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含有包含SEQ ID NO:84的核酸。在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含与SEQ ID NO:84有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的核酸序列。

[0352] 在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含有包含SEQ ID NO:85的核酸。在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含与SEQ ID NO:85有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的核酸序列。

[0353] 在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含有包含SEQ ID NO: 86的核酸。在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含与SEQ ID NO: 86有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的核酸序列。

[0354] 在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含有包含SEQ ID NO: 94的核酸。在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含与SEQ ID NO: 94有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的核酸序列。

[0355] 在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含有包含SEQ ID NO: 96的核酸。在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含与SEQ ID NO: 96有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的核酸序列。

[0356] 在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含有包含SEQ ID NO: 106的核酸。在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含与SEQ ID NO: 106有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的核酸序列。

[0357] 在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含有包含SEQ ID NO: 130的核酸。在一些实施方案中,一个或多个胞内信号传导结构域之一包含与SEQ ID NO: 130有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的核酸序列。

[0358] 酶促抑制性结构域

[0359] 在一些实施方案中,抑制性嵌合受体包含酶促抑制性结构域。在一些实施方案中,相对于缺乏酶促抑制性结构域的其他方面相同的嵌合抑制性受体,当在免疫调节细胞上表达时,酶促抑制性结构域能够防止、减弱或抑制嵌合受体的激活。

[0360] 在一些实施方案中,酶促抑制性结构域包含酶催化结构域。在一些实施方案中,酶催化结构域衍生自选自自由以下组成的组的酶:CSK、SHP-1、PTEN、CD45、CD148、PTP-MEG1、PTP-PEST、c-CBL、CBL-b、PTPN22、LAR、PTPH1、SHIP-1和RasGAP。

[0361] 在一些实施方案中,酶促抑制性结构域包含一个或多个修饰,相对于缺乏一个或多个修饰的其他方面相同的酶促抑制性结构域,一个或多个修饰调节基础防止、减弱或抑制。在一些实施方案中,相对于缺乏一个或多个修饰的其他方面相同的酶促抑制性结构域,一个或多个修饰降低基础防止、减弱或抑制。在一些实施方案中,相对于缺乏一个或多个修饰的其他方面相同的酶促抑制性结构域,一个或多个修饰增加基础防止、减弱或抑制。

[0362] 激活和共刺激性结构域

[0363] 在一些实施方案中,本文所公开的细胞还可包含至少一种肿瘤靶向嵌合受体或T

细胞受体,其包含激活性胞内结构域或共刺激性胞内结构域。在一些实施方案中,细胞包含至少一种抑制性嵌合受体和至少一种肿瘤靶向嵌合受体。细胞可包含至少1种、至少2种、至少3种、至少4种、至少5种、至少6种、至少7种、至少8种、至少9种或至少10种或更多种肿瘤靶向CAR和至少1种、至少2种、至少3种、至少4种、至少5种、至少6种、至少7种、至少8种、至少9种或至少10种或更多种抑制性嵌合受体。

[0364] 在一些实施方案中,激活性信号传导结构域是CD3- δ 蛋白,其包括三个基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)。激活性信号传导结构域的其他实例包括CD28、4-1BB和OX40。在一些实施方案中,细胞受体包含多于一个激活性信号传导结构域,其各自被称为共刺激性结构域。

[0365] 在一些实施方案中,肿瘤靶向嵌合受体是嵌合抗原受体(CAR)或工程化T细胞受体。在一些实施方案中,CAR结合一种或多种在肿瘤细胞的表面上表达的抗原。

[0366] 在一些实施方案中,在抗原与嵌合抑制性受体结合之前,肿瘤靶向嵌合受体能够激活细胞。

[0367] 在一些实施方案中,肿瘤靶向嵌合抗体包含SEQ ID NO:51中所示出的序列。在一些实施方案中,肿瘤靶向嵌合抗体包含SEQ ID NO:52中所示出的序列。

[0368] 跨膜结构域

[0369] 抑制性嵌合受体可含有跨膜结构域,其将蛋白结合结构域连接至胞内结构域。不同的跨膜结构域导致不同的受体稳定性。合适的跨膜结构域包括但不限于BTLA、CD8、CD28、CD3 δ 、CD4、4-1BB、OX40、ICOS、2B4、CD25、CD7、LAX、LAT、PD-1、CTLA4、TIM3、KIR3DL1、LIR1、NKG2A、TIGIT和LAG3。

[0370] 在一些实施方案中,跨膜结构域衍生自选自自由以下组成的组的蛋白:BTLA、CD8、CD28、CD3 δ 、CD4、4-1BB、OX40、ICOS、2B4、CD25、CD7、LAX、LAT、PD-1、CTLA4、TIM3、KIR3DL1、LIR1、NKG2A、TIGIT和LAG3。在一些实施方案中,细胞受体的跨膜结构域是BTLA跨膜结构域。在一些实施方案中,细胞受体的跨膜结构域是CD8跨膜结构域。在一些实施方案中,细胞受体的跨膜结构域是CD28跨膜结构域。在一些实施方案中,细胞受体的跨膜结构域是CD3 δ 跨膜结构域。在一些实施方案中,细胞受体的跨膜结构域是CD4跨膜结构域。在一些实施方案中,细胞受体的跨膜结构域是4-1BB跨膜结构域。在一些实施方案中,细胞受体的跨膜结构域是OX40跨膜结构域。在一些实施方案中,细胞受体的跨膜结构域是ICOS跨膜结构域。在一些实施方案中,细胞受体的跨膜结构域是2B4跨膜结构域。在一些实施方案中,细胞受体的跨膜结构域是CD25跨膜结构域。在一些实施方案中,细胞受体的跨膜结构域是CD7跨膜结构域。在一些实施方案中,细胞受体的跨膜结构域是LAX跨膜结构域。在一些实施方案中,细胞受体的跨膜结构域是LAT跨膜结构域。在一些实施方案中,细胞受体的跨膜结构域是PD-1跨膜结构域。在一些实施方案中,细胞受体的跨膜结构域是CLTA4跨膜结构域。在一些实施方案中,细胞受体的跨膜结构域是TIM3跨膜结构域。在一些实施方案中,细胞受体的跨膜结构域是KIR3DL跨膜结构域。在一些实施方案中,细胞受体的跨膜结构域是LIR1跨膜结构域。在一些实施方案中,细胞受体的跨膜结构域是NKG2A跨膜结构域。在一些实施方案中,细胞受体的跨膜结构域是TIGIT跨膜结构域。在一些实施方案中,细胞受体的跨膜结构域是LAG3跨膜结构域。

[0371] 在一些实施方案中,跨膜结构域还包含相同蛋白的胞外结构域的至少一部分。在

一些实施方案中,跨膜结构域还包含BTLA的胞外结构域的至少一部分。在一些实施方案中,跨膜结构域还包含PD-1的胞外结构域的至少一部分。在一些实施方案中,跨膜结构域还包含CTLA4的胞外结构域的至少一部分。在一些实施方案中,跨膜结构域还包含TIM3的胞外结构域的至少一部分。在一些实施方案中,跨膜结构域还包含KIR3DL1的胞外结构域的至少一部分。在一些实施方案中,跨膜结构域还包含LIR1的胞外结构域的至少一部分。在一些实施方案中,跨膜结构域还包含NKG2A的胞外结构域的至少一部分。在一些实施方案中,跨膜结构域还包含TIGIT的胞外结构域的至少一部分。在一些实施方案中,跨膜结构域还包含LAG3的胞外结构域的至少一部分。

[0372] 在一些实施方案中,跨膜结构域还包含BTLA胞外结构域的至少一部分。在一些实施方案中,跨膜结构域包含BTLA胞外结构域的至少1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100或更多个氨基酸。在一些实施方案中,跨膜结构域包含与BTLA胞外结构域的一部分有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。

[0373] 在一些实施方案中,跨膜结构域还包含LIR1胞外结构域的至少一部分。在一些实施方案中,跨膜结构域包含LIR1胞外结构域的至少1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100或更多个氨基酸。在一些实施方案中,跨膜结构域包含与LIR1胞外结构域的一部分有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。

[0374] 在一些实施方案中,跨膜结构域还包含PD-1胞外结构域的至少一部分。在一些实施方案中,跨膜结构域包含PD-1胞外结构域的至少1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100或更多个氨基酸。在一些实施方案中,跨膜结构域包含与PD-1胞外结构域的一部分有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。

[0375] 在一些实施方案中,跨膜结构域还包含CTLA4胞外结构域的至少一部分。在一些实施方案中,跨膜结构域包含CTLA4胞外结构域的至少1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100或更多个氨基酸。在一些实施方案中,跨膜结构域包含与CTLA4胞外结构域的一部分有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。

[0376] 在一些实施方案中,跨膜结构域还包含KIR3DL1胞外结构域的至少一部分。在一些实施方案中,跨膜结构域包含KIR3DL1胞外结构域的至少1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100或更多个氨基酸。在一些实施方案中,跨膜结构域包含与KIR3DL1胞外结构域的一部分有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。

[0377] 在一些实施方案中,跨膜结构域还包含CD28胞外结构域的至少一部分。在一些实

实施方案中,跨膜结构域包含CD28胞外结构域的至少1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100或更多个氨基酸。在一些实施方案中,跨膜结构域包含与CD28胞外结构域的一部分有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。

[0378] 在一些实施方案中,跨膜结构域包含与SEQ ID NO:7有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,跨膜结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:7。在一些实施方案中,跨膜结构域包含与SEQ ID NO:8有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,跨膜结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:8。在一些实施方案中,跨膜结构域包含与SEQ ID NO:9有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,跨膜结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:9。在一些实施方案中,跨膜结构域包含与SEQ ID NO:10有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,跨膜结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:10。

[0379] 在一些实施方案中,跨膜结构域包含与SEQ ID NO:11有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,跨膜结构域包含氨基酸序列FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO:11)。

[0380] 在一些实施方案中,跨膜结构域包含与SEQ ID NO:12有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,跨膜结构域包含氨基酸序列LLPLGGLPLLITTCFCLFCCL (SEQ ID NO:12)。

[0381] 在一些实施方案中,跨膜结构域包含与SEQ ID NO:59有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,跨膜结构域包含氨基酸序列VIGILVAVILLLLLLLLLLFLI (SEQ ID NO:59)。

[0382] 在一些实施方案中,跨膜结构域包含与SEQ ID NO:60有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,跨膜结构域包含氨基酸序列VGVVGGLLGSLVLLVWLAVI (SEQ ID NO:60)。

[0383] 在一些实施方案中,跨膜结构域包含与SEQ ID NO:68有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,跨膜结构域包含氨基酸序列DFLLWILAAVSSGLFFYSFLLT (SEQ ID NO:68)。

[0384] 在一些实施方案中,跨膜结构域包含与SEQ ID NO:69有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,跨膜结构域包含氨基酸序列ILIGTSVVIILFILLFFLL (SEQ ID NO:69)。

[0385] 示例性跨膜结构域氨基酸序列示于表3中。示例性跨膜结构域核酸序列示于表4中。

[0386]

氨基酸序列	SEQ ID NO:	描述
IFSGFAGLLAILLVVAVFCIL	7	LAX 跨膜结构域

[0387]

氨基酸序列	SEQ ID NO:	描述
VAVAGCVFLLISVLLLSGL	8	CD25 跨膜结构域
AALAVISFLLGLGLGVACVLA	9	CD7 跨膜结构域
MEADALSPVGLGLLLLPFLVTLAALA VRARELPVS	10	LAT 跨膜结构域
FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	11	CD28 跨膜结构域
LLPLGGLPLLITTCFCLFCCL	12	BTLA 跨膜结构域
VIGILVAVILLLLLLLFLI	59	LIR1 跨膜结构域
VGVVGGLLGSLLVLLVWVLA VI	60	PD-1 跨膜结构域
DLLWILAAVSSGLFFYSFLT	68	CTLA4 跨膜结构域
ILIGTSVVIILFILLFFLL	69	KIR3DL1 跨膜结构域
IVVITVVSAMLILCHIGLIGVIL	89	NKG2A (反向)跨膜结构域
LLGAMAATLVVICTAVIVVVA	91	TIGIT 跨膜结构域
LIVGILGHIILMASVVTIVVI	107	NKG2A 跨膜结构域

表 4-示例性跨膜结构域核酸序列

核酸序列	SEQ ID NO:	描述
TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAG TCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACA GTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTG	13	CD28 跨膜结 构域
CTCTGCCGTTGGGGGGTCTGCCACTTCT CATAACAATTGCTTCTGCCTTTTTTGCT GTTTG	14	BTLA 跨膜结 构域
CTGCTGCCTCTTGGAGGACTGCCCTCCT GATCACCACATGCTTTTGCCTGTTCTGCT GTCTG	61	BTLA 跨膜结 构域
GTTATAGGGATCCTGGTGGCTGTCATAC TCCTCTTGCTCCTCTTGTTGCTGCTTTTT TGATA	62	LIR1 跨膜结构 域
GTGATCGGAATTCTGGTGGCCGTGATTC TGCTGCTGCTCCTTCTGCTCCTGCTGTTT CTGATT	63	LIR1 跨膜结构 域
GTTGGGGTTGTAGGTGGTCTGCTCGGCA GCCTGGTCTTGTGGTGTGGGTCTTGGCT GTGATC	64	PD-1 跨膜结构 域
GTGGGAGTTGTTGGCGGCCTGCTGGGAT CTCTGGTGCTGCTTGTTTGGGTGCTCGCC GTGATC	65	PD-1 跨膜结构 域
GATTTTCTGCTGTGGATTCTGGCAGCTGT	80	CTLA-4 跨膜

[0388]

表 4-示例性跨膜结构域核酸序列

核酸序列	SEQ ID NO:	描述
GAGCTCTGGCTTGTTTTTCTACAGCTTCC TCCTGACC		结构域
ATCCTGATCGGGACAAGTGTAGTAATCA TACTTTTCATACTCCTGCTCTTTTTTCTCT TG	81	KIR3DL1 跨膜 结构域
GTGATCGGAATTCTGGTGGCCGTGATCC TGCTGCTCCTGCTTCTCCTCCTGCTGTT CTGATC	82	LIR1 跨膜结构 域(密码子优 化#1)
GTGATCGGCATTCTGGTGGCCGTGATTCT GCTGCTCCTGCTGTTGCTGCTGCTGTTCC TGATC	131	LIR1 跨膜结构 域(密码子优 化#2)
[0389] FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	83	CD28 跨膜结 构域
ATAGTGGTCATCACTGTAGTTAGTGCAA TGCTTATTCTTTGTATCATAGGGCTCATA GGGGTAATCCTG	90	NKG2A 跨膜 结构域
CTGCTGGGCGCCATGGCCGCCACACTGG TTGTTATCTGTACCGCCGTGATCGTGGTG GTGGCC	92	TIGIT 跨膜结 构域
CTGATCGTGGGAATCCTGGGCATCATCT GCCTGATCCTGATGGCCAGCGTGGTCAC CATCGTGGTCATC	108	NKG2A 跨膜 结构域
CTGATCGTGGGCATCCTGGGCATCATCT GTCTGATCCTGATGGCCAGCGTGGTCAC CATCGTGGTCATC	132	NKG2A 跨膜 结构域(密码 子优化)

[0390] 在一些实施方案中,跨膜结构域物理连接至胞外蛋白结合结构域。在一些实施方案中,一或多个胞内信号传导结构域之一物理连接至跨膜结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域物理连接至胞外蛋白结合结构域,并且一或多个胞内信号传导结构域之一物理连接至跨膜结构域。

[0391] 在一些实施方案中,跨膜结构域包含与SEQ ID NO:7有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,跨膜结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:7。

[0392] 在一些实施方案中,跨膜结构域包含与SEQ ID NO:13有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的核酸序列。在一些实施方案中,跨膜结构域包含核酸序列SEQ ID NO:13。

[0393] 在一些实施方案中,跨膜结构域包含与SEQ ID NO:14有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的核酸序列。在一些实施方案中,跨膜结构域包含核酸序列SEQ ID NO:14。

膜结构域包含核酸序列SEQ ID NO:90。

[0404] 在一些实施方案中,跨膜结构域包含与SEQ ID NO:92有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的核酸序列。在一些实施方案中,跨膜结构域包含核酸序列SEQ ID NO:92。

[0405] 在一些实施方案中,跨膜结构域包含与SEQ ID NO:108有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的核酸序列。在一些实施方案中,跨膜结构域包含核酸序列SEQ ID NO:108。

[0406] 在一些实施方案中,跨膜结构域包含与SEQ ID NO:131有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的核酸序列。在一些实施方案中,跨膜结构域包含核酸序列SEQ ID NO:131。

[0407] 在一些实施方案中,跨膜结构域包含与SEQ ID NO:132有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的核酸序列。在一些实施方案中,跨膜结构域包含核酸序列SEQ ID NO:132。

[0408] 胞外蛋白结合结构域

[0409] 本文所述的抑制性嵌合受体还包含胞外蛋白结合结构域,诸如配体结合结构域、受体结合结构域、抗原结合结构域等。

[0410] 在一些实施方案中,表达抑制性嵌合受体的免疫细胞经基因修饰以识别多种靶标或蛋白(例如,配体、受体、抗原等),其允许识别肿瘤细胞上的独特靶标或蛋白(例如,配体、受体、抗原等)表达模式。

[0411] 在一些实施方案中,蛋白(例如,配体、受体、抗原等)不在靶肿瘤上表达。在一些实施方案中,与导致肿瘤靶向嵌合抗原受体的激活的表达水平相比,非肿瘤细胞中的表达低至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍或至少10倍或更多。

[0412] 在一些实施方案中,蛋白(例如,配体、受体、抗原等)在非肿瘤细胞上表达。

[0413] 在一些实施方案中,蛋白(例如,配体、受体、抗原等)在衍生自选自以下组成的组的组织的非肿瘤细胞上表达:脑、神经元组织、内分泌、内皮、骨、骨髓、免疫系统、肌肉、肺、肝、胆囊、胰腺、胃肠道、肾脏、膀胱、雄性生殖器、雌性生殖器、脂肪、软组织和皮肤。

[0414] 在一些实施方案中,本公开的抑制性嵌合受体的胞外蛋白结合结构域包含抗原结合结构域,诸如特异于肿瘤抗原的单链Fv(scFv)。在一些实施方案中,胞外蛋白结合结构域包含抗体、其抗原结合片段、F(ab)、F(ab')、单链可变片段(scFv)或单结构域抗体(sdAb)。

[0415] 术语“单链”是指包含通过肽键线性连接的氨基酸单体的分子。在一个特定此类实施方案中,在单链Fab分子中,Fab轻链的C末端连接至Fab重链的N末端。如本文更详细描述,scFv的轻链(VL)可变结构域通过多肽链从其C末端连接至重链(VH)可变结构域的N末端。可选地,scFv包含其中VH的C末端通过多肽链连接至VL的N末端的多肽链。

[0416] “Fab片段”(也称为抗原结合片段)含有轻链恒定结构域(CL)和重链第一恒定结构

域(CH1)以及分别在轻链和重链上的可变结构域VL和VH。可变结构域包含参与抗原结合的互补决定环(CDR,也称为高变区)。Fab'片段与Fab片段的区别在于在重链CH1域的羧基末端添加了一些残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。

[0417] “F(ab')₂”片段含有两个Fab'片段,其在铰链区附近通过双硫键接合。F(ab')₂片段可例如通过重组方法或通过完整抗体的胃蛋白酶消化而产生。F(ab')片段可例如通过用β-巯基乙醇处理来解离。

[0418] “Fv”片段包含一个重链可变结构域与一个轻链可变结构域的非共价连接的二聚体。

[0419] “单链Fv”或“sFv”或“scFv”包括抗体的VH和VL结构域,其中这些结构域存在于单一多肽链中。在一个实施方案中,Fv多肽还包含在VH与VL域之间的多肽接头,其使scFv能够形成抗原结合的期望结构。

[0420] 术语“单结构域抗体”或“sdAb”是指一种分子,在所述分子中抗体的一个可变结构域在不存在另一个可变结构域的情况下与抗原特异性结合。单结构域抗体及其片段描述于Arabi Ghahroudi等人,FEBS Letters,1998,414:521-526和Muyldermans等人,Trends in Biochem.Sci.,2001,26:230-245中,所述文献各自以引用的方式整体并入。单结构域抗体也称为sdAb或纳米抗体。sdab相当稳定并且易于作为与抗体的Fc链融合伴侣来表达(Harmsen MM,De Haard HJ(2007).“Properties,production,and applications of camelid single-domain antibody fragments”.Appl.Microbiol Biotechnol.77(1):13-22)。

[0421] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,诸如完整抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段包括例如Fv片段、Fab片段、F(ab')₂片段、Fab'片段、scFv(sFv)片段和scFv-Fc片段。

[0422] 在一些实施方案中,蛋白结合结构域是包含抗体、抗体的抗原结合片段、F(ab)片段、F(ab')片段、单链可变片段(scFv)或单结构域抗体(sdAb)的抗原结合结构域。在一些实施方案中,抗原结合结构域包含单链可变片段(scFv)。在一些实施方案中,每个scFv包含重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)。在一些实施方案中,VH和VL由肽接头分开。

[0423] 在一些实施方案中,胞外蛋白结合结构域包含配体结合结构域。配体结合结构域可以是来自受体的结构域,其中受体选自由以下组成的组:TCR、BCR、细胞因子受体、RTK受体、丝氨酸/苏氨酸激酶受体、激素受体、免疫球蛋白超家族受体和TNFR受体超家族。

[0424] 结合结构域的选择取决于限定靶细胞的表面的配体的类型和数量。例如,蛋白结合结构域可被选择以识别充当靶细胞上与非疾病状态(诸如“自身”正常组织)相关的细胞表面标志物的配体。或者蛋白结合结构域可被选择以识别充当靶标上与特定疾病状态(诸如癌症或自体免疫疾病)相关的细胞表面标志物的配体。一般而言,抑制性嵌合受体结合结构域可选自非疾病状态细胞表面标志物,而肿瘤靶向嵌合受体结合结构域可选自疾病状态细胞表面标志物。因此,可充当本公开的抑制性嵌合受体中的蛋白结合结构域的配体的细胞表面标志物的实例包括与正常组织相关的那些,并且可充当肿瘤靶向嵌合受体中的蛋白结合结构域的配体的细胞表面标志物的实例包括与癌细胞和/或其他形式患病细胞相关的那些。在一些实施方案中,通过工程化与非肿瘤细胞上由工程化核酸所编码的抗原或蛋白特异性结合的期望抗原或蛋白结合结构域,将抑制性嵌合受体被工程化成靶向所关注的非肿瘤抗原或蛋白。

[0425] 在一些实施方案中,胞外蛋白结合结构域包含受体结合结构域。在一些实施方案中,胞外蛋白结合结构域包含抗原结合结构域。

[0426] 与靶标或表位特异性结合的蛋白结合结构域(例如,配体结合结构域、受体结合结构域或抗原结合结构域,诸如scFv)是本领域所理解的术语,并且确定此类特异性结合的方法也是本领域已知的。如果分子与特定靶抗原反应或缔合与其与替代靶标反应或缔合相比频率更高、速度更快、持续时间更长和/或亲和力更大,则称所述分子表现出特异性结合。与第一靶抗原特异性结合的蛋白结合结构域(例如,配体结合结构域、受体结合结构域或抗原结合结构域,诸如scFv)可与或不与第二靶抗原特异性结合。因此,特异性结合不一定需要(但是其可包括)排他性结合。

[0427] 在一些实施方案中,蛋白结合结构域具有高结合亲和力。

[0428] 在一些实施方案中,蛋白结合结构域具有低结合亲和力。

[0429] 接头

[0430] 在一些实施方案中,抑制性嵌合受体包含肽接头。接头一般用于连接蛋白结合结构域(例如,抗原结合结构域、配体结合结构域、受体结合结构域等)的两种肽,诸如scFv或sdAb的肽。可使用本领域已知的任何适当接头,包括基于甘油-丝氨酸的接头。在一些实施方案中,scFv的重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)由肽接头分开。在一些实施方案中,scFv包含结构VH-L-VL或VL-L-VH,其中VH是重链可变结构域,L是肽接头,并且VL是轻链可变结构域。

[0431] 在一些实施方案中,抑制性嵌合受体包含肽接头。接头一般用于连接蛋白结合结构域(例如,抗原结合结构域、配体结合结构域、受体结合结构域等)的两种肽,诸如scFv或sdAb的肽。可使用本领域已知的任何适当接头,包括基于甘油-丝氨酸的接头。在一些实施方案中,scFv的重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)由肽接头分开。在一些实施方案中,scFv包含结构VH-L-VL或VL-L-VH,其中VH是重链可变结构域,L是肽接头,并且VL是轻链可变结构域。在一些实施方案中,肽接头包含选自以下组成的组的氨基酸序列:GGS (SEQ ID NO:15)、GGSGGS (SEQ ID NO:16)、GGSGGSGGS (SEQ ID NO:17)、GGSGGSGGSGGS (SEQ ID NO:18)、GGSGGSGGSGGSGGS (SEQ ID NO:19)、GGGS (SEQ ID NO:20)、GGGSGGGS (SEQ ID NO:21)、GGGSGGGS (SEQ ID NO:22)、GGGSGGGS (SEQ ID NO:23)、GGGSGGGS (SEQ ID NO:24)、GGGS (SEQ ID NO:25)、GGGSGGGS (SEQ ID NO:26)、GGGSGGGS (SEQ ID NO:27)、GGGSGGGS (SEQ ID NO:28)和GGGSGGGS (SEQ ID NO:29)。在一些实施方案中,肽接头包含有包含SEQ ID NO:30中所示出的序列的核酸序列。

[0432] 示例性接头氨基酸序列示于表5中。示例性接头核酸序列示于表6中。

表 5-示例性接头氨基酸序列

氨基酸序列	SEQ ID NO:	描述
GGG	15	(G ₂ S) ₁ scFv 接头
GGSGGS	16	(G ₂ S) ₂ scFv 接头
GGSGGSGGS	17	(G ₂ S) ₃ scFv 接头
GGSGGSGGSGGS	18	(G ₂ S) ₄ scFv 接头
GGSGGSGGSGGSGGS	19	(G ₂ S) ₅ scFv 接头
GGGS	20	(G ₃ S) ₁ scFv 接头
GGGSGGGS	21	(G ₃ S) ₂ scFv 接头
GGGSGGGS GGGS	22	(G ₃ S) ₃ scFv 接头
GGGSGGGS GGGS GGGS	23	(G ₃ S) ₄ scFv 接头
GGGSGGGS GGGS GGGS GGGS	24	(G ₃ S) ₅ scFv 接头
GGGGS	25	(G ₄ S) ₁ scFv 接头
GGGGS GGGS	26	(G ₄ S) ₂ scFv 接头
GGGGS GGGS GGGS	27	(G ₄ S) ₃ scFv 接头
GGGGS GGGS GGGS GGGS	28	(G ₄ S) ₄ scFv 接头
GGGGS GGGS GGGS GGGS GGGS	29	(G ₄ S) ₅ scFv 接头

[0433]

表 6-示例性接头核酸序列

核酸序列	SEQ ID NO:	描述
GGAGGCGGAGGATCTGGTGGC GGAGGAAGTGGCGGAGGCGGT TCT	30	(G ₄ S) ₃ scFv 接头

[0434]

[0435] 间隔/铰链

[0436] 嵌合受体也可在多肽中含有间隔或铰链结构域。在一些实施方案中,间隔结构域或铰链结构域位于抑制性嵌合受体或肿瘤靶向嵌合受体的胞外结构域(例如,包含蛋白结合结构域)与跨膜结构域之间,或位于抑制性嵌合受体或肿瘤靶向嵌合受体的胞内信号传导结构域与跨膜结构域之间。间隔或铰链结构域是起到在多肽链中将跨膜结构域连接至胞外结构域和/或胞内结构域的作用的任何寡肽或多肽。间隔或铰链结构域为抑制性嵌合受体或肿瘤靶向嵌合受体或其结构域提供灵活性,或防止抑制性嵌合受体或肿瘤靶向嵌合受体或其结构域的空间位阻。在一些实施方案中,间隔结构域或铰链结构域可包含至多300个氨基酸(例如,10至100个氨基酸,或5至20个氨基酸)。在一些实施方案中,一个或多个间隔结构域可包括在抑制性嵌合受体或肿瘤靶向嵌合受体的其他区域中。

[0437] 示例性间隔或铰链结构域氨基酸序列示于表7中。示例性间隔或铰链结构域核酸序列示于表8中。

[0438]

氨基酸序列	SEQ ID NO:	描述
AAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIH VKGKHLCPSPFLPGPSKP	31	CD28 铰链
ESKYGPPCPSCP	32	IgG4 最小铰链
ESKYGPPAPSAP	33	IgG4 最小铰链, 无二 硫键
ESKYGPPCPPCP	34	IgG4 S228P 最小铰链, 二硫键形成增强
EPKSCDKTHTCP	35	IgG1 最小铰链
AAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTP APTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYWAPLAGTCGV	36	延伸的 CD8a 铰链

[0439]

氨基酸序列	SEQ ID NO:	描述
LLLSLVITLYCNHRN		
TTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPE ACRPAAGGAVHTRGLDFACD	37	CD8a 铰链
ACPTGLYTHSGECCACNLGEGV AQPCGANQTVCEPCLDSVTFSDV VSATEPCKPCTECVGLQSMSAPC VEADDAVCRCAYGYYQDETTGR CEACRVCEAGSGLVFSCQDKQNT VCEECPDGTYSDEADAEC	38	LNGFR 铰链
ACPTGLYTHSGECCACNLGEGV AQPCGANQTV	39	截短的 LNGFR 铰链 (TNFR-Cys1)
AVGQDTQEVIVVPHSLPFKV	40	PDGFR-β 胞外接头
TTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPE ACRPAAGGAVHTRGLDFACDQTT PGERSSLPAFYPGTSGSCSGCGSLS LP	70	CD8a-DAP10e 铰链

表 8-示例性间隔或铰链结构域核酸序列

核酸序列	SEQ ID NO:	描述
GCAGCAGCTATCGAGGTGATGT ATCCTCCGCCCTACCTGGATAA TGAAAAGAGTAATGGGACTATC ATTCATGTAAAAGGGAAGCATC TTTGTCTTCTCCCCTTTTCCCC GGTCCGTCTAAACCT	41	CD28 铰链
GAAAGCAAGTACGGTCCACCTT GCCCTAGCTGTCCG	42	IgG4 最小铰链
GAATCCAAGTACGGCCCCCAG CGCCTAGTGCCCCA	43	IgG4 最小铰链, 无二 硫键
GAATCTAAATATGGCCCGCCAT GCCCGCCTTGCCCCA	44	IgG4 S228P 最小铰链, 二硫键形成增强
GAACCGAAGTCTTGTGATAAAA CTCATAACGTGCCCG	45	IgG1 最小铰链
GCTGCTGCTTTCGTACCCGTGTT CCTCCCTGCTAAGCCTACGACT ACCCCGCACCGAGACCACCCA CGCCAGCACCCACGATTGCTAG CCAGCCCCTTAGTTTGCGACCA GAAGCTTGTCGGCCTGCTGCTG GTGGCGCGGTACATACCCGCGG CCTTGATTTTGCTTGCGATATAT ATATCTGGGCGCCTCTGGCCGG AACATGCGGGGTCTCCTCCTTT	46	延伸的 CD8a 铰链

[0440]

表 8-示例性间隔或铰链结构域核酸序列

核酸序列	SEQ ID NO:	描述
CTCTGGTTATTACTCTCTACTGT AATCACAGGAAT		
GCCTGCCCCGACCGGGCTCTACA CTCATAGCGGGAATGTTGTAA GGCATGTAACCTGGGTGAGGGC GTCGCACAGCCCTGCGGAGCTA ACCAAACAGTGTGCGAACCCCTG CCTCGATAGTGTGACGTTCTCTG ATGTTGTATCAGCTACAGAGCC TTGCAAACCATGTACTGAGTGC GTTGGACTTCAGTCAATGAGCG CTCCATGTGTGGAGGCAGATGA TGCGGTCTGTCGATGTGCTTAC GGATACTACCAAGACGAGACAA CAGGGCGGTGCGAGGCCTGTAG AGTTTGTGAGGCGGGCTCCGGG CTGGTGTTTTCATGTCAAGACA AGCAAATACGGTCTGTGAAGA GTGCCCTGATGGCACCTACTCA GACGAAGCAGATGCAGAATGC	47	LNGFR 铰链
GCCTGCCCTACAGGACTCTACA CGCATAGCGGTGAGTGTGTAA AGCATGCAACCTCGGGGAAGGT GTAGCCCAGCCATGCGGGGCTA ACCAAACCGTTTGC	48	截短的 LNGFR 铰链 (TNFR-Cys1)
GCTGTGGGCCAGGACACGCAGG AGGTCATCGTGGTGCCACACTC CTTGCCCTTTAAGGTG	49	PDGFR- β 胞外接头
ACCACGACGCCAGCGCCGCGAC CACCAACACCGGCGCCACCAT CGCGTTGCAGCCCCTGTCCCTG CGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAG CGGCGGGGGGCGCAGTGCACAC GAGGGGGCTGGACTTCGCTGT GAT	79	CD8 铰链
ACCACGACGCCAGCGCCGCGAC CACCAACACCGGCGCCACCAT CGCGTTGCAGCCCCTGTCCCTG CGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAG CGGCGGGGGGCGCAGTGCACAC GAGGGGGCTGGACTTCGCTGT GATCAGACCACACCTGGCGAGA GATCTTCCCTGCCTGCCTTCTAT CCTGGCACCAGCGGCTCTTGTT CTGGCTGTGGATCACTGAGCCT GCCT	87	CD8a-DAP10e 铰链
GCCGCTGCTATCGAAGTGATGT	88	CD28 铰链

[0441]

表 8-示例性间隔或铰链结构域核酸序列

核酸序列	SEQ ID NO:	描述
[0442] ACCCTCCTCCTTACCTGGACAA CGAGAAGTCCAACGGCACCATC ATCCACGTGAAGGGCAAGCACC TGTGTCCTTCTCCACTGTTCCCC GGACCTAGCAAGCCT		

[0443] 在一些实施方案中,嵌合抑制性受体还包含定位在蛋白结合结构域与跨膜结构域之间并且可操作地连接至蛋白结合结构域和跨膜结构域中的每个的间隔区。在一些实施方案中,嵌合抑制性受体还包含定位在蛋白结合结构域与跨膜结构域之间并且物理连接至蛋白结合结构域和跨膜结构域中的每个的间隔区。

[0444] 在一些实施方案中,嵌合抑制性受体还包含在蛋白结合结构域与跨膜结构域之间的间隔区。

[0445] 在一些实施方案中,间隔区衍生自选自自由以下组成的组的蛋白:CD8 α 、CD4、CD7、CD28、IgG1、IgG4、Fc γ RIII α 、LNGFR和PDGFR。在一些实施方案中,间隔区包含选自自由以下组成的组的氨基酸序列:AAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLFPGPSKP (SEQ ID NO:31)、ESKYGPPCPSCP (SEQ ID NO:32)、ESKYGPPAPSAP (SEQ ID NO:33)、ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:34)、EPKSCDKTHTCP (SEQ ID NO:35)、AAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN (SEQ ID NO:36)、TTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO:37)、ACPTGLYTHSGECKACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTECVGLQSMSAPVEADDAVCRCAHYGYQDETTRCEACRVCEAGSGLVFSCQDKQNTVCEECPDGTYSDEADAEC (SEQ ID NO:38)、ACPTGLYTHSGECKACNLGEGVAQPCGANQTV (SEQ ID NO:39)、AVGQDTQEIVVPHSLPFKV (SEQ ID NO:40) 和TTTTAPRPPTPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDQTTPGERSSLPAYFPGTSGSCSGCSLSLP (SEQ ID NO:70)。

[0446] 在一些实施方案中,间隔区包含与SEQ ID NO:31有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,间隔区包含与SEQ ID NO:32有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,间隔区包含与SEQ ID NO:33有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,间隔区包含与SEQ ID NO:34有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,间隔区包含与SEQ ID NO:35有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,间隔区包含与SEQ ID NO:36有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中,间隔区包含与SEQ ID NO:37有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,间隔区包含与SEQ ID NO:38有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,间隔区包含与SEQ ID NO:39有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,间隔区包含与SEQ ID NO:40有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,间隔区包含与SEQ ID NO:70有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。

[0447] 在一些实施方案中,间隔区调节嵌合抑制性受体的敏感性。在一些实施方案中,相对于缺乏间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,间隔区增加嵌合抑制性受体的敏感性。在一些实施方案中,相对于缺乏间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,间隔区降低嵌合抑制性受体的敏感性。在一些实施方案中,相对于缺乏间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,间隔区调节嵌合抑制性受体的效力。在一些实施方案中,相对于缺乏间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,间隔区增加嵌合抑制性受体的效力。在一些实施方案中,相对于缺乏间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,间隔区降低嵌合抑制性受体的效力。在一些实施方案中,相对于缺乏间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,间隔区调节在免疫调节细胞上表达的肿瘤靶向嵌合受体的激活的基础防止、减弱或抑制。在一些实施方案中,相对于缺乏间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,间隔区降低基础防止、减弱或抑制。在一些实施方案中,相对于缺乏间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,间隔区增加基础防止、减弱或抑制。

[0448] 在一些实施方案中,其中嵌合抑制性受体还包含定位在跨膜结构域与一个或多个胞内信号传导结构域之一之间并且可操作地连接至跨膜结构域和胞内信号传导结构域中的每个的胞内间隔区。在一些实施方案中,嵌合抑制性受体还包含定位在跨膜结构域与一个或多个胞内信号传导结构域之一之间并且物理连接至跨膜结构域和胞内信号传导结构域中的每个的胞内间隔区。

[0449] 在一些实施方案中,相对于缺乏胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,胞内间隔区调节嵌合抑制性受体的敏感性。在一些实施方案中,相对于缺乏胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,胞内间隔区增加嵌合抑制性受体的敏感性。在一些实施方案中,相对于缺乏胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,胞内间隔区降低嵌合抑制性受体的敏感性。在一些实施方案中,相对于缺乏胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,胞内间隔区调节嵌合抑制性受体的效力。

[0450] 在一些实施方案中,相对于缺乏胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,胞内间隔区增加嵌合抑制性受体的效力。在一些实施方案中,相对于缺乏胞内间隔区的其

他方面相同的嵌合抑制性受体,胞内间隔区降低嵌合抑制性受体的效力。在一些实施方案中,相对于缺乏胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,当在免疫调节细胞上表达时,胞内间隔区调节在免疫调节细胞上表达的肿瘤靶向嵌合受体的激活的基础防止、减弱或抑制。在一些实施方案中,相对于缺乏胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,胞内间隔区降低基础防止、减弱或抑制。在一些实施方案中,相对于缺乏胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,胞内间隔区增加基础防止、减弱或抑制。

[0451] 编码抑制性嵌合受体的多核苷酸

[0452] 本文还呈现了编码抑制性嵌合受体的多核苷酸或多核苷酸集合,以及包含此类多核苷酸的载体。当抑制性嵌合受体是多链受体时,使用多核苷酸组。在这种情况下,可将多核苷酸组克隆至单一载体或多个载体中。在一些实施方案中,多核苷酸包含编码抑制性嵌合受体的序列,其中编码胞外蛋白结合结构域的序列与编码胞内信号传导结构域和跨膜结构域的序列邻接并在相同的阅读框中。

[0453] 可对多核苷酸进行密码子优化以在哺乳动物细胞中表达。在一些实施方案中,对多核苷酸的整个序列进行密码子优化以在哺乳动物细胞中表达。密码子优化是指发现编码DNA中同义密码子(即,编码相同氨基酸的密码子)的出现频率在不同物种中有偏好性。此类密码子简并性使相同多肽由多种核酸序列编码。多种密码子优化方法是本领域已知的,并且包括例如至少在美国专利号5,786,464和6,114,148中所公开的方法。

[0454] 编码抑制性嵌合受体的多核苷酸可使用本领域已知的重组方法(诸如像通过筛选表达多核苷酸的细胞的文库,通过将其从已知包括其的载体衍生出,或通过直接从含有其的细胞和组织分离出)来使用标准技术获得。可选地,多核苷酸可合成产生,而不是克隆。

[0455] 可将多核苷酸克隆至载体中。在一些实施方案中,使用本领域已知的表达载体。因此,本公开包括表达抑制性嵌合受体的逆转录病毒和慢病毒载体构建体,其可直接转导至细胞中。

[0456] 本公开还包括可直接转导至细胞中的RNA构建体。用于产生在转染中使用的mRNA的方法涉及用专门设计的引物体外转录(IVT)模板,接着添加polyA,以产生含有3'和5'非翻译序列("UTR")(例如,本文所述的3'和/或5'UTR)、5'帽(例如,本文所述的5'帽)和/或内部核糖体进入位点(IRES)(例如,本文所述的IRES)、要表达的核酸和polyA尾的构建体。如此产生的RNA可有效转染不同类型的细胞。在一些实施方案中,通过电穿孔将RNA抑制性嵌合受体转导至细胞(例如,T细胞或NK细胞)中。

[0457] 细胞

[0458] 在一个方面,本公开提供了抑制性嵌合受体修饰的细胞。细胞可衍生经修饰以表达本文所述的抑制性嵌合受体的干细胞、祖细胞和/或免疫细胞。在一些实施方案中,使用衍生自免疫细胞的细胞系。如本文所提供,细胞的非限制性实例包括间充质干细胞(MSC)、自然杀伤(NK)细胞、NKT细胞、先天性淋巴样细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、间充质干细胞、树突状细胞、T细胞(例如,CD8⁺ T细胞、CD4⁺ T细胞、 γ δ T细胞和调节性T细胞(CD4⁺、FOXP3⁺、CD25⁺))和B细胞。在一些实施方案中,细胞是干细胞,诸如多能干细胞、胚胎干细胞、成体干细胞、骨髓干细胞、脐带干细胞或其他干细胞。

[0459] 细胞可经修饰以表达本文所提供的抑制性嵌合受体。因此,本公开提供一种被工程化成表达抑制性嵌合受体的细胞(例如,细胞群体),其中抑制性嵌合受体包含蛋白结合

结构域(例如,抗原结合结构域、配体结合结构域、受体结合结构域等)、跨膜结构域和一个或多个抑制性胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,抑制性嵌合受体包含两个或更多个胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,抑制性嵌合受体包含三个或更多个胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,抑制性嵌合受体包含四个或更多个胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,抑制性嵌合受体包含五个或更多个胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,抑制性嵌合受体包含一个胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,抑制性嵌合受体包含两个胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,抑制性嵌合受体包含三个胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,抑制性嵌合受体包含四个胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,抑制性嵌合受体包含五个胞内信号传导结构域。

[0460] 在一些实施方案中,免疫调节细胞选自以下组成的组:T细胞、CD8+ T细胞、CD4+ T细胞、 γ δ T细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、调节性T细胞、病毒特异性T细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、自然杀伤(NK)细胞、B细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、先天性淋巴样细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、髓系细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突状细胞、ESC衍生细胞和iPSC衍生细胞。在一些实施方案中,免疫调节细胞是自然杀伤(NK)细胞。

[0461] 在一些实施方案中,细胞是自体的。在一些实施方案中,细胞是同种异体的。

[0462] 在一些实施方案中,免疫调节细胞包含嵌合抑制性受体,其中嵌合抑制性受体包含:胞外蛋白结合结构域(例如,胞外抗原结合结构域、胞外配体结合结构域、胞外受体结合结构域等);跨膜结构域,其中跨膜结构域可操作地连接至胞外蛋白结合结构域;和一个或多个胞内信号传导结构域,其中一个或多个胞内信号传导结构域可操作地连接至跨膜结构域,并且其中在蛋白(例如,配体、受体、抗原等)与嵌合抑制性受体结合之后,嵌合抑制性受体防止、减弱或抑制在细胞的表面上表达的肿瘤靶向嵌合受体的激活。在一些实施方案中,抑制性嵌合受体包含两个或更多个胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,抑制性嵌合受体包含三个或更多个胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,抑制性嵌合受体包含四个或更多个胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,抑制性嵌合受体包含五个或更多个胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,抑制性嵌合受体包含一个胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,抑制性嵌合受体包含两个胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,抑制性嵌合受体包含三个胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,抑制性嵌合受体包含四个胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,抑制性嵌合受体包含五个胞内信号传导结构域。

[0463] 在一些实施方案中,细胞还包含在细胞的表面上表达的肿瘤靶向嵌合受体。在一些实施方案中,嵌合抑制性受体经重组表达。

[0464] 在一些实施方案中,在蛋白(例如,配体、受体、抗原等)与嵌合抑制性受体结合之前,肿瘤靶向嵌合受体能够激活细胞。在一些实施方案中,在蛋白(例如,配体、受体、抗原等)与嵌合抑制性受体结合之后,嵌合抑制性受体压制激活细胞产生细胞因子。在一些实施方案中,在蛋白(例如,配体、受体、抗原等)与嵌合抑制性受体结合之后,嵌合抑制性受体压制对靶细胞的细胞介导的免疫反应,其中免疫反应通过免疫调节细胞的激活来诱导。在一些实施方案中,靶细胞是肿瘤细胞。在一些实施方案中,靶细胞是非肿瘤细胞。

[0465] 表达多种嵌合受体的细胞

[0466] 细胞可经修饰以表达本文所提供的抑制性嵌合受体。细胞也可经修饰以表达抑制性嵌合受体(例如,iCAR)和肿瘤靶向CAR(例如,aCAR)。如果细胞经修饰以表达至少一种抑制性嵌合受体和至少一种肿瘤靶向CAR,则细胞可表达多种抑制性和/或肿瘤靶向嵌合受体蛋白和/或多核苷酸。在一些实施方案中,细胞表达至少1种、至少2种、至少3种、至少4种、至少5种、至少6种、至少7种、至少8种、至少9种或至少10种或更多种抑制性嵌合受体多核苷酸和/或多肽。在一些实施方案中,细胞含有至少1种、至少2种、至少3种、至少4种、至少5种、至少6种、至少7种、至少8种、至少9种或至少10种或更多种肿瘤靶向嵌合受体多核苷酸和/或多肽。

[0467] 制备抑制性嵌合受体修饰的细胞的方法

[0468] 在一个方面,本公开提供了一种制备包含抑制性嵌合受体的修饰的免疫细胞以用于实验或治疗用途的方法。

[0469] 用于制备治疗抑制性嵌合受体修饰的细胞的离体程序是本领域已知的。例如,将细胞从哺乳动物(例如,人)分离并用表达本文所公开的抑制性嵌合受体的载体进行基因修饰(即,体外转导或转染)。可向哺乳动物接受者施用抑制性嵌合受体修饰的细胞以提供治疗益处。哺乳动物接受者可以是人,并且抑制性嵌合受体修饰的细胞对于接受者可以是自体的。可选地,细胞对于接受者可以是同种异体、同系或异种的。用于离体扩增造血干细胞和祖细胞的程序描述于美国专利号5,199,942(其以引用的方式并入本文)中并可应用于本公开的细胞。其他合适方法是本领域已知的,因此本公开不限于任何特定的离体扩增细胞的方法。简言之,免疫效应细胞(例如,T细胞、NK细胞)的离体培养和扩增包括:(1)从外周血收获物或骨髓外植体收集哺乳动物的CD34+造血干细胞和祖细胞;以及(2)离体扩增此类细胞。除美国专利号5,199,942中所描述的细胞生长因子之外,其他因子,诸如f1t3-L、IL-1、IL-3和c-kit配体,也可用于培养和扩增细胞。

[0470] 在一些实施方案中,方法包括将细胞群体(例如,在细胞培养基中)培养至期望细胞密度(例如,对于特定基于细胞的治疗来说足够的细胞密度)。在一些实施方案中,在不存在阻遏可阻遏蛋白酶活性的剂的情况下或在存在阻遏可阻遏蛋白酶活性的剂的情况下培养细胞群体。

[0471] 在一些实施方案中,将细胞群体培养一段时间,使得产生包含至少2倍起始群体细胞数目的扩增细胞群体。在一些实施方案中,将细胞群体培养一段时间,使得产生包含至少4倍起始群体细胞数目的扩增细胞群体。在一些实施方案中,将细胞群体培养一段时间,使得产生包含至少16倍起始群体细胞数目的扩增细胞群体。

[0472] 使用方法

[0473] 还涵盖用于治疗免疫相关病症诸如癌症的方法。所述方法包括施用如本文所述的抑制性嵌合受体或免疫反应性抑制性嵌合受体修饰的细胞。在一些实施方案中,可向受试者全身或直接提供包含嵌合受体或基因修饰的表达此类嵌合受体的免疫反应性细胞的组合物以用于治疗增殖性病症,诸如癌症。

[0474] 在一个方面,本公开提供了一种制备包含至少一种抑制性嵌合受体的修饰的免疫细胞(例如,抑制性嵌合受体(iCAR)修饰的细胞)以用于实验或治疗用途的方法。在一些实施方案中,修饰的免疫细胞还包含至少一种肿瘤靶向嵌合受体(例如,iCAR和aCAR修饰的细胞)。

[0475] 在一些方面,使用方法涵盖防止、减弱或抑制由在免疫调节细胞的表面上表达的嵌合受体诱导的细胞介导的反应的方法,其包括:将免疫调节细胞工程化成在免疫调节细胞的表面上表达本文所述的嵌合受体,其中在同源蛋白(例如,配体、受体、抗原等)与嵌合抑制性受体结合之后,胞内信号传导结构域防止、减弱或抑制嵌合受体的激活。在其他方面中,使用方法涵盖防止、减弱或抑制在免疫调节细胞的表面上表达的嵌合受体的激活的方法,其包括:在适于嵌合抑制性受体结合同源蛋白(例如,配体、受体、抗原等)的条件下,将如本文所述的分离的细胞或组合物与嵌合抑制性受体的同源蛋白(例如,配体、受体、抗原等)接触,其中在蛋白(例如,配体、受体、抗原等)与嵌合抑制性受体结合之后,胞内信号传导结构域防止、减弱或抑制嵌合受体的激活。

[0476] 一般而言,抑制性嵌合受体用于防止、减弱、抑制或压制通过肿瘤靶向嵌合受体(例如,激活性CAR)引发的免疫反应。例如,免疫调节细胞表达识别蛋白靶标1(例如,非肿瘤靶配体、受体、抗原等)的抑制性嵌合受体和识别蛋白靶标2(例如,肿瘤靶抗原)的肿瘤靶向嵌合受体。当示例性免疫调节细胞接触靶细胞时,抑制性嵌合受体和肿瘤靶向嵌合受体可或不与其同源蛋白结合。在靶细胞是表达蛋白靶标1和蛋白靶标2的非肿瘤细胞的示例性情况下,抑制性嵌合受体和肿瘤靶向的受体可被激活。在此类情况下,抑制性嵌合受体的激活导致防止、减弱或抑制肿瘤靶向嵌合受体信号传导,并且免疫调节细胞未被激活。类似地,在靶细胞是仅表达蛋白靶标1的非肿瘤细胞的示例性情况下,仅抑制性嵌合受体可被激活。相比之下,在靶细胞是仅表达蛋白靶标2的肿瘤细胞的示例性情况下,抑制性嵌合受体可被激活,同时肿瘤靶向嵌合受体可被激活,从而产生导致免疫调节细胞的激活的信号传导。

[0477] 通过肿瘤靶向嵌合受体引发的免疫反应的减弱可以是肿瘤靶向嵌合受体的激活的降低或减少、肿瘤靶向嵌合受体的信号传导的降低或减少或者免疫调节细胞的激活的降低或减少。与肿瘤靶向嵌合受体的激活、信号传导或者与缺乏抑制性嵌合受体的免疫调节细胞相比的免疫调节细胞的激活相比,抑制性嵌合受体可使肿瘤靶向嵌合受体的激活、通过肿瘤靶向嵌合受体的信号传导或通过肿瘤靶向的受体的免疫调节细胞的激活减弱1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或更多。在一些实施方案中,减弱是指在肿瘤靶向嵌合受体被激活之后,其活性的降低或减少。

[0478] 通过肿瘤靶向嵌合受体引发的免疫反应的防止可以是肿瘤靶向嵌合受体的激活的抑制或降低、肿瘤靶向嵌合受体的信号传导的抑制或降低或者免疫调节细胞的激活的抑制或降低。与肿瘤靶向嵌合受体的激活、信号传导或者与缺乏抑制性嵌合受体的免疫调节细胞相比的免疫调节细胞的激活相比,抑制性嵌合受体可使肿瘤靶向嵌合受体的激活、通过肿瘤靶向嵌合受体的信号传导或通过肿瘤靶向的受体的免疫调节细胞的激活防止约1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或更多。在一些实施方案中,防止是指在肿瘤靶向嵌合受体被激活之前阻断其活性。

[0479] 通过肿瘤靶向嵌合受体引发的免疫反应的抑制可以是肿瘤靶向嵌合受体的激活的抑制或降低、肿瘤靶向嵌合受体的信号传导的抑制或降低或者免疫调节细胞的激活的抑制或降低。与肿瘤靶向嵌合受体的激活、信号传导或者与缺乏抑制性嵌合受体的免疫调节

细胞相比的免疫调节细胞的激活相比,抑制性嵌合受体可使肿瘤靶向嵌合受体的激活、通过肿瘤靶向嵌合受体的信号转导或通过肿瘤靶向的受体的免疫调节细胞的激活抑制约1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或更多。在一些实施方案中,抑制是指在肿瘤靶向嵌合受体被激活之前或之后,其活性的降低或减少。

[0480] 通过肿瘤靶向嵌合受体引发的免疫反应的压制可为肿瘤靶向嵌合受体的激活的抑制或降低、肿瘤靶向嵌合受体的信号转导的抑制或降低或者免疫调节细胞的激活的抑制或降低。与肿瘤靶向嵌合受体的激活、信号转导或者与缺乏抑制性嵌合受体的免疫调节细胞相比的免疫调节细胞的激活相比,抑制性嵌合受体可使肿瘤靶向嵌合受体的激活、通过肿瘤靶向嵌合受体的信号转导或通过肿瘤靶向的受体的免疫调节细胞的激活压制约1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或更多。在一些实施方案中,压制是指在肿瘤靶向嵌合受体激活之前或之后,其活性的降低或减少。

[0481] 免疫反应可以是激活的免疫调节细胞产生和分泌细胞因子或趋化因子。免疫反应可以是对靶细胞的细胞介导的免疫反应。

[0482] 在一些实施方案中,嵌合抑制性受体能够压制激活的免疫调节细胞产生细胞因子。在一些实施方案中,嵌合抑制性受体能够压制对靶细胞的细胞介导的免疫反应,其中免疫反应通过免疫调节细胞的激活来诱导。

[0483] 在一个方面,本公开提供一种类型的细胞疗法,在所述细胞疗法中,免疫细胞经基因修饰以表达本文所提供的抑制性嵌合受体,并且向有需要的受试者施用修饰的免疫细胞。

[0484] 因此,在一些实施方案中,所述方法包括向需要基于细胞的疗法的受试者递送扩增细胞群体的细胞以治疗疾患或病症。在一些实施方案中,受试者是人受试者。在一些实施方案中,疾患或病症是自身免疫疾患。在一些实施方案中,疾患或病症是免疫相关疾患。在一些实施方案中,疾患或病症是癌症(例如,原发性癌症或转移性癌症)。在一些实施方案中,癌症是固体癌症。在一些实施方案中,癌症是液体癌症,诸如髓系病症。

[0485] 药物组合物

[0486] 可将抑制性嵌合受体或免疫反应性细胞配制在药物组合物中。本公开的药物组合物可包含如本文所述的抑制性嵌合受体(例如,iCAR)或免疫反应性细胞(例如,多个抑制性嵌合受体表达细胞)以及一种或多种药学上或生理学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。此类材料应该是无毒的并且应不干扰活性成分的功效。载体或其他材料的精确性质可取决于施用途径,例如,经口、静脉内、皮肤或皮下、经鼻、肌肉内、腹膜内途径。在某些实施方案中,将组合物直接注射至所关注的器官(例如,受病症影响的器官)中。可选地,可例如通过向循环系统(例如,肿瘤脉管系统)中施用来将组合物间接地提供至所关注的器官。可在施用组合物之前、期间或之后提供扩增和分化剂以增加体外或体内T细胞、NK细胞或CTL细胞产生。

[0487] 在某些实施方案中,组合物是包含基因修饰的细胞(诸如免疫反应性细胞或其祖细胞)和药学上可接受的载体的药物组合物。施用可以是自体或异体的。例如,可从一名受试者获得免疫反应性细胞或祖细胞,并且将其施用于同一受试者或不同的相容受试者。在一些实施方案中,本公开的免疫反应性细胞或其后代可衍生自外周血细胞(例如,体内、离

体或体外衍生)并经由局部注射来施用,包括导管施用、全身注射、局部注射、静脉内注射或胃肠外施用。当施用本公开的治疗组合物(例如,含有本公开的基因修饰的细胞的药物组合物)时,其一般以单位剂量可注射形式(溶液、混悬液、乳液)进行配制。

[0488] 本公开的某些方面涉及包含本公开的嵌合受体或表达此类嵌合受体的基因修饰的细胞(例如,本公开的免疫反应细胞)的组合物的制剂。在一些实施方案中,包含基因修饰的细胞的本公开的组合物可作为无菌液体制剂提供,包括但不限于等渗水溶液、混悬液、乳液、分散液和粘性组合物,其可缓冲至选定pH。液体制剂通常比凝胶、其他粘性组合物和固体组合物更易于制备。另外,液体组合物可更便于施用,尤其通过注射来施用。在一些实施方案中,粘性组合物可被配制在适当粘度范围内以提供与特定组织的较长接触时间。液体或粘性组合物可包含载体,其可以是含有例如水、盐水、磷酸缓冲盐水、多元醇(例如,甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)和它们的合适混合物的溶剂或分散介质。

[0489] 用于经口施用的药物组合物可以是片剂、胶囊、散剂或液体形式。片剂可包括固体载体诸如明胶或佐剂。液体药物组合物一般包括液体载体,诸如水、石油、动物或植物油、矿物油或合成油。可包括生理盐水溶液、右旋糖或其他糖溶液或二醇诸如乙二醇、丙二醇或聚乙二醇。

[0490] 对于静脉内、皮肤或皮下注射或者在患处注射,活性成分将是胃肠外可接受的水溶液的形式,其无热原并具有合适的pH、等渗性和稳定性。本领域相关技术人员能够使用例如等渗媒介物诸如氯化钠注射液、林格式注射液、乳酸林格氏注射液来制备合适的溶液。需要时,可包括防腐剂、稳定剂、缓冲液、抗氧化剂和/或其他添加剂。在一些实施方案中,本公开的组合物可以是等渗的,即,渗透压与血液和泪液相同。在一些实施方案中,期望等渗性可使用例如氯化钠、右旋糖、硼酸、酒石酸钠、丙二醇或其他无机或有机溶质来实现。

[0491] 在一些实施方案中,本公开的组合物还可包括各种可增强组合物的稳定性和无菌性的添加剂。此类添加剂的实例包括但不限于抗微生物防腐剂、抗氧化剂、螯合剂和缓冲液。在一些实施方案中,可通过包含各种抗细菌和抗真菌剂(包括但不限于对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、山梨酸等)中任一种来防止微生物污染。可通过使用合适的延迟吸收的剂(诸如单硬脂酸铝和明胶)来实现本公开的可注射药物制剂的延长吸收。在一些实施方案中,可通过将本公开的基因修饰的细胞掺入按需要具有各种量任何其他成分的足够量的适当溶剂来制备无菌可注射溶液。此类组合物可与合适的载体、稀释剂或赋形剂诸如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等混合。在一些实施方案中,组合物也可冻干。根据施用途和期望制备物,组合物可含有辅助物质,诸如润湿剂、分散剂、pH缓冲剂和抗微生物剂。

[0492] 在一些实施方案中,本公开的制剂的组分被选择为化学惰性的并且不影响本公开的基因修饰的细胞的活力或功效。

[0493] 关于本公开的基因修饰的细胞的治疗用途的一个考虑因素是实现最佳功效所需的细胞的数量。在一些实施方案中,要施用的细胞的数量将因正被治疗的受试者而不同。在某些实施方案中,向有需要的受试者施用的基因修饰的细胞的数量范围可以是 1×10^4 个细胞至 1×10^{10} 个细胞。在一些实施方案中,视为有效剂量的细胞的精确数量可基于每个受试者的个别因素,包括其体型、年龄、性别、体重和特定受试者的状况。本领域技术人员可基于本公开和本领域的知识而容易地确定剂量。

[0494] 无论是多肽、抗体、核酸、小分子还是要给予个体的其他根据本发明的药学上可用

的化合物,施用优选以“治疗有效量”或“预防有效量”(正如可能出现的情况那样,但是可将预防视为治疗),这足以显示出对个体有益。所施用的实际量和施用速率和时程将取决于正治疗的蛋白聚集疾病的性质和严重性。治疗处方,例如剂量决定等,在全科医师和其他医生的责任范围内,并且通常考虑到要治疗的病症、个别患者的状况、递送部位、施用方法和医师已知的其他因素。上文提及的技术和方案的实例可在Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,Osol, A. (编),1980中找到。

[0495] 组合物可单独施用或与其他治疗剂组合根据要治疗的疾患同时或依序施用。

[0496] 药盒

[0497] 本公开的某些方面涉及用于治疗 and/或预防癌症或其他疾病(例如,免疫相关或自身免疫病症)的药盒。在某些实施方案中,药盒包括治疗或预防组合物,其包含有效量的一种或多种本公开的嵌合受体、本公开的分离的核酸、本公开的载体和/或本公开的细胞(例如,免疫反应性细胞)。在一些实施方案中,药盒包含无菌容器。在一些实施方案中,此类容器可以是盒子、安瓿、瓶子、小瓶、管、袋、囊、泡罩包装或本领域已知的其他合适容器。容器可由塑胶、玻璃、层压纸、金属箔或适于盛装药物的其他材料制成。

[0498] 在一些实施方案中,提供了治疗或预防组合物,以及用于将治疗或预防组合物向患有癌症或免疫相关病症或处于发展出所述病症的风险中的受试者施用的说明书。在一些实施方案中,说明书可包括关于组合物用于治疗 and/或预防病症的用途的信息。在一些实施方案中,说明书包括但不限于治疗或预防性组合物的描述、剂量时间表、用于治疗或预防病症或其症状的施用时间表、注意事项、警告、适应症、禁忌症、剂量过量信息、不良反应、动物药理学、临床研究和/或参考文献。在一些实施方案中,说明书可直接在容器(存在时)上、或者作为贴在容器上的标签、或者作为在容器中或与其一起供应的单独纸张、小册子、卡片或折页来印刷。

[0499] 另外的实施方案

[0500] 下文提供了描述本发明的特定实施方案的枚举实施方案:

[0501] 实施方案1:一种嵌合抑制性受体,其包含:

[0502] -胞外蛋白结合结构域,

[0503] -跨膜结构域,其中所述跨膜结构域可操作地连接至所述胞外蛋白结合结构域,和

[0504] -胞内信号传导结构域,其中所述胞内信号传导结构域可操作地连接至所述跨膜结构域;并且

[0505] 其中所述胞内信号传导结构域能够防止、减弱或抑制在免疫调节细胞上表达的肿瘤靶向嵌合受体的激活。

[0506] 实施方案2:如实施方案1所述的嵌合抑制性受体,其中所述胞内信号传导结构域衍生自选自以下组成的组的蛋白: BTLA、PD-1、CTLA4、TIM3、KIR3DL1、LIR1、NKG2A、TIGIT 和LAG3。

[0507] 实施方案3:如实施方案1或实施方案2所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域和所述胞内信号传导结构域衍生自相同蛋白。

[0508] 实施方案4:如实施方案3所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域还包含相同蛋白的胞外结构域的至少一部分。

[0509] 实施方案5:如实施方案1或实施方案2所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构

域衍生自第一蛋白,并且所述胞内信号传导结构域衍生自与所述第一蛋白不同的第二蛋白。

[0510] 实施方案6:如实施方案1-5中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述胞内信号传导结构域衍生自BTLA。

[0511] 实施方案7:如实施方案6所述的嵌合抑制性受体,其中所述胞内信号传导结构域包含与RRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCL EENKPGIVYASLNHSVIGPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS (SEQ ID NO:3) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。

[0512] 实施方案8:如实施方案6所述的嵌合抑制性受体,其中所述胞内信号传导结构域包含氨基酸序列RRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGS EVYSNPCL EENKPGIVYASLNHSVIGPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS (SEQ ID NO:3)。

[0513] 实施方案9:如实施方案1-5中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述胞内信号传导结构域衍生自LIR1。

[0514] 实施方案10:如实施方案9的嵌合抑制性受体,其中所述胞内信号传导结构域包含与LRHRRQGHWTSTQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPAADAQEENLYAAVKHTQPEDGVEMDTRSPHDED PQAVTYAEVKHSRPRREMASPPSPLSGEFLDTKDRQAEEDRQMDTEAAASEAPQDVTYAQLHSLTLRREATEPPPS QEGPSPAVPSIYATLAIH (SEQ ID NO:50) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。

[0515] 实施方案11:如实施方案9所述的嵌合抑制性受体,其中所述胞内信号传导结构域包含氨基酸序列LRHRRQGHWTSTQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPAADAQEENLYAAVKHTQPEDG VEMDTRSPHDED PQAVTYAEVKHSRPRREMASPPSPLSGEFLDTKDRQAEEDRQMDTEAAASEAPQDVTYAQLHSL TLRREATEPPPSQEGPSPAVPSIYATLAIH (SEQ ID NO:50)。

[0516] 实施方案12:如实施方案1-5中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述胞内信号传导结构域衍生自KIR3DL1。

[0517] 实施方案13:如实施方案12所述的嵌合抑制性受体,其中所述胞内信号传导结构域包含与HLWCSNKNAAVMDQEPAGNRTANSEDSDEQDPEEVTYAQLDHCVFTQRKITRPSQRPKTPPTDTILY TELPNAKPRSKVVSCP (SEQ ID NO:66) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。

[0518] 实施方案14:如实施方案12所述的嵌合抑制性受体,其中所述胞内信号传导结构域包含氨基酸序列HLWCSNKNAAVMDQEPAGNRTANSEDSDEQDPEEVTYAQLDHCVFTQRKITRPSQRPKT PPTDTILYTELPNAKPRSKVVSCP (SEQ ID NO:66)。

[0519] 实施方案15:如实施方案1-5中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述胞内信号传导结构域衍生自PD-1。

[0520] 实施方案16:如实施方案15所述的嵌合抑制性受体,其中所述胞内信号传导结构域包含与CSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFVSDYQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFSPGMGT SSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL (SEQ ID NO:1) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、

至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。

[0521] 实施方案17:如实施方案15所述的嵌合抑制性受体,其中所述胞内信号传导结构域包含氨基酸序列CSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFVSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSMGMTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL (SEQ ID NO:1)。

[0522] 实施方案18:如实施方案1-5中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述胞内信号传导结构域衍生自CTLA4。

[0523] 实施方案19:如实施方案18所述的嵌合抑制性受体,其中所述胞内信号传导结构域包含与AVLSKMLKKRSPLTTGVGVKMPPEPECEKQFQPYFIPIN (SEQ ID NO:67) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。

[0524] 实施方案20:如实施方案18所述的嵌合抑制性受体,其中所述胞内信号传导结构域包含氨基酸序列AVLSKMLKKRSPLTTGVGVKMPPEPECEKQFQPYFIPIN (SEQ ID NO:67)。

[0525] 实施方案21:如实施方案1-20中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域衍生自选自自由以下组成的组的蛋白:BTLA、CD8、CD28、CD3 δ 、CD4、4-1BB、OX40、ICOS、2B4、CD25、CD7、LAX、LAT、PD-1、CTLA4、TIM3、KIR3DL1、LIR1、NKG2A、TIGIT和LAG3。

[0526] 实施方案22:如实施方案1-20中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体包含衍生自BTLA的跨膜结构域。

[0527] 实施方案23:如实施方案22所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域包含与LLPLGGLPLLITTCFCLFCCL (SEQ ID NO:12) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。

[0528] 实施方案24:如实施方案22所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域包含氨基酸序列LLPLGGLPLLITTCFCLFCCL (SEQ ID NO:12)。

[0529] 实施方案25:如实施方案22-24中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域还包含所述BTLA胞外结构域的至少一部分。

[0530] 实施方案26:如实施方案1-20中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体包含衍生自PD-1的跨膜结构域。

[0531] 实施方案27:如实施方案26所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域包含与VGVVGGLLGSLVLLVWVLAVI (SEQ ID NO:60) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。

[0532] 实施方案28:如实施方案26所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域包含氨基酸序列VGVVGGLLGSLVLLVWVLAVI (SEQ ID NO:60)。

[0533] 实施方案29:如实施方案26-28中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域还包含所述PD-1胞外结构域的至少一部分。

[0534] 实施方案30:如实施方案1-20中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体包含衍生自CTLA4的跨膜结构域。

[0535] 实施方案31:如实施方案30所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域包含与

DFLLWILAAVSSGLFFYSFLLT (SEQ ID NO:68) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。

[0536] 实施方案32:如实施方案30所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域包含氨基酸序列DFLLWILAAVSSGLFFYSFLLT (SEQ ID NO:68)。

[0537] 实施方案33:如实施方案30-32中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域还包含所述CTLA4胞外结构域的至少一部分。

[0538] 实施方案34:如实施方案1-20中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体包含衍生自KIR3DL1的跨膜结构域。

[0539] 实施方案35:如实施方案34所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域包含与ILIGTSVVIILFILLFFLL (SEQ ID NO:69) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。

[0540] 实施方案36:如实施方案34所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域包含氨基酸序列ILIGTSVVIILFILLFFLL (SEQ ID NO:69)。

[0541] 实施方案37:如实施方案34-36中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域还包含所述KIR3DL1胞外结构域的至少一部分。

[0542] 实施方案38:如实施方案1-20中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体包含衍生自LIR1的跨膜结构域。

[0543] 实施方案39:如实施方案38所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域包含与VIGILVAVILLLLLLLLLLFLI (SEQ ID NO:59) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。

[0544] 实施方案40:如实施方案38所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域包含氨基酸序列VIGILVAVILLLLLLLLLLFLI (SEQ ID NO:59)。

[0545] 实施方案41:如实施方案38-40中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域还包含所述LIR1胞外结构域的至少一部分。

[0546] 实施方案42:如实施方案1-20中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体包含衍生自CD28的跨膜结构域。

[0547] 实施方案43:如实施方案42所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域包含与FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO:11) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。

[0548] 实施方案44:如实施方案42所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域包含氨基酸序列FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO:11)。

[0549] 实施方案45:如实施方案42-44中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域还包含所述CD28胞外结构域的至少一部分。

[0550] 实施方案46:如实施方案1-45中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述蛋白不在靶肿瘤上表达。

[0551] 实施方案47:如实施方案1-46中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述蛋白在非肿瘤细胞上表达。

[0552] 实施方案48:如实施方案47所述的嵌合抑制性受体,其中所述蛋白在衍生自选自以下组成的组的组织的非肿瘤细胞上表达:脑、神经元组织、内分泌、内皮、骨、骨髓、免疫系统、肌肉、肺、肝、胆囊、胰腺、胃肠道、肾脏、膀胱、雄性生殖器、雌性生殖器、脂肪、软组织和皮肤。

[0553] 实施方案49:如实施方案1-48中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述胞外蛋白结合结构域包含配体结合结构域。

[0554] 实施方案50:如实施方案1-48中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述胞外蛋白结合结构域包含受体结合结构域。

[0555] 实施方案51:如实施方案1-48中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述胞外蛋白结合结构域包含抗原结合结构域。

[0556] 实施方案52:如实施方案51所述的嵌合抑制性受体,其中所述抗原结合结构域包含抗体、抗体的抗原结合片段、F(ab)片段、F(ab')片段、单链可变片段(scFv)或单结构域抗体(sdAb)。

[0557] 实施方案53:如实施方案51所述的嵌合抑制性受体,其中所述抗原结合结构域包含单链可变片段(scFv)。

[0558] 实施方案54:如实施方案53所述的嵌合抑制性受体,其中每个scFv包含重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)。

[0559] 实施方案55:如实施方案54所述的嵌合抑制性受体,其中所述VH和VL由肽接头分开。

[0560] 实施方案56:如实施方案55所述的嵌合抑制性受体,其中所述肽接头包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:GGG(SEQ ID NO:15)、GGSGGS(SEQ ID NO:16)、GGSGGSGGS(SEQ ID NO:17)、GGSGGSGGSGGS(SEQ ID NO:18)、GGSGGSGGSGGSGGS(SEQ ID NO:19)、GGGS(SEQ ID NO:20)、GGGSGGS(SEQ ID NO:21)、GGGSGGSGGS(SEQ ID NO:22)、GGGSGGSGGSGGGS(SEQ ID NO:23)、GGGSGGSGGSGGSGGGS(SEQ ID NO:24)、GGGS(SEQ ID NO:25)、GGGSGGSGGS(SEQ ID NO:26)、GGGSGGSGGSGGSGGGS(SEQ ID NO:27)、GGGSGGSGGSGGSGGSGGGS(SEQ ID NO:28)和GGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGGS(SEQ ID NO:29)。

[0561] 实施方案57:如实施方案54-56中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述scFv包含结构VH-L-VL或VL-L-VH,其中VH是所述重链可变结构域,L是所述肽接头,并且VL是所述轻链可变结构域。

[0562] 实施方案58:如实施方案1-57中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域物理连接至所述胞外蛋白结合结构域。

[0563] 实施方案59:如实施方案1-58中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述胞内信号传导结构域物理连接至所述跨膜结构域。

[0564] 实施方案60:如实施方案1-57中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域物理连接至所述胞外蛋白结合结构域,并且所述胞内信号传导结构域物理连接至所述跨膜结构域。

[0565] 实施方案61:如实施方案1-60中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述胞外蛋

白结合结构域具有高结合亲和力。

[0566] 实施方案62:如实施方案1-60中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述胞外蛋白结合结构域具有低结合亲和力。

[0567] 实施方案63:如实施方案1-62中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体能够压制激活的免疫调节细胞产生细胞因子。

[0568] 实施方案64:如实施方案1-63中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体能够压制对靶细胞的细胞介导的免疫反应,其中所述免疫反应通过所述免疫调节细胞的激活来诱导。

[0569] 实施方案65:如实施方案1-64中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述靶细胞是肿瘤细胞。

[0570] 实施方案66:如实施方案1-65中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述胞内信号传导结构域包含一个或多个修饰。

[0571] 实施方案67:如实施方案66所述的嵌合抑制性受体,其中相对于其他方面相同的未修饰受体,所述一个或多个修饰调节所述嵌合抑制性受体的敏感性。

[0572] 实施方案68:如实施方案66所述的嵌合抑制性受体,其中相对于其他方面相同的未修饰受体,所述一个或多个修饰增加所述嵌合抑制性受体的敏感性。

[0573] 实施方案69:如实施方案66所述的嵌合抑制性受体,其中相对于其他方面相同的未修饰受体,所述一个或多个修饰降低所述嵌合抑制性受体的敏感性。

[0574] 实施方案70:如实施方案66-69中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中相对于其他方面相同的未修饰受体,所述一个或多个修饰调节所述嵌合抑制性受体的效力。

[0575] 实施方案71:如实施方案70所述的嵌合抑制性受体,其中相对于其他方面相同的未修饰受体,所述一个或多个修饰增加所述嵌合抑制性受体的效力。

[0576] 实施方案72:如实施方案70所述的嵌合抑制性受体,其中相对于其他方面相同的未修饰受体,所述一个或多个修饰降低所述嵌合抑制性受体的效力。

[0577] 实施方案73:如实施方案66-72中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中相对于其他方面相同的未修饰受体,当在免疫调节细胞上表达时,所述一个或多个修饰调节所述肿瘤靶向嵌合受体的激活的基础防止、减弱或抑制。

[0578] 实施方案74:如实施方案73所述的嵌合抑制性受体,其中相对于其他方面相同的未修饰受体,所述一个或多个修饰降低基础防止、减弱或抑制。

[0579] 实施方案75:如实施方案73所述的嵌合抑制性受体,其中相对于其他方面相同的未修饰受体,所述一个或多个修饰增加基础防止、减弱或抑制。

[0580] 实施方案76:如实施方案1-75中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体还包含定位在所述胞外蛋白结合结构域与所述跨膜结构域之间并且可操作地连接至所述胞外蛋白结合结构域和所述跨膜结构域中的每个的间隔区。

[0581] 实施方案77:如实施方案1-75中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体还包含定位在所述胞外蛋白结合结构域与所述跨膜结构域之间并且物理连接至所述胞外蛋白结合结构域和所述跨膜结构域中的每个的间隔区。

[0582] 实施方案78:如实施方案76或实施方案77所述的嵌合抑制性受体,其中所述间隔区衍生自选自自由以下组成的组的蛋白:CD8 α 、CD4、CD7、CD28、IgG1、IgG4、Fc γ RIII α 、LNGFR

和PDGFR。

[0583] 实施方案79:如实施方案76或实施方案77所述的嵌合抑制性受体,其中所述间隔区包含选自以下组成的组的序列:AAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKP (SEQ ID NO:31)、ESKYGPPCPCP (SEQ ID NO:32)、ESKYGPPAPSAP (SEQ ID NO:33)、ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:34)、EPKSCDKTHTCP (SEQ ID NO:35)、AAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN (SEQ ID NO:36)、TTTPAPRPP TPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO:37)、ACPTGLYTHSGECCACNLGEGVAQ PCGANQTVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTECVGLQSMSAPCVEADDAVCRCAYGYYQDETTGRCEACRVCEAG SGLVFSCQDKQNTVCECPDGTYSDEADAEC (SEQ ID NO:38)、ACPTGLYTHSGECCACNLGEGVAQPCGAN QTVC (SEQ ID NO:39)、AVGQDTQEVIVPHSLPFKV (SEQ ID NO:40)和TTTPAPRPPTPAPTIALQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDQTTPGERSLPAFYPGTSGSCSGSLSLP (SEQ ID NO:70)。

[0584] 实施方案80:如实施方案76-79中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述间隔区调节所述嵌合抑制性受体的敏感性。

[0585] 实施方案81:如实施方案80所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述间隔区增加所述嵌合抑制性受体的敏感性。

[0586] 实施方案82:如实施方案80所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述间隔区降低所述嵌合抑制性受体的敏感性。

[0587] 实施方案83:如实施方案76-82中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述间隔区调节所述嵌合抑制性受体的效力。

[0588] 实施方案84:如实施方案83所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述间隔区增加所述嵌合抑制性受体的效力。

[0589] 实施方案85:如实施方案83所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述间隔区降低所述嵌合抑制性受体的效力。

[0590] 实施方案86:如实施方案76-85中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,当在免疫调节细胞上表达时,所述间隔区调节所述肿瘤靶向嵌合受体的激活的基础防止、减弱或抑制。

[0591] 实施方案87:如实施方案86所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述间隔区降低基础防止、减弱或抑制。

[0592] 实施方案88:如实施方案86所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述间隔区增加基础防止、减弱或抑制。

[0593] 实施方案89:如实施方案1-88中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体还包含定位在所述跨膜结构域与所述胞内信号传导结构域之间并且可操作地连接至所述跨膜结构域和所述胞内信号传导结构域中的每个的胞内间隔区。

[0594] 实施方案90:如实施方案1-88中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体还包含定位在所述跨膜结构域与所述胞内信号传导结构域之间并且物理连接至所述跨膜结构域和所述胞内信号传导结构域中的每个的胞内间隔区。

[0595] 实施方案91:如实施方案89或实施方案90所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺

乏所述胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述胞内间隔区调节所述嵌合抑制性受体的敏感性。

[0596] 实施方案92:如实施方案91所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述胞内间隔区增加所述嵌合抑制性受体的敏感性。

[0597] 实施方案93:如实施方案91所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述胞内间隔区降低所述嵌合抑制性受体的敏感性。

[0598] 实施方案94:如实施方案89-93中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述胞内间隔区调节所述嵌合抑制性受体的效力。

[0599] 实施方案95:如实施方案94所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述胞内间隔区增加所述嵌合抑制性受体的效力。

[0600] 实施方案96:如实施方案94所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述胞内间隔区降低所述嵌合抑制性受体的效力。

[0601] 实施方案97:如实施方案89-96中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,当在免疫调节细胞上表达时,所述胞内间隔区调节所述肿瘤靶向嵌合受体的激活的基础防止、减弱或抑制。

[0602] 实施方案98:如实施方案97所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述胞内间隔区降低基础防止、减弱或抑制。

[0603] 实施方案99:如实施方案97所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述胞内间隔区增加基础防止、减弱或抑制。

[0604] 实施方案100:如实施方案1-99中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述抑制性嵌合受体还包含酶促抑制性结构域。

[0605] 实施方案101:如实施方案100所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述酶促抑制性结构域的其他方面相同的嵌合抑制性受体,当在免疫调节细胞上表达时,所述酶促抑制性结构域能够防止、减弱或抑制肿瘤靶向嵌合受体的激活。

[0606] 实施方案102:如实施方案100或实施方案101所述的嵌合抑制性受体,其中所述酶促抑制性结构域包含酶催化结构域。

[0607] 实施方案103:如实施方案102所述的嵌合抑制性受体,其中所述酶催化结构域衍生自选自自由以下组成的组的酶:CSK、SHP-1、PTEN、CD45、CD148、PTP-MEG1、PTP-PEST、c-CBL、CBL-b、PTPN22、LAR、PTPH1、SHIP-1和RasGAP。

[0608] 实施方案104:如实施方案100-103中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述酶促抑制性结构域包含一个或多个修饰,相对于缺乏所述一个或多个修饰的其他方面相同的酶促抑制性结构域,所述一个或多个修饰调节基础防止、减弱或抑制。

[0609] 实施方案105:如实施方案104所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述酶促抑制性结构域的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述一个或多个修饰降低所述嵌合抑制

性受体的基础防止、减弱或抑制。

[0610] 实施方案106:如实施方案104所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述酶促抑制性结构域的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述一个或多个修饰增加所述嵌合抑制性受体的基础防止、减弱或抑制。

[0611] 实施方案107:如实施方案1-106中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述肿瘤靶向嵌合受体是肿瘤靶向嵌合抗原受体(CAR)或工程化T细胞受体(TCR)。

[0612] 实施方案108:如实施方案1-107中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述免疫调节细胞选自自由以下组成的组:T细胞、CD8⁺ T细胞、CD4⁺ T细胞、 γ δ T细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、调节性T细胞、病毒特异性T细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、自然杀伤(NK)细胞、B细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、先天性淋巴样细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、髓系细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突状细胞、ESC衍生细胞和iPSC衍生细胞。

[0613] 实施方案109:如实施方案1-108中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述免疫调节细胞是自然杀伤(NK)细胞。

[0614] 实施方案110:一种嵌合抑制性受体,其包含:

[0615] -胞外蛋白结合结构域,

[0616] -跨膜结构域,其中所述跨膜结构域可操作地连接至所述胞外蛋白结合结构域,和

[0617] -两个或更多个胞内信号传导结构域,其中所述两个或更多个胞内信号传导结构域可操作地连接至所述跨膜结构域;并且

[0618] 其中所述两个或更多个胞内信号传导结构域中的至少一个能够防止、减弱或抑制在免疫调节细胞上表达的肿瘤靶向嵌合受体的激活。

[0619] 实施方案111:如实施方案110所述的嵌合抑制性受体,其中所述两个或更多个胞内信号传导结构域各自衍生自选自自由以下组成的组的蛋白:BTLA、PD-1、CTLA4、TIM3、KIR3DL1、LIR1、NKG2A、TIGIT和LAG3。

[0620] 实施方案112:如实施方案110或实施方案111所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域衍生自与所述两个或更多个胞内信号传导结构域之一相同的蛋白。

[0621] 实施方案113:如实施方案112所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域还包含相同蛋白的胞外结构域的至少一部分。

[0622] 实施方案114:如实施方案110或实施方案111所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域衍生自第一蛋白,并且所述两个或更多个胞内信号传导结构域衍生自与所述第一蛋白不同的蛋白。

[0623] 实施方案115:如实施方案110-114中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述两个或更多个胞内信号传导结构域中的至少一个衍生自BTLA。

[0624] 实施方案116:如实施方案115所述的嵌合抑制性受体,其中所述两个或更多个胞内信号传导结构域中的至少一个包含与RRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASLNHSVIGPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS (SEQ ID NO:3)有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。

[0625] 实施方案117:如实施方案115所述的嵌合抑制性受体,其中所述两个或更多个胞

内信号传导结构域中的至少一个包含氨基酸序列RRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEAST RQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASLNHSVIGPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS (SEQ ID NO:3)。

[0626] 实施方案118:如实施方案110-114中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述两个或更多个胞内信号传导结构域中的至少一个衍生自LIR1。

[0627] 实施方案119:如实施方案118所述的嵌合抑制性受体,其中所述两个或更多个胞内信号传导结构域中的至少一个包含与LRHRRQGKHWSTQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPA ADAQEENLYAAVKHTQPEDGVEMDTRSPHDEDPAVTYAEVKHSRPRREMASPPSPLSGEFLDTKDRQAEEDRQMD TEAAASEAPQDVTYAQLHSLTLRREATEPPPSQEGPSPAVPSIYATLAIH (SEQ ID NO:50) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。

[0628] 实施方案120:如实施方案118所述的嵌合抑制性受体,其中所述两个或更多个胞内信号传导结构域中的至少一个包含氨基酸序列LRHRRQGKHWSTQRKADFQHPAGAVGPEPTDRG LQWRSSPAADAQEENLYAAVKHTQPEDGVEMDTRSPHDEDPAVTYAEVKHSRPRREMASPPSPLSGEFLDTKDRQ AEEDRQMDTEAAASEAPQDVTYAQLHSLTLRREATEPPPSQEGPSPAVPSIYATLAIH (SEQ ID NO:50)。

[0629] 实施方案121:如实施方案110-114中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述两个或更多个胞内信号传导结构域中的至少一个衍生自PD-1。

[0630] 实施方案122:如实施方案121所述的嵌合抑制性受体,其中所述两个或更多个胞内信号传导结构域中的至少一个包含与CSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGE LDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL (SEQ ID NO:1) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。

[0631] 实施方案123:如实施方案121所述的嵌合抑制性受体,其中所述两个或更多个胞内信号传导结构域中的至少一个包含氨基酸序列CSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGE LDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL (SEQ ID NO:1)。

[0632] 实施方案124:如实施方案110-114中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述两个或更多个胞内信号传导结构域中的至少一个衍生自KIR3DL1。

[0633] 实施方案125:如实施方案124所述的嵌合抑制性受体,其中所述两个或更多个胞内信号传导结构域中的至少一个包含与HLWCSNKKNAAVMDQEPAGNRTANSEDSDEQDPEEVTYAQLD HCVFTQRKITRPSQRPKTPPTDTILYTELPNAKPRSKVVSCP (SEQ ID NO:66) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。

[0634] 实施方案126:如实施方案124所述的嵌合抑制性受体,其中所述两个或更多个胞内信号传导结构域中的至少一个包含氨基酸序列HLWCSNKKNAAVMDQEPAGNRTANSEDSDEQDPE EVTYAQLDHCVFTQRKITRPSQRPKTPPTDTILYTELPNAKPRSKVVSCP (SEQ ID NO:66)。

[0635] 实施方案127:如实施方案110-114中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述两个或更多个胞内信号传导结构域中的至少一个衍生自CTLA4。

[0636] 实施方案128:如实施方案127所述的嵌合抑制性受体,其中所述两个或更多个胞内信号传导结构域中的至少一个包含与AVLSKMLKKRSPLTTGVGVKMPPEPECEKQFPYFIPIN

(SEQ ID NO:67) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。

[0637] 实施方案129:如实施方案127所述的嵌合抑制性受体,其中所述胞内信号传导结构域包含氨基酸序列AVSLSKMLKKRSPLTTGVGVKMPPEPECEKQFQPYFIPIN (SEQ ID NO:67)。

[0638] 实施方案130:如实施方案110-129中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域衍生自选自自由以下组成的组的蛋白:BTLA、CD8、CD28、CD3 δ 、CD4、4-1BB、OX40、ICOS、2B4、CD25、CD7、LAX、LAT、PD-1、CTLA4、TIM3、KIR3DL1、LIR1、NKG2A、TIGIT和LAG3。

[0639] 实施方案131:如实施方案110-130中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体包含衍生自BTLA的跨膜结构域。

[0640] 实施方案132:如实施方案131所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域包含与LLPLGGLPLLITTCFCLFCCL (SEQ ID NO:12) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。

[0641] 实施方案133:如实施方案131所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域包含氨基酸序列LLPLGGLPLLITTCFCLFCCL (SEQ ID NO:12)。

[0642] 实施方案134:如实施方案131-133中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域还包含所述BTLA胞外结构域的至少一部分。

[0643] 实施方案135:如实施方案110-130中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体包含衍生自LIR1的跨膜结构域。

[0644] 实施方案136:如实施方案135所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域包含与VIGILVAVILLLLLLLLLLFLI (SEQ ID NO:59) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。

[0645] 实施方案137:如实施方案135所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域包含氨基酸序列VIGILVAVILLLLLLLLLLFLI (SEQ ID NO:59)。

[0646] 实施方案138:如实施方案135-137中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域还包含所述LIR1胞外结构域的至少一部分。

[0647] 实施方案139:如实施方案110-130中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体包含衍生自PD-1的跨膜结构域。

[0648] 实施方案140:如实施方案139所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域包含与VGVVGGLLGSLVLLVWVLAVI (SEQ ID NO:60) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。

[0649] 实施方案141:如实施方案139所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域包含氨基酸序列VGVVGGLLGSLVLLVWVLAVI (SEQ ID NO:60)。

[0650] 实施方案142:如实施方案139-141中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域还包含所述PD-1胞外结构域的至少一部分。

[0651] 实施方案143:如实施方案110-130中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述嵌

合抑制性受体包含衍生自CTLA4的跨膜结构域。

[0652] 实施方案144:如实施方案143所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域包含与DFLLWILAAVSSGLFFYSFLLT (SEQ ID NO:68) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。

[0653] 实施方案145:如实施方案143所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域包含氨基酸序列DFLLWILAAVSSGLFFYSFLLT (SEQ ID NO:68)。

[0654] 实施方案146:如实施方案143-145中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域还包含所述CTLA4胞外结构域的至少一部分。

[0655] 实施方案147:如实施方案110-130中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体包含衍生自KIR3DL1的跨膜结构域。

[0656] 实施方案148:如实施方案147所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域包含与ILIGTSVVIILFILLFFLL (SEQ ID NO:69) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。

[0657] 实施方案149:如实施方案147所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域包含氨基酸序列ILIGTSVVIILFILLFFLL (SEQ ID NO:69)。

[0658] 实施方案150:如实施方案147-149中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域还包含所述KIR3DL1胞外结构域的至少一部分。

[0659] 实施方案151:如实施方案110-130中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体包含衍生自CD28的跨膜结构域。

[0660] 实施方案152:如实施方案151所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域包含与FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO:X) 有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。

[0661] 实施方案153:如实施方案151所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域包含氨基酸序列FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO:X)。

[0662] 实施方案154:如实施方案151-153中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域还包含所述CD28胞外结构域的至少一部分。

[0663] 实施方案155:如实施方案110-154中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体包含衍生自LIR1的第一胞内信号传导结构域和衍生自BTLA的第二胞内信号传导结构域。

[0664] 实施方案156:如实施方案110-154中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体包含衍生自LIR1的第一胞内信号传导结构域和衍生自PD-1的第二胞内信号传导结构域。

[0665] 实施方案157:如实施方案110-154中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体包含衍生自LIR1的第一胞内信号传导结构域和衍生自KIR3DL1的第二胞内信号传导结构域。

[0666] 实施方案158:如实施方案110-154中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述嵌

合抑制性受体包含衍生自LIR1的第一胞内信号传导结构域和衍生自LIR1的第二胞内信号传导结构域。

[0667] 实施方案159:如实施方案155-158中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述第一胞内信号传导结构域还包含衍生自LIR1的跨膜结构域。

[0668] 实施方案160:如实施方案110-154中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体包含衍生自BTLA的第一胞内信号传导结构域和衍生自LIR1的第二胞内信号传导结构域。

[0669] 实施方案161:如实施方案110-154中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体包含衍生自BTLA的第一胞内信号传导结构域和衍生自PD-1的第二胞内信号传导结构域。

[0670] 实施方案162:如实施方案160或实施方案161所述的嵌合抑制性受体,其中所述第一胞内信号传导结构域还包含衍生自BTLA的跨膜结构域。

[0671] 实施方案163:如实施方案110-154中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体包含衍生自PD-1的第一胞内信号传导结构域和衍生自LIR1的第二胞内信号传导结构域。

[0672] 实施方案164:如实施方案110-154中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体包含衍生自PD-1的第一胞内信号传导结构域和衍生自BTLA的第二胞内信号传导结构域。

[0673] 实施方案165:如实施方案163或实施方案164所述的嵌合抑制性受体,其中所述第一胞内信号传导结构域还包含衍生自PD-1的跨膜结构域。

[0674] 实施方案166:如实施方案110-154中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体包含衍生自KIR3DL1的第一胞内信号传导结构域和衍生自LIR1的第二胞内信号传导结构域。

[0675] 实施方案167:如实施方案110-154中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体包含衍生自KIR3DL1的第一胞内信号传导结构域和衍生自KIR3DL1的第二胞内信号传导结构域。

[0676] 实施方案168:如实施方案166或实施方案167所述的嵌合抑制性受体,其中所述第一胞内信号传导结构域还包含衍生自KIR3DL1的跨膜结构域。

[0677] 实施方案169:如实施方案110-168中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述蛋白不在靶肿瘤上表达。

[0678] 实施方案170:如实施方案110-169中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述蛋白在非肿瘤细胞上表达。

[0679] 实施方案171:如实施方案170所述的嵌合抑制性受体,其中所述蛋白在衍生自选自以下组成的组的组织的非肿瘤细胞上表达:脑、神经元组织、内分泌、内皮、骨、骨髓、免疫系统、肌肉、肺、肝、胆囊、胰腺、胃肠道、肾脏、膀胱、雄性生殖器、雌性生殖器、脂肪、组织和皮肤。

[0680] 实施方案172:如实施方案110-171中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述胞外蛋白结合结构域包含配体结合结构域。

[0681] 实施方案173:如实施方案110-171中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述胞

外蛋白结合结构域包含受体结合结构域。

[0682] 实施方案174:如实施方案110-171中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述胞外蛋白结合结构域包含抗原结合结构域。

[0683] 实施方案175:如实施方案174所述的嵌合抑制性受体,其中所述抗原结合结构域包含抗体、抗体的抗原结合片段、F(ab)片段、F(ab')片段、单链可变片段(scFv)或单结构域抗体(sdAb)。

[0684] 实施方案176:如实施方案174所述的嵌合抑制性受体,其中所述抗原结合结构域包含单链可变片段(scFv)。

[0685] 实施方案177:如实施方案176所述的嵌合抑制性受体,其中每个scFv包含重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)。

[0686] 实施方案178:如实施方案177所述的嵌合抑制性受体,其中所述VH和VL由肽接头分开。

[0687] 实施方案179:如实施方案178所述的嵌合抑制性受体,其中所述肽接头包含选自自由以下组成的组的氨基酸序列:GGG(SEQ ID NO:15)、GGSGG(SEQ ID NO:16)、GGSGGSGG(SEQ ID NO:17)、GGSGGSGGSGG(SEQ ID NO:18)、GGSGGSGGSGGSGG(SEQ ID NO:19)、GGGS(SEQ ID NO:20)、GGGSGGGS(SEQ ID NO:21)、GGGSGGGS GGGS(SEQ ID NO:22)、GGGSGGGS GGGS GGGS(SEQ ID NO:23)、GGGSGGGS GGGS GGGS GGGS(SEQ ID NO:24)、GGGS(SEQ ID NO:25)、GGGSGGGS(SEQ ID NO:26)、GGGSGGGS GGGS(SEQ ID NO:27)、GGGSGGGS GGGS GGGS(SEQ ID NO:28)和GGGSGGGS GGGS GGGS GGGS GGGS(SEQ ID NO:29)。

[0688] 实施方案180:如实施方案177-179中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述scFv包含结构VH-L-VL或VL-L-VH,其中VH是所述重链可变结构域,L是所述肽接头,并且VL是所述轻链可变结构域。

[0689] 实施方案181:如实施方案110-180中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域物理连接至所述胞外蛋白结合结构域。

[0690] 实施方案182:如实施方案110-181中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述两个或更多个胞内信号传导结构域之一物理连接至所述跨膜结构域。

[0691] 实施方案183:如实施方案110-171中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜结构域物理连接至所述胞外蛋白结合结构域,并且所述两个或更多个胞内信号传导结构域之一物理连接至所述跨膜结构域。

[0692] 实施方案184:如实施方案110-183中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述胞外蛋白结合结构域具有高结合亲和力。

[0693] 实施方案185:如实施方案110-183中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述胞外蛋白结合结构域具有低结合亲和力。

[0694] 实施方案186:如实施方案110-185中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体能够压制激活的免疫调节细胞产生细胞因子。

[0695] 实施方案187:如实施方案110-186中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体能够压制对靶细胞的细胞介导的免疫反应,其中所述免疫反应通过所述免疫调节细胞的激活来诱导。

[0696] 实施方案188:如实施方案110-187中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述靶

细胞是肿瘤细胞。

[0697] 实施方案189:如实施方案110-188中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述两个或更多个胞内信号传导结构域中的至少一个包含一个或多个修饰。

[0698] 实施方案190:如实施方案189所述的嵌合抑制性受体,其中相对于其他方面相同的未修饰受体,所述一个或多个修饰调节所述嵌合抑制性受体的敏感性。

[0699] 实施方案191:如实施方案189所述的嵌合抑制性受体,其中相对于其他方面相同的未修饰受体,所述一个或多个修饰增加所述嵌合抑制性受体的敏感性。

[0700] 实施方案192:如实施方案189所述的嵌合抑制性受体,其中相对于其他方面相同的未修饰受体,所述一个或多个修饰降低所述嵌合抑制性受体的敏感性。

[0701] 实施方案193:如实施方案189-192中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中相对于其他方面相同的未修饰受体,所述一个或多个修饰调节所述嵌合抑制性受体的效力。

[0702] 实施方案194:如实施方案193所述的嵌合抑制性受体,其中相对于其他方面相同的未修饰受体,所述一个或多个修饰增加所述嵌合抑制性受体的效力。

[0703] 实施方案195:如实施方案193所述的嵌合抑制性受体,其中相对于其他方面相同的未修饰受体,所述一个或多个修饰降低所述嵌合抑制性受体的效力。

[0704] 实施方案196:如实施方案189-195中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中相对于其他方面相同的未修饰受体,当在免疫调节细胞上表达时,所述一个或多个修饰调节所述肿瘤靶向嵌合受体的激活的基础防止、减弱或抑制。

[0705] 实施方案197:如实施方案196所述的嵌合抑制性受体,其中相对于其他方面相同的未修饰受体,所述一个或多个修饰降低基础防止、减弱或抑制。

[0706] 实施方案198:如实施方案196所述的嵌合抑制性受体,其中相对于其他方面相同的未修饰受体,所述一个或多个修饰增加基础防止、减弱或抑制。

[0707] 实施方案199:如实施方案110-198中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体还包含定位在所述胞外蛋白结合结构域与所述跨膜结构域之间并且可操作地连接至所述胞外蛋白结合结构域和所述跨膜结构域中的每个的间隔区。

[0708] 实施方案200:如实施方案110-198中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体还包含定位在所述胞外蛋白结合结构域与所述跨膜结构域之间并且物理连接至所述胞外蛋白结合结构域和所述跨膜结构域中的每个的间隔区。

[0709] 实施方案201:如实施方案199或实施方案200所述的嵌合抑制性受体,其中所述间隔区衍生自选自自由以下组成的组的蛋白:CD8 α 、CD4、CD7、CD28、IgG1、IgG4、Fc γ RIII α 、LNGFR和PDGFR。

[0710] 实施方案202:如实施方案199或实施方案200所述的嵌合抑制性受体,其中所述间隔区包含选自由以下组成的组的序列:AAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKP (SEQ ID NO:31)、ESKYGPPCPSCP (SEQ ID NO:32)、ESKYGPPAPSAP (SEQ ID NO:33)、ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:34)、EPKSCDKTHTCP (SEQ ID NO:35)、AAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPP TPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN (SEQ ID NO:36)、TTTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO:37)、ACPTGLYTHSGE CCKACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTECVGLQSMSAPCVEADDAVCRCAYGYYQDET TGRCEACRVCEAGSGLVFSQDKQNTVCEECPDGTYSDEADAEC (SEQ ID NO:38)、ACPTGLYTHSGECKAC

NLGEQVAQPCGANQTV (SEQ ID NO:39)、AVGQDTQEIVVPHSLPFKV (SEQ ID NO:40) 和TTTPAPRP PTPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDQTTPGERSSLPAFYPGTSGSCSGCGLSLP (SEQ ID NO:70)。

[0711] 实施方案203:如实施方案199-202中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述间隔区调节所述嵌合抑制性受体的敏感性。

[0712] 实施方案204:如实施方案203所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述间隔区增加所述嵌合抑制性受体的敏感性。

[0713] 实施方案205:如实施方案203所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述间隔区降低所述嵌合抑制性受体的敏感性。

[0714] 实施方案206:如实施方案199-205中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述间隔区调节所述嵌合抑制性受体的效力。

[0715] 实施方案207:如实施方案206所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述间隔区增加所述嵌合抑制性受体的效力。

[0716] 实施方案208:如实施方案206所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述间隔区降低所述嵌合抑制性受体的效力。

[0717] 实施方案209:如实施方案199-208中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,当在免疫调节细胞上表达时,所述间隔区调节所述肿瘤靶向嵌合受体的激活的基础防止、减弱或抑制。

[0718] 实施方案210:如实施方案209所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述间隔区降低基础防止、减弱或抑制。

[0719] 实施方案211:如实施方案209所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述间隔区增加基础防止、减弱或抑制。

[0720] 实施方案212:如实施方案110-211中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体还包含定位在所述跨膜结构域与所述两个或更多个胞内信号传导结构域之一之间并且可操作地连接至所述跨膜结构域和所述胞内信号传导结构域中的每个的胞内间隔区。

[0721] 实施方案213:如实施方案110-211中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体还包含定位在所述跨膜结构域与所述两个或更多个胞内信号传导结构域之一之间并且物理连接至所述跨膜结构域和所述胞内信号传导结构域中的每个的胞内间隔区。

[0722] 实施方案214:如实施方案212或实施方案213所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述胞内间隔区调节所述嵌合抑制性受体的敏感性。

[0723] 实施方案215:如实施方案214所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述胞内间隔区增加所述嵌合抑制性受体的敏感性。

[0724] 实施方案216:如实施方案214所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述胞内

间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述胞内间隔区降低所述嵌合抑制性受体的敏感性。

[0725] 实施方案217:如实施方案212-216中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述胞内间隔区调节所述嵌合抑制性受体的效力。

[0726] 实施方案218:如实施方案217所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述胞内间隔区增加所述嵌合抑制性受体的效力。

[0727] 实施方案219:如实施方案217所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述胞内间隔区降低所述嵌合抑制性受体的效力。

[0728] 实施方案220:如实施方案212-219中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,当在免疫调节细胞上表达时,所述胞内间隔区调节所述肿瘤靶向嵌合受体的激活的基础防止、减弱或抑制。

[0729] 实施方案221:如实施方案220所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述胞内间隔区降低基础防止、减弱或抑制。

[0730] 实施方案222:如实施方案220所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述胞内间隔区增加基础防止、减弱或抑制。

[0731] 实施方案223:如实施方案110-222中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述抑制性嵌合受体还包含酶促抑制性结构域。

[0732] 实施方案224:如实施方案223所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述酶促抑制性结构域的其他方面相同的嵌合抑制性受体,当在免疫调节细胞上表达时,所述酶促抑制性结构域能够防止、减弱或抑制肿瘤靶向嵌合受体的激活。

[0733] 实施方案225:如实施方案223或实施方案224所述的嵌合抑制性受体,其中所述酶促抑制性结构域包含酶催化结构域。

[0734] 实施方案226:如实施方案225所述的嵌合抑制性受体,其中所述酶催化结构域衍生自选自以下组成的组的酶:CSK、SHP-1、PTEN、CD45、CD148、PTP-MEG1、PTP-PEST、c-CBL、CBL-b、PTPN22、LAR、PTPH1、SHIP-1和RasGAP。

[0735] 实施方案227:如实施方案223-226中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述酶促抑制性结构域包含一个或多个修饰,相对于缺乏一个或多个修饰的其他方面相同的酶促抑制性结构域,所述一个或多个修饰调节基础防止、减弱或抑制。

[0736] 实施方案228:如实施方案227所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述酶促抑制性结构域的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述一个或多个修饰降低所述嵌合抑制性受体的基础防止、减弱或抑制。

[0737] 实施方案229:如实施方案227所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述酶促抑制性结构域的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述一个或多个修饰增加所述嵌合抑制性受体的基础防止、减弱或抑制。

[0738] 实施方案230:如实施方案110-229中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述肿瘤靶向嵌合受体是肿瘤靶向嵌合抗原受体(CAR)或工程化T细胞受体(TCR)。

[0739] 实施方案231:如实施方案110-230中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述免疫调节细胞选自自由以下组成的组:T细胞、CD8⁺ T细胞、CD4⁺ T细胞、 γ δ T细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、调节性T细胞、病毒特异性T细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、自然杀伤(NK)细胞、B细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、先天性淋巴样细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、髓系细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突状细胞、ESC衍生细胞和iPSC衍生细胞。

[0740] 实施方案232:如实施方案110-230中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述免疫调节细胞是自然杀伤(NK)细胞。

[0741] 实施方案233:一种组合物,其包含如实施方案1-232中任一项所述的嵌合抑制性受体和药学上可接受的载体。

[0742] 实施方案234:一种工程化核酸,其编码如实施方案1-232中任一项所述的嵌合抑制性受体。

[0743] 实施方案235:一种表达载体,其包含如实施方案234所述的工程化核酸。

[0744] 实施方案236:一种分离的免疫调节细胞,其包含如实施方案234所述的工程化核酸或如实施方案235所述的表达载体。

[0745] 实施方案237:一种组合物,其包含如实施方案234所述的工程化核酸或如所述实施方案235的表达载体和药学上可接受的载体。

[0746] 实施方案238:一种分离的免疫调节细胞,其包含如实施方案1-232中任一项所述的嵌合抑制性受体。

[0747] 实施方案239:如实施方案238所述的分离的细胞,其中所述细胞还包含在所述细胞的表面上表达的肿瘤靶向嵌合受体。

[0748] 实施方案240:如实施方案239所述的分离的细胞,其中相对于缺乏所述嵌合抑制性受体的其他方面相同的细胞,在所述蛋白与所述嵌合抑制性受体结合之后,所述嵌合抑制性受体防止、减弱或抑制所述肿瘤靶向嵌合受体的激活。

[0749] 实施方案241:一种分离的免疫调节细胞,其包含嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体包含:

[0750] -胞外蛋白结合结构域;

[0751] -跨膜结构域,其中所述跨膜结构域可操作地连接至所述胞外蛋白结合结构域,和

[0752] -胞内信号传导结构域,其中所述胞内信号传导结构域可操作地连接至所述跨膜结构域;并且

[0753] 其中相对于缺乏所述嵌合抑制性受体的其他方面相同的细胞,在所述蛋白与所述嵌合抑制性受体结合之后,所述嵌合抑制性受体防止、减弱或抑制在所述细胞的表面上表达的肿瘤靶向嵌合受体的激活。

[0754] 实施方案242:如实施方案241所述的分离的细胞,其中所述细胞还包含在所述细胞的表面上表达的肿瘤靶向嵌合受体。

[0755] 实施方案243:一种分离的免疫调节细胞,其包含:

[0756] (a) 嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体包含:

[0757] -胞外蛋白结合结构域,

[0758] -跨膜结构域,其中所述跨膜结构域可操作地连接至所述胞外蛋白结合结构域,和

[0759] -胞内信号传导结构域,其中所述胞内信号传导结构域可操作地连接至所述跨膜结构域;和

[0760] (b) 在所述细胞的表面上表达的肿瘤靶向嵌合受体,

[0761] 其中相对于缺乏所述嵌合抑制性受体的其他方面相同的细胞,在所述蛋白与所述嵌合抑制性受体结合之后,所述嵌合抑制性受体防止、减弱或抑制所述肿瘤靶向嵌合受体的激活。

[0762] 实施方案244:如实施方案241-243中任一项所述的分离的细胞,其中所述胞内信号传导结构域衍生自选自自由以下组成的组的蛋白:BTLA、PD-1、CTLA4、TIM3、KIR3DL1、LIR1、NKG2A、TIGIT和LAG3。

[0763] 实施方案245:如实施方案238-244中任一项所述的分离的细胞,其中所述嵌合抑制性受体经重组表达。

[0764] 实施方案246:如实施方案238-245中任一项所述的分离的细胞,其中所述嵌合抑制性受体由载体或所述细胞的基因组中的选定基因座表达。

[0765] 实施方案247:如实施方案238-246中任一项所述的分离的细胞,其中所述肿瘤靶向嵌合受体是嵌合抗原受体(CAR)或工程化T细胞受体。

[0766] 实施方案248:如实施方案238-247中任一项所述的细胞,其中在所述蛋白与所述嵌合抑制性受体结合之前,所述肿瘤靶向嵌合受体能够激活所述细胞。

[0767] 实施方案249:如实施方案238-248中任一项所述的细胞,其中在所述蛋白与所述嵌合抑制性受体结合之后,所述嵌合抑制性受体压制所述激活细胞产生细胞因子。

[0768] 实施方案250:如实施方案238-249中任一项所述的细胞,其中在所述蛋白与所述嵌合抑制性受体结合之后,所述嵌合抑制性受体压制对靶细胞的细胞介导的免疫反应,其中所述免疫反应通过所述免疫调节细胞的激活来诱导。

[0769] 实施方案251:如实施方案241-250中任一项所述的细胞,其中所述跨膜结构域物理连接至所述胞外蛋白结合结构域。

[0770] 实施方案252:如实施方案241-251中任一项所述的细胞,其中所述胞内信号传导结构域物理连接至所述跨膜结构域。

[0771] 实施方案253:如实施方案241-250中任一项所述的细胞,其中所述跨膜结构域物理连接至所述胞外蛋白结合结构域,并且所述胞内信号传导结构域物理连接至所述跨膜结构域。

[0772] 实施方案254:一种分离的免疫调节细胞,其包含嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体包含:

[0773] -胞外蛋白结合结构域;

[0774] -跨膜结构域,其中所述跨膜结构域可操作地连接至所述胞外蛋白结合结构域,和

[0775] -两个或更多个胞内信号传导结构域,其中所述两个或更多个胞内信号传导结构域可操作地连接至所述跨膜结构域;并且

[0776] 其中相对于缺乏所述嵌合抑制性受体的其他方面相同的细胞,在所述蛋白与所述嵌合抑制性受体结合之后,所述嵌合抑制性受体防止、减弱或抑制在所述细胞的表面上表达的肿瘤靶向嵌合受体的激活。

[0777] 实施方案255:如实施方案252所述的分离的细胞,其中所述细胞还包含在所述细

胞的表面上表达的肿瘤靶向嵌合受体。

[0778] 实施方案256:一种分离的免疫调节细胞,其包含:

[0779] (a) 嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体包含:

[0780] -胞外蛋白结合结构域,

[0781] -跨膜结构域,其中所述跨膜结构域可操作地连接至所述胞外蛋白结合结构域,和

[0782] -两个或更多个胞内信号传导结构域,其中所述两个或更多个胞内信号传导结构域可操作地连接至所述跨膜结构域;和

[0783] (b) 在所述细胞的表面上表达的肿瘤靶向嵌合受体,

[0784] 其中相对于缺乏所述嵌合抑制性受体的其他方面相同的细胞,在所述蛋白与所述嵌合抑制性受体结合之后,所述嵌合抑制性受体防止、减弱或抑制所述肿瘤靶向嵌合受体的激活。

[0785] 实施方案257:如实施方案254-256中任一项所述的分离的细胞,其中所述两个或更多个胞内信号传导结构域中的每个衍生自选自以下组成的组的蛋白: BTLA、PD-1、CTLA4、TIM3、KIR3DL1、LIR1、NKG2A、TIGIT和LAG3。

[0786] 实施方案258:如实施方案254-257中任一项所述的分离的细胞,其中所述嵌合抑制性受体经重组表达。

[0787] 实施方案259:如实施方案254-258中任一项所述的分离的细胞,其中所述嵌合抑制性受体由载体或所述细胞的基因组中的选定基因座表达。

[0788] 实施方案260:如实施方案254-259中任一项所述的分离的细胞,其中所述肿瘤靶向嵌合受体是嵌合抗原受体(CAR)或工程化T细胞受体。

[0789] 实施方案261:如实施方案254-260中任一项所述的细胞,其中在所述蛋白与所述嵌合抑制性受体结合之前,所述肿瘤靶向嵌合受体能够激活所述细胞。

[0790] 实施方案262:如实施方案254-261中任一项所述的分离的细胞,其中在所述蛋白与所述嵌合抑制性受体结合之后,所述嵌合抑制性受体压制所述激活细胞产生细胞因子。

[0791] 实施方案263:如实施方案254-262中任一项所述的分离的细胞,其中在所述蛋白与所述嵌合抑制性受体结合之后,所述嵌合抑制性受体压制对靶细胞的细胞介导的免疫反应,其中所述免疫反应通过所述免疫调节细胞的激活来诱导。

[0792] 实施方案264:如实施方案254-263中任一项所述的分离的细胞,其中所述跨膜结构域物理连接至所述胞外蛋白结合结构域。

[0793] 实施方案265:如实施方案254-264中任一项所述的分离的细胞,其中所述两个或更多个胞内信号传导结构域之一物理连接至所述跨膜结构域。

[0794] 实施方案266:如实施方案254-263中任一项所述的分离的细胞,其中所述跨膜结构域物理连接至所述胞外蛋白结合结构域,并且所述两个或更多个胞内信号传导结构域之一物理连接至所述跨膜结构域。

[0795] 实施方案267:如实施方案238-266中任一项所述的分离的细胞,其中所述靶细胞是肿瘤细胞。

[0796] 实施方案268:如实施方案238-267中任一项所述的分离的细胞,其中所述细胞选自以下组成的组:T细胞、CD8⁺ T细胞、CD4⁺ T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、调节性T细胞、病毒特异性T细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、自然杀伤(NK)细胞、B细胞、肿瘤浸

润淋巴细胞 (TIL)、先天性淋巴样细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、髓系细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突状细胞、ESC衍生细胞和iPSC衍生细胞。

[0797] 实施方案269:如实施方案238-267中任一项所述的分离的细胞,其中所述细胞是自然杀伤(NK)细胞。

[0798] 实施方案270:如实施方案238-269中任一项所述的分离的细胞,其中所述细胞是自体的。

[0799] 实施方案271:如实施方案238-269中任一项所述的分离的细胞,其中所述细胞是同种异体的。

[0800] 实施方案272:一种组合物,其包含如实施方案238-271中任一项所述的分离的细胞和药学上可接受的载体。

[0801] 实施方案273:一种防止、减弱或抑制由在免疫调节细胞的表面上表达的肿瘤靶向嵌合受体诱导的细胞介导的免疫反应的方法,其包括:

[0802] 将所述免疫调节细胞工程化成在所述免疫调节细胞的表面上表达如实施方案1-231中任一项所述的嵌合抑制性受体,

[0803] 其中在同源蛋白与所述嵌合抑制性受体结合之后,所述胞内信号传导结构域防止、减弱或抑制所述肿瘤靶向嵌合受体的激活。

[0804] 实施方案274:一种防止、减弱或抑制在免疫调节细胞的表面上表达的肿瘤靶向嵌合受体的激活的方法,其包括:

[0805] 将如实施方案238-271中任一项所述的分离的细胞或如实施方案272所述的组合物与所述嵌合抑制性受体的同源蛋白在适于所述嵌合抑制性受体结合所述同源蛋白的条件下接触,

[0806] 其中在所述蛋白与所述嵌合抑制性受体结合之后,所述胞内信号传导结构域防止、减弱或抑制所述肿瘤靶向嵌合受体的激活。

[0807] 实施方案275:如实施方案273或实施方案274所述的方法,其中所述肿瘤靶向嵌合受体是嵌合抗原受体(CAR)或工程化T细胞受体(TCR)。

[0808] 实施方案276:如实施方案275所述的方法,其中所述CAR结合一种或多种在肿瘤细胞的表面上表达的抗原。

[0809] 实施例

[0810] 以下是用于实施本发明的特定实施方案的实施例。实施例仅出于说明性目的提供,并不意图以任何方式限制本发明的范围。已经努力确保所使用的数字(例如,量、温度等)的准确性,但仍应允许一些实验误差和偏差。

[0811] 除非另外指定,否则本发明的实践将采用本领域技术范围内的蛋白质化学、生物化学、重组DNA技术和药理学的常规方法。文献中充分解释了此类技术。参见例如T.E.Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H.Freeman and Company, 1993); A.L.Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., 当前版本); Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第2版, 1989); *Methods In Enzymology* (S.Colowick和N.Kaplan编, Academic Press, Inc.); *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 第18版 (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey和Sundberg *Advanced Organic Chemistry* 第3版 (Plenum Press) A卷和B卷

(1992)。

[0812] 实施例1:具有各种信号传导结构域的抑制性CAR减少T细胞激活

[0813] 方法和材料

[0814] 抑制性嵌合受体和肿瘤靶向嵌合受体构建体

[0815] 合成了具有BTLA胞内信号传导结构域的抑制性嵌合受体(iCAR)。iCAR包含IgGκ分泌信号、具有FLAG标签的抗CD19 scFv、CD8铰链结构域、BTLA跨膜结构域和BTLA胞内信号传导结构域。将FLAG标签融合在iCAR中scFv(在信号序列之后)的N末端。还构建了两种激活性CAR(aCAR)。一种aCAR具有CD8分泌信号、具有Myc标签的抗CD19 scFv、CD8铰链结构域、CD28跨膜结构域和CD28与CD3δ胞内信号传导结构域。另一种aCAR具有CD8分泌信号、具有Myc标签的抗CD20 scFv、CD8铰链结构域、CD28跨膜结构域和CD28与CD3δ胞内信号传导结构域。将MYC标签融合在aCAR中scFv(在铰链之前)的C末端。在两种情况下,在scFv和将scFv连接至跨膜结构域的CD8铰链中使用3x(G4S)接头。

[0816] 共表达抗CD19-BTLA iCAR和抗CD19-CD28/CD3δaCAR的T细胞接触表达CD19的靶细胞的示例性图解示于图1A中。

[0817] 共表达抗CD19-BTLA iCAR和抗CD20-CD28/CD3δaCAR的T细胞接触表达CD19和CD20的靶细胞的示例性图解示于图4A中。

[0818] 还合成了具有与BTLA、PD1、CTLA4、KIR3DL1、NKG2A或LIR1胞内信号传导结构域和GFP融合的抗Her2 scFv的额外抑制性嵌合受体。如上文所述,这些抑制性嵌合受体具有FLAG标签和GFP荧光蛋白。还合成了包含与CD3δ胞内信号传导结构域和mCherry融合的抗Ax1 scFv的额外aCAR。表达Ax1、Her2、Ax1和Her2两者或Ax1和Her2都不表达的靶细胞以及共表达具有一般胞内抑制性结构域的抗Her2 iCAR和抗Ax1-CD3δaCAR的T细胞的示例性图解示于图7A中。

[0819] 表9提供了所合成的抑制性和肿瘤靶向嵌合受体的序列。

表 9-抑制性和肿瘤靶向嵌合受体

[0820]

氨基酸序列	SEQ ID NO:	描述
METDTLLLWVLLLWVPGSTGAGG SDYKDDDDKGGSEVKLQESGPGL VAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVS WIRQPPRKGLEWLGVWGSETTY YNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKM NSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSY AMDYWGQGTSVTVSSGGGGSGG GGSGGGGSDIQMTQTSSLSASLG DRV TISCRASQDISKYL N WYQQKP DGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGS GSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQ GNTLPYTFGGGKLEITTTTPAPRP PTPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDLLPLGGLPLLIT TCFCLFCCLRRHQGKQNELSDTAG REINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQ VLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSE VYSNPCLEENKPGIVYASLNHSVI GPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS	56	抗 CD19 BTLA 抑制性 嵌合受体
MALPVTALLLPLALLLHAARPEVK LQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGV SLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGV WGSETTYNSALKSRLTIKDNSK SQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKH YYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQT	57	抗 CD19-CD28 /CD3 ζ 肿瘤靶向的 CAR

	<p>SSLSASLGDRVTISCRASQDISKYL NWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQE DIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLE ITEQKLISEEDLNGAATTPAPRPP TPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDFWVLVVVGGVL ACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLH SDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAP PRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYK QGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGDPPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGHDGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPR</p>		
<p>[0821]</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPQV QLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS GYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEW MGFITPTTGYPEYNQKFKDRVTMT ADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYY CARRKVGKGVYYALDYWGQGT VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRTITCRASG NIHNYLAWYQQKPGKVPKLLIYN TKTLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTI SSLQPEDVATYYCQHFWSWPWF GGGTKVEIKEQKLISEEDLNGAAT TTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPEAC RPAAGGAVHTRGLDFACDFWVLV VVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRS KRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRK HYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSA DAPAYKQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR</p>	<p>58</p>	<p>抗 CD20-CD28/CD3ζ 肿瘤靶向 CAR</p>

[0822] 具有BTLA胞内信号传导结构域的抗CD19 BTLA抑制性嵌合受体的序列示出为SEQ ID NO:56。抗CD19-CD28/CD3 δ 肿瘤靶向的CAR的序列示出为SEQ ID NO:57。抗CD20-CD28/CD3 δ 肿瘤靶向的CAR的序列示出为SEQ ID NO:58。

[0823] 用抗CD19或抗CD20激活性CAR (aCAR) 和/或抗CD19抑制性CAR (iCAR) 的T细胞转导和扩增

[0824] 在第1天,将 1×10^6 个纯化的CD4+/CD8+ T细胞解冻并用 3×10^6 个Dynabead刺激,然后在具有0.2ug/mL IL-2的1mL Optimizer CTS T细胞扩增培养基(Gibco)中培养。在第2天,用编码抗CD19或抗CD20激活性CAR (aCAR) 和/或抗CD19抑制性CAR (iCAR) 的组成型表达的慢病毒(每个100K,如通过GoStix (Tekara)所量化)单一转导或共同转导T细胞。

[0825] 在第3天,通过磁铁去除Dynabead。对T细胞进行计数并传代(0.5×10^6 个细胞/

mL)。用PE缀合的抗MYC和BV421缀合的抗FLAG抗体(对应于aCAR和iCAR)对这些细胞的等分试样进行染色,并且使用LX CytoFlex流式细胞仪量化其转基因表达。在后续扩增中,使细胞每两天传代一次(0.5×10^6 个细胞/mL)。

[0826] 抗CD19/CD20 iCAR和aCAR的T细胞共培养测定

[0827] 在第8天,对T细胞进行计数并分配至96孔盘中以供共培养测定。每个孔含有 5×10^5 个用cell trace violet染料(Invitrogen)染色的Nalm6靶细胞和 5×10^5 个aCAR加或减iCAR T细胞。将共培养物在37°C与5% CO₂下孵育18小时。

[0828] 在第9天,用NIR活力染料(Biolegend)对共培养物中的细胞进行染色,并且使用LX CytoFlex流式细胞仪量化靶细胞的死亡百分比。将杀伤百分比归一化为仅靶细胞。使用磁性Luminex测定(Human magnetic Luminex assay)(R&D系统)和MAGPIX分析仪(Millipore Sigma)测量相同共培养物的培养基中的细胞因子。

[0829] 用抗Ax1-CD3 ζ 激活性CAR(aCAR)和/或抗Her2抑制性CAR(iCAR)的T细胞转导和扩增

[0830] 在第1天,将 1×10^6 个纯化的CD4⁺ T细胞解冻并用 3×10^6 个Dynabead刺激,然后在具有0.2ug/mL IL-2的1mL Optimizer CTS T细胞扩增培养基(Gibco)中培养。在第2天,用编码抗Ax1-CD3 δ -mCherry激活性CAR(aCAR)和/或单独地各种抗Her2抑制性CAR(iCAR)的组成型表达的慢病毒(每个100K,如通过GoStix(Tekara)所定量)单一转导或共同转导的T细胞。iCAR表达质粒包括嘌呤霉素抗性基因。

[0831] 在第4天,将T细胞与含有嘌呤霉素的培养基一起孵育以针对所指示的iCAR的表达进行选择。未用嘌呤霉素选择仅用抗Ax1-CD3 δ -mCherry激活性CAR转导的对照细胞。

[0832] 通过磁铁去除Dynabead。对T细胞进行计数并传代(0.5×10^6 个细胞/mL)。通过针对mCherry表达的流式细胞术检查抗Ax1-CD3 δ -mCherry aCAR的表达。在后续扩增中,使细胞每两天传代一次(0.5×10^6 个细胞/mL)。

[0833] 抗Her2 iCAR和抗Ax1 aCAR的T细胞共培养测定

[0834] 在第7天,对T细胞进行计数并分配至具有补充有人抗体的X-VIVO15培养基(Lonza)的96孔板中,以供共培养测定。每个孔含有 1×10^5 个表达Ax1、Her2、Ax1与Her2或Ax1或Her2(wt)的Nalm6靶细胞以及 1×10^5 个表达抗Ax1激活性CAR和所指示的抗Her2抑制性CAR的CD4⁺ T细胞。将仅表达抗Ax1激活性CAR的CD4⁺ T细胞用作对照。将共培养物在37°C与5% CO₂下孵育18小时。

[0835] 在第8天,收集上清液并经由ELISA分析细胞因子。

[0836] 结果

[0837] 抑制性嵌合受体和肿瘤靶向嵌合受体结合相同抗原

[0838] 评估了在表达结合相同抗原的iCAR和aCAR的细胞中iCAR减少或抑制T细胞激活的能力。共表达抗CD19-BTLA iCAR和抗CD19aCAR的T细胞接触表达CD19的靶细胞的示例性图解示于图1A中。用抗CD19-BTLA-iCAR和抗CD19 aCAR转导的细胞在原代T细胞中显示出高水平的表面表达。仅用aCAR转导的T细胞显示出高aCAR表达并且无iCAR表达(图1C),而用aCAR和iCAR共转导的T细胞显示出高水平的两种CAR蛋白表达(图1D)。阴性对照细胞未显示出任一构建体表达(图1B)。

[0839] 在与表达CD19的Nalm6细胞共培养之后,抗CD19-BTLA iCAR压制通过抗CD19 aCAR

(aCD19-28z) 诱导的T细胞细胞因子产生。表达CD19的Na1m6细胞与抗CD19 aCAR T细胞的共培养诱导TNF- α 、IFN- γ 和IL-2产生(分别参见图2A、图2B和图2C)。然而,在与Na1m6靶细胞共培养之后,表达抗CD19 aCAR和抗CD19 BTLA-iCAR的T细胞显著减少TNF- α 、IFN- γ 和IL-2产生(* $p > 0.05$, ** $p > 0.01$)。因此,iCAR与其在靶细胞上的同源配体的结合成功减少aCAR诱导的细胞因子产生。

[0840] 另外,在与表达CD19的Na1m6细胞共培养之后,抗CD19-BTLA iCAR压制通过抗CD19 aCAR诱导的T细胞细胞毒性。如图3中所示,表达CD19的靶Na1m6细胞与仅表达抗CD19 aCAR的T细胞的共培养导致靶细胞的显著杀伤。然而,当与Na1m6靶细胞共培养时,表达抗CD19 aCAR和抗CD19 BTLA iCAR的T细胞的细胞毒性统计学上显著降低。因此,iCAR与其在靶细胞上的同源配体的结合成功减少T细胞的aCAR诱导的细胞毒性活性。

[0841] 抑制性嵌合受体和肿瘤靶向嵌合受体结合不同抗原

[0842] 接下来,评估了在表达各自结合不同抗原的iCAR和aCAR的T细胞中iCAR减少或抑制T细胞激活的能力。共表达抗CD20-BTLA iCAR和抗CD19 aCAR的T细胞接触表达CD19和CD20的靶细胞的示例性图解示于图4A中。用抗CD19-BTLA iCAR和抗CD20 aCAR转导的细胞在原代T细胞中显示出高水平的表面表达。仅用aCAR转导的T细胞显示出高aCAR表达并且无iCAR表达(图4C),而用aCAR和iCAR共转导的T细胞显示出高水平的两种CAR蛋白表达(图4D)。阴性对照细胞未显示出任一构建体表达(图4B)。

[0843] 在与表达CD19和CD20的Raji细胞共培养之后,抗CD19-BTLA iCAR压制通过抗CD20 aCAR(aCD20-28z) 诱导的T细胞细胞因子产生。Raji细胞与抗CD20 aCAR T细胞的共培养诱导TNF- α 、IFN- γ 和IL-2产生(分别参见图5A、图5B和图5C)。然而,在与Raji靶细胞共培养之后,表达抗CD20 aCAR和抗CD19 BTLA iCAR的T细胞显著减少TNF- α 、IFN- γ 和IL-2产生(** $p > 0.01$, **** $p > 0.0001$)。因此,iCAR与其在靶细胞上的同源配体的结合成功减少aCAR诱导的细胞因子产生。

[0844] 因此,抗CD19-BTLA融合物(iCAR)在慢病毒转导的CD4⁺和CD8⁺ T细胞中以高水平表达而无随后的富集。重要的是,在共转导之后观察到高水平的iCAR和aCAR的共表达。另外,CD19-BTLA iCAR在两种情形下压制多种T细胞激活反应(细胞毒性和细胞因子TNF- α 、IFN- γ 和IL-2产生):i)当iCAR共享与aCAR(CD19受体)相同的细胞表面配体时;和ii)当iCAR和aCAR靶向不同的细胞表面配体(分别为CD19和CD20)时。

[0845] 额外iCAR结构域的功能

[0846] 图6示出了如通过mCherry的流式细胞术量化所确定的CD4⁺ T细胞中抗Ax1-CD3 δ -mCherry aCAR的表达。在抗性选择的T细胞的mCherry流式细胞术量化之前,经由嘌呤霉素抗性选择确定了所指示的抗Her2抑制性CAR的表达。不将仅表达抗Ax1-CD3 δ aCAR的对照细胞与嘌呤霉素一起孵育。因此,图6中所有双重转导的T细胞表达抗Ax1-CD3 δ aCAR和所指示的抗Her2抑制性CAR两者。

[0847] 在与表达单独Ax1、单独Her2或Ax1与Her2(HAML细胞)的靶Na1m6细胞一起孵育之后,评估了双重表达T细胞的IL-2(图7B)和IFN- γ (图7C)分泌。将表达Ax1或Her2的WT Na1m6细胞用作对照。

[0848] 如图7B中所示,表达抗Ax1-CD3 δ aCAR和抗Her2-PD-1iCAR或抗Her2-BTLA iCAR两者的细胞在IL-2分泌测定中具有最高特异性。在那些样品中,表达Ax1的Na1m6细胞诱导T细

胞的IL-2分泌,而表达Ax1和Her2的Na1m6细胞HAML不诱导IL-2分泌,指示抗Her2-PD-1iCAR或抗Her2-BTLA iCAR对T细胞中抗Ax1-CD3 δ aCAR的激活和信号传导的成功的抑制性活性。在接触HAML双重表达靶细胞之后,抗Her2-NKG2A iCAR还成功减少T细胞中抗Ax1-CD3 δ aCAR诱导的IL-2分泌。

[0849] 如图7C中所示,表达抗Ax1-CD3 δ aCAR和抗Her2-PD-1iCAR、抗Her2-KIR3DL1 iCAR或抗Her2-LIR1 iCAR两者的细胞在IFN- γ 分泌测定中具有最高特异性。在那些样品中,表达Ax1的Na1m6细胞诱导T细胞的IFN- γ 分泌,而表达Ax1和Her2的Na1m6细胞HAML不诱导IFN- γ 分泌,指示抗Her2-PD-1iCAR、抗Her2-KIR3DL1 iCAR或抗Her2-LIR1 iCAR对T细胞中抗Ax1-CD3 δ aCAR的激活和信号传导的成功的抑制性活性。在接触HAML双重表达靶细胞之后,抗Her2-BTLA iCAR和抗Her2-NKG2A iCAR还成功减少T细胞中抗Ax1-CD3 δ aCAR诱导的IFN- γ 分泌。

[0850] 实施例2:具有BTLA信号传导结构域的抑制性嵌合受体降低NK细胞激活

[0851] 材料和方法

[0852] 转导和扩增

[0853] 在第1天,将NK细胞以1:1比率与辐照aAPC (K562mIL-15/4-1BBL/CD86)一起共培养以驱动扩增。在第7天,通过在4 $^{\circ}$ 下用RetroNectin (Tekara, 7 μ g/孔)涂布24孔板的孔过夜来制备测定板。

[0854] 在第8天,根据制造商的方案,使用RetroNectin (MOI:5-10),用编码激活性CAR (aCAR)和/或抑制性CAR (iCAR)的组成型表达的慢病毒共转导NK细胞。aCAR是与CD3 δ 胞内信号传导结构域和mCherry融合的抗Ax1 scFv。iCAR是与BTLA胞内信号传导结构域和GFP融合的抗Her2 scFv。在第9天,重复转导。通过荧光显微镜术和流式细胞术检查aCAR和iCAR转基因的表达。

[0855] 共培养测定

[0856] 在递增的效应子与靶细胞的比率(E:T)下,将表达aCAR和/或iCAR的NK细胞与工程化Na1m6靶细胞(Her2 $^{+}$, Ax1 $^{+}$)一起孵育。根据制造商的说明书,使用LDH-GloTM细胞毒性测定(Promega)进行Na1m6靶细胞的NK细胞杀伤。

[0857] 结果

[0858] 在与抗Ax1 CD3 δ -aCAR共转导的情况下,抗Her2 BTLA-iCAR显示出在原代NK细胞中高水平的表面表达。图8A示出了非转导的NK细胞(阴性对照,上图)和仅用抗Her2-BTLA iCAR表达构建体转导的NK细胞(下图)的流式细胞术点图。图8B示出了非转导的细胞、用抗Her2-BTLA iCAR转导的细胞、用抗Ax1-CD3 δ aCAR转导的细胞和用iCAR与aCAR转导的细胞的免疫荧光显微镜术的GFP、mCherry和合并通道。如通过融合的mCherry或GFP报告蛋白的表达所示,单一和双重转导的细胞均显示出CAR的良好表达。非转导的细胞显示出在GFP、mCherry或合并通道中无信号。Her2-BTLA-GFP细胞显示出在GFP通道中的信号。Ax1-CD3 δ -mCherry细胞显示出在mCherry通道中的信号。Her2-BTLA-GFP和Ax1-CD3 δ -mCherry细胞显示出在合并通道中重叠的对应通道中的GFP和mCherry表达,指示双重转导的细胞成功表达Her2-BTLA-GFP iCAR和Ax1-CD3 δ -mCherry aCAR构建体。

[0859] 抗Her2-BTLA iCAR在原代NK细胞中压制抗Ax1-CD3 δ aCAR细胞毒性。图9A示出了在与单一表达或共表达抗Her2-BTLA iCAR和抗Ax1-CD3 δ aCAR的NK细胞一起孵育4小时之后,

靶Her2+Ax1+Nalm6细胞的细胞裂解百分比。与未转导的NK细胞相比,仅表达抗Her2-BTLA iCAR的NK细胞不诱导细胞裂解,而与未转导的NK细胞相比,仅表达抗Ax1-CD3 δ aCAR的NK细胞诱导显著量的细胞裂解。重要的是,与表达单独aCAR的NK细胞相比,共表达iCAR和aCAR的NK细胞诱导较低水平的靶细胞裂解。这指示,iCAR通过靶细胞上其同源配体的激活抑制aCAR的信号传导,并且因此抑制NK细胞的激活。在孵育8h之后看到类似的结果(图9B),在共转导的NK细胞中iCAR对aCAR信号传导的抑制性活性较大。

[0860] 因此,抗Her2-BTLA融合物(iCAR)在慢病毒转导的NK细胞中以高水平表达而无随后的富集。重要的是,在共转导之后看到iCAR和aCAR的共表达。此外,scFv-BTLA iCAR压制靶细胞的aCAR介导的细胞毒性。

[0861] 实施例3:LIR1和KIR3DL1抑制性嵌合受体在减少NK细胞激活方面的评估

[0862] 材料和方法

[0863] 转导和扩增

[0864] 用丝裂霉素C处理的K562饲养细胞(feeder cell)将NK细胞扩增10天,接着用7.5e5 pg单独aCAR病毒(SFFV FLAGtag aAx1 CD28-CD3z)或用7.5e5 pg iCAR1或iCAR2病毒(分别为SFFV aHer2V5tag LIR1 P2A PuroR或SFFV aHer2 V5tag KIR3DL1 P2A PuroR)进行转导。所评估的iCAR构建体的序列示于表10A中。所评估的aCAR构建体的序列示于表10B中。每个iCAR构建体形式从N末端至C末端为:信号序列1-信号序列2-scFv-标签-铰链-TM-抑制性细胞溶质结构域1-抑制性细胞溶质结构域2(如果存在)。aAx1 CD28-CD3z形式从N末端至C末端为:信号序列-标签-scFv-铰链-TM-胞内信号传导结构域1-胞内信号传导结构域2。4天之后,将嘌呤霉素添加至细胞中以供选择。

[0865] 再3天之后,通过将工程化NK细胞和亲代NALM6靶标(WT)或被工程化成过表达Ax1或Ax1和Her2两者的NALM6靶标共孵育来进行细胞毒性测定。对每个工程化NK细胞进行孵育,其中:(1)每种靶细胞类型单独地以25,000个NK细胞与50,000个NALM6细胞的比率,一式三份;或(2)作为25,000个单一抗原仅Ax1+和25,000个双重抗原Ax1+Her2+NALM6细胞与25,000个具有所指示的类型的NK细胞以1:1:1比率的混合物(用不同膜染料将双重抗原靶标染色,使其能够通过流动来区分)。孵育过夜之后,将细胞用活力染料染色并经由流式细胞术进行计数。将靶细胞减少量化为 $100\% \times (1 - \text{靶标数} / \text{靶标数}(NV))$ 。还从细胞毒性测定收集上清液并通过ELISA(Luminex)分析NK细胞分泌的细胞毒性因子(包括TNF α 、颗粒酶B和IFN γ)的存在。

[0866] 表10A-抗Her2 iCAR形式和结构域

[0867]

构建体(通过 ICD)	结构域	序列
KIR3DL1 LIR1	信号序列 1 (CD8) 氨基酸	MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 71)
KIR3DL1 LIR1	信号序列 1 (CD8) 核酸	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTG CCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGG CCG (SEQ ID NO: 72)
KIR3DL1 LIR1	信号序列 2 (pelB) 氨基酸	KYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA (SEQ ID NO: 73)
KIR3DL1 LIR1	信号序列 2 (pelB) 核酸	AAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGG ATTGTTATTACTCGCGGCCAGCCGGCCAT GGCC (SEQ ID NO: 74)
KIR3DL1 LIR1	scFv (具有 (G4S) ₃ 接 头的 aHer2 H3B1) 氨基酸	QVQLVQSGAEVKKPAGESLKISCKGSGYSFTS YWIAWVRQMPGKGLIYMGDSYDTKY SPSFQGQVTISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDS AVYFCARHDVGYCTDRTCAKWPEYFQHWG QGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQ PPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWY QQLPGTAPKLLIYDHTNRPAGVPDRFSGSKS GTSASLAISGFRSEDEADYYCASWDYTLTG

[0868]

		WVFGGGTKLTVLG (SEQ ID NO: 75)
KIR3DL1 LIR1	scFv (具有 (G4S) ₃ 接 头的 aHer2 H3B1) 核酸	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCAGA GGTGA AAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGA TCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTA CCAGCTACTGGATCGCCTGGGTGCGCCAG ATGCCCGGGAAAGGCCTGGAGTACATGGG GCTCATCTATCCTGGTGACTCTGACACCAA ATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCA CCATCTCAGTCGACAAGTCCGTCAGCACT GCCTACTTGCAATGGAGCAGTCTGAAGCC CTCGGACAGCGCCGTGTATTTTTGTGCGAG ACATGACGTGGGATATTGCACCGACCGGA CTTGCGCAAAGTGGCCTGAATACTTCCAG CATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGT CTCCTCAGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAG GTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGCAGTCT GTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCG GCCCCAGGACAGAAGGTCACCATCTCCTG CTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATA ATTATGTATCCTGGTACCAGCAGCTCCAG GAACAGCCCCAAACTCCTCATCTATGATC ACACCAATCGGCCCGCAGGGGTCCCTGAC CGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCA GCCTCCCTGGCCATCAGTGGGTTCCGGTCC GAGGATGAGGCTGATTACTGTGCCTCC TGGGACTACACCCTCTCGGGCTGGGTGTTT GGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGG T (SEQ ID NO: 76)
KIR3DL1 LIR1	标签 (V5 + NGAA 接 头) 氨基酸	GKPIPNPLLGLDSTNGAA (SEQ ID NO: 77)
KIR3DL1 LIR1	标签 (V5 + NGAA 接 头) 核酸	GGGAAGCCTATCCCGAACCCCTCTGTTGGG TCTCGATAGTACCAATGGGGCCGCA (SEQ ID NO: 78)
KIR3DL1 LIR1	铰链 (CD8) 氨基酸	TTTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPEACRPAAG GAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO: 37)
KIR3DL1 LIR1	铰链 (CD8) 核酸	ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAAC ACCGGCGCCACCATCGCGTTGCAGCCCC TGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCA GCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGG GGCTGGACTTCGCCTGTGAT (SEQ ID NO: 79)
KIR3DL1	TM (KIR3DL1)	ILIGTSVVIILFILLFFLL (SEQ ID NO: 69)

[0869]

	氨基酸	
KIR3DL1	TM (KIR3DL1) 核酸	ATCCTGATCGGGACAAGTGTAGTAATCAT ACTTTTCATACTCCTGCTCTTTTTTCTCTTG (SEQ ID NO: 81)
LIR1	TM (LIR1) 氨基酸	VIGILVAVILLLLLLLLLLFLI (SEQ ID NO: 59)
LIR1	TM (LIR1) 核酸	GTTATAGGGATCCTGGTGGCTGTCATACTC CTCTTGCTCCTCTTGTTGCTGCTTTTTTTGA TA (SEQ ID NO: 62)
KIR3DL1	抑制性细 胞溶质结 构域 1 (KIR3DL1) 氨基酸	HLWCSNKKNAAVMDQEPAGNRTANSESD EQDPEEVTYAQLDHCVFTQRKITRPSQRPKT PPTDTILYTELPNAKPRSKVVSCP (SEQ ID NO: 66)
KIR3DL1	抑制性细 胞溶质结 构域 1 (KIR3DL1) 核酸	CATCTGTGGTGTCTAATAAGAAGAATGCT GCTGTGATGGATCAAGAGCCCGCTGGTAA CAGAACGGCCAACAGTGAAGATAGCGATG AGCAGGACCCAGAAGAAGTGACCTACGCC CAACTCGACCACTGTGTTTTTACGCAGCGG AAAATCACTCGACCCTCTCAACGACCCAA AACGCCGCTACGGACACCATACTCTACA CCGAAGTCCGAACGCCAAACCACGGTCC AAGGTGGTATCATGTCCG (SEQ ID NO: 85)
LIR1	抑制性细 胞溶质结 构域 1 (LIR1) 氨基酸	LRHRRQGKHWSTQRKADFQHPAGAVGPE PTDRGLQWRSSPAADAQEENLYAAVKHTQP EDGVEMDTRSPHDEDPQAVTYAEVKHSRPR REMASPPSPLSGEFLDTKDRQAEEDRQMDT EAAASEAPQDVTYAQLHSLTLRREATEPPPS QEGPSPAVPSIYATLAIH (SEQ ID NO: 50)
LIR1	抑制性细 胞溶质结 构域 1 (LIR1) 核酸	TTGCGCCACAGACGGCAGGGAAAGCACTG GACTAGTACGCAGAGGAAAGCGGACTTCC AGCATCCCAGCAGGAGCCGTGGGGCCTGAA CCCACTGATCGCGGCCTTCAATGGAGGTCT AGCCCCGGCGGCAGACGCACAAGAGGAAA ACTTGTACGCAGCCGTTAAGCACACCCAA CCGGAGGACGGCGTTGAGATGGATACCCG CTCCCCTCACGATGAAGACCCTCAAGCAG TCACTTACGCGGAAGTAAAGCATAGCCGC CCCAGACGGGAAATGGCTAGCCCCGCCGTC CCCCCTTAGCGGGGAATTTCTGGACACTA AAGATAGGCAGGCGGAAGAGGACCGCCA AATGGATACAGAGGCGGGCGGCAAGTGAA GCACCTCAAGACGTTACTTACGCTCAACTT CACAGCCTTACCCTCAGGCGAGAAGCGAC TGAACCACCCCTTCCCAAGAAGGGCCAA GCCAGCGGTTCTTCTATCTATGCTACTC TTGCTATTAC (SEQ ID NO: 54)

[0870] 表10B-aAx1 CD28-CD3z aCAR结构域

构建体	域	序列
aAxl CD28- CD3z	信号序列 (IgK) 氨基酸	METDTLLLWVLLLWVPGSTG (SEQ ID NO: 113)
aAxl CD28- CD3z	信号序列 (IgK) 核酸	ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCT GCTTCTTTGGGTGCCCGGATCTACAGGT (SEQ ID NO: 114)
aAxl CD28- CD3z	scFv (具有(G4S) ³ 接头的 aAxl 1448) 氨基酸	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSNYW GWIRQPPGKGLEWMGYITYSGSTSYNPSLKSRTI SRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAITTFYY WGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQ SPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGNYLRWFQKP GKAPKLLISGATNLAAGVPSRFSGSGSGSDFTLTI SSLQPEDFATYYCLQSKESPWTFGQGTKVEIKRT (SEQ ID NO: 115)
aAxl CD28- CD3z	scFv (具有(G4S) ³ 接头的 aAxl 1448) 核酸	CAGGTCCAGCTGCAAGAATCTGGACCAGGCCT CGTGAAGCCCAGCGAGACACTGTCTCTGACCT GTACCGTGTCCGGCTACAGCATCACCAGCAAC TACTGGGGCTGGATCAGACAGCCTCCTGGCAA AGGCCTTGAGTGGATGGGCTACATCACCTACA GCGGCAGCACCAGCTACAACCCAGCCTGAAG TCCCGGATCACCATCAGCAGAGACACCAGCAA GAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCAGCGTGA CAGCCGCCGATACAGCCGTGTACTACTGTGCC ATCACCACCTTCTACTATTGGGGCCAGGGCAC CCTGGTCACAGTTTCTAGCGGAGGCGGAGGAT CTGGTGGCGGAGGAAGTGGCGGAGGCGGTTCT GATATCCAGATGACACAGAGCCCCAGCAGCCT GTCTGCCTCTGTGGGAGACAGAGTGACCATCA CCTGTAGGGCCAGCCAGGACATCGGCAACTAC CTGAGATGGTTCCAGCAGAAGCCTGGCAAGGC CCCTAAGCTGCTGATTAGCGGCGCCACAAATC TGGCTGCTGGCGTGCCAAGCAGATTTTCCGGC TCTGGCAGCGGCTCCGATTTACCCTGACCAT ATCTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCT ACTACTGCCTGCAGAGCAAAGAGAGCCCCTGG ACATTTGGACAGGGCACCAAGGTGGAAATCAA GCGGACC (SEQ ID NO: 116)
aAxl CD28- CD3z	标签 (AGGS FLAGtag GGS) 氨基酸	AGGSDYKDDDDKGGG (SEQ ID NO: 117)
aAxl CD28- CD3z	标签 (AGGS FLAGtag	GCCGGCGGAAGCGACTACAAGGACGACGATG ACAAAGGCGGCAGC (SEQ ID NO: 118)

[0871]

	GGG) 核酸	
aAx1 CD28- CD3z	铰链 (CD8) 氨基酸	TTTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACD (SEQ ID NO: 37)
aAx1 CD28- CD3z	铰链 (CD8) 核酸	ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACC GGCGCCCACCATCGCGTTGCAGCCCCTGTCCC TGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGG GGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCG CCTGTGAT (SEQ ID NO: 79)
aAx1 CD28- CD3z	TM (CD28) 氨基酸	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO: 11)
aAx1 CD28- CD3z	TM (CD28) 核酸	TTCTGGGTGCTCGTTGTTGTTGGCGGCGTGCTG GCCTGTTATTCCCTGCTGGTTACCGTGGCCTTC ATCATCTTTTGGGTC (SEQ ID NO: 83)
aAx1 CD28- CD3z	胞内信号传 导结构域 1 (CD28) 氨基酸	RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP RDFAAIRS (SEQ ID NO: 119)
[0872] aAx1 CD28- CD3z	胞内信号传 导结构域 1 (CD28) 核酸	CGAAGCAAGCGGAGCCGGCTGCTGCACAGCG ATTACATGAACATGACCCCTCGGAGGCCCGGA CCTACCAGAAAGCACTACCAGCCTTACGCTCC TCCTAGAGATTTCCGCCGCTACCGGTCC (SEQ ID NO: 120)
aAx1 CD28- CD3z	胞内信号传 导结构域 2 (CD3z) 氨基酸	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGYQGLSTA TKDITYDALHMQUALPPR (SEQ ID NO: 121)
aAx1 CD28- CD3z	胞内信号传 导结构域 2 (CD3z) 核酸	AGAGTGAAGTTCAGCAGATCCGCCGATGCTCC CGCTATAAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACA ACGAGCTGAACCTGGGGAGAAGAGAAGAGTA CGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGCAGAGAT CCTGAAATGGGCGGCAAGCCCAGACGGAAGA ATCCTCAAGAGGGCCTGTATAATGAGCTGCAG AAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGA TCGGAATGAAGGGCGAGCGCAGAAGAGGCAA GGGACACGATGGACTGTACCAGGGACTGAGC ACCGCCACCAAGGATACCTATGACGCCCTGCA CATGCAGGCCCTGCCTCCAAGA (SEQ ID NO: 122)

[0873] 结果

[0874] NK细胞被工程化成表达激活性嵌合受体 (aCAR) 和具有LIR1与KIR3DL1抑制性结构域的抑制性嵌合受体 (iCAR)。然后针对iCAR减少NK细胞的aCAR介导的激活来对工程化NK细胞进行评估。

[0875] 用仅aCAR (抗Ax1-CD28/CD3z; “aAx1 28z”) 或其与抗Her2iCAR1 (LIR1抑制性结构

域;“ α Her2 LIR1”)或iCAR2(KIR3DL1抑制性结构域;“ α Her2 KIR3DL1”)的组合对NK细胞进行病毒转导。如图10中所示,对于单独aCAR,CAR在约50%的NK细胞中表达(右上图)。用iCAR共工程化的NK细胞展示在约50%的细胞中共表达(aCAR+iCAR+) (每个下图的右上象限)。应注意,共工程化NK细胞仅展示约5%-6%的细胞表达仅aCAR(aCAR+iCAR-;每个下图的右下象限)。表达结果表明NK细胞可成功地被工程化成共表达aCAR和iCAR。

[0876] 然后针对iCAR减少aCAR诱导的NK细胞介导的靶细胞杀伤来对工程化NK细胞进行评估。如图11中所示,相对于不表达aCAR抗原的亲代靶细胞(NALM6 WT;每个工程化条件,柱1)的杀伤,被工程化成共表达aCAR和iCAR的NK细胞杀伤仅表达aCAR抗原的靶细胞(NALM6 Ax1+;每个工程化条件,柱2),不逊色于仅用aCAR转导的NK细胞,表明aCAR抗原依赖性抗原特异性杀伤。当与表达aCAR和iCAR抗原两者的靶细胞(NALM6 Ax1+Her2+;每个工程化条件,柱3)共孵育时,相对于仅表达aCAR抗原的靶细胞的杀伤,被工程化成共表达aCAR和iCAR的NK细胞表现出显著降低的杀伤(分别地,aCAR/iCAR1和aCAR/iCAR2比较柱3与2)。相比之下,被工程化成仅表达aCAR的NK细胞未展示出杀伤的显著减少(分别地,仅aCAR比较柱3与2)。结果表明,被工程化成共表达aCAR和iCAR的NK细胞在不存在iCAR配体的情况下成功杀伤靶细胞并且在存在iCAR配体的情况下成功减少NK介导的杀伤。

[0877] 然后针对在混合靶标群体的情形下iCAR减少aCAR诱导的NK细胞介导的杀伤对工程化NK细胞进行评估。如图12中所示,与被工程化成仅表达aCAR的NK细胞(分别地,仅aCAR比较柱2与1)相比,在混合群体(分别地,aCAR/iCAR1和aCAR/iCAR2比较柱2与1)内,相对于仅表达aCAR配体的靶细胞的杀伤,被工程化成共表达aCAR和iCAR的NK细胞表现出显著减少的表达aCAR和iCAR抗原的靶细胞的杀伤。结果表明,在混合细胞群体中,被工程化成共表达aCAR和iCAR的NK细胞成功地选择性杀伤不表达iCAR配体的靶细胞。

[0878] 然后如通过细胞因子产生所评估,针对iCAR减少NK细胞的aCAR介导的激活来对工程化NK细胞进行评估。如图13中所示,当与仅表达aCAR配体的靶细胞(aCAR/iCAR1和aCAR/iCAR2柱2)或一半仅表达aCAR配体的混合靶细胞群体(aCAR/iCAR1和aCAR/iCAR2比较柱4)一起共孵育时,被工程化成共表达aCAR和iCAR的NK细胞分泌细胞因子TNF α 、颗粒酶B和IFN γ ,而在与表达aCAR和iCAR抗原的靶细胞(aCAR/iCAR1和aCAR/iCAR2比较柱3)共孵育之后,细胞因子分泌减少。

[0879] 结果表明,NK细胞可成功地被工程化成共表达aCAR和iCAR,被工程化成共表达aCAR和iCAR的NK细胞在不存在iCAR配体的情况下成功地杀伤靶细胞和促炎性细胞因子产生,并且被工程化成共表达aCAR和iCAR的NK细胞成功地以iCAR配体依赖性方式减少NK介导的杀伤和促炎性细胞因子产生。

[0880] 实施例4:各种抑制性嵌合受体在减少NK细胞激活方面的评估

[0881] 材料和方法

[0882] 转导和扩增

[0883] 用丝裂霉素C处理的K562饲养细胞将NK细胞扩增10天,接着用7.5e5 pg针对aCAR和iCAR构建体的每种慢病毒进行转导。所评估的iCAR构建体的序列示于表11中。所评估的aCAR构建体的序列示于表10B中。每个iCAR构建体形式从N末端至C末端为:信号序列1-信号序列2-scFv-标签-铰链-TM-抑制性细胞溶质结构域1-抑制性细胞溶质结构域2(如果存在)。aAx1 CD28-CD3z形式从N末端至C末端为:信号序列-标签-scFv-铰链-TM-胞内信号传

导结构域1-胞内信号传导结构域2。4天之后,将嘌呤霉素添加至细胞中以供选择。

[0884] 再3天之后,通过将工程化NK细胞和亲代SEM靶细胞(WT)或被工程化成过表达Ax1或Ax1和Her2两者的SEM靶标共孵育来进行细胞毒性测定。对每个工程化NK细胞进行孵育,其中:(1)每种靶细胞类型单独地以25,000个NK细胞与50,000个SEM细胞的比率,一式三份;或(2)作为25,000个单一抗原仅Ax1+和25,000个双重抗原Ax1+Her2+SEM细胞与25,000个具有所指示的类型的NK细胞以1:1:1比率的混合物(用不同膜染料将双重抗原靶标染色,使其能够通过流动来区分)。孵育过夜之后,将细胞用活力染料染色并经由流式细胞术进行计数。将靶细胞减少量化为 $100\% \times (1 - \text{靶标数} / \text{靶标数}(NV))$ 。

[0885] 表11-抗Her2 iCAR形式和结构域

构建体(通过 ICD)	结构域	序列
PD-1 CTLA-4 KIR3DL1 LIR1 BTLA NKG2A	信号序列 1 (CD8) 氨基酸	MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 71)
[0886] PD-1 CTLA-4 KIR3DL1 LIR1 BTLA NKG2A	信号序列 1 (CD8) 核酸	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCG (SEQ ID NO: 72)
PD-1 CTLA-4 KIR3DL1 LIR1 BTLA NKG2A	信号序列 2 (pelB) 氨基酸	KYLLPTAAAGLLLLLAAQPAMA (SEQ ID NO: 73)
PD-1 CTLA-4	信号序列 2 (pelB)	AAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCAGCCGGCCA

[0887]

KIR3DL1 LIR1 BTLA NKG2A	核酸	TGGCC (SEQ ID NO: 74)
PD-1 CTLA-4 KIR3DL1 LIR1 BTLA NKG2A	scFv (具有 (G4S) ₃ 接 头的 aHer2 H3B1) 氨基酸	SEQ ID NO: 75
PD-1 CTLA-4 KIR3DL1 LIR1 BTLA NKG2A	scFv (具有 (G4S) ₃ 接 头的 aHer2 H3B1) 核酸	SEQ ID NO: 76
PD-1 CTLA-4 KIR3DL1 LIR1 BTLA NKG2A	标签 (V5 + NGAA 接 头) 氨基酸	GKPIP NPLLGLDSTNGAA (SEQ ID NO: 77)
PD-1 CTLA-4 KIR3DL1 LIR1 BTLA NKG2A	标签 (V5 + NGAA 接 头) 核酸	GGGAAGCCTATCCCGAACCCCTCTGTTGGG TCTCGATAGTACCAATGGGGCCGCA (SEQ ID NO: 78)
PD-1 CTLA-4 KIR3DL1 LIR1 BTLA NKG2A	铰链 (CD8) 氨基酸	TTTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPEACRPAAG GAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO: 37)
PD-1 CTLA-4 KIR3DL1 LIR1 BTLA NKG2A	铰链 (CD8) 核酸	ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAAC ACCGGCGCCCACCATCGCGTTGCAGCCCC TGTCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCCA GCGGCGGGGGCGCAGTGCACACGAGGG GGCTGGACTTCGCCTGTGAT (SEQ ID NO: 79)
PD-1	TM (PD-1) 氨基酸	VGVVGLLGSLVLLVWVLAVI (SEQ ID NO: 60)
PD-1	TM (PD-1) 核酸	GTTGGGGTTGTAGGTGGTCTGCTCGGCAG CCTGGTCTTGTGGTGTGGGTCTGGCTGT GATC (SEQ ID NO: 64)
CTLA-4	TM (CTLA-4)	DFLLWILAAVSSGLFFYSFLLT (SEQ ID NO: 68)

[0888]

	氨基酸	
CTLA-4	TM (CTLA-4) 核酸	GATTTTCTGCTGTGGATTCTGGCAGCTGTG AGCTCTGGCTTGTCTTTCTACAGCTTCCTC CTGACC (SEQ ID NO: 80)
KIR3DL1	TM (KIR3DL1) 氨基酸	ILIGTSVVHILFILLFFLL (SEQ ID NO: 69)
KIR3DL1	TM (KIR3DL1) 核酸	ATCCTGATCGGGACAAGTGTAATCAT ACTTTTCATACTCCTGCTCTTTTTTCTCTTG (SEQ ID NO: 81)
LIR1	TM (LIR1) 氨基酸	VIGILVAVILLLLLLLLLLLFLI (SEQ ID NO: 59)
LIR1	TM (LIR1) 核酸	GTTATAGGGATCCTGGTGGCTGTCATACT CCTCTTGCTCCTCTTGTTGCTGCTTTTTTTG ATA (SEQ ID NO: 62)
BTLA	TM (BTLA) 核酸	LLPLGGLPLLITTCFCLFCCL (SEQ ID NO: 12)
BTLA	TM (BTLA) 核酸	CTCTTGCCGTTGGGGGTCTGCCACTTCTC ATAACAACCTTGCTTCTGCCTTTTTTGCTGT TTG (SEQ ID NO: 14)
CD28	TM (CD28) 氨基酸	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO: 11)
CD28	TM (CD28) 核酸	TTCTGGGTGCTCGTTGTTGTTGGCGGCGTG CTGGCCTGTTATTCCCTGCTGGTTACCGTG GCCTTCATCATCTTTGGGTC (SEQ ID NO: 83)
NKG2A	TM (NKG2A- 反向) 氨基酸	IVVITVVSAMLILCIIGLIGVIL (SEQ ID NO: 89)
NKG2A	TM (NKG2A- 反向) 氨基酸	ATAGTGGTCATCACTGTAGTTAGTGCAAT GCTTATTCTTTGTATCATAGGGCTCATAGG GGTAATCCTG (SEQ ID NO: 90)
PD-1	抑制性细 胞溶质结 构域 1 (PD-1) 氨基酸	CSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVD YGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVF PSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGH CSWPL (SEQ ID NO: 1)
PD-1	抑制性细 胞溶质结 构域 1 (PD-1) 核酸	TGTAGCCGAGCGGCCAGAGGCACAATCGG GGCAAGACGAACAGGACAGCCGCTCAAA GAGGACCCAGTGCGGTCCCCGTTTTCTC CGTGGATTACGGAGAACTGGATTTCAGT GGCGGGAGAAGACACCAGAGCCCCCGGT

[0889]

		GCCCTGCGTGCCGGAGCAGACTGAGTACG CCACGATTGTGTTTCCCTCTGGAATGGGG ACTTCATCCCCCGCTAGGCGCGGCTCAGC TGATGGCCCAAGATCCGCTCAACCGTTGC GGCCAGAGGACGGGCATTGCAGTTGGCCT CTG (SEQ ID NO: 51)
CTLA-4	抑制性细 胞溶质结 构域 1 (CTLA-4) 氨基酸	AVSLSKMLKKRSPLTTGVGVKMPPEPECE KQFQPYFIPIN (SEQ ID NO: 67)
CTLA-4	抑制性细 胞溶质结 构域 1 (CTLA-4) 核酸	GCCGTGTCACTTAGTAAGATGCTGAAGAA GAGGTCACCACTGACGACAGGGGTTGGAG TGAAGATGCCACCCACAGAACCCGAATGT GAGAAGCAATTCCAGCCTTATTTATTCC AATAAAT (SEQ ID NO: 84)
KIR3DL1	抑制性细 胞溶质结 构域 1 (KIR3DL1) 氨基酸	HLWCSNKKNAAVMDQEPAGNRTANSESD EQDPEEVTYAQLDHCVFTQRKITRPSQRPKT PPTDTILYTELPNAKPRSKVVSCP (SEQ ID NO: 66)
KIR3DL1	抑制性细 胞溶质结 构域 1 (KIR3DL1) 核酸	CATCTGTGGTGTCTAATAAGAAGAATGC TGCTGTGATGGATCAAGAGCCCGCTGGTA ACAGAACGGCCAACAGTGAAGATAGCGA TGAGCAGGACCCAGAAGAAGTGACCTAC GCCCAACTCGACCACTGTGTTTTTACGCA GCGGAAAATCACTCGACCCTCTCAACGAC CCAAAACGCCGCCTACGGACACCATACTC TACACCGAACTGCCGAACGCCAAACCAG GTCCAAGGTGGTATCATGTCCG (SEQ ID NO: 85)
LIR1	抑制性细 胞溶质结 构域 1 (LIR1) 氨基酸	LRHRRQKHWSTSTQRKADFQHPAGAVGPE PTDRGLQWRSSPAADAQEENLYAAVKHTQ PEDGVEMDTRSPHDEDPAVTYAEVKHSRP RREMASPPSPLSGEFLDTKDRQAEEDRQMD TEAAASEAPQDVTYAQLHSLTLRREATEPPP SQEGPSPAVPSIYATLAIH (SEQ ID NO: 50)
LIR1	抑制性细 胞溶质结 构域 1 (LIR1) 核酸	TTGCGCCACAGACGGCAGGGAAAGCACTG GACTAGTACGCAGAGGAAAGCGGACTTCC AGCATCCCGCAGGAGCCGTGGGGCCTGAA CCCCTGATCGCGCCTTCAATGGAGGTC TAGCCCGGCGGCAGACGCACAAGAGGAA AACTTGTACGCAGCCGTTAAGCACACCCA ACCGGAGGACGGCGTTGAGATGGATACCC GCTCCCCTCACGATGAAGACCCTCAAGCA GTCACTTACGCGGAAGTAAAGCATAGCCG CCCAGACGGGAAATGGCTAGCCCGCCGT CCCCCTTAGCGGGGAATTTCTGGACT

[0890]

		AAAGATAGGCAGGCGGAAGAGGACCGCC AAATGGATACAGAGGCGGCGCAAGTGA AGCACCTCAAGACGTTACTTACGCTCAAC TTCACAGCCTTACCCTCAGGCGAGAAGCG ACTGAACCACCCCCTTCCCAAGAAGGGCC AAGCCAGCGGTTCTTCTATCTATGCTAC TCTTGCTATTCAC (SEQ ID NO: 54)
BTLA	抑制性细 胞溶质结 构域 1 (BTLA) 氨基酸	RRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQT EASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQE GSEVYSNPCLEENKPGIVYASLNHSVIGPNS RLARNVKEAPTEYASICVRS (SEQ ID NO: 3)
BTLA	抑制性细 胞溶质结 构域 1 (BTLA) 核酸	AGAAGACATCAGGGGAAGCAGAATGAAC TCAGCGATACAGCAGGGCGAGAAATTAAT TTGGTAGACGCGCATCTGAAGTCCGAACA GACAGAGGCTTCTACTAGACAGAACTCCC AAGTTTTGTTGAGTGAGACGGGGATCTAT GATAATGATCCCGATCTGTGTTTTAGAAT GCAGGAGGGTAGTGAAGTCTACTCAAACC CGTGCCTGGAAGAAAATAAGCCCGGCATT GTTTACGCTAGTTTGAATCATTCTGTAATA GGCCCGAACTCCAGACTGGCTCGCAATGT GAAGGAGGCCCAACTGAGTATGCGTCCA TTTGCCTGCGGTCT (SEQ ID NO: 52)
NKG2A	抑制性细 胞溶质结 构域 1 (NKG2A- 反向) 氨基酸	KEPASPLDKCHYTKDNGQFDQSAKQLNLEA YTIEQETALISNKNKPKRQQRKPNPLNLD SYIVGQNDM (SEQ ID NO: 93)
NKG2A	抑制性细 胞溶质结 构域 1 (NKG2A- 反向) 核酸	AAGGAGCCTGCGTCCCCGTTGGATAAATG CCACTATACTAAGGATAACGGTCAGTTCG ATCAGAGTGCAAAGCAACTTAACTTGGAG GCTTACACTATAGAGCAAGAAACAGCGCT GATAAGTAATAAGAACGGTAAGCCAAAG CGACAGCAGAGGAAACCCAATCCTCCGCT TAACTTGGATAGCTACATCGTCGGGCAA ATGACATG (SEQ ID NO: 94)

[0891] 结果

[0892] NK细胞被工程化成表达激活性嵌合受体 (aCAR) 和具有各种抑制性结构域的抑制性嵌合受体 (iCAR)。用仅aCAR (抗Ax1-CD28/CD3 δ ; “aAx1 28 δ ”) 或其与具有各种所指示的抑制性结构域的抗Her2iCAR的组合对NK细胞进行病毒转导。然后针对iCAR减少aCAR诱导的NK细胞介导的靶细胞杀伤来对工程化NK细胞进行评估。如图14中所示, 相对于不表达aCAR抗原的亲代靶细胞 (每个工程化条件, 柱1) 的杀伤, 被工程化成共表达aCAR和iCAR的NK细胞杀伤作为单独的靶标群体 (每个工程化条件, 柱2) 或混合靶标群体 (每个工程化条件, 柱4) 中的仅表达aCAR抗原 (“Ax1⁺”) 的靶细胞, 不逊色于仅用aCAR转导的NK细胞, 表明抗原特异性

杀伤。应注意,相对于仅表达aCAR抗原的靶细胞,被工程化成表达具有LIR1和KIR3DL1抑制性结构域的抗Her2 iCAR的NK细胞展示出减少的作为单独的靶标群体(每个工程化条件,柱3)或混合靶标群体(每个工程化条件,柱5)中的表达aCAR抗原和iCAR抗原(“Ax1+Her+”)的靶细胞的杀伤,而在被工程化成共表达具有NKG2A、CTLA4、PD-1或BTLA抑制性结构域的抗Her2 iCAR的NK细胞中未观察到差异。结果表明,被工程化成共表达aCAR和选择iCAR的NK细胞在不存在iCAR配体的情况下成功地杀伤靶细胞并且以iCAR配体依赖性方式成功地减少NK介导的杀伤,同时还指示,在NK细胞激活的iCAR抗原依赖性压制方面,具有衍生自不同天然抑制性共受体的抑制性结构域的iCAR可能相对于彼此有所不同。

[0893] 实施例5:串联抑制性嵌合受体在减少NK细胞激活方面的评估

[0894] 材料和方法

[0895] 转导和扩增

[0896] 用丝裂霉素C处理的K562饲养细胞将NK细胞扩增10天,接着用 7.5×10^5 pg针对具有串联抑制性结构域的aCAR和iCAR构建体的每种慢病毒进行转导。所评估的iCAR构建体的序列示于表12中。所评估的aCAR构建体的序列展示于表10B中。每个iCAR构建体形式从N末端至C末端为:信号序列1-信号序列2-scFv-标签-铰链-TM-抑制性细胞溶质结构域1-抑制性细胞溶质结构域2(如果存在)。aAx1 CD28-CD3z形式从N末端至C末端为:信号序列-标签-scFv-铰链-TM-胞内信号传导结构域1-胞内信号传导结构域2。4天之后,将嘌呤霉素添加至细胞中以供选择。

[0897] 再3天之后,通过将工程化NK细胞和亲代SEM靶细胞(WT)或被工程化成过表达Ax1或Ax1和Her2两者的SEM靶标共孵育来进行细胞毒性测定。对每个工程化NK细胞进行孵育,其中:(1)每种靶细胞类型单独地以25,000个NK细胞与50,000个SEM细胞的比率,一式三份;或(2)作为25,000个单一抗原仅Ax1+和25,000个双重抗原Ax1+Her2+SEM细胞与25,000个具有有所指示的类型的NK细胞以1:1:1比率的混合物(用不同膜染料将双重抗原靶标染色,使其能够通过流动来区分)。孵育过夜之后,将细胞用活力染料染色并经由流式细胞术进行计数。将靶细胞减少量化为 $100\% \times (1 - \text{靶标数} / \text{靶标数}(NV))$ 。

[0898] 表12-抗Her2 iCAR形式和结构域

[0899]

构建体(通过 ICD)	结构域	序列
LIR1-BTLA LIR1-PD1	信号序列 1 (CD8) 氨基酸	MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 71)
LIR1-BTLA LIR1-PD1	信号序列 1 (CD8) 核酸	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTC CTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCC GCCAGGCCG (SEQ ID NO: 72)
LIR1-BTLA LIR1-PD1	信号序列 2 (pelB) 氨基酸	KYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA (SEQ ID NO: 73)
LIR1-BTLA LIR1-PD1	信号序列 2 (pelB) 核酸	AAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCT GGATTGTTATTACTCGCGGCCAGCCG GCCATGGCC (SEQ ID NO: 74)
LIR1-BTLA LIR1-PD1	scFv (具有(G4S) ₃ 接头的 aHer2 H3B1) 氨基酸	SEQ ID NO: 75
LIR1-BTLA LIR1-PD1	scFv (具有(G4S) ₃ 接头的 aHer2 H3B1)	SEQ ID NO: 76

[0900]

	核酸	
LIR1-BTLA LIR1-PD1	标签 (V5 + NGAA 接头) 氨基酸	GKPIP NPLLGLDSTNGAA (SEQ ID NO: 77)
LIR1-BTLA LIR1-PD1	标签 (V5 + NGAA 接头) 核酸	GGGAAGCCTATCCCGAACCCTCTGTTG GGTCTCGATAGTACCAATGGGGCCGC A (SEQ ID NO: 78)
LIR1-BTLA LIR1-PD1	铰链 (CD8) 氨基酸	TTTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO: 37)
LIR1-BTLA LIR1-PD1	铰链 (CD8) 核酸	ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACC AACACCGGCGCCACCATCGCGTTGC AGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGT GCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTG CACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTG TGAT (SEQ ID NO: 79)
LIR1-BTLA LIR1-PD1	TM (LIR1) 氨基酸	VIGILVAVILLLLLLLLLLFLI (SEQ ID NO: 59)
LIR1-BTLA LIR1-PD1	TM (LIR1) 核酸	GTTATAGGGATCCTGGTGGCTGTCATA CTCCTCTTGCTCCTCTTGTGCTGCTTT TTTTGATA (SEQ ID NO: 62)
LIR1-BTLA LIR1-PD1	抑制性细胞溶 质结构域 1 (LIR1) 氨基酸	SEQ ID NO: 50
LIR1-BTLA LIR1-PD1	抑制性细胞溶 质结构域 1 (LIR1) 核酸	SEQ ID NO: 54
LIR1-BTLA	抑制性细胞溶 质结构域 2 (BTLA) 氨基酸	RRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKS EQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDL CFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASLN HSVIGPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS (SEQ ID NO: 3)
LIR1-BTLA	抑制性细胞溶 质结构域 2 (BTLA) 核酸	AGAAGACATCAGGGGAAGCAGAATGA ACTCAGCGATACAGCAGGGCGAGAAA TTAATTTGGTAGACGCGCATCTGAAGT CCGAACAGACAGAGGCTTCTACTAGA CAGAACTCCAAGTTTTGTTGAGTGAG ACGGGGATCTATGATAATGATCCCGAT CTGTGTTTTAGAAATGCAGGAGGGTAGT GAAGTCTACTCAAACCCGTGCCTGGA AGAAAATAAGCCCGGCATTGTTTACG CTAGTTTGAATCATTCTGTAATAGGCC

		CGAACTCCAGACTGGCTCGCAATGTG AAGGAGGCCCAACTGAGTATGCGTC CATTGCGTGCGGTCT (SEQ ID NO: 52)
	LIR1-PD1 抑制性细胞溶 质结构域 2 (PD-1) 氨基酸	CSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVF SVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTE YATIVFSPGMGTSSPARRGSADGPRSAQ PLRPEDGHCSWPL (SEQ ID NO: 1)
[0901]	LIR1-PD1 抑制性细胞溶 质结构域 2 (PD-1) 核酸	TGTAGCCGAGCGGCCAGAGGCACAAT CGGGGCAAGACGAACAGGACAGCCGC TCAAAGAGGACCCCAGTGCGGTCCCC GTTTTCTCCGTGGATTACGGAGAAGT GATTCCAGTGGCGGGAGAAGACACC AGAGCCCCCGGTGCCCTGCGTGCCGG AGCAGACTGAGTACGCCACGATTGTG TTCCCTCTGGAATGGGGACTTCATCC CCCCTAGGCGCGGCTCAGCTGATGG CCAAGATCCGCTCAACCGTTGCGGCC AGAGGACGGGCATTGCAGTTGGCCTC TG (SEQ ID NO: 51)

[0902] 结果

[0903] NK细胞被工程化成表达激活性嵌合受体 (aCAR) 和胞内结构域具有串联的抑制性结构域的抑制性嵌合受体 (iCAR)。用仅aCAR (抗Ax1-CD28/CD3δ; “αAx128δ”) 或其与具有各种所指示的串联抑制性结构域的抗Her2 iCAR的组合对NK细胞进行病毒转导。如图15中所示,对于单独aCAR, CAR在约40%的NK细胞中表达 (右上图)。用iCAR共工程化的NK细胞展示在约40% -45%的细胞中共表达 (aCAR+iCAR+) (每个下图的右上象限)。应注意,共工程化NK细胞仅展示少于5%的细胞表达仅aCAR (aCAR+iCAR-; 每个下图的右下象限)。表达结果表明, NK细胞可成功地被工程化成共表达aCAR和具有串联胞内抑制性结构域的iCAR。

[0904] 然后针对iCAR减少aCAR诱导的NK细胞介导的靶细胞杀伤来对工程化NK细胞进行评估。如图16中所示,相对于不表达aCAR抗原的亲代细胞 (WT SEM) (每个工程化条件, 柱1) 的杀伤,被工程化成共表达aCAR和iCAR的NK细胞杀伤Ax1+靶细胞 (每个工程化条件, 柱2), 但逊色于仅用aCAR转导的NK细胞 (GFP-PuroR), 表明aCAR抗原依赖性抗原特异性杀伤。当与表达aCAR和iCAR抗原两者的靶细胞 (Ax1+Her2+SEM细胞; 每个工程化条件, 柱3) 共孵育时, 相对于仅表达aCAR抗原的靶细胞的杀伤 (比较柱3与2), 被工程化成共表达aCAR和具有串联LIR1/PD-1组织的iCAR的NK细胞表现出显著减少的杀伤, 并且具有串联LIR1/BTLA组织的iCAR表现出明显 (p=.055) 减少的杀伤。相比之下, 被工程化成仅表达aCAR的NK细胞未展示出杀伤的明显减少 (分别地, GFP-PuroR比较柱3与2)。结果表明, 被工程化成共表达aCAR和iCAR的NK细胞在不存在iCAR配体的情况下成功杀伤靶细胞并且以iCAR配体依赖性方式成功减少NK介导的杀伤。

[0905] 实施例6: 具有或不具有抑制性结构域的胞外结构域的抑制性嵌合受体在减少T细胞激活方面的评估

[0906] 材料和方法

[0907] 转导和扩增

[0908] 从人供体PBMC分离出原代T细胞并冷冻。在第1天,将 1×10^6 个纯化的CD4+/CD8+ T细胞解冻并用 3×10^6 个Dynabead刺激,然后在具有0.2ug/mL IL-2的1mL Optimizer CTS T细胞扩增培养基(Gibco)中培养。在第2天,用慢病毒(每个100K,如通过GoStix(Tekara)所量化)单一转导或共转导的T细胞。所评估的iCAR构建体的序列示于表13A中。每个iCAR构建体形式从N末端至C末端(除了指定为“全”的那些)为:信号序列1-信号序列2-scFv-标签-铰链-TM-抑制性细胞溶质结构域1-抑制性细胞溶质结构域2(如果存在)。具有ECD(指定为“全”)的每个iCAR构建体从N末端至C末端(除了NKG2A“全”)为:信号序列1-信号序列2-scFv-标签-铰链-ECD-TM-抑制性细胞溶质结构域1。NKG2A“全”iCAR形式从N末端至C末端为:抑制性细胞溶质结构域1-TM-ECD-铰链-标签-信号序列1-scFv。aCAR构建体aAx1 CD3z的序列示于表13B中。aAx1 CD3z形式从N末端至C末端为:信号序列-scFv-标签-铰链-TM-胞内信号传导结构域。

[0909] 通过磁铁去除Dynabead。扩增细胞并用嘌呤霉素处理10天。用PE缀合的抗MYC和BV421缀合的抗FLAG抗体(对应于aCAR和iCAR)对每个条件的等分试样进行染色,并且使用LX CytoFlex流式细胞仪量化其转基因表达。

[0910] T细胞共培养物杀伤测定

[0911] 对T细胞进行计数并分配至96孔板中以供共培养测定。通过将工程化T细胞和亲代NALM6靶标(WT)或被工程化成过表达Ax1、Her2或Ax1和Her2两者的NALM6靶标共孵育来进行细胞毒性测定。每个孔含有 1×10^5 个用cell trace violet染料(Invitrogen)预染色的Nalm6靶细胞和 1×10^5 个工程化T细胞。将共培养物在37°C与5% CO₂下孵育24小时。用7-AAD活力染料将细胞染色,并通过流式细胞术量化靶细胞的死亡百分比。将杀伤百分比归一化为仅靶细胞。使用人磁性Luminex测定(Human magnetic Luminex assay)(R&D系统)和MAGPIX分析仪(Millipore Sigma)测量相同共培养物的培养基中的细胞因子。

[0912] 表13A-抗Her2 iCAR形式和结构域

构建体(通过ICD)	结构域	序列
LIR1 PD-1 (全) CTLA-4 (全) KIR3DL1 (全) NKG2A TIGIT TIGIT (全)	信号序列 1 (CD8) 氨基酸	MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 71)
LIR1 PD-1 (全) CTLA-4 (全) KIR3DL1 (全) NKG2A	信号序列 1 (CD8) 核酸	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCA GGCCG (SEQ ID NO: 72)

[0914]

TIGIT TIGIT (全)		
LIR1 PD-1 (全) CTLA-4 (全) KIR3DL1 (全) NKG2A TIGIT TIGIT (全) NKG2A 全, 无 ss1	信号序列 2 (pelB) 氨基酸	KYLLPTAAAGLLLLLAAQPAMA (SEQ ID NO: 73)
LIR1 PD-1 (全) CTLA-4 (全) KIR3DL1 (全) NKG2A TIGIT TIGIT (全) NKG2A 全, 无 ss1	信号序列 2 (pelB) 核酸	AAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGG ATTGTTATTACTCGCGGCCAGCCGGCCA TGGCC (SEQ ID NO: 74)
LIR1 PD-1 (全) CTLA-4 (全) KIR3DL1 (全) NKG2A NKG2A (全) TIGIT TIGIT (全)	scFv (具有 (G4S)3 接 头的 aHer2 H3B1) 氨基酸	SEQ ID NO: 75
LIR1 PD-1 (全) CTLA-4 (全) KIR3DL1 (全) NKG2A NKG2A (全) TIGIT TIGIT (全)	scFv (具有 (G4S)3 接 头的 aHer2 H3B1) 核酸	SEQ ID NO: 76
LIR1 PD-1 (全) CTLA-4 (全) KIR3DL1 (全) NKG2A	标签 (V5 + NGAA 接 头) 氨基酸	GKPIP NPLLGLDSTNGAA (SEQ ID NO: 77)

[0915]

NKG2A (全) TIGIT TIGIT (全)		
LIR1 PD-1 (全) CTLA-4 (全) KIR3DL1 (全) NKG2A TIGIT TIGIT (全)	标签 (V5 + NGAA 接 头) 核酸	GGGAAGCCTATCCCGAACCCCTCTGTTGGG TCTCGATAGTACCAATGGGGCCGCA (SEQ ID NO: 78)
LIR1 PD-1 (全) CTLA-4 (全) KIR3DL1 (全) NKG2A NKG2A (全) TIGIT TIGIT (全)	铰链 (CD8) 氨基酸	TTTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPEACRPAAG GAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO: 37)
LIR1 PD-1 (全) CTLA-4 (全) KIR3DL1 (全) NKG2A NKG2A (全) TIGIT TIGIT (全)	铰链 (CD8) 核酸	ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAA CACCGGCGCCCACCATCGCGTTGCAGCCC CTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCC AGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGG GGGCTGGACTTCGCCTGTGAT (SEQ ID NO: 79)
PD-1 (全)	TM (PD-1) 氨基酸	VGVVGLLGSLVLLVWVLAVI (SEQ ID NO: 60)
PD-1 (全)	TM (PD-1) 核酸	GTTGGGGTTGTAGGTGGTCTGCTCGGCAG CCTGGTCTTGTGGTGTGGGTCTTGGCTG TGATC (SEQ ID NO: 64)
CTLA-4 (全)	TM (CTLA-4) 氨基酸	DFLLWILAAVSSGLFFYSFLLT (SEQ ID NO: 68)
CTLA-4 (全)	TM (CTLA-4) 核酸	GATTTTCTGCTGTGGATTCTGGCAGCTGT GAGCTCTGGCTTGTTTTTCTACAGCTTCCT CCTGACC (SEQ ID NO: 80)
KIR3DL1 (全)	TM (KIR3DL1) 氨基酸	ILIGTSVVIILFILLFFLL (SEQ ID NO: 69)
KIR3DL1 (全)	TM (KIR3DL1) 核酸	ATCCTGATCGGGACAAGTGTAGTAATCAT ACTTTTCATACTCCTGCTCTTTTTTCTCTT G (SEQ ID NO: 81)

[0916]

LIR1	TM (LIR1) 氨基酸	VIGILVAVILLLLLLLLLLLFLI (SEQ ID NO: 59)
LIR1	TM (LIR1) 核酸	GTTATAGGGATCCTGGTGGCTGTCATACT CCTCTTGCTCCTCTTGTTGCTGCTTTTTTT GATA (SEQ ID NO: 62)
NKG2A	TM (NKG2A- 反向) 氨基酸	IVVITVVSAMLILCIIGLIGVIL (SEQ ID NO: 89)
NKG2A	TM (NKG2A- 反向) 氨基酸	ATAGTGGTCATCACTGTAGTTAGTGCAAT GCTTATTCTTTGTATCATAGGGCTCATAG GGTAATCCTG (SEQ ID NO: 90)
TIGIT TIGIT (全)	TM (TIGIT) 氨基酸	LLGAMAATLVVICTAVIVVVA (SEQ ID NO: 91)
TIGIT TIGIT (全)	TM (TIGIT) 核酸	CTGCTGGGCGCCATGGCCGCCACACTGGT TGTTATCTGTACCGCCGTGATCGTGGTGG TGGCC (SEQ ID NO: 92)
PD-1 (全)	抑制性细 胞溶质结 构域 1 (PD-1) 氨基酸	CSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSV DYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATI VFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPED GHCSWPL (SEQ ID NO: 1)
PD-1 (全)	抑制性细 胞溶质结 构域 1 (PD-1) 核酸	TGTAGCCGAGCGGCCAGAGGCACAATCG GGCAAGACGAACAGGACAGCCGCTCAA AGAGGACCCAGTGCGGTCCCCGTTTTCT CCGTGGATTACGGAGAACTGGATTTCCAG TGGCGGGAGAAGACACCAGAGCCCCCGG TGCCCTGCGTGCCGGAGCAGACTGAGTAC GCCACGATTGTGTTTCCCTCTGGAATGGG GACTTCATCCCCCGCTAGGCGCGGCTCAG CTGATGGCCCAAGATCCGCTCAACCGTTG CGGCCAGAGGACGGGCATTGCAGTTGGC CTCTG (SEQ ID NO: 51)
CTLA-4 (全)	抑制性细 胞溶质结 构域 1 (CTLA-4) 氨基酸	AVSLSKMLKRSPLTTGVGVKMPPEPECE KQFQPYFIPIN (SEQ ID NO: 67)
CTLA-4 (全)	抑制性细 胞溶质结 构域 1 (CTLA-4) 核酸	GCCGTGTCACTTAGTAAGATGCTGAAGAA GAGGTCACCACTGACGACAGGGGTTGGA GTGAAGATGCCACCCACAGAACCCGAAT GTGAGAAGCAATTCCAGCCTTATTTTCATT CCAATAAAT (SEQ ID NO: 84)
KIR3DL1	抑制性细	HLWCSNKKNAAVMDQEPAGNRTANSEDS

[0917]

(全)	胞溶质结构域 1 (KIR3DL1) 氨基酸	DEQDPEEVTYAQLDHCVFTQRKITRPSQRP KTPPTDILYTELPNAKPRSKVVSCP (SEQ ID NO: 66)
KIR3DL1 (全)	抑制性细 胞溶质结 构域 1 (KIR3DL1) 核酸	CATCTGTGGTGTCTAATAAGAAGAATGC TGCTGTGATGGATCAAGAGCCCGCTGGTA ACAGAACGGCCAACAGTGAAGATAGCGA TGAGCAGGACCCAGAAGAAGTGACCTAC GCCCAACTCGACCACTGTGTTTTTACGCA GCGGAAAATCACTCGACCCTCTCAACGAC CCAAAACGCCGCTACGGACACCATACTC TACACCGAACTGCCGAACGCCAAACCAC GGTCCAAGGTGGTATCATGTCCG (SEQ ID NO: 85)
LIR1	抑制性细 胞溶质结 构域 1 (LIR1) 氨基酸	LRHRRQGKHWSTSTQRKADFQHPAGAVGPE PTDRGLQWRSSPAADAQEENLYAAVKHTQ PEDGVEMDTRSPHDEDPQAVTYAEVKHSR PRREMASPPSPLSGEFLDTKDRQAEEDRQM DTEAAASEAPQDVTYAQLHSLTLRREATEP PPSQEGPSPAVPSIYATLAIH (SEQ ID NO: 50)
LIR1	抑制性细 胞溶质结 构域 1 (LIR1) 核酸	TTGCGCCACAGACGGCAGGGAAAGCACT GGACTAGTACGCAGAGGAAAGCGGACTT CCAGCATCCCGCAGGAGCCGTGGGGCCT GAACCCACTGATCGCGGCCTTCAATGGAG GTCTAGCCCGGCGGCAGACGCACAAGAG GAAAACCTTGACGCAGCCGTTAAGCACA CCCAACCGGAGGACGGCGTTGAGATGGA TACCCGCTCCCCTCACGATGAAGACCCTC AAGCAGTCACTTACGCGGAAGTAAAGCA TAGCCGCCCCAGACGGGAAATGGCTAGC CCGCCGTCCCCCTTAGCGGGGAATTTCT GGACACTAAAGATAGGCAGGCGGAAGAG GACCGCCAAATGGATACAGAGGCGGCGG CAAGTGAAGCACCTCAAGACGTTACTTAC GCTCAACTTCACAGCCTTACCCTCAGGCG AGAAGCGACTGAACCACCCCCTTCCCAA GAAGGGCCAAGCCCAGCGGTTCTTCTAT CTATGCTACTCTTGCTATTAC (SEQ ID NO: 54)
NKG2A	抑制性细 胞溶质结 构域 1 (NKG2A- 反向) 氨基酸	KEPASPLDKCHYTKDNGQFDQSAKQLNLE AYTIEQETALISNKNKGPKRQQRKPNPPLNL DSYIVGQNDM (SEQ ID NO: 93)
NKG2A	抑制性细 胞溶质结	AAGGAGCCTGCGTCCCCGTTGGATAAATG CCACTATACTAAGGATAACGGTCAGTTCG ATCAGAGTGCAAAGCAACTTAACTTGA

[0918]

	构域 1 (NKG2A- 反向) 核酸	GGCTTACACTATAGAGCAAGAAACAGCG CTGATAAGTAATAAGAACGGTAAGCCAA AGCGACAGCAGAGGAAACCCAATCCTCC GCTTAACTTGGATAGCTACATCGTCGGGC AAAATGACATG (SEQ ID NO: 94)
TIGIT TIGIT (全)	抑制性细 胞溶质结 构域 1 (TIGIT) 氨基酸	LTRKKKALRIHSVEGDLRRKSAGQEEWSPS APSPPGSCVQAEAAPAGLCGEQRGEDCAEL HDYFNVLSYRSLGNCSEFFTETG (SEQ ID NO: 95)
TIGIT TIGIT (全)	抑制性细 胞溶质结 构域 1 (TIGIT) 核酸	CTGACCAGAAAGAAGAAGGCCCTGAGAA TCCACAGCGTGGAAGGCGACCTGCGGAG AAAGTCTGCCGACAAGAAGAGTGGTCC CCTAGCGCTCCATCTCCACCTGGATCTTG TGTGCAGGCCGAAGCAGCTCCTGCTGGAC TGTGTGGCGAACAGAGAGGCCGAAGATTG CGCCGAGCTGCACGACTACTTCAACGTGC TGAGCTACAGAAGCCTGGGCAACTGCAG CTTCTTCACCGAGACAGGA (SEQ ID NO: 96)
PD-1 (全)	ECD (PD-1)氨基 酸	FLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFT CSFSNTSESVLNWYRMSPSNQTDKLAAFP EDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVR ARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELR VTERRAEVPTAHPSPPRPAGQFQTLV (SEQ ID NO: 97)
PD-1 (全)	ECD (PD-1)核酸	TTCCTGGACAGCCCCGACAGACCTTGGAA CCCTCCTACATTCAGCCCCGCTCTGCTGG TGGTTACCGAGGGCGATAATGCCACCTTC ACCTGTAGCTTCAGCAACACCAGCGAGA GCTTCGTGCTGAACTGGTACAGAATGAGC CCCAGCAACCAGACCGACAAGCTGGCCG CCTTTCCTGAGGATAGATCTCAGCCCCGC CAGGACTGCCGGTTCAGAGTTACACAGCT GCCCAACGGCCGGGACTTCCACATGTCTG TCGTCCGGGCCAGAAGAAACGACAGCGG CACATATCTGTGCGGCCATTTCTCTGG CCCCTAAGGCTCAGATCAAAGAGAGCCT GAGAGCCGAGCTGAGAGTGACAGAAAGA CGGGCCGAAGTGCCACAGCTCACCTTC ACCTTCTCCAAGACCTGCCGGCCAGTTTC AGACACTGGTT (SEQ ID NO: 98)
CTLA-4 (全)	ECD (CTLA-4) 氨基酸	KAMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPG KATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMG NELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAM DTGLYICKVELMYPYPYLLGIGNGTQIYVID PEPCPDSDFLLWILAAVSSGLFFYSFLLT (SEQ ID NO: 99)
CTLA-4 (全)	ECD	AAGGCCATGCATGTGGCTCAGCCTGCTGT

[0919]

	(CTLA-4) 核酸	GGTGCTGGCCTCTTCTAGAGGAATCGCCA GCTTCGTGTGCGAGTACGCCTCTCCTGGA AAGGCCACTGAAGTGCGCGTGACCGTTCT GAGACAGGCCGATAGCCAAGTGACCGAA GTGTGCGCCGCCACCTACATGATGGGCAA CGAGCTGACCTTCCTGGACGACAGCATCT GTACCGGCACCAGCAGCGGCAATCAAGT GAACCTGACCATCCAGGGCCTGAGAGCC ATGGATAACGGCCTGTACATCTGCAAGGT GGAAGTGTACCTCCTCCTTACTACC TCGGCATCGGCAACGGCACCCAGATCTAC GTGATCGACCCTGAGCCTTGTCTGACAG CGACTTTCTGCTGTGGATCCTGGCTGCCG TGCCAGCGGCCTGTTCTTCTACTCTTTTC TGCTGACC (SEQ ID NO: 100)
KIR3DL1 (全)	ECD (KIR3DL1) 氨基酸	HMGGQDKPFLSAWPSAVVPRGGHVTLRCH YRHRFNNFMLYKEDRIHIPIFHGRIFQESFN MSPVTTAHAGNYTCRGSHPHSPTGWSAPS NPVVIMVTGNHRKPSLLAHPGPLVKSGERV ILQCWSDIMFEHFLLHKEGISKDPSRLVGQI HDGVSKANFSIGPMMLALAGTYRCYGSVT HTPYQLSAPSDPLDIVVTGPYEKPSLSAQPG PKVQAGESVTLSCSSRSSYDMYHLSREGGA HERRLPAVRKVNRTFQADFPLGPATHGGT YRCFGSFRHSPYEWSDPSDPLLVSVTGNPSS SWPSPTEPSSKSGNPRHLH (SEQ ID NO: 101)
KIR3DL1 (全)	ECD (KIR3DL1) 核酸	CACATGGGCGGACAGGATAAGCCTTTCCT GAGCGCCTGGCCTTCTGCCGTTGTTCTTA GAGGCGGACACGTGACCCTGCGGTGTCA CTACAGACACCGGTTCAACAACCTTCATGC TGTACAAAGAGGACCGGATTCACATCCCC ATCTTCCACGGCCGGATCTTCCAAGAGTC CTTCAACATGAGCCCCGTGACCACAGCTC ACGCCGGCAACTACACATGCAGAGGCTC TCACCCTCACAGCCCTACAGGCTGGAGTG CCCCTTCTAACCCCGTGGTCATCATGGTC ACCGGCAACCACAGAAAGCCCAGCCTGC TTGCTCATCCCGGACCTCTGGTTAAGTCT GGCGAGCGAGTGATCCTGCAGTGTTGGA GCGATATTATGTTTCGAGCACTTCTTTCTG CACAAAGAGGGCATCAGCAAGGACCCCT CTAGACTCGTGGGCCAGATCCATGATGGC GTGTCCAAGGCCAACTTCAGCATCGGCC TATGATGCTGGCCCTGGCCGGCACCTATA GATGTTACGGCAGCGTGACCCACACACCT TACCAGCTGAGCGCCCCTAGCGACCCTCT GGATATCGTGGTCACAGGCCCTACGAG AAGCCTAGCCTGTCTGCACAGCCTGGACC TAAAGTGCAGGCCGGCGAAAGCGTGACA CTGAGCTGTAGCAGCAGATCCAGCTACG

[0920]

		ACATGTACCACCTGAGCAGAGAAGGCGG AGCCCACGAGAGAAGGCTGCCTGCCGTC AGAAAAGTGAACCGGACCTTCCAGGCCG ACTTTCCTCTGGGACCTGCTACACACGGC GGCACCTACCGGTGTTTCGGCAGCTTTAG ACACAGCCCTTACGAGTGGAGCGACCCCT CTGATCCTCTGCTGGTGTCTGTGACCGGC AATCCTAGCAGCAGCTGGCCCTCTCCAAC AGAGCCTTCTAGCAAGAGCGGCAACCCC AGACATCTGCAC (SEQ ID NO: 102)
TIGIT (全)	ECD (TIGIT)氨基酸	MMTGTIETTGNISAEEKGGSIIQCHLSSTA QVTQVNWEQQDQLLAICNADLGWHISPSF KDRVAPGPGLGLTLQSLTVNDTGEYFCIYH TYPDGYTGRIFLEVLESSVAEHGARFQIP (SEQ ID NO: 103)
TIGIT (全)	ECD (TIGIT)核酸	ATGATGACCGGCACCATCGAGACAACCG GCAACATCTCTGCCGAGAAAGGCGGCAG CATCATCCTGCAGTGTACCTGTCTAGCA CCACCGCTCAAGTGACCCAAGTGAAGT GGAGCAGCAGGATCAGCTGCTGGCCATC TGCAATGCCGATCTCGGCTGGCACATCAG CCCCAGCTTCAAGGATAGAGTGGCCCCTG GACCTGGCCTGGGACTGACACTTCAGAGC CTGACCGTGAACGATACCGGCGAGTACTT CTGCATCTACCACACATACCCCGACGGCA CCTATACCGGCCGGATCTTTCTGGAAGTG CTGGAAAGCTCTGTGGCCGAGCACGGCG CCAGATTTTCAGATTCCT (SEQ ID NO: 104)
NKG2A (全)	抑制性细 胞溶质结 构域 1 (NKG2A) 氨基酸	MDNQGVIIYSDLNLPNPKRQQRKPKGNKN SILATEQEITYAELNLQKASQDFQGNDKTY HCKDLPSAPEK (SEQ ID NO: 105)
NKG2A (全)	抑制性细 胞溶质结 构域 1 (NKG2A) 核酸	ATGGACAACCAGGGCGTGATCTACAGCG ACCTGAACCTGCCTCCTAATCCTAAGCGG CAGCAGAGAAAGCCCAAGGGCAACAAGA ACAGCATCCTGGCCACCGAGCAAGAGAT CACCTACCCGAGCTGAATCTGCAGAAG GCCAGCCAGGACTTCCAGGGCAACGACA AGACCTACCACTGCAAGGACCTGCCTAGC GCTCCCGAGAAG (SEQ ID NO: 106)
NKG2A (全)	TM (NKG2A) 氨基酸	LIVGILGIIILMASVVTIVVI (SEQ ID NO: 107)
NKG2A (全)	TM (NKG2A) 核酸	CTGATCGTGGGAATCCTGGGCATCATCTG CCTGATCCTGATGGCCAGCGTGGTCACCA TCGTGGTCATC (SEQ ID NO: 108)
NKG2A (全)	ECD (NKG2A)	PSTLIQRHNNSSLNTRTQKARHCGHCPEEW ITYSNSCYIYGKERRTWEESELLACTSKNSSL

	氨基酸	LSIDNEEEMKFLSIISPSSWIGVFRNSSHHPW VTMNGLAFKHEIKDSDNAELNCAVLQVNR LKSAQCGSSIIYHCKHKL (SEQ ID NO: 109)
[0921]	NKG2A (全) ECD (NKG2A) 核酸	CCCAGCACACTGATCCAGCGGCACAACA ACAGCAGCCTGAACACCAGAACACAGAA GGCCCGGCACTGCGGCCACTGTCCTGAAG AGTGGATCACATACAGCAACAGCTGCTA CTACATCGGCAAAGAGCGGCGGACCTGG GAAGAATCTCTGCTGGCCTGCACCAGCAA GAACTCCAGCCTGCTGAGCATCGACAAC GAGGAAGAGATGAAGTTCCTGTCCATCAT CAGCCCAGCAGCTGGATCGGCGTGTTCA GAAACAGCTCCCACCATCCTTGGGTCACC ATGAACGGCCTGGCCTTCAAGCACGAGA TCAAGGACAGCGACAACGCCGAAGTAA CTGTGCCGTGCTGCAAGTGAACCGGCTGA AGTCTGCCAGTGTGGCAGCAGCATCATC TACTACTGCAAGCACAAAGCTG (SEQ ID NO: 110)
	NKG2A (全) 标签 (NGAA + Myc 标签) 氨基酸	NGAAEQKLISEEDL (SEQ ID NO: 111)
	NKG2A (全) 标签 (NGAA + Myc 标签) 核酸	AATGGGGCCGCAGAACA AAAACTCATCT CAGAAGAAGATCTG (SEQ ID NO: 112)

[0922] 表13B-aAxl CD3z aCAR结构域

构建体	结构域	序列
aAxl CD3z	信号序列 (CD8) 氨基酸	MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 71)
aAxl CD3z	信号序列 (CD8) 核酸	ATGGCCCTGCCTGTGACAGCTCTGCTGCTGCCT CTGGCCCTGCTGCTGCATGCTGCTAGACCT (SEQ ID NO: 123)
[0923] aAxl CD3z	scFv (具有 (G4S) ₃ 接头的 aAxl 1448) 氨基酸	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSNYW GWIRQPPGKGLEWMGYITYSGSTSYNPSLKSRTI SRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAITTFYYW GQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSP SSLSASVGDRTITCRASQDIGNYLRWFQKPGK APKLLISGATNLAAGVPSRFSGSGSGSDFTLTISSL QPEDFATYYCLQSKESPWTFGQGTKVEIKRT (SEQ ID NO: 115)
aAxl CD3z	scFv (具有	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCT CGTGAAGCCTAGCGAGACACTGAGCCTGACCT GCACCGTGTCCGGCTACAGCATCACCAGCAAC

[0924]

	(G4S)3 接头的 aAxl 1448) 核酸	TACTGGGGCTGGATCAGACAGCCCCCTGGCAA GGGCCTGGAATGGATGGGCTACATCACCTACA GCGGCAGCACCAGCTACAACCCAGCCTGAAG TCCCGGATCACCATCAGCCGGGACACCAGCAA GAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCAGCGTGA CAGCCGCCGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCA TCACCACCTTCTACTATTGGGGCCAGGGCACCC TCGTGACCGTGTCTAGCGGAGGCGGAGGATCT GGCGGCGGAGGAAGTGGCGGAGGGGGCTCTGA TATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGT CTGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACC TGTAGAGCCAGCCAGGACATCGGCAACTACCT GCGGTGGTTCCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCC CCAAGCTGCTGATCTCCGGCGCCACAAATCTGG CCGCTGGCGTGCCAAGCAGATTCAGCGGCTCT GGCAGCGGCTCCGACTTCACCCTGACCATCTCT AGCCTGCAGCCCAGGACTTCGCCACCTACTAC TGCCTGCAGAGCAAAGAGAGCCCCTGGACCTT CGGACAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGGA CA (SEQ ID NO: 124)
aAxl CD3z	标签 (Myc + NGAA 接 头) 氨基酸	EQKLISEEDLNGAA (SEQ ID NO: 125)
aAxl CD3z	标签 (Myc + NGAA 接 头) 核酸	GAACAAAAACTCATCTCAGAAGAAGATCTGAA TGGGGCCGCA (SEQ ID NO: 126)
aAxl CD3z	铰链 (CD8) 氨基酸	TTTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACD (SEQ ID NO: 37)
aAxl CD3z	铰链 (CD8) 核酸	ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACC GGCGCCCACCATCGCGTTGCAGCCCCTGTCCCT GCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGG GCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCC TGTGAT (SEQ ID NO: 79)
aAxl CD3z	TM (CD8) 氨基酸	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT (SEQ ID NO: 127)
aAxl CD3z	TM (CD8) 核酸	ATATACATCTGGGCTCCTCTGGCTGGCACTTGC GGAGTGCTTCTGCTGAGTCTGGTTATTACC (SEQ ID NO: 128)
aAxl CD3z	胞内信号传 导结构域 (CD3ζ) 氨基酸	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD KMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDL YQGLSTATK DTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 121)

[0925]	aAxl CD3z	胞内信号传导结构域 (CD3 ζ) 核酸	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCC CGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATA ACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTAC GATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCC TGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAAC CCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAA AGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTG GGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGG GCACGATGGCCTTACCAGGGTCTCAGTACAGC CACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGC AGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO: 129)
--------	--------------	-----------------------------------	--

[0926] 结果

[0927] T细胞被工程化成表达激活性嵌合受体 (aCAR) 和具有各种抑制性结构域的抑制性嵌合受体 (iCAR), 尤其包括仅以抑制性受体的细胞溶质结构域 (CD) 或还以相应抑制性受体的胞外结构域 (ECD; “全”) 为特征的形式。

[0928] 用仅aCAR (aAxl-CD3z-mCherry) 或其与具有各种所指示的抑制性结构域的抗Her2 iCAR的组合对NK细胞进行病毒转导。如图17中所示, 在仅具有LIR1的细胞溶质结构域或具有全 (CD+ECD) KIR3DL1序列的iCAR的情况下观察到较高百分比的细胞展示出共表达 (aCAR+iCAR+), 在具有全 (CD+ECD) PD-1或TIGIT序列的iCAR的情况下可观察到但较低百分比的细胞共表达, 并且在具有全CTLA-4序列、全NKG2A序列或TIGIT的细胞溶质结构域的iCAR的情况下可观察到最小程度的共表达。

[0929] 然后针对iCAR减少aCAR诱导的T细胞激活来对工程化T细胞进行评估。如图18中所示, 相对于不表达aCAR抗原的亲代靶细胞 (WT NALM6; 每个工程化条件, 柱1) 或仅表达iCAR抗原的靶细胞 (Her2 NALM6; 每个工程化条件, 柱1) 的杀伤, 被工程化成仅表达aCAR (“aAxl-CD3z”) 或共表达aCAR和各种iCAR形式的T细胞全部展示出对仅表达aCAR抗原的靶细胞 (Axl NALM6; 每个工程化条件, 柱3) 的杀伤, 表明aCAR抗原依赖性抗原特异性杀伤。当与表达aCAR和iCAR抗原的靶细胞 (Her2 Axl NALM6; 每个工程化条件, 柱4) 共孵育时, 相对于仅表达仅具有LIR1的细胞溶质结构域 (“aCAR+LIR1 icd iCAR”) 或具有全 (CD+ECD) KIR3DL1序列 (“aCAR+KIR3DL1全iCAR”) 的iCAR的靶细胞 (分别地, 比较柱4与3) 的杀伤, 被工程化成共表达aCAR和iCAR的T细胞表现出明显减少的杀伤, 而其他iCAR形式表现出更适度的减少, 大体上与仅aCAR条件一致。如图19中所示, 还评估了T细胞IL-2分泌的iCAR依赖性减少, 并且其与T细胞杀伤相关。应注意, T细胞杀伤的iCAR依赖性减少和与iCAR表达 (即, 展示出较大表达的仅具有LIR1的细胞溶质结构域或具有全 (CD+ECD) KIR3DL1序列的iCAR) 相关的细胞因子产生也展示出aCAR介导的T细胞激活的最大调控。

[0930] 结果表明, 可针对选择的形式成功地将T细胞工程化成共表达aCAR和选择iCAR。另外, iCAR以iCAR配体依赖性方式展示出T细胞介导的杀伤和细胞因子产生的减少, 这与T细胞中的共表达对应。

[0931] 实施例7: 各种抑制性嵌合受体在减少NK细胞激活方面的评估

[0932] 材料和方法

[0933] 转导和扩增

[0934] 用丝裂霉素C处理的K562饲养细胞将NK细胞扩增10天, 接着用7.5e5 pg针对aCAR

和iCAR构建体的每种慢病毒进行转导。所评估的iCAR构建体的序列示于表14中。每个iCAR构建体形式从N末端至C末端(除了指定为“全”的那些)为:信号序列1-信号序列2-scFv-标签-铰链-TM-抑制性细胞溶质结构域1-抑制性细胞溶质结构域2(如果存在)。具有ECD(指定为“全”)的每个iCAR构建体从N末端至N末端(除了NKG2A“全”)为:信号序列1-信号序列2-scFv-标签-铰链-ECD-TM-抑制性细胞溶质结构域1。NKG2A“全”iCAR形式从N末端至C末端为:抑制性细胞溶质结构域1-TM-ECD-铰链-标签-信号序列1-scFv。使用抗Ax1 aCAR形式aAx1 CD28-CD3z或aAx1 CD3z。aAx1-CD28/CD3z aCAR构建体的序列示于表10B中。aAx1 CD28-CD3z形式从N末端至C末端为:信号序列-标签-scFv-铰链-TM-胞内信号传导结构域1-胞内信号传导结构域2。aAx1 CD3z aCAR构建体的序列示于表13B中。aAx1 CD3z形式从N末端至C末端为:信号序列-scFv-标签-铰链-TM-胞内信号传导结构域。4天之后,将嘌呤霉素添加至细胞中以供选择。

[0935] 再3天之后,通过将工程化NK细胞和亲代靶细胞(WT)或者被工程化成过表达aCAR抗原(例如,Ax1)或aCAR抗原和iCAR抗原(例如,Ax1与Her2)两者的靶标共孵育来进行细胞毒性测定。对每个工程化NK细胞进行孵育,其中:(1)每种靶细胞类型单独地以25,000个NK细胞与50,000个靶细胞的比率,一式三份;或(2)作为25,000个仅aCAR抗原和25,000个双重抗原靶细胞与25,000个具有所指示的类型的NK细胞以1:1:1比率的混合物(用不同膜染料将双重抗原靶标染色,使其能够通过流动来区分)。孵育过夜之后,将细胞用活力染料染色并经由流式细胞术进行计数。将靶细胞减少量化为 $100\% \times (1 - \text{靶标数} / \text{靶标数}(NV))$ 。

[0936] 表14-抗Her2 iCAR形式和结构域

[0937]

构建体(通过 ICD)	结构域	序列
PD-1 CTLA-4 KIR3DL1 LIR1 BTLA NKG2A LIR1-BTLA LIR1-PD1 LIR1-KIR3DL1 KIR3DL1-LIR1 LIR1 2x KIR3DL1 2x DAP10e KIR3DL1 28-28 KIR3DL1 LIR1 (密码子优化) PD-1 (全) CTLA-4 (全)	信号序列 1 (CD8) 氨基酸	MALPVTALLLPLALLLHAA RP (SEQ ID NO: 71)

[0938]

<p>KIR3DL1 (全) TIGIT TIGIT (全) LIR1-BTLA LIR1-PD-1</p>		
<p>PD-1 CTLA-4 KIR3DL1 LIR1 BTLA NKG2A LIR1-BTLA LIR1-PD1 LIR1-KIR3DL1 KIR3DL1-LIR1 LIR1 2x KIR3DL1 2x DAP10e KIR3DL1 28-28 KIR3DL1 LIR1 (密码子优化) PD-1 (全) CTLA-4 (全) KIR3DL1 (全) TIGIT TIGIT (全) LIR1-BTLA LIR1-PD-1</p>	<p>信号序列 1 (CD8) 核酸</p>	<p>ATGGCCTTACCAGTGACC GCCTTGCTCCTGCCGCTGG CCTTGCTGCTCCACGCCGC CAGGCCG (SEQ ID NO: 72)</p>
<p>PD-1 CTLA-4 KIR3DL1 LIR1 BTLA NKG2A LIR1-BTLA LIR1-PD1 LIR1-KIR3DL1 KIR3DL1-LIR1 LIR1 2x KIR3DL1 2x DAP10e KIR3DL1 28-28 KIR3DL1 LIR1 (密码子优化) PD-1 (全) CTLA-4 (全) KIR3DL1 (全) TIGIT TIGIT (全) LIR1-BTLA</p>	<p>信号序列 2 (pelB) 氨基酸</p>	<p>KYLLPTAAAGLLLLAAQPA MA (SEQ ID NO: 73)</p>

[0939]

LIR1-PD-1 NKG2A 全, 无 ss1		
PD-1 CTLA-4 KIR3DL1 LIR1 BTLA NKG2A LIR1-BTLA LIR1-PD1 LIR1-KIR3DL1 KIR3DL1-LIR1 LIR1 2x KIR3DL1 2x DAP10e KIR3DL1 28-28 KIR3DL1 LIR1 (密码子优化) PD-1 (全) CTLA-4 (全) KIR3DL1 (全) TIGIT TIGIT (全) LIR1-BTLA LIR1-PD-1 NKG2A 全, 无 ss1	信号序列 2 (pelB) 核酸	AAATACCTATTGCCTACG GCAGCCGCTGGATTGTTA TTACTCGCGGCCAGCCG GCCATGGCC (SEQ ID NO: 74)
PD-1 CTLA-4 KIR3DL1 LIR1 BTLA NKG2A TIGIT LIR1-BTLA LIR1-PD1 LIR1-KIR3DL1 KIR3DL1-LIR1 LIR1 2x KIR3DL1 2x DAP10e KIR3DL1 28-28 KIR3DL1 LIR1 (密码子优化) PD-1 (全) CTLA-4 (全) KIR3DL1 (全) NKG2A (全) TIGIT (全) LIR1-BTLA LIR1-PD-1	scFv (具有(G4S) ³ 接头的 aHer2 H3B1) 氨基酸	QVQLVQSGAEVKKPGESLK ISCKGSGYSFTSYWIAWVR QMPGKGLEYMGLIYPGDS DTKYSPSFQGGQVTISVDKS VSTAYLQWSSLKPSDSAVY FCARHDVGYCTDRITCAKW PEYFQHWGQGLVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSQSVL TQPPSVSAAPGQKVTISCSG SSSNIGNNYVSWYQQLPGT APKLLIYDHTNRPAGVPDR FSGSKSGTSASLAISGFRSE DEADYYCASWDYTLGSGWV FGGGTKLTVLG (SEQ ID NO: 75)

[0940]

<p>PD-1 CTLA-4 KIR3DL1 LIR1 BTLA NKG2A TIGIT LIR1-BTLA LIR1-PD1 LIR1-KIR3DL1 KIR3DL1-LIR1 LIR1 2x KIR3DL1 2x DAP10e KIR3DL1 28-28 KIR3DL1 LIR1 (密码子优化) PD-1 (全) CTLA-4 (全) KIR3DL1 (全) NKG2A (全) TIGIT (全) LIR1-BTLA LIR1-PD-1</p>	<p>scFv (具有(G4S)3 接头的 aHer2 H3B1) 核酸</p>	<p>CAGGTGCAGCTGGTGCAG TCTGGGGCAGAGGTGAAA AAGCCCGGGGAGTCTCTG AAGATCTCCTGTAAGGGT TCTGGATACAGCTTTACCA GCTACTGGATCGCCTGGG TGCGCCAGATGCCCGGGA AAGGCCTGGAGTACATGG GGCTCATCTATCCTGGTGA CTCTGACACCAAATACAG CCCGTCCTTCCAAGGCCA GGTCACCATCTCAGTCGA CAAGTCCGTCAGCACTGC CTACTTGCAATGGAGCAG TCTGAAGCCCTCGGACAG CGCCGTGTATTTTTGTGCG AGACATGACGTGGGATAT TGCACCGACCGGACTTGC GCAAAGTGGCCTGAATAC TTCCAGCATTGGGGCCAG GGCACCCCTGGTCACCGTC TCCTCAGGTGGAGGCGGT TCAGGCGGAGGTGGCTCT GGCGGTGGCGGATCGCAG TCTGTGTTGACGCAGCCG CCCTCAGTGTCTGCGGCCC CAGGACAGAAGGTCACCA TCTCCTGCTCTGGAAGCA GCTCCAACATTGGGAATA ATTATGTATCCTGGTACCA GCAGCTCCCAGGAACAGC CCCCAAACTCCTCATCTAT GATCACACCAATCGGCC GCAGGGGTCCCTGACCGA TTCTCTGGCTCCAAGTCTG GCACCTCAGCCTCCCTGG CCATCAGTGGGTTCCGGT CCGAGGATGAGGCTGATT ATTACTGTGCCTCCTGGGA CTACACCCTCTCGGGCTG GGTGTTTCGGCGGAGGGAC CAAGCTGACCGTCCTAGG T (SEQ ID NO: 76)</p>
<p>PD-1 CTLA-4 KIR3DL1 LIR1 BTLA NKG2A TIGIT</p>	<p>标签 (V5 + NGAA 接头) 氨基酸</p>	<p>GKPIP NPLLGLDSTNGAA (SEQ ID NO: 77)</p>

[0941]

LIR1-BTLA LIR1-PD1 LIR1-KIR3DL1 KIR3DL1-LIR1 LIR1 2x KIR3DL1 2x DAP10e KIR3DL1 28-28 KIR3DL1 LIR1 (密码子优化) PD-1 (全) CTLA-4 (全) KIR3DL1 (全) TIGIT (全) LIR1-BTLA LIR1-PD-1		
PD-1 CTLA-4 KIR3DL1 LIR1 BTLA NKG2A TIGIT LIR1-BTLA LIR1-PD1 LIR1-KIR3DL1 KIR3DL1-LIR1 LIR1 2x KIR3DL1 2x DAP10e KIR3DL1 28-28 KIR3DL1 LIR1 (密码子优化) PD-1 (全) CTLA-4 (全) KIR3DL1 (全) TIGIT (全) LIR1-BTLA LIR1-PD-1	标签 (V5 + NGAA 接头) 核酸	GGGAAGCCTATCCCGAAC CCTCTGTTGGGTCTCGATA GTACCAATGGGGCCGCA (SEQ ID NO: 78)
PD-1 CTLA-4 KIR3DL1 LIR1 BTLA NKG2A TIGIT LIR1-BTLA LIR1-PD1 LIR1-KIR3DL1 KIR3DL1-LIR1 LIR1 2x	铰链 (CD8) 氨基酸	TTTPAPRPPTPAPTIALQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACD (SEQ ID NO: 37)

[0942]

KIR3DL1 2x DAP10e KIR3DL1 28-28 KIR3DL1 LIR1 (密码子优化) PD-1 (全) CTLA-4 (全) KIR3DL1 (全) NKG2A (全) TIGIT (全) LIR1-BTLA LIR1-PD-1		
PD-1 CTLA-4 KIR3DL1 LIR1 BTLA NKG2A TIGIT LIR1-BTLA LIR1-PD1 LIR1-KIR3DL1 KIR3DL1-LIR1 LIR1 2x KIR3DL1 2x DAP10e KIR3DL1 28-28 KIR3DL1 LIR1 (密码子优化) PD-1 (全) CTLA-4 (全) KIR3DL1 (全) NKG2A (全) TIGIT (全) LIR1-BTLA LIR1-PD-1	铰链 (CD8) 核酸	ACCACGACGCCAGCGCCG CGACCACCAACACCGGCG CCCACCATCGCGTTGCAG CCCCTGTCCCTGCGCCCAG AGGCGTGCCGGCCAGCGG CGGGGGGCGCAGTGCACA CGAGGGGGCTGGACTTCG CCTGTGAT (SEQ ID NO: 79)
PD-1 PD-1 (全)	TM (PD-1) 氨基酸	VGVVGGLLGLSLVLLVWVL AVI (SEQ ID NO: 60)
PD-1 PD-1 (全)	TM (PD-1) 核酸	GTTGGGGTTGTAGGTGGT CTGCTCGGCAGCCTGGTCT TGTTGGTGTGGGTCTTGGC TGTGATC (SEQ ID NO: 64)
CTLA-4 CTLA-4 (全)	TM (CTLA-4) 氨基酸	DFLWILAAVSSGLFFYSFL LT (SEQ ID NO: 68)
CTLA-4 CTLA-4 (全)	TM (CTLA-4) 核酸	GATTTTCTGCTGTGGATTC TGGCAGCTGTGAGCTCTG GCTTGTTTTTCTACAGCTT CCTCCTGACC (SEQ ID NO:

[0943]

		80)
KIR3DL1 KIR3DL1-LIR1 KIR3DL1 2x DAP10e KIR3DL1 KIR3DL1 (全)	TM (KIR3DL1) 氨基酸	ILIGTSVVILFILLFFLL (SEQ ID NO: 69)
KIR3DL1 KIR3DL1-LIR1 KIR3DL1 2x DAP10e KIR3DL1 KIR3DL1 (全)	TM (KIR3DL1) 核酸	ATCCTGATCGGGACAAGT GTAGTAATCATACTTTTCA TACTCCTGCTCTTTTTTCT CTTG (SEQ ID NO: 81)
LIR1 LIR1-KIR3DL1 LIR1 2x LIR1 (密码子优化) LIR1-BTLA LIR1-PD1	TM (LIR1) 氨基酸	VIGILVAVILLLLLLLLLLFLI (SEQ ID NO: 59)
LIR1 LIR1-KIR3DL1 LIR1 2x LIR1-BTLA LIR1-PD1	TM (LIR1) 核酸	GTTATAGGGATCCTGGTG GCTGTCATACTCCTCTTGC TCCTCTTGTTGCTGCTTTT TTGATA (SEQ ID NO: 62)
LIR1 (密码子优化)	TM (LIR1) 核酸	GTGATCGGAATTCTGGTG GCCGTGATCCTGCTGCTCC TGCTTCTCCTCCTGCTGTT TCTGATC (SEQ ID NO: 82)
BTLA	TM (BTLA) 核酸	LLPLGGLPLLITTCFCLFCCL (SEQ ID NO: 12)
BTLA	TM (BTLA) 核酸	CTCTTGCCGTTGGGGGGTC TGCCACTTCTCATAACAAC TTGCTTCTGCCTTTTTTGC TGTTG (SEQ ID NO: 14)
CD28	TM (CD28) 氨基酸	FWVLVVVGGVLACYSLLV TVAFIIFWV (SEQ ID NO: 11)
CD28	TM (CD28) 核酸	TTCTGGGTGCTCGTTGTTG TTGGCGGCGTGCTGGCCT GTTATTCCCTGCTGGTTAC CGTGGCCTTCATCATCTTT TGGGTC (SEQ ID NO: 83)
NKG2A	TM (NKG2A-反向) 氨基酸	IVVITVVSAMLILCHIGLIGVI L (SEQ ID NO: 89)
NKG2A	TM (NKG2A-反向) 氨基酸	ATAGTGGTCATCACTGTA GTTAGTGCAATGCTTATTC TTTGATCATAGGGCTCAT AGGGGTAATCCTG (SEQ ID

		NO: 90)
TIGIT TIGIT (全)	TM (TIGIT) 氨基酸	LLGAMAATLVVICTAVIVV VA (SEQ ID NO: 91)
TIGIT TIGIT (全)	TM (TIGIT) 核酸	CTGCTGGGCGCCATGGCC GCCACACTGGTTGTTATCT GTACCGCCGTGATCGTGG TGGTGGCC (SEQ ID NO: 92)
PD-1 PD-1 (全)	抑制性细胞溶质结 构域 1 (PD-1) 氨基酸	CSRAARGTIGARRTGQPLK EDPSAVPVFSVDYGELDFQ WREKTPEPPVPCVPEQTEY ATIVFPSGMGTSSPARRGSA DGPRSAQPLRPEDGHCSWP L (SEQ ID NO: 1)
PD-1 PD-1 (全)	抑制性细胞溶质结 构域 1 (PD-1) 核酸	TGTAGCCGAGCGGCCAGA GGCACAATCGGGGCAAGA CGAACAGGACAGCCGCTC AAAGAGGACCCAGTGCG GTCCCCGTTTTCTCCGTGG ATTACGGAGAACTGGATT TCCAGTGGCGGGAGAAGA CACCAGAGCCCCGGTGC CCTGCGTGCCGGAGCAGA CTGAGTACGCCACGATTG TGTTCCCTCTGGAATGGG GACTTCATCCCCGCTAG GCGCGGCTCAGCTGATGG CCCAAGATCCGCTCAACC GTTGCGGCCAGAGGACGG GCATTGCAGTTGGCCTCTG (SEQ ID NO: 51)
CTLA-4 CTLA-4 (全)	抑制性细胞溶质结 构域 1 (CTLA-4) 氨基酸	AVSLSKMLKKRSPLTTGVG VKMPPEPECEKQFQPYFIP IN (SEQ ID NO: 67)
CTLA-4 CTLA-4 (全)	抑制性细胞溶质结 构域 1 (CTLA-4) 核酸	GCCGTGTCACTTAGTAAG ATGCTGAAGAAGAGGTCA CCACTGACGACAGGGGTT GGAGTGAAGATGCCACCC ACAGAACCCGAATGTGAG AAGCAATTCCAGCCTTATT TCATTCCAATAAAT (SEQ ID NO: 84)
KIR3DL1 KIR3DL1-LIR1 KIR3DL1 2x DAP10e KIR3DL1 28-28 KIR3DL1 KIR3DL1 (全)	抑制性细胞溶质结 构域 1 (KIR3DL1) 氨基酸	HLWCSNKKNAAVMDQEP GNRTANSEDSDEQDPEEVT YAQLDHCVFTQRKITRPSQ RPKTPPTDILYTELPNAKP RSKVVSCP (SEQ ID NO: 66)
KIR3DL1	抑制性细胞溶质结	CATCTGTGGTGTCTAATA

[0944]

[0945]

<p>KIR3DL1-LIR1 KIR3DL1 2x DAP10e KIR3DL1 28-28 KIR3DL1 KIR3DL1 (全)</p>	<p>枸域 1 (KIR3DL1) 核酸</p>	<p>AGAAGAATGCTGCTGTGA TGGATCAAGAGCCCCTG GTAACAGAACGGCCAACA GTGAAGATAGCGATGAGC AGGACCCAGAAGAAGTGA CCTACGCCCAACTCGACC ACTGTGTTTTTACGCAGCG GAAAATCACTCGACCCTC TCAACGACCCAAAACGCC GCCTACGGACACCATACT CTACACCGAACTGCCGAA CGCCAAACCACGGTCCAA GGTGGTATCATGTCCG (SEQ ID NO: 85)</p>
<p>LIR1 LIR1-KIR3DL1 LIR1 2x LIR1 (密码子优化) LIR1-BTLA LIR1-PD1</p>	<p>抑制性细胞溶质结 枸域 1 (LIR1) 氨基酸</p>	<p>LRHRRQGKHWSTQRKAD FQHPAGAVGPEPTDRGLQ WRSSPAADAQEENLYAAV KHTQPEDGVEMDTRSPHDE DPQAVTYAEVKHSRPRE MASPPSPLSGEFLDTKDRQ AEEDRQMDTEAAASEAPQ DVTYAQLHSLTLRREATEP PPSQEGPSPAVPSIYATLAIH (SEQ ID NO: 50)</p>
<p>LIR1 LIR1-KIR3DL1 LIR1 2x LIR1-BTLA LIR1-PD1</p>	<p>抑制性细胞溶质结 枸域 1 (LIR1) 核酸</p>	<p>TTGCGCCACAGACGGCAG GGAAAGCACTGGACTAGT ACGCAGAGGAAAGCGGAC TTCCAGCATCCCGCAGGA GCCGTGGGGCCTGAACCC ACTGATCGCGGCCTTCAA TGGAGGTCTAGCCCGGCG GCAGACGCACAAGAGGAA AACTTGTACGCAGCCGTT AAGCACACCCAACCGGAG GACGGCGTTGAGATGGAT ACCCGCTCCCCTCACGAT GAAGACCCTCAAGCAGTC ACTTACGCGGAAGTAAAG CATAGCCGCCCCAGACGG GAAATGGCTAGCCCGCCG TCCCCCTTAGCGGGGAA TTTCTGGACACTAAAGAT AGGCAGGCGGAAGAGGA CCGCCAAATGGATACAGA GGCGGCGGCAAGTGAAGC ACCTCAAGACGTTACTTA CGCTCAACTTCACAGCCTT ACCCTCAGGCGAGAAGCG ACTGAACCACCCCTTCCC AAGAAGGGCCAAGCCCAG</p>

[0946]

		CGGTTTCCTTCTATCTATGC TACTCTTGCTATTAC (SEQ ID NO: 54)
LIR1 (密码子优化)	抑制性细胞溶质结 构域 1 (LIR1) 核酸 密码子优化	CTGCGGCACAGAAGGCAG GGCAAGCACTGGACAAGC ACCCAGAGAAAGGCCGAT TTTCAGCACCTGCTGGCG CCGTTGGACCTGAGCCTA CAGATAGAGGACTGCAGT GGCGGTCTAGCCCTGCTG CCGATGCTCAAGAGGAAA ACCTGTACGCCGCCGTGA AGCACACCCAACCTGAAG ATGGCGTGGAAATGGACA CCAGATCTCCCCACGATG AGGACCCTCAGGCCGTGA CATACGCTGAAGTGAAGC ACTCCCGGCCTCGGAGAG AAATGGCTAGCCCTCCAA GTCCTCTGAGCGGCGAGT TCCTGGACACCAAGGATA GACAGGCCGAAGAGGACC GGCAGATGGATACAGAAG CTGCCGCCTCTGAAGCCC CACAGGATGTGACATATG CCCAGCTGCATAGCCTGA CACTGCGGAGAGAAGCCA CAGAGCCTCCACCTTCTCA AGAGGGCCCATCTCCAGC CGTGCCTAGCATCTATGCC ACACTGGCCATTAC (SEQ ID NO: 86)
BTLA	抑制性细胞溶质结 构域 1 (BTLA) 氨基酸	RRHQGKQNELSDTAGREIN LVDAHLKSEQTEASTRQNS QVLLSETGIYDNDPDLCFR MQEGSEVYSNPCLEENKPG IVYASLNHSVIGPNSRLARN VKEAPTEYASICVRS (SEQ ID NO: 3)
BTLA	抑制性细胞溶质结 构域 1 (BTLA) 核酸	AGAAGACATCAGGGGAAG CAGAATGAACTCAGCGAT ACAGCAGGGCGAGAAATT AATTTGGTAGACGCGCAT CTGAAGTCCGAACAGACA GAGGCTTCTACTAGACAG AACTCCCAAGTTTTGTTGA GTGAGACGGGGATCTATG ATAATGATCCCGATCTGT GTTTTAGAATGCAGGAGG GTAGTGAAGTCTACTCAA

[0947]

		ACCCGTGCCTGGAAGAAA ATAAGCCCGGCATTGTT ACGCTAGTTTGAATCATTC TGTAATAGGCCCGAACTC CAGACTGGCTCGCAATGT GAAGGAGGCCCAACTGA GTATGCGTCCATTTGCGTG CGGTCT (SEQ ID NO: 52)
NKG2A	抑制性细胞溶质结 构域 1 (NKG2A-反 向) 氨基酸	KEPASPLDKCHYTKDNGQF DQSAKQLNLEAYTIEQETA LISNKNKPKRQQRKPNPP LNLDSYIVGQNDM (SEQ ID NO: 93)
NKG2A	抑制性细胞溶质结 构域 1 (NKG2A-反 向) 核酸	AAGGAGCCTGCGTCCCCG TTGGATAAATGCCACTAT ACTAAGGATAACGGTCAG TTCGATCAGAGTGCAAAG CAACTTAACTTGGAGGCT TACTATAGAGCAAGAA ACAGCGCTGATAAGTAAT AAGAACGGTAAGCCAAAG CGACAGCAGAGGAAACCC AATCCTCCGCTTAACTTGG ATAGCTACATCGTCGGGC AAAATGACATG (SEQ ID NO: 94)
LIR1-KIR3DL1 KIR3DL1 2x	抑制性细胞溶质结 构域 2 (KIR3DL1) 氨基酸	SEQ ID NO: 66
LIR1-KIR3DL1 KIR3DL1 2x	抑制性细胞溶质结 构域 2 (KIR3DL1) 核酸	SEQ ID NO: 85
KIR3DL1-LIR1 LIR1 2x	抑制性细胞溶质结 构域 2 (LIR1) 氨基酸	SEQ ID NO: 50
KIR3DL1-LIR1 LIR1 2x	抑制性细胞溶质结 构域 2 (LIR1) 核酸	SEQ ID NO: 54
LIR1-BTLA	抑制性细胞溶质结 构域 2 (BTLA) 氨基酸	RRHQGKQNELSDTAGREIN LVDAHLKSEQTEASTRQNS QVLLSETGIYDNDPDLCFR MQEGSEVYSNPCLEENKPG IVYASLNHSVIGPNSRLARN VKEAPTEYASICVRS (SEQ ID NO: 3)
LIR1-BTLA	抑制性细胞溶质结 构域 2 (BTLA) 核酸	AGAAGACATCAGGGGAAG CAGAATGAACTCAGCGAT ACAGCAGGGCGAGAAATT

[0948]

		AATTTGGTAGACGCGCAT CTGAAGTCCGAACAGACA GAGGCTTCTACTAGACAG AACTCCCAAGTTTTGTTGA GTGAGACGGGGATCTATG ATAATGATCCCGATCTGT GTTTTAGAATGCAGGAGG GTAGTGAAGTCTACTCAA ACCCGTGCCTGGAAGAAA ATAAGCCCGGCATTGTTT ACGCTAGTTTGAATCATTC TGTAATAGGCCCGAACTC CAGACTGGCTCGCAATGT GAAGGAGGCCCAACTGA GTATGCGTCCATTTGCGTG CGGTCT (SEQ ID NO: 52)
LIR1-PD1	抑制性细胞溶质结构域 2 (PD-1) 氨基酸	CSRAARGTIGARRTGQPLK EDPSAVPVFSVDYGELDFQ WREKTPEPPVPCVPEQTEY ATIVFPSGMGTSSPARRGSA DGPRSAQPLRPEDGHCSWP L (SEQ ID NO: 1)
LIR1-PD1	抑制性细胞溶质结构域 2 (PD-1) 核酸	TGTAGCCGAGCGGCCAGA GGCACAATCGGGGCAAGA CGAACAGGACAGCCGCTC AAAGAGGACCCAGTGCG GTCCCCGTTTTCTCCGTGG ATTACGGGAGAACTGGATT TCCAGTGGCGGGAGAAGA CACCAGAGCCCCCGGTGC CCTGCGTGCCGGAGCAGA CTGAGTACGCCACGATTG TGTTTCCCTCTGGAATGGG GACTTCATCCCCGCTAG GCGCGGCTCAGCTGATGG CCAAGATCCGCTCAACC GTTGCGGCCAGAGGACGG GCATTGCAGTTGGCCTCTG (SEQ ID NO: 51)
DAP10e KIR3DL1	铰链 (CD8-DAP10e) 氨基酸	TTTPAPRPPTPAPTIALQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACDQTTPGERSSLPAFYF GTSGSCSGCGSLSLP (SEQ ID NO: 70)
DAP10e KIR3DL1	铰链 (CD8-DAP10e) 核酸	ACCACGACGCCAGCGCCG CGACCACCAACACCGGCG CCCACCATCGCGTTGCAG CCCCTGTCCCTGCGCCAG AGGCGTGCCGGCCAGCGG CGGGGGGCGCAGTGACA

[0949]

		CGAGGGGGCTGGACTTCG CCTGTGATCAGACCACAC CTGGCGAGAGATCTTCCC TGCCTGCCTTCTATCCTGG CACCAGCGGCTCTTGTTCT GGCTGTGGATCACTGAGC CTGCCT (SEQ ID NO: 87)
28-28 KIR3DL1	铰链 (CD28) 氨基酸	AAAIEVMYPPPYLDNEKSN GTHHVKGKHLCPSPFP SKP (SEQ ID NO: 31)
28-28 KIR3DL1	铰链 (CD28) 核酸	GCCGCTGCTATCGAAGTG ATGTACCCTCCTCCTTACC TGGACAACGAGAAGTCCA ACGGCACCATCATCCACG TGAAGGGCAAGCACCTGT GTCCTTCTCCACTGTTCCC CGGACCTAGCAAGCCT (SEQ ID NO: 88)
TIGIT TIGIT (全)	抑制性细胞溶质结 构域 1 (TIGIT) 氨基酸	LTRKKKALRIHSVEGLRR KSAGQEEWSPSAPSPGSC VQAEAAPAGLCGEQRG CAELHDYFNVLSYRSLGNC SFFTETG (SEQ ID NO: 95)
TIGIT TIGIT (全)	抑制性细胞溶质结 构域 1 (TIGIT) 核酸	CTGACCAGAAAGAAGAAG GCCCTGAGAATCCACAGC GTGGAAGGCGACCTGCGG AGAAAGTCTGCCGACAA GAAGAGTGGTCCCCTAGC GCTCCATCTCCACCTGGAT CTTGTGTGCAGGCCGAAG CAGCTCCTGCTGGACTGT GTGGCGAACAGAGAGGCG AAGATTGCGCCGAGCTGC ACGACTACTTCAACGTGC TGAGCTACAGAAGCCTGG GCAACTGCAGCTTCTTCAC CGAGACAGGA (SEQ ID NO: 96)
PD-1 (全)	ECD (PD-1)氨基酸	FLDSPDRPWNPPTFSPALLV VTEGDNATFTCSFSNTSESF VLNWYRMSPSNQTDKLA FPEDRSQPGQDCFRVTL PNGRDFHMSVVRARRNDS GTYLCGAISLAPKAQIKESL RAELRVTERRAEVPTAHPS PSPRPAGQFQTLV (SEQ ID NO: 97)
PD-1 (全)	ECD (PD-1)核酸	TTCCTGGACAGCCCCGAC AGACCTTGGAACCCTCCT ACATTCAGCCCCGCTCTGC

[0950]

		<p>TGGTGGTTACCGAGGGCG ATAATGCCACCTTCACCTG TAGCTTCAGCAACACCAG CGAGAGCTTCGTGCTGAA CTGGTACAGAATGAGCCC CAGCAACCAGACCGACAA GCTGGCCGCCTTTCCTGAG GATAGATCTCAGCCCGGC CAGGACTGCCGGTTCAGA GTTACACAGCTGCCCAAC GGCCGGGACTTCCACATG TCTGTCGTCCGGGCCAGA AGAAACGACAGCGGCACA TATCTGTGCGGCGCCATTT CTCTGGCCCCTAAGGCTC AGATCAAAGAGAGCCTGA GAGCCGAGCTGAGAGTGA CAGAAAGACGGGCCGAAG TGCCACAGCTCACCTTC ACCTTCTCCAAGACCTGCC GGCCAGTTTCAGACACTG GTT (SEQ ID NO: 98)</p>
CTLA-4 (全)	ECD (CTLA-4)氨基酸	<p>KAMHVAQPAVVLASSRGI ASFVCEYASPGKATEVRVT VLRQADSQVTEVCAATYM MGNELTFLDDSICTGTSSG NQVNLTIQGLRAMDTGLYI CKVELMYPPPYLIGINGT QIYVIDPEPCPDSDFLLWIL AAVSSGLFFYSFLLT (SEQ ID NO: 99)</p>
CTLA-4 (全)	ECD (CTLA-4)核酸	<p>AAGGCCATGCATGTGGCT CAGCCTGCTGTGGTGCTG GCCTCTTCTAGAGGAATC GCCAGCTTCGTGTGCGAG TACGCCTCTCCTGGAAAG GCCACTGAAGTGCGCGTG ACCGTTCTGAGACAGGCC GATAGCCAAGTGACCGAA GTGTGCGCCGCCACCTAC ATGATGGGCAACGAGCTG ACCTCCTGGACGACAGC ATCTGTACCGGCACCAGC AGCGGCAATCAAGTGAAC CTGACCATCCAGGGCCTG AGAGCCATGGATACCGGC CTGTACATCTGCAAGGTG GAACTGATGTACCCTCCTC CTTACTACCTCGGCATCGG CAACGGCACCCAGATCTA</p>

[0951]

		CGTGATCGACCCTGAGCC TTGTCCTGACAGCGACTTT CTGCTGTGGATCCTGGCTG CCGTGTCCAGCGGCCTGTT CTTCTACTCTTTTCTGCTG ACC (SEQ ID NO: 100)
KIR3DL1 (全)	ECD (KIR3DL1)氨基酸	HMGGQDKPFLSAWPSAVV PRGGHVTLRCHYRHRFNNF MLYKEDRIHIPIFHGRIFQES FNMSPVTTAHAGNYTCRGS HPSPTGWSAPSNPVVIMV TGNHRKPSLLAHPGPLVKS GERVILQCWSDIMFEHFFL HKEGISKDPSRLVGQIHDG VSKANFSIGPMMLLAGTY RCYGSVTHTPYQLSAPSDP LDIVVTGYPYEKPSLSAQPGP KVQAGESVTLSCSRSSYD MYHLSREGGAHERRLPAV RKVNRTFQADFPLGPATHG GTYRCFGSFRHSPYEWSDP SDPLLVSVTGNPSSSWPSPT EPSSKSGNPRHLH (SEQ ID NO: 101)
KIR3DL1 (全)	ECD (KIR3DL1)核酸	CACATGGGCGGACAGGAT AAGCCTTTCCTGAGCGCCT GGCCTTCTGCCGTTGTTC TAGAGGCGGACACGTGAC CCTGCGGTGTCACTACAG ACACCGGTTCAACAACCTT CATGCTGTACAAAGAGGA CCGGATTCACATCCCCATC TTCCACGGCCGGATCTTCC AAGAGTCCTTCAACATGA GCCCCGTGACCACAGCTC ACGCCGCAACTACACAT GCAGAGGCTTCCACCCTC ACAGCCCTACAGGCTGGA GTGCCCCTTCTAACCCCGT GGTCATCATGGTCACCGG CAACCACAGAAAGCCCAG CCTGCTTGCTCATCCCGGA CCTCTGGTTAAGTCTGGCG AGCGAGTGATCCTGCAGT GTTGGAGCGATATTATGTT CGAGCACTTCTTTCTGCAC AAAGAGGGCATCAGCAAG GACCCCTCTAGACTCGTG GGCCAGATCCATGATGGC GTGTCCAAGGCCAACTTC

[0952]

		AGCATCGGCCCTATGATG CTGGCCCTGGCCGGCACC TATAGATGTTACGGCAGC GTGACCCACACACCTTAC CAGCTGAGCGCCCCTAGC GACCCTCTGGATATCGTG GTCACAGGCCCTACGAG AAGCCTAGCCTGTCTGCA CAGCCTGGACCTAAAGTG CAGGCCGGCGAAAGCGTG AACTGAGCTGTAGCAGC AGATCCAGCTACGACATG TACCACCTGAGCAGAGAA GGCGGAGCCCACGAGAGA AGGCTGCCTGCCGTCAGA AAAGTGAACCGGACCTTC CAGGCCGACTTTCCTCTGG GACCTGCTACACACGGCG GCACCTACCGGTGTTTCG GCAGCTTTAGACACAGCC CTTACGAGTGGAGCGACC CCTCTGATCCTCTGCTGGT GTCTGTGACCGGCAATCC TAGCAGCAGCTGGCCCTC TCCAACAGAGCCTTCTAG CAAGAGCGGCAACCCAG ACATCTGCAC (SEQ ID NO: 102)
TIGIT (全)	ECD (TIGIT)氨基酸	MMTGTIETTGNISAIEKGGSI ILQCHLSSTTAQVTQVNWE QQDQLLAICNADLGWHISP SFKDRVAPGPGGLGLTLQSL TVNDTGEYFCIYHTYPDGT YTGRIFLEVLESSVAEHGAR FQIP (SEQ ID NO: 103)
TIGIT (全)	ECD (TIGIT)核酸	ATGATGACCGGCACCATC GAGACAACCGGCAACATC TCTGCCGAGAAAGGCGGC AGCATCATCCTGCAGTGT CACCTGTCTAGCACCACC GCTCAAGTGACCCAAGTG AACTGGGAGCAGCAGGAT CAGCTGCTGGCCATCTGC AATGCCGATCTCGGCTGG CACATCAGCCCCAGCTTC AAGGATAGAGTGGCCCCT GGACCTGGCCTGGGACTG ACACTTCAGAGCCTGACC GTGAACGATACCGGCGAG TACTTCTGCATCTACCACA

[0953]

		CATACCCCGACGGCACCT ATACCGGCCGGATCTTTCT GGAAGTGCTGGAAAGCTC TGTGGCCGAGCACGGCGC CAGATTTTCAGATTCCT (SEQ ID NO: 104)
NKG2A (全)	抑制性细胞溶质结 构域 1 (NKG2A) 氨基酸	MDNQGVYISDLNLPPNPKR QQRKPKGNKNSILATEQEIT YAELNLQKASQDFQGNDK TYHCKDLPSAPEK (SEQ ID NO: 105)
NKG2A (全)	抑制性细胞溶质结 构域 1 (NKG2A) 核酸	ATGGACAACCAGGGCGTG ATCTACAGCGACCTGAAC CTGCCTCCTAATCCTAAGC GGCAGCAGAGAAAGCCCA AGGGCAACAAGAACAGCA TCCTGGCCACCGAGCAAG AGATCACCTACGCCGAGC TGAATCTGCAGAAGGCCA GCCAGGACTTCCAGGGCA ACGACAAGACCTACCACT GCAAGGACCTGCCTAGCG CTCCCGAGAAG (SEQ ID NO: 106)
NKG2A (全)	TM (NKG2A)氨基 酸	LIVGILGIICLILMASVVTIV VI (SEQ ID NO: 107)
NKG2A (全)	TM (NKG2A)核酸	CTGATCGTGGGAATCCTG GGCATCATCTGCCTGATCC TGATGGCCAGCGTGGTCA CCATCGTGGTCATC (SEQ ID NO: 108)
NKG2A (全)	ECD (NKG2A)氨基 酸	PSTLIQRHNNSSLNTRTQKA RHCGHCPPEEWITYSNSYY IGKERRTWEESLLACTSKN SSLLSIDNEEEMKFLSIHSPSS WIGVFRNSSHPWVTMNG LAFKHEIKDSDNAELNCAV LQVNRLKSAQCGSSIIYHCK HKL (SEQ ID NO: 109)
NKG2A (全)	ECD (NKG2A)核酸	CCCAGCACACTGATCCAG CGGCACAACAACAGCAGC CTGAACACCAGAACACAG AAGGCCCGGCACTGCGGC CACTGTCCTGAAGAGTGG ATCACATAACAGCAACAGC TGCTACTACATCGGCAAA GAGCGGCGGACCTGGGAA GAATCTCTGCTGGCCTGC ACCAGCAAGAACTCCAGC CTGCTGAGCATCGACAAC

[0954]		<p>GAGGAAGAGATGAAGTTC CTGTCCATCATCAGCCCA GCAGCTGGATCGGCGTGT TCAGAAACAGCTCCCACC ATCCTTGGGTCACCATGA ACGGCCTGGCCTTCAAGC ACGAGATCAAGGACAGCG ACAACGCCGAAGTGAAGT GTGCCGTGCTGCAAGTGA ACCGGCTGAAGTCTGCCC AGTGTGGCAGCAGCATCA TCTATCACTGCAAGCACA AGCTG (SEQ ID NO: 110)</p>
	<p>NKG2A (全) 标签 (NGAA + Myc 标 签)氨基酸</p>	<p>NGAAEQKLISEEDL (SEQ ID NO: 111)</p>
	<p>NKG2A (全) 标签 (NGAA + Myc 标 签)核酸</p>	<p>AATGGGGCCGCAGAACAA AAACATCTCAGAAGAA GATCTG (SEQ ID NO: 112)</p>

[0955] 结果

[0956] NK细胞被工程化成表达激活性嵌合受体 (aCAR) 和具有各种抑制性结构域形式 (诸如衍生自不同抑制性受体的各种抑制性结构域、各种CAR序列 (例如, 各种跨膜或铰链序列) 和/或抑制性结构域的各种串联组织) 的抑制性嵌合受体 (iCAR)。所评估的形式描述于表14中。用仅aCAR或其与具有各种所指示的抑制性结构域的iCAR的组合对NK细胞进行病毒转导。然后针对iCAR减少aCAR诱导的NK细胞介导的靶细胞杀伤和NK细胞细胞因子产生来对工程化NK细胞进行评估。结果表明, NK成功地被工程化成共表达aCAR和iCAR, 在不存在iCAR配体的情况下以aCAR配体依赖性方式成功地杀伤靶细胞并产生细胞因子, 并且以iCAR配体依赖性方式成功地减少NK介导的杀伤和细胞因子产生。

[0957] 实施例8: 各种抑制性嵌合受体在减少NK细胞激活方面的进一步评估

[0958] 材料和方法

[0959] 将单独的iCAR和aCAR构建体包装至慢病毒颗粒中并用于在用K562饲养细胞与500U/mL IL-2和20ng/uL IL-15扩增10天之后转导原代NK细胞。通过p24滴度设定病毒量 (每次转导750,000pg)。iCAR构建体含有puroR盒, 并且在转导之后第4天至第7天, 将嘌呤霉素添加至NK细胞培养物中, 此时通过流式细胞术评估表达并将NK细胞转移至微孔板中以供用12,500个NK细胞和50,000个总肿瘤细胞的杀伤测定。将NK细胞与以下一起培养: (1) 仅表达aCAR抗原的肿瘤细胞 (SEM细胞); (2) 表达aCAR抗原和iCAR抗原两者的肿瘤细胞; 或 (3) 混合的两种肿瘤细胞类型。16-18小时之后, 通过流式细胞术分析培养物并对每种类型的剩余活靶细胞进行计数。通过首先计算总杀伤 (与仅靶标条件相比的靶标减少), 然后减去通过对照 (仅iCAR) NK细胞的总杀伤来量化aCAR介导的给定NK细胞类型杀伤 (减去基础)。将iCAR介导的保护量化为具有或不具有iCAR抗原的靶标之间的aCAR介导的杀伤的变化。分析杀伤测定上清液的TNF α 分泌, 并且与杀伤类似地计算aCAR和iCAR性能指标。对于表达分析, 用aV5-Alexafluor 647染色iCAR并用aFLAG-BV-421染色aCAR。基于iCAR+/-和aCAR+/-表达状

态,将细胞分配至4个象限,使得能够评估“%aCAR+iCAR+”和“%非aCAR+iCAR-”(aCAR+iCAR-未经门控并且要避免潜在毒性的CAR-NK细胞)。为了进一步分析表达水平,测量了aCAR+iCAR+亚群体的aCAR和iCAR的中位荧光强度(MFI),其通过相应荧光通道中的未转导的NK细胞的MFI被归一化。对于每个iCAR,进行1-3个生物重复(示出为具有相同标志物类型的不同点)。X和Y误差线(适用时):+/-平均值的标准误差。

[0960] 所评估的iCAR构建体的序列示于表15中。每个iCAR构建体形式从N末端至C末端为:信号序列1-信号序列2-scFv-标签-铰链-TM-抑制性细胞溶质结构域1-抑制性细胞溶质结构域2(如果存在)。所评估的NKG2A形式不包括信号序列2。aCAR形式使用CD28-CD3z形式,其从N末端至C末端为:信号序列-标签-scFv-铰链-TM-胞内信号传导结构域1-胞内信号传导结构域2(参见表10B中示出的序列)。

[0961] 表15-NK细胞的iCAR形式和结构域

[0962]

构建体(通过 ICD)	结构域	序列
BTLA LIR1 LIR1 2x LIR1-KIR3D L1 KIR3DL1 KIR3DL1 2x NKG2A NKG2A (LIR1 TM)	信号序列 1 (CD8) 氨基酸	MALPVTALLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 71)
BTLA LIR1 LIR1 2x LIR1-KIR3D L1 KIR3DL1 KIR3DL1 2x NKG2A NKG2A (LIR1 TM)	信号序列 1 (CD8) 核酸	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCC TGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCG CAGGCCG (SEQ ID NO: 72)
BTLA LIR1 LIR1 2x LIR1-KIR3D L1 KIR3DL1 KIR3DL1 2x	信号序列 2 (pelB) 氨基酸	KYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA (SEQ ID NO: 73)
BTLA LIR1 LIR1 2x LIR1-KIR3D L1 KIR3DL1 KIR3DL1 2x	信号序列 2 (pelB) 核酸	AAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCT GGATTGTTATTACTCGCGGCCAGCCG GCCATGGCC (SEQ ID NO: 74)
BTLA LIR1 LIR1 2x LIR1-KIR3D L1 KIR3DL1 KIR3DL1 2x NKG2A	scFv (具有(G4S) ₃ 接头的 iCAR 特异性 scFv)	具有(G4S) ₃ 接头的 iCAR 抗原特异性 scFv

[0963]

NKG2A (LIR1 TM)		
BTLA LIR1 LIR1 2x LIR1-KIR3D L1 KIR3DL1 KIR3DL1 2x NKG2A NKG2A (LIR1 TM)	标签 (V5 + NGAA 接头) 氨基酸	GKPIP NPLLGLDSTNGAA (SEQ ID NO: 77)
BTLA LIR1 LIR1 2x LIR1-KIR3D L1 KIR3DL1 KIR3DL1 2x NKG2A NKG2A (LIR1 TM)	标签 (V5 + NGAA 接头) 核酸	GGGAAGCCTATCCCGAACCCTCTGTTG GGTCTCGATAGTACCAATGGGGCCGCA (SEQ ID NO: 78)
BTLA LIR1 LIR1 2x LIR1-KIR3D L1 KIR3DL1 KIR3DL1 2x NKG2A NKG2A (LIR1 TM)	铰链 (CD8) 氨基酸	TTTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO: 37)
BTLA LIR1 LIR1 2x LIR1-KIR3D L1 KIR3DL1 KIR3DL1 2x NKG2A NKG2A (LIR1 TM)	铰链 (CD8) 核酸	ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCA ACACCGGCGCCCACCATCGCGTTGCAG CCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGC CGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCAC ACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT (SEQ ID NO: 79)
KIR3DL1 KIR3DL1 2x	TM (KIR3DL1) 氨基酸	ILIGTSVVIILFILLFFLL (SEQ ID NO: 69)
KIR3DL1 KIR3DL1 2x	TM (KIR3DL1) 核酸	ATCCTGATCGGGACAAGTGTAGTAATC ATACTTTTCATACTCCTGCTCTTTTTTCT CTTG (SEQ ID NO: 81)
LIR1	TM	VIGILVAVILLLLLLLLLLLFLI (SEQ ID NO:

[0964]

LIR1-KIR3D L1 LIR1 2x NKG2A (LIR1 TM)	(LIR1) 氨基酸	59)
LIR1 LIR1-KIR3D L1 LIR1 2x	TM (LIR1) 核酸	GTTATAGGGATCCTGGTGGCTGTCATAC TCCTCTTGCTCCTCTTGTTGCTGCTTTTT TTGATA (SEQ ID NO: 62)
NKG2A (LIR1 TM)	TM (LIR1) 核酸	GTGATCGGCATTCTGGTGGCCGTGATTC TGCTGCTCCTGCTGTTGCTGCTGCTGTT CCTGATC (SEQ ID NO: 131)
BTLA	TM (BTLA) 核酸	LLPLGGLPLLITTCFCLFCCL (SEQ ID NO: 12)
BTLA	TM (BTLA) 核酸	CTCTTGCCGTTGGGGGTCTGCCACTTC TCATAACAACCTTGCTTCTGCCTTTTTTG CTGTTG (SEQ ID NO: 14)
NKG2A	TM (NKG2A) 氨基酸	LIVGILGIICLILMASVVTIVVI (SEQ ID NO: 107)
NKG2A	TM (NKG2A) 氨基酸	CTGATCGTGGGCATCCTGGGCATCATCT GTCTGATCCTGATGGCCAGCGTGGTCA CCATCGTGGTCATC (SEQ ID NO: 132)
KIR3DL1 KIR3DL1 2x	抑制性细胞溶 质结构域 1 (KIR3DL1) 氨基酸	HLWCSNKKNAAVMDQEPAGNRTANSED SDEQDPEEVTYAQLDHCVFTQRKITRPSQ RPKTPPTDILYTELPNAKPRSKVVSCP (SEQ ID NO: 66)
KIR3DL1 KIR3DL1 2x	抑制性细胞溶 质结构域 1 (KIR3DL1) 核酸	CATCTGTGGTGTCTAATAAGAAGAAT GCTGCTGTGATGGATCAAGAGCCCGCT GGTAACAGAACGGCCAACAGTGAAGAT AGCGATGAGCAGGACCCAGAAGAAGT GACCTACGCCCAACTCGACCACTGTGTT TTACGCAGCGGAAAATCACTCGACCC TCTCAACGACCCAAAACGCCGCCTACG GACACCATACTCTACACCGAAGTCCG AACGCCAAACCACGGTCCAAGGTGGTA TCATGTCCG (SEQ ID NO: 85)
LIR1 LIR1-KIR3D L1 LIR1 2x	抑制性细胞溶 质结构域 1 (LIR1) 氨基酸	LRHRRQGKHWSTSTQRKADFQHPAGAVG PEPTDRGLQWRSSPAADAQEENLYAAVK HTQPEDGVEMDTRSPHDEDPQAVTYAEV KHSRPRREMASPPSPLSGEFLDTKDRQAE EDRQMDTEAAASEAPQDVTYAQLHSLTL RREATEPPPSQEGPSPAVPSIYATLAIH (SEQ ID NO: 50)
LIR1 LIR1-KIR3D L1 LIR1 2x	抑制性细胞溶 质结构域 1 (LIR1)	TTGCGCCACAGACGGCAGGGAAAGCAC TGGACTAGTACGCAGAGGAAAGCGGAC TTCCAGCATCCCGCAGGAGCCGTGGGG CCTGAACCCACTGATCGCGGCCTTCAAT

[0965]

	核酸	GGAGGTCTAGCCCGGCGGCAGACGCAC AAGAGGAAAACCTTGTACGCAGCCGTTA AGCACACCCAACCGGAGGACGGCGTTG AGATGGATACCCGCTCCCCTCACGATG AAGACCCTCAAGCAGTCACTTACGCGG AAGTAAAGCATAGCCGCCCCAGACGGG AAATGGCTAGCCCGCCGTCCCCCTTA GCGGGGAATTTCTGGACACTAAAGATA GGCAGGCGGAAGAGGACCGCCAAATG GATACAGAGGCGGCGGCAAGTGAAGC ACCTCAAGACGTTACTTACGCTCAACTT CACAGCCTTACCCTCAGGCGAGAAGCG ACTGAACCACCCCTTCCCAAGAAGGG CCAAGCCCAGCGGTTCTTCTATCTATG CTACTCTTGCTATTAC (SEQ ID NO: 54)
BTLA	抑制性细胞溶 质结构域 1 (BTLA) 氨基酸	RRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSE QTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFR MQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASLNHS VIGPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS (SEQ ID NO: 3)
BTLA	抑制性细胞溶 质结构域 1 (BTLA) 核酸	AGAAGACATCAGGGGAAGCAGAATGA ACTCAGCGATACAGCAGGGCGAGAAAT TAATTTGGTAGACGCGCATCTGAAGTC CGAACAGACAGAGGCTTCTACTAGACA GAACTCCCAAGTTTTGTTGAGTGAGAC GGGGATCTATGATAATGATCCCGATCT GTGTTTTAGAATGCAGGAGGGTAGTGA AGTCTACTCAAACCCGTGCCTGGAAGA AAATAAGCCCGGCATTGTTTACGCTAG TTTGAATCATTCTGTAATAGGCCCGAAC TCCAGACTGGCTCGCAATGTGAAGGAG GCCCAACTGAGTATGCGTCCATTTGCG TGCGGTCT (SEQ ID NO: 52)
NKG2A NKG2A (LIR1 TM)	抑制性细胞溶 质结构域 1 (NKG2A) 氨基酸	MDNQGVIYSDLNLPPNPKRQQRKPKGNK NSILATEQEITYAELNLQKASQDFQGNDK TYHCKDLPSAPEK (SEQ ID NO: 105)
NKG2A NKG2A (LIR1 TM)	抑制性细胞溶 质结构域 1 (NKG2A) 核酸	ATGGACAACCAGGGCGTCATCTACAGC GACCTGAACCTGCCTCCTAATCCAAAG CGGCAGCAGCGGAAGCCCAAGGGCAA CAAGAATAGCATCCTGGCCACCGAGCA AGAGATCACCTACGCCGAGCTGAATCT GCAGAAGGCCAGCCAGGATTTCCAGGG CAACGACAAGACCTACCACTGCAAGGA CCTGCCTAGCGCTCCTGAGAAA (SEQ ID NO: 130)
LIR1-KIR3D L1 KIR3DL1 2x	抑制性细胞溶 质结构域 2 (KIR3DL1)	SEQ ID NO: 66

	氨基酸	
[0966]	LIR1-KIR3DL1 KIR3DL1 2x 抑制性细胞溶质结构域 2 (KIR3DL1) 核酸	SEQ ID NO: 85
	LIR1 2x 抑制性细胞溶质结构域 2 (LIR1) 氨基酸	SEQ ID NO: 50
	LIR1 2x 抑制性细胞溶质结构域 2 (LIR1) 核酸	SEQ ID NO: 54

[0967] 结果

[0968] NK细胞被工程化成表达激活性嵌合受体 (aCAR) 和具有各种抑制性结构域形式 (诸如衍生自不同抑制性受体的各种抑制性结构域、各种CAR序列 (例如, 各种跨膜或铰链序列) 和/或抑制性结构域的各种串联组织) 的抑制性嵌合受体 (iCAR)。所评估的形式描述于表15中。用仅aCAR或其与具有各种所指示的抑制性结构域的iCAR的组合对NK细胞进行病毒转导。

[0969] 评估工程化NK细胞的CAR表达。如图20中所示, 在aCAR+iCAR+NK细胞 (上图) 中, aCAR表达通常是背景的大于10倍, 并且iCAR通常是大于100倍。LIR1构建体展示出相对于其他构建体明显高的表达。还评估了CAR表达群体的概况 (下图) 并表明总群体含有少于5% aCAR+iCAR- 细胞并且对于各种iCAR形式具有不同百分比的aCAR+iCAR+群体。同样, 相对于其他构建体, 含有LIR1的iCAR通常明显展示出较大比例的aCAR+iCAR+细胞。

[0970] 接下来, 评估了aCAR诱导的NK细胞介导的靶细胞杀伤和NK细胞细胞因子产生的iCAR减少。单独地 (“单独”: 仅aCAR抗原SEM细胞和共表达aCAR/iCAR抗原的SEM细胞单独地) 或在混合的靶细胞和非靶细胞的群体的情形下 (“混合的”: 仅aCAR抗原SEM细胞和共表达aCAR/iCAR抗原的SEM细胞一起在同一培养物中) 评估靶SEM细胞中的每个的减少。如图21中所示, 表达LIR1、LIR1 (2x)、KIR3DL1、KIR3DL1 (2x) iCAR形式的NK细胞展示出一致的aCAR介导的杀伤性能 (上图) 以及iCAR介导的杀伤 (上图) 和细胞因子减少 (下图) 两者的保护, 其中BTLA和NKG2A构建体的性能改变较大。

[0971] 结果表明, NK成功地被工程化成共表达aCAR和iCAR, 在不存在iCAR配体的情况下以aCAR配体依赖性方式成功地杀伤靶细胞并产生细胞因子, 并且以iCAR配体依赖性方式成功地减少NK介导的杀伤和细胞因子产生。

[0972] 以引用的方式并入

[0973] 本申请中所引用的所有公布、专利、专利申请和其他文件出于所有目的特此以引用的方式整体并入, 其程度如同每个单独的公布、专利、专利申请或其他文件出于所有目的单独地以引用的方式并入。

[0974] 等效物

[0975] 尽管已经说明并描述了各种特定实施方案, 但是上文说明书不具有限制性。应当

理解,可在不脱离本公开的精神和范围的情况下进行各种改变。许多变化在回顾本说明书之后对于本领域技术人员而言是显而易见的。

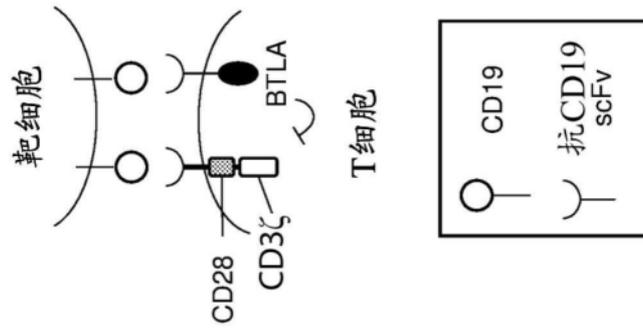


图1A

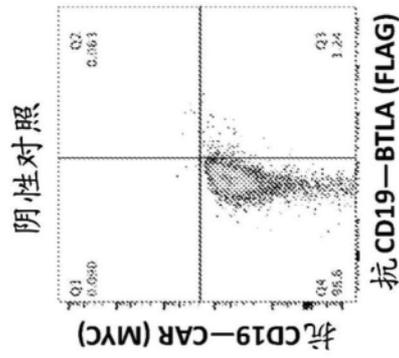


图1B

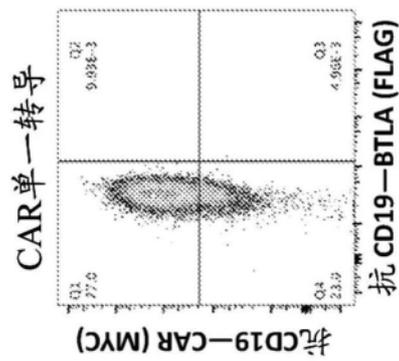


图1C

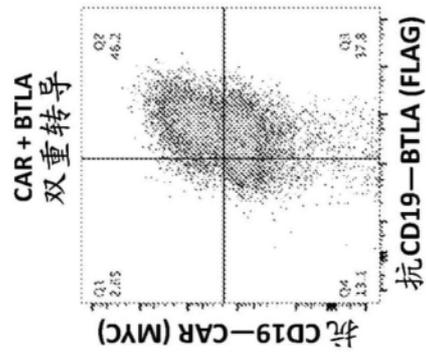


图1D

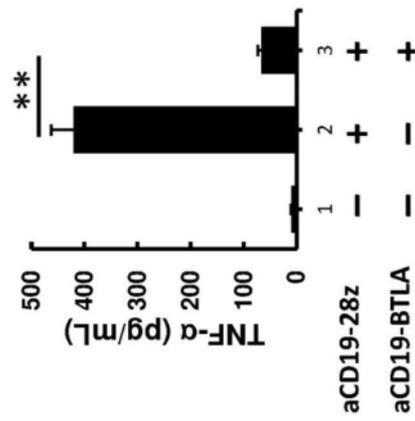


图2A

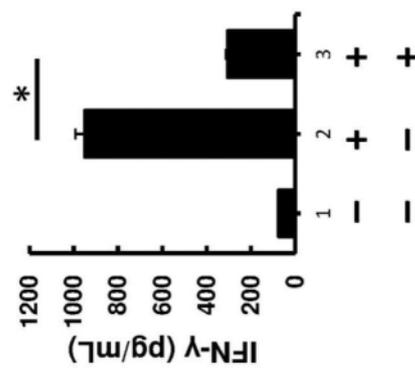


图2B

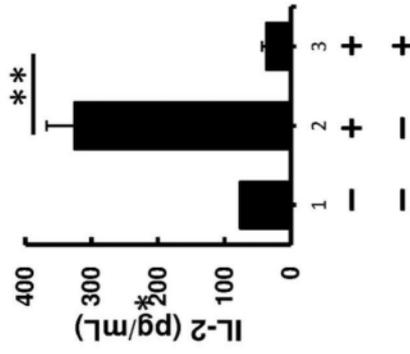


图2C

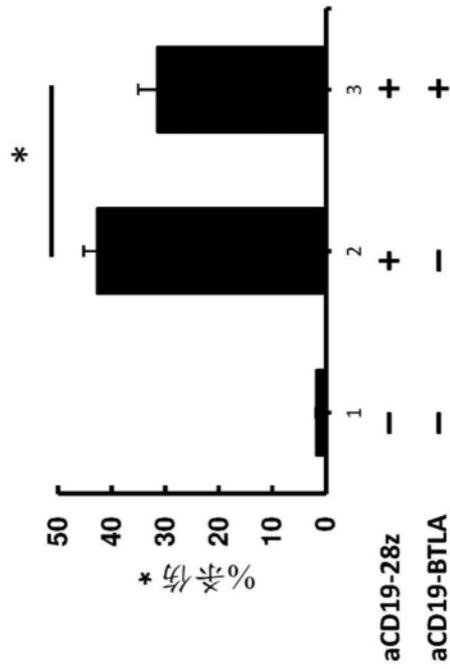


图3

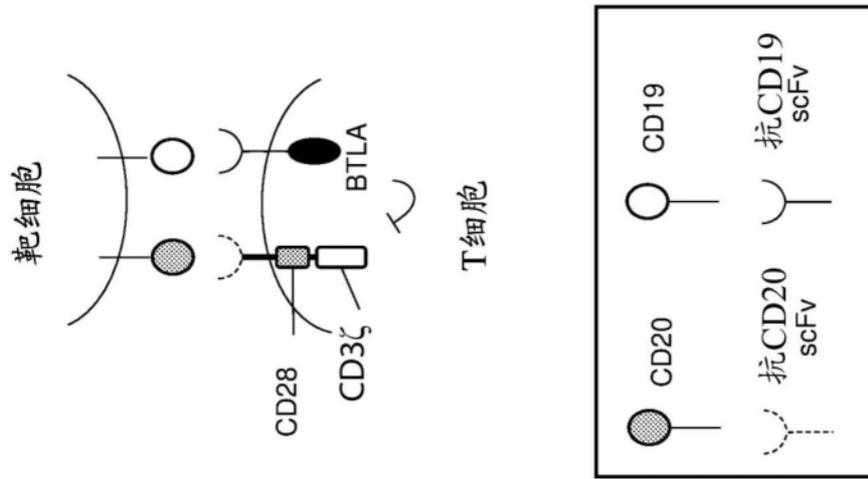


图4A

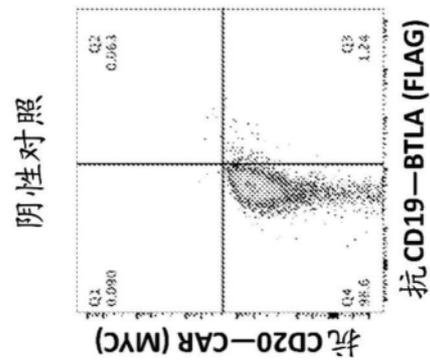


图4B

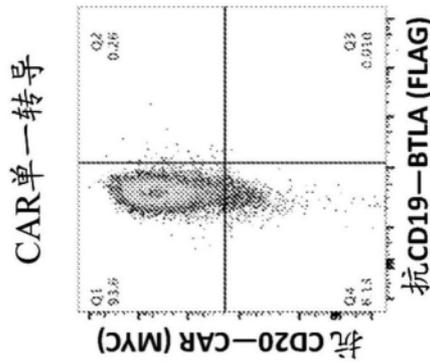


图4C

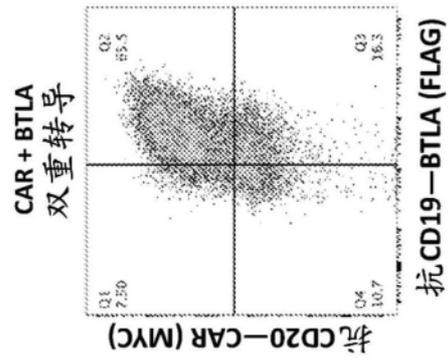


图4D

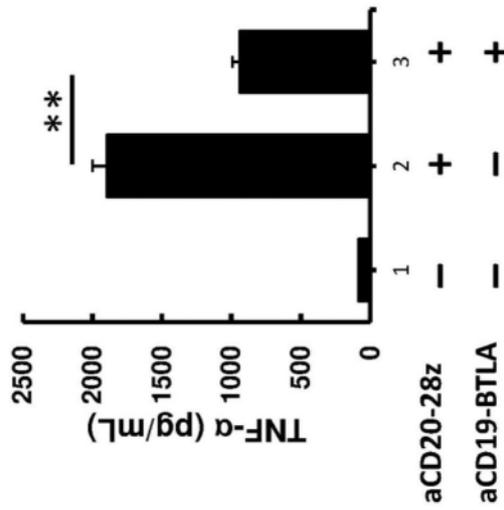


图5A

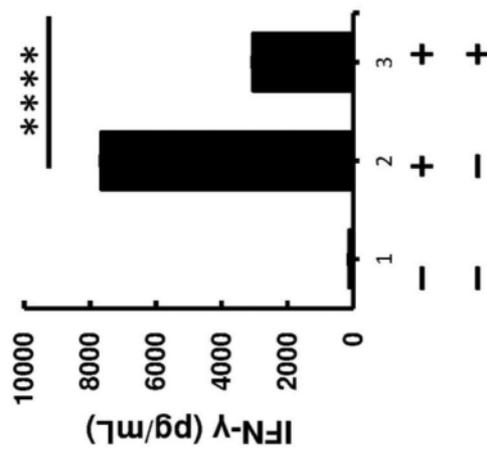


图5B

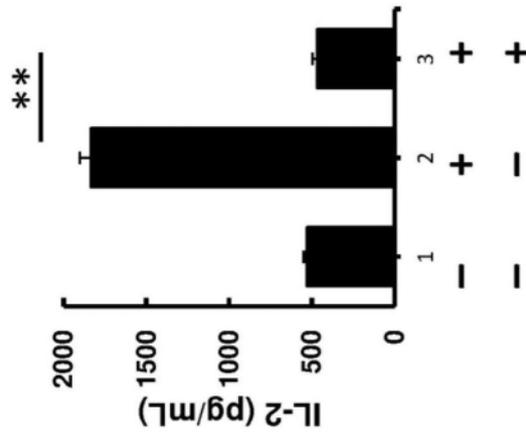


图5C

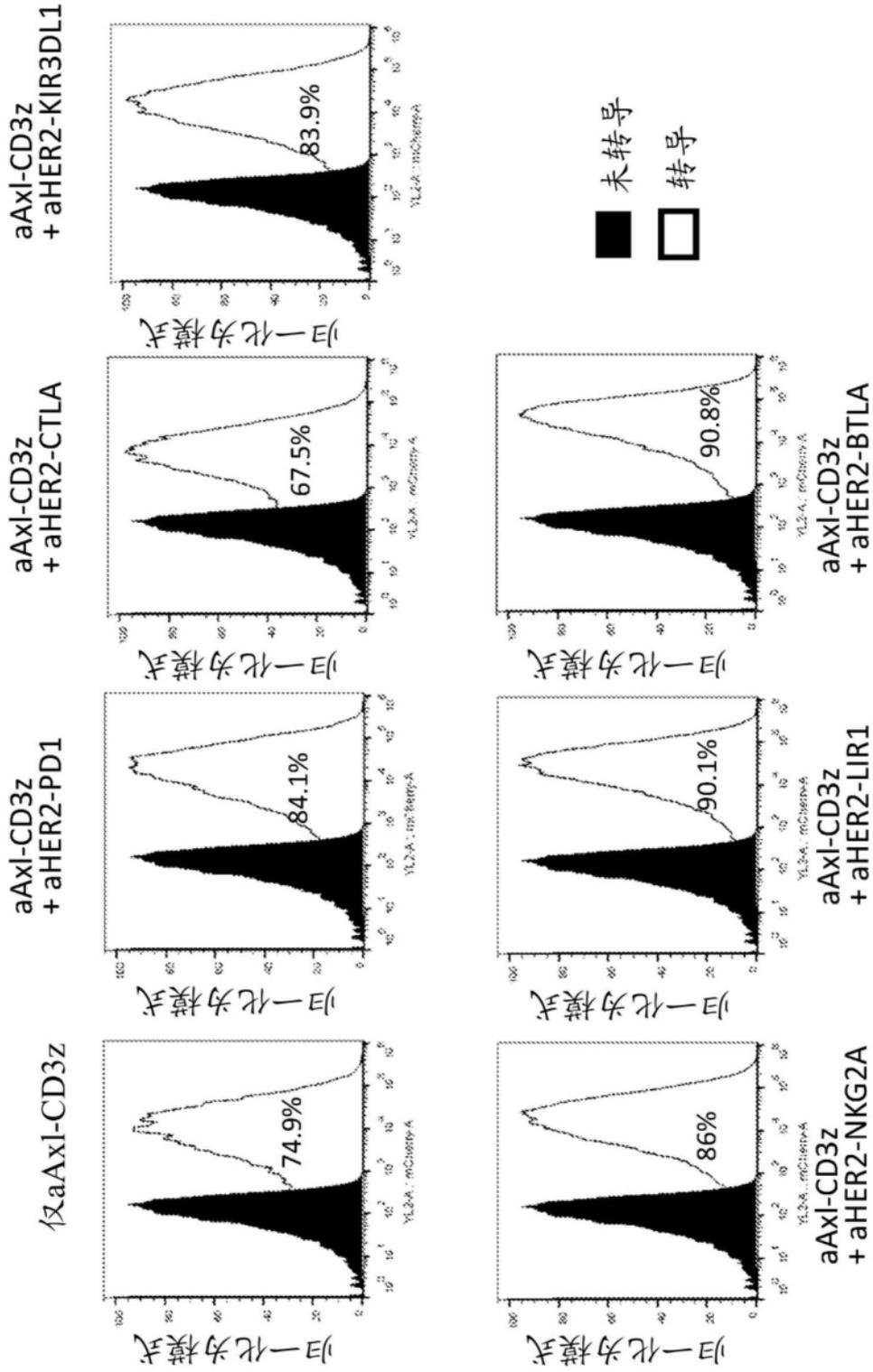


图6

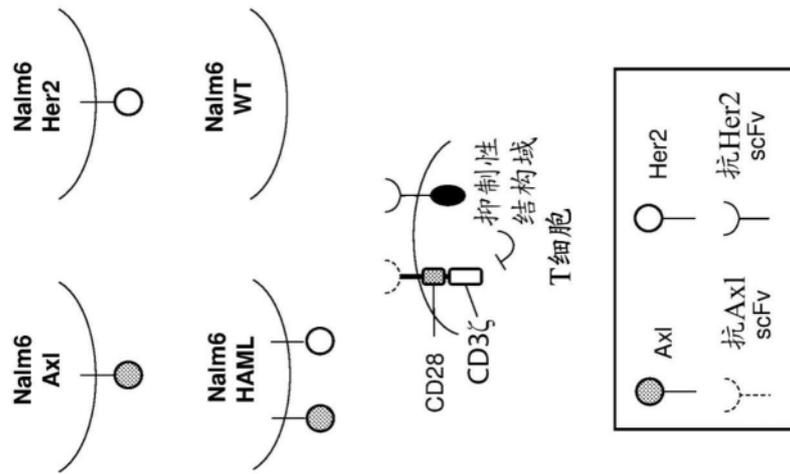


图7A

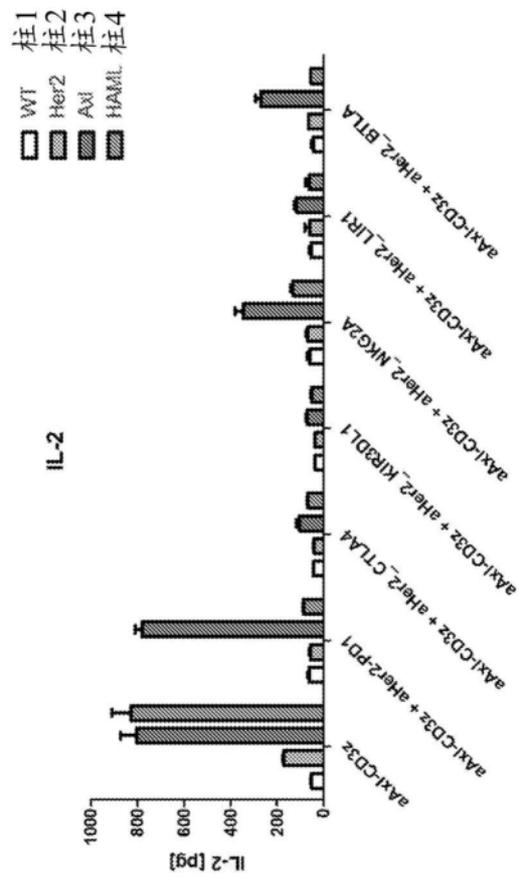


图7B

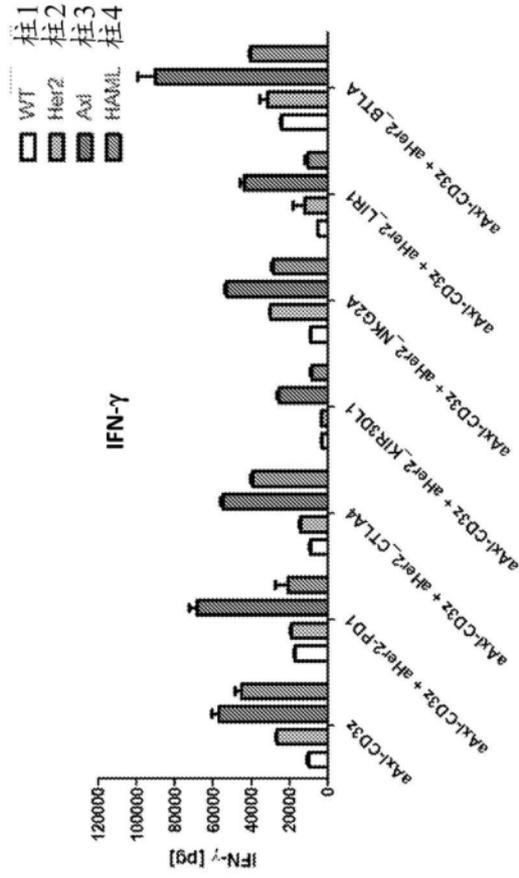


图7C

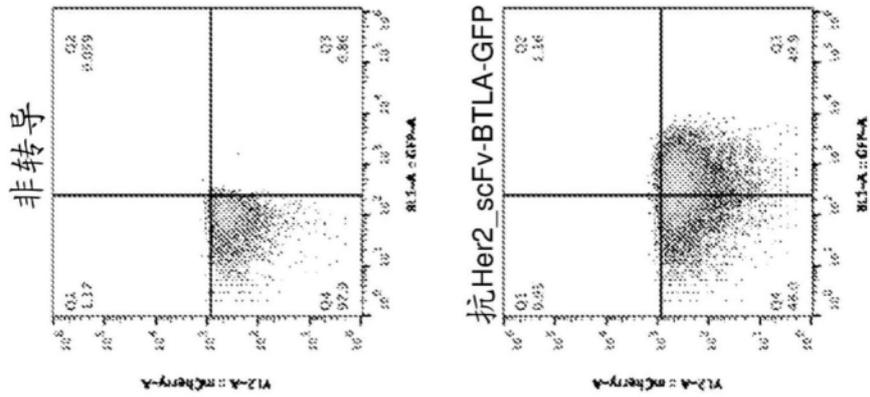


图8A

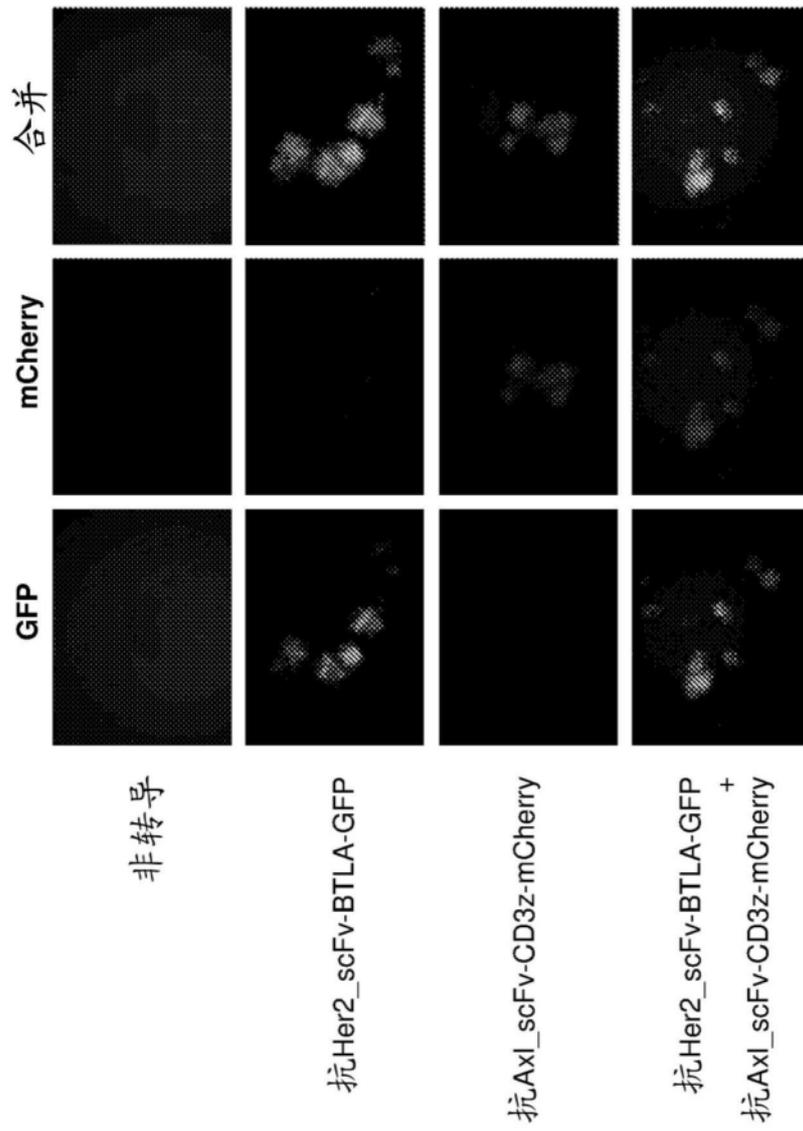


图8B

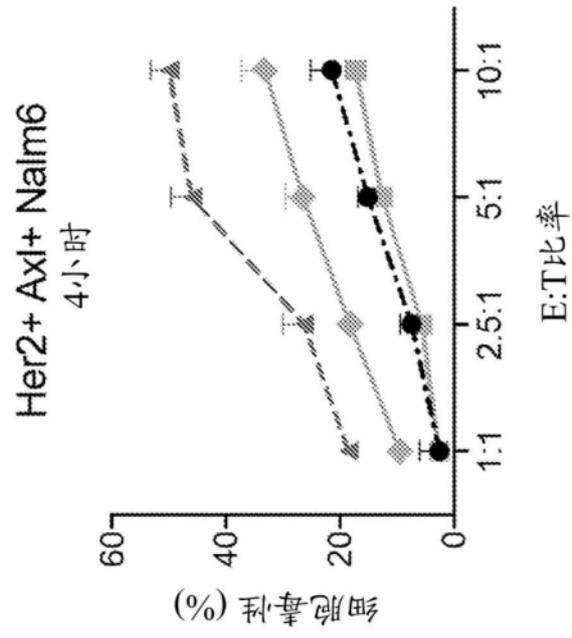


图9A

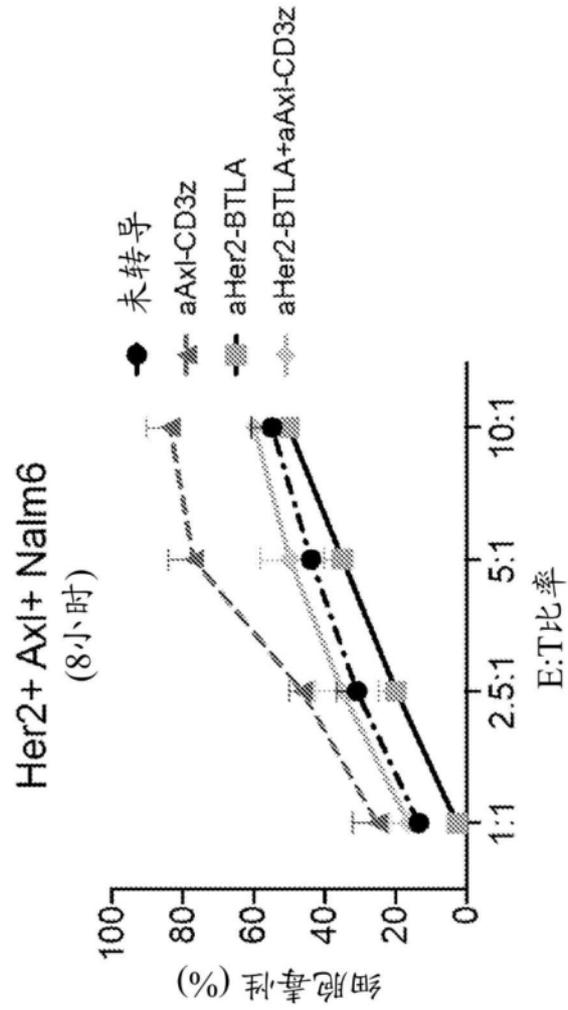


图9B

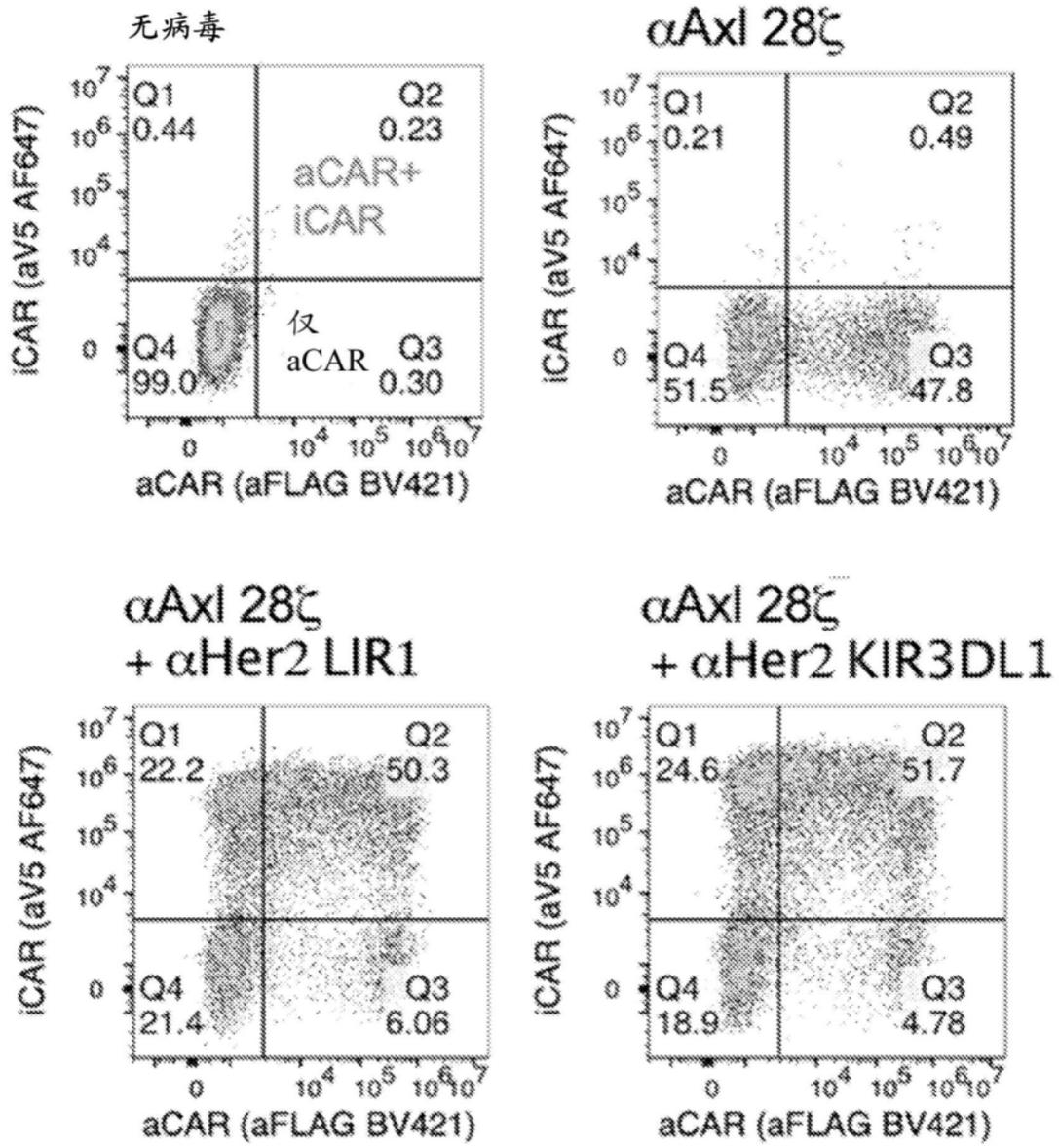


图10

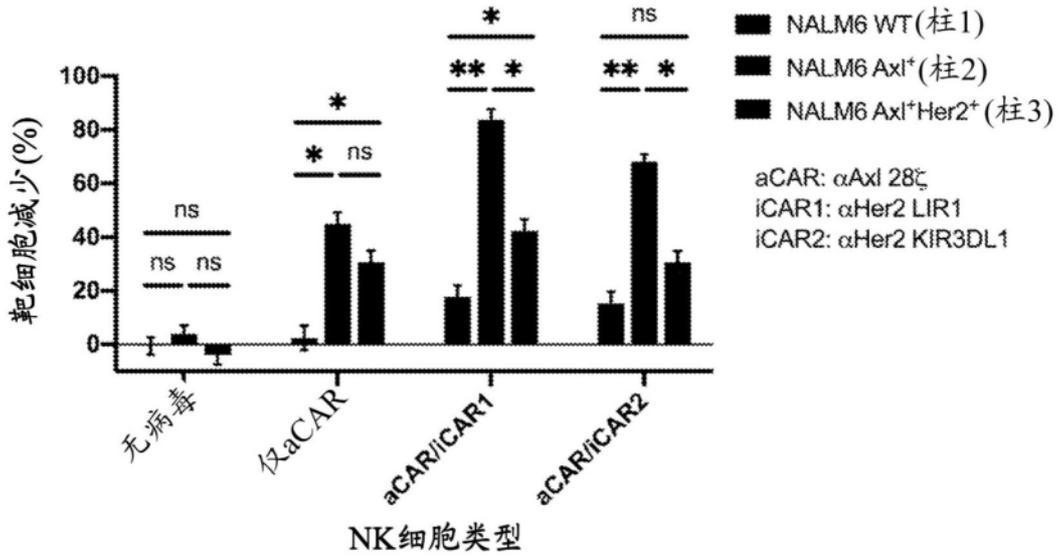


图11

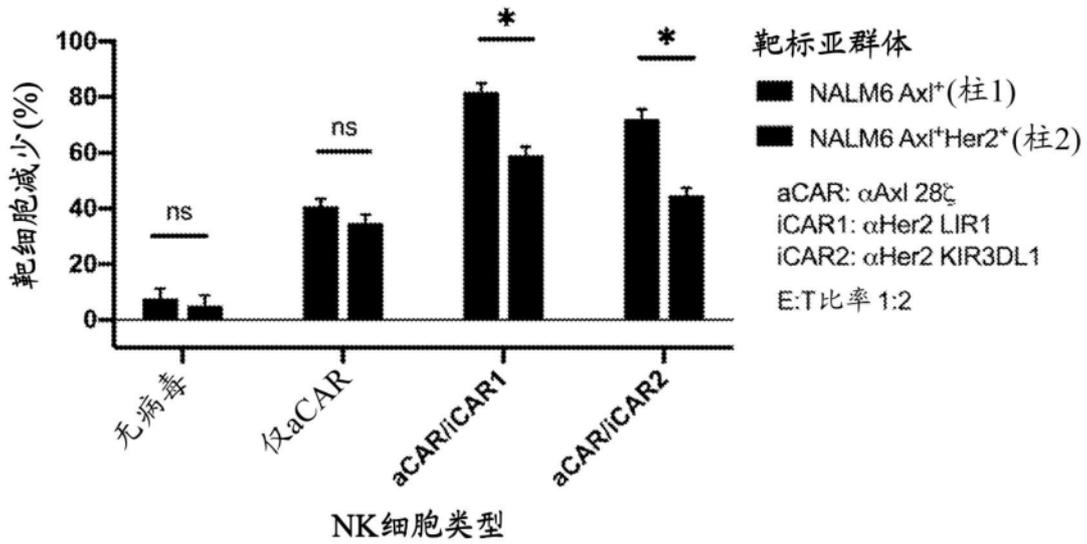


图12

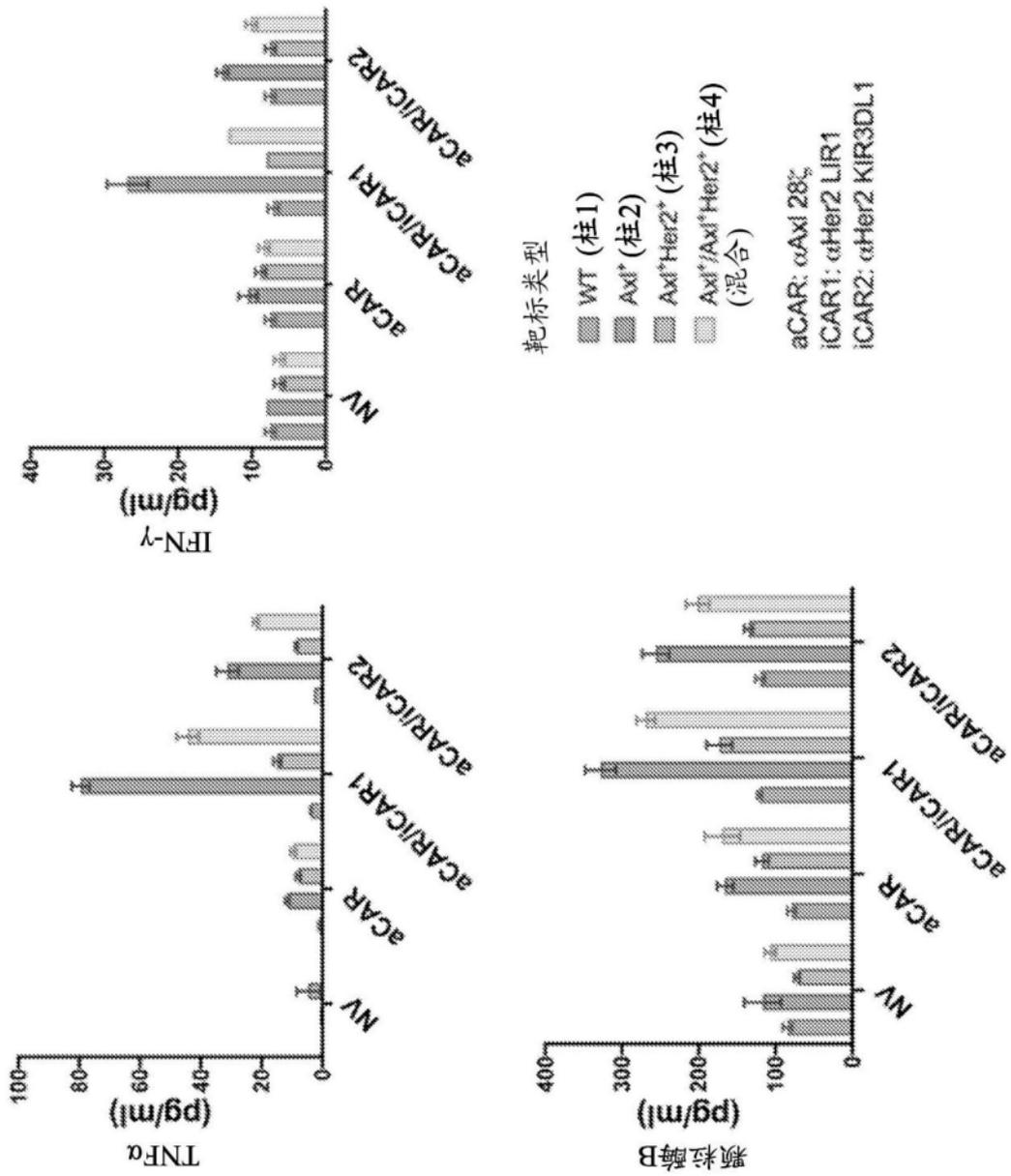


图13

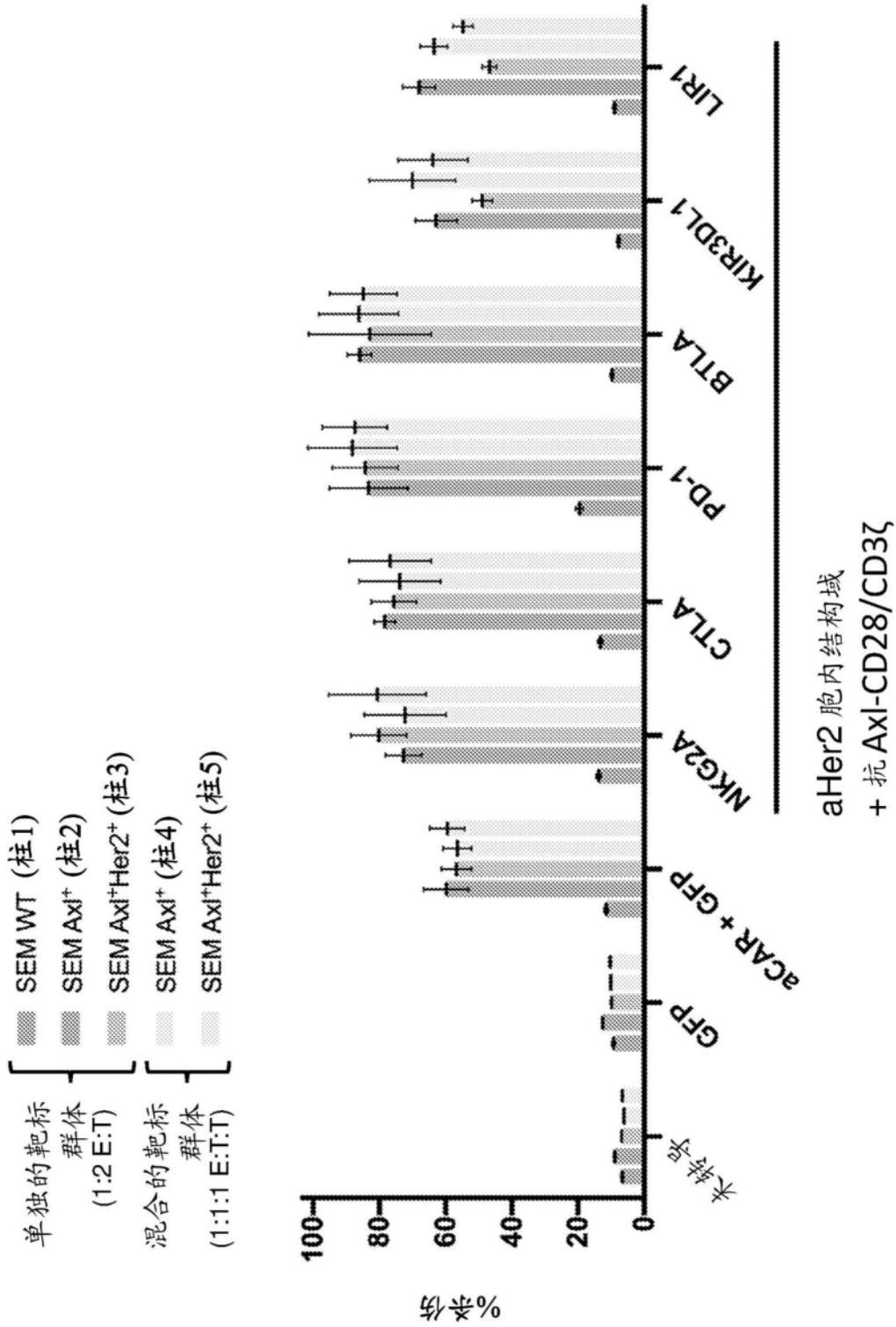


图14

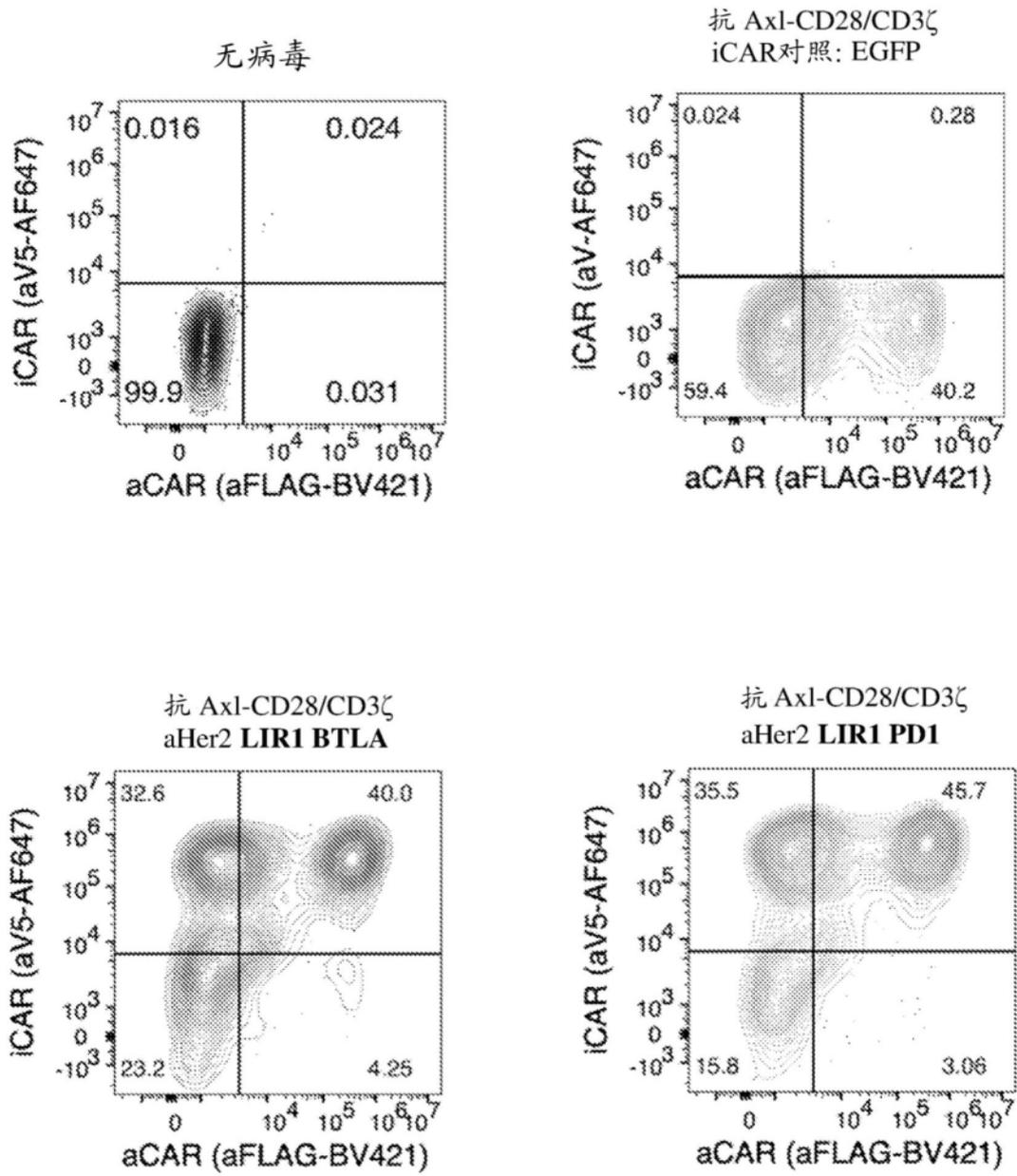


图15

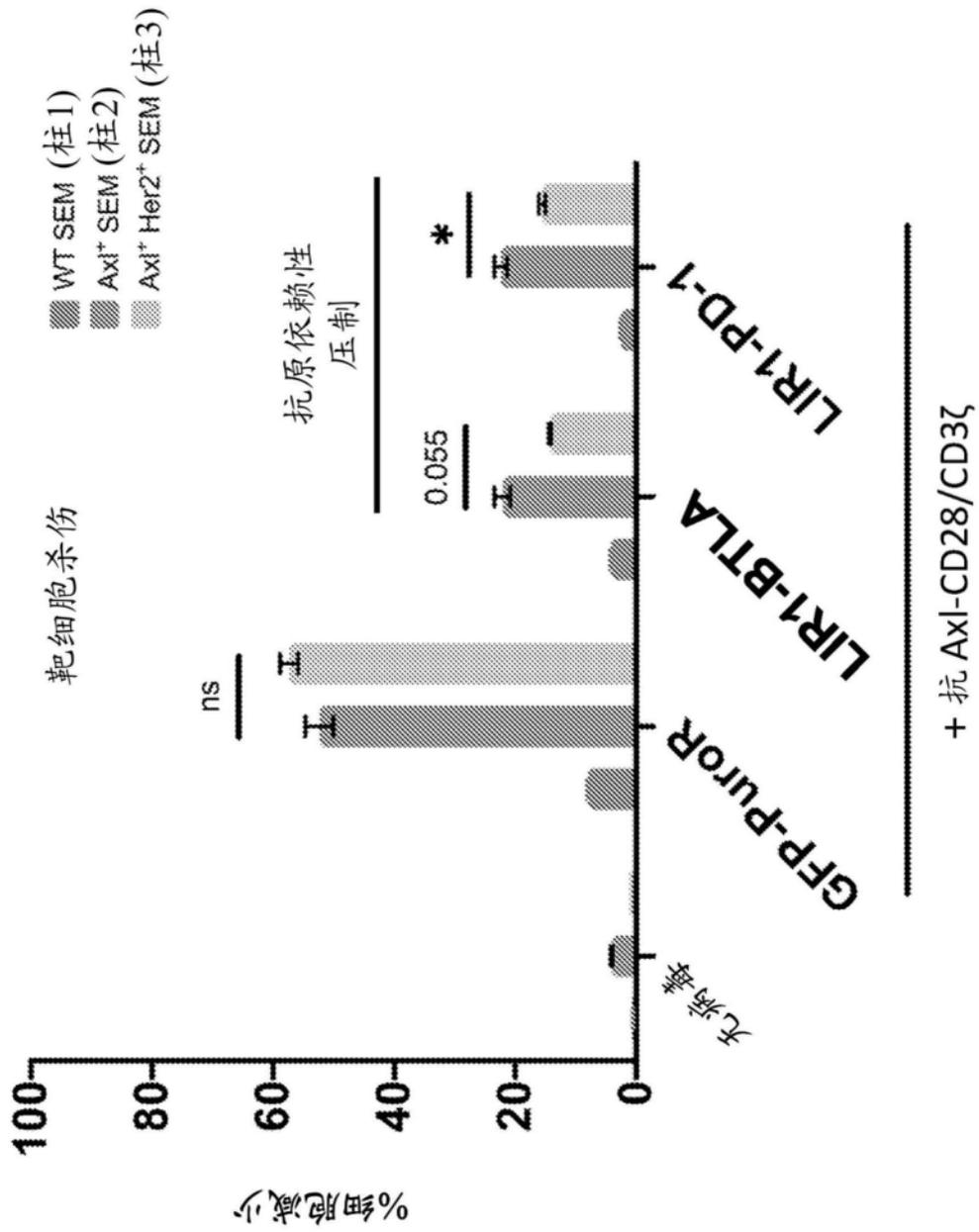


图16

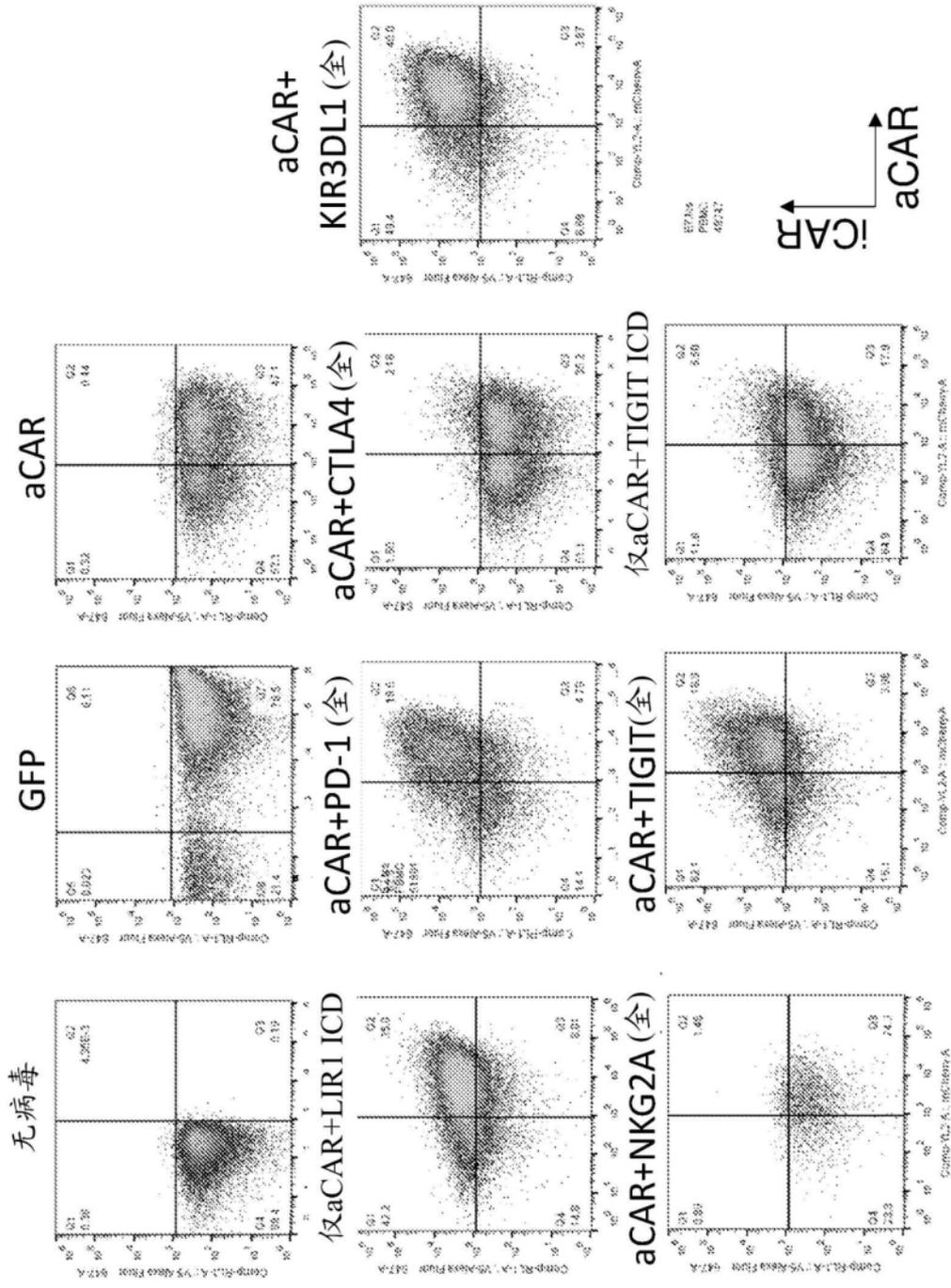


图17

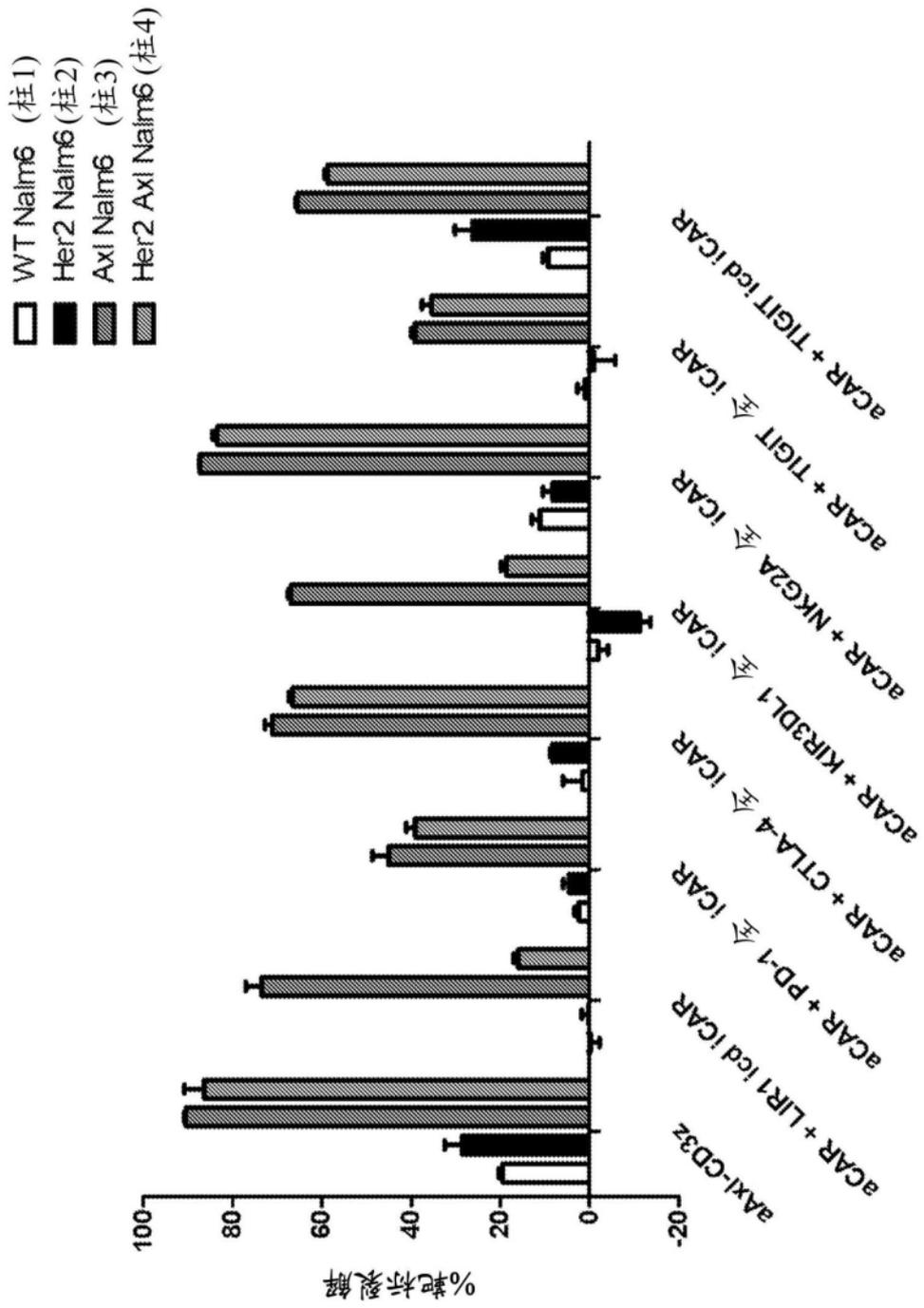


图18

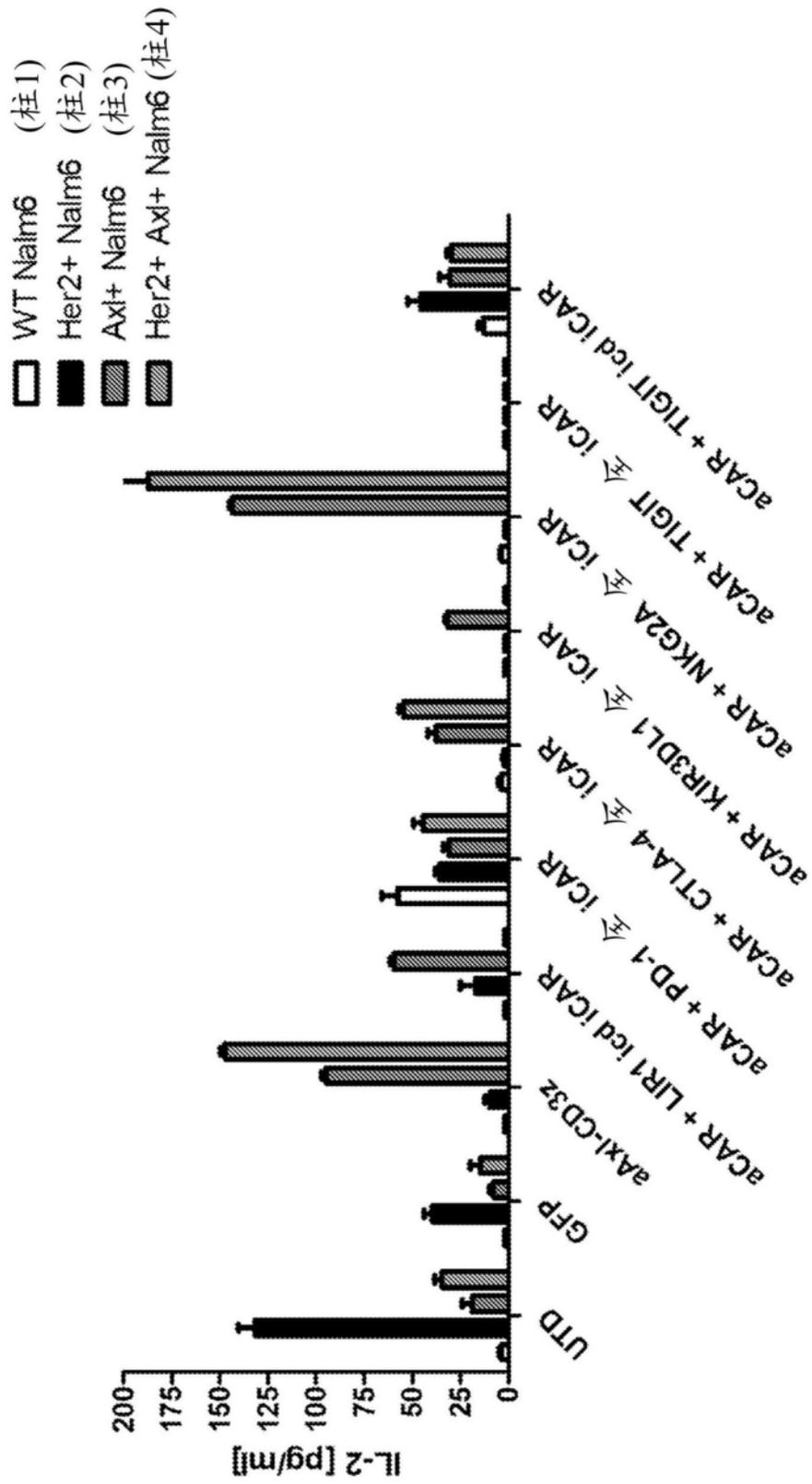


图19

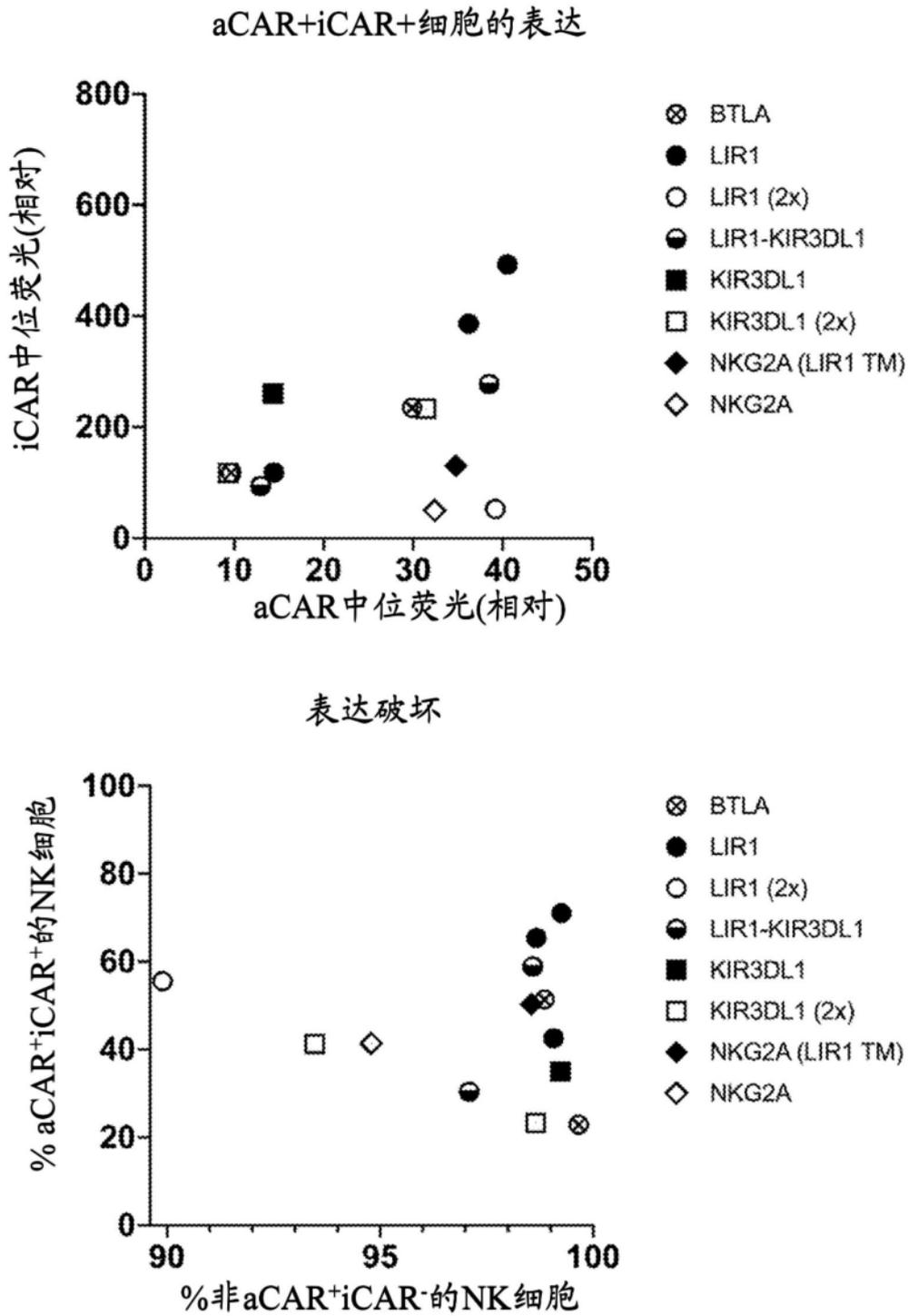


图20

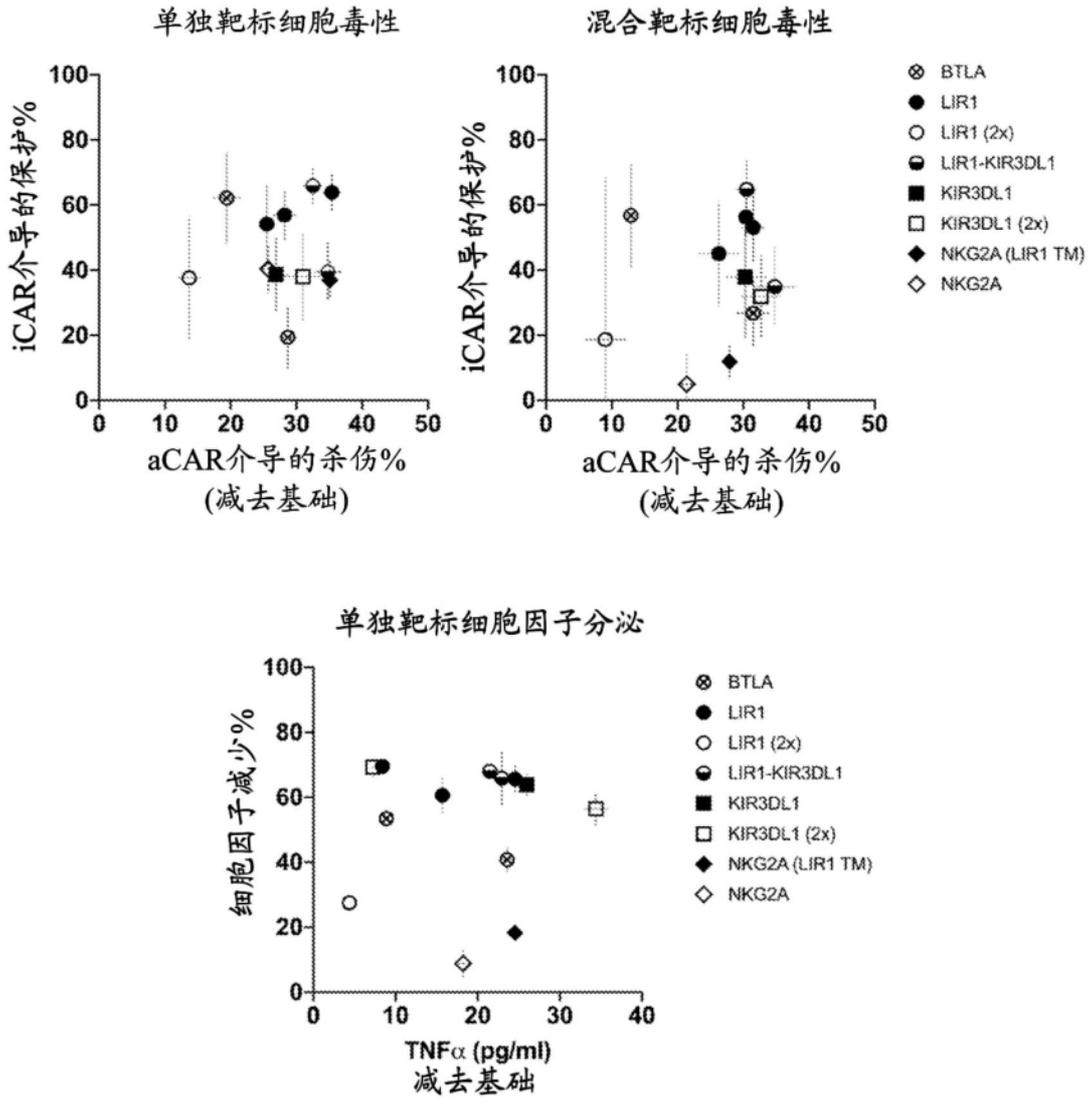


图21