



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115298209 A

(43) 申请公布日 2022. 11. 04

(21) 申请号 202180021605.7

N · 弗兰克尔

(22) 申请日 2021.02.19

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

(30) 优先权数据

专利代理师 陈文平

62/979,310 2020.02.20 US

63/127,843 2020.12.18 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.Cl.

C07K 14/705 (2006.01)

2022.09.15

C07K 16/30 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/018847 2021.02.19

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/168298 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

(72) 发明人 R · M · 戈德莱

M · 古兹曼 · 阿亚拉 G · 李

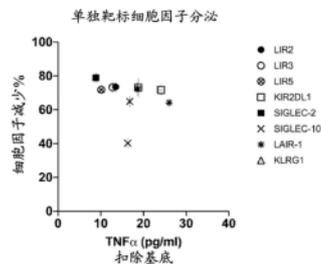
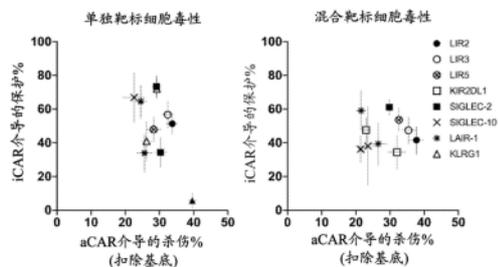
权利要求书7页 说明书72页 附图5页

(54) 发明名称

抑制性嵌合受体构造体

(57) 摘要

本文提供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) 细胞外蛋白结合域;

(b) 跨膜域,其中所述跨膜域可操作地连接至所述细胞外蛋白结合域;以及

(c) 一个或多个细胞内信号传导域,其中所述一个或多个细胞内信号传导域可操作地连接至所述跨膜域;并且

其中所述一个或多个细胞内信号传导域中的每一者衍生自选自自由以下组成的组的蛋白:SLAP1、SLAP2、Dok-1、Dok-2、LAIR1、GRB-2、CD200R、SIRP $\alpha$ 、HAVR、GITR、PD-L1、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR3DL2、CD94、KLRG-1、CEACAM1、LIR2、LIR3、LIR5、SIGLEC-2和SIGLEC-10,并且

其中所述一个或多个细胞内信号传导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活化。

2. 如权利要求1所述的嵌合抑制性受体,其中:

(a) 所述跨膜域和所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自相同蛋白,任选其中所述跨膜域进一步包含相同蛋白的细胞外域的至少一部分;或

(b) 所述跨膜域衍生自第一蛋白,且所述一个或多个细胞内信号传导域中的每一者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) 所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自SLAP1,任选其中所述细胞内信号传导域包含与PAPAERPLNPEGLDSDFLAVLSDYSPDISPPIFRRGEKLRVISDEGGWWKAISLSTGRESYIPGICVARVYHGWLFEGLGRDKAEELLQLPDTKVGSMIRESETKKGFYSLSVRHRQVKHYRIFRLPNNWYYISPRLTFQCLEDLVNHYSEVADGLCCVLTTPCLTQSTAAPAVRASSSPVTLRQKTVDWRRVSRLQEDPEGTENPLGVDESLFSYGLRESIASYLSLTSEDNTSFDRKKKKSISLMYGGSKRKSSFFSSPPYFED (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%同一性的氨基酸序列,或其中所述细胞内信号传导域包含氨基酸序列PAPAERPLNPEGLDSDFLAVLSDYSPDISPPIFRRGEKLRVISDEGGWWKAISLSTGRESYIPGICVARVYHGWLFEGLGRDKAEELLQLPDTKVGSMIRESETKKGFYSLSVRHRQVKHYRIFRLPNNWYYISPRLTFQCLEDLVNHYSEVADGLCCVLTTPCLTQSTAAPAVRASSSPVTLRQKTVDWRRVSRLQEDPEGTENPLGVDESLFSYGLRESIASYLSLTSEDNTSFDRKKKKSISLMYGGSKRKSSFFSSPPYFED (SEQ ID NO:4);或

(b) 所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自SLAP1,任选其中所述细胞内信号传导域包含与PAPAERPLNPEGLDSDFLAVLSDYSPDISPPIFRRGEKLRVISDEGGWWKAISLSTGRESYIPGICVARVYHGWLFEGLGRDKAEELLQLPDTKVGSMIRESETKKGFYSLSVRHRQVKHYRIFRLPNNWYYISPRLTFQCLEDLVNHYSEVADGLCCVLTTPCLTQSTAAPAVRASSSPVTLRQKTVDWRRVSRLQEDPEGTENPLGVDESLFSYGLRESIASYLSLTSEDNTSF (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%同一性的氨基酸序列,或其中所述细胞内信号传导域包含氨基酸序列PAPAERPLNPEGLDSDFLAVLSDYSPDISPPIFRRGEKLRVISDEGGWWKAISLSTGRESYIPGICVARVYHGWLFEGLGRDKAEELLQLPDTKVGSMIRESETKKGFYSLSVRHRQVKHYRIFRLPNNWYYISPRLTFQCLEDLVNHYSEVADGLCCVLTTPCLTQSTAAPAVRASSSPVTLRQKTVDWRRVSRLQEDPEGTENPLGVDESLFSYGLRESIASYLSLTSEDNTSF (SEQ ID NO:5)

LRESIASYLSLTSEDNTSF (SEQ ID NO:5) ;或

(c) 所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自SLAP2, 任选其中所述细胞内信号传导域包含与RKSLPSPSLSSSVQGGPVTMEAERSKATAVALGSFPAGGPAELSLRLGEPLTIVSEDGDWWTVLSEVSGREYNIPSVHVAKVSHGWLYEGLSREKAEELLLLPGNPGGAFLIRESQTRRGYSLSVRLSRPASWDRI RHYRIHCLDNGWLYISPRLTFPSLQALVDHYSELADDICLLKEPCVLQRAGPLPGKDIPLPVTVQRTPLNWKELDSSLLFSEAATGEESLLSEGLRESLSFYISLNDEAVSLDDA (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%同一性的氨基酸序列, 或其中所述细胞内信号传导域包含氨基酸序列RKSLPSPSLSSSVQGGPVTMEAERSKATAVALGSFPAGGPAELSLRLGEPLTIVSEDGDWWTVLSEVSGREYNIPSVHVAKVSHGWLYEGLSREKAEELLLLPGNPGGAFLIRESQTRRGYSLSVRLSRPASWDRI RHYRIHCLDNGWLYISPRLTFPSLQALVDHYSELADDICLLKEPCVLQRAGPLPGKDIPLPVTVQRTPLNWKELDSSLLFSEAATGEESLLSEGLRESLSFYISLNDEAVSLDDA (SEQ ID NO:6) ;或

(d) 所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自KIR2DL1, 任选其中所述细胞内信号传导域包含与HRWCSNKKNAAVMDQESAGNRTANSEDSDEQDPQEVYTYQLNHCVFTQRKITRPSQRPKTPPTDIIVYTELPNAESRSKVVSCP (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, 或其中所述细胞内信号传导域包含氨基酸序列HRWCSNKKNAAVMDQESAGNRTANSEDSDEQDPQEVYTYQLNHCVFTQRKITRPSQRPKTPPTDIIVYTELPNAESRSKVVSCP (SEQ ID NO:60) ;或

(e) 所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自KLRG-1, 任选其中所述细胞内信号传导域包含与MTDSVIYSMLLEPTATQAQNDYGPQQKSSSRPSCSCLGSG (SEQ ID NO:61) 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, 或其中所述细胞内信号传导域包含氨基酸序列MTDSVIYSMLLEPTATQAQNDYGPQQKSSSRPSCSCLGSG (SEQ ID NO:61) ;或

(f) 所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自LAIR1, 任选其中所述细胞内信号传导域包含与HRQNQIKQGPPRSKDEEQKPQRPDLAVDVLERTADKATVNGLPEKDRETDT SALAAGSSQEVTYAQLDHWALTQRTARAVSPQSTKPAESITYAAVARH (SEQ ID NO:62) 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, 或其中所述细胞内信号传导域包含氨基酸序列HRQNQIKQGPPRSKDEEQKPQRPDLAVDVLERTADKATVNGLPEKDRETDT SALAAGSSQEVTYAQLDHWALTQRTARAVSPQSTKPAESITYAAVARH (SEQ ID NO:62) ;或

(g) 所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自LIR2, 任选其中所述细胞内信号传导域包含与LRHRRQKGHWSTQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPAADAQEENLYAAVKDTQPEDGVEMDTRAAASEAPQDVTYAQLHSLTLRRKATEPPPSQEREPPAEPsiyatLAIH (SEQ ID NO:63) 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, 或其中所述细胞内信号传导域包含氨基酸序列LRHRRQKGHWSTQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPAADAQEENLYAAVKDTQPEDGVEMDTRAAASEAPQDVTYAQLHSLTLRRKATEPPPSQEREPPAEPsiyat

LAIH (SEQ ID NO:63); 或

(h) 所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自LIR3, 任选其中所述细胞内信号传导域包含与RRQRHSHKRTSDQRKTDQFQRPAGAAETEPKDRGLLRSSPAADVQEEENLYAAVKDTQSEDRVELDSQSPHDEDPQAVTYAPVKHSSPRREMASPPSSLSGFLDTKDRQVEEDRQMDTEAAASEASQDVTYAQLHSLTLRRKATEPPPSQEGEPPAEPESIYATLAIH (SEQ ID NO:64) 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, 或其中所述细胞内信号传导域包含氨基酸序列RRQRHSHKRTSDQRKTDQFQRPAGAAETEPKDRGLLRSSPAADVQEEENLYAAVKDTQSEDRVELDSQSPHDEDPQAVTYAPVKHSSPRREMASPPSSLSGFLDTKDRQVEEDRQMDTEAAASEASQDVTYAQLHSLTLRRKATEPPPSQEGEPPAEPESIYATLAIH (SEQ ID NO:64); 或

(i) 所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自LIR5, 任选其中所述细胞内信号传导域包含与QHWRQGKHRTLAQRQADFQRPPGAAEPEPKDGGLQRRSSPAADVQGENFCAAVKNTQPEDGVMEDTRQSPHDEDPQAVTYAKVKHSRPRREMASPPSPLSGFLDTKDRQAEEDRQMDTEAAASEAPQDVTYAQLHSFTLRQKATEPPPSQEGASPAEPSVYATLAIH (SEQ ID NO:65) 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, 或其中所述细胞内信号传导域包含氨基酸序列QHWRQGKHRTLAQRQADFQRPPGAAEPEPKDGGLQRRSSPAADVQGENFCAAVKNTQPEDGVMEDTRQSPHDEDPQAVTYAKVKHSRPRREMASPPSPLSGFLDTKDRQAEEDRQMDTEAAASEAPQDVTYAQLHSFTLRQKATEPPPSQEGASPAEPSVYATLAIH (SEQ ID NO:65); 或

(j) 所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自SIGLEC-2, 任选其中所述细胞内信号传导域包含与KLQRRWKRTQSQQGLQENSSGQSFFVRNKKVRRAPLSEGPLSLGCYNPMMEDGISYTTLRFPEMNIPTGDAESSEMQRPPDCDDTVTYSALHQRQVGDYENVIPDFPEDEGIHYSELIQFGVGERPQAQENV DYVILKH (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, 或其中所述细胞内信号传导域包含氨基酸序列KLQRRWKRTQSQQGLQENSSGQSFFVRNKKVRRAPLSEGPLSLGCYNPMMEDGISYTTLRFPEMNIPTGDAESSEMQRPPDCDDTVTYSALHQRQVGDYENVIPDFPEDEGIHYSELIQFGVGERPQAQENV DYVILKH (SEQ ID NO:66); 或

(k) 所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自SIGLEC-10, 任选其中所述细胞内信号传导域包含与KILPKRRTQTETPRPRFSRHSTILDYINVVPTAGPLAQKRNQKATPNSPRTPLPPGAPSPESKKNQKKQYQLPSFPEPKSSTQAPESQESQEELHYATLNFPGVPRPEARMPKGTQADYAEVKFQ (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, 或其中所述细胞内信号传导域包含氨基酸序列KILPKRRTQTETPRPRFSRHSTILDYINVVPTAGPLAQKRNQKATPNSPRTPLPPGAPSPESKKNQKKQYQLPSFPEPKSSTQAPESQESQEELHYATLNFPGVPRPEARMPKGTQADYAEVKFQ (SEQ ID NO:67)。

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) 所述跨膜域衍生自选自自由以下组成的组的蛋白: CD8、CD28、CD3 $\zeta$ 、CD4、4-1BB、OX40、ICOS、2B4、CD25、CD7、LAX、LAT、LAIR1、GRB-2、Dok-1、Dok-2、SLAP1、SLAP2、CD200R、SIRP $\alpha$ 、

HAVR、GITR、PD-L1、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR3DL2、CD94、KLRG-1、CEACAM1、LIR2、LIR3、LIR5、SIGLEC-2和SIGLEC-10;或

(b) 所述跨膜域衍生自CD28, 任选其中所述跨膜域包含与FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO:20) 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, 或其中所述跨膜域包含氨基酸序列FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO:20); 或

(c) 所述跨膜域衍生自KIR2DL1, 任选其中所述跨膜域包含与ILIGTSVVIILFILLFFLL (SEQ ID NO:76) 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, 或其中所述跨膜域包含氨基酸序列ILIGTSVVIILFILLFFLL (SEQ ID NO:76); 或

(d) 所述跨膜域衍生自KLRG-1, 任选其中所述跨膜域包含与VAIALGLLTAVLLSVLLYQWI (SEQ ID NO:78) 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, 或其中所述跨膜域包含氨基酸序列VAIALGLLTAVLLSVLLYQWI (SEQ ID NO:78); 或

(e) 所述跨膜域衍生自LAIR1, 任选其中所述跨膜域包含与ILIGSVVFLFCLLLLVLFL (SEQ ID NO:79) 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, 或其中所述跨膜域包含氨基酸序列ILIGSVVFLFCLLLLVLFL (SEQ ID NO:79); 或

(f) 所述跨膜域衍生自LIR2, 任选其中所述跨膜域包含与VIGILVAVLLLLLLLLLFLI (SEQ ID NO:80) 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, 或其中所述跨膜域包含氨基酸序列VIGILVAVLLLLLLLLLFLI (SEQ ID NO:80); 或

(g) 所述跨膜域衍生自LIR3, 任选其中所述跨膜域包含与VLIGSVAFVLLLFLLLFLLL (SEQ ID NO:81) 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, 或其中所述跨膜域包含氨基酸序列VLIGSVAFVLLLFLLLFLLL (SEQ ID NO:81); 或

(h) 所述跨膜域衍生自LIR5, 任选其中所述跨膜域包含与VLIGLVVSILLSSLLLFLLL (SEQ ID NO:82) 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, 或其中所述跨膜域包含氨基酸序列VLIGLVVSILLSSLLLFLLL (SEQ ID NO:82); 或

(i) 所述跨膜域衍生自SIGLEC-2, 任选其中所述跨膜域包含与VAVGLGSCLAAILILAICGL (SEQ ID NO:83) 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,或其中所述跨膜域包含氨基酸序列VAVGLGSLAILILAICGL (SEQ ID NO:83);或

(j) 所述跨膜域衍生自SIGLEC-10, 任选其中所述跨膜域包含与GAFLGIGITALLFLCLALIIM (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%同一性的氨基酸序列,或其中所述跨膜域包含氨基酸序列GAFLGIGITALLFLCLALIIM (SEQ ID NO:84)。

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) 所述嵌合抑制性受体包含衍生自KIR2DL1的第一细胞内信号传导域和衍生自LIR2的第二细胞内信号传导域;或

(b) 所述嵌合抑制性受体包含衍生自KIR2DL1的第一细胞内信号传导域和衍生自LIR3的第二细胞内信号传导域;或

(c) 所述嵌合抑制性受体包含衍生自KIR2DL1的第一细胞内信号传导域和衍生自LIR5的第二细胞内信号传导域;或

(d) 所述嵌合抑制性受体包含衍生自LIR2的第一细胞内信号传导域和衍生自KIR2DL1的第二细胞内信号传导域;或

(e) 所述嵌合抑制性受体包含衍生自LIR3的第一细胞内信号传导域和衍生自KIR2DL1的第二细胞内信号传导域;或

(f) 所述嵌合抑制性受体包含衍生自LIR5的第一细胞内信号传导域和衍生自KIR2DL1的第二细胞内信号传导域。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的嵌合抑制性受体, 其中:

(a) 所述蛋白结合域结合不在靶肿瘤上表达的蛋白, 或所述蛋白结合域结合在非肿瘤细胞上表达的蛋白, 任选所述非肿瘤细胞衍生自选自自由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、胰脏、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) 所述细胞外蛋白结合域包含配体结合域, 或所述细胞外蛋白结合域包含受体结合域, 或所述细胞外蛋白结合域包含抗原结合域, 任选其中当所述细胞外蛋白结合域包含抗原结合域时, 其中所述抗原结合域包含抗体、抗体的抗原结合片段、F(ab)片段、F(ab')片段、单链可变片段(scFv)或单域抗体(sdAb), 且任选其中当所述抗原结合域包含scFv时, 所述scFv包含重链可变域(VH)和轻链可变域(VL), 且所述VH和VL通过肽接头分开, 且任选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: GGS (SEQ ID NO:23)、GGS GGS (SEQ ID NO:24)、GGS GGS GGS (SEQ ID NO:25)、GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO:26)、GGS GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO:27)、GGS GGS (SEQ ID NO:28)、GGS GGS GGS (SEQ ID NO:29)、GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO:30)、GGS GGS GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO:31)、GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO:32)、GGS GGS (SEQ ID NO:33)、GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO:34)、GGS GGS GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO:35)、GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO:36)、GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO:37) 和 TTTTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDQTTPGERSSLP AFYPGTSGSCSGCGSLSLP (SEQ ID NO:94)。

7. 如权利要求1-6中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体进一步包含位于所述细胞外蛋白结合域与所述跨膜域之间且可操作地连接或物理连接至所述细胞外蛋白结合域和所述跨膜域中的每一者的间隔区,

任选其中所述嵌合抑制性受体进一步包含位于所述跨膜域与所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个之间且可操作地连接或物理连接至所述跨膜域和所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个中的每一者的间隔区,

任选其中所述间隔区衍生自选自自由以下组成的组的蛋白:CD8 $\alpha$ 、CD4、CD7、CD28、IgG1、IgG4、Fc  $\gamma$  RIII $\alpha$ 、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:39)、ESKYGPPCPSCP (SEQ ID NO:40)、ESKYGPPAPSAP (SEQ ID NO:41)、ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:42)、EPKSCDKTHTCP (SEQ ID NO:43)、AAAFVVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN (SEQ ID NO:44)、ACPTGLYTHSGECCACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTECVGLQSMSAPVEADDAVCRCAYGYYQDETGRCEACRVCEAGSGLVFSCQDKQNTVCEECPDGTYSDEADAEC (SEQ ID NO:46)、ACPTGLYTHSGECCACNLGEGVAQPCGANQTV (SEQ ID NO:47)和AVGQDTQEVIVVPHSLPFKV (SEQ ID NO:48)。

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

9. 如权利要求1-8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、 $\gamma$   $\delta$ 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、自然杀手T(NKT)细胞、自然杀手(NK)细胞、B细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、先天性淋巴样细胞、肥胖细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、髓样细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突状细胞、ESC衍生细胞和iPSC衍生细胞。

10. 一种工程改造的核酸,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所述的工程改造的核酸。

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所述的工程改造的核酸或如权利要求11所述的表达载体,任选其中所述细胞进一步包含在所述细胞的表面上表达的肿瘤靶向嵌合受体,且任选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活化。

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所述的工程改造的核酸、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;以及

(b) 药学上可接受的载剂、药学上可接受的赋形剂或其组合。

14. 一种防止、减弱或抑制通过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,其包含:

对所述免疫调节细胞进行工程改造,以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,

其中在同源抗原与所述嵌合抑制性受体结合之后,所述细胞内信号传导域防止、减弱或抑制所述肿瘤靶向嵌合受体的活化,

任选其中所述肿瘤靶向嵌合受体为嵌合抗原受体 (CAR) 或工程改造的T细胞受体,且任选其中所述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活化的方法,其包含:

在适合于所述嵌合抑制性受体结合所述嵌合抑制性受体的同源抗原的条件下,使如权利要求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同源抗原接触,

其中在所述抗原与所述嵌合抑制性受体结合之后,所述细胞内信号传导域防止、减弱或抑制所述肿瘤靶向嵌合受体的活化,

任选其中所述肿瘤靶向嵌合受体为嵌合抗原受体 (CAR) 或工程改造的T细胞受体,且任选其中所述CAR结合一种或多种在肿瘤细胞的表面上表达的抗原。

## 抑制性嵌合受体构造体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年12月18日提交的美国临时申请号63/127,843和2020年2月20日提交的美国临时申请号62/979,310的权益,所述申请中的每一者出于所有目的均以引用的方式整体并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有序列表,其已经由EFS-Web提交并以引用的方式整体并入本文。所述ASCII复本创建于20XX年XX月,名称为XXXXXUS\_sequences\_listing.txt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)的靶向体内活化。这些重组膜受体具有抗原结合域和一个或多个信号传导域(例如,T细胞活化域)。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细胞活化和信号传导途径。表达嵌合受体的T细胞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细胞疗法有关的副作用,产生显著的安全问题。一种副作用为来自TCR和CAR工程改造的T细胞的“在靶但脱组织(on-target but off-tissue)”不良事件,在所述等不良事件中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(还称为iCAR)为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细胞内域进行抑制,但已证明难以再现。因此,需要用于iCAR的替代抑制域。

### 发明内容

[0007] 本文提供了嵌合抑制性受体,其包含:细胞外蛋白结合域;跨膜域,其中所述跨膜域可操作地连接至所述细胞外蛋白结合域;以及一个或多个细胞内信号传导域,其中所述一个或多个细胞内信号传导域可操作地连接至所述跨膜域,且其中所述一个或多个细胞内信号传导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活化。

[0008] 在一些方面中,所述一个或多个细胞内信号传导域各自衍生自选自自由以下组成的组的蛋白:SLAP1、SLAP2、Dok-1、Dok-2、LAIR1、GRB-2、CD200R、SIRP $\alpha$ 、HAVR、GITR、PD-L1、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3KIR3DL2、CD94、KLRG-1、CEACAM1、LIR2、LIR3、LIR5、SIGLEC-2和SIGLEC-10。

[0009] 在一些方面中,跨膜域衍生自与所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个相同的蛋白。

[0010] 在一些方面中,跨膜域进一步包含相同蛋白的细胞外域的至少一部分。

[0011] 在一些方面中,跨膜域衍生自第一蛋白,且所述一个或多个细胞内信号传导域衍生自与第一蛋白不同的第二蛋白。

[0012] 在一些方面中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自SLAP1。

[0013] 在一些方面中,细胞内信号传导域包含与PAPAERPLNPEGLDSDFLAVLSDYSPDISPPIFRERGEKLRVISDEGGWWKAI SLSTGRESYIPGICVARVYHGWLFEGLGRDKAEELLQLPDTKVGSMIRESETKKG FYSLSVRHRQVKHYRIFRLPNNWYYISPRLTFQCLEDLVNHYSEVADGLCCVLTTPCLTQSTAAPAVRASSSPVTLRQKTVDWRRVSRLQEDPEGTENPLGVDESLSYGLRESIASYLSLTSEDNTSFDRKKKSIISLMYGGSKRKSSFFS SPPYFED (SEQ ID NO:4) 或PAPAERPLNPEGLDSDFLAVLSDYSPDISPPIFRERGEKLRVISDEGGWWKAI SLSTGRESYIPGICVARVYHGWLFEGLGRDKAEELLQLPDTKVGSMIRESETKKG FYSLSVRHRQVKHYRIFRLP NNWYYISPRLTFQCLEDLVNHYSEVADGLCCVLTTPCLTQSTAAPAVRASSSPVTLRQKTVDWRRVSRLQEDPEGTE ENPLGVDESLSYGLRESIASYLSLTSEDNTSF (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%同一性的氨基酸序列。

[0014] 在一些方面中,细胞内信号传导域包含氨基酸序列PAPAERPLNPEGLDSDFLAVLSDY PSPDISPPIFRERGEKLRVISDEGGWWKAI SLSTGRESYIPGICVARVYHGWLFEGLGRDKAEELLQLPDTKVGSM IRESETKKG FYSLSVRHRQVKHYRIFRLPNNWYYISPRLTFQCLEDLVNHYSEVADGLCCVLTTPCLTQSTAAPAV RASSSPVTLRQKTVDWRRVSRLQEDPEGTENPLGVDESLSYGLRESIASYLSLTSEDNTSFDRKKKSIISLMYGG S KRKSSFFS SPPYFED (SEQ ID NO:4) 或PAPAERPLNPEGLDSDFLAVLSDYSPDISPPIFRERGEKLRVISD EGGWWKAI SLSTGRESYIPGICVARVYHGWLFEGLGRDKAEELLQLPDTKVGSMIRESETKKG FYSLSVRHRQVK HYRIFRLPNNWYYISPRLTFQCLEDLVNHYSEVADGLCCVLTTPCLTQSTAAPAVRASSSPVTLRQKTVDWRRVSR LQEDPEGTENPLGVDESLSYGLRESIASYLSLTSEDNTSF (SEQ ID NO:5)。

[0015] 在一些方面中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自SLAP2。

[0016] 在一些方面中,细胞内信号传导域包含与RKSLPSPSLSSSVQGGPVTMEERSKATAVAL GSFPAGGPAELSLRLGEPLTIVSEDGDWWTVLSEVSGREYNIPSVHVAKVSHGWLYEGLSREKAEELLLLPGNPGG AFLIRESQTRRGYSLSVRLSRPASWDRIRHYRIHCLDNGWLYISPRLTFPSLQALVDHYSELADDICLLKEPCV LQRAGPLPGKDIPLPVTVQRTPLNWKELDSSLLFSEAATGEESLSEGLRESLSFYISLNDEAVSLDDA (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 氨基酸序列。

[0017] 在一些方面中,细胞内信号传导域包含氨基酸序列RKSLPSPSLSSSVQGGPVTMEER SKATAVALGSFPAGGPAELSLRLGEPLTIVSEDGDWWTVLSEVSGREYNIPSVHVAKVSHGWLYEGLSREKAEELL LLLPGNPGG AFLIRESQTRRGYSLSVRLSRPASWDRIRHYRIHCLDNGWLYISPRLTFPSLQALVDHYSELADDIC CLLKEPCVLQRAGPLPGKDIPLPVTVQRTPLNWKELDSSLLFSEAATGEESLSEGLRESLSFYISLNDEAVSLDDA (SEQ ID NO:6)。

[0018] 在一些方面中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自KIR2DL1。

[0019] 在一些方面中,细胞内信号传导域包含与HRWC SNKKNAAVMDQESAGNRTANSEDSDEQDP QEVTYTQLNHCVFTQRKITRPSQRPKTPPTDIIVYTELPNAESRSKVVSCP (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。

[0020] 在一些方面中,细胞内信号传导域包含氨基酸序列HRWCSNKKNAAVMDQESAGNRTANS EDSDEQDPQEVYTYTQLNHCVFTQRKITRPSQRPKTPPTDIIVYTELPNAESRSKVVSCP (SEQ ID NO:60)。

[0021] 在一些方面中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自KLRG-1。

[0022] 在一些方面中,细胞内信号传导域包含与MTDSVIYSMLLEPTATQAQNDYGPQQKSSSRP SCSCCLGSG (SEQ ID NO:61) 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。

[0023] 在一些方面中,细胞内信号传导域包含氨基酸序列MTDSVIYSMLLEPTATQAQNDYGPQ QKSSSRPSCSCCLGSG (SEQ ID NO:61)。

[0024] 在一些方面中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自LAIR1。

[0025] 在一些方面中,细胞内信号传导域包含与HRQNQIKQGPPRSKDDEEQKQRPDLAVDVLER TADKATVNGLEPKDRETDTSALAAGSSQEVTYAQLDHWALTQRTARAVSPQSTKPMAESITYAAVARH (SEQ ID NO:62) 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。

[0026] 在一些方面中,细胞内信号传导域包含氨基酸序列HRQNQIKQGPPRSKDDEEQKQRPDL AVDVLERTADKATVNGLEPKDRETDTSALAAGSSQEVTYAQLDHWALTQRTARAVSPQSTKPMAESITYAAVARH (SEQ ID NO:62)。

[0027] 在一些方面中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自LIR2。

[0028] 在一些方面中,细胞内信号传导域包含与LRHRRQGKHWSTQKADFQHPAGAVGPEPTDR GLQWRSSPAADAQEENLYAAVKDTPEDGVEMDTRAAASEAPQDVTYAQLHSLTLRRKATEPPPSQEREPPAEP SIYATLAIH (SEQ ID NO:63) 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。

[0029] 在一些方面中,细胞内信号传导域包含氨基酸序列LRHRRQGKHWSTQKADFQHPAGA VGPEPTDRGLQWRSSPAADAQEENLYAAVKDTPEDGVEMDTRAAASEAPQDVTYAQLHSLTLRRKATEPPPSQER EPPAEP SIYATLAIH (SEQ ID NO:63)。

[0030] 在一些方面中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自LIR3。

[0031] 在一些方面中,细胞内信号传导域包含与RRQRHSHKRTSDQRKTDQRPAGAAETEPKDRG LLRSSPAADVQEENLYAAVKDQSEDRVELDSQSPHDEDPAVYAPVKHSSPRREMASPPSSLSGFLDTKDRQ VEEDRQMDTEAAASEASQDVTYAQLHSLTLRRKATEPPPSQEGEPPAEP SIYATLAIH (SEQ ID NO:64) 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。

[0032] 在一些方面中,细胞内信号传导域包含氨基酸序列RRQRHSHKRTSDQRKTDQRPAGAA ETEPKDRGLLRSSPAADVQEENLYAAVKDQSEDRVELDSQSPHDEDPAVYAPVKHSSPRREMASPPSSLSGE FLDTKDRQVEEDRQMDTEAAASEASQDVTYAQLHSLTLRRKATEPPPSQEGEPPAEP SIYATLAIH (SEQ ID NO: 64)。

[0033] 在一些方面中,其中所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自LIR5。

[0034] 在一些方面中,细胞内信号传导域包含与QHWRQGKHRTLAQRQADFQRPPGAAEPEPKDGG LQRRSSPAADVQGENFCAAVKNTQPEDGVEMDTRQSPHDEDPQAVTYAKVKHSRPRREMASPPSPLSGEFLDTKDR QAEEDRQMDTEAAASEAPQDVTYAQLHSFTLRQKATEPPPSQEGASPAEPSVYATLAIH (SEQ ID NO:65) 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。

[0035] 在一些方面中,细胞内信号传导域包含氨基酸序列QHWRQGKHRTLAQRQADFQRPPGAA EPEPKDGG LQRRSSPAADVQGENFCAAVKNTQPEDGVEMDTRQSPHDEDPQAVTYAKVKHSRPRREMASPPSPLSG EFLDTKDRQAEEDRQMDTEAAASEAPQDVTYAQLHSFTLRQKATEPPPSQEGASPAEPSVYATLAIH (SEQ ID NO:65)。

[0036] 在一些方面中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自SIGLEC-2。

[0037] 在一些方面中,细胞内信号传导域包含与KLQRRWKRTQSQQGLQENSSGQSFFVRNKKVRR APLSEGPLSLGCYNPMMEDGISYTTLRFPENIPRTGDAESSEMQRPPPCDDTDTYTSALHKRQVGDYENVIPDFP EDEGIHYSELIQFGVGERPQAQENVYVILKH (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。

[0038] 在一些方面中,细胞内信号传导域包含氨基酸序列KLQRRWKRTQSQQGLQENSSGQSFF VRNKKVRRAPLSEGPLSLGCYNPMMEDGISYTTLRFPENIPRTGDAESSEMQRPPPCDDTDTYTSALHKRQVGDY ENVIPDFPEDEGIHYSELIQFGVGERPQAQENVYVILKH (SEQ ID NO:66)。

[0039] 在一些方面中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自SIGLEC-10。

[0040] 在一些方面中,细胞内信号传导域包含与KILPKRRTQTETPRPRFSRHSTILDYINVVPTA GPLAQKRNQKATPNSPRTPLPPGAPSPESKKNQKKQYQLPSFPEPKSSTQAPESQESQEELHYATLNFPGVPRPE ARMPKGTQADYAEVKFQ (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。

[0041] 在一些方面中,细胞内信号传导域包含氨基酸序列KILPKRRTQTETPRPRFSRHSTILD YINVVPTAGPLAQKRNQKATPNSPRTPLPPGAPSPESKKNQKKQYQLPSFPEPKSSTQAPESQESQEELHYATLNF PGVPRPEARMPKGTQADYAEVKFQ (SEQ ID NO:67)。

[0042] 在一些方面中,跨膜域衍生自选自自由以下组成的组的蛋白:CD8、CD28、CD3 $\delta$ 、CD4、4-1BB、OX40、ICOS、2B4、CD25、CD7、LAX、LAT、LAIR1、GRB-2、Dok-1、Dok-2、SLAP1、SLAP2、CD200R、SIRP $\alpha$ 、HAVR、GITR、PD-L1、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR3DL2、CD94、KLRG-1、CEACAM1、LIR2、LIR3、LIR5、SIGLEC-2和SIGLEC-10。

[0043] 在一些方面中,嵌合抑制性受体包含衍生自CD28的跨膜域。

[0044] 在一些方面中,跨膜域包含与FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO:20) 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。

[0045] 在一些方面中,跨膜域包含氨基酸序列FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO:20)。

- [0046] 在一些方面中,嵌合抑制性受体包含衍生自KIR2DL1的跨膜域。
- [0047] 在一些方面中,跨膜域包含与ILIGTSVVIILFILLFFLL (SEQ ID NO:76) 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。
- [0048] 在一些方面中,跨膜域包含氨基酸序列ILIGTSVVIILFILLFFLL (SEQ ID NO:76)。
- [0049] 在一些方面中,嵌合抑制性受体包含衍生自KLRG-1的跨膜域。
- [0050] 在一些方面中,跨膜域包含与VAIALGLLTAVLLSVLLYQWI (SEQ ID NO:78) 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。
- [0051] 在一些方面中,跨膜域包含氨基酸序列VAIALGLLTAVLLSVLLYQWI (SEQ ID NO:78)。
- [0052] 在一些方面中,嵌合抑制性受体包含衍生自LAIR1的跨膜域。
- [0053] 在一些方面中,跨膜域包含与ILIGSVVFLFCLLLLVLFL (SEQ ID NO:79) 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。
- [0054] 在一些方面中,跨膜域包含氨基酸序列ILIGSVVFLFCLLLLVLFL (SEQ ID NO:79)。
- [0055] 在一些方面中,嵌合抑制性受体包含衍生自LIR2的跨膜域。
- [0056] 在一些方面中,跨膜域包含与VIGILVAVLLLLLLLLLFLI (SEQ ID NO:80) 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。
- [0057] 在一些方面中,跨膜域包含氨基酸序列VIGILVAVLLLLLLLLLFLI (SEQ ID NO:80)。
- [0058] 在一些方面中,嵌合抑制性受体包含衍生自LIR3的跨膜域。
- [0059] 在一些方面中,跨膜域包含与VLIGVSVAFVLLLFLLLFLLL (SEQ ID NO:81) 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。
- [0060] 在一些方面中,跨膜域包含氨基酸序列VLIGVSVAFVLLLFLLLFLLL (SEQ ID NO:81)。
- [0061] 在一些方面中,嵌合抑制性受体包含衍生自LIR5的跨膜域。
- [0062] 在一些方面中,跨膜域包含与VLIGVLVVSILLSSLLLFLLL (SEQ ID NO:82) 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。
- [0063] 在一些方面中,跨膜域包含氨基酸序列VLIGVLVVSILLSSLLLFLLL (SEQ ID NO:82)。
- [0064] 在一些方面中,嵌合抑制性受体包含衍生自SIGLEC-2的跨膜域。
- [0065] 在一些方面中,跨膜域包含与VAVGLGSCLAAILILAICGL (SEQ ID NO:83) 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。
- [0066] 在一些方面中,跨膜域包含氨基酸序列VAVGLGSCLAAILILAICGL (SEQ ID NO:83)。
- [0067] 在一些方面中,嵌合抑制性受体包含衍生自SIGLEC-10的跨膜域。
- [0068] 在一些方面中,跨膜域包含与GAFLGIGITALLFLCLALIIM (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%同一性的氨基酸序列。

- [0069] 在一些方面中,跨膜域包含氨基酸序列GAFLGIGITALLFLCLALIIM(SEQ ID NO:84)。
- [0070] 在一些方面中,所述一个或多个细胞内信号传导域为两个细胞内信号传导域。
- [0071] 在一些方面中,嵌合抑制性受体包含衍生自KIR2DL1的第一细胞内信号传导域和衍生自LIR2的第二细胞内信号传导域。
- [0072] 在一些方面中,嵌合抑制性受体包含衍生自KIR2DL1的第一细胞内信号传导域和衍生自LIR3的第二细胞内信号传导域。
- [0073] 在一些方面中,嵌合抑制性受体包含衍生自KIR2DL1的第一细胞内信号传导域和衍生自LIR5的第二细胞内信号传导域。
- [0074] 在一些方面中,第一细胞内信号传导域进一步包含衍生自KIR2DL1的跨膜域。
- [0075] 在一些方面中,嵌合抑制性受体包含衍生自LIR2的第一细胞内信号传导域和衍生自KIR2DL1的第二细胞内信号传导域。
- [0076] 在一些方面中,第一细胞内信号传导域进一步包含衍生自LIR2的跨膜域。
- [0077] 在一些方面中,嵌合抑制性受体包含衍生自LIR3的第一细胞内信号传导域和衍生自KIR2DL1的第二细胞内信号传导域。
- [0078] 在一些方面中,第一细胞内信号传导域进一步包含衍生自LIR3的跨膜域。
- [0079] 在一些方面中,嵌合抑制性受体包含衍生自LIR5的第一细胞内信号传导域和衍生自KIR2DL1的第二细胞内信号传导域。
- [0080] 在一些方面中,第一细胞内信号传导域进一步包含衍生自LIR5的跨膜域。
- [0081] 在一些方面中,蛋白不在靶肿瘤上表达。
- [0082] 在一些方面中,蛋白在非肿瘤细胞上表达。
- [0083] 在一些方面中,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、胰脏、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。
- [0084] 在一些方面中,细胞外蛋白结合域包含配体结合域。
- [0085] 在一些方面中,细胞外蛋白结合域包含受体结合域。
- [0086] 在一些方面中,细胞外蛋白结合域包含抗原结合域。
- [0087] 在一些方面中,抗原结合域包含抗体、抗体的抗原结合片段、F(ab)片段、F(ab')片段、单链可变片段(scFv)或单域抗体(sdAb)。
- [0088] 在一些方面中,抗原结合域包含单链可变片段(scFv)。
- [0089] 在一些方面中,每个scFv均包含重链可变域(VH)和轻链可变域(VL)。
- [0090] 在一些方面中,VH和VL通过肽接头分开。
- [0091] 在一些方面中,肽接头包含选自以下组成的组的氨基酸序列:GGG(SEQ ID NO:23)、GGSGGS(SEQ ID NO:24)、GGSGGSGGS(SEQ ID NO:25)、GGSGGSGGSGGS(SEQ ID NO:26)、GGSGGSGGSGGSGGS(SEQ ID NO:27)、GGGS(SEQ ID NO:28)、GGGSGGGS(SEQ ID NO:29)、GGGSGGGSGGGS(SEQ ID NO:30)、GGGSGGGSGGGSGGGS(SEQ ID NO:31)、GGGSGGGSGGGSGGGS(SEQ ID NO:32)、GGGS(SEQ ID NO:33)、GGGSGGGGS(SEQ ID NO:34)、GGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:35)、GGGSGGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:36)、GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:37)和TTTTAPRPPTPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDQTTPGERSLPAFYPGTSGSCSGCGLSLP(SEQ ID NO:94)。

- [0092] 在一些方面中, scFv包含结构VH-L-VL或VL-L-VH, 其中VH为重链可变域, L为肽接头, 且VL为轻链可变域。
- [0093] 在一些方面中, 跨膜域物理连接至细胞外蛋白结合域。
- [0094] 在一些方面中, 所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个物理连接至跨膜域。
- [0095] 在一些方面中, 跨膜域物理连接至细胞外蛋白结合域, 且所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个物理连接至跨膜域。
- [0096] 在一些方面中, 细胞外蛋白结合具有高结合亲和力。
- [0097] 在一些方面中, 细胞外蛋白结合具有低结合亲和力。
- [0098] 在一些方面中, 嵌合抑制性受体能够压制经活化的免疫调节细胞产生细胞因子。
- [0099] 在一些方面中, 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活化来诱导。
- [0100] 在一些方面中, 靶细胞为肿瘤细胞。
- [0101] 在一些方面中, 所述一个或多个细胞内信号传导域包含一个或多个修饰。
- [0102] 在一些方面中, 相对于其他方面相同的未经修饰的受体, 所述一个或多个修饰调节嵌合抑制性受体的敏感性。
- [0103] 在一些方面中, 相对于其他方面相同的未经修饰的受体, 所述一个或多个修饰增加嵌合抑制性受体的敏感性。
- [0104] 在一些方面中, 相对于其他方面相同的未经修饰的受体, 所述一个或多个修饰降低嵌合抑制性受体的敏感性。
- [0105] 在一些方面中, 相对于其他方面相同的未经修饰的受体, 所述一个或多个修饰调节嵌合抑制性受体的效力。
- [0106] 在一些方面中, 相对于其他方面相同的未经修饰的受体, 所述一个或多个修饰增加嵌合抑制性受体的效力。
- [0107] 在一些方面中, 相对于其他方面相同的未经修饰的受体, 所述一个或多个修饰降低嵌合抑制性受体的效力。
- [0108] 在一些方面中, 相对于其他方面相同的未经修饰的受体, 当在免疫调节细胞上表达时, 所述一个或多个修饰调节肿瘤靶向嵌合受体的活化的基础防止、减弱或抑制。
- [0109] 在一些方面中, 相对于其他方面相同的未经修饰的受体, 所述一个或多个修饰降低基础防止、减弱或抑制。
- [0110] 在一些方面中, 相对于其他方面相同的未经修饰的受体, 所述一个或多个修饰增加基础防止、减弱或抑制。
- [0111] 在一些方面中, 嵌合抑制性受体进一步包含位于细胞外蛋白结合域与跨膜域之间且可操作地连接至细胞外蛋白结合域和跨膜域中的每一者的间隔区。
- [0112] 在一些方面中, 嵌合抑制性受体进一步包含位于细胞外蛋白结合域与跨膜域之间且物理连接至细胞外蛋白结合域和跨膜域中的每一者的间隔区。
- [0113] 在一些方面中, 间隔区衍生自选自以下组成的组的蛋白: CD8 $\alpha$ 、CD4、CD7、CD28、IgG1、IgG4、Fc  $\gamma$  RIII $\alpha$ 、LNGFR和PDGFR。
- [0114] 在一些方面中, 间隔区包含选自以下组成的组的氨基酸序列: AAAIEVMYPPPYLD NEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKP (SEQ ID NO:39)、ESKYGPPCPSCP (SEQ ID NO:40)、

ESKYGPPAPSAP (SEQ ID NO:41)、ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:42)、EPKSCDKTHTCP (SEQ ID NO:43)、AAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCNHRN (SEQ ID NO:44)、ACPTGLYTHSGECKACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTFSDVV SATEPCKPCTECVGLQSMSAPCVEADDAVCRCAYGYYQDETTGRCEACRVCEAGSGLVFSCQDKQNTVCEECPDGTYSDEADAEC (SEQ ID NO:46)、ACPTGLYTHSGECKACNLGEGVAQPCGANQTV (SEQ ID NO:47) 和 AVGQDTQEVIIVPHSLPFKV (SEQ ID NO:48)。

[0115] 在一些方面中,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敏感性。

[0116] 在一些方面中,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。

[0117] 在一些方面中,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。

[0118] 在一些方面中,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。

[0119] 在一些方面中,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。

[0120] 在一些方面中,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。

[0121] 在一些方面中,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活化的基础防止、减弱或抑制。

[0122] 在一些方面中,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。

[0123] 在一些方面中,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。

[0124] 在一些方面中,嵌合抑制性受体进一步包含位于跨膜域与所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个之间且可操作地连接至跨膜域和所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个中的每一者的细胞内间隔区。

[0125] 在一些方面中,嵌合抑制性受体进一步包含位于跨膜域与所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个之间且物理连接至跨膜域和所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个中的每一者的细胞内间隔区。

[0126] 在一些方面中,相对于缺乏细胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,细胞内间隔区调节嵌合抑制性受体的敏感性。

[0127] 在一些方面中,相对于缺乏细胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,细胞内间隔区增加嵌合抑制性受体的敏感性。

[0128] 在一些方面中,相对于缺乏细胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,细胞内间隔区降低嵌合抑制性受体的敏感性。

[0129] 在一些方面中,相对于缺乏细胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,细胞内间隔区调节嵌合抑制性受体的效力。

[0130] 在一些方面中,相对于缺乏细胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,细

胞内间隔区增加嵌合抑制性受体的效力。

[0131] 在一些方面中,相对于缺乏细胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,细胞内间隔区降低嵌合抑制性受体的效力。

[0132] 在一些方面中,相对于缺乏细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,细胞内间隔区调节肿瘤靶向嵌合受体的活化的基础防止、减弱或抑制。

[0133] 在一些方面中,相对于缺乏细胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,细胞内间隔区降低基础防止、减弱或抑制。

[0134] 在一些方面中,相对于缺乏细胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,细胞内间隔区增加基础防止、减弱或抑制。

[0135] 在一些方面中,抑制性嵌合受体进一步包含酶抑制性域。

[0136] 在一些方面中,相对于缺乏酶抑制性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,酶抑制性域能够防止、减弱或抑制肿瘤靶向嵌合受体的活化。

[0137] 在一些方面中,酶抑制性域包含酶催化域。

[0138] 在一些方面中,酶催化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。

[0139] 在一些方面中,酶抑制性域包含一个或多个调节基础防止、减弱或抑制的修饰。

[0140] 在一些方面中,相对于缺乏所述一个或多个修饰的其他方面相同的酶抑制性域,所述一个或多个修饰降低基础防止、减弱或抑制。

[0141] 在一些方面中,相对于缺乏所述一个或多个修饰的其他方面相同的酶抑制性域,所述一个或多个修饰增加基础防止、减弱或抑制。

[0142] 在一些方面中,肿瘤靶向嵌合受体为嵌合抗原受体(CAR)或工程改造的T细胞受体(TCR)。

[0143] 在一些方面中,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、 $\gamma$   $\delta$ 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、自然杀手T(NKT)细胞、自然杀手(NK)细胞、B细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、先天性淋巴样细胞、肥胖细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、髓样细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突状细胞、ESC衍生细胞和iPSC衍生细胞。

[0144] 在一些方面中,免疫调节细胞为自然杀手(NK)细胞。

[0145] 本文还提供包含如本文所述的嵌合抑制性受体和药学上可接受的载剂的组合物。

[0146] 本文还提供编码如本文所述的嵌合抑制性受体的工程改造的核酸。

[0147] 本文还提供包含如本文所述的工程改造的核酸的表达载体。

[0148] 本文还提供包含如本文所述的工程改造的核酸或如本文所述的表达载体和药学上可接受的载剂的组合物。

[0149] 本文还提供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。

[0150] 在一些方面中,细胞进一步包含在细胞的表面上表达的肿瘤靶向嵌合受体。

[0151] 在一些方面中,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活化。

[0152] 本文还提供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:细胞外蛋白结合域;跨膜域,其中所述跨膜域可操作地连接至所述细胞外蛋白结合域;以及一个或多个细胞内信号传导域,其中所述一个或多个细胞内信号传导域可操作地连接至所述跨膜域;且其中所述一个或多个细胞内信号传导域各自衍生自选自自由以下组成的组的蛋白:SLAP1、SLAP2、Dok-1、Dok-2、LAIR1、GRB-2、CD200R、SIRP $\alpha$ 、HAVR、GITR、PD-L1、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR3DL2、CD94、KLRG-1、CEACAM1、LIR2、LIR3、LIR5、SIGLEC-2和SIGLEC-10;且其中在所述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活化。

[0153] 在一些方面中,细胞进一步包含在细胞的表面上表达的肿瘤靶向嵌合受体。

[0154] 本文还提供分离的细胞,其包含:嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体包含:细胞外蛋白结合域;跨膜域,其中所述跨膜域可操作地连接至所述细胞外蛋白结合域;以及一个或多个细胞内信号传导域,其中所述一个或多个细胞内信号传导域可操作地连接至所述跨膜域;且其中所述一个或多个细胞内信号传导域各自衍生自选自自由以下组成的组的蛋白:SLAP1、SLAP2、Dok-1、Dok-2、LAIR1、GRB-2、CD200R、SIRP $\alpha$ 、HAVR、GITR、PD-L1、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR3DL2、CD94、KLRG-1、CEACAM1、LIR2、LIR3、LIR5、SIGLEC-2和SIGLEC-10;以及在细胞的表面上表达的肿瘤靶向嵌合受体,其中在所述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活化。

[0155] 在一些方面中,嵌合抑制性受体经重组表达。

[0156] 在一些方面中,嵌合抑制性受体自载体或细胞基因组的选定基因座表达。

[0157] 在一些方面中,肿瘤靶向嵌合受体为嵌合抗原受体(CAR)或工程改造的T细胞受体。

[0158] 在一些方面中,在所述蛋白与嵌合抑制性受体结合之前,肿瘤靶向嵌合受体能够活化细胞。

[0159] 在一些方面中,在所述蛋白与嵌合抑制性受体结合之后,嵌合抑制性受体压制经活化的细胞产生细胞因子。

[0160] 在一些方面中,在所述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活化来诱导。

[0161] 在一些方面中,跨膜域物理连接至细胞外蛋白结合域。

[0162] 在一些方面中,细胞内信号传导域物理连接至跨膜域。

[0163] 在一些方面中,跨膜域物理连接至细胞外蛋白结合域,且所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个物理连接至跨膜域。

[0164] 在一些方面中,靶细胞为肿瘤细胞。

[0165] 在一些方面中,细胞选自由以下组成的组:T细胞、CD8<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>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、自然杀手T(NKT)细胞、自然杀手(NK)细胞、B细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、先天性淋巴样细胞、肥胖细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、髓样细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突状细胞、ESC衍生细胞和iPSC衍生细胞。

[0166] 在一些方面中,免疫调节细胞为自然杀手(NK)细胞。

[0167] 在一些方面中,细胞为自体的。

[0168] 在一些方面中,细胞为同种异体的。

[0169] 本文还提供包含如本文所述的分离的细胞和药学上可接受的载剂的组合物。

[0170] 本文还提供防止、减弱或抑制通过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,其包含:对免疫调节细胞进行工程改造,以在免疫调节细胞的表面上表达如权利要求1-75中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中在同源抗原与嵌合抑制性受体结合之后,细胞内信号传导域防止、减弱或抑制肿瘤靶向嵌合受体的活化。

[0171] 本文还提供防止、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活化的方法,其包含:在适合于嵌合抑制性受体结合嵌合抑制性受体的同源抗原的条件下,使如本文所述的分离的细胞或如本文所述的组合物与所述同源抗原接触,其中在所述抗原与所述嵌合抑制性受体结合之后,细胞内信号传导域防止、减弱或抑制肿瘤靶向嵌合受体的活化。

[0172] 在一些方面中,肿瘤靶向嵌合受体为嵌合抗原受体(CAR)或工程改造的T细胞受体。

[0173] 在一些方面中,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

[0174] 本发明的这些和其他特征、方面和优势将关于以下描述和随附图式得到更好的理解,在随附图式中:

[0175] 图1A示出了共表达抗CD19-SLAP iCAR和抗CD20-CD28/CD3 $\delta$ aCAR的T细胞接触表达CD19和CD20的靶细胞的示例性图表。图1B示出了无一CAR构建体表达的阴性对照细胞。图1C示出了经转导的T细胞中的抗CD20-CD28/CD3 $\delta$ aCAR表达。图1D示出了经转导的T细胞中的抗CD20-CD28/CD3 $\delta$ aCAR和抗CD19-SLAP iCAR表达。

[0176] 图2A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- $\alpha$ 产生。图2B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- $\gamma$ 产生。图2C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。

[0177] 图3示出了如通过流式细胞术所评估,在NK细胞的转导之后,抗FLT3 aCAR和各种具有抗EMCN结合域的iCAR形式的表达概况,包括共表达。每个条件有1至3次生物性重复(指示为单独的点)。

[0178] 图4示出了NK细胞介导的杀伤(上图)和细胞因子分泌(下图)。示出了经工程改造以共表达抗FLT3aCAR和所指示的抗EMCN iCAR的各种NK细胞。“单独的”=各类型的SEM细胞单独呈现(左上图)。“混合的”=两种类型的SEM细胞一起混合在同一培养物中(右上图)。每个条件有1至3次生物性重复(指示为单独的点)。每次测量有3次技术重复,在相关处绘制X和Y SEM。当iCAR保护为阴性时,未示出KLRG1。

## 具体实施方式

[0179] 定义

[0180] 除非另外指定,否则权利要求书和说明书中所用的术语均如下文所示进行定义。

[0181] 如本文所用的术语“抑制性嵌合受体”或“抑制性嵌合抗原受体”或“嵌合抑制性受

体”是指多肽或一组多肽,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细胞内信号生成。抑制性嵌合受体通常包括细胞外蛋白结合域(例如,呈抗原结合域的抗体片段)、间隔域、跨膜域和一个或多个细胞内信号传导/共信号传导域。抑制性嵌合受体还可称为“iCAR”。

[0182] 术语“肿瘤靶向嵌合受体”是指活化嵌合受体、靶向肿瘤的嵌合抗原受体(CAR)或工程改造的T细胞受体。肿瘤靶向嵌合受体还可称为“aCAR”。

[0183] 如本文所用的术语“嵌合抗原受体”或替代地“CAR”是指多肽或一组多肽,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细胞内信号生成。CAR通常包括细胞外蛋白结合域(例如,呈抗原结合域的抗体片段)、间隔域、跨膜域和一个或多个细胞内信号传导/共信号传导域。在一些实施方案中,CAR至少包含细胞外抗原结合域、跨膜域和细胞质信号传导域(本文还称为“细胞内信号传导域”),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域。在一些方面中,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进一步包含在细胞外抗原结合域与跨膜域之间的间隔域。在一些实施方案中,一组多肽包括募集域,诸如二聚化或多聚化域,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细胞外抗原结合域、跨膜域和细胞内信号传导域的嵌合融合蛋白,细胞内信号传导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域。在一个方面中,抑制性嵌合受体包含有包含细胞外抗原结合域、跨膜域和细胞内信号传导域的嵌合融合蛋白,细胞内信号传导域包含衍生自抑制性分子的功能性抑制性域。在一个方面中,肿瘤靶向嵌合受体包含有包含细胞外抗原结合域、跨膜域和细胞内信号传导域的嵌合融合蛋白,细胞内信号传导域包含衍生自共刺激性分子的功能性信号传导域和衍生自刺激性分子的功能性信号传导域。

[0184] 如本文所用的术语“细胞内信号传导域”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性域。在一些实施方案中,细胞内信号传导域为抑制性信号传导域。在分子结合域与蛋白结合之后,例如,抑制性信号传导域抑制受体信号传导,而活化信号传导域将信号(例如,增殖/存活信号)传递至细胞。

[0185] 如本文所用的术语“跨膜域”是指跨越细胞膜的域。在一些实施方案中,跨膜域包含疏水性 $\alpha$ 螺旋。

[0186] 如本文所用的术语“细胞外蛋白结合域”或“细胞外抗原结合域”是指分子结合域,其通常为细胞受体的胞外域或抗体的抗原结合域且位于细胞外部,暴露于细胞外空间。细胞外抗原结合域可包括能够与另一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,细胞外蛋白或抗原结合域包含抗体、其抗原结合片段、F(ab)、F(ab')、单链可变片段(scFv)或单域抗体(sdAb)。在一些实施方案中,细胞外蛋白或抗原结合域与细胞表面配体(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。

[0187] 术语“肿瘤”是指肿瘤细胞和有关的肿瘤微环境(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。

[0188] 术语“未经表达的”是指与非肿瘤细胞中导致靶向肿瘤的嵌合抗原受体的活化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靶向肿瘤的嵌合抗原受体的活化的表达水平相比,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。

[0189] 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、严重程度或进展减轻、缓解或治愈。

[0190] 术语“原位”是指在与活生物体分开生长(例如在组织培养物中生长)的活细胞中发生的过程。

[0191] 术语“体内”是指在活生物体中发生的过程。

[0192] 本文所用的术语“哺乳动物”包括人和非人,且包括但不限于人、非人灵长类动物、犬、猫、鼠、牛、马和猪。

[0193] 在两个或更多个核酸或多肽序列的情境中,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苷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”可以存在于正比较的序列的区上,例如功能性域,或替代地存在于欲比较的两个序列的全长上。

[0194] 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电脑中,必要时指定子序列坐标,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。

[0195] 用于比较的最佳序列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)的相似性搜寻方法;这些算法的电脑化实施(Wisconsin Genetics 套装软件 Genetics Computer Group 中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA, 575 Science Dr., Madison, Wis);或目视检查(大体上参见Ausubel等人,见下文)。

[0196] 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为BLAST算法,其描述于Altschul等人, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)。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/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) 公开获得。

[0197] 术语“足够量”意指足以产生所需效果的量,例如足以调节细胞中蛋白聚集的量。

[0198] 术语“治疗有效量”是指有效改善疾病症状的量。治疗有效量可为“预防有效量”,因为可以将预防视为治疗。

[0199] 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书中所用,单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数个提及物。

[0200] 嵌合抑制性受体

[0201] 在一个方面中,本文提供了嵌合抑制性受体,其包含:(i) 细胞外蛋白结合域;(ii) 跨膜域,其中所述跨膜域可操作地连接至所述细胞外蛋白结合域;以及(iii) 一个或多个细胞内信号传导域,其中所述一个或多个细胞内信号传导域可操作地连接至所述跨膜域,且其中所述一个或多个细胞内信号传导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活化。

[0202] 一般而言,抑制性或肿瘤靶向嵌合受体系针对T细胞或NK细胞进行设计,且为细胞

内信号传导域和抗原识别域(例如,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细胞在本领域中称为CAR T细胞。活化或靶向肿瘤的CAR通常在经由细胞内信号传导域与其同源配体结合之后诱导T细胞信号传导途径,导致T细胞活化和免疫反应。活化CAR(Activation CAR和activating CAR)和靶向肿瘤的CAR为可互换的术语。

[0203] 一般而言,抑制性嵌合受体为经工程改造以识别细胞表达的蛋白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,而活化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蛋白。嵌合受体一般通常包括呈细胞外蛋白结合域的抗体片段、间隔或铰链域、疏水性 $\alpha$ 螺旋跨膜域和一个或多个细胞内信号传导/共信号传导域。

[0204] 抑制性嵌合受体一般遵循活化CAR(aCAR)结构,但使用针对细胞内信号传导域的抑制性域,而不是衍生自T细胞受体(TCR)的活化信号传导域。细胞内信号传导/共信号传导域为减少或抑制同一细胞中其他受体蛋白信号传导的抑制性域。抑制性嵌合受体细胞可含有抗原特异性抑制性受体例如以阻断可能由肿瘤外靶标表达所致的非特异性免疫活化。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细胞受体或活化或靶向肿瘤的CAR所活化的T细胞反应。例如,免疫调节细胞可表达识别非肿瘤蛋白靶标的抑制性嵌合受体和识别肿瘤蛋白的肿瘤靶向嵌合受体。当这种免疫调节细胞接触肿瘤细胞时,仅靶向肿瘤的受体识别并结合其同源配体且被活化,得到细胞信号传导途径的诱导和免疫细胞活化。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配体结合且压制或抑制通过肿瘤靶向嵌合受体的活化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。

[0205] 在一些实施方案中,抑制性嵌合受体所结合的蛋白不在靶肿瘤上表达。在一些实施方案中,与非肿瘤细胞中导致靶向肿瘤的嵌合抗原受体的活化的表达水平相比,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。

[0206] 在一些实施方案中,抑制性嵌合受体所结合的蛋白在非肿瘤细胞上表达。

[0207] 在一些实施方案中,抑制性嵌合受体所结合的蛋白在衍生自选自以下组成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、胰脏、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。

[0208] 细胞内信号传导域

[0209] 本公开的抑制性嵌合受体包含能够防止、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活化的细胞内信号传导域。在一些实施方案中,嵌合抑制性受体包含一个或多个细胞内信号传导域。

[0210] 在一些实施方案中,细胞内信号传导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经修饰的受体,所述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经修饰的受体,所述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经修饰的受体,所述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经修饰的受体,所述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经修饰的受体,所述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经修饰的受体,所述一个或多个修饰降低嵌合抑制性受体的效力。

[0211] 在一些实施方案中,相对于其他方面相同的未经修饰的受体,所述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活化的基础防止、减弱或抑制。在一些实施方案中,相对于其他方面相同的未经修饰的受体,所述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,相对于其他方面相同的未经修饰的受体,所述一个或多个修饰增加基础防止、减弱或抑制。

[0212] 抑制性域

[0213] 在一些实施方案中,抑制性细胞内信号传导域衍生自选自以下组成的组的蛋白:SLAP1、SLAP2、LAIR1、GRB-2、Dok-1、Dok-2、CD200R、SIRP $\alpha$ 、HAVR、GITR、PD-L1、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR3DL2、CD94、KLRG-1、CEACAM1、LIR2、LIR3、LIR5、SIGLEC-2和SIGLEC-10。在一些实施方案中,本文所述的抑制性嵌合受体包含抑制性细胞内信号传导域。在一些实施方案中,抑制性细胞内信号传导域为SLAP1域。在一些实施方案中,SLAP1域包含全长SLAP1蛋白的氨基酸残基8-276。在一些实施方案中,SLAP1域包含全长SLAP1蛋白的氨基酸残基8-247。在一些实施方案中,SLAP1域包含全长SLAP1蛋白的氨基酸残基8-261。在一些实施方案中,抑制性细胞内信号传导域为SLAP2域。在一些实施方案中,抑制性细胞内信号传导域为Dok-2域。在一些实施方案中,抑制性细胞内信号传导域为Dok-1域。在一些实施方案中,抑制性细胞内信号传导域为GRB2域。在一些实施方案中,抑制性细胞内信号传导域为CD200R域。在一些实施方案中,抑制性细胞内信号传导域为SIRP $\alpha$ 域。

[0214] Src样转接蛋白1和2 (SLAP1和SLAP2) 为参与细胞内信号传导途径且在淋巴细胞中表达的转接蛋白。SLAP1和SLAP2含有共同的SH2和SH3域。SH2域允许蛋白与经磷酸化的酪氨酸抗原表位结合。SLAP1和SLAP2起到T细胞受体 (TCR) 信号传导的负调节物的作用,如通过与E3泛素连接酶c-Cbl缔合来实现,这促进TCR $\delta$ 链的泛素化和降解,使得TCR信号传导降低。

[0215] 对接蛋白2 (Dok-2) 为T细胞中负信号传导复合物的一部分。对接蛋白1 (Dok-1) 为胰岛素受体信号传导途径的负调节的一部分。生长因子受体结合蛋白2 (GRB2) 为参与信号传导的转接蛋白且含有一个SH2域和两个SH3域。信号调节蛋白 $\alpha$  (SIRP $\alpha$ ) 为含有四种基于免疫受体酪氨酸的抑制基序 (ITIM) 的抑制性受体。细胞表面跨膜糖蛋白CD200受体1 (CD200R) 参与调节促炎性分子的表达的信号传导途径且与Dok-1和Dok-2缔合。

[0216] 示例性抑制性细胞内信号传导域氨基酸序列示于表1。示例性抑制性细胞内信号传导域核酸序列示于表2。

| 表 1-示例性抑制性细胞内信号传导域氨基酸序列   |            |               |
|---|------------|---------------|
| 氨基酸序列   | SEQ ID NO: | 描述            |
| <b>抑制性细胞内信号传导域</b>  |            |               |
| [0217] MEAIAKYDFKATADDELSFKRGDILKVLNEEC<br>DQNWYKAELNGKDGFIKPNYIEMKPHPWFFG<br>KIPRAKAEMLSKQRHDGAFLIRESESAPGDFS<br>LSVKFGNDVQHFKVLRDAGAKYFLWVVKFNS<br>LNELVDYHRSTSVSRNQQIFLRDIEQVPQQPTY<br>VQALFDFDPQEDGELGFRRGDFIHVMDNSDPN<br>WWKGACHGQTGMFPRNYVTPVNRNV | 1          | GRB2 细胞内信号传导域 |

表 1-示例性抑制性细胞内信号传导域氨基酸序列

| 氨基酸序列  | SEQ ID NO: | 描述                                  |
|--|------------|-------------------------------------|
| MDGAVMEGPLFLQSQRFGTKRWRKTWAVLYP<br>ASPHGVARLEFFDHKGSSSGGGRGSSRRLDCK<br>VIRLAECVSVAPVTVETPPEPGATAFRLDTAQR<br>SHLLAADAPSSAAWVQTLCRNAFPKGSWTLAP<br>TDNPPKLSALEMLENSLYSPTWEGSQFWVTVQ<br>RTEAAERCGLHGSYVLRVEAERLTLTVGAQS<br>QILEPLLSWPYTLRRYGRDKVMFSFEAGRRC<br>SGPGTFTFQTAQGNDFQAVETAIHRQKAQGK<br>AGQGHVLRADSHGEVAEGKLPSPGPGQELL<br>DSPPALYAEPLDSLRIAPCPSQDSLYSDPLDSTS<br>AQAGEGVQRKKPLYWDLYEHAQQQLLAKLT<br>DPKEDPIYDEPEGLAPVPPQGLYDLPREPKDAW<br>WCQARVKEEGYELPYNPATDDYAVPPPRTKP<br>LLAPKPQGPAPPEPGTATGSGIKSHNSALYSQV<br>QKSGASGSWDCGLSRVGTDKTGKSEGST | 2          | Dok-1 细胞内信号传导域                      |
| MGDGA VKQGF LYLQQQTFGKKWRRFGASL<br>YGGSDCALARLELQEGPEKPRRCEAARKVIRLS<br>DCLRVAEAGGEASSPRDTSAFFLETKERLYLLA<br>APAAERGDWVQAICLLAFPGRKELSGPEGKQ<br>SRPCMEENELYSSAVTVGPHKEFAVTMRPTEA<br>SERCHLRGSYTLRAGESALELWGGPEPGTQLY<br>DWPYRFLRRFGRDKVTFSFEAGRRCVSGEGNF<br>EFETRQNEIFLALEEAI SAQKNAAPATPQPQP<br>ATIPASLPRPDSYSRPHDSLPPSPPTTPVPAPRP<br>RGQEGEYAVPFDAVARSLGKNFRGILAVPPQL<br>LADPLYDSIEETLPPRPDHIYDEPEGVAALS LYD<br>SPQEPRGEAWRRQATADRDPAGLQHVQPAGQ<br>DFSASGWQPGTEYDENVLKKGPK   | 3          | Dok-2 细胞内信号传导域                      |
| PAPAERPLNPEGLDSDFLAVLSDYSPDISPPIF<br>RRGEKLRVISDEGGWWKAISLSTGRESYIPGIC<br>VARVYHGWLFEGLGRDKAEELLQLPDTKVGS<br>FMIRESETKKG FYLSVRHRQVKHYRIFRLPNN<br>WYYISPRLTFQCLEDLVNHYSEVADGLCCVLT<br>TPCLTQSTAAPAVRASSPVTLRQKTVDWRRV<br>SRLQEDPEGTENPLGVDESLSYGLRESIASYLS<br>LTSEDNTSFDRKKKSISLMYGGSKRKSFFSSPP<br>YFED  | 4          | SLAP1 <sub>aa8-aa276</sub> 细胞内信号传导域 |
| PAPAERPLNPEGLDSDFLAVLSDYSPDISPPIF<br>RRGEKLRVISDEGGWWKAISLSTGRESYIPGIC<br>VARVYHGWLFEGLGRDKAEELLQLPDTKVGS<br>FMIRESETKKG FYLSVRHRQVKHYRIFRLPNN<br>WYYISPRLTFQCLEDLVNHYSEVADGLCCVLT<br>TPCLTQSTAAPAVRASSPVTLRQKTVDWRRV<br>SRLQEDPEGTENPLGVDESLSYGLRESIASYLS<br>LTSEDNTSF  | 5          | SLAP1 <sub>aa8-aa247</sub> 细胞内信号传导域 |
| RKSLPSPSLSSSVQGGQGPVTMEAERSKATAVAL   | 6          | SLAP2 <sub>aa8-aa261</sub> 细        |

[0218]

表 1-示例性抑制性细胞内信号传导域氨基酸序列

| 氨基酸序列   | SEQ ID NO: | 描述                     |
|---|------------|------------------------|
| GSFPAGGPAELSLRLGEPLTIVSEDGDWWTVLS<br>EVSGREYNIPSVHVAKVSHGWLYEGLSREKAE<br>ELLLLPGNPGGAFLIRESQTRRGYSLSVRLSRP<br>ASWDRIRHYRIHCLDNGWLYISPRLTFPSLQAL<br>VDHYSELADDICLLKEPCVLQRAGPLPGKDIP<br>LPVTVQRTPLNWKELDSSLLFSEAATGEESLLS<br>EGLRESLSFYISLNDEAVSLDDA |            | 胞内信号传导域                |
| KVNGCRKYKLNKTESTPVVEEDEMOPYASYTE<br>KNNPLYDTTNKVKASEALQSEVDTDLHTL   | 7          | CD200R 细胞内信号传导域        |
| RIRQKKAQGSTSSTRLHEPEKNAREITQDTNDIT<br>YADLNLPKGGKPAPQAAEPNNHTEYASIQTSP<br>QPASEDTLTYADLDMVHLNRTPKQPAPKPEPS<br>FSEYASVQVPRK  | 8          | SIRP $\alpha$ 细胞内信号传导域 |
| HRWCSNKKNAAVMDQESAGNRTANSEDSDEQ<br>DPQEVTYTQLNHCVFTQRKITRPSQRPKTPPTDI<br>IVYTELPNAESRSKVVSCP  | 60         | KIR2DL1 细胞内信号传导域       |
| MTDSVIYSMLELPTATQAQNDYGPQQKSSSSR<br>PSCSCLGSG   | 61         | KLRG1 细胞内信号传导域         |
| HRQNQIKQGPPRSKDEEQKPPQRPDLAVDVLE<br>RTADKATVNGLPKEDRETDTSAALAGSSQEV<br>YAQLDHWALTQRTARAVSPQSTKPMASITYA<br>AVARH   | 62         | LAIR1 细胞内信号传导域         |
| LRHRRQGKHWTSTQRKADFQHPAGAVGPEPT<br>DRGLQWRSSPAADAQEENLYAAVKDTQPEDG<br>VEMDTRAAASEAPQDVTYAQLHSLTLRRKATE<br>PPPSQEREPPAEPSIYATLAIH  | 63         | LIR2 细胞内信号传导域          |
| RRQRHSHKRTSDQRKTDQFQRPAGAAETEPKDR<br>GLLRRSSPAADVQGENLYAAVKDTQSEDRVEL<br>DSQSPHDEDPQAVTYAPVKHSSPRREMASPPSS<br>LSGEFLDTKDRQVEEDRQMDTEAAASEASQDV<br>TYAQLHSLTLRRKATEPPPSQEGEPPAEPSIYAT<br>LAIH  | 64         | LIR3 细胞内信号传导域          |
| QHWRRQGKHRTLAQRQADFQRPAGAAEPEPKD<br>GGLQRRSSPAADVQGENFCAAVKNTQPEDGV<br>EMDTRQSPHDEDPQAVTYAKVKHSRPREMA<br>SPPSPLSGEFLDTKDRQAEEDRQMDTEAAASE<br>APQDVTYAQLHSFTLRQKATEPPPSQEGASPAE<br>PSVYATLAIH  | 65         | LIR5 细胞内信号传导域          |
| KLQRRWKRTQSQQGLQENSSGQSFFVRNKKV<br>RRAPLSEGPLHSLGCYNPMMEDGISYTTLRFP<br>EMNIPRTGDAESSEMQRPPDCDDTVTYSALHKR<br>QVGDYENVIPDFPEDEGIHYSELIQFGVGERPQ<br>AQENVYVILKH  | 66         | SIGLEC-2 细胞内信号传导域      |
| KILPKRRTQTETPRPRFSRHSTILDYINVVPTAG<br>PLAQKRNQKATPNSPRTPLPPGAPSPESKKNQK   | 67         | SIGLEC-10 细胞内信号传导域     |

[0219]

[0220]

| 表 1-示例性抑制性细胞内信号传导域氨基酸序列   |            |    |
|---|------------|----|
| 氨基酸序列   | SEQ ID NO: | 描述 |
| KQYQLPSFPEPKSSTQAPESQESQEELHYATLN<br>FPGVRPRPEARMPKGTQADYAEVKFQ |            | 域  |

[0221]

| 表 2-示例性抑制性细胞内信号传导域核酸序列  |            |                    |
|---|------------|--------------------|
| 核酸序列  | SEQ ID NO: | 描述                 |
| <b>抑制性细胞内信号传导域</b>  |            |                    |
| ATGGAAGCCATTGCCAAATACGACTTCAAGG<br>CCACCGCCGACGACGAGCTGAGCTTCAAGAG<br>AGGCGACATCCTGAAGGTGCTGAACGAGGAA<br>TGCGACCAGAAGTGGTACAAGGCCGAGCTGA<br>ACGGCAAGGACGGCTTCATCCCCAAGAATA<br>CATCGAGATGAAGCCCCATCCATGGTTCTTCG<br>GCAAGATCCCCAGAGCCAAGGCCGAAGAGAT<br>GCTGAGCAAGCAGAGACACGACGGCGCCTTT<br>CTGATCCGGGAATCTGAATCTGCCCTGGCGA<br>CTTCAGCCTGAGCGTGAAGTTCGGCAACGAC<br>GTGCAGCACTTCAAGGTCCTGAGAGATGGCG<br>CCGAAAGTACTTCCTGTGGGTCGTGAAGTTT<br>AACAGCCTGAACGAGCTGGTGGACTACCACA<br>GATCCACCAGCGTGTCCCGGAACCAGCAGAT<br>CTTCCTGCGGGACATCGAACAGGTGCCACAG<br>CAGCCAACATACGTGCAGGCCCTGTTCTGACTT<br>CGACCCTCAAGAGGATGGCGAGCTGGGCTTT<br>AGACGGGGCGATTCATCCACGTGATGGACA<br>ACAGCGACCCCAACTGGTGGAAAGGGCGCTTG<br>TCATGGACAGACCGGCATGTTCCCCAGAAAC<br>TACGTGACCCCTGTGAACCGGAACGTG | 9          | GRB2 细胞内信<br>号传导域  |
| ATGGATGGCGCCGTGATGGAAGGCCCTCTGTT<br>TCTCCAGAGCCAGAGATTCGGCACCAAGCGG<br>TGGCGGAAAACATGGGCCGTTCTGTACCCTGC<br>CTCTCCTCATGGCGTGGCCCGGCTGGAATTTT<br>TCGATCACAAGGGCTCTAGCAGCGGCGGAGG<br>CAGAGGATCTAGTAGACGGCTGGACTGCAA<br>GTGATCCGGCTGGCCGAGTGTGTGTCTGTGGC<br>TCCTGTGACCGTGGAACCCCTCCTGAACCTG<br>GCGCCACAGCCTTCAGACTGGATACAGCCCA<br>GAGAAGCCATCTGCTGGCCGCCGATGCTCCTT<br>CTTCTGCTGCTTGGGTGCAGACCCTGTGCCGG<br>AACGCTTTTCTAAAGGCAGCTGGACACTGGC<br>CCCTACCGACAATCCTCCTAAGCTGAGCGCCC<br>TGGAATGCTGGAAAACAGCCTGTACAGCCC<br>CACCTGGGAGGGCTCTCAGTTTTGGGTCACCG<br>TGCAGAGAACAGAGGCCGCCGAAAGATGTGG  | 10         | Dok-1 细胞内信<br>号传导域 |

表 2-示例性抑制性细胞内信号传导域核酸序列

| 核酸序列  | SEQ ID NO: | 描述             |
|---|------------|----------------|
| CCTGCACGGCTCTTATGTGCTGAGAGTGGAAG<br>CCGAGAGACTGACCCTGCTGACAGTGGGAGC<br>CCAGTCTCAGATCCTGGAACCTCTGCTGAGCT<br>GGCCCTACACACTGCTGAGAAGATACGGCCG<br>GGACAAAGTGATGTTTCAGCTTCGAGGCCGGC<br>AGAAGATGTCCTTCTGGCCCTGGCACATTAC<br>ATTTTCAGACAGCCCAGGGCAACGACATCTTCC<br>AGGCTGTGGAAACCGCCATCCACAGACAGAA<br>GGCCCAGGGAAAAGCCGGCCAGGGACACGAT<br>GTTCTGAGAGCCGATTCTCACGAGGGCGAAG<br>TGGCCGAGGGAAAGCTTCCTTCTCCACCTGGA<br>CCTCAAGAGCTGCTGGATAGCCCTCCTGCTCT<br>GTATGCCGAGCCTCTGGACAGCCTGAGAATC<br>GCCCCTTGTCCAAGCCAGGACTCTCTGTACAG<br>CGATCCCCTGGATAGCACATCTGCCCAAGCTG<br>GCGAAGGCGTGCAGAGGAAGAAGCCCCTGTA<br>CTGGGATCTGTACGAGCACGCTCAGCAGCAA<br>CTGCTGAAGGCCAAGCTGACAGACCCCAAAG<br>AGGACCCCATCTACGACGAGCCTGAAGGACT<br>TGCTCCAGTGCCACCTCAGGGCCTGTACGATC<br>TGCCTAGAGAGCCTAAAGACGCCTGGTGGTG<br>TCAGGCCAGAGTGAAAGAGGAAGGCTACGAG<br>CTGCCTTACAACCCCGCCACCGATGATTATGC<br>CGTGCCTCCTCCAAGAAGCACCAAACCACTG<br>CTGGCCCCAAAGCCTCAGGGACCTGCTTTTCC<br>TGAGCCTGGAACAGCCACAGGCAGCGGCATC<br>AAGAGCCACAATAGCGCCCTGTATAGCCAGG<br>TGCAGAAAAGCGGCGCCAGCGGCTCTTGGGA<br>TTGTGGACTTAGCAGAGTGGGCACCGACAAG<br>ACCGGCGTGAAGTCTGAGGGGAAGCACA |            |                |
| ATGGGAGATGGCGCCGTGAAGCAGGGCTTTC<br>TGTATCTCCAGCAGCAGCAGACCTTCGGCAA<br>GAAGTGCGGAGATTTGGCGCCTCTCTGTACG<br>GCGGCTCTGATTGTGCTCTGGCCCGACTGGAA<br>CTGCAAGAGGGACCTGAGAAGCCCAGAAGAT<br>GCGAGGCCCGCCAGAAAAGTGATCCGGCTGAG<br>CGATTGTCTGAGAGTGGCTGAAGCAGGCGGC<br>GAAGCCAGCTCTCCTAGAGATACCAGCGCAT<br>TCTTCCTGGAAACAAAAGAGCGGCTGTACCT<br>GCTGGCCGCTCCTGCTGCTGAAAGAGGCGATT<br>GGGTCCAAGCCATCTGCCTGCTGGCTTTTCCC<br>GGCCAGAGAAAAGAGCTGTCTGGCCCTGAGG<br>GCAAGCAGAGCAGGCCTTGCATGGAAGAGAA<br>CGAGCTGTACTCCAGCGCCGTGACAGTGGGC<br>CCTCACAAAGAATTTGCCGTGACCATGAGGC<br>CCACCGAGGCCAGCGAAAGATGTCACCTGAG  | 11         | Dok-2 细胞内信号传导域 |

[0222]

表 2-示例性抑制性细胞内信号传导域核酸序列

| 核酸序列   | SEQ ID NO: | 描述                                  |
|--|------------|-------------------------------------|
| AGGCAGCTACACCCTGAGAGCCGGCGAATCT<br>GCTCTGGAAC TTTGGGGAGGACCTGAGCCTG<br>GCACACAGCTGTACGACTGGCCCTACAGATTC<br>CTGCGGAGATTCGGCCGGGACAAAGTGACCT<br>TCAGCTTTGAGGCTGGCCGCAGATGTGTGTCC<br>GGCGAGGGCAATTCGAGTTCGAGACAAGAC<br>AGGGCAACGAGATCTTCTGGCTCTGGAAGA<br>GGCCATCAGCGCCCAGAAAAATGCTGCCCT<br>GCTACACCTCAGCCTCAGCCTGCTACAATCCC<br>TGCCTCTTGCCCAGACCTGACAGCCCTTATA<br>GCAGACCCACGACTCTCTGCCTCCACCTTCT<br>CCAACAACACCCGTGCCTGCTCCTAGACCTAG<br>AGGACAAGAGGGGCGAGTACGCCGTGCCTTTT<br>GATGCCGTGGCTAGAAGCCTGGGCAAGA ACT<br>TCAGAGGCATCCTGGCTGTGCCTCCACAGCTG<br>CTGGCTGACCCTCTGTACGACAGCATCGAGG<br>AAACCCTGCCTCCAAGACCTGACCACATCTAC<br>GACGAGCCTGAAGGCGTGGCAGCCCTGTCTC<br>TGTATGACTCCCCTCAAGAGCCTAGAGGCGA<br>AGCCTGGCGTAGACAGGCTACCGCCGATAGA<br>GATCCTGCCGGACTGCAACATGTGCAGCCAG<br>CCGGCCAGGATTTTTCTGCCTCTGGATGGCAG<br>CCAGGCACCGAGTACGATAACGTGGTGCTGA<br>AGAAGGGCCCCAAG |            |                                     |
| CCAGCCCCAGCGGAGCGACCGCTGCCAAACC<br>CTGAAGGGCTCGACAGTGACTTTTTGGCTGTC<br>CTCTCCGACTATCCTAGTCCCGATATCAGCCC<br>CCCGATATTCAGGCGCGGTGAAAACTCCGA<br>GTCATCAGCGATGAGGGGGGTTGGTGGAAAG<br>CCATCAGCCTGAGTACCGGACGAGAGTCATA<br>CATTCTGGAATATGTGTAGCGAGGGTGTACC<br>ACGGTTGGCTGTTTCGAGGGTCTGGGAAGAGA<br>TAAGGCCGAGGAACTTCTCCA ACTCCCAGAT<br>ACAAAGTCGGTAGTTTTATGATTCGGGAAA<br>GTGAAACTAAAAAGGGGTTCTATAGCCTCTC<br>AGTTCGGCATAGGCAGGTCAAGCATTATCGG<br>ATATTCGCTTGCCTAACAACTGGTACTACAT<br>AAGTCCCCGACTCACATTCCAATGCCTGGAGG<br>ACCTCGTGAATCACTATTCAGAAGTTGCAGAT<br>GGCCTCTGCTGCGTACTCACGACACCCTGCCT<br>TACCCAGAGTACAGCGGCCCCGGCTGTTCCG<br>GCATCTTCCAGCCCAGTAACACTCAGGCAAA<br>AA ACTGTGGATTGGCGCAGAGTCTCACGCCTT<br>CAGGAAGATCCTGAGGGTACGGAAAATCCGC<br>TCGGTGTGGACGAGTCACTGTTCTCCTATGGC<br>TTGAGGGAATCTATAGCGTCTTACCTTTCCTT  | 12         | SLAP1 <sub>aa8-aa276</sub> 细胞内信号传导域 |

[0223]

表 2-示例性抑制性细胞内信号传导域核酸序列

| 核酸序列  | SEQ ID NO: | 描述                                  |
|---|------------|-------------------------------------|
| GACGTCTGAAGATAATACGTCTTTCGATCGCA<br>AAAAAAAAAATCAATATCTCTTATGTATGGCGG<br>AAGCAAAGGAAATCATCATTCTTTCCTCTC<br>CACCATATTTCGAAGAT  |            |                                     |
| CCAGCCCCAGCGGAGCGACCGCTGCCAAACC<br>CTGAAGGGCTCGACAGTGACTTTTTGGCTGTC<br>CTCTCCGACTATCCTAGTCCCGATATCAGCCC<br>CCCGATATTCAGGCGCGGTGAAAACTCCGA<br>GTCATCAGCGATGAGGGGGTGGTGGAAAG<br>CCATCAGCCTGAGTACCGGACGAGAGTCATA<br>CATTCTGGAATATGTGTAGCGAGGGTGTACC<br>ACGTTGGCTGTTTCGAGGGTCTGGGAAGAGA<br>TAAGGCCGAGGAACTTCTCCAATCCCAGAT<br>ACAAAGTCGGTAGTTTTATGATTCGGGAAA<br>GTGAAACTAAAAAGGGTCTATAGCCTCTC<br>AGTTCGGCATAGGCAGGTCAAGCATTATCGG<br>ATATTCGCTTGCCTAACAACTGGTACTACAT<br>AAGTCCCCGACTCACATTCCAATGCCTGGAGG<br>ACCTCGTGAATCACTATTCAGAAGTTGCAGAT<br>GGCTCTGCTGCGTACTCACGACACCCTGCCT<br>TACCCAGAGTACAGCGGCCCGGCTGTTCCGG<br>GCATCTCCAGCCCAGTAACACTCAGGCAAA<br>AAAGTGTGGATTGGCGCAGAGTCTCACGCCT<br>CAGGAAGATCCTGAGGGTACGGAAAATCCGC<br>TCGGTGTGGACGAGTCACTGTTCTCCTATGGC<br>TTGAGGGAATCTATAGCGTCTTACCTTTCCTT<br>GACGTCTGAAGATAATACGTCTTTC | 13         | SLAP1 <sub>aa8-aa247</sub> 细胞内信号传导域 |
| AGAAAATCCCTCCCCAGTCCAAGCCTGTCTAG<br>TAGCGTTCAGGGTCAGGGCCAGTACTATGG<br>AAGCGGAACGATCCAAGGCTACCGCAGTTGC<br>TCTGGGTTTATTCCCGGCTGGAGGGCCAGCGG<br>AACTCTCCTTGCGCCTGGGTGAGCCACTTACC<br>ATCGTTTCTGAGGACGGAGATTGGTGGACGG<br>TTCTTTCTGAAGTATCTGGGAGAGAATAACAAC<br>ATACCGTCAGTTCATGTTCGAAAAGTTTACA<br>CGGTTGGCTTTACGAGGGACTCAGCAGGGAA<br>AAAGCGGAGGAATTGTTGCTTTTGCCCGGCA<br>ATCCTGGCGGAGCATTGTTGATAAGAGAGAG<br>TCAGACCCGGAGAGGCAGTTATCCCTGTCAG<br>TTAGACTCAGCAGACCTGCGAGTTGGGATAG<br>GATTTCGGCACTACAGGATTCCTGCCTTGATA<br>ACGGCTGGCTGTATATATCTCCTCGCCTGACA<br>TTCCCTAGCCTCCAAGCGTTGGTTGATCATT<br>CTCTGAACTGGCAGACGATATCTGCTGCCTGC<br>TCAAGGAACCGTGCCTCCTCCAGAGGGCAGG<br>CCCACTTCTGGCAAGGATATTCCACTTCCAG  | 14         | SLAP2 <sub>aa8-aa261</sub> 细胞内信号传导域 |

[0224]

表 2-示例性抑制性细胞内信号传导域核酸序列

| 核酸序列  | SEQ ID NO: | 描述                   |
|---|------------|----------------------|
| TCACGGTTCAAAGAACCCCCCTCAATTGGAA<br>GGAGCTGGATAGCTCTCTCCTCTTTTCCGAGG<br>CCGCTACAGGTGAAGAATCTCTGTTGTCTGAA<br>GGATTGAGAGAGAGTCTCTCCTTCTACATCTC<br>TCTGAATGATGAAGCAGTGTCATTGGACGAC<br>GCA   |            |                      |
| AAAGTGAACGGCTGCCGGAAGTACAAGCTGA<br>ACAAGACCGAGAGCACCCCTGTGGTGGGAAGA<br>GGACGAGATGCAGCCTTACGCCAGCTACACC<br>GAGAAGAACAACCCTCTGTACGACACCACCA<br>ACAAAGTGAAGGCCAGCGAGGCCCTCCAGAG<br>CGAGGTTGACACAGATCTGCACACCCTG  | 15         | CD200R 细胞内<br>信号传导域  |
| CACCGGTGGTGCAGCAACAAGAAAAACGCCG<br>CCGTGATGGACCAAGAGAGCGCCGAAATAG<br>AACCGCCAACAGCGAGGATAGCGACGAGCAG<br>GACCTCAAGAAGTGACCTACACACAGCTGA<br>ACCACTGCGTGTTACCCAGCGGAAGATCAC<br>CAGACCTAGCCAGCGGCCTAAGACACCACCT<br>ACCGACATCATCGTGTACACCGAGCTGCCCA<br>ACGCCGAGAGCAGATCCAAGGTCGTGTCTG<br>TCCT  | 68         | KIR2DL1 细胞<br>内信号传导域 |
| ATGACCGACAGCGTGATCTACAGCATGCTCG<br>AGCTGCCTACAGCCACACAGGCCCAGAATGA<br>TTACGGCCCTCAGCAGAAGTCCAGCTCCAGC<br>AGACCTAGCTGTAGCTGTCTTGCTCCGGC  | 69         | KLRG1 细胞内<br>信号传导域   |
| CACCGGCAGAACCAGATCAAGCAGGGCCCTC<br>CTAGAAGCAAGGACGAGGAACAGAAGCCTCA<br>GCAGAGGCCTGATCTGGCCGTGGACGTGCTG<br>GAAAGAACAGCCGATAAGGCCACCGTGAACG<br>GCCTGCCTGAGAAGGACAGAGAGACAGACAC<br>ATCTGCCCTGGCCGCTGGCAGCTCCCAAGAA<br>GTGACATACGCCAGCTGGACCACTGGGCC<br>TGACACAGAGAACTGCCAGAGCTGTGTCCCC<br>TCAGAGCACCAAACCTATGGCCGAGAGCATC<br>ACCTATGCCGCCGTGGCCAGACAT   | 70         | LAIR1 细胞内<br>信号传导域   |
| CTGCGGCACAGAAGGCAGGGCAAGCACTGGA<br>CAAGCACCCAGAGAAAGGCCGATTTTCAGCA<br>CCCTGCTGGCGCCGTTGGACCTGAGCCTACAG<br>ATAGAGGACTGCAGTGGCGGTCTAGCCCTGC<br>TGCCGATGCTCAAGAGGAAAACCTGTACGCC<br>GCCGTGAAGGACACCCAACCTGAAGATGGCG<br>TGAAATGGACACCAGAGCCCGCATCTGA<br>AGCCCCTCAGGATGTGACATACGCCAGCTG<br>CATAGCCTGACACTGAGGCGGAAAGCCACAG<br>AGCCTCCACCTAGCCAAGAGAGAGAGCCTCC<br>TGCCGAGCCTAGCATCTATGCCACACTGGCCA | 71         | LIR2 细胞内信<br>号传导域    |

[0225]

表 2-示例性抑制性细胞内信号传导域核酸序列

| 核酸序列   | SEQ ID NO: | 描述                |
|--|------------|-------------------|
| TTCAC<br>CGGAGACAGAGACACAGCAAGCACAGAACC<br>AGCGACCAGAGAAAGACCGACTTCCAGAGGC<br>CTGCTGGCGCCGCTGAGACAGAGCCTAAAGA<br>TAGAGGACTGCTGCGGAGAAGCAGCCCTGCT<br>GCCGATGTGCAAGAGGAAAATCTGTACGCCG<br>CCGTGAAGGACACCCAGAGCGAGGATAGAGT<br>GGAAGTGGACAGCCAGTCTCCTCACGACGAA<br>GATCCTCAGGCCGTGACATACGCCCTGTGAA<br>GCACAGCAGCCCTCGGAGAGAAATGGCCTCT<br>CCACCTTCTAGCCTGAGCGGCGAGTTCCTGGA<br>CACCAAGGACAGACAGGTGGAAGAGGACCG<br>GCAGATGGATACAGAAGCTGCCGCCTCTGAA<br>GCCAGCCAGGATGTGACATATGCCAGCTGC<br>ATAGCCTGACACTGCGGCGGAAAGCTACAGA<br>GCCTCCTCCATCTCAAGAGGGCGAGCCTCCAG<br>CCGAGCCTAGCATCTATGCCACACTGGCCATT<br>CAC | 72         | LIR3 细胞内信号传导域     |
| CAGCATTGGAGACAGGGAAAGCACAGAACAC<br>TGGCCAGCGGCAGGCCGATTTCCAAAGACC<br>TCCAGGTGCCGCCGAACCTGAGCCTAAAGAT<br>GGTGGCCTGCAGCGGAGATCTTCTCCTGCTGC<br>CGATGTGCAGGGCGAGAATTTTTGTGCCGCCG<br>TGAAGAACACCCAGCCTGAGGATGGCGTGGA<br>AATGGACACCAGACAGAGCCCTCACGACGAG<br>GATCCACAGGCCGTGACATACGCCAAAGTGA<br>AGCACAGCCGGCCTCGGAGAGAAATGGCTAG<br>CCCTCCAAGTCCTCTGAGCGGCGAGTTCCTGG<br>ACACCAAAGACAGACAGGCCGAAGAGGACC<br>GGCAGATGGATACAGAAGCTGCCGCCTCTGA<br>AGCCCCTCAGGATGTGACATATGCCAGCTGC<br>ATAGCTTCACCCTGCGGCAGAAAGCCACAGA<br>GCCTCCACCTTCTCAAGAGGGCGCTTCTCCAG<br>CCGAGCCATCTGTGTATGCCACACTGGCCATT<br>CAC       | 73         | LIR5 细胞内信号传导域     |
| AAGCTGCAGCGGAGATGGAAGAGAACACAG<br>AGCCAGCAGGGCCTGCAAGAGAATAGCAGCG<br>GCCAGAGCTTCTTCGTGCGGAACAAGAAAGT<br>GCGGAGAGCCCCTCTGTCTGAGGGACCTCAT<br>AGCCTGGGCTGTTACAACCCCATGATGGAAG<br>ATGGCATCAGCTACACCACACTGCGGTTCCCC<br>GAGATGAACATCCCTAGAACAGGCGACGCCG<br>AGAGCAGCGAAATGCAAAGACCTCCTCCTGA<br>CTGCGACGACACCGTGACATATAGCGCCCTG<br>CACAAGAGACAAGTGGGCGACTACGAGAACG<br>TGATCCCTGACTTCCCTGAGGACGAGGGCATC   | 74         | SIGLEC-2 细胞内信号传导域 |

[0226]

表 2-示例性抑制性细胞内信号传导域核酸序列

| 核酸序列  | SEQ ID NO: | 描述                         |
|---|------------|----------------------------|
| CACTACAGCGAGCTGATCCAGTTTGGCGTGG<br>GCGAAAGACCCCAGGCTCAAGAGAATGTGGA<br>CTACGTGATCCTGAAGCAC   |            |                            |
| AAGATCCTGCCTAAGCGGCGCACCCAGACCG<br>AGACTCCTAGACCTAGATTCAGCCGGCACAG<br>CACCATCCTGGACTACATCAACGTGGTGCCTA<br>CCGCCGGACCACTGGCTCAGAAGAGAAACCA<br>GAAGGCCACACCTAACAGCCCCAGAACACCT<br>CTTCCACCTGGCGCACCTTCTCCAGAGAGCAA<br>GAAGAACCAGAAGAAGCAGTACCAGCTGCCT<br>AGCTTCCCCGAGCCTAAGAGCAGTACACAGG<br>CCCCTGAGAGCCAAGAGTCCAAGAGGAACT<br>GCACTACGCCACACTGAACTTCCCCGGCGTCA<br>GACCTAGACCTGAGGCCAGAATGCCTAAGGG<br>CACCCAGGCCGATTACGCCGAAGTGAAGTTT<br>CAA | 75         | SIGLEC-10 细<br>胞内信号传导<br>域 |

[0227]

[0228] 在一些实施方案中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自选自自由以下组成的组的蛋白:SLAP1、SLAP2、Dok-1、Dok-2、LAIR1、GRB-2、CD200R、SIRPα、HAVR、GITR、PD-L1、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR3DL2、CD94、KLRG-1、CEACAM1、LIR2、LIR3、LIR5、SIGLEC-2和SIGLEC-10。

[0229] 在一些实施方案中,跨膜域衍生自与所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个相同的蛋白。在一些实施方案中,所述跨膜域衍生自第一蛋白,且所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自与所述第一蛋白不同的第二蛋白。

[0230] 在一些实施方案中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自SLAP1。

[0231] 在一些实施方案中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个包含与PAPAERP LPNPEGLDSDFLAVLSDYSPDISPPIFRRGEKLRVISDEGGWKAISLSTGRESYIPGICVARVYHGWLFEGGLGRDKAEELLQLPDTKVGFSMIRESETKKGFSYLSVRHRQVKHYRIFRLPNNWYYISPRLTFQCLEDLVNHYSEVADGLCCVLTTPCLTQSTAAPAVRASSSPVTLRQKTVDWRRVSRLQEDPEGTENPLGVDESLSYGLRESIASYLSLTSEDNTSFDRKKKSISLMYGGSKRKSSFFSPPYFED (SEQ ID NO:4) 或PAPAERPLNPEGLDSDFLAVLSDYSPDISPPIFRRGEKLRVISDEGGWKAISLSTGRESYIPGICVARVYHGWLFEGGLGRDKAEELLQLPDTKVGFSMIRESETKKGFSYLSVRHRQVKHYRIFRLPNNWYYISPRLTFQCLEDLVNHYSEVADGLCCVLTTPCLTQSTAAPAVRAS SSPVTLRQKTVDWRRVSRLQEDPEGTENPLGVDESLSYGLRESIASYLSLTSEDNTSF (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%同一性的氨基酸序列。

[0232] 在一些实施方案中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个包含氨基酸序列PAPAERPLNPEGLDSDFLAVLSDYSPDISPPIFRRGEKLRVISDEGGWKAISLSTGRESYIPGICVARVYHGWLFEGGLGRDKAEELLQLPDTKVGFSMIRESETKKGFSYLSVRHRQVKHYRIFRLPNNWYYISPRLTFQCLEDLVNHYSEVADGLCCVLTTPCLTQSTAAPAVRASSSPVTLRQKTVDWRRVSRLQEDPEGTENPLGVDESLSYGLRESIASYLSLTSEDNTSFDRKKKSISLMYGGSKRKSSFFSPPYFED (SEQ ID NO:4) 或PAPAERPLNPEGLDSDFLAV

LSDYSPDISPPIFRRGEKLRVISDEGGWWKAISLSTGRESYIPGICVARVYHGWLFEGLGRDKAEELLQLPDTKV  
GSFMIRESETKKGFYSLSVRHRQVKHYRIFRLPNNWYYIISPRLTFQCLEDLVNHYSEVADGLCCVLTTPCLTQSTA  
APAVRASSSPVTLRQKTVDWRRVSRQLQEDPEGTENPLGVDESLSYGLRESIASYLSLTSEDNTSF (SEQ ID NO:  
5)。

[0233] 在一些实施方案中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自SLAP2。

[0234] 在一些实施方案中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个包含与RKSLPSP  
SLSSSVQGGPVTMEAERSKATAVALGSFPAGGPAELSLRLGEPLTIVSEDGDWWTVLSEVSGREYNIPSVHVAKV  
SHGWLYEGLSREKAEELLLLPGNPGGAFLIRESQTRRGSYSLSVRLSRPASWDRIRHYRIHCLDNGWLYISPRLTF  
PSLQALVDHYSELADDICLLKEPCVLQRAGPLPGKDIPLPVTVQRTPLNWKELDSSLLFSEAATGEESLLSEGLR  
ESLSFYISLNDEAVSLDDA (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%同一性的氨基酸序列。

[0235] 在一些实施方案中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个包含氨基酸序列  
RKSLPSPSLSSSVQGGPVTMEAERSKATAVALGSFPAGGPAELSLRLGEPLTIVSEDGDWWTVLSEVSGREYNIP  
SVHVAKVSHGWLYEGLSREKAEELLLLPGNPGGAFLIRESQTRRGSYSLSVRLSRPASWDRIRHYRIHCLDNGWLY  
ISPRLTFPSLQALVDHYSELADDICLLKEPCVLQRAGPLPGKDIPLPVTVQRTPLNWKELDSSLLFSEAATGEES  
LLSEGLRESLSFYISLNDEAVSLDDA (SEQ ID NO:6)。

[0236] 在一些实施方案中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自KIR2DL1。

[0237] 在一些实施方案中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个包含与HRWCSNK  
KNAAVMDQESAGNRTANSEDSDEQDPQEVYTYQLNHCVFTRKQITRPSQRPKTPPTDIIVYTELPNAESRSKVVSCP  
(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。

[0238] 在一些实施方案中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个包含氨基酸序列  
HRWCSNKKNAAVMDQESAGNRTANSEDSDEQDPQEVYTYQLNHCVFTRKQITRPSQRPKTPPTDIIVYTELPNAES  
RSKVVSCP (SEQ ID NO:60)。

[0239] 在一些实施方案中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自KLRG-1。

[0240] 在一些实施方案中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个包含与MTDSVIY  
SMLELPTATQAQNDYGPQQKSSSRPSCSCLGSG (SEQ ID NO:61) 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。

[0241] 在一些实施方案中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个包含氨基酸序列  
MTDSVIYSMLELPTATQAQNDYGPQQKSSSRPSCSCLGSG (SEQ ID NO:61)。

[0242] 在一些实施方案中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自LAIR1。

[0243] 在一些实施方案中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个包含与HRQNQIK  
QGPPRSKDEEQKPPQRPDLAVDLERTADKATVNLPEKDRETDTSALAAGSSQEVTYAQLDHWALTQRTARAVSP  
QSTKPMAESITYAAVARH (SEQ ID NO:62) 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。

[0244] 在一些实施方案中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个包含氨基酸序列 HRQNQIKQGPPRSKDEEQKPQQRDLAVDVLERTADKATVNGLPKDRDTSALAAAGSSQEVTYAQLDHWALTQR TARAVSPQSTKPMASITYAAVARH (SEQ ID NO:62)。

[0245] 在一些实施方案中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自LIR2。

[0246] 在一些实施方案中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个包含与LRHRRQG KHWSTSTQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPAADAQEENLYAAVKDTQPEDGVEMDTRAAASEAPQDVTYAQL HSLTLRRKATEPPPSQEREPPAEPsiyatLAIH (SEQ ID NO:63) 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。

[0247] 在一些实施方案中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个包含氨基酸序列 LRHRRQGHWTSTQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPAADAQEENLYAAVKDTQPEDGVEMDTRAAASEAPQ DVTYAQLHSLTLRRKATEPPPSQEREPPAEPsiyatLAIH (SEQ ID NO:63)。

[0248] 在一些实施方案中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自LIR3。

[0249] 在一些实施方案中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个包含与RRQRHSH KRTSDQRKTDfQRPAGAAETEPKDRGLLRSSPAADVQEENLYAAVKDTQSEDRVELDSQSPHDEDPQAVTYAPVK HSSPRREMASPPSSLSGFLDTKDRQVEEDRQMDTEAAASEASQDVTYAQLHSLTLRRKATEPPPSQEGEPPAEPsi yatLAIH (SEQ ID NO:64) 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。

[0250] 在一些实施方案中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个包含氨基酸序列 RRQRHSHKRTSDQRKTDfQRPAGAAETEPKDRGLLRSSPAADVQEENLYAAVKDTQSEDRVELDSQSPHDEDPQA VTYAPVKHSSPRREMASPPSSLSGFLDTKDRQVEEDRQMDTEAAASEASQDVTYAQLHSLTLRRKATEPPPSQEG EPPAEPsiyatLAIH (SEQ ID NO:64)。

[0251] 在一些实施方案中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自LIR5。

[0252] 在一些实施方案中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个包含与QHWRQGK HRTLAQRQADFQRPAGAAEPEPKDGGLQRRSSPAADVQGENFCAAVKNTQPEDGVEMDTRQSPHDEDPQAVTYAKV KHSRPRREMASPPSPLSGFLDTKDRQAEEDRQMDTEAAASEAPQDVTYAQLHSFTLRQKATEPPPSQEGASPAEP SVYATLAIH (SEQ ID NO:65) 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。

[0253] 在一些实施方案中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个包含氨基酸序列 QHWRQGKHRTLAQRQADFQRPAGAAEPEPKDGGLQRRSSPAADVQGENFCAAVKNTQPEDGVEMDTRQSPHDEDPQ AVTYAKVKHSRPRREMASPPSPLSGFLDTKDRQAEEDRQMDTEAAASEAPQDVTYAQLHSFTLRQKATEPPPSQE GASPAEPSVYATLAIH (SEQ ID NO:65)。

[0254] 在一些实施方案中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自SIGLEC-2。

[0255] 在一些实施方案中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个包含与KLQRRWK RTQSQQGLQENSSGQSFVRNKKVRRAPLSEGPLSLGCYNPMMEDGISYTTLRFPENIPIRTGDAESSEMQRPPPD CDDTVTYSALHKRQVGDYENVIPDFPEDEGIHYSELIQFGVGERPQAQENVYVILKH (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。

[0256] 在一些实施方案中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个包含氨基酸序列 KLQRRWKRTQSQQGLQENSSGQSFFVRNKKVRRAPLSEPHSLGCYNPMMEDGISYTTLRFPEMNIPTGDAESSE MQRPPDCDDTVTYSALHKRQVGDYENVIPDFPEDEGIHYSELIQFGVGERPQAQENVYVILKH (SEQ ID NO: 66)。

[0257] 在一些实施方案中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自SIGLEC-10。

[0258] 在一些实施方案中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个包含与KILPKRR TQTETPRPRFSRHSTILDYINVVPTAGPLAQKRNQKATPNSPRTPLPPGAPSPESKKNQKKQYQLPSFPEPKSSTQ APESQESQEELHYATLNFPGVRPRPEARMPKGQTADYAEVKFQ (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。

[0259] 在一些实施方案中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个包含氨基酸序列 KILPKRRTQTETPRPRFSRHSTILDYINVVPTAGPLAQKRNQKATPNSPRTPLPPGAPSPESKKNQKKQYQLPSFP EPKSSTQAPESQESQEELHYATLNFPGVRPRPEARMPKGQTADYAEVKFQ (SEQ ID NO:67)。

[0260] 在一些实施方案中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个包含与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,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个包含与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,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个包含与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,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个包含与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%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个包含与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,所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个包含与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。

[0261] 在一些实施方案中,跨膜域和所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自相同蛋白。在一些实施方案中,所述跨膜域衍生自第一蛋白,且所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自与所述第一蛋白不同的第二蛋白。

**[0262] 酶抑制性域**

[0263] 在一些实施方案中,抑制性嵌合受体包含酶抑制性域。在一些实施方案中,相对于缺乏酶抑制性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,酶抑制性域还能够防止、减弱或抑制嵌合受体的活化。

[0264] 在一些实施方案中,酶抑制性域包含酶催化域。在一些实施方案中,酶催化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。

[0265] 在一些实施方案中,酶抑制性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抑制性域,所述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,相对于缺乏所述一个或多个修饰的其他方面相同的酶抑制性域,所述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,相对于缺乏所述一个或多个修饰的其他方面相同的酶抑制性域,所述一个或多个修饰增加基础防止、减弱或抑制。

**[0266] 活化和共刺激性域**

[0267] 在一些实施方案中,本文所公开的细胞可进一步包含至少一种肿瘤靶向嵌合受体或T细胞受体,其包含活化细胞内域或共刺激性细胞内域。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种或更多种靶向肿瘤的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。

[0268] 在一些实施方案中,活化信号传导域为CD3- $\delta$ 蛋白,其包括三个基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)。活化信号传导域的其他实例包括CD28、4-1BB和OX40。在一些实施方案中,细胞受体包含多于一个活化信号传导域,其各自被称为共刺激性域。

[0269] 在一些实施方案中,肿瘤靶向嵌合受体为嵌合抗原受体(CAR)或工程改造的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蛋白。

[0270] 在一些实施方案中,在所述蛋白与嵌合抑制性受体结合之前,肿瘤靶向嵌合受体能够活化细胞。

**[0271] 跨膜域**

[0272] 抑制性嵌合受体可含有跨膜域,其将蛋白结合域连接至细胞内域。不同的跨膜域得到不同的受体稳定性。合适的跨膜域包括但不限于CD8、CD28、CD3 $\delta$ 、CD4、4-1BB、OX40、ICOS、2B4、CD25、CD7、LAX、LAT、LAIR1、GRB-2、Dok-1、Dok-2、SLAP1、SLAP2、CD200R、SIRP $\alpha$ 、HAVR、GITR、PD-L1、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR3DL2、CD94、KLRG-1、CEACAM1、LIR2、LIR3、LIR5、SIGLEC-2和SIGLEC-10。

[0273] 在一些实施方案中,跨膜域衍生自选自以下组成的组的蛋白:CD8、CD28、CD3 $\delta$ 、CD4、4-1BB、OX40、ICOS、2B4、CD25、CD7、LAX、LAT、LAIR1、GRB-2、Dok-1、Dok-2、SLAP1、SLAP2、CD200R、SIRP $\alpha$ 、HAVR、GITR、PD-L1、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR3DL2、CD94、KLRG-1、CEACAM1、LIR2、LIR3、LIR5、SIGLEC-2和SIGLEC-10。在一些实施方案中,细胞受体的跨膜域为LAX跨膜域。在一些实施方案中,细胞受体的跨膜域为CD28跨膜域。在一些实施方案中,细胞受体的跨膜域为CD25跨膜域。在一些实施方案中,细胞受体的跨膜域为CD7跨膜域。在一些实施方案中,细胞受体的跨膜域为LAT跨膜域。在一些实施方案中,细胞受体的跨膜域为

SIRPα跨膜域。

[0274] 在一些实施方案中,跨膜域和细胞内信号传导域衍生自相同蛋白。在一些实施方案中,跨膜域衍生自第一蛋白,且细胞内信号传导域衍生自与第一蛋白不同的第二蛋白,其中所述嵌合抑制性受体包含衍生自CD28的跨膜域。

[0275] 在一些实施方案中,跨膜域包含与FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO: 20) 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,跨膜域包含氨基酸序列FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO:20)。

[0276] 在一些实施方案中,跨膜域和细胞内信号传导域衍生自相同蛋白。在一些实施方案中,跨膜域衍生自第一蛋白,且细胞内信号传导域衍生自与第一蛋白不同的第二蛋白,其中所述嵌合抑制性受体包含衍生自KIR2DL1的跨膜域。

[0277] 在一些实施方案中,跨膜域包含与ILIGTSVVIILFILLFFLL (SEQ ID NO:76) 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,跨膜域包含氨基酸序列ILIGTSVVIILFILLFFLL (SEQ ID NO:76)。

[0278] 在一些实施方案中,跨膜域和细胞内信号传导域衍生自相同蛋白。在一些实施方案中,跨膜域衍生自第一蛋白,且细胞内信号传导域衍生自与第一蛋白不同的第二蛋白,其中所述嵌合抑制性受体包含衍生自KLRG-1跨膜域。

[0279] 在一些实施方案中,跨膜域包含与VAIALGLLTAVLLSVLLYQWI (SEQ ID NO:78) 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,跨膜域包含氨基酸序列VAIALGLLTAVLLSVLLYQWI (SEQ ID NO:78)。

[0280] 在一些实施方案中,跨膜域和细胞内信号传导域衍生自相同蛋白。在一些实施方案中,跨膜域衍生自第一蛋白,且细胞内信号传导域衍生自与第一蛋白不同的第二蛋白,其中所述嵌合抑制性受体包含衍生自LAIR1的跨膜域。

[0281] 在一些实施方案中,跨膜域包含与ILIGSVVFLFCLLLLVLFL (SEQ ID NO:79) 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,跨膜域包含氨基酸序列ILIGSVVFLFCLLLLVLFL (SEQ ID NO:79)。

[0282] 在一些实施方案中,跨膜域和细胞内信号传导域衍生自相同蛋白。在一些实施方案中,跨膜域衍生自第一蛋白,且细胞内信号传导域衍生自与第一蛋白不同的第二蛋白,其中所述嵌合抑制性受体包含衍生自LIR2的跨膜域。

[0283] 在一些实施方案中,跨膜域包含与VIGILVAVLLLLLLLLLFLI (SEQ ID NO:80) 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,跨膜域包含氨基酸序列VIGILVAVLLLLLLLLLFLI (SEQ ID NO:80)。

[0284] 在一些实施方案中,跨膜域和细胞内信号传导域衍生自相同蛋白。在一些实施方案中,跨膜域衍生自第一蛋白,且细胞内信号传导域衍生自与第一蛋白不同的第二蛋白,其

中所述嵌合抑制性受体包含衍生自LIR3的跨膜域。

[0285] 在一些实施方案中,跨膜域包含与VLIGVSVAFVLLLFLLLFLLL (SEQ ID NO:81) 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,跨膜域包含氨基酸序列VLIGVSVAFVLLLFLLLFLLL (SEQ ID NO:81)。

[0286] 在一些实施方案中,跨膜域和细胞内信号传导域衍生自相同蛋白。在一些实施方案中,跨膜域衍生自第一蛋白,且细胞内信号传导域衍生自与第一蛋白不同的第二蛋白,其中所述嵌合抑制性受体包含衍生自LIR5的跨膜域。

[0287] 在一些实施方案中,跨膜域包含与VLIGVLVVSILLLSLLLFLLL (SEQ ID NO:82) 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,跨膜域包含氨基酸序列VLIGVLVVSILLLSLLLFLLL (SEQ ID NO:82)。

[0288] 在一些实施方案中,跨膜域和细胞内信号传导域衍生自相同蛋白。在一些实施方案中,跨膜域衍生自第一蛋白,且细胞内信号传导域衍生自与第一蛋白不同的第二蛋白,其中所述嵌合抑制性受体包含衍生自SIGLEC-2跨膜域。

[0289] 在一些实施方案中,跨膜域包含与VAVGLGSCLAAILILAICGL (SEQ ID NO:83) 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,跨膜域包含氨基酸序列VAVGLGSCLAAILILAICGL (SEQ ID NO:83)。

[0290] 在一些实施方案中,跨膜域和细胞内信号传导域衍生自相同蛋白。在一些实施方案中,跨膜域衍生自第一蛋白,且细胞内信号传导域衍生自与第一蛋白不同的第二蛋白,其中所述嵌合抑制性受体包含衍生自SIGLEC-10跨膜域。

[0291] 在一些实施方案中,跨膜域包含与GAFLGIGITALLFLCLALIIM (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%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,跨膜域包含氨基酸序列GAFLGIGITALLFLCLALIIM (SEQ ID NO:84)。

[0292] 在一些实施方案中,跨膜域包含与SEQ ID NO:16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,跨膜域包含与SEQ ID NO:17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,跨膜域包含与SEQ ID NO:18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,跨膜域包含与SEQ ID NO:19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,跨膜域包含与SEQ ID NO:21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。

[0293] 示例性跨膜域氨基酸序列示于表3。示例性跨膜域核酸序列示于表4。

| 氨基酸序列                                   | SEQ ID NO: | 描述                |
|---|------------|-------------------|
| IFSGFAGLLAILLVAVFCIL                    | 16         | LAX 跨膜域           |
| VAVAGCVFLLISVLLLSGL                     | 17         | CD25 跨膜域          |
| AALAVISFLLGLGLGVACVLA                   | 18         | CD7 跨膜域           |
| MEADALSPVGLGLLLLPFLVTLAALAVRAR<br>ELPVS | 19         | LAT 跨膜域           |
| FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV             | 20         | CD28 跨膜域          |
| IVVGVVCTLLVALLMAALYLV                   | 21         | SIRP $\alpha$ 跨膜域 |
| ILIGTSVVILFILLFFLL                      | 76         | KIR2DL1 跨膜域       |
| VIGILVAVILLLLLLLLLLFLI                  | 77         | LIR1 跨膜域          |
| VAIALGLLTAVLLSVLLYQWI                   | 78         | KLRG1 跨膜域         |
| ILIGVSVVFLFCLLLLVLFC                    | 79         | LAIR1 跨膜域         |
| VIGILVAVVLLLLLLLLLLLLFLI                | 80         | LIR2 跨膜域          |
| VLIGVSVAFVLLLFLLLFLLL                   | 81         | LIR3 跨膜域          |
| VLIGVLVVSILLSSLLFLLL                    | 82         | LIR5 跨膜域          |
| VAVGLGSCILAILAICGL                      | 83         | SIGLEC-2 跨膜域      |
| GAF LGIGITALLFLCLALHIM                  | 84         | SIGLEC-10 跨膜域     |

[0294]

| 核酸序列   | SEQ ID NO: | 描述          |
|--|------------|-------------|
| TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAG<br>TCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAAC<br>AGTGGCCTTTATTATTTCTGGGTG | 22         | CD28 跨膜域    |
| ATCCTGATCGGCACCAGCGTGGTCATC<br>ATCCTGTTATCCTGCTGTTCTTCCTGCT<br>G                         | 85         | KIR2DL1 跨膜域 |
| GTGATCGGCATTCTGGTGGCCGTGATTC<br>TGCTGCTCCTGCTGTTGCTGCTGCTGTT<br>CCTGATC                  | 86         | LIR1 跨膜域    |
| GTGGCCATTGCTCTGGGACTGCTTACAG<br>CCGTGCTGCTGAGTGTGCTGCTGTACCA<br>GTGGATC                  | 87         | KLRG1 跨膜域   |
| ATCCTGATCGGAGTGTCCGTGGTGTTC<br>TGTTCTGCCTGCTCCTGCTGGTGCTGTT<br>CTGTCTG                   | 88         | LAIR1 跨膜域   |

|        |   |    |                   |
|--------|---|----|-------------------|
| [0295] | GTGATCGGAATTCTGGTGGCCGTGGTG<br>CTGCTCCTGCTGCTTCTCCTTCTGCTGTT<br>CCTGATC   | 89 | LIR2 跨膜域          |
|        | GTGCTGATCGGAGTGTCTGTGGCTTTCG<br>TGCTGCTCCTGTTCCCTCCTGCTGTTCCCT<br>GCTCCTG | 90 | LIR3 跨膜域          |
|        | GTGCTGATTGGCGTGCTGGTGGTGTCTA<br>TCCTGCTCCTGTCACTGCTGCTGTTTCT<br>GCTGCTC   | 91 | LIR5 跨膜域          |
|        | GTGGCCGTTGGCCTGGGATCTTGTCTGG<br>CCATTCTGATCCTGGCCATCTGCGGCCT<br>G         | 92 | SIGLEC-2 跨膜<br>域  |
|        | GGCGCCTTTCTCGGCATCGGAATTACA<br>GCCCTGCTGTTCCCTGTGCCTGGCTCTGA<br>TCATCATG  | 93 | SIGLEC-10 跨<br>膜域 |

[0296] 在一些实施方案中,跨膜域物理连接至细胞外蛋白结合域。在一些实施方案中,细胞内信号传导域物理连接至跨膜域。在一些实施方案中,跨膜域物理连接至细胞外蛋白结合域,且细胞内信号传导域物理连接至跨膜域。

[0297] 在一些实施方案中,所述一个或多个细胞内信号传导域为两个细胞内信号传导域。

[0298] 在一些实施方案中,嵌合抑制性受体包含衍生自KIR2DL1的第一细胞内信号传导域和衍生自LIR2的第二细胞内信号传导域。在一些实施方案中,嵌合抑制性受体包含衍生自KIR2DL1的第一细胞内信号传导域和衍生自LIR3的第二细胞内信号传导域。在一些实施方案中,嵌合抑制性受体包含衍生自KIR2DL1的第一细胞内信号传导域和衍生自LIR5的第二细胞内信号传导域。在一些实施方案中,第一细胞内信号传导域进一步包含衍生自KIR2DL1的跨膜域。

[0299] 在一些实施方案中,嵌合抑制性受体包含衍生自LIR2的第一细胞内信号传导域和衍生自KIR2DL1的第二细胞内信号传导域。在一些实施方案中,第一细胞内信号传导域进一步包含衍生自LIR2的跨膜域。

[0300] 在一些实施方案中,嵌合抑制性受体包含衍生自LIR3的第一细胞内信号传导域和衍生自KIR2DL1的第二细胞内信号传导域。在一些实施方案中,第一细胞内信号传导域进一步包含衍生自LIR3的跨膜域。

[0301] 在一些实施方案中,嵌合抑制性受体包含衍生自LIR5的第一细胞内信号传导域和衍生自KIR2DL1的第二细胞内信号传导域。在一些实施方案中,第一细胞内信号传导域进一步包含衍生自LIR5的跨膜域。

[0302] 细胞外蛋白结合域

[0303] 本文所述的抑制性嵌合受体进一步包含细胞外蛋白结合域。

[0304] 在一些实施方案中,表达抑制性嵌合受体的免疫细胞经遗传修饰以识别多种靶标或抗原,其允许识别肿瘤细胞上的独特靶标或蛋白表达模式。

[0305] 在一些实施方案中,蛋白不在靶肿瘤上表达。在一些实施方案中,与导致靶向肿瘤的嵌合抗原受体的活化的表达水平相比,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。

[0306] 在一些实施方案中,蛋白在非肿瘤细胞上表达。

[0307] 在一些实施方案中,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、胰脏、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,细胞外蛋白结合域包含配体结合域。在一些实施方案中,配体结合域可为来自受体的域,其中受体选自以下组成的组:T细胞受体(TCR)、B细胞受体(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超家族受体。在一些实施方案中,细胞外蛋白结合域包含受体结合域。在一些实施方案中,细胞外蛋白结合域包含抗原结合域。

[0309] 在一些实施方案中,本公开的抑制性嵌合受体的细胞外蛋白结合域包含抗原结合域,诸如特异于肿瘤抗原的单链Fv(scFv)。在一些实施方案中,细胞外蛋白结合域包含抗体、其抗原结合片段、F(ab)、F(ab')、单链可变片段(scFv)或单域抗体(sdAb)。

[0310] 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。在一特定此类实施方案中,在单链Fab分子中,Fab轻链的C端连接至Fab重链的N端。如本文更详细描述,scFv的轻链(VL)可变域通过多肽链自其C端连接至重链(VH)可变域的N端。替代地,scFv包含其中VH的C端通过多肽链连接至VL的N端的多肽链。

[0311] “Fab片段”(还称为抗原结合片段)含有轻链恒定域(CL)和重链第一恒定域(CH1)以及分别在轻链和重链上的可变域VL和VH。可变域包含参与抗原结合的互补决定环(CDR,还称为高变区)。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。

[0312] “F(ab')<sub>2</sub>”片段含有两个Fab'片段,其在铰链区附近通过二硫键接合。F(ab')<sub>2</sub>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生成。F(ab')<sub>2</sub>片段可例如通过用β-巯基乙醇处理来解离。

[0313] “Fv”片段包含一个重链可变域与一个轻链可变域的非共价连接的二聚体。

[0314] “单链Fv”或“sFv”或“scFv”包括抗体的VH和VL域,其中这些域存在于单一多肽链中。在一个实施方案中,Fv多肽进一步包含在VH与VL域之间的多肽接头,其使scFv能够形成抗原结合所需结构。

[0315] 术语“单域抗体”或“sdAb”是指以下分子,在所述分子中抗体的一个可变域在不存在另一可变域的情况下与抗原特异性结合。单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,其各自以引用的方式整体并入。单域抗体还称为sdAb或纳米抗体。Sdab相当稳定且易于呈抗体Fc链的融合伴侣来表达(Harmsen MM,De Haard HJ(2007).“Properties,production,and applications of camelid single-domain antibody fragments”.Appl.Microbiol Biotechnol.77(1):13-22)。

[0316] “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')<sub>2</sub>片段、Fab'片段、scFv(sFv)片段和scFv-Fc片段。

[0317] 在一些实施方案中,抗原结合域包含抗体、抗体的抗原结合片段、F(ab)片段、F(ab')片段、单链可变片段(scFv)或单域抗体(sdAb)。在一些实施方案中,抗原结合域包含单链可变片段(scFv)。在一些实施方案中,每个scFv均包含重链可变域(VH)和轻链可变域

(VL)。在一些实施方案中，VH和VL通过肽接头分开。

[0318] 在一些实施方案中，细胞外蛋白结合域包含配体结合域。配体结合域可为来自受体的域，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。在一些实施方案中，细胞外蛋白结合域与包含CD20或CD19的靶蛋白结合。

[0319] 结合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，可选择细胞外蛋白结合域以识别充当与非疾病状态（诸如“自身”或正常组织）相关的靶细胞上的细胞表面标志物的配体，或者可选择细胞外蛋白结合域以识别充当与特定疾病状态（诸如癌症或自体免疫疾病）相关的靶标上的细胞表面标志物的配体。一般而言，抑制性嵌合受体结合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细胞外蛋白结合域的配体的细胞表面标志物的实例包括与正常组织有关的那些，且可充当肿瘤靶向嵌合受体中的蛋白结合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有关的那些。在一些实施方案中，借助于工程改造与非肿瘤细胞上工程改造的核酸所编码的蛋白特异性结合的所需蛋白结合域，将抑制性嵌合受体工程改造以靶向感兴趣的非肿瘤蛋白。

[0320] 与靶标或抗原表位特异性结合的细胞外蛋白结合域（例如，scFv）为本领域中理解的术语，且确定此类特异性结合的方法也为本领域中已知的。若分子与特定靶蛋白的反应或缔合与其与替代靶标的反应或缔合相比更频繁、更快速、持续时间更长且/或亲和力更大，则称所述分子展现特异性结合。与第一靶蛋白特异性结合的细胞外蛋白结合域（例如，scFv）可或可不与第二靶蛋白特异性结合。因此，特异性结合不一定需要（但是其可以包括）排他性结合。在一些实施方案中，细胞外蛋白结合域为抗原结合域。

[0321] 在一些实施方案中，细胞外蛋白结合域具有高结合亲和力。

[0322] 在一些实施方案中，细胞外蛋白结合域具有低结合亲和力。

[0323] 接头

[0324] 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域的一种肽，诸如scFv或sdAb的肽。可以使用本领域中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的重链可变域（VH）和轻链可变域（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为重链可变域，L为肽接头，且VL为轻链可变域。在一些实施方案中，肽接头包含选自由以下组成的组的氨基酸序列：GGG（SEQ ID NO:23）、GGSGGS（SEQ ID NO:24）、GGSGGSGGS（SEQ ID NO:25）、GGSGGSGGSGGS（SEQ ID NO:26）、GGSGGSGGSGGSGGS（SEQ ID NO:27）、GGGS（SEQ ID NO:28）、GGGSGGGS（SEQ ID NO:29）、GGGSGGSGGGS（SEQ ID NO:30）、GGGSGGSGGSGGGS（SEQ ID NO:31）、GGGSGGSGGSGGSGGGS（SEQ ID NO:32）、GGGGS（SEQ ID NO:33）、GGGSGGGS（SEQ ID NO:34）、GGGSGGSGGSGGGS（SEQ ID NO:35）、GGGSGGSGGSGGSGGGS（SEQ ID NO:36）、GGGSGGSGGSGGSGGSGGGS（SEQ ID NO:37）和TTTTAPRPPPTPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDQTTPGERSLPAFYPGTSGSCSGGSLSLP（SEQ ID NO:94）。

[0325] 示例性接头氨基酸序列示于表5。示例性接头核酸序列示于表6。

表 5-示例性接头氨基酸序列

| 氨基酸序列  | SEQ ID NO: | 描述                                      |
|--|------------|---|
| GGS  | 23         | (G <sub>2</sub> S) <sub>1</sub> scFv 接头 |
| GGSGGS   | 24         | (G <sub>2</sub> S) <sub>2</sub> scFv 接头 |
| GGSGGSGGS  | 25         | (G <sub>2</sub> S) <sub>3</sub> scFv 接头 |
| GGSGGSGGSGGS   | 26         | (G <sub>2</sub> S) <sub>4</sub> scFv 接头 |
| GGSGGSGGSGGSGGS  | 27         | (G <sub>2</sub> S) <sub>5</sub> scFv 接头 |
| GGGS   | 28         | (G <sub>3</sub> S) <sub>1</sub> scFv 接头 |
| GGGSGGGS   | 29         | (G <sub>3</sub> S) <sub>2</sub> scFv 接头 |
| GGGSGGGS GGGS  | 30         | (G <sub>3</sub> S) <sub>3</sub> scFv 接头 |
| GGGSGGGS GGGSGGGS  | 31         | (G <sub>3</sub> S) <sub>4</sub> scFv 接头 |
| GGGSGGGS GGGSGGGS GGGS   | 32         | (G <sub>3</sub> S) <sub>5</sub> scFv 接头 |
| GGGGS  | 33         | (G <sub>4</sub> S) <sub>1</sub> scFv 接头 |
| GGGGS GGGS   | 34         | (G <sub>4</sub> S) <sub>2</sub> scFv 接头 |
| GGGGS GGGSGGGS   | 35         | (G <sub>4</sub> S) <sub>3</sub> scFv 接头 |
| GGGGS GGGSGGGS GGGS  | 36         | (G <sub>4</sub> S) <sub>4</sub> scFv 接头 |
| GGGGS GGGSGGGS GGGSGGGS GGGS   | 37         | (G <sub>4</sub> S) <sub>5</sub> scFv 接头 |
| TTTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPEACRPAA<br>GGAVHTRGLDFACDQTTPGERSSLP AFYP<br>GTSGSCSGCGSLSLP | 94         | 接头                                      |

[0326]

表 6-示例性接头核酸序列

| 核酸序列  | SEQ ID NO: | 描述                                      |
|---|------------|---|
| GGAGGCGGAGGATCTGGTGGCGGAGGA<br>AGTGGCGGAGGCGGTTCT | 38         | (G <sub>4</sub> S) <sub>3</sub> scFv 接头 |

[0327]

[0328] 间隔或铰链域

[0329] 嵌合受体还可在多肽中含有间隔或铰链域。在一些实施方案中,间隔域或铰链域位于抑制性嵌合受体或肿瘤靶向嵌合受体的细胞外域(例如,包含蛋白结合域)与跨膜域之间,或位于抑制性嵌合受体或肿瘤靶向嵌合受体的细胞内信号传导域与跨膜域之间。间隔或铰链域为起到在多肽链中将跨膜域连接至细胞外域和/或细胞内信号传导域的作用的任何寡肽或多肽。间隔或铰链域为抑制性嵌合受体或肿瘤靶向嵌合受体或其域提供弹性,或防止抑制性嵌合受体或肿瘤靶向嵌合受体或其域的立体阻碍。在一些实施方案中,间隔域或铰链域可包含至多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,所述一个或多个间隔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中。

[0330] 示例性间隔或铰链域氨基酸序列示于表7。示例性间隔或铰链域核酸序列示于表8。

表 7-示例性间隔或铰链域氨基酸序列

| 氨基酸序列   | SEQ ID NO: | 描述                          |
|---|------------|-----------------------------|
| AAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHV<br>K GKHLCP SPLFPGPSKP  | 39         | CD28 铰链                     |
| ESKYGPPCPSCP  | 40         | IgG4 最小铰链                   |
| ESKYGPPAPSAP  | 41         | IgG4 最小铰链, 无二硫              |
| ESKYGPPCPPCP  | 42         | IgG4 S228P 最小铰链,<br>二硫形成增强  |
| EPKSCDKTHTCP  | 43         | IgG1 最小铰链                   |
| AAAFVVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAP<br>T IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR<br>GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSL<br>VITLYCNHRN  | 44         | 延伸的 CD8a 铰链                 |
| TTTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPEA<br>CRPAAGGAVHTRGLDFACD   | 45         | CD8a 铰链                     |
| ACPTGLYTHSGECCACNLGEGVA<br>QPCGANQTVCEPCLDSVTFSDVVS<br>ATEPCKPCTECVGLQSMSAPCVEA<br>DDAVCRCAYGYYQDETTGRCEAC<br>RVCEAGSGLVFSCQDKQNTVCEEC<br>PDGTYSDEADAEC | 46         | LNGFR 铰链                    |
| ACPTGLYTHSGECCACNLGEGVA<br>QPCGANQTV  | 47         | 截短的 LNGFR 铰链<br>(TNFR-Cys1) |
| AVGQDTQEVIVVPHSLPFKV  | 48         | PDGFR-β 细胞外接头               |

[0331]

表 8-示例性间隔或铰链域核酸序列

| 核酸序列  | SEQ ID NO: | 描述                      |
|---|------------|-------------------------|
| GCAGCAGCTATCGAGGTGATGTATCC<br>TCCGCCCTACCTGGATAATGAAAAGA<br>GTAATGGGACTATCATTTCATGTAAAA<br>GGGAAGCATCTTTGTCCTTCTCCCCTT<br>TTCCCCGGTCCGTCTAAACCT   | 49         | CD28 铰链                 |
| GAA AGC AAG TAC GGT CCA CCT<br>TGC CCT AGC TGT CCG  | 50         | IgG4 最小铰链               |
| GAA TCC AAG TAC GGC CCC CCA<br>GCG CCT AGT GCC CCA  | 51         | IgG4 最小铰链, 无二硫          |
| GAA TCT AAA TAT GGC CCG CCA<br>TGC CCG CCT TGC CCA  | 52         | IgG4 S228P 最小铰链, 二硫形成增强 |
| GAA CCG AAG TCT TGT GAT AAA<br>ACT CAT ACG TGC CCG  | 53         | IgG1 最小铰链               |
| GCT GCT GCT TTC GTA CCC GTG TTC<br>CTC CCT GCT AAG CCT ACG ACT ACC<br>CCC GCA CCG AGA CCA CCC ACG<br>CCA GCA CCC ACG ATTGCT AGC CAG<br>CCC CTT AGT TTG CGA CCA GAA<br>GCT TGT CGG CCT GCT GCT GGT GGC<br>GCG GTA CAT ACC CGC GGC CTT<br>GAT TTT GCTTGC GAT ATA TAT ATC<br>TGG GCG CCT CTG GCC GGA ACA<br>TGC GGG GTC CTC CTC CTT TCT CTG<br>GTT ATT ACT CTC TAC TGT AAT<br>CACAGG AAT   | 54         | 延伸的 CD8a 铰链             |
| GCC TGC CCG ACC GGG CTC TAC<br>ACT CAT AGC GGG GAA TGT TGT<br>AAG GCA TGT AAC TTG GGT GAG<br>GGC GTC GCA CAG CCC TGC<br>GGAGCT AAC CAA ACA GTG TGC<br>GAA CCC TGC CTC GAT AGT GTG<br>ACG TTC TCT GAT GTT GTA TCA GCT<br>ACA GAG CCT TGC AAA CCA TGTACT<br>GAG TGC GTT GGA CTT CAG TCA<br>ATG AGC GCT CCA TGT GTG GAG<br>GCA GAT GAT GCG GTC TGT CGA<br>TGT GCT TAC GGA TAC TACCAA GAC<br>GAG ACA ACA GGG CGG TGC GAG<br>GCC TGT AGA GTT TGT GAG GCG<br>GGC TCC GGG CTG GTG TTT TCA TGT<br>CAA GAC AAG CAAAAT ACG GTC<br>TGT GAA GAG TGC CCT GAT GGC<br>ACC TAC TCA GAC GAA GCA GAT<br>GCA GAA TGC | 55         | LNGFR 铰链                |

[0332]

|        |   |    |                         |
|--------|---|----|-------------------------|
| [0333] | GCC TGC CCT ACA GGA CTC TAC<br>ACG CAT AGC GGT GAG TGT TGT<br>AAA GCA TGC AAC CTC GGG GAA<br>GGT GTA GCC CAG CCA TGC GGG<br>GCT AAC CAA ACC GTT TGC | 56 | 截短的 LNGFR 铰链(TNFR-Cys1) |
|        | GCTGTGGGCCAGGACACGCAGGAGG<br>TCATCGTGGTGCCACACTCCTTGCCC<br>TTTAAGGTG  | 57 | PDGFR-β 细胞外接头           |

[0334] 在一些实施方案中,嵌合抑制性受体进一步包含在蛋白结合域与跨膜域之间的间隔区。

[0335] 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 $\alpha$ 、CD4、CD7、CD28、IgG1、IgG4、Fc  $\gamma$  RIII $\alpha$ 、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:39)、ESKYGPPCPSCP (SEQ ID NO:40)、ESKYGPPAPSAP (SEQ ID NO:41)、ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:42)、EPKSCDKTHTCP (SEQ ID NO:43)、AAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG GAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCNHRN (SEQ ID NO:44)、TTTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO:45)、ACPTGLYTHSGECKACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTECVGLQSMSAPCVEADDAVCRCAHYGYQDETTGRCEACRVCEAGSGLVFSCQDKQNTVCEECPDGTYSDEADAEC (SEQ ID NO:46)、ACPTGLYTHSGECKACNLGEGVAQPCGANQTV (SEQ ID NO:47)和AVGQDTQEVIVVPHSLPFKV (SEQ ID NO:48)。

[0336] 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:41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:42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:43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:44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:45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:46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:47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:48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:49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。

[0337] 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活化的基础防止、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。

[0338] 在一些实施方案中,其中嵌合抑制性受体进一步包含位于跨膜域与细胞内信号传导域之间且可操作地连接至跨膜域和细胞内信号传导域中的每一者的细胞内间隔区。在一些实施方案中,嵌合抑制性受体进一步包含位于跨膜域与细胞内信号传导域之间且物理连接至跨膜域和细胞内信号传导域中的每一者的细胞内间隔区。

[0339] 在一些实施方案中,相对于缺乏细胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,细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,相对于缺乏细胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,细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,相对于缺乏细胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,细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,相对于缺乏细胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,细胞内间隔区调节嵌合抑制性受体的效力。

[0340] 在一些实施方案中,相对于缺乏细胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,细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,相对于缺乏细胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,细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,相对于缺乏细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,细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活化的基础防止、减弱或抑制。在一些实施方案中,相对于缺乏细胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,细胞内间隔区降低基础防止、减弱或抑制。在一些实施方案中,相对于缺乏细

胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,细胞内间隔区增加基础防止、减弱或抑制。

[0341] 编码抑制性嵌合受体的多核苷酸

[0342] 在另一方面中,本文还呈现了编码抑制性嵌合受体的多核苷酸或一组多核苷酸,以及包含此类多核苷酸的载体。当抑制性嵌合受体为多链受体时,使用一组多核苷酸。在这种情况下,可将一组多核苷酸克隆至单一载体或复数个载体中。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,其中编码细胞外蛋白结合域的序列与编码细胞内信号传导域和跨膜域的序列邻接并在相同的阅读框中。

[0343] 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差。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为本领域中已知的,且包括例如至少在美国专利号5,786,464和6,114,148中公开的方法。

[0344] 编码抑制性嵌合受体的多核苷酸可使用本领域中已知的重组方法(诸如像通过筛选表达多核苷酸的细胞的文库,通过将其自己知包括其的载体衍生出,或通过直接自含有其的细胞和组织分离出)来使用标准技术获得。替代地,多核苷酸可合成产生,而不是克隆产生。

[0345] 可将多核苷酸克隆至载体中。在一些实施方案中,使用本领域中已知的表达载体。据此,本公开包括表达抑制性嵌合受体的反转录病毒和慢病毒载体,其可直接转导至细胞中。

[0346] 本公开还包括可直接转导至细胞中的RNA构建体。用于生成在转染中使用的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'未翻译序列("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)、欲表达的核酸和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。

[0347] 细胞

[0348] 在一个方面中,本公开提供抑制性嵌合受体修饰的细胞。细胞可为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叶干细胞(MSC)、自然杀手(NK)细胞、NKT细胞、先天性淋巴样细胞、肥胖细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、间叶干细胞、树突状细胞、T细胞(例如,CD8+T细胞、CD4+T细胞、 $\gamma$   $\delta$ 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,细胞为干细胞,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。

[0349] 细胞可经修饰以表达本文所提供的抑制性嵌合受体。据此,本公开提供一种经工程改造以表达抑制性嵌合受体的细胞(例如,细胞群),其中抑制性嵌合受体包含蛋白结合域、跨膜域和抑制性细胞内信号传导域。

[0350] 在一些实施方案中,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、 $\gamma$   $\delta$ 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、自然杀手T(NKT)细胞、自然杀手(NK)细胞、B细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、先天性淋巴样细胞、肥胖

细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、髓样细胞、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,免疫调节细胞为CD8+T细胞。在一些实施方案中,免疫调节细胞为CD4+T细胞。在一些实施方案中,免疫调节细胞为自然杀手T(NKT)细胞。在一些实施方案中,免疫调节细胞为自然杀手(NK)细胞。

[0351] 在一些实施方案中,细胞为自体的。在一些实施方案中,细胞为同种异体的。

[0352] 在一些实施方案中,免疫调节细胞包含嵌合抑制性受体,其中所述嵌合抑制性受体包含:细胞外蛋白结合域;跨膜域,其中跨膜域可操作地连接至细胞外蛋白结合域;和细胞内信号传导域,其中细胞内信号传导域可操作地连接至跨膜域,且其中在所述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活化。

[0353] 在一些实施方案中,细胞进一步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。

[0354] 在一些实施方案中,在所述蛋白与嵌合抑制性受体结合之前,肿瘤靶向嵌合受体能够活化细胞。在一些实施方案中,在所述蛋白与嵌合抑制性受体结合之后,嵌合抑制性受体压制经活化的细胞产生细胞因子。在一些实施方案中,在所述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活化来诱导。在一些实施方案中,靶细胞为肿瘤细胞。在一些实施方案中,靶细胞为非肿瘤细胞。

[0355] 表达多种嵌合受体的细胞

[0356] 细胞可经修饰以表达本文所提供的抑制性嵌合受体。细胞还可经修饰以表达抑制性嵌合受体(例如,iCAR)和靶向肿瘤的CAR(例如,aCAR)。若细胞经修饰以表达至少一种抑制性嵌合受体和至少一种靶向肿瘤的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。

[0357] 制备抑制性嵌合受体修饰的细胞的方法

[0358] 在一个方面中,本公开提供一种制备包含抑制性嵌合受体的经修饰的免疫细胞以用于实验或治疗用途的方法。

[0359] 用于制备治疗抑制性嵌合受体修饰的细胞的离体程序为本领域中熟知的。例如,将细胞自哺乳动物(例如,人)分离且用表达本文所公开的抑制性嵌合受体的载体进行遗传修饰(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。哺乳动物接受者可为人,且抑制性嵌合受体修饰的细胞可关于接受者为自体的。替代地,细胞可关于接受者为同种异体、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)中且可应用于本公开的细胞。其他合适方法为本领域中已知的,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,离体培养和扩增免疫效应细胞(例如,T细胞、NK细胞)包括:(1)自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中所述的细胞生长因子之外,其他因子诸如flt3-L、IL-1、IL-3和c-kit配体还可用于培养和扩增细胞。

[0360] 在一些实施方案中,方法包括将细胞群(例如,在细胞培养基中)培养至所需细胞密度(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,在不存在抑制可抑制蛋白酶活性的剂的情况下或在存在抑制可抑制蛋白酶活性的剂的情况下培养细胞群。

[0361] 在一些实施方案中,将细胞群培养一段时间,使得产生包含至少2倍起始群体细胞数的扩增细胞群。在一些实施方案中,将细胞群培养一段时间,使得产生包含至少4倍起始群体细胞数的扩增细胞群。在一些实施方案中,将细胞群培养一段时间,使得产生包含至少16倍起始群体细胞数的扩增细胞群。

[0362] 使用方法

[0363] 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经遗传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生性病症,诸如癌症。

[0364] 在一个方面中,本公开提供一种制备包含至少一种抑制性嵌合受体的经修饰的免疫细胞(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,经修饰的免疫细胞进一步包含至少一种肿瘤靶向嵌合受体(例如,iCAR和aCAR修饰的细胞)。

[0365] 在一些方面中,使用方法涵盖防止、减弱或抑制通过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免疫反应的方法,其包含:对免疫调节细胞进行工程改造,以在免疫调节细胞的表面上表达本文所述的嵌合抑制性受体,其中在同源蛋白与嵌合抑制性受体结合之后,细胞内信号传导域防止、减弱或抑制嵌合受体的活化。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活化的方法,其包含:在适合于嵌合抑制性受体结合同源蛋白的条件下,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接触,其中在所述蛋白与嵌合抑制性受体结合之后,细胞内信号传导域防止、减弱或抑制嵌合受体的活化。

[0366] 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,活化CAR)引发的免疫反应。例如,免疫调节细胞表达识别抗原靶标1(例如,非肿瘤抗原)的抑制性嵌合抗原和识别抗原靶标2(例如,肿瘤靶标)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抗原结合。在靶细胞为表达抗原靶标1和抗原靶标2的非肿瘤细胞的示例性情况下,抑制性嵌合受体和靶向肿瘤的受体两者均可被活化。在此类情况下,抑制性嵌合受体的活化导致防止、减弱或抑制肿瘤靶向嵌合受体信号传导,且免疫调节细胞未被活化。类似地,在靶细胞为仅表达抗原靶标1的非肿瘤细胞的示例性情况下,仅抑制性嵌合受体可被活化。相比之下,在靶细胞为仅表达抗原靶标2的肿瘤细胞的示例性情况下,抑制性嵌合受体不可被活化,同时肿瘤靶向嵌合受体可被活化,得到导致免疫调节细胞的活化的信号转导。

[0367] 通过肿瘤靶向嵌合受体引发的免疫反应的减弱可为肿瘤靶向嵌合受体的活化的降低或减少、肿瘤靶向嵌合受体的信号转导的降低或减少或者免疫调节细胞的活化的降低

或减少。与肿瘤靶向嵌合受体的活化、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活化相比,抑制性嵌合受体可使肿瘤靶向嵌合受体的活化、通过肿瘤靶向嵌合受体的信号转导或通过肿瘤靶向嵌合受体的免疫调节细胞的活化减弱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,减弱是指在活化之后肿瘤靶向嵌合受体的活性的降低或减少。

[0368] 通过肿瘤靶向嵌合受体引发的免疫反应的防止可为肿瘤靶向嵌合受体的活化的抑制或降低、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活化的抑制或降低。与肿瘤靶向嵌合受体的活化、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活化相比,抑制性嵌合受体可使肿瘤靶向嵌合受体的活化、通过肿瘤靶向嵌合受体的信号转导或通过肿瘤靶向嵌合受体的免疫调节细胞的活化防止约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,防止是指在活化之前阻断肿瘤靶向嵌合受体的活性。

[0369] 通过肿瘤靶向嵌合受体引发的免疫反应的抑制可为肿瘤靶向嵌合受体的活化的抑制或降低、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活化的抑制或降低。与肿瘤靶向嵌合受体的活化、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活化相比,抑制性嵌合受体可使肿瘤靶向嵌合受体的活化、通过肿瘤靶向嵌合受体的信号转导或通过肿瘤靶向嵌合受体的免疫调节细胞的活化抑制约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,抑制是指在活化之前或之后,肿瘤靶向嵌合受体的活性的降低或减少。

[0370] 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活化的抑制或降低、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活化的抑制或降低。与肿瘤靶向嵌合受体的活化、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活化相比,抑制性嵌合受体可使肿瘤靶向嵌合受体的活化、通过肿瘤靶向嵌合受体的信号转导或通过肿瘤靶向嵌合受体的免疫调节细胞的活化压制约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,压制是指在活化之前或之后,肿瘤靶向嵌合受体的活性的降低或减少。

[0371] 免疫反应可为经活化的免疫调节细胞产生和分泌细胞因子或趋化因子。免疫反应可为对靶细胞的细胞介导的免疫反应。

[0372] 在一些实施方案中,嵌合抑制性受体能够压制经活化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活化来诱导。

[0373] 在一个方面中,本公开提供一种类型的细胞疗法,在所述细胞疗法中,免疫细胞经遗传修饰以表达本文所提供的抑制性嵌合受体,且向有需要的受试者施用经修饰的免疫细胞。

[0374] 因此,在一些实施方案中,所述等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的细胞以治疗病状或病症。在一些实施方案中,受试者为人受试者。在一些实施

方案中,病状或病症为自体免疫病状。在一些实施方案中,病状或病症为免疫相关病状。在一些实施方案中,病状或病症为癌症(例如,原发性癌症或转移性癌症)。在一些实施方案中,癌症为固态癌症。在一些实施方案中,癌症为液态癌症,诸如骨髓性病状。

#### [0375] 药物组合物

[0376] 可将抑制性嵌合受体或免疫反应性细胞配制于药物组合物中。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,复数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剂、稀释剂或赋形剂。此类材料应为无毒的且应不干扰活性成分的功效。载剂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、肌内、腹膜内途径。在某些实施方案中,将组合物直接注射至感兴趣的器官(例如,受病症影响的器官)中。替代地,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感兴趣的器官。可以在施用组合物之前、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。

[0377] 在某些实施方案中,组合物为包含经遗传修饰的细胞(诸如免疫反应性细胞或其祖细胞)和药学上可接受的载剂的药物组合物。施用可为自体或异体的。例如,可自一名受试者获得免疫反应性细胞或祖细胞,且向同一受试者或不同的相容受试者施用。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)且可经由局部注射来施用,包括导管施用、全身注射、局部注射、静脉内注射或肠胃外施用。当施用本公开的治疗组合物(例如,含有本公开的经遗传修饰的细胞的药物组合物)时,其一般将以单位剂量可注射形式(溶液、混悬液、乳液)进行配制。

[0378] 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经遗传修饰的细胞(例如,本公开的免疫反应性细胞)的组合物的制剂。在一些实施方案中,包含经遗传修饰的细胞的本公开的组合物可提供为无菌液体制剂,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,其可经缓冲至选定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。此外,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,粘性组合物可经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剂,其可为含有例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、多元醇(例如,甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)及其合适混合物的溶剂或分散介质。

[0379] 用于经口施用的药物组合物可为锭剂、胶囊、散剂或液体形式。锭剂可包括固体载剂诸如明胶或佐剂。液体药物组合物一般包括液体载剂,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。

[0380] 对于静脉内、皮肤或皮下注射或者在患处注射,活性成分将为肠胃外可接受的水溶液的形式,其无热原且具有合适pH、等渗性和稳定性。本领域相关技术人员能够很好地使用例如等渗媒介物诸如氯化钠注射液、林格氏注射液、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,本公开的组合物可为等渗的,即,渗透压与血液和泪液相同。在一些实施方案中,所需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达成。

[0381] 在一些实施方案中,本公开的组合物可进一步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,可通过包括各种抗细菌和抗真菌剂(包括但不限于对羟苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、山梨酸等)中任一者来防止微生物污染。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,可通过将本公开的经遗传修饰的细胞并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载剂、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,组合物还可经冻干。根据施用途径和所需制剂,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。

[0382] 在一些实施方案中,本公开的制剂的组分经选择为化学惰性的且不影响本公开的经遗传修饰的细胞的活力或功效。

[0383] 关于本公开的经遗传修饰的细胞的治疗用途的一个考量为达成最佳功效所需的细胞的量。在一些实施方案中,欲施用的细胞的量将因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经遗传修饰的细胞的量的范围可为 $1 \times 10^4$ 个细胞至 $1 \times 10^{10}$ 个细胞。在一些实施方案中,视为有效剂量的细胞的精确量可基于因各受试者而异的因素,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。

[0384] 无论是向个体给予的多肽、抗体、核酸、小分子还是向个体给予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),这足以展示对个体有益。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程度。治疗处方,例如剂量决定等,为全科医生和其他医学医师责任,且通常考虑到欲治疗的病症、个别患者的状况、递送部位、施用方法和从业人员已知的其他因素。上文提及的技术和方案的实例可见于Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,0sol,A.(编),1980。

[0385] 组合物可单独施用或与其他治疗剂组合根据欲治疗的病状同时或依序施用。

[0386] 药盒

[0387] 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,免疫相关或自体免疫病症)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,此类容器可为盒子、安瓿、瓶子、小瓶、管、袋、囊、泡鼓包装或本领域中已知的其他合适容器。容器可由塑料、玻璃、层压纸、金属箔或适合于盛装药剂的其他材料制成。

[0388] 在一些实施方案中,提供了治疗或预防组合物,以及用于向患有癌症或免疫相关病症或处于发展其的风险中的受试者施用治疗或预防组合物的说明书。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、剂量安排、用于治疗或预防病症或其症状的施用安排、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 and/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、或者作为施加至容器的标签、或者作为在容器中或与其一起供应的单独纸册、小册子、卡片或折页来印刷。

[0389] 额外实施方案

[0390] 下文提供描述本发明的特定实施方案的所列举的实施方案：

[0391] 实施方案1：一种嵌合抑制性受体，其包含：

[0392] -细胞外蛋白结合域；

[0393] -跨膜域，其中所述跨膜域可操作地连接至所述细胞外蛋白结合域；和

[0394] -一个或多个细胞内信号传导域，其中所述一个或多个细胞内信号传导域可操作地连接至所述跨膜域，且

[0395] 其中所述一个或多个细胞内信号传导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活化。

[0396] 实施方案2：如实施方案1所述的嵌合抑制性受体，其中所述一个或多个细胞内信号传导域各自衍生自选自自由以下组成的组的蛋白：SLAP1、SLAP2、Dok-1、Dok-2、LAIR1、GRB-2、CD200R、SIRP $\alpha$ 、HAVR、GITR、PD-L1、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR3DL2、CD94、KLRG-1、CEACAM1、LIR2、LIR3、LIR5、SIGLEC-2和SIGLEC-10。

[0397] 实施方案3：如实施方案1或2中任一项所述的嵌合抑制性受体，其中所述跨膜域衍生自与所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个相同的蛋白。

[0398] 实施方案4：如实施方案3所述的嵌合抑制性受体，其中所述跨膜域进一步包含相同蛋白的细胞外域的至少一部分。

[0399] 实施方案5：如实施方案1或2中任一项所述的嵌合抑制性受体，其中所述跨膜域衍生自第一蛋白，且所述一个或多个细胞内信号传导域衍生自与所述第一蛋白不同的蛋白。

[0400] 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，其中所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自SLAP1。

[0401] 实施方案7：如实施方案6所述的嵌合抑制性受体，其中所述细胞内信号传导域包含与PAPAERPLPNPEGLDSDFLAVLSDYSPDISPPIFRRGEKLRVISDEGGWWKAISLSTGRESYIPGICVARVYHGWLFEGGLGRDKAEELLQLPDTKVGFSFMIRESETKKGFYSLSVRHRQVKHYRIFRLPNNWYYISPRLTFQCLEDLVNHYSEVADGLCCVLTTPCLTQSTAAPAVRASSSPVTLRQKTVDWRRVSRLQEDPEGTENPLGVDESLSYGLRESIASYLSLTSEDNTSFDRKKKSISLMYGGSKRKSSFFSSPPYFED (SEQ ID NO:4) 或PAPAERPLPNPEGLDSDFLAVLSDYSPDISPPIFRRGEKLRVISDEGGWWKAISLSTGRESYIPGICVARVYHGWLFEGGLGRDKAEELLQLPDTKVGFSFMIRESETKKGFYSLSVRHRQVKHYRIFRLPNNWYYISPRLTFQCLEDLVNHYSEVADGLCCVLTTPCLTQSTAAPAVRASSSPVTLRQKTVDWRRVSRLQEDPEGTENPLGVDESLSYGLRESIASYLSLTSEDNTSF (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%同一性的氨基酸序列。

[0402] 实施方案8：如实施方案6所述的嵌合抑制性受体，其中所述细胞内信号传导域包含氨基酸序列PAPAERPLPNPEGLDSDFLAVLSDYSPDISPPIFRRGEKLRVISDEGGWWKAISLSTGRESYIPGICVARVYHGWLFEGGLGRDKAEELLQLPDTKVGFSFMIRESETKKGFYSLSVRHRQVKHYRIFRLPNNWYYISPRLTFQCLEDLVNHYSEVADGLCCVLTTPCLTQSTAAPAVRASSSPVTLRQKTVDWRRVSRLQEDPEGTENPLGVDESLSYGLRESIASYLSLTSEDNTSFDRKKKSISLMYGGSKRKSSFFSSPPYFED (SEQ ID NO:4) 或PAPAERPLPNPEGLDSDFLAVLSDYSPDISPPIFRRGEKLRVISDEGGWWKAISLSTGRESYIPGICVARVYHGWLFEGGLGRDKAEELLQLPDTKVGFSFMIRESETKKGFYSLSVRHRQVKHYRIFRLPNNWYYISPRLTFQCLEDLVNHYSEVADGLCCVLTTPCLTQSTAAPAVRASSSPVTLRQKTVDWRRVSRLQEDPEGTENPLGVDESLSYGLRESIASYLSLTSEDNT

SF (SEQ ID NO:5)。

[0403] 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,其中所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自SLAP2。

[0404] 实施方案10:如实施方案9所述的嵌合抑制性受体,其中所述细胞内信号传导域包含与RKSLPSPSLSSSVQGGPVTMEAERSKATAVALGSFPAGGPAELSLRLGEPLTIVSEGDWWTVLSEVSGREYNIPSVHVAKVSHGWLYEGLSREKAEELLLPGNPGGAFLIRESQTRRGYSLSVRLSRPASWDRIRHYRIHCLDNWLYISPRLTFPSLQALVDHYSELADDICLLKEPCVLQRAGPLPGKDIPLPVTVQRTPLNWKELDSSLLFSEAATGEESLLSEGLRESLSFYISLNDEAVSLDDA (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%同一性的氨基酸序列。

[0405] 实施方案11:如实施方案9所述的嵌合抑制性受体,其中所述细胞内信号传导域包含氨基酸序列RKSLPSPSLSSSVQGGPVTMEAERSKATAVALGSFPAGGPAELSLRLGEPLTIVSEGDWWTVLSEVSGREYNIPSVHVAKVSHGWLYEGLSREKAEELLLPGNPGGAFLIRESQTRRGYSLSVRLSRPASWDRIRHYRIHCLDNWLYISPRLTFPSLQALVDHYSELADDICLLKEPCVLQRAGPLPGKDIPLPVTVQRTPLNWKELDSSLLFSEAATGEESLLSEGLRESLSFYISLNDEAVSLDDA (SEQ ID NO:6)。

[0406] 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,其中所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自KIR2DL1。

[0407] 实施方案13:如实施方案12所述的嵌合抑制性受体,其中所述细胞内信号传导域包含与HRWCSNKKNAAVMDQESAGNRTANSEDSDEQDPQEVYTYTLNHCVFTRKQITRPSQRPKTPPTDIIVYTELPNAESRSKVVSCP (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。

[0408] 实施方案14:如实施方案12所述的嵌合抑制性受体,其中所述细胞内信号传导域包含氨基酸序列HRWCSNKKNAAVMDQESAGNRTANSEDSDEQDPQEVYTYTLNHCVFTRKQITRPSQRPKTPPTDIIVYTELPNAESRSKVVSCP (SEQ ID NO:60)。

[0409] 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,其中所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自KLRG-1。

[0410] 实施方案16:如实施方案15所述的嵌合抑制性受体,其中所述细胞内信号传导域包含与MTDSVIYSMLLELPTATQAQNDYGPQQKSSSRPSCSCLGSG (SEQ ID NO:61) 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。

[0411] 实施方案17:如实施方案15所述的嵌合抑制性受体,其中所述细胞内信号传导域包含氨基酸序列MTDSVIYSMLLELPTATQAQNDYGPQQKSSSRPSCSCLGSG (SEQ ID NO:61)。

[0412] 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,其中所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自LAIR1。

[0413] 实施方案19:如实施方案18所述的嵌合抑制性受体,其中所述细胞内信号传导域包含与HRQNQIKQGPPRSKDEEQKQRPDLAVDVLERTADKATVNGLPKDRDTDSALAAGSSQEVTYAQLDHWALTQRTARAVSPQSTKPMAESITYAAVARH (SEQ ID NO:62) 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。

[0414] 实施方案20:如实施方案18所述的嵌合抑制性受体,其中所述细胞内信号传导域包含氨基酸序列HRQNQIKQGPPRSKDEEQKPQRPDLAVDVLERTADKATVNGLPKDRDTSALAAAGSSQEVTYAQLDHWALTQRTARAVSPQSTKPMASITYAAVARH (SEQ ID NO:62)。

[0415] 实施方案21:如实施方案1-5中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自LIR2。

[0416] 实施方案22:如实施方案21所述的嵌合抑制性受体,其中所述细胞内信号传导域包含与LRHRRQGKHWSTQKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPAADAQEENLYAAVKDTPEDGVEMDTRAAASEAPQDVTYAQLHSLTLRRKATEPPPSQEREPPAEPSEIYATLAIH (SEQ ID NO:63) 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。

[0417] 实施方案23:如实施方案21所述的嵌合抑制性受体,其中所述细胞内信号传导域包含氨基酸序列LRHRRQGKHWSTQKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPAADAQEENLYAAVKDTPEDGVEMDTRAAASEAPQDVTYAQLHSLTLRRKATEPPPSQEREPPAEPSEIYATLAIH (SEQ ID NO:63)。

[0418] 实施方案24:如实施方案1-5中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自LIR3。

[0419] 实施方案25:如实施方案24所述的嵌合抑制性受体,其中所述细胞内信号传导域包含与RRQRHSHKRTSDQRKTDQRPAGAAETEPKDRGLLRSSPAADVQEENLYAAVKDQSEDRVELDSQSPHDEDPAVITYAPVKHSSPRREMASPPSSLSGFLDTKDRQVEEDRQMDTEAAASEASQDVTYAQLHSLTLRRKATEPPPSQEGEPPAEPSEIYATLAIH (SEQ ID NO:64) 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。

[0420] 实施方案26:如实施方案24所述的嵌合抑制性受体,其中所述细胞内信号传导域包含氨基酸序列RRQRHSHKRTSDQRKTDQRPAGAAETEPKDRGLLRSSPAADVQEENLYAAVKDQSEDRVELDSQSPHDEDPAVITYAPVKHSSPRREMASPPSSLSGFLDTKDRQVEEDRQMDTEAAASEASQDVTYAQLHSLTLRRKATEPPPSQEGEPPAEPSEIYATLAIH (SEQ ID NO:64)。

[0421] 实施方案27:如实施方案1-5中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自LIR5。

[0422] 实施方案28:如实施方案27所述的嵌合抑制性受体,其中所述细胞内信号传导域包含与QHWRQGKHRTLAQRQADFQRPPGAAEPEPKDGGLQRRSSPAADVQGENFCAAVKNTQPEDGVEMDTRQSPHDEDPAVITYAKVKHSRPRREMASPPSPLSGEFLDTKDRQAEEDRQMDTEAAASEAPQDVTYAQLHSFTLRQKATEPPPSQEGASPAEPSEIYATLAIH (SEQ ID NO:65) 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。

[0423] 实施方案29:如实施方案27所述的嵌合抑制性受体,其中所述细胞内信号传导域包含氨基酸序列QHWRQGKHRTLAQRQADFQRPPGAAEPEPKDGGLQRRSSPAADVQGENFCAAVKNTQPEDGVEMDTRQSPHDEDPAVITYAKVKHSRPRREMASPPSPLSGEFLDTKDRQAEEDRQMDTEAAASEAPQDVTYAQLHSFTLRQKATEPPPSQEGASPAEPSEIYATLAIH (SEQ ID NO:65)。

[0424] 实施方案30:如实施方案1-5中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述一个或多个

个细胞内信号传导域中的一个衍生自SIGLEC-2。

[0425] 实施方案31:如实施方案30所述的嵌合抑制性受体,其中所述细胞内信号传导域包含与KLQRRWKRTQSQQGLQENSSGQSFFVRNKKVRRAPLSEGPLSLGCYNPMMEDGISYTTLRFPEMNIPRTGDAESSEMQRPPPCDDTVTYSALHKRQVGDYENVIPDFPEDEGIHYSELIQFGVGERPQAQENVYVILKH (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。

[0426] 实施方案32:如实施方案30所述的嵌合抑制性受体,其中所述细胞内信号传导域包含氨基酸序列KLQRRWKRTQSQQGLQENSSGQSFFVRNKKVRRAPLSEGPLSLGCYNPMMEDGISYTTLRFPEMNIPRTGDAESSEMQRPPPCDDTVTYSALHKRQVGDYENVIPDFPEDEGIHYSELIQFGVGERPQAQENVYVILKH (SEQ ID NO:66)。

[0427] 实施方案33:如实施方案1-5中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个衍生自SIGLEC-10。

[0428] 实施方案34:如实施方案33所述的嵌合抑制性受体,其中所述细胞内信号传导域包含与KILPKRRTQTETPRPRFSRHSTILDYINVVPTAGPLAQKRNQKATPNSPRTPLPPGAPSPESKKNQKKQYQLPSFPEPKSSTQAPESQESQEELHYATLNFPGVVRPPEARMPKGTQADYAEVKFQ (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。

[0429] 实施方案35:如实施方案33所述的嵌合抑制性受体,其中所述细胞内信号传导域包含氨基酸序列KILPKRRTQTETPRPRFSRHSTILDYINVVPTAGPLAQKRNQKATPNSPRTPLPPGAPSPESKKNQKKQYQLPSFPEPKSSTQAPESQESQEELHYATLNFPGVVRPPEARMPKGTQADYAEVKFQ (SEQ ID NO:67)。

[0430] 实施方案36:如实施方案1-35中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜域衍生自选自以下组成的组的蛋白:CD8、CD28、CD3 $\delta$ 、CD4、4-1BB、OX40、ICOS、2B4、CD25、CD7、LAX、LAT、LAIR1、GRB-2、Dok-1、Dok-2、SLAP1、SLAP2、CD200R、SIRP $\alpha$ 、HAVR、GITR、PD-L1、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR3DL2、CD94、KLRG-1、CEACAM1、LIR2、LIR3、LIR5、SIGLEC-2和SIGLEC-10。

[0431] 实施方案37:如实施方案1-36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的跨膜域。

[0432] 实施方案38:如实施方案37所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜域包含与FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO:20) 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。

[0433] 实施方案39:如实施方案37所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜域包含氨基酸序列FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO:20)。

[0434] 实施方案40:如实施方案1-36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KIR2DL1的跨膜域。

[0435] 实施方案41:如实施方案40所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜域包含与

ILIGTSVVIILFILLFFLL (SEQ ID NO:76) 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。

[0436] 实施方案42:如实施方案40所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜域包含氨基酸序列ILIGTSVVIILFILLFFLL (SEQ ID NO:76)。

[0437] 实施方案43:如实施方案1-36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KLRG-1的跨膜域。

[0438] 实施方案44:如实施方案43所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜域包含与VAIALGLLTAVLLSVLLYQWI (SEQ ID NO:78) 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。

[0439] 实施方案45:如实施方案43所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜域包含氨基酸序列VAIALGLLTAVLLSVLLYQWI (SEQ ID NO:78)。

[0440] 实施方案46:如实施方案1-36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LAIR1的跨膜域。

[0441] 实施方案47:如实施方案46所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜域包含与ILIGSVVFLFCLLLLVLFL (SEQ ID NO:79) 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。

[0442] 实施方案48:如实施方案46所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜域包含氨基酸序列ILIGSVVFLFCLLLLVLFL (SEQ ID NO:79)。

[0443] 实施方案49:如实施方案1-36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LIR2的跨膜域。

[0444] 实施方案50:如实施方案49所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜域包含与VIGILVAVLLLLLLLLLFLI (SEQ ID NO:80) 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。

[0445] 实施方案51:如实施方案49所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜域包含氨基酸序列VIGILVAVLLLLLLLLLFLI (SEQ ID NO:80)。

[0446] 实施方案52:如实施方案1-36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LIR3的跨膜域。

[0447] 实施方案53:如实施方案52所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜域包含与VLIGVSAFVLLLLFLLL (SEQ ID NO:81) 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。

[0448] 实施方案54:如实施方案52所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜域包含氨基酸序列VLIGVSAFVLLLLFLLL (SEQ ID NO:81)。

[0449] 实施方案55:如实施方案1-36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LIR5的跨膜域。

[0450] 实施方案56:如实施方案55所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜域包含与VLIGVLVVSILLLSLLLFLLL (SEQ ID NO:82) 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。

[0451] 实施方案57:如实施方案55所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜域包含氨基酸序列VLIGVLVVSILLLSLLLFLLL (SEQ ID NO:82)。

[0452] 实施方案58:如实施方案1-36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SIGLEC-2的跨膜域。

[0453] 实施方案59:如实施方案58所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜域包含与VAVGLGSCLAILILAICGL (SEQ ID NO:83) 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。

[0454] 实施方案60:如实施方案58所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜域包含氨基酸序列VAVGLGSCLAILILAICGL (SEQ ID NO:83)。

[0455] 实施方案61:如实施方案1-36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SIGLEC-10的跨膜域。

[0456] 实施方案62:如实施方案61所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜域包含与GAFLGIGITALLFLCLALIIM (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%同一性的氨基酸序列。

[0457] 实施方案63:如实施方案61所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜域包含氨基酸序列GAFLGIGITALLFLCLALIIM (SEQ ID NO:84)。

[0458] 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,其中所述一个或多个细胞内信号传导域为两个细胞内信号传导域。

[0459] 实施方案65:如实施方案64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KIR2DL1的第一细胞内信号传导域和衍生自LIR2的第二细胞内信号传导域。

[0460] 实施方案66:如实施方案64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KIR2DL1的第一细胞内信号传导域和衍生自LIR3的第二细胞内信号传导域。

[0461] 实施方案67:如实施方案64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KIR2DL1的第一细胞内信号传导域和衍生自LIR5的第二细胞内信号传导域。

[0462] 实施方案68:如实施方案65-67中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述第一细胞内信号传导域进一步包含衍生自KIR2DL1的跨膜域。

[0463] 实施方案69:如实施方案64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LIR2的第一细胞内信号传导域和衍生自KIR2DL1的第二细胞内信号传导域。

[0464] 实施方案70:如实施方案69所述的嵌合抑制性受体,其中所述第一细胞内信号传导域进一步包含衍生自LIR2的跨膜域。

[0465] 实施方案71:如实施方案64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LIR3的第一细胞内信号传导域和衍生自KIR2DL1的第二细胞内信号传导域。

[0466] 实施方案72:如实施方案71所述的嵌合抑制性受体,其中所述第一细胞内信号传

导域进一步包含衍生自LIR3的跨膜域。

[0467] 实施方案73:如实施方案64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LIR5的第一细胞内信号传导域和衍生自KIR2DL1的第二细胞内信号传导域。

[0468] 实施方案74:如实施方案73所述的嵌合抑制性受体,其中所述第一细胞内信号传导域进一步包含衍生自LIR5的跨膜域。

[0469] 实施方案75:如实施方案1-74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。

[0470] 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,其中所述蛋白在非肿瘤细胞上表达。

[0471] 实施方案77:如实施方案76所述的嵌合抑制性受体,其中所述蛋白在衍生自选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、胰脏、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。

[0472] 实施方案78:如实施方案1-77中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述细胞外蛋白结合域包含配体结合域。

[0473] 实施方案79:如实施方案1-77中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述细胞外蛋白结合域包含受体结合域。

[0474] 实施方案80:如实施方案1-77中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述细胞外蛋白结合域包含抗原结合域。

[0475] 实施方案81:如实施方案80所述的嵌合抑制性受体,其中所述抗原结合域包含抗体、抗体的抗原结合片段、F(ab)片段、F(ab')片段、单链可变片段(scFv)或单域抗体(sdAb)。

[0476] 实施方案82:如实施方案80所述的嵌合抑制性受体,其中所述抗原结合域包含单链可变片段(scFv)。

[0477] 实施方案83:如实施方案82所述的嵌合抑制性受体,其中每个scFv均包含重链可变域(VH)和轻链可变域(VL)。

[0478] 实施方案84:如实施方案83所述的嵌合抑制性受体,其中所述VH和VL通过肽接头分开。

[0479] 实施方案85:如实施方案84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:GGS(SEQ ID NO:23)、GGSGGS(SEQ ID NO:24)、GGSGGSGGS(SEQ ID NO:25)、GGSGGSGGSGGS(SEQ ID NO:26)、GGSGGSGGSGGSGGS(SEQ ID NO:27)、GGGS(SEQ ID NO:28)、GGGSGGGS(SEQ ID NO:29)、GGGSGGSGGGS(SEQ ID NO:30)、GGGSGGSGGSGGGS(SEQ ID NO:31)、GGGSGGSGGSGGSGGGS(SEQ ID NO:32)、GGGGS(SEQ ID NO:33)、GGGSGGGS(SEQ ID NO:34)、GGGSGGSGGSGGGS(SEQ ID NO:35)、GGGSGGSGGSGGSGGGS(SEQ ID NO:36)、GGGSGGSGGSGGSGGSGGGS(SEQ ID NO:37)和TTTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDQTTPGERSSLPAPFYPTSGSCSGCGSLSLP(SEQ ID NO:94)。

[0480] 实施方案86:如实施方案83-85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为重链可变域,L为肽接头,且VL为轻链可变域。

[0481] 实施方案87:如实施方案1-86中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述跨膜域

物理连接至所述细胞外蛋白结合域。

[0482] 实施方案88:如实施方案1-87中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个物理连接至所述跨膜域。

[0483] 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,其中所述跨膜域物理连接至所述细胞外蛋白结合域,且所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个物理连接至所述跨膜域。

[0484] 实施方案90:如实施方案1-89中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述细胞外蛋白结合域具有高结合亲和力。

[0485] 实施方案91:如实施方案1-89中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述细胞外蛋白结合域具有低结合亲和力。

[0486] 实施方案92:如实施方案1-91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经活化的免疫调节细胞产生细胞因子。

[0487] 实施方案93:如实施方案1-92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活化来诱导。

[0488] 实施方案94:如实施方案1-93中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述靶细胞为肿瘤细胞。

[0489] 实施方案95:如实施方案1-94中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述一个或多个细胞内信号传导域包含一个或多个修饰。

[0490] 实施方案96:如实施方案95所述的嵌合抑制性受体,其中相对于其他方面相同的未经修饰的受体,所述一个或多个修饰调节所述嵌合抑制性受体的敏感性。

[0491] 实施方案97:如实施方案95所述的嵌合抑制性受体,其中相对于其他方面相同的未经修饰的受体,所述一个或多个修饰增加所述嵌合抑制性受体的敏感性。

[0492] 实施方案98:如实施方案95所述的嵌合抑制性受体,其中相对于其他方面相同的未经修饰的受体,所述一个或多个修饰降低所述嵌合抑制性受体的敏感性。

[0493] 实施方案99:如实施方案95-98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经修饰的受体,所述一个或多个修饰调节所述嵌合抑制性受体的效力。

[0494] 实施方案100:如实施方案99所述的嵌合抑制性受体,其中相对于其他方面相同的未经修饰的受体,所述一个或多个修饰增加所述嵌合抑制性受体的效力。

[0495] 实施方案101:如实施方案99所述的嵌合抑制性受体,其中相对于其他方面相同的未经修饰的受体,所述一个或多个修饰降低所述嵌合抑制性受体的效力。

[0496] 实施方案102:如实施方案95-101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经修饰的受体,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活化的基础防止、减弱或抑制。

[0497] 实施方案103:如实施方案102所述的嵌合抑制性受体,其中相对于其他方面相同的未经修饰的受体,所述一个或多个修饰降低基础防止、减弱或抑制。

[0498] 实施方案104:如实施方案102所述的嵌合抑制性受体,其中相对于其他方面相同的未经修饰的受体,所述一个或多个修饰增加基础防止、减弱或抑制。

[0499] 实施方案105:如实施方案1-104中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述嵌合

抑制性受体进一步包含位于所述细胞外蛋白结合域与所述跨膜域之间且可操作地连接至所述细胞外蛋白结合域和所述跨膜域中的每一者的间隔区。

[0500] 实施方案106:如实施方案1-104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进一步包含位于所述细胞外蛋白结合域与所述跨膜域之间且物理连接至所述细胞外蛋白结合域和所述跨膜域中的每一者的间隔区。

[0501] 实施方案107:如实施方案105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 $\alpha$ 、CD4、CD7、CD28、IgG1、IgG4、Fc  $\gamma$  RIII $\alpha$ 、LNGFR和PDGFR。

[0502] 实施方案108:如实施方案105所述的嵌合抑制性受体,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:AAAEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKP (SEQ ID NO:39)、ESKYGPPCSP (SEQ ID NO:40)、ESKYGPPAPSAP (SEQ ID NO:41)、ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:42)、EPKSCDKTHTCP (SEQ ID NO:43)、AAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN (SEQ ID NO:44)、ACPTGLYTHSGECC KACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTECVGLQSMSAPVEADDAVCRCAYGYYQDETTG RCEACRVCEAGSGLVFSQDKQNTVCEECPDGTYSDEADAEC (SEQ ID NO:46)、ACPTGLYTHSGECC KACNL GEGVAQPCGANQTV (SEQ ID NO:47) 和AVGQDTQEVIVVPHSLPFKV (SEQ ID NO:48)。

[0503] 实施方案109:如实施方案105-108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。

[0504] 实施方案110:如实施方案109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。

[0505] 实施方案111:如实施方案109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。

[0506] 实施方案112:如实施方案105-111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。

[0507] 实施方案113:如实施方案112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。

[0508] 实施方案114:如实施方案112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。

[0509] 实施方案115:如实施方案105-114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活化的基础防止、减弱或抑制。

[0510] 实施方案116:如实施方案115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。

[0511] 实施方案117:如实施方案115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。

[0512] 实施方案118:如实施方案1-117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进一步包含位于所述跨膜域与所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个之间且可操作地连接至所述跨膜域和所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个中的每一

者的细胞内间隔区。

[0513] 实施方案119:如实施方案1-117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进一步包含位于所述跨膜域与所述两个或更多个细胞内信号传导域中的一个之间且物理连接至所述跨膜域和所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个中的每一者的细胞内间隔区。

[0514] 实施方案120:如实施方案118所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述细胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述细胞内间隔区调节所述嵌合抑制性受体的敏感性。

[0515] 实施方案121:如实施方案120所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述细胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述细胞内间隔区增加所述嵌合抑制性受体的敏感性。

[0516] 实施方案122:如实施方案120所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述细胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述细胞内间隔区降低所述嵌合抑制性受体的敏感性。

[0517] 实施方案123:如实施方案118-122中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述细胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述细胞内间隔区调节所述嵌合抑制性受体的效力。

[0518] 实施方案124:如实施方案123所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述细胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述细胞内间隔区增加所述嵌合抑制性受体的效力。

[0519] 实施方案125:如实施方案123所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述细胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述细胞内间隔区降低所述嵌合抑制性受体的效力。

[0520] 实施方案126:如实施方案118-125中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述细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,所述细胞内间隔区调节所述肿瘤靶向嵌合受体的活化的基础防止、减弱或抑制。

[0521] 实施方案127:如实施方案126所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述细胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述细胞内间隔区降低基础防止、减弱或抑制。

[0522] 实施方案128:如实施方案126所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述细胞内间隔区的其他方面相同的嵌合抑制性受体,所述细胞内间隔区增加基础防止、减弱或抑制。

[0523] 实施方案129:如实施方案1-128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进一步包含酶抑制性域。

[0524] 实施方案130:如实施方案129所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述酶抑制性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,所述酶抑制性域能够防止、减弱或抑制肿瘤靶向嵌合受体的活化。

[0525] 实施方案131:如实施方案129或实施方案130所述的嵌合抑制性受体,其中所述酶抑制性域包含酶催化域。

[0526] 实施方案132:如实施方案131所述的嵌合抑制性受体,其中所述酶催化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。

[0527] 实施方案133:如实施方案129-132中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述酶抑制性域包含一个或多个调节基础防止、减弱或抑制的修饰。

[0528] 实施方案134:如实施方案133所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述一个或多个修饰的其他方面相同的酶抑制性域,所述一个或多个修饰降低基础防止、减弱或抑制。

[0529] 实施方案135:如实施方案133所述的嵌合抑制性受体,其中相对于缺乏所述一个或多个修饰的其他方面相同的酶抑制性域,所述一个或多个修饰增加基础防止、减弱或抑制。

[0530] 实施方案136:如实施方案1-135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为嵌合抗原受体(CAR)或工程改造的T细胞受体(TCR)。

[0531] 实施方案137:如实施方案1-136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、 $\gamma$   $\delta$ 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、自然杀手T(NKT)细胞、自然杀手(NK)细胞、B细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、先天性淋巴样细胞、肥胖细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、髓样细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突状细胞、ESC衍生细胞和iPSC衍生细胞。

[0532] 实施方案138:如实施方案1-136中任一项所述的嵌合抑制性受体,其中所述免疫调节细胞为自然杀手(NK)细胞。

[0533] 实施方案139:一种组合物,其包含如实施方案1-138中任一项所述的嵌合抑制性受体和药学上可接受的载剂。

[0534] 实施方案140:一种工程改造的核酸,其编码如实施方案1-138中任一项所述的嵌合抑制性受体。

[0535] 实施方案141:一种表达载体,其包含如实施方案140所述的工程改造的核酸。

[0536] 实施方案142:一种组合物,其包含如实施方案140所述的工程改造的核酸或如实施方案141所述的表达载体和药学上可接受的载剂

[0537] 实施方案143:一种分离的免疫调节细胞,其包含如实施方案1-138中任一项所述的嵌合抑制性受体。

[0538] 实施方案144:如实施方案143所述的分离的细胞,其中所述细胞进一步包含在所述细胞的表面上表达的肿瘤靶向嵌合受体。

[0539] 实施方案145:如实施方案144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,在所述蛋白与嵌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活化。

[0540] 实施方案146:一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:

[0541] -细胞外蛋白结合域,

[0542] -跨膜域,其中所述跨膜域可操作地连接至所述细胞外蛋白结合域,和

[0543] -一个或多个细胞内信号传导域,其中所述一个或多个细胞内信号传导域可操作

地连接至所述跨膜域,且其中所述一个或多个细胞内信号传导域各自衍生自选自由以下组成的组的蛋白:SLAP1、SLAP2、Dok-1、Dok-2、LAIR1、GRB-2、CD200R、SIRP $\alpha$ 、HAVR、GITR、PD-L1、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR3DL2、CD94、KLRG-1、CEACAM1、LIR2、LIR3、LIR5、SIGLEC-2和SIGLEC-10;且

[0544] 其中在所述蛋白与嵌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活化。

[0545] 实施方案147:如实施方案146所述的分离的细胞,其中所述细胞进一步包含在所述细胞的表面上表达的肿瘤靶向嵌合受体。

[0546] 实施方案148:一种分离的细胞,其包含:

[0547] (a) 嵌合抑制性受体,且其中所述嵌合抑制性受体包含:

[0548] -细胞外蛋白结合域,

[0549] -跨膜域,其中所述跨膜域可操作地连接至所述细胞外蛋白结合域,和

[0550] -一个或多个细胞内信号传导域,其中所述一个或多个细胞内信号传导域可操作地连接至所述跨膜域,且其中所述一个或多个细胞内信号传导域各自衍生自选自由以下组成的组的蛋白:SLAP1、SLAP2、Dok-1、Dok-2、LAIR1、GRB-2、CD200R、SIRP $\alpha$ 、HAVR、GITR、PD-L1、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR3DL2、CD94、KLRG-1、CEACAM1、LIR2、LIR3、LIR5、SIGLEC-2和SIGLEC-10;且

[0551] (b) 在所述细胞的表面上表达的肿瘤靶向嵌合受体,

[0552] 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防止、减弱或抑制所述肿瘤靶向嵌合受体的活化。

[0553] 实施方案149:如实施方案143-148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。

[0554] 实施方案150:如实施方案143-149中任一项所述的分离的细胞,其中所述嵌合抑制性受体自载体或所述细胞的基因组的选定基因座表达。

[0555] 实施方案151:如实施方案143-150中任一项所述的分离的细胞,其中所述肿瘤靶向嵌合受体为嵌合抗原受体(CAR)或工程改造的T细胞受体。

[0556] 实施方案152:如实施方案143-151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活化所述细胞。

[0557] 实施方案153:如实施方案143-152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经活化的细胞产生细胞因子。

[0558] 实施方案154:如实施方案143-153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活化来诱导。

[0559] 实施方案155:如实施方案143-154中任一项所述的细胞,其中所述跨膜域物理连接至所述细胞外蛋白结合域。

[0560] 实施方案156:如实施方案143-154中任一项所述的细胞,其中所述细胞内信号传导域物理连接至所述跨膜域。

[0561] 实施方案157:如实施方案143-154中任一项所述的细胞,其中所述跨膜域物理连接至所述细胞外蛋白结合域,且所述一个或多个细胞内信号传导域中的一个物理连接至所

述跨膜域。

[0562] 实施方案158:如实施方案143-154中任一项所述的分离的细胞,其中所述靶细胞为肿瘤细胞。

[0563] 实施方案159:如实施方案143-158中任一项所述的分离的细胞,其中所述细胞选自自由以下组成的组: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、自然杀手T(NKT)细胞、自然杀手(NK)细胞、B细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、先天性淋巴样细胞、肥胖细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、髓样细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突状细胞、ESC衍生细胞和iPSC衍生细胞。

[0564] 实施方案160:如实施方案143-158中任一项所述的分离的细胞,其中所述细胞为自然杀手(NK)细胞。

[0565] 实施方案161:如实施方案143-160中任一项所述的分离的细胞,其中所述细胞为自体的。

[0566] 实施方案162:如实施方案143-160中任一项所述的分离的细胞,其中所述细胞为同种异体的。

[0567] 实施方案163:一种组合物,其包含如实施方案143-162中任一项所述的分离的细胞和药学上可接受的载剂。

[0568] 实施方案164:一种防止、减弱或抑制通过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,其包含:

[0569] 对所述免疫调节细胞进行工程改造,以在所述免疫调节细胞的表面上表达如实施方案1-138中任一项所述的嵌合抑制性受体,

[0570] 其中在同源抗原与所述嵌合抑制性受体结合之后,所述细胞内信号传导域防止、减弱或抑制所述肿瘤靶向嵌合受体的活化。

[0571] 实施方案165:一种防止、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方法,其包含:

[0572] 在适合于所述嵌合抑制性受体结合所述嵌合抑制性受体的同源抗原的条件下,使如实施方案143-162中任一项所述的分离的细胞或如实施方案163所述的组合物与所述同源抗原接触,

[0573] 其中在所述抗原与所述嵌合抑制性受体结合之后,所述细胞内信号传导域防止、减弱或抑制所述肿瘤靶向嵌合受体的活化。

[0574] 实施方案166:如实施方案164或实施方案165所述的方法,其中所述肿瘤靶向嵌合受体为嵌合抗原受体(CAR)或工程改造的T细胞受体。

[0575] 实施方案167:如实施方案166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。

[0576] 实施例

[0577] 以下为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,且不旨在以任何方式限制本发明的范围。已经努力确保所用的数字(例如,量、温度等)的准确性,但仍应允许一些实验误差和偏差。

[0578] 除非另外指示,否则本发明的实践将采用本领域技术内的蛋白质化学、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., current addition); 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)。

[0579] 实施例1: 具有SLAP信号传导域的抑制性嵌合受体降低T细胞活化

[0580] 方法和材料

[0581] T细胞转导和扩增

[0582] 合成了具有SLAP1 (Src样转接蛋白1) 细胞内信号传导域的抑制性嵌合受体 (iCAR)。抑制性嵌合受体包含IgG $\kappa$ 分泌信号、具有FLAG标签的抗CD19 scFv、CD8铰链域、CD28跨膜域和SLAP1细胞内信号传导域。将FLAG标签融合在iCAR中scFv (在信号序列之后) 的N端。还构建了靶向肿瘤的CAR (活化CAR, aCAR), 其具有CD8分泌信号、具有Myc标签的抗CD20 scFv、CD8铰链域、CD28跨膜域和CD28与CD3 $\delta$ 细胞内信号传导域。将Myc标签融合在aCAR的铰链区中scFv的C端。共表达抗CD19-SLAP iCAR和抗CD20-CD28/CD3 $\delta$ aCAR的T细胞接触表达CD19和CD20的靶细胞的示例性图表示于图1A。

[0583] 表9提供所合成的抑制性嵌合受体和肿瘤靶向嵌合受体的全序列。

| SEQ ID NO | 名称 | 序列                                   |
|-----------|----|--------------------------------------|
| 58        | 抗  | METDTLLLWVLLLWVPGSTGAGGSDYKDDDDKGGSE |

|        |                                 |  |
|--------|---------------------------------|--|
| [0585] | CD19-CD8 铰链-CD28 TM-SLA P1 iCAR | VKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQ PPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQ VFLKMNSLQTD DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQ GTSVTVSSGGGGSGGGGSDIQMTQTSSLSASL GDRVTISCRASQDISKYL N WYQQKPDGTVKLLIYHTSR L HSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGN TLPYTFGGGTKLEITTTTPAPRPPTPAPTIALQPLSLRPE ACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWVLVVVGGV LACYSL LVTVAFIIFWVPAPAERPLPNPEGLDSDFLAVLSDY PSP DISPPIFRRGEKLRVISDEGGWWKAISLSTGRESYIPGIC VARVYHGWLFEGLGRDKAEELLQLPDTKVGSFMIRESETKKGFYSLSVRHRQVKHYRIFRLPNNWYYISPRLTFQ CLEDLVNHYSEVADGLCCVLTTPCLTQSTAAPAVRASS SPVTLRQKTVDWRRVSR LQEDPEGTENPLGVDESLSFY GLRESIASYLSLTSEDNTSF |
| 59     | 抗 CD20-CD28/ CD3 $\zeta$ aCAR   | MALPVTALLLPLALLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWMGFIT PTTGYPEYNQKFKDRVTMTADKSTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCARRKVGKGVYALDYWGQTTVTVSSGG GSGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SGNIHNYLAWYQQKPGKVPKLLIYNTKTLADGVPSRFS GSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCQHFWSWPWFSGG TKVEIKEQKLISEEDLNGAATTPAPRPPTPAPTIALQPL SLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWVLVVVGGV LACYSLLVTVAFIIFWVRSKR S RLLHSDYMNMTPRRPGP TRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYKQGQN QLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDP EMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALPPR  |

[0586] T细胞转导

[0587] 在第1天,将 $1 \times 10^6$ 个纯化的CD4+/CD8+T细胞解冻并用 $3 \times 10^6$ 个Dynabead刺激,然后培养于具有0.2ug/mL IL-2的1mL Optimizer CTS T细胞扩增培养基(Gibco)中。在第2天,用编码抗CD20活化CAR (aCAR) 或抗CD19抑制性CAR (iCAR) 的组成型表达的慢病毒(各100K,如GoStix (Tekara) 所定量) 单一或共同转导T细胞。

[0588] 在第3天,通过磁铁移除Dynabead。对T细胞进行计数并传代( $0.5 \times 10^6$ 个细胞/mL)。用PE缀合的抗MYC和BV421缀合的抗FLAG抗体(分别对应于aCAR和iCAR)对这些细胞的等分试样进行染色,且使用LX CytoFlex流式细胞仪定量其转基因表达。在后续扩增中,每两天对细胞进行传代( $0.5 \times 10^6$ 个细胞/mL)。

[0589] T细胞共培养物测定

[0590] 在第8天,对T细胞进行计数并分配至96孔板中以供共培养物测定。各孔含有 $5 \times 10^5$ 个用cell trace violet染料(Invitrogen)染色的Raji氏靶细胞和 $5 \times 10^5$ 个表达aCAR的T细胞。将共培养物孵育(37°C, 5%CO<sub>2</sub>) 18h。

[0591] 在第9天,收集共培养物上清液,并使用人磁性Luminex测定(R&D systems)和MAGPIX分析仪(Millipore Sigma)测量培养基中的细胞因子。

[0592] 结果

[0593] 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细胞活化的能力。共表达抗CD20-SLAP 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表示于图1A中。用抗CD19-SLAP-iCAR和抗CD20 aCAR转导的细胞在初代T细胞中展示高水平的表面表达。仅用aCAR转导的T细胞展示高aCAR表达且无iCAR表达(图1C),而用aCAR和iCAR两者共转导的T细胞展示高水平的两种CAR蛋白表达(图1D)。阴性对照细胞未展示任一构建体表达(图1B)。

[0594] 在与表达CD19和CD20的Raji氏细胞共培养之后,抗CD19-SLAP iCAR压制通过抗CD20 aCAR(aCD20-28z)诱导的T细胞细胞因子产生。Raji氏细胞与抗CD20 aCAR T细胞的共培养诱导TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 和IL-2产生(分别地,图2A、图2B和图2C)。然而,在与Raji氏靶细胞共培养之后,表达抗CD20 aCAR和抗CD19 SLAP iCAR两者的T细胞显著减少TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 和IL-2产生(\*\*p>0.01,\*\*\*p>0.001)。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。

[0595] 因此,抗CD19-SLAP融合物(iCAR)在慢病毒转导的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞中以高水平表达,而无需后续富集。重要的是,在共转导之后观察到高水平的iCAR和aCAR的共表达。此外,当iCAR和aCAR靶向不同的细胞表面配体(分别为CD19和CD20)时,CD19-SLAP iCAR压制了T细胞活化反应(细胞因子TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 和IL-2的产生)。

[0596] 实施例2:具有KIR2DL1、KLRG1、LAIR、LIR2、LIR3、LIR5、SIGLEC-2或SIGLEC-10信号传导域的抑制性嵌合受体降低T细胞活化

[0597] 方法和材料

[0598] T细胞转导和扩增

[0599] 合成了具有KIR2DL1、KLRG1、LAIR、LIR2、LIR3、LIR5、SIGLEC-2或SIGLEC-10细胞内信号传导域的抑制性嵌合受体(iCAR)。抑制性嵌合受体各自包含CD8信号、pe1B信号(不包括SIGLEC-2和SIGLEC-10,其仅包含CD8信号)、具有V5标签的抗HER2 scFv、CD8铰链域以及如表10中所说明的跨膜域和细胞内信号传导域配对。将V5标签融合在iCAR中scFv的C端。还构建了靶向肿瘤的CAR(活化CAR,aCAR),其具有CD8分泌信号、具有Myc标签的抗CD20 scFv、CD8铰链域、CD28跨膜域和CD28与CD3 $\delta$ 细胞内信号传导域。将Myc标签融合在aCAR的铰链区中scFv的C端。

[0600] 表10提供此项研究的跨膜域和细胞内信号传导域配对。

| 表 10-跨膜域和细胞内信号传导域配对 |           |
|---------------------|-----------|
| 跨膜域                 | 细胞内信号传导域  |
| KIR2DL1             | KIR2DL1   |
| LIR1                | KLRG1     |
| KLRG1               | KLRG1     |
| LAIR1               | LAIR1     |
| LIR2                | LIR2      |
| LIR3                | LIR3      |
| LIR5                | LIR5      |
| SIGLEC-2            | SIGLEC-2  |
| SIGLEC-10           | SIGLEC-10 |

[0603] 表11提供抑制性嵌合受体和肿瘤靶向嵌合受体的全序列。

表 11-抑制性嵌合受体和肿瘤靶向嵌合受体序列

| SEQ ID NO | 名称   | 序列  |
|-----------|--|---|
| 95        | 抗<br>HER2-C<br>D8 铰链<br>-KIR2DL<br>1<br>TM-KIR2<br>DL1<br>iCAR | MALPVTALLLPLALLLHAARPKYLLPTAAAGLLLLAA<br>QPAMAQVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSY<br>WIAWVRQMPGKGLEYMGLIYPGSDTKYSPSFQGGVTT<br>ISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDSAVYFCARHDTVGYCTD<br>RTCAKWPEYFQHWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGG<br>GSQSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWY<br>QQLPGTAPKLLIYDHTNRPAGVPDRFSGSKSGTSASLAI<br>SGFRSEDEADYYCASWDYTLSGWVFGGGTKLTVLGG<br>KPIPPELLGLDSTNGAATTPAPRPPTPAPTIALQPLSLR<br>PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDILIGTSVVILFILLFFL<br>LHRWCSNKKNAAVMDQESAGNRTANSEDSDEQDPQE<br>VTYTQLNHCVFTRKTRPSQRPKTPPTDIIIVYTELPNA<br>ESRSKVVSCP |
| 96        | 抗<br>HER2-C<br>D8 铰链-<br>LIR1 TM-<br>KLRG1<br>iCAR             | MALPVTALLLPLALLLHAARPKYLLPTAAAGLLLLAA<br>QPAMAQVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSY<br>WIAWVRQMPGKGLEYMGLIYPGSDTKYSPSFQGGVTT<br>ISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDSAVYFCARHDTVGYCTD<br>RTCAKWPEYFQHWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGG<br>GSQSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWY<br>QQLPGTAPKLLIYDHTNRPAGVPDRFSGSKSGTSASLAI<br>SGFRSEDEADYYCASWDYTLSGWVFGGGTKLTVLGG<br>KPIPPELLGLDSTNGAATTPAPRPPTPAPTIALQPLSLR<br>PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDVIGILVAVILLLLLLLL<br>LFLIMTDSVIYSMLELPTATQAQNDYGPQQKSSSSRPSC<br>SCLGSG  |
| 97        | 抗<br>HER2-C<br>D8 铰链<br>-KLRG1<br>TM-<br>KLRG1<br>iCAR         | MALPVTALLLPLALLLHAARPKYLLPTAAAGLLLLAA<br>QPAMAQVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSY<br>WIAWVRQMPGKGLEYMGLIYPGSDTKYSPSFQGGVTT<br>ISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDSAVYFCARHDTVGYCTD<br>RTCAKWPEYFQHWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGG<br>GSQSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWY<br>QQLPGTAPKLLIYDHTNRPAGVPDRFSGSKSGTSASLAI<br>SGFRSEDEADYYCASWDYTLSGWVFGGGTKLTVLGG<br>KPIPPELLGLDSTNGAATTPAPRPPTPAPTIALQPLSLR<br>PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDVAIALGLLTAVLLSVL<br>LYQWIMTDSVIYSMLELPTATQAQNDYGPQQKSSSSRP<br>SCSCLGSG  |
| 98        | 抗<br>HER2-C  | MALPVTALLLPLALLLHAARPKYLLPTAAAGLLLLAA<br>QPAMAQVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSY  |

[0604]

[0605]

|     |  |   |
|-----|--|---|
|     | D8 铰链<br>-LAIR1<br>TM-LAIR<br>1 iCAR             | WIAWVRQMPGKGLEYMGLIYPGSDTKYSPSFQGGQVT<br>ISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDSAVYFCARHDVGYCTD<br>RTCAKWPEYFQHWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGG<br>GSQSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWY<br>QQLPGTAPKLLIYDHTNRPAGVPDRFSGSKSGTSASLAI<br>SGFRSEDEADYYCASWDYTLSGWVFGGGTKLTVLGG<br>KPIPPLLGLDSTNGAATTPAPRPPTPAPTIALQPLSLR<br>PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDILIGVSVVFLFCLLLL<br>VLFCLHRQNQIKQGPPRSKDEEQKPPQRPDLAVDVLER<br>TADKATVNLPEKDRETDTSALAAGSSQEVTYAQLDH<br>WALTQRTARAVSPQSTKPMASITYAAVARH  |
| 99  | 抗<br>HER2-C<br>D8 铰链<br>-LIR2<br>TM-LIR2<br>iCAR | MALPVTALLLPLALLLHAARPKYLLPTAAAGLLLLAA<br>QPAMAQVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSY<br>WIAWVRQMPGKGLEYMGLIYPGSDTKYSPSFQGGQVT<br>ISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDSAVYFCARHDVGYCTD<br>RTCAKWPEYFQHWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGG<br>GSQSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWY<br>QQLPGTAPKLLIYDHTNRPAGVPDRFSGSKSGTSASLAI<br>SGFRSEDEADYYCASWDYTLSGWVFGGGTKLTVLGG<br>KPIPPLLGLDSTNGAATTPAPRPPTPAPTIALQPLSLR<br>PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDVIGILVAVVLLLLLLL<br>LLFLILRHRRQGKHWTSTQRKADFQHPAGAVGPEPTD<br>RGLQWRSSPAADAQEENLYAAVKDTQPEDGVEMDTR<br>AAASEAPQDVTYAQLHSLTLRRKATEPPPSQEREPPAE<br>PSIYATLAIH   |
| 100 | 抗<br>HER2-C<br>D8 铰链<br>-LIR3<br>TM-LIR3<br>iCAR | MALPVTALLLPLALLLHAARPKYLLPTAAAGLLLLAA<br>QPAMAQVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSY<br>WIAWVRQMPGKGLEYMGLIYPGSDTKYSPSFQGGQVT<br>ISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDSAVYFCARHDVGYCTD<br>RTCAKWPEYFQHWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGG<br>GSQSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWY<br>QQLPGTAPKLLIYDHTNRPAGVPDRFSGSKSGTSASLAI<br>SGFRSEDEADYYCASWDYTLSGWVFGGGTKLTVLGG<br>KPIPPLLGLDSTNGAATTPAPRPPTPAPTIALQPLSLR<br>PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDVLIGVSVAFVLLFL<br>LFLLLRRQRHSHKRTSDQRKTDQRPAGAAETEPKDRG<br>LLRRSSPAADVQEENLYAAVKDTQSEDRVELDSQSPH<br>DEDPQAVTYAPVKHSSPRREMASPPSSLSGEFLDTKDR<br>QVEEDRQMDTEAAASEASQDVTYAQLHSLTLRRKATE<br>PPPSQEGEPPAEPsiyatLAIH |
| 101 | 抗<br>HER2-C<br>D8 铰链<br>-LIR5<br>TM-LIR5<br>iCAR | MALPVTALLLPLALLLHAARPKYLLPTAAAGLLLLAA<br>QPAMAQVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSY<br>WIAWVRQMPGKGLEYMGLIYPGSDTKYSPSFQGGQVT<br>ISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDSAVYFCARHDVGYCTD<br>RTCAKWPEYFQHWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGG<br>GSQSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWY<br>QQLPGTAPKLLIYDHTNRPAGVPDRFSGSKSGTSASLAI<br>SGFRSEDEADYYCASWDYTLSGWVFGGGTKLTVLGG<br>KPIPPLLGLDSTNGAATTPAPRPPTPAPTIALQPLSLR<br>PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDVLIGVLVVSILLLSLL  |

|        |  |  |
|--------|--|--|
|        |  | LFLLLQHWRRQGKHRTLAQRQADFQRPPGAAEPEPKDG<br>GLQRRSSPAADVQGENFCAAVKNTQPEDGVEMDTRQS<br>PHDEDPQAVTYAKVKHSRPRREMASPPSPLSGEFLDTK<br>DRQAEEDRQMDTEAAASEAPQDVITYAQLHSFTLRQKA<br>TEPPPSQEGASPAEPSVYATLAIH  |
| 102    | 抗<br>HER2-C<br>D8 铰链<br>-SIGLEC-<br>2 TM-<br>SIGLEC-<br>2 iCAR   | MALPVTALLLPLALLLHAARPKYLLPTAAAGLLLLAA<br>QPAMAQVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSY<br>WIAWVRQMPGKGLEYMGLIYPGSDTKYSPSFQGGQVT<br>ISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDSAVYFCARHDVGYCTD<br>RTCAKWPEYFQHWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGG<br>GSQSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWY<br>QQLPGTAPKLLIYDHTNRPAGVDPDRFSGSKSGTSASLAI<br>SGFRSEDEADYYCASWDYTLSGWVFGGGTKLTVLGG<br>KPIPPLLGLDSTNGAATTPAPRPPTPAPTIALQPLSLR<br>PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDVAVGLGSCLAAILLAI<br>CGLKLQRRWKRTQSQQGLQENSSGQSFVRNKKVRRRA<br>PLSEGPLHSLGCYNPMEDGISYTTLRFPENIPRTGDA<br>ESSEMQRPPDCDDTVTYSALHKRQVGDYENVIPDFPE<br>DEGIHYSELIQFGVGERPQAQENVYVILKH |
| [0606] | 抗<br>HER2-C<br>D8 铰链<br>-SIGLEC-<br>10 TM-<br>SIGLEC-<br>10 iCAR | MALPVTALLLPLALLLHAARPKYLLPTAAAGLLLLAA<br>QPAMAQVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSY<br>WIAWVRQMPGKGLEYMGLIYPGSDTKYSPSFQGGQVT<br>ISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDSAVYFCARHDVGYCTD<br>RTCAKWPEYFQHWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGG<br>GSQSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWY<br>QQLPGTAPKLLIYDHTNRPAGVDPDRFSGSKSGTSASLAI<br>SGFRSEDEADYYCASWDYTLSGWVFGGGTKLTVLGG<br>KPIPPLLGLDSTNGAATTPAPRPPTPAPTIALQPLSLR<br>PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDGAFLGIGITALLFLCL<br>ALIIMKILPKRRTQTETPRPRFRSRHSTILDYINVVPTAGP<br>LAQQRNQAATPNSPRTPPPGAPSPESKKNQKKQYQLP<br>SFPEPKSSTQAPESQESQEELHYATLNFPGVRPRPEARM<br>PKGTQADYAEVKFQ           |
| 59     | 抗<br>CD20-CD<br>28/ CD3ζ<br>aCAR                                 | MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGA<br>SVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWMGFIT<br>PTTGYPEYNQKFKDRVTMTADKSTSTAYMELSSLRSE<br>DTAVYYCARRKVGKGVYYALDYWGQTTVTVSSGG<br>GGSGGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA<br>SGNIHNYLAWYQQKPGKVPKLLIYNTKTLADGVPSRFS<br>GSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCQHFWSWPWFSGG<br>TKVEIKEQKLISEEDLNGAATTPAPRPPTPAPTIALQPL<br>SLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWVLLVVGGVLL<br>ACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGP<br>TRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYKQGQN<br>QLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNP<br>QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLY<br>QGLSTATKDTYDALHMQUALPPR               |

[0607] T细胞转导

[0608] 在第1天,将 $1 \times 10^6$ 个纯化的CD4+/CD8+T细胞解冻并用 $3 \times 10^6$ 个Dynabead刺激,然

后培养于具有0.2ug/mL IL-2的1mL Optimizer CTS T细胞扩增培养基(Gibco)中。在第2天,用编码抗CD20活化CAR (aCAR) 或抗HER2抑制性CAR (iCAR) 的组成型表达的慢病毒(各100K,如GoStix (Tekara) 所定量) 单一或共同转导T细胞。

[0609] 在第3天,通过磁铁移除Dynabead。对T细胞进行计数并传代( $0.5 \times 10^6$ 个细胞/mL)。用PE缀合的抗MYC和BV421缀合的抗V5抗体(分别对应于aCAR和iCAR) 对这些细胞的等分试样进行染色,且使用LX CytoFlex流式细胞仪定量其转基因表达。在后续扩增中,每两天对细胞进行传代( $0.5 \times 10^6$ 个细胞/mL)。

[0610] T细胞共培养物测定

[0611] 在第8天,对T细胞进行计数并分配至96孔板中以供共培养物测定。测试了两种Raji氏细胞群:亲代系,其内源性表达CD20+;和外源性过表达HER的Raji氏系(CD20+Her2+)。各孔含有 $5 \times 10^4$ 个用cell trace violet染料(Invitrogen) 染色的Raji氏靶细胞和 $5 \times 10^4$ 个表达aCAR的T细胞。将共培养物孵育( $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{CO}_2$ ) 18h。

[0612] 在第9天,收集共培养物上清液,并使用人磁性Luminex测定(R&D systems) 和MAGPIX分析仪(Millipore Sigma) 测量培养基中的细胞因子。

[0613] 结果

[0614] 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细胞活化的能力。

[0615] 在与表达HER2和CD20的Raji氏细胞共培养之后,具有KIR2DL1、KLRG1、LAIR、LIR2、LIR3、LIR5、SIGLEC-2或SIGLEC-10衍生的抑制性细胞内信号传导域的抗HER2 iCAR压制抗CD20 aCAR (aCD20-28z) 诱导的T细胞细胞因子产生。Raji氏细胞与抗CD20 aCAR T细胞的共培养诱导TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  和IL-2产生。然而,在与Raji氏靶细胞共培养之后,表达抗CD20 aCAR和具有KIR2DL1、KLRG1、LAIR、LIR2、LIR3、LIR5、SIGLEC-2或SIGLEC-10衍生的抑制性细胞内信号传导域的抗HER2 iCAR两者的T细胞的TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  和IL-2产生显著减少。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。

[0616] 具有KIR2DL1、KLRG1、LAIR、LIR2、LIR3、LIR5、SIGLEC-2或SIGLEC-10衍生的抑制性细胞内信号传导域的抗HER2 iCAR在慢病毒转导的CD4+和CD8+T细胞中高水平表达,而无需后续富集。在共转导之后观察到高水平的iCAR和aCAR的共表达。此外,当iCAR和aCAR靶向不同的细胞表面配体(分别为HER2和CD20)时,具有KIR2DL1、KLRG1、LAIR、LIR2、LIR3、LIR5、SIGLEC-2或SIGLEC-10衍生的抑制性细胞内信号传导域的抗HER2 iCAR压制T细胞活化反应(细胞因子TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  和IL-2的产生)。

[0617] 实施例3:具有KIR2DL1、KLRG1、LAIR、LIR2、LIR3、LIR5、SIGLEC-2或SIGLEC-10信号传导域的抑制性嵌合受体降低NK细胞活化

[0618] 方法和材料

[0619] NK细胞转导和扩增

[0620] 如上文实施例2中所述,合成了具有KIR2DL1、KLRG1、LAIR、LIR2、LIR3、LIR5、SIGLEC-2或SIGLEC-10细胞内信号传导域的抑制性嵌合受体(iCAR)。

[0621] 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 $7.5 \times 10^5$ pg的针对aCAR和iCAR构建体的各慢病毒进行转导。欲评估的构建体的序列示于上文表11中。4天之后,将嘌呤霉素添加至细胞中以供选择。

[0622] NK细胞细胞毒性测定

[0623] 再三天之后,通过共孵育工程改造的NK细胞和靶细胞(亲代Raji氏细胞(WT)或经工程改造以过表达Her2抗原的Raji氏细胞)来进行细胞毒性测定。对工程改造的NK细胞进行孵育,其中:(1)各靶细胞型单独地以25,000个NK细胞与50,000个Raji氏细胞的比率,一式三份;或(2)呈25,000个Raji氏Her2和25,000个双抗原Her2+Raji氏细胞与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(用不同膜染料将双抗原靶标染色,使其能够通过流动来区分)。孵育隔夜之后,将细胞用活力染料染色并经由流式细胞术进行计数。将靶细胞减少定量为 $100\% \times (1 - \text{靶标数} / \text{靶标数}(NV))$ 。

[0624] 结果

[0625] 评估了在表达各自结合不同抗原的iCAR和aCAR的NK细胞中iCAR减少或抑制NK细胞活化的能力。

[0626] 在与表达HER2和CD20的Raji氏细胞共培养之后,具有KIR2DL1、KLRG1、LAIR、LIR2、LIR3、LIR5、SIGLEC-2或SIGLEC-10衍生的抑制性细胞内信号传导域的抗HER2 iCAR压制抗CD20 aCAR(aCD20-28z)的NK细胞介导的细胞毒性。Raji氏靶细胞与抗CD20 aCAR NK细胞的共培养诱导了亲代靶细胞的细胞毒性。然而,在与Raji氏靶细胞共培养之后,表达抗CD20 aCAR和具有KIR2DL1、KLRG1、LAIR、LIR2、LIR3、LIR5、SIGLEC-2或SIGLEC-10衍生的抑制性细胞内信号传导域的抗HER2 iCAR两者的NK细胞的细胞毒性减少。因此,iCAR与其在靶细胞上的同源配体的结合成功减少aCAR诱导的细胞毒性。

[0627] 具有KIR2DL1、KLRG1、LAIR、LIR2、LIR3、LIR5、SIGLEC-2或SIGLEC-10衍生的抑制性细胞内信号传导域的抗HER2 iCAR在慢病毒转导的NK细胞中高水平表达,而无需后续富集。在共转导之后观察到高水平的iCAR和aCAR的共表达。此外,当iCAR和aCAR靶向不同的细胞表面配体(分别为HER2和CD20)时,具有KIR2DL1、KLRG1、LAIR、LIR2、LIR3、LIR5、SIGLEC-2或SIGLEC-10衍生的抑制性细胞内信号传导域的抗HER2 iCAR压制NK细胞活性(NK细胞介导的细胞毒性)

[0628] 实施例4:各种抑制性嵌合受体在减少NK细胞活化方面的评估

[0629] 方法和材料

[0630] 将个别iCAR和aCAR构建体包装至慢病毒粒子中并用于在用K562饲养细胞与500U/mL IL-2和20ng/uL IL-15扩增10天之后转导初代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,所以在转导之后第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且将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FLT3的肿瘤细胞;(2)表达aCAR抗原FLT3和iCAR抗原EMCN两者的肿瘤细胞;或(3)混合的两种肿瘤细胞型。16-18h之后,通过流式细胞术分析培养物并对各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),然后扣除通过对照(仅iCAR)NK细胞的总杀伤来定量aCAR介导的给定NK细胞型杀伤(扣除基底)。将iCAR介导的保护定量为具有或不具有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 $\alpha$ 分泌,且与杀伤类似地计算aCAR和iCAR性能度量。对于表达分析,用aV5-Alexafluor 647染色iCAR且用aFLAG-BV-421染色aCAR。基于iCAR+/-和aCAR+/-表达状态,将细胞指派至4个象限,使我们能够评估“%aCAR+iCAR+”和“%非aCAR+iCAR-”(aCAR+iCAR-

未经门控且欲避免潜在毒性的CAR-NK细胞)。为了进一步分析表达水平,我们测量了aCAR+iCAR+亚群体的aCAR和iCAR的中值荧光强度(MFI),我们通过相应荧光通道中的未经转导的NK细胞的MFI将其标准格式化。对于各iCAR,进行1-3次生物性重复(展示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。

[0631] 所评估的抗EMCN iCAR构建体使用关于细胞内域的表12中所示的形式。所评估的抗FLT3 aCAR构建体也示于表12中。

表 12 - 抑制性嵌合受体和肿瘤靶向嵌合受体序列

| SEQ ID NO | 名称   | 序列  |
|-----------|--|---|
| 104       | 抗 EMCN-CD8 铰链-KIR2DL1 TM-KIR2DL1 iCAR (CD8 SS 粗体; EMCN scFv 斜体; V5 + NGAA 接头粗体且斜体) | <b>MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLKESGPGLVQP</b><br><i>SQTLSTCTVSGFSLSRYSRDMHWVRQPPGQGLEWMGVI</i><br><i>WGNGNTHYHSALKSRLSISRDTSKSQVFLKMNSLQTED</i><br><i>TAIFYCTLRIKDWGPGTMVTVSSGGGGSGGGSGGGG</i><br><i>SDIVMTQTPPSLSVALGQSVSISCKSSQSLVASDENTYLN</i><br><i>WLLQSPGRSPKRLIYQVSKLDSGVPDRFSGSGSEKDFT</i><br><i>LKISRVEAEDLGVYYCLOGIHLPTWTFGGGTKLELKGK</i><br><b>IPNPLLGLDSTNGAAT</b> TTTPAPRPPTPAPTIALQPLSLR<br>PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDILIGTSVVILFILLF<br>FLLHRWCSNKKNAAVMDQESAGNRTANSEDSDEQ<br>DPQEVTYTQLNHCVFTQRKITRPSQRPKTPPTDIIVY<br>TELPNAESRSKVVSCP |
| 105       | 抗 EMCN-CD8 铰链- LIR1 TM-KLRG1 iCAR  | MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLKESGPGLVQPS<br>QTLSTCTVSGFSLSRYSRDMHWVRQPPGQGLEWMG<br>VIWGNGNTHYHSALKSRLSISRDTSKSQVFLKMNSL<br>QTEDTAIFYCTLRIKDWGPGTMVTVSSGGGGSGGG<br>GSGGGGSDIVMTQTPPSLSVALGQSVSISCKSSQSLV<br>ASDENTYLNWLLQSPGRSPKRLIYQVSKLDSGVPDR<br>FSGSGSEKDFTLKISRVEAEDLGVYYCLOGIHLPTW<br>TFGGGTKLELKGKPIP<br>NPLLGLDSTNGAATTTTPAPRPP<br>TPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD<br>VIGILVAVILLLLLLLLLLFLIMTDSVIYSMLELPTATQ<br>AQNDYGPQQKSSSRPSCSCLGSG  |
| 106       | 抗 EMCN-CD8 铰链 -KLRG1 TM- KLRG1 iCAR  | MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLKESGPGLVQPS<br>QTLSTCTVSGFSLSRYSRDMHWVRQPPGQGLEWMG<br>VIWGNGNTHYHSALKSRLSISRDTSKSQVFLKMNSL<br>QTEDTAIFYCTLRIKDWGPGTMVTVSSGGGGSGGG<br>GSGGGGSDIVMTQTPPSLSVALGQSVSISCKSSQSLV<br>ASDENTYLNWLLQSPGRSPKRLIYQVSKLDSGVPDR<br>FSGSGSEKDFTLKISRVEAEDLGVYYCLOGIHLPTW<br>TFGGGTKLELKGKPIP<br>NPLLGLDSTNGAATTTTPAPRPP<br>TPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD<br>VAIALGLLTAVLLSVLLYQWIMTDSVIYSMLELPTA<br>TQAQNDYGPQQKSSSRPSCSCLGSG   |
| 107       | 抗 EMCN-CD8 铰链 -LAIR1 TM-LAIR1 iCAR   | MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLKESGPGLVQPS<br>QTLSTCTVSGFSLSRYSRDMHWVRQPPGQGLEWMG<br>VIWGNGNTHYHSALKSRLSISRDTSKSQVFLKMNSL<br>QTEDTAIFYCTLRIKDWGPGTMVTVSSGGGGSGGG  |

[0632]

[0633]

|     |  |  |
|-----|--|--|
|     |  | GSGGGGSDIVMTQTTPPSLSVALGQSVSISCKSSQSLV<br>ASDENTYLNWLLQSPGRSPKRLIYQVSKLDSGVPDR<br>FSGSGSEKDFTLKISRVEAEDLGVYYCLQGIHLPWT<br>FGGGTKLELKGKPIPNNLLGLDSTNGAATTTTPAPRPP<br>TPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI<br>LIGVSVVFLFCLLLLVLFLHRQNQIKQGPPRSKDEE<br>QKPQQRPD LAVDVLERTADKATVNGLPKEDRETDT<br>SALAAGSSQEVTYAQLDHWALTQRTARAVSPQSTK<br>PMAESITYAAVARH   |
| 108 | 抗 EMCN-CD8<br>铰链 -LIR2<br>TM-LIR2 iCAR | MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLKESGPGLVQPS<br>QTLSLTCTVSGFSLSRYDMHWVRQPPGQGLEWMG<br>VIWGNGNTHYHSALKSRLSISRDTSKSQVFLKMNSL<br>QTEDTAIFYCTLRIKDWGPGTMVTVSSGGGGSSGGG<br>GSGGGGSDIVMTQTTPPSLSVALGQSVSISCKSSQSLV<br>ASDENTYLNWLLQSPGRSPKRLIYQVSKLDSGVPDR<br>FSGSGSEKDFTLKISRVEAEDLGVYYCLQGIHLPWT<br>FGGGTKLELKGKPIPNNLLGLDSTNGAATTTTPAPRPP<br>TPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD<br>VIGILVAVVLLLLLLLLLFLILRHRQGHWTSTQRK<br>ADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPAADAQEENLY<br>AAVKDTQPEDGVEMDTRAAASEAPQDVTYAQLHS<br>LTLRRKATEPPPSQEREPPAEPsiyatLAIH  |
| 109 | 抗 EMCN-CD8<br>铰链 -LIR3<br>TM-LIR3 iCAR | MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLKESGPGLVQPS<br>QTLSLTCTVSGFSLSRYDMHWVRQPPGQGLEWMG<br>VIWGNGNTHYHSALKSRLSISRDTSKSQVFLKMNSL<br>QTEDTAIFYCTLRIKDWGPGTMVTVSSGGGGSSGGG<br>GSGGGGSDIVMTQTTPPSLSVALGQSVSISCKSSQSLV<br>ASDENTYLNWLLQSPGRSPKRLIYQVSKLDSGVPDR<br>FSGSGSEKDFTLKISRVEAEDLGVYYCLQGIHLPWT<br>FGGGTKLELKGKPIPNNLLGLDSTNGAATTTTPAPRPP<br>TPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD<br>VLIGVSVAFVLLFLLFLLRRQRHSHKRTSDQRK<br>TDFQRPAGAAETEPKDRGLLRSSPAADVQEENLY<br>AAVKDTQSEDRVELDSQSPHDEDPQAVTYAPVKHS<br>SPRREMASPPSSLSGEFLDTKDRQVEEDRQMDTEAA<br>ASEASQDVTYAQLHSLTLRRKATEPPPSQEGEPPAE<br>PSIYATLAIH |
| 110 | 抗 EMCN-CD8<br>铰链 -LIR5<br>TM-LIR5 iCAR | MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLKESGPGLVQPS<br>QTLSLTCTVSGFSLSRYDMHWVRQPPGQGLEWMG<br>VIWGNGNTHYHSALKSRLSISRDTSKSQVFLKMNSL<br>QTEDTAIFYCTLRIKDWGPGTMVTVSSGGGGSSGGG<br>GSGGGGSDIVMTQTTPPSLSVALGQSVSISCKSSQSLV<br>ASDENTYLNWLLQSPGRSPKRLIYQVSKLDSGVPDR<br>FSGSGSEKDFTLKISRVEAEDLGVYYCLQGIHLPWT<br>FGGGTKLELKGKPIPNNLLGLDSTNGAATTTTPAPRPP<br>TPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD<br>VLIGVLVVSILLSSLLFLLLQHWRQGHRTLAQRQ<br>ADFQRPPGAAEPEPKDGGLQRRSSPAADVQGENFC<br>AAVKNTQPEDGVEMDTRQSPHDEDPQAVTYAKVK<br>HSRPRREMASPPSPLSGEFLDTKDRQAEEDRQMDTE  |

|     |  |  |
|-----|--|--|
|     |  | AAASEAPQDVTYAQLHSFTLRQKATEPPPSQEGASP<br>AEPSVYATLAIH   |
| 111 | 抗 EMCN-CD8<br>铰链-SIGLEC-2<br>TM- SIGLEC-2<br>iCAR          | MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLKESGPGLVQPS<br>QTLSTCTVSGFSLSRYDMHWVRQPPGQGLEWMG<br>VIWNGNTHYHSALKSRLSISRDTSKSQVFLKMNSL<br>QTEDTAIFYCTLRKDWGPGTMVTVSSGGGGSGGG<br>GSGGGGSDIVMTQTPPSLSVALGQSVSISCKSSQSLV<br>ASDENTYLNWLLQSPGRSPKRLIYQVSKLDSGVPDR<br>FSGSGSEKDFTLKISRVEAEDLGVYYCLQGIHLPWT<br>FGGGTKLELKGKPIPNNLLGLDSTNGAATTTTPAPRPP<br>TPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD<br>VAVGLGSCLAAILAICGLKLQRRWKRTQSQQGLQE<br>NSSGQSFVVRNKKVRRAPLSEGPLSLGCYNPMMED<br>GISYTTLRFPEMNIPRTGDAESSEMQRPPPCDDT VT<br>YSALHKRQVGDYENVIPDFPEDEGIHYSELIQFGVG<br>ERPQAQENVVYVILKH   |
| 112 | 抗 EMCN-CD8<br>铰链<br>-SIGLEC-10<br>TM-<br>SIGLEC-10<br>iCAR | MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLKESGPGLVQPS<br>QTLSTCTVSGFSLSRYDMHWVRQPPGQGLEWMG<br>VIWNGNTHYHSALKSRLSISRDTSKSQVFLKMNSL<br>QTEDTAIFYCTLRKDWGPGTMVTVSSGGGGSGGG<br>GSGGGGSDIVMTQTPPSLSVALGQSVSISCKSSQSLV<br>ASDENTYLNWLLQSPGRSPKRLIYQVSKLDSGVPDR<br>FSGSGSEKDFTLKISRVEAEDLGVYYCLQGIHLPWT<br>FGGGTKLELKGKPIPNNLLGLDSTNGAATTTTPAPRPP<br>TPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD<br>GAFLGIGITALLFLCLALIIMKILPKRRTQTETPRPRFS<br>RHSTILDYINVVPTAGPLAQKRNOKATPNSPRTPLPP<br>GAPSPESKKNQKKQYQLPSFPEPKSSTQAPESQESQE<br>ELHYATLNFPGVVRPRPEARMPKGTQADYAEVKFQ  |
| 113 | 具有 (G4S) <sub>3</sub> 接<br>头的抗 EMCN<br>scFv 核苷酸序<br>列      | CAGGTGCAGCTGAAAGAGTCTGGACCTGGACTGG<br>TGCAGCCCAGCCAAACACTGAGCCTGACCTGTAC<br>CGTGTCCGGCTTCAGCCTGAGCAGATACGACATG<br>CACTGGGTCCGACAGCCTCCAGGACAAGGCTTGG<br>AATGGATGGGCGTGATCTGGGGCAACGGCAACAC<br>ACACTATCACAGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGAGC<br>ATCAGCAGAGATACCAGCAAGAGCCAGGTGTTCC<br>TGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGAGGACACCGC<br>CATCTATTTCTGCACCCTGCGGATCAAGGATTGGG<br>GCCCTGGCACAATGGTCACCGTTTCTAGCGGAGG<br>CGGAGGATCTGGTGGCGGAGGAAGTGGCGGAGG<br>CGGTTCTGATATCGTGATGACCCAGACACCTCCTA<br>GCCTGTCTGTGGCTCTGGGCCAGTCTGTGTCCATC<br>AGCTGCAAGAGCAGCCAGAGCCTGGTGGCCTCCG<br>ACGAGAACACCTACCTGAATTGGCTGCTGCAGAG<br>CCCCGGCAGAAGCCCCAAGAGACTGATCTACCAG<br>GTGTCCAAGCTGGACAGCGGCGTGCCCGATAGAT<br>TTTCTGGCAGCGGCAGCGAGAAGGACTTCACCCT<br>GAAGATCTCCAGAGTGGAAGCCGAGGACCTGGGC<br>GTGTACTACTGTCTGCAAGGCATCCATCTGCCTTG<br>GACCTTTGGAGGCGGCACAAAGCTGGAAGTAAA |

[0634]

|     |   |   |
|-----|---|---|
| 114 | 抗 FLT3 scFv   | EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISW<br>VRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITA<br>DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCATFALFGFREQA<br>FDIWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQ<br>SPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGK<br>APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLQP<br>EDLATYYCQQSYSTPFTFGPGTKVDIK   |
| 115 | 抗 FLT3-CD28/<br>CD3 $\zeta$ aCAR<br>(IgK 信号序列<br>粗体 ;<br>AGGS-Flag 斜<br>体)        | <b>METDTLLLWVLLLWVPGSTGAGGSDYKDDDDKG</b><br>GSEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAI<br>SWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTI<br>TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCATFALGFRE<br>QAFDIWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQM<br>TQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPG<br>KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLQ<br>PEDLATYYCQQSYSTPFTFGPGTKVDIKTTTPAPRPP<br>TPAPTIALQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD<br>FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSLRH<br>SDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVK<br>FRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDR<br>RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS<br>EIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHM<br>QALPPR   |
| 116 | SS (IgK)-Flag-<br>抗<br>FLT3-CD28/CD<br>3 $\zeta$ aCAR 核苷酸<br>序列 (Kozak 粗<br>体且斜体) | <b>GCCGCCACCATGGAACCGACACACTGCTGCTGT</b><br>GGGTGCTGCTTCTTTGGGTGCCCGGATCTACAGGT<br>GCCGGCGGAAGCGACTACAAGGACGACGATGAC<br>AAAGGCGGCAGCGAGGTTCAACTGGTACAAAGC<br>GGAGCCGAGGTAAAGAAACCAGGGAGTAGCGTC<br>AAAGTGTCCTGCAAAGCCTCAGGCGGCACATTCA<br>GTAGCTATGCTATTTTCATGGGTACGCCAAGCACC<br>AGGACAGGGGCTGGAGTGGATGGGCGGGATTATC<br>CCCATCTTCGGTACGGCAAACCTATGCACAAAAGT<br>TCCAGGGACGAGTCACCATCACGGCTGATAAGTC<br>CACCTCCACCGCCTATATGGAGCTGAGTTCCCTTC<br>GGAGCGAGGATACTGCTGTGTATTATTGTGCCAC<br>GTTTCGCACTGTTTCGGTTTTTCGGGAGCAGGCGTTTG<br>ATATTTGGGGACAAGGCACAACGGTCACGGTCAG<br>TTCAGGCGGAGGGGGATCAGGGGGTGGGGGGTC<br>AGGTGGCGGTGGAAGTGACATTCAGATGACCCAG<br>AGTCCCTCTTCATTGAGTGCGAGCGTCGGTGATCG<br>GGTTACGATAACCTGTAGGGCCTCCCAAAGTATA<br>TCATCATATTTGAACTGGTACCAACAGAAACCTG<br>GGAAAGCGCCGAAGCTCCTTATCTATGCTGCCAG<br>CTCTTTGCAAAGCGGTGTGCCCTCACGGTTCTCCG<br>GTAGTGGGTCCGGACCGACTTCACTTTGACCAT<br>CAGCAGCCTTCAGCCAGAGGATCTTGCCACTTATT<br>ACTGCCAGCAATCTTATAGCACACCGTTTACATTC<br>GGTCCAGGCACAAAGGTAGACATTAAGACCACCA<br>CACCAGCTCCTAGACCTCCAACCTCCTGCTCCTACA<br>ATCGCCCTGCAGCCACTGAGTCTGAGGCCAGAGG<br>CTTGTAGACCTGCTGCAGGCGGAGCCGTGCATAC |

[0635]

|        |   |
|--------|---|
| [0636] | <pre> AAGAGGACTGGATTTTCGCCTGCGACTTCTGGGTG CTCGTGGTTGTTGGCGGAGTGCTGGCCTGTTACAG CCTGCTGGTTACCGTGGCCTTCATCATCTTTTGGG TCCGAAGCAAGCGGAGCCGGCTGCTGCACAGCGA TTACATGAACATGACCCCTCGGAGGCCCGGACCT ACCAGAAAGCACTACCAGCCTTACGCTCCTCCTA GAGATTTTCGCCGCCTACCGGTCCAGAGTGAAGTT CAGCAGATCCGCCGATGCTCCCGCCTATAAGCAG GGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGG GGAGAAGAGAAGAGTACGACGTGCTGGACAAGC GGAGAGGCAGAGATCCTGAAATGGGCGGCAAGC CCAGACGGAAGAATCCTCAAGAGGGCCTGTATAA TGAGCTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTAC AGCGAGATCGGAATGAAGGGCGAGCGCAGAAGA GGCAAGGGACACGATGGACTGTACCAGGGACTG AGCACCGCCACCAAGGATACCTATGACGCCCTGC ACATGCAGGCCCTGCCTCCAAGATAA </pre> |
|--------|---|

[0637] 结果

[0638] NK细胞经工程改造以表达活化嵌合受体 (aCAR) 和具有各种抑制性域形式的抑制性嵌合受体 (iCAR), 所述抑制性域形式衍生自不同的抑制性受体。用仅aCAR或其与具有各种所指示的抑制性域的iCAR的组合对NK细胞进行病毒转导。

[0639] 评估工程改造的NK细胞的CAR表达。如图3中所示, 在aCAR+iCAR+NK细胞(上图)中, 抗FLT3 aCAR表达通常高于背景大于10倍, 且抗EMCN iCAR表达通常大于100倍。LIR家族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)且表明总群体含有少于5% aCAR+iCAR-细胞且对于各种iCAR形式具有不同百分比的aCAR+iCAR+群体, 其中KLRG1、LIR2、LIR3、LIR5和SIGLEC-2形式始终具有大于50% aCAR+iCAR+细胞。再次, 相对于其他构建体, LIR家族iCAR通常明显展示出较大比例的aCAR+iCAR+细胞。

[0640] 接下来, 评估了抗FLT3 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抗EMCN iCAR减少。确定靶SEM细胞中的每一者单独地 (“单独”: 仅aCAR抗原FLT3 SEM细胞和共表达aCAR/iCAR抗原FLT3/EMCN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况下 (“混合的”: 仅aCAR抗原FLT3 SEM细胞和共表达aCAR/iCAR抗原FLT3/EMCN的SEM细胞一起在同一培养物中) 的减少。如图4中所示, 表达LIR2、LIR3、LIR5、KIR2DL1、LAIR1和SIGLEC-2抗EMCN iCAR形式的NK细胞展现出一致的aCAR介导的杀伤性能(上图)和iCAR介导的杀伤(上图)和细胞因子减少(下图)的保护, SIGLEC-10和KLRG1构建体的性能改变较大。

[0641] 结果表明, NK细胞成功地经工程改造以共表达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, 且各种iCAR形式以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。

[0642] 以引用的方式并入

[0643] 本申请中所引用的所有公开案、专利、专利申请和其他文件出于所有目的据此以引用的方式整体并入, 其程度如同各个别公开案、专利、专利申请或其他文件出于所有目的个别地经指出以引用的方式并入。

[0644] 等效物

[0645] 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,可在不背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将变得显而易见。

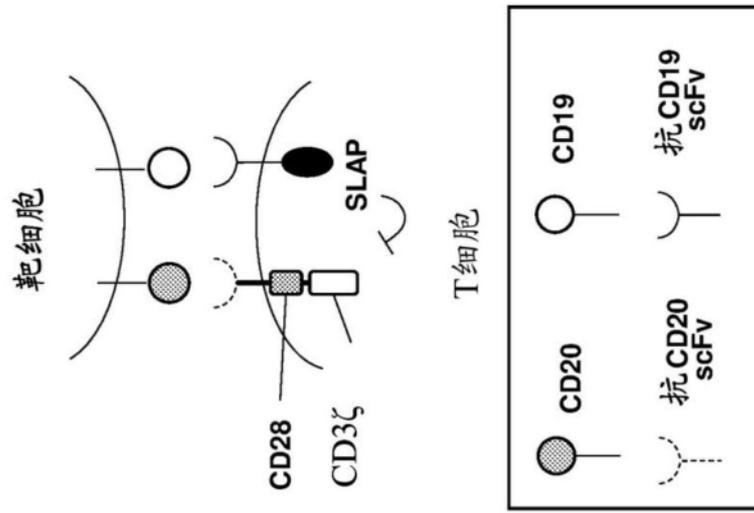


图1A

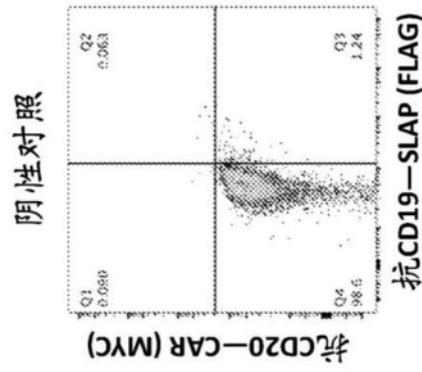


图1B

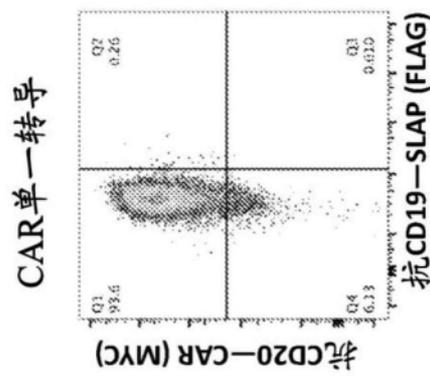


图1C

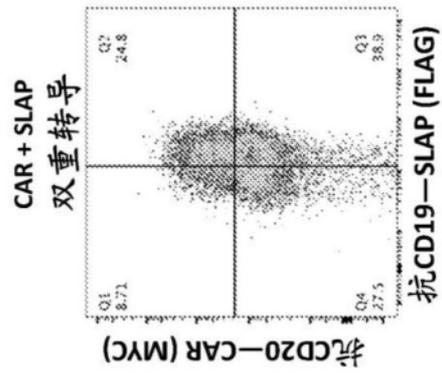


图1D

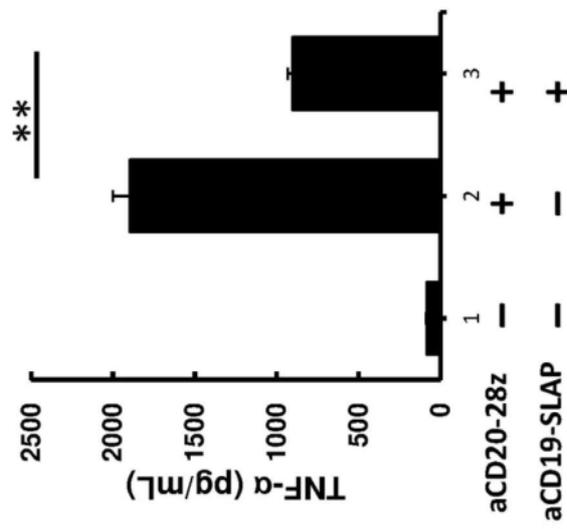


图2A

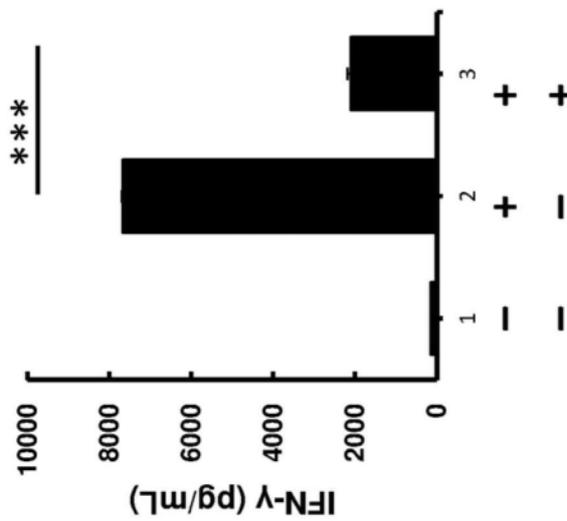


图2B

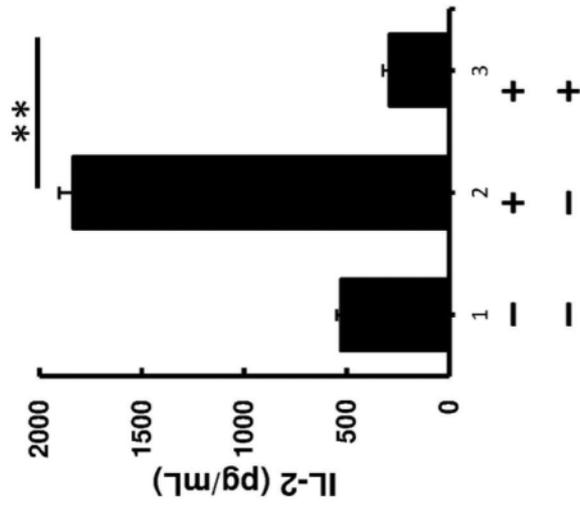


图2C

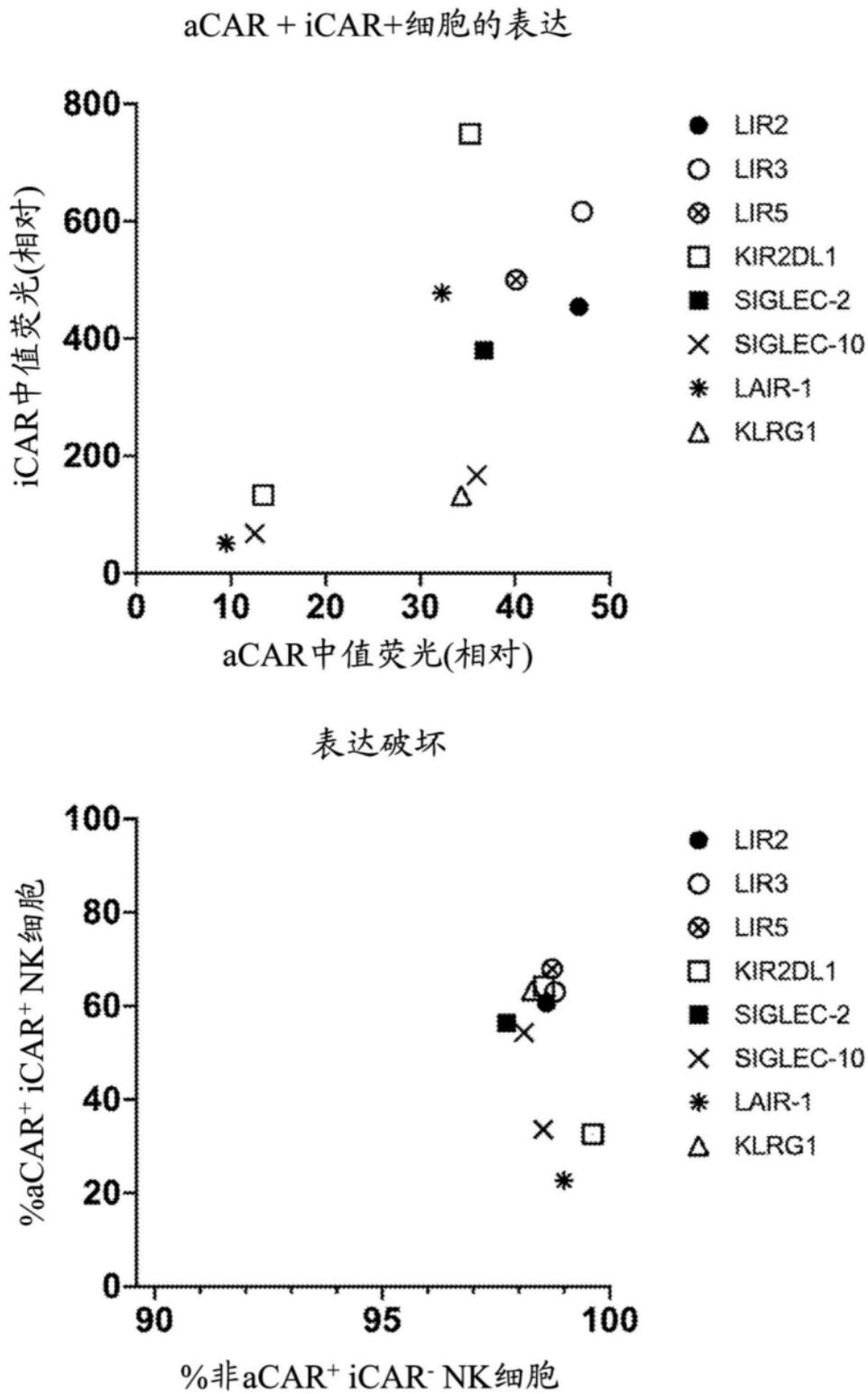


图3

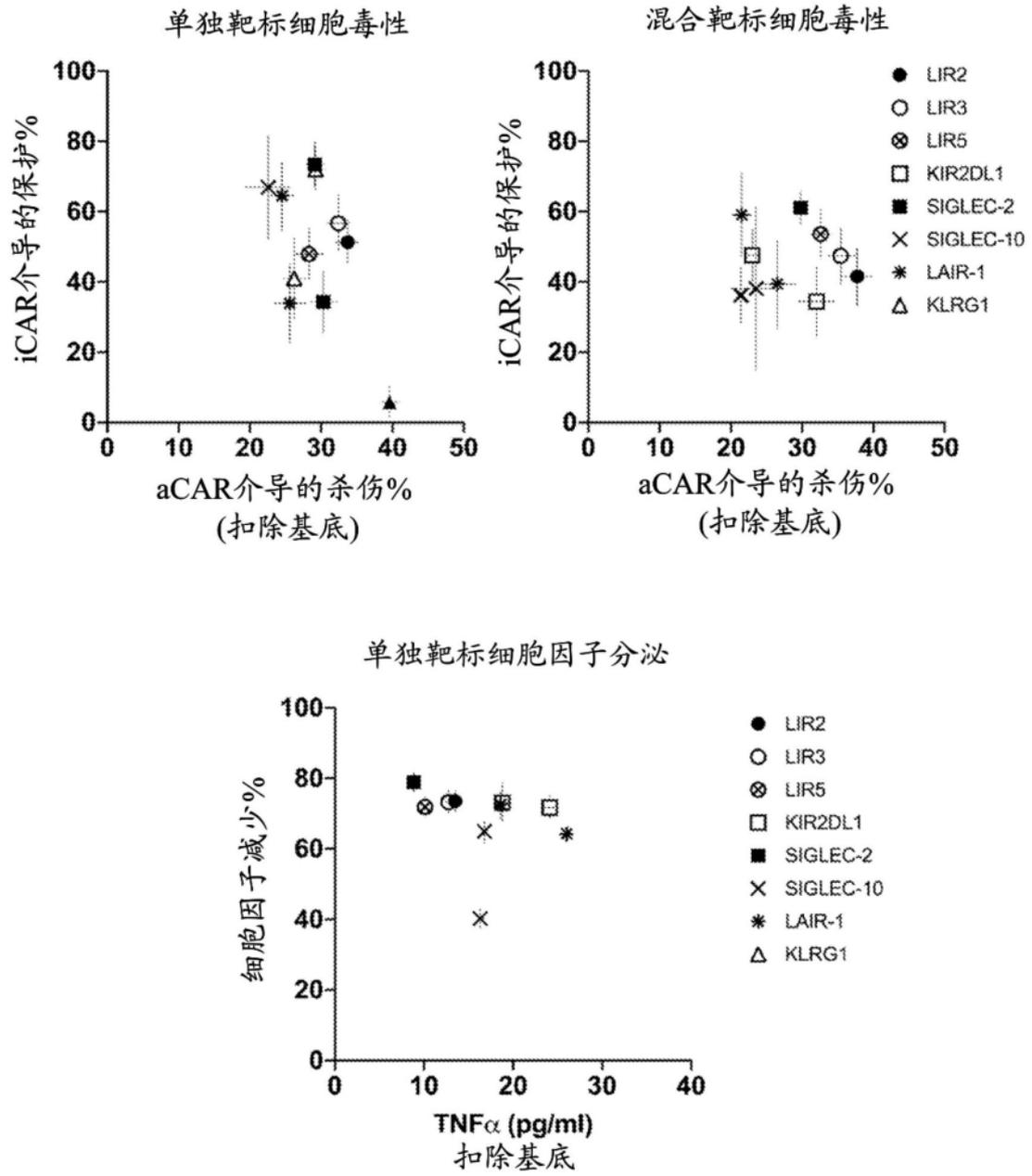


图4