



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 117396214 A

(43) 申请公布日 2024.01.12

(21) 申请号 202280037637.0

(22) 申请日 2022.03.25

(30) 优先权数据

63/166,073 2021.03.25 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.11.24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/021877 2022.03.25

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/204474 EN 2022.09.29

(71) 申请人 宾夕法尼亚大学董事会

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 L·R·约翰逊 A·米恩

C·H·祝恩

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

专利代理师 张全信

(51) Int.Cl.

A61K 35/17 (2006.01)

权利要求书5页 说明书68页

序列表14页 附图44页

(54) 发明名称

合成肽治疗剂的CAR-T递送

(57) 摘要

本公开内容提供了包含嵌合抗原受体 (CAR) 和治疗性肽的工程细胞 (如T细胞) 及其使用方法。

1. 一种工程细胞,其包含嵌合抗原受体 (CAR) 和治疗性肽,其中所述CAR包含抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内结构域,并且其中所述治疗性肽是非天然治疗性肽;其中所述CAR分子和所述治疗性肽由同一表达构建体表达。

2. 一种工程细胞,其包含嵌合抗原受体 (CAR) 和治疗性肽,其中所述CAR包含抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内结构域,并且其中所述治疗性肽是非天然治疗性肽,其中所述治疗性肽具有以下一种或多种特性:

(i) 所述治疗性肽是干扰素基因刺激因子 (STING) 通路的激活剂,

(ii) 所述治疗性肽是环状二核苷酸的模拟物,

(iii) 所述治疗性肽是短链脂肪酸 (SCFA) 的模拟物,

(iv) 所述治疗性肽是模式识别受体 (PRR) 的激动剂,

(v) 所述治疗性肽是类固醇/激素样分子的模拟物,

(vi) 所述治疗性肽促进靶细胞的凋亡,

(vii) 所述治疗性肽是免疫原性表位,和/或

(viii) 所述治疗性肽阻断靶细胞中DNA修复的一种或多种机制。

3. 根据权利要求1或2所述的工程细胞,其中所述治疗性肽是cGAMP、cAMP或cGMP的模拟物。

4. 根据权利要求1或2所述的工程细胞,其中所述治疗性肽是TLR激动剂的模拟物。

5. 根据权利要求4所述的工程细胞,其中所述治疗性肽是鞭毛蛋白、CpG基序、肽聚糖、脂多糖 (LPS) 或单磷酸脂质A (MPL) 的模拟物。

6. 根据权利要求1或权利要求2所述的工程细胞,其中所述治疗性肽为第二线粒体源性胱天蛋白酶激活因子 (SMAC) 模拟物。

7. 根据权利要求1或权利要求2所述的工程细胞,其中所述治疗性肽是聚ADP核糖聚合酶 (PARP) 的抑制剂。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的工程细胞,其中所述非天然肽是与天然发生肽具有不超过90%序列同一性的肽。

9. 根据权利要求1-7中任一项所述的工程细胞,其中所述非天然肽是与天然发生肽具有不超过80%序列同一性的肽。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的工程细胞,其中所述肽包含选自SEQ ID NO:1-16的氨基酸序列。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述的工程细胞,其中所述治疗性肽在细胞外囊泡中从所述工程细胞中输出。

12. 根据权利要求1-11中任一项所述的工程细胞,其中所述治疗性肽是与G蛋白偶联受体 (GPCR) 结合的SCFA的模拟物。

13. 根据权利要求1-12中任一项所述的工程细胞,其中所述靶细胞是肿瘤细胞。

14. 根据权利要求1-13中任一项所述的工程细胞,其中所述工程细胞是T细胞或NK细胞。

15. 根据权利要求1-14中任一项所述的工程细胞,其中所述抗原结合结构域选自抗体、抗原结合片段 (Fab) 和单链可变片段 (scFv)。

16. 根据权利要求1-14中任一项所述的工程细胞,其中所述结合结构域是T细胞受体

(TCR)。

17. 根据权利要求1-16中任一项所述的工程细胞,其中所述靶抗原选自CD19、CD20、CD22、BCMA、CD123、CD133、EGFR、EGFRvIII、间皮素、Her2、PSMA、CEA、GD2、IL-13Ra2、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3、CIAX、LI-CAM、CA 125、CTAG1B、粘蛋白1和叶酸受体- α 。

18. 根据权利要求17所述的工程细胞,其中所述靶抗原在肠细胞上表达。

19. 根据权利要求1-18中任一项所述的工程细胞,其中所述跨膜结构域是选自CD8 α 、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD28和ICOS的蛋白质的跨膜结构域。

20. 根据权利要求1-19中任一项所述的工程细胞,其中所述胞内信号传导结构域包括选自CD3 ζ 、TCR ζ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 或ICOS的蛋白质的功能性信号传导结构域。

21. 根据权利要求1-19中任一项所述的工程细胞,其中所述胞内信号传导结构域包括功能性信号传导结构域,并且进一步包括共刺激结构域,其中所述共刺激结构域包括来自4-1BB或CD28的功能性信号传导结构域。

22. 根据权利要求1-21中任一项所述的工程细胞,其中所述CAR包含抗CD19 scFv、CD8 α 跨膜结构域、4-1BB共刺激结构域和CD3 ζ 信号结构域。

23. 根据权利要求1-13中任一项所述的工程细胞,其中所述治疗性肽是SCFA模拟物或是类固醇和/或激素样分子的模拟物,并且其中所述工程细胞已被进一步修饰以降低一种或多种效应器功能的活性。

24. 根据权利要求23所述的工程细胞,其中所述工程细胞已被修饰以减少或阻止一种或多种炎性细胞因子的表达、颗粒酶B的表达或穿孔素的表达。

25. 根据权利要求1-24中任一项所述的工程细胞,其中所述CAR分子和所述治疗性肽由相同的表达构建体表达,并且其中所述表达构建体进一步包含激活PRR的RNA分子。

26. 根据权利要求25所述的工程细胞,其中所述RNA分子为7SL。

27. 一种组合物,其包含权利要求1-26中任一项所述的工程细胞。

28. 编码(i)嵌合抗原受体(CAR)和(ii)治疗性肽的核酸分子,所述CAR包含抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内信号传导结构域,其中所述治疗性肽是非天然肽。

29. 根据权利要求28所述的核酸分子,其中终止密码子将编码所述CAR的核酸片段与编码所述治疗性肽的核酸片段分开。

30. 根据权利要求28或权利要求29所述的核酸分子,其中由所述核酸分子编码的治疗性肽具有以下一种或多种性质:

- (i) 所述治疗性肽是干扰素基因刺激因子(STING)通路的激活剂,
- (ii) 所述治疗性肽是环状二核苷酸的模拟物,
- (iii) 所述治疗性肽是短链脂肪酸(SCFA)的模拟物,
- (iv) 所述治疗性肽是模式识别受体(PRR)的激动剂,
- (v) 所述治疗性肽是类固醇/激素样分子的模拟物,
- (vi) 所述治疗性肽促进靶细胞的凋亡,
- (vii) 所述治疗性肽是免疫原性表位,和/或
- (viii) 所述治疗性肽阻断所述靶细胞中DNA修复的一种或多种机制。

31. 根据权利要求30所述的核酸分子,其中所述治疗性肽是cGAMP、cAMP或cGMP的模拟物。

32. 根据权利要求30所述的核酸分子,其中所述治疗性肽是TLR激动剂的模拟物。
33. 根据权利要求32的核酸分子,其中所述治疗性肽是鞭毛蛋白、CpG基序、肽聚糖、脂多糖(LPS)或单磷酸脂质A(MPL)的模拟物。
34. 根据权利要求30所述的核酸分子,其中所述治疗性肽是第二线粒体源性胱天蛋白酶激活因子(SMAC)模拟物。
35. 根据权利要求30所述的核酸分子,其中所述治疗性肽是聚ADP核糖聚合酶(PARP)的抑制剂。
36. 根据权利要求28-35中任一项所述的核酸分子,其中编码所述非天然肽的核酸与编码天然发生肽的核酸具有不超过80%的序列同一性。
37. 根据权利要求28-36中任一项所述的核酸分子,其中所述靶细胞是肿瘤细胞。
38. 根据权利要求28-37中任一项所述的核酸分子,其中由所述核酸分子编码的所述抗原结合结构域选自抗体、Fab和scFv。
39. 根据权利要求28-37中任一项所述的核酸分子,其中由所述核酸分子编码的所述结合结构域是TCR。
40. 根据权利要求28-39中任一项所述的核酸分子,其中由所述核酸分子编码的所述结合结构域结合靶抗原,所述靶抗原选自CD19、CD20、CD22、BCMA、CD123、CD133、EGFR、EGFRvIII、间皮素、Her2、PSMA、CEA、GD2、IL-13Ra2、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3、CIAX、LI-CAM、CA 125、CTAG1B、粘蛋白1和叶酸受体- α 。
41. 根据权利要求28-40中任一项所述的核酸分子,其中由所述核酸分子编码的所述跨膜结构域是来自选自CD8 α 、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD28和ICOS的蛋白质的跨膜结构域。
42. 根据权利要求28-41中任一项所述的核酸分子,其中由所述核酸分子编码的所述胞内信号传导结构域包括选自CD3 ζ 、TCR ζ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 或ICOS的蛋白质的功能性信号传导结构域。
43. 根据权利要求28-42中任一项所述的核酸分子,其中由所述核酸分子编码的所述胞内信号传导结构域包含功能性信号传导结构域,并且进一步包含共刺激结构域,其中所述共刺激结构域包含来自4-1BB或CD28的功能性信号传导结构域。
44. 根据权利要求28-43中任一项所述的核酸分子,其中所述核酸分子编码CAR分子,所述CAR分子包含抗CD19 scFv、CD8 α 跨膜结构域、4-1BB共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域。
45. 根据权利要求28-44中任一项所述的核酸分子,其进一步包含激活PRR的RNA分子。
46. 根据权利要求45所述的工程细胞,其中所述RNA分子是7SL。
47. 一种表达载体,其包含根据权利要求28-46中任一项所述的核酸分子。
48. 一种在细胞中共表达CAR和治疗性肽的方法,所述方法包括在使所述CAR和所述治疗性肽表达的条件下,将根据权利要求47所述的表达载体递送至所述细胞。
49. 一种细胞,其包含根据权利要求28-45中任一项所述的核酸分子或根据权利要求47所述的表达载体。
50. 一种治疗受试者中的疾病或紊乱的方法,其包括向所述受试者施用有效量的基因修饰以表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞,其中所述CAR包含抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内信号传导结构域,并且其中所述方法进一步包括通过非天然治疗性肽刺激针对癌症的

内源性免疫应答,其中所述非天然治疗性肽在所修饰的T细胞中表达和/或与所修饰的T细胞联合施用,并且其中所述非天然治疗性肽具有以下一种或多种性质:

- (i) 所述治疗性肽是干扰素基因刺激因子 (STING) 通路的激活剂,
- (ii) 所述治疗性肽是环状二核苷酸的模拟物,
- (iii) 所述治疗性肽是短链脂肪酸 (SCFA) 的模拟物,
- (iv) 所述治疗性肽是模式识别受体 (PRR) 的激动剂,
- (v) 所述治疗性肽是类固醇/激素样分子的模拟物,
- (vi) 所述治疗性肽促进所述靶细胞的凋亡,
- (vii) 所述治疗性肽是免疫原性表位,和/或
- (viii) 所述治疗性肽阻断所述靶细胞中DNA修复的一种或多种机制。

51. 根据权利要求50所述的方法,其中所述治疗性肽是cGAMP、cAMP或cGMP的模拟物。

52. 根据权利要求50所述的方法,其中所述治疗性肽是TLR激动剂的模拟物。

53. 根据权利要求50的方法,其中所述治疗性肽是鞭毛蛋白、CpG基序、肽聚糖、脂多糖 (LPS) 或单磷酸脂质A (MPL) 的模拟物。

54. 根据权利要求50所述的方法,其中所述治疗性肽是第二线粒体源性胱天蛋白酶激活因子 (SMAC) 模拟物。

55. 根据权利要求50所述的方法,其中所述治疗性肽是聚ADP核糖聚合酶 (PARP) 的抑制剂。

56. 根据权利要求50的方法,其中所述非天然肽是与任何天然发生肽具有不超过80% 序列同一性的肽。

57. 根据权利要求50所述的方法,其中所述肽包含选自SEQ ID NO:1-16的氨基酸序列。

58. 根据权利要求50所述的方法,其中所述治疗性肽是免疫原性表位,并且其中在施用至所述受试者之后,所述免疫原性表位在所述受试者中的癌细胞的表面上表达。

59. 根据权利要求51-58中任一项所述的方法,其中所述治疗性肽在所修饰的T细胞中表达,其中在将所述修饰的T细胞施用至所述受试者后,所述治疗性肽在一个或多个胞外囊泡中从所述修饰的T细胞中输出。

60. 根据权利要求59所述的方法,其中所述治疗性肽经由所述一个或多个胞外囊泡递送至所述受试者中的一个或多个抗原呈递细胞。

61. 一种增强基因修饰以表达嵌合抗原受体 (CAR) 的T细胞的抗癌活性的方法,其中所述CAR包括抗原结合结构域、跨膜结构域和信号传导结构域,所述抗原结合结构域特异性结合在肿瘤细胞上表达的抗原,其中所述方法包括在所述T细胞中共表达非天然治疗性肽,并且其中所述非天然治疗性肽具有以下一种或多种性质:

- (i) 所述治疗性肽是干扰素基因刺激因子 (STING) 通路的激活剂,
- (ii) 所述治疗性肽是环状二核苷酸的模拟物,
- (iii) 所述治疗性肽是短链脂肪酸 (SCFA) 的模拟物,
- (iv) 所述治疗性肽是模式识别受体 (PRR) 的激动剂,
- (v) 所述治疗性肽是类固醇/激素样分子的模拟物,
- (vi) 所述治疗性肽促进所述靶细胞的凋亡,
- (vii) 所述治疗性肽是免疫原性表位,和/或

(viii) 所述治疗性肽阻断所述靶细胞中DNA修复的一种或多种机制。

62. 一种用于治疗受试者中的炎性疾病、自身免疫性疾病或癌症的方法,其包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求1-26中任一项所述的工程细胞或根据权利要求27所述的组合物或权利要求49所述的细胞。

63. 根据权利要求50-61中任一项所述的方法,其中所述癌症是实体瘤癌症。

64. 根据权利要求63所述的方法,其中所述癌症选自肺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、间皮瘤、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、输卵管癌、宫颈癌、前列腺癌、结直肠癌、胃癌、膀胱癌、食管癌和黑色素瘤。

65. 根据权利要求50-61中任一项所述的方法,其中所述癌症是血液学癌症。

66. 根据权利要求65所述的方法,其中所述血液学癌症是白血病或淋巴瘤。

67. 根据权利要求65所述的方法,其中所述血液学癌症选自慢性淋巴细胞白血病(CLL)、套细胞淋巴瘤(MCL)多发性骨髓瘤、急性淋巴细胞白血病(ALL)、霍奇金淋巴瘤、B细胞急性淋巴细胞白血病(BALL)、T细胞急性淋巴细胞白血病(TALL)、小淋巴细胞白血病(SLL)、急性髓细胞白血病(AML)、B细胞前淋巴细胞白血病、母细胞浆细胞样树突状细胞肿瘤、伯基特淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、慢性粒细胞白血病、骨髓增生性肿瘤、滤泡性淋巴瘤、儿童滤泡性淋巴瘤、毛细胞白血病、小细胞或大细胞滤泡性淋巴瘤、恶性淋巴增生性疾病、MALT淋巴瘤(粘膜相关淋巴组织的结外边缘区淋巴瘤)、边缘区淋巴瘤、骨髓发育不良、骨髓增生异常综合征、非霍奇金淋巴瘤、浆母细胞淋巴瘤、浆细胞样树突状细胞肿瘤、Waldenstrom巨球蛋白血症、脾边缘区淋巴瘤、淋巴浆细胞淋巴瘤和浆细胞骨髓瘤。

68. 根据权利要求62所述的方法,其中所述自身免疫性疾病是炎性肠病。

合成肽治疗剂的CAR-T递送

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 根据35U.S.C. §119(e), 本申请享有2021年3月25日提交的美国临时专利申请号63/166,073的优先权, 在此通过引用以其全部并入本文。

[0003] 关于联邦政府赞助的研究或开发的声明

[0004] 本发明是在美国国立卫生研究院颁发的CA228455号文件的政府支持下完成的。政府对本发明享有某些权利。

背景技术

[0005] 嵌合抗原受体T细胞 (CAR-T) 在液态恶性肿瘤中显示出巨大的潜力, 但迄今为止对实体瘤的反应还很有限。同样, 生物活性肽治疗剂也在体外和体内显示出良好的临床前活性, 但尚未显示出显著的临床益处。这两种疗法都面临着不同的障碍, 难以在更大的患者群体中发挥作用。在诸如CAR-T等过继细胞疗法 (ACT) 的情况下, 各种局部肿瘤内在免疫抑制机制限制了其抗肿瘤疗效。同样, 肽治疗剂的高效递送和定位也被证明是一个重大障碍。

[0006] 本领域需要能增强抗肿瘤活性的改进型CAR-T疗法。本发明可满足这一需求。

发明内容

[0007] 在一个方面, 本公开内容提供了一种工程细胞, 其包括嵌合抗原受体 (CAR) 和治疗性肽。CAR包括抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内结构域。治疗性肽是非天然治疗性肽, 并且CAR分子和治疗性肽由相同的表达构建体表达。

[0008] 在另一个方面, 本公开内容提供了一种包含嵌合抗原受体 (CAR) 和治疗性肽的工程细胞。CAR包括抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内结构域, 治疗性肽是非天然治疗性肽。治疗性肽具有以下一种或多种性质: (i) 治疗性肽是干扰素基因刺激因子 (STING) 通路的激活剂; (ii) 治疗性肽是环状二核苷酸的模拟物; (iii) 治疗性肽是短链脂肪酸 (SCFA) 的模拟物; (iv) 治疗性肽是模式识别受体 (PRR) 的激动剂, (v) 治疗性肽是类固醇/激素样分子的模拟物, (vi) 治疗性肽促进靶细胞凋亡, (vii) 治疗性肽是免疫原表位, 和/或 (viii) 治疗性肽阻断靶细胞中DNA修复的一种或多种机制。

[0009] 在某些实施方式中, 治疗性肽是cGAMP、cAMP或cGMP的模拟物。在某些实施方式中, 治疗性肽是TLR激动剂的模拟物。在某些实施方式中, 治疗性肽是鞭毛蛋白、CpG基序、肽聚糖、脂多糖 (LPS) 或单磷酸脂质A (MPL) 的模拟物。在某些实施方式中, 治疗性肽是第二线粒体源性胱天蛋白酶激活因子 (SMAC) 模拟物。在某些实施方式中, 治疗性肽是聚ADP核糖聚合酶 (PARP) 的抑制剂。

[0010] 在某些实施方式中, 非天然肽是与天然发生肽的序列同一性不超过90%的肽。在某些实施方式中, 非天然肽是与天然肽的序列同一性不超过80%的多肽。在某些实施方式中, 所述肽包含选自SEQ ID NO:1-16的氨基酸序列。

[0011] 在某些实施方式中, 治疗性肽在细胞外囊泡中从工程细胞中输出。在某些实施方式中, 治疗性肽是与G蛋白偶联受体 (GPCR) 结合的SCFA的模拟物。

- [0012] 在某些实施方式中,靶细胞是肿瘤细胞。
- [0013] 在某些实施方式中,工程细胞是T细胞或NK细胞。
- [0014] 在某些实施方式中,抗原结合结构域选自抗体、抗原结合片段(Fab)和单链可变片段(scFv)。
- [0015] 在某些实施方式中,结合结构域是T细胞受体(TCR)。
- [0016] 在某些实施方式中,靶抗原选自CD19、CD20、CD22、BCMA、CD123、CD133、EGFR、EGFRvIII、间皮素、Her2、PSMA、CEA、GD2、IL-13Ra2、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3、CIAX、LI-CAM、CA125、CTAG1B、粘蛋白1和叶酸受体- α 。在某些实施方式中,靶抗原在肠细胞上表达。
- [0017] 在某些实施方式中,跨膜结构域是选自CD8 α 、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD28和ICOS的蛋白质的跨膜结构域。
- [0018] 在某些实施方式中,胞内信号传导结构域包括选自CD3 ζ 、TCR ζ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 或ICOS的蛋白质的功能信号传导结构域。在某些实施方式中,胞内信号传导结构域包括功能信号传导结构域,并且进一步包括共刺激结构域,其中共刺激结构域包括来自4-1BB或CD28的功能信号传导结构域。
- [0019] 在某些实施方式中,CAR包括抗CD19 scFv、CD8 α 跨膜结构域、4-1BB共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域。
- [0020] 在某些实施方式中,治疗性肽是SCFA模拟物或类固醇和/或激素样分子的模拟物,并且其中工程细胞已被进一步修饰以降低一种或多种效应器功能的活性。
- [0021] 在某些实施方式中,已对工程细胞进行修饰,以减少或防止一种或多种炎性细胞因子的表达、颗粒酶B的表达或穿孔素的表达。
- [0022] 在某些实施方式中,CAR分子和治疗性肽由相同的表达构建体表达,并且其中表达构建体进一步包括激活PRR的RNA分子。在某些实施方式中,RNA分子是7SL。
- [0023] 在另一个方面,本公开内容提供了包含本文考虑的任何工程细胞的组合物。
- [0024] 在另一个方面,本公开内容提供了编码以下的核酸分子:(i)嵌合抗原受体(CAR),该嵌合抗原受体(CAR)包括抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内信号转导结构域,以及(ii)治疗性肽,其中治疗性肽是非天然肽。
- [0025] 在某些实施方式中,终止密码子将编码CAR的核酸片段与编码治疗性肽的核酸片段分开。
- [0026] 在某些实施方式中,核酸分子编码的治疗性肽具有以下一种或多种性质:(i)治疗性肽是干扰素基因刺激因子(STING)通路的激活剂,(ii)治疗性肽是环状二核苷酸的模拟物,(iii)治疗性肽是短链脂肪酸(SCFA)的模拟物;(iv)治疗性肽是模式识别受体(PRR)的激动剂,(v)治疗性肽是类固醇/激素样分子的模拟物,(vi)治疗性肽促进靶细胞的凋亡,(vii)治疗性肽是免疫原性表位,和/或(viii)治疗性肽阻断靶细胞中DNA修复的一种或多种机制。
- [0027] 在某些实施方式中,治疗性肽是cGAMP、cAMP或cGMP的模拟物。在某些实施方式中,治疗性肽是TLR激动剂的模拟物。在某些实施方式中,治疗性肽是鞭毛蛋白、CpG基序、肽聚糖、脂多糖(LPS)或单磷酸脂质A(MPL)的模拟物。在某些实施方式中,治疗性肽是第二线粒体源性胱天蛋白酶激活因子(SMAC)模拟物。在某些实施方式中,治疗性肽是聚ADP核糖聚合酶(PARP)的抑制剂。

[0028] 在某些实施方式中,编码非天然肽的核酸与编码天然发生肽的核酸的序列同一性不超过80%。

[0029] 在某些实施方式中,靶细胞是肿瘤细胞。

[0030] 在某些实施方式中,核酸分子编码的抗原结合结构域选自抗体、Fab和scFv。

[0031] 在某些实施方式中,核酸分子编码的结合结构域是TCR。

[0032] 在某些实施方式中,核酸分子编码的结合结构域结合选自CD19、CD20、CD22、BCMA、CD123、CD133、EGFR、EGFRvIII、间皮素、Her2、PSMA、CEA、GD2、IL-13Ra2、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3、CIAX、LI-CAM、CA 125、CTAG1B、粘蛋白1和叶酸受体- α 的靶抗原。

[0033] 在某些实施方式中,核酸分子编码的跨膜结构域是选自CD8 α 、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD28和ICOS的蛋白质的跨膜结构域。

[0034] 在某些实施方式中,核酸分子编码的胞内信号传导结构域包括选自CD3 ζ 、TCR ζ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 或ICOS的蛋白质的功能信号传导结构域。在某些实施方式中,核酸分子编码的胞内信号传导结构域包括功能信号传导结构域,并进一步包括共刺激结构域,其中共刺激结构域包括来自4-1BB或CD28的功能信号传导结构域。

[0035] 在某些实施方式中,核酸分子编码包括抗-CD19 scFv、CD8 α 跨膜结构域、4-1BB共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域的CAR分子。

[0036] 在某些实施方式中,核酸分子进一步包括激活PRR的RNA分子。在某些实施方式中, RNA分子是7SL。

[0037] 在另一个方面,本公开内容提供了一种表达载体,其包含本文考虑的任何核酸分子。

[0038] 在另一个方面,本公开内容提供了一种在细胞中共同表达CAR和治疗性肽的方法。该方法包括在使CAR和治疗性肽表达的条件下,向细胞递送本文所考虑的任何表达载体。

[0039] 在另一个方面,本公开内容提供了一种包含本文所考虑的任何核酸分子或任何表达载体的细胞。

[0040] 在另一方面,本公开内容提供了一种治疗受试者疾病或紊乱的方法。该方法包括向受试者施用有效量的经基因修饰以表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞。CAR包括抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内信号传导结构域。该方法进一步包括通过非天然治疗性肽刺激针对癌症的内源性免疫应答。非天然治疗性肽在修饰的T细胞中表达,和/或与修饰的T细胞联合施用。非天然治疗性肽具有以下一种或多种性质:(i) 治疗性肽是干扰素基因刺激因子(STING)通路的激活剂;(ii) 治疗性肽是环状二核苷酸的模拟物;(iii) 治疗性肽是短链脂肪酸(SCFA)的模拟物;(iv) 治疗性肽是模式识别受体(PRR)的激动剂;(v) 治疗性肽是类固醇/激素样分子的模拟物,(vi) 治疗性肽促进靶细胞的凋亡,(vii) 治疗性肽是免疫原表位,和/或(viii) 治疗性肽阻断靶细胞中DNA修复的一种或多种机制。

[0041] 在某些实施方式中,治疗性肽是cGAMP、cAMP或cGMP的模拟物。在某些实施方式中,治疗性肽是TLR激动剂的模拟物。在某些实施方式中,治疗性肽是鞭毛蛋白、CpG基序、肽聚糖、脂多糖(LPS)或单磷酸脂质A(MPL)的模拟物。在某些实施方式中,治疗性肽是第二线粒体源性胱天蛋白酶激活因子(SMAC)模拟物。在某些实施方式中,治疗性肽是聚ADP核糖聚合酶(PARP)的抑制剂。

[0042] 在某些实施方式中,非天然肽是与任何天然存在的肽的序列同一性不超过80%的

肽。

[0043] 在某些实施方式中,肽包含选自SEQ ID NO:1-16的氨基酸序列。

[0044] 在某些实施方式中,治疗性肽是免疫原表位,并且其中免疫原表位在施用至给受试者后被表达在受试者的癌细胞表面上。在某些实施方式中,治疗性肽在修饰的T细胞中表达,其中在对受试者施用修饰的T细胞后,治疗性肽在一个或多个细胞外囊泡中从修饰的T细胞中输出。在某些实施方式中,治疗性肽经由一个或多个细胞外囊泡被递送到受试者体内的一个或多个抗原呈递细胞。

[0045] 在另一方面,本公开内容提供了一种增强经基因修饰以表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞的抗癌活性的方法。该CAR包括抗原结合结构域、跨膜结构域和信号传导结构域,该抗原结合结构域特异性结合肿瘤细胞上表达的抗原。该方法包括在T细胞中共同表达非天然治疗性肽。非天然治疗性肽具有以下一种或多种性质:(i)治疗性肽是干扰素基因刺激因子(STING)通路的激活剂,(ii)治疗性肽是环状二核苷酸的模拟物,(iii)治疗性肽是短链脂肪酸(SCFA)的模拟物,(iv)治疗性肽是模式识别受体(PRR)的激动剂,(v)治疗性肽是类固醇/激素样分子的模拟物,(vi)治疗性肽促进靶细胞的凋亡,(vii)治疗性肽是免疫原表位,和/或(viii)治疗性肽阻断靶细胞中DNA修复的一种或多种机制。

[0046] 在另一方面,本公开内容提供了一种治疗受试者中炎症性疾病、自身免疫性疾病或癌症的方法。该方法包括向受试者施用有效量的本文所考虑的任何工程细胞或任何组合物。

[0047] 在某些实施方式中,癌症是实体瘤癌症。在某些实施方式中,癌症选自肺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、间皮瘤、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、输卵管癌、宫颈癌、前列腺癌、结直肠癌、胃癌、膀胱癌、食管癌和黑色素瘤。在某些实施方式中,癌症是血液学癌症。在某些实施方式中,血液学癌症是白血病或淋巴瘤。在某些实施方式中,血液学癌症选自慢性淋巴细胞白血病(CLL)、套细胞淋巴瘤(MCL)多发性骨髓瘤、急性淋巴细胞白血病(ALL)、霍奇金淋巴瘤、B细胞急性淋巴细胞白血病(BALL)、T细胞急性淋巴细胞白血病(TALL)、小淋巴细胞白血病(SLL)、急性髓细胞白血病(AML)、B细胞前淋巴细胞白血病、母细胞浆细胞样树突状细胞肿瘤、伯基特淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、慢性粒细胞白血病、骨髓增生性肿瘤、滤泡性淋巴瘤、儿童滤泡性淋巴瘤、毛细胞白血病、小细胞或大细胞滤泡性淋巴瘤、恶性淋巴增生性疾病、MALT淋巴瘤(粘膜相关淋巴组织结外边缘区淋巴瘤)、边缘区淋巴瘤、骨髓发育不良、骨髓增生异常综合征、非霍奇金淋巴瘤、浆母细胞淋巴瘤、浆细胞样树突状细胞肿瘤、Waldenstrom巨球蛋白血症、脾边缘区淋巴瘤、淋巴浆细胞淋巴瘤和浆细胞骨髓瘤。

[0048] 在某些实施方式中,自身免疫性疾病是炎性肠病。

附图说明

[0049] 通过结合附图对说明性实施方式的以下详细描述,将更充分地理解本发明的上述和其他特征和优点。

[0050] 图1描绘了本公开内容的示例性实施方式的示意图。

[0051] 图2是包括被终止密码子分开的CAR分子(19BBz)和非天然肽(SIINFEKL)(SEQ ID NO:7)的示例性CAR构建体的示意图。

[0052] 图3描绘了流式细胞术图,其显示了19BBz CAR转导(CAR+)和未转导(CAR-)细胞以

及Ova-19BBz CAR转导(CAR+)和未转导(CAR-)细胞上的肽/MHC表达。

[0053] 图4描绘了流式细胞术图,其显示尽管包含内部终止密码子,CAR分子仍被表达。CAR表达是通过用抗-人Fab' 2抗体染色来确定的。显示了提出的肽转移事件。

[0054] 图5是评估将来自CAR-T转导细胞的免疫原性肽包含在细胞外囊泡中并将免疫原性肽表位转移到肿瘤细胞中的研究的实验设计的示意图。

[0055] 图6A描绘了流式细胞术图,其显示了用无CAR-T EV、18 μ g EV、37.5 μ g EV或75 μ g EV温育的肿瘤细胞上的肽/MHC表达(第一行)和OT-I T细胞中的颗粒酶B表达(第二行)。

[0056] 图6B描绘了流式细胞术图,其显示了用无CAR-T EV、18 μ g EV、37.5 μ g EV或75 μ g EV温育的OT-I T细胞中的Ki67表达(顶行)和IFN γ 表达(底行)。

[0057] 图6C描绘了图6A底行和图6B所示的Ova-19BBz EV数据的定量。与来自表达CAR-T细胞的19BBz(即,无Ova肽)的等量EV相比,EV存在时,Ki67表达(图6C,左图)、颗粒酶B表达(图6C,中图)和IFN γ 表达(图6C,右图)显著增加。

[0058] 图7是显示用OT-I T细胞和0 μ g EV、18 μ g EV、37.5 μ g EV或75 μ g EV温育的B16细胞的相对细胞死亡的柱状图。

[0059] 图8是使用B16-hCD19肿瘤细胞对免疫原性肽表位的表达和体内转移进行体内研究的研究设计的示意图。

[0060] 图9A显示了19BBz或Ova-19BBz施用至植入肿瘤细胞的小鼠后,肿瘤细胞(顶部两幅图)或树突细胞(底部两图)上肽/MHC的表达。

[0061] 图9B显示了施用19BBz(左图)或Ova-19BBz(中图)后,从肿瘤中收获的CD8+T细胞上的肽四聚体染色。从Ova-19BBz组分离的四聚体+细胞也是Ki67+(右图),表明SIINFEKL特异性细胞被激活。

[0062] 图10A显示了19BBz受体与Ova-19BBz受体相比的Ova+肿瘤细胞百分比(左图)和Ova+内源性免疫细胞百分比(右图)。

[0063] 图10B显示了19BBz受体小鼠与Ova-19BBz受体小鼠相比,内源性T细胞用Ova四聚体阳性染色的百分比(左上图)和表达增殖标记物Ki67的CD8+T细胞的百分比(右上图)。受体小鼠在第16天的肿瘤重量显示在底部图中。

[0064] 图11A是使用1:1混合的B16-CD19和B16 WT细胞以植入肿瘤的免疫原性肽表位的表达和体内转移的体内研究的研究设计的示意图。

[0065] 图11B显示,在肿瘤植入后第21天、第24天和第28天,施用19BBz的动物的肿瘤体积(cm^3)明显大于施用Ova-19BBz的动物;并且与Ova-19BBz受体相比,19BBz受体的肿瘤体积生长更快。

[0066] 图12A是包含由终止密码子分开的CAR分子(19BBz)和非天然肽(SIINFEKL)的示例性CAR构建体的示意图;以及包含SIINFEKL肽、终止密码子、19BBz CAR分子和7SL RNA的示例性CAR构建体的示意图。RNA启动子U6将19BBz CAR分子和7SL分开。还显示了使用Ova-19BBz、19BBz-7SL、Ova-19BBz-7SL或对照(19BBz)CAR T细胞,使用1:1混合的KP-hCD19和KP WT细胞以植入肿瘤,对免疫原性肽表位的表达和转移进行体内研究的研究设计的示意图。

[0067] 图12B显示了用(未处理(Utx1)、19BBz、Ova-19BBz(Ova-19)、19BBz-7SL(19-7SL)或Ova-19BBz-7SL(Ova-19-7SL)治疗的每组小鼠的肿瘤体积。

[0068] 图12C显示了用19BBz、Ova-19BBz(BBz-Ova)、19BBz-7SL(BBz-7SL)和Ova-19BBz-

7SL (Ova-BBz-7SL) 治疗的小鼠或未治疗 (utx) 的小鼠随时间的存活百分比。

[0069] 图13显示了与cGAMP复合物中的人STING分子的蛋白质数据库晶体结构 (PDB结构4EMT;左图) 或去除cGAMP的STING结构,以显示具有空cGAMP袋的分离的活性STING结构。

[0070] 图14显示了具有poly-Gly的STING用于采样以产生结合肽 (左图),以及具有存在于cGAMP结合位的预测结合肽的STING (右图)。所示的预测结合肽是肽ST2。

[0071] 图15是用于评估所鉴定的STING激动剂肽活性的研究设计的示意图,如通过CD86作为DC激活读数所测量 (左图)。图15的右图显示了与阴性对照、阳性对照 (cGAMP) 或所示STING肽一起温育后,通过流式细胞术测量的CD86+细胞百分比。

[0072] 图16是评估STING激动剂肽与DC和OT-1T细胞一起温育时效果的研究设计的示意图 (左图)。右图显示了用脂质体包封的STING肽温育的WT细胞中颗粒酶B、IFN γ 和Ki67的倍数变化。仅用脂质体作为阴性对照。除了WT,还使用了来自STING敲除小鼠 (KO) 的细胞,并表明ST2对T细胞的激活是STING依赖性的。

[0073] 图17提供了19BBz CAR构建体和包括STING激动剂肽ST2和19BBz的STING激动剂肽-19BBz CAR构建体的示意图 (顶部)。底部显示了表达19BBz-ST2构建体的细胞的体内评估的示例性实验计划。

[0074] 图18显示,与接受传统19BBz CAR-T细胞的动物相比,接受表达19BBz-STING肽的CAR-T细胞的动物表现出显著改善的存活率。

[0075] 图19显示了当在TNF存在下与仅脂质体 (阴性对照) 或指定浓度的SMAC模拟肽Pep1、Pep3、Pep4、Pep5或Pep6一起温育时,B16肿瘤细胞 (左图) 或KP肿瘤细胞 (右图) 中的相对细胞死亡。

[0076] 图20显示了在TNF存在或不存在的条件下,仅用脂质体 (阴性对照) 或指示的增加浓度的SMAC模拟肽SMACm6温育的B16细胞的相对细胞死亡。浓度以 μM 表示。SMACm6诱导细胞死亡的功效取决于TNF信号传导。

[0077] 图21是包括SMACm6肽和19BBz的CAR-T构建体的示意图 (顶部),以及用于评估从扩增的SMACm CAR-T细胞释放的EV对肿瘤细胞系的影响的实验设计 (底部)。

[0078] 图22显示了用19BBz或19BBz-SMACm6细胞来源的EV的指定浓度温育的B16 (左图) 或KP (右图) 细胞的相对细胞死亡。

[0079] 图23显示了施用指定CAR-T细胞 (19BBz或19-SMACm6) 的动物在有或没有抗-CTLA4治疗的情况下的肿瘤体积 (cm^3 ;左侧两图) 和存活率 (右侧两图)。

[0080] 图24是说明PARPi dsDNA触发PDL1的示意图。

[0081] 图25显示了在TSA乳腺癌细胞中PD-L1的表达改变了与脂质体包封的PARPi肽 (Pep1、Pep2、Pep1C或Pep3)、阴性对照 (仅脂质体) 或阳性对照 (PARP抑制剂olaparib) 的温育。

[0082] 图26A显示了表达Ova (Ova-19BBz) 或Ova加RN7SL1 (Ova-19-7SL) 的19BBz CAR载体的设计 (顶部) 和显示检测CAR+和CAR-T细胞上SIINFEKL肽的代表性流式细胞术图 (底部)。

[0083] 图26B显示了用来自Ova-19BBz CAR-T细胞或19BBz CAR-T细胞 (对照) 的指定浓度的EV加载的B16细胞上SIINFEKL肽的检测 (流程图,顶部)。然后添加OT-I T细胞,使用GZMB和Ki67测量激活 (流程图,底部) 并定量 (点图,底部)。

[0084] 图26C显示了在用19BBz或Ova-19BBz (Ova) CAR-T细胞体内治疗后,在混合的CD19

⁺/CD19-B16肿瘤中测量的向癌细胞和免疫细胞的SIINFEKL肽转移。癌细胞的代表性流式细胞术图如图所示(左)。

[0085] 图26D-26E显示了通过四聚体和Ki67表达测量的内源性Ova特异性T细胞扩增(图26D),以及Ova特异性和Ki67+CD8⁺ T细胞的频率(图26E)。

[0086] 图26F显示了用指定的CAR-T细胞治疗后异质性CD19⁺/CD19-B16肿瘤的生长。

[0087] 图26G显示了用抗-CTLA4加抗PD1的CAR-T细胞治疗后异质性CD19⁺/CD19-KP混合肿瘤的生长。在肿瘤植入前转移了 5×10^5 OT-I T细胞。

[0088] 图26H显示了Ova肽从CD45.1⁺ CAR⁻ T细胞到肿瘤内CD45.2⁺免疫细胞相对于混合CD19⁻和CD19⁺B16肿瘤中的CD45.2⁻肿瘤细胞的相对转移,如通过用于SIINFEKL/MHC-I染色的流式细胞术所定量。每个条表示一个单独的肿瘤。

[0089] 图27A描绘了用于评估CAR-T细胞通过递送来自CAR-T细胞胞外囊泡(EV)的抗原肽来激活内源性T细胞所需的MHC-I的研究的实验设置。

[0090] 图27B显示了在所示的培养条件下(x轴),添加来自表达MHC-I(顶部)或MHC-I缺陷(底部)的EV后,OT-I T细胞上所示T细胞激活标志物的表达。

[0091] 图27C显示了OT-I T细胞上T细胞激活标志物的代表性流式细胞术图。

[0092] 图28A描绘了用于评估来自CAR-T细胞的细胞外囊泡的能力的研究的实验设置,该细胞外囊泡被设计为递送抗原肽以直接激活内源性T细胞。

[0093] 图28B显示了将指定的CAR-T细胞添加到下孔后,来自上孔的OT-I CD8⁺ T细胞针对指定的T细胞激活标记物(第一行)或针对从CAR-T细胞EV转移的OVA/MHC-I(第二行)的代表性流式细胞术图。显示了两个独立的重复。

具体实施方式

[0094] 嵌合抗原受体(CAR)疗法,诸如CAR-T细胞,为治疗诸如癌症等疾病提供了新的方法,但这种疗法需要改进。对CAR疗法的理想改进包括增强针对癌症的免疫应答的效力和/或持久性,利用肿瘤细胞内的促细胞死亡途径,识别新的和多样化的新抗原,抵消或超越肿瘤细胞或肿瘤环境中的免疫逃避和生存策略,识别和使用新型肿瘤抗原以靶向对肿瘤的免疫应答,和/或以其他方式触发或增强抗癌效果。

[0095] 已经探索了增强的CAR-T疗法——其涉及在细胞中用外源RNA分子(诸如刺激免疫系统的RNA分子)表达CAR分子,并提供了改善的抗癌免疫活性。然而,这种方法不能利用无法在RNA分子上编码的免疫应答的许多途径和特征。本公开内容提供了解决这一需求的有效方法,并证明本文提供的方法具有令人惊讶的高功效。

[0096] 因此,在某些方面,本公开内容提供了向肿瘤和肿瘤微环境递送根据特定疾病的需要定制的多重抗肿瘤免疫组分的方法和组合物。在某些实施方式中,本公开内容提供了通过CAR疗法递送并增强CAR疗法的新型治疗分子。在某些实施方式中,新型治疗分子是合成的非天然肽。本公开内容进一步提供了制造和使用本文提供的新型组合物的方法。本公开内容进一步提供了用于生成免疫原表位文库和将免疫原肽转移到肿瘤细胞以增强抗癌免疫力的组合物和方法。

[0097] 应当理解的是,本公开内容中描述的方法并不限于本文公开的特定方法和实验条件,因为这些方法和条件可能会有所不同。还应理解的是,本文中使用的术语仅用于描述特

定的实施方式,并不具有限制性。

[0098] 此外,本文所述的实验,除非另有说明,均采用本领域技术人员众所周知的常规分子和细胞生物学及免疫学技术。这些技术是技术人员所众所周知的,并在文献中作了充分解释。例如,参见Ausubel等人编,Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, Inc., NY, N.Y. (1987-2008), 包括所有增刊,分子克隆:A Laboratory Manual (第四版), MR Green and J. Sambrook and Harlow等人,抗体:A Laboratory Manual, Chapter 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (2013, 第2版)。

[0099] A. 定义

[0100] 除非另有定义,否则本文所使用的科学和技术术语具有本领域普通技术人员通常理解的含义。如果存在任何潜在的歧义,本文提供的定义优先于任何字典或外来定义。除非上下文另有要求,否则单数术语应包括复数,并且复数术语应包括单数。除非另有说明,否则使用“或”表示“和/或”。使用术语“包括(including)”以及其他形式,如“包括(includes)”和“包括(included)”不具有限制性。

[0101] 一般来说,本文所述的与细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学以及蛋白质和核酸化学和杂交有关的术语是本领域众所周知并且常用的术语。除非另有说明,否则本文提供的方法和技术通常根据本领域众所周知的常规方法以及本说明书中引用和讨论的各种一般和更具体的参考文献中所述的方法和技术进行。酶促反应和纯化技术按照制造商的说明书、本领域通常实现的或本文所述的进行。与本文所述的分析化学、合成有机化学、药物化学和制药化学结合使用的术语、实验室程序和技术均为本领域众所周知的并且常用的术语。标准技术用于化学合成、化学分析、药物制备、配方和给药以及病人治疗。

[0102] 为了更容易地理解所公开的内容,下文对选择术语进行了定义。

[0103] 本文中使用的冠词“一(a)”和“一(an)”是指一个或多个(即,至少一个)冠词的语法对象。例如,“一种元素(an element)”是指一种元素或多于一种元素。

[0104] 当本文所使用的“约(about)”指可测量值,比如量、时间长度等时,是指包括与规定值相差 $\pm 20\%$ 或 $\pm 10\%$,更优选地 $\pm 5\%$,甚至更优选地 $\pm 1\%$,并且更优选地 $\pm 0.1\%$ 的变化,因为这种变化适合于执行所公开的方法。

[0105] 本文所使用的“活化(activation)”是指T细胞受到充分刺激以诱导可检测到的细胞增殖的状态。活化还可与诱导细胞因子的产生和可检测的效应功能相关联。术语“活化的T细胞(activated T cell)”指的是正在进行细胞分裂的T细胞等。

[0106] 本文所使用的“缓解(alleviate)”疾病是指降低疾病的一种或多种症状的严重程度。

[0107] 如本文所使用的术语“抗原(antigen)”被定义为引起免疫反应的分子。这种免疫反应可能涉及抗体的产生,或特异性免疫功能细胞的激活,或两者。熟练的技术人员会明白,任何大分子,包括几乎所有的蛋白质或肽,都可以作为抗原。

[0108] 此外,抗原还可以源自重组DNA或基因组DNA。熟练的技术人员会明白,任何DNA,包括编码能引起免疫反应的蛋白质的核苷酸序列或部分核苷酸序列,因此编码“抗原”(如该术语在本文所使用的)。此外,本领域的技术人员可以理解,抗原不一定仅由基因的全长核苷酸序列编码。显而易见的是,本发明包括但不限于使用多于一个基因的部分核苷酸序列,并且这些核苷酸序列以各种不同的组合方式排列,以引起所需的免疫反应。此外,熟练的技

术人员会明白,抗原根本不需要由“基因(gene)”编码。显而易见的是,抗原可以是合成产生的,或者可以源自生物样品。这种生物样品可以包括但不限于组织样品、肿瘤样品、细胞或生物液体。

[0109] 如本文所使用的,术语“自体的(autologous)”指的是来源于同一个体,随后将被重新引入该个体的任何材料。

[0110] “共刺激分子(co-stimulatory molecule)”是指T细胞上的同源结合伴侣,它特异性地与共刺激配体结合,从而介导T细胞的共刺激反应,例如但不限于增殖。共刺激分子包括但不限于MHC I类分子、BTLA和Toll配体受体。

[0111] 本文所使用的“共刺激信号(co-stimulatory signal)”是指与主信号(比如TCR/CD3连接)结合可导致T细胞增殖和/或关键分子的上调或下调的信号。

[0112] “疾病(disease)”是指动物的一种健康状态,其中动物无法维持稳态,并且其中如果疾病得不到改善,动物的健康就会继续恶化。与此相反,动物的“失调(disorder)”是一种健康状态,其中动物能够维持稳态,但其健康状况比没有失调时要差。如果不加以治疗,失调并不一定会导致动物的健康状况进一步恶化。

[0113] 本文所使用的术语“下调(downregulation)”是指一个或多个基因的表达的减少或消失。

[0114] “有效量(effective amount)”或“治疗有效量(therapeutically effective amount)”在本文中可互换使用,并且是指有效地达到特定的生物学效果或提供治疗或预防益处的本文所述的化合物、制剂、材料或组合物的量。这种结果可包括但不限于这样的量,与不存在本发明的组合物的情况下检测到的免疫反应相比,当向哺乳动物施用导致可检测到一定程度的免疫抑制或耐受的量。免疫反应可通过大量公认的技术方法进行评估。熟练的技术人员会明白,本文施用的组合物的量是不同的,并且可以基于许多因素来确定,比如治疗的疾病或病症、接受治疗的哺乳动物的年龄、健康和身体状况、疾病的严重程度、施用的具体化合物等。

[0115] “编码(encoding)”是指多核苷酸(比如基因、cDNA或mRNA)中特定核苷酸序列在生物过程中作为合成其他聚合物和大分子的模板的固有特性,这些聚合物和大分子具有确定的核苷酸序列(即,rRNA、tRNA和mRNA)或确定的氨基酸序列以及由此产生的生物特性。因此,如果与基因相对应的mRNA的转录和翻译能在细胞或其他生物系统中产生蛋白质,那么该基因就能编码蛋白质。编码链(其核苷酸序列与mRNA序列相同,并且通常以序列列表的形式提供)和非编码链(用作基因或cDNA的转录模板)均可称为编码蛋白质或该基因或cDNA的其他产物。

[0116] 本文所使用的“内源的(endogenous)”是指来自或产生于生物体、细胞、组织或系统内部的任何物质。

[0117] 本文所使用的术语“表位(epitope)”被定义为抗原上可引起免疫反应、诱导B和/或T细胞反应的的小的化学物质。抗原可以有一个或多个表位。大多数抗原具有许多表位;即,它们是多价的。一般来说,表位的大小大致约为10个氨基酸和/或糖。优选地,表位为约4-18个氨基酸,更优选地为约5-16个氨基酸,并且甚至更优选地为6-14个氨基酸,更优选地为约7-12个氨基酸,和最优选地为约8-10个氨基酸。本领域技术人员理解,一般来说,整体三维结构,而不是分子的特定线性序列,是抗原特异性的主要标准,并且因此可以将一个表

位与另一个表位区分开来。基于本公开内容,本发明中使用的肽可以是表位。

[0118] 本文所使用的术语“外源的(exogenous)”是指从生物体、细胞、组织或系统外部引入或产生的任何物质。

[0119] 本文所使用的术语“扩增(expand)”是指数量的增加,如T细胞数量的增加。在一个实施方式中,离体扩增的T细胞的数量相对于培养物中最初存在的数量有所增加。在另一个实施方式中,离体扩增的T细胞的数量相对于培养物中的其他细胞类型的数量有所增加。本文所使用的术语“离体(ex vivo,)”是指从活体(例如,人)中取出并在生物体外(例如,培养皿、试管或生物反应器中)繁殖的细胞。

[0120] 本文所使用的术语“表达(expression)”被定义为由启动子驱动的特定核苷酸序列的转录和/或翻译。

[0121] “表达载体(expression vector)”是指包括重组多核苷酸的载体,该重组多核苷酸包括与待表达的核苷酸序列操作性的连接的表达控制序列。表达载体包括足够的顺式作用表达元件;其他表达元件可由宿主细胞或体外表达系统提供。表达载体包括本领域已知的所有那些,比如并入重组多核苷酸的粘粒、质粒(例如,裸的或包含在脂质体中)和病毒(例如,仙台病毒、慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0122] 本文所使用的“同一性(identity)”是指两个聚合分子,特别是两个氨基酸分子,如两个多肽分子之间的亚基序列同一性。当两个氨基酸序列在相同位置上具有相同的残基时;例如,如果两个多肽分子中每一个的位置都被精氨酸占据,那么它们在该位置上是相同的。在比对中,两个氨基酸序列在相同位置上具有相同残基的同一性或程度通常表示为百分比。两个氨基酸序列之间的同一性是匹配或相同位置的数量的直接函数;例如,如果两个序列中一半的位置(例如,长度为10个氨基酸的聚合物中的5个位置)是相同的,则这两个序列有50%是相同的;如果90%的位置(例如,10个中的9个)是匹配或相同的,则这两个氨基酸序列有90%是相同的。

[0123] 本文所使用的术语“免疫反应(immune response)”被定义为当淋巴细胞将抗原分子识别为外来物并诱导形成抗体和/或激活淋巴细胞清除抗原时发生的对抗原的细胞应答。

[0124] 术语“免疫抑制(immunosuppressive)”在本文中用于指降低整体免疫反应。

[0125] “分离的(isolated)”是指改变或脱离自然状态。例如,天然存在于活体动物体内的核酸或肽不是“分离的”,但从其天然状态的共存物质部分或完全分离的相同核酸或肽是“分离的”。分离的核酸或蛋白质可以以基本上纯化的形式存在,或者可以存在于非原生环境,诸如例如宿主细胞中。

[0126] 本文所使用的“慢病毒(lentivirus)”是指逆转录病毒科的属。慢病毒在逆转录病毒中是独一无二的,因为它可以感染不分裂的细胞;它可以将大量遗传信息传递到宿主细胞的DNA中,因此是基因传递载体中最有效的方法之一。HIV、SIV和FIV都是慢病毒的实例。由慢病毒衍生的载体提供了在体内实现显著水平的基因转移的方法。

[0127] 本文所使用的“修饰的(modified)”是指本发明的分子或细胞的改变的状态或结构。分子可通过包括化学、结构和功能上的多种方式进行修饰。细胞可通过引入核酸进行修饰。

[0128] 本文所使用的术语“调节(modulating)”是指与没有治疗或化合物的情况下受试

者的反应水平相比,和/或其他相同但未经治疗的受试者的反应水平相比,介导受试者反应水平的可检测的增加或减少。该术语包括扰乱和/或影响原生信号或反应,从而介导受试者(优选地是人)的有益治疗反应。

[0129] 在本发明的上下文中,使用经常出现的核酸碱基的以下缩写。“A”指腺苷,“C”指胞嘧啶,“G”指鸟苷,“T”指胸苷,和“U”指尿苷。

[0130] 术语“寡核苷酸(oligonucleotide)”通常指短的多核苷酸。将理解的是,当核苷酸序列由DNA序列(即,A、T、C、G)表示时,这还包括RNA序列(即,A、U、C、G),其中“U”取代了“T”。

[0131] 除非另有说明,否则“编码氨基酸序列的核苷酸序列(nucleotide sequence encoding an amino acid sequence)”包括彼此为简并形式且编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。编码蛋白质或RNA的短语核苷酸序列还可包括内含子,达到编码蛋白质的核苷酸序列在某些形式中含有内含子(一种或多种)的程度。

[0132] 免疫原组合物的“肠胃外(parenteral)”施用包括皮下(s.c.)、静脉(i.v.)、肌肉(i.m.)或胸骨内注射或输液技术等。

[0133] 本文所使用的术语“多核苷酸(polynucleotide)”被定义为核苷酸链。此外,核酸是核苷酸的聚合物。因此,本文所使用的核酸和多核苷酸可以互换。本领域技术人员一般都知道核酸是多核苷酸,其可以水解成单体“核苷酸(nucleotide)”。单体核苷酸可以水解成核苷。本文所使用的多核苷酸包括但不限于通过本领域任何方法获得的所有核酸序列,该方法包括但不限于重组方法,即,使用普通克隆技术和PCR等从重组文库或细胞基因组中克隆核酸序列,以及合成方法。

[0134] 如本文中所使用的,术语“肽(peptide)”、“多肽(polypeptide)”和“蛋白质(protein)”可互换使用,并且是指由肽键共价连接的氨基酸残基组成的化合物。蛋白质或多肽必须至少包含两个氨基酸,并且不限制可包括蛋白质或肽序列的氨基酸的最大数量。多肽包括任何由通过肽键连接的两个或更多个氨基酸的肽或蛋白质。如本文中所使用的,该术语指短链,其在本领域通常也称为例如肽、寡肽和寡聚体等,并且还指长链,其在本领域通常被称为蛋白质,有多种类型。“多肽(polypeptide)”包括例如,生物活性片段、基本同源的多肽、寡肽、同源二聚体、异源二聚体、多肽变体、修饰多肽、衍生物、类似物、融合蛋白等。多肽包括天然肽、重组肽、合成肽或其组合。

[0135] 如本文中相对于抗体所使用的术语“特定地结合(specifically bind)”是指能识别特异性抗原,但是基本上不能识别或结合样品中的其他分子的抗体。例如,与来自一个物种的抗原特异性结合的抗体也可能与来自一个或多个物种的抗原结合。但是,这种跨物种反应性本身并不会改变抗体的特异性分类。在另一个实例中,与抗原特异性结合的抗体也可能与抗原的不同等位基因形式结合。然而,这种交叉反应性本身并不会改变抗体的特异性分类。在一些情况下,术语“特异性结合(specific binding)”或“特定地结合(specifically bind)”可用于指抗体、蛋白质或肽与第二种化学物质的相互作用,意指这种相互作用取决于化学物质上特定结构(例如,抗原决定簇或表位)的存在;例如,抗体可识别并结合特定的蛋白质结构,而不是一般的蛋白质。如果抗体对表位“A”具有特异性,那么在含有标记“A”和抗体的反应中,如果存在含有表位“A”的分子(或游离的、未标记的“A”),则会减少与抗体结合的标记“A”的量。

[0136] 术语“刺激(stimulation)”是指由刺激分子(例如,TCR/CD3复合物)与其同源配体

结合而诱导,从而介导信号传导事件,比如,但不限于经由TCR/CD3复合物的信号传导的初级反应。刺激可介导某些分子表达的改变,比如TGF- β 的下调和/或细胞骨架结构的重组等。

[0137] 如本文所使用的术语“刺激分子(stimulatory molecule)”是指与存在于抗原呈递细胞上的同源刺激配体特异性结合的T细胞上的分子。

[0138] 如本文中所使用的,“刺激配体(stimulatory ligand)”是指这样的一种配体,当存在于抗原呈递细胞(例如aAPC、树突细胞、B细胞等)上时,可与T细胞上的同源结合伴侣(本文称为“刺激分子”)特异性结合,从而介导T细胞的初级反应,包括但不限于活化、启动免疫反应、增殖等。刺激配体在本领域是众所周知的,并且包括装载有肽的MHC I类分子、抗-CD3抗体、超级激动剂抗-CD28抗体和超级激动剂抗-CD2抗体等。

[0139] 术语“受试者(subject)”包括可引起免疫反应的活生物体(例如,哺乳动物)。如本文中所使用的,“受试者(subject)”或“患者(patient)”可以是人或非人哺乳动物。非人哺乳动物包括例如家畜和宠物,比如绵羊、牛、猪、犬、猫和鼠类哺乳动物。优选地,受试者是人。

[0140] 如本文中所使用的,术语“T细胞受体(T cell receptor)”或“TCR”是指响应抗原呈递参与激活T细胞的膜蛋白复合物。TCR负责识别与主要组织相容性复合物分子结合的抗原。TCR由alpha(α)和beta(β)链的异二聚体组成,尽管在一些细胞中,TCR由 γ 和 δ (γ/δ)链组成。TCR可能以 α/β 和 γ/δ 形式存在,它们在结构上相似,但是在解剖位置和功能上各不相同。每条链都由两个胞外结构域(可变结构域和恒定结构域)组成。在一些实施方式中,TCR可在包括TCR的任何细胞上进行修饰,例如包括辅助性T细胞、细胞毒性T细胞、记忆性T细胞、调节性T细胞、自然杀伤性T细胞和 $\gamma-\delta$ T细胞。

[0141] 本文所使用的术语“治疗的(therapeutic)”是指治疗和/或预防。治疗效果通过抑制、缓解或根除疾病状态而获得。

[0142] “移植”是指要移植的生物相容性网格或供体组织、器官或细胞。移植的实例可包括但不限于皮肤细胞或组织、骨髓以及诸如心脏、胰腺、肾脏、肺和肝脏等实体器官。移植也可以指任何要施用给宿主材料。例如,移植可以指核酸或蛋白质。

[0143] 本文所使用的术语“转染(transfected)”或“转化(transformed)”或“转导(transduced)”是指将外源核酸转移或引入宿主细胞中的过程。“转染的(transfected)”或“转化的(transformed)”或“转导的(transduced)”细胞是指被外源核酸转染、转化或转导的细胞。细胞包括原代受试细胞及其后代。

[0144] 如本文所使用的术语“治疗(treat)”疾病是指降低受试者所经历的疾病或紊乱的至少一种体征或症状的频率或严重程度。

[0145] “载体(vector)”是一种包括分离的核酸并且可用于将分离的核酸传递到细胞内部的物质组合物。很多载体在本领域是已知的,包括但不限于线性多核苷酸、与离子或两亲化合物相关的多核苷酸、质粒和病毒。因此,术语“载体”包括自主复制的质粒或病毒。该术语还应解释为包括非质粒和非病毒化合物,它们有助于将核酸转移到细胞,诸如例如,聚赖氨酸化合物、脂质体等中。病毒载体的实例包括但不限于仙台病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体等。

[0146] 范围:在整篇本公开内容中,本发明的各个方面可以用范围的格式来表示。应当理解,以范围格式进行描述只是为了方便和简洁,并且不应被理解为对本发明的范围的僵化

限制。因此,对范围的描述应被解释为已具体公开了该范围内所有可能的子范围以及各个数值。例如,对1至6这样的范围的描述应被解释为已具体公开了1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等子范围,以及该范围内的各个数值,例如,1、2、2.7、3、4、5、5.3和6。无论范围的宽度如何,这都适用。

[0147] B. 治疗性肽

[0148] 如本文所用,术语“治疗性肽”是指通过CAR分子或与CAR分子组合递送的肽,其引发和/或施加和/或增强受试者的治疗反应。在某些实施方式中,由治疗性肽引发、施加或增强的治疗反应是抗癌效果。例如,在某些实施方式中,治疗性肽与靶标结合并触发细胞中的一个或多个途径,从而增加或增强免疫反应,和/或增加或增强肿瘤细胞中的促死亡途径。在其他实施方式中,治疗性肽是免疫原性肽,例如,新抗原。在某些实施方式中,通过本文提供的方法递送治疗性肽导致免疫原性肽转移到肿瘤细胞,从而增强抗-癌免疫应答。例如,在某些实施方式中,本文提供的治疗性肽是免疫原性肽,其可以从相同的表达载体表达和/或与CAR分子结合表达。在进一步的实施方式中,在细胞中表达治疗性肽后,肽在细胞外囊泡中分泌,被肿瘤细胞或免疫细胞(例如,抗原呈递细胞)摄取。在某些实施方式中,肽在细胞外囊泡中分泌,使得治疗性肽通过肿瘤细胞上的MHC摄取、加工和呈递。

[0149] 在某些实施方式中,本文提供的治疗性肽是合成的并且是非天然肽。本文提供的非天然治疗性肽可以通过本文提供的方法或本领域已知的其他方法鉴定的新肽。在某些实施方式中,本文提供的治疗性肽是能够结合特定靶标的合理或计算设计的肽。在某些实施方式中,治疗性肽对特定靶标具有高度特异性。在某些实施方式中,治疗途径被设计为充当模拟物,并模拟配体与受体的结合。在某些实施方式中,治疗性肽模拟的配体不是肽或蛋白质。在某些实施方式中,治疗性肽作为激动剂或拮抗剂,以触发细胞(例如,免疫细胞)中的途径。本文详细描述了示例性靶标和途径,但本领域技术人员将认识到,本公开内容提供了通过靶向任何期望途径的合成治疗性肽来增强抗癌效果的方法。

[0150] 在某些实施方式中,治疗性肽在表达CAR分子的另一细胞中表达。在某些实施方式中,治疗性肽和CAR分子在相同的表达载体上编码。在某些实施方式中,治疗性肽在表达CAR分子的细胞中表达,然后从细胞中分泌到细胞外囊泡(EV)中。在某些实施方式中,治疗性肽对其表达的细胞(例如,表达CAR分子的细胞)产生影响。在某些实施方式中,治疗性肽从细胞(例如,在EV中)输出,并在细胞外空间(例如,在肿瘤微环境中)产生影响,或直接或间接地对邻近细胞(诸如树突细胞、T细胞或肿瘤细胞)产生影响。

[0151] 在某些实施方式中,本文提供的非天然治疗性肽是合理设计的,并使用标准肽结合测定测试其与靶标分子的结合。在其他实施方式中,本文提供的非天然治疗性肽是使用算法和计算肽结合预测生成的。在某些实施方式中,将与配体复合的靶标的晶体结构与不存在配体时的靶标晶体结构进行比较。然后,计算程序执行折叠肽建模的迭代过程,以进行结合预测。以这种方式,鉴定并生成了合成的候选肽。可以测试合成候选肽的靶标结合。可以进一步测试合成候选肽的功能效应,诸如免疫刺激、肿瘤细胞死亡诱导、免疫刺激和/或细胞死亡的替代标记物诱导,或与靶标相关的任何其他效应。在仍其他实施方式中,本文提供的治疗性肽是通过从肿瘤样本中产生免疫原性表位库而鉴定出的新抗原。候选合成肽可进一步从表达本文提供的CAR的表达载体表达,并测试体内效应,例如,在癌症模型中。

[0152] 表1: 示例性治疗性肽的氨基酸序列

SEQ ID NO.	氨基酸序列	描述
1	CIFEFGC	cGAMP模拟物ST1C
2	IFEFG	cGAMP模拟物ST1
3	LFILSG	cGAMP模拟物ST2
4	TFEYSG	cGAMP模拟物ST3
5	MFEYG	cGAMP模拟物ST4
6	LFIKP	cGAMP模拟物ST5
7	SIINFEKL	卵清蛋白CD8+T细胞表位
[0153] 8	AVPIGGGGGGGGGGGGGGGGIPVA	SMAC 模拟物 Pep 6 (SMACm6)
9	AVPI	SMAC 模拟物 Pep 1 (SMACm1)
10	AVPIGGGGGGIPVA	SMAC 模拟物 Pep 3 (SMACm3)
11	AVPIGGGGGAVPI	SMAC 模拟物 Pep 4 (SMACm4)
12	AVPIGGGGGGGGIPVA	SMAC 模拟物 Pep 5 (SMACm5)
13	APLPP	PARP 模拟物 PRP1
14	CAPLPPC	PARP 模拟物 PRP1C
15	APLGG	PARP 模拟物 PRP2
16	VPHPP	PARP 模拟物 PRP3

[0154] 本文提供的氨基酸序列可以被修饰。这种修饰可以是保守序列修饰。“保守序列修饰”是指不会显著影响或改变蛋白质功能特性的氨基酸修饰。保守替代是指氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基替代。本领域已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、 β -支链侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。在某些实施方式中,本文提供的氨基酸序列可以被修饰,使其与参考序列具有约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%的序列同一性。

[0155] 本公开内容中还包括与本文提供的特定序列具有约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%同源性(或与其具有约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%序列同一性)的序列。

[0156] 在某些实施方式中,本文提供的肽是非天然肽。非天然肽包括与天然发生肽具有例如且取决于肽的长度和上下文的不超过99%、不超过98%、不超过97%、不超过96%、不超过95%、不超过94%、不超过93%、不超过92%、不超过91%、不超过90%、不超过89%、不超过88%、不超过87%、不超过86%、不超过85%、不超过84%、不超过83%、不超过82%、不超过81%、不超过80%、不超过79%、不超过78%、不超过77%、不超过76%、不超过75%、不超过74%、不超过73%、不超过72%、不超过71%、不超过70%、不超过69%、不超过68%、不超过67%、不超过66%、不超过65%、不超过64%、不超过63%、不超过62%、不超过61%或不超过60%序列同一性的肽。关于非天然蛋白质,据报道,与天然蛋白质相比,定向进化方法或de novo肽的产生提供了新的和/或独特的功能。例如,据报道,突变少量氨基酸(例如,与天然肽具有94%或更高的同源性)导致肽具有相对于天然肽不同的功能(参见,例如,

Adriano-Silva et al., Nature 565(186-191) (2019))。

[0157] 在某些实施方式中,本公开内容提供了细胞外囊泡(EV)中包含的治疗性肽。因此,在某些实施方式中,本公开内容提供了包含本文提供的一种或多种治疗性肽的EV。EV是细胞释放的膜状微米或纳米级生物颗粒,能够移动穿过细胞间空隙并接触邻近细胞。在本公开内容的组合物和方法中,在某些实施方式中,本文提供的治疗性肽在免疫细胞中表达,然后包装入EV并从细胞释放。在某些实施方式中,包含本文提供的一种或多种治疗性肽的EV被邻近细胞(诸如肿瘤细胞或其他免疫细胞)摄取。一旦被邻近细胞摄取,治疗性肽可以发挥其治疗作用,例如,作为免疫刺激分子、促死或凋亡途径的调节剂、DNA修复机制的调节剂、MHC背景下的抗原递呈或其他作用。

[0158] C. 示例性靶标和途径

[0159] 本公开内容有利地提供了用于向靶细胞递送基于细胞的治疗剂的组合物和方法,其包括通过在期望靶组织表达治疗性肽的细胞进行持久或长期递送。这些方法和组合物极大地改善了疾病和紊乱的目前可用的治疗方法,这些疾病和紊乱通过递送需要重复施用的分子可以治疗或已经治疗。因此,本公开内容提供了用于有效治疗疾病和紊乱,同时避免了治疗某些疾病和紊乱通常所需的长期重复施用治疗剂的组合物和方法。

[0160] 在某些实施方式中,疾病或紊乱是癌症或另一种细胞增殖紊乱。在这种实施方式中,本文提供的工程细胞有利地增强癌症细胞或与细胞增殖障碍相关的其他细胞中的免疫应答和/或引发促凋亡程序和细胞死亡。在其他实施方式中,疾病或紊乱是免疫介导的疾病,诸如自身免疫性疾病(例如,炎性肠病)。在这些实施方式中,本文提供的工程细胞可进一步修饰以降低效应细胞功能。例如,在增强免疫反应是不期望的情况下,本文提供的工程细胞可以被修饰以减少或消除一种或多种炎性细胞因子的产生、颗粒酶B表达、穿孔素表达、抗体分泌和/或增殖能力。

[0161] 癌症和其他细胞增殖障碍的一种潜在免疫疗法与免疫系统对与致病性感染和/或细胞或组织损伤相关的某些危险信号的反应有关。先天免疫系统没有抗原特异性,但对各种效应机制的确有反应,诸如损伤相关的分子模式(DAMP)和病原体相关的分子模式(PAMP)。识别PAMP的受体称为模式识别受体(PRR),并且包括Toll样受体(TLR)、含核苷酸结合结构域富亮氨酸重复序列的蛋白(NLR;也称为NOD样受体)、C型凝集素受体(CLR)和视黄酸诱导基因1(RIG-1)样受体(RLR)的RNA解旋酶。在某些实施方式中,本公开内容将这种免疫刺激途径与表达CAR的细胞疗法相结合,为治疗诸如癌症等疾病和紊乱提供增强的靶向治疗策略。在某些实施方式中,这是通过刺激危险信号途径的小分子和治疗性肽模拟物实现的。

[0162] PAMP和DAMP的实例包括游离细胞质DNA和RNA,例如,双链DNA(dsDNA)。环状二核苷酸是多种细菌中用于信号转导的第二信使,并且是哺乳动物细胞中先天免疫反应的激动剂。示例性环状二核苷酸包括环状鸟苷酸单磷酸(cGMP)、环状腺苷酸单磷酸(cAMP)、环状二-GMP、环状二-AMP和环状AMP-GMP(cAMP-GMP,也称为cGAMP)。细胞质DNA的主要传感器是cGAS(环状GMPAMP合酶)。识别细胞质DNA后,cGAS催化cGAMP的生成,cGAMP与ER跨膜衔接蛋白干扰素基因刺激因子(STING)强烈结合。当STING被cGAMP结合时,它会发生构象变化,转移到核周区,并诱导关键转录因子IRF-3和NF- κ B的激活。这导致I型干扰素的强烈诱导和促炎细胞因子诸如IL-6、TNF- α 和IFN- γ 的产生。这些分子例如通过增强树突细胞和巨噬细胞

摄取、加工、呈递和交叉呈递抗原至T细胞的能力,并且通过结合其同源受体来触发干扰素反应基因的激活,强烈增强T细胞激活。因此,通过cGAMP结合以及其他DAMP和PAMP触发的途径刺激STING显著贡献于适应性免疫细胞激活。

[0163] TLR是先天免疫的强效诱导剂,能够检测细胞表面或诸如内体或溶酶体等细胞内囊泡的管腔内的PAMP。配体(激动剂)结合后,发生TLR的激活,导致衔接分子MyD88和TRIF的募集,随后激活激酶驱动的信号传导途径,导致IRF3/7NF- κ B的活化和如上所述的炎症反应。TLR配体包括:双链RNA(dsRNA),其表明存在病毒并激活TLR3;含有未甲基化CpG基序的DNA,其在病毒和细菌DNA中发现并激活TLR9;单链RNA(ssRNA)和小干扰RNA(siRNA)分子,其也是病毒衍生的,并激活TLR7和TLR8;鞭毛蛋白,其源自活动细菌并激活TLR5;革兰氏阴性细菌的脂多糖(LPS)和单磷酸脂质A(MPL),其均激活TLR4。

[0164] NLR是在细胞质中发现的PRR,由诸如以下细菌产物激活:肽聚糖片段和源自鞭毛蛋白的肽,III型分泌系统棒状成分,毒素(例如,炭疽杆菌致死毒素(LT);黑曲霉素(吸水链霉菌),气溶素(嗜水气单胞菌),刺尾鱼毒素(滨海甲藻),短杆菌肽(芽孢杆菌)和 α -毒素(金黄色葡萄球菌)),以及病毒双链DNA(dsDNA)。NOD1和NOD2是两个特征明显的NLR,它们识别肽聚糖的不同结构基序。NALP3和NALP1识别细菌衍生的组分,如毒素。IPAF和NAIP5识别鞭毛蛋白。NLR激活导致形成“炎性复合体(inflammasome)”,其涉及胱天蛋白酶-1,最终导致IL-1 β 的产生。

[0165] RLR(例如,RIG-I)通常识别细胞质病毒dsRNA,然后募集衔接子IFN- β 启动子刺激因子1(IPS-1;也称为MAVS、VISA和Cardif),导致转录因子IRF-3和IRF7磷酸化,以及I型IFN基因的表达。黑色素瘤2(AIM2)中缺少的一种干扰素诱导的蛋白质,该蛋白质可以结合细胞质中的dsDNA并诱导胱天蛋白酶1的自切割,从而激活炎性复合体。C型凝集素受体(CLR)诸如Dectin-1结合真菌细胞壁组分(例如, β -葡聚糖),并触发NF- κ B的激活。

[0166] 在某些实施方式中,本公开内容提供了能够激活免疫反应的小分子和/或治疗性肽,例如,先天免疫反应途径,其包括但不限于本文所述的那些。小分子和/或治疗性肽可以是刺激先天免疫反应途径的分子的模拟物,诸如PRR模拟物、环状二核苷酸模拟物和短链脂肪酸模拟物。在某些实施方式中,本公开内容提供了合成的、非天然的小分子和合成的、非天然的治疗性肽,它们是细菌第二信使、TLR激动剂、NLR激动剂、RLR激动剂、CLR激动剂或短链脂肪酸中的一种或多种的模拟物。例如,提供的小分子和/或治疗性肽可以是cGAMP、cAMP、cGMP、CpG、LPS、鞭毛蛋白、细菌毒素、肽聚糖或丁酸的模拟物。

[0167] 因此,这类化合物在人类癌症治疗中具有潜在用途。鉴于STING和其他PRR相关途径在刺激免疫反应方面的效力,这些分子与非常期望的策略相关,以增强诸如CAR-T细胞疗法等现有疗法。然而,由于STING结合配偶体cGAMP是环状二核苷酸,因此它不能在RNA上编码。类似地,许多其他PRR和相关分子不能在RNA上编码和/或使用合成设计的肽结合剂可以更有效地激活其结合配偶体。本公开内容提供了涉及肽模拟物的新方法,该肽模拟物可在表达CAR的细胞中表达和/或与表达CAR的细胞结合,并用于刺激STING途径或其他免疫激活途径以增强CAR疗法。

[0168] 在某些实施方式中,治疗性肽是PARP抑制剂。聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)是一种核和细胞质酶,其参与包括DNA修复、基因组稳定性和程序性细胞死亡的细胞过程。PARP的一个重要功能是检测DNA链断裂并在细胞中启动修复反应。作为对DNA断裂的反应,PARP-1

或PARP-2与单链和双链DNA缺口结合。PARP抑制剂可用作癌症治疗的化学增敏剂和放射增敏剂,因为许多用于癌症治疗的放射治疗和化学治疗方法通过诱导DNA损伤而起作用。除了参与DNA修复外,PARP还可能作为细胞死亡的介质。由于PARP通过将NAD⁺分解为烟酰胺和ADP-核糖以形成ADP-核糖聚合物而发挥作用,因此PARP激活可导致细胞内NAD⁺的大量消耗,从而导致细胞死亡。

[0169] 一些癌症依赖于PARP活性进行DNA修复,因此PARP抑制剂已被开发并用作癌症治疗剂。示例性PARP抑制剂包括奥拉帕尼、鲁卡帕尼、尼拉帕尼、他拉唑帕尼、维利帕尼和帕米帕利(pamiparib)。在实施方式中,本公开内容提供了新型PARP抑制剂,其为合成产生的小分子和/或治疗性肽。在某些实施方式中,本文提供的PARP抑制剂可与表达CAR的细胞治疗结合使用,例如,在癌症治疗中。

[0170] 在某些实施方式中,本文提供的治疗性肽是SMAC模拟物。第二线粒体源性胱天蛋白酶激活因子(SMAC)是一种促凋亡线粒体蛋白,其在某些凋亡反应刺激下释放到细胞质中。一旦进入细胞质,SMAC就会与凋亡蛋白抑制剂(IAP)相互作用并对其拮抗,从而通过释放胱天蛋白酶来允许凋亡进行。因此,SMAC使肿瘤细胞对凋亡敏感。在某些具有高IAP活性的癌症细胞中,SMAC活性本身能够诱导细胞凋亡。在一些癌症细胞中,SMAC增加了细胞死亡因子诸如TNF-相关凋亡诱导配体(TRAIL)的凋亡效应。在不希望受理论束缚的情况下,SMAC通路特别适合与CAR-T细胞疗法联合使用,因为激活的CAR-T细胞部分通过细胞死亡触发因子(诸如TRAIL)诱导肿瘤细胞凋亡。在某些实施方式中,本公开内容提供了SMAC的新型模拟物。在某些实施方式中,SMAC模拟物可与表达CAR的细胞治疗结合使用,例如,在癌症治疗中,以诱导癌症细胞死亡。

[0171] 短链脂肪酸(SCFA)是另一类免疫调节剂。SCFA是含有少于6个碳原子的游离脂肪酸。它们是由肠道微生物群作为细菌发酵产物产生的,包括甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸和2-甲基丁酸。SCFA可以通过与在肠道上皮细胞、脂肪细胞、髓样细胞和/或位于肠道的其他细胞上表达的代谢物敏感的G蛋白偶联受体(例如,GPR41、GPR43和GPR109A)结合来调节免疫分化和功能。SCFA还通过HDAC抑制剂途径起作用。据报道,SCFA在调节肠道炎症方面具有抗炎活性,从而有助于预防慢性肠道炎症反应,例如,通过巨噬细胞、DC和其他细胞间接影响T细胞分化和细胞因子产生。SCFA已被证明可以促进细胞因子(诸如IL-10和/或IL-1 β)的产生,因此人们对利用SCFA在炎性肠病(IBD)中的作用产生了兴趣。然而,SCFA的递送以及可能需要启动和/或维持效果的重复给药提出了挑战。在某些实施方式中,本公开内容提供了通过表达CAR的细胞疗法递送SCFA模拟物的方法。本文提供的通过表达CAR的细胞疗法递送SCFA模拟物的一个重要优点是SCFA模拟物在肠道微环境中的持久表达(例如,通过表达CAR的细胞)。

[0172] 在某些实施方式中,本公开内容提供了一种包含CAR构建体的工程细胞,该CAR构建体包含CAR和为SCFA模拟物的治疗性肽。在某些实施方式中,本公开内容提供了治疗胃肠系统紊乱的方法,其包括向需要其的受试者施用本文提供的工程细胞,该工程细胞包含CAR和作为SCFA模拟物的治疗性肽。在某些实施方式中,本公开内容提供了治疗炎性紊乱的方法,其包括向需要其的受试者施用本文提供的工程细胞,该工程细胞包含CAR和作为SCFA模拟物的治疗性肽。例如,在某些实施方式中,炎性紊乱是炎性肠病(IBD),诸如溃疡性结肠炎或克罗恩病。在这种情况下,可能需要减少工程细胞可能诱导的炎症。因此,在某些实施方

式中,工程细胞已被进一步修饰,以敲除和/或减少一种或多种效应器功能的表达或活性。例如,在某些实施方式中,工程细胞已被修饰,以敲除或减少炎性细胞因子表达、颗粒酶B表达、穿孔素表达和/或与炎症相关的其他效应器功能所需的一种或多种基因的表达。

[0173] 在某些实施方式中,本公开内容的治疗性肽是类固醇、激素和/或激素样分子的模拟物。例如,在某些实施方式中,治疗性肽是用于治疗疾病或紊乱的类固醇或激素的模拟物。示例性疾病和紊乱包括生长缺陷紊乱、甲状腺紊乱、不孕症和癌症,诸如乳腺癌和前列腺癌。本文提供的治疗性肽的示例性激素或激素样分子可以是人生长激素、促黄体生成激素释放激素(LHRH)拮抗剂、雌激素、雌二醇和黄体酮。示例性类固醇包括倍他米松、氢化可的松、甲基泼尼松龙、泼尼松龙和曲安奈德。在某些实施方式中,期望在可用类固醇、激素和/或激素样分子治疗的疾病和紊乱中减少炎症或避免过度炎症。在这些实施方式中,工程细胞可进一步修饰以敲除和/或减少一种或多种效应器功能的表达或活性(例如,修饰以敲除或减少炎性细胞因子表达、颗粒酶B表达、穿孔素表达和/或与炎症相关的其他效应器功能所需的一种或多种基因的表达)。

[0174] D. 嵌合抗原受体

[0175] 本公开内容提供了工程细胞(例如,免疫细胞或其前体细胞,例如,T细胞)的组合物和方法,该工程细胞包括嵌合抗原受体(CAR)和治疗性肽。因此,在一些实施方式中,免疫细胞已被基因修饰以表达CAR。本公开内容的CAR包括抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内结构域。

[0176] 抗原结合结构域可与CAR的另一个结构域(诸如跨膜结构域或胞内结构域,其均在本文其他地方描述)有效连接,以在细胞中表达。在一个实施方式中,编码抗原结合结构域的第一核酸序列与编码跨膜结构域的第二核酸有效连接,并进一步与编码胞内结构域第三核酸序列有效连接。

[0177] 本文所述的抗原结合结构域可与本文所述的任何跨膜结构域、本文所述的任何胞内结构域或细胞质结构域或可包含在本公开的CAR中的本文所述的任何其他结构域组合。如本文所述,本公开内容的主题CAR还可包含铰链结构域。如本文所述,本公开内容的主题CAR还可包含间隔结构域。在一些实施方式中,抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内结构域中的每个由接头分开。

[0178] 本发明应被解释为包括本领域已知的和/或本文公开的任何CAR。示例性CAR包括但不限于本文公开的那些、US8916381B1、US9394368B2、US20140050708A1、US9598489B2、US9365641B2、US20210079059A1、US9783591B2、W02016028896A1、US9446105B2、W02016014576A1、US20210284752A1、W02016014565A2、W02016014535A1和US9272002B2中公开的那些,以及本领域通常公开的任何其他CAR。

[0179] 抗原结合结构域

[0180] CAR的抗原结合域是CAR的细胞外区域,用于结合包括蛋白质、碳水化合物和糖脂的特定靶抗原。在某些实施方式中,CAR包括对靶细胞上靶抗原的亲和力。靶抗原可包括与靶细胞相关的任何类型的蛋白质或其表位。例如,CAR可包括对靶细胞上靶抗原的亲和力,表明靶细胞的特定疾病状态。

[0181] 在某些实施方式中,靶细胞抗原是肿瘤相关抗原(TAA)。肿瘤相关抗原(TAA)的实例包括但不限于分化抗原,诸如MART-1/MelanA(MART-I)、gp100(Pmel 17)、酪氨酸酶、TRP-

1、TRP-2和肿瘤特异性多谱系抗原,诸如MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15;过表达的胚胎抗原,诸如CEA;过表达的癌基因和突变的肿瘤抑制基因,诸如p53、Ras、HER-2/neu;由染色体易位引起的独特肿瘤抗原,诸如BCR-ABL、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR;和病毒抗原,诸如Epstein Barr病毒抗原EBVA和人乳头瘤病毒(HPV)抗原E6和E7。其他大型蛋白质基抗原包括TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、RAGE、NY-ESO、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、PSA、TAG-72、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、 β -Catenin、CDK4、Mum-1、p 15、p 16、43-9F、5T4、791Tgp72、甲胎蛋白、 β -HCG、BCA225、BTAA、CA 125、CA 15-3\CA 27.29\BCAA、CA 195、CA 242、CA-50、CAM43、CD68\P1、CO-029、FGF-5、G250、Ga733\EpCAM、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB/70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90\Mac-2结合蛋白\亲环素C-相关蛋白、TAAL6、TAG72、TLP和TPS。在一个优选实施方式中,CAR的抗原结合结构域靶向的抗原包括但不限于CD19、CD20、CD22、ROR1、间皮素、CD33/IL3Ra、c-Met、PSMA、PSCA、糖脂F77、EGFRvIII、GD-2、MY-ESO-1TCR、MAGEA3 TCR等。

[0182] 在某些实施方式中,靶抗原选自CD19、CD20、CD22、BCMA、CD123、CD133、EGFR、EGFRvIII、间皮素、Her2、PSMA、CEA、GD2、IL-13Ra2、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3、CIAX、LI-CAM、CA 125、CTAG1B、粘蛋白1和叶酸受体- α 。

[0183] 在某些实施方式中,靶抗原在肠细胞上表达。

[0184] 根据要靶向的期望抗原,CAR可以被工程化以包含对期望抗原靶标特异性的适当抗原结合结构域。例如,如果CD19是要靶向的期望抗原,则CD19的抗体可以用作抗原结合部分,以并入到CAR中。

[0185] 在一个实施方式中,靶细胞抗原是CD19。因此,在一个实施方式中,本公开内容的CAR对靶细胞上的CD19具有亲和力。这不应被解释为以任何方式进行限制,因为对任何靶抗原具有亲和力的CAR适用于本公开内容的组合物或方法。

[0186] 如本文所述,本公开内容的对靶细胞上的特定靶抗原具有亲和力的CAR可包含靶特异性结合结构域。在某些实施方式中,靶特异性结合结构域是鼠靶特异性结合结构域,例如,靶特异性结合结构域是鼠源的。在某些实施方式中,靶特异性结合结构域是人靶特异性结合结构域,例如,靶特异性结合结构域是人源的。在一个实施方式中,对靶细胞上的CD19具有亲和力的本公开内容的CAR可包含CD19结合结构域。

[0187] 在一些实施方式中,本公开内容的CAR可与一个或多个靶细胞上的一个或多个靶抗原具有亲和力。在一些实施方式中,CAR可与靶细胞上的一个或多个靶抗原具有亲和力。在这些实施方式中,CAR是双特异性CAR或多特异性CAR。在一些实施方式中,CAR包含赋予对一个或多个靶抗原的亲和力的一个或多个靶特异性结合域。在一些实施方式中,CAR包含赋予对同一靶抗原的亲和力的一个或多个靶特异性结合域。例如,包含对同一靶抗原具有亲和力的一个或多个靶特异性结合域的CAR可与靶抗原的不同表位结合。当CAR中存在多个靶特异性结合结构域时,结合结构域可串联排列,并可由接头肽分隔。例如,在包含两个靶特异性结合结构域的CAR中,结合结构域通过寡聚或多聚接头、Fc铰链区或膜铰链区在单个多肽链上彼此共价连接。

[0188] 在一些实施方式中,抗原结合结构域选自抗体、抗原结合片段(Fab)和单链可变片段(scFv)。在一些实施方式中,本公开内容的CD19结合结构域选自CD19特异性抗体、CD19特异性Fab和CD19特异性scFv。在一个实施方式中,CD19结合结构域是CD19特异性抗体。在一

个实施方式中,CD19结合结构域是CD19特异性Fab。在一个实施方式中,CD19结合结构域是CD19特异性scFv。

[0189] 抗原结合结构域可包括与抗原结合的任何结构域,并可包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、合成抗体、人抗体、人源化抗体、非人抗体及其任何片段。在某些实施方式中,抗原结合结构域部分包括哺乳动物抗体或其片段。抗原结合结构域的选择可取决于靶细胞表面上存在的抗原的类型和数量。

[0190] 如本文所用,术语“单链可变片段”或“scFv”是免疫球蛋白(例如,小鼠或人)的重链(VH)和轻链(VL)的可变区的融合蛋白,其共价连接以形成VH:VL异二聚体。重链(VH)和轻链(VL)直接连接或通过肽编码接头连接,该接头连接VH的N末端和VL的C末端,或VH的C末端和VL的N末端。在一些实施方式中,抗原结合结构域(例如,CD19结合结构域)包括具有从N末端到C末端的配置VH-接头-VL的scFv。在一些实施方式中,抗原结合结构域包括具有从N末端到C末端的配置VL-接头-VH的scFv。本领域的技术人员能够选择适当的配置用于本公开内容。

[0191] 接头通常富含甘氨酸以增加灵活性,以及富含丝氨酸或苏氨酸以增加溶解性。接头可以连接细胞外抗原结合结构域的重链可变区和轻链可变区。接头的非限制性实例公开于Shen et al., Anal. Chem. 80(6):1910-1917(2008)和WO 2014/087010中,其内容通过引用以其全部在此并入。本领域已知各种接头序列,其包括但不限于甘氨酸丝氨酸(GS)接头,诸如(GS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:17)、(GGGS)_n(SEQ ID NO:18)和(GGGGS)_n(SEQ ID NO:19),其中n表示至少1的整数。示例性接头序列可以包括氨基酸序列,其包括但不限于GGSG(SEQ ID NO:20)、GGSGG(SEQ ID NO:21)、GSGSG(SEQ ID NO:22)、GSGGG(SEQ ID NO:23)、GGGSG(SEQ ID NO:24)、GSSSG(SEQ ID NO:25)、GGGGG(SEQ ID NO:26)、GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:27)等。本领域技术人员能够选择用于本公开内容的适当接头序列。在一个实施方式中,本公开的抗原结合结构域包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH和VL由具有氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:27)的接头序列分隔,其可由核酸序列GGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGG TCGGGTGGCGGCGGATCT(SEQ ID NO:28)编码。

[0192] 尽管去除了恒定区并引入了接头,但是scFv蛋白仍保留了原始免疫球蛋白的特异性。单链Fv多肽抗体可由包括VH和VL编码序列的核酸表达,如Huston等人(Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883, 1988)所描述的。另外参见美国专利号5,091,513、5,132,405和4,956,778;以及美国专利公开号20050196754和20050196754。具有抑制活性的拮抗scFvs已被描述(例如,参见Zhao等人,Hybridoma (Larchmt) 2008 27(6):455-51;Peter等人,JCachexia Sarcopenia Muscle, 2012年8月12日;Shieh等人, J Immunol 2009 183(4):2277-85;Giomarelli等人, Thromb Haemost 2007 97(6):955-63;Fife et al., J Clin Invest 2006 116(8):2252-61;Brocks等人, Immunotechnology 1997 3(3):173-84;Moosmayer等人, Ther Immunol 1995 2(10):31-40)。已经描述了具有刺激活性的拮抗scFv(例如,参见Peter等人, J Biol Chem 2003 278(38):36740-7;Xie等人, Nat Biotech 1997 15(8):768-71;Ledbetter等人, Crit Rev Immunol 1997 17(5-6):427-55;Ho等人, Biochim Biophys Acta 2003 1638(3):257-66)。

[0193] 如本文中所使用的,“Fab”是指与抗原结合但为单价且不具有Fc部分的抗体结构片段,例如,通过木瓜蛋白酶消化的抗体产生两个Fab片段和一个Fc片段(例如,重(H)链恒

定区;不与抗原结合的Fc区)。

[0194] 如本文中所使用的,“F(ab')₂”是指通过胃蛋白酶消化全IgG抗体产生的抗体片段,其中该片段具有两个抗原结合(ab') (二价)区,其中每个(ab')区包括两条单独的氨基酸链,H链的一部分和轻(L)链通过S-S键连接,用于结合抗原,并且其余的H链部分连接在一起。“F(ab')₂”片段可以分成两个单独的Fab'片段。

[0195] 在一些实施方式中,抗原结合结构域可源自最终使用CAR的同一物种。例如,用于人时,CAR的抗原结合结构域可包括人抗体或其片段。在一些实施方式中,抗原结合结构域可以源自最终使用CAR的不同物种。例如,用于人时,CAR的抗原结合结构域可包括鼠类抗体或其片段。

[0196] 示例性抗原结合结构域包括但不限于US8916381B1、US9394368B2、US20140050708A1、US9598489B2、US9365641B2、US20210079059A1、US9783591B2、W02016028896A1、US9446105B2、W02016014576A1、US20210284752A1、W02016014565A2、W02016014535A1、US9272002B2中发现的那些,以及本领域中通常公开的任何CAR的任何抗原结合结构域。另外的示例性抗原结合结构域是与SEQ ID NO:41、42或43具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的那些。

[0197] FMC63(抗CD19) scFv (SEQ ID NO:41)

[0198] ALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGVLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGETTYNSALKSRLTI IKDNSKSKVFLKMNLSLQTD DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS

[0199] M5(抗-间皮素) scFv (SEQ ID NO:42)

[0200] ALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVEKPGASVKVSKASGYTFDYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCASGWDFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGSGGGGSDIVMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSI RY YLSWYQQKPGKAPKLLIYTASILQNGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQTYTTPDFGPGTKVEIK

[0201] 4D5(抗-Her2) scFv (SEQ ID NO:43)

[0202] DFQVQIFSFLLISASVIMSRGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTGSTSGSGKPGSGEGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDVWGQGLTVTVSS

[0203] 跨膜结构域

[0204] 本公开的CAR可包括连接CAR的抗原结合结构域与CAR的胞内结构域的跨膜结构域。主题CAR的跨膜结构域是能够跨越细胞(例如,免疫细胞或其前体)质膜的区域。在一些实施方式中,跨膜结构域用于插入细胞膜,例如,真核细胞膜中。在一些实施方式中,跨膜结构域插入CAR的抗原结合结构域与胞内结构域之间。

[0205] 在一些实施方式中,跨膜结构域与CAR中的一个或多个结构域天然相关。在一些实施方式中,可以通过一个或多个氨基酸取代来选择或修饰跨膜结构域,以避免这种结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合,以使与受体复合物其他成员的相互作用最小化。

[0206] 跨膜结构域可以源自天然来源或合成来源。在来源是天然的情况下,该结构域可以源自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白,例如I型跨膜蛋白。在来源是合成的情况下,跨膜结构域可以是有利于CAR插入细胞膜的任何人工序列,例如,人工疏水序列。本公开中特别使用的跨膜结构域的实例包括但不限于源自T细胞受体、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD7、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134 (OX-40)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、Toll-样受体1 (TLR1)、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8和TLR9的 α 、 β 或 ζ 链的(即,至少包括其跨膜区(一个或多个))的跨膜结构域。在一些实施方式中,跨膜结构域可以是合成的,在这种情况下,它将主要包含疏水性残基,诸如亮氨酸和缬氨酸。优选地,在合成跨膜结构域的每一端都存在苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体。在某些实施方式中,跨膜结构域选自CD8 α 、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD28和ICOS。

[0207] 本文所述的跨膜结构域可与本文所述的任何抗原结合结构域、本文所述的任何胞内结构域或本文所述的可能包括在主题CAR中的任何其他结构域相结合。

[0208] 在一些实施方式中,跨膜结构域进一步包括铰链区。本公开的主题CAR还可包括铰链区。CAR的铰链区是位于抗原结合结构域和跨膜结构域之间的亲水区域。在一些实施方式中,该结构域有助于CAR的适当蛋白质折叠。铰链区是CAR的任选组件。铰链区可包括选自抗体Fc片段、抗体铰链区、抗体CH2区、抗体CH3区、人工铰链序列或其组合的结构域。铰链区的实例包括但不限于CD8a铰链、由可小至三个甘氨酸(Gly)的多肽组成的人工铰链以及IgG(比如,人IgG4)的CH1和CH3结构域。

[0209] 在一些实施方式中,本公开的主题CAR包括连接抗原结合结构域和跨膜结构域的铰链区,其又与胞内结构域连接。铰链区优选地能够支持抗原结合结构域识别靶细胞上的靶抗原并与其结合(参见,例如,Hudecek等人,Cancer Immunol. Res. (2015) 3 (2) :125-135)。在一些实施方式中,铰链区是柔性结构域,因此使抗原结合结构域具有最佳地识别细胞比如肿瘤细胞上的靶抗原的特定结构和密度的结构(Hudecek等人,同上)。铰链区的灵活性允许铰链区采用多种不同的构象。

[0210] 在一些实施方式中,铰链区是免疫球蛋白重链铰链区。在一些实施方式中,铰链区是源自受体的铰链区多肽(例如,源自CD8的铰链区)。

[0211] 铰链区的长度可以为约4个氨基酸至约50个氨基酸,例如,约4aa至约10aa、约10aa至约15aa、约15aa至约20aa、约20aa至约25aa、约25aa至约30aa、约30aa至约40aa或约40aa至约50aa。在一些实施方式中,铰链区的长度可以为大于5aa、大于10aa、大于15aa、大于20aa、大于25aa、大于30aa、大于35aa、大于40aa、大于45aa、大于50aa、大于55aa或更长。

[0212] 合适的铰链区可以容易地选择,并且可以是许多合适的长度中的任何一个,比如1个氨基酸(例如,Gly)到20个氨基酸、2个氨基酸到15个氨基酸、3个氨基酸到12个氨基酸,包括4个氨基酸到10个氨基酸,5个氨基酸到9个氨基酸,6个氨基酸到8个氨基酸,或7个氨基酸到8个氨基酸,并且可以是1、2、3、4、5、6或7个氨基酸。合适的铰链区的长度可以超过20个氨基酸(例如,30、40、50、60或更多个氨基酸)。

[0213] 例如,铰链区包括甘氨酸聚合物(G)_n、甘氨酸-丝氨酸聚合物(例如,包括(GS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:17)和(GGGGS)_n(SEQ ID NO:18),其中n为至少1的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物以及本领域已知的其他柔性接头。可使用甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物;Gly和Ser二者都是相对非结构化的,并且因此可作为组分间的中性系

链。可以使用甘氨酸聚合物；甘氨酸可进入的phi-psi空间比丙氨酸显著更大，并且比具有较长侧链的残基所受的限制要小得多（例如，参见Scheraga, Rev. Computational. Chem. (1992) 2: 73-142）。示例性铰链区可包括氨基酸序列，该序列包括但不限于GGSG (SEQ ID NO:20)、GGSGG (SEQ ID NO:21)、GSGSG (SEQ ID NO:22)、GSGGG (SEQ ID NO:23)、GGGSG (SEQ ID NO:24)、GSSSG (SEQ ID NO:25) 等。

[0214] 在一些实施方式中，铰链区是免疫球蛋白重链铰链区。免疫球蛋白铰链区氨基酸序列在本领域是已知的；例如，参见Tan等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87 (1) :162-166；和Huck等人, Nucleic Acids Res. (1986) 14(4) :1779-1789。作为非限制性实例，免疫球蛋白铰链区可包括以下氨基酸序列之一：DKTHT (SEQ ID NO:29)；CPPC (SEQ ID NO:30)；CPEPKSCDTPPPCPR (SEQ ID NO:31)（参见，例如Glaser等人, J. Biol. Chem. (2005) 280: 41494-41503）；ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO:32)；KSCDKTHTCP (SEQ ID NO:33)；KCCVDCP (SEQ ID NO:34)；KYGPPCP (SEQ ID NO:35)；EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:36)（人IgG1铰链）；ERKCCVECP (SEQ ID NO:37)（人IgG2铰链）；ELKTPLGDTTHTCPRCP (SEQ ID NO:38)（人IgG3铰链）；SPNMVPHAHHAQ (SEQ ID NO:39)（人IgG4铰链）；等。

[0215] 铰链区可包括人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4铰链区的氨基酸序列。在一个实施方式中，与野生型（天然存在的）铰链区相比，铰链区可包括一个或多个氨基酸取代和/或插入和/或缺失。例如，人IgG1铰链中的His 229可被Tyr取代，使得铰链区包括序列EPKSCDKTYTCPPCP (SEQ ID NO:40)；例如，参见Yan等人, J. Biol. Chem. (2012) 287:5891-5897。在一个实施方式中，铰链区可包括源自人CD8或其变体的氨基酸序列。

[0216] 胞内信号传导结构域

[0217] 本公开的主题CAR还包括胞内信号传导结构域。术语“胞内信号传导结构域”和“胞内结构域”在本文中可互换使用。CAR的胞内信号传导结构域负责激活表达CAR的细胞（例如，免疫细胞）的至少一种效应功能。胞内信号传导结构域转导效应功能信号，并引导细胞（例如，免疫细胞）执行其专门的功能，例如，伤害和/或破坏靶细胞。

[0218] 用于本公开的胞内结构域的实例包括但不限于表面受体的细胞质部分、共刺激分子、协同作用以启动T细胞内的信号传导的任何分子，以及这些元件的任何衍生物或变体和具有相同功能能力的任何合成序列。

[0219] 胞内信号传导结构域的实例包括但不限于T细胞受体复合物的 ζ 链或其任何同源物，例如， η 链、FcsRI γ 和 β 链、MB 1 (Iga) 链、B29 (Ig) 链等，人CD3 ζ 链、CD3多肽 (Δ 、 δ 和 ϵ)、syk家族酪氨酸激酶 (Syk、ZAP 70等)、src家族酪氨酸激酶 (Lck、Fyn、Lyn等) 以及参与T细胞转导的其他分子，比如CD2、CD5和CD28。在一个实施方式中，胞内信号传导结构域可以是人CD3 ζ 链、Fc γ RIII、FcsRI、Fc受体的细胞质尾部、带有细胞质受体的基于免疫受体酪氨酸的激活基序 (ITAM) 以及它们的组合。

[0220] 在一个实施方式中，CAR的胞内信号传导结构域包括一种或多种共刺激分子的任何部分，比如来自CD2、CD3、CD8、CD27、CD28、ICOS、4-1BB、PD-1的至少一个信号传导结构域，其任何衍生物或变体，具有相同功能能力的任何合成序列，及其任何组合。

[0221] 胞内结构域的其他实例包括来自一种或多种分子或受体的片段或结构域，该分子或受体包括但不限于，TCR、CD3 ζ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD86、常见的FcR γ 、FcR β (Fc ERIb)、CD79a、CD79b、Fc γ RIIa、DAP10、DAP12、T细胞受体 (TCR)、CD8、CD27、CD28、4-1BB (CD137)、

OX9、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、KIR家族蛋白、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、与CD83特异性结合的配体、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM (LIGHTR)、SLAMF7、NKp80 (KLRF1)、CD127、CD160、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (触觉)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、Toll-样受体1 (TLR1)、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、本文所述的其他共刺激分子、任何衍生物、变体或其片段、具有相同功能性能力的共刺激分子的任何合成序列,及其任何组合。

[0222] 胞内结构域的另外的实例包括但不限于几种类型的其它各种免疫信号传导受体的胞内信号传导结构域,包括但不限于第一代、第二代和第三代T细胞信号传导蛋白,包括CD3、B7家族共刺激和肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 超家族受体 (参见,例如Park和Brentjens, *J. Clin. Oncol.* (2015) 33 (6) : 651-653)。此外,胞内信号传导结构域可包括NK和NKT细胞使用的信号传导结构域 (参见,例如Hermanson和Kaufman, *Front. Immunol.* (2015) 6: 195), 比如NKp30 (B7-H6) (参见,例如Zhang等人, *J. Immunol.* (2012) 189 (5) : 2290-2299) 和DAP 12 (参见,例如Topfer等人, *J. Immunol.* (2015) 194 (7) : 3201-3212)、NKG2D、NKp44、NKp46、DAP10和CD3z的信号传导结构域。

[0223] 在某些实施方式中,胞内信号传导结构域包括选自CD3 ζ 、TCR ζ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 或ICOS的蛋白质的功能性信号传导结构域。在某些实施方式中,胞内信号传导结构域包括功能性信号传导结构域,并进一步包括共刺激结构域,其中共刺激结构域包括来自4-1BB或CD28的功能性信号传导结构域。

[0224] 适合用于本公开的主题CAR的胞内信号传导结构域包括任何期望的信号传导结构域,该信号传导结构域可响应CAR的激活 (即,被抗原和二聚剂激活) 提供明显的并且可检测的信号 (例如,细胞产生一种或多种细胞因子的增加;靶基因的转录的改变;蛋白质活性的改变;细胞行为的改变,例如,细胞死亡;细胞增殖;细胞分化;细胞存活;细胞信号传导反应的调节等)。在一些实施方式中,胞内信号传导结构域包括至少一个 (例如,一个、两个、三个、四个、五个、六个等) 如下所述的ITAM基序。在一些实施方式中,胞内信号传导结构域包括DAP10/CD28型信号传导链。在一些实施方式中,胞内信号传导结构域不与膜结合CAR共价连接,而是在细胞质中扩散。

[0225] 适合用于本公开的主题CAR的胞内信号传导结构域包括含有基于免疫受体酪氨酸的激活基序 (ITAM) 的胞内信号传导多肽。在一些实施方式中,ITAM基序在胞内信号传导结构域中重复两次,其中第一个和第二个ITAM基序彼此相隔6至8个氨基酸。在一个实施方式中,主题CAR的胞内信号传导结构域包括3个ITAM基序。

[0226] 在一些实施方式中,胞内信号传导结构域包括人免疫球蛋白受体的信号传导结构域,该结构域含有基于免疫受体酪氨酸的激活基序 (ITAM), 比如但不限于Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIC、Fc γ RIIIA、FcRL5 (参见,例如Gillis等人, *Front. Immunol.* (2014) 5: 254)。

[0227] 合适的胞内信号传导结构域可以是含有ITAM基序的部分,该部分源自含有ITAM基

序的多肽。例如,合适的胞内信号传导结构域可以是来自任何含ITAM基序的蛋白质的含ITAM基序的结构域。因此,合适的胞内信号传导结构域不必包含其源自的整个蛋白质的全部序列。合适的含ITAM基序的多肽的实例包括但不限于:DAP12、FCER1G (Fc ϵ 受体I γ 链)、CD3D (CD3 δ)、CD3E (CD3 ϵ)、CD3G (CD3 γ)、CD3Z (CD3 ζ) 和CD79A (抗原受体复合物相关蛋白 α 链)。

[0228] 在一个实施方式中,胞内信号传导结构域源自DAP12 (也称为TYROBP;TYRO蛋白酪氨酸激酶结合蛋白;KARAP;PLOS;DNAX-激活蛋白12;KAR相关蛋白;TYRO蛋白酪氨酸激酶结合蛋白;杀伤激活受体相关蛋白;杀伤-激活受体相关蛋白;等)。在一个实施方式中,胞内信号传导结构域源自FCER1G (也称为FCRG;Fc ϵ 受体I γ 链;Fc受体 γ -链;fc- ϵ RI- γ ;fcR γ ;fcer1 γ ;高亲和性免疫球蛋白 ϵ 受体亚基 γ ;免疫球蛋白E受体,高亲和性 γ 链;等)。在一个实施方式中,胞内信号传导结构域源自T细胞表面糖蛋白CD3 δ 链 (也称为CD3D;CD3-DELTA;T3D;CD3抗原、 δ 亚基;CD3 δ ;CD3d抗原、 δ 多肽 (TiT3复合物);OKT3、 δ 链;T细胞受体T3 δ 链;T细胞表面糖蛋白CD3 δ 链;等)。在一个实施方式中,胞内信号传导结构域源自T细胞表面糖蛋白CD3 ϵ 链 (也称为CD3e、T细胞表面抗原T3/Leu-4 ϵ 链、T细胞表面糖蛋白CD3 ϵ 链、AI504783、CD3、CD3 ϵ 、T3e等)。在一个实施方式中,胞内信号传导结构域源自T细胞表面糖蛋白CD3 γ 链 (也称为CD3G、T细胞受体T3 γ 链、CD3- Γ 、T3G、 γ 多肽 (TiT3复合物)等)。在一个实施方式中,胞内信号传导结构域源自T细胞表面糖蛋白CD3 ζ 链 (也称为CD3Z、T细胞受体T3 ζ 链、CD247、CD3-ZETA、CD3H、CD3Q、T3Z、TCRZ等)。在一个实施方式中,胞内信号传导结构域源自CD79A (也称为B细胞抗原受体复合物相关蛋白 α 链;CD79a抗原 (免疫球蛋白相关 α);MB-1膜糖蛋白;ig- α ;膜结合免疫球蛋白相关蛋白;表面IgM相关蛋白;等)。在一个实施方式中,适合用于本公开内容的FN3 CAR的胞内信号传导结构域包括DAP10/CD28型信号传导链。在一个实施方式中,适合用于本公开内容的FN3 CAR的胞内信号传导结构域包括ZAP70多肽。在一些实施方式中,胞内信号传导结构域包括TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b或CD66d的细胞质信号传导结构域。在一个实施方式中,CAR的胞内信号传导结构域包括人CD3 ζ 的细胞质信号传导结构域。

[0229] 虽然通常可以使用整个胞内信号传导结构域,但是在许多情况下并不需要使用整条链。就使用胞内信号传导结构域的截短部分而言,只要它能转导效应功能信号,就可以用这种截短部分代替完整的链。胞内信号传导结构域包括足以转导效应功能信号的胞内信号传导结构域的任何截短部分。

[0230] 本文所述的胞内信号传导结构域可与本文所述的任何抗原结合结构域、本文所述的任何跨膜结构域或本文所述的可包括在CAR中的任何其他结构域相结合。

[0231] E. 工程细胞

[0232] 本公开内容提供了工程细胞 (例如,修饰的免疫细胞或其前体;例如,T细胞),其包含嵌合抗原受体 (CAR) 和治疗性肽。在某些实施方式中,治疗性肽是非天然治疗性肽。在某些实施方式中,CAR分子和治疗性肽由相同的表达构建体表达。还提供了包含本文所考虑的任何核酸分子或本文所考虑的任何表达载体的细胞。

[0233] 在某些实施方式中,细胞包含具有以下一种或多种性质的治疗性肽:(i) 治疗性肽是干扰素基因刺激因子 (STING) 通路的激活剂,(ii) 治疗性肽是环状二核苷酸的模拟物,(iii) 治疗性肽是短链脂肪酸 (SCFA) 的模拟物,(iv) 治疗性肽是模式识别受体 (PRR) 的激动

剂, (v) 治疗性肽是类固醇/激素样分子的模拟物, (vi) 治疗性肽促进靶细胞的凋亡, (vii) 治疗性肽是免疫原性表位, 和/或 (viii) 治疗性肽阻断靶细胞中DNA修复的一种或多种机制。

[0234] 在某些实施方式中, 治疗性肽是cGAMP、cAMP或cGMP的模拟物。在某些实施方式中, 治疗性肽是TLR激动剂的模拟物。在某些实施方式中, 治疗性肽是鞭毛蛋白、CpG基序、肽聚糖、脂多糖 (LPS) 或单磷酸脂质A (MPL) 的模拟物。在某些实施方式中, 治疗性肽是第二线粒体源性胱天蛋白酶激活因子 (SMAC) 模拟物。在某些实施方式中, 治疗性肽是聚ADP核糖聚合酶 (PARP) 的抑制剂。在某些实施方式中, 治疗性肽是与G蛋白偶联受体 (GPCR) 结合的SCFA的模拟物。在某些实施方式中, 治疗性肽是SCFA模拟物或类固醇和/或激素样分子的模拟物, 并且其中工程细胞已被进一步修饰以降低一种或多种效应器功能的活性。

[0235] 在某些实施方式中, 非天然肽是与天然发生肽具有不超过90%序列同一性的肽。在某些实施方式中, 非天然肽是与天然发生肽具有不超过80%序列同一性的肽。在某些实施方式中, 肽包含选自SEQ ID NO:1-16的氨基酸序列。

[0236] 在某些实施方式中, 治疗性肽在细胞外囊泡中从工程细胞输出。在某些实施方式中, 靶细胞是肿瘤细胞。在某些实施方式中, 工程细胞是T细胞或NK细胞。

[0237] 在某些实施方式中, 工程细胞已被修饰以减少或阻止一种或多种炎性细胞因子的表达、颗粒酶B的表达或穿孔蛋白的表达。

[0238] 在某些实施方式中, CAR分子和治疗性肽由相同的表达构建体表达, 并且其中表达构建体进一步包含激活PRR的RNA分子。在某些实施方式中, RNA分子是7SL。

[0239] 因此, 提供了增强免疫细胞 (诸如T细胞) 在过继细胞疗法中功能的细胞、组合物和方法, 其包括通过增加施用的基因工程细胞的活性和效力而提供改善的功效, 同时保持对转移细胞的持续或随时间暴露。在一些实施方式中, 与某些可用方法相比, 基因工程细胞在体内施用于受试者时表现出增加的扩增和/或持续。在一些实施方式中, 提供的细胞在体内施用于受试者时表现出增加的持续。在一些实施方式中, 施用后在受试者中工程细胞的持续比通过替代方法实现的持续更长, 所述替代方法例如包括施用通过其中T细胞不包含CAR和治疗性肽的方法工程化的细胞的那些方法。在一些实施方式中, 持续至少增加或至少约1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或更多。

[0240] 在一些实施方式中, 被施用的细胞持续的程度或范围可以在施用至受试者后进行检测或定量。例如, 在某些方面, 定量PCR (qPCR) 用于评估受试者血液或血清或器官或组织 (例如, 疾病部位) 中表达CAR和治疗性肽的细胞数量。在某些方面, 持续被定量为DNA或每微克DNA编码外源受体的质粒的拷贝数, 或每微升样品 (例如, 血液或血清) 中表达受体的细胞数量, 或每微升样品的外周血单核细胞 (PBMC) 或白细胞或T细胞总数。在某些实施方式中, 也可以进行通常使用受体特异性抗体检测表达受体的细胞的流式细胞术测定。基于细胞的测定也可用于检测功能性细胞的数量或百分比, 所述功能性细胞诸如能够结合和/或中和和/或诱导反应 (例如, 细胞毒性反应) 的细胞, 这些反应针对疾病或病症的细胞或表达受体识别的抗原的细胞。在这些实施方式中的任何一个中, 与CAR相关的另一个标记物的表达程度或水平可用于区分所施用细胞和受试者体内的内源性细胞。

[0241] F. 细胞的来源

[0242] 在某些实施方式中,细胞的来源(例如,免疫细胞;例如,T细胞)从受试者获得用于体外操作。用于体外操作的靶细胞的来源还可包括例如自体或异体供血、脐带血或骨髓。例如,免疫细胞的来源可以是来自要用本公开内容的修饰的免疫细胞治疗的受试者,例如,受试者的血液、受试者的脐带血或受试者的骨髓。受试者的非限制性实例包括人、狗、猫、小鼠、大鼠及其转基因物种。优选地,受试者是人。

[0243] 免疫细胞可从多种来源获得,其包括血液、外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脾脏组织、脐带、淋巴或淋巴器官。免疫细胞是免疫系统的细胞,诸如先天性或适应性免疫的细胞,例如髓细胞或淋巴的细胞,包括淋巴细胞(lymphocyte),通常是T细胞和/或NK细胞。其他示例性细胞包括干细胞,诸如多潜能(multipotent)干细胞和多能干细胞,其包括诱导性多能干细胞(iPSC)。在某些方面,细胞是人细胞。就待治疗受试者而言,细胞可以是同种异体的和/或自体的。细胞通常是原代细胞,诸如直接从受试者分离的细胞和/或从受试者分离并冷冻的细胞。

[0244] 在某些实施方式中,细胞是T细胞,例如CD8+T细胞(例如,CD8+幼稚T细胞、中枢记忆T细胞或效应记忆T细胞)、CD4+T细胞、自然杀伤T细胞(NKT细胞)、调节性T细胞(Treg)、干细胞记忆T细胞、淋巴祖细胞、造血干细胞、自然杀伤细胞(NK细胞)或树突状细胞。在某些实施方式中,细胞是单核细胞或粒细胞,例如,髓细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞和/或嗜碱性粒细胞。在一个实施方式中,靶细胞是诱导性多能干细胞(iPS)或源自iPS细胞的细胞,例如,由受试者产生的iPS细胞,通过操作以改变(例如,诱导突变)或操纵一个或多个靶基因的表达,并分化成例如T细胞,例如,CD8+T细胞(例如,CD8+幼稚T细胞、中枢记忆T细胞或效应记忆T细胞)、CD4+T细胞、干细胞记忆T细胞、淋巴祖细胞或造血干细胞。

[0245] 在某些实施方式中,细胞包括以下细胞中的一个或多个子集:T细胞或其他细胞类型,诸如整个T细胞群、CD4+细胞、CD8+细胞及其亚群,诸如根据功能、激活状态、成熟度、分化潜力、扩增、再循环、定位和/或持久能力、抗原特异性、抗原受体类型、在特定器官或区室中的存在、标记物或细胞因子分泌情况和/或分化程度限定的亚群。T细胞和/或CD4+和/或CD8+T细胞的亚型和亚群中有幼稚T(TN)细胞、效应T细胞(TEFF)、记忆T细胞及其亚型,诸如干细胞记忆T(TSCM)细胞、中枢记忆T(TCM)细胞、效应记忆T(TEM)细胞或终末分化的效应记忆T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、未成熟T细胞、成熟T细胞、辅助性T细胞、细胞毒性T细胞、粘膜相关不变性T(MAIT)细胞、天然存在和适应性调节性T(Treg)细胞、辅助性T细胞,诸如TH1细胞、TH2细胞、TH3细胞、TH17细胞、TH9细胞、TH22细胞、滤泡辅助性T细胞、 α/β T细胞和 δ/γ T细胞。在某些实施方式中,可以使用本领域可获得的任何数量的T细胞系。

[0246] 在某些实施方式中,方法包括从受试者体内分离免疫细胞,制备、处理、培养和/或工程化它们。在某些实施方式中,工程细胞的制备包括一个或多个培养和/或制备步骤。所述的用于工程化的细胞可从样品诸如生物样品中分离出来,例如,从受试者获得或源自受试者的样品。在某些实施方式中,从其中分离出细胞的受试者是患有疾病或病况或需要细胞疗法或将其施用细胞疗法的受试者。在某些实施方式中,受试者是需要特定治疗干预的人,干预诸如分离、处理和/或工程化细胞的过继性细胞疗法。因此,在某些实施方式中,细胞是原代细胞,例如,原代人细胞。样品包括直接取自受试者的组织、流体和其他样品,以及经过一个或多个处理步骤,诸如分离、离心、基因工程化(例如,用病毒载体转导)、洗涤

和/或培养后所得的样品。生物样品可以是直接从生物来源获取的样品,或者可以是经过处理的样品。生物样品包括但不限于体液(诸如血液、血浆、血清、脑脊液、滑膜液、尿液和汗液)、组织和器官样品——其包括源自其的处理样品。

[0247] 在某些方面,细胞源自其或从其分离的样品是血液或源自血液的样品,或者是或衍生自单采血或白细胞单采产品。示例性样品包括全血、外周血单核细胞(PBMC)、白细胞、骨髓、胸腺、组织活检、肿瘤、白血病、淋巴瘤、淋巴结、肠道相关淋巴组织、粘膜相关淋巴组织、脾、其他淋巴组织、肝、肺、胃、肠、结肠、肾、胰腺、乳房、骨骼、前列腺、子宫颈、睾丸、卵巢、扁桃体或其他器官,和/或衍生自其的细胞。在细胞治疗(例如,过继性细胞治疗)的背景下,样品包括来自自体 and 同种异体来源的样品。

[0248] 在某些实施方式中,细胞源自细胞系,例如,T细胞系。在某些实施方式中,细胞获得自异种来源,例如,获得自小鼠、大鼠、非人灵长类动物和猪。在某些实施方式中,细胞的分离包括一个或多个制备和/或非亲和性类细胞分离步骤。在某些实例中,细胞在一种或多种试剂的存在下被洗涤、离心和/或温育,例如,以去除不需要的组分,富集所需的组分,裂解或去除对特定试剂敏感的细胞。在某些实例中,基于一种或多种性质,诸如密度、粘附性、大小、对特定组分的敏感性和/或抗性等,对细胞进行分离。

[0249] 在某些实例中,从受试者的循环血液中获得细胞,例如,通过单采血或白细胞单采。在某些方面,样品含有淋巴细胞,其包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其他有核白细胞、红细胞和/或血小板,并且在某些方面,还含有红细胞和血小板以外的细胞。在某些实施方式中,对从受试者收集的血细胞进行洗涤,例如,以去除血浆部分,并将细胞置于适当的缓冲液或培养基中,以便进行后续处理步骤。在某些实施方式中,将细胞用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤。在某些方面,洗涤步骤是根据制造商的说明通过切向流过滤(TFF)完成的。在某些实施方式中,细胞在洗涤后被重悬于各种生物相容性缓冲液中。在某些实施方式中,去除血细胞样品的组分,并将细胞重悬于培养基中。在某些实施方式中,方法包括基于密度的细胞分离法,诸如通过裂解红细胞并通过Percoll或Ficoll梯度离心从外周血中制备白细胞。

[0250] 在一个实施方式中,免疫细胞获得自个体循环血液中,并且通过单采血或白细胞单采获得。单采血产品通常含有淋巴细胞,其包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其他有核白细胞、红细胞和血小板。通过单采血收集的细胞可进行洗涤,以去除血浆部分,并将细胞放置在适当的缓冲液或培养基中,诸如磷酸盐缓冲盐水(PBS)或缺乏钙并且可能缺乏镁或可能缺乏许多(如果不是全部)二价阳离子的洗涤液中,以进行后续处理步骤。洗涤后,细胞可重悬于各种生物相容性缓冲液中,诸如,例如,不含钙、镁的PBS。可选地,可以去除单采血样品中不期望的组分,并将细胞直接重悬于培养基中。

[0251] 在一些实施方式中,分离方法包括基于细胞中一种或多种特定分子,诸如表面标记物(例如,表面蛋白)、细胞内标记物或核酸的表达或存在来分离不同类型的细胞。在一些实施方式中,可以使用任何已知的基于这种标记物的分离方法。在一些实施方式中,分离是基于亲和力或免疫亲和力的分离。例如,在某些方面,分离包括基于细胞对一种或多种标记物(通常是细胞表面标记物)的表达或表达水平来分离细胞和细胞群,例如,通过与特异性结合这种标记物的抗体或结合配偶体温育,然后通常进行洗涤步骤,并将结合了抗体或结合配偶体的细胞与未结合抗体或结合配偶体的细胞分离。

[0252] 这种分离步骤可以基于阳性选择和/或阴性选择,在阳性选择中保留与试剂结合的细胞以备进一步使用;在阴性选择中保留未与抗体或结合配偶体结合的细胞以备进一步使用。在某些实例中,两个部分都被保留以备进一步使用。在某些方面,当没有特异性识别异质群体中的细胞类型的抗体可用时,阴性选择可能是特别有用的,使得基于期望群体以外的细胞表达的标记物最佳地进行分离。分离不一定导致100%富集或去除特定细胞群或表达特定标记物的细胞。例如,阳性选择或富集特定类型的细胞,诸如表达标记物的细胞,是指增加这种细胞的数量或百分比,但不一定导致完全没有不表达标记物的细胞。同样,对特定类型细胞(诸如表达标记物的细胞)的阴性选择、去除或消耗是指减少这种细胞的数量或百分比,但不一定导致完全去除所有这种细胞。

[0253] 在某些实例中,进行多轮分离步骤,其中一个步骤中的阳性选择或阴性选择部分要经过另一个分离步骤,诸如后续的阳性选择或阴性选择。在某些实例中,单个分离步骤可同时消耗表达多种标记物的细胞,诸如通过用多种抗体或结合配偶体温育细胞,每种抗体或结合配偶体对阴性选择的靶向标记物都具有特异性。同样,通过用表达在不同细胞类型上的多种抗体或结合配偶体温育细胞,可同时对多种细胞类型进行阳性选择。

[0254] 在某些实施方式中,一种或多种T细胞群被富集或消耗对一种或多种特定标记物(诸如表面标记物)呈阳性(标记物⁺)或表达高水平(标记物^高)的细胞,或被富集或消耗对一种或多种标记物呈阴性(标记物⁻)或表达相对低水平(标记物^低)的细胞。例如,在某些方面,通过阳性或阴性选择技术分离出特定的T细胞亚群,诸如阳性或高水平表达一种或多种表面标记物的细胞,例如,CD28⁺、CD62L⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺和/或CD45RO⁺T细胞。在某些情况下,这些标记物在某些T细胞群(诸如非记忆细胞)中不存在或表达水平相对较低,但在某些其他T细胞群(诸如记忆细胞)中存在或表达水平相对较高。在一个实施方式中,细胞(诸如CD8⁺细胞或T细胞,例如,CD3⁺细胞)被富集(即,阳性选择)为CD45RO⁺、CCR7⁺、CD28⁺、CD27⁺、CD44⁺、CD 127和/或CD62L阳性或表达高表面水平的细胞,和/或被消耗(例如,阴性选择)为CD45RA⁺阳性或表达高表面水平的细胞。在一些实施方式中,富集或消耗了CD 122⁺、CD95⁺、CD25⁺、CD27和/或IL7-Ra (CD 127) 阳性或表达高表面水平的细胞。在一些实例中,CD8⁺T细胞被富集为CD45RO⁺阳性(或CD45RA⁻阴性)和CD62L阳性的细胞。例如,可使用CD3/CD28缀合磁珠(例如,DYNABEADS[®]M-450CD3/CD28T细胞扩增仪)对CD3⁺、CD28⁺T细胞进行阳性选择。

[0255] 在某些实施方式中,通过阴性选择非T细胞(诸如B细胞)、单核细胞或其他白细胞(诸如CD 14)上表达的标记物,将T细胞从PBMC样品中分离出来。在某些方面,CD4⁺或CD8⁺选择步骤用于分离CD4⁺辅助性T细胞和CD8⁺细胞毒性T细胞。通过对在一个或多个幼稚、记忆和/或效应T细胞亚群中表达或表达程度相对较高的标记物进行阳性选择或阴性选择选择,可将这些CD4⁺和CD8⁺群进一步分选为亚群。在一些实施方式中,CD8⁺细胞可进一步富集或消耗幼稚细胞、中心记忆细胞、效应记忆细胞和/或中心记忆干细胞,诸如通过基于与各亚群相关的表面抗原进行阳性或阴性选择。在一些实施方式中,对中心记忆T(TCM)细胞进行富集以提高功效,诸如改善施用后的长期存活、扩增和/或接种,在某些方面,这些亚群的疗效特别强。在某些实施方式中,富集TCM的CD8⁺T细胞与CD4⁺T细胞的结合进一步提高功效。

[0256] 在某些实施方式中,记忆T细胞存在于CD8⁺外周血淋巴细胞的CD62L⁺和CD62L⁻子集中。可使用诸如抗CD8和抗CD62L抗体富集或消耗PBMC中的CD62L⁻CD8⁺和/或CD62L⁺CD8⁺

部分。在一些实施方式中,CD4+T细胞群和CD8+T细胞亚群,例如,富集中心记忆(TCM)细胞的亚群。在一些实施方式中,中心记忆T(TCM)细胞的富集是基于CD45R0、CD62L、CCR7、CD28、CD3和/或CD 127的阳性或高表面表达;在一些方面,其是基于表达或高表达CD45RA和/或颗粒酶B的细胞的阴性选择。在一些方面,富集TCM细胞的CD8+群的分离是通过消耗表达CD4、CD14、CD45RA的细胞和阳性选择或富集表达CD62L的细胞来进行的。在一个方面,中心记忆T(TCM)细胞的富集从基于CD4表达选择的细胞阴性部分开始而进行,然后进行基于CD 14和CD45RA表达的阴性选择和基于CD62L的阳性选择。这些选择在某些方面是同时进行的,而在其他方面则是按顺序依次进行的。在一些方面,用于制备CD8+细胞群或亚群的基于相同CD4表达的选择步骤,也用于产生CD4+细胞群或亚群,使得基于CD4的分离的阳性和阴性部分都被保留,并用于方法的后续步骤,任选地在一个或多个进一步的阳性或阴性选择步骤之后。

[0257] 通过识别具有细胞表面抗原的细胞群,将CD4+T辅助性细胞分选为幼稚细胞、中枢记忆细胞和效应细胞。CD4+淋巴细胞可通过标准方法获得。在一些实施方式中,幼稚CD4+T淋巴细胞是CD45R0⁻、CD45RA⁺、CD62L⁺、CD4+T细胞。在一些实施方式中,中心记忆CD4+细胞是CD62L⁺和CD45R0⁺。在一些实施方式中,效应CD4+细胞是CD62L⁻和CD45R0⁻。在一个实例中,为了通过阴性选择富集CD4+细胞,单克隆抗体混合物通常包括CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。在一些实施方式中,抗体或结合配偶体与固体载体或基质(诸如磁珠或顺磁珠)结合,以允许分离进行阳性和/或阴性选择的细胞。

[0258] 在一些实施方式中,在基因工程之前或与基因工程有关温育和/或培养细胞。培养步骤可包括培养、培育、刺激、激活和/或繁殖。在一些实施方式中,组合物或细胞在刺激条件或刺激剂存在下进行温养。这些条件包括设计为诱导群体中细胞的增殖、扩增、激活和/或存活,模拟抗原暴露,和/或为细胞的基因工程,诸如引入重组抗原受体做准备的那些条件。条件可包括特定培养基、温度、氧含量、二氧化碳含量、时间、试剂(例如,营养素、氨基酸、抗生素、离子)和/或刺激因子(诸如细胞因子、趋化因子、抗原、结合配偶体、融合蛋白、重组可溶性受体)以及任何其他设计为激活细胞的试剂中的一种或多种。在一些实施方式中,刺激条件或试剂包括一种或多种试剂,例如配体,它能够激活TCR复合物的细胞内信号传导结构域。在一些方面,试剂开启或启动T细胞中的TCR/CD3细胞内信号传导级联。这种试剂可包括抗体,诸如针对TCR组分和/或共刺激受体的特异性抗体,例如,抗CD3、抗CD28,例如,与固体载体如珠结合的抗体,和/或一种或多种细胞因子。任选地,扩增方法可进一步包括向培养基中添加抗-CD3和/或抗-CD28抗体的步骤(例如,浓度至少为约0.5ng/ml)。在一些实施方式中,刺激剂包括IL-2和/或IL-15,例如,IL-2浓度至少为约10单位/mL。

[0259] 在另一个实施方式中,通过裂解红细胞和消耗单核细胞,例如,通过PERCOLL™梯度离心,从外周血中分离T细胞。可选地,可以从脐带中分离T细胞。在任何情况下,T细胞的特定亚群都可以通过阳性或阴性选择技术进一步分离出来。

[0260] 这样分离出来的脐带血单核细胞可以消耗掉表达某些抗原的细胞,包括但不限于CD34、CD8、CD14、CD19和CD56。这些细胞的消耗可通过分离抗体、包含抗体的生物样品(诸如腹水)、与物理载体结合的抗体以及与细胞结合的抗体来完成。

[0261] 通过阴性选择富集T细胞群可以使用针对阴性选择细胞特有的表面标记物的抗体组合来完成。一种优选的方法是通过负磁性免疫粘附或流式细胞术进行细胞分选和/或选择,其使用针对阴性选择细胞上存在的细胞表面标记物的单克隆抗体的混合物。例如,为了

通过阴性选择富集CD4⁺细胞,单克隆抗体混合体通常包括CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。

[0262] 为了通过阳性或阴性选择分离出所需的细胞群,可以改变细胞和表面(例如,诸如珠粒等颗粒)的浓度。在某些实施方式中,可能期望显著减少珠粒和细胞混合在一起的体积(即,增加细胞浓度),以确保细胞和珠粒的最大接触。例如,在一个实施方式中,使用20亿个细胞/ml的浓度。在另一个实施方式中,使用10亿个细胞/ml的浓度。在进一步的实施方式中,使用大于1亿个细胞/ml的浓度。在进一步的实施方式中,使用1000万、1500万、2000万、2500万、3000万、3500万、4000万、4500万或5000万个细胞/ml的浓度。在又一个实施方式中,使用7500万、8000万、8500万、9000万、9500万或1亿个细胞/ml的细胞浓度。在进一步的实施方式中,可以使用1.25亿或1.5亿个细胞/ml的浓度。使用高浓度可提高细胞产量、细胞激活和细胞扩增。

[0263] T细胞也可以在洗涤步骤后冷冻,不需要单核细胞去除步骤。虽然不希望受理论的束缚,但冷冻和后续的解冻步骤可通过去除细胞群中的粒细胞和一定程度上的单核细胞,从而提供更均匀的产品。在去除血浆和血小板的洗涤步骤后,可将细胞悬浮在冷冻溶液中。虽然许多冷冻溶液和参数都是本领域已知的,并在这种情况下也有用,但在一个非限制性的实例中,一种方法涉及使用含有20% DMSO和8%人血清白蛋白的PBS,或其他合适的细胞冷冻介质。然后以每分钟1°C的速度将细胞冷冻到-80°C,并储存在液氮储存罐的气相中。也可使用其他受控冷冻方法以及在-20°C或液氮中立即进行的非受控冷冻。

[0264] 在一个实施方式中,T细胞群包含在诸如外周血单核细胞、脐带血细胞、纯化的T细胞群和T细胞系等细胞内。在另一个实施方式中,外周血单核细胞包括T细胞群。在又一个实施方式中,纯化的T细胞包括T细胞群。

[0265] 在某些实施方式中,可从样品中分离出T调节细胞(Treg)。样品可以包括但不限于脐带血或外周血。在某些实施方式中,Treg是通过流式细胞仪分选分离出来的。在分离之前,可通过本领域已知的任何方法富集样品中的Treg。分离出的Treg在使用前可低温保存和/或扩增。分离Treg的方法在美国专利号7,754,482、8,722,400和9,555,105,以及美国专利申请号13/639,927中描述,其内容以其全部并入本文。

[0266] G. 核酸和表达载体

[0267] 本公开内容提供了一种编码嵌合抗原受体(CAR)和治疗性肽的核酸。可以考虑本文其他地方详细公开的任何CAR。在某些实施方式中,治疗性肽是非天然肽。本文在其他地方详细公开的任何治疗性肽都是可以考虑的。

[0268] 在某些实施方式中,终止密码子将编码CAR的核酸片段与编码治疗性肽的核酸片段分离。

[0269] 在某些实施方式中,接头可用于允许多个蛋白质由同一核酸序列(例如,多顺反子或双顺反子序列)编码,该核酸序列被翻译成解离成单独的蛋白质组分的多聚蛋白。在一些实施方式中,接头包括编码内部核糖体进入位点(IRES)的核酸序列。本文所使用的“内部核糖体进入位点(an internal ribosome entry site)”或“IRES”指的是促进内部核糖体直接进入蛋白质编码区的起始密码子(例如,ATG),从而导致基因的帽非依赖性翻译的元件。本领域技术人员已知各种内部核糖体进入位点,包括但不限于可从病毒或细胞mRNA源,例如,免疫球蛋白重链结合蛋白(BiP);血管内皮生长因子(VEGF);成纤维细胞生长因子2;胰

岛素样生长因子;翻译起始因子eIF4G;酵母转录因子TFIID和HAP4获得的IRES;以及可获得自例如,心肌病毒、鼻病毒、口蹄疫病毒、HCV、弗里德小鼠白血病毒(Friend murine leukemia virus)(FrMLV)和莫洛尼小鼠白血病毒(Moloney murine leukemia virus)(MoMLV)的IRES。本领域技术人员可以选择适当的IRES用于本公开。

[0270] 在一些实施方式中,接头包括编码自裂解肽的核酸序列。本文所使用的“自裂解肽(self-cleaving peptide)”或“2A肽”是指一种使多个蛋白质编码为多聚蛋白的寡肽,该多聚蛋白在翻译时解离为组分蛋白。使用术语“自裂解(self-cleaving)”并不意味着蛋白水解裂解反应。本领域技术人员已知各种自裂解肽或2A肽,包括但不限于在小rNA病毒科成员中发现的那些,例如,口蹄疫病毒(FMDV)、马鼻炎A病毒(ERAV)、明脉扁刺蛾病毒(Thosea asigna virus)(TaV)和猪捷申病毒(porcine tescho virus)-1(PTV-1);以及卡介病毒(cariovirus),比如泰勒病毒(Theilovirus)和脑心肌炎病毒。源自FMDV、ERAV、PTV-1和TaV的2A肽在本文中分别称为“F2A”、“E2A”、“P2A”和“T2A”。本领域技术人员可以选择适当的自裂解肽用于本公开。

[0271] 在一些实施方式中,接头进一步包括编码弗林蛋白裂解位点的核酸序列。弗林蛋白是一种普遍表达的蛋白酶,它存在于跨高尔基体中,在蛋白质前体分泌前对其进行处理。弗林蛋白在其共识识别序列的COOH-末端进行裂解。本领域技术人员将能够选择适当的弗林蛋白裂解位点用于本公开。

[0272] 在一些实施方式中,接头包括编码弗林蛋白裂解位点和2A肽的组合的核酸序列。实例包括但不限于包括编码弗林蛋白和F2A的核酸序列的接头、包括编码弗林蛋白和E2A的核酸序列的接头、包括编码弗林蛋白和P2A的核酸序列的接头、包括编码弗林蛋白和T2A的核酸序列的接头。本领域技术人员将能够选择适当的组合用于本公开。在这种实施方式中,接头可进一步包括弗林蛋白和2A肽之间的间隔序列。本领域已知各种间隔序列,其包括但不限于甘氨酸丝氨酸(GS)间隔序列,诸如(GS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:17)和(GGGGS)_n(SEQ ID NO:18),其中n表示至少1的整数。示例性间隔序列可包括氨基酸序列,其包括但不限于GGSG(SEQ ID NO:20)、GGSGG(SEQ ID NO:21)、GSGSG(SEQ ID NO:22)、GSGGG(SEQ ID NO:23)、GGGSG(SEQ ID NO:24)、GSSSG(SEQ ID NO:25)等。本领域技术人员可以选择适当的间隔序列用于本公开。

[0273] 在一些实施方式中,本公开内容的核酸可与转录控制元件,例如,启动子和增强子等可操作地连接。合适的启动子和增强子元件是本领域技术人员已知的。

[0274] 在某些实施方式中,编码CAR的核酸与启动子可操作连接。在某些实施方式中,启动子是磷酸甘油激酶-1(PGK)启动子。

[0275] 对于在细菌细胞中的表达,合适的启动子包括但不限于lacI、lacZ、T3、T7、gpt、lambda P和trc。对于在真核细胞中的表达,合适的启动子包括但不限于轻链和/或重链免疫球蛋白基因启动子和增强子元件;巨细胞病毒即早期启动子;单纯疱疹病毒胸苷激酶启动子;早期和晚期SV40启动子;存在于逆转录病毒长末端重复序列中的启动子;小鼠金属硫蛋白-I启动子;以及各种本领域已知的组织特异性启动子。合适的可逆启动子,包括可逆的诱导型启动子,都是本领域已知的。这种可逆启动子可以从许多生物体,例如,真核生物和原核生物中分离和提取。对源自第一种生物的可逆启动子进行修饰以用于第二种生物,例如,第一种原核生物和第二种真核生物、第一种真核生物和第二种原核生物等,在本领域是

众所周知的。这种可逆启动子以及基于这种可逆启动子但还包括另外的控制蛋白的系统包括但不限于醇调控启动子(例如,醇脱氢酶I(alcA)基因启动子、对醇转化激活因子蛋白(A1cR)有反应的启动子等)、四环素调控启动子(例如,包括TetActivators、TetON、TetOFF等的启动子系统)、类固醇调控启动子(例如,大鼠糖皮质激素受体启动子系统、人雌激素受体启动子系统、类维生素A启动子系统、甲状腺启动子系统、蜕皮激素启动子系统、米非司酮启动子系统等)、金属调控启动子(例如,金属硫蛋白启动子系统等)、发病机制相关调控启动子(例如,水杨酸调控启动子、乙烯调控启动子、苯并噻二唑调控启动子等)、温度调控启动子(例如,热休克诱导型启动子(例如,HSP-70、HSP-90、大豆热休克启动子等)、光调控启动子、合成诱导型启动子等。

[0276] 在一些实施方式中,启动子是CD8细胞特异性启动子、CD4细胞特异性启动子、中性粒细胞特异性启动子或NK特异性启动子。例如,可以使用CD4基因启动子;参见,例如Salmon等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1993)90:7739;和Marodon等人,(2003)Blood101:3416。作为另一个实例,可以使用CD8基因启动子。NK细胞特异性表达可通过使用NcrI(p46)启动子来实现;参见,例如Eckelhart等人(2011),Blood(2011)117:1565。

[0277] 对于在酵母细胞中的表达,合适的启动子是组成型启动子,比如ADH1启动子、PGK1启动子、ENO启动子、PYK1启动子等;或可调控的启动子比如GAL1启动子、GAL10启动子、ADH2启动子、PHOS启动子、CUP1启动子、GALT启动子、MET25启动子、MET3启动子、CYC1启动子、HIS3启动子、ADH1启动子、PGK启动子、GAPDH启动子、ADC1启动子、TRP1启动子、URA3启动子、LEU2启动子、ENO启动子、TP1启动子和AOX1(例如,用于毕赤酵母属)。选择合适的载体和启动子完全在本领域技术人员的水平内。用于原核宿主细胞的合适的启动子包括但不限于:噬菌体T7 RNA聚合酶启动子;trp启动子;lac操作子启动子;混合启动子,例如:lac/tac混合启动子、lac/tac混合启动子、tac/trc混合启动子、trp/lac启动子、T7/lac启动子;trc启动子;tac启动子等;araBAD启动子;体内调控启动子,比如IssaG启动子或相关启动子(参见,例如美国专利公布号20040131637)、pagC启动子(Pulkinen和Miller,J.Bacteriol.(1991)173(1):86-93;Alpuche-Aranda等人,Proc.Natl.USA(1992)89(21):10079-83)、nirB启动子(Harborne等人,Mol.Micro.(1992)6:2805-2813)等(参见,例如Dunstan等人,Infect.Immun.(1999)67:5133-5141;McKelvie等人,Vaccine(2004)22:3243-3255;以及Chatfield等人,Biotechnol.(1992)10:888-892); σ 70启动子,例如,共有 σ 70启动子(参见,例如GenBank登录号AX798980、AX798961和AX798183);静止期启动子,例如,dps启动子、spv启动子等;源自致病性岛SPI-2的启动子(参见,例如W096/17951);actA启动子(参见,例如Shetron-Rama等人,Infect.Immun.(2002)70:1087-1096);rpsM启动子(参见,例如Valdivia和Falkow Mol.Microbiol.(1996).22:367);tet启动子(参见,例如Hillen,W.和Wissmann,A.(1989)In Saenger,W.and Heinemann,U.(编),Topics in Molecular and Structural Biology,Protein--Nucleic Acid Interaction.Macmillan,London,UK,第10卷,第143-162页);SP6启动子(参见,例如Melton等人,Nucl.Acids Res.(1984)12:7035);等。用于原核生物(比如,大肠杆菌)的合适的强启动子包括但不限于Trc、Tac、T5、T7和PLambda。用于细菌宿主细胞的操作子的非限制性实例包括乳糖启动操作子(LacI抑制蛋白与乳糖接触时会改变构象,从而阻止Lad抑制蛋白与操作子结合)、色氨酸启动操作子(与色氨酸复合时,TrpR抑制蛋白具有与操作子结合的构象;在没有色氨酸的情况下,TrpR抑制蛋

白具有不与操作子结合的构象),以及tac启动操作子(参见,例如deBoer等人, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. (1983)80:21-25)。

[0278] 合适的启动子的其他实例包括即刻早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列。该启动子序列是一种能够驱动与其可操作地连接的任何多核苷酸序列的高水平表达的强组成型启动子序列。也可使用其他组成型启动子序列,包括但不限于猿猴病毒40(SV40)早期启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)或人体免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复(LTR)启动子、MoMuLV启动子、禽类白血病毒启动子、埃-巴二氏病毒(Epstein-Barr virus)即早期启动子、劳斯肉瘤(Rous sarcom)病毒启动子、EF-1 α 启动子以及人基因启动子比如,但不限于肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、血红蛋白启动子和肌酸激酶启动子。此外,本发明不应仅限于组成型启动子的使用。还考虑使用诱导型启动子作为本发明的一部分。诱导型启动子的使用提供了一种分子开关,当需要这种表达时,它能够开启与之可操作地连接的多核苷酸序列的表达,或者当不需要表达时关闭表达。诱导型启动子的实例包括但不限于金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素启动子。

[0279] 在一些实施方式中,含有合适启动子的基因座或构建体或转基因通过诱导系统的诱导进行不可逆转换。诱导不可逆转换的合适系统在本领域是众所周知的,例如,不可逆转换的诱导可利用Cre-lox介导的重组(参见例如Fuhrmann-Benzakein等人, Proc.Natl.Sci.USA(2000)28:e99,其公开内容通过引用并入本文)。本领域已知的重组酶、内切核酸酶、连接酶、重组位点等的任何适当组合都可用于产生不可逆转换启动子。本文其它地方描述的进行位点特异性重组的方法、机制和要求可用于产生不可逆转换启动子,并且是本领域众所周知的,参见,例如Grindley等人,Annual Review of Biochemistry (2006)567-605;和Tropp,Molecular Biology(2012)(Jones&Bartlett Publishers, Sudbury,Mass.),其公开内容通过引用并入本文。

[0280] 在一些实施方式中,本公开内容的核酸进一步包括编码CAR诱导型表达盒的核酸序列。在一个实施方式中,CAR诱导型表达盒用于产生在CAR信号传导时释放的转基因多肽产物。参见,例如Chmielewski和Abken,Expert Opin.Biol.Ther. (2015)15(8):1145-1154;和Abken,Immunotherapy(2015)7(5):535-544。在一些实施方式中,本公开内容的核酸进一步包括编码与T细胞活化应答启动子可操作地连接的细胞因子的核酸序列。在一些实施方式中,与T细胞活化应答启动子可操作地连接的细胞因子存在于单独的核酸序列上。在一个实施方式中,细胞因子是IL-12。

[0281] 本公开内容的核酸可存在于表达载体和/或克隆载体中。表达载体可包括选择标记、复制原点和提供复制和/或维持载体的其他特征。合适的表达载体包括例如,质粒、病毒载体等。本领域技术人员已知大量合适的载体和启动子;许多在商业上可获得用于产生重组构建体。通过举例提供以下载体,并且不应以任何方式解释为限制性的:细菌的:pBs、phagescript、PsiX174、pBluescript SK、pBs KS、pNH8a、pNH16a、pNH18a、pNH46a (Stratagene,La Jolla,Calif.,USA);pTrc99A、pKK223-3、pKK233-3、pDR540和pRIT5 (Pharmacia,Uppsala,Sweden)。真核的:pWNeo、pSV2cat、pOG44、PXR1、pSG (Stratagene) pSVK3、pBPV、pMSG和pSVL (Pharmacia)。

[0282] 表达载体通常在启动子序列附近有方便的限制酶切位点,以提供插入编码异源蛋白的核酸序列。表达宿主中可能存在可操作的选择标记。合适的表达载体包括但不限于病

毒载体(例如基于痘苗病毒的病毒载体;脊髓灰质炎病毒;腺病毒(参见,例如Li等人, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (1994) 35:2543-2549;Borras等人, *Gene Ther.* (1999) 6:515-524;Li和Davidson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92:7700-7704;Sakamoto等人, *H. Gene Ther.* (1999) 5:1088-1097;W094/12649, W093/03769;W0 93/19191;W0 94/28938;W0 95/11984和W0 95/00655);腺相关病毒(参见,例如Ali等人, *Hum. Gene Ther.* (1998) 9:81-86, Flannery等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) 94:6916-6921;Bennett等人, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (1997) 38:2857-2863;Jomary等人, *Gene Ther.* (1997) 4:683-690;Rolling等人, *Hum. Gene Ther.* (1999) 10:641-648;Ali等人, *Hum. Mol. Genet.* (1996) 5:591-594;W0 93/09239, Samulski等人, *J. Vir.* (1989) 63:3822-3828中的Srivastava; Mendelson等人, *Virol.* (1988) 166:154-165;和Flotte等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993) 90:10613-10617);SV40;单纯疱疹病毒;人体免疫缺陷病毒(参见,例如Miyoshi等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) 94:10319-23;Takahashi等人, *J. Virol.* (1999) 73:7812-7816);逆转录病毒载体(例如,鼠白血病毒、脾坏死病毒和源自逆转录病毒的载体,比如劳斯肉瘤病毒、哈维肉瘤病毒、禽白血病毒、人体免疫缺陷病毒、骨髓增生性肉瘤病毒和乳腺肿瘤病毒);等。

[0283] 适合使用的另外的表达载体是例如但不限于慢病毒载体、 γ 逆转录病毒载体、泡沫病毒载体、腺相关病毒载体、腺病毒载体、痘病毒载体、疱疹病毒载体、工程化的杂交病毒载体、转座子介导的载体等。病毒载体技术在本领域是众所周知的,并且例如在Sambrook等人, 2012, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第1-4卷, Cold Spring Harbor Press, NY) 以及其他病毒学和分子生物学手册中进行了描述。可用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒和慢病毒。

[0284] 一般来说,合适的载体包含在至少一种生物体中起作用的复制原点、启动子序列、方便的限制性内切酶位点和一个或多个选择标记(例如, W0 01/96584; W0 01/29058; 和美国专利号6,326,193)。

[0285] 在一些实施方式中,可使用表达载体(例如,慢病毒载体)将CAR引入免疫细胞或其前体(例如, T细胞)中。因此,本发明的表达载体(例如,慢病毒载体)可包括编码CAR和治疗性肽的核酸。在一些实施方式中,表达载体(例如,慢病毒载体)将包括有助于其中编码的CAR功能性表达的附加元件。在一些实施方式中,包括编码CAR的核酸的表达载体进一步包括哺乳动物启动子。在一个实施方式中,载体进一步包括一个延伸因子-1- α 启动子(EF-1 α 启动子)。使用EF-1 α 启动子可提高下游转基因(例如,编码CAR和治疗性肽的核酸序列)的表达效率。生理启动子(例如,EF-1 α 启动子)不太可能诱导整合介导的遗传毒性,并且可能削弱逆转录病毒载体转化干细胞的能力。适合用于载体(例如,慢病毒载体)的其他生理启动子是本领域技术人员已知的,并且可并入本发明的载体中。在一些实施方式中,载体(例如,慢病毒载体)进一步包括可提高滴度和基因表达的非必需顺式作用序列。非必要顺式作用序列的一个非限制性实例是中心多嘌呤束和中心终止序列(cPPT/CTS),它对有效的逆转录和核导入非常重要。其他非必要顺式作用序列是本领域技术人员已知的,并且可整合到本发明的载体(例如,慢病毒载体)中。在一些实施方式中,载体进一步包括转录后调控元件。转录后调控元件可改善RNA翻译、改善转基因表达和稳定RNA转录体。转录后调控元件的一个实例是土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)。因此,在一些实施方式中,本发明的载体

进一步包含WPRE序列。各种转录后调控元件是本领域技术人员已知的,并且可整合到本发明的载体(例如,慢病毒载体)中。本发明的载体可进一步包括另外的元件,比如用于RNA转运的rev反应元件(RRE)、包装序列以及5'和3'长末端重复序列(LTR)。术语“长末端重复序列(long terminal repeat)”或“LTR”是指位于逆转录病毒DNA末端的碱基对结构域,其包括U3、R和U5区域。LTR通常提供逆转录病毒基因表达(例如,基因转录体的促进、起始和多腺苷酸化)和病毒复制所需的功能。在一个实施方式中,本发明的载体(例如,慢病毒载体)包括3' U3删除的LTR。因此,本发明的载体(例如,慢病毒载体)包括本文所述的元件的任何组合,以提高转基因功能表达的效率。例如,除了编码CAR和治疗性肽的核酸外,本发明的载体(例如,慢病毒载体)可包括WPRE序列、cPPT序列、RRE序列、5' LTR、3' U3删除的LTR'。

[0286] 本公开的载体可以是自失活载体。如本文所使用的,术语“自失活载体(self-inactivating vector)”是指3' LTR增强子启动子区(U3区)已被修饰(例如,通过删除或替换)的载体。自失活载体可防止病毒转录超过第一轮病毒复制。因此,自失活载体只能感染宿主基因组(例如,哺乳动物基因组)一次,并且然后整合到其中,并且不能继续传递。因此,自失活载体可以大大降低产生具有复制能力病毒的风险。

[0287] 在一些实施方式中,本公开的核酸可以是RNA,例如,体外合成的RNA。体外合成RNA的方法是本领域技术人员已知的;任何已知的方法都可用于合成包含编码本公开内容的CAR和治疗性肽的序列的RNA。将RNA引入宿主细胞的方法是本领域已知的。例如,参见Zhao et al. *Cancer Res.* (2010) 15:9053。将包含编码本公开内容的CAR和治疗性肽的核苷酸序列的RNA引入宿主细胞可在体外、离体或体内进行。例如,宿主细胞(例如,NK细胞、细胞毒性T淋巴细胞等)可在体外或离体用包含编码本公开内容的CAR和治疗性肽的核苷酸序列的RNA进行电穿孔。

[0288] 为了评估多肽或其部分的表达,要引入细胞的表达载体还可含有选择标记基因或报告基因,或两者,以便于从试图通过病毒载体转染或感染的细胞群中鉴定和选择表达细胞。在一些实施方式中,选择标记可携带在单独的DNA片段上,并在共转染过程中使用。选择标记和报告基因的侧翼都可以有适当的调控序列,以实现在宿主细胞中的表达。有用的选择标记包括但不限于抗生素抗性基因。

[0289] 报告基因可用于识别潜在的转染细胞和评估调控序列的功能。一般来说,报告基因是在受体生物体或组织中不存在或不被其表达并且编码多肽的基因,其表达表现为某种易于检测的特性,例如,酶活性。在DNA引入受体细胞后的适当时间对报告基因的表达进行评估。合适的报告基因可包括但不限于编码荧光素酶、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、分泌型碱性磷酸酶或绿色荧光蛋白基因的基因(例如,Ui-Tei等人,2000FEBS Letters 479:79-82)。

[0290] H. 治疗方法

[0291] 本文所述的工程细胞(例如,包含CAR和治疗性肽的T细胞)可包括在免疫疗法组合物中。该组合物可包括药物组合物,并进一步包括药学上可接受的载体。可以施用治疗有效量的包含工程T细胞的药物组合物。

[0292] 在一个方面,本公开内容提供了一种用于过继细胞转移疗法的方法,其包括向需要其的受试者施用本公开内容的工程化T细胞。在另一个方面,本公开内容提供了一种治疗受试者疾病或病症的方法,其包括向需要其的受试者施用工程化T细胞群。

[0293] 用于过继细胞疗法的免疫细胞施用方法是本领域已知的,并且可与所提供的方法和组合物结合使用。例如,过继T细胞治疗方法在例如,Gruenberg等人的美国专利申请公开号2003/0170238;Rosenberg的美国专利号4,690,915;Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol. 8(10):577-85)中进行了描述。参见,例如Themeli等人(2013) Nat Biotechnol. 31(10):928-933;Tsukahara等人(2013) Biochem Biophys Res Commun 438(1):84-9;Davila等人(2013) PLoS ONE 8(4):e61338。在一些实施方式中,细胞疗法,例如,过继T细胞疗法是通过自体转移进行的,其中细胞是从将接受细胞疗法的受试者或从源自该受试者的样品中分离和/或以其他方式制备的。因此,在一些方面,细胞源自需要治疗的受试者,例如患者,并且细胞在分离和处理后施用至同一受试者。

[0294] 在一些实施方式中,细胞疗法,例如过继T细胞疗法,是通过异体转移进行的,其中细胞是从除要接受或最终接受细胞疗法的受试者(例如第一受试者)以外的受试者分离和/或以其他方式制备的。在这种实施方式中,然后将细胞施用至同一物种的不同受试者,例如,第二受试者。在一些实施方式中,第一和第二受试者的基因相同。在某些实施方式中,第一和第二受试者的基因相似。在一些实施方式中,第二受试者与第一受试者表达相同的HLA类别或超类型。

[0295] 在一些实施方式中,在施用细胞或含有细胞的组合物之前,受试者已经接受了靶向疾病或病症(例如,肿瘤)的治疗剂的治疗。在一些方面,受试者对其他治疗剂是难治的或无反应的。在一些实施方式中,例如,在用另一种治疗干预措施,包括化疗、放疗和/或造血干细胞移植(HSCT),例如,异基因HSCT治疗后,受试者患有持续的或复发的疾病。在一些实施方式中,尽管受试者已对另一种疗法产生抗药性,但是施用仍能有效地治疗受试者。

[0296] 在一些实施方式中,受试者对另一种治疗剂有反应,并且用治疗剂治疗可减轻疾病负担。在一些方面,受试者最初对治疗剂有反应,但是随着时间的推移展现疾病或病症的复发。在一些实施方式中,受试者没有复发。在一些这样的实施方式中,受试者被确定为有复发风险,比如复发风险很高,并且因此要预防性地施用细胞,例如以降低复发的可能性或防止复发。在一些方面,受试者之前没有接受过另一种治疗剂的治疗。

[0297] 在一些实施方式中,例如,在用另一种治疗干预措施,包括化疗、放疗和/或造血干细胞移植(HSCT),例如异基因HSCT治疗后,受试者患有持续的或复发的疾病。在一些实施方式中,尽管受试者已对另一种疗法产生抗药性,但是施用仍能有效地治疗受试者。

[0298] 可以将本公开的工程细胞施用至动物,优选地哺乳动物,更优选地人,以治疗癌症。此外,本公开的细胞可用于治疗与癌症有关的任何病症,特别是针对肿瘤细胞(一种或多种)的细胞介导的免疫反应,在该肿瘤细胞中治疗或缓解疾病是期望的。用本公开的经修饰的细胞或药物组合物治疗的癌症类型包括:癌(carcinoma)、胚细胞瘤和肉瘤,以及某些白血病或淋巴恶性肿瘤、良性和恶性肿瘤,以及恶性肿瘤例如肉瘤、癌和黑素瘤。其他示例性癌症包括但不限于乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、胰腺癌、结肠直肠癌、肾癌、肝癌、脑癌、淋巴瘤、白血病、肺癌、甲状腺癌等。癌症可以是非实体瘤(比如,血液肿瘤)或实体瘤。也包括成人肿瘤/癌症和儿童肿瘤/癌症。在一个实施方式中,癌症是实体瘤或血液肿瘤。在一个实施方式中,癌症是癌。在一个实施方式中,癌症是肉瘤。在一个实施方式中,癌症是白血病。在一个实施方式中,癌症是实体瘤。

[0299] 实体瘤是通常不包含囊肿或液体区域的异常组织块。实体瘤可以是良性的或恶性

的。不同类型的实体瘤因形成它们的细胞类型而命名(比如,肉瘤、癌和淋巴瘤)。实体瘤比如肉瘤和癌的实例包括纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨肉瘤和其他肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏肿瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、淋巴恶性肿瘤、胰腺癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝细胞癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、甲状腺髓样癌、甲状腺乳头状癌、嗜铬细胞瘤皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、威尔姆斯瘤、宫颈癌、睾丸肿瘤、精原细胞瘤、膀胱癌、黑色素瘤和CNS肿瘤(比如神经胶质瘤(比如,脑干神经胶质瘤和混合神经胶质瘤)、胶质母细胞瘤(也称为多形性胶质母细胞瘤)、星形细胞瘤、CNS淋巴瘤、生殖细胞瘤、成神经管细胞瘤、施万细胞瘤(Schwannoma craniopharyngioma)、室管膜细胞瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤和脑转移)。

[0300] 可通过本文所公开的方法进行治疗的癌症包括但不限于食管癌、肝细胞癌、基底细胞癌(皮肤癌的一种)、鳞状细胞癌(各种组织)、膀胱癌、包括过渡性细胞癌(一种膀胱恶性肿瘤)、支气管癌、结肠癌、结肠直肠癌、胃癌、肺癌(包括小细胞癌)、膀胱癌(一种膀胱恶性肿瘤)、包括过渡细胞癌(膀胱恶性肿瘤)、支气管癌、结肠癌、结肠直肠癌、胃癌、肺癌(包括小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、肾上腺皮质癌、甲状腺癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、肾细胞癌、导管原位癌或胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎癌、威尔姆斯瘤、宫颈癌、子宫癌、睾丸癌、成骨癌、上皮癌和鼻咽癌。

[0301] 可通过本文所公开的方法进行治疗的肉瘤包括但不限于纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、脊索瘤、成骨肉瘤、骨肉瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏肉瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤和其他软组织肉瘤。

[0302] 在某些示例性实施方式中,本发明的经修饰的免疫细胞用于治疗骨髓瘤或与骨髓瘤相关的病症。骨髓瘤或与之相关的病症的实例包括但不限于轻链骨髓瘤、非分泌性骨髓瘤、意义不明的单克隆 γ 病(MGUS)、浆细胞瘤(例如,单发、多发单发、髓外浆细胞瘤)、淀粉样变性和多发性骨髓瘤。在一个实施方式中,本公开内容的方法用于治疗多发性骨髓瘤。在一个实施方式中,本公开内容的方法用于治疗难治性骨髓瘤。在一个实施方式中,本公开内容的方法用于治疗复发性骨髓瘤。

[0303] 在某些示例性实施方式中,本发明的经修饰的免疫细胞用于治疗黑色素瘤或与黑色素瘤相关的病症。黑色素瘤或与之相关的病症的实例包括但不限于浅表扩散性黑色素瘤、结节性黑色素瘤、雀斑样痣恶性黑色素瘤(lentigo maligna melanoma)、肢端雀斑痣性黑色素瘤(acral lentiginous melanoma)、无黑色素性黑色素瘤(amelanotic melanoma)或皮肤黑色素瘤(例如,皮肤、眼、外阴、阴道、直肠黑色素瘤)。在一个实施方式中,本公开内容的方法用于治疗皮肤黑色素瘤。在一个实施方式中,本公开内容的方法用于治疗难治性黑色素瘤。在一个实施方式中,本公开内容的方法用于治疗复发性黑色素瘤。

[0304] 在又其他示例性实施方式中,本发明的经修饰的免疫细胞用于治疗肉瘤或与肉瘤相关的病症。肉瘤或与之相关的病症的实例包括但不限于血管肉瘤、软骨肉瘤、尤文氏肉瘤、纤维肉瘤、胃肠道间质瘤、平滑肌肉瘤、脂肪肉瘤、恶性周围神经鞘瘤、骨肉瘤、多形性肉瘤、横纹肌肉瘤和滑膜肉瘤。在一个实施方式中,本公开内容的方法用于治疗滑膜肉瘤。在一个实施方式中,本公开内容的方法用于治疗脂肪肉瘤,比如粘液样/圆形细胞脂肪肉瘤、

分化/去分化脂肪肉瘤和多形性脂肪肉瘤。在一个实施方式中,本公开内容的方法用于治疗肌样/圆形细胞脂肪肉瘤。在一个实施方式中,本公开内容的方法用于治疗难治性肉瘤。在一个实施方式中,本公开内容的方法用于治疗复发性肉瘤。

[0305] 相对于接受治疗的受试者,待施用的本发明的细胞可以是自体的。

[0306] 本发明细胞的施用可以本领域技术人员已知的任何方便的方式进行。本发明的细胞可以通过气溶胶吸入、注射、摄取、输血、植入或移植施用至受试者。本文所述的组合物可通过经动脉、皮下、皮内、肿瘤内、结节内、髓内、肌肉内、静脉(i.v.)注射或腹腔注射施用至患者。在其他情况下,本发明的细胞可直接注射到受试者的炎症部位、受试者的局部疾病部位、淋巴结、器官、肿瘤等。

[0307] 在一些实施方式中,细胞以期望的剂量施用,在一些方面包括细胞或细胞类型(一种或多种)的期望剂量或数量和/或细胞类型的期望比例。因此,在一些实施方式中,细胞的剂量是基于细胞的总数(或每千克体重的细胞数)和单个群体或亚型的期望比例,比如CD4+与CD8+的比例。在一些实施方式中,细胞的剂量是基于单个群体或单个细胞类型中细胞的期望总数(或每千克体重的数量)。在一些实施方式中,剂量是基于这些特征的组合,比如期望的细胞总数、单个群体中细胞的期望比例和期望总数。

[0308] 在一些实施方式中,细胞群或细胞亚型(比如,CD8+和CD4+T细胞)以总细胞的期望剂量(例如,T细胞的期望剂量)或在其可容忍差值范围内施用。在一些方面,期望剂量是指细胞的期望数量或向其施用细胞的受试者的每单位体重的期望细胞数量,例如细胞/kg。在一些方面,期望剂量为或超过最小细胞数或每单位体重的最小细胞数。在一些方面,在以期期望剂量施用的总细胞中,单个群体或亚型以或接近期望的输出比例(比如,CD4+与CD8+的比例)存在,例如,在该比例的一定可容忍差值或误差范围内。

[0309] 在某些实施方式中,细胞以一个或多个单个群体或亚型细胞的期望剂量或在期望剂量的可容忍差值范围内施用,比如CD4+细胞的期望剂量和/或CD8+细胞的期望剂量。在一些方面,期望剂量是细胞亚型或群体的期望数量,或向其施用细胞的受试者的每单位体重的期望的细胞数量,例如,细胞/kg。在一些方面,期望剂量为或高于细胞群或亚型的最小细胞数,或每单位体重的细胞群或亚型的最小细胞数。因此,在一些实施方式中,剂量是基于总细胞的期望固定剂量和期望比例,和/或基于一个或多个(例如,每个)单个亚型或亚群的期望固定剂量。因此,在一些实施方式中,剂量是基于T细胞的期望的固定或最小剂量以及CD4+与CD8+细胞的期望比例,和/或基于CD4+和/或CD8+细胞的期望的固定或最小剂量。

[0310] 在某些实施方式中,细胞或细胞亚型的单个群体以下述范围施用至受试者:约100万至约1000亿个细胞,诸如例如,100万至约500亿个细胞(例如,约500万个细胞、约2500万个细胞、约50000万个细胞、约10亿个细胞、约50亿个细胞、约200亿个细胞、约300亿个细胞、约400亿个细胞或上述任两个值定义的范围),比如约1000万至约1000亿个细胞(例如,约2000万个细胞、约3000万个细胞、约4000万个细胞、约6000万个细胞、约7000万个细胞、约8000万个细胞、约9000万个细胞、约100亿个细胞、约250亿个细胞、约500亿个细胞、约750亿个细胞、约900亿个细胞或上述任两个值定义的范围),并且在一些情况下,约10000万个细胞至约500亿个细胞(例如,约12000万个细胞、约25000万个细胞、约35000万个细胞、约45000万个细胞、约65000万个细胞、约80000万个细胞、约90000万个细胞、约30亿个细胞、约300亿个细胞、约450亿个细胞)或这些范围之间的任何值。

[0311] 在一些实施方式中,总细胞的剂量和/或单个细胞亚群的剂量在为或约 1×10^5 个细胞/kg至约 1×10^{11} 个细胞/kg 10^4 和为或约 10^{11} 个细胞/千克(kg)体重之间,比如在 10^5 和 10^6 个细胞/kg体重之间的范围内,例如,为或约 1×10^5 个细胞/kg、 1.5×10^5 个细胞/kg、 2×10^5 个细胞/kg、或 1×10^6 个细胞/kg体重。例如,在一些实施方式中,细胞在为或约 10^4 和为或约 10^9 个T细胞/千克(kg)体重之间,比如在 10^5 和 10^6 个T细胞/kg体重之间或在其一定误差范围内施用,例如,为或约 1×10^5 个T细胞/kg、 1.5×10^5 个T细胞/kg、 2×10^5 个T细胞/kg或 1×10^6 个T细胞/kg体重。在其他示例性实施方式中,用于本公开内容的方法的经修饰的细胞的合适剂量范围包括但不限于约 1×10^5 个细胞/kg至约 1×10^6 个细胞/kg、约 1×10^6 个细胞/kg至约 1×10^7 个细胞/kg、约 1×10^7 个细胞/kg约 1×10^8 个细胞/kg、约 1×10^8 个细胞/kg约 1×10^9 个细胞/kg、约 1×10^9 个细胞/kg约 1×10^{10} 个细胞/kg、约 1×10^{10} 个细胞/kg约 1×10^{11} 个细胞/kg。在示例性实施方式中,用于本公开内容的方法的合适剂量为约 1×10^8 个细胞/kg。在示例性实施方式中,用于本公开内容的方法的合适剂量为约 1×10^7 个细胞/kg。在其他实施方式中,合适剂量为约 1×10^7 个总细胞至约 5×10^7 个总细胞。在一些实施方式中,合适剂量为约 1×10^8 个总细胞至约 5×10^8 个总细胞。在一些实施方式中,合适剂量为约 1.4×10^7 个总细胞至约 1.1×10^9 个总细胞。在示例性实施方式中,用于本公开内容的方法的合适剂量为约 7×10^9 个总细胞。

[0312] 在一些实施方式中,细胞在为或约 10^4 和为或约 10^9 个 $CD4^+$ 和/或 $CD8^+$ 细胞/千克(kg)体重之间,比如在 10^5 和 10^6 个 $CD4^+$ 和/或 $CD8^+$ 细胞/kg体重之间或在其一定误差范围内施用,例如,为或约 1×10^5 个 $CD4^+$ 和/或 $CD8^+$ 细胞/kg, 1.5×10^5 个 $CD4^+$ 和/或 $CD8^+$ 细胞/kg, 2×10^5 个 $CD4^+$ 和/或 $CD8^+$ 细胞/kg, 或 1×10^6 个 $CD4^+$ 和/或 $CD8^+$ 细胞/kg体重。在一些实施方式中,细胞以大于和/或至少约 1×10^6 、约 2.5×10^6 、约 5×10^6 、约 7.5×10^6 或约 9×10^6 个 $CD4^+$ 细胞,和/或至少约 1×10^6 、约 2.5×10^6 、约 5×10^6 、约 7.5×10^6 或约 9×10^6 个 $CD8^+$ 细胞,和/或至少约 1×10^6 、约 2.5×10^6 、约 5×10^6 、约 7.5×10^6 或约 9×10^6 个T细胞或在其一定误差范围内施用。在一些实施方式中,细胞在约 10^8 和 10^{12} 之间或约 10^{10} 和 10^{11} 个T细胞之间、约 10^8 和 10^{12} 之间或约 10^{10} 和 10^{11} 个 $CD4^+$ 细胞之间,和/或约 10^8 和 10^{12} 之间或约 10^{10} 和 10^{11} 个 $CD8^+$ 细胞之间或在其一定误差范围内施用。

[0313] 在一些实施方式中,细胞以多种细胞群或亚型(比如, $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 细胞或亚型)的期望输出比例或在其可容忍范围内施用。在一些方面,期望的比例可以是特定的比例或者是比例范围,例如,在一些实施方式中,期望的比例(例如, $CD4^+$ 与 $CD8^+$ 细胞的比例)在为或约5:1和为或约5:1(或大于约1:5且小于约5:1)之间,或在为或约1:3和为或约3:1(或大于约1:3且小于约3:1)之间,比如在为或约2:1和为或约1:5(或大于约1:5且小于约2:1)之间,比如为或约5:1、4.5:1、4:1、3.5:1、3:1、2.5:1、2:1、1.9:1、1.8:1、1.7:1、1.6:1、1.5:1、1.4:1、1.3:1、1.2:1、1.1:1、1:1、1:1.1、1:1.2、1:1.3、1:1.4、1:1.5、1:1.6、1:1.7、1:1.8、1:1.9:1:2、1:2.5、1:3、1:3.5、1:4、1:4.5或1:5。在一些方面,可容忍差值在期望比例的约1%、约2%、约3%、约4%约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%内,包括这些范围之间的任何值。

[0314] 在一些实施方式中,以单剂量或多剂量向有需要的受试者施用一定剂量的经修饰的细胞。在一些实施方式中,一定剂量的经修饰的细胞以多剂量施用,例如每周一次或每7天一次,每2周一次或每14天一次,每3周一次或每21天一次,每4周一次或每28天一次。在示

例性实施方式中,向有需要的受试者施用单剂量的经修饰的细胞。在示例性实施方式中,通过快速静脉输液向有需要的受试者施用单剂量经修饰的细胞。

[0315] 对于疾病的预防或治疗,适当的剂量可能取决于待治疗疾病的类型、细胞或重组受体的类型、疾病的严重程度和病程、细胞是用于预防还是治疗目的、先前的治疗、受试者的临床病史和对细胞的反应,以及主治医师的判断。在一些实施方式中,组合物和细胞可一次性或经过一系列治疗适当地施用至受试者。

[0316] 在一些实施方式中,细胞作为联合治疗的一部分施用,比如与另一种治疗干预措施,比如抗体或工程化细胞或受体或制剂,比如细胞毒性药物或治疗剂,同时或以任何顺序依次施用。在一些实施方式中,细胞与一种或多种另外的治疗剂,或与另一种治疗干预措施结合同时或按任何顺序依次共同施用。在一些情况下,细胞与另一种疗法在足够近的时间内共同施用,使得细胞群增强一种或多种另外的治疗剂的效果,反之亦然。在一些实施方式中,细胞在一种或多种另外的治疗剂之前施用。在一些实施方式中,细胞在一种或多种另外的治疗剂之后施用。在一些实施方式中,一种或多种另外的治疗剂包括细胞因子,比如IL-2,以增强持久性。在一些实施方式中,该方法包括施用化疗剂。

[0317] 在某些实施方式中,本公开的工程细胞(例如,包括CAR和治疗性肽的经修饰的细胞)可以与免疫检查点抗体(例如,抗PD1、抗CTLA-4或抗PDL1抗体)联合施用至受试者。例如,经修饰的细胞可与靶向例如PD-1(程序性死亡1蛋白)的抗体或抗体片段联合施用。抗PD-1抗体的实例包括但不限于派姆单抗(KEYTRUDA®,原名帕博利珠单抗(lambrolizumab),又名MK-3475)和纳武单抗(nivolumab)(BMS-936558、MDX-1106、ONO-4538、OPDIVA®)或其抗原结合片段。在某些实施方式中,经修饰的细胞可与抗PD-L1抗体或其抗原结合片段联合施用。抗PD-L1抗体的实例包括但不限于BMS-936559、MPDL3280A(TECENTRIQ®,阿特珠单抗(Atezolizumab))和MEDI4736(德瓦鲁单抗(Durvalumab),Imfinzi)。在某些实施方式中,经修饰的细胞可与抗CTLA-4抗体或其抗原结合片段联合施用。抗CTLA-4抗体的实例包括但不限于伊匹单抗(Ipilimumab)(商品名Yervoy)。还可使用其他类型的免疫检查点调节剂,包括但不限于小分子、siRNA、miRNA和CRISPR系统。免疫检查点调节剂可在包括CAR和治疗性肽的经修饰的细胞之前、之后或同时施用。在某些实施方式中,包括免疫检查点调节剂的联合治疗可提高包括本发明的经修饰的细胞的治疗效果。

[0318] 在一些实施方式中,在施用细胞后,可通过多种已知方法中的任何一种测量工程化细胞群的生物活性。要评估的参数包括工程化细胞或天然T细胞或其他免疫细胞与抗原的特异性结合,在体内通过例如成像,或在体外通过例如ELISA或流式细胞术。在某些实施方式中,工程化细胞破坏靶细胞的能力可以使用本领域已知的任何合适的方法来测量,诸如例如在Kochenderfer等人,J. Immunotherapy, 32(7):689-702(2009),以及Herman等人,J. Immunological Methods, 285(1):25-40(2004)中描述的细胞毒性测定。在某些实施方式中,细胞的生物活性是通过测定一种或多种细胞因子,比如CD 107a、IFN γ 、IL-2和TNF的表达和/或分泌来测量的。在一些方面,生物活性是通过评估临床结果,比如肿瘤负担或负荷的减少来测量的。

[0319] 在某些实施方式中,向受试者提供二次治疗。二次治疗包括但不限于化疗、放疗、手术和药物。

[0320] 在一些实施方式中,受试者可在CAR T细胞疗法之前施用调理疗法。在一些实施方式中,调理疗法包括向受试者施用有效量的环磷酰胺。在一些实施方式中,调理疗法包括向受试者施用有效量的氟达拉滨。在优选的实施方式中,调理疗法包括向受试者施用有效量的环磷酰胺和氟达拉滨的组合。在CAR T细胞疗法之前施用调理疗法可提高CAR T细胞疗法的疗效。在美国专利号9,855,298中描述了调理T细胞疗法的患者的方法,其通过引用以其整体并入本文。

[0321] 在一些实施方式中,本公开内容的具体剂量方案包括在施用经修饰的T细胞之前的淋巴细胞清除步骤。在示例性实施方式中,淋巴细胞清除步骤包括施用环磷酰胺和/或氟达拉滨。

[0322] 在一些实施方式中,淋巴细胞清除步骤包括施用剂量在约200mg/m²/天和约2000mg/m²/天之间(例如,200mg/m²/天、300mg/m²/天或500mg/m²/天)的环磷酰胺。在示例性实施方式中,环磷酰胺的剂量为约300mg/m²/天。在一些实施方式中,淋巴细胞清除步骤包括施用剂量在约20mg/m²/天和约900mg/m²/天之间(例如,20mg/m²/天、25mg/m²/天、30mg/m²/天或60mg/m²/天)的氟达拉滨。在示例性实施方式中,氟达拉滨的剂量为约30mg/m²/天。

[0323] 在一些实施方式中,淋巴细胞清除步骤包括施用剂量在约200mg/m²/天和约2000mg/m²/天之间(例如,200mg/m²/天、300mg/m²/天或500mg/m²/天)的环磷酰胺,和剂量在约20mg/m²/天和约900mg/m²/天之间(例如,20mg/m²/天、25mg/m²/天、30mg/m²/天或60mg/m²/天)的氟达拉滨。在示例性实施方式中,淋巴细胞清除步骤包括施用剂量为约300mg/m²/天的环磷酰胺和剂量为约30mg/m²/天的氟达拉滨。

[0324] 在示例性实施方式中,环磷酰胺的给予为300mg/m²/天,持续三天,并且氟达拉滨的给予为30mg/m²/天,持续三天。

[0325] 相对于第0天的T细胞(例如,CAR-T、TCR-T、修饰的T细胞等)输液,淋巴细胞清除化疗的给予可安排在第6天至第4天(有1天窗口期,即在第7天至第5天给予)。

[0326] 在示例性实施方式中,对于患有癌症的受试者,在施用经修饰的T细胞前3天,受试者通过静脉输液接受包括300mg/m²环磷酰胺的淋巴细胞清除化疗。在示例性实施方式中,对于患有癌症的受试者,在施用经修饰的T细胞前3天,受试者通过静脉输液接受包括300mg/m²环磷酰胺的淋巴细胞清除化疗。

[0327] 在示例性实施方式中,对于患有癌症的受试者,受试者接受包括剂量在约20mg/m²/天和约900mg/m²/天之间(例如,20mg/m²/天、25mg/m²/天、30mg/m²/天或60mg/m²/天)的氟达拉滨的淋巴细胞清除化疗。在示例性实施方式中,对于患有癌症的受试者,受试者接受包括剂量为30mg/m²的氟达拉滨的淋巴细胞清除化疗,持续3天。

[0328] 在示例性实施方式中,对于患有癌症的受试者,受试者接受包括剂量在约200mg/m²/天和约2000mg/m²/天之间(例如,200mg/m²/天、300mg/m²/天或500mg/m²/天)的环磷酰胺,以及剂量在约20mg/m²/天和约900mg/m²/天之间(例如,20mg/m²/天、25mg/m²/天、30mg/m²/天或60mg/m²/天)的氟达拉滨的淋巴细胞清除化疗。在示例性实施方式中,对于患有癌症的受试者,受试者接受包括剂量为约300mg/m²/天的环磷酰胺和剂量为30mg/m²的氟达拉滨的淋巴细胞清除化疗,持续3天。

[0329] 本发明的细胞可以在适当的临床前和临床实验和试验中确定的剂量、途径和次数施用。细胞组合物可以在这些剂量范围内多次施用。本发明细胞的施用可与本领域技术人

员确定的治疗期望的疾病或病症的其他有用的方法相结合。

[0330] 本领域已知输注CAR T细胞后的不良反应之一是免疫活化的开始,被称为细胞因子释放综合征(CRS)。CRS是一种导致炎性细胞因子升高的免疫活化。CRS是一种已知的靶向毒性,其发生可能与疗效有关。临床和实验室指标的范围从轻度CRS(体征和/或2级器官毒性)到重度CRS(sCRS; ≥ 3 级器官毒性、积极的临床干预措施和/或可能危及生命)。临床特征包括:高烧、乏力、疲劳、肌痛、恶心、厌食、心动过速/低血压、毛细血管渗漏、心功能不全、肾功能损害、肝功能衰竭和弥散性血管内凝血。在CAR T细胞输注后,显示包括 γ 干扰素、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、IL-10和IL-6的细胞因子显著升高。一种CRS标志是包括IL-6(严重升高)、IFN- γ 、TNF- α (中度)和IL-2(轻度)的细胞因子的升高。还观察到包括铁蛋白和C反应蛋白(CRP)的临床可用的炎症标志物的升高与CRS综合征相关。CRS的出现通常与过继转移的细胞的扩增和进行性免疫活化有关。已经表明,CRS的严重程度取决于输液时的疾病负担,因为肿瘤负担重的患者会出现更多的CRS。

[0331] 因此,本发明在确诊CRS后提供了适当的CRS管理策略,以减轻炎症失控的生理症状,同时不影响工程化细胞(例如,CAR T细胞)的抗肿瘤疗效。CRS管理策略是本领域已知的。例如,可以施用全身性皮质类固醇来迅速逆转sCRS(例如,3级CRS)症状,而不影响初始抗肿瘤反应。

[0332] 在一些实施方式中,可以施用抗IL-6R抗体。抗IL-6R抗体的实例是美国食品和药物管理局批准的单克隆抗体托珠单抗(tocilizumab),也称为阿替珠单抗(atlizumab)(市场名为Actemra或RoActemra)。托珠单抗是一种针对白细胞介素-6受体(IL-6R)的人源化单克隆抗体。施用托珠单抗表明几乎可以立即逆转CRS。

[0333] CRS通常基于所观察到的综合征的严重程度进行管理,并据此定制干预措施。CRS管理决策可能基于临床症状和体征以及对干预措施的反应,而不仅仅是实验室数值。

[0334] 轻度至中度病例通常采用症状管理来治疗,并根据需要使用液体疗法、非甾体抗炎药(NSAID)和抗组胺药来充分缓解症状。较严重的病例包括任何程度的血流动力学不稳定的患者;如果出现任何血流动力学不稳定,推荐使用托珠单抗。在一些实施方式中,CRS的一线管理可以是标记剂量为8mg/kg IV的托珠单抗,持续60分钟(不超过800mg/剂);可在Q8小时后重复使用托珠单抗。如果对第一剂量的托珠单抗的反应次最佳,可考虑附加剂量的托珠单抗。托珠单抗可单独施用或者可与皮质类固醇疗法联合施用。如果患者的CRS症状持续或进展,12-18小时内临床症状改善不充分或对托珠单抗的反应较差,可使用大剂量皮质类固醇治疗剂,通常为静脉注射100mg氢化可的松或1-2mg/kg的甲基强的松龙来治疗。在血流动力学不稳定或呼吸道症状较严重的患者中,可在CRS病程早期施用大剂量皮质类固醇治疗剂。CRS管理指南可基于已公布的标准(Lee等人(2019) *Biol Blood Marrow Transplant*, doi.org/10.1016/j.bbmt.2018.12.758; Neelapu等人(2018) *Nat Rev Clin Oncology*, 15:47; Teachey等人(2016) *Cancer Discov*, 6(6):664-679)。

[0335] 在用CAR-T疗法(Henter, 2007年)的患者中观察到了与巨噬细胞活化综合征(MAS)或嗜血细胞淋巴组织细胞增多症(HLH)一致的特征,与CRS的临床表现相一致。MAS似乎是由CRS发生的免疫活化反应,并且因此应被视为CRS的表现。MAS与HLH(也是一种免疫刺激反应)相似。MAS临床综合征的特征是高热不退、影响三个系中至少两个系的细胞减少和肝脾肿大。它与高血清铁蛋白、可溶性白细胞介素-2受体和甘油三酯以及循环自然杀伤(NK)活

性下降有关。

[0336] 因此,包含本公开内容的CAR和治疗性肽的工程细胞用于本文所述的治疗方法时,可增强工程细胞执行其功能的能力。因此,本公开内容提供了一种用于本文所述的治疗方法中增强工程细胞(例如,免疫细胞)功能的方法。

[0337] 在一个方面,本公开内容提供了一种治疗需要起的受试者癌症的方法,包括向受试者施用本文公开的工程细胞中的任何一种。本公开内容的又另一方面提供了一种治疗需要其的受试者癌症的方法,其包括向受试者施用由本文公开的任一种方法产生的工程细胞。

[0338] 另一个方面包括一种治疗受试者疾病或紊乱的方法,其包括向受试者施用有效量的经基因修饰以表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞。该CAR包括抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内信号传导结构域。该方法进一步包括经由非天然治疗性肽刺激针对癌症的内源性免疫应答。非天然治疗性肽在修饰T细胞中表达,和/或与修饰T细胞联合施用。非天然治疗性肽具有以下一种或多种性质:(i)治疗性肽是干扰素基因刺激因子(STING)通路的激活剂;(ii)治疗性肽是环状二核苷酸的模拟物;(iii)治疗性肽是短链脂肪酸(SCFA)的模拟物;(iv)治疗性肽是模式识别受体(PRR)的激动剂,(v)治疗性肽是类固醇/激素样分子的模拟物,(vi)治疗性肽促进靶细胞凋亡,(vii)治疗性肽是免疫原性表位,和/或(viii)治疗性肽阻断靶细胞中DNA修复的一种或多种机制。

[0339] 在某些实施方式中,治疗性肽是cGAMP、cAMP或cGMP的模拟物。在某些实施方式中,治疗性肽是TLR激动剂的模拟物。在某些实施方式中,治疗性肽是鞭毛蛋白、CpG基序、肽聚糖、脂多糖(LPS)或单磷脂A(MPL)的模拟物。在某些实施方式中,治疗性肽是第二线粒体源性胱天蛋白酶激活因子(SMAC)模拟物。在某些实施方式中,治疗性肽是聚ADP核糖聚合酶(PARP)的抑制剂。在某些实施方式中,非天然肽是与任何天然存在的肽的序列同一性不超过80%的肽。在某些实施方式中,肽包含选自SEQ ID NOs:1-16的氨基酸序列。

[0340] 在某些实施方式中,治疗性肽是免疫原表位,并且施用至受试者后,免疫原表位在受试者的癌细胞表面表达。在某些实施方式中,治疗性肽在修饰T细胞中表达,并且在受试者施用修饰T细胞后,治疗性肽在一个或多个细胞外囊泡中从修饰T细胞中输出。在某些实施方式中,治疗性肽经由一个或多个细胞外囊泡被递送到受试者体内的一个或多个抗原呈递细胞。

[0341] 本文还提供了一种增强基因修饰以表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞的抗癌活性的方法,其中CAR包括抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内信号传导结构域,该抗原结合结构域与肿瘤细胞上表达的抗原特异性结合。方法包括在T细胞中共同表达非天然治疗性肽。非天然治疗性肽具有以下中的一种或多种性质:(i)治疗性肽是干扰素基因刺激因子(STING)通路的激活剂,(ii)治疗性肽是环状二核苷酸的模拟物,(iii)治疗性肽是短链脂肪酸(SCFA)的模拟物,(iv)治疗性肽是模式识别受体(PRR)的激动剂,(v)治疗性肽是类固醇/激素样分子的模拟物,(vi)治疗性肽促进靶细胞凋亡,(vii)治疗性肽是免疫原表位,和/或(viii)治疗性肽阻断靶细胞中DNA修复的一种或多种机制。

[0342] 本文还提供了治疗受试者炎症性疾病、自身免疫性疾病或癌症的方法,其包括向受试者施用有效量的本文所考虑的任何工程细胞或组合物。

[0343] I. 生产工程细胞的方法

[0344] 本文提供了生产或产生本公开内容的工程细胞(例如,免疫细胞或其前体;例如,T细胞)的方法,该工程细胞用于肿瘤免疫治疗,例如,过继免疫治疗。这些细胞一般是通过将一种或多种编码CAR和治疗性肽的核酸引入细胞而被工程化。

[0345] 还提供了一种在细胞中共同表达CAR和治疗性肽的方法。该方法包括在使CAR和治疗性肽表达的条件下,向细胞递送本文考虑的任何表达载体。

[0346] 在一些实施方式中,通过表达载体将CAR和治疗性肽引入细胞。本文提供了包含编码本公开内容的CAR和治疗性肽的核酸序列的表达载体。合适的表达载体包括慢病毒载体、 γ 逆转录病毒载体、泡沫病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体、腺病毒载体、工程杂交病毒、裸DNA,其包括但不限于转座子介导的载体,诸如睡美人、猪流感病毒(Piggybak)和整合酶,诸如Phi31。一些其他合适的表达载体包括单纯疱疹病毒(HSV)和逆转录病毒表达载体。

[0347] 在某些实施方式中,编码CAR的核酸通过病毒转导引入细胞。在某些实施方式中,病毒转导包括用包含编码CAR的核酸的病毒载体接触免疫细胞或前体细胞。在某些实施方式中,病毒载体是腺相关病毒(AAV)载体。在某些实施方式中,AAV载体包括5' ITR和3' ITR。在某些实施方式中,AAV载体包括土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件(WPRE)。在某些实施方式中,AAV载体包括多腺苷酸化(polyA)序列。在某些实施方式中,polyA序列是牛生长激素(BGH)polyA序列。

[0348] 腺病毒表达载体基于腺病毒,腺病毒整合到基因组DNA的能力低,但转染宿主细胞的效率高。腺病毒表达载体包含足以:(a)支持表达载体的包装和(b)最终在宿主细胞中表达CAR的腺病毒序列。在一些实施方式中,腺病毒基因组是36kb的线性双链DNA,其中可插入外源DNA序列(例如,编码CAR的核酸)以替代大块腺病毒DNA,从而制备本公开内容的表达载体(参见,例如,Danthinne和Imperiale, *Gene Therapy* (2000) 7 (20):1707-1714)。

[0349] 另一种表达载体基于腺相关病毒(AAV),其利用了腺病毒耦合系统。这种AAV表达载体高频率地整合到宿主基因组中。它可以感染非分裂细胞,因此使其可用于将基因递送到哺乳动物细胞中,例如,在组织培养或体内。AAV载体具有广泛的感染宿主范围。关于AAV载体的产生和使用的细节在美国专利号5,139,941和4,797,368进行了描述。

[0350] 逆转录病毒表达载体能够整合到宿主基因组中,递送大量的外源遗传物质,感染广泛的物种和细胞类型,并被包装在特殊细胞系中。逆转录病毒载体是通过在病毒基因组的某些位置插入核酸(例如,编码CAR和治疗性肽的核酸)来构建的,以产生有复制缺陷的病毒。虽然逆转录病毒载体能够感染多种细胞类型,但CAR和治疗性肽的整合和稳定表达需要宿主细胞的分裂。

[0351] 慢病毒载体源自慢病毒,慢病毒是一种复杂的逆转录病毒,除了常见的逆转录病毒基因gag、pol和env外,其还含有其他具有调节或结构功能的基因(参见,美国专利号6,013,516和5,994,136)。慢病毒的一些实例包括人类免疫缺陷病毒(HIV-1、HIV-2)和猴免疫缺陷病毒(SIV)。慢病毒载体是通过多重减弱HIV毒力基因产生的,例如,基因env、vif、vpr、vpu和nef被删除,使载体在生物学上是安全的。慢病毒载体能够感染非分裂细胞,并且可用于体内和离体基因转移和表达,例如,编码CAR和治疗性肽的核酸的体内和离体基因转移和表达(参见,例如,美国专利号5,994,136)。

[0352] 包括本公开内容核酸的表达载体可通过本领域技术人员已知的任何手段引入宿主细胞。如果需要,表达载体可包括用于转染的病毒序列。可选地,表达载体也可以通过融

合、电穿孔、生物技术、转染、脂质转染等引入。在引入表达载体之前,宿主细胞可在培养物中生长和扩增,然后进行适当的处理以引入和整合载体。然后扩增宿主细胞,并可通过载体中存在的标记物筛选宿主细胞。可以使用的各种标记物是本领域已知的,并且可以包括hprt、新霉素抗性、胸苷激酶、潮霉素抗性等。如本文所用,术语“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可以互换地使用。在一些实施方式中,宿主细胞是免疫细胞或其前体,例如,T细胞、NK细胞或NKT细胞。

[0353] 本公开内容还提供了包括并稳定表达本公开内容的CAR的基因工程细胞。在一些实施方式中,基因工程细胞是基因工程化的T淋巴细胞(T细胞)、幼稚T细胞(TN)、记忆T细胞(例如,中枢记忆T细胞(TCM)、效应记忆细胞(TEM))、自然杀伤细胞(NK细胞)和能够产生治疗相关后代的巨噬细胞。在某些实施方式中,基因工程细胞是自体细胞。在某些实施方式中,修饰细胞对T细胞耗竭具有抗性。在某些实施方式中,修饰细胞对T细胞功能障碍具有抗性。

[0354] 修饰细胞(例如,其包括CAR)可通过用包括本公开内容的核酸的表达载体稳定转染宿主细胞来产生。产生本公开内容的修饰细胞的另外的方法包括但不限于化学转化法(例如,使用磷酸钙、树枝状聚合物、脂质体和/或阳离子聚合物)、非化学转化法(例如,电穿孔、光学转化、基因电转移和/或流体动力学递送)和/或基于颗粒的方法(例如,刺穿、使用基因枪和/或磁感染)。表达本公开内容的CAR和治疗性肽的转染细胞可在体外扩增。

[0355] 将表达载体引入宿主细胞的物理方法包括磷酸钙沉淀法、脂质体感染法、粒子轰击法、显微注射法、电穿孔法等。生产包含载体和/或外源核酸的细胞的方法是本领域众所周知的。参见,例如,Sambrook et al. (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York。将表达载体引入宿主细胞的化学方法包括胶体分散系统,诸如大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠粒和基于脂质的系统,其包括水包油乳液、胶束、混合胶束和脂质体。

[0356] 适合使用的脂质可以从商业来源获得。例如,二肉豆蔻基磷脂酰胆碱(“DMPC”)可从Sigma, St. Louis, MO获得;磷酸二鲸蜡酯(“DCP”)可从K&K Laboratories (Plainview, NY)获得;胆固醇(“Choi”)可从Calbiochem-Behring获得;二肉豆蔻基磷脂酰甘油(“DMPG”)和其它脂质可从Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL)获得。脂质在氯仿或氯仿/甲醇中的储备溶液可保存在约-20℃下。氯仿可作为唯一的溶剂,因为它比甲醇更容易挥发。“脂质体”是一个通用术语,其包括通过生成封闭的脂质双层或聚集体而形成的各种单层和多层脂质载体。脂质体可以被表征为具有磷脂双层膜和内部含水介质的囊泡结构。多层脂质体具有通过含水介质分离的多个脂质层。当磷脂悬浮在过量的水溶液中时,它们会自发形成。脂质组分在形成封闭结构之前经历自重排,并在脂质双层之间截留水分和溶解的溶质(Ghosh et al., 1991 *Glycobiology* 5:505-10)。还考虑在溶液中具有与正常囊泡结构不同结构的组合物。例如,脂质可能具有胶束结构,或仅仅作为脂质分子的不均匀聚集体存在。还考虑了lipofectamine-核酸复合物。

[0357] 无论采用何种方法将外源核酸引入宿主细胞或以其他方式使细胞暴露于本公开内容的抑制剂,为了确认核酸是否存在于宿主细胞中,可进行各种测定。这种测定包括,例如,本领域技术人员熟知的分子生物学测定,诸如Southern和Northern印迹、RT-PCR和PCR;生物化学测定,诸如检测特定肽的存在或不存在,例如,通过免疫学手段(ELISA和Western

印迹)或通过本文所述的测定来识别落入本公开内容范围内的试剂。

[0358] 在一个实施方式中,引入宿主细胞的核酸是RNA。在另一个实施方式中, RNA是包括体外转录RNA或合成RNA的mRNA。RNA可以使用聚合酶链反应(PCR)生成的模板通过体外转录产生。使用适当的引物和RNA聚合酶,可将任何来源的感兴趣DNA直接通过PCR转化为用于体外mRNA合成的模板。DNA的来源可以是,例如,基因组DNA、质粒DNA、噬菌体DNA、cDNA、合成DNA序列或任何其他适当的DNA来源。

[0359] PCR可用于生成mRNA的体外转录模板,然后将其引入细胞。进行PCR的方法是本领域众所周知的。用于PCR的引物被设计为具有与要用作PCR模板的DNA区域基本互补的区域。如本文所用,“基本互补”是指引物序列中大部分或全部碱基互补的核苷酸序列。在用于PCR的退火条件下,基本互补序列能够与预期的DNA靶标退火或杂交。可以设计引物来与DNA模板的任何部分基本互补。例如,引物可被设计为扩增细胞中正常转录的基因部分(开放阅读框),包括5'和3'UTR。引物还可被设计为扩增基因中编码特定感兴趣结构域的部分。在一个实施方式中,引物被设计为扩增人cDNA的编码区,包括5'和3'UTR的全部或部分。可用于PCR的引物是通过本领域众所周知的合成方法产生的。“正向引物”是指含有与要扩增的DNA序列上游的DNA模板上的核苷酸基本互补的核苷酸区域的引物。“上游”在本文中用于指代相对于编码链要扩增的DNA序列的5号位置。“反向引物”是指与含有要扩增的DNA序列下游的双链DNA模板基本互补的核苷酸区域的引物。“下游”在本文中用于指代相对于编码链的待扩增的DNA序列的3'位置。

[0360] 也可使用能提高RNA稳定性和/或翻译效率的化学结构。RNA优选地具有5'和3'UTR。在一个实施方式中,5'UTR的长度在0至3000个核苷酸之间。要添加到编码区的5'和3'UTR序列的长度可以通过不同的方法改变,其包括但不限于,设计退火到UTR不同区域的PCR引物。使用这种方法,本领域的普通技术人员可以修改在转染转录RNA后达到最佳翻译效率所需的5'和3'UTR长度。

[0361] 5'和3'UTR可以是目标基因的天然存在的内源性5'和3'UTR。可选地,可以通过在正向和反向引物中加入UTR序列或对模板进行任何其他修饰来添加非目标基因内源性的UTR序列。使用非目标基因内源性的UTR序列可用于改进RNA的稳定性和/或翻译效率。例如,已知3'UTR序列中富含AU元素会降低mRNA的稳定性。因此,基于本领域众所周知的UTR性质,可以选择或设计3'UTR,以提高转录RNA的稳定性。

[0362] 在一个实施方式中,5'UTR可以含有内源基因的Kozak序列。可选地,当如上所述通过PCR添加对目标基因不是内源性的5'UTR时,可以通过添加5'UTR序列来重新设计共有Kozak序列。Kozak序列可以提高某些RNA转录本的翻译效率,但似乎并非所有RNA都需要Kozak序列才能实现高效翻译。许多mRNA对Kozak序列的要求在本领域是已知的。在其他实施方式中,5'UTR可以源自RNA病毒,其RNA基因组在细胞中是稳定的。在其他实施方式中,可在3'或5'UTR中使用各种核苷酸类似物,以阻碍外切酶对mRNA的降解。

[0363] 为了能从DNA模板合成RNA而不需要基因克隆,应在待转录序列上游的DNA模板上附接转录启动子。当作为RNA聚合酶启动子的序列被添加到正向引物的5'端时, RNA聚合酶启动子就会被整合到要转录的开放阅读框上游的PCR产物中。在一个实施方式中,启动子是T7聚合酶启动子,如本文其他部分所述。其他有用的启动子包括但不限于,T3和SP6 RNA聚合酶启动子。T7、T3和SP6启动子的共有核苷酸序列是本领域已知的。

[0364] 在一个实施方式中,mRNA具有5'端帽和3' poly (A) 尾,其决定了核糖体的结合、翻译的启动和mRNA在细胞中的稳定性。在环状DNA模板(例如,质粒DNA)上,RNA聚合酶会产生不适合在真核细胞中表达的长凹面产物。在3'UTR末端线性化的质粒DNA的转录会导致正常大小的mRNA,即使其在转录后被聚腺苷酸化,其在真核转染中也是无效的。

[0365] 在线性DNA模板上,噬菌体T7 RNA聚合酶可将转录本的3'端延伸到模板的最后一个碱基之外(Schenborn和Mierendorf,Nuc Acids Res.,13:6223-36(1985);Nacheva and Berzal-Herranz,Eur.J.Biochem.,270:1485-65(2003))。

[0366] 转录DNA模板的polyA/T片段可在PCR期间通过使用含有polyT尾(诸如100T尾(大小可以是50-5000T))的反向引物产生,或在PCR之后通过任何其他方法产生,包括但不限于DNA连接或体外重组。Poly(A)尾也为RNA提供稳定性,并且减少其降解。一般来说,Poly(A)尾的长度与转录RNA的稳定性呈正相关。在一个实施方式中,poly(A)尾的长度在100到5000个腺苷之间。

[0367] 在使用poly(A)聚合酶(诸如大肠杆菌polyA聚合酶(E-PAP))进行体外转录后,可进一步延长RNA的poly(A)尾。在一个实施方式中,将聚(A)尾的长度从100个核苷酸增加到300至400个核苷酸导致RNA的翻译效率提高约两倍。此外,将不同的化学基团附接到3'端可以增加mRNA的稳定性。这种附接可以包含修饰/人工核苷酸、适配子和其他化合物。例如,可以使用poly(A)聚合酶将ATP类似物结合到poly(A)尾中。ATP类似物可进一步提高RNA的稳定性。

[0368] 5'帽也为RNA分子提供稳定性。在一个优选的实施方式中,通过本文公开的方法生产的RNA包括5'帽。5'帽是利用本领域已知的技术提供的,并在本文中也有描述(Cougot,et al.,Trends in Biochem.Sci.,29:436-444(2001);Stepinski,et al.,RNA,7:1468-95(2001);Elango,et al.,Biochim.Biophys.Res.Comm.,330:958-966(2005))。

[0369] 在一些实施方式中,RNA被电穿孔到细胞中,诸如体外转录的RNA。可包括任何适合细胞电穿孔的溶质,其可含有促进细胞渗透性和活力的因子,诸如糖、肽、脂质、蛋白质、抗氧化剂和表面活性剂。

[0370] 在一些实施方式中,编码本公开内容的CAR的核酸将是RNA,例如,体外合成的RNA。体外合成RNA的方法是本领域已知的;任何已知的方法都可用于合成包含编码CAR和治疗性肽序列的RNA。将RNA引入宿主细胞的方法也是本领域已知的。参见,例如,Zhao et al.Cancer Res.(2010)15:9053。将包含编码CAR和治疗性肽的核苷酸序列的RNA引入宿主细胞可在体外、离体或体内进行。例如,宿主细胞(例如,NK细胞、细胞毒性T淋巴细胞等)可在体外或离体用包含编码CAR和治疗性肽的核苷酸序列的RNA进行电穿孔。

[0371] 所公开的方法可应用于基础研究和治疗中的T细胞活性调节,癌症、干细胞、急性和慢性感染以及自身免疫性疾病等领域,包括评估基因修饰的T细胞杀死目标癌细胞的能力。

[0372] 方法还提供了通过改变例如启动子或输入RNA的量,在宽范围内控制表达水平的能力,使得可以单独调节表达水平。此外,基于PCR的mRNA生产技术也大大地促进了具有不同结构及其结构域组合的mRNA的设计。

[0373] 本公开内容的RNA转染方法的一个优点是RNA转染基本上是瞬时的,并且不含载体。RNA转基因可被递送到淋巴细胞,并在短暂的体外细胞活化后在淋巴细胞中表达,作为

最小表达盒,而不需要任何额外的病毒序列。在这些条件下,转基因不太可能整合到宿主细胞基因组中。由于RNA的转染效率及其均匀修饰整个淋巴细胞群的能力,细胞的克隆是不必要的。

[0374] 用体外转录RNA (IVT-RNA) 对T细胞进行基因修饰利用了两种不同的策略,这两种策略都已在各种动物模型中相继进行了测试。通过脂质体转染或电穿孔用体外转录RNA转染细胞。期望使用各种修饰来稳定IVT-RNA,以实现转移的IVT-RNA的延长表达。

[0375] 文献中已知一些IVT载体,它们以标准化的方式用作体外转录的模板,并且已经以产生稳定的RNA转录本的方式进行了基因修饰。目前在本领域中使用的方案是基于具有以下结构的质粒载体:能够进行RNA转录的5' RNA聚合酶启动子,然后是被非翻译区(UTR)侧翼为3'和/或5'的目标基因,以及含有50-70A核苷酸的3'聚腺苷酸盒。在体外转录之前,通过II型限制性内切酶(识别序列对应于切割位点)将环状质粒在聚腺苷酸盒下游线性化。因此,聚腺苷酸盒对应于转录本中后面的poly(A)序列。由于该过程,一些核苷酸在线性化后保留为酶切割位点的一部分,并在3'端延伸或掩蔽poly(A)序列。还不清楚这种非生理性悬垂是否会影响这种构建体在细胞内产生的蛋白质的量。

[0376] 在另一方面,RNA构建体通过电穿孔输送到细胞中。参见,例如,US2004/0014645、US2005/0052630A1、US2005/0070841A1、US2004/0059285A1、US2004/0092907A1中教导的将核酸构建体电穿孔到哺乳动物细胞中的制剂和方法。电穿孔任何已知细胞类型所需的各种参数(包括电场强度)在相关研究文献以及该领域的众多专利和专利申请中通常是已知的。例如,参见美国专利号6,678,556、美国专利号7,171,264以及美国专利号7,173,116。用于电穿孔治疗应用的设备是商业上可获得的,例如MedPulser™DNA电穿孔治疗系统(Inovio/Genetronics, San Diego, California),并在诸如美国专利号6,567,694;美国专利号6,516,223、美国专利号5,993,434、美国专利号6,181,964、美国专利号6,241,701,以及美国专利号6,233,482中描述;电穿孔也可用于体外细胞转染,如US20070128708A1所述。电穿孔也可用于将核酸递送到体外细胞中。因此,利用本领域技术人员已知的许多可用装置和电穿孔系统中的任何一种,电穿孔介导的将核酸(包括表达构建体)施用到细胞中呈现了将目标RNA递送到靶细胞的令人兴奋的新手段。

[0377] 在一些实施方式中,细胞(例如,T细胞)可以在引入编码CAR和治疗性肽的核酸分子之前、期间和/或之后进行温育或培养。在一些实施方式中,细胞(例如,T细胞)可以在引入编码CAR和治疗性肽的核酸分子之前、期间或之后温育或培养,诸如在用编码CAR和治疗性肽的病毒载体(例如,慢病毒载体)转导细胞之前、期间或之后温育或培养。在一些实施方式中,方法包括在引入编码CAR和治疗性肽的核酸分子之前,用刺激剂或激活剂(例如,抗-CD3/抗-CD28抗体)激活或刺激细胞。在一些实施方式中,在引入试剂之前,刺激剂或激活剂和/或细胞因子不会被去除。本领域技术人员能够确定将一个或多个核酸序列的每一个引入宿主细胞的顺序。

[0378] J. 免疫细胞的扩增

[0379] 无论是在工程化细胞(例如以表达CAR和治疗性肽)之前还是之后,都可以使用在例如美国专利号6,352,694;6,534,055;6,905,680;6,692,964;5,858,358;6,887,466;6,905,681;7,144,575;7,067,318;7,172,869;7,232,566;7,175,843;5,883,223;6,905,874;6,797,514;6,867,041;和美国公开号20060121005中描述的方法来活化并在数量上扩

增细胞。例如,本公开的T细胞可通过与在其上附有刺激CD3/TCR复合物相关信号的试剂和刺激T细胞表面上的共刺激分子的配体的表面接触而扩增。具体而言,可通过与固定在表面上的抗CD3抗体或其抗原结合片段或抗CD2抗体接触,或通过与结合钙离子载体的蛋白激酶C激活剂(例如,苔藓抑素)接触而刺激T细胞群。为了共同刺激T细胞表面上的附属分子,可使用与附属分子结合的配体。例如,在适合刺激T细胞增殖的条件下,T细胞可与抗CD3抗体和抗CD28抗体接触。抗CD28抗体的实例包括9.3、B-T3、XR-CD28(Diaclone, Besancon, France),并且这些可用于本发明,本领域已知的其他方法和试剂(例如,参见ten Berge等人, Transplant Proc. (1998) 30 (8) :3975-3977; Haanen等人, J. Exp. Med. (1999) 190 (9) :1319-1328; 和Garland等人, J. Immunol. Methods (1999) 227 (1-2) :53-63) 也可用于本发明。

[0380] 通过本文所公开的方法扩增T细胞可增加约10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、2000倍、3000倍、4000倍、5000倍、6000倍、7000倍、8000倍、9000倍、10,000倍、100,000倍、1,000,000倍、10,000,000倍或更多,以及两者之间的任一个和所有整数或部分整数。在一个实施方式中,T细胞在约20倍至约50倍的范围内扩增。

[0381] 在培养后,T细胞可在培养装置中的细胞培养基中温育一段时间或直到细胞达到汇合或高细胞密度,以获得最佳传代,然后将细胞传递到另一个培养装置中。培养装置可以是通常用于体外培养细胞的任何培养装置。优选地,在将细胞传递到另一个培养装置之前,汇合度为70%或更高。更优选地,汇合度为90%或更高。一段时间可以是适合体外培养细胞的任何时间。在T细胞培养期间,可在任意时间更换T细胞培养基。优选地,约每2到3天更换一次T细胞培养基。然后从培养装置中收获T细胞,接着T细胞可以立即被使用或冷冻保存以备日后使用。在一个实施方式中,本发明包括冷冻保存扩增的T细胞。在将核酸引入T细胞之前将冷冻保存的T细胞解冻。

[0382] 在另一个实施方式中,该方法包括分离T细胞并扩增T细胞。在另一个实施方式中,本发明进一步包括在扩增前冷冻保存T细胞。在又一个实施方式中,解冻冷冻保存的T细胞以使用编码嵌合膜蛋白的RNA进行电穿孔。

[0383] 在美国专利号5,199,942(通过引用并入本文)中描述了离体扩增细胞的另一种方法。比如,在美国专利号5,199,942中所描述的扩增可作为本文所述其它扩增方法的替代或补充。简而言之,T细胞的离体培养和扩增包括添加细胞生长因子,比如在美国专利号5,199,942中描述的那些,或其他因子,比如f1t3-L、IL-1、IL-3和c-kit配体。在一个实施方式中,扩增T细胞包括用选自f1t3-L、IL-1、IL-3和c-kit配体的因子培养T细胞。

[0384] 本文所述的培养步骤(与本文所述的试剂接触或电穿孔后)可以很短,例如少于24小时,比如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小时。本文进一步描述的培养步骤(与本文所述的试剂接触)可以更长,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14天或更多天。

[0385] 各种术语用于描述培养物中的细胞。细胞培养物一般是指从活体生物体中提取并在受控条件下生长的细胞。原代细胞培养物是指直接取自生物体的细胞、组织或器官在第一次继代培养之前的培养物。当在促进细胞生长和/或分裂的条件下将细胞置于生长培养基中时,细胞在培养物中扩增,产生更大的细胞群。当细胞在培养物中扩增时,细胞增殖率通常以细胞数量倍增所需的时间来衡量,也称为倍增时间。

[0386] 每一轮继代培养称为一代。当细胞经继代培养时,它们被称为经过传代。特定的细胞群或细胞系有时被称为或表征为传代次数。例如,经过十次传代培养的细胞群可称为P10培养物。原代培养物,即,从组织中分离出细胞后的第一次培养物,被称为P0。在第一次继代培养后,细胞被描述为二级培养物(P1或第1代)。在第二次继代培养后,细胞成为三级培养物(P2或第2代)等。本领域技术人员可以理解,在传代期间可能会有多次群体倍增,因此培养物的群体倍增数大于传代数。细胞在传代之间的扩增(即,群体倍增数)取决于许多因素,包括但不限于接种密度、基质、培养基和传代之间的时间。

[0387] 在一个实施方式中,可以将细胞培养数小时(约3小时)至约14天或其间的任何小时整数值。适合T细胞培养的条件包括合适的培养基(例如,最小必需培养基或RPMI培养基1640或X-vivo 15, (Lonza)),其可能含有增殖和存活所必需的因子,包括血清(例如,胎牛或人血清)、白细胞介素-2(IL-2)、胰岛素、IFN- γ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF- β 和TNF- α 或技术人员已知的用于细胞生长的其他添加剂。用于细胞生长的其他添加剂包括但不限于表面活性剂、人血浆蛋白粉(plasmanate)和还原剂,比如N-乙酰-半胱氨酸和2-巯基乙醇。培养基可包括RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo 15和X-Vivo 20,优选步骤是添加氨基酸、丙酮酸钠和维生素,不含血清或添加适量血清(或血浆)或规定的激素集和/或足以促进T细胞生长和扩增的细胞因子(一种或多种)。抗生素(例如,青霉素和链霉素)仅包括在实验培养物中,不包括在将注入受试者的细胞培养物中。靶细胞维持在支持生长所必需的条件下,例如合适的温度(例如,37°C)和气氛(例如,空气加5%的CO₂)。

[0388] 用于培养T细胞的培养基可包括可共同刺激T细胞的试剂。例如,可刺激CD3的试剂是CD3抗体,并且可刺激CD28的试剂是CD28抗体。通过本文所公开的方法分离的细胞可扩增约10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、2000倍、3000倍、4000倍、5000倍、6000倍、7000倍、8000倍、9000倍、10,000倍、100,000倍、1,000,000倍、10,000,000倍或更高。在一个实施方式中,T细胞在约20倍至约50倍或更大的范围内扩增。在一个实施方式中,经由抗CD3抗体包被的KT64.86人工抗原递呈细胞(aAPC)扩增人T调节细胞。扩增和活化T细胞的方法可参见美国专利号7,754,482、8,722,400,和9,555,105,其内容以其整体并入本文。

[0389] 在一个实施方式中,扩增T细胞的方法可进一步包括分离扩增的T细胞以进一步应用。在另一个实施方式中,扩增方法可进一步包括对扩增的T细胞进行后续电穿孔,然后进行培养。后续电穿孔可包括向扩增的T细胞群中引入编码试剂的核酸,比如转导扩增的T细胞、转染扩增的T细胞或用核酸电穿孔扩增的T细胞,其中试剂进一步刺激T细胞。试剂可刺激T细胞,比如通过刺激进一步的扩增、效应功能或另一种T细胞功能。

[0390] K. T细胞受体

[0391] 本公开内容提供了包含外源性T细胞受体(TCR)和治疗性肽的工程细胞(例如,免疫细胞或其前体,例如,T细胞)的组合物和方法。因此,在一些实施方式中,细胞已被改变为含有特异性T细胞受体(TCR)基因(例如,编码 α/β TCR的核酸)。TCR或其抗原结合部分包括识别靶多肽(例如,肿瘤抗原、病毒或自身免疫蛋白)的肽表位或T细胞表位的那些。在某些实施方式中,TCR对肿瘤相关抗原(例如,人NY-ESO-1)具有结合特异性。

[0392] TCR是一种由六条不同的膜结合链组成的二硫键连接的异源二聚体蛋白,其参与T

细胞响应于抗原的激活。存在 α/β TCR和 γ/δ TCR。 α/β TCR包含TCR α 链和TCR β 链。表达包含TCR α 链和TCR β 链的TCR的T细胞通常被称为 α/β T细胞。 γ/δ TCR包含TCR γ 链和TCR δ 链。表达包含TCR γ 链和TCR δ 链的TCR的T细胞通常被称为 γ/δ T细胞。本公开内容的TCR是包含TCR α 链和TCR β 链的TCR。

[0393] TCR α 链和TCR β 链各自由两个细胞外结构域、一个可变区和一个恒定区组成。TCR对靶抗原的亲合力需要TCR α 链可变区和TCR β 链可变区。每个可变区都包含三个提供用于与靶抗原结合的超可变区或互补决定区(CDR)。TCR α 链的恒定区和TCR β 链的恒定区靠近细胞膜。TCR进一步包括跨膜区和短的胞质尾。CD3分子与TCR异二聚体组装在一起。CD3分子包含酪氨酸磷酸化的特征序列基序,其被称为基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)。近端信号传导事件通过CD3分子介导,因此,TCR-CD3复合物的相互作用在介导细胞识别事件中起着重要作用。

[0394] TCR的刺激是由抗原呈递细胞上的主要组织相容性复合物分子(MHC)触发的,这些抗原呈递细胞将抗原肽呈递给T细胞并与TCR相互作用,以诱导一系列胞内信号传导级联反应。TCR的参与会启动正负信号传导级联反应,导致细胞增殖、细胞因子产生和/或激活诱导的细胞死亡。

[0395] 本公开内容的TCR可以是野生型TCR、高亲合力TCR和/或嵌合TCR。高亲合力TCR可能是对野生型TCR进行修饰的结果,与野生型TCR相比,其赋予靶抗原更高的亲合力。高亲合力TCR可能是亲合力成熟的TCR。本领域技术人员已知修饰TCR和/或亲合力成熟TCR的方法。工程化和表达TCR的技术包括但不限于生产TCR异二聚体,其包括连接各亚基的天然二硫键(Garboczi, et al., (1996), Nature 384(6605):134-41; Garboczi, et al., (1996), J Immunol 157(12):5403-10; Chang et al., (1994), PNAS USA 91:11408-11412; Davodeau et al., (1993), J. Biol. Chem. 268(21):15455-15460; Golden et al., (1997), J. Imm. Meth. 206:163-169; U.S. Pat. No. 6,080,840)。

[0396] 在一些实施方式中,外源性TCR是全TCR或其抗原结合部分或其抗原结合片段。在一些实施方式中,TCR是完整或全长TCR,其包括 $\alpha\beta$ 形式或 $\gamma\delta$ 形式的TCR。在一些实施方式中,TCR是小于全长TCR,但与MHC分子中结合的特定肽结合,诸如与MHC-肽复合物结合的抗原结合部分。在某些情况下,TCR的抗原结合部分或片段可以仅包含全长或完整TCR的结构域的一部分,但又能够结合肽表位,诸如与全TCR结合的MHC-肽复合物。在某些情况下,抗原结合部分含有TCR的可变结构域,诸如,TCR的可变 α 链和可变 β 链,足以形成结合位点,用于结合特定的MHC-肽复合物。通常,TCR的可变链含有参与肽、MHC和/或MHC-肽复合物的识别的互补决定区(CDR)。

[0397] 在一些实施方式中,TCR的可变结构域含有高变环或CDR,其通常是抗原识别和结合能力以及特异性的主要贡献者。在一些实施方式中,TCR的CDR或其组合形成所有或基本所有含有给定TCR分子的抗原结合位点。TCR链可变区内的各种CDR通常由框架区(FR)分离,框架区通常与CDR相比在TCR分子中表现出较小的可变性(参见,例如, Jores et al, Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 87:9138, 1990; Chothia et al., EMBO J. 7:3745, 1988; see also Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003)。在一些实施方式中,CDR3是负责抗原结合或特异性的主要CDR,或者是在给定的TCR可变区上的三个CDR中对于抗原识别和/或与肽-MHC复合物的加工肽部分相互作用最重要的CDR。在某些情况下, α 链的CDR1可以与某

些抗原肽的N末端部分相互作用。在某些情况下,β链的CDR1可以与肽的C末端部分相互作用。在某些情况下,CDR2对MHC-肽复合物的MHC部分的相互作用或识别贡献最大,或为负责的主要CDR。在一些实施方式中,β链的可变区可以含有进一步的超可变区(CDR4或HVR4),其通常涉及超抗原结合而非抗原识别(Kotb(1995) *Clinical Microbiology Reviews*, 8:411-426)。

[0398] 在一些实施方式中,TCR含有可变α结构域(V_{α})和/或可变β结构域(V_{β})或其抗原结合片段。在一些实施方式中,TCR的α链和/或β链还可以含有恒定结构域、跨膜结构域和/或短胞质尾部(参见,例如, JJaneway et al., *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 3Ed., Current Biology Publications, p.4:33, 1997)。在一些实施方式中,α链恒定结构域由TRAC基因(IMG T命名法)编码,或为其变体。在一些实施方式中,β链恒定区由TRBC1或TRBC2基因(IMG T命名法)编码,或为其变体。在一些实施方式中,恒定结构域与细胞膜相邻。例如,在某些情况下,由两条链形成的TCR的细胞外部分含有两个膜近端恒定结构域和两个膜远端可变结构域,其每个可变结构域含有CDR。

[0399] 确定或识别TCR的各种结构域或区域属于本领域技术人员的水平。在某些方面,TCR的残基是已知的或可以根据国际免疫遗传学信息系统(IMG T)编号系统进行识别(参见,例如www.imgt.org;也参见Lefranc et al. (2003) *Developmental and Comparative Immunology*, 2&55-77;以及The T Cell Factsbook 2nd Edition, Lefranc and LeFranc Academic Press 2001)。使用该系统,TCR V_{α} 链和/或 V_{β} 链内的CDR1序列对应于残基编号27-38(包括27和38)之间存在的氨基酸,TCR V_{α} 链和/或 V_{β} 链内的CDR2序列对应于残基编号56-65(包括56和65)之间存在的氨基酸,TCR V_{α} 链和/或 V_{β} 链内的CDR3序列对应于残基编号105-117(包括105和117)之间存在的氨基酸。IMG T编号系统不应被解释为以任何方式进行限制,因为本领域技术人员已知存在其他编号系统,并且使用任何可用的编号系统来识别TCR的各种结构域或区域属于本领域技术人员的水平。

[0400] 在一些实施方式中,TCR可为两条链α和β(或任选的γ和δ)的异二聚体,其通过诸如一个或多个二硫键连接。在一些实施方式中,TCR的恒定结构域可含有短连接序列,其中半胱氨酸残基形成二硫键,从而连接TCR的两条链。在一些实施方式中,TCR可在α和β链的每条链中具有额外的半胱氨酸残基,使得TCR在恒定结构域中含有两个二硫键。在一些实施方式中,恒定结构域和可变结构域中的每个包含半胱氨酸残基形成的二硫键。

[0401] 在一些实施方式中,所述的用于对细胞进行工程化的TCR是由已知的TCR序列(一个或多个)(诸如 V_{α} , β链序列)产生的,其具有易于获得的基本上全长的编码序列。从细胞来源获得全长TCR序列(包括V链序列)的方法是众所周知的。在一些实施方式中,编码TCR的核酸可以从多种来源获得,诸如通过聚合酶链式反应(PCR)扩增一个或多个给定细胞内或分离自其的编码TCR的核酸,或合成可公开获得的TCR DNA序列。在一些实施方式中,TCR从生物来源获得,诸如从细胞,诸如从T细胞(例如,细胞毒性T细胞)、T细胞杂交瘤或其他公开来源获得。在一些实施方式中,T细胞可以从体内分离的细胞中获得。在一些实施方式中,T细胞可以是培养的T细胞杂交瘤或克隆。在一些实施方式中,TCR或其抗原结合部分可以根据TCR序列的知识合成产生。在一些实施方式中,鉴定靶抗原(例如,癌症抗原)的高亲和力T细胞克隆,从患者中分离,并将其引入细胞中。在一些实施方式中,已在用人类免疫系统基因(例如,人白细胞抗原系统或HLA)工程化的转基因小鼠中产生了用于靶抗原的TCR克隆。参

见,例如,肿瘤抗原(参见,例如,Parkhurst et al. (2009) Clin Cancer Res.15:169-180 and Cohen et al. (2005) J Immunol.175:5799-5808) 在一些实施方式中,噬菌体展示用于分离针对靶抗原的TCR(参见,例如,Varela-Rohena et al. (2008) Nat Med.14:1390-1395和Li (2005) Nat Biotechnol.23:349-354)。

[0402] 在一些实施方式中,TCR或其抗原结合部分是经过修饰或工程化的部分。在一些实施方式中,定向进化方法用于产生具有改变性质的TCR,诸如对特定MHC-肽复合物具有更高的亲和力。在一些实施方式中,定向进化是通过展示方法实现的,其包括但不限于,酵母展示(Holler et al. (2003) Nat Immunol,4,55-62;Holler et al. (2000) Proc Natl Acad Sci U SA,97,5387-92)、噬菌体展示((Li et al. (2005) Nat Biotechnol,23,349-54) 或T细胞展示(Chervinet al. (2008) J Immunol Methods,339,175-84)。在一些实施方式中,展示方法涉及工程化或修饰已知的母体或参考TCR。例如,在某些情况下,野生型TCR可以用作产生其中CDR的一个或多个残基发生突变的突变TCR的模板,并且选择具有所需改变性质(诸如对所需靶抗原具有更高的亲和力)的突变体。

[0403] 在所述的一些实施方式中,TCR可以包含引入的一个或多个二硫键。在一些实施方式中,天然二硫键是不存在的。在一些实施方式中,形成天然链间二硫键的一个或多个天然半胱氨酸(例如,在 α 链和 β 链的恒定结构域中)被另一个残基诸如丝氨酸或丙氨酸取代。在一些实施方式中,引入的二硫键可以通过使 α 链和 β 链上的非半胱氨酸残基(诸如,在 α 链和 β 链的恒定结构域中)突变为半胱氨酸而形成。TCR的示例性非天然二硫键在已公布的国际PCT号W02006/000830和W02006/037960中有描述。在一些实施方式中,可以在 α 链的Thr48残基和 β 链的Ser57残基、 α 链的Thr45残基和 β 链的Ser77残基、 α 链的Tyr10残基和 β 链的Ser17残基、 α 链的Thr45残基和 β 链的Asp59残基和/或 α 链的Ser15残基和 β 链的Glu15残基处引入半胱氨酸。在一些实施方式中,重组TCR中存在非天然半胱氨酸残基(例如,导致一个或多个非天然二硫键)可以有利于在细胞中产生期望的重组TCR,在该细胞中引入含有天然TCR链的错配TCR对的过表达。

[0404] 在一些实施方式中,TCR链包含跨膜结构域。在一些实施方式中,跨膜结构域带正电荷。在某些情况下,TCR链包含胞质尾。在某些方面,TCR的每条链(例如, α 或 β)可以具有一个N-末端免疫球蛋白可变结构域、一个免疫球蛋白恒定结构域、一个跨膜区域和一个位于C-末端的短胞质尾。在一些实施方式中,TCR,例如,通过胞质尾,与参与介导信号转导的CD3复合物的恒定蛋白相关联。在某些情况下,结构允许TCR与CD3及其子单元等其他分子相关联。例如,包含具有跨膜区域的恒定结构域的TCR可以将蛋白质锚定在细胞膜上,并与CD3信号传导设备或复合物的恒定子单元相关联。CD3信号传导子单元(例如,CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 和CD3 ζ 链)的细胞内尾包含一个或多个免疫受体酪氨酸基激活基序或ITAM,其参与TCR复合物的信号传导能力。

[0405] 在一些实施方式中,TCR是全长TCR。在一些实施方式中,TCR是抗原结合部分。在一些实施方式中,TCR是二聚体TCR(dTCR)。在一些实施方式中,TCR是单链TCR(sc-TCR)。TCR可以是细胞结合形式或可溶形式。在一些实施方式中,为了提供的方法,TCR是表达在细胞表面上的细胞结合形式。在一些实施方式中,dTCR包含第一多肽,其中与TCR α 链可变区序列对应的序列与TCR α 链恒定区细胞外序列对应的序列的N-末端融合,以及第二多肽,其中与TCR β 链可变区序列对应的序列与TCR β 链恒定区细胞外序列对应的序列的N-末端融合,第一和

第二多肽由二硫键连接。在一些实施方式中,该键可以对应于天然二聚体 $\alpha\beta$ TCR中存在的天然链间二硫键。在一些实施方式中,链间二硫键不存在于天然TCR中。例如,在一些实施方式中,一个或多个半胱氨酸可以并入到dTCR多肽对的恒定区细胞外序列。在某些情况下,天然和非天然二硫键可以都是期望的。在一些实施方式中,TCR包含跨膜序列以锚定到膜上。在一些实施方式中,dTCR包含TCR α 链,其包含可变 α 结构域、恒定 α 结构域和附接到恒定 α 结构域的C-末端的第一二聚化基序,以及TCR β 链,其包含可变 β 结构域、恒定 β 结构域和附接到恒定 β 结构域的C-末端的第一二聚化基序,其中第一和第二二聚化基序容易相互作用,以在第一二聚化基序中的氨基酸和第二二聚化基序中的氨基酸之间形成将TCR α 链和TCR β 链连接在一起的共价键。

[0406] 在一些实施方式中,TCR是scTCR,其为包含 α 链和能够结合MHC-肽复合物的 β 链的单氨基酸链。通常,可以使用本领域技术人员已知的方法产生scTCR,参见,例如,国际公开的PCT号W0 96/13593、W0 96/18105、W099/18129、W004/033685、W02006/037960、W02011/044186;美国专利号7,569,664;以及Schlueter, C.J. et al. *J. Mol. Biol.* 256, 859 (1996)。在一些实施方式中,scTCR包含由与TCR α 链可变区对应的氨基酸序列构成的第一段,由与融合到与TCR β 链恒定结构域胞外序列对应的氨基酸序列的N-末端的TCR β 链可变区序列对应的氨基酸序列构成的第二段,以及连接第一段的C-末端和第二段的N-末端的接头序列。在一些实施方式中,scTCR包含由与TCR β 链可变区对应的氨基酸序列构成的第一段,由与融合到与TCR α 链恒定结构域胞外序列对应的氨基酸序列的N-末端的TCR α 链可变区序列对应的氨基酸序列构成的第二段,以及将第一段的C-末端连接到第二段的N-末端的接头序列。在一些实施方式中,scTCR包含由与融合到 α 链胞外恒定结构域序列的N-末端的 α 链可变区序列构成的第一段,和由与融合到 β 链胞外恒定序列和跨膜序列的序列的N-末端的 β 链可变区序列构成的第二段,以及任选地,将第一段的C-末端连接到第二段的N-末端的接头序列。在一些实施方式中,scTCR包含由融合到 β 链胞外恒定结构域序列的N-末端的TCR β 链可变区序列构成的第一段,和由融合到包含 α 链胞外恒定结构域序列和跨膜序列的序列的N-末端的 α 链可变区序列构成的第二段,并且任选地,将第一段的C-末端连接到第二段的N-末端的接头序列。在一些实施方式中,为了scTCR结合MHC-肽复合物, α 和 β 链必须配对,以便其可变区序列定向用于这种结合。促进scTCR中 α 和 β 配对的不同方法在本领域是公知的。在一些实施方式中,包括连接 α 和 β 链以形成单条多肽链的接头序列。在一些实施方式中,接头应具有足够的长度,以跨越 α 链的C-末端和 β 链的N-末端之间的距离,反之亦然,同时还确保接头长度不会太长,从而阻止或减少scTCR与靶肽-MHC复合物的结合。在一些实施方式中,连接第一和第二TCR段的scTCR的接头可以是能够形成单条多肽链同时保持TCR结合特异性的任何接头。在一些实施方式中,接头序列可以具有,例如,式-P-AA-P-,其中P是脯氨酸,AA表示氨基酸序列,其中氨基酸是甘氨酸和丝氨酸。在一些实施方式中,第一和第二段配对,使得其可变区序列定向用于这种结合。因此,在某些情况下,接头具有足够的长度,以跨越第一段的C-末端和第二段的N-末端之间的距离,反之亦然,但不会太长以阻止或减少scTCR与靶配体的结合。在一些实施方式中,接头可以包含为或为约10至45个氨基酸,诸如10至30个氨基酸或26至41个氨基酸残基,例如29、30、31或32个氨基酸。在一些实施方式中,scTCR在单条氨基酸链的残基之间包含二硫键,这在某些情况下可以促进单链分子的 α 和 β 区域之间的配对的稳定性(参见,例如,美国专利号7,569,664)。在一些实施方式中,scTCR包含共价二硫键,

其将 α 链的恒定结构域的免疫球蛋白区的残基连接到单链分子的 β 链的恒定结构域的免疫球蛋白区的残基。在一些实施方式中,二硫键对应于天然dTCR中存在的天然二硫键。在一些实施方式中,天然TCR中不存在二硫键。在一些实施方式中,二硫键是引入的非天然二硫键,例如,通过将一个或多个半胱氨酸并入到scTCR多肽的第一和第二链区的恒定区胞外序列中。示例性半胱氨酸突变包括上述任何突变。在某些情况下,天然和非天然二硫键二者都可能存在。

[0407] 在一些实施方式中,任何TCR,其包括dTCR或scTCR,都可以与信号传导结构域连接,其在T细胞表面上产生活化的TCR。在一些实施方式中,TCR在细胞表面表达。在一些实施方式中,TCR确实含有与跨膜序列相对应的序列。在一些实施方式中,跨膜结构域可以是Ca或CP跨膜结构域。在一些实施方式中,跨膜结构域可以来自非TCR来源,例如,CD3z、CD28或B7.1的跨膜区域。在一些实施方式中,TCR确实含有与细胞质序列相对应的序列。在一些实施方式中,TCR含有CD3z信号传导结构域。在一些实施方式中,TCR能够与CD3形成TCR复合物。在一些实施方式中,TCR或其抗原结合部分可能是重组产生的天然蛋白质或其突变形式,其中一个或多个性质,诸如结合特性,已被改变。在一些实施方式中,TCR可能源自各种动物物种中的一种,诸如人、小鼠、大鼠或其他哺乳动物。

[0408] 在一些实施方式中,TCR包括对靶细胞上靶抗原的亲和力。靶抗原可包括与靶细胞相关的任何类型的蛋白质或其表位。例如,TCR可包括对靶细胞上指示靶细胞的特定疾病状态的靶抗原的亲和力。在一些实施方式中,靶抗原由MHC加工和呈递。

[0409] L. 药物组合物和制剂

[0410] 还提供了本公开的细胞(例如免疫细胞;如T细胞)群、含有这种细胞和/或富集这种细胞的组合物,比如其中表达CAR和治疗性肽的细胞至少构成某种类型比如T细胞或CD8+或CD4+细胞的组合物或细胞中的总细胞的50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多。组合物中包括用于施用,例如用于过继细胞疗法的药物组合物和制剂。还提供了对受试者(例如,患者)施用细胞和组合物的治疗方法。

[0411] 还提供了包括用于施用的细胞的组合物,包括药物组合物和制剂,比如单位剂量形式的组合物,包括以给定剂量或其部分施用的细胞数量。药物组合物和制剂一般包括一种或多种任选的药学上可接受的载体或赋形剂。在一些实施方式中,组合物包括至少一种另外的治疗剂。

[0412] 术语“药物制剂(pharmaceutical formulation)”是指这样的一种制剂,其形式可使其中所含的活性成分的生物活性有效,并且不含对施用该制剂的受试者具有不可接受的毒性的另外的成分。“药学上可接受的载体(pharmaceutically acceptable carrier)”是指药物制剂中除活性成分以外的对受试者无毒的成分。药学上可接受的载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。在一些方面,载体的选择部分取决于特定的细胞和/或施用方法。因此,有多种合适的制剂。例如,药物组合物可以含有防腐剂。合适的防腐剂可包括例如,对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸钠和苯扎氯铵。在一些方面,可使用两种或更多种防腐剂的混合物。防腐剂或其混合物的量通常为总组合物的按重量计约0.0001%至约2%。在例如Remington的Pharmaceutical Sciences,第16版,Osol, A. Ed. (1980)中描述了载体。药学上可接受的载体在使用剂量和浓度下一般对受体无毒,并且包括但不限于:缓冲剂比如磷酸盐、柠檬酸酯和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和蛋氨

酸;防腐剂(比如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲基氯化铵;苯扎氯铵;苄索氯铵(benzethonium chloride);苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,比如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白质,比如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物比如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,比如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,比如EDTA;糖,比如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;形成盐的反离子,比如钠;金属络合物(例如Zn-蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂,比如聚乙二醇(PEG)。

[0413] 在一些方面,缓冲剂包括在组合物中。合适的缓冲剂包括柠檬酸、柠檬酸钠、磷酸、磷酸钾以及其他各种酸和盐。在一些方面,使用两种或更多种缓冲剂的混合物。缓冲剂或其混合物的量通常为总组合物的按重量计约0.001%至约4%。用于制备可施用的药物组合物的方法是已知的。例如,在Remington:The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams&Wilkins;第21版(2005年5月1日)中描述了示例性方法。

[0414] 制剂可包括水溶液。制剂或组合物还可含有多于一种对细胞治疗的特定适应症、疾病或病症有用的活性成分,优选地是与细胞活性互补的那些,其中各自的活性不会对彼此产生不利影响。这些活性成分可以适当地以对预期目的有效的量组合。因此,在一些实施方式中,药物组合物进一步包括其他药理学活性剂或药物,比如化疗剂,例如,天冬酰胺酶、白消安、卡铂、顺铂、道诺霉素、多柔比星、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、甲氨蝶呤、紫杉醇、利妥昔单抗、长春碱和/或长春新碱。在一些实施方式中,药物组合物含有有效治疗或预防疾病或病症的量,比如治疗有效量或预防有效量的细胞。在一些实施方式中,治疗或预防效果是通过对所治疗的受试者进行定期评估来监测的。期望的剂量可通过单次推注施用细胞、多次推注施用细胞或连续输注细胞来实现。

[0415] 制剂包括用于口服、静脉、腹腔、皮下、肺部、透皮、肌肉内、鼻内、含服、舌下或栓剂施用的那些。在一些实施方式中,细胞群经肠胃外施用。本文所使用的术语“肠胃外(parenteral)”包括静脉、肌肉内、皮下、直肠、阴道和腹腔施用。在一些实施方式中,使用通过静脉、腹腔或皮下注射的外周全身给药法向受试者施用细胞。在一些实施方式中,组合物以无菌液体制剂提供,例如等渗水溶液、悬浮液、乳剂、分散液或粘性组合物,在一些方面可缓冲至选定的pH值。液体制剂通常比凝胶、其他粘性组合物和固体组合物更容易制备。此外,液体制剂在某种程度上更便于施用,特别是通过注射。另一方面,粘性组合物可以在适当的粘度范围内配制以提供与特定组织的更长的接触时间。液体或粘性组合物可以包括载体,载体可以是含有例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、多元醇(例如,甘油、丙二醇、液态聚乙二醇)及其适当的混合物的溶剂或分散介质。

[0416] 无菌可注射溶液可通过将细胞并入溶剂中,比如与合适的载体、稀释剂或赋形剂,比如无菌水、生理盐水、葡萄糖、葡萄糖等混合来制备。基于施用途径和期望的制剂,组合物还可含有辅助物质,比如润湿剂、分散剂或乳化剂(例如,甲基纤维素)、pH缓冲剂、胶凝剂或粘度增强添加剂、防腐剂、调味剂和/或色素。在一些方面,可以参考标准文本来配制合适的制剂。

[0417] 还可以添加增强组合物的稳定性和无菌性的各种添加剂,包括抗菌防腐剂、抗氧化剂、螯合剂和缓冲剂。通过各种抗菌剂和抗真菌剂(例如,对羟基苯甲酸酯、氯代丁醇、苯

酚和山梨酸)可确保预防微生物的作用。通过使用延缓吸收的试剂,例如单硬脂酸铝和明胶可以延长可注射的药物形式的吸收。

[0418] 用于体内施用的制剂通常是无菌的。无菌可例如通过无菌过滤膜过滤来轻易实现。

[0419] M. 列举的实施方式

[0420] 提供了以下列举的实施方式,其编号不应被解释为指定重要性级别。

[0421] 实施方式1提供了一种工程细胞,其包含嵌合抗原受体(CAR)和治疗性肽,其中所述CAR包含抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内结构域,并且其中所述治疗性肽是非天然治疗性肽;其中所述CAR分子和所述治疗性肽由相同的表达构建体表达。

[0422] 实施方式2提供了一种工程细胞,其包含嵌合抗原受体(CAR)和治疗性肽,其中所述CAR包含抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内结构域,并且其中所述治疗性肽是非天然治疗性肽,并且其中所述治疗性肽具有以下一种或多种性质:(i)所述治疗性肽是干扰素基因刺激因子(STING)通路的激活剂,(ii)所述治疗性肽是环状二核苷酸的模拟物,(iii)所述治疗性肽是短链脂肪酸(SCFA)的模拟物,(iv)所述治疗性肽是模式识别受体(PRR)的激动剂,(v)所述治疗性肽是类固醇/激素样分子的模拟物,(vi)所述治疗性肽促进靶细胞的凋亡,(vii)所述治疗性肽是免疫原性表位,和/或(viii)所述治疗性肽阻断所述靶细胞中DNA修复的一种或多种机制。

[0423] 实施方式3提供了任何前述实施方式所述的工程细胞,其中所述治疗性肽是cGAMP、cAMP或cGMP的模拟物。

[0424] 实施方式4提供了实施方式1或2所述的工程细胞,其中所述治疗性肽是TLR激动剂的模拟物。

[0425] 实施例5提供了实施方式4所述的工程细胞,其中所述治疗性肽是鞭毛蛋白、CpG基序、肽聚糖、脂多糖(LPS)或单磷酸脂质A(MPL)的模拟物。

[0426] 实施方式6提供了实施方式1或2所述的工程细胞,其中所述治疗性肽是第二线粒体源性胱天蛋白酶激活因子(SMAC)模拟物。

[0427] 实施方式7提供了实施方式1或2所述的工程细胞,其中所述治疗性肽是聚ADP核糖聚合酶(PARP)的抑制剂。

[0428] 实施方式8提供了实施方式1-7中任一项所述的工程细胞,其中所述非天然肽是与天然发生肽具有不超过90%序列同一性的肽。

[0429] 实施方式9提供了实施方式1-7中任一项所述的工程细胞,其中所述非天然肽是与天然发生肽具有不超过80%序列同一性的肽。

[0430] 实施方式10提供了实施方式1-9中任一项所述的工程细胞,其中所述肽包含选自SEQ ID NO:1-16的氨基酸序列。

[0431] 实施例11提供了实施方式1-10中任一项所述的工程细胞,其中所述治疗性肽在细胞外囊泡中从工程细胞中输出。

[0432] 实施方式12提供了实施方式1-11中任一项所述的工程细胞,其中所述治疗性肽是与G蛋白偶联受体(GPCR)结合的SCFA的模拟物。

[0433] 实施例13提供了实施方式1-12中任一项所述的工程细胞,其中所述靶细胞是肿瘤细胞。

[0434] 实施方式14提供了实施方式1-13中任一项所述的工程细胞,其中所述工程细胞是T细胞或NK细胞。

[0435] 实施方式15提供了实施方式1-14中任一项所述的工程细胞,其中所述抗原结合结构域选自抗体、抗原结合片段(Fab)和单链可变片段(scFv)。

[0436] 实施方式16提供了实施方式1-14中任一项所述的工程细胞,其中所述结合结构域是T细胞受体(TCR)。

[0437] 实施方式17提供了实施方式1-16中任一项所述的工程细胞,其中所述靶抗原选自CD19、CD20、CD22、BCMA、CD123、CD133、EGFR、EGFRvIII、间皮素、Her2、PSMA、CEA、GD2、IL-13Ra2、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3、CIAX、LI-CAM、CA 125、CTAG1B、粘蛋白1和叶酸受体- α 。

[0438] 实施例18提供实施方式17所述的工程细胞,其中所述靶抗原在肠细胞上表达。

[0439] 实施方式19提供了实施方式1-18中任一项所述的工程细胞,其中所述跨膜结构域是来自选自CD8 α 、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD28和ICOS的蛋白质的跨膜结构域。

[0440] 实施方式20提供了实施方式1-19中任一项所述的工程细胞,其中所述胞内信号传导结构域包含选自CD3 ζ 、TCR ζ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 或ICOS的蛋白质的功能性信号传导结构域。

[0441] 实施方式21提供了实施方式1-19中任一项所述的工程细胞,其中所述胞内信号传导结构域包括功能性信号传导结构域,并且进一步包括共刺激结构域,其中所述共刺激结构域包括来自4-1BB或CD28的功能性信号传导结构域。

[0442] 实施方式22提供了实施方式1-21中任一项所述的工程细胞,其中所述CAR包含抗-CD19 scFv、CD8 α 跨膜结构域、4-1BB共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域。

[0443] 实施例23提供了实施方式1-13中任一项所述的工程细胞,其中治疗性肽是SCFA模拟物或类固醇和/或激素样分子的模拟物,并且其中所述工程细胞已被进一步修饰以降低一种或多种效应器功能的活性。

[0444] 实施例24提供了实施方式23所述的工程细胞,其中所述工程细胞已被修饰以减少或防止一种或多种炎性细胞因子的表达、颗粒酶B的表达或穿孔素的表达。

[0445] 实施方式25提供了实施方式1-24中任一项所述的工程细胞,其中所述CAR分子和所述治疗性肽由相同的表达构建体表达,并且其中所述表达构建体进一步包含激活PRR的RNA分子。

[0446] 实施方式26提供了实施方式25所述的工程细胞,其中所述RNA分子是7SL。

[0447] 实施方式27提供了一种组合物,其包含实施方式1-26中任一项所述的工程细胞。

[0448] 实施方式28提供了一种编码(i)嵌合抗原受体(CAR)和(ii)治疗性肽的核酸分子,所述CAR包含抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内信号传导结构域,其中所述治疗性肽是非天然肽。

[0449] 实施方式29提供了实施方式28所述的核酸分子,其中终止密码子将编码所述CAR的核酸片段与编码所述治疗性肽的核酸片段分开。

[0450] 实施方式30提供了实施方式28或29所述的核酸分子,其中由所述核酸分子编码的治疗性肽具有以下一种或多种性质:(i)所述治疗性肽是干扰素基因刺激因子(STING)通路的激活剂,(ii)所述治疗性肽是环状二核苷酸的模拟物,(iii)所述治疗性肽是短链脂肪酸(SCFA)的模拟物,(iv)所述治疗性肽是模式识别受体(PRR)的激动剂,(v)所述治疗性肽是

类固醇/激素样分子的模拟物, (vi) 所述治疗性肽促进靶细胞的凋亡, (vii) 所述治疗性肽是免疫原性表位, 和/或 (viii) 所述治疗性肽阻断所述靶细胞中DNA修复的一种或多种机制。

[0451] 实施方式31提供了实施方式30所述的核酸分子, 其中所述治疗性肽是cGAMP、cAMP或cGMP的模拟物。

[0452] 实施方式32提供了实施方式30所述的核酸分子, 其中所述治疗性肽是TLR激动剂的模拟物。

[0453] 实施方式33提供了实施方式32所述的核酸分子, 其中所述治疗性肽是鞭毛蛋白、CpG基序、肽聚糖、脂多糖 (LPS) 或单磷酸脂质A (MPL) 的模拟物。

[0454] 实施方式34提供了实施方式30所述的核酸分子, 其中所述治疗性肽是第二线粒体源性胱天蛋白酶激活因子 (SMAC) 模拟物。

[0455] 实施方式35提供了实施方式30所述的核酸分子, 其中所述治疗性肽是聚ADP核糖聚合酶 (PARP) 的抑制剂。

[0456] 实施方式36提供了实施方式28-35中任一项所述的核酸分子, 其中编码所述非天然肽的核酸与编码天然发生肽的核酸具有不超过80%的序列同一性。

[0457] 实施方式37提供了实施方式28-36中任一项所述的核酸分子, 其中所述靶细胞是肿瘤细胞。

[0458] 实施方式38提供了实施方式28-37中任一项所述的核酸分子, 其中由所述核酸分子编码的所述抗原结合结构域选自抗体、Fab和scFv。

[0459] 实施方式39提供了实施方式28-37中任一项所述的核酸分子, 其中由所述核酸分子编码的所述结合结构域是TCR。

[0460] 实施方式40提供了实施方式28-39中任一项所述的核酸分子, 其中由所述核酸分子编码的所述结合结构域结合靶抗原, 所述靶抗原选自CD19、CD20、CD22、BCMA、CD123、CD133、EGFR、EGFRvIII、间皮素、Her2、PSMA、CEA、GD2、IL-13Ra2、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3、CIAX、LI-CAM、CA125、CTAG1B、粘蛋白1和叶酸受体- α 。

[0461] 实施方式41提供了实施方式28-40中任一项所述的核酸分子, 其中由所述核酸分子编码的所述跨膜结构域是来自选自CD8 α 、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD28和ICOS的蛋白质的跨膜结构域。

[0462] 实施方式42提供了实施方式28-41中任一项所述的核酸分子, 其中由所述核酸分子编码的所述胞内信号传导结构域包含选自CD3 ζ 、TCR ζ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 或ICOS的蛋白质的功能性信号传导结构域。

[0463] 实施方式43提供了实施方式28-42中任一项所述的核酸分子, 其中由所述核酸分子编码的所述胞内信号传导结构域包含功能性信号传导结构域, 并且进一步包含共刺激结构域, 其中所述共刺激结构域包含来自4-1BB或CD28的功能性信号传导结构域。

[0464] 实施方式44提供了实施方式28-43中任一项所述的核酸分子, 其中所述核酸分子编码CAR分子, 所述CAR分子包含抗-CD19 scFv、CD8 α 跨膜结构域、4-1BB共刺激结构域和CD3 ζ 信号传导结构域。

[0465] 实施方式45提供了实施方式28-44中任一项所述的核酸分子, 其进一步包含激活PRR的RNA分子。

- [0466] 实施方式46提供了实施方式45所述的工程细胞,其中所述RNA分子是7SL。
- [0467] 实施方式47提供了一种表达载体,其包含实施方式28-46中任一项所述的核酸分子。
- [0468] 实施方式48提供了一种在细胞中共表达CAR和治疗性肽的方法,所述方法包括在使所述CAR和所述治疗性肽表达的条件下,将根据实施方式47所述的表达载体递送至所述细胞。
- [0469] 实施方式49提供了一种细胞,其包含根据实施方式28-45中任一项所述的核酸分子或根据实施方式47所述的表达载体。
- [0470] 实施方式50提供了一种治疗受试者中的疾病或紊乱的方法,其包括向所述受试者施用有效量的基因修饰以表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞,其中所述CAR包含抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内信号传导结构域,并且其中所述方法进一步包括通过非天然治疗性肽刺激针对癌症的内源性免疫应答,并且其中所述非天然治疗性肽具有以下一种或多种性质:(i)所述治疗性肽是干扰素基因刺激因子(STING)通路的激活剂,(ii)所述治疗性肽是环状二核苷酸的模拟物,(iii)所述治疗性肽是短链脂肪酸(SCFA)的模拟物,(iv)所述治疗性肽是模式识别受体(PRR)的激动剂,(v)所述治疗性肽是类固醇/激素样分子的模拟物,(vi)所述治疗性肽促进所述靶细胞的凋亡,(vii)所述治疗性肽是免疫原性表位,和/或(viii)所述治疗性肽阻断所述靶细胞中DNA修复的一种或多种机制。
- [0471] 实施方式51提供了实施方式50所述的方法,其中所述治疗性肽是cGAMP、cAMP或cGMP的模拟物。
- [0472] 实施方式52提供了实施方式50所述的方法,其中所述治疗性肽是TLR激动剂的模拟物。
- [0473] 实施方式53提供了实施方式50所述的方法,其中所述治疗性肽是鞭毛蛋白、CpG基序、肽聚糖、脂多糖(LPS)或单磷酸脂质A(MPL)的模拟物。
- [0474] 实施方式54提供了实施例50所述的方法,其中所述治疗性肽是第二线粒体源性胱天蛋白酶激活因子(SMAC)模拟物。
- [0475] 实施方式55提供了实施方式50所述的方法,其中所述治疗性肽是聚ADP核糖聚合酶(PARP)的抑制剂。
- [0476] 实施方式56提供了权利要求50所述的方法,其中所述非天然肽是与任何天然发生肽具有不超过80%序列同一性的肽。
- [0477] 实施方式57提供了实施方式50所述的方法,其中所述肽包含选自SEQ ID NO:1-16的氨基酸序列。
- [0478] 实施方式58提供了实施方式50所述的方法,其中所述治疗性肽是免疫原性表位,并且其中在施用至所述受试者之后,所述免疫原性表位在所述受检者的癌细胞的表面上表达。
- [0479] 实施方式59提供了实施方式51-58中任一项所述的方法,其中所述治疗性肽在修饰的T细胞中表达,其中在将所述修饰的T细胞施用至所述受试者后,所述治疗性肽在一个或多个胞外囊泡中从所述修饰的T细胞中输出。
- [0480] 实施方式60提供了实施方式59所述的方法,其中所述治疗性肽经由所述一个或多个胞外囊泡递送至所述受试者中的一个或多个抗原呈递细胞。

[0481] 实施方式61提供了增强基因修饰以表达嵌合抗原受体 (CAR) 的T细胞的抗癌活性的方法,其中所述CAR包括抗原结合结构域、跨膜结构域和信号传导结构域,所述抗原结合结构域特异性结合在肿瘤细胞上表达的抗原,其中所述方法包括在所述T细胞中共表达非天然治疗性肽,并且其中所述非天然治疗性肽具有以下一种或多种性质:(i) 所述治疗性肽是干扰素基因刺激因子 (STING) 通路的激活剂,(ii) 所述治疗性肽是环状二核苷酸的模拟物,(iii) 所述治疗性肽是短链脂肪酸 (SCFA) 的模拟物,(iv) 所述治疗性肽是模式识别受体 (PRR) 的激动剂,(v) 所述治疗性肽是类固醇/激素样分子的模拟物,(vi) 所述治疗性肽促进靶细胞的凋亡,(vii) 所述治疗性肽是免疫原性表位,和/或 (viii) 所述治疗性肽阻断所述靶细胞中DNA修复的一种或多种机制。

[0482] 实施方式62提供了一种用于治疗受试者中的炎性疾病、自身免疫性疾病或癌症的方法,其包括向所述受试者施用有效量的根据实施方式1-26中任一项所述的工程细胞或根据实施方式27所述的组合物或根据实施方式49所述的细胞。

[0483] 实施方式63提供了实施方式50-61中任一项所述的方法,其中所述癌症是实体瘤癌症。

[0484] 实施方式64提供实施方式63所述的方法,其中所述癌症选自肺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、间皮瘤、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、输卵管癌、宫颈癌、前列腺癌、结直肠癌、胃癌、膀胱癌、食管癌和黑色素瘤。

[0485] 实施方式65提供了实施方式50-61中任一项所述的方法,其中所述癌症是血液学癌症。

[0486] 实施方式66提供了实施方式65所述的方法,其中所述血液学癌症是白血病或淋巴瘤。

[0487] 实施方式67提供实施方式65所述的方法,其中所述血液学癌症选自慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、套细胞淋巴瘤 (MCL) 多发性骨髓瘤、急性淋巴细胞白血病 (ALL)、霍奇金淋巴瘤、B细胞急性淋巴细胞白血病 (BALL)、T细胞急性淋巴细胞白血病、小淋巴细胞白血病 (SLL)、急性髓细胞白血病 (AML)、B细胞前淋巴细胞白血病、母细胞浆细胞样树突状细胞肿瘤、伯基特淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL)、慢性粒细胞白血病、骨髓增生性肿瘤、滤泡性淋巴瘤、儿童滤泡性淋巴瘤、毛细胞白血病、小细胞或大细胞滤泡性淋巴瘤、恶性淋巴增生性疾病、MALT淋巴瘤 (粘膜相关淋巴组织结外边缘区淋巴瘤)、边缘区淋巴瘤、骨髓发育不良、骨髓增生异常综合征、非霍奇金淋巴瘤、浆母细胞淋巴瘤、浆细胞样树突状细胞肿瘤、Waldenstrom巨球蛋白血症、脾边缘区淋巴瘤、淋巴浆细胞淋巴瘤和浆细胞骨髓瘤。

[0488] 实施方式68提供了实施方式62所述的方法,其中所述自身免疫性疾病是炎性肠病。

[0489] 本文提及或引用的文章、专利和专利申请的内容,以及所有其他文件和可以以电子形式获得的信息均通过引用以其整体并入本文,其程度与每份单独出版物通过引用并入本文的程度相同。申请人保留将任何这种文章、专利、专利申请或其他实体和电子文件中的任何及所有材料和信息并入本申请的权利。

[0490] 虽然本发明已参照其具体实施方式进行了描述,但是本领域技术人员应理解,在不背离本发明的真实精神和范围的情况下可以进行各种改变,并且可以用等同物进行替代。对本领域技术人员来说显而易见的是,可以使用适当的等同物对本文所述的方法进行

其他适当的修改和调整,而不会背离本文所公开的实施方式的范围。此外,可以进行许多修改以使具体情况、材料、物质组成、工艺、工艺步骤(一个或多个)适应本发明的目标、精神和范围。所有这些修改都在所附的权利要求书的范围内。在现在详细描述了本发明的某些实施方式之后,通过参考以下实施例可以更清楚地理解本发明。

[0491] 实验实施例

[0492] 现在参照以下实施例对本发明进行描述。提供这些实施例仅用于说明目的,并且本发明并不限于这些实施例,而是包括因本文所提供的教导而显而易见的所有变型。

[0493] 实施例1:被工程化以表达并转移免疫原性肽表位的CAR-T细胞

[0494] 进行了一项研究,以评估是否可以对CAR-T细胞进行工程化以表达并转移免疫原性肽表位。使用SIINFEKL肽(SEQ ID NO:7)作为测试肽。图2提供了用于递送SIINFEKL肽的病毒构建体的示意图。该构建体包括19BBz CAR分子(抗-CD19 scFv,以及4-1BB和CD3 ζ 胞内结构域)和SIINFEKL肽("Ova-19BBz CAR")。肽的短长度允许内部终止密码子,这有利于肽和CAR分子二者的有效表达。如图2所示的SIINFEKL肽的构建体被并入到从受试者分离的CD3+T细胞中。随后通过流式细胞术对细胞进行评估,以确定CAR和/或肽是否在工程细胞上表达。图3显示肽和CAR分子二者均有效表达。肽表达通过SIINFEKL肽/MHC-特异性抗体检测。此外,肽/MHC复合物不仅在CAR+细胞上检测到,而且在未转导(非-CAR表达)细胞上检测到,表明抗原肽成功转移到群中的其他细胞(图4)。

[0495] 进行了进一步的研究,以评估抗原肽从表达CAR的细胞转移到肿瘤细胞和/或免疫细胞。如图5中的示意图所示,Ova-19BBz CAR T细胞在培养基中扩增,并且扩增后收集细胞和EV。为了扩增,使用阴性选择T细胞分离试剂盒从小鼠脾细胞中分离T细胞。分离后,用CD3/CD28珠粒刺激T细胞,24小时后,引入编码指定CAR分子的逆转录病毒(在MSGV骨架上)。转导48小时后,将细胞去除珠粒并检查CAR转导。

[0496] 通过超速离心从培养基中收集胞外囊泡(EV)。然后,将EV与B16细胞(一种黑色素瘤细胞系)在体外以不同浓度一起培养,同时添加 1×10^6 个OT-I T细胞,该细胞对SIINFEKL具有特异性。72小时后,通过流式细胞术评估肽/MHC负载和OT-I T细胞激活。通过颗粒酶B染色确定T细胞激活。如图6A所示,随着来自表达Ova-CAR-T的细胞中EV浓度的增加,观察到肿瘤上增加Ova/MHC表达以及OT-I T细胞中增加颗粒酶B表达的剂量反应。如图6B所示,类似地,在从表达Ova-CAR-T的细胞释放的EV存在下,OT-I T细胞中的Ki67(增殖)和IFN γ 表达以剂量依赖的方式增加。图6C提供了图6A和6B中所示的Ki67表达(左图)、颗粒酶B表达(中图)和IFN γ 表达的定量。数据显示,CAR-T细胞表达了该肽并将其转移到肿瘤细胞中,其中其在MHC的背景下呈递。进一步地,这种肽转移以剂量依赖和统计学显著的方式增强了抗肿瘤T细胞反应。

[0497] 利用相同的实验设置(图5),在各种Ova-CAR T EV负载浓度下,通过流式细胞术还评估肿瘤细胞死亡。相对细胞死亡如图7所示。在EV浓度增加(0、18、37.5和75 μ g)时,B16细胞与EV和OT-I T细胞一起温育导致肿瘤细胞死亡水平在统计学上显著增加。因此,体外研究表明,工程化以表达免疫原性肽的CAR-T细胞可将免疫原性肽转移到肿瘤细胞,并且与不表达免疫原性肽的CAR-T细胞相比,可引发增强的T细胞反应和肿瘤死亡。

[0498] 为了测试CAR-T细胞是否在体内表达和转移免疫原性肽表位,将小鼠植入有1:1混合的B16 WT和B16-hCD19肿瘤细胞(50,000个细胞),随后在第12天用 4.5×10^6 个Ova-19BBz

CAR-T细胞治疗,如图8所描绘。四天后,收集肿瘤,用流式细胞术评估肿瘤细胞和DC的肽负载。结果在图9A中提供。在接受对照CAR-T细胞(19BBz)的动物中,(在活细胞/CD45.2+、F4/80-、CD11c+/MHCII+上表达的)肿瘤细胞或树突状细胞中未检测到肽/MHC负载。然而,在从接受Ova-19BBz CAR-T细胞的动物中分离的肿瘤细胞和树突状细胞二者中均检测到肽/MHC阳性细胞。与19BBz对照受体(图9B,左图)相比,Ova肽负载也导致Ova特异性CD8+T细胞的扩增,如在Ova-19BBz受体中通过阳性四聚体染色所检测(图9B,中间图)。四聚体阳性的Ova特异性T细胞对Ki67也呈阳性,表明其被激活(图9B,右图)。图10A显示了19BBz和Ova-19BBz受体小鼠中Ova+肿瘤细胞(左图)和内源性免疫细胞(右图)的百分比。如上所述,接受对照19BBz细胞的动物未检测到Ova+肿瘤或内源性免疫细胞,而Ova-19BBz受体中,大量肿瘤和内源性免疫细胞呈现Ova。图10B中顶部两幅图提供了对Ova四聚体阳性染色的内源性T细胞百分比和表达Ki67的CD8⁺T细胞百分比的定量。图10B中底部两幅图显示了16天时两个不同组中的肿瘤重量。Ova-19BBz受体的肿瘤重量明显小于19BBz受体的肿瘤重量($p=0.002$)。

[0499] 使用类似的体内实验设置,但使用1:1混合的B16-hCD16和B16 WT细胞植入肿瘤,进一步评估Ova-19BBz CAR-T细胞在体内控制肿瘤生长的能力。将小鼠植入B16-hCD19/B16肿瘤细胞混合物,随后在植入后12天用Ova-19BBz CAR-T细胞或对照19BBz CAR-T细胞进行治疗(图11A)。随着时间监测肿瘤细胞的生长,并将其测量为肿瘤体积(cm^3)。图11B显示,在肿瘤植入后第21天(CAR-T细胞施用后8天),19BBz组的肿瘤体积明显大于Ova-19BBz组。在肿瘤植入后第24天和第28天,两组之间的肿瘤体积差异随着时间而持续增加($p<0.001$)。

[0500] 综上所述,研究显示,将免疫原性肽表位并入CAR构建体,并在细胞中表达CAR分子和肽,可以通过将免疫原性肽转移到肿瘤细胞和树突细胞来增强CAR-T疗法,从而增强抗肿瘤T细胞反应。这种免疫原性肽转移转化为增强抗原特异性T细胞激活和抗肿瘤活性,其包括显著抑制肿瘤大小。因此,研究显示,一种表达免疫原性肽的方法与CAR-T细胞疗法相结合,显著提高了CAR-T细胞疗法的功效。

[0501] 为了研究Ova-19BBz CAR-T细胞在较低免疫原性癌症背景下的作用,将小鼠植入混合KP肿瘤,随后在植入后第5天和第12天用Ova-19BBz CAR-T细胞治疗,并在第8天、第11天和第14天联合使用抗-CTLA4和抗PD1抗体(图12A)。监测生长和存活情况。此外,该研究被设计为评估含有Ova肽和RNA RN7SL1(7SL)组合的CAR对较低免疫原性癌症的影响;参见图12A中的构建体。7SL是一种高度结构化的RNA,其功能是作为肿瘤内PAMP并激活PRR信号传导。7SL CAR-T细胞(例如,BBz-7SL)已在例如国际专利申请号PCT/US2019/012675和Johnson et al.,*J.Immunol* vol.202(1)134-4(2019)中讨论。如图12B和12C所示,在极低免疫原性的KP肿瘤的情况下中,与19BBz CAR-T细胞以及Ova-19BBz或BBz-7SL CAR-T细胞相比,Ova肽与7SL PAMP的组合导致肿瘤体积随时间显著减小,存活率显著提高。因此,免疫原性肽和7SL的组合显著提高了CAR-T细胞在此情况下的抗肿瘤作用。

[0502] 许多实体人肿瘤缺乏足够的新抗原和/或足够的抗肿瘤T细胞库,其中任何一种都可能限制表达RN7SL1的CAR-T细胞引发的内源性T细胞反应。为了解决这个问题,CAR-T细胞被工程化为将RN7SL1与选择的肽抗原共同递送。作为概念证明,19BBz CAR-T细胞被工程化为单独表达SIINFEKL肽(Ova-19BBz)或与RN7SL1(Ova-19-7SL)一起表达(图26A,顶部)。使用检测与MHC I类复合的SIINFEKL的抗体(Porgador et al.,(1997) *Immunity* 6,715-726),证实该肽有效地呈递在Ova-19BBz CAR-T细胞上,也在CAR-T细胞上检测到(图26A,底

部),表明该肽抗原的成功表达和部署。事实上,当来自Ova-19BBz CAR-T细胞培养物的EV与B16肿瘤细胞温育时,观察到MHC I类对癌症细胞的SIINFEKL呈递的剂量依赖性增加(图26B,顶行,左图),并且添加幼稚OT-I T细胞显示T细胞活化增加(图26B)。平行体内实验表明,Ova-19BBz CAR-T细胞递送SIINFEKL,以便肿瘤细胞和CD45.2+免疫细胞呈递到MHC I类上(图26C),促进Ki67+Ova特异性和总内源性CD8 T细胞的扩增(图26D-26E),并改善对混合CD19+和CD19-B16肿瘤的控制(图26F)。与CAR-T细胞递送RNA不同,SIINFEKL递送没有明显偏向于免疫细胞(图26H)。因此,CAR-T细胞可以被工程化为递送肽抗原,这些肽抗原由肿瘤和免疫细胞有效地呈递。

[0503] 在验证了CAR-T细胞能够有效递送Ova肽后,对共表达SIINFEKL和RN7SL1的19BBz CAR-T细胞进行了测试,并针对CAR抗原缺失的低突变负担肿瘤模型评估其功效(图26G)。为此,将小鼠植入由人CD19+和CD19-KP肺癌细胞1:1混合组成的肿瘤(DuPage et al., (2011) Cancer Cell 19,72-85),并过继转移 5×10^5 个OT-I T细胞以控制预先存在的T细胞池的存在。19BBz CAR-T细胞或递送SIINFEKL或RN7SL1的19BBz CAR-T细胞几乎没有效果。这表明,在较差的免疫原性异质性肿瘤中,自主的CAR功能、内源性免疫力的募集或不增强佐剂的情况下提供新抗原都是单独不足的。然而,通过同时CAR-T细胞递送RN7SL1和SIINFEKL来组合这些功能,可以显著延迟肿瘤的生长。因此,这些数据表明,即使具有异质性CAR抗原表达的肿瘤缺乏足够的新抗原,多保护的(armored) CAR-T细胞可以与RN7SL1共同部署肽抗原,以进一步募集内源性免疫,使CAR-T细胞对CAR抗原丢失不太敏感。

[0504] 实施例2:新型STING激动剂肽和被工程化以靶向STING通路的CAR-T细胞

[0505] 进行研究以评估计算开发的de novo治疗性肽通过CAR-T细胞递送并增强其有效性的能力。为了开发治疗性肽,本发明人利用了一种计算肽结合预测算法。该算法提取未折叠的肽,并利用与特定位点结合的迭代计算预测将其折叠成新的肽(参见,例如,Obarska-Koshina et al., "PepComposer: computational design of peptides binding to a given protein surface." Nucleic Acid Research 2016 Jul 8;44(W1):W522-8)。

[0506] STING通路因其强大的触发免疫反应的能力而被选为通路靶标。STING由环状二核苷酸cGAMP触发,其不能在表达载体中编码以便在细胞中与CAR分子一起表达。作为初始步骤,生成了与cGAMP占据的STING结合位点结合的肽。通过从蛋白质数据库提供的晶体结构(结构4EMT)中所呈现的STING-cGAMP活性复合物的结构中去掉cGAMP,鉴定了与STING结构结合的新型肽,以获得不含cGAMP的分离的活性STING的结构(图13)。通过蒙特卡洛侧链取代预测了空cGAMP袋中的肽结合。图14左图显示了STING结构,其中聚甘氨酸肽用于代表性取样肽结合。图14右图显示了STING结构,其中预测的STING结合肽结合在cGAMP袋内。结构中显示的肽是肽ST2(SEQ ID NO:3:LFILSG)。

[0507] 选择6种cGAMP模拟肽(本文也称为STING肽)进行活性测试。对骨髓树突状细胞(BMDC)刺激的初步筛选表明,通过计算方法产生的6种STING肽是活性的。从小鼠后肢收集骨髓并在培养基(30ng/mL GM-CSF中的RPMI+10% FBS)中培养4天来制备BMDC。然后用脂质体(Lipofectamine 2000)中包封的潜在STING激动剂肽刺激BMDC,并返回以用GM-CSF培养48小时。然后通过流式细胞术评估BMDC的CD86表达,作为STING活性的替代物。图15的左图提供了研究设计的示意图。

[0508] 结果提供在图15的右图中。所测试的肽为肽ST1C、ST1、ST2、ST3、ST4和ST5(分别为

SEQ ID NO:1、2、3、4、5和6) (表1)。天然配体cGAMP用作阳性对照。研究显示,与阴性对照相比,所有5种肽均在BMDC中以统计学显著水平增加了CD86表达。ST2肽诱导了所测试肽中最高CD86表达。

[0509] 进一步表征STING激动剂肽ST2的活性。如上所述制备来自野生型(WT)或STING敲除(KO)小鼠的BMDC。用ST2刺激后,将细胞负载Ova(SIINFEKL)肽,然后充分洗涤以去除残留肽。然后,将对Ova肽特异性的OT-I T细胞添加至BMDC培养物中,以评估DC活性和刺激CD8 T细胞反应的能力。48小时后,通过流式细胞术评估OT-I T细胞表达颗粒酶B(细胞杀伤活性的指示)、Ki67(细胞增殖的指示)和IFN γ 。如图16所示,用ST2肽刺激DC显著增加了WT细胞中通过颗粒酶B、Ki67和IFN γ 的所有三种所测量的T细胞刺激。STING KO细胞中颗粒酶B、Ki67和IFN γ 与仅含脂质体的对照相比没有显著增加,表明ST2的活性需要STING通路。因此,结果显示STING肽通过STING依赖的机制通过DC增强了T细胞功能。

[0510] 接下来,进行一项研究以确定由CAR-T细胞递送本文提供的新型STING肽是否会增强CAR-T疗法的抗癌活性。图17顶图提供了本研究中使用的CAR-T构建体的示意图。19BBz CAR构建体被用作对照,以产生CD19 CAR-T细胞(“19BBz”)。还制备了进一步包含ST2肽的19BBz CAR构建体,其中终止密码子将编码ST2肽的核酸片段和编码19BBz CAR分子的核酸分开,以产生具有ST2肽的CD19 CAR-T细胞(“19BBz-STING肽”)。

[0511] 图17底图提供了研究设计的示意图。小鼠被植入B16-hCD19肿瘤,并在第5天和第12天用CAR-T细胞治疗,在第8、11和14天用抗-CTLA4抗体治疗。存活率百分比监测超过80天。与接受不含ST2肽的CAR-T细胞的小鼠相比,接受19BBz-STING肽CAR-T细胞的动物表现出显著改善的存活率(图18;p=0.036)。

[0512] 总之,研究显示,通过计算结合分析产生的新型STING肽能够作为有效的cGAMP模拟肽,并增强对癌症抗原的免疫反应。在CAR-T细胞治疗的背景下,cGAMP模拟、STING激动剂肽的存在显著改善了CAR-T细胞的抗癌效果。因此,本公开内容提供了通过利用无法通过先前已知或常规手段由CAR-T细胞递送的免疫系统的有效途径来改善CAR-T细胞疗法的新颖方法。

[0513] 实施例3:SMAC模拟肽与CAR-T细胞疗法的组合

[0514] SMAC的激活增强了凋亡,并且在存在细胞死亡信号时在诱导细胞死亡方面特别有效。SMAC模拟小分子已经在癌症中进行了测试,但就其自身而言,它们尚未在临床研究中证明有效。不希望受理论束缚,SMAC小分子在临床研究中的低功效可能部分或全部是由于缺乏细胞死亡触发物(例如,TNF/TRAIL通路的激活),触发物可能是最佳SMAC活性所必需的。

[0515] 使用合理的设计策略生成SMAC肽。在剂量反应测定中,选择具有(如通过诱导细胞死亡所测量的)最佳结合力和效力的肽进行测试。将SMAC模拟肽组合物包封在脂质体中,并在20ng/mL的TNF的存在下以不同浓度体外转染到B16或KP(肺腺癌)细胞中。24小时后,通过流式细胞术评估细胞死亡。图19中提供了示例性数据集。基于多细胞系中的剂量反应,选择肽6(SMACm6;SEQ ID NO:8)进行进一步分析。

[0516] 将SMACm6模拟肽包封在脂质体中,并在存在或不存在20ng/mL TNF的情况下,以不同浓度在体外转染到B16或KP细胞中。如图20所示,在不存在TNF的情况下,没有观察到细胞死亡。在存在TNF的情况下,包封的SMACm6浓度的增加导致相对细胞死亡的增加。因此,数据显示,SMAC模拟肽在体外诱导了肿瘤细胞的TNF依赖性细胞死亡。

[0517] 如图21所示,产生了SMACm CAR-T构建体,并在T细胞中表达。在培养基中扩增SMACm CAR-T细胞。细胞培养后,通过超速离心从培养基中收集EV。然后,在存在20ng/mL TNF的情况下,将EV与指定细胞以不同浓度在体外温育。24小时后,通过流式细胞术评估细胞死亡。结果提供在图22中,并表明在两种肿瘤细胞类型中,SMACm6 EV显著增强了细胞死亡。

[0518] 此外,SMACm CAR-T EV增强了体内的肿瘤控制。小鼠被植入50,000个B16-hCD19肿瘤,并在植入后第5天和第12天以每剂量 2×10^6 个SMACm6 CAR-T细胞治疗,并在一些组中在第8天、11天和14天用抗-CTLA4抗体治疗。随着时间测量肿瘤生长。研究结果显示,在存在或不存在作为免疫检查点阻断剂的抗-CTLA4抗体的情况下,与对照19BBz CAR-T细胞相比,SMACm CAR-T细胞显著降低了肿瘤体积并显著提高了存活率(图23)。

[0519] 因此,该研究显示,触发TNF依赖性细胞死亡通路的肽,在临床研究中作为靶点的效用有限,但在某些情况下可以作为细胞死亡的有效介质,可以通过CAR-T细胞疗法递送,并通过增加靶肿瘤细胞的细胞死亡来显著提高CAR-T细胞疗法的功效。此外,无论是否存在免疫检查点抑制剂,CAR-T细胞+SMAC模拟肽组中都实现了肿瘤体积和存活率的改善。

[0520] 实施例4:PARP抑制剂与CAR-T细胞疗法的联合

[0521] PARP抑制剂通过阻断DNA损伤修复(DDR)和诱导细胞死亡来增强细胞应激。DDR的减少与损伤相关分子模式分子(DAMP)的产生介导的抗肿瘤免疫增强以及新抗原患病率增加有关。本发明人试图产生和识别PARPi模拟肽,作为本文提供的抗癌方法和组合中靶向PARP的策略的一部分。

[0522] 使用实施例2中所述的方法计算设计PARP抑制剂肽。将所得的PARP抑制剂(PARPi)模拟肽包封在脂质体中,并在体外转染到TSA乳腺癌细胞中。48小时后,作为DNA损伤反应的读数,通过流式细胞术评估PD-L1。研究结果如图25所示。PARPi模拟肽(Pep1、Pep1C、Pep2和Pep3;分别为SEQ ID NO:13、14、15和16)增加了PD-L1的表达。PARP抑制剂olaparib用作阳性对照。PARPi模拟肽将PD-L1表达提高到与olaparib相似的水平。因此,研究显示,计算设计的新型PARPi模拟肽诱导DNA损伤反应,这将导致癌症细胞死亡。在实施方式中,可以将PARPi模拟肽引入CAR构建体中,以通过工程CAR-T细胞递送至肿瘤微环境。

[0523] 实施例5:通过从CAR-T细胞胞外囊泡(EV)递送抗原肽来激活内源性T细胞,需要来自CAR-T细胞的MHC-I

[0524] 使用表达OVA-19BBz或对照CAR的存在MHC-I或不存在MHC-I的CAR-T细胞(由野生型或B2M KO CD4 T细胞产生)来分离EV(图27A)。然后将这些EV添加到OT-I CD8 T细胞(OVA特异性的)与野生型B16癌症细胞或MHC-I(B2M KO)缺乏的B16细胞的共培养物中。48小时后,进行流式细胞术检测OT-I T细胞表达的T细胞激活标记物。在指定的培养条件下,添加来自表达MHC-I或MHC-I缺乏的CAR-T细胞的EV后,OT-I T细胞上指定的T细胞激活标记物的表达分别显示在图27B的顶部和底部。图27C显示了OT-I T细胞上T细胞激活标记物的代表性流式细胞术图。数据表明,通过递送来自CAR-T细胞胞外囊泡(EV)的抗原肽,来自CAR-T细胞的MHC-I是激活内源性T细胞所必需的。

[0525] 实施例6:来自工程化以递送抗原肽的CAR-T细胞的胞外囊泡可以直接激活内源性T细胞

[0526] 使用跨孔过滤器将OT-I CD8 T细胞(图28A,上孔)与未转导或表达OVA-19BBz

CAR或对照19BBz CAR的CAR-T细胞(图28A,下孔)分离。将孔分离的过滤器的孔径为0.4微米,其允许细胞外囊泡(EV)穿过,但不允许细胞穿过(图28A)。对于指示的T细胞激活标记物,或对于在将指示的CAR-T细胞添加到下孔后从CAR-T细胞EV转移的OVA/MHC-I,图28B显示了来自上孔的OT-I CD8 T细胞的代表性流式细胞术图。结果表明,工程化以递送抗原肽的CAR-T细胞的细胞外囊泡可以直接激活内源性T细胞。

[0527] 其他实施方式

[0528] 本文中变量的任何定义中要素列表的表述包括该变量作为所列要素的任何单个要素或组合(或子组合)的定义。本文中实施方式的表述包括该实施方式作为任何单个实施方式或与任何其他实施方式或其部分的组合。

[0529] 本文引用的每项或每一项专利、专利申请和出版物的公开内容均在此通过引用以其全部并入本文。虽然本发明已参照具体实施方式进行公开,但显然本领域的技术人员可以在不脱离本发明真实精神和范围的情况下设计本发明的其他实施方式和变型。所附的权利要求旨在被解释为包括所有这种实施方式和等效变型。

<210> 4
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<400> 4
Thr Phe Glu Tyr Ser Gly
1 5
<210> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<400> 5
Met Phe Glu Tyr Gly
1 5
<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<400> 6
Leu Phe Ile Lys Pro
1 5
<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<400> 7
Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
1 5
<210> 8
<211> 23
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<400> 8

Ala Val Pro Ile Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1

5

10

15

Gly Gly Gly Ile Pro Val Ala

20

<210> 9

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<400> 9

Ala Val Pro Ile

1

<210> 10

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<400> 10

Ala Val Pro Ile Gly Gly Gly Gly Gly Ile Pro Val Ala

1

5

10

<210> 11

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<400> 11

Ala Val Pro Ile Gly Gly Gly Gly Gly Ala Val Pro Ile

1

5

10

<210> 12

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

- <400> 16
Val Pro His Pro Pro
1 5
- <210> 17
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<220>
<221> 重复
<222> (1) .. (5)
<223> 重复n次,其中n表示至少为1的整数
- <400> 17
Gly Ser Gly Gly Ser
1 5
- <210> 18
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<220>
<221> 重复
<222> (1) .. (4)
<223> 重复n次,其中n表示至少为1的整数
- <400> 18
Gly Gly Gly Ser
1
- <210> 19
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<220>
<221> 重复
<222> (1) .. (5)
<223> 重复n次,其中n表示至少为1的整数

<400> 19
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 20
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 接头
 <400> 20
 Gly Gly Ser Gly
 1
 <210> 21
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 接头
 <400> 21
 Gly Gly Ser Gly Gly
 1 5
 <210> 22
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 接头
 <400> 22
 Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5
 <210> 23
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 接头
 <400> 23
 Gly Ser Gly Gly Gly
 1 5

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 24

Gly Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 25

Gly Ser Ser Ser Gly

1 5

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 26

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 27

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 28

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 28

ggtggcgggtg gctcgggcgg tggtaggtcg ggtggcggcg gatct

45

<210> 29

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 铰链

<400> 29

Asp Lys Thr His Thr

1 5

<210> 30

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 铰链

<400> 30

Cys Pro Pro Cys

1

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 铰链

<400> 31

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg

1 5 10 15

<210> 32

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 铰链

<400> 32

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr

1 5 10

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 铰链

<400> 33

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro

1 5 10

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 铰链

<400> 34

Lys Cys Cys Val Asp Cys Pro

1 5

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 铰链

<400> 35

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro

1 5

<210> 36

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 铰链

<400> 36

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

<210> 37

<211> 261
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗-间皮素scFv
 <400> 42
 Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu His
 1 5 10 15
 Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Glu
 20 25 30
 Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
 35 40 45
 Phe Thr Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly
 50 55 60
 Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr
 65 70 75 80
 Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile
 85 90 95
 Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala
 100 105 110
 Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Trp Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr
 145 150 155 160
 Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
 165 170 175
 Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Arg Tyr Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln
 180 185 190
 Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Ala Ser Ile
 195 200 205
 Leu Gln Asn Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 210 215 220
 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
 225 230 235 240
 Tyr Tyr Cys Leu Gln Thr Tyr Thr Thr Pro Asp Phe Gly Pro Gly Thr
 245 250 255
 Lys Val Glu Ile Lys

260

<210> 43
 <211> 265
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 抗-Her2 scFv
 <400> 43
 Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Ile Met Ser Arg Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 20 25 30
 Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
 35 40 45
 Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 50 55 60
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 85 90 95
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His
 100 105 110
 Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125
 Arg Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly
 130 135 140
 Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 145 150 155 160
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp
 165 170 175
 Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 180 185 190
 Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser
 195 200 205
 Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
 210 215 220
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 225 230 235 240
 Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly

				245					250					255
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
				260					265					

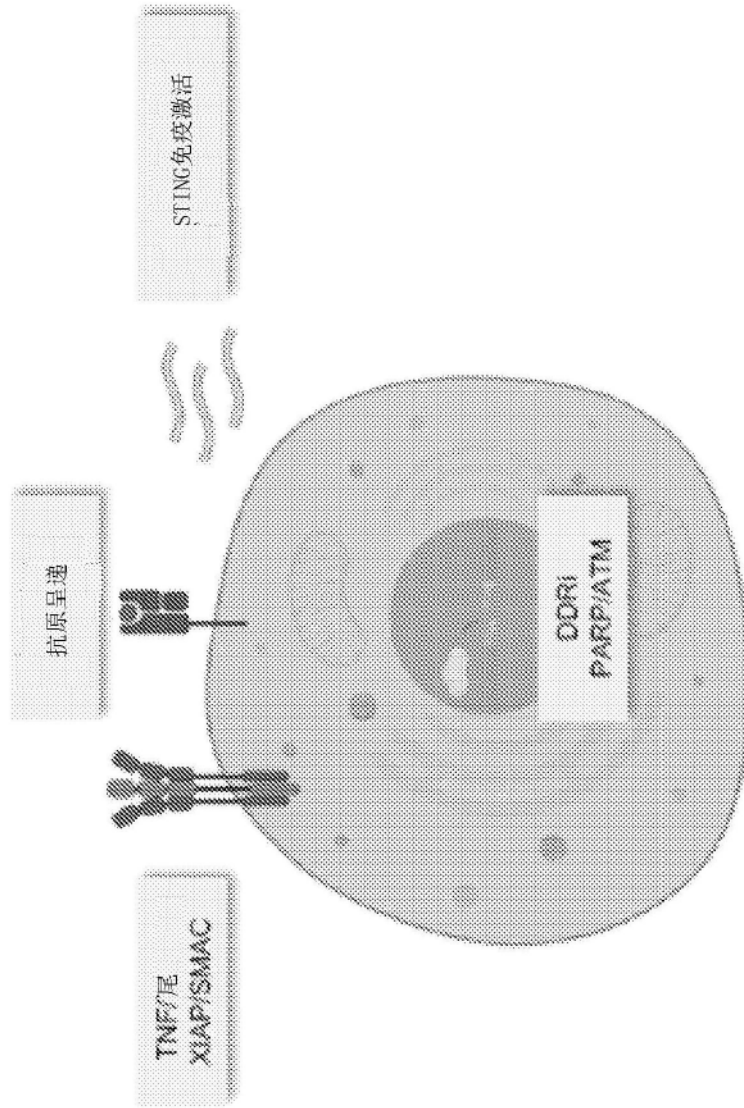


图1

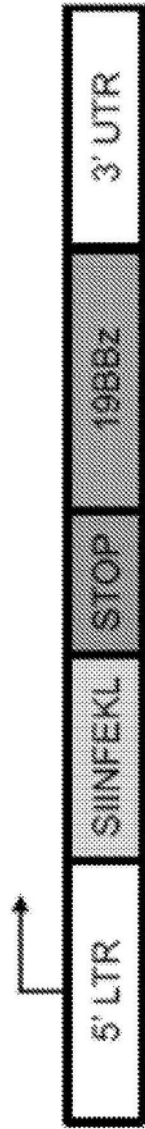


图2

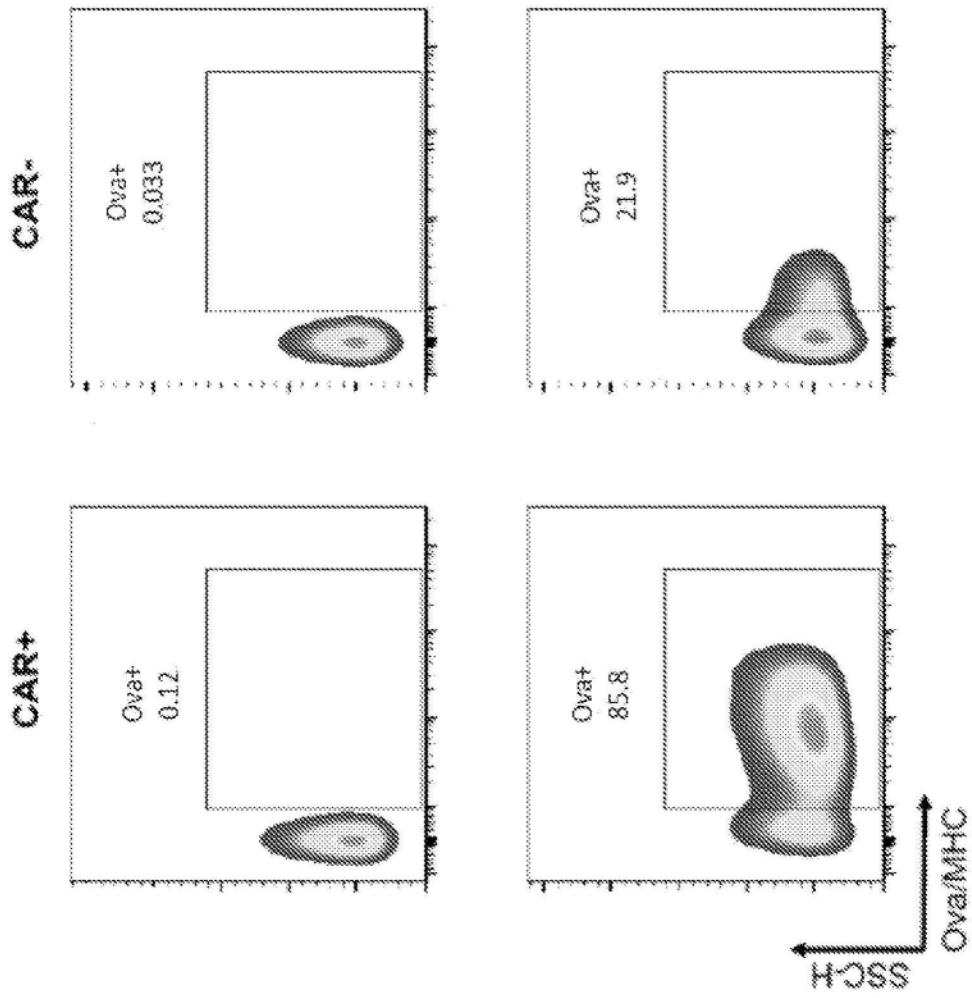


图3

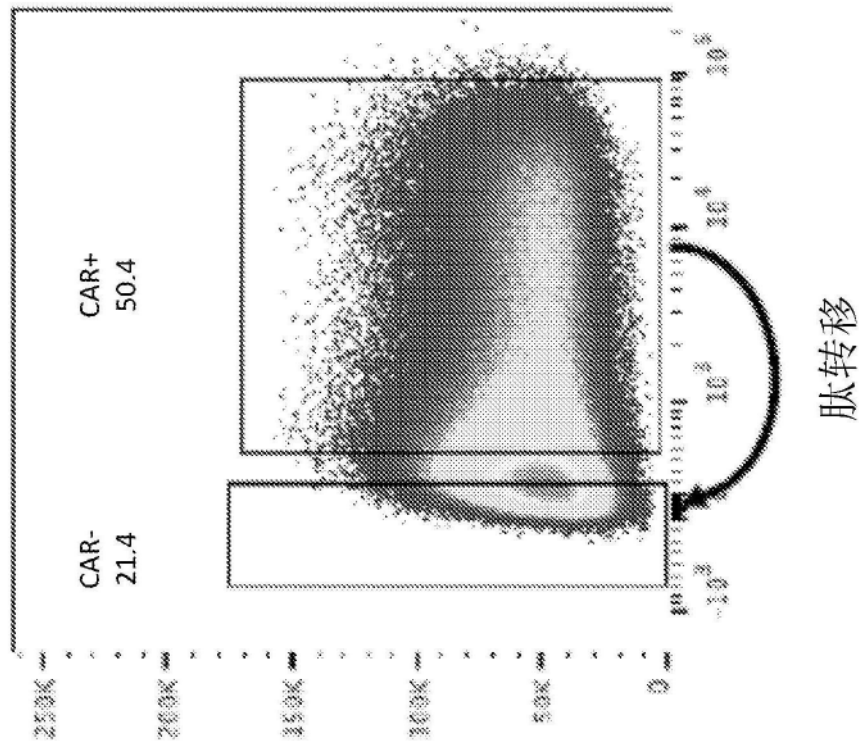


图4

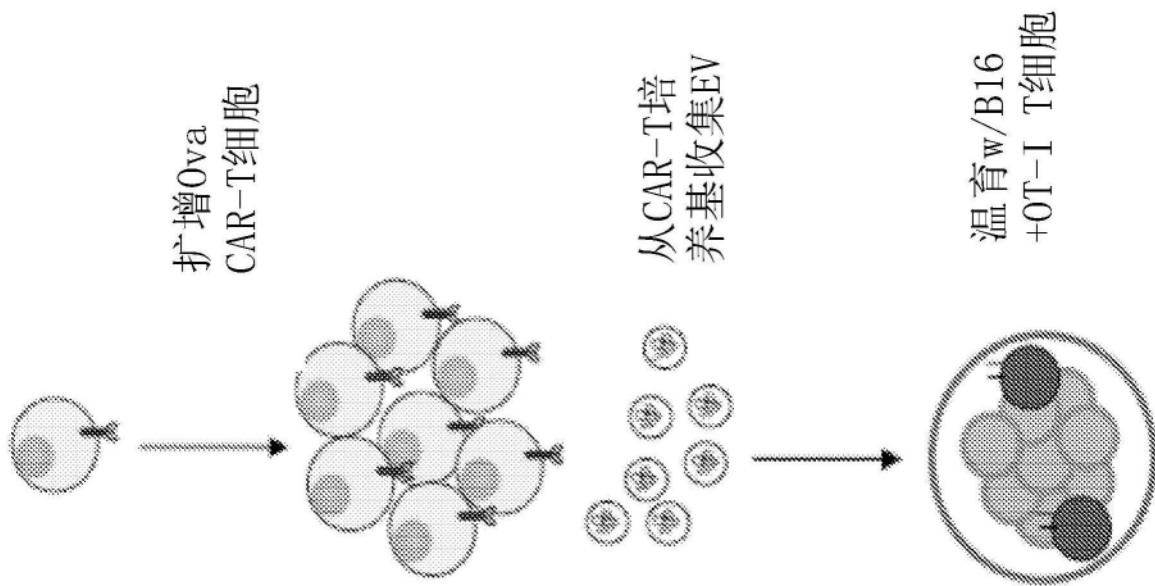


图5

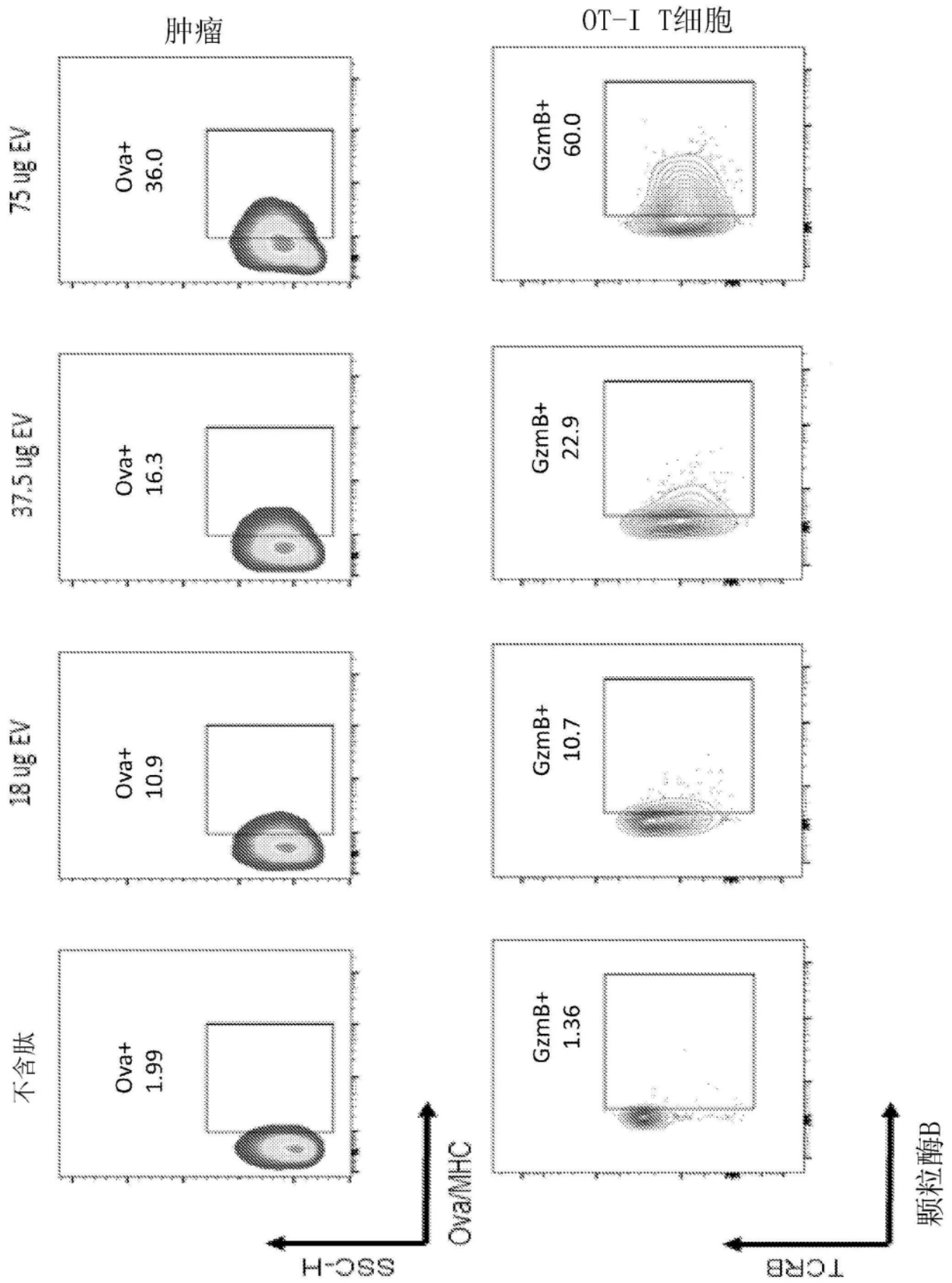


图6A

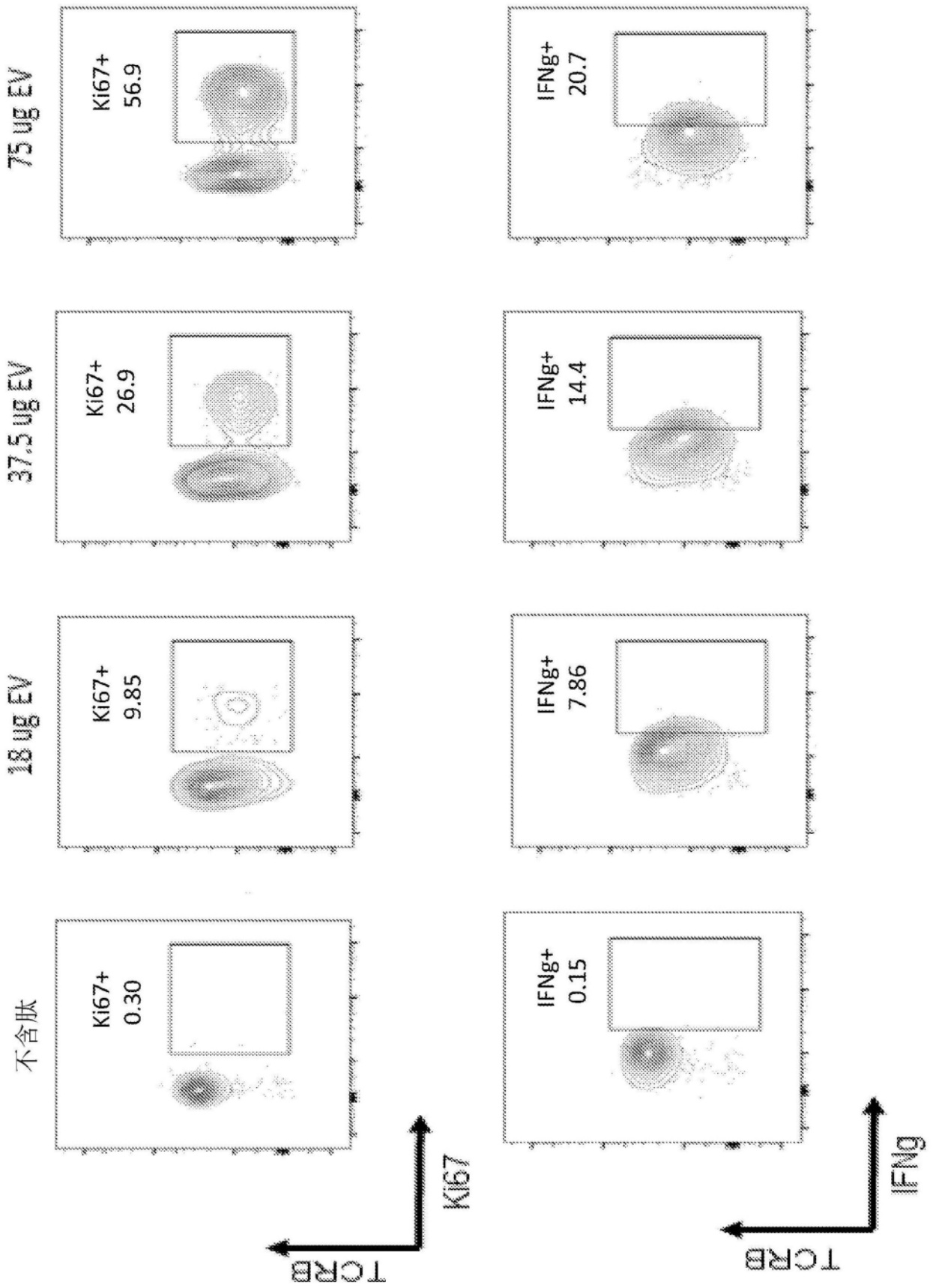


图6B

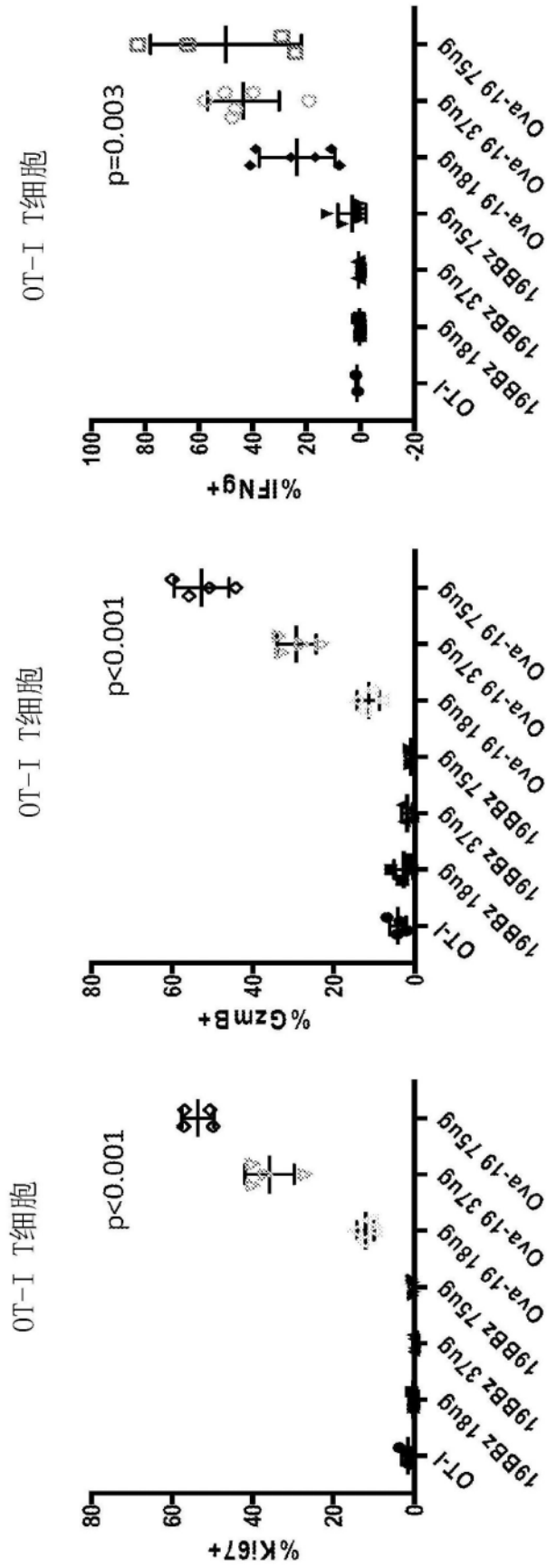


图6C

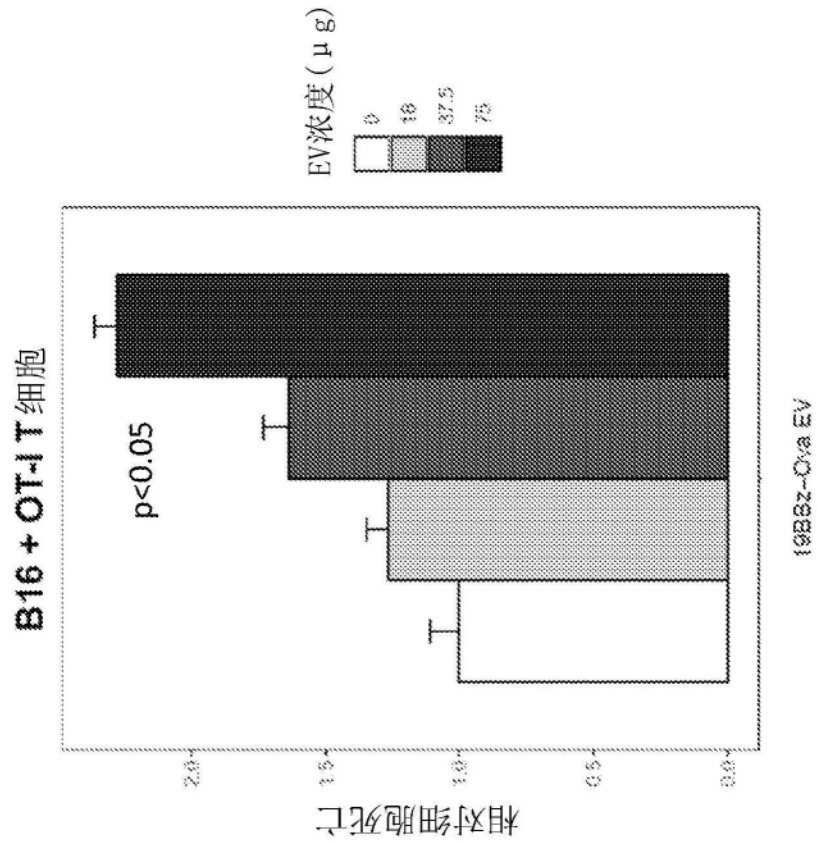


图7

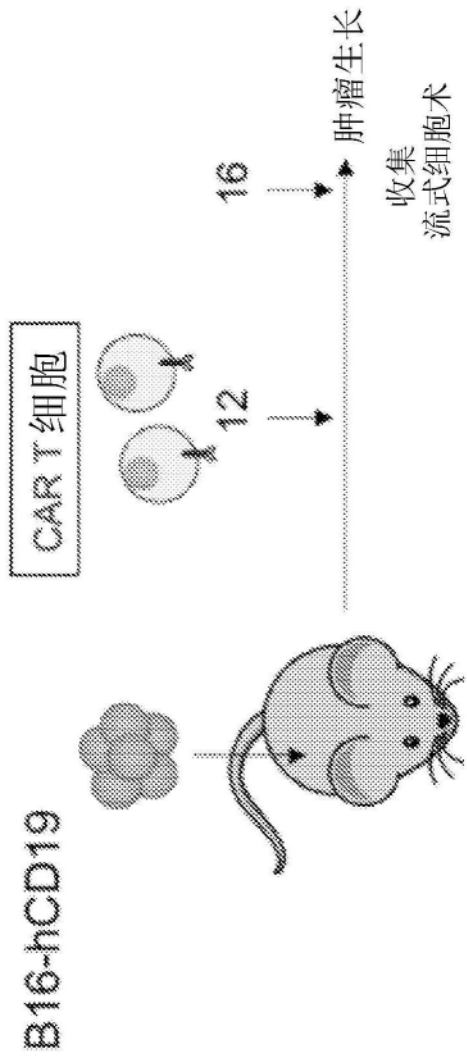


图8

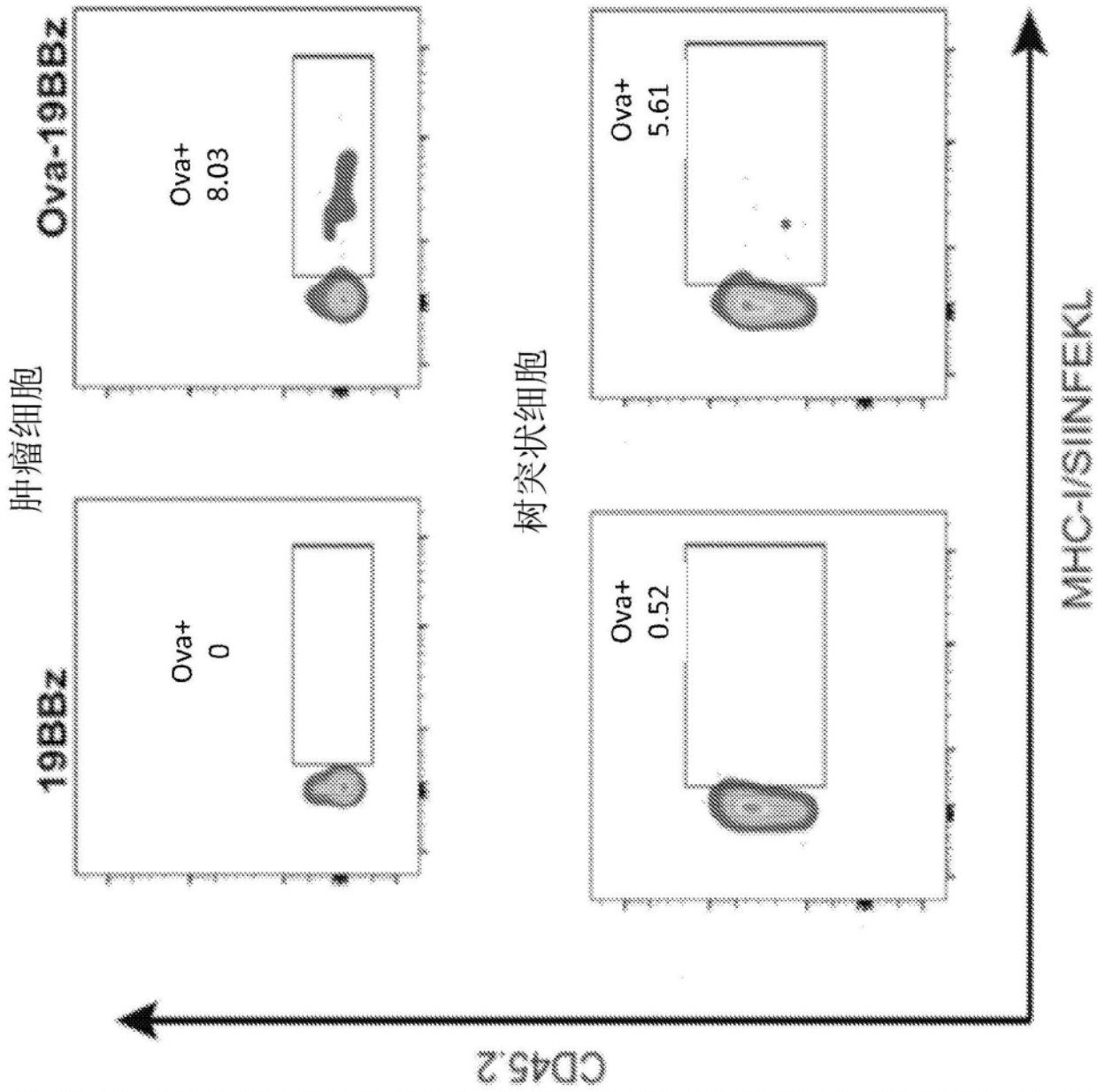


图9A

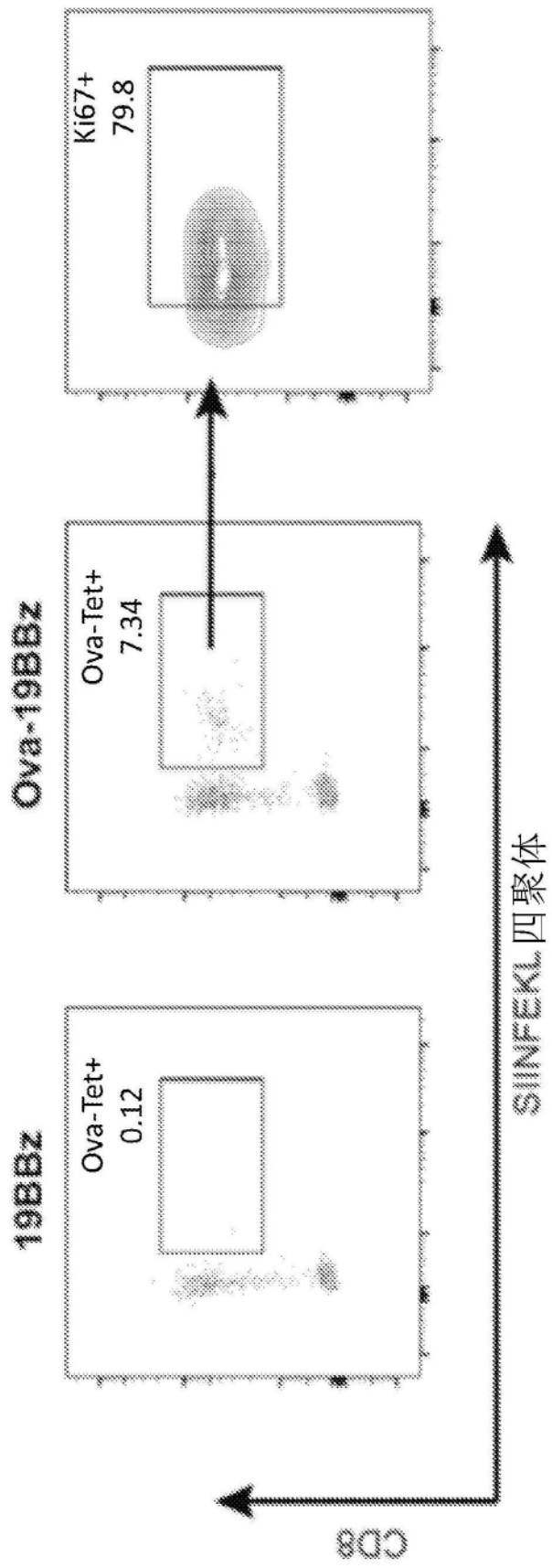


图9B

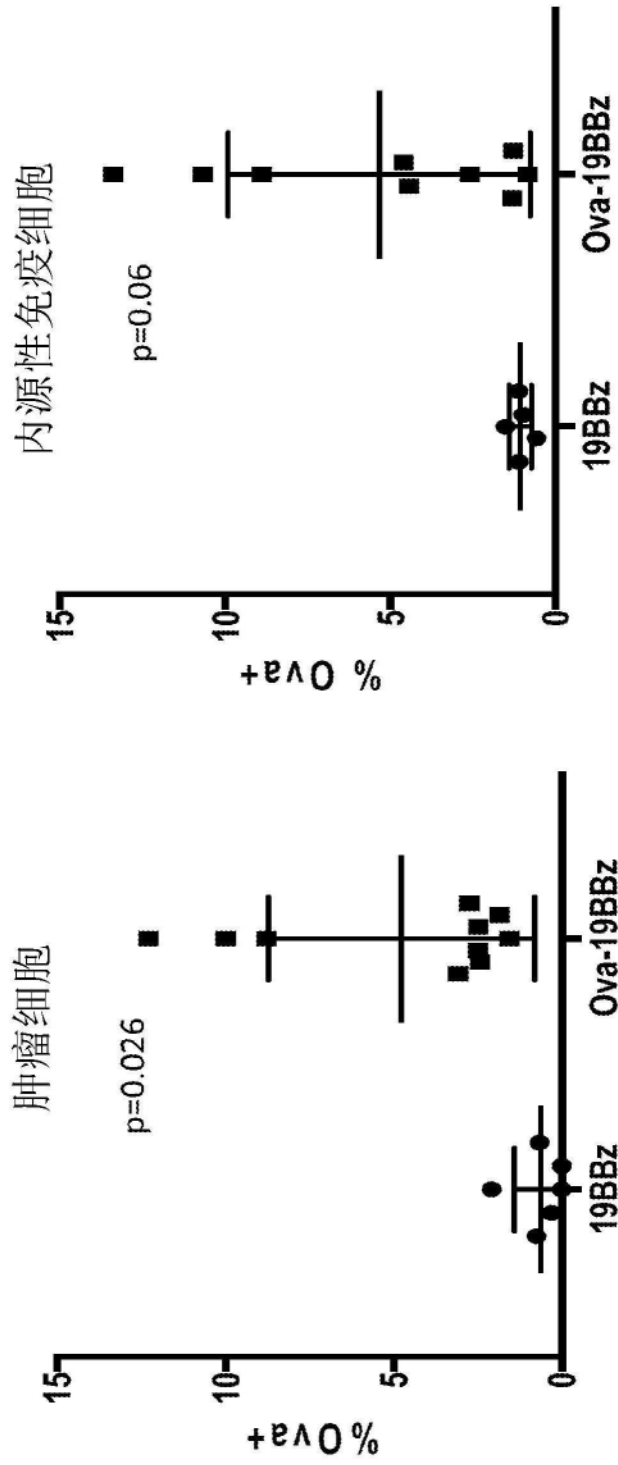


图10A

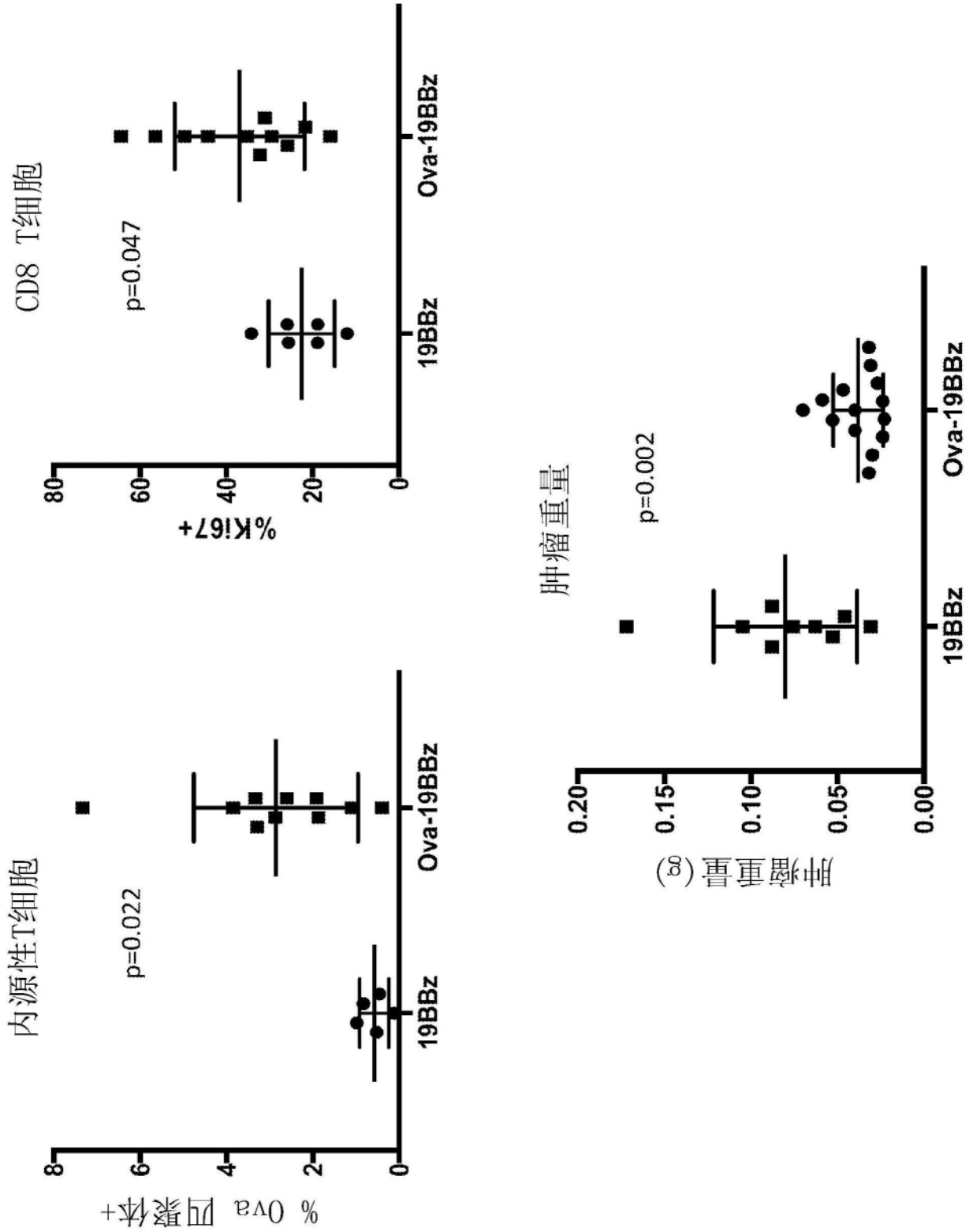


图10B

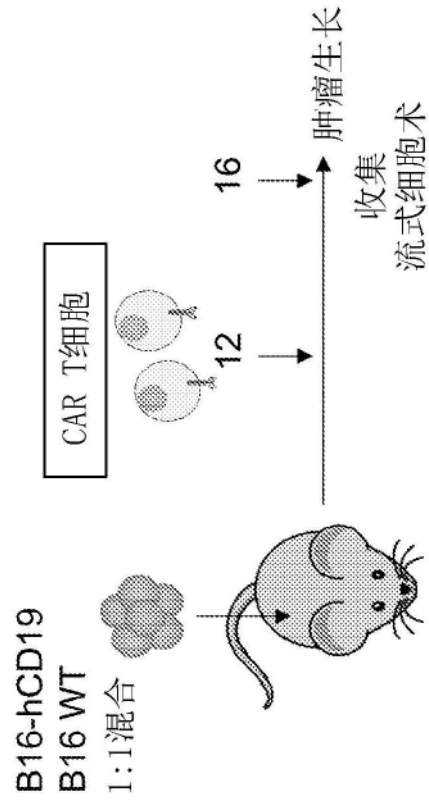


图11A

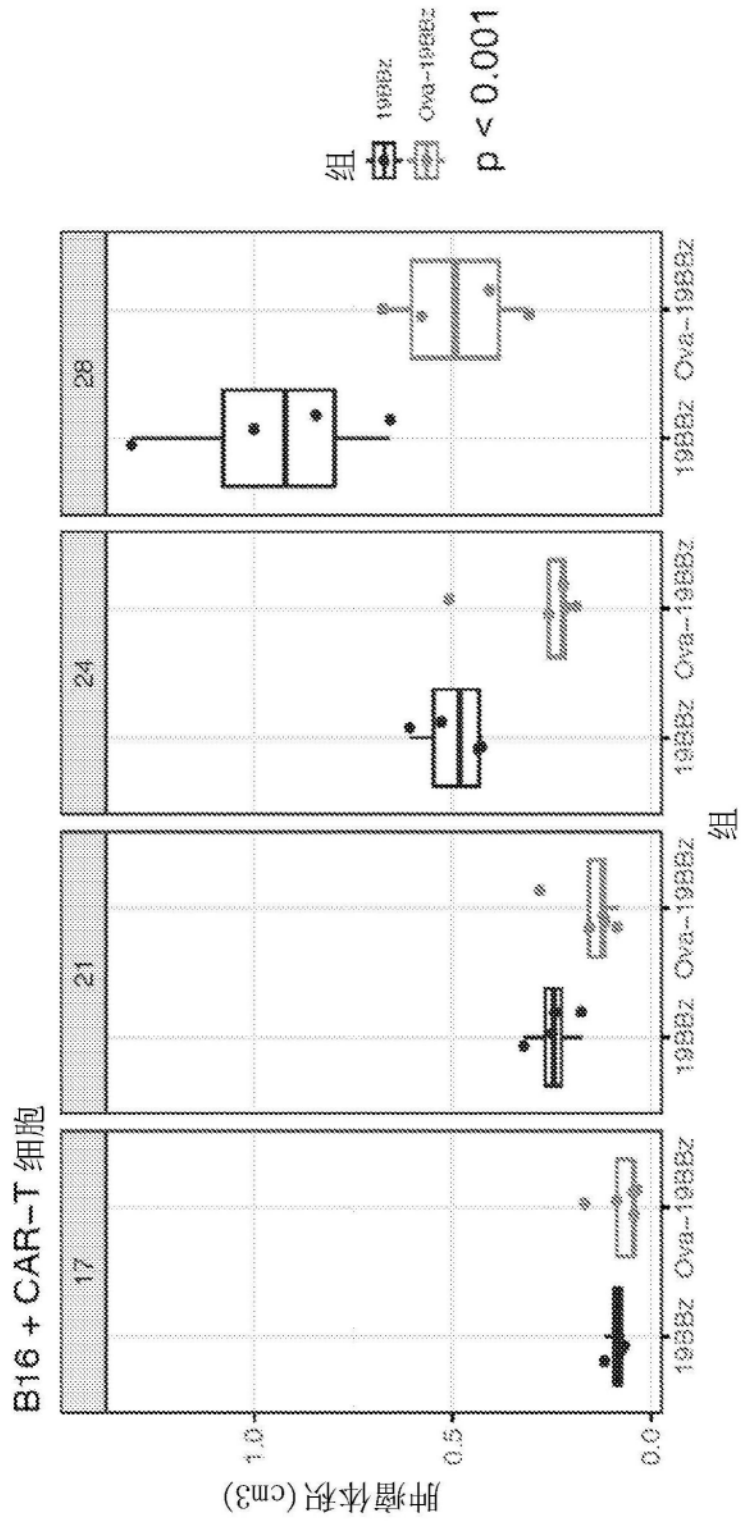


图11B

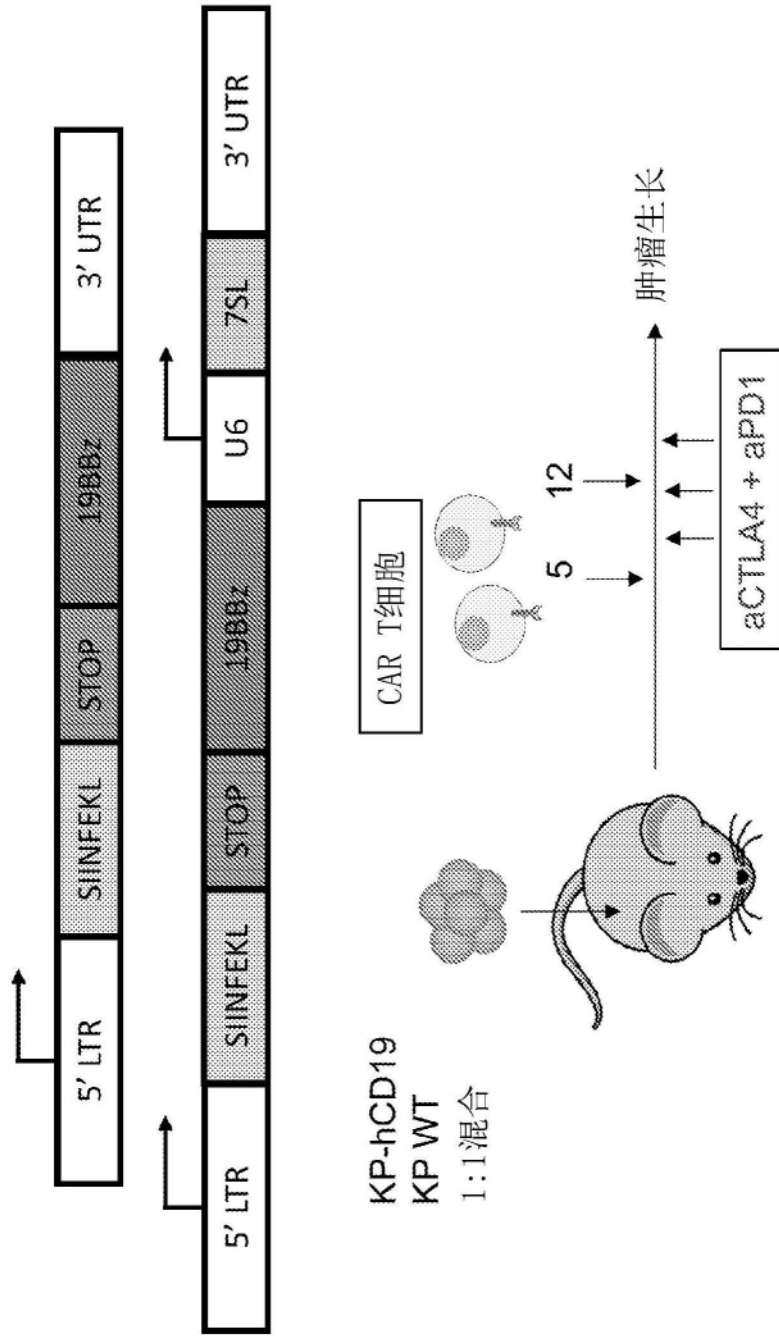


图12A

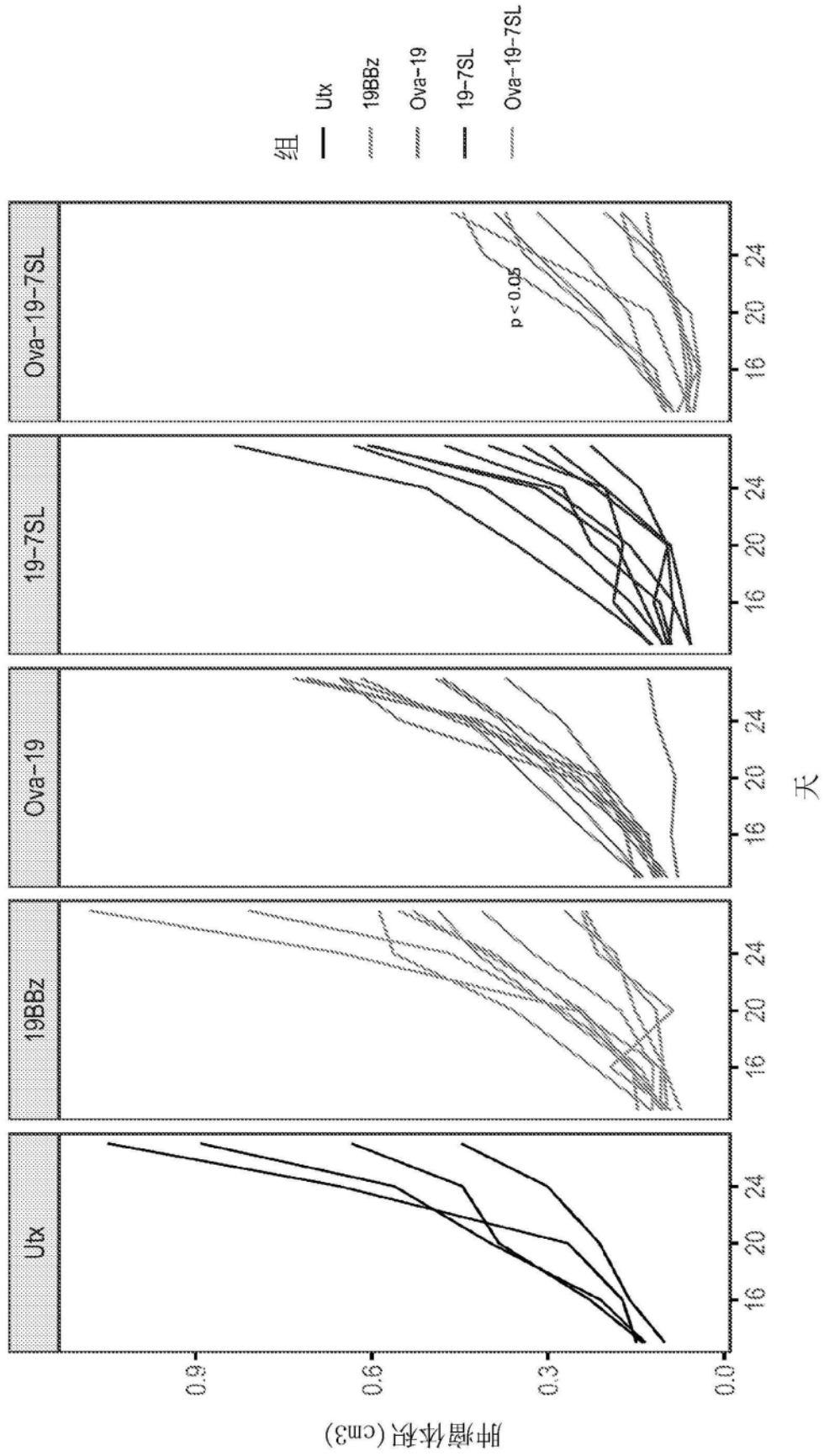


图12B

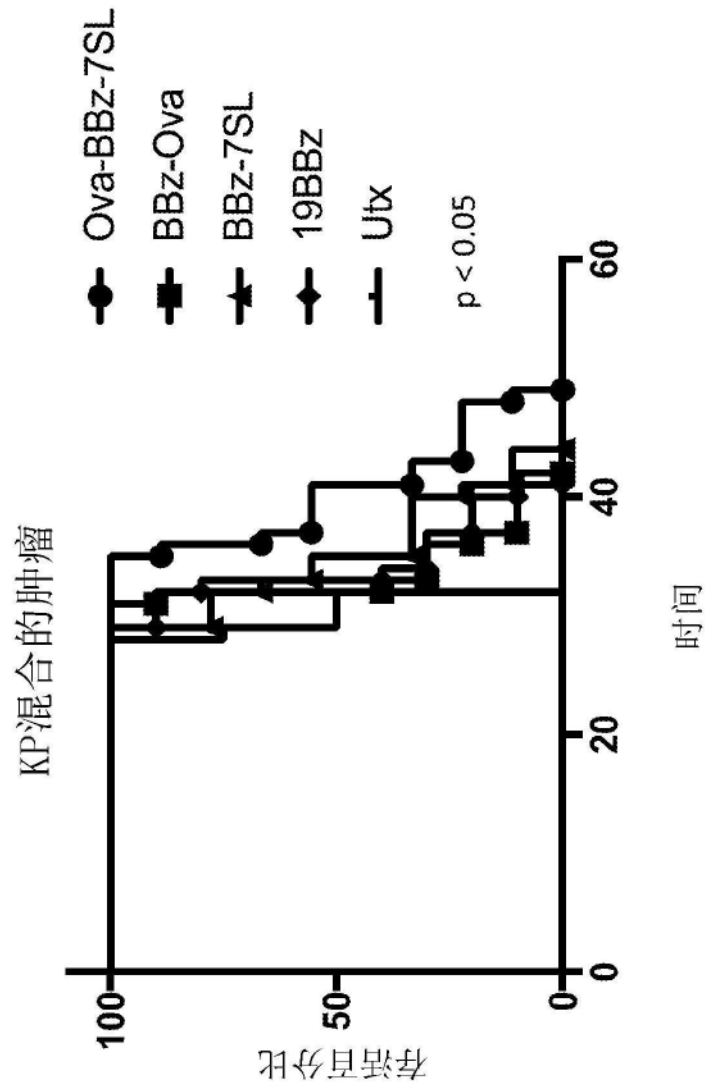
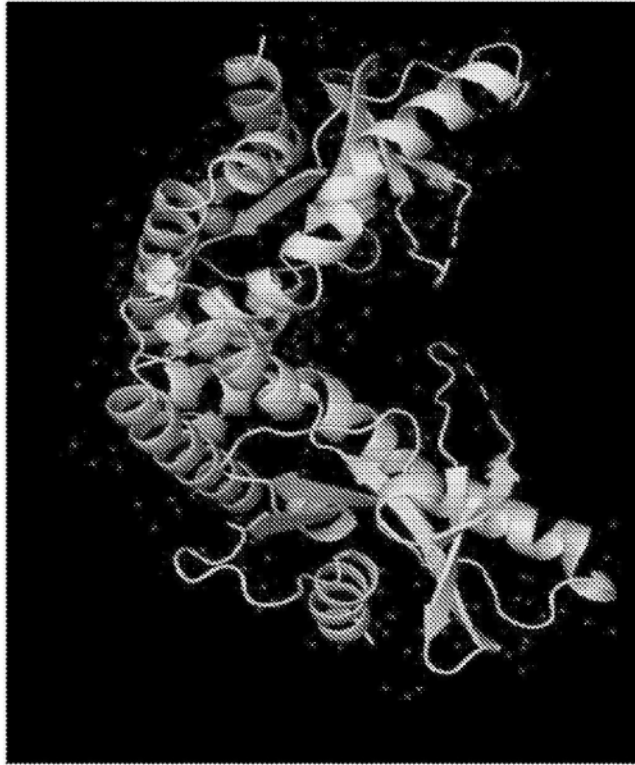
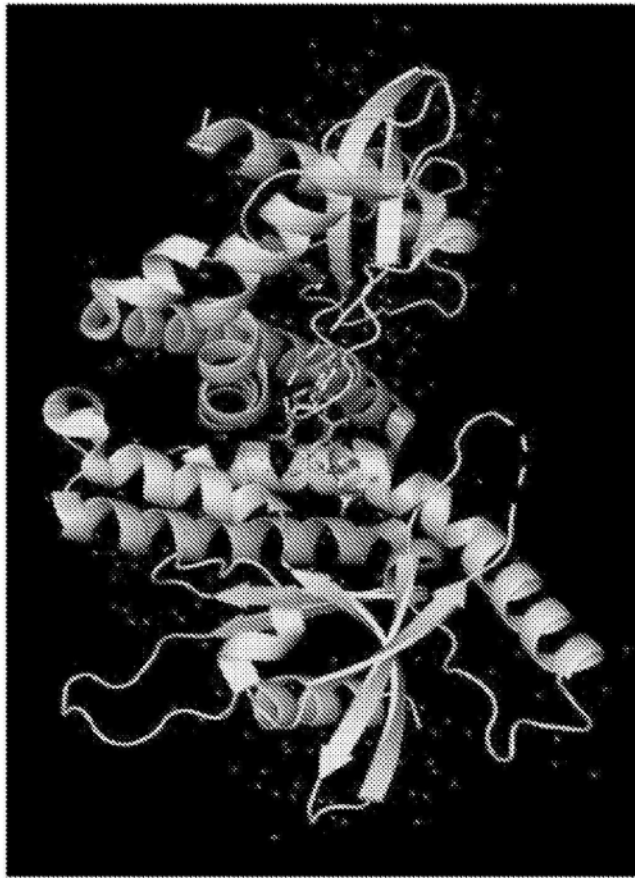


图12C



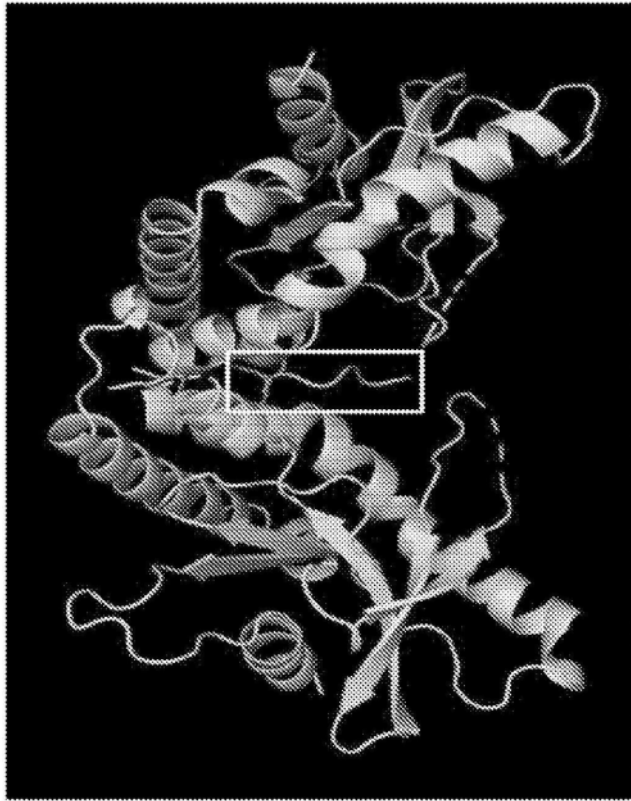
分离的活性STING结构



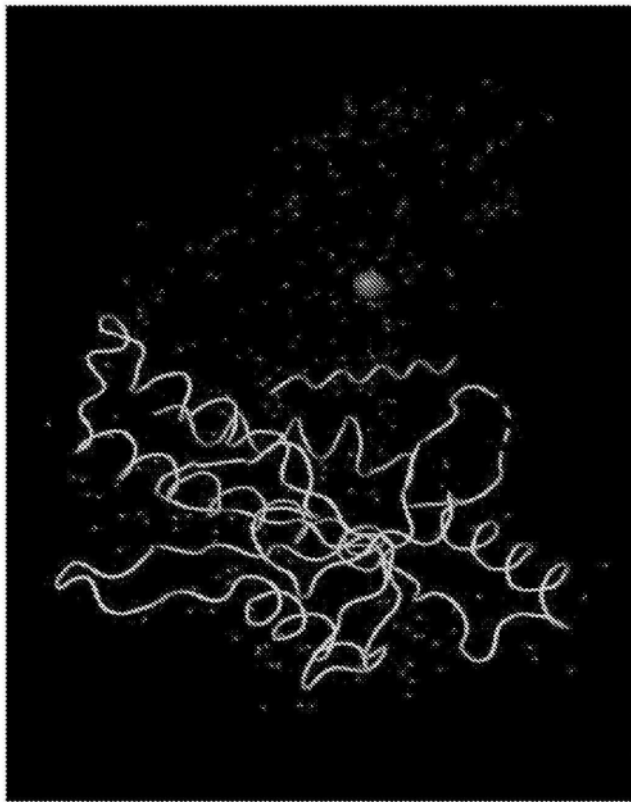
与cGAMP复合的STING

PDB结构4EMT

图13



具有预测结合肽的STING



具有聚-Gly的STING用于采样

图14

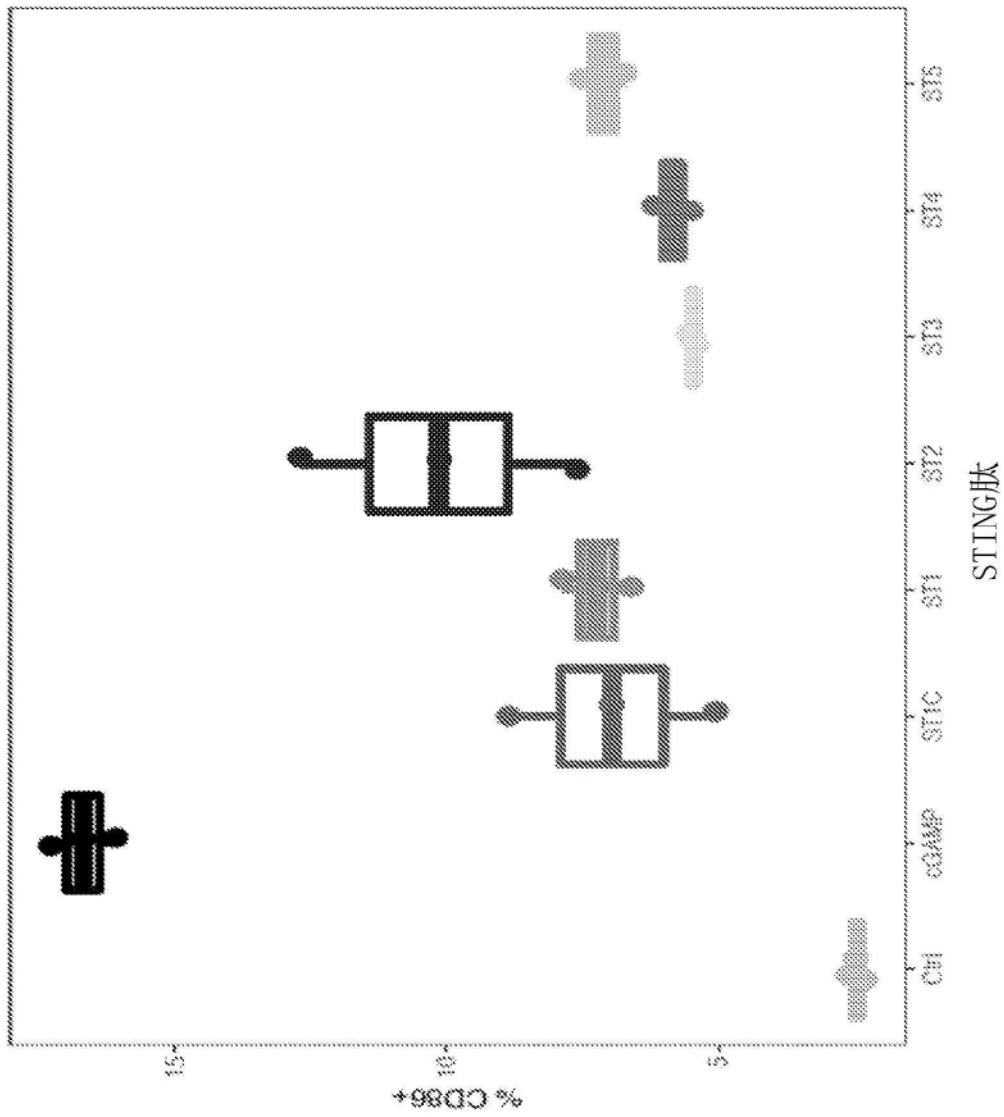
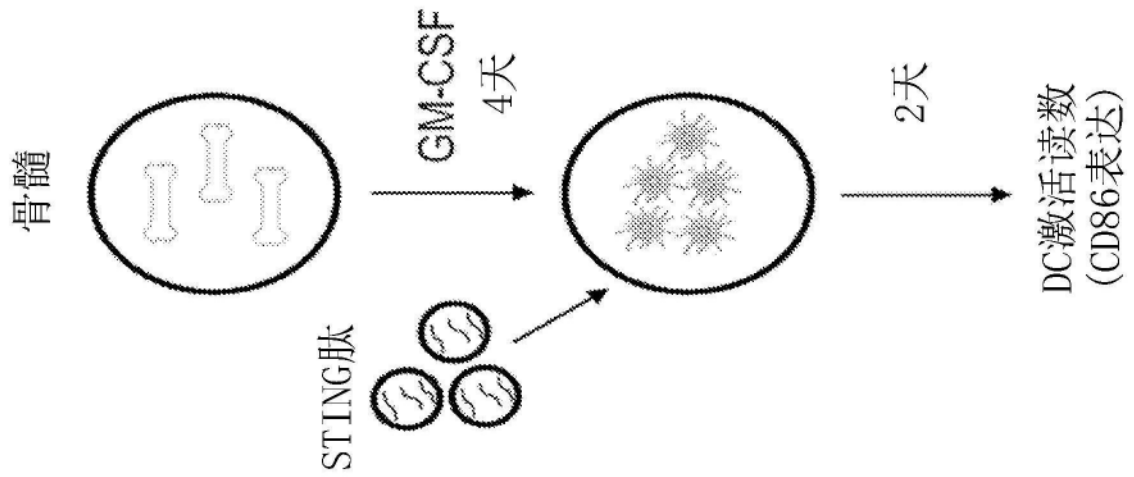


图15

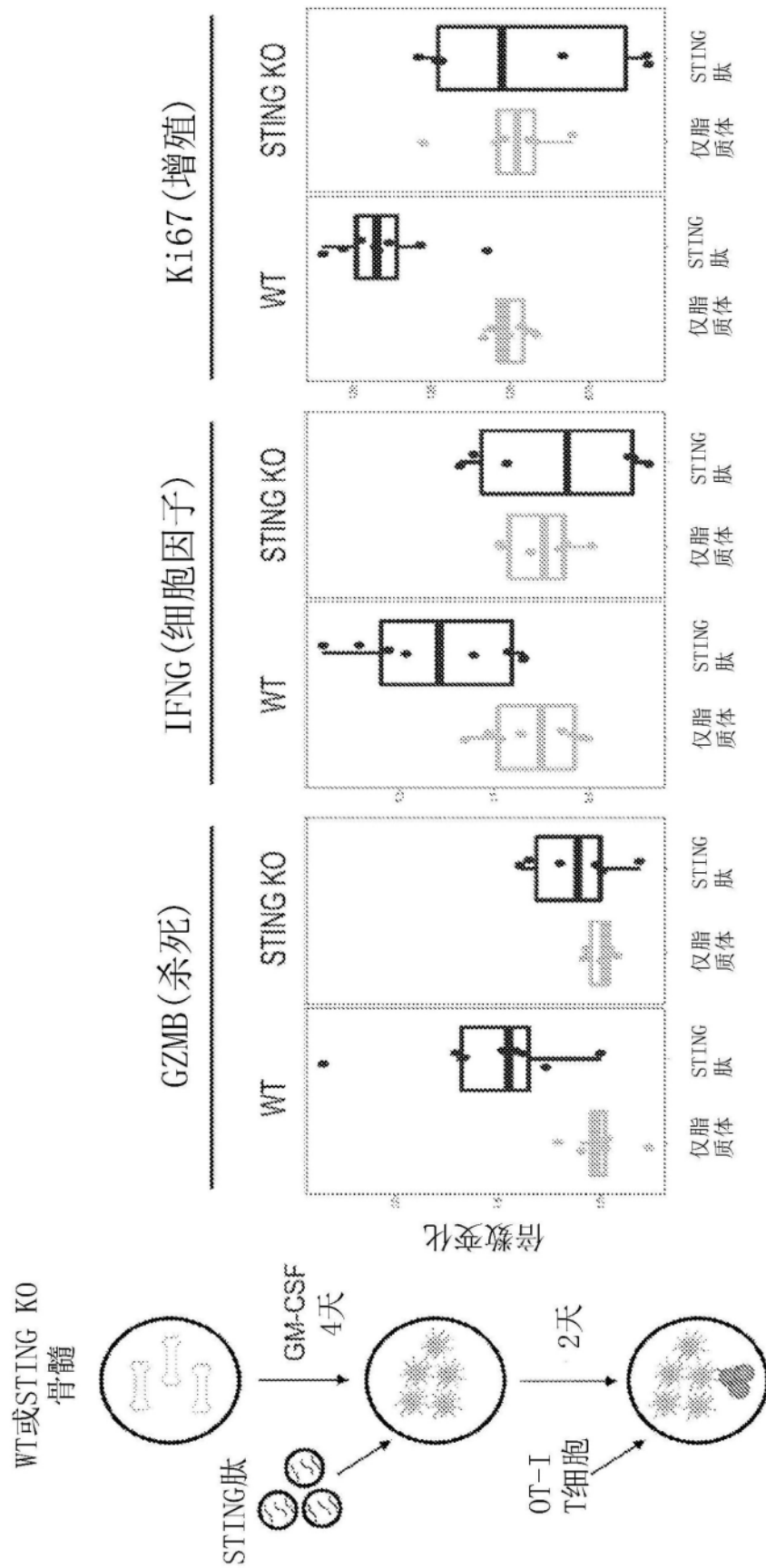


图16

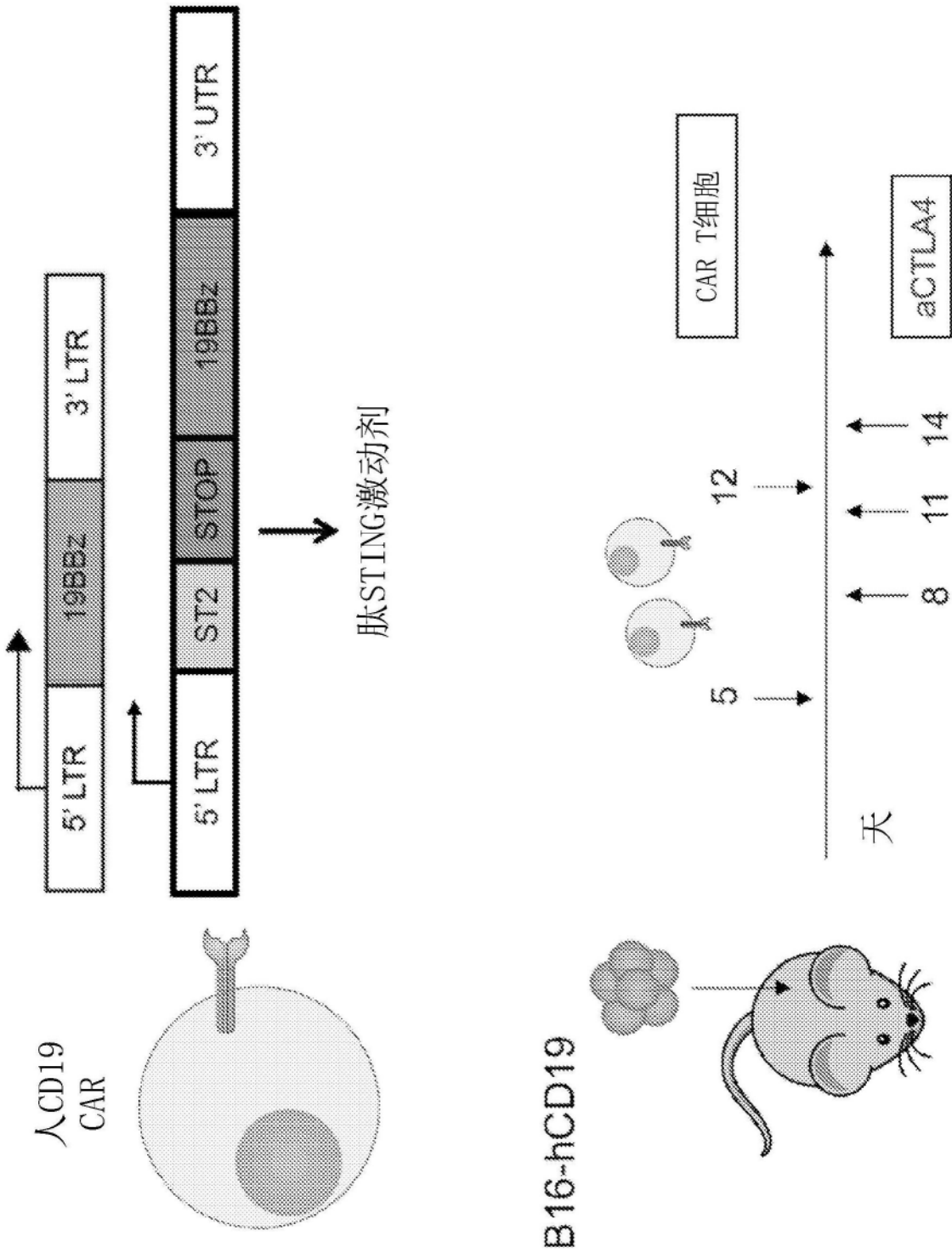


图17

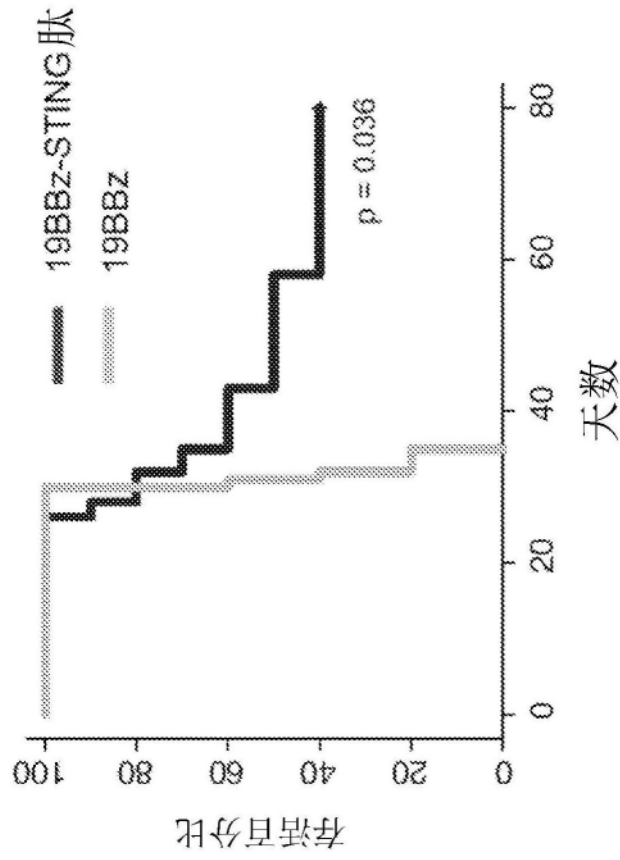


图18

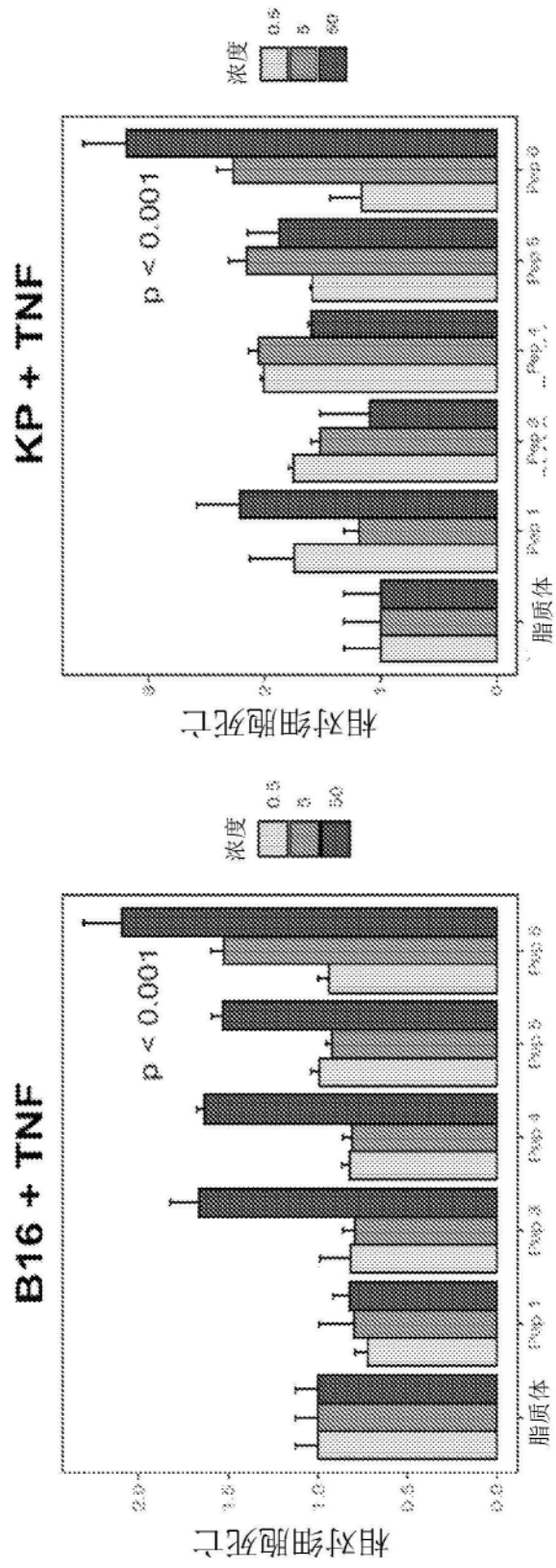


图19

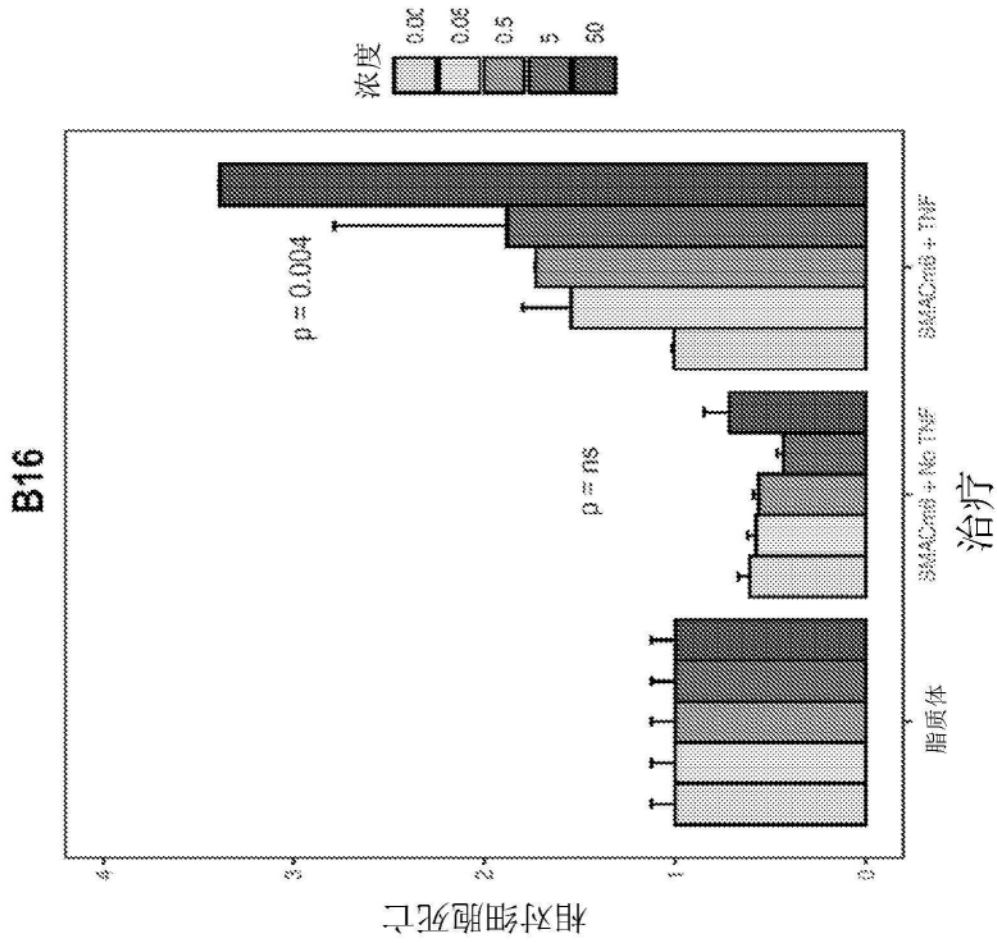


图20

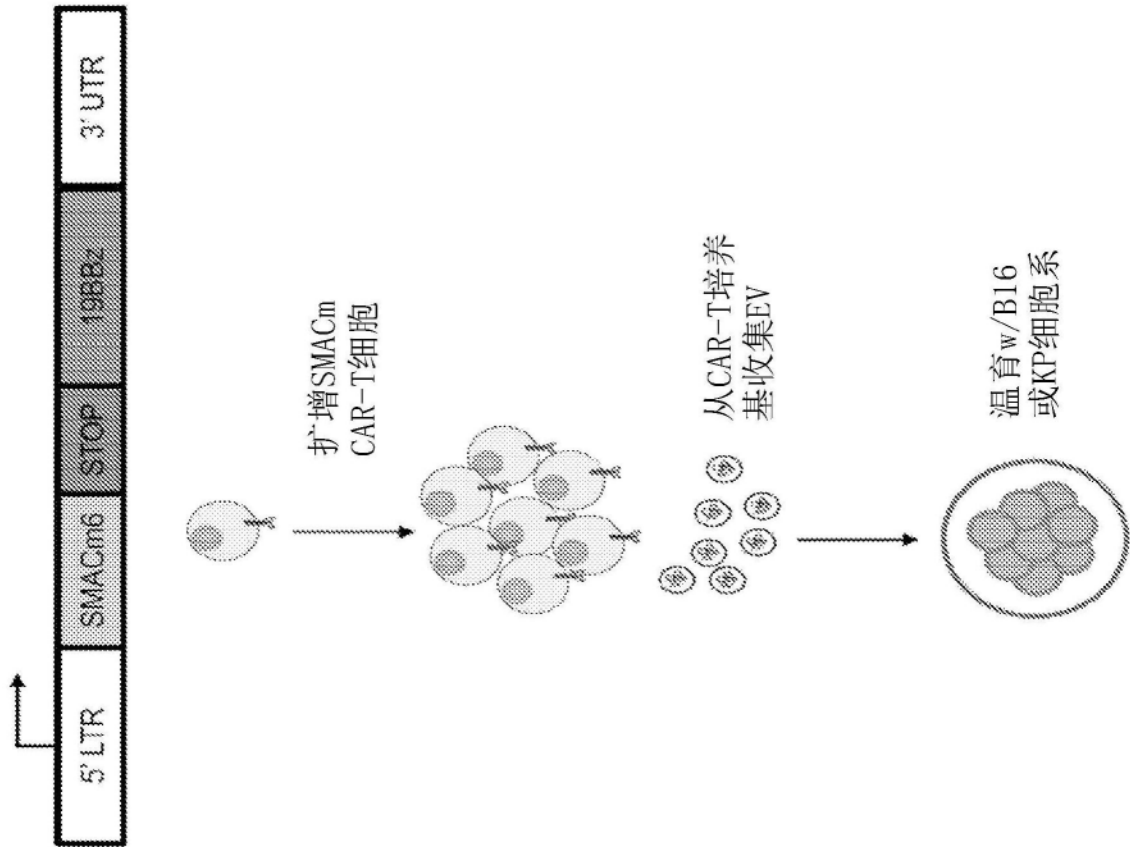


图21

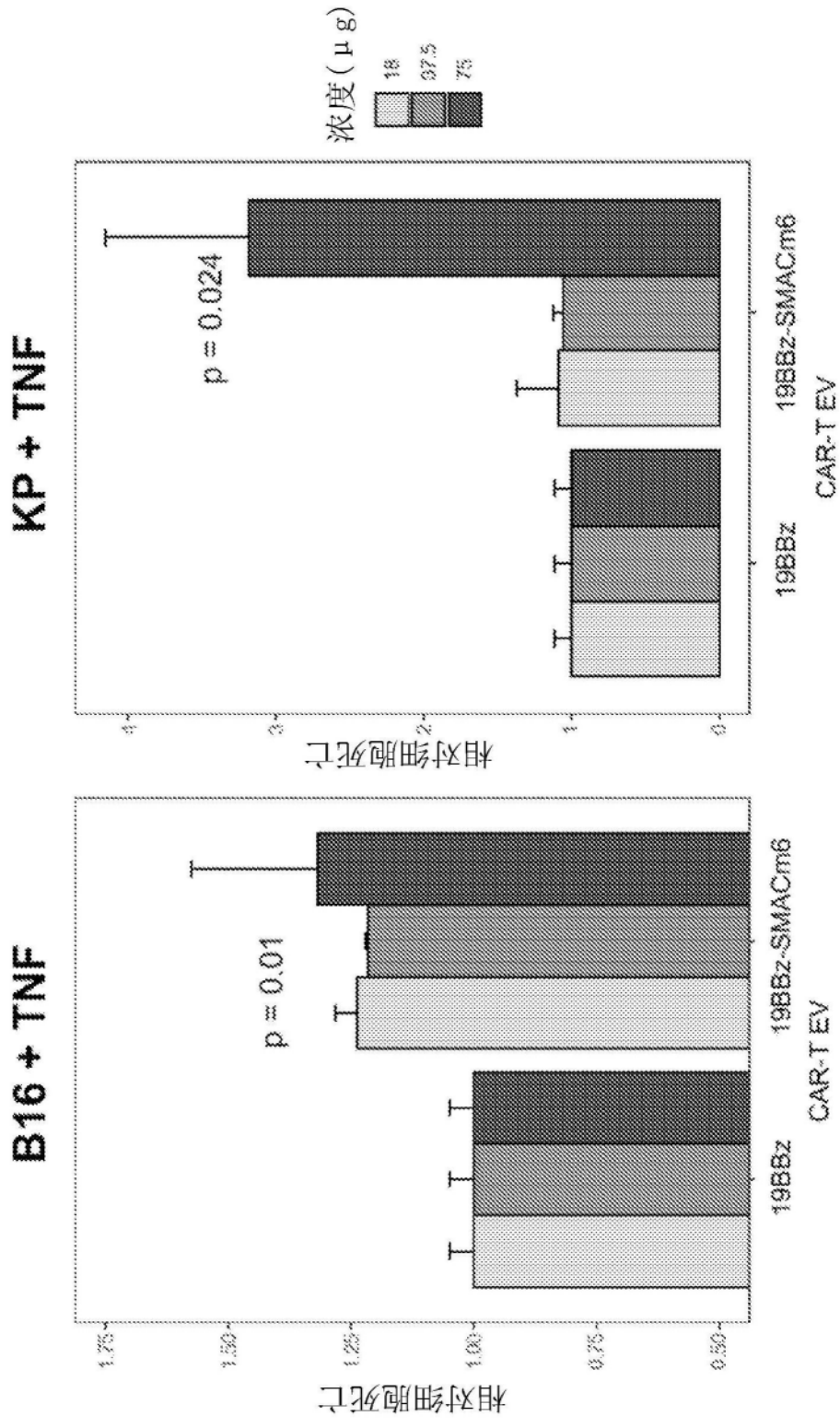


图22

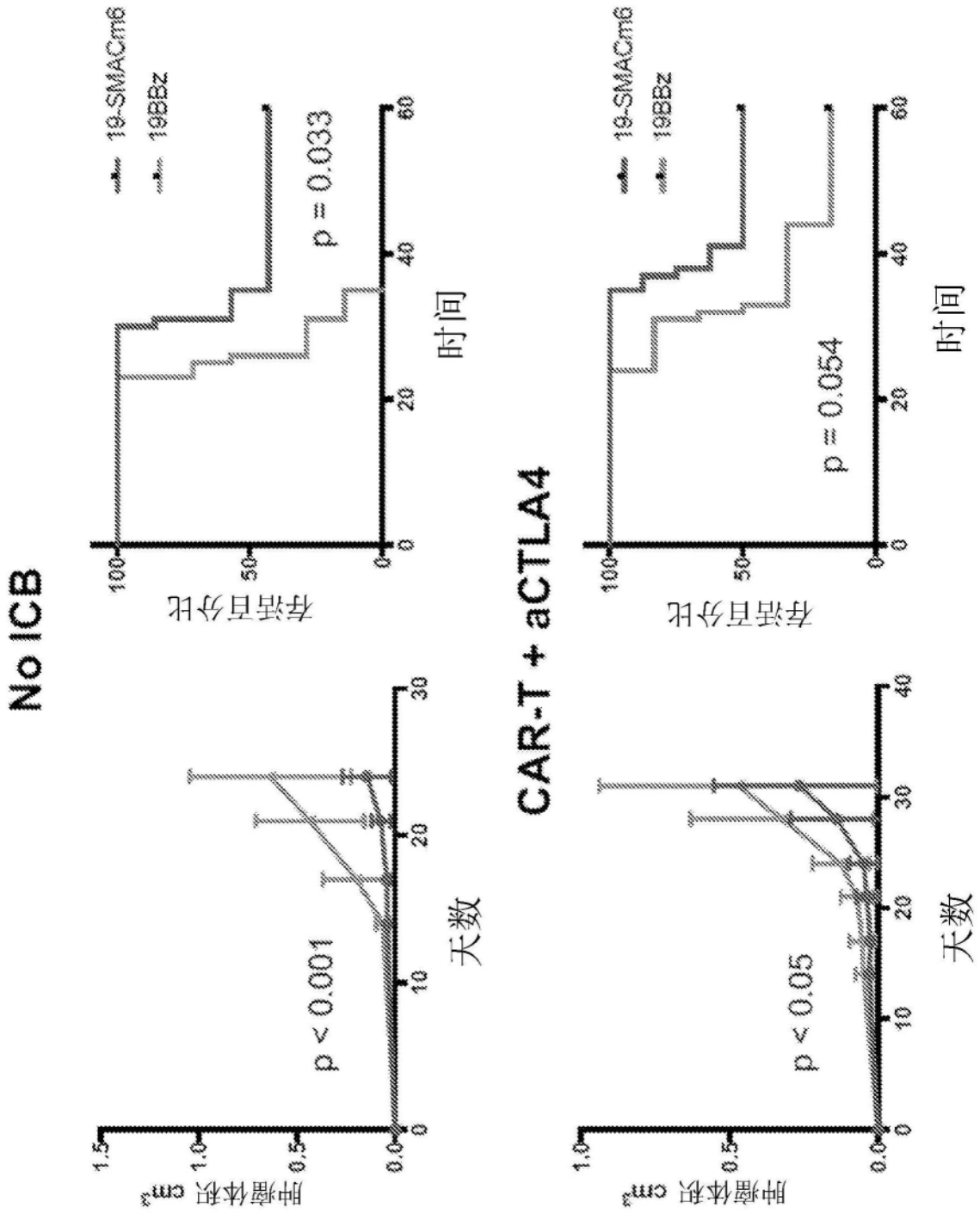


图23

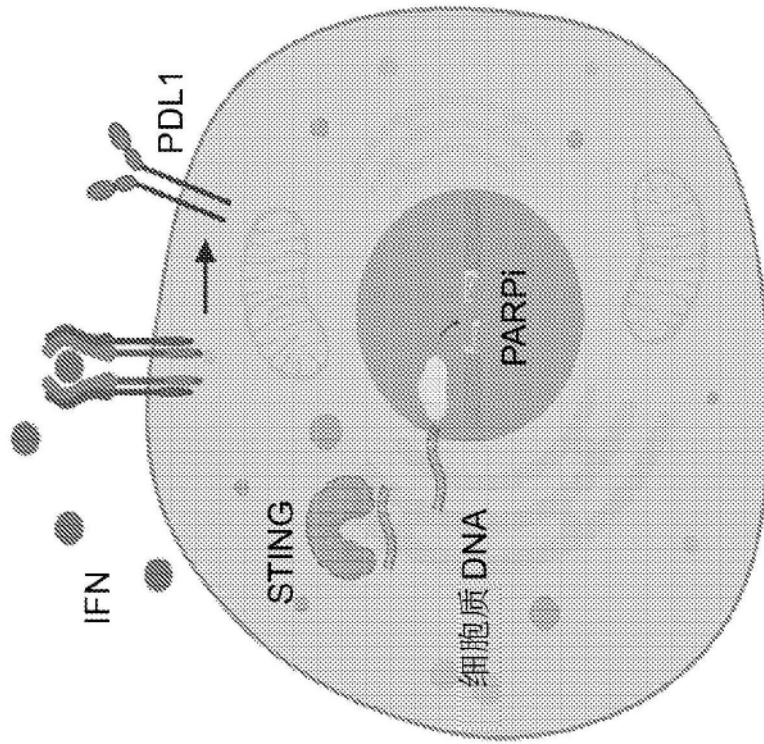


图24

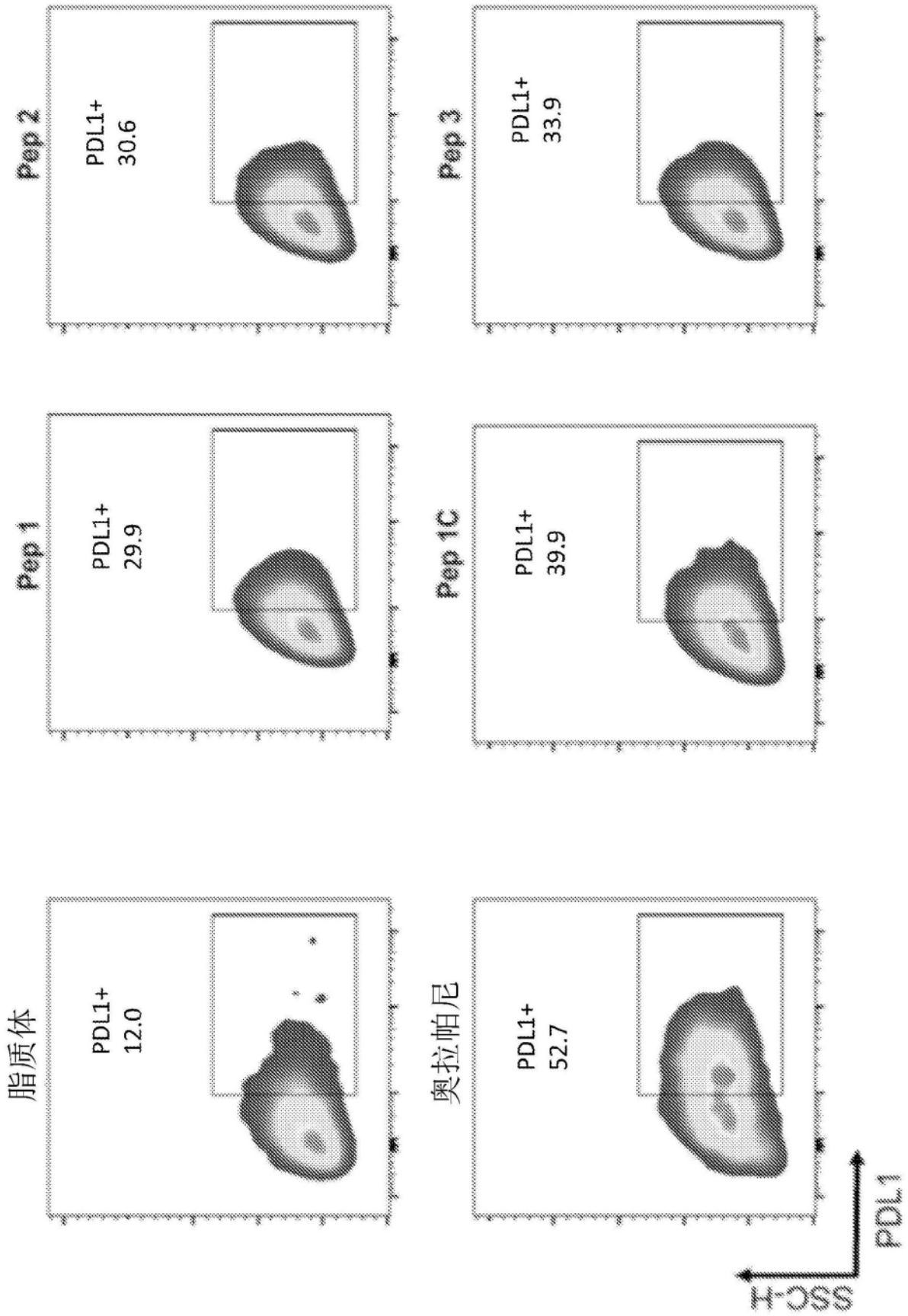


图25

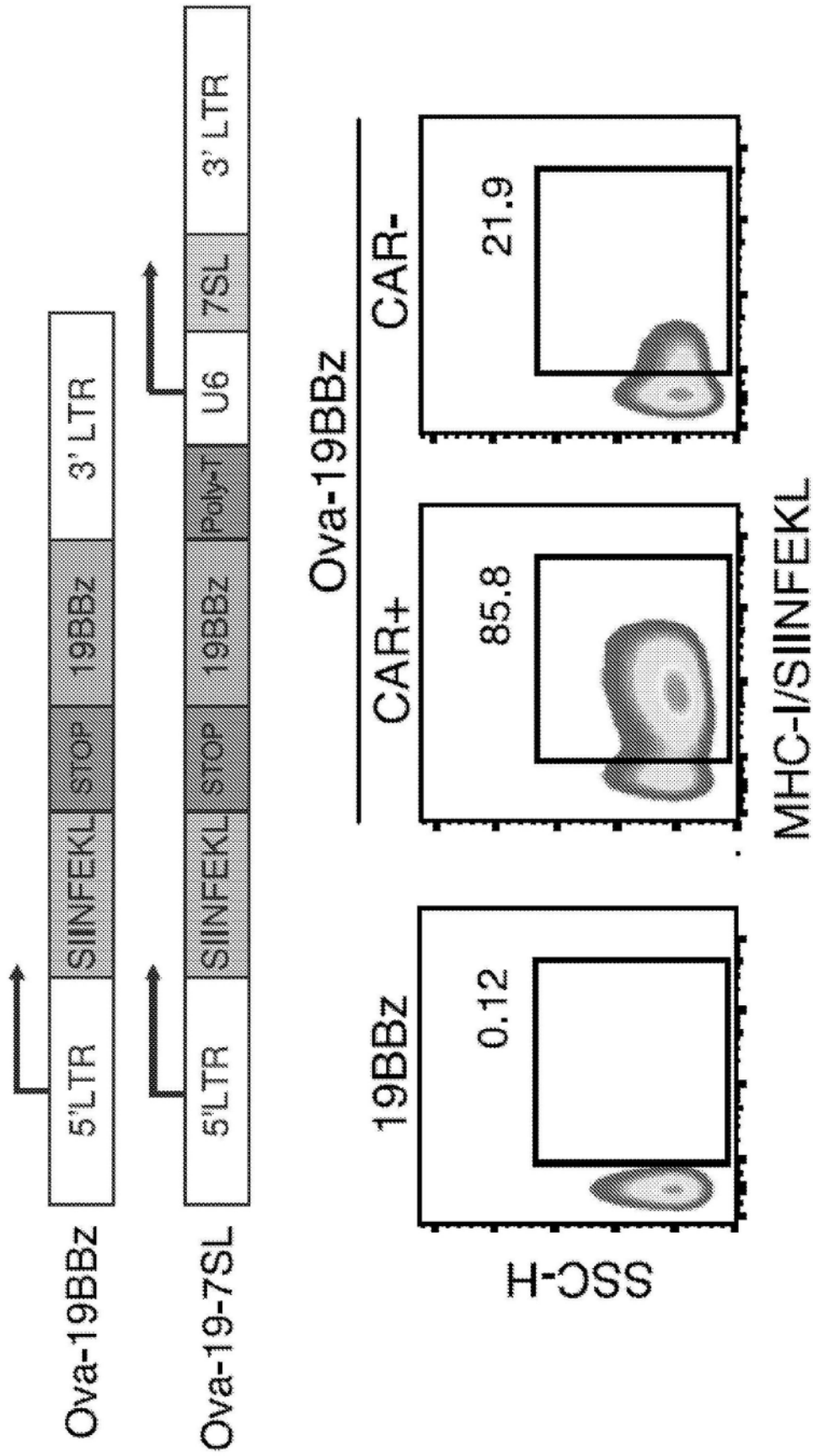


图26A

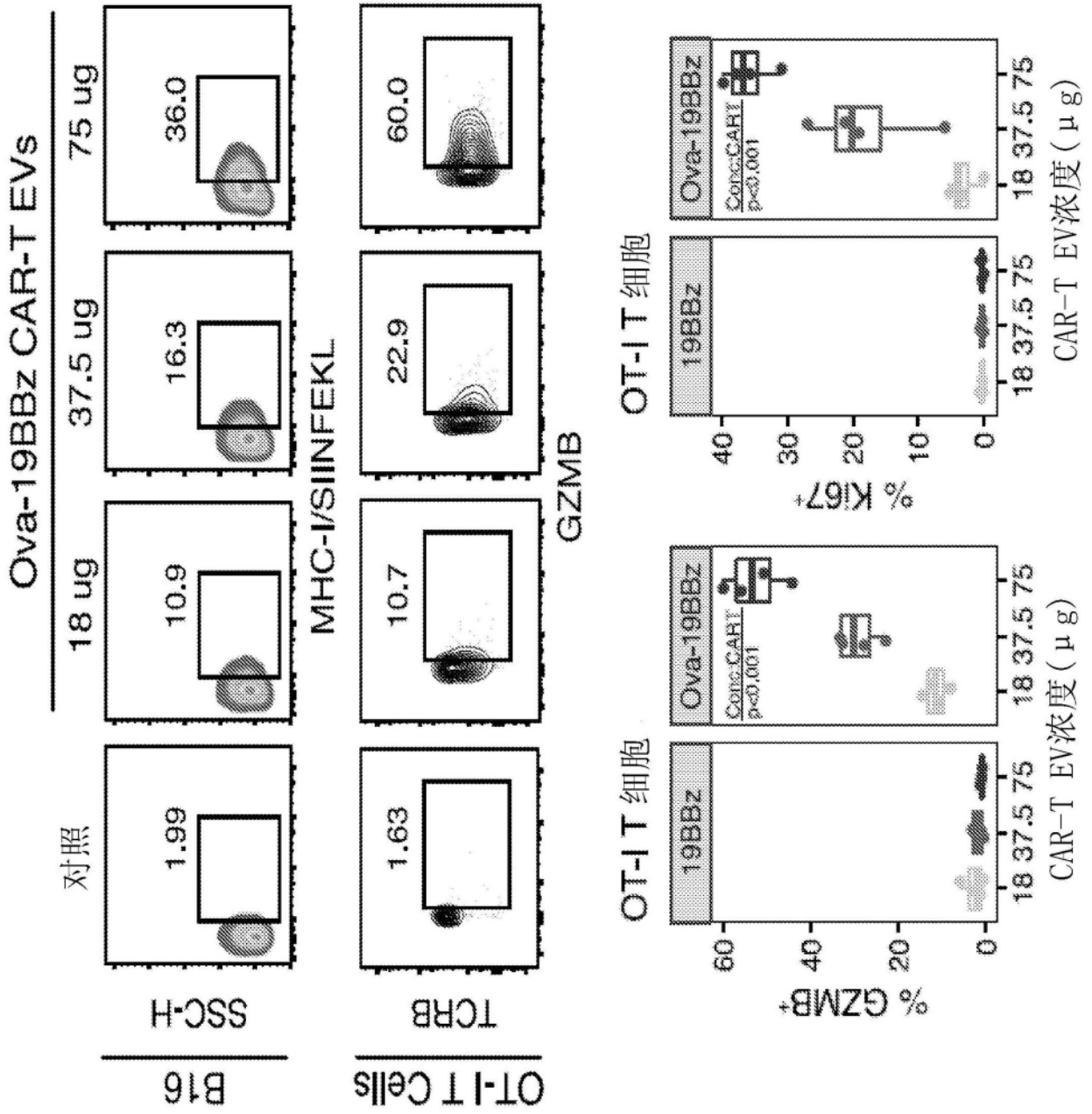


图26B

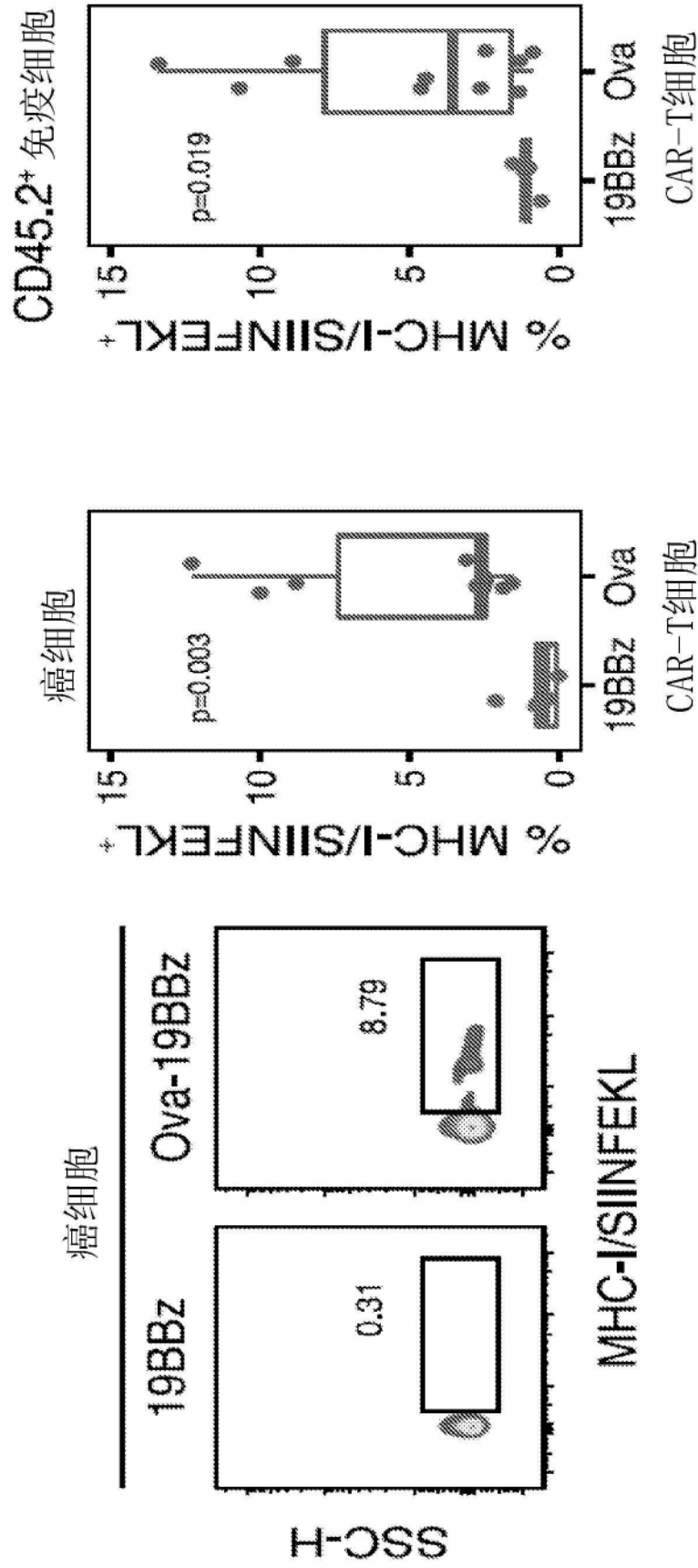


图26C

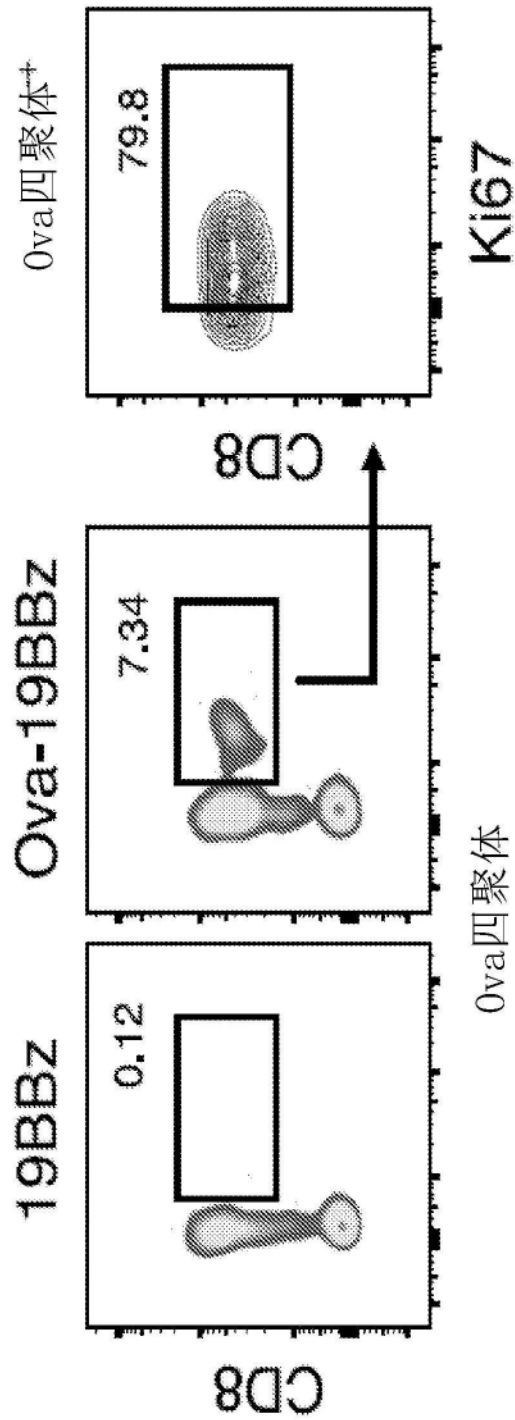


图26D

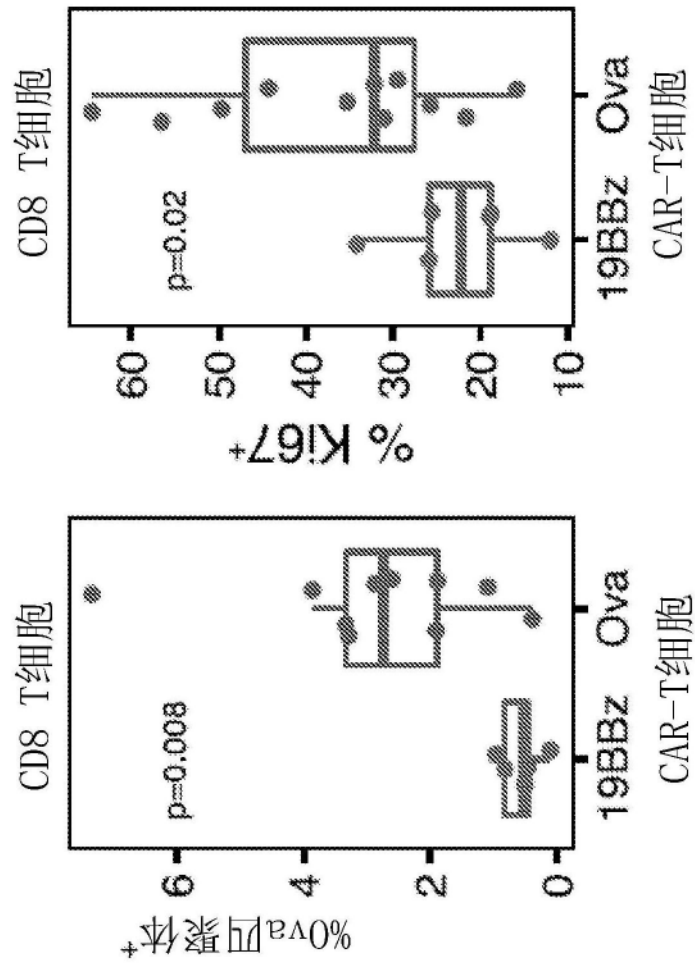


图26E

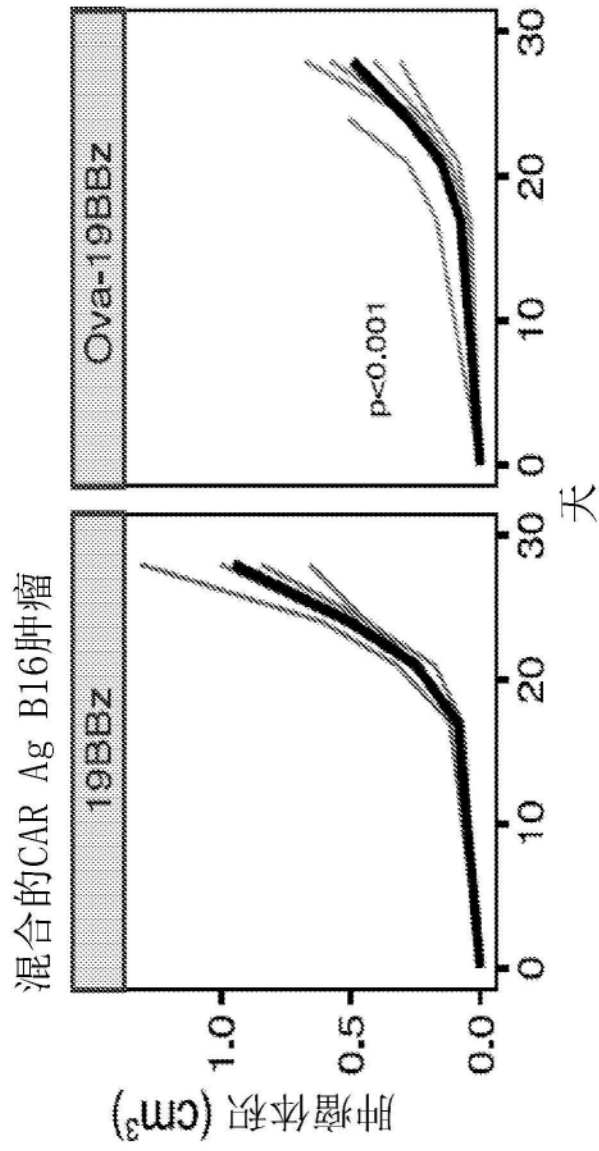


图26F

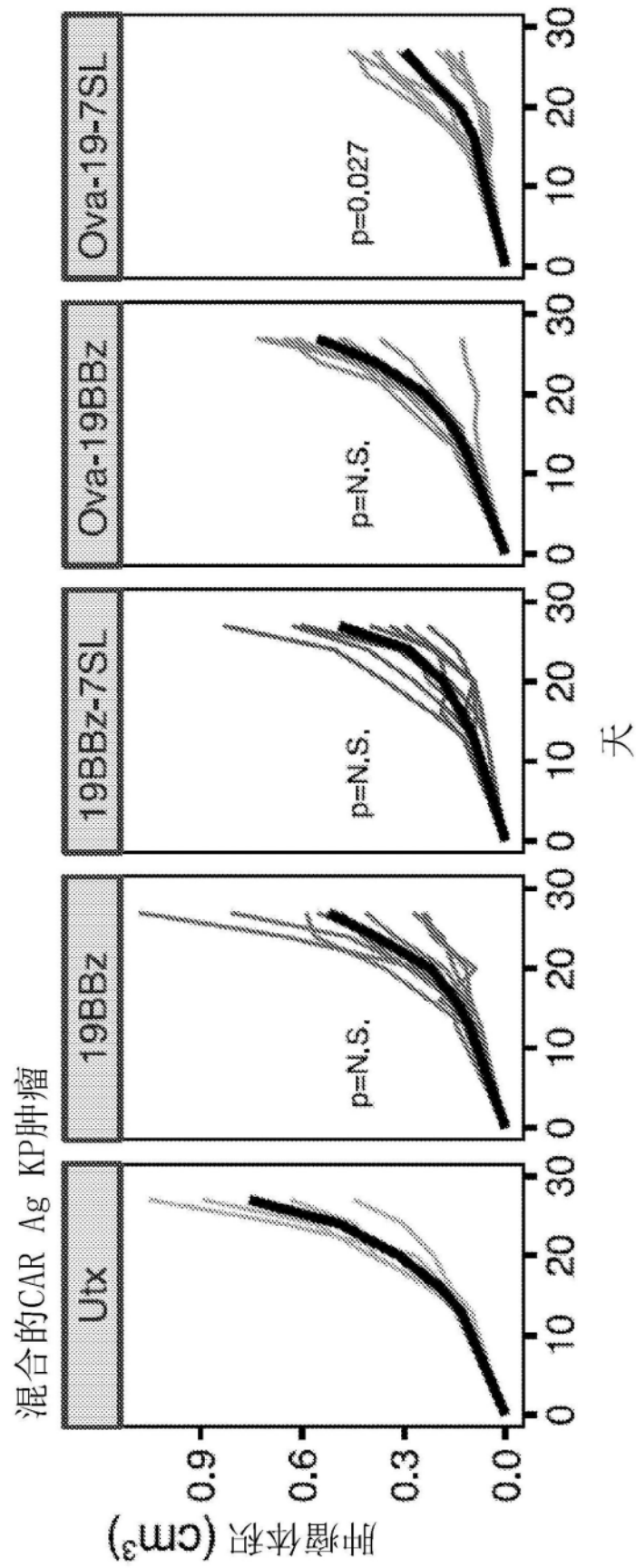


图26G

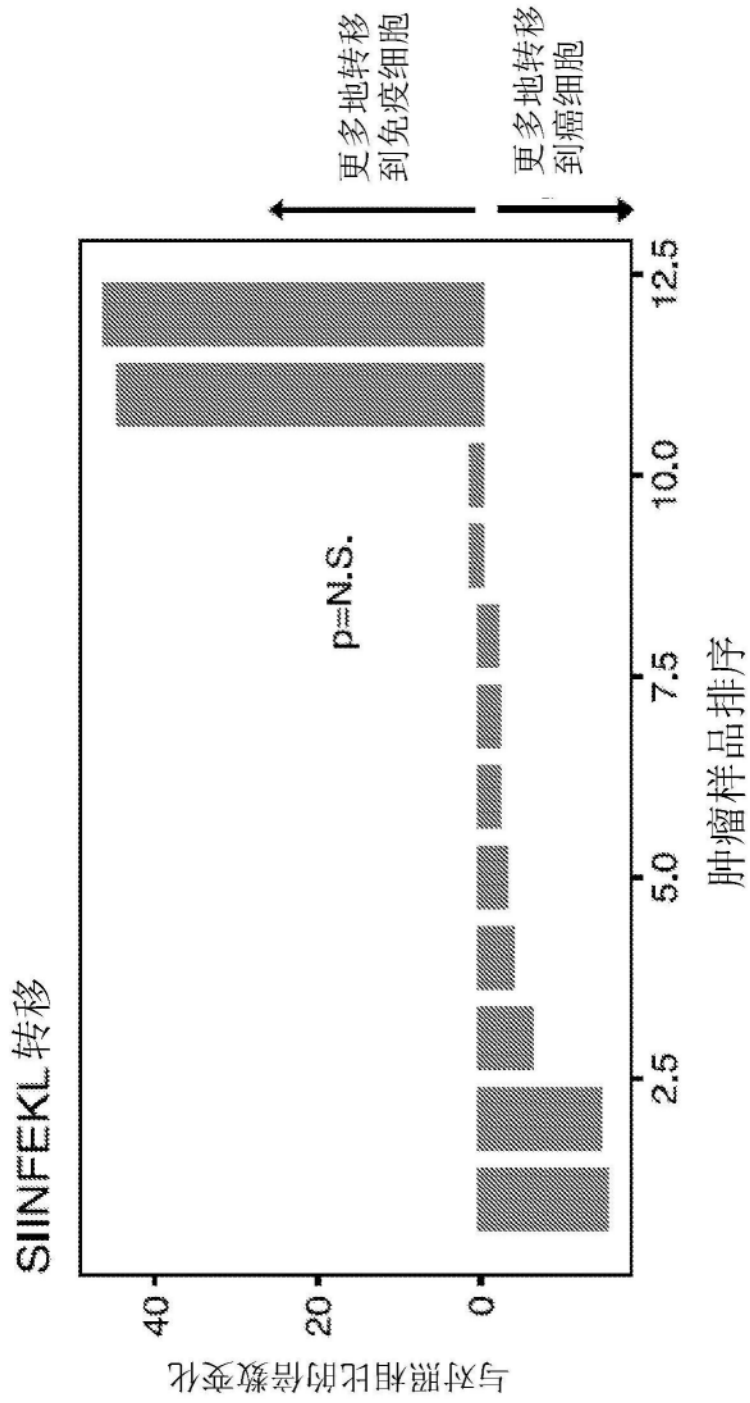


图26H

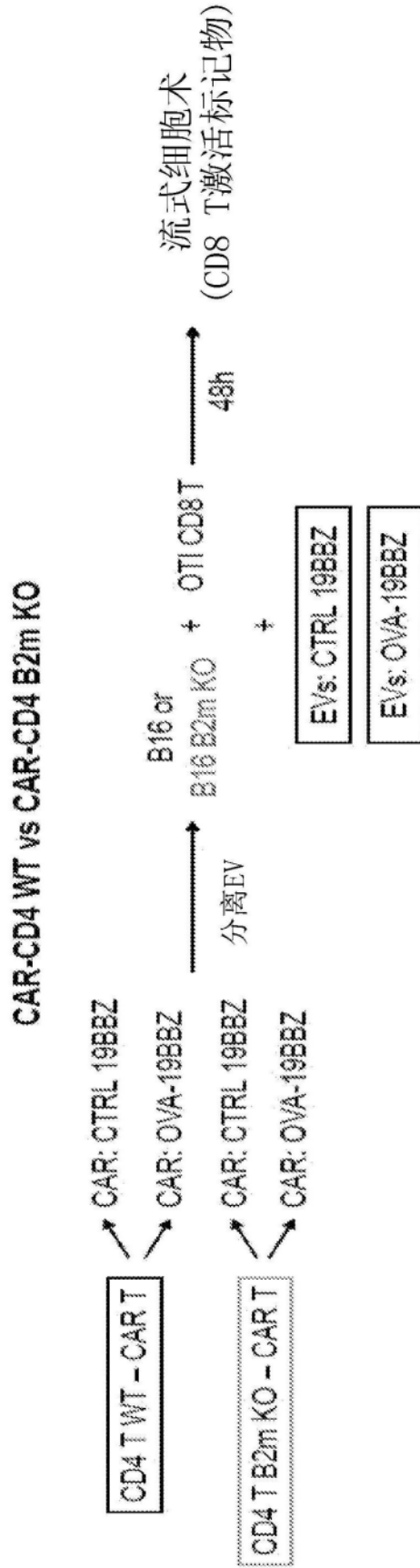


图27A

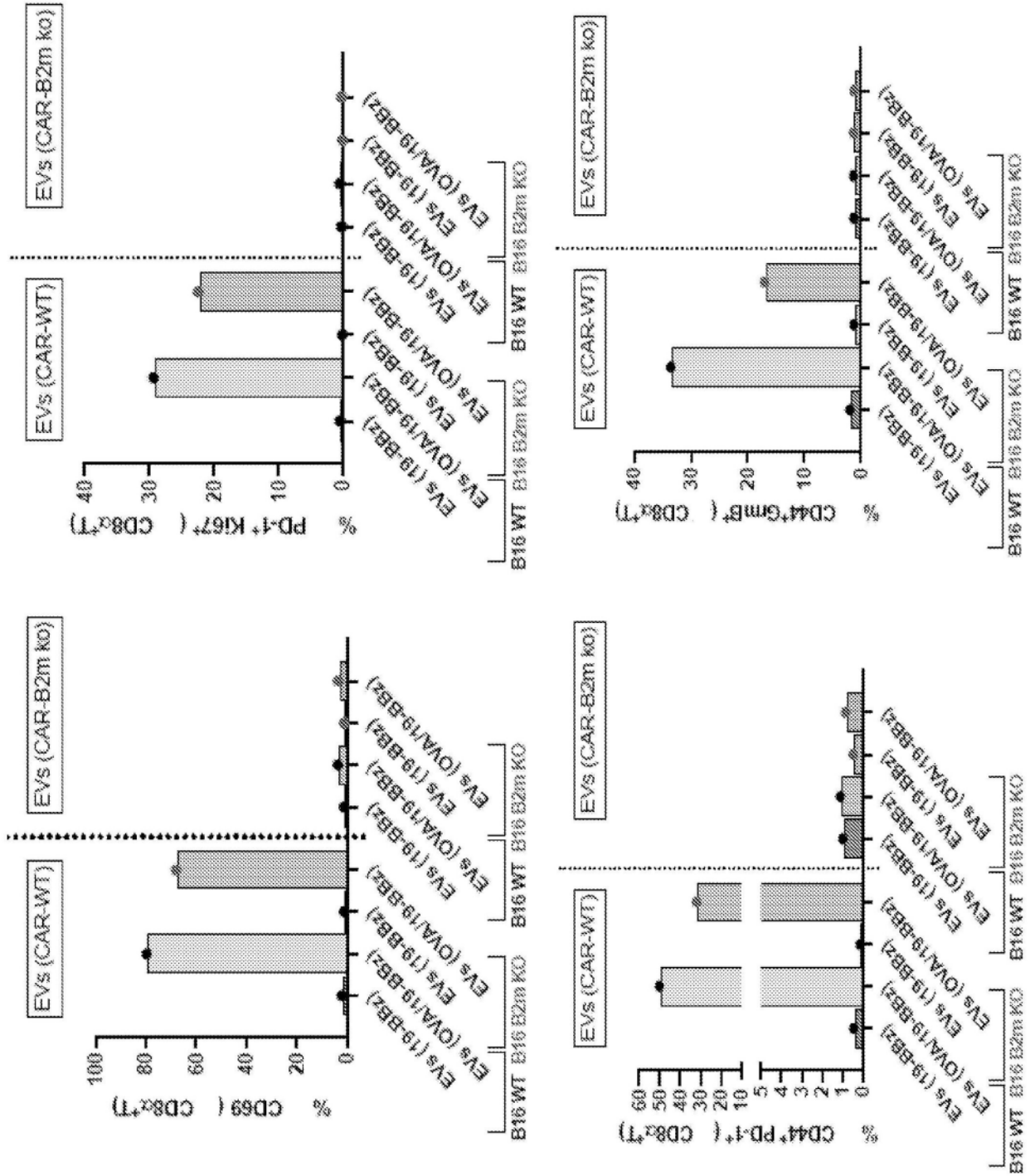


图27B

T细胞激活标志物

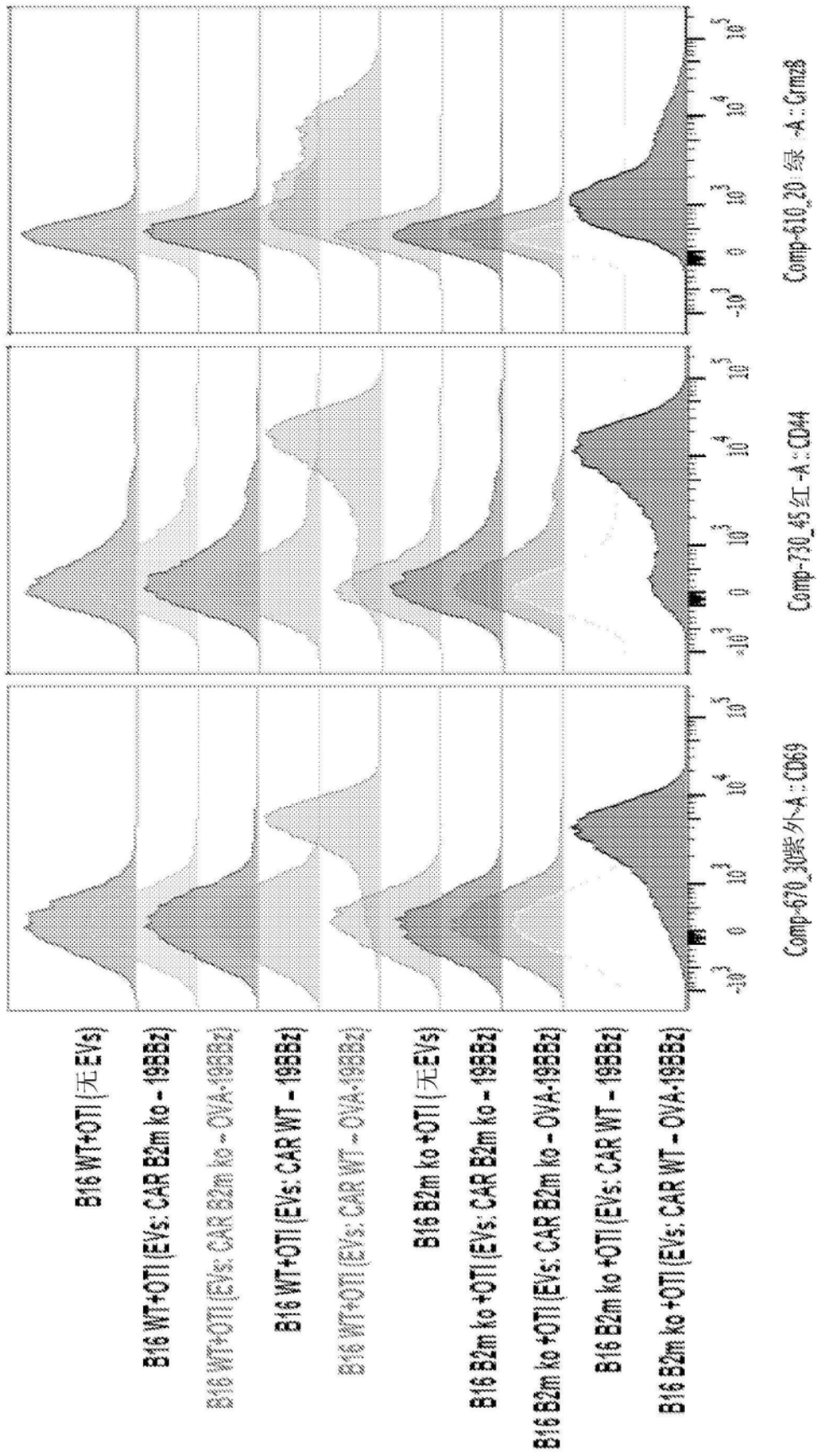


图27C

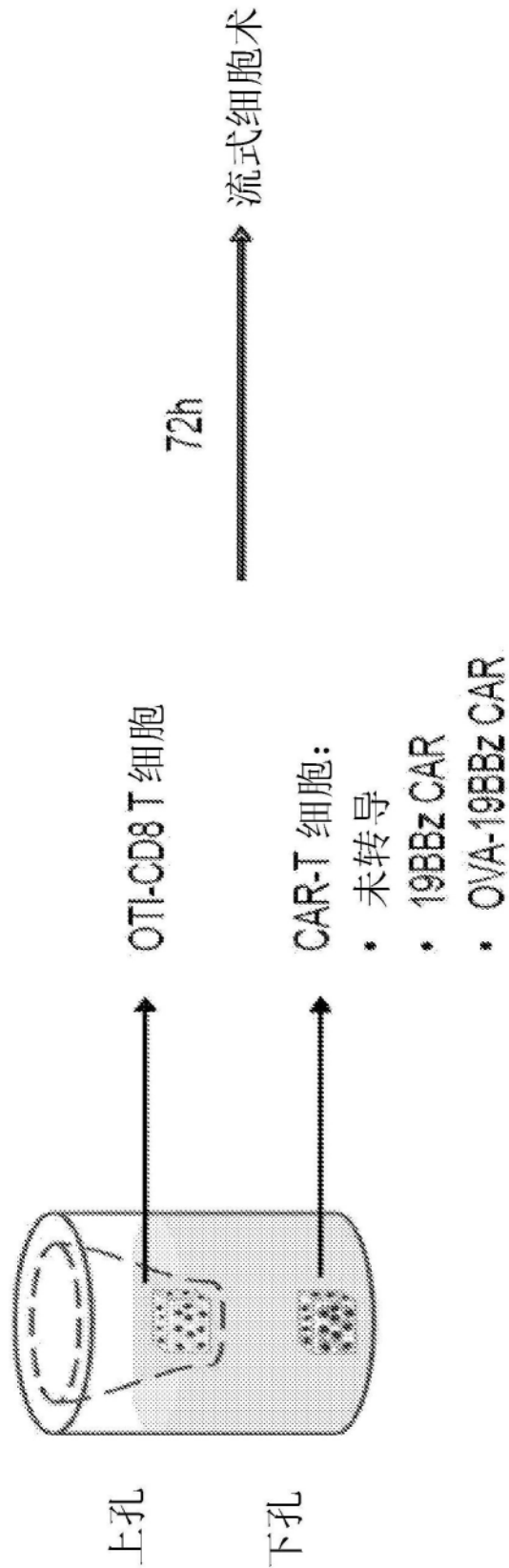


图28A

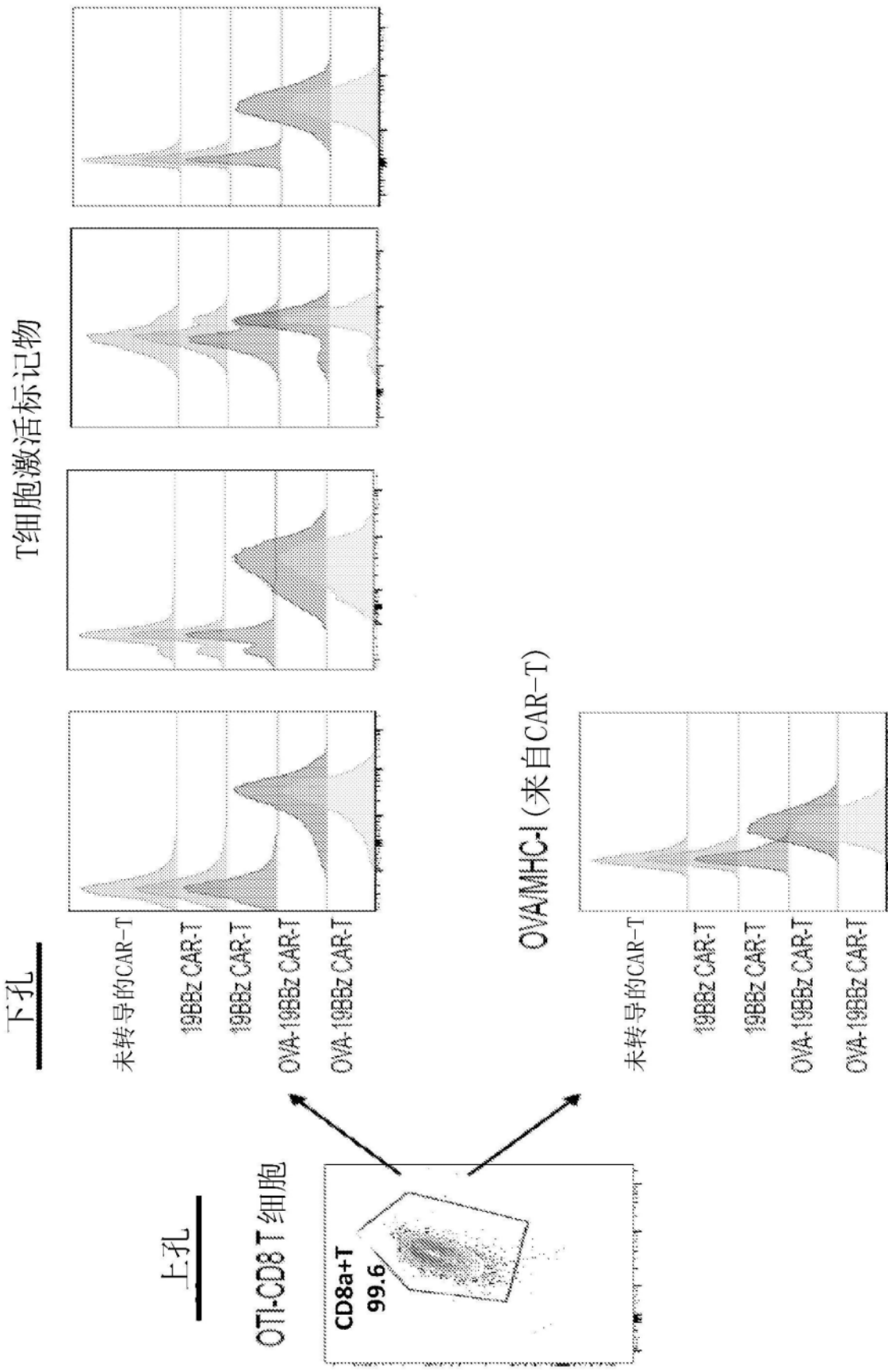


图28B