



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105339498 A

(43) 申请公布日 2016.02.17

(21) 申请号 201480026310.9

C12N 5/10(2006.01)

(22) 申请日 2014.03.07

A61K 38/17(2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 35/00(2006.01)

61/774,040 2013.03.07 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015.11.09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/022137 2014.03.07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/138704 EN 2014.09.12

(71) 申请人 贝勒医学院

地址 美国得克萨斯州

(72) 发明人 G·道提 C·A·拉莫斯

B·萨沃尔多

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 陶启长 陶家蓉

(51) Int. Cl.

C12N 15/63(2006.01)

权利要求书2页 说明书34页 附图16页

(54) 发明名称

癌症中靶向 CD138

(57) 摘要

本发明的实施方式涉及靶向某些癌细胞而不是具有相同抗原的其它细胞的治疗载体和细胞。在具体实施方式中,本发明的方法和组合物涉及具有 CD138- 特异性嵌合抗原受体的细胞,其表达处于环境特异性调控的控制之下。在具体实施方式中,环境是缺氧。在一些情况中,该组合物包含自杀基因。

1. 一种表达载体,所述表达载体编码 CD138- 特异性嵌合抗原受体 (CAR) 和与之功能上相关的一种或多种低氧应答调控元件。
2. 如权利要求 1 所述的载体,所述载体还包含编码诱导型自杀基因的序列。
3. 一种表达载体,所述表达载体编码 CD138- 特异性嵌合抗原受体 (CAR) 并包含:
 - a) 与 CD138- 特异性 CAR 功能上相关的一种或多种低氧应答调控元件;和 / 或
 - b) 诱导型自杀基因。
4. 如权利要求 1 或 3 所述的载体,其特征在于,所述载体是非病毒载体或病毒载体。
5. 如权利要求 1 或 3 所述的载体,其特征在于,所述病毒载体是逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体或腺相关病毒载体。
6. 如权利要求 1 或 3 所述的载体,其特征在于,CD138- 特异性 CAR 包含 IgG1 铰链区。
7. 如权利要求 1 或 3 所述的载体,其特征在于,所述 CD138- 特异性 CAR 包含选自下组的胞内信号传导结构域:CD28、OX40、4-1BB、ICOS 及其组合。
8. 如权利要求 1 或 3 所述的载体,其特征在于,所述 CD138- 特异性 CAR 包含选自 CD3- ζ 和 CD28 的跨膜结构域。
9. 如权利要求 2 或 3 所述的载体,其特征在于,所述自杀基因选自下组:胱冬酶 9、单纯疱疹病毒、胸苷激酶 (HSV-tk)、胞嘧啶脱氨酶 (CD) 和细胞色素 P450。
10. 如权利要求 1 或 2 所述的载体,其特征在于,所述低氧应答调控元件包含 VEGF 低氧应答调控元件、 α 1B- 肾上腺素能受体低氧应答调控元件、脂肪酸合成酶低氧应答调控元件或其组合。
11. 一种包含如权利要求 1、2 或 3 所述载体的细胞。
12. 如权利要求 11 所述的细胞,其特征在于,所述细胞还限定为真核细胞。
13. 如权利要求 11 所述的细胞,其特征在于,所述细胞还限定为人细胞。
14. 如权利要求 11 所述的细胞,其特征在于,所述细胞还限定为相对于特定个体是自体同源的、同系的、同种异体的或异种异体的。
15. 如权利要求 14 所述的细胞,其特征在于,所述个体需要癌症治疗。
16. 如权利要求 14 所述的细胞,其特征在于,所述个体需要针对 B- 系血液恶性肿瘤的治疗。
17. 如权利要求 14 所述的细胞,其特征在于,所述个体需要针对多发性骨髓瘤的治疗。
18. 如权利要求 11 所述的细胞,其特征在于,所述细胞还限定为细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL)、自然杀伤细胞或自然杀伤 T 细胞。
19. 如权利要求 18 所述的细胞,其特征在于,所述细胞是病毒特异性的。
20. 如权利要求 19 所述的细胞,其特征在于,所述病毒是 EBV、CMV、腺病毒、BK 病毒、HHV6、RSV、流感病毒、副流感病毒、博卡病毒、冠状病毒、LCMV、腮腺炎病毒、麻疹病毒、偏肺病毒、细小病毒 B、轮状病毒、西尼罗河病毒、JC、HHV7 或 HIV。
21. 如权利要求 19 所述的细胞,其特征在于,所述细胞包含对除 CD138 以外的抗原具有特异性的至少一种其它 CAR。
22. 如权利要求 21 所述的细胞,其特征在于,所述 CAR 针对选自下组的抗原具有特异性:黑色素瘤 - 相关抗原 (MAGE),黑色素瘤的优先表达抗原 (PRAME)、生存素、CD19、CD20、CD22、k 轻链、CD30、CD33、CD123、CD38、ROR1、ErbB2、ErbB3/4、ErbB 二聚体、EGFr vIII、癌

胚抗原、EGP2、EGP40、间皮素、TAG72、PSMA、NKG2D 配体、B7-H6、IL-13 受体 $\alpha 2$ 、MUC1、MUC16、CA9、GD2、GD3、HMW-MAA、CD171、Lewis Y、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2NY-ESO-1、PSCA、叶酸受体 α 、CD44v6、CD44v7/8、 $\alpha_v\beta_6$ 整联蛋白、8H9、NCAM、VEGF 受体、5T4、胎牛 AchR、NKG2D 配体、CD44v6、双抗原和通用抗原。

23. 权利要求 18 所述的细胞,其特征在于,所述细胞表达可分泌接合蛋白,所述蛋白包含激活结构域和抗原识别结构域。

24. 权利要求 23 所述的细胞,其特征在于,所述激活结构域、抗原识别结构域或两者包含单链可变区片段(scFV) 抗体部分。

25. 如权利要求 1 所述的细胞,其特征在于,所述激活结构域是识别选自下组的分子的 scFV :CD3、CD16、CD28、CD40、CD134 和 CD137。

26. 如权利要求 23 所述的细胞,其特征在于,所述抗原识别结构域结合 CD138。

27. 一种治疗个体中癌症的方法,所述方法包括向所述个体递送治疗有效量的权利要求 1-10 中任一项所述的载体的步骤。

28. 一种治疗个体中癌症的方法,所述方法包括向所述个体递送治疗有效量的权利要求 11-26 中任一项所述的细胞的步骤。

29. 一种包含权利要求 1-10 中任一项所述的载体的试剂盒。

30. 一种包含权利要求 11-26 中任一项所述的细胞的试剂盒。

31. 一种表达载体,所述表达载体编码肿瘤抗原-特异性 CAR 和与之功能上相关的一种或多种低氧应答调控元件。

32. 如权利要求 31 所述的载体,所述载体还包含编码诱导型自杀基因的序列。

33. 一种表达载体,所述表达载体编码肿瘤抗原-特异性 CAR 并包含:

- a) 与肿瘤抗原-特异性 CAR 功能上相关的一种或多种低氧应答调控元件;和/或
- b) 诱导型自杀基因。

34. 如权利要求 31 或 33 所述的载体,其特征在于,所述肿瘤抗原选自下组:黑色素瘤-相关抗原(MAGE),黑色素瘤的优先表达抗原(PRAME)、生存素、CD19、CD20、CD22、k 轻链、CD30、CD33、CD123、CD38、ROR1、ErbB2、ErbB3/4、ErbB 二聚体、EGFr vIII、癌胚抗原、EGP2、EGP40、间皮素、TAG72、PSMA、NKG2D 配体、B7-H6、IL-13 受体 $\alpha 2$ 、MUC1、MUC16、CA9、GD2、GD3、HMW-MAA、CD171、Lewis Y、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2NY-ESO-1、PSCA、叶酸受体 α 、CD44v6、CD44v7/8、 $\alpha_v\beta_6$ 整联蛋白、8H9、NCAM、VEGF 受体、5T4、胎牛 AchR、NKG2D 配体、CD44v6、双抗原和通用抗原。

癌症中靶向 CD138

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本发明要求 2013 年 3 月 7 日提交的美国临时专利申请系列第 61/774,040 号的优先权,其通过引用全文纳入本文。

技术领域

[0003] 本发明的实施方式至少涉及细胞治疗、免疫学、免疫治疗、分子生物学、细胞生物学和医学,包括癌症医学的领域。

[0004] 背景

[0005] 在过去的 15 年,使用高剂量化疗和干细胞拯救、沙利度胺、来那度胺 (lenalidomide) 和硼替佐米 (bortezomib) 已经延长了多发性骨髓瘤 (MM) 患者的存活 (10 年存活大约为 30%)。然而,该疾病仍然基本无法治愈。恶性浆细胞 (PC) 对于 T-细胞免疫识别和消除敏感,如由用骨髓消融性或非骨髓消融性同种异体干细胞移植治疗的患者中移植物对抗 MM 的作用所介导的肿瘤消退所示。这一观察已经刺激了开发基于这种涉及在肿瘤 PC 中过表达的几种可靶向肿瘤相关抗原 (TAA) 的疾病中肿瘤特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 的离体生成的过继 T-细胞疗法。

[0006] 在过去的几年中,血液恶性肿瘤中的嵌合抗原受体 (CAR) 技术呈指数增长。CAR 是人工受体,其由从特异性单克隆抗体获得的单链可变片段 (scFv) (抗原-结合位点) 组成,连接到 CD3 ζ 链的胞浆内结构域和共刺激内结构域。当由 T 细胞表达时,CAR 同时介导 MHC- 无限制抗原识别和 T-细胞共刺激。

[0007] 为了使用 CAR 技术靶向恶性 PC,选择在恶性 PC 的细胞表面上总是过表达的 CD138 分子 (多配体聚糖 -1)。这种靶向抗原已经通过开发 CD138- 特异性人源化单克隆抗体的成功努力对 MM 验证,其已经在临床试验中产生了理想的初步报告。通过使用 CAR 技术将 CD138- 抗体特异性与 T 淋巴细胞的细胞毒性和寿命结合应代表了显著的治疗进展。

[0008] 虽然 CD138 在生理上位于简单上皮细胞的基底外侧表面上并且围绕分层上皮细胞,向 MM 患者给予 CD138- 单克隆抗体具有证明的安全性,可能是由于在这些正常组织上的 CD138 表达密度低。然而,CD138- 抗体作为 CAR 在 T 细胞上的表达可能增加了抗体的亲合力并带来其它 T-细胞效应机制,从而导致已经在其它 CAR 中观察到的“命中靶标”但“脱离器官”的细胞毒性靶向在正常组织中低水平表达的抗原。如果通过激活充足的自杀基因来快速消除 CAR-T 细胞,则可避免这种不希望的作用,或者如果 CAR 仅由 T 细胞瞬时表达 (例如在 mRNA 转染之后),则降低这种不希望的作用。然而,即使两种方法增加了安全性,它们消除了过继 T 细胞疗法的主要优势,即对疾病的长期免疫控制。

[0009] 本发明满足了本领域中对患有 CD138- 表达癌症 (至少包括 MM) 的个体提供有效过继 T-细胞疗法的需求。

[0010] 概述

[0011] 本发明涉及与细胞疗法相关的方法和组合物。在具体的实施方式中,细胞疗法用于对细胞疗法有需求的个体,如哺乳动物,包括人。细胞疗法可适用于任何医学条件,虽然

在具体实施方式中,该细胞疗法是用于肿瘤。癌症可以是任意类型和任意阶段。个体可以是任意年龄或性别。在具体实施方式中,个体已知患有癌症、处于患有癌症的风险中、或者易于患有癌症。癌症可以是原发性癌症或转移性癌症,并且癌症可能难以治疗。个体可具有癌症复发。在具体实施方式中,癌症是血液恶性肿瘤,如 B 系血液恶性肿瘤。在一些情况中,癌症不是血液恶性肿瘤。在一些情况中,血液是骨髓瘤,包括多发性骨髓瘤。在具体实施方式中,癌症是例如,白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、乳腺癌、肺癌、脑癌、结肠癌、肾癌、前列腺癌、胰腺癌、甲状腺癌、骨癌、宫颈癌、脾癌、肛门癌、食道癌、头颈癌、胃癌、胆囊癌、黑色素瘤、非小细胞肺癌等。在具体方面中,癌症表达一种或多种肿瘤抗原,并且在具体实施方式中,细胞疗法靶向这一种或多种肿瘤抗原。在具体实施方式中,肿瘤抗原是 CD138(其也可称为多配体聚糖-1)。

[0012] 在本发明的具体实施方式中,存在涉及适用于免疫疗法的细胞的方案和组合物。在特定方面中,本发明的方法和组合物是对本领域中采用的技术的改进。在具体情况中,本发明的实施方式是对任意类型的免疫疗法所采用的细胞的改进,虽然在特定情况中,免疫治疗细胞用于癌症疗法。

[0013] 在本发明的特定方面中,向个体提供细胞,该细胞向个体提供治疗。细胞可以是任何类型,但在具体实施方式中,该细胞能够向具有表达 CD138 抗原的癌细胞的个体提供治疗。在某些实施方式中,向已知患有表达 CD138 的癌症的个体提供细胞,如 B 系血液恶性肿瘤,如多发性骨髓瘤,虽然在某些情况中,没有确定 CD138 抗原的存在。该细胞可以是免疫细胞,如 T- 细胞。在一些情况中,该细胞可以是细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL)、NK- 细胞、NKT- 细胞等。

[0014] 在本发明的实施方式中,存在与治疗载体和 / 或含有该载体的细胞相关的方法和组合物。在本发明的方面中,本发明的治疗细胞靶向包含 CD138 抗原的癌细胞,但是不靶向具有 CD138 抗原的其它细胞,并且这种差别是治疗细胞中 CD138 受体的环境特异性表达的结果。在具体实施方式中,本发明的方法和组合物涉及具有 CD138- 特异性嵌合抗原受体的细胞,其表达处于环境特异性调控的控制之下。在具体实施方式中,环境是低氧。在某些实施方式中,本发明的方法和组合物涉及具有表达处于组织特异性调控的控制之下的 CD138- 特异性嵌合抗原受体的细胞。在一些情况中,除了或替代环境调控和 / 或组织特异性调控,材料包含自杀基因。

[0015] 在本发明的某些方面中,任何 CAR(包括除了 CD138 以外)在低氧特异性调控下在本发明中采用。示例性 CAR 是 CD138 的替代或除了 CD138 以外包含对选自下组的抗原的特异性:黑色素瘤-相关抗原 (MAGE),黑色素瘤的优先表达抗原 (PRAME)、生存素、CD19、CD20、CD22、k 轻链、CD30、CD33、CD123、CD38、ROR1、ErbB2、ErbB3/4、ErbB 二聚体、EGFr vIII、癌胚抗原、EGP2、EGP40、间皮素、TAG72、PSMA、NKG2D 配体、B7-H6、IL-13 受体 $\alpha 2$ 、MUC1、MUC16、CA9、GD2、GD3、HMW-MAA、CD171、Lewis Y、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2NY-ES0-1、PSCA、叶酸受体 α 、CD44v6、CD44v7/8、 $\alpha_v\beta_6$ 整合蛋白、8H9、NCAM、VEGF 受体、5T4、胎牛 AchR、NKG2D 配体、CD44v6、双抗原和通用抗原。

[0016] 在本发明的某些方面中,在肿瘤环境中存在免疫细胞,如 T- 细胞,其表达 CAR。CD138,而非组成型表达。已经通过受影响部位中氧压的直接测量 (22) 和 HIF-1 α (低氧诱导应答的主要调节物) 过表达 (23, 24) 间接证明低含氧量 MM 微环境。可通过用低氧相应

元件控制其表达来调节 T 细胞中 CAR. CD138 的表达,使得工程改造的 T 细胞仅在低氧 MM 微环境内表达功能水平的 CAR,从而限制抗原靶向其它器官中。

[0017] 在本发明的一些实施方式中,存在编码 CD138-特异性嵌合抗原受体 (CAR) 和与之功能上相关的一种或多种低氧应答调控元件的表达载体。在具体实施方式中,该载体还包含编码诱导型自杀基因的序列。

[0018] 在一个实施方式中,存在编码 CD138-特异性嵌合抗原受体 (CAR) 并包含以下的表达载体:a) 一种或多种低氧应答调控元件,其在功能上与 CD138-特异性 CAR 相关;和/或 b) 诱导型自杀基因(例如,胱冬酶 9、单纯疱疹病毒、胸苷激酶 (HSV-tk)、胞嘧啶脱氨酶 (CD) 和细胞色素 P450)。在具体实施方式中,载体是非病毒载体或病毒载体(如逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体或腺相关病毒载体)。在具体实施方式中,CD138-特异性 CAR 包含 IgG1 铰链区。在至少一些情况中,CD138-特异性 CAR 包含胞内信号传导结构域,该结构域选自下组:CD28、OX40、4-1BB、ICOS 及其组合。CD138-特异性 CAR 可包含选自 CD3- ζ 和 CD28 的跨膜结构域。

[0019] 低氧应答调控元件可包含 VEGF 低氧应答调控元件、 α 1B-肾上腺素能受体低氧应答调控元件、脂肪酸合成酶低氧应答调控元件或其组合。

[0020] 在本发明的实施方式中,存在包含本发明的载体的细胞。该细胞是真核细胞,包括人细胞。该细胞可相对于特定个体是自体同源的、同系的、同种异体的或异种异体的。在一些情况中,提供本发明的方法和/或组合物的个体需要癌症治疗,包括针对特定类型的癌症。在一些情况中,个体需要针对 B 系血液恶性肿瘤的治疗。在特定情况中,个体需要针对 CD138-表达癌症,包括至少多发性淋巴瘤的治疗。该细胞可以是任意类型,但在具体实施方式中,该细胞是免疫细胞,如 T-细胞。该细胞可以是例如细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL)、自然杀伤细胞、或自然杀伤 T 细胞。该细胞可以是效应细胞。该细胞可以是病毒特异性的 T 细胞,并且该病毒可以是例如,EBV、CMV、腺病毒、BK 病毒、HHV6、RSV、流感病毒、副流感病毒、博卡病毒、冠状病毒、LCMV、流行性腮腺炎病毒、麻疹病毒、偏肺病毒、细小病毒 B、轮状病毒、西尼罗河病毒、JC、HHV7 或 HIV。

[0021] 在一些情况中,该细胞包含针对除 CD138 以外的抗原或作为 CD138 的替代物的抗原具有特异性的至少一种其它 CAR。在本发明的具体实施方式中,CAR 针对选自下组的抗原具有特异性:黑色素瘤-相关抗原 (MAGE),黑色素瘤的优先表达抗原 (PRAME)、生存素、CD19、CD20、CD22、k 轻链、CD30、CD33、CD123、CD38、ROR1、ErbB2、ErbB3/4、ErbB 二聚体、EGFr vIII、癌胚抗原、EGP2、EGP40、间皮素、TAG72、PSMA、NKG2D 配体、B7-H6、IL-13 受体 a2、MUC1、MUC16、CA9、GD2、GD3、HMW-MAA、CD171、Lewis Y、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2NY-ES0-1、PSCA、叶酸受体 -a、CD44v6、CD44v7/8、 $\alpha_v\beta_6$ 整联蛋白、8H9、NCAM、VEGF 受体、5T4、胎牛 AchR、NKG2D 配体、CD44v6、双抗原和通用抗原。

[0022] 在除了使用 CD138-特异性 CAR 或替代的实施方式中,本发明的细胞表达指向 CD138 的可分泌接合蛋白,所述蛋白包含激活结构域和抗原识别结构域。激活结构域、抗原识别结构域或两种结构域可包含单链可变区片段 (scFv) 抗体部分,并且该激活结构域可包含识别选自下组的分子的 scFv:CD3、CD16、CD28、CD40、CD134 和 CD137。在特定实施方式中,与 CAR 联用时,可存在编码与 PD-1、CTLA-4、LAG-3、Tim-3 等(结合或抑制基序)组合的 CD138-结合基序的接合物。在某些实施方式中,抗原识别结构域结合 CD138,但是其可

结合黑色素瘤 - 相关抗原 (MAGE), 黑色素瘤的优先表达抗原 (PRAME)、生存素、CD19、CD20、CD22、k 轻链、CD30、CD33、CD123、CD38、ROR1、ErbB2、ErbB3/4、ErbB 二聚体、EGFr vIII、癌胚抗原、EGP2、EGP40、间皮素、TAG72、PSMA、NKG2D 配体、B7-H6、IL-13 受体 $\alpha 2$ 、MUC1、MUC16、CA9、GD2、GD3、HMW-MAA、CD171、Lewis Y、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2NY-ESO-1、PSCA、叶酸受体 α 、CD44v6、CD44v7/8、 $\alpha_v\beta_6$ 整合蛋白、8H9、NCAM、VEGF 受体、5T4、胎牛 AchR、NKG2D 配体、CD44v6、双抗原或通用肿瘤抗原。

[0023] 在本发明的实施方式中, 提供了一种治疗个体癌症的方法, 包括向个体递送治疗有效量的本发明的载体的步骤。在某些实施方式中, 存在治疗个体中癌症的方法, 包括向该个体递送治疗有效量的本发明的细胞的步骤。

[0024] 在本发明的一些实施方式中, 存在编码肿瘤抗原特异性 CAR 和与之功能上相关的一种或多种低氧应答调控元件的表达载体。该载体还可包含编码诱导型自杀基因的序列。在本发明的实施方式中, 存在编码肿瘤抗原特异性 CAR 的表达载体, 该表达载体包含: a) 与肿瘤抗原特异性 CAR 功能上相关的一种或多种低氧应答调控元件; 和 / 或 b) 诱导型自杀基因。本发明的任意载体可包含 CAR, 其具有针对选自下组的肿瘤抗原的特异性: 黑色素瘤 - 相关抗原 (MAGE), 黑色素瘤的优先表达抗原 (PRAME)、生存素、CD19、CD20、CD22、k 轻链、CD30、CD33、CD123、CD38、ROR1、ErbB2、ErbB3/4、ErbB 二聚体、EGFr vIII、癌胚抗原、EGP2、EGP40、间皮素、TAG72、PSMA、NKG2D 配体、B7-H6、IL-13 受体 $\alpha 2$ 、MUC1、MUC16、CA9、GD2、GD3、HMW-MAA、CD171、Lewis Y、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2NY-ESO-1、PSCA、叶酸受体 α 、CD44v6、CD44v7/8、 $\alpha_v\beta_6$ 整合蛋白、8H9、NCAM、VEGF 受体、5T4、胎牛 AchR、NKG2D 配体、CD44v6、双抗原和通用抗原。用这些载体治疗癌症的方法包含于本发明。表达这些载体的细胞和使用细胞治疗癌症的方法也包含于本发明。

[0025] 在本发明的实施方式中, 存在包含本文所述的载体和 / 或本文所述细胞的试剂盒。

[0026] 在本发明的实施方式中, 存在编码至少一个 CD138- 特异性识别部分并具有与之功能上相关的一个或多个低氧应答调控元件的多核苷酸。在具体实施方式中, CD138- 特异性识别部分包含 CD138- 特异性嵌合抗原受体 (CAR)、CD138- 特异性接合分子或同时包含两者。在具体实施方式中, 该多核苷酸还定义为表达载体。在某些实施方式中, 该多核苷酸还包含编码诱导型自杀基因的序列。在一些情况中, 载体是非病毒载体或病毒载体 (包括逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体或腺相关病毒载体)。在某些实施方式中, CD138- 特异性 CAR 包含 IgG1 铰链区。在一些情况中, CD138- 特异性 CAR 包含胞内信号传导结构域, 该结构域选自下组: CD28、OX40、4-1BB、ICOS 及其组合。在特定情况中, CD138- 特异性 CAR 包含选自 CD3- ζ 和 CD28 的跨膜结构域。在特定方面, 自杀基因选自下组: 胱冬酶 9、单纯疱疹病毒、胸苷激酶 (HSV-tk)、胞嘧啶脱氨酶 (CD) 和细胞色素 P450。在一些实施方式中, 低氧应答调控元件包含 VEGF 低氧应答调控元件、 $\alpha 1B$ - 肾上腺素能受体低氧应答调控元件、脂肪酸合成酶低氧应答调控元件或其组合。

[0027] 在一些实施方式中, 提供了一种包含本发明的多核苷酸的细胞。在具体实施方式中, 该细胞是真核细胞, 如人细胞, 包括免疫细胞。在特定实施方式中, 细胞还限定为相对于特定个体是自体同源的、同系的、同种异体的或异种异体的。该个体可能需要癌症治疗, 包括对 B- 系血液恶性肿瘤如多发性骨髓瘤的治疗。在一些情况中, 该细胞还可限定为细

胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL)、自然杀伤细胞或自然杀伤 T 细胞。该细胞可包含对病毒潜伏蛋白有特异性的天然受体。示例性的病毒包括 EBV、CMV、腺病毒、BK 病毒、HHV6、RSV、流感病毒、副流感病毒、博卡病毒、冠状病毒、LCMV、腮腺炎病毒、麻疹病毒、偏肺病毒、细小病毒 B、轮状病毒、西尼罗河病毒、JC、HHV7 或 HIV。在特定实施方式中,该细胞包含对除 CD138 以外的抗原具有特异性的至少一种其它 CAR。该 CAR 可针对选自下组的抗原具有特异性:黑色素瘤-相关抗原 (MAGE),黑色素瘤的优先表达抗原 (PRAME)、生存素、CD19、CD20、CD22、k 轻链、CD30、CD33、CD123、CD38、ROR1、ErbB2、ErbB3/4、ErbB 二聚体、EGFr vIII、癌胚抗原、EGP2、EGP40、间皮素、TAG72、PSMA、NKG2D 配体、B7-H6、IL-13 受体 $\alpha 2$ 、MUC1、MUC16、CA9、GD2、GD3、HMW-MAA、CD171、Lewis Y、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2NY-ES0-1、PSCA、叶酸受体 α 、CD44v6、CD44v7/8、 $\alpha_v\beta_6$ 整合蛋白、8H9、NCAM、VEGF 受体、5T4、胎牛 AchR、NKG2D 配体、CD44v6、双抗原和通用抗原。在特定实施方式中,CD138-特异性识别部分包含 CD138-特异性接合分子,其具有激活结构域和抗原识别结构域,其中两种结构域包含单链可变区片段 (scFv) 抗体部分。在一些情况中,激活部分是识别选自下组的分子的 scFv:CD3、CD16、CD28、CD40、CD134 和 CD137。

[0028] 在一个实施方式中,存在治疗个体中癌症的方法,包括向该个体递送治疗有效量的本发明的多核苷酸的步骤。在一些实施方式中,存在治疗个体中癌症的方法,包括向该个体递送治疗有效量的本发明的细胞的步骤。在特定实施方式中,存在包含本发明的载体的试剂盒。在具体实施方式中,存在包含本发明的一种或多种细胞的试剂盒。在一些方面,存在编码肿瘤抗原特异性 CAR 和与之功能上相关的一种或多种低氧应答调控元件的表达载体。在某些实施方式中,该载体还包含编码诱导型自杀基因的序列。该载体可包含选自下组的肿瘤抗原:黑色素瘤-相关抗原 (MAGE),黑色素瘤的优先表达抗原 (PRAME)、生存素、CD19、CD20、CD22、k 轻链、CD30、CD33、CD123、CD38、ROR1、ErbB2、ErbB3/4、ErbB 二聚体、EGFr vIII、癌胚抗原、EGP2、EGP40、间皮素、TAG72、PSMA、NKG2D 配体、B7-H6、IL-13 受体 $\alpha 2$ 、MUC1、MUC16、CA9、GD2、GD3、HMW-MAA、CD171、Lewis Y、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2NY-ES0-1、PSCA、叶酸受体 α 、CD44v6、CD44v7/8、 $\alpha_v\beta_6$ 整合蛋白、8H9、NCAM、VEGF 受体、5T4、胎牛 AchR、NKG2D 配体、CD44v6、双抗原和 / 或通用抗原。

[0029] 前述内容相当宽泛地描述了本发明内容的特征和技术优点,使得能够更好地理解以下的详细说明。以下描述的本发明的其他特征和优点构成本发明要求保护的主体。本领域的技术人员应理解,所揭示的观念和具体实施方式可以方便地被用作改进或设计实现本发明的同样目的的其他结构的基础。本领域的技术人员还应认识到这种等价结构没有偏离所附权利要求书中提出的本发明的精神和范围。被认为是本发明的特征的新特征,对于其构建和方法的操作,还有其他对象和优点等,可以结合以下详细的说明和附图一起,得到更好的理解。但应理解,各附图仅仅是为了示意和说明,并不旨在对本发明进行限定。

[0030] 附图简要说明

[0031] 为了更完整地理解本发明,下面结合附图提供以下说明,其中:

[0032] 图 1. CAR. CD138 的生成和表征。组图 A. 在逆转录病毒载体中编码的 CAR. CD138 的示意图。组图 B. 逆转录病毒转导后,CAR 在激活的 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞中高效表达。组图 C 显示了用标准 ⁵¹Cr 释放试验评价的对照和 CAR. CD138T 针对 CD138⁺ 靶标 (RPMI 和 U266)、CD138 - 靶标 (拉吉) 和 NK 靶标 (K562) 的细胞毒活性。数据表示 4 个不同供体的平均

值 \pm SD。组图 D. 用 CD138⁺ 靶标 (U266 和 RPMI) 或 CD138⁻ 靶标 (拉吉) 共培养的对照和 CAR+T 细胞 (T 细胞 : 肿瘤细胞的比率为 5:1)。在培养 4 天后,收集细胞并用 CD3 和 CD138 染色以评价肿瘤细胞的生长。当其与 CAR+T 细胞共培养时,没有可检测的肿瘤细胞。数据表示 4 个不同供体的平均值 \pm SD。组图 E 显示了使用含有来自 2 个供体的 CD138⁺ 恶性 PC 的 BM 样品的共培养实验。CAR+T 细胞而不是对照细胞消除了恶性 PC。组图 F 显示了响应 CD138⁺ 靶标 U266 细胞的 T 细胞的 Th1 概况。

[0033] 图 2a 和 2b. CAR. CD138+T 淋巴细胞具有体内抗-MM 作用。在含有用 FFLuc 标记的 U266 细胞的 SCID 小鼠中静脉输注对照和 CAR. CD138+T 细胞。不使用外源性细胞因子。使用体内成像系统 (Xenogen-IVIS 成像系统) 来监测肿瘤生长。左图显示了在接受对照的小鼠中测量为信号强度 (p/s/cm²/sr) 的肿瘤生长明显高于接受 CAR. CD138+T 细胞的小鼠。右图显示了两个不同实验中每组 5 只小鼠的平均值 \pm SD。

[0034] 图 3. hCAR. CD138 的生成和表征。组图 A. 在逆转录病毒载体中编码的 hCAR. CD138 的示意图。组图 B. 持续 48 小时低氧中的 T 细胞中组成型 CAR. CD138 和 hCAR. CD138 的表达与正常氧压中的相比。组图 C. 对照、CAR. CD138⁺ 和 hCAR. CD138+T 细胞在低氧中与 CD138⁺ 靶标 (U266) 共培养 (T 细胞 : 肿瘤细胞的比率为 2:1)。在培养 3 天后,收集细胞并用 CD3 和 CD138 染色以评价肿瘤细胞的生长。当这些细胞与表达组成型 CAR. CD138 或 hCAR. CD138 的 T 细胞共培养时,没有可检测的肿瘤细胞。

[0035] 图 4. CAR. CD138 可在来自健康供体和多发性骨髓瘤 (MM) 样品的 T 细胞中高效和稳定地表达。(A) 编码包含 CD28 内结构域的 CD138⁻ 特异性 CAR 的逆转录病毒载体。(B) 在 CD8⁺ 和 CD4⁺ T 细胞上都检测到 CAR. CD138 的表达。(C) 在从健康供体生成的 7 个不同系中 CAR. CD138 的转导效率是 74% \pm 9%,而在从 MM 患者生成的 6 个系中是 82% \pm 5%。(D) 来自健康供体的对照和转导 T 细胞都含有均衡比例的 CD3⁺CD8⁺ T 细胞 (57% \pm 26% 和 54% \pm 14%) 和 CD3⁺CD4⁺ T 细胞 (35% \pm 17% 和 37% \pm 13%),而来自 MM 患者的 T 细胞更偏向含有 CD8⁺ 细胞 (80% \pm 10%)。不到 2% 的细胞是 CD3⁻CD56⁺CD16⁺。来自健康供体和 MM 患者的转导 T 细胞也含有与离体增殖过程相容的一定比例的记忆和效应记忆细胞 (CD45RO⁺: 分别为 82% \pm 16% 和 79% \pm 9%; CD62L⁺ 分别为 51% \pm 17% 和 42% \pm 14%)。

[0036] 图 5 CAR. CD138⁺ T 细胞靶向 CD138⁺ 肿瘤细胞系。在标准 ⁵¹Cr 释放试验 (A, D) 中,来自健康供体的表达 CAR. CD138 的 T 细胞 (在 10:1E:T 比例下分别为 31% \pm 8%、30% \pm 8%、39% \pm 7% 和 65% \pm 13%) 以明显比对照 T 细胞 (在 10:1E:T 比例下分别为 9% \pm 2%、7% \pm 6%、2% \pm 6% 和 5% \pm 2%) 高的比例裂解 CD138⁺ MM⁻ 衍生的细胞系 U266、RPMI-8266、OPM-2 和 MM. 1S。当从 MM 患者生成转导的 T 细胞时,观察到相似的杀伤图案。相反, CAR. CD138⁺ T 细胞具有针对 CD138⁻ 靶标 (拉吉、ARH-77 和 K562) 的可忽略活性 (A、B、D)。对照 T 细胞也观察到可忽略的杀伤 (C)。(D) 显示了至少 5 次独立实验的的汇总 \pm SD。

[0037] 图 6. CAR. CD138⁺ T 细胞在共培养实验中消除 CD138⁺ 肿瘤细胞。(A) 为了评价 CAR. CD138⁺ 消除 CD138⁺ 肿瘤细胞的长期能力,在没有外源性细胞因子的情况下, CAR⁺ 或对照 T 细胞与 CD138⁺ (U266, RPMI-8266, OPM-2 和 MM. 1S) 或 CD138⁻ (拉吉或 ARH77) 肿瘤细胞共培养,并且在 5-7 天后通过 FACS 分析对残留肿瘤细胞进行计数。在没有 CAR⁺ T 细胞的情况下, CD138⁺ 肿瘤完全消除,而肿瘤细胞在含对照 T 细胞的培养中过度生长 (U266: 57% \pm 18%; RPMI: 29% \pm 13%; OPM-2: 63% \pm 13%; MM. 1S: 67% \pm 1%)。相反,观察到缺少针对 CD138⁻

靶细胞的抗肿瘤效果。(B) 显示了 5 次独立实验的的汇总 \pm SD。

[0038] 图 7. CAR. CD138⁺T 细胞显示响应肿瘤细胞的 Th1 概况。为了评价 CAR. CD138⁺的细胞因子概况, CAR⁺或对照 T 细胞与 CD138⁺(U266、RPMI-8266、OPM-2 和 MM. 1S) 或 CD138⁻(拉吉) 肿瘤细胞共培养。在 24 小时后收集培养上清并分析 Th1 和 Th1 细胞因子的存在。

[0039] 图 8. CAR. CD138⁺T 细胞靶向推定的癌症干细胞为了确保该方法也可靶向推定的癌症干细胞, 通过由 RPMI-8266 肿瘤细胞中含有的 SP 细胞研究 CD138 的表达, 然后监测该亚组是否也可被 CAR⁺T 细胞有效消除。在与对照 T 细胞的共培养中, 不仅 RPMI-8266 细胞仍然存在 (73% \pm 7%), 平均 6% (范围为 0.11% 至 26.7%) 的 SP 细胞也仍然存在 (A, B)。相反, 在与 CAR⁺T 细胞的培养中, RPMI 细胞明显减少 (11% \pm 10%) 并且没有可检测的 SP 细胞 (0.04% \pm 0.07%) (A, B)。为了进一步确认这一能力, 直接从 RPMI 细胞系中分选 SP 细胞并与对照或 CAR⁺T 细胞培养 (C)。仅在转导的 T 细胞存在下, SP 细胞分选的细胞被完全消除。显示了 2 个代表性共培养实验。

[0040] 图 9. CAR. CD138⁺T 细胞靶向原发性骨髓瘤细胞。(A) 与对照 T 细胞相反, 从健康供体生成的 CAR⁺T 细胞成功地消除了来自 MM 患者的 CD138 选择的肿瘤细胞 (<80% 倍数降低)。(B) 类似地, 自体同源 CAR⁺T 细胞与对照 T 细胞 (2% \pm 2%) 相比消除了原发性 MM 细胞 (37% \pm 14%) (90% \pm 10% 倍数降低)。(C) 这些实验中的细胞因子概况与 Th1 一致。

[0041] 图 10. CAR. CD138⁺T 细胞具有体内抗肿瘤活性。NSG 小鼠接受静脉内给予 4×10^6 个萤火虫荧光素酶标记的 OPM-2 细胞, 之后是 3 次用 CAR. CD138⁺T 细胞的静脉内输注 (1×10^7)。在第 23 天开始进行 Bioluminescent 成像 (BLI) 以监测肿瘤生长。(A) 由 BLI 测定每只小鼠的平均光子 /sec/cm²/sr, 比较用对照 T 细胞 (NT, n = 11, 黑色圆点) 或 CAR. CD138⁺T 细胞 (n = 11, 灰色方块) 处理的小鼠。在第 59 天时的平均值 \pm SEM, *p = 0.05。3 次独立实验的汇总。(D) 用 CAR. CD138⁺T 细胞或对照 T 细胞处理的小鼠的卡普兰 - 迈耶存活曲线 (p < 0.01)。

[0042] 图 11. 低氧诱导型 CAR. CD138 (HRE. CAR. CD138) 的生成和功能。(A) 在逆转录病毒载体中编码的 HRE. CAR. CD138 的示意图。(B) 对照、组成型 CAR. CD138⁺或 HRE. CAR. CD138⁺T 细胞在正常氧 (20% 氧压) 或低氧 (1% 氧压) 下与 CD138⁺靶标 (U266) 共培养。在培养 4 天后, 收集细胞并用 CD3 和 CD138 染色以评价肿瘤细胞的生长。也评价 T 细胞上 CAR 的表达。HRE. CAR. CD138⁺T 细胞在低氧条件下消除肿瘤细胞。(C) 对照、组成型 CAR. CD138⁺或 HRE. CAR. CD138⁺T 细胞用 CFSE 标记并在正常氧 (20% 氧压) 或低氧 (1% 氧压) 下与 CD138⁺靶标 (U266) 共培养。在 4 天的培养后, 收集细胞, 用 CD3 染色并通过流式细胞术测量 CFSE 的稀释。HRE. CAR. CD138⁺T 细胞在低氧条件下增殖。

[0043] 发明详述

[0044] 与长期存在的专利法惯例一致, 本说明书 (包括权利要求) 中使用的单词“一”和“一个”与单词包括一致, 表示“一种或多种”。本发明的一些实施方式可能由一个或多个本发明的元素、方法步骤和 / 或方法组成或基本由其组成。考虑到本文所述的任意方法或组合物可相对于本文所述的任意其他方法或组合物实施。

[0045] 本文所用术语“含氧量低”是指 20% 氧压并且本文所用的“低氧”是指 1% 氧压。在具体实施方式中, 生理组织低氧被认为低于约 60mmHg。

[0046] I. 一般实施方式

[0047] 在本发明的实施方式中,存在用于治疗 CD138⁻ 表达癌细胞的方法和组合物。在具体实施方式中,癌症是血液恶性肿瘤,如多发性骨髓瘤 (MM),或实体瘤,如乳腺癌,以及几乎为不变地含氧量低的实体瘤。该方法和组合物涉及提供向特定需要的组织或细胞递送治疗,但不向 CD138⁻ 表达的非癌细胞递送治疗的处理。该方法和组合物涉及提供向表达 CD138 的癌组织或细胞递送治疗但不向表达 CD138 但不需要癌症治疗的细胞递送治疗的处理。在特定实施方式中,该治疗在低氧的组织或环境中有效并且该治疗在正常氧的组织或环境中无效。在本发明的方面中,治疗在低氧的组织或环境中有效并且在正常氧的组织或环境中无效,因为治疗部分并不存在于正常氧的组织或环境中。在一些情况中,细胞治疗可在低氧的组织或环境中有效并且在正常氧的组织或环境中无效,因为细胞在正常氧组织或环境中缺少治疗部分的表达,但是这种表达存在于低氧组织或环境中。在本发明的实施方式中,治疗部分包含至少 CD138 抗原特异性 CAR。可用也具有组织特异性或环境特异性表达的响应部分靶向其它组织特异性抗原。

[0048] 本发明的特定方面对已知患有 MM、疑似患有 MM 或处于发生 MM 风险的个体提供了针对 MM 的治疗。在一些情况中,可通过除了 CD138⁻ 阳性癌细胞的鉴定以外的方式确定个体患有 MM。在特定实施方式中,已经或正向个体提供针对 MM 的治疗。一开始或在治疗一段时间之后,个体可能耐受一种或多种任意类型的 MM 治疗 (除本发明以外)。

[0049] 本发明的特定方面向已知患有乳腺癌、疑似患有乳腺癌或处于发生乳腺癌风险 (如具有一种或多种指示性遗传标记物或家族或个人病史) 的个体提供了针对乳腺癌的治疗。在一些情况中,可通过除了 CD138⁻ 阳性癌细胞的鉴定以外的方式确定个体患有乳腺癌。在特定实施方式中,已经或正向个体提供针对乳腺癌的治疗。一开始或在治疗一段时间之后,个体可能耐受一种或多种任意类型的乳腺癌治疗 (除本发明以外)。

[0050] 尽管在针对 MM 的治疗选择中有显著的改善,该疾病仍然是基本无法治愈的。具体地,发明人和其它人已经证明表达靶向肿瘤相关抗原 (TAA) 的嵌合抗原受体 (CAR) 并包含充足的共刺激内结构域的 T 细胞是治疗 B 系血液恶性肿瘤的有吸引力的方式。由于恶性淋巴瘤细胞 (PC) 表达高水平的 CD138 抗原,它们可被重定向以靶向该抗原的 T 细胞有效消除是合乎逻辑的。事实上,在初始研究中,CD138⁻ 特异性 CAR (CAR. CD138) 已经显示出针对 CD138⁺ 肿瘤细胞的有用活性。使用 CD138 的一个注意之处在于,抗原也以低水平在上皮细胞、间充质细胞、血管平滑肌细胞、内皮细胞和神经细胞的基底侧表面上表达,例如,增加了 CAR⁻ 修饰的 T 细胞的毒性“命中靶标”但“脱离器官”或“脱离组织”的风险。因此,在本发明的具体实施方式中,可通过在低氧应答元件的诱导型控制下表达 CAR. CD138 来探索正常的 MM 骨髓 (BM) 微环境的低氧性质。也可限定在体外和体内的低氧环境,如在异种移植小鼠模型中用于 CAR⁻ 修饰的 T 细胞的共刺激的最优选免疫元件。最后,为了进一步提高本发明的实施方式的安全性,可在构建体中加入自杀基因,如基于诱导型胱冬酶 9 (iC9) 的先前验证的自杀基因。这一策略使得 CAR⁻ 修饰的 T 细胞的快速消融应该以比预期更大的数量逃离低氧 BM 环境并保留充足的功能性 CAR 表达以造成“命中靶标”但“脱离器官”的毒性。在某些方面中,可制备临床级逆转录病毒载体并从 MM 患者中制备 CAR⁻ 修饰的自体同源 T 细胞系,并将这些细胞输注到在一期临床试验中招募的患有复发的 MM 的患者中。在某些情况中,可评价过程的安全性,输注的 T 细胞的体内存活,和这些细胞在 BM 中的积累以及外周血 (PB) 对比 BM 中 T 细胞的 CAR 差异表达。如果存在毒性,可确定 iC9 安全性基因的体内

活性。也可评价 T- 细胞输注是否在患有可检测疾病的患者中提供疾病控制。

[0051] 本发明的目的是通过在低氧应答元件 (HRE) 的诱导型控制下表达 CAR. CD138 来探索 MM BM 微环境的低氧性质。也可在异种移植小鼠模型中限定在体外和体内的低氧环境中用于 CAR- 修饰的 T 细胞的共刺激的最优选免疫元件。最后, 为了进一步提高所述方法的安全性, 可基于诱导型胱冬酶 9 (iC9) 在构建体内纳入先前验证的自杀基因。在某些实施方式中, 可使用小分子 (例如 AP1903) 使诱导型胱冬酶 9 (iCaspase9) 二聚化。参见, 例如, Straathof 等, *Blood* 105:4247-4254 (2005)。

[0052] 可从 MM 患者制备临床级载体 (如逆转录病毒载体) 和 CAR- 修饰的 T- 细胞系并将其输注到患有复发的 MM 的患者中。可评价过程的安全性, 并且, 如果出现毒性, 可给予二聚体药物以激活体内的 iC9 安全性基因。也可评价 T- 细胞输注是否在患有可检测疾病的患者中提供疾病对照。

[0053] 本发明的目的是通过测量其体内存活来表征输注的 CAR-T 细胞的命运, 以及二聚化药物在体外和 (如果临床显示) 体内对这些细胞的后续影响。也可比较这些细胞在 BM 和外周血中的累积, 各环境中 T 细胞的 CAR 差异表达以及它们杀死肿瘤细胞的能力。可向有此需求的个体临床上提供细胞以及适当时的二聚化药物。

[0054] 本发明的实施方式将通过疫苗接种在 MM 患者中引发生存素特异性 CTL。在补充的方法中, 本发明提供了靶肿瘤 PC, 在血液恶性肿瘤中利用 CAR 技术。

[0055] II. 血液恶性肿瘤

[0056] 血液恶性肿瘤包括影响血液、骨髓和淋巴结的癌症类型。它们可衍生自两种主要的血细胞系之一: 骨髓或淋巴细胞系。骨髓细胞系通常产生粒细胞、红细胞、凝血细胞、巨噬细胞和肥大细胞; 淋巴细胞系产生 B 细胞、T 细胞、NK 细胞和浆细胞。淋巴瘤、淋巴细胞性白血病和骨髓瘤来自淋巴细胞系, 而急性和慢性骨髓性白血病、骨髓发育异常综合征和骨髓增生疾病的来源是骨髓。在某些实施方式中, 可用本发明的方法和 / 或组合物治疗任意这些血液恶性肿瘤。

[0057] 可用本发明的方法和组合物治疗多发性骨髓瘤 (MM, 其也称为浆细胞骨髓瘤或卡勒氏病)。MM 是浆细胞的癌症, 其是正常情况下负责产生抗体的一种类型的白细胞。在 MM 中, 骨髓中多个异常浆细胞聚积, 其在那里破坏正常血细胞的产生。可以多种方式诊断 MM, 如通过血液检查 (例如, 血清蛋白质电泳或无血清 κ / λ 轻链试验)、骨髓检查、尿蛋白质电泳和通常涉及骨的 X- 射线。虽然被认为无法治愈, 可用类固醇、化疗、蛋白酶体抑制剂 (例如, 硼替佐米)、免疫调节药物 (IMiD) 如沙利度胺或来那度胺、放射和 / 或干细胞移植进行治疗。某些症状包括, 例如, 升高的钙、肾衰竭、贫血和 / 或骨损伤。本发明的治疗可用于一期、二期或三期 MM。MM 的病情检查的部分可包括例如, 无血清轻链试验、骨骼检查、骨髓活检和 / 或 IgG 的定量测量。

[0058] 除了本发明的实施方式以外, 可向患有 MM 的人提供高剂量化疗和自体同源造血干细胞移植, 尤其是如果个体的年龄在 65 岁以下。在干细胞移植之前, 这些个体可接受诱导化疗的初步疗程, 如沙利度胺、地塞米松、基于硼替佐米的方案、来那度胺或其组合。可采用自体同源或同种异体干细胞移植 (ASCT)。可用美法仑、氯泼尼松、硼替佐米、美法仑、来那度胺或其组合来治疗 65 岁以上的个体。

[0059] III. CD138

[0060] CD138(也称为多配体聚糖-1)是人中由SDC1基因编码的蛋白质。例如, GenBank® 登录号 BC008765 提供了示例性 CD138 多核苷酸并且 GenBank® 登录号 AAH08765 提供了示例性 CD138 多肽,两者都通过引用全文纳入本文。本领域技术人员可使用这类序列来生成,例如 CD138-特异性 CAR 分子。

[0061] IV. 嵌合抗原受体 (CAR)

[0062] 在一些情况中,细胞经修饰表达 CD138-特异性 CAR。使人 T 淋巴细胞表达肿瘤介导的嵌合抗原受体 (CAR) 的遗传工程改造可产生抗肿瘤效应细胞,其疏通了肿瘤免疫逃逸机制,这是由于蛋白质-抗原加工和呈递中的异常。此外,这些转基因受体可导向非蛋白来源的肿瘤相关抗原。在本发明的某些实施方式中,存在经修饰以包含至少 CAR 的 CTL。在具体方面中,特定细胞包含两种或更多种 CD138-特异性识别部分,包括两种或更多种 CD138-特异性 CAR 的表达。

[0063] 本发明包括人工 T 细胞受体,其称为 CAR(其也可称为嵌合 T 细胞受体或嵌合免疫受体)。在本发明的实施方式中,其对于 CD138 是特异性的。CAR 一般可包括胞外结构域、跨膜结构域和内结构域。在具体实施方式中,其可以是第一代、第二代或第三代。

[0064] 在特定情况中,免疫细胞包括嵌合、非天然、至少部分人工工程改造、并导向 CD138 的 CAR。在特定情况中,工程改造的 CAR 具有 1 个、2 个、3 个、4 个或更多个组件,并且在一些实施方式中,这一个或多个组件促进 T 淋巴细胞靶向或结合包含肿瘤抗原的癌细胞。在具体实施方式中, CAR 包含针对肿瘤抗原的抗体、胞质信号传导结构域的部分或全部、和/或一个或多个共刺激分子的部分或全部,例如共刺激分子的内结构域。在特定实施方式中,该抗体是单链可变区片段(scFv)。在某些方面中,抗体导向例如,表达 CD138 的癌细胞的细胞表面上的靶抗原。在某些实施方式中,采用胞质信号传导结构域,如衍生自 T 细胞受体 ζ -链的那些作为嵌合受体的至少一部分以产生刺激信号供于 T 淋巴细胞增殖和效应功能随后接合嵌合受体与靶抗原。示例可包括但不限于,来自共刺激分子如 CD27、CD28、4-1BB 和 OX40 或细胞因子受体如 IL7 和 IL15 的信号传导组分的内结构域。在特定实施方式中,采用共刺激分子来增强抗原接合后由 CAR 产生的 T 细胞的激活、增殖和细胞毒性。在具体实施方式中,共刺激分子是 CD28、OX40 和 4-1BB,并且细胞因子和细胞因子受体是 IL7 和 IL15。

[0065] 通常, CAR 的胞外结构域包含信号肽、抗原识别结构域和连接抗原识别结构域到跨膜结构域的间隔子。抗原识别结构域通常会包含针对 CD138 有特异性的单链可变片段(scFv)。然而,在相同细胞中存在两种或更多种 CAR 的情况中,第二 CAR 包含针对选自下组的抗原有特异性的 scFv:例如,黑色素瘤-相关抗原(MAGE),黑色素瘤的优先表达抗原(PRAME)、生存素、CD19、CD20、CD22、 κ -轻链、CD30、CD33、CD123、CD38、ROR1、ErbB2、ErbB3/4、EGFr vIII、癌胚抗原、EGP2、EGP40、间皮素、TAG72、PSMA、NKG2D 配体、B7-H6、IL-13 受体 $\alpha 2$ 、MUC1、MUC16、CA9、GD2、GD3、HMW-MAA、CD171、Lewis Y、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2NY-ES0-1、PSCI、叶酸受体 α 、CD44v6、CD44v7/8、8H9、NCAM、VEGF 受体、5T4、胎牛 AchR、NKG2D 配体或 CD44v6。

[0066] 胞外结构域的铰链的示例包括免疫球蛋白的 CH2CH3 区, IgG1 的铰链区和 CD3 部分。跨膜区可以是任意类型,虽然在一些情况中,其可以是 CD28。

[0067] 通常,在抗原识别和受体聚类之后,采用本发明的 CAR 的内结构域来进行细胞内信号传输。最常用的内结构域组件是 CD3- ζ ,其含有 3 个 ITAM 并且在抗原结合之后将激活

信号传输到 T 细胞。在一些情况中,采用其它共刺激信号传导,如 CD3- ζ 与 CD28、4-1BB 和 / 或 OX40 的组合。

[0068] V. 自杀基因

[0069] 在本发明的实施方式中,在特定表达载体中采用自杀基因来使细胞通过在例如所需的时间点或位置或生理事件处通过凋亡来自杀。自杀基因可存在于与 CD138-CAR 载体相同的表达载体上。虽然自杀基因是本领域已知并常规使用的,在具体实施方式中,本发明中使用的自杀基因是胱冬酶 9、单纯疱疹病毒、胸苷激酶 (HSV-tk)、胞嘧啶脱氨酶 (CD) 或细胞色素 P450。在具体方面中,使用二聚化的特定化学诱导剂 (CID) 可诱导并激活自杀基因 (Ramos 等, 2010)。

[0070] VI. 低氧应答调控元件

[0071] 本发明的实施方式采用允许对治疗细胞的活性进行环境控制的调控元件,包括控制治疗细胞中人工抗原受体的表达。在具体实施方式中,以环境或组织特异性的方式调控 CAR 的表达,如存在低氧下或在低氧组织中。这一个或多个元件用于编码 CD138- 特异性 CAR 的表达载体中并且在功能上与编码 CD138- 特异性 CAR 的序列相关。功能上相关可表示这一个或多个元件被设置成合适的方式以能够调节编码 CD138- 特异性 CAR 多肽的序列的表达。在一些实施方式中,通过在正常氧环境中限定的这类元件完全不能影响 CD138- 特异性 CAR 的转录或影响可忽略不计。

[0072] 可采用的示例性 HRE 包括序列 NCGTG, 例如,在具体实施方式中,该序列随机重复,如至少 6 次,虽然其可以是 7、8、9、10 或更多次。

[0073] VII. 接合分子

[0074] 在本发明的一些实施方式中,也修饰包含 CD138- 特异性 CAR 的本发明的细胞以表达接合分子。在特定实施方式中,这类细胞能够分泌双特异性 T 细胞接合分子。特定实施方式中的双特异性包含存在激活结构域和抗原识别结构域。抗原识别结构域结合在靶细胞中或其上存在或由其分泌的分子,并且激活结构域结合 T- 细胞、NK- 细胞或 NKT- 细胞上存在的细胞表面受体,其引发最终激活受体细胞的过程。结合结构域和抗原识别结构域可以是任意类型,但在具体实施方式中,一个 scFv 针对介导激活的细胞表面分子有特异性并且其它 scFv 对所选定的特定肿瘤抗原具有特异性,包括 CD138 或另一种肿瘤抗原。可调整肿瘤抗原的特定 scFv 以识别具有特定肿瘤抗原的相应癌细胞。

[0075] 在特定方面中,接合分子包含结合免疫细胞表面 (或工程改造的免疫细胞表面) 上的激活分子的激活结构域,和结合靶细胞抗原 (例如,肿瘤细胞或癌细胞表面上表达的抗原) 的抗原识别结构域。

[0076] 接合物可以是两部分的 (例如,包含激活结构域和抗原识别结构域,其可任选地由接头连接),或可以是三部分或多部分的 (例如,包含一个或多个激活结构域和 / 或抗原识别结构域,或其它结构域)。在具体实施方式中,接合物的激活结构域是或包含抗体或其抗原结合片段或部分,例如,单链可变片段 (scFv)。在其他具体实施方式中,抗原识别结构域是或包含抗体或抗原结合片段或其部分,例如,单克隆抗体或 scFv, 或者其可包含配体、肽、可溶性 T- 细胞受体或其组合。在某些实施方式中,激活结构域和抗原识别结构域通过接头,例如肽接头连接。

[0077] 本领域技术人员识别具有不同激活受体的免疫细胞,以及接合物对正在激活的细

胞进行调节。例如, CD3 是 T- 细胞上的激活受体, 而 CD16、NKG2D 或 NKp30 是 NK 细胞上的激活受体, 并且 CD3 或非变异 TCR 是 NKT- 细胞上的激活受体。因此, 激活 T- 细胞的接合分子可具有与激活 NK 细胞的接合分子不同的激活结构域。在具体实施方式中, 例如, 在免疫细胞是 T- 细胞的情况下, 激活分子是以下中的一种或多种: CD3, 例如 CD3 γ 、CD3 δ 或 CD3 ϵ ; 或者 CD27、CD28、CD40、CD134、CD137 和 CD278。在其他具体实施方式中, 例如, 在免疫细胞是 NK 细胞的情况下, 激活分子是 CD16、NKG2D 或 NKp30, 或者在免疫细胞是 NKT- 细胞的情况下, 激活分子是 CD3 或非变异 TCR。

[0078] 在某些其他实施方式中, 接合物还包含一种或多种辅助结构域, 例如, 一种或多种细胞因子、共刺激结构域、抑制 T- 细胞激活的负调控分子的结构域或其组合。在具体实施方式中, 细胞因子是 IL-15、IL-2 和 / 或 IL-7。在其他具体实施方式中, 共刺激结构域是 CD27、CD80、CD86、CD134 或 CD137。在其他具体实施方式中, 抑制 T- 细胞激活负调控分子的结构域是 PD-1、PD-L1、CTLA4 或 B7-H4。

[0079] 在一些情况中, 接合物的 scFv 对以下有特异性: EphA2、CD19、8H9、CAIX、CD20、CD30、CD33、CD44、CD70、CD123、CD138、EGFR、EGFRvIII、EGP2、EGP40、EPCAM、EphA2、ERBB2 (HER2)、ERBB3、ERBB4、FAP、FAR、FBP、GD2、GD3、HLA-A1+MAGE1、IL11R α 、IL13R α 2、 κ - 轻链、KDR、 λ (Lambda)、Lewis-Y、MCSP、间皮素、Muc1、NCAM、NKG2D 配体、TAG72、TEM1、TEM8、CEA、PSCA 和 PSMA。

[0080] VIII. 病毒特异性

[0081] 在本发明的实施方式中, CD138-CAR 细胞是 CTL, 其天然受体对病毒潜伏蛋白有特异性, 如衍生自 EBV、HIV、HTLV-1 等的那些。这些病毒特异性 CTL 可接受来自专门抗原呈递细胞加工潜伏病毒抗原的生理共刺激并通过其 CAR 杀死肿瘤细胞。这种双特异性使重定向的 CTL 接受来自专门抗原呈递细胞的生理共刺激, 同时通过 CAR 探索抗肿瘤活性。

[0082] 本领域技术人员认识到生成这类细胞是常规的。

[0083] IX. 包含 CD138- 特异性 CAR 的宿主细胞

[0084] 本发明的细胞的实施方式包含能够表达 CD138- 特异性 CAR 的那些细胞并且包含例如 T- 细胞、NK- 细胞和 NKT- 细胞。本文所用的术语“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用。所有这些术语也包括其后代, 其是任意或全部的后代。应理解, 由于有意或偶然的突变, 所有的后代可能不是相同的。在表达异源核酸序列的内容中, “宿主细胞”可指代原核或真核细胞, 并且其包括能够复制载体和 / 或表达由载体编码的异源基因的任何可转化的生物体。宿主细胞可用作, 且已经用作载体的受主。宿主细胞可以是“转染的”或“转化的”, 其指外源性核酸转染或转导到宿主细胞中的过程。转化的细胞包括原代对象细胞及其后代。本文所用的术语“工程改造的”和“重组的”细胞或宿主细胞往往指其中已经导入外源性核酸序列, 例如载体的细胞。因此, 重组细胞与不含重组导入的核酸的天然出现的细胞不同。在本发明的实施方式中, 宿主细胞是免疫细胞, 如 T 细胞, 包括细胞毒性 T 细胞 (也称为 TC、细胞毒性 T 淋巴细胞、CTL、T- 杀伤 - 细胞、溶细胞性 T- 细胞、CD8+T- 细胞或杀伤 T 细胞), NK 细胞, NKT 细胞, 并且本发明中也包含其它可引发效应功能的免疫细胞。

[0085] 在某些实施方式中, 考虑到 RNA 或蛋白质序列可以与其他选定的 RNA 或蛋白质序列在相同宿主细胞中共表达。可通过用两种或更多种不同的重组载体共转染宿主细胞来实现共表达。或者, 可将单个重组载体构建成包含多个不同 RNA 编码区的, 其然后可在用单一

载体转染的宿主细胞中表达。

[0086] 一些载体可采用控制序列,这些控制序列使得它们在原核和真核细胞中复制和/或表达。本领域技术人员还会理解繁育全部上述宿主细胞以维持细胞并进行载体复制的条件。也理解并知晓能进行载体以及由载体编码的核酸及其关联多肽、蛋白或肽的大规模生产的技术和条件。

[0087] 本发明中所用的细胞是真核细胞,包括哺乳动物细胞,但可在载体或 DNA 的重组工程改造操作中采用原核细胞以整合到载体中。细胞特别是人,但可与感兴趣的动物相关,尤其是家养动物,如马科、牛科、鼠科、绵羊、犬科、猫科等,用于它们相应的动物中。在这些物种中,可包括各种类型的细胞,如 T 细胞、NK 细胞、NKT 细胞等。

[0088] 例如相对于接受它们的个体,这类细胞可以是自体同源细胞、同源细胞、异体细胞,并且甚至在一些情况中可以是异种细胞。可通过改变主要组织相容性复合物 (“MHC”) 的特征、通过灭活 β_2 -微球蛋白来防止形成功能性 I 类 MHC 分子、灭活 II 类分子、提供一种或多种 MHC 分子的表达、通过增强或抑制与细胞毒性相关的基因的表达以增强或灭活细胞毒性能力来修饰细胞。

[0089] 在一些情况中,感兴趣的可以是具体克隆或寡克隆细胞,其中该细胞具有特定特异性,如具有特定抗原特异性或寻靶位点特异性的 T 细胞和 B 细胞。

[0090] 具有 CD138-特异性 CAR 的本发明的细胞也可表达第二 CAR,也可表达接合物分子,和/或可以是病毒特异性的,并且任意重组表达构建体可以处于或不处于 HRE 的调控之下。

[0091] 编码 CD138-特异性 CAR 的表达载体可作为一种或多种 DNA 分子或构建体导入,其中可存在至少一种标记物,其将能够选择含有构建体的宿主细胞。可以常规方式制备构建体,其中基因和调控区域可适当分离、连接、克隆到合适的克隆宿主中、通过限制或测序或其他常规方式来分析。具体地,使用 PCR,可分离包括功能单元的全部或部分的个体片段,其中可使用“引物修复”、连接、体外诱变等引入一个或多个突变(如果需要)。一旦完成并证明具有合适序列的构建体然后可通过任意常规方式导入 CTL 中。构建体可被整合并包装到非复制、缺陷型病毒基因组中,如腺病毒、腺-相关病毒(AAV)或单纯疱疹病毒(HSV)或其他,包括逆转录病毒,用于感染或转导到细胞中。如果需要,构建体可包括用于转染的病毒序列。或者,可通过融合、电穿孔、基因枪、转染、脂质转染等导入构建体。宿主细胞可在导入构建体之前在培养基中生长并增殖,之后是适当的处理以导入构建体并整合构建体。然后细胞增殖并通过构建体中存在的标记物筛选。可成功使用的各种标记物包括 hpert、新霉素抗性、胸苷激酶、潮霉素抗性等。

[0092] 在许多情况中,在希望终止治疗、该细胞变成肿瘤、在对该细胞存在后缺少该细胞的情况感兴趣的研究中的或其它事件的情况下,人们可能希望能够杀死修饰的细胞。为了这一目的,可提供特定基因产物的表达,其中人们可在受控的条件下杀死修饰的细胞。自杀基因产物,如胱冬酶 9,是这类产物的示例。

[0093] 通过示例的方式,如下治疗癌症患者或易患癌症的患者或疑似患有癌症的患者。如本文所述修饰的细胞可给予患者并且停留延长的时间段。个体可接受一次或多次细胞给药。示例性的细胞包括低氧应答 CD138-特异性 CAR T 细胞。该细胞可经修饰以至少表达低氧应答 CD138-特异性 CAR 并且向有此需要的个体提供。

[0094] X. 将构建体导入细胞中

[0095] 低氧应答 CD138- 特异性 CAR 构建体或本文所述的任意构建体可作为一种或多种 DNA 分子或构建体导入,其中可存在至少一种标记物,其将能够选择含有构建体的宿主细胞。可以常规方式制备构建体,其中基因和调控区域可适当分离、连接、克隆到合适的克隆宿主中、通过限制或测序或其他常规方式来分析。具体地,使用 PCR,可分离包括功能单元的全部或部分的个体片段,其中可使用“引物修复”、连接、体外诱变等引入一个或多个突变(如果需要)。一旦完成并证明具有合适序列的构建体然后可通过任意常规方式导入宿主细胞中。构建体可被整合并包装到非复制、缺陷型病毒基因组中,如腺病毒、腺-相关病毒(AAV)或单纯疱疹病毒(HSV)或其他,包括逆转录病毒,用于感染或转导到细胞中。如果需要,构建体可包括用于转染的病毒序列。或者,可通过融合、电穿孔、基因枪、转染、脂质转染等导入构建体。宿主细胞可在导入构建体之前在培养基中生长并增殖,之后是适当的处理以导入构建体并整合构建体。然后细胞增殖并通过构建体中存在的标记物筛选。可成功使用的各种标记物包括 hprt、新霉素抗性、胸苷激酶、潮霉素抗性等。

[0096] 在一些情况中,可具有同源重组的目标位点,其中需要将构建体整合在特定基因座中。例如,可敲除内源基因并用通过使用本领域已知的材料和方法用于同源重组的构建体编码的基因代替(在相同或其他基因座)。对于同源重组,可使用 OMEGA 或 0- 载体。参见,例如,Thomas 和 Capecchi, Cell(1987)51, 503-512 ;Mansour 等, Nature(1988)336, 348-352 ;和 Joyner 等, Nature(1989)338, 153-156。

[0097] 可用于制备大量构建体 DNA 并用于进行转染的含有可用元件,如细菌或酵母复制起点、可选择和 / 或可扩增标记物、用于在原核细胞或真核细胞中表达的启动子 / 增强子元件等的载体是本领域熟知的,并且许多是市售可得的。

[0098] XI. 给予细胞

[0099] 本发明包括向有此需要的个体给予细胞,一旦已经适当地制备细胞,包括工程改造的细胞以表达 CD138- 特异性 CAR 并且,至少在一些情况中,在给予个体之前增殖细胞。

[0100] 已经用 DNA 构建体修饰的细胞在选择性条件下在培养基中生长,并且选择具有构建体的细胞然后可增殖并使用例如聚合酶链反应进一步分析以确定宿主细胞中存在构建体。一旦已经鉴定或确认修饰的宿主细胞,然后可根据计划使用它们,例如在培养中增殖或导入宿主生物体。

[0101] 根据细胞的性质,可以多种方式将细胞导入宿主生物体,例如哺乳动物。在具体实施方式中,(例如)在骨髓中局部导入细胞,但在替代性实施方式中,细胞全身给予并定位到癌症或者经修饰定位到癌症。所采用的细胞数量将取决于多种情况、导入的目的、细胞的寿命、待使用的方案、给药的次数、细胞繁殖的能力、重组构建体的稳定性等。细胞可以分散体应用,通常注射到或接近感兴趣的位点。细胞可以在生理上可接受的基质中。

[0102] DNA 转导不需要在每种情况中产生整合。在一些情况中,导入的 DNA 的瞬时维持可能是足够的。通过这种方式,可能有短期效果,其中可将细胞导入宿主,然后在预定的时间后开启,例如,在细胞已经能够定位到特定位点之后。

[0103] 可根据需要给予细胞。根据所需的响应、给药方式、细胞寿命、存在的细胞数量,可采用多种方案。给药的次数将至少部分取决于上述因素。

[0104] 应理解,该系统易受许多因素的影响,如对配体的细胞响应、表达效率、以及适当地,分泌水平、表达产物的活性、患者的具体需求,这些可随着时间和环境变化,由于缺少细

胞导致的细胞活性缺失率或单个细胞的表达活性等。因此,即使存在可大规模给予群体的通用细胞,预期对于各个体患者监测各患者的个体合适剂量,并且这类监测患者的实践在本领域中是常规的。

[0105] 通过静脉内输注给予 CAR- 修饰的 T- 细胞。剂量范围可以是,例如, $1 \times 10^7/m^2$ 至 $2 \times 10^8/m^2$ 。

[0106] 在特定情况中,向患有表达 CD138 抗原的癌症的个体给予多个 CD138CAR- 表达免疫细胞。在具体实施方式中,需要单次给药。在其他实施方式中,需要多次给予细胞。例如,在第一次给予工程改造的免疫细胞之后,可能检测个体例如,是否存在癌症或者肿瘤数量和 / 或尺寸降低。在癌症显示需要进一步治疗的情况中,如在第一次给药之后肿瘤生长,向个体另外递送一次或多次相同的 CD138-CAR 表达细胞 (或任选地,另一类癌症疗法,包括另一类免疫疗法和 / 或化疗、手术和 / 或放疗)。在一些情况中,个体中肿瘤尺寸的减小表明 CD138CAR 表达免疫疗法是有效的,因此向该个体提供进一步给药。

[0107] XI. 编码 CD138- 特异性 CAR 的多核苷酸

[0108] 本发明还包括包含编码本文定义的 CD138- 特异性 CAR 的核酸序列的组合物和具有该核酸序列的细胞。在特定方面中,该核酸分子是重组核酸分子且可以是合成的。其可包含 DNA、RNA 以及 PNA (肽核酸) 并且可以是其杂合体。

[0109] 此外,处于其他目的,设想核酸分子可含有例如硫酯键和 / 或核苷酸类似物。这些修饰可用于针对细胞中的核酸内切酶和 / 或外切酶稳定核酸分子。这些核酸分子可由适当的载体转录,其包含允许细胞中所述核酸分子转录的嵌合基因。在这一方面,还应立即,这类多核苷酸可用于“基因靶向”或“基因治疗”方法。在另一个实施方式中,这些核酸分子是标记的。检测核酸的方法是本领域熟知的,例如 Southern 和 Northern 印迹、PCR 或引物延伸。在基因治疗方法期间,该实施方式可用于筛选方法以验证是否成功导入上文所述核酸分子。

[0110] 这些核酸分子可以是包含前述核酸分子中任一种的重组产生的嵌合核酸分子,其可单独使用或联用。在具体方面中,这些核酸分子是载体的一部分。

[0111] 本发明因此还涉及包含载体的组合物,其包含本发明所述的核酸分子。

[0112] 许多合适在载体是分子生物学领域普通技术人员所已知的,其选择取决于所需的功能并且包括质粒、粘粒、病毒、噬菌体和遗传工程中常用的其它载体。本领域技术人员熟知的方法可用于构建各种质粒和载体;参见例如, Sambrook 等 (1989) 和 Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology (《新编分子生物学新方法》), 纽约的格林出版联合公司和韦利出版公司 (Green Publishing Associates and Wiley Interscience) (1989), (1994) 所述的技术。或者,本发明的多核苷酸和载体可重组到脂质体中以用于递送至靶细胞。可使用克隆载体来分离 DNA 的单个序列。可将相关序列转移到表达载体中,该载体中需要特定多肽的表达。一般的克隆载体包括 pBluescript SK、pGEM、pUC9、pBR322 和 pGBT9。一般的表达载体包括 pTRE、pCAL-n-EK、pESP-1、pOP13CAT。

[0113] 在具体实施方式中,存在一种包含核酸序列的载体,所述核酸序列是调控序列,其可操作地连接编码本发明所定义的 CD138- 特异性 CAR 的核酸序列。这类调控序列 (控制序列) 是本领域技术人员已知的且可包括启动子、拼接盒 (splice cassette)、翻译起始密码子、用于将插入片段导入载体的翻译和插入位点。在具体实施方式中,该核酸分子操作性

连接所述表达控制序列,从而在真核或原核细胞中表达。

[0114] 设想载体是包含编码本文定义的 CD138- 特异性 CAR 的核酸分子的表达载体。在具体方面中,该载体是病毒载体,如慢病毒载体。慢病毒载体是市售可得的,包括来自例如克隆泰克公司 (Clontech) (加利福尼亚州芒廷维尤) 或复能基因公司 (GeneCopoeia) (马里兰州罗克维尔)。

[0115] 术语“调控序列”指影响其连接的编码序列的表达所必需的 DNA 序列。这类控制序列的本质根据宿主生命体而不同。在原核生物中,控制序列通常包括启动子、核糖体结合位点和终止子。在真核生物中,通常控制序列包括启动子、终止子且在一些情况下包括增强子、反式激活因子或转录因子。术语“控制序列”旨在包括至少以下所有组分:其存在是表达所必需的,且还可包括其他有利的组分。

[0116] 术语“可操作地连接”表示并置位置,其中如此描述的组分的关系允许其以所需方式发挥功能。“可操作地连接”至编码序列的控制序列以在与控制序列相容的条件下完成编码序列表达的方式连接。在控制序列是启动子的情况下,优选使用双链核酸对本领域技术人员而言是显而易见的。

[0117] 因此,在某些实施方式中,所述载体是一种表达载体。“表达载体”是一种构建体,其可用于转化所选宿主并提供所选宿主中编码基因的表达。表达载体可例如是克隆载体,双向载体或整合载体。表达包括核酸分子的转录,优选转录为可翻译的 mRNA。确保原核和/或真核细胞中表达的调控元件是本领域技术人员熟知的。在真核细胞的情况下,其通常包括确保转录起始的启动子且任选地包括确保转录终止和转录本稳定化的聚 A 信号。允许在原核宿主细胞中表达的可能调控元件包括,例如,大肠杆菌中的 P_L 、lac、trp 或 tac 启动子,并且允许在真核宿主细胞中表达的调控元件的示例是酵母中的 AOX1 或 GAL1 启动子或者哺乳动物和其它动物细胞中的 CMV-、SV40-、RSV- 启动子 (劳氏肉瘤病毒)、CMV- 增强子、SV40- 增强子或球蛋白内含子。

[0118] 除负责转录起始的元件外,这类调控元件还可包含转录终止信号,如 SV40 聚 A 位点或 tk 聚 A 位点,其在多核苷酸的下游。此外,根据所用的表达系统,能够引导多肽至细胞隔室或将其分泌至介质中的前导序列可添加至所述核酸序列的编码序列中并且是本领域熟知的。这些前导序列与翻译、起始和终止序列以适当方式组装,且优选能够引导翻译后蛋白质或其部分分泌至周质空间或胞外介质的前导序列。任选地,异质性序列可编码包含 N 端鉴定肽的融合蛋白,所述 N 端鉴定肽具有所需特性,例如表达的重组蛋白的稳定化或简化纯化;参见同上。本文中,合适的表达载体是本领域已知的,例如 Okayama-Berg cDNA 表达载体 pcDV1 (法玛西亚公司 (Pharmacia))、pEF-Neo、pCDM8、pRc/CMV、pcDNA1、pcDNA3 (英杰公司 (Invitrogen))、pEF-DHFR 和 pEF-ADA (Raum 等, *Cancer Immunol Immunother* (2001) 50 (3), 141-150) 或 pSPORT1 (GIBCO BRL 公司)。

[0119] 在一些实施方式中,这些表达控制序列是载体中的真核启动子系统,能够转化或转染真核宿主细胞,但也可使用用于原核宿主的控制序列。一旦载体整合到合适宿主中,即将宿主维持在适于核苷酸序列的高水平表达的条件下,并根据需要可随后收集和纯化本发明的多肽。在特定实施方式中,通过相应低氧环境的表达控制序列来调控一个或多个可编码序列。

[0120] 其他调控元件可包括转录以及翻译增强子。有利地,上述本发明的载体包含可

选择和 / 或可评分的标志物。用于选择转化的细胞的可选择标志物基因是本领域技术人员熟知的且包括例如作为选择 dhfr 的基础的抗代谢物抗性, 其赋予对氨基蝶呤的抗性 (Reiss, *Plant Physiol. (Life-Sci. Adv.)* 13(1994), 143-149); npt, 其赋予对氨基糖甙类新霉素、卡那霉素和巴龙霉素的抗性 (Herrera-Estrella, *EMBO J.* 2(1983), 987-995) 以及 hyg^r, 其赋予对潮霉素的抗性 (Marsh, *Gene* 32(1984), 481-485)。已描述了其他可选择基因, 即 trpB, 其允许细胞利用吡啶代替色氨酸; hisD, 其允许细胞利用组氨酸代替组氨酸 (Hartman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85(1988), 8047); 甘露糖-6-磷酸异构酶, 其允许细胞利用甘露糖 (W094/20627) 和 ODC (鸟氨酸脱羧酶), 其赋予对鸟氨酸脱羧酶抑制剂, 2-(二氟甲基)-DL-鸟氨酸, DFMO 的抗性 (McConlogue, 1987, 刊于 *Current Communications in Molecular Biology* (《分子生物学的当前通信》), 冷泉港实验室编) 或来自土曲霉的脱氨酶, 其赋予对杀稻瘟菌素-S 的抗性 (Tamura, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59(1995), 2336-2338)。

[0121] 有用的可评分标志物也是本领域技术人员已知的, 可以商购。有利地, 所述标记物是编码以下物质的基因: 荧光素酶 (Giacomin, *Pl. Sci.* 116(1996), 59-72; Scikantha, *J. Bact.* 178(1996), 121)、绿色荧光蛋白 (Gerdes, *FEBS Lett.* 389(1996), 44-47) 或-葡糖醛酸糖苷酶 (Jefferson, *EMBO J.* 6(1987), 3901-3907)。对于简单和快速地筛选含有所述载体的细胞、组织和生物体而言, 该实施方式是特别有用的。

[0122] 如上所述, 所述核酸分子可单独或者作为载体的部分用于细胞, 以在细胞中表达编码的多肽。向细胞中导入含有编码 CD138-特异性 CAR 构建体中任一种的 DNA 序列的核酸分子或载体, 其继而产生感兴趣的多肽。所述的核酸分子和载体可经设计用于直接导入或通过脂质体或病毒载体 (例如, 腺病毒, 逆转录病毒) 导入细胞中。在某些实施方式中, 细胞是例如 T-细胞、CAR T-细胞、NK 细胞、NKT-细胞、MSC、神经干细胞或造血干细胞。

[0123] 根据上文, 本发明涉及衍生遗传工程改造中常规使用的载体, 尤其是质粒、粘粒、病毒和噬菌体的方法, 该载体包含编码本文定义的 CD138-特异性 CAR 的多肽序列的核酸分子。优选地, 所述载体是表达载体和 / 或基因转移或靶向载体。源自病毒如逆转录病毒、痘苗病毒、腺相关病毒、疱疹病毒或牛乳头瘤病毒的表达载体可用于递送所述多核苷酸或载体到靶细胞群中。可使用本领域技术人员熟知的方法来构建重组载体; 参见例如 Sambrook 等 (在上述引文中)、Ausubel (1989, 在上述引文中) 或其他标准教科书中描述的技术。替代地, 可将所述核酸分子和载体重建成用于递送到靶细胞的脂质体。含有本发明的核酸分子的载体可通过熟知的方法转移至宿主细胞中, 其根据细胞宿主的类型而变化。例如, 氯化钙转染通常用于原核细胞, 而磷酸钙处理或电转可用于其它细胞宿主, 参见 Sambrook, 同上。

[0124] XII. 通常的载体

[0125] 本发明的载体可用于重组工程改造以产生并且在至少一些情况中表达 CD138-特异性识别部分, 包括 CD138-特异性 CAR 或 CD138-特异性接合分子。

[0126] 使用术语“载体”指代运载体核酸分子, 其中可插入核酸序列以导入细胞, 其可在该细胞中复制。核酸序列可以是“外源的”, 这表示该序列相对于导入载体的细胞是外来的, 或者该序列与细胞中的序列同源, 但是其位于宿主细胞核酸内原本未发现该序列的位置上。载体包括质粒、碾粒、病毒 (噬菌体、动物病毒和植物病毒) 和人工染色体 (例如,

YAC)。本领域技术人员有条件通过标准重组技术构建载体（参见，例如，Maniatis 等，1988 和 Ausubel 等，1994，两者通过引用纳入本文）。

[0127] 术语“表达载体”是指包含编码能够被转录的 RNA 的核酸的任何类型的遗传构建体。在一些情况中，RNA 分子然后翻译成蛋白、多肽或肽。在其他情况中，这些序列未经翻译，例如，在反义分子或核酶的产生中。表达载体可含有多种“控制序列”，其是指特定宿主细胞中可操作连接的编码序列的转录和可能的翻译所需的核酸序列。除了控制转录和翻译的控制序列以外，载体和表达载体可含有还具有其他功能并在下文中描述的核酸序列。

[0128] 本发明中采用的调控序列包括一种或多种低氧应答元件，其功能上连接到表达受调控的表达构建体。以下描述了可采用的其它调控元件。

[0129] “启动子”是一种控制序列，其是核酸序列的一个区域，在该区域中控制转录的起始和速率。其可含有调控蛋白和分子（如 RNA 聚合物和其他转录因子）可结合的遗传元件以启动核酸序列的具体转录。术语“可操作地定位”、“可操作地连接”、“控制下”和“转录控制下”表示启动子位于相对于核酸序列的正确功能位置和 / 或取向以控制该序列的转录起始和 / 或表达。

[0130] 启动子一般包含功能为定位 RNA 合成的起始位点的序列。其熟知的示例是 TATA 盒，但在一些缺少 TATA 盒的启动子中，例如，哺乳动物末端脱氧核苷酸转移酶基因的启动子和 SV40 晚基因的启动子，与其起始位点本身重叠的离散元件有助于固定启动的位置。其他启动子元件调控转录起始的频率。通常，这些位于起始位点上游 30-110bp 的区域中，但是几种启动子已经显示在起始位点的下游也含有功能元件。为了将编码序列置于启动子的“控制下”，将其定位于所选择启动子的“下游”（即 3' 端）的转录阅读框的转录起始位点的 5' 端。“上游”启动子刺激 DNA 的转录并且促进编码的 RNA 的表达。

[0131] 启动子元件之间的间隙通常是柔性的，使得当元件翻转或相对于彼此移动时保留启动子功能。在 tk 启动子中，在活性开始减弱之前，启动子元件之间的间距可增加到 50bp。取决于启动子，单个元件似乎可协同或单独发挥作用以激活转录。启动子可与或可不与“增强子”联用，增强子是指参与核酸序列的转录活性的瞬时作用调控序列。

[0132] 启动子可以是与核酸序列天然相关的启动子，如可通过分离位于编码片段和 / 或外显子上游的 5' 非编码序列获得。这种启动子可称为“内源的”。类似地，增强子可以是与核酸序列天然相关的增强子，位于该序列的上游或下游。或者，将通过定位重组或异源启动子控制下的编码核酸片段来获得特定优势，该重组或异源启动子是指在其天然环境中正常情况下不与核酸序列相关的启动子。重组或异源增强子也指在其天然环境中通常不与核酸序列相关的增强子。这类启动子或增强子可包括其他基因的启动子或增强子、从任何其他病毒或原核或真核细胞中分离的启动子或增强子、和“天然不存在”的启动子或增强子，即含有不同转录调控区域的不同元件，和 / 或改变表达的突变。例如，在重组 DNA 构建中最常用的启动子包括 β -内酰胺酶（青霉素酶），乳糖和色氨酸（trp）启动子系统。除了通过合成产生启动子和增强子的核酸序列以外，可使用重组克隆和 / 或核酸扩增技术（包括 PCR[™]）与本文所述的组合物结合来产生序列（参见美国专利号 4,683,202 和 5,928,906，各自通过引用纳入本文）。此外，考虑也可采用在非核细胞器如线粒体、叶绿体等内引序列的转录和 / 或翻译的控制序列。

[0133] 天然地，采用有效引导 DNA 片段在选择表达的细胞器、细胞类型、组织、器官或生

物体中表达的启动子和 / 或增强子会是重要的。分子生物学领域中的技术人员一般已知使用启动子、增强子和细胞类型的组合来表达蛋白 (参见, 例如, Sambrook 等, 1989, 其通过引用纳入本文)。所采用的启动子可以是组成型、组织特异性、诱导型、和 / 或可用于在合适条件下引导导入的 DNA 片段的高水平表达, 这在重组蛋白和 / 或肽的大规模生产中是有优势的。启动子可以是异源或内源的。

[0134] 另外, 可使用任意启动子 / 增强子组合来驱动表达。T3、T7 或 SP6 胞质表达系统的使用是另一种可能的实施方式。如果以递送复合物的部分或额外的基因表达构建体提供合适的细菌聚合酶, 真核细胞可支持来自特定细菌启动子的胞质转录。

[0135] 组织特异性启动子或元件的鉴定, 以及表征其活性的试验是本领域技术人员所熟知的。在具体实施方式中, 采用环境特异性启动子或元件, 如低氧特异性调控元件。可采用组织特异性、谱系特异性和 / 或激活特异性启动子, 并且示例包括激活的 T- 细胞元件、NFAT (谱系限制的激活)、早期生长应答基因 (激活)、肝 X 受体应答元件 (激活)、低氧应答元件 (环境) 等。

[0136] 编码序列的充分翻译也可能需要特异性启动信号。这些信号包括 ATG 起始密码子或相邻序列。可能需要提供外源性翻译控制信号, 包括 ATG 启动密码子。本领域普通技术人员将易于确定这些并提供必要的信号。

[0137] 在本发明的某些实施方式中, 使用内部核糖体进入位点 (IRES) 元件来产生多基因, 或多顺反子, 信号, 并且可用于本发明中。

[0138] 载体可包括多重克隆位点 (MCS), 其为含有多个限制性酶位点的核酸区域, 其中任意位点可与标准重组技术联用来消化载体。“限制性酶消化”是指用仅在核酸分子的特异性位置上发挥作用的酶催化切割核酸分子。这些限制性酶中的许多是市售可得的。本领域技术人员充分理解这类酶的使用。通常, 使用在 MCS 内切割的限制性酶将载体线性化或片段化以使外源性序列能够连接到载体中。“连接”是指在两个可能互相毗连或不互相毗连的核酸片段之间形成磷酸二酯键的过程。涉及限制性酶和连接反应的技术是重组技术领域中的技术人员所熟知的。

[0139] 也可采用剪接位点、终止信号、复制起点和选择性标记物。

[0140] 在某些实施方式中, 考虑质粒载体用于转化宿主细胞。通常, 含有衍生自与宿主细胞相容的物种的控制序列和复制子的质粒载体与这些宿主结合使用。载体通常携带复制位点以及标记序列, 其能够在转化的细胞中提供表型选择。在非限制性示例中, 通常使用 pBR322 (一种衍生自大肠杆菌物种的质粒) 的衍生物来转化大肠杆菌。pBR322 含有氨苄青霉素和四环素抗性基因, 并且因此提供了鉴定转化的细胞的便捷方式。pBR 质粒, 或其他微生物质粒或噬菌体必须也含有, 或经修饰含有, 例如可由微生物生物体使用来表达其自身蛋白的启动子。

[0141] 另外, 含有与宿主微生物相容的控制序列和复制子的噬菌体载体可用作与这些宿主结合使用的转化载体。例如, 可采用噬菌体 λ GEMTM-11 制备重组噬菌体载体, 其可用于转化宿主细胞, 例如, 大肠杆菌 LE392。

[0142] 其他可用的质粒载体包括 pIN 载体 (Inouye 等, 1985) 和 pGEX 载体, 其用于生成谷胱甘肽 S- 转移酶 (GST) 可溶性融合蛋白用于随后的纯化和分离或切割。其他合适的融合蛋白是具有 β - 半乳糖苷酶、泛素等的哪些。

[0143] 包含表达载体的细菌宿主细胞,例如,大肠杆菌在数种合适培养基中的任一种中生长,例如LB。如本领域技术人员所知,可通过将宿主细胞与对特定启动子有特异性的抗原接触,例如通过向培养基中加入 IPTG 或通过将孵育切换到较高的温度来诱导特定载体中重组蛋白的表达。在继续培养细菌之后(一般为 2 至 24 小时),细胞通过离心收集并洗涤以去除残留的培养基。

[0144] A. 病毒载体

[0145] 特定病毒通过受体介导的胞吞感染细胞或进入细胞并整合到宿主细胞基因组中并稳定和高效地表达病毒基因的能力使其成为将外来核酸转入细胞(例如,哺乳动物细胞)的有吸引力的候选者。本发明的组分可以是编码类肝素酶的病毒载体。下文中描述了可用于递送本发明的核酸的病毒载体的非限制性示例。

[0146] 1. 腺病毒载体

[0147] 递送核酸的具体方法包括使用腺病毒表达载体。已知腺病毒载体具有低的整合到基因组 DNA 的能力,这一特征被通过这些载体得到的高效基因转化所平衡。“腺病毒表达载体”往往包括含有足够的腺病毒序列以 (a) 支持构建体的包装和 (b) 最终表达已经在其中克隆的组织或细胞特异性构建体的那些构建体。根据腺病毒(一种 36kb 的线性双链 DNA 病毒)的遗传组织的知识,能够用高达 7kb 的外来序列取代腺病毒 DNA 的大片段(Grunhaus 和 Horwitz,1992)。

[0148] 2. AAV 载体

[0149] 可使用腺病毒辅助的转染来将核酸导入细胞。已经在使用腺病毒偶联的系统的细胞系统中报道了增加的转染效率(Kelleher 和 Vos,1994;Cotton 等,1992;Curiel,1994)。腺相关病毒(AAV)是用于本发明的细胞中的吸引人的载体系统,由于其具有高整合频率并且可感染非分裂细胞,因此使其可用于向哺乳动物细胞中递送基因,例如在组织培养中(Muzyczka,1992)或在体内。AAV 具有宽的宿主感染范围(Tratschin 等,1984;Laughlin 等,1986;Lebkowski 等,1988;McLaughlin 等,1988)。关于 rAAV 载体生成和使用的详细内容见述于美国专利号 5,139,941 和 4,797,368,其各自通过引用纳入本文。

[0150] 3. 逆转录病毒载体

[0151] 由于其将它们基因整合到宿主基因组中的能力、转化大量的外来遗传物质、感染广谱物种和细胞类型以及在特定细胞系中包装,逆转录病毒可用作递送载体(Miller,1992)。

[0152] 为了构建类肝素酶逆转录病毒载体,将核酸(例如,一种编码类肝素酶的部分或全部的核酸)在特定病毒序列位置中插入病毒基因组以产生复制缺陷型的病毒。为了产生病毒颗粒,构建含有 gag、pol 和 env 基因但不含 LTR 和包装组分包装细胞系(Mann 等,1983)。当含有 cDNA 和逆转录病毒 LTR 以及包装序列的重组质粒导入特定细胞系中(例如,通过磷酸钙沉淀)时,包装序列允许重组质粒的 RNA 转录物包装到病毒颗粒中,其然后分泌到培养基中(Nicolas 和 Rubenstein,1988;Temin,1986;Mann 等,1983)。然后收集含有重组逆转录病毒的基质,任选地浓缩并用于基因转化。逆转录病毒载体能够感染广泛的细胞类型。然而,整合和稳定表达需要宿主细胞的分裂(Paskind 等,1975)。

[0153] 慢病毒是复杂的逆转录病毒,其除了共有的逆转录病毒基因 gag、pol 和 env 以外还含有具有调控或结构功能的其他基因。慢病毒载体是本领域熟知的(参见,例

如, Naldini 等, 1996 ; Zufferey 等, 1997 ; Blomer 等, 1997 ; 美国专利号 6, 013, 516 和 5, 994, 136)。慢病毒的一些示例包括人免疫缺陷病毒 : HIV-1、HIV-2 和猿免疫缺陷病毒 : SIV。已经通过多次减弱 HIV 毒力基因来生成慢病毒载体, 例如删除基因 env、vif、vpr、vpu 和 nef 使得载体在生物学上是安全的。

[0154] 重组慢病毒载体能够感染非分裂细胞并且可用于核酸序列的体内和离体基因转化和表达。例如, 在美国专利号 5, 994, 136 中描述了能够感染非分裂细胞的重组慢病毒, 其中用两种或多种携带包装功能 (即 gag、pol 和 env 以及 rev) 的载体转染合适的宿主细胞。可通过将包膜蛋白与抗体或特定配体连接来将重组病毒靶向特定细胞类型的受体。例如, 通过在病毒载体中插入感兴趣的序列 (包括调控区) 和编码针对特定目标细胞上的受体的配体的另一种基因, 该载体现在是目标特异性的。

[0155] 4. 其他病毒载体

[0156] 其他病毒载体可在本发明中用作疫苗构建体。可采用衍生自病毒, 如痘苗病毒 (Ridgeway, 1988 ; Baichwal 和 Sugden, 1986 ; Coupar 等, 1988)、辛德比斯病毒、巨细胞病毒和单纯疱疹病毒的载体。它们提供了对多种哺乳动物细胞的若干有吸引力的特征 (Friedmann, 1989 ; Ridgeway, 1988 ; Baichwal 和 Sugden, 1986 ; Coupar 等, 1988 ; Horwich 等, 1990)。

[0157] 5. 使用修饰的载体的递送

[0158] 待递送的核酸可以内装在感染性病毒中, 该感染性病毒已经工程改造以表达特异性结合配体。因此, 病毒颗粒将特异性结合目标细胞的相关受体并将内容物递送到细胞中。基于通过向病毒包膜化学添加乳糖残基对逆转录病毒进行的化学修饰开发了设计使逆转录病毒载体特异性靶向的新方法。这种修饰可通过唾液酸糖蛋白受体特异性感染干细胞。

[0159] 设计了另一种重组逆转录病毒靶向的方法, 其中使用针对逆转录病毒包膜蛋白和特定细胞受体的生物素化抗体。通过使用链霉亲和素由生物素组分偶联抗体 (Roux 等, 1989)。使用针对 I 类和 II 类主要组织相容性复合物抗原的抗体, 它们用亲嗜性病毒在体外显示多种人细胞的感染, 这些人细胞带有那些表面抗原 (Roux 等, 1989)。

[0160] B. 载体递送和细胞转化

[0161] 本领域普通技术人员已知用于细胞转染或转化的核酸递送的合适方法。这类方法包括, 但不限于, DNA 的直接递送, 如通过离体转染、通过注射等。通过本领域已知技术的应用, 可稳定或瞬时转化细胞。

[0162] C. 离体转化

[0163] 本领域技术人员已知在离体环境中从生物体中去除组织和转染真核细胞的方法。因此, 可考虑去除细胞或组织并使用类肝素酶或本发明的其他核酸离体转染该细胞或组织。在具体方面中, 可将移植的细胞或组织放入生物体中。在优选的方面中, 核酸在移植的细胞中表达。

[0164] XIII. 联合治疗

[0165] 在本发明的某些实施方式中, 临床方面的本发明的方法, 例如给予个体具有 CD138- 表达癌症免疫细胞 (例如表达 CD138- 特异性 CAR 的 T 细胞), 与其它在治疗过度增殖疾病中有效的其它试剂如抗癌药联用。“抗癌”试剂能对对象的癌症产生不利影响, 例如通过杀死癌细胞、诱导癌细胞凋亡、降低癌细胞生长速率、降低转移的发生率或数量、降

低肿瘤尺寸、抑制肿瘤生长、减少对肿瘤或癌细胞的血液供给、促进对癌细胞或肿瘤的免疫应答、阻止或抑制癌症发展、或延长患病对象的寿命。更一般地,这些其他组合物会以有效杀死或抑制细胞增殖的组合物提供。该过程可涉及用表达构建体和试剂或多种因子同时接触所述癌细胞。这可通过用单一组合物或包括两种试剂的药物制剂接触所述细胞,或者通过用两种不同组合物或制剂同时接触所述细胞来实现,其中一种组合物包括所述表达构建体而另一种包括所述第二试剂。

[0166] 在本发明的实施方式中,除了本发明的治疗细胞以外,向患有 MM 的个体提供一种或多种:类固醇、化疗、蛋白酶体抑制剂(例如,硼替佐米)、免疫调节药物(IMiD)如沙利度胺或来那度胺、放射、和/或干细胞移植。

[0167] 耐受化疗和放疗试剂的肿瘤细胞是临床肿瘤学中的主要问题。现有的癌症研究的一个目标是寻找通过将化疗和放疗与基因疗法组合改善化疗和放疗的效率的方式。例如,通过逆转录病毒载体系统递送单纯疱疹胸苷激酶(HS-tK)基因到脑肿瘤时,其成功诱导了对抗病毒试剂更昔洛韦的易感性(Culver等,1992)。本发明的内容中,除了其他促凋亡或细胞周期调控试剂外,预期细胞治疗可相似地与化疗、放疗或免疫治疗介入联用。

[0168] 或者,本发明治疗可先于或在其他试剂治疗之后,间隔数分钟到数周。在所述其他试剂和本发明对所述个体分别应用的实施方式中,一般需保证各递送的时间之间没有显著的时间段,从而所述试剂和发明治疗法仍可在细胞上产生有利的组合效果。在这类情况中,考虑可将细胞与两种方案接触,互相间隔在约12-24小时内,并且更优选互相间隔在约6-12小时内。然而在一些情况中,可能需要显著延长治疗时间,其中各给药之间间隔数天(2、3、4、5、6或7)到数周(1、2、3、4、5、6、7或8)。

[0169] 可采用各种组合,本发明为“A”,所述第二试剂如放疗或化疗为“B”。

[0170] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

[0171] B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

[0172] B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

[0173] 预期所述治疗循环在需要时重复。还预期各种标准治疗法以及外科手术介入可与本发明细胞治疗法联用。

[0174] A. 化疗

[0175] 癌症疗法可包括多种同时有基于化学物和放射的治疗的组合疗法。组合化疗包括,例如,阿西维辛;阿柔比星;盐酸阿考达唑;阿克罗宁;阿多来新;阿地白介素;六甲蜜胺;安波霉素;乙酸阿美萘醌;安吡啶;阿那曲唑;安曲霉素;门冬酰胺酶;曲林菌素;阿扎胞苷;阿扎替派;阿佐霉素;巴马司他;苯佐替派;比卡鲁胺;盐酸比生群;二甲磺酸双奈法德;比折来新;硫酸博来霉素;布喹那钠;溴匹立明;白消安;放线菌素C;卡普萘酮;卡醋酸;卡贝替姆;卡铂;卡莫司汀;盐酸卡柔比星;卡折来新;西地芬戈;塞来考昔(COX-2抑制剂);苯丁酸氮芥;西罗霉素;顺铂;克拉屈滨;甲磺酸克立那托;环磷酰胺;阿糖胞苷;达卡巴嗪;放线菌素D;盐酸柔红霉素;地西他滨;右奥马铂;地扎胍宁;甲磺酸地扎胍宁;地吡醌;多西他赛;多柔比星;盐酸多柔比星;屈洛昔芬;柠檬酸屈洛昔芬;丙酸屈他雄酮;达佐霉素;依达曲沙;盐酸依氟鸟氨酸;依沙芦星;恩洛铂;恩普氨酯;依匹哌啶;盐酸表柔比星;厄布洛唑;盐酸依索比星;雌莫司汀;雌莫司汀磷酸钠;依他硝唑;依托泊苷;磷酸依托泊苷;氯苯乙噻胺;盐酸法倔唑;法扎拉滨;芬维A胺;氮尿苷;磷酸氟达拉滨;氟

尿嘧啶;氟西他滨;磷喹酮;福司曲星钠;吉西他滨;盐酸吉西他滨;羟基脲;盐酸伊达比星;异环磷酰胺;伊莫福新;异丙铂;伊立替康;盐酸伊立替康;乙酸兰瑞肽;来曲唑;乙酸亮丙瑞林;盐酸利阿唑;洛美曲索钠;洛莫司汀;盐酸洛索萘醌;马索罗酚;美登素;盐酸氮芥;乙酸基孕甾酮;乙酸美仑孕酮;苯丙氨酸氮芥;美诺立尔;巯嘌呤;氨甲喋呤;氨甲喋呤钠;氯苯氨啉;美妥替派;米丁度胺;米托卡星;丝裂红素;米托洁林;丝裂马菌素;丝裂霉素;米托司培;米托坦;盐酸米托萘醌;霉酚酸;诺考达唑;诺拉霉素;奥马铂;奥昔舒仑;紫杉醇;培门冬酶;培利霉素;奈莫司汀;硫酸培洛霉素;培磷酰胺;哌泊溴烷;哌泊舒凡;盐酸吡罗萘醌;普卡霉素;普洛美坦;吡菲尔钠;泊非霉素;泼尼莫司汀;盐酸丙卡巴肼;噻罗霉素;盐酸噻罗霉素;吡唑咪喃菌素;利波腺苷;沙芬戈;盐酸沙芬戈;司莫司汀;辛曲秦;磷乙酰天冬氨酸钠;司帕霉素;盐酸锗螺胺;螺莫司汀;螺铂;链黑霉素;链佐星;磺氯苯脲;他利霉素;替可加兰钠;泰索帝;替加氟;盐酸替洛萘醌;替莫泊芬;替尼泊苷;替罗昔隆;鞣内酪;硫咪嘌呤;硫鸟嘌呤;塞替派;噻唑咪林;替拉扎明;柠檬酸托瑞米芬;乙酸曲托龙;磷酸曲西立滨;三甲曲沙;葡糖醛酸三甲曲沙;曲普瑞林;盐酸妥布氯唑;乌拉莫司汀;乌瑞替派;伐普肽;维替泊芬;硫酸长春碱;硫酸长春新碱;长春地辛;硫酸长春地辛;硫酸长春匹定;硫酸长春甘酯;硫酸长春罗新;酒石酸长春瑞滨;硫酸长春罗定;硫酸长春利定;伏氯唑;折尼铂;净司他丁;盐酸佐柔比星;20-表-1,25-二羟基维生素D3;5-乙炔基尿嘧啶;阿比特龙;阿柔比星;酰基富烯;腺环戊醇(adecypenol);阿多来新;阿地白介素;ALL-TK拮抗剂;六甲蜜胺;氨莫司汀;阿米多克斯(amidox);氨基乙酰丙酸;氨柔比星;安吡啶;阿那格雷;阿那曲唑;穿心莲内酯;血管新生抑制剂;拮抗剂D;拮抗剂G;安雷利克斯;抗-背侧化形成蛋白-1;抗雄激素,前列腺癌;抗雌激素;抗癌酮(antineoplaston);反义寡核苷酸;甘氨酸阿非迪霉素;凋亡基因调节剂;凋亡调节剂;脱嘌呤核酸;ara-CDP-DL-PTBA;精氨酸脱氨酶;阿苏拉科林(asulacrine);阿他美坦;阿莫司汀;阿西他汀(axinastatin)1;阿西他汀2;阿西他汀3;阿扎司琼;阿扎毒素;重氮酪氨酸;浆果赤霉素III衍生物;巴拉醇(balanol);巴马司他;BCR/ABL拮抗剂;苯并二氢卟吩(benzochlorin);苯甲酰星孢素; β 内酰胺衍生物; β -阿里辛(β -alethine);贝塔克拉霉素(betaclamycin)B;桦木酸;bFGF抑制剂;比卡鲁胺;比生群;双氮丙啶精胺;双奈法德;比特迪尼(bistratene)A;比折来新;贝伏特(breflate);溴匹立明;布度钛;丁基硫基亚胺;卡泊三醇;卡弗他丁(calphostin)C;喜树碱衍生物;卡培他滨;羧酰胺-氨基-三唑;羧基酰胺三唑;CaRest M3;CARN 700;软骨衍生的抑制剂;卡折来新;酪蛋白激酶抑制剂(ICOS);澳栗精胺;杀菌肽B;西曲瑞克;双氢叶吩(chlorins);氯代喹啉磺酰胺;西卡前列素;顺-卟啉;克拉屈滨;恩氯米芬类似物;克霉唑;克利霉素(collismycin)A;克利霉素B;考布他汀A4;考布他汀类似物;克纳宁(conagenin);科莱贝司丁(crambescidin)816;克立那托;自念珠藻环肽(cryptophycin)8;自念珠藻环肽A衍生物;麻疯树毒蛋白(curacin)A;环戊萘醌(cyclopentantraquinone);环普拉坦(cycloplatan);塞培霉素(cypemycin);阿糖胞苷十八烷基磷酸钠;细胞裂解因子;磷酸己烷雌酚(cytostatin);达昔单抗;地西他滨;脱氢代代宁B;地洛瑞林;地塞米松;右异环磷酰胺;右雷佐生;右维拉帕米;地吡醌;代代宁B;二羟基苯并氧肟酸(didox);二乙基正精胺;二氢-5-氮杂胞苷;二氢紫杉醇,9-;二氧霉素(dioxamycin);二苯基螺莫斯汀;多西他赛;二十二烷醇;多拉司琼;去氧氟尿苷;阿霉素;屈洛昔芬;屈大麻酚;多卡霉素SA;依

布硒;依考莫司汀;依地福新;依决洛单抗;依氟鸟氨酸;榄香烯;乙嘧替氟;表柔比星;依立雄胺;雌莫司汀类似物;雌激素激动剂;雌激素拮抗剂;依他硝唑;磷酸依托泊甙;依西美坦;法倔唑;法扎拉滨;芬维 A 胺;非格司亭;非那雄胺;黄皮酮 (flavopiridol);氟卓斯汀;夫卢丝龙 (fluasterone);氟达拉滨;盐酸氟代柔红霉素 (fluorodaunorubicin);福酚美克;福美坦;福司曲星;福莫司汀;德卞啉钆 (gadolinium texaphyrin);硝酸镓;加洛他滨;加尼瑞克;明胶酶抑制剂;吉西他滨;谷胱甘肽抑制剂;赫舒反 (hepsulfam);调蛋白;环己基双乙酰胺;金丝桃蒽酮;伊班膦酸;黄胆素;艾多昔芬;伊决孟酮;伊莫福新;伊洛马司他;伊马替尼 (例如, GLEEVEC®);咪喹莫特;免疫刺激肽;胰岛素样生长因子-1 受体抑制剂;干扰素激动剂;干扰素;白介素;碘苄胍;碘阿霉素;甘薯苦醇, 4-;伊罗普拉;伊索拉定;异本格唑 (isobengazole);异高软海绵素 (isohomohalicondrin)B;伊他司琼;结丝立得 (jasplakinolide);卡哈拉得 (kahalalide)F;片螺素 (lamellarin)-N 三乙酸;兰瑞肽;雷纳霉素 (leinamycin);来格司亭;硫酸蘑菇多糖;莱托斯汀 (leptostatins);来曲唑;白血病抑制因子;白细胞 α 干扰素;亮丙瑞林 + 雌激素 + 孕酮;亮丙瑞林;左旋咪唑;利阿唑;直链多胺类似物;亲脂性二糖肽;亲脂性铂化合物;利索纳得 (lissoclinamide)7;洛铂;胍乙基磷酸丝氨酸;洛美曲索;氯尼达明;洛索萘醌;洛索立宾;勒托替康;德卞啉钆 (lutetium texaphyrin);莱索菲林 (lysofylline);细胞裂解肽;美坦新;慢诺他汀 (mannostatin)A;马立马司他;马索罗酚;马斯平 (maspin);基质溶解因子抑制剂;基质金属蛋白酶抑制剂;美诺立尔;硫巴妥苯胺;美替瑞林;甲硫氨酸酶;甲氧氯普胺;MIF 抑制剂;米非司酮;米替福新;米立司亭;米托胍脘;二溴卫矛醇;丝裂霉素类似物;米托萘胺;米托毒素 (mitotoxin) 成纤维细胞生长因子-皂草毒蛋白;米托萘醌;莫法罗汀;莫拉司亭;西妥昔单抗, 人绒毛膜促性腺激素;单磷酸基脂质 A+ 分支杆菌细胞壁骨架;莫哌达醇;芥类抗癌剂;印度洋海绵 (mycaperoxide)B;分枝杆菌细胞壁提取物;米亚普龙 (myriaporone);N- 乙酰基地那林;N- 取代的苯甲酰胺;那法瑞林;那瑞替喷 (nagrestip);纳洛酮 + 镇痛新;纳帕英 (napavin);萘萘二醇 (naphterpin);那托司亭;奈达铂;奈莫柔比星;奈立膦酸;尼鲁米特;尼萨霉素 (nisamycin);氮氧化物调节剂;硝基氧抗氧化剂;尼多林 (nitruillyn);奥利默森 (GENASENSE®);⁰- 苄基鸟嘌呤;奥曲肽;奥可斯酮 (okicenone);寡核苷酸;奥那司酮;昂丹司琼;昂丹司琼;奥莱辛 (oracin);口服细胞因子诱导物;奥马铂;奥沙特隆;奥沙利铂;氧杂奥诺霉素 (oxaunomycin);紫杉醇;紫杉醇类似物;紫杉醇衍生物;帕劳胺 (palauamine);棕榈酰根霉素;帕米磷酸;人参炔三醇;帕诺米芬;副菌铁素 (parabactin);帕折普汀;培门冬酶;培得星;戊聚硫钠;喷司他丁;喷托唑 (pentrozole);全氟溴烷;培磷酰胺;紫苏子醇;苯那霉素 (phenazinomycin);乙酸苯酯 (phenylacetate);磷酸酶抑制剂;皮西巴尼 (picibanil);盐酸匹鲁卡品;吡柔比星;吡曲克辛;胎盘素 (placetin)A;胎盘素 B;纤溶酶原激活物抑制剂;铂络合物;铂化合物;铂-三胺络合物;卞菲尔钠;泊非霉素;氯泼尼松;丙基双吡啶酮;前列腺素 J2;蛋白酶体抑制剂;基于蛋白 A 的免疫调节剂;蛋白激酶 C 抑制剂;蛋白激酶 C 抑制剂, 微藻 (microalgal);蛋白质酪氨酸磷酸酶抑制剂;嘌呤核苷磷酸化酶抑制剂;红紫素;吡唑啉吡啶;吡哆醛化的血红蛋白聚氧乙烯偶联物;raf 拮抗剂;雷替曲塞;雷莫司琼;ras 法尼基蛋白转移酶抑制剂;ras 抑制剂;ras-GAP 抑制剂;去甲基化的瑞替普汀;依替膦酸铈 Re186;根霉素;核酶;RII 维甲酰胺 (retinamide);罗希吐碱 (rohitukine);罗莫肽;罗喹美克;

卢比格酮 (rubiginone)B1;卢伯西 (ruboxyl);沙芬戈;伞托平 (saintopin);SarCNU;萨可菲醇 (sarcophytol)A;沙格司亭;Sdi 1 模拟物;司莫司汀;衰老衍生的抑制剂 1;正义寡核苷酸;信号转导抑制剂;西佐喃;索布佐生;硼卡钠;苯基乙酸钠;索尔醇 (solverol);生长调节素结合蛋白;索纳明;膦门冬酸;斯卡霉素 (spicamycin)D;螺莫司汀;脾脏五肽 (splenopentin);海绵他汀 (spongistatin)1;角鲨胺;斯提酰胺 (stipiamide);基质分解素抑制剂;斯菲诺辛 (sulfinosine);强效血管活性肠肽拮抗剂;素拉迪塔 (suradista);苏拉明;苦马豆碱;他莫司汀;他莫昔芬甲碘化物;牛磺莫司汀;他扎罗汀;替可加兰钠;替加氟;碲吡喃洋 (tellurapyrylium);端粒酶抑制剂;替莫泊芬;替尼泊昔;十氧化四氯 (tetrachlorodecaoxide);四佐胺 (tetrazomine);泰立拉汀 (thaliblastine);噻可拉林;血小板生成素;血小板生成素模拟物;胸腺法新;胸腺生成素受体激动剂;胸腺曲南;促甲状腺激素;本紫红素乙酯锡;替拉扎明;二氯环戊二烯钛;拓扑森汀 (topsentin);托瑞米芬;翻译抑制剂;维甲酸;三乙酰基尿苷;曲西立滨;三甲曲沙;曲普瑞林;托烷司琼;妥罗雄脲;酪氨酸激酶抑制剂;酪氨酸磷酸化抑制剂 (tyrphostin);UBC 抑制剂;乌苯美司;泌尿生殖窦衍生的生长抑制因子;脲激酶受体拮抗剂;伐普肽;瓦立奥林 (variolin)B;维拉雷琐;藜芦明;瓦尔丁 (verdins);维替泊芬;长春瑞滨;威科萨汀 (vinxaltine);维他辛 (Vitaxin);伏氯唑;扎诺特隆;折尼铂;亚苕维 C;和净司他丁斯酯,或前述的任意类似物或衍生物变体。

[0176] B. 放疗

[0177] 造成 DNA 损伤并已广泛使用的其他因素包括通常称为 γ 射线、X 射线和 / 或将放射性同位素直接递送给肿瘤细胞。也考虑其它形式的 DNA 破坏因素,如微波和紫外辐射。所有这些元素很有可能会对 DNA、DNA 前体、DNA 复制和修复、染色体装配和维持造成较宽范围的损伤。X- 射线的剂量范围从延长期间 (3 至 4 周) 50 至 200 伦琴的每天剂量到 2000 至 6000 伦琴的单次剂量。放射性同位素的剂量范围差异很大,取决于所述同位素的半衰期、发射辐射的强度和类型、以及肿瘤细胞的摄入。

[0178] 本文所用术语“接触”和“暴露”用于细胞时,描述治疗构建体和化疗或放疗试剂递送给靶细胞或放置成与所述靶细胞直接并置所用的方法。为了实现细胞杀死或静止,以有效杀死所述细胞或阻止其分裂的结合量将两种试剂递送给细胞。

[0179] C. 免疫疗法

[0180] 在一个实施方式中,除了 CD138- 特异性识别部分 (CD138- 特异性 CAR- 表达 T- 细胞或含 CD138- 特异性接合分子的 T- 细胞) 以外的免疫疗法与本发明的方法一起使用。

[0181] 一般免疫治疗法依赖于使用免疫效应细胞和分子靶向并破坏癌细胞。所述免疫效应物可为例如对肿瘤细胞表面的一些标记特异的抗体。抗体本身可用作治疗效应物或其可招募其他细胞以实际影响细胞杀死。抗体也可与药物或毒素 (化疗剂、放射性核素、蓖麻毒素 A 链、霍乱毒素、百日咳毒素等) 偶联并且仅用作靶向剂。或者所述效应物可为携带表面分子的淋巴细胞,所述分子直接或间接与肿瘤细胞靶标相互作用。各种效应细胞包括 T 细胞、细胞毒性 T 细胞、NKT 细胞和 NK 细胞。

[0182] 因此,免疫治疗可用作组合治疗的部分,与本细胞治疗联用。组合疗法的一般方法如下所述。一般而言,肿瘤细胞必须携带一些易于靶向的标记物,即,不存在于大多数其它细胞上。存在许多肿瘤标记物并且这些标记物中的任一种适用于在本发明的内容中靶

向。常见的肿瘤标记物包括癌胚抗原、前列腺特异性抗原、胎儿抗原、酪氨酸酶 (p97)、gp68、TAG-72、HMGF、Sialyl Lewis 抗原、MucA、MucB、PLAP、雌激素受体、层粘连蛋白受体、erb B、p155、黑色素瘤 - 相关抗原 (MAGE)，黑色素瘤的优先表达抗原 (PRAME)、生存素、CD19、CD20、CD22、k 轻链、CD30、CD33、CD123、CD38、ROR1、ErbB2、ErbB3/4、ErbB 二聚体、EGFr vIII、癌胚抗原、EGP2、EGP40、间皮素、TAG72、PSMA、NKG2D 配体、B7-H6、IL-13 受体 a2、MUC1、MUC16、CA9、GD2、GD3、HMW-MAA、CD171、Lewis Y、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2NY-ESO-1、PSCA、叶酸受体 -a、CD44v6、CD44v7/8、a₆、整联蛋白、8H9、NCAM、VEGF 受体、5T4、胎牛 AchR、NKG2D 配体、CD44v6、双抗原和通用抗原。

[0183] D. 基因

[0184] 在另一实施方式中，所述第二治疗为基因治疗，其中在本发明临床实施方式之前、之后或同时给予治疗性多核苷酸。本发明涵盖各种表达产物，包括细胞增殖诱导剂、细胞增殖抑制剂或细胞程序性死亡调节剂。

[0185] E. 手术

[0186] 约 60% 的癌症患者会经历一些类型的外科手术，包括预防性、诊断性或分期、治愈性和缓解性外科手术。治愈性外科手术是可与其他治疗法联用的癌症治疗，所述治疗法如本发明的治疗、化疗、放疗、激素治疗、基因治疗、免疫治疗和 / 或其他治疗。

[0187] 治愈性外科手术包括切除术，其中所有或部分癌组织被物理移除、切割和 / 或破坏。肿瘤切除是指物理去除至少部分肿瘤。除了肿瘤切除术，外科手术治疗包括激光手术、冷冻手术、电外科手术和显微镜控制手术 (莫氏 (Mohs) 手术)。还预期本发明可与浅表性癌、初癌或附带量的正常组织移除联用。

[0188] 所有癌细胞、组织或肿瘤的部分切割后，可在体内形成空腔。治疗可通过灌注、直接注射或局部区域应用其他抗癌治疗来实现。该治疗可例如每 1、2、3、4、5、6 或 7 天或每 1、2、3、4 和 5 周或每 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 个月重复。这些治疗也可用不同的剂量。

[0189] F. 其它药剂

[0190] 其它药剂可考虑与本发明联用以改善治疗功效。这些其他试剂包括免疫调节剂、影响细胞表面受体和 GAP 连接上调的试剂、细胞抑制和分化试剂、细胞粘附抑制剂、或增加所述过度增殖性细胞对凋亡诱导物的敏感性的试剂。免疫调节剂包括肿瘤坏死因子；干扰素 α 、 β 和 γ ；IL-2 和其他细胞因子；F42K 和其他细胞因子类似物；或 MIP-1、MIP-1 β 、MCP-1、RANTES 和其他趋化因子。还考虑细胞表面受体或其配体如 Fas/Fas 配体、DR4 或 DR5/TRAIL 的上调将通过对过度增殖细胞建立自分泌或旁分泌作用来增强本发明的凋亡诱导能力。通过提高 GAP 接头的数量将提高对相邻过度增殖细胞群的抗 - 过度增殖作用。在其他实施方式中，细胞抑制或分化试剂可与本发明联用以改进所述治疗的抗过度增殖效力。考虑细胞粘附抑制剂来改善本发明的功效。细胞粘附抑制剂的例子为粘着斑激酶 (FAK) 抑制剂和洛伐他汀。还可考虑增加过度增殖细胞对凋亡的敏感性的其它药剂，如抗体 c225 与本发明联用以提高治疗功效。

[0191] XII. 药物组合物

[0192] 根据本发明，术语“药物组合物”指用于给予个体的组合物。在本发明的具体方面中，药物组合物包含多种导向癌细胞上的 CD138 的免疫细胞。在优选的实施方式中，该药物

组合物包括用于胃肠道外、透皮、管腔内、动脉内、鞘内或静脉内给药或用于直接注射至癌症的组合物。具体设想通过输注或注射向个体给予所述药物组合物。可通过不同方式有效地给予合适的组合物,例如通过静脉内、皮下、腹膜内、肌内、局部或皮内给药。

[0193] 本发明的药物组合物还可包含药学上可接受的运载体。合适的药学运载体的示例是本领域已知的且包括磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳液,如油/水乳液、多种类型的润湿剂、无菌溶液等。可通过熟知的常规方法配制包含这类运载体的组合物。这些药物组合物可以合适剂量给予对象。

[0194] 可通过参与的医师和临床因素来确定剂量方案。如医学领域所熟知,用于任何一个患者的剂量取决于多种因素,包括患者的体型、体表面积、年龄、给予的特定化合物、患者性别、给药时间和给药途径、总体健康状况和同时给予的其他药物。优选的给予剂量的范围可以是每天 0.24 μ g 至 48mg,优选 0.24 μ g 至 24mg,更优选 0.24 μ g 至 2.4mg,甚至更优选 0.24 μ g 至 1.2mg 并且最优选 0.24 μ g 至 240mg 单位每千克体重。以下列出了特别优选的剂量。可通过周期性评估来监测过程。通过静脉内输注给予 CAR- 修饰的 T- 细胞。剂量范围可以是 $1 \times 10^7/m^2$ 至 $2 \times 10^8/m^2$ 。

[0195] 本发明的组合物和局部或系统性给予。给药通常将是胃肠道外的(例如静脉内);还可直接将 DNA 给予目标位点,例如通过基因枪递送到内部或外部目标位点或通过导管递送到动脉内位点。在优选的实施方式中,皮下给予药物组合物,且在更有效的实施方式中,静脉内给予。胃肠道外给药制剂包括无菌的水性或非水性溶液、悬液和乳液。非水性溶剂的示例是丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油,和可注射有机酯如油酸乙酯。水性载体包括水、醇溶液/水溶液、乳液或混悬液,包括盐水和缓冲介质。胃肠道外载剂包括氯化钠溶液、林格右旋糖、右旋糖和氯化钠、乳酸林格溶液或固定油。静脉内载剂包括液体和营养补充剂、电解质补充剂(例如基于林格右旋糖的那些物质)等。也可存在方法及和其它添加剂,例如,抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。此外,本发明的药物组合物可包含蛋白性运载体,例如血清白蛋白或免疫球蛋白,优选人来源的。除 CAR 构建体或编码其的核酸分子或载体(如上文所述)外,设想本发明的药物组合物还可包含生物活性试剂,这取决于该药物组合物的预定用途。

[0196] 本文所述的任意组合物可包含于用于治疗表达 CD138 的癌症的试剂盒。在一个非限制性实施例中,可在试剂盒中包含用于细胞疗法的一种或多种 CD138- 引导的免疫细胞和/或生成用于细胞疗法的一种或多种细胞的试剂,该疗法含有重组表达载体。以合适的容器方式提供试剂盒组分。

[0197] 试剂盒的一些组分可包装在水性基质中或包装成冻干形式。所述试剂盒的容器用具通常包括至少一种小瓶、试管、烧瓶、瓶、注射器或其它容器用具,其中该组分可放置,并优选适当分装于其中。在试剂盒中存在超过一种组分的情况下,该试剂盒通常还含有第二、第三或其他容器,其中可分开放置其他组分。然而,可在小瓶中包含组分各种组合。这些试剂盒通常还包含用于市售的封闭约束形式含有该组分的器具。此类容器可包括注塑或吹塑的塑料容器,其中保留所需小瓶。

[0198] 当在一种和/或多种液体溶液中提供试剂盒的组分时,液体溶液是水性溶液,无菌水性溶液是特别有用的。在一些情况中,容器用具本身可以是注射器、移液器和/或其他这类设备,从中可将制剂施用于身体的受感染区域、注射到动物中和/或甚至用于和/或与

试剂盒的其他组分混合。

[0199] 然而,试剂盒的组分可以干粉形式提供。当以干粉提供试剂和 / 或组分时,可通过加入合适的溶剂来重建粉末。设想也可以另一种容器用具提供溶剂。该试剂盒还可包含含有无菌的、药学上可接受的缓冲剂和 / 或其他稀释剂的第二容器用具。

[0200] 在具体实施方式中,在试剂盒中提供待用于细胞疗法的细胞,并且在一些情况中,细胞基本上是试剂盒的唯一组分。该试剂盒可包含制备所需细胞的试剂和材料。在具体实施方式中,该试剂和材料包含用于扩增所需序列的引物、核苷酸、合适的缓冲剂或缓冲试剂、盐等,并且在一些情况中,该试剂包括编码本文所述的接合分子和 / 或其调控元件的 DNA 和 / 或载体。

[0201] 在具体实施方式中,试剂盒中存在适用于从个体提取一个或多个样品的一种或多种设备。该设备可以是注射器、解剖刀等。

[0202] 在特定方面中,试剂盒包含本发明的细胞疗法并且还包含细胞对其免疫的化疗。在一些情况中,除了细胞疗法实施方式以外,该试剂盒还包括第二肿瘤疗法,例如化疗、激素疗法和 / 或免疫疗法。这些试剂盒可对个体的具体癌症调整并且包含该个体的相应第二癌症疗法。

[0203] XII. 表达 CD138CAR 的宿主 T 细胞的治疗用途

[0204] 通过示例的方式,如下治疗癌症患者或易患癌症的患者或疑似患有癌症的患者。如本文所述修饰的免疫细胞可给予个体并且停留延长的时间段。个体可接受一次或多次细胞给药。在一些实施方式中,遗传修饰的细胞经包封以已知免疫识别并位于肿瘤位点。

[0205] 在多个实施方式中,这些表达构建体、核酸序列、载体、宿主细胞和 / 或包含这些物质的药物组合物可用于预防、治疗或缓解癌性疾病,如肿瘤性疾病。在具体实施方式中,本发明的药物组合物具体可用于预防、缓解和 / 或治疗癌症,包括例如具有实体瘤的癌症。

[0206] 本文所用“治疗”或“处理”包括对疾病或病理状况的症状或病变的任何有益或需要的效果,并且可包括受治疗的疾病或病症(例如,癌症)的一种或多种可测量标志物的甚至很小的减少。治疗可任选地包括疾病或病症的症状的降低或缓解,或者疾病或病症进展的延迟。“治疗”不一定表示疾病或病症或其相关症状的完全根除或愈合。

[0207] 本文所用的“预防”和类似词汇如“防止”等表示用于预防、抑制或降低疾病或病症(例如,癌症)出现或复发的可能性的方法。其也指延迟疾病或病症的发生或复发或者延迟疾病或病症的症状的出现或复发。本文所用“预防”和类似词汇也包括在疾病或病症发生或复发之前降低疾病或病症的强度、影响、症状和 / 或负担。

[0208] 在具体的实施方式中,本发明部分涵盖可单独使用或与其他疗法联用的含有表达构建体的细胞、核酸分子和 / 或载体,且在至少一些方面中,还包括药学上可接受的运载体或赋形剂。在某些实施方式中,在给予细胞之前,所述核酸分子或载体可稳定地接合到细胞的基因组中。在具体的实施方式中,可使用特异性针对某些细胞或组织且在所述细胞中持续存在的病毒载体。合适的药学运载体和赋形剂在本领域是众所周知的。根据本发明制备的组合物可而用于预防或治疗或延缓上述鉴定的疾病。

[0209] 此外,本发明设计预防、治疗或缓解癌症(包括肿瘤)的方法,该方法包括步骤:向有此需要的对象给予有效量的含有抗原识别部分分子或化疗耐性分子的细胞、编码其的核酸序列、编码其的载体,如本文所考虑和 / 或本文所考虑的过程所产生。

[0210] 给予示例性修饰的免疫细胞的组合物的可能指示是癌症,包括肿瘤疾病,包括乳腺、前列腺、肺和结肠癌或上皮癌,如 MM、乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、头颈癌、皮肤癌、生殖-泌尿道癌症,例如卵巢癌、子宫内膜癌、宫颈癌和肾癌、肺癌、胃癌、小肠癌、肝癌、胰腺癌、胆囊癌、胆管癌、食道癌、唾液腺癌和甲状腺癌。给予细胞组合物的示例性指示是癌症,包括表达例如 CD138 的任意恶性肿瘤。另外,其包含异常表达其它肿瘤抗原并且也可靶向的恶性肿瘤。给予本发明的组合物可用于癌症的所有阶段和类型,包括用于例如微小残留病、早期癌症、晚期癌症和 / 或转移性癌症和 / 或难以治疗的癌症。

[0211] 本发明还包括与其它化合物,例如双特异性抗体构建体、靶向毒素或其它化合物(其通过免疫细胞发挥作用)的共同给予方案。共同给予本发明的化合物的临床方案可包括在给予其他组分同时、之前和 / 或之后共同给予。具体组合疗法包括化疗、放疗、手术、激素疗法或其他类型的免疫疗法。

[0212] 各实施方式涉及包含一种或多种本发明所述免疫细胞、本发明所述核酸序列、本发明所述载体和 / 或本发明所述宿主的试剂盒。还考虑本发明的试剂盒包含上文所述药物组合物,其单独使用或与其他待给予药物联用于需要医学治疗或干预的个体。

[0213] 已经用构建体修饰的 CTL 在选择性条件下在培养基中生长,并且选择具有构建体的细胞然后可增殖并使用例如聚合酶链反应进一步分析以确定宿主细胞中存在构建体。一旦已经鉴定到修饰的宿主细胞,然后可根据计划使用它们,例如在培养中增殖或导入宿主生物体。

[0214] 根据细胞的性质,可以多种方式将细胞导入宿主生物体,例如哺乳动物。在具体实施方式中,可在肿瘤位点处导入细胞,但在替代性实施方式中,细胞定位到癌症或者经修饰定位到癌症。所采用的细胞数量将取决于多种情况、导入的目的、细胞的寿命、待使用的方案、给药的次数、细胞繁殖的能力、重组构建体的稳定性等。细胞可以分散体应用,通常注射到或接近感兴趣的位点。细胞可以在生理上可接受的基质中。

[0215] DNA 转导不需要在每种情况中产生整合。在一些情况中,导入的 DNA 的瞬时维持可能是足够的。通过这种方式,可能有短期效果,其中可将细胞导入宿主,然后在预定的时间后开启,例如,在细胞已经能够定位到特定位点之后。

[0216] 可根据需要给予细胞。根据所需的响应、给药方式、细胞寿命、存在的细胞数量,可采用多种方案。给药的次数将至少部分取决于上述因素。

[0217] 应理解,该系统易受许多因素的影响,如对配体的细胞响应、表达效率、以及适当地,分泌水平、表达产物的活性、患者的具体需求,这些可随着时间和环境变化,由于缺少细胞导致的细胞活性缺失率或单个细胞的表达活性等。因此,即使存在可大规模给予群体的通用细胞,预期对于各个体患者监测各患者的个体合适剂量,并且这类监测患者的实践在本领域中是常规的。

实施例

[0218] 纳入下列实施例以显示本发明的优选实施方式。本领域的普通技术人员应理解,根据本发明人揭示的技术,实施例中公开的技术能很好地用于实施本发明,从而可将其视为实施本发明的优选模式。但是,本领域技术人员根据本公开应理解,在不偏离本发明精神和范围的前提下,可对所公开的具体实施方式进行许多变化,同时仍能获得相同或类似的

结果。

[0219] 实施例 1

[0220] 初始研究

[0221] XII. 初始研究 / 初步数据

[0222] 已经开发了使用基于 CAR 的技术靶向 CD19、人免疫球蛋白的 κ -轻链和淋巴瘤中 CD30 的临床试验。该策略处于临床研究下,并且它们最近报道用 CAR. CD19 治疗的第一组患者。在本发明的实施方式中,使用 CAR 技术来靶向示例性血液癌症,该血液癌症还未被选择通过该方法治疗。

[0223] CAR. CD138- 重定向 T 细胞靶向 CD138+ 恶性 PC。发明人用如前所述的 IgG1 铰链-CH2CH3 区、CD28 内结构域和 ζ -链(第 2 代 CAR)克隆了框架内的 CD138- 特异性单链(scFv)。图 1 显示了 CAR. CD138 在激活的 T 淋巴细胞中的表达及其特异性杀伤 CD138+MM 细胞系(U266 和 RPMI)和原发性肿瘤 PC。

[0224] CAR. CD138⁺T 细胞控制体内 MM 生长。为了评价 CAR- 重定向 T 细胞的体内抗肿瘤效果,发明人已经在 SCID 小鼠中建立的异种移植模型,并且使用生物发光系统来追踪 MM 生长。对于这些实验,用萤火虫荧光素酶(FFLuc)标记的 U266 细胞(0.5×10^6 个细胞)静脉内注射小鼠。当肿瘤细胞可通过荧光持续检测时,用不含外源细胞因子的 CAR+T 细胞(10^7 细胞/小鼠)和对照静脉内注射小鼠。如图 2 所示,CAR+T 细胞提供了对 MM 生长的控制。

[0225] CAR. CD138 的低氧诱导型表达。为了生成低氧诱导型的 CAR. CD138,发明人将 CAR. CD138 的取向反转到 SFG 逆转录病毒骨架中,并包含在其 3' 末端与最小 CMV 启动子(克隆泰克公司(Clontech))融合的 6 个 HRE 重复。图 3 显示了在正常氧和低氧(1%氧压)下激活的 T 淋巴细胞中低氧诱导型的 CAR. CD138(hCAR. CD138) 的表达和功能。

[0226] 总之,这些初始研究显示了本发明的实用性。重要的是,在 HRE 控制下表达的 CAR. CD138 保留完整的抗-MM 功能。

[0227] 实施例 2

[0228] 示例性方法

[0229] 在先前的出版物(9,25)中完整描述了几种常规使用的方法。

[0230] 在本发明的实施方式中,通过在低氧应答元件(HRE)的诱导型控制下表达 CAR. CD138 来探索 MM BM 微环境的低氧性质。也可在异种移植小鼠模型中限定在体外和体内的低氧环境中用于 CAR T 细胞的共刺激的最优选免疫元件。最后,为了提高所述方法的安全性,本领域技术人员可基于诱导型胱冬酶 9(ic9)在构建体内加入先前验证的自杀基因。

[0231] 初始研究(图 1 和 2)清楚地显示组成型表达 CAR. CD138 的 T 细胞在异种移植小鼠模型中具有体外和体内抗 MM 效果。如图 3 所示,hCAR. CD138 在 T 细胞暴露于低氧时明显上调,并且这些细胞保持抗-MM 活性。这些研究中的 CAR. CD138 编码 CD28 共刺激内结构域。可在体外比较共刺激内结构域,包括 4-1BB 及其组合在低氧中的效果。可在小鼠模型中体内系列抗原刺激和抗肿瘤活性之后测量体外增殖、细胞因子释放和细胞毒活性(图 2)。另外,由于仍然能在正常氧下观察到微弱的 CAR 表达(图 3),可在载体的 3' 末端 LTR 和 HRE 之间包含绝缘子以进一步降低表达。在 hCAR. CD138 在 BM 低氧中的功能性表达之后,具有自我更新能力的 T 细胞可逃离 BM 环境并再循环,导致潜在毒性。由于 T 细胞下调 CAR 表达

需要 48-72 小时,当从低氧转移到正常氧时(在至少一些实施方式中),可在组成型启动子下共表达基于自杀型胱冬酶 9(iC9)的自杀基因,使得如果它们导致毒性时可快速被消除。iC9 基因可在 5' LTR 的组成型控制下以相反的取向包含于图 3 所述的逆转录病毒载体中。评价载体的体外和体内功能性。

[0232] 在本发明的实施方式中,有用的载体使得 CAR. CD138 在体外和体内的低氧下主导且功能性表达。另外,包含自杀基因预期在有毒性的情况下消除细胞。如果低氧下 CAR 的表达是功能上不足的,可能归咎于包含绝缘子的盒的大小(总 3.5kb)并且可将盒转移到慢病毒载体中,与逆转录病毒载体相比,其具有增加的容量。可采用逆转录病毒方法,因为这些载体的制备是稳健且高度可重复的,但在一些情况中采用慢病毒。

[0233] 在本发明的实施方式中,存在一种方法,该方法包括制备临床级逆转录病毒载体和从 MM 患者制备 CAR- 修饰的 T- 细胞系,并且将它们输注到复发 MM 的患者中。本领域技术人员可评价过程的安全性,并且,如果出现毒性,可给予二聚体药物以激活体内的 iC9 安全性基因。也可评价 T- 细胞输注是否在患有可检测疾病的患者中提供疾病对照。

[0234] 生产了编码 hCAR. CD138 和组成型 iC9 的稳定逆转录病毒生产细胞系。如前所述,可采用 PG13 包装。在核心描述中提供了制备生产细胞系的详细过程。从这种包装得到的临床级上清可用于转导来自 MM 患者得到的 PB 样品的 T 细胞。

[0235] 可评价增加的表达 hCAR. CD138 和 iC9 的淋巴细胞的剂量在患有复发 / 难治 MM 的患者中的效果(与其它实施方式相反,其可治疗响应标准一线治疗的患者)。可初步评价 3 个不同剂量水平下的 CAR-T 细胞的单次静脉内剂量。在用苯达莫司汀治疗后给予 T 细胞,因为该药物具有一定的抗 MM 活性并且可能产生对过继转移的 CAR T- 细胞的扩增有利的环境。

[0236] 可开发具有有效价 $>10^6$ /mL 的稳定生产细胞系。低氧下, T- 细胞转导效率的范围可以是 30% 至 40% (图 3)。重定向 T 细胞可在低氧下的共培养实验中消除 CD138+ 靶标并且可在体外暴露于 AP1903 (20-50nM) 24 小时内被快速消除 (>90% 转导的细胞), AP1903 是激活 iC9 自杀基因的小分子二聚体。

[0237] 在本发明的实施方式中,通过测量其体内存活来表征输注的 CAR-T 细胞的命运,并且可确定二聚化药物在体外和体内对这些细胞的后续影响。也可比较这些细胞在 BM 和外周血中的累积,各环境中 T 细胞的 CAR 差异表达以及它们杀死肿瘤细胞的能力。

[0238] 使用免疫表型和实时定量 PCR 试验 (Q-PCR) 在 T- 细胞输注之后在不同时间点上收集的 PB 中提取的 DNA 中评估转化的 T 细胞的持续性和增殖。在第 6 周收集 BM 样品作为对这些患者的临床评价的部分。间隔收集血样样品并速冻以检测体内 T 细胞释放的 IL-2、IL6、IFN γ 和 TNF α 。也可通过在例如第 6、12 和 24 周监测副蛋白水平和 PC BM 渗透来寻找抗肿瘤活性的临床证据。密切监测患者按照 NCI 标准出现的毒性。在 III-IV 级毒性的情况中,用 AP1903 处理患者以如前所述激活 iC9 基因。通过 QPCR 测量 CAR+ 循环细胞的损失和 iC9 转基因的变化来对 iC9 的效果进行定量。

[0239] 在第 6 周前检测到 PB 和 BM 样品中 CAR 的分子信号(其为低氧独立性的),虽然由于 CAR T 细胞的积累在 BM 中可能有较高的信号。预期通过流式细胞术测量的 T 细胞中 CAR 的表达(其是低氧依赖性的,由于其检测蛋白合成)在 BM 中远高于 PB,由于 MM BM 是含氧量低的。在具体实施方式中,如果在 PB 和 BM 中等量的 T 细胞在表型上是 CAR 阳性的,

这反映了低氧激活的 T 细胞的再循环而没有发生预期的 CAR 下调,而这预计发生在细胞回到正常氧环境时。可确定这种持续表达是否与毒性相关,如果与毒性相关,可确定是否可通过给予激活 iC9 自杀基因的 AP1903 来消除。iC9 的激活可在给予 AP1903 的 3 小时内消除 >90% 的 hCAR. CD138T。如果尽管给予 AP1903,副作用持续增加,则可给予额外剂量的药物和高剂量类固醇。在具体实施方式中,hCAR. CD138T 细胞的输注产生了肿瘤的显著减小。在一次剂量的 T 细胞不足以诱导完全缓解的事件中,可给予额外剂量的 T 细胞。

[0240] 在具体实施方式中,CAR. CD138 被移植到第三部分的 EBV- 特异性 CTL 中以制备对于患有 MM 的患者“现成 (off the shelf)”的产物,这是一种在非骨髓消融性同种异体干细胞移植 (可用于患有严重疾病的老年 MM 患者) 后有特别价值的方法。在一些实施方式中,使用导向 MM TAA 的 TCR 靶向其它肿瘤相关抗原 (MAGE, PRAME, 生存素)。在一些实施方式中,由 CAR 而不是 TCR 介导的第三种特异性的加入可显著降低由于 HLA 分子表达 / 抗原加工或抗原的缺失而导致的肿瘤逃逸。可将 CD138scFv 表达为可分泌的“接合”蛋白。

[0241] 实施例 3

[0242] 用于渐进性浆细胞病的表达 CD138- 特异性 CAR 的 T 细胞的研究

[0243] 在本发明的实施方式中,可评价递增剂量的自体同源或同系的激活的外周血 T 淋巴细胞 (ATL) 的安全性,该 T 淋巴细胞经遗传修饰表达 (a) 在低氧依赖性启动子下靶向 CD138 分子的人工 T- 细胞受体 (嵌合抗原受体或 CAR) (CD138. CAR), 和 (b) 组成型激活启动子下的诱导型胱冬酶 -9 (iC9) 自杀蛋白。本发明的方法的具体实施方式包括 (1) 测量这些 CD138. CAR-ATL 在体内的存活和功能;(2) 对 CD138. CAR-ATL 在患有难治浆细胞病的患者中的抗肿瘤效果进行定量,由改进的国际骨髓瘤工作组 (IMWG) 统一应答标准来评价临床应答;和 (3) 如果出现毒性,通过测量来自外周血的转基因阳性细胞的消失来评价给予 AP1903 的功效,其为用于激活自杀基因的二聚体。

[0244] 在初始研究的至少一些情况中,存在对 T 细胞治疗的示例性合格标准。(1) 难治 / 复发浆细胞病 (或新诊断的,如果患者不能接受或完成标准治疗);(2) 至少 12 周的寿命延长;(3) 足够的器官功能;(4) 由流式细胞术确定的具有 >20% 的 CD138. CAR/iC9 表达的可用的自体同源转导的外周血 T 细胞;(5) 签字的知情同意书;(6) 对含鼠蛋白的产品没有超敏反应史。

[0245] 治疗计划的示例。苯达莫司汀的给予。患者接受苯达莫司汀 (例如,45mg/m²每天持续 2 天) 以产生对输注的 CAR+T 细胞的淋巴消耗和有利移植。

[0246] 苯达莫司汀也可能具有优先的抗骨髓瘤效果。T 细胞给予。在苯达莫司汀治疗后第 4-7 天输注 T 细胞以最大化其对包括 IL-7 和 IL-15 的再生细胞因子的发育环境的暴露。使用改良的连续重新估计方法评估 3 种剂量水平并且各剂量水平招募 2 个一组。各患者按照以下给药计划接受一次注射:组 1, 2×10⁷ 个细胞 /m²;组 2, 1×10⁸ 个细胞 /m²;组 3, 2×10⁸ 个细胞 /m²。在没有直接毒性的情况下,可获得给予顺序剂量的 T 细胞的允许,这是示例性前述研究中的策略。

[0247] 监测临床和生物参数。可监测某些参数并包括病史和生理检查以及在 T- 细胞输注前和 T 细胞输注后 4 小时及 1、2、4、6 周时进行的常规实验室观察。还可通过如用于其它设计检测逆转录病毒部分的研究所述的特定 Q-PCR 试验监测 CAR+T 细胞的持续性。按照 FDA 指南进行复制型逆转录病毒的检测 (PCR) 和逆转录病毒部分克隆性的检测。采用治疗

前和治疗后 6 周的疾病负荷评估,包括 BM。

[0248] 剂量限制性毒性 (DLT)。可按照可被认为大概、可能或明确与修饰的 T 细胞相关的以下任意来定义 DLT:(1) 任何 3 级或 4 级非血液毒性;(2) 任何 4 级血液 DLT(血细胞减少症用苯达莫司汀进行预期并且不被认为是 DLT;患有广泛骨髓病变的患者不可评估血液 DLT)。如果出现非血液 DLT,将用一次剂量的二聚体药物 (0.4mg/kg) 治疗患者并且研究其对循环基因修饰的 T 细胞的影响。如果在 48 小时内毒性没有降低,方案将使用最高 3 次额外剂量的二聚体药物与类固醇的组合(每天 1mg/kg 的甲泼尼龙)。

[0249] 研究终止。当最少 10 个患者得到治疗而 6 个患者增加至现有剂量,如果没有 DLT 时,或者当可预测的 DLT 概率 >20% 时,可终止试验。最大 18 个患者可获得治疗。使用 NCI (CTCAE) 评估毒性。在具体实施方式中,6 周的时间构成疗程并且作为评价 DLT 的基础。

[0250] 实施例 4

[0251] CD138CAR T- 细胞在体外和体内有效

[0252] 通过体外和体内测量,本发明的实施例显示示例性 CD138- 特异性 CAR T- 细胞对肿瘤细胞是有效的。

[0253] 图 4 证明 CAR. CD138 可在来自健康供体和多发性骨髓瘤 (MM) 样品的 T 细胞中高效和稳定地表达。如图 4D 所示,来自健康供体的对照和转导 T 细胞都含有均衡比例的 CD3⁺CD8⁺T 细胞 (57% ± 26% 和 54% ± 14%) 和 CD3⁺CD4⁺T 细胞 (35% ± 17% 和 37% ± 13%), 而来自 MM 患者的 T 细胞更偏向含有 CD8⁺ 细胞 (80% ± 10%)。来自健康供体和 MM 患者的转导 T 细胞含有与离体增殖过程相容的一定比例的记忆和效应记忆细胞 (CD45RO⁺: 分别为 82% ± 16% 和 79% ± 9%; CD62L⁺ 分别为 51% ± 17% 和 42% ± 14%)。

[0254] 在图 5 中, CAR. CD138⁺T 细胞靶向 CD138⁺ 肿瘤细胞系。来自健康供体的表达 CAR. CD138 的 T 细胞以比标准 51Cr 释放试验中的对照 T 细胞明显高的比率裂解选择的 CD138⁺MM- 衍生的细胞系 (图 5A, 5D)。当从 MM 患者生成转导 T 细胞时,观察到相似的杀伤图案 (图 5B)。相反, CAR. CD138⁺T 细胞具有针对特定 CD138⁻ 靶标 (图 5A, 5B, 5D) 或对照 T 细胞 (图 5C) 的可忽略的活性。

[0255] 图 6 证明 CAR. CD138⁺T 细胞在共培养实验中消除 CD138⁺ 肿瘤细胞。为了评价 CAR. CD138⁺ 消除 CD138⁺ 肿瘤细胞的长期能力,在没有外源性细胞因子的情况下, CAR⁺ 或对照 T 细胞与 CD138⁺ 肿瘤细胞或 CD138⁻ 肿瘤细胞共培养 (图 6A); 通过 FACS 分析在 5-7 天后对残留的肿瘤细胞进行计数。在 CAR⁺T 细胞存在的条件下 CD138⁺ 肿瘤完全消除,而肿瘤细胞在含对照 T 细胞的培养中过度生长。

[0256] CAR. CD138⁺T 细胞显示响应肿瘤细胞的 Th1 概况 (图 7)。为了评价 CAR. CD138⁺ 的细胞因子概况, CAR⁺ 或对照 T 细胞与 CD138⁺ 或 CD138⁻ 肿瘤细胞共培养。在 24 小时后收集培养上清并分析特定 Th1 和 Th1 细胞因子的存在。

[0257] CAR. CD138⁺T 细胞靶向推定的癌症干细胞 (图 8)。为了确保该方法也靶向推定的癌症干细胞,通过由 RPMI-8266 肿瘤细胞中含有的 SP 细胞研究 CD138 的表达,然后监测该亚组是否也可被 CAR⁺T 细胞有效消除。在与对照 T 细胞的共培养中,不仅 RPMI-8266 细胞仍然存在,而且平均 6% 的 SP 细胞也仍然存在 (图 8A, 8B)。相反,在与 CAR⁺T 细胞的培养中, RPMI 细胞明显减少且没有可检测的 SP 细胞 (图 8A, 8B)。为了进一步确认这一能力,直接从 RPMI 细胞系中分选 SP 细胞并与对照或 CAR⁺T 细胞培养 (图 8C)。仅在转导的 T 细胞存

在下, SP 细胞分选的细胞被完全消除。

[0258] 图 9 显示 CAR. CD138⁺T 细胞靶向原发性骨髓瘤细胞。与对照 T 细胞相反, 从健康供体生成的 CAR⁺T 细胞成功地消除了来自 MM 患者的 CD138 选择的肿瘤细胞 (<80% 倍数降低) (图 9A)。在图 9B 中, 类似地, 与对照 T 细胞相比, 自体同源 CAR⁺T 细胞消除了原发性 MM 细胞, 并且这些实验中的细胞因子概况与 Th1 相一致 (图 9C)。

[0259] 图 10 证明 CAR. CD138⁺T 细胞具有体内抗肿瘤活性。NSG 小鼠接受静脉内给予 4×10^6 个萤火虫荧光素酶标记的 OPM-2 细胞, 之后是 3 次用 CAR. CD138⁺T 细胞的静脉内输注 (1×10^7)。在第 23 天开始进行 Bioluminescent 成像 (BLI) 以监测肿瘤生长。图 10A 显示用 BLI 测定的每只小鼠的平均光子 / 秒 / cm^2/sr , 比较了用对照 T 细胞或 CAR. CD138⁺T 细胞治疗的小鼠。3 次独立实验的汇总。图 10B 显示了用 CAR. CD138⁺T 细胞或对照 T 细胞治疗的小鼠的卡普兰 - 迈耶存活曲线 ($p < 0.01$)。

[0260] 在图 11 中, 存在低氧可诱导 CAR. CD138 (HRE. CAR. CD138) 的生成和功能。图 11A 提供了在逆转录病毒载体中编码的 HRE. CAR. CD138 的示意图。对照、组成型 CAR. CD138⁺或 HRE. CAR. CD138⁺T 细胞在正常氧或低氧下与 CD138⁺靶标共培养 (图 11B)。在培养 4 天后, 收集细胞并用 CD3 和 CD138 染色以评价肿瘤细胞的生长。也评价 T 细胞上 CAR 的表达。HRE. CAR. CD138⁺T 细胞在低氧条件下消除肿瘤细胞。(图 11C) 对照、组成型 CAR. CD138⁺或 HRE. CAR. CD138⁺T 细胞被标记并在正常氧或低氧下与 CD138⁺靶标共培养。在 4 天的培养后, 收集细胞, 用 CD3 染色并通过流式细胞术测量 CFSE 的稀释。HRE. CAR. CD138⁺T 细胞在低氧条件下增殖。

[0261] 尽管已经详细描述了本发明和其优势, 但是应当理解, 可对本文进行各种变化、替代和改变而不背离所附权利要求所定义的本发明的精神和范围。此外, 本申请的范围不是旨在限制于本说明书所述的形式、手段、方法和步骤的过程、机器、制造、组合物的具体实施方式。本领域普通技术人员通过本发明的内容将容易理解, 现存或后续开发的与本文所述相应实施方式实施基本相同功能或实现基本相同结果的形式、手段、方法、或步骤的过程、机器、制造、组合物均可使用。因此, 所附权利要求旨在将形式、手段、方法、或步骤的过程、机器、制造、组合物包括在其范围内。

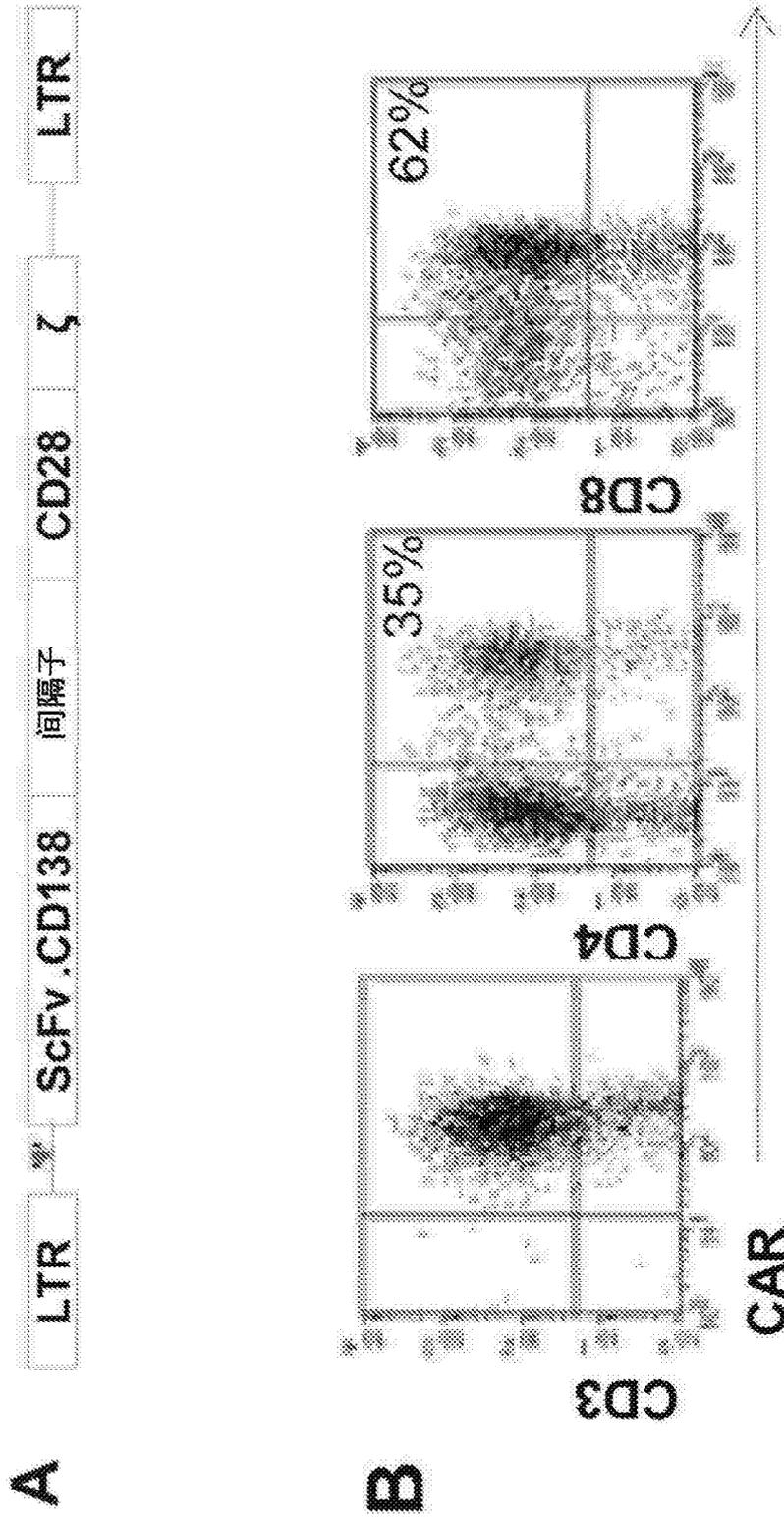


图 1a

图 1b

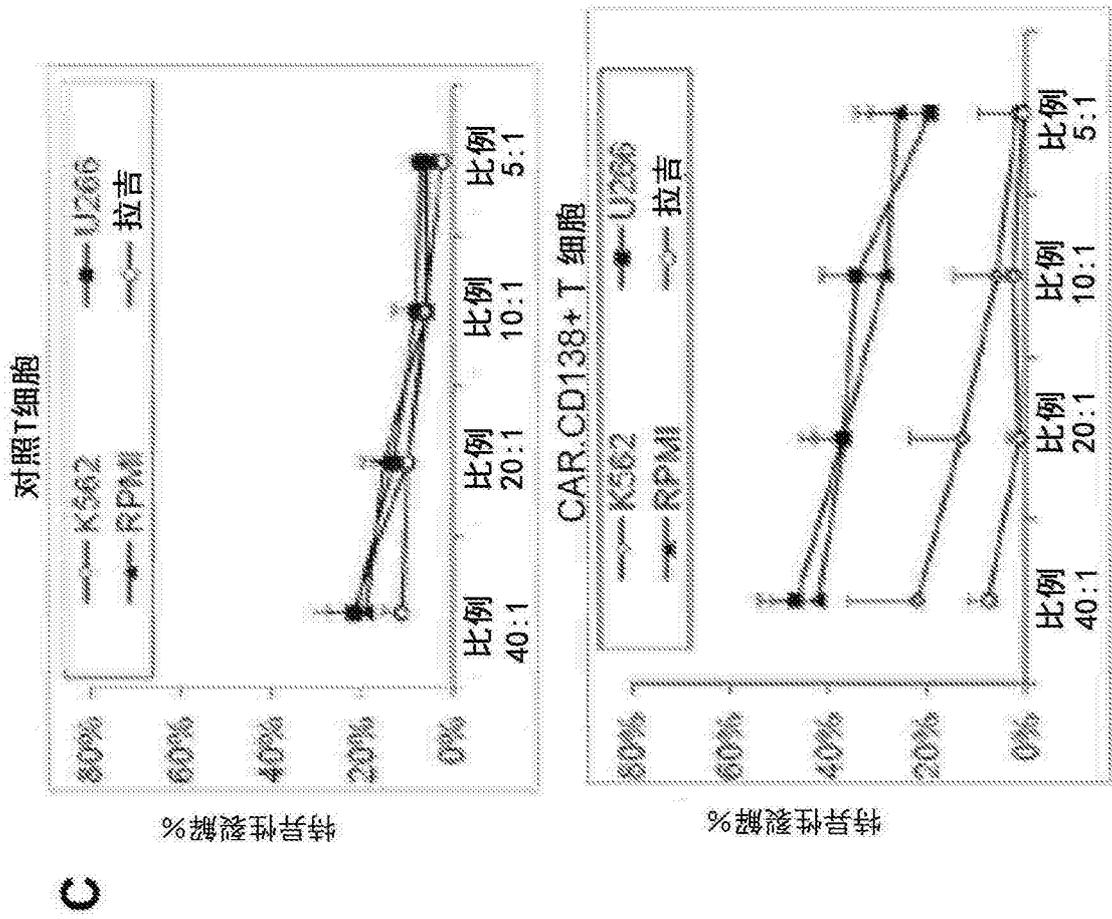


图 1c

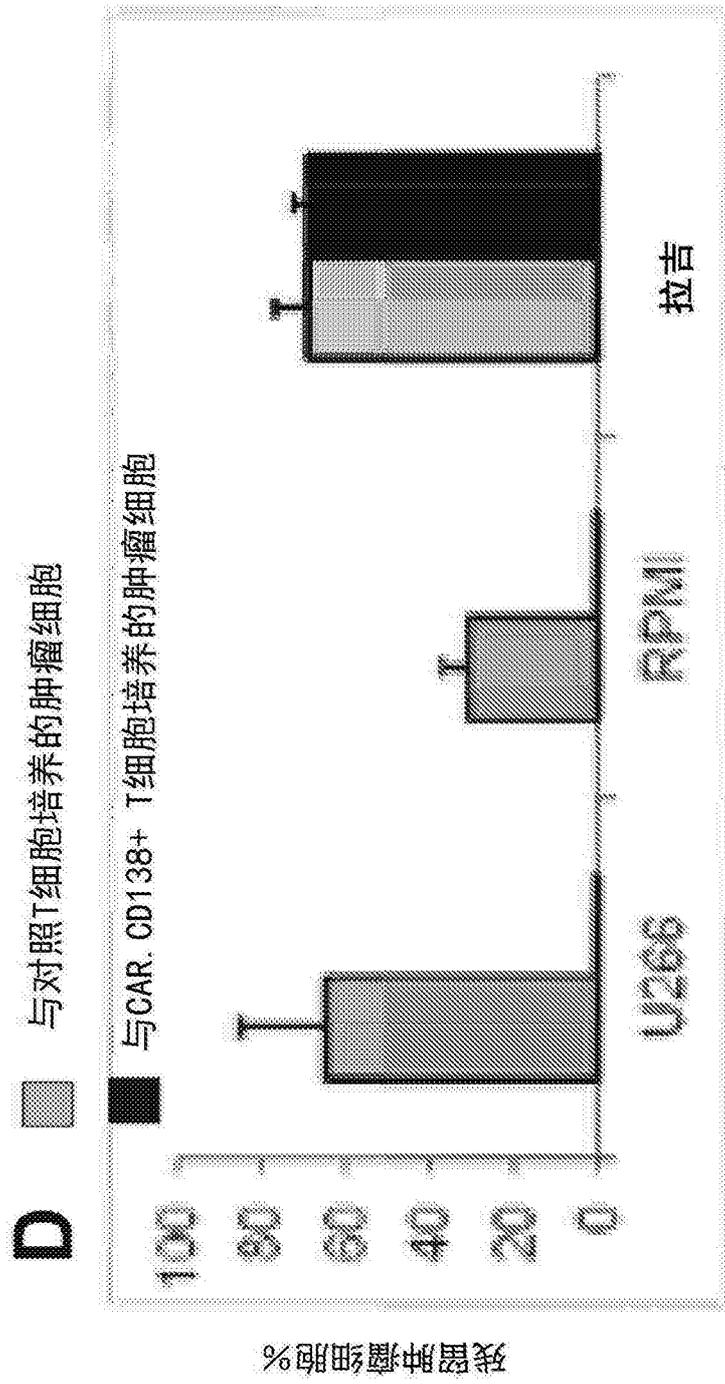


图 1d

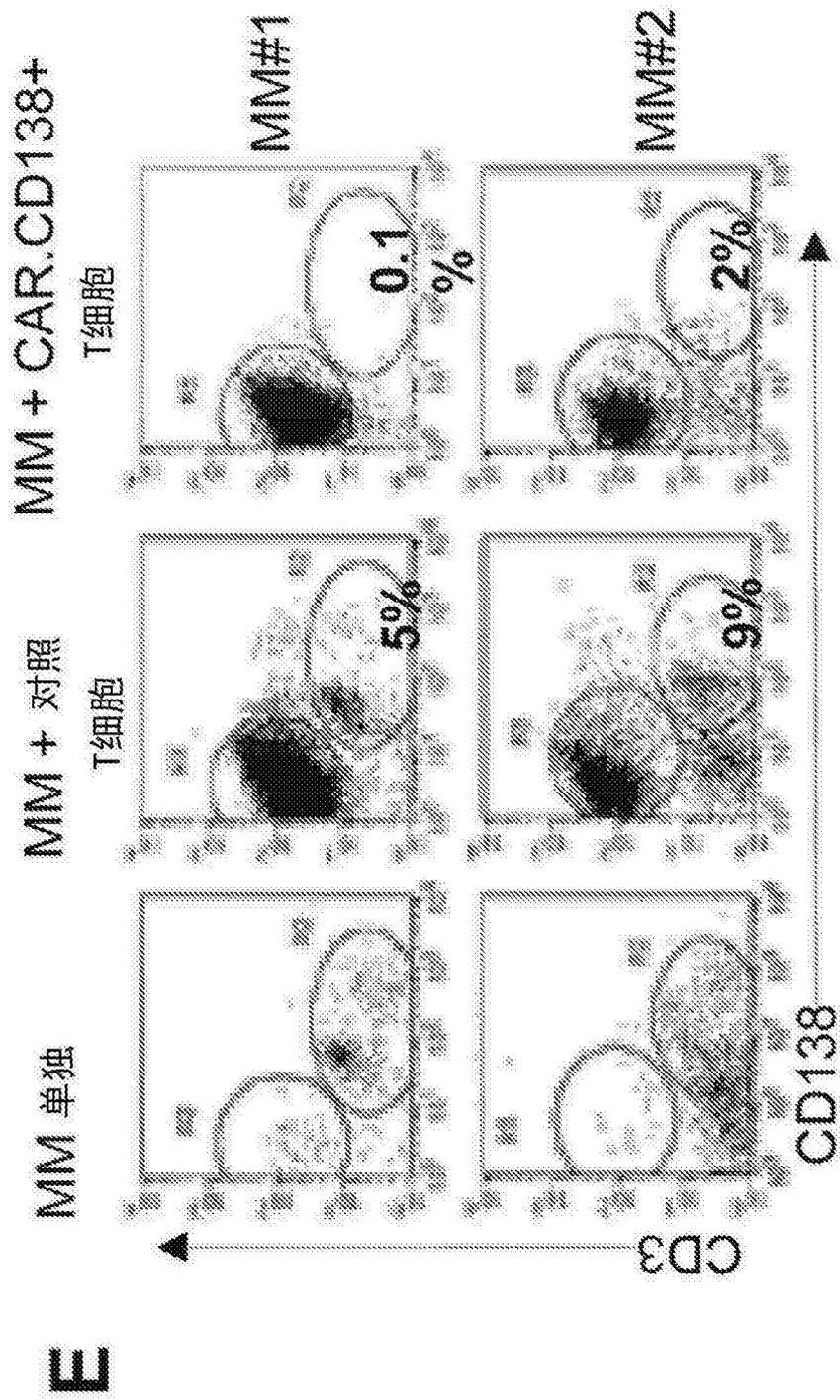


图 1e

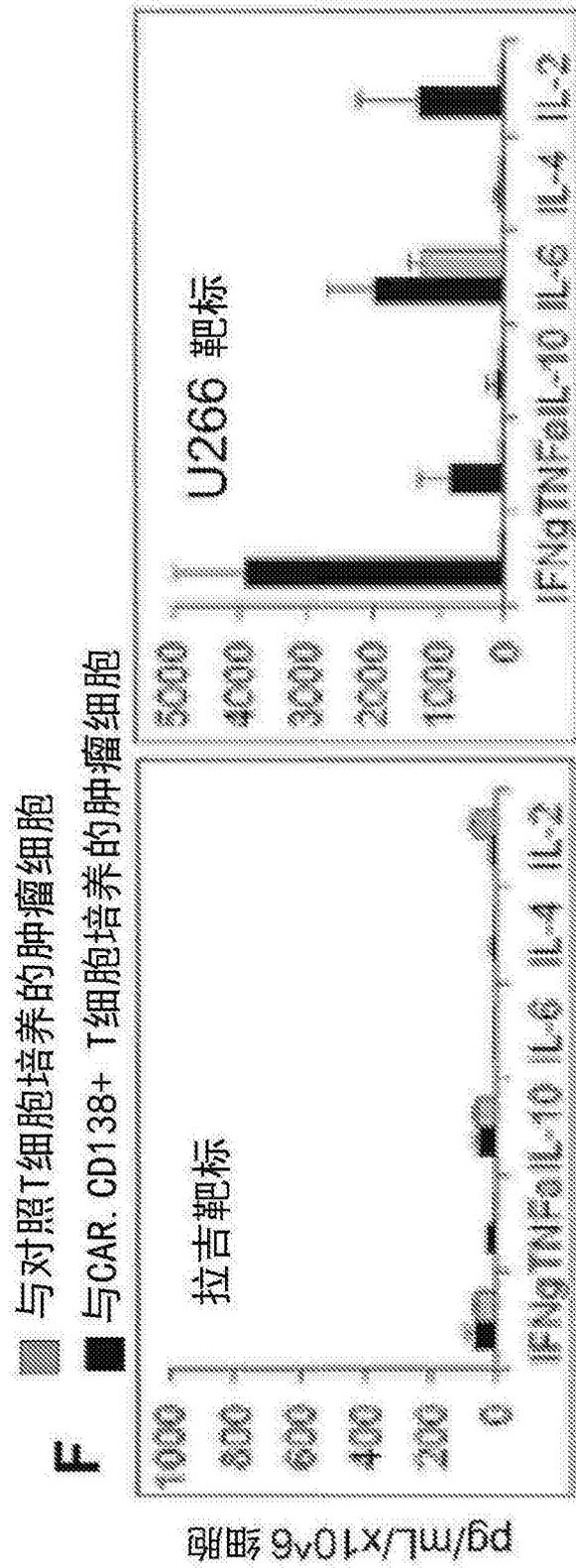


图 1f

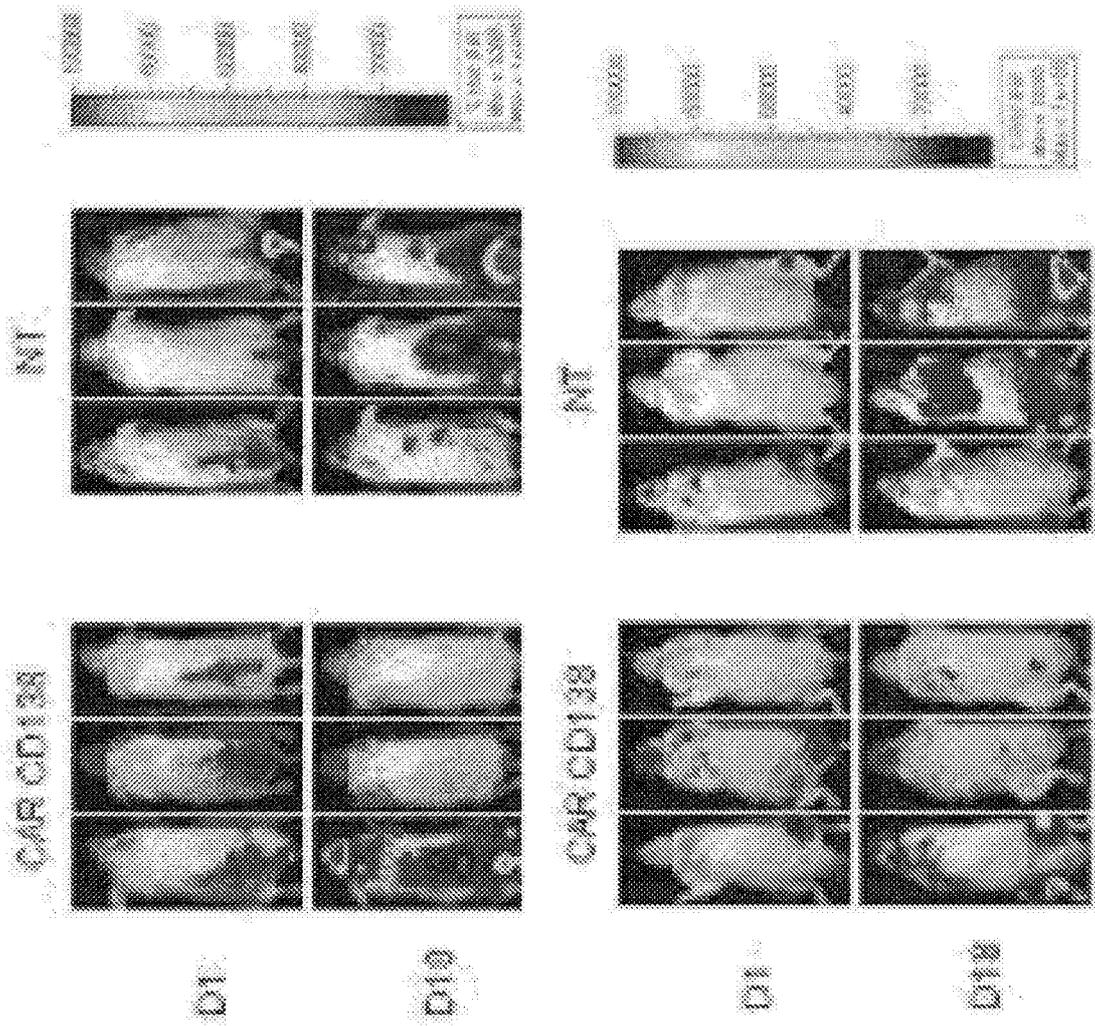


图 2a

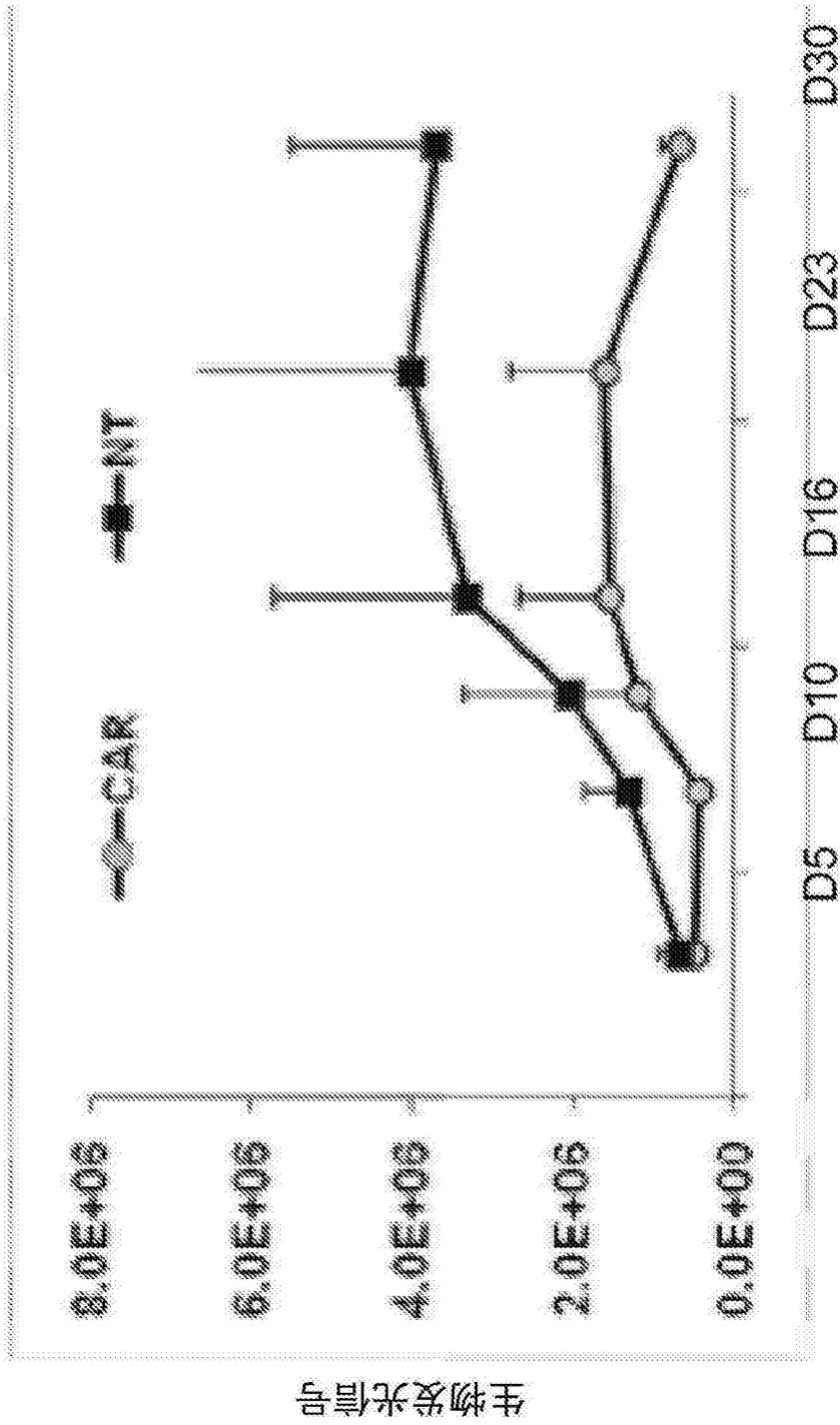


图 2b

A

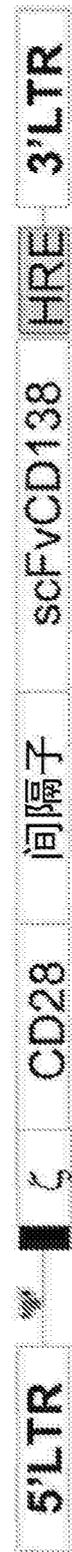


图 3a

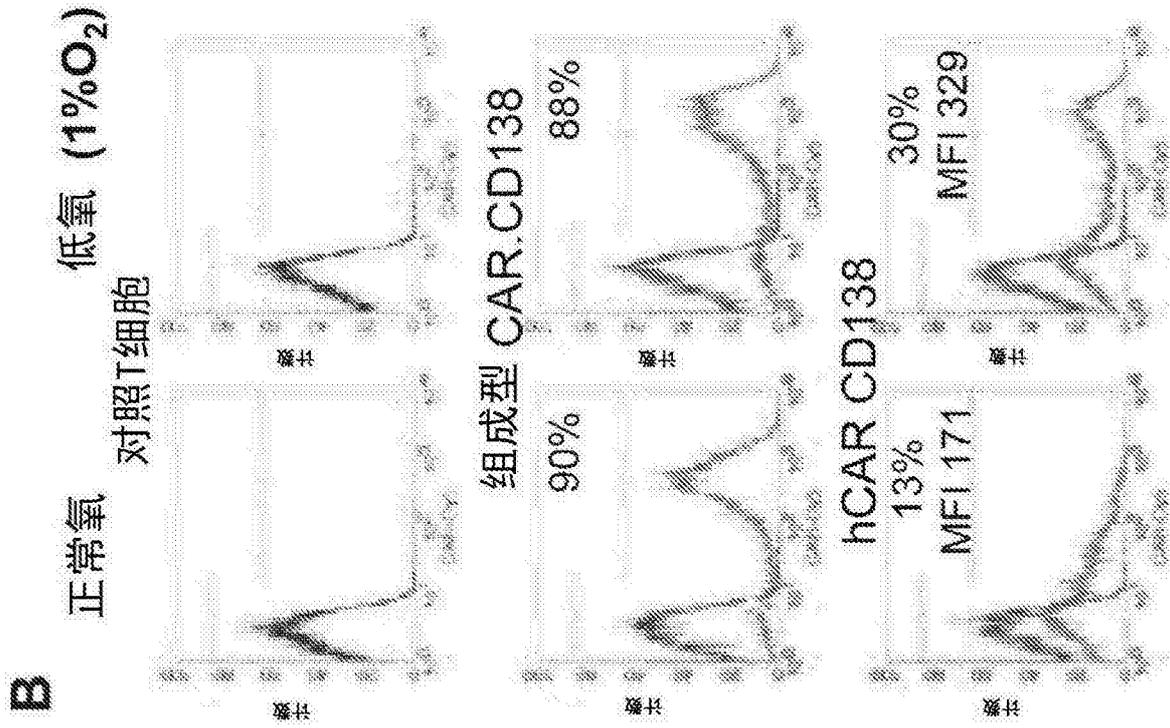


图 3b

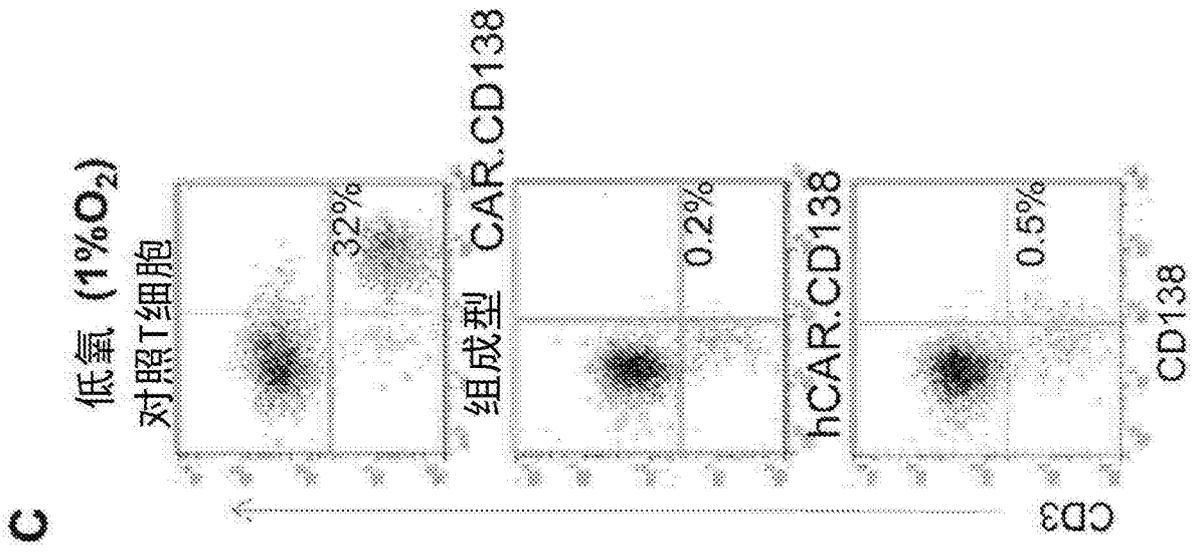


图 3c

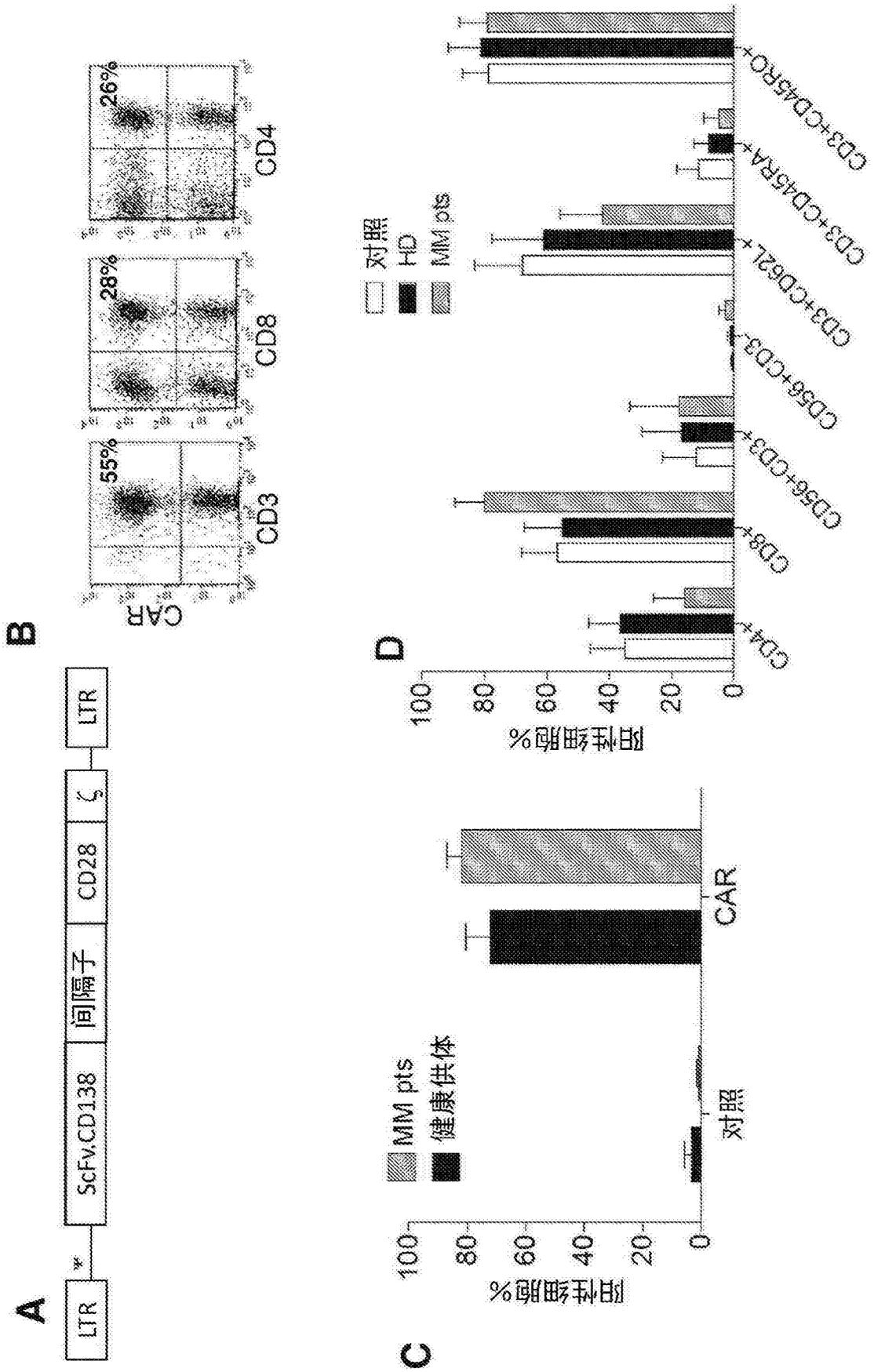


图 4

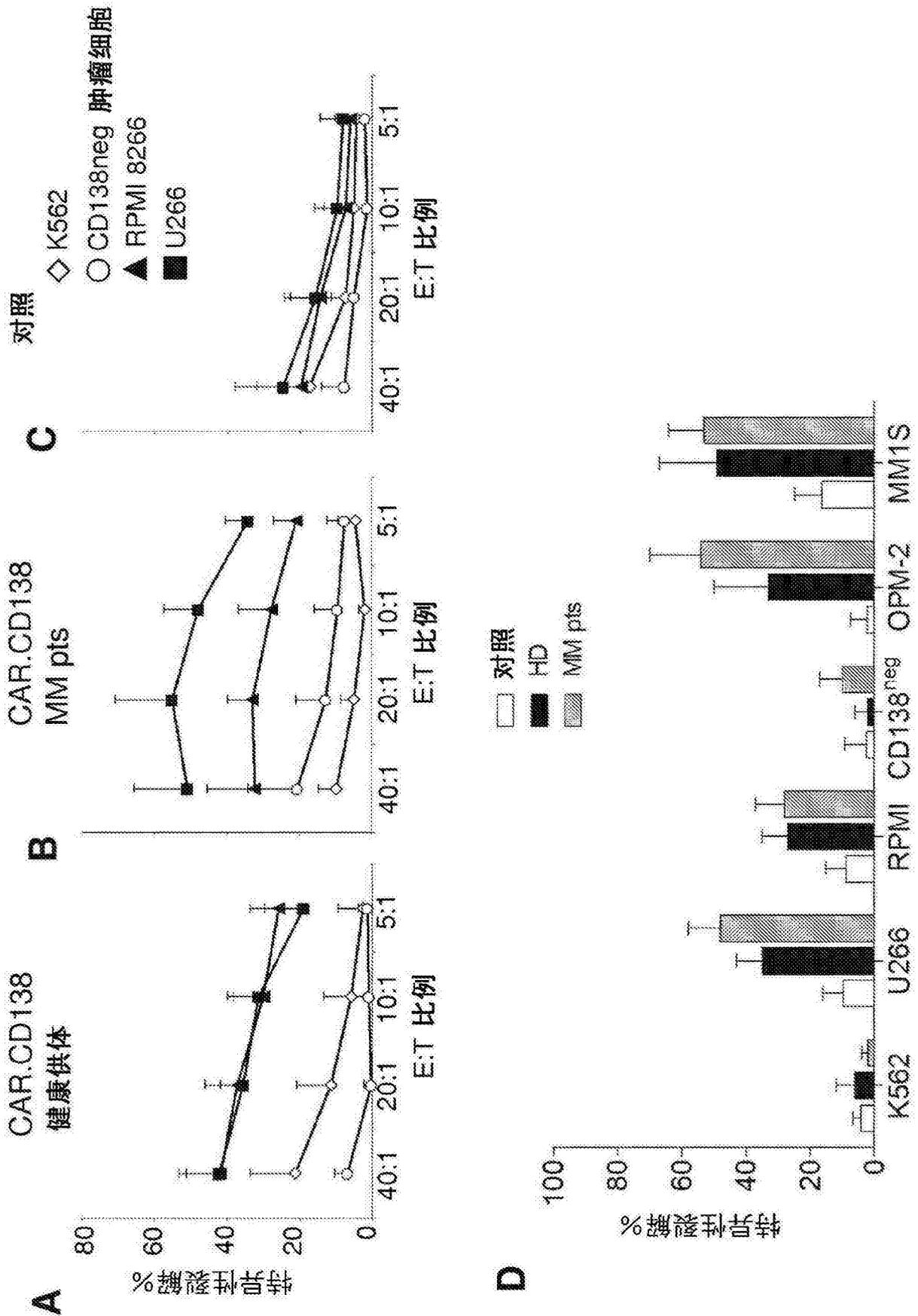


图 5

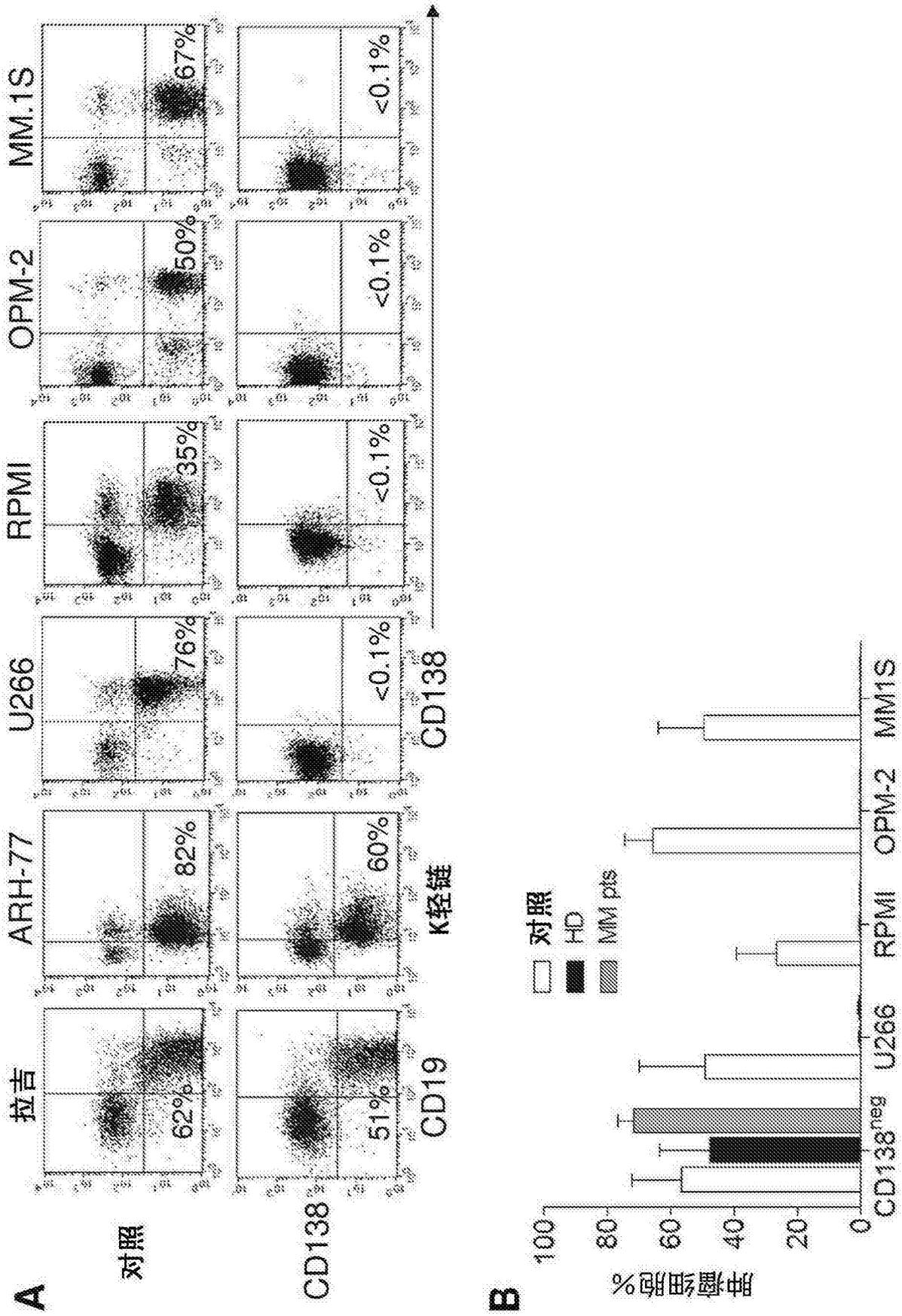


图 6

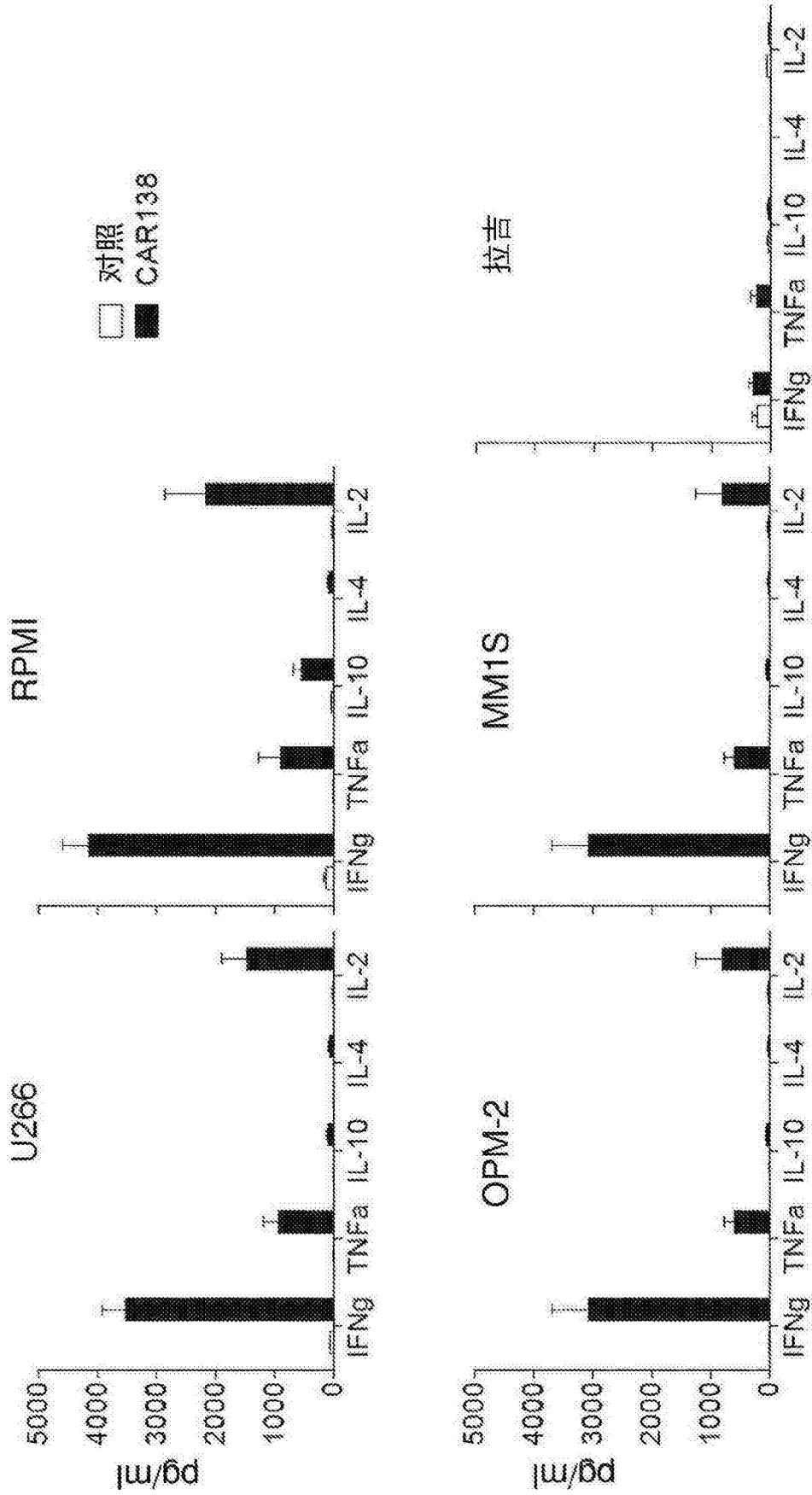


图 7

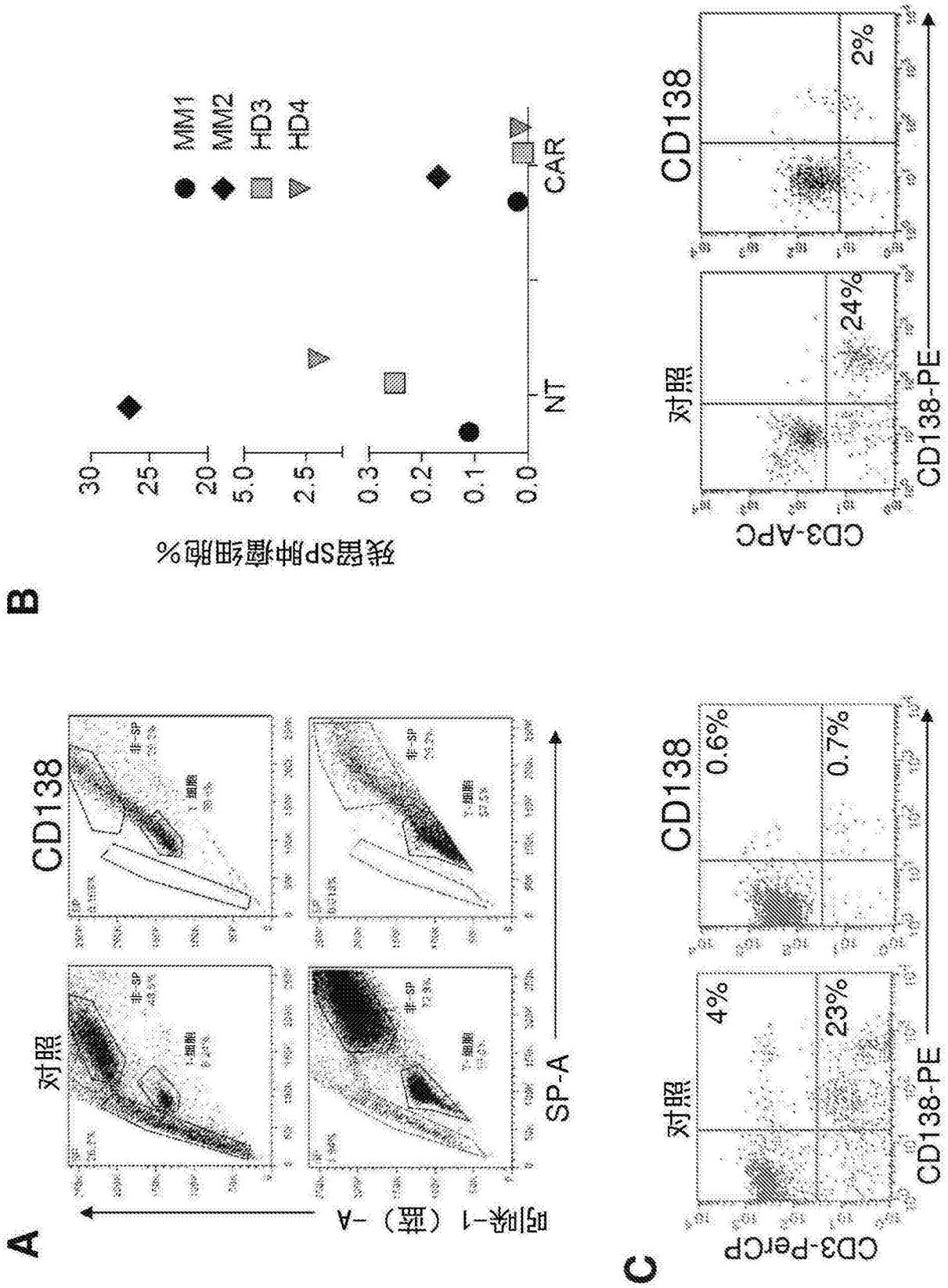


图 8

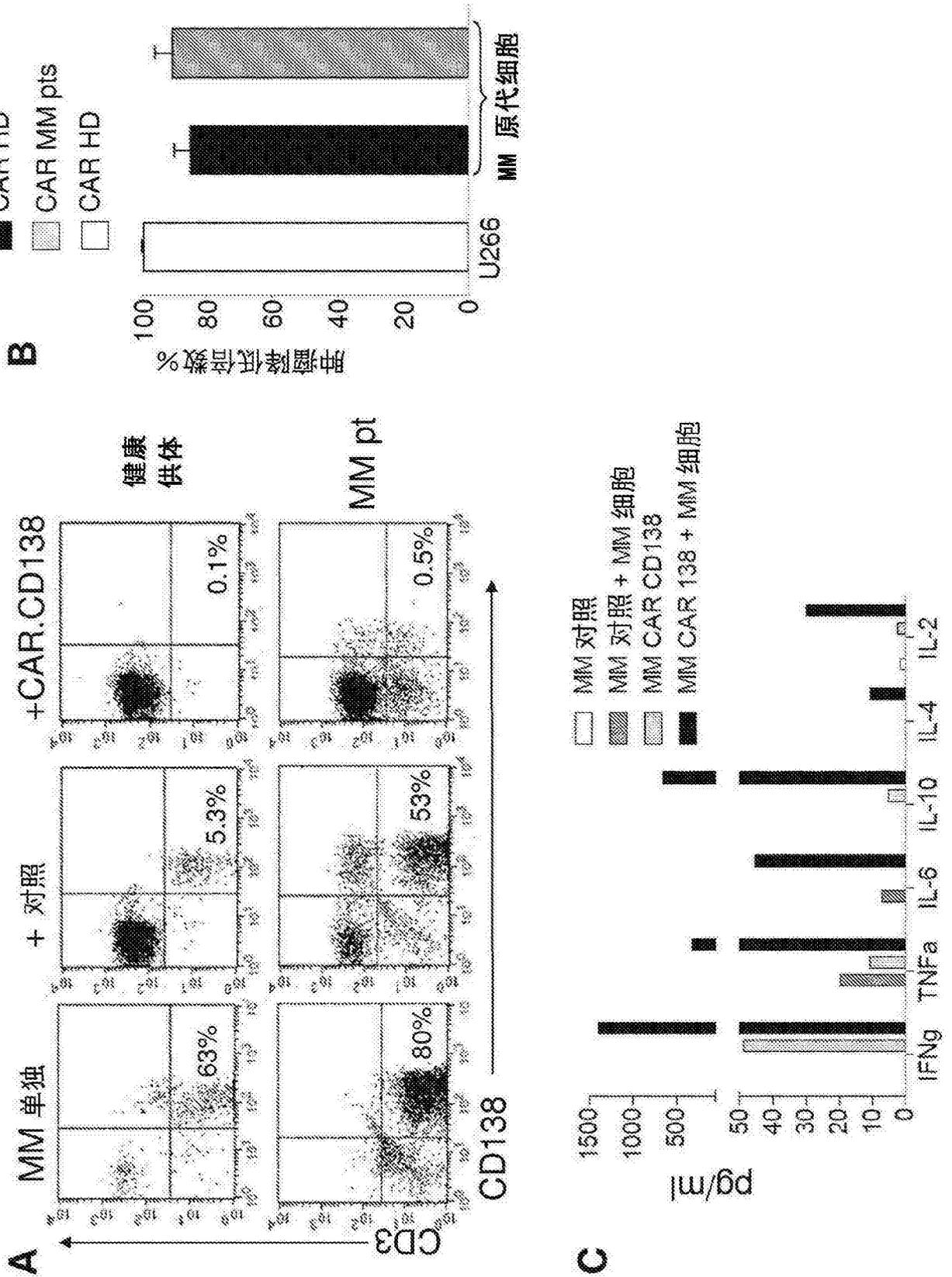


图 9

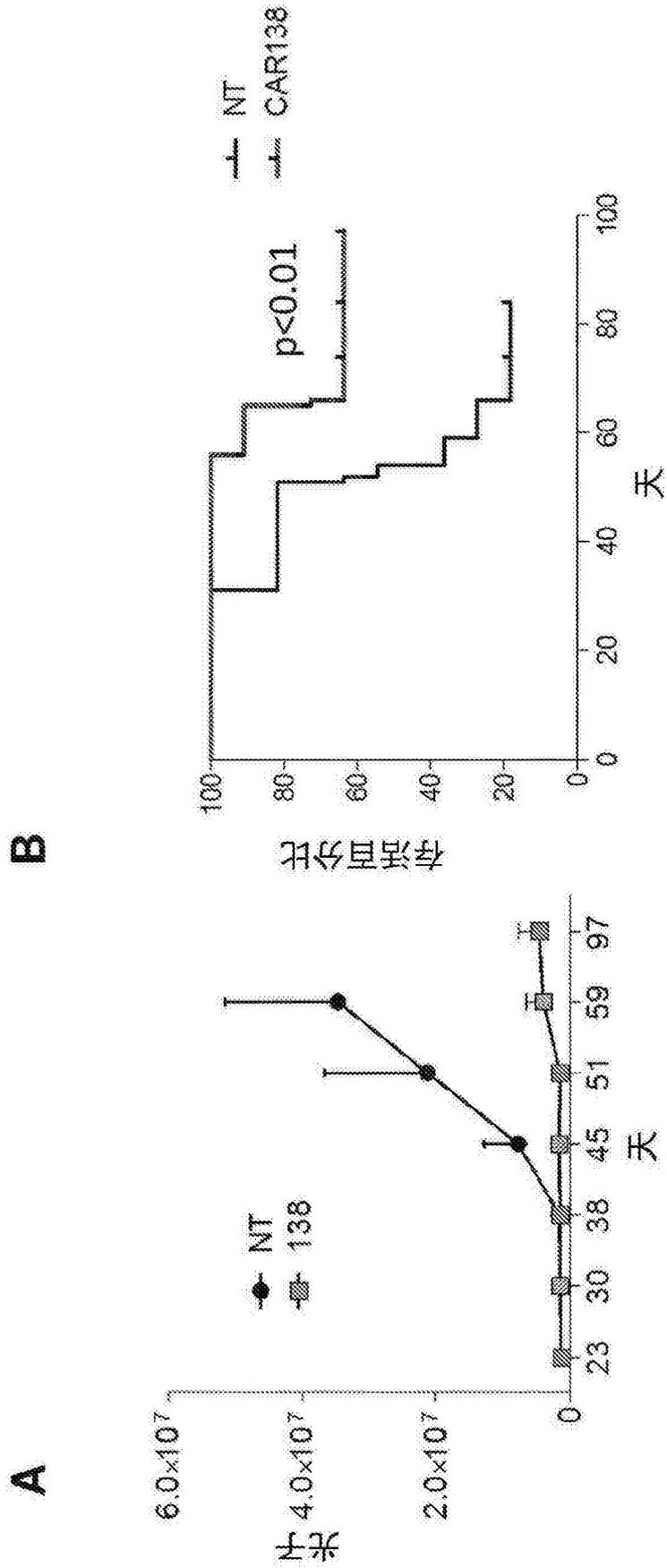


图 10

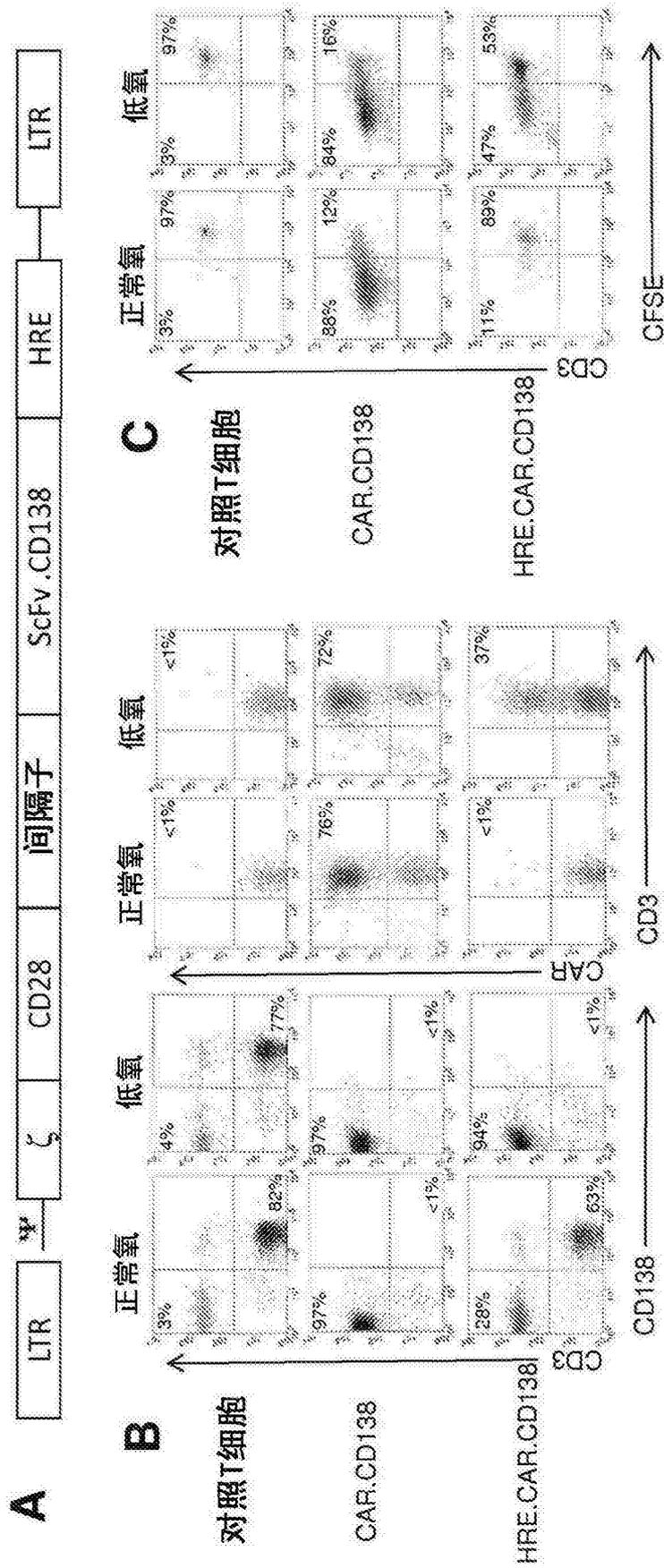


图 11