



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119365202 A

(43) 申请公布日 2025. 01. 24

(21) 申请号 202380047510.1

(22) 申请日 2023.04.13

(30) 优先权数据

63/331,758 2022.04.15 US

63/341,995 2022.05.13 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.12.16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/065710 2023.04.13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/201288 EN 2023.10.19

(71) 申请人 总医院有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 M·V·毛斯 M·莱克

(74) 专利代理机构 北京市君合律师事务所
11517

专利代理师 黄遵玲 顾云峰

(51) Int.Cl.

A61K 35/17 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

权利要求书3页 说明书37页

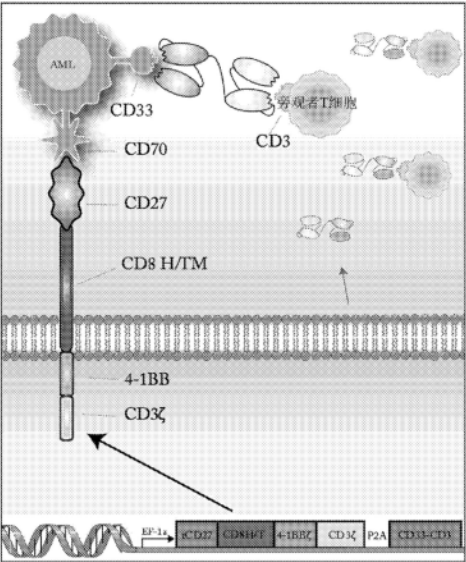
序列表(电子公布) 附图46页

(54) 发明名称

包含结合CD33的T细胞接合抗体分子的结合
CD70的CAR-T细胞

(57) 摘要

本公开涉及用于治疗癌症的方法和组合物, 其特征在于包含与CD70结合的嵌合抗原受体 (CAR) 和与CD33结合的T细胞接合抗体分子 (TEAM) 的细胞; 核酸分子, 所述核酸分子编码与CD70结合的嵌合抗原受体 (CAR) 和/或与CD33结合的TEAM; 以及与其相关的组合物和方法。



1. 一种细胞,其包含嵌合抗原受体 (CAR) 和T细胞接合抗体分子 (TEAM),所述CAR与CD70结合,所述TEAM与CD33结合。
2. 根据权利要求1所述的细胞,其中所述细胞是免疫细胞。
3. 根据权利要求2所述的细胞,其中所述免疫细胞是T细胞、NK细胞、树突状细胞、巨噬细胞、B细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞、髓源性抑制细胞、间充质干细胞、其前体或组合。
4. 根据权利要求3所述的细胞,其中所述免疫细胞是T细胞。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的细胞,其中所述细胞取自受试者,任选地取自人类受试者。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的细胞,其中所述CAR包含:
 - (i) 细胞外靶结合结构域,所述细胞外靶结合结构域包含与CD70结合的多肽;
 - (ii) 跨膜结构域;以及
 - (iii) 细胞内信号传导结构域。
7. 根据权利要求6所述的细胞,其中所述细胞外靶结合结构域包含CD27的CD70结合结构域。
8. 根据权利要求7所述的细胞,其中细胞外靶结合结构域包含CD27的细胞外结构域。
9. 根据权利要求8所述的细胞,其中所述细胞外靶结合结构域包含与SEQ ID NO:1、8或9中任一个的氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列。
10. 根据权利要求9所述的细胞,其中所述细胞外靶结合结构域包含SEQ ID NO:1、8或9中任一个的氨基酸序列。
11. 根据权利要求6所述的细胞,其中所述细胞外靶结合结构域包含抗CD70抗体,任选地scFv。
12. 根据权利要求6至11中任一项所述的细胞,其中所述跨膜结构域是CD27的跨膜结构域。
13. 根据权利要求6至12中任一项所述的细胞,其中所述细胞内信号传导结构域包含(i) 含ITAM的信号传导结构域和/或(ii) 来自一种或多种共刺激蛋白或细胞因子受体的一个或多个信号传导结构域。
14. 根据权利要求13所述的细胞,其中所述细胞内信号传导结构域包含CD3 γ 结构域、CD3 ϵ 结构域、CD3 δ 结构域或CD3 ζ 结构域。
15. 根据权利要求14所述的细胞,其中所述细胞内信号传导结构域包含CD3 ζ 结构域。
16. 根据权利要求6至15中任一项所述的细胞,其中所述共刺激结构域包含CD28结构域、4-1BB结构域、2B4结构域、KIR结构域、OX40结构域、ICOS结构域、MYD88结构域、IL2受体结构域或SynNotch结构域。
17. 根据权利要求16所述的细胞,其中所述共刺激结构域包含4-1BB结构域。
18. 根据权利要求1至17中任一项所述的细胞,其中所述细胞外靶结合结构域进一步包含信号肽,任选地其中所述信号肽包含CD27信号肽。
19. 根据权利要求1至18中任一项所述的细胞,其中所述CAR包含与SEQ ID NO:2-7中任一个的氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列。
20. 根据权利要求1至19中任一项所述的细胞,其中所述CAR包含SEQ ID NO:2-7中任一

个的氨基酸序列。

21. 根据权利要求1至20中任一项所述的细胞,其中所述TEAM包含抗CD33抗体或其功能片段。

22. 根据权利要求21所述的细胞,其中所述抗CD33抗体选自由以下组成的组:片段抗原结合区(Fab区)、单链可变片段(scFv)、双功能抗体、纳米抗体或单克隆抗体。

23. 根据权利要求21或权利要求22所述的细胞,其中所述抗CD33抗体是scFv。

24. 根据权利要求21至23中任一项所述的细胞,其中所述抗CD33抗体包含VH结构域和/或VL结构域,所述VH结构域具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列,所述VL结构域具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列。

25. 根据权利要求24所述的细胞,其中所述VH结构域是所述VL结构域的N末端。

26. 根据权利要求24所述的细胞,其中所述VL结构域是所述VH结构域的N末端。

27. 根据权利要求1至26中任一项所述的细胞,其中所述TEAM包含免疫细胞结合部分,任选地所述免疫细胞结合部分与CD3、CD8、CD4、CXCR3、CCR4、GARP、LAP、CD25、CTLA-4或CD16结合。

28. 根据权利要求27所述的细胞,其中所述免疫细胞结合部分选自由以下组成的组:片段抗原结合区(Fab区)、单链可变片段(scFv)、双功能抗体、纳米抗体或单克隆抗体。

29. 根据权利要求27或权利要求28所述的细胞,其中所述免疫细胞结合部分是抗CD3scFv。

30. 根据权利要求27至29中任一项所述的细胞,其中所述TEAM包含连接子,所述连接子位于所述抗CD33抗体与所述免疫细胞结合部分之间。

31. 根据权利要求30所述的细胞,其中所述连接子是不可切割的连接子,任选地是(GGGGS)₃(SEQ ID NO:27)连接子。

32. 根据权利要求1至31中任一项所述的细胞,其中所述TEAM进一步包含分泌标签,任选地包含IgK分泌标签。

33. 根据权利要求1至32中任一项所述的细胞,其中所述TEAM包含与SEQ ID NO:17-18中任一个至少85%相同的氨基酸序列。

34. 根据权利要求1至33中任一项所述的细胞,其中所述细胞包含多核苷酸分子,所述多核苷酸分子包含编码SEQ ID NO:17-18中任一个的氨基酸序列的核酸序列。

35. 根据权利要求1至34中任一项所述的细胞,其中编码所述TEAM的所述核酸序列是经密码子优化的。

36. 根据权利要求1至35中任一项所述的细胞,其包含第一多核苷酸分子和第二多核苷酸分子,所述第一多核苷酸分子包含编码所述CAR的核酸序列,所述第二多核苷酸分子包含编码所述TEAM的核酸序列。

37. 根据权利要求1至35中任一项所述的细胞,其包含多核苷酸分子,所述多核苷酸分子包含编码所述CAR的核酸序列和编码所述TEAM的核酸序列。

38. 根据权利要求37所述的细胞,其中所述多核苷酸分子进一步包含编码连接子的核酸序列,所述编码连接子的核酸序列位于所述编码所述CAR的核酸序列与所述编码所述TEAM的核酸序列之间,任选地其中所述连接子是可切割的连接子。

39. 根据权利要求38所述的细胞,其中所述可切割的连接子是可自切割的,任选地是

P2A可自切割连接子、E2A可自切割连接子、F2A可自切割连接子或T2A可自切割连接子。

40. 根据权利要求37所述的细胞,其中所述可切割连接子包含蛋白酶基序。

41. 根据权利要求38所述的细胞,其中所述连接子包含内部核糖体进入位点(IRES)。

42. 根据权利要求34至41中任一项所述的细胞,其中所述多核苷酸分子包含启动子,所述启动子与编码所述CAR的所述核酸序列和编码所述TEAM的所述核酸序列可操作地连接。

43. 根据权利要求42中任一项所述的细胞,其中所述启动子是组成型活性启动子。

44. 根据权利要求43中任一项所述的细胞,其中所述启动子是EF1 α 启动子。

45. 根据权利要求39至44中任一项所述的细胞,其中所述多核苷酸分子的有义链从5'至3'依次包含编码所述CAR的所述核酸序列、所述连接子和编码所述TEAM的所述核酸序列。

46. 根据权利要求39至44中任一项所述的细胞,其中所述多核苷酸分子的有义链从5'至3'依次包含编码所述TEAM的所述核酸序列、所述连接子和编码所述CAR的所述核酸序列。

47. 根据权利要求34至46中任一项所述的细胞,其中所述多核苷酸分子包含编码氨基酸序列的核酸序列,所述氨基酸序列与SEQ ID NO:22-25中任一个至少85%相同。

48. 一种多核苷酸,其包含根据权利要求37至44中任一项所述的编码CAR和TEAM的核酸序列。

49. 一种多肽,其包含根据权利要求1至47中任一项所述的CAR和TEAM。

50. 一种方法,其包括向受试者施用根据权利要求1至47中任一项所述的细胞。

51. 一种治疗癌症的方法,所述癌症的特征在于表达CD70的癌细胞,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的根据权利要求1至47中任一项所述的细胞。

52. 一种治疗癌症的方法,所述癌症的特征在于表达CD70和CD33的癌细胞,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的根据权利要求1至47中任一项所述的细胞。

53. 一种治疗癌症的方法,所述癌症的特征在于表达CD33的癌细胞,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的根据权利要求1至47中任一项所述的细胞。

54. 一种治疗癌症的方法,所述癌症的特征在于具有降低的CD70表达的癌细胞,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的根据权利要求1至47中任一项所述的细胞。

55. 根据权利要求50至54中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

56. 根据权利要求50至55中任一项所述的方法,其中施用包括输注。

57. 根据权利要求51至56中任一项所述的方法,其中所述癌症是血液癌症。

58. 根据权利要求51至57中任一项所述的方法,其中所述癌症是髓细胞癌。

59. 根据权利要求51至58中任一项所述的方法,其中所述癌症是急性髓系白血病。

包含结合CD33的T细胞接合抗体分子的结合CD70的CAR-T细胞

[0001] 相关申请

[0002] 本申请根据35U.S.C. §119(e) 要求保护于2022年4月15日提交的美国临时申请第63/331,758号和于2022年5月13日提交的美国临时申请第63/341,995号的权益,所述美国临时申请中的每个美国临时申请的全部内容通过引用并入本文。

[0003] 政府资助

[0004] 本发明是根据国立卫生研究院(National Institutes of Health)授予的授权号5R01CA238268-03在政府支持下进行的。政府享有本发明中的某些权利。

背景技术

[0005] 嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)对某些血液系统恶性肿瘤高度有效。TNF- α 家族成员CD70已经成为AML中有前景的表面靶抗原。然而,抗原特异性癌症治疗后可能发生抗原逃逸,从而导致抗原阴性癌症复发。

发明内容

[0006] 本公开涉及用于治疗癌症的方法和组合物,所述癌症的特征在于表达CD70的细胞和任选地表达较低水平的CD70或不表达CD70的细胞(例如,在抗CD70治疗后,使得癌症不再是以表达CD70的细胞为特征,(例如,CD70抗原逃逸))。本公开部分涉及克服此类抗原逃逸的组合物和方法。本公开提供了一种双重靶向策略,在所述策略中CD70 CAR T细胞被工程化,使其能表达和分泌T细胞接合抗体分子(TEAM)。在一些实施方式中,所述TEAM包含癌症结合部分(例如,抗CD33抗体)和免疫细胞结合部分(例如,抗CD3抗体)。在不希望受理论束缚的情况下,所述TEAM可以引导CAR-T细胞或旁观者细胞与靶癌细胞(例如,表达CD33的癌细胞)或髓源性抑制细胞(MDSC)(例如,表达CD33的MDSC)的直接结合,而不依赖于CD70 CAR的表达。

[0007] 因此,在一个方面中,本公开涉及一种细胞,其包含嵌合抗原受体(CAR)和T细胞接合抗体分子(TEAM),所述CAR与CD70结合,所述TEAM与CD33结合。在一些实施方式中,所述细胞是免疫细胞。在一些实施方式中,所述免疫细胞是T细胞、NK细胞、树突状细胞、巨噬细胞、B细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞、髓源性抑制细胞、间充质干细胞、其前体或组合。在一些实施方式中,所述免疫细胞是T细胞。在一些实施方式中,所述细胞取自受试者,任选地取自人类受试者。

[0008] 在一些实施方式中,所述CAR包含:(i)细胞外靶结合结构域,所述细胞外靶结合结构域包含与CD70结合的多肽;(ii)跨膜结构域;以及(iii)细胞内信号传导结构域。在一些实施方式中,所述细胞外靶结合结构域包含CD27的CD70结合结构域。在一些实施方式中,所述细胞外靶结合结构域包含CD27的细胞外结构域。在一些实施方式中,所述细胞外靶结合结构域包含与SEQ ID NO:1、8或9中任一个的氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述细胞外靶结合结构域包含SEQ ID NO:1、8或9中任一个的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述细胞外靶结合结构域包含抗CD70抗体,任选地scFv。在一些实施方

式中,所述跨膜结构域是CD27的跨膜结构域。在一些实施方式中,所述细胞内信号传导结构域包含(i)含ITAM的信号传导结构域和/或(ii)来自一种或多种共刺激蛋白或细胞因子受体的一个或多个信号传导结构域。在一些实施方式中,所述细胞内信号传导结构域包含CD3 γ 结构域、CD3 ϵ 结构域、CD3 δ 结构域或CD3 ζ 结构域。在一些实施方式中,所述细胞内信号传导结构域包含CD3 ζ 结构域。在一些实施方式中,所述共刺激结构域包含CD28结构域、4-1BB结构域、2B4结构域、KIR结构域、OX40结构域、ICOS结构域、MYD88结构域、IL2受体结构域或SynNotch结构域。在一些实施方式中,所述共刺激结构域包含4-1BB结构域。在一些实施方式中,所述细胞外靶结合结构域进一步包含信号肽。在一些实施方式中,所述信号肽包含CD27信号肽。在一些实施方式中,所述CAR包含与SEQ ID NO:2-7中任一个的氨基酸序列至少80%相同的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述CAR包含SEQ ID NO:2-7中任一个的氨基酸序列。

[0009] 在一些实施方式中,所述TEAM包含抗CD33抗体或其功能片段(例如,抗CD33抗体的VH结构域和/或VL结构域)。在一些实施方式中,所述抗CD33抗体选自由以下组成的组:片段抗原结合区(Fab区)、单链可变片段(scFv)、双功能抗体、纳米抗体或单克隆抗体。在一些实施方式中,所述抗CD33抗体是scFv。在一些实施方式中,所述抗CD33抗体包含VH结构域和/或VL结构域,所述VH结构域具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列,所述VL结构域具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述VH结构域位于所述VL结构域的N末端。在一些实施方式中,所述VL结构域位于所述VH结构域的N末端。在一些实施方式中,所述TEAM包含免疫细胞结合部分。在一些实施方式中,所述免疫细胞结合部分与CD3、CD8、CD4、CXCR3、CCR4、GARP、LAP、CD25、CTLA-4或CD16结合。在一些实施方式中,所述免疫细胞结合部分选自由以下组成的组:片段抗原结合区(Fab区)、单链可变片段(scFv)、双功能抗体、纳米抗体或单克隆抗体。在一些实施方式中,所述免疫细胞结合部分是抗CD3 scFv。在一些实施方式中,所述TEAM包含连接子,所述连接子位于所述抗CD33抗体与所述免疫细胞结合部分之间。在一些实施方式中,所述连接子是不可切割的连接子,任选地是(GGGGS)₃(SEQ ID NO:27)连接子。在一些实施方式中,所述TEAM进一步包含分泌标签,任选地包含IgK分泌标签。在一些实施方式中,所述TEAM包含与SEQ ID NO:17-18中任一个至少85%相同的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述细胞包含多核苷酸分子,所述多核苷酸分子包含编码SEQ ID NO:17-18中任一个的氨基酸序列的核酸序列。在一些实施方式中,编码所述TEAM的所述核酸序列是经密码子优化的。

[0010] 在一些实施方式中,所述细胞包含第一多核苷酸分子和第二多核苷酸分子,所述第一多核苷酸分子包含编码所述CAR的核酸序列,所述第二多核苷酸分子包含编码所述TEAM的核酸序列。在一些实施例中,所述细胞包含多核苷酸分子,所述多核苷酸分子包含编码所述CAR的核酸序列和编码所述TEAM的核酸序列。在一些实施方式中,所述多核苷酸分子进一步包含编码连接子的核酸序列,所述编码连接子的核酸序列位于所述编码所述CAR的核酸序列与所述编码所述TEAM的核酸序列之间,任选地其中所述连接子是可切割的连接子。在一些实施方式中,所述可切割连接子是可自切割的,任选地是P2A可自切割连接子、E2A可自切割连接子、F2A可自切割连接子或T2A可自切割连接子。在一些实施方式中,所述可切割连接子包含蛋白酶基序。在一些实施方式中,所述连接子包含内部核糖体进入位点(IRES)。在一些实施方式中,所述多核苷酸分子包含启动子,所述启动子与编码所述CAR的

核酸序列和编码所述TEAM的核酸序列可操作地连接。在一些实施方式中,所述启动子是组成型活性启动子。在一些实施方式中,所述启动子是EF1 α 启动子。

[0011] 在一些实施方式中,所述多核苷酸分子的有义链从5'至3'依次包含编码所述CAR的核酸序列、所述连接子和编码所述TEAM的核酸序列。在一些实施方式中,所述多核苷酸分子的有义链从5'至3'依次包含编码所述TEAM的核酸序列、所述连接子和编码所述CAR的核酸序列。在一些实施方式中,所述多核苷酸分子包含编码氨基酸序列的核酸序列,所述氨基酸序列与SEQ ID NO:22-25中任一个至少85%相同。

[0012] 在一些方面中,本公开涉及一种多核苷酸,其包含如本文所述的编码CAR和TEAM的核酸序列。在一些方面中,本公开涉及一种细胞,其包含如本文所述的CAR和TEAM。

[0013] 在一些方面中,本公开涉及一种方法,其包括向受试者施用如本文所述的细胞。在一些方面中,本公开涉及一种治疗癌症的方法,所述癌症的特征在于表达CD70的细胞,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的如本文所述的细胞。在一些方面中,本公开涉及一种治疗癌症的方法,所述癌症的特征在于表达CD70和CD33的癌细胞,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的如本文所述的细胞。

[0014] 在一些方面中,本公开涉及一种治疗癌症的方法,所述癌症的特征在于表达CD33的癌细胞,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的如本文所述的细胞。

[0015] 在一些方面中,本公开涉及一种治疗癌症的方法,所述癌症的特征在于具有降低的CD70表达的癌细胞,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的如本文所述的细胞。

[0016] 在一些实施方式中,所述受试者是人。在一些实施方式中,施用包括输注。在一些实施方式中,所述癌症是血液癌症。在一些实施方式中,所述癌症是髓细胞癌。在一些实施例中,所述癌症是急性髓系白血病。

附图说明

[0017] 以下附图构成本说明书的一部分,并且被包括以进一步说明本公开的某些方面,通过参考这些附图中的一个或多个附图、结合本文呈现的具体实施例的具体实施方式,可以更好地理解所述方面。

[0018] 图1示出了分泌CD33-CD3双特异性T细胞接合子(或T细胞接合抗体分子(TEAM))的trCD27-CD8H/TM CAR的图。CD27 CAR可以与急性髓系白血病(AML)结合,并且CD33 TEAM可以使旁观者T细胞与AML细胞接合。

[0019] 图2示出了流式细胞术数据的图,所述流式细胞术数据表明在AML PDX中进行靶向CD70的CAR治疗后出现CD70低表达复发。在第-4天,向NSG小鼠移植 5×10^6 个DFAM68555 AML患者来源的异种移植细胞。在第0天,小鼠接受 2×10^6 个经trCD27 CD8H/TM修饰的靶向CD70的CAR-T细胞。大多数经trCD8H/TM修饰的小鼠清除了肿瘤,然而部分小鼠出现了CD70低表达的肿瘤复发。

[0020] 图3A-3C示出了在AML中,CD33和CD70作为组合型CAR靶点的配对表达情况。图3A示出了CD33和CD70在血液中的共表达。图3B示出了CD33和CD70单独及共同在原发性AML样品中的表达情况。图3C示出了与正常BM HSC和T细胞相比,AML细胞中CD33+CD70抗原对的共表达情况。

[0021] 图4是展示出CAR^{TEAM}的假定优势的示意图:CAR^{TEAM}细胞表现出快速肾清除力,使肝

细胞免受伤害,并且具有降低的肝毒性。

[0022] 图5A-5E示出了示例性CAR和TEAM的图以及表明TEAM由CAR-T细胞分泌并且能与适当的靶抗原结合的图。图5A:trCD27 CAR和/或CD33 TEAM构建体的结构。图5B:经激活的T细胞健康供体T细胞的转导效率(来自3名不同的健康供体,且代表至少2次独立实验)。图5C:将来自所指定的细胞(行)的上清液添加到所指定的细胞类型(列)中,并且评估抗His标签(TEAM)的结合。图5D:将来自用所指定的构建体转导的Jurkat T细胞的上清液与板结合的Molm13肿瘤细胞和抗His标签AF647抗体(红色)一起温育。在Incucyte仪器上测量荧光强度,并示出代表性图像。图5E:将来自用所指定的构建体转导的Jurkat T细胞的上清液与Molm13肿瘤细胞和未经转导的(UTD)健康原代人T细胞和抗CD69抗体共培养。示出了随时间推移表达CD69的细胞的百分比。PMA(佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯)为阳性对照。

[0023] 图6示出了CAR-T细胞和TEAM作用的示意图,以及表明CD33 TEAM介导UTD驱动的靶依赖性细胞毒性的图表。将用trCD27 CAR-CD33-TEAM构建体或trCD27-CD19-TEAM构建体转导的细胞或未经转导的T细胞(UTD)添加到transwell插入室的顶部。将未经转导的T细胞与Molm13WT细胞或Molm13CD33细胞一起添加到transwell插入室的底部。仅trCD27-CAR-CD33-TEAM构建体能够介导对Molm13WT细胞的清除,所述清除是靶依赖性的,并且随着CD33的缺失而被废止。

[0024] 图7A-7B示出了图和显微图,表明通过CAR和TEAM同时对T细胞进行重定向,对于异质性肿瘤是有效的,并且优于单独几种CAR的混合使用。图7A:针对具有不同水平的CD70或CD33的AML靶标(左)将单独靶向CD70或CD33的CAR-T细胞与CD70CARCD33TEAM或CD70CARCD19TEAM进行比较(左侧)。在incucyte仪器上进行的实时细胞毒性测定中,CD70CARCD33 TEAM细胞表现出更强的细胞毒性和CAR扩增能力。图7B示出了实验结束时的代表性图像。肿瘤细胞呈绿色。所展示的数据代表了由3名健康供体的T细胞制备的CAR-T细胞的结果,每个实验均进行了两次重复,且整个实验至少重复了两次(n=2次)。

[0025] 图8A-8E示出了CD70CAR^{CD33TEAM}在体内消除混合肿瘤群的情况。图8A示出了在第-7天,向NSG小鼠注射 5×10^5 个经混合的Molm13细胞群(90%的Molm13^{CD70KO},10%的Molm13^{WT},n=10只小鼠/组),所述细胞表达生物发光(BLI)报告基因叩甲虫绿(click beetle green)。在第0天,小鼠接受 2×10^6 个CD70CAR^{CD19TEAM}或CD70CAR^{CD33TEAM}细胞(n=5只小鼠/单个T细胞供体/组)。图8B-8C表明,连续BLI监测揭示了CD70CAR^{CD33TEAM}组中小鼠的肿瘤被消除,但是CD70CAR^{CD19TEAM}组中小鼠的肿瘤生长不受控制。P值如双向ANOVA所示。图8D示出了CAR-T注射后第14-28天通过流式细胞术测定的外周血中的细胞扩增。P值由单独的曼-惠特尼U检验(Mann-Whitney U test)得出。图8E示出了与未经刺激且未经转导的供体匹配的T细胞相比,CAR-T注射后第+21天通过流式细胞术对小鼠血液中的外周血CAR-T进行的表型谱分析。示出了代表性实例。CM(中央记忆)、EM(效应记忆)、TDE(末端分化的效应子)。

[0026] 图9A-9C示出了在体内与CD70CAR^{CD19TEAM}细胞的表达程序相比,CD70CAR^{CD33TEAM}细胞表现出不同的表达程序。图9A示出了火山图,突出显示了构建体之间的转录程序差异。经调整的p值小于0.05(Benjamini-Hochberg法)的基因被标记为红色。图9B示出了以无偏差方式对所有可用通路进行的通路聚类分析(上方)。下方示出了所选通路的热图。图9C示出了CD70CAR^{CD33TEAM}(右侧)和CD70CAR^{CD19TEAM}(左侧)的TCR信号传导的通路评分。P值通过非配对t检验得出。

[0027] 图10示出了向患者来源的异种移植 (PDX) AML小鼠模型施用两种不同剂量的CD70CAR^{CD33TEAM} CAR T细胞。在第-4天,向小鼠施用 5×10^6 个AML PDX细胞。在第0天,向小鼠分别施用 5×10^5 个或 1×10^6 个CD70CAR^{CD33TEAM} CAR T细胞。将未处理组和CD70CAR^{CD19TEAM}组作为对照。在第15天,测量小鼠血液中的肿瘤细胞 (CD33+/CD45+) 的浓度。结果表明,施用 5×10^5 个和 1×10^6 个CD70CAR^{CD33TEAM} CAR T细胞对肿瘤细胞浓度的有着相似影响。

[0028] 图11A-11E示出了分泌CD33T细胞接合抗体分子的CD70-CAR-T细胞的构建。图11A示出了,在第-4天,向NSG小鼠移植 5×10^6 个DFAM68555 AML患者来源的异种移植细胞。在第0天,小鼠接受 2×10^6 个靶向CD70的CAR-T细胞。大多数CAR-T细胞治疗的小鼠清除了肿瘤,然而一些小鼠出现了CD70^低肿瘤的复发。图11B示出了分泌CD33-CD3T细胞接合抗体分子的CD70 CAR-T细胞。图11D示出了本文使用的CAR的构建体示意图。图11E示出了原代健康供体T细胞的转导效率 (n=3个不同的健康供体,并代表至少2次独立实验)。

[0029] 图12A-12D示出了,TEAM是由CAR-T细胞分泌并且与适当的靶抗原结合。图12A表明,将来自指定条件 (行) 的上清液添加到指定的细胞类型 (列) 中,并且通过流式细胞术评估其与抗His标签 (TEAM) 的结合情况。图12B表明,将来自指定构建体转导的Jurkat T细胞的上清液与板结合的表达CD33的K562肿瘤细胞以及抗His标签AF647抗体一起温育。在Incucyte仪器上测量荧光强度,并示出代表性图像。图12C示出了,将来自指定构建体转导的Jurkat T细胞的上清液与Molm13肿瘤细胞、未经转导的 (UTD) 健康原代人T细胞和抗CD69抗体共培养。示出了随时间推移表达CD69的细胞的百分比。PMA (佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯) 为阳性对照。图12D示出了,将用70³³构建体或70¹⁹构建体转导的细胞或UTD添加到transwell插入室的顶部。将UTD与Molm13^{WT}或Molm13^{CD33KO}细胞一起添加到transwell插入室的底部。随时间推移测量肿瘤增殖。P值表示指定条件之间的双向ANOVA结果。实验至少重复了n=2次。

[0030] 图13A-13C示出了,通过CAR和TEAM同时对T细胞进行重定向,对异质性肿瘤是有效的,并且优于单独几种CAR的混合使用。图13A示出了,在效应子与靶比例为2:1的情况下,针对经工程化的Molm13wt、Molm13^{CD70KO}、Molm13^{CD33KO} AML靶,将单独靶向的CAR33 T细胞与70³³或70¹⁹CAR-T细胞进行比较。示出了通过流式细胞术评估的指定靶的表达情况 (左侧) 以及实时细胞毒性检测结果 (图13B-上方) 和CAR-T扩增情况 (图13B-下方)。图13C示出了在指定条件下,incucyte仪器上在40小时时的代表性图像。所展示的数据代表由3名健康供体的T细胞制备的CAR-T细胞进行重复实验 (重复两次) 所得的汇总数据。实验至少重复了n=2次。P值表示指定条件之间的双向ANOVA结果。

[0031] 图14A-14D表明,在AML患者来源的异种移植模型中,通过CAR和TEAM同时对T细胞进行重定向的效果优于标准的CAR-T细胞。图14A示出,在第-4天,通过尾静脉将 5×10^6 个DFAM68555 AML PDX细胞注射到NSG小鼠体内 (n=5只小鼠/组)。四天后,在第0天,通过尾静脉注射 5×10^5 个或 1×10^6 个70³³或70¹⁹CAR-T细胞。图14B表明,分泌CD33 TEAM的CD70 CAR-T细胞 (70³³) 对循环中的CD33+肿瘤细胞的杀伤效率高于分泌CD19 TEAM的CD70 CAR-T细胞 (70¹⁹)。图14C示出了在第+14天时循环中的70³³和70¹⁹CAR-T细胞的数量。图14D:实验中小鼠的存活率。P值由对数秩检验 (mantel cox) 得出。

[0032] 图15A-15H表明,70³³在体内清除混合肿瘤细胞群。图15A表明,在第-7天,向NSG小鼠注射 5×10^5 个混合的Molm13细胞群 (90%的Molm13^{CD70KO}, 10%的Molm13^{WT}, 每组n=10只小

鼠),该细胞表达生物发光(BLI)报告基因叩甲虫绿(click beetle green)。在第0天,小鼠接受 2×10^6 个 70^{19} 或 70CAR^{33} 细胞($n=5$ 只小鼠/单个T细胞供体/组)。图15B示出了CAR-T注射后第14-28天通过流式细胞术测定的外周血中CAR-T细胞的扩增。图15C-15D示出了对肿瘤生长的连续BLI监测。P值表示双向ANOVA结果。图15E示出了,在CAR-T注射第+21天后,通过流式细胞术对小鼠外周血中CAR-T细胞进行的表型分析,并与未经刺激且未转导的供体匹配的T细胞进行的比较。示出了代表性实例。CM(中央记忆)、EM(效应记忆)、TDE(末端分化的效应子)。图15F示出了在混合肿瘤模型中,于第+28天从小鼠的脾中通过FACS分选的CAR-T细胞,所述CAR-T细胞通过NanoString技术进行了基因表达分析,该分析不仅使用了CAR-T特征面板,还加入了一个自定义的“插入式(drop-in)”基因集。。火山图突出显示了不同构建体之间的转录程序的差异。经调整的p值小于0.05(Benjamini-Hochberg法)的基因被标记为深灰色。图15G示出了以无偏差方式对所有可用通路进行的通路层次聚类分析(上部),并展示了所选通路的热图。图15H示出了 $70^{33\text{T}}$ 和 70CAR^{19} 的TCR信号传导的通路评分。P值通过非配对t检验得出。

[0033] 图16A-16G表明,TEAM能够有效地使AML患者的T细胞重定向以杀死肿瘤细胞。图16A示出了利用了其T细胞的AML患者的临床特征。图16B示出了AML患者T细胞相对于健康供体T细胞的流式T细胞表型分析。图16C示出了AML患者T细胞中具有代表性的表型和PD-1的表达。图16D示出了TEAM生产者细胞与分离的AML患者的T细胞和Molm13肿瘤靶标的共培养。在incucyte仪器上测量实时细胞毒性。图16E示出了相对于健康供体,从患者获取的18小时后的归一化细胞因子测量结果。图16F示出了transwell实验,其中TEAM生产者细胞置于上部,分离的AML患者T细胞与肿瘤靶标置于下部。测量实时细胞毒性(上方)以及激活情况(CD69)(下方)。图16G示出了在激活40小时时的代表性图像。

[0034] 图17表明,通过CAR和TEAM同时对T细胞进行重定向,对于具有内源性抗原表达水平的异质性肿瘤是有效的,并且优于单独几种CAR的混合使用。在效应子与靶标比例为2:1的情况下,针对AML细胞系Kasumi1、Monomac1和OCI-AML3,将单独靶向的CAR33 T细胞与 70^{33} 或 70^{19} CAR-T细胞进行比较。示出了通过流式细胞术评估的指定靶标的表达情况(左侧)以及实时细胞毒性检测结果(顶部)和CAR-T扩增情况(底部)。所展示的数据代表由3名健康供体的T细胞制备的CAR-T细胞进行重复实验(重复两次)所得的合并数据。实验至少重复了 $n=2$ 次。P值代表指定条件之间的双向ANOVA结果。

[0035] 图18示出了以无偏差方式对所有可用通路进行的通路层次聚类分析(顶部),热图示出了所有nanosttring可用通路的热图。

具体实施方式

[0036] 结合CD-70的嵌合抗原受体(CAR)

[0037] 在一些方面中,本公开提供了靶向肿瘤坏死因子 α 家族成员CD70的CAR-T细胞以及此类CAR-T细胞在治疗血液系统恶性肿瘤(例如,急性髓系白血病(AML))中的用途。CD70在髓系母细胞和白血病干细胞上持续表达,但其表达在健康人体组织中高度受限。如先前所证明的,靶向CD70的CAR-T细胞在体外和体内的白血病模型中实现了抗原特异性激活、细胞因子产生和细胞毒性活性,例如PCT/US2020/051018中所述,该申请的全部内容通过引用并入本文。

[0038] 本公开的一些方面提供了嵌合抗原受体 (CAR), 其包含: (i) 细胞外靶结合结构域, 所述细胞外靶结合结构域包含与CD70结合的多肽; (ii) 跨膜结构域; 以及 (iii) 细胞内信号传导结构域。

[0039] “嵌合抗原受体 (CAR)”是指经工程化后可同时执行抗原结合和细胞激活功能的受体蛋白。在一些实施方式中, CAR包含多个具有不同功能且相互连接的结构域。CAR结构域包括具有抗原结合功能的结构域、具有结构功能的结构域以及具有信号传导功能的结构域。在一些实施方式中, CAR至少包含细胞外配体结构域、跨膜结构域和细胞质信号传导结构域 (本文中还被称为“细胞内信号传导结构域”), 所述细胞质信号传导结构域包含衍生自如下文所定义的刺激分子的功能性信号传导结构域。在一些实施方式中, CAR包含任选的前导序列 (还被称为“信号肽”)、细胞外抗原结合结构域、铰链区、跨膜结构域和细胞内刺激结构域。在一些实施方式中, CAR中的结构域位于同一多肽链中, 例如包含嵌合融合蛋白。在一些实施方式中, CAR中的各个结构域彼此不连续。

[0040] 在一些实施方式中, 本文所述的CAR包含细胞外靶结合结构域, 所述细胞外靶结合结构域包含能结合分化簇70 (CD70) 的多肽。“CD70”是指由人CD70基因 (NCBI基因ID: 970) 编码的多肽。如本文所述, CD70的表达在正常人 (非癌症) 组织中高度受限。然而, CD70在多种癌症中均有表达, 例如膀胱癌、浸润性乳腺癌、宫颈癌、胆管癌、结直肠癌、弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBC)、食管癌、胶质母细胞瘤 (GBM)、头颈癌、低级别胶质瘤 (LGG)、肝癌、肺腺癌、黑色素瘤、间皮瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肉瘤、胃癌、睾丸生殖细胞癌、胸腺瘤、甲状腺癌、子宫癌、葡萄膜黑色素瘤、透明细胞肾细胞癌 (ccRCC)、嫌色性肾细胞癌、乳头状肾细胞癌 (pRCC)、急性髓系白血病和腺样囊性癌 (ACC) (《泛癌症图谱》(Pan-Cancer Atlas) 2018年版)。CD70是包含细胞质结构域、跨膜结构域和细胞外结构域的细胞因子。CD70的细胞外结构域是CD27的配体。

[0041] 在一些实施方式中, 与CD70结合的多肽包含分化簇27 (CD27) (还被称为CD27抗原) 的CD70结合结构域。“CD27”是指由人CD27基因 (NCBI基因ID: 939, Uniprot ID: P26842) 编码的多肽。下文提供了CD27氨基酸序列的实例。

[0042] MARPHPWWLCVLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDCDQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVNRNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLPARTLSTHWPPQRSLSDFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLHQRRKYRSNKGESPVEPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP (SEQ ID NO: 8)

[0043] CD27蛋白具有细胞外结构域、跨膜结构域和细胞质结构域。在一些实施方式中, CD70结合结构域位于CD27的细胞外信号传导结构域内。在一些实施方式中, 细胞外区含有多个富含半胱氨酸的结构域 (CRD): CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施方式中, CD70结合结构域位于CRD2结构域内。

[0044] 在一些实施方式中, CD27中的CD70结合结构域包含肽段, 所述肽段具有TRPHCESCRHCN (SEQ ID NO: 9) 的氨基酸序列, 其位于CD27的细胞外结构域中。在一些实施方式中, 本文所述的CAR的细胞外靶向结合结构域包含多肽, 所述多肽包含与SEQ ID NO: 9的氨基酸序列至少70%相同 (例如, 至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%相同) 的氨基酸序列。在一些实施方式中, 本文所述的CAR的细胞外靶向结合结构域包含SEQ ID NO: 9的氨基酸序列。

[0045] 在一些实施方式中,本文所述的CAR的细胞外靶向结合结构域包含多肽,所述多肽包含CD27的细胞外结构域或其功能片段(例如,能够与CD70结合的片段)。在一些实施方式中,功能片段包含SEQ ID NO:9或其变体。在一些实施方式中,本文所述的CAR的细胞外靶向结合结构域包含多肽,所述多肽包含与SEQ ID NO:1、8或9的氨基酸序列至少70%相同(例如,至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%相同)的氨基酸序列。在一些实施方式中,本文所述的CAR的细胞外靶向结合结构域包含多肽,所述多肽包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0046] 在一些实施方式中,本文所述的CAR的细胞外靶向结合结构域中的与CD70结合的多肽包含抗CD70抗体。本文所使用的术语“抗体”涵盖不同形式的抗体和抗体片段。在一些实施方式中,抗体包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体和其功能片段(包括但不限于单链可变片段(scFv))、单结构域抗体(如重链可变结构域(VH)、轻链可变结构域(VL)和骆驼来源的纳米抗体的可变结构域(VHH))以及本领域已知的可用作抗原结合结构域的替代性支架(如重组纤连蛋白结构域)等。在一些实施方式中,抗原结合结构域源自于最终将要使用该CAR的同一物种是有益的。例如,对于在人类中使用,CAR的抗原结合结构域包含人或人源化的抗体或抗体片段的抗原结合结构域残基可能是有益的。在一些实施方式中,本文所述的CAR的细胞外靶向结合结构域中的与CD70结合的多肽包含与CD70结合的scFv。

[0047] 在一些实施方式中,所述CD70抗体包含如US11434298、US7491390、US8124738、US11377500或US9701752中所述的抗体或抗原结合结构域(例如,CDR或VH和VL),上述各专利的全部内容均通过引用并入本文。

[0048] 在一些实施方式中,所述抗体是人抗体或抗体片段。在一些实施方式中,抗体是人源化抗体或抗体片段。人源化抗体可以使用本领域已知的各种技术制备,所述各种技术包括但不限于CDR移植(参见例如,欧洲专利第EP 239,400号;国际公开第W0 91/09967号;以及美国专利第5,225,539号、第5,530,101号和第5,585,089号,上述各文献的全部内容通过引用并入本文)、镶饰或表面重塑(参见例如,欧洲专利第EP 592,106号和第EP 519,596号;Padlan,1991,《分子免疫学(Molecular Immunology)》,28(4/5):489-498;Studnicka等人,1994,《蛋白质工程(Protein Engineering)》,7(6):805-814;以及Roguska等人,1994,《美国国家科学院院刊(PNAS)》,91:969-973,所述各文献的全部内容通过引用并入本文)、链改组(参见例如,美国专利第5,565,332号,其全部内容通过引用并入本文)以及在例如以下中公开的技术:美国专利申请公开第US2005/0042664号;美国专利申请公开第US2005/0048617号;美国专利第6,407,213号;美国专利第5,766,886号;国际公开第W0 9317105号;Tan等人,《免疫学杂志(J.Immunol.)》,169:1119-25(2002);Caldas等人,《蛋白质工程》,13(5):353-60(2000);Morea等人,《方法(Methods)》,20(3):267-79(2000);Baca等人,《生物化学杂志(J.Biol.Chem.)》,272(16):10678-84(1997);Roguska等人,《蛋白质工程》,9(10):895-904(1996);Couto等人,《癌症研究(Cancer Res.)》,55(23增刊):5973s-5977s(1995);Couto等人,《癌症研究》,55(8):1717-22(1995);Sandhu J S,《基因(Gene)》,150(2):409-10(1994);以及Pedersen等人,《分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)》,235(3):959-73(1994),所述各文献的全部内容均通过引用并入本文。通常,框架区中的框架残基会被来自CDR供体抗体的相应残基取代,以改变(例如提高)抗原结合能力。这些框架取代可通过本领域

域众所周知的方法来鉴定,例如通过对CDR和框架残基的相互作用进行建模,以鉴定对抗原结合起重要作用的框架残基,以及通过序列比对来鉴定特定位置上异常的框架残基。(参见例如,Queen等人,美国专利第5,585,089号;以及Riechmann等人,1988,《自然(Nature)》,332:323,所述文献的全部内容均通过引用并入本文)。

[0049] 人源化抗体或抗体片段中保留着一个或多个非人类来源的氨基酸残基。这些非人类的氨基酸残基通常被称为“引入(import)”残基,所述引入残基通常取自“引入”可变结构域。如本文所述,人源化抗体或抗体片段包含来自非人免疫球蛋白分子的一个或多个CDR以及框架区,其中构成框架的氨基酸残基完全或大部分来源于人种系。用于抗体或抗体片段的人源化的多种技术在本领域中是众所周知的,并且基本上可以按照Winter和合作者(Jones等人,《自然》,321:522-525(1986);Riechmann等人,《自然》,332:323-327(1988);Verhoeyen等人《科学(Science)》,239:1534-1536(1988))的方法来实现,即通过将啮齿动物CDR或CDR序列取代为人抗体的相应序列来实现,也就是CDR移植(EP 239,400;PCT公开第WO 91/09967号;以及美国专利第4,816,567号;第6,331,415号;第5,225,539号;第5,530,101号;第5,585,089号;第6,548,640号,所述文献的全部内容通过引用并入本文)。在此类人源化抗体和抗体片段中,来自非人物种的对应序列取代了人类可变区结构域的一部分,其中这部分远少于完整的人类可变区结构域。人源化抗体通常是其中一些CDR残基和可能的一些框架(FR)残基被来自啮齿动物抗体中的相似位点的残基所取代的人抗体。抗体和抗体片段的人源化也可以通过镶饰或表面重塑(EP 592,106;EP 519,596;Padlan,1991,《分子免疫学》,28(4/5):489-498;Studnicka等人,《蛋白质工程》,7(6):805-814(1994);以及Roguska等人,《美国国家科学院院刊》,91:969-973(1994))或链改组(美国专利第5,565,332号)的方法来实现,所述文献的全部内容通过引用并入本文。

[0050] 在一些实施方式中,抗体源自于展示文库。展示文库是实体的集合;每个实体包含可获得多肽组分和编码或鉴定多肽组分的可回收组分。多肽组分是变化的,以便呈现不同的氨基酸序列。多肽组分可以具有任意长度,例如从三个氨基酸至超过300个氨基酸不等。展示文库实体可以包含不止一种多肽组分,例如Fab的两条多肽链。在一个示例性实施方式中,展示文库可以用于鉴定抗原结合结构域。在筛选过程中,用抗原或其片段来探测文库中每个成员的多肽组分,如果多肽组分与抗原结合,那么通常会通过在载体上保留从而识别出该展示文库成员。

[0051] 从载体上回收保留的展示文库成员并对其进行分析。分析可以包括扩增和随后在相似或不相似条件下的再次筛选。例如,可以交替进行阳性筛选和阴性筛选。分析还可以包括确定多肽组分的氨基酸序列和纯化多肽组分以进行详细表征。

[0052] 展示文库可以采用多种形式。例如噬菌体展示。在噬菌体展示中,蛋白质组分通常与噬菌体外壳蛋白共价连接。所述连接是通过编码与外壳蛋白融合的蛋白质组分的核酸的翻译引起的。所述连接可以包含柔性肽连接子、蛋白酶位点或因终止密码子抑制而掺入的氨基酸。噬菌体展示技术例如在美国专利第5,223,409号;第WO 92/18619号;第WO 91/17271号;第WO 92/20791号;第WO 92/15679号;第WO 93/01288号;第WO 92/01047号;第WO 92/09690号;第WO 90/02809号等文件中有相关描述。展示蛋白质组分的噬菌体可以使用标准的噬菌体制备方法来培养和收集,例如,从生长培养基中进行的PEG沉淀法。在筛选出单个展示噬菌体后,编码选定蛋白质组分的核酸可以在扩增后从感染了所选噬菌体的细胞或

从噬菌体自身中分离。可以挑选单个菌落或噬菌斑,将核酸分离并且测序。其它展示形式包括基于细胞的展示(参见例如,WO 03/029456)、蛋白质-核酸融合(参见例如,美国专利第6,207,446号)、核糖体展示和大肠杆菌(*E.coli*)周质展示。

[0053] 本文所述的CAR的跨膜结构域可以源自于天然来源或重组来源。在来源是天然的情况下,结构域可以源自于任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。在一个方面中,当CAR与靶标结合时,跨膜结构域能够向细胞内结构域传导信号。特别用于本发明的跨膜结构域可以至少包括例如T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8(例如、CD8 α 、CD8 β)、CD9、CD16、CD22、CD27、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154等的跨膜区。在一些实施方式中,跨膜结构域可以至少包括例如KIRDS2、OX40、CD2、CD27、LFA-1(CD11a、CD18)、ICOS(CD278)、4-1BB(CD137)、GITR、CD40、BAFFR、HVEM(LIGHTR)、SLAMF7、Nkp80(KLRF1)、Nkp44、Nkp30、Nkp46、CD160、CD19、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA1、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、rfGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(触觉)、CEACAM1、CRT AM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、PAG/Cbp、NKG2D、NKG2C和CD19等的跨膜区。在一些实施方式中,跨膜结构域是CD28跨膜结构域或CD8跨膜结构域。在一些实施例中,跨膜结构域是CD27的跨膜结构域。在一些实施方式中,CD27的跨膜结构域包含ILVIFSGMFLVFTLAGALFL的氨基酸序列(SEQ ID NO:10)。

[0054] 在一些实施方式中,跨膜结构域可以通过铰链(例如,来自人蛋白的铰链)附接到CAR的细胞外区(例如CAR的配体结构域)。例如,在一个实施方式中,铰链可以是人Ig(免疫球蛋白)铰链,例如IgG4铰链或CD8a铰链。

[0055] 在一些实施方式中,本文所述的CAR的细胞质结构域或区包含一个或多个细胞内信号传导结构域。细胞内信号传导结构域能够激活导入了该CAR的免疫细胞的至少一种正常效应功能。用于本文所述的CAR的细胞内信号传导结构域的实例包括T细胞受体(TCR)的细胞质序列以及协同作用以在抗原受体接合后启动信号转导的共受体的细胞质序列,还包括这些序列的任何衍生物或变体以及任何具有相同功能能力的重组序列。

[0056] 可以说T细胞激活是由两种不同类别的细胞质信号传导序列介导的:一类是通过TCR启动抗原依赖性初级激活的序列(初级细胞内信号传导结构域);另一类是以抗原非依赖性方式起作用以提供次级或共刺激信号的序列(次级细胞质结构域,例如共刺激结构域)。

[0057] 如本文所使用的术语“细胞内信号传导结构域”是指分子的细胞内部分。细胞内信号传导结构域可以产生信号,促进含CAR的细胞(例如,CAR T细胞或表达CAR的NK细胞)的免疫效应功能。例如CAR T细胞或表达CAR的NK细胞中的免疫效应功能的实例包括细胞溶解活性和辅助活性,其包括细胞因子的分泌。在实施方式中,细胞内信号结构域转导效应功能信号,并且引导细胞执行特定功能。虽然可以使用整个细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。就使用细胞内信号传导结构域的截短部分而言,只要该截短部分能够传导效应功能信号,就可以用来代替完整的链。因此,术语“细胞内信号传导结构域”意在包括足以传导效应功能信号的细胞内信号传导结构域的任何截短部分。

[0058] 在一些实施方式中,一个或多个细胞内信号传导结构域包括初级细胞内信号传导结构域。示例性初级细胞内信号传导结构域包括源自于负责初级刺激或抗原依赖性刺激的分子的结构域。在一些实施方式中,初级细胞内信号传导结构域包含被称为基于免疫受体酪氨酸激活基序或ITAM的信号传导基序。包含ITAM的初级细胞质信号传导序列的实例包括但不限于衍生自CD3 ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 θ 、CD3 η 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278(“ICOS”)、Fc ϵ RI、CD66d、DAP10和DAP12的信号传导序列。在一些实施方式中,CAR的细胞内信号传导结构域包含CD3- ζ (CD3 ζ)信号传导结构域。在一些实施方式中,CD3- ζ (CD3 ζ)信号传导结构域包含如下氨基酸序列:RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRGRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR(SEQ ID NO:11)。在一些实施方式中,本文所述CAR的CD3- ζ (CD3 ζ)信号传导结构域包含与SEQ ID NO:11的氨基酸序列至少70%相同(例如,至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%相同)的氨基酸序列。

[0059] 在一些实施方式中,一个或多个细胞内信号传导结构域包含共刺激细胞内结构域。共刺激细胞内信号传导结构域是指共刺激分子的细胞内部分。细胞内信号传导结构域可以包含其来源分子的整个细胞内部分,或整个天然细胞内信号传导结构域,或者其功能片段。示例性共刺激细胞内信号传导结构域包括那些源自于负责共刺激信号(例如,抗原非依赖性刺激)的分子的结构域以及源自于细胞因子受体的结构域。在一些实施方式中,一个或多个细胞内信号传导结构域包含初级细胞内信号传导结构域和源自于一种或多种共刺激蛋白或细胞因子受体的共刺激细胞内信号传导结构域。

[0060] 术语“共刺激分子”是指T细胞上的与共刺激配体特异性结合的同源结合配偶体,由此介导T细胞产生共刺激应答,例如,但不限于,增殖。共刺激分子是除抗原受体或其配体之外的细胞表面分子,是有效免疫应答所必需的。此类分子的实例包括MHC I类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白样蛋白、细胞因子受体、整合素、信号传导淋巴细胞激活分子(SLAM蛋白)、激活性NK细胞受体、BTLA、Toll配体受体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、4-1BB(CD137)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS(CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、Nkp80(KLRF1)、Nkp44、Nkp30、Nkp46、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、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(触觉蛋白(Tactile))、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、CD19a以及与CD83特异性结合的配体。例如,已经证明CD27共刺激可增强人CART细胞在体外的扩增、效应功能和存活,并且提高人T细胞在体内的持续性和抗肿瘤活性(Song等人《血液(Blood)》.2012;119(3):696-706)。在一些实施方式中,本文所述的CAR的共刺激结构域包含来自一种或多种共刺激蛋白或细胞因子受体的一个或多个信号传导结构域,所述一种或多种共刺激蛋白或细胞因子受体选自CD28、4-1BB、2B4、KIR、CD27、OX40、ICOS、MYD88、IL2受体和SynNotch。在一些实施方式中,本文所述的CAR的共刺激结构域包含4-1BB共刺激信号传导结构域。在一些实施方式中,4-1BB共刺激信号传导结构域包含以下氨基酸序列:KRGRKKLL

YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO:12)。在一些实施方式中,本文所述的CAR的4-1BB共刺激信号传导结构域包含与SEQ ID NO:12的氨基酸序列至少70%相同(例如,至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%相同)的氨基酸序列。

[0061] 在一些实施方式中,本文所述的CAR的细胞内信号传导结构域包含初级信号传导结构域(例如含ITAM的结构域,如CD3- ζ 信号传导结构域),其可以单独存在,也可以与共刺激信号传导结构域相组合(例如,来自一种或多种共刺激蛋白或细胞因子受体的共刺激结构域,所述一种或多种共刺激蛋白或细胞因子受体选自CD28、4-1BB、2B4、KIR、CD27、OX40、ICOS、MYD88、IL2受体和SynNotch)。在一些实施方式中,本文所述的CAR的细胞内信号传导结构域包含CD3- ζ (CD3 ζ) 信号传导结构域和4-1BB共刺激信号传导结构域。

[0062] 在一些实施方式中,在CAR的不同结构域之间可使用不同的连接子序列,例如(GGGS)_n (SEQ ID NO:35)连接子,其中n为1-20(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20)。在一些实施方式中,连接子是(GGGS)₇ (SEQ ID NO:36)。在一些实施方式中,CAR包含来自CD27的另外的序列,例如CD27的位于细胞外靶结合结构域与跨膜区之间的柄和铰链区。在一些实施方式中,CD27的柄和铰链区包含如下氨基酸序列:PLPNP SLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARTAGHMQ TLADFRQLPARTLSTHWPPQRS LCSSDFIR (SEQ ID NO:13)。在一些实施方式中,CAR不包含来自CD27的另外的序列,例如位于细胞外靶结合结构域与跨膜区之间的柄和铰链区。

[0063] 在一些实施方式中,本文所述的CAR包含与SEQ ID NO:2-7中任一个的氨基酸序列至少70%相同(例如,至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%相同)的氨基酸序列。在一些实施方式中,本文所述的CAR包含SEQ ID NO:2-7中任一个的氨基酸序列。

[0064] 在一些实施方式中,本文所述的CAR进一步包含位于抗原结合结构域的氨基末端(N末端)处的前导序列(本文中还可称为信号肽)。在一些实施方式中,CAR进一步包含位于抗原结合结构域的N末端处的前导序列,其中所述前导序列在对CAR进行细胞处理并将其定位到细胞膜期间可任选地从抗原结合结构域(例如,scFv)上被切割。在一些实施方式中,前导序列是CD27信号肽(例如,具有以下氨基酸序列的肽段:MARPHPWWLCVLGTLVGLS (SEQ ID NO:14)。在一些实施方式中,前导序列是白介素2信号肽或CD8前导序列。在一些实施方式中,前导序列包括如下氨基酸序列:MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO:15)。

[0065] 在一些实施方式中,本文所述的CAR进一步包含另外的氨基酸序列(例如,位于细胞外靶结合结构域与前导序列之间)。在一些实施方式中,额外的序列是亲和标签(例如,Myc标签,EQKLISEEDL (SEQ ID NO:16))。

[0066] T细胞接合抗体分子 (TEAM)

[0067] 在一些方面中,本申请公开了包含能结合CD70的CAR (CD70 CAR,如上文所述)以及能结合CD33的TEAM (CD33 TEAM) 的细胞(例如,T细胞)。如本文所述,TEAM是包含第一结合部分(例如,抗CD33抗体)和第二结合部分(例如,免疫细胞结合部分)的分子。在不希望受理论束缚的情况下,CD33 TEAM通过为免疫细胞与癌的结合提供次级结合位点(即,CD33)来帮助克服癌症抗原逃逸(例如,癌细胞不再表达CAR所靶向的分子)。在一些实施方式中,CD33 TEAM使T细胞与癌接合。CD33 TEAM可以使CAR-T细胞和天然T细胞都与癌细胞接合。如本文

所公开的,表达CD70 CAR和CD33 TEAM的CAR-T细胞在治疗出现CD70缺失的复发癌细胞方面的疗效有所提高。

[0068] 在一些实施方式中,CD33 TEAM包含抗CD33抗体和免疫细胞结合部分。在一些实施方式中,抗CD33抗体包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体和其功能片段(包括但不限于单链可变片段(scFv))、单结构域抗体(如重链可变结构域(VH)、轻链可变结构域(VL)和骆驼来源的纳米抗体的可变结构域(VHH))和本领域已知的可用作抗原结合结构域的替代性支架(如重组纤连蛋白结构域)等。在一些实施方式中,抗CD33抗体从N末端到C末端依次包含VH结构域和VL结构域。在一些实施方式中,抗CD33抗体从N末端到C末端依次包含VL结构域和VH结构域。在一些实施方式中,CD33抗体是scFv。在一些实施方式中,CD33抗体包含SEQ ID NO:19的VL结构域或其变体以及SEQ ID NO:20的VH结构域或其变体。

[0069] 在一些实施方式中,抗CD33抗体包含如US11136390、US10556951、US10787514、US8759494、US10000566、US11174313、US10711062、US11466082和US20210317208中所述的任意一种抗体或抗原结合结构域(例如,CDR或VH和VL),所述各文献的全部内容通过引用并入。

[0070] 在一些实施方式中,免疫细胞结合部分是一种能与在T细胞、NK细胞、树突状细胞、巨噬细胞、B细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞、髓源性抑制细胞、间充质干细胞或其组合的表面上表达的蛋白质结合的分子,或上述细胞的任何前体细胞、衍生细胞或祖细胞的表面上表达的蛋白质结合的分子。在一些实施方式中,免疫细胞结合部分是一种能与在T细胞的表面上表达的蛋白质结合的分子(例如,CD3)。在一些实施方式中,免疫细胞结合部分与T细胞的细胞表面标志物结合。在一些实施方式中,免疫细胞结合部分选自由以下组成的组:CD3、CD8、CD4、CXCR3、CCR4、GARP、LAP、CD25、CTLA-4或CD16。在一些实施方式中,免疫细胞结合部分是如本文所述的抗体(例如,能与在T细胞的表面上表达的蛋白质结合的抗体)。在一些实施方式中,免疫细胞结合部分包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体和其功能片段(包括但不限于单链可变片段(scFv))、单结构域抗体(如重链可变结构域(VH)、轻链可变结构域(VL)和骆驼来源的纳米抗体的可变结构域(VHH))和本领域已知的可用作抗原结合结构域的替代性支架(如重组纤连蛋白结构域)等。在一些实施方式中,免疫细胞结合部分是scFv。在一些实施方式中,免疫细胞结合部分是抗CD3抗体。在一些实施方式中,抗CD3抗体从N末端到C末端依次包含VH结构域和VL结构域。在一些实施方式中,抗CD33抗体从N末端到C末端依次包含VL结构域和VH结构域。在一些实施方式中,免疫细胞结合部分包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列(抗CD3 scFv)或其变体。

[0071] 在一些实施方式中,抗CD3抗体包含如US9657102、US20210244815、US11530275、US10759858、US20220380464、US20210253701和US11505606中所述的任意一种抗体或抗原结合结构域(例如,CDR或VH和VL)。

[0072] 在一些实施方式中,CD33 TEAM在CD33抗体与免疫细胞结合部分之间包含连接子。在一些实施方式中,连接子是肽连接子。在一些实施方式中,连接子是不可切割的。在一些实施方式中,连接子是甘氨酸连接子。在一些实施方式中,连接子是GlySer连接子。在一些实施方式中,GlySer连接子包含氨基酸序列GGGS(SEQ ID NO:34)。在一些实施方式中,

GlySer连接子包含氨基酸序列 (GGGS) 2 (SEQ ID NO:37)、(GGGS) 3 (SEQ ID NO:26)、(GGGS) 4 (SEQ ID NO:38)、(GGGS) 5 (SEQ ID NO:39)、(GGGS) 6 (SEQ ID NO:40)。在一些实施方式中, GlySer连接子包含氨基酸序列 (GGGS) 2 (SEQ ID NO:41)、(GGGS) 3 (SEQ ID NO:27)、(GGGS) 4 (SEQ ID NO:28)、(GGGS) 5 (SEQ ID NO:42)、(GGGS) 6 (SEQ ID NO:43)。在一些实施方式中, 连接子包含SEQ ID NO:26-30中任一个的氨基酸序列。在一些实施方式中, 连接子包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。在一些实施方式中, 连接子是本文所述的任何连接子。

[0073] 在一些实施方式中, CD33 TEAM包含信号肽。在一些实施方式中, 信号肽是IgK信号肽、CD8信号肽或CD27信号肽。在一些实施方式中, 信号肽包含SEQ ID NO:14、15或33中任一个的氨基酸序列, 或包含SEQ ID NO:14、15或33中任一个的氨基酸序列, 或包含与SEQ ID NO:14、15或33中任一个的序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%序列同一性的氨基酸序列。

[0074] 在一些实施方式中, CD33 TEAM包含CD33 scFv、不可切割连接子和CD3 scFv。在一些实施方式中, CD33 TEAM包含CD33 scFv、不可切割连接子、CD3 scFv、His6标签、T2A可自切割序列以及荧光蛋白 (例如, 红色荧光蛋白 (mCherry))。

[0075] 在一些实施方式中, CD33 TEAM是经密码子优化的。密码子优化是一个向编码蛋白质的核酸序列 (例如, 编码CD33 TEAM的核酸序列) 引入沉默突变的过程, 其目的在于提高该蛋白质 (例如, CD33 TEAM) 的表达水平。密码子优化不会改变蛋白质的氨基酸序列, 密码子优化的方法在本领域中是众所周知的, 例如Mauro等人, 在《生物药物 (BioDrugs) 》32.1 (2018):69-81中所描述的方法。

[0076] 在一些实施方式中, CD33 TEAM包含与SEQ ID NO:17-18中任一个至少85% (例如, 至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少99.5%) 相同的氨基酸序列。在一些实施方式中, CD33 TEAM包含SEQ ID NO:17-18中任一个的氨基酸序列。在一些实施方式中, CD33 TEAM由SEQ ID NO:17-18中任一个的氨基酸序列组成。

[0077] CD70 CAR-CD33 TEAM构建体

[0078] 在一些实施方式中, CD70 CAR CD33 TEAM构建体包含如本文所述的CD70 CAR以及如本文所述的CD33 TEAM。如本文所使用的, 构建体是指包含一种或多种组分 (例如, 包含CD70 CAR和CD33 TEAM) 的核酸序列或氨基酸序列。在一些实施方式中, CD70CAR-CD33 TEAM构建体包含CD70 CAR, 所述CD70 CAR包含能够与如本文所述的CD70结合的CD27或其片段。在一些实施方式中, CD70 CAR-CD33 TEAM构建体包含位于CD70CAR与CD33 TEAM之间的连接子。在一些实施方式中, 连接子是可切割连接子。在一些实施方式中, 可切割连接子是蛋白酶可切割连接子。在一些实施方式中, 连接子是可自切割连接子 (例如, P2A (SEQ ID NO:32)、E2A、F2A或T2A (SEQ ID NO:31))。在一些实施方式中, 所述连接子包含内部核糖体进入位点 (IRES)。在不受理论束缚的情况下, 当CD70 CAR CD33 TEAM构建体作为融合蛋白表达时, 其可能会在CD70 CAR与CD33TEAM之间的可切割连接子处发生切割。此切割会释放出CD33 TEAM。CD33 TEAM可以由细胞分泌, 并且可以与表达CD33的癌细胞和免疫细胞 (例如, 表达CD3的CAR-T细胞、未经转导的T细胞、内源性T细胞和/或旁观者T细胞) 结合。在一些实施方式中, CD33 TEAM可以激活表达CD3的CAR-T细胞、未经转导的T细胞、内源性T细胞和/或旁观者T细胞。

[0079] 在一些实施方式中,CD70 CAR和CD33 TEAM各自可操作地连接至启动子,例如,本文所述的启动子。在一些实施方式中,CD70 CAR和CD33 TEAM可操作地连接至同一启动子。在一些实施方式中,CD70 CAR和CD33 TEAM可操作地连接至不同启动子。在一些实施方式中,启动子是组成型启动子,并且在本文中进行了描述。在一些实施方式中,启动子和诱导型启动子,并且在本文中进行了描述。在一些实施方式中,CD70 CAR CD33TEAM可操作地连接至EF1 α 启动子。

[0080] 在一些实施方式中,CD70 CAR CD33 TEAM构建体从N末端到C末端依次包含CD70CAR (例如,CD27 CAR)、可切割连接子(例如,P2A)和CD33 TEAM。在一些实施方式中,CD70 CAR CD33 TEAM构建体从N末端到C末端依次包含CD33 TEAM、可切割连接子(例如,P2A)和CD70 CAR (例如,CD27 CAR)。在一些实施方式中,CD70 CAR CD33 TEAM包含截短的CD27 CAR和CD33 TEAM。在一些实施方式中,CD70 CAR CD33TEAM从N末端到C末端依次包含截短的CD27 (trCD27)、CD8铰链、CD8跨膜结构域、4-1BB共刺激信号传导结构域、CD3- ζ 结构域、P2A可切割肽、IgK前导序列、CD33 scFv和CD3 scFv。在一些实施方式中,CD70 CAR CD33 TEAM从N末端到C末端包含截短的CD27 (trCD27)、CD8铰链、CD8跨膜结构域、4-1BB细胞内信号传导结构域、CD3- ζ 信号传导结构域、P2A可切割肽、IgK前导序列、CD33 scFv、不可切割连接子和CD3 scFv。在一些实施方式中,CD70 CAR CD33 TEAM从N末端到C末端包含截短的CD27 (trCD27)、CD8铰链、CD8跨膜结构域、4-1BB细胞内信号传导结构域、CD3- ζ 结构域、P2A可切割肽、IgK前导序列、CD33 scFv、不可切割连接子、CD3 scFv、His6标签、T2A可切割肽和荧光蛋白(例如,mCherry)。

[0081] 在一些实施方式中,CD70 CAR CD33 TEAM构建体包含与SEQ ID NO:22-25中任一一个至少85% (例如,至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少99.5%) 相同的氨基酸序列。在一些实施方式中,CD70 CAR CD33 TEAM构建体包含SEQ ID NO:22-25中任一一个的氨基酸序列。在一些实施方式中,CD70 CAR CD33 TEAM构建体包含SEQ ID NO:22-23中任一一个的氨基酸序列。在一些实施方式中,CD70 CAR CD33 TEAM构建体由SEQ ID NO:22-25中任一一个的氨基酸序列组成。

[0082] 在一些方面中,本公开提供了用于在细胞(例如,T细胞)中表达CD70 CAR CD33TEAM构建体的核酸分子(例如,载体)。在一些实施方式中,核酸分子包含编码本文所述的CD70 CAR CD33 TEAM构建体的核苷酸序列。编码所需的分子的核酸序列可以使用本领域已知的重组方法获得,例如通过从表达该基因的细胞文库中筛选、通过从已知包含该基因的载体中获取所述基因或通过使用标准技术直接从含有所述基因的细胞和组织中分离得到。此处使用的重组DNA和分子克隆技术在本领域中是众所周知的,并且例如由Sambrook, J., Fritsch, E.F. 和Maniatis, T. 所著的《分子克隆:实验室手册 (MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL)》,第2版;冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory):纽约冷泉港(Cold Spring Harbor, N.Y.), 1989;以及Silhavy, T.J., Bennis, M.L. 和Enquist, L.W. 所著的《基因融合实验 (EXPERIMENTS WITH GENE FUSIONS)》;冷泉港实验室:纽约冷泉港, 1984;以及Ausubel, F.M. 等人所著的《当代分子生物学指南 (CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY)》,格林出版社(Greene Publishing)和威利国际科学出版社(Wiley-Interscience)出版,1987进行描述(上述每个文献的全部内容在此通过引用并入本文)。可替代地,所关注的基因可以通过合成的方式产生,而非克隆获得。

[0083] 在一些实施方式中,所需的CD70 CAR CD33 TEAM构建体可以通过转座子的方式在细胞中表达。在一些实施方式中,天然或合成核酸CAR的表达通常是通过将编码CAR的核酸可操作地连接至启动子上,并且将构建体整合到表达载体中来实现的。载体可以适于到真核生物中进行复制和整合。典型的克隆载体包含转录和翻译终止子、起始序列和可用于调控所需核酸序列的表达的启动子。本公开的表达构建体还可利用标准基因递送方案用于核酸免疫和基因疗法。用于基因递送的方法在本领域中是已知的。参见例如,美国专利第5,399,346号、第5,580,859号、第5,589,466号,所述美国专利的全部内容通过引用并入本文。

[0084] 额外的启动子元件(例如,增强子)可调控转录起始的频率。通常,启动子元件位于起始位点上游30-110bp的区域内,但是近来已发现许多启动子在起始位点下游也含有功能元件。启动子元件之间的间距通常是灵活的,所以当这些元件相对于彼此倒置或移动时,启动子的功能仍能得以保留。在胸苷激酶(tk)启动子中,启动子元件之间的间距在活性开始下降之前可以增加至相隔50bp。根据启动子的不同,单个元件可以协同地或独立地起作用以激活转录。

[0085] 合适的启动子的一个实例是巨细胞病毒(CMV)即刻早期启动子序列。此启动子序列是一种强组成型启动子序列,能够驱动与其有效连接的任何多核苷酸序列的高水平表达。另一个合适启动子的实例是延伸因子-1a(EF-1a)。然而,也可以使用其它组成型启动子序列,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)启动子、人免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复序列(LTR)启动子、MoMuLV启动子、禽白血病病毒启动子、爱泼斯坦-巴尔病毒(Epstein-Barr virus)即刻早期启动子、劳氏肉瘤病毒(Rous sarcoma virus)启动子和人基因启动子,例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。进一步地,本公开并不局限于使用组成型启动子。诱导型启动子也作为本公开的一部分。使用诱导型启动子提供了一种分子开关,当需要表达与之有效连接的多核苷酸序列时,能够开启该表达;而当不需要表达时,则能够关闭该表达。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。在一些实施方式中,启动子是EF-1a启动子。

[0086] 在一些实施方式中,包含编码本文所述的CD70 CAR CD33 TEAM构建体的核苷酸序列的核酸是载体。核酸可以被克隆到多种类型的载体中。例如,核酸可以被克隆到包括但不限于以下的载体中:质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、动物病毒和粘粒。特别关注的载体包括表达载体、复制载体、探针生成载体和测序载体。

[0087] 进一步地,表达载体可以以病毒载体的形式提供给细胞。病毒载体技术在本领域中是众所周知的,并且在例如Sambrook等人(2001,《分子克隆:实验室手册》,纽约的冷泉港实验室)以及其它病毒学和分子生物学手册中均有描述。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。一般而言,合适的载体包含在至少一种生物体中起作用的复制起点、启动子序列、方便的限制性核酸内切酶位点和一种或多种可选择标志物(例如,WO 01/96584;WO 01/29058;以及美国专利第6,326,193号)。

[0088] 已经开发出了多种基于病毒的系统以用于将基因转移到哺乳动物细胞中。例如,逆转录病毒为基因递送系统提供了便捷的平台。可以使用本领域已知的技术,可将所选择的基因插入到载体中,并包装到逆转录病毒颗粒中。然后,可以将重组病毒分离并且将其在体内或体外递送到受试者的细胞中。在一些实施方式中,使用逆转录病毒载体。在一些实施

方式中,使用慢病毒载体。在一些实施方式中,还可以使用腺相关病毒(AAV)载体。

[0089] 源自于逆转录病毒(如慢病毒等)的载体是实现长期基因转移的合适工具,因为其能使转基因实现长期、稳定的整合,并可在子代细胞中增殖。与源自于致癌逆转录病毒(如鼠白血病病毒等)的载体相比,慢病毒载体具有另外的优点,因为其可以转导非增殖细胞,如肝细胞等。所述慢病毒载体还具有低免疫原性的另外的优点。如本文所使用的,“慢病毒”是指逆转录病毒科(Retroviridae family)的一个属。在逆转录病毒中,慢病毒的独特之处在于其能够感染非分裂细胞;其可以将大量的遗传信息递送到宿主细胞的DNA中,因此慢病毒是基因递送载体中的最有效的方法之一。HIV、SIV和FIV都是慢病毒的实例。源自于慢病毒的载体为在体内实现高水平的基因转移提供了途径。

[0090] 可以使用本领域已知的任何将核酸或蛋白质递送至细胞内的方法,例如转染、转化、转导或电穿孔。如本文所使用的,术语“经转染的”或“经转化的”或“经转导的”是指将外源性核酸转移或引入到宿主细胞中的过程。“经转染的”或“经转化的”或“经转导的”细胞是已用外源性核酸进行了转染、转化或转导的细胞。所述细胞包括原代受试者细胞及其子代细胞。

[0091] 包含CD70 CAR和CD33 TEAM的细胞

[0092] 在一些方面中,本申请公开了包含如本文所述的CD70 CAR和CD33 TEAM的细胞。在一些实施方式中,所述细胞包含如本文所述的CD70 CAR-CD33 TEAM构建体。在一些实施方式中,细胞是免疫细胞。在一些实施方式中,免疫细胞是哺乳动物免疫细胞。在一些实施方式中,免疫细胞是人免疫细胞。“免疫细胞”可以是T细胞、NK细胞、树突状细胞、巨噬细胞、B细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞、髓源性抑制细胞、间充质干细胞或其组合,或者其任何前体细胞、衍生物或祖细胞。在一些实施方式中,免疫细胞是T细胞。在一些实施方式中,免疫细胞是人T细胞。

[0093] 免疫细胞(例如,T细胞)可以从多个来源获得,所述来源包括外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾组织和肿瘤。免疫细胞(例如,T细胞)还可以由诱导多能干细胞或造血干细胞或祖细胞产生。在一些实施方式中,可以使用本领域可用的任何数量的免疫细胞系,包括但不限于T细胞系,包括例如Hep-2、Jurkat和Raji细胞系。在一些实施方式中,可以使用本领域的技术人员已知的任何数量的技术(如Ficoll™分离)从受试者采集的单位血液中获取免疫细胞(例如,T细胞)。在一些实施方式中,可以通过单采血液成分术获取个体循环血液中的细胞。单采血液成分术的产物通常包含淋巴细胞(T细胞)、单核细胞、粒细胞、B细胞、NK细胞、其它有核白细胞、红细胞和血小板。在一些实施方式中,可以洗涤通过单采血液成分术收集的细胞,以去除血浆级分,并且将细胞置于适合的缓冲液或培养基中,以供后续的处理步骤。在一些实施方式中,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤细胞。在一些实施方式中,洗涤溶液不含钙,可能不含镁或可能不含许多(如果不是全部的话)二价阳离子。而且,令人惊讶的是,不含钙的情况下进行初始激活步骤会导致激活增强。如本领域的普通技术人员容易理解的,洗涤步骤可以通过本领域的技术人员已知的方法完成,如根据制造商的说明,使用半自动“流通式”离心机(例如,巴克斯特公司(Baxter CytoMate)的Cobe 2991细胞处理器或美国血液科技公司(Haemonetics)的细胞保存器5)。在洗涤之后,可以将细胞重悬于多种生物相容性缓冲液中,例如不含Ca²⁺不含Mg²⁺的PBS、勃脉力A(PlasmaLyte A)或具有或不具有缓冲液的其它盐

溶液。可替代地,可以去除单采血液成分术样品的不需要的组分,并且将细胞直接重悬于培养基中。

[0094] 在一些实施方式中,免疫细胞(例如,T细胞)是通过裂解红细胞并且去除单核细胞的方法(例如,通过PERCOLL™梯度离心法或者通过逆流离心淘析法)从外周血淋巴细胞中分离出来的。特定的T细胞亚群,例如CD3⁺T细胞、CD28⁺T细胞、CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、CD45RA⁺T细胞和CD45RO⁺T细胞等,可以通过阳性或阴性选择技术来进一步分离。

[0095] 通过阴性选择富集T细胞群可借助针对阴性选择细胞所特有的表面标志物的多种抗体的组合来完成。一种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,所述负磁性免疫粘附或流式细胞术借助针对存在于阴性选择细胞表面标志物的单克隆抗体混合物。例如,为了通过阴性选择富集CD4⁺细胞,单克隆抗体混合物通常包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。在某些实施方式中,可能需要富集或者阳性选择通常表达CD4⁺、CD25⁺、CD62L^{hi}、GITR⁺和FoxP3⁺的调节性T细胞。可替代地,在一些实施方式中,调节性T细胞通过抗CD25缀合的珠粒或其它类似选择方法耗竭。

[0096] 经工程化的免疫细胞(例如,T细胞)可以是自体的。是“自体的”意指免疫细胞取自受试者,被工程化为表达本文所述的CAR并且施用于同一受试者。与施用非自体细胞相比,向受试者施用自体细胞可以使免疫细胞的排斥减少。可替代地,经工程化的免疫细胞(例如,T细胞)可以是同种异体细胞。是“同种异体的”,细胞是从第一受试者中获得的,被修饰成表达本文所述的CAR,并且施用于第二受试者,所述第二受试者不同于第一受试者但属于同一物种。例如,同种异体免疫细胞可以源自于人类供体,并且施用于不同于供体的人类接受者。

[0097] 在一些实施方式中,本申请公开了一种CAR-T细胞,其包含如本文所述的CD70 CAR(例如,CD27细胞外结合结构域)和CD33 TEAM(例如,包含抗CD33抗体和抗CD3抗体)。在一些实施方式中,CAR-T细胞包含编码SEQ ID NO:22-25中任一个的氨基酸序列的CD70 CAR-CD33 TEAM构建体。

[0098] 治疗方法

[0099] 在一些实施方式中,本申请公开了治疗癌症(例如,特征在于表达CD70和CD33的细胞的癌症)的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的细胞(例如,包含CD70 CAR和CD33 TEAM的CAR-T细胞)。在一些实施方式中,该方法用于治疗特征在于表达CD70的细胞的癌症,并且所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的本文所述的经工程化的免疫细胞(例如,CD70 CAR CD33 TEAM CAR-T细胞)或包含所述经工程化的免疫细胞(例如,CD70 CAR CD33 TEAM CAR-T细胞)的组合物。在一些实施方式中,方法用于治疗特征在于表达CD70的细胞以及表达低水平的CD70(即,低于前文提及的表达CD70的癌细胞的水平)的细胞或不表达CD70的细胞的癌症,并且所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的本文所述的经工程化的免疫细胞(例如,CD70 CAR CD33 TEAM CAR-T细胞)或包含所述经工程化的免疫细胞(例如,CD70 CAR CD33 TEAM CAR-T细胞)的组合物。在一些实施方式中,所述方法包括向患有或诊断为患有表达CD70的癌症的受试者施用CD70 CAR CD33 TEAM CAR-T细胞。在一些实施方式中,所述方法包括向有表达CD70的癌细胞的受试者施用CD70 CAR CD33 TEAM CAR-T细胞。在一些实施方式中,所述方法包括向有表达CD70和CD33的癌细胞的受试者施用CD70 CAR CD33 TEAM CAR-T细胞。在一些实施方式中,所述方法包括向有表达CD33的癌细胞的受

试者施用CD70 CAR CD33 TEAM CAR-T细胞。在一些实施方式中,所述方法包括向有对基于CD70CAR的治疗具有抗性(例如,CD70表达降低或者突变使CD70 CAR与癌细胞的CD70的结合减少)的癌细胞的受试者施用CD70 CAR CD33 TEAM CAR-T细胞。在一些实施方式中,所述方法包括向具有CD70表达降低的癌细胞的受试者施用CD70 CAR CD33 TEAM CAR-T细胞。如本文所使用的,“CD70表达降低”是相对于能够被CD70 CAR T细胞定向杀死的表达CD70的癌细胞(例如,尚未用抗CD70治疗剂治疗的表达CD70的癌细胞)而言表达量有所降低。在一些实施方式中,与尚未用抗CD70治疗剂(例如,CD70 CAR)治疗的表达CD70的癌细胞和/或预期可被抗CD70 CAR T细胞杀死的表达CD70的癌细胞相比,CD70表达降低了至少0.1%(例如,至少0.5%、至少1%、至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%)。在一些实施方式中,与Molm13^{WT}细胞的CD70表达相比,CD70表达降低了至少0.1%(例如,至少0.5%、至少1%、至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%)。在一些实施方式中,“CD70表达降低”是指检测不到CD70表达(例如,检测不到细胞表面的CD70表达)。

[0100] 在一些实施方式中,方法包括向患有表达CD70的癌症的受试者施用本文所述的CD70CAR CD33 TEAM CAR-T细胞。本领域技术人员将理解,在一次或多次施用后,癌细胞中的一些癌细胞可能会降低CD70的表达,以避免被CD70 CAR CD33 TEAM CAR-T细胞结合。因此,在一些实施方式中,向患有表达CD70的癌症的受试者施用本文所述的CD70CAR CD33 TEAM CAR-T细胞的方法包括向CD70表达已降低的癌细胞施用一个或多个轮次的CD70 CAR CD33 TEAM CAR-T细胞。

[0101] 在一些实施方式中,方法包括向患有表达CD70的癌症的受试者施用CD70 CAR CAR-T细胞,并且在癌症使CD70表达降低或者以其它方式变得对CD70 CAR-T细胞具有抗性的情况下,该方法进一步包括施用CD70 CAR CD33 TEAM CAR-T细胞。

[0102] 如本文所使用的,术语“治疗”是指将包含一种或多种活性剂的组合物应用或施用于患有目标疾病、出现目标疾病症状或者具有目标疾病易感性的受试者,其目的是治疗、治愈、减轻、缓解、改变、补救、改良、改善或影响疾病、疾病的症状或对疾病的易感性。

[0103] 在一些实施方式中,使用CD70 CAR CD33 TEAM CAR-T细胞对受试者进行癌症治疗不会导致全身毒性。在一些实施方式中,使用CD70 CAR CD33 TEAM CAR-T细胞对受试者进行癌症治疗不会导致CD33 TEAM全身毒性。在一些实施方式中,使用CD70 CAR CD33 TEAM CAR-T细胞对受试者进行癌症治疗不会导致肝毒性。在一些实施方式中,使用CD70 CAR CD33 TEAM CAR-T细胞对受试者进行癌症治疗不会导致CD33 TEAM肝毒性。

[0104] 在一些实施方式中,方法用于治疗以表达CD70的细胞为特征的癌症,并且所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的本文所述的经工程化的免疫细胞(例如,CD70 CAR CD33 TEAM CAR-T细胞)或包含所述经工程化的免疫细胞(例如,CD70 CAR CD33 TEAM CAR-T细胞)的组合物以及有效量的能增强癌症中CD70的表达的药剂(例如,阿扎胞苷(azacitidine)或地西他滨(decitabine))。

[0105] 以表达CD70的细胞为特征的癌症的实例包括但不限于膀胱癌、乳腺侵袭性癌、宫颈癌、胆管癌、结直肠癌、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBC)、食管、胶质母细胞瘤(GBM)、头颈癌、低级别胶质瘤(LGG)、肝癌、肺腺癌、黑色素瘤、间皮瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肉瘤、胃

癌、睾丸生殖细胞癌、胸腺瘤、甲状腺癌、子宫癌、葡萄膜黑色素瘤、透明细胞肾细胞癌(ccRCC)、嫌色肾细胞癌、乳头状肾细胞癌(pRCC)、急性髓系白血病和腺样囊性癌(ACC)。在一些实施方式中,癌症是淋巴瘤。在一些实施方式中,淋巴瘤是B细胞非霍奇金淋巴瘤(Non-Hodgkin Lymphoma,NHL)、套细胞淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、B细胞淋巴瘤母细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、边缘区淋巴瘤或T细胞淋巴瘤。在一些实施方式中,癌症是白血病。在一些实施方式中,白血病是急性髓系白血病(AML)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、慢性髓系白血病(CML)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、B细胞淋巴瘤母细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病(CLL)或T细胞白血病。在一些实施方式中,所述癌症是髓细胞癌。在一些实施方式中,所述癌症是急性髓系白血病。

[0106] 本公开的其它方面提供了包含本文所述的免疫细胞中的任一种免疫细胞(例如,CD70CAR CD33 TEAM CAR-T细胞)的组合物。在一些实施方式中,包含经工程化的免疫细胞(例如,CD70 CAR CD33 TEAM CAR-T细胞)的组合物进一步包含能增强癌细胞中的CD70表达的药剂。在一些实施方式中,药剂使癌症中的编码CD-70的发生低甲基化。在一些实施方式中,药剂是阿扎胞苷或地西他滨。在一些实施方式中,所述组合物包含经工程化的免疫细胞(例如,CD70 CAR CD33 TEAM CAR-T细胞)和阿扎胞苷。在一些实施方式中,所述组合物包含经工程化的免疫细胞(例如,靶向CD70的CAR-T细胞)和阿扎胞苷,其中阿扎胞苷在所述组合物中的浓度为100 μ M或更低(例如,100 μ M或更低、90 μ M或更低、80 μ M或更低、70 μ M或更低、60 μ M或更低、50 μ M或更低、40 μ M或更低、30 μ M或更低、20 μ M或更低、10 μ M或更低、5 μ M或更低、1 μ M或更低)。在一些实施方式中,所述组合物包含经工程化的免疫细胞(例如,CD70 CAR CD33 TEAM CAR-T细胞)和阿扎胞苷,其中阿扎胞苷在所述组合物中的浓度为100 μ M、90 μ M、80 μ M、70 μ M、60 μ M、50 μ M、40 μ M、30 μ M、20 μ M、10 μ M、5 μ M或1 μ M。

[0107] 施用

[0108] 在一些实施方式中,组合物是药物组合物。在一些实施方式中,所述组合物进一步包含本领域通常使用的药学上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂(所有这些都称为“赋形剂”),例如缓冲剂、稳定剂、防腐剂、等渗剂、非离子洗涤剂、抗氧化剂和/或其它各类的添加剂。

[0109] 在一些实施方式中,将本文所述的任一种经工程化的免疫细胞(例如,CD70 CAR CD33TEAM CAR-T细胞)或包含本文所述的经工程化的免疫细胞的任一种组合物施用于受试者。因此,本公开的一些方面提供了向受试者施用本文所述的任一种经工程化的免疫细胞(例如,CD70 CAR CD33 TEAM CAR-T细胞)或包含所述经工程化的免疫细胞(例如,CD70 CAR CD33 TEAM CAR-T细胞)的任一种组合物的方法。

[0110] 在一些实施方式中,经工程化的免疫细胞(例如,CD70 CAR CD33 TEAM CAR-T细胞)和药剂(例如,阿扎胞苷(azacitidine)或地西他滨)(例如,经工程化的免疫细胞和药剂以用于施用的组合物的形式调配)是同时施用的。在一些实施方式中,所述组合物包含经工程化的免疫细胞(例如,靶向CD70的CAR-T细胞)和阿扎胞苷,其中阿扎胞苷在所述组合物中的浓度为100 μ M或更低(例如,100 μ M或更低、90 μ M或更低、80 μ M或更低、70 μ M或更低、60 μ M或更低、50 μ M或更低、40 μ M或更低、30 μ M或更低、20 μ M或更低、10 μ M或更低、5 μ M或更低、1 μ M或更低)。在一些实施方式中,所述组合物包含经工程化的免疫细胞(例如,靶向CD70的CAR-T细胞)和阿扎胞苷,其中阿扎胞苷在所述组合物中的浓度为100 μ M、90 μ M、80 μ M、70 μ M、60 μ M、50 μ M

M、40 μ M、30 μ M、20 μ M、10 μ M、5 μ M或1 μ M。

[0111] 在一些实施方式中,经工程化的免疫细胞(例如,CD70 CAR CD33 TEAM CAR-T细胞)和药剂是依序施用的。在一些实施方式中,在施用经工程化的免疫细胞(例如,靶向CD70的CAR-T细胞)之前施用药剂(例如,阿扎胞苷或地西他滨)。在一些实施方式中,在施用药剂(例如,阿扎胞苷或地西他滨)与施用经工程化的免疫细胞之间存在等待时间段。等待时间段是为了使药剂(例如,阿扎胞苷或地西他滨)增强癌症中CD70表达并且在施用经工程化的免疫细胞(例如,CD70 CAR CD33 TEAM CAR-T细胞)之前从受试者体内清除。在一些实施方式中,等待时间段为3小时或更长时间(例如,3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、12小时、24小时或更长时间)。

[0112] 在一些实施方式中,与未暴露于药剂(例如,阿扎胞苷或地西他滨)的相同癌症相比,所述药剂(例如,阿扎胞苷或地西他滨)使癌症中的CD70表达增强了至少10%(例如,至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少100%、至少2倍、至少5倍、至少10倍或更多)。

[0113] 在一些实施方式中,与单独施用经工程化的免疫细胞(例如,靶向CD70的CAR-T细胞)或药剂(例如,阿扎胞苷或地西他滨)时相比,向受试者同时施用经工程化的免疫细胞(例如,靶向CD70的CAR-T细胞)和药剂(例如,阿扎胞苷或地西他滨)使治疗效果增强了至少10%(例如,至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少100%、至少2倍、至少5倍、至少10倍或更多)。治疗效果可以通过本领域已知的方法来测量,例如癌细胞的清除、受试者的生存期延长。

[0114] 为了实践本文所述的方法,可以通过合适的途径(例如,静脉内输注)将有效量的经工程化的免疫细胞(例如,CD70 CAR CD33 TEAM CAR-T细胞)和或增强癌症中的CD70表达的药剂(例如,阿扎胞苷或地西他滨)施用于受试者。在施用之前,可将免疫细胞群与药学上可接受的载剂混合以形成药物组合物,这也在本公开的范围之内。

[0115] 待治疗的受试者可以是哺乳动物(例如,人、小鼠、猪、牛、大鼠、狗、豚鼠、兔、仓鼠、猫、山羊、绵羊或猴)。受试者可以患有癌症或免疫性疾病(例如,自身免疫性疾病)。

[0116] 如本文所使用的,术语“有效量”是指单独或与一种或多种活性剂组合来赋予受试者治疗效果所需的每种活性剂的量。如本领域的技术人员所认识到的,有效量根据所治疗的具体病状、病状的严重程度、个体患者的各项参数(包括年龄、身体状况、大小、性别和体重)、治疗的持续时间、施用途径、赋形剂使用、与其它活性剂的联合使用(如果有的话)以及在健康从业者的知识和专长内的相似因素而变化。待施用的量取决于待治疗的受试者,例如包括个体的免疫系统产生细胞介导的免疫应答的能力。需要施用的活性成分的精确量取决于从业者的判断。然而,合适的剂量范围可很容易地由本领域的技术人员确定。

[0117] 本文所述的治疗方法可以与用于癌症的其它类型的疗法(如化学疗法、外科手术、放射、基因疗法等)联合使用。此类疗法可以与本文所述的免疫疗法同时或依序(以任何顺序)施用。在与另外的治疗剂共施用时,由于相加作用或协同作用,每种药剂合适的治疗有效剂量可能会降低。

[0118] 可与本文所述的经修饰的免疫细胞联合使用的其它抗癌治疗剂的非限制性实例包括但不限于免疫检查点抑制剂(例如,PDL1、PD1和CTLA4抑制剂)、抗血管生成剂(例如,TNP-470、血小板因子4、血小板反应蛋白-1、金属蛋白酶的抑制剂、催乳素、血管抑素、

内皮抑素、bFGF可溶性受体、转化生长因子 β 、干扰素 α 、可溶性KDR和FLT-1受体以及胎盘增殖素相关蛋白)、VEGF拮抗剂(例如,抗VEGF抗体、VEGF变体、可溶性VEGF受体片段)、化学治疗化合物。示例性化学治疗化合物包括嘧啶类似物(例如,5-氟尿嘧啶、氟尿苷(floxuridine)、卡培他滨(capecitabine)、吉西他滨(gemcitabine)和阿糖胞苷(cytarabine));嘌呤类似物(例如,氟达拉滨(fludarabine));叶酸拮抗剂(例如,巯基嘌呤(mercaptopurine)和硫鸟嘌呤(thioguanine));抗增殖剂或抗有丝分裂剂,例如长春花生物碱(vinca alkaloids);微管干扰剂,如紫杉烷(taxane)(例如,紫杉醇(paclitaxel)、多西他赛(docetaxel))、长春新碱(vincristin)、长春碱(vinblastin)、诺考达唑(nocodazole)、埃博霉素(epothilones)和长春瑞滨(navelbine)以及表鬼臼毒素(epidipodophyllotoxin);DNA损伤剂(例如,放线菌素(actinomycin)、安吡啶(amsacrine)、蒽环霉素(anthracycline)、博来霉素(bleomycin)、白消安(busulfan)、喜树碱(camptothecin)、卡铂(carboplatin)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、顺铂(cisplatin)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、癌得星(cytosan)、更生霉素(dactinomycin)、道诺霉素(daunorubicin)、阿霉素(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、六亚甲基亚胺(hexamethylnelamine)、奥沙利铂(oxaliplatin)、异环磷酰胺(iphosphamide)、美法仑(melphalan)、氮芥(merchlorehtamine)、丝裂霉素(mitomycin)、米托蒽醌(mitoxantrone)、亚硝基脲(nitrosourea)、普卡霉素(plicamycin)、甲基苄肼(procarbazine)、紫杉酚(taxol)、泰索帝(taxotere)、替尼泊苷(teniposide)、三乙烯硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)和依托泊苷(etoposide))。

[0119] 在一些实施方式中,放射或放射和化学疗法与包含本文所述的经修饰的免疫细胞的细胞群组合使用。另外的有用的药剂和疗法可以查阅《医师案头参考(Physician's Desk Reference)》,增刊第59版,(2005),新泽西州蒙特瓦尔市的汤姆森公司(Thomson P D R, Montvale N.J.);Gennaro等人编著的《雷明顿药理学科学与实践(Remington's The Science and Practice of Pharmacy)》增刊第20版,(2000),马里兰州巴尔的摩市的利平科特·威廉姆斯和威尔金斯公司(Lippincott Williams and Wilkins,Baltimore Md.);Braunwald等人编著的《哈里森内科医学原理(Harrison's Principles of Internal Medicine)》,增刊第15版,(2001),纽约市的麦格劳·希尔公司(McGraw Hill,NY);Berkow等人编著的《默克诊断与疗法手册(The Merck Manual of Diagnosis and Therapy)》,(1992),新泽西州拉威市的默克研究实验室(Merck Research Laboratories,Rahway N.J.)。

[0120] 本申请全文中引用的所有专利和其它出版物,包括参考文献、授权专利、已公布的专利申请和共同待决的专利申请,均明确地通过引用并入本文,目的在于描述和公开,例如,在此类出版物中所描述的可能与本文所述的技术相关联而可使用的方法。提供这些出版物仅仅是因为其在在本申请的提交日期之前就已公开。关于这一点,任何内容都不应被解释为承认发明人无权借助先前技术或出于任何其它原因而提前此类公开。关于这些文件日期的所有陈述或对其内容的描述均基于申请人可获得的信息,并且不构成对这些文件的日期或内容的正确性的任何承认。

[0121] 对本公开的実施方式的描述并非旨在详尽无遗或将本公开限制在所公开的确切形式内。尽管本文出于说明性目的描述了本公开的特定实施方式和实例,但是如相关领域的技术人员将认识到的,在本公开的范围内可以进行各种等效修改。例如,虽然方法步骤或

功能是以给定的顺序呈现的,但是替代性实施方式可以以不同的顺序执行功能或者可以基本上并行地执行功能。本文提供的本公开的教导可以适当地应用于其它程序或方法。可以将本文所述的各个实施方式进行组合以提供额外的实施方式。如有必要,可以对本公开的各方面进行修改,以采用上述参考文献和申请中的组合物、功能和概念来提供本公开的更多的实施方式。此外,出于生物功能等效性的考虑,在不影响生物或化学作用的性质或量的情况下,可以在蛋白质结构中做出一些改变。根据详细描述,可以对本公开做出这些和其它改变。所有此类修改旨在包括在所附权利要求的范围内。

[0122] 前述任何实施方式中的特定元件可以与其它实施方式中的元件组合或相互替代。此外,尽管已经在这些实施方式的上下文中描述了与本公开的某些实施方式相关的优点,但是其它实施方式也可以展示出此类优点,并且并非所有实施方式都需要必然地展示出此类优点才能落入在本公开的范围。

[0123] 通过以下实例进一步说明了本文所述的技术,所述实例决不应被解释为进一步的限制。

[0124] 表1:序列

[0125]

SEQ ID NO	名称	序列
1	CD70 CAR 细胞 外靶结合结构域	ATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDCD QHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSG LLVRNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECD
2	CD70 CAR 1	ATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDCD QHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSG LLVRNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECDPLPNP SLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARTAGHMQT LADFRQLPARTLSTHWPPQRSLSGDFIRILVIFSGMF LVFTLAGALFLKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE DGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQ LYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDG LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
3	CD70 CAR 2	EQKLISEEDLATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEP GTFLVKDCDQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHC ESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQCRDKE CTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLE ARTAGHMQTLADFRQLPARTLSTHWPPQRSLSGDF IRILVIFSGMFLVFTLAGALFLKRGRKKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADA PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
4	CD70 CAR 3	ATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDCD QHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSG LLVRNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECDTTTPA PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYI FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKF SRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA LPPR
5	CD70 CAR 4	ATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDCD QHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSG LLVRNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECDGGGS GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG SGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG GMFLVFTLAGALFLKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQG QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
6	CD70 CAR 5	ATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDCD QHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSG

[0126]

		LLVRNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECDPLPNP SLTARSSLCSSDFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLKRGR KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA EAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDA LHMQUALPPR
7	CD70 CAR 6	ATPAPKSCPERHYWAQGKLCQMCCEPGTFLVKDCD QHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHTRPHCESCRHCNSG LLVRNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECDILVIFS GMFLVFTLAGALFLKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQG QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
8	CD27	MARPHPWWLCVLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQ GKLCQMCCEPGTFLVKDCDQHRKAAQCDPCIPGV FSPDHTRPHCESCRHCNSGLLRNCTITANAECAC RNGWQCRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQ THLPYVSEMLEARAGHMQLADFRQLPARTLSTH WPPQRSCLSSDFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLHQR KYRSNKGESPVPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYR KPEPACSP
9	CD27 CD70 结 合结构域	TRPHCESCRHCN
10	CD27 跨膜结构 域	ILVIFSGMFLVFTLAGALFL
11	CD3- ζ 信号传导 结构域	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQUALPPR
12	4-1BB 共刺激信 号传导结构域	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE EGGCEL
13	CD27 柄和铰链	PLPNPSLTARSSQALSPHPQTHLPYVSEMLEARAG HMQLADFRQLPARTLSTHWPPQRSCLSSDFIR
14	CD27 信号肽	MARPHPWWLCVLGTLVGLS
15	CD8 前导序列	MALPVTALLPLALLHAARP
16	Myc 标签	EQKLISEEDL
17	CD33 (VL/VH) TEAM	DIQLTQSPSTLSASVGDRVITICRAESLDNYGIRFLT WFQQKPGKAPKLLMYAASNQGSVPSRFSGSGSGT EFTLTISLQPDDEFATYYCQQTKEVPWSFGQGTKVE VKGSGSGSGSGSGSGGSEVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGYTITDSNIHWVRQAPGQSLEWIGYIYPY NGGTDYNQKFKNRATLTVDNPTNTAYMELSSLRSED TAFYYCVNGNPWLAYWGQGLTVTVSSGGGGSDIKL QQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVK

[0127]

		QRPQGQLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDK SSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYW GQGTTLTVSSVEGGSGGSGGSGGSGGVDDIQLTQSP AIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSP KRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAE DAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK
18	CD33 (VH/VL) TEAM	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTITDSNIHW VRQAPGQSLEWIGYIYPYNGGTDYNQKFKNRATLT VDNPTNTAYMELSSLRSEDTAFYYCVNGNPWLAYW GQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQLTQSPSTL SASVGDRVITITCRASESLDNYGIRFLTWFFQKPGKA PKLLMYAASNQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQP DDFATYYCQQTKEVPWSFGQGTKVEVKGGGSDIK LQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWV KQRPQGQLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDD KSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDY WGQGTTLTVSSVEGGSGGSGGSGGSGGVDDIQLTQS PAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTS PKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEA EDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK
19	抗 CD33 scFv VL	DIQLTQSPSTLSASVGDRVITITCRASESLDNYGIRFLT WFQKPGKAPKLLMYAASNQSGVPSRFSGSGSGT EFTLTISLQPD FAFATYYCQQTKEVPWSFGQGTKVE VK
20	抗 CD33 scFv VH	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTITDSNIHW VRQAPGQSLEWIGYIYPYNGGTDYNQKFKNRATLT VDNPTNTAYMELSSLRSEDTAFYYCVNGNPWLAYW GQGTTLTVSS
21	抗 CD3 scFv	DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMH WVKQRPQGQLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATL TTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCL DYWGQGTTLTVSSVEGGSGGSGGSGGSGGVDDIQL TQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKS GTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISS MEAEADAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELKHHHHH H
22	CD27 CAR- CD33 TEAM (VH/VL) [CD27-信号- trCD27- CD8H/TM-4- 1BBz-CD33H- CD33L-CD3 CAR-TEAM]	MARPHPWWLCVLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQ GKLCCQMCEPGTFLVKDCDQHRKAAQCDCIPGVS FSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLRNCTITANAECAC RNGWQCRDKECTEDTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL RPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGV LLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED GCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQL YNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDG LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRSGGSGATNFSL KQAGDVEENPGPMHMETDTLLLWVLLLWVPGSTG DEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTITDSNIH WVRQAPGQSLEWIGYIYPYNGGTDYNQKFKNRATL

[0128]

		TVDNPTNTAYMELSSLRSEDFAFYVCVNGNPWLAY WGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQLTQSPST LSASVGDRVTITCRASESLDNYGIRFLTWFQQKPGK APKLLMYAASNQGSVPSPRFSGSGSGTEFTLTISLQ PDDFATYYCQQTKEVPWSFGQGTKVEVKGGGSDI KLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHW VKQRPQGGLWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTT DKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDY WGQGTTLTVSSVEGGSGGGSGGGSGGVDDIQLTQS PAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTS PKRWIYDTSKVASGVYPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEA EDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK
23	CD27 CAR- CD33 TEAM (VL/VH) [CD27-信号- trCD27- CD8H/TM-4- 1BBz-CD33L- CD33H-CD3 CAR-TEAM]	MARPHPWWLCVLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQ GKLCCQMCEPGTFLVKDCDQHRKAAQCDPCIPGVS FSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLRNCTITANAECAC RNGWQCRDKECTEDTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL RPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAFLAGTCGV LLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED GCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQL YNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDG LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRSGGSGATNFSLL KQAGDVEENPGPMHMETDTLLLWVLLLWVPGSTG DDIQLTQSPSTLSASVGDRVTITCRASESLDNYGIRFL TWFAQKPGKAPKLLMYAASNQGSVPSPRFSGSGSG TEFTLTISLQPDDEFATYYCQQTKEVPWSFGQGTKVE VKGGGGSGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSKASGYTITDSNIHWVRQAPGQSLEWIGYIYPY NGGTDYNQKFKNRATLTVDNPTNTAYMELSSLRSED TAFYVCVNGNPWLAYWGQGTTLTVSSGGGGSDIKL QQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVK QRPQGGLWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDK SSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYW GQGTTLTVSSVEGGSGGGSGGGSGGVDDIQLTQSP AIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSP KRWIYDTSKVASGVYPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEA DAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK
24	CD27 CAR- CD33 TEAM (VH/VL) [CD27-信号- trCD27- CD8H/TM-4- 1BBz-CD33H- CD33L-CD3 CAR-TEAM (具有 mCherry)]	MARPHPWWLCVLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQ GKLCCQMCEPGTFLVKDCDQHRKAAQCDPCIPGVS FSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLRNCTITANAECAC RNGWQCRDKECTEDPLPNPSLTARSSQALSPHPQP THLPYVSEMLEARAGHMQTLADFRQLPARTLSTH WPPQRSLSDFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLKRGR KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA EAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDA LHMQALPPRSGGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMH METDTLLLWVLLLWVPGSTGDEVQLVQSGAEVKKP GSSVKVSKASGYTITDSNIHWVRQAPGQSLEWIGY

[0129]

		IYPYNGGTDYNQKFKNRATLTVDNPTNTAYMELSSL RSEDYAFYYCVNGNPWLAYWGQGTTLTVSSGGGGS GGGGSGGGGSDIQLTQSPSTLSASVGDRVITICRASE SLDNYGIRFLTWFQQKPGKAPKLLMYAASNQGS PSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFAFYCYCQQTKEVP WSFGQGTKEVEKGGGGSDIKLQQSGAELARPGASV KMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPQGQLEWIGYINP SRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSE DSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSVEGGS GGSGSGSGSGGVDDIQLTQSPAIMSASPGEKVTMT RASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVP YRFSGSGSGTSYSLTISMEADAATYYCQQWSSNP LTFGAGTKLELKHHHHHH
25	CD27 CAR- CD33 TEAM (VL/VH) [CD27-信号- trCD27- CD8H&TM-4- 1BBz-CD33L- CD33H-CD3 CAR-TEAM (具有 mCherry)]	MARPHPWWLCVLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQ GKLCCQMCEPGTFLVKDCDQHRKAAQCDPCIPGVS FSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLRNCTITANAECAC RNGWQCRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQP THLPYVSEMLEARAGHMQLADFRQLPARTLSTH WPPQRSLSGSDIFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLKRGR KLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCE LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA EAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDA LHMQUALPPRSGSGGATNFSLLKQAGDVEENPGPMH METDTLLLWVLLLWVPGSTGDDIQLTQSPSTLSASV GDRVITICRASESLDNYGIRFLTWFQQKPGKAPKLL MYAASNQGSVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFA TYCYCQQTKEVPWSFGQGTKEVEKGGGGSGGGGSG GGGSEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTITDS NIHWVRQAPGQSLEWIGYIYPYNGGTDYNQKFKNR ATLTVDNPTNTAYMELSSLRSEDYAFYYCVNGNPWL AYWGQGTTLTVSSGGGGSDIKLQQSGAELARPGAS VKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPQGQLEWIGYIN PSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLT EDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSVEG SGSGSGSGSGGVDDIQLTQSPAIMSASPGEKVTM TCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASG VPYRFSGSGSGTSYSLTISMEADAATYYCQQWSS NPLTFGAGTKLELKHHHHHH
26	连接子-1 (G3S)3	GGGSGGGSGGGS
27	连接子-2 (G4S)3	GGGGSGGGSGGGGS
28	连接子-3 (G4S)4	GGGGSGGGSGGGSGGGGS
29	连接子-4	GSTSGSGKPGSGEGSTKG
30	连接子-5	GGSSRSSSSGGGGSGGGG
31	T2A	SGGGGEGRGSLTCGDVEENPGPR
32	P2A	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP
33	IgK-信号序列	METDTLLLWVLLLWVPGSTGD

[0130]	34	连接子	GGGS
	35	连接子-(G3S)20	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG SGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG
	36	连接子-(G3S)7	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG
	37	连接子-(G3S)2	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG
	38	连接子-(G3S)4	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG
	39	连接子-(G3S)5	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG
	40	连接子-(G3S)6	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG
	41	连接子-(G4S)2	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG
	42	连接子-(G4S)5	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG
	43	连接子-(G4S)6	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG

[0131] 实施例

[0132] 急性髓系白血病 (AML) 是成人中最常见的急性白血病, 虽然半个世纪前一律是致命的, 但是现在通过强化化疗, 40% 的成人患者可以达到治愈¹。虽然这代表实质性的进步, 但是对于其中治愈速率迅速下降到百分之十以下的老年患者和复发的/难治性患者来说, 临床需求仍然显著未得到满足¹。自强化“诱导”细胞毒性化学疗法问世的五十多年以来, AML 的治疗方法改变很小, 然而, 自从 2017 年以来, 已经批准了八种 FDA 药物, 包括 hedgehog 抑制剂、BCL-2 抑制剂、FLT3 抑制剂、IDH1/2 抑制剂、CD33 抗体偶联药物以及更有效力的诱导化学疗法的脂质体制剂²。虽然这些干预代表实质性进展, 但是大多数 AML 患者仍然对治疗无反应或出现复发, 并且死于该疾病。

[0133] 免疫疗法革命在许多恶性肿瘤中看到了显著疗效³。然而, 这种治疗方式在 AML 中的成效有限, 这可能是由于其具有低的肿瘤突变负荷, 导致新抗原缺乏, 再加上存在具有大量髓源性抑制细胞 (MDSC)、调节性 T 细胞 (T_{reg}) 和耗竭的效应 T 细胞 (T_{eff}) 的免疫抑制微环境⁴⁻⁸。最近在针对新诊断和复发的 AML 患者的 T 细胞亚群和免疫检查点表达的研究发现, 与健康对照相比, T_{reg} 和耗竭的 T_{eff} 细胞在 AML 患者中富集⁹。

[0134] 避开 T 细胞启动和有限的天然 TCR 库的一种方式是利用嵌合抗原受体 (CAR) 对 T 细胞进行重定向, 并且输注 CAR-T 细胞作为过继性免疫疗法。CAR-T 细胞疗法已迅速革新了淋巴恶性肿瘤的治疗, 其中 2017 年 FDA 批准了两项针对侵袭性 B 细胞恶性肿瘤的该疗法^{10,11}, 并且现在已达四项。这些疗法破坏了恶性克隆, 然而, 也存脱靶 (on target, off tumor) 效应, 所述效应会导致正常 B 细胞被清除, 从而引发低丙球蛋白血症, 幸运的是, 所述低丙球蛋白血症可通过施用静脉内免疫球蛋白来控制。

[0135] 使用过继性细胞疗法来治疗 AML 变得更加困难。AML 母细胞上存在的大多数可用表面抗原也存在于许多髓细胞和干细胞群体中, 长时间清除所述髓细胞和干细胞群体与患者生存不相容。最近已出现了针对靶向 AML 中的许多不同抗原的 CAR (CD123^{12,13}、CD33^{14,15}、FLT3¹⁶), 其中的一些目前正处于 I 期临床试验中, 但是没有一种能像 CD19 那样理想地用于淋巴恶性肿瘤¹⁷。这些 CAR 中的至少一种已经导致了严重的副作用, 包括第一位接受治疗的患者死亡, 这可能是由于 CAR 靶向正常血管上的 CD123 所产生的副作用导致的¹⁸。

[0136] CD70 是肿瘤坏死 α 家族成员, 其充当参与 T 细胞信号传导的 CD27 的配体。CD70 在正常组织上的表达极其受限, 但是在包括 AML 在内的许多癌症类型中显著过表达^{19,20}。首个靶

向CD70的AML药物ARGX-110,是一种抗体偶联药物(ADC),在针对不适合传统疗法的新确诊的AML患者的I期试验中显示出令人瞩目的应答速率²¹。尽管经验有限,但是此前CD19靶向的双特异性T细胞接合子博纳吐单抗(blinatumomab)的经验表明,在有效的同时,CAR-T细胞的临床疗效相较于传统的基于抗体的疗法,可能具有更强的临床疗效²²。

[0137] 在CAR-T毒性的临床管理方面有所改进的情况下,针对淋巴恶性肿瘤的CAR-T细胞疗法现在面临的关键问题是复发(图2)。特别是在B细胞急性淋巴细胞白血病(ALL)中,高达94%的复发患者可能出现靶抗原缺失的情况²³。令人警醒的是,即使精心选择的靶抗原表达仅有适度下降,也可能足以逃逸CAR杀伤²⁴。为了解决抗原逃逸所面临的挑战,已经采用了若干种策略:靶向两种抗原且连接有单链可变片段的双特异性CAR(串联CAR)或在同一T细胞中表达的两种完全独立的CAR(双顺反子CAR),目前处于早期临床试验中,其成功率不同²⁵⁻²⁹。最近开创了另一种新型双重靶向策略,所述策略利用分泌双特异性T细胞接合抗体分子(TeAM)的CAR-T细胞(CAR-TeAM),所述CAR-TeAM同时靶向多种抗原并且通过将TeAM局限在肿瘤部位分泌,以最小化靶标毒性³⁰。此技术具有额外的优点,即通过由CAR分泌的TeAM,利用未经转导的但已输注的T细胞,所述T细胞通常占临床级CAR-T细胞产物中的所有输注的细胞的>70%(由于需要低MOI来排除多个病毒整合事件)。特别是在AML中,任何单一独特抗原都缺乏统一表达,这表明增加靶抗原表达的策略或多靶向方法可能是较为明智的¹⁹。一种特别充分表征的AML抗原是CD33,其在高达90%的白血病母细胞中表达(也在正常髓细胞和一些祖细胞上表达,但不在CD34⁺干细胞上表达³¹)³²。对AML细胞系和原发性患者样品的全面AML表面组学分析预测,同时靶向AML中的CD33和CD70在97%以上的患者中将是可行的,且不会出现重叠的旁观者组织毒性¹⁹(图3A-3C)。为了同时解决抗原异质性,通过募集T_{常规}、T_{调节}和耗竭的T_{效应}来促进局部抗肿瘤活性,并且消除免疫抑制性的MDSC,我们构建了一种分泌分泌靶向CD70 CAR的CD3/CD33 TeAM(CAR-TeAM)(图1和图5A)。

[0138] 靶向CD70的CAR-T细胞会转运到骨髓,在所述骨髓中其使AML母细胞裂解,并且同时局部递送极少量的CD33 TeAM,以接合T_{常规}细胞,并且进一步增强靶向CD70的CAR对AML母细胞和MDSC的作用,但是由于TeAM在人体内极快地被清除,所以不会引起全身毒性²²(图4)。

[0139] 尽管双顺反子载体的体积较大,但是trCD27-CAR-CD33-TeAM在三名健康供体的T细胞中的转导效率与单靶向的构建体的转导效率相当,均超过60%(图5B)。结果表明,TeAM是由CAR-T细胞分泌的(图5C)。结果还表明,来自trCD27-CAR-CD33-TeAM的上清液的TeAM与表达靶标的细胞特异性结合(图5D)。结果还表明,CD33 TeAM使细胞表达CD69的百分比降低(图5E)。

[0140] 另外的实验在治疗(1)表达CD33,(2)不表达CD33,以及(3)不表达CD70的Molm13细胞方面将trCD27-CD33-TeAM构建体与trCD27-CD19-TeAM构建体进行了比较。将用CD70CAR^{CD33TeAM}构建体或CD70CAR^{CD19TeAM}构建体转导的细胞或未经转导的T细胞(UTD)添加到transwell插入室的顶部。将未经转导的T细胞与Molm13^{WT}细胞或Molm13^{CD33KO}细胞一起添加到transwell插入室的底部。仅CD70CAR^{CD33TeAM}构建体能够介导Molm13^{WT}细胞清除,所述细胞清除是靶标依赖性的,并且随着CD33的缺失而消除。底部上缺乏UTD的孔也不能够杀死肿瘤,这表明杀伤作用是由UTD+TeAM而非单独的TeAM介导的。(图6)。这些结果表明,TeAM介导UTD驱动的依赖靶标的细胞毒性作用。实验还表明,通过CAR和TeAM进行的同时对T细胞进行重定向,对异质性肿瘤是有效的,并且优于通过单独几种CAR的混合使用。针对具有不同水

平的CD70或CD33的AML靶标(图7A,左)将单独靶向的CD70或CD33 CAR-T细胞与CD70CAR^{CD33TEAM}或CD70CAR^{CD19TEAM}进行比较。在在incucyte仪器上进行的该实时细胞毒性测定中,CD70CAR^{CD33TEAM}细胞在效应子与靶标2:1的比例下,表现出优越的细胞毒性和CAR扩增能力。(图7A-7B)。CAR-T细胞以一式两份形式从3名健康供体的T细胞制备的。

[0141] 接下来,测试CD70CAR^{CD33TEAM}在AML的异种移植模型中在体内的有效性。在第-7天,向NSG小鼠注射 5×10^5 个经混合的Molm13细胞群(90%的Molm13^{CD70KO},10%的Molm13^{WT},每组n=10只小鼠),所述细胞表达生物发光(BLI)报告基因叩甲虫绿(图8A)。在第0天,小鼠接受 2×10^6 个CD70CAR^{CD19TEAM}或CD70CAR^{CD33TEAM}细胞(每组中每个单独的T细胞供体对应n=5只小鼠)。连续BLI监测揭示了CD70CAR^{CD33TEAM}小鼠组中的肿瘤根除,但是CD70CAR^{CD19TEAM}中的肿瘤生长不受控制。(图8B-8C)。CAR-T注射后第14-28天,通过流式细胞术测定外周血CAR-T细胞的扩增(图8D)。在CAR-T注射后第+21天,通过流式细胞术对小鼠血液进行了外周血CAR-T表型谱分析,并与未经刺激且未经转导的供体匹配的T细胞进行了比较(图8E)。

[0142] 还发现在体内环境下,与CD70CAR^{CD19TEAM}细胞的表达程序相比,CD70CAR^{CD33TEAM}细胞呈现出不同的表达程序。通过荧光激活的细胞分选(FACS),从混合肿瘤模型小鼠的脾中分离出CAR-T细胞。然后,裂解CAR-T细胞,并且除了使用定制‘插入式’基因集之外,CAR-T细胞还通过nanosttring技术利用CAR-T细胞表征面板进行了基因表达分析(图9A-9C)。

[0143] 接下来,确定降低施用于患者源性异种移植AML小鼠模型的CAR-T细胞的剂量是否会改变治疗效果。施用一定剂量的 5×10^5 个和 1×10^6 个CD70 CAR CD33 TEAM CAR-T细胞(图10)。结果表明,在使用这两种剂量的小鼠体内,CD33+/CD45+细胞(肿瘤细胞)的数量都出现相似程度的减少。

[0144] 总体而言,这些发现证明了靶向CD70的CAR的效力,所述靶向CD70的CAR分泌CD33靶向的T细胞接合抗体分子,可针对具有可变的CD33和CD70抗原表达情况的肿瘤靶标发挥作用。

[0145] 一种特征已被充分表征的AML抗原是CD33,其在高达90%的白血病母细胞中表达³¹(也在正常髓细胞和一些祖细胞上表达,但不在CD34+干细胞上表达³²)。重要的是,通过用单克隆抗体对骨髓自体移植植物进行处理来消除CD33+细胞虽会使定向髓系祖细胞消除,但正常的三系造血虽会延迟却仍会发生。³³出乎意料的是,CD33还存在于肝细胞上,并且使用CD33 ADC、吉妥珠单抗奥唑米星(gemtuzumab ozogamicin,GO)进行治疗已导致以肝静脉闭塞性疾病(VOD)形式出现的致命肝毒性。³⁴CD33还可以存在于患有AML的患者的骨髓中的免疫抑制性MDSC上。最近,已经有研究在体外证明了使用CD3/CD33双特异性T细胞接合子对这些MDSC和AML进行协同靶向治疗是成功的。³⁵对AML细胞系和初诊患者样品进行全面AML表面组学分析预测,在超过97%的患者中,同时靶向AML中的CD33和CD70是可行的,且不会出现累及旁观者组织的重叠毒性。¹⁹

[0146] 为了同时解决抗原异质性,通过募集T_{常规}、T_{调节}和耗竭的T_{效应}来促进局部抗肿瘤活性,并且消除免疫抑制性MDSC,研究人员基于先前优化的靶向CD70的CAR-T平台构建并测试了分泌CD3/CD33 TEAM的靶向CD70的CAR(CAR-TEAM)。³⁶

[0147] 先前已证实具有经修饰的铰链和跨膜结构域的第二代基于配体的靶向CD70的CAR构建体相对于未经修饰的版本在AML的患者源性异种移植模型中消除蛋白酶介导的CAR切割的优势(Leick等人2022)。然而,在一些小鼠中,CD70抗原表达存在缺失(图11A)。CD33是

大多数AML母细胞上的高度表达的髓细胞抗原(并且事实上,在PDX模型中也呈现高水平表达,图11B),并且已经表明,CAR-T细胞对CD33和CD70的组合靶向能消除大多数的AML,且不会出现累及旁观者的非重叠性脱靶毒性(Perna等人2017)。因此,使用经优化的靶向CD70的CAR作为平台,通过将其修饰成分泌CD33靶向的T细胞接合抗体分子(TEAM),开发出一种双重靶向策略,将其命名为70³³(图11C)。对于下游测试,将此构建体与CD33靶向的CAR(CAR33)和对照版本进行比较,所述对照版本分泌靶向CD19的TEAM 70¹⁹, (CD19是在典型AML病例中未发现的抗原)(图11D)。尽管添加了分泌型TEAM这一有效载荷,但是转导效率在健康供体的T细胞中是十分充足的并且与CAR33的转导效率相当(图11E)。

[0148] 为了确保TEAM分子与其预期抗原的适当靶结合,收集了用各构建体转导的jurkat T细胞的上清液,并且将所述上清液与表达相关抗原的靶细胞一起温育,并且通过流式细胞术测定TEAM的存在(图12A)。发现,70³³上清液表现出与表达CD33的K562以及未经转导的T(UTD)细胞结合,而70¹⁹上清液与表达CD19的K562和UTD结合。在单独的证实性测定中,将70³³上清液或70¹⁹上清液添加到固定的molm13肿瘤靶标中,之后是添加抗His-PE抗体,从而允许通过显微镜观察来使TEAM结合可视化(图12B)。

[0149] 接下来,为了评估TEAM分子激活旁观者T细胞的能力,将70³³上清液、70¹⁹上清液或UTD上清液添加到含有固定的肿瘤靶标、UTD T细胞和抗激活标志物CD69抗体的孔中。发现,70³³上清液导致的UTD CD69表达比70¹⁹导致的UTD CD69表达更显著($p=.0001$),所述70¹⁹导致的UTD CD69表达与UTD上清液导致的UTD CD69表达不可区分(图12C)。最后,为了确定TEAM的细胞溶解能力,进行了transwell测定,在所述测定中,将产生TEAM的细胞放置在transwell插入室的顶部中(transwell插入室过小以至于细胞不能通过,但是对于蛋白质通过来说足够大),同时将肿瘤靶标和UTD放置在底部中(图12D)。仅当将产生70³³的细胞置于transwell的顶部,且底部包含UTD时,肿瘤才会被消除($p=.018$)。此现象是靶标特异性的,因为无论transwell插入室的顶部放置的是70³³还是70¹⁹,Molm13^{CD33KO}(CD33基因敲除的Molm细胞)都以相同速率生长($p=.97$)。

[0150] 在证实CD33 TEAM分子的特异性和细胞溶解能力后,研究溶液对整个构建体在不同水平的CD33和CD70抗原表达的表现进行了研究。将CAR33、70¹⁹、70³³的杀伤能力与野生型molm13细胞系和经工程化的molm13细胞系的杀伤能力进行比较,并且发现,70³³CAR-T细胞介导针对以下的优越的细胞毒性:molm13^{WT}相对于70¹⁹($p=.064$)、molm13^{CD33KO}相对于CAR33($p=.007$)和molm13^{CD70KO}相对于70¹⁹($p<.0001$)(图13A-13C)。70³³CAR-T细胞在每种情况的不同组合中也具有最高水平的扩增(图13B)。在使用70³³以靶向AML细胞系Kasumi1、Monomac1和OCI-AML3中的不同天然水平的CD33和CD70时,看也观察到类似结果(图17)。

[0151] 在确立了双靶向70³³系统的体外效力后,返回到原始PDX模型,以确定此策略是否比原始经优化的CD70 CAR有所改进。在PDX模型的应激版本中,在第-4天向NSG小鼠注射 5×10^6 个新鲜PDX细胞,之后是在第0天注射 5×10^5 个或 1×10^6 个70³³或70¹⁹CAR-T细胞(分别为先前治疗剂量的 $1/2$ 和 $1/4$)(图14A)。在两种剂量水平下,到第+14天,70³³CAR-T细胞产生了优异的肿瘤控制(分别地, $p=.0028$, $p=.0059$,图14B)、数值上更高的扩增(分别地, $p=.78$, $p=.13$,图14C)和延长的生存期(两者均为 $p=.027$,图14D)。

[0152] 为了更精确地模拟此前在CD70 CAR单一疗法后识别出的CD70抗原逃逸,在第-7天将 5×10^5 个Molm13^{WT}细胞与Molm13^{CD70KO}细胞的混合物注射到NSG小鼠体内,七天后在第0天注

射 2×10^6 个 70^{19} 、 70^{33} 或UTD细胞(图15A)。相对于 70^{19} 、 70^{33} CAR-T细胞在各时间点(第+14天, $p = .053$;第+21天, $p = 0.13$;第+28天, $p = .00087$)的扩增显著更高。通过生物发光成像评估发现, 70^{33} 小鼠体内的肿瘤在第+18天时被来自两种健康供体的 70^{33} CAR-T细胞彻底清除,而 70^{19} CAR-T细胞未能控制肿瘤生长($p = 0.0003$,图15C-15D)。在第+21天时,两种构建体主要都表现出中央记忆样表型(图15E)。

[0153] 为了了解是否存在不同的转录程序驱动这两种CAR-T细胞的行为,在第+28天时收集来自每个组的小鼠的脾,并且针对CAR-T细胞进行FACS分选,所述CAR-T细胞然后经历靶向基因表达分析(图15F)。在 70^{33} CAR-T中,参与CAR-T细胞组织信号传导的关键因子如JAK2和MYC的表达较高,而在 70^{19} CAR-T细胞中,如CISH和PDCD1 (PD-1)等T细胞功能的负调节子的表达较高。有趣的是,由于采用NK细胞样表型已与CAR-T功能障碍相关(Good等人2021),在 70^{33} 相对于 70^{19} CAR-T细胞中,表达倍数变化最高的基因是NK细胞受体NCR1。无偏差通路聚类分析结果显示,各构建体分别聚类,并在激活、细胞毒性和持续性的基因集评分(signature score)方面存在关键差异(图15G、图18)。 70^{33} CAR-T细胞中的TCR信号通路的评分显著更高,这表明CAR-T细胞可同时通过CAR以及TCR(通过与TEAM的接合)被激活(图15H)。

[0154] CAR-T细胞疗法在癌症患者中的一个局限性是,由于癌症自身的免疫抑制作用,或者由于高强度的化学免疫疗法对T细胞造成损伤,用于制备基质的T细胞本身存在内在缺陷(Das等人2019;Fraiotta等人2018)。为了评估本文所述的TEAM成功利用AML患者的T细胞来靶向AML的能力,从已经接受过多种高强度化学疗法和免疫疗法(包括同种异体骨髓移植)的AML患者中获取了PBMC(图16A)。分离出T细胞,并且进行流式细胞术表型分析。结果发现,与健康供体的T细胞相比,AML患者的T细胞呈现出更分化且耗竭的表型(图16B-16C)。AML患者的细胞在存在肿瘤的情况下表现出显著激活($p = .036$),尽管激活水平低于健康供体的T细胞($p = .0052$,图16G)。为了评估AML患者的T细胞作为通过TEAM重定向的旁观者细胞所具有的细胞毒性,将从这些患者身上分离出的T细胞与TEAM生产者细胞和AML靶标共培养。AML患者统一表现出显著的细胞毒性($p = .0002$,尽管其效力低于健康供体T细胞, $p = .017$,图16D)。来自AML患者的T细胞能产生炎性细胞因子,尽管其数量低于健康供体T细胞产生的炎性细胞因子的数量,但是有趣的是IFN γ 除外(图16E)。

[0155] 参考文献

[0156] 1.Döhner H,Weisdorf DJ,Bloomfield CD.急性髓系白血病(Acute Myeloid Leukemia).《新英格兰医学杂志(New England Journal of Medicine)》2015;373(12):1136-1152.DOI:10.1056/NEJMr1406184。

[0157] 2.Guerra VA,DiNardo C,Konopleva M.基于维奈托克的急性髓系白血病疗法(Venetoclax-based therapies for acute myeloid leukemia).《临床血液学最佳实践和研究(Best practice&research Clinical haematology)》2019;32(2):145-153。(英文版).DOI:10.1016/j.beha.2019.05.008。

[0158] 3.Yarchoan M,Hopkins A,Jaffee EM.肿瘤突变负荷对PD-1抑制剂的应答率(Tumor Mutational Burden and Response Rate to PD-1Inhibition).《新英格兰医学杂志》2017;377(25):2500-2501。(英文版).DOI:10.1056/NEJMc1713444。

[0159] 4.Daver NG,Basu S,Garcia-Manero G等人纳武单抗和氮杂胞苷(AZA)在患有复

发的AML的患者(pts)中的IB/II期研究(Phase IB/II study of nivolumab with azacytidine(AZA) in patients(pts)with relapsed AML).《临床肿瘤学杂志(Journal of Clinical Oncology)》2017;35(15_增刊):7026-7026.DOI:10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.7026。

[0160] 5.Lawrence MS,Stojanov P,Polak P等人癌症中的突变异质性和新的癌症相关基因的探寻(Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes).《自然》2013;499(7457):214-218.(英文版).DOI:10.1038/nature12213。

[0161] 6.Papaemmanuil E,Gerstung M,Bullinger L等人急性髓系白血病的基因组分类和预后(Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia).《新英格兰医学杂志》2016;374(23):2209-2221.DOI:10.1056/NEJMoa1516192。

[0162] 7.Pyzer AR,Stroopinsky D,Rosenblatt J等人髓源性抑制细胞在患有AML的患者中扩增并依赖于MUC1表达(Myeloid-Derived Suppressor Cells Are Expanded in Patients with AML and Are Dependent on MUC1 Expression).《血液》2014;124(21):226-226.DOI:10.1182/blood.V124.21.226.226。

[0163] 8.Alex AA,Tartour E,Gey A等人急性白血病中的髓源性抑制细胞及其与常规细胞遗传学和分子风险因素的相关性(Myeloid Derived Suppressor Cells in Acute Leukemia and Its Association with Conventional Cytogenetic and Molecular Risk Factors).《血液》2012;120(21):1446-1446.DOI:10.1182/blood.V120.21.1446.1446。

[0164] 9.Williams P,Basu S,Garcia-Manero G等人初诊及复发的急性髓系白血病患者中的T细胞子集的分布以及免疫检查点受体和配体的表达(The distribution of T-cell subsets and the expression of immune checkpoint receptors and ligands in patients with newly diagnosed and relapsed acute myeloid leukemia).《癌症(Cancer)》2019;125(9):1470-1481.DOI:10.1002/cncr.31896。

[0165] 10.Schuster SJ,Svoboda J,Chong EA等人嵌合抗原受体T细胞用于难治性B细胞淋巴瘤(Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas).《新英格兰医学杂志》2017;377(26):2545-2554.DOI:10.1056/NEJMoa1708566。

[0166] 11.Neelapu SS,Locke FL,Bartlett NL等人阿基仑赛CAR T细胞疗法用于难治性大B细胞淋巴瘤(Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma).《新英格兰医学杂志》2017;377(26):2531-2544.DOI:10.1056/NEJMoa1707447。

[0167] 12.Mardiros A,Dos Santos C,McDonald T等人表达CD123特异性嵌合抗原受体的T细胞表现出特异性细胞溶解效应功能和对人急性髓系白血病的抗肿瘤作用(T cells expressing CD123-specific chimeric antigen receptors exhibit specific cytolytic effector functions and antitumor effects against human acute myeloid leukemia).《血液》2013;122(18):3138-3148.DOI:10.1182/blood-2012-12-474056。

[0168] 13.Luo Y,Chang L-J,Hu Y,Dong L,Wei G,Huang H.首例人类CD123特异性嵌合抗原受体修饰的T细胞用于治疗难治性急性髓系白血病(First-in-Man CD123-Specific

Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells for the Treatment of Refractory Acute Myeloid Leukemia).《血液》2015;126(23):3778-3778.DOI:10.1182/blood.V126.23.3778.3778。

[0169] 14.Wang Q-s,Wang Y,Lv H-y等人对一名患有复发的且难治性急性髓系白血病的患者采用CD33导向的嵌合抗原受体修饰的T细胞进行治疗(Treatment of CD33-directed Chimeric Antigen Receptor-modified T Cells in One Patient With Relapsed and Refractory Acute Myeloid Leukemia).《分子疗法(Molecular Therapy)》2015;23(1):184-191.DOI:doi.org/10.1038/mt.2014.164。

[0170] 15.Kim MY,Yu K-R,Kenderian SS等人造血干细胞中的CD33的基因失活使CAR T细胞免疫疗法能够用于急性髓系白血病(Genetic Inactivation of CD33 in Hematopoietic Stem Cells to Enable CAR T Cell Immunotherapy for Acute Myeloid Leukemia).《细胞(Cell)》2018;173(6):1439-1453.e19.DOI:doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.013。

[0171] 16.Jetani H,Garcia-Cadenas I,Nerreter T等人靶向FLT3的CAR T细胞对FLT3-ITD+AML具有有效活性,并且与FLT3抑制剂克萊拉尼协同地起作用(CAR T-cells targeting FLT3 have potent activity against FLT3-ITD+AML and act synergistically with the FLT3-inhibitor crenolanib).《白血病(Leukemia)》2018;32(5):1168-1179.DOI:10.1038/s41375-018-0009-0。

[0172] 17.Hofmann S,Schubert ML,Wang L等人嵌合抗原受体(CAR)T细胞疗法用于急性髓系白血病(AML)(Chimeric Antigen Receptor(CAR)T Cell Therapy in Acute Myeloid Leukemia(AML)).《临床医学杂志(Journal of clinical medicine)》2019;8(2)(英文版).DOI:10.3390/jcm8020200。

[0173] 18.Melao A.FDA在患者死亡后暂停UCART123试验(FDA Suspends UCART123Trials After Patient Death).《免疫肿瘤学新闻(Immuno-oncology News)》.2017年9月7日。

[0174] 19.Perna F,Berman SH,Soni RK等人整合蛋白质组学和转录组学用于AML的系统性组合式嵌合抗原受体疗法(Integrating Proteomics and Transcriptomics for Systematic Combinatorial Chimeric Antigen Receptor Therapy of AML).《癌细胞(Cancer Cell)》2017;32(4):506-519.e5.DOI:doi.org/10.1016/j.ccell.2017.09.004。

[0175] 20.Riether C,Schürch CM,Bührer ED等人CD70/CD27信号传导促进母细胞干性并且是急性髓系白血病的可行治疗靶标(CD70/CD27 signaling promotes blast stemness and is aviable therapeutic target in acute myeloid leukemia).《实验医学杂志(J Exp Med)》2017;214(2):359-380.(英文版).DOI:10.1084/jem.20152008。

[0176] 21.Ochsenbein A.在正在进行的I/II期临床试验中,靶向CD70的Argx-110与阿扎胞苷的联合使用在初诊AML患者中表现出良好的安全性

[0177] 概况和有前景的抗白血病活性:摘要(Argx-110 Targeting CD70,in Combination with Azacitidine,Shows Favorable Safety Profile and Promising Anti-Leukemia Activity in Newly Diagnosed AML Patients in an Ongoing Phase 1/2Clinical Trial.Abstract)2680.《美国血液学会年会(American Society of

Hematology Annual Meeting)》.加利福尼亚州圣地亚哥(San Diego,CA)2018。

[0178] 22.Slaney CY,Wang P,Darcy PK,Kershaw MH.CAR与BiTE:用于癌症治疗的T细胞重定向策略的比较(CARs versus BiTEs:AComparison between T Cell-Redirection Strategies for Cancer Treatment).《癌症发现(Cancer Discov)》2018;8(8):924-934.(英文版).DOI:10.1158/2159-8290.Cd-18-0297。

[0179] 23.Majzner RG,Mackall CL.从CAR T细胞旅程的第一程学习到的临床课程(Clinical lessons learned from the first leg of the CAR T cell journey).《自然医学(Nature Medicine)》2019;25(9):1341-1355.DOI:10.1038/s41591-019-0564-6。

[0180] 24.Fry TJ,Shah NN,Orentas RJ等人CD22靶向的CAR T细胞诱导初始的或对CD19靶向的CAR免疫疗法耐药的B-ALL的缓解(CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy).《自然医学(Nat Med)》2018;24(1):20-28.(英文版).DOI:10.1038/nm.4441。

[0181] 25.Shah NN,Zhu F,Schneider D等人双特异性抗CD19、抗CD20嵌合抗原受体(CAR)修饰的T细胞用于复发的难治性非霍奇金淋巴瘤的I期研究结果(Results of a phase I study of bispecific anti-CD19,anti-CD20 chimeric antigen receptor (CAR)modified T cells for relapsed,refractory,non-Hodgkin lymphoma).《临床肿瘤学杂志》2019;37(15_增刊):2510-2510.DOI:10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.2510。

[0182] 26.Gardner R,Annesley C,Finney O等人CD19 x CD22双特异性CAR T细胞用于增强对急性淋巴细胞白血病的抗白血病靶向性的早期临床经验(Early Clinical Experience of CD19 x CD22 Dual Specific CAR T Cells for Enhanced Anti-Leukemic Targeting of Acute Lymphoblastic Leukemia).《血液》2018;132:278-278.DOI:10.1182/blood-2018-99-113126。

[0183] 27.Amrolia PJ,Wynn R,Hough R等人同时靶向CD19和CD22:AUTO3双顺反子嵌合抗原受体(CAR)T细胞疗法在患有复发的/难治性B细胞急性淋巴细胞白血病(r/r B-ALL)的儿童患者中的I期研究:Amelia研究(Simultaneous Targeting of CD19 and CD22:Phase I Study of AUTO3,a Bicistronic Chimeric Antigen Receptor(CAR)T-Cell Therapy, in Pediatric Patients with Relapsed/Refractory B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia(r/r B-ALL):Amelia Study).《血液》2018;132(增刊1):279-279.DOI:10.1182/blood-2018-99-118616。

[0184] 28.Hossain N,Sahaf B,Abramian M等人靶向CD19和CD22的双特异性CAR在患有B细胞恶性肿瘤的成人中的I期经验(Phase I Experience with a Bi-Specific CAR Targeting CD19 and CD22 in Adults with B-Cell Malignancies).《血液》2018;132:490-490.DOI:10.1182/blood-2018-99-110142。

[0185] 29.Schultz L,Davis K,Baggott C等人CD19/CD22双特异性嵌合抗原受体(CAR)疗法在患有B细胞急性淋巴细胞白血病(ALL)的儿童和青少年中的I期研究(Phase I Study of CD19/CD22 Bispecific Chimeric Antigen Receptor(CAR)Therapy in Children and Young Adults with B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia(ALL)).《血液》2018;132:898-898.DOI:10.1182/blood-2018-99-117445。

[0186] 30.Choi BD,Yu X,Castano AP等人分泌BiTE的CAR-T细胞可规避抗原逃逸且未检

测到毒性 (CAR-T cells secreting BiTEs circumvent antigen escape without detectable toxicity).《自然生物技术 (Nature Biotechnology)》2019;37 (9):1049-1058.DOI:10.1038/s41587-019-0192-1。

[0187] 31.Hauswirth AW, Florian S, Printz D 等人靶受体CD33在CD34+/CD38-/CD123+ AML干细胞中的表达 (Expression of the target receptor CD33 in CD34+/CD38-/CD123+AML stem cells).《欧洲临床研究杂志 (European Journal of Clinical Investigation)》2007;37(1):73-82.DOI:10.1111/j.1365-2362.2007.01746.x。

[0188] 32.Nguyen DH, Ball ED, Varki A. 髓细胞前体和急性髓系白血病细胞表达多种CD33相关的Siglecs (Myeloid precursors and acute myeloid leukemia cells express multiple CD33-related Siglecs).《实验血液学 (Experimental Hematology)》2006;34 (6):728-735.DOI:doi.org/10.1016/j.exphem.2006.03.003。

[0189] 33.Robertson MJ, Soiffer RJ, Freedman AS 等人去除CD33阳性细胞的人骨髓可介导造血功能延迟但更持久的重建:应用MY9单克隆抗体净化自体移植物治疗急性髓系白血病的临床试验 (Human bone marrow depleted of CD33-positive cells mediates delayed but durable reconstitution of hematopoiesis:clinical trial of MY9 monoclonal antibody-purged autografts for the treatment of acute myeloid leukemia).《血液》1992;79(9):2229-36. (英文版)。

[0190] 34.Rajvanshi P, Shulman HM, Sievers EL, McDonald GB. 吉妥珠单抗奥唑米星 (Mylotarg) 疗法后的肝窦梗阻 (Hepatic sinusoidal obstruction after gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) therapy).《血液》2002;99(7):2310-4. (英文版).DOI:10.1182/blood.v99.7.2310。

[0191] 35.Jitschin, R. 等人CD33/CD3双特异性T细胞接合 (BiTE®) 抗体构建体靶向单核细胞性AML髓源性抑制细胞 (CD33/CD3-bispecific T-cell engaging (BiTE®) antibody construct targets monocytic AML myeloid-derived suppressor cells).《癌症免疫疗法杂志 (Journal for ImmunoTherapy of Cancer)》第6卷预印本<https://doi.org/10.1186/s40425-018-0432-9>(2018)。

[0192] 36.Leick, M.B. 等人不可切割的铰链可增强CAR-T细胞对急性髓系白血病的亲和力及的扩增能力 (Non-cleavable hinge enhances avidity and expansion of CAR-T cells for acute myeloid leukemia).《癌细胞》40,494-508.e5(2022)。

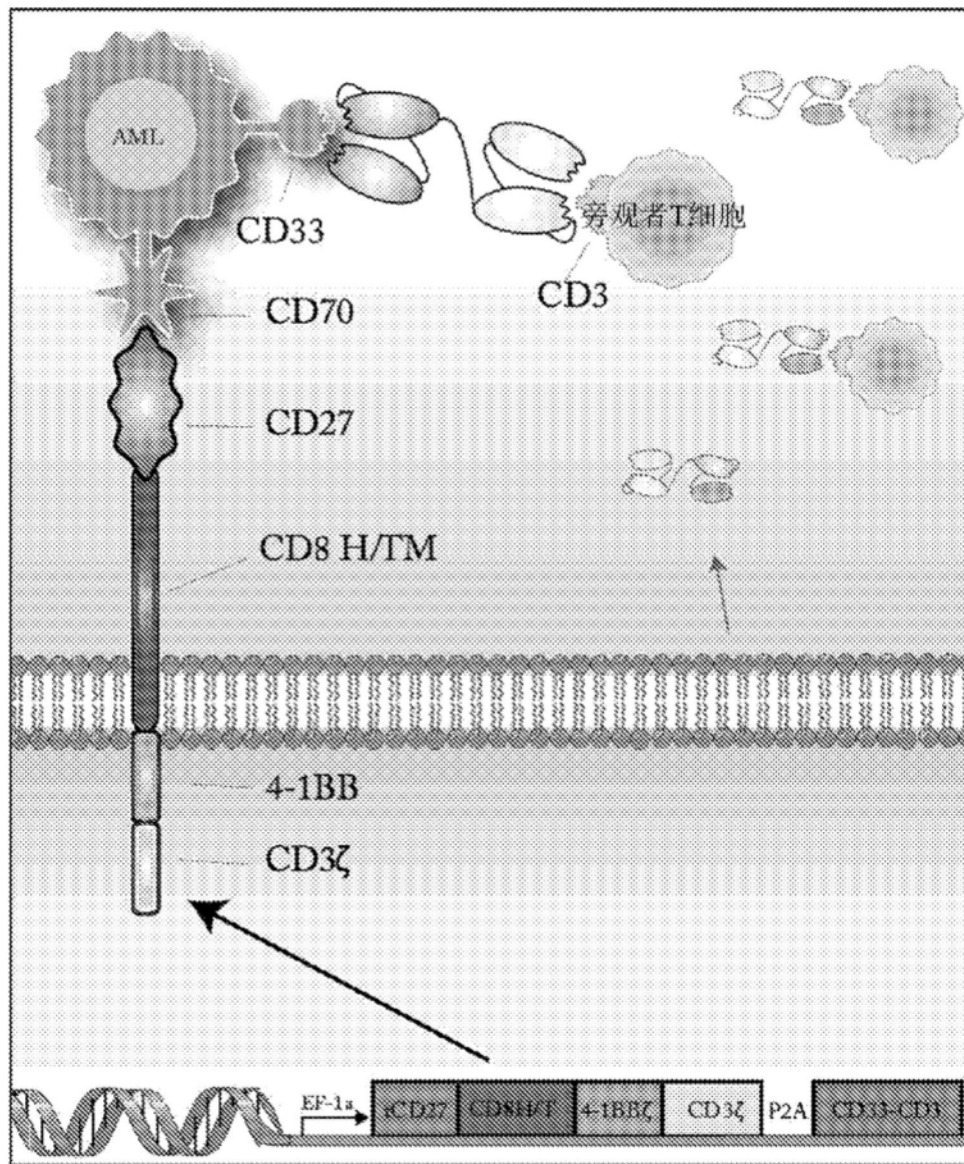


图1

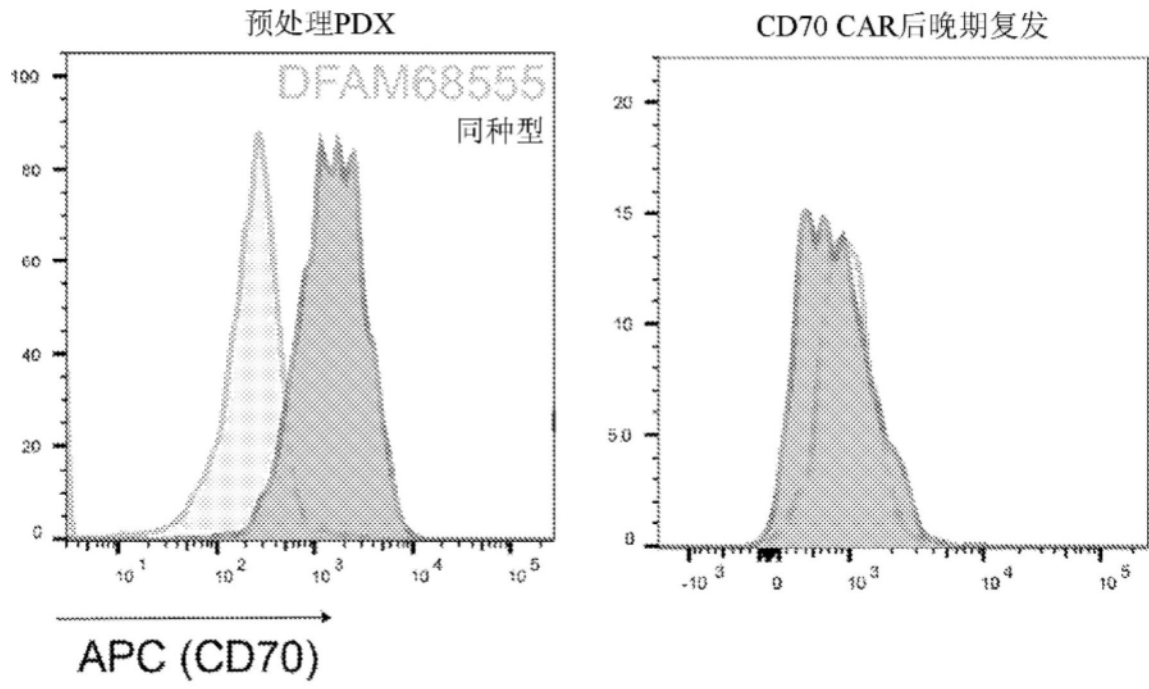


图2



图3A

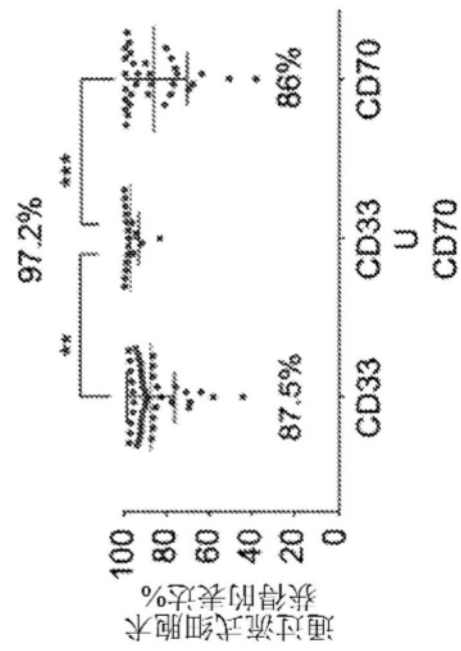


图3B

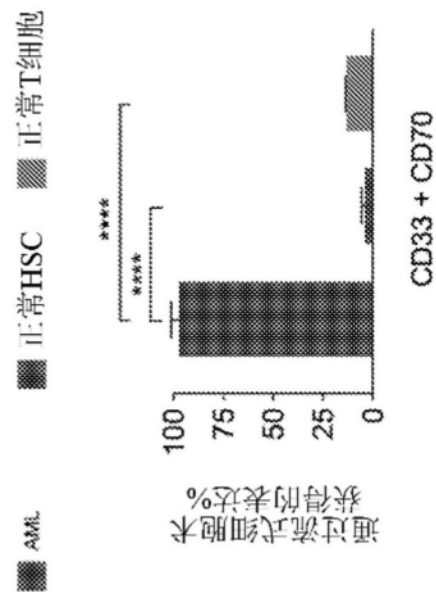


图3C

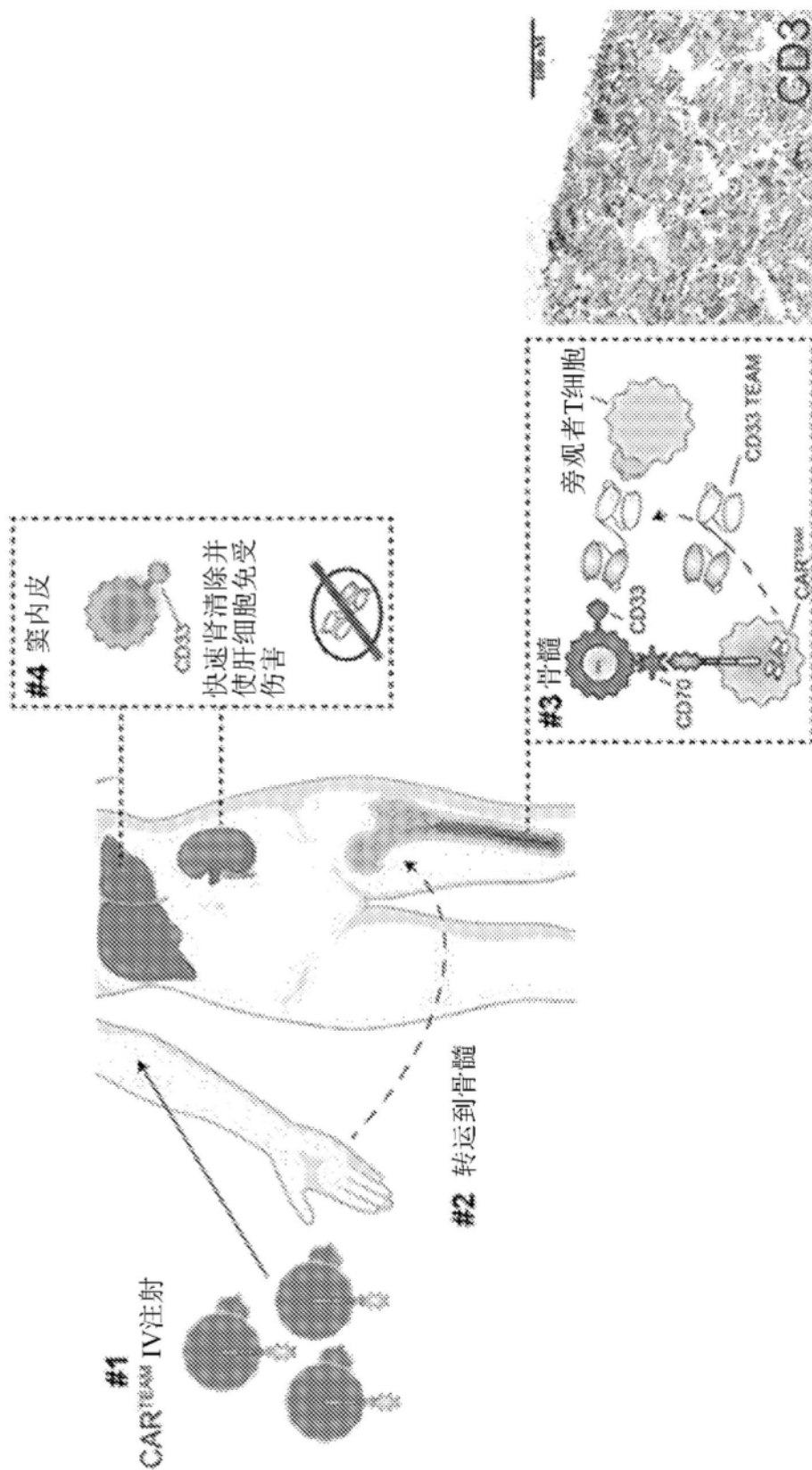


图4

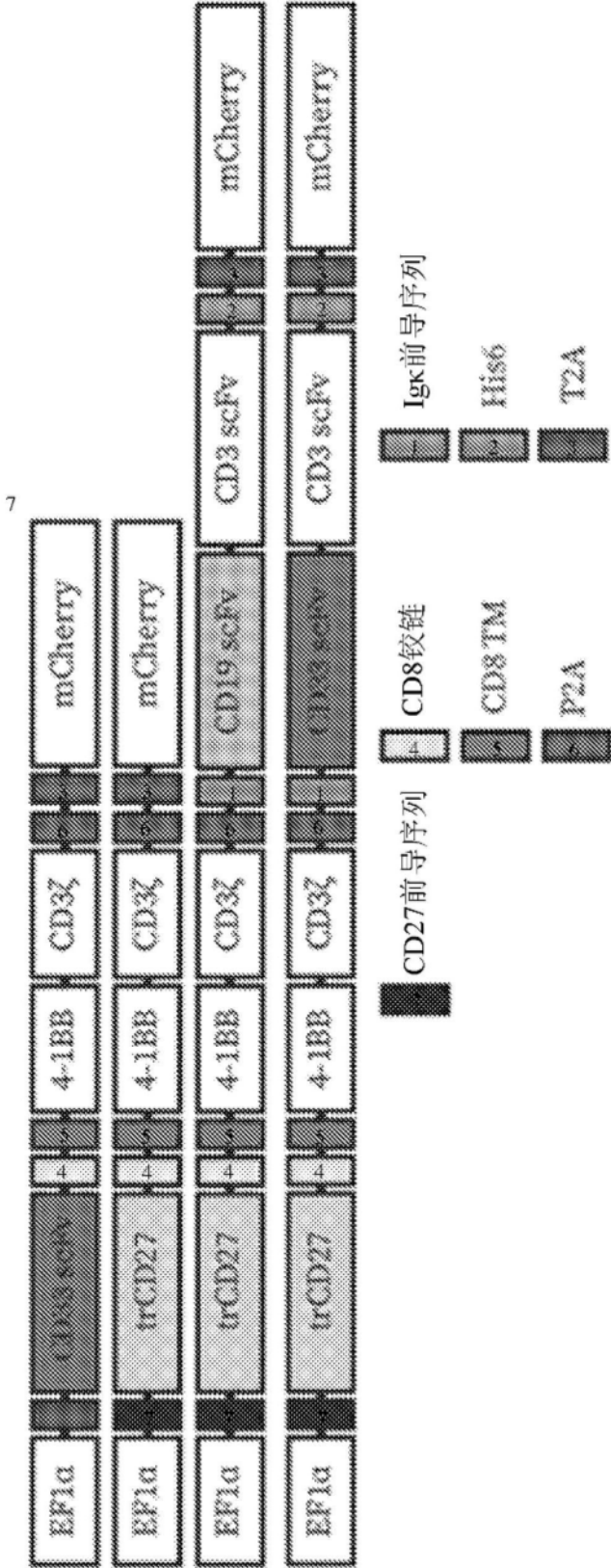


图5A

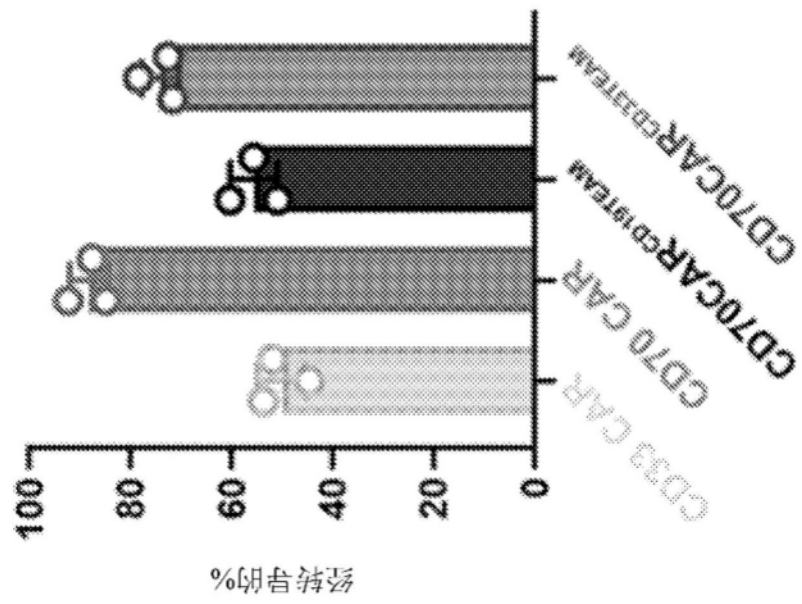


图5B

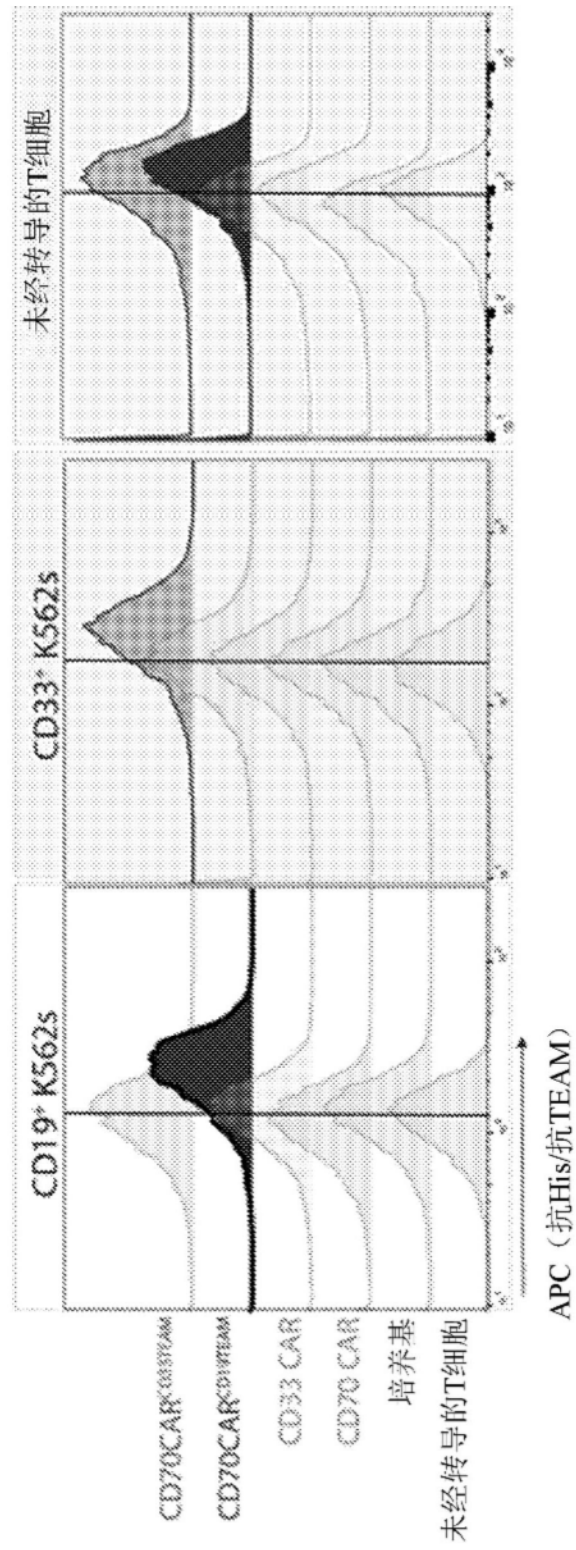


图5C

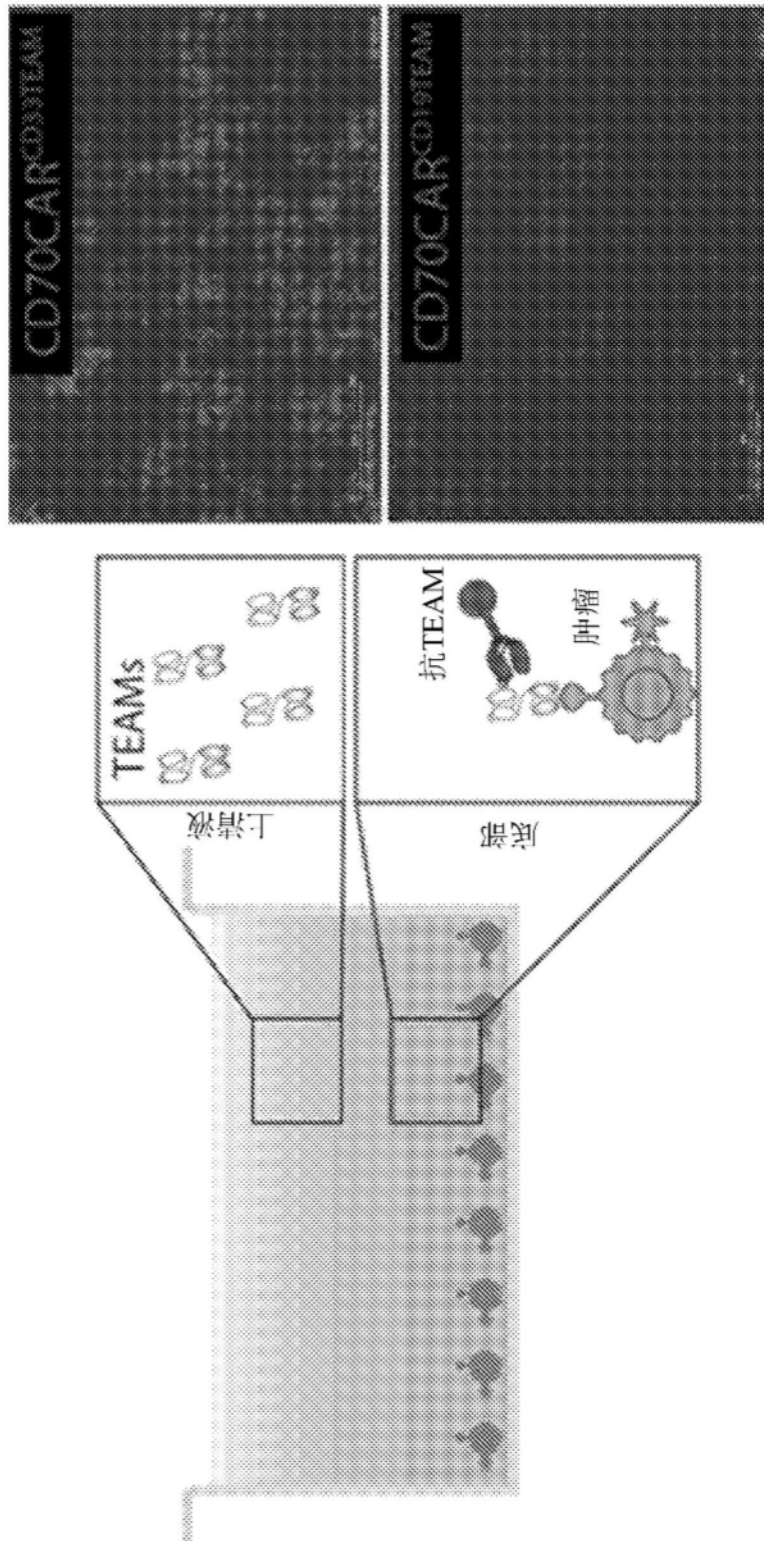


图5D

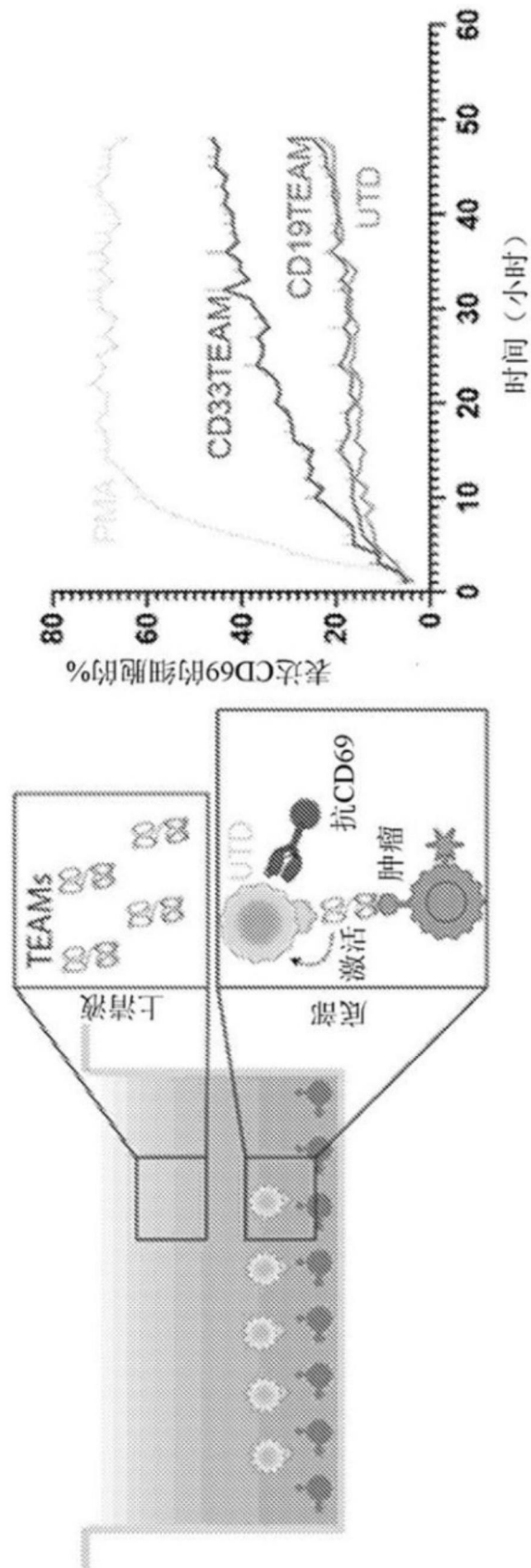


图5E

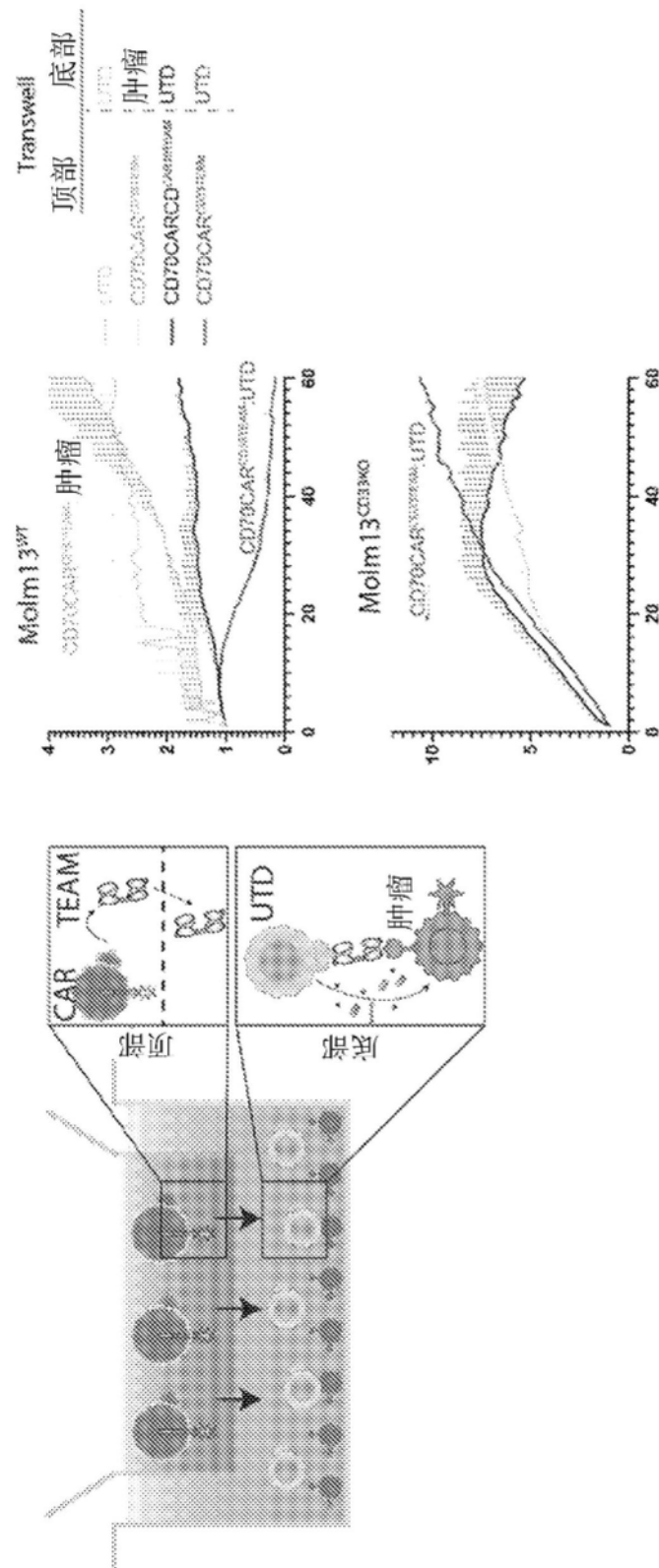


图6

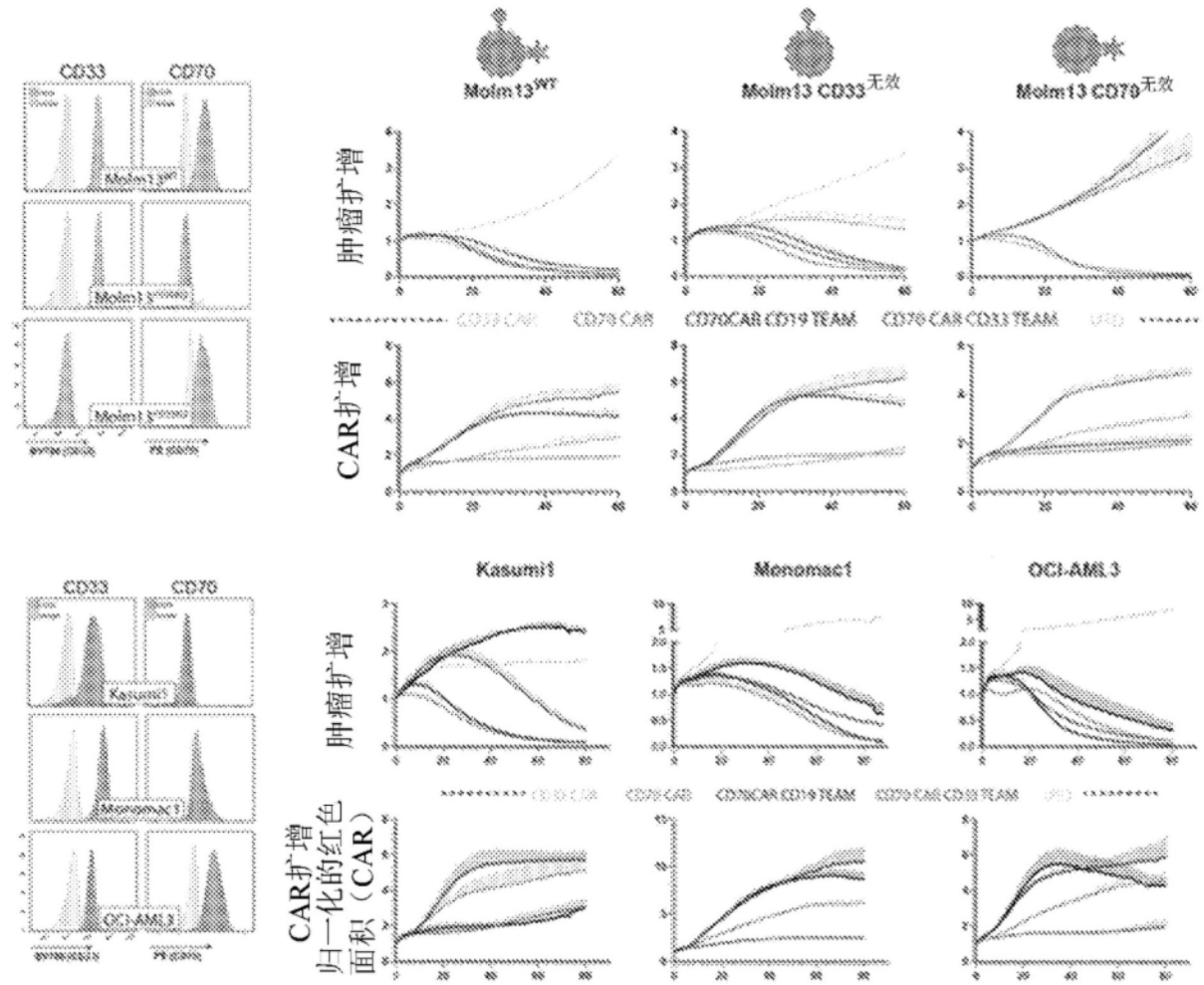


图7A

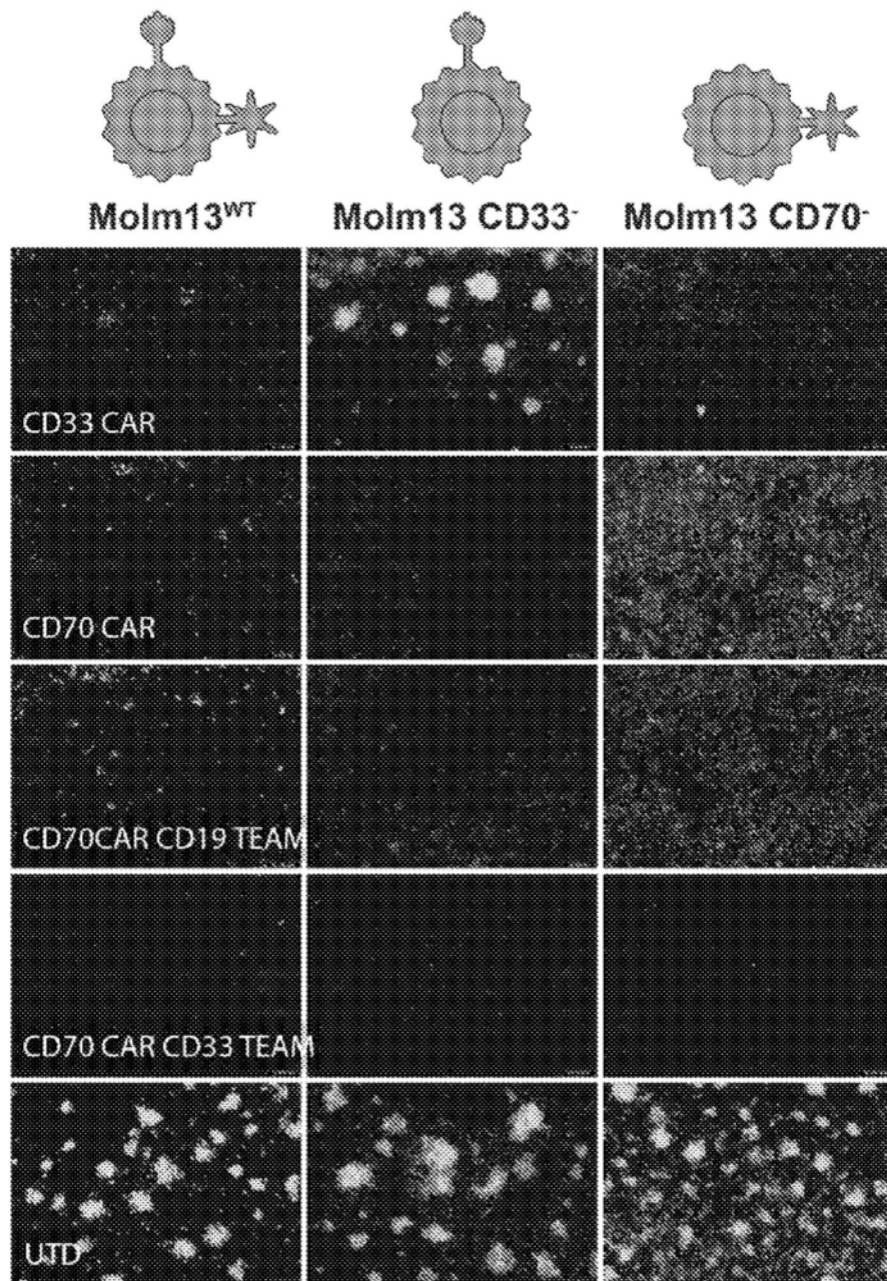


图7B

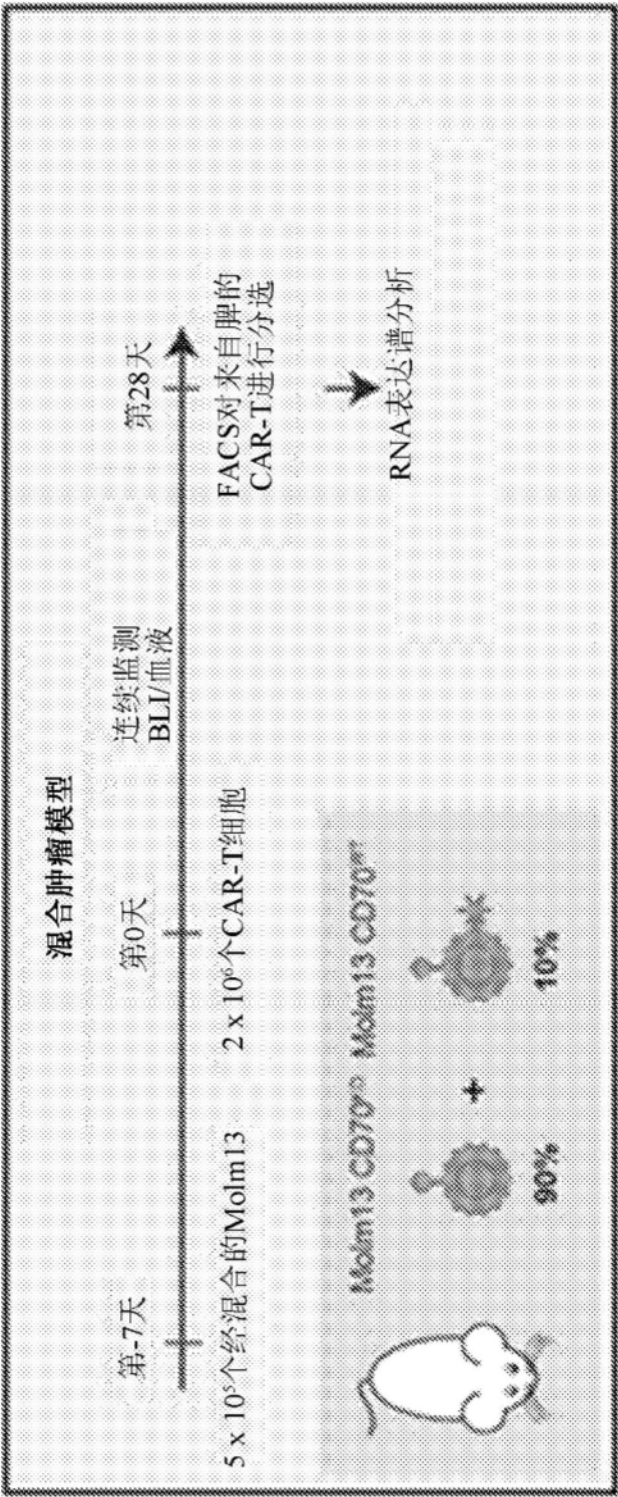


图8A

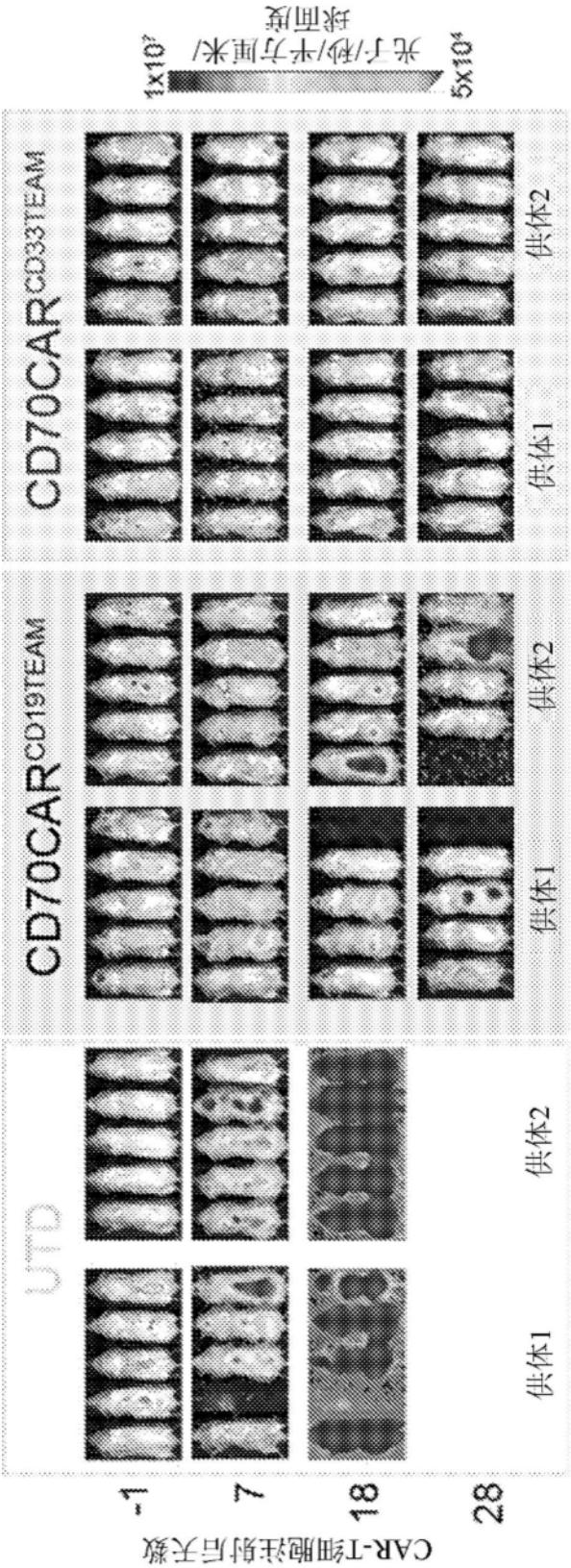


图8B

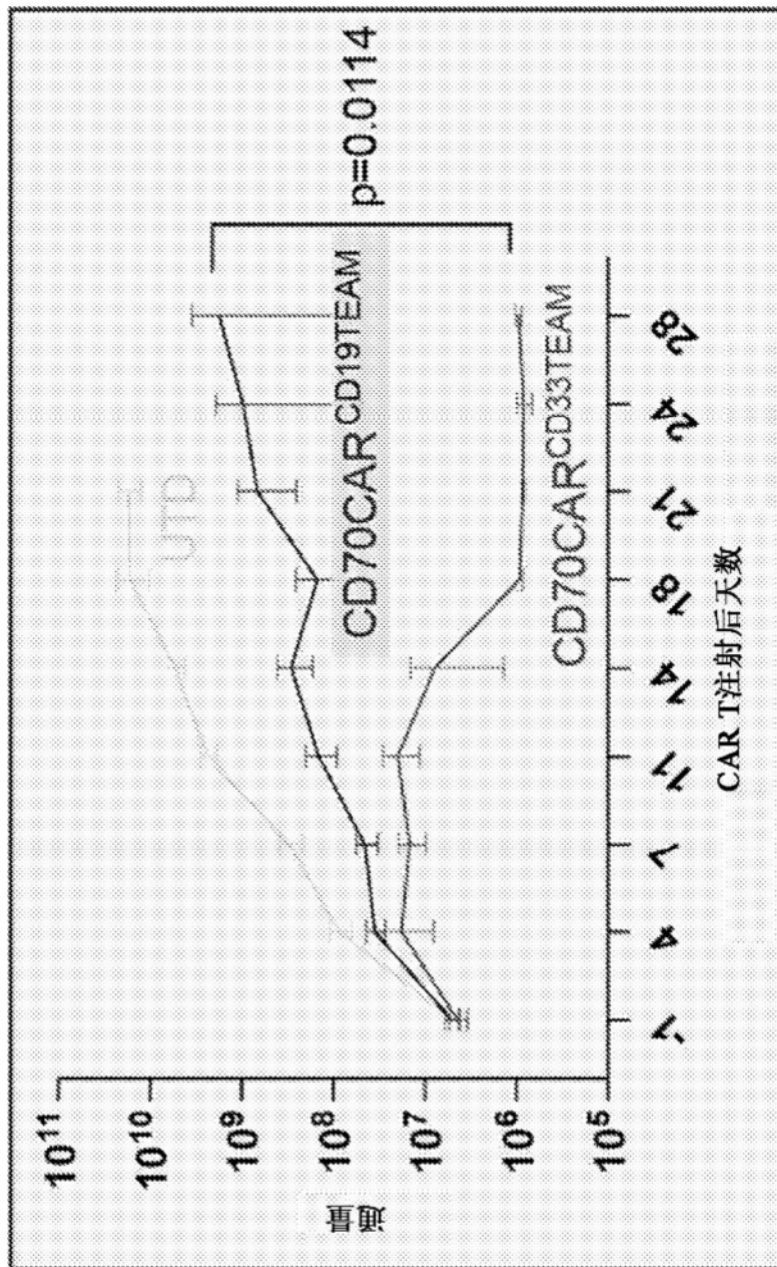


图8C

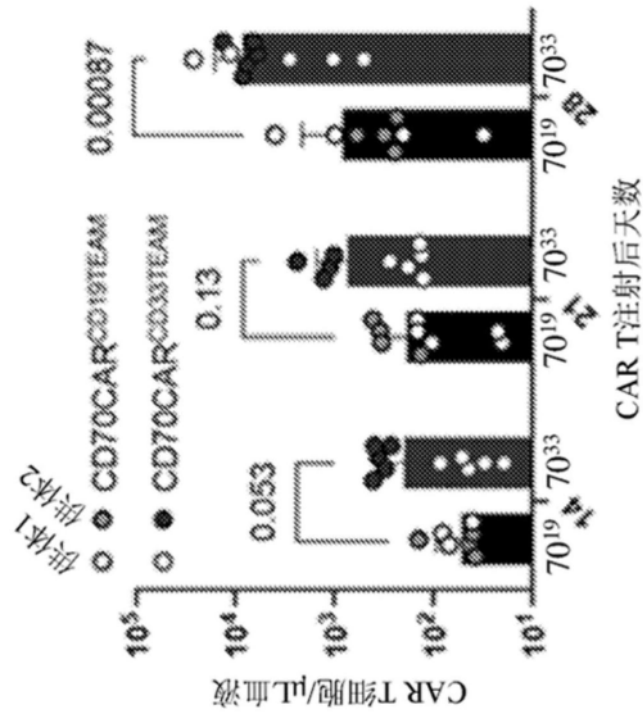


图8D

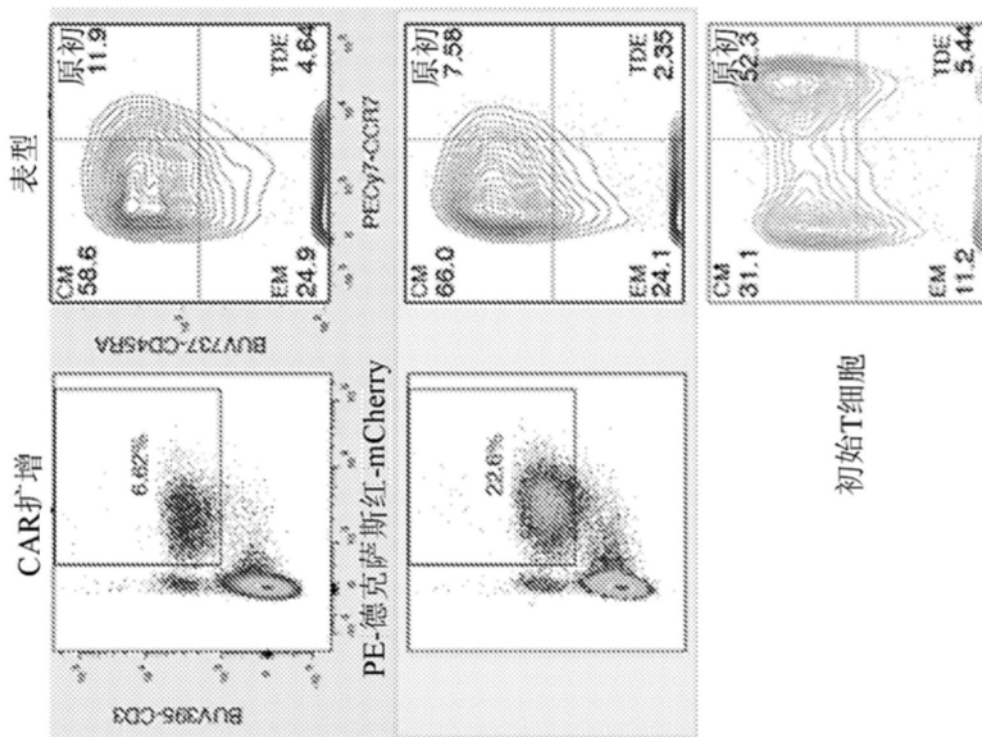


图8E

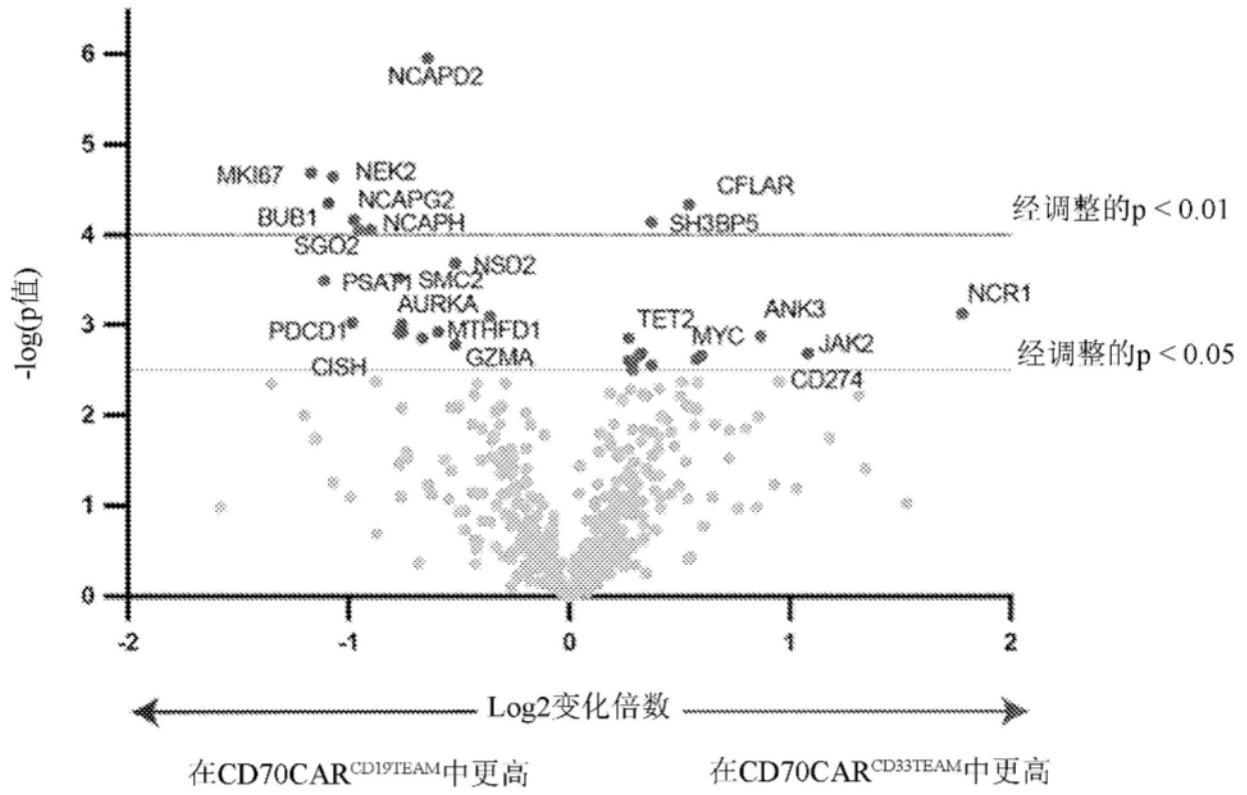


图9A

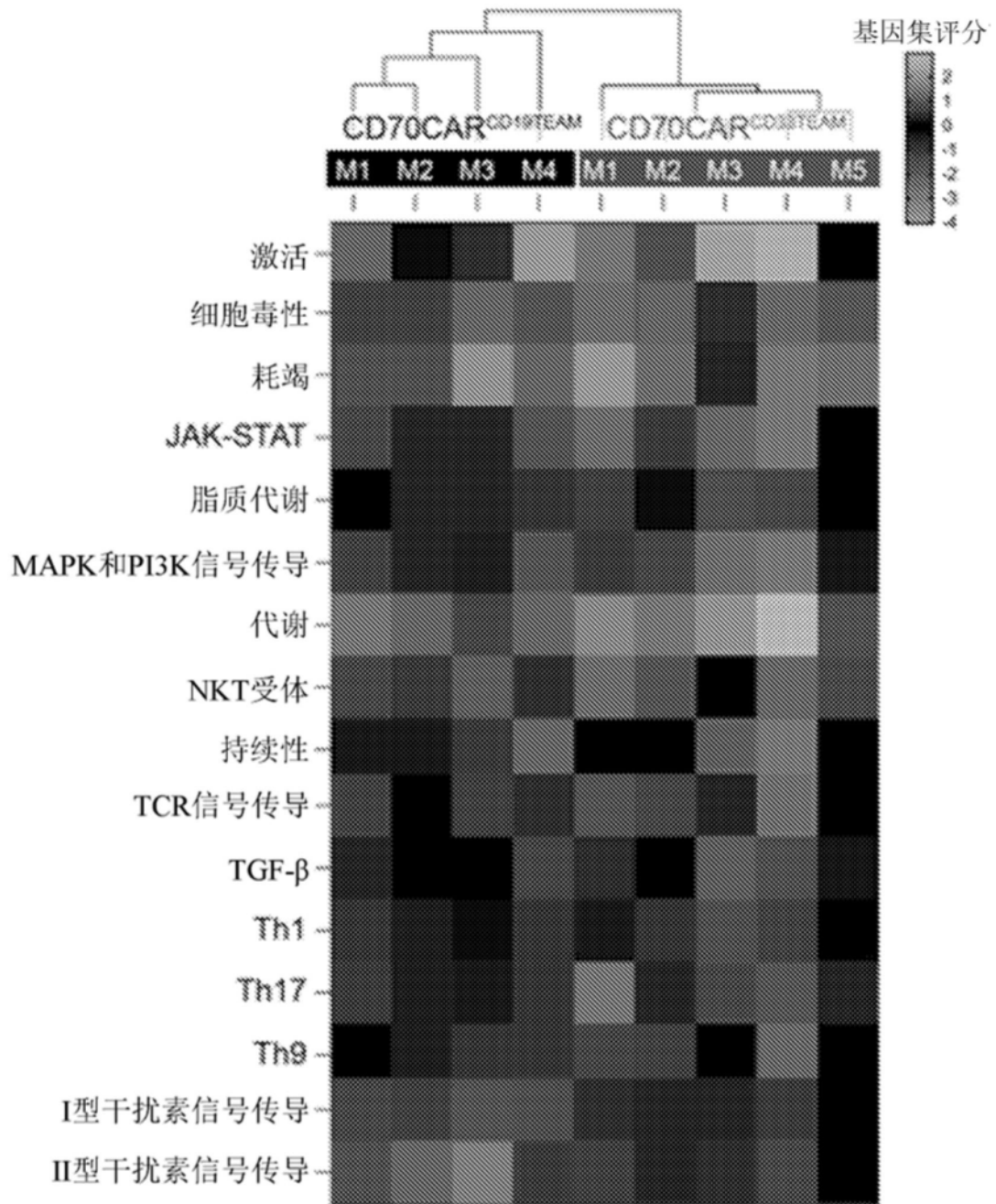


图9B

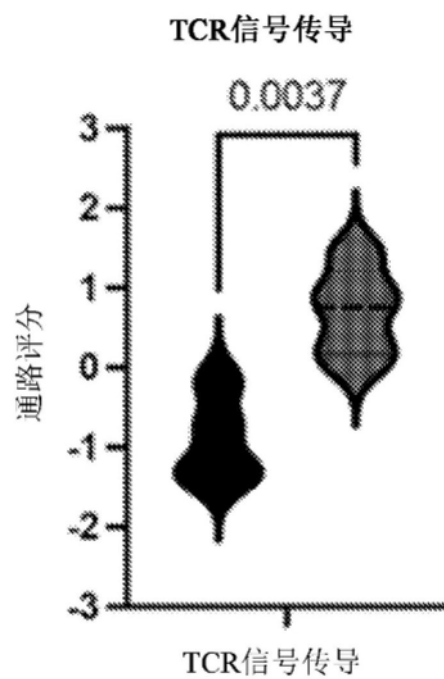


图9C

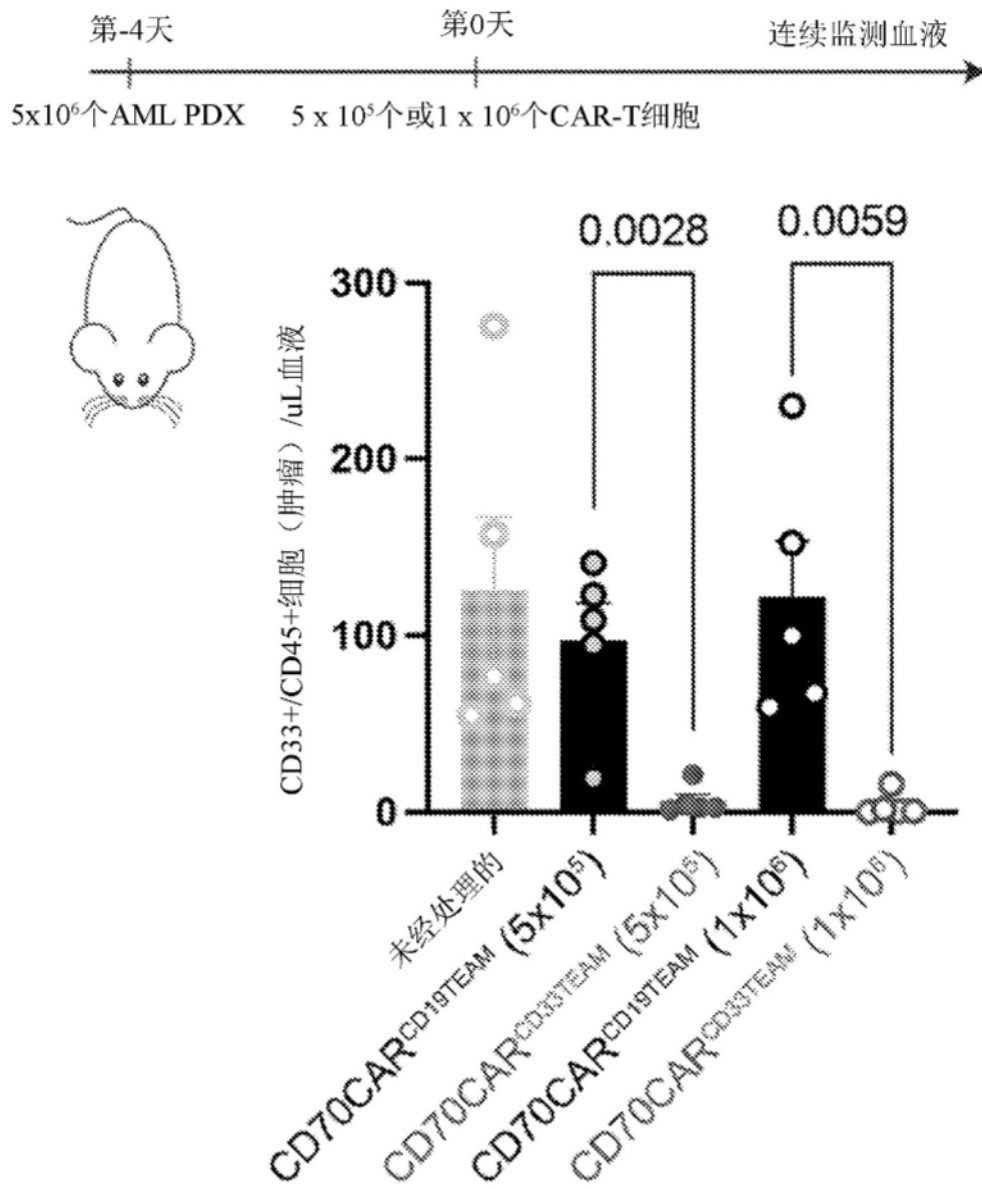


图10

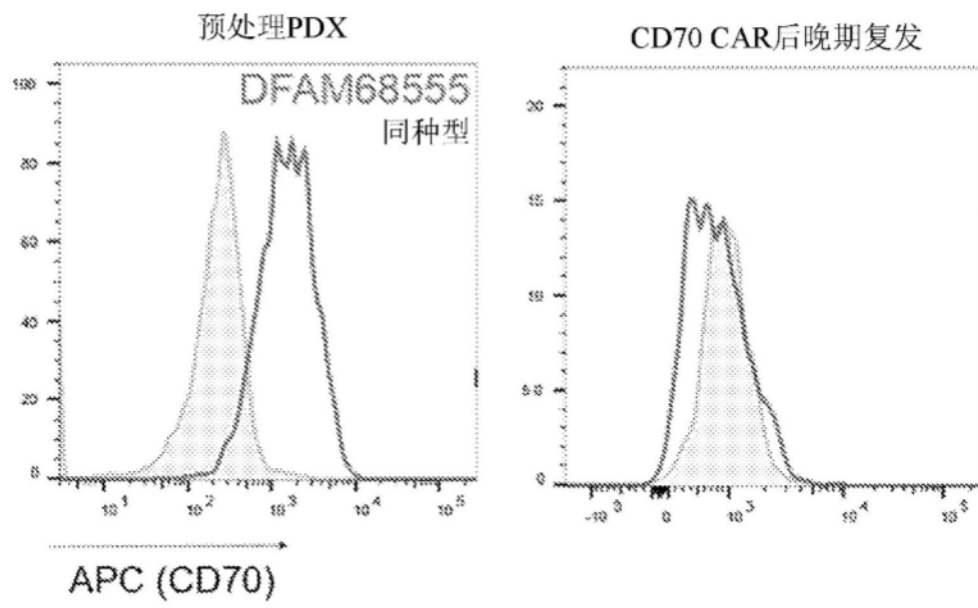


图11A

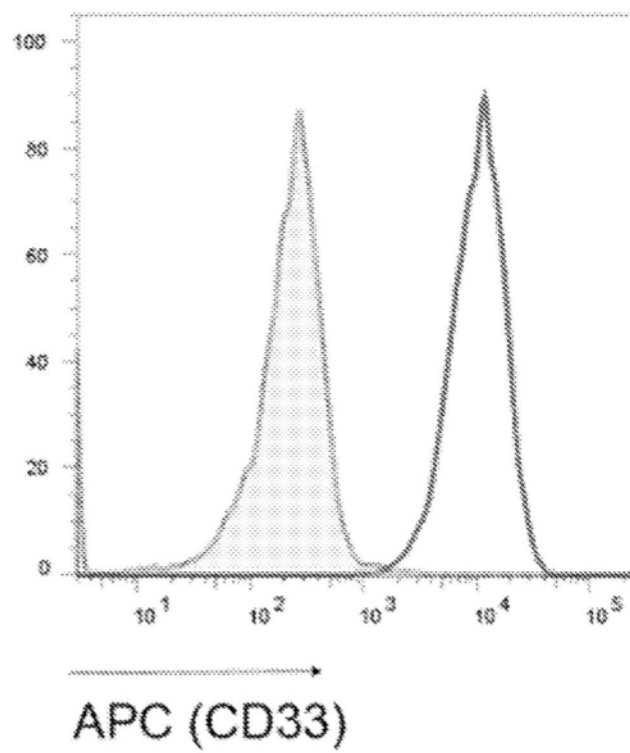


图11B

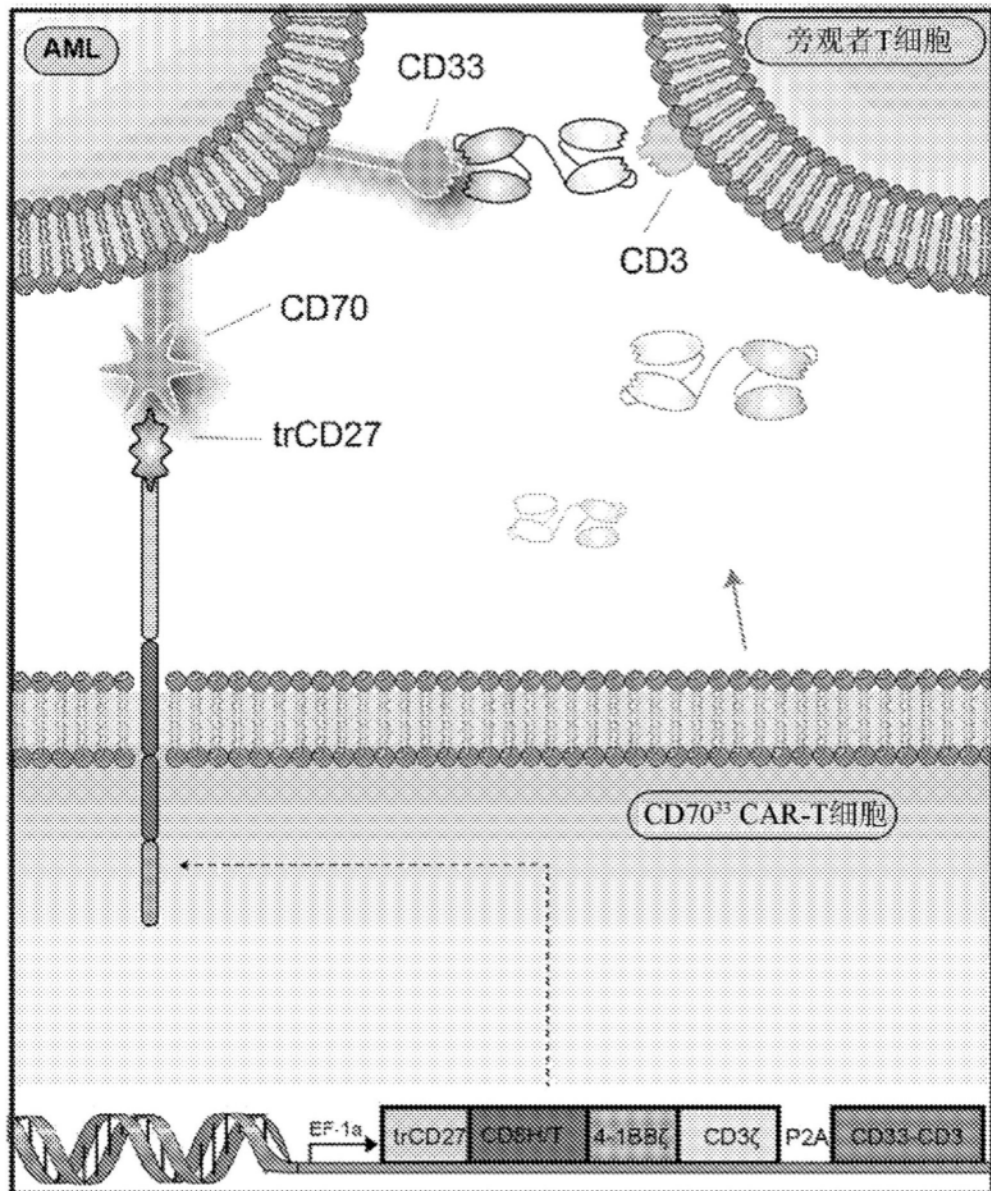


图11C

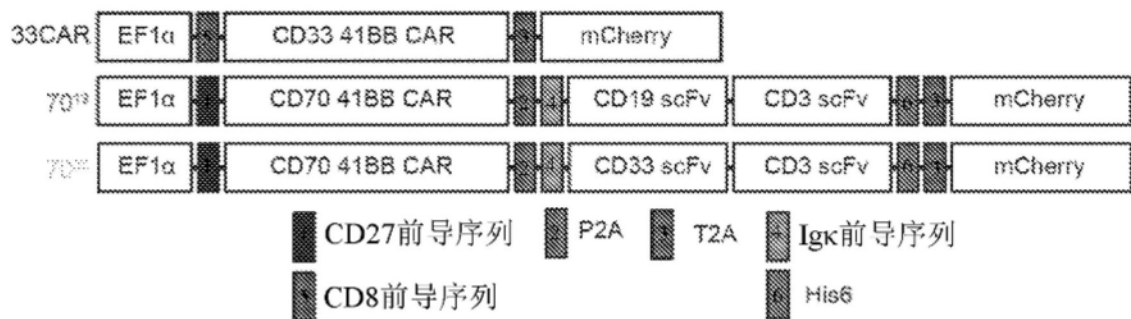


图11D

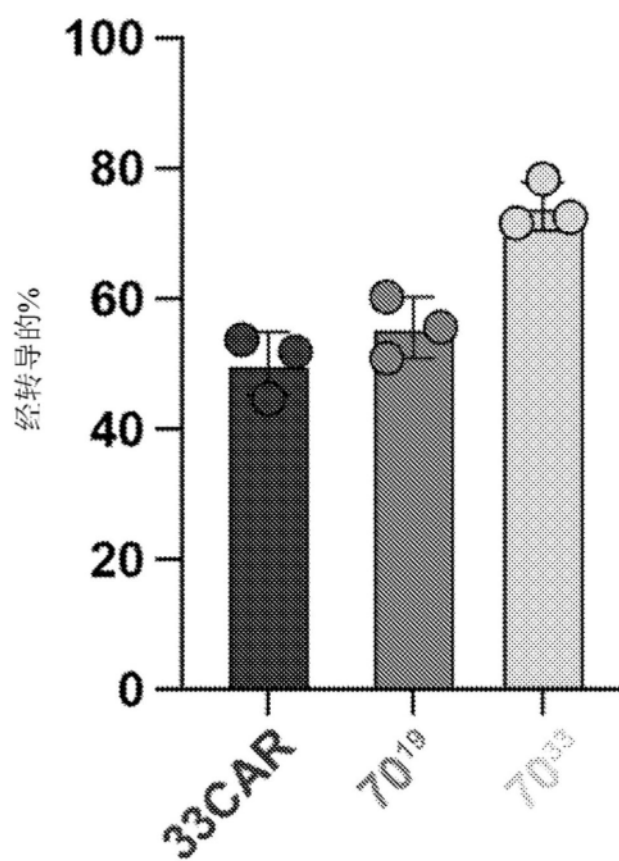


图11E

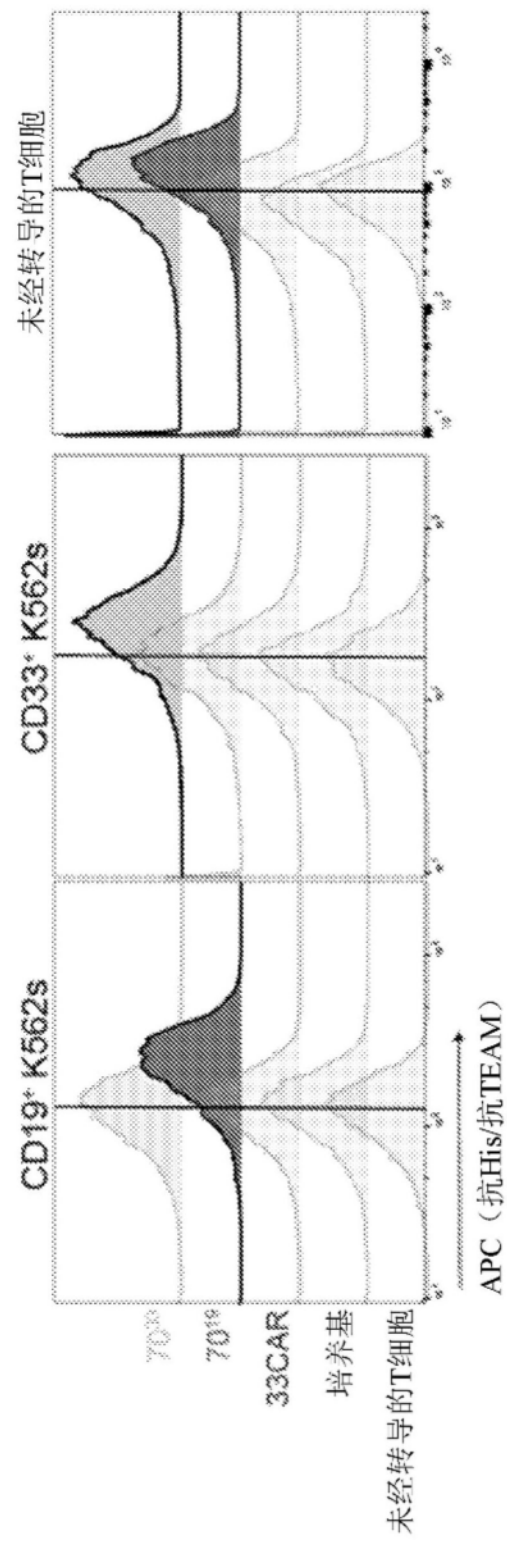


图12A

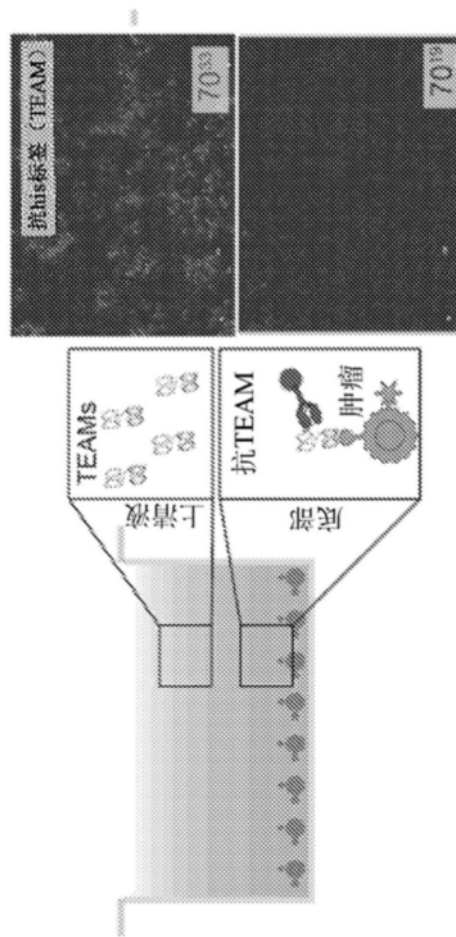


图12B

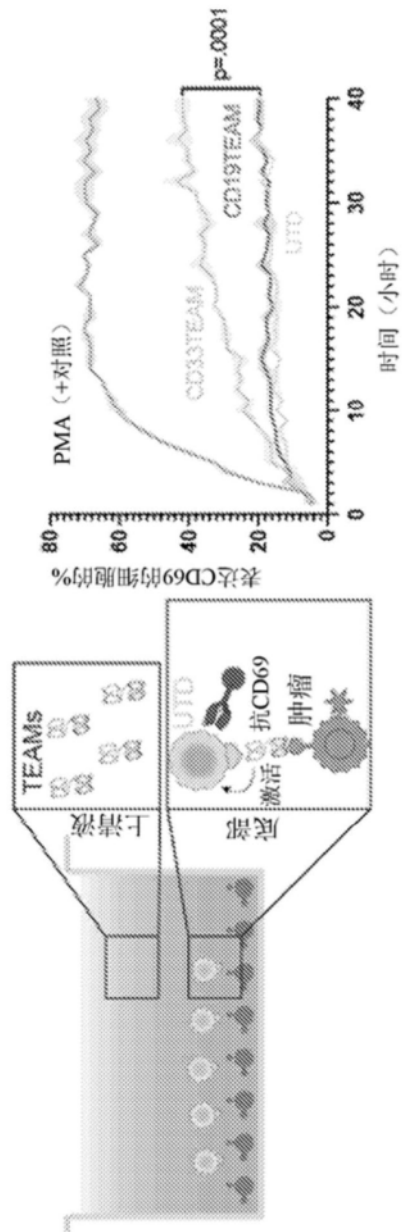


图12C

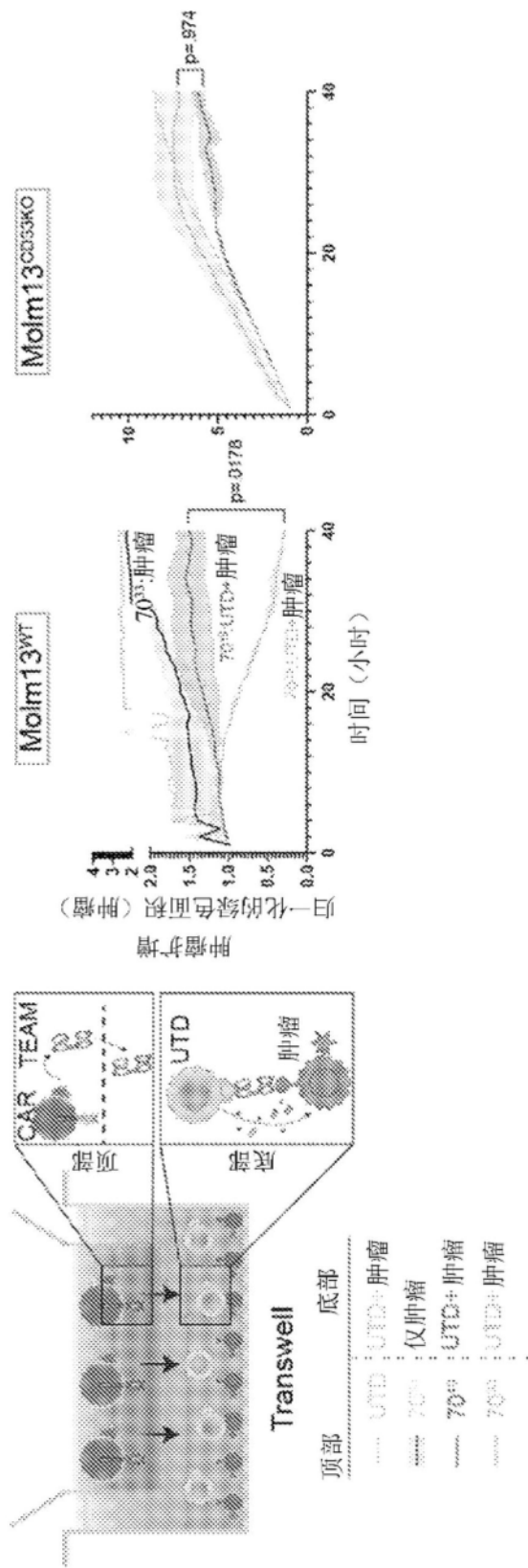


图12D

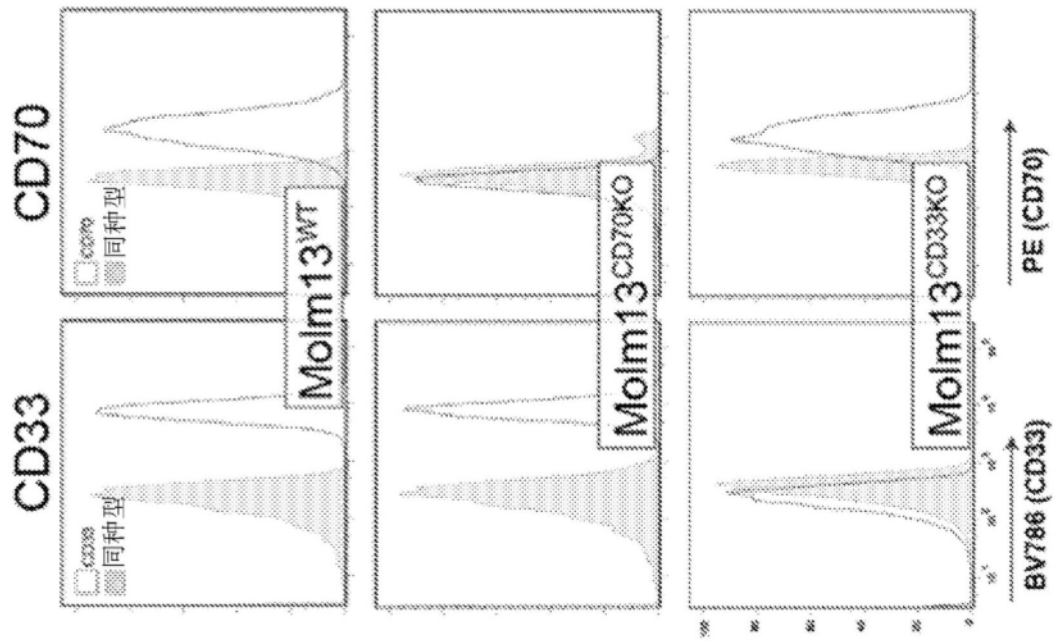


图13A

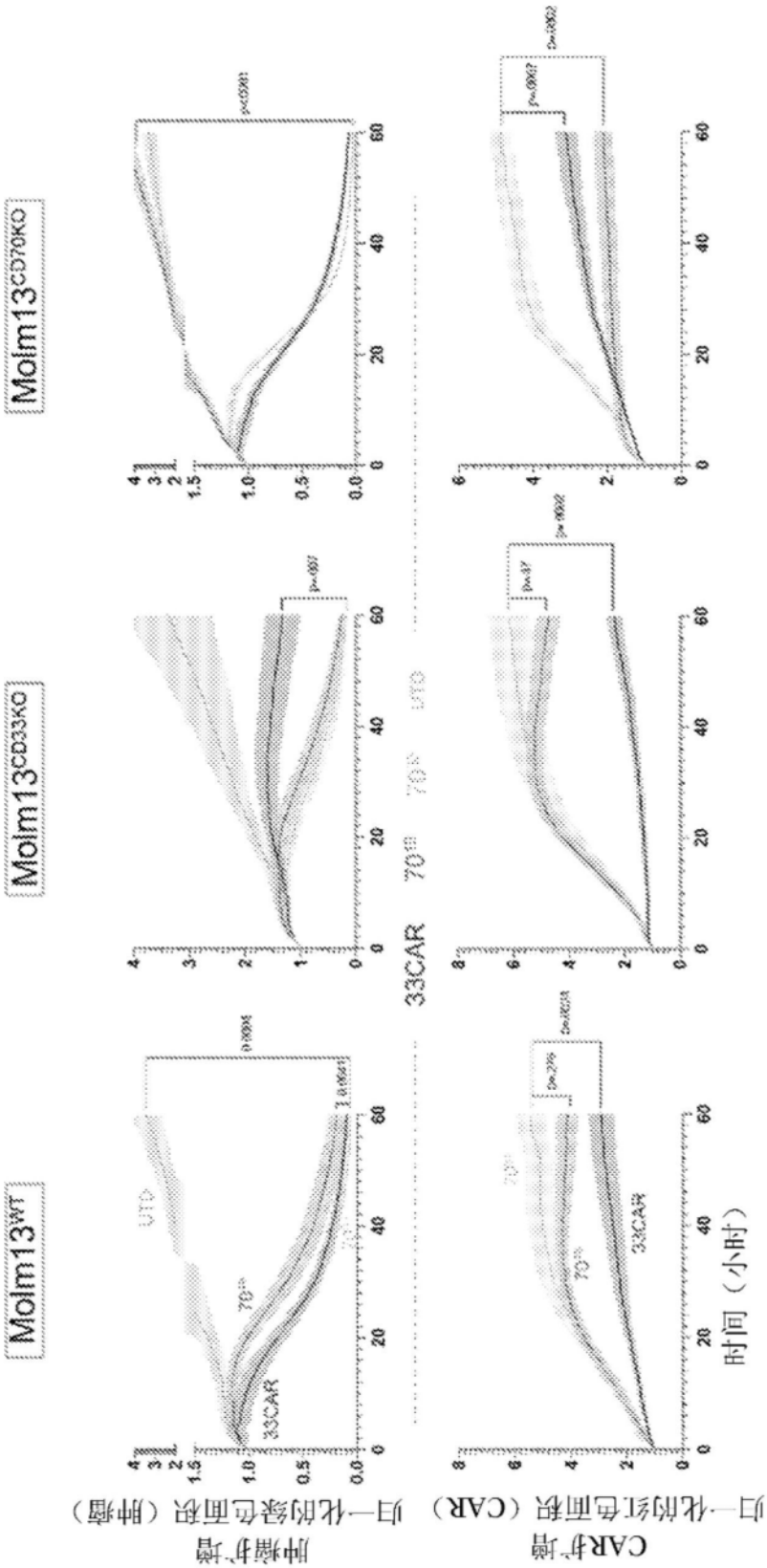


图13B

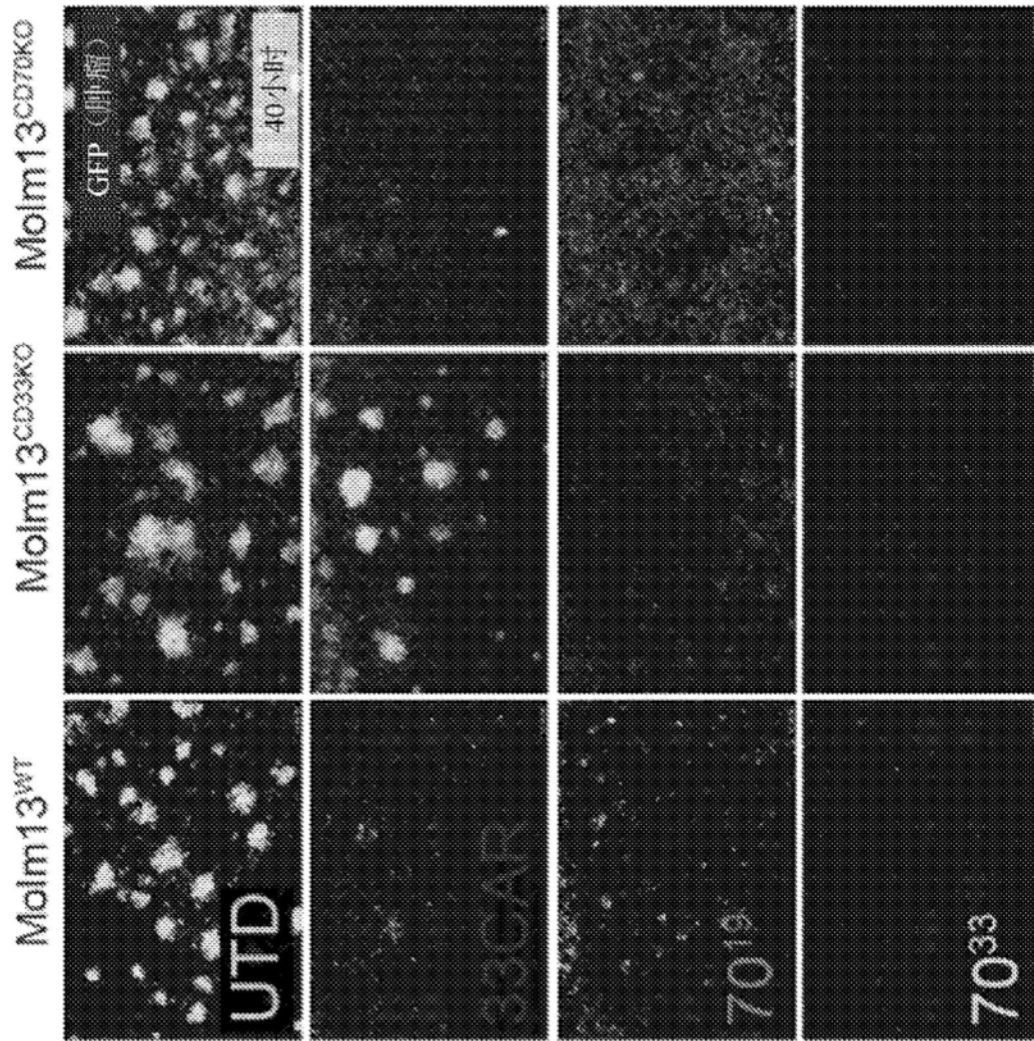


图13C

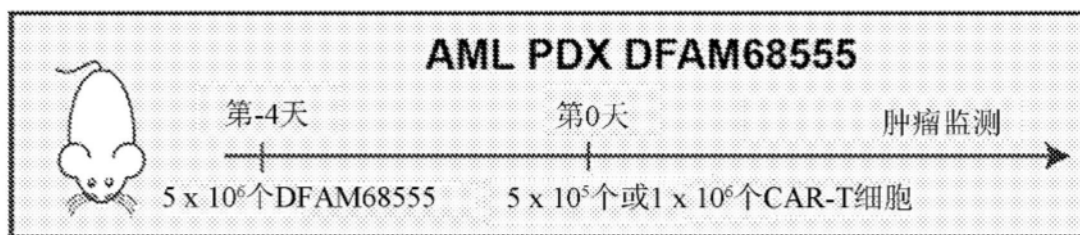


图14A

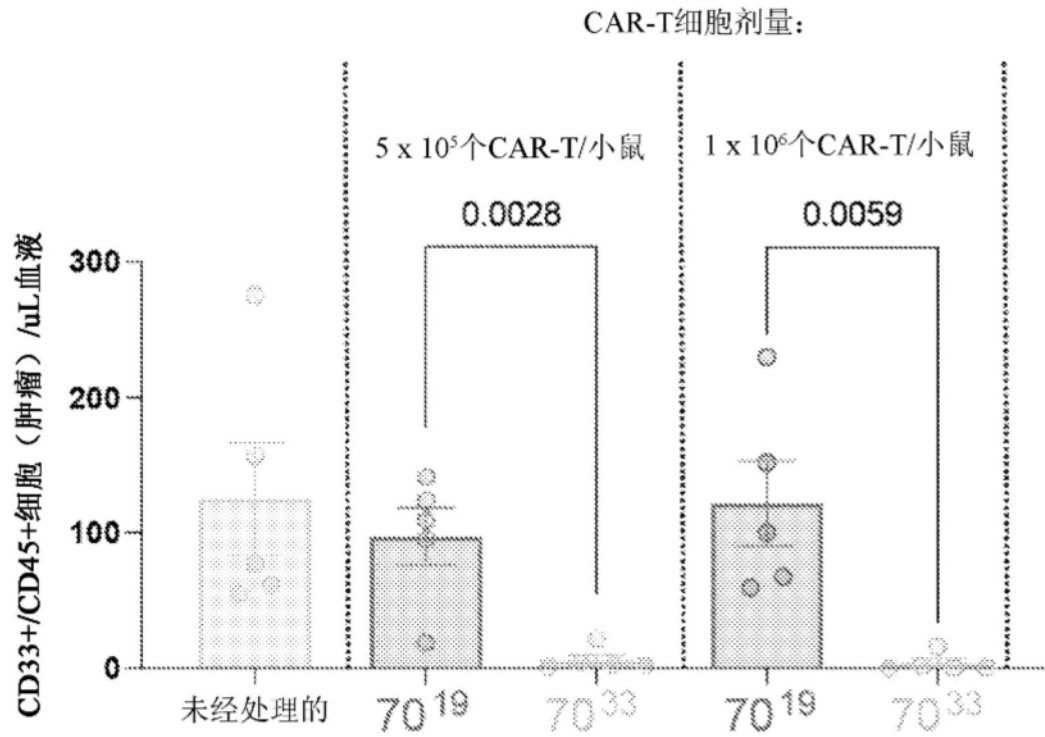


图14B

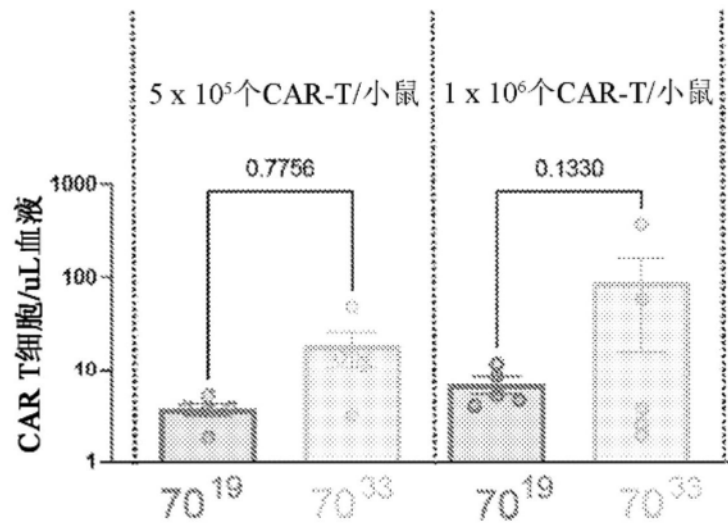


图14C

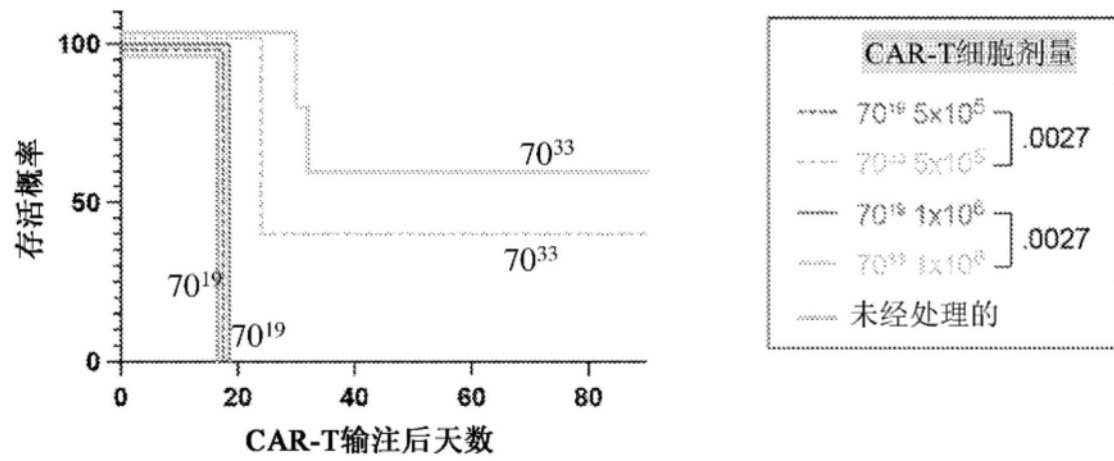


图14D



图15A

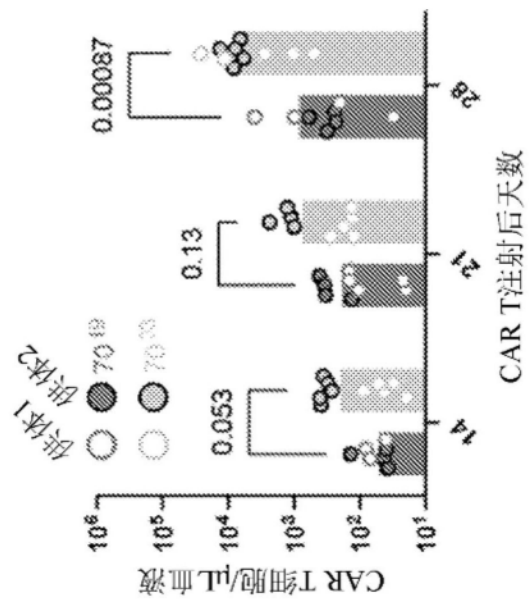


图15B

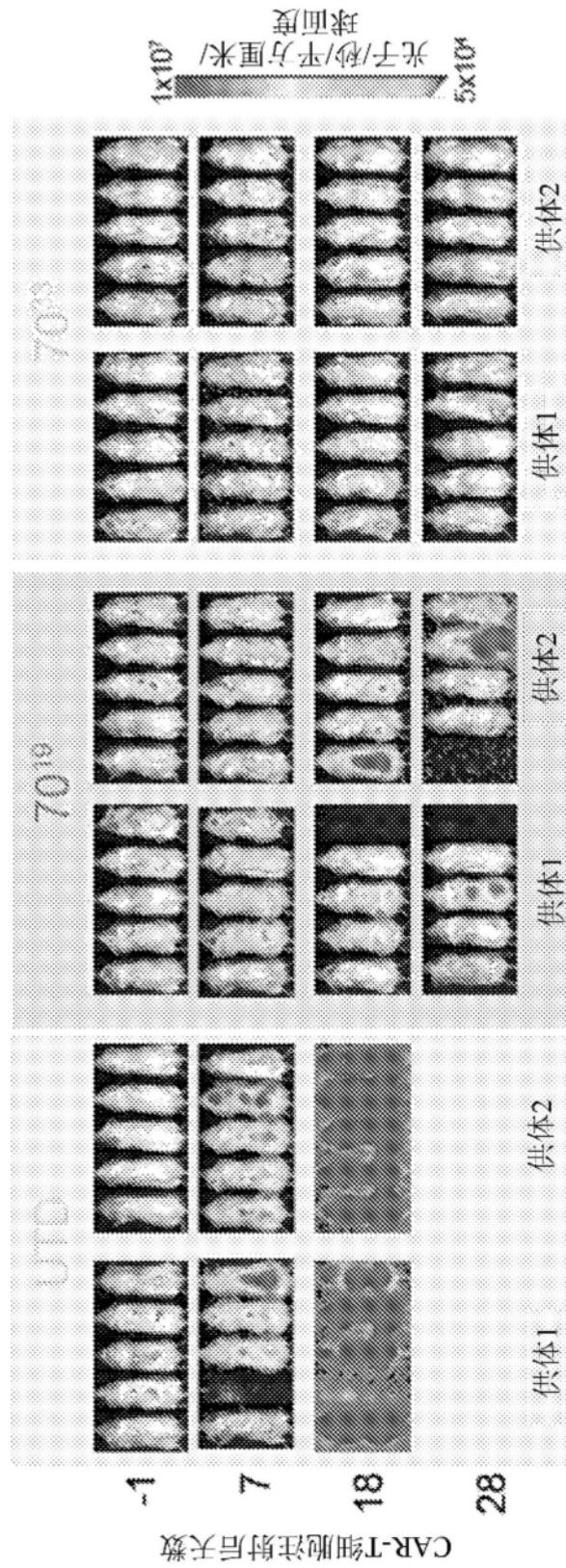


图15C

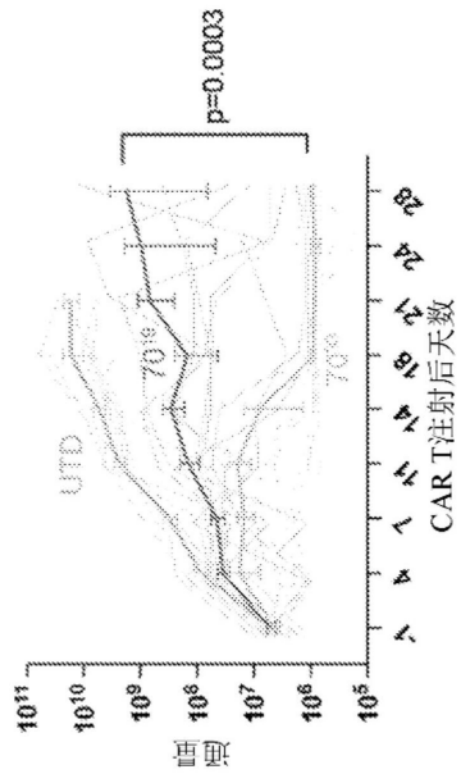


图15D

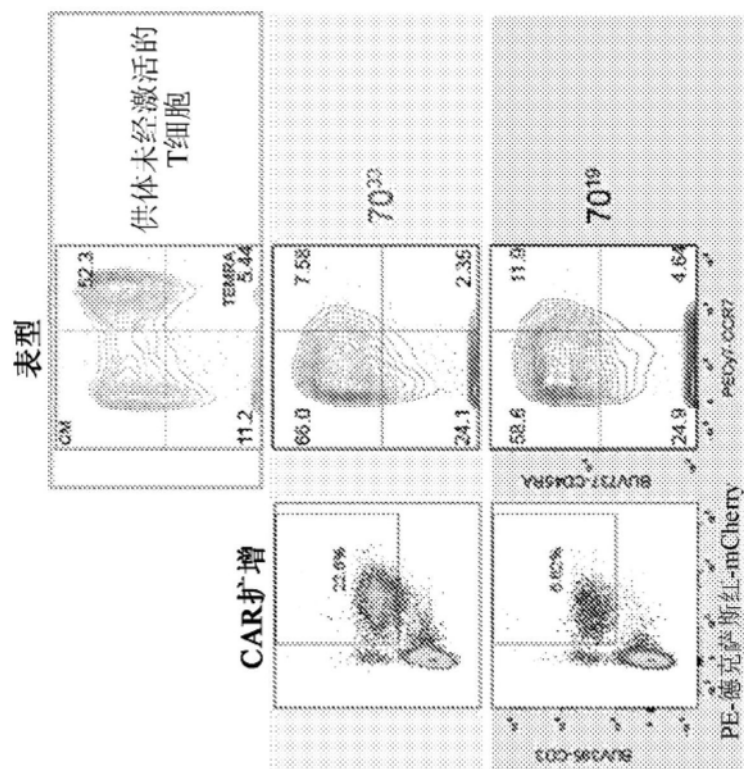


图15E

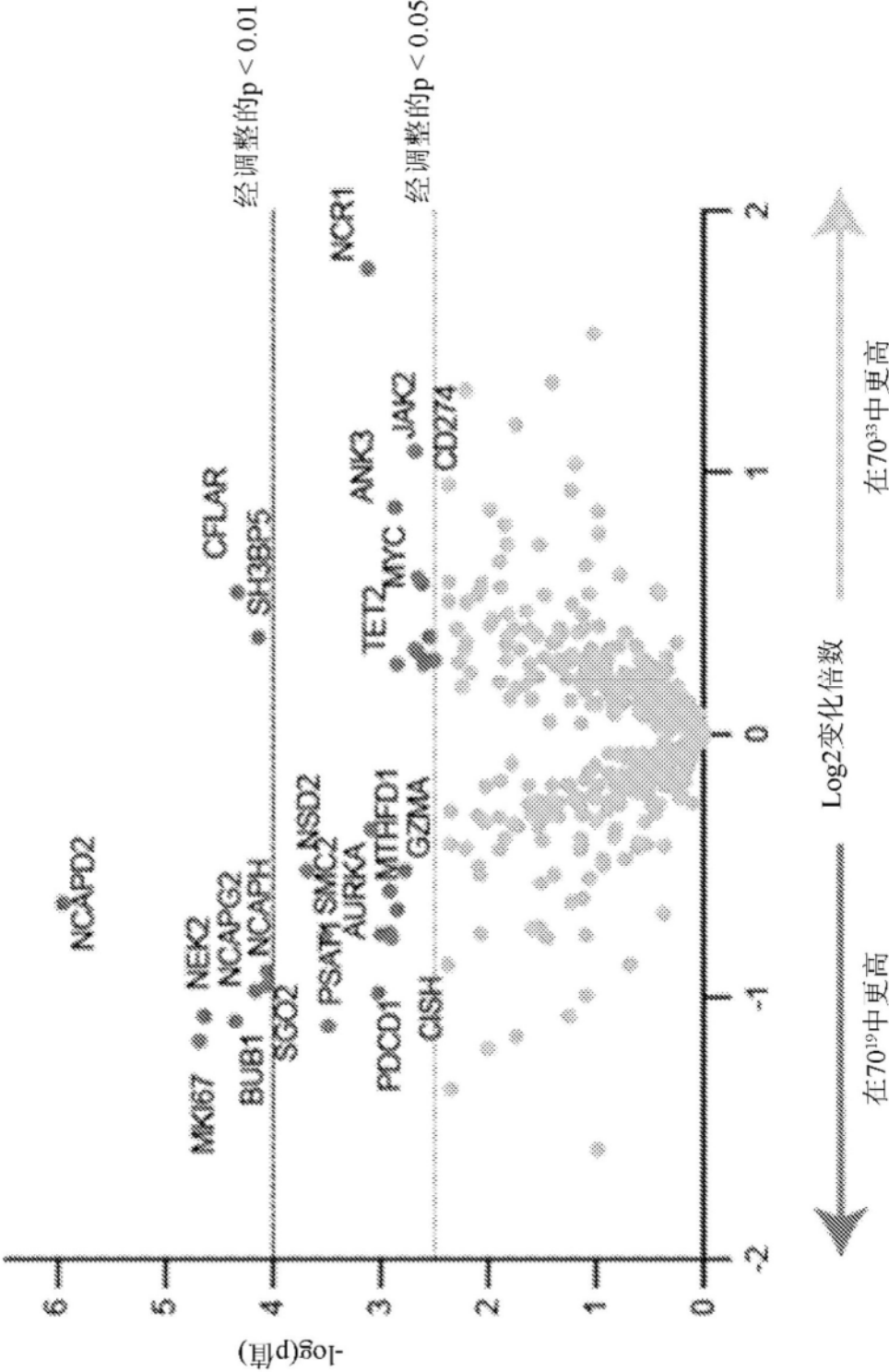


图15F

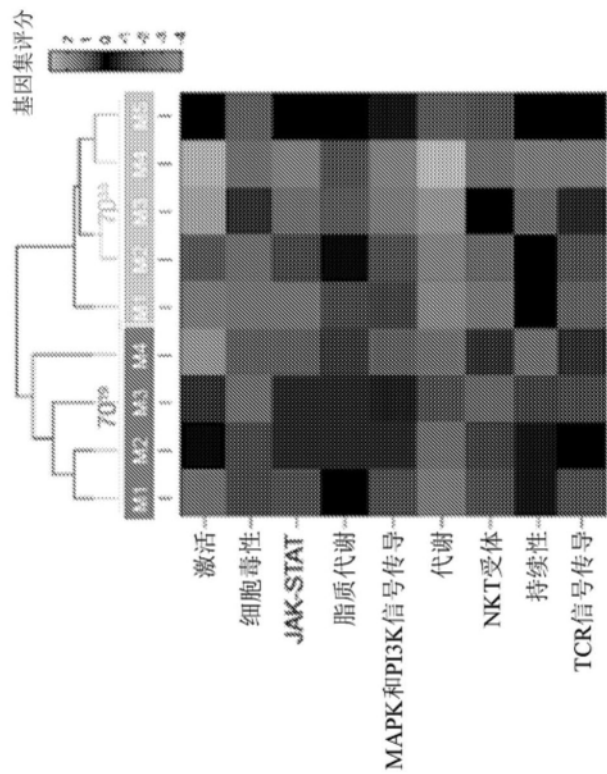


图15G

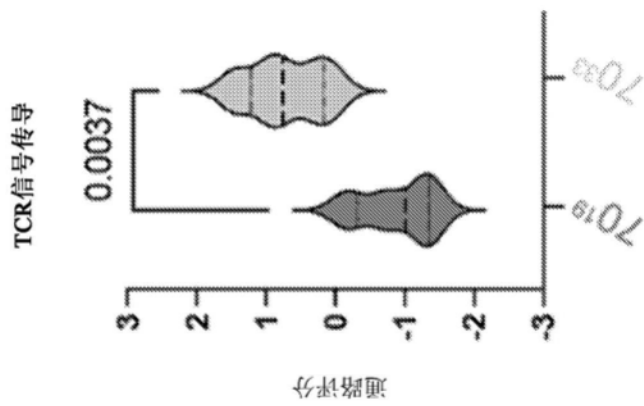


图15H

患者ID	诊断	年龄	治疗
1	AML复发的	74	HMA
2	AML复发的	35	诱导, 巩固, 移植, HAM
3	CR中有AML	78	HMA
4	CR中有AML	66	诱导 + IDHi
5	AML难治性	36	诱导, 巩固, 移植, MEC, HMA/rev
6	AML复发的	29	诱导, 巩固, 移植, hidac
7	AML复发的	70	HMA, 诱导, 移植, 西塔拉滨 (cytarabine) /MTX
8	AML复发的	78	HMA

图16A

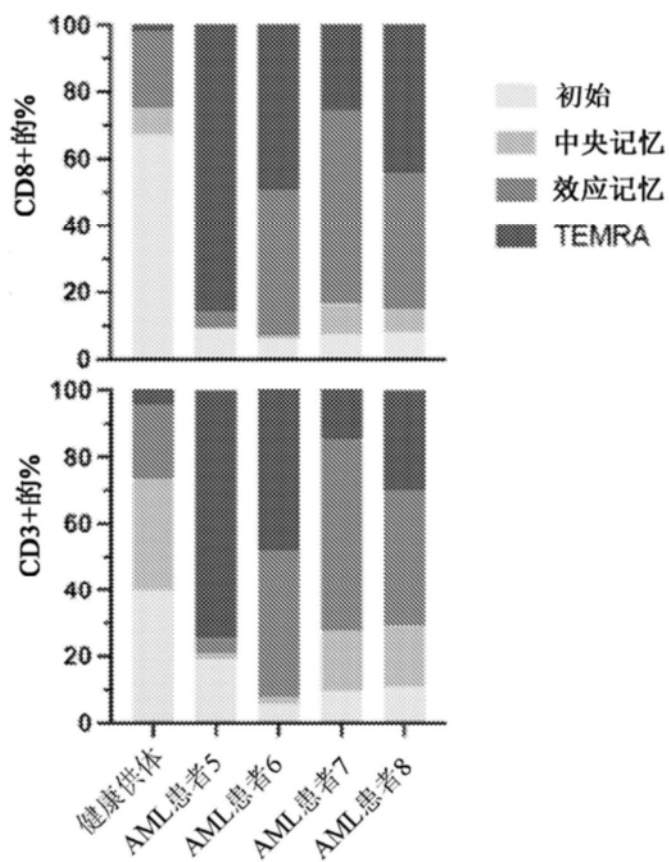


图16B

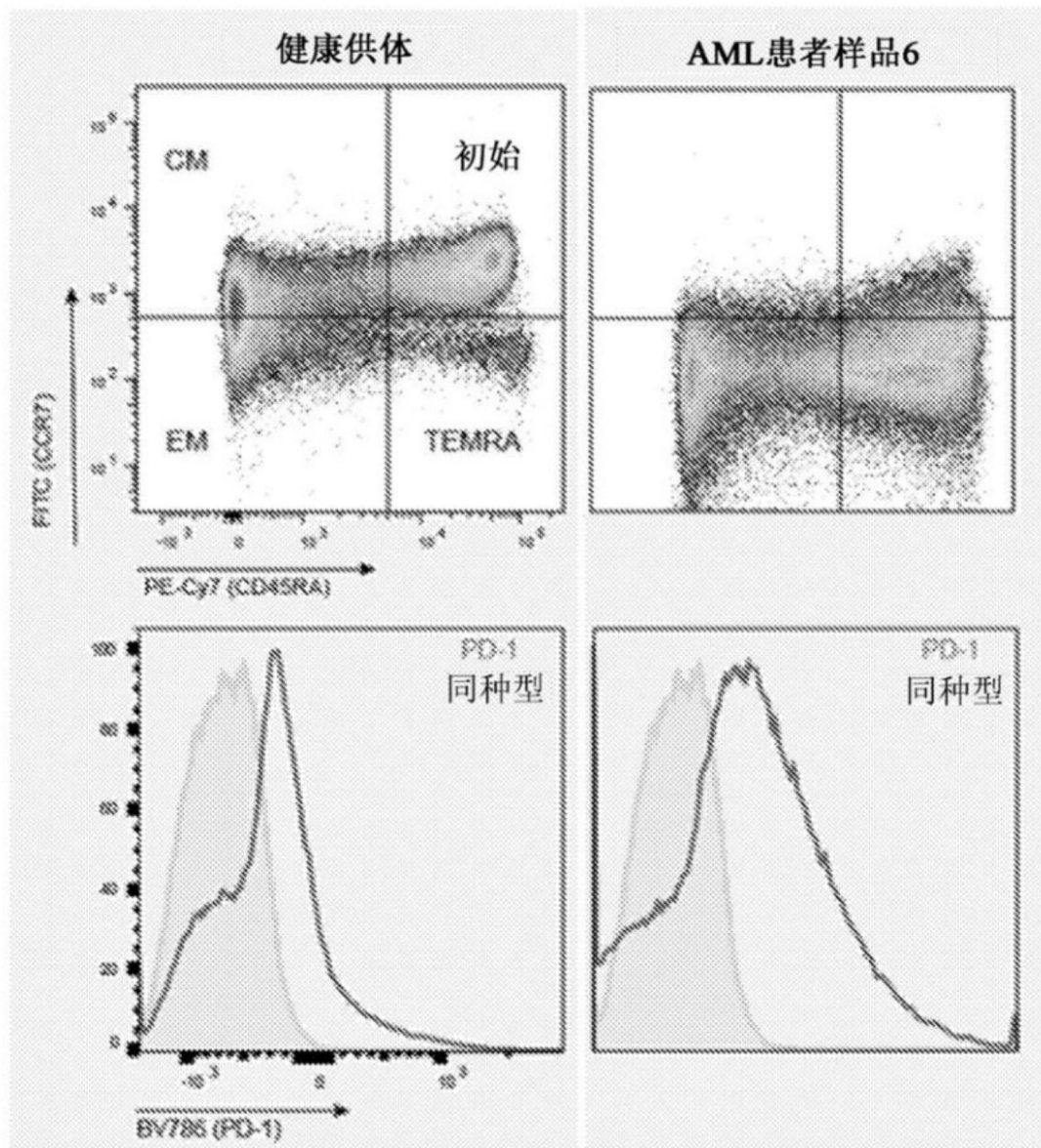


图16C

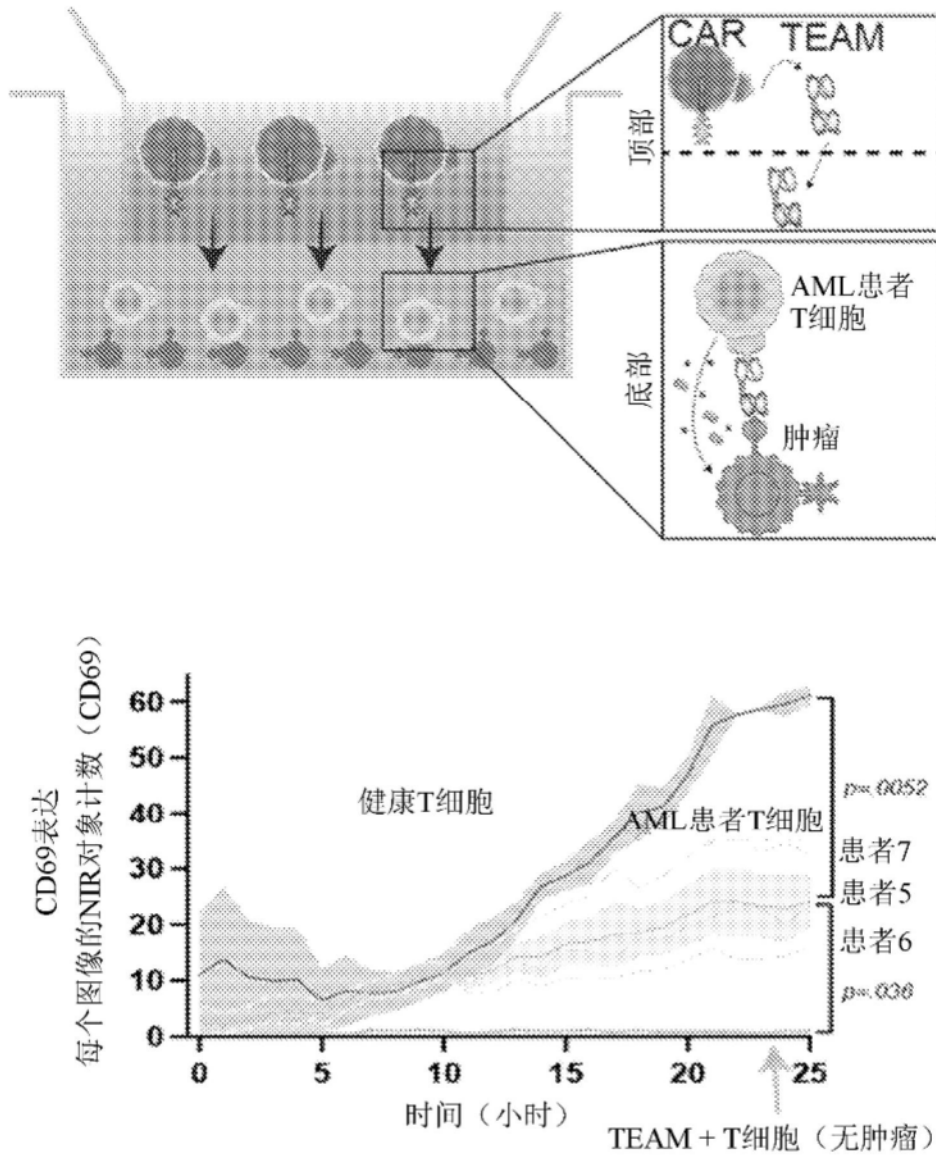


图16D

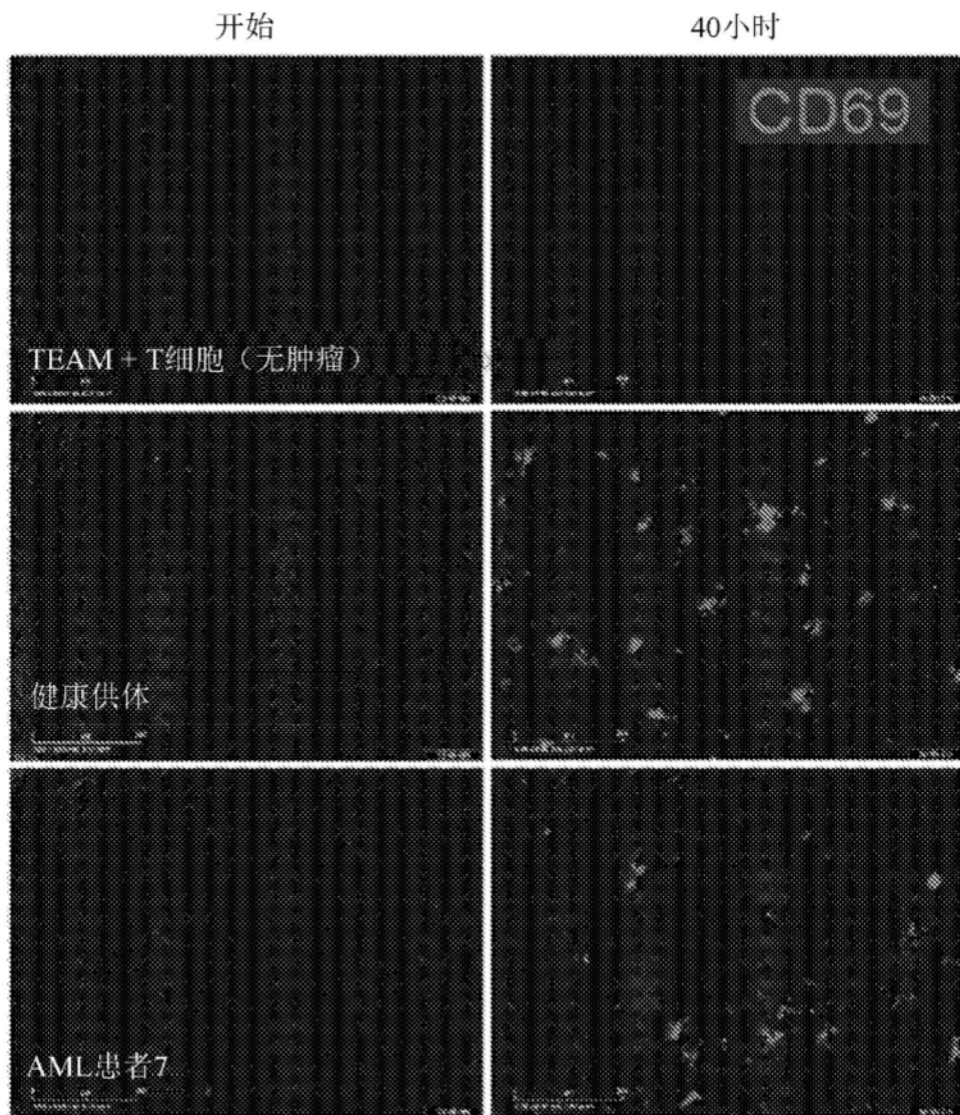


图16E

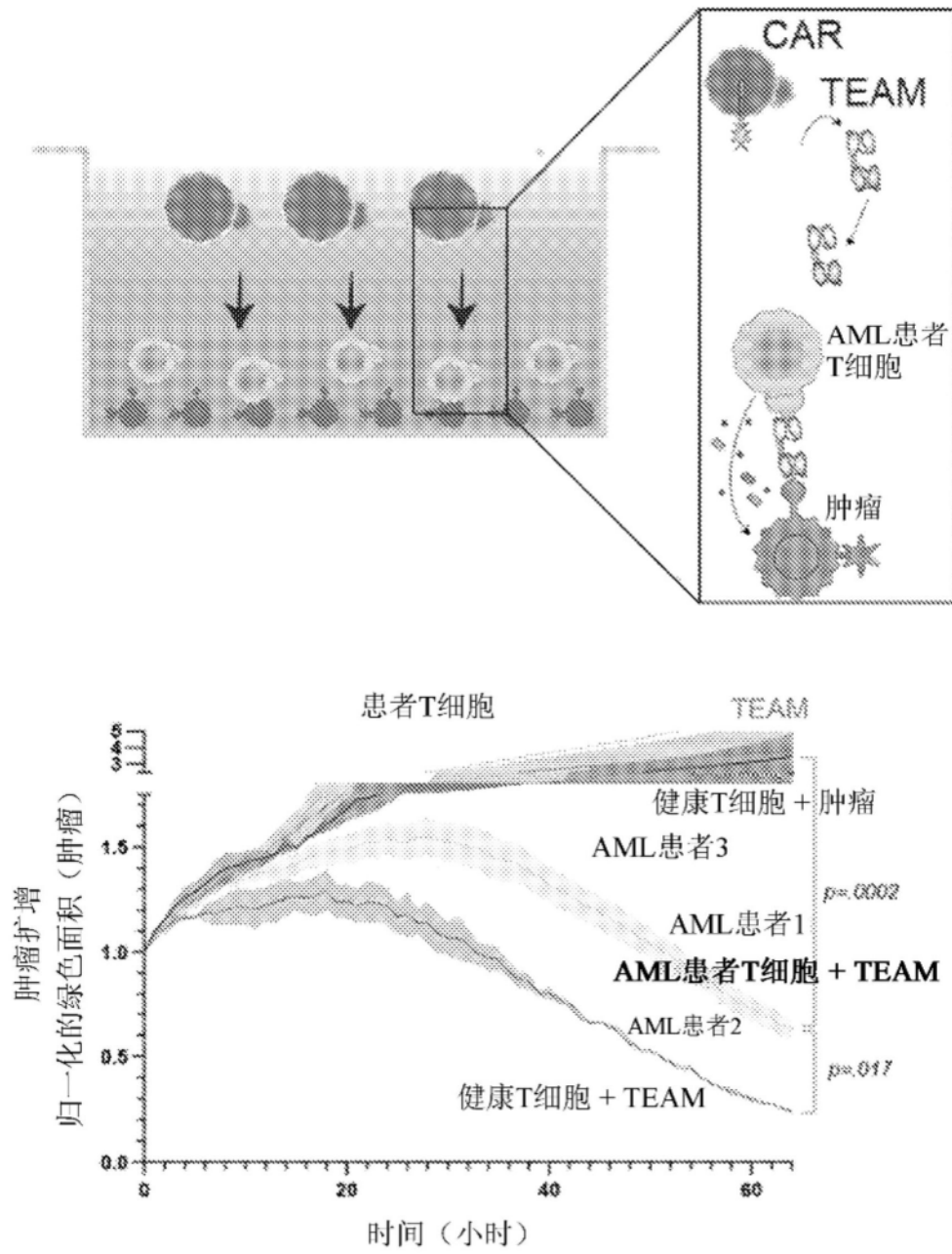


图16F

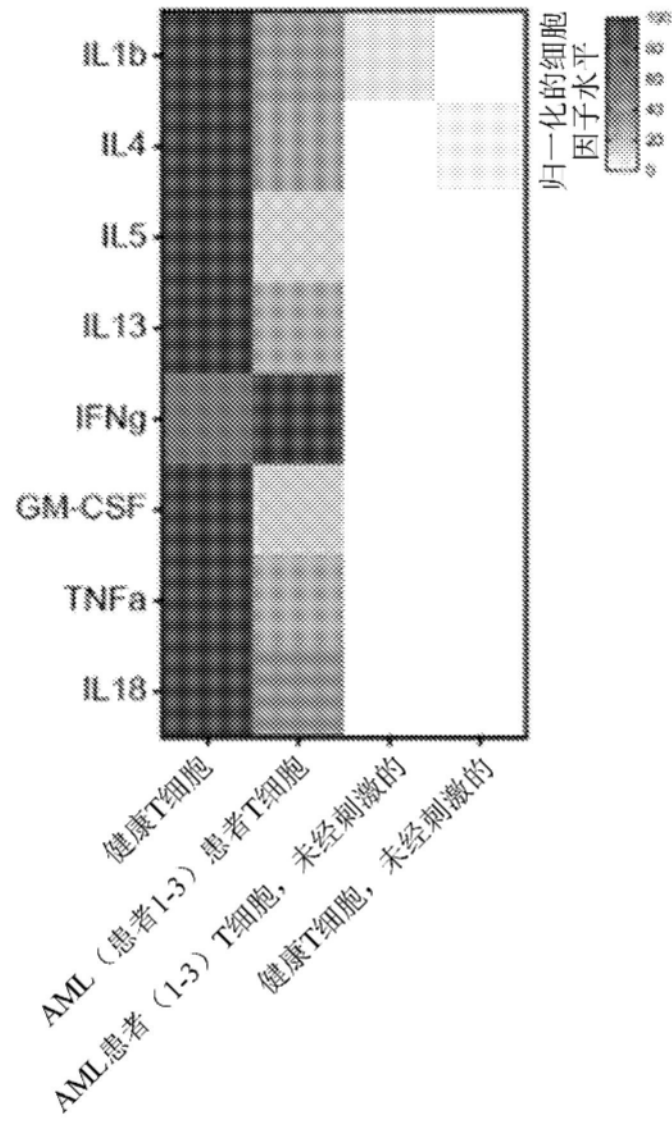


图16G

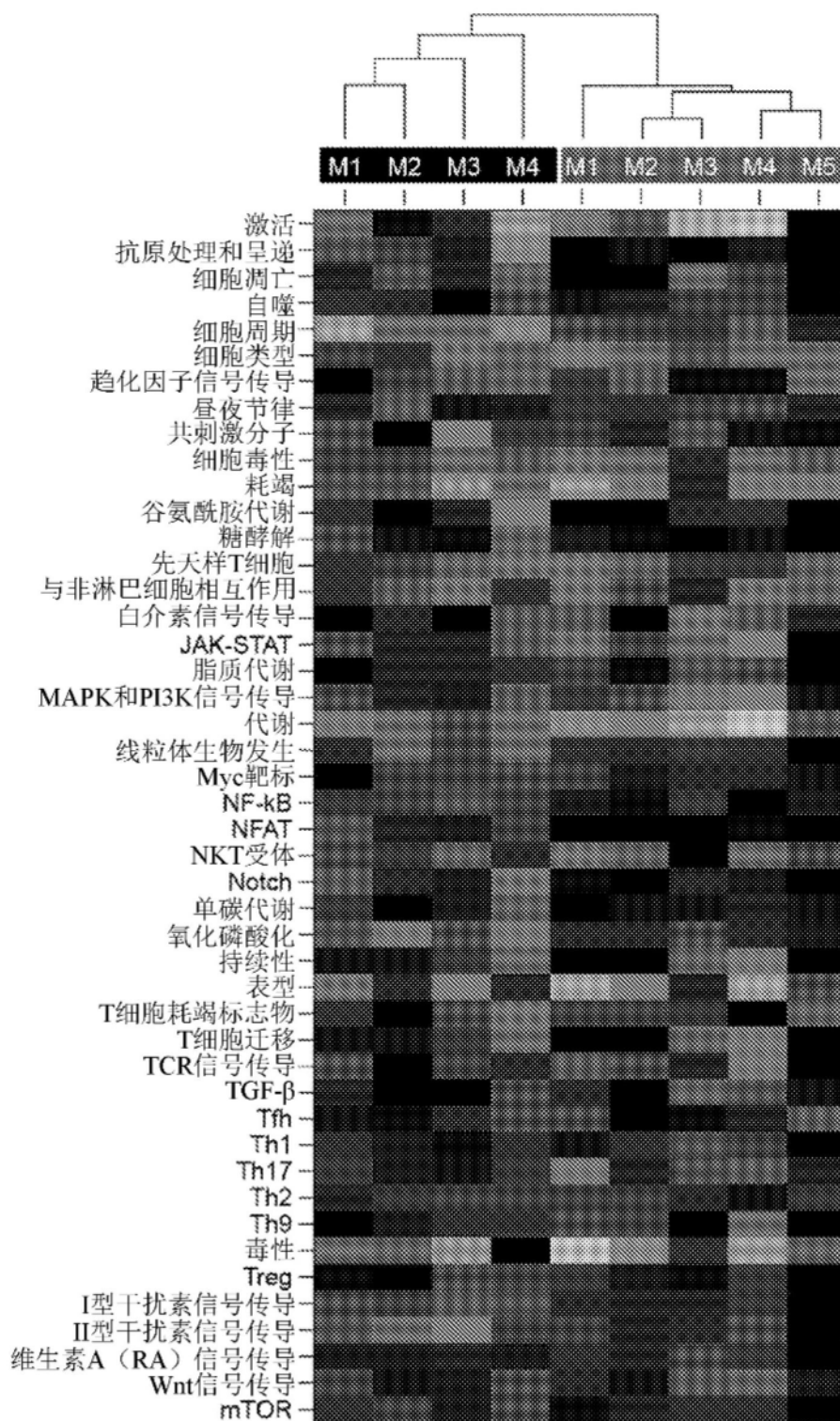


图18