(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119768178 A
(43)申请公布日 2025.04.04

(21)申请号 202380061160.4
(22)申请日 2023.04.03
(30)优先权数据
PCT/EP2022/073443 2022.08.23 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.02.20
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2023/058651 2023.04.03
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/041761 EN 2024.02.29
(71)申请人 基因医疗免疫疗法有限责任公司
地址 德国普拉内格-马廷斯里德
(72)发明人 玛娅·布尔德克 凯瑟琳·穆兹
佩特拉·普林茨
安吉利卡·赫尔姆布莱希特
(74)专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事务所(普通合伙) 11201
专利代理师 宋融冰
(51)Int.Cl.
A61K 39/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
C07K 14/725(2006.01)
C07K 14/705(2006.01)
C07K 14/715(2006.01)

权利要求书3页 说明书23页
序列表（电子公布） 附图12页

(54)发明名称

NY-ESO-1特异性T细胞受体与嵌合共刺激受体的组合

(57)摘要

本发明涉及表达TCR和共刺激的免疫细胞。特别地,本发明涉及免疫细胞,所述免疫细胞表达(i)对NY-ESO-1肽SLLMWITQC特异性TCR特异性的T细胞受体(TCR)和(ii)包含源自PD-1(CD279)的胞外结构域和源自4-1BB(CD137)的胞内结构域的嵌合共刺激受体。

CN 119768178 A

1.靶特异性免疫细胞,其中所述靶特异性免疫细胞表达

(A)NY-ESO-1/LAGE-1特异性TCR,所述TCR包含

-TCRα链,其包含具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDR 2和具有SEQ ID NO:37的序列的CDR 3;和

-TCRβ链,其包含具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR 2和具有SEQ ID NO:40的序列的CDR 3;

(B)嵌合共刺激受体,所述嵌合共刺激受体包含

-含有源自PD-1的多肽的胞外结构域,

-跨膜结构域,和

-含有源自4-1BB的多肽的胞内结构域。

2.根据权利要求2所述的靶特异性免疫细胞,其中所述嵌合共刺激受体包含

-含有源自PD-1的胞外结构域的胞外结构域,

-源自PD-1的跨膜结构域,和

-含有源自4-1BB的胞内结构域的胞内结构域。

3.根据权利要求3所述的靶特异性免疫细胞,其中所述源自PD-1的胞外结构域包含与如SEQ ID NO:28所示的源自PD-1的胞外结构域相比具有至多0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸取代的氨基酸序列。

4.根据前述权利要求中任一项所述的靶特异性免疫细胞,其中所述源自4-1BB的胞内结构域包含与如SEQ ID NO:32所示的源自4-1BB的细胞间结构域相比具有至多0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸取代的氨基酸序列。

5.根据前述权利要求中任一项所述的靶特异性免疫细胞,其中所述源自PD-1的胞外结构域包含SEQ ID NO:28的序列,并且其中所述源自4-1BB的胞内结构域包含SEQ ID NO:32的序列。

6.根据权利要求2至5中任一项所述的靶特异性免疫细胞,其中所述源自PD-1的跨膜结构域包含与如SEQ ID NO:30所示的源自PD-1的跨膜序列相比具有至多0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸取代的氨基酸序列。

7.根据权利要求6所述的靶特异性免疫细胞,其中所述跨膜结构域源自PD-1,其中优选地含有源自PD-1的多肽的跨膜结构域包含SEQ ID NO:30的序列。

8.根据前述权利要求中任一项所述的靶特异性免疫细胞,优选地其中所述嵌合共刺激受体包含SEQ ID NO:26的序列。

9.根据前述权利要求中任一项所述的靶特异性免疫细胞,其中所述靶特异性免疫细胞是淋巴细胞。

10.根据前述权利要求中任一项所述的靶特异性免疫细胞,其中所述靶特异性免疫细胞是T细胞。

11.根据前述权利要求中任一项所述的靶特异性免疫细胞,其中所述TCR包含具有与SEQ ID NO:41至少80%相同的氨基酸序列的可变TCRα区和具有与SEQ ID NO:42至少80%相同的氨基酸序列的可变TCRβ区。

12.根据前述权利要求中任一项所述的靶特异性免疫细胞,其中所述TCR包含具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的可变TCRα区和具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的可变TCRβ区。

13.根据前述权利要求中任一项所述的靶特异性免疫细胞,其中所述TCR能够结合具有如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列的NY-ESO肽或其部分,优选其HLA-A2结合形式。

14.根据前述权利要求中任一项所述的靶特异性免疫细胞,其中所述HLA-A2是HLA-A*02:01、HLA-A*02:02、HLA-A*02:04或HLA-A*02:09编码分子,优选HLA-A*2:01编码分子。

15.包含根据权利要求1至14所述的靶特异性免疫细胞的细胞群体。

16.根据权利要求15所述的细胞群体,

其中所述细胞群体包含分泌至少两种蛋白质的细胞。

17.根据权利要求16所述的细胞群体,其中所述细胞群体包含分泌至少三种蛋白质的细胞。

18.根据权利要求16或17所述的细胞群体,其中所述细胞群体包含分泌至少六种蛋白质的细胞。

19.根据权利要求16至18中任一项所述的细胞群体,其中所述蛋白质选自效应蛋白、刺激性细胞因子和化学吸引性细胞因子的组。

20.根据权利要求16至19中任一项所述的细胞群体,其中所述群体中至少5%分泌多于1种效应蛋白。

21.根据权利要求16至20中任一项所述的细胞群体,其中所述群体中至少4%分泌选自效应蛋白、刺激性细胞因子和化学吸引性细胞因子的多于一种。

22.根据权利要求16至21中任一项所述的细胞群体,其中所述细胞分泌至少一种选自RANTES、MIP-1α、穿孔素、TNF-α和TNF-β的蛋白质。

23.根据权利要求19至22所述的细胞群体,其中所述效应蛋白选自由Gzm-B、IFN-γ、穿孔素、TNF-α、TNF-β、MIP-1α组成的组。

24.根据权利要求19至23所述的细胞群体,其中所述效应蛋白选自由Gzm-B、IFN-γ、穿孔素、TNF-α、TNF-β组成的组。

25.根据权利要求19至24所述的细胞群体,其中所述刺激性细胞因子选自由GM-CSF、IL-2、IL-5、IL-7、IL-8、IL-9、IL-12组成的组。

26.根据权利要求19至25所述的细胞群体,其中所述刺激性细胞因子选自由GM-CSF、IL-2、IL-7、IL-8、IL-9、IL-12组成的组。

27.根据权利要求19至26所述的细胞群体,其中所述化学吸引性细胞因子选自IP-10和MIP-1β。

28.根据权利要求16至27所述的细胞群体,其中所述蛋白质选自由Gzm-B、IFN-γ、穿孔素、TNF-α、TNF-β、MIP-1α、GM-CSF、IL-2、IL-5、IL-7、IL-8、IL-9、IL-12、IP-10和MIP-1β组成的组。

29.根据权利要求16至28所述的细胞群体,其中所述蛋白质选自由Gzm-B、IFN-γ、穿孔素、TNF-α、TNF-β、GM-CSF、IL-2、IL-8、MIP-1β和IP-10组成的组。

30.根据权利要求16至29中任一项所述的细胞群体,其中所述蛋白质选自由Gzm-B、IFN-γ、穿孔素、TNF-α、TNF-β、GM-CSF、IL-2、MIP-1β组成的组。

31.根据权利要求16至30中任一项所述的细胞群体,其中所述蛋白质选自由IFN-γ、Gzm-B和IP-10组成的组。

32.根据权利要求16至31中任一项所述的细胞群体,其中所述蛋白质选自由IFN-γ和

Gzm-B组成的组。

33.包含如权利要求1至14定义的靶特异性免疫细胞或如权利要求15至32定义的细胞群体的药物组合物。

34.治疗有此需要的人类或非人类动物中的癌症的方法,包括向所述人类或非人类动物施用根据权利要求1至14所述的靶特异性免疫细胞或根据权利要求15至33所述的细胞群体。

35.根据权利要求34所述的方法,其中所述癌症是实体肿瘤。

NY-ESO-1特异性T细胞受体与嵌合共刺激受体的组合

技术领域

[0001] 本发明涉及表达TCR和共刺激的免疫细胞。特别地,本发明涉及免疫细胞,所述免疫细胞表达(i)对NY-ESO-1肽SLLMWITQC特异性TCR特异性的T细胞受体(TCR)和(ii)包含源自PD-1(CD279)的胞外结构域和源自4-1BB(CD137)的胞内结构域的嵌合共刺激受体。

背景技术

[0002] NY-ESO-1和LAGE-1是属于癌症/睾丸抗原家族的重要免疫治疗靶抗原。癌症/睾丸抗原在多种恶性肿瘤和睾丸生殖细胞中表达,但不在其他成体组织中表达。

[0003] 利用TCR修饰的T细胞进行免疫治疗的成功不仅取决于靶抗原的选择,还取决于具有高抗原特异性和敏感性的TCR的选择。另一个挑战(特别是在实体肿瘤治疗中)是免疫抑制性肿瘤微环境(TME),其对TCR修饰的T细胞的功效、适应性和持久性产生负面影响。除了抑制性细胞因子和缺乏必需代谢因子外,T细胞还面临TME中的抑制性检查点PD-1/PD-L1轴,这会减少T细胞浸润并导致其耗竭。因此,需要新的策略来使TCR修饰的T细胞具有克服抑制性免疫抑制TME的特性。更具体地说,需要靶向特定抗原(例如NY-ESO-1)的具有高特异性和增强的增殖、细胞因子释放和细胞毒性的TCR修饰的T细胞。

发明内容

[0004] 为了满足这些需求,本发明提供了高亲和力TCR和嵌合共刺激受体的组合,其允许产生靶向抗原(例如NY-ESO-1)的具有增强的细胞因子释放、增殖和细胞毒性的高特异性T细胞,特别是分泌2种或更多种细胞因子的多功能免疫细胞。

[0005] 本发明涉及一种靶特异性免疫细胞,其表达

[0006] (A)抗原特异性TCR,和

[0007] (B)嵌合共刺激受体,

[0008] 其中所述靶特异性免疫细胞分泌至少两种蛋白质。

[0009] 因此,本发明的一个实施方案是提供一种细胞,其包含

[0010] (A)NY-ESO-1/LAGE-1特异性TCR,所述TCR包含

[0011] -TCRα链,其包含具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDR 2和具有SEQ ID NO:37的序列的CDR 3;和

[0012] -TCRβ链,其包含具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR 2和具有SEQ ID NO:40的序列的CDR 3。

[0013] (B)嵌合共刺激受体,所述嵌合共刺激受体包含

[0014] -含有源自PD-1的多肽的胞外结构域,

[0015] -跨膜结构域,和

[0016] -含有源自4-1BB的多肽的胞内结构域,

[0017] 使用的NY-ESO-1特异性TCR能够结合具有氨基酸序列SLLMWITQC(SEQ ID NO:34)的NY-ESO-1肽或其部分,或其HLA-A2结合形式。它提供高功能亲和力和有利的肿瘤细胞识

别和杀伤特性。共刺激受体逆转抑制性检查点轴PD-1/PD-L1以改善T细胞功能性,特别是在抑制性TME中。因此,本发明的TCR和嵌合共刺激受体的组合允许以高特异性和增强的增殖、细胞因子释放和细胞毒性改善NY-ESO-1的靶向性。

[0018] 嵌合共刺激受体可包含源自PD-1的跨膜结构域。在特定实施方案中,嵌合共刺激受体的序列可包含SEQ ID NO:26的序列。

[0019] 因此,另一方面涉及一种组合物,其包含

[0020] -编码NY-ESO-1特异性T细胞受体(TCR)的核酸,所述TCR包含

[0021] -TCRα链,其包含具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的CDR3;和

[0022] -TCRβ链,其包含具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDR3;和

[0023] -编码嵌合共刺激受体的核酸,所述嵌合共刺激受体包含

[0024] -含有源自PD-1的多肽的胞外结构域,

[0025] -跨膜结构域,和

[0026] -含有源自4-1BB的多肽的胞内结构域。

[0027] 此外,一个方面涉及一种核酸,其包含

[0028] -编码NY-ESO-1特异性T细胞受体(TCR)的核酸,所述TCR包含

[0029] -TCRα链,其包含具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的CDR3;和

[0030] -TCRβ链,其包含具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDR3;和

[0031] -编码嵌合共刺激受体的核酸,所述嵌合共刺激受体包含

[0032] -含有源自PD-1的多肽的胞外结构域,

[0033] -跨膜结构域,和

[0034] -含有源自4-1BB的多肽的胞内结构域。

[0035] 另一方面涉及一种载体,所述载体包含含有NY-ESO-1特异性TCR和嵌合共刺激受体的序列的核酸。还包括包含核酸组合物和/或载体的细胞。

[0036] 通常,细胞是外周血淋巴细胞(PBL)或外周血单核细胞(PBMC)。在特定实施方案中,细胞是T细胞。

[0037] 多功能免疫细胞

[0038] 本发明的一个目的涉及一种细胞群体,所述细胞群体包含表达以下的细胞:

[0039] (A)抗原特异性TCR

[0040] (B)嵌合共刺激受体

[0041] 其中所述细胞群体包含分泌至少两种蛋白质的细胞。

[0042] 在一些实施方案中,嵌合共刺激受体包含

[0043] -含有源自PD-1的多肽的胞外结构域,

[0044] -源自PD-1的跨膜结构域,和

[0045] -含有源自4-1BB的多肽的胞内结构域,

[0046] 其中所述细胞群体包含分泌至少两种蛋白质的细胞。

[0047] 本发明的另一方面涉及一种靶特异性免疫细胞,其表达

[0048] (A)抗原特异性TCR,和

[0049] (B)如本文所述的嵌合共刺激受体,

[0050] 其中靶特异性免疫细胞分泌至少两种蛋白质。

[0051] 在一些实施方案中,细胞分泌至少三种蛋白质,例如至少四种或至少五种蛋白质。

[0052] 另一些方面涉及一种药物组合物,其包含本文定义的细胞、组合物、核酸和载体。另一些方面涉及本文定义的细胞、组合物、核酸和载体,其用于癌症治疗。

[0053] 令人惊讶的是,发明人发现,表达本文定义的嵌合共刺激受体的TCR-T细胞与缺乏本文定义的嵌合共刺激受体的TCR-T细胞相比表现出更高的多功能性。转基因T细胞的更高多功能性是指更高的体内功能性和抗肿瘤活性,并且与临床结果相关。

[0054] 特别地,我们可表明,表达本文定义的靶特异性NY-ESO-2特异性TCR和嵌合共刺激受体两者的细胞群体包括分泌至少两种蛋白质,例如至少三种蛋白质、至少四种蛋白质、至少五种蛋白质、至少六种蛋白质的细胞。

附图说明

[0055] 图1:与缺乏PD1-41BB的靶向NY-ESO-1的TCR-T细胞相比,表达PD1-41BB的靶向NY-ESO-1的TCR-T细胞表现出更高的多功能性。使用IsoLight®技术(IsoPlexis)分析了具有或不具有PD1-41BB的TCR转基因T细胞的单细胞多功能性(释放2种或更多种细胞因子)。与PD-L1过表达、NY-ESO-1阳性的MelA375和Mel624.38肿瘤细胞共培养后,评估单CD8+T细胞分泌32种T细胞细胞因子/蛋白的情况,并与未转导的TCR-T细胞进行比较。

[0056] (A)与缺乏PD1-41BB的TCR-T细胞相比,表达PD1-41BB的TCR-T细胞显示出更高百分比的多功能T细胞。不同深浅的灰色表示单个T细胞同时释放了多少细胞因子。

[0057] (B)多功能强度指数(PSI)是通过将各种分泌的细胞因子的强度乘以多功能T细胞的百分比来计算的。与缺乏PD1-41BB的TCR-T细胞相比,表达PD1-41BB的TCR-T细胞显示出更高的多功能强度指数(PSI)。对释放的各种细胞因子/裂解蛋白进行分类,发现效应(Gzm-B、IFN-γ、MIP-1a、穿孔素、TNF-α、TNF-β)和刺激性(GM-CSF、IL-2、IL-5、IL-8、IL-9、IL-12)细胞因子/裂解蛋白对优异的PSI具有大的贡献,其次是化学吸引性(chemo-attractive)(IP-10、MIP-1β、RANTES)细胞因子。调节性(IL-4、IL-10、IL-22、sCD137、TGF-β1)和炎症性(IL-6、IL-17F、MCP-1)细胞因子的释放程度较低。

[0058] (C)使用多功能性热图对单细胞多细胞因子释放进行详细分析,其显示具有和不具有PD1-41BB的TCR-T细胞的多细胞因子特征不同。值得注意的是,表达PD1-41BB的TCR-T细胞含有更高比例的同时分泌2-6种细胞因子的单细胞。

[0059] 图2:共表达嵌合PD1-41BB共刺激受体的NY-ESO-1TCR-T细胞的改善的效应功能。(A)未转导(UT)、NY-ESO-1TCR表达(TCR)和NY-ESO-1TCR共表达PD1-41BB(TCR+PD1-41BB)的T细胞的流式细胞术分析。(B)具有或不具有PD1-41BB的NY-ESO-1TCR转基因CD8+T细胞与表达不同水平NY-ESO-1和PD-L1的肿瘤细胞系一起培养,并通过ELISA测定释放的IFN-γ水平(t检验,**p>0.01,***p<0.001)。(C)通过qPCR测量NY-ESO-1的表达水平,并根据标准校准曲线进行量化。这里总结的PD-L1水平是通过qPCR和FACS分析评估的。(D)具有或不具有PD1-41BB的NY-ESO-1TCR转基因CD8+T细胞用染料膜追踪剂(dye membrane tracker)染色,

并与NY-ESO-1+PD-L1+肿瘤细胞系共培养5天。通过流式细胞术分析增殖,并使用FlowJo评估数据。

[0060] 图3:通过共表达嵌合共刺激受体PD1-41BB增强的NY-ESO-1TCR-T细胞的多功能性。在与肿瘤靶细胞系Mel624.38_PD-L1和MelA375_PD-L1共培养24小时后,使用一组32种分泌的细胞因子、趋化因子(chemokines)和细胞毒性分子的单细胞蛋白质组学分析(IsoLight技术,IsoPlexis)对具有(TCR+PD1-41BB)和不具有(TCR)嵌合共刺激受体PD1-41BB的共表达的NY-ESO-1特异性TCR-T细胞进行分析。与同一供体的未转导T细胞(UT)共培养作为对照。分泌2种或更多种细胞因子的细胞被认为是多功能的。(A)单TCR T细胞的多功能性以样品的百分比显示,并按同时表达2、3、4和5+种分析物的细胞百分比(橙色阴影)分类。(B)所显示样品的多功能强度指数(PSI)定义为每个细胞分泌超过2种效应分子的T细胞(a)中的多功能T细胞)的数量,乘以各自细胞分泌的蛋白质的平均荧光强度(MFI),并按与效应、刺激性、化学吸引性、调节性和炎症性特性相关的蛋白质分类(灰色阴影)。(C)单细胞多功能性热图显示每个样品分泌的单细胞细胞因子组合。每列代表一种特定的细胞因子组合,而橙色方块描述了相应样品分泌特定细胞因子组合的频率(显示靶细胞Mel624.38_PD-L1和MelA375_PD-L1的平均值)。细胞因子组按多功能性排序,并且仅显示样品中存在的40个最多功能性的组。

[0061] 图4:共表达共刺激受体PD1-41BB的TCR-T细胞分泌效应、刺激性和化学吸引性蛋白的频率增加。配备PD1-41BB细胞的TCR T细胞和靶细胞系Mel624.38_PD-L1共培养诱导的单一蛋白的分泌频率。显示蛋白质并按因它们的a)效应、b)刺激性、c)化学吸引性、d)调节性和e)炎症性特性的功能分类。

[0062] 图5:肿瘤细胞球体的连续杀伤。在共培养前72小时,在96孔ULA板中从1000个NucLightRed转导细胞开始生成肿瘤细胞球体。添加具有和不具有PD1-41BB的TCR转导T细胞(每孔10,000-38,000个),并通过使用IncuCyte S3对NucLightRed信号进行实时成像来监测肿瘤细胞的杀伤。每72-96小时添加如上所述生成的新鲜肿瘤细胞球体。

具体实施方式

[0063] 在针对其一些优选实施方案详细描述本发明之前,先提供以下一般定义。

[0064] 如下文中示例性描述的本发明可在不存在本文未具体公开的任何一个或多个要素、一个或多个限制的情况下适当地实施。

[0065] 将针对特定实施方案并参考某些附图描述本发明,但本发明不限于此,而仅限于权利要求。

[0066] 当在本说明书和权利要求中使用术语“包括”时,其不排除其他要素。就本发明的目的而言,术语“由……组成”被认为是术语“包括……”的优选实施方案。如果下文中将组定义为包括至少一定数量的实施方案,则这也应理解为公开了优选仅由这些实施方案组成的组。

[0067] 就本发明的目的而言,术语“获得的”被认为是术语“可获得的”的优选实施方案。如果下文例如抗体被定义为从特定来源可获得的,则这也应理解为公开了从该来源获得的抗体。

[0068] 当指代单数名词时使用不定冠词或定冠词,例如“a”、“an”或“the”,除非另有明确

说明,否则这包括该名词的复数。在本发明的上下文中,术语“约”或“大约”表示本领域技术人员将理解的仍然确保所讨论特征的技术效果的准确度区间。该术语通常表示与所示数值的偏差为±10%,优选为±5%。

[0069] 技术术语以其对本领域技术人员的常识或含义使用。如果对某些术语赋予特定含义,则将在下文中根据使用这些术语的上下文给出术语的定义。

[0070] TCR背景

[0071] TCR由两条不同且独立的蛋白质链(即TCR alpha(α)和TCR beta(β)链)构成。TCRα链包含可变(V)、连接(J)和恒定(C)区。TCRβ链包含可变(V)、多样性(D)、连接(J)和恒定(C)区。TCRα和TCRβ链的重排V(D)J区均包含高变区(CDR,互补决定区),其中CDR3区决定特异性表位识别。TCRα链和TCRβ链在C末端区域均包含疏水跨膜结构域并以短胞质尾结束。

[0072] 通常,TCR是一条α链和一条β链的异二聚体。该异二聚体可以与呈递肽的MHC分子结合。

[0073] 本发明上下文中的术语“可变TCRα区”或“TCRα可变链”或“可变结构域”是指TCRα链的可变区。本发明上下文中的术语“可变TCRβ区”或“TCRβ可变链”是指TCRβ链的可变区。

[0074] TCR基因座和基因使用国际免疫遗传学(IMGT)TCR命名法(IMGT数据库,www.IMGT.org;Giudicelli,V.,等人IMGT/LIGM-DB,the IMGT® comprehensive database of immunoglobulin and T cell receptor nucleotide sequences,Nucl.Acids Res.,34,D781-D784(2006).PMID:16381979;T cell Receptor Factsbook,LeFranc and LeFranc,Academic Press ISBN 0-12-441352-8)命名。

[0075] 靶标

[0076] 术语“表位”通常指结合结构域识别的抗原(通常是(多)肽)上的位点。术语“结合结构域”在其最广泛的意义上指“抗原结合位点”,即表征分子的与抗原靶标上的特定表位结合/相互作用的结构域。抗原靶标可能包含单个表位,但通常包含至少两个表位,并且可以根据抗原的尺寸、构象和类型包含任意数量的表位。术语“表位”通常包括线性表位和构象表位。线性表位是氨基酸一级序列中包含的连续表位,通常包含至少2个或更多氨基酸。构象表位由通过靶抗原(特别是靶(多)肽)的折叠而并列的非连续氨基酸形成。

[0077] 其他实施方案涉及一种细胞,其包含

[0078] (A)NY-ESO1特异性T细胞受体(TCR),所述TCR包含

[0079] -TCRα链,其包含具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的CDR3,和

[0080] -TCRβ链,其包含具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDR3

[0081] 和

[0082] (B)嵌合共刺激受体,所述嵌合共刺激受体包含

[0083] -含有源自PD-1的多肽的胞外结构域

[0084] -跨膜结构域,和

[0085] -含有源自4-1BB的多肽的胞内结构域,

[0086] 其中细胞分泌超过两种蛋白质。

[0087] TCR特异性序列

[0088] 本文所用的“至少80％相同”,特别是“具有……至少80％相同的氨基酸序列”包括氨基酸序列与所列氨基酸序列至少80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％相同。

[0089] 多个序列之间的百分比同一性的确定优选使用Vector NTI Advance™ 10程序(Invitrogen Corporation,Carlsbad CA,USA)的AlignX应用程序来完成。该程序使用经过修改的Clustal W算法(Thompson等人.,1994.Nucl Acids Res.22:pp.4673-4680;Invitrogen Corporation;Vector NTI Advance™ 10DNA and protein sequence analysis software.User's Manual,2004,pp.389-662)。使用AlignX应用程序的标准参数进行百分比同一性的确定。

[0090] 本文所述的TCR对NY-ESO-1,特别是NY-ESO-1表位SLLMWITQC(SEQ ID NO:34)具有特异性,并且仅表现出与其他表位或抗原的极低交叉反应性。

[0091] 因此,本发明组合中使用的示例性TCR包含

[0092] -TCRα链,其包含具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的CDR3;和

[0093] -TCRβ链,其包含具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDR3。

[0094] 在一些实施方案中,TCR包含具有与SEQ ID NO:41至少80％相同的氨基酸序列的可变TCRα区和具有与SEQ ID NO:42至少80％相同的氨基酸序列的可变TCRβ区。

[0095] 在具体实施方案中,TCR包含具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的可变TCRα区和具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的可变TCRβ区。

[0096] 在一些实施方案中,TCR可包含具有与SEQ ID NO:43相同或至少80％相同的氨基酸序列的TCRα链和具有与SEQ ID NO:44相同或至少80％相同的氨基酸序列的TCRβ链。

[0097] 在一些实施方案中,TCR可包含具有SEQ ID NO:43的氨基酸序列的TCRα链和具有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的TCRβ链。

[0098] 修饰

[0099] 在一些实施方案中,TCR和/或嵌合共刺激受体的氨基酸序列可包含一个或多个表型沉默取代。

[0100] “表型沉默取代”也称为“保守氨基酸取代”。本领域技术人员理解“保守氨基酸取代”的概念,优选地意味着编码带正电荷残基(H、K和R)的密码子被编码带正电荷残基的密码子取代,编码带负电荷残基(D和E)的密码子被编码带负电荷残基的密码子取代,编码中性极性残基(C、G、N、Q、S、T和Y)的密码子被编码中性极性残基的密码子取代,以及编码中性非极性残基(A、F、I、L、M、P、V和W)的密码子被编码中性非极性残基的密码子取代。这些变异可以自发发生,通过随机诱变引入,或可以通过定向诱变引入。这些变化可以在不破坏这些多肽的基本特征的情况下进行。普通技术人员可以容易且常规地筛选变体氨基酸和/或编码它们的核酸,以通过本领域已知的方法确定这些变异是否显著降低或破坏配体结合能力。

[0101] 技术人员理解,编码TCR和/或嵌合共刺激受体的核酸也可以被修饰。整个核酸序列中的有用修饰包括序列的密码子优化。可以进行导致其表达的氨基酸序列内的保守取代的改变。这些变化可以在TCR链的氨基酸序列的不影响功能的互补决定区和非互补决定区

中进行。通常,不应在CDR3区域进行添加和缺失。

[0102] 根据本发明的一些实施方案,TCR和/或嵌合共刺激受体的氨基酸序列被修饰以包含可检测的标记、治疗剂或药代动力学修饰部分。

[0103] 可检测标记的非限制性实例是放射性标记、荧光标记、核酸探针、酶和对比剂。可与TCR缔合的治疗剂包括放射性化合物、免疫调节剂、酶或化学治疗剂。治疗剂可以被与TCR连接的脂质体包裹,以便化合物可以在靶位点缓慢释放。这将避免在体内运输过程中造成损害,并确保治疗剂(例如毒素)在TCR与相关抗原呈递细胞结合后发挥最大作用。治疗剂的其他实例是:

[0104] 肽细胞毒素,即具有杀伤哺乳动物细胞的能力的蛋白质或肽,例如蓖麻毒素、白喉毒素、假单胞菌细菌外毒素A、DNase和RNase。小分子细胞毒性剂,即具有杀死哺乳动物细胞的能力且分子量小于700道尔顿的化合物。此类化合物可含有能够具有细胞毒性作用的毒性金属。此外,应理解这些小分子细胞毒性剂还包括前药,即在生理条件下衰变或转化以释放细胞毒性剂的化合物。此类药剂可以例如包括多西他赛、吉西他滨、顺铂、美登素衍生物、拉奇霉素(rachelmycin)、卡奇霉素(calicheamicin)、依托泊苷、异环磷酰胺、伊立替康、卟吩姆钠光敏素II、替莫唑胺、拓扑替康、三甲曲沙葡萄糖醛酸酯(trimetrexate glucoronate)、米托蒽醌、奥瑞他汀E、长春新碱和阿霉素;放射性核素,例如碘131、铼186、铟111、钇90、铋210和213、锕225和砹213。放射性核素与TCR或其衍生物的缔合可例如通过螯合剂进行;免疫刺激剂,也称为免疫刺激物,即刺激免疫反应的免疫效应分子。示例性的免疫刺激剂是细胞因子,例如IL-2和IFN-γ、抗体或其片段,包括抗T细胞或NK细胞决定簇抗体(例如抗CD3、抗CD28或抗CD16);具有抗体样结合特性的替代蛋白质支架;超抗原,即引起T细胞非特异性激活,导致多克隆T细胞激活和大量细胞因子释放的抗原及其突变体;趋化因子,例如IL-8、血小板因子4、黑色素瘤生长刺激蛋白等;补体激活剂;异种蛋白结构域、同种异体蛋白结构域、病毒/细菌蛋白结构域、病毒/细菌肽。

[0105] 治疗剂可以优选地选自由免疫效应分子、细胞毒性剂和放射性核素组成的组。优选地,免疫效应分子是细胞因子。

[0106] 药代动力学修饰部分可以是例如至少一个聚乙二醇重复单元、至少一个二醇基团、至少一个唾液酸基团或其组合。至少一个聚乙二醇重复单元、至少一个二醇基团、至少一个唾液酸基团的缔合可以通过本领域技术人员已知的多种方式实现。在优选的实施方案中,这些单元与TCR共价连接。根据本发明的TCR可以通过一个或多个药代动力学修饰部分进行修饰。特别地,TCR的可溶形式通过一个或多个药代动力学修饰部分进行修饰。药代动力学修饰部分可以实现对治疗剂的药代动力学特征的有益改变,例如改善血浆半衰期、降低或增强免疫原性以及改善溶解度。

[0107] 可以通过附接额外的功能部分来修饰TCR和/或嵌合共刺激受体,例如用于降低免疫原性、增加流体动力学尺寸(溶液中的尺寸)溶解度和/或稳定性(例如通过增强对蛋白水解降解的保护)和/或延长血清半衰期。

[0108] 其他有用的功能部分和修饰包括“自杀”或“安全开关”,其可用于在患者体内关闭携带本发明TCR的效应宿主细胞。一个实例是Gargett和Brown Front Pharmacol.2014;5:235描述的可诱导胱天蛋白酶9(iCasp9)“安全开关”。简而言之,通过众所周知的方法修饰效应宿主细胞以表达胱天蛋白酶9结构域,该结构域的二聚化依赖于小分子二聚化药物(例

如AP1903/CIP),并导致修饰的效应细胞中细胞凋亡的快速诱导。该系统例如在EP2173869(A2)中描述。其他“自杀”“安全开关”的实例在本领域中是已知的,例如单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-TK),CD20的表达以及随后使用抗CD20抗体或myc标签的消耗(Kieback等人,Proc Natl Acad Sci U S A.2008Jan 15;105(2):623-8)。

[0109] 本文还设想了具有改变的糖基化模式的TCR。如本领域所知,糖基化模式可取决于氨基酸序列(例如,特定糖基化氨基酸残基的存在或不存在,如下所述)和/或产生蛋白质的宿主细胞或生物体。多肽的糖基化通常是N连接的或O连接的。N连接是指碳水化合物部分附着到天冬酰胺残基的侧链上。通过改变氨基酸序列,使其包含选自天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸(其中是除脯氨酸外的任何氨基酸)的一个或多个三肽序列,可以方便地实现将N连接的糖基化位点添加到结合分子中。可通过在起始序列中添加或取代一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基来引入O连接的糖基化位点。

[0110] TCR糖基化的另一种方法是将糖苷化学或酶促偶联到蛋白质上。根据所用的偶联模式,糖可以附着于(a)精氨酸和组氨酸,(b)游离羧基基团,(c)游离巯基基团,如半胱氨酸的那些,(d)游离羟基基团,如丝氨酸、苏氨酸或羟脯氨酸的那些,(e)芳香族残基,如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸的那些,或(f)谷氨酰胺的酰胺基团。同样,脱糖基化(即去除结合分子上存在的碳水化合物部分)可以通过化学方法(例如通过将TCR暴露于三氟甲磺酸)或通过使用内切和外切糖苷酶以酶促方式完成。

[0111] 还可以设想将药物(例如小分子化合物)添加至TCR,特别是本发明的TCR的可溶形式。连接可以通过共价键或非共价相互作用(例如通过静电力)实现。可以使用本领域已知的各种接头来形成药物缀合物。

[0112] TCR、特别是本发明的TCR的可溶形式可以另外进行修饰以引入有助于相应的分子(标签)的识别、追踪、纯化和/或分离的额外结构域。因此,在一些实施方案中,可以对TCRα链或TCRβ链进行修饰以包含表位标签。

[0113] 表位标签是可以并入本发明的TCR中的标签的有用实例。表位标签是允许结合特定抗体的氨基酸短片段,因此能够识别和追踪患者体内或培养的(宿主)细胞内的可溶性TCR或宿主细胞的结合和运动。可以使用多种不同的技术来实现表位标签和因此标记后的TCR的检测。

[0114] 通过在对所述标签具有特异性的结合分子(抗体)的存在下培养细胞,标签还可以用于刺激和扩增携带本发明的TCR的宿主细胞。

[0115] 通常,在一些例子中,可以通过改变TCR与靶抗原的亲和力和解离率的各种突变来修饰TCR。特别地,突变可以增加亲和力和/或降低解离率。因此,TCR可在至少一个CDR及其可变结构域框架区中发生突变。

[0116] 然而,在优选实施方案中,TCR的CDR不被修饰或体外亲和力成熟,例如对于实施例中的TCR。这意味着CDR具有天然存在的序列。这可能是有利的,因为体外亲和力成熟可能导致TCR分子的免疫原性。这可能导致产生抗药抗体,从而降低或抑制治疗效果和治疗和/或引起不良反应。

[0117] 突变可以是一个或多个取代、缺失或插入。这些突变可以通过本领域已知的任何合适方法引入,例如聚合酶链式反应、基于限制性酶的克隆、不依赖连接的克隆程序,其例如在Sambrook,Molecular Cloning-4th Edition(2012)Cold Spring Harbor Laboratory

Press中所描述的。

[0118] 理论上,由于内源和外源TCR链之间的错配,可能会出现具有交叉反应风险的不可预测的TCR特异性。为了避免TCR序列错配,可对重组TCR序列进行修饰,以包含鼠源化或最小鼠源化Cα和Cβ区域,这种技术已被证明可以有效增强多个不同的转导TCR链的正确配对。TCR的鼠源化(即用鼠对应物交换人类Cα和Cβ区域)是一种常用于改善宿主细胞中TCR的细胞表面表达的技术。不希望受特定理论的束缚,人们认为鼠源化TCR与CD3共受体更有效缔合;和/或彼此优先配对,并且不易在体外经过基因修饰以表达具有所需抗原特异性的TCR的人类T细胞上形成混合TCR,但仍保留和表达其"原始"TCR。

[0119] 已鉴定出九个负责改善鼠源化TCR的表达的氨基酸(Sommermeyer和Uckert,J Immunol.2010Jun 1;184(11):6223-31),并设想将TCRα和/或β链恒定区中的一个或所有氨基酸残基取代成其鼠对应残基。该技术也称为"最小鼠源化",并且提供了增强细胞表面表达的优势,同时减少氨基酸序列中"外来"氨基酸残基的数量,从而降低免疫原性的风险。

[0120] 一些实施方案涉及本文所述的分离的TCR,其中TCR为单链类型,其中TCRα链和TCRβ链由接头序列连接。

[0121] 合适的单链TCR形式包括由对应于可变TCRα区的氨基酸序列构成的第一片段,由与对应于TCRβ链恒定区胞外序列的氨基酸序列的N末端融合的对应于可变TCRβ区的氨基酸序列构成的第二片段,以及将第一片段的C末端连接至第二片段的N末端的接头序列。或者,第一片段可以由对应于TCRβ链可变区的氨基酸序列构成,第二片段可以由与对应于TCRα链恒定区胞外序列的氨基酸序列的N末端融合的对应于TCRα链可变区序列的氨基酸序列构成。上述单链TCR还可以在第一链与第二链之间包含二硫键,其中接头序列的长度和二硫键的位置使得第一和第二片段的可变结构域序列基本上与天然T细胞受体中的相互定向一致。更具体地说,第一片段可以由与对应于TCRα链恒定区胞外序列的氨基酸序列的N末端融合的对应于TCRα链可变区序列的氨基酸序列构成,第二片段可由与对应于TCRβ链恒定区胞外序列的氨基酸序列的N末端融合的对应于TCRβ链可变区的氨基酸序列构成,并且在第一链与第二链之间可以提供二硫键。接头序列可以是任何不损害TCR功能的序列。

[0122] 在本发明的上下文中,"功能性"TCRα和/或β链融合蛋白应指保持至少实质性的生物活性的TCR或(例如通过氨基酸的添加、缺失或取代被修饰的)TCR变体。在TCR的α和/或β链的情况下,这应意味着两条链仍然能够形成发挥其生物学功能的TCR(具有未修饰的α和/或β链或具有另一种本发明的融合蛋白α和/或β链),特别是与所述TCR的特定肽-MHC复合物结合,和/或在特定肽:MHC相互作用后进行功能性信号转导。

[0123] 在特定实施方案中,TCR可被修饰为功能性TCRα和/或β链融合蛋白,其中所述表位标签的长度为6至15个氨基酸,优选9至11个氨基酸。在另一实施方案中,TCR可被修饰为功能性T细胞受体(TCR)α和/或β链融合蛋白,其中所述TCRα和/或β链融合蛋白包含两个或更多个彼此间隔开或直接串联的表位标签。融合蛋白的实施方案可包含2、3、4、5或更多个表位标签,只要融合蛋白保持其生物活性("功能性")。

[0124] 优选的是根据本发明的功能性TCRα和/或β链融合蛋白,其中所述表位标签选自但不限于CD20或Her2/neu标签,或其他常规标签,例如myc标签、FLAG标签、T7标签、HA(血凝素)标签、His标签、S标签、GST标签或GFP标签。myc、T7、GST、GFP标签是源自现有分子的表位。相反,FLAG是设计用于高抗原性的合成表位标签(参见例如美国专利号4,703,004和4,

851,341)。可以优选使用myc标签,因为有可用的高质量试剂用于检测它。除了被抗体识别外,表位标签当然可以具有一种或多种额外的功能。这些标签的序列在文献中描述并且为本领域技术人员所熟知。

[0125] 嵌合共刺激受体

[0126] 与抗原特异性TCR(NY-ESO特异性TCR)组合使用的嵌合共刺激受体包含

[0127] -含有源自PD-1的多肽的胞外结构域,

[0128] -跨膜结构域,和

[0129] -含有源自4-1BB的多肽的胞内结构域。

[0130] 与抗原特异性TCR(例如NY-ESO-1特异性TCR)组合使用的嵌合共刺激受体在本文中可以特别地包含含有源自PD-1(例如人类PD-1)的胞外结构域的胞外结构域。在此上下文中,术语“源自”特别意味着胞外结构域中包含的多肽分别包含PD-1(例如人类PD-1)的至少一部分,优选PD-1的胞外结构域。包含源自PD-1的胞外结构域的嵌合共刺激受体对PD-L1、PD-L2或PD-1的其他抑制性配体具有结合活性。如本文所用,术语“源自”PD-1还允许与PD-1(例如人PD-1)的天然序列或其部分(例如,胞外结构域)相比,取代、缺失和/或插入至多0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个氨基酸。

[0131] 在一个实施方案中,含有源自PD-1的多肽的胞外结构域包含SEQ ID NO:28中所示的序列或与SEQ ID NO:28至少80%相同的氨基酸序列。在特定实施方案中,含有源自PD-1的多肽的胞外结构域包含SEQ ID NO:28中所示的序列。

[0132] 在本发明的一个实施方案中,嵌合共刺激受体包含含有源自PD-1的多肽的胞外结构域,与人或鼠PD-1胞外结构域的氨基酸序列(例如SEQ ID NO:28所示的人PD-1序列)相比,其包含具有至多0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸取代(优选保守或高度保守取代)、缺失和/或插入的氨基酸序列。

[0133] 与抗原特异性TCR(例如NY-ESO-1特异性TCR)组合使用的嵌合共刺激受体在本文中还包含可操作地连接在胞外结构域和胞内结构域之间的跨膜结构域。通常,跨膜结构域不限于特定的跨膜结构域。优选地,跨膜结构域允许融合蛋白稳定地锚定在表达融合蛋白的细胞(例如,T细胞)的膜中,并且进一步允许胞外结构域分别与PD-L1结合,并且在与PD-L1结合后,允许信号传导至含有源自4-1BB的多肽的胞内结构域。

[0134] 在优选的实施方案中,嵌合共刺激受体的跨膜结构域源自PD-1。在一个实施方案中,跨膜结构域包含SEQ ID NO:30中所示的序列或与SEQ ID NO:30至少80%相同的氨基酸序列。在特定实施方案中,含有源自PD-1的多肽的跨膜结构域包含SEQ ID NO:30中所示的序列。

[0135] 与抗原特异性TCR(例如NY-ESO-1特异性TCR)组合使用的嵌合共刺激受体在本文中可以特别包含含有源自4-1BB(也称为“41BB”)的多肽,优选地4-1BB(例如人类4-1BB)的胞内结构域的胞内结构域。在此上下文中,术语“源自”特别指胞内结构域中包含的多肽分别包含4-1BB(例如人类4-1BB)的至少一部分,优选4-1BB的胞内结构域。包含源自4-1BB的胞内结构域的嵌合共刺激受体能够在用PD-L1、PD-L2或PD-1的另一抑制性配体刺激后增加表达所述嵌合共刺激受体的T细胞的增殖率,和/或与不表达嵌合共刺激受体的相应T细胞相比,能够增加表达所述嵌合共刺激受体的T细胞的效应功能(例如增加IFN-γ释放和/或增加细胞毒性)。如本文所用,术语“源自”4-1BB还允许与4-1BB(人或鼠,优选人4-1BB)的天

然序列或其部分(例如,胞内结构域)相比,至多0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个氨基酸被取代、缺失和/或插入。在一个实施方案中,含有源自4-1BB的多肽的胞内结构域包含SEQ ID NO:32中所示的序列或与SEQ ID NO:32至少80%相同的氨基酸序列。在特定实施方案中,含有源自4-1BB的多肽的胞内结构域包含SEQ ID NO:32中所示的序列。

[0136] 本文所用的"至少80%相同",特别是"具有……至少80%相同的氨基酸序列"包括氨基酸序列与所列氨基酸序列至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同。

[0137] 多个序列之间的百分比同一性的确定优选地使用Vector NTI Advance™ 10程序(Invitrogen Corporation,Carlsbad CA,USA)的AlignX应用程序来完成。该程序使用改进的Clustal W算法(Thompson等人.,1994.Nucl Acids Res.22:pp.4673-4680;Invitrogen Corporation;Vector NTI Advance™ 10DNA and protein sequence analysis software.User's Manual,2004,pp.389-662)。使用AlignX应用程序的标准参数进行百分比同一性的确定。

[0138] 核酸、核酸组合物和载体

[0139] 本发明涵盖编码本文所述的抗原特异性TCR、特别是NY-ESO-1特异性TCR的核酸,以及包含所述核酸的相应核酸组合物和载体。

[0140] 编码NY-ESO特异性TCR的相关区域和结构域的核苷酸序列列于表1中:

[0141]

肽序列 SEQ ID NO	描述
35	TCR1 α链 CDR1
36	TCR1 α链 CDR2
37	TCR1 α链 CDR3
38	TCR1 β链 CDR1
39	TCR1 β链 CDR2
40	TCR1 β链 CDR3
41	TCR1 α链可变区
42	TCR1 β链可变区
43	TCR β链
42	TCR α链

[0142] 编码嵌合共刺激受体相关区域和结构域的核苷酸序列列于表2中:

[0143]

肽序列 SEQ ID NO	核苷酸序列 SEQ ID NO	描述
26	27	包含 PD-1 胞外结构域、PD-1 跨膜结构域和 4-1BB 胞内结构域的嵌合共刺激受体
28	29	PD-1 胞外结构域
30	31	PD-1 跨膜结构域
32	33	4-1BB 胞内结构域

[0144] 表2

[0145] 此外,另一方面涉及一种组合物,其包含

[0146] -编码NY-ESO-1特异性T细胞受体(TCR)的核酸,所述TCR包含

[0147] -TCRα链,其包含具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的CDR3,和

[0148] -TCRβ链,其包含具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDR3;和

[0149] -编码嵌合共刺激受体的核酸,所述嵌合共刺激受体包含

[0150] -含有源自PD-1的多肽的胞外结构域,

[0151] -跨膜结构域,和

[0152] -含有源自4-1BB的多肽的胞内结构域。

[0153] 此外,一个方面涉及一种核酸,其包含

[0154] -编码NY-ESO-1特异性T细胞受体(TCR)的核酸,所述TCR包含

[0155] -TCRα链,其包含具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的CDR3,和

[0156] -TCRβ链,其包含具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR2和具有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDR3;和

[0157] -编码嵌合共刺激受体的核酸,所述嵌合共刺激受体包含

[0158] -含有源自PD-1的多肽的胞外结构域,

[0159] -跨膜结构域,和

[0160] -含有源自4-1BB的多肽的胞内结构域。

[0161] 另一方面涉及一种载体,所述载体包含核酸,所述核酸包含NY-ESO-1特异性TCR和嵌合共刺激受体的序列。还包括包含核酸组合物和/或载体的细胞。

[0162] “核酸分子”通常是指DNA或RNA的聚合物,其可以是单链或双链的,合成的或从天然来源获得的(例如,分离和/或纯化的),其可以包含天然的、非天然的或改变的核苷酸,并且可以包含天然的、非天然的或改变的核苷酸间键,例如磷酰胺键或硫代磷酸酯键,而不是未修饰寡核苷酸的核苷酸之间的磷酸二酯。优选地,本文所述的核酸是重组的。如本文所用,术语“重组”是指(i)通过将天然或合成的核酸片段连接到可以在活细胞中复制的核酸分子而在活细胞外构建的分子,或(ii)由上述(i)中描述的分子的复制产生的分子。出于本文的目的,复制可以是体外复制或体内复制。核酸可以基于化学合成和/或酶促连接反应使用本领域已知或商业上可获得(例如来自Genscript、Thermo Fisher等公司)的程序构建。

参见例如Sambrook等人,可以使用天然存在的核苷酸或各种修饰的核苷酸(例如参见Sambrook等人2001)化学合成核酸,所述修饰的核苷酸被设计为增加分子的生物稳定性或增加杂交后形成的双链的物理稳定性(例如,硫代磷酸酯衍生物和吖啶取代的核苷酸)。核酸可以包含编码任何重组TCR和/或嵌合共刺激受体、多肽或蛋白质或其功能部分或功能变体的任何核苷酸序列。

[0163] 例如,本公开内容还提供了分离或纯化的核酸的变体,其中变体核酸包含与编码本文描述的TCR的核苷酸序列至少75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的核苷酸序列。此类变体核苷酸序列编码特异性识别NY-ESO-1、尤其是SEQ ID NO:34的NY-ESO-1表位的功能性TCR。

[0164] 例如,本公开内容还提供了分离或纯化的核酸的变体,其中变体核酸包含与本文所述的嵌合共刺激受体至少75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的核苷酸序列。此类变体核苷酸序列编码如本文所述的功能性嵌合共刺激受体。

[0165] 如本文其他地方所述,可以修饰编码TCR和/或嵌合共刺激受体的核酸。整个核酸序列中的有用修饰可以是密码子优化。可以进行导致翻译的氨基酸序列内的保守取代的改变。关于TCR,这些变化可以在TCR链的氨基酸序列的不影响功能的互补决定区和非互补决定区中进行。通常,不应在CDR3区域进行添加和缺失。

[0166] 另一个实施方案涉及包含编码本文所述的TCR和嵌合共刺激受体的核酸的载体。

[0167] 载体优选为质粒、穿梭载体、噬菌粒、粘粒、表达载体、逆转录病毒载体、腺病毒载体或颗粒和/或用于基因治疗的载体。

[0168] “载体”是能够将核酸序列携带到合适的(在其中可以进行编码多肽的合成的)宿主细胞中的任何分子或组合物。通常,并且优选地,载体是使用本领域已知的重组DNA技术进行工程改造以整合期望核酸序列(例如本发明的核酸)的核酸。载体可以包含DNA或RNA和/或包含脂质体和/病毒颗粒。载体可以是质粒、穿梭载体、噬菌粒、粘粒、表达载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体或颗粒和/或用于基因治疗的载体。载体可以包含允许其在宿主细胞中复制的核酸序列,例如复制起点。载体还可以包含一个或多个可选择的标记基因和本领域普通技术人员已知的其他遗传元件。载体优选地是表达载体,其包含可操作地连接到允许所述核酸表达的序列的根据本发明的核酸。

[0169] 优选地,载体是表达载体。更优选地,载体是逆转录病毒,更特别地是γ-逆转录病毒或慢病毒载体。

[0170] 本领域技术人员理解,嵌合共刺激受体序列和TCR链TCR-α和TCR-β链序列可以包含在一个核酸中,例如一个载体中。在这种情况下,序列与内部核糖体进入位点(IRES)序列或源自猪捷申病毒(P2A)或源自其他物种的2A肽序列(如刺蛾(Thosea asigna)病毒2A肽(T2A)或口蹄疫病毒2A肽(F2A))连接(如Szymczak等人.:Development of 2A peptide-based strategies in the design of multicistronic vectors中所述),导致在转导细胞内在病毒启动子的控制下表达单个信使RNA(mRNA)分子。

[0171] 在特定实施方案中,细胞可包含编码本文所述的TCR和嵌合共刺激受体的核酸或包含所述核酸的载体。

[0172] 术语“转染”和“转导”可互换,并且是指将外源核酸序列引入宿主细胞(例如真核宿主细胞)的过程。值得注意的是,核酸序列的引入或转移不限于上述方法,而是可以通过多种方式实现,包括电穿孔、微注射、基因枪递送、脂质转染、超转染和上述通过逆转录病毒或其他适合转导或转染的病毒感染。TCR的克隆和外源表达方法例如在Engels等人.(Relapse or eradication of cancer is predicted by peptide-major histocompatibility complex affinity.Cancer Cell,23(4),516-26.2013)中描述。例如,在Cribbs“simplified production and concentration of lentiviral vectors to achieve high transduction in primary human T cells”BMC Biotechnol.2013;13:98中描述了使用慢病毒载体转导原代人T细胞。

[0173] 本发明的上下文中描述和提供的包含本文描述和提供的核酸分子或载体的细胞优选能够稳定或瞬时(例如,稳定)表达(组成性或条件性)抗原特异性TCR,例如NY-ESO-1特异性TCR,以及本发明的嵌合共刺激受体。宿主细胞通常可以通过任何方法用任何合适的核酸分子或载体进行转导或转化。在一个实施方案中,宿主细胞用包含编码如上所述的本发明的融合蛋白或其部分(例如,ECD、TMD和/或ICD)的核酸分子的逆转录病毒或慢病毒(例如,逆转录病毒)载体进行转导。

[0174] 在一些实施方案中,细胞(包括例如靶特异性免疫细胞或本文所述的细胞群体的细胞)是外周血淋巴细胞(PBL)或外周血单核细胞(PBMC)。细胞可以是自然杀伤细胞或T细胞。优选地,细胞是T细胞。T细胞可以是CD4+或CD8+T细胞。在一些实施方案中,细胞是干细胞,如记忆T细胞。

[0175] 干细胞样记忆T细胞(TSCM)是CD8+或CD4+T细胞的分化较低的亚群,其特点是具有自我更新和长期存活的能力。一旦这些细胞在体内遇到其抗原,它们就会进一步分化为中央记忆T细胞(TCM)、效应记忆T细胞(TEM)和终末分化效应记忆T细胞(TEMRA),其中一些TSCM保持静止状态(Flynn等人.,Clinical&Translational Immunology(2014)。这些剩余的TSCM细胞显示出在体内建立持久免疫记忆的能力,并且因此被认为是用于过继性T细胞疗法的重要T细胞亚群(Lugli等人.,Nature Protocols 8,33-42(2013)Gattinoni等人.,Nat.Med.2011Oct;17(10):1290-1297)。可以使用免疫磁性选择将T细胞池限制为干细胞记忆T细胞亚型,参见(Riddell等人.2014,Cancer Journal 20(2):141-44)。

[0176] 药物组合物、医学治疗和试剂盒

[0177] 本发明的另一个方面涉及药物组合物,其包含细胞,其包含抗原特异性TCR(例如NY-ESO-1特异性TCR)和嵌合共刺激受体;或包含编码如本文描述的所述分子的核酸分子,该核酸编码抗原特异性TCR(例如NY-ESO-1特异性TCR)和嵌合共刺激受体的;包含组合物,其包含编码抗原特异性TCR(例如NY-ESO-1特异性TCR)的核酸和编码嵌合共刺激受体的核酸;相应载体,如本文所述。

[0178] 本发明的那些活性成分优选以使得疾病可以得到治疗或至少得到缓解的剂量,与可接受的载体或载体材料混合用于这样的药物组合物中。这样的组合物(除了活性成分和载体之外)可以包括填充材料、盐、缓冲剂、稳定剂、增溶剂和其他材料,这些材料是本领域已知的。

[0179] 术语“药学上可接受的”定义为无毒材料,其不干扰活性成分的生物活性的有效性。载体的选择取决于应用。

[0180] 药物组合物可以包含增强活性成分的活性或补充治疗的附加成分。此类附加成分和/或因子可以是药物组合物的一部分,以实现协同作用或将不良或不想要的影响降至最低。

[0181] 用于本发明的活性成分的配制或制备和应用/用药的技术已在"Remington's Pharmaceutical Sciences",Mack Publishing Co.,Easton,PA,latest edition中公开。适当的应用是肠外应用,例如肌肉内、皮下、髓内注射以及鞘内、直接心室内、静脉内、结内、腹膜内或肿瘤内注射。静脉内注射是患者的优选治疗。

[0182] 根据优选实施方案,药物组合物是输注剂或注射剂。

[0183] 可注射组合物是药学上可接受的流体组合物,其包含至少一种活性成分,例如包含抗原特异性TCR(例如NY-ESO-1特异性TCR)和嵌合共刺激受体的扩增的T细胞群体(例如,对于要治疗的患者自体或同种异体)。活性成分通常溶解或悬浮在生理学上可接受的载体中,并且组合物还可以包含少量的一种或多种无毒辅助物质,例如乳化剂、防腐剂和pH缓冲剂等。可用于与本公开的融合蛋白一起使用的此类可注射组合物是常规的;适当的制剂是本领域普通技术人员所熟知的。

[0184] 通常,药物组合物包含至少一种药学上可接受的载体。

[0185] 因此,本发明的另一个方面涉及本文所述的细胞、本文所述的组合物、本文所述的核酸和/或本文所述的载体,其用作药物。

[0186] 一些实施方案涉及本文所述的细胞、本文所述的组合物、本文所述的核酸和/或载体,其用于癌症的治疗。

[0187] 因此,还考虑了用于治疗有此需要的人类或非人类动物中的癌症的方法,包括向所述人类或非人类动物施用本文所述的细胞、本文所述的组合物、本文所述的核酸和/或本文所述的载体。

[0188] 在一个实施方案中,癌症是血液癌症或实体肿瘤。

[0189] 血液癌症也称为血癌,其不形成实体肿瘤,因此分散在体内。血液癌症的实例是白血病、淋巴瘤或多发性骨髓瘤。有两种主要类型的实体肿瘤:肉瘤和癌(carcinomas)。肉瘤例如是血管、骨、脂肪组织、韧带、淋巴管、肌肉或肌腱的肿瘤。在特定实施方案中,癌症是实体肿瘤。

[0190] 在一个实施方案中,癌症选自由以下组成的组:前列腺癌、子宫癌、甲状腺癌、睾丸癌、肾癌、胰腺癌、卵巢癌、食道癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、鳞状细胞癌、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、黑色素瘤、肝细胞癌、头颈癌、胃癌、子宫内膜癌、宫颈癌、结直肠癌、胃腺癌、胆管癌、乳腺癌、膀胱癌、髓性白血病和急性淋巴细胞白血病、癌、肉瘤或骨肉瘤。

[0191] 包含本文所述的修饰T细胞的组合物可根据已知技术用于过继免疫疗法的方法和组合物中,或本领域技术人员基于本公开内容显而易见的其变体。

[0192] 在一些实施方案中,通过首先从其培养基中收获细胞,然后在适合施用的培养基和容器系统("药学上可接受的"载体)中以治疗有效量清洗和浓缩细胞来配置细胞。合适的输注培养基可以是任何等渗培养基制剂,通常是生理盐水、Normosol R(Abbott)或Plasma-Lyte A(Baxter),但也可以使用5%葡萄糖水溶液或林格氏乳酸盐。输注培养基可以补充人血清白蛋白。

[0193] 组合物中用于有效治疗的细胞数量通常大于10个细胞,并且多至10^6细胞,多至并

且包括10^8或10^9个细胞,并且可以超过10^{10}个细胞。细胞数量将取决于组合物的最终用途以及其中包含的细胞类型。对于本文提供的用途,细胞的体积通常为1升或更少,可以是500ml或更少,甚至250ml或100ml或更少。因此,期望细胞的密度通常大于10^6个细胞/ml,并且通常大于10^7个细胞/ml,通常为10^8个细胞/ml或更大。临床相关的免疫细胞数量可以分配到累计等于或超过10^9、10^{10}或10^{11}个细胞的多次输注中。本文提供的药物组合物可以是各种形式,例如固体、液体、粉末、水性或冻干形式。合适的药物载体的实例是本领域已知的。此类载体和/或添加剂可以通过常规方法配制,并且可以以合适的剂量施用于受试者。稳定剂,例如脂质、核酸酶抑制剂、聚合物和螯合剂,可以保护组合物免于在体内降解。在旨在通过注射施用的组合物中,可以包括表面活性剂、防腐剂、润湿剂、分散剂、悬浮剂、缓冲剂、稳定剂和等渗剂中的一种或多种。

[0194] 包含编码本文提供的抗原特异性TCR(例如NY-ESO-1特异性TCR)和嵌合共刺激受体的核苷酸序列的病毒载体颗粒可以包装为试剂盒。试剂盒可以任选地包括一个或多个组件,例如使用说明、装置和附加试剂,以及用于方法实践的组件,例如管、容器和注射器。示例性试剂盒可以包括编码本文提供的重组TCR和嵌合共刺激受体的核酸、重组多肽或病毒,并且可以任选地包括使用说明、用于检测受试者体内病毒的装置、用于向受试者施用组合物的装置和用于向受试者施用组合物的装置。

[0195] 本文还考虑了包含编码抗原特异性TCR(例如NY-ESO-1特异性TCR)和嵌合共刺激受体的多核苷酸的试剂盒。本文还考虑了包含编码感兴趣序列(例如重组TCR)的病毒载体和任选地编码免疫检查点抑制剂的多核苷酸序列的试剂盒。

[0196] 本文考虑的试剂盒还包括用于实施检测编码本文公开的TCR和/或嵌合共刺激受体中的任一种或多种的多核苷酸存在的方法的试剂盒。特别地,此类诊断试剂盒可包含适当的扩增和检测引物组以及用于进行深度测序的其他相关试剂,以检测编码本文公开的TCR和/或嵌合共刺激受体的多核苷酸。在进一步的实施方案中,本文的试剂盒可包含用于检测本文公开的TCR和/或嵌合共刺激受体的试剂,例如抗体或其他结合分子。诊断试剂盒还可包含用于确定编码本文公开的TCR和/或嵌合共刺激受体的多核苷酸的存在或用于确定本文公开的TCR和/或嵌合共刺激受体的存在的说明书。试剂盒还可包含说明书。说明书通常包括描述试剂盒中所含成分以及施用方法,包括用于确定受试者的适当状态、适当剂量和适当施用方法的方法的具体表达。说明书还可包括用于在治疗期间监测受试者的指导。

[0197] 本文提供的试剂盒还可以包括用于向受试者施用本文所述组合物的装置。本领域已知的用于施用药物或疫苗的各种装置中的任一种都可以包含在本文提供的试剂盒中。示例性装置包括但不限于皮下注射针、静脉注射针、导管、无针注射装置、吸入器和液体分配器,例如眼滴管。通常,试剂盒的用于施用病毒的装置将与试剂盒的病毒兼容;例如,无针注射装置(例如高压注射装置)可以包含在具有不会被高压注射损坏的病毒的试剂盒中,但通常不包含在具有会被高压注射损坏的病毒的试剂盒中。

[0198] 细胞因子释放

[0199] 表达TCR和共刺激分子(例如PD1-4BB)的细胞表现出增强的细胞因子释放。群体大量分泌的细胞因子/溶解蛋白尤其是IFN-γ、Gzm-B和IP-10、MIP-1β。

[0200] 令人惊讶的是,表达本文定义的嵌合共刺激受体的免疫细胞、特别是TCR-T细胞与

缺乏本文定义的嵌合共刺激受体的TCR-T细胞相比表现出更高的多功能性。

[0201] 转基因T细胞的更高多功能性是指更高的体内功能性和抗肿瘤活性,并且与临床结果相关。

[0202] 术语“多功能”是指细胞分泌至少2种,例如至少3种、至少4种、至少5种蛋白质。

[0203] 技术人员理解,细胞在抗原特异性刺激后(例如当细胞与在MHC分子中呈递抗原的抗原呈递细胞接触时)分泌蛋白质。

[0204] 特别地,细胞群体包含显著比例的细胞,例如0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1%、1.5%、2%、3%、4%、4.5%的多功能细胞。

[0205] 特别地,细胞群体包含显著比例的细胞,例如至少1%、优选至少1.5%、更优选1.75%的表达3种或更多种蛋白质的细胞。

[0206] 在一些实施方案中,多功能强度指数为80或更多、优选90或更多、更优选100或更多。

[0207] 多功能强度指数(PSI)通过将各种分泌的细胞因子的强度与多功能T细胞的百分比相乘来计算。

[0208] 特别地,我们可以表明,表达本文定义的靶特异性(例如NY-ESO-1特异性)TCR和嵌合共刺激受体的细胞群体包括分泌至少两种蛋白质(例如至少三种蛋白质、至少四种蛋白质、至少五种蛋白质)的细胞。

[0209] 因此,本发明的另一个方面涉及一种体外测定,其通过指示T细胞群体是否包含显著比例的本文定义的多功能T细胞来指示T细胞群体的效力。

[0210] 因此,一般而言,需要的是高效靶特异性T细胞,其分泌至少两种、至少三种、至少四种、至少五种选自效应蛋白、刺激性细胞因子和化学吸引性细胞因子的蛋白质。

[0211] 特别地,本发明涉及一种指示免疫细胞群体的效力的体外测定,其包括以下步骤

[0212] -测量第一细胞群体中多功能免疫细胞的比例,

[0213] -评估第一免疫细胞群体的效力并评估第二T细胞群体的效力,其中与第二细胞群体相比第一细胞群体中多功能细胞的比例增加表明第一细胞群体具有比第二细胞群体更高的效力。

[0214] 多功能免疫细胞的比例的测量可以通过IsoLight®技术(Isoplexis)进行。

[0215] 因此,期望包含靶特异性T细胞的T细胞群体,其中细胞群体包含分泌至少两种、至少三种、至少四种、至少五种选自效应蛋白、刺激性细胞因子和化学吸引性细胞因子的组的蛋白质的T细胞。

[0216] 效应蛋白可以选自由Gzm-B、IFN-γ、穿孔素、TNF-α、TNF-β、MIP-1α组成的组。

[0217] 在一个实施方案中,刺激性细胞因子可以选自由GM-CSF、IL-2、IL-7、IL-8、IL-9、IL-12组成的组。在一个实施方案中,刺激性蛋白选自GM-CSF、IL-2和IL-8。在一个实施方案中,刺激性蛋白是GM-CSF。

[0218] 化学吸引性细胞因子可以选自IP-10和MIP-1β。

[0219] 在一些实施方案中,分泌至少两种蛋白质的细胞中的每一个分泌至少一种选自由Gzm-B、IFN-γ、穿孔素、TNF-α、TNF-β、MIP-1α、GM-CSF、IL-2、IL-5、IL-7、IL-8、IL-9、IL-12、IP-10和MIP-1β组成的组的蛋白质。在一些实施方案中,分泌至少两种蛋白质的细胞中的每一个分泌至少一种选自由Gzm-B、IFN-γ、穿孔素、TNF-α、TNF-β、GM-CSF、IL-2、IL-8、MIP-1β

和IP-10组成的组的蛋白质。在一些实施方案中,分泌至少两种蛋白质的细胞中的每一个分泌至少一种选自由IFN-γ、Gzm-B、GM-CSF、MIP-1β和IP-10组成的组的蛋白质。在一些实施方案中,分泌至少两种蛋白质的细胞中的每一个分泌至少一种选自由IFN-γ、Gzm-B、GM-CSF组成的组的蛋白质。在一些实施方案中,分泌至少两种蛋白质的细胞中的每一个分泌至少一种选自由IFN-γ、Gzm-B和IP-10组成的组的蛋白质。在一些实施方案中,分泌至少两种蛋白质的细胞中的每一个分泌至少一种选自由IFN-γ和Gzm-B组成的组的蛋白质。

[0220] 通常,细胞群体不包含分泌大量IL-6和/或IL-10的细胞。

[0221] 其他实施方案涉及表达(A)本文定义的NY-ESO-1特异性TCR和(B)本文定义的嵌合共刺激受体的T细胞,其中T细胞分泌至少两种、至少三种、至少四种、至少五种选自由效应蛋白、刺激性细胞因子和化学吸引性细胞因子组成的组的蛋白质。

[0222] 因此,一些实施方案涉及包含表达(A)本文定义的NY-ESO-1特异性TCR和(B)本文定义的嵌合共刺激受体的T细胞的细胞群体,其中细胞群体包含分泌至少两种、至少三种、至少四种、至少五种选自由效应蛋白、刺激性细胞因子和化学吸引性细胞因子组成的组的蛋白质的T细胞。

[0223] 实验

[0224] 实施例1:与缺乏PD1-41BB的靶向NY-ESO-1的TCR-T细胞相比,表达PD1-41BB的靶向NY-ESO-1的TCR-T细胞表现出更高的多功能性。

[0225] 使用IsoLight®技术(IsoPlexis)分析具有或不具有PD1-41BB的TCR转基因T细胞的单细胞多功能性(释放2种或更多种蛋白质)。所谓的"多功能"T细胞分泌多种蛋白质(特别是细胞因子和其他效应蛋白,如Gzm-B),从而实现各种效应功能和高效的免疫反应。与PD-L1过表达、NY-ESO-1阳性的MelA375或Mel624.38肿瘤细胞系共培养20小时后,使用CD8微珠(Miltenyi Biotec)从肿瘤细胞中分离单$CD8^+$T细胞并加载到IsoCode芯片(IsoPlexis)上。使用IsoLight设备和IsoSpeak软件(IsoPlexis)分析32种T细胞细胞因子/蛋白质的分泌。与缺乏PD1-41BB的TCR-T细胞相比,表达PD1-41BB的TCR-T细胞显示出更高百分比的多功能T细胞,即分泌2种或更多种蛋白质的T细胞(图1A)。多功能强度指数(PSI)是通过将各种分泌蛋白质/细胞因子的强度乘以多功能T细胞的百分比来计算的。与缺乏PD1-41BB的TCR-T细胞相比,表达PD1-41BB的TCR-T细胞表现出更高的PSI(图1B)。

[0226] 对释放的各种蛋白质/细胞因子进行分类,发现效应蛋白(Gzm-B、IFN-γ、MIP-1a、穿孔素、TNF-α、TNF-β)和刺激性细胞因子(GM-CSF、IL-12、IL-2、IL-5、IL-8、IL-9)对优异的PSI的具有大的贡献,其次是化学吸引性细胞因子(IP-10、MIP-1β、RANTES)。调节性(IL-4、IL-10、IL-22、sCD137、TGF-β1)和炎症性(CP-1、IL-17F、IL8)细胞因子的释放程度较低。使用多功能性热图对单细胞多蛋白/细胞因子释放进行详细分析,其表明具有和不具有PD1-41BB的TCR-T细胞的多聚蛋白/细胞因子特征不同(图1C)。值得注意的是,表达PD1-41BB的TCR-T细胞含有更高比例的同时分泌2-6种蛋白质/细胞因子的单细胞,这表明与缺乏PD1-41BB的TCR-T细胞相比更优异的功能性。表达PD1-41BB的TCR-T细胞释放的主要蛋白/细胞因子是Gzm-B、IFN-γ、GM-CSF和MIP-1β,属于效应蛋白和刺激性细胞因子家族,因此表明高TCR-T细胞功能性和潜在的抗肿瘤活性。

[0227] 实施例2:共表达嵌合PD1-41BB共刺激受体的NY-ESO-1TCR-T细胞的改善的效应功能。未转导(UT)、NY-ESO-1TCR表达(TCR)和NY-ESO-1TCR共表达PD1-41BB(TCR+PD1-41BB)T

细胞的流式细胞术分析(图2A)。将具有或不具有PD1-41BB的NY-ESO-1TCR转基因CD8+T细胞与表达不同水平NY-ESO-1和PD-L1的肿瘤细胞系一起培养,并通过ELISA测定释放的IFN-γ水平(t检验,**p>0.01,***p<0.001)(图2B)。通过qPCR测量NY-ESO-1的表达水平,并根据标准校准曲线进行量化。这里总结的PD-L1水平是通过qPCR和FACS分析评估的(图2C)。将具有或不具有PD1-41BB的NY-ESO-1TCR转基因CD8+T细胞用染料膜示踪剂染色,并与NY-ESO-1+PD-L1+肿瘤细胞系共培养5天。通过流式细胞术分析增殖,并使用FlowJo评估数据(图2d)。

[0228] 实施例3:通过共表达嵌合共刺激受体PD1-41BB增强的NY-ESO-1TCR-T细胞的多功能性。在与肿瘤靶细胞系Mel624.38_PD-L1和MelA375_PD-L1共培养24小时后,使用一组32种分泌的细胞因子、趋化因子和细胞毒性分子的单细胞蛋白质组学分析(IsoLight技术,IsoPlexis)对具有(TCR+PD1-41BB)和不具有(TCR)嵌合共刺激受体PD1-41BB的共表达的NY-ESO-1特异性TCR-T细胞进行分析。与同一供体的未转导T细胞(UT)共培养作为对照。分泌2种或更多种细胞因子的细胞被认为是多功能的。单TCR T细胞的多功能性以样品的百分比显示,并按同时表达2、3、4和5+种分析物的细胞百分比(灰色阴影)分类(图3A)。所显示样品的多功能强度指数(PSI)定义为每个细胞分泌超过2种效应分子的T细胞(A)中的多功能T细胞)的数量,乘以各自细胞分泌的蛋白质的平均荧光强度(MFI),并按与效应、刺激性、化学吸引性、调节性和炎症性特性相关的蛋白质分类(灰色阴影)(图3B)。单细胞多功能性热图显示每个样品分泌的单细胞细胞因子组合。每列代表一种特定的细胞因子组合,而橙色方块描述了相应样品分泌特定细胞因子组合的频率(显示靶细胞Mel624.38_PD-L1和MelA375_PD-L1的平均值)(图3C)。

[0229] 实施例4:共表达共刺激受体PD1-41BB的TCR-T细胞分泌效应、刺激性和化学吸引性蛋白的频率增加。配备PD1-41BB细胞的TCR T细胞和靶细胞系Mel624.38_PD-L1共培养诱导的单一蛋白的分泌频率。显示蛋白质并按因它们的a)效应、b)刺激、c)化学吸引、d)调节和e)炎症特性的功能分类(图4)。

[0230] 实施例5:肿瘤细胞球体的连续杀伤。在共培养前72小时,在96孔ULA板中从1000个NucLightRed转导细胞开始生成肿瘤细胞球体。添加具有和不具有PD1-41BB的TCR转导T细胞(每孔10,000-38,000个),并通过使用IncuCyte S3对NucLightRed信号进行实时成像来监测肿瘤细胞的杀伤。每72-96小时添加如上所述生成的新鲜肿瘤细胞球体(图5)。

[0231] 本申请还包括以下项目:

[0232] 项目1.一种细胞群体,所述细胞群体包含表达以下的细胞:

[0233] (A)抗原特异性TCR,和

[0234] (B)嵌合共刺激受体,

[0235] 其中所述细胞群体包含分泌至少两种蛋白质的细胞。

[0236] 项目2.根据项目2所述的细胞群体,其中所述嵌合共刺激受体包含

[0237] -含有源自PD-1的多肽的胞外结构域,

[0238] -跨膜结构域,和

[0239] -含有源自4-1BB的多肽的胞内结构域,

[0240] 其中所述细胞群体包含分泌至少两种蛋白质的细胞。

[0241] 项目3.根据项目2所述的细胞群体,其中所述嵌合共刺激受体包含

[0242] -含有源自PD-1的多肽的胞外结构域,

[0243] -源自PD-1的跨膜结构域,和

[0244] -含有源自4-1BB的多肽的胞内结构域,

[0245] 其中所述细胞群体包含分泌至少两种蛋白质的细胞。

[0246] 项目4.根据项目3所述的细胞群体,所述细胞群体包含表达以下的细胞:

[0247] (A)NY-ESO-1/LAGE-1特异性TCR,所述TCR包含

[0248] -TCRα链,其包含具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDR 2和具有SEQ ID NO:37的序列的CDR 3;和

[0249] -TCRβ链,其包含具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR 2和具有SEQ ID NO:40的序列的CDR 3;和

[0250] (B)嵌合共刺激受体,所述嵌合共刺激受体包含

[0251] -含有源自PD-1的多肽的胞外结构域,

[0252] -跨膜结构域,和

[0253] -含有源自4-1BB的多肽的胞内结构域,

[0254] 其中所述细胞群体包含分泌至少两种蛋白质的细胞。

[0255] 项目5.根据前述任何一项所述的细胞群体,其中所述细胞群体包含分泌至少三种蛋白质的细胞。

[0256] 项目6.根据前述任何一项所述的细胞群体,其中所述细胞群体包含分泌至少四种蛋白质的细胞。

[0257] 项目7.根据前述任何一项所述的细胞群体,其中所述,其中细胞群体包含分泌至少五种蛋白质的细胞。

[0258] 项目8.根据前述任何一项所述的细胞群体,其中所述蛋白质选自效应蛋白、刺激性细胞因子和化学吸引性细胞因子的组。

[0259] 项目9.根据项目8所述的细胞群体,其中所述效应蛋白选自由Gzm-B、IFN-γ、穿孔素、TNF-α、TNF-β、MIP-1α组成的组。

[0260] 项目10.根据项目9所述的细胞群体,其中所述效应蛋白选自由Gzm-B、IFN-γ、穿孔素、TNF-α、TNF-β组成的组。

[0261] 项目11.根据项目8至9所述的细胞群体,其中所述刺激性细胞因子选自由GM-CSF、IL-2、IL-5、IL-7、IL-8、IL-9、IL-12组成的组。

[0262] 项目12.根据项目8至11所述的细胞群体,其中所述刺激性细胞因子选自由GM-CSF、IL-2、IL-7、IL-8、IL-9、IL-12组成的组。

[0263] 项目13.根据项目8至12所述的细胞群体,其中所述化学吸引性细胞因子选自IP-10和MIP-1β。

[0264] 项目14.根据前述项目中任一项所述的细胞群体,其中所述蛋白质选自由Gzm-B、IFN-γ、穿孔素、TNF-α、TNF-β、MIP-1α、GM-CSF、IL-2、IL-5、IL-7、IL-8、IL-9、IL-12、IP-10和MIP-1β组成的组。

[0265] 项目15.根据前述项目中任一项所述的细胞群体,其中所述蛋白质选自由Gzm-B、IFN-γ、穿孔素、TNF-α、TNF-β、GM-CSF、IL-2、IL-8、MIP-1β和IP-10组成的组。

[0266] 项目16.根据前述项目中任一项所述的细胞群体,其中所述蛋白质选自由Gzm-B、IFN-γ、穿孔素、TNF-α、TNF-βGM-CSF、IL-2、MIP-1β组成的组。

[0267] 项目17.根据前述项目中任一项所述的细胞群体,其中所述蛋白质选自由IFN-γ、Gzm-B和IP-10组成的组。

[0268] 项目18.根据前述项目中任一项所述的细胞群体,其中所述蛋白质选自由IFN-γ和Gzm-B组成的组。

[0269] 项目19.根据项目4和6至18中任一项所述的细胞群体,其中所述TCR能够结合具有如SEQ ID NO:34中所示的氨基酸序列的NY-ESO肽或其部分,优选其HLA-A2结合形式。

[0270] 项目20.根据项目19所述的细胞群体,其中所述HLA-A2是HLA-A*02:01、HLA-A*02:02、HLA-A*02:04或HLA-A*02:09编码分子,优选HLA-A*2:01编码分子。

[0271] 项目21.根据项目3至20中任一项所述的细胞群体,其中所述含有源自PD-1的多肽的胞外结构域包含SEQ ID NO:28的序列,并且

[0272] 其中所述含有源自4-1BB的多肽的胞内结构域包含SEQ ID NO:32的序列。

[0273] 项目22.根据项目3至21中任一项所述的细胞群体,其中所述跨膜结构域源自PD-1,其中优选地所述含有源自PD-1的多肽的跨膜结构域包含SEQ ID NO:30的序列,优选地其中所述嵌合共刺激受体包含SEQ ID NO:26的序列。

[0274] 项目23.根据前述项目中任一项所述的细胞群体,其用于治疗癌症。

[0275] 项目24.一种靶特异性免疫细胞,其表达

[0276] (A)抗原特异性TCR,和

[0277] (B)嵌合共刺激受体,

[0278] 其中所述靶特异性免疫细胞分泌至少两种蛋白质。

[0279] 项目25.根据项目24所述的靶特异性免疫细胞,其中所述嵌合共刺激受体包含

[0280] -含有源自PD-1的多肽的胞外结构域,

[0281] -跨膜结构域,和

[0282] -含有源自4-1BB的多肽的胞内结构域,

[0283] 其中所述靶特异性免疫细胞分泌至少两种蛋白质。

[0284] 项目26.根据项目25所述的靶特异性免疫细胞,其中所述嵌合共刺激受体包含

[0285] -含有源自PD-1的多肽的胞外结构域,

[0286] -源自PD-1的跨膜结构域,和

[0287] -含有源自4-1BB的多肽的胞内结构域,

[0288] 其中所述靶特异性免疫细胞分泌至少两种蛋白质。

[0289] 项目27.根据项目24至26中任一项所述的靶特异性免疫细胞,其中所述靶特异性免疫细胞表达

[0290] (A)NY-ESO-1/LAGE-1特异性TCR,所述TCR包含

[0291] -TCRα链,其包含具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDR 2和具有SEQ ID NO:37的序列的CDR 3;和

[0292] -TCRβ链,其包含具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR 2和具有SEQ ID NO:40的序列的CDR 3;

[0293] (B)嵌合共刺激受体,所述嵌合共刺激受体包含

[0294] -含有源自PD-1的多肽的胞外结构域,

[0295] -跨膜结构域,和

[0296] -含有源自4-1BB的多肽的胞内结构域，

[0297] 其中所述靶特异性免疫细胞分泌至少两种蛋白质。

[0298] 项目28.根据项目24至27中任一项所述的靶特异性免疫细胞，其中所述靶特异性免疫细胞分泌至少三种蛋白质。

[0299] 项目29.根据项目24至28中任一项所述的靶特异性免疫细胞，其中所述靶特异性免疫细胞分泌至少四种蛋白质。

[0300] 项目30.根据项目24至29中任一项所述的靶特异性免疫细胞，其中所述靶特异性免疫细胞分泌至少五种蛋白质。

[0301] 项目31.根据项目24至30中任一项所述的靶特异性免疫细胞，其中所述蛋白质选自由效应蛋白、刺激性细胞因子和化学吸引性细胞因子的组。

[0302] 项目32.根据项目31所述的靶特异性免疫细胞，其中所述效应蛋白选自由Gzm-B、IFN-γ、穿孔素、TNF-α、TNF-β、MIP-1α组成的组。

[0303] 项目33.根据项目32所述的靶特异性免疫细胞，其中所述效应蛋白选自由Gzm-B、IFN-γ、穿孔素、TNF-α、TNF-β组成的组。

[0304] 项目34.根据项目31至33中任一项所述的靶特异性免疫细胞，其中所述刺激性细胞因子选自由GM-CSF、IL-2、IL-5、IL-7、IL-8、IL-9、IL-12组成的组。

[0305] 项目35.根据项目31至34中任一项所述的靶特异性免疫细胞，其中所述刺激性细胞因子选自由GM-CSF、IL-2、IL-7、IL-8、IL-9、IL-12组成的组。

[0306] 项目36.根据项目31至35中任一项所述的靶特异性免疫细胞，其中所述化学吸引性细胞因子选自IP-10和MIP-1β。

[0307] 项目37.根据项目24至36中任一项所述的靶特异性免疫细胞，其中所述蛋白质选自由Gzm-B、IFN-γ、穿孔素、TNF-α、TNF-β、MIP-1α、GM-CSF、IL-2、IL-5、IL-7、IL-8、IL-9、IL-12、IP-10和MIP-1β组成的组。

[0308] 项目38.根据项目24至37中任一项所述的靶特异性免疫细胞，其中所述蛋白质选自由Gzm-B、IFN-γ、穿孔素、TNF-α、TNF-β、GM-CSF、IL-2、IL-8、MIP-1β和IP-10组成的组。

[0309] 项目39.根据项目24至38中任一项所述的细胞群体，其中所述蛋白质选自由Gzm-B、IFN-γ、穿孔素、TNF-α、TNF-β、GM-CSF、IL-2、MIP-1β组成的组。

[0310] 项目40.根据项目24至39中任一项所述的靶特异性免疫细胞，其中所述蛋白质选自由IFN-γ、Gzm-B和IP-10组成的组。

[0311] 项目41.根据项目24至40中任一项所述的靶特异性免疫细胞，其中所述蛋白质选自由IFN-γ和Gzm-B组成的组。

[0312] 项目42.根据项目27和28至41中任一项所述的靶特异性免疫细胞，其中所述TCR能够结合具有SEQ ID NO:34中所示的氨基酸序列的NY-ESO肽或其部分，优选其HLA-A2结合形式。

[0313] 项目43.根据项目42所述的靶特异性免疫细胞，其中所述HLA-A2是HLA-A*02:01、HLA-A*02:02、HLA-A*02:04或HLA-A*02:09编码分子。

[0314] 项目44.根据项目43所述的靶特异性免疫细胞，其中所述HLA-A2是HLA-A*2:01编码分子。

[0315] 项目45.根据项目25至43中任一项所述的靶特异性免疫细胞，其中所述含有源自

PD-1的多肽的胞外结构域包含SEQ ID NO:28的序列,并且

[0316] 其中所述含有源自4-1BB的多肽的胞内结构域包含SEQ ID NO:32的序列。

[0317] 项目46.根据项目26至45中任一项所述的靶特异性免疫细胞,其中所述跨膜结构域源自PD-1,其中优选地所述含有源自PD-1的多肽的跨膜结构域包含SEQ ID NO:30的序列,优选地其中所述嵌合共刺激受体包含SEQ ID NO:26的序列。

[0318] 项目47.根据项目24至46中任一项所述的靶特异性免疫细胞,其中所述靶特异性免疫细胞是淋巴细胞。

[0319] 项目48.根据项目24至47中任一项所述的靶特异性免疫细胞,其用于治疗癌症。

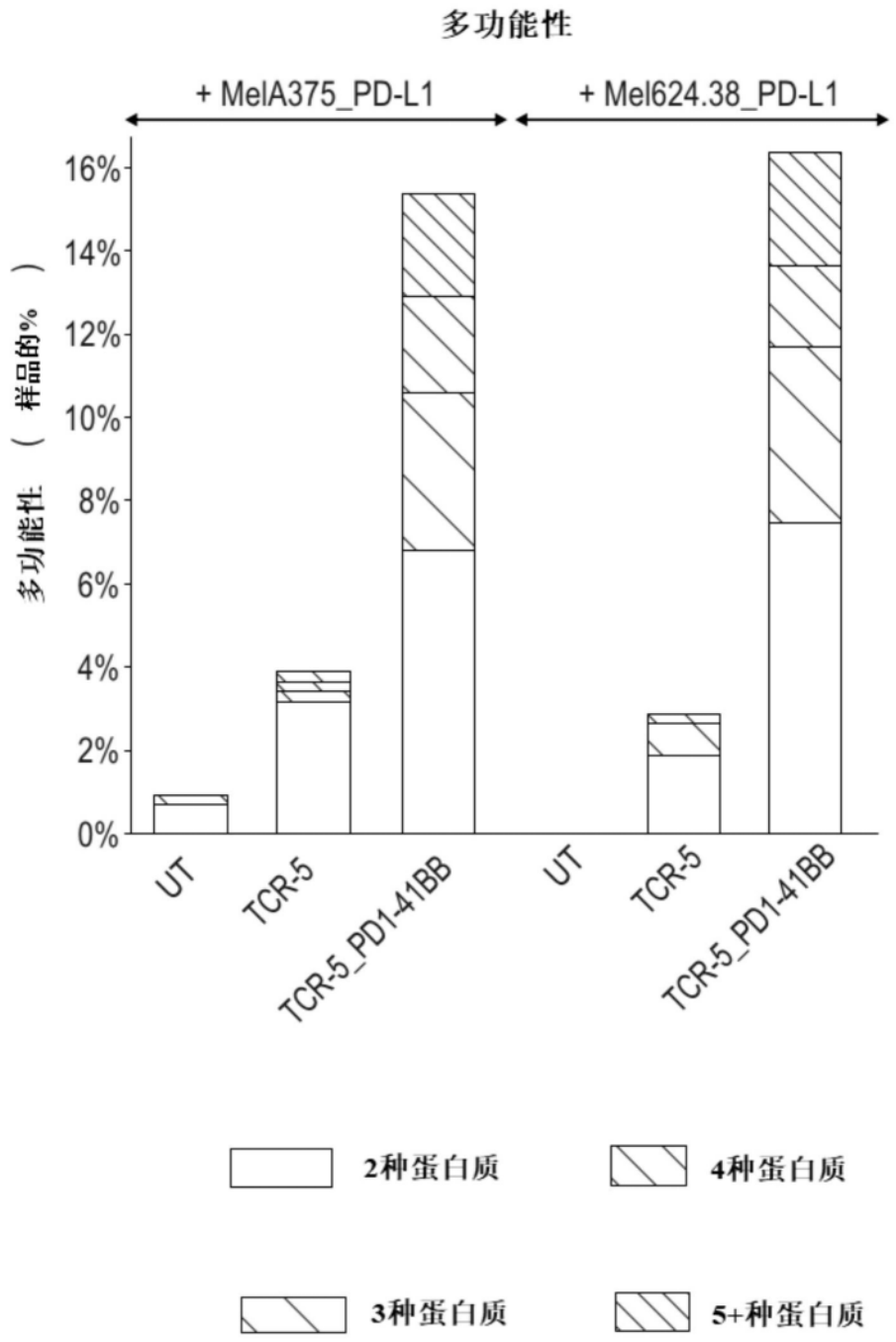

多功能性
+ MelA375_PD-L1
+ Mel624.38_PD-L1
多功能性（样品的%）
16%
14%
12%
10%
8%
6%
4%
2%
0%
UT
TCR-5
TCR-5_PD1-41BB
UT
TCR-5
TCR-5_PD1-41BB
2种蛋白质
4种蛋白质
3种蛋白质
5+种蛋白质

图1A

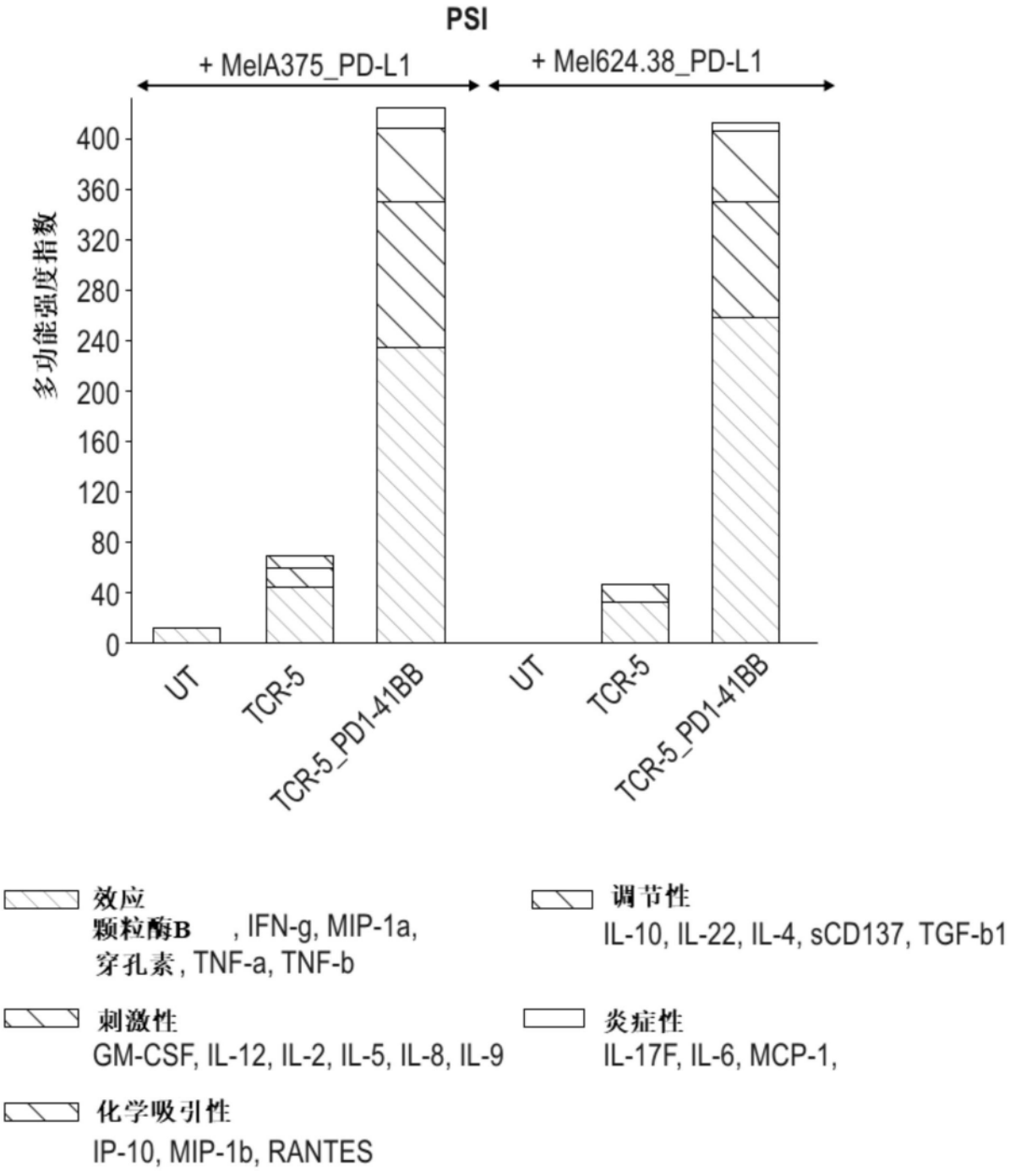

PSI
+ MelA375_PD-L1
+ Mel624.38_PD-L1
多功能强度指数
400
360
320
280
240
200
160
120
80
40
0
UT
TCR-5
TCR-5_PD1-41BB
UT
TCR-5
TCR-5_PD1-41BB
效应
颗粒酶B , IFN-g, MIP-1a,
穿孔素, TNF-a, TNF-b
调节性
IL-10, IL-22, IL-4, sCD137, TGF-b1
刺激性
GM-CSF, IL-12, IL-2, IL-5, IL-8, IL-9
炎症性
IL-17F, IL-6, MCP-1,
化学吸引性
IP-10, MIP-1b, RANTES

图1B

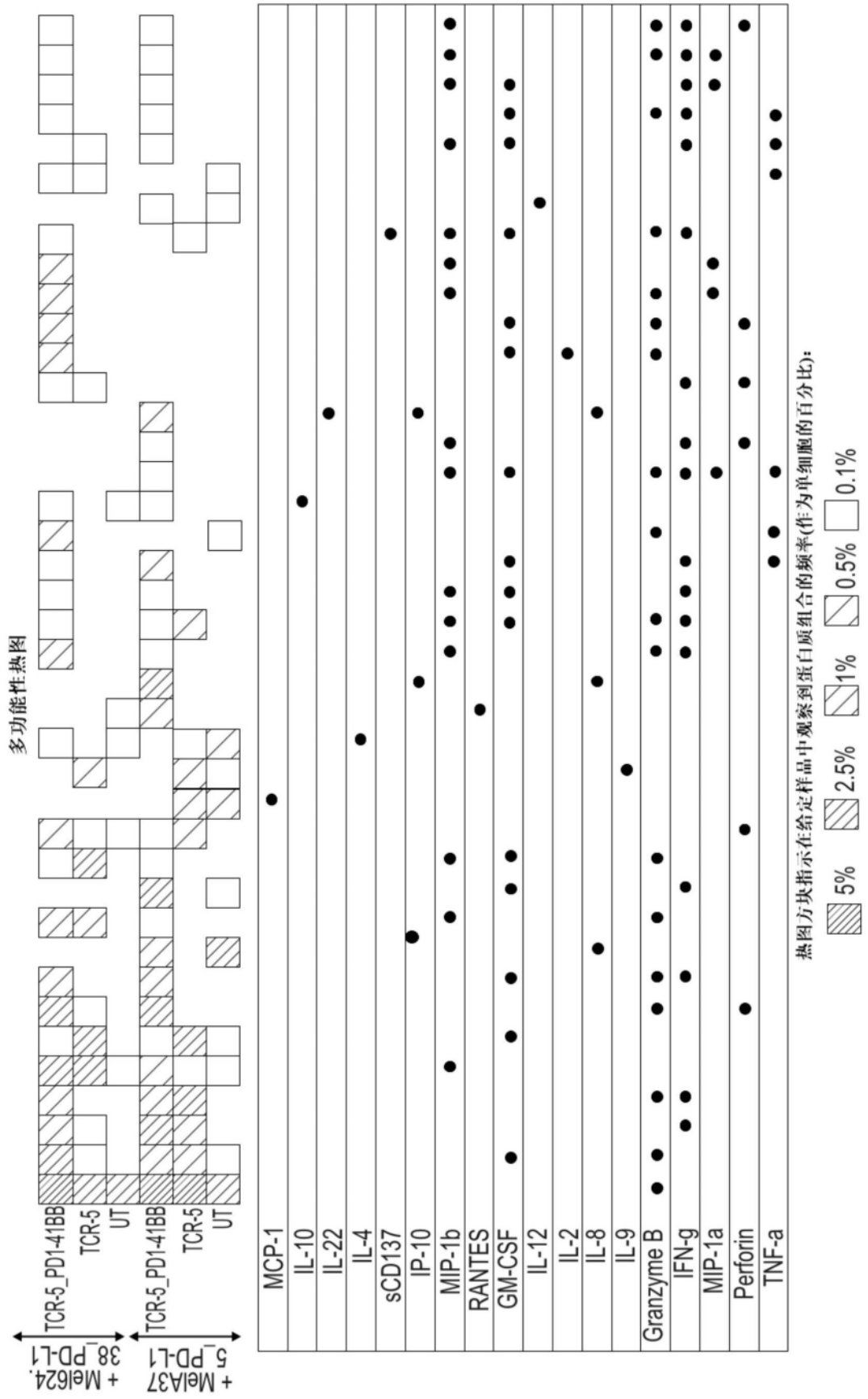

多功能性热图
+ MelA37 5_PD-L1
+ Mel624. 38_PD-L1
TCR-5_PD1-41BB
TCR-5
UT
TCR-5_PD1-41BB
TCR-5
UT
MCP-1
IL-10
IL-22
IL-4
sCD137
IP-10
MIP-1b
RANTES
GM-CSF
IL-12
IL-2
IL-8
IL-9
Granzyme B
IFN-g
MIP-1a
Perforin
TNF-a
热图方块指示在给定样品中观察到蛋白质组合的频率(作为单细胞的百分比):
5%
2.5%
1%
0.5%
0.1%

图1C

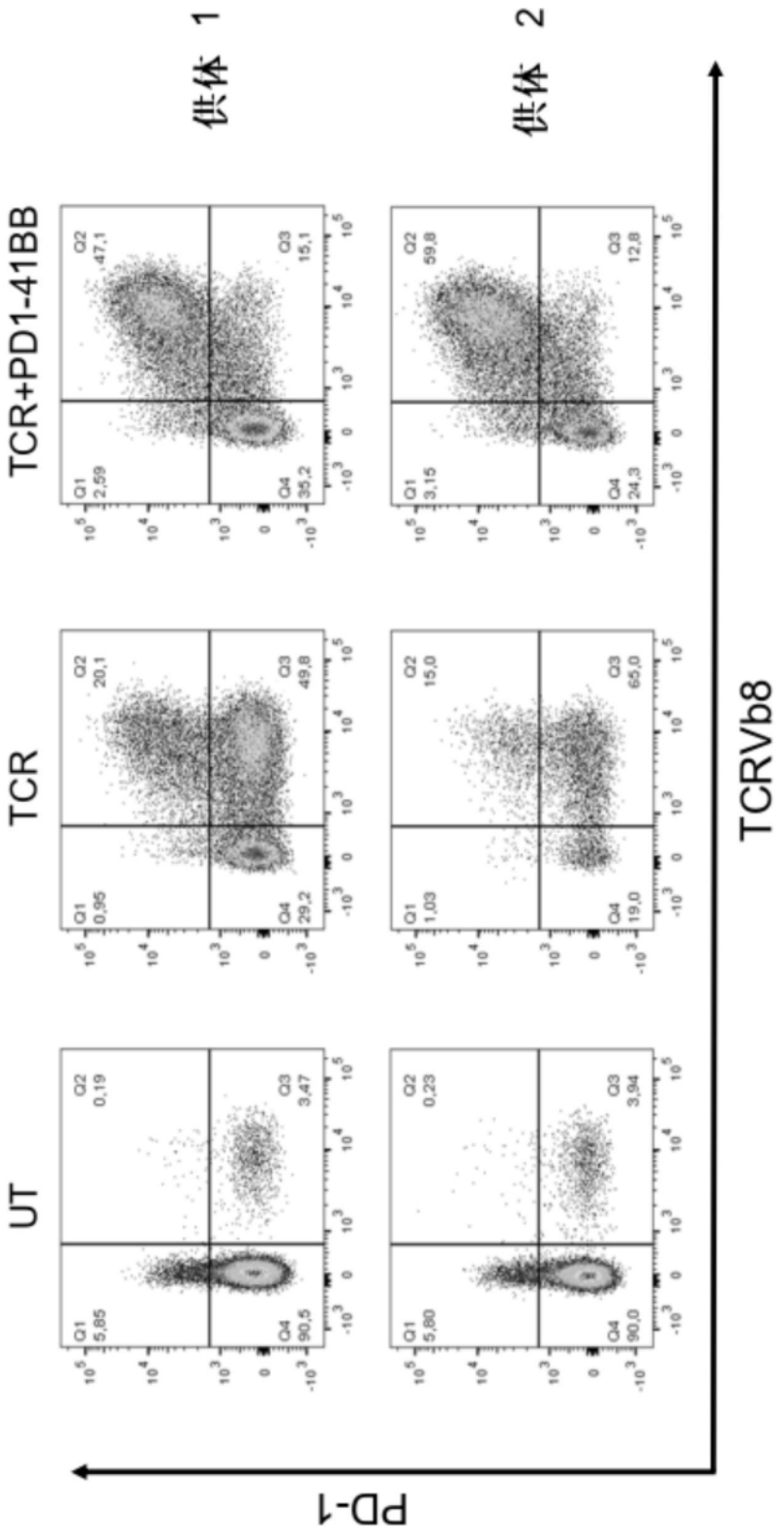

供体 1
供体 2
UT
TCR
TCR+PD1-41BB
PD-1
TCRVb8
Q1 5,85
Q2 0,19
Q3 3,47
Q4 90,5
Q1 0,95
Q2 20,1
Q3 49,8
Q4 29,2
Q1 2,59
Q2 47,1
Q3 15,1
Q4 35,2
Q1 5,80
Q2 0,23
Q3 3,94
Q4 90,0
Q1 1,03
Q2 15,0
Q3 65,0
Q4 19,0
Q1 3,15
Q2 59,8
Q3 12,8
Q4 24,3

图2A

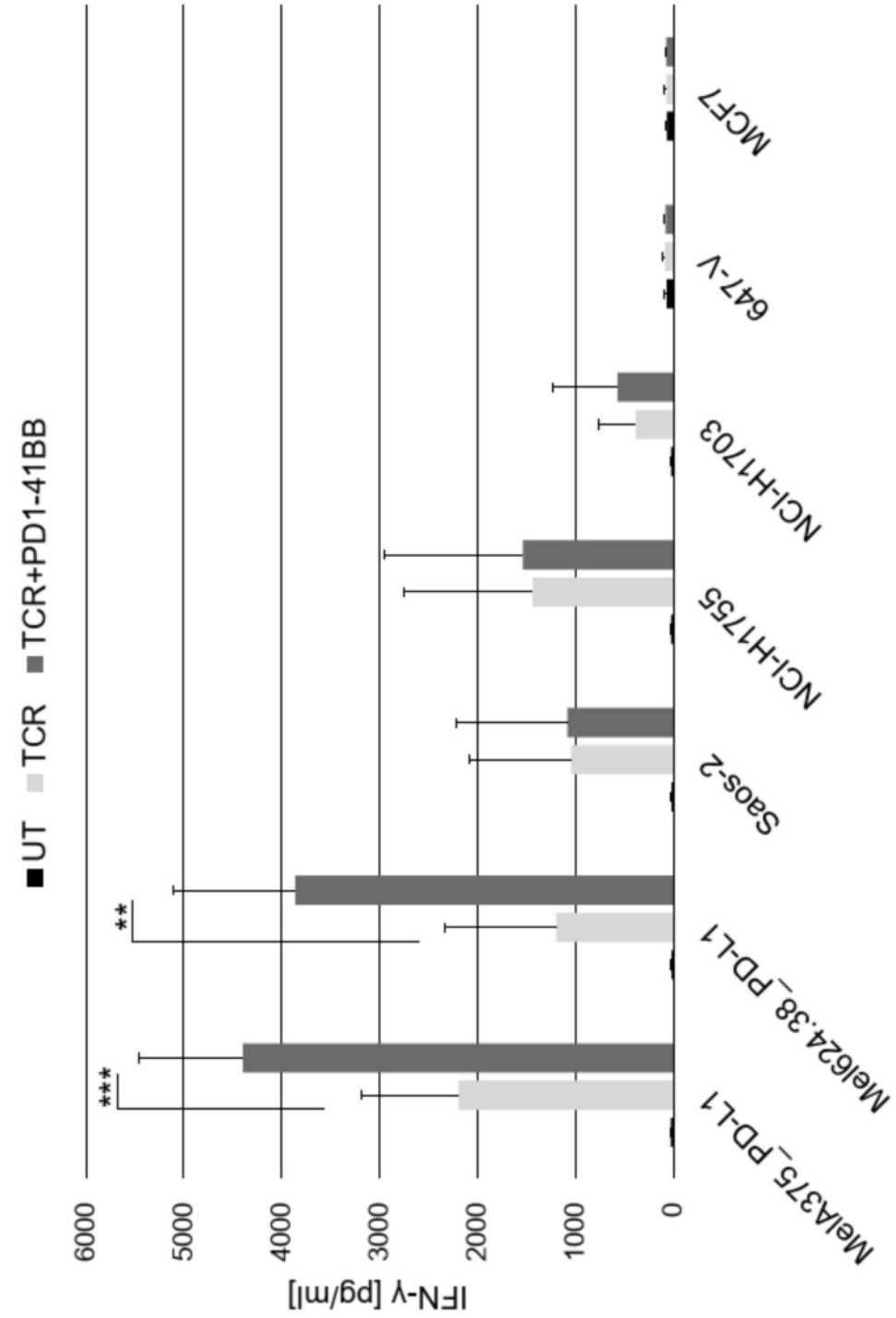
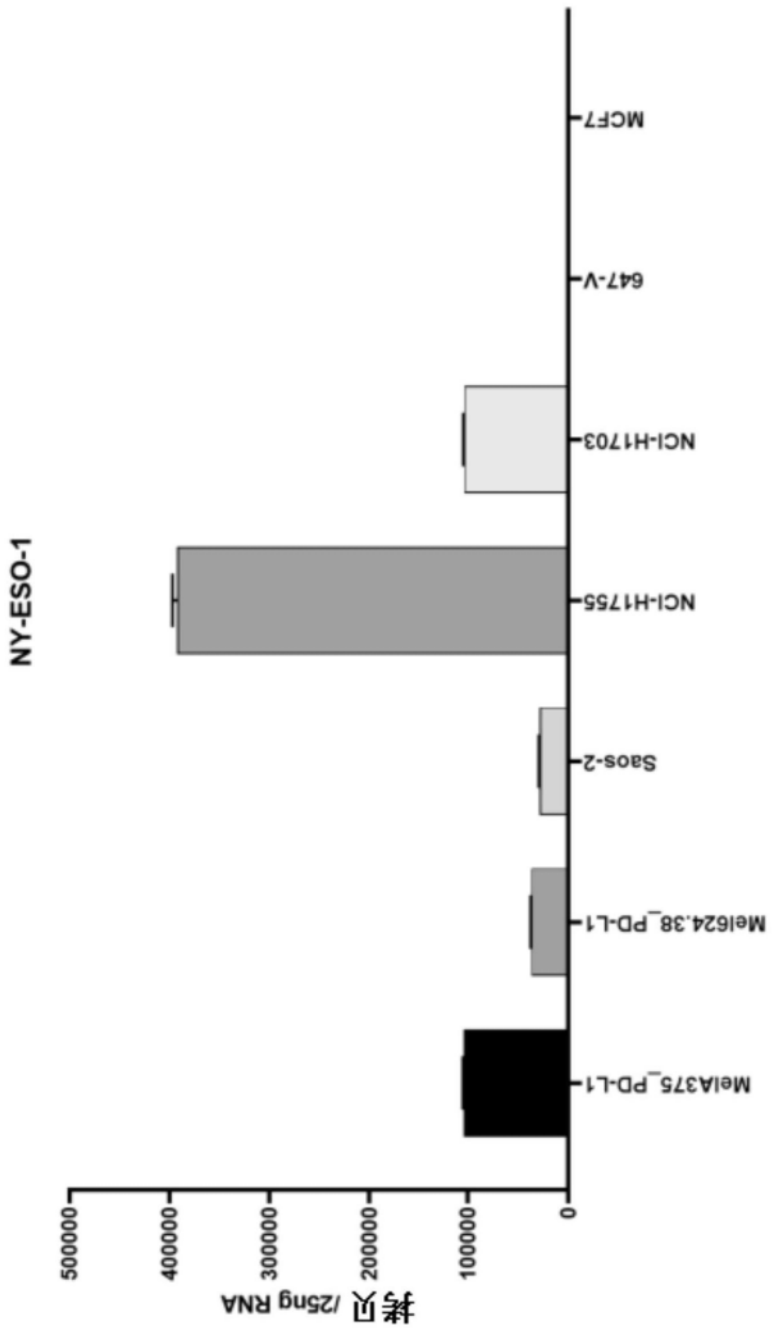
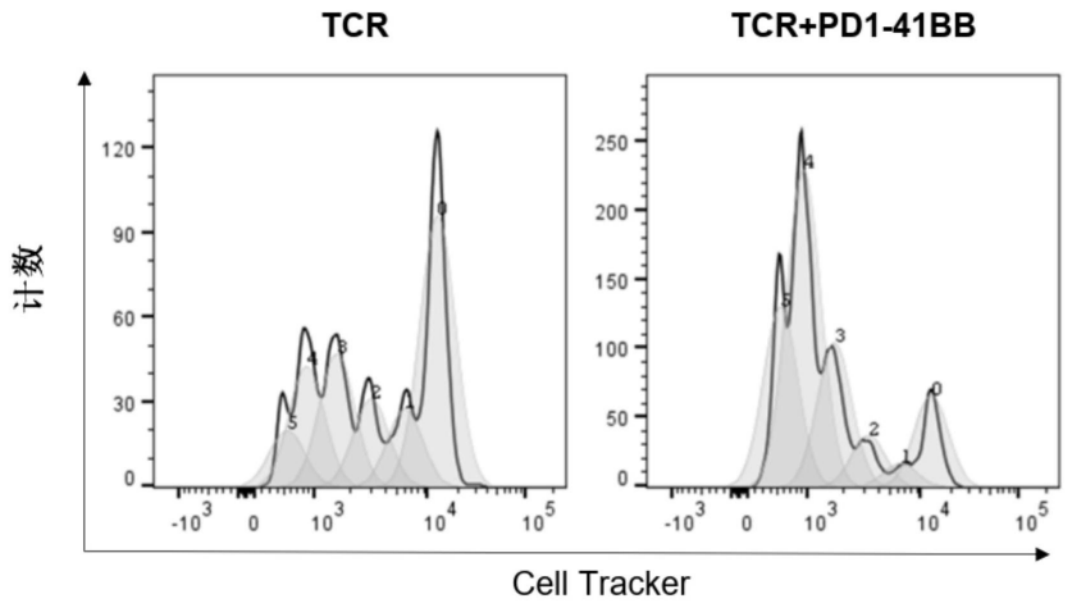

UT
TCR
TCR+PD1-41BB
IFN-γ [pg/ml]
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
MeIA375_PD-L1
MeIl624.38_PD-L1
Saos-2
NCI-H1755
NCI-H1703
647-V
MCF7
**
***

图2B



表达	MelA375_PD-L1	Mel624.38_PD-L1	Saos-2	NCI-H1755	NCI-H1703	647-V	MCF7
NY-ESO-1	+++	++	++	+++	+++	-	-
PD-L1	+++	+++	+	-	-	++	-

图2C



	TCR	TCR+PD1-41BB
分裂百分比	24.3	42.7
增殖指数	1.98	2.91
扩增指数	2.09	5.05

图2D

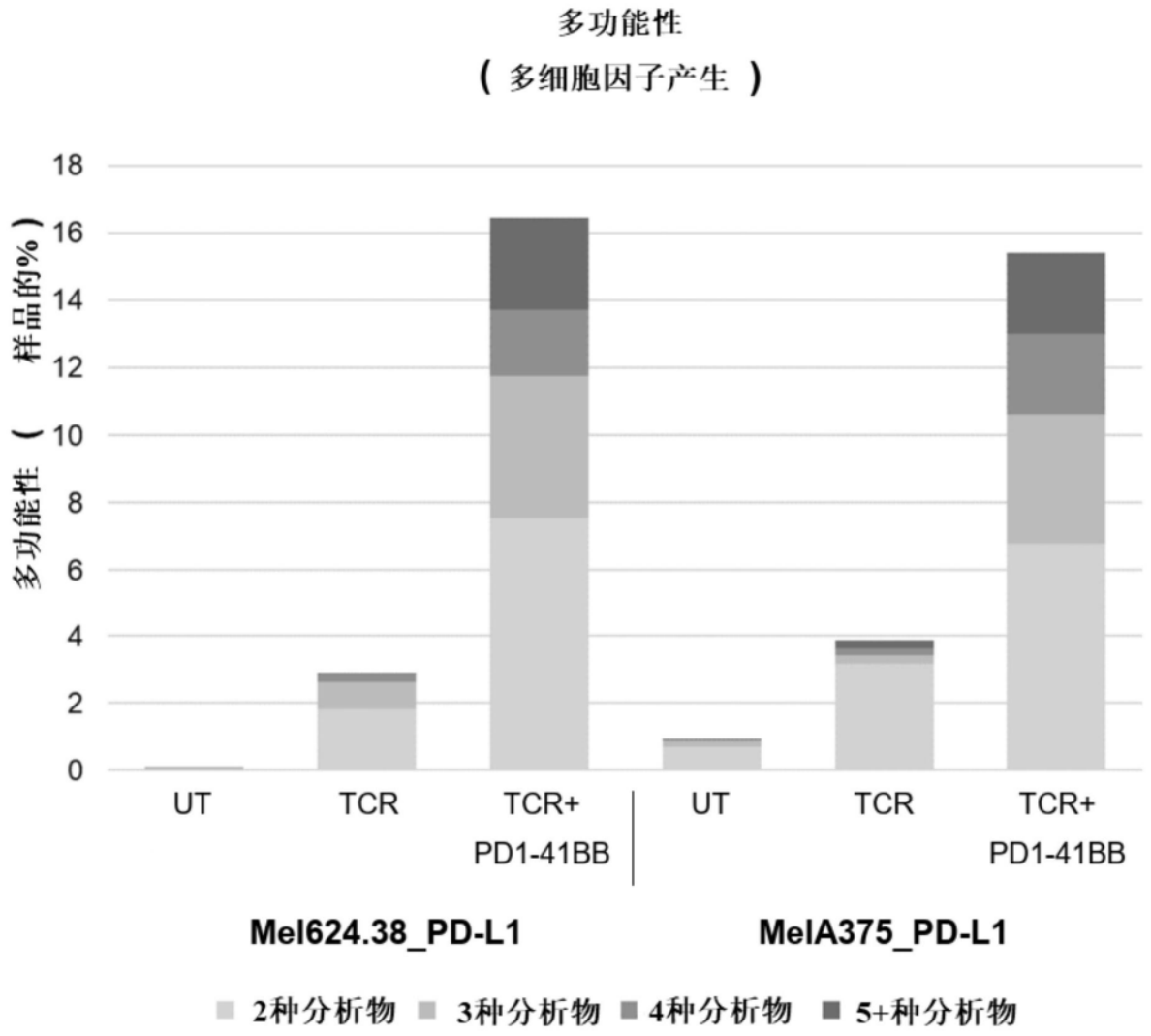

多功能性
（多细胞因子产生）
多功能性（样品的%）
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
UT
TCR
TCR+ PD1-41BB
UT
TCR
TCR+ PD1-41BB
Mel624.38_PD-L1
MelA375_PD-L1
2种分析物
3种分析物
4种分析物
5+种分析物

图3A

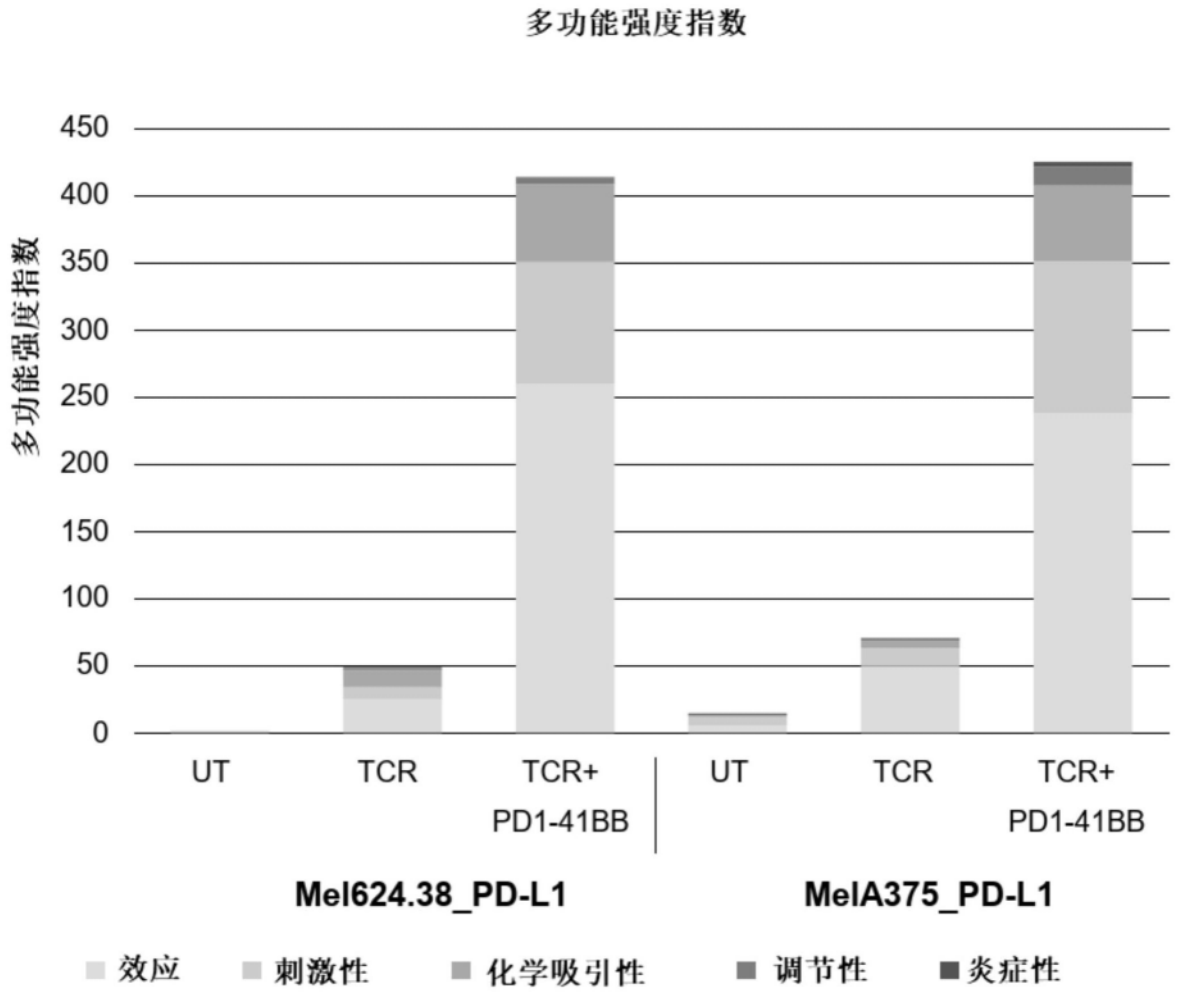

多功能强度指数
多功能强度指数
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
UT
TCR
TCR+
PD1-41BB
UT
TCR
TCR+
PD1-41BB
Mel624.38_PD-L1
MelA375_PD-L1
效应
刺激性
化学吸引性
调节性
炎症性

图3B

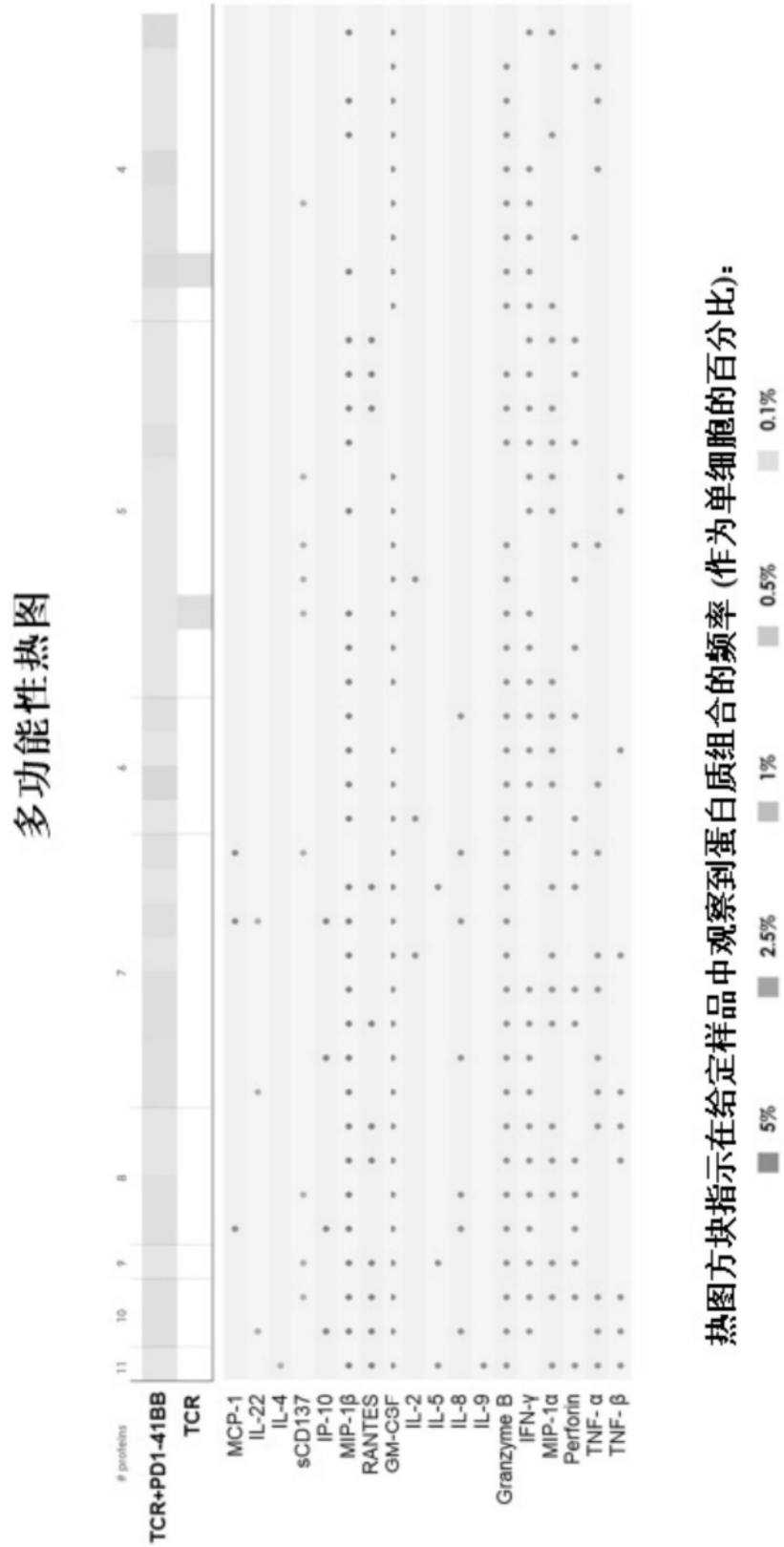

多功能性热图
proteins
TCR+PD1-41BB
TCR
MCP-1
IL-22
IL-4
sCD137
IP-10
MIP-1β
RANTES
GM-CSF
IL-2
IL-5
IL-8
IL-9
Granzyme B
IFN-γ
MIP-1α
Perforin
TNF-α
TNF-β
热图方块指示在给定样品中观察到蛋白质组合的频率 (作为单细胞的百分比):
5%
2.5%
1%
0.5%
0.1%

图3C

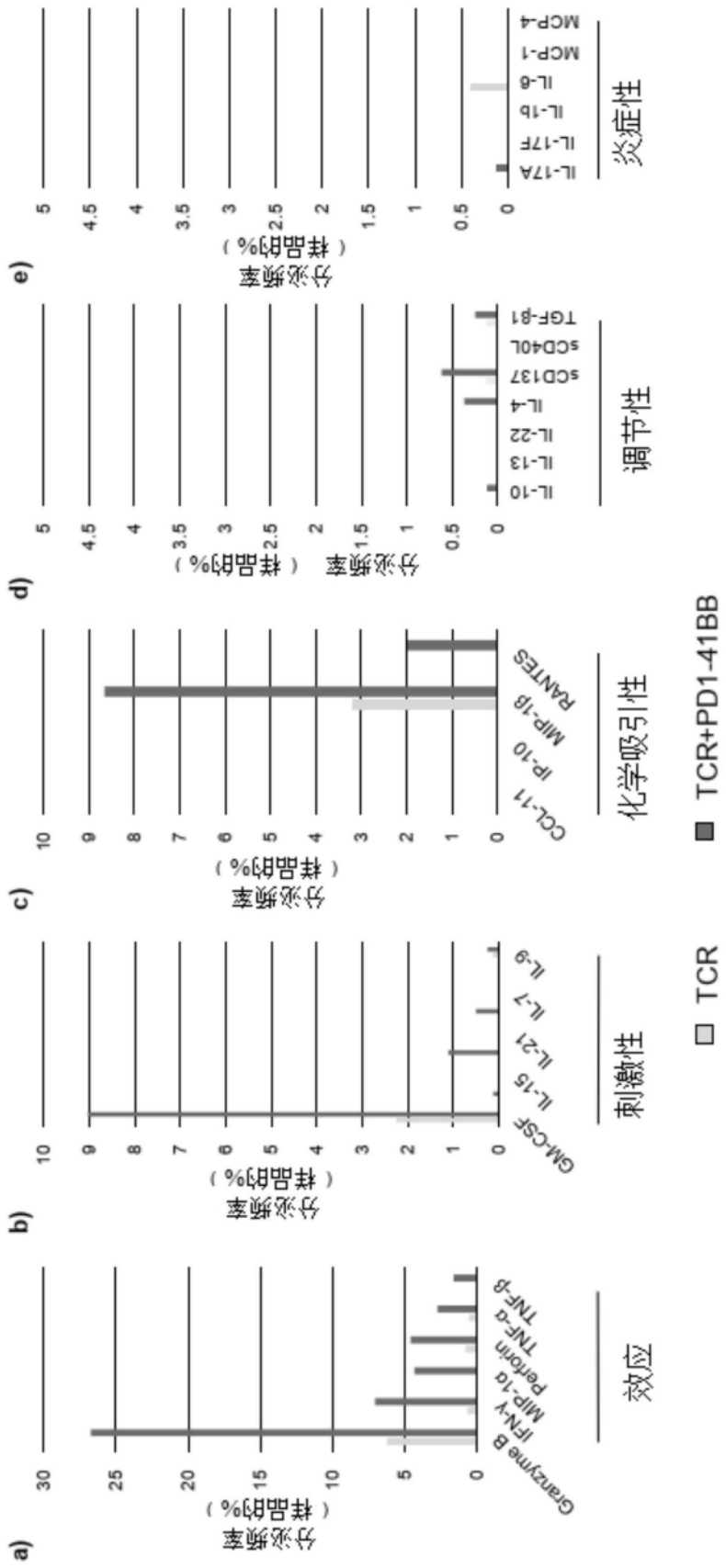

a)
分泌频率
（样品的%）
Granzyme B
IFN-γ
MIP-1α
Perforin
TNF-α
TNF-β
效应
b)
分泌频率
（样品的%）
GM-CSF
IL-15
IL-21
IL-7
IL-9
刺激性
c)
分泌频率
（样品的%）
CCL-11
IP-10
MIP-1β
RANTES
化学吸引性
d)
分泌频率 （样品的%）
IL-10
IL-13
IL-22
IL-4
sCD137
sCD40L
TGF-β1
调节性
e)
分泌频率
（样品的%）
IL-17A
IL-17F
IL-1b
IL-6
MCP-1
MCP-4
炎症性
TCR
TCR+PD1-41BB

图4

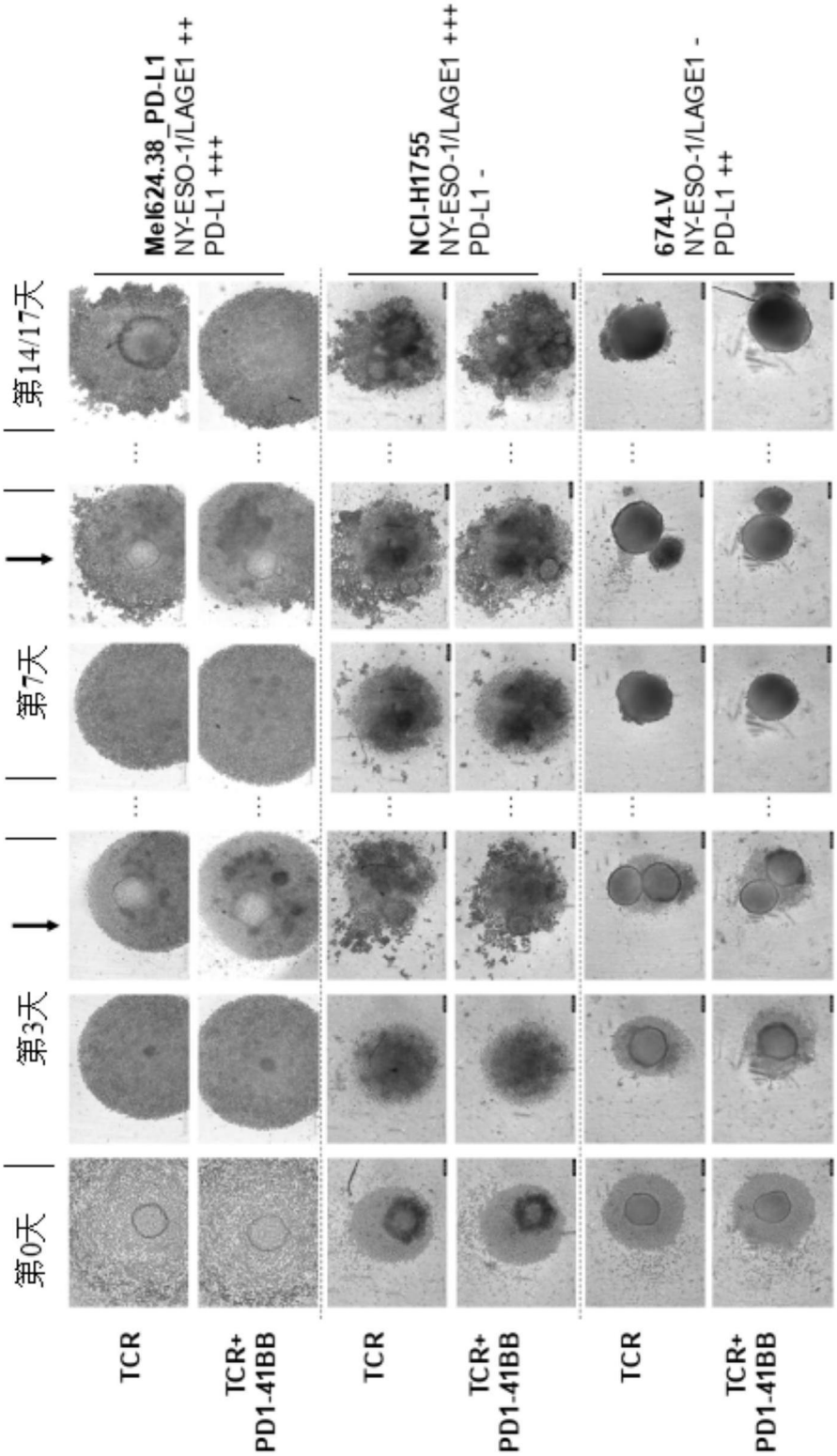

第0天
第3天
第7天
第14/17天
Mel624.38_PD-L1
NY-ESO-1/LAGE1 ++
PD-L1 +++
NCI-H1755
NY-ESO-1/LAGE1 +++
PD-L1 -
674-V
NY-ESO-1/LAGE1 -
PD-L1 ++
TCR
TCR+ PD1-41BB
TCR
TCR+ PD1-41BB
TCR
TCR+ PD1-41BB

图5