



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108137707 A

(43)申请公布日 2018.06.08

(21)申请号 201680048831.3

(22)申请日 2016.06.29

(30)优先权数据

62/186108 2015.06.29 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.02.23

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/040010 2016.06.29

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/004150 EN 2017.01.05

(71)申请人 约翰霍普金斯大学

地址 美国马里兰州

(72)发明人 I.M.博雷洛 S.李 K.A.努南

D.M.帕多尔

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 段菊兰 杨思捷

(51)Int.Cl.

C07K 19/00(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

C07K 14/705(2006.01)

C07K 14/725(2006.01)

A61K 38/17(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书12页 附图12页

(54)发明名称

免疫检查点嵌合受体疗法

(57)摘要

在一些方面,该实施方案涉及与嵌合跨膜蛋白相关的组合物和方法。该嵌合跨膜蛋白可以包含抑制性受体的胞外域和可以激活免疫反应的胞内信号传导域。

1. 嵌合跨膜蛋白, 包含:
抑制性受体的胞外域; 和
可以激活免疫反应的胞内信号传导域, 其中所述胞内信号传导域包含胞内信号蛋白的一部分。
2. 权利要求1的蛋白, 其中所述蛋白包含SEQ ID NO:10的序列。
3. 权利要求2的蛋白, 其中所述蛋白包含SEQ ID NO:11的序列。
4. 权利要求1的蛋白, 其中所述蛋白包含SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8的序列。
5. 权利要求1的蛋白, 其中所述蛋白包含SEQ ID NO:9的序列。
6. 前述权利要求任一项的蛋白, 其中所述胞内信号传导域包含激酶活性。
7. 前述权利要求任一项的蛋白, 其中所述胞内信号传导域包含磷酸化位点。
8. 前述权利要求任一项的蛋白, 其中所述蛋白包含所述抑制性受体的跨膜结构域或所述胞内信号蛋白的跨膜结构域。
9. 前述权利要求任一项的蛋白, 其中所述抑制性受体是人抑制性受体或小鼠抑制性受体。
10. 前述权利要求任一项的蛋白, 其中所述抑制性受体在结合到天然激动剂时降低免疫活性。
11. 前述权利要求任一项的蛋白, 其中所述抑制性受体在结合到天然激动剂时可以降低T细胞增殖、T细胞存活、细胞因子分泌或免疫溶细胞活性。
12. 前述权利要求任一项的蛋白, 其中所述抑制性受体是淋巴细胞抑制性受体。
13. 权利要求12的蛋白, 其中所述抑制性受体是CTLA-4、PD-1、LAG-3或Tim-3。
14. 权利要求13的蛋白, 其中所述抑制性受体是PD-1。
15. 前述权利要求任一项的蛋白, 其中所述胞内信号蛋白是人蛋白或小鼠蛋白。
16. 前述权利要求任一项的蛋白, 其中所述胞内信号蛋白提高免疫活性。
17. 前述权利要求任一项的蛋白, 其中所述胞内信号蛋白可以增强T细胞增殖、T细胞存活、细胞因子分泌或免疫溶细胞活性。
18. 前述权利要求任一项的蛋白, 其中所述胞内信号蛋白是跨膜蛋白, 或所述胞内信号蛋白可以结合天然跨膜蛋白。
19. 前述权利要求任一项的蛋白, 其中所述胞内信号蛋白是淋巴细胞蛋白。
20. 权利要求19的蛋白, 其中所述胞内信号蛋白是CD3 ζ 、4-1BB或CD28。
21. 权利要求19的蛋白, 其中所述胞内信号蛋白是4-1BB。
22. 前述权利要求任一项的蛋白, 进一步包含自杀结构域。
23. 权利要求22的蛋白, 其中所述自杀结构域具有胸苷激酶活性, 或所述自杀结构域是半胱天冬酶。
24. 权利要求23的蛋白, 其中所述自杀结构域是HSV胸苷激酶的胸苷激酶结构域, 或所述自杀结构域包含半胱天冬酶9的一部分。
25. 核酸, 其编码权利要求1-24任一项的嵌合跨膜蛋白。
26. 重组细胞, 其包含权利要求25的核酸。
27. 重组细胞, 其包含权利要求1-24任一项的嵌合跨膜蛋白。
28. 权利要求26或27的细胞, 其中所述细胞是淋巴细胞。

29. 权利要求27的细胞,其中所述细胞是T细胞。
30. 权利要求27的细胞,其中所述细胞是肿瘤浸润淋巴细胞(“TIL”)。
31. 权利要求27的细胞,其中所述细胞是骨髓浸润淋巴细胞(“MIL”)。
32. 权利要求31的细胞,其中所述MIL是低氧MIL。
33. 制造重组细胞的方法,包括用编码权利要求1-24任一项的嵌合跨膜蛋白的核酸分子转染或感染细胞。
34. 权利要求33的方法,其中所述细胞是MIL。
35. 权利要求33或34的方法,进一步包括在用编码所述嵌合跨膜蛋白的核酸分子转染或感染所述细胞之前在低氧条件下孵育所述MIL。
36. 权利要求35的方法,其中所述低氧条件包含大约0.5%至大约5%的氧气。
37. 权利要求35的方法,其中所述低氧条件包含大约1%至大约2%的氧气。
38. 权利要求35-37任一项的方法,进一步包括在低氧孵育之后在常氧条件下孵育所述细胞。
39. 权利要求33至38任一项的方法,进一步包括使所述细胞与抗CD3/抗CD28珠粒接触。
40. 在受试者中提高免疫反应的方法,包括向所述受试者施用权利要求26-32任一项的重组细胞。
41. 权利要求40的方法,进一步包括制造所述重组细胞,其中制造所述重组细胞包括用编码所述嵌合跨膜蛋白的核酸转染细胞。
42. 权利要求40的方法,进一步包括从受试者分离所述细胞。
43. 权利要求40的方法,其中所述受试者患有肿瘤。
44. 权利要求43的方法,其中所述肿瘤是白血病、淋巴瘤或多发性骨髓瘤。
45. 权利要求40的方法,其中所述受试者是人类。
46. 在受试者中治疗肿瘤的方法,包括向所述受试者施用权利要求26-32任一项的重组细胞。
47. 权利要求46的方法,进一步包括制造所述重组细胞,其中制造所述重组细胞包括用编码所述嵌合跨膜蛋白的核酸转染细胞。
48. 权利要求46的方法,进一步包括从受试者分离所述细胞。
49. 权利要求46的方法,其中所述受试者患有肿瘤。
50. 权利要求49的方法,其中所述肿瘤是多发性骨髓瘤、白血病或淋巴瘤。
51. 权利要求46的方法,其中所述受试者是人类。
52. 权利要求46的方法,进一步包括在将所述细胞施用于所述受试者之前:
使所述细胞与抗CD3/抗CD28珠粒接触;
在低氧条件下孵育所述细胞;和
在常氧条件下孵育所述细胞。
53. 权利要求52的方法,其中所述细胞在低氧条件下孵育大约0.5至大约4天。
54. 权利要求52的方法,其中所述细胞在常氧条件下孵育大约0.5至大约4天。

免疫检查点嵌合受体疗法

[0001] 相关申请的交叉参考

本申请要求2015年6月29日提交的美国临时申请号62/186,108的优先权,其经此引用全文并入本文。

[0002] 发明背景

绝大多数恶性肿瘤患者将死于其疾病。治疗这些患者的一种方法是通过嵌合抗原受体(CAR)表达来基因修饰T细胞以靶向在肿瘤细胞上表达的抗原。CAR是设计为以不依赖于人白细胞抗原的方式识别细胞表面抗原的抗原受体。在采用CD19靶向方法取得的成功之外,使用表达CAR的基因修饰细胞治疗其它恶性肿瘤的尝试仅取得了有限的成功。

[0003] 近来,靶向CTLA-4(伊匹单抗(ipilimumab))和PD-1(纳武单抗(nivolumab))、派姆单抗(pembrolizumab)的检查点抑制抗体在治疗包括转移性黑素瘤、非小细胞肺癌(NSCLC)和霍奇金氏淋巴瘤的各种恶性肿瘤中显示出相当大的活性。这些数据证明了检查点阻断如何通过克服T细胞无反应性而成为有效免疫疗法的主要障碍。

[0004] 发明概述

在一些方面,该实施方案涉及嵌合跨膜蛋白,其包含抑制性受体的胞外域和可以激活免疫反应的胞内信号传导域。该胞外域可以是例如来自CTLA-4、PD-1、LAG-3或Tim-3的胞外域。该胞内信号传导域可以是例如CD3 ζ 、4-1BB或CD28的胞内信号传导域。在一些方面,该实施方案涉及编码如本文中所述的嵌合跨膜蛋白的核酸。

[0005] 在一些方面,该实施方案涉及细胞,其包含编码如本文中所述的嵌合跨膜蛋白的核酸。在一些方面,该实施方案涉及细胞,其包含如本文中所述的嵌合跨膜蛋白。

[0006] 在一些方面,该实施方案涉及制造重组细胞的方法,其包括用编码如本文中所述的嵌合跨膜蛋白的核酸转染细胞。

[0007] 在一些方面,该实施方案涉及在受试者中提高免疫反应的方法,其包括向受试者施用如本文中所述的重组细胞。在一些方面,该实施方案涉及在受试者中治疗肿瘤的方法,其包括向受试者施用如本文中所述的重组细胞。

[0008] 附图概述

图1显示了编码嵌合跨膜蛋白的核苷酸序列(SEQ ID NO:1),所述嵌合跨膜蛋白包含来自CD8的前导肽(“CD8a LP”)、小鼠PD-1的胞外域(“PD-1ECD”)和小鼠4-1BB的跨膜与胞内域(分别为“4-1BB TM”和“4-1BB ICD”)。还显示了该核苷酸序列的反向互补(SEQ ID NO:2)。优化密码子以用于在小鼠淋巴细胞中表达。

[0009] 图2显示了编码嵌合跨膜蛋白的核苷酸序列(SEQ ID NO:3),所述嵌合跨膜蛋白包含来自CD8的前导肽(“CD8a LP”)、人PD-1的胞外域(“PD-1ECD”)和人4-1BB的跨膜与胞内域(分别为“4-1BB TM”和“4-1BB ICD”)。还显示了该核苷酸序列的反向互补(SEQ ID NO:4)。优化密码子以用于在人淋巴细胞中表达。

[0010] 图3显示了Lenti-X 293T细胞的流式细胞仪结果,使用下面的实施例2中描述的转染方案,用mCherry基因和编码包含PD-1的胞外域的嵌合跨膜蛋白的核酸(SEQ ID NO:1)转染所述细胞。图3表明,该核酸在293T细胞中表达。

[0011] 图4显示了Lenti-X 293T细胞的流式细胞仪结果,使用下面的实施例1中描述的转导方案,用mCherry基因和编码包含PD-1的胞外域和4-1BB的胞内结构域的嵌合跨膜蛋白的核酸(SEQ ID NO:1)转导所述细胞。细胞在6孔板的1个孔(含有1.9毫升病毒)中转导。图4表明,该核酸在293T细胞中表达。

[0012] 图5显示了Lenti-X 293T细胞的流式细胞仪结果,使用下面的实施例1中描述的转导方案,用mCherry基因和编码包含PD-1的胞外域和4-1BB的胞内结构域的嵌合跨膜蛋白的核酸(SEQ ID NO:1)转导所述细胞。细胞在6孔板的1个孔(0.38毫升病毒)中转导。图5表明,该核酸在293T细胞中表达。

[0013] 图6,A栏和B栏显示了包含具有PD-1胞外域、4-1BB跨膜结构域和4-1BB胞内结构域的嵌合受体的MIL不会负面地影响肿瘤特异性。

[0014] 发明详述

CAR疗法迄今已显示出显著的希望。靶向慢性淋巴细胞性白血病(CLL)和近来靶向急性淋巴细胞性白血病(ALL)的CD19CAR已经取得了显著的成功。有趣的是,靶向其它抗原的CAR还未提供类似的临床反应。此类抗原靶向方法的一个局限在于其仅限于表达特定表面受体的疾病的治疗适用性,以及导致具有抗原损失变体的复发的靶向单一肿瘤抗原的限制。

[0015] 肿瘤免疫学中的一个主要障碍是诱导肿瘤特异性耐受,其限制了许多基于细胞的方法的固有抗肿瘤功效。最近的研究通过靶向导致批准用于转移性黑素瘤的抗-CTLA-4和抗-PD-1的检查点抑制剂显示了明显的临床功效。在一些方面,该实施方案涉及嵌合受体,包含表达检查点抑制剂的胞外域和激活的胞内结构域。其具有将致耐受机制劫持到激活信号中的优点。这种方法可用于其中T细胞无反应性是疾病发病机理的主要方面且其中由内源性T细胞受体库提供抗原特异性的所有临床情况。

[0016] 在一些方面,该实施方案涉及嵌合跨膜蛋白,包含抑制性受体的胞外域、跨膜结构域和胞内信号传导域。在一些实施方案中,该胞内信号传导域可以激活免疫反应。该胞内信号传导域可以包含胞内信号蛋白的一部分。在一些实施方案中,该胞内结构域可以用于维持细胞(如T细胞的)的活化。

[0017] 在一些实施方案中,该胞外域可以将信号转导到胞内信号传导域中。例如,该胞外域可以在结合天然抑制性受体的激动剂时将信号转导至胞内信号传导域。

[0018] 信号转导可以包含蛋白的低聚。低聚可以包括同源低聚或异源低聚。低聚可以包括蛋白的二聚,即与第二嵌合跨膜蛋白的同源二聚或与不同蛋白的异源二聚。

[0019] 信号转导可以包含磷酸化。例如,该胞内信号传导域可以包含激酶活性和/或磷酸化位点。信号转导可以包含自磷酸化,例如该胞内信号传导域的自磷酸化。

[0020] 在一些实施方案中,该蛋白包含跨膜结构域。在一些实施方案中,该蛋白是整合膜蛋白。例如,该蛋白可以是1型膜蛋白、2型膜蛋白或多重跨膜蛋白。在一些实施方案中,该蛋白包含该抑制性受体的跨膜结构域。在一些实施方案中,该蛋白包含该胞内信号蛋白的跨膜结构域。该嵌合跨膜蛋白可以包含信号肽,例如使胞外域跨越细胞膜移位。在一些实施方案中,该跨膜结构域包含IISFFLALTSTALLFLLFLLTLRFSVV的序列(SEQ ID NO:5)。在一些实施方案中,该嵌合跨膜蛋白包含源自CD8的信号肽。在一些实施方案中,该信号肽包含CD8前导肽。在一些实施方案中,该信号肽包含MALPVTALLLPLALLLHAARP(SEQ ID NO:6)。

[0021] 在一些实施方案中,该胞外域是抑制性受体的胞外域。在一些实施方案中,该胞外

域包含配体结合域,例如该抑制性受体的激动剂结合域。在一些实施方案中,该胞外域包含足够的结构以在响应配体结合时跨膜转导信号。不受任何特定理论的束缚,对于通过多价配体介导的低聚来转导信号的抑制性受体而言,仅配体结合域的存在可能是足以在响应配体结合时跨膜转导信号的结构。不受任何特定理论的束缚,对于通过改变相对于细胞膜的跨膜结构域取向转导信号的抑制性受体而言,该胞外域可能需要在配体结合域与跨膜结构域之间的天然结构以在响应配体结合时跨膜转导信号。例如,胞外域可以包含由其配体结合域至其跨膜结构域的抑制性受体的天然序列。

[0022] 该天然抑制性受体可以是人抑制性受体或小鼠抑制性受体。因此,该胞外域可以包含人或小鼠氨基酸序列。在一些实施方案中,选择该天然抑制性受体的来源以匹配受治疗的受试者的物种,例如以避免针对该嵌合跨膜蛋白的免疫反应。尽管如此,例如为了方便起见,该天然抑制性受体可以选自不同的物种。因此,相对于该蛋白在其中表达的细胞的物种或向其施用该蛋白的受试者的物种,该嵌合蛋白可以是或不是异种衍生的。

[0023] 在一些实施方案中,该天然抑制性受体选自在结合天然激动剂时降低免疫活性的蛋白。例如,该天然抑制性受体可以在结合天然激动剂时降低T细胞增殖、T细胞存活、细胞因子分泌或免疫溶细胞活性。该天然抑制性受体可以是淋巴细胞抑制性受体(即可以在淋巴细胞如T细胞上表达的抑制性受体)。例如,该天然抑制性受体可以在T细胞上表达,并且激动剂与天然抑制性受体的结合可能引起不利于T细胞增殖、T细胞存活、细胞因子分泌或免疫溶细胞活性的细胞信号传导。

[0024] 在一些实施方案中,该天然抑制性受体可以是CTLA-4(细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4;CD152)、PD-1(程序性细胞死亡蛋白1;CD279)、LAG-3(淋巴细胞激活基因3;CD223)或Tim-3(T细胞免疫球蛋白粘蛋白-3)。因此,在一些实施方案中,该胞外域可以是来自CTLA-4、PD-1、LAG-3或Tim-3的胞外域。该抑制性受体可以是PD-1。在一些实施方案中,该跨膜蛋白包含PD-1的胞外域。在一些实施方案中,该胞外域的序列包含

PGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESVFLNWYRMSPSNQT

DKLAAFPEDRSQPGQDCRFRTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGYLCAISLAPK。

AQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLV。(SEQ ID NO:7)

[0025] 在一些实施方案中,该胞内信号传导域是胞内信号蛋白的信号传导域。在一些实施方案中,该胞内信号传导域可以包含激酶活性或磷酸化位点。在一些实施方案中,该胞内信号传导域可以激活信号分子,如激酶或磷酸化酶,例如在跨越细胞膜的信号转导之后。该胞内信号传导域可以通过下游激酶或磷酸化酶发出信号。

[0026] 该胞内信号蛋白可以是人蛋白或小鼠蛋白。因此,该胞内信号传导域可以包含人或小鼠氨基酸序列。在一些实施方案中,选择该胞内信号蛋白以匹配受试者和用于治疗的人的物种,例如使得该信号传导域可以利用该细胞的胞质系统以激活下游的信号分子。尽管如此,如上所述,例如为了方便起见,该胞内信号蛋白可以选自不同的物种。

[0027] 在一些实施方案中,该胞内信号蛋白提高免疫活性。因此,经由嵌合跨膜蛋白的信号转导可以导致提高免疫活性的信号级联,其中该胞内信号传导域介导胞内信号级联反应。在一些实施方案中,该胞内信号蛋白可以增强T细胞增殖、T细胞存活、细胞因子分泌或免疫溶细胞活性。在一些实施方案中,该胞内信号蛋白是跨膜蛋白,或者该胞内信号蛋白可以结合天然跨膜蛋白。该胞内信号蛋白可以是淋巴细胞蛋白(即该胞内信号蛋白可以在淋

巴细胞,如T细胞上表达)。

[0028] 在一些实施方案中,该胞内信号蛋白是CD3 ζ (T细胞表面糖蛋白CD3 ζ 链;CD247)、4-1BB (肿瘤坏死因子受体超家族成员9;CD137) 或CD28 (T细胞特异性表面糖蛋白CD28;Tp44)。因此,该胞内信号蛋白可以包含来自CD3 ζ 、4-1BB或CD28的信号传导域。该胞内信号蛋白可以是4-1BB。因此,该胞内信号蛋白可以包含来自4-1BB的信号传导域。在一些实施方案中,该胞内结构域包含

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL (SEQ ID NO:8)。

[0029] 在一些实施方案中,该嵌合跨膜蛋白包含自杀结构域,即以杀死包含该蛋白的重组细胞。该自杀结构域可以包含胸苷激酶活性或半胱天冬酶活性。例如,该自杀结构域可以是胸苷激酶或半胱天冬酶。在一些实施方案中,该自杀结构域是HSV胸苷激酶(“HSV-TK”)的胸苷激酶结构域,或者该自杀结构域包含半胱天冬酶9的一部分。

[0030] 在一些方面,该实施方案涉及编码如本文中所述的嵌合跨膜蛋白的核酸分子。该核酸分子可以包含启动子,其中该启动子可操作地连接到编码该嵌合跨膜蛋白的核苷酸序列上,例如用于在重组细胞中表达嵌合跨膜蛋白。在一些实施方案中,该启动子是组成型启动子。在一些实施方案中,该启动子是细胞特异性启动子。在一些实施方案中,该启动子是组织特异性启动子。

[0031] 该核酸分子可以包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4中所示的序列。该核酸分子在SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4中所示的序列中可以包含至少大约100、200、300、400、500、600或700个连续的核苷酸。该核酸分子可以包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4中所示的核苷酸序列具有至少大约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同源性的核苷酸序列。该核酸分子可以包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4中所示的核苷酸序列中至少大约100、200、300、400、500、600或700个连续的核苷酸具有至少大约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同源性的核苷酸序列。例如,该核酸分子可以包含与SEQ ID NO:3中所示的核苷酸序列中至少100个连续的核苷酸具有至少95%的序列同源性的核苷酸序列。

[0032] 在一些实施方案中,该核酸分子编码如本文中和/或附图中所述的氨基酸序列。在一些实施方案中,该核酸分子编码包含SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11中所示一种或多种氨基酸序列的氨基酸序列。在一些实施方案中,该核酸分子可以包含与本文中和/或附图中所述的核苷酸序列具有至少大约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同源性的编码氨基酸序列的核苷酸序列。同源性在蛋白质的情况下可以是同一性或类似性。序列同源性在核酸分子的情况下指的是序列同一性。同源性可以通过利用常规工具如Expasy、BLASTp、Clustal等等采用默认设置来使用。

[0033] 在一些实施方案中,该嵌合跨膜蛋白包含下表中所示的一个或多个氨基酸序列:

序列	SEQ ID NO
IISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVV	5
MALPVTALLPLALLHAARP	6
PGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVTEGDNATFTC SFSNTSESVFLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQ PGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGT LCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHP SPSPRPAGQFQTLV	7
KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE EEEEGGCEL	8
IISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLY IFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL	9
PGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVTEGDNATFTC SFSNTSESVFLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQ PGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGT LCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHP SPSPRPAGQFQTLVIISFFLALTSTALLFLLFFLTLR FSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC RFPEEEEEGGCEL	10
MALPVTALLPLALLHAARPPGWFLDSPDRPW NPPTFSPALLVTEGDNATFTCSFSNTSESVFLNW YRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLP NGRDFHMSVVRARRNDSGTLYCGAISLAPKAQI KESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTL VIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL	11

在一些实施方案中,该嵌合跨膜蛋白包含与本文中所示氨基酸序列之一具有至少大约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同源性的氨基酸序列。

[0034] 在各种实施方案中可以包括本文所述的氨基酸序列的变体。术语“变体”是指其与蛋白或多肽的氨基酸序列相比存在一个或多个(例如1个、2个、3个、4个等等)氨基酸置换、缺失和/或插入的蛋白或多肽,并且该术语包括蛋白或多肽的天然存在的等位基因变体和可变剪接变体。术语“变体”包括用类似或同源的氨基酸或不同的氨基酸取代氨基酸序列中的一个或多个氨基酸。一些变体包括在氨基酸序列中一个或多个氨基酸位置处的丙氨酸置换。其它置换包括对蛋白的整体净电荷、极性或疏水性几乎没有影响或没有影响的保守性置换。保守性置换可能对嵌合跨膜蛋白的功能具有微小的影响。在一些实施方案中,如实施例3中所述,该功能可以是在淋巴细胞,例如骨髓浸润性淋巴细胞(MIL)中表达时蛋白的特异性。本领域技术人员通过使用与实施例3相同或类似的方案与本文中提供的序列进行比较来确定置换是否影响嵌合跨膜蛋白的功能。非限制性的示例性保守性置换显示在下表中。根据一些实施方案,嵌合跨膜蛋白与本文中描述的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性。

[0035] 保守性氨基酸置换

碱性：	精氨酸 赖氨酸 组氨酸
酸性：	谷氨酸 天冬氨酸
非荷电极性：	谷氨酰胺 天冬酰胺 丝氨酸 苏氨酸 酪氨酸
非极性：	苯丙氨酸 色氨酸 半胱氨酸 甘氨酸 丙氨酸 缬氨酸 脯氨酸 蛋氨酸 亮氨酸 异亮氨酸

下表列出了保守性氨基酸置换的另一种方案。

原始残基	保守性置换
Ala	Gly;Ser;Thr
Arg	Lys;Gln
Asn	Gln;His;Ser
Asp	Glu;Asn
Cys	Ser
Gln	Asn;Ser;Asp;Glu

Glu	Asp;Gln;Lys
Gly	Ala;Pro;Asn
His	Asn;Gln;Tyr
Ile	Leu;Val;Met;Val;Phe
Leu	Ile;Val;Met;Phe
Lys	Arg;Gln
Met	Leu;Tyr;Ile;Val;Phe
Pro	Ser;Thr;Ala;Gly
Phe	Met;Leu;Tyr;Trp
Ser	Thr;Gly;Asn;Asp
Thr	Ser;Asn
Trp	Tyr;Phe
Tyr	Trp;Phe
Val	Ile;Leu;Met;Phe

[0036] 因此,在一些实施方案中,本文中公开的氨基酸序列的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸残基用保守性置换进行修饰。在一些实施方案中,仅用保守性置换置换1、2、3、4或5个氨基酸残基。

[0037] 在一些实施方案中,该嵌合跨膜蛋白包含SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11或其变体的序列。SEQ ID NO:10是SEQ ID NO:5、7和8的组合。SEQ ID NO:11是SEQ ID NO:5、6、7和8的组合。在一些实施方案中,用另一信号肽或前导序列置换SEQ ID NO:6的序列,其可以帮助将该嵌合跨膜蛋白转运至胞外膜。在一些实施方案中,该跨膜结构域(例如SEQ ID NO:5)被不同的跨膜蛋白替代。在一些实施方案中,该跨膜结构域是PD-1的跨膜结构域。在一些实施方案中,该跨膜结构域是4-1BB的跨膜结构域。

[0038] 在一些方面,该实施方案涉及包含本文中公开的核酸的重组细胞。在一些实施方案中,该实施方案涉及包含如本文中所述的嵌合跨膜蛋白的重组细胞。在一些实施方案中,该细胞包含嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含SEQ ID NO:5、6、7、8、9、10或11或其变体的蛋白。在一些实施方案中,该细胞是淋巴细胞。该细胞可以是T细胞。在一些实施方案中,该细胞可以是肿瘤浸润的淋巴细胞(“TIL”)或骨髓浸润的淋巴细胞(“MIL”)。

[0039] 在一些实施方案中,与不具有嵌合跨膜蛋白的细胞相比,当将包含本文中描述的嵌合跨膜蛋白的细胞施用于受试者时,其在受试者中持续更长时间和/或保持活性状态更长时间。

[0040] 在一些方面,该实施方案涉及制造重组细胞的方法,包括用本文中所述的核酸分子转染细胞。在一些方面,该实施方案涉及制造重组细胞的方法,包括用编码本文中所述的氨基酸序列的核酸分子转染细胞。该核酸分子可以是质粒。该细胞可以被包含一个或多个本文中所述的核苷酸序列的质粒转染。该细胞还可以被包含该核酸分子的病毒或病毒样颗粒感染。在一些实施方案中,该细胞是TIL或MIL。在一些实施方案中,该MIL是激活的MIL。例如可以通过将它们与抗CD3/抗CD28珠粒和适当的细胞因子一起例如在低氧条件下孵育来激活MIL。在低氧条件下生长MIL的实例例如可以在WO 2016037054中找到,其经此引用全文并入本文。在一些实施方案中,在细胞已经在本文中所述的低氧环境中孵育后,将该核酸分

子转染到该细胞中。在一些实施方案中,在细胞已经在低氧环境中孵育大约1、2、3、4或5天后,将该核酸分子转染到该细胞中。在一些实施方案中,该细胞随后在常氧条件下孵育大约1、2、3、4或5天。

[0041] 在一些实施方案中,根据W02016037054 (经此引用全文并入本文) 中描述的方法制备包含该嵌合跨膜蛋白的MIL。在一些实施方案中,该方法可以包括从受试者中移出骨髓中的细胞、淋巴细胞和/或骨髓浸润淋巴细胞(“MIL”);在低氧环境中孵育该细胞,由此产生激活的MIL;并将激活的MIL施用至该受试者。如本文中所述,可以在抗CD3/抗CD28抗体和细胞因子的存在下激活该细胞。在低氧环境中孵育该MIL之前或之后,可以将编码嵌合跨膜蛋白的核酸分子,例如本文所述的那些之一,转染或感染到细胞中。

[0042] 该低氧环境可以包含少于大约21%的氧,如少于大约20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%或少于大约3%的氧。例如,该低氧环境可以包含大约0%的氧至大约20%的氧,如大约0%的氧至大约19%的氧,大约0%的氧至大约18%的氧、大约0%的氧至大约17%的氧、大约0%的氧至大约16%的氧、大约0%的氧至大约15%的氧、大约0%的氧至大约14%的氧、大约0%的氧至大约13%的氧、大约0%的氧至大约12%的氧、大约0%的氧至大约11%的氧、大约0%的氧至大约10%的氧、大约0%的氧至大约9%的氧、大约0%的氧至大约8%的氧、大约0%的氧至大约7%的氧、大约0%的氧至大约6%的氧、大约0%的氧至大约5%的氧、大约0%的氧至大约4%的氧或大约0%的氧至大约3%的氧。在一些实施方案中,该低氧环境包含大约1%至大约7%的氧。在一些实施方案中,该低氧环境为大约1%至大约2%的氧。在一些实施方案中,该低氧环境为大约0.5%至大约1.5%的氧。在一些实施方案中,该低氧环境为大约0.5%至大约2%的氧。该低氧环境可以包含大约20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或大约0%的氧。在一些实施方案中,该低氧环境包含大约7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%的氧。

[0043] 在低氧环境中孵育MIL可以包括例如在组织培养基中孵育该MIL至少大约1小时,如至少大约12小时、18小时、24小时、30小时、36小时、42小时、48小时、60小时、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或甚至至少大约14天。孵育可以包括孵育该MIL大约1小时至大约30天,如大约1天至大约20天、大约1天至大约14天或大约1天至大约12天。在一些实施方案中,在低氧环境中孵育MIL包括在低氧环境中孵育该MIL大约2天至大约5天。该方法可以包括在低氧环境中孵育MIL大约1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天。在一些实施方案中,该方法包括在低氧环境中孵育MIL大约3天。在一些实施方案中,该方法包括在低氧环境中孵育MIL大约2天至大约4天。在一些实施方案中,该方法包括在低氧环境中孵育MIL大约3天至大约4天。

[0044] 在一些实施方案中,该方法进一步包括在常氧环境中孵育该MIL,例如在低氧环境中孵育该MIL之后。

[0045] 该常氧环境可以包含至少大约21%的氧。该常氧环境可以包含大约5%的氧至大约30%的氧,如大约10%的氧至大约30%的氧、大约15%的氧至大约25%的氧、大约18%的氧至大约24%的氧、大约19%的氧至大约23%的氧或大约20%的氧至大约22%的氧。在一些实施方案中,该常氧环境包含大约21%的氧。

[0046] 在常氧环境中孵育MIL可以包括例如在组织培养基中孵育该MIL至少大约1小时,

如至少大约12小时、18小时、24小时、30小时、36小时、42小时、48小时、60小时、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或甚至至少大约14天。孵育可以包括孵育该MIL大约1小时至大约30天,如大约1天至大约20天、大约1天至大约14天、大约1天至大约12天或大约2天至大约12天。

[0047] 在一些实施方案中,在置于常氧环境中之后或在将其置于常氧环境中之前,用编码本文中描述的嵌合跨膜蛋白的核酸分子转染或感染该细胞。

[0048] 在一些实施方案中,通过从受试者提取骨髓样品获得该MIL并如本文中所述培养/孵育该细胞来。在一些实施方案中,将该骨髓样品离心以除去红细胞。在一些实施方案中,不对骨髓样品施以成分分离。在一些实施方案中,该骨髓样品不包含外周血淋巴细胞(“PBL”),或者该骨髓样品基本不含PBL。选择这些方法用于与被称为TIL的细胞不同的细胞。因此,MIL不是TIL。TIL可以通过本领域技术人员已知的方法来选择,并用本文中描述的核酸分子转染或感染,使得该TIL可以表达本文中描述的嵌合跨膜蛋白。

[0049] 在一些实施方案中,还可以通过用对CD3和CD28的抗体培养来激活该细胞。这可以例如通过用市售或可以由本领域技术人员制得的抗CD3/抗CD28珠粒孵育该细胞来进行。该细胞可以随后铺在板、烧瓶或袋子中。可以通过用95%氮气和5%CO₂气体混合物吹扫低氧室或细胞培养袋3分钟来实现低氧条件。这可以在容器中导致,例如1-2%或更少的O₂气体。随后可以如本文中所述或如W02016037054(其经此引用并入本文)的实施例中那样培养细胞。

[0050] 在一些实施方案中,提供了包含如本文中所述的嵌合跨膜蛋白的低氧MIL。在一些实施方案中,该低氧MIL在大约0.5%至大约5%的氧气的环境中。在一些实施方案中,该低氧MIL在大约1%至大约2%的氧气的环境中。在一些实施方案中,该低氧MIL在大约1%至大约3%的氧气的环境中。在一些实施方案中,该低氧MIL在大约1%至大约4%的氧气的环境中。低氧MIL是已经在低氧环境(如本文中所述的那些)中孵育一段时间的MIL,如本文中所述的那些。不受任何特定理论的束缚,低氧MIL将经历影响该MIL的抗肿瘤能力的蛋白和/或基因表达的变化。如本文中所述,该低氧MIL还可以在抗CD3/抗CD28珠粒或其它类似的激活试剂的存在下被激活。因此,该低氧MIL也可以是激活的低氧MIL。

[0051] 在一些方面,该实施方案涉及在受试者中提高免疫反应的方法,包括向该受试者施用如本文中所述的重组细胞。在一些实施方案中,该实施方案涉及在受试者中治疗肿瘤的方法,包括向该受试者施用如本文中所述的重组细胞。该肿瘤可以是良性肿瘤、恶性肿瘤或继发性肿瘤。该肿瘤可以是癌症。该肿瘤可以是淋巴瘤或白血病,如慢性淋巴细胞性白血病(“CLL”)或急性淋巴细胞性白血病(“ALL”)。该肿瘤可以是多发性骨髓瘤以及任何实体瘤(例如乳腺癌、前列腺癌、肺癌、食道癌、脑癌、肾癌、膀胱癌、胰腺癌、骨肉瘤等等)。

[0052] 该方法可以包括向受试者施用多个本文中所述的重组细胞。该方法可以包括向受试者施用有效量的本文中所述的重组细胞。

[0053] 在一些实施方案中,该细胞获自该受试者。被转染或感染的细胞可以获自该受试者。该细胞可以如本文中所述获得。例如,施用的细胞对该受试者可以是自体同源的。在一些实施方案中,施用的细胞对该受试者可以是同种异体的。该细胞可以获自该受试者并用编码如本文中所述的嵌合跨膜蛋白的核酸转染或感染。该细胞可以是子细胞,其中子细胞的亲代获自该受试者。该重组细胞可以已经用该核酸转染或感染,或该重组细胞的亲代可

以已经用该核酸转染或感染。在一些实施方案中,转染或感染后的细胞表达包含一种或多种本文中描述的氨基酸序列的蛋白。

[0054] 该方法可以进一步包括制造该重组细胞,其中制造该重组细胞包括用编码嵌合跨膜蛋白的核酸,如本文中所述的那些,来转染或感染细胞。在一些实施方案中,该嵌合跨膜蛋白包含SEQ ID NO:5、6、7、8、9、10或11的任一项所示的氨基酸序列或其变体。类似地,该方法可以进一步包括制造多个重组细胞,其中制造多个重组细胞包括用编码嵌合跨膜蛋白的核酸,如本文中所述的那些,来转染或感染多个细胞。该方法可以进一步包括扩增亲代细胞,例如该重组细胞可以是该亲代细胞的子细胞。该方法可以包括扩增细胞群,例如该方法可以包括向受试者施用多个如本文中所述的重组细胞,所述多个重组细胞的各个细胞可以是亲代细胞的子细胞。

[0055] 该方法可以进一步包括从受试者中分离该细胞或亲代细胞。

[0056] 该方法可以进一步包括分选该细胞,例如通过荧光激活细胞分选(“FACS”)或磁性激活细胞分选(“MACS”)。

[0057] 该细胞可以通过任何合适的途径例如在可药用组合物中施用于受试者。在一些实施方案中,该组合物是无热原的。例如,可以采用本领域已知的任何方法进行细胞的施用。例如,施用可以是胃肠外、静脉内、动脉内、皮下、肌肉内、颅内、眼眶内、眼内、心室内、囊内、脊柱内、脑池内、腹膜内、脑室内或鞘内。对于胃肠外给药,该细胞可以在含有可药用赋形剂或载体的组合物中通过静脉内、皮下或肌肉内注射来施用。该细胞可以配制用于通过注射,例如通过推注或连续输注来进行肠胃外给药。该组合物可以采取诸如在油性或水性赋形剂中的混悬剂、溶液或乳液的形式,并可以含有配制剂,例如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。

[0058] 对于注射给药,可能期望使用在无菌水性赋形剂中的溶液的细胞,所述溶液还可以含有其它溶质,如缓冲剂或防腐剂以及足够量的可药用盐或葡萄糖以使该溶液等渗。在一些实施方案中,该药物组合物可以用可药用载体配制以提供用于注射给药的无菌溶液或混悬剂。特别地,注射剂可以以常规形式以液体溶液或悬浮液形式或以乳液形式来制备。合适的赋形剂是例如水、盐水、右旋糖、甘露糖醇、乳糖、卵磷脂、白蛋白、谷氨酸钠、半胱氨酸盐酸盐等等。此外,如果需要的话,可注射药物组合物可以含有少量的无毒辅助物质,如润湿剂、pH缓冲剂等等。合适的药物载体描述在E.W.Martin的“Remington’s pharmaceutical Sciences”中。

[0059] 该受试者可以是包含免疫细胞的任何生物体。例如,该受试者可以选自啮齿类、犬、猫、猪、绵羊、牛、马和灵长类。该受试者可以是小鼠或人类。

[0060] 该受试者可以患有肿瘤。该肿瘤可以是良性肿瘤、恶性肿瘤或继发性肿瘤。该肿瘤可以是癌症。该肿瘤可以是淋巴瘤或白血病,如慢性淋巴细胞性白血病(“CLL”)或急性淋巴细胞性白血病(“ALL”)。该受试者可以患有胶质母细胞瘤、髓母细胞瘤、乳腺癌、头颈癌、肾癌、卵巢癌、卡波西氏肉瘤、急性骨髓性白血病和B系恶性肿瘤。该受试者可以患有多发性骨髓瘤。

[0061] 在一些实施方案中,该受试者是“需要其”的受试者。本文中所用的短语“需要其”指的是该受试者已被确定或怀疑为需要特定方法或治疗。在一些实施方案中,所述确定可以通过任何诊断手段进行。在本文中描述的任何方法和治疗中,该受试者可以是需要其的受试者。

[0062] 除非上下文另行明确要求,本文中所用的术语如“一个”、“一种”和“该”包括单数和复数指示物。

[0063] 本文中所用的术语“包含”、“具有(have)”、“具有(has)”和“包括”以及它们的结合物在本文中使用时是指“包括但不限于”。虽然就“包含”各种组分或步骤而言(解释为“包括但不限于”)描述了各种组合物和方法,该组合物、方法和装置还可以“基本上由”或“由”各种组分和步骤“组成”,此类术语应解释为限定了基本封闭的成员组。

[0064] 本文中所用的术语“治疗(treat)”、“治疗(treated)”和“治疗(treating)”指的是其中目标是减缓(减少)不期望的生理病症、失调或疾病,或获得有益或期望的临床结果的治疗性处理。对本文中描述的实施方案来说,有益或期望的临床结果包括但不限于缓解症状;减轻病症、失调或疾病的程度;稳定(即不恶化)病症、失调或疾病的状态;延迟病症、失调或疾病的发作或减缓病症、失调或疾病的进展;改善病症、失调或疾病状态或缓解(无论部分还是全部),无论可检测还是不可检测;改善至少一种可测量的物理参数,不必可以由患者辨别;或增进或改善病症、失调或疾病。由此,“癌症治疗”或“治疗癌症”指的是减轻或改善与癌症或本文中描述的任何其它病症相关的任何原发现象和继发病状的活性。在一些实施方案中,治疗的癌症是本文中所述癌症之一。

实施例

[0065] 下面的实施例说明而非限制本文中描述的方法与组合物。治疗中通常遇到并对本领域技术人员显而易见的各种病症和参数的其它合适的修改与调整在实施方案的精神与范围内。

[0066] 实施例1:CAR转导方案

在转导前16-24小时,将T细胞铺在合适的培养基中并用CD3、CD28和IL-2刺激。该细胞随后放置在孵育箱(37℃/5%CO₂)中过夜。在16-24小时后,在不干扰细胞的情况下尽可能多地除去培养基。随后向细胞中添加CAR病毒并放回孵育箱中放置4-12小时。在4-12小时后,将适当体积的含有IL-2的培养基加回到细胞中并放回到孵育箱中。细胞留在孵育箱中生长(在必要的情况下分开并更换培养基)3-12天。可以通过多种方法来检查CAR转导,包括但不限于流式细胞仪、蛋白质印迹或荧光显微术(如果使用荧光报道基因的话)。

[0067] 实施例2:CAR转染方案

293T细胞在DMEM+10%FBS中每两天传代,传代至少三次,其细胞密度使其不会超过80%汇合。在转染前一天,以24小时后(在转染当天)其为大约80%汇合的密度接种该293T细胞。在转染当天,除去培养基,并加入足够的新鲜培养基以覆盖细胞。在单独的试管中,将VSV-G、Gag、Pol&Rev质粒、转染试剂和CAR质粒混合并在室温下孵育10-20分钟。随后将该混合物逐滴添加到293T细胞中并孵育过夜。在转染后12-24小时,完全更换培养基或添加额外的新鲜培养基。在转染后48小时和72小时,收集来自该细胞的含有病毒的培养基并用新鲜培养基补充该细胞。通过离心或过滤移除收集的培养基中的任何细胞。收集的培养基随后在超速离心机中旋转以使病毒成球。除去过量的培养基,并将病毒重新悬浮在DMEM或HBSS中,分装到无菌试管中并在-80℃下储存直至使用。

[0068] 实施例3:嵌合受体蛋白的存在不会负面地影响MIL功能和生长

如本文中所述激活和扩增获自受试者的MIL。简而言之,在从受试者处获得骨髓样品

后,如W0 2016037054 (其经此引用并入本文) 中所述,该细胞在低氧条件下在抗CD3/抗CD28 珠粒和细胞因子的存在下孵育。随后用包含编码含有SEQ ID NO:11的嵌合跨膜蛋白的核酸分子的病毒感染该MIL。该细胞随后在常氧条件下生长并使其扩增。对照物和感染的MIL与不同的细胞类型接触。无论MIL的扩增还是MIL识别抗原的能力都不受该嵌合跨膜蛋白的存在的负面影响。这些结果表明,向MIL中添加嵌合跨膜蛋白对其功能和生长无害。该结果显示在图6,A栏和B栏中,其来自两名不同的患者。

[0069] 总而言之,本文中提供的实施方案和实施例证明,表达嵌合跨膜蛋白的细胞可以有效地用于治疗癌症和/或调节免疫反应。

[0070] 在本说明书中提及和/或在申请数据表中列出的任何美国专利、美国专利申请公开、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物(包括CAS编号)均经此引用以其全文并入本文。

具有密码子优化的最终序列

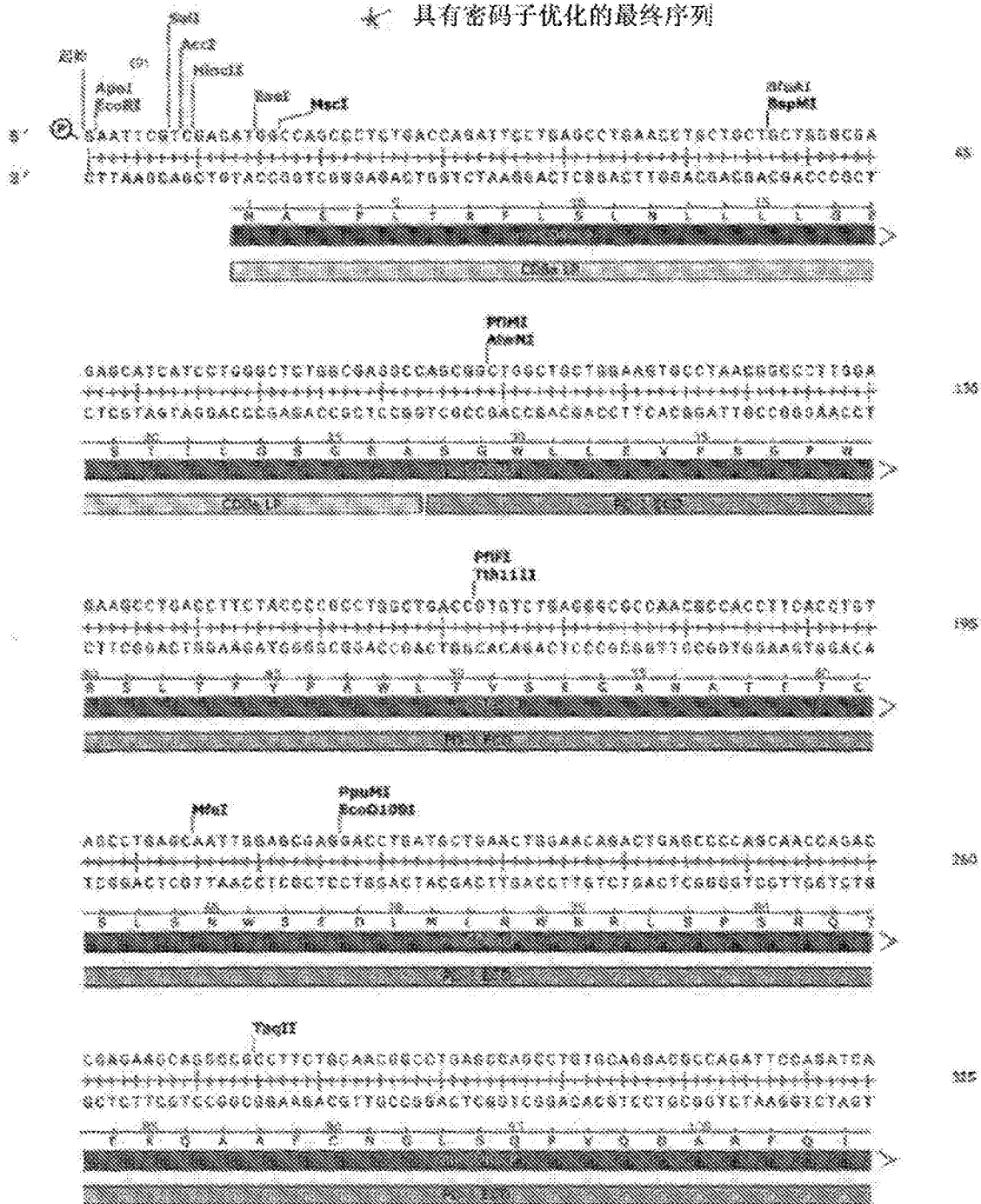


图 1

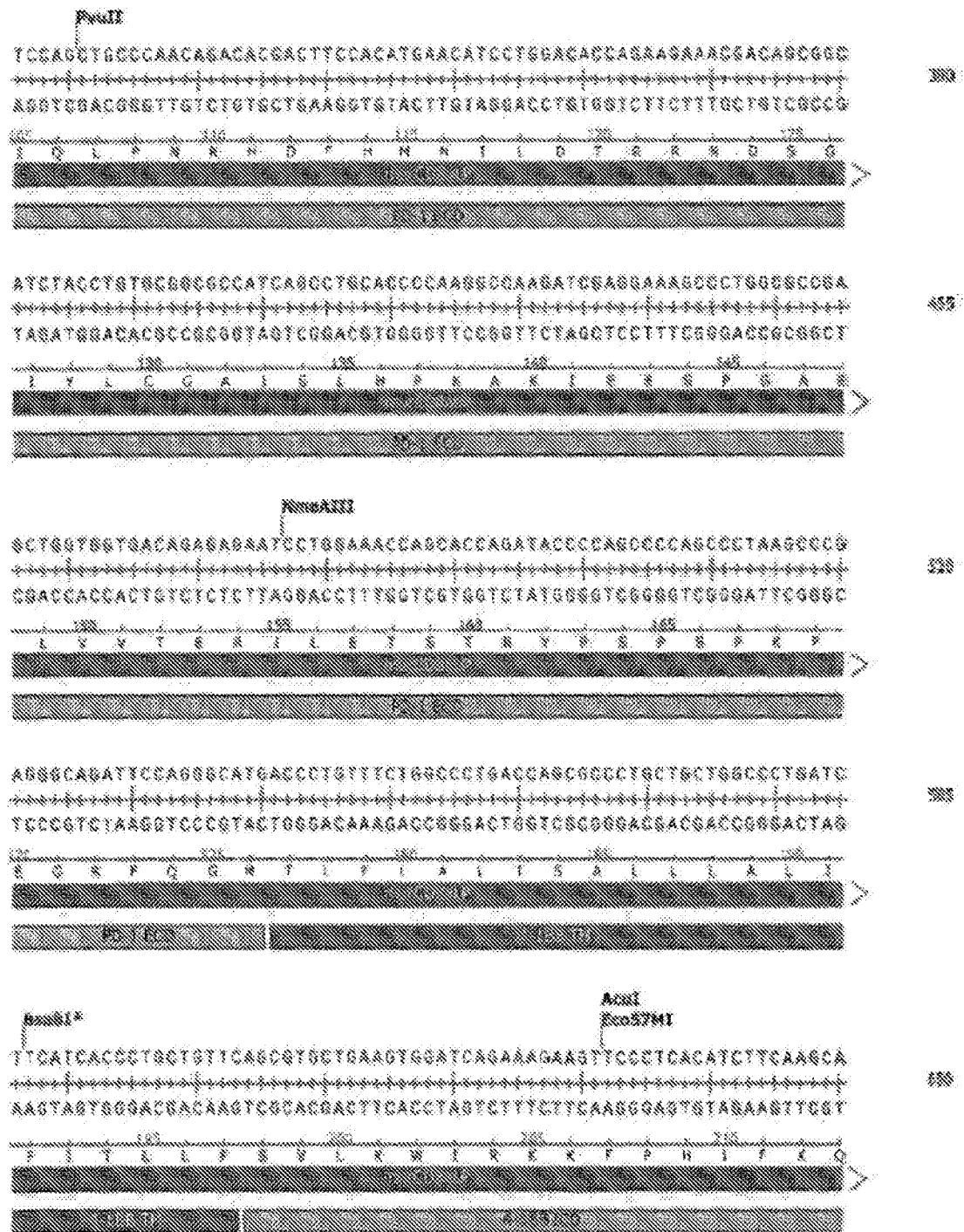
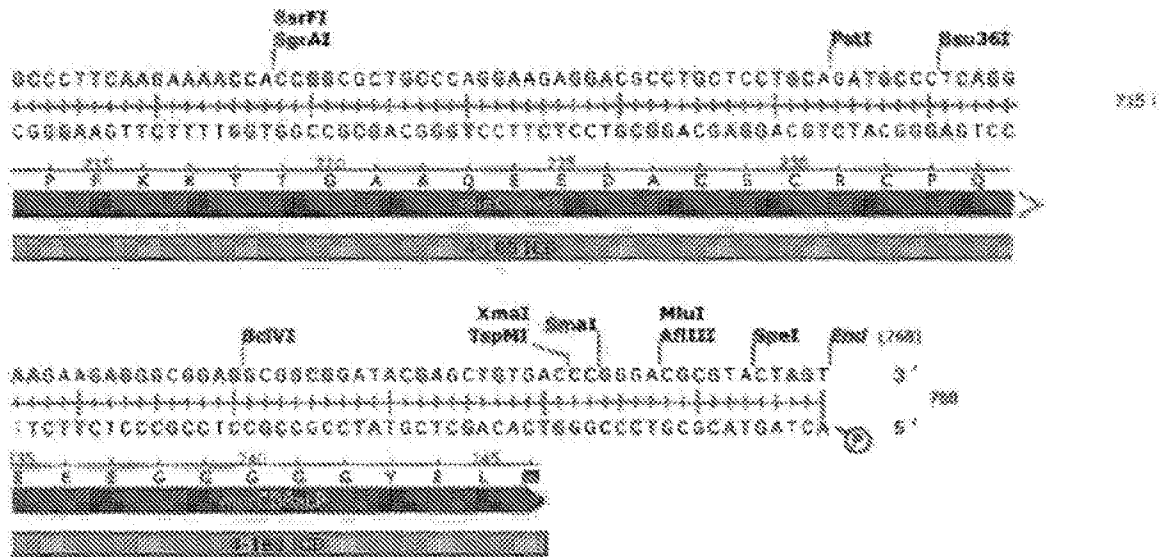


图 1 (续)



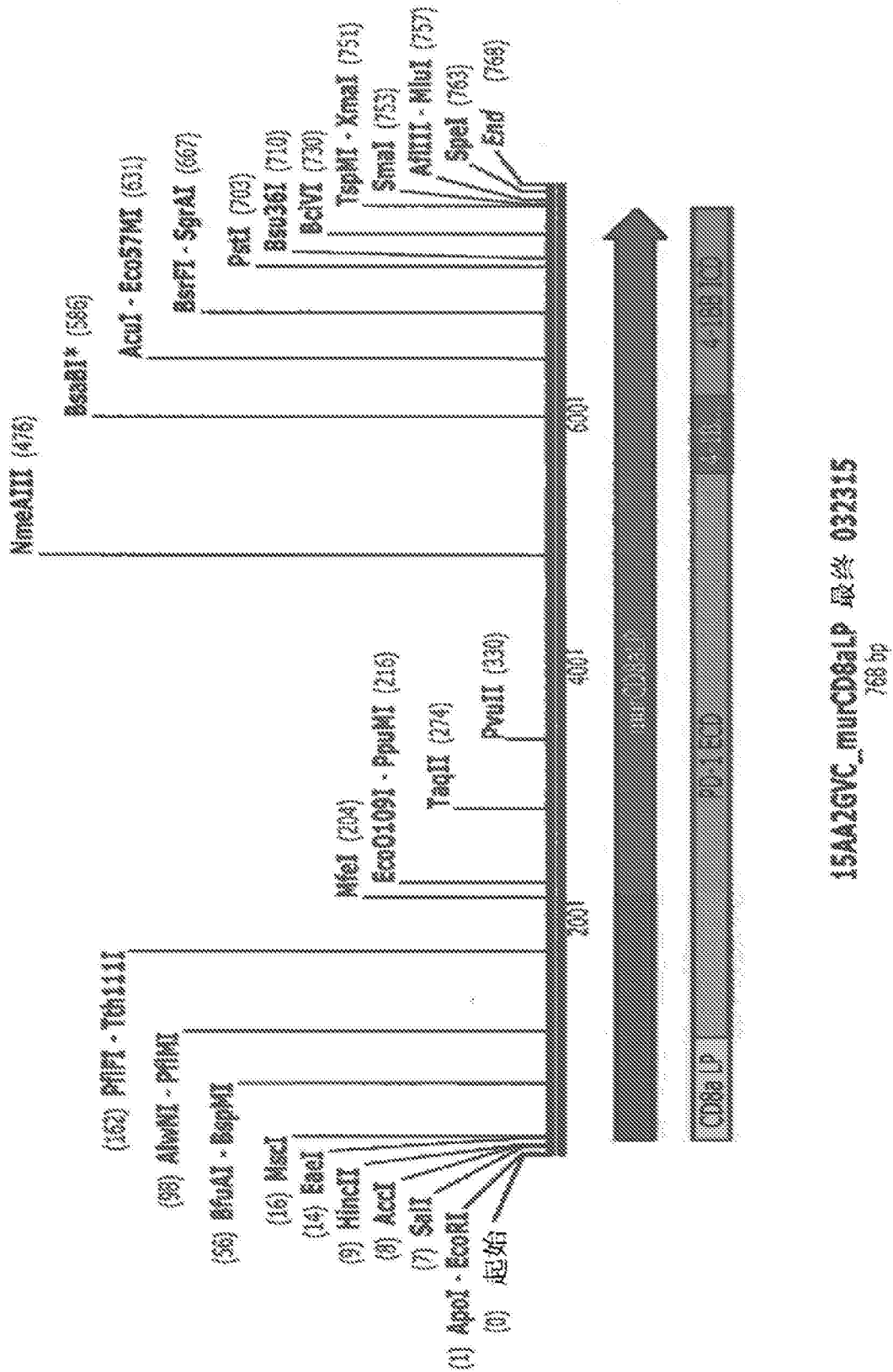


图 1(续)

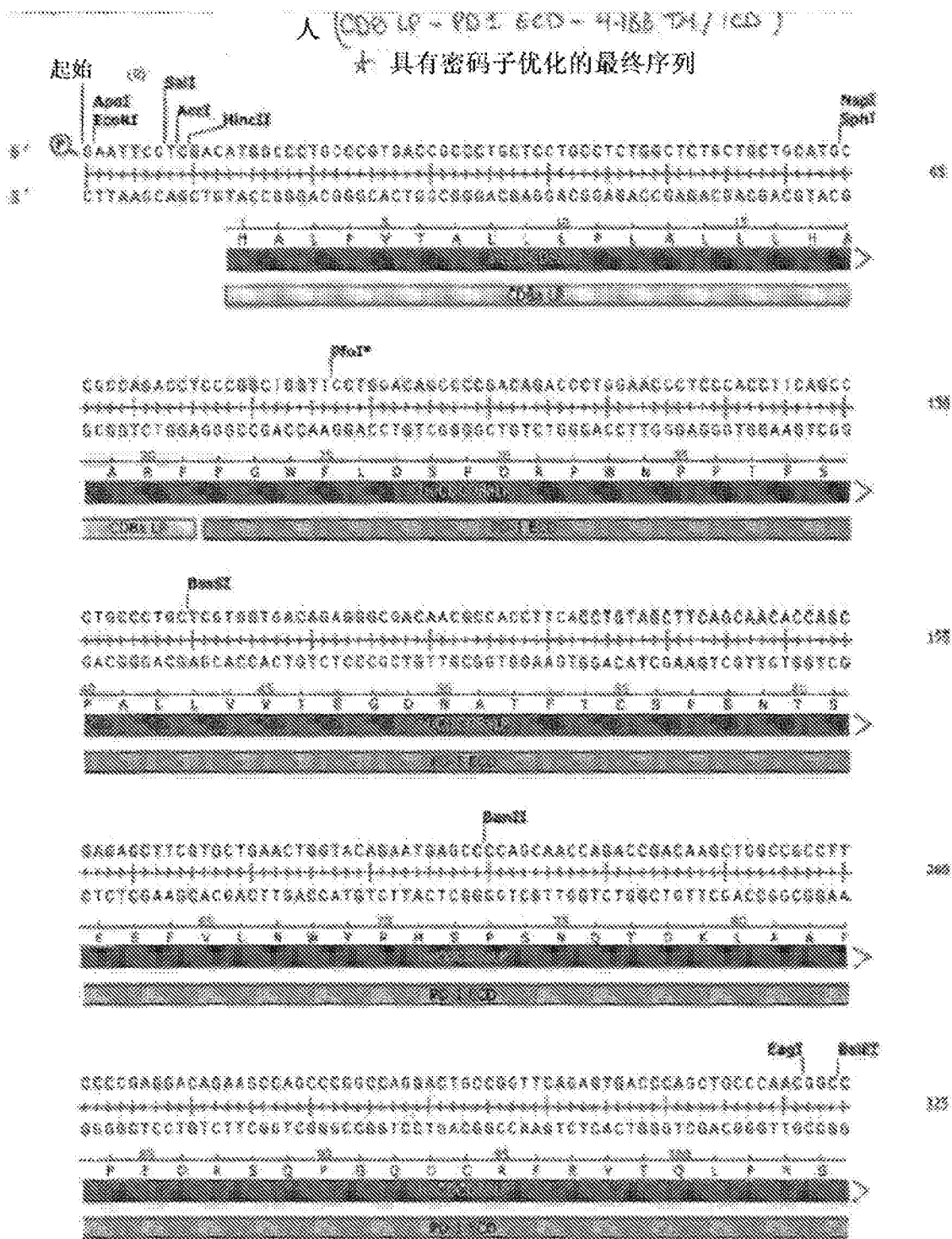


图 2

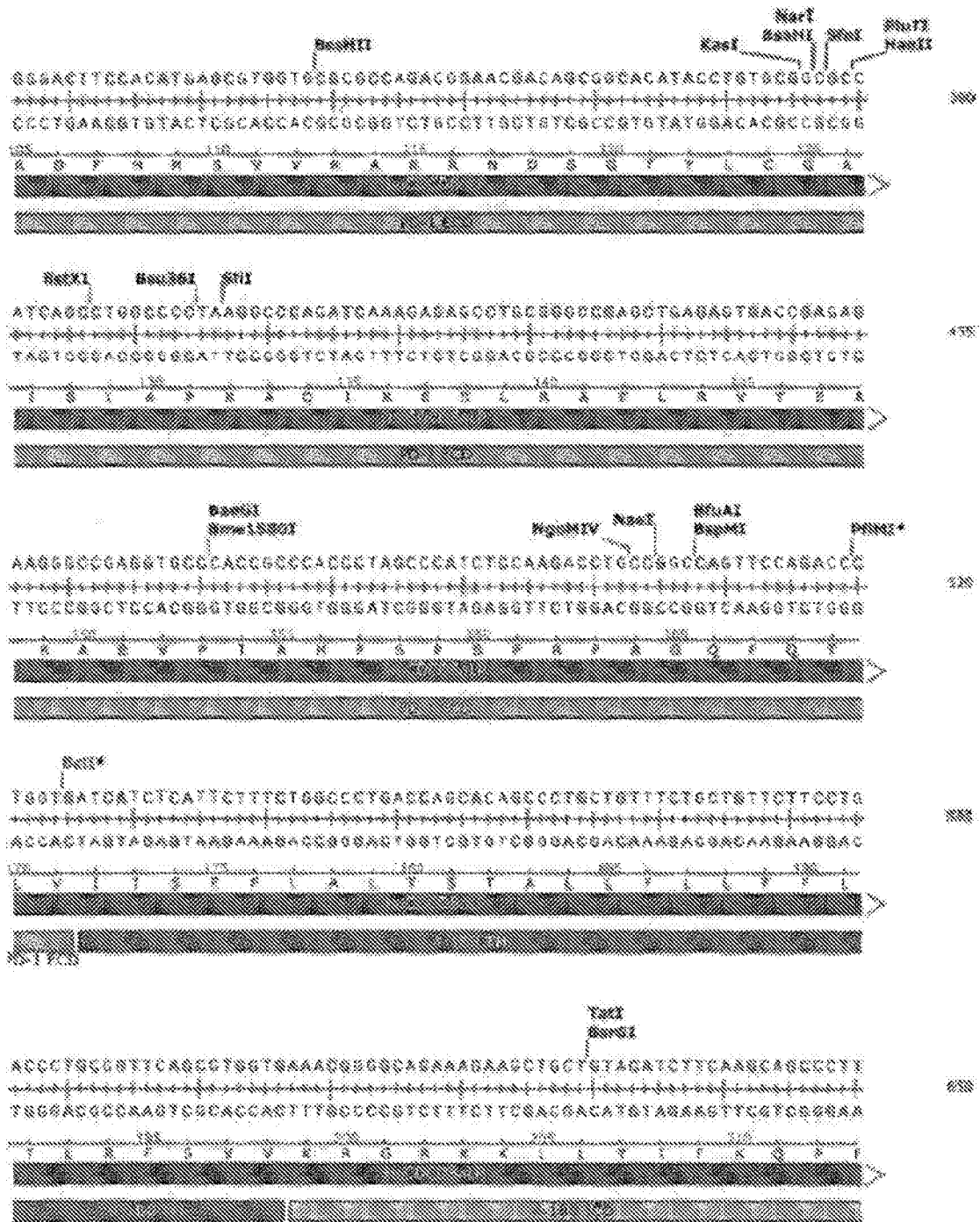


图 2(续)

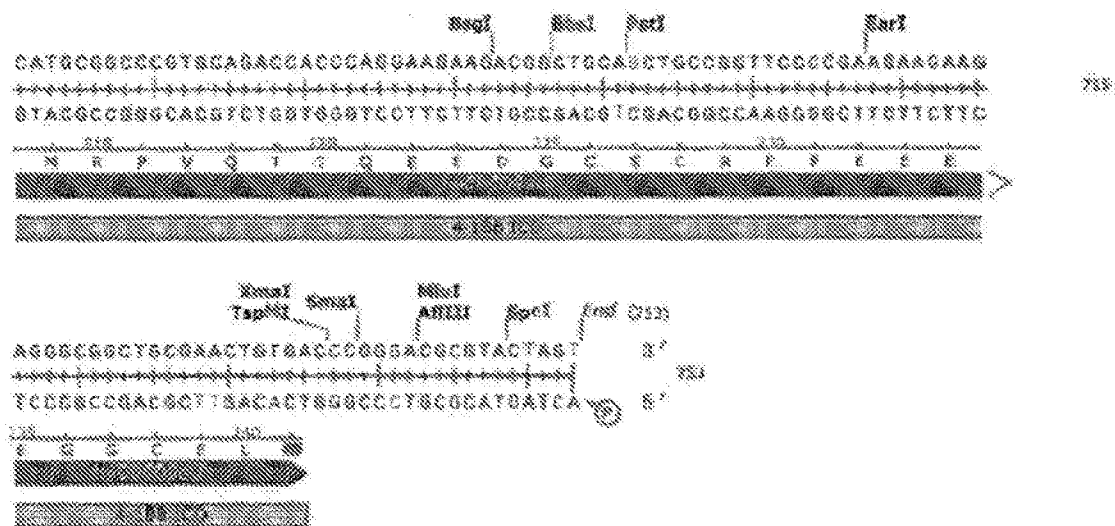


图 2(续)

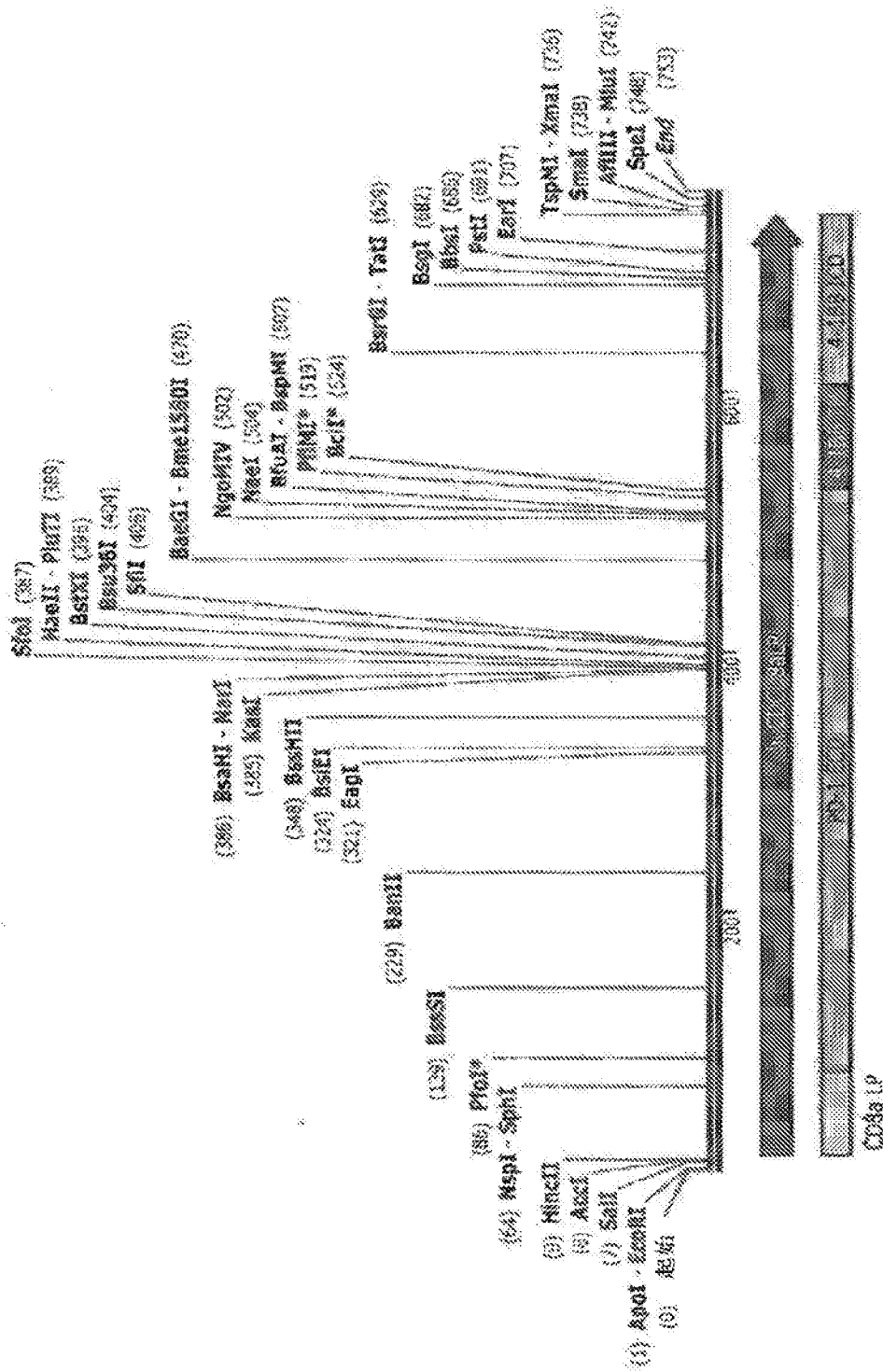


图 2(续)

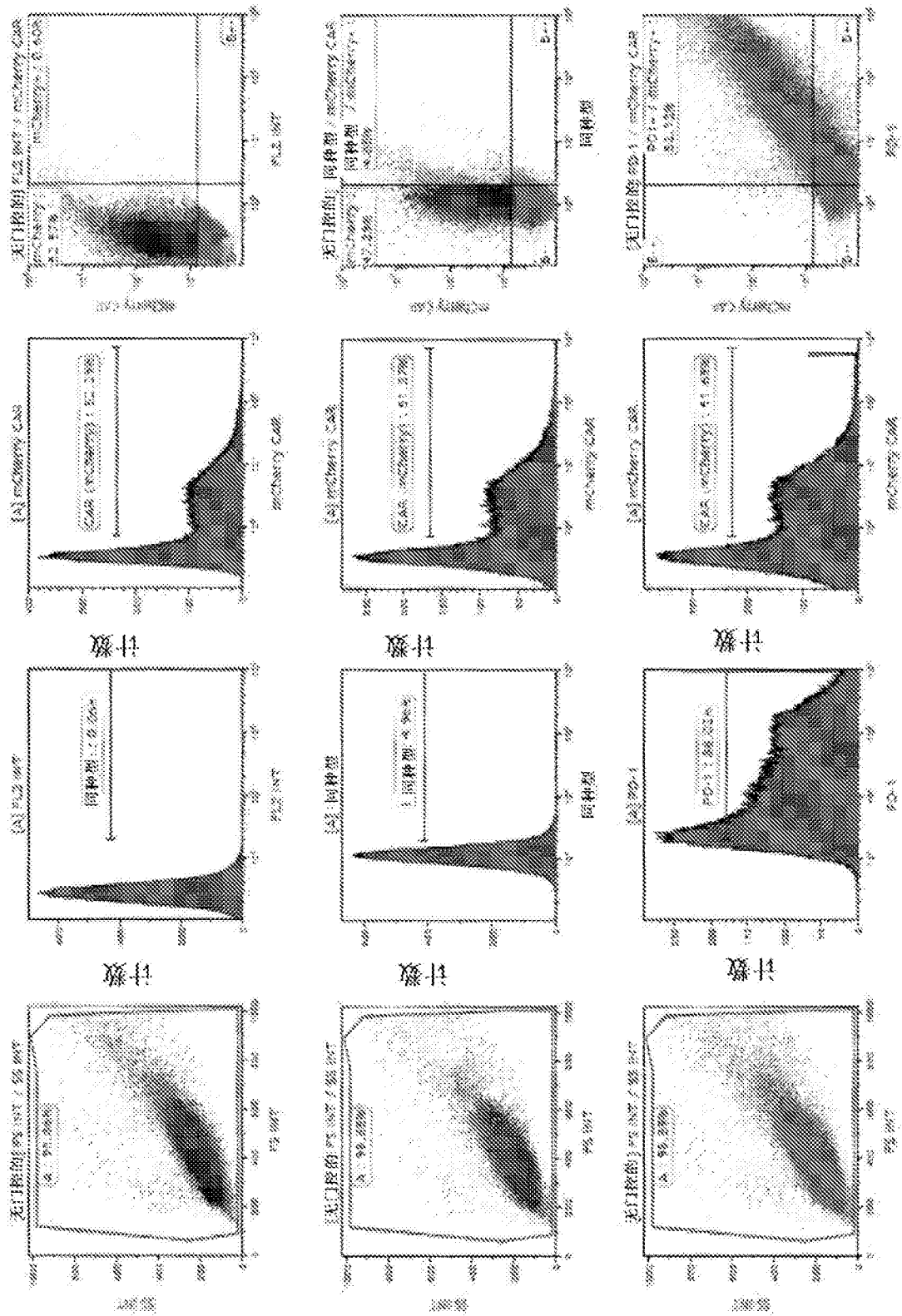


图 3

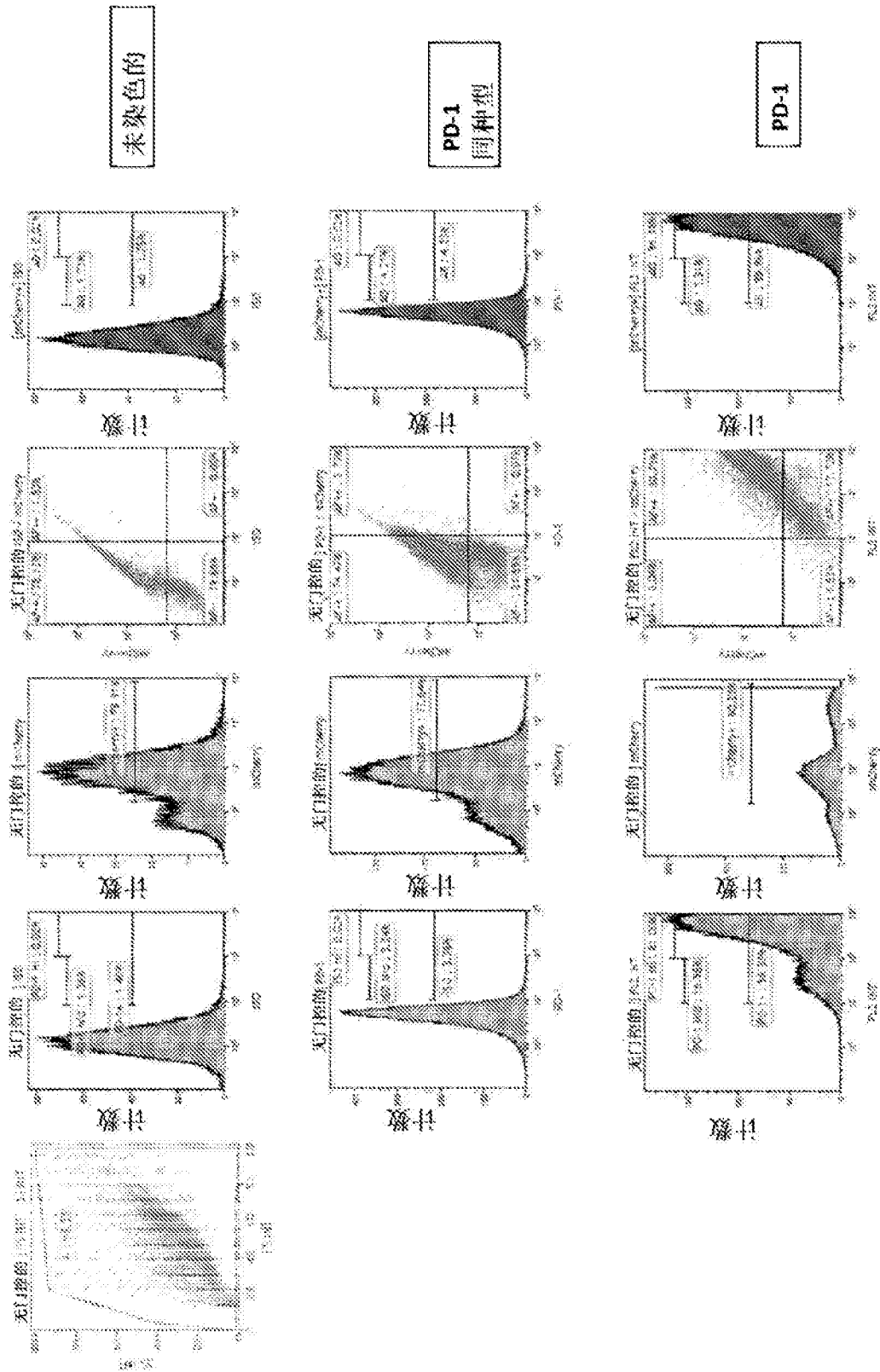


图 4

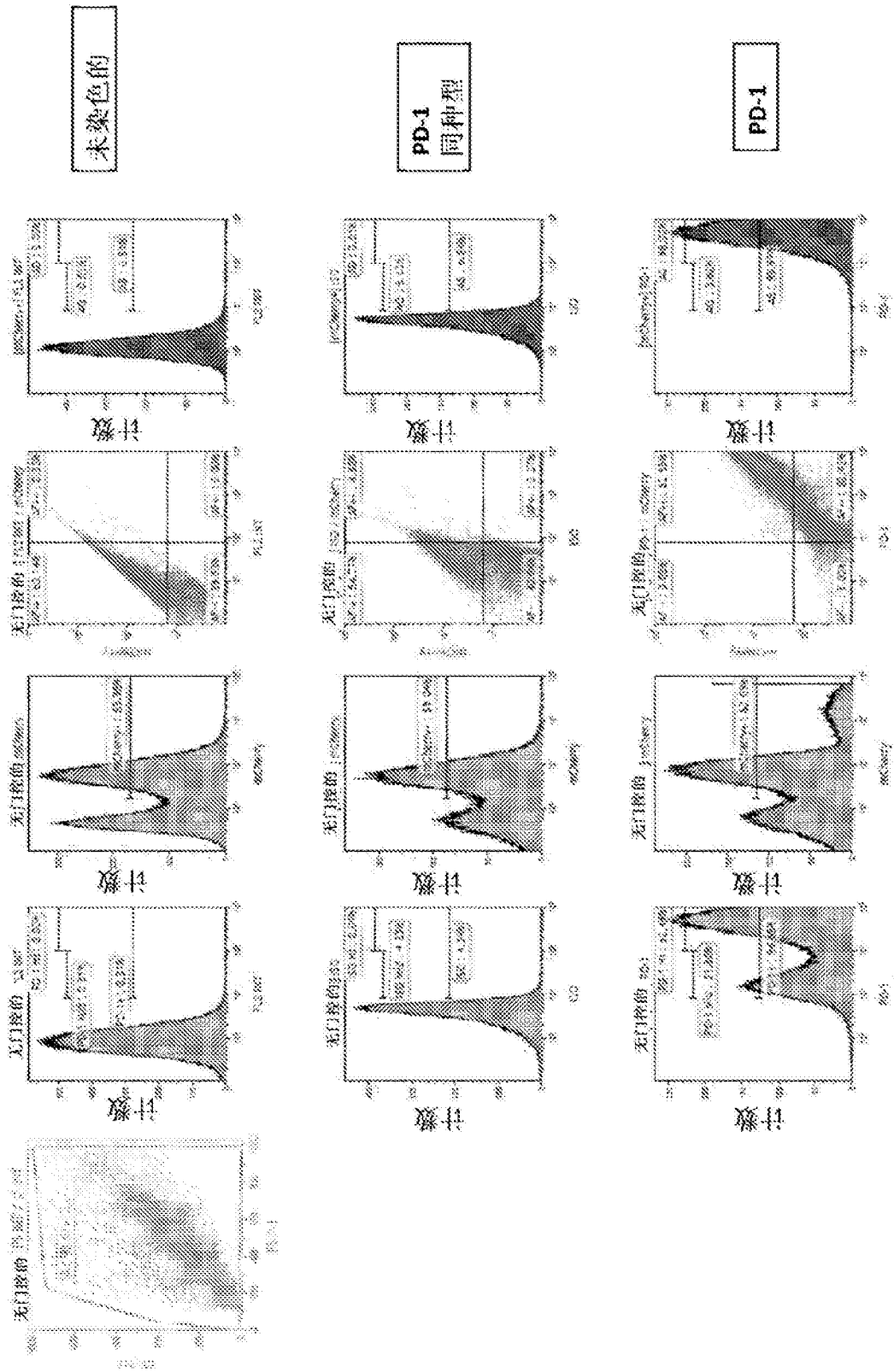
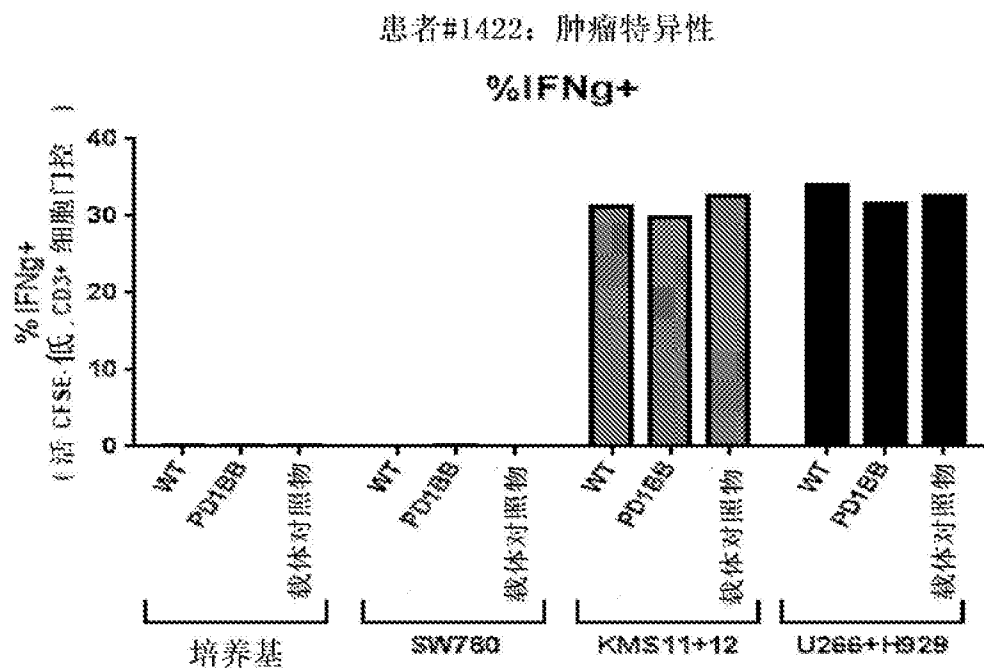


图 5

A.



B.

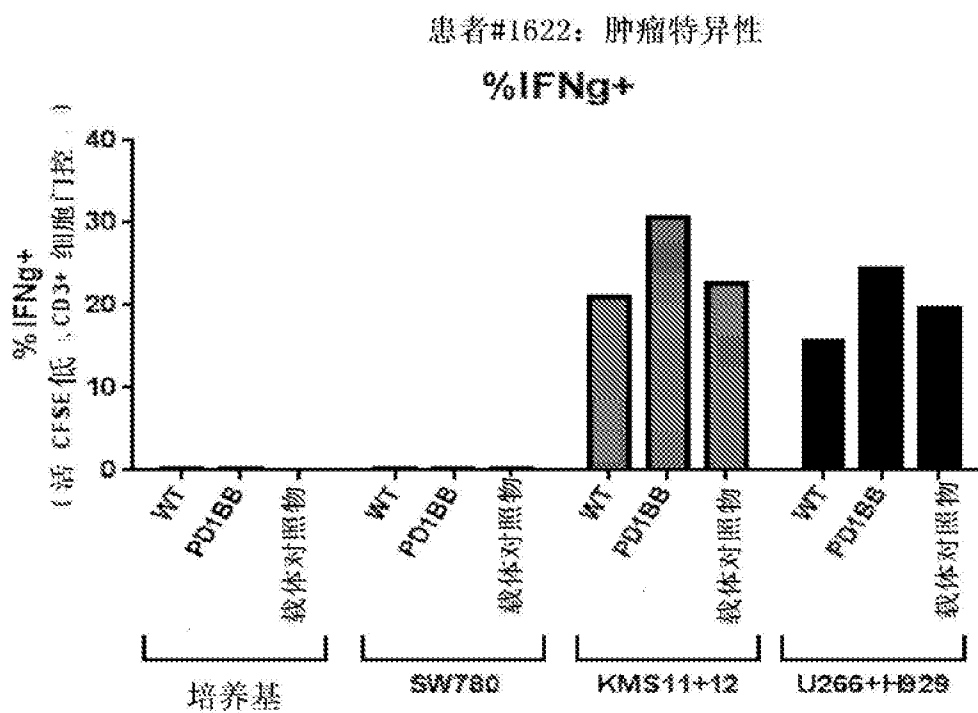


图 6