



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110545826 A

(43)申请公布日 2019.12.06

(21)申请号 201780085434.8

(22)申请日 2017.12.01

(30)优先权数据

62/429,732 2016.12.03 US

62/581,644 2017.11.03 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.08.01

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/064362 2017.12.01

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/102785 EN 2018.06.07

(71)申请人 朱诺治疗学股份有限公司

地址 美国华盛顿州

申请人 安塞塔制药有限责任公司

安塞塔制药公司

(72)发明人 M·波斯 J·秦 R·萨蒙

O·巴特罗维奇

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 封新琴

(51)Int.Cl.

A61K 35/00(2006.01)

C07K 14/00(2006.01)

C07K 16/28(2006.01)

A61K 45/06(2006.01)

A61K 31/505(2006.01)

A61K 31/506(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61K 35/17(2006.01)

权利要求书13页 说明书108页

序列表13页 附图47页

(54)发明名称

用于与激酶抑制剂组合使用治疗性T细胞的方法和组合物

(57)摘要

本公开文本涉及方法、组合物和用途,所述方法、组合物和用途涉及免疫疗法和靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂,其中所述激酶不是IL-2诱导型T细胞激酶(ITK)和/或选自布鲁顿酪氨酸激酶(BTK)、tec蛋白酪氨酸激酶(TEC)、BMX非受体酪氨酸激酶(Etk)、TXK酪氨酸激酶(TXK)和/或受体酪氨酸蛋白激酶ErbB4(ErbB4)。所提供的方法、组合物和用途包括给予一种或多种这样的抑制剂与另一种药剂如靶向T细胞的免疫治疗剂和/或基因工程化T细胞,如表达CAR的T细胞。还提供了制备工程化细胞的方法、细胞、组合物、给予方法、核酸、制品和试剂盒。在一些方面,所述方法和细胞的特征为过继细胞疗法的T细胞或通过免疫治疗剂募集的内源T细胞提供了改善的活性、功效、持久性、扩增和/或增殖。

1. 一种治疗方法,所述方法包括:

(a) 向患有疾病或病症的受试者给予T细胞,所述T细胞特异性识别或特异性结合与所述疾病或病症相关或在所述疾病或病症的细胞上表达或存在的抗原和/或由特异性靶向所述疾病或病症并且已经或将要给予所述受试者的治疗剂包含的标签;以及

(b) 向所述受试者给予靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂,其中所述抑制剂不抑制ITK和/或以大于或大于约1000nM的半最大抑制浓度 (IC_{50}) 抑制ITK,

其中所述疾病或病症 (i) 不是B细胞来源的疾病或病症 (ii) 与CD19、CD22或CD20的表达无关; (iii) 不表达所述靶蛋白酪氨酸激酶, (iv) 不含有对所述抑制剂敏感的所述靶蛋白酪氨酸激酶的形式, (v) 不含有对所述抑制剂敏感的激酶和/或 (vi) 对所述抑制剂的抑制不敏感和/或其中所述受试者或疾病或病症对所述抑制剂和/或对BTK的抑制剂具有抗性 or 难治性和/或其中所述蛋白酪氨酸激酶在所述疾病或病症所来源的细胞中通常不表达或不被怀疑表达。

2. 一种治疗方法,所述方法包括向患有疾病或病症的受试者给予T细胞,所述T细胞特异性识别或特异性结合与所述疾病或病症相关或在所述疾病或病症的细胞上表达或存在的抗原和/或由特异性靶向所述疾病或病症并且已经或将要给予所述受试者的治疗剂包含的标签,其中:

已经向所述受试者给予靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂,其中所述抑制剂不抑制ITK和/或以大于或大于约1000nM的半最大抑制浓度 (IC_{50}) 抑制ITK;并且

所述疾病或病症 (i) 不是B细胞来源的疾病或病症 (ii) 与CD19、CD22或CD20的表达无关; (iii) 不表达所述蛋白酪氨酸激酶, (iv) 不含有对所述抑制剂敏感的所述靶蛋白酪氨酸激酶的形式, (v) 不含有对所述抑制剂敏感的激酶和/或 (vi) 对所述抑制剂的抑制不敏感和/或其中所述受试者或疾病或病症对所述抑制剂和/或对BTK的抑制剂具有抗性 or 难治性和/或其中所述蛋白酪氨酸激酶在所述疾病或病症所来源的细胞中通常不表达或不被怀疑表达。

3. 一种治疗方法,所述方法包括向患有疾病或病症的受试者给予靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂,其中所述抑制剂不抑制ITK和/或以大于或大于约1000nM的半最大抑制浓度 (IC_{50}) 抑制ITK,其中:

已经向所述受试者给予T细胞,所述T细胞特异性识别或特异性结合与所述疾病或病症相关或在所述疾病或病症的细胞上表达或存在的抗原和/或由特异性靶向所述疾病或病症并且已经或将要给予所述受试者的治疗剂包含的标签;并且

所述疾病或病症 (i) 不是B细胞来源的疾病或病症 (ii) 与CD19、CD22或CD20的表达无关; (iii) 不表达所述靶蛋白酪氨酸激酶, (iv) 不含有对所述抑制剂敏感的所述靶蛋白酪氨酸激酶的形式, (v) 不含有对所述抑制剂敏感的激酶和/或 (vi) 对所述抑制剂的抑制不敏感和/或其中所述受试者或疾病或病症对所述抑制剂和/或对BTK的抑制剂具有抗性 or 难治性和/或其中所述TEC家族激酶在所述疾病或病症所来源的细胞中通常不表达或不被怀疑表达。

4. 权利要求1-3中任一项的方法,其中所述靶蛋白酪氨酸激酶是在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶 (TEC)、静息淋巴细胞激酶 (RLK/TXK)、BMX/ETK或ERBB4。

5. 权利要求1-4中任一项的方法,其中所述靶蛋白酪氨酸激酶是TEC家族激酶。

6. 权利要求1-5中任一项的方法,其中所述抑制剂选自式(II)的化合物、ONO/GS-4059、化合物30或化合物38、GDC-0834、RN-486、CGI-560、CGI-1764、HM-71224、CC-292、ONO-4059、CNX-774和LFM-A13。

7. 权利要求1-6中任一项的方法,其中:

所述抑制剂是所述靶蛋白酪氨酸激酶的选择性抑制剂;和/或

所述抑制剂以比所述抑制剂对任何另外的蛋白酪氨酸激酶或TEC家族激酶的 IC_{50} 低至少10倍或至少100倍的半最大抑制浓度(IC_{50})抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶,和/或以比所述抑制剂对ITK和BTK二者的 IC_{50} 值低至少2倍、至少10倍或至少100倍的 IC_{50} 抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶;和/或

所述抑制剂以小于或小于约1000nM、900nM、800nM、600nM、500nM、400nM、300nM、200nM、100nM或更小的半最大抑制浓度(IC_{50})抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶。

8. 一种治疗方法,所述方法包括:

(1) 向患有疾病或病症的受试者给予T细胞,所述T细胞特异性识别或特异性结合与所述疾病或病症相关的抗原和/或由特异性靶向所述疾病或病症并且已经或将要给予所述受试者的治疗剂包含的标签;以及

(2) 向所述受试者给予靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂,所述靶蛋白酪氨酸激酶是在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶(TEC)、静息淋巴细胞激酶(RLK/TXK)、BMX/ETK或ERBB4,其中:

所述抑制剂是所述靶蛋白酪氨酸激酶的选择性抑制剂;和/或

所述抑制剂以比所述抑制剂对不同于所述靶蛋白酪氨酸激酶的任何蛋白酪氨酸激酶或TEC家族激酶的 IC_{50} 低至少10倍或至少100倍的半最大抑制浓度(IC_{50})抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶,和/或以比所述抑制剂对ITK和BTK二者的 IC_{50} 值低至少2倍、至少10倍或至少100倍的 IC_{50} 抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶;和/或

所述抑制剂以小于或小于约1000nM、900nM、800nM、600nM、500nM、400nM、300nM、200nM、100nM或更小的半最大抑制浓度(IC_{50})抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶。

9. 一种治疗方法,所述方法包括向患有疾病或病症的受试者给予T细胞,所述T细胞特异性识别或特异性结合与所述疾病或病症相关的抗原和/或由特异性靶向所述疾病或病症并且已经或将要给予所述受试者的治疗剂包含的标签,已经向所述受试者给予靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂,所述靶蛋白酪氨酸激酶是在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶(TEC)、静息淋巴细胞激酶(RLK/TXK)、BMX/ETK或ERBB4,其中:

所述抑制剂是所述靶蛋白酪氨酸激酶的选择性抑制剂;和/或

所述抑制剂以比所述抑制剂对不同于所述靶蛋白酪氨酸激酶的任何蛋白酪氨酸激酶或TEC家族激酶的 IC_{50} 低至少10倍或至少100倍的半最大抑制浓度(IC_{50})抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶,和/或以比所述抑制剂对ITK和BTK二者的 IC_{50} 值低至少2倍、至少10倍或至少100倍的 IC_{50} 抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶;和/或

所述抑制剂以小于或小于约1000nM、900nM、800nM、600nM、500nM、400nM、300nM、200nM、100nM或更小的半最大抑制浓度(IC_{50})抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶。

10. 一种治疗方法,所述方法包括向患有疾病或病症的受试者给予靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂,所述靶蛋白酪氨酸激酶是在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶(TEC)、静息淋巴细胞激酶(RLK/TXK)、BMX/ETK或ERBB4,已经向所述受试者给予特异性识别或特异性结合与所述

疾病或病症相关的抗原和/或由特异性靶向所述疾病或病症并且已经或将要给予所述受试者的治疗剂包含的标签的T细胞,其中:

所述抑制剂是所述靶蛋白酪氨酸激酶的选择性抑制剂;和/或

所述抑制剂以比所述抑制剂对不同于所述靶蛋白酪氨酸激酶的任何蛋白酪氨酸激酶或TEC家族激酶的 IC_{50} 低至少10倍或至少100倍的半最大抑制浓度(IC_{50})抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶,和/或以比所述抑制剂对ITK和BTK二者的 IC_{50} 值低至少2倍、至少10倍或至少100倍的 IC_{50} 抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶;和/或

所述抑制剂以小于或小于约1000nM、900nM、800nM、600nM、500nM、400nM、300nM、200nM、100nM或更小的半最大抑制浓度(IC_{50})抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶。

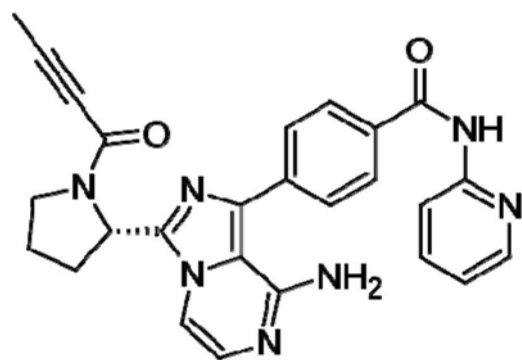
11. 权利要求8-10中任一项的方法,其中所述疾病或病症(i)不是B细胞来源的疾病或病症(ii)与CD19、CD22或CD20的表达无关;(iii)不表达所述靶蛋白酪氨酸激酶,(iv)不含有对所述抑制剂敏感的所述靶蛋白酪氨酸激酶的形式,(v)不含有对所述抑制剂敏感的激酶和/或(vi)对所述抑制剂的抑制不敏感和/或其中所述受试者或疾病或病症对所述抑制剂和/或对BTK的抑制剂具有抗性 or 难治性和/或所述靶激酶在所述疾病或病症所来源的细胞中通常不表达或不被怀疑表达。

12. 权利要求4-11中任一项的方法,其中所述靶蛋白酪氨酸激酶是RLK/TKK。

13. 权利要求4-12中任一项的方法,其中所述靶蛋白酪氨酸激酶是BMX/ETK,并且所述抑制剂以比所述抑制剂对任何其他TEC家族激酶和/或对ITK的 IC_{50} 低至少10倍或至少100倍的半最大抑制浓度(IC_{50})抑制Bmx/Etk,和/或以小于或小于约1000nM、900nM、800nM、600nM、500nM、400nM、300nM、200nM、100nM或更小的半最大抑制浓度(IC_{50})抑制Bmx/Etk。

14. 权利要求4和7-13中任一项的方法,其中所述靶激酶是或包含ErbB4。

15. 权利要求1-13中任一项的方法,其中所述抑制剂包含是式(II)的化合物:



或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共

(II)

晶、多晶型物或前药。

16. 权利要求1-15中任一项的方法,其中所述抑制剂包含式(II)的化合物或其对映体、药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药或包含任何前述物质的药物组合物。

17. 一种治疗方法,所述方法包括:

(1) 向患有疾病或病症的受试者给予T细胞,所述T细胞包含特异性结合与所述疾病或病症相关的抗原和/或由特异性靶向所述疾病或病症并且已经或将要给予所述受试者的治疗剂包含的标签的重组抗原受体;以及

(2) 向所述受试者给予激酶抑制剂或包含所述抑制剂的药物组合物,其中所述抑制剂

包含式 (II) 的化合物包含式 (II) 的化合物或其对映体、药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。

18. 一种治疗方法, 所述方法包括向患有疾病或病症的受试者给予T细胞, 所述T细胞包含特异性结合与所述疾病或病症相关的抗原和/或由特异性靶向所述疾病或病症并且已经或将要给予所述受试者的治疗剂包含的标签的重组抗原受体, 已经向所述受试者给予激酶抑制剂或包含所述抑制剂的药物组合物, 其中所述抑制剂包含式 (II) 的化合物或其对映体、药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。

19. 一种治疗方法, 所述方法包括向患有疾病或病症的受试者给予激酶抑制剂或包含所述抑制剂的药物组合物, 其中所述抑制剂包含式 (II) 的化合物或其对映体、药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药, 已经向所述受试者给予包含特异性结合与所述疾病或病症相关的抗原和/或由特异性靶向所述疾病或病症并且已经或将要给予所述受试者的治疗剂包含的标签的重组抗原受体的T细胞。

20. 权利要求17-19中任一项的方法, 其中所述疾病或病症是癌症。

21. 权利要求1-20中任一项的方法, 其中:

(i) 所述受试者和/或所述疾病或病症 (a) 对布鲁顿酪氨酸激酶 (BTK) 的抑制具有抗性和/或 (b) 包含对所述抑制剂的抑制具有抗性的细胞群;

(ii) 所述受试者和/或所述疾病或病症在编码BTK的核酸中包含能够降低或防止所述抑制剂和/或依鲁替尼对BTK的抑制的突变或破坏; 和/或

(iii) 在 (1) 中给予时和在 (2) 中给予时, 所述受试者在用所述抑制剂治疗和/或用BTK抑制剂疗法治疗后发生缓解后复发, 或者已经被认为对用所述抑制剂治疗和/或用BTK抑制剂疗法治疗是难治性的。

22. 权利要求21的方法, 其中所述细胞群是或包含B细胞群和/或不包含T细胞。

23. 权利要求21或权利要求22的方法, 其中编码BTK的核酸中的所述突变包含位置C481、任选地C481S或C481R处的取代, 和/或位置T474、任选地T474I或T474M处的取代。

24. 权利要求1-23中任一项的方法, 其中:

所述靶蛋白酪氨酸激酶不由所述疾病或病症的细胞表达, 在所述疾病或病症所来源的细胞中通常不表达或不被怀疑表达, 和/或

所述疾病或病症对所述抑制剂不敏感; 和/或

至少多个所述T细胞表达所述靶蛋白酪氨酸激酶; 和/或

所述靶蛋白酪氨酸激酶在T细胞中表达。

25. 权利要求1-24中任一项的方法, 其中所述疾病或病症是不表达B细胞抗原的癌症, 是非血液癌, 不是B细胞恶性肿瘤, 不是B细胞白血病, 或者是实体瘤。

26. 权利要求1-25中任一项的方法, 其中所述疾病或病症是选自肉瘤、癌、淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL)、白血病、CLL、ALL、AML和骨髓瘤的癌症。

27. 权利要求1-26中任一项的方法, 其中所述疾病或病症是胰腺癌、膀胱癌、结直肠癌、乳腺癌、前列腺癌、肾癌、肝细胞癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、胰腺癌、直肠癌、甲状腺癌、子宫癌、胃癌、食管癌、头颈癌、黑色素瘤、神经内分泌癌、CNS癌症、脑肿瘤、骨癌或软组织肉瘤。

28. 权利要求1-27中任一项的方法, 其中所述T细胞识别或靶向选自以下的抗原: ROR1、B细胞成熟抗原 (BCMA)、tEGFR、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、间皮素、CEA和乙型肝炎表面

抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3或4、erbB二聚体、EGFR vIII、FBP、FCRL5、FCRH5、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、 κ 轻链、Lewis Y、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、黑色素瘤相关抗原(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、优先表达的黑色素瘤抗原(PRAME)、存活蛋白、EGP2、EGP40、TAG72、B7-H6、IL-13受体a2(IL-13Ra2)、CA9、GD3、HMW-MAA、CD171、G250/CAIX、HLA-A1、HLA-A2 NY-ESO-1、PSCA、叶酸受体-a、CD44v6、CD44v7/8、 α v β 6整合素、8H9、NCAM、VEGF受体、5T4、胎儿AChR、NKG2D配体、CD44v6、双重抗原和与通用标签相关的抗原、癌症-睾丸抗原、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、癌胚胎抗原、ROR1、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、Her2/neu、雌激素受体、孕酮受体、肝配蛋白B2、CD123、c-Met、GD-2、O-乙酰化GD2(OGD2)、CE7、Wilms肿瘤1(WT-1)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、CCL-1、CD138和病原体特异性抗原。

29. 权利要求1-28中任一项的方法,其中:

所述抗原不是B细胞抗原;和/或

所述抗原不是选自CD19、CD20、CD22和ROR1的B细胞抗原。

30. 权利要求29的方法,其中:

所述抗原不是选自CD19、CD20、CD22和ROR1的B细胞抗原;和/或

所述疾病或病症不表达选自CD19、CD20、CD22和ROR1的B细胞抗原和/或 κ 轻链。

31. 权利要求1-30中任一项的方法,其中所述T细胞包含肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)或包含表达特异性结合所述抗原的重组受体的基因工程化T细胞。

32. 权利要求31的方法,其中所述T细胞包含表达特异性结合所述抗原或所述标签的重组受体的基因工程化T细胞,所述受体任选地是嵌合抗原受体。

33. 权利要求31或权利要求32的方法,其中所述重组受体是转基因T细胞受体(TCR)或功能性非T细胞受体。

34. 权利要求31-33中任一项的方法,其中所述重组受体是嵌合受体,其任选地是嵌合抗原受体(CAR)。

35. 权利要求34的方法,其中所述嵌合抗原受体(CAR)包含特异性结合所述抗原的细胞外抗原识别结构域和包含ITAM的细胞内信号传导结构域。

36. 权利要求35的方法,其中所述细胞内信号传导结构域包含CD3-zeta(CD3 ζ)链的细胞内结构域。

37. 权利要求35或权利要求36的方法,其中所述嵌合抗原受体(CAR)还包含共刺激信号传导区域。

38. 权利要求37的方法,其中所述共刺激信号传导区域包含CD28或4-1BB的信号传导结构域。

39. 权利要求37或权利要求38的方法,其中所述共刺激结构域是CD28的结构域。

40. 权利要求1-39中任一项的方法,其中所述抑制剂是小分子、肽、蛋白质、抗体或其抗原结合片段、抗体模拟物、适配体或核酸分子。

41. 权利要求1-40中任一项的方法,其中所述抑制剂不可逆地降低或消除所述靶蛋白酪氨酸激酶的激活,特异性结合所述靶蛋白酪氨酸激酶的活性位点中的结合位点,所述靶蛋白酪氨酸激酶包含对应于SEQ ID NO:18中所示序列中的残基C481的氨基酸残基,和/或

降低或消除所述靶蛋白酪氨酸激酶的自身磷酸化活性。

42. 权利要求1-41中任一项的方法,其中所述抑制剂不是依鲁替尼。

43. 权利要求1-41中任一项的方法,其中所述抑制剂不是式(II)的化合物。

44. 权利要求1-41中任一项的方法,其中所述抑制剂不是GDC-0834、RN-486、CGI-560、CGI-1764、HM-71224、CC-292、ON0-4059、CNX-774和LFM-A13。

45. 权利要求1、2-8、10-17和19-44中任一项的方法,其中与开始给予包含所述T细胞的组合物同时或在之后给予所述抑制剂。

46. 权利要求1、2-8、10-17和19-45中任一项的方法,其中在开始给予所述T细胞之后给予所述抑制剂。

47. 权利要求45或权利要求46的方法,其中在开始给予所述T细胞的1小时、2小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时或1周内或约1小时、2小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时或1周内给予所述抑制剂。

48. 权利要求45-47中任一项的方法,其中在这样的时间给予所述抑制剂,其中:

与在开始给予所述T细胞之后的在前时间点所述受试者体内的所给予的T细胞数量相比,所述受试者的血液中可检测的所给予的T细胞数量降低;

所述血液中可检测的所给予的T细胞数量是开始给予所述T细胞之后所述受试者的血液中可检测的所述T细胞疗法的细胞数量峰值或最大值的少于或少于约1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、50倍或100倍或更少;和/或

在这样的时间给予所述抑制剂:在所述受试者的血液中可检测到所给予的T细胞水平的峰值或最大值之后,所述受试者的血液中可检测的T细胞的细胞数量或源自所述T细胞的细胞数量是所述受试者的血液中总外周血单核细胞(PBMC)的少于10%、少于5%、少于1%或少于0.1%。

49. 权利要求48的方法,其中所述增加或降低大于或大于约1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍或更多。

50. 权利要求1-49中任一项的方法,其中在开始给予所述T细胞之后持续长达2天、长达7天、长达14天、长达21天、长达一个月、长达两个月、长达三个月、长达6个月或长达1年的时间段给予所述抑制剂。

51. 权利要求1、2-8、10-17和19-50中任一项的方法,其中在开始给予所述T细胞之后长达3个月给予所述抑制剂。

52. 权利要求1-51中任一项的方法,其中所述抑制剂的给予从至少在开始给予所述T细胞之后继续,直到:

与恰在给予所述抑制剂之前的在前时间点所述受试者体内的细胞数量相比或与给予所述T细胞疗法之后的在前时间点相比,所述受试者的血液中可检测的所给予的T细胞的细胞数量或源自所述T细胞的细胞数量增加;

所述血液中可检测的T细胞的细胞数量或源自所述T细胞的细胞数量是开始给予所述T细胞之后所述受试者的血液中观察到的数量峰值或最大值的2.0倍(更大或更小);

所述受试者的血液中可检测的T细胞的细胞数量是所述受试者的血液中总外周血单核细胞(PBMC)的大于或大于约10%、15%、20%、30%、40%、50%或60%;和/或

所述受试者展现出与紧接所述T细胞的给予之前或紧接所述抑制剂的给予之前的肿瘤

负荷相比肿瘤负荷的降低;和/或

所述受试者展现出完全或临床缓解。

53. 权利要求1-52中任一项的方法,其中口服、皮下或静脉内给予所述抑制剂。

54. 权利要求53的方法,其中口服给予所述抑制剂。

55. 权利要求1-54中任一项的方法,其中将所述抑制剂每天给予六次、每天给予五次、每天给予四次、每天给予三次、每天给予两次、每天给予一次、每隔一天给予、每周给予三次或每周给予至少一次。

56. 权利要求55的方法,其中将所述抑制剂每天给予一次或每天给予两次。

57. 权利要求1-56中任一项的方法,其中以至少或至少约50mg/天、100mg/天、150mg/天、175mg/天、200mg/天、250mg/天、300mg/天、350mg/天、400mg/天、450mg/天、500mg/天、600mg/天、700mg/天、800mg/天或更多的总日剂量给予所述抑制剂。

58. 权利要求1-57中任一项的方法,其中以小于或约小于或约或为420mg/天的量给予所述抑制剂。

59. 权利要求1-58中任一项的方法,其中所给予的T细胞包含作为CD4+或CD8+的T细胞。

60. 权利要求1-59中任一项的方法,其中所给予的T细胞包含对所述受试者而言自体的细胞。

61. 权利要求1-60中任一项的方法,其中所给予的T细胞包含对所述受试者而言同种异体的T细胞。

62. 权利要求1-61中任一项的方法,其中所给予的T细胞包括给予包含许多细胞的剂量,所述剂量在或在约 5×10^5 个细胞/kg受试者体重与 1×10^7 个细胞/kg之间、 0.5×10^6 个细胞/kg与 5×10^6 个细胞/kg、在或在约 0.5×10^6 个细胞/kg与 3×10^6 个细胞/kg之间、在或在约 0.5×10^6 个细胞/kg与 2×10^6 个细胞/kg之间、在或在约 0.5×10^6 个细胞/kg与 1×10^6 个细胞/kg之间、在或在约 1.0×10^6 个细胞/kg受试者体重与 5×10^6 个细胞/kg之间、在或在约 1.0×10^6 个细胞/kg与 3×10^6 个细胞/kg之间、在或在约 1.0×10^6 个细胞/kg与 2×10^6 个细胞/kg之间、在或在约 2.0×10^6 个细胞/kg受试者体重与 5×10^6 个细胞/kg之间、在或在约 2.0×10^6 个细胞/kg与 3×10^6 个细胞/kg之间或在或在约 3.0×10^6 个细胞/kg受试者体重与 5×10^6 个细胞/kg之间,每个都包含端值。

63. 权利要求1-62中任一项的方法,其中所给予的细胞剂量小于在不给予所述抑制剂的情况下给予所给予的T细胞的方法中的剂量。

64. 权利要求63的方法,其中所述剂量至少1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍或10倍。

65. 权利要求1-64中任一项的方法,其中以单一剂量给予所述T细胞,所述单一剂量任选地是包含所述细胞的单一药物组合物。

66. 权利要求1-65中任一项的方法,其中以分割剂量给予所述T细胞,其中将所述单一剂量的细胞在不超过三天的时间段内以共同包含所述细胞剂量的多个组合物来给予,和/或所述方法还包括给予一个或多个另外剂量的所述T细胞。

67. 权利要求1-66中任一项的方法,其中所述方法还包括在给予所述T细胞之前给予淋巴细胞清除化学疗法和/或其中所述受试者在给予所述T细胞之前已经接受过淋巴细胞清除化学疗法。

68. 权利要求67的方法,其中所述淋巴细胞清除化学疗法包括向所述受试者给予氟达

拉滨和/或环磷酸胺。

69. 权利要求1-68中任一项的方法, 其还包括:

向所述受试者给予免疫调节剂, 其中所述细胞的给予和所述免疫调节剂的给予同时、单独地或在单一组合物中或者以任何顺序依次进行。

70. 权利要求69的方法, 其中所述免疫调节剂能够抑制或阻断分子的功能或涉及所述分子的信号传导途径, 其中所述分子是免疫抑制分子和/或其中所述分子是免疫检查点分子。

71. 权利要求70的方法, 其中所述免疫检查点分子或途径选自PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、LAG-3、TIM3、VISTA、腺苷2A受体 (A2AR) 或腺苷或涉及任何前述物质的途径。

72. 权利要求69-71中任一项的方法, 其中所述免疫调节剂是或包含抗体, 所述抗体任选地是抗体片段、单链抗体、多特异性抗体或免疫缀合物。

73. 权利要求72的方法, 其中:

所述抗体特异性结合所述免疫检查点分子或其配体或受体; 和/或

所述抗体能够阻断或损害所述免疫检查点分子与其配体或受体之间的相互作用。

74. 权利要求1-73中任一项的方法, 其中与在不存在所述抑制剂的情况下向所述受试者给予所给予的T细胞的方法相比, 所给予的T细胞在所述受试者体内展现出增加的或延长的扩增和/或持久性。

75. 权利要求1-74中任一项的方法, 其中与采用在不存在所述抑制剂的情况下向所述受试者给予所给予的T细胞的可比较方法所观察到的降低相比, 所述方法在更大程度上和/或在更长的时间段内降低肿瘤负荷。

76. 一种组合, 其包含:

表达重组受体的基因工程化T细胞, 所述重组受体结合除B细胞抗原以外或除选自CD19、CD20、CD22和ROR1的B细胞抗原以外的抗原, 以及靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂, 其中所述抑制剂不抑制ITK和/或以大于或大于约1000nM的半最大抑制浓度 (IC₅₀) 抑制ITK和/或所述靶蛋白酪氨酸激酶是在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶 (TEC)、静息淋巴细胞激酶 (RLK/TXK)、BMX/ETK或ERBB4。

77. 权利要求76的组合, 其中所述抗原选自Her2、L1-CAM、间皮素、CEA、乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3或4、erbB二聚体、EGFR vIII、FBP、FCRL5、FCRH5、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、Lewis Y、L1细胞粘附分子 (L1-CAM)、黑色素瘤相关抗原 (MAGEMAGE-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、优先表达的黑色素瘤抗原 (PRAME)、存活蛋白、EGP2、EGP40、TAG72、B7-H6、IL-13受体 α 2 (IL-13Ra2)、CA9、GD3、HMW-MAA、CD171、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2 NY-ESO-1、PSCA、叶酸受体-a、CD44v6、CD44v7/8、avb6整合素、8H9、NCAM、VEGF受体、5T4、胎儿AChR、NKG2D配体、CD44v6、双重抗原和与通用标签相关的抗原、癌症-睾丸抗原、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、癌胚胎抗原、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原 (CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、雌激素受体、孕酮受体、肝配蛋白B2、CD123、c-Met、GD-2、O-乙酰化GD2 (OGD2)、CE7、Wilms肿瘤1 (WT-1)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、CCL-1、CD138和病原体特异性抗原。

78. 权利要求76或权利要求77的组合, 其中所述抗原是病原体特异性抗原, 其是病毒抗

原、细菌抗原或寄生虫抗原。

79. 权利要求76-78中任一项的组合,其中所述重组受体是转基因T细胞受体 (TCR) 或功能性非T细胞受体。

80. 权利要求76-79中任一项的组合,其中所述重组受体是嵌合受体,其任选地是嵌合抗原受体 (CAR)。

81. 权利要求76-80中任一项的组合,其中:

所述抑制剂是所述靶蛋白酪氨酸激酶的选择性抑制剂;和/或

所述抑制剂以比所述抑制剂对不同于所述靶蛋白酪氨酸激酶的任何蛋白酪氨酸激酶或TEC家族激酶的IC₅₀低至少10倍或至少100倍的半最大抑制浓度 (IC₅₀) 抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶,和/或以比所述抑制剂对ITK和BTK二者的IC₅₀值低至少2倍、至少10倍或至少100倍的IC₅₀抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶;和/或

所述抑制剂以小于或小于约1000nM、900nM、800nM、600nM、500nM、400nM、300nM、200nM、100nM或更小的半最大抑制浓度 (IC₅₀) 抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶。

82. 权利要求76-81中任一项的组合,其中所述抑制剂是小分子、肽、蛋白质、抗体或其抗原结合片段、抗体模拟物、适配体或核酸分子。

83. 权利要求76-82中任一项的组合,其中所述抑制剂选自式 (II) 的化合物、ONO/GS-4059、化合物30或化合物38、GDC-0834、RN-486、CGI-560、CGI-1764、HM-71224、CC-292、ONO-4059、CNX-774和LFM-A13。

84. 权利要求76-83中任一项的组合,其中所述抑制剂包含式 (II) 的化合物或其对映体、药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药或包含任何前述物质的药物组合物。

85. 权利要求76-84中任一项的组合,将其配制在同一组合物中。

86. 权利要求76-84中任一项的组合,将其配制在单独组合物中。

87. 一种试剂盒,其包含权利要求76-86中任一项的组合和用于针对治疗疾病或病症、任选地癌症向受试者给予所述基因工程化细胞和所述抑制剂的说明书。

88. 一种试剂盒,其包含:

包含治疗有效量的表达重组受体的基因工程化T细胞的组合物,所述重组受体结合除B细胞抗原以外或除选自CD19、CD20、CD22和ROR1的B细胞抗原以外的抗原;以及

用于针对治疗癌症向受试者给予所述基因工程化细胞与靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂的组合疗法的说明书,其中所述抑制剂不抑制ITK和/或以大于或大于约1000nM的半最大抑制浓度 (IC₅₀) 抑制ITK和/或所述靶蛋白酪氨酸激酶是在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶 (TEC)、静息淋巴细胞激酶 (RLK/TXK)、BMX/ETK或ERBB4。

89. 一种试剂盒,其包含:

包含治疗有效量的靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂的组合物,其中所述抑制剂不抑制ITK和/或以大于或大于约1000nM的半最大抑制浓度 (IC₅₀) 抑制ITK和/或所述靶蛋白酪氨酸激酶是在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶 (TEC)、静息淋巴细胞激酶 (RLK/TXK)、BMX/ETK或ERBB4;以及

用于针对治疗疾病或病症、任选地癌症向受试者给予所述抑制剂与基因工程化T细胞的组合疗法的说明书,所述T细胞表达结合除B细胞抗原以外或除选自CD19、CD20、CD22和

ROR1的B细胞抗原以外的抗原的重组受体。

90. 权利要求87-89中任一项的试剂盒,其中所述癌症不是表达B细胞抗原的癌症,是非血液癌,不是B细胞恶性肿瘤,不是B细胞白血病,或者是实体瘤。

91. 权利要求87-89中任一项的试剂盒,其中所述癌症是肉瘤、癌或淋巴瘤任选地非霍奇金淋巴瘤(NHL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、白血病、CLL、ALL、AML和骨髓瘤。

92. 权利要求87-91中任一项的试剂盒,其中所述癌症是胰腺癌、膀胱癌、结直肠癌、乳腺癌、前列腺癌、肾癌、肝细胞癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、胰腺癌、直肠癌、甲状腺癌、子宫癌、胃癌、食管癌、头颈癌、黑色素瘤、神经内分泌癌、CNS癌症、脑肿瘤、骨癌或软组织肉瘤。

93. 权利要求87-92中任一项的试剂盒,其中(i)所述受试者和/或所述疾病或病症(a)对布鲁顿酪氨酸激酶(BTK)的抑制具有抗性和/或(b)包含对所述抑制剂的抑制具有抗性的细胞群;

(ii)所述受试者和/或所述疾病或病症在编码BTK的核酸中包含能够降低或防止所述抑制剂和/或依鲁替尼对BTK的抑制的突变或破坏;和/或

(iii)在所述给予时,所述受试者在用所述抑制剂治疗和/或用BTK抑制剂疗法治疗后发生缓解后复发,或者已经被认为对用所述抑制剂治疗和/或用BTK抑制剂疗法治疗是难治性的。

94. 权利要求93的方法,其中所述细胞群是或包含B细胞群和/或不包含T细胞。

95. 权利要求93或权利要求94的试剂盒,其中编码BTK的核酸中的所述突变包含位置C481、任选地C481S或C481R处的取代,和/或位置T474、任选地T474I或T474M处的取代。

96. 权利要求87-95中任一项的试剂盒,其中所述抗原选自Her2、L1-CAM、间皮素、CEA、乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3或4、erbB二聚体、EGFR vIII、FBP、FCRL5、FCRH5、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、Lewis Y、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、黑色素瘤相关抗原(MAGEMAGE-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、优先表达的黑色素瘤抗原(PRAME)、存活蛋白、EGP2、EGP40、TAG72、B7-H6、IL-13受体 α 2(IL-13Ra2)、CA9、GD3、HMW-MAA、CD171、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2NY-ESO-1、PSCA、叶酸受体-a、CD44v6、CD44v7/8、avb6整合素、8H9、NCAM、VEGF受体、5T4、胎儿AchR、NKG2D配体、CD44v6、双重抗原和与通用标签相关的抗原、癌症-睾丸抗原、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、癌胚胎抗原、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、雌激素受体、孕酮受体、肝配蛋白B2、CD123、c-Met、GD-2、O-乙酰化GD2(OGD2)、CE7、Wilms肿瘤1(WT-1)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、CCL-1、CD138和病原体特异性抗原。

97. 权利要求87-96中任一项的试剂盒,其中所述抗原是病原体特异性抗原,其是病毒抗原、细菌抗原或寄生虫抗原。

98. 权利要求87-97中任一项的试剂盒,其中所述重组受体是转基因T细胞受体(TCR)或功能性非T细胞受体。

99. 权利要求87-98中任一项的试剂盒,其中所述重组受体是嵌合受体,其任选地是嵌合抗原受体(CAR)。

100. 权利要求87-99中任一项的试剂盒,其中:

所述抑制剂是所述靶蛋白酪氨酸激酶的选择性抑制剂;和/或

所述抑制剂以比所述抑制剂对不同于所述靶蛋白酪氨酸激酶的任何蛋白酪氨酸激酶或TEC家族激酶的 IC_{50} 低至少10倍或至少100倍的半最大抑制浓度(IC_{50})抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶,和/或以比所述抑制剂对ITK和BTK二者的 IC_{50} 值低至少2倍、至少10倍或至少100倍的 IC_{50} 抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶;和/或

所述抑制剂以小于或小于约1000nM、900nM、800nM、600nM、500nM、400nM、300nM、200nM、100nM或更小的半最大抑制浓度(IC_{50})抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶。

101. 权利要求87-100中任一项的试剂盒,其中所述抑制剂是小分子、肽、蛋白质、抗体或其抗原结合片段、抗体模拟物、适配体或核酸分子。

102. 权利要求87-101中任一项的试剂盒,其中所述抑制剂选自式(II)的化合物、ONO/GS-4059、化合物30或化合物38、GDC-0834、RN-486、CGI-560、CGI-1764、HM-71224、CC-292、ONO-4059、CNX-774和LFM-A13。

103. 权利要求87-102中任一项的试剂盒,其中所述抑制剂包含式(II)的化合物或其对映体、药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药或包含任何前述物质的药物组合物。

104. 权利要求87-103中任一项的试剂盒,其中所述说明书用于与开始给予包含所述T细胞的组合物同时或在之后给予所述抑制剂。

105. 权利要求87-104中任一项的试剂盒,其中所述说明书用于在开始给予所述T细胞之后给予所述抑制剂。

106. 权利要求104或权利要求105的试剂盒,其中所述说明书用于在开始给予所述T细胞的1小时、2小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时或1周内或约1小时、2小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时或1周内给予所述抑制剂。

107. 权利要求104-106中任一项的试剂盒,其中所述说明书用于在这样的时间给予所述抑制剂,其中:

与在开始给予所述T细胞之后的在前时间点所述受试者体内的细胞数量相比,所述受试者的血液中可检测的所述T细胞疗法的细胞数量降低;

所述血液中可检测的所述T细胞疗法的细胞数量是开始给予所述T细胞之后所述受试者的血液中可检测的所述T细胞疗法的细胞数量峰值或最大值的少于或少于约1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、50倍或100倍或更少;和/或

在这样的时间给予所述抑制剂;在所述受试者的血液中可检测到所述T细胞疗法的细胞水平的峰值或最大值之后,所述受试者的血液中可检测的T细胞的细胞数量或源自所述T细胞的细胞数量是所述受试者的血液中总外周血单核细胞(PBMC)的少于10%、少于5%、少于1%或少于0.1%。

108. 权利要求107的试剂盒,其中所述增加或降低大于或大于约1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍或更多。

109. 权利要求87-108中任一项的试剂盒,其中所述说明书用于在开始给予所述T细胞之后持续长达2天、长达7天、长达14天、长达21天、长达一个月、长达两个月、长达三个月、长达6个月或长达1年的时间段给予所述抑制剂。

110. 权利要求87-109中任一项的试剂盒,其中所述说明书用于从至少在开始给予所述T细胞之后进一步给予所述抑制剂,直到:

与恰在给予所述抑制剂之前的在前时间点所述受试者体内的细胞数量相比或与给予所述T细胞疗法之后的在前时间点相比,所述受试者的血液中可检测的所给予的T细胞的细胞数量或源自所述T细胞的细胞数量增加;

所述血液中可检测的T细胞的细胞数量或源自所述T细胞的细胞数量是开始给予所述T细胞之后所述受试者的血液中观察到的数量峰值或最大值的2.0倍(更大或更小);

所述受试者的血液中可检测的T细胞的细胞数量是所述受试者的血液中总外周血单核细胞(PBMC)的大于或大于约10%、15%、20%、30%、40%、50%或60%;和/或

所述受试者展现出与紧接所述T细胞的给予之前或紧接所述抑制剂的给予之前的肿瘤负荷相比肿瘤负荷的降低;和/或

所述受试者展现出完全或临床缓解。

111. 权利要求87-110中任一项的试剂盒,其中所述基因工程化T细胞包含对所述受试者而言自体的细胞。

112. 权利要求87-111中任一项的试剂盒,其中所述基因工程化T细胞包含对所述受试者而言同种异体的T细胞。

113. 一种工程化表达重组受体的免疫细胞的方法,其包括:

使包含T细胞的细胞群与靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂接触,其中所述抑制剂不抑制ITK和/或以大于或大于约1000nM的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制ITK和/或所述靶蛋白酪氨酸激酶是在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶(TEC)、静息淋巴细胞激酶(RLK/TXK)、BMX/ETK或ERBB4;以及

在使得表达重组受体的条件下将编码所述重组受体的核酸引入所述T细胞群中。

114. 权利要求113的方法,其中所述细胞群是或包含T细胞,任选地CD4⁺或CD8⁺。

115. 权利要求113或权利要求114的方法,其中所述从受试者、细胞群任选地人受试者分离。

116. 权利要求113-115中任一项的方法,其中所述接触发生在所述引入之前和/或期间。

117. 一种产生基因工程化T细胞的方法,其包括将编码重组受体的核酸分子引入原代T细胞中,其中所述T细胞来自已经被给予靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂的受试者,其中所述抑制剂不抑制ITK和/或以大于或大于约1000nM的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制ITK和/或所述靶蛋白酪氨酸激酶是在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶(TEC)、静息淋巴细胞激酶(RLK/TXK)、BMX/ETK或ERBB4。

118. 权利要求117的方法,其中在引入所述核酸分子之前不超过30天、20天、10天、9天、8天、7天、6天、5天、4天、3天、2天或1天已经向所述受试者给予所述抑制剂。

119. 权利要求113-118中任一项的方法,其中:

所述抑制剂是所述靶蛋白酪氨酸激酶的选择性抑制剂;和/或

所述抑制剂以比所述抑制剂对不同于所述靶蛋白酪氨酸激酶的任何蛋白酪氨酸激酶或TEC家族激酶的IC₅₀低至少10倍或至少100倍的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶,和/或以比所述抑制剂对ITK和BTK二者的IC₅₀值低至少2倍、至少10倍或至少100倍的IC₅₀抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶;和/或

所述抑制剂以小于或小于约1000nM、900nM、800nM、600nM、500nM、400nM、300nM、200nM、

100nM或更小的半最大抑制浓度 (IC₅₀) 抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶。

120. 权利要求113-119中任一项的方法, 其中所述抑制剂是小分子、肽、蛋白质、抗体或其抗原结合片段、抗体模拟物、适配体或核酸分子。

121. 权利要求113-120中任一项的方法, 其中所述抑制剂选自式 (II) 的化合物、ONO/GS-4059、化合物30或化合物38、GDC-0834、RN-486、CGI-560、CGI-1764、HM-71224、CC-292、ONO-4059、CNX-774和LFM-A13。

122. 权利要求113-121中任一项的方法, 其中所述抑制剂包含式 (II) 的化合物或其对映体、药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药或包含任何前述物质的药物组合物。

123. 权利要求113-122中任一项的方法, 其中所述T细胞包含CD4⁺或CD8⁺细胞。

用于与激酶抑制剂组合使用治疗性T细胞的方法和组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2016年12月3日提交的标题为“用于与激酶抑制剂组合使用治疗性T细胞的方法和组合物”(Methods and Compositions for Use of Therapeutic T cells in Combination with Kinase Inhibitors)的美国临时申请号62/429,732和2017年11月3日提交的标题为“用于与激酶抑制剂组合使用治疗性T细胞的方法和组合物”(Methods and Compositions for Use of Therapeutic T cells in Combination with Kinase Inhibitors)的美国临时申请号62/581,644的优先权,将其内容通过引用整体并入。

[0003] 通过引用并入序列表

[0004] 本申请是连同电子格式的序列表一起提交的。序列表以2017年11月29日创建的名称为735042008940seqlist.txt的文件提供,其大小为24,225字节。将所述序列表的电子格式的信息通过引用以其整体并入。

技术领域

[0005] 本公开文本在一些方面涉及方法、组合物和用途,所述方法、组合物和用途涉及与靶激酶(如靶蛋白酪氨酸激酶)的调节剂(例如,抑制剂)组合或结合的免疫疗法(如过继细胞疗法,例如T细胞疗法)。还提供了制备此类工程化细胞的方法、细胞、组合物,如在存在一种或多种激酶抑制剂的情况下产生所述细胞的方法。还提供了向受试者给予的方法、用于所述方法中的核酸、制品和试剂盒。

背景技术

[0006] 多种策略可用于免疫疗法,例如,涉及给予T细胞(如表达基因工程化抗原受体(如CAR)的那些)的过继细胞疗法。在一些方面,可用的方法可能不完全令人满意。需要用于免疫疗法和过继细胞疗法的另外的策略,例如增强所给予的细胞的持久性、活性和/或增殖和反应的策略以及用于调节T细胞表型的策略。提供了满足此类需求的方法、细胞、组合物、试剂盒和系统。

发明内容

[0007] 本文提供了增强或调节与免疫疗法或免疫治疗剂的给予相关的T细胞的增殖和/或活性的方法,所述免疫治疗剂是例如包含用于过继细胞疗法(例如像T细胞疗法)的细胞(例如表达CAR的T细胞)的组合物,或能够募集一种或多种T细胞或其他免疫细胞的T细胞接合治疗剂,如双特异性或多特异性药剂或抗体。在一些方面,此类方法包括组合给予所述免疫疗法或免疫治疗剂和一种或多种非受体蛋白酪氨酸激酶(如TEC家族激酶)的抑制剂。在一些方面,所述蛋白酪氨酸激酶不是IL-2诱导型T细胞激酶(不是ITK)和/或所述抑制剂不抑制ITK,例如不抑制ITK,其中IC₅₀值小于1000或小于500nM。在一些方面,所述靶蛋白酪氨酸激酶是布鲁顿酪氨酸激酶(BTK)、tec蛋白酪氨酸激酶(TEC)、BMX非受体酪氨酸激酶(Etk)、TXK酪氨酸激酶(TXK)和/或受体酪氨酸蛋白激酶ErbB4(ErbB4)。所提供的方法、组合

物和用途包括用于组合疗法的那些方法、组合物和用途,所述组合疗法涉及一种或多种这样的抑制剂与另一种药剂和/或含有免疫细胞(如T细胞,如基因工程化T细胞,如表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞)的治疗性组合物的结合给予或使用,所述另一种药剂是例如涉及、募集或接合靶向疾病或病症的T细胞的免疫治疗剂,如治疗性抗体,例如多特异性(例如,T细胞接合)抗体。在一些方面,所述方法和细胞的特征为过继细胞疗法的T细胞或通过免疫治疗剂募集的内源T细胞提供了增加或改善的活性、功效、持久性、扩增和/或增殖。

[0008] 在一些实施方案中,所述方法通常涉及给予免疫疗法或免疫治疗剂和靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂的组合疗法,所述免疫治疗剂是例如包含用于过继细胞疗法(例如像T细胞疗法)的细胞(例如表达CAR的T细胞)的组合物或T细胞接合治疗剂,所述靶蛋白酪氨酸激酶不是IL-2诱导型T细胞激酶(ITK)和/或其中所述靶蛋白酪氨酸激酶选自布鲁顿酪氨酸激酶(BTK)、tec蛋白酪氨酸激酶(TEC)、BMX非受体酪氨酸激酶(Etk)、TXK酪氨酸激酶(TXK)和/或受体酪氨酸蛋白激酶ErbB4(ErbB4)。

[0009] 本文提供了治疗方法,其涉及:(a)向患有疾病或病症的受试者给予T细胞,所述T细胞特异性识别或特异性结合与所述疾病或病症相关或在所述疾病或病症的细胞上表达或存在的抗原和/或由特异性靶向所述疾病或病症并且已经或将要给予所述受试者的治疗剂包含的标签;以及(b)向所述受试者给予靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂,其中所述抑制剂不抑制ITK和/或以大于或大于约1000nM的半最大抑制浓度(IC50)抑制ITK,其中所述疾病或病症(i)不是B细胞来源的疾病或病症(ii)与CD19、CD22或CD20的表达无关;(iii)不表达所述靶蛋白酪氨酸激酶,(iv)不含有对所述抑制剂敏感的所述靶蛋白酪氨酸激酶的形式,(v)不含有对所述抑制剂敏感的激酶和/或(vi)对所述抑制剂的抑制不敏感和/或其中所述受试者或疾病或病症对所述抑制剂和/或对BTK的抑制剂具有抗性 or 难治性和/或其中所述蛋白酪氨酸激酶在所述疾病或病症所来源的细胞中通常不表达或不被怀疑表达。

[0010] 在一些方面,提供了治疗方法,其涉及向患有疾病或病症的受试者给予T细胞,所述T细胞特异性识别或特异性结合与所述疾病或病症相关或在所述疾病或病症的细胞上表达或存在的抗原和/或由特异性靶向所述疾病或病症并且已经或将要给予所述受试者的治疗剂包含的标签,其中:已经向所述受试者给予靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂,其中所述抑制剂不抑制ITK和/或以大于或大于约1000nM的半最大抑制浓度(IC50)抑制ITK;并且所述疾病或病症(i)不是B细胞来源的疾病或病症(ii)与CD19、CD22或CD20的表达无关;(iii)不表达所述蛋白酪氨酸激酶,(iv)不含有对所述抑制剂敏感的所述靶蛋白酪氨酸激酶的形式,(v)不含有对所述抑制剂敏感的激酶和/或(vi)对所述抑制剂的抑制不敏感和/或其中所述受试者或疾病或病症对所述抑制剂和/或对BTK的抑制剂具有抗性 or 难治性和/或其中所述蛋白酪氨酸激酶在所述疾病或病症所来源的细胞中通常不表达或不被怀疑表达。

[0011] 本文提供了治疗方法,其涉及向患有疾病或病症的受试者给予靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂,其中所述抑制剂不抑制ITK和/或以大于或大于约1000nM的半最大抑制浓度(IC50)抑制ITK,其中:已经向所述受试者给予T细胞,所述T细胞特异性识别或特异性结合与所述疾病或病症相关或在所述疾病或病症的细胞上表达或存在的抗原和/或由特异性靶向所述疾病或病症并且已经或将要给予所述受试者的治疗剂包含的标签;并且所述疾病或病症(i)不是B细胞来源的疾病或病症(ii)与CD19、CD22或CD20的表达无关;(iii)不表达所述靶蛋白酪氨酸激酶,(iv)不含有对所述抑制剂敏感的所述靶蛋白酪氨酸激酶的形式,(v)

不含有对所述抑制剂敏感的激酶和/或(vi)对所述抑制剂的抑制不敏感和/或其中所述受试者或疾病或病症对所述抑制剂和/或对BTK的抑制剂具有抗性 or 难治性和/或其中所述TEC家族激酶在所述疾病或病症所来源的细胞中通常不表达或不被怀疑表达。

[0012] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,所述靶蛋白酪氨酸激酶是在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶(TEC)、静息淋巴细胞激酶(RLK/TXK)、BMX/ETK或ERBB4。在一些实施方案中,所述靶蛋白酪氨酸激酶是TEC家族激酶。

[0013] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,所述抑制剂选自式(II)、ON0/GS-4059、化合物30或化合物38、GDC-0834、RN-486、CGI-560、CGI-1764、HM-71224、CC-292、ON0-4059、CNX-774和LFM-A13。

[0014] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,所述抑制剂是所述靶蛋白酪氨酸激酶的选择性抑制剂。在一些实施方案中,所述抑制剂以比所述抑制剂对任何另外的蛋白酪氨酸激酶或TEC家族激酶的IC₅₀低至少10倍或至少100倍的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶,和/或以比所述抑制剂对ITK和BTK二者的IC₅₀值低至少2倍、至少10倍或至少100倍的IC₅₀抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶。在一些实施方案中,所述抑制剂以小于或小于约1000nM、900nM、800nM、600nM、500nM、400nM、300nM、200nM、100nM或更小的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶。

[0015] 本文提供了方法,其涉及:(1)向患有疾病或病症的受试者给予T细胞,所述T细胞特异性识别或特异性结合与所述疾病或病症相关的抗原和/或由特异性靶向所述疾病或病症并且已经或将要给予所述受试者的治疗剂包含的标签;以及(2)向所述受试者给予靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂,所述靶蛋白酪氨酸激酶是在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶(TEC)、静息淋巴细胞激酶(RLK/TXK)、BMX/ETK或ERBB4。在一些实施方案中,所述抑制剂是所述靶蛋白酪氨酸激酶的选择性抑制剂。在一些实施方案中,所述抑制剂以比所述抑制剂对不同于所述靶蛋白酪氨酸激酶的任何蛋白酪氨酸激酶或TEC家族激酶的IC₅₀低至少10倍或至少100倍的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶,和/或以比所述抑制剂对ITK和BTK二者的IC₅₀值低至少2倍、至少10倍或至少100倍的IC₅₀抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶。在一些实施方案中,所述抑制剂以小于或小于约1000nM、900nM、800nM、600nM、500nM、400nM、300nM、200nM、100nM或更小的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶。

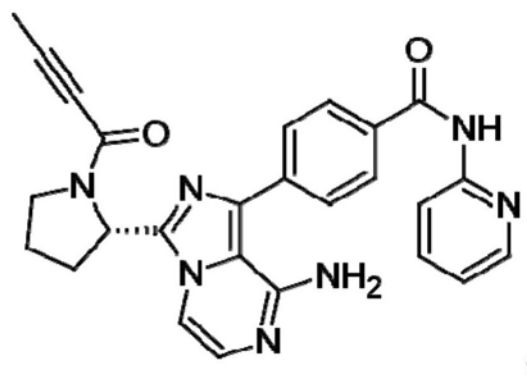
[0016] 本文提供了方法,其涉及向患有疾病或病症的受试者给予T细胞,所述T细胞特异性识别或特异性结合与所述疾病或病症相关的抗原和/或由特异性靶向所述疾病或病症并且已经或将要给予所述受试者的治疗剂包含的标签,已经向所述受试者给予靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂,所述靶蛋白酪氨酸激酶是在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶(TEC)、静息淋巴细胞激酶(RLK/TXK)、BMX/ETK或ERBB4。在一些实施方案中,所述抑制剂是所述靶蛋白酪氨酸激酶的选择性抑制剂。在本文提供的任何方法的一些实施方案中,所述抑制剂以比所述抑制剂对不同于所述靶蛋白酪氨酸激酶的任何蛋白酪氨酸激酶或TEC家族激酶的IC₅₀低至少10倍或至少100倍的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶,和/或以比所述抑制剂对ITK和BTK二者的IC₅₀值低至少2倍、至少10倍或至少100倍的IC₅₀抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶。在本文提供的任何方法的一些实施方案中,所述抑制剂以小于或小于约1000nM、900nM、800nM、600nM、500nM、400nM、300nM、200nM、100nM或更小的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶。

[0017] 本文提供了治疗方法,其涉及向患有疾病或病症的受试者给予靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂,所述靶蛋白酪氨酸激酶是在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶(TEC)、静息淋巴细胞激酶(RLK/TXK)、BMX/ETK或ERBB4,已经向所述受试者给予特异性识别或特异性结合与所述疾病或病症相关的抗原和/或由特异性靶向所述疾病或病症并且已经或将要给予所述受试者的治疗剂包含的标签的T细胞。在一些实施方案中,所述抑制剂是所述靶蛋白酪氨酸激酶的选择性抑制剂。在本文提供的任何方法的一些实施方案中,所述抑制剂以比所述抑制剂对不同于所述靶蛋白酪氨酸激酶的任何蛋白酪氨酸激酶或TEC家族激酶的IC₅₀低至少10倍或至少100倍的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶,和/或以比所述抑制剂对ITK和BTK二者的IC₅₀值低至少2倍、至少10倍或至少100倍的IC₅₀抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶。在本文提供的任何方法的一些实施方案中,所述抑制剂以小于或小于约1000nM、900nM、800nM、600nM、500nM、400nM、300nM、200nM、100nM或更小的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶。

[0018] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,所述疾病或病症(i)不是B细胞来源的疾病或病症(ii)与CD19、CD22或CD20的表达无关;(iii)不表达所述靶蛋白酪氨酸激酶,(iv)不含有对所述抑制剂敏感的所述靶蛋白酪氨酸激酶的形式,(v)不含有对所述抑制剂敏感的激酶和/或(vi)对所述抑制剂的抑制不敏感和/或其中所述受试者或疾病或病症对所述抑制剂和/或对BTK的抑制剂具有抗性 or 难治性和/或所述靶激酶在所述疾病或病症所来源的细胞中通常不表达或不被怀疑表达。在本文提供的任何方法的一些实施方案中,所述靶蛋白酪氨酸激酶是RLK/TXK。

[0019] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,所述靶蛋白酪氨酸激酶是BMX/ETK,并且所述抑制剂以比所述抑制剂对任何其他TEC家族激酶和/或对ITK的IC₅₀低至少10倍或至少100倍的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制Bmx/Etk,和/或以小于或小于约1000nM、900nM、800nM、600nM、500nM、400nM、300nM、200nM、100nM或更小的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制Bmx/Etk。在本文提供的任何方法的一些实施方案中,所述靶激酶是或含有ErbB4。

[0020] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,所述抑制剂含有式(II)的化合物:



或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共

(II)

晶、多晶型物或前药。

[0021] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,所述抑制剂含有式(II)的化合物或其对映体、药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药或包含任何前述物质的药物组合物。

[0022] 在一些方面,提供了治疗方法,其涉及(1)向患有疾病或病症的受试者给予T细胞,所述T细胞包含特异性结合与所述疾病或病症相关的抗原和/或由特异性靶向所述疾病或

病症并且已经或将要给予所述受试者的治疗剂包含的标签的重组抗原受体;以及(2)向所述受试者给予激酶抑制剂或包含所述抑制剂的药物组合物,其中所述抑制剂含有式(II)的化合物或其对映体、药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。

[0023] 在一些方面,提供了治疗方法,其涉及向患有疾病或病症的受试者给予T细胞,所述T细胞包含特异性结合与所述疾病或病症相关的抗原和/或由特异性靶向所述疾病或病症并且已经或将要给予所述受试者的治疗剂包含的标签的重组抗原受体,已经向所述受试者给予激酶抑制剂或包含所述抑制剂的药物组合物,其中所述抑制剂含有式(II)的化合物或其对映体、药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。

[0024] 在一些方面,提供了治疗方法,其涉及向患有疾病或病症的受试者给予激酶抑制剂或包含所述抑制剂的药物组合物,其中所述抑制剂含有式(II)的化合物或其对映体、药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药,已经向所述受试者给予包含特异性结合与所述疾病或病症相关的抗原和/或由特异性靶向所述疾病或病症并且已经或将要给予所述受试者的治疗剂包含的标签的重组抗原受体的T细胞。

[0025] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,所述疾病或病症是癌症。

[0026] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,(i)所述受试者和/或所述疾病或病症(a)对布鲁顿酪氨酸激酶(BTK)的抑制具有抗性和/或(b)包含对所述抑制剂的抑制具有抗性的细胞群;(ii)所述受试者和/或所述疾病或病症在编码BTK的核酸中含有能够降低或防止所述抑制剂和/或依鲁替尼对BTK的抑制的突变或破坏;和/或(iii)在(1)中给予时和在(2)中给予时,所述受试者在用所述抑制剂治疗和/或用BTK抑制剂疗法治疗后发生缓解后复发,或者已经被认为对用所述抑制剂治疗和/或用BTK抑制剂疗法治疗是难治性的。在一些实施方案中,所述细胞群是或包含B细胞群和/或不包括T细胞。在一些实施方案中,编码BTK的核酸中的所述突变含有位置C48I、任选地C48IS或C48IR处的取代,和/或位置T474、任选地T474I或T474M处的取代。

[0027] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,所述靶蛋白酪氨酸激酶不由所述疾病或病症的细胞表达,在所述疾病或病症所来源的细胞中通常不表达或不被怀疑表达,和/或所述疾病或病症对所述抑制剂不敏感;和/或至少多个所述T细胞表达所述靶蛋白酪氨酸激酶;和/或所述靶蛋白酪氨酸激酶在T细胞中表达。

[0028] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,所述疾病或病症是不表达B细胞抗原的癌症,是非血液癌,不是B细胞恶性肿瘤,不是B细胞白血病,或者是实体瘤。

[0029] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,所述疾病或病症是选自肉瘤、癌、淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、白血病、CLL、ALL、AML和骨髓瘤的癌症。

[0030] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,所述疾病或病症是胰腺癌、膀胱癌、结直肠癌、乳腺癌、前列腺癌、肾癌、肝细胞癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、胰腺癌、直肠癌、甲状腺癌、子宫癌、胃癌、食管癌、头颈癌、黑色素瘤、神经内分泌癌、CNS癌症、脑肿瘤、骨癌或软组织肉瘤。

[0031] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,所述T细胞识别或靶向选自以下的抗原:ROR1、B细胞成熟抗原(BCMA)、tEGFR、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、间皮素、CEA和乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、

ErbB2、3或4、erbB二聚体、EGFR vIII、FBP、FCRL5、FCRH5、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、 κ 轻链、Lewis Y、L1细胞粘附分子 (L1-CAM)、黑色素瘤相关抗原 (MAGE) -A1、MAGE-A3、MAGE-A6、优先表达的黑色素瘤抗原 (PRAME)、存活蛋白、EGP2、EGP40、TAG72、B7-H6、IL-13受体 α 2 (IL-13Ra2)、CA9、GD3、HMW-MAA、CD171、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2NY-ESO-1、PSCA、叶酸受体-a、CD44v6、CD44v7/8、avb6整合素、8H9、NCAM、VEGF受体、5T4、胎儿AchR、NKG2D配体、CD44v6、双重抗原和与通用标签相关的抗原、癌症-睾丸抗原、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、癌胚胎抗原、ROR1、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原 (CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、Her2/neu、雌激素受体、孕酮受体、肝配蛋白B2、CD123、c-Met、GD-2、O-乙酰化GD2 (OGD2)、CE7、Wilms肿瘤1 (WT-1)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、CCL-1、CD138和病原体特异性抗原。

[0032] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,所述抗原不是B细胞抗原;和/或所述抗原不是选自CD19、CD20、CD22和ROR1的B细胞抗原。在一些实施方案中,所述抗原不是选自CD19、CD20、CD22和ROR1的B细胞抗原;和/或所述疾病或病症不表达选自CD19、CD20、CD22和ROR1的B细胞抗原和/或 κ 轻链。

[0033] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,所述T细胞含有肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 或含有表达特异性结合所述抗原的重组受体的基因工程化T细胞。在一些实施方案中,所述T细胞包含表达特异性结合所述抗原或所述标签的重组受体的基因工程化T细胞,所述受体任选地是嵌合抗原受体。在一些实施方案中,所述重组受体是转基因T细胞受体 (TCR) 或功能性非T细胞受体。在一些实施方案中,所述重组受体是嵌合受体,其任选地是嵌合抗原受体 (CAR)。在一些实施方案中,所述嵌合抗原受体 (CAR) 包括特异性结合所述抗原的细胞外抗原识别结构域和包含ITAM的细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,所述细胞内信号传导结构域包括CD3-zeta (CD3 ζ) 链的细胞内结构域。在一些实施方案中,所述嵌合抗原受体 (CAR) 还含有共刺激信号传导区域。在一些实施方案中,所述共刺激信号传导区域含有CD28或4-1BB的信号传导结构域。在一些实施方案中,所述共刺激结构域是CD28的结构域。

[0034] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,所述抑制剂是小分子、肽、蛋白质、抗体或其抗原结合片段、抗体模拟物、适配体或核酸分子。

[0035] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,所述抑制剂不可逆地降低或消除所述靶蛋白酪氨酸激酶的激活,特异性结合所述靶蛋白酪氨酸激酶的活性位点中的结合位点,所述靶蛋白酪氨酸激酶包含对应于SEQ ID NO:18中所示序列中的残基C481的氨基酸残基,和/或降低或消除所述靶蛋白酪氨酸激酶的自身磷酸化活性。

[0036] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,所述抑制剂不是依鲁替尼。在本文提供的任何方法的一些实施方案中,所述抑制剂不是式 (II) 的化合物。在本文提供的任何方法的一些实施方案中,所述抑制剂不是GDC-0834、RN-486、CGI-560、CGI-1764、HM-71224、CC-292、ONO-4059、CNX-774和LFM-A13。

[0037] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,与开始给予包含所述T细胞的组合物同时或在之后给予所述抑制剂。

[0038] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,在开始给予所述T细胞之后给予所述抑制剂。

[0039] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,在开始给予所述T细胞的1小时、2小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时或1周内或约1小时、2小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时或1周内给予所述抑制剂。

[0040] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,在这样的时间给予所述抑制剂,其中:与在开始给予所述T细胞之后的在前时间点所述受试者体内的所给予的T细胞数量相比,所述受试者的血液中可检测的所给予的T细胞数量降低;所述血液中可检测的所给予的T细胞数量是开始给予所述T细胞之后所述受试者的血液中可检测的所述T细胞疗法的细胞数量峰值或最大值的少于或少于约1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、50倍或100倍或更少;和/或在这样的时间给予所述抑制剂:在所述受试者的血液中可检测到所给予的T细胞水平的峰值或最大值之后,所述受试者的血液中可检测的T细胞的细胞数量或源自所述T细胞的细胞数量是所述受试者的血液中总外周血单核细胞(PBMC)的少于10%、少于5%、少于1%或少于0.1%。

[0041] 在一些实施方案中,所述增加或降低大于或大于约1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍或更多。

[0042] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,在开始给予所述T细胞之后持续长达2天、长达7天、长达14天、长达21天、长达一个月、长达两个月、长达三个月、长达6个月或长达1年的时间段给予所述抑制剂。

[0043] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,在开始给予所述T细胞之后长达3个月给予所述抑制剂。

[0044] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,所述抑制剂的给予从至少在开始给予所述T细胞之后继续,直到:与恰在给予所述抑制剂之前的在前时间点所述受试者体内的细胞数量相比或与给予所述T细胞疗法之后的在前时间点相比,所述受试者的血液中可检测的所给予的T细胞的细胞数量或源自所述T细胞的细胞数量增加;所述血液中可检测的T细胞的细胞数量或源自所述T细胞的细胞数量是开始给予所述T细胞之后所述受试者的血液中观察到的数量峰值或最大值的2.0倍(更大或更小);所述受试者的血液中可检测的T细胞的细胞数量是所述受试者的血液中总外周血单核细胞(PBMC)的大于或大于约10%、15%、20%、30%、40%、50%或60%;和/或所述受试者展现出与紧接所述T细胞的给予之前或紧接所述抑制剂的给予之前的肿瘤负荷相比肿瘤负荷的降低;和/或所述受试者展现出完全或临床缓解。

[0045] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,口服、皮下或静脉内给予所述抑制剂。在一些实施方案中,口服给予所述抑制剂。

[0046] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,将所述抑制剂每天给予六次、每天给予五次、每天给予四次、每天给予三次、每天给予两次、每天给予一次、每隔一天给予、每周给予三次或每周给予至少一次。在本文提供的任何方法的一些实施方案中,将所述抑制剂每天给予一次或每天给予两次。

[0047] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,以至少或至少约50mg/天、100mg/天、150mg/天、175mg/天、200mg/天、250mg/天、300mg/天、350mg/天、400mg/天、450mg/天、500mg/天、600mg/天、700mg/天、800mg/天或更多的总日剂量给予所述抑制剂。在一些实施方案中,以小于或约小于或约或为420mg/天的量给予所述抑制剂。

[0048] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,所给予的T细胞含有作为CD4⁺或CD8⁺的T细胞。在本文提供的任何方法的一些实施方案中,所给予的T细胞含有对所述受试者而言自体的细胞。在本文提供的任何方法的一些实施方案中,所给予的T细胞含有对所述受试者而言同种异体的T细胞。在本文提供的任何方法的一些实施方案中,所给予的T细胞包括给予包含许多细胞的剂量,所述剂量在或在约 5×10^5 个细胞/kg受试者体重与 1×10^7 个细胞/kg之间、 0.5×10^6 个细胞/kg与 5×10^6 个细胞/kg、在或在约 0.5×10^6 个细胞/kg与 3×10^6 个细胞/kg之间、在或在约 0.5×10^6 个细胞/kg与 2×10^6 个细胞/kg之间、在或在约 0.5×10^6 个细胞/kg与 1×10^6 个细胞/kg之间、在或在约 1.0×10^6 个细胞/kg受试者体重与 5×10^6 个细胞/kg之间、在或在约 1.0×10^6 个细胞/kg与 3×10^6 个细胞/kg之间、在或在约 1.0×10^6 个细胞/kg与 2×10^6 个细胞/kg之间、在或在约 2.0×10^6 个细胞/kg受试者体重与 5×10^6 个细胞/kg之间、在或在约 2.0×10^6 个细胞/kg与 3×10^6 个细胞/kg之间或在或在约 3.0×10^6 个细胞/kg受试者体重与 5×10^6 个细胞/kg之间,每个都包含端值。

[0049] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,所给予的细胞剂量小于在不给予所述抑制剂的情况下给予所给予的T细胞的方法中的剂量。在一些实施方案中,所述剂量至少1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍或10倍。

[0050] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,以单一剂量给予所述T细胞,所述单一剂量任选地是包含所述细胞的单一药物组合物。

[0051] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,以分割剂量给予所述T细胞,其中将所述单一剂量的细胞在不超过三天的时间段内以共同包含所述细胞剂量的多个组合物来给予,和/或所述方法还包括给予一个或多个另外剂量的所述T细胞。

[0052] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,所述方法还包括在给予所述T细胞之前给予淋巴细胞清除化学疗法和/或其中所述受试者在给予所述T细胞之前已经接受过淋巴细胞清除化学疗法。

[0053] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,所述淋巴细胞清除化学疗法包括向所述受试者给予氟达拉滨和/或环磷酰胺。

[0054] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,所述方法还包括:向所述受试者给予免疫调节剂,其中所述细胞的给予和所述免疫调节剂的给予同时、单独地或在单一组合物中或者以任何顺序依次进行。在一些实施方案中,所述免疫调节剂能够抑制或阻断分子的功能或涉及所述分子的信号传导途径,其中所述分子是免疫抑制分子和/或其中所述分子是免疫检查点分子。

[0055] 在一些实施方案中,所述免疫检查点分子或途径选自PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、LAG-3、TIM3、VISTA、腺苷2A受体(A2AR)或腺苷或涉及任何前述物质的途径。

[0056] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,所述免疫调节剂是或含有抗体,所述抗体任选地是抗体片段、单链抗体、多特异性抗体或免疫缀合物。

[0057] 在一些实施方案中,所述抗体特异性结合所述免疫检查点分子或其配体或受体;和/或所述抗体能够阻断或损害所述免疫检查点分子与其配体或受体之间的相互作用。

[0058] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,与在不存在所述抑制剂的情况下向所述受试者给予所给予的T细胞的方法相比,所给予的T细胞在所述受试者体内展现出增加的或延长的扩增和/或持久性。

[0059] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,与采用在不存在所述抑制剂的情况下向所述受试者给予所给予的T细胞的可比较方法所观察到的降低相比,所述方法在更大程度上和/或在更长的时间段内降低肿瘤负荷。

[0060] 在一些方面,提供了组合,其含有:表达重组受体的基因工程化T细胞,所述重组受体结合除B细胞抗原以外或除选自CD19、CD20、CD22和ROR1的B细胞抗原以外的抗原,以及靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂,其中所述抑制剂不抑制ITK和/或以大于或大于约1000nM的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制ITK和/或所述靶蛋白酪氨酸激酶是在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶(TEC)、静息淋巴细胞激酶(RLK/TXK)、BMX/ETK或ERBB4。

[0061] 在本文的任何组合的一些实施方案中,所述抗原选自Her2、L1-CAM、间皮素、CEA、乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3或4、erbB二聚体、EGFRvIII、FBP、FCRL5、FCRH5、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、Lewis Y、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、黑色素瘤相关抗原(MAGEMAGE-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、优先表达的黑色素瘤抗原(PRAME)、存活蛋白、EGP2、EGP40、TAG72、B7-H6、IL-13受体 α 2(IL-13Ra2)、CA9、GD3、HMW-MAA、CD171、G250/CAIX、HLA-A1、HLA-A2NY-ESO-1、PSCA、叶酸受体- α 、CD44v6、CD44v7/8、avb6整合素、8H9、NCAM、VEGF受体、5T4、胎儿AChR、NKG2D配体、CD44v6、双重抗原和与通用标签相关的抗原、癌症-睾丸抗原、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、癌胚抗原、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、雌激素受体、孕酮受体、肝配蛋白B2、CD123、c-Met、GD-2、O-乙酰化GD2(OGD2)、CE7、Wilms肿瘤1(WT-1)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、CCL-1、CD138和病原体特异性抗原。

[0062] 在本文的任何组合的一些实施方案中,所述抗原是病原体特异性抗原,其是病毒抗原、细菌抗原或寄生虫抗原。

[0063] 在本文的任何组合的一些实施方案中,所述重组受体是转基因T细胞受体(TCR)或功能性非T细胞受体。

[0064] 在本文的任何组合的一些实施方案中,所述重组受体是嵌合受体,其任选地是嵌合抗原受体(CAR)。

[0065] 在本文的任何组合的一些实施方案中,所述抑制剂是所述靶蛋白酪氨酸激酶的选择性抑制剂;和/或所述抑制剂以比所述抑制剂对不同于所述靶蛋白酪氨酸激酶的任何蛋白酪氨酸激酶或TEC家族激酶的IC₅₀低至少10倍或至少100倍的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶,和/或以比所述抑制剂对ITK和BTK二者的IC₅₀值低至少2倍、至少10倍或至少100倍的IC₅₀抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶;和/或所述抑制剂以小于或小于约1000nM、900nM、800nM、600nM、500nM、400nM、300nM、200nM、100nM或更小的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶。

[0066] 在本文的任何组合的一些实施方案中,所述抑制剂是小分子、肽、蛋白质、抗体或其抗原结合片段、抗体模拟物、适配体或核酸分子。

[0067] 在本文的任何组合的一些实施方案中,所述抑制剂选自式(II)、ONO/GS-4059、化合物30或化合物38、GDC-0834、RN-486、CGI-560、CGI-1764、HM-71224、CC-292、ONO-4059、CNX-774和LFM-A13。

[0068] 在本文的任何组合的一些实施方案中,所述抑制剂含有式(II)的化合物或其对映

体、药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药或包含任何前述物质的药物组合物。

[0069] 在本文的任何组合的一些实施方案中,将所述组合配制在同一组合物中。在本文的任何组合的一些实施方案中,将所述组合配制在单独组合物中。

[0070] 本文提供了试剂盒,其含有权利要求76-86中任一项的组合和用于针对治疗疾病或病症、任选地癌症向受试者给予所述基因工程化细胞和所述抑制剂的说明书。

[0071] 本文提供了试剂盒,其含有包含治疗有效量的基因工程化T细胞的组合物,所述基因工程化T细胞表达结合除B细胞抗原以外或除选自CD19、CD20、CD22和ROR1的B细胞抗原以外的抗原的重组受体;以及用于针对治疗癌症向受试者给予所述基因工程化细胞与靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂的组合疗法的说明书,其中所述抑制剂不抑制ITK和/或以大于或大于约1000nM的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制ITK和/或所述靶蛋白酪氨酸激酶是在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶(TEC)、静息淋巴细胞激酶(RLK/TXK)、BMX/ETK或ERBB4。

[0072] 本文提供了试剂盒,其含有包含治疗有效量的靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂的组合物,其中所述抑制剂不抑制ITK和/或以大于或大于约1000nM的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制ITK和/或所述靶蛋白酪氨酸激酶是在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶(TEC)、静息淋巴细胞激酶(RLK/TXK)、BMX/ETK或ERBB4;以及用于针对治疗疾病或病症、任选地癌症向受试者给予所述抑制剂与基因工程化T细胞的组合疗法的说明书,所述T细胞表达结合除B细胞抗原以外或除选自CD19、CD20、CD22和ROR1的B细胞抗原以外的抗原的重组受体。

[0073] 在本文的任何实施方案的一些实施方案中,所述癌症不是表达B细胞抗原的癌症,是非血液癌,不是B细胞恶性肿瘤,不是B细胞白血病,或者是实体瘤。

[0074] 在本文的任何实施方案的一些实施方案中,所述癌症是肉瘤、癌或淋巴瘤任选地非霍奇金淋巴瘤(NHL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、白血病、CLL、ALL、AML和骨髓瘤。

[0075] 在本文的任何实施方案的一些实施方案中,所述癌症是胰腺癌、膀胱癌、结直肠癌、乳腺癌、前列腺癌、肾癌、肝细胞癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、胰腺癌、直肠癌、甲状腺癌、子宫癌、胃癌、食管癌、头颈癌、黑色素瘤、神经内分泌癌、CNS癌症、脑肿瘤、骨癌或软组织肉瘤。

[0076] 在本文的任何实施方案的一些实施方案中,(i)所述受试者和/或所述疾病或病症(a)对布鲁顿酪氨酸激酶(BTK)的抑制具有抗性和/或(b)含有对所述抑制剂的抑制具有抗性的细胞群;(ii)所述受试者和/或所述疾病或病症在编码BTK的核酸中含有能够降低或防止所述抑制剂和/或依鲁替尼对BTK的抑制的突变或破坏;和/或(iii)在所述给予时,所述受试者在用所述抑制剂治疗和/或用BTK抑制剂疗法治疗后发生缓解后复发,或者已经被认为对用所述抑制剂治疗和/或用BTK抑制剂疗法治疗是难治性的。

[0077] 在本文的任何实施方案的一些实施方案中,所述细胞群是或含有B细胞群和/或不含有T细胞。

[0078] 在本文的任何实施方案的一些实施方案中,编码BTK的核酸中的所述突变含有位置C481、任选地C481S或C481R处的取代,和/或位置T474、任选地T474I或T474M处的取代。

[0079] 在本文的任何实施方案的一些实施方案中,所述抗原选自Her2、L1-CAM、间皮素、CEA、乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3或4、erbB二聚体、EGFR vIII、FBP、FCRL5、FCRH5、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、

HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、Lewis Y、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、黑色素瘤相关抗原(MAGEMAGE-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、优先表达的黑色素瘤抗原(PRAME)、存活蛋白、EGP2、EGP40、TAG72、B7-H6、IL-13受体 α 2(IL-13Ra2)、CA9、GD3、HMW-MAA、CD171、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2NY-ESO-1、PSCA、叶酸受体- α 、CD44v6、CD44v7/8、 α v β 6整合素、8H9、NCAM、VEGF受体、5T4、胎儿AchR、NKG2D配体、CD44v6、双重抗原和与通用标签相关的抗原、癌症-睾丸抗原、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、癌胚胎抗原、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、雌激素受体、孕酮受体、肝配蛋白B2、CD123、c-Met、GD-2、O-乙酰化GD2(OGD2)、CE7、Wilms肿瘤1(WT-1)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、CCL-1、CD138和病原体特异性抗原。

[0080] 在本文的任何实施方案的一些实施方案中,所述抗原是病原体特异性抗原,其是病毒抗原、细菌抗原或寄生虫抗原。

[0081] 在本文的任何实施方案的一些实施方案中,所述重组受体是转基因T细胞受体(TCR)或功能性非T细胞受体。

[0082] 在本文的任何实施方案的一些实施方案中,所述重组受体是嵌合受体,其任选地是嵌合抗原受体(CAR)。

[0083] 在本文的任何实施方案的一些实施方案中,所述抑制剂是所述靶蛋白酪氨酸激酶的选择性抑制剂;和/或所述抑制剂以比所述抑制剂对不同于所述靶蛋白酪氨酸激酶的任何蛋白酪氨酸激酶或TEC家族激酶的IC₅₀低至少10倍或至少100倍的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶,和/或以比所述抑制剂对ITK和BTK二者的IC₅₀值低至少2倍、至少10倍或至少100倍的IC₅₀抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶;和/或所述抑制剂以小于或小于约1000nM、900nM、800nM、600nM、500nM、400nM、300nM、200nM、100nM或更小的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶。

[0084] 在本文的任何试剂盒的一些实施方案中,所述抑制剂是小分子、肽、蛋白质、抗体或其抗原结合片段、抗体模拟物、适配体或核酸分子。在本文的任何实施方案的一些实施方案中,所述抑制剂选自式(II)、ON0/GS-4059、化合物30或化合物38、GDC-0834、RN-486、CGI-560、CGI-1764、HM-71224、CC-292、ON0-4059、CNX-774和LFM-A13。

[0085] 在本文的任何试剂盒的一些实施方案中,所述抑制剂含有式(II)的化合物或其对映体、药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药或包含任何前述物质的药物组合物。

[0086] 在本文的任何试剂盒的一些实施方案中,所述说明书用于与开始给予包含所述T细胞的组合物同时或在之后给予所述抑制剂。在本文的任何试剂盒的一些实施方案中,所述说明书用于在开始给予所述T细胞之后给予所述抑制剂。

[0087] 在本文提供的任何试剂盒的一些实施方案中,所述说明书用于在开始给予所述T细胞的1小时、2小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时或1周内或约1小时、2小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时或1周内给予所述抑制剂。

[0088] 在本文的任何试剂盒的一些实施方案中,所述说明书用于在这样的时间给予所述抑制剂,其中:与在开始给予所述T细胞之后的在前时间点所述受试者体内的细胞数量相比,所述受试者的血液中可检测的所述T细胞疗法的细胞数量降低;所述血液中可检测的所述T细胞疗法的细胞数量是开始给予所述T细胞之后所述受试者的血液中可检测的所述T细

胞疗法的细胞数量峰值或最大值的少于或少于约1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、50倍或100倍或更少;和/或在这样的时间给予所述抑制剂:在所述受试者的血液中可检测到所述T细胞疗法的细胞水平的峰值或最大值之后,所述受试者的血液中可检测的T细胞的细胞数量或源自所述T细胞的细胞数量是所述受试者的血液中总外周血单核细胞(PBMC)的少于10%、少于5%、少于1%或少于0.1%。

[0089] 在本文的任何实施方案的一些实施方案中,所述增加或降低大于或大于约1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍或更多。

[0090] 在本文的任何实施方案的一些实施方案中,所述说明书用于在开始给予所述T细胞之后持续长达2天、长达7天、长达14天、长达21天、长达一个月、长达两个月、长达三个月、长达6个月或长达1年的时间段给予所述抑制剂。

[0091] 在本文的任何实施方案的一些实施方案中,所述说明书用于从至少在开始给予所述T细胞之后进一步给予所述抑制剂,直到:

[0092] 与恰在给予所述抑制剂之前的在前时间点所述受试者体内的细胞数量相比或与给予所述T细胞疗法之后的在前时间点相比,所述受试者的血液中可检测的所给予的T细胞的细胞数量或源自所述T细胞的细胞数量增加;所述血液中可检测的T细胞的细胞数量或源自所述T细胞的细胞数量是开始给予所述T细胞之后所述受试者的血液中观察到的数量峰值或最大值的2.0倍(更大或更小);所述受试者的血液中可检测的T细胞的细胞数量是所述受试者的血液中总外周血单核细胞(PBMC)的大于或大于约10%、15%、20%、30%、40%、50%或60%;和/或所述受试者展现出与紧接所述T细胞的给予之前或紧接所述抑制剂的给予之前的肿瘤负荷相比肿瘤负荷的降低;和/或所述受试者展现出完全或临床缓解。

[0093] 在本文的任何实施方案的一些实施方案中,所述基因工程化T细胞含有对所述受试者而言自体的细胞。在本文的任何实施方案的一些实施方案中,所述基因工程化T细胞含有对所述受试者而言同种异体的T细胞。

[0094] 在一些方面,提供了工程化表达重组受体的免疫细胞的方法,其包括:使包含T细胞的细胞群与靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂接触,其中所述抑制剂不抑制ITK和/或以大于或大于约1000nM的半最大抑制浓度(IC50)抑制ITK和/或所述靶蛋白酪氨酸激酶是在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶(TEC)、静息淋巴细胞激酶(RLK/TXK)、BMX/ETK或ERBB4;以及在使得表达重组受体的条件下将编码所述重组受体的核酸引入所述T细胞群中。

[0095] 在本文的任何方法的一些实施方案中,所述细胞群是或含有T细胞,任选地CD4+或CD8+。

[0096] 在本文的任何方法的一些实施方案中,所述细胞群从受试者、任选地人受试者分离。

[0097] 在本文的任何方法的一些实施方案中,所述接触发生在所述引入之前和/或期间。

[0098] 在一些方面,提供了产生基因工程化T细胞的方法,其包括将编码重组受体的核酸分子引入原代T细胞中,其中所述T细胞来自已经被给予靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂的受试者,其中所述抑制剂不抑制ITK和/或以大于或大于约1000nM的半最大抑制浓度(IC50)抑制ITK和/或所述靶蛋白酪氨酸激酶是在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶(TEC)、静息淋巴细胞激酶(RLK/TXK)、BMX/ETK或ERBB4。

[0099] 在本文的任何方法的一些实施方案中,在引入所述核酸分子之前不超过30天、20

天、10天、9天、8天、7天、6天、5天、4天、3天、2天或1天已经向所述受试者给予所述抑制剂。

[0100] 在本文的任何方法的一些实施方案中,所述抑制剂是所述靶蛋白赖氨酸激酶的选择性抑制剂;和/或所述抑制剂以比所述抑制剂对不同于所述靶蛋白酪氨酸激酶的任何蛋白酪氨酸激酶或TEC家族激酶的IC₅₀低至少10倍或至少100倍的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶,和/或以比所述抑制剂对ITK和BTK二者的IC₅₀值低至少2倍、至少10倍或至少100倍的IC₅₀抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶;和/或所述抑制剂以小于或小于约1000nM、900nM、800nM、600nM、500nM、400nM、300nM、200nM、100nM或更小的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶。

[0101] 在本文的任何方法的一些实施方案中,所述抑制剂是小分子、肽、蛋白质、抗体或其抗原结合片段、抗体模拟物、适配体或核酸分子。

[0102] 在本文的任何方法的一些实施方案中,所述抑制剂选自式(II)的化合物、ONO/GS-4059、化合物30或化合物38、GDC-0834、RN-486、CGI-560、CGI-1764、HM-71224、CC-292、ONO-4059、CNX-774和LFM-A13。

[0103] 在本文的任何方法的一些实施方案中,所述抑制剂含有式(II)的化合物或其对映体、药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药或包含任何前述物质的药物组合物。

[0104] 在本文的任何方法的一些实施方案中,所述T细胞含有CD4⁺或CD8⁺细胞。

附图说明

[0105] 图1A显示了评估在用CAR T细胞与依鲁替尼或式(II)的化合物共培养的一式三份的孔中靶标特异性细胞溶解活性的归一化靶细胞数量的图。

[0106] 图1B显示了在细胞毒性测定的开始和结束时,与CAR T细胞以2.5:1的效应子与靶标比率(E:T)共培养的靶细胞(NucLight Red K562.CD19细胞)的代表性图像。

[0107] 图1C和图1D分别显示了评估在存在或不存在依鲁替尼或式(II)的化合物的情况下抗CD19CAR T细胞的靶标特异性细胞溶解活性的研究结果。图显示了来自三个独立供体的数据,并且针对未处理的对照(100%)进行归一化。描绘了平均值±SEM,并且统计学上显著的差异指示为P<0.00001(****)。

[0108] 图2A和图2B分别显示了在存在或不存在指定浓度的依鲁替尼或式(II)的化合物的情况下培养CD4⁺和CD8⁺细胞后CD25、CD28、CD39和CD95的CAR T细胞表达。

[0109] 图2C和图2D分别显示了在存在依鲁替尼或式(II)的化合物的情况下初始刺激后,经过四天来自一个供体来源的细胞的CAR T细胞的TCM(CCR7+CD45RA⁻)和TEM(CCR7-CD45RA⁻)的百分比的代表性结果。

[0110] 图2E和图2F分别显示了在存在或不存在指定浓度的依鲁替尼的情况下培养CD4⁺和CD8⁺细胞后CD69、CD107a和PD-1的CAR-T细胞表达。

[0111] 图2G和图2H分别显示了在存在或不存在指定浓度的式(II)的化合物的情况下培养CD4⁺和CD8⁺细胞后CD69、CD107a和PD-1的CAR-T细胞表达。

[0112] 图3A和图3B分别显示了以2.5:1的E:T用靶细胞刺激并用依鲁替尼或式(II)的化合物处理的来自一个供体来源的细胞的CAR T细胞的IFN- γ 、IL-2和TNF- α 的测量值。

[0113] 图3C描绘了在两(2)个独立的测定中,在存在依鲁替尼的情况下刺激CAR-T细胞2

天后源自三个供体的细胞中分泌的细胞因子IFN- γ 、IL-2和TNF- α 的读出与未处理的对照相比的百分比变化。

[0114] 图3D描绘了在2个独立测定中对于三个供体,在存在式(II)的化合物的情况下刺激CAR-T细胞2天后分泌的细胞因子IFN- γ 、IL-2和TNF- α 的读出与未处理的对照相比的百分比变化。

[0115] 图4A显示了在不存在(对照)或存在50nM或500nM依鲁替尼的情况下,在连续刺激测定中的各轮再刺激后CAR-T细胞的群体倍增数量。箭头指示每次再刺激的时间点,此时计数CAR T细胞并添加新的靶细胞和依鲁替尼。

[0116] 图4B显示了在不存在(对照)或存在158nM或1581nM的式(II)的化合物的情况下,在连续刺激测定中的各轮再刺激后CAR-T细胞的群体倍增数量。箭头指示每次再刺激的时间点,此时计数CAR T细胞并添加新的靶细胞和式(II)的化合物。

[0117] 图4C显示了在连续刺激测定中在存在或不存在指定浓度的依鲁替尼的情况下5轮再刺激后第18天的细胞数量, $P<0.05$ (*)。

[0118] 图4D显示了在连续刺激测定中在存在或不存在指定浓度的式(II)的化合物的情况下5轮再刺激后第18天的细胞数量, $P<0.05$ (*)。

[0119] 图5A显示了评估在存在式(II)的化合物或依鲁替尼的情况下刺激T细胞后,用于区分TH2与TH1表型T细胞的细胞表面标记的表面表达水平的流式细胞术研究的结果。

[0120] 图5B显示了对于在存在或不存在式(II)的化合物或依鲁替尼的情况下培养的T细胞,如通过流式细胞术测定测量的随时间观察到的TH1细胞的百分比。

[0121] 图5C显示了在不存在或存在指定浓度的式(II)的化合物或依鲁替尼的情况下连续再刺激T细胞后第18天,如通过流式细胞术测定测量的TH1细胞的百分比。

[0122] 图5D显示了在存在式(II)的化合物的情况下连续刺激的第0、11、18和21天,CD25、CD38、CD39和CD45RO的表达(图5D)。显示了来自一个供体来源的细胞的CAR T细胞的代表性结果。

[0123] 图5E显示了在存在式(II)的化合物的情况下连续刺激的第0、11、18和21天,CD62L、CD69、CD107a和PD-1的表达(图5E)。显示了来自一个供体来源的细胞的CAR T细胞的代表性结果。

[0124] 图5F和图5G显示了在存在依鲁替尼的情况下连续刺激的第0、11、18和21天,CD25、CD38、CD39和CD45RO(图5D)和CD62L、CD69、CD107a和PD-1(图5E)的表达。显示了来自一个供体来源的细胞的CAR T细胞的代表性结果。

[0125] 图6A显示了评估在给予次最佳剂量的CAR+T细胞(抗CD19CAR)与口服给予(a)单独运载体(口服运载体)或(b)依鲁替尼(口服依鲁替尼)、(iii)口服给予单独运载体(运载体)或(iv)口服给予单独依鲁替尼(依鲁替尼)的组合后在播散性肿瘤异种移植物小鼠模型(所述模型被鉴定为对BTK抑制具有抗性)中随时间的肿瘤负荷的研究结果。图6B显示了在存在或不存在依鲁替尼或运载体对照的情况下用来自两个不同供体来源的细胞的CAR+T细胞处理的小鼠中肿瘤排斥后更长时间点的相同研究的结果。图6A和图6B中的结果描绘了如通过生物发光测量平均辐射率所指示的随时间的肿瘤生长。

[0126] 图6C显示了参考图6A所描述的这些处理组中动物的存活的KaplanMeier曲线。图6D显示了在存在或不存在依鲁替尼或运载体对照的情况下用来自两个不同供体来源的细

胞的CAR+T细胞处理的小鼠中肿瘤排斥后更长时间点的相同研究中存活的结果。

[0127] 图7A显示了Kaplan meier曲线,其描绘了所观察到的被单独地或与给予每日依鲁替尼或式(II)的化合物组合地给予由两个不同供体产生的CAR-T细胞的荷瘤小鼠的存活,每种都经由饮用水给予。显示了统计学上显著的差异, $P<0.001$ (***)。

[0128] 图7B显示了如通过生物发光测量被给予由两个不同供体产生的CAR-T细胞并用依鲁替尼或式(II)的化合物处理的小鼠的平均辐射率所指示的随时间的肿瘤生长,每种都经由饮用水给予。显示了统计学上显著的差异,双向ANOVA $P<0.05$ (*), $P<0.01$ (**)。

[0129] 图7C显示了评估用或未用依鲁替尼处理的小鼠的血液和骨髓中CAR-T细胞数量的研究结果。统计学上显著的差异指示为 $P<0.05$ (*), $P<0.001$ (***)。

[0130] 图7D显示了在用或未用依鲁替尼处理后在CAR-T细胞转移后第19天血液中的细胞数量。统计学上显著的差异指示为 $P<0.05$ (*)。

[0131] 图7E显示了评估用或未用式(II)的化合物处理的小鼠的血液和骨髓中CAR-T细胞数量的研究结果。统计学上显著的差异指示为 $P<0.001$ (***) 和 $P<0.0001$ (****)。

[0132] 图7F显示了在用或未用式(II)的化合物处理后,在CAR-T细胞转移后第19天血液中的细胞数量。统计学上显著的差异指示为 $P<0.001$ (***)。

[0133] 图7G显示了在用单独的CAR-T细胞处理或用依鲁替尼处理的小鼠的血液和骨髓中在CAR T转移后第7、12、19和26天的肿瘤细胞计数。统计学上显著的差异指示为 $P<0.05$ (*), $P<0.01$ (**), $P<0.001$ (***) 和 $P<0.0001$ (****)。

[0134] 图7H显示了在用单独的CAR-T细胞处理或用式(II)的化合物处理的小鼠的血液、骨髓中在CAR T转移后第7、12、19和26天的肿瘤细胞计数。统计学上显著的差异指示为 $P<0.05$ (*), $P<0.01$ (**), $P<0.001$ (***) 和 $P<0.0001$ (****)。

[0135] 图8A描绘了在不存在抑制剂的情况下(对照)或在存在依鲁替尼或式(II)的化合物的情况下用CAR-T细胞处理后第12天,从动物的骨髓收获的CAR工程化T细胞上的表面标记的T分布随机邻域嵌入(t-SNE)高维度分析。

[0136] 图8B描绘了四个群体,其源自在不存在抑制剂的情况下(对照)或在存在依鲁替尼或式(II)的化合物的情况下用CAR-T细胞处理后第12天,从动物的骨髓收获的CAR工程化T细胞上的表面标记的T分布随机邻域嵌入(t-SNE)高维度分析。结果表示每组三只小鼠的汇总分析。

[0137] 图8C描绘了直方图,其显示了来自4门控t-SNE的CD4、CD8、CD62L、CD45RA、CD44和CXCR3的各个表达谱覆盖在总群体的表达上(阴影直方图)。

[0138] 图8D描绘了来自对照小鼠或用依鲁替尼或式(II)的化合物处理的小鼠的每个t-SNE群体的百分比和倍数变化。

[0139] 图9A显示了在经过从患有弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)的受试者获得的细胞产生的CAR工程化细胞的21天培养期的连续刺激测定中的群体倍增数量,其中将细胞在不存在依鲁替尼的情况下(对照)或在存在50nM或500nM依鲁替尼的情况下进行培养。箭头指示每次再刺激的时间点,此时计数CAR T细胞并添加新的靶细胞和依鲁替尼。

[0140] 图9B显示了在存在或不存在依鲁替尼的情况下在16天连续再刺激后,CAR-T细胞对于表达CD19的靶细胞的细胞溶解活性的测定结果。将杀伤百分比针对未处理的对照(100%)进行归一化。数据显示为来自重复孔的平均值 $\pm$ SEM。统计学上显著的差异指示为P

<0.001 (***) , $P<0.0001$ (****) 。

[0141] 图10A是火山图,其描绘了与对照相比,用500nM依鲁替尼处理的第18天连续刺激的CAR T细胞的差异表达基因。显著差异上调的基因位于右侧虚线的右侧,而显著差异下调的基因位于左侧虚线的左侧 ($FDR<0.05$, $abslog_2FC>0.5$) 。

[0142] 图10B描绘了与对照相比,用1581nM的式(II)的化合物处理的第18天连续刺激的CAR T细胞的表达基因的火山图。显著差异上调的基因位于右侧虚线的右侧,而显著差异下调的基因位于左侧虚线的左侧 ($FDR<0.05$, $abslog_2FC>0.5$) 。

[0143] 图10C是热图,其描绘了在对照和500nM依鲁替尼组中跨越3个供体的来自图10A的差异表达基因的归一化表达(平均转录物/百万/供体+条件,每个基因归一化的z得分)。

[0144] 图11A至图11B描绘了与对照相比,跨越供体和实验所总结的每个条件下的来自用50nM或500nM依鲁替尼处理的连续刺激的CAR T细胞的GZMA和SELL (CD62L) 的表达 (TPM,每百万转录物) 箱形图谱。

[0145] 图12A是如通过流式细胞术测量的,在18天连续刺激后来自一个供体来源的细胞的CAR T细胞中CD62L表达的代表性直方图。

[0146] 图12B描绘了如通过流式细胞术测量的,在18天连续刺激后,针对对照归一化的来自一个供体来源的细胞的CD62L+CAR T细胞百分比的倍数变化。数据来自两个独立的实验(平均值 $\pm$ SEM)。

具体实施方式

[0147] 本文提供了增强或调节与免疫疗法或免疫治疗剂的给予相关的T细胞的增殖和/或活性的方法,所述免疫治疗剂是例如包含用于过继细胞疗法(例如像T细胞疗法)的细胞(例如表达CAR的T细胞)的组合物,或能够募集一种或多种T细胞或其他免疫细胞的T细胞接合治疗剂,如双特异性或多特异性药剂或抗体。在一些实施方案中,组合疗法涉及给予靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂,所述靶蛋白酪氨酸激酶不是IL-2诱导型T细胞激酶(ITK)和/或其中所述靶蛋白酪氨酸激酶是选自布鲁顿酪氨酸激酶(Btk)、tec蛋白酪氨酸激酶(TEC)、BMX非受体酪氨酸激酶(Etk)、TXK酪氨酸激酶(TXK)和/或受体酪氨酸蛋白激酶ErbB4(ErbB4)的一种或多种蛋白酪氨酸激酶,例如式(II)的化合物式(II)的化合物;以及给予免疫疗法或免疫治疗剂,如包含用于过继细胞疗法的细胞的组合物,例如像T细胞疗法(例如表达CAR的T细胞)或T细胞接合治疗剂。

[0148] 本申请中提及的所有出版物(包括专利文献、科学文章和数据库)出于所有目的通过引用以其整体并入,在程度上如同每个单独的出版物通过引用单独并入。如果本文所述的定义与通过引用并入本文的专利、申请、公开的申请和其他出版物中所述的定义相反或在其他方面不一致,则本文所述的定义优先于通过引用并入本文的定义。

[0149] 本文使用的章节标题仅用于组织目的,而不应解释为限制所描述的主题。

[0150] I. 概述

[0151] 本文提供了组合疗法,其涉及与抑制剂组合给予含有或调节T细胞的接合或活性的细胞疗法或其他免疫治疗剂。此类药剂包括用于T细胞疗法的药剂(如工程化T细胞(例如,表达CAR的T细胞))和用于过继T细胞疗法的其他药剂。抑制剂通常是靶激酶的抑制剂,所述靶激酶是例如靶蛋白酪氨酸激酶,包括非受体酪氨酸激酶,如TEC激酶家族的那些。在

一些方面,抑制剂是蛋白酪氨酸激酶的抑制剂,所述蛋白酪氨酸激酶不是IL-2诱导型T细胞激酶 (ITK) 和/或不抑制ITK。在一些实施方案中,靶蛋白酪氨酸激酶是布鲁顿酪氨酸激酶 (Btk)、tec蛋白酪氨酸激酶 (TEC)、BMX非受体酪氨酸激酶 (Etk)、TXK酪氨酸激酶 (TXK) 和/或受体酪氨酸蛋白激酶ErbB4 (ErbB4) 中的一种或多种。抑制剂包括式 (II) 的化合物。

[0152] 基于T细胞的疗法如过继T细胞疗法 (包括涉及给予表达对感兴趣的疾病或病症具特异性的嵌合受体 (如嵌合抗原受体 (CAR) 和/或其他重组抗原受体) 的细胞的那些过继细胞疗法,以及其他过继免疫细胞和过继T细胞疗法) 可以有效地治疗癌症以及其他疾病和障碍。在T细胞表面上重组受体 (如嵌合抗原受体 (CAR)) 的工程化表达使得能够重定向T细胞特异性。在临床研究中,CAR-T细胞 (例如抗CD19CAR-T细胞) 已经在白血病和淋巴瘤患者中均产生了持久的完全反应 (Porter等人 (2015) *Sci Transl Med.*, 7:303ra139; Kochenderfer (2015) *J.Clin.Oncol.*, 33:540-9; Lee等人 (2015) *Lancet*, 385:517-28; Maude等人 (2014) *N Engl J Med*, 371:1507-17)。

[0153] 在某些情况下,过继细胞疗法的可行方法可能并不总是完全令人满意。在一些情况下,最佳功效可取决于所给予细胞的以下能力:识别并结合靶标 (例如,靶抗原),运输、定位至并成功进入受试者、肿瘤和其环境内的适当位点。在一些情况下,最佳功效可取决于所给予细胞的以下能力:被激活,扩增,发挥各种效应子功能 (包括细胞毒性杀伤和分泌各种因子如细胞因子),持续 (包括长期),分化、转换或参与重编程为某些表型状态 (如长期记忆、低分化和效应子状态),避免或减少疾病局部微环境中的免疫抑制条件,在清除并重新暴露于靶配体或抗原后提供有效且稳健的回忆反应,以及避免或减少耗竭、无反应性、外周耐受、终末分化和/或分化为抑制状态。

[0154] 在一些情况下,可以通过给予淋巴细胞清除疗法或用淋巴细胞清除疗法预处理来改善反应,与不进行预处理或使用不同的淋巴细胞清除疗法进行预处理的方法相比,这在一些方面增加了给予后细胞的持久性和/或功效。淋巴细胞清除疗法通常包括给予氟达拉滨,其通常与另一种化学疗法或其他药剂如环磷酰胺组合给予,它们可以以任何顺序依次或同时给予。在最近的I/II期临床研究中,急性成淋巴细胞白血病 (ALL)、非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 和慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 患者的完全反应 (CR) 分别为94%、47%和50%,并且与接受环磷酰胺但不接受氟达拉滨的那些患者相比,接受环磷酰胺和氟达拉滨淋巴细胞清除的患者的无疾病存活率更高 (Cameron等人 (2016) *J Clin Oncol*, 34 (增刊;abstr 102)。然而,在一些方面,即使使用淋巴细胞清除疗法,CAR-T细胞疗法在所有受试者中并不总是始终有效。

[0155] 在一些方面,与某些替代方法相比,所提供的方法和用途提供了或实现了如在特定的所治疗的受试者组中改善的或更持久的反应或功效。在一些实施方案中,借助于以下方式,所述方法是有利的:给予免疫疗法或免疫治疗剂,如包含用于过继细胞疗法的细胞的组合物,例如像T细胞疗法 (例如表达CAR的T细胞) 或T细胞接合治疗剂,如双特异性或多特异性药剂或抗体;以及抑制、靶向除IL-2诱导型T细胞激酶 (ITK) 以外的靶蛋白酪氨酸激酶或降低其活性的靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂,所述靶蛋白酪氨酸激酶是例如布鲁顿酪氨酸激酶 (Btk)、tec蛋白酪氨酸激酶 (TEC)、BMX非受体酪氨酸激酶 (Etk)、TXK酪氨酸激酶 (TXK) 和/或受体酪氨酸蛋白激酶ErbB4 (ErbB4) 中的一种或多种,例如式 (II) 的化合物。

[0156] 所提供的方法是基于以下观察结果:即BTK抑制剂 (例如依鲁替尼和式 (II)) 改善T

细胞功能,包括与T细胞的扩增、增殖和持久性相关的功能。在本文中发现,无论使用依鲁替尼还是式(II)的化合物,此效果以及此效果的范围和程度基本上相同。然而,依鲁替尼和式(II)的化合物对蛋白质酪氨酸激酶并不展现出完全相同的特异性。依鲁替尼是一种不可逆的小分子抑制剂(SMI),其阻断布鲁顿酪氨酸激酶(Btk)的活性,并对ITK和众多其他TEC家族激酶和其他激酶展现出活性。式(II)的化合物作为与依鲁替尼相比具有更高的特异性和效力的下一代Btk抑制剂而开发(Wu等人(2016) *JHematol Oncol*, 9:21; Byrd等人(2016) *N Engl J Med.*, 374:323-332)。有趣的是,式(II)的化合物对白细胞介素-2诱导型激酶(ITK)并不展现出活性,所述激酶是在CD4和CD8T细胞中均高度表达的激酶,并且被认为参与对下游T细胞受体信号传导的影响(Berg等人(2005) *Annu Rev. Immunol.*, 23:549-600)。因此,此发现表明抑制剂对T细胞功能的影响并不是由ITK介导的,而是通过抑制这些抑制剂靶向的其他激酶中的一种或多种(如BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4中的一种或多种)介导的。

[0157] BTK抑制剂通常用于治疗B细胞恶性肿瘤。例如,依鲁替尼被批准用于复发性难治性环境中的套细胞淋巴瘤(MCL)和华氏巨球蛋白血症(Waldenström's Macroglobulinemia) (Davids等人(2014) *Future Oncol.*, 10:957-67)。在一些情况下,B细胞受体(BCR)信号传导途径的异常激活是B细胞恶性肿瘤(如MCL和CLL)的主要机制,由此慢性Btk信号传导可以通过促进B细胞存活和异常激活的NF- κ B和MAP激酶启动磷酸化级联反应。因此,现有的采用BTK抑制剂(例如依鲁替尼)的方法用于治疗B细胞恶性肿瘤。

[0158] 所提供的发现表明在涉及T细胞(如涉及给予过继T细胞疗法)的方法中的抑制剂的组合疗法实现了T细胞疗法的改善的功能。在一些实施方案中,细胞疗法(例如,给予工程化T细胞)与来自BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4的一种或多种靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂(如这种激酶的选择性和/或不可逆抑制剂)的组合改善了或增强了T细胞疗法的一种或多种功能和/或作用,如持久性、扩增、细胞毒性和/或治疗结果,例如杀死肿瘤或其他疾病或靶细胞或降低其负荷的能力。在一些实施方案中,来自BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4的一种或多种靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂(如这种激酶的选择性和/或不可逆抑制剂)可以在较高浓度下抑制CAR T激活,而在较低浓度下增加激活。

[0159] 在一些方面,尽管肿瘤或疾病或靶细胞本身对抑制剂、靶向抑制剂具有选择性的激酶的抑制剂不敏感,和/或对抑制剂对BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4的抑制具有抗性,仍观察到此类效应。例如,在一些实施方案中,癌症对抑制剂不敏感或已经具有抗性,或者对抑制剂(例如,式(II)的化合物)对BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4的抑制不敏感或已经具有抗性。在一些实施方案中,与抑制剂的组合在改善一种或多种结果或功能属性的同时不会影响T细胞中的一种或多种副作用或不想要的变化,例如与在其他方面相同但不存在抑制剂的条件下培养的细胞相比,不会降低细胞被激活、分泌一种或多种所需细胞因子、扩增和/或持续的能力,例如如在体外测定中所测量的。因此,在一些实施方案中,提供了导致T细胞功能或表型(例如,固有T细胞功能性和/或固有T细胞表型)的改善而通常不损害功能性(例如,CAR-T细胞功能性)的一种或多种其他所需特性的方法和组合。

[0160] 因此,在一些实施方案中,所提供的方法可以加强CAR-T细胞疗法,在一些方面,这可以改善治疗患有对其他疗法具有抗性或难以治愈、作为侵袭性或高风险癌症、和/或与另一种类型的癌症相比对在没有抑制剂的情况下给予的CAR-T细胞疗法展现出或可能展现出

相对较低的反应率的癌症的受试者的结果。

[0161] 在一些实施方案中,所述方法可以用于治疗B细胞恶性肿瘤或血液恶性肿瘤,特别是这样的恶性肿瘤,其中对单独用免疫疗法或免疫治疗剂(如包含用于过继细胞疗法的细胞的组合物,例如像T细胞疗法(例如表达CAR的T细胞)或T细胞接合治疗剂)的治疗的反应(例如完全反应)与其他B细胞恶性肿瘤相比相对较低(例如在少于或少于约60%、少于约50%或少于约45%的这样治疗的受试者中的CR)和/或其中受试者对单独用抑制剂的治疗无反应。在一些实施方案中,本文提供的组合疗法用于患有癌症的受试者,其中受试者和/或癌症对BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4的抑制具有抗性或包含对抑制剂的抑制具有抗性的细胞群。在一些实施方案中,本文提供的组合疗法用于患有癌症的受试者,其中受试者和/或癌症在编码BTK的核酸中包含突变或破坏,其中这种突变能够降低或防止抑制剂(例如式(II)的化合物)对BTK的抑制。

[0162] 在一些实施方案中,本文提供的组合疗法用于患有癌症的受试者,其中在给予免疫疗法或免疫治疗剂(如包含用于过继细胞疗法的细胞的组合物,例如像T细胞疗法(例如,表达CAR的T细胞)或T细胞接合治疗剂)时,以及在给予抑制剂时,受试者在用抑制剂治疗和/或用BTK抑制剂疗法治疗后发生缓解后复发,或者已经被认为对用抑制剂治疗和/或BTK抑制剂疗法治疗是难治性的。

[0163] 在一些实施方案中,某些癌症(如NHL,例如高风险或侵袭性NHL,如DLBCL;和/或慢性淋巴细胞白血病(CLL))可能与固有T细胞功能性的缺陷或减少(其在一些情况下受疾病本身的影响)相关。例如,许多癌症(如CLL和NHL,例如DLBCL)的发病机理可能与免疫缺陷相关,导致促进肿瘤生长和免疫逃避,例如由于T细胞的免疫抑制,例如受肿瘤微环境中的一种或多种因子的驱动。在一些情况下,与过继细胞疗法结合缓解从此类患者的癌症获得的固有T细胞缺陷可以提供对过继T细胞疗法(例如CAR-T细胞疗法)的更有效的反应。

[0164] 在一些实施方案中,所提供的方法用于治疗受试者的癌症,其中与参考T细胞群或者参考或阈值水平(例如来自不患有或不怀疑患有癌症的受试者、例如来自健康或正常受试者的T细胞)相比,这种受试者的T细胞显示出或已经被观察到显示出降低水平的指示T细胞功能、健康或活性的因子。在一些实施方案中,所提供的方法用于治疗被鉴定为患有高风险NHL和/或侵袭性NHL、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、原发性纵隔大B细胞淋巴瘤(PMBCL)、富T细胞/组织细胞的大B细胞淋巴瘤(TCHRBCL)、伯基特淋巴瘤、套细胞淋巴瘤(MCL)和/或滤泡性淋巴瘤(FL)的受试者。例如,如本文所示,在存在示例性BTK抑制剂依鲁替尼的情况下,从患有DLBCL的受试者工程化的T细胞展现出更大的T细胞功能活性,表明T细胞的功能在存在抑制剂的情况下被加强。在一些实施方案中,受试者患有DLBCL。在一些实施方案中,所提供的方法用于治疗患有慢性淋巴细胞白血病(CLL)的受试者。在此类方法的一些实施方案中,所给予的工程化T细胞对受试者而言是自体的。

[0165] 在一些实施方案中,所提供的方法还包括以下方法,其中癌症不是B细胞恶性肿瘤,不是B细胞白血病或淋巴瘤,是非血液癌或者是实体瘤;和/或抗原不是B细胞抗原,例如不是CD19、CD20、CD22和ROR1。在一些实施方案中,组合疗法包括向患有实体瘤(如肉瘤或癌)的受试者给予1)特异性识别和/或靶向与癌症相关和/或存在于通用标签上的抗原的T细胞和2)除ITK以外(例如是BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4中的一种或多种)的靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂(例如式(II)的化合物)。在一些实施方案中,T细胞所识别或靶向

的抗原是Her2、L1-CAM、间皮素、CEA、乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3或4、erbB二聚体、EGFR vIII、FBP、FCRL5、FCRH5、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、Lewis Y、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、黑色素瘤相关抗原(MAGEMAGE-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、优先表达的黑色素瘤抗原(PRAME)、存活蛋白、EGP2、EGP40、TAG72、B7-H6、IL-13受体a2(IL-13Ra2)、CA9、GD3、HMW-MAA、CD171、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2NY-ES0-1、PSCA、叶酸受体-a、CD44v6、CD44v7/8、avb6整合素、8H9、NCAM、VEGF受体、5T4、胎儿AchR、NKG2D配体、CD44v6、双重抗原和与通用标签相关的抗原、癌症-睾丸抗原、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ES0-1、MART-1、gp100、癌胚胎抗原、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、雌激素受体、孕酮受体、肝配蛋白B2、CD123、c-Met、GD-2、O-乙酰化GD2(OGD2)、CE7、Wilms肿瘤1(WT-1)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、CCL-1、CD138或病原体特异性抗原。

[0166] 在所提供的方法的一些实施方案中,与参考组合物的所给予细胞相比,所给予的基因工程化细胞的一种或多种特性可以被改善或增加或更高,例如这样给予的细胞在受试者体内增加或更长的扩增和/或持久性或者在用抗原再刺激后增加或更高的回忆反应。在一些实施方案中,与给予参考细胞组合物后的相同特性或特征相比,这种特性或特征的增加可以是至少1.2倍、至少1.5倍、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍或至少10倍的增加。在一些实施方案中,在给予基因工程化细胞后的一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月或12个月内,可以观察到或存在一种或多种此类特性或特征的增加。

[0167] 在一些实施方案中,参考细胞组合物可以是来自不患有或不怀疑患有癌症的受试者的血液的T细胞的组合物,或者是在相同或基本上相同的条件下(除了没有存在除ITK以外(例如是BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4中的一种或多种)的靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂的情况下)获得、分离、生成、产生、繁育和/或给予的T细胞群。在一些实施方案中,参考细胞组合物含有基本上相同的基因工程化细胞,包括相同重组受体(例如CAR)的表达。在一些方面,相同地或基本上相同地处理此类T细胞,例如类似地制造、类似地配制、以相同或大约相同的剂量给予以及其他类似因素。

[0168] 在一些实施方案中,具有增加的持久性的基因工程化细胞在给予其的受试者体内展现出更好的效力。在一些实施方案中,与通过替代方法(如涉及给予参考细胞组合物的那些替代方法)所实现的持久性相比,基因工程化细胞(如表达CAR的T细胞)在给予后在受试者体内的持久性更高。在一些实施方案中,持久性增加至少或约至少1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或更多。

[0169] 在一些实施方案中,可以在给予受试者之后检测或定量所给予细胞的持久性的程度或范围。例如,在一些方面,使用定量PCR(qPCR)来评估在受试者的血液或血清或器官或组织(例如,疾病部位)中表达重组受体的细胞(例如,表达CAR的细胞)的量。在一些方面,持久性被定量为每微克的DNA中编码受体(例如,CAR)的DNA或质粒的拷贝,或者定量为每微升的样品(例如,血液或血清)中表达受体的(例如,表达CAR的)细胞的数量,或者每微升的样品中外周血单核细胞(PBMC)或白细胞或T细胞的总数量。在一些实施方案中,也可以进行流式细胞术测定,其通常使用对受体具特异性的抗体检测表达受体的细胞。也可以使用基于细胞的测定来检测功能细胞的数量或百分比,所述功能细胞是例如能够结合和/或中和疾

病或病症或者表达受体所识别的抗原的细胞和/或诱导针对所述细胞的反应(例如,细胞毒性反应)的细胞。在任何此类实施方案中,与重组受体相关的另一种标记(例如表达CAR的细胞)的表达范围或水平可以用于区分受试者体内的所给予细胞与内源细胞。

[0170] 还提供了用于工程化、制备和产生细胞的方法,含有细胞和/或抑制剂的组合物,以及含有和例如根据所提供的组合疗法方法使用、产生和给予细胞和/或抑制剂的试剂盒和装置。

[0171] II. 组合疗法

[0172] 本文提供了用于治疗疾病或障碍(例如癌症或增殖性疾病)的组合疗法的方法,其包括向受试者给予以下的组合疗法:1) 不抑制ITK和/或抑制BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4中的一种或多种的靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂;以及2) 免疫疗法或免疫治疗剂,如过继免疫细胞疗法,例如T细胞疗法(例如表达CAR的细胞,例如T细胞)或T细胞接合或免疫调节疗法,例如多特异性T细胞募集抗体和/或检查点抑制剂。在一些实施方案中,免疫疗法是过继免疫细胞疗法,其包含特异性识别和/或靶向与疾病或障碍(例如癌症或增殖性疾病)相关的抗原的T细胞。还提供了组合和制品(如试剂盒),其含有包含T细胞疗法的组合物和/或包含抑制剂(如BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4中的一种或多种的抑制剂)的组合物;以及此类组合物和组合用于治疗或预防疾病、病症和障碍(包括癌症)的用途。此类方法可以包括在给予(例如,开始给予)T细胞疗法(例如表达CAR的T细胞)或其他疗法(如T细胞接合疗法)之前、同时、期间、在过程中(包括在过程中一次性地和/或周期性地)和/或随后给予抑制剂。在一些实施方案中,给药可以包括依次或间歇给予抑制剂和/或免疫疗法或免疫治疗剂,例如T细胞疗法。

[0173] 在一些实施方案中,细胞疗法是过继细胞疗法。在一些实施方案中,细胞疗法是或包括肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)疗法、转基因TCR疗法或表达重组受体的细胞疗法(任选地T细胞疗法),其任选地是表达嵌合抗原受体(CAR)的细胞疗法。在一些实施方案中,疗法靶向CD19或者是B细胞靶向疗法。在一些实施方案中,细胞和用于给予细胞的剂量方案可以包括如在“细胞的给予”下的以下小节A中描述的任何细胞和剂量方案。

[0174] 在一些实施方案中,与其他蛋白酪氨酸激酶相比或与其他TEC家族激酶相比,抑制剂选择性抑制来自BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4的一种或多种靶蛋白酪氨酸激酶。在一些实施方案中,抑制剂不抑制ITK,或者对ITK的IC₅₀或K_d大于1000nM,和/或与ITK相比,选择性抑制BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4中的一种或多种。在一些实施方案中,与ITK相比,抑制剂对BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4中的一种或多种展现出至少1.5倍、2.5倍、5.0倍、10.0倍、25倍、50倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、1000倍或更高的活性。在一些实施方案中,与BTK、ITK相比和/或与来自TEC、Etk、Txk和/或ErbB4的其他激酶相比,抑制剂选择性抑制TEC、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4中的一种,例如,与BTK、ITK相比和/或与和所述蛋白酪氨酸激酶不同的来自TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4的另一种激酶相比,抑制剂对TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4中的一种展现出至少1.5倍、2.5倍、5.0倍、10.0倍、25倍、50倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、1000倍或更高的活性。在一些实施方案中,细胞和用于给予抑制剂的剂量方案可以包括如在“抑制剂的给予”下的以下小节B中描述的任何抑制剂和剂量方案。

[0175] 在一些实施方案中,将免疫疗法(如T细胞疗法(例如表达CAR的T细胞)或T细胞接

合疗法)和抑制剂作为药物组合物来提供以便向受试者给予。在一些实施方案中,药物组合物含有治疗有效量的一种或两种用于组合疗法的药剂,例如用于过继细胞疗法的T细胞和如所述的抑制剂。在一些实施方案中,将药剂配制成为用于在单独的药物组合物中给予。在一些实施方案中,本文提供的任何药物组合物可以按适合于每种给予途径的剂型来配制。

[0176] 在一些实施方案中,将组合疗法(其包括给予免疫疗法(例如T细胞疗法,包括工程化细胞,如CAR-T细胞疗法)和抑制剂)给予患有待治疗的疾病或病症(例如癌症)或有患上所述疾病或病症(例如癌症)的风险的受试者或患者。在一些方面,所述方法治疗疾病或病症(例如,改善其一种或多种症状),例如通过减轻表达免疫疗法或免疫治疗剂所识别(例如工程化T细胞所识别)的抗原的癌症中的肿瘤负荷。

[0177] 在一些实施方案中,所治疗的疾病或病症可以是任何疾病或病症,其中抗原的表达与疾病状况或障碍的病因学相关和/或参与其中,例如导致、加剧这种疾病、病症或障碍或以其他方式参与其中。示例性疾病和病症可以包括与恶性肿瘤或细胞转化(例如癌症)、自身免疫或炎症性疾病或例如由细菌、病毒或其他病原体引起的感染性疾病相关的疾病或病症。示例性抗原(其包括与可以治疗的各种疾病和病症相关的抗原)包括本文所述的任何抗原。在具体实施方案中,在组合疗法的工程化细胞上表达的重组受体(包括嵌合抗原受体或转基因TCR)特异性结合与疾病或病症相关的抗原。

[0178] 在一些实施方案中,疾病或病症是肿瘤,如实体瘤、淋巴瘤、白血病、血液肿瘤、转移性肿瘤或其他癌症或肿瘤类型。

[0179] 在一些实施方案中,癌症或增殖性疾病是B细胞恶性肿瘤或血液恶性肿瘤。在一些实施方案中,癌症或增殖性疾病是成淋巴细胞白血病(ALL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)或慢性淋巴细胞白血病(CLL)。在一些实施方案中,癌症是CLL。在一些实施方案中,所述方法可以用于治疗骨髓瘤、淋巴瘤或白血病。在一些实施方案中,所述方法可以用于治疗非霍奇金淋巴瘤(NHL)、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、急性髓性白血病(AML)或骨髓瘤(例如,多发性骨髓瘤(MM))。在一些实施方案中,所述方法可以用于治疗MM或DBCBL。

[0180] 在一些实施方案中,与疾病或障碍相关的抗原选自ROR1、B细胞成熟抗原(BCMA)、tEGFR、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、间皮素、CEA和乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3或4、erbB二聚体、EGFRvIII、FBP、FCRL5、FCRH5、胎儿乙酰胆碱受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、 κ 轻链、Lewis Y、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、黑色素瘤相关抗原(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、优先表达的黑色素瘤抗原(PRAME)、存活蛋白、EGP2、EGP40、TAG72、B7-H6、IL-13受体a2(IL-13Ra2)、CA9、GD3、HMW-MAA、CD171、G250/CAIX、HLA-A1、HLA-A2NY-ESO-1、PSCA、叶酸受体-a、CD44v6、CD44v7/8、avb6整合素、8H9、NCAM、VEGF受体、5T4、胎儿AChR、NKG2D配体、CD44v6、双重抗原和与通用标签相关的抗原、癌症-睾丸抗原、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、癌胚胎抗原、ROR1、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、Her2/neu、雌激素受体、孕酮受体、肝配蛋白B2、CD123、c-Met、GD-2、O-乙酰化GD2(OGD2)、CE7、Wilms肿瘤1(WT-1)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、CCL-1、CD138和病原体特异性抗原。在一些实施方案中,抗原与通用标签相关或者是通用标签。

[0181] 在一些实施方案中,癌症或增殖性疾病不是表达B细胞抗原的癌症。在一些实施方案中,B细胞抗原选自CD19、CD20、CD22和ROR1。在一些实施方案中,癌症或增殖性疾病是非血液癌。在一些实施方案中,癌症或增殖性疾病是实体瘤。在一些实施方案中,癌症或增殖性疾病不表达CD19、CD20、CD22或ROR1。在一些实施方案中,所提供的方法采用不靶向或特异性结合CD19、CD20、CD22或ROR1的表达重组受体的T细胞(例如CAR-T细胞)。

[0182] 在一些实施方案中,所述方法可以用于治疗非血液癌,如实体瘤。在一些实施方案中,所述方法可以用于治疗膀胱癌、肺癌、脑癌、黑色素瘤(例如小细胞肺癌、黑色素瘤)、乳腺癌、宫颈癌、卵巢癌、结直肠癌、胰腺癌、子宫内膜癌、食管癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、皮肤癌、甲状腺癌或子宫癌。在一些实施方案中,癌症或增殖性疾病是癌症是胰腺癌、膀胱癌、结直肠癌、乳腺癌、前列腺癌、肾癌、肝细胞癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、胰腺癌、直肠癌、甲状腺癌、子宫癌、胃癌、食管癌、头颈癌、黑色素瘤、神经内分泌癌、CNS癌症、脑肿瘤、骨癌或软组织肉瘤。

[0183] 在一些实施方案中,疾病或病症是感染性疾病或病症,例如但不限于病毒、逆转录病毒、细菌和原生动物感染、免疫缺陷、巨细胞病毒(CMV)、埃-巴二氏病毒(Epstein-Barr virus,EBV)、腺病毒、BK多瘤病毒。在一些实施方案中,疾病或病症是自身免疫或炎症性疾病或病症,如关节炎(例如,类风湿性关节炎(RA))、I型糖尿病、系统性红斑狼疮(SLE)、炎症肠病、银屑病、硬皮病、自身免疫性甲状腺疾病、格雷夫斯病、克罗恩病、多发性硬化症、哮喘和/或与移植物相关的疾病或病症。

[0184] 为了预防或治疗疾病,BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4中的一种或多种的抑制剂(如选择性抑制剂)和/或免疫疗法(如T细胞疗法(例如,表达CAR的T细胞)或T细胞接合疗法)的适当剂量可取决于待治疗疾病的类型、特定的抑制剂、细胞和/或在细胞上表达的重组受体、疾病的严重程度和病程、给予途径、给予抑制剂和/或免疫疗法(例如,T细胞疗法)是用于预防还是治疗目的、先前的疗法、给予频率、受试者的临床病史和对细胞的反应以及主治医师的决断。在一些实施方案中,所述组合物和细胞适合一次或在一系列治疗中给予受试者。描述了用于所提供的组合疗法的示例性剂量方案和时间表。

[0185] 在一些实施方案中,将免疫疗法(例如T细胞疗法)和BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4中的一种或多种的抑制剂(如选择性抑制剂)作为另外的组合治疗的一部分给予,所述另外的组合治疗可以与另一种治疗干预同时给予或以任何顺序依次给予。在一些情况下,将免疫疗法(例如工程化T细胞,如表达CAR的T细胞)与另一种疗法在时间上足够接近地共同给予,使得免疫疗法增强一种或多种另外的治疗剂的效果,或反之亦然。在一些实施方案中,所述细胞在一种或多种另外的治疗剂之前给予。在一些实施方案中,将免疫疗法(例如工程化T细胞,如表达CAR的T细胞)在一种或多种另外的治疗剂之后给予。在一些实施方案中,所述组合疗法方法还包括淋巴细胞清除疗法,如给予化学治疗剂。在一些实施方案中,组合疗法还包括给予另一种治疗剂,如抗癌剂、检查点抑制剂或另一种免疫调节剂。用途包括组合疗法在此类方法和治疗中的用途、以及此类组合物在制备实施此类组合疗法方法的药物中的用途。在一些实施方案中,所述方法和用途由此治疗受试者的疾病或病症或障碍,如癌症或增殖性疾病。

[0186] 在给予免疫疗法(例如T细胞疗法,如CAR-T细胞疗法)和/或BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4中的一种或多种的抑制剂(如选择性抑制剂)之前、期间或之后,在一些

实施方案中例如通过许多已知方法中的任何一种测量免疫疗法的生物活性(例如工程化细胞群的生物活性)。待评估的参数包括工程化细胞破坏靶细胞的能力、持久性和T细胞活性的其他量度,例如使用本领域已知的任何合适的方法(如在下文第IV节中进一步描述的测定)测量。在一些实施方案中,通过测定细胞毒性细胞杀伤、一种或多种细胞因子的表达和/或分泌、增殖或扩增(如用抗原再刺激后)来测量细胞(例如,基于T细胞的疗法所给予的T细胞)的生物活性。在一些方面,通过评估疾病负担和/或临床结果(如肿瘤负荷或负担的降低)来测量生物活性。在一些实施方案中,可以根据给予组合疗法的一种或两种药剂之前、期间、在过程中或之后的测定结果来确定组合疗法的一种或两种药剂的给予和/或疗法的任何重复给予。

[0187] 在一些实施方案中,与仅涉及抑制剂或用细胞疗法的单一疗法相比,组合中的抑制剂与细胞疗法的组合效果可以是协同的。例如,在一些实施方案中,本文提供的方法导致所需治疗效果的增加或改善,如与癌症相关的一种或多种症状的减少或抑制的增加或改善。

[0188] 在一些实施方案中,抑制剂增加工程化T细胞(如CAR T细胞)的扩增或增殖。在一些实施方案中,在给予受试者后,观察到体内扩增或增殖的增加。在一些实施方案中,工程化T细胞(例如CAR-T细胞)数量的增加增加了大于或大于约1.2倍、1.5倍、2.0倍、3.0倍、4.0倍、5.0倍、6.0倍、7.0倍、8.0倍、9.0倍、10.0倍或更多。

[0189] A. 免疫疗法(例如T细胞疗法或T细胞接合疗法)的给予

[0190] 在本文提供的方法、组合物、组合、试剂盒和用途的一些实施方案中,组合疗法包括向受试者给予免疫疗法,如T细胞疗法(例如表达CAR的T细胞)或T细胞接合疗法。此类疗法可以在如所述的TEK家族激酶的一种或多种抑制剂的给予之前、之后、同时给予。

[0191] 在一些实施方案中,免疫疗法是基于细胞的疗法,其是或包括给予靶向在病灶(如肿瘤或癌症)表面上表达的分子的细胞,如免疫细胞,例如T细胞或NK细胞。在一些实施方案中,免疫细胞表达T细胞受体(TCR)或其他抗原结合受体。在一些实施方案中,免疫细胞表达重组受体,如转基因TCR或嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,细胞对受试者而言是自体的。在一些实施方案中,细胞对受试者而言是同种异体的。下文描述了用于所提供的方法的示例性的此类细胞疗法(例如T细胞疗法)。

[0192] 1. T细胞接合疗法

[0193] 在一些实施方案中,免疫疗法是或包括T细胞接合疗法,其是或包含能够结合在T细胞上表达的表面分子的结合分子。在一些实施方案中,表面分子是T细胞的激活组分,如T细胞受体复合物的组分。在一些实施方案中,表面分子是CD3或者是CD2。在一些实施方案中,T细胞接合疗法是或包含抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,T细胞接合疗法是双特异性抗体,其含有至少一个结合T细胞的激活组分(例如T细胞表面分子,例如CD3或CD2)的抗原结合结构域和至少一个结合靶细胞上的表面抗原(如肿瘤或癌细胞上的表面抗原,例如如本文所述的任何所列出的抗原,例如CD19)的抗原结合结构域。在一些实施方案中,这种抗体与其两种靶标同时或几乎同时结合可以导致靶细胞和T细胞之间的暂时相互作用,从而导致T细胞的激活(例如细胞毒活性)和随后的靶细胞裂解。

[0194] 此类示例性双特异性抗体T细胞衔接器包括双特异性T细胞衔接器(BiTE)分子,其含有通过柔性接头融合的串联scFv分子(参见例如,Nagorsen和Bauerle,Exp Cell Res

317,1255-1260 (2011))、通过例如柔性接头彼此融合的串联scFv分子,并且还含有由能够稳定缔合的第一和第二亚基组成的Fc结构域(WO 2013026837);双抗体及其衍生物,包括串联双抗体(Holliger等人,Prot Eng 9,299-305 (1996);Kipriyanov等人,J Mol Biol 293,41-66 (1999));双亲和重靶向(DART)分子,其可以包括具有C末端二硫桥的双抗体形式;或者包括完整的杂交体小鼠/大鼠IgG分子的三功能单抗(triomab)(Seimetz等人,Cancer Treat Rev 36,458-467 (2010))。在一些实施方案中,T细胞接合疗法是博纳吐单抗(blinatumomab)或AMG 330。任何此类T细胞衔接器均可以用于所提供的方法中。

[0195] 2.T细胞疗法

[0196] 在一些方面,T细胞疗法是或包括肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)疗法、转基因TCR疗法或包含基因工程化细胞的T细胞疗法(如表达重组受体的细胞疗法)。在一些实施方案中,重组受体特异性结合配体,如与疾病或病症相关的配体,例如与肿瘤或癌症相关的配体或在肿瘤或癌症的细胞上表达的配体。在一些实施方案中,T细胞疗法包括给予被工程化以表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞。

[0197] 在一些实施方案中,所提供的细胞表达和/或被工程化以表达受体,如重组受体,包括含有配体结合结构域或其结合片段的那些受体;和T细胞受体(TCR)及其组分;和/或功能性非TCR抗原受体,如嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,重组受体含有特异性结合抗原的细胞外配体结合结构域。在一些实施方案中,重组受体是CAR,其含有特异性结合抗原的细胞外抗原识别结构域。在一些实施方案中,配体(如抗原)是在细胞表面上表达的蛋白质。在一些实施方案中,CAR是TCR样CAR,并且抗原是加工过的肽抗原,如细胞内蛋白的肽抗原,其与TCR一样在主要组织相容性复合物(MHC)分子的背景下在细胞表面上被识别。

[0198] 在下文的第III节中描述了工程化细胞(包括含有重组受体的工程化细胞)。示例性重组受体(包括CAR和重组TCR)以及用于将受体工程化并引入细胞中的方法包括例如国际专利申请公开号WO 200014257、WO2013126726、WO 2012/129514、WO 2014031687、WO 2013/166321、WO2013/071154、WO 2013/123061,美国专利申请公开号US 2002131960、US2013287748、US 20130149337,美国专利号6,451,995、7,446,190、8,252,592、8,339,645、8,398,282、7,446,179、6,410,319、7,070,995、7,265,209、7,354,762、7,446,191、8,324,353和8,479,118,以及欧洲专利申请号EP2537416中所述的那些,和/或由Sadellain等人,Cancer Discov.2013年4月;3(4):388-398;Davila等人(2013)PLoS ONE 8(4):e61338;Turtle等人,Curr.Opin.Immunol.,2012年10月;24(5):633-39;Wu等人,Cancer,2012年3月18(2):160-75所述的那些。在一些方面,基因工程化抗原受体包括CAR,如美国专利号7,446,190中所述的,以及国际专利申请公开号WO/2014055668A1中所述的那些。

[0199] 用于过继细胞疗法的工程化细胞的给予方法是已知的,并且可以与所提供的方法和组合物结合使用。例如,过继T细胞疗法方法描述于例如Gruenberg等人的美国专利申请公开号2003/0170238;Rosenberg的美国专利号4,690,915;Rosenberg(2011)Nat Rev Clin Oncol.8(10):577-85中。参见例如,Themeli等人,(2013)Nat Biotechnol.31(10):928-933;Tsukahara等人,(2013)Biochem Biophys Res Commun 438(1):84-9;Davila等人,(2013)PLoS ONE 8(4):e61338。

[0200] 在一些实施方案中,细胞疗法(例如,过继T细胞疗法)通过自体转移进行,其中从接受细胞疗法的受试者或从来源于这种受试者的样品中分离和/或以其他方式制备细胞。

因此,在一些方面,细胞来源于需要治疗的受试者(例如,患者),并且在分离和加工后将细胞给予同一受试者。

[0201] 在一些实施方案中,细胞疗法(例如,过继T细胞疗法)通过同种异体转移进行,其中从将要接受或最终接受细胞疗法的受试者以外的受试者(例如,第一受试者)分离和/或以其他方式制备细胞。在此类实施方案中,然后将所述细胞给予至相同物种的不同受试者,例如第二受试者。在一些实施方案中,所述第一和第二受试者在遗传上是相同的。在一些实施方案中,所述第一和第二受试者在遗传上是相似的。在一些实施方案中,所述第二受试者与所述第一受试者表达相同的HLA类别或超类型。

[0202] 细胞可以通过任何合适的方式给予。将细胞以实现治疗效果(如降低肿瘤负荷)的给药方案给予。给药和给予可部分取决于TEC家族激酶的抑制剂的给予时间表,所述抑制剂可以在开始给予T细胞疗法之前、之后和/或同时给予。T细胞疗法的各种给药时间表包括但不限于在不同时间点的单次或多次给予、推注给予和脉冲输注。

[0203] a. 组合物和配制品

[0204] 在一些实施方案中,将T细胞疗法(如包含用重组抗原受体(例如CAR或TCR)工程化的细胞的T细胞疗法)的细胞剂量提供为组合物或配制品(如药物组合物或配制品)。此类组合物可以根据所提供的方法使用,如在预防或治疗疾病、病症和障碍中。

[0205] 在一些实施方案中,用药学上可接受的载体配制T细胞疗法(如工程化T细胞(例如CAR T细胞))。在一些方面,载体的选择部分地由特定细胞或药剂和/或通过给药方法确定。因此,存在多种合适的配制品。例如,所述药物组合物可以含有防腐剂。合适的防腐剂可以包括例如对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸钠和苯扎氯铵。在一些方面,使用两种或更多种防腐剂的混合物。所述防腐剂或其混合物通常以按总组合物的重量计约0.0001%至约2%的量存在。例如由Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol, A. 编辑(1980)描述了载体。药学上可接受的载体在所用的剂量和浓度下通常对接受者无毒,并且包括但不限于:缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲氯铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚;丁醇或苄醇;烷基对羟基苯甲酸酯,如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖类,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子,如钠;金属络合物(例如锌-蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂,如聚乙二醇(PEG)。

[0206] 在一些方面,缓冲剂被包括在所述组合物中。合适的缓冲剂包括例如柠檬酸、柠檬酸钠、磷酸、磷酸钾和各种其他酸和盐。在一些方面,使用两种或更多种缓冲剂的混合物。所述缓冲剂或其混合物通常以按总组合物的重量计约0.001%至约4%的量存在。用于制备可给予的药物组合物的方法是已知的。示例性方法更详细地描述于例如Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 第21版(2005年5月1日)中。

[0207] 配制品可以包括水溶液。配制品或组合物还可含有多于一种活性成分,其可用于用细胞或药剂预防或治疗的特定适应症、疾病或病症,其中各自的活性不会相互产生不利

影响。此类活性成分以有效用于既定目的的量以合适的方式组合存在。因此,在一些实施方案中,药物组合物还包括其他药学活性剂或药物,如化学治疗剂,例如天冬酰胺酶、白消安、卡铂、顺铂、柔红霉素、多柔比星、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、甲氨蝶呤、紫杉醇、利妥昔单抗、长春碱、长春新碱等。

[0208] 在一些实施方案中,药物组合物含有有效治疗或预防疾病或病症的量(如治疗有效量或预防有效量)的细胞。在一些实施方案中,通过定期评估所治疗的受试者来监测治疗或预防功效。对于数天或更长时间的重复给予,取决于病症,重复所述治疗直至出现所需疾病症状的抑制。然而,其他剂量方案可能是有用的并且可以被确定。所需剂量可以通过单次推注给予所述组合物、通过多次推注给予所述组合物或通过连续输注给予所述组合物来递送。

[0209] 可以使用标准给予技术、配制品和/或装置来给予细胞。提供了用于储存和给予所述组合物的配制品和装置(如注射器和小瓶)。关于细胞,给药可以是自体同源的或异源的。例如,免疫应答细胞或祖细胞可以获得自一名受试者,并且给予至同一受试者或不同的相容受试者。外周血衍生的免疫应答细胞或其后代(例如,体内、离体或体外衍生的)可以经由局部注射给予,包括导管给药、全身注射、局部注射、静脉内注射或肠胃外给药。在给予治疗性组合物(例如,含有遗传修饰的免疫反应细胞的药物组合物)时,通常将其配制成单位剂量可注射形式(溶液、悬浮液、乳液)。

[0210] 配制品包括用于口服、静脉内、腹膜内、皮下、经肺、透皮、肌内、鼻内、经颊、舌下或栓剂给予的那些。在一些实施方案中,肠胃外给予药剂或细胞群。如本文所用术语“肠胃外”包括静脉内、肌内、皮下、直肠、阴道和腹膜内给予。在一些实施方案中,使用通过静脉内、腹膜内或皮下注射的外周全身递送向受试者给予药剂或细胞群。

[0211] 在一些实施方案中,组合物作为无菌液体制剂提供,例如等渗水溶液、悬浮液、乳液、分散体或粘性组合物,其在一些方面可以缓冲至选择的pH。液体制剂一般比凝胶、其他粘性组合物和固体组合物制备起来更容易。另外地,液体组合物稍微更方便给予,特别是通过注射。在另一方面,粘性组合物可以配制在适当的粘度范围内,以提供与特定组织的更长的接触时间。液体或粘性组合物可以包含载体,其可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、多元醇(例如,甘油、丙二醇、液体聚乙二醇)及其合适的混合物。

[0212] 无菌可注射溶液可以通过将细胞掺入溶剂中来制备,例如与合适的载体、稀释剂或赋形剂(如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等)掺合。所述组合物也可以是冻干的。所述组合物可以含有辅助物质,如润湿剂、分散剂或乳化剂(例如,甲基纤维素)、pH缓冲剂、胶凝或粘度增强添加剂、防腐剂、调味剂、颜料等,这取决于给予途径和所需的制剂。在一些方面,可以参考标准文本来制备合适的制剂。

[0213] 可以添加各种增强所述组合物的稳定性和无菌性的添加剂,包括抗微生物防腐剂、抗氧化剂、螯合剂和缓冲剂。防止微生物的作用可以通过不同的抗细菌和抗真菌剂(例如,对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、抗坏血酸等)来确保。通过使用延迟吸收的药剂(例如单硬脂酸铝和明胶)可以实现可注射药物形式的延长吸收。

[0214] 用于体内给予的配制品通常是无菌的。可以例如通过经无菌滤膜过滤容易地实现无菌。

[0215] 对于疾病的预防或治疗,适当的剂量可取决于待治疗的疾病类型、一种或多种药

剂的类型、细胞或重组受体的类型、疾病的严重程度和病程、给予药剂或细胞用于预防性目的还是治疗性目的、先前疗法、受试者的临床病史和对药剂或细胞的反应以及主治医师的决断。在一些实施方案中,所述组合物适合一次或在一系列治疗中给予受试者。

[0216] 在一些情况下,将细胞疗法作为包含细胞的单一药物组合物来给予。在一些实施方案中,给定剂量通过细胞或药剂的单次推注给药来给予。在一些实施方案中,给定剂量是通过例如在不超过3天的时间段内对细胞或药剂的多次推注给予或通过细胞或药剂的连续输注给予来给予。

[0217] b. 剂量时间表和给予

[0218] 在一些实施方案中,根据所提供的方法将细胞剂量给予受试者。在一些实施方案中,剂量的大小或时机根据受试者的特定疾病或病症确定。鉴于所提供的描述,凭经验确定特定疾病的剂量的大小或时机在技术人员的水平内。

[0219] 在某些实施方案中,向受试者给予约10万至约1000亿个细胞和/或该量的细胞/公斤受试者体重的范围的细胞或单独细胞亚型群体,例如像10万至约500亿个细胞(例如,约500万个细胞、约2500万个细胞、约5亿个细胞、约10亿个细胞、约50亿个细胞、约200亿个细胞、约300亿个细胞、约400亿个细胞或由任两个前述值定义的范围)、100万至约500亿个细胞(例如,约500万个细胞、约2500万个细胞、约5亿个细胞、约10亿个细胞、约50亿个细胞、约200亿个细胞、约300亿个细胞、约400亿个细胞或由任两个前述值定义的范围),如约1000万至约1000亿个细胞(例如,约2000万个细胞、约3000万个细胞、约4000万个细胞、约6000万个细胞、约7000万个细胞、约8000万个细胞、约9000万个细胞、约100亿个细胞、约250亿个细胞、约500亿个细胞、约750亿个细胞、约900亿个细胞或由前述任何两个值定义的范围),并且在一些情况下,约1亿个细胞至约500亿个细胞(例如,约1.2亿个细胞、约2.5亿个细胞、约3.5亿个细胞、约4.5亿个细胞、约6.5亿个细胞、约8亿个细胞、约9亿个细胞、约30亿个细胞、约300亿个细胞、约450亿个细胞)或这些范围之间的任何值和/或每公斤受试者体重。剂量可以根据疾病或障碍和/或患者和/或其他治疗特有的属性而变化。在一些实施方案中,这些值是指表达重组受体的细胞的数量;在其他实施方案中,它们是指给予的T细胞或PBMC或总细胞的数量。

[0220] 在一些实施方案中,细胞疗法包括给予包含许多细胞的剂量,所述剂量是至少或至少约或为或约 0.1×10^6 个细胞/kg受试者体重、 0.2×10^6 个细胞/kg、 0.3×10^6 个细胞/kg、 0.4×10^6 个细胞/kg、 0.5×10^6 个细胞/kg、 1×10^6 个细胞/kg、 2.0×10^6 个细胞/kg、 3×10^6 个细胞/kg或 5×10^6 个细胞/kg。

[0221] 在一些实施方案中,细胞疗法包括给予包含许多细胞的剂量,所述剂量在或在约 0.1×10^6 个细胞/kg受试者体重和 1.0×10^7 个细胞/kg之间、在或在约 0.5×10^6 个细胞/kg和 5×10^6 个细胞/kg之间、在或在约 0.5×10^6 个细胞/kg和 3×10^6 个细胞/kg之间、在或在约 0.5×10^6 个细胞/kg和 2×10^6 个细胞/kg之间、在或在约 0.5×10^6 个细胞/kg和 1×10^6 个细胞/kg之间、在或在约 1.0×10^6 个细胞/kg受试者体重和 5×10^6 个细胞/kg之间、在或在约 1.0×10^6 个细胞/kg和 3×10^6 个细胞/kg之间、在或在约 1.0×10^6 个细胞/kg和 2×10^6 个细胞/kg之间、在或在约 2.0×10^6 个细胞/kg受试者体重和 5×10^6 个细胞/kg之间、在或在约 2.0×10^6 个细胞/kg和 3×10^6 个细胞/kg之间或者在或在约 3.0×10^6 个细胞/kg受试者体重和 5×10^6 个细胞/kg之间(每个都包含端值)。

[0222] 在一些实施方案中,细胞剂量包含在 2×10^5 或约 2×10^5 个细胞/kg和 2×10^6 或约 2×10^6 个细胞/kg之间,如在 4×10^5 或约 4×10^5 个细胞/kg和 1×10^6 或约 1×10^6 个细胞/kg之间或在 6×10^5 或约 6×10^5 个细胞/kg和 8×10^5 或约 8×10^5 个细胞/kg之间。在一些实施方案中,细胞剂量包含不超过 2×10^5 个细胞(例如表达抗原的细胞,如表达CAR的细胞)/公斤受试者体重(细胞/kg),如不超过或不超过约 3×10^5 个细胞/kg、不超过或不超过约 4×10^5 个细胞/kg、不超过或不超过约 5×10^5 个细胞/kg、不超过或不超过约 6×10^5 个细胞/kg、不超过或不超过约 7×10^5 个细胞/kg、不超过或不超过约 8×10^5 个细胞/kg、不超过或不超过约 9×10^5 个细胞/kg、不超过或不超过约 1×10^6 个细胞/kg或者不超过或不超过约 2×10^6 个细胞/kg。在一些实施方案中,细胞剂量包含至少 2×10^5 个细胞或至少约 2×10^5 个细胞或 2×10^5 个细胞或约 2×10^5 个细胞(例如表达抗原的细胞,如表达CAR的细胞)/公斤受试者体重(细胞/kg),如至少 3×10^5 个细胞/kg或至少约 3×10^5 个细胞/kg或 3×10^5 个细胞/kg或约 3×10^5 个细胞/kg、至少 4×10^5 个细胞/kg或至少约 4×10^5 个细胞/kg或 4×10^5 个细胞/kg或约 4×10^5 个细胞/kg、至少 5×10^5 个细胞/kg或至少约 5×10^5 个细胞/kg或 5×10^5 个细胞/kg或约 5×10^5 个细胞/kg、至少 6×10^5 个细胞/kg或至少约 6×10^5 个细胞/kg或 6×10^5 个细胞/kg或约 6×10^5 个细胞/kg、至少 7×10^5 个细胞/kg或至少约 7×10^5 个细胞/kg或 7×10^5 个细胞/kg或约 7×10^5 个细胞/kg、至少 8×10^5 个细胞/kg或至少约 8×10^5 个细胞/kg或 8×10^5 个细胞/kg或约 8×10^5 个细胞/kg、至少 9×10^5 个细胞/kg或至少约 9×10^5 个细胞/kg或 9×10^5 个细胞/kg或约 9×10^5 个细胞/kg、至少 1×10^6 个细胞/kg或至少约 1×10^6 个细胞/kg或 1×10^6 个细胞/kg或约 1×10^6 个细胞/kg或者至少 2×10^6 个细胞/kg或至少约 2×10^6 个细胞/kg或 2×10^6 个细胞/kg或约 2×10^6 个细胞/kg。

[0223] 在某些实施方案中,所述细胞或单独的细胞亚型群体以约100万至约1000亿个细胞和/或按每公斤体重所述细胞量的范围给予受试者,例如,100万至约500亿个细胞(例如,约500万个细胞、约2500万个细胞、约5亿个细胞、约10亿个细胞、约50亿个细胞、约200亿个细胞、约300亿个细胞、约400亿个细胞或由任两个前述值定义的范围),如约1000万至约1000亿个细胞(例如,约2000万个细胞、约3000万个细胞、约4000万个细胞、约6000万个细胞、约7000万个细胞、约8000万个细胞、约9000万个细胞、约100亿个细胞、约250亿个细胞、约500亿个细胞、约750亿个细胞、约900亿个细胞或由任两个前述值定义的范围),并且在一些情况下约1亿个细胞至约500亿个细胞(例如,约1.2亿个细胞、约2.5亿个细胞、约3.5亿个细胞、约4.5亿个细胞、约6.5亿个细胞、约8亿个细胞、约9亿个细胞、约30亿个细胞、约300亿个细胞、约450亿个细胞或在这些范围之间的任何值)和/或每公斤体重的范围。剂量可以根据疾病或障碍和/或患者和/或其他治疗特有的属性而变化。

[0224] 在一些实施方案中,细胞剂量是细胞的平剂量或细胞的固定剂量,使得细胞剂量不依赖于或基于受试者的体表面积或体重。

[0225] 在一些实施方案中,例如,当受试者是人时,剂量包括少于约 1×10^8 个表达重组受体(例如,CAR)的总细胞、T细胞或外周血单核细胞(PBMC),例如在约 1×10^6 至 1×10^8 个此类细胞(如 2×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 或 1×10^8)或总此类细胞的范围中,或前述任何两个值之间的范围。在一些实施方案中,当受试者是人时,剂量包括约 1×10^6 和 3×10^8 个之间的表达重组受体(例如,CAR)的总细胞,例如在约 1×10^7 至 2×10^8 个此类细胞(如 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 或 1.5×10^8 个总此类细胞)的范围中,或前述任何两个值之间的范围。在一些实

施方案中,给予患者多个剂量,并且每个剂量或总剂量可以在任何前述值内。在一些实施方案中,细胞剂量包括给予从或从约 1×10^5 至 5×10^8 个表达重组受体的总T细胞或总T细胞、 1×10^5 至 1×10^8 个表达重组受体的总T细胞或总T细胞、从或从约 5×10^5 至 1×10^7 个表达重组受体的总T细胞或总T细胞或者从或从约 1×10^6 至 1×10^7 个表达重组受体的总T细胞或总T细胞(每个都包含端值)。

[0226] 在一些实施方案中,剂量的T细胞包括CD4+T细胞、CD8+T细胞或CD4+和CD8+T细胞。

[0227] 在一些实施方案中,例如,当受试者是人时,剂量的CD8+T细胞(包括在剂量中包括CD4+和CD8+T细胞)包括在约 1×10^6 和 1×10^8 个之间的表达重组受体(例如,CAR)的总CD8+细胞,例如在约 5×10^6 至 1×10^8 个此类细胞的范围内,如 1×10^7 、 2.5×10^7 、 5×10^7 、 7.5×10^7 或 1×10^8 个总此类细胞,或前述任何两个值之间的范围。在一些实施方案中,给予患者多个剂量,并且每个剂量或总剂量可以在任何前述值内。在一些实施方案中,细胞剂量包括给予从或从约 1×10^7 至 0.75×10^8 个表达重组受体的总CD8+T细胞、 1×10^7 至 2.5×10^7 个表达重组受体的总CD8+T细胞、从或从约 1×10^7 至 0.75×10^8 个表达重组受体的总CD8+T细胞(每个都包含端值)。在一些实施方案中,细胞剂量包括给予或给予约 1×10^7 、 2.5×10^7 、 5×10^7 、 7.5×10^7 或 1×10^8 个表达重组受体的总CD8+T细胞。

[0228] 在一些实施方案中,细胞(例如,表达重组受体的T细胞)的剂量作为单一剂量给予受试者,或者在两周、一个月、三个月、六个月、1年或更长的时间段内仅给予一次。

[0229] 在过继细胞疗法的背景下,给定细胞“剂量”的给予包括以单一组合物和/或单次不间断给药的方式(例如,以单次注射或连续输注的方式)给予给定量或数量的细胞,并且还包括在如不超过3天的指定时间段内以在多个单独组合物或输注中提供的分割剂量的方式给予给定量或数量的细胞。因此,在一些情况下,剂量是指定数量的细胞的单次或连续给药,在单个时间点给予或开始。然而,在一些情况下,剂量在不超过三天的时间段内以多次注射或输注的方式给予,如每天一次持续三天或两天或者通过在一天的时间内多次输注。

[0230] 因此,在一些方面,所述剂量的细胞以单一药物组合物给予。在一些实施方案中,所述剂量的细胞以共同含有所述剂量的细胞的多种组合物给予。

[0231] 在一些实施方案中,术语“分割剂量”是指这样分割的剂量,使其在超过一天的时间内给予。这种类型的给药包括在本方法中并且被认为是单一剂量。在一些实施方案中,分割剂量的细胞在不超过三天的时间段内以共同包含剂量的细胞的多个组合物来给予。

[0232] 因此,细胞剂量可以作为分割剂量给予,例如随时间给予的分割剂量。例如,在一些实施方案中,剂量可以在2天或3天内给予受试者。用于分割给药的示例性方法包括在第一天给予25%的剂量并在第二天给予剩余的75%的剂量。在其他实施方案中,可以在第一天给予33%的剂量,并且在第二天给予剩余的67%。在一些方面,在第一天给予10%的剂量,在第二天给予30%的剂量,并且在第三天给予60%的剂量。在一些实施方案中,分割剂量不超过3天。

[0233] 在一些实施方案中,所述剂细胞通常足够大以有效减轻疾病负担。

[0234] 在一些实施方案中,细胞以所需剂量给予,所述所需剂量在一些方面包括所需剂量或数量的细胞或一种或多种细胞类型和/或所需比率的细胞类型。因此,在一些实施方案中,细胞剂量基于细胞总数(或每kg体重的细胞数量)和所需的单独群体或亚型的比率,如CD4+与CD8+的比率。在一些实施方案中,细胞剂量基于所需的单独群体中的细胞或单独细

胞类型的总数(或每kg体重的细胞数量)。在一些实施方案中,剂量基于这种特征的组合,如所需的总细胞数量、所需比率和所需的单独群体中的细胞总数。

[0235] 在一些实施方案中,以所需剂量的总细胞(如期望剂量的T细胞)的耐受差异或在所述耐受差异之内给予细胞的群体或亚型如CD8⁺和CD4⁺T细胞。在一些方面,所需剂量是所需细胞数或被给予所述细胞的受试者的每单位体重的所需细胞数(例如,细胞/kg)。在一些方面,所需剂量等于或高于最小细胞数量或每单位体重的最小细胞数量。在一些方面,在以所需剂量给予的总细胞中,单独群体或亚型以等于或接近所需输出比例(如CD4⁺与CD8⁺比例)存在,例如在这种比例的一定耐受差异或误差内。

[0236] 在一些实施方案中,细胞以所需剂量的一种或多种单独细胞群或亚型的耐受差异或在所述耐受差异之内给予,如所需剂量的CD4⁺细胞和/或所需剂量的CD8⁺细胞。在一些方面,所需剂量是所需的亚型或群体的细胞数或所需的被给予所述细胞的受试者的每单位体重的此类细胞数(例如,细胞/kg)。在一些方面,所需剂量等于或高于最小的群体或亚型的细胞数量或每单位体重的最小的群体或亚型的细胞数量。

[0237] 因此,在一些实施方案中,剂量基于所需的总细胞的固定剂量和所需比例,和/或基于所需的一种或多种单独亚型或亚群(例如,各自)的固定剂量。因此,在一些实施方案中,剂量基于所需的T细胞的固定或最小剂量和所需的CD4⁺与CD8⁺细胞的比率,和/或基于所需的CD4⁺和/或CD8⁺细胞的固定或最小剂量。

[0238] 在一些实施方案中,细胞在多种细胞群或亚型(如CD4⁺和CD8⁺细胞或亚型)的所需输出比率的耐受范围下或耐受范围内给予。在一些方面,所需比率可以是特定比率或可以是一系列比率。例如,在一些实施方案中,所需比例(例如,CD4⁺与CD8⁺细胞的比例)在1:5或约1:5和5:1或约5:1之间(或大于约1:5且小于约5:1),或在1:3或约1:3和3:1或约3:1之间(或大于约1:3且小于约3:1),如在2:1或约2:1和1:5或约1:5之间(或大于约1:5且小于约2:1,如5:1、4.5:1、4:1、3.5:1、3:1、2.5:1、2:1、1.9:1、1.8:1、1.7:1、1.6:1、1.5:1、1.4:1、1.3:1、1.2:1、1.1:1、1:1、1:1.1、1:1.2、1:1.3、1:1.4、1:1.5、1:1.6、1:1.7、1:1.8、1:1.9、1:2、1:2.5、1:3、1:3.5、1:4、1:4.5或1:5或者约5:1、4.5:1、4:1、3.5:1、3:1、2.5:1、2:1、1.9:1、1.8:1、1.7:1、1.6:1、1.5:1、1.4:1、1.3:1、1.2:1、1.1:1、1:1、1:1.1、1:1.2、1:1.3、1:1.4、1:1.5、1:1.6、1:1.7、1:1.8、1:1.9、1:2、1:2.5、1:3、1:3.5、1:4、1:4.5或1:5)。在一些方面,耐受差异在所需比率的约1%、约2%、约3%、约4%、约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%,包括这些范围之间的任何值。

[0239] 在具体实施方案中,细胞的数量和/或浓度是指表达重组受体(例如,CAR)的细胞的数量。在其他实施方案中,细胞的数量和/或浓度是指给予的所有细胞、T细胞或外周血单核细胞(PBMC)的数量或浓度。

[0240] 在一些方面,剂量的大小基于一个或多个标准来确定,如受试者对先前治疗(例如化学疗法)的反应、受试者的疾病负担(如肿瘤负荷、体积、尺寸或程度)、转移的程度或类型、分期和/或受试者发生毒性结果(例如,CRS、巨噬细胞激活综合征、肿瘤溶解综合征、神经毒性和/或针对所给予的细胞和/或重组受体的宿主免疫应答)的可能性或发生率。

[0241] 在一些实施方案中,与细胞组合给予抑制剂能够增加(在一些情况下显著增加)细胞的扩增或增殖,因此可以向受试者给予较低细胞剂量。在一些情况下,所提供的方法允许给予较低剂量的此类细胞,以实现与在不给予抑制剂的情况下给予细胞疗法的方法中的剂

量相同或更好的治疗功效,如比在不给予抑制剂的情况下给予细胞疗法的方法中的剂量至少1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍或10倍。

[0242] 在一些实施方案中,例如,较低剂量含有少于约 5×10^6 个细胞、表达重组受体(例如CAR)的细胞、T细胞和/或PBMC/公斤受试者体重,如少于约 $.5 \times 10^6$ 、 4×10^6 、 3.5×10^6 、 3×10^6 、 2.5×10^6 、 2×10^6 、 1.5×10^6 、 1×10^6 、 5×10^5 、 2.5×10^5 或 1×10^5 个此类细胞/公斤受试者体重。在一些实施方案中,较低剂量含有少于约 1×10^5 、 2×10^5 、 5×10^5 或 1×10^6 个此类细胞/公斤受试者体重,或在前述任何两个值之间的范围内的值。在一些实施方案中,这些值是指表达重组受体的细胞的数量;在其他实施方案中,它们是指给予的T细胞或PBMC或总细胞的数量。

[0243] 在一些实施方案中,可以向受试者给予一个或多个后续细胞剂量。在一些实施方案中,在开始给予第一细胞剂量后大于或大于约7天、14天、21天、28天或35天给予后续细胞剂量。后续细胞剂量可以大于、大致等于或小于第一剂量。在一些实施方案中,可以重复T细胞疗法的给予(如第一和/或第二细胞剂量的给予)。

[0244] 在一些实施方案中,在给予抑制剂之前(before/prior to)、同时或之后(随后(subsequently或subsequent to))给予(开始给予)细胞疗法(例如细胞剂量或分割细胞剂量的第一剂量)。

[0245] 在一些实施方案中,与开始(starting或initiating)给予抑制剂同时或在之后给予细胞剂量或后续细胞剂量。在一些实施方案中,在开始(starting或initiating)给予抑制剂之后0至90天(如0至30天、0至15天、0至6天、0至96小时、0至24小时、0至12小时、0至6小时、或0至2小时、2小时至30天、2小时至15天、2小时至6天、2小时至96小时、2小时至24小时、2小时至12小时、2小时至6小时、6小时至90天、6小时至30天、6小时至15天、6小时至6天、6小时至96小时、6小时至24小时、6小时至12小时、12小时至90天、12小时至30天、12小时至15天、12小时至6天、12小时至96小时、12小时至24小时、24小时至90天、24小时至30天、24小时至15天、24小时至6天、24小时至96小时、96小时至90天、96小时至30天、96小时至15天、96小时至6天、6天至90天、6天至30天、6天至15天、15天至90天、15天至30天或30天至90天)给予细胞剂量或后续细胞剂量。在一些实施方案中,在开始(starting或initiating)给予抑制剂之后至少或约至少或约1小时、2小时、6小时、12小时、24小时、2天、3天、6天、12天、15天、30天、60天或90天给予细胞剂量。

[0246] 在一些实施方案中,在实现抑制剂的一种或多种效果时给予细胞剂量。

[0247] 在一些实施方案中,在开始(starting或initiating)给予抑制剂之前给予细胞剂量或后续细胞剂量。在一些实施方案中,在给予抑制剂之前至少或至少约1小时、至少或至少约2小时、至少或至少约3小时、至少或至少约6小时、至少或至少约12小时、至少或至少约1天、至少或至少约2天、至少或至少约3天、至少或至少约4天、至少或至少约5天、至少或至少约6天、至少或至少约7天、至少或至少约12天、至少或至少约14天、至少或至少约15天、至少或至少约21天、至少或至少约28天、至少或至少约30天、至少或至少约35天、至少或至少约42天、至少或至少约60天或至少或至少约90天给予细胞剂量。

[0248] 在一些实施方案中,在这样的时间给予抑制剂,其中免疫疗法(例如T细胞疗法,如CAR-T细胞疗法)的先前给予与和恰在开始免疫疗法(例如T细胞疗法,如CAR-T细胞疗法)之前的时间或在开始免疫疗法之后的在前时间点T细胞的功能性相比T细胞的功能性下降相

关联或可能与其相关。在一些实施方案中,在给予T细胞疗法(例如,过继T细胞疗法)的细胞剂量之后但在给予抑制剂之前,所述方法涉及评估来自受试者的样品的T细胞的一种或多种功能,如细胞的扩增或持久性,例如如通过血液中的水平或量或如本文所述的其他表型或所需结果(例如像第III节中所述的那些)确定的。用于确定或评估组合疗法的方案的各种参数在第III节中描述。

[0249] B. 抑制剂的给予

[0250] 所提供的方法、组合物、组合、试剂盒和用途涉及给予选自布鲁顿酪氨酸激酶(Btk)、tec蛋白酪氨酸激酶(TEC)、BMX非受体酪氨酸激酶(BMX/ETK)、TXK酪氨酸激酶(TXK; RLK/TXK)和/或受体酪氨酸蛋白激酶ErbB4 (ERBB4)的蛋白酪氨酸激酶的抑制剂。抑制剂可以在给予免疫治疗剂或免疫疗法(例如,T细胞疗法)(例如,给予表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞)之前、之后、期间、同时或几乎同时、依次和/或间歇地给予。

[0251] 在一些实施方案中,抑制剂以小于或小于约1000nM、小于或小于约900nM、小于或小于约800nM、小于或小于约700nM、小于或小于约600nM、小于或小于约500nM、小于或小于约400nM、小于或小于约300nM、小于或小于约200nM或者小于或小于约100nM的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制BTK。在一些实施方案中,抑制剂以小于或小于约1000nM、小于或小于约900nM、小于或小于约800nM、小于或小于约700nM、小于或小于约600nM、小于或小于约500nM、小于或小于约400nM、小于或小于约300nM、小于或小于约200nM或者小于或小于约100nM的解离常数(K_d)与BTK结合。在一些实施方案中,抑制剂对BTK的抑制常数(K_i)小于或小于约1000nM、小于或小于约900nM、小于或小于约800nM、小于或小于约700nM、小于或小于约600nM、小于或小于约500nM、小于或小于约400nM、小于或小于约300nM、小于或小于约200nM或者小于或小于约100nM。

[0252] 在一些实施方案中,抑制剂以小于或小于约1000nM、小于或小于约900nM、小于或小于约800nM、小于或小于约700nM、小于或小于约600nM、小于或小于约500nM、小于或小于约400nM、小于或小于约300nM、小于或小于约200nM或者小于或小于约100nM的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制TEC。在一些实施方案中,抑制剂以小于或小于约1000nM、小于或小于约900nM、小于或小于约800nM、小于或小于约700nM、小于或小于约600nM、小于或小于约500nM、小于或小于约400nM、小于或小于约300nM、小于或小于约200nM或者小于或小于约100nM的解离常数(K_d)与TEC结合。在一些实施方案中,抑制剂对TEC的抑制常数(K_i)小于或小于约1000nM、小于或小于约900nM、小于或小于约800nM、小于或小于约700nM、小于或小于约600nM、小于或小于约500nM、小于或小于约400nM、小于或小于约300nM、小于或小于约200nM或者小于或小于约100nM。

[0253] 在一些实施方案中,抑制剂以小于或小于约1000nM、小于或小于约900nM、小于或小于约800nM、小于或小于约700nM、小于或小于约600nM、小于或小于约500nM、小于或小于约400nM、小于或小于约300nM、小于或小于约200nM或者小于或小于约100nM的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制BMX/ETK。在一些实施方案中,抑制剂以小于或小于约1000nM、小于或小于约900nM、小于或小于约800nM、小于或小于约700nM、小于或小于约600nM、小于或小于约500nM、小于或小于约400nM、小于或小于约300nM、小于或小于约200nM或者小于或小于约100nM的解离常数(K_d)与BMX/ETK结合。在一些实施方案中,抑制剂对BMX/ETK的抑制常数(K_i)小于或小于约1000nM、小于或小于约900nM、小于或小于约800nM、小于或小于约700nM、

小于或小于约600nM、小于或小于约500nM、小于或小于约400nM、小于或小于约300nM、小于或小于约200nM或者小于或小于约100nM。

[0254] 在一些实施方案中,抑制剂以小于或小于约1000nM、小于或小于约900nM、小于或小于约800nM、小于或小于约700nM、小于或小于约600nM、小于或小于约500nM、小于或小于约400nM、小于或小于约300nM、小于或小于约200nM或者小于或小于约100nM的半最大抑制浓度 (IC_{50}) 抑制RLK/TXK。在一些实施方案中,抑制剂以小于或小于约1000nM、小于或小于约900nM、小于或小于约800nM、小于或小于约700nM、小于或小于约600nM、小于或小于约500nM、小于或小于约400nM、小于或小于约300nM、小于或小于约200nM或者小于或小于约100nM的解离常数 (K_d) 与RLK/TXK结合。在一些实施方案中,抑制剂对RLK/TXK的抑制常数 (K_i) 小于或小于约1000nM、小于或小于约900nM、小于或小于约800nM、小于或小于约700nM、小于或小于约600nM、小于或小于约500nM、小于或小于约400nM、小于或小于约300nM、小于或小于约200nM或者小于或小于约100nM。

[0255] 在一些实施方案中,抑制剂以小于或小于约1000nM、小于或小于约900nM、小于或小于约800nM、小于或小于约700nM、小于或小于约600nM、小于或小于约500nM、小于或小于约400nM、小于或小于约300nM、小于或小于约200nM或者小于或小于约100nM的半最大抑制浓度 (IC_{50}) 抑制ERBB4。在一些实施方案中,抑制剂以小于或小于约1000nM、小于或小于约900nM、小于或小于约800nM、小于或小于约700nM、小于或小于约600nM、小于或小于约500nM、小于或小于约400nM、小于或小于约300nM、小于或小于约200nM或者小于或小于约100nM的解离常数 (K_d) 与ERBB4结合。在一些实施方案中,抑制剂对ERBB4的抑制常数 (K_i) 小于或小于约1000nM、小于或小于约900nM、小于或小于约800nM、小于或小于约700nM、小于或小于约600nM、小于或小于约500nM、小于或小于约400nM、小于或小于约300nM、小于或小于约200nM或者小于或小于约100nM。

[0256] 在一些实施方案中,抑制剂不抑制IL-2诱导型T细胞激酶 (ITK)。在一些实施方案中,抑制剂对ITK展现出大于或大于约1000nM、大于或大于约2 μ M、大于或大于约3 μ M、大于或大于约4 μ M、大于或大于约5 μ M、大于或大于约10 μ M、大于或大于约50 μ M、大于或大于约100 μ M或者大于或大于约1000 μ M的半最大抑制浓度 (IC_{50})。在一些实施方案中,抑制剂对ITK的解离常数 (K_d) 大于或大于约1000nM、大于或大于约2 μ M、大于或大于约3 μ M、大于或大于约4 μ M、大于或大于约5 μ M、大于或大于约10 μ M、大于或大于约50 μ M、大于或大于约100 μ M或者大于或大于约1000 μ M。

[0257] 在一些实施方案中,抑制剂以比ITK的半最大抑制浓度低至少约2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约10倍、至少约20倍、至少约30倍、至少约40倍、至少约50倍、至少约100倍、至少约500倍、至少约1000倍、至少约10,000倍、至少约100,000倍或至少约1,000,000倍的半最大抑制浓度 (IC_{50}) 抑制BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK或ERBB4中的一种或多种。

[0258] 在一些实施方案中,抑制剂对BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK或ERBB4中的一种或多种的解离常数 (K_d) 比对ITK的解离常数低至少约2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约10倍、至少约20倍、至少约30倍、至少约40倍、至少约50倍、至少约100倍、至少约500倍、至少约1000倍、至少约10,000倍、至少约100,000倍或至少约1,000,000倍。

[0259] 在一些实施方案中,抑制剂对BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK或ERBB4中的一种或多种

的抑制常数 (K_i) 比对ITK的抑制常数低至少约2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约10倍、至少约20倍、至少约30倍、至少约40倍、至少约50倍、至少约100倍、至少约500倍、至少约1000倍、至少约10,000倍、至少约100,000倍或至少约1,000,000倍。

[0260] 在一些实施方案中,使用体外测定测量或确定 IC_{50} 、 K_d 和/或 K_i 。用于评估或定量或测量如所述的蛋白酪氨酸激酶抑制剂活性的测定在本领域是已知的。此类测定可以在体外进行,并且包括用于评估药剂抑制特定生物或生物化学功能的能力的测定。在一些实施方案中。在一些实施方案中,可以进行激酶活动研究。蛋白酪氨酸激酶催化末端磷酸基团从三磷酸腺苷(ATP)转移到激酶本身或另一种蛋白质底物的酪氨酸残基的羟基。在一些实施方案中,可以通过在存在ATP的情况下将激酶与底物(例如,抑制剂)一起孵育来测量激酶活性。在一些实施方案中,可以通过几种报告系统(包括比色、放射性和荧光检测)来评估特定激酶对磷酸化底物的测量。(Johnson, S.A. & T. Hunter (2005) Nat. Methods 2:17。)在一些实施方案中,可以评估抑制剂对一种或多种特定激酶的亲和力,例如通过使用竞争配体结合测定(Ma等人, Expert Opin Drug Discov. 2008年6月; 3(6):607-621)。从这些测定可以计算半最大抑制浓度(IC_{50})。 IC_{50} 是将生物或生物化学反应或功能降低其最大值的50%的浓度。在一些情况下,例如在激酶活性研究中, IC_{50} 是需要将靶激酶活性抑制50%的化合物浓度。在一些情况下,可以另外或可替代地确定解离常数(K_d)和/或抑制常数(K_i 值)。 IC_{50} 和 K_d 可以通过本领域已知的许多方式来计算。可以根据Cheng-Prusoff等式从 IC_{50} 和 K_d 值计算抑制常数(K_i 值): $K_i = IC_{50} / (1 + L / K_d)$, 其中L是抑制剂的浓度(Biochem Pharmacol 22:3099-3108, 1973)。 K_i 是将导致占用50%的在不存在配体或其他竞争物的情况下存在的结合位点的未标记抑制剂的浓度。

[0261] 在一些实施方案中,抑制剂是肽、蛋白质、抗体或其抗原结合片段、抗体模拟物、适配体或核酸分子。在一些实施方案中,抑制剂是小分子。

[0262] 在一些实施方案中,抑制剂是在酪氨酸激酶的活性位点附近具有可接近的半胱氨酸残基的酪氨酸蛋白激酶的抑制剂。在一些实施方案中,抑制剂不可逆地降低或消除酪氨酸激酶的激活。在一些实施方案中,抑制剂与蛋白酪氨酸激酶上的半胱氨酸残基形成共价键。在一些实施方案中,半胱氨酸残基是Cys 481残基。在一些实施方案中,抑制剂包含迈克尔(Michael)受体部分,其与酪氨酸激酶的适当半胱氨酸残基形成共价键。在一些实施方案中,相对于也含有可评估的-SH部分的其他生物分子,迈克尔受体部分优先与酪氨酸激酶蛋白的适当半胱氨酸侧链结合。

[0263] 在一些实施方案中,抑制剂例如以5.1nM或约5.1nM的 IC_{50} 值对Btk展现出抑制活性;对Itk不展现出抑制活性或者以大于或大于约1000nM的 IC_{50} 值展现出任何这种活性;例如以93nM或约93nM的 IC_{50} 值对Tec展现出抑制活性;例如以368nM或约368nM的 IC_{50} 值对RLK/TKX展现出抑制活性;以46nM或约46nM的 IC_{50} 值对BMX/ETK展现出抑制活性;和/或例如以16nM或约16nM的 IC_{50} 值对ErbB4展现出抑制活性,在每种情况下任选地如通过已知的体外测定和/或本文所述的测定测量的。在一些方面,抑制剂是式(II)或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Byrd JC, Harrington B, O'Brien S, Jones JA, Schuh A, Devereux S等人 The compound of Formula (II) in relapsed chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med. 2016; 374(4):323-32; Wu等人, "The compound of Formula (II): a selective second-generation BTK inhibitor," Journal of

Hematology&Oncology (2016) 9:21。

[0264] 在一些实施方案中,抑制剂例如以1 μ M或约1 μ M的IC₅₀值对Btk展现出抑制活性,例如像如通过已知的体外测定和/或本文所述的测定测量的。在一些方面,抑制剂是BGB-3111 (由Wu等人,“Second-generation inhibitors of Bruton tyrosine kinase,”Journal of Hematology&Oncology (2016) 9:80W02016/024230描述)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。在一些实施方案中,抑制剂例如以1.9nM或约1.9nM的IC₅₀值对Btk展现出抑制活性;对Itk不展现出抑制活性或者以大于或大于约1000nM或者4000或4270nM或约4000或4270nM的IC₅₀值展现出任何这种活性,或者对ITK具有与式(II)的化合物相同的较少的抑制活性。在一些实施方案中,抑制剂不抑制TEC或者仅以大于1000nM或大于10,000nM的IC₅₀值对IC₅₀展现出任何这种抑制活性。在一些实施方案中,抑制剂不抑制BMX或者仅以大于1000nM或为或约或大于1800nM或大于10,000nM的IC₅₀值对IC₅₀展现出任何这种抑制活性。在一些方面,抑制剂是CGI-1746 (参见Hendriks等人,“Targeting Bruton’s tyrosine kinase in B cell malignancies,”Nature,2014,14:219-232; Akinleye等人,“Ibrutinib and novel BTK inhibitors in clinical development.”Journal of Hematology&Oncology 2013,6:59;W02016/024230;Di Paolo等人,Nat.Chem.Biol.,2011,7(1):41-50)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。

[0265] 在一些实施方案中,抑制剂例如小于约4.4nM或约5nM的IC₅₀值对Btk展现出抑制活性;对Itk不展现出抑制活性或者以大于或大于约3000nM的IC₅₀值展现出任何这种活性;例如以8.2nM或约8.2nM或约6.2nM的IC₅₀值对Tec展现出抑制活性;例如以1.9nM或1.4nM或约1.9nM或1.4nM的IC₅₀值对RLK/TXK展现出抑制活性;和/或以1.9nM或0.7nM或约1.9nM或0.7nM的IC₅₀值对BMX/ETK展现出抑制活性,在每种情况下任选地如通过已知的体外测定和/或本文所述的测定测量的。在一些方面,抑制剂是N-(3-(2-(3-氨基苯基氨基)嘧啶-5-基氨基甲酰基)-4-甲基苯基)-2-萘甲酰胺化合物或N-(2-(3-(2-丙烯酰胺基乙酰胺基)苯基氨基)嘧啶-5-基)-2-甲基-5-(3-(三氟甲基)苯甲酰胺基)苯甲酰胺(化合物31或38)(Li等人,J.Med.Chem.,2014,57(12):5112-28)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。

[0266] 在一些实施方案中,抑制剂例如以约50nM的IC₅₀值对ErbB4展现出抑制活性;并且对Itk不展现出抑制活性或者以大于或大于约10 μ M的IC₅₀值展现出任何这种活性,在每种情况下任选地如通过已知的体外测定和/或本文所述的测定测量的。在一些方面,抑制剂是4557W(CAS ID 179248-61-4)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Anastassiasdis等人,Nat Biotechnol.2011年10月30日;29(11):1039-45。

[0267] 在一些实施方案中,抑制剂例如以约5nM至约500nM的IC₅₀值对ErbB4展现出抑制活性;并且对Itk不展现出抑制活性或者以大于或大于约10 μ M的IC₅₀值展现出任何这种活性,在每种情况下任选地如通过已知的体外测定和/或本文所述的测定测量的。在一些实施方案中,抑制剂例如以约6.3nM的IC₅₀值对ErbB4展现出抑制活性。在一些方面,抑制剂是阿法替尼(Afatinib)(CAS ID 439081-18-2)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Davis等人,Nat Biotechnol,2011;29:1046-51。在一些实施方案中,抑制剂例如以约250nM的IC₅₀值对ErbB4展现出抑制活性。在一些方面,抑制剂是AG1478(CAS

ID 175178-82-2) 或化合物56 (CAS ID171745-13-4)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Anastassiasdis等人, Nat Biotechnol. 2011年10月30日; 29 (11) :1039-45。在一些实施方案中, 抑制剂例如以约150nM的IC₅₀值对ErbB4展现出抑制活性。在一些方面, 抑制剂是吉非替尼 (Gefitinib) (CAS ID184475-35-2)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Karaman等人, Nat Biotechnol. 2008年1月; 26 (1) :127-32。在一些方面, 抑制剂是WHI-P154 (CAS ID 211555-04-3)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Anastassiasdis等人, Nat Biotechnol. 2011年10月30日; 29 (11) :1039-45。在一些实施方案中, 抑制剂例如以约21nM的IC₅₀值对ErbB4展现出抑制活性。在一些方面, 抑制剂是JNJ-28871063 (CAS ID 944341-54-2)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Emanuel等人, Mol Pharmacol. 2008年2月; 73 (2) :338-48。在一些实施方案中, 抑制剂例如以约18nM的IC₅₀值对ErbB4展现出抑制活性。在一些方面, 抑制剂是Kinome_714、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Fidanze等人, Bioorg Med Chem Lett. 2010年4月15日; 20 (8) :2452-5。在一些实施方案中, 抑制剂例如以约21nM的Kd对ErbB4展现出抑制活性。在一些方面, 抑制剂是培利替尼 (Pelitinib) (CAS ID 257933-82-7)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Fabian等人, Nat Biotechnol. 2005年3月; 23 (3) 329-36。在一些实施方案中, 抑制剂例如以约230nM的Kd对ErbB4展现出抑制活性。在一些方面, 抑制剂是厄洛替尼 (CAS ID183319-69-9)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Davis等人, Nat Biotechnol, 2011; 29:1046-51。在一些实施方案中, 抑制剂例如以约345nM的IC₅₀值对ErbB4展现出抑制活性。在一些方面, 抑制剂是拉帕替尼 (Lapatinib) (CAS ID 183319-69-9)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Mirams等人, J Pharmacol Toxicol Methods, 2014; 70:246-54。

[0268] 在一些实施方案中, 抑制剂例如以小于约250nM的IC₅₀值对Btk展现出抑制活性; 对Itk不展现出抑制活性或者以大于或大于约5μM的IC₅₀值展现出任何这种活性; 和/或例如以250nM或约250nM的IC₅₀值对RLK/TXK展现出抑制活性, 在每种情况下任选地如通过已知的体外测定和/或本文所述的测定测量的。在一些方面, 抑制剂是Aloisine A (CAS ID 496864-16-5)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Anastassiasdis等人, Nat Biotechnol. 2011年10月30日; 29 (11) :1039-45。

[0269] 在一些实施方案中, 抑制剂例如以约545nM的IC₅₀值对Btk展现出抑制活性; 并且对Itk不展现出抑制活性或者以大于或大于约25μM的IC₅₀值展现出任何这种活性, 在每种情况下任选地如通过已知的体外测定和/或本文所述的测定测量的。在一些方面, 抑制剂是AMG-47a (CAS ID 882663-88-9)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见DiMauro等人, J Med Chem, 2006年9月21日; 49 (19) :5671-86。

[0270] 在一些实施方案中, 抑制剂例如以小于约500nM的IC₅₀值对Btk展现出抑制活性; 对Itk不展现出抑制活性或者以大于或大于约10μM的IC₅₀值展现出任何这种活性; 和/或例如以500nM或约500nM的IC₅₀值对RLK/TXK展现出抑制活性, 在每种情况下任选地如通过已知的体外测定和/或本文所述的测定测量的。在一些方面, 抑制剂是AS601245 (CAS ID 345987-15-7)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见

Anastassiasdis等人, Nat Biotechnol. 2011年10月30日; 29 (11) : 1039-45。

[0271] 在一些实施方案中, 抑制剂例如以小于约50nM的Kd值对Btk展现出抑制活性; 对Itk不展现出抑制活性或者以大于或大于约5000nM的IC₅₀值展现出任何这种活性; 例如以50nM或约50nM的Kd值对RLK/TKK展现出抑制活性; 和/或以约60nM的IC₅₀值对ErbB4展现出抑制活性, 在每种情况下任选地如通过已知的体外测定和/或本文所述的测定测量的。在一些方面, 抑制剂是BMS-690514 (CAS ID 859853-30-8)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Wong等人, Clin Cancer Res. 2011年6月15日; 17 (12) : 4031-41。

[0272] 在一些实施方案中, 抑制剂例如以小于约2.5nM的IC₅₀值对Btk展现出抑制活性; 对Itk不展现出抑制活性或者以大于或大于约1700nM的Kd值展现出任何这种活性; 例如以282nM或约282nM的IC₅₀值对Tec展现出抑制活性; 例如以40nM或约40nM的IC₅₀值对RLK/TKK展现出抑制活性; 以7.9nM或约7.9nM的IC₅₀值对BMX/ETK展现出抑制活性; 并且以2.5nM或约2.5nM的IC₅₀值对ErbB4展现出抑制活性, 在每种情况下任选地如通过已知的体外测定和/或本文所述的测定测量的。在一些方面, 抑制剂是博舒替尼 (Bosutinib) (CAS ID 380843-75-4)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Remsing等人, Leukemia. 2009年3月; 23 (3) : 477-85。

[0273] 在一些实施方案中, 抑制剂例如以约185nM的IC₅₀值对Btk展现出抑制活性; 对Itk不展现出抑制活性或者以大于或大于约5600nM的Kd值展现出任何这种活性; 例如以700nM或约700nM的Kd值对RLK/TKK展现出抑制活性; 以62nM或约62nM的IC₅₀值对BMX/ETK展现出抑制活性; 并且以6.5nM或约6.5nM的Kd值对ErbB4展现出抑制活性, 在每种情况下任选地如通过已知的体外测定和/或本文所述的测定测量的。在一些方面, 抑制剂是卡那替尼 (Canertinib) (CAS ID 289499-45-2)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Hur等人, Bioorg Med Chem Lett. 2008年11月15日; 18 (22) : 5916-9。

[0274] 在一些实施方案中, 抑制剂例如以约2nM的IC₅₀值对Btk展现出抑制活性; 对Itk不展现出抑制活性或者以大于或大于约10000nM的Kd值展现出任何这种活性; 例如以2nM或约2nM的IC₅₀值对RLK/TKK展现出抑制活性; 和/或以36nM或约36nM的Kd值对BMX/ETK展现出抑制活性; 在每种情况下任选地如通过已知的体外测定和/或本文所述的测定测量的。在一些方面, 抑制剂是CHEMBL249097、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Bamborough等人, Bioorg Med Chem Lett. 2007年8月1日; 17 (15) : 4363-8。

[0275] 在一些方面, 抑制剂是CHEMBL383899 (CAS ID 879127-16-9)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Anastassiasdis等人, Nat Biotechnol. 2011年10月30日; 29 (11) : 1039-45。

[0276] 在一些方面, 抑制剂是CP724714 (CAS ID 537705-08-1)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Karaman等人, Nat Biotechnol. 2008年1月; 26 (1) : 127-32。

[0277] 在一些方面, 抑制剂是达沙替尼 (CAS ID 302962-49-8)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Remsing等人, Leukemia. 2009年3月; 23 (3) : 477-85。

[0278] 在一些方面, 抑制剂是GSK-3抑制剂X (CAS ID 740841-15-0)、或其药学上可接受

的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Anastassiasdis等人,Nat Biotechnol.2011年10月30日;29(11):1039-45。

[0279] 在一些方面,抑制剂是HDS029(CAS ID 881001-19-0)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Anastassiasdis等人,Nat Biotechnol.2011年10月30日;29(11):1039-45。

[0280] 在一些方面,抑制剂是IKK-2抑制剂IV(CAS ID 507475-17-4)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。

[0281] 在一些方面,抑制剂是JNJ-10198409(CAS ID 627518-40-5)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Anastassiasdis等人,Nat Biotechnol.2011年10月30日;29(11):1039-45。

[0282] 在一些方面,抑制剂是Ki11502(CAS ID 347155-76-4)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Anastassiasdis等人,Nat Biotechnol.2011年10月30日;29(11):1039-45。

[0283] 在一些方面,抑制剂是Lck抑制剂(CAS ID 213743-31-8)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Anastassiasdis等人,Nat Biotechnol.2011年10月30日;29(11):1039-45。

[0284] 在一些方面,抑制剂是MK5108(CAS ID 1010085-13-8)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Shimomura等人,Mol Cancer Ther.2010年1月;9(1):157-66。

[0285] 在一些方面,抑制剂是N-苯甲酰基星孢菌素(CAS ID 120685-11-2)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Anastassiasdis等人,Nat Biotechnol.2011年10月30日;29(11):1039-45。

[0286] 在一些方面,抑制剂是来那替尼(Neratinib)(CAS ID 698387-09-6)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Davis等人,Nat Biotechnol, 2011;29:1046-51。

[0287] 在一些方面,抑制剂是NU6140(CAS ID 444723-13-1)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Anastassiasdis等人,Nat Biotechnol.2011年10月30日;29(11):1039-45。

[0288] 在一些方面,抑制剂是帕唑帕尼(Pazopanib)(CAS ID 444731-52-6)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Anastassiasdis等人,Nat Biotechnol.2011年10月30日;29(11):1039-45。

[0289] 在一些方面,抑制剂是PD168393(CAS ID 194423-15-9)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Hur等人,Bioorg Med Chem Lett.2008年11月15日;18(22):5916-9。

[0290] 在一些方面,抑制剂是PD169316(CAS ID 152121-53-4)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Anastassiasdis等人,Nat Biotechnol.2011年10月30日;29(11):1039-45。

[0291] 在一些方面,抑制剂是PD173955(CAS ID 260415-63-2)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Davis等人,NatBiotechnol,2011;29:1046-

51。

[0292] 在一些方面,抑制剂是PDK1/Akt/Flt双途径抑制剂(CAS ID 331253-86-2)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Anastassiasdis等人,Nat Biotechnol.2011年10月30日;29(11):1039-45。

[0293] 在一些方面,抑制剂是帕纳替尼(Ponatinib)(CAS ID 943319-70-8)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Huang等人,J Med Chem.2010年6月24日;53(12):4701-19。

[0294] 在一些方面,抑制剂是PP1类似物II;1NM-PP1(CAS ID 221244-14-0)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Anastassiasdis等人,Nat Biotechnol.2011年10月30日;29(11):1039-45。

[0295] 在一些方面,抑制剂是PP121(CAS ID 1092788-83-4)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Apsel等人,Nat Chem Biol.2008年11月;4(11):691-9。

[0296] 在一些方面,抑制剂是Purvalanol A(CAS ID 212844-53-6)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Anastassiasdis等人,Nat Biotechnol.2011年10月30日;29(11):1039-45。

[0297] 在一些方面,抑制剂是Src激酶抑制剂I(CAS ID 179248-59-0)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Anastassiasdis等人,Nat Biotechnol.2011年10月30日;29(11):1039-45。

[0298] 在一些方面,抑制剂是SureCN7018367、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Bamborough等人,J Med Chem.2008年12月25日;51(24):7898-914。

[0299] 在一些方面,抑制剂是TWS119(CAS ID 601514-19-6)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Anastassiasdis等人,Nat Biotechnol.2011年10月30日;29(11):1039-45。

[0300] 在一些方面,抑制剂是凡德他尼(Vandetanib)(CAS ID 443913-73-3)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Anastassiasdis等人,Nat Biotechnol.2011年10月30日;29(11):1039-45。

[0301] 在一些方面,抑制剂是BDBM50126732(2-(2,6-二氯-苯基氨基)-7-(3-二乙基氨基-丙烯基)-1,6-二甲基-1,8-二氢-咪唑并[4,5-h]异喹啉-9-酮)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Goldberg等人,J Med Chem,2003;46:1337-49。

[0302] 在一些方面,抑制剂是BDBM50020476(CHEMBL3290148)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Li等人,J Med Chem,2014;57:5112-28。

[0303] 在一些方面,抑制剂是BDBM4567(N-{4-[(3-溴苯基)氨基]喹唑啉-6-基}丙-2-烯酰胺)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Tsou等人,J Med Chem,2001;44:2719-34。

[0304] 在一些方面,抑制剂是BDBM4779(N-{4-[(3-氯-4-氟苯基)氨基]-7-[3-(吗啉-4-基)丙氧基]喹唑啉-6-基}丙-2-烯酰胺)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、

多晶型物或前药。参见Davis等人, Nat Biotechnol, 2011; 29:1046-51。

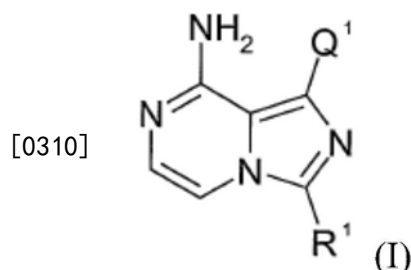
[0305] 在一些方面, 抑制剂是BDBM36409 (PP242)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Davis等人, Nat Biotechnol, 2011; 29:1046-51。

[0306] 在一些方面, 抑制剂是BDBM50161957 (HKI-272)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Klumpers等人, J Med Chem, 2005; 48:1107-31。

[0307] 在一些方面, 抑制剂是BDBM6568 (PD-173955)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。参见Davis等人, Nat Biotechnol, 2011; 29:1046-51。

[0308] 在一些实施方案中, 抑制剂对Itk不展现出抑制活性或者以大于或大于约1000nM或者4000或4270nM或约4000或4270nM的IC₅₀值展现出任何这种活性, 或者对ITK具有与式(II)的化合物相同的抑制活性; 不抑制TEC或者仅以大于1000nM或大于10,000nM的IC₅₀值对IC₅₀展现出任何这种抑制活性; 不抑制BMX或者仅以大于1000nM或为或约或大于1800nM或大于10,000nM的IC₅₀值对IC₅₀展现出任何这种抑制活性。在一些方面, 抑制剂不是CGI-1746 (参见Hendriks等人, "Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies," Nature, 2014, 14:219-232; Akinleye等人, "Ibrutinib and novel BTK inhibitors in clinical development." Journal of Hematology&Oncology 2013, 6:59; WO 2016/024230; Di Paolo等人, Nat. Chem. Biol., 2011, 7(1):41-50)、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。在一些实施方案中, 抑制剂不是以下抑制剂, 其以大于或大于约1000nM或者4000或4270nM或约4000或4270nM的IC₅₀值对ITK展现出活性, 或者对ITK具有与式(II)的化合物相同的较少的抑制活性; 不抑制TEC或者仅以大于1000nM或大于10,000nM的IC₅₀值对IC₅₀展现出任何这种抑制活性; 不抑制BMX或者仅以大于1000nM或为或约或大于1800nM或大于10,000nM的IC₅₀值对IC₅₀展现出任何这种抑制活性。

[0309] 在一些实施方案中, 抑制剂是式(I)的化合物:



[0311] 或其药学上可接受的盐, 其中:

[0312] Q¹是芳基¹、杂芳基¹、环烷基、杂环基、环烯基或杂环烯基, 其中的任何一个任选地被一至五个独立的G¹取代基取代;

[0313] R¹是烷基、环烷基、双环烷基、芳基、杂芳基、芳烷基、杂芳烷基、杂环基或杂双环烷基, 其中的任何一个任选地被一个或多个独立的G¹¹取代基取代;

[0314] G¹和G⁴¹各自独立地是卤基、氧代、-CF₃、-OCF₃、-OR²、-NR²R³ (R^{3a})_{j1}、-C(O)R²、-CO₂R²、-CONR²R³、-NO₂、-CN、-S(O)_{j1}R²、-SO₂NR²R³、NR²(C=O)R³、NR²(C=O)OR³、NR²(C=O)NR²R³、NR²S(O)_{j1}R³、-(C=S)OR²、-(C=O)SR²、-NR²(C=NR³)NR^{2a}R^{3a}、-NR²(C=NR³)OR^{2a}、-NR²(C=NR³)SR^{3a}、-O(C=O)OR²、-O(C=O)NR²R³、-O(C=O)SR²、-S(C=O)OR²、-S(C=O)NR²R³、C₀₋₁₀烷基、C₂₋₁₀烯基、C₂₋₁₀炔基、C₁₋₁₀烷氧基C₁₋₁₀烷基、C₁₋₁₀烷氧基C₂₋₁₀烯基、C₁₋₁₀烷氧基C₂₋₁₀炔基、C₁₋₁₀烷硫基C₁₋₁₀烷基、C₁₋₁₀烷硫基C₂₋₁₀烯基、C₁₋₁₀烷硫基C₂₋₁₀炔基、环C₃₋₈烷基、环C₃₋₈烯基、环

C₃₋₈烷基C₁₋₁₀烷基、环C₃₋₈烯基C₁₋₁₀烷基、环C₃₋₈烷基C₂₋₁₀烯基、环C₃₋₈烯基C₂₋₁₀烯基、环C₃₋₈烷基C₂₋₁₀炔基、环C₃₋₈烯基C₂₋₁₀炔基、杂环基-C₀₋₁₀烷基、杂环基-C₂₋₁₀烯基或杂环基-C₂₋₁₀炔基，其中的任何一个任选地被一个或多个独立的卤基、氧代、-CF₃、-OCF₃、-OR²²²、-NR²²²R³³³ (R^{333a})_{j1a}、-C(O)R²²²、-CO₂R²²²、-CONR²²²R³³³、-NO₂、-CN、-S(O)_{j1a}R²²²、-SO₂NR²²²R³³³、NR²²²(C=O)R³³³、NR²²²(C=O)OR³³³、NR²²²(C=O)NR²²²R³³³、NR²²²S(O)_{j1a}R³³³、-(C=S)OR²²²、-(C=O)SR²²²、-NR²²²(C=NR³³³)NR^{222a}R^{333a}、-NR²²²(C=NR³³³)OR^{222a}、-NR²²²(C=NR³³³)SR^{333a}、-O(C=O)OR²²²、-O(C=O)NR²²²R³³³、-O(C=O)SR²²²、-S(C=O)OR²²²或-S(C=O)NR²²²R³³³取代基取代；或-(X¹)_n-(Y¹)_m-R⁴；或芳基-C₀₋₁₀烷基、芳基-C₂₋₁₀烯基或芳基-C₂₋₁₀炔基，其中的任何一个任选地被一个或多个独立的卤基、-CF₃、-OCF₃、-OR²²²、-NR²²²R³³³ (R^{333a})_{j2a}、-C(O)R²²²、-CO₂R²²²、-CONR²²²R³³³、-NO₂、-CN、-S(O)_{j2a}R²²²、-SO₂NR²²²R³³³、NR²²²(C=O)R³³³、NR²²²(C=O)OR³³³、NR²²²(C=O)NR²²²R³³³、NR²²²S(O)_{j2a}R³³³、-(C=S)OR²²²、-(C=O)SR²²²、-NR²²²(C=NR³³³)NR^{222a}R^{333a}、-NR²²²(C=NR³³³)OR^{222a}、-NR²²²(C=NR³³³)SR^{333a}、-O(C=O)OR²²²、-O(C=O)NR²²²R³³³、-O(C=O)SR²²²、-S(C=O)OR²²²或-S(C=O)NR²²²R³³³取代基取代；或杂芳基-C₀₋₁₀烷基、杂芳基-C₂₋₁₀烯基或杂芳基-C₂₋₁₀炔基，其中的任何一个任选地被一个或多个独立的卤基、-CF₃、-OCF₃、-OR²²²、-NR²²²R³³³ (R^{333a})_{j3a}、-C(O)R²²²、-CO₂R²²²、-CONR²²²R³³³、-NO₂、-CN、-S(O)_{j3a}R²²²、-SO₂NR²²²R³³³、NR²²²(C=O)R³³³、NR²²²(C=O)OR³³³、NR²²²(C=O)NR²²²R³³³、NR²²²S(O)_{j3a}R³³³、-(C=S)OR²²²、-(C=O)SR²²²、-NR²²²(C=NR³³³)NR^{222a}R^{333a}、-NR²²²(C=NR³³³)OR^{222a}、-NR²²²(C=NR³³³)SR^{333a}、-O(C=O)OR²²²、-O(C=O)NR²²²R³³³、-O(C=O)SR²²²、-S(C=O)OR²²²或-S(C=O)NR²²²R³³³取代基取代；

[0315] G¹¹是卤基、氧代、-CF₃、-OCF₃、-OR²¹、-NR²¹R³¹ (R^{3a1})_{j4}、-C(O)R²¹、-CO₂R²¹、-CONR²¹R³¹、-NO₂、-CN、-S(O)_{j4}R²¹、-SO₂NR²¹R³¹、NR²¹(C=O)R³¹、NR²¹(C=O)OR³¹、NR²¹(C=O)NR²¹R³¹、NR²¹S(O)_{j4}R³¹、-(C=S)OR²¹、-(C=O)SR²¹、-NR²¹(C=NR³¹)NR^{2a1}R^{3a1}、-NR²¹(C=NR³¹)OR^{2a1}、-NR²¹(C=NR³¹)SR^{3a1}、-O(C=O)OR²¹、-O(C=O)NR²¹R³¹、-O(C=O)SR²¹、-S(C=O)OR²¹、-S(C=O)NR²¹R³¹、-P(O)OR²¹OR³¹、C₀₋₁₀烷基、C₂₋₁₀烯基、C₂₋₁₀炔基、C₁₋₁₀烷氧基C₁₋₁₀烷基、C₁₋₁₀烷氧基C₂₋₁₀烯基、C₁₋₁₀烷氧基C₂₋₁₀炔基、C₁₋₁₀烷硫基C₁₋₁₀烷基、C₁₋₁₀烷硫基C₂₋₁₀烯基、C₁₋₁₀烷硫基C₂₋₁₀炔基、环C₃₋₈烷基、环C₃₋₈烯基、环C₃₋₈烷基C₁₋₁₀烷基、环C₃₋₈烯基C₁₋₁₀烷基、环C₃₋₈烷基C₂₋₁₀烯基、环C₃₋₈烯基C₂₋₁₀烯基、环C₃₋₈烷基C₂₋₁₀炔基、环C₃₋₈烯基C₂₋₁₀炔基、杂环基-C₀₋₁₀烷基、杂环基-C₂₋₁₀烯基或杂环基-C₂₋₁₀炔基，其中的任何一个任选地被一个或多个独立的卤基、氧代、-CF₃、-OCF₃、-OR²²²¹、-NR²²²¹R³³³¹ (R^{333a1})_{j4a}、-C(O)R²²²¹、-CO₂R²²²¹、-CONR²²²¹R³³³¹、-NO₂、-CN、-S(O)_{j4a}R²²²¹、-SO₂NR²²²¹R³³³¹、NR²²²¹(C=O)R³³³¹、NR²²²¹(C=O)OR³³³¹、NR²²²¹(C=O)NR²²²¹R³³³¹、NR²²²¹S(O)_{j4a}R³³³¹、-(C=S)R²²²¹、-(C=O)SR²²²¹、-NR²²²¹(C=NR³³³¹)NR^{222a1}R^{333a1}、-NR²²²¹(C=NR³³³¹)OR^{222a1}、-NR²²²¹(C=NR³³³¹)SR^{333a1}、-O(C=O)OR²²²¹、-O(C=O)NR²²²¹R³³³¹、-O(C=O)SR²²²¹、-S(C=O)OR²²²¹、-P(O)OR²²²¹OR³³³¹或-S(C=O)NR²²²¹R³³³¹取代基取代；或芳基-C₀₋₁₀烷基、芳基-C₂₋₁₀烯基或芳基-C₂₋₁₀炔基，其中的任何一个任选地被一个或多个独立的卤基、-CF₃、-OCF₃、-OR²²²¹、-NR²²²¹R³³³¹ (R^{333a1})_{j5a}、-C(O)R²²²¹、-CO₂R²²²¹、-CONR²²²¹R³³³¹、-NO₂、-CN、-S(O)_{j5a}R²²²¹、-SO₂NR²²²¹R³³³¹、NR²²²¹(C=O)R³³³¹、NR²²²¹(C=O)OR³³³¹、NR²²²¹(C=O)NR²²²¹R³³³¹、NR²²²¹S(O)_{j5a}R³³³¹、-(C=S)OR²²²¹、-(C=O)SR²²²¹、-NR²²²¹(C=NR³³³¹)NR^{222a1}R^{333a1}、-NR²²²¹(C=NR³³³¹)OR^{222a1}、-NR²²²¹(C=NR³³³¹)SR^{333a1}、-O(C=O)OR²²²¹、-O(C=O)NR²²²¹R³³³¹、-O(C=O)SR²²²¹、-S(C=O)OR²²²¹、-P(O)OR²²²¹OR³³³¹或-S(C=O)NR²²²¹R³³³¹取代基取代；或杂芳基-

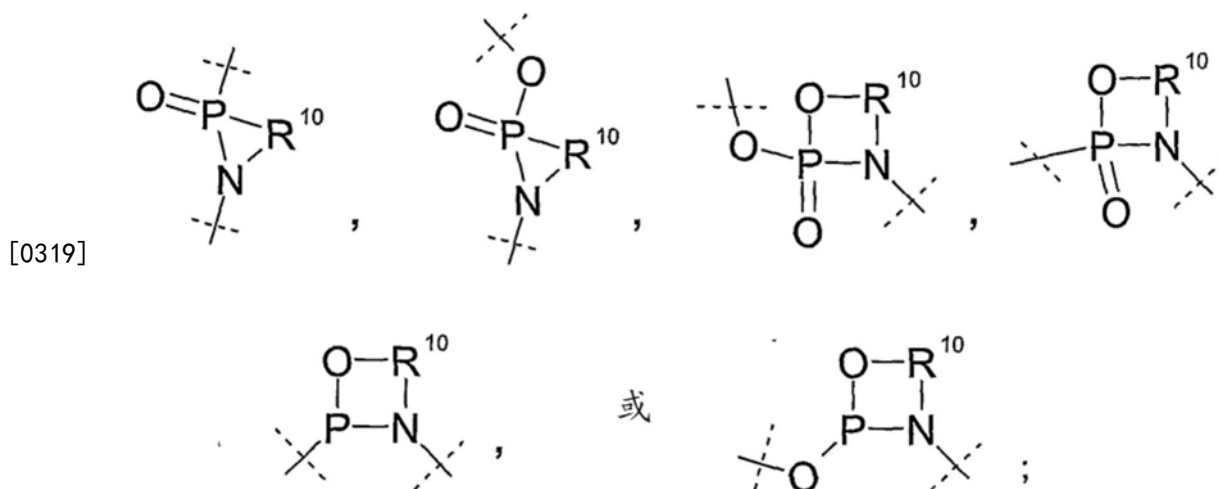
C₀₋₁₀烷基、杂芳基-C₂₋₁₀烯基或杂芳基-C₂₋₁₀炔基,其中的任何一个任选地被一个或多个独立的卤基、-CF₃、-OCF₃、-OR、-NR²²²¹R³³³¹(R^{333a1})_{j6a}、-C(O)R²²²¹、-CO₂R²²²¹、-CONR²²²¹R³³³¹、-NO₂、-CN、-S(O)_{j6a}R²²²¹、-SO₂NR²²²¹R³³³¹、NR²²²¹(C=O)R³³³¹、NR²²²¹(C=O)OR³³³¹、NR²²²¹(C=O)NR²²²¹R³³³¹、NR²²²¹S(O)_{j6a}R³³³¹、-(C=S)OR²²²¹、-(CO)SR²²²¹、-NR²²²¹(C=NR³³³¹)NR^{222a1}R^{333a1}、-NR²²²¹(C=NR³³³¹)OR^{222a1}、-NR²²²¹(C=NR³³³¹)SR^{333a1}、-O(C=O)OR²²²¹、-O(C=O)NR²²²¹R³³³¹、-O(C=O)SR²²²¹、-S(C=O)OR²²²¹、-P(O)OR²²²¹OR³³³¹或-S(C=O)NR²²²¹R³³³¹取代基取代;或者G¹¹与它所附接的碳一起形成双键,其被R⁵和G¹¹¹取代;

[0316] R²、R^{2a}、R³、R^{3a}、R²²²、R^{222a}、R³³³、R^{333a}、R²¹、R^{2a1}、R³¹、R^{3a1}、R²²²¹、R^{222a1}、R³³³¹和R³³³¹各自独立地等于C₀₋₁₀烷基、C₂₋₁₀烯基、C₂₋₁₀炔基、C₁₋₁₀烷氧基C₁₋₁₀烷基、C₁₋₁₀烷氧基C₂₋₁₀烯基、C₁₋₁₀烷氧基C₂₋₁₀炔基、C₁₋₁₀烷硫基C₁₋₁₀烷基、C₁₋₁₀烷硫基C₂₋₁₀烯基、C₁₋₁₀烷硫基C₂₋₁₀炔基、环C₃₋₈烷基、环C₃₋₈烯基、环C₃₋₈炔基C₁₋₁₀烷基、环C₃₋₈烯基C₂₋₁₀烯基、环C₃₋₈炔基C₂₋₁₀炔基、杂环基-C₀₋₁₀烷基、杂环基-C₂₋₁₀烯基或杂环基-C₂₋₁₀炔基,其中的任何一个任选地被一个或多个G¹¹¹取代基取代;或芳基-C₀₋₁₀烷基、芳基-C₂₋₁₀烯基或芳基-C₂₋₁₀炔基、杂芳基-C₀₋₁₀烷基、杂芳基-C₂₋₁₀烯基或杂芳基-C₂₋₁₀炔基,其中的任何一个任选地被一个或多个G¹¹¹取代基取代;或者在-NR²R³(R^{3a})_{j1}或-NR²²²R³³³(R^{333a})_{j1a}或-NR²²²R³³³(R^{333a})_{j2a}或-NR²²²¹R³³³¹(R^{333a1})_{j3a}或-NR²²²¹R³³³¹(R^{333a1})_{j4a}或-NR²²²¹R³³³¹(R^{333a1})_{j5a}或-NR²²²¹R³³³¹(R^{333a1})_{j6a}的情况下,R²和R³或R²²²和R³³³或R²²²¹和R³³³¹与它们所附接的氮原子一起形成3-10元饱和环、不饱和环、杂环饱和环或杂环不饱和环,其中所述环任选地被一个或多个G¹¹¹取代基取代;

[0317] X¹和Y¹各自独立地是-O-、-NR⁷-、-S(O)_{j7}--CR⁵R⁶-、-N(C(O)OR⁷)-、-N(C(O)R⁷)-、-N(SO₂R⁷)-、-CH₂O--CH₂S--CH₂N(R⁷)--CH(NR⁷)-、-CH₂N(C(O)R⁷)-、-CH₂N(C(O)OR⁷)-、-CH₂N(SO₂R⁷)-、-CH(NHR⁷)-、-CH(NHC(O)R⁷)-、-CH(NHSO₂R⁷)-、-CH(NHC(O)OR⁷)-、-CH(OC(O)R⁷)-、-CH(OC(O)NHR⁷)-、-CH-CH-、-C-、-C(=NOR⁷)-、-C(O)-、-CH(OR⁷)-、-C(O)N(R⁷)-、-N(R⁷)C(O)-、-N(R⁷)S(O)-、-N(R⁷)S(O)₂--OC(O)N(R⁷)-、-N(R⁷)C(O)N(R⁷)-、-NR⁷C(O)O--S(O)N(R⁷)-、-S(O)₂N(R⁷)-、-N(C(O)R⁷)S(O)-、-N(C(O)R⁷)S(O)₂-、-N(R⁷)S(O)N(R⁷)-、-N(R⁷)S(O)₂N; (R⁷)-、-C(O)N(R⁷)C(O)-、-S(O)N(R⁷)C(O)-、-S(O)₂N(R⁷)C(O)-、-OS(O)N(R⁷)-、-OS(O)₂N(R⁷)-、-N(R⁷)S(O)O-、-N(R⁷)S(O)₂O-、-N(R⁷)S(O)C(O)--N(R⁷)S(O)₂C(O)-、-SON(C(O)R⁷)-、-SO₂N(C(O)R⁷)-、-N(R⁷)SON(R⁷)-、-N(R⁷)SO₂N(R⁷)-、-C(O)O--N(R⁷)P(OR⁸)O-、-N(R⁷)P(OR⁸)-、-N(R⁷)P(O)(OR⁸)O--N(R⁷)P(O)(OR⁸)-、-N(C(O)R⁷)P(OR⁸)O--N(C(O)R⁷)P(OR⁸)-、-N(C(O)R⁷)P(O)(OR⁸)O-、-N(C(O)R⁷)P(OR⁸)-、-CH(R⁷)S(O)-、-CH(R⁷)S(O)₂--CH(R⁷)N(C(O)OR⁷)--CH(R⁷)N(C(O)R⁷)-、-CH(R⁷)N(SO₂R⁷)-、-CH(R⁷)O--CH(R⁷)S--CH(R⁷)N(R⁷)-、-CH(R⁷)N(C(O)R⁷)-、-CH(R⁷)N(C(O)OR⁷)-、-CH(R⁷)N(SO₂R⁷)-、-CH(R⁷)C(=NOR⁷)-、-CH(R⁷)C(O)-、-CH(R⁷)CH(OR⁷)-、-CH(R⁷)C(O)N(R⁷)-、-CH(R⁷)N(R⁷)C(O)-、-CH(R⁷)N(R⁷)S(O)-、-CH(R⁷)N(R⁷)S(O)₂-、-CH(R⁷)OC(O)N(R⁷)-、-CH(R⁷)N(R⁷)C(O)N(R⁷)-、-CH(R⁷)NR⁷C(O)O-、-CH(R⁷)S(O)N(R⁷)-、-CH(R⁷)S(O)₂N(R⁷)-、-CH(R⁷)N(C(O)R⁷)S(O)-、-CH(R⁷)N(C(O)R⁷)S(O)-、-CH(R⁷)N(R⁷)S(O)₂N(R⁷)-、-CH(R⁷)C(O)N(R⁷)C(O)-、-CH(R⁷)S(O)N(R⁷)C(O)-、-CH(R⁷)S(O)₂N(R⁷)C(O)--CH(R⁷)OS(O)N(R⁷)-、-CH(R⁷)OS(O)₂N(R⁷)-、-CH(R⁷)N(R⁷)S(O)O-、-CH(R⁷)N(R⁷)S(O)₂O-、-CH(R⁷)N(R⁷)S(O)C(O)-、-CH(R⁷)N(R⁷)S(O)₂C(O)-、-CH(R⁷)SON(C(O)R⁷)-、-CH(R⁷)SO₂N(C(O)R⁷)-、-CH(R⁷)N(R⁷)SON(R⁷)-、-CH(R⁷)N(R⁷)SO₂N(R⁷)-、-CH

(R⁷) C (O) O-、-CH (R⁷) N (R⁷) P (OR⁸) O-、-CH (R⁷) N (R⁷) P (OR⁸) -、-CH (R⁷) N (R⁷) P (O) (OR⁸) O-、-CH (R⁷) N (R⁷) P (O) (OR⁸) -、-CH (R⁷) N (C (O) R⁷) P (OR⁸) O-、-CH (R⁷) N (C (O) R⁷) P (OR⁸) -、-CH (R⁷) N (C (O) R⁷) P (O) (OR⁸) O-或-CH (R⁷) N (C (O) R⁷) P (OR⁸) -;或者

[0318] X¹和Y¹各自独立地由以下结构式之一表示:



[0320] R¹⁰与次膦酰胺 (phosphinamide) 或膦酰胺 (phosphonamide) 一起是5元、6元或7元芳基、杂芳基或杂环基环系统;

[0321] R⁵、R⁶和G¹¹¹各自独立地是C₀₋₁₀烷基、C₂₋₁₀烯基、C₂₋₁₀炔基、C₁₋₁₀烷氧基C₁₋₁₀烷基、C₁₋₁₀烷氧基C₂₋₁₀烯基、C₁₋₁₀烷氧基C₂₋₁₀炔基、C₁₋₁₀烷硫基C₁₋₁₀烷基、C₁₋₁₀烷硫基C₂₋₁₀烯基、C₁₋₁₀烷硫基C₂₋₁₀炔基、环C₃₋₈烷基、环C₃₋₈烯基、环C₃₋₈炔基C₁₋₁₀烷基、环C₃₋₈烯基C₁₋₁₀烷基、环C₃₋₈炔基C₂₋₁₀烯基、环C₃₋₈炔基C₂₋₁₀炔基、环C₃₋₈炔基C₂₋₁₀炔基、杂环基-C₀₋₁₀烷基、杂环基-C₂₋₁₀烯基或杂环基-C₂₋₁₀炔基,其中的任何一个任选地被一个或多个独立的卤基、-CF₃、-OCF₃、-OR⁷⁷、-NR⁷⁷R⁸⁷、-C (O) R⁷⁷、-CO₂R⁷⁷、-CONR⁷⁷R⁸⁷、-NO₂、-CN、-S (O)_{j5a}R⁷⁷、-SO₂NR⁷⁷R⁸⁷、NR⁷⁷ (C=O) R⁸⁷、NR⁷⁷ (C=O) OR⁸⁷、NR⁷⁷ (C=O) NR⁷⁸R⁸⁷、NR⁷⁷S (O)_{j5a}R⁸⁷、- (C=S) OR⁷⁷、- (C=O) SR⁷⁷、-NR⁷⁷ (C=NR⁸⁷) NR⁷⁸R⁸⁸、-NR⁷⁷ (C=NR⁸⁷) OR⁷⁸、-NR⁷⁷ (C=NR⁸⁷) SR⁷⁸、-O (C=O) OR⁷⁷、-O (C=O) NR⁷⁷R⁸⁷、-O (C=O) SR⁷⁷、-S (C=O) OR⁷⁷、-P (O) OR⁷⁷OR⁸⁷或-S (C=O) NR⁷⁷R⁸⁷取代基取代;或芳基-C₀₋₁₀烷基、芳基-C₂₋₁₀烯基或芳基-C₂₋₁₀炔基,其中的任何一个任选地被一个或多个独立的卤基、-CF₃、-OCF₃、-OR⁷⁷、-NR⁷⁷R⁸⁷、-C (O) R⁷⁷、-CO₂R⁷⁷、-CONR⁷⁷R⁸⁷、-NO₂、-CN、-S (O)_{j5a}R⁷⁷、-SO₂NR⁷⁷R⁸⁷、NR⁷⁷ (C=O) R⁸⁷、NR⁷⁷ (C=O) OR⁸⁷、NR⁷⁷ (C=O) NR⁷⁸R⁸⁷、NR⁷⁷S (O)_{j5a}R⁸⁷、- (C=S) OR⁷⁷、- (C=O) SR⁷⁷、-NR⁷⁷ (C=NR⁸⁷) NR⁷⁸R⁸⁸、-NR⁷⁷ (C=NR⁸⁷) OR⁷⁸、-NR⁷⁷ (C=NR⁸⁷) SR⁷⁸、-O (C=O) OR⁷⁷、-O (C=O) NR⁷⁷R⁸⁷、-O (C=O) SR⁷⁷、-S (C=O) OR⁷⁷、-P (O) OR⁷⁷OR⁸⁷或-S (C=O) NR⁷⁷R⁸⁷取代基取代;或杂芳基-C₀₋₁₀烷基、杂芳基-C₂₋₁₀烯基或杂芳基-C₂₋₁₀炔基,其中的任何一个任选地被一个或多个独立的卤基、-CF₃、-OCF₃、-OR⁷⁷、-NR⁷⁷R⁸⁷、-C (O) R⁷⁷、-CO₂R⁷⁷、-CONR⁷⁷R⁸⁷、-NO₂、-CN、-S (O)_{j5a}R⁷⁷、-SO₂NR⁷⁷R⁸⁷、NR⁷⁷ (C=O) R⁸⁷、NR⁷⁷ (C=O) OR⁸⁷、NR⁷⁷ (C=O) NR⁷⁸R⁸⁷、NR⁷⁷S (O)_{j5a}R⁸⁷、- (C=S) OR⁷⁷、- (C=O) SR⁷⁷、-NR⁷⁷ (C=NR⁸⁷) NR⁷⁸R⁸⁸、-NR⁷⁷ (C=NR⁸⁷) OR⁷⁸、-NR⁷⁷ (C=NR⁸⁷) SR⁷⁸、-O (C=O) OR⁷⁷、-O (C=O) NR⁷⁷R⁸⁷、-O (C=O) SR⁷⁷、-S (C=O) OR⁷⁷、-P (O) OR⁷⁷OR⁸⁷或-S (C=O) NR⁷⁷R⁸⁷取代基取代;或者R⁵和R⁶与它们所附接的相应碳原子一起形成3-10元饱和或不饱和环,其中所述环任选地被R⁶⁹取代;或者R⁵和R⁶与它们所附接的相应碳原子一起形成3-10元饱和或不饱和杂环,其中所述环任选地被R⁶⁹取代;

[0322] R^7 和 R^8 各自独立地是H、酰基、烷基、烯基、芳基、杂芳基、杂环基或环烷基,其中的任何一个任选地被一个或多个 G^{111} 取代基取代;

[0323] R^4 是H、烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、环烷基、杂环基、环烯基或杂环烯基,其中的任何一个任选地被一个或多个 G^{41} 取代基取代;

[0324] R^{69} 是卤基、 $-OR^{78}$ 、 $-SH$ 、 $-NR^{78}R^{88}$ 、 $-CO_2R^{78}$ 、 $-CONR^{78}R^{88}$ 、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-S(O)_{j8}R^{78}$ 、 $-SO_2NR^{78}R^{88}$ 、 C_{0-10} 烷基、 C_{2-10} 烯基、 C_{2-10} 炔基、 C_{1-10} 烷氧基 C_{1-10} 烷基、 C_{1-10} 烷氧基 C_{2-10} 烯基、 C_{1-10} 烷氧基 C_{2-10} 炔基、 C_{1-10} 烷硫基 C_{1-10} 烷基、 C_{1-10} 烷硫基 C_{2-10} 烯基、 C_{1-10} 烷硫基 C_{2-10} 炔基、环 C_{3-8} 烷基、环 C_{3-8} 烯基、环 C_{3-8} 炔基 C_{1-10} 烷基、环 C_{3-8} 烯基 C_{1-10} 烷基、环 C_{3-8} 炔基 C_{2-10} 烯基、环 C_{3-8} 炔基 C_{2-10} 炔基、杂环基- C_{0-10} 烷基、杂环基- C_{2-10} 烯基或杂环基- C_{2-10} 炔基,其中的任何一个任选地被一个或多个独立的卤基、氰基、硝基、 $-OR^{778}$ 、 $-SO_2NR^{778}R^{888}$ 或 $-NR^{778}R^{888}$ 取代基取代;或芳基- C_{0-10} 烷基、芳基- C_{2-10} 烯基或芳基- C_{2-10} 炔基,其中的任何一个任选地被一个或多个独立的卤基、氰基、硝基、 $-OR^{778}$ 、 C_{1-10} 烷基、 C_{2-10} 烯基、 C_{2-10} 炔基、卤代 C_{1-10} 烷基、卤代 C_{2-10} 烯基、卤代 C_{2-10} 炔基、 $-COOH$ 、 C_{1-4} 烷氧基羰基、 $-CONR^{778}R^{888}$ 、 $-SO_2NR^{778}R^{888}$ 或 $-NR^{778}R^{888}$ 取代基取代;或杂芳基- C_{0-10} 烷基、杂芳基- C_{2-10} 烯基或杂芳基- C_{2-10} 炔基,其中的任何一个任选地被一个或多个独立的卤基、氰基、硝基、 $-OR^{778}$ 、 C_{1-10} 烷基、 C_{2-10} 烯基、 C_{2-10} 炔基、卤代 C_{1-10} 烷基、卤代 C_{2-10} 烯基、卤代 C_{2-10} 炔基、 $-COOH$ 、 C_{1-4} 烷氧基羰基、 $-CONR^{778}R^{888}$ 、 $-SO_2NR^{778}R^{888}$ 或 $-NR^{778}R^{888}$ 取代基取代;或单(C_{1-6} 烷基)氨基 C_{1-6} 烷基、二(C_{1-6} 烷基)氨基 C_{1-6} 烷基、单(芳基)氨基 C_{1-6} 烷基、二(芳基)氨基 C_{1-6} 烷基或 $-N(C_{1-6}烷基)-C_{1-6}烷基$ -芳基,其中的任何一个任选地被一个或多个独立的卤基、氰基、硝基、 $-OR^{778}$ 、 C_{1-10} 烷基、 C_{2-10} 烯基、 C_{2-10} 炔基、卤代 C_{1-10} 烷基、卤代 C_{2-10} 烯基、卤代 C_{2-10} 炔基、 $-COOH$ 、 C_{1-4} 烷氧基羰基、 $-CONR^{778}R^{888}$ 、 $-SO_2NR^{778}R^{888}$ 或 $-NR^{778}R^{888}$ 取代基取代;或者在 $-NR^{78}R^{88}$ 的情况下, R^{78} 和 R^{88} 与它们所附接的氮原子一起形成3-10元饱和环、不饱和环、杂环饱和环或杂环不饱和环,其中所述环任选地被一个或多个独立的卤基、氰基、羟基、硝基、 C_{1-10} 烷氧基、 $-SO_2NR^{778}R^{888}$ 或 $-NR^{778}R^{888}$ 取代基取代;

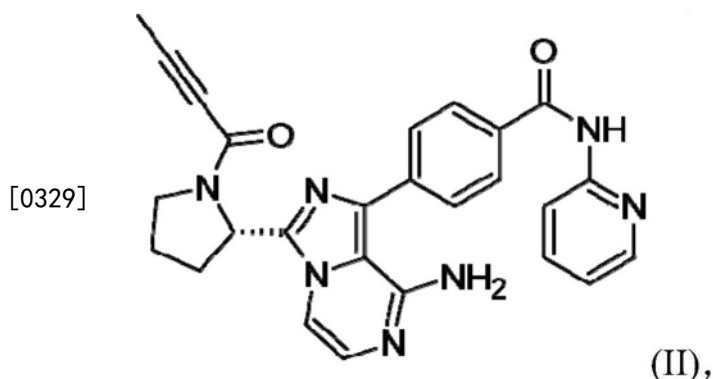
[0325] R^{77} 、 R^{78} 、 R^{87} 、 R^{88} 、 R^{778} 和 R^{888} 各自独立地是 C_{0-10} 烷基、 C_{2-10} 烯基、 C_{2-10} 炔基、 C_{1-10} 烷氧基 C_{1-10} 烷基、 C_{1-10} 烷氧基 C_{2-10} 烯基、 C_{1-10} 烷氧基 C_{2-10} 炔基、 C_{1-10} 烷硫基 C_{1-10} 烷基、 C_{1-10} 烷硫基 C_{2-10} 烯基、 C_{1-10} 烷硫基 C_{2-10} 炔基、环 C_{3-8} 烷基、环 C_{3-8} 烯基、环 C_{3-8} 炔基 C_{1-10} 烷基、环 C_{3-8} 烯基 C_{1-10} 烷基、环 C_{3-8} 炔基 C_{2-10} 烯基、环 C_{3-8} 炔基 C_{2-10} 炔基、环 C_{3-8} 炔基 C_{2-10} 炔基、杂环基- C_{0-10} 烷基、杂环基- C_{2-10} 烯基、杂环基- C_{2-10} 炔基、 C_{1-10} 烷基羰基、 C_{2-10} 烯基羰基、 C_{2-10} 炔基羰基、 C_{1-10} 烷氧基羰基、 C_{1-10} 烷氧基羰基 C_{1-10} 烷基、单(C_{1-6} 烷基)氨基羰基、二(C_{1-6} 烷基)氨基羰基、单(芳基)氨基羰基、二(芳基)氨基羰基或 C_{1-10} 烷基(芳基)氨基羰基,其中的任何一个任选地被一个或多个独立的卤基、氰基、羟基、硝基、 C_{1-10} 烷氧基、 $-SO_2N(C_{0-4}烷基)(C_{0-4}烷基)$ 或 $-N(C_{0-4}烷基)(C_{0-4}烷基)$ 取代基取代;或芳基- C_{0-10} 烷基、芳基- C_{2-10} 烯基或芳基- C_{2-10} 炔基,其中的任何一个任选地被一个或多个独立的卤基、氰基、硝基、 $-O(C_{0-4}烷基)$ 、 C_{1-10} 烷基、 C_{2-10} 烯基、 C_{2-10} 炔基、卤代 C_{1-10} 烷基、卤代 C_{2-10} 烯基、卤代 C_{2-10} 炔基、 $-COOH$ 、 C_{1-4} 烷氧基羰基、 $-CON(C_{0-4}烷基)(C_{0-4}烷基)$ 、 $-SO_2N(C_{0-4}烷基)(C_{0-4}烷基)$ 或 $-N(C_{0-4}烷基)(C_{0-4}烷基)$ 取代基取代;或杂芳基- C_{0-10} 烷基、杂芳基- C_{2-10} 烯基或杂芳基- C_{2-10} 炔基,其中的任何一个任选地被一个或多个独立的卤基、氰基、硝基、 $-O(C_{0-4}烷基)$ 、 C_{1-10} 烷基、 C_{2-10} 烯基、 C_{2-10} 炔基、卤代 C_{1-10} 烷基、卤代 C_{2-10} 烯基、卤代 C_{2-10} 炔基、 $-COOH$ 、 C_{1-4} 烷氧基羰基、 $-CON(C_{0-4}烷基)(C_{0-4}烷基)$ 、 $-SO_2N(C_{0-4}烷基)(C_{0-4}烷基)$ 或 $-N(C_{0-4}烷基)(C_{0-4}烷基)$ 取代基取代;

烷基) (C₀₋₄烷基) 或-N (C₀₋₄烷基) (C₀₋₄烷基) 取代基取代;或单 (C₁₋₆烷基) 氨基C₁₋₆烷基、二 (C₁₋₆烷基) 氨基C₁₋₆烷基、单 (芳基) 氨基C₁₋₆烷基、二 (芳基) 氨基C₁₋₆烷基或-N (C₁₋₆烷基) -C₁₋₆烷基-芳基,其中的任何一个任选地被一个或多个独立的卤基、氰基、硝基、-O (C₀₋₄烷基)、C₁₋₁₀烷基、C₂₋₁₀烯基、C₂₋₁₀炔基、卤代C₁₋₁₀烷基、卤代C₂₋₁₀烯基、卤代C₂₋₁₀炔基、-COOH、C₁₋₄烷氧基羰基、-CON (C₀₋₄烷基) (C₀₋₄烷基)、-SO₂N (C₀₋₄烷基) (C₀₋₄烷基) 或-N (C₀₋₄烷基) (C₀₋₄烷基) 取代基取代;并且

[0326] n、m、j1、j1a、j2a、j3a、j4、j4a、j5a、j6a、j7和j8各自独立地等于0、1或2。

[0327] 在一些实施方案中,抑制剂是4-{8-氨基-3-[(2S)-1-(2-丁炔酰基)-2-吡咯烷基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基}-N-(2-吡啶基)苯甲酰胺、或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。在一些实施方案中,抑制剂具有CAS编号1420477-60-6。

[0328] 在一些实施方案中,抑制剂是式 (II) 的化合物:



[0330] 或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。

[0331] 在一些实施方案中,抑制剂是如美国专利号US 7459554和PCT申请号W0 2005/037836中描述的抑制剂。

[0332] 1. 组合物和配制品

[0333] 在本文提供的方法、组合物、组合、试剂盒和用途的一些实施方案中,组合疗法可以按一种或多种组合物给予,所述组合物是例如含有TEC家族激酶的抑制剂(例如Btk抑制剂)和/或细胞疗法(例如,T细胞疗法)的药物组合物。

[0334] 在一些实施方案中,组合物(例如,含有除ITK的抑制剂以外的蛋白酪氨酸激酶的抑制剂和/或BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TKX和/或ERBB4中的一种或多种的抑制剂的药物组合物)可以包括与抑制剂和/或细胞一起给予的载体,如稀释剂、佐剂、赋形剂或运载体。合适的药物载体的例子由E.W.Martin描述于“Remington's Pharmaceutical Sciences”中。此类组合物将含有治疗有效量的通常呈纯化形式的酪氨酸激酶抑制剂(例如Btk抑制剂)以及适量的载体,以便为患者提供适当的给予形式。此类药物载体可以是无菌液体,如水和油,包括石油、动物、植物或合成源的那些油,如花生油、大豆油、矿物油和芝麻油。盐水溶液和水性右旋糖和甘油溶液也可以用作液体载体,特别是用于可注射溶液。药物组合物可以含有一种或多种稀释剂、一种或多种佐剂、一种或多种抗粘附剂、一种或多种粘合剂、一种或多种涂层、一种或多种填充剂、一种或多种调味剂、一种或多种颜料、一种或多种润滑剂、一种或多种助流剂、一种或多种防腐剂、一种或多种洗涤剂、一种或多种吸附剂、一种或多种乳化剂、一种或多种药物赋形剂、一种或多种pH缓冲剂或一种或多种甜味剂中的任何一种或多种及其组合。在一些实施方案中,药物组合物可以是液体、固体、冻干粉末、呈凝胶形式

和/或其组合。在一些方面,载体的选择部分取决于特定抑制剂和/或给予方法。

[0335] 药学上可接受的载体在所用的剂量和浓度下通常对接受者无毒,并且包括但不限于:缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲氯铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苄醇;烷基对羟基苯甲酸酯,如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖类,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子,如钠;金属络合物(例如锌-蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂,如聚乙二醇(PEG);稳定剂和/或防腐剂。也可以将含有酪氨酸激酶抑制剂(例如Btk抑制剂)的组合物冻干。

[0336] 在一些实施方案中,可以将药物组合物配制成为用于通过本领域技术人员已知的任何途径给予,包括肌肉内、静脉内、皮内、病灶内、腹膜内注射、皮下、肿瘤内、硬膜外、经鼻、口服、经阴道、经直肠、外用(topical)、局部(local)、经耳、吸入、经颊(例如,舌下)以及透皮给予或任何途径。在一些实施方案中,也考虑了其他给予方式。在一些实施方案中,给予是通过推注输注,通过注射例如静脉内或皮下注射、眼内注射、眼周注射、视网膜下注射、玻璃体内注射、经中隔注射、巩膜下注射、脉络膜内注射、前房注射、结膜下(subconjunctival)注射、结膜下(subconjunctival)注射、眼球筋膜囊下(sub-Tenon)注射、球后注射、球周注射或后近巩膜(posterior juxtасcleral)递送。在一些实施方案中,给予是通过肠胃外、肺内和鼻内给予,并且如果需要局部治疗,则通过病灶内给予。肠胃外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下给予。在一些实施方案中,给定剂量通过单次推注给药来给予。在一些实施方案中,给定剂量通过多次推注给药例如在不超过3天的时间段内来给予,或通过连续输注给药来给予。

[0337] 在一些实施方案中,给予可以是局部的、外用的或全身的,这取决于治疗位点。在一些实施方案中,局部给予至需要治疗的区域可以通过例如但不限于手术期间的局部输注、外用施用(例如,与手术后的伤口敷料结合)、通过注射、借助导管、借助栓剂或借助植入物来实现。在一些实施方案中,组合物还可以与其他生物活性剂一起给予,依次地、间歇地或在同一组合物中。在一些实施方案中,给予还可以包括控释系统,包括控释配制品和装置控释,如借助泵。在一些实施方案中,给予是口服的。

[0338] 在一些实施方案中,药理学和治疗活性化合物及其衍生物通常以单位剂型或多剂型配制和给予。每个单位剂量含有预定量的足以产生所需治疗效果的治疗活性化合物,与所需的药物载体、运载体或稀释剂结合。在一些实施方案中,单位剂型包括但不限于含有适量化合物或其药学上可接受的衍生物的片剂、胶囊剂、丸剂、散剂、颗粒剂、无菌肠胃外溶液或悬浮液以及口服溶液或悬浮液和油水乳液。单位剂型可以容纳在安瓿和注射器中或单独包装的片剂或胶囊剂中。单位剂型可以按其分数或倍数给予。在一些实施方案中,多剂量形式是包装在单个容器中的待以分离的单位剂型给予的多个相同的单位剂型。多剂量形式的例子包括小瓶、片剂或胶囊剂瓶或者品脱或加仑瓶。

[0339] 2. 抑制剂剂量时间表

[0340] 在一些实施方案中,所述方法涉及向受试者给予治疗有效量的除ITK的抑制剂以

外的蛋白酪氨酸激酶的抑制剂和/或BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4中的一种或多种的抑制剂以及细胞疗法(如T细胞疗法(例如表达CAR的T细胞)或T细胞接合疗法)。在一些实施方案中,在给予细胞疗法(如T细胞疗法(例如表达CAR的T细胞)或T细胞接合疗法)之前、之后、期间、在过程中、同时、几乎同时、依次和/或间歇地给予抑制剂。在一些实施方案中,所述方法涉及在给予T细胞疗法之前给予抑制剂。在其他实施方案中,所述方法涉及在给予T细胞疗法之后给予抑制剂。在一些实施方案中,在开始T细胞疗法之后不再进一步给予抑制剂。在一些实施方案中,剂量时间表包括在开始T细胞疗法之前和之后给予抑制剂。在一些实施方案中,剂量时间表包括在给予T细胞疗法的同时给予抑制剂。

[0341] 在一些实施方案中,以多个剂量多次给予除ITK的抑制剂以外的蛋白酪氨酸激酶的抑制剂和/或BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4中的一种或多种的抑制剂。在一些实施方案中,将抑制剂给予一次。在一些实施方案中,在开始给予细胞疗法(例如T细胞疗法,如CAR-T细胞疗法)之前或之后,将抑制剂每天给予六次、每天给予五次、每天给予四次、每天给予三次、每天给予两次、每天给予一次、每隔一天给予、每三天给予、每周给予两次、每周给予一次或仅给予一次。在一些实施方案中,在细胞疗法(例如T细胞疗法,如CAR-T细胞疗法)的给予期之前、期间、在过程中和/或之后以规律间隔以多个剂量给予抑制剂。在一些实施方案中,在给予细胞疗法(例如T细胞疗法,如CAR-T细胞疗法)之前以规律间隔以一个或多个剂量给予抑制剂。在一些实施方案中,在给予细胞疗法(例如T细胞疗法,如CAR-T细胞疗法)之后以规律间隔以一个或多个剂量给予抑制剂。在一些实施方案中,抑制剂的一个或多个剂量可以与一定剂量的细胞疗法(例如T细胞疗法,如CAR-T细胞疗法)的给予同时发生。

[0342] 在一些实施方案中,基于本文所述的筛选步骤和/或治疗结果评估的结果的特定阈值或标准(例如,在本文第IV节中描述的那些)来确定除ITK的抑制剂以外的蛋白酪氨酸激酶的抑制剂和/或BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4中的一种或多种的抑制剂的给予剂量、频率、持续时间、时机和/或顺序。

[0343] 在一些实施方案中,所述方法涉及向先前已经给予了治疗有效量的抑制剂的受试者给予细胞疗法。在一些实施方案中,在向受试者给予一定剂量的表达重组受体的细胞之前,向所述受试者给予抑制剂。在一些实施方案中,用抑制剂治疗与细胞剂量的给予同时发生。在一些实施方案中,在给予细胞剂量之后给予抑制剂。在一些实施方案中,在细胞疗法之前足够的时间给予抑制剂,使得组合疗法的治疗效果增加。

[0344] 在一些实施方案中,在给予细胞疗法(例如T细胞疗法,如CAR-T细胞疗法)之前和/或同时给予除ITK的抑制剂以外的蛋白酪氨酸激酶的抑制剂和/或BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4中的一种或多种的抑制剂。在一些实施方案中,在开始细胞疗法(例如T细胞疗法,如CAR-T细胞疗法)之前从或从约0至90天(如0至30天、0至15天、0至6天、0至96小时、0至24小时、0至12小时、0至6小时、或0至2小时、2小时至30天、2小时至15天、2小时至6天、2小时至96小时、2小时至24小时、2小时至12小时、2小时至6小时、6小时至90天、6小时至30天、6小时至15天、6小时至6天、6小时至96小时、6小时至24小时、6小时至12小时、12小时至90天、12小时至30天、12小时至15天、12小时至6天、12小时至96小时、12小时至24小时、24小时至90天、24小时至30天、24小时至15天、24小时至6天、24小时至96小时、96小时至90天、96小时至30天、96小时至15天、96小时至6天、6天至90天、6天至30天、6天至15天、15天至90天、15天

至30天或30天至90天)给予抑制剂。在一些方面,在开始细胞疗法(例如T细胞疗法,如CAR-T细胞疗法)之前不超过约96小时、72小时、48小时、24小时、12小时、6小时、2小时或1小时给予抑制剂。

[0345] 在一些实施方案中,在开始给予细胞疗法(例如T细胞疗法,如CAR-T细胞疗法)之前至少或约至少1小时、至少或约至少2小时、至少或约至少6小时、至少或约至少12小时、至少或约至少1天、至少或约至少2天、至少或约至少3天、至少或约至少4天、至少或约至少5天、至少或约至少6天、至少或约至少7天、至少或至少约12天、至少或约至少14天、至少或至少约15天、至少或约至少21天、至少或至少约24天、至少或约至少28天、至少或约至少30天、至少或约至少35天或至少或约至少42天、至少或约至少60天或至少或约至少90天给予除ITK的抑制剂以外的蛋白酪氨酸激酶的抑制剂和/或BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4中的一种或多种的抑制剂。在一些实施方案中,在开始给予细胞疗法(例如T细胞疗法,如CAR-T细胞疗法)之前长达2天、长达3天、长达4天、长达5天、长达6天、长达7天、长达8天、长达12天、长达14天、长达15天、长达21天、长达24天、长达28天、长达30天、长达35天、长达42天、长达60天或长达90天给予TEC家族激酶的抑制剂(例如,BTK抑制剂)。

[0346] 在其中在细胞疗法(例如T细胞疗法,如CAR-T细胞疗法)之前给予除ITK的抑制剂以外的蛋白酪氨酸激酶的抑制剂和/或BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4中的一种或多种的抑制剂的一些任何此类实施方案中,抑制剂的给予以规则间隔继续直到细胞疗法的开始和/或细胞疗法开始后的一段时间。

[0347] 在一些实施方案中,在给予细胞疗法(例如T细胞疗法,如CAR-T细胞疗法)之后给予,或者进一步给予除ITK的抑制剂以外的蛋白酪氨酸激酶的抑制剂和/或BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4中的一种或多种的抑制剂。在一些实施方案中,在开始给予细胞疗法(例如T细胞疗法)之后1小时、2小时、6小时、12小时、24小时、48小时、96小时、4天、5天、6天或7天、14天、15天、21天、24天、28天、30天、36天、42天、60天、72天或90天内或者约1小时、2小时、6小时、12小时、24小时、48小时、96小时、4天、5天、6天或7天、14天、15天、21天、24天、28天、30天、36天、42天、60天、72天或90天内给予抑制剂。在一些实施方案中,所提供的方法涉及在开始给予细胞疗法之后如以规则间隔继续给予抑制剂。

[0348] 在一些实施方案中,在给予细胞疗法(例如T细胞疗法,如CAR-T细胞疗法)之后长达或长达约1天、长达或长达约2天、长达或长达约3天、长达或长达约4天、长达或长达约5天、长达或长达约6天、长达或长达约7天、长达或长达约12天、长达或长达约14天、长达或长达约21天、长达或长达约24天、长达或长达约28天、长达或长达约30天、长达或长达约35天、长达或长达约42天、长达或长达约60天或者长达或长达约90天、长达或长达约120天、长达或长达约180天、长达或长达约240天、长达或长达约360天或者长达或长达约720天或更长时间给予(例如每天给予)除ITK的抑制剂以外的蛋白酪氨酸激酶的抑制剂和/或BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4r中的一种或多种的抑制剂。

[0349] 在一些任何此类上述实施方案中,在开始给予细胞疗法(例如T细胞疗法,如CAR-T细胞疗法)之前和之后给予除ITK的抑制剂以外的蛋白酪氨酸激酶的抑制剂和/或BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4中的一种或多种的抑制剂。

[0350] 在一些实施方案中,在开始细胞疗法之后将除ITK的抑制剂以外的蛋白酪氨酸激酶的抑制剂和/或BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4中的一种或多种的抑制剂每天给

予数次、每天给予两次、每天给予、每隔一天给予、每周给予三次、每周给予两次或每周给予一次。在一些实施方案中,每天给予抑制剂。在一些实施方案中,将抑制剂每天给予两次。在一些实施方案中,将抑制剂每天给予三次。在其他实施方案中,每隔一天给予抑制剂。

[0351] 在一些实施方案中,每天给予除ITK的抑制剂以外的蛋白酪氨酸激酶的抑制剂和/或BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4中的一种或多种的抑制剂,持续7、14、21、28、35或42天的周期。在一些实施方案中,将抑制剂每天给予两次,持续7、14、21、28、35或42天的周期。在一些实施方案中,将抑制剂每天给予三次,持续7、14、21、28、35或42天的周期。在一些实施方案中,每隔一天给予抑制剂,持续7、14、21、28、35或42天的周期。在一些实施方案中,给予抑制剂,持续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24个周期。

[0352] 在本文提供的方法的一些实施方案中,同时或几乎同时给予除ITK的抑制剂以外的蛋白酪氨酸激酶的抑制剂和/或BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4中的一种或多种的抑制剂以及细胞疗法(例如T细胞疗法,如CAR-T细胞疗法)。

[0353] 在一些实施方案中,以从或从约0.2mg/kg受试者体重(mg/kg)至200mg/kg、0.2mg/kg至100mg/kg、0.2mg/kg至50mg/kg、0.2mg/kg至10mg/kg、0.2mg/kg至1.0mg/kg、1.0mg/kg至200mg/kg、1.0mg/kg至100mg/kg、1.0mg/kg至50mg/kg、1.0mg/kg至10mg/kg、10mg/kg至200mg/kg、10mg/kg至100mg/kg、10mg/kg至50mg/kg、50mg/kg至200mg/kg、50mg/kg至100mg/kg或100mg/kg至200mg/kg的剂量独立地给予除ITK的抑制剂以外的蛋白酪氨酸激酶的抑制剂和/或BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4中的一种或多种的抑制剂。在一些实施方案中,以约0.2mg/kg受试者体重(mg/kg)至50mg/kg、0.2mg/kg至25mg/kg、0.2mg/kg至10mg/kg、0.2mg/kg至5mg/kg、0.2mg/kg至1.0mg/kg、1.0mg/kg至50mg/kg、1.0mg/kg至25mg/kg、1.0mg/kg至10mg/kg、1.0mg/kg至5mg/kg、5mg/kg至50mg/kg、5mg/kg至25mg/kg、5mg/kg至10mg/kg或10mg/kg至25mg/kg的剂量给予抑制剂。

[0354] 在一些实施方案中,以从或从约25mg至2000mg、25mg至1000mg、25mg至500mg、25mg至200mg、25mg至100mg、25mg至50mg、50mg至2000mg、50mg至1000mg、50mg至500mg、50mg至200mg、50mg至100mg、100mg至2000mg、100mg至1000mg、100mg至500mg、100mg至200mg、200mg至2000mg、200mg至1000mg、200mg至500mg、500mg至2000mg、500mg至1000mg或1000mg至2000mg(每个都包含端值)的剂量独立地给予除ITK的抑制剂以外的蛋白酪氨酸激酶的抑制剂和/或BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4中的一种或多种的抑制剂。

[0355] 在一些实施方案中,抑制剂是式(II)的化合物,将其以从或从约50mg至420mg、50mg至400mg、50mg至380mg、50mg至360mg、50mg至340mg、50mg至320mg、50mg至300mg、50mg至280mg、100mg至400mg、100mg至380mg、100mg至360mg、100mg至340mg、100mg至320mg、100mg至300mg、100mg至280mg、100mg至200mg、140mg至400mg、140mg至380mg、140mg至360mg、140mg至340mg、140mg至320mg、140mg至300mg、140mg至280mg、140mg至200mg、180mg至400mg、180mg至380mg、180mg至360mg、180mg至340mg、180mg至320mg、180mg至300mg、180mg至280mg、200mg至400mg、200mg至380mg、200mg至360mg、200mg至340mg、200mg至320mg、200mg至300mg、200mg至280mg、220mg至400mg、220mg至380mg、220mg至360mg、220mg至340mg、220mg至320mg、220mg至300mg、220mg至280mg、240mg至400mg、240mg至380mg、240mg至360mg、240mg至340mg、240mg至320mg、240mg至300mg、240mg至280mg、280mg至420mg

或300mg至400mg (每个都包含端值) 的剂量给予。

[0356] 在一些实施方案中,以至少或至少约50mg/天、100mg/天、150mg/天、175mg/天、200mg/天、250mg/天、300mg/天、350mg/天、400mg/天、420mg/天、440mg/天、460mg/天、480mg/天、500mg/天、520mg/天、540mg/天、560mg/天、580mg/天或600mg/天的总日剂量给予除ITK的抑制剂以外的蛋白酪氨酸激酶的抑制剂和/或BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TKX和/或ERBB4中的一种或多种的抑制剂。在一些实施方案中,以低于420mg/天的量给予抑制剂。在一些实施方案中,每天给予一次抑制剂。在一些实施方案中,每天给予两次抑制剂。

[0357] 在任何上述实施方案中,可以口服给予抑制剂(例如式(II)的化合物)。

[0358] 在一些实施方案中,以一个或多个分剂量(如2、3或4个剂量)或以单一配制品给予剂量(如日剂量)。在存在药学上可接受的载体的情况下,或者在存在其他治疗剂的情况下,可以单独给予抑制剂。

[0359] 本领域技术人员将认识到,可以使用更高或更低剂量的抑制剂,例如取决于特定药剂和给予途径。在一些实施方案中,可以单独或以药物组合物的形式给予抑制剂,在所述药物组合物中,化合物与一种或多种药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂掺合或混合。在一些实施方案中,可以将抑制剂全身地或局部地给予待治疗的器官或组织。示例性给予途径包括但不限于外用、注射(如皮下、肌肉内、皮内、腹膜内、肿瘤内和静脉内)、口服、舌下、经直肠、透皮、鼻内、经阴道和吸入途径。在一些实施方案中,给予途径是口服、肠胃外、经直肠、经鼻、外用或眼部途径,或者通过吸入。在一些实施方案中,口服给予所述抑制剂。在一些实施方案中,以固体剂型(如胶囊剂、片剂和散剂)或以液体剂型(如酞剂、糖浆剂和悬浮液)口服给予抑制剂。

[0360] 一旦患者的疾病得到改善,便可以调整剂量用于预防或维持治疗。例如,给予剂量或频率或两者可以根据症状减少至维持所需治疗或预防效果的水平。如果症状已经缓解到适当的水平,可以停止治疗。然而,基于症状的任何复发,患者可能需要长期间歇治疗。患者可能还需要长期慢性治疗。

[0361] C. 淋巴细胞清除治疗

[0362] 在一些方面,所提供的方法还可以包括给予一种或多种淋巴细胞清除疗法,例如在开始给予免疫疗法(如T细胞疗法(例如表达CAR的T细胞)或T细胞接合疗法)之前或同时。在一些实施方案中,淋巴细胞清除疗法包括给予磷酰胺,如环磷酰胺。在一些实施方案中,淋巴细胞清除疗法可以包括给予氟达拉滨。

[0363] 在一些方面,用免疫细胞清除(例如,淋巴细胞清除)疗法预处理受试者可以改善过继细胞疗法(ACT)的效果。用淋巴细胞清除剂(包括环孢霉素和氟达拉滨的组合)预处理已经有效地改善转移的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)在细胞疗法中的功效,包括改善转移细胞的反应和/或持久性。参见例如,Dudley等人,Science,298,850-54(2002);Rosenberg等人,Clin Cancer Res,17(13):4550-4557(2011)。同样地,在CAR+T细胞的背景下,一些研究已经掺入了淋巴细胞清除剂,最常见的是环磷酰胺、氟达拉滨、苯达莫司汀或其组合,有时伴有低剂量辐射。参见Han等人Journal of Hematology & Oncology,6:47(2013);Kochenderfer等人,Blood,119:2709-2720(2012);Kalos等人,Sci Transl Med,3(95):95ra73(2011);临床试验研究记录号:NCT02315612;NCT01822652。

[0364] 可以进行这种预处理,目的是降低可能抑制所述疗法的功效的各种结果中的一种

或多种的风险。这些结果包括被称为“细胞因子吸收”的现象,通过所述现象,T细胞、B细胞、NK细胞与TIL竞争稳态的和激活的细胞因子,如IL-2、IL-7和/或IL-15;通过调节性T细胞、NK细胞或免疫系统的其他细胞抑制TIL;负调节物对肿瘤微环境的影响。Muranski等人,Nat Clin Pract Oncol.12月;3(12):668-681(2006)。

[0365] 因此,在一些实施方案中,所提供的方法还涉及向受试者给予淋巴细胞清除疗法。在一些实施方案中,所述方法涉及在给予细胞剂量之前向受试者给予淋巴细胞清除疗法。在一些实施方案中,淋巴细胞清除疗法含有化学治疗剂,如氟达拉滨和/或环磷酰胺。在一些实施方案中,细胞剂量和/或淋巴细胞清除疗法的给予经由门诊递送进行。

[0366] 在一些实施方案中,所述方法包括在给予细胞剂量之前向受试者给予预处理剂,如淋巴细胞清除剂或化学治疗剂,如环磷酰胺、氟达拉滨或其组合。例如,可以在第一或后续剂量之前至少2天如至少3、4、5、6或7天向所述受试者给予预处理剂。在一些实施方案中,在给予细胞剂量之前不超过7天(如不超过6、5、4、3或2天),向受试者给予预处理剂。

[0367] 在一些实施方案中,将受试者用在或在约20mg/kg和100mg/kg之间(如在或在约40mg/kg何80mg/kg之间)的剂量的环磷酰胺进行预处理。在一些方面,将所述受试者用60mg/kg或约60mg/kg的环磷酰胺进行预处理。在一些实施方案中,氟达拉滨可以按单一剂量给予或者可以按多个剂量给予,如每天给药、每隔一天给药或每三天给药。在一些实施方案中,环磷酰胺每天给予一次,持续一天或两天。

[0368] 在一些实施方案中,当淋巴细胞清除剂包含氟达拉滨时,向受试者给予在或在约1mg/m²和100mg/m²之间(如在或在约10mg/m²和75mg/m²、15mg/m²和50mg/m²、20mg/m²和30mg/m²或24mg/m²和26mg/m²之间)的剂量的氟达拉滨。在一些情况下,向所述受试者给予25mg/m²的氟达拉滨。在一些实施方案中,氟达拉滨可以按单一剂量给予或者可以按多个剂量给予,如每天给药、每隔一天给药或每三天给药。在一些实施方案中,每天给予氟达拉滨,如持续1-5天,例如持续3至5天。

[0369] 在一些实施方案中,淋巴细胞清除剂包含药剂的组合,如环磷酰胺和氟达拉滨的组合。因此,药剂的组合可包括任何剂量或给药时间表(如上述那些剂量或给药时间表)下的环磷酰胺以及任何剂量或给药时间表(如上述那些剂量或给药时间表)下的氟达拉滨。例如,在一些方面,在给予细胞剂量之前,向受试者给予60mg/kg(约2g/m²)的环磷酰胺和3至5个剂量的25mg/m²氟达拉滨。

[0370] 在一个示例性剂量方案中,在接受第一剂量之前,受试者在给予细胞前1天接受激酶抑制剂并且接受环磷酰胺和氟达拉滨(CY/FLU)的淋巴细胞清除预处理化疗,其是在第一剂量的表达CAR的细胞之前至少两天且通常在给予细胞之前不超过7天给予。在一些情况下,例如,在给予除ITK的抑制剂以外的蛋白酪氨酸激酶的抑制剂和/或BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4中的一种或多种的抑制剂之后24至27天给予环磷酰胺。在预处理治疗后,向受试者给予如上所述的表达CAR的T细胞的剂量。

[0371] 在一些实施方案中,在输注细胞剂量之前给予预处理剂改善了治疗结果。例如,在一些方面,预处理改善了用剂量治疗的功效或者增加了表达重组受体的细胞(例如,表达CAR的细胞,如表达CAR的T细胞)在受试者体内的持久性。在一些实施方案中,预处理治疗提高了无疾病存活,如在细胞剂量后在一段给定的时间之后活着且没有展现出最少的残留或可分子检测的疾病的受试者的百分比。在一些实施方案中,中位无疾病存活的时间增加了。

[0372] 在将所述细胞给予受试者(例如人)后,在一些方面中工程化细胞群的生物活性通过许多已知方法中的任何一种来测量。待评估的参数包括工程化或天然T细胞或其他免疫细胞与抗原的特异性结合,其在体内例如通过成像进行评估,或离体例如通过ELISA或流式细胞术进行评估。在某些实施方案中,可以使用本领域已知的任何合适的方法(如描述于例如Kochenderfer等人,J.Immunotherapy,32(7):689-702(2009)和Herman等人J.Immunological Methods,285(1):25-40(2004)中的细胞毒性测定)测量工程化细胞破坏靶细胞的能力。在某些实施方案中,还可以通过测定某些细胞因子(如CD107a、IFN γ 、IL-2和TNF)的表达和/或分泌来测量所述细胞的生物活性。在一些方面,通过评估临床结果(如肿瘤负荷或负担的减少)来测量生物活性。在一些方面,评估毒性结果、细胞的持久性和/或扩增和/或宿主免疫应答的存在或不存在。

[0373] 在一些实施方案中,在输注细胞剂量之前给予预处理剂改善了治疗结果(例如通过改善用剂量治疗的功效)或者增加了表达重组受体的细胞(例如,表达CAR的细胞,如表达CAR的T细胞)在受试者体内的持久性。因此,在一些实施方案中,在作为用抑制剂和细胞疗法的组合疗法的方法中给予的预处理剂的剂量高于在不用抑制剂的方法中给予的剂量。

[0374] III.T细胞疗法和工程化细胞

[0375] 在一些实施方案中,用于根据所提供的组合疗法方法使用的T细胞疗法包括给予表达重组受体的工程化细胞,所述重组受体被设计用于识别和/或特异性结合与疾病或病症相关的分子并引起反应,如在与此类分子结合后针对此类分子的免疫应答。受体可以包括嵌合受体(例如,嵌合抗原受体(CAR))和其他转基因抗原受体(包括转基因T细胞受体(TCR))。

[0376] 在一些实施方案中,细胞含有或被工程化以含有工程化受体,例如工程化抗原受体,如嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)。还提供了此类细胞群、含有此类细胞和/或富含此类细胞的组合物,如其中富集或选择某种类型的细胞(如T细胞或CD8⁺或CD4⁺细胞)。所述组合物包括用于给予(如用于过继细胞疗法)的药物组合物和配制品。还提供了用于向受试者(例如,患者)给予细胞和组合物的治疗方法。

[0377] 因此,在一些实施方案中,细胞包括经由基因工程引入的一种或多种核酸,从而表达此类核酸的重组或基因工程化产物。在一些实施方案中,通过以下方式完成基因转移:首先刺激细胞,如通过将其与诱导反应(如增殖、存活和/或激活)的刺激物进行组合,例如通过细胞因子或激活标记的表达测量的,然后转导激活的细胞,并且在培养物中扩增至足以用于临床应用的数目。

[0378] A. 重组受体

[0379] 细胞通常表达重组受体如抗原受体(包括功能性非TCR抗原受体,例如嵌合抗原受体(CAR))和其他抗原结合受体如转基因T细胞受体(TCR)。受体还包括其他嵌合受体。

[0380] 1. 嵌合抗原受体(CAR)

[0381] 示例性抗原受体(包括CAR)以及用于将此类受体工程化并引入细胞中的方法包括例如国际专利申请公开号WO 2000/14257、WO 2013/126726、WO 2012/129514、WO 2014/031687、WO 2013/166321、WO 2013/071154、WO 2013/123061,美国专利申请公开号US 2002131960、US 2013287748、US 20130149337,美国专利号6,451,995、7,446,190、8,252,592、8,339,645、8,398,282、7,446,179、6,410,319、7,070,995、7,265,209、7,354,762、7,

446,191、8,324,353和8,479,118,以及欧洲专利申请号EP2537416中所述的那些,和/或由 Sadelain等人,Cancer Discov.,3(4):388-398(2013);Davila等人,PLoS ONE8(4):e61338(2013);Turtle等人,Curr.Opin.Immunol.,24(5):633-39(2012);Wu等人,Cancer,18(2):160-75(2012)所述的那些。在一些方面,抗原受体包括如美国专利号7,446,190中所述的CAR,和国际专利申请公开号W0/2014055668A1中所述的那些。CAR的例子包括如任何前述出版物中所披露的CAR,如W0 2014031687、US 8,339,645、US 7,446,179、US2013/0149337、美国专利号7,446,190、美国专利号8,389,282;Kochenderfer等人,Nature Reviews Clinical Oncology,10,267-276(2013);Wang等人,J.Immunother.35(9):689-701(2012);和Brentjens等人,Sci Transl Med.5(177)(2013)。还参见W0 2014031687、US 8,339,645、US 7,446,179、US2013/0149337、美国专利号7,446,190和美国专利号8,389,282。嵌合受体(如CAR)通常包括细胞外抗原结合结构域,如抗体分子的一部分,通常是抗体的可变重(V_H)链区域和/或可变轻(V_L)链区域,例如scFv抗体片段。

[0382] 在一些实施方案中,受体所靶向的抗原是多肽。在一些实施方案中,它是碳水化合物或其他分子。在一些实施方案中,如与正常或非靶向细胞或组织相比,抗原在疾病或病症的细胞(例如,肿瘤或病原性细胞)上选择性表达或过表达。在其他实施方案中,抗原在正常细胞上表达和/或在工程化细胞上表达。

[0383] 在一些实施方案中,受体所靶向的抗原包括孤儿酪氨酸激酶受体ROR1、tEGFR、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、间皮素、CEA和乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3或4、FBP、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、 κ 轻链、Lewis Y、L1-细胞粘附分子、MAGE-A1、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、癌胚胎抗原、ROR1、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、Her2/neu、雌激素受体、孕酮受体、肝配蛋白B2、CD123、c-Met、GD-2和MAGE A3、CE7、Wilms肿瘤1(WT-1)、细胞周期蛋白(如细胞周期蛋白A1(CCNA1))和/或生物素化分子和/或由HIV、HCV、HBV或其他病原体表达的分子。

[0384] 在一些实施方案中,CAR结合病原体特异性抗原。在一些实施方案中,CAR对病毒抗原(如HIV、HCV、HBV等)、细菌抗原和/或寄生虫抗原具特异性。

[0385] 在一些实施方案中,重组受体(例如,CAR)的抗体部分还包括免疫球蛋白恒定区的至少一部分,如铰链区(例如,IgG4铰链区)和/或C_H1/C_L和/或Fc区。在一些实施方案中,恒定区或部分是人IgG如IgG4或IgG1的。在一些方面,恒定区的所述部分用作抗原识别组分(例如,scFv)与跨膜结构域之间的间隔子区。与不存在间隔子的情况下相比,间隔子的长度可以提供抗原结合后增强的细胞反应性。示例性间隔子(例如,铰链区)包括国际专利申请公开号W0 2014/031687中所述的那些。在一些例子中,间隔子的长度为或为约12个氨基酸或者长度不超过12个氨基酸。示例性间隔子包括具有至少约10至229个氨基酸、约10至200个氨基酸、约10至175个氨基酸、约10至150个氨基酸、约10至125个氨基酸、约10至100个氨基酸、约10至75个氨基酸、约10至50个氨基酸,约10至40个氨基酸、约10至30个氨基酸、约10至20个氨基酸或约10至15个氨基酸(并且包括任何列出的范围的端点之间的任何整数)的那些。在一些实施方案中,间隔子区具有约12个或更少的氨基酸、约119个或更少的氨基酸或约229个或更少的氨基酸。示例性间隔子包括单独的IgG4铰链、连接至C_H2和C_H3结构域的IgG4铰链或连接至CH3结构域的IgG4铰链。示例性间隔子包括但不限于Hudecek等人,

Clin.Cancer Res.,19:3153 (2013);国际专利申请公开号WO 2014031687、美国专利号8,822,647或公开的申请号US 2014/0271635中所述的那些。

[0386] 在一些实施方案中,恒定区或部分是人IgG如IgG4或IgG1的。在一些实施方案中,间隔子具有序列ESKYGPPCPPCP(如SEQ ID NO:1中所示),并且由SEQ ID NO:2中所示的序列编码。在一些实施方案中,间隔子具有SEQ ID NO:3中所示的序列。在一些实施方案中,间隔子具有SEQ ID NO:4中所示的序列。在一些实施方案中,恒定区或部分是人IgD。在一些实施方案中,间隔子具有SEQ ID NO:5中所示的序列。在一些实施方案中,间隔子具有展现与SEQ ID NO:1、3、4或5中的任一个至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0387] 这个抗原识别结构域通常连接至一种或多种细胞内信号传导组分(如通过抗原受体复合物(如TCR复合物)(在CAR的情况下)模拟激活和/或经由另一种细胞表面受体传导信号的信号传导组分)。因此,在一些实施方案中,抗原结合组分(例如,抗体)连接至一个或多个跨膜和细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,所述跨膜结构域与细胞外结构域融合。在一个实施方案中,使用天然地与受体(例如CAR)中的结构域之一相关的跨膜结构域。在一些情形中,通过氨基酸取代选择或修饰所述跨膜结构域以避免此类结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合,以最小化与所述受体复合物的其他成员的相互作用。

[0388] 在一些实施方案中,所述跨膜结构域源自天然或合成来源。当来源是天然的时,在一些方面,所述结构域可以源自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。跨膜区包括源自以下项的那些跨膜区(即,包括以下项的至少一个或多个跨膜区):T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链,CD28,CD3 ϵ ,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD86,CD134,CD137或CD154。可替代地,在一些实施方案中,跨膜结构域是合成的。在一些方面,合成跨膜结构域主要包含疏水性残基,例如亮氨酸和缬氨酸。在一些方面,将在合成跨膜结构域的每个末端发现苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体。在一些实施方案中,连接是通过接头、间隔子和/或一个或多个跨膜结构域。

[0389] 细胞内信号传导结构域包括通过天然抗原受体模拟或接近信号、通过这种受体与共刺激受体组合模拟或接近信号和/或仅通过共刺激受体模拟或接近信号的那些。在一些实施方案中,短的寡肽或多肽接头(例如,长度在2与10个之间的氨基酸的接头,如含有甘氨酸和丝氨酸的接头,例如甘氨酸-丝氨酸双联体)存在并形成CAR的跨膜结构域与细胞质信号传导结构域之间的连接。

[0390] 受体(例如,CAR)通常包括至少一种或多种细胞内信号传导组分。在一些实施方案中,受体包括TCR复合物的细胞内组分,如介导T细胞激活和细胞毒性的TCR CD3链,例如,CD3 ζ 链。因此,在一些方面,所述抗原结合部分连接至一个或多个细胞信号传导模块。在一些实施方案中,细胞信号传导模块包括CD3跨膜结构域、CD3细胞内信号传导结构域和/或其他CD跨膜结构域。在一些实施方案中,受体(例如,CAR)还包括一种或多种其他分子(如Fc受体 γ 、CD8、CD4、CD25或CD16)的一部分。例如,在一些方面,CAR或其他嵌合受体包括CD3- ζ (CD3- ζ)或Fc受体 γ 与CD8、CD4、CD25或CD16之间的嵌合分子。

[0391] 在一些实施方案中,在连接CAR或其他嵌合受体后,受体的细胞质结构域或细胞内信号传导结构域激活免疫细胞(例如,被工程化以表达CAR的T细胞)的至少一种正常效应子功能或反应。例如,在一些情况下,CAR诱导T细胞的功能,例如细胞溶解活性或T辅助活性,

例如细胞因子或其他因子的分泌。在一些实施方案中,使用抗原受体组分或共刺激分子的细胞内信号传导结构域的截短部分(例如如果其转导效应子功能信号的话)代替完整的免疫刺激链。在一些实施方案中,一个或多个细胞内信号传导结构域包括T细胞受体(TCR)的细胞质序列,并且在一些方面还包括共受体的那些细胞质序列,所述共受体在自然环境中与此类受体协同作用以启动抗原受体接合后的信号转导。

[0392] 在天然TCR的情况下,完全激活通常不仅需要通过TCR进行信号传导,还需要共刺激信号。因此,在一些实施方案中,为了促进完全激活,用于生成次级或共刺激信号的组分也被包括在所述CAR中。在其他实施方案中,所述CAR不包括用于生成共刺激信号的组分。在一些方面,另外的CAR在同一细胞中表达,并且提供用于生成次级或共刺激信号的组分。

[0393] 在一些方面,将T细胞激活描述为由两个类别的细胞质信号传导序列来介导:通过TCR启动抗原依赖性初级激活的那些序列(初级细胞质信号传导序列)以及以非抗原依赖性方式作用以提供刺激或共刺激信号的那些序列(次级细胞质信号传导序列)。在一些方面,CAR包括此类信号传导组分中的一种或两种。

[0394] 在一些方面,所述CAR包括调节所述TCR复合物的初级激活的初级胞质信号传导序列。以刺激方式起作用的初级胞质信号传导序列可以含有信号传导基序(其被称为基于免疫受体酪氨酸的激活基序或ITAM)。含有初级细胞质信号传导序列的ITAM的例子包括源自以下的那些:TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD8、CD22、CD79a、CD79b和CD66d。在一些实施方案中,所述CAR中的胞质信号传导分子含有源自CD3 ζ 的胞质信号传导结构域、其部分或序列。

[0395] 在一些实施方案中,CAR包括共刺激受体如CD28、4-1BB、OX40、DAP10和ICOS的信号传导结构域和/或跨膜部分。在一些方面,同一CAR同时包括激活和共刺激组分。

[0396] 在一些实施方案中,激活结构域包括于一个CAR内,而共刺激组分是由识别另一种抗原的另一种CAR提供。在一些实施方案中,CAR包括在同一细胞上表达的激活或刺激CAR、共刺激CAR(参见WO 2014/055668)。在一些方面,细胞包括一种或多种刺激或激活CAR和/或共刺激CAR。在一些实施方案中,细胞还包括抑制性CAR(iCAR,参见Fedorov等人,Sci.Transl.Medicine,5(215)(2013)),如识别除了与疾病或病症相关和/或对所述疾病或病症具特异性的抗原以外的抗原的CAR,由此通过靶向疾病的CAR递送的激活信号由于抑制性CAR与其配体的结合而有所减小或被抑制,例如以减小脱靶效应。

[0397] 在某些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含连接至CD3(例如,CD3- ζ)细胞内结构域的CD28跨膜和信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含连接至CD3 ζ 细胞内结构域的嵌合CD28和CD137(4-1BB,TNFRSF9)共刺激结构域。

[0398] 在一些实施方案中,CAR在细胞质部分中涵盖一个或多个(例如,两个或更多个)共刺激结构域以及激活结构域(例如,初级激活结构域)。示例性CAR包括CD3- ζ 、CD28和4-1BB的细胞内组分。

[0399] 在一些实施方案中,CAR或其他抗原受体还包括标记和/或表达CAR或其他抗原受体的细胞,所述标记还包括替代标记,如细胞表面标记,其可以用于确认使细胞表达受体(如细胞表面受体的截短形式,如截短的EGFR(tEGFR))的转导或工程化。在一些方面,标记例如替代标记包括CD34、NGFR或表皮生长因子受体(例如,tEGFR)的全部或部分(例如,截短形式)。在一些实施方案中,编码标记的核酸可操作地连接至编码接头序列(如可切割接头

序列,例如T2A)的多核苷酸。例如,标记和任选地接头序列可以是如PCT公开号W0 2014031687中所披露的任一种。例如,标记可以是截短的EGFR (tEGFR),其任选地连接至接头序列,如T2A可切割接头序列。截短的EGFR (例如,tEGFR)的示例性多肽包含SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列或展现与SEQ ID NO:7至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。示例性T2A接头序列包含SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列或展现与SEQ ID NO:6至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0400] 在一些实施方案中,标记是并非在T细胞上天然发现或并非在T细胞表面上天然发现的分子(例如细胞表面蛋白)或其部分。在一些实施方案中,所述分子是非自身分子,例如非自身蛋白质,即并非被将细胞过继转移至其中的宿主的免疫系统识别为“自身”的分子。

[0401] 在一些实施方案中,标记不提供治疗功能和/或不产生除了用作基因工程化标记(例如,用于选择成功工程化的细胞)以外的作用。在其他实施方案中,标记可以是治疗性分子或原本发挥一定所需作用的分子,如在体内所遇到的细胞的配体,如共刺激或免疫检查点分子,以增强和/或减弱细胞在过继转移和遇到配体后的反应。

[0402] 在一些情况下,CAR被称为第一代、第二代和/或第三代CAR。在一些方面,第一代CAR是在抗原结合后仅提供CD3链诱导的信号信号的CAR;在一些方面,第二代CAR是提供这种信号和共刺激信号的CAR,例如包括来自共刺激受体(如CD28或CD137)的细胞内信号传导结构域的CAR;在一些方面,第三代CAR是包括不同共刺激受体的多个共刺激结构域的CAR。

[0403] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体包括含有抗体或抗体片段的细胞外部分。在一些方面,嵌合抗原受体包括含有抗体或片段的细胞外部分和细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,抗体或片段包括scFv,并且细胞内结构域含有ITAM。在一些方面,所述细胞内信号传导结构域包括CD3-zeta (CD3 ζ)链的 ζ 链的信号传导结构域。在一些实施方案中,嵌合抗原受体包括连接细胞外结构域与细胞内信号传导结构域的跨膜结构域。在一些方面,跨膜结构域含有CD28的跨膜部分。在一些实施方案中,嵌合抗原受体含有T细胞共刺激分子的细胞内结构域。细胞外结构域和跨膜结构域可以直接或间接连接。在一些实施方案中,所述细胞外结构域和跨膜通过间隔子(如本文描述的任何间隔子)连接。在一些实施方案中,受体含有衍生出跨膜结构域的分子的细胞外部分,如CD28细胞外部分。在一些实施方案中,嵌合抗原受体含有源自T细胞共刺激分子的细胞内结构域或其功能变体,如位于跨膜结构域与细胞内信号传导结构域之间。在一些方面,T细胞共刺激分子是CD28或41BB。

[0404] 例如,在一些实施方案中,CAR含有抗体(例如抗体片段)、是或含有CD28的跨膜部分或其功能变体的跨膜结构域、以及含有CD28的信号传导部分或其功能变体和CD3 ζ 的信号传导部分或其功能变体的细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,CAR含有抗体(例如抗体片段)、是或含有CD28的跨膜部分或其功能变体的跨膜结构域、以及含有4-1BB的信号传导部分或其功能变体和CD3 ζ 的信号传导部分或其功能变体的细胞内信号传导结构域。在一些此类实施方案中,受体还包括间隔子,其含有Ig分子(如人Ig分子)的一部分,如Ig铰链,例如IgG4铰链,如仅铰链间隔子。

[0405] 在一些实施方案中,重组受体(例如,CAR)的跨膜结构域是或包括人CD28(例如,登录号P01747.1)的跨膜结构域或其变体,如包含SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列或展现与

SEQ ID NO:8至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列的跨膜结构域;在一些实施方案中,重组受体的含有跨膜结构域的部分包含SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:9具有至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0406] 在一些实施方案中,重组受体(例如,CAR)的一种或多种细胞内信号传导组分含有人CD28的细胞内共刺激信号传导结构域或其功能变体或部分,如在天然CD28蛋白的位置186-187具有LL至GG取代的结构域。例如,细胞内信号传导结构域可以包含SEQ ID NO:10或11中所示的氨基酸序列或展现与SEQ ID NO:10或11至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,细胞内结构域包含4-1BB(例如,登录号Q07011.1)的细胞内共刺激信号传导结构域或其功能变体或部分,如SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列或展现与SEQ ID NO:12至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0407] 在一些实施方案中,重组受体(例如,CAR)的细胞内信号传导结构域包含人CD3 ζ 刺激信号传导结构域或其功能变体,如人CD3 ζ 的亚型3(登录号P20963.2)的112个AA的细胞质结构域或如美国专利号7,446,190或美国专利号8,911,993中所述的CD3 ζ 信号传导结构域。例如,在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:13、14或15中所示的氨基酸序列或展现与SEQ ID NO:13、14或15至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0408] 在一些方面,间隔子仅含有IgG的铰链区,如仅IgG4或IgG1的铰链,如SEQ ID NO:1中所示的仅铰链间隔子。在其他实施方案中,间隔子是或含有任选地连接至CH2和/或CH3结构域的Ig铰链,例如IgG4源铰链。在一些实施方案中,间隔子是连接至CH2和CH3结构域的Ig铰链,例如IgG4铰链,如SEQ ID NO:4中所示。在一些实施方案中,间隔子是仅连接至CH3结构域的Ig铰链,例如IgG4铰链,如SEQ ID NO:3中所示。在一些实施方案中,间隔子是或包含富甘氨酸-丝氨酸的序列或其他柔性接头,如已知的柔性接头。

[0409] 例如,在一些实施方案中,CAR包括抗体(如抗体片段,包括scFv)、间隔子(如含有免疫球蛋白分子的一部分的间隔子,如铰链区和/或重链分子的一个或多个恒定区,如含有Ig铰链的间隔子)、含有CD28源跨膜结构域的全部或部分的跨膜结构域、CD2源细胞内信号传导结构域和CD3 ζ 信号传导结构域。在一些实施方案中,CAR包括抗体或片段(如scFv)、间隔子(如任何含Ig铰链的间隔子)、CD28源跨膜结构域、4-1BB源细胞内信号传导结构域和CD3 ζ 源信号传导结构域。

[0410] 在一些实施方案中,编码此类CAR构建体的核酸分子还包括编码T2A核糖体跳跃元件和/或tEGFR序列的序列(例如,在编码CAR的序列的下游)。在一些实施方案中,序列编码SEQ ID NO:6中所示的T2A核糖体跳跃元件或展现与SEQ ID NO:6至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,还可以产生表达抗原受体(例如,CAR)的T细胞以表达截短的EGFR(EGFRt)作为非免疫原性选择表位(例如,通过引入编码由T2A核糖体开关隔开的CAR和EGFRt的构建体以从同一构建体表达两种蛋白质),然后可以使用其作为标记来检测此类

细胞(参见例如,美国专利号8,802,374)。在一些实施方案中,序列编码SEQ ID NO:7中所示的tEGFR序列或展现与SEQ ID NO:7至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0411] 由给予受试者的细胞表达的重组受体(如CAR)通常识别或特异性结合以下分子,所述分子在被治疗的疾病或病症或其细胞中表达、与被治疗的疾病或病症或其细胞相关和/或对被治疗的疾病或病症或其细胞具特异性。在特异性结合分子(例如,抗原)后,受体通常将免疫刺激性信号(如ITAM转导的信号)递送至细胞中,由此促进靶向疾病或病症的免疫应答。例如,在一些实施方案中,细胞表达CAR,其特异性结合由疾病或病症的细胞或组织表达的或与疾病或病症相关的抗原。

[0412] 2. TCR

[0413] 在一些实施方案中,提供了工程化细胞(如T细胞),其表达识别靶多肽(如肿瘤、病毒或自身免疫蛋白的抗原)的肽表位或T细胞表位的T细胞受体(TCR)或其抗原结合部分。

[0414] 在一些实施方案中,“T细胞受体”或“TCR”是含有可变 α 和 β 链(也分别称为TCR α 和TCR β)或可变 γ 和 δ 链(也分别称为TCR α 和TCR β)的分子或其抗原结合部分,并且其能够特异性结合与MHC分子结合的肽。在一些实施方案中,所述TCR呈 $\alpha\beta$ 形式。通常,以 $\alpha\beta$ 和 $\gamma\delta$ 形式存在的TCR一般在结构上相似,但是表达它们的T细胞可以具有不同的解剖位置或功能。TCR可以在细胞的表面上发现或以可溶形式发现。通常,发现TCR在T细胞(或T淋巴细胞)的表面上,在此处它通常负责识别与主要组织相容性复合物(MHC)分子结合的抗原。

[0415] 除非另有说明,否则术语“TCR”应理解为涵盖完整的TCR以及其抗原结合部分或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述TCR是完整或全长TCR,包括呈 $\alpha\beta$ 形式或 $\gamma\delta$ 形式的TCR。在一些实施方案中,所述TCR是这样的抗原结合部分,其少于全长TCR但与在MHC分子中结合的特定肽结合(如与MHC-肽复合物结合)。在一些情况下,TCR的抗原结合部分或片段可以仅含有全长或完整TCR的结构域的一部分,但是仍能够结合与完整TCR结合的肽表位(如MHC-肽复合物)。在一些情况下,抗原结合部分含有TCR的可变结构域(如TCR的可变 α 链和可变 β 链),足以形成用于与特定MHC-肽复合物结合的结合位点。通常,TCR的可变链含有参与肽、MHC和/或MHC-肽复合物的识别的互补决定区。

[0416] 在一些实施方案中,TCR的可变结构域含有超变环或互补决定区(CDR),其通常是抗原识别和结合能力和特异性的主要贡献者。在一些实施方案中,TCR的CDR或其组合形成给定TCR分子的全部或基本上全部的抗原结合位点。TCR链的可变区内的各个CDR通常由框架区(FR)隔开,与CDR相比,所述框架区通常在TCR分子之间展示较低可变性(参见例如,Jores等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.U.S.A.87:9138,1990;Chothia等人,EMBO J.7:3745,1988;还参见Lefranc等人,Dev.Comp.Immunol.27:55,2003)。在一些实施方案中,CDR3是负责抗原结合或特异性的主要CDR,或者是在给定TCR可变区的用于所述肽-MHC复合物的加工肽部分的抗原识别和/或用于与其相互作用的三个CDR中最重要的CDR。在一些情况下,所述 α 链的CDR1可以与某些抗原肽的N-末端部分相互作用。在一些情况下,所述 β 链的CDR1可以与所述肽的C-末端部分相互作用。在一些情况下,CDR2对与所述MHC-肽复合物的MHC部分的相互作用或识别具有最强的作用或者是主要的负责CDR。在一些实施方案中,所述 β -链的可变区可以含有另外的高变区(CDR4或HVR4),其通常参与超抗原结合而非抗原识别(Kotb (1995)Clinical Microbiology Reviews,8:411-426)。

[0417] 在一些实施方案中,TCR还可以含有恒定结构域、跨膜结构域和/或短细胞质尾(参见例如,Janeway等人,Immunobiology:The Immune System in Health and Disease,第3版,Current Biology Publications,第4页:33,1997)。在一些方面,TCR的每条链可以具有一个N末端免疫球蛋白可变结构域、一个免疫球蛋白恒定结构域、跨膜区和位于C末端的短细胞质尾。在一些实施方案中,TCR与参与介导信号转导的CD3复合物的不变蛋白质缔合。

[0418] 在一些实施方案中,TCR链含有一个或多个恒定结构域。例如,给定TCR链(例如, α 链或 β 链)的细胞外部分可以含有两个与细胞膜相邻的免疫球蛋白样结构域,如可变结构域(例如, $V\alpha$ 或 $V\beta$;通常基于Kabat编号为氨基酸1至116,Kabat等人,“Sequences of Proteins of Immunological Interest”,US Dept.Health and Human Services,Public Health Service National Institutes of Health,1991,第5版)和恒定结构域(例如, α 链恒定结构域或 $C\alpha$,通常基于Kabat编号为链的位置117至259;或 β 链恒定结构域或 $C\beta$,通常基于Kabat为链的位置117至295)。例如,在一些情况下,由两条链形成的TCR的细胞外部分含有两个膜近端恒定结构域和两个膜远端可变结构域,其中可变结构域各自含有CDR。TCR的恒定结构域可含有短连接序列,其中半胱氨酸残基形成二硫键,由此连接TCR的两条链。在一些实施方案中,TCR可在每条 α 和 β 链中具有另外的半胱氨酸残基,使得TCR在恒定结构域中含有两个二硫键。

[0419] 在一些实施方案中,所述TCR链含有跨膜结构域。在一些实施方案中,所述跨膜结构域带正电荷。在一些情况下,所述TCR链含有胞质尾。在一些情况下,结构允许TCR与其他分子(如CD3和其亚基)缔合。例如,含有恒定结构域与跨膜区的TCR可以将所述蛋白质锚定在细胞膜中并与所述CD3信号传导装置或复合物的不变亚基缔合。CD3信号传导亚基(例如,CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 和CD3 ζ 链)的细胞内尾含有TCR复合物的信号传导能力中所涉及的一个或多个基于免疫受体酪氨酸的激活基序或ITAM。

[0420] 在一些实施方案中,TCR可以是两条链 α 和 β (或者任选地 γ 和 δ)的异二聚体,或者其可以是单链TCR构建体。在一些实施方案中,TCR是含有两条单独链(α 和 β 链或 γ 和 δ 链)的异二聚体,所述链是通过例如一个或多个二硫键连接。

[0421] 在一些实施方案中,TCR可以从一个或多个已知的TCR序列(如 $V\alpha$, β 链的序列)产生,所述一个或多个已知的TCR序列的基本上全长的编码序列是易于获得的。用于从细胞来源获得全长TCR序列(包括V链序列)的方法是熟知的。在一些实施方案中,编码TCR的核酸可以从多种来源获得,如通过一种或多种给定细胞内的或从所述一种或多种给定细胞分离的编码TCR的核酸的聚合酶链式反应(PCR)扩增获得,或者通过公众可获得的TCR DNA序列的合成获得。

[0422] 在一些实施方案中,TCR是从生物来源获得,如来自细胞,如来自T细胞(例如,细胞毒性T细胞)、T细胞杂交瘤或其他公众可获得的来源。在一些实施方案中,T细胞可以从体内分离的细胞获得。在一些实施方案中,TCR是胸腺选择的TCR。在一些实施方案中,TCR是新表位限制性TCR。在一些实施方案中,T细胞可以是培养的T细胞杂交瘤或克隆。在一些实施方案中,TCR或其抗原结合部分可以从TCR序列的知识合成地产生。

[0423] 在一些实施方案中,TCR是从通过针对靶多肽抗原或其靶T细胞表位筛选候选TCR文库而鉴定或选择的TCR产生的。TCR文库可以通过扩增来自T细胞的 $V\alpha$ 和 $V\beta$ 库来产生,所述T细胞是从受试者分离,包括存在于PBMC、脾或其他淋巴器官中的细胞。在一些情况下,T细

胞可以从肿瘤浸润性淋巴细胞 (TIL) 扩增。在一些实施方案中, TCR文库可以从CD4⁺或CD8⁺细胞产生。在一些实施方案中, TCR可以从正常或健康受试者的T细胞来源(即, 正常TCR文库) 扩增。在一些实施方案中, TCR可以从患病受试者的T细胞来源(即, 患病TCR文库) 扩增。在一些实施方案中, 使用简并引物扩增V α 和V β 的基因库, 如通过在从人获得的样品(如T细胞) 中进行RT-PCR。在一些实施方案中, scTv文库可以从天然V α 和V β 文库组装, 其中扩增的产物被克隆或组装以通过接头分开。取决于受试者和细胞的来源, 所述文库可以是HLA等位基因特异性的。可替代地, 在一些实施方案中, TCR文库可以通过亲本或支架TCR分子的诱变或多样化产生。在一些方面, 如通过例如 α 或 β 链的诱变, 使TCR经历定向进化。在一些方面, 所述TCR的CDR内的特定残基被改变。在一些实施方案中, 可以通过亲和力成熟来修饰选择的TCR。在一些实施方案中, 可以选择抗原特异性T细胞, 如通过筛选以评估针对所述肽的CTL活性。在一些方面, 例如存在于抗原特异性T细胞上的TCR可以通过如结合活性来选择, 例如对抗原的特定亲和力或亲合力。

[0424] 在一些实施方案中, TCR或其抗原结合部分是已经修饰或工程化的。在一些实施方案中, 使用定向进化方法来产生具有改变的特性如具有较高的对特定MHC-肽复合物的亲和力的TCR。在一些实施方案中, 定向进化是通过展示方法来实现, 包括但不限于酵母展示(Holler等人, (2003) *Nat Immunol*, 4, 55-62; Holler等人, (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 5387-92)、噬菌体展示(Li等人, (2005) *Nat Biotechnol*, 23, 349-54) 或T细胞展示(Chervin等人, (2008) *J Immunol Methods*, 339, 175-84)。在一些实施方案中, 展示途径涉及工程化或修饰已知的亲本或参考TCR。例如, 在一些情况下, 野生型TCR可以用作模板以用于产生诱变的TCR, 其中CDR的一个或多个残基被突变, 并且选择具有所需改变的特性(如对所需靶抗原具有更高的亲和力) 的突变体。

[0425] 在一些实施方案中, 用于产生或生成目标TCR的靶多肽的肽是已知的或可以由熟练技术人员容易地鉴定。在一些实施方案中, 适用于产生TCR或抗原结合部分的肽可以基于目标靶多肽(如下文所述的靶多肽) 中HLA限制性基序的存在来确定。在一些实施方案中, 使用本领域技术人员已知的计算机预测模型鉴定肽。在一些实施方案中, 对于预测MHC I类结合位点, 此类结合模型包括但不限于ProPred1 (Singh和Raghava (2001) *Bioinformatics* 17 (12): 1236-1237) 和SYFPEITHI (参见Schuler等人, (2007) *Immunoinformatics Methods in Molecular Biology*, 409 (1): 75-93 2007)。在一些实施方案中, MHC限制性表位是HLA-A0201, 其在所有高加索人的约39%-46%中表达, 并因此代表用于制备TCR或其他MHC-肽结合分子的MHC抗原的合适选择。

[0426] 使用计算机预测模型的HLA-A0201结合基序以及蛋白酶体和免疫蛋白酶体的裂解位点是本领域技术人员已知的。用于预测MHC I类结合位点的此类模型包括但不限于ProPred1 (更详细地描述于Singh和Raghava, ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. *BIOINFORMATICS* 17 (12): 1236-1237 2001中) 和SYFPEITHI (参见Schuler等人, SYFPEITHI, Database for Searching and T-Cell Epitope Prediction. in *Immunoinformatics Methods in Molecular Biology*, 第409 (1) 卷: 75-93 2007)

[0427] 在一些实施方案中, 所述TCR或其抗原结合部分可以是重组产生的天然蛋白质或其突变形式(其中一种或多种特性(如结合特征) 已经被改变)。在一些实施方案中, TCR可以来源于各种动物物种之一, 如人、小鼠、大鼠或其他哺乳动物。TCR可以是细胞结合的或呈可

溶形式。在一些实施方案中,出于所提供的方法的目的,所述TCR呈在细胞的表面上表达的细胞结合形式。

[0428] 在一些实施方案中,所述TCR是全长TCR。在一些实施方案中,所述TCR是抗原结合部分。在一些实施方案中,所述TCR是二聚体TCR(dTCR)。在一些实施方案中,所述TCR是单链TCR(sc-TCR)。在一些实施方案中,dTCR或scTCR具有如WO 03/020763、WO 04/033685、WO 2011/044186中所述的结构。

[0429] 在一些实施方案中,TCR含有对应于跨膜序列的序列。在一些实施方案中,所述TCR确实含有对应于胞质序列的序列。在一些实施方案中,所述TCR能够与CD3形成TCR复合物。在一些实施方案中,任何TCR(包括dTCR或scTCR)可以与在T细胞的表面上产生活性TCR的信号传导结构域连接。在一些实施方案中,所述TCR在细胞的表面上表达。

[0430] 在一些实施方案中,dTCR含有第一多肽(其中对应于TCR α 链可变区序列的序列与对应于TCR α 链恒定区细胞外序列的序列的N末端融合)和第二多肽(其中对应于TCR β 链可变区序列的序列与对应于TCR β 链恒定区细胞外序列的序列的N末端融合),所述第一和第二多肽通过二硫键连接。在一些实施方案中,所述键可以对应于天然二聚 $\alpha\beta$ TCR中存在的天然链间二硫键。在一些实施方案中,所述链间二硫键不存在于天然TCR中。例如,在一些实施方案中,可以将一个或多个半胱氨酸掺入dTCR多肽对的恒定区细胞外序列中。在一些情况下,可能需要天然和非天然二硫键。在一些实施方案中,所述TCR含有跨膜序列以锚定至膜。

[0431] 在一些实施方案中,dTCR含有TCR α 链(含有可变 α 结构域、恒定 α 结构域和附接至恒定 α 结构域C末端的第一二聚化基序)和TCR β 链(包含可变 β 结构域、恒定 β 结构域和附接至恒定 β 结构域C末端的第一二聚化基序),其中所述第一和第二二聚化基序易于相互作用以在第一二聚化基序的氨基酸与第二二聚化基序的氨基酸之间形成共价键,从而将TCR α 链与TCR β 链连接在一起。

[0432] 在一些实施方案中,TCR是scTCR。通常,scTCR可以使用本领域技术人员已知的方法来产生,参见例如,Soo Hoo, W.F. 等人,PNAS (USA) 89, 4759 (1992); Wülfing, C. 和 Plü ckthun, A., J. Mol. Biol. 242, 655 (1994); Kurucz, I. 等人,PNAS (USA) 90 3830 (1993); 国际公开PCT号WO 96/13593、WO 96/18105、WO 99/60120、WO 99/18129、WO 03/020763、WO 2011/044186; 和 Schlueter, C.J. 等人, J. Mol. Biol. 256, 859 (1996)。在一些实施方案中,scTCR含有引入的非天然链间二硫键以促进TCR链的缔合(参见例如,国际公开PCT号WO03/020763)。在一些实施方案中,scTCR是非二硫键连接的截短的TCR,其中融合至其C末端的异源亮氨酸拉链促进链缔合(参见例如,国际公开PCT号WO 99/60120)。在一些实施方案中,scTCR含有TCR α 可变结构域,其通过肽接头共价连接至TCR β 可变结构域(参见例如,国际公开PCT号WO99/18129)。

[0433] 在一些实施方案中,scTCR含有由对应于TCR α 链可变区的氨基酸序列构成的第一区段、由对应于TCR β 链可变区序列的氨基酸序列构成的第二区段(融合至对应于TCR β 链恒定结构域细胞外序列的氨基酸序列的N末端)和将第一区段的C末端连接至第二区段的N末端的接头序列。

[0434] 在一些实施方案中,scTCR含有第一区段(其由与 α 链细胞外恒定结构域序列的N末端融合的 α 链可变区序列构成)和第二区段(其由与序列 β 链细胞外恒定和跨膜序列的N末端融合的 β 链可变区序列构成)以及任选地接头序列(其将所述第一区段的C末端连接至所述

第二区段的N末端)。

[0435] 在一些实施方案中,scTCR含有第一区段(其由与β链细胞外恒定结构域序列的N末端融合的TCRβ链可变区序列构成)和第二区段(其由与序列α链细胞外恒定和跨膜序列的N末端融合的α链可变区序列构成)以及任选地接头序列(其将所述第一区段的C末端连接至所述第二区段的N末端)。

[0436] 在一些实施方案中,scTCR的连接所述第一和第二TCR区段的接头可以是能够形成单多肽链同时保留TCR结合特异性的任何接头。在一些实施方案中,接头序列可例如具有式-P-AA-P-,其中P是脯氨酸并且AA代表氨基酸序列,其中所述氨基酸是甘氨酸和丝氨酸。在一些实施方案中,所述第一和第二区段配对,使得其可变区序列定向用于这种结合。因此,在一些情况下,所述接头具有足够的长度以跨越所述第一区段的C末端与所述第二区段的N末端之间的距离,或反之亦然,但是不能太长以阻断或减少所述scTCR与所述靶配体的结合。在一些实施方案中,所述接头可以含有从或从约10至45个氨基酸,如10至30个氨基酸或26至41个氨基酸残基,例如29、30、31或32个氨基酸。在一些实施方案中,接头具有式-PGGG-(SGGGG)5-P-,其中P是脯氨酸,G是甘氨酸并且S是丝氨酸(SEQ ID NO:16)。在一些实施方案中,所述接头具有序列GSADDAKKDAAKKD GKS(SEQ ID NO:17)

[0437] 在一些实施方案中,scTCR含有共价二硫键,其将α链的恒定结构域的免疫球蛋白区域的残基连接至β链的恒定结构域的免疫球蛋白区域的残基。在一些实施方案中,天然TCR中不存在链间二硫键。例如,在一些实施方案中,可以将一个或多个半胱氨酸掺入scTCR多肽的第一和第二区段的恒定区细胞外序列中。在一些情况下,可能需要天然和非天然二硫键。

[0438] 在含有引入的链间二硫键的dTCR或scTCR的一些实施方案中,不存在天然二硫键。在一些实施方案中,用形成天然链间二硫键的一个或多个天然半胱氨酸取代另一残基,如取代丝氨酸或丙氨酸。在一些实施方案中,可以通过使第一和第二区段上的非半胱氨酸残基突变为半胱氨酸来形成引入的二硫键。TCR的示例性非天然二硫键描述于已公开的国际PCT号W02006/000830中。

[0439] 在一些实施方案中,TCR或其抗原结合片段对靶抗原以平衡结合常数展现出亲和力,所述平衡结合常数在或在约 10^{-5} 与 10^{-12} M之间以及其中的所有单独值和范围。在一些实施方案中,靶抗原是MHC-肽复合物或配体。

[0440] 在一些实施方案中,编码TCR(如α和β链)的一种或多种核酸可以通过PCR、克隆或其他合适的方法扩增,并且克隆到合适的表达载体中。所述表达载体可以是任何合适的重组表达载体,并且可以用于转化或转染任何合适的宿主。合适的载体包括设计用于繁殖和扩增或用于表达或用于两者的那些,如质粒和病毒。

[0441] 在一些实施方案中,载体可以是以下系列的载体:pUC系列(Fermentas Life Sciences)、pBluescript系列(Stratagene,加利福尼亚州拉霍亚)、pET系列(Novagen,威斯康星州麦迪逊)、pGEX系列(Pharmacia Biotech,瑞典乌普萨拉)或pEX系列(Clontech,加利福尼亚州帕罗奥图)。在一些情况下,也可以使用噬菌体载体,如λG10、λGT11、λZapII(Stratagene)、λEMBL4和λNM1149。在一些实施方案中,可以使用植物表达载体,并且包括pBI01、pBI101.2、pBI101.3、pBI121和pBIN19(Clontech)。在一些实施方案中,动物表达载体包括pEUK-C1、pMAM和pMAMneo(Clontech)。在一些实施方案中,使用病毒载体,如逆转录

病毒载体。

[0442] 在一些实施方案中,可以使用标准重组DNA技术来制备所述重组表达载体。在一些实施方案中,载体可以含有调节序列,如转录和翻译起始和终止密码子,其对引入载体的宿主(例如,细菌、真菌,植物或动物)的类型具特异性,酌情并考虑所述载体是基于DNA还是基于RNA。在一些实施方案中,载体可以含有非天然启动子,其可操作地连接至编码TCR或抗原结合部分(或其他MHC-肽结合分子)的核苷酸序列。在一些实施方案中,所述启动子可以是非病毒启动子或病毒启动子,如巨细胞病毒(CMV)启动子、SV40启动子、RSV启动子和在鼠干细胞病毒的长末端重复序列中发现的启动子。还考虑了熟练技术人员已知的其他启动子。

[0443] 在一些实施方案中,为了产生编码TCR的载体,将 α 和 β 链从表达目标TCR的T细胞克隆分离的总cDNA进行PCR扩增,并将其克隆到表达载体中。在一些实施方案中,将所述 α 和 β 链克隆到同一载体中。在一些实施方案中,将所述 α 和 β 链克隆到不同的载体中。在一些实施方案中,将所产生的 α 和 β 链掺入逆转录病毒(例如,慢病毒)载体中。

[0444] 3. 多靶向

[0445] 在一些实施方案中,细胞和方法包括多靶向策略,例如在细胞上表达两种或更多种基因工程化受体,每种受体识别相同或不同的抗原,并且通常各自包括不同的细胞内信号传导组分。此类多靶向策略描述于例如以下文献中:PCT公开号WO 2014055668A1(描述了激活和共刺激CAR的组合,例如靶向两种不同的抗原,所述抗原在脱靶(例如,正常细胞)上单独存在,但是在待治疗的疾病或病症的细胞上仅一起存在)和Fedorov等人, Sci. Transl. Medicine, 5(215) (2013) (描述了表达激活和抑制性CAR的细胞,例如其中激活CAR结合同时正常或非患病细胞和待治疗疾病或病症的细胞上表达的一种抗原,并且抑制性CAR结合仅在正常细胞或不希望治疗的细胞上表达的另一种抗原的那些细胞)。

[0446] 例如,在一些实施方案中,细胞包括表达第一基因工程化抗原受体(例如,CAR或TCR)的受体,所述受体通常在特异性结合第一受体所识别的抗原(例如,第一抗原)后,能够将激活信号诱导至细胞。在一些实施方案中,细胞还包括第二基因工程化抗原受体(例如,CAR或TCR),例如嵌合共刺激受体,所述受体通常在特异性结合第二受体所识别的第二抗原后,能够将共刺激信号诱导至免疫细胞。在一些实施方案中,第一抗原与第二抗原是相同的。在一些实施方案中,第一抗原与第二抗原是不同的。

[0447] 在一些实施方案中,第一和/或第二基因工程化抗原受体(例如,CAR或TCR)能够将激活信号诱导至细胞。在一些实施方案中,受体包括含有ITAM或ITAM样基序的细胞内信号传导组分。在一些实施方案中,由第一受体诱导的激活涉及信号转导或细胞中蛋白质表达的变化,导致启动免疫应答(例如ITAM磷酸化)和/或启动ITAM介导的信号转导级联、形成免疫突触和/或所结合受体(例如CD4或CD8等)附近的分子的聚簇、激活一种或多种转录因子(例如NF- κ B和/或AP-1)和/或诱导因子(例如细胞因子)的基因表达、增殖和/或存活。

[0448] 在一些实施方案中,第一和/或第二受体包括共刺激受体(如CD28、CD137(4-1BB)、OX40和/或ICOS)的细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,第一和第二受体包括不同共刺激受体的细胞内信号传导结构域。在一个实施方案中,第一受体含有CD28共刺激信号传导区域,并且第二受体含有4-1BB共刺激信号传导区域,或反之亦然。

[0449] 在一些实施方案中,第一和/或第二受体包括含有ITAM或ITAM样基序的细胞内信号传导结构域和共刺激受体的细胞内信号传导结构域。

[0450] 在一些实施方案中,第一受体含有包含ITAM或ITAM样基序的细胞内信号传导结构域,并且第二受体含有共刺激受体的细胞内信号传导结构域。与在相同细胞中诱导的激活信号组合的共刺激信号是导致免疫应答的共刺激信号,所述免疫应答是例如稳健且持续的免疫应答,如增加的基因表达、细胞因子和其他因子的分泌、以及T细胞介导的效应子功能(如细胞杀伤)。

[0451] 在一些实施方案中,单独的第一受体的连接和单独的第二受体的连接都不会诱导稳健的免疫应答。在一些方面,如果仅连接一个受体,则细胞变得耐受抗原或对抗原无反应,或被抑制,和/或不被诱导增殖或分泌因子或实现效应子功能。然而,在一些此类实施方案中,在连接多种受体时,如在遇到表达第一和第二抗原的细胞时,实现所需反应,如完全免疫激活或刺激,例如通过一种或多种细胞因子的分泌、增殖、持久性和/或执行免疫效应子功能(如靶细胞的细胞毒性杀伤)所指示的。

[0452] 在一些实施方案中,两种受体分别将激活和抑制信号诱导至细胞,使得一种受体与其抗原的结合激活细胞或诱导反应,但是第二抑制性受体与其抗原的结合诱导了抑制或减弱所述反应的信号。例子是激活CAR与抑制性CAR或iCAR的组合。例如,可以使用这种策略,其中激活CAR结合在疾病或病症中表达但也在正常细胞上表达的抗原,并且抑制性受体结合在正常细胞上表达但不在疾病或病症的细胞上表达的单独抗原。

[0453] 在一些实施方案中,多靶向策略用于以下情况:其中与特定疾病或病症相关的抗原在未患病细胞上表达和/或在工程化细胞本身上表达,所述表达为瞬时表达(例如,在与基因工程化相关的刺激后)或永久表达。在此类情况下,通过需要连接两个分开的和单独特异性抗原受体,可以改善特异性、选择性和/或功效。

[0454] 在一些实施方案中,多种抗原(例如第一和第二抗原)在所靶向的细胞、组织或疾病或病症上(例如在癌细胞上)表达。在一些方面,细胞、组织、疾病或病症是多发性骨髓瘤或多发性骨髓瘤细胞。在一些实施方案中,多种抗原中的一种或多种通常也在不需要用细胞疗法靶向的细胞(例如正常或未患病细胞或组织,和/或工程化细胞本身)上表达。在此类实施方案中,通过需要连接多个受体以实现细胞的反应,实现特异性和/或功效。

[0455] B. 用于基因工程的细胞和细胞的制备

[0456] 表达受体并通过所提供的方法给予的细胞包括工程化细胞。基因工程通常涉及将编码重组或工程化组分的核酸引入含有细胞的组合物中,如通过逆转录病毒转导、转染或转化。

[0457] 在一些实施方案中,核酸是异源的,即通常不存在于细胞或从细胞获得的样品中,如从另一种生物或细胞获得的核酸,例如,所述核酸通常不在被工程化的细胞和/或这种细胞所来源的生物中发现。在一些实施方案中,核酸不是天然存在的如自然界中未发现的核酸,包括包含编码来自多种不同细胞类型的各种结构域的核酸的嵌合组合的核酸。

[0458] 细胞通常是真核细胞,例如哺乳动物细胞,并且通常是人细胞。在一些实施方案中,所述细胞源自血液、骨髓、淋巴或淋巴器官,是免疫系统的细胞,如先天或适应性免疫的细胞,例如骨髓或淋巴细胞,包括淋巴细胞,通常为T细胞和/或NK细胞。其他示例性细胞包括干细胞,如多潜能干细胞和多能干细胞,包括诱导多能干细胞(iPSC)。细胞通常是原代细胞如直接从受试者分离和/或从受试者分离并冷冻的那些原代细胞。在一些实施方案中,细胞包括T细胞或其他细胞类型的一个或多个亚组,如整个T细胞群、CD4⁺细胞、CD8⁺细胞及其

亚群,如由以下各项所定义的那些亚群:功能、激活状态、成熟度、分化的可能性、扩增、再循环、定位和/或持久能力、抗原特异性、抗原受体类型、在特定器官或区室中的存在、标记或细胞因子分泌特征和/或分化程度。关于待治疗的受试者,细胞可以是同种异体的和/或自体同源的。所述方法包括现成的方法。在一些方面,如对于现有技术,所述细胞是多能和/或多潜能的,如干细胞,如诱导多潜能干细胞(iPSC)。在一些实施方案中,所述方法包括从受试者分离细胞、制备、加工、培养和/或将它们工程化,并在冷冻保存之前或之后将它们重新引入同一受试者体内。

[0459] T细胞和/或CD4⁺和/或CD8⁺T细胞的亚型和亚群包括幼稚T(T_N)细胞、效应T细胞(T_{EFF})、记忆T细胞及其亚型(如干细胞记忆T(T_{SCM})、中枢记忆T(T_{CM}),效应记忆T(T_{EM})或终末分化效应记忆T细胞)、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、未成熟T细胞、成熟T细胞、辅助T细胞、细胞毒性T细胞、粘膜相关不变T(MAIT)细胞、天然存在和适应性调节T(T_{reg})细胞、辅助T细胞(如TH1细胞、TH2细胞、TH3细胞、TH17细胞、TH9细胞、TH22细胞、滤泡辅助细胞T细胞)、 α/β T细胞和 δ/γ T细胞。

[0460] 在一些实施方案中,所述细胞是天然杀伤(NK)细胞。在一些实施方案中,所述细胞是单核细胞或粒细胞,例如骨髓细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞和/或嗜碱性粒细胞。

[0461] 在一些实施方案中,所述细胞包括经由基因工程引入的一种或多种核酸,从而表达此类核酸的重组或基因工程化产物。在一些实施方案中,核酸是异源的,即通常不存在于细胞或从细胞获得的样品中,如从另一种生物或细胞获得的核酸,例如,所述核酸通常不在被工程化的细胞和/或这种细胞所来源的生物中发现。在一些实施方案中,核酸不是天然存在的如自然界中未发现的核酸,包括包含编码来自多种不同细胞类型的各种结构域的核酸的嵌合组合的核酸。

[0462] 在一些实施方案中,工程化细胞的制备包括一个或多个培养和/或制备步骤。用于引入编码转基因受体(如CAR)的核酸的细胞可以从样品(如生物样品,例如从受试者获得或源自受试者的生物样品)分离。在一些实施方案中,分离出细胞的受试者是患有疾病或病症或需要细胞疗法或将其给予细胞疗法的受试者。在一些实施方案中,所述受试者是需要特定治疗性干预(如过继细胞疗法,其中细胞被分离、加工和/或工程化)的人。

[0463] 因此,在一些实施方案中,细胞是原代细胞,例如原代人细胞。样品包括直接取自受试者的组织、流体和其他样品,以及来自一个或多个加工步骤(如分离、离心、基因工程化(例如用病毒载体转导)、洗涤和/或孵育)的样品。所述生物样品可以是直接从生物来源获得的样品或经过加工的样品。生物样品包括但不限于体液(如血液、血浆、血清、脑脊液、滑液、尿液和汗液)、组织和器官样品,包括由其衍生的加工样品。

[0464] 在一些方面,细胞从其中衍生或分离的样品是血液或血液衍生的样品,或者是或源自单采术或白细胞分离术产物。示例性样品包括全血、外周血单核细胞(PBMC)、白细胞、骨髓、胸腺、组织活检、肿瘤、白血病、淋巴瘤、淋巴结、肠相关淋巴组织、粘膜相关淋巴组织、脾、其他淋巴组织、肝、肺、胃、肠、结肠、肾、胰腺、乳房、骨、前列腺、子宫颈、睾丸、卵巢、扁桃体或其他器官和/或由其衍生的细胞。在细胞疗法(例如过继细胞疗法)的背景下,样品包括来自自体 and 同种异体来源的样品。

[0465] 在一些实施方案中,细胞源自细胞系,例如T细胞系。在一些实施方案中,细胞获得

自异种来源,例如获得自小鼠、大鼠、非人灵长类动物和猪。

[0466] 在一些实施方案中,细胞的分离包括一个或多个制备和/或基于非亲和力的细胞分离步骤。在一些例子中,将细胞在存在一种或多种试剂的情况下洗涤、离心和/或孵育,例如以去除不需要的组分、针对所需组分进行富集、裂解或去除对特定试剂敏感的细胞。在一些例子中,基于一种或多种特性(如密度、粘附特性、尺寸、对特定组分的敏感性和/或抗性)分离细胞。

[0467] 在一些例子中,来自受试者的循环血液的细胞例如通过单采术或白细胞分离术获得。在一些方面,所述样品含有淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其他有核白细胞、红细胞和/或血小板,并且在一些方面含有除红细胞和血小板之外的细胞。

[0468] 在一些实施方案中,洗涤从受试者收集的血细胞,例如以去除血浆级分并将细胞置于适当的缓冲液或介质中以用于随后的加工步骤。在一些实施方案中,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤所述细胞。在一些实施方案中,所述洗涤溶液缺乏钙和/或镁和/或许多或所有二价阳离子。在一些方面,根据制造商的说明书,通过半自动“流通”离心机(例如,Cobe 2991细胞加工器,Baxter)完成洗涤步骤。在一些方面,根据制造商的说明书,通过切向流过滤(TFF)完成洗涤步骤。在一些实施方案中,洗涤后将所述细胞重悬于多种生物相容性缓冲液(例如像不含 $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ 的PBS)中。在某些实施方案中,去除血细胞样品的组分并将所述细胞直接重悬于培养基中。

[0469] 在一些实施方案中,所述方法包括基于密度的细胞分离方法,如通过裂解红细胞并通过Percoll或Ficoll梯度离心而从外周血制备白细胞。

[0470] 在一些实施方案中,分离方法包括基于细胞中一种或多种特定分子(如表面标记,例如表面蛋白、细胞内标记或核酸)的表达或存在来分离不同细胞类型。在一些实施方案中,可以使用任何已知的基于此类标记的用于分离的方法。在一些实施方案中,所述分离是基于亲和力或免疫亲和力的分离。例如,在一些方面,所述分离包括基于所述细胞的一种或多种标记(通常为细胞表面标记)的表达或表达水平来分离细胞和细胞群,例如通过和与此类标记特异性结合的抗体或结合配偶体一起孵育,然后通常是洗涤步骤和从那些未与所述抗体或结合配偶体结合的细胞中分离已结合所述抗体或结合配偶体的细胞。

[0471] 此类分离步骤可以基于阳性选择(其中保留已经结合所述试剂的细胞以供进一步使用)和/或阴性选择(其中保留未与所述抗体或结合配偶体结合的细胞)。在一些例子中,保留两种级分以供进一步使用。在一些方面,在没有可用于特异性鉴定异质群体中的细胞类型的抗体的情况下,阴性选择可能特别有用,使得最好基于由除所需群体之外的细胞表达的标记进行分离。

[0472] 所述分离不需要导致100%富集或去除特定细胞群或表达特定标记的细胞。例如,针对特定类型的细胞(如表达标记的那些)的阳性选择或富集是指增加此类细胞的数量或百分比,但不需要导致不表达所述标记的细胞的完全不存在。同样地,特定类型的细胞(如表达标记的那些)的阴性选择、去除或耗尽是指减少此类细胞的数量或百分比,但不需要导致所有此类细胞的完全去除。

[0473] 在一些例子中,进行多轮分离步骤,其中来自一个步骤的阳性或阴性选择的级分经受另一个分离步骤,如随后的阳性或阴性选择。在一些例子中,单个分离步骤可以同时耗尽表达多种标记的细胞,如通过将细胞与多种抗体或结合配偶体(每种抗体或结合配偶体

对被靶向用于阴性选择的标记具特异性)一起孵育。同样地,通过将细胞与在各种细胞类型上表达的多种抗体或结合配偶体一起孵育,可以同时阳性选择多种细胞类型。

[0474] 例如,在一些方面,T细胞的特定亚群,如对一种或多种表面标记呈阳性或高水平表达的细胞(例如CD28⁺、CD62L⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺和/或CD45RO⁺T细胞)通过阳性或阴性选择技术来分离。

[0475] 例如,可以使用CD3/CD28缀合的磁珠(例如,DYNABEADS® M-450CD3/CD28T Cell Expander)阳性选择CD3⁺、CD28⁺T细胞。

[0476] 在一些实施方案中,通过阳性选择针对特定细胞群富集或者通过阴性选择针对特定细胞群耗尽来进行分离。在一些实施方案中,通过将细胞与一种或多种抗体或其他结合剂一起孵育来完成阳性或阴性选择,所述一种或多种抗体或其他结合剂与分别在阳性或阴性选择的细胞上表达或以相对较高水平(标记高)(标记⁺)的一种或多种表面标记特异性结合。

[0477] 在一些实施方案中,通过阴性选择非T细胞(如B细胞、单核细胞或其他白细胞,如CD14)上表达的标记,将T细胞与PBMC样品分离。在一些方面,CD4⁺或CD8⁺选择步骤用于分离CD4⁺辅助T细胞和CD8⁺细胞毒性T细胞。通过对在一种或多种原初、记忆和/或效应T细胞亚群上表达或以相对较高程度表达的标记的阳性或阴性选择,可以将此类CD4⁺和CD8⁺群体进一步分类成亚群。

[0478] 在一些实施方案中,如通过基于与相应子群体相关的表面抗原进行阳性或阴性选择,将CD8⁺细胞针对天然、中枢记忆、效应子记忆和/或中枢记忆干细胞进一步富集或耗尽。在一些实施方案中,针对中枢记忆T(T_{CM})细胞进行富集以增加功效,如以改善给予后的长期存活、扩增和/或移植,这在一些方面中在此类亚群中特别稳健。参见Terakura等人,Blood.1:72-82(2012);Wang等人,J Immunother.35(9):689-701(2012)。在一些实施方案中,组合富含TCM的CD8⁺T细胞与CD4⁺T细胞进一步增强功效。

[0479] 在实施方案中,记忆T细胞存在于CD8⁺外周血淋巴细胞的CD62L⁺和CD62L⁻两个子集中。可以将PBMC针对CD62L⁻CD8⁺和/或CD62L⁺CD8⁺级分进行富集或耗尽,如使用抗CD8和抗CD62L抗体。

[0480] 在一些实施方案中,中枢记忆T(T_{CM})细胞的富集是基于CD45RO、CD62L、CCR7、CD28、CD3和/或CD 127的阳性或高表面表达;在一些方面,它是基于对表达或高度表达CD45RA和/或颗粒酶B的细胞的阴性选择。在一些方面,通过表达CD4、CD14、CD45RA的细胞的耗尽和表达CD62L的细胞的阳性选择或富集来进行富含TCM细胞的CD8⁺群体的分离。在一个方面,中枢记忆T(T_{CM})细胞的富集从基于CD4表达所选择的阴性细胞级分开始进行,所述阴性细胞级分基于CD14和CD45RA的表达进行阴性选择且基于CD62L进行阳性选择。在一些方面这种选择是同时进行的,而在其他方面以任何顺序依次进行。在一些方面,用于制备CD8⁺细胞群或亚群的相同的基于CD4表达的选择步骤也用于生成CD4⁺细胞群或亚群,使得来自基于CD4的分离的阳性和阴性级分被保留并用于所述方法的后续步骤中,任选地在一个或多个其他阳性或阴性选择步骤之后。

[0481] 在特定例子中,PBMC样品或其他白细胞样品进行CD4⁺细胞的选择,其中保留了阴性和阳性级分。然后所述阴性级分基于CD14和CD45RA或CD19的表达进行阴性选择,并基于中枢记忆T细胞(如CD62L或CCR7)的标记特征进行阳性选择,其中以任何顺序进行所述阳性

和阴性选择。

[0482] 通过鉴定具有细胞表面抗原的细胞群,将CD4⁺T辅助细胞分类为幼稚、中枢记忆和效应细胞。CD4⁺淋巴细胞可通过标准方法获得。在一些实施方案中,幼稚CD4⁺T淋巴细胞是CD45RO⁻、CD45RA⁺、CD62L⁺、CD4⁺T细胞。在一些实施方案中,中枢记忆CD4⁺细胞是CD62L⁺和CD45RO⁺。在一些实施方案中,效应子CD4⁺细胞是CD62L⁻和CD45RO⁻。

[0483] 在一个例子中,为了通过负向选择富集CD4⁺细胞,单克隆抗体混合剂通常包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。在一些实施方案中,所述抗体或结合配偶体与固体支持物或基质(如磁珠或顺磁珠)结合,以允许细胞分离以用于阳性和/或阴性选择。例如,在一些实施方案中,使用免疫磁性(或亲和磁性)分开技术来分开或分离细胞和细胞群(综述于Methods in Molecular Medicine,第58卷:Metastasis Research Protocols,第2卷:Cell Behavior In vitro and In vivo,第17-25页S.A.Brooks和U.Schumacher编辑© Humana Press Inc.,新泽西州托托瓦)。

[0484] 在一些方面,将待分离的细胞的样品或组合物与小的可磁化或磁响应材料(如磁响应颗粒或微粒,如顺磁珠(例如像Dynalbeads或MACS珠))一起孵育。磁响应材料(例如,颗粒)通常直接或间接地附着于结合配偶体(例如,抗体),所述结合配偶体与希望分离(例如,希望阴性地或阳性地选择)的一个细胞、多个细胞或细胞群上存在的分子(例如,表面标记)特异性结合。

[0485] 在一些实施方案中,所述磁性颗粒或珠包含与特异性结合成员(如抗体或其他结合配偶体)结合的磁响应材料。有许多在磁分离方法中使用的熟知的磁响应材料。合适的磁性颗粒包括在Molday,美国专利号4,452,773和在欧洲专利说明书EP 452342B(将其通过引用特此并入)中描述的那些。胶体大小的颗粒(如在Owen美国专利号4,795,698以及Liberti等人,美国专利号5,200,084中描述的那些)是其他例子。

[0486] 所述孵育通常在这样的条件下进行,由此抗体或结合配偶体或者与附着于磁性颗粒或珠的此类抗体或结合配偶体特异性结合的分子(如二抗或其他试剂)与细胞表面分子(如果存在于所述样品内的细胞上的话)特异性结合。

[0487] 在一些方面,将所述样品置于磁场中,并且具有附着于其上的磁响应或可磁化颗粒的那些细胞将被吸引到磁体并与未标记的细胞分离。对于阳性选择,保留被磁铁吸引的细胞;对于阴性选择,保留未被吸引的细胞(未标记的细胞)。在一些方面,在同一选择步骤期间进行阳性和阴性选择的组合,其中保留阳性和阴性级分并进一步加工或经受另外的分离步骤。

[0488] 在某些实施方案中,所述磁响应颗粒被包被在一抗或其他结合伴侣、二抗、凝集素、酶或链霉亲和素中。在某些实施方案中,所述磁性颗粒通过对一种或多种标记具特异性的一抗的包被而附着于细胞。在某些实施方案中,用一抗或结合配偶体标记所述细胞而不是珠,并且然后添加细胞类型特异性二抗或其他结合配偶体(例如链霉亲和素)包被的磁性颗粒。在某些实施方案中,将链霉亲和素包被的磁性颗粒与生物素化的一抗或二抗结合使用。

[0489] 在一些实施方案中,所述磁响应颗粒保持附着于所述细胞,所述细胞随后被孵育,培养和/或工程化;在一些方面,所述颗粒保持附着于所述细胞以用于给予患者。在一些实施方案中,从所述细胞中去除可磁化或磁响应颗粒。从细胞中去除可磁化颗粒的方法是已

知的,并且包括例如使用竞争的非标记抗体和与可切割接头缀合的可磁化颗粒或抗体。在一些实施方案中,可磁化颗粒是可生物降解的。

[0490] 在一些实施方案中,基于亲和力的选择是经由磁激活细胞分选 (MACS) (Miltenyi Biotec,加利福尼亚州奥本)。磁激活细胞分选 (MACS) 系统能够高纯度选择附着有磁化颗粒的细胞。在某些实施方案中,MACS以这样的模式操作,其中在施加外部磁场之后依次洗脱非靶标和靶标种类。也就是说,附着于磁化颗粒的细胞保持在适当的位置,而未附着的种类被洗脱。然后,在完成第一次洗脱步骤之后,以某种方式释放被捕获在磁场中并被阻止洗脱的种类,使得它们可以被洗脱和回收。在某些实施方案中,所述非靶细胞被标记并从异质细胞群中耗尽。

[0491] 在某些实施方案中,使用这样的系统、装置或设备进行分离或分开,所述系统、装置或设备进行所述方法的分离、细胞制备、分开、加工、孵育、培养和/或制备步骤中的一种或多种。在一些方面,所述系统用于在封闭或无菌环境中进行这些步骤中的每一个,例如以最小化错误、用户操作和/或污染。在一个例子中,所述系统是如PCT公开号WO 2009/072003或US 20110003380A1中所述的系统。

[0492] 在一些实施方案中,所述系统或设备在集成或独立系统中和/或以自动或可编程方式进行分离、加工、工程化和配制步骤中的一个或多个(例如,全部)。在一些方面,所述系统或设备包括与所述系统或设备通信的计算机和/或计算机程序,其允许用户对加工、分离、工程化和配制步骤的各个方面进行编程、控制、评估其结果和/或调整。

[0493] 在一些方面,使用CliniMACS系统 (Miltenyi Biotec) 进行所述分离和/或其他步骤,例如以用于在封闭和无菌系统中在临床规模水平上自动分离细胞。部件可以包括集成微计算机、磁分离单元、蠕动泵和各种夹管阀。在一些方面,所述集成计算机控制所述仪器的所有部件并指示所述系统以标准化顺序执行重复程序。在一些方面,所述磁分离单元包括可移动的永磁体和用于选择柱的支架。所述蠕动泵控制整个管组的流速,并与夹管阀一起确保缓冲液通过所述系统的受控流动和细胞的连续悬浮。

[0494] 在一些方面,所述CliniMACS系统使用抗体偶联的可磁化颗粒,其在无菌,无热原的溶液中提供。在一些实施方案中,在用磁性颗粒标记细胞后,洗涤所述细胞以去除过量的颗粒。然后将细胞制备袋连接到管组,所述管组又连接到含有缓冲液的袋和细胞收集袋。所述管组由预装配的无菌管(包括预柱和分离柱)组成,并且仅供一次性使用。在启动分离程序后,所述系统自动将细胞样品施加到分离柱。标记的细胞保留在柱内,而未标记的细胞通过一系列洗涤步骤去除。在一些实施方案中,用于与本文描述的方法一起使用的细胞群是未标记的并且不保留在柱中。在一些实施方案中,用于与本文描述的方法一起使用的细胞群被标记并保留在柱中。在一些实施方案中,用于与本文描述的方法一起使用的细胞群在去除磁场后从柱中洗脱,并且收集在细胞收集袋内。

[0495] 在某些实施方案中,使用CliniMACS Prodigy系统 (Miltenyi Biotec) 进行分离和/或其他步骤。在一些方面,CliniMACS Prodigy系统配备有细胞加工联合体,其允许通过离心自动化洗涤和分级分离细胞。CliniMACS Prodigy系统还可以包括机载相机和图像识别软件,其通过辨别源细胞产物的宏观层来确定最佳的细胞分级分离终点。例如,外周血自动分离成红细胞、白细胞和血浆层。CliniMACS Prodigy系统还可以包括集成细胞养殖室,其实现细胞培养方案例如细胞分化和扩增、抗原加载和长期细胞培养。输入端口可允许无

菌移除和补充培养基,并且可以使用集成显微镜监测细胞。参见例如,Klebanoff等人,J Immunother.35 (9):651-660 (2012);Terakura等人,Blood.1:72-82 (2012);和Wang等人,J Immunother.35 (9):689-701 (2012)。

[0496] 在一些实施方案中,通过流式细胞术收集和富集(或耗尽)本文描述的细胞群,其中针对多种细胞表面标记染色的细胞在流体流中载携。在一些实施方案中,通过制备规模(FACS)分类收集和富集(或耗尽)本文描述的细胞群。在某些实施方案中,通过使用微机电系统(MEMS)芯片结合基于FACS的检测系统来收集和富集(或耗尽)本文描述的细胞群(参见例如,WO 2010/033140,Cho等人,Lab Chip 10,1567-1573 (2010);和Godin等人,J Biophoton.1 (5):355-376 (2008))。在两种情况下,细胞可以用多种标记来标记,允许以高纯度分离明确定义的T细胞子集。

[0497] 在一些实施方案中,用一种或多种可检测标记来标记抗体或结合配偶体,以促进分离供阳性和/或阴性选择。例如,分离可以基于与荧光标记的抗体的结合。在一些例子中,基于对一种或多种细胞表面标记具特异性的抗体或其他结合配偶体的结合来分离细胞在流体流中载携,如通过荧光激活细胞分选(FACS),包括制备规模(FACS)和/或微机电系统(MEMS)芯片,例如与流式细胞检测系统组合。此类方法允许基于多种标记同时进行阳性和阴性选择。

[0498] 在一些实施方案中,制备方法包括在分离、孵育和/或工程化之前或之后冷冻(例如,冷冻保存)细胞的步骤。在一些实施方案中,所述冷冻和后续解冻步骤去除所述细胞群中的粒细胞,并且在一定程度上去除单核细胞。在一些实施方案中,例如在洗涤步骤之后将细胞悬浮在冷冻溶液中以去除血浆和血小板。在一些方面,可以使用多种已知的冷冻溶液和参数中的任何一种。一个例子涉及使用含有20%DMSO和8%人血清白蛋白(HSA)的PBS,或其他合适的细胞冷冻培养基。然后将其用培养基1:1稀释,使得DMSO和HSA的最终浓度分别为10%和4%。然后通常将细胞以1°/分钟的速率冷冻至-80℃并储存在液氮储罐的气相中。

[0499] 在一些实施方案中,在基因工程化之前或与其相连地孵育和/或培养细胞。所述孵育步骤可以包括培养、培育、刺激、激活和/或繁殖。孵育和/或工程化可以在培养容器中进行,所述培养容器是如单元、室、孔、柱、管、管组、阀、小瓶、培养皿、袋或其他用于培养或培育细胞的容器。在一些实施方案中,在存在刺激条件或刺激剂的情况下孵育所述组合物或细胞。这些条件包括针对以下而设计的那些条件:用于诱导群体中细胞的增殖、扩增、激活和/或存活的条件,用于模拟抗原暴露和/或用于引发细胞进行基因工程化,如以引入重组抗原受体。

[0500] 条件可以包括以下中的一种或多种:特定培养基、温度、氧含量、二氧化碳含量、时间、药剂(例如,营养素、氨基酸、抗生素、离子和/或刺激因子(如细胞因子、趋化因子、抗原、结合配偶体、融合蛋白、重组可溶性受体和任何其他旨在激活细胞的药剂))。

[0501] 在一些实施方案中,刺激条件或药剂包括一种或多种药剂(例如配体),其能够激活TCR复合物的细胞内信号传导结构域。在一些方面,所述药剂在T细胞中开启或启动TCR/CD3细胞内信号传导级联。此类药剂可以包括例如结合至固体支持物(如珠)的抗体,如对TCR组分和/或共刺激受体具有特异性的抗体(例如抗CD3、抗CD28);和/或一种或多种细胞因子。任选地,扩增方法还可以包括向培养基中添加抗CD3和/或抗CD28抗体(例如,以至少约0.5ng/ml的浓度)的步骤。在一些实施方案中,刺激剂包括IL-2和/或IL-15,例如,IL-2浓

度为至少约10单位/mL。

[0502] 在一些方面, 孵育是根据多种技术来进行, 例如以下文献中所述的那些技术: Riddell等人的美国专利号6,040,177; Klebanoff等人, J Immunother. 35 (9): 651-660 (2012); Terakura等人, Blood. 1: 72-82 (2012); 和/或Wang等人, J Immunother. 35 (9): 689-701 (2012)。

[0503] 在一些实施方案中, 通过以下方法扩增T细胞: 向培养起始组合物中加入饲养细胞(如非分裂外周血单核细胞(PBMC)) (例如, 使得所得细胞群含有至少约5、10、20或40种或更多种PBMC饲养细胞, 以使初始群体中的每种T淋巴细胞进行扩增); 以及孵育培养物(例如, 持续足以扩增T细胞数量的时间)。在一些方面, 非分裂饲养细胞可包含 γ 辐射的PBMC饲养细胞。在一些实施方案中, 用约3000至3600拉德范围内的 γ 射线照射PBMC以防止细胞分裂。在一些方面, 在添加T细胞群之前将饲养细胞加入到培养基中。

[0504] 在一些实施方案中, 所述刺激条件包括适合于人T淋巴细胞生长的温度, 例如至少约25摄氏度, 通常为至少约30摄氏度, 并且通常在或约在37摄氏度。任选地, 孵育还可以包括加入非分裂的EBV转化的类淋巴母细胞(LCL)作为饲养细胞。可以用约6000至10,000拉德范围内的 γ 射线照射LCL。在一些方面, 所述LCL饲养细胞以任何合适的量(如LCL饲养细胞与初始T淋巴细胞的比率为至少约10:1)提供。

[0505] 在实施方案中, 抗原特异性T细胞(如抗原特异性CD4⁺和/或CD8⁺T细胞)是通过用抗原刺激幼稚或抗原特异性T淋巴细胞来获得。例如, 可以通过从被感染的受试者分离T细胞并在体外用相同抗原刺激所述细胞, 针对巨细胞病毒抗原来产生抗原特异性T细胞系或克隆。

[0506] C. 用于基因工程的载体和方法

[0507] 编码重组受体的核酸分子的引入可以使用许多已知载体中的任何一种进行。此类载体包括病毒和非病毒系统, 包括慢病毒和 γ 逆转录病毒系统, 以及基于转座子的系统, 如基于PiggyBac或Sleeping Beauty的基因转移系统。示例性方法包括用于转移编码受体的核酸的那些, 包括通过病毒(如逆转录病毒或慢病毒)、转导、转座子和电穿孔。

[0508] 在一些实施方案中, 通过以下方式完成基因转移: 首先刺激细胞, 如通过将其与诱导反应(如增殖、存活和/或激活)的刺激物进行组合, 例如如通过细胞因子或激活标记的表达测量的, 然后转导激活的细胞, 并且在培养物中扩增至足以用于临床应用的数目。

[0509] 在一些实施方案中, 在基因转移之前或期间, 在存在除ITK的抑制剂以外的蛋白酪氨酸激酶的抑制剂和/或BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TKK和/或ERBB4中的一种或多种的抑制剂(包括如本文所述的任何一种)的情况下孵育或培养细胞。在一些实施方案中, 抑制剂是在细胞制造过程期间(例如, 在工程化CAR-T细胞的过程期间)添加的。在一些方面, 抑制剂的存在可以改善所产生细胞群的质量。在一些方面, 除ITK的抑制剂以外的蛋白酪氨酸激酶的抑制剂和/或BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TKK和/或ERBB4中的一种或多种的抑制剂可以增加细胞的增殖或扩增, 或者可以改变一个或多个信号传导途径, 从而产生具有较低分化或较少激活的表面表型, 但展现出显著扩增和/或效应子功能的细胞。

[0510] 在一些情况下, 刺激因子(例如, 淋巴因子或细胞因子)的过表达可能对受试者有毒。因此, 在一些情况下, 工程化细胞包括导致细胞在体内(如在过继免疫疗法中给予时)对阴性选择易感的基因区段。例如, 在一些方面, 工程化细胞, 使得它们可以由于给予它们的

患者的体内状况的改变而被消除。阴性选择性表型可以由赋予对所给予的药剂(例如,化合物)的敏感性的基因的插入而产生。阴性选择性基因包括单纯疱疹病毒I型胸苷激酶(HSV-I TK)基因(Wigler等人,Cell 11:223,1977),其赋予更昔洛韦敏感性;细胞次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶(HPRT)基因;细胞腺嘌呤磷酸核糖基转移酶(APRT)基因;细菌胞嘧啶脱氨酶(Mullen等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.89:33(1992))。

[0511] 在一些实施方案中,使用重组感染性病毒粒子(例如像源自猿猴病毒40(SV40)、腺病毒、腺相关病毒(AAV)的载体)将重组核酸转移至细胞中。在一些实施方案中,使用重组慢病毒载体或逆转录病毒载体(如 γ -逆转录病毒载体)将重组核酸转移至T细胞中(参见例如,Koste等人(2014)Gene Therapy 2014年4月3日.doi:10.1038/gt.2014.25;Carlens等人(2000)Exp Hematol 28(10):1137-46;Alonso-Camino等人(2013)Mol Ther Nucl Acids 2,e93;Park等人,Trends Biotechnol.2011年11月29(11):550-557)。

[0512] 在一些实施方案中,所述逆转录病毒载体具有长末端重复序列(LTR),例如源自莫洛尼鼠白血病毒(MoMLV)、骨髓增生性肉瘤病毒(MPSV)、鼠胚胎干细胞病毒(MESV)、鼠干细胞病毒(MSCV)、脾病灶形成病毒(SFFV)或腺相关病毒(AAV)的逆转录病毒载体。大多数逆转录病毒载体源自鼠逆转录病毒。在一些实施方案中,所述逆转录病毒包括源自于任何禽类或哺乳动物细胞来源的那些。所述逆转录病毒通常是双嗜性的,这意味着它们能够感染包括人在内的若干种物种的宿主细胞。在一个实施方案中,待表达的基因替代逆转录病毒gag、pol和/或env序列。已经描述了许多说明性逆转录病毒系统(例如,美国专利号5,219,740;6,207,453;5,219,740;Miller和Rosman(1989)BioTechniques 7:980-990;Miller, A.D.(1990)Human Gene Therapy 1:5-14;Scarpa等人(1991)Virology 180:849-852;Burns等人(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:8033-8037;以及Boris-Lawrie和Temin(1993)Cur.Opin.Genet.Develop.3:102-109)。

[0513] 慢病毒转导的方法是已知的。示例性方法描述于例如Wang等人(2012)J.Immunother.35(9):689-701;Cooper等人(2003)Blood.101:1637-1644;Verhoeven等人(2009)Methods Mol Biol.506:97-114;以及Cavalieri等人(2003)Blood.102(2):497-505中。

[0514] 在一些实施方案中,经由电穿孔将重组核酸转移到T细胞中(参见例如,Chicaybam等人,(2013)PLoS ONE 8(3):e60298和Van Tedeloo等人(2000)Gene Therapy 7(16):1431-1437)。在一些实施方案中,经由转座将重组核酸转移到T细胞中(参见例如,Manuri等人(2010)Hum Gene Ther 21(4):427-437;Sharma等人(2013)Molec Ther Nucl Acids 2,e74;和Huang等人(2009)Methods Mol Biol 506:115-126)。在免疫细胞中引入和表达遗传材料的其他方法包括磷酸钙转染(例如,如Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons,纽约州纽约中所述)、原生质体融合、阳离子脂质体介导的转染、钨颗粒促进的微粒轰击(Johnston,Nature,346:776-777(1990))和磷酸铈DNA共沉淀(Brash等人,Mol.Cell Biol.,7:2031-2034(1987))。

[0515] 用于转移编码重组产物的核酸的其他方法和载体是例如在国际专利申请公开号WO 2014055668和美国专利号7,446,190中所述的那些。

[0516] 在一些实施方案中,细胞(例如,T细胞)可以在扩增期间或之后例如用T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)进行转染。例如,这种用于引入所需受体的基因的转染可以用

任何合适的逆转录病毒载体进行。然后可以使遗传修饰的细胞群摆脱初始刺激物(例如CD3/CD28刺激物),并且随后用第二种类型的刺激物(例如经由从头引入的受体)进行刺激。该第二种类型的刺激物可以包括肽/MHC分子形式的抗原刺激物、遗传引入的受体的同源(交联)配体(例如CAR的天然配体)或在新受体的框架内直接结合(例如通过识别受体内的恒定区)的任何配体(如抗体)。参见例如,Cheadle等人,“Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy”*Methods Mol Biol.*2012;907:645-66或Barrett等人,Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer *Annual Review of Medicine*第65卷:333-347 (2014)。

[0517] 在一些情况下,可以使用不需要激活细胞(例如,T细胞)的载体。在一些这样的情况下,可以在激活之前选择和/或转导细胞。因此,可以在培养细胞之前或之后将细胞工程化,并且在一些情况下在培养的同时或至少一部分期间将细胞工程化。

[0518] 在一些方面,进一步工程化细胞以促进细胞因子或其他因子的表达。其他用于引入的核酸(例如基因)包括如通过促进所转移细胞的活力和/或功能改善疗法功效的那些;提供用于选择和/或评价细胞的遗传标记如以评估体内存活或定位的基因;例如通过使细胞对体内阴性选择易感来提高安全性的基因,如以下文献中所述:Lupton S.D.等人,*Mol. and Cell Biol.*,11:6 (1991);和Riddell等人,*Human Gene Therapy* 3:319-338 (1992);还参见Lupton等人的PCT/US 91/08442和PCT/US 94/05601的公开案,所述公开案描述了使用源自融合显性的阳性选择标记与阴性选择标记的双功能可选融合基因。参见例如,Riddell等人,美国专利号6,040,177,第14-17栏。

[0519] IV. 示例性治疗结果及其评估方法

[0520] 在本文所提供的方法、组合物、组合、试剂盒和用途的一些实施方案中,所提供的组合疗法产生一种或多种治疗结果,如与任何一种或多种与疗法或治疗相关的参数相关的特征,如下所述。在一些实施方案中,组合疗法还可以包括一个或多个筛选步骤以鉴定用组合疗法治疗和/或继续组合疗法的受试者,和/或评估治疗结果和/或监测治疗结果的步骤。在一些实施方案中,评估治疗结果的步骤可以包括评价和/或监测治疗和/或鉴定给予疗法的进一步或剩余步骤和/或重复疗法的受试者的步骤。在一些实施方案中,筛选步骤和/或治疗结果的评估可以用于确定本文所提供的组合疗法的剂量、频率、持续时间、时机和/或顺序。

[0521] 在一些实施方案中,本文所述的任何筛选步骤和/或治疗结果的评估可以在给予所提供组合疗法的一个或多个步骤之前、期间、在过程中或之后使用,所述给予是例如给予免疫疗法,如T细胞疗法(例如,表达CAR的T细胞)或T细胞接合疗法,和/或除ITK的抑制剂以外的蛋白酪氨酸激酶的抑制剂和/或BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4中的一种或多种的抑制剂。在一些实施方案中,在进行本文所提供的任何方法之前、期间、在过程中或之后进行评估。在一些实施方案中,在进行本文所提供的方法之前进行评估。在一些实施方案中,在进行本文所提供的方法的一个或多个步骤之后进行评估。在一些实施方案中,在给予所提供的组合疗法的一个或多个步骤之前进行评估,例如以筛选并鉴定适合于和/或易于接受组合疗法的患者。在一些实施方案中,在给予所提供的组合疗法的一个或多个步骤期间、在过程中或之后进行评估,例如以评估中间或最终治疗结果,例如以确定治疗功效和/或确定是否继续或重复治疗和/或确定是否给予组合疗法的剩余步骤。

[0522] 在一些实施方案中,治疗结果包括改善的免疫功能,例如基于细胞的疗法所给予的T细胞和/或体内内源T细胞的免疫功能。在一些实施方案中,示例性治疗结果包括但不限于增强的T细胞增殖、增强的T细胞功能活性、免疫细胞表型标记表达的变化,例如与给予受试者的工程化T细胞(例如,CAR-T细胞)相关的此类特征。在一些实施方案中,示例性治疗结果包括降低的疾病负担(例如肿瘤负荷)、改善的临床结果和/或增强的治疗功效。

[0523] 在一些实施方案中,筛选步骤和/或治疗结果的评估包括评估基于细胞的疗法所给予的T细胞的存活和/或功能。在一些实施方案中,筛选步骤和/或治疗结果的评估包括评估细胞因子或生长因子的水平。在一些实施方案中,筛选步骤和/或治疗结果的评估包括评估疾病负担和/或改善,例如评估肿瘤负荷和/或临床结果。在一些实施方案中,筛选步骤和/或治疗结果的评估中的任一个可以包括本文所述的和/或本领域已知的任何评估方法和/或测定,并且可以进行一次或多次,例如在给予组合疗法的一个或多个步骤之前、期间、在过程中或之后进行。与可以在本文所提供的方法的一些实施方案中评估的治疗结果相关的示例性参数集包括外周血免疫细胞群谱和/或肿瘤负荷。

[0524] 在一些实施方案中,所述方法影响细胞疗法在受试者体内的功效。在一些实施方案中,与通过不给予抑制剂的方法实现的持久性、扩增和/或存在相比,在所述方法中给予细胞剂量和抑制剂之后,受试者体内表达重组受体(例如表达CAR)的细胞的持久性、扩增和/或存在更大。在本文所提供的免疫疗法方法(如T细胞疗法(例如,表达CAR的T细胞)或T细胞接合疗法)的一些实施方案中,参数的评估包括评估与在不存在抑制剂的情况下向受试者给予免疫疗法的方法相比,免疫疗法(例如,T细胞疗法)的所给予的T细胞在受试者体内的扩增和/或持久性。在一些实施方案中,与在不存在抑制剂的情况下向受试者给予T细胞疗法的方法相比,所述方法导致所给予的T细胞在受试者体内展现出增加或延长的扩增和/或持久性。

[0525] 在一些实施方案中,与在不存在抑制剂的情况下向受试者给予表达重组受体的细胞剂量的方法相比,给予除ITK的抑制剂以外的蛋白酪氨酸激酶的抑制剂和/或BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4中的一种或多种的抑制剂降低受试者体内的疾病负担(例如肿瘤负荷)。在一些实施方案中,与在不存在抑制剂的情况下向受试者给予表达重组受体的细胞剂量的方法相比,给予抑制剂减少受试者的骨髓原始细胞。在一些实施方案中,与在不存在抑制剂的情况下向受试者给予表达重组受体的细胞剂量的方法相比,给予抑制剂导致改善的临床结果,例如客观反应率(ORR)、无进展存活(PFS)和总体存活(OS)。

[0526] 在一些实施方案中,可以在给予组合疗法的一个或多个步骤之前筛选受试者。例如,可以在给予组合治疗之前筛选受试者的疾病和/或疾病负担(例如肿瘤负荷)的特征,以确定给予组合疗法的适合性、反应性和/或易感性。在一些实施方案中,筛选步骤和/或治疗结果的评估可以用于确定本文所提供的组合疗法的剂量、频率、持续时间、时机和/或顺序。

[0527] 在一些实施方案中,可以在给予组合疗法的一个步骤之后筛选受试者,以确定和鉴定接受组合治疗的剩余步骤和/或监测治疗功效的受试者。在一些实施方案中,在给予抑制剂之前和/或在给予抑制剂之后评估所给予的T细胞的数量、水平或量和/或所给予的T细胞的增殖和/或活性。

[0528] 在一些实施方案中,给予除ITK的抑制剂以外的蛋白酪氨酸激酶的抑制剂和/或BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4中的一种或多种的抑制剂,直到工程化细胞在受试

者的血液中的浓度或数量(i)至少或至少约10个工程化细胞/微升,(ii)外周血单核细胞(PBMC)总数的至少20%、30%、40%或50%,(iii)至少或至少约 1×10^5 个工程化细胞;或(iv)至少5,000个拷贝的编码重组受体的DNA/微克DNA;和/或在(a)中开始给予后第90天,表达CAR的细胞在受试者的血液或血清中可检测到;和/或在(a)中开始给予后第90天,受试者的血液含有至少20%表达CAR的细胞、至少10个表达CAR的细胞/微升或至少 1×10^4 个表达CAR的细胞。

[0529] 在一些实施方案中,给予除ITK的抑制剂以外的蛋白酪氨酸激酶的抑制剂和/或BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4中的一种或多种的抑制剂,直到存在治疗的临床益处,例如总肿瘤体积减少至少或大于50%、其中可检测肿瘤已经消失的完全反应(CR)、大于6个月或大于1年或者更长时间的无进展存活或无疾病存活。

[0530] 在一些实施方案中,确定或评估与不同的评估时间点、不同条件、参考点和/或不同受试者的相同参数或结果的水平、值或测量值相比的参数或结果的水平、值或测量值的变化和/或改变(例如,增加、升高、降低或减少)。例如,在一些实施方案中,可以确定与不同条件(例如,在给予抑制剂之前或之后)的相同参数相比的特定参数(例如,样品中的工程化T细胞数量)的倍数变化(例如,增加或降低)。在一些实施方案中,确定两个或更多个参数的水平、值或测量值,并比较相对水平。在一些实施方案中,将所确定的参数的水平、值或测量值与来自对照样品或未处理样品的水平、值或测量值进行比较。在一些实施方案中,将所确定的参数的水平、值或测量值与在不同时间点来自同一受试者的样品的水平进行比较。可以将单独参数的定量中获得的值组合用于疾病评估的目的,例如通过使用多参数分析对参数的水平、值或测量值形成算术或逻辑运算。在一些实施方案中,可以计算两个或更多个特定参数的比率。

[0531] A.T细胞暴露、持久性和增殖

[0532] 在一些实施方案中,与疗法或治疗结果相关的参数(其包括可以评估用于筛选步骤和/或评估治疗结果和/或监测治疗结果的参数)是或包括对T细胞(例如,基于T细胞的疗法所给予的T细胞)的暴露、持久性和增殖的评估。在一些实施方案中,可以通过在体外或离体评估T细胞的特征来测量本文所提供的方法中细胞的增加的暴露或延长的扩增/或持久性,和/或细胞的细胞表型或功能活性的变化,所述细胞是例如免疫疗法(例如,T细胞疗法)所给予的细胞。在一些实施方案中,可以在给予本文所提供的组合疗法的一个或多个步骤之前或之后,使用此类测定来确定或确认用于免疫疗法(例如,T细胞疗法)的T细胞的功能。

[0533] 在一些实施方案中,给予除ITK的抑制剂以外的蛋白酪氨酸激酶的抑制剂和/或BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4中的一种或多种的抑制剂被设计用于促进受试者对细胞(例如,基于T细胞的疗法所给予的T细胞)的暴露,例如通过促进其随时间的扩增和/或持久性。在一些实施方案中,与不存在抑制剂的情况下向受试者给予T细胞疗法的方法相比,所述T细胞疗法在受试者体内展现出增加或延长的扩增和/或持久性。

[0534] 在一些实施方案中,所提供的方法增加受试者对所给予的细胞的暴露(例如,增加的细胞数量或随时间的持续时间)和/或改善免疫疗法(例如,T细胞疗法)的疗效和治疗结果。在一些方面,与其他方法相比,所述方法的有利之处在于,对表达重组受体的细胞(例如,表达CAR的细胞)的更大和/或更长程度的暴露改善治疗结果。即使在具有严重肿瘤负荷的个体中,此类结果也可以包括患者的存活和缓解。

[0535] 在一些实施方案中,如与在不存在抑制剂的情况下仅给予T细胞相比,给予除ITK的抑制剂以外的蛋白酪氨酸激酶的抑制剂和/或BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TKK和/或ERBB4激酶中的一种或多种的抑制剂可以在受试者体内增加对细胞(例如基于T细胞的疗法所给予的T细胞)的暴露的最大值、总量和/或持续时间。在一些方面,在高疾病负担(因此抗原量较高)和/或更具侵袭性或抗性的癌症的情况下,与在相同情况下在不存在抑制剂的情况下仅给予T细胞(这可能导致免疫抑制、无反应性和/或消耗,从而可能阻止细胞的扩增和/或持久性)相比,给予抑制剂增强功效。

[0536] 在一些实施方案中,在给予T细胞后以及在给予抑制剂之前、期间和/或之后,检测表达重组受体的细胞(例如,基于T细胞的疗法所给予的表达CAR的细胞)在受试者体内的存在和/或量。在一些方面,使用定量PCR(qPCR)评估表达重组受体的细胞(例如,基于T细胞的疗法所给予的表达CAR的细胞)在受试者的血液或血清或器官或组织样品(例如,疾病部位,例如肿瘤样品)中的量。在一些方面,持久性被定量为每微克的DNA中编码受体(例如,CAR)的DNA或质粒的拷贝,或者定量为每微升的样品(例如,血液或血清)中表达受体的(例如,表达CAR的)细胞的数量,或者每微升的样品中外周血单核细胞(PBMC)或白细胞或T细胞的总数量。

[0537] 在一些实施方案中,在给予T细胞(例如,表达CAR的T细胞)之后,在或至少在4、14、15、27或28天,在受试者体内检测细胞。在一些方面,在给予T细胞(例如,表达CAR的T细胞)和/或抑制剂后,在或至少在2、4或6周,或3、6、或12、18、或24、或30、或36个月,或1、2、3、4、5年或更长时间,检测细胞。

[0538] 在一些实施方案中,与通过替代方法(如涉及在不存在抑制剂的情况下仅给予免疫疗法,例如给予T细胞(例如,表达CAR的T细胞)的那些方法)所实现的持久性相比,在给予T细胞(例如,表达CAR的T细胞)和/或抑制剂后,通过所述方法在受试者体内实现的表达受体的细胞(例如表达CAR的细胞)的持久性更大。

[0539] 指示扩增和/或持久性的细胞(例如,T细胞疗法所给予的T细胞)的暴露(例如,数量)可以根据以下方面来陈述:暴露至受试者的细胞的最大数量、可检测细胞或高于某一数量或百分比的细胞的持续时间、细胞数量相对于时间的曲线下面积和/或其组合和其指示物。此类结果可以使用已知方法来评估,例如使用qPCR来检测与特定样品(例如,血液、血清、血浆或组织,如肿瘤样品)中核酸或DNA的总量相比,编码重组受体的核酸的拷贝数;和/或使用流式细胞术测定,通常使用对受体具特异性的抗体来检测表达受体的细胞。也可以使用基于细胞的测定来检测功能细胞的数量或百分比,所述功能细胞是例如能够结合和/或中和疾病或病症或者表达受体所识别的抗原的细胞和/或诱导针对所述细胞的反应(例如,细胞毒性反应)的细胞。

[0540] 在一些方面,增加的受试者对细胞的暴露包括增加的细胞扩增。在一些实施方案中,在给予T细胞(例如,表达CAR的T细胞)后和/或在给予抑制剂后,表达受体的细胞(例如,表达CAR的细胞)在受试者体内扩增。在一些方面,与其他方法(如涉及在不给予抑制剂的情况下给予T细胞(例如,表达CAR的T细胞)的那些方法)相比,所述方法导致细胞的更大扩增。

[0541] 在一些方面,所述方法导致所给予的细胞的高体内增殖,例如如通过流式细胞术测量的。在一些方面,检测细胞的高峰比例。例如,在一些实施方案中,在受试者的血液或疾病部位或其白细胞级分(例如,PBMC级分或T细胞级分)中,在给予T细胞(例如,表达CAR的T

细胞)和/或抑制剂后,在水平峰值或最大值时,至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%或至少约90%的细胞表达重组受体(例如,CAR)。

[0542] 在一些实施方案中,所述方法导致受试者的血液或血清或其他体液或器官或组织中的浓度最大值为至少100、500、1000、1500、2000、5000、10,000或15,000个拷贝的编码受体(例如,CAR)的核酸/微克DNA,或为每个外周血单核细胞(PBMC)总数、单核细胞总数、T细胞总数或微升总数至少0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8或0.9个表达受体(例如,表达CAR)的细胞。在一些实施方案中,表达受体的细胞被检测为受试者的血液中总PBMC的至少10%、20%、30%、40%、50%或60%,和/或在给予T细胞(例如,表达CAR的T细胞)和/或抑制剂后在这个水平下持续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、24、36、48或52周,或在这种给予后持续1、2、3、4或5年或更长时间。

[0543] 在一些方面,所述方法导致例如受试者的血清、血浆、血液或组织(例如肿瘤样品)中,每微克DNA中编码重组受体(例如CAR)的核酸的拷贝数增加至少2倍、至少4倍、至少10倍或至少20倍。

[0544] 在一些实施方案中,在给予T细胞(例如,表达CAR的T细胞)后或在给予抑制剂后至少20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59或60天或更长时间,在给予T细胞(例如,表达CAR的T细胞)和/或抑制剂后至少或至少约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24周或更长时间,受试者的血清、血浆、血液或组织(例如,肿瘤样品)中的表达受体的细胞可以例如通过指定方法(如qPCR或基于流式细胞术的检测方法)检测到。

[0545] 在一些方面,在受试者或其体液、血浆、血清、组织或隔室中,例如在其血液(例如外周血)或疾病部位(例如肿瘤)中,可检测到或存在至少约 1×10^2 、至少约 1×10^3 、至少约 1×10^4 、至少约 1×10^5 、或至少约 1×10^6 、或至少约 5×10^6 、或至少约 1×10^7 、或至少约 5×10^7 、或至少约 1×10^8 个表达重组受体(例如表达CAR)的细胞,和/或每微升至少10、25、50、100、200、300、400或500或1000个表达受体的细胞(例如每微升至少10个细胞)。在一些实施方案中,在给予T细胞(例如,表达CAR的T细胞)后和/或在给予抑制剂后的至少约20天、至少约40天、或至少约60天,或至少约3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月,或至少2或3年,这种数量或浓度的细胞在受试者体内可检测到。此类细胞数量可以如通过基于流式细胞术或基于定量PCR的方法来检测,并使用已知方法外推至总细胞数量。参见例如,Brentjens等人,Sci Transl Med.2013 5(177);Park等人,Molecular Therapy 15(4):825-833(2007);Savoldo等人,JCI 121(5):1822-1826(2011);Davila等人,(2013) PLoS ONE 8(4):e61338;Davila等人,Oncoimmunology 1(9):1577-1583(2012);Lamers,Blood 2011 117:72-82;Jensen等人,Biol Blood Marrow Transplant 2010年9月;16(9):1245-1256;Brentjens等人,Blood 2011 118(18):4817-4828。

[0546] 在一些方面,如通过免疫组织化学、PCR和/或流式细胞术测量的,在给予细胞(例如,表达CAR的T细胞)和/或抑制剂后在约1周、约2周、约3周、约4周、约5周或至少约6周,或至少约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月或者至少2或3年,例如在外周血或骨髓或其他隔室中,每100个细胞中编码重组受体的核酸的拷贝数(例如载体拷贝数)是至少0.01、至少

0.1、至少1或至少10。在一些实施方案中,在给予T细胞(例如,表达CAR的T细胞)或抑制剂后约1周、约2周、约3周或至少约4周的时间,或在这种给予后至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月或者至少2或3年,每微克基因组DNA中表达受体(例如,CAR)的载体的拷贝数为至少100、至少1000、至少5000、或至少10,000、或至少15,000或至少20,000。

[0547] 在一些方面,在给予细胞后(例如,在开始给予T细胞(例如,表达CAR的T细胞)和/或抑制剂后)至少约3个月、至少约6个月、至少约12个月、至少约1年、至少约2年、至少约3年或超过3年的时间,在受试者、其血浆、血清、血液、组织和/或疾病部位(例如,肿瘤部位)中,由细胞表达的受体(例如,CAR)可通过定量PCR(qPCR)或通过流式细胞术检测到。

[0548] 在一些实施方案中,与通过替代给药方案(其中在不给予抑制剂的情况下向受试者给予T细胞(例如,表达CAR的T细胞))所实现的曲线下面积相比,在给予T细胞(例如,表达CAR的T细胞)后和/或在给予抑制剂后,在受试者的体液、血浆、血清、血液、组织、器官和/或疾病部位(例如肿瘤部位)中,表达受体(例如,CAR)的细胞的浓度相对于时间的曲线下面积(AUC)更大。

[0549] 在一些方面,所述方法导致所给予的细胞的高体内增殖,例如如通过流式细胞术测量的。在一些方面,检测细胞的高峰比例。例如,在一些实施方案中,在受试者的血液、血浆、血清、组织或疾病部位或其白细胞级分(例如,PBMC级分或T细胞级分)中,在T细胞(例如,表达CAR的T细胞)和/或抑制剂后,在水平峰值或最大值时,至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%或至少约90%的细胞表达重组受体(例如,CAR)。

[0550] 在一些方面,在给予抑制剂的受试者体内,细胞剂量的增加或延长的扩增和/或持久性与受试者体内肿瘤相关结果的益处相关。在一些实施方案中,肿瘤相关结果包括受试者体内肿瘤负荷的降低或骨髓原始细胞的减少。在一些实施方案中,在给予所述方法后,肿瘤负荷的降低量为或至少或至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。在一些实施方案中,与已经用不涉及给予除ITK的抑制剂以外的蛋白酪氨酸激酶的抑制剂和/或BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4中的一种或多种的抑制剂的方法治疗的受试者相比,在细胞剂量后,疾病负担、肿瘤大小、肿瘤体积、肿瘤质量和/或肿瘤负荷或体积减少至少或至少约50%、60%、70%、80%、90%或更多。

[0551] B.T细胞功能活性

[0552] 在一些实施方案中,与疗法或治疗结果相关的参数(其包括可以评估用于筛选步骤和/或评估治疗结果和/或监测治疗结果的参数)包括T细胞的活性、表型、增殖或功能中的一种或多种。在一些实施方案中,可以使用本领域中用于评估T细胞(例如,T细胞疗法所给予的T细胞)的活性、表型、增殖和/或功能的任何已知测定。在给予细胞和/或抑制剂之前和/或之后,在一些实施方案中,例如通过多种已知方法中的任一种测量工程化细胞群的生物活性。待评估的参数包括工程化或天然T细胞或其他免疫细胞与抗原的特异性结合,其在体内例如通过成像进行评估,或离体例如通过ELISA或流式细胞术进行评估。在某些实施方案中,可以使用本领域中已知的任何适宜方法测量工程化细胞破坏靶细胞的能力,所述方法是例如以下文献中所述的细胞毒性测定:例如,Kochenderfer等人,J.Immunotherapy,32(7):689-702(2009),和Herman等人,J.Immunological Methods,285(1):25-40(2004)。在某些实施方案中,通过评估一种或多种细胞因子(如CD107a、IFN γ 、IL-2、GM-CSF和TNF α)的

表达和/或分泌和/或通过评估细胞溶解活性来测量细胞的生物活性。

[0553] 在一些实施方案中,对T细胞(例如,T细胞疗法所给予的T细胞)的活性、表型、增殖和/或功能的测定包括但不限于ELISPOT、ELISA、细胞增殖、细胞毒性淋巴细胞(CTL)测定、与T细胞表位、抗原或配体结合、或细胞内细胞因子染色、增殖测定、淋巴因子分泌测定、直接细胞毒性测定和有限稀释测定。在一些实施方案中,可以测量T细胞的增殖反应,例如通过将³H-胸苷、BrdU(5-溴-2'-脱氧尿苷)或2'-脱氧-5-乙炔基尿苷(EdU)掺入T细胞的DNA中或使用诸如羧基荧光素二乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)、CellTraceViolet或膜染料PKH26等染料的染料稀释测定。

[0554] 在一些实施方案中,评估T细胞(例如,T细胞疗法所给予的T细胞)的活性、表型、增殖和/或功能包括测量T细胞的细胞因子产生,和/或测量来自受试者的生物样品(例如血浆、血清、血液和/或组织样品,例如肿瘤样品)中的细胞因子产生。在一些情况下,此类所测量的细胞因子可以包括但不限于白细胞介素-2(IL-2)、干扰素- γ (IFN γ)、白细胞介素-4(IL-4)、TNF- α (TNF α)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-10(IL-10)、白细胞介素-12(IL-12)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、CD107a和/或TGF- β (TGF β)。测量细胞因子的测定是本领域所熟知的,并且包括但不限于ELISA、细胞内细胞因子染色、流式微珠阵列、RT-PCR、ELISPOT、流式细胞术和在存在测试样品的情况下测试对相关细胞因子有反应的细胞反应性(例如,增殖)的生物测定。

[0555] 在一些实施方案中,评估T细胞(例如,T细胞疗法所给予的T细胞)的活性、表型、增殖和/或功能包括评估细胞表型,例如特定细胞表面标记的表达。在一些实施方案中,评估T细胞(例如,T细胞疗法所给予的T细胞)中T细胞激活标记、T细胞消耗标记和/或T细胞分化标记的表达。在一些实施方案中,在给予之前评估细胞表型。在一些实施方案中,在给予之后评估细胞表型。用于评估的T细胞激活标记、T细胞消耗标记和/或T细胞分化标记包括本领域已知用于特定T细胞子集的任何标记,例如CD25、CD38、人白细胞抗原-DR(HLA-DR)、CD69、CD44、CD137、KLRG1、CD62L^低、CCR7^低、CD71、CD2、CD54、CD58、CD244、CD160、程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)、淋巴细胞激活基因3蛋白(LAG-3)、T细胞免疫球蛋白结构域和粘蛋白结构域蛋白3(TIM-3)、细胞毒性T淋巴细胞抗原-4(CTLA-4)、B和T淋巴细胞衰减因子(BTLA)和/或基于T细胞免疫球蛋白和免疫受体酪氨酸的抑制基序结构域(TIGIT)(参见例如,Liu等人,Cell Death and Disease(2015)6,e1792)。在一些实施方案中,所评估的细胞表面标记是CD25、PD-1和/或TIM-3。在一些实施方案中,所评估的细胞表面标记是CD25。

[0556] 在一些方面,检测表达水平包括进行体外测定。在一些实施方案中,体外测定是免疫测定、基于适配体的测定、组织学或细胞学测定或mRNA表达水平测定。在一些实施方案中,通过酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫印迹、免疫沉淀、放射免疫测定(RIA)、免疫染色、流式细胞术测定、表面等离子体共振(SPR)、化学发光测定、侧流免疫测定、抑制测定或亲和力测定来检测一种或多种因子、效应子、酶和/或表面标记各自的一种或多种的一个或多个参数。在一些实施方案中,细胞因子和/或表面标记的检测是使用特异性结合至少一种生物标记的结合试剂来确定的。在一些情况下,结合试剂是抗体或其抗原结合片段、适配体或核酸探针。

[0557] 在一些实施方案中,给予抑制剂提高循环CAR T细胞的水平。在一些实施方案中,用激酶抑制剂治疗会使T细胞发育向Th1免疫表型倾斜。在一些实施方案中,用依鲁替尼或

式(II)的化合物治疗可能使CAR T细胞向更记忆样表型倾斜,这种表型与增加的CAR T体内持久性相关(Busch,D.H.等人(2016)Semin Immunol,28(1):28-34)。

[0558] C.疾病负担、反应、功效和存活

[0559] 在一些实施方案中,与疗法或治疗结果相关的参数(其包括可以评估用于筛选步骤和/或评估治疗结果和/或监测治疗结果的参数)包括肿瘤或疾病负担。给予免疫疗法(如T细胞疗法(例如,表达CAR的T细胞)或T细胞接合疗法)和/或抑制剂可以减少或防止受试者的疾病或病症的发展或负担。例如,在疾病或病症是肿瘤时,所述方法通常减小肿瘤大小、体积、转移、骨髓中原始细胞的百分比或可分子检测的癌症和/或改善预后或存活或其他与肿瘤负荷相关的症状。

[0560] 在一些实施方案中,与在不给予抑制剂的情况下给予免疫疗法(如T细胞疗法(例如表达CAR的T细胞)或T细胞接合疗法)的替代方法相比,所提供的方法导致所治疗受试者的肿瘤负荷降低。肿瘤负荷不一定在接受组合疗法的所有受试者中都实际上降低,但是例如基于临床数据,所治疗受试者的平均肿瘤负荷降低,其中大多数用这种组合疗法治疗的受试者展现出降低的肿瘤负荷,例如至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多用组合疗法治疗的受试者展现出降低的肿瘤负荷。

[0561] 疾病负担可以涵盖受试者体内或受试者的器官、组织或体液(如肿瘤的器官或组织或例如可指示转移的另一位置)中疾病细胞的总数。例如,在某些血液恶性肿瘤的情况下可以在血液、淋巴或骨髓中检测和/或定量肿瘤细胞。在一些实施方案中,疾病负担可以包括肿瘤的质量、转移的数量或程度和/或骨髓中存在的原始细胞的百分比。

[0562] 在一些实施方案中,受试者患有骨髓瘤、淋巴瘤或白血病。在一些实施方案中,受试者患有非霍奇金淋巴瘤(NHL)、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)或骨髓瘤(例如多发性骨髓瘤(MM))。在一些实施方案中,受试者患有MM或DBCBL。

[0563] 在一些实施方案中,受试者患有实体瘤。

[0564] 在MM的情况下,评估疾病负担程度的示例性参数包括诸如以下等参数:克隆血浆细胞数量(例如,在骨髓活组织检查中>10%或在来自其他组织的活组织检查中的任何量;浆细胞瘤)、单克隆蛋白(副蛋白)在血清或尿液中的存在、感觉与浆细胞障碍相关的终末器官损害的证据(例如,高钙血症(校正钙>2.75mmol/l);骨髓瘤引起的肾功能不全;贫血(血红蛋白<10g/dl);和/或骨病灶(溶解性病灶或具有压缩性骨折的骨质疏松症))。

[0565] 在DLBCL的情况下,评估疾病负担程度的示例性参数包括诸如以下等参数:细胞形态(例如,中心母细胞、免疫母细胞和间变细胞)、基因表达,miRNA表达和蛋白质表达(例如,BCL2、BCL6、MUM1、LM02、MYC和p21的表达)。

[0566] 在白血病的情况下,可以通过评估血液或骨髓中残留的白血病来确定疾病负担程度。在一些实施方案中,如果例如通过光学显微镜检查检测的,在骨髓中存在大于或等于5%的原始细胞,则受试者展现出形态学疾病。在一些实施方案中,如果骨髓中存在少于5%原始细胞,则受试者展现出完全或临床缓解。

[0567] 在一些实施方案中,对于白血病,受试者可展现出完全缓解,但是存在小部分形态学不可检测(通过光学显微镜检查技术)的残留白血病细胞。如果受试者展现在骨髓中小于5%原始细胞并且展现可分子检测的癌症,则称受试者展现出最小残留病(MRD)。在一些实

施方案中,可以使用允许灵敏检测少量细胞的各种分子技术中的任何一种来评估可分子检测的癌症。在一些方面,此类技术包括PCR测定,其可以确定由染色体易位产生的独特Ig/T细胞受体基因重排或融合转录物。在一些实施方案中,流式细胞术可以用于基于白血病特异性免疫表型鉴定癌细胞。在一些实施方案中,癌症的分子检测可以检测100,000个正常细胞中的少至1个白血病细胞。在一些实施方案中,如果如通过PCR或流式细胞术检测到100,000个细胞中的至少或大于1个白血病细胞,则受试者展现出可分子检测的MRD。在一些实施方案中,受试者的疾病负担是不可分子检测的或MRD⁻,使得在一些情况下使用PCR或流式细胞术技术不能检测到受试者体内的白血病细胞。

[0568] 在一些实施方案中,与在紧邻免疫疗法(例如,T细胞疗法)和/或抑制剂的给予之前的时间的疾病负担相比,所述方法和/或给予免疫疗法(如T细胞疗法(例如,表达CAR的T细胞)或T细胞接合疗法)和/或抑制剂减轻疾病负担。

[0569] 在一些方面,给予免疫疗法(例如T细胞疗法)和/或抑制剂可以防止疾病负担增加,并且这可以通过疾病负担不变化来证明。

[0570] 在一些实施方案中,与采用使用替代疗法(如受试者在不给予抑制剂的情况下仅接受免疫疗法(例如T细胞疗法)的疗法)的可比较方法观察到的减轻相比,所述方法以更大的程度和/或更长的时间段减轻疾病或病症的负担,例如肿瘤细胞数量、肿瘤大小、患者存活或无事件存活的持续时间。在一些实施方案中,与通过给予单独的每种药剂(例如,将抑制剂给予未接受免疫疗法(例如,T细胞疗法)的受试者;或者将免疫疗法(例如,T细胞疗法)给予未接受抑制剂的受试者)实现的减轻相比,在给予免疫疗法(例如,T细胞疗法)和抑制剂的组合疗法后,疾病负担以更大程度或更长持续时间减轻。

[0571] 在一些实施方案中,检测、评估或测量受试者的疾病或病症负荷。在一些方面,可以通过检测疾病细胞或疾病相关细胞(例如,肿瘤细胞)在受试者体内或在受试者的器官、组织或体液(如血液或血清)中的总数来检测疾病负担。在一些实施方案中,通过测量实体瘤的质量和/或转移的数量或程度来评估疾病负担(例如肿瘤负荷)。在一些方面,评估受试者的存活、特定时间段内的存活、存活程度、无事件或无症状存活的存在或持续时间或无复发存活。在一些实施方案中,评估疾病或病症的任何症状。在一些实施方案中,指定疾病或病症负荷的量度。在一些实施方案中,用于确定的示例性参数包括指示疾病或病症(例如肿瘤)的改善或改良的特定临床结果。此类参数包括:疾病控制的持续时间,所述疾病控制包括完全反应(CR)、部分反应(PR)或稳定疾病(SD)(参见例如,实体瘤中的反应评价标准(Response Evaluation Criteria In Solid Tumors,RECIST)指南)、客观反应率(ORR)、无进展存活(PFS)和总体存活(OS)。可以设定参数的具体阈值以确定本文所提供的组合疗法方法的功效。

[0572] 在一些方面,在给予免疫疗法(例如,T细胞疗法)之前,在给予免疫疗法(例如,T细胞疗法)之后但在给予抑制剂之前,在给予抑制剂之前但在给予免疫疗法(例如,T细胞疗法)之前,和/或在给予免疫疗法(例如,T细胞疗法)和抑制剂二者之后,测量或检测疾病负担。在多次给予组合疗法的一个或多个步骤的情况下,在一些实施方案中,可以在给予任何步骤、剂量和/或给予周期之前或之后,或者在给予任何步骤、剂量和/或给予周期之间的时间,测量疾病负担。

[0573] 在一些实施方案中,与紧邻抑制剂和免疫疗法(例如,T细胞疗法)的给予之前相

比,通过所提供的方法,负担的降低量为或至少或至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。在一些实施方案中,与紧邻免疫疗法(例如,T细胞疗法)和/或抑制剂的给予之前相比,在给予免疫疗法(例如,T细胞疗法)和抑制剂后,疾病负担、肿瘤大小、肿瘤体积、肿瘤质量和/或肿瘤负荷或体积减少至少或至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多。

[0574] 在一些实施方案中,通过所述方法减轻疾病负担包括诱导形态学完全缓解,例如如在给予(例如,开始)组合疗法后1个月、2个月、3个月或超过3个月时评估的。

[0575] 在一些方面,例如如通过多参数流式细胞术测量的,对最小残留疾病的测定是阴性的,或最小残留疾病的水平小于约0.3%、小于约0.2%、小于约0.1%或小于约0.05%。

[0576] 在一些实施方案中,与其他方法相比,所述方法提高受试者的无事件存活率或总体存活率。例如,在一些实施方案中,在本文所提供的组合疗法方法后6个月时,通过所述方法治疗的受试者的无事件存活率或概率大于约40%、大于约50%、大于约60%、大于约70%、大于约80%、大于约90%或大于约95%。在一些方面,总体存活率大于约40%、大于约50%、大于约60%、大于约70%、大于约80%、大于约90%或大于约95%。在一些实施方案中,用所述方法治疗的受试者展现出无事件存活、无复发存活或存活至少6个月或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10年。在一些实施方案中,进展的时间得到改善,如进展的时间大于或大于约6个月或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10年。

[0577] 在一些实施方案中,与其他方法相比,在通过所述方法治疗后,复发概率有所减小。例如,在一些实施方案中,在组合疗法方法后6个月时,复发概率小于约80%、小于约70%、小于约60%、小于约50%、小于约40%、小于约30%、小于约20%或小于约10%。

[0578] V. 制品和试剂盒

[0579] 还提供了制品,其含有除ITK的抑制剂以外的蛋白酪氨酸激酶的抑制剂和/或BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4中的一种或多种的抑制剂(例如,式(II)的化合物)和用于免疫疗法的组分,例如抗体或其抗原结合片段或T细胞疗法(例如,工程化细胞),和/或其组合物。所述制品可以包括容器和在所述容器上或与所述容器相连的标签或包装说明书。合适的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器、IV溶液袋等。容器可以由各种材料(例如玻璃或塑料)形成。在一些实施方案中,容器容纳组合物自身或组合物与有效治疗、预防和/或诊断病症的另一种组合物的组合。在一些实施方案中,容器具有无菌入口。示例性容器包括静脉内溶液袋、小瓶(包括具有可被注射针刺穿的塞子的那些溶液袋、小瓶)或用于口服给药剂剂的瓶子或小瓶。标签或包装说明书可以指示,将组合物用于治疗疾病或病症。

[0580] 所述制品可以包括(a)其中含有组合物的第一容器,其中所述组合物包括用于免疫疗法(例如,T细胞疗法)的抗体或工程化细胞;和(b)其中含有组合物的第二容器,其中所述组合物包括第二药剂,例如除ITK的抑制剂以外的蛋白酪氨酸激酶的抑制剂和/或BTK、TEC、BMX/ETK、RLK/TXK和/或ERBB4中的一种或多种的抑制剂。所述制品还可以包括包装说明书,其指示组合物可以用于治疗特定病症。可替代地或另外,所述制品还可以包括另一种或相同的容器,所述容器包含药学上可接受的缓冲剂。它还可以包括其他材料,如其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针头和/或注射器。

[0581] VI. 定义

[0582] 除非另外定义,否则本文使用的所有领域术语、符号和其他技术和科学术语或命

名旨在具有与所要求保护的主体所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。在一些情况下,为了清楚和/或为了便于参考而在本文中定义具有通常理解的含义的术语,并且本文中包含的此类定义不应被解释为表示与本领域通常理解的实质性差异。

[0583] 如本文所用,“受试者”是哺乳动物,如人或其他动物,并且通常是人。在一些实施方案中,向其给予免疫调节多肽、工程化细胞或组合物的受试者(例如,患者)是哺乳动物,通常是灵长类动物,如人。在一些实施方案中,所述灵长类动物是猴或猿。所述受试者可以是雄性或雌性,并且可以处于任何合适的年龄,包括婴儿、幼年、青春期、成年和老年受试者。在一些实施方案中,所述受试者是非灵长类哺乳动物,如啮齿动物。

[0584] 如本文所用,“治疗(treatment)”(及其语法变体如“治疗”(“treat”或“treating”))是指疾病或病症或障碍、或者与之相关的症状、不良效果或结果或表型的完全或部分改善或减轻。理想的治疗效果包括但不限于预防疾病的发生或复发、症状的缓解、疾病的任何直接或间接病理后果的减少、预防转移、降低疾病进展的速度、改善或缓解疾病状态以及缓解或改善预后。所述术语并不暗示完全治愈疾病或完全消除任何症状或对所有症状或结果的影响。

[0585] 如本文所用,“延迟疾病的发展”意指推迟、阻碍、减慢、延缓、稳定、抑制和/或延期疾病(如癌症)的发展。此延迟可以具有不同的时间长度,这取决于病史和/或所治疗的个体。对于本领域技术人员显而易见的是,足够或显著的延迟实际上可以涵盖预防,因为个体不会患上疾病。例如,可能延迟晚期癌症,如转移的发展。

[0586] 如本文所用,“预防”包括提供关于受试者的疾病的发生或复发的预防,所述受试者可能易患所述疾病但尚未被诊断患有所述疾病。在一些实施方案中,所提供的细胞和组合物用于延迟疾病的发展或延缓疾病的进展。

[0587] 如本文所用,“抑制”功能或活性是当与除了感兴趣的条件或参数以外的原本相同的条件相比时,或者与另一种条件相比时,减少功能或活性。例如,与不存在所述细胞的情况下的肿瘤生长速率相比,抑制肿瘤生长的细胞降低了肿瘤的生长速率。

[0588] 在给药的情况下,药剂(例如药物配制品、细胞或组合物)的“有效量”是指在必要的剂量/量下和必要的时间段内有效实现所需结果(例如治疗或预防结果)的量。

[0589] 药剂(例如药物配制品或工程化细胞)的“治疗有效量”是指在必要的剂量下和必要的时间段内有效实现所需治疗结果(如针对治疗疾病、病症或障碍)和/或治疗的药代动力学或药效动力学作用的量。治疗有效量可根据诸如以下等因素而变化:疾病状态、受试者的年龄、性别和体重、以及所给予的免疫调节多肽或工程化细胞。在一些实施方案中,所提供的方法涉及以有效量(例如,治疗有效量)给予免疫调节多肽、工程化细胞或组合物。

[0590] “预防有效量”是指在必要的剂量下和必要的时间段内有效实现所需预防结果的量。通常但不是必要地,因为在疾病之前或疾病的早期阶段在受试者中使用预防剂量,所以预防有效量将小于治疗有效量。

[0591] 术语“药物配制品”是指这样的制剂,其处于使得其中所含活性成分的生物活性有效的形式,并且不含对给予配制品的受试者具有不可接受的毒性的另外的组分。

[0592] “药学上可接受的载体”是指药物配制品中除了活性成分以外的对受试者无毒的成分。药学上可接受的载体包括但不限于缓冲液、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0593] 如本文所用,叙述核苷酸或氨基酸位置“对应于”所公开序列中的核苷酸或氨基酸

位置(例如序列表中所示)是指,在使用标准比对算法(例如GAP算法)与所公开序列比对以使同一性最大化之后,所鉴定的核苷酸或氨基酸位置。通过比对序列,本领域技术人员可以例如使用保守和相同的氨基酸残基作为指导来鉴定相应的残基。通常,为了鉴定对应位置,比对氨基酸序列使得获得最高阶匹配(参见例如:Computational Molecular Biology, Lesk, A.M. 编辑, Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W. 编辑, Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M. 和 Griffin, H.G. 编辑, Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; 和 Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. 和 Devereux, J. 编辑, M Stockton Press, New York, 1991; Carrillo 等人 (1988) SIAM J Applied Math 48:1073)。

[0594] 如本文所用的术语“载体”是指能传播其所连接的另一核酸分子的核酸分子。所述术语包括作为自我复制核酸结构的载体以及掺入已引入其的宿主细胞基因组中的载体。某些载体能够指导它们可操作地连接的核酸的表达。此类载体在本文中称为“表达载体”。载体包括病毒载体,如逆转录病毒(例如, γ 逆转录病毒)和慢病毒载体。

[0595] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用,并且是指已引入外源核酸的细胞,包括此类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“转化细胞”,其包括原代转化细胞和源自其的后代,不考虑传代次数。后代的核酸含量可能与亲代细胞不完全相同,但可能含有突变。本文包括如在初始转化细胞中所筛选或选择,具有相同功能或生物活性的突变体后代。

[0596] 如本文所用,细胞或细胞群对特定标记呈“阳性”的陈述是指特定标记(通常为表面标记)在细胞上或细胞中的可检测的存在。当提及表面标记时,所述术语是指如通过流式细胞术检测到的,表面表达的存在,例如通过用与所述标记特异性结合的抗体进行染色并检测所述抗体,其中所述染色通过流式细胞术以如下水平是可检测的,所述水平基本上高于在其他方面相同的条件下用同种型匹配对照进行相同程序检测到的染色,和/或所述水平基本上与已知对所述标记呈阳性的细胞的水平相似,和/或所述水平基本上高于已知对所述标记呈阴性的细胞的水平。

[0597] 如本文所用,细胞或细胞群对特定标记呈“阴性”的陈述是指特定标记(通常为表面标记)在细胞上或细胞中不存在实质上可检测的存在。当提及表面标记时,所述术语是指如通过流式细胞术检测到的,表面表达的不存在,例如通过用与所述标记特异性结合的抗体进行染色并检测所述抗体,其中所述染色通过流式细胞术以如下水平没有检测到,所述水平基本上高于在其他方面相同的条件下用同种型匹配对照进行相同程序检测到的染色,和/或所述水平基本上低于已知对所述标记呈阳性的细胞的水平,和/或所述水平与已知对所述标记呈阴性的细胞的水平相比是基本上相似的。

[0598] 如本文所用,在关于氨基酸序列(参考多肽序列)使用时,“氨基酸序列同一性百分比(%)”和“同一性百分比”定义为,在比对序列并在必要时引入空位以实现最大序列同一性百分比并且不将任何保守取代视作序列同一性的一部分之后,候选序列(例如,主题抗体或片段)中与参考多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。用于确定氨基酸序列同一性百分比的比对可以以本领域熟知的多种方式来实现,例如,使用公众可获得的计算机软件,如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确

定用于比对序列的适当参数,包括在所比较序列的全长中实现最大比对所需的任何算法。

[0599] 如本文所用的,单数形式“一种/个(a/an)”和“所述(the)”包括复数种/个指示物,除非上下文另外明确说明。例如,“一种/个(a/an)”意指“至少一种/个”或“一种/个或多个/个”。应理解,本文描述的方面和变化包括“由方面和变化组成”和/或“基本上由方面和变化组成”。

[0600] 贯穿本公开内容,所要求保护的主题的各个方面以范围形式呈现。应当理解,范围形式的描述仅仅是为了方便和简洁,并且不应该被解释为对所要求保护的主题的范围的僵硬限制。因此,应当认为范围的描述具体公开了所有可能的子范围以及所述范围内的各个数值。例如,在提供一系列值的情况下,应当理解,在所述范围的上限和下限之间的每个中间值以及在所述范围内的任何其他所述或中间值包含在所要求保护的主题内。这些更小范围的上限和下限可以独立地被包括在更小范围之内,并且也被涵盖在所要求保护的主题之内,服从于在所陈述范围内任何确切排除的限制。在所陈述的范围包括一个或两个限制时,排除了那些被包括的限制的任一个或两者的范围也被包括在所要求保护的主体之内。无论范围的广度如何,这都适用。

[0601] 如本文所用术语“约”是指本技术领域的技术人员容易知道的相应值的通常误差范围。本文对“约”某一值或参数的提及包括(并描述)针对所述值或参数本身的实施方案。例如,涉及“约X”的描述包括“X”的描述。

[0602] 如本文所用的,组合物是指两种或更多种产物、物质或化合物(包括细胞)的任何混合物。其可以是溶液、悬浮液、液体、粉末、糊剂、水性、非水性或其任何组合。

[0603] VII. 示例性实施方案

[0604] 所提供的实施方案包括:

[0605] 1. 一种治疗方法,所述方法包括:

[0606] (a) 向患有疾病或病症的受试者给予T细胞,所述T细胞特异性识别或特异性结合与所述疾病或病症相关或在所述疾病或病症的细胞上表达或存在的抗原和/或由特异性靶向所述疾病或病症并且已经或将要给予所述受试者的治疗剂包含的标签;以及

[0607] (b) 向所述受试者给予靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂,其中所述抑制剂不抑制ITK和/或以大于或大于约1000nM的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制ITK,

[0608] 其中所述疾病或病症(i)不是B细胞来源的疾病或病症(ii)与CD19、CD22或CD20的表达无关;(iii)不表达所述靶蛋白酪氨酸激酶,(iv)不含有对所述抑制剂敏感的所述靶蛋白酪氨酸激酶的形式,(v)不含有对所述抑制剂敏感的激酶和/或(vi)对所述抑制剂的抑制不敏感和/或其中所述受试者或疾病或病症对所述抑制剂和/或对BTK的抑制剂具有抗性 or 难治性和/或其中所述蛋白酪氨酸激酶在所述疾病或病症所来源的细胞中通常不表达或不被怀疑表达。

[0609] 2. 一种治疗方法,所述方法包括向患有疾病或病症的受试者给予T细胞,所述T细胞特异性识别或特异性结合与所述疾病或病症相关或在所述疾病或病症的细胞上表达或存在的抗原和/或由特异性靶向所述疾病或病症并且已经或将要给予所述受试者的治疗剂包含的标签,其中:

[0610] 已经向所述受试者给予靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂,其中所述抑制剂不抑制ITK和/或以大于或大于约1000nM的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制ITK;并且

[0611] 所述疾病或病症 (i) 不是B细胞来源的疾病或病症 (ii) 与CD19、CD22或CD20的表达无关; (iii) 不表达所述蛋白酪氨酸激酶, (iv) 不含有对所述抑制剂敏感的所述靶蛋白酪氨酸激酶的形式, (v) 不含有对所述抑制剂敏感的激酶和/或 (vi) 对所述抑制剂的抑制不敏感和/或其中所述受试者或疾病或病症对所述抑制剂和/或对BTK的抑制剂具有抗性 or 难治性和/或其中所述蛋白酪氨酸激酶在所述疾病或病症所来源的细胞中通常不表达或不被怀疑表达。

[0612] 3. 一种治疗方法, 所述方法包括向患有疾病或病症的受试者给予靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂, 其中所述抑制剂不抑制ITK和/或以大于或大于约1000nM的半最大抑制浓度 (IC₅₀) 抑制ITK, 其中:

[0613] 已经向所述受试者给予T细胞, 所述T细胞特异性识别或特异性结合与所述疾病或病症相关或在所述疾病或病症的细胞上表达或存在的抗原和/或由特异性靶向所述疾病或病症并且已经或将要给予所述受试者的治疗剂包含的标签; 并且

[0614] 所述疾病或病症 (i) 不是B细胞来源的疾病或病症 (ii) 与CD19、CD22或CD20的表达无关; (iii) 不表达所述靶蛋白酪氨酸激酶, (iv) 不含有对所述抑制剂敏感的所述靶蛋白酪氨酸激酶的形式, (v) 不含有对所述抑制剂敏感的激酶和/或 (vi) 对所述抑制剂的抑制不敏感和/或其中所述受试者或疾病或病症对所述抑制剂和/或对BTK的抑制剂具有抗性 or 难治性和/或其中所述TEC家族激酶在所述疾病或病症所来源的细胞中通常不表达或不被怀疑表达。

[0615] 4. 实施方案1-3中任一项的方法, 所述靶蛋白酪氨酸激酶是在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶 (TEC)、静息淋巴细胞激酶 (RLK/TXK)、BMX/ETK或ERBB4。

[0616] 5. 实施方案1-4中任一项的方法, 其中所述靶蛋白酪氨酸激酶是TEC家族激酶。

[0617] 6. 实施方案1-5中任一项的方法, 其中所述抑制剂选自式 (II) 的化合物、ONO/GS-4059、化合物30或化合物38、GDC-0834、RN-486、CGI-560、CGI-1764、HM-71224、CC-292、ONO-4059、CNX-774和LFM-A13。

[0618] 7. 实施方案1-6中任一项的方法, 其中:

[0619] 所述抑制剂是所述靶蛋白酪氨酸激酶的选择性抑制剂; 和/或

[0620] 所述抑制剂以比所述抑制剂对任何另外的蛋白酪氨酸激酶或TEC家族激酶的IC₅₀低至少10倍或至少100倍的半最大抑制浓度 (IC₅₀) 抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶, 和/或以比所述抑制剂对ITK和BTK二者的IC₅₀值低至少2倍、至少10倍或至少100倍的IC₅₀抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶; 和/或

[0621] 所述抑制剂以小于或小于约1000nM、900nM、800nM、600nM、500nM、400nM、300nM、200nM、100nM或更小的半最大抑制浓度 (IC₅₀) 抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶。

[0622] 8. 一种治疗方法, 所述方法包括:

[0623] (1) 向患有疾病或病症的受试者给予T细胞, 所述T细胞特异性识别或特异性结合与所述疾病或病症相关的抗原和/或由特异性靶向所述疾病或病症并且已经或将要给予所述受试者的治疗剂包含的标签; 以及

[0624] (2) 向所述受试者给予靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂, 所述靶蛋白酪氨酸激酶是在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶 (TEC)、静息淋巴细胞激酶 (RLK/TXK)、BMX/ETK或ERBB4, 其中:

[0625] 所述抑制剂是所述靶蛋白酪氨酸激酶的选择性抑制剂;和/或

[0626] 所述抑制剂以比所述抑制剂对不同于所述靶蛋白酪氨酸激酶的任何蛋白酪氨酸激酶或TEC家族激酶的IC₅₀低至少10倍或至少100倍的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶,和/或以比所述抑制剂对ITK和BTK二者的IC₅₀值低至少2倍、至少10倍或至少100倍的IC₅₀抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶;和/或

[0627] 所述抑制剂以小于或小于约1000nM、900nM、800nM、600nM、500nM、400nM、300nM、200nM、100nM或更小的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶。

[0628] 9.一种治疗方法,所述方法包括向患有疾病或病症的受试者给予T细胞,所述T细胞特异性识别或特异性结合与所述疾病或病症相关的抗原和/或由特异性靶向所述疾病或病症并且已经或将要给予所述受试者的治疗剂包含的标签,已经向所述受试者给予靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂,所述靶蛋白酪氨酸激酶是在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶(TEC)、静息淋巴细胞激酶(RLK/TXK)、BMX/ETK或ERBB4,其中:

[0629] 所述抑制剂是所述靶蛋白酪氨酸激酶的选择性抑制剂;和/或

[0630] 所述抑制剂以比所述抑制剂对不同于所述靶蛋白酪氨酸激酶的任何蛋白酪氨酸激酶或TEC家族激酶的IC₅₀低至少10倍或至少100倍的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶,和/或以比所述抑制剂对ITK和BTK二者的IC₅₀值低至少2倍、至少10倍或至少100倍的IC₅₀抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶;和/或

[0631] 所述抑制剂以小于或小于约1000nM、900nM、800nM、600nM、500nM、400nM、300nM、200nM、100nM或更小的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶。

[0632] 10.一种治疗方法,所述方法包括向患有疾病或病症的受试者给予靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂,所述靶蛋白酪氨酸激酶是在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶(TEC)、静息淋巴细胞激酶(RLK/TXK)、BMX/ETK或ERBB4,已经向所述受试者给予特异性识别或特异性结合与所述疾病或病症相关的抗原和/或由特异性靶向所述疾病或病症并且已经或将要给予所述受试者的治疗剂包含的标签的T细胞,其中:

[0633] 所述抑制剂是所述靶蛋白酪氨酸激酶的选择性抑制剂;和/或

[0634] 所述抑制剂以比所述抑制剂对不同于所述靶蛋白酪氨酸激酶的任何蛋白酪氨酸激酶或TEC家族激酶的IC₅₀低至少10倍或至少100倍的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶,和/或以比所述抑制剂对ITK和BTK二者的IC₅₀值低至少2倍、至少10倍或至少100倍的IC₅₀抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶;和/或

[0635] 所述抑制剂以小于或小于约1000nM、900nM、800nM、600nM、500nM、400nM、300nM、200nM、100nM或更小的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶。

[0636] 11.实施方案8-10中任一项的方法,其中所述疾病或病症(i)不是B细胞来源的疾病或病症(ii)与CD19、CD22或CD20的表达无关;(iii)不表达所述靶蛋白酪氨酸激酶,(iv)不含有对所述抑制剂敏感的所述靶蛋白酪氨酸激酶的形式,(v)不含有对所述抑制剂敏感的激酶和/或(vi)对所述抑制剂的抑制不敏感和/或其中所述受试者或疾病或病症对所述抑制剂和/或对BTK的抑制剂具有抗性 or 难治性和/或所述靶激酶在所述疾病或病症所来源的细胞中通常不表达或不被怀疑表达。

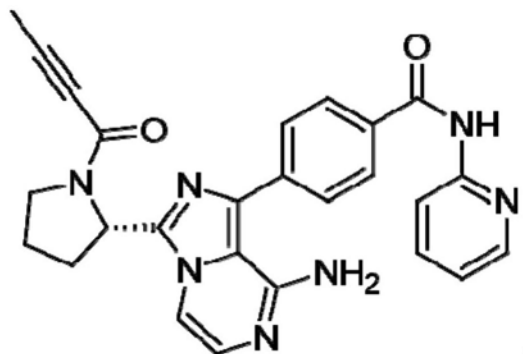
[0637] 12.实施方案4-11中任一项的方法,其中所述靶蛋白酪氨酸激酶是RLK/TXK。

[0638] 13.实施方案4-12中任一项的方法,其中所述靶蛋白酪氨酸激酶是BMX/ETK,并且

所述抑制剂以比所述抑制剂对任何其他TEC家族激酶和/或对ITK的 IC_{50} 低至少10倍或至少100倍的半最大抑制浓度 (IC_{50}) 抑制Bmx/Etk, 和/或以小于或小于约1000nM、900nM、800nM、600nM、500nM、400nM、300nM、200nM、100nM或更小的半最大抑制浓度 (IC_{50}) 抑制Bmx/Etk。

[0639] 14. 实施方案4和7-13中任一项的方法, 其中所述靶激酶是或包含ErbB4。

[0640] 15. 实施方案1-13中任一项的方法, 其中所述抑制剂包含式 (II) 的化合物:



或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共

(II)

晶、多晶型物或前药。

[0641] 16. 实施方案1-15中任一项的方法, 其中所述抑制剂包含式 (II) 的化合物或其对映体、药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药或包含任何前述物质的药物组合物。

[0642] 17. 一种治疗方法, 所述方法包括:

[0643] (1) 向患有疾病或病症的受试者给予T细胞, 所述T细胞包含特异性结合与所述疾病或病症相关的抗原和/或由特异性靶向所述疾病或病症并且已经或将要给予所述受试者的治疗剂包含的标签的重组抗原受体; 以及

[0644] (2) 向所述受试者给予激酶抑制剂或包含所述抑制剂的药物组合物, 其中所述抑制剂包含式 (II) 的化合物包含式 (II) 的化合物或其对映体、药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。

[0645] 18. 一种治疗方法, 所述方法包括向患有疾病或病症的受试者给予T细胞, 所述T细胞包含特异性结合与所述疾病或病症相关的抗原和/或由特异性靶向所述疾病或病症并且已经或将要给予所述受试者的治疗剂包含的标签的重组抗原受体, 已经向所述受试者给予激酶抑制剂或包含所述抑制剂的药物组合物, 其中所述抑制剂包含式 (II) 的化合物或其对映体、药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药。

[0646] 19. 一种治疗方法, 所述方法包括向患有疾病或病症的受试者给予激酶抑制剂或包含所述抑制剂的药物组合物, 其中所述抑制剂包含式 (II) 的化合物或其对映体、药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药, 已经向所述受试者给予包含特异性结合与所述疾病或病症相关的抗原和/或由特异性靶向所述疾病或病症并且已经或将要给予所述受试者的治疗剂包含的标签的重组抗原受体的T细胞。

[0647] 20. 实施方案17-19中任一项的方法, 其中所述疾病或病症是癌症。

[0648] 21. 实施方案1-20中任一项的方法, 其中:

[0649] (i) 所述受试者和/或所述疾病或病症 (a) 对布鲁顿酪氨酸激酶 (BTK) 的抑制具有抗性和/或 (b) 包含对所述抑制剂的抑制具有抗性的细胞群;

[0650] (ii) 所述受试者和/或所述疾病或病症在编码BTK的核酸中包含能够降低或防止

所述抑制剂和/或依鲁替尼对BTK的抑制的突变或破坏;和/或

[0651] (iii) 在(1)中给予时和在(2)中给予时,所述受试者在使用所述抑制剂治疗和/或用BTK抑制剂疗法治疗后发生缓解后复发,或者已经被认为对用所述抑制剂治疗和/或用BTK抑制剂疗法治疗是难治性的。

[0652] 22. 实施方案21的方法,其中所述细胞群是或包含B细胞群和/或不包含T细胞。

[0653] 23. 实施方案21或实施方案22的方法,其中编码BTK的核酸中的所述突变包含位置C481、任选地C481S或C481R处的取代,和/或位置T474、任选地T474I或T474M处的取代。

[0654] 24. 实施方案1-23中任一项的方法,其中:

[0655] 所述靶蛋白酪氨酸激酶不由所述疾病或病症的细胞表达,在所述疾病或病症所来源的细胞中通常不表达或不被怀疑表达,和/或

[0656] 所述疾病或病症对所述抑制剂不敏感;和/或

[0657] 至少多个所述T细胞表达所述靶蛋白酪氨酸激酶;和/或

[0658] 所述靶蛋白酪氨酸激酶在T细胞中表达。

[0659] 25. 实施方案1-24中任一项的方法,其中所述疾病或病症是不表达B细胞抗原的癌症,是非血液癌,不是B细胞恶性肿瘤,不是B细胞白血病,或者是实体瘤。

[0660] 26. 实施方案1-25中任一项的方法,其中所述疾病或病症是选自肉瘤、癌、淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、白血病、CLL、ALL、AML和骨髓瘤的癌症。

[0661] 27. 实施方案1-26中任一项的方法,其中所述疾病或病症是胰腺癌、膀胱癌、结直肠癌、乳腺癌、前列腺癌、肾癌、肝细胞癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、胰腺癌、直肠癌、甲状腺癌、子宫癌、胃癌、食管癌、头颈癌、黑色素瘤、神经内分泌癌、CNS癌症、脑肿瘤、骨癌或软组织肉瘤。

[0662] 28. 实施方案1-27中任一项的方法,其中所述T细胞识别或靶向选自以下的抗原: ROR1、B细胞成熟抗原(BCMA)、tEGFR、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、间皮素、CEA和乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3或4、erbB二聚体、EGFR vIII、FBP、FCRL5、FCRH5、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、 κ 轻链、Lewis Y、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、黑色素瘤相关抗原(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、优先表达的黑色素瘤抗原(PRAME)、存活蛋白、EGP2、EGP40、TAG72、B7-H6、IL-13受体 α 2(IL-13Ra2)、CA9、GD3、HMW-MAA、CD171、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2NY-ESO-1、PSCA、叶酸受体-a、CD44v6、CD44v7/8、avb6整合素、8H9、NCAM、VEGF受体、5T4、胎儿AchR、NKG2D配体、CD44v6、双重抗原和与通用标签相关的抗原、癌症-睾丸抗原、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、癌胚胎抗原、ROR1、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、Her2/neu、雌激素受体、孕酮受体、肝配蛋白B2、CD123、c-Met、GD-2、O-乙酰化GD2(OGD2)、CE7、Wilms肿瘤1(WT-1)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、CCL-1、CD138和病原体特异性抗原。

[0663] 29. 实施方案1-28中任一项的方法,其中:

[0664] 所述抗原不是B细胞抗原;和/或

[0665] 所述抗原不是选自CD19、CD20、CD22和ROR1的B细胞抗原。

[0666] 30. 实施方案29的方法,其中:

- [0667] 所述抗原不是选自CD19、CD20、CD22和ROR1的B细胞抗原；和/或
- [0668] 所述疾病或病症不表达选自CD19、CD20、CD22和ROR1的B细胞抗原和/或 κ 轻链。
- [0669] 31. 实施方案1-30中任一项的方法，其中所述T细胞包含肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 或包含表达特异性结合所述抗原的重组受体的基因工程化T细胞。
- [0670] 32. 实施方案31的方法，其中所述T细胞包含表达特异性结合所述抗原或所述标签的重组受体的基因工程化T细胞，所述受体任选地是嵌合抗原受体。
- [0671] 33. 实施方案31或实施方案32的方法，其中所述重组受体是转基因T细胞受体 (TCR) 或功能性非T细胞受体。
- [0672] 34. 实施方案31-33中任一项的方法，其中所述重组受体是嵌合受体，其任选地是嵌合抗原受体 (CAR)。
- [0673] 35. 实施方案34的方法，其中所述嵌合抗原受体 (CAR) 包含特异性结合所述抗原的细胞外抗原识别结构域和包含ITAM的细胞内信号传导结构域。
- [0674] 36. 实施方案35的方法，其中所述细胞内信号传导结构域包含CD3-zeta (CD3 ζ) 链的细胞内结构域。
- [0675] 37. 实施方案35或实施方案36的方法，其中所述嵌合抗原受体 (CAR) 还包含共刺激信号传导区域。
- [0676] 38. 实施方案37的方法，其中所述共刺激信号传导区域包含CD28或4-1BB的信号传导结构域。
- [0677] 39. 实施方案37或实施方案38的方法，其中所述共刺激结构域是CD28的结构域。
- [0678] 40. 实施方案1-39中任一项的方法，其中所述抑制剂是小分子、肽、蛋白质、抗体或其抗原结合片段、抗体模拟物、适配体或核酸分子。
- [0679] 41. 实施方案1-40中任一项的方法，其中所述抑制剂不可逆地降低或消除所述靶蛋白酪氨酸激酶的激活，特异性结合所述靶蛋白酪氨酸激酶的活性位点中的结合位点，所述靶蛋白酪氨酸激酶包含对应于SEQ ID NO:18中所示序列中的残基C481的氨基酸残基，和/或降低或消除所述靶蛋白酪氨酸激酶的自身磷酸化活性。
- [0680] 42. 实施方案1-41中任一项的方法，其中所述抑制剂不是依鲁替尼。
- [0681] 43. 实施方案1-41中任一项的方法，其中所述抑制剂不是式 (II) 的化合物。
- [0682] 44. 实施方案1-41中任一项的方法，其中所述抑制剂不是GDC-0834、RN-486、CGI-560、CGI-1764、HM-71224、CC-292、ONO-4059、CNX-774和LFM-A13。
- [0683] 45. 实施方案1、2-8、10-17和19-44中任一项的方法，其中与开始给予包含所述T细胞的组合物同时或在之后给予所述抑制剂。
- [0684] 46. 实施方案1、2-8、10-17和19-45中任一项的方法，其中在开始给予所述T细胞之后给予所述抑制剂。
- [0685] 47. 实施方案45或实施方案46的方法，其中在开始给予所述T细胞的1小时、2小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时或1周内或约1小时、2小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时或1周内给予所述抑制剂。
- [0686] 48. 实施方案45-47中任一项的方法，其中在这样的时间给予所述抑制剂，其中：
- [0687] 与在开始给予所述T细胞之后的在前时间点所述受试者体内的所给予的T细胞数量相比，所述受试者的血液中可检测的所给予的T细胞数量降低；

[0688] 所述血液中可检测的所给予的T细胞数量是开始给予所述T细胞之后所述受试者的血液中可检测的所述T细胞疗法的细胞数量峰值或最大值的少于或少于约1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、50倍或100倍或更少；和/或

[0689] 在这样的时间给予所述抑制剂：在所述受试者的血液中可检测到所给予的T细胞水平的峰值或最大值之后，所述受试者的血液中可检测的T细胞的细胞数量或源自所述T细胞的细胞数量是所述受试者的血液中总外周血单核细胞 (PBMC) 的少于10%、少于5%、少于1%或少于0.1%。

[0690] 49. 实施方案48的方法，其中所述增加或降低大于或大于约1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍或更多。

[0691] 50. 实施方案1-49中任一项的方法，其中在开始给予所述T细胞之后持续长达2天、长达7天、长达14天、长达21天、长达一个月、长达两个月、长达三个月、长达6个月或长达1年的时间段给予所述抑制剂。

[0692] 51. 实施方案1、2-8、10-17和19-50中任一项的方法，其中在开始给予所述T细胞之后长达3个月给予所述抑制剂。

[0693] 52. 实施方案1-51中任一项的方法，其中所述抑制剂的给予从至少在开始给予所述T细胞之后继续，直到：

[0694] 与恰在给予所述抑制剂之前的在前时间点所述受试者体内的细胞数量相比或与给予所述T细胞疗法之后的在前时间点相比，所述受试者的血液中可检测的所给予的T细胞的细胞数量或源自所述T细胞的细胞数量增加；

[0695] 所述血液中可检测的T细胞的细胞数量或源自所述T细胞的细胞数量是开始给予所述T细胞之后所述受试者的血液中观察到的数量峰值或最大值的2.0倍（更大或更小）；

[0696] 所述受试者的血液中可检测的T细胞的细胞数量是所述受试者的血液中总外周血单核细胞 (PBMC) 的大于或大于约10%、15%、20%、30%、40%、50%或60%；和/或

[0697] 所述受试者展现出与紧接所述T细胞的给予之前或紧接所述抑制剂的给予之前的肿瘤负荷相比肿瘤负荷的降低；和/或

[0698] 所述受试者展现出完全或临床缓解。

[0699] 53. 实施方案1-52中任一项的方法，其中口服、皮下或静脉内给予所述抑制剂。

[0700] 54. 实施方案53的方法，其中口服给予所述抑制剂。

[0701] 55. 实施方案1-54中任一项的方法，其中将所述抑制剂每天给予六次、每天给予五次、每天给予四次、每天给予三次、每天给予两次、每天给予一次、每隔一天给予、每周给予三次或每周给予至少一次。

[0702] 56. 实施方案55的方法，其中将所述抑制剂每天给予一次或每天给予两次。

[0703] 57. 实施方案1-56中任一项的方法，其中以至少或至少约50mg/天、100mg/天、150mg/天、175mg/天、200mg/天、250mg/天、300mg/天、350mg/天、400mg/天、450mg/天、500mg/天、600mg/天、700mg/天、800mg/天或更多的总日剂量给予所述抑制剂。

[0704] 58. 实施方案1-57中任一项的方法，其中以小于或约小于或约或为420mg/天的量给予所述抑制剂。

[0705] 59. 实施方案1-58中任一项的方法，其中所给予的T细胞包含作为CD4+或CD8+的T细胞。

[0706] 60. 实施方案1-59中任一项的方法,其中所给予的T细胞包含对所述受试者而言自体的细胞。

[0707] 61. 实施方案1-60中任一项的方法,其中所给予的T细胞包含对所述受试者而言同种异体的T细胞。

[0708] 62. 实施方案1-61中任一项的方法,其中所给予的T细胞包括给予包含许多细胞的剂量,所述剂量在或在约 5×10^5 个细胞/kg受试者体重与 1×10^7 个细胞/kg之间、 0.5×10^6 个细胞/kg与 5×10^6 个细胞/kg、在或在约 0.5×10^6 个细胞/kg与 3×10^6 个细胞/kg之间、在或在约 0.5×10^6 个细胞/kg与 2×10^6 个细胞/kg之间、在或在约 0.5×10^6 个细胞/kg与 1×10^6 个细胞/kg之间、在或在约 1.0×10^6 个细胞/kg受试者体重与 5×10^6 个细胞/kg之间、在或在约 1.0×10^6 个细胞/kg与 3×10^6 个细胞/kg之间、在或在约 1.0×10^6 个细胞/kg与 2×10^6 个细胞/kg之间、在或在约 2.0×10^6 个细胞/kg受试者体重与 5×10^6 个细胞/kg之间、在或在约 2.0×10^6 个细胞/kg与 3×10^6 个细胞/kg之间或在或在约 3.0×10^6 个细胞/kg受试者体重与 5×10^6 个细胞/kg之间,每个都包含端值。

[0709] 63. 实施方案1-62中任一项的方法,其中所给予的细胞剂量小于在不给予所述抑制剂的情况下给予所给予的T细胞的方法中的剂量。

[0710] 64. 实施方案63的方法,其中所述剂量至少1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍或10倍。

[0711] 65. 实施方案1-64中任一项的方法,其中以单一剂量给予所述T细胞,所述单一剂量任选地是包含所述细胞的单一药物组合物。

[0712] 66. 实施方案1-65中任一项的方法,其中以分割剂量给予所述T细胞,其中将所述单一剂量的细胞在不超过三天的时间段内以共同包含所述细胞剂量的多个组合物来给予,和/或所述方法还包括给予一个或多个另外剂量的所述T细胞。

[0713] 67. 实施方案1-66中任一项的方法,其中所述方法还包括在给予所述T细胞之前给予淋巴细胞清除化学疗法和/或其中所述受试者在给予所述T细胞之前已经接受过淋巴细胞清除化学疗法。

[0714] 68. 实施方案67的方法,其中所述淋巴细胞清除化学疗法包括向所述受试者给予氟达拉滨和/或环磷酰胺。

[0715] 69. 实施方案1-68中任一项的方法,其还包括:

[0716] 向所述受试者给予免疫调节剂,其中所述细胞的给予和所述免疫调节剂的给予同时、单独地或在单一组合物中或者以任何顺序依次进行。

[0717] 70. 实施方案69的方法,其中所述免疫调节剂能够抑制或阻断分子的功能或涉及所述分子的信号传导途径,其中所述分子是免疫抑制分子和/或其中所述分子是免疫检查点分子。

[0718] 71. 实施方案70的方法,其中所述免疫检查点分子或途径选自PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、LAG-3、TIM3、VISTA、腺苷2A受体(A2AR)或腺苷或涉及任何前述物质的途径。

[0719] 72. 实施方案69-71中任一项的方法,其中所述免疫调节剂是或包含抗体,所述抗体任选地是抗体片段、单链抗体、多特异性抗体或免疫缀合物。

[0720] 73. 实施方案72的方法,其中:

[0721] 所述抗体特异性结合所述免疫检查点分子或其配体或受体;和/或

[0722] 所述抗体能够阻断或损害所述免疫检查点分子与其配体或受体之间的相互作用。

[0723] 74. 实施方案1-73中任一项的方法,其中与在不存在所述抑制剂的情况下向所述受试者给予所给予的T细胞的方法相比,所给予的T细胞在所述受试者体内展现出增加的或延长的扩增和/或持久性。

[0724] 75. 实施方案1-74中任一项的方法,其中与采用在不存在所述抑制剂的情况下向所述受试者给予所给予的T细胞的可比较方法所观察到的降低相比,所述方法在更大程度上和/或在更长的时间段内降低肿瘤负荷。

[0725] 76. 一种组合,其包含:

[0726] 表达重组受体的基因工程化T细胞,所述重组受体结合除B细胞抗原以外或除选自CD19、CD20、CD22和ROR1的B细胞抗原以外的抗原,以及

[0727] 靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂,其中所述抑制剂不抑制ITK和/或以大于或大于约1000nM的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制ITK和/或所述靶蛋白酪氨酸激酶是在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶(TEC)、静息淋巴细胞激酶(RLK/TXK)、BMX/ETK或ERBB4。

[0728] 77. 实施方案76的组合,其中所述抗原选自Her2、L1-CAM、间皮素、CEA、乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3或4、erbB二聚体、EGFR vIII、FBP、FCRL5、FCRH5、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、Lewis Y、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、黑色素瘤相关抗原(MAGEMAGE-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、优先表达的黑色素瘤抗原(PRAME)、存活蛋白、EGP2、EGP40、TAG72、B7-H6、IL-13受体 α 2(IL-13Ra2)、CA9、GD3、HMW-MAA、CD171、G250/CAIX、HLA-AI MAGEA1、HLA-A2NY-ESO-1、PSCA、叶酸受体-a、CD44v6、CD44v7/8、avb6整合素、8H9、NCAM、VEGF受体、5T4、胎儿AChR、NKG2D配体、CD44v6、双重抗原和与通用标签相关的抗原、癌症-睾丸抗原、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、癌胚胎抗原、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、雌激素受体、孕酮受体、肝配蛋白B2、CD123、c-Met、GD-2、O-乙酰化GD2(OGD2)、CE7、Wilms肿瘤1(WT-1)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、CCL-1、CD138和病原体特异性抗原。

[0729] 78. 实施方案76或实施方案77的组合,其中所述抗原是病原体特异性抗原,其是病毒抗原、细菌抗原或寄生虫抗原。

[0730] 79. 实施方案76-78中任一项的组合,其中所述重组受体是转基因T细胞受体(TCR)或功能性非T细胞受体。

[0731] 80. 实施方案76-79中任一项的组合,其中所述重组受体是嵌合受体,其任选地是嵌合抗原受体(CAR)。

[0732] 81. 实施方案76-80中任一项的组合,其中:

[0733] 所述抑制剂是所述靶蛋白酪氨酸激酶的选择性抑制剂;和/或

[0734] 所述抑制剂以比所述抑制剂对不同于所述靶蛋白酪氨酸激酶的任何蛋白酪氨酸激酶或TEC家族激酶的IC₅₀低至少10倍或至少100倍的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶,和/或以比所述抑制剂对ITK和BTK二者的IC₅₀值低至少2倍、至少10倍或至少100倍的IC₅₀抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶;和/或

[0735] 所述抑制剂以小于或小于约1000nM、900nM、800nM、600nM、500nM、400nM、300nM、200nM、100nM或更小的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶。

[0736] 82. 实施方案76-81中任一项的组合,其中所述抑制剂是小分子、肽、蛋白质、抗体

或其抗原结合片段、抗体模拟物、适配体或核酸分子。

[0737] 83. 实施方案76-82中任一项的组合, 其中所述抑制剂选自式(II)的化合物、ONO/GS-4059、化合物30或化合物38、GDC-0834、RN-486、CGI-560、CGI-1764、HM-71224、CC-292、ONO-4059、CNX-774和LFM-A13。

[0738] 84. 实施方案76-83中任一项的组合, 其中所述抑制剂包含式(II)的化合物或其对映体、药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药或包含任何前述物质的药物组合物。

[0739] 85. 实施方案76-84中任一项的组合, 将其配制在同一组合物中。

[0740] 86. 实施方案76-84的组合, 将其配制在单独组合物中。

[0741] 87. 一种试剂盒, 其包含实施方案76-86中任一项的组合和用于针对治疗疾病或病症、任选地癌症向受试者给予所述基因工程化细胞和所述抑制剂的说明书。

[0742] 88. 一种试剂盒, 其包含:

[0743] 包含治疗有效量的表达重组受体的基因工程化T细胞的组合物, 所述重组受体结合除B细胞抗原以外或除选自CD19、CD20、CD22和ROR1的B细胞抗原以外的抗原; 以及

[0744] 用于针对治疗癌症向受试者给予所述基因工程化细胞与靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂的组合疗法的说明书, 其中所述抑制剂不抑制ITK和/或以大于或大于约1000nM的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制ITK和/或所述靶蛋白酪氨酸激酶是在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶(TEC)、静息淋巴细胞激酶(RLK/TXK)、BMX/ETK或ERBB4。

[0745] 89. 一种试剂盒, 其包含:

[0746] 包含治疗有效量的靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂的组合物, 其中所述抑制剂不抑制ITK和/或以大于或大于约1000nM的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制ITK和/或所述靶蛋白酪氨酸激酶是在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶(TEC)、静息淋巴细胞激酶(RLK/TXK)、BMX/ETK或ERBB4; 以及

[0747] 用于针对治疗疾病或病症、任选地癌症向受试者给予所述抑制剂与基因工程化T细胞的组合疗法的说明书, 所述T细胞表达结合除B细胞抗原以外或除选自CD19、CD20、CD22和ROR1的B细胞抗原以外的抗原的重组受体。

[0748] 90. 实施方案87-89中任一项的试剂盒, 其中所述癌症不是表达B细胞抗原的癌症, 是非血液癌, 不是B细胞恶性肿瘤, 不是B细胞白血病, 或者是实体瘤。

[0749] 91. 实施方案87-89中任一项的试剂盒, 其中所述癌症是肉瘤、癌或淋巴瘤任选地非霍奇金淋巴瘤(NHL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、白血病、CLL、ALL、AML和骨髓瘤。

[0750] 92. 实施方案87-91中任一项的试剂盒, 其中所述癌症是胰腺癌、膀胱癌、结直肠癌、乳腺癌、前列腺癌、肾癌、肝细胞癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、胰腺癌、直肠癌、甲状腺癌、子宫癌、胃癌、食管癌、头颈癌、黑色素瘤、神经内分泌癌、CNS癌症、脑肿瘤、骨癌或软组织肉瘤。

[0751] 93. 实施方案87-92中任一项的试剂盒, 其中(i)所述受试者和/或所述疾病或病症(a)对布鲁顿酪氨酸激酶(BTK)的抑制具有抗性和/或(b)包含对所述抑制剂的抑制具有抗性的细胞群;

[0752] (ii)所述受试者和/或所述疾病或病症在编码BTK的核酸中包含能够降低或防止所述抑制剂和/或依鲁替尼对BTK的抑制的突变或破坏; 和/或

[0753] (iii) 在所述给予时,所述受试者在用所述抑制剂治疗和/或用BTK抑制剂疗法治疗后发生缓解后复发,或者已经被认为对用所述抑制剂治疗和/或用BTK抑制剂疗法治疗是难治性的。

[0754] 94. 实施方案93的方法,其中所述细胞群是或包含B细胞群和/或不包含T细胞。

[0755] 95. 实施方案93或实施方案94的试剂盒,其中编码BTK的核酸中的所述突变包含位置C481、任选地C481S或C481R处的取代,和/或位置T474、任选地T474I或T474M处的取代。

[0756] 96. 实施方案87-95中任一项的试剂盒,其中所述抗原选自Her2、L1-CAM、间皮素、CEA、乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3或4、erbB二聚体、EGFR vIII、FBP、FCRL5、FCRH5、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、Lewis Y、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、黑色素瘤相关抗原(MAGEMAGE-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、优先表达的黑色素瘤抗原(PRAME)、存活蛋白、EGP2、EGP40、TAG72、B7-H6、IL-13受体 α 2(IL-13Ra2)、CA9、GD3、HMW-MAA、CD171、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2NY-ESO-1、PSCA、叶酸受体-a、CD44v6、CD44v7/8、avb6整合素、8H9、NCAM、VEGF受体、5T4、胎儿AchR、NKG2D配体、CD44v6、双重抗原和与通用标签相关的抗原、癌症-睾丸抗原、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、癌胚抗原、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、雌激素受体、孕酮受体、肝配蛋白B2、CD123、c-Met、GD-2、O-乙酰化GD2(OGD2)、CE7、Wilms肿瘤1(WT-1)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、CCL-1、CD138和病原体特异性抗原。

[0757] 97. 实施方案87-96中任一项的试剂盒,其中所述抗原是病原体特异性抗原,其是病毒抗原、细菌抗原或寄生虫抗原。

[0758] 98. 实施方案87-97的任一项的试剂盒,其中所述重组受体是转基因T细胞受体(TCR)或功能性非T细胞受体。

[0759] 99. 实施方案87-98中任一项的试剂盒,其中所述重组受体是嵌合受体,其任选地是嵌合抗原受体(CAR)。

[0760] 100. 实施方案87-99中任一项的试剂盒,其中:

[0761] 所述抑制剂是所述靶蛋白酪氨酸激酶的选择性抑制剂;和/或

[0762] 所述抑制剂以比所述抑制剂对不同于所述靶蛋白酪氨酸激酶的任何蛋白酪氨酸激酶或TEC家族激酶的 IC_{50} 低至少10倍或至少100倍的半最大抑制浓度(IC_{50})抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶,和/或以比所述抑制剂对ITK和BTK二者的 IC_{50} 值低至少2倍、至少10倍或至少100倍的 IC_{50} 抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶;和/或

[0763] 所述抑制剂以小于或小于约1000nM、900nM、800nM、600nM、500nM、400nM、300nM、200nM、100nM或更小的半最大抑制浓度(IC_{50})抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶。

[0764] 101. 实施方案87-100中任一项的试剂盒,其中所述抑制剂是小分子、肽、蛋白质、抗体或其抗原结合片段、抗体模拟物、适配体或核酸分子。

[0765] 102. 实施方案87-101中任一项的试剂盒,其中所述抑制剂选自式(II)的化合物、ONO/GS-4059、化合物30或化合物38、GDC-0834、RN-486、CGI-560、CGI-1764、HM-71224、CC-292、ONO-4059、CNX-774和LFM-A13。

[0766] 103. 实施方案87-102中任一项的试剂盒,其中所述抑制剂包含式(II)的化合物或其对映体、药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药或包含任何前述物

质的药物组合物。

[0767] 104. 实施方案87-103中任一项的试剂盒, 其中所述说明书用于与开始给予包含所述T细胞的组合物同时或在之后给予所述抑制剂。

[0768] 105. 实施方案87-104中任一项的试剂盒, 其中所述说明书用于在开始给予所述T细胞之后给予所述抑制剂。

[0769] 106. 实施方案104或实施方案105的试剂盒, 其中所述说明书用于在开始给予所述T细胞的1小时、2小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时或1周内或约1小时、2小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时或1周内给予所述抑制剂。

[0770] 107. 实施方案104-106中任一项的试剂盒, 其中所述说明书用于在这样的时间给予所述抑制剂, 其中:

[0771] 与在开始给予所述T细胞之后的在前时间点所述受试者体内的细胞数量相比, 所述受试者的血液中可检测的所述T细胞疗法的细胞数量降低;

[0772] 所述血液中可检测的所述T细胞疗法的细胞数量是开始给予所述T细胞之后所述受试者的血液中可检测的所述T细胞疗法的细胞数量峰值或最大值的少于或少于约1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、50倍或100倍或更少; 和/或

[0773] 在这样的时间给予所述抑制剂: 在所述受试者的血液中可检测到所述T细胞疗法的细胞水平的峰值或最大值之后, 所述受试者的血液中可检测的T细胞的细胞数量或源自所述T细胞的细胞数量是所述受试者的血液中总外周血单核细胞(PBMC)的少于10%、少于5%、少于1%或少于0.1%。

[0774] 108. 实施方案107的试剂盒, 其中所述增加或降低大于或大于约1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍或更多。

[0775] 109. 实施方案87-108中任一项的试剂盒, 其中所述说明书用于在开始给予所述T细胞之后持续长达2天、长达7天、长达14天、长达21天、长达一个月、长达两个月、长达三个月、长达6个月或长达1年的时间段给予所述抑制剂。

[0776] 110. 实施方案87-109中任一项的试剂盒, 其中所述说明书用于从至少在开始给予所述T细胞之后进一步给予所述抑制剂, 直到:

[0777] 与恰在给予所述抑制剂之前的在前时间点所述受试者体内的细胞数量相比或与给予所述T细胞疗法之后的在前时间点相比, 所述受试者的血液中可检测的所给予的T细胞的细胞数量或源自所述T细胞的细胞数量增加;

[0778] 所述血液中可检测的T细胞的细胞数量或源自所述T细胞的细胞数量是开始给予所述T细胞之后所述受试者的血液中观察到的数量峰值或最大值的2.0倍(更大或更小);

[0779] 所述受试者的血液中可检测的T细胞的细胞数量是所述受试者的血液中总外周血单核细胞(PBMC)的大于或大于约10%、15%、20%、30%、40%、50%或60%; 和/或

[0780] 所述受试者展现出与紧接所述T细胞的给予之前或紧接所述抑制剂的给予之前的肿瘤负荷相比肿瘤负荷的降低; 和/或

[0781] 所述受试者展现出完全或临床缓解。

[0782] 111. 实施方案87-110中任一项的试剂盒, 其中所述基因工程化T细胞包含对所述受试者而言自体的细胞。

[0783] 112. 实施方案87-111中任一项的试剂盒, 其中所述基因工程化T细胞包含对所述

受试者而言同种异体的T细胞。

[0784] 113.一种工程化表达重组受体的免疫细胞的方法,其包括:

[0785] 使包含T细胞的细胞群与靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂接触,其中所述抑制剂不抑制ITK和/或以大于或大于约1000nM的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制ITK和/或所述靶蛋白酪氨酸激酶是在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶(TEC)、静息淋巴细胞激酶(RLK/TKK)、BMX/ETK或ERBB4;以及

[0786] 在使得表达重组受体的条件下将编码所述重组受体的核酸引入所述T细胞群中。

[0787] 114.实施方案113的方法,其中所述细胞群是或包含T细胞,任选地CD4⁺或CD8⁺。

[0788] 115.实施方案113或实施方案114的方法,其中所述从受试者、细胞群任选地人受试者分离。

[0789] 116.实施方案113-115中任一项的方法,其中所述接触发生在所述引入之前和/或期间。

[0790] 117.一种产生基因工程化T细胞的方法,其包括将编码重组受体的核酸分子引入原代T细胞中,其中所述T细胞来自已经被给予靶蛋白酪氨酸激酶的抑制剂的受试者,其中所述抑制剂不抑制ITK和/或以大于或大于约1000nM的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制ITK和/或所述靶蛋白酪氨酸激酶是在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶(TEC)、静息淋巴细胞激酶(RLK/TKK)、BMX/ETK或ERBB4。

[0791] 118.实施方案117的方法,其中在引入所述核酸分子之前不超过30天、20天、10天、9天、8天、7天、6天、5天、4天、3天、2天或1天已经向所述受试者给予所述抑制剂。

[0792] 119.实施方案113-118中任一项的方法,其中:

[0793] 所述抑制剂是所述靶蛋白酪氨酸激酶的选择性抑制剂;和/或

[0794] 所述抑制剂以比所述抑制剂对不同于所述靶蛋白酪氨酸激酶的任何蛋白酪氨酸激酶或TEC家族激酶的IC₅₀低至少10倍或至少100倍的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶,和/或以比所述抑制剂对ITK和BTK二者的IC₅₀值低至少2倍、至少10倍或至少100倍的IC₅₀抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶;和/或

[0795] 所述抑制剂以小于或小于约1000nM、900nM、800nM、600nM、500nM、400nM、300nM、200nM、100nM或更小的半最大抑制浓度(IC₅₀)抑制所述靶蛋白酪氨酸激酶。

[0796] 120.实施方案113-119中任一项的方法,其中所述抑制剂是小分子、肽、蛋白质、抗体或其抗原结合片段、抗体模拟物、适配体或核酸分子。

[0797] 121.实施方案113-120中任一项的方法,其中所述抑制剂选自式(II)的化合物、ONO/GS-4059、化合物30或化合物38、GDC-0834、RN-486、CGI-560、CGI-1764、HM-71224、CC-292、ONO-4059、CNX-774和LFM-A13。

[0798] 122.实施方案113-121中任一项的方法,其中所述抑制剂包含式(II)的化合物或其对映体、药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、共晶、多晶型物或前药或包含任何前述物质的药物组合物。

[0799] 123.实施方案113-122中任一项的方法,其中所述T细胞包含CD4⁺或CD8⁺细胞。

[0800] VIII. 实施例

[0801] 以下实施例被包括在内仅用于说明目的,并不旨在限制本发明的范围。

[0802] 实施例1:在存在TEC家族的抑制剂的情况下表达CAR的T细胞表型和功能的评估

[0803] 在体外研究中评估在存在TEC家族激酶的抑制剂、依鲁替尼或式(II)的化合物的情况下表达CAR的T细胞的特性。

[0804] 为了产生表达CAR的T细胞,通过基于免疫亲和力的富集从三个健康人供体受试者分离T细胞,并且激活来自每个供体的细胞并用编码抗CD19CAR的病毒载体转导。CAR含有抗CD19scFv、Ig源间隔子、人CD28源跨膜结构域、人4-1BB源细胞内信号传导结构域和人CD3 ζ 源信号传导结构域。编码CAR的核酸构建体还包括用作转导标记的截短的EGFR(tEGFR)序列,其通过自切割T2A序列与CAR序列分离。

[0805] 将对于每个供体的表达CAR的CD4⁺和CD8⁺细胞分别以1:1混合,并在各种条件下在体外评估每个供体的合并细胞。

[0806] A. 细胞溶解活性

[0807] 将如上所述产生的CAR T细胞一式三份地铺板在聚D-赖氨酸板上,然后以2.5:1的效应子与靶标(E:T)比率与依鲁替尼抗性的表达CD19的靶细胞(转导为表达CD19、K562-CD19的K562细胞)共培养。用NucLight Red (NLR) 标记靶细胞以允许通过显微镜检查追踪靶细胞。将依鲁替尼以5000、500、50、5和0.5nM的浓度(反映了覆盖观察为超生理学(500nM)和C_{max}(227nM)的剂量的剂量范围)添加至培养物中。将式(II)的化合物以5000、500、50、5和0.5nM的浓度(反映了覆盖观察为超生理学(5000nM)和C_{max}(1.8 μ M)的剂量的剂量范围)添加至培养物中。将在存在靶细胞的情况下且在不存在抑制剂的情况下孵育的CAR-T细胞用作“未处理的”对照。通过测量如通过红色荧光信号(使用IncuCyte®活细胞分析系统,Essen Bioscience)测定的在四天的时间段内活靶细胞的损失来评估细胞溶解活性。通过测量归一化靶细胞计数相对于时间的曲线下面积(AUC)和通过定义0%值(单独的靶细胞)和100%值(在运载体对照中CAR+T细胞与靶细胞共培养)归一化AUC倒数(1/AUC)值,评估靶标杀伤的百分比(%)。

[0808] 如显微镜检查所示,在靶细胞生长的初始期后,来自所有供体的抗CD19CAR T细胞都能够在四天的时间段内降低靶细胞数量,从而证明在测定中的有效杀伤(图1A)。在细胞毒性测定的开始和结束时与CAR T细胞共培养的靶细胞的代表性图像示于图1B中。

[0809] 将在存在或不存在一系列剂量的依鲁替尼或式(II)的化合物的情况下CAR-T细胞对靶细胞的靶标特异性细胞溶解活性针对未处理的对照的结果进行归一化。如图1C所示,对于两个供体,即使当浓度增加至超生理学水平(500nM)时,依鲁替尼也没有显著影响细胞溶解活性。在共培养期间测试的所有浓度下添加依鲁替尼不会抑制抗CD19CAR T细胞的细胞溶解功能。然而,对于用依鲁替尼处理的一个供体,观察到适度增加的靶细胞杀伤($P < 0.0001$) (图1C)。图1D还显示,当用式(II)的化合物以50至5000nM的浓度处理时,观察到来自相同的三个供体中的每一个的细胞的类似结果,所述浓度范围包括观察为超生理学(5000nM)和观察到的C_{max}(1.8 μ M)的剂量。因此,观察到两种抑制剂在评估的跨越C_{max}或超生理学剂量的剂量范围内对CAR-T细胞的细胞溶解功能都没有负面影响。

[0810] B. CAR-T细胞表面标记的表达。

[0811] 为了评估在存在依鲁替尼或式(II)的化合物的情况下培养的抗CD19CAR T细胞的各种表型标记,在用辐照的表达CD19同源抗原的K562靶细胞刺激后追踪4天CAR⁺、CD4⁺和CD8⁺细胞(来自三个供体)上的一组激活标记。将如上所述产生的CAR-T细胞以100,000个细胞/孔铺板在96孔聚D-赖氨酸包被的板上。以2.5:1的效应子与靶标比率添加辐照的K562-

CD19靶细胞。对于培养的持续时间,在不存在抑制剂的情况下或在存在依鲁替尼(浓度为5000、500、50、5和0.5nM)的情况下或在存在式(II)的化合物(浓度为5000、1582、500、158和50nM)的情况下将细胞培养长达4天。在第1、2、3和4天收获细胞,并通过流式细胞术分析T细胞激活和分化表面标记CD69、CD107a、PD-1、CD25、CD38、CD39、CD95、CD62L、CCR7、CD45RO和EGFRt(CAR转导细胞的替代标记)。

[0812] 在3个不同的抗CD19CAR T细胞供体中,浓度为5000、500、50、5和0.5nM的依鲁替尼对EGFRt替代标记的表达或对激活标记CD25、CD38、CD39、CD95或CD62L的任何一个或对本研究中评估的任何T细胞表型标记(CCR7、CD62L和CD45RO)没有显著影响,这与该测定中依鲁替尼不显著影响T细胞的激活状态和/或分化亚型的结论一致。对于在存在式(II)的化合物的情况下的培养观察到类似的结果。图2A和图2B描绘了示例性标记的结果。图2C和图2D中的结果显示分别用依鲁替尼或式(II)的化合物处理不影响作为中心(TCM)或效应子(TEM)记忆子集的细胞的表型,如通过CCR7和CD45RA的表达所评估的。如图2E和图2F所示,当在存在依鲁替尼的情况下分别培养CD4⁺或CD8⁺细胞时,CD69、CD107a或PD-1的表达水平有微妙降低。对于在存在式(II)的化合物的情况下的培养观察到类似的结果(图2G和图2H)。观察到一些供体随时间和量级的变化性。

[0813] C. 细胞因子产生

[0814] 通过评估CAR-T细胞和辐照的K562-CD19靶细胞的共培养物的上清液中的细胞因子水平,评估在存在或不存在依鲁替尼或式(II)的化合物的情况下培养的抗CD19CAR T细胞的细胞因子产生。将如上所述产生的CAR-T细胞以100,000个细胞/孔铺板在96孔聚D-赖氨酸包被的板上。以2.5:1的效应子与靶标比率添加辐照的靶细胞(K562-CD19)。将细胞在不存在抑制剂的情况下、在存在浓度为50、150、500、1500或5000nM的式(II)的化合物的情况下或在存在浓度为0.5、5、50或500nM的依鲁替尼的情况下培养长达4天。在第2、3或4天收获培养物上清液,并使用来自Meso Scale Discovery (MSD)的细胞因子试剂盒从培养上清液中测量IFN γ 、IL-2和TNF α 。在存在依鲁替尼或式(II)的化合物的情况下与辐照的K562-CD19靶细胞共培养后,随时间的来自健康供体来源的抗CD19CAR T细胞批次的分泌的IFN γ 、IL-2和TNF α 水平分别示于图3A和图3B中。刺激后2天,测定了在用依鲁替尼(图3C)或式(II)的化合物(图3D)处理的细胞中由供体2产生的CAR-T细胞的细胞因子产生的绝对变化,各自在2个独立实验中(平均值 $\pm$ SEM)。如图3C和图3D所示,依鲁替尼和式(II)的化合物的生理浓度各自不显著抑制细胞因子浓度。虽然供体之间的反应的量级不同,但是在用抗原特异性K562-CD19细胞刺激后,依鲁替尼或式(II)的化合物总体上不抑制CAR T细胞因子产生。式(II)的化合物在一些供体中适度地增加了细胞因子产生,并且采用50nM的依鲁替尼观察到类似的作用。相反,采用500nM依鲁替尼观察到IL-2的平均降低为19.6%或1200pg/mL ($P<0.05$) (图3C)。当测量IL-4和IL-10时获得了类似的结果。

[0815] D. 连续再刺激

[0816] 在一些方面,在重复刺激后细胞离体扩增的能力可以指示CAR-T细胞持久(例如,在初始激活后)的能力和/或指示体内功能和/或适合性(Zhao等人(2015) Cancer Cell, 28: 415-28)。将如上所述产生的抗CD19CAR-T细胞以100,000个细胞/孔一式三份地铺板在96孔聚D-赖氨酸包被的板上,并以2.5:1的效应子与靶标比率添加辐照的靶细胞(K562-CD19)。在存在500和50nM依鲁替尼或1581和158nM的式(II)的化合物的情况下刺激细胞,每3-4天

收获并计数,并在将细胞数量重置为每轮的初始接种密度后,使用相同的培养条件和所添加浓度的依鲁替尼或式(II)的化合物培养以用新的靶细胞再刺激。在25天培养期过程中进行总共7轮刺激。

[0817] 对于每轮刺激,测定细胞数量的倍数变化和倍增数量。依鲁替尼和式(II)的化合物的群体倍增的结果分别示于图4A和图4B中。在本研究中,未观察到任一种抑制剂影响CAR+T细胞的初始生长。在三轮刺激(第11天)后,所有处理组的扩增动力学相似,如通过倍数变化和群体倍增数量所观察到的。然而,到第18天,在多次再刺激后对于本研究中三个供体中的两个产生的CAR+T细胞,观察到通过依鲁替尼或式(II)的化合物(在各个抑制剂所评估的每种浓度下,如通过提高的细胞数量和增加的群体倍增数量所指示的)的存在提高了扩增(如通过群体倍增所测量的)。通常,与来源于另一个供体的那些相比,来源于观察到这些差异的两个供体的细胞在不存在任一种抑制剂的情况下的连续再刺激测定中表现较差。

[0818] 图4C和图4D分别总结了在存在依鲁替尼或式(II)的化合物的情况下刺激三个供体后第18天(5轮再刺激)培养物中细胞数量的结果。如图所示,观察到18天连续刺激测定后细胞数量的统计学上显著的增加。特别地,在五轮刺激(第18天)后,来自用最高浓度的依鲁替尼或式(II)的化合物处理的供体2的CAR+T细胞相对于对照细胞具有显著($P<0.05$)增加的细胞计数。对于来自用测试的最高浓度的依鲁替尼或式(II)的化合物处理的供体3的细胞,也观察到非显著的增加的细胞计数。当在对照条件下评估细胞计数时,来源于供体2和3的细胞在该测定中展现出比供体1细胞更差的性能。而且,通常,与来源于另一个供体的那些相比,来源于观察到这些差异的两个供体的细胞在不存在任一种抑制剂的情况下的连续再刺激测定中表现较差。值得注意的是,这些性能较差的供体在该测定中受益于用依鲁替尼或式(II)的化合物的处理。结果与依鲁替尼或式(II)的化合物或其他Btk(或其他TEC家族激酶)抑制剂(包括不抑制Itk的选择性抑制剂)改善在影响T细胞功能、存活和/或增殖能力的一个或多个因素中受损的T细胞的功能、存活和/或扩增的实用性是一致的。例如,即使在不能特异性抑制Itk的激酶抑制剂的情况下,此类组合也可以改善抗原遭遇后的T细胞功能和/或持久性。

[0819] E. TH1表型

[0820] 当在存在依鲁替尼或式(II)的化合物的情况下培养时,进行测定以评估抗CD19CAR+T细胞向TH1表型的倾斜。已经观察到依鲁替尼通过抑制ITK来限制 T_H2 CD4T细胞激活和增殖(Honda, F.等人(2012) Nat Immunol, 13(4):369-78)。如上所述进行连续再刺激测定,并在不同时间收获细胞并通过流式细胞术分析以评估TH1表型(评估为CD4+CXCR3+CRTH2-) T细胞或TH2表型(评估为CD4+CXCR3-CRTH2+)的百分比。用或不用指定浓度的依鲁替尼或式(II)的化合物培养的细胞的代表性图示于图5A中,并且在连续再刺激过程中和在各种浓度的依鲁替尼或式(II)的化合物下培养后TH1细胞的百分比分别示于图5B和图5C中。

[0821] 在该测定中观察到在连续刺激后依鲁替尼而非式(II)的化合物的存在增加所观察到展现TH1表型的CAR+T细胞的百分比,并且观察到所述作用随着依鲁替尼的浓度增加而增大。在18天连续刺激期过程中,在对照条件下,所有三个供体的CAR+T TH1细胞百分比都增加(图5B)。500nM依鲁替尼进一步提高了TH1细胞的百分比($P<0.01$),而采用式(II)的化合物处理未观察到显著作用(图C)。据报道,与依鲁替尼相比,式(II)的化合物对ITK具有低

>200倍的亲和力(Byrd, J.C.等人(2016) N Engl J Med, 374(4):323-32), 这表明依鲁替尼介导的TH1倾斜可能受到脱靶ITK活性的影响。

[0822] 在从连续刺激测定分离的CAR T细胞中未观察到任一种抑制剂对另外的CAR T激活或记忆标记的显著作用(图5D和图5E, 式(II)的化合物;以及图5F和图5G, 依鲁替尼)。

[0823] 实施例2: 在存在TEC家族激酶的抑制剂的情况下提高表达CAR的T细胞的抗肿瘤活性

[0824] 通过给NOD/Scid/gc-/- (NSG) 小鼠注射鉴定为对BTK抑制具有抗性的CD19+Na1m-6播散性肿瘤细胞系, 产生播散性肿瘤异种移植小鼠模型。

[0825] 在第零(0)天, 给NSG小鼠静脉内注射 5×10^5 个表达萤火虫萤光素酶的Na1m-6细胞。从第4天开始并且在研究持续时间每天用运载体对照处理小鼠或用依鲁替尼处理小鼠, 在每种情况下通过每天口服管饲(口服)以25mg/kg每天处理四次。为了允许评估与抑制剂的组合疗法的效果, 在第5天将来自两个不同供体的次最佳剂量的抗CD19CAR T细胞以 5×10^5 /小鼠静脉注射至小鼠体内。作为对照, 向小鼠给予运载体对照或依鲁替尼, 但不给予CAR-T细胞。每组监测八(N=8)只小鼠。

[0826] 在如上所述处理后, 通过生物发光成像测量随时间的肿瘤生长, 并测量平均辐射率($p/s/cm^2/sr$)。用依鲁替尼和CAR T细胞处理的小鼠随时间的肿瘤生长的结果示于图6A中。来自两个不同供体在肿瘤注射后更长时间点监测肿瘤生长的相同研究的结果的分析示于图6B中。如图所示, 与运载体处理相比, 单独的依鲁替尼处理对该依鲁替尼抗性模型中的肿瘤负荷没有影响。相反, 与用CAR-T细胞和运载体对照处理的小鼠相比, 被给予CAR-T细胞和依鲁替尼的小鼠展现出显著降低的肿瘤生长($p < 0.001$, ***)。

[0827] 还观察到CAR T和依鲁替尼的组合给予导致与CAR T和运载体条件相比显著增加的存活, 如通过显示用依鲁替尼和CAR T细胞处理的荷瘤小鼠的存活的Kaplan Meier曲线所示的。如图6C所示, 与接受次最佳抗CD19CAR T细胞剂量+运载体的组相比, 用CAR-T细胞和依鲁替尼处理的小鼠展现出增加的中值存活。来自两个不同供体在肿瘤注射后更长时间点监测存活的相同研究的结果的分析示于图6D中, 所述分析显示与CAR T和运载体条件相比, 观察到CAR T和依鲁替尼的组合给予也导致存活显著增加($p < 0.001$, ***)。

[0828] 实施例3: 在存在TEC家族激酶的抑制剂的情况下表达CAR的T细胞表型、功能和体内抗肿瘤活性的评估

[0829] 在第0天, 给实施例2中描述的NSG小鼠静脉内注射 5×10^5 个表达萤火虫萤光素酶的Na1m-6细胞。从第4天开始并且在研究持续时间每天用运载体对照处理小鼠或每天用TEC家族激酶的抑制剂(依鲁替尼或式(II)的化合物)处理小鼠, 在饮用水(D.W.)中以25mg/kg/天处理。桥接实验证实通过饮用水给予依鲁替尼相当于口服管饲给予(数据未示出)。为了允许评估与抑制剂的组合疗法的效果, 在第5天将次最佳剂量的抗CD19CAR T细胞以 5×10^5 /小鼠静脉注射至小鼠体内。作为对照, 向小鼠给予运载体对照, 但不给予CAR-T细胞或抑制剂。

[0830] 如上所述处理后, 测定处理小鼠的肿瘤生长和存活百分比。如图7A所示, 与接受次最佳抗CD19CAR T细胞剂量+运载体的组相比, 用抗CD19CAR-T细胞和依鲁替尼或式(II)的化合物处理的小鼠展现出增加的中值存活($p < 0.001$)。与和单独运载体给予的CAR T相比, 与CAR T组合给予的式(II)的化合物或依鲁替尼也显著($P < 0.001$)降低肿瘤生长(图7B)。使

用来源于两个不同供体的工程化T细胞产生的抗CD19CAR-T细胞的结果相似。

[0831] 在已经接受过来自一个供体来源的细胞的抗CD19CAR+T细胞并且已经用运载体、依鲁替尼或式(II)的化合物处理的小鼠的血液和骨髓中分析CAR+T细胞的药代动力学分析(每组3只小鼠)。分析样品以在CAR+T细胞转移后第7、12、19和26天评估EGFRt+CAR T细胞和/或肿瘤细胞的存在和水平。如图7C和图7E所示,与用CAR+T细胞和运载体处理的那些相比,在分别用依鲁替尼和式(II)的化合物处理的小鼠中观察到循环CAR+T细胞的显著增加,这与在存在抑制剂的情况下血液中CAR-T细胞的更多扩增是一致的。在CAR-T细胞转移后第19天,在分别用依鲁替尼(图7D;* $p<0.05$)和式(II)的化合物(图7E;*** $p<0.001$)处理后观察到血液中细胞数量的显著增加。如图7G和图7H所示,与用单独的运载体相比,在CAR+细胞处理与用依鲁替尼或式(II)的化合物的处理组合的小鼠的血液或骨髓中检测到显著较少的肿瘤细胞。

[0832] 在CAR T后第12天从接受CAR+T细胞并且已经用运载体、依鲁替尼或式(II)的化合物处理的小鼠的骨髓收获的CAR+T细胞也进行离体免疫表型分型(每组 $n=3$ 只小鼠)。通过流式细胞术评估细胞的表面标记CD44、CD45RA、CD62L、CD154、CXCR3、CXCR4、PD-1,并使用FlowJo软件进行T分布随机邻域嵌入(t-SNE)高维度分析。如图8A所示,与用单独的运载体(对照)相比,在从已经接受过CAR-T细胞与依鲁替尼或式(II)的化合物的组合的动物的骨髓分离的CAR+T细胞中观察到变化。使用来自每组三只小鼠的基于合并的分析的多变量t-SNE FACS分析,鉴定了4个不同的群体簇(图8B)。FAC直方图示于图8C中,其显示来自图8A中的4门控t-SNE的CD4、CD8、CD62L、CD45RA、CD44和CXCR3的各个表达谱覆盖在总群体的表达上(阴影)。在对照小鼠或用依鲁替尼或式(II)的化合物处理的小鼠中每个t-SNE群体的百分比和倍数变化示于图8D中。统计学上显著的差异指示为 $P<0.95$ (*)、 $P<0.01$ (**)、 $P<0.001$ (***)、 $P<0.0001$ (****)。

[0833] 在CAR T转移后第12天,与对照小鼠相比,在也被给予依鲁替尼或式(II)的化合物的CAR T处理的小鼠的骨髓中观察到CD8+CD44^{hi} CXCR3^{hi}CD45RA^{lo} CD62L^{hi}(群体2)和CD4+CD44^{hi} CXCR3^{int} CD45RA^{hi} CD62L^{hi}(群体4)的增加(图8B至图8C)。与在依鲁替尼处理的动物中观察到的相比,用式(II)的化合物处理的小鼠展现出更大的群体2富集(群体2和4分别代表这些小鼠中CAR-T细胞的29.2%和8.4%),而在依鲁替尼处理的动物中观察到群体4的更大增强(CAR-T细胞的15.2%与4.4%相比)(图8D)。

[0834] 实施例4:在存在TEC家族激酶的抑制剂的情况下增强由弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)患者产生的表达CAR的T细胞的细胞溶解功能

[0835] 基本上如实施例1中所述产生抗CD19CAR-T细胞,不同之处在于从患有弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)的两名示例性患者分离T细胞。通过将CAR+T细胞与K562-CD19靶细胞以2.5:1的效应子与靶标比率并且在存在500和50nM依鲁替尼的情况下共培养,使细胞经受如实施例1.D所述的连续再刺激,从而每3-4天收获细胞并在重设细胞数量后在相同条件下再刺激。在21天培养期内对细胞进行连续再刺激,并监测细胞扩增和细胞毒活性。

[0836] 如图9A所示,在21天培养期过程中,从来源于每个单独受试者的细胞观察到细胞扩增,如通过细胞倍增数量所确定的。依鲁替尼不抑制来源于任一名患者的CAR T细胞的增殖(图9A),该观察结果与来自健康供体来源的CART细胞的先前数据是一致的。从来源于每个单独受试者的细胞产生的CAR+T细胞显示在16天连续再刺激后在存在500nM依鲁替尼的

情况下细胞溶解功能的增强 ($P < 0.001$) (图9B)。在来源于一名患者的细胞中,采用50nM依鲁替尼观察到16天连续刺激后细胞溶解活性的增强 ($P < 0.01$) (图9B)。细胞溶解活性的这种增强与健康供体细胞的结果是一致的(图1C、图1D)。

[0837] 实施例5:通过对用依鲁替尼处理的表达CAR的T细胞进行RNA-Seq来评估分子标签

[0838] 从已经在存在依鲁替尼 (50nM、500nM)、式 (II) 的化合物 (1581nM) 或对照 (0nM) 的情况下在连续刺激测定中处理18天的来源于三个不同供体的各个表达CAR的细胞分离RNA。使用RNEasy微型试剂盒 (Qiagen) 进行RNA分离。对样品进行测序并将RNASeq读段定位至人基因组 (GRCh38) 并与GENCODE释放24基因模型进行比对。产生并评价RNAseq质量指标以确认样品之间的一致性。通过施加 $\log_2$ 倍数变化截断值0.5和Benjamini-Hochberg调整的误差发现率 (FDR) 截断值0.05来鉴定差异表达的基因。

[0839] 如图10A中的火山图所示,500nM依鲁替尼显著 ($FDR < 0.05$, $absLog_2FC > 0.5$) 改变了41个蛋白质编码基因的表达。图10C显示了图10A中鉴定的基因的基因表达变化的热图。在相似培养条件下的单独实验中,在用式 (II) 的化合物 (1581nM) 的处理下仅3个基因显著改变 ($FDR < 0.05$, $absLog_2FC > 0.5$)。图10B描绘了与对照相比,用1581nM的式 (II) 的化合物处理的第18天连续刺激的CAR T细胞的表达基因的火山图。

[0840] 用不同浓度的抑制剂 (50nM或500nM) 或对照处理后的两个示例性基因的基因表达的箱形图示于图11A至图11B中。基因如颗粒酶A的减少(图11A)和SELL/CD62L的增加(图11B)与依鲁替尼抑制末端效应子样基因同时增强与记忆发育相关的基因的作用是一致的。此外,RNA-Seq揭示与促进TH1分化相关的基因通过依鲁替尼来改变,所述基因的改变包括已知能抑制TH2编程的MSC的上调(Wu,C.等人(2017) *Nat Immunol*, 18 (3):344-353)、以及与被鉴定为抑制TH1发育的ATRA/视黄酸信号传导途径相关的HES6、HIC1、LZTFL1、NRIP1、CD38和RARRES3的下调(Britschgi,C.等人(2008) *Br J Haematol*, 141 (2):179-87;Jiang,H.等人(2016) *J Immunol*, 196 (3):1081-90;Heim,K.C.等人(2007) *Mol Cancer*, 6:57;Nijhof,I.S.等人(2015) *Leukemia*, 29 (10):2039-49;Zirn,B.等人(2005) *Oncogene*, 24 (33):5246-51) (图11E-B-D)。为了支持RNA-Seq结果,在供体2和3中,在18天连续刺激后,通过流式细胞术观察到CD62L表达的显著增加(图12A和图12B)。总之,这些结果支持长期依鲁替尼处理可能导致CAR T中TH1和记忆样表型增加。

[0841] 本发明并不旨在限于具体公开的实施方案的范围,所提供的实施例例如是为了说明本发明的各个方面。根据本文的描述和传授,对组合物和方法的各种修改将变得清楚。可以在不脱离本公开文本的真实范围和精神的情况下实践这些变化,并且这些变化旨在落入本公开文本的范围内。

[0842] 序列

[0843]

SEQ ID NO.	序列	描述
1	ESKYGPPCPPCP	间隔子 (IgG4 铰链) (aa) 智人
2	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCCCT	间隔子 (IgG4 铰链) (nt) 智人
3	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	铰链-CH3 间 隔子 智人
4	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	铰 链 -CH2-CH3 间 隔子 智人
5	RWPESPKAQASSVPTAQPAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKE KEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSD LKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSL WNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAPVKLSLNLASSDPPEAA SWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWS VLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSIVTDH	IgD- 铰 链 -Fc 智人
6	LEGGGEGRGSL LTCGDVEENPGPR	T2A 人工
7	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTISGDLHILPVAFRGDSFT HTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRK QHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVLIISGNKNLCYANTINWKKL FGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNV SRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDN CIQCAHYIDGPHCVKTCFAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYG CTGPGLEGCP TNGPKIPSIATGMV GALLLLLVVALGIGLFM	tEGFR 人工
8	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (登录号 P10747 的 氮

[0844]

		基 酸 153-179) 智人
9	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPFGPSKP FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (登录号 P10747 的 氨 基 酸 114-179) 智人
10	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 (P10747 的 氨 基 酸 180-220) 智人
11	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 (LL 到 GG) 智人
12	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCEL	4-1BB (Q07011.1 的 氨 基 酸 214-255) 智人
13	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEGKP RRKNPQEGLYN ELQKDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALP PR	CD3ζ 智人
14	RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEGKP RRKNPQEGLYN ELQKDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALP PR	CD3ζ 智人
15	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEGKP RRKNPQEGLYN ELQKDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALP PR	CD3ζ 智人
16	PGGG- (SGGG) 5-P-, 其中P是脯氨酸, G是甘氨酸, 并且S是丝氨酸	接头
17	GSADDAKKDAAKKGKS	接头
18	MAAVILESIFLKRSQQKKKTSPLNFKKRLFLLTVHKLSYYEYDFERGRR GSKKGSIDVEKITCVETVVPEKNPPPERQIPRRGEESSEMEQISIIERF	酪氨酸蛋白激 酶BTK

[0845]

	PYPFQVVYDEGPLYVFSPTTEELRKRWIHQ LKNVIRYNSDLVQKYHPCFW IDGQYLCCSQ TAKNAMGCQILENRNGSLKPGSSHRKTKKPLPPTPEEDQ ILKKPLPPEPAAAPVSTSELKKVVALYDYM PMNANDLQLRKGEYFILE ESNLPWWRARDKNGQEGYIPSNYVTEAEDSIEMYEWYSKHMTRSQAQQL LKQEGKEGGFIVRDSSKAGKYTVSVFAKSTGDPQG VIRHYVVCSTPQSQ YYLAEKHLFSTIPELINYHQHNSAGLISRLKYPVSQQNK NAPSTAGLGY GSWEIDPKDLTFLKELGTGQFGVVKYGKWRGQYDVAIKMIKEGSMSEDE FIEEAKVMMNLSHEKLVQLYGVCTKQRPIFIITEY MANGCLLNYLREMR HRFQTQQLLEMCKDVCEAMEYLESKQFLHRDLAARNCLVNDQG VVKVSD FGLSRYVLDDEYTSSVGSKFPVRWSPPEVLMYSKFSSKSDIWA FGVL MW EIYSLGKMPYERFTNSETAEHIAQGLRLYRPHLASEKVYTIMYSCWHEK ADERPTFKILLSNILDVMDEES	智人
19	AACTGAGTGGCTGTGAAAGGGTGGGGTTTGCTCAGACTGTCCTTCCTCT CTGGACTGTAAGAATATGTCTCCAGGGCCAGTGTCTGCTGCGATCGAGT CCCACCTTCCAAGTCCTGGCATCTCAATGCATCTGGGAAGCTACCTGCA TTAAGTCAGGACTGAGCACACAGGTGAACTCCAGAAAGAAGAAGCTATG GCCGCAGTGATTCTGGAGAGCATCTTTCTGAAGCGATCCCAACAGAAAA AGAAAAACATCACCTCTAAACTTCAAGAAGCGCCTGTTTCTCTTGACCGT GCACAAACTCTCCTACTATGAGTATGACTTTGAACGTGGGAGAAGAGGC AGTAAGAAGGGTTCAATAGATGTTGAGAAGATCACTTGTGTTGAAACAG TG GTTCTGAAAAAATCCTCCTCCAGAAAGACAGATTCCGAGAAGAGG TGAAGAGTCCAGTGAAATGGAGCAAATTTCAATCATTGAAAGGTTCCCT TATCCCTTCCAGGTTGTATATGATGAAGGGCCTCTCTACGTCTTCTCCC CAACTGAAGAACTAAGGAAGCGGTGGATTACCAGCTCAAAAACGTAAT CCGGTACAACAGTGATCTGGTTCAGAAATATCACCTTGCTTCTGGATC GATGGGCAGTATCTCTGCTGCTCTCAGACAGCCAAAAATGCTATGGGCT GCCAAATTTTGGAGAACAGGAATGGAAGCTTAAACCTGGGAGTTCTCA CCGGAAGACAAAAAGCCTCTTCCCCAACGCTGAGGAGGACCAGATC TTGAAAAAGCCACTACCGCCTGAGCCAGCAGCAGCACCAGTCTCCACAA GTGAGCTGAAAAAGGTTGTGGCCCTTTATGATTACATGCCAATGAATGC AAATGATCTACAGCTGCGGAAGGGTGATGAATATTTTATCTTGAGAGAA AGCAACTTACCATGGTGGAGAGCACGAGATAAAAAATGGGCAGGAAGGCT ACATTCTAGTAACTATGTCACTGAAGCAGAAGACTCCATAGAAATGTA TGAGTGGTATTCCAAACACATGACTCGGAGTCAGGCTGAGCAACTGCTA AAGCAAGAGGGGAAAGAAGGAGGTTTCATTGTCAGAGACTCCAGCAAAG CTGGCAAATATACAGTGTCTGTGTTTGCTAAATCCACAGGGGACCCTCA AGGGGTGATACGTCATTATGTTGTGTGTTCCACACCTCAGAGCCAGTAT TACCTGGCTGAGAAGCACCTTTTCAGCACCATCCCTGAGCTCATTA ACT ACCATCAGCACAACTCTGCAGGACTCATATCCAGGCTCAAATATCCAGT	酪氨酸蛋白激 酶BTK 智人

[0846]

GTCTCAACAAAACAAGAATGCACCTTCCACTGCAGGCCTGGGATACGGA
TCATGGGAAATTGATCCAAAGGACCTGACCTTCTTGAAGGAGCTGGGGA
CTGGACAATTTGGGGTAGTGAAGTATGGGAAATGGAGAGGCCAGTACGA
CGTGGCCATCAAGATGATCAAAGAAGGCTCCATGTCTGAAGATGAATTC
ATTGAAGAAGCCAAAGTCATGATGAATCTTTCCCATGAGAAGCTGGTGC
AGTTGTATGGCGTCTGCACCAAGCAGCGCCCCATCTTCATCATCACTGA
GTACATGGCCAATGGCTGCCTCCTGAACTACCTGAGGGAGATGCGCCAC
CGCTTCCAGACTCAGCAGCTGCTAGAGATGTGCAAGGATGTCTGTGAAG
CCATGGAATACCTGGAGTCAAAGCAGTTCCTTCACCGAGACCTGGCAGC
TCGAAACTGTTTGGTAAACGATCAAGGAGTTGTTAAAGTATCTGATTTTC
GGCCTGTCCAGGTATGTCTGGATGATGAATACACAAGCTCAGTAGGCT
CCAAATTTCCAGTCCGGTGGTCCCCACCGGAAGTCCTGATGTATAGCAA
GTTTACGAGCAAAATCTGACATTTGGGCTTTTGGGGTTTGTATGTGGGAA
ATTTACTCCCTGGGGAAGATGCCATATGAGAGATTTACTAACAGTGAGA
CTGCTGAACACATTGCCCAAGGCCTACGTCTCTACAGGCCTCATCTGGC
TTCAGAGAAGGTATATACCATCATGTACAGTTGCTGGCATGAGAAAGCA
GATGAGCGTCCCACTTTCAAAATTCTTCTGAGCAATATTCTAGATGTCA
TGGATGAAGAATCCTGAGCTCGCCAATAAGCTTCTTGGTTCTACTTCTC
TTCTCCACAAGCCCCAATTTCACTTTCTCAGAGGAAATCCCAAGCTTAG
GAGCCCTGGAGCCTTTGTGCTCCCACTCAATACAAAAGGCCCTCTCT
ACATCTGGGAATGCACCTCTTCTTTGATTCCCTGGGATAGTGGCTTCTG
AGCAAAGGCCAAGAAATTATTGTGCCTGAAATTTCCCGAGAGAATTAAG
ACAGACTGAATTTGCGATGAAAAATTTTTTTAGGAGGGAGGATGTAAAT
AGCCGCACAAAGGGGTCCAACAGCTCTTTGAGTAGGCATTTGGTAGAGC
TTGGGGGTGTGTGTGTGGGGGTGGACCGAATTTGGCAAGAATGAAATGG
TGTCATAAAGATGGGAGGGGAGGGTGTTTTGATAAAATAAAATTACTAG
AAAGCTTGAAAGTC

序列表

<110> PORTS, Michael

QIN, Jim

SALMON, Ruth Amanda

BATUREVYCH, Alex

<120> 用于与激酶抑制剂组合使用治疗性T细胞的方法和组合物

<130> 735042008940

<140> 尚未分配

<141> 同时随同提交

<150> 62/581,644

<151> 2017-11-03

<150> 62/429,732

<151> 2016-12-03

<160> 19

<170> Windows 4.0版的FastSEQ

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> 间隔子 (IgG4铰链)

<400> 1

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 2

<211> 36

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<223> 间隔子 (IgG4铰链)

<400> 2

gaatctaagt acggaccgcc ctgccccct tgcct 36

<210> 3

<211> 119

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> 铰链-CH3间隔子

<400> 3

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Gly Gln Pro Arg
 1 5 10 15
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 20 25 30
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 35 40 45
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 50 55 60
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 65 70 75 80
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 85 90 95
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 100 105 110
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 115

<210> 4

<211> 229

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> 铰链-CH2-CH3间隔子

<400> 4

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
 1 5 10 15
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 20 25 30
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 35 40 45
 Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 50 55 60
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 65 70 75 80
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 85 90 95
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
 100 105 110
 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro

115	120	125
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln		
130	135	140
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
145	150	155
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		
165	170	175
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu		
180	185	190
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
195	200	205
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
210	215	220
Leu Ser Leu Gly Lys		
225		
<210> 5		
<211> 282		
<212> PRT		
<213> 智人		
<220>		
<223> IgD-铰链-Fc		
<400> 5		
Arg Trp Pro Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro Thr Ala		
1	5	10
Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala		
20	25	30
Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys		
35	40	45
Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro		
50	55	60
Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Tyr Leu Leu Thr Pro Ala Val Gln		
65	70	75
Asp Leu Trp Leu Arg Asp Lys Ala Thr Phe Thr Cys Phe Val Val Gly		
85	90	95
Ser Asp Leu Lys Asp Ala His Leu Thr Trp Glu Val Ala Gly Lys Val		
100	105	110
Pro Thr Gly Gly Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Arg His Ser Asn Gly		
115	120	125
Ser Gln Ser Gln His Ser Arg Leu Thr Leu Pro Arg Ser Leu Trp Asn		

130	135	140
Ala Gly Thr Ser Val	Thr Cys Thr Leu Asn His	Pro Ser Leu Pro Pro
145	150	155
Gln Arg Leu Met Ala	Leu Arg Glu Pro Ala Ala	Gln Ala Pro Val Lys
165	170	175
Leu Ser Leu Asn Leu	Leu Ala Ser Ser Asp	Pro Pro Glu Ala Ala Ser
180	185	190
Trp Leu Leu Cys Glu	Val Ser Gly Phe Ser	Pro Pro Asn Ile Leu Leu
195	200	205
Met Trp Leu Glu Asp	Gln Arg Glu Val Asn	Thr Ser Gly Phe Ala Pro
210	215	220
Ala Arg Pro Pro Pro	Gln Pro Gly Ser Thr	Thr Phe Trp Ala Trp Ser
225	230	235
Val Leu Arg Val Pro	Ala Pro Pro Ser Pro	Gln Pro Ala Thr Tyr Thr
245	250	255
Cys Val Val Ser His	Glu Asp Ser Arg Thr	Leu Leu Asn Ala Ser Arg
260	265	270
Ser Leu Glu Val Ser	Tyr Val Thr Asp	His
275	280	

<210> 6

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> T2A

<400> 6

Leu Glu Gly Gly Gly	Glu Gly Arg Gly	Ser Leu Leu Thr	Cys Gly Asp
1	5	10	15
Val Glu Glu Asn Pro	Gly Pro Arg		
20			

<210> 7

<211> 335

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> tEGFR

<400> 7

Arg Lys Val Cys Asn	Gly Ile Gly Ile	Gly Glu Phe Lys	Asp Ser Leu
1	5	10	15

Ser	Ile	Asn	Ala	Thr	Asn	Ile	Lys	His	Phe	Lys	Asn	Cys	Thr	Ser	Ile
20				25				30							
Ser	Gly	Asp	Leu	His	Ile	Leu	Pro	Val	Ala	Phe	Arg	Gly	Asp	Ser	Phe
35				40				45							
Thr	His	Thr	Pro	Pro	Leu	Asp	Pro	Gln	Glu	Leu	Asp	Ile	Leu	Lys	Thr
50				55				60							
Val	Lys	Glu	Ile	Thr	Gly	Phe	Leu	Leu	Ile	Gln	Ala	Trp	Pro	Glu	Asn
65				70				75				80			
Arg	Thr	Asp	Leu	His	Ala	Phe	Glu	Asn	Leu	Glu	Ile	Ile	Arg	Gly	Arg
85				90				95							
Thr	Lys	Gln	His	Gly	Gln	Phe	Ser	Leu	Ala	Val	Val	Ser	Leu	Asn	Ile
100				105				110							
Thr	Ser	Leu	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Lys	Glu	Ile	Ser	Asp	Gly	Asp	Val
115				120				125							
Ile	Ile	Ser	Gly	Asn	Lys	Asn	Leu	Cys	Tyr	Ala	Asn	Thr	Ile	Asn	Trp
130				135				140							
Lys	Lys	Leu	Phe	Gly	Thr	Ser	Gly	Gln	Lys	Thr	Lys	Ile	Ile	Ser	Asn
145				150				155				160			
Arg	Gly	Glu	Asn	Ser	Cys	Lys	Ala	Thr	Gly	Gln	Val	Cys	His	Ala	Leu
165				170				175							
Cys	Ser	Pro	Glu	Gly	Cys	Trp	Gly	Pro	Glu	Pro	Arg	Asp	Cys	Val	Ser
180				185				190							
Cys	Arg	Asn	Val	Ser	Arg	Gly	Arg	Glu	Cys	Val	Asp	Lys	Cys	Asn	Leu
195				200				205							
Leu	Glu	Gly	Glu	Pro	Arg	Glu	Phe	Val	Glu	Asn	Ser	Glu	Cys	Ile	Gln
210				215				220							
Cys	His	Pro	Glu	Cys	Leu	Pro	Gln	Ala	Met	Asn	Ile	Thr	Cys	Thr	Gly
225				230				235				240			
Arg	Gly	Pro	Asp	Asn	Cys	Ile	Gln	Cys	Ala	His	Tyr	Ile	Asp	Gly	Pro
245				250				255							
His	Cys	Val	Lys	Thr	Cys	Pro	Ala	Gly	Val	Met	Gly	Glu	Asn	Asn	Thr
260				265				270							
Leu	Val	Trp	Lys	Tyr	Ala	Asp	Ala	Gly	His	Val	Cys	His	Leu	Cys	His
275				280				285							
Pro	Asn	Cys	Thr	Tyr	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Gly	Leu	Glu	Gly	Cys	Pro
290				295				300							
Thr	Asn	Gly	Pro	Lys	Ile	Pro	Ser	Ile	Ala	Thr	Gly	Met	Val	Gly	Ala
305				310				315				320			
Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Val	Ala	Leu	Gly	Ile	Gly	Leu	Phe	Met	

325	330	335
<210> 8		
<211> 27		
<212> PRT		
<213> 智人		
<220>		
<223> CD28		
<300>		
<308> UniProt登录号P10747		
<309> 1989-07-01		
<400> 8		
Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu		
1 5 10 15		
Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val		
20 25		
<210> 9		
<211> 66		
<212> PRT		
<213> 智人		
<220>		
<223> CD28		
<300>		
<308> UniProt登录号P10747		
<309> 1989-07-01		
<400> 9		
Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn		
1 5 10 15		
Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu		
20 25 30		
Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly		
35 40 45		
Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe		
50 55 60		
Trp Val		
65		
<210> 10		
<211> 41		
<212> PRT		
<213> 智人		

<220>

<223> CD28

<300>

<308> UniProt登录号P10747

<309> 1989-07-01

<400> 10

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr

1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro

20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

35 40

<210> 11

<211> 41

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> CD28

<400> 11

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr

1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro

20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

35 40

<210> 12

<211> 42

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> 4-1BB

<300>

<308> UniProt登录号Q07011.1

<309> 1995-02-01

<400> 12

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met

1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe

20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
35 40

<210> 13

<211> 112

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> CD3ζ

<400> 13

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
1 5 10 15
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
50 55 60
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65 70 75 80
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

<210> 14

<211> 112

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> CD3ζ

<400> 14

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Glu Pro Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
1 5 10 15
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
50 55 60
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg

65	70	75	80
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala			
	85	90	95
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
100	105	110	

<210> 15

<211> 112

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> CD3ζ

<400> 15

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly
1 5 10 15
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<220>

<221> 重复

<222> (5) ... (9)

<223> SGGGG重复5次

<400> 16

Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Pro
1 5 10

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 17

Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Gly Lys

1 5 10 15

Ser

<210> 18

<211> 659

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> 酪氨酸蛋白激酶BTK

<400> 18

Met Ala Ala Val Ile Leu Glu Ser Ile Phe Leu Lys Arg Ser Gln Gln

1 5 10 15

Lys Lys Lys Thr Ser Pro Leu Asn Phe Lys Lys Arg Leu Phe Leu Leu

20 25 30

Thr Val His Lys Leu Ser Tyr Tyr Glu Tyr Asp Phe Glu Arg Gly Arg

35 40 45

Arg Gly Ser Lys Lys Gly Ser Ile Asp Val Glu Lys Ile Thr Cys Val

50 55 60

Glu Thr Val Val Pro Glu Lys Asn Pro Pro Pro Glu Arg Gln Ile Pro

65 70 75 80

Arg Arg Gly Glu Glu Ser Ser Glu Met Glu Gln Ile Ser Ile Ile Glu

85 90 95

Arg Phe Pro Tyr Pro Phe Gln Val Val Tyr Asp Glu Gly Pro Leu Tyr

100 105 110

Val Phe Ser Pro Thr Glu Glu Leu Arg Lys Arg Trp Ile His Gln Leu

115 120 125

Lys Asn Val Ile Arg Tyr Asn Ser Asp Leu Val Gln Lys Tyr His Pro

130 135 140

Cys Phe Trp Ile Asp Gly Gln Tyr Leu Cys Cys Ser Gln Thr Ala Lys

145 150 155 160

Asn Ala Met Gly Cys Gln Ile Leu Glu Asn Arg Asn Gly Ser Leu Lys

165 170 175

Pro Gly Ser Ser His Arg Lys Thr Lys Lys Pro Leu Pro Pro Thr Pro		
180	185	190
Glu Glu Asp Gln Ile Leu Lys Lys Pro Leu Pro Pro Glu Pro Ala Ala		
195	200	205
Ala Pro Val Ser Thr Ser Glu Leu Lys Lys Val Val Ala Leu Tyr Asp		
210	215	220
Tyr Met Pro Met Asn Ala Asn Asp Leu Gln Leu Arg Lys Gly Asp Glu		
225	230	235
Tyr Phe Ile Leu Glu Glu Ser Asn Leu Pro Trp Trp Arg Ala Arg Asp		
245	250	255
Lys Asn Gly Gln Glu Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Thr Glu Ala		
260	265	270
Glu Asp Ser Ile Glu Met Tyr Glu Trp Tyr Ser Lys His Met Thr Arg		
275	280	285
Ser Gln Ala Glu Gln Leu Leu Lys Gln Glu Gly Lys Glu Gly Gly Phe		
290	295	300
Ile Val Arg Asp Ser Ser Lys Ala Gly Lys Tyr Thr Val Ser Val Phe		
305	310	315
Ala Lys Ser Thr Gly Asp Pro Gln Gly Val Ile Arg His Tyr Val Val		
325	330	335
Cys Ser Thr Pro Gln Ser Gln Tyr Tyr Leu Ala Glu Lys His Leu Phe		
340	345	350
Ser Thr Ile Pro Glu Leu Ile Asn Tyr His Gln His Asn Ser Ala Gly		
355	360	365
Leu Ile Ser Arg Leu Lys Tyr Pro Val Ser Gln Gln Asn Lys Asn Ala		
370	375	380
Pro Ser Thr Ala Gly Leu Gly Tyr Gly Ser Trp Glu Ile Asp Pro Lys		
385	390	395
Asp Leu Thr Phe Leu Lys Glu Leu Gly Thr Gly Gln Phe Gly Val Val		
405	410	415
Lys Tyr Gly Lys Trp Arg Gly Gln Tyr Asp Val Ala Ile Lys Met Ile		
420	425	430
Lys Glu Gly Ser Met Ser Glu Asp Glu Phe Ile Glu Glu Ala Lys Val		
435	440	445
Met Met Asn Leu Ser His Glu Lys Leu Val Gln Leu Tyr Gly Val Cys		
450	455	460
Thr Lys Gln Arg Pro Ile Phe Ile Ile Thr Glu Tyr Met Ala Asn Gly		
465	470	475
Cys Leu Leu Asn Tyr Leu Arg Glu Met Arg His Arg Phe Gln Thr Gln		

485	490	495
Gln Leu Leu Glu Met Cys Lys Asp Val Cys Glu Ala Met Glu Tyr Leu		
500	505	510
Glu Ser Lys Gln Phe Leu His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Leu		
515	520	525
Val Asn Asp Gln Gly Val Val Lys Val Ser Asp Phe Gly Leu Ser Arg		
530	535	540
Tyr Val Leu Asp Asp Glu Tyr Thr Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Pro		
545	550	555
Val Arg Trp Ser Pro Pro Glu Val Leu Met Tyr Ser Lys Phe Ser Ser		
565	570	575
Lys Ser Asp Ile Trp Ala Phe Gly Val Leu Met Trp Glu Ile Tyr Ser		
580	585	590
Leu Gly Lys Met Pro Tyr Glu Arg Phe Thr Asn Ser Glu Thr Ala Glu		
595	600	605
His Ile Ala Gln Gly Leu Arg Leu Tyr Arg Pro His Leu Ala Ser Glu		
610	615	620
Lys Val Tyr Thr Ile Met Tyr Ser Cys Trp His Glu Lys Ala Asp Glu		
625	630	635
Arg Pro Thr Phe Lys Ile Leu Leu Ser Asn Ile Leu Asp Val Met Asp		
645	650	655

Glu Glu Ser

<210> 19

<211> 2611

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<223> 酪氨酸蛋白激酶BTK

<400> 19

```

aactgagtgg ctgtgaaagg gtgggggtttg ctcagactgt ccttcctctc tggactgtaa 60
gaatatgtct ccagggccag tgtctgctgc gatcgagtcc caccttccaa gtcttgcat 120
ctcaatgcat ctgggaagct acctgcatta agtcaggact gagcacacag gtgaactcca 180
gaaagaagaa gctatggccg cagtgattct ggagagcatc tttctgaagc gatcccaaca 240
gaaaaagaaa acatcacctc taaacttcaa gaagcgctg tttctcttga ccgtgcacaa 300
actctcctac tatgagtatg actttgaacg tgggagaaga ggcagtaaga agggttcaat 360
agatgttgag aagatcactt gtgttgaaac agtggttcct gaaaaaaatc ctctccaga 420
aagacagatt ccgagaagag gtgaagagtc cagtgaatg gagcaaattt caatcattga 480
aaggttccct tatcccttcc aggttgata tgatgaaggg cctctctacg tcttctcccc 540
aactgaagaa ctaaggaagc ggtggattca ccagctcaaa aacgtaatcc ggtacaacag 600

```

```

tgatctgggt cagaaatata acccttgctt ctggatcgat gggcagtata tctgctgctc 660
tcagacagcc aaaaatgcta tgggctgcca aattttggag aacaggaatg gaagcttaaa 720
acctgggagt tctcaccgga agacaaaaaa gcctcttccc ccaacgcctg aggaggacca 780
gatcttgaaa aagccactac cgcctgagcc agcagcagca ccagtctcca caagttagct 840
gaaaaagggt gtggcccttt atgattacat gccaatgaat gcaaatgata tacagctgcg 900
gaagggtgat gaatatctta tcttggagga aagcaactta ccatggtgga gaggcacgaga 960
taaaaatggg caggaaggct acattcctag taactatgtc actgaagcag aagactccat 1020
agaaatgtat gagggttatt ccaaacacat gactcggagt caggctgagc aactgctaaa 1080
gcaagagggg aaagaaggag gtttcattgt cagagactcc agcaaagctg gcaaatatac 1140
agtgtctgtg tttgctaaat ccacagggga cctcaaggg gtgatacgta attatgttgt 1200
gtgttccaca cctcagagcc agtattacct ggctgagaag caccttttca gcaccatccc 1260
tgagctcatt aactaccata agcacaactc tgcaggactc atatccaggc tcaaatatcc 1320
agtgtctcaa caaaacaaga atgcaccttc cactgcaggc ctgggatacg gatcatggga 1380
aattgatcca aaggacctga cttctctgaa ggagctgggg actggacaat ttggggtagt 1440
gaagtatggg aaatggagag gccagtacga cgtggccatc aagatgatca aagaaggctc 1500
catgtctgaa gatgaattca ttgaagaagc caaagtcata atgaatcttt cccatgagaa 1560
gctggtgcag ttgtatggcg tctgcaccaa gcagcgcccc atcttcatca tcaactagta 1620
catggccaat ggctgcctcc tgaactacct gagggagatg cgccaccgct tccagactca 1680
gcagctgcta gagatgtgca aggatgtctg tgaagccatg gaatacctgg agtcaaagca 1740
gttccttcac cgagacctgg cagctcgaaa ctgttttgta aacgatcaag gagttgttaa 1800
agtatctgat ttcggcctgt ccaggtatgt cctggatgat gaatacaca gctcagtagg 1860
ctccaaatct ccagtcagggt ggtccccacc ggaagtcttg atgtatagca agttcagcag 1920
caaatctgac atttgggctt ttgggggttt gatgtgggaa atttactccc tggggaagat 1980
gccatatgag agatttacta acagtgagac tgctgaacac attgccaag gcctacgtct 2040
ctacaggcct catctggctt cagagaaggat atataccata atgtacagtt gctggcatga 2100
gaaagcagat gagcgtccca ctttcaaaat tcttctgagc aatattctag atgtcatgga 2160
tgaagaatcc tgagctcgcc aataagcttc ttggttctac ttctcttctc cacaagcccc 2220
aatttcactt tctcagagga aatcccaagc ttaggagccc tggagccttt gtgctccac 2280
tcaatacaaaa aaggccccctc tctacatctg ggaatgcacc tcttctttga ttccctggga 2340
tagtggcttc tgagcaaagg ccaagaaatt attgtgcctg aaatttcccg agagaattaa 2400
gacagactga atttgcatg aaaatatctt ttaggagggg ggatgtaaat agccgcacaa 2460
aggggtccaa cagctctttg agtaggcatt tggtagagct tgggggtgtg tgtgtggggg 2520
tggaaccgaat ttggcaagaa tgaaatggtg tcataaagat gggagggggg ggtgttttga 2580
taaaaataaaa ttactagaaa gcttgaaagt c 2611

```

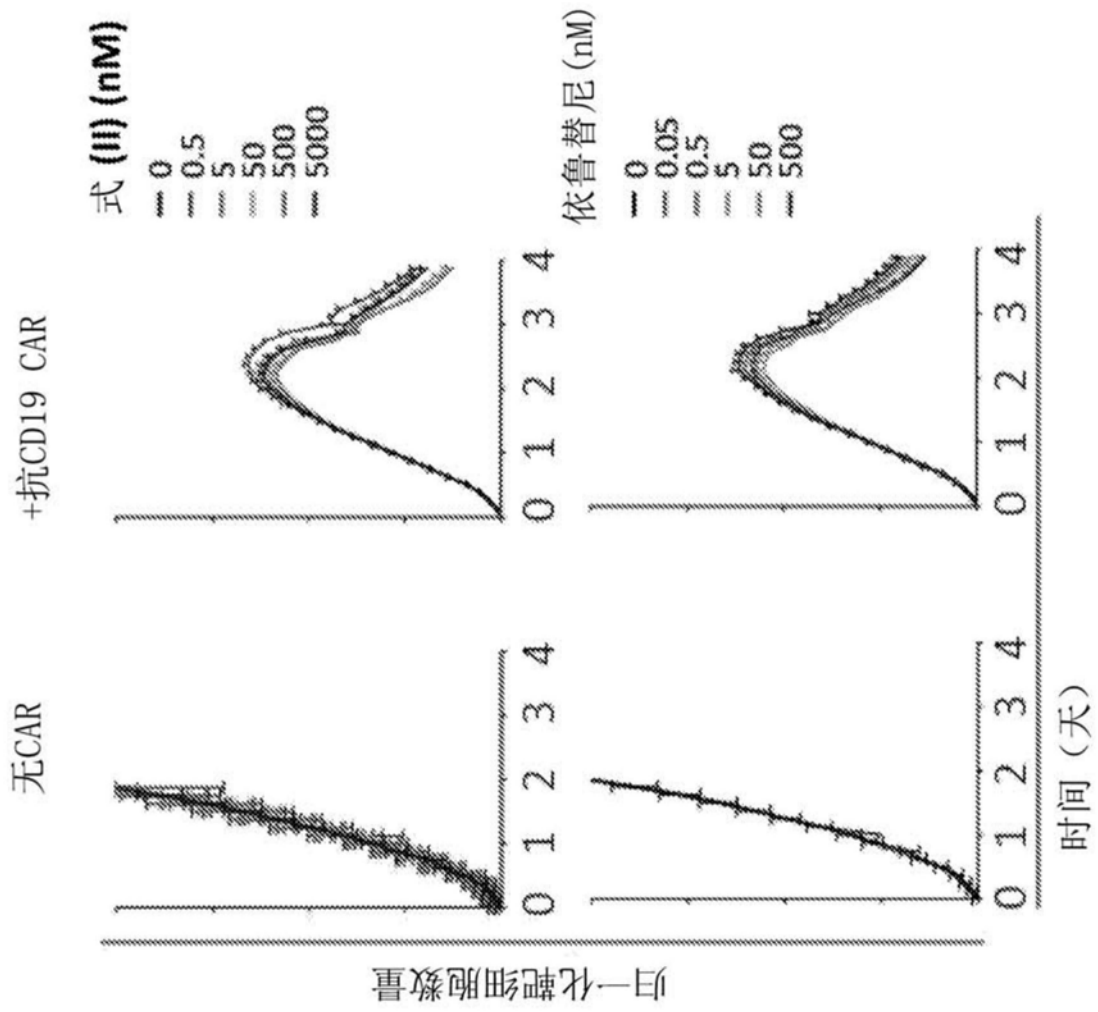


图1A

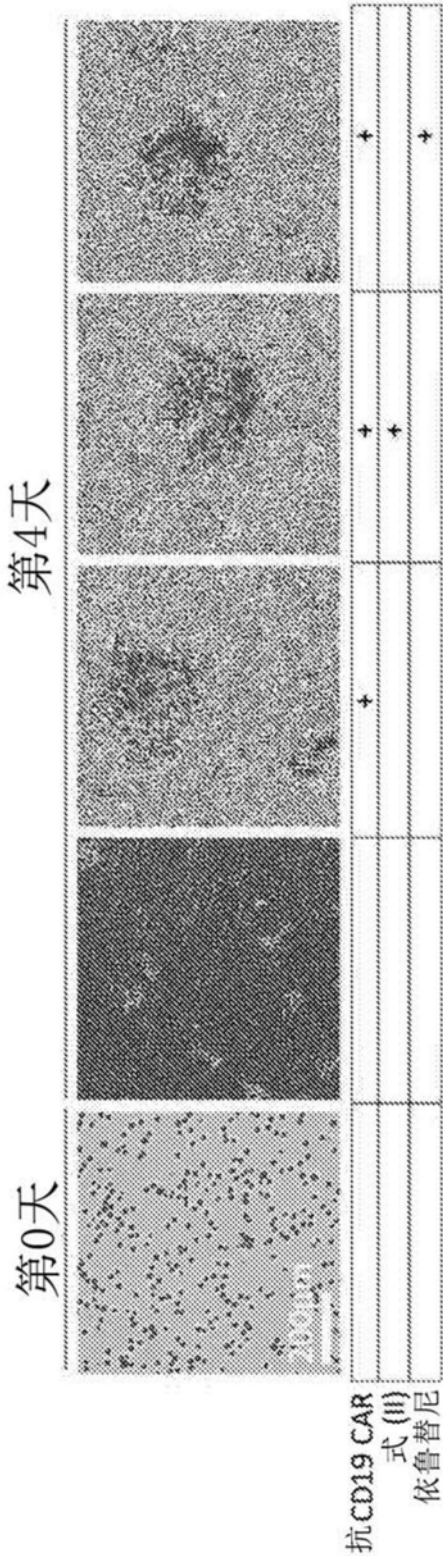


图1B

依鲁替尼

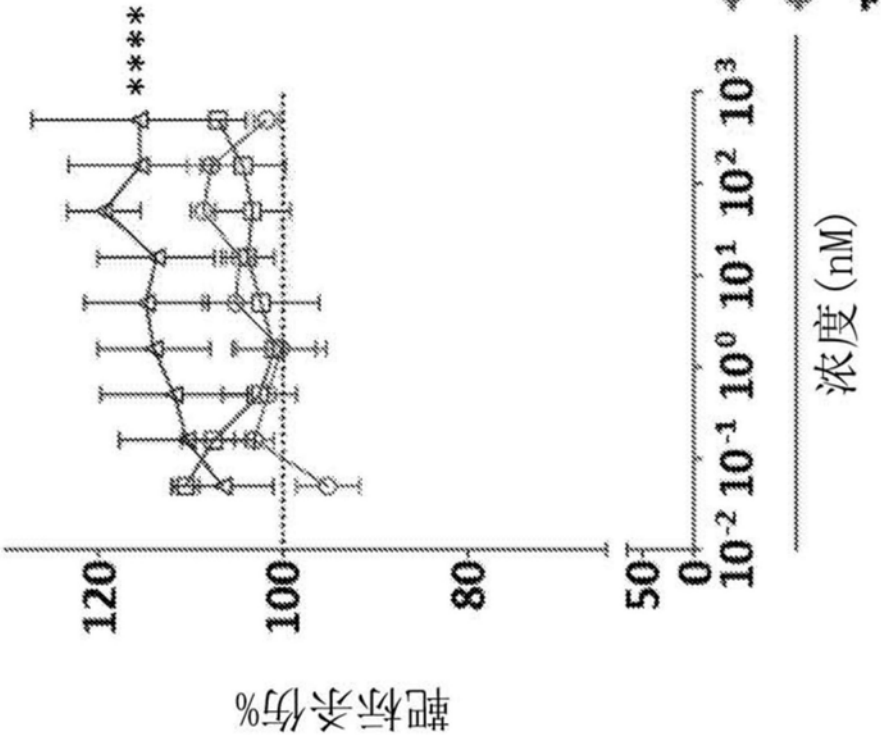


图1C

式(III)

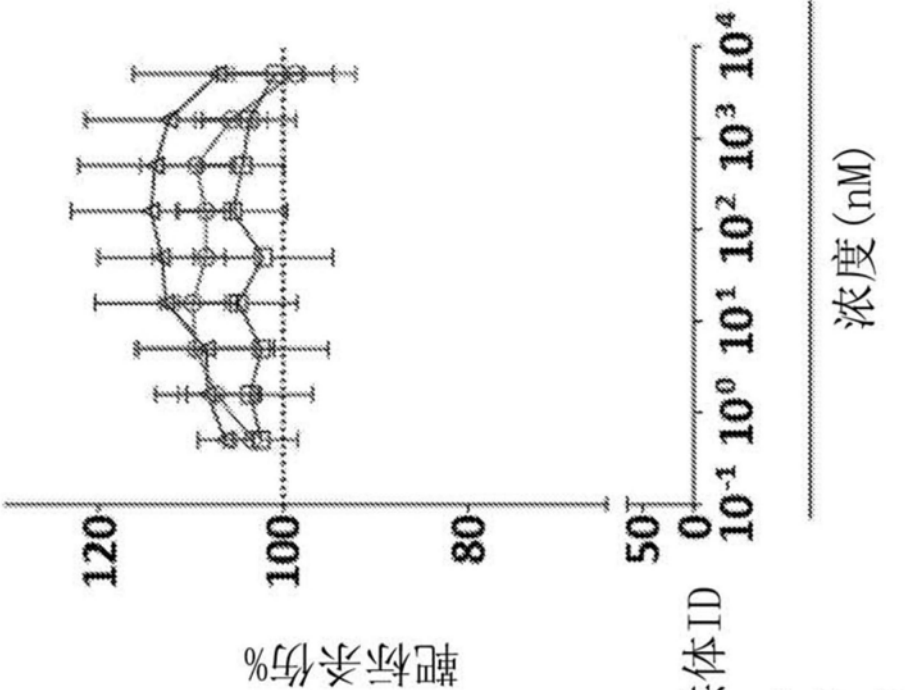


图1D

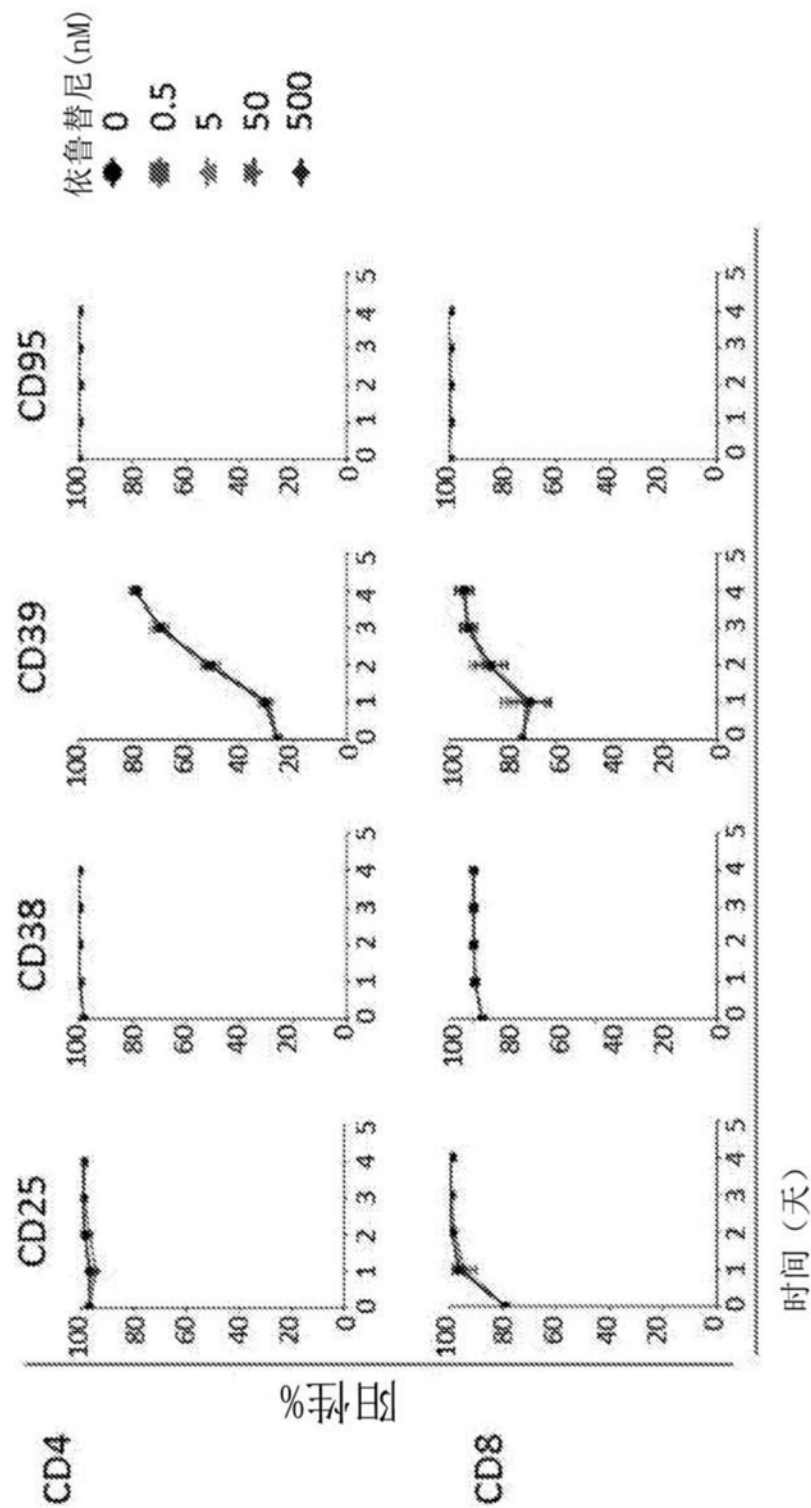


图2A

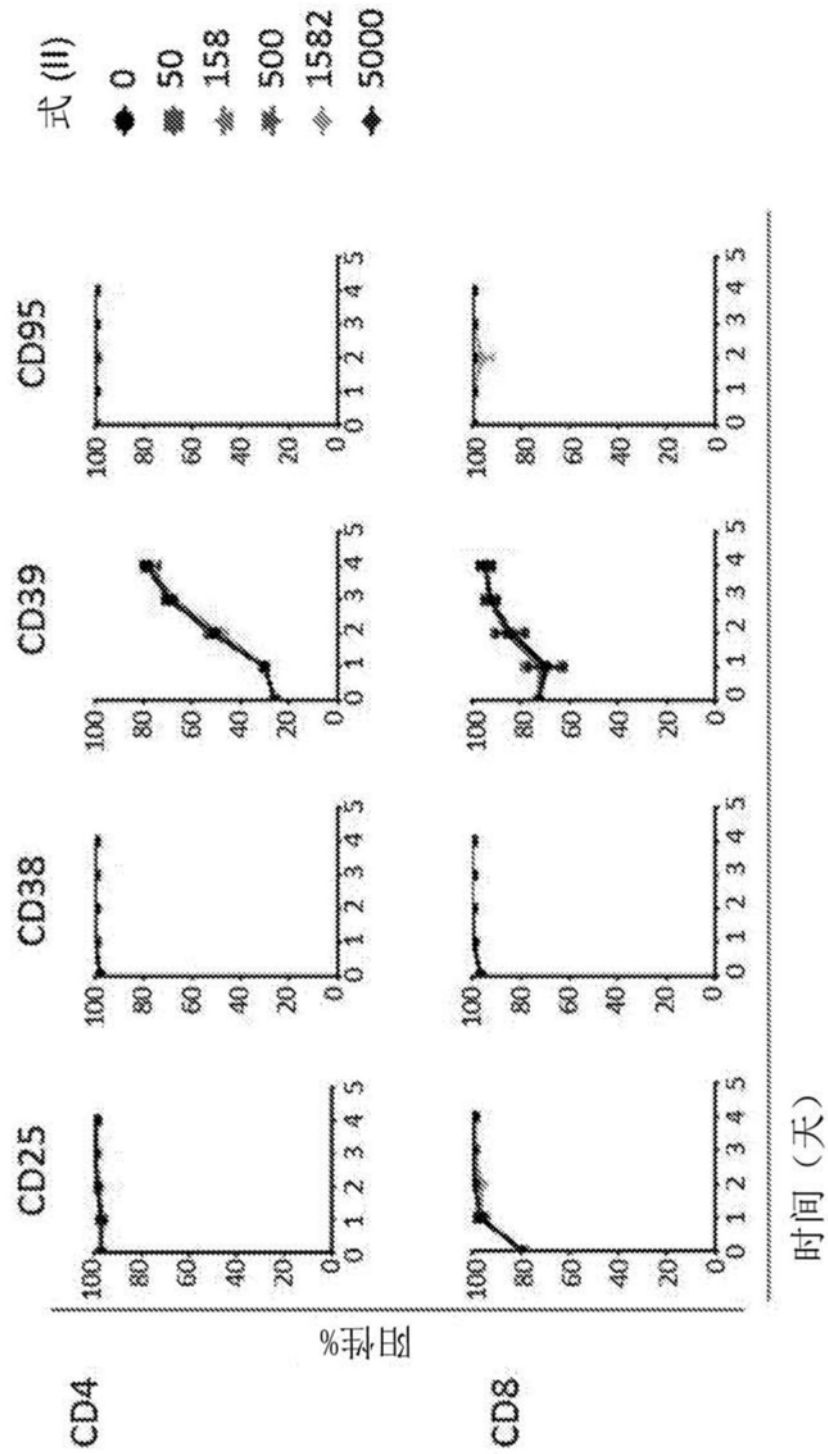


图2B

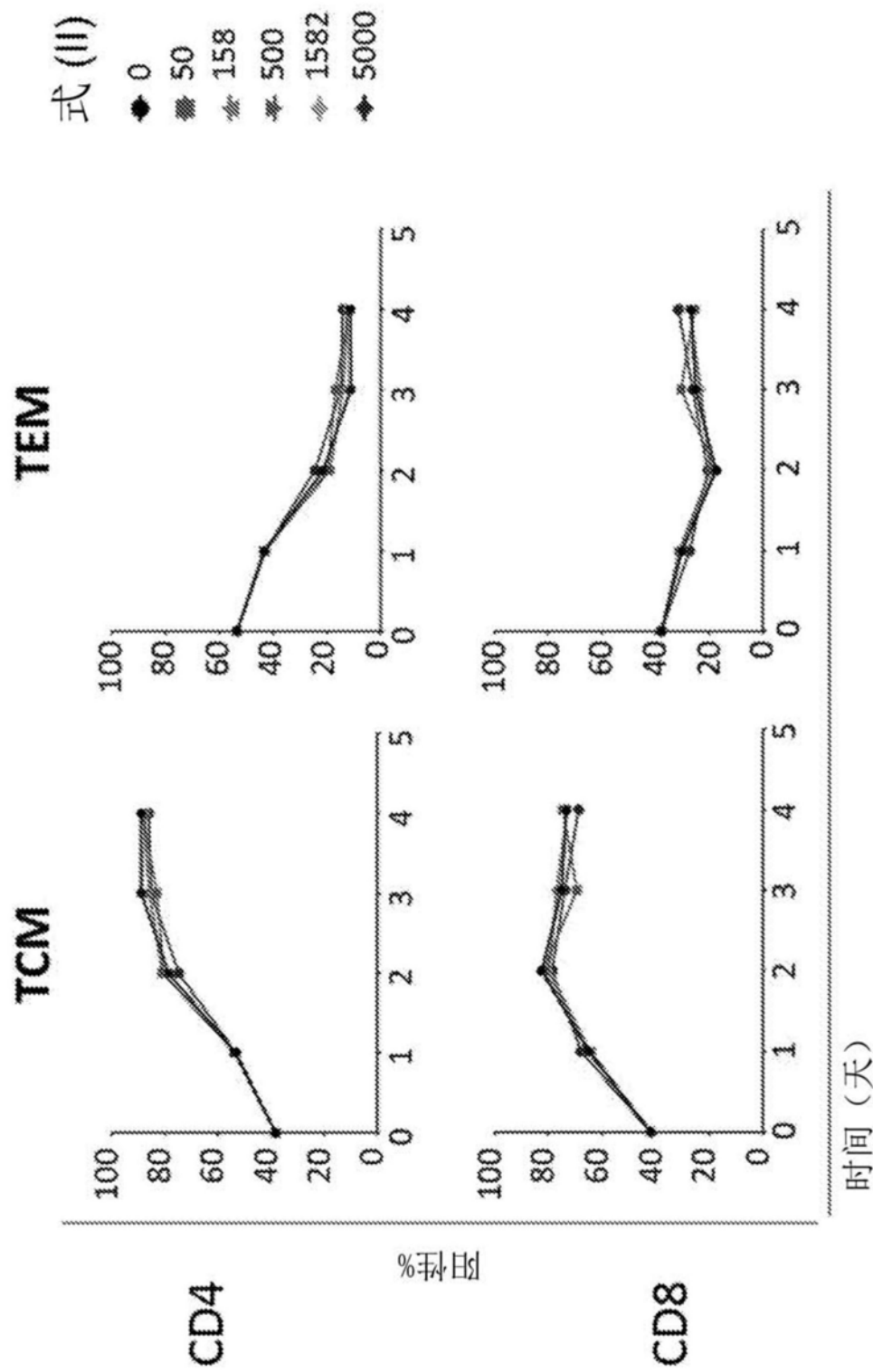


图2C

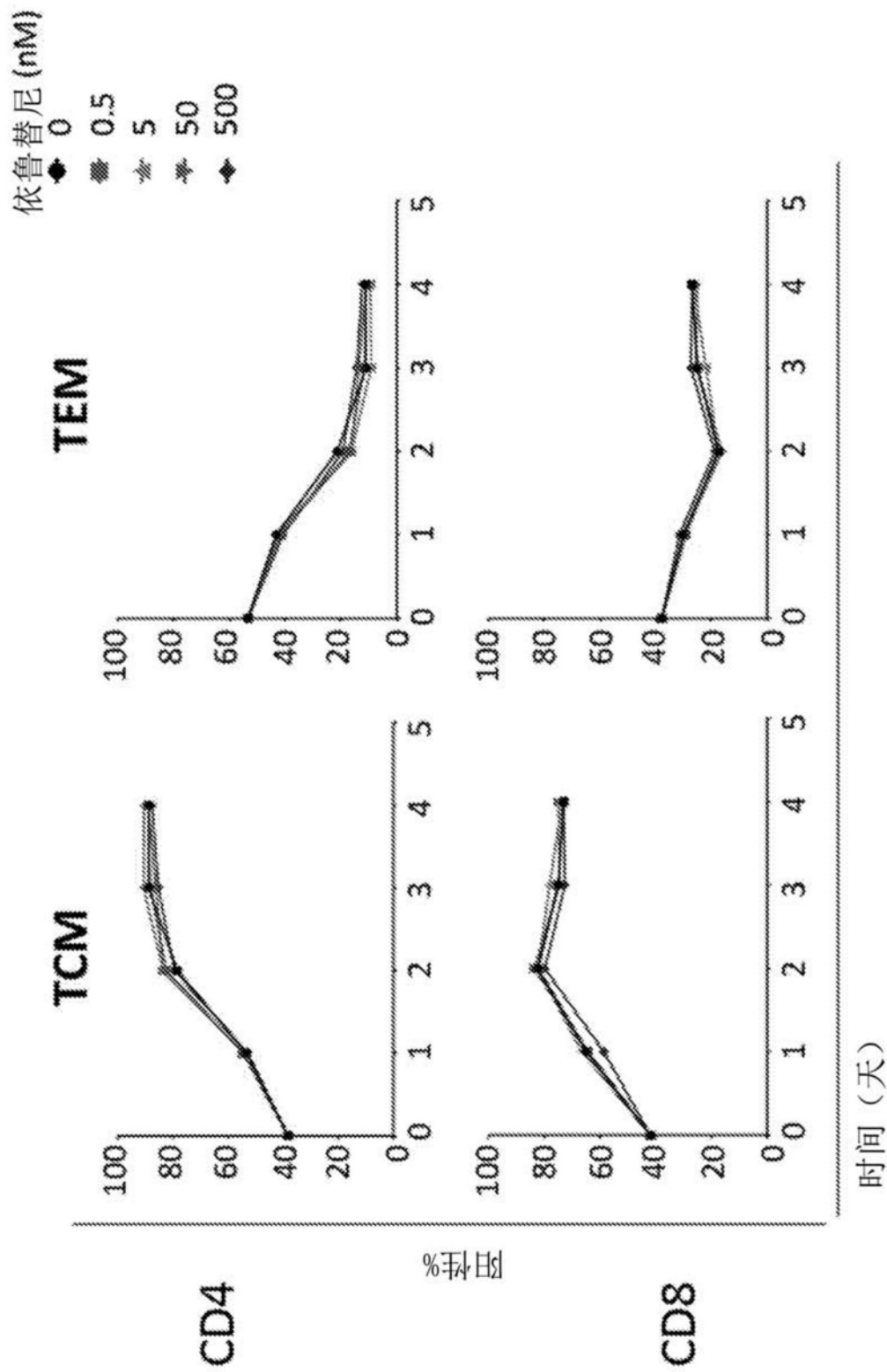


图2D

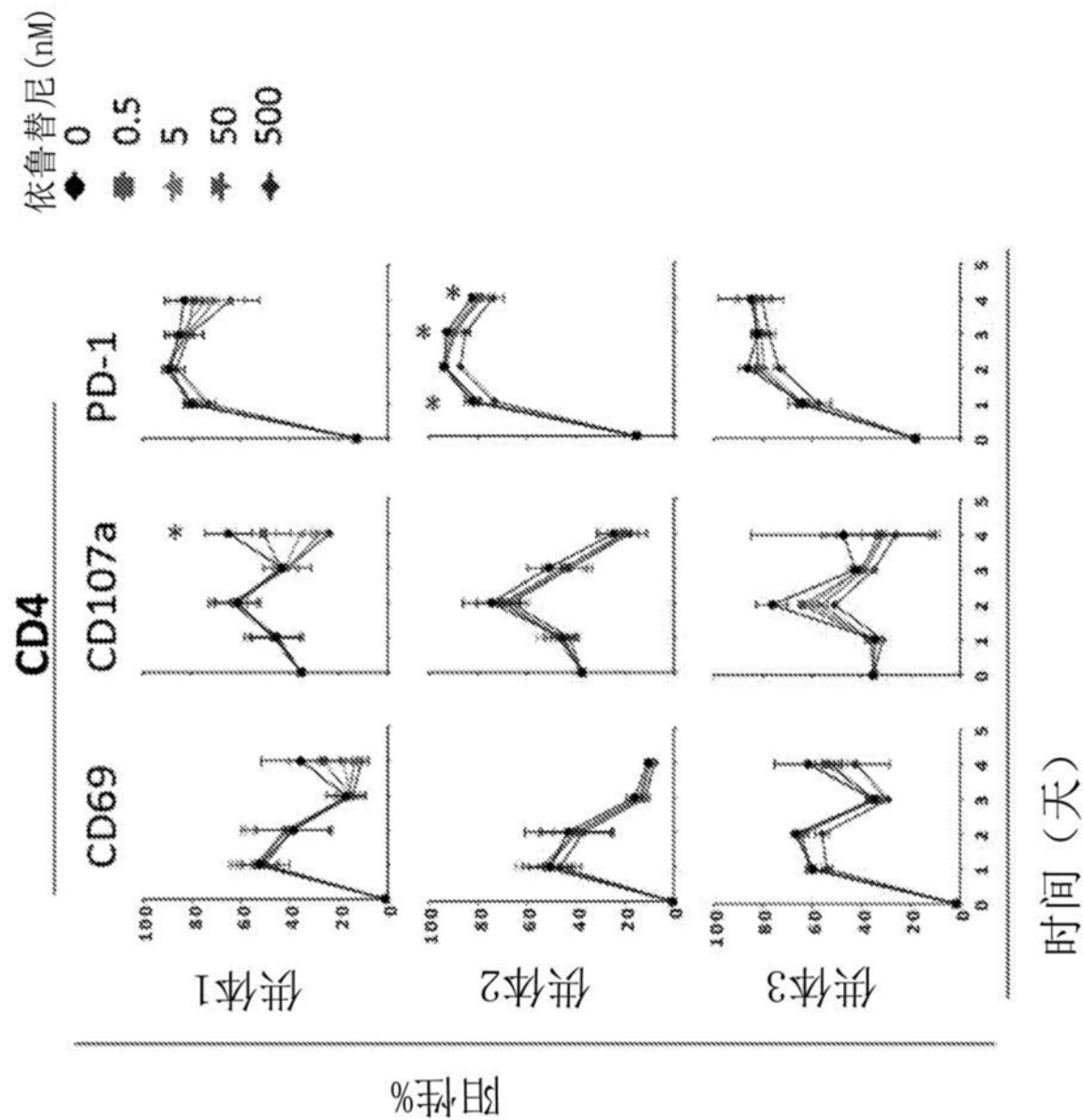


图2E

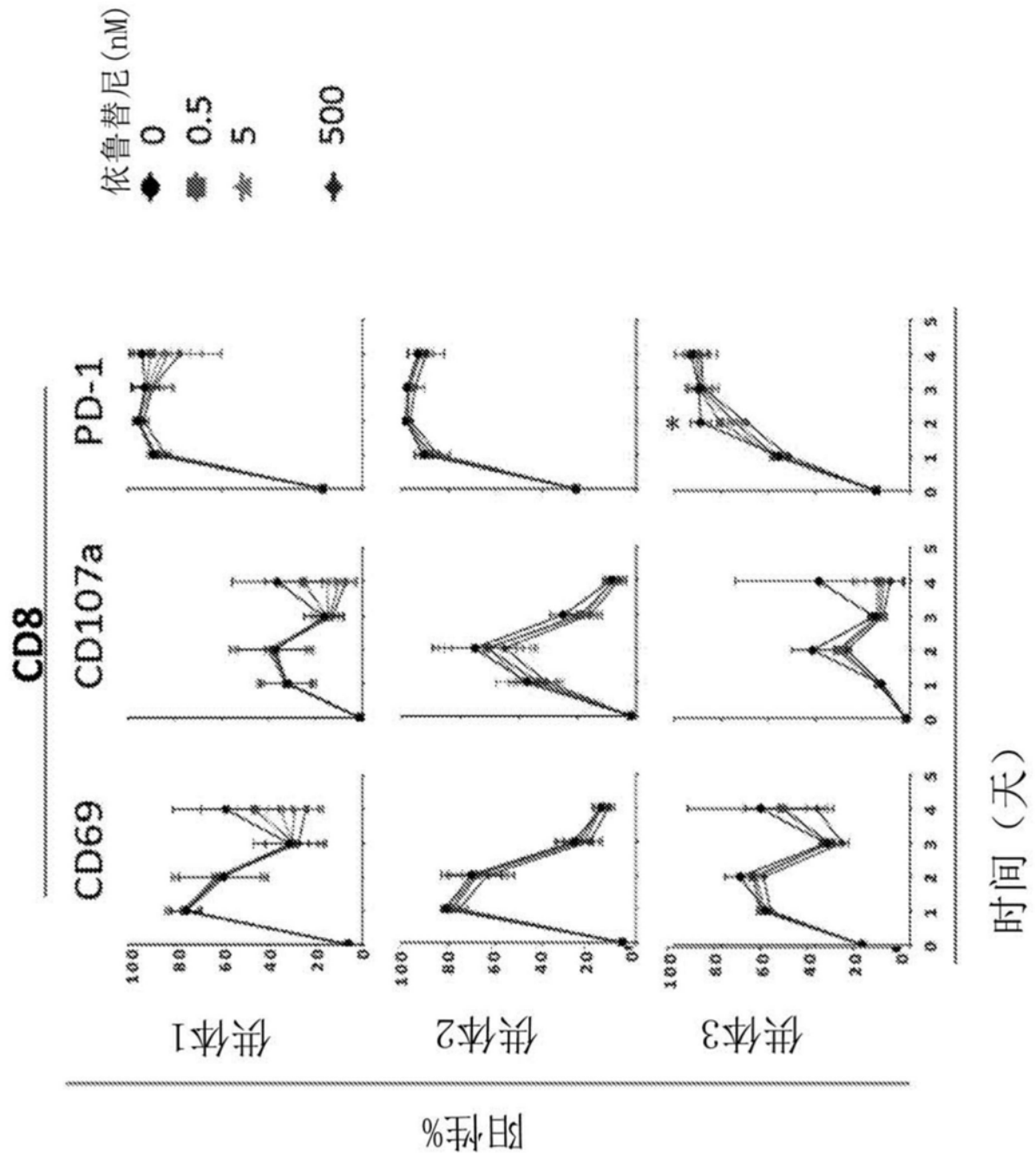


图2F

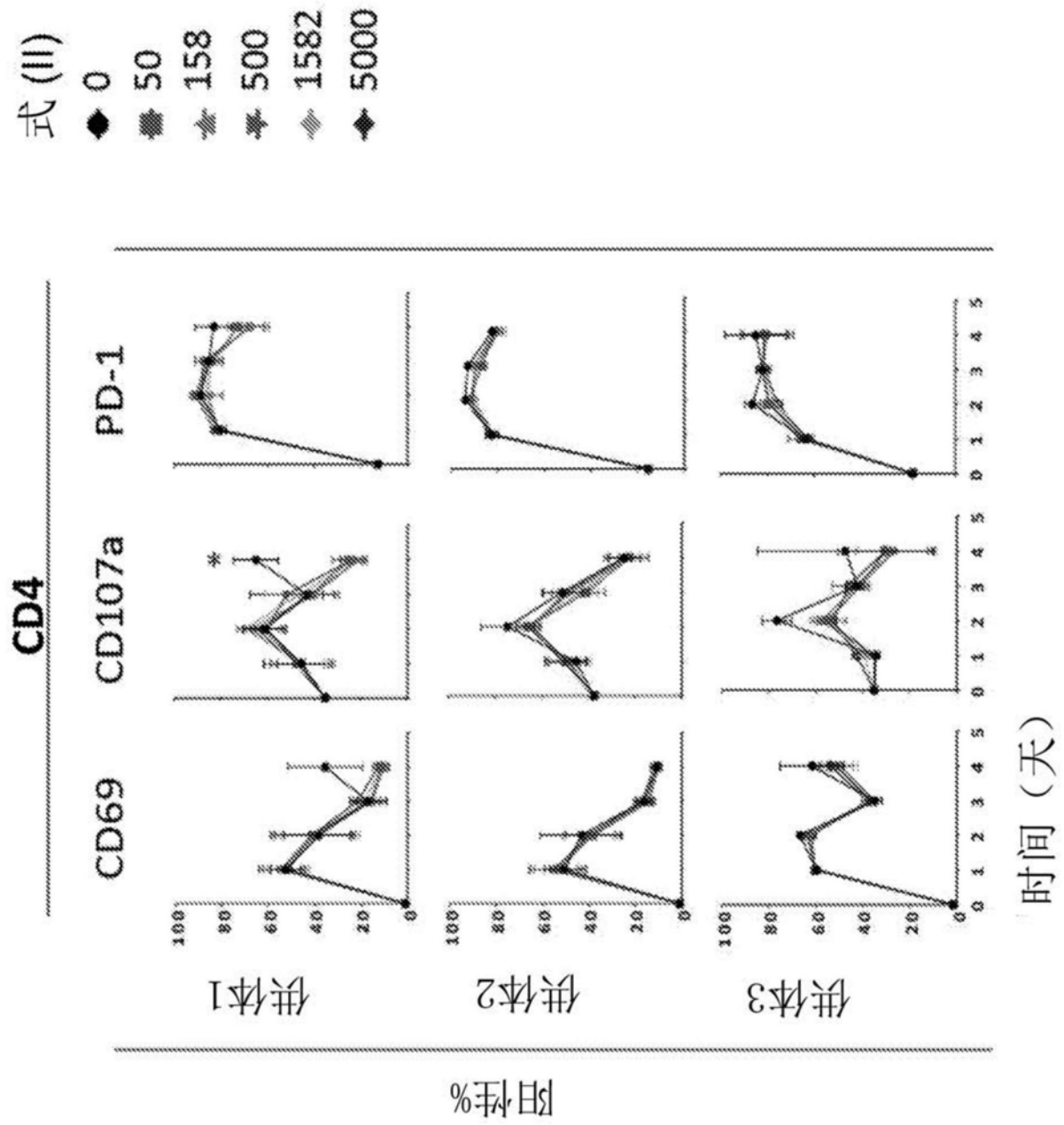


图2G

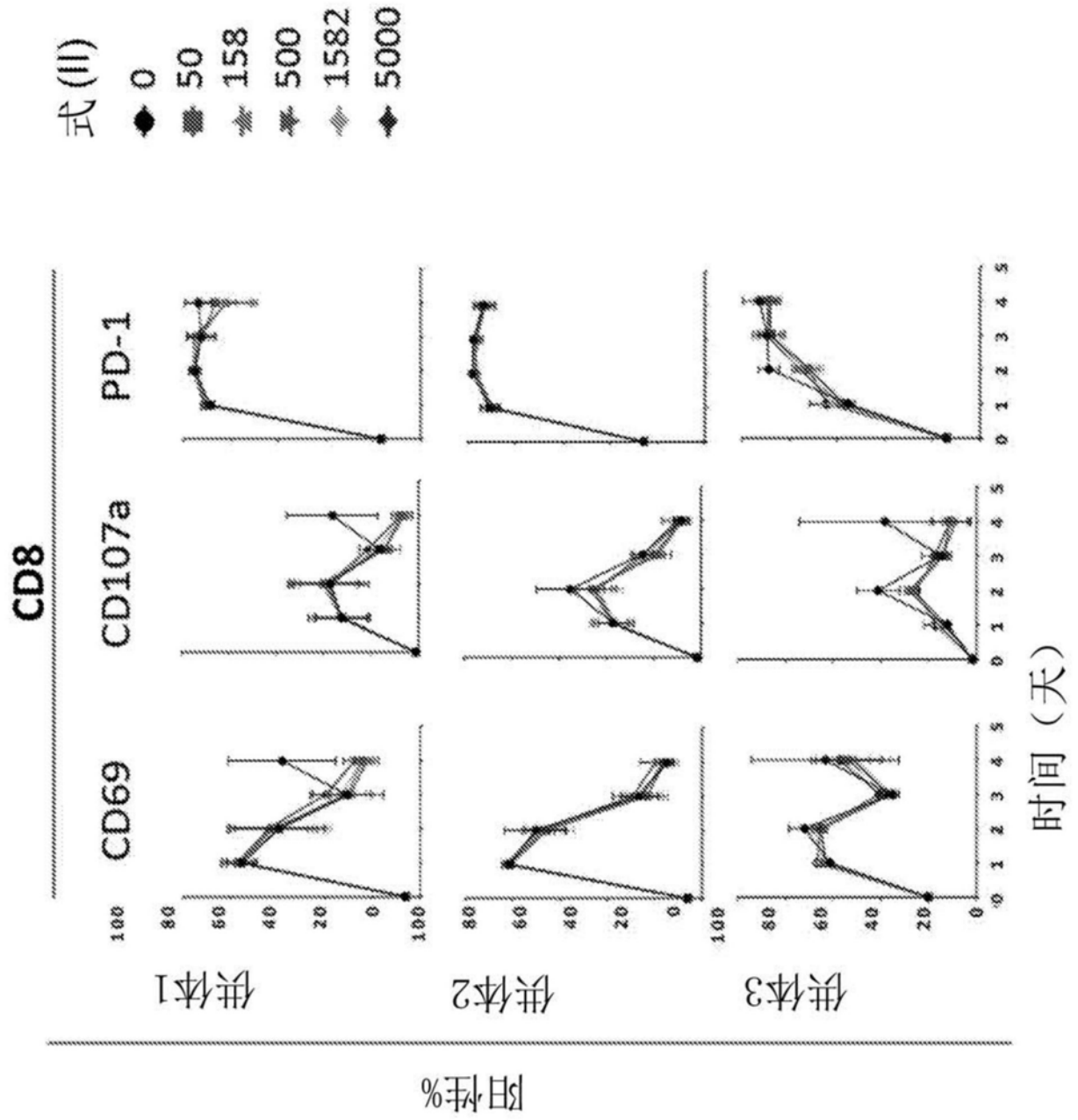


图2H

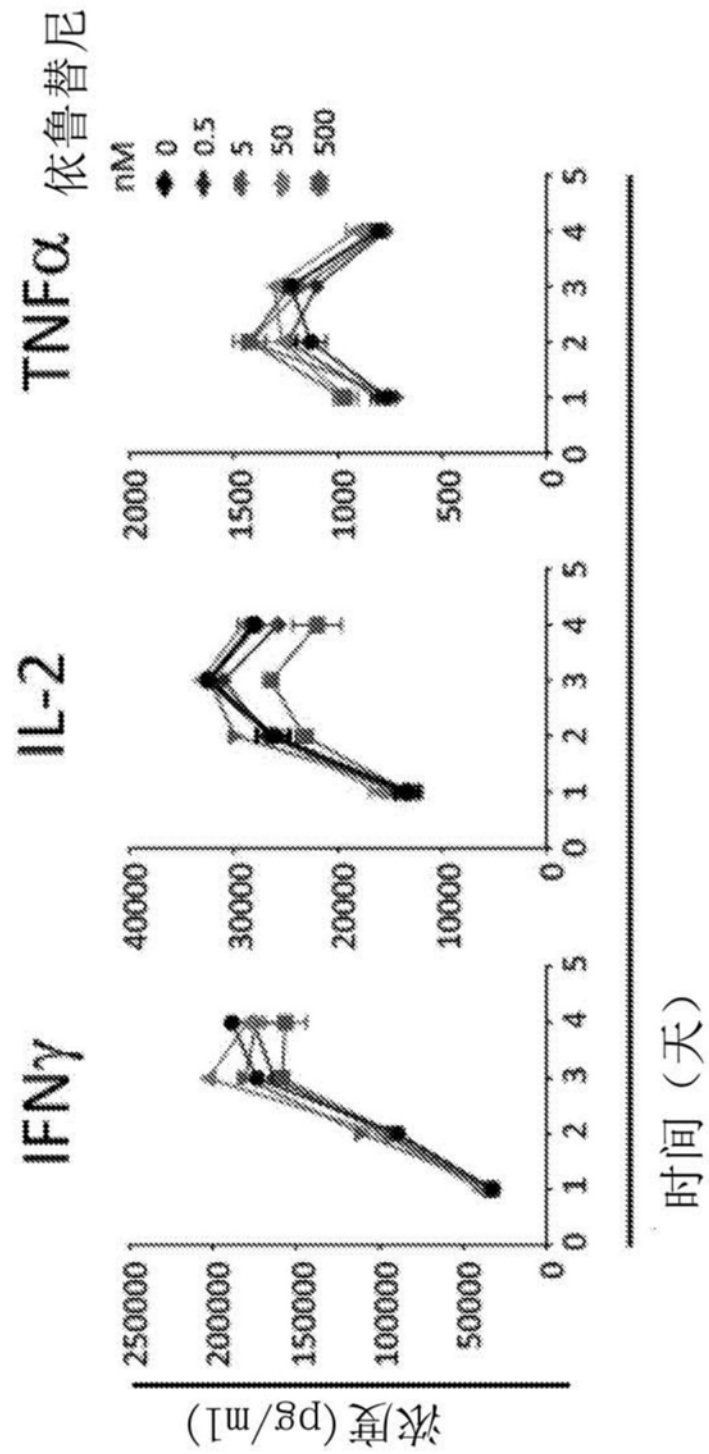


图3A

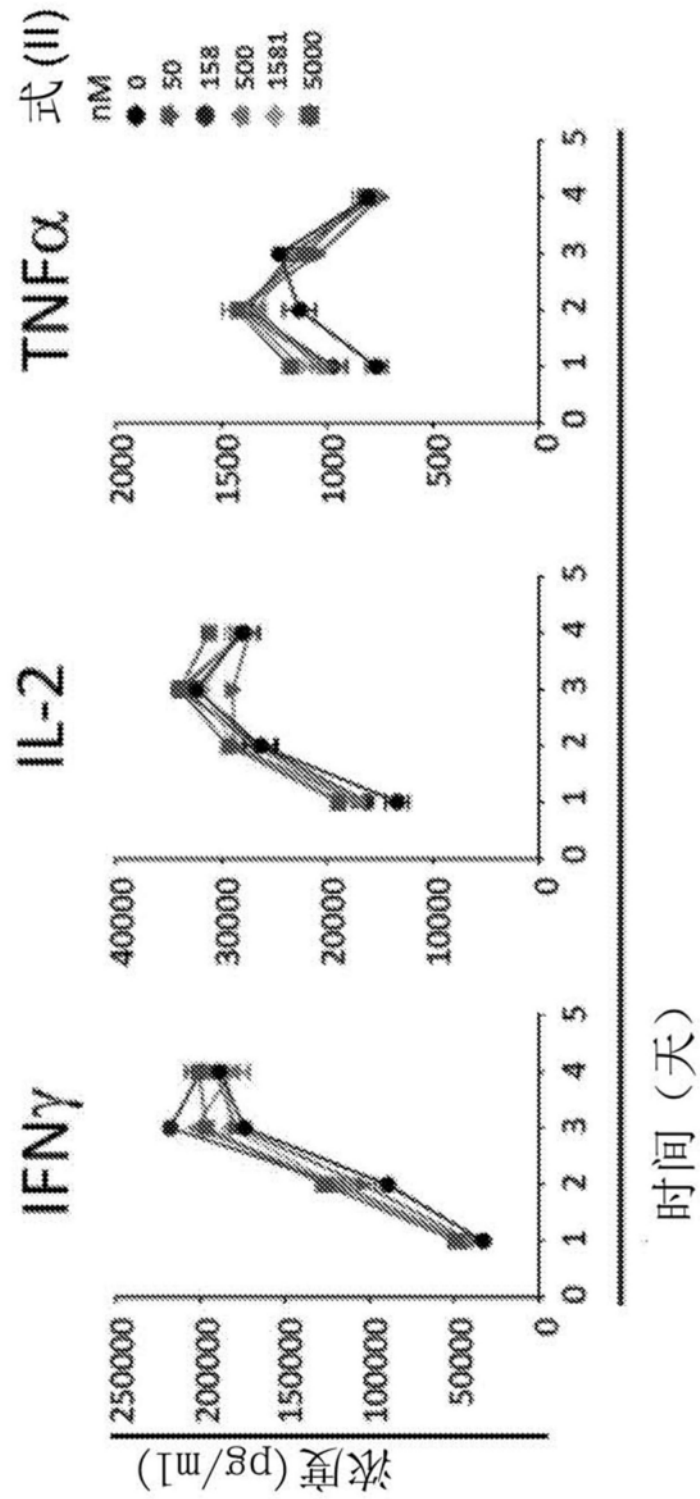


图3B

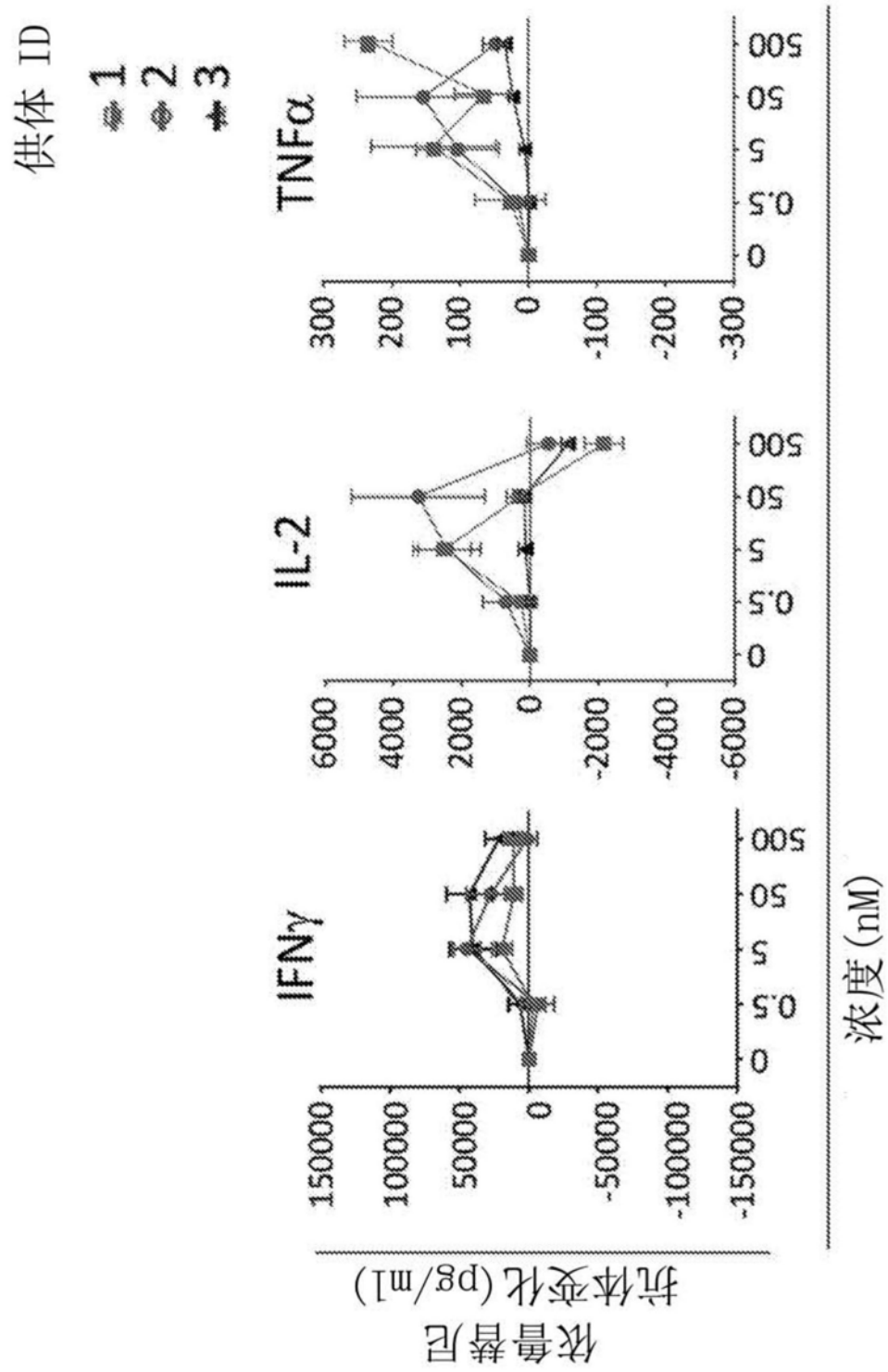


图3C

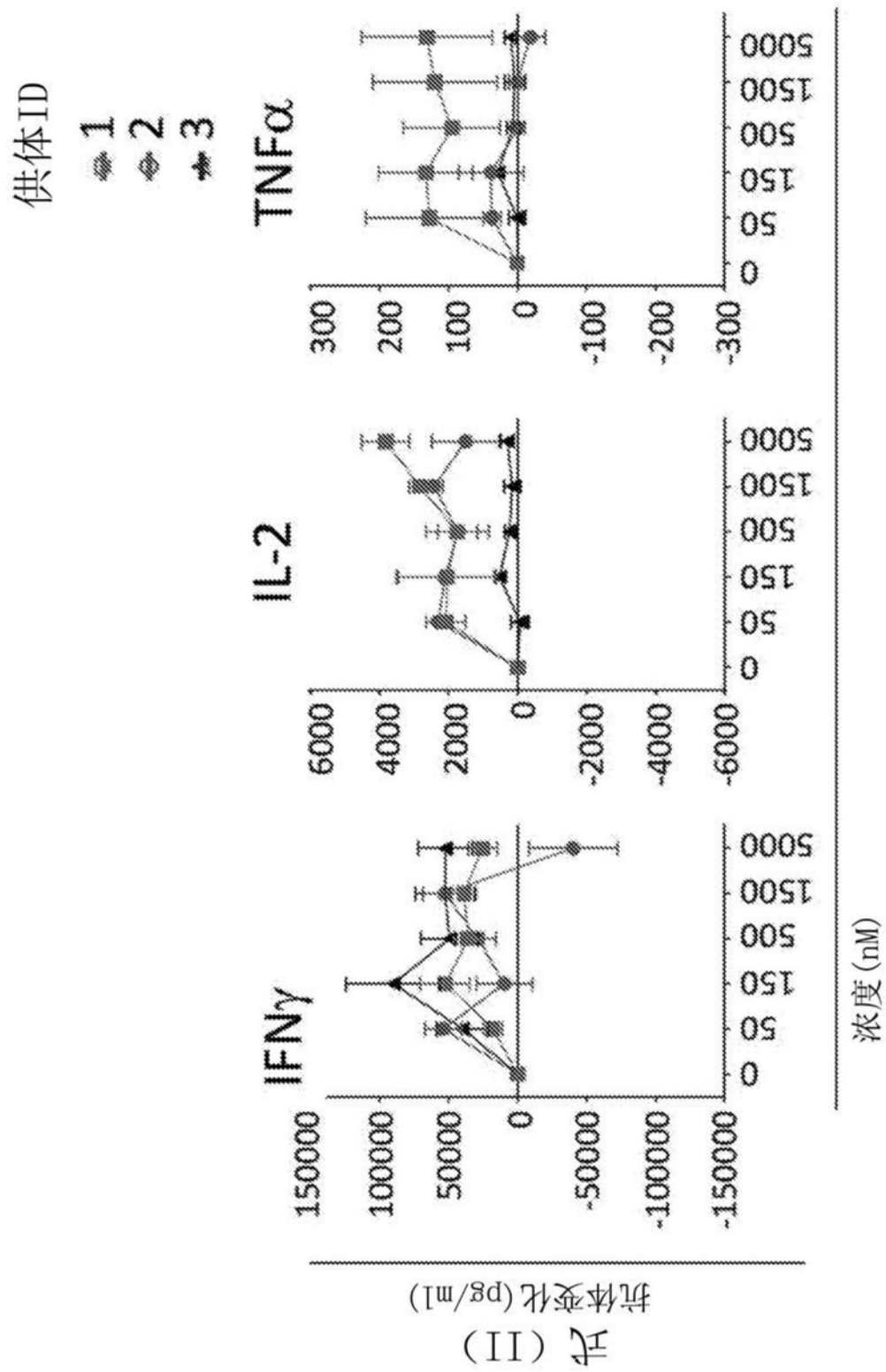


图3D

依鲁替尼

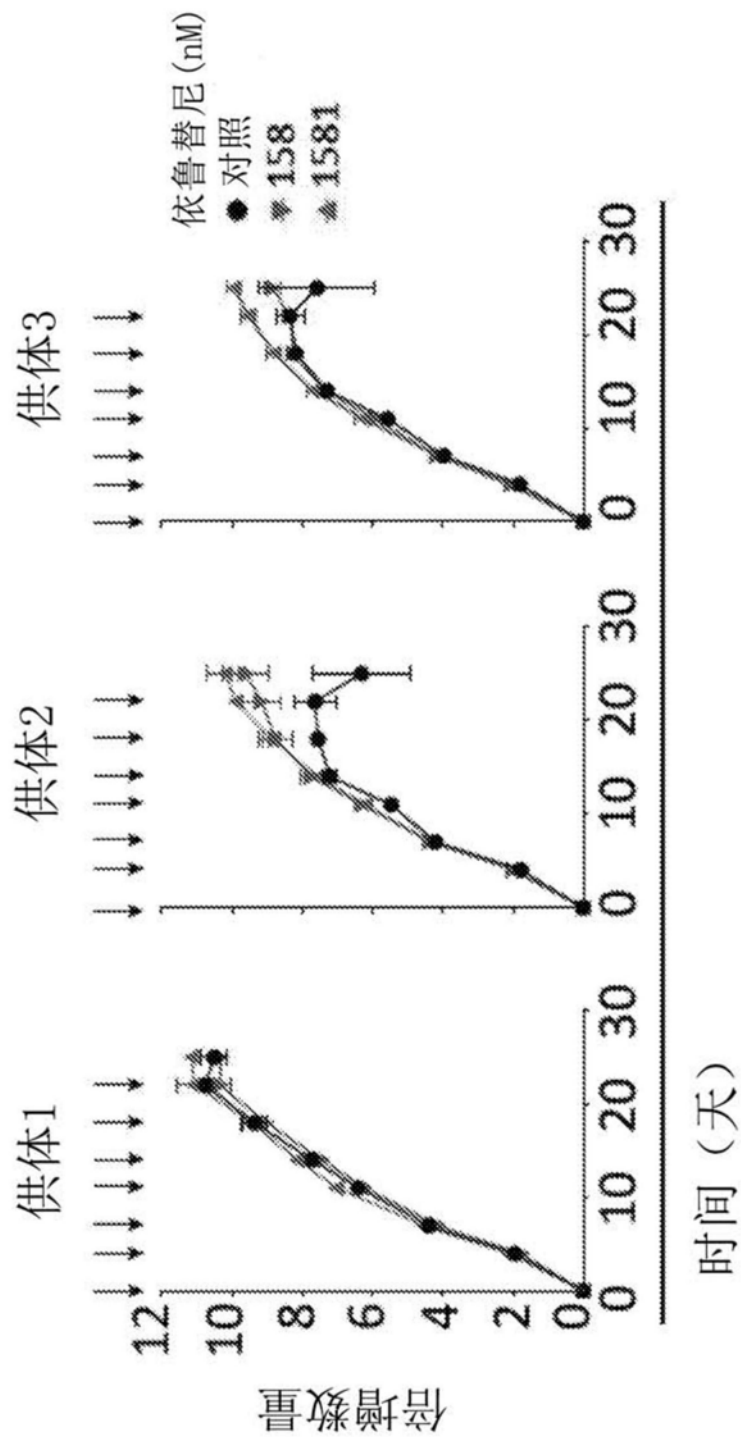


图4A

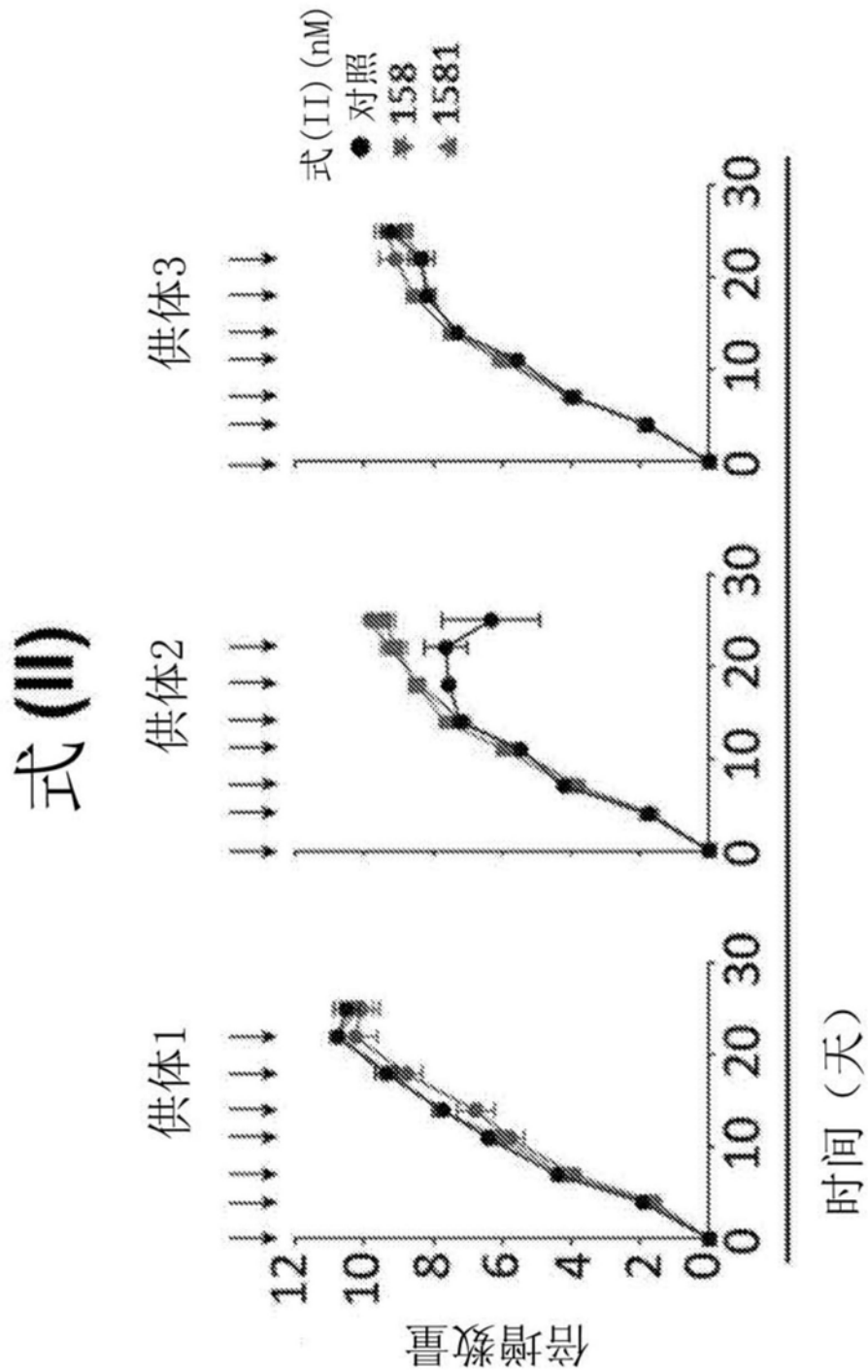


图4B

依鲁替尼

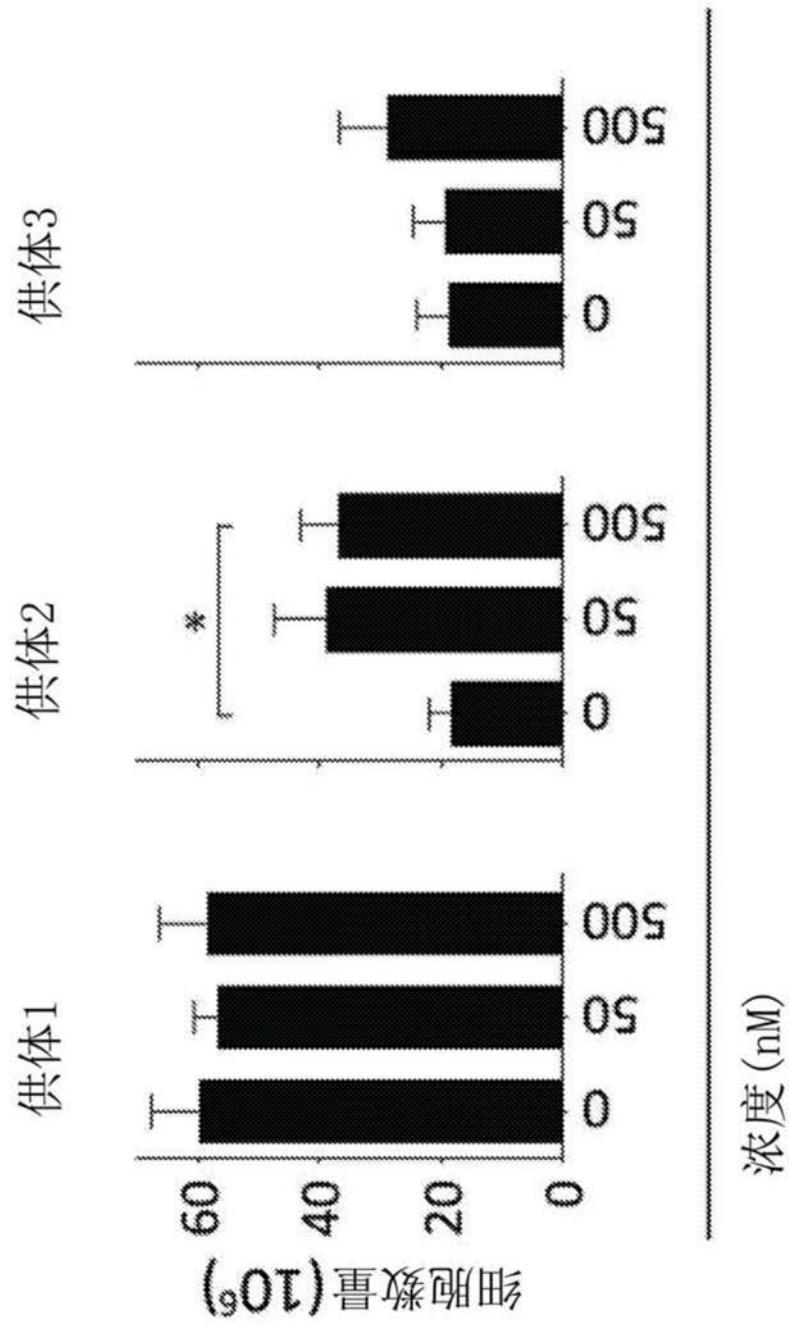


图4C

式 (III)

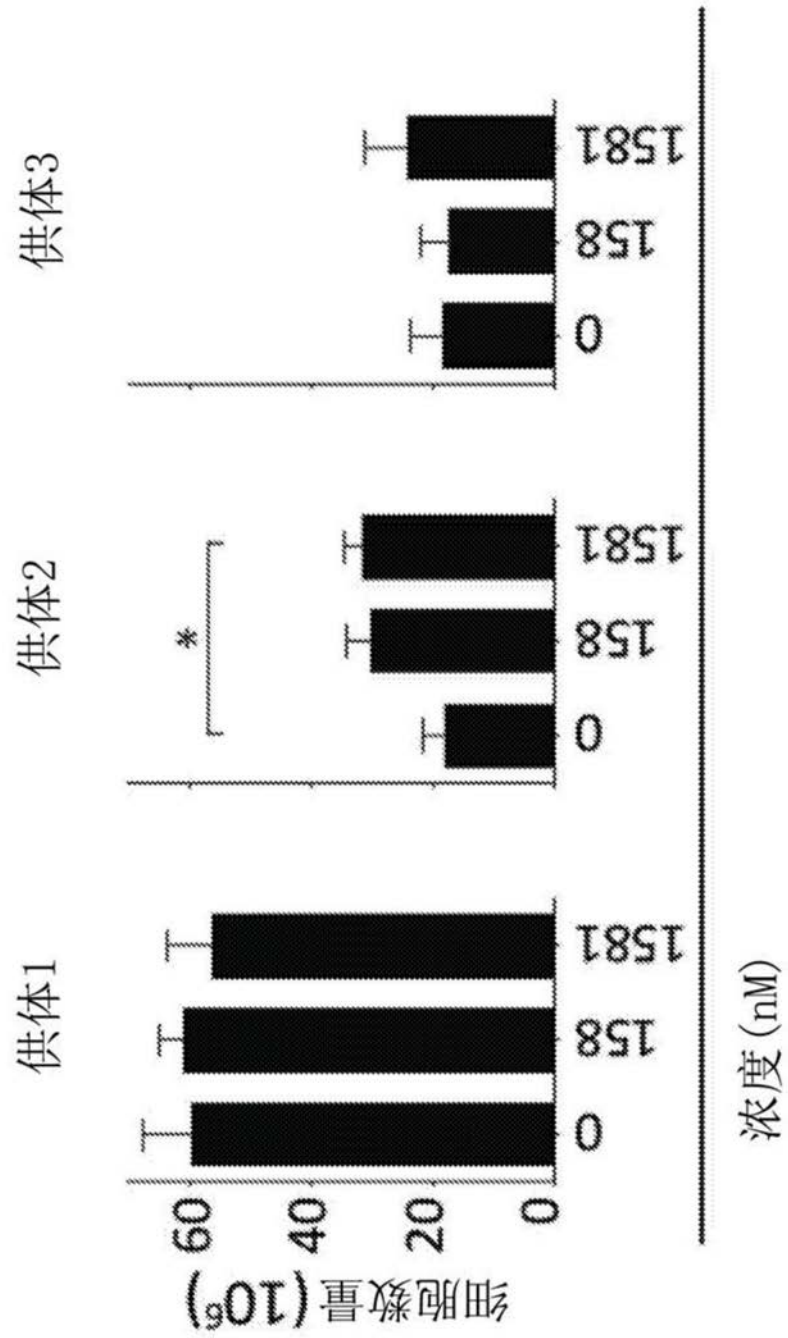


图4D

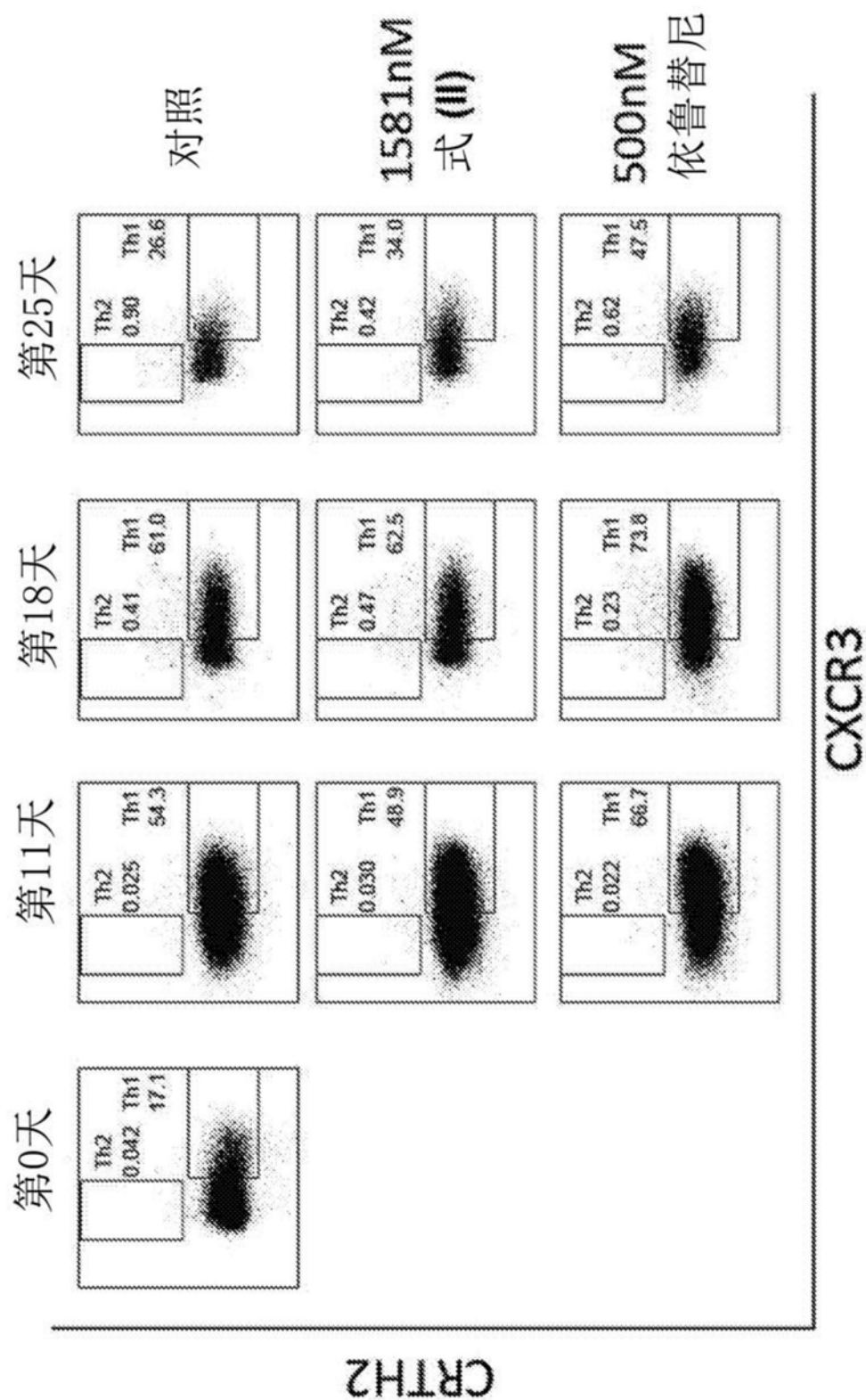


图5A

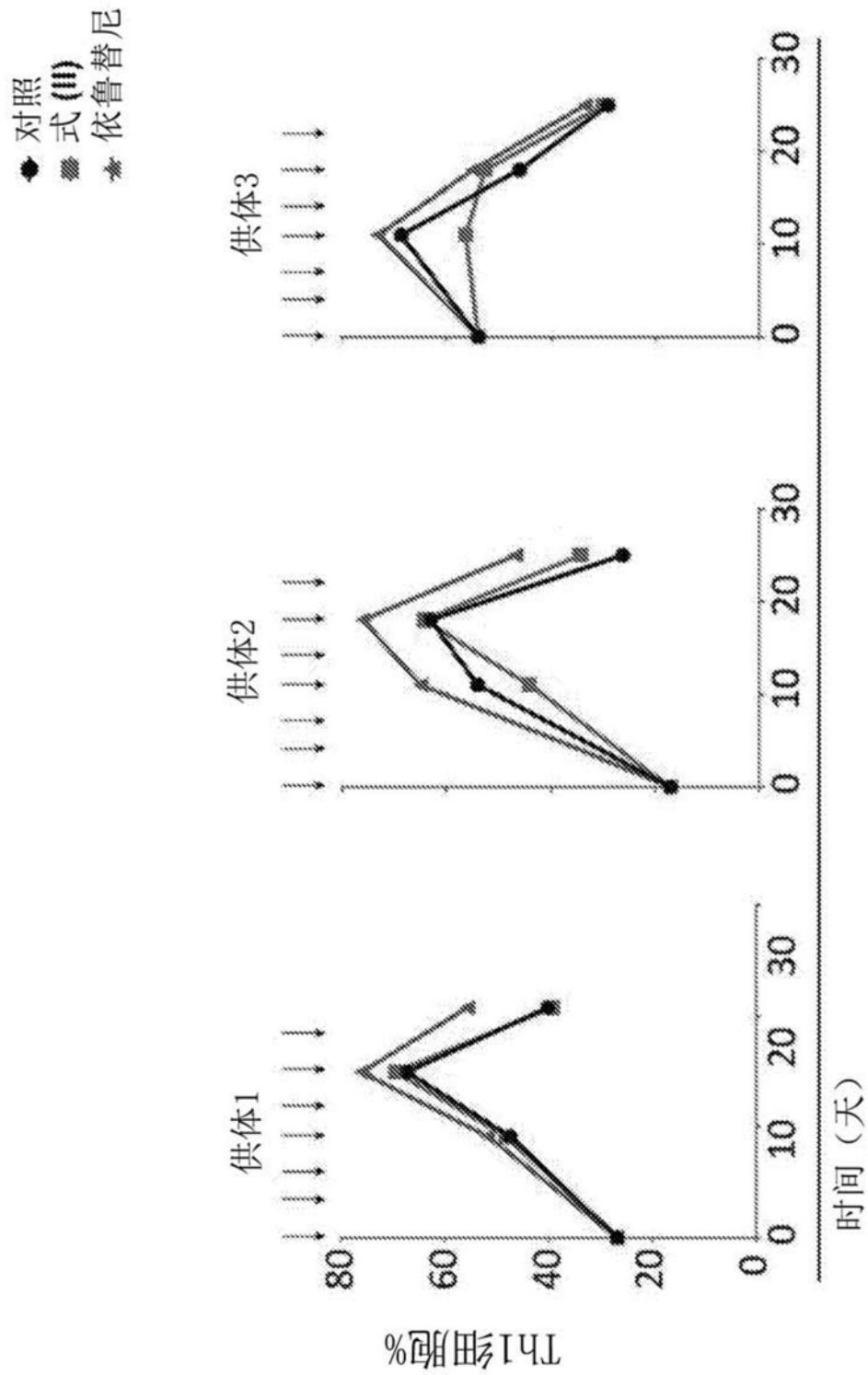


图5B

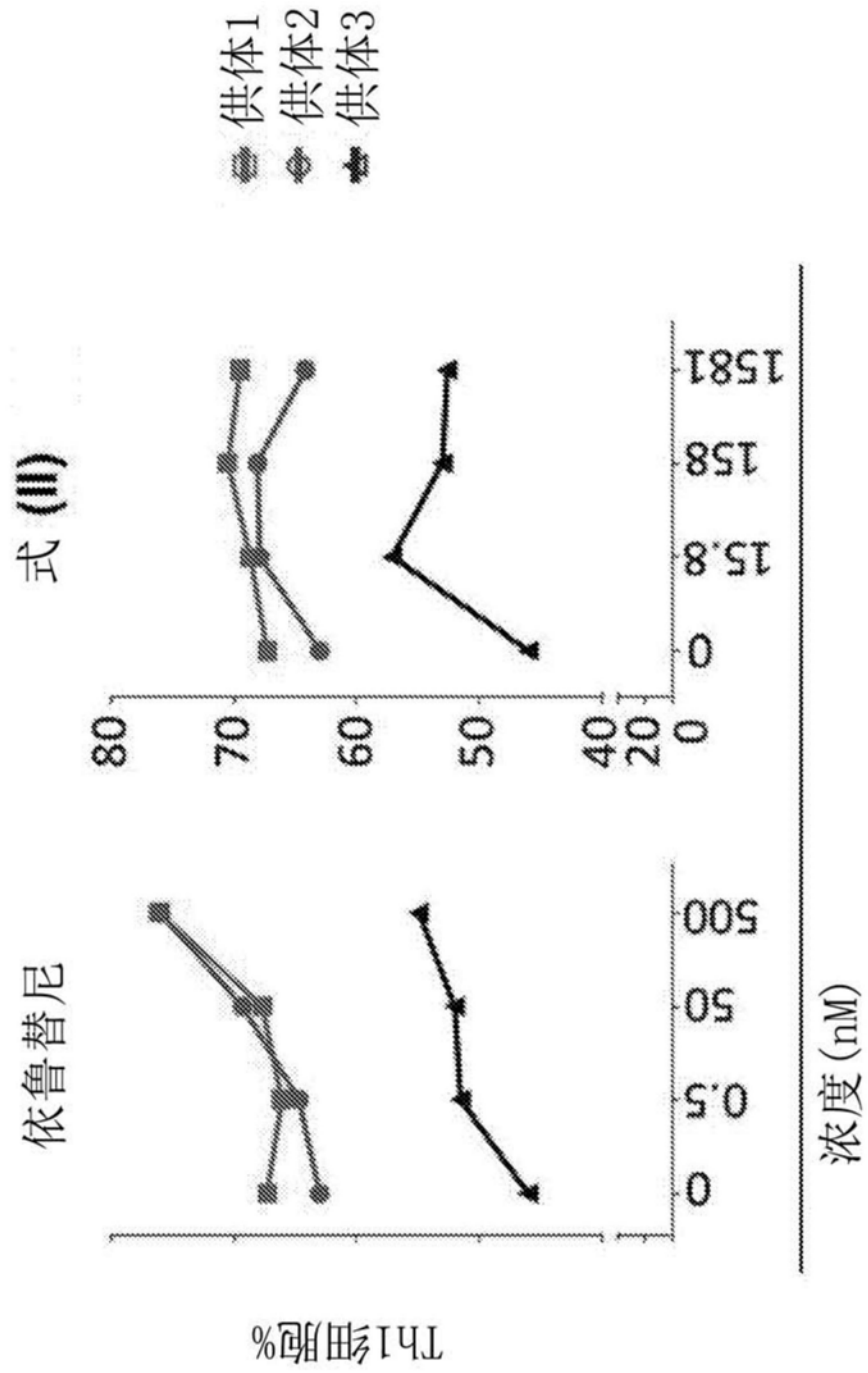


图5C

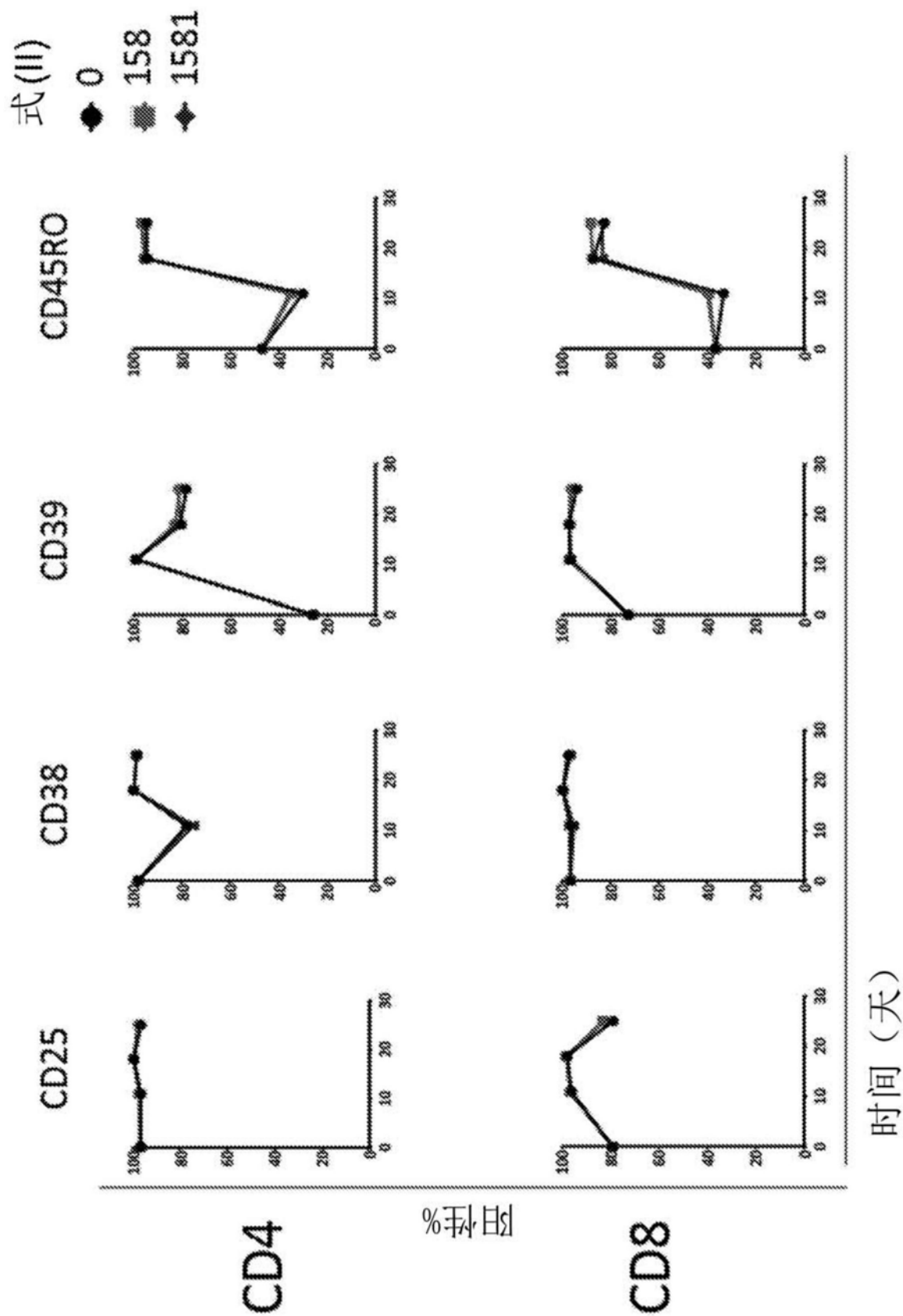


图5D

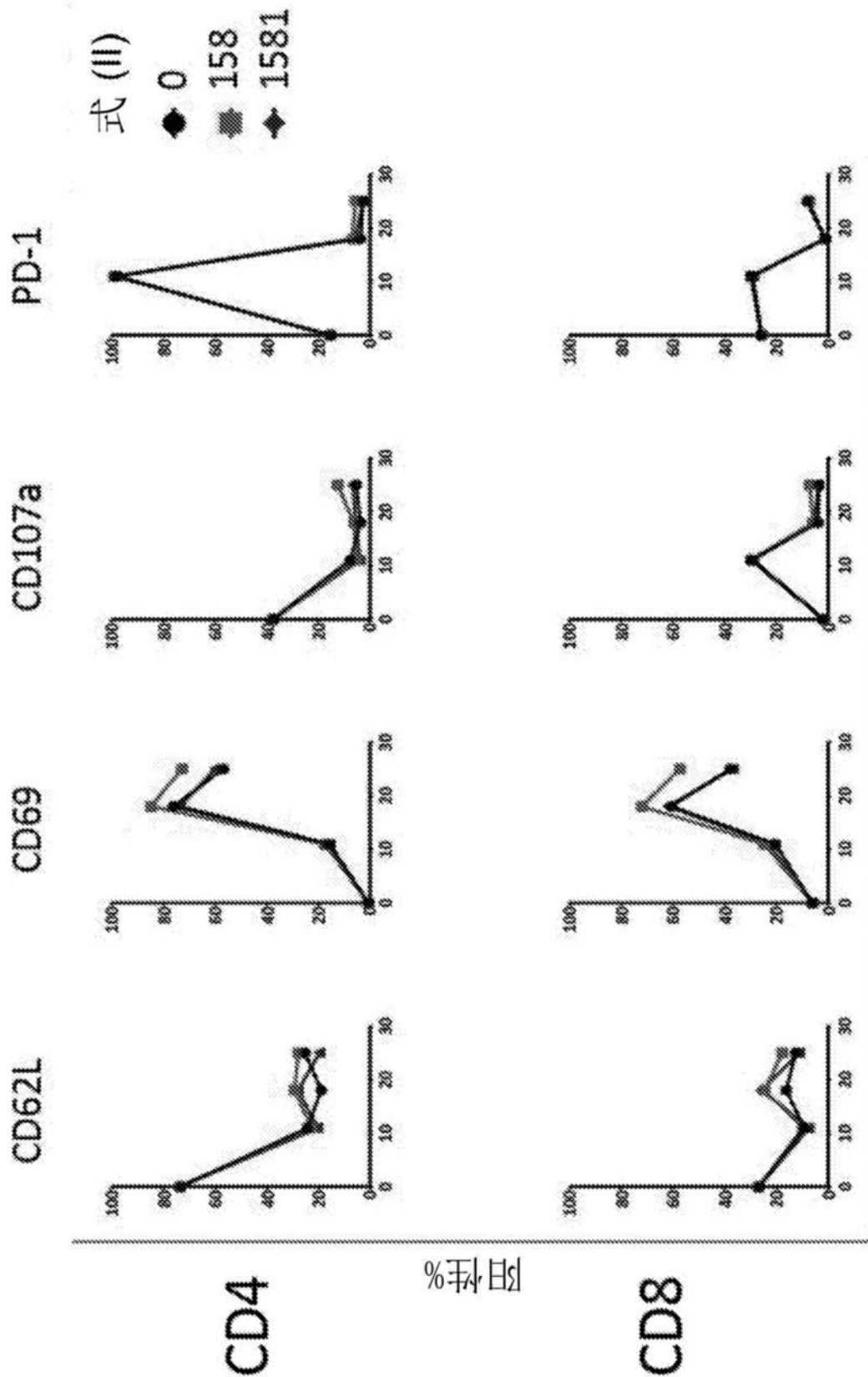


图5E

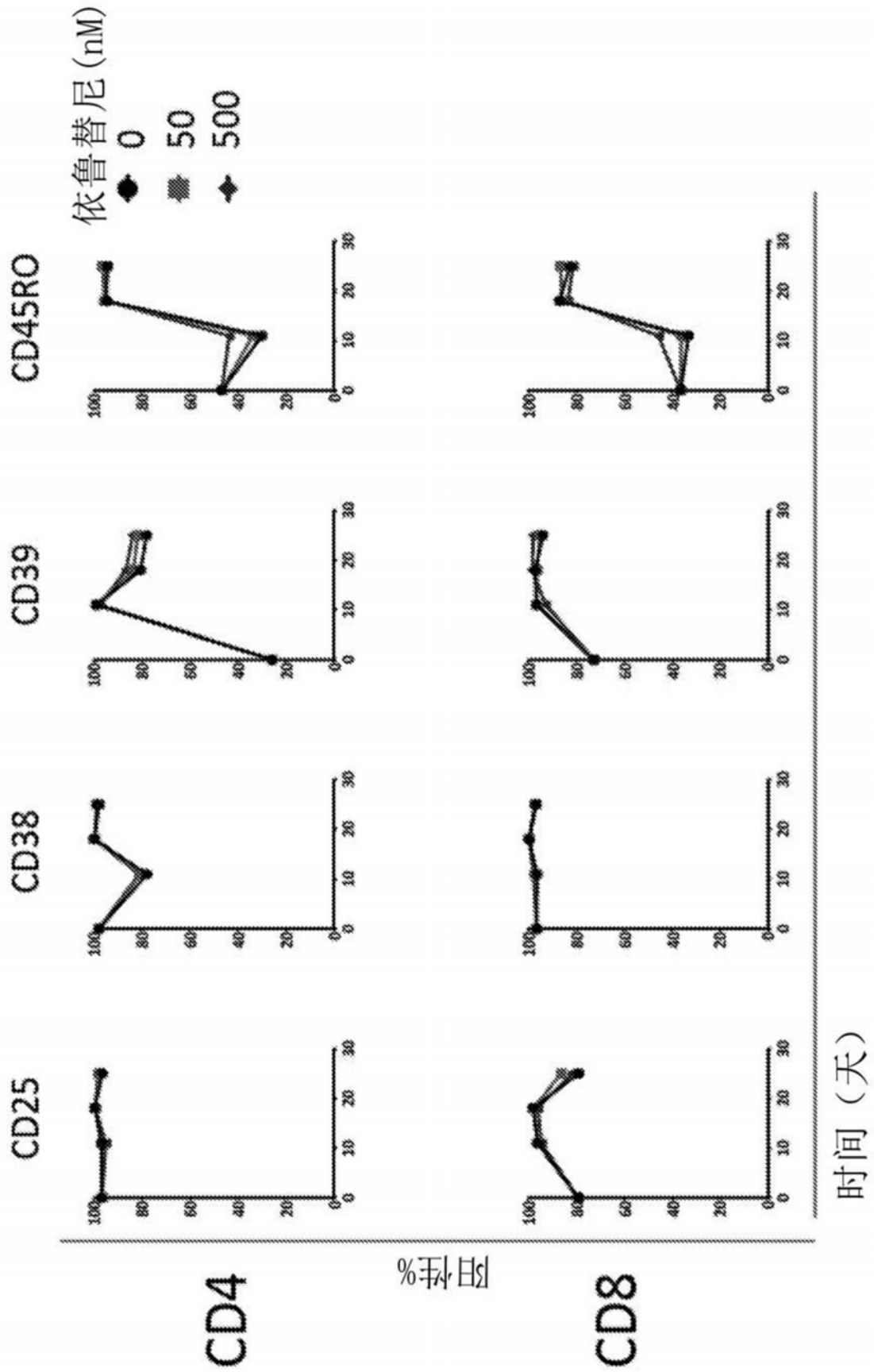


图5F

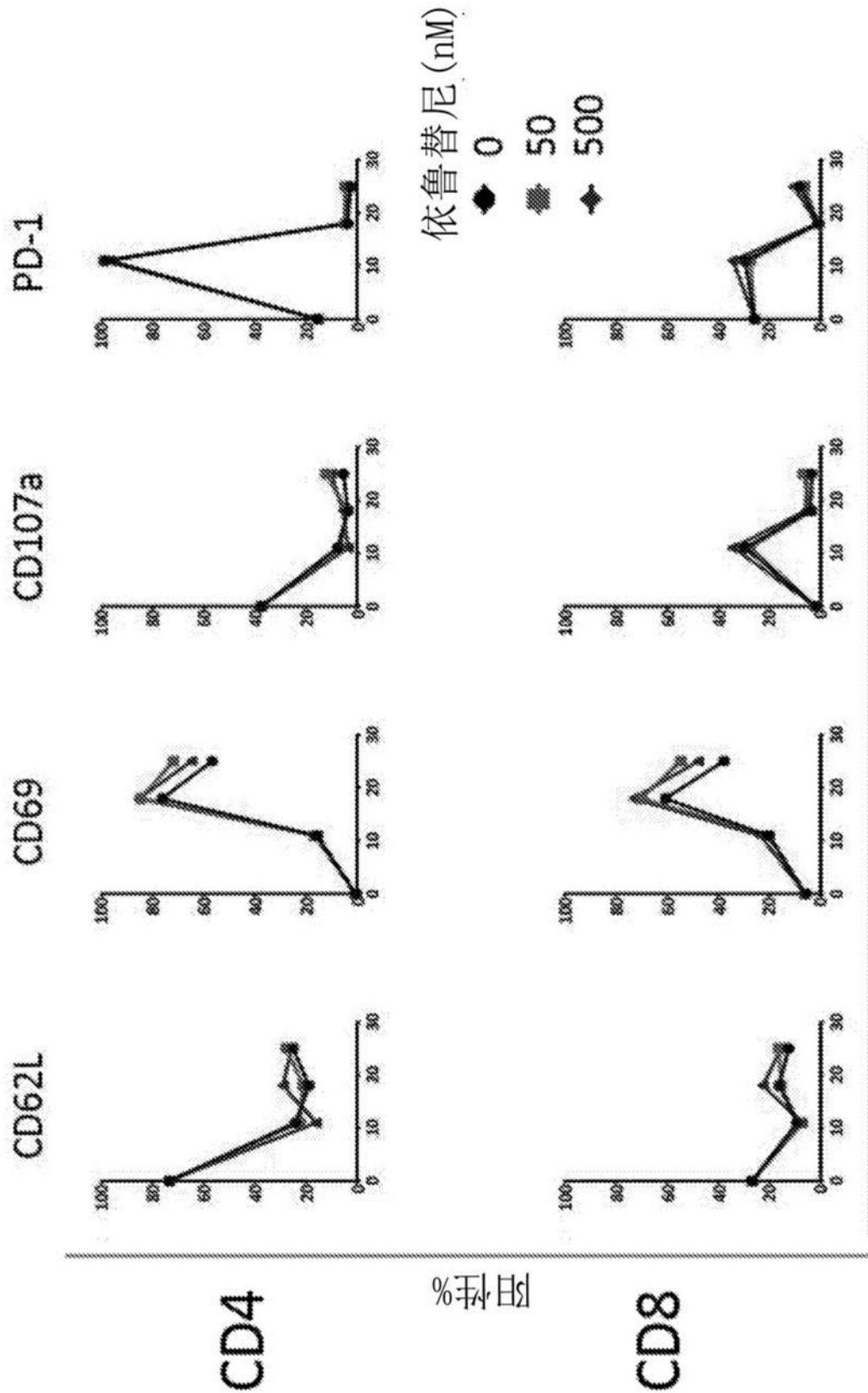


图5G

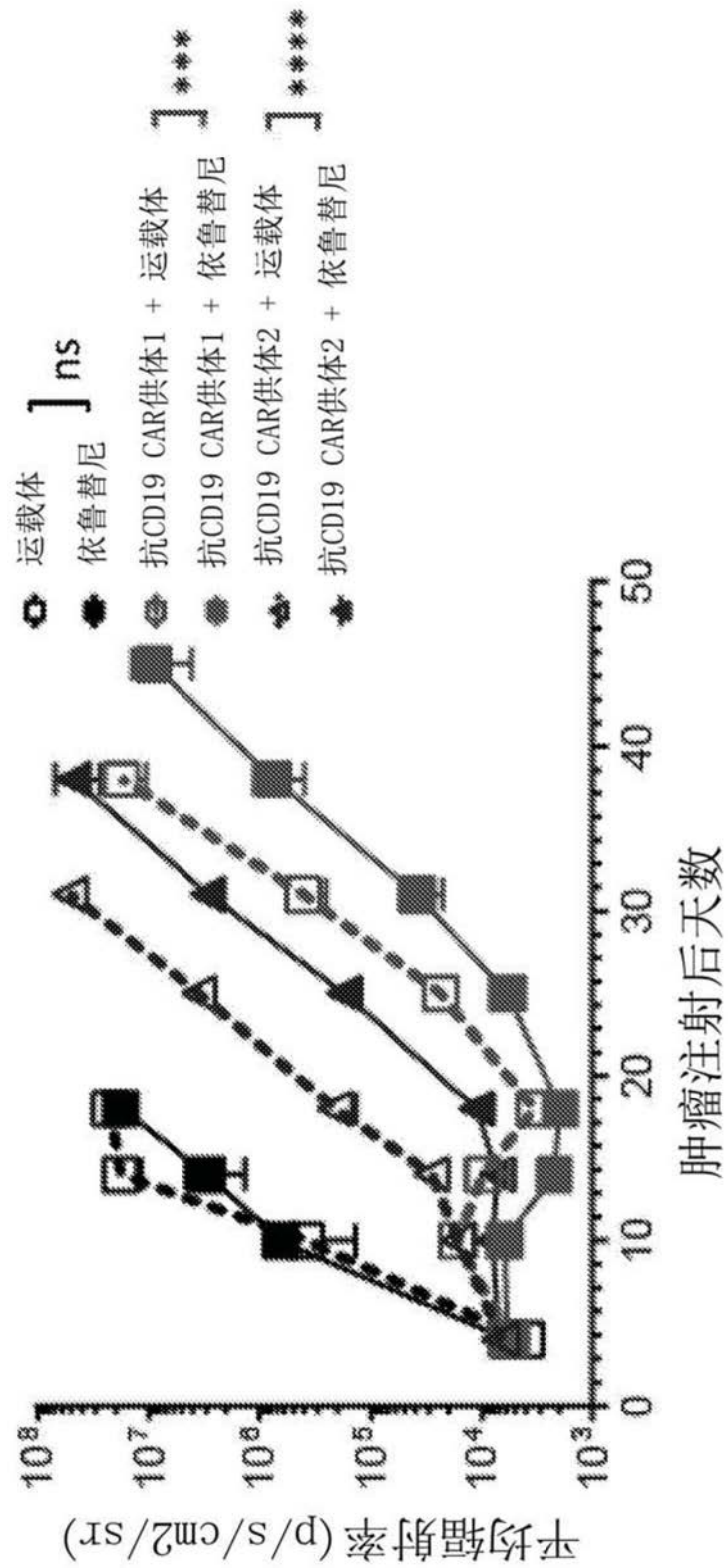


图6A

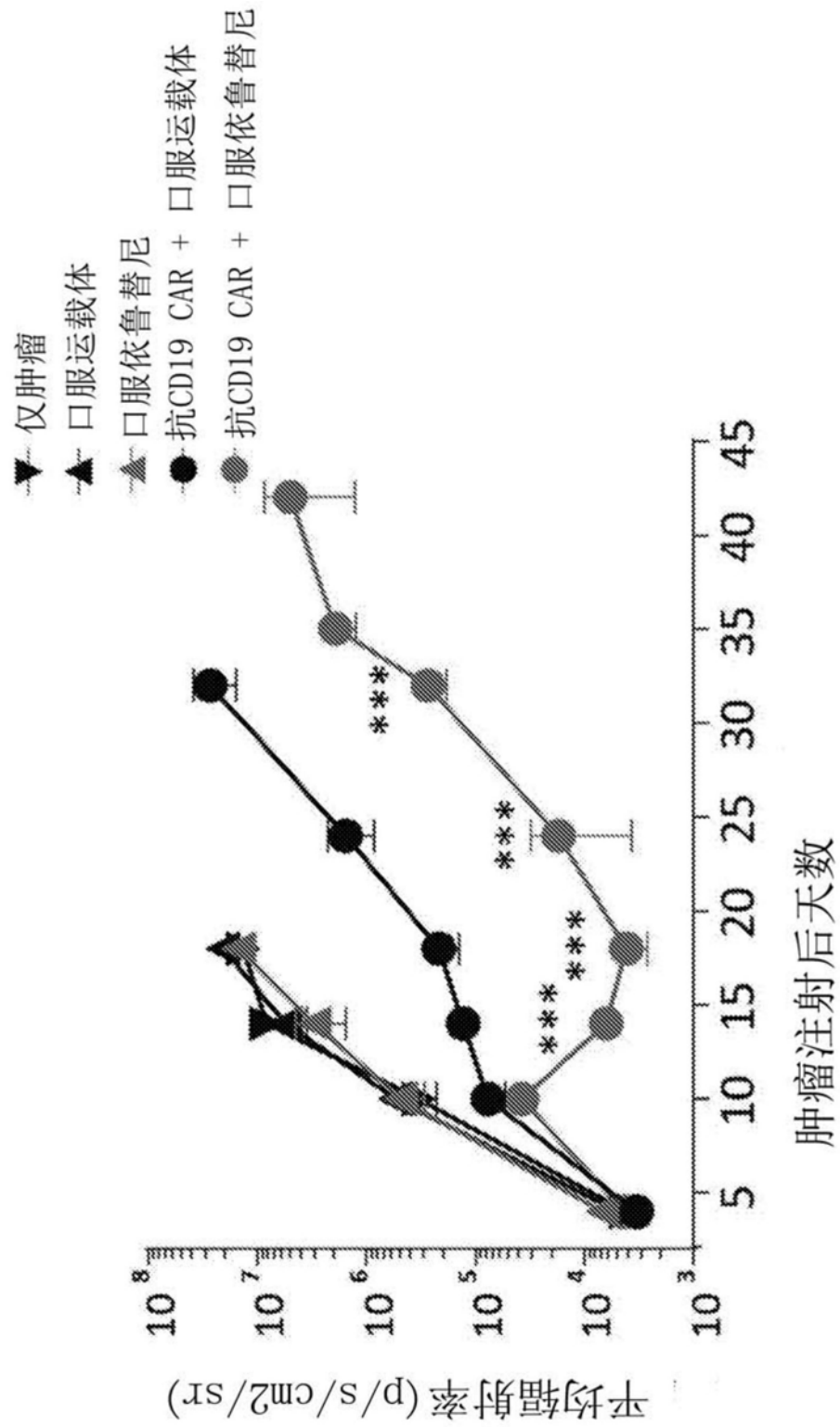


图6B

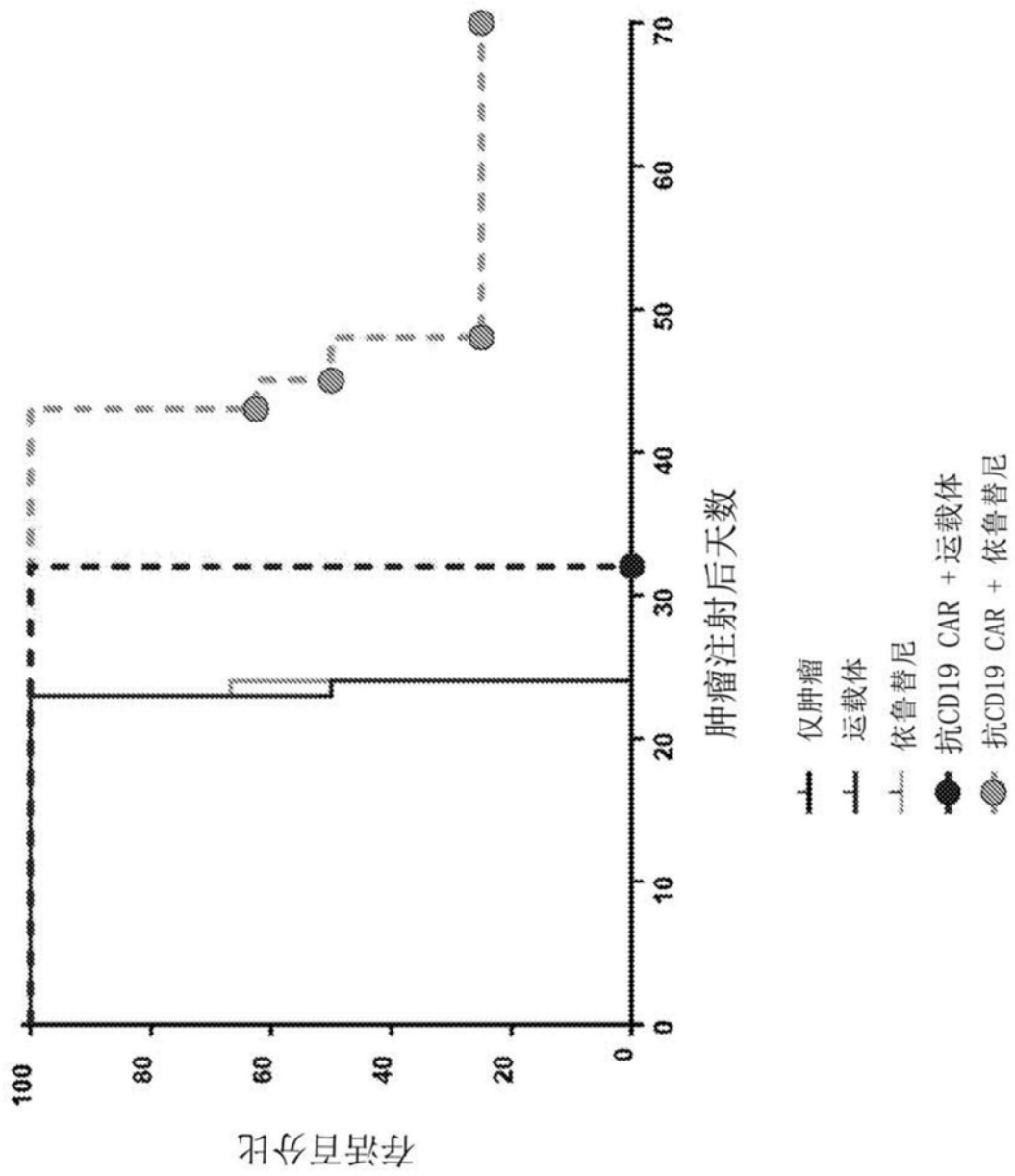


图6C

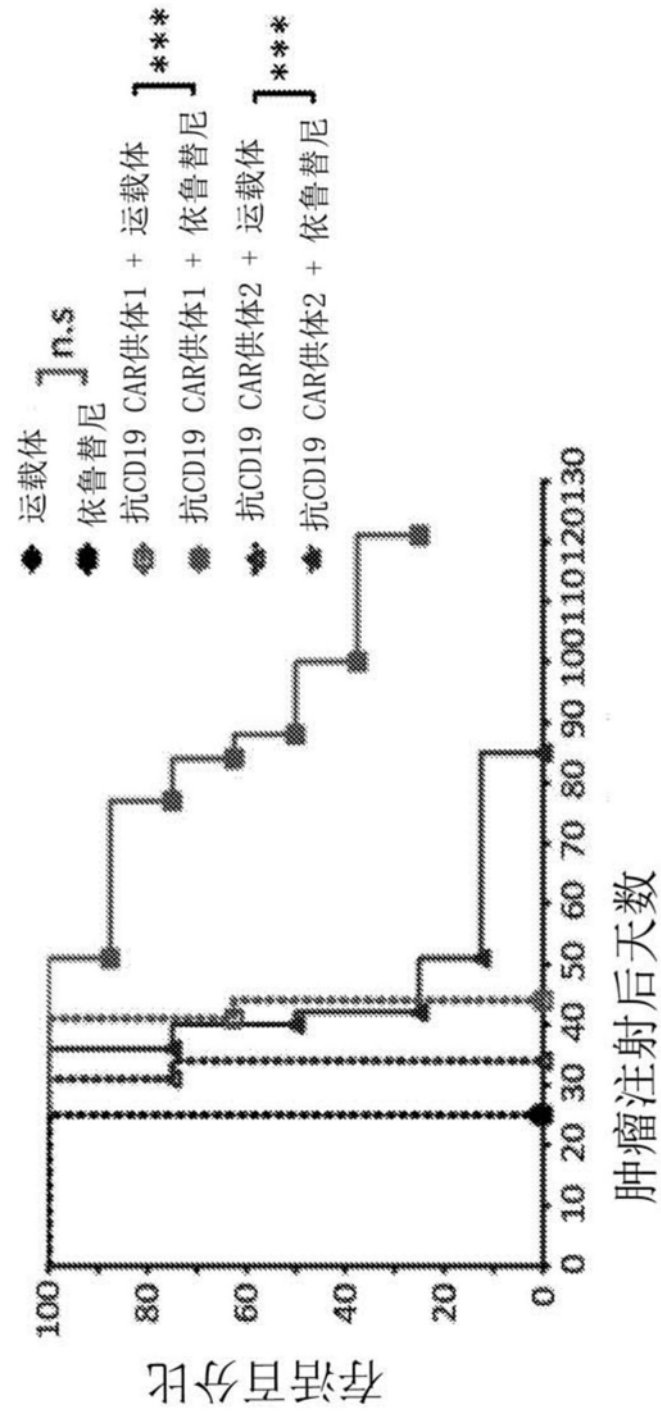


图6D

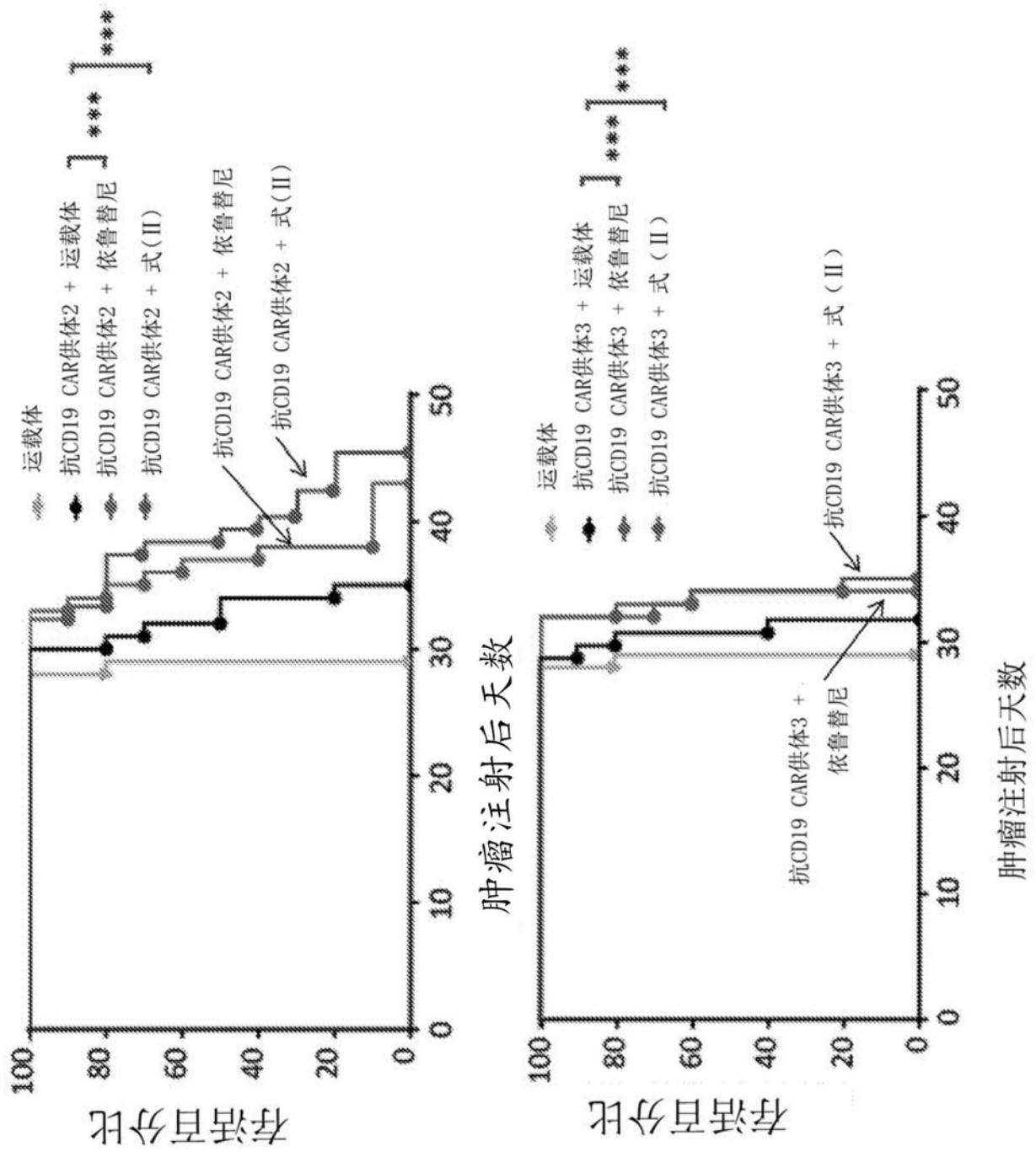


图7A

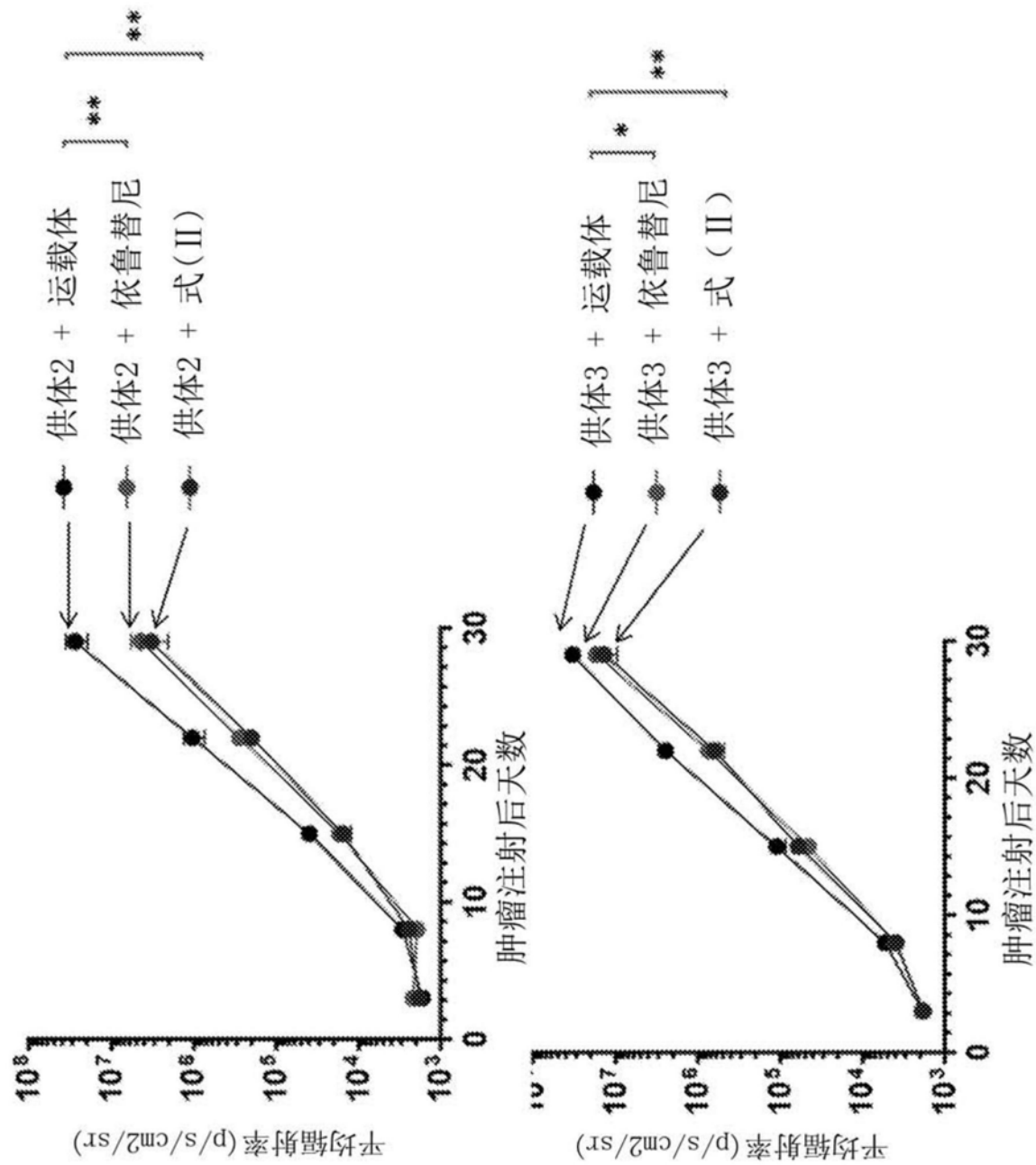


图7B

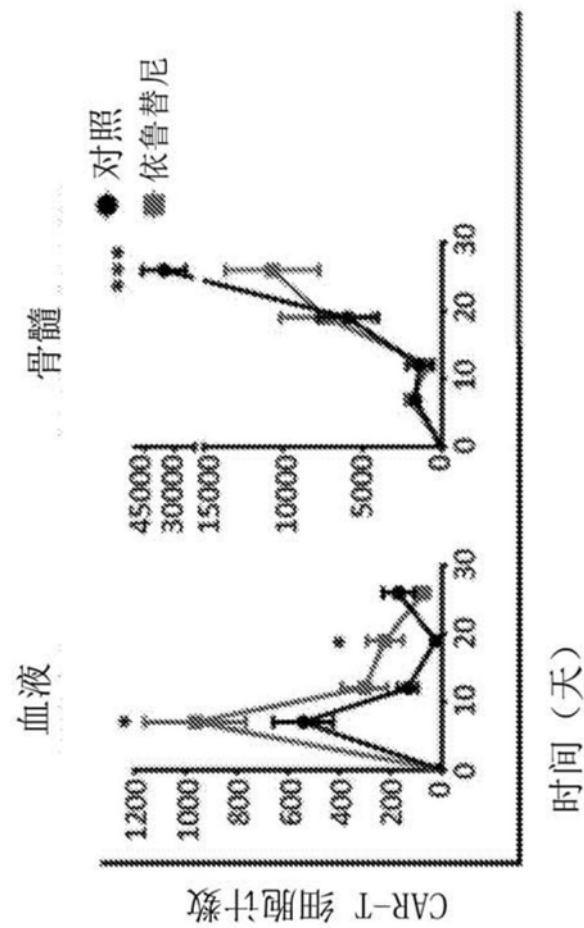


图7C

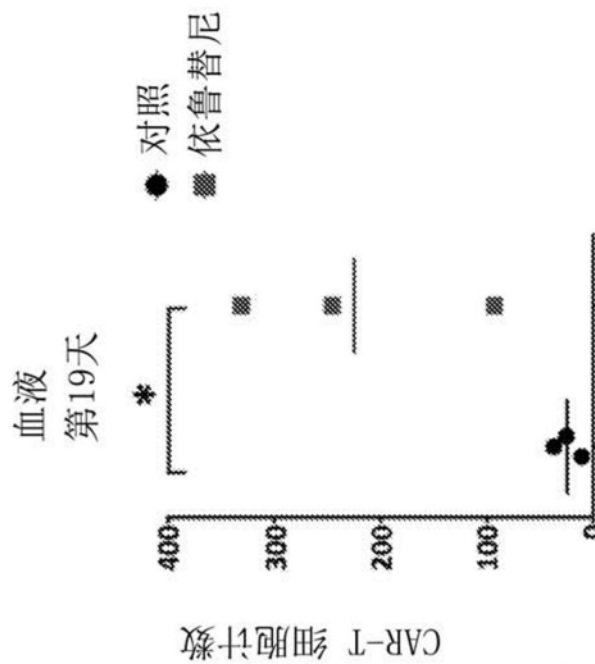


图7D

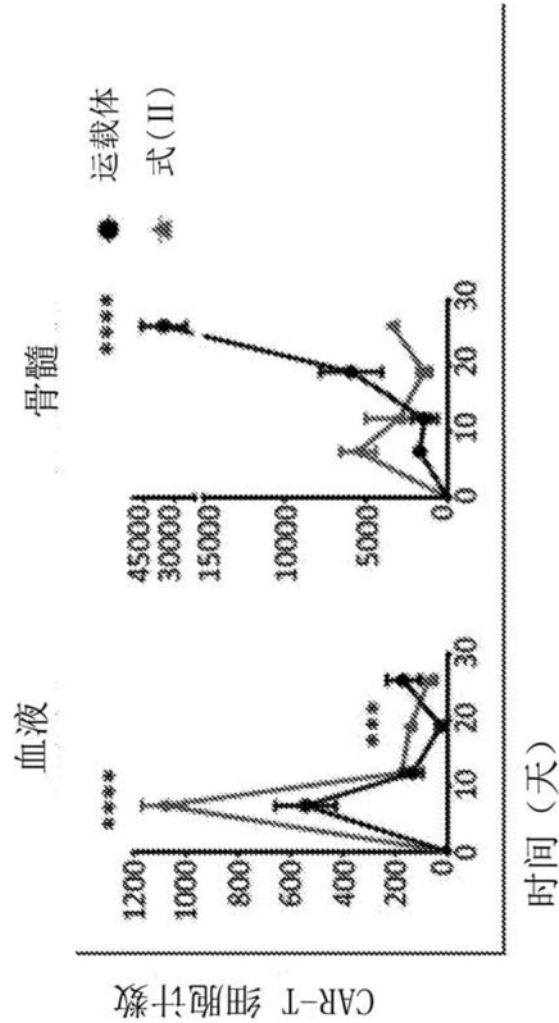


图7E

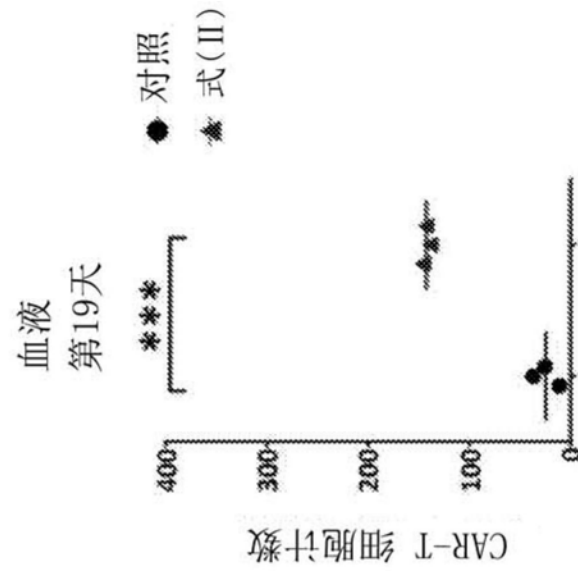


图7F

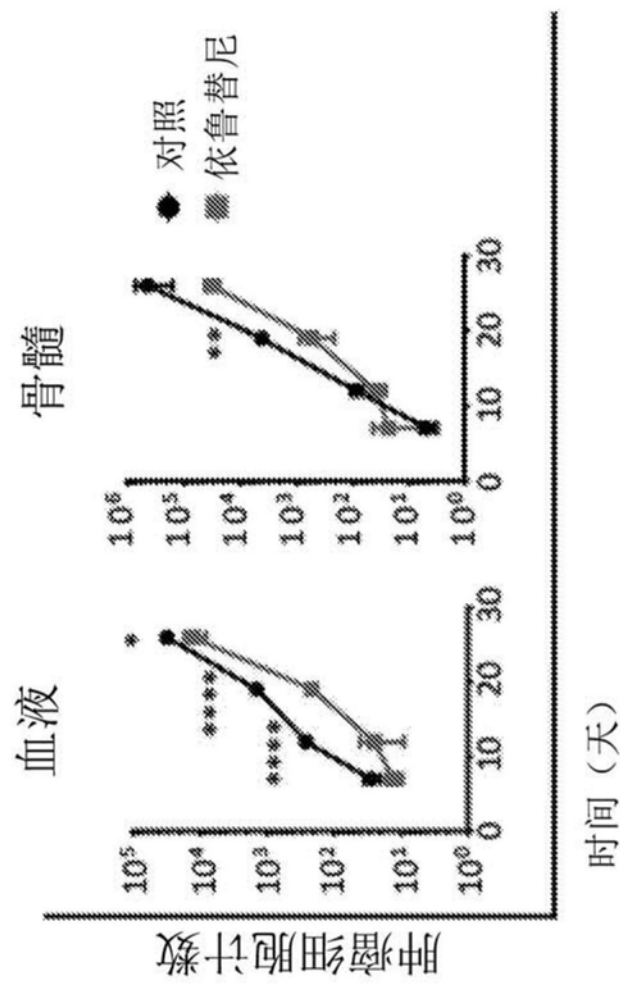


图7G

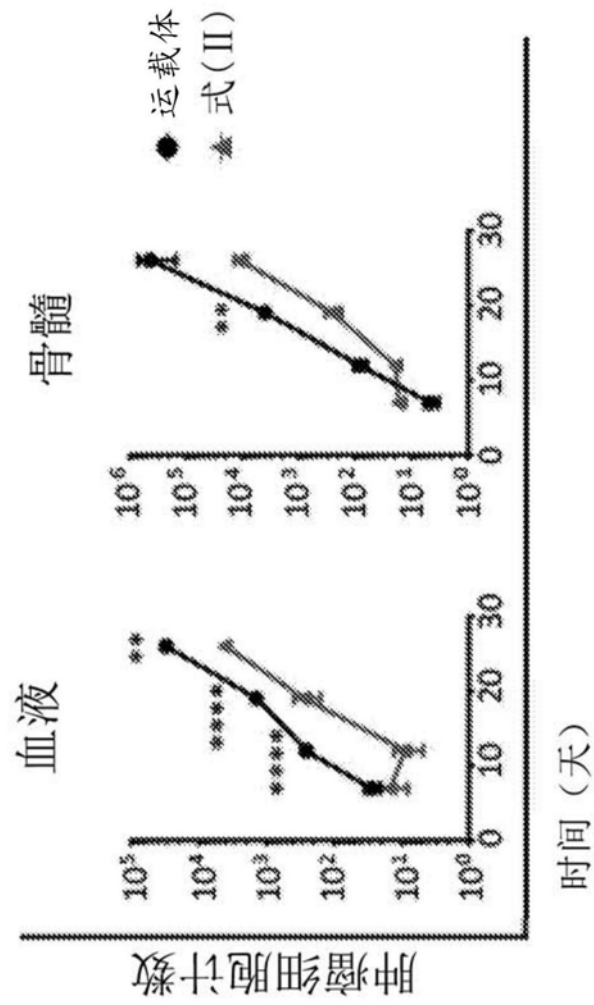


图7H

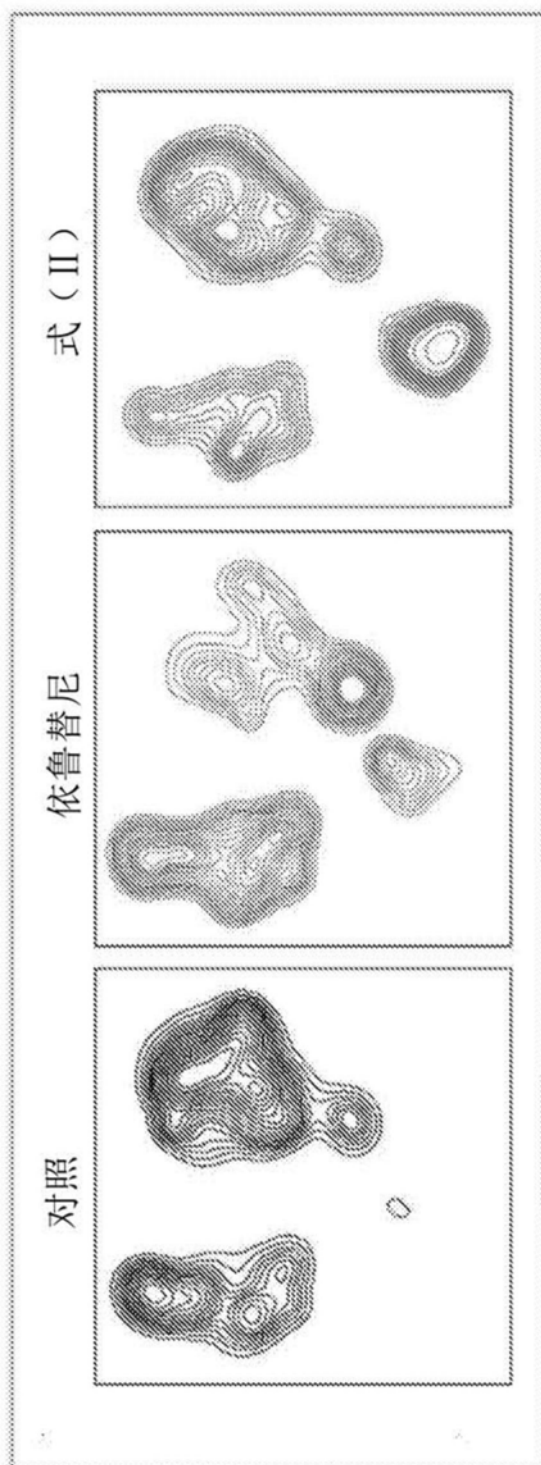


图8A

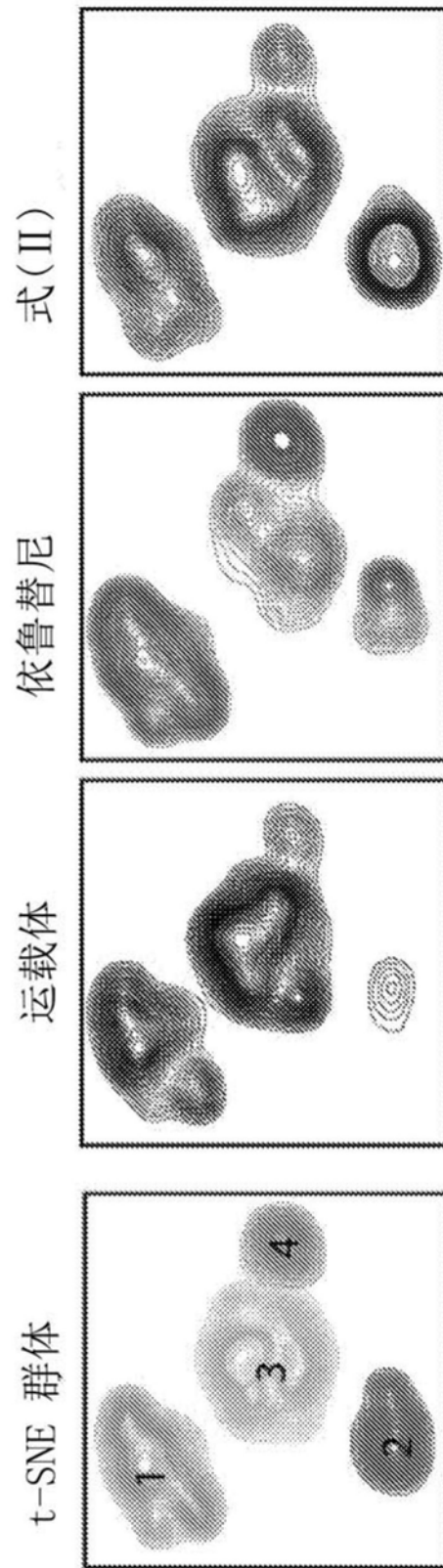


图8B

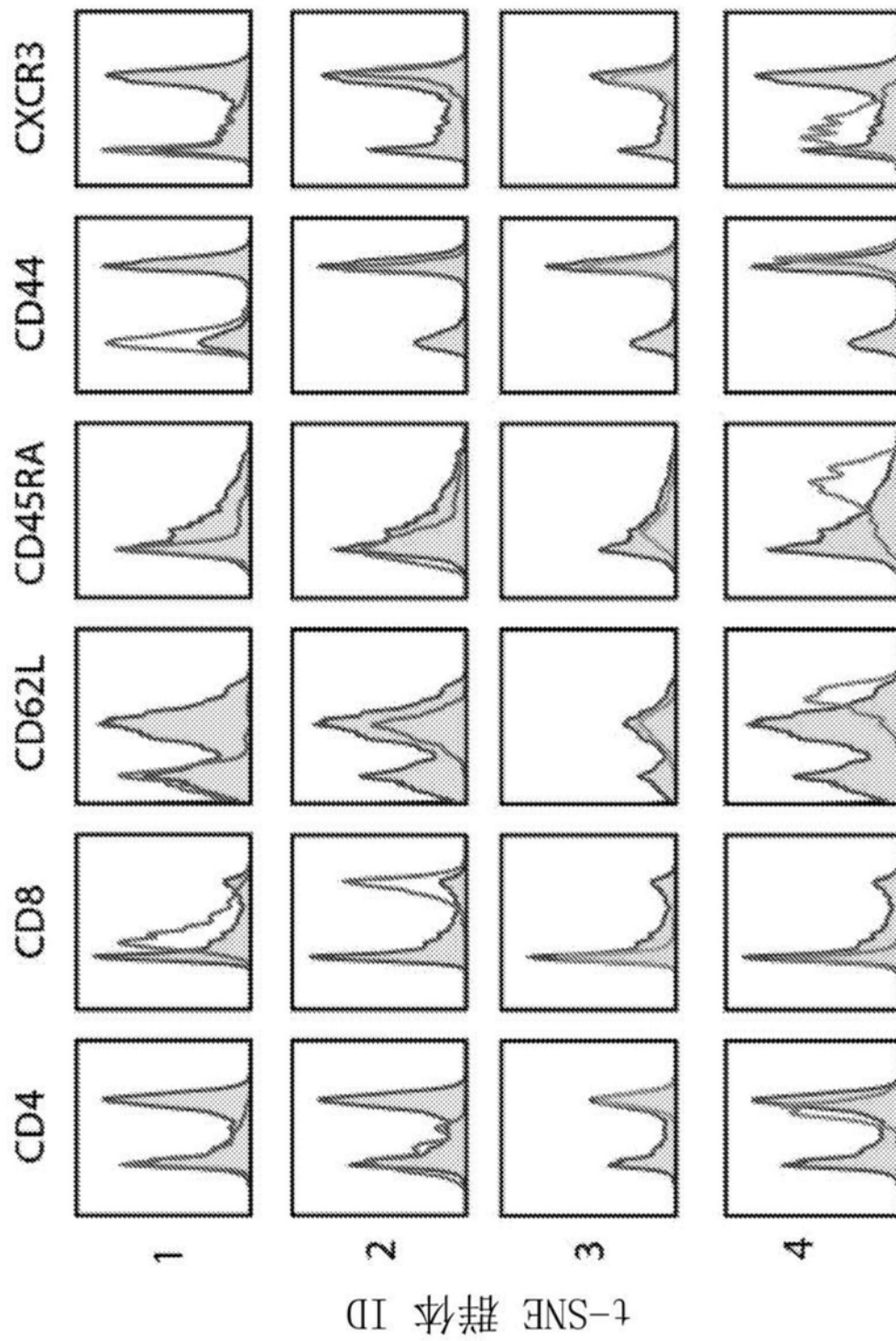


图8C

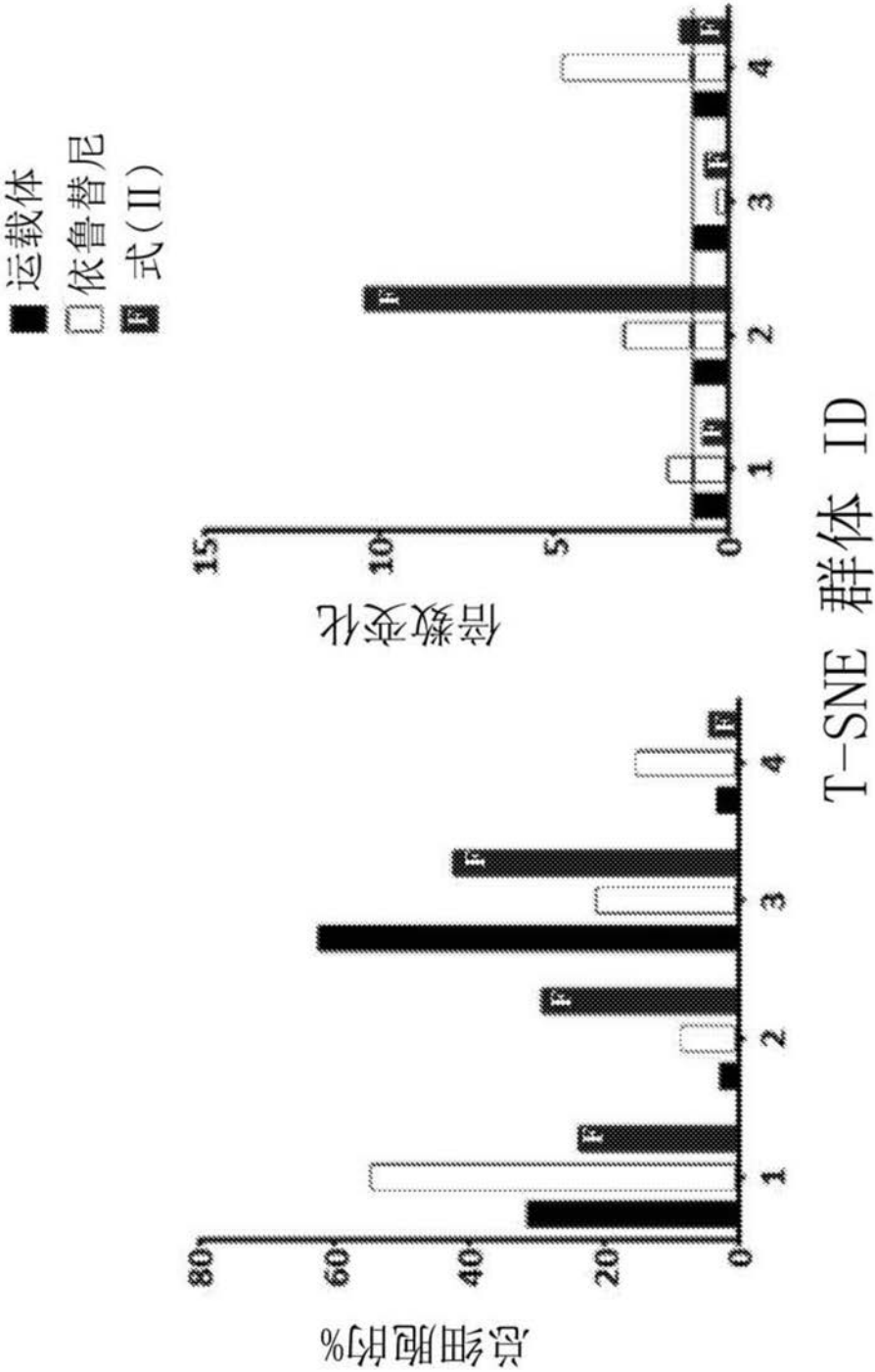


图8D

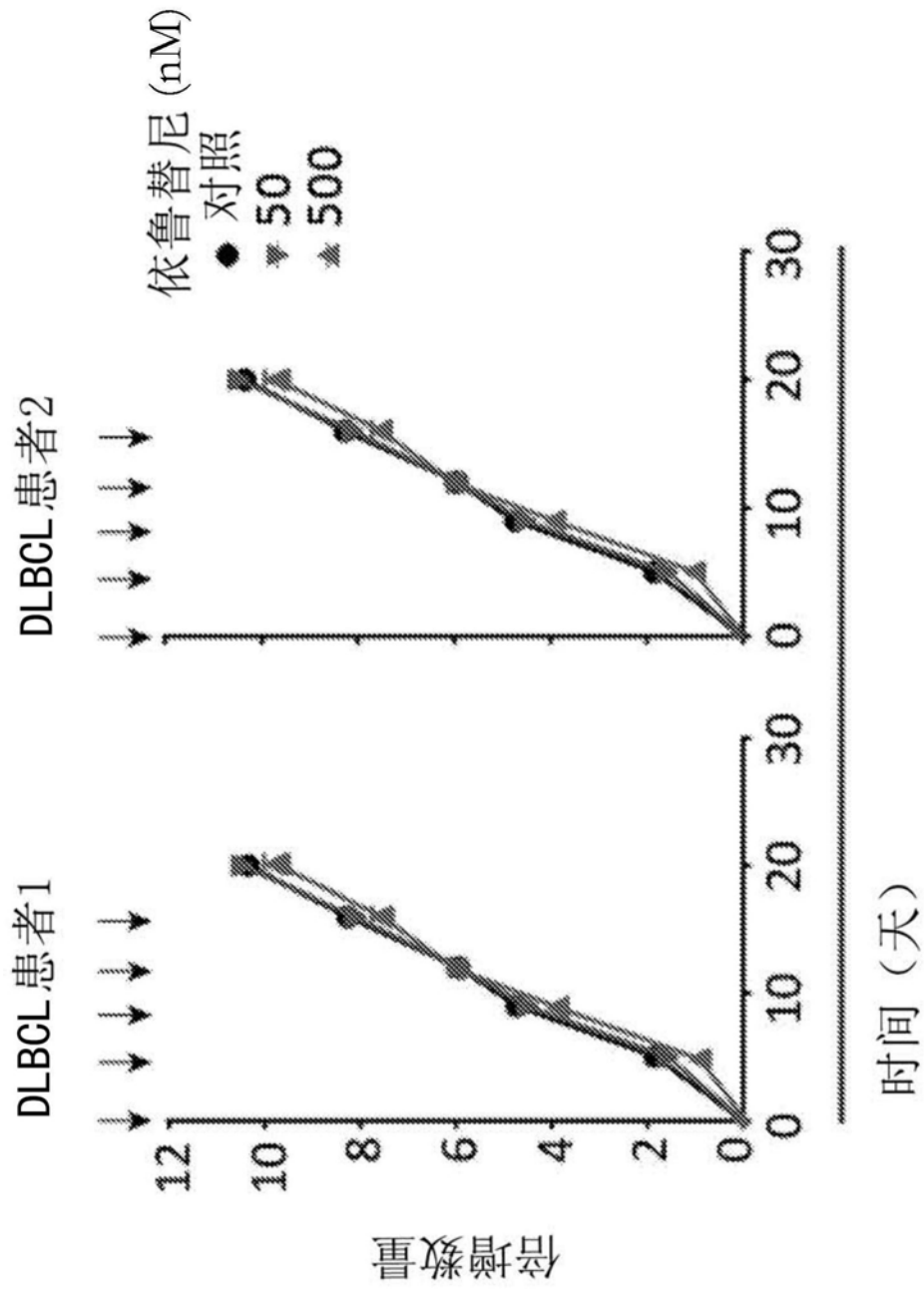


图9A

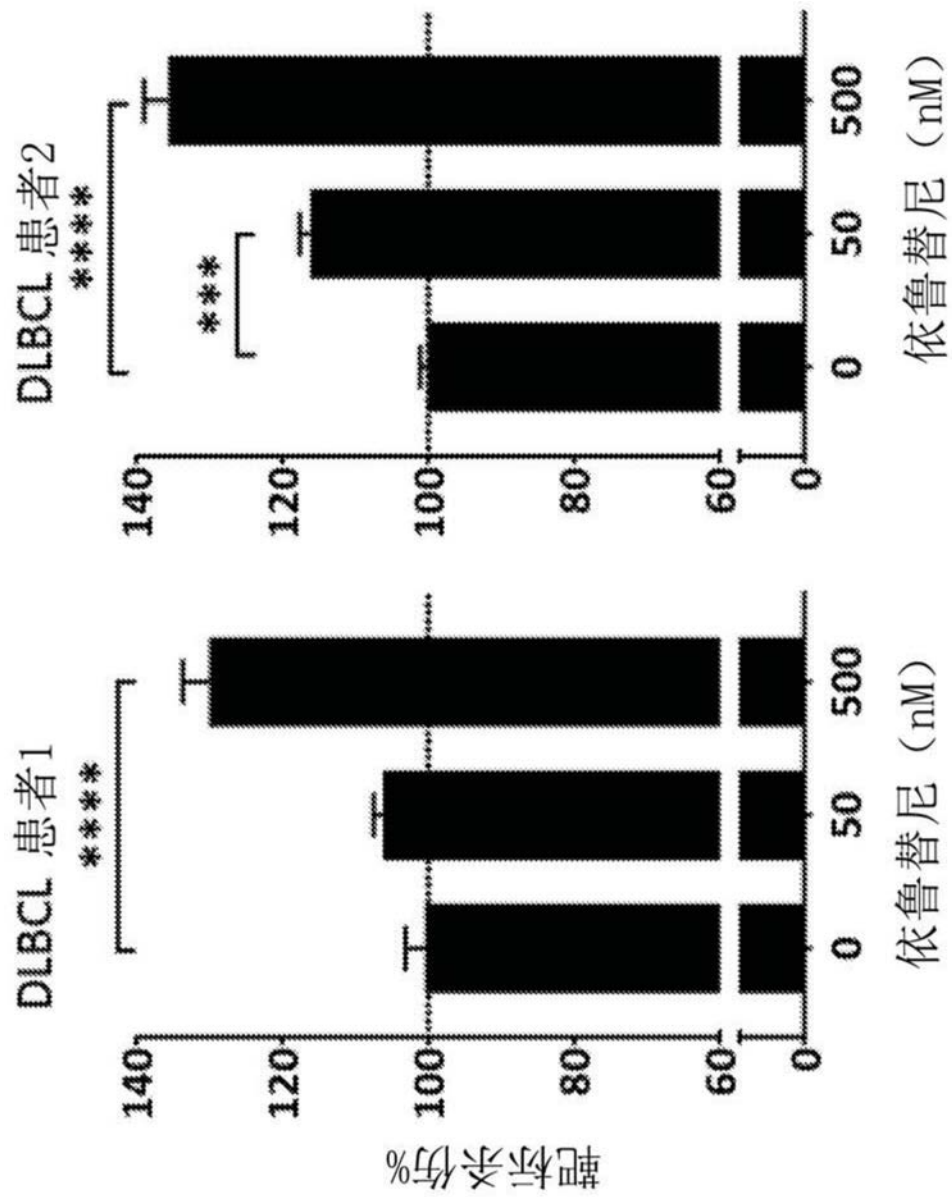


图9B

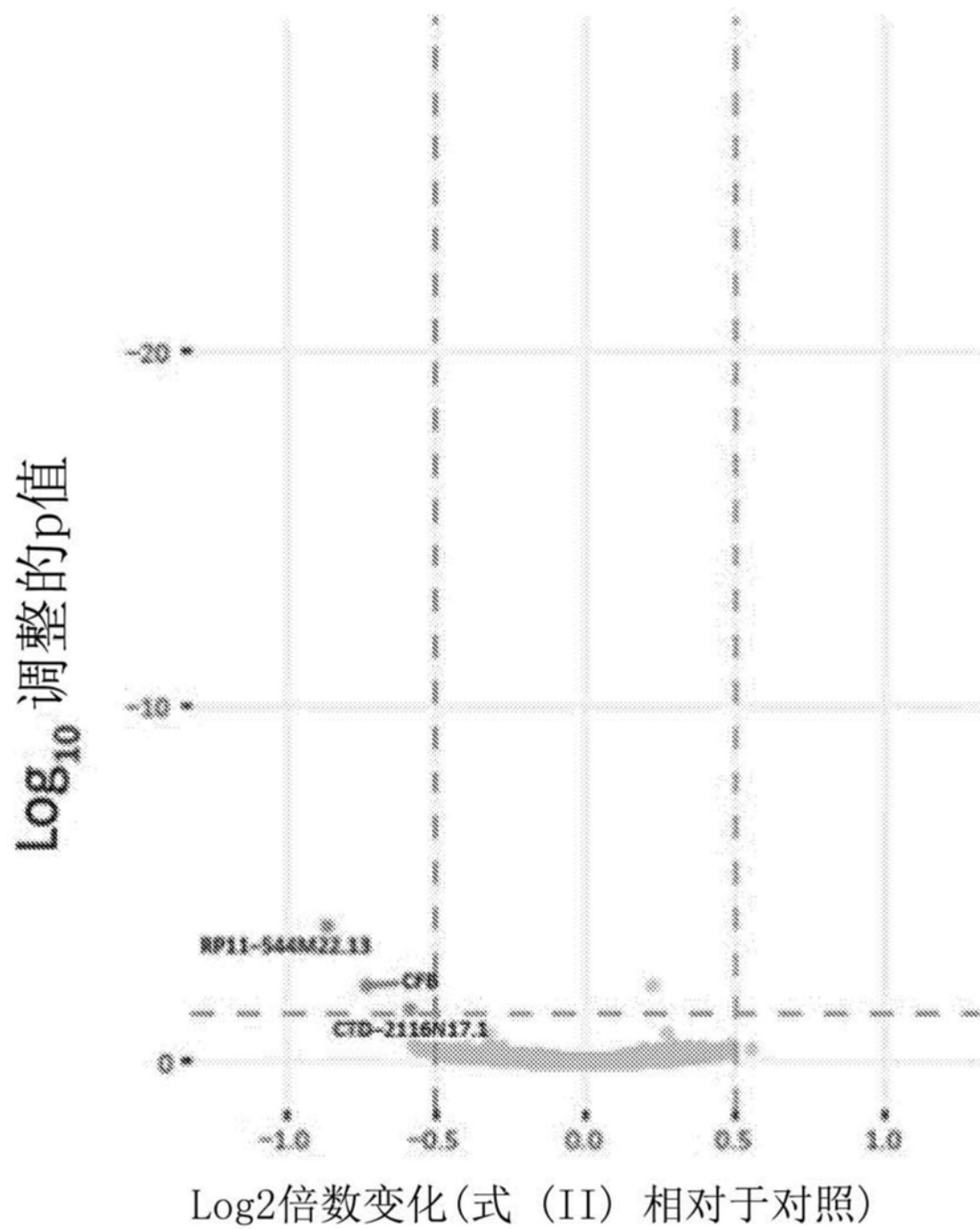


图10B

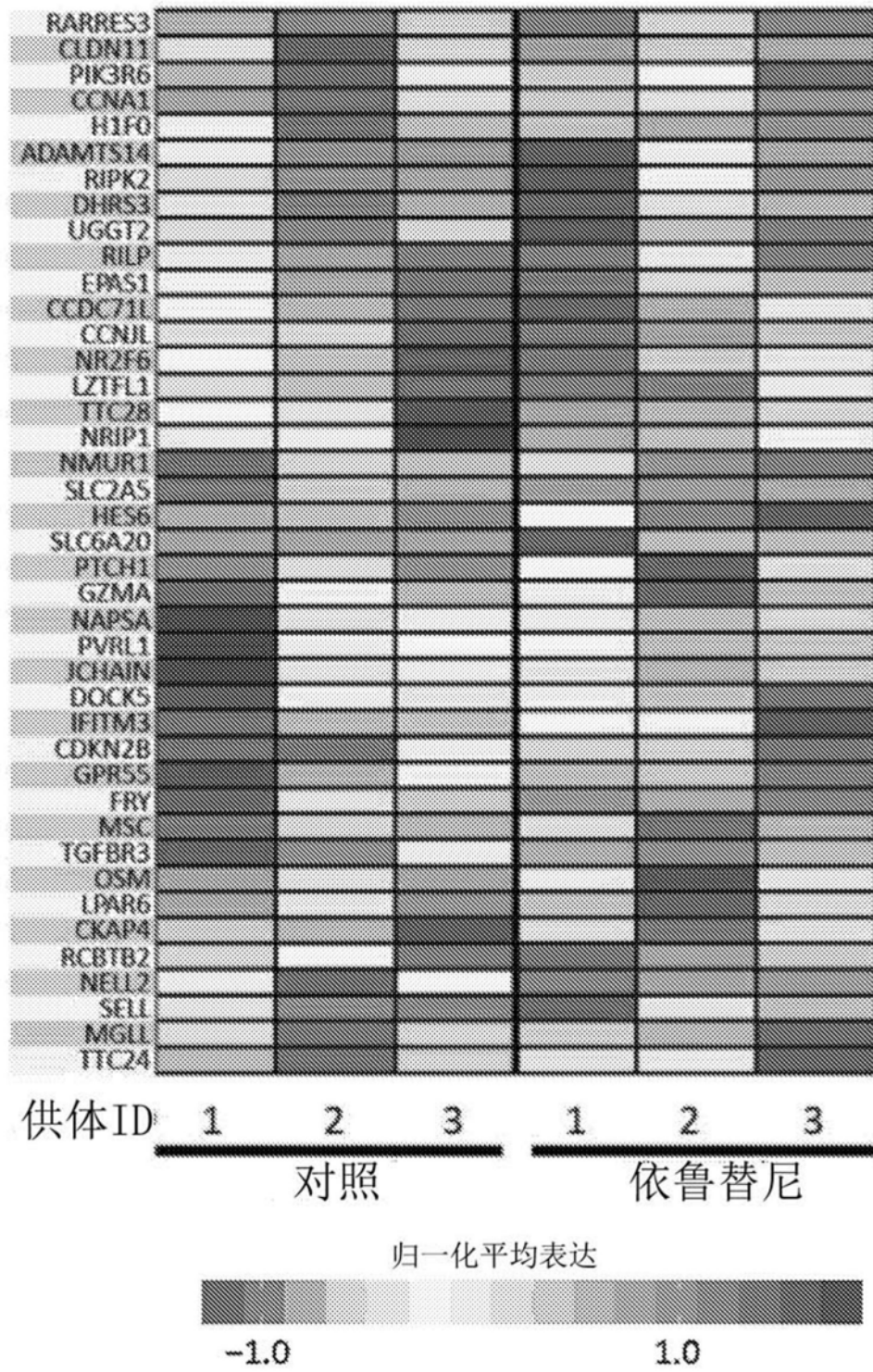


图10C

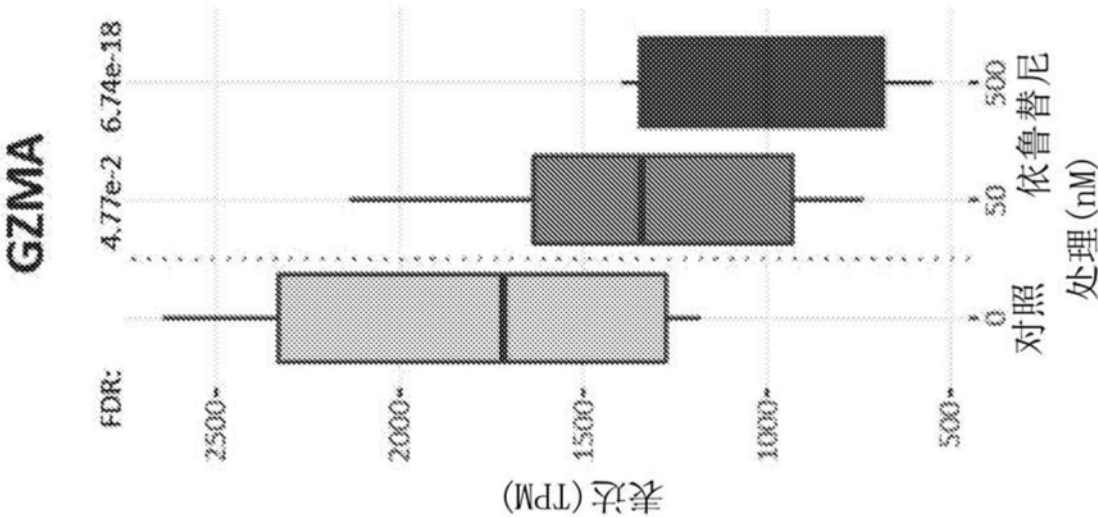


图11A

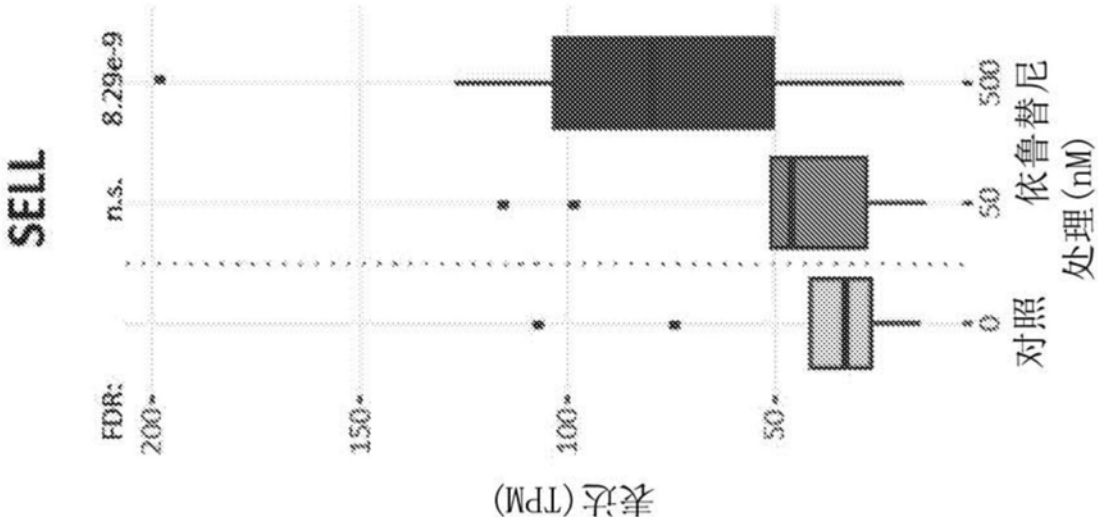


图11B

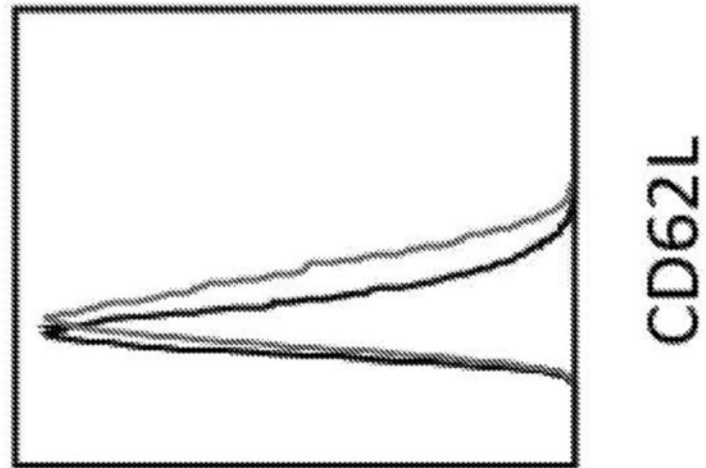


图12A

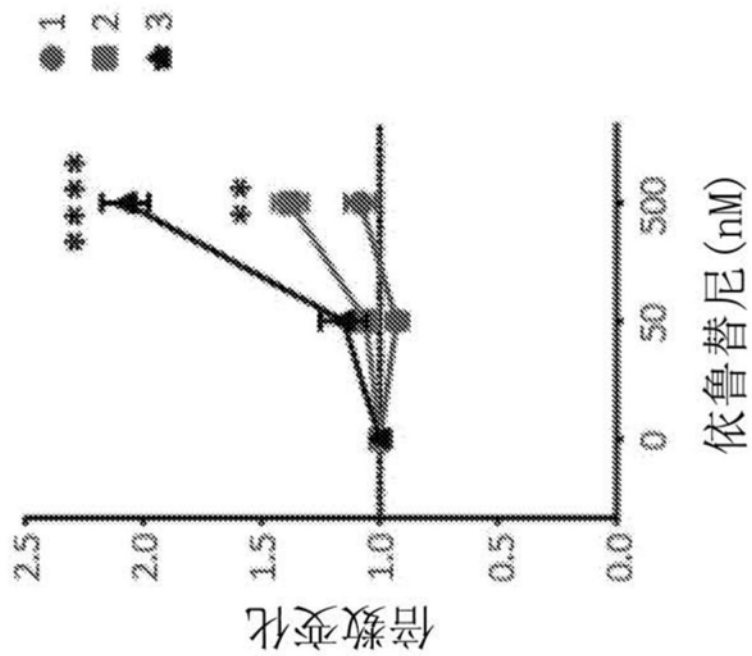


图12B