



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110819595 A

(43)申请公布日 2020.02.21

(21)申请号 201911200096.5

C12N 15/867(2006.01)

(22)申请日 2015.04.24

A61K 35/17(2015.01)

(30)优先权数据

A61P 37/04(2006.01)

61/984,558 2014.04.25 US

A61P 35/00(2006.01)

(62)分案原申请数据

201580033084.1 2015.04.24

(71)申请人 蓝鸟生物公司

地址 美国马萨诸塞州剑桥宾尼街60号

(72)发明人 理查德·摩根 凯文·弗里德曼

道恩·迈尔

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.

C12N 5/10(2006.01)

权利要求书1页 说明书55页

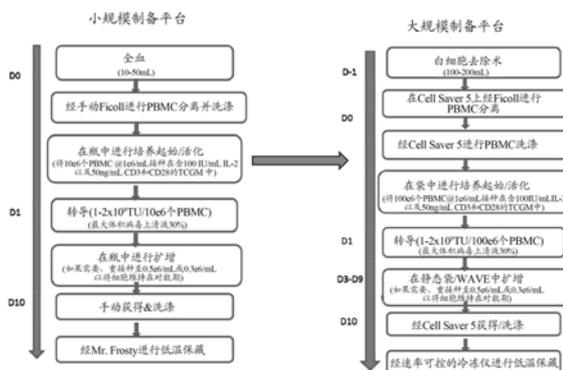
序列表5页 附图18页

(54)发明名称

制备过继性细胞疗法的改善方法

(57)摘要

本发明提供组合物以及用于制备过继性细胞疗法的方法。在具体实施方案中,本发明提供得到细胞群,分离并活化PBMC,扩增T细胞,以及向有此需要的对象施用T细胞治疗剂的方法。



1. 制备人T细胞治疗剂的方法,其包括:

a) 将PBMC群在细胞培养基中培养约16小时至约32小时,所述细胞培养基包含:i) 白细胞介素-2 (IL-2), ii) 抗CD3抗体或其CD3结合片段,以及iii) 抗CD28抗体或其CD28结合片段、B7-1或其CD28结合片段、或者B7-2或其CD28结合片段,其中所述培养活化并刺激所述T细胞;

b) 用编码抗BCMA嵌合抗原受体 (CAR) 的慢病毒载体转导步骤a) 中活化的PBMC群;以及

c) 将来自步骤b) 的PBMC群在细胞生长培养基中培养以扩增转导的T细胞;

从而制备所述T细胞治疗剂。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述抗BCMACAR包括:胞外结构域,其包含抗BCMA抗体或其抗原结合片段;CD8 α 或CD28跨膜结构域;一个或多个胞内共刺激信号转导结构域,其选自:CD27、CD28、CD54 (ICAM)、CD134 (OX40)、CD137 (41BB) 和CD278 (ICOS);以及CD3 ζ 初级信号转导结构域。

3. 制备人T细胞治疗剂的方法,其包括:

a) 将PBMC群在细胞培养基中培养约16小时至约32小时,所述细胞培养基包含:

i) 白细胞介素-2 (IL-2);

ii) 抗CD3抗体或其CD3结合片段;以及

iii) 抗CD28抗体或其CD28结合片段、B7-1或其CD28结合片段、或者B7-2或其CD28结合片段,其中所述培养活化并刺激所述T细胞;

b) 用编码抗BCMACAR的慢病毒载体转导步骤a) 中活化的PBMC群,所述抗BCMACAR包括能结合BCMA的单链可变片段 (scFv)、CD8 α 跨膜结构域、CD137胞内共刺激信号转导结构域和CD3 ζ 初级信号转导结构域;以及

c) 将来自步骤b) 的PBMC群在细胞生长培养基中培养以扩增转导的T细胞;

从而制备所述T细胞治疗剂。

4. 如权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述PBMC群在步骤a) 中的培养之前是低温保藏的。

5. 如权利要求1至4中任一项所述的方法,其还包括在缓冲液或细胞培养基中洗涤所述PBMC群。

6. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中将约 1×10^9 TU至约 2×10^9 TU的慢病毒载体用于转导 1×10^8 个接种细胞。

7. 如权利要求1至6中任一项所述的方法,其中将步骤c) 中的PBMC群培养扩增约5天至约8天。

8. 组合物,其包含通过权利要求1至7中任一项所述的方法制备的T细胞以及生理学可接受的赋形剂。

9. 通过权利要求1至7中任一项所述的方法制备的人T细胞。

10. 权利要求8所述的组合物或权利要求9所述的人T细胞在制备用于治疗有需要的对象中的恶性肿瘤的药物中的用途。

制备过继性细胞疗法的改善方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请基于35U.S.C.§119(e)要求于2014年4月25日提交的美国临时申请第61/984,558号的权益,将其通过引用整体并入本文。

[0003] 关于序列表的声明

[0004] 与本申请相关的序列表以文本格式提供,代替纸质本,并且在此通过引用并入说明书。含有序列表的文本文件的名称是BLBD_028_01W0_ST25.txt。文本文件为3KB,创建于2015年4月24日,并且经EFS-Web以电子方式与说明书文件同时提交。

[0005] 背景

技术领域

[0006] 本发明涉及用于制备免疫效应细胞的改善平台和相关方法。更具体而言,本发明涉及用于制备包含T细胞的治疗性免疫效应细胞组合物的可扩展、灵活、可靠且可复制的方法。

[0007] 相关领域的描述

[0008] 过继免疫疗法或过继性细胞疗法(ACT)是将基因修饰的T淋巴细胞转移至对象,用于疾病的疗法。过继免疫疗法尚未发挥其治疗多种疾病的潜能,所述疾病包括癌症、感染性疾病、自身免疫病、炎症性疾病和免疫缺陷。然而,大多数(即使不是全部)的过继免疫疗法策略需要T细胞的活化和扩增步骤以产生临床有效的治疗剂量的T细胞。由于活细胞培养的固有复杂性以及患者之间的可变性,用于产生治疗剂量的T细胞(包括工程化的T细胞)的当前技术仍然受繁琐的T细胞制备方法的限制。既有的T细胞制备方法并不是容易扩展、可重复、可靠或高效的,并且通常产生易于耗竭和丧失效应免疫细胞功能的较差T细胞产物。

[0009] 迄今为止,工程化的T细胞过继免疫疗法仅满足有限的成就并且通常显示可变的临床活性。因此,此类疗法不适合于广泛的临床用途。

[0010] 简要概述

[0011] 本发明大体上提供用于过继性细胞疗法的方法。

[0012] 在不同实施方案中,提供用于制备T细胞治疗剂的方法,其包括:获得包含T细胞和抗原递呈细胞(APC)的细胞群;将所述细胞群在细胞培养基中培养,所述细胞培养基包含:i)一种或多种细胞因子,ii)抗CD3抗体或其CD3结合片段,以及iii)抗CD28抗体或其CD28结合片段、B7-1或其CD28结合片段、或者B7-2或其CD28结合片段,其中所述培养活化并刺激T细胞;用病毒载体转导活化的细胞群;以及将细胞群于细胞生长培养基中培养以扩增转导的T细胞;从而制备T细胞治疗剂。

[0013] 在具体实施方案中,细胞群获自外周血、外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、来自感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾组织或肿瘤。

[0014] 在某些实施方案中,T细胞获自外周血、外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、来自感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾组织、肿瘤或T细胞系。

[0015] 在另外的实施方案中,APC获自外周血、外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带

血、胸腺组织、来自感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾组织或肿瘤。

[0016] 在一些实施方案中,细胞群包含外周血单核细胞(PBMC)。

[0017] 在其它实施方案中,得到或获得细胞群包括白细胞去除术。

[0018] 在具体实施方案中,分离细胞群包括沉降。

[0019] 在另外的实施方案中,沉降包括FICOLL™或PERCOLL™梯度。

[0020] 在某些实施方案中,使用半自动直流离心机进行沉降。

[0021] 在另外的实施方案中,半自动直流离心机是Cobe 2991细胞处理器、Cell Saver 5+或Teruma Elutra。

[0022] 在具体实施方案中,所述方法还包括在缓冲液或细胞培养基中洗涤细胞群。

[0023] 在一些实施方案中,在含有一种或多种细胞因子的T细胞生长培养基(TCGM)中洗涤细胞群。

[0024] 在一些实施方案中,TCGM中的一种或多种细胞因子选自:IL-2、IL7、IL-15、IL-9和IL-21。

[0025] 在具体实施方案中,细胞因子是IL-2。

[0026] 在某些实施方案中,IL-2的浓度为约250IU/mL。

[0027] 在某些实施方案中,IL-2的浓度为约100IU/mL至约300IU/mL。

[0028] 在一些实施方案中,所分离的细胞群包含PBMC。

[0029] 在另外的实施方案中,将细胞群在速率可控的冷冻仪中低温保藏。

[0030] 在其它实施方案中,将低温保藏的细胞群解冻。

[0031] 在其它实施方案中,以约 1×10^8 个细胞/mL的密度将细胞群接种于TCGM中,以在步骤(b)中培养。

[0032] 在其它实施方案中,以约 1×10^7 个细胞/mL的密度将细胞群接种于TCGM中,以在步骤(b)中培养。

[0033] 在其它实施方案中,以约 1×10^6 个细胞/mL的密度将细胞群接种于TCGM中,以在步骤(b)中培养。

[0034] 在其它实施方案中,以约 1×10^6 个细胞/mL的密度将约 1×10^8 个细胞接种于TCGM中,以在步骤(b)中培养。

[0035] 在具体实施方案中,将细胞群在细胞培养袋或生物反应器中培养。

[0036] 在某些实施方案中,TCGM包含选自以下的一种或多种细胞因子:IL-2、IL7、IL-15、IL-9和IL-21。

[0037] 在其它实施方案中,一种或多种细胞因子选自IL-2、IL-7和IL-15。

[0038] 在另外的实施方案中,一种或多种细胞因子包括IL-2。

[0039] 在另外的实施方案中,一种或多种细胞因子的浓度为约250IU/mL。

[0040] 在另外的实施方案中,一种或多种细胞因子的浓度为约25IU/mL至约500IU/mL。

[0041] 在其它实施方案中,用可溶的抗CD3抗体和可溶的抗CD28抗体培养细胞群。

[0042] 在某些实施方案中,抗CD3抗体的浓度为约50ng/mL。

[0043] 在具体实施方案中,抗CD28抗体的浓度为约50ng/mL。

[0044] 在具体实施方案中,在转导之前,将步骤b)的细胞群培养约12小时至约48小时。

[0045] 在其它实施方案中,在转导之前,将步骤b)的细胞群培养约16小时至约32小时。

- [0046] 在另外的实施方案中,在转导之前,将步骤b)的细胞群培养至少18小时。
- [0047] 在其它实施方案中,在转导之前,将步骤b)的细胞群培养至少24小时。
- [0048] 在某些实施方案中,用逆转录病毒载体转导步骤d)的细胞群。
- [0049] 在某些实施方案中,用慢病毒载体转导步骤d)的细胞群。
- [0050] 在其它实施方案中,将约 1×10^9 TU至约 2×10^9 TU的病毒载体用于转导 1×10^8 个接种细胞。
- [0051] 在其它实施方案中,将约 1×10^9 TU至约 4×10^9 TU的病毒载体用于转导 1×10^8 个接种细胞。
- [0052] 在具体实施方案中,将病毒载体稀释至总培养体积的20% v/v。
- [0053] 在具体实施方案中,将病毒载体稀释至总培养体积的约20%至约40% v/v。
- [0054] 在另外的实施方案中,将细胞群转导约18至约48小时。
- [0055] 在其它实施方案中,将细胞群转导约18至约36小时。
- [0056] 在其它实施方案中,将细胞群转导约24小时。
- [0057] 在另外的实施方案中,病毒载体包含编码嵌合抗原受体的多核苷酸。
- [0058] 在某些实施方案中,CAR包含胞外结构域,跨膜结构域,一个或多个胞内共刺激信号转导结构域以及CD3 ζ 信号转导结构域;所述胞外结构域与选自以下的抗原结合: α 叶酸受体、5T4、 α v β 6整合素、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD138、CD171、CEA、CSPG4、EGFR、包括ErbB2 (HER2)的EGFR家族、EGFRvIII、EGP2、EGP40、EPCAM、EphA2、EpCAM、FAP、胎儿型AchR、FR α 、GD2、GD3、' 磷脂酰肌醇聚糖-3 (GPC3)、HLA-A1+MAGE1、HLA-A2+MAGE1、HLA-A3+MAGE1、HLA-A1+NY-ESO-1、HLA-A2+NY-ESO-1、HLA-A3+NY-ESO-1、IL-11R α 、IL-13R α 2、 λ 、Lewis-Y、 κ 、间皮素、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2D配体、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、ROR1、SSX、生存素、TAG72、TEM和VEGFR2;所述跨膜结构域源自选自以下的多肽:CD8 α 、CD4、CD28、CD45、PD1和CD152;所述一个或多个胞内共刺激信号转导结构域选自:CD28、CD54 (ICAM)、CD134 (OX40)、CD137 (41BB)、CD152 (CTLA4)、CD273 (PD-L2)、CD274 (PD-L1)和CD278 (ICOS)。
- [0059] 在具体实施方案中,胞外结构域包含与抗原结合的抗体或抗原结合片段。
- [0060] 在其它实施方案中,跨膜结构域源自CD8 α 或CD28。
- [0061] 在某些实施方案中,一个或多个共刺激信号转导结构域选自CD28、CD134和CD137。
- [0062] 在其它实施方案中,其包含铰链区多肽。
- [0063] 在另外的实施方案中,铰链区多肽包含IgG1或CD8 α 的铰链区。
- [0064] 在具体实施方案中,CAR还包含信号肽。
- [0065] 在具体实施方案中,信号肽包括IgG1重链信号多肽、CD8 α 信号多肽或人GM-CSF受体 α 信号多肽。
- [0066] 在另外的实施方案中,将步骤d)中的细胞群培养扩增约5至约8天。
- [0067] 在某些实施方案中,将步骤d)中的细胞群在细胞培养袋中培养扩增约5天至约8天。
- [0068] 在其它实施方案中,将步骤d)中的细胞群在细胞培养袋中培养扩增约5天,然后在生物反应器中培养约3天。
- [0069] 在另外的实施方案中,将步骤d)中的细胞群在生物反应器中培养扩增约5天至约8

天。

- [0070] 在其它实施方案中,生物反应器是WAVE生物反应器或GREX生物反应器。
- [0071] 在具体实施方案中,在步骤d)的培养期间,T细胞的数目扩增至少50倍。
- [0072] 在某些实施方案中,在步骤d)的培养期间,T细胞的数目扩增至少100倍。
- [0073] 在具体实施方案中,在步骤d)的培养期间,T细胞的数目扩增至少200倍。
- [0074] 在其它实施方案中,在步骤d)的培养期间,T细胞的数目扩增至少300倍。
- [0075] 在另外的实施方案中,在步骤d)的培养期间,T细胞的数目扩增至少400倍。
- [0076] 在另外的实施方案中,在步骤d)的培养期间,T细胞的数目扩增至少500倍。
- [0077] 在其它实施方案中,在步骤d)的培养期间,T细胞的数目扩增至少600倍。
- [0078] 在某些实施方案中,所述方法还包括回收所制备的T细胞治疗剂。
- [0079] 在某些实施方案中,回收T细胞治疗剂包括浓缩并洗涤步骤d)中扩增的细胞。
- [0080] 在具体实施方案中,使用半自动直流离心机(semiautomated flowthrough centrifuge)浓缩并洗涤T细胞治疗剂。
- [0081] 在其它实施方案中,半自动直流离心机为Cell Saver 5+或LOVO。
- [0082] 在具体实施方案中,所述方法还包括将T细胞治疗剂低温保藏。
- [0083] 在另外的实施方案中,将低温保藏的T细胞解冻,以用于过继性细胞疗法的方法。
- [0084] 在不同实施方案中,提供组合物,其包含以上所描述的前述实施方案中任一项以及本文别处所述制备的T细胞以及生理学可接受的赋形剂。
- [0085] 在各种其它实施方案中,提供治疗有此需要的对象中的恶性肿瘤的方法,其包括向所述对象施用以上所描述的前述实施方案中任一项以及本文别处所述的T细胞治疗剂。
- [0086] 附图几个视图的简要描述
- [0087] 图1显示了在T细胞制备过程期间,在不同时间进行转导的转导细胞的转导效率和VCN。在D0、D1和D2,用表达GFP的慢病毒以 $1-2 \times 10^8$ TU/106个PBMC对细胞进行转导。对表达GFP的细胞进行的CD3、CD8或CD4表达的FACS分析确定,转导效率和VCN在活化之后20至24小时(D1)进行转导的细胞中最高。
- [0088] 图2显示了使用不同的方法活化的细胞的转导效率。使用(i)板结合的抗CD3和抗CD28抗体;(ii)可溶的抗CD3和抗CD28抗体;以及(iii)珠结合的抗CD3和抗CD28抗体来活化PBMC。用表达抗CD19CAR的慢病毒以 $1-2 \times 10^8$ TU/106个PBMC对活化的细胞进行转导。与其它方法相比,转导效率和VCN在用可溶的抗CD3和抗CD28抗体活化的表达T细胞标志物CD3、CD8或CD4的表达GFP的细胞中较高。
- [0089] 图3显示,在细胞培养袋中的活化和转导可与在瓶中的转导相比较。在D0,使用浓度为50ng/mL的可溶的抗CD3和抗CD28抗体对PBMC进行活化。在D1,用表达 κ LC的慢病毒,以 3×10^8 TU/106个PBMC转导活化的细胞。当细胞在细胞培养袋或瓶中活化和转导时,其转导效率是可比较的。在细胞培养袋中活化和转导的细胞中,VCN略高。
- [0090] 图4显示,通过不同方法活化的PBMC中T细胞的扩增是可比较的。使用(i)板结合的抗CD3和抗CD28抗体;和(ii)可溶的抗CD3和抗CD28抗体,来活化PBMC;或者使用(iii)珠结合的抗CD3和抗CD28抗体来活化纯化的淋巴细胞。PBMC和淋巴细胞来自相同来源。用表达抗CD19 CAR的慢病毒,以 $1-2 \times 10^8$ TU/106个PBMC对活化的细胞进行转导。通过三种方法活化的PBMC中的细胞扩增在十天的扩增培养期是可比较的。

[0091] 图5显示,来自多个供体的PBMC显示可比较的和稳健的扩增。使用可溶的抗CD3和抗CD28抗体对PBMC进行活化。用表达抗CD19CAR的慢病毒,以 $1-2 \times 10^8$ TU/106个PBMC对活化的细胞进行转导。培养10天的来自多个供体的活化且转导的细胞在彼此和未转导的对照(UTD)之间显示可比较的生长速率。还显示了在第10天,存在于各扩增培养物中的淋巴细胞的数目。

[0092] 图6是代表性的FACS分析,其显示抗CD19 CAR的表达在产生自不同患者的细胞产物中是可比较的,平均值为约61%标记的,范围为29%至80% ($n=5$)。qPCR也表明,细胞产物中的VCN在产生自不同患者的细胞产物中是可比较的。

[0093] 图7显示,通过用可溶的抗体活化的T细胞进行的抗原特异性肿瘤清除与使用其它方法活化的T细胞一样好,或者优于使用其它方法活化的T细胞。使用(i)板结合的抗CD3和抗CD28抗体;(ii)可溶的抗CD3和抗CD28抗体;以及(iii)珠结合的抗CD3和抗CD28抗体,对PBMC进行活化。用表达抗CD19 CAR的慢病毒,以 $1-2 \times 10^8$ TU/106个PBMC对活化的细胞进行转导。将扩增的抗CD19 CAR T细胞与表达CD19的Daudi细胞或不表达CD19的K562细胞共培养。使用可溶的抗体活化的抗CD19 CAR T细胞以抗原特异性的方式杀死Daudi细胞,但是不杀死K562细胞,其与通过其它方法活化的抗CD19 CAR T细胞一样好,或者优于通过其它方法活化的抗CD19 CAR T细胞。

[0094] 图8显示了通过使用本文所考虑的方法制备的CAR T细胞进行的抗原特异性肿瘤清除的代表性实验。使用可溶的抗CD3和抗CD28抗体对PBMC进行活化,用表达抗CD19 CAR的慢病毒,以 $1-2 \times 10^8$ TU/ 10^6 个PBMC进行转导。抗CD19 CAR T细胞杀死表达CD19的Daudi细胞,但是不杀死不表达CD19的K562细胞。

[0095] 图9显示了小规模研究T细胞制备平台和按比例增加的临床cGMP药物制备平台的流程图比较。小规模方法允许对CART构建体进行较高通量的评价,确保数据与大规模cGMP制备平台将是可比较的。

[0096] 图10显示了利用新鲜的PBMC、细胞培养袋以及任选地WAVE生物反应器的T细胞制备平台的流程图。

[0097] 图11显示了利用冷冻的PBMC、细胞培养袋以及任选地WAVE生物反应器的T细胞制备平台的流程图。

[0098] 图12显示了利用新鲜的PBMC和GREX生物反应器的T细胞制备平台的流程图。

[0099] 图13显示了对来自小规模和大规模制备方法的最终制备的CAR T细胞产物的表型进行比较的示例性实验。对CD4、CD8、CAR T构建体、CD56和CD62L细胞表面标志物的表达进行的FACS分析确定平台之间最终CAR T产物的表型中无任何显著差异。两个平台之间所有表面标志物的 $p \geq 0.20$ ($n=3$)。

[0100] 图14显示了来自18名供体的PBMC的细胞组合物,其利用FICOLL™分离并且在Cell Saver® 5+自体血回收系统(Haemonetics)上进行洗涤。通过对CD45⁺细胞、T细胞、CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、B细胞、NK细胞以及单核细胞和树突细胞进行FACS,表征得到的细胞群。细胞特性在18名供体之间是一致的。

[0101] 图15显示利用不同的方法制备的CAR T细胞产生可比较的最终细胞产物。利用小规模(T25瓶)和大规模(GREX100、静态细胞培养袋和WAVE生物反应器)设备制备CAR T细胞。10天培养期内的细胞生长速率和扩增的细胞数在方法之间是可比较的。(A).FACS分析显示

CD3⁺细胞的数量在制备方法之间是一致的。(B) .qPCR显示CD3⁺细胞的VCN在所测试的各种制备方法之间是可比较的。

[0102] 图16显示了多种慢病毒CAR构建体的卡通图。构建体在启动子、scFV、+/-接头、铰链、跨膜区和信号转导结构域方面不同。

[0103] 图17显示,不同的CAR T细胞产物显示(A) 可比较的生长速率;(B) VCN;以及(C) 不同CAR构建体的细胞表面表达。

[0104] 图18显示了使用表达CAR的T细胞的抗原特异性肿瘤清除。(A) .表达抗BCMA的CAR T细胞杀死用羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE) 标记的表达BCMA的肿瘤细胞;通过FACS测量荧光。(B) .将表达抗BCMA的CAR T细胞与K562细胞和被遗传修饰以表达BCMA的K562细胞共培养,以及在24小时后收集上清液,并经ELISA分析IFN- γ 的释放(n=3)。

[0105] 详细描述

[0106] A. 概述

[0107] 既有的用于制备过继性细胞疗法的方法繁琐且昂贵,并且对在临床上使用ACT作为广泛的治疗呈现巨大障碍。所述组合物和方法为涉及制备基于细胞的治疗剂的这些和其它问题提供了解决方案。本发明大体上涉及用于制备T细胞治疗剂的改善方法。不希望束缚于任何具体理论,与本领域中既有的T细胞组合物相比,本文所考虑的发明方法产生可复制、可靠且稳健的ACT制备平台。

[0108] 在不同实施方案中,提供用于制备过继性细胞疗法的方法、免疫效应细胞组合物或治疗剂的方法,用于扩增免疫效应细胞的方法,以及免疫效应细胞制备平台。在具体的优选实施方案中,通过本文所考虑的方法制备工程化的TCR或CAR免疫效应细胞组合物,其还可以增加免疫效应细胞过继性细胞疗法的效力。本文所考虑的制备的细胞组合物在众多病况的治疗或预防中有益,所述病况包括但不限于癌症、感染性疾病、自身免疫病、炎症性疾病和免疫缺陷。

[0109] 在不同实施方案中,用于制备包含免疫效应细胞的治疗性组合物的方法包括:获得包含免疫效应细胞的细胞群,活化所述细胞群,以及培养所述细胞群以扩增免疫效应细胞。在具体实施方案中,免疫效应细胞包含T细胞,以及任选地包含NK细胞和/或NKT细胞。

[0110] 在不同实施方案中,在细胞培养袋和/或生物反应器中制备免疫效应细胞。

[0111] 在其它不同的实施方案中,在生物反应器中制备免疫效应细胞。

[0112] 在一个实施方案中,用于制备包含T细胞的治疗性组合物的方法包括从对象中得到细胞,并且使用封闭的系统方法分离细胞群。在具体实施方案中,可以从任何合适的新鲜或冷冻来源分离细胞。在某些实施方案中,分离的细胞群包含外周血单核细胞(PBMC)。接种分离的细胞群以起始培养,以及通过使细胞与初级配体(primary ligand) 和共刺激配体接触,活化并刺激T细胞。在具体实施方案中,用病毒载体转导包含活化的T细胞的细胞群,以便将转导的细胞重定向至特定的靶抗原。在某些实施方案中,用编码CAR或工程化的TCR的病毒载体转导细胞。然后将转导的细胞或非转导的细胞在生长培养基中培养以扩增免疫效应细胞,例如T细胞。然后将制备的免疫效应细胞组合物用来治疗有此需要的对象或者冷冻备用。

[0113] 使用本文所考虑的方法制备的过继性细胞疗法在产生具有可复制水平的扩增、细胞特性、VCN的细胞药物产品方面是有效的,并且所述药物产品在介导抗原特异性肿瘤清除

方面是有效的。所述方法在产生过继性细胞疗法中提供降低的患者间的可变性,并且是可复制、可靠、可扩展且可转移的cGMP制备方法。因此,与既有的过继性细胞免疫疗法相比,本文所考虑的方法和组合物显示重大改善。

[0114] 除非明确指明相反,否则本发明的实践将采用本领域技术内的常规化学、生物化学、有机化学、分子生物学、微生物学、重组DNA技术、遗传学、免疫学和细胞生物学方法,出于示例的目的,下文描述其中的一些。此类技术在文献中被充分解释。参见,例如,Sambrook等人,《分子克隆:实验室手册》(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)(第3版,2001);Sambrook等人,《分子克隆:实验室手册》(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)(第2版,1989);Maniatis等人,《分子克隆:实验室手册》(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)(1982);Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley和Sons,2008年7月更新);Short Protocols in Molecular Biology:A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology,Greenlee Pub.Associates and Wiley-Interscience;Glover,DNA Cloning:A Practical Approach,vol.I&II(IRL Press,Oxford,1985);Anand,Techniques for the Analysis of Complex Genomes,(Academic Press,New York,1992);Transcription and Translation(B.Hames&S.Higgins,Eds.,1984);Perbal,A Practical Guide to Molecular Cloning(1984);Harlow和Lane,Antibodies,(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1998)Current Protocols in Immunology Q.E.Coligan,A.M.Kruisbeek,D.H.Margulies,E.M.Shevach和W.Strober,eds.,1991);Annual Review of Immunology;以及期刊专著如Advances in Immunology。

[0115] 在此,将本文引用的所有出版物、专利和专利申请通过引用整体并入。

[0116] B. 定义

[0117] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同。尽管在本发明的实践或测试中可以使用与本文描述的方法和材料类似或等同的任何方法和材料,但是本文描述了组合物、方法和材料的优选实施方案。出于本发明的目的,在下文定义了以下术语。

[0118] 冠词“一个/一种(a)”、“一个/一种(an)”和“所述(the)”在本文用来指“一个/一种(one)”或者指“多个/多种(more than one)”(即,指“至少一个/至少一种(at least one)”)的所述冠词的语法上对象。举例来说,“元素(an element)”意指一种元素或多种元素。

[0119] 本文使用的术语“约”或“大约”指针对参照的量、水平、值、数、频率、百分比、尺寸、大小、数量、重量或长度变化多达30%、25%、20%、25%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%的量、水平、值、数、频率、百分比、尺寸、大小、数量、重量或长度。在具体实施方案中,当在数值之前时,术语“约”或“大约”表示加或减15%、10%、5%或1%范围的值。

[0120] 本文使用的术语“基本上”指为参照的量、水平、值、数、频率、百分比、尺寸、大小、数量、重量或长度的80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的量、水平、值、数、频率、百分比、尺寸、大小、数量、重量或长度。在一个实施方案中,“基本上相同”指产生与参照的量、水平、值、数、频率、百分比、尺寸、大小、数量、重量或长度大约相同的效果(例如,生理效应)的量、水平、值、数、频率、百分比、尺寸、大小、数量、重量

或长度。

[0121] 在整个说明书中,除非上下文另有要求,单词“包含(comprise)”、“包含(comprises)”和“包含(comprising)”将被理解为暗示包括指定的步骤或元素或者步骤或元素的组,但不排除任何其它步骤或元素或者步骤或元素的组。“由...组成”意指包括且限于短语“由...组成”之后的任何内容。因此,短语“由...组成”表示列出的元素是必需或强制的,并且不可以存在其它元素。“基本上由...组成”意指包括短语之后列出的任何元素,且限于不干扰或者不促进本公开详细说明书的所列元素的活性或作用的其它元素。因此,短语“基本上由...组成”表示所列元素是必需的或强制的,但是其它元素不是任选的,且可以存在或不可以存在,这取决于它们是否影响所列元素的活性或作用。

[0122] 在整个说明书中提及的“一个实施方案”、“实施方案”、“具体实施方案”、“相关实施方案”、“某些实施方案”、“另外的实施方案”或“其它实施方案”或者以上的组合意指,与实施方案相关的所描述的具体特征、结构或特性被包括在本发明的至少一个实施方案中。因此,前述短语在整个说明书的不同地方的出现不一定全部指相同的实施方案。而且,可以在一个或多个实施方案中,以任意合适的方式将具体的特征、结构或特性组合。

[0123] 本文使用的术语“T细胞制备”或“制备T细胞的方法”或者相当的术语指产生T细胞的治疗性组合物的方法,所述制备方法可以包括对包含T细胞的细胞群或纯化的T细胞群进行一次或多次下述步骤中的一种或多种或者全部:得到、分离、洗涤、刺激、活化、修饰、扩增、低温保藏以及解冻,或者以上的任何合适组合。

[0124] 术语“T细胞”或“T淋巴细胞”是本领域公认的,且旨在包括胸腺细胞、初始T淋巴细胞、不成熟的T淋巴细胞、成熟的T淋巴细胞、静息T淋巴细胞或活化的T淋巴细胞。适合用于具体实施方案中的示例性T细胞群包括但不限于辅助性T细胞(HTL;CD4⁺T细胞)、细胞毒性T细胞(CTL;CD8⁺T细胞)、CD4⁺CD8⁺T细胞、CD4⁺CD8⁻T细胞或者T细胞的任何其它亚群。适合用于具体实施方案中的其它示例性T细胞群包括但不限于表达下述标志物中的一种或多种的T细胞:CD3、CD4、CD8、CD27、CD28、CD45RA、CD45RO、CD62L、CD127、CD197和HLA-DR,并且若需要,可以通过阳性或阴性选择技术进一步分离。

[0125] 外周血单核细胞(PBMC)被定义为具有圆形核的任何血细胞(即,淋巴细胞、单核细胞或巨噬细胞)。这些血细胞是免疫系统抵抗感染并适应入侵者的关键组分。淋巴细胞群由CD4⁺和CD8⁺T细胞、B细胞和自然杀伤细胞、CD14⁺单核细胞和嗜碱性粒细胞/嗜中性粒细胞/嗜酸性粒细胞/树突细胞组成。通常,使用FICOLL™(使血液分层的亲水多糖),从全血或从leukopack分离这些细胞,其中单核细胞和淋巴细胞在血浆层下形成血沉棕黄层。在一个实施方案中,“PBMC”指至少包含T细胞,以及任选地包含NK细胞和抗原递呈细胞的细胞群。

[0126] “抗原递呈细胞”指通过加工抗原并将抗原递呈至T细胞来介导细胞免疫应答的异质免疫活性细胞群。抗原递呈细胞包括但不限于:巨噬细胞、树突细胞、朗格汉斯细胞、B淋巴细胞、血小板和人工抗原递呈细胞(aAPC)。

[0127] 可以通过工程化设计K562、U937、721.221、T2和C1R细胞,以指导各种共刺激分子和细胞因子的稳定表达和分泌来制备aAPC。在具体实施方案中,K32或U32 aAPC用于指导一种或多种基于抗体的刺激分子在AAPC细胞表面上的展示。可以通过表达各种共刺激分子的aAPC扩增T细胞群,所述共刺激分子包括但不限于,CD137L(4-1BBL)、CD134L(OX40L)和/或CD80或CD86。最后,aAPC提供了扩增遗传修饰的T细胞并维持CD28在CD8⁺T细胞上的表达的

高效平台。在此将在WO 03/057171和US2003/0147869中提供的aAPC通过引用整体并入。

[0128] 本文使用的术语“增殖”指细胞分裂(细胞的对称或不对称分裂)的增加。在具体实施方案中,“增殖”指T细胞的对称或不对称分裂。当与未处理的样本中的细胞相比,处理的样本中的细胞数存在增加时,发生“增殖增加”。

[0129] “免疫效应细胞”是具有一种或多种效应功能(例如,细胞毒性细胞杀伤活性、细胞因子的分泌、ADCC和/或CDC的诱导)的免疫系统的任何细胞。本文所考虑的示例性的免疫效应细胞是T淋巴细胞,特别是细胞毒性T细胞(CTL;CD8⁺T细胞)和辅助性T细胞(HTL;CD4⁺T细胞)。如技术人员所理解的,其它细胞也可以用作具有如本文所描述的CAR的免疫效应细胞。具体而言,免疫效应细胞还包括NK细胞、NKT细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞。在具体实施方案中,使用本文所考虑的制备方法,对T细胞以及一种或多种其它细胞类型(如NK细胞、NKT细胞、嗜中性粒细胞和/或巨噬细胞)进行遗传修饰和扩增。

[0130] “修饰的T细胞”指通过引入编码本文所考虑的工程化的TCR或CAR的多核苷酸而被修饰的T细胞。修饰的T细胞既包含遗传修饰又包含非遗传修饰(例如,游离的或染色体外的)。

[0131] 本文使用的术语“遗传工程化的”或“遗传修饰的”指将DNA或RNA形式的额外的遗传物质添加至细胞的总遗传物质中。

[0132] 术语“遗传修饰的细胞”、“修饰的细胞”和“重定向的细胞”可互换使用。

[0133] 本文使用的术语“基因疗法”指为恢复、校正或改变基因的表达,或者出于表达治疗多肽例如,TCR或CAR和/或一种或多种细胞因子的目的,将DNA或RNA形式的额外的遗传物质引入细胞的总遗传物质中。在具体实施方案中,例如,通过将表达TCR或CAR的附加型载体引入细胞,对T细胞进行修饰以表达工程化的TCR或CAR,而不改变细胞的基因组。

[0134] 术语“离体”通常指在有机体外发生的活动,如在有机体外的人工环境(优选对自然条件进行最小改变)中的活组织内或活组织上进行实验或测量。在具体实施方案中,“离体”程序涉及取自有机体且在实验室装置中培养或调节的活细胞或组织,所述培养或调整通常在无菌条件下进行,并且通常持续几小时或多至约24小时,但是包括多至48小时或72小时,这取决于环境。在某些实施方案中,可以将此类组织或细胞收集并冷冻,以及随后解冻用于离体处理。利用活细胞或组织,持续时间长于几天的组织培养实验或程序通常被认为是“在体外”,但是在某些实施方案中,该术语与离体可互换使用。

[0135] 术语“在体内”通常指发生在有机体内的活动,如细胞的自我更新和扩增。在一个实施方案中,术语“体内扩增”指细胞群在体内数量增加的能力。

[0136] 术语“刺激”指通过刺激分子(例如,TCR/CD3复合物)与其同源配体结合从而介导信号转导事件(包括但不限于经TCR/CD3复合物的信号转导)而诱导的初始应答。

[0137] “刺激分子”指与同源刺激配体特异性结合的T细胞上的分子。

[0138] 本文使用的“刺激配体”意指这样的配体,当其存在于抗原递呈细胞(例如,aAPC、树突细胞、B细胞等)上时,可以与T细胞上的同源结合伴侣(在本文被称为“刺激分子”)特异性结合,从而通过T细胞介导初始应答,包括但不限于,活化、起始免疫应答、增殖等。刺激配体包括但不限于CD3配体或结合剂(例如,抗CD3抗体)以及CD2配体或结合剂(例如,抗CD2抗体)。

[0139] 术语“活化”指被充分刺激以诱导可检测的细胞增殖的T细胞的状态。在具体实施

方案中,活化还可以与诱导的细胞因子的产生和可检测的效应功能相关。术语“活化的T细胞”指(除了其它方面)正在增殖的T细胞。通过单独的TCR产生的信号不足以完全活化T细胞,还需要一种或多种次级信号或共刺激信号。因此,T细胞的活化包含通过TCR/CD3复合物的初级刺激信号以及一种或多种次级共刺激信号。由T细胞的增殖和/或细胞因子的产生可以证实共刺激,所述T细胞已接受初级活化信号,如通过CD3/TCR复合物或通过CD2的刺激。

[0140] “共刺激信号”指这样的信号,其与初级信号(如TCR/CD3结合)的组合导致T细胞增殖、细胞因子产生和/或特定分子上调或下调。

[0141] “共刺激配体”指与共刺激分子结合的分子。共刺激配体可以是可溶解的或者提供于表面上。共刺激配体可以包括但不限于:CD7、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、可诱导的共刺激配体(ICOS-L)、细胞间粘附分子(ICAM)、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB、HVEM、淋巴毒素 β 受体、3/TR6、ILT3、ILT4、HVEM、与Toll配体受体结合的激动剂或抗体以及与B7-H3特异性结合的配体。共刺激配体还包含特别是与T细胞上存在的共刺激分子特异性结合的抗体或其抗原结合片段以及与CD83特异性结合的配体,所述共刺激分子如但不限于,CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3。

[0142] “共刺激分子”指与共刺激配体特异性结合,从而通过T细胞介导共刺激应答(包括但不限于增殖)的T细胞上的同源结合伴侣,例如,CD28。

[0143] 本文使用的“自体同源(Autologous)”指来自同一对象的细胞。

[0144] 本文使用的“同种异体(Allogeneic)”指与相比较的细胞在遗传学上不同的相同物种的细胞。

[0145] 本文使用的“同基因(Syngeneic)”指与相比较的细胞在遗传学上相同的不同对象的细胞。

[0146] 本文使用的“异基因(Xenogeneic)”指与相比较的细胞不同物种的细胞。

[0147] 本文使用的术语“个体”和“对象”通常可互换使用,并且指显现出可用基因疗法载体、基于细胞的治疗剂以及本文别处所公开的方法进行治疗的癌症、感染性疾病、免疫缺陷、炎症性疾病或者自身免疫病症的症状的任何动物。合适的对象(例如,患者)包括实验室动物(如小鼠、大鼠、兔或豚鼠)、农场动物和家养动物或宠物(如猫或狗)。包括非人灵长类以及优选包括人。典型的对象包括患有癌症、感染性疾病、免疫缺陷、炎症性疾病或自身免疫病症的人,已被诊断患有癌症、感染性疾病、免疫缺陷、炎症性疾病或自身免疫病症的人,或者处于患癌症、感染性疾病、免疫缺陷、炎症性疾病或自身免疫病症风险的人。

[0148] 本文使用的术语“患者”指已被诊断具有特定迹象的对象,所述特定迹象可以用基因疗法载体、基于细胞的治疗剂以及本文别处所公开的方法进行治疗。

[0149] 本文使用的“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”包括对疾病或病理状态的症状或病状的任何有益或期望的效果,并且甚至可以包括被治疗的疾病或病况(例如,癌症)的一种或多种可测量标志物的最小减少。治疗可以任选地包括疾病或病况的一种或多种症状的改善或彻底减轻,或者疾病或病况的进展延迟。“治疗”不一定指示疾病或病况或者其相关症状的完全根除或治愈。

[0150] 本文使用的“预防(prevent)”和类似的单词如“预防(prevented)”、“预防(preventing)”等指用于预防、抑制或降低疾病或病况(例如,癌症)发生或复发的可能性的

方法。其还指延迟疾病或病况的发作或复发,或者延迟疾病或病况的症状的发生或复发。本文使用的“预防(prevention)”和类似的单词还包括在疾病或病况发作或复发之前降低疾病或病况的强度、影响、症状和/或负担。

[0151] 本文使用的术语“数量”指遗传修饰的治疗细胞(例如,T细胞)实现有益或期望的预防或治疗结果(包括临床结果)的“有效量(an amount effective)”或“有效量(an effective amount)”。

[0152] “预防有效量”指遗传修饰的治疗细胞有效实现期望的预防结果的量。通常但不必须,由于预防剂量是在疾病之前或在疾病的早期阶段用于对象,所以预防有效量小于治疗有效量。

[0153] 遗传修饰的治疗细胞的“治疗有效量”可以根据诸如以下的因素而改变:个体的疾病状态、年龄、性别和体重,以及T细胞在个体中引发期望应答的能力。治疗有效量也是这样的量:其中病毒或者所转导的治疗细胞的任何毒性或有害影响被治疗有益效果超过。术语“治疗有效量”包括有效“治疗”对象(例如,患者)的量。当指示治疗量时,待施用的本发明的组合物的精确量可以由医师考虑患者(对象)的年龄、重量、肿瘤大小、感染或转移的程度以及病况方面的个体差异来确定。

[0154] 本文使用的术语“癌症”通常涉及异常细胞不受控制地分裂并且可侵入邻近的组织的一类疾病或病况。

[0155] 本文使用的术语“恶性的”指这样的癌症,其中肿瘤细胞组呈现不受控制的生长(即,分裂超出正常限制)、侵袭(即,侵入并破坏相邻的组织)和转移(即,经淋巴或血液扩散至身体的其它位置)中一种或多种。本文使用的术语“转移”指癌症从身体的一部分扩散至另外的部分。由扩散的细胞形成的肿瘤叫做“转移性肿瘤”或“转移”。转移性肿瘤含有与原始(原发)肿瘤中的细胞相同的细胞。

[0156] 本文使用的术语“良性”或“非恶性的”指可以长大但不扩散至身体的其它部分的肿瘤。良性肿瘤自我限制并且通常不会侵袭或转移。

[0157] “癌症细胞”或“肿瘤细胞”指癌性生长物或组织的个体细胞。肿瘤通常指由细胞的异常生长形成的肿胀或损伤,其可以是良性的、恶变前的或恶性的。大多数癌症形成肿瘤,但是有一些癌症(例如,白血病)不一定形成肿瘤。对于形成肿瘤的那些癌症,术语癌症(癌细胞)和肿瘤(肿瘤细胞)可互换使用。个体的肿瘤的量是“肿瘤负担”,其可以测量为肿瘤数、肿瘤体积或肿瘤重量。

[0158] “感染性疾病”指可以在人与人之间或在有机体之间传播,且由微生物物质(microbial agent)引起的疾病(例如,普通感冒)。感染性疾病在本领域是已知的,并且包括,例如肝炎、性传播疾病(例如,衣原体、淋病)、肺结核、HIV/AIDS、白喉、乙型肝炎、丙型肝炎、霍乱和流行性感冒。

[0159] “自身免疫病”指身体对其自身组织的某些组分产生免疫原性(即,免疫系统)应答的疾病。换句话说,免疫系统丧失了其将身体内的某些组织或系统识别为“自身”的能力,并且靶向和攻击所述组织或系统,仿佛它们是外来的。自身免疫病可被分类为其中主要是一种器官受影响的自身免疫病(例如,溶血性贫血和自身免疫性甲状腺炎(anti-immune thyroiditis)),以及其中自身免疫病的过程通过许多组织扩散的自身免疫病(例如,系统性红斑狼疮)。例如,多发性硬化症被认为是由T细胞攻击围绕脑和脊髓神经纤维的鞘所引

起的。这导致协调性丧失、虚弱以及视力模糊。自身免疫病在本领域是已知的,并且包括,例如桥本氏甲状腺炎、格雷夫斯氏病(Grave's disease)、狼疮、多发性硬化、风湿性关节炎、溶血性贫血、自身免疫性甲状腺炎、系统性红斑狼疮、乳糜泻、克罗恩氏病(Crohn's disease)、结肠炎、糖尿病、硬皮病、银屑病等。

[0160] “免疫缺陷”意指免疫系统被疾病或化学物质的施用损伤的患者的状态。该病况使系统缺乏防御抵抗外来物质所需的血细胞的数目和类型。免疫缺陷病况或疾病在本领域是已知的,并且包括,例如AIDS(获得性免疫缺陷综合征)、SCID(重症联合免疫缺陷病)、选择性IgA缺乏症、常见变异型免疫缺陷病、X连锁无丙种球蛋白血症、慢性肉芽肿病、高IgM综合征以及糖尿病。

[0161] 本文使用的术语“炎症性疾病”指急性或慢性炎症性病况,其可以由感染性或非感染性原因引起。各种感染性原因包括脑膜炎、脑炎、葡萄膜炎、结肠炎、肺结核、皮炎以及成人呼吸窘迫综合征。非感染性原因包括创伤(烧伤、割伤、挫伤、挤压伤)、自身免疫病以及器官排斥发作(organ rejection episode)。

[0162] “增强”或“促进”或者“增加”或“扩大”通常指与由媒介物或对照分子/组合物引起的应答相比,本文所考虑的组合物产生、引发或引起较强的生理学应答(即,下游效应)的能力。除了从本领域的理解和本文的描述显而易见的之外,可测量的生理学应答可以包括T细胞的扩增、活化、增殖的增加,和/或癌细胞死亡杀伤能力的增加。“增加的”量或“增强的”量通常是“统计学显著的”量,并且可以包括由媒介物或对照组合物产生的应答的1.1倍、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍或更多倍(例如,500倍、1000倍)(包括在其间且在1以上的所有整数和小数点,例如,1.5、1.6、1.7、1.8等)的增加。

[0163] “下将(decrease)”或“降低(lower)”、或者“变少(lessen)”、或者“减少(reduce)”、或者“减轻(abate)”通常指与由媒介物或对照分子/组合物引起的应答相比,本文所考虑的组合物产生、引发或引起较小生理学应答(即,下游效应)的能力。“减小”或“减少的”量通常是“统计学显著的”量,并且可以包括由媒介物、对照组合物产生的应答(参照应答),或者特定细胞谱系中的应答的1.1倍、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍或更多倍(例如500倍,1000倍)(包括在其间且在1以上的所有整数和小数点,例如1.5、1.6、1.7、1.8等)的减少。

[0164] “维持(maintain)”、或“保持(preserve)”、或“维持(maintenance)”或“无变化(no change)”、或“无明显变化(no substantial change)”、或“无明显减少(no substantial decrease)”通常指与由媒介物、对照分子/组合物引起的应答,或者特定细胞谱系中的应答相比,本文所考虑的组合物在细胞中产生、引发或引起较小生理学应答(即,下游效应)的能力。可比较的应答是与参照应答没有显著不同或者可测量的不同的应答。

[0165] 本文使用的术语“特异性结合亲和力(specific binding affinity)”或“特异性结合(specifically binds)”或“特异性结合(specifically bound)”或“特异性结合(specific binding)”或“特异性靶向(specifically targets)”描述了一种分子以高于背景结合的结合亲和力与另一种分子结合。如果结合结构域(或者包含结合结构域的CAR或含有结合结构域的融合蛋白)与靶分子的结合或联合具有例如大于或等于约 10^5M^{-1} 的亲合力或 K_a (即,具体的结合相互作用的平衡缔合常数,单位为 $1/\text{M}$),则所述结合结构域与靶分子

“特异性结合”。在某些实施方案中,结合结构域(或其融合蛋白)与靶标的结合具有大于或等于约 10^6M^{-1} 、 10^7M^{-1} 、 10^8M^{-1} 、 10^9M^{-1} 、 10^{10}M^{-1} 、 10^{11}M^{-1} 、 10^{12}M^{-1} 或 10^{13}M^{-1} 的 K_a 。“高亲和力”结合结构域(或其单链融合蛋白)指 K_a 为至少 10^7M^{-1} 、至少 10^8M^{-1} 、至少 10^9M^{-1} 、至少 10^{10}M^{-1} 、至少 10^{11}M^{-1} 、至少 10^{12}M^{-1} 、至少 10^{13}M^{-1} 或更高的那些结合结构域。

[0166] 可选地,亲和力可以被定义为具体结合相互作用的平衡解离常数(K_d),单位为M(例如, 10^{-5}M 至 10^{-13}M 或更低)。使用常规的技术,可以容易地测定本公开所述的结合结构域多肽和CAR蛋白的亲和力,例如,通过竞争性ELISA(酶联免疫吸附分析),或通过结合缔合,或利用标记的配体的位移分析(displacement assay),或者使用表面等离子共振装置(如Biacore T100,其可获自Biacore, Inc., Piscataway, NJ)或光学生物传感器技术(如分别可获自Corning和Perkin Elmer的EPIC系统或EnSpire)(还参见,例如,Scatchard et al. (1949) Ann. N. Y. Acad. Sci. 51:660;和美国专利第5,283,173号、第5,468,614号或同等物)。

[0167] 在一个实施方案中,特异性结合的亲和力高于背景结合约2倍、高于背景结合约5倍、高于背景结合约10倍、高于背景结合约20倍、高于背景结合约50倍、高于背景结合约100倍或者高于背景结合约1000倍或者更多倍。

[0168] “抗原(Ag)”指可以刺激动物中抗体或T细胞应答的产生的化合物、组合物或物质,包括被注射进或吸收进动物的组合物(如包含肿瘤特异性蛋白的组合物)。抗原与特异性体液免疫或细胞免疫的产物反应,所述产物包括由异源抗原(如本公开的抗原)所诱导的产物。“靶抗原”或“目的靶抗原”是被设计以结合本文所考虑的CAR或工程化的TCR的结合结构域的抗原。

[0169] “表位”或“抗原决定簇”指结合剂结合的抗原区域。

[0170] 本文使用的“分离的肽”或“分离的多肽”等指重组肽或合成肽或者多肽分子或者天然存在的肽或多肽的体外分离物、合成物和/或纯化物,其来自细胞环境以及来自与细胞的其它组分的结合物,即其不与体内物质明显结合。

[0171] 本文使用的“分离的多核苷酸”指重组、合成或非天然存在的多核苷酸的体外分离物、合成物和/或纯化物,例如分离的互补DNA(cDNA)或者在自然中不存在且通过人为处理制备的其它多核苷酸。在具体实施方案中,分离的多核苷酸指已从天然状态下位于其侧翼的序列纯化出来的重组的、合成的或非天然存在的多核苷酸,例如,已从通常与其相邻的序列移出的DNA片段。

[0172] 优选地,使用本文所考虑的方法制备的细胞治疗剂无内毒素,并且根据cGMP实践进行制备。本文使用的术语“无内毒素”指含有至多痕量(即,对对象无不良的生理学影响的量)内毒素,以及优选不可检测的量的内毒素的容器和/或组合物。在一个实施方案中,术语“无内毒素”指至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%无内毒素的组合物。内毒素是与某些细菌(通常是革兰氏阴性菌)相关的毒素,尽管内毒素可见于革兰氏阳性菌中,如单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)。最普遍的内毒素是存在于各种革兰氏阴性菌外膜中的脂多糖(LPS)或脂寡糖(LOS),并且其代表了这些细菌引起疾病的能力的重要致病特征。除了其它不良的生理学影响,人体中少量的内毒素可以产生发热、血压降低以及炎症和凝血的激活。因此,从药品容器中移除大部分或所有痕量内毒素通常是可取的,因为即使很少的量也可能在人体中引起不良反应。可以使用本领域已知的方法将内毒素从容器中移除,例如,可以将容器在HEPA过滤的洗涤装置中用无内毒素的水清

洁,于250℃去热原,并且在位于100/10级洁净室(例如,100级洁净室,其在一立方英尺的空气中含有不超过100个大于半微米的颗粒)内的HEPA过滤工作站中进行清洁包装。

[0173] 本文使用的术语“现行良好生产规范(cGMP)”指食品、药品和医学装置的制备和质量控制测试的控制以及管理。cGMP不一定依赖于取样,而是依赖于药物和医学装置制备所涉及的过程、活动和操作的每一方面的记录。如果显示产品如何制备和测试的记录(其使得可追溯,以及在未来问题事件中从市场召回成为可能)不正确且没有按顺序,则产品不满足所需的规格且被认为受污染(即,在US为掺入次级品)。此外,cGMP通常要求,所有的制备和检测装备均合格适用,以及根据预定的规范验证药物制备过程中利用的所有操作方法和程序(例如,制备、清洁、以及分析测试)以证明它们可以进实施其所声称的功能。在US,短语“现行良好生产规范”出现于1938食品、药品和化妆品法案(21U.S.C. §351)的501(B)。

[0174] C.T细胞制备方法

[0175] 目前,既有的T细胞制备方法包括用于分离、活化、转导和扩增CAR T细胞的各种复杂步骤。相比之下,本发明的发明人使用小规模的研究模型来开发简单、稳健、表征良好、灵活、封闭系统的T细胞制备平台,可以将其转移至大规模的临床cGMP制备过程用于工程化的CAR T细胞。

[0176] 在不同实施方案中,使用封闭式处理系统,或者与封闭式细胞处理系统组合来制备细胞。封闭式细胞处理系统使在“封闭的”或可重封的容器内的过程自动化,所述过程包括处理、离心、孵育、培养基添加、细胞选择、细胞洗涤以及最终填装和表面处理(finish)。封闭式细胞处理系统使所述过程一体化和自动化,并且重复许多定性控制的手动任务以提供一致且独立于操作员的特质。

[0177] 与自动化的封闭式细胞处理系统相关的益处包括疗法费用(通常为25-90%)以及需要的操作员人数(通常>70%)的显著减少;对熟练劳动者的依赖性降低;通过更好的设施使用导致资金投入的明显节约(通常为30-50%);质量提高和较少的质量事件;以及更迅速地纵向扩展和横向扩展以匹配市场需求的能力。

[0178] 在不同实施方案中,用于制备治疗性T细胞组合物的方法包括使用封闭系统方法获得包含免疫效应细胞和抗原递呈细胞的细胞群。在某些实施方案中,将分离的细胞群以特定的密度进行接种以起始培养,以及通过使T细胞与初级配体和共刺激配体接触来活化并刺激T细胞。在具体实施方案中,用编码CAR或工程化的TCR的病毒载体转导包含活化的T细胞的细胞群,并且培养以扩增所述T细胞。然后,可以将所制备的包含治疗性T细胞的免疫效应细胞组合物用于治疗有此需要的对象或者冷冻备用。

[0179] 1.T细胞的来源

[0180] 在具体实施方案中,可以从许多来源获得T细胞,其包括但不限于:外周血、外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、来自感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾组织和肿瘤。在一个实施方案中,T细胞还可以获自培养的T细胞系,例如Jurkat、SupT1等。在具体实施方案中,将包含T细胞的细胞群(例如,PBMC)用于本文所考虑的制备方法中。在其它实施方案中,将分离或纯化的T细胞群用于本文所考虑的制备方法中。

[0181] 在一个实施方案中,T细胞的来源还可以商购获得,例如,Sanguine Biosciences。

[0182] 2.获得细胞

[0183] 本发明考虑改善的T细胞组合物的制备。细胞可以是自体同源的/自体的(“自己

的”)或非自体同源的(“非自己的”,例如同种异体的、同基因的或异基因的)。在一个实施方案中,细胞获自哺乳类对象。在另一实施方案中,细胞获自灵长类对象。在具体实施方案中,细胞获自人类对象。

[0184] 在不同实施方案中,包含T细胞的细胞群获自个体,并且经历本文所考虑的制备方法。在一个实施方案中,通过血浆分离置换法(apheresis),例如白细胞去除术(leukapheresis),获得来自个体循环血液的细胞。血浆分离置换产物可以含有淋巴细胞,所述淋巴细胞包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其它有核的白细胞、红细胞和血小板,或者可以是包含淋巴细胞的白细胞去除术产物,所述淋巴细胞包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞和其它有核的白细胞。在一个实施方案中,可以洗涤通过血浆分离置换法收集的细胞以移除血浆部分并将所述细胞置于合适的缓冲液或培养基中用于后续处理。可以用PBS或者缺乏钙、镁以及大多数(即使不是全部)其它二价阳离子的另外合适的溶液来洗涤细胞。

[0185] 一旦获得包含T细胞的细胞群,可以测定细胞群内的细胞数和细胞活力,可以将所述细胞群或其一部分低温保藏,用于将来使用或分析,并且可以使用大量细胞标志物组(例如,CD3、CD4、CD8、CD14、CD16、CD19、CD28、CD45RA、CD45RO、CD61、CD62L、CD66b、CD127和HLA-DR)来表征群中的细胞,例如,PBMC。

[0186] 在具体实施方案中,用于本文所考虑的制备方法中的血浆分离置换的细胞的体积为约50mL至约500mL、约50mL至约250mL、约50mL至约200mL、约100mL至约500mL、约100mL至约250mL或约100mL至约200mL,或者其间任何范围。

[0187] 在某些实施方案中,用于本文所考虑的制备方法中的血浆分离置换的细胞的体积为约25mL、约50mL、约75mL、约100mL、约125mL、约150mL、约175mL、约200mL、约225mL、约250mL、约275mL、约300mL、约325mL、约350mL、约375mL、约400mL、约425mL、约450mL、约475mL或约500mL,或者其间任何体积。

[0188] 3. PBMC分离

[0189] 在具体实施方案中,将PBMC群用于本文所考虑的T细胞制备方法中。在某些实施方案中,可以使用技术人员已知的任何数目的技术,如离心和沉降(例如FICOLL™分离、PERCOLL™分离)等,从收集自对象的血液或血浆分离置换部分单元获得包含T细胞的PBMC。

[0190] 在某些实施方案中,使用半自动直流离心机,例如Cobe 2991细胞处理器、Cell Saver 5等,在FICOLL™或PERCOLL™梯度中分离通过血浆分离置换法收集的PBMC。在一些实施方案中,使用逆流离心淘析装置(例如,Terumo BCT ELUTRA®等),在不使用FICOLL™或PERCOLL™梯度的情况下,分离通过血浆分离置换法收集的PBMC。Cell Saver 5的使用允许PBMC原材料经Ficoll进行的封闭系统处理以及最终浓缩和洗涤制备的T细胞组合物在一个装置上进行。封闭系统的使用通过使cGMP加工所需的装备最少化而简化了制备,并且产生一致且可再生产的纯的PBMC或最终的T细胞组合物。

[0191] 在一个实施方案中,将PBMC使用ELUTRA®逆流离心淘析装置分离,并且在Cell Saver 5+或LOVO中洗涤。

[0192] 在一些实施方案中,在PBMC分离之后,在活化、扩增和/或遗传修饰之前或之后,可以使用封闭系统装置和cGMP试剂(例如,CliniMACS),将细胞毒性T淋巴细胞和辅助性T淋巴细胞分选为初始T细胞亚群、记忆T细胞亚群以及效应T细胞亚群。

[0193] 在分离之后,可以测定PBMC的细胞数和活力,可以将PBMC或其一部分低温保藏,用于将来使用或分析,以及可以使用大量细胞标志物组(例如,CD3、CD4、CD8、CD11b、CD11c、CD14、CD16、CD19、CD45RA、CD45RO、CD61和CD66b)来表征PBMC。

[0194] 在具体实施方案中,在分离PBMC之后,使其经历一个或多个洗涤步骤,例如,以移除Ficoll。在某些实施方案中,可在任何数量的本文所考虑的制备步骤之前、期间或之后,将细胞洗涤一次或多次。洗涤可以在任何合适的缓冲液或培养基中进行,例如,补充有HABS或HSA的CliniMACS缓冲液,PlasmaLyte,TCGM,PBS,林格氏液(Ringer's solution),生理盐水,0.9%NaCl,或者不含钙、镁和大多数(即使不是全部)其它二价阳离子的其它合适的溶液,或者任何合适的培养基,或者以上的任何合适组合。在一个实施方案中,在分离PBMC之后,将它们诸如Cobe 2991细胞处理器、Cell Saver 5、Baxter CytoMate、LOVO等的半自动直流离心机中洗涤。在另一实施方案中,在分离PBMC之后,将它们转移至另一无菌器皿中,例如,转移或培养器皿。本文使用的术语“器皿”通常涉及能够用于培养、操纵、操作、储存、分析、孵育、施用和另外建立、支持、生长、得到、处理、以及离体或体外使用细胞及其副产物的目的或者以其它方式用于如本文所示和所考虑的各种目的的任何容器。

[0195] “转移器皿(Transfer vessel)”通常指不可透气的器皿。在一个实施方案中,洗涤在转移器皿中进行,以及随后的细胞操作在一种或多种类型的细胞培养器皿中进行。

[0196] 细胞培养器皿的示例性实例包括但不限于细胞培养袋、生物反应器(例如,可透气的快速扩增瓶(G-Rex)生物反应器(Wilson-Wolf Manufacturing);和WAVE生物反应器(GE Healthcare Life Sciences))、细胞或组织培养装置、袋、胶囊、培养小瓶、设备、细胞工厂、容器、培养管(例如,微量离心管、EPPENDORF TUBES®、FALCON®锥形管等)、培养皿(例如,皮氏培养皿(Petri dish))、培养瓶、转瓶、滚瓶、多孔板(例如,2孔板、4孔板、6孔板、12孔板、24孔板、48孔板、96孔和384孔板)、微培养箱、微载体、微板块、显微镜载玻片(microslide)和腔室玻片。

[0197] 而在另一实施方案中,可以将PBMC在半自动直流离心机中洗涤一次或多次,以及将其转移并在合适的器皿中洗涤一次或多次。

[0198] 细胞培养袋的示例性实施方案包括但不限于MACS® GMP细胞扩增袋、MACS® GMP细胞分化袋、EXP-Pak™细胞扩增生物容器、VueLife™袋、KryoSure™袋、KryoVue™袋、Lifecell®袋、PermaLife™袋、X-Fold™袋、Si-Culture™袋、Origen生物医学冷袋(cryobag)和VectraCell™袋。在具体实施方案中,细胞培养袋包含下述特性中的一种或多种:透气性(材料对氧气、二氧化碳和氮气具有合适的气体转移率);可忽略的失水率(材料几乎不透水);化学和生物学惰性(材料不与器皿内容物反应);以及在不同的条件下保留弹性和强度(材料使得器皿能够微波、UV照射处理、离心,或者在广泛的温度内使用,例如,-100℃至+100℃)。

[0199] 本文所考虑的细胞培养器皿的示例性体积包括但不限于约10mL、约25mL、约50mL、约75mL、约100mL、约150mL、约250mL、约500mL、约750mL、约1000mL、约1250mL、约1500mL、约1750mL、约2000mL或更大的体积,包括任何介于中间的体积。例如,介于10mL和25mL之间的体积包括11mL、12mL、13mL、14mL、15mL、16mL、17mL、18mL、19mL、20mL、21mL、22mL、23mL和24mL。在一个实施方案中,细胞培养器皿的体积为约100mL至约10L。

[0200] 在洗涤所分离的细胞之后,可以测定洗涤后的细胞数和活力,可以将其低温保藏用于将来使用或分析,和/或可以使用荧光激活细胞分选(FACS)分析,使用大量细胞标志物,例如CD3,CD4,CD8,CD27,CD28,CD45RA,CD45RO,CD62L,CD127,CD197,CD279和HLA-DR对其进行表征。

[0201] 4. 低温保藏(Cryopreservation)

[0202] 在具体实施方案中,使用新鲜分离的包含T细胞的细胞群实践本文所考虑的T细胞制备方法。在其它具体实施方案中,使用低温保藏的包含T细胞的细胞群实践本文所考虑的方法。可以在得到或分离PBMC后,在培养起始和活化之后,在转导之后或在扩增之后或者在任何方法步骤之后,低温保藏细胞。也可在T细胞制备方法后,低温保藏制备的T细胞组合物。冻融循环可以通过移除非T细胞群提供更一致的T细胞组合物。

[0203] 基于PBMC的分离和本文别处所述,可以将细胞群在如本文所考虑的合适的细胞培养器皿(参见上文)中低温保藏。可以在合适的细胞培养基和/或冷冻培养基中冷冻细胞群,例如,50%plasmalyte和50%Cryostor 10;50/40/10(XVIVO/HABS/DMSO);Cryostor 10;含有20%DMSO和8%人血清白蛋白的PBS;或者含有10%葡聚糖40和5%葡萄糖、20%人血清白蛋白以及7.5%DMSO的培养基,或者含有31.25%Plasmalyte-A、31.25%葡萄糖5%、0.45%NaCl、10%葡聚糖40和5%葡萄糖、20%人血清白蛋白以及7.5%DMSO的培养基;或者含有例如Hespan和PlasmaLyte A的其它合适的细胞冷冻培养基。然后将细胞在速率可控的冷冻仪中以每分钟1°的速率冷冻至约-80°C至约-135°C的温度为,并且在液氮储存罐的蒸气相中储存。可以使用控制冷冻的其它示例性方法,以及于-20°C或在液氮中直接不受控制的冷冻。

[0204] 在低温保藏之后,将细胞在37°C水浴中解冻,并且在合适的细胞培养基或缓冲液(例如,TCGM)中洗涤。随后,可以将解冻的细胞用于本文所考虑的制备方法或者用于向对象施用。可以如本文别处所考虑的的进行洗涤步骤。

[0205] 在某些实施方案中,将包含T细胞的细胞群从个体分离,并且进行活化和刺激以在体外增殖,而无需进一步离体或体外操作。然后可将这样的细胞直接重新施用至所述个体。在其它实施方案中,将包含T细胞的细胞群分离之后,在进行遗传修饰以表达工程化的TCR或CAR之前,首先活化并刺激细胞以在体外增殖。在这方面,可以在进行遗传修饰(即,进行转导或转染以表达本文所考虑的工程化的TCR或CAR)之前和/或之后培养所述T细胞。

[0206] 5. 培养起始和活化

[0207] 为了获得足够治疗剂量的T细胞组合物,用于制备T细胞的既有方法通常进行一轮或多轮的刺激、活化和/或扩增,从而引入了更多污染机会,增加了制备方法的费用和时间,并且通常导致差的细胞疗法产物。

[0208] 本文所考虑的T细胞制备方法包括简单且稳健的培养起始和活化步骤,所述步骤有助于得到为优良治疗产物的T细胞组合物。在一个实施方案中,培养起始和活化包括在细胞培养器皿(例如,细胞培养袋、GREX生物反应器、WAVE生物反应器等)中接种细胞群,并且通过初级和共刺激T细胞信号转导通路活化T细胞。还可以在一种或多种另外的生长因子或细胞因子(例如,IL-2、IL7和/或IL-15,或者其任何合适的组合)存在的情况下培养细胞组合物。

[0209] 在具体实施方案中,培养起始包括将包含T细胞的细胞群(例如,PBMC)以期望的密

度(例如, $1-5 \times 10^6$ 个细胞/mL)接种于细胞培养器皿中的合适的细胞培养基中,所述细胞培养基含有一种或多种细胞因子、初级刺激配体和共刺激配体。在另一实施方案中,可以随后将细胞因子、刺激和共刺激配体添加至含PBMC的细胞培养基中。

[0210] 在一个实施方案中,如本文别处所考虑的,细胞培养器皿是细胞培养袋,其包括但不限于 **MACS®** GMP细胞扩增袋、**MACS®** GMP细胞分化袋、EXP-Pak™细胞扩增生物容器、VueLife™袋、KryoSure™袋、KryoVue™袋、**Lifecell®** 袋、PermaLife™袋、X-FOLD™袋、Si-Culture™袋和VectraCell™袋。

[0211] 在具体实施方案中,使细胞培养容器接种总共约 1×10^9 个细胞、约 5×10^8 个细胞、约 1×10^8 个细胞、约 5×10^7 个细胞、约 1×10^7 个细胞、约 5×10^6 个细胞或约 1×10^6 个细胞,或者其间任何数量的细胞。在具体实施方案中,细胞是PBMC,并且接种总共约 1×10^8 个细胞。

[0212] 在某些实施方案中,将细胞群(例如,PBMC)以以下密度接种于细胞培养器皿中:约 1×10^7 个细胞/mL、约 9×10^6 个细胞/mL、约 8×10^6 个细胞/mL、约 7×10^6 个细胞/mL、约 6×10^6 个细胞/mL、约 5×10^6 个细胞/mL、约 4×10^6 个细胞/mL、约 3×10^6 个细胞/mL、约 2×10^6 个细胞/mL、约 1×10^6 个细胞/mL、约 9×10^5 个细胞/mL、约 8×10^5 个细胞/mL、约 7×10^5 个细胞/mL、约 6×10^5 个细胞/mL、约 5×10^5 个细胞/mL、约 4×10^5 个细胞/mL、约 3×10^5 个细胞/mL、约 2×10^5 个细胞/mL或约 1×10^5 个细胞/mL,或者其间任何密度的细胞。在具体实施方案中,以约 1×10^6 个细胞/mL的密度接种PBMC。

[0213] 在具体实施方案中,将细胞接种在包含合适的细胞培养基的细胞培养器皿中。合适的细胞培养基的示例性实例包括但不限于:T细胞生长培养基(TCGM;补充有2mM GlutaMAX™-I、10mM HEPES和5%人AB血清的X-VIVO™15),CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM (Life Technologies),CTS™ AIMV®培养基(Life Technologies),RPMI 1640,Clicks,DMEM, MEM, a-MEM, F-12, X-Vivo 15 (Lonza), **CellGro®** 无血清培养基(CellGenix),以及含有添加的氨基酸、丙酮酸钠和维生素的X-Vivo 20 (Lonza),所述X-Vivo 20不含血清或者补充有适量的血清(或血浆),或者补充有一组确定的激素,和/或足够用于T细胞生长和扩增的量的细胞因子。在具体实施方案中,细胞培养基是TCGM。

[0214] 本文所考虑的细胞培养基还可以包含一种或多种因子,所述因子包括但不限于血清(例如,胎牛血清或人血清)、白细胞介素-2(IL-2)、胰岛素、IFN- γ 、IL-4、IL-7、IL-21、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF β 和TNF- α 。

[0215] 在一个实施方案中,细胞培养基可以包含一种或多种细胞因子,例如如IL-2、IL-7和/或IL-15,或者其任何合适的组合。各细胞因子的合适浓度或者细胞因子总浓度的示例性实例包括约25IU/mL、约50IU/mL、约75IU/mL、约100IU/mL、约125IU/mL、约150IU/mL、约175IU/mL、约200IU/mL、约250IU/mL、约300IU/mL、约350IU/mL、约400IU/mL、约450IU/mL或约500IU/mL,或者其间任何量的细胞因子。在具体实施方案中,细胞培养基包含各自或者总共为约100IU/mL的IL-2、IL-1和/或IL-15,或者其任意组合。

[0216] 在具体实施方案中,细胞培养基包含各自或者总共为约250IU/mL的IL-2、IL-1和/或IL-15,或者其任意组合。

[0217] 在具体实施方案中,使PBMC或分离的T细胞与一种或多种刺激剂和共刺激剂(如抗CD3和抗CD28抗体)以及一种或多种细胞因子(如IL-2、IL-7和/或IL-15)接触。

[0218] 可以通过经T细胞TCR/CD3复合物或者经CD2表面蛋白的刺激提供初级刺激信号,以及通过经辅助分子(如CD28或4-1BBL)提供次级共刺激信号来实现T细胞的活化。

[0219] 可以通过使T细胞与合适的CD3结合剂(例如,CD3配体或抗CD3单克隆抗体)接触来刺激TCR/CD3复合物。CD3抗体的示例性实例包括但不限于,OKT3、G19-4、BC3和64.1。还可以使用与上述抗体中任一种的相同表位结合的其它抗体。可以通过如本文别处所公开的标准技术制备并鉴定另外的抗体或者抗体组合。在一个实施方案中,抗CD3抗体是OKT3。

[0220] 在另外的实施方案中,可将CD2结合剂用于向T细胞提供初级刺激信号。CD2结合剂的示例性实例包括但不限于,CD2配体和抗CD2抗体,例如与T11.1或T11.2抗体组合的T11.3抗体(Meuer, S.C.等人, (1984) *Ce11* 36:897-906),以及9-1抗体组合的9.6抗体(其与TI 1.1识别相同的表位)(Yang, S.Y.等人, (1986) *J. Immunol.* 137:1097-1100)。

[0221] 除了通过TCR/CD3复合物,或者经CD2提供的初级刺激信号之外,诱导T细胞应答需要次级共刺激信号。在具体实施方案中,可将CD28结合剂用于提供共刺激信号。合适的共刺激配体包括但不限于:CD7、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、PD-L 1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、可诱导的共刺激配体(ICOS-L)、细胞间粘附分子(ICAM)、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB、HVEM、淋巴毒素β受体、ILT3、ILT4、结合Toll配体受体的激动剂或抗体以及与B7-H3特异性结合的配体。

[0222] 在具体实施方案中,共刺激配体包括与T细胞上存在的共刺激分子特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其包括但不限于:CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3以及与CD83特异性结合的配体。

[0223] CD28结合剂的示例性实例包括但不限于:天然CD28配体,例如CD28的天然配体(例如,B7蛋白家族的成员,如B7-1 (CD80)和B7-2 (CD86));以及能够交联CD28分子的抗CD28单克隆抗体或其片段,例如单克隆抗体9.3、B-T3、XR-CD28、KOLT-2、15E8、248.23.2和EX5.3D10。在一个实施方案中,抗CD28抗体是15E8。

[0224] 在一个实施方案中,提供初级刺激信号的分子(例如通过TCR/CD3复合物或CD2提供刺激的分子)与共刺激分子在同一表面偶联。

[0225] 在某些实施方案中,提供刺激和共刺激信号的结合剂位于细胞表面。这可以通过用编码结合剂的核酸以适于其在细胞表面表达的形式转染或转导细胞或者可选地通过将结合剂与细胞表面偶联来实现。

[0226] 在另一实施方案中,提供初级刺激信号的分子(例如通过TCR/CD3复合物或CD2提供刺激的分子)和共刺激分子展示于抗原递呈细胞上。

[0227] 在一个实施方案中,提供初级刺激信号的分子(例如通过TCR/CD3复合物或CD2提供刺激的分子)和共刺激分子存在于不同的表面上。

[0228] 在某一实施方案中,提供刺激和共刺激信号的结合剂之一是可溶的(以溶液的形式提供),以及其它试剂存在于一个或多个表面上。

[0229] 在具体实施方案中,提供刺激和共刺激信号的结合剂均以可溶的形式提供(以溶液的形式提供)。

[0230] 在不同实施方案中,本文所考虑的用于制备T细胞的方法包括通过使T细胞与可溶的抗CD3和抗CD28抗体接触而活化T细胞。

[0231] 在具体实施方案中,用于活化T细胞的细胞培养基包含以下浓度的抗CD3抗体或CD3结合剂:约10ng/mL、约20ng/mL、约30ng/mL、约40ng/mL、约50ng/mL、约60ng/mL、约70ng/mL、约80ng/mL、约90ng/mL、约100ng/mL或约200ng/mL或者任意介于中间的浓度。

[0232] 在某些实施方案中,用于活化T细胞的细胞培养基包含以下浓度的抗CD28抗体或CD28结合剂:约10ng/mL、约20ng/mL、约30ng/mL、约40ng/mL、约50ng/mL、约60ng/mL、约70ng/mL、约80ng/mL、约90ng/mL、约100ng/mL或约200ng/mL或者任意介于中间的浓度。

[0233] 在不同实施方案中,用于活化T细胞的细胞培养基包含约50ng/mL的抗CD3抗体和50ng/mL的抗CD28抗体。

[0234] 将接种在细胞培养器皿中的细胞群活化至少30分钟、至少1小时、至少2小时、至少3小时、至少4小时、至少5小时、至少6小时、至少7小时、至少9小时、至少10小时、至少11小时、至少12小时、至少13小时、至少14小时、至少15小时、至少16小时、至少17小时、至少18小时、至少19小时、至少20小时、至少21小时、至少22小时、至少23小时或至少24小时或者任意介于中间的时长。

[0235] 在某些实施方案中,得到、分离并洗涤细胞,起始细胞培养,并且在约18小时至约36小时的时期内或在约24小时的时期内或者其间任何时长内活化全部T细胞。

[0236] 6. 转导

[0237] 本文所考虑的T细胞制备方法包括对免疫效应细胞和/或T细胞进行修饰以表达工程化的T细胞受体 (TCR) 或嵌合抗原受体 (CAR)。在具体实施方案中,将包含T细胞的细胞群活化、修饰以表达工程化的TCR或CAR,以及然后进行培养以扩增。所述步骤可以发生于同一细胞培养器皿或不同的器皿中。“转导”指使用逆转录病毒或慢病毒载体,通过病毒感染的手段,向免疫效应细胞(包括T细胞)递送基因或其它核苷酸序列(例如,工程化的TCR或CAR)。在一个实施方案中,通过感染和原病毒整合将逆转录病毒载体转导进细胞。在某些实施方案中,如果靶细胞(例如,PBMC或T细胞)包含使用病毒或逆转录病毒载体通过感染被递送至细胞的基因或其它多核苷酸序列,则其是“转导的”。在具体实施方案中,转导的细胞在其细胞基因组中包含通过逆转录病毒或慢病毒载体递送的一种或多种基因或者其它多核苷酸序列。

[0238] 可以使用常规的技术产生感染性病毒颗粒和病毒储液。制备病毒储液的方法是本领域已知的,并且由例如Y.Soneoka等人(1995) Nucl. Acids Res. 23:628-633和N.R.Landau等人(1992) J. Virol. 66:5110-5113阐述。可以通过已知的技术产生滴度为每毫升数百万转导单位(TU/mL)的重组病毒。在超速离心后,可以获得约 10^8 TU/mL、 10^9 TU/mL、 10^{10} TU/mL、 10^{11} TU/mL或 10^{12} TU/mL或者任意介于中间的滴度的浓缩储液。

[0239] 可以根据病毒滴度(TU/mL)递送病毒,所述病毒滴度可以例如通过使用可商购获得的p24滴度分析(其为针对p24病毒壳蛋白的ELISA)测定。下述公式可以用于计算pg/mL的p24:每物理颗粒(PP)的慢病毒存在大约2000个p24分子: $(2 \times 10^3) \times (\text{每PP } 24 \times 10^3 \text{ Da的p24}) \times (48 \times 10^6 / \text{Avogadro}) = (48 \times 10^6) \times (2 \times 10^3) \times (6 \times 10^{23}) = \text{每PP } 8 \times 10^{-17} \text{ g p24}$,每 $1 \times 10^{-16} \text{ g p24}$ 大约1PP,每pg p24为 1×10^4 PP。合理良好包装的VSV-G假型慢病毒载体的感染指数范围为每1000物理颗粒(PP) 1个TU至每100PP 1个TU(或更低)。因此,所述范围为大约10至100TU/pg p24。通过该转化获得TU/mL。

[0240] 还可以通过分析转导的人骨肉瘤(HOS)细胞测定感染滴度(Kutner等人,2009,

Nature Protocols 4:495-505)。简言之,将转导的HOS细胞在补充有10%胎牛血清(FBS)的DMEM中培养7天,之后通过DNeasy(Qiagen, Venlo Netherlands, Cat#69506)提取基因组DNA,并且通过定量PCR(qPCR)进行评价。qPCR方案的引物/探针集通过测定慢病毒psi-gag区拷贝数/内源人RNaseP拷贝数来测量转导的细胞的载体拷贝数(VCN)。通过对单个原病毒插入进行测序来评估原病毒的整合。

[0241] 在一个实施方案中,使用HOS细胞系分析来测定病毒滴度。

[0242] 在具体实施方案中,在大约活化时、活化后约1小时、活化后约2小时、活化后约3小时、活化后约4小时、活化后约5小时、活化后约6小时、活化后约7小时、活化后约8小时、活化后约9小时、活化后约10小时、活化后约11小时、活化后约12小时、活化后约13小时、活化后约14小时、活化后约15小时、活化后约16小时、活化后约17小时、活化后约18小时、活化后约19小时、活化后约20小时、活化后约21小时、活化后约22小时、活化后约23小时、活化后约24小时、活化后约25小时、活化后约26小时、活化后约27小时、活化后约28小时、活化后约29小时或者活化后约30小时或者活化后任意介于中间的时长,在细胞培养器皿中转导包含活化的T细胞的细胞群。

[0243] 在一个实施方案中,在活化后约20至约24小时转导细胞群。

[0244] 本文所考虑的制备方法包括:在细胞培养器皿中,用约 1×10^8 至约 1×10^{10} TU/ 10^8 个PBMC、约 5×10^8 至约 5×10^9 TU/ 10^8 个PBMC、约 1×10^9 至约 5×10^9 TU/ 10^8 个PBMC、约 1×10^9 至约 4×10^9 TU/ 10^8 个PBMC、约 1×10^9 至约 3×10^9 TU/ 10^8 个PBMC、约 1×10^9 至约 2×10^9 TU/ 10^8 个PBMC或者其间任何TU的载体转导包含活化的T细胞的PBMC。

[0245] 在一个实施方案中,本文所考虑的制备方法包括:在细胞培养器皿中,用约 1×10^8 TU/ 10^8 个PBMC、约 5×10^8 TU/ 10^8 个PBMC、约 6×10^8 TU/ 10^8 个PBMC、约 7×10^8 TU/ 10^8 个PBMC、约 8×10^8 TU/ 10^8 个PBMC、约 9×10^8 TU/ 10^8 个PBMC、约 1×10^9 TU/ 10^8 个PBMC、约 2×10^9 TU/ 10^8 个PBMC、约 3×10^9 TU/ 10^8 个PBMC、约 4×10^9 TU/ 10^8 个PBMC、约 5×10^9 TU/ 10^8 个PBMC、约 6×10^9 TU/ 10^8 个PBMC、约 7×10^9 TU/ 10^8 个PBMC、约 8×10^9 TU/ 10^8 个PBMC、约 9×10^9 TU/ 10^8 个PBMC或约 1×10^{10} TU/ 10^8 个PBMC或者任意介于中间的TU的载体转导包含活化的T细胞的PBMC。

[0246] 在具体实施方案中,用约 1×10^7 至约 2×10^9 TU/ 10^8 个PBMC的载体转导细胞。

[0247] 在一个实施方案中,本文所考虑的制备方法包括:在细胞培养器皿中,以约1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100或者任意介于中间的整数的MOI,用载体转导包含活化的T细胞的PBMC。在一个实施方案中,以约20的MOI用载体转导PBMC。

[0248] 在某些实施方案中,可以将载体在细胞培养基中稀释多至细胞培养体积的约10%、细胞培养体积的约15%、细胞培养体积的约16%、细胞培养体积的约17%、细胞培养体积的约18%、细胞培养体积的约19%、细胞培养体积的约20%、细胞培养体积的约21%、细胞培养体积的约22%、细胞培养体积的约23%、细胞培养体积的约24%、细胞培养体积的约25%、细胞培养体积的约30%、细胞培养体积的约35%、细胞培养体积的约40%、细胞培养体积的约45%或细胞培养体积的约50%或者其间任何百分数。

[0249] 在具体实施方案中,将载体在细胞培养基(例如,TCGM)中稀释多至细胞培养体积的约20%。

[0250] 将接种在细胞培养器皿中的细胞群转导约6小时、约12小时、约18小时、约24小时、

约30小时、约36小时、约42小时、约48小时、约54小时或约60小时或者任意介于中间的时长。

[0251] 在具体实施方案中,将细胞转导约48小时。

[0252] 在细胞被转导之后,可以使它们经历如本文所考虑的一个或多个洗涤步骤,并且随后接种于合适的细胞培养器皿中,用于扩增。

[0253] 7. 扩增

[0254] 本文所考虑的T细胞制备平台可以包括一轮或多轮T细胞扩增。在具体实施方案中,将已活化和/或转导的包含T细胞的细胞群接种在包含适于扩增的细胞培养基的合适的细胞培养器皿中。在具体实施方案中,将细胞接种进生物反应器中并且进行周期性地获得,而无需重新接种。

[0255] 在某些实施方案中,将细胞以一定的密度重新接种以维持细胞的对数期生长。

[0256] 在具体实施方案中,将细胞以以下密度接种在细胞培养物中:约 0.1×10^6 至约 1×10^7 个细胞/mL、约 0.1×10^6 至约 0.9×10^6 个细胞/mL、约 0.1×10^6 至约 0.8×10^6 个细胞/mL、约 0.1×10^6 至约 0.7×10^6 个细胞/mL、约 0.1×10^6 至约 0.6×10^6 个细胞/mL、约 0.1×10^6 至约 0.5×10^6 个细胞/mL、约 0.2×10^6 至约 0.5×10^6 个细胞/mL或约 0.3×10^6 至约 0.5×10^6 个细胞/mL或者任何介于中间的细胞密度,只要所述细胞维持在对数期生长。

[0257] 在某些实施方案中,将细胞以以下的密度接种在细胞培养物中:约 0.1×10^6 个细胞/mL、约 0.2×10^6 个细胞/mL、约 0.3×10^6 个细胞/mL、约 0.4×10^6 个细胞/mL、约 0.5×10^6 个细胞/mL、约 0.6×10^6 个细胞/mL、约 0.7×10^6 个细胞/mL、约 0.8×10^6 个细胞/mL、约 0.9×10^6 个细胞/mL或约 1×10^7 个细胞/mL或者任何介于中间的细胞密度,只要所述细胞维持在对数期生长。

[0258] 在一些实施方案中,将细胞以以下的密度接种进生物反应器(例如,WAVE生物反应器):约 0.1×10^6 个细胞/mL、约 0.5×10^6 个细胞/mL、约 1×10^6 个细胞/mL、约 2×10^6 个细胞/mL、约 3×10^6 个细胞/mL、约 4×10^6 个细胞/mL、约 5×10^6 个细胞/mL、约 6×10^6 个细胞/mL、约 7×10^6 个细胞/mL、约 8×10^6 个细胞/mL、约 9×10^6 个细胞/mL或约 1×10^7 个细胞/mL或者任何介于中间的细胞密度,只要所述细胞维持在对数期生长。

[0259] 在具体实施方案中,将细胞接种在包含用于T细胞扩增的合适的细胞培养基的细胞培养器皿中。用于T细胞扩增的合适的细胞培养基的示例性实例包括但不限于:T细胞生长培养基(TCGM)、CTS™OpTmizer™T细胞扩增SFM(Life Technologies)、CTS™ AIM V®培养基(Life Technologies)、RPMI 1640、Clicks、DMEM、MEM、a-MEM、F-12、X-Vivo 15(Lonza)和X-Vivo 20(Lonza)和/或足够用于T细胞的生长和扩增的另外的激素、生长因子或细胞因子。在具体实施方案中,细胞培养基是TCGM。在某些实施方案中,细胞培养基还包含一种或多种因子,所述因子包括但不限于血清(例如,胎牛血清或人血清)、白细胞介素-2(IL-2)、胰岛素、IFN- γ 、IL-4、IL-7、IL-21、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF β 和TNF- α 或者以上的任何组合。

[0260] 在一个实施方案中,细胞培养基可以包含一种或多种细胞因子,例如如IL-2、IL-7和/或IL-15,或者其任何合适的组合。各细胞因子的合适浓度或细胞因子的总浓度的示例性实例包括约25IU/mL、约50IU/mL、约75IU/mL、约100IU/mL、约125IU/mL、约150IU/mL、约175IU/mL、约200IU/mL、约250IU/mL、约300IU/mL、约350IU/mL、约400IU/mL、约450IU/mL或约500IU/mL或者其间任何细胞因子量。在具体实施方案中,细胞培养基包含各自或者总共

为约100IU/mL的IL-2、IL-1和/或IL-15,或者其任意组合。

[0261] 在具体实施方案中,细胞培养基包含各自或者总共为约250IU/mL的IL-2、IL-1和/或IL-15,或者其任意组合。

[0262] 在具体实施方案中,本文所考虑的T细胞制备方法包括将T细胞扩增约3天至约14天、约3天至约13天、约3天至约12天、约3天至约11天、约3天至约10天、约3天至约9天、约3天至约8天或约3天至约7天或约5天至约8天或者任何介于中间的天数。在某些实施方案中,本文所考虑的T细胞制备方法包括将T细胞扩增约3天、约4天、约5天、约6天、约7天、约8天、约9天、约10天、约11天或者约12天。对于整个扩增期,可以在相同的器皿和/或相同类型的器皿中进行扩增,或者对于扩增期,可以在不同的器皿和/或不同类型的器皿中进行扩增。

[0263] 在一个实施方案中,在细胞培养袋中进行T细胞的扩增,持续约5天至约8天。

[0264] 在一个实施方案中,在细胞培养袋中进行T细胞的扩增,持续约5天至约8天,然后在生物反应器中继续扩增,所述生物反应器包括但不限于WAVE或G-REX生物反应器。在具体实施方案中,可以在生物反应器中继续扩增,持续约1天、约2天、约3天、约4天或约5天或者更多天。

[0265] 在另一实施方案中,在生物反应器中进行T细胞的扩增,持续约5天至约8天,所述生物反应器包括但不限于WAVE生物反应器或G-REX生物反应器。

[0266] WAVE生物反应器允许不同的摇动速率以及各种不同的摇动角度。示例性的摇动速率包括但不限于每分钟1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20次摇动。在某些实施方案中,本发明的刺激和扩增方法提供设置为1.5°、2°、2.5°、3°、3.5°、4°、4.5°、5°、5.5°、6°、6.5°、7°、7.5°、8°、8.5°或9.0°的摇动平台角度。

[0267] 在一个实施方案中,WAVE生物反应器的体积是2500mL,摇动速率是约6rpm或约7rpm,角度是约7至约8。

[0268] 在一个实施方案中,最初在GREX生物反应器中将细胞接种在约100mL中,以及在第3天、第4天和第5天将约200mL新鲜生长培养基添加至培养物。在某些实施方案中,将另外的培养基添加至GREX生物反应器以在第7天使培养体积达到约1L。

[0269] 每日或者在任意天数检查细胞数和活力,可以将细胞或一部分细胞低温保藏,和/或可以通过FACS分析对细胞的标志物的表达进行表征,所述标志物例如CD3、CD4、CD8、CD28、CD45RA、CD45RO、CD62L、CD127、CD27、CD197和HLA-DR转基因。

[0270] 在一个实施方案中,与开始的T细胞群相比,进行本文所考虑的制备方法的T细胞群扩增至少50倍、至少100倍、至少200倍、至少300倍、至少400倍、至少500倍、至少600倍、至少700倍、至少800倍、至少900倍或至少1000倍或者更多倍。

[0271] 8. 制备的T细胞组合物的回收

[0272] 在具体实施方案中,本文所考虑的用于制备T细胞的方法包括回收制备的T细胞组合物的步骤,其包括使用半自动直流离心机,例如,Cobe 2991细胞处理器、Cell Saver 5、Baxter CytoMate、LOVO等得到并洗涤扩增的细胞。

[0273] 在获得扩增的细胞之前,可以取等份的获得前的样本以确立细胞数、活性、细胞特性(例如,FACS分析)、纯度和/或细胞的其它一般发行标准(release criteria)。此外,可以取等份的获得后样本以确立细胞数和/或活力。

[0274] 然后将回收的T细胞组合物转移至一个或多个IV袋或其它合适的器皿,例如

MACS® GMP细胞扩增袋、MACS® GMP细胞分化袋、EXP-Pak™细胞扩增生物容器、VueLife™袋、KryoSure™袋、KryoVue™袋、Lifecell®袋、PermaLife™袋、X-FOLD™袋、Si-Culture™袋、Origen生物学冷袋和VectraCell™袋,并且如前面和本文别处所讨论的在速率可控的冷冻仪中低温保藏,直到准备使用细胞。在具体实施方案中,将细胞冷冻于50% plasmalyte和50% Cryostor 10;50/40/10 (XVIVO/HABS/DMSO);或Cryostor 10中。

[0275] 将含有治疗性T细胞组合物的袋(10至250mL容量)在监测为-80℃至-135℃的血库条件下储存。将输液袋储存于冷冻库中直到需要。

[0276] D. 工程化的T细胞受体和嵌合抗原受体

[0277] 所考虑的T细胞制备方法对于扩增被修饰以以可靠且可复制的方式表达高亲和力的T细胞受体(工程化的TCR)或嵌合抗原受体(CAR)的T细胞特别有用。在一个实施方案中,对T细胞进行遗传修饰以表达一种或多种工程化的TCR或CAR。如本文所使用的,本文考虑的被修饰以表达工程化的TCR或CAR的T细胞可被称作“抗原-特异性重定向T细胞”。

[0278] 1. 工程化的TCR

[0279] 天然存在的T细胞受体包含两个亚基, α -亚基和 β -亚基,其各自是在各T细胞基因组中通过重组事件产生的独特蛋白。可以针对TCR对特定靶抗原的选择性筛选TCR文库。以该方式,可以对对靶抗原具有高亲合力和反应性的天然TCR进行选择,对其进行克隆,以及随后将其引入T细胞群用于过继免疫疗法。

[0280] 在一个实施方案中,通过引入编码具有形成TCR的能力的TCR亚基的多核苷酸对T细胞进行修饰,所述TCR赋予T细胞对表达靶抗原的肿瘤细胞的特异性。在具体实施方案中,与天然存在的亚基相比,亚基具有一个或多个氨基酸的置换、缺失、插入或修饰,只要所述亚基保留形成TCR的能力,其赋予以上转染的T细胞靶向靶细胞,并且参与免疫相关细胞因子的信号转导的能力。工程化的TCR优选地还以高亲合力结合展示相关肿瘤相关肽的靶细胞,并且任选地介导对在体内递呈相关肽的靶细胞进行有效杀伤。

[0281] 编码工程化的TCR的核酸优选地分离自它们在T细胞(天然存在)染色体中的天然环境,并且可被并入如本文别处所描述的合适的载体中。可将核酸和有效包含所述核酸的载体转入细胞,所述细胞优选为T细胞。然后修饰的T细胞能够表达由转导的核酸所编码的TCR的两条链。在优选实施方案中,工程化的TCR是外源TCR,因为其被引入通常不表达所述特定TCR的T细胞。工程化的TCR的基本方面是其对通过主要组织相容性复合体(MHC)或类似的免疫组分呈递的肿瘤抗原具有高亲合力。与工程化的TCR相比,CAR被工程化以以MHC独立的方式结合靶抗原。

[0282] 由本发明的核酸所编码的蛋白可以与连接至本发明的TCR的 α -链或 β -链的氨基末端或羧基末端部分的其它多肽一起表达,只要所连接的其它多肽不干扰 α -链或 β -链形成功能性T细胞受体以及MHC依赖性抗原识别的能力。

[0283] 被本文所考虑的工程化的TCR识别的抗原包括但不限于癌症抗原,包括血液癌和实体瘤上的抗原。示例性的抗原包括但不限于 α 叶酸受体、5T4、 $\alpha_v\beta_6$ 整合素、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD138、CD171、CEA、CSPG4、EGFR、包括ErbB2(HER2)的EGFR家族、EGFRvIII、EGP2、EGP40、EPCAM、EphA2、EpCAM、FAP、胎儿型AChR、FR α 、GD2、GD3、' 磷脂酰肌醇聚糖-3(GPC3)、HLA-A1+MAGE1、HLA-A2+MAGE1、HLA-A3+MAGE1、HLA-A1+NY-ESO-1、HLA-A2+NY-ESO-1、HLA-A3+NY-

ESO-1、IL-11R α 、IL-13R α 2、 λ 、Lewis-Y、 κ 、间皮素、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2D配体、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、ROR1、SSX、生存素、TAG72、TEM和VEGFR2。

[0284] 2. 嵌合抗原受体 (CAR)

[0285] 本文所考虑的T细胞制备方法包括对T细胞进行修饰以表达如本文所考虑的一种或多种CAR。在不同实施方案中,本发明提供用载体进行遗传工程化的T细胞,所述载体被设计以表达将细胞毒性重定向至肿瘤细胞的CAR。CAR是这样的分子:其将基于抗体的对靶抗原(例如,肿瘤抗原)的特异性与T细胞受体活化胞内结构域组合以产生呈现特异性抗肿瘤细胞免疫活性的嵌合蛋白。本文使用的术语“嵌合”描述了其由来自不同来源的不同蛋白或DNA的部分组成。

[0286] 本文所考虑的CAR包含胞外结构域(也被称作结合结构域或抗原特异性结合结构域)、跨膜结构域以及胞内信号转导结构域,所述胞外结构域与特定的靶抗原结合。CAR的主要特性是它们使免疫效应细胞特异性重定向的能力,从而引发增殖、细胞因子的产生、吞噬作用或者能够以独立于主要组织相容性(MHC)的方式介导表达靶抗原的细胞的细胞死亡的分子的产生,利用单克隆抗体、可溶性配体或细胞特异性共受体的细胞特异性靶向的能力。

[0287] 在具体实施方案中,CAR包含特异性结合靶抗原的胞外结合结构域,所述胞外结合结构域包括但不限于抗体或其抗原结合片段、束缚配体或者共受体的胞外结构域,所述靶抗原是肿瘤相关抗原(TAA)或肿瘤特异性抗原(TSA)。在某些实施方案中,TAA或TSA在血癌细胞上表达。在另一实施方案中,TAA或TSA在实体瘤细胞上表达。在具体实施方案中,实体瘤是胶质母细胞瘤、非小细胞肺癌、除非小细胞肺癌之外的肺癌、乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、肝癌、结肠癌、胃癌、脾脏癌、皮肤癌、除胶质母细胞瘤之外的脑癌、肾癌、甲状腺癌等。

[0288] 在具体实施方案中,TAA或TSA选自: α 叶酸受体、5T4、 $\alpha_v\beta_6$ 整合素、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD138、CD171、CEA、CSPG4、EGFR、包括ErbB2(HER2)的EGFR家族、EGFRvIII、EGP2、EGP40、EPCAM、EphA2、EpCAM、FAP、胎儿型AChR、FR α 、GD2、GD3、' 磷脂酰肌醇聚糖-3(GPC3)、HLA-A1+MAGE1、HLA-A2+MAGE1、HLA-A3+MAGE1、HLA-A1+NY-ESO-1、HLA-A2+NY-ESO-1、HLA-A3+NY-ESO-1、IL-11R α 、IL-13R α 2、 λ 、Lewis-Y、 κ 、间皮素、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2D配体、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、ROR1、SSX、生存素、TAG72、TEM和VEGFR2。

[0289] a. 结合结构域

[0290] 在具体实施方案中,本文所考虑的CAR包含与在肿瘤细胞上表达的靶标多肽(例如,靶抗原)特异性结合的胞外结合结构域。本文使用的术语“结合结构域”、“胞外结构域”、“胞外结合结构域”、“抗原-特异性结合结构域”和“胞外抗原特异性结合结构域”可互换使用,并且提供具有与目的靶抗原特异性结合的能力的CAR。结合结构域可以包含具有特异性识别并结合生物分子(例如,细胞表面受体或肿瘤蛋白、脂质、多糖或者其它细胞表面靶标分子或其组分)的能力的任何蛋白、多肽、寡肽或肽。结合结构域包含任何天然存在的、合成的、半合成的或者重组产生的目的生物分子的结合伴侣。

[0291] 在具体实施方案中,CAR的胞外结合结构域包含抗体或其抗原结合片段。“抗体”指这样的结合剂:其为至少包含轻链或重链免疫球蛋白可变区的多肽,所述免疫球蛋白可变区特异性识别并结合靶抗原(如肽、脂质、多糖或含有抗原决定簇的核酸(如通过免疫细胞所识别的那些))的表位。抗体包括其抗原结合片段。该术语还包括遗传工程化的形式,如嵌

合抗体(例如,人源化的鼠抗体)、异源缀合抗体(heteroconjugate antibody)(如,双特异抗体)及其抗原结合片段。还参见,Pierce Catalog and Handbook,1994-1995(Pierce Chemical Co.,Rockford,IL);Kuby,J.,Immunology,第三版.,W.H.Freeman&Co.,New York,1997。

[0292] 在具体实施方案中,靶抗原是以下的表位: α 叶酸受体、5T4、 $\alpha_v\beta_6$ 整合素、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD138、CD171、CEA、CSPG4、EGFR、包括ErbB2(HER2)的EGFR家族、EGFRvIII、EGP2、EGP40、EPCAM、EphA2、EpCAM、FAP、胎儿型AChR、FR α 、GD2、GD3、' 磷脂酰肌醇聚糖-3(GPC3)、HLA-A1+MAGE1、HLA-A2+MAGE1、HLA-A3+MAGE1、HLA-A1+NY-ESO-1、HLA-A2+NY-ESO-1、HLA-A3+NY-ESO-1、IL-11R α 、IL-13R α 2、 λ 、Lewis-Y、 κ 、间皮素、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2D配体、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、ROR1、SSX、生存素、TAG72、TEM或VEGFR2多肽。

[0293] 轻链和重链可变区含有被三个高变区间隔的“框架”区,也被称为“互补决定区”或“CDR”。通过常规方法,如通过根据Kabat等(Wu,TT和Kabat,E.A.,J Exp Med.132(2):211-50,(1970);Borden,P.和Kabat E.A.,PNAS,84:2440-2443(1987);(参见,Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,U.S.Department of Health and Human Services,1991,在此将其通过引用并入)所述的序列,或者通过根据Chothia等人(Chothia,C.和Lesk,A.M.,J Mol.Biol.,196(4):901-917(1987),Chothia,C.等人,Nature,342:877-883(1989))所述的结构来限定或鉴定CDR。

[0294] 不同轻链或重链的框架区的序列在物种(如人)内相对保守。抗体的框架区(其为组成的轻链或重链的组合框架区)用于在三维空间中定位和对齐CDR。CDR主要负责与抗原表位结合。各链的CDR通常被称作CDR1、CDR2和CDR3,从N-末端开始顺序编号,并且通常还通过特定CDR所位于的链进行鉴定。因此,位于抗体重链可变结构域上的CDR被称作CDRH1、CDRH2和CDRH3,而位于抗体轻链可变结构域的CDR被称作CDRL1、CDRL2和CDRL3。具有不同特异性(即,针对不同抗原的不同的组合位点)的抗体具有不同的CDR。尽管CDR在抗体与抗体之间是不同的,但是CDR内只有有限数量的氨基酸位点直接参与抗原结合。CDR内的这些位点被称为特异性决定残基(SDR)。

[0295] 提及“V_H”或“VH”,指免疫球蛋白重链的可变区,包括抗体、Fv、scFv、dsFv、Fab或如本文所公开的其它抗体片段的重链可变区。提及“V_L”或“VL”,指免疫球蛋白轻链的可变区,其包括抗体、Fv、scFv、dsFv、Fab或如本文所公开的其它抗体片段的轻链可变区。

[0296] “单克隆抗体”是由B淋巴细胞的单一克隆或者由转染有单一抗体的轻链或重链基因的细胞所产生的抗体。通过本领域技术人员已知的方法,例如通过从骨髓瘤细胞与免疫脾细胞的融合体制备杂交抗体形成细胞来产生单克隆抗体。单克隆抗体包括人源化单克隆抗体。

[0297] “嵌合抗体”具有来自一个物种(如人)的框架残基和来自另外物种(如小鼠)的CDR(其通常赋予抗原结合)。在具体的优选实施方案中,本文所考虑的CAR包含抗原特异性结合结构域,所述抗原特异性结合结构域为嵌合抗体或其抗原结合片段。

[0298] 在某些优选实施方案中,抗体是与肿瘤细胞上的表面蛋白特异性结合的人源化抗体(如人源化单克隆抗体)。“人源化”抗体是包含人框架区和来自非人(例如小鼠、大鼠或合成的)免疫球蛋白的一种或多种CDR的免疫球蛋白。可以通过遗传工程的方法构建人源化抗

体(参见例如,美国专利第5,585,089号)。

[0299] 在具体实施方案中,CAR的胞外结合结构域包含抗体或其抗原结合片段,包括但不限于骆驼Ig(骆驼科抗体(VHH))、Ig NAR、Fab片段、Fab'片段、F(ab)'₂片段、F(ab)'₃片段、Fv、单链Fv抗体("scFv")、双-scFv、(scFv)₂、微型抗体(minibody)、双功能抗体(diabody)、三功能抗体(triabody)、四功能抗体(tetrabody)、二硫键稳定的Fv蛋白("dsFv")和单域抗体(sdAb,纳米抗体)。

[0300] 本文使用的“骆驼Ig”或“骆驼科VHH”指重链抗体的最小已知抗原结合单元(Koch-Nolte等人,FASEB J.,21:3490-3498(2007))。“重链抗体”或“骆驼科抗体”指含有两个VH结构域且无轻链的抗体(Riechmann L.等人,J.Immunol.Methods 231:25-38(1999);W094/04678;W094/25591;美国专利第6,005,079号)。

[0301] “免疫球蛋白新抗原受体”的“IgNAR”指来自鲨鱼免疫库的抗体类,其由一个可变的新抗原受体(VNAR)结构域和五个恒定的新抗原受体(CNAR)结构域的同源二聚体组成。

[0302] 抗体的木瓜蛋白酶消化产生两个相同的抗原结合片段(叫做“Fab”片段)和剩余的“Fc”片段,所述两个相同的抗原结合片段各自具有单一抗原结合位点,“Fc”片段的名称反映了其容易结晶的能力。Fab片段含有重链可变结构域和轻链可变结构域,并且还含有轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域(CH1)。Fab'片段与Fab片段的不同之处在于,在重链CH1结构域的羧基末端添加了几个残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH是本文对恒定结构域的半胱氨酸残基具有游离的巯醇基的Fab'的命名。F(ab')₂抗体片段最初产生为Fab'片段对,所述Fab'片段对在其间具有铰链半胱氨酸。抗体片段的其它化学偶联体也是已知的。

[0303] “Fv”是最小的抗体片段,其含有完整的抗原结合位点。在单链Fv(scFv)种类中,一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域可以通过柔性肽接头共价连接,使得轻链或重链可以与双链Fv种类中的类似的“二聚”结构的形式结合。

[0304] 术语“双功能抗体(diabody)”指具有两个抗原结合位点的抗体片段,所述片段在同一多肽链中(VH-VL)包含与轻链可变结构域(VL)连接的重链可变结构域(VH)。通过使用太短而不能使同一链上的两个结构域之间配对的接头,强迫所述结构域与另一链上的互补结构域配对并且产生两个抗原结合位点。双特异抗体可以是二价的或双特异性的。双功能抗体更充分地描述于例如,EP 404,097;WO 1993/01161;Hudson等人,Nat.Med.9:129-134(2003);以及Hollinger等人,PNAS USA 90:6444-6448(1993)。三功能抗体和四功能抗体也描述于Hudson等人,Nat.Med.9:129-134(2003)。

[0305] “单结构域抗体”或“sdAb”或“纳米抗体”指由抗体重链的可变区(VH结构域)或抗体轻链的可变区(VL结构域)组成的抗体片段(Holt,L.等人,Trends in Biotechnology,21(11):484-490)。

[0306] “单链Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的VH和VL结构域,其中这些结构域存在于单个多肽链上且处于任一方向(例如,VL-VH或VH-VL)。通常,scFv多肽在VH和VL结构域之间还包含多肽接头,所述接头使scFv能够形成用于抗原结合的期望结构。对于scFv的综述,参见,例如,Pluckthün,in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,vol.113,Rosenburg and Moore eds.,(Springer-Verlag,New York,1994),pp.269-315。

[0307] 在某些实施方案中,scFv结合 α 叶酸受体、5T4、 $\alpha_v\beta_6$ 整合素、BCMA、B7-H3、B7-H6、

CAIX、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD138、CD171、CEA、CSPG4、EGFR、包括ErbB2 (HER2) 的EGFR家族、EGFRvIII、EGP2、EGP40、EPCAM、EphA2、EpCAM、FAP、胎儿型AChR、FR α 、GD2、GD3、' 磷脂酰肌醇聚糖-3 (GPC3)、HLA-A1+MAGE1、HLA-A2+MAGE1、HLA-A3+MAGE1、HLA-A1+NY-ESO-1、HLA-A2+NY-ESO-1、HLA-A3+NY-ESO-1、IL-11R α 、IL-13R α 2、 λ 、Lewis-Y、 κ 、间皮素、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2D配体、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、ROR1、SSX、生存素、TAG72、TEM或VEGFR2多肽。

[0308] b. 接头

[0309] 在某些实施方案中,本文所考虑的CAR可以在各个结构域之间,(例如在V_H和V_L结构域之间)包含接头残基,添加所述接头残基为了所述分子的适当的间距和构象。本文所考虑的CAR可以包含1、2、3、4或5个或者更多个接头。在具体实施方案中,接头的长度是约1至约25个氨基酸、约5至约20个氨基酸或约10至约20个氨基酸或者任意介于中间长度的氨基酸。在一些实施方案中,接头的长度是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25个或者更多个氨基酸。

[0310] 接头的示例性实例包括甘氨酸聚合物(G)_n;甘氨酸-丝氨酸聚合物(G₁₋₅S₁₋₅)_n,其中n是至少为1、2、3、4或5的整数;甘氨酸-丙氨酸聚合物;丙氨酸-丝氨酸聚合物;以及本领域已知的其它柔性接头。甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物相对非结构化,并且因此可以作为融合蛋白(如本文所描述的CAR)的结构域之间的中性系链(neutral tether)。甘氨酸甚至比丙氨酸显著更大程度地接近phi-psi空间,并且比具有更长侧链的残基受到更少的限制(参见Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992))。普通技术人员将理解,在具体实施方案中,CAR的设计可以包含全部或部分柔性的接头,使得接头可以包含柔性接头以及赋予较小柔性结构的一个或多个部分以提供期望的CAR结构。

[0311] 其它示例性接头包括但不限于下述氨基酸序列:GGG;DGGGS (SEQ ID NO:1);TGEKP (SEQ ID NO:2) (参见,例如,Liu等人,PNAS 55:25-5530 (1997));GGRR (SEQ ID NO:3) (Pomerantz等人,1995,同上);(GGGS)_n,其中n=1、2、3、4或5 (SEQ ID NO:4) (Kim等人,PNAS 93,1156-1160 (1996));EGKSSGSGSESKVD (SEQ ID NO:5) (Chaudhary等人,1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:1066-1070);KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO:6) (Bird等人,1988, Science 242:423-426),GGRRGGGS (SEQ ID NO:7);LRQRDGERP (SEQ ID NO:8);LRQKDGGSERP (SEQ ID NO:9);LRQKd (GGGS)₂ERP (SEQ ID NO:10)。可选地,使用能够模拟DNA-结合位点和肽自身的计算机程序(Desjarlais&Berg,PNAS 90:2256-2260 (1993), PNAS 91:11099-11103 (1994))或者通过噬菌体展示方法可以理性地设计柔性接头。

[0312] 在具体实施方案中,CAR包含还含有可变区连接序列的scFv。“可变区连接序列”是将重链可变区与轻链可变区连接的氨基酸序列,并且提供与两个亚结合结构域的相互作用兼容的间隔功能,以使所得到的多肽对与包含相同轻链或重链可变区的抗体相同的靶分子维持特异性结合亲和性。在一个实施方案中,可变区连接序列的长度是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25个或更多个氨基酸。在具体实施方案中,可变区连接序列包含甘氨酸-丝氨酸聚合物(G₁₋₅S₁₋₅)_n,其中n是至少为1、2、3、4或5的整数。在另一实施方案中,可变区连接序列包含(G₄S)₃氨基酸接头。

[0313] c. 间隔结构域

[0314] 在具体实施方案中,CAR的结合结构域之后是一个或多个“间隔结构域”,所述“间

“间隔结构域”指这样的区域：其使抗原结合结构域远离效应细胞的表面，使能够进行适当的细胞/细胞接触、抗原结合和活化 (Patel 等人, GeneTherapy, 1999; 6: 412-419)。间隔结构域可以源自天然的、合成的、半合成的或重组来源。在某些实施方案中，间隔结构域是免疫球蛋白的一部分，包括但不限于，一个或多个重链恒定区，例如，CH2和CH3。间隔结构域可以包含天然存在的免疫球蛋白铰链区或改变的免疫球蛋白铰链区的氨基酸序列。

[0315] 在一个实施方案中，间隔结构域包含IgG1的CH2和CH3。

[0316] d. 铰链结构域

[0317] 通常，CAR的结合结构域之后是一个或多个“铰链结构域”，其在将抗原结合结构域定位于远离效应细胞表面以能够进行适当的细胞/细胞接触、抗原结合和活化方面发挥作用。CAR通常在结合结构域和跨膜结构域(TM)之间包含一个或多个铰链结构域。铰链结构域可以源自天然的、合成的、半合成的或重组来源。铰链结构域可以包含天然存在的免疫球蛋白铰链区或改变的免疫球蛋白铰链区的氨基酸序列。

[0318] 适合用于本文所描述的CAR的示例性铰链结构域包括源自I型膜蛋白(如CD8 α 、CD4、CD28和CD7)胞外区的铰链区，其可以是来自这些分子的野生型铰链区，或者可以是改变了的铰链区。在另一实施方案中，铰链结构域包含CD8 α 铰链区。

[0319] e. 跨膜(TM)结构域

[0320] “跨膜结构域”是CAR的一部分，其使胞外结合部分和胞内信号转导结构域融合，并且使CAR锚定至免疫效应细胞的质膜上。TM结构域可以源自天然的、合成的、半合成的或重组来源。

[0321] 示例性的TM结构域可以源自(即，至少包括以下的跨膜区)：T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD4、CD5、CD9、CD 16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137和CD154。

[0322] 在一个实施方案中，本文所考虑的CAR包含源自CD8 α 的TM结构域。在另一实施方案中，本文所考虑的CAR包含源自CD8 α 的TM结构域和优选长度为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸的短的寡肽或多肽接头，所述接头连接CAR的TM结构域和胞内信号转导结构域。甘氨酸-丝氨酸接头提供特别合适的接头。

[0323] f. 胞内信号转导结构域

[0324] 在具体实施方案中，本文所考虑的CAR包含胞内信号转导结构域。“胞内信号转导结构域”指CAR的一部分，其参与将有效的CAR结合靶抗原的信息转导进免疫效应细胞的内部，以引发效应细胞的功能，例如活化、细胞因子的产生、增殖和细胞毒性活性，包括将细胞毒性因子释放至CAR结合的靶细胞或者用与胞外CAR结构域结合的抗原引发的其它细胞应答。

[0325] 术语“效应功能”指细胞的特化功能。T细胞的效应功能，例如，可以是细胞溶解活性或者辅助或者包括细胞因子的分泌在内的活性。因此，术语“胞内信号转导结构域”指转导效应功能信号并引导细胞实施特化功能的蛋白部分。虽然通常可以采用整个胞内信号转导结构域，但是在许多情况下，不必使用整个结构域。就使用胞内信号转导结构域的截短部分而言，此类截短部分可以用于代替整个结构域，只要其能转导效应功能信号。术语胞内信号转导结构域意指包括足以转导效应功能信号的胞内信号转导结构域的任何截短部分。

[0326] 已知，单独通过TCR产生的信号不足以完全活化T细胞，并且还需要次级信号或共

刺激信号。因此，T细胞活化可以说成是由两种不同类型的胞内信号转导结构域介导：初级信号结构域，其通过TCR（例如，TCR/CD3复合物）起始抗原依赖的初级活化；和共刺激信号转导结构域，其以抗原非依赖性方式起作用以提供次级或共刺激信号。在优选实施方案中，本文所考虑的CAR包含含有一个或多个“共刺激信号转导结构域”和“初级信号转导结构域”的胞内信号转导结构域。

[0327] 初级信号转导结构域以刺激的方式或抑制的方式调控TCR复合物的初级活化。以刺激方式起作用的初级信号转导结构域可以包含被称为免疫受体酪氨酸激活基序或ITAM的信号转导基序。

[0328] 在本发明中特别有用的含有ITAM的初级信号转导结构域的示例性实例包括源自TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的那些。在具体的优选实施方案中，CAR包含CD3 ζ 初级信号转导结构域以及一个或多个共刺激信号转导结构域。胞内初级信号转导结构域和共刺激信号转导结构域可以以任意顺序串联连接至跨膜结构域的羧基末端。

[0329] 本文所考虑的CAR包含一个或多个共刺激信号转导结构域以增强表达CAR受体的T细胞的效力和扩增。本文使用的术语“共刺激信号转导结构域”或“共刺激结构域”指共刺激分子的胞内信号转导结构域。

[0330] 此类共刺激分子的示例性实例包括CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40 (CD134)、CD30、CD40、PD-1、ICOS (CD278)、CTLA4、LFA-1、CD2、CD7、LIGHT、TRIM、LCK3、SLAM、DAP10、LAG3、HVEM和NKD2C以及CD83。在一个实施方案中，CAR包含选自CD28、CD137和CD134的一个或多个共刺激信号转导结构域以及CD3 ζ 初级信号转导结构域。

[0331] 在一个实施方案中，CAR包含scFv、跨膜结构域和一个或多个胞内共刺激信号转导结构域以及CD3 ζ 初级信号转导结构域，所述scFv结合 α 叶酸受体、5T4、 $\alpha_v\beta_6$ 整合素、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD138、CD171、CEA、CSPG4、EGFR、包括ErbB2 (HER2) 的EGFR家族、EGFRvIII、EGP2、EGP40、EPCAM、EphA2、EpCAM、FAP、胎儿型AchR、FR α 、GD2、GD3、' 磷脂酰肌醇聚糖-3 (GPC3)、HLA-A1+MAGE1、HLA-A2+MAGE1、HLA-A3+MAGE1、HLA-A1+NY-ESO-1、HLA-A2+NY-ESO-1、HLA-A3+NY-ESO-1、IL-11R α 、IL-13R α_2 、 λ 、Lewis-Y、 κ 、间皮素、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2D配体、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、ROR1、SSX、生存素、TAG72、TEM或VEGFR2多肽；所述跨膜结构域源自选自CD8 α 、CD4、CD45、PD1和CD152的多肽；以及所述一个或多个胞内共刺激信号转导结构域选自：CD28、CD54、CD134、CD137、CD152、CD273、CD274和CD278。

[0332] 在另一实施方案中，CAR包含scFv、铰链结构域，跨膜结构域和一个或多个胞内共刺激信号转导结构域以及CD3 ζ 初级信号转导结构域，所述scFv结合 α 叶酸受体、5T4、 $\alpha_v\beta_6$ 整合素、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD138、CD171、CEA、CSPG4、EGFR、包括ErbB2 (HER2) 的EGFR家族、EGFRvIII、EGP2、EGP40、EPCAM、EphA2、EpCAM、FAP、胎儿型AchR、FR α 、GD2、GD3、' 磷脂酰肌醇聚糖-3 (GPC3)、HLA-A1+MAGE1、HLA-A2+MAGE1、HLA-A3+MAGE1、HLA-A1+NY-ESO-1、HLA-A2+NY-ESO-1、HLA-A3+NY-ESO-1、IL-11R α 、IL-13R α_2 、 λ 、Lewis-Y、 κ 、间皮素、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2D配体、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、ROR1、SSX、生存素、TAG72、TEM或VEGFR2多肽；所述铰链结构域选自IgG1铰链/CH2/CH3和CD8 α ，以及CD8 α ；所述跨膜结构域源自选自CD8 α 、CD4、

CD45、PD1和CD152的多肽；所述一个或多个胞内共刺激信号转导结构域选自CD28、CD134和CD137。

[0333] 而在另一实施方案中，CAR包含scFv，铰链结构域，跨膜结构域和一个或多个胞内共刺激信号转导结构域以及CD3 ζ 初级信号转导结构域；所述scFv还含有接头，其结合 α 叶酸受体、5T4、 $\alpha_v\beta_6$ 整合素、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD138、CD171、CEA、CSPG4、EGFR、包括ErbB2 (HER2)的EGFR家族、EGFRvIII、EGP2、EGP40、EPCAM、EphA2、EpCAM、FAP、胎儿型AchR、FR α 、GD2、GD3、' 磷脂酰肌醇聚糖-3 (GPC3)、HLA-A1+MAGE1、HLA-A2+MAGE1、HLA-A3+MAGE1、HLA-A1+NY-ESO-1、HLA-A2+NY-ESO-1、HLA-A3+NY-ESO-1、IL-11R α 、IL-13R α_2 、 λ 、Lewis-Y、 κ 、间皮素、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2D配体、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、ROR1、SSX、生存素、TAG72、TEM或VEGFR2多肽；所述铰链结构域选自：IgG1铰链/CH2/CH3和CD8 α ，以及CD8 α ；所述跨膜结构域包含TM结构域和短的寡肽或多肽接头，所述TM结构域源自选自CD8 α 、CD4、CD45、PD1和CD152的多肽，所述短的寡肽或多肽接头将TM结构域与CAR的胞内信号转导结构域连接，其长度优选为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸；以及所述一个或多个胞内共刺激信号转导结构域选自CD28、CD134和CD137。

[0334] 在具体实施方案中，CAR包含scFv，铰链结构域，CD8 α 跨膜结构域、一个或多个胞内共刺激信号转导结构域以及CD3 ζ 初级信号转导结构域；所述scFv结合 α 叶酸受体、5T4、 $\alpha_v\beta_6$ 整合素、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD138、CD171、CEA、CSPG4、EGFR、包括ErbB2 (HER2)的EGFR家族、EGFRvIII、EGP2、EGP40、EPCAM、EphA2、EpCAM、FAP、胎儿型AchR、FR α 、GD2、GD3、' 磷脂酰肌醇聚糖-3 (GPC3)、HLA-A1+MAGE1、HLA-A2+MAGE1、HLA-A3+MAGE1、HLA-A1+NY-ESO-1、HLA-A2+NY-ESO-1、HLA-A3+NY-ESO-1、IL-11R α 、IL-13R α_2 、 λ 、Lewis-Y、 κ 、间皮素、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2D配体、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、ROR1、SSX、生存素、TAG72、TEM或VEGFR2多肽；所述铰链结构域包含CD8 α 多肽；所述CD8 α 跨膜结构域包含约3个氨基酸的多肽接头；所述一个或多个胞内共刺激信号转导结构域选自CD28、CD134和CD137。

[0335] E. 多肽

[0336] 本发明部分考虑工程化的TCR和CAR多肽及其片段，包含所述工程化的TCR和CAR多肽及其片段的细胞和组合物，以及表达多肽的载体。“多肽”、“多肽片段”、“肽”和“蛋白”可互换使用，并且指重组的、合成的或非天然的氨基酸聚合物。多肽不限于特定的长度，例如，它们可以包含全长蛋白序列或者全长蛋白的片段，并且可以包括多肽的翻译后修饰物（例如，糖基化物、乙酰化物、磷酸化物等）以及天然存在和非天然存在的本领域已知的其它修饰物。在不同实施方案中，本文所考虑的多肽在蛋白的N端包含信号（或前导）序列，其共翻译或翻译后地引导蛋白的转移。用于本公开中的合适信号序列的示例性实例包括但不限于IgG1重链信号多肽、CD8 α 信号多肽或人GM-CSF受体 α 信号多肽。可以使用多种熟知的重组和/或合成技术中的任何技术来制备多肽。具体地，本文所考虑的多肽包含本公开的CAR，或者本文所考虑的多肽的一个或多个氨基酸缺失、添加和/或置换的序列。

[0337] 多肽包括“多肽变体”。多肽变体与天然存在多肽的不同之处可以在于一处或多处置换、缺失、添加和/或插入。此类变体可以是天然存在的或者例如通过对上述多肽序列中的一种或多种进行修饰而合成产生的。例如，在具体实施方案中，可以期望通过引入一处或

多处置换、缺失、添加和/或插入来改善工程化的TCR或CAR的结合亲和力和/或其它生物学特性。优选地,本发明的多肽包括与其具有至少约65%、70%、75%、85%、90%、95%、98%或99%的氨基酸同一性的多肽。

[0338] 多肽包括“多肽片段”。多肽片段指天然存在的或重组产生的多肽的氨基末端缺失、羧基末端缺失和/或内部的缺失或置换的多肽,其是单体或多体。在某些实施方案中,多肽片段可以包含至少5个至约500个氨基酸长度的氨基酸链。将理解,在某些实施方案中,片段的长度为至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、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、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、150、200、250、300、350、400或450个氨基酸。

[0339] 多肽还可以框内融合或者与接头或其它序列缀合,以便于多肽的合成、纯化或鉴定(例如,多His),或者以增强多肽与固体支持物的结合。

[0340] 如上所注意到的,可以以多种方式改变本文所考虑的多肽,包括氨基酸置换、缺失、截短和插入。此类操作的方法在本领域通常是已知的。例如,可以通过DNA的突变制备参照多肽的氨基酸序列变体。用于突变发生和核苷酸序列改变的方法在本领域众所周知。参见,例如,Kunkel (1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:488-492)、Kunkel等(1987, Methods in Enzymol, 154:367-382)、美国专利第4,873,192号、Watson, J.D.等(《基因的分子生物学》(Molecular Biology of the Gene)), 第四版, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1987)以及其中所引用的参考文献。关于不影响目的蛋白的生物学活性的适当氨基酸置换的指导可见于Dayhoff等(1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.)的模式。

[0341] 在某些实施方案中,变体将包含保守性置换。“保守性置换”是这样的置换,其中氨基酸被置换为具有类似特性的另一氨基酸,使得肽化学领域的技术人员将预期所述多肽的二级结构和亲水(hydrophobic)性质基本上未改变。可以对本发明的多核苷酸和多肽的结构进行修饰,并仍然获得编码具有期望特性的变体或衍生多肽的功能分子。

[0342] 多肽变体还包括糖基化形式、与其它分子的聚集缀合物,以及具有不相关的化学部分(例如,聚乙二醇化的分子)的共价缀合物。如本领域所知,可以通过将官能团与存在于氨基酸链的基团或位于N-末端或C-末端的残基连接来制备共价变体。变体还包括等位变体、物种变体和突变蛋白(mutein)。不影响蛋白功能活性的区域的截短或缺失也是变体。

[0343] 在一个实施方案中,当期望表达两种或更多种多肽时,可以通过如本文别处所讨论的IRES序列隔开编码所述多肽的多核苷酸序列。在另一实施方案中,两种或更多种多肽可以表达为包含一个或多个自切割多肽序列的融合蛋白。

[0344] 本发明的多肽包括融合多肽。在优选实施方案中,提供融合多肽和编码融合多肽的多核苷酸。融合多肽和融合蛋白指包含至少两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个或更多个多肽区段的多肽。融合多肽通常是C-末端连接至N-末端,但是它们也可以是C-末端连接至C-末端、N-末端连接至N-末端、或者N-末端连接至C-末端。融合蛋白的多肽可以是任意顺序或指定的顺序。融合多肽或融合蛋白还可以包括保守修饰的变体、多态变体、等位基因、突变体、子序列以及种间同系物,只要保留融合多肽的期望转录活性。可以通过化学合成方法或者通过两个部分之间化学键合来产生融合多肽,或者通常可以使用其它标准技术来制备融合多肽。将包含融合多肽的连接DNA序列与如本文别处所讨论的合

适的转录或翻译控制元件可操作地连接。

[0345] 在一个实施方案中,融合伴侣包含有助于以比天然重组蛋白更高的产率表达蛋白的序列(表达增强子)。可以选择其它融合伴侣,以增加蛋白的溶解性或者使蛋白能够靶向期望的胞内区室或者促进融合蛋白通过细胞膜的转运。

[0346] 融合多肽还可以在本文所描述的各多肽结构域之间包含多肽切割信号。此外,多肽位点可以位于任何接头肽序列。示例性的多肽切割信号包括多肽切割识别位点,如蛋白酶切割位点、核酸酶切割位点(例如,罕见限制性酶识别位点、自切割核酶识别位点)和自切割病毒寡肽(参见deFelipe和Ryan,2004.Traffic,5(8);616-26)。

[0347] 合适的蛋白酶切割位点和自切割肽是对技术人员来说是已知的(参见,例如,Ryan等人,1997.J.Gener.Virol.78,699-722;Scymczak等人(2004)Nature Biotech.5,589-594)。示例性蛋白酶切割位点包括但不限于以下的切割位点:马铃薯Y病毒NIa蛋白酶(例如,烟草蚀纹病毒蛋白酶)、马铃薯Y病毒HC蛋白酶、马铃薯Y病毒P1(P35)蛋白酶、byovirus NIa蛋白酶、byovirus RNA-2-编码的蛋白酶、口蹄疫病毒L蛋白酶、肠病毒2A蛋白酶、鼻病毒2A蛋白酶、小RNA病毒(picorna)3C蛋白酶、豇豆花叶病毒24K蛋白酶、线虫传多面体病毒24K蛋白酶、RTSV(水稻东格鲁球状病毒)3C-样蛋白酶、PYVF(欧防风黄点病毒)3C-样蛋白酶、肝素、凝血酶、因子Xa和肠激酶。由于其高的切割严格性,在一个实施方案中,优选TEV(烟草蚀纹病毒)蛋白酶切割位点,例如,EXXYXQ(G/S)(SEQ ID NO:11),例如ENLYFQG(SEQ ID NO:12)和ENLYFQS(SEQ ID NO:13),其中X代表任何氨基酸(TEV切割发生在Q和G或者Q和S之间)。

[0348] 在具体实施方案中,自切割肽包括获自以下的那些多肽序列:马铃薯Y病毒和心病病毒2A肽、FMDV(口蹄疫疾病病毒)、马鼻炎病毒A、明脉扁刺蛾β四体病毒和猪捷申病毒。

[0349] 在某些实施方案中,自切割多肽位点包含2A或2A-样位点、序列或结构域(Donnelly等人,2001.J.Gen.Virol.82:1027-1041)。

[0350] F. 多核苷酸

[0351] 在具体实施方案中,提供编码本文所考虑的一种或多种工程化的TCR或CAR多肽的多核苷酸。本文使用的术语“多核苷酸”或“核酸”指信使RNA(mRNA)、RNA、基因组RNA(gRNA)、正链RNA(RNA(+))、负链RNA(RNA(-))、基因组DNA(gDNA)、互补DNA(cDNA)、重组DNA、合成的DNA或非天然存在的DNA。多核苷酸包括单链和双链多核苷酸。优选地,本发明的多核苷酸包括与本文所描述的任何参照序列(参见,例如,序列表)具有至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性的多核苷酸或变体,通常,其中所述变体维持参照序列的至少一种生物学活性。在不同的示例性实施方案中,本发明部分考虑包含多核苷酸的表达载体、病毒载体、转移质粒和组合物,以及包含所述包含多核苷酸的表达载体、病毒载体、转移质粒和组合物的细胞。

[0352] 在具体实施方案中,本发明提供编码本发明多肽的至少约5、10、25、50、100、150、200、250、300、350、400、500、1000、1250、1500、1750或2000个或者更多个连续氨基酸残基,以及所有中间长度的连续氨基酸残基的多核苷酸。将容易理解,本背景中的“中间长度”意指引用的数值之间的任意长度,如6、7、8、9等;101、102、103等;151、152、153等;201、202、203等。

[0353] 本文使用的术语“多核苷酸变体”和“变体”等,指与参照多核苷酸序列呈现基本的

序列同一性的多核苷酸,或者在其后所定义的严格条件下与参照序列杂合的多核苷酸。这些术语包括与参照多核苷酸相比,添加或缺失了一个或多个核苷酸,或者用不同核苷酸替代一个或多个核苷酸的多核苷酸。在这点上,在本领域众所周知的是,可以对参照多核苷酸进行某些改变,包括突变、添加、缺失和置换,以使改变的多核苷酸保留参照多核苷酸的生物学功能或活性。

[0354] 本文使用的叙述“序列同一性”或者例如,包含“与...50%相同的序列”,指在比较窗口中以逐个核苷酸或逐个氨基酸为基础的序列相同的程度。因此,可以通过以下步骤计算“序列同一性百分比”:对比较窗口中两个最佳对齐的序列进行比较,确定两个序列中均存在的相同核酸碱基(例如,A、T、C、G、I)或相同氨基酸残基(例如,Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys和Met)的位点数以得到匹配位点的数目,将匹配的位点数除以比较窗口中的总位点数(即,窗口大小),并且将结果乘以100,以产生序列同一性百分比。包括与本文所描述的任何参照序列具有至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核苷酸和多肽,通常其中多肽变体维持参照多肽的至少一种生物学活性。

[0355] 用于描述两个或更多个多核苷酸或多肽之间的序列关系的术语包括“参照序列”、“比较窗口”、“序列同一性”、“序列同一性百分比”以及“基本相同”。“参照序列”的长度为至少12个,但通常为15至18个,以及通常至少25个单体单元,所述单体单元包括核苷酸和氨基酸残基。因为两个多核苷酸可以各自包含(1)两个多核苷酸之间类似的序列(即,仅完整多核苷酸序列的一部分)和(2)两个多核苷酸之间不同的序列,所以通常通过比较“比较窗口”中的两个多核苷酸的序列来进行两个(或者更多个)多核苷酸之间的序列比较,从而鉴定和比较局部区域的序列相似性。“比较窗口”指至少6个连续位点,通常约50至约100个,更通常约100至约150个连续位点的概念上的区段,其中在将两个序列最佳对齐后,将序列与相同连续位点数的参照序列进行比较。为了两个序列的最佳比对,比较窗口可以包含与参照序列(其不包含添加或缺失)相比约20%或更少的添加或缺失(即,空位)。可以通过算法的计算机化实施(威斯康星遗传学软件包版本7.0中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA,Genetics Computer Group,575Science Drive Madison,WI,USA)或通过检验和由所选择的各种方法中的任一种所产生的最佳对齐(即,在比较窗口中产生最高百分比同源性),进行对齐比较窗口的序列的最佳比对。还可以参考例如由Altschul等人,1997,Nucl.Acids Res.25:3389所公开的BLAST程序家族。序列分析的详细讨论可见于Ausubel等人编著的《最新分子生物学实验指南》(Current Protocols in Molecular Biology)(John Wiley&Sons Inc,1994-1998,第15章)第19.3单元。

[0356] 本发明的多核苷酸(不考虑编码序列本身的长度)可以与本文别处所公开的或者本领域已知的其它DNA序列组合,使得它们的总长度可以大大改变,所述其它DNA序列如启动子和/或增强子,非翻译区(UTR),Kozak序列,聚腺苷酸化信号,另外的限制性酶位点,多克隆位点,内部核糖体进入位点(IRES),重组酶识别位点(例如LoxP,FRT和Att位点),终止密码子,转录终止信号以及编码自切割多肽、表位标签的多核苷酸。因此考虑,可以采用几乎任意长度的多核苷酸片段,其中总长度优选受制备的容易性和在预期的重组DNA方案中的用途的限制。

[0357] 可以使用本领域已知且可用的各种很好建立的技术中的任一种制备、操作和/或

表达多核苷酸。为了表达期望的多肽,可以将编码多肽的核苷酸序列插入适当的载体中。载体的实例是质粒、自主复制序列和转座元件。另外的示例性载体包括但不限于,质粒、噬菌粒、粘粒、人工染色体(如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1来源的人工染色体(PAC))、细菌噬菌体(如 λ 噬菌体或M13噬菌体)以及动物病毒。可用作载体的动物病毒类的实例包括但不限于:逆转录病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(例如、单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒和乳头多瘤空泡病毒(例如,SV40)。表达载体的实例是用于在哺乳动物细胞中表达的pCIneo载体(Promega);用于在哺乳动物细胞中进行慢病毒介导的基因转移和表达的pLenti4/V5-DESTTM、pLenti6/V5-DESTTM和pLenti6.2/V5-GW/lacZ(Invitrogen)。在具体实施方案中,可以将本文所公开的嵌合蛋白的编码序列连接进此类表达载体中,以用于嵌合蛋白在哺乳动物细胞中的表达。

[0358] 存在于表达载体中的“控制元件”或“调控序列”是载体的那些非翻译区-复制起点、选择盒、启动子、增强子、翻译起始信号(Shine Dalgarno序列或Kozak序列)内含子、聚腺苷酸化序列、5'和3'非翻译区-其与宿主细胞蛋白相互作用以进行转录和翻译。此类元件在强度和特异性方面可以不同。根据所利用的载体系统和宿主,可以使用任何数量的合适的转录和翻译元件,包括普遍存在的启动子和可诱导的启动子。

[0359] 在具体实施方案中,用于实践本发明的载体(包括但不限于表达载体和病毒载体)将包含外源、内源或异源控制序列,如启动子和/或增强子。“内源”控制序列是与基因组中指定的基因天然连接的序列。“外源”控制序列是通过遗传操作的方法(即,分子生物学技术)与基因并列放置,以使所述基因的转录由连接的增强子/启动子引导的序列。“异源”控制序列是来自与进行遗传操作的细胞不同物种的外源序列。

[0360] 本文使用的术语“启动子”指RNA聚合酶所结合的多核苷酸(DNA或RNA)的识别位点。RNA聚合酶起始并转录与启动子可操作地连接的多核苷酸。在具体实施方案中,在哺乳动物细胞中起作用的启动子包含位于转录起始位点上游大约25至30个碱基处的富含AT的区域和/或存在于转录开始上游70至80个碱基处的另一序列,CNCAAT区域,其中N可以是任意核苷酸。

[0361] 术语“增强子”指这样的DNA区段:其含有能够提供增强的转录且在某些情况下可以独立于其与另外的控制序列相对的方向而起作用的序列。增强子可以与启动子和/或其它增强子元件合作地或叠加地起作用。术语“启动子/增强子”指含有能够提供启动子和增强子功能的序列的DNA区段。

[0362] 术语“可操作地连接”指并列,其中所描述的组分处于允许其以它们预期的方式起作用的关系中。在一个实施方案中,该术语指核酸表达控制序列(如启动子和/或增强子)和第二多核苷酸序列(例如,目的多核苷酸)之间的功能性连接,其中表达控制序列引导与第二序列对应的核酸的转录。

[0363] 本文使用的术语“组成型表达控制序列”指连续地或连续不断地允许可操作地连接的序列转录的启动子、增强子或启动子/增强子。组成型表达控制序列可以分别是允许在多种细胞和组织类型中表达的“普遍存在的”启动子、增强子或者启动子/增强子,或者是允许在受限制的多种细胞和组织类型中表达的“细胞特异性”、“细胞类型特异性”、“细胞谱系特异性”或“组织特异性”的启动子、增强子或者启动子/增强子。

[0364] 适合用于本发明的具体实施方案中的示例性的普遍存在的表达控制序列包括但

不限于:巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子,病毒猿猴病毒40(SV40)(例如早期或晚期),莫洛尼鼠白血病毒(MoMLV)LTR启动子,Rous肉瘤病毒(RSV)LTR,单纯疱疹病毒(HSV)(胸苷激酶)启动子,来自牛痘病毒的H5、P7.5和P11启动子,延伸因子1- α (EF1a)启动子,早期生长应答因子1(EGR1),铁蛋白H(FerH),铁蛋白L(FerL),甘油醛3-磷酸脱氢酶(GAPDH),真核翻译起始因子4A1(EIF4A1),热休克70kDa蛋白5(HSPA5),热休克蛋白90kDa β 成员1(HSP90B1),热休克蛋白70kDa(HSP70), β -驱动蛋白(β -KIN),人ROSA26基因座(Irions等人,Nature Biotechnology 25,1477-1482(2007)),泛素C启动子(UBC),磷酸甘油酸激酶-1(PGK)启动子,巨细胞病毒增强子/鸡 β -肌动蛋白(CAG)启动子, β -肌动蛋白启动子以及骨髓增殖肉瘤病毒(myeloproliferative sarcoma virus)增强子、负控制区缺失的d1587rev引物-结合位点取代的(MND)启动子(Challita等人,J Virol.69(2):748-55(1995))。

[0365] 在具体实施方案中,可以期望由在T细胞中提供稳定且长期表达的启动子表达包含工程化的TCR或CAR的多核苷酸,并且表达水平足以使T细胞重定向至表达靶抗原的细胞。在优选实施方案中,启动子是EF1 α 启动子或MND启动子。

[0366] 本文使用的“条件性表达”可以指任何类型的条件性表达,包括但不限于可诱导的表达;可阻遏的表达;在具有特定生理学、生物学或疾病状态等的细胞或组织中的表达。该定义并非意图排除细胞类型或组织的特异性表达。本发明的某些实施方案提供目的多核苷酸的条件性表达,例如通过使细胞、组织、有机体等经历引起多核苷酸表达或者引起由目的多核苷酸编码的多核苷酸的表达增加或减少的处理或条件来控制表达。

[0367] 诱导型启动子/系统的示例性实例包括但不限于,类固醇诱导型启动子(如用于编码糖皮质激素或雌激素受体的基因的启动子(可通过用对应的激素处理来诱导))、金属硫蛋白启动子(metallothionine promoter)(可通过用各种重金属处理来诱导)、MX-1启动子(可通过干扰素诱导)、“GeneSwitch”米非司酮调控系统(Sirin等人,2003,Gene,323:67)、cumate诱导型基因开关(WO 2002/088346)、四环素依赖性调控系统等。

[0368] 也可以通过使用位点特异性DNA重组酶实现条件性表达。根据本发明的某些实施方案,载体包含至少一个(通常两个)位点用于通过位点特异性重组酶介导重组。本文使用的术语“重组酶”或“位点特异性重组酶”包括参与重组反应的分割的或整合的蛋白、酶、辅因子或相关蛋白,所述重组反应涉及一个或多个(例如,2个、3个、4个、5个、7个、10个、12个、15个、20个、30个、50个等)重组位点,其可以是野生型蛋白(参见Landy,Current Opinion in Biotechnology 3:699-707(1993)),或者其突变体、衍生物(例如,含有重组蛋白序列或其片段的融合蛋白)、片段和变体。适合用于本发明具体实施方案中的重组酶的示例性实例包括但不限于:Cre、Int、IHF、Xis、Flp、Fis、Hin、Gin、 Φ C31、Cin、Tn3解离酶、TndX、XerC、XerD、TnpX、Hjc、Gin、SpCCE1以及ParA。

[0369] G. 病毒载体

[0370] 在具体实施方案中,用编码本文所考虑的工程化的TCR或CAR的逆转录病毒载体(例如,慢病毒载体)转导包含T细胞的细胞群(例如,PBMC)或纯化的T细胞群。转导的T细胞引发稳定、长期且持久的T-细胞应答。

[0371] 本文使用的术语“逆转录病毒”指将其基因组RNA逆转录为线性双链DNA拷贝并使其基因组DNA随后共价整合进宿主基因组的RNA病毒。适合用于具体实施方案中的示例性逆转录病毒包括但不限于:莫洛尼鼠白血病毒(M-MuLV)、莫洛尼鼠肉瘤病毒(MoMSV)、

Harvey鼠肉瘤病毒 (HaMuSV)、鼠乳腺癌病毒 (MuMTV)、长臂猿白血病毒 (GaLV)、猫白血病毒 (FLV)、泡沫病毒、Friend鼠白血病毒、鼠干细胞病毒 (MSCV) 和Rous肉瘤病毒 (RSV) 以及慢病毒。

[0372] 本文使用的术语“慢病毒”指复杂逆转录病毒组(或属)。示例性慢病毒包括但不限于:HIV(人免疫缺陷病毒;包括HIV 1型和HIV 2型);维斯纳-梅迪病毒(visna-maedi virus) (VMV) 病毒;山羊关节炎-脑炎病毒(CAEV);马传染性贫血病毒(EIAV);猫免疫缺陷病毒(FIV);牛免疫缺陷病毒(BIV);以及猿猴免疫缺陷病毒(SIV)。在一个实施方案中,优选基于HIV的载体骨架(即,HIV顺式作用序列元件)。

[0373] 术语“载体”在本文用来指能够转移或转运另外的核酸分子的核酸分子。转移的核酸通常被连接至例如插进载体核酸分子。载体可以包含引导在细胞中的自主复制的序列,或者可以包含足以允许整合进宿主细胞DNA的序列。有用的载体包括,例如,质粒(例如,DNA质粒或RNA质粒)、转座子、粘粒、细菌人工染色体和病毒载体。有用的病毒载体包括,例如复制缺陷型逆转录病毒和慢病毒。

[0374] 如对本领域技术人员明显的是,术语“病毒载体”广泛用于指包含通常促进核酸分子的转移或整合进细胞基因组的病毒来源的核酸元件的核酸分子(例如,转移质粒)或者指介导核酸转移的病毒颗粒。病毒颗粒通常包含各种病毒组分,并且有时还包含除核酸之外的宿主细胞组分。

[0375] 术语病毒载体可以指能够将核酸转移进细胞的病毒或病毒颗粒,或者指转移的核酸本身。病毒载体和转移质粒含有主要源自病毒的结构和/或功能性遗传元件。术语“逆转录病毒载体”指含有主要源自逆转录病毒的结构和功能性遗传元件或其部分的病毒载体或质粒。术语“慢病毒载体”指含有主要源自慢病毒的结构和功能性遗传元件或者其部分(包括LTR)的病毒载体或质粒。术语“杂合载体”指含有逆转录病毒例如慢病毒序列和非慢病毒序列的载体、LTR或其它核酸。在一个实施方案中,杂合载体指包含用于逆转录、复制、整合和/或包装的逆转录病毒(例如,慢病毒)序列的载体或转移质粒。

[0376] 在具体实施方案中,术语“慢病毒载体”、“慢病毒表达载体”可以用来指慢病毒转移质粒和/或感染性慢病毒颗粒。当在本文提及诸如克隆位点、启动子、调控元件、异源核酸等的元件时,应理解,这些元件的序列以RNA形式存在于本发明的慢病毒颗粒中,以及以DNA形式存在于本发明的DNA质粒中。

[0377] 在原病毒的两端是叫做“长末端重复序列”或“LTR”的结构。术语“长末端重复序列(LTR)”指位于逆转录病毒DNA端的碱基对结构域,在其天然序列背景中,所述碱基对结构域是直接的重复并且含有U3、R和U5区域。LTR通常对逆转录病毒基因的表达(例如,基因转录本的促进、起始和聚腺苷酸化)以及病毒复制提供基本功能。LTR含有众多调控信号,包括转录控制元件、聚腺苷酸化信号以及用于病毒基因组的复制和整合所需的序列。将病毒LTR分为叫做U3、R和U5的三个区域。U3区含有增强子和启动子元件。U5区是引物结合位点和R区之间的序列,并且含有聚腺苷酸化序列。R(重复)区的侧翼是U3和U5区。LTR由U3、R和U5区构成,并且出现在病毒基因组的5'端和3'端。邻近5'LTR的是用于基因组反转录所需的序列(tRNA引物结合位点)以及用于病毒RNA有效包装成颗粒所需的序列(Psi位点)。

[0378] 本文使用的术语“包装信号”或“包装序列”指位于逆转录病毒基因组内的序列,其是将病毒RNA插入病毒衣壳或颗粒所必需的,参见例如,Clever等人,1995.J.of Virology,

Vol. 69, No. 4; pp. 2101-2109。数种逆转录病毒载体利用病毒基因组衣壳化所需的最小包装信号(也被称作psi[Ψ]序列)。因此,本文使用的术语“包装序列”、“包装信号”、“psi”和符号“Ψ”被用来提及病毒颗粒形成期间,逆转录病毒RNA链衣壳化所需的非编码序列。

[0379] 在不同实施方案中,载体包含修饰的5' LTR和/或3' LTR。所述LTR的任一者或二者可以包含一种或多种修饰,包括但不限于,一处或多处缺失、插入或置换。通常对3' LTR进行修饰以通过使病毒复制缺陷,来改善慢病毒或逆转录病毒系统的安全性。本文使用的术语“复制缺陷”指不能够完全有效复制以致于不能产生感染性病毒颗粒(例如,复制缺陷型慢病毒子代)的病毒。术语“可复制(replication-competent)”指能够复制以致于病毒的病毒复制能够产生感染性病毒颗粒(例如,可复制的慢病毒子代)的野生型病毒或突变病毒。

[0380] “自失活”(SIN)载体指复制缺陷型载体,例如被称作U3区的右侧(3')LTR增强子-启动子区被修饰(例如,通过缺失或置换)以阻止除第一轮病毒复制之外的病毒转录的逆转录病毒或慢病毒载体。这是因为,在病毒复制期间右侧(3')LTR U3区被用作左侧(5')LTR U3区的模板,因此在无U3增强子-启动子的情况下不能形成病毒转录本。在本发明的又一实施方案中,对3' LTR进行修饰以使U5区被例如理想的聚(A)序列替换。应当注意到,本发明也包括对LTR的修饰,如对3' LTR、5' LTR或者3'和5' LTR二者的修饰。

[0381] 通过用异源启动子替换5' LTR的U3区以在病毒颗粒产生期间驱动病毒基因组的转录来增强另外的安全性。可以使用的异源启动子的实例包括,例如病毒猿猴病毒40(SV40)(例如,早期或晚期)、巨细胞病毒(CMV)(例如,立即早期)、莫洛尼鼠白血病病毒(MoMLV)、Rous肉瘤病毒(RSV)和单纯疱疹病毒(HSV)(胸苷激酶)启动子。典型的启动子能够以Tat独立型方式驱动高水平的转录。该替换降低了重组以产生可复制的病毒的可能性,因为在病毒产生系统中不存在完整的U3序列。在某些实施方案中,异源启动子在控制病毒基因组的转录方式方面具有另外的优势。例如,异源启动子可以是可诱导的,使得仅当诱导因子存在时,发生病毒基因组的全部或部分转录。诱导因子包括但不限于,一种或多种化合物或者培养宿主细胞的生理条件,如温度或pH。

[0382] 在一些实施方案中,病毒载体包含TAR元件。术语“TAR”指位于慢病毒(例如,HIV)LTR的R区的“反式激活反应因子”遗传元件。该元件与慢病毒反式激活因子(tat)遗传元件相互作用以增强病毒复制。然而,在5' LTR的U3区被异源启动子替换的实施方案中,该元件不是必需的。

[0383] “R区”指逆转录病毒LTR内的区域,其开始于加帽基团起点处(即,转录的起点)并结束于紧接PolyA序列段(tract)的起点之前。R区也被限定为侧翼为U3和U5区。在反转录期间,R区在允许初期DNA从基因组的一端转移至另一端中发挥作用。

[0384] 本文使用的术语“FLAP元件”指这样的核酸,其序列包含逆转录病毒(例如,HIV-1或HIV-2)的中央聚嘌呤序列段和中央终止序列(cPPT和CTS)。合适的FLAP元件描述于美国专利第6,682,907号和Zennou等人,2000,Cell,101:173。在HIV-1反转录期间,位于中央聚嘌呤序列段(cPPT)的正链DNA的中央起始和在中央终止序列(CTS)处的中央终止导致三链DNA结构:HIV-1中央DNA瓣(DNA flap)的形成。虽然不希望被任何理论束缚,DNA瓣可以作为慢病毒基因组核输入的顺式作用决定子发挥作用和/或可以增加病毒的滴度。在具体实施方案中,逆转录病毒或慢病毒载体骨架在载体中目的异源基因的上游或下游包含一个或多个FLAP元件。例如,在具体实施方案中,转移质粒包含FLAP元件。在一个实施方案中,本发明

的载体包含分离自HIV-1的FLAP元件。

[0385] 在一个实施方案中,逆转录病毒或慢病毒转移载体包含一个或多个输出元件。术语“输出元件”指顺式作用转录后调控元件,其调控RNA转录物从细胞的核至细胞胞质的转运。RNA输出元件的实例包括但不限于,人免疫缺陷病毒(HIV) rev应答元件(RRE)(参见例如,Cullen等人,1991.J.Virology.65:1053;和Cullen等人,1991.Cell 58:423)和乙型肝炎病毒转录后调控元件(HPRE)。通常,RNA输出元件置于基因的3' UTR内,并且可以作为一个或多个拷贝插入。

[0386] 在具体实施方案中,通过将转录后调控元件、高效的聚腺苷酸化位点以及任选地转录终止信号引入载体来增加病毒载体中异源序列的表达。各种转录后调控元件可以在蛋白水平增加异源核酸的表达,例如,土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE;Zufferey等人,1999,J.Virology.,73:2886);存在于乙型肝炎病毒中的转录后调控元件(HPRE)(Huang等人,Mol.Cell.Biol.,5:3864)等(Liu等人,1995,Genes Dev.,9:1766)。在具体实施方案中,本发明的载体包含诸如WPRE或HPRE的转录后调控元件。

[0387] 在具体实施方案中,本发明的载体缺乏或者不包含诸如WPRE或HPRE的转录后调控元件,因为在一些情况下,这些元件增加了细胞转化的风险和/或不会大幅度或显著增加mRNA转录本的量或者增加mRNA的稳定性。因此,在一些实施方案中,作为添加的安全度量,本发明的载体缺乏或者不包含WPRE或HPRE。

[0388] 引导异源核酸转录本的有效终止和聚腺苷酸化的元件增加了异源基因的表达。转录终止信号通常存在于聚腺苷酸化信号的下流。在具体实施方案中,载体在编码待表达多肽的多核苷酸的3'处包含聚腺苷酸化序列。本文使用的术语“polyA位点”或“polyA序列”表示通过RNA聚合酶II引导初期RNA转录本终止和聚腺苷酸化的DNA序列。通过将polyA尾巴添加至编码序列的3'端,聚腺苷酸化序列可以促进mRNA的稳定性,并且因此有助于翻译效率的提高。重组转录本的高效聚腺苷酸化是所希望的,因为缺乏polyA尾巴的转录本不稳定且被快速降解。可以用于本发明的载体中的polyA信号的示范性实例包括理想的polyA序列(例如,AATAAA、ATTAAA、AGTAAA)、牛生长激素polyA序列(BGHpA)、兔 β -球蛋白polyA序列(r β gpA)或者本领域已知的其它合适的异源或内源polyA序列。

[0389] 在不同实施方案中,本发明的载体包含与编码工程化的TCR或CAR多肽的多核苷酸可操作地连接的启动子。载体可以含有一个或多个LTR,其中任一LTR包含一种或多种修饰,如一个或多个核苷酸置换、添加或缺失。载体还可以包含增加转导效率的多种辅助元件之一(例如,cPPT/FLAP)、病毒包装信号(例如,Psi(Ψ)包装信号、RRE)和/或增加治疗性基因表达的其它元件(例如,poly(A)序列),并且可以任选地包含WPRE或HPRE。技术人员将理解,许多其它不同的实施方案可以改变自本发明的既有实施方案。

[0390] “宿主细胞”包括用本发明的重组载体或多核苷酸在体内、离体或者在体外转染、感染或者转导的细胞。宿主细胞可以包括包装细胞、生产细胞和用病毒载体感染的细胞。在具体实施方案中,向需要治疗的对象施用用本发明的病毒载体感染的宿主细胞。在某些实施方案中,术语“靶细胞”可与宿主细胞互换使用,并且指期望的细胞类型的转染的、感染的或者转导的细胞。在优选实施方案中,靶细胞是T细胞。

[0391] 大规模病毒颗粒的产生通常是达到合理的病毒滴度所必需的。通过将转移载体转染至包含病毒结构基因和/或辅助基因的包装细胞系中而产生病毒颗粒,所述病毒结构基

因和/或辅助基因例如gag、pol、env、tat、rev、vif、vpr、vpu、vpx或nef基因或者其它逆转录病毒基因。

[0392] 本文使用的术语“包装载体”指缺乏包装信号,并包含编码一种、两种、三种、四种或者更多种病毒结构基因和/或辅助基因的多核苷酸的表达载体或病毒载体。通常,包装载体包含于包装细胞中,并经转染、转导或感染被引入细胞。转染、转导或感染的方法为本领域技术人员所熟知。可经转染、转导或感染将本发明的逆转录病毒/慢病毒转移载体引入包装细胞系,以产生生产细胞或细胞系。可以通过标准方法将本发明的包装载体引入人细胞或细胞系,所述标准方法包括,例如磷酸钙转染、脂质体转染或电穿孔。在一些实施方案中,将包装载体与显性选择标志物基因一同引入细胞,随后在合适的药物存在的情况下进行选择,并分离克隆,所述显性选择标记物如新霉素、潮霉素、嘌呤霉素、杀稻瘟菌素(blastocidin)、zeocin、胸苷激酶、DHFR、Gln合成酶或ADA。可以例如通过IRES或自切割病毒肽将选择标志物基因与由包装载体编码的基因物理连接。

[0393] 病毒包膜蛋白(env)决定了最终可被由细胞系产生的重组逆转录病毒感染或转化的宿主细胞的范围。在慢病毒如HIV-1、HIV-2、SIV、FIV和EIV的情况下,env蛋白包括gp41和gp120。优选地,由本发明的包装细胞表达的病毒env蛋白在与病毒gag和pol基因不同的载体上编码,正如之前所描述的。

[0394] 可用于本发明的逆转录病毒来源的env基因的示例性实例包括但不限于:MLV包膜,10A1包膜,BAEV、FeLV-B、RD114、SSAV、埃博拉病毒、仙台病毒、FPV(鸡瘟病毒)和流感病毒的包膜。类似地,可以使用编码来自RNA病毒(例如,小RNA病毒科、杯状病毒科(Coronaviridae)、星状病毒科、披膜病毒科、黄病毒科、冠状病毒科、副粘液病毒科、弹状病毒科、丝状病毒科、正粘病毒科、布尼亚病毒科、沙粒病毒科、呼肠孤病毒科、双RNA病毒科、逆转录病毒科的RNA病毒家族)包膜以及来自DNA病毒(嗜肝DNA病毒科、圆环病毒科、小DNA病毒科、乳头多瘤空泡病毒科、腺病毒科、疱疹病毒科、痘病毒科(Poxyiridae)以及虹彩病毒科的家族)包膜的基因。代表性的实例包括:FeLV、VEE、HFVW、WDSV、SFV、狂犬病毒、ALV、BIV、BLV、EBV、CAEV、SNV、ChTLV、STLV、MPMV、SMRV、RAV、FuSV、MH2、AEV、AMV、CT10以及EIAV。

[0395] 在其它实施方案中,用于假型包装(pseudotyping)本发明的病毒的包膜蛋白包括但不限于任何下述病毒:A型流感病毒(如H1N1、H1N2、H3N2和H5N1(禽流感病毒))、B型流感病毒、C型流感病毒、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、戊型肝炎病毒、轮状病毒、诺瓦克病毒组的任何病毒、肠道腺病毒、细小病毒、登革热病毒、猴痘病毒、单股负链病毒、狂犬病毒属(如狂犬病毒、拉各斯蝙蝠病毒、莫科拉病毒、杜文黑基病毒、欧洲蝙蝠病毒1型&2型以及澳大利亚蝙蝠病毒)、暂时热病毒属、水泡病毒属、水泡性口炎病毒(VSV)、疱疹病毒(如单纯疱疹病毒类型1和2、水痘带状疱疹病毒、巨细胞病毒、爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)、人疱疹病毒(HHV)、人疱疹病毒6型和8型)、人类免疫缺陷病毒(HIV)、乳头状瘤病毒、鼠 γ 疱疹病毒、沙粒病毒(如阿根廷出血热病毒、玻利维亚出血热病毒、萨比亚相关出血热病毒(Sabia-associated hemorrhagic fever virus)、委内瑞拉出血热病毒、拉沙热病毒、马丘波病毒)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、布尼亚病毒科(Bunyaviridae)(如克里米亚-刚果出血热病毒、汉坦病毒、引起肾综合征出血热的病毒、裂谷热病毒)、丝状病毒科(线状病毒)(包括埃博拉出血热病毒和马尔堡出血热病毒)、黄病毒科(包括卡萨诺尔森林病病毒、鄂木斯克出血热病毒、引起蜱传脑炎的病毒)和副粘液病

毒科(如亨德拉病毒和立百病毒)、大天花和小天花(天花)、甲病毒(如委内瑞拉马脑炎病毒、东方马脑炎病毒、西方马脑炎病毒)、SARS相关的冠状病毒(SARS-CoV)、西尼罗病毒、引起任何脑炎的病毒。

[0396] 在一个实施方案中,本发明提供产生用VSV-G糖蛋白假型包装的重组逆转录病毒(例如慢病毒)的包装细胞。

[0397] 本文使用的术语“假型(pseudotype)”或“假型包装(pseudotyping)”指病毒包膜蛋白已被具有更优特征的其它病毒的包膜蛋白替代的病毒。例如,可用水泡性口炎病毒G蛋白(VSV-G)包膜蛋白对HIV进行假型,这允许HIV感染更广范围的细胞,因为HIV包膜蛋白(由env基因编码)通常使病毒靶向CD4+递呈细胞。在本发明的优选实施方案中,用VSV-G对慢病毒包膜蛋白进行假型。在一个实施方案中,本发明提供产生用VSV-G包膜糖蛋白进行假型包装的重组逆转录病毒(例如慢病毒)的包装细胞。

[0398] 本文使用的术语“包装细胞系”用于指这样的细胞系:其不包含包装信号,但是稳定或者瞬时表达病毒颗粒正确包装所必需的病毒结构蛋白和复制酶(例如gag、pol和env)。可将任何合适的细胞系用于制备本发明的包装细胞。通常,细胞为哺乳动物细胞。在具体实施方案中,用于产生包装细胞系的细胞是人细胞。可以使用的合适的细胞系包括,例如,CHO细胞、BHK细胞、MDCK细胞、C3H 10T1/2细胞、FLY细胞、Psi-2细胞、BOSC 23细胞、PA317细胞、WEHI细胞、COS细胞、BSC 1细胞、BSC 40细胞、BMT 10细胞、VERO细胞、W138细胞、MRC5细胞、A549细胞、HT1080细胞、293细胞、293T细胞、B-50细胞、3T3细胞、NIH3T3细胞、HepG2细胞、Saos-2细胞、Huh7细胞、HeLa细胞、W163细胞、211细胞以及211A细胞。在优选实施方案中,包装细胞为293细胞、293T细胞或者A549细胞。

[0399] 本文使用的术语“生产细胞系”指能够产生重组逆转录病毒颗粒的细胞系,包括包装细胞系和包含包装信号的转移载体构建体。感染性病毒颗粒和病毒储液的产生可以利用常规技术进行。制备病毒储液的方法在本领域是已知的,并且由例如Y. Soneoka等人(1995) Nucl. Acids Res. 23:628-633和N.R. Landau等人(1992) J. Virol. 66:5110-5113阐明。可以利用常规技术从包装细胞中收集感染性病毒颗粒。例如,如本领域所知的,可以通过细胞裂解或者收集细胞培养物的上清液来收集感染性颗粒。任选地,如果需要,可将收集的病毒颗粒进行纯化。合适的纯化技术对于本领域技术人员而言众所周知。

[0400] 使用逆转录病毒或慢病毒载体,通过病毒感染而非通过转染递送基因或其它多核苷酸序列被称为“转导”。在一个实施方案中,通过感染和原病毒整合将逆转录病毒载体转导进细胞。在某些实施方案中,如果靶细胞(例如T细胞)包含使用病毒或逆转录病毒载体通过感染递送至细胞的基因或其它多核苷酸序列,则其被“转导”。在具体实施方案中,转导的细胞在其细胞基因组中包含通过逆转录病毒或慢病毒载体递送的一种或多种基因或者其它多核苷酸序列。

[0401] 在具体实施方案中,向对象施用用表达一种或多种多肽的本发明的病毒载体转导的宿主细胞,以治疗和/或预防B细胞恶性肿瘤。根据本发明的某些实施方案可被使用的涉及病毒载体在基因疗法中的应用的其它方法可见于,例如Kay, M.A. (1997) Chest 111 (6Supp.):138S-142S; Ferry, N. 和 Heard, J.M. (1998) Hum. Gene Ther. 9:1975-81; Shiratory, Y. 等人(1999) Liver 19:265-74; Oka, K. 等人(2000) Curr. Opin. Lipidol. 11:179-86; Thule, P.M. 和 Liu, J.M. (2000) Gene Ther. 7:1744-52; Yang, N.S. (1992)

Crit.Rev.Biotechnol.12:335-56;Alt,M.(1995)J.Hepatol.23:746-58;Brody,S.L.和Crystal,R.G.(1994)Ann.N.Y.Acad.Sci.716:90-101;Strayer,D.S.(1999)Expert Opin.Investig.Drugs 8:2159-2172;Smith-Arica,J.R.and Bartlett,J.S.(2001)Curr.Cardiol.Rep.3:43-49;以及Lee,H.C.等人(2000)Nature408:483-8。

[0402] H.组合物和制剂

[0403] 本文所考虑的组合物可以包含如本文所考虑的一种或多种多肽、多核苷酸、包含一种或多种多肽、多核苷酸的载体以及T细胞组合物。组合物包括但不限于药物组合物。“药物组合物”指在药学可接受的或生理学可接受的溶液中配制的组合物,其用于向细胞或动物单独施用或者与一种或多种其它治疗形式组合施用。也将理解,如果需要,可将本发明的组合物也与其它物质组合施用,所述其它物质如例如细胞因子、生长因子、激素、小分子、化学治疗剂、前药、药物、抗体或其它各种药学活性剂。对于也可包含于组合物中的其它组分几乎无限制,条件是另外的组分未不利地影响组合物提供预期治疗的能力。

[0404] 短语“药学可接受的”在本文用来指这样的化合物、材料、组合物和/或剂型:在合理的医学判断的范围内,其适于与人和动物的组织接触使用而无过度的毒性、刺激性、过敏反应或者其它问题或并发症,与合理的益处/风险比相对应。

[0405] 如本文所使用的,“药学可接受的载体、稀释剂或赋形剂”包括但不限于已经美国食品和药品管理局批准为可接受用于人或家养动物的任何佐剂、载体、赋形剂、助流剂、甜味剂、稀释剂、防腐剂、染料/着色剂、增味剂、表面活性剂、润湿剂、分散剂、悬浮剂、稳定剂、等张剂、溶剂、表面活性剂或者乳化剂。示例性的药学可接受的载体包括但不限于:糖,如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;黄蓍胶;麦芽;明胶;滑石;可可脂、蜡、动物和植物油脂、石蜡、硅酮、膨润土、硅酸、氧化锌;油类,如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;二醇类,如丙二醇;多元醇,如丙三醇、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;酯类,如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原水;等张盐水;林格氏液;乙醇;磷酸盐缓冲液;以及药制剂中采用的任何其它相容的物质。

[0406] 在具体实施方案中,本发明的组合物包含一定量的由本文所考虑的方法制备的修饰的T细胞。通常规定,包含由本文所考虑的方法制备的T细胞的药物组合物可以以 10^2 至 10^{10} 个细胞/kg体重的剂量,优选 10^5 至 10^6 个细胞/kg体重的剂量,包括那些范围内的所有整数值的剂量施用。细胞数将取决于组合物预期的最终用途以及其内将包括的细胞类型。对于本文提供的用途,细胞通常是升或更少的体积,可以是500mL或更少,甚至是250mL或100mL或者更少。因此期望的细胞的密度通常大于 10^6 个细胞/ml,以及通常大于 10^7 个细胞/ml,通常为 10^8 个细胞/ml或更大。可以将临床相关数目的免疫细胞分配成多次输注,所述多次输注累积等于或超过 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 或 10^{12} 个细胞。所述细胞相对于经历疗法的患者可以是同种异体的、同基因的、异基因的或自体同源的。若需要,治疗还可以包括施用如本文所描述的有丝分裂原(例如,PHA)或淋巴因子、细胞因子和/或趋化因子(例如,IFN- γ 、IL-2、IL-7、IL-15、IL-12、TNF- α 、IL-18和TNF- β 、GM-CSF、IL-4、IL-13、Flt3-L、RANTES、MIP1 α 等)以增强输注的T细胞的移植和功能。

[0407] 通常,包含如本文所述活化或扩增的细胞的组合物可以用于治疗和预防在免疫受损的个体中发生的疾病。具体而言,将包含通过本文所考虑的方法制备的修饰T细胞的组合

物用于癌症的治疗。本发明的修饰的T细胞可以单独施用,或者可以作为与载体、稀释剂、赋形剂和/或与其它组分(如IL-2、IL-7和/或IL-15)或其它细胞因子或细胞群组合的药物组合物施用。在具体实施方案中,本文所考虑的药物组合物包含一定量的与一种或多种药学或生理学可接受的载体、稀释剂或赋形剂组合的遗传修饰的T细胞。

[0408] 包含本文所考虑的修饰的T细胞的药物组合物还可以包含缓冲剂,如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等;碳水化合物,如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇;蛋白;多肽或氨基酸,如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂,如EDTA或谷胱甘肽;佐剂(例如,氢氧化铝);以及防腐剂。优选地,将本发明的组合物配制为肠胃外施用,例如血管内(静脉内或动脉内)施用、腹膜内施用或肌肉内施用。

[0409] 在一个实施方案中,静脉内施用组合物。

[0410] 液体药物组合物,无论其为溶液、悬液或其它类似形式,均可以包含下述中的一种或多种:DMSO,无菌稀释剂,如用于注射的水、盐溶液(优选生理盐水)、林格氏液、等张氯化钠、固定油(如可作为溶剂或悬浮介质的合成的单酸甘油酯或甘油二酯)、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它溶剂;抗菌剂,如苯甲醇或羟苯甲酸甲酯;抗氧化剂,如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,如乙二胺四乙酸;缓冲剂,如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;以及用于调节张度的试剂,如氯化钠或葡萄糖。

[0411] 在具体实施方案中,将细胞冷冻于不溶的低温介质,50% plasmalyte和50% Cryostor 10;50/40/10 (XVIVO/HABS/DMSO) 或Cryostor 10中。

[0412] 可以将肠胃外制备物封装在玻璃或塑料袋、安瓿、一次性注射器或多剂量瓶中。可注射的药物组合物优选是无菌的。

[0413] 在具体实施方案中,本文所考虑的组合物包含单独地或与一种或多种治疗剂组合的有效量的扩增的修饰的T细胞组合物。因此,T细胞组合物可以单独施用或者与其它已知的癌症疗法组合施用,所述其它已知的癌症疗法如放疗、化疗、移植、免疫疗法、激素疗法、光动力疗法等。还可将组合物与抗生素组合施用。在本领域,可以接受此类治疗剂作为如本文所述的具体疾病状态(如具体的癌症)的标准疗法。考虑的示例性的治疗剂包括细胞因子、生长因子、类固醇、NSAID、DMARD、抗炎剂、化疗剂、放疗剂、治疗性抗体或者其它活性剂和辅助剂。

[0414] 在某些实施方案中,可将包含本文所考虑的T细胞的组合物与任何数目的化疗剂联合施用。化疗剂的示例性实例包括:烷化剂,如噻替哌和环磷酰胺(CYTOXAN™);烃基磺酸酯,如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡;氮杂环丙烷(aziridine),如苯佐替哌(benzodopa)、卡波醌、美妥替哌(meturedopa)和乌瑞替哌(uredopa);乙撑亚胺(ethylenimine)和甲基蜜胺类(methylamelamine),包括六甲蜜胺、三乙撑蜜胺(triethylenemelamine)、三乙撑磷酰胺(triethylenephosphoramidate)、三乙撑硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)和trimethylolomelamine resins;氮芥类(nitrogen mustards),如苯丁酸氮芥、氮芥(mechlorethamine)、盐酸氧氮芥、美法仑、新恩比兴(novembichin)、胆甾醇对苯乙酸氮芥(phenesterine)、泼尼氮芥、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥;亚硝基脲(nitrosureas),如卡莫司汀、氯脲霉素(chlorozotocin)、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀、雷莫司汀;抗生素,如阿克拉霉素(aclacinomysins)、放线菌素、安曲霉素、重氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素c

(cactinomycin)、卡奇霉素、carabycin、洋红霉素、嗜癌菌素、色霉素、放线菌素d (dactinomycin)、柔红霉素、地拖比星 (detorubicin)、6-重氨基-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、培洛霉素、泊非霉素 (potfiromycin)、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑菌素、链脲佐菌素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星; 抗代谢物, 如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶 (5-FU); 叶酸类似物, 如二甲叶酸、甲氨蝶呤、蝶罗呤、三甲曲沙; 嘌呤类似物, 如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤; 嘧啶类似物, 如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮杂尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、二脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷、5-FU; 雄激素, 如卡普睾酮、屈他雄酮丙酸酯 (dromostanolone propionate)、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯; 抗肾上腺类, 如氨鲁米特、米托坦、曲洛斯坦; 叶酸补充物, 如亚叶酸 (frolinic acid); 醋葡醛内酯; 醛磷酰胺糖苷; 氨基乙酰丙酸; 安吡啶; bestrabucil; 比生群; 依达曲沙 (edatraxate); 地磷酰胺 (defofamine); 秋水仙胺; 地吡醌; elformithine; 依利醋铵; 依托格鲁; 硝酸镓; 羟基脲; 香菇多糖; 氯尼达明; 米托胍脞; 米托蒽醌; 莫哌达醇; 硝氨丙吡啶; 喷司他丁; 蛋氨酸芥 (phenamet); 吡柔比星; 鬼臼酸; 2-ethylhydrazide; 丙卡巴肼; **PSK®**; 雷佐生 (razoxane); 西左喃; 锗螺胺; 细交链孢菌酮酸; 三亚胺醌; 2,2',2''-三氯三乙胺; 乌拉坦 (urethan); 长春地辛; 达卡巴嗪; 甘露莫司汀; 二溴甘露醇; 二溴卫矛醇; 哌泊溴烷; gacytosine; 阿拉伯糖苷 (“Ara-C”); 环磷酰胺; 噻替派; 紫杉烷, 例如紫杉醇 (**TAXOL®**、Bristol-Myers Squibb Oncology、Princeton、N.J.) 和多西紫杉醇 (doxorubicin) (**TAXOTERE®**、Rhne-Poulenc Rorer、Antony、France); 苯丁酸氮芥; 吉西他滨; 6-巯鸟嘌呤; 巯基嘌呤; 甲氨蝶呤; 铂类似物, 如顺铂和卡铂; 长春花碱; 铂; 依托泊苷; 异环磷酰胺; 丝裂霉素C; 米托蒽醌; 长春新碱; 长春瑞滨; 诺维本 (navelbine); 诺消灵 (novantrone); 替尼泊苷; 道诺霉素; 氨基蝶呤; 希罗达 (xeloda); 伊班膦酸盐; CPT-11; 拓扑异构酶抑制剂RFS 2000; 二氟甲基鸟氨酸 (difluoromethylomithine) (DMFO); 视黄酸衍生物, 如Targretin™ (蓓萨罗丁)、Panretin™ (阿利维a酸); ONTAK™ (地尼白介素-2 (denileukin diftitox)); 埃斯波霉素 (esperamicins); 卡培他滨; 以及上述任一种的药学可接受的盐、酸或衍生物。该定义中还包含调节或抑制激素对肿瘤的作用的抗激素药物, 如抗雌激素, 包括例如他莫昔芬、雷洛昔芬、芳香酶抑制性4(5)-咪唑类、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、可莫昔芬 (keoxifene)、LY117018、奥那司酮和托瑞米芬 (法乐通); 以及抗雄激素, 如氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮丙瑞林 (leuprolide) 和戈舍瑞林 (goserelin); 以及以上任一种的药学可接受的盐、酸或衍生物。

[0415] 可将多种其它治疗剂与本文所述的组合物联合使用。在一个实施方案中, 将包含T细胞的组合物与抗炎剂一同施用。抗炎剂或抗炎药包括但不限于: 类固醇和糖皮质激素 (包括倍他米松、布地奈德、地塞米松、醋酸氢化可的松、氢化可的松、氢化可的松、甲基泼尼松龙、泼尼松龙、泼尼松、曲安西龙); 非甾体抗炎药 (NSAID), 包括阿司匹林、布洛芬、萘普生、甲氨蝶呤、柳氮磺吡啶、来氟米特、抗TNF药物、环磷酰胺以及麦考酚酯。

[0416] 其它示例性NSAID选自布洛芬、萘普生、萘普生钠、Cox-2抑制剂 (如 **VIOXX®** (罗非昔布) 和 **CELEBREX®** (塞来考昔)) 以及唾液酸化剂 (sialylate)。示例性的镇痛药选自醋氨酚、羟考酮、曲马朵 (tramadol) 或盐酸丙氧吩 (propoxyphene hydrochloride)。示

例性的糖皮质激素选自：可的松、地塞米松、氢化可的松、甲基泼尼松龙、泼尼松龙或者泼尼松。示例性的生物应答调节剂包括针对细胞表面标志物（例如，CD4、CD5等）的分子，细胞因子抑制剂如TNF拮抗剂（例如依那西普（ENBREL®）、阿达木单抗（HUMIRA®）和英夫利昔单抗（REMICADE®）），趋化因子抑制剂和粘附分子抑制剂。生物应答调节剂包括单克隆抗体以及重组形式的分子。示例性的DMARD包括咪唑硫嘌呤、环磷酰胺、环孢菌素、甲氨蝶呤、青霉胺、来氟米特、柳氮磺吡啶、羟氯喹、Gold（口服（金诺芬）和肌肉内施用）以及米诺环素。

[0417] 适于与本文所考虑的CAR修饰的T细胞组合的治疗性抗体的示例性实例包括但不限于：阿巴伏单抗（abagovomab）、阿德木单抗（adecatumumab）、阿托珠单抗（afutuzumab）、阿仑单抗（alemtuzumab）、阿妥莫单抗、阿麦妥昔（amatuximab）、anatumomab、阿西莫单抗、巴维昔单抗（bavituximab）、贝妥莫单抗、贝伐单抗、比伐单抗（bivatuzumab）、blinatumomab、本妥昔单抗（brentuximab）、坎妥珠单抗（cantuzumab）、卡妥索单抗（catumaxomab）、西妥昔单抗（cetuximab）、西他土珠、西妥木单抗（cixutumumab）、clivatuzumab、可那木单抗（conatumumab）、达雷木单抗（daratumumab）、卓齐妥单抗（drozitumab）、度利戈妥单抗（duligotumab）、杜昔妥单抗（dusigitumab）、地莫单抗（detumomab）、达西珠单抗（dacetuzumab）、达妥珠单抗（dalotuzumab）、依美昔单抗（ecromeximab）、埃罗妥珠单抗（elotuzumab）、恩司昔单抗（ensituximab）、厄妥索单抗（ertumaxomab）、伊瑞西珠（etaracizumab）、farietuzumab、ficlatuzumab、figitumumab、弗兰托单抗（flanvotumab）、弗妥昔单抗（futuximab）、盖尼塔单抗（ganitumab）、吉妥珠单抗（gemtuzumab）、吉瑞妥昔单抗（girentuximab）、格莱木单抗（glembatumumab）、替伊莫单抗（ibritumomab）、伊戈伏单抗（igovomab）、英加妥珠单抗（imgatuzumab）、英达妥昔单抗（indatuximab）、奥英妥珠单抗（inotuzumab）、英妥木单抗（intetumumab）、伊匹单抗（ipilimumab）、伊妥木单抗（iratumumab）、拉贝珠单抗（labetuzumab）、来沙木单抗（lexatumumab）、林妥珠单抗（lintuzumab）、lorvotuzumab、鲁卡木单抗（lucatumumab）、马帕木单抗（mapatumumab）、马妥珠单抗（matuzumab）、米拉图珠单抗（milatuzumab）、明瑞莫单抗（minretumomab）、米妥莫单抗（mitumomab）、moxetumomab、纳那妥单抗（narnatumab）、那妥莫单抗（naptumomab）、奈昔木单抗（necitumumab）、尼妥珠单抗（nimotuzumab）、诺非单抗（nofetumomab）、ocaratumumab、奥法木单抗（ofatumumab）、奥拉珠单抗（olaratumab）、奥纳珠单抗（onartuzumab）、oportuzumab、奥戈伏单抗（oregovomab）、帕尼单抗（panitumumab）、巴萨妥珠单抗（parsatumumab）、帕曲土单抗（patritumab）、pemtumomab、帕妥珠单抗（pertuzumab）、平妥单抗（pintumomab）、普托木单抗（pritumumab）、雷妥莫单抗（racotumomab）、雷得妥单抗（radretumab）、rilotumumab、利妥昔单抗（rituximab）、罗妥木单抗（robatumumab）、沙妥莫单抗（satumomab）、西罗珠单抗（sibrotuzumab）、司妥昔单抗（siltuximab）、singtuzumab、索利托单抗（solitomab）、他珠单抗（tacatumumab）、taplitumomab、替妥莫单抗（tenatumomab）、替妥木单抗（teprotumumab）、替加珠单抗（tigatumumab）、托西莫单抗（tositumomab）、曲妥珠单抗（trastuzumab）、西莫白介素单抗（tucotuzumab）、乌妥昔单抗（ublrituximab）、维妥珠单抗（veltuzumab）、伏司妥珠单抗（vorsetuzumab）、伏妥莫单抗（votumumab）、扎鲁木单抗（zalutumumab）、CC49以及3F8。

[0418] 在某些实施方案中,将本文所述的组合物与细胞因子联合施用。本文使用的“细胞因子”意为这样的蛋白的通用术语:其由一种细胞群释放,作为细胞间的介质作用于另一细胞。此类细胞因子的实例为淋巴因子、单核因子、趋化因子(如RANTES、MIP1a)和常规的多肽类激素。所述细胞因子包括:生长激素,如人生长激素、N-甲硫氨酰人生长激素和牛生长激素;甲状旁腺素;甲状腺素;胰岛素;胰岛素原;松弛素;松弛素原(prorelaxin);糖蛋白类激素,如促卵泡激素(FSH)、促甲状腺激素(TSH)和促黄体生成素(LH);肝细胞生长因子(hepatic growth factor);成纤维细胞生长因子;催乳素;胎盘催乳素;肿瘤坏死因子- α 和- β ;缪勒管抑制物质;鼠促性腺激素相关肽;抑制素;活化素;血管内皮生长因子;整合素;促血小板生成素(TPO);神经生长因子,如NGF- β ;血小板生长因子;转化生长因子(TGF),如TGF- α 和TGF- β ;胰岛素样生长因子-I和-II;红细胞生成素(EPO);骨诱导因子;干扰素,如干扰素- α 、 β 和- γ ;集落刺激因子(CSF),如巨噬细胞-CSF(M-CSF);粒细胞-巨噬细胞-CSF(GM-CSF);和粒细胞-CSF(G-CSF);白介素(IL),如IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-15、IL-21;肿瘤坏死因子如TNF α 或TNF- β ;以及其它多肽因子,包括LIF和kit配体(KL)。本文使用的术语细胞因子包括来自天然来源或者来自重组细胞培养物的蛋白,以及天然序列的细胞因子的生物活性等同物。

[0419] I. 靶细胞和抗原

[0420] 本发明部分考虑重定向至靶细胞(例如,肿瘤细胞或癌细胞)并包含工程化T细胞受体或CAR的遗传修饰的免疫效应细胞的细胞制备平台,所述工程化T细胞受体或CAR具有与细胞上的靶抗原结合的结合结构域。癌细胞也可通过血液和淋巴系统扩散至身体的其它部分。存在几种主要类型的癌症。恶性上皮肿瘤(Carcinoma)是开始于皮肤或者衬于或覆盖内脏器官的组织的癌症。肉瘤是开始于骨、软骨、脂肪、肌肉、血管或者其它结缔组织或支持性组织的癌症。白血病是开始于造血组织(如骨髓),并引起大量异常的血细胞产生并进入血液的癌症。淋巴瘤和多发性骨髓瘤是开始于免疫系统的细胞的癌症。中枢神经系统癌症是开始于脑和脊髓的组织的癌症。

[0421] 在一个实施方案中,靶细胞表达在其它正常(期望的)细胞表面未大量存在的抗原,例如靶抗原。在一个实施方案中,靶细胞为胰腺实质细胞、胰管细胞、肝细胞(hepatic cell)、心肌细胞、骨骼肌细胞、成骨细胞、骨骼肌成肌细胞、神经元、血管内皮细胞、色素细胞、平滑肌细胞、神经胶质细胞、脂肪细胞(fat cell)、骨细胞、软骨细胞、胰岛细胞、CNS细胞、PNS细胞、肝细胞(liver cell)、脂肪细胞(adipose cell)、肾细胞、肺细胞、皮肤细胞、卵巢细胞、卵泡细胞、上皮细胞、免疫细胞或者内皮细胞。

[0422] 在某些实施方案中,靶细胞是下述组织的一部分:胰腺组织、神经组织、心脏组织、骨髓、肌肉组织、骨组织、皮肤组织、肝组织、毛囊、血管组织、脂肪组织、肺组织以及肾组织。

[0423] 在具体实施方案中,靶细胞是肿瘤细胞。在另一具体实施方案中,靶细胞是癌细胞,如患有癌症的患者中的细胞。可用本公开的方法杀死的示例性的细胞包括下述肿瘤细胞:液体瘤,如白血病,包括急性白血病(如急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病以及成髓细胞白血病、早幼粒细胞白血病、粒单核细胞白血病、单核细胞白血病和红细胞白血病)、慢性白血病(如慢性髓细胞(粒细胞)白血病和慢性淋巴细胞白血病);真性红细胞增多症、淋巴瘤、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、原发性巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)、重链疾病)。

[0424] 在另一实施方案中,细胞为实体瘤细胞,所述实体瘤如肉瘤和恶性上皮肿瘤(carcinomas)、纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨性肉瘤和其它肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏肿瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝细胞癌、肺癌、结肠直肠癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌(例如胰腺、结肠、卵巢、肺、乳腺、胃、前列腺、宫颈或食道的腺癌)、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌(papillary adenocarcinomas)、髓样癌、支气管原癌、肾细胞癌、肝细胞瘤、胆管癌、绒毛膜癌、维尔姆斯瘤、宫颈癌、睾丸瘤、膀胱癌、CNS肿瘤(如神经胶质瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤(craniopharyngioma)、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤(meningioma)、黑素瘤、成神经细胞瘤和视网膜母细胞瘤)。

[0425] 在一个实施方案中,癌症选自:如权利要求所述的方法1,其中所述癌症选自:维尔姆斯瘤、尤文肉瘤、神经内分泌肿瘤、胶质母细胞瘤、成神经细胞瘤、黑素瘤、皮肤癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、前列腺癌、肝癌、肾癌、胰腺癌、肺癌、胆管癌、宫颈癌、子宫内膜癌、食道癌、胃癌、头颈癌、甲状腺髓样癌、卵巢癌、神经胶质瘤、淋巴瘤、白血病、骨髓瘤、急性淋巴细胞白血病、急性骨髓性白血病、慢性淋巴细胞白血病、慢性骨髓性白血病、霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤以及膀胱癌。

[0426] 在一个实施方案中,靶细胞为肝脏、胰腺、肺、乳腺、膀胱、脑、骨、甲状腺、肾、皮肤和造血系统的恶性细胞。在另一实施方案中,靶细胞为肝癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、膀胱癌、脑癌、骨癌、甲状腺癌、肾癌、皮肤癌或者血液癌症(hematological cancer)中的细胞。

[0427] 在一个实施方案中,靶抗原为下述的表位: α 叶酸受体、5T4、 $\alpha_v\beta_6$ 整合素、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD138、CD171、CEA、CSPG4、EGFR、包括ErbB2(HER2)的EGFR家族、EGFRvIII、EGP2、EGP40、EPCAM、EphA2、EpCAM、FAP、胎儿型AchR、FR α 、GD2、GD3、' 磷脂酰肌醇聚糖-3(GPC3)、HLA-A1+MAGE1、HLA-A2+MAGE1、HLA-A3+MAGE1、HLA-A1+NY-ESO-1、HLA-A2+NY-ESO-1、HLA-A3+NY-ESO-1、IL-11R α 、IL-13R α 2、 λ 、Lewis-Y、 κ 、间皮素、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2D配体、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、ROR1、SSX、生存素、TAG72、TEM或者VEGFR2。

[0428] J. 治疗方法

[0429] 通过本文所考虑的方法制备的修饰的T细胞提供改善的过继免疫疗法,用于治疗多种病况,所述病况包括但不限于癌症、感染性疾病、自身免疫病、炎症性疾病和免疫缺陷。在具体实施方案中,通过用本文所考虑的工程化的TCR或CAR遗传修饰初始T细胞,使初始细胞的特异性重定向至肿瘤细胞或癌症细胞。

[0430] 在一个实施方案中,本发明包括一种类型的细胞疗法,其中对T细胞进行修饰,以表达靶向表达靶抗原的癌细胞的工程化的TCR或CAR,以及将修饰的T细胞输注进需要的接受者中。输注的细胞能够杀死接受者中的肿瘤细胞。与抗体疗法不同,工程化的TCR或CAR修饰的T细胞能够在体内复制,从而有助于可以导致持续的癌症治疗的长期持续性。

[0431] 在一个实施方案中,本发明的工程化的TCR和CAR T细胞可以经历稳健的体内T细胞扩增,并且能够坚持延长的时间。在另一实施方案中,本发明的工程化的TCR或CAR T细胞发展为能够再活化以抑制任何其它肿瘤的形成或生长的特异性记忆T细胞。

[0432] 在具体实施方案中,将包含用载体进行遗传修饰的免疫效应细胞的组合物用于实体瘤或实体癌的治疗,所述载体包含与编码CAR的多核苷酸可操作地连接的启动子,所述实

体瘤或实体瘤包括但不限于：肝癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、膀胱癌、脑癌、骨癌、甲状腺癌、肾癌或者皮肤癌。

[0433] 在具体实施方案中，将包含用载体进行遗传修饰的免疫效应细胞的组合物用于多种癌症包括但不限于胰腺癌、膀胱癌和肺癌的治疗，所述载体包含与编码工程化的TCR或CAR的多核苷酸可操作地连接的启动子，所述工程化的TCR或CAR包含与PSCA或MUC1的表位结合的抗原特异性结合结构域。

[0434] 在具体实施方案中，将包含用载体进行遗传修饰的免疫效应细胞的组合物用于液体瘤的治疗，所述载体包含与编码工程化的TCR或CAR的多核苷酸可操作地连接的启动子，所述液体瘤包括但不限于白血病，包括急性白血病（例如ALL、AML以及骨髓细胞白血病、早幼粒细胞白血病、粒单核细胞白血病、单核细胞白血病和红白血病）、慢性白血病（例如CLL、SLL、CML、HCL）；真性红细胞增多症、淋巴瘤、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、原发性巨球蛋白血症以及重链疾病。

[0435] 在具体实施方案中，将包含用载体进行遗传修饰的免疫效应细胞的组合物用于B细胞恶性肿瘤的治疗，所述载体包含与编码工程化的TCR或CAR的多核苷酸可操作地连接的启动子，所述B细胞恶性肿瘤包括但不限于多发性骨髓瘤（MM）、非霍奇金淋巴瘤（NHL）和慢性淋巴细胞白血病（CLL）。

[0436] 多发性骨髓瘤是B细胞的成熟浆细胞的恶性肿瘤，其形态学特征为这些类型的细胞的单克隆的致瘤性转化。这些浆细胞在BM中增殖，并且可能侵袭邻近的骨，以及有时侵袭血液。多发性骨髓瘤的变体形式包括：明显的多发性骨髓瘤、冒烟型多发性骨髓瘤、浆细胞白血病、非分泌型骨髓瘤、IgD骨髓瘤、骨硬化性骨髓瘤、骨孤立性浆细胞瘤和髓外浆细胞瘤（参见，例如Braunwald等人（eds），Harrison's Principles of Internal Medicine，第15版（McGraw-Hill 2001））。

[0437] 非霍奇金淋巴瘤包含一大组淋巴细胞（白细胞）癌。非霍奇金淋巴瘤可以发生于任何年龄，并且通常具有淋巴结大于正常淋巴结、发热和体重减轻的特点。存在多种不同类型的非霍奇金淋巴瘤。例如，非霍奇金淋巴瘤可以分为侵略型（生长快速）和惰性型（生长缓慢）。尽管非霍奇金淋巴瘤可以来源于B细胞和T细胞，但是本文使用的术语“非霍奇金淋巴瘤”与“B细胞非霍奇金淋巴瘤”可互换使用。B细胞非霍奇金淋巴瘤（NHL）包括：伯基特淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病/小淋巴细胞淋巴瘤（CLL/SLL）、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、免疫母细胞性大细胞淋巴瘤、前体B淋巴母细胞淋巴瘤以及套细胞淋巴瘤。发生于骨髓或干细胞移植之后的淋巴瘤通常为B细胞非霍奇金淋巴瘤。

[0438] 慢性淋巴细胞白血病（CLL）为引起未成熟的白细胞（称为B淋巴细胞或B细胞）缓慢增加的惰性（生长缓慢）癌症。癌细胞经血液和骨髓扩散，并且也可影响淋巴结和其它器官，如肝脏和脾脏。CLL最终引起骨髓衰竭。有时，在疾病晚期，该疾病被称为小淋巴细胞淋巴瘤。

[0439] 在具体实施方案中，提供方法，所述方法包括将治疗有效量的本文所考虑的修饰的T细胞或者包含本文所考虑的修饰的T细胞的组合物，单独或者与一种或多种治疗剂组合施用于需要的患者。在某些实施方案中，将本发明的细胞用于治疗处于发展为癌症的风险的患者。因此，本发明提供治疗或预防癌症的方法，所述方法包括向需要的对象施用治疗有效量的本发明的修饰的T细胞。

[0440] 在一个实施方案中,治疗需要的对象中的癌症的方法包括施用有效量(例如治疗有效量)的组合物,所述组合物包含本文所考虑的遗传修饰的免疫效应细胞。施用的量和频率将由诸如患者的情况以及患者疾病的类型和严重性的因素决定,尽管适当的剂量可由临床试验确定。

[0441] 在一个实施方案中,向对象施用的组合物中的修饰的T细胞的数量为至少 0.1×10^7 个修饰的T细胞/ m^2 、至少 0.5×10^7 个修饰的T细胞/ m^2 、至少 1×10^7 个修饰的T细胞/ m^2 、至少 5×10^7 个修饰的T细胞/ m^2 、至少 0.1×10^8 个修饰的T细胞/ m^2 、至少 0.5×10^8 个修饰的T细胞/ m^2 、至少 1×10^8 个修饰的T细胞/ m^2 、至少 5×10^8 个修饰的T细胞/ m^2 或者至少 1×10^9 个修饰的T细胞/ m^2 或者任意中间数目的修饰的T细胞。

[0442] 向对象施用的修饰的T细胞数通常只是向对象施用的总细胞数的子集。在具体实施方案中,向对象施用至少 0.1×10^7 个总T细胞、至少 0.5×10^7 个总T细胞、至少 1×10^7 个总T细胞、至少 5×10^7 个总T细胞、至少 0.1×10^8 个总T细胞、至少 0.5×10^8 个总T细胞、至少 1×10^8 个总T细胞、至少 5×10^8 个总T细胞、至少 0.1×10^9 个总T细胞、至少 0.5×10^9 个总T细胞、至少 1×10^9 个总T细胞、至少 5×10^9 个总T细胞或者至少 0.1×10^{10} 个总T细胞或者任意中间数目的T细胞。

[0443] 本领域技术人员将理解,可能需要多次施用本发明的组合物以实现期望的疗法。例如可以在1周、2周、3周、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、1年、2年、5年、10年或更长时间的时间跨度内施用组合物1、2、3、4、5、6、7、8、9或10次或者更多次。

[0444] 在某些实施方案中,下述是可取的:向对象施用活化的T细胞,然后随后再次抽血(或者实施血浆分离置换法),根据本发明活化由此得到的T细胞,以及使患者再输注这些活化并扩增的T细胞。可以每隔几周多次实施该过程。在某些实施方案中,可以使来自10cc至400cc血液抽取物的T细胞活化。在某些实施方案中,使来自20cc、30cc、40cc、50cc、60cc、70cc、80cc、90cc、100cc、150cc、200cc、250cc、300cc、350cc或者400cc或者更多血液抽取物的T细胞活化。未受理论束缚,可将该多次抽血/多次再输注方案用于选出某些T细胞群。

[0445] 可以以任何方便的方式进行本文所考虑的组合物的施用,包括通过气雾剂吸入、注射、摄取、输注、植入或者移植的方式。在优选实施方案中,肠胃外施用组合物。本文使用的短语“肠胃外施用(parenteral administration)”和“肠胃外施用(administered parenterally)”指不同于肠内和局部施用之外的施用模式,通常通过注射施用,并且包括但不限于:血管内注射、静脉内注射、肌肉内注射、动脉内注射、鞘内注射、囊内注射、眶内注射、瘤内注射、心脏内注射、真皮内注射、腹膜内注射、经气管注射、皮下注射、表皮下注射、关节内注射、囊下注射、蛛网膜下注射、脊柱内注射和胸骨内注射以及输注。在一个实施方案中,通过直接注射至肿瘤、淋巴结或者感染部位将本文所考虑的组合物施用于对象。

[0446] 在一个实施方案中,向需要的对象施用有效量的组合物,以增加对象中针对癌症的细胞免疫应答。免疫应答可以包括由能够杀死感染的细胞的细胞毒性T细胞介导的细胞免疫应答、调节性T细胞以及辅助性T细胞的应答。也可诱导主要由能够活化B细胞从而导致抗体的产生的辅助性T细胞介导的体液免疫应答。可将多种技术用于分析由本发明的组合物诱导的免疫应答的类型,其在本领域被充分描述:例如,由John E.Coligan, Ada M.Kruisbeek, David H.Margulies, Ethan M.Shevach, Warren Strober编辑的Current Protocols in Immunology, (2001) John Wiley&Sons, NY, N.Y.

[0447] 在T细胞介导的死亡的情况下,CAR配体的结合起始CAR至T细胞的信号转导,导致多种T细胞信号通路的活化,所述信号通路诱导T细胞产生或者释放能够通过多种机制诱导靶细胞凋亡的蛋白。这些T细胞介导的机制包括(但不限于)胞内细胞毒性颗粒由T细胞至靶细胞的转移、T细胞分泌能够直接诱导(或者经其它杀伤效应细胞的募集间接诱导)靶细胞死亡的促炎性细胞因子以及T细胞表面上的死亡受体配体(例如FasL)的上调,所述死亡受体配体在与靶细胞上的其同源死亡受体(例如Fas)结合之后诱导靶细胞的凋亡。

[0448] 在一个实施方案中,本发明提供治疗确诊患有癌症的对象的方法,所述方法包括从所述对象中移出免疫效应细胞,用包含编码如本文所考虑的工程化的TCR或CAR的核酸的载体对所述免疫效应细胞进行遗传修饰,从而产生修饰的免疫效应细胞群,以及将所述修饰的免疫效应细胞群施用于所述对象。在优选实施方案中,免疫效应细胞包含T细胞。

[0449] 在某些实施方案中,本发明还提供刺激免疫效应细胞介导的针对对象中的靶细胞群的免疫调节物应答(immune modulator response)的方法,所述方法包括向对象施用表达核酸构建体的免疫效应细胞群的步骤,所述核酸构建体编码工程化的TCR或CAR分子。

[0450] 施用本文所述的细胞组合物的方法包括有效导致再引入离体遗传修饰的免疫效应细胞或者再引入遗传修饰的免疫效应细胞祖细胞的任何方法,所述离体遗传修饰的免疫效应细胞在对象中直接表达工程化的TCR或CAR,所述遗传修饰的免疫效应细胞祖细胞在被引入对象时分化为表达工程化的TCR或CAR的成熟的免疫效应细胞。一种方法包括用根据本发明的核酸构建体离体转导外周血T细胞,并使转导的细胞返回至所述对象。

[0451] 将本说明书中引用的所有出版物、专利申请和授权专利通过引用并入本文,如同明确且单独地指示将各单独的出版物、专利申请或者授权专利通过引用并入。

[0452] 尽管出于清楚理解的目的,通过示例和实例的方式一定程度上详细地描述了上述发明,但是根据本发明的教导,在不脱离所附的权利要求的精神或范围的情况下,可对本发明作出某些改变和修改,这对于本领域技术人员将是显而易见的。仅通过示例性的方式且不通过限制性的方式提供下述实施例。本领域技术人员将容易地识别可被改变或修改以得到基本相类似的结果的多个非关键参数。

实施例

[0453] 利用嵌合抗原受体(CAR)工程化的自体同源T细胞进行的过继性细胞疗法(ACT)仍受到缺乏简单且稳健的制备方法的挑战。由于活细胞培养的固有复杂性和患者之间的变化性,发展高效、可重复且可扩展的方法是重要的。而且,发展ACT的封闭系统处理在将ACT转化为用于大量患者的标准治疗中是重要的。

[0454] 目前,既有的T细胞制备方法包括用于分离、活化、转导和扩增CAR T细胞的多个复杂步骤。相比之下,本发明的发明人使用小规模研究模型来发展简单、稳健、性质良好、灵活、封闭系统的T细胞制备平台,所述T细胞制备平台被转变为用于工程化的CAR T细胞的大规模临床cGMP制备方法。

[0455] 所述制备在10天内一致地实现平均值为6.75(+/-1.5)的群体倍增水平。平均转导效率是65.3%(+/-12.4%)。培养物的纯度一致为>98%CD3细胞。表型上,T细胞表达与动物模型和临床研究中的肿瘤消退相关的表面标志物。此外,工程化的CAR T细胞在体外和体内均呈现对表达抗原靶标的细胞毒性。

[0456] 实施例1

[0457] 小规模制备平台

[0458] 建立了新的小规模制备平台,其简单、可靠且可复制。该制备平台比既有方法简单、更稳健,且在CAR T细胞的活化、转导和扩增方面实施最少操作。此外,通过本文所考虑的方法制备的CAR T细胞产生可与通过既有方法产生的工程化的CAR T细胞治疗剂相比较(即使不优于)的CAR T细胞治疗剂。

[0459] 1. 获得PBMC

[0460] PBMC被用作用于小规模研究制备平台的T细胞来源。可以利用FICOLL™梯度和洗涤来人工分离来自全血抽取物的PBMC。在该实验中,使用冷冻的PBMC。将PBMC的冷冻小瓶于37℃水浴中解冻。一旦解冻,将PBMC转移至含有~20-30mL温的TCGM培养基的50mL锥形管中,然后于175x g离心10分钟。移除上清液,并且将细胞团在含250IU/mL IL-2的小体积TCGM中重悬。经multisizer或血细胞计数器对等份的重悬细胞进行计数,并且测定活细胞数。

[0461] 2. 培养起始和活化

[0462] 在第0天(D0),将PBMC以 1×10^6 个细胞/mL接种于T25培养瓶中总体积为10mL的TCGM(含有250IU/mL IL-2)中。通过向培养物添加5 μ L 100ng/ μ L的抗CD3抗体和5 μ L 100ng/ μ L的抗CD28抗体来活化T细胞。一旦建立PBMC培养物,就将它们在37℃,5%CO₂培养箱中平躺孵育直到第1天(D1),随后转导细胞,或者如果随后不对细胞进行转导的话,则直到第3天(D3)。

[0463] 3. 转导

[0464] 测定CAR T慢病毒载体的滴度。以 $1-2 \times 10^8$ TU/ 10^6 个PBMC(在D0接种的PBMC数)对细胞进行转导。将病毒在TCGM+IL-2中稀释至2mL体积或者培养体积的20%v/v。用病毒转导细胞,持续约48小时,直到第3天(D3)。

[0465] 数次实验确定,在活化细胞之后约20至24小时转导最高效。在D0、D1和D2,用表达GFP的慢病毒以 $1-2 \times 10^8$ TU/ 10^6 个PBMC转导细胞。在转导之后,通过FACS分析分离表达GFP的细胞,以便测定被转导的各种类型T细胞的百分数和转导的细胞的载体拷贝数(VCN)。基于T细胞标志物的表达,分析表达GFP的细胞。当在活化后20至24小时(D1)转导细胞时,鉴定更多表达GFP和T细胞标志物CD3、CD8或CD4的转导细胞。图1。此外,VCN在活化后20至24小时(D1)进行转导的细胞中较高(图1)。

[0466] 另外的实验确定,使用可溶的CD3和CD28配体活化的T细胞的转导效率可与通过其它方法活化的T细胞的转导效率相比较。使用下述活化PBMC:(i)浓度为1 μ g/mL的板结合抗CD3和抗CD28抗体,持续20-24小时;(ii)浓度为50ng/mL的可溶的抗CD3和抗CD28抗体,持续20-24小时;以及使用珠结合的抗CD3和抗CD28抗体活化来自与PBMC同一来源的富集的淋巴细胞,使用1个T细胞比3个珠的比例的CD3/CD28免疫磁珠(Dynabead),持续20-24小时。活化之后,用表达抗CD19的慢病毒以 $1-2 \times 10^8$ TU/ 10^6 个PBMC对细胞进行转导。与其它方法相比,当用可溶的抗CD3和抗CD28抗体活化细胞时,鉴定更多表达抗CD19 CAR和T细胞标志物CD3、CD8或CD4的转导细胞。图2。此外,VCN在用可溶的抗CD3和抗CD28抗体活化的细胞中也较高(图2)。

[0467] 实验还确定了,在细胞培养袋中的活化和转导可与在瓶中的转导相比较。在D0,使用浓度为50ng/mL的可溶的抗CD3和抗CD28抗体活化PBMC,持续20-24小时。在活化之后,在

D1,用表达 κ_{LC} 的慢病毒以 3×10^8 TU/ 10^6 个PBMC转导细胞。当在细胞培养袋或瓶中活化和转导细胞时,表达 κ_{LC} 和T细胞标志物CD3、CD8或CD4的转导细胞的数目可比较(图3)。

[0468] 4. 扩增

[0469] 还测定了通过不同的方法活化的PBMC中的T细胞扩增。使用下述活化PBMC:(i)浓度为 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 的板结合抗CD3和抗CD28,持续20-24小时;(ii)浓度为 $50\text{ng}/\text{mL}$ 的可溶的抗CD3和抗CD28抗体,持续20-24小时;以及(iii)珠结合的抗CD3和抗CD28抗体,以3:1的珠:T细胞比例使用免疫磁珠,持续20-24小时。在活化之后,用表达抗CD19CAR的慢病毒以 $1-2 \times 10^8$ TU/ 10^6 个PBMC转导细胞。将活化且转导的细胞培养扩增多至10天。通过三种方法活化的PBMC中的细胞扩增在扩增培养期期间是可比较的(图4)。

[0470] 经历本文所考虑的T细胞制备方法的来自多个供体的PBMC显示可复制且稳健的扩增、CAR细胞表面表达以及VCN。使用浓度为 $50\text{ng}/\text{mL}$ 的可溶的抗CD3和抗CD28抗体将PBMC活化20-24小时。用表达抗CD19 CAR的慢病毒以 $1-2 \times 10^8$ TU/ 10^6 个PBMC转导活化的细胞。培养10天的来自多个供体的活化且转导的细胞彼此之间以及与未转导的对照(UTD)之间显示可比较的生长速率。图5。图5还显示了在第10天,各扩增培养物中存在的淋巴细胞数。FACS分析确定,抗CD19的表达在产生自不同患者的细胞产物中是可比较的,标记的平均值为约61%,以及范围为29%至80%($n=5$)。图6。qPCR还表明,细胞产物中的VCN是可比较的(图6)。

[0471] 5. 抗原特异性肿瘤清除

[0472] 通过用可溶抗体活化的T细胞进行的抗原特异性肿瘤清除与使用其它方法活化的T细胞一样好,或者优于使用其它方法活化的T细胞。使用下述活化PBMC:(i)浓度为 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 的板结合抗CD3和抗CD28抗体,持续20-24小时;(ii)浓度为 $50\text{ng}/\text{mL}$ 的可溶的抗CD3和抗CD28抗体,持续20-24小时;以及(iii)珠结合的抗CD3和抗CD28抗体,以3:1的珠:T细胞比例使用免疫磁珠,持续20-24小时。在活化之后,用表达抗CD19 CAR的慢病毒以 $1-2 \times 10^8$ TU/ 10^6 个PBMC转导细胞。将活化且转导的细胞培养扩增多至10天。将治疗性的抗CD19 CAR T细胞与表达CD19的Daudi细胞或不表达CD19的K562细胞共培养。在共培养10天之后,使用可溶抗体活化的抗CD19 CAR T细胞杀死Daudi细胞,与使用其它方法活化的抗CD19 CAR T细胞一样好,或者优于使用其它方法活化的抗CD19 CAR T细胞(图7和图8)。

[0473] 6. 小规模制备平台

[0474] 总体而言,小规模制备平台用来发展10天的T细胞扩增方法:在D0,将PBMC以 1×10^6 个细胞/ mL 的密度接种,并且使用 $50\text{ng}/\text{mL}$ 抗CD3和抗CD28抗体活化约24小时;在D1,将活化的PBMC用 2×10^8 TU/ 10^6 个细胞转导约24小时至48小时;在D3至D9,扩增转导的细胞并重新接种以维持对数期的生长。该T细胞制备方法通常导致T细胞扩增100-600倍,这取决于供体。

[0475] 前述实验鉴定了用于将小规模研究方法转为大规模临床cGMP制备方法的重要元素。所述元素显示于表1中。

[0476] 表1.

转化为大规模制备平台的小规模元素	
原材料	PBMC
培养基配方	TCGM: XVIVO-15, 补充有 5% HABS、2 mM 谷氨酰胺、10 mM HEPES 和 250 IU/mL IL-2 (以及任选地 IL7 和/或 IL-15)
[0477] 活化方法	50 ng/mL 可溶的抗 CD3 抗体和 50 ng/mL 可溶的抗 CD28 抗体
转导	活化后转导 20-24 小时
扩增	通过以 0.3×10^6 个细胞/mL 至 0.5×10^6 个细胞/mL 的浓度接种使细胞维持在对数生长期

[0478] 7. 平台稳健性

[0479] 通过设计、制备并评价多种慢病毒CAR构建体证明制备平台的稳健性。构建体在使用的启动子、scFV、+/-接头、铰链、跨膜区和信号转导结构域方面不同。(图16)

[0480] 如别处所描述的,在HEK 293T细胞中产生编码CAR的慢病毒载体(LV)的上清液(例如,Naldini等人,1996;Dull等人,1998以及Zufferey等人,1998)。使293细胞瞬时转染4种质粒:编码HIV gag-pol的质粒、编码VSV-G包膜蛋白的质粒、编码HIV rev蛋白的质粒以及编码CAR的慢病毒转移载体,例如图16。

[0481] 如以上实施例1所述制备CAR T细胞。如通过群体倍增所测定的,各种CAR T细胞产物显示可比较的生长速率(图17A);qPCR显示,VCN在不同CAR T细胞中是可比较的,其中每个细胞大约1至4个拷贝(图17B);以及通过FACS显示不同CAR构建体的可比较的细胞表面表达;百分比标记范围为约40%至60%,这取决于构建体(图17C)。

[0482] 8. 功能性CART药品的产生

[0483] 如以上实施例1所述制备表达抗BCMA的CAR T细胞。这些CAR T细胞显示抗原特异性肿瘤清除。将表达抗BCMA的CAR T细胞与K562细胞或者被修饰以表达BCMA的K562细胞共培养4小时。用羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)标记表达抗原的肿瘤细胞,并且通过FACS测量荧光。表达抗BCMA的CAR T细胞杀死表达BCMA的K562细胞(图18A)并释放IFN- γ (图18B)(n=3)。

[0484] 实施例2

[0485] 小规模研究平台转化为大规模临床cGMP药物制备平台

[0486] 小规模研究方法允许对CAR构建体进行更高通量评价,以确保数据可与大规模cGMP药物制备平台相比较。该实施例提供来自利用大规模临床cGMP药物制备平台进行的示例性实验的数据。

[0487] 1. 小规模 and 大规模制备之间的比较

[0488] 图9显示了小规模研究T细胞制备平台和按比例增加的临床cGMP药物制备平台的流程图比较。使用实施例1中概述的程序制备CAR T细胞。对于大规模制备,例如图10-12,如下所述制备CAR T细胞:

[0489] 获得.使用Spectra Optia®血浆分离置换法系统或等同物,通过白细胞去除术获

得细胞。用于制备方法的白细胞去除术产物的开始体积是约100mL至约200mL。对等份细胞进行计数,测定活力,低温保藏,以及使用FACS分析对PBMC进行表征。

[0490] 分离. 在Cell Saver® 5+自体血回收系统(Haemonetics)上,使用封闭系统FICOLL™梯度来分离PBMC。FICOLL™后,将棕黄层用CliniMACS缓冲液w/2% HABS洗涤,然后重悬于含250IU IU/mL IL-2的TCGM中。进行洗涤前和洗涤后的细胞计数,活力、以及PBMC的FACS分析。

[0491] 低温保藏. 大规模制备方法的具体实施方案包括在分离之后以及在任何进一步的下游制备之前,低温保藏PBMC。将PBMC在TCFM中低温保藏,并在速率可控的冷冻仪中以每分钟1°的速率在约-80°C至约-135°C温度下的速率可控的冷冻仪中冷冻,并在液氮储存罐的汽相中保藏。

[0492] 第0天:培养起始/活化-袋,新鲜细胞. 将在含250IU/mL IL-2的TCGM中的 1×10^8 个PBMC以 1×10^6 PBMC/mL的密度接种进100mL MACS® GMP细胞分化袋中。通过向培养物中添加50ng/mL抗CD3抗体和50ng/mL抗CD28抗体活化PBMC,并培养约24小时。

[0493] 第0天:培养起始/活化-袋,冷冻细胞. 大规模制备方法的具体实施方案包括使用冷冻的PBMC。将冷冻的PBMC在37°C水浴中解冻,并在含250IU/mL IL-2的TCGM中洗涤。将在含250IU/mL IL-2的TCGM中的 1×10^8 个解冻的PBMC接种进100mL MACS® GMP细胞分化袋中。通过向培养物中添加50ng/mL抗CD3抗体和50ng/mL抗CD28抗体活化解冻的PBMC,并培养约24小时。

[0494] 第0天:培养起始/活化-GREX生物反应器. 大规模制备方法的具体实施方案包括在GREX生物反应器中制备T细胞。将在含250IU/mL IL-2的TCGM中的 1×10^8 个PBMC接种进GREX-100的100mL TCGM中。通过向培养物中添加50ng/mL抗CD3抗体和50ng/mL抗CD28抗体活化PBMC,并培养约24小时。

[0495] 第1天:转导. 用 $1-2 \times 10^9$ TU的慢病毒/ 10^8 个PBMC转导活化的细胞。将慢病毒在TCGM中稀释至培养体积的20%。例如如果培养体积是100mL TCGM,则将病毒在TCGM中稀释以使添加至培养物的最大体积为20mL。将细胞转导约48小时。

[0496] 第3天至第10天:扩增. 将转导的细胞在含250IU/mL IL-2的TCGM中扩增5至8天。在一天或多天扩增中的每一天,任选地取等份的细胞,并且对细胞进行计数,测定活力,低温保藏,以及使用FACS分析对PBMC进行表征。如果需要,将培养物以 0.3×10^6 个PBMC/mL至 0.5×10^6 个PBMC/mL的密度重新接种,以维持细胞在对数期的生长。对于基于细胞培养袋的制备,在第7天,任选地将细胞转移至WAVE生物反应器,直到第10天,以允许进一步扩增。在一个实施方案中,在第3天、第4天、第5天、第6天、第7天、第8天和/或第9天和/或第10天,进行细胞计数。在一个实施方案中,如果细胞在第7天不能达到靶扩增水平,则可以将它们转移至WAVE生物反应器,其中以2L/天灌注培养基,持续第8天和第9天以允许扩增增加。

[0497] 对于基于GREX的制备,使细胞在GREX生物反应器中持续培养整个扩增期。

[0498] 第10天:回收和低温保藏. 在Cell Saver® 5+自体血回收系统上回收并洗涤扩增的细胞。将细胞用2L 0.9% NaCl洗涤,然后用PlasmaLyte进行最后的洗涤。在回收前和回收后,进行细胞计数,活力以及FACS分析,以测定CAR T细胞的纯度和同一性。任选地将回收的细胞在50% plasmalyte和50% Cryostor 10;50/40/10 (XVIVO/HABS/DMSO);或Cryostor 10

中低温保藏,以及在速率可控的冷冻仪中以每分钟 1° 的速率在约 -80°C 至约 -135°C 的速率可控的冷冻仪中冷冻,并在液氮储存罐的汽相中保藏。

[0499] 2. 小规模和大规模制备方法的最终细胞产物的细胞表型之间是可比较的

[0500] 使用实施例1中所描述的小规模方法和实施例2中所描述的大规模方法制备CAR T细胞(以上)。将最终细胞产物进行针对CD4、CD8、CAR T构建体、CD56和CD62L细胞表面标志物的表达的FACS分析,以测定最终产物的细胞组合物中的任何差异。在研究平台和临床规模平台之间最终CAR T产物的表型中未观察到显著差异。对于两个平台之间的所有表面标志物, $p \geq 0.20$ ($n=3$) (图13)。

[0501] 3. PBMC分离&T细胞获得的简化细胞处理

[0502] 本文所考虑的制备方法的主要优点之一是实施封闭系统处理步骤。通过白细胞去除术获得PBMC,以及使用Cell Saver® 5+自体血回收系统(Haemonetics)对其进行分离和洗涤。Cell Saver® 5+还用于回收和洗涤最终制备的CAR T细胞产物。

[0503] 经过多次实验($n=18$)对最终的PBMC和CAR T产物进行表征,以证明原材料和最终产物的细胞组合物显著一致的纯度。图14. 封闭系统方法的利用简化了制备并且使cGMP处理所需的设备最少。

[0504] 4. 制备方法的灵活性

[0505] 为了解决患者之间的变化性,并确保可以实现所需剂量水平的CAR T细胞产物,将用于CAR T细胞扩增的多个设备进行比较以显示由所考虑的制备方法提供的灵活性。如以上所述实施小规模(T25瓶)和大规模(GREX100、静态细胞培养袋和WAVE生物反应器)制备方法。由不同的制备方法制备的细胞在10天的培养期内显示出可比较的生长速率和扩增的细胞数。图15A. FACS分析显示 $\text{CD}3^{+}/\text{CAR}^{+}$ 细胞的数量在制备方法之间是一致的。图15B. 此外, $\text{CD}3^{+}/\text{CAR}^{+}$ 细胞的VCN在所测试的各种制备方法中是可比较的。图15B. 这些结果表明,所考虑的T细胞制备方法是灵活的并且产生可比较的最终细胞产物。

[0506] 一般而言,在下述权利要求中,所使用的术语不应当被解释为将权利要求限制于本说明书和权利要求中公开的具体实施方案,而应当被解释为包括所有可能的实施方案以及此类权利要求授予的等同物的全部范围。因此,权利要求不受本公开的限制。

序列表

<110> 蓝鸟生物公司 (bluebird bio, Inc.)

<120> 制备的改善方法

<130> BLBD-028/01W0

<150> US 61/984,558

<151> 2014-04-25

<160> 13

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> () .. ()

<223> 柔性肽接头

<400> 1

Asp Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> () .. ()

<223> 柔性肽接头

<400> 2

Thr Gly Glu Lys Pro

1 5

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> () .. ()

<223> 柔性肽接头

<400> 3

Gly Gly Arg Arg

1

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> ()..()

<223> 柔性肽接头

<400> 4

Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> ()..()

<223> 柔性肽接头

<400> 5

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Val Asp

1

5

10

<210> 6

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> ()..()

<223> 柔性肽接头

<400> 6

Lys Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Gln Leu Ala Gln Phe Arg Ser

1

5

10

15

Leu Asp

<210> 7

<211> 8

<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()..()
<223> 柔性肽接头
<400> 7
Gly Gly Arg Arg Gly Gly Gly Ser
1 5
<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()..()
<223> 柔性肽接头
<400> 8
Leu Arg Gln Arg Asp Gly Glu Arg Pro
1 5
<210> 9
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()..()
<223> 柔性肽接头
<400> 9
Leu Arg Gln Lys Asp Gly Gly Gly Ser Glu Arg Pro
1 5 10
<210> 10
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> PEPTIDE
<222> ()..()
<223> 柔性肽接头

<400> 10

Leu Arg Gln Lys Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Arg Pro
 1 5 10 15

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> () .. ()

<223> 多肽切割序列

<220>

<221> SITE

<222> (2) .. (3)

<223> Xaa = 任何氨基酸

<220>

<221> SITE

<222> (5) .. (5)

<223> Xaa = 任何氨基酸

<220>

<221> SITE

<222> (7) .. (7)

<223> Xaa为Gly或Ser

<400> 11

Glu Xaa Xaa Tyr Xaa Gln Xaa
 1 5

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> () .. ()

<223> 多肽切割序列

<400> 12

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly
 1 5

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> ()..()

<223> 多肽切割序列

<400> 13

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser

1

5

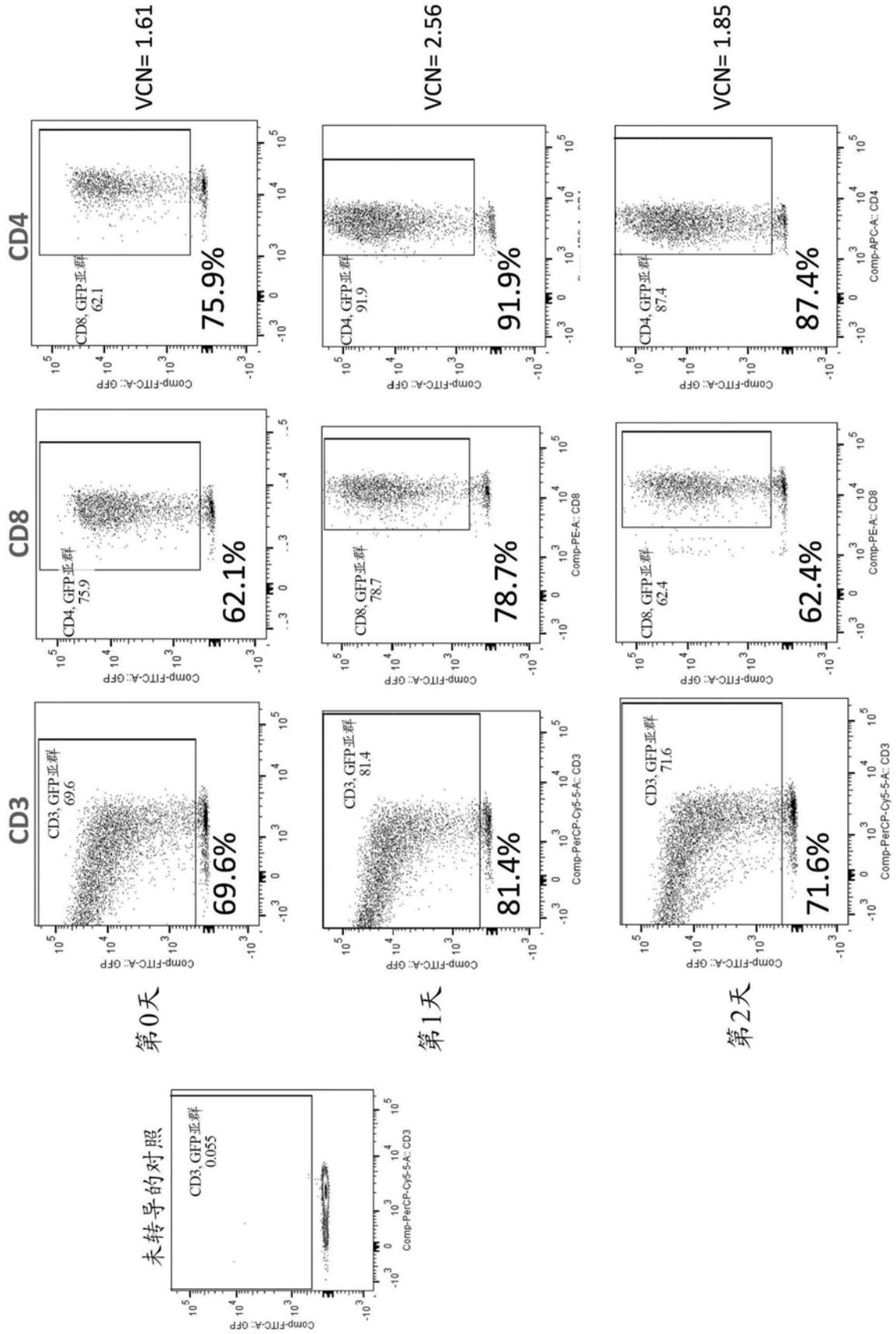


图1

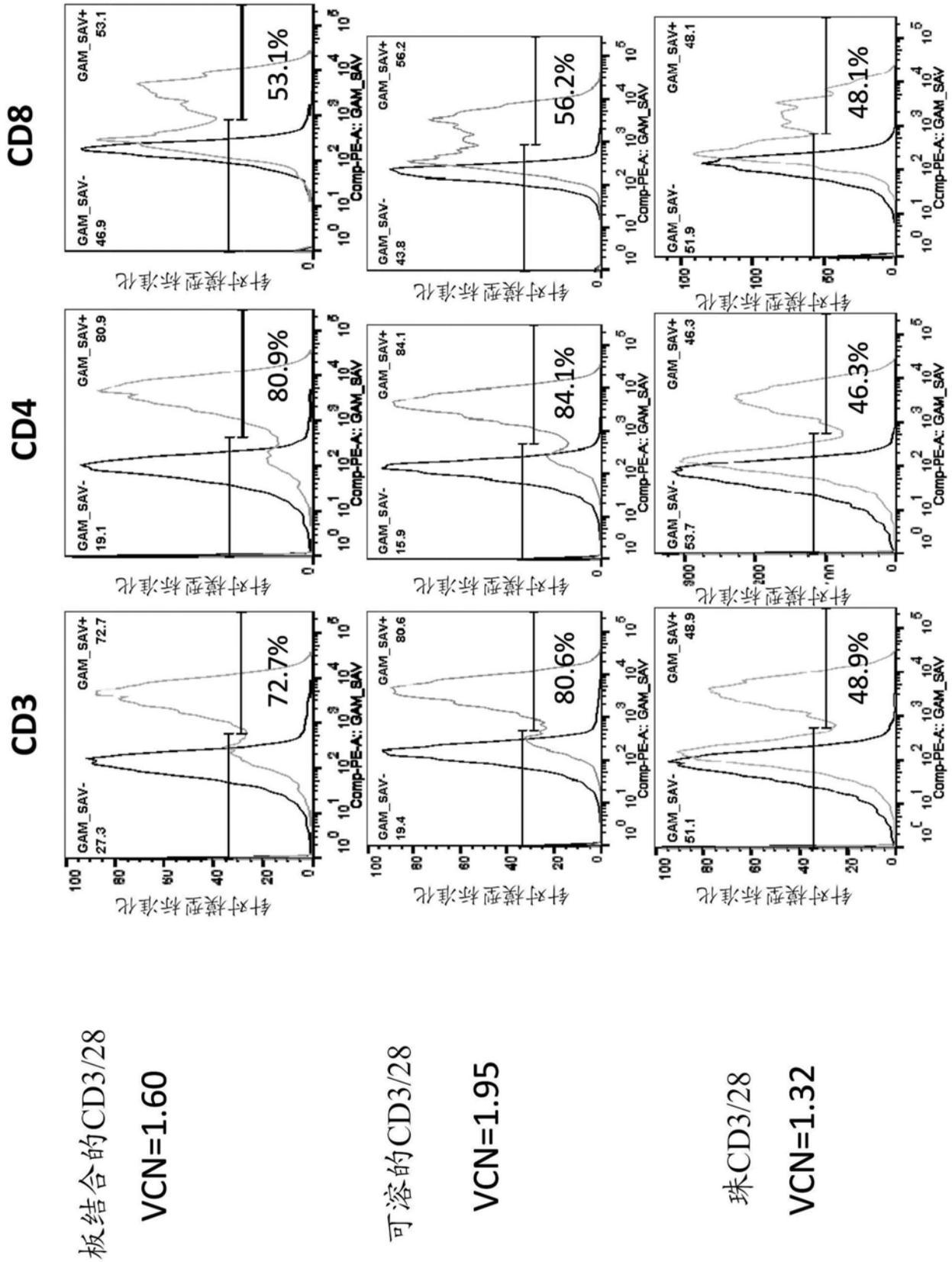
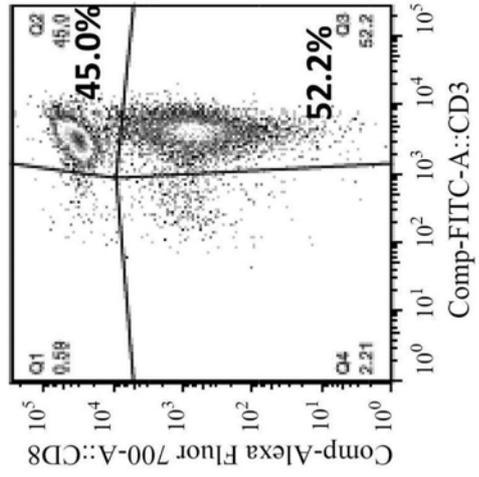
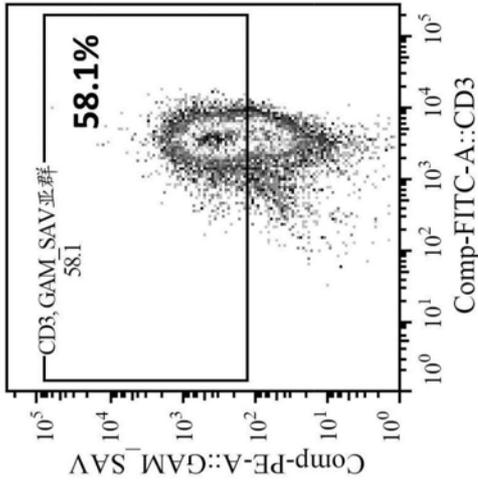
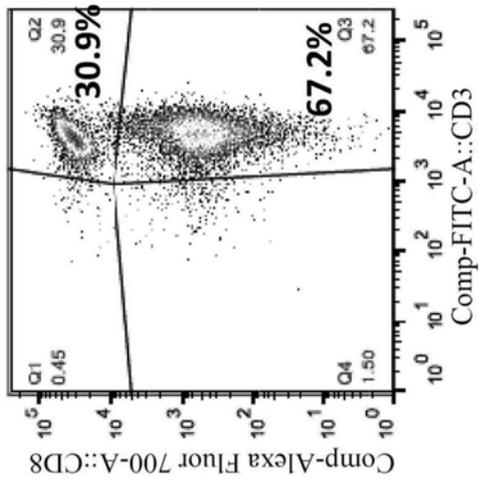
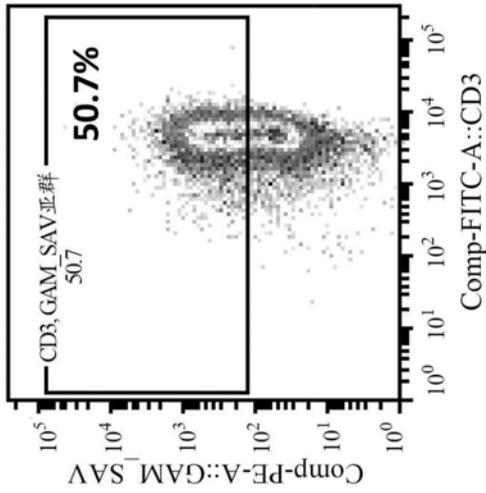


图2

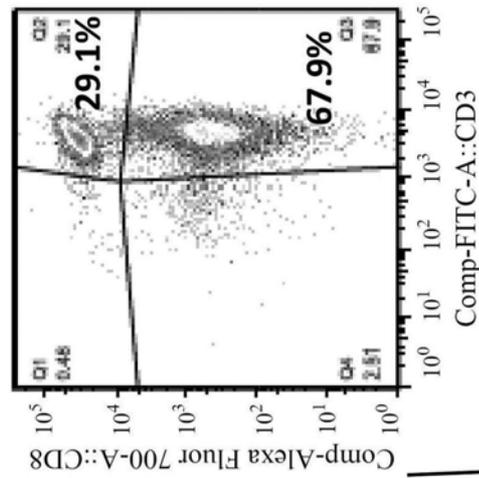
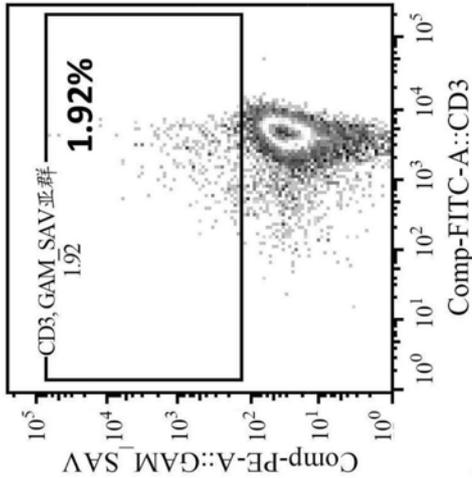
转导的袋



转导的T25



未转导的T25



CD3
CD8

图3

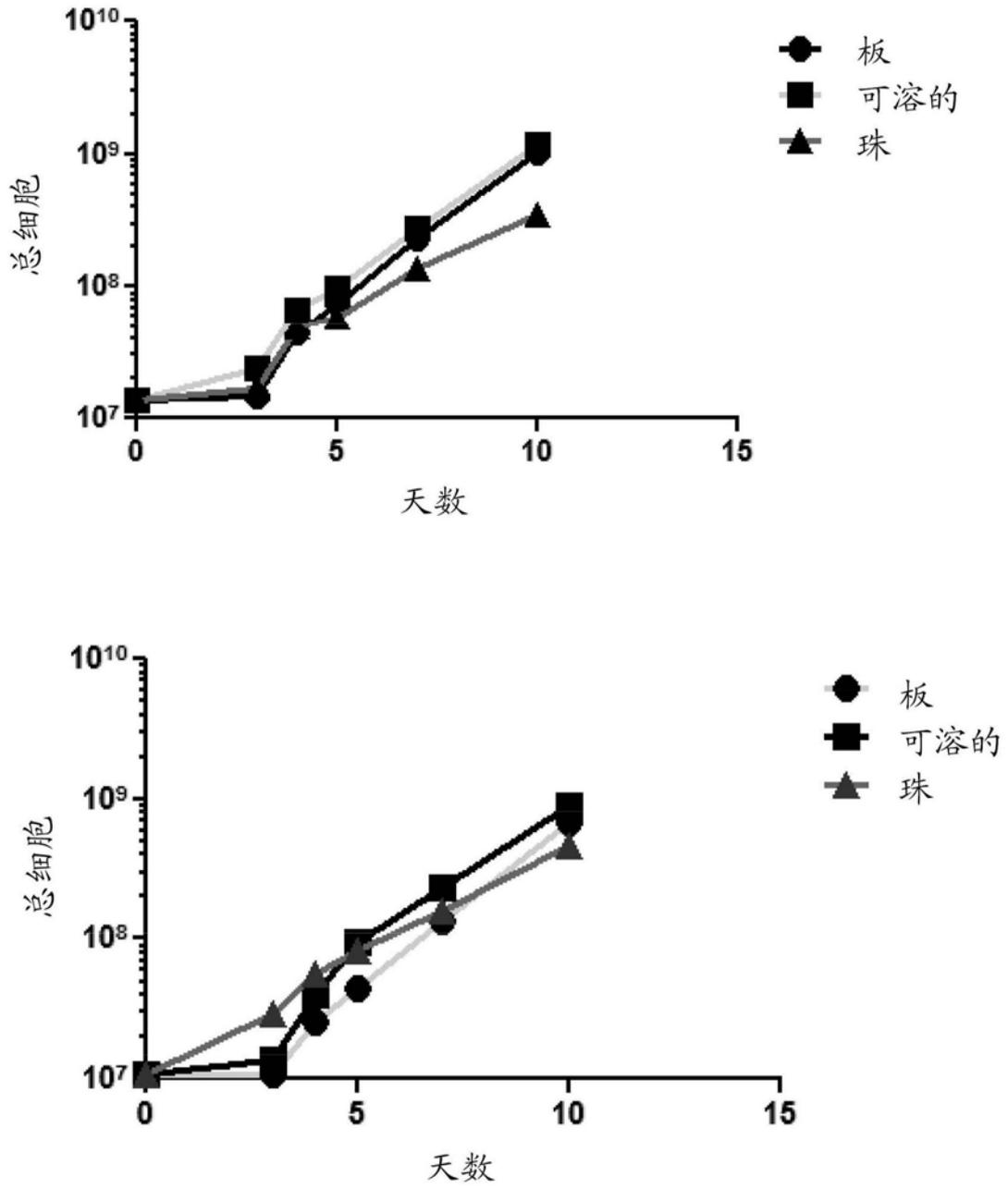


图4

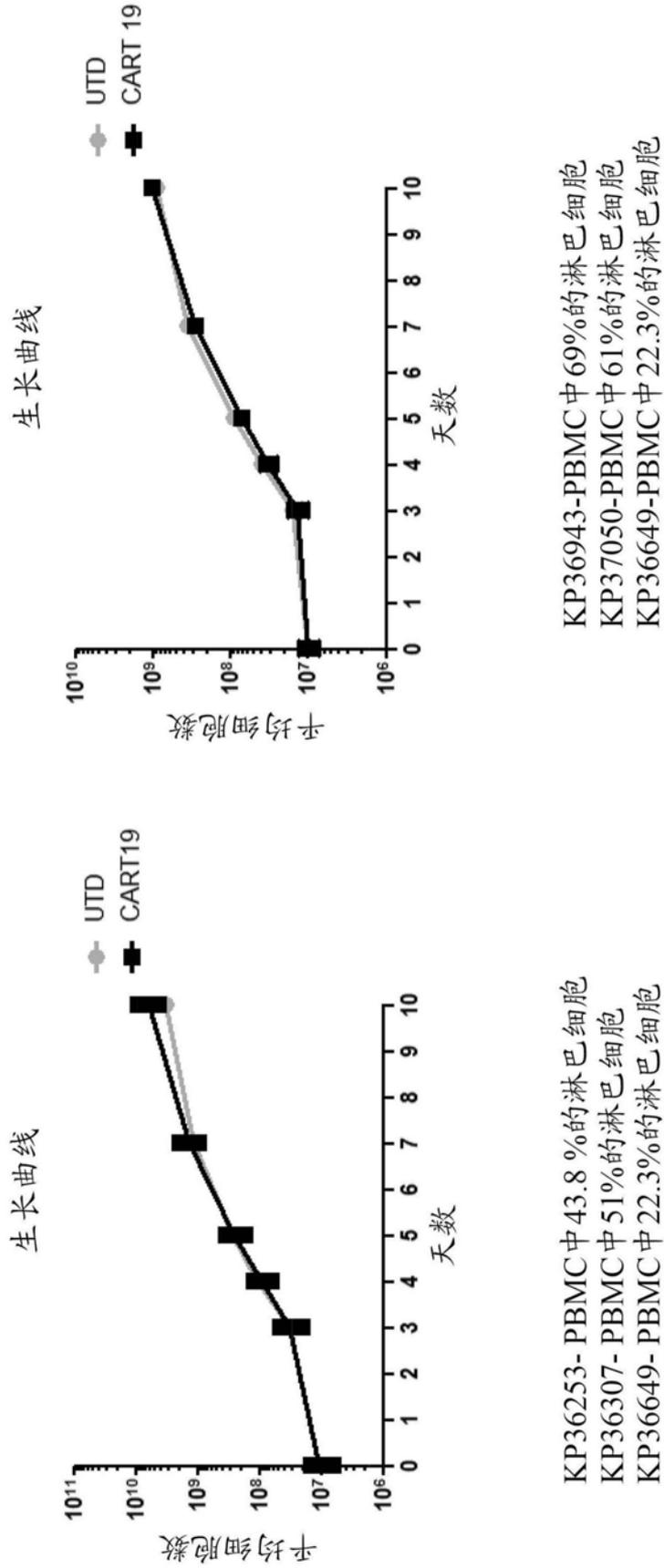


图5

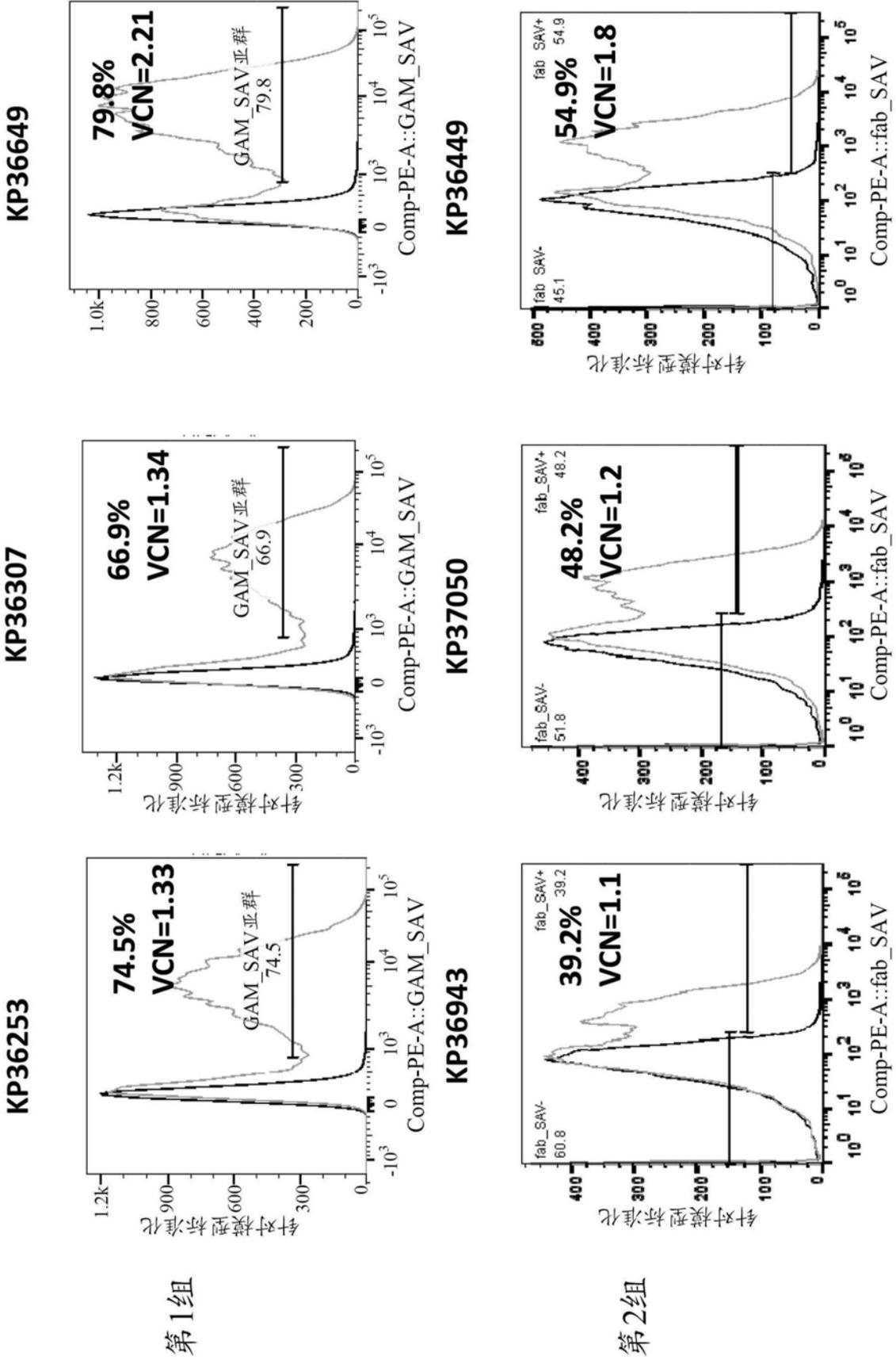


图6

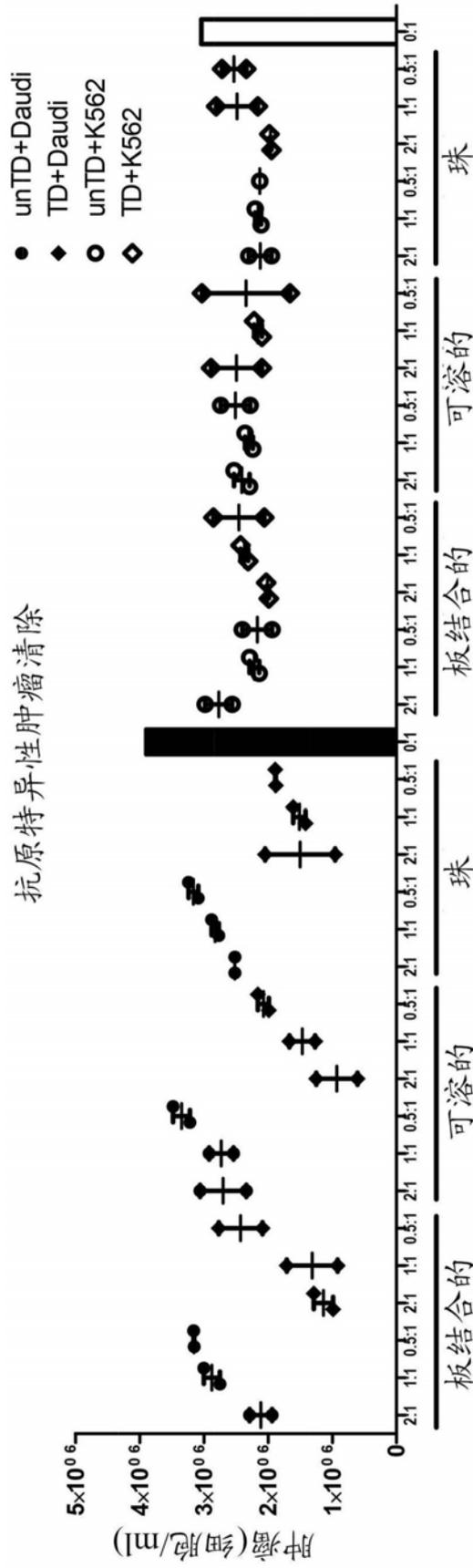
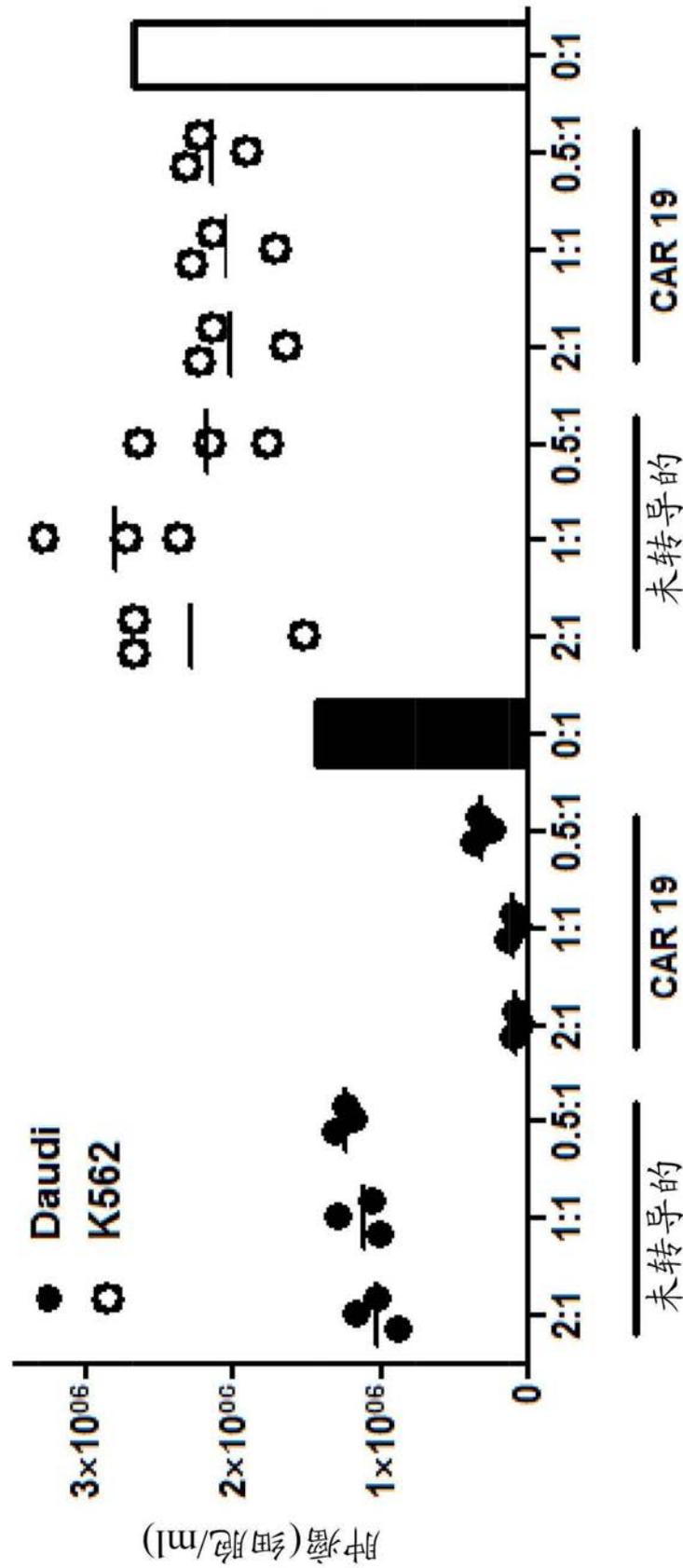


图7

抗原特异性肿瘤清除



T细胞: 肿瘤的比率

图8

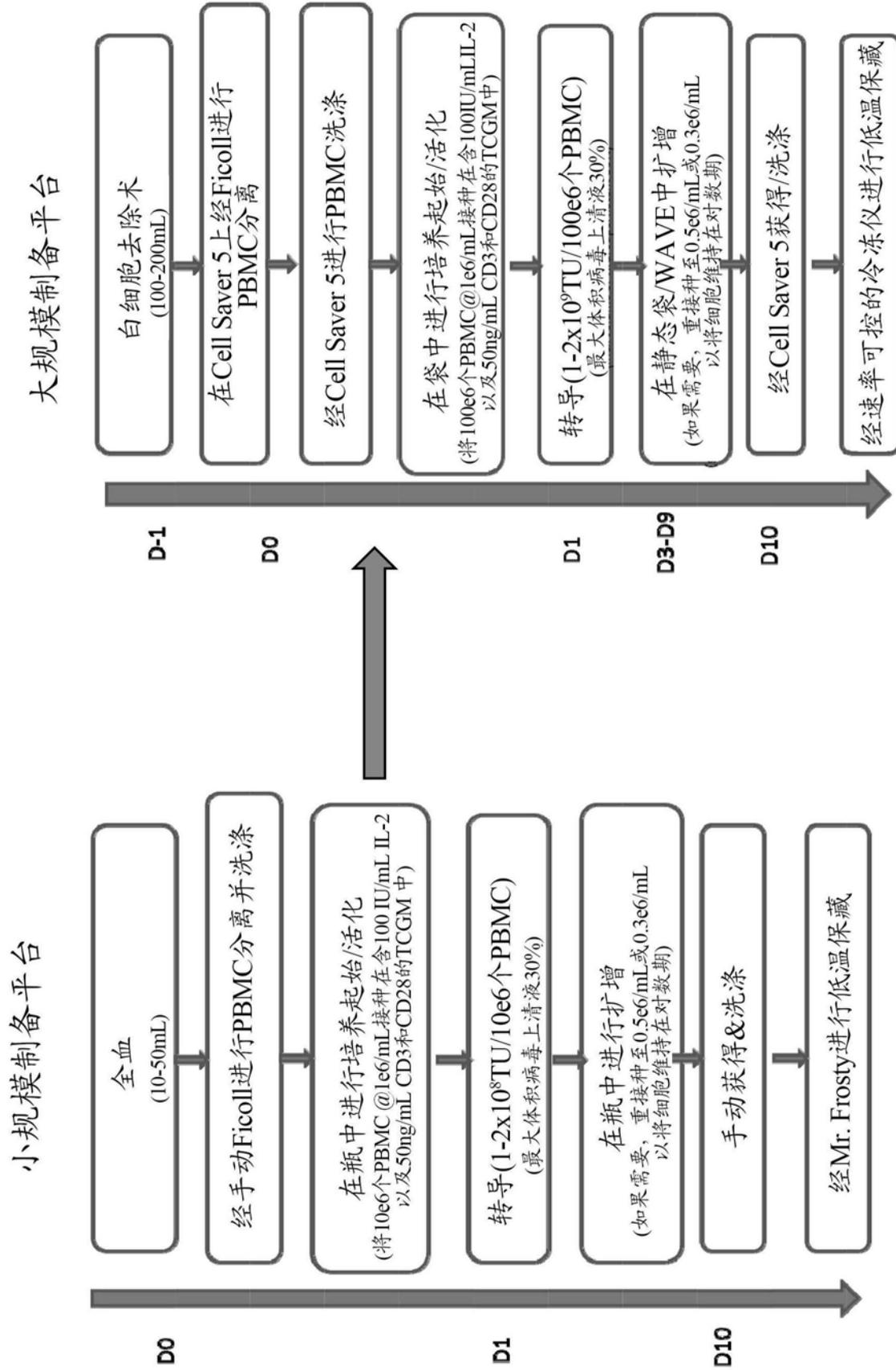


图9

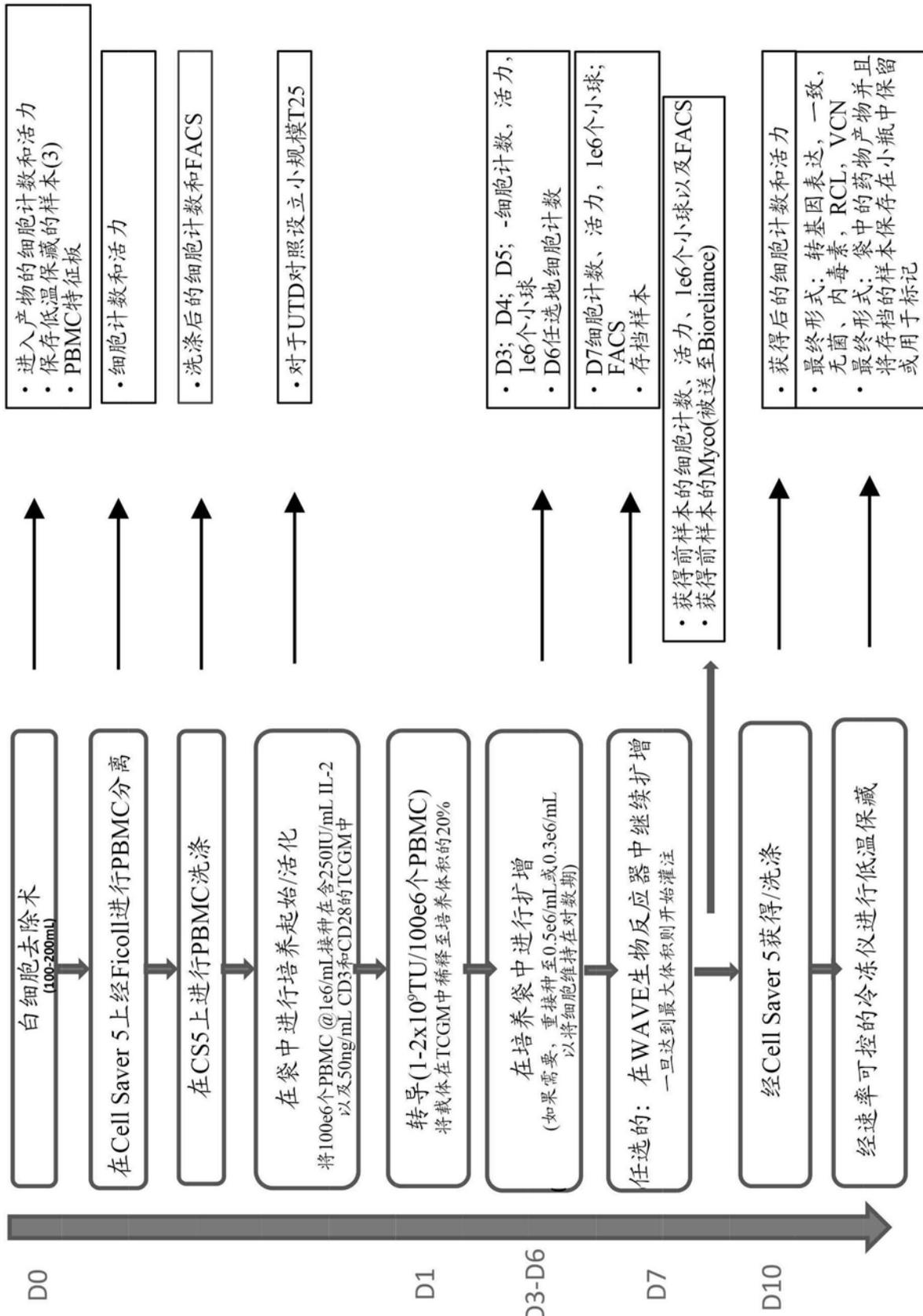


图10

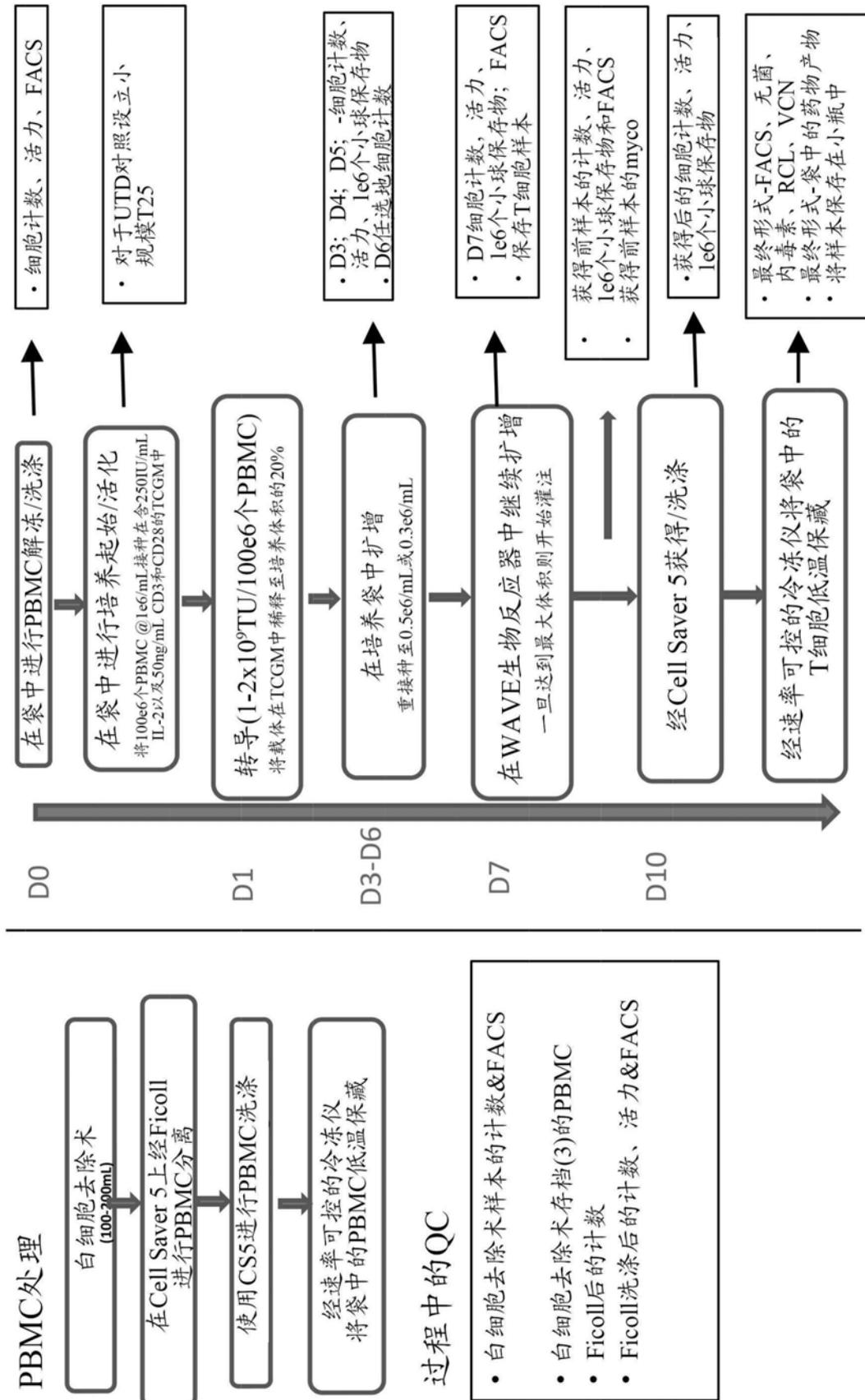


图11

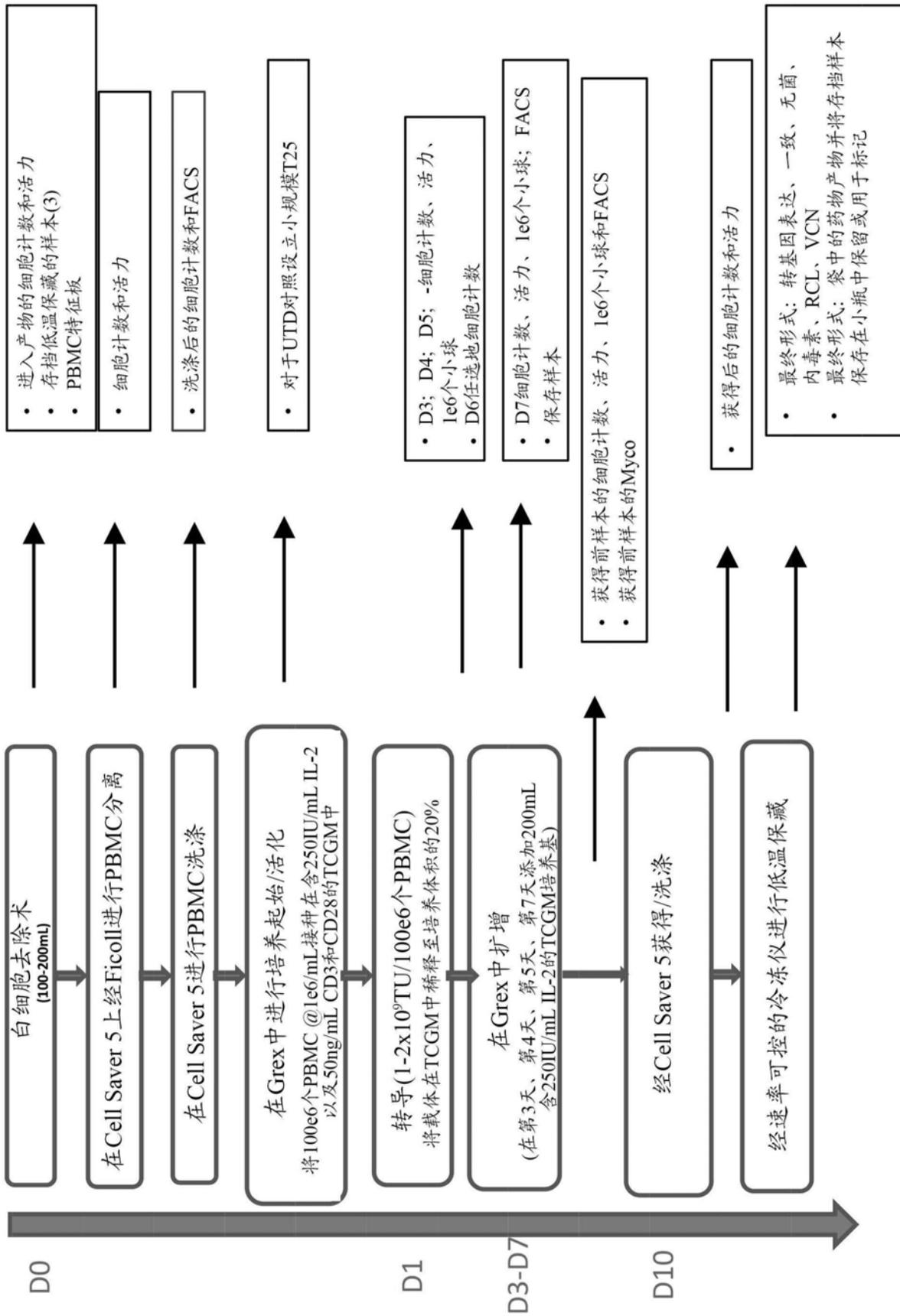


图12

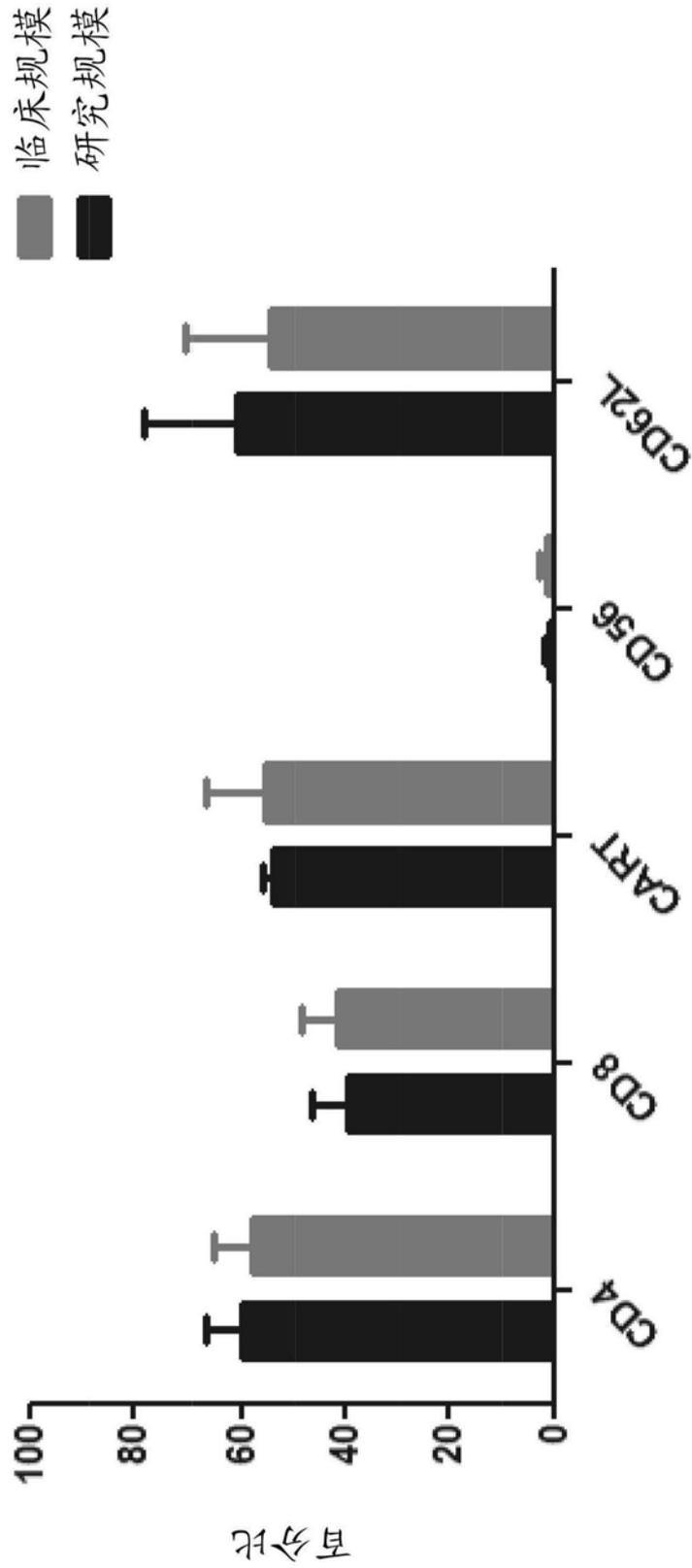


图13

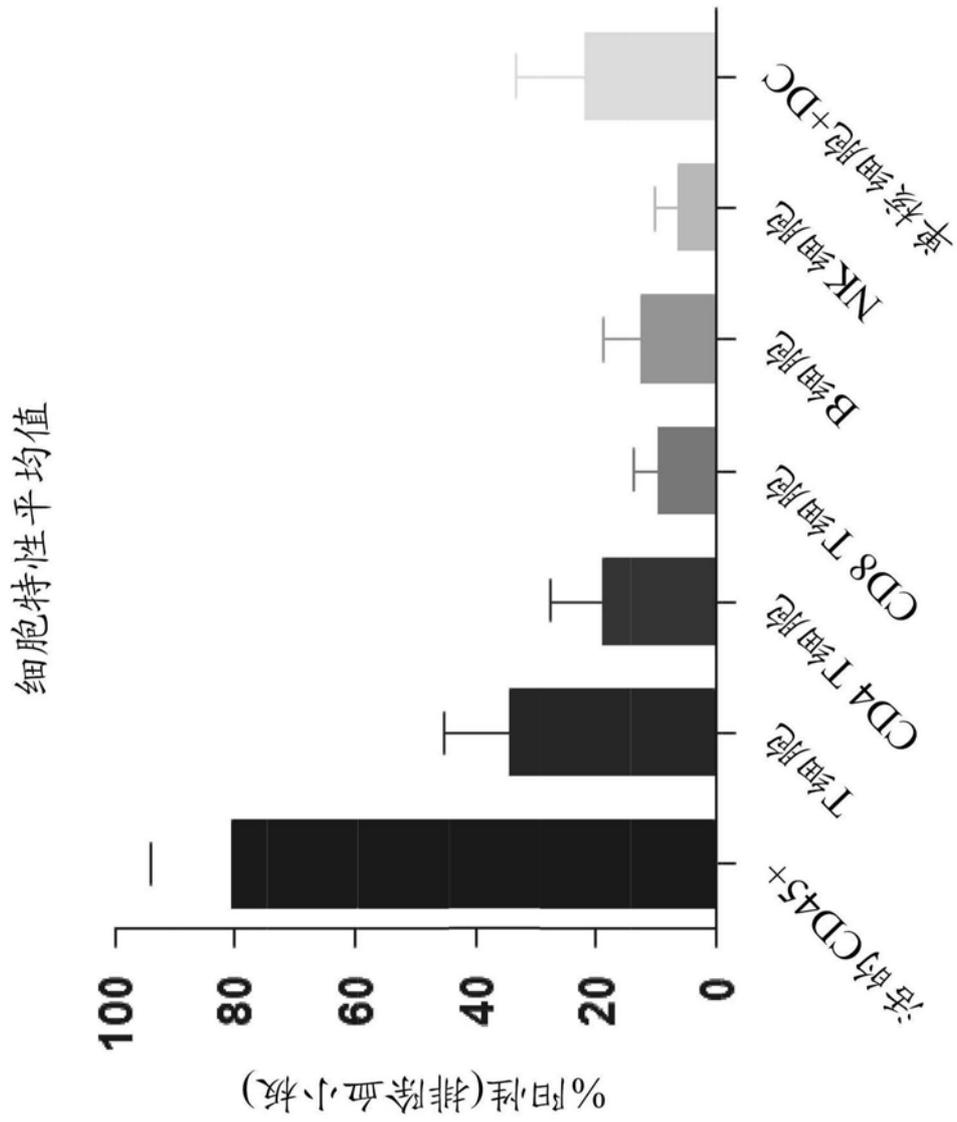


图14

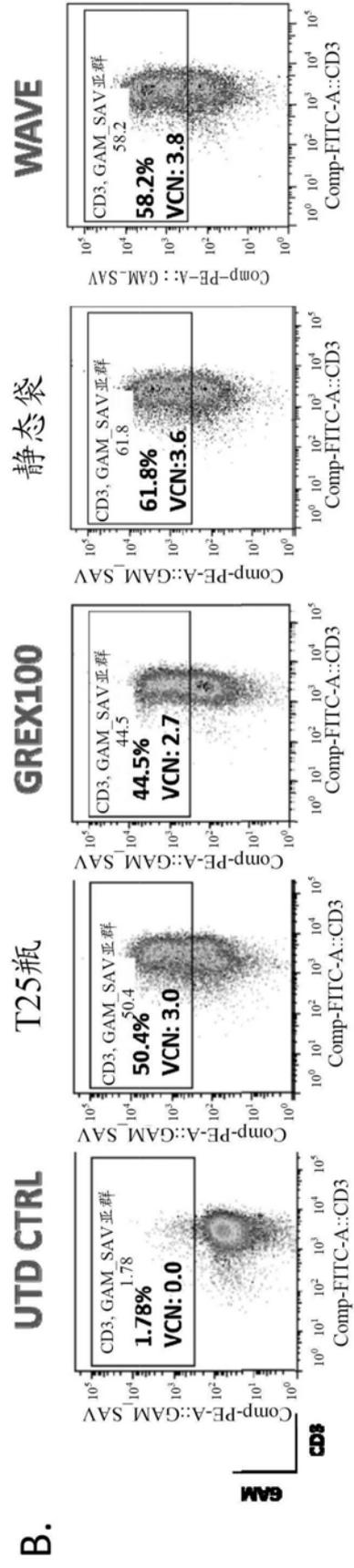
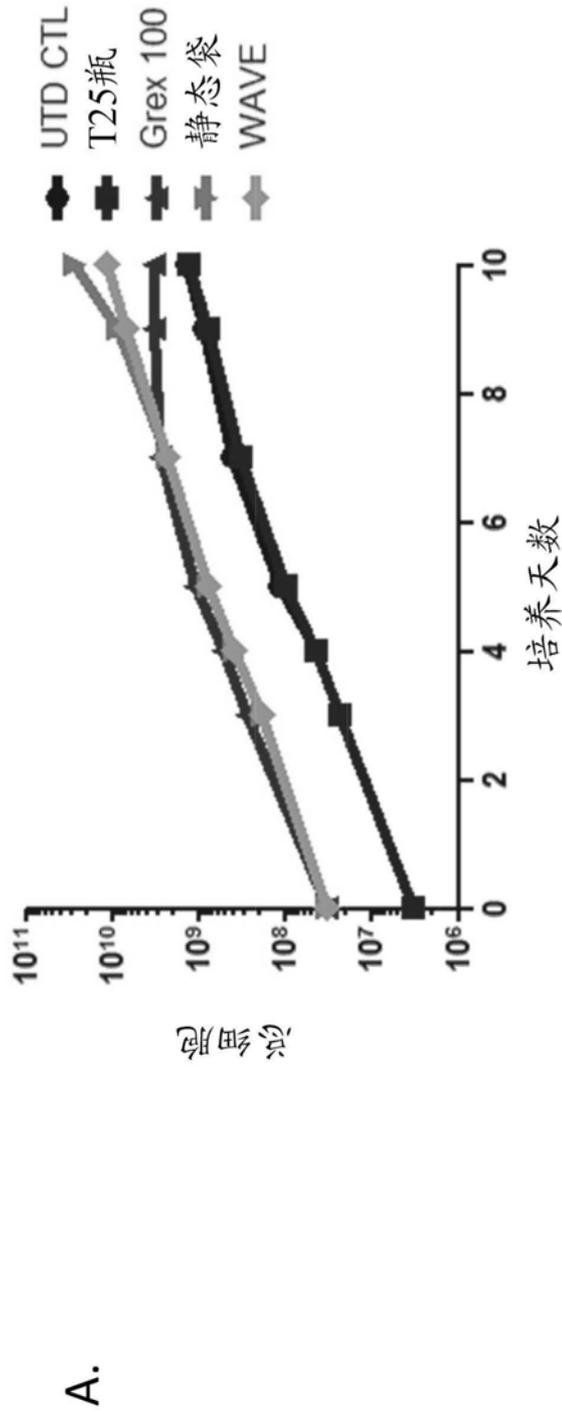


图15

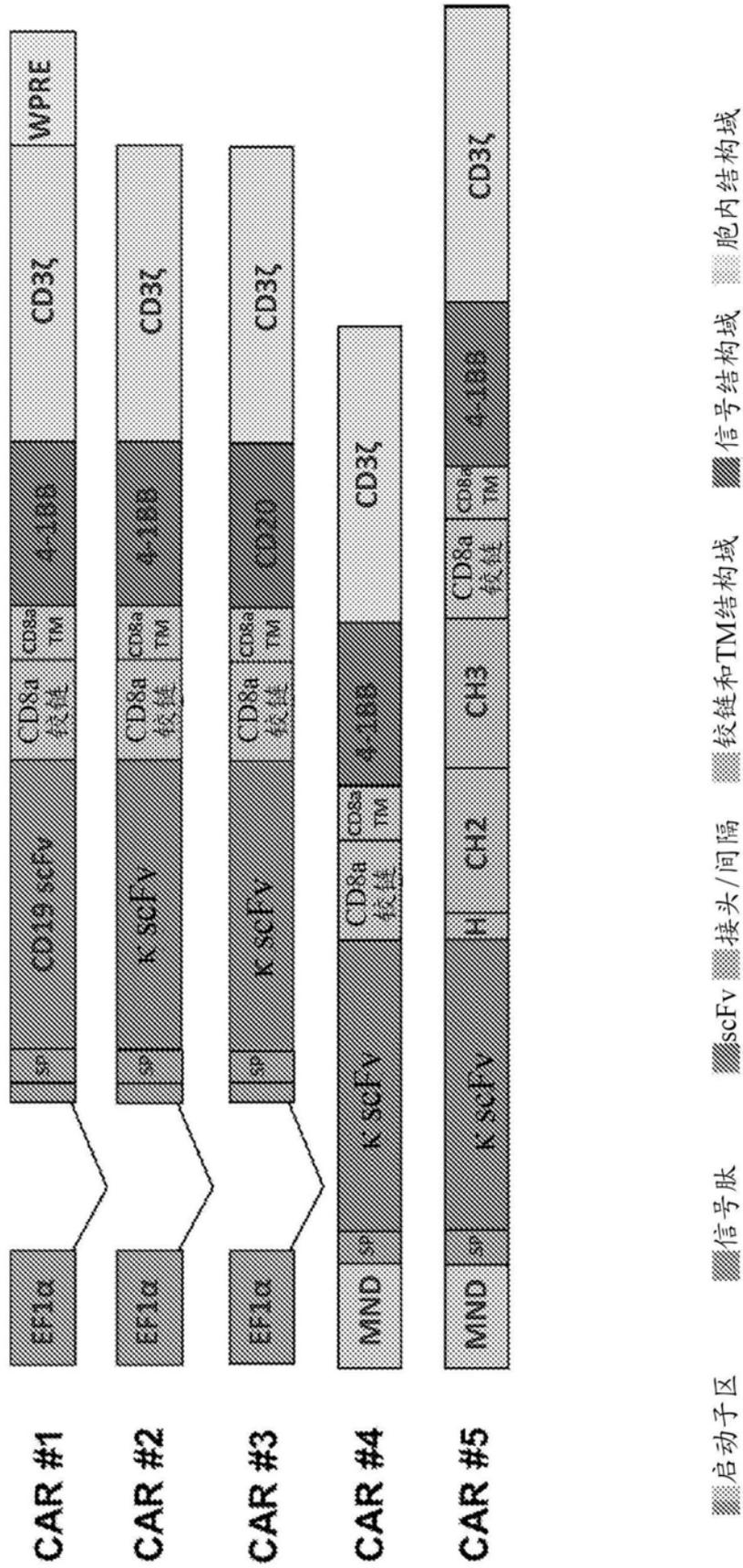


图16

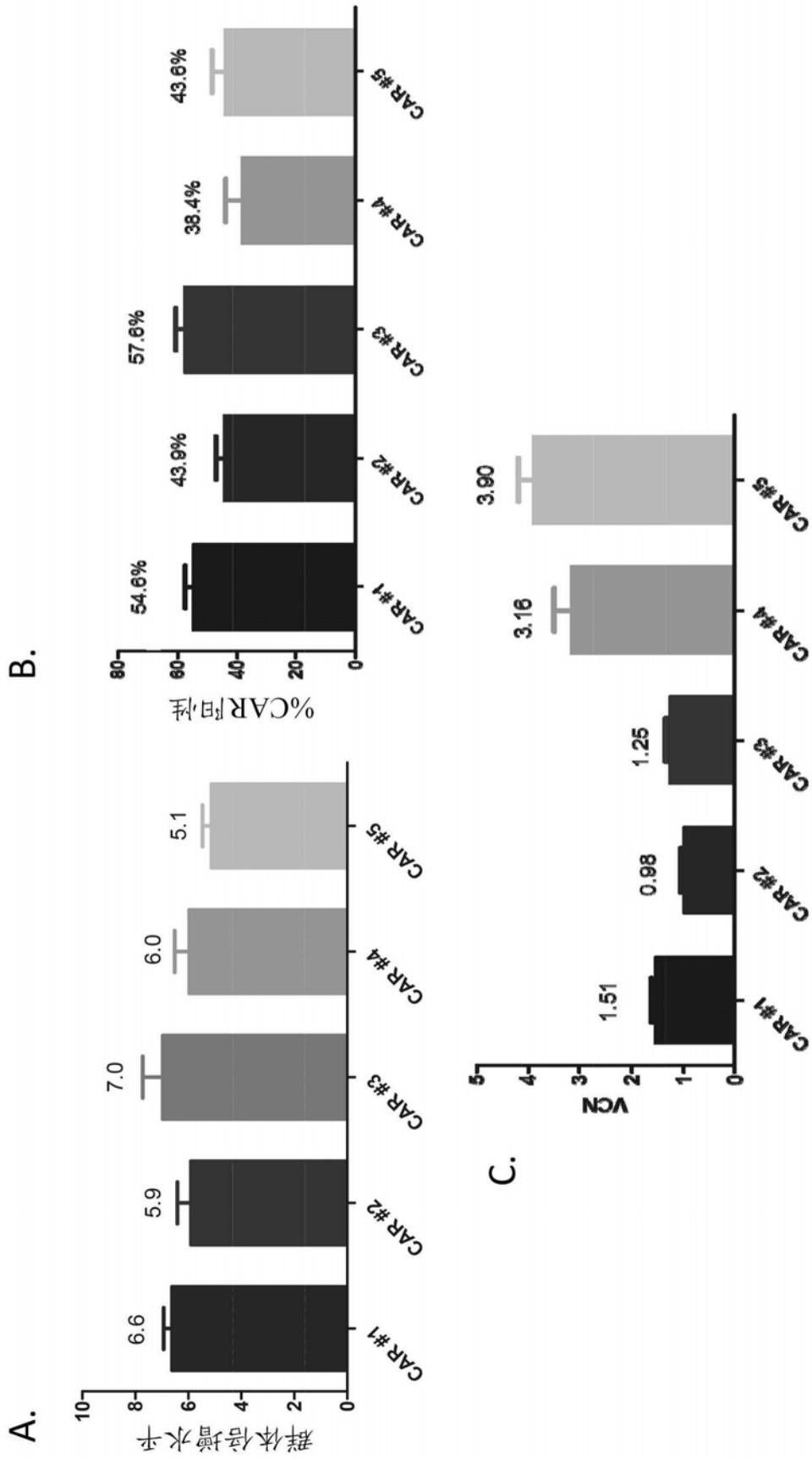


图17

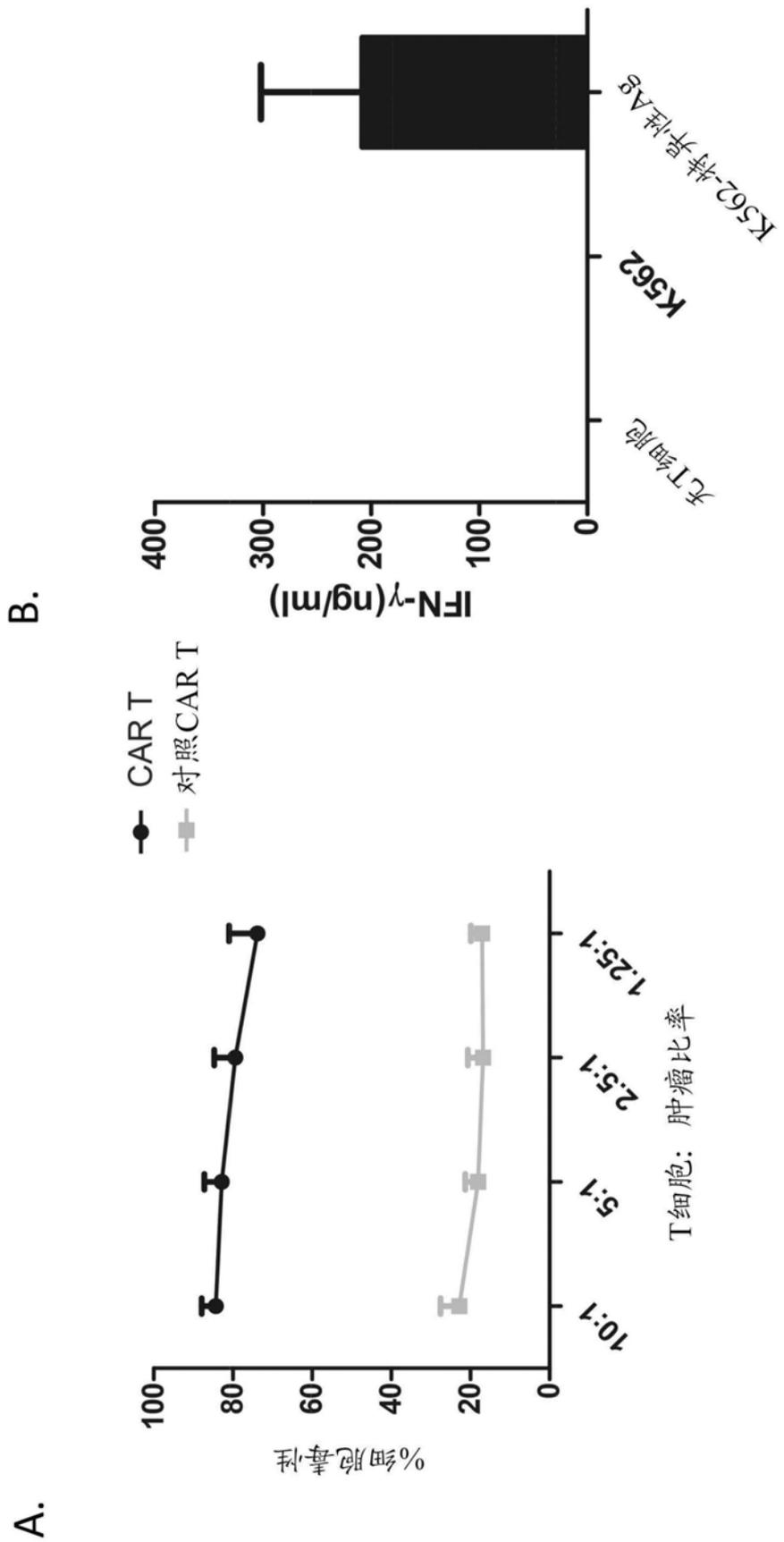


图18