



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110461335 A

(43)申请公布日 2019.11.15

(21)申请号 201880012364.8

(74)专利代理机构 深圳市百瑞专利商标事务所
(普通合伙) 44240

(22)申请日 2018.02.16

代理人 金辉

(30)优先权数据

62/460,612 2017.02.17 US

62/582,270 2017.11.06 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.08.16

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/000050 2018.02.16

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/151836 EN 2018.08.23

(71)申请人 弗雷德哈钦森癌症研究中心

地址 美国华盛顿州

(72)发明人 S·R·里德尔 D·格林 T·希尔

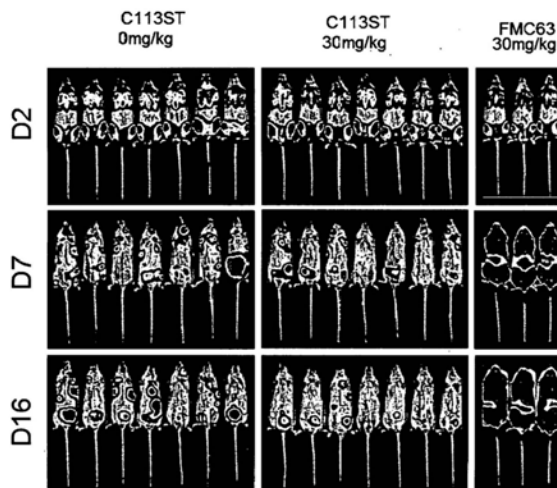
权利要求书4页 说明书33页
序列表12页 附图50页

(54)发明名称

用于治疗BCMA相关癌症和自身免疫性失调的联合疗法

(57)摘要

本发明涉及使用BCMA特异性结合分子(例如BCMA特异性嵌合抗原受体或抗体)与 γ -分泌酶抑制剂联用的方法,其可以同时或顺序进行,以治疗或预防B细胞相关的增殖性疾病,例如癌症或自身免疫疾病等。与 γ -分泌酶抑制剂联用的BCMA特异性结合分子可用于例如过继免疫疗法。



1. 一种方法, 治疗

(i) 增殖性疾病或失调, 例如癌症和/或

(ii) 自身免疫疾病或失调,

在患有或怀疑患有与BCMA表达相关的疾病或失调的受试者中, 包括给予受试者治疗有效量的BCMA特异性结合蛋白和治疗有效量的 γ -分泌酶抑制剂。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中BCMA特异性结合蛋白是BCMA特异性抗体或其抗原结合部分、嵌合抗原受体(CAR)或标记的嵌合抗原受体分子(T-ChARM)。

3. 根据权利要求2所述的方法, 其中BCMA特异性结合蛋白是人的或人源化的。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法, 其中所述BCMA特异性结合蛋白包含BCMA特异性scFv、BCMA特异性scTCR或BCMA配体或其结合部分。

5. 根据权利要求4所述的方法, 其中结合BCMA特异性结合蛋白是包含基于BCMA抗体J22.0-xi、J22.9-xi、J6M0、J6M1、J6M2、J9M0、J9M1、J9M2、11D5-3、CA8、A7D12.2、C11D5.3、C12A3.2、C13F12.1、13C2、17A5、83A10、13A4、13D2、14B11、14E1、29B11、29F3、13A7、CA7、S307118G03、SG1、S332121F02、S332126E04、S322110D07、S336105A07、S335115G01、S335122F05、ET140-3、ET140-24、ET140-37、ET140-40、ET140-54、TBL-CLN1、C4.E2.1、Vicky-1、pSCHLI333、pSCHLI372或pSCHLI373的重链和轻链可变区的scFv。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法, 其中所述BCMA特异性结合蛋白是嵌合抗原受体, 其包含置于胞外组分和胞内组分之间的疏水部分, 其中所述胞外组分包含BCMA特异性结合蛋白, 所述BCMA特异性结合蛋白包含(a)来自BCMA抗体J22.0-xi、J22.9-xi、J6M0、11D5-3、CA8、A7D12.2、C11D5.3、C12A3.2、C13F12.1、13C2、17A5、83A10、13A4、13D2、14B11、14E1、29B11、29F3、13A7、CA7、SG1、S307118G03、S332121F02、S332126E04、S322110D07、S336105A07、S335115G01、S335122F05、ET140-3、ET140-24、ET140-37、ET140-40、ET140-54、TBL-CLN1、C4.E2.1、Vicky-1、pSCHLI333、pSCHLI372或pSCHLI373的BCMA特异性抗原结合部分; 或(b)基于或衍生自BAFF或APRIL的BCMA配体或其结合部分。

7. 根据权利要求6所述的方法, 其中所述疏水部分是跨膜结构域。

8. 根据权利要求7所述的方法, 其中跨膜结构域是CD4、CD8、CD28或CD27跨膜结构域。

9. 根据权利要求6至8中任一项所述的方法, 其中所述胞内组分包含效应子结构域或其功能部分、共刺激结构域或其功能部分、或其任何组合。

10. 根据权利要求9所述的方法, 其中所述胞内组分包含4-1BB(CD137)、CD3 ϵ 、CD3 δ 、CD3 ζ 、CD25、CD27、CD28、CD79A、CD79B、CARD11、DAP10、FcR α 、FcR β 、FcR γ 、Fyn、HVEM、ICOS、Lck、LAG3、LAT、LRP、NKG2D、NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3、NOTCH4、OX40(CD134)、ROR2、Ryk、SLAMF1、Slp76、pT α 、TCR α 、TCR β 、TRIM、Zap70、PTCH2或其功能部分, 或其任何组合。

11. 根据权利要求9或10所述的方法, 其中效应子结构域包含CD3 ζ 或其功能部分。

12. 根据权利要求6-11中任一项所述的方法, 其中所述胞内组分包含选自CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40(CD134)的共刺激结构域或其功能部分, 或其任何组合。

13. 根据权利要求6-12中任一项所述的方法, 其中所述效应子结构域或效应子部分包含CD3 ζ 或其功能部分、以及4-1BB(CD137)、CD27、CD28和OX40(CD134)的一个或多个共刺激结构域或其功能部分。

14. 根据权利要求6-13中任一项所述的方法, 其中所述胞内组分包含(a)4-1BB或其功

能部分和CD3 ζ , (b) CD27或其功能部分和CD3 ζ , (c) CD28或其功能部分和CD3 ζ , (d) OX40或其功能部分和CD3 ζ , (e) CD28或其功能部分、4-1BB或其功能部分和CD3 ζ , (f) OX40或其功能部分、4-1BB或其功能部分和CD3 ζ , 或 (g) CD28或其功能部分、OX40或其功能部分和CD3 ζ 。

15. 根据权利要求6-14中任一项所述的方法, 其中所述胞外组分包含置于BCMA特异性结合蛋白和疏水部分之间的免疫球蛋白铰链区、CH2结构域和CH3结构域、CH3结构域、或其任何组合。

16. 根据权利要求15所述的方法, 其中免疫球蛋白铰链区是IgG1铰链区。

17. 根据权利要求15或16所述的方法, 其中CH2结构域是IgG1 CH2结构域, CH3结构域是IgG1 CH3结构域。

18. 根据权利要求1-17中任一项所述的方法, 其中所述BCMA特异性结合蛋白由外源多核苷酸编码并在宿主细胞中表达。

19. 根据权利要求18所述的方法, 其中宿主细胞是人免疫系统细胞。

20. 根据权利要求19所述的方法, 其中人免疫系统细胞是CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、CD4⁻CD8⁻双阴性T细胞、 γ δ T细胞、天然杀伤细胞、树突细胞、或其任何组合。

21. 根据权利要求20所述的表达载体, 其中所述人免疫系统细胞是T细胞, 所述T细胞是幼稚T细胞、中枢记忆T细胞、效应记忆T细胞、大量T细胞或其任何组合。

22. 根据权利要求1至21中任一项所述的方法, 其中所述 γ -分泌酶抑制剂是avagacestat、DAPT、BMS906024、BMS-986115、MK-0752、PF03084014、R04929097或Y0-01027。

23. 根据权利要求22所述的方法, 其中 γ -分泌酶抑制剂是呆蛋白特异性结合蛋白。

24. 根据权利要求23所述的方法, 其中所述呆蛋白特异性结合蛋白是scFvG9、抗体A5226A、抗体2H6或抗体10C11。

25. 根据权利要求1至24中任一项所述的方法, 其中所述BCMA特异性结合蛋白包括: 包含SEQ ID NO:14-16中任一个的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3的可变结构域, 和包含SEQ ID NO:17-21中任一个的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3的可变结构域。

26. 根据权利要求1至25中任一项所述的方法, 其中所述方法还包括在BCMA特异性结合蛋白和 γ -分泌酶抑制剂之前或同时用免疫抑制方案预调节受试者。

27. 根据权利要求26所述的方法, 其中所述免疫抑制方案是非清髓性治疗或清髓性治疗。

28. 根据权利要求27所述的方法, 其中所述非清髓治疗包括环磷酰胺或环磷酰胺与氟达拉滨联用。

29. 根据权利要求1至28中任一项所述的方法, 其中顺序给予BCMA特异性结合蛋白和 γ -分泌酶抑制剂。

30. 根据权利要求1至28中任一项所述的方法, 其中同时给予BCMA特异性结合蛋白和 γ -分泌酶抑制剂。

31. 根据权利要求30的方法, 其中将BCMA特异性结合蛋白和 γ -分泌酶抑制剂配制在一起。

32. 根据权利要求1至31中任一项所述的方法, 其中肠胃外给予BCMA特异性结合蛋白, 口服给予 γ -分泌酶抑制剂。

33. 根据权利要求1至32中任一项所述的方法, 其中所述增殖性疾病或失调是血液学癌

症或实体癌症。

34. 根据权利要求33所述的方法,其中所述血液学癌症选自多发性骨髓瘤、浆细胞瘤、浆细胞白血病、Waldenström巨球蛋白血症、B细胞淋巴瘤和淋巴浆细胞淋巴瘤组成的组。

35. 根据权利要求33所述的方法,其中所述实体癌症是乳腺的腺癌或肺的支气管癌。

36. 根据权利要求1至32中任一项所述的方法,其中所述自身免疫疾病选自有关节炎、类风湿性关节炎、幼年类风湿性关节炎、骨关节炎、多软骨炎、银屑病关节炎、银屑病、皮炎、多发性肌炎/皮肌炎、包涵体肌炎、炎性肌炎、中毒性表皮坏死松解症、系统性硬皮病和硬化症、CREST综合征、炎症性肠病疾病、克罗恩病、溃疡性结肠炎、呼吸窘迫综合征、成人呼吸窘迫综合征(ARDS)、脑膜炎、脑炎、葡萄膜炎、结肠炎、肾小球肾炎、过敏性病况、湿疹、哮喘、涉及T细胞浸润和慢性炎症反应的病况、动脉粥样硬化、自身免疫性心肌炎、白细胞粘附缺陷、系统性红斑狼疮(SLE)、亚急性皮肤红斑狼疮、盘状红斑狼疮、狼疮性脊髓炎、狼疮性脑炎、青少年糖尿病、多发性硬化、过敏性脑脊髓炎、视神经脊髓炎、风湿热、Sydenham舞蹈病、细胞因子和T淋巴细胞介导的与急性和迟发性过敏反应相关的免疫应答、结核病、结节病、肉芽肿病包括韦格纳肉芽肿病和Churg-Strauss病、粒细胞缺乏症、血管炎(包括过敏性血管炎/脉管炎、ANCA和类风湿性血管炎)、再生障碍性贫血、Diamond Blackfan贫血、免疫性溶血性贫血包括自身免疫性溶血性贫血(AIHA)、恶性贫血、纯红细胞再生障碍(PRCA)、因子VIII缺乏、血友病A、自身免疫性中性粒细胞减少症、全血细胞减少症、白细胞减少症、涉及白细胞渗出的疾病、中枢神经系统(CNS)炎性失调、多器官损伤综合征、重症肌无力、抗原-抗体复合物介导的疾病、抗肾小球基底膜疾病、抗磷脂抗体综合征、过敏性神经炎、Behcet病、Castleman综合征、Goodpasture综合征、Lambert-Eaton肌无力综合征、Reynaud综合征、Sjorgen综合征、Stevens-Johnson综合征、实体器官移植排斥反应、移植物抗宿主病(GVHD)、大疱性类天疱疮、天疱疮、自身免疫性多发性内分泌病、血清阴性脊柱关节病、Reiter病、僵硬综合征、巨细胞动脉炎、免疫复合性肾炎、IgA肾病、IgM多发性神经病或IgM介导的神经病变、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、血栓性血小板减少性紫癜(TTP)、过敏性紫癜、自身免疫性血小板减少症、睾丸和卵巢自身免疫性疾病包括自身免疫性睾丸炎和卵巢炎、原发性甲状腺功能减退症;自身免疫性内分泌疾病包括自身免疫性甲状腺炎、慢性甲状腺炎(桥本氏甲状腺炎)、亚急性甲状腺炎、特发性甲状腺功能减退症、艾迪生病、格雷夫斯病、自身免疫性多腺体综合征(或多腺内分泌综合征)、I型糖尿病也称为胰岛素依赖型糖尿病(IDDM)和Sheehan综合征;自身免疫性肝炎、淋巴间质性肺炎(HIV)、闭塞性细支气管炎(非移植)、非特异性间质性肺炎(NSIP)、格林-巴利综合征、大血管炎(包括风湿性多肌痛和巨细胞(大动脉)动脉炎)、中血管血管炎(包括川崎病和结节性多动脉炎)、结节性多动脉炎(PAN)强直性脊柱炎、伯格氏病(IgA肾病)、急进性肾小球肾炎、原发性胆汁性肝硬化、腹腔口炎性腹泻(麸质肠病)、冷球蛋白血症、与肝炎相关的冷球蛋白血症、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、冠状动脉疾病、家族性地中海热、显微镜下多血管炎、Cogan综合征、Whiskott-Aldrich综合征和血栓闭塞性脉管炎组成的组。

37. 一种用于治疗血液学和/或自身免疫疾病或失调的试剂盒,其包含(a)单位剂量的BCMA特异性结合蛋白,和(b)单位剂量的 γ -分泌酶抑制剂。

38. 根据权利要求37所述的试剂盒,还包含CD20特异性结合蛋白,例如利妥昔单抗、奥

法木单抗、ocrelizumab;CD19特异性结合蛋白;CD45特异性结合蛋白;CD38特异性结合蛋白;细胞因子;趋化因子;生长因子;化学治疗剂;或放射治疗剂。

39. 根据权利要求6-36中任一项所述的方法,其中所述嵌合抗原受体包含T-ChARM,并且其中所述T-ChARM的胞外结构域包含Strep标签。

40. 根据权利要求39所述的方法,其中T-ChARM的胞外结构域包含两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个或九个标签盒。

41. 根据权利要求1-40中任一项所述的方法,其中在第一次给予BCMA特异性结合蛋白后,至少向受试者给予所述 γ -分泌酶抑制剂一次。

42. 根据权利要求41所述的方法,其中在第一次给予BCMA特异性结合蛋白后,给予所述 γ -分泌酶抑制剂至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少15、至少20、至少25、至少30、至少35、至少40、至少45、或至少50次。

43. 根据权利要求1-42中任一项所述的方法,其中 γ -分泌酶抑制剂以约30mg/kg的浓度给予。

44. 根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述BCMA特异性结合蛋白包含与细胞毒剂偶联的抗体或其抗原结合部分。

45. 根据权利要求1-5或44中任一项所述的方法,其中所述BCMA特异性结合蛋白是多特异性的。

46. 根据权利要求45所述的方法,其中BCMA特异性结合蛋白是双特异性的。

用于治疗BCMA相关癌症和自身免疫性失调的联合疗法

[0001] 政府利益声明

[0002] 本发明是在国立卫生研究院授予的CA136551的政府支持下完成的。政府拥有本发明的某些权利。

[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以代替纸质副本,并且通过引用结合到本说明书中。包含序列表的文本文件的名称是360056_445WO_SEQUENCE_LISTING.txt。该文本文件为14.4KB,创建于2018年2月16日,并通过EFS-Web以电子方式提交。

背景技术

[0005] 人体免疫系统通常保护身体免受外来物质和病原体的侵害。B淋巴细胞,也称为B细胞和免疫系统的组分,产生与外来物质或病原体结合并在某些情况下介导其破坏的抗体。然而,在某些情况下,免疫系统可能失调并导致涉及B细胞不受控制的增殖的疾病,例如癌症、自身免疫疾病和炎性疾病。

[0006] 成熟B细胞及其分化后代可通过其细胞表面的分子鉴定,如B细胞成熟抗原(BCMA,也称为肿瘤坏死因子受体超家族成员17(TNFRSF17)、TNFRSF13A和CD269),其表达于浆细胞和一些成熟B细胞。已显示BCMA特异性结合B细胞活化因子(BAFF,也称为TNFSF13B、TALL-1和CD257)和增殖诱导配体(APRIL,也称为TNFSF13、TALL-2和CD256),可导致NF- κ B激活。BCMA靶向疗法,包括过继转移BCMA特异性嵌合抗原受体(CAR)修饰的T细胞、裸BCMA特异性抗体或与治疗部分缀合的BCMA特异性抗体(抗体药物缀合物、ADC,例如放射性标记)的给药,可以用于治疗某些类型的B细胞恶性肿瘤,例如多发性骨髓瘤,但可能通过在肿瘤细胞表面上表达的BCMA分子的数量和/或循环中可溶性BCMA的存在来限制功效。由于与肿瘤细胞表面上存在的BCMA的不充分结合,癌细胞上的低BCMA表面表达或可溶性BCMA可以限制和阻止治疗剂的功效。用抗体,抗体药物缀合物或嵌合抗原受体T细胞靶向的肿瘤细胞上的低水平的其他靶分子(例如,CD19、CD20)已经显示出限制这些疗法的功效,并且使得表达低水平靶分子而逃避消除的癌细胞成为可能。在BCMA的情况下,分子的胞外部分通过伽马-分泌酶(γ -分泌酶)的作用从细胞表面切割并脱落, γ -分泌酶是参与蛋白质切割的膜定位的细胞酶。这种切割降低了表达该分子的骨髓瘤细胞等细胞上BCMA的密度,导致某些自身免疫性疾病(如系统性红斑狼疮)和癌症(如多发性骨髓瘤)患者血清中可溶性BCMA(sBCMA)水平升高。

[0007] 目前,在免疫治疗领域仍然需要用于更有效地治疗自身免疫疾病和癌症的替代或改进的组合物和方法。

附图说明

[0008] 图1A-1P显示了本发明的示例性嵌合抗原受体(CAR)分子的设计和测试。

[0009] (A) 具有胞外组分的示例性CAR的插图,所述胞外组分包含衍生自A7D12.2抗体(“A7”)或C11D5.3抗体(“C11”)的BCMA特异性scFv和间隔区(包括IgG4铰链区)、疏水部分

(包括CD28跨膜结构域)、和包括CD3 ζ 效应子结构域和41BB共刺激结构域的胞内组分。构建scFv,其中V_H区的C末端连接(“G4S”可变区接头(SEQ ID NO:30))至V_L区的N末端(“HL”方向)或V_L区的C末端连接到V_H区的N末端(“LH”方向)。

[0010] (B) 流式细胞术数据(羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)染色),其显示响应于表达BCMA的肿瘤细胞,表达图1A中所示的CAR的人T细胞和的不含CAR的对照T细胞的增殖。

[0011] (C) 当体外与所示BCMA⁻(K562)或BCMA⁺(K562BCMA、U266、MM1.S)肿瘤细胞系培养时,图1B中所示的CAR转导的T细胞产生的细胞因子(IFN γ)。

[0012] (D) BCMA CAR-T细胞对所示靶细胞系的特异性裂解。

[0013] (E) 本发明的两种示例性CAR的说明,其中间隔区(间隔+)可包括标签盒、接头模块、铰链、间隔氨基酸及其任何组合。如果CAR在间隔区中含有一个或多个标记,则它将称为如本文所述的T-ChARM。上面的CAR包含胞外组分(包含BCMA特异性scFv,间隔区可选地包含其他元件,例如标签或接头)、疏水部分(包含CD28跨膜结构域)和胞内组分(包含CD3 ζ 效应子结构域和4-1BB共刺激结构域)。下面的CAR含有胞外组分(包括BCMA特异性scFv和间隔区,间隔区可选地含有其他元件,例如标签或接头)、疏水部分(包括CD28跨膜结构域)和胞内组分(包括CD3 ζ 效应子结构域和CD28共刺激结构域)。两种BCMA特异性CAR/T-ChARM构建体都含有用于转导的基因标志,基因标志包含截短的人EGFR(EGFRt),通过自切割明脉扁刺蛾病毒2A(Thosaaasigna virus 2A,T2A)肽序列与BCMA特异性CAR/T-ChARM构建体分离。也可以使用其他已知的自切割肽,例如猪捷申病毒21A(P2A)、马鼻炎病毒(ERAV)2A(E2A)和口蹄疫病毒(FMDV)2A(F2A)。

[0014] (F) 具有不同长度间隔区的示例性CAR/T-ChARM构建体。sh=12氨基酸短间隔;2ST=48个氨基酸间隔,带有两个Strep标签盒;3ST=66个氨基酸间隔,带有三个Strep标签盒;2ST Int=157个氨基酸中长度间隔,带有两个Strep标签盒和Lo=228氨基酸间隔长间隔。短和长间隔可选地含有标签盒,例如Strep标签。

[0015] (G) 具有C11或A7 HL scFv并具有不同间隔区(可选地包括STII标签)的示例性CAR/T-ChARM构建体的附加说明。

[0016] (H) 通过用羧基荧光素(CFSE)标记T细胞、将CAR-T细胞或对照未转导的CFSE标记T细胞与转导有编码全长BCMA(K562/BCMA)的多核苷酸的K562细胞培养,并使用流式细胞术测量每个细胞分裂的CFSE稀释度,来测量用BCMA特异性CAR修饰的人T细胞识别BCMA和增殖的能力。CFSE标记的含有具有不同的间隔长度的不同的BCMA特异性CAR的T细胞,与K562/BCMA细胞共培养后稀释了CFSE,但对照未转导的T细胞(UT)没有。含有2个ST或更长间隔的CAR-T细胞比表达短间隔的CAR-T细胞增殖更好。

[0017] (I、J) 响应于BCMA表达U266和8266骨髓瘤细胞,具有不同间隔长度的抗BCMA CAR T细胞释放的细胞因子(IFN- γ , I; IL-2, J)。

[0018] (K) 分离和扩增后,用抗BCMA C11T-ChARM或BCMA-2 CAR构建体转导的CD8⁺T细胞上的细胞表面EGFRt和STII表达。

[0019] (L、M) 经工程化以表达本发明的C11T-ChARM的人CD4(上图)T细胞和CD8(下图)T细胞或先前公开的抗BCMA CAR(“BCMA-2”;参见Carpenter等,Clin.Cancer Res.19:2048,2013)释放的细胞因子(IFN γ , L; IL-2, M),所述C11T-ChARM包括41BB共刺激结构域或CD28共刺激结构域。

[0020] (N) 当与所示BCMA表达细胞系共培养时,工程化以表达所公开的C11T-ChARM或BCMA-2 CAR的人T细胞的增殖。

[0021] (O) 以所示的E:T比率通过CD8T细胞裂解K562 BCMA阴性细胞,所述CD8T细胞经工程化以表达本发明的C11T-ChARM(圆圈=41BB共刺激结构域,方形=CD28共刺激结构域)或BCMA-2 CAR(三角形)。

[0022] (P) 通过图10中所示的工程化CD8T细胞以各种E:T比率(x轴)对转导以表达BCMA的K562细胞的裂解。

[0023] 图2A-2Q显示培养物中多发性骨髓瘤(MM)细胞产生的BCMA和PD-L1以及可溶性BCMA、表面结合的BCMA和表面结合的PD-L1对抗BCMA T-ChARM-T细胞识别肿瘤细胞并产生IFN γ 能力的影响。

[0024] (A) 洗涤U266骨髓瘤细胞并在培养基中铺板1、3、5和24小时。收获培养基上清液并通过ELISA测定可溶性BCMA。数据显示上清液中可溶性BCMA(sBCMA)水平随时间增加。

[0025] (B) 通过ELISA测量的,显示参考MM细胞(RPMI 8226)或具有高(Pt.1)、中(Pt.2)或低/阴性表达(Pt.3)的示例性患者原代MM细胞的BCMA表达的直方图(黑色=抗BCMA抗体;灰色线=同种型对照)。

[0026] (C) 显示在MM细胞中具有高、中、或低/阴性BCMA表达的骨髓瘤患者(n=19)的百分比的图表。

[0027] (D) 抗BCMA C11 T-ChARM⁺CD8⁺T细胞响应于具有高(左,n=5)或低(右,n=4)BCMA表达(24小时,2:1)的患者MM细胞的刺激而产生IFN- γ 。(以2:1的E:T持续24h(ELISA))。使用未配对的双尾T检验测试显著性,条形代表平均IFN- γ 产量+SEM。

[0028] (E) 直方图显示通过ELISA测量的RPMI 8226骨髓瘤细胞(最左图)和来自具有高、低/阴性或中PD-L1表达的3名患者的原代MM细胞的PD-L1表达(对角阴影=用抗PD-L1抗体染色;空直方图=同种型对照)。

[0029] (F) 显示在MM细胞中具有高、中或低/阴性PD-L1表达的患者(n=19)的百分比的图表。

[0030] (G) 本发明的抗BCMA C11T-ChARM⁺CD8⁺细胞响应于具有高(左,n=4)或低(右,n=5)PD-L1表达的患者MM细胞产生的IFN γ (以2:1的E:T持续24小时(ELISA))。使用未配对的双尾T检验测试显著性,条形代表平均IFN- γ 产量+SEM。

[0031] (H) 在外源可溶性BCMA存在下,BCMA特异性T-ChARM T细胞产生的IFN- γ 。将sBCMA添加到表达BCMA特异性T-ChARM的T细胞和用编码全长BCMA(K562/BCMA⁺)的多核苷酸转导的K562细胞的共培养物中。如通过释放到培养基上清液中的IFN γ 所测量的,存在BCMA特异性T-ChARM T细胞效应子功能的剂量依赖性抑制。

[0032] (I) 来自另一剂量滴定实验的数据,显示sBCMA对识别K562 BCMA⁺细胞的BCMA特异性T-ChARM T细胞产生IFN- γ 的影响,其中包括以另一个更高浓度将sBCMA添加到培养物中(5000ng/mL)。

[0033] (J) 体外培养的所示MM细胞脱落的BCMA。

[0034] (K) 在具有较低(<2%CD138⁺细胞)或较高(>2%CD138⁺细胞)疾病负荷的患者的骨髓(BM)血清中测量的sBCMA。

[0035] (L) 与本发明的C113ST-ChARM T细胞结合的sBCMA。将T细胞与所示水平的重组

sBCMA一起温育(图的右侧),然后用与APC缀合的BCMA-Fc融合染色。

[0036] (M) 显示C113ST T-ChARM和FMC63 CAR-T细胞的表面染色(APC缀合的BCMA-Fc和抗EGFRt抗体)和CD4表达的流式细胞术数据。

[0037] (N) 显示表达本发明的C113ST-ChARM(“C113ST”)的T细胞或对照抗CD19 CAR(“FMC632”)的IFN- γ 产生(y轴)和CD4表达(x轴)的流式细胞术数据,其与靶标表达K562细胞共培养并给予BCMA-Fc融合蛋白(左图:0ng/ml BCMA-Fc;右图:1000ng/ml BCMA-Fc)。

[0038] (O) 剂量滴定显示CART细胞响应靶细胞系释放IFN- γ ,如存在或不存在外源重组BCMA(BCMA-Fc融合)情况所示。FMC63(抗CD19)与K562 CD19+(对照;向下三角形),C113ST T-ChARM T细胞与RPMI 8226(向上三角形),U266(正方形)和K562 BCMA+细胞(圆形)。数据代表2个独立实验。条形代表平均值 \pm SEM。P值= <0.05 ,通过单因素方差分析和后测试确定。MFI=平均荧光强度。

[0039] (P) 图20中所示的T细胞与所示抗原表达细胞共培养并且存在或不存在BCMA-Fc(x-轴)时的IFN- γ 产生(归一化平均荧光强度,MFI)。

[0040] (Q) 在不同浓度的重组BCMA下,E:T比率为10:1,用4小时CRA分析CD8⁺C113ST T-ChARM T细胞对K562 BCMA⁺靶细胞的细胞溶解活性和FMC63 CAR-T细胞对K562CD19⁺靶细胞的细胞溶解活性。数据代表2个独立实验。条形代表平均值 \pm SEM。P值= <0.05 ,通过单因素方差分析和后测试确定。MFI=平均荧光强度。

[0041] 图3A-3R显示 γ -分泌酶抑制剂(GSI)R04929097对骨髓瘤细胞系或原发性骨髓瘤细胞上细胞表面BCMA和其他细胞表面分子水平的影响。

[0042] (A) 在骨髓瘤细胞系与浓度范围为0 μ M(DMSO对照)至1.0 μ M的GSI R04929097温育之前和之后5小时(见图),在4个骨髓瘤细胞系(8226、U266B1、MM1.R、H929)上通过流式细胞术用抗BCMA单克隆抗体测定细胞表面BCMA。

[0043] (B) 用所示浓度的R04929097培养的MM.1R细胞的表面BCMA表达;与同种型对照(灰线)相比,用抗BCMA抗体染色(黑线)。

[0044] (C) 当用所示浓度的R04929097培养时,MM细胞系表面BCMA表达的倍数变化;相对于相同品系的未处理的MM细胞,所示倍数变化。

[0045] (D) 用1 μ M R04929097培养的所示MM细胞随时间的表面BCMA表达的倍数变化动力学。

[0046] (E) 将U266骨髓瘤细胞在各种浓度的GSI R04929097(0.01 μ M、0.1 μ M和1.0 μ M)存在下温育1、3、5和24小时,并通过流式细胞术评估表面BCMA表达。在GSI存在下,BCMA表达以剂量依赖性方式增加,在暴露5小时后观察到峰值增加。

[0047] (F) 在1 μ M GSI中随时间培养的细胞系(MM1R=三角形、U266=平方、8226=圆形)表面BCMA表达的倍数变化。GSI每两天更换一半培养基。BCMA的倍数变化定义为处理(MFIBCMA-MFI_{iso})/对照(MFIBCMA-MFI_{iso})。数据代表至少2次独立实验。

[0048] (G、H) 在所示浓度的R04929097存在下培养的MM细胞系细胞中sBCMA的培养物上清液浓度。

[0049] (I) 洗涤U266骨髓瘤细胞并在各种浓度的GSI R04929097(0.01 μ M、0.1 μ M和1.0 μ M)存在下铺板于培养基中。在1、3、5和24小时后收获培养基上清液,并通过ELISA测定可溶性BCMA(sBCMA)。数据显示,当GSI以至少约0.01 μ M的浓度存在时,从肿瘤细胞释放到上清液中

的BCMA的量随时间减少。

[0050] (J、K) 与持续存在GSI的培养物 (GSI+/-) 相比,从骨髓瘤细胞系培养物 (GSI+/-) 中除去1 μ M GSI后,BCMA表达 (J) 和上清液sBCMA浓度 (K) 在不同时间点的倍数变化。

[0051] (L) 通过在1 μ M GSI中培养的细胞系的碘化丙锭染色测量的所示MM表达细胞的活力。

[0052] (M) 用所示浓度的R04929097培养的原代患者MM细胞的表面BCMA表达。如关于图3B所述进行染色。

[0053] (N) 用不同量的GSI培养4小时的原发性骨髓瘤细胞 (n=7) 上BCMA的倍数变化。原代和细胞系以 0.5×10^6 细胞/mL培养。BCMA的倍数变化定义为处理 (MFIBCMA-MFI_{iso}) /对照 (MFIBCMA-MFI_{iso})。数据代表来自不同供体的T细胞的3个独立实验。

[0054] (O、P) 与不同浓度的GSI共培养4小时的原发性骨髓瘤细胞不影响肿瘤细胞上的几种其他细胞表面分子的水平,包括CS1、CD86、PD-L1、CD80和CD38。

[0055] (Q) 在培养基中存在 (黑色) 或不存在 (灰色) 1 μ M GSI的情况下在MM1R细胞上染色各种表面标志物。同种型染色显示为开放图。

[0056] (R) 从患者骨髓样品中富集CD138+原发性骨髓瘤细胞,在各种浓度的GSI R0429097 (0.01 μ M至10 μ M) 存在下温育3小时,并通过流式细胞术评估表面BCMA表达。肿瘤细胞上的BCMA平均荧光强度 (MFI) 表示为比在没有R0429097温育的肿瘤细胞上观察到的倍数增加。观察到BCMA的剂量依赖性上调。

[0057] 图4A-4C显示当用GSI预处理骨髓瘤细胞时,BCMA特异性CAR-T细胞识别原发性骨髓瘤细胞,然后细胞因子释放增加。

[0058] (A) 通过BCMA CAR-T细胞 (BCMA特异性T-ChARM C11 3ST-CD28和BCMA特异性T-ChARM C11 3ST-41BB) 或对照CD19sh CAR (短间隔区)-T细胞与原发性人骨髓瘤肿瘤细胞共培养24小时 (单独或与不同浓度的GSI R0429097 (0.003 μ M至3.0 μ M)) 来产生IL-2。

[0059] (B) 在不同浓度的R0429097下与骨髓瘤细胞共培养的BMCA T-ChARM T细胞产生的IFN- γ 。

[0060] (C) 在与单独的培养基或含有所示浓度的GSI R0429097的培养基中的原代人骨髓瘤肿瘤细胞共培养3天后,CFSE标记的BCMA特异性T-ChARM T细胞的增殖以剂量依赖性方式增加。

[0061] 图5A-5R显示了各种浓度的GSI对CAR-T细胞活力、生长和功能活性的影响。

[0062] (A) 用或不用GSI培养 \pm 12-16小时的K562 CD19⁺和Raji细胞的CD19染色。同型对照显示为灰线。

[0063] (B) 原代人T细胞在0.01 μ M至100 μ M浓度的GSI R0429097中培养,24小时后通过台盼蓝染料排除测量活力。在任何浓度下,GSI对T细胞活力没有影响。

[0064] (C) CD19 CAR-T细胞与K562/CD19靶细胞在含有各种浓度的R0429097的培养基中共培养。如通过测量IL-2 (上图) 和IFN γ (下图) 产量而确定的,R0429097在共培养时以 $>3\mu$ M的浓度抑制CD19 CAR-T细胞效应子功能。方框显示了不抑制CAR-T细胞效应子功能的药物的相关治疗窗口。

[0065] (D) 在渐进浓度的GSI R0429097存在下,用靶细胞培养的CD19 CAR-T细胞产生的IL-2。

[0066] (E) 在渐进浓度的GSI R04929097存在下,用靶细胞(“K562 CD19”)或对照细胞(“K562 BCMA”)培养的CD19 CAR-T细胞产生的IL-2。向细胞施用指定量的GSI,然后洗涤(空条)或不洗涤(填充条)。

[0067] (F) 来自另一个实验的数据,显示在与不同浓度的GSI预温育后,与K562 BCMA+或K562 CD19+细胞过夜共培养后CD19 CAR-T细胞产生IL-2。洗涤后,将GSI加回(+ / +)或从共培养物中除去(+ / -)以评估细胞因子产生的可逆性。

[0068] (G) 在GSI R04929097存在下,通过CD19 CAR-T细胞对所示靶标或对照细胞的特异性裂解。

[0069] (H) 在存在或不存在GSI的情况下与CD19表达细胞一起培养的CD19 CAR-T细胞的增殖,或在不存在GSI的情况下与对照细胞一起培养的CD19 CAR-T细胞的增殖。用CFSE染色细胞,并通过流式细胞术测量增殖。

[0070] (I) 在所示浓度的GSI R04929097存在下,CD19 CAR-T细胞的细胞分裂数的图示。水平条的宽度表示培养物中CAR-T细胞的比率,其在实验过程中划分所示的世代数(即,5、4、3、2、1或0代)。

[0071] (J) 在不存在GSI(圆形)或存在0.5 μ M的GSI(正方形)或5 μ M的GSI(三角形)时,用CD19⁺TM LCL细胞和外源IL-2扩增CD19特异性CAR-T细胞期间的细胞计数(CD8染色)。

[0072] (K) 用CD19⁺TM扩增的CD19特异性CAR-T细胞(CD4:CD8(1:1))的细胞计数。在不存在或存在GSI的情况下,LCL细胞如图所示,但不添加外源IL-2。

[0073] (L) 用K562细胞(无抗原)、K562 CD19+细胞或Raji细胞再刺激后,GSI扩增的抗CD19 CAR CD8⁺T细胞的上清液中的IFN- γ 浓度。

[0074] (M、N) 在不存在GSI或存在0.5 μ M或5 μ M GSI的情况下用所示细胞系再刺激后,CD4:CD8抗CD19 CAR-T细胞混合物产生的IFN- γ (M)和IL-2(N)。

[0075] (O) 细胞内染色显示在不存在(0 μ M,左图)GSI R04929097或存在(1 μ M,右图)的情况下,本发明的T-ChARM T细胞与来自2名患者的原代MM细胞一起培养的IFN- γ 产量(y-轴)和CD8表达(x-轴)。

[0076] (P) 在所示浓度的R04929097(x轴)存在下,与原代MM细胞一起培养本发明的T-ChARM T细胞的IFN- γ 产量(几何平均荧光强度(gMFI))。

[0077] (Q) 在所示浓度的R04929097(x轴)存在下,与原代MM细胞一起培养的本发明T-ChARM T细胞的IFN- γ 产量(归一化MFI,y轴)。

[0078] (R) 原代MM细胞存在下,未处理(灰色阴影)或用1.0 μ M GSI R04929097处理的本发明T-ChARM T细胞的增殖。

[0079] 图6A-6C显示了GSI R04929097对多发性骨髓瘤的临床前体内模型中BCMA表达的影响。

[0080] (A) 弥散性异种移植小鼠骨髓瘤模型的实验方案。照射NSG小鼠(275rad)以促进肿瘤植入并接受人MM肿瘤细胞(5×10^6 MM.1R),然后进行GSI处理(30mg/kg)。随后,对小鼠实施安乐死,并采集血液和BM样品以确定GSI是否在体内上调了骨髓瘤细胞上的BCMA表达。

[0081] (B) 在第二次GSI给药后,在所示时间点安乐死的小鼠骨髓瘤细胞上表面BCMA表达的倍数变化。

[0082] (C) 给予R04929097后在所示时间点处死的小鼠血清中sBCMA的水平。

[0083] 图7A-7E显示了GSI R04929097在临床前小鼠MM模型中对抗BCMA CAR T细胞疗法的作用。

[0084] (A) 实验方案,其中小鼠接受辐射,随后接受人MM肿瘤细胞(表达萤火虫荧光素酶的 5×10^6 MM.1R)。20天后,在所示时间点给予小鼠GSI (30mg/kg),和在第0天给予单次次优剂量的抗BCMA T-ChARM T细胞(0.33×10^6 个细胞,1:1CD4:CD8)。始终监测生物发光(BLI)成像和存活。

[0085] (B) 在用C113ST T-ChARM T细胞(0mg/kg 0.33×10^6 细胞,1:1 CD4:CD8,左图;30mg/kg,中图)或对照FM63抗CD19 CAR T细胞(0.33×10^6 细胞,1:1 CD4:CD8,30mg/kg,右图)处理后第2天、第17天和第16天拍摄的小鼠BLI图像。

[0086] (C) 来自图8B中所示的BLI的定量发光数据。

[0087] (D) 给予T-ChARM T细胞后图8B中所示小鼠的存活百分比。

[0088] (E) (左) 来自图8B中所示的BLI的定量发光数据;(右) 给予T-ChARM T细胞后小鼠的存活百分比。

[0089] 图8显示了在存在或不存在GSI的情况下,通过对BCMA具有特异性的双特异性融合分子,结合H929 MM细胞的流式细胞术分析。还测试了不靶向BCMA的对照双特异性融合分子。

具体实施方式

[0090] 本发明提供了通过可溶形式或在细胞毒性或其他细胞上表达的B细胞成熟抗原(BCMA)特异性结合蛋白和 γ -分泌酶抑制剂(GSI)的组合使用来治疗自身免疫疾病和癌症的组合物和方法。编码这种BCMA特异性结合蛋白的多核苷酸可用于产生修饰的宿主免疫细胞(例如T细胞),用于例如过继免疫疗法。在某些方面,本发明涉及这样的疗法在需要与GSI联合治疗的受试者中的用途,后者治疗可以在过继性免疫疗法之前,同时或之后给予(即,免疫疗法,采用在细胞表面表达BCMA特异性结合蛋白的修饰免疫细胞)。本文还提供了免疫疗法,其包括联合给予GSI与BCMA特异性结合蛋白,所述BCMA特异性结合蛋白包含抗体或其抗原结合部分,其在某些实施例中可以与细胞毒性药物缀合或以其他方式偶联,例如形成抗体-药物缀合物(ADC)。有用的治疗应用包括治疗其中BCMA阳性细胞致病的受试者中的增殖性疾病或失调(例如癌症)、自身免疫疾病或衰老相关疾病或失调。

[0091] 在更详细地阐述本发明之前,提供本文中使用的某些术语的定义可能有助于理解本发明。在整个本发明中阐述了其他的定义。

[0092] 在本说明书中,任何浓度范围、百分比范围、比率范围或整数范围应理解为包括所述范围内的任何整数的值,并且在适当时,包括其分数(例如,整数的十分之一和百分之一)。除非另有说明。此外,除非另有说明,否则本文所述的与任何物理特征相关的任何数字范围,例如聚合物亚单元、尺寸或厚度,应理解为包括所述范围内的任何整数。除非另有说明,本文所用的术语“约”是指所示范围、值或结构的 $\pm 20\%$ 。应当理解,本文所用的术语“一”和“一个”是指所列举的组分中的“一个或多个”。替代方案(例如,“或”)的使用应理解为意指替代方案中的一个、两个或其任何组合。如本文所用,术语“包括”,“具有”和“包含”同义使用,其术语和变体旨在解释为非限制性的。

[0093] 此外,应当理解,本申请公开了衍生自本文所述结构和取代基的各种组合的各个

化合物或化合物组,其被本申请公开的程度如同单独阐述每种化合物或化合物组。因此,特定结构或特定取代基的选择在本发明的范围内。

[0094] 术语“基本上由.....组成”将权利要求的范围限制于指定的材料或步骤,或者实质上不影响要求保护的发明的基本特征的那些材料或步骤。例如,蛋白结构域、区域、模块或盒(例如,结合域、铰链区、接头模块、标签盒)或蛋白质(其可具有一个或多个结构域、区域、模块或盒)基本上由当结构域、区域、模块、盒或蛋白质的氨基酸序列包括延伸、缺失、突变或其组合时的特定氨基酸序列(例如,氨基或羧基末端或结构域之间的氨基酸)组成,延伸、缺失、突变组合起来,对结构域、区域、模块、盒或蛋白质的长度贡献至多20%(例如,至多15%、10%、8%、6%、5%、4%、3%、2%或1%),并没有实质性影响(即,没将活性降低50%以上,例如不超过40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%或1%)结构域、区域、模块、盒或蛋白质的活性(例如,结合蛋白或标签盒的靶标结合亲和力)。

[0095] 如本文所用,“增殖性失调”是指与正常或未患病的细胞相比过度或以其他方式异常生长或增殖。过度或异常生长包括,例如,可以快速发生的失调的生长或增殖(例如,过度增殖),或者在天然组织内(例如,骨髓内的浆细胞瘤生长)能够随时间更缓慢或逐渐地发生以及在非原于患病细胞的远端组织或身体部位内扩散/生长的失调的生长或增殖(例如,多发性骨髓瘤)。示例性增殖性失调包括肿瘤、癌症、肿瘤组织、癌、肉瘤、恶性细胞、恶性前细胞、以及非肿瘤性或非恶性增殖性失调(例如,腺瘤、纤维瘤、脂肪瘤、平滑肌瘤、血管瘤、纤维化、再狭窄)或自身免疫疾病(例如类风湿性关节炎、骨关节炎、牛皮癣、炎性肠病等)。

[0096] 如本文所用,“结合蛋白”(也称为“结合域”、“结合区”或“结合部分”)是指具有与靶分子(例如BCMA)特异性和非共价缔合、联合或组合的能力的分子,例如肽、寡肽、多肽或蛋白质。结合蛋白包括生物分子、化合物或其他感兴趣靶标的任何天然存在的、合成的、半合成的或重组产生的结合配偶体。在一些实施例中,结合蛋白来自免疫球蛋白或免疫球蛋白样分子,例如抗体或T细胞受体(TCR),其包括功能性结合域或其抗原结合片段。示例性结合蛋白包括单链抗体可变区(例如,结构域抗体、sFv、scFv、Fab)、BCMA配体(例如,BAFF、APRIL及其结合片段)、T细胞受体(TCR)的抗原结合区,例如单链TCR(scTCR)、或选择用于结合生物分子的特异性能力的合成多肽。

[0097] 如本文所用,“特异性结合”是指结合域或其融合蛋白与靶分子以亲和力或 K_a 的缔合或联合(即,特定结合相互作用的平衡缔合常数,单位 $1/M$),亲和力或 K_a 等于或大于 $10^5 M^{-1}$,而不与样品中的任何其他分子或组分显著缔合或联合。结合域(或其融合蛋白)可以分为“高亲和力”结合域(或其融合蛋白)或“低亲和力”结合域(或其融合蛋白)。“高亲和力”结合域是指具有至少 $10^7 M^{-1}$ 、至少 $10^8 M^{-1}$ 、至少 $10^9 M^{-1}$ 、至少 $10^{10} M^{-1}$ 、至少 $10^{11} M^{-1}$ 、至少 $10^{12} M^{-1}$ 、或至少 $10^{13} M^{-1}$ 的 K_a 的那些结合域。“低亲和力”结合域是指具有高达 $10^7 M^{-1}$ 、高达 $10^6 M^{-1}$ 、高达 $10^5 M^{-1}$ 的 K_a 的那些结合域。或者,亲和力可以定义成单位为 M (例如, $10^{-5} M$ 至 $10^{-13} M$)的特定结合相互作用的平衡解离常数(K_d)。在某些实施例中,结合域可具有“增强的亲和力”,其是指选择的或工程化的结合域,与靶抗原的结合比野生型(或亲本)结合结构域更强。例如,增强的亲和力可能是由于靶抗原的 K_a (平衡缔合常数)高于野生型结合域,或者是由于靶抗原的 K_d (解离常数)小于野生型结合域的 K_d (解离常数),或由于靶抗原的解离速率(K_{off})小于野生型结合域的解离速率(K_{off})。已知多种测定法用于鉴定特异性结合特定靶标的本发明的结合域,以及确定结合域或融合蛋白亲和力,例如Western blot、ELISA和Biacore® analysis

(也参见,例如,Scatchard et al.,Ann.N.Y.Acad.Sci.51:660,1949;和U.S.专利Nos.5,283,173,5,468,614,或其等同物)。

[0098] 如本文所用,“异源的”或“非内源的”或“外源的”是指非原于宿主细胞或受试者的任何基因、蛋白质、化合物、分子或活性,或者是原于宿主或宿主细胞但是已改变或突变使得结构、活性或两者在原生和突变分子之间不同的任何基因、蛋白质、化合物、分子或活性。在某些实施例中,异源、非内源或外源分子(例如,受体、配体)可能对宿主细胞或受试者不是内源的,而是编码此类分子的核酸可以通过缀合、转化、转染、电穿孔等已经添加到宿主细胞中,其中添加的核酸分子可以整合到宿主细胞基因组中或可以作为染色体外遗传物质存在(例如,作为质粒或其他自我复制载体)。术语“同源的”或“同源”是指在宿主细胞、物种或菌株中发现,或衍生自宿主细胞、物种或菌株的分子或活性。例如,编码该分子的异源或外源分子或基因可以分别与编码该分子的天然宿主或宿主细胞分子或基因同源,但可以具有改变的结构、序列、表达水平或其组合。非内源分子可以来自相同物种、不同物种或其组合。

[0099] 如本文所用,术语“内源的”或“天然的”是指通常存在于宿主或宿主细胞中的基因、蛋白质、化合物、分子或活性。

[0100] 如本文所用,“标签盒”是指附着于、融合至感兴趣的蛋白质或是感兴趣的蛋白质的一部分的独特肽序列,异源或非内源同源结合分子(例如,受体、配体、抗体、或其他结合配偶体)能够特异性结合标签盒,其中结合特性可用于检测、鉴定、分离或纯化、追踪、富集或靶向标记蛋白质或表达标记蛋白质的细胞,特别是当标记蛋白质是蛋白质或其他材料的异质群体的一部分时,或当表达标记蛋白质的细胞是异质细胞群体(例如,外周血等生物样品)的一部分时。在某些实施例中,表达标记蛋白的细胞可以与异源或非内源同源结合分子接触,并诱导生物应答,例如促进细胞活化、细胞增殖或细胞死亡。在所提供的融合蛋白中,标签盒与同源结合分子特异性结合的能力不同于或在结合域特异性结合靶分子的能力之外。标签盒通常不是抗原结合分子,例如,不是抗体或TCR或其抗原结合部分。

[0101] 如本文所用,“铰链区”或“铰链”是指(a)免疫球蛋白铰链序列(由例如上部和核心区组成)或其功能片段或变体,(b)II型C-凝集素域间(茎)区或其功能片段或变体,或(c)分化簇(CD)分子茎区或其功能变体。如本文所用,“野生型免疫球蛋白铰链区”是指在抗体重链中发现的,插入在CH1和CH2结构域之间并连接CH1和CH2结构域(对于IgG、IgA和IgD)或插入在CH1和CH3结构域(对于IgE和IgM)之间并连接CH1和CH3结构域的天然存在的上部和中间铰链氨基酸序列。在某些实施例中,铰链区是人的,并且在特定实施例中,包含人IgG铰链区。

[0102] 如本文所用,“间隔区”是指一种或多种蛋白质、多肽、寡肽、肽、结构域、区域、模块、盒、基序或其任何组合,其连接融合蛋白中的两种或更多种蛋白质、多肽、寡肽、肽、结构域、区域、模块、盒、基序或其任何组合。例如,间隔区可以提供分离或间隔功能以促进两个单链融合蛋白的相互作用,或定位一个或多个结合域,使得所得多肽结构保持对靶分子的特异性结合亲和力或维持信号传导活性(例如效应子结构域活性)或两者。在某些实施例中,间隔区可以包含“接头模块”,其是具有约2至约500个氨基酸的氨基酸序列,其可以为由接头连接的两个区域、结构域、基序、盒或模块之间的构象运动提供柔性和空间。示例性接头模块包括具有1至约10个重复的Gly_xSer_y(SEQ ID NO:31)的那些,其中x和y独立地是0至

10的整数,条件是x和y不都是0(例如(Gly₄Ser)₂(SEQ ID NO:32), (Gly₃Ser)₂(SEQ ID NO:33), Gly₂Ser或其组合诸如(Gly₃Ser)₂Gly₂Ser)(SEQ ID NO:34)。在某些其他实施例中,间隔区可具有包含一个或多个免疫球蛋白重链恒定区的接头模块,例如单独的CH3或CH2CH3。在进一步的实施例中,间隔区可包括铰链区或标签盒。每个这样的连接组分不是互斥的。例如,间隔区可以包括铰链和一个或多个接头模块,或间隔区可以包括铰链,一个或多个铰链模块,以及一个或多个标签盒。示例性间隔区的长度可以变化,例如,约5至约500个氨基酸、或约10至约350个氨基酸、或约15至约100个氨基酸、或约20至约75个氨基酸、或约25至约35个氨基酸。示例性短间隔范围为约5至约100个氨基酸(例如,12个氨基酸、15个氨基酸、48个氨基酸、50个氨基酸、66个氨基酸、70个氨基酸)、中间隔范围为约100至约200个氨基酸(例如,110个氨基酸、120个氨基酸、130个氨基酸、140个氨基酸、150个氨基酸、157个氨基酸、175个氨基酸)和长间隔范围为约200至约500个氨基酸(例如,200个氨基酸、210个氨基酸、220个氨基酸、228个氨基酸、230个氨基酸、250个氨基酸、300个氨基酸、350个氨基酸、400个氨基酸、450个氨基酸)。

[0103] 如本文所用,“疏水部分”是指具有在细胞膜中热力学稳定的三维结构的任何氨基酸序列,并且通常在约15个氨基酸至约30个氨基酸的长度范围内。疏水结构域的结构可包括 α 螺旋、 β 桶、 β 折叠、 β 螺旋或其任何组合。

[0104] 如本文所用,“效应子结构域”是融合蛋白或受体的胞内部分,其在接收适当信号时可直接或间接促进细胞中的生物或生理反应。在某些实施例中,效应子结构域是蛋白质或蛋白质复合物的一部分,其在被结合或者直接结合靶分子时接收信号,所述靶分子从效应子结构域触发信号。效应子结构域可以在其含有一个或多个信号传导结构域或基序(例如基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM))时直接促进细胞应答,并且可以通过共刺激结构域或其功能部分辅助或改善这种细胞应答。具有效应子结构域的示例性蛋白质是CD3 ζ 。在其他实施例中,效应子结构域将通过与一种或多种直接促进细胞反应的其他蛋白质缔合而间接促进细胞反应。

[0105] 本文使用的术语“共刺激结构域”是指为T细胞提供信号的信号传导部分,所述信号(除了由例如TCR/CD3复合物的CD3 ζ 链提供的初级(效应子)信号外)介导T细胞应答,包括激活、增殖、分化、细胞因子分泌等。在某些实施例中,胞内组分包含效应子结构域或其功能部分、共刺激结构域或其功能部分、或其任何组合。

[0106] “可变区接头”具体是指将重链免疫球蛋白可变区与轻链免疫球蛋白可变区连接、或连接T细胞受体V α / β 和C α / β 链(例如,V α -C α 、V β -C β 、V α -V β)或将每个V α -C α 、V β -C β 、V α -V β 对连接到铰链或疏水结构域的5至约35个氨基酸序列,其提供足以使两个亚结合域相互作用的间隔功能和柔性,从而所得单链多肽保留与抗体或T细胞受体对相同的靶分子的特异性结合亲和力。在某些实施例中,可变区接头包含约10至约30个氨基酸或约15至约25个氨基酸。在特定实施例中,可变区接头肽包含1-10个重复Gly_xSer_y,其中x和y独立地是1至5的整数(例如,Gly₄Ser(SEQ ID NO:1)、Gly₃Ser(SEQ ID NO:2)、Gly₂Ser或(Gly₃Ser)_n(Gly₄Ser)₁(SEQ ID NO:3)、(Gly₃Ser)_n(Gly₄Ser)_n(SEQ ID NO:4)或(Gly₄Ser)_n(SEQ ID NO:5),其中n是整数1、2、3、4或5),并且其中连接的可变区形成功能性结合域(例如,scFv、scTCR)。

[0107] “连接氨基酸”或“连接氨基酸残基”是指多肽的两个相邻基序、区域或结构域之间的一个或多个(例如,约2-20个)氨基酸残基,例如在结合域和相邻接头区之间、或在疏水结

构域和相邻效应子结构域之间或在连接两个基序、区域或结构域(例如,接头和相邻结合域之间和/或接头和相邻铰链之间)的接头区的一端或两端的氨基酸残基。连接氨基酸可以由融合蛋白的构建体设计产生(例如,在构建编码融合蛋白的核酸分子的过程中使用限制酶位点所产生的氨基酸残基)。

[0108] 除非本文中有不同的明确定义,否则抗体技术领域的技术人员所理解的术语均赋予本领域中获得的含义。术语“抗体”是指包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的完整抗体,以及具有或保留结合靶分子的能力的完整抗体的抗原结合部分。单克隆抗体或其抗原结合部分可以是非人的、嵌合的、人源化的或人的、优选人源化的或人的。免疫球蛋白结构和功能综述于例如Harlow et al.,Eds.,Antibodies:A Laboratory Manual,Chapter 14(Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,1988)。

[0109] 例如,术语“V_L”和“V_H”分别指抗体轻链和重链的可变结合区。可变结合区由离散的、明确定义的子区域组成,称为“互补决定区”(CDR)和“框架区”(FR)。术语“CL”是指“免疫球蛋白轻链恒定区”或“轻链恒定区”,即来自抗体轻链的恒定区。术语“CH”是指“免疫球蛋白重链恒定区”或“重链恒定区”,其进一步可分为(取决于抗体同种型)CH1、CH2和CH3(IgA、IgD、IgG),或CH1、CH2、CH3和CH4结构域(IgE、IgM)。“Fab”(片段抗原结合)是抗体的一部分,其与抗原结合并包括通过链间二硫键与轻链连接的重链的可变区和CH1。

[0110] 如本文所用,“Fc区部分”是指来自抗体的Fc片段的恒定区段(“可结晶片段”区或Fc区),其可以包括一个或多个恒定结构域,例如CH2、CH3、CH4或其任何组合。在某些实施例中,Fc区部分包括IgG、IgA或IgD抗体的CH2和CH3结构域或其任何组合,或IgM或IgE抗体的CH3和CH4结构域及其任何组合。在其他实施例中,CH2CH3或CH3CH4结构具有来自相同抗体同种型的亚区域结构域并且是人的,例如人IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE或IgM(例如,来自人IgG1的CH2CH3)。作为背景,Fc区负责免疫球蛋白的效应子功能(例如ADCC(抗体依赖性细胞介导的细胞毒性),CDC(补体依赖性细胞毒性)和补体固定)、负责与Fc受体的结合(例如CD16、CD32、FcRn)、相对于缺乏Fc区的多肽的更大体内半衰期、蛋白A结合、甚至胎盘转移(参见Capon et al.,Nature 337:525,1989)。在某些实施例中,在本发明的融合蛋白中发现的Fc区部分将能够介导这些效应子功能中的一种或多种,或者将通过例如本领域已知一种或多种突变而缺乏这些活性中的一种或多种或全部。

[0111] 另外,抗体具有通常位于Fab和Fc区之间的铰链序列(但是铰链的下部可以包括Fc区的氨基末端部分)。作为背景,免疫球蛋白铰链充当柔性间隔以允许Fab部分在空间中自由移动。与恒定区相反,铰链在结构上是多样的,在免疫球蛋白类之间甚至在亚类之间在序列和长度上都不同。例如,人IgG1铰链区是自由柔性的,这允许Fab片段围绕它们的对称轴旋转,并在以两个重链间二硫键桥中的第一个为中心的球内移动。相比之下,人IgG2铰链相对较短并且含有由四个重链间二硫键桥稳定的刚性聚脯氨酸双螺旋,这限制了柔性。人IgG3铰链与其他亚类的区别在于其独特的延伸铰链区(约为IgG1铰链的4倍),含有62个氨基酸(包括21个脯氨酸和11个半胱氨酸),形成不可弯曲的聚脯氨酸双螺旋并提供更高柔性,因为Fab片段离Fc片段相对较远。人IgG4铰链比IgG1短,但具有与IgG2相同的长度,并且其柔性介于IgG1和IgG2之间。

[0112] “T细胞受体”(TCR)是指在T细胞(或T淋巴细胞)表面上发现的分子,其与CD3缔合,通常负责识别与主要组织相容性复合物(MHC)分子结合的抗原。TCR在大多数T细胞中具有

高度可变的 α 和 β 链(也分别称为TCR α 和TCR β)的二硫键连接的异二聚体。在一小部分T细胞中,TCR由可变 γ 链和 δ 链的异二聚体组成(也分别称为TCR γ 和TCR δ)。TCR的每个链是免疫球蛋白超家族的成员,并且在C末端具有一个N末端免疫球蛋白可变结构域、一个免疫球蛋白恒定结构域、跨膜区和短细胞质尾(参见Janeway et al., Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3rd Ed., Current Biology Publications, p.4:33, 1997)。如在本发明中使用的,TCR可以来自各种动物物种,包括人、小鼠、大鼠、猫、狗、山羊、马或其他哺乳动物。TCR可以是细胞结合的(即,具有跨膜区或结构域)或可溶形式。

[0113] “主要组织相容性复合物分子”(MHC分子)是指将肽抗原递送至细胞表面的糖蛋白。MHC I类分子是异二聚体,由跨膜 α 链(具有三个 α 结构域)和非共价缔合的 β 2微球蛋白组成。MHC II类分子由两种跨膜糖蛋白 α 和 β 组成,两者都跨膜。每个链都有两个结构域。MHC I类分子将源自胞质溶胶的肽递送至细胞表面,其中肽:MHC复合物由CD8⁺T细胞识别。MHC II类分子将起源于囊泡系统的肽递送至细胞表面,在那里它们由CD4⁺T细胞识别。MHC分子可以来自各种动物物种,包括人、小鼠、大鼠或其他哺乳动物。

[0114] “载体”是能够转运另一种核酸的核酸分子。载体可以是例如质粒、粘粒、病毒或噬菌体。“表达载体”是这样的载体:当存在于适当环境中时能够指导由该载体携带的一个或多个基因编码的蛋白质的表达。

[0115] “逆转录病毒”是具有RNA基因组的病毒。“ γ 逆转录病毒(Gammaretrovirus)”是指逆转录病毒科的一个属。示例性的 γ 逆转录病毒包括小鼠干细胞病毒、鼠白血病病毒、猫白血病病毒、猫肉瘤病毒和禽网状内皮细胞增多症病毒。

[0116] “慢病毒”是指能够感染分裂和非分裂细胞的逆转录病毒属。慢病毒的几个例子包括HIV(人类免疫缺陷病毒:包括HIV 1型和HIV 2型)、马传染性贫血病毒、猫免疫缺陷病毒(FIV)、牛免疫缺陷病毒(BIV)、和猿猴免疫缺陷病毒(SIV)。

[0117] “T细胞”或“T细胞谱系细胞”是指显示T细胞或其前体或祖细胞的至少一种表型特征的细胞,所述表型特征区分细胞与其他淋巴细胞和红细胞或骨髓谱系的细胞。此类表型特征可包括一种或多种对T细胞特异的蛋白质(例如,CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺)的表达,或对T细胞特异的生理学、形态学、功能或免疫学特征。例如,T细胞谱系的细胞可以是定向于T细胞谱系的祖细胞或前体细胞、CD25⁺未成熟和灭活的T细胞、经历过CD4或CD8谱系定向的细胞、CD4⁺CD8⁺双阳性的胸腺细胞祖细胞、单阳性CD4⁺或CD8⁺、TCR $\alpha\beta$ 或TCR $\gamma\delta$ 、或成熟和功能性或活化的T细胞。

[0118] “核酸分子”或“多核苷酸”可以是RNA或DNA的形式,其包括cDNA、基因组DNA和合成DNA。核酸分子可以是双链或单链的,并且如果是单链的,可以是编码链或非编码链(反义链)。编码分子可以具有与本领域已知的编码序列相同的编码序列,或者可以具有不同的编码序列,由于遗传密码的冗余或简并或者通过剪接,编码分子可以编码相同的多肽。

[0119] “治疗”或“治疗”或“改善”是指对象的疾病、失调或病况(例如,人或非人哺乳动物,诸如灵长类动物、马、狗、小鼠、大鼠)的医学管理。例如,给予包含BCMA特异性结合蛋白或表达BCMA特异性结合蛋白的宿主细胞的适当剂量或治疗方案,与本发明的 γ -分泌酶抑制剂(GSI)以及可选的佐剂或预调理方案联合使用,以引发治疗或预防性益处。治疗或预防/防备性益处包括改善临床结果、减轻或缓解与疾病相关的症状、降低症状发生率、提高生活质量、更长的无病状态、减轻疾病程度、稳定疾病状态、延迟疾病进展、缓解、生存、延长

生存期、或其任何组合。

[0120] BCMA特异性结合蛋白(也称为BCMA特异性或BCMA靶向免疫疗法)、 γ -分泌酶抑制剂、表达BCMA特异性结合蛋白的宿主细胞或表达本发明的 γ -分泌酶抑制剂的宿主细胞(例如,BCMA特异性CAR,抗 γ -分泌酶抗体)的“治疗有效量”或“有效量”是指足以导致以统计学上显著的方式改善所治疗疾病的一种或多种症状的化合物或细胞的量。当提及单独给予各个活性成分或表达单一活性成分的细胞时,治疗有效剂量是指那种成分或表达该成分的细胞的作用。当提及组合时,治疗有效剂量是指活性成分或组合的辅助活性成分与表达活性成分的细胞的组合量,其产生治疗效果,无论是连续给药,共同给药还是同时给药。另一种组合可以是表达一种以上活性成分的细胞,例如两种或更多种不同的BCMA特异性结合蛋白等。

[0121] 贯穿本发明提供了另外的定义。

[0122] B细胞成熟抗原(BCMA)结合蛋白或分子

[0123] 在某些方面,本发明提供了治疗患有或怀疑患有疾病或失调的受试者的增殖性或自身免疫性疾病或失调方法,包括给予受试者治疗有效量的BCMA特异性结合蛋白(或BCMA靶向免疫疗法)和治疗有效量的 γ -分泌酶抑制剂。示例性BCMA特异性结合蛋白是嵌合抗原受体,其包含胞外组分和通过疏水部分连接的胞内组分,其中胞外组分包含BCMA特异性结合域(例如,BCMA特异性scFv、BCMA配体或其结合部分,例如BAFF或APRIL)并且可选地包含间隔区或铰链,并且其中胞内组分包含效应子结构域和可选的共刺激结构域。

[0124] 在某些实施例中,本发明内容提供了BCMA靶向免疫疗法,其与 γ -分泌酶抑制剂一起用于治疗增殖性或自身免疫性疾病或病症,其包含BCMA特异性抗体或其抗原结合部分、嵌合抗原受体(CAR)、或标记的嵌合抗原受体分子(T-ChARM)。在某些实施例中,BCMA特异性抗体或其抗原结合部分是人的或人源化的。

[0125] 示例性BCMA特异性抗体包括抗体J22.0-xi、J22.9-xi、J6M0、J6M1、J6M2、J9M0、J9M1、J9M2、11D5-3、CA8、A7D12.2、C11D5.3、C12A3.2、C13F12.1、13C2、17A5、83A10、13A4、13D2、14B11、14E1、29B11、29F3、13A7、CA7、SG1、S307118G03、S332121F02、S332126E04、S322110D07、S336105A07、S335115G01、S335122F05、ET140-3、ET140-24、ET140-37、ET140-40、ET140-54、TBL-CLN1、C4.E2.1、Vicky-1、pSCHLI333、pSCHLI372和pSCHLI373及其抗原结合部分。BCMA特异性抗体及其抗原结合部分(包括人源化形式)的各种实施例公开于例如PCT公开号WO 2002/066516、WO 2007/062090、WO 2010/104949、WO 2011/108008、WO 2012/163805、WO2014/068079、WO2015/166073、WO2014/122143、WO2014/089335、WO2016/090327和WO2016/079177;Ryan et al.,Mol.Cancer.Ther.6(11):3009,2007;和Abbas et al.,Blood 128:1688,2016,其中的BCMA特异性抗体、其抗原结合部分和人源化形式均通过引用整体并入本文。来自这些BCMA特异性抗体的可变结构域和scFv分子可用作本文提及的任何T-ChARM和CAR蛋白中的结合域。

[0126] 从本发明的BCMA特异性抗体获得并且可用于本文公开的方法的抗原结合部分或结构域包括例如结构域抗体、sFv、单链Fv片段(scFv)、Fab、F(ab')₂、纳米抗体、串联scFvs、scFv-Fc、scFv二聚体、scFv拉链、双抗体、微抗体、三抗体、四抗体、Fab、F(ab')₂、scFab、微抗体、纳米抗体、纳米抗体-HSA、双特异性T细胞招募剂(BiTE)、DAR、单链双抗体(scDiabody)、单链双抗体-CH3或scFv-CH3隆突进洞(KIH)组件。

[0127] 在某些实施例中,BCMA特异性结合蛋白包含双特异性或多特异性抗体(或其抗原结合部分),其包含特异于BCMA的第一结合区(例如,重链可变区、轻链可变区或两者),和至少一个特异于第二靶标的其他结合区(例如,不同于第一结合区的表位的BCMA表位,或非BCMA靶标的表位,诸如,例如不是BCMA的肿瘤相关抗原(例如,CD19(例如,博纳吐单抗、MOR-208、SGN-19A、SAR3419、coltuximabravtansine、denituzumabmafodotin、帕他普莫单抗、XmAb 5574、MDI-551、默克专利抗CD19又名B4又名DI-B4、XmAb 5871、MDX-1342、AFM11)、CD20(例如利妥昔单抗、奥法木单抗、ocrelizumab)、CD38(例如,达雷木单抗或伊沙妥昔单抗(isatuximab,SAR650984)、CD45或在免疫效应子细胞上表达的细胞表面蛋白,诸如T细胞(例如CD3)、NK细胞(例如CD56)或NK-T细胞(例如,NK1.1)、或另一种非肿瘤相关抗原或靶标。

[0128] 在具体的实施例中,本发明提供单独的或在细胞中表达为T-ChARM的BCMA特异性结合蛋白,用于与 γ -分泌酶抑制剂(GSI)使用。示例性T-ChARM包含胞外组分和通过疏水部分连接的胞内组分,其中胞外组分包含特异性结合BCMA的结合域,任意的间隔区,标签盒和铰链区,并且其中胞内组分包括效应子结构域和任意的共刺激结构域(例如,来自41BB的功能结构域或部分,来自CD28的功能结构域或部分,或两者)。在某些实施例中,T-ChARM结合域包含BCMA特异性scFv、BCMA特异性scTCR或BCMA配体或其结合部分(例如BAFF、APRIL),可选地其中BCMA特异性scFv是人的或人源化的。T-ChARM的各种实施例公开在PCT公开号WO 2015/095895中,其中T-ChARM支架通过引用整体并入本文。

[0129] 示例性标签盒包括Strep标签(其指的是原始Strep® tag、Strep® tag II或其任何变体,参见例如美国专利No.7,981,632,其中Strep标签通过引用并入本文)、His标签、Flag标签、Xpress标签、Avi标签、钙调蛋白标签、聚谷氨酸标签、HA标签、Myc标签、Nus标签、S标签、SBP标签、Softag 1、Softag 3、V5标签,CREB结合蛋白(CBP)、谷胱甘肽S-转移酶(GST)、麦芽糖结合蛋白(MBP)、绿色荧光蛋白(GFP)、硫氧还蛋白标签或其任何组合。在一些实施例中,标签盒可以是遗传工程化的亲和位点,例如最小的螯合位点(例如,HGGHHG,SEQ ID NO:6)。在某些实施例中,标签盒是具有Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys(SEQ ID NO.:7)或Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly(SEQ ID NO.:8)的氨基酸序列的Strep标签。

[0130] 标签盒可以在本发明的融合蛋白中以单拷贝或多拷贝存在。例如,本发明的BCMA特异性结合蛋白可具有一个、两个、三个、四个或五个标签盒(例如,Strep标签)。在某些实施例中,BCMA特异性T-ChARM的胞外组分包括一个标签盒、两个标签盒、三个标签盒、四个标签盒或五个标签盒。多个标签盒中的每一个可以相同或不同。

[0131] 在某些实施例中,标签盒包含约5至约500个氨基酸、或约6至约100个氨基酸、或约7至约50个氨基酸、或约8至约20个氨基酸。在一些实施例中,标签盒具有7至10个氨基酸。优选地,标签盒是非免疫原性的或最低免疫原性的。基本上,标签盒可以用作手柄或信标,以允许识别、富集、分离、促进增殖、激活、跟踪或消除表达BCMA特异性T-ChARM的细胞。

[0132] 在进一步的实施例中,本发明内容提供了与 γ -分泌酶抑制剂一起使用的BCMA特异性结合蛋白,其是嵌合抗原受体(CAR),其包含胞外组分和通过疏水部分连接的胞内组分,其中所述胞外组分包含特异性结合BCMA的结合域和铰链区,并且其中胞内组分包含效应子结构域和可选的共刺激结构域。在某些实施例中,CAR结合域包含BCMA特异性scFv,BCMA特异性scTCR,BCMA特异性TCR结合域(参见,例如,Walseng et al.,Scientific

Reports 7:10713 (2017), 其中的TCR CAR构建体通过引用整体并入本文), 或BCMA配体或其结合部分(例如, BAFF、APRIL), 可选地其中BCMA特异性scFv是人的或人源化的。在任何这些实施例中, CAR形式的BCMA特异性结合蛋白可以在细胞表面上表达, 例如免疫系统细胞(例如T细胞)。

[0133] BCMA特异性T-ChARM或CAR可以是细胞结合的(例如, 在细胞表面上表达)或可溶形式。在某些实施例中, 可以对编码BCMA特异性T-ChARM或CAR蛋白的多核苷酸进行密码子优化以增强或最大化宿主细胞(例如T细胞)中的表达(Scholten et al., Clin.Immunol.119:135, 2006)。

[0134] 在某些实施例中, 存在于本发明的BCMA特异性T-ChARM或CAR中的铰链可以是免疫球蛋白铰链区, 例如野生型免疫球蛋白铰链区或其改变的免疫球蛋白铰链区。在某些实施例中, 铰链是野生型人免疫球蛋白铰链区。在某些其他实施例中, 可以在野生型免疫球蛋白铰链区的氨基或羧基末端添加一个或多个氨基酸残基, 作为融合蛋白构建体设计的一部分。例如, 一个、两个或三个额外的连接氨基酸残基可以存在于铰链氨基末端或羧基末端, 或者铰链可以含有末端或内部缺失并且添加回了一个、两个或三个额外的连接氨基酸残基。

[0135] 在某些实施例中, 铰链是改变的免疫球蛋白铰链, 其中野生型免疫球蛋白铰链区中的一个或多个半胱氨酸残基被一个或多个其他氨基酸残基取代。示例性改变的免疫球蛋白铰链包括免疫球蛋白人IgG1、IgG2或IgG4铰链区, 其中在野生型人IgG1、IgG2或IgG4铰链中发现的一个、两个或三个半胱氨酸残基被一个、两个或三个不同的氨基酸残基取代(例如, 丝氨酸或丙氨酸)。在某些实施例中, 铰链多肽包含或是与野生型免疫球蛋白铰链区(例如野生型人IgG1铰链、野生型人IgG2铰链或野生型人IgG4铰链)至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%相同的序列。

[0136] 在进一步的实施例中, 存在于本发明的BCMA特异性T-ChARM或CAR中的铰链可以是不基于或不衍生自免疫球蛋白铰链的铰链(即, 不是野生型免疫球蛋白铰链或改变的免疫球蛋白铰链)。此类铰链的实例包括II型C-凝集素或CD分子的茎区的约5至约150个氨基酸的肽、包括约8至约25个氨基酸的肽或约7至约18个氨基酸的肽、或其变体。

[0137] II型C-凝集素或CD分子的“茎区”是指位于C型凝集素样结构域(CTLD, 例如, 类似于自然杀伤细胞受体的CTLD)和疏水部分(跨膜结构域)之间的II型C-凝集素或CD分子的胞外结构域部分。例如, 人CD94的胞外结构域(GenBank登录号AAC50291.1)对应于氨基酸残基34-179, 但CTLD对应于氨基酸残基61-176, 因此人CD94分子的茎区包含氨基酸残基34-60, 其位于疏水部分(跨膜结构域)和CTLD之间(参见Boyington et al., Immunity 10:75, 1999; for descriptions of other stalk regions, 也参见Beavil et al., Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 89:753, 1992和Figdor et al., Nat.Rev.Immunol.2:77, 2002)。这些II型C-凝集素或CD分子也可以在茎区和跨膜区或CTLD之间具有连接氨基酸。在另一个实例中, 233个氨基酸的人NKG2A蛋白(GenBank登录号P26715.1)具有疏水部分(跨膜结构域, 范围为氨基酸71-93)和胞外结构域(范围为氨基酸94-233)。CTLD包含氨基酸119-231, 并且茎区包含氨基酸99-116, 其可以侧接另外的连接氨基酸。其他II型C-凝集素或CD分子, 以及它们的

胞外配体结合域、茎区和CTLD是本领域已知的(参见,例如,GenBank Accession Nos.NP_001993.2、AAH07037.1、NP_001773.1;AAL65234.1、CAA04925.1,分别用于人CD23、CD69、CD72、NKG2A和NKG2D的序列及其描述)。

[0138] II型C-凝集素或CD分子的茎区铰链或其片段的“衍生物”包括约8至约150个氨基酸序列,其中野生型II型C-凝集素或CD分子的茎区的一个、两个或三个氨基酸具有缺失、插入、取代或其任何组合。例如,衍生物可包含一个或多个氨基酸取代和/或氨基酸缺失。在某些实施例中,与野生型茎区序列相比,茎区的衍生物对蛋白水解切割更具抗性,例如衍生自NKG2A、NKG2D、CD23、CD64、CD72或CD94的约8至约20个氨基酸的那些。

[0139] 在某些实施例中,茎区铰链可包含约7至约18个氨基酸并可形成 α -螺旋卷曲螺旋结构。在某些实施例中,茎区铰链含有0、1、2、3或4个半胱氨酸。示例性的茎区铰链包括茎区的片段,例如包含来自CD69、CD72、CD94、NKG2A和NKG2D的茎区的约10至约150个氨基酸的那些部分。

[0140] 可用于本发明的BCMA特异性T ChARM和CAR的替代铰链来自连接免疫球蛋白V样或免疫球蛋白C样结构域的细胞表面受体(域间区域)的部分。Ig V样结构域之间的区域和Ig C样结构域之间区域也认为是在本发明BCMA特异性T-ChARM和CAR中有用的铰链,其中在Ig V样结构域,细胞表面受体包含多个串联Ig V样结构域,其中在Ig C样结构域,细胞表面受体包含多个串联Ig C样区域。在某些实施例中,包括细胞表面受体域间区域的铰链序列可以进一步含有天然存在的或添加的基序,例如IgG核心铰链序列,以提供一个或多个二硫键以稳定BCMA特异性T-ChARM或CAR二聚体形成。铰链的实例包括CD2、CD4、CD22、CD33、CD48、CD58、CD66、CD80、CD86、CD150、CD166或CD244的IgV样区域和IgC样区域之间的域间区域。

[0141] 在某些实施例中,铰链序列具有约5至约150个氨基酸、约5至约10个氨基酸、约10至约20个氨基酸、约20至约30个氨基酸、约30至约40个氨基酸、约40个至约50个氨基酸、约50至约60个氨基酸、约5至约60个氨基酸、约5至约40个氨基酸,例如,约8至约20个氨基酸或约10至约15个氨基酸。铰链可以主要是柔性的,但也可以提供更刚性的特性,或者可以主要包含具有最小 β -折叠结构的 α -螺旋结构。

[0142] 在某些实施例中,铰链序列在血浆和血清中是稳定的,并且对蛋白水解切割具有抗性。例如,IgG1上铰链区中的第一个赖氨酸可以突变或缺失以使蛋白水解切割最小化,并且铰链可以包括连接氨基酸。在一些实施例中,铰链序列可含有天然存在的或添加的基序,例如免疫球蛋白铰链核心结构CPPCP(SEQ ID NO.:9),其赋予形成二硫键或多个二硫键以稳定二聚体形成的能力。

[0143] 包含在本发明的BCMA特异性结合蛋白中的疏水部分(例如,BCMA特异性T-ChARM或CAR)将允许本发明的BCMA特异性结合蛋白与细胞膜结合,使得一部分结合蛋白将位于细胞外(例如,标签盒、结合域),并且一部分将位于细胞内(例如,效应子结构域、共刺激结构域)。疏水部分通常设置在细胞膜磷脂双层内。在某些实施例中,一个或多个连接氨基酸可以设置在疏水部分与效应子结构域之间并将其连接,或者设置在疏水部分与间隔区之间并将其连接,或者设置在疏水部分与标签盒之间并将其连接。

[0144] 在某些实施例中,疏水结构域是跨膜结构域,例如衍生自整合膜蛋白(例如,受体、分化簇(CD)分子、酶、转运蛋白、细胞粘附分子等)的跨膜结构域。在特定的实施例中,疏水部分是来自CD4、CD8、CD27或CD28的跨膜结构域。

[0145] 包含在本发明的BCMA特异性结合蛋白上的胞内组分(例如,BCMA特异性T-ChARM或CAR)将能够将功能信号传递至细胞。在某些实施例中,BCMA特异性T-ChARM或CAR将分别与第二单链T-ChARM或CAR二聚化,其中二聚化允许包含效应子结构域和可选的共刺激结构域的胞内组分非常接近并且当暴露于合适的信号时促进信号转导。除了形成这种二聚体蛋白复合物之外,效应子结构域和可选的共刺激结构域还可以与其他信号传导因子如共刺激因子结合,以形成产生胞内信号的多蛋白复合物。在某些实施例中,效应子结构域将通过与一种或多种直接促进细胞反应的其他蛋白质缔合而间接促进细胞反应。胞内组分可包括一个、两个、三个或更多个受体信号传导结构域(例如,效应子结构域)、共刺激结构域或其组合。包含来自任何各种信号传导分子(例如,信号转导受体)的效应子结构域或其功能部分、共刺激结构域或其功能部分或其任何组合的任何胞内组分可用于本发明的BCMA特异性结合蛋白中。

[0146] 胞内组分可以具有可用于本发明的BCMA特异性结合蛋白的效应子或共刺激结构域,其可以基于或来自Wnt信号传导途径的蛋白质(例如,LRP、Ryk、ROR2)、NOTCH信号传导途径的蛋白质(例如,NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3、NOTCH4)、Hedgehog信号传导途径的蛋白质(例如,PTCH、SMO)、受体酪氨酸激酶(RTK)(例如,表皮生长因子(EGF)受体家族、成纤维细胞生长因子(FGF)受体家族、肝细胞生长因子(HGF)受体家族、胰岛素受体(IR)家族、血小板衍生生长因子(PDGF)受体家族、血管内皮生长因子(VEGF)受体家族、原肌凝蛋白受体激酶(Trk)受体家族、肝配蛋白(Eph)受体家族、AXL受体家族、白细胞酪氨酸激酶(LTK)受体家族、具有免疫球蛋白样和EGF样结构域的酪氨酸激酶1(TIE)受体家族、受体酪氨酸激酶样孤儿(ROR)受体家族、盘状蛋白结构域(DDR)受体家庭、在转染期间重排(RET)受体家族、酪氨酸蛋白激酶样(PTK7)受体家族、与受体酪氨酸激酶(RYK)受体家族相关、肌肉特异性激酶(MuSK)受体家族);G蛋白偶联受体,GPCR(卷曲、平滑);丝氨酸/苏氨酸激酶受体(BMPR、TGFR);或细胞因子受体(IL-1R、IL-2R、IL-7R、IL-15R)。

[0147] 在某些实施例中,效应子结构域包含淋巴细胞受体信号传导结构域或包含具有一个或多个基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)的氨基酸序列。在更进一步的实施例中,效应子结构域包含与细胞质信号传导蛋白缔合的细胞质部分,其中细胞质信号传导蛋白是淋巴细胞受体或其信号传导结构域、包含多个ITAM的蛋白质、共刺激因子或其任何组合。

[0148] 示例性效应子结构域和共刺激结构域包括基于或衍生自4-1BB、CD3 ϵ 、CD3 δ 、CD3 ζ 、CD27、CD28、CD79A、CD79B、CARD11、DAP10、FcR α 、FcR β 、FcR γ 、Fyn、HVEM、ICOS、Lck、LAG3、LAT、LRP、NOTCH1、Wnt、NKG2D、OX40、ROR2、Ryk、SLAMF1、Slp76、pT α 、TCR α 、TCR β 、TRIM、Zap70、PTCH2的那些或其任何组合。

[0149] 在具体的实施例中,本发明的BCMA特异性结合蛋白包含(a)来自CD3 ζ 或其功能部分的效应子结构域和来自CD28或其功能部分的共刺激结构域,(b)来自CD3 ζ 或其功能部分的效应子结构域和来自4-1BB或其功能部分的共刺激结构域,或(c) (a)来自CD3 ζ 或其功能部分的效应子结构域和来自CD28和4-1BB或其功能部分的共刺激结构域。

[0150] γ -分泌酶抑制剂(GSI)

[0151] 作为背景, γ -分泌酶是多亚基整合膜蛋白酶复合物,包括早老蛋白(PS)、呆蛋白(nicastrin,NCT)、前咽缺陷蛋白1(APH-1)和早老蛋白增强蛋白2(PEN-2)。PS是催化亚基,其是天冬氨酸蛋白酶,能够形成埋在膜内的亲水性催化孔(Takasugi et al.,Nature 422:

438-41, 2003), 其切割跨膜结构域内的单通道跨膜蛋白。NCT是具有大胞外结构域(ECD)的I型膜糖蛋白, 其ECD捕获底物的氨基末端作为 γ -分泌酶的主要底物受体(Shah et al., Cell 122:435-47, 2005)。 γ -分泌酶复合物在多种底物(包括Notch、CD44、钙粘着蛋白和肝配蛋白B2)的加工中起作用, 以及将淀粉样蛋白前体蛋白切割成与阿尔茨海默病有关的淀粉状蛋白 β 肽。还已知 γ -分泌酶复合物切割B细胞成熟抗原(BCMA)(Laurent et al., Nature Communications 6, 2015), 其是包括多发性骨髓瘤在内的各种癌症的治疗靶标。

[0152] 示例性 γ -分泌酶抑制剂(GSI)包括小分子, 拟肽化合物或 γ -分泌酶特异性结合蛋白。GSI可靶向任何一种或多种 γ -分泌酶复合蛋白, 包括早老蛋白1(PS1)、早老蛋白2(PS2)、呆蛋白(NCT)、前咽缺陷蛋白1(APH-1)和早老蛋白增强蛋白2(PEN-2), 条件是与未抑制的 γ -分泌酶相比, γ -分泌酶的切割活性降低。在某些实施例中, γ -分泌酶活性降低至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、或100%。用于测量 γ -分泌酶活性的测定法是本领域已知的(参见, 例如, Laurent et al., 2015)。例如, 可溶性BCMA的水平可以是 γ -分泌酶活性的替代量度。用于BCMA靶向免疫疗法以治疗增殖性或自身免疫疾病或失调的代表性小分子GSI包括avagacestat、DAPT、BMS-906024、BMS-986115、LY411575、MK-0752、PF-03084014、R04929097、semagacestat、Y0-01027及其任何组合。

[0153] 其他GSI是 γ -分泌酶特异性结合蛋白, 例如 γ -分泌酶复合物或 γ -分泌酶复合蛋白(例如早老蛋白1(PS1)、早老蛋白2(PS2)、呆蛋白(NCT)、前咽缺陷蛋白1(APH1)和早老蛋白增强蛋白2(PEN2))的抗体或其抗原结合部分。示例性 γ -分泌酶特异性结合蛋白是呆蛋白特异性结合蛋白, 例如抗体scFvG9、A5226A、2H6、10C11及其抗原结合片段。

[0154] 结合域

[0155] 结合域可以是如本文所述的特异性结合BCMA或特异性抑制 γ -分泌酶活性的任何肽。结合域的来源包括来自不同物种的抗体可变区(其可以是抗体、sFv、scFv、Fab、基于scFv的grababody或可溶性VH结构域或结构域抗体的形式), 包括人、啮齿动物、禽类或绵羊。结合域的其他来源包括来自其他物种的抗体的可变区, 例如骆驼科动物(来自骆驼, 单峰骆驼或美洲驼; Ghahroudi et al., FEBS Lett. 414:521, 1997; Vincke et al., J. Biol. Chem. 284:3273, 2009; Hamers-Casterman et al., Nature 363:446, 1993和Nguyen et al., J. Mol. Biol. 275:413, 1998)、护士鲨(Roux et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) 95:11804, 1998)、斑点鲶鱼(Nguyen et al., Immunogen. 54:39, 2002), 或七鳃鳗(Herrin et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) 105:2040, 2008和Alder et al. Nat. Immunol. 9:319, 2008)。这些抗体仅使用重链可变区可以形成抗原结合区, 即这些功能性抗体仅是重链的同源二聚体(称为“重链抗体”)(Jespers et al., Nat. Biotechnol. 22:1161, 2004、Cortez-Retamozo et al., Cancer Res. 64:2853, 2004、Baral et al., Nature Med. 12:580, 2006和Barthelemy et al., J. Biol. Chem. 283:3639, 2008)。

[0156] 本发明内容的结合域的替代来源包括编码随机肽文库的序列或编码可替代非抗体支架的环区域中的工程化多样性氨基酸的序列, 例如scTCR(参见例如Lake et al., Int. Immunol. 11:745, 1999; Maynard et al., J. Immunol. Methods 306:51, 2005; 美国专利号8,361,794), 纤维蛋白原结构域(参见例如see, e.g., Weisel et al., Science 230:1388, 1985), Kunitz结构域(参见例如美国专利号6,423,498), 设计的锚蛋白重复蛋白

(DARPin) (Binz et al., J.Mol.Biol.332:489,2003和Binz et al., Nat.Biotechnol.22:575,2004), 纤连蛋白结合域 (adnectin或单体) (Richards et al., J.Mol.Biol.326:1475,2003;Parker et al., Protein Eng.Des.Selec.18:435,2005和Hackel et al. (2008) J.Mol.Biol.381:1238-1252), 半胱氨酸结小蛋白 (Vita et al. (1995) Proc.Nat'l.Acad.Sci. (USA) 92:6404-6408;Martin et al. (2002) Nat.Biotechnol.21:71,2002和Huang et al. (2005) Structure 13:755,2005), 四十肽重复结构域 (Main et al., Structure 11:497,2003和Cortajarena et al., ACS Chem.Biol.3:161,2008), 富亮氨酸重复结构域 (Stumpp et al., J.Mol.Biol.332:471,2003), 脂质运载蛋白结构域 (参见, 例如, WO 2006/095164, Beste et al., Proc.Nat'l.Acad.Sci. (USA) 96:1898,1999和Schönfeld et al., Proc.Nat'l.Acad.Sci. (USA) 106:8198,2009), V-样结构域 (参见, 例如, 美国专利申请公开号2007/0065431), C-型凝集素结构域 (Zelensky and Gready, FEBS J.272:6179,2005;Beavil et al., Proc.Nat'l.Acad.Sci. (USA) 89:753,1992和Sato et al., Proc.Nat'l.Acad.Sci. (USA) 100:7779,2003), mAb²或FcabTM (参见, 例如, PCT专利申请公开号WO 2007/098934;WO 2006/072620), 狢狢重复蛋白 (参见, 例如, Madhurantakam et al., Protein Sci.21:1015,2012;PCT专利申请公号W02009/040338), affilin (Ebersbach et al., J.Mol.Biol.372:172,2007)、affibody、avimers、knottins、fynomer、atrimers、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白-4 (Weidle et al., Cancer Gen.Proteo.10:155,2013) 等 (Nord et al., Protein Eng.8:601,1995;Nord et al., Nat.Biotechnol.15:772,1997;Nord et al., Euro.J.Biochem.268:4269,2001;Binz et al., Nat.Biotechnol.23:1257,2005;Boersma and Plückthun, Curr.Opin.Biotechnol.22:849,2011)。

[0157] 本发明的结合域可如本文所述或通过本领域已知的多种方法产生 (参见, 例如, 美国专利号6,291,161和6,291,158)。例如, 可以通过筛选Fab噬菌体文库的特异性结合目标靶标的Fab片段 (例如, BCMA, γ -分泌酶复合物组分, 例如早老蛋白或呆蛋白) 来鉴定本发明内容的结合域 (参见Hoet et al., Nat.Biotechnol.23:344,2005)。此外, 方便的系统中 (例如, 小鼠、HuMAbmouse[®]、TC mouseTM、KM-mouse[®]、美洲驼、鸡、大鼠、仓鼠、兔等) 使用感兴趣的靶标 (例如, BCMA、 γ -分泌酶复合物组分如早老蛋白或呆蛋白) 作为免疫原的开发杂交瘤的传统策略可用于开发本发明的结合域。

[0158] 在一些实施例中, 结合域是单链Fv片段 (scFv), 其包含对感兴趣靶标 (例如, BCMA、 γ -分泌酶复合物组分如早老蛋白或呆蛋白) 特异的V_H和V_L区。在某些实施例中, V_H和V_L区是人的。示例性的V_H和V_L区包括抗BCMA特异性抗体J22.0-xi、J22.9-xi、J6M0、J6M1、J6M2、J9M0、J9M1、J9M2、11D5-3、CA8、A7D12.2、C11D5.3、C12A3.2、C13F12.1、13C2、17A5、83A10、13A4、13D2、14B11、14E1、29B11、29F3、13A7、CA7、SG1、S307118G03、S332121F02、S332126E04、S322110D07、S336105A07、S335115G01、S335122F05、ET140-3、ET140-24、ET140-37、ET140-40、ET140-54、TBL-CLN1、C4.E2.1、Vicky-1、pSCHLI333、pSCHLI372或pSCHLI373的区段。其他示例性V_H和V_L区包括来自scFvG9、A5226A、2H6或10C11的抗呆蛋白特异性抗体或其抗原结合片段的区段。

[0159] 在某些实施例中, 结合域包含, 或是与轻链可变区 (VL) 的氨基酸序列 (例如, 来自抗BCMA J22.0-xi、J22.9-xi、J6M0、J6M1、J6M2、J9M0、J9M1、J9M2、11D5-3、CA8、A7D12.2、C11D5.3、C12A3.2或C13F12.1、13C2、17A5、83A10、13A4、13D2、14B11、14E1、29B11、29F3、

13A7、CA7、S307118G03、S332121F02、S332126E04、S322110D07、S336105A07、S335115G01、S335122F05、ET140-3、ET140-24、ET140-37、ET140-40、ET140-54、TBL-CLN1、C4.E2.1、Vicky-1、pSCHLI333、pSCHLI372或pSCHLI373,或来自抗呆蛋白scFvG9、A5226A、2H6或10C11)或与重链可变区(VH)的氨基酸序列(例如来自抗BCMA J22.0-xi、J22.9-xi、J6M0、J6M1、J6M2、J9M0、J9M1、J9M2、11D5-3、CA8、A7D12.2、C11D5.3、C12A3.2、C13F12.1、13C2、17A5、83A10、13A4、13D2、14B11、14E1、29B11、29F3、13A7、CA7、SG1、S307118G03、S332121F02、S332126E04、S322110D07、S336105A07、S335115G01、S335122F05、ET140-3、ET140-24、ET140-37、ET140-40、ET140-54、TBL-CLN1、C4.E2.1、Vicky-1、pSCHLI333、pSCHLI372或pSCHLI373,或者来自抗呆蛋白scFvG9、A5226A、2H6或10C11)或两者至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%相同的序列,其中每个CDR包含来自特异性结合感兴趣靶标(例如,BCMA、 γ -分泌酶复合物组分如早老蛋白或呆蛋白)的单克隆抗体或其片段或衍生物为零变化或至多一个、两个或三个变化。

[0160] 在某些实施例中,当与已知单克隆抗体的 V_H 比较时,本发明的结合域 V_H 区可以衍生自或基于已知单克隆抗体的 V_H 并且含有一个或多个(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10)插入,一个或多个(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10)缺失,一个或多个(例如,2、3、4、5、6、7、8)氨基酸取代(例如,保守氨基酸取代或非保守氨基酸取代)或上述变化的组合。插入、缺失或取代可以是 V_H 区中的任何位置,包括在该区域的氨基端或羧基端或两端,条件是每个CDR包含零变化或至多一个、两个或三个变化并使得含有修饰的 V_H 区的结合域仍然可以与野生型结合域相似的亲和力特异性结合其靶标。

[0161] 在进一步的实施例中,当与已知单克隆抗体的 V_L 比较时,本发明的结合域中的 V_L 区衍生自或基于已知单克隆抗体的 V_L 并且含有一个或多个(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10)插入、一个或多个(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10)缺失、一个或多个(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10)氨基酸取代(例如,保守氨基酸取代)或上述变化的组合。插入、缺失或取代可以是 V_L 区域中的任何位置,包括在该区域的氨基端或羧基端或两端,条件是每个CDR包含零变化或至多一个、两个或三个变化并且使得含有修饰的 V_L 区的结合域仍然可以与野生型结合域相似的亲和力特异性结合其靶标。

[0162] V_H 和 V_L 结构域可以以任一朝向排列(即,从氨基末端到羧基末端, V_H - V_L 或 V_L - V_H),并且可以通过氨基酸序列连接(例如,具有约5至约35个氨基酸的长度),所述氨基酸序列能够提供间隔功能,使得两个亚结合域可以相互作用以形成功能性结合域。在某些实施例中,连接 V_H 和 V_L 结构域的可变区接头包括属于(Gly_nSer)家族的那些,例如(Gly₃Ser)_n(Gly₄Ser)₁(SEQ ID NO:3)、(Gly₃Ser)₁(Gly₄Ser)_n(SEQ ID NO:10)、(Gly₃Ser)_n(Gly₄Ser)_n(SEQ ID NO:4)或(Gly₄Ser)_n(SEQ ID NO:5),其中n是整数1至5。在某些实施例中,接头是(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃(SEQ ID NO.:12)或(Gly-Gly-Gly-Ser)₄(SEQ ID NO.:13)。在某些实施例中,这些(基于Gly_nSer)的接头用于连接结合域中的 V_H 和 V_L 结构域,并且这些接头也可用于将结合域连接至标签盒,或将标签盒连接至疏水部分或胞内组分。

[0163] 在一些实施例中,结合域是单链T细胞受体(scTCR),其包含 $V_{\alpha/\beta}$ 和 $C_{\alpha/\beta}$ 链(例如, V_{α} - C_{α} 、 V_{β} - C_{β} 、 V_{α} - V_{β})或包含特异于感兴趣靶标(例如,肽-MHC复合物)的 V_{α} - C_{α} 、 V_{β} - C_{β} 、 V_{α} - V_{β} 对。

[0164] 在某些实施例中,结合域包含或是与TCRV $_{\alpha}$ 、 V_{β} 、 C_{α} 或 C_{β} 的氨基酸序列至少90%、至

少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%或100%相同的序列,其中每个CDR包含零变化或至多一个、两个、或三个变化,所述变化来自特异性结合感兴趣靶标(例如,BCMA、 γ -分泌酶复合物组分如早老蛋白或呆蛋白)的TCR或其片段或衍生物。

[0165] 在某些实施例中,当与已知TCR的 V_{α} 、 V_{β} 、 C_{α} 或 C_{β} 比较时,本发明的结合域 V_{α} 、 V_{β} 、 C_{α} 或 C_{β} 区可以衍生自或基于已知TCR(例如,高亲和力TCR)的 V_{α} 、 V_{β} 、 C_{α} 或 C_{β} ,并且包含一个或多个(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10)插入、一个或多个(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10)缺失、一个或多个(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10)个氨基酸取代(例如,保守氨基酸取代或非保守氨基酸取代)或上述变化的组合。插入、缺失或取代可以是 V_{α} 、 V_{β} 、 C_{α} 或 C_{β} 区域中的任何位置,包括在这些区域的氨基端或羧基端或两端,条件是每个CDR包含零变化或至多一个、两个或者三个变化使得含有修饰的 V_{α} 、 V_{β} 、 C_{α} 或 C_{β} 区域的结合域仍然可以与野生型相似的亲和力特异性结合其靶标。

[0166] 可以发现BCMA、 γ -分泌酶或两者在感兴趣的细胞(“靶细胞”)上或与其缔合。示例性靶细胞包括癌细胞、与自身免疫疾病或病症或与炎性疾病或失调相关的细胞,以及感染性生物或细胞(例如,细菌、病毒、病毒感染的细胞)。

[0167] 细胞毒性缀合物

[0168] 抗体-药物缀合物用于选择性地将细胞毒性元件递送至靶细胞,例如肿瘤或癌细胞。抗体-药物缀合物和相关技术和化学物质描述于例如Nasiri et al., *J. Cell. Physiol.* (2018), Hedrich et al., *Clin. Pharmacokinet.* (2017), Drake and Rabuka, *BioDrugs* 31 (6):521 (2017), Meyer et al., *Bioconj. Chem.* 27 (12):2791 (2016), Moek et al., *J. Nucl. Med.* 58:83S (2017), Nareshkumar et al., *Pharm. Res.* 32:3526 (2015), Parslow et al., *Biomedicines* 4:14 (2016) 和 Green et al., *Blood* 131:611 (2018), 其中抗体形式、细胞毒性有效负载、接头和缀合化学物质、给药方案、治疗方法、药代动力学和ADC设计原理通过引用整体并入本文。

[0169] 在本文提供的方法的某些实施例中,BCMA特异性抗体或其抗原结合部分、嵌合抗原受体(CAR)或标记的嵌合抗原受体分子(T-ChARM)缀合或以其他方式偶联至细胞毒剂,例如化学治疗剂。化学治疗剂包括但不限于染色质功能抑制剂、拓扑异构酶抑制剂、微管抑制药物、DNA损伤剂、抗代谢物(如叶酸拮抗剂、嘧啶类似物、嘌呤类似物和糖修饰类似物)、DNA合成抑制剂、DNA相互作用剂(如嵌入剂)和DNA修复抑制剂。示例性化学治疗剂包括但不限于以下组:抗代谢物/抗癌剂,例如嘧啶类似物(5-氟尿嘧啶、氟尿苷、卡培他滨、吉西他滨和阿糖胞苷)和嘌呤类似物、叶酸拮抗剂和相关抑制剂(巯基嘌呤、硫鸟嘌呤、喷司他丁和2-氯脱氧腺苷(克拉屈滨));抗增殖剂/抗有丝分裂剂,包括长春花生物碱(长春碱、长春新碱和长春瑞滨)等天然产物,微管破坏剂如紫杉烷(紫杉醇、多西他赛)、长春新碱、长春花碱、诺考达唑、埃博霉素和长春瑞滨、表鬼臼毒素(依托泊苷,替尼泊苷)等;DNA损伤药剂(放线菌素、安吡啶、蒽环霉素、博来霉素、白消安、喜树碱、卡铂、苯丁酸氮芥、顺铂、环磷酰胺、环磷酰胺、放线菌素、柔红霉素、阿霉素、表阿霉素、六甲基蜜胺奥沙利铂、异磷胺、美法仑、氯苄胺(merchlorehtamine)、丝裂霉素、米托蒽醌、亚硝基脲、普卡霉素、丙卡巴肼、紫杉醇、泰索帝、替莫唑胺、替尼泊苷,三亚乙基硫代磷酰胺和依托泊苷(VP 16));抗生素如放线菌素(放线菌素D)、柔红霉素、多柔比星(阿霉素)、伊达比星、蒽环霉素、米托蒽醌、博来霉素、普卡霉

素(光神霉素)和丝裂霉素等;酶(L-天冬酰胺酶,其系统地代谢L-天冬酰胺并排除不具有合成自身天冬酰胺能力的细胞);抗血小板药;抗增殖/抗有丝分裂烷化剂,如氮芥类(氮芥、环磷酰胺和类似物、美法仑、苯丁酸氮芥)、乙烯亚胺和甲基三聚氰胺(六甲基三聚氰胺和塞替派)、烷基磺酸盐-白消安、亚硝基脲类(卡莫司汀(BCNU)和类似物、链脲佐菌素)、trazenes-dacarbazine(DTIC);抗增殖/抗有丝分裂抗代谢物如叶酸类似物(甲氨蝶呤);铂配位络合物(顺铂、卡铂)、丙卡巴肼、羟基脲、米托坦、氨鲁米特;激素、激素类似物(雌激素、他莫昔芬、戈舍瑞林、比卡鲁胺、尼鲁米特)和芳香酶抑制剂(来曲唑、阿那曲唑);抗凝血剂(肝素、合成肝素盐和凝血酶的其他抑制剂);纤维蛋白溶解剂(如组织纤溶酶原激活剂、链激酶和尿激酶)、阿司匹林、双嘧达莫、噻氯匹定、氯吡格雷、阿昔单抗;抗迁移剂;抗分泌剂(breveldin);免疫抑制剂(环孢菌素、他克莫司(FK-506)、西罗莫司(雷帕霉素)、硫唑嘌呤、霉酚酸酯);抗血管生成化合物(TNP470、染料木黄酮)和生长因子抑制剂(血管内皮生长因子(VEGF)抑制剂、成纤维细胞生长因子(FGF)抑制剂);血管紧张素受体阻滞剂;一氧化氮供体;反义寡核苷酸;抗体(曲妥珠单抗、利妥昔单抗);嵌合抗原受体;细胞周期抑制剂和分化诱导剂(维甲酸);mTOR抑制剂、拓扑异构酶抑制剂(多柔比星(阿霉素)、安吡啶、喜树碱、柔红霉素、放线菌素、eniposide、表柔比星、依托泊苷、伊达比星、伊立替康(CPT-11)和米托蒽醌、托泊替康、伊立替康)、皮质类固醇(可的松、地塞米松、氢化可的松、甲基强的松龙、泼尼松和泼尼松龙);生长因子信号转导激酶抑制剂;线粒体功能障碍诱导剂、毒素如霍乱毒素、蓖麻毒素、假单胞菌外毒素、百日咳博德特氏菌腺苷酸环化酶毒素或白喉毒素,以及半胱天冬酶激活剂;和染色质干扰物。

[0170] 特异性结合BCMA的示例性ADC是J6M0-mcMMAF(GSK2857916),描述于Tai et al., Blood 123(20):3128-3138(2014),其中ADC及其使用方法在此通过引入整体并入本文。Ryan等人(Mol.Cancer Ther.,6(11):3009-3018,2007)描述了另一种BCMA特异性ADC(SG1-MMAF),其中ADC通过引用并入本文。

[0171] 宿主细胞和核酸

[0172] 在某些方面,本发明提供了编码本文所述的BCMA特异性结合蛋白(包括包含至少一个BCMA结合域的多特异性和双特异性结合蛋白)或 γ -分泌酶抑制剂中的任何一种或多种的核酸分子。可将此类核酸分子插入合适的载体(例如,病毒载体或非病毒质粒载体)中以引入感兴趣宿主细胞(例如T细胞)。

[0173] 如本文所用,术语“重组”或“非天然的”是指包括至少一个遗传改变或通过引入外源核酸分子而被修饰的生物、微生物、细胞、核酸分子或载体,其中通过遗传工程引入这种改变或修饰。遗传改变包括,例如,引入编码蛋白质、融合蛋白或酶的可表达核酸分子的修饰,或细胞遗传物质的其他核酸分子添加、缺失、取代或其他功能性破坏。另外的修饰包括,例如,非编码调节区,其中修饰改变基因或操纵子的表达。在某些实施例中,如本文所述通过引入编码本发明的BCMA特异性结合蛋白或 γ -分泌酶抑制剂(例如,BCMA特异性T-ChARM或CAR;或抗 γ -分泌酶)的核酸,可以将从受试者获得的细胞(例如T细胞)转化为非天然或重组细胞(例如,非天然或重组T细胞),并且其中该细胞表达位于细胞表面的BCMA特异性结合蛋白。

[0174] 编码核心病毒的载体在本文中称为“病毒载体”。存在大量适用于本发明组合物的可用病毒载体,包括鉴定用于人基因治疗应用的那些(参见Pfeifer and Verma,

Ann.Rev.Genomics Hum.Genet.2:177,2001)。合适的病毒载体包括基于RNA病毒的载体,诸如逆转录病毒衍生的载体,例如莫洛尼鼠白血病病毒(MLV)衍生的载体,并且包括更复杂的逆转录病毒衍生的载体,例如慢病毒衍生的载体。HIV-1衍生的载体属于这一类。其他实例包括衍生自HIV-2、FIV、马传染性贫血病毒、SIV和梅迪-维斯纳(绵羊慢病毒)的慢病毒载体。使用逆转录病毒和慢病毒载体和包装细胞,用含有嵌合抗原受体转基因的病毒颗粒转导哺乳动物宿主细胞的方法是本领域已知的,并且先前已例如描述于美国专利8,119,772、Walchli et al., PLoS One 6:327930,2011、Zhao et al., J.Immunol.174:4415,2005、Engels et al., Hum.Gene Ther.14:1155,2003、Frecha et al., Mol.Ther.18:1748,2010、Verhoeyen et al., Methods Mol.Biol.506:97,2009。逆转录病毒和慢病毒载体构建体和表达系统也是可商购的。

[0175] 在某些实施例中,病毒载体用于引入编码BCMA特异性结合蛋白或 γ -分泌酶抑制剂的非内源多核苷酸。病毒载体可以是逆转录病毒载体或慢病毒载体。病毒载体还可包括编码转导标志的多核苷酸。用于病毒载体的转导标志是本领域已知的,包括可赋予药物抗性的选择标志,或可通过诸如流式细胞术等方法检测的可检测标志诸如荧光标志或细胞表面蛋白。在特定的实施例中,病毒载体还包含用于转导的基因标志,其包含绿色荧光蛋白,人CD2的胞外结构域或截短的人EGFR(huEGFRt;参见Wang et al., Blood 118:1255,2011)。当病毒载体基因组包含多个待在宿主细胞中表达的核酸序列作为单独的转录本时,病毒载体还可以包含两个(或更多个)转录本之间的额外序列,从而允许双顺反子或多顺反子表达。用于病毒载体的此类序列的实例包括内部核糖体进入位点(IRES)、弗林蛋白酶切割位点、病毒2A肽(例如P2A、T2A、E2A、F2A)或其任何组合。

[0176] 其他载体也可用于多核苷酸递送,包括DNA病毒载体,包括例如基于腺病毒的载体和基于腺相关病毒(AAV)的载体;衍生自单纯疱疹病毒(HSV)的载体,包括扩增子载体、复制缺陷型HSV和减毒HSV(Krisky et al., Gene Ther.5:1517,1998)。

[0177] 最近开发用于基因治疗用途的其他载体也可以与本发明的组合物和方法一起使用。这些载体包括源自杆状病毒和 α -病毒的载体(Jolly, D J.1999. Emerging Viral Vectors.p.209-40 in Friedmann T.ed.The Development of Human Gene Therapy.New York:Cold Spring Harbor Lab),或质粒载体(如睡美人或其他转座子载体)。在一些实施例中,病毒或质粒载体还包含用于转导的基因标志(例如绿色荧光蛋白,huEGFRt)。

[0178] 在某些实施例中,修饰造血祖细胞或胚胎干细胞以包含编码本发明内容的BCMA特异性结合蛋白(例如,BCMA特异性T-ChARM或CAR)的非内源多核苷酸。造血祖细胞可以包含胸腺细胞祖细胞或诱导的多能干细胞,其可以衍生自或源自胎儿肝脏组织、骨髓、脐带血或外周血。造血祖细胞可以来自人、小鼠、大鼠或其他哺乳动物。在特定实施例中,使用CD24^{lo} Lin⁻CD117⁺胸腺细胞祖细胞。

[0179] 在某些实施例中,培养条件需要培养表达本发明的融合蛋白的造血祖细胞足够的时间以诱导增殖或分化。通常将细胞维持培养约3天至约5天、或约4至约10天、或约5至约20天。应当理解,可以将细胞维持适当的所需时间以达到所需的结果,即所需的细胞组合物或增殖水平。例如,为了产生主要包含未成熟和灭活T细胞的细胞组合物,可以将细胞维持培养约5至约20天。可以将细胞维持培养约20至约30天,以产生主要包含成熟T细胞的细胞组合物。也可以在不同时间点,例如在约数天至约25天从培养物中收集非贴壁细胞。在某些实

施例中,造血干细胞在基质细胞系上共培养(美国专利号7,575,925;Schmitt et al., Nat.Immunol.5:410,2004;Schmitt et al.,Immunity 17:749,2002)。

[0180] 可以将一种或多种促进造血祖细胞的定向或分化的细胞因子添加到培养物中。细胞因子可以是人的或非人的。可以使用的细胞因子的代表性实例包括FGF家族的所有成员,包括FGF-4和FGF-2;Flt-3配体、干细胞因子(SCF)、血小板生成素(TPO)和IL-7。细胞因子可以与糖胺聚糖(例如硫酸肝素)联合使用。

[0181] 在一些实施例中,能够在细胞表面上表达本发明的BCMA特异性结合蛋白的宿主细胞是T细胞,包括衍生自人、小鼠、大鼠或其他哺乳动物的原代细胞或细胞系。如果从哺乳动物获得,可以从许多来源获得T细胞,包括血液、骨髓、淋巴结、胸腺或其他组织或液体。可以富集或纯化T细胞或其亚群(例如,幼稚、中枢记忆、效应记忆)。T细胞系是本领域熟知的,其中一些描述于Sandberg et al.,Leukemia 21:230,2000中。在某些实施例中,使用缺乏TCR α 和 β 链的内源表达的T细胞。此类T细胞可能天然缺乏TCR α 和 β 链的内源性表达,或者可能已被修饰以阻断表达(例如,来自不表达TCR α 和 β 链的转基因小鼠的T细胞或已被操纵以抑制TCR α 和 β 链表达的细胞)或敲除TCR α 链、TCR β 链或两者基因。在某些实施例中,能够在细胞表面上表达本发明的BCMA特异性结合蛋白的细胞不是T细胞或T细胞谱系的细胞,而是祖细胞、干细胞或经过修饰以表达细胞表面抗CD3的细胞。

[0182] 在本文提供的任何实施例中,宿主细胞可以是“通用供体”细胞,其被修饰以减少或消除参与免疫应答的一种或多种内源基因的表达。例如,可以修饰T细胞以减少或消除选自PD-1、LAG-3、CTLA4、TIGIT、TIM3、HLA复合物组分或TCR或TCR复合物组分的一种或多种多肽的表达。不希望受理论束缚,某些内源表达的免疫细胞蛋白可被接受修饰的免疫细胞的同种异体宿主识别为外源的,这可导致修饰的免疫细胞的消除(例如,HLA等位基因),或者可能下调修饰的免疫细胞的免疫活性(例如,PD-1、LAG-3、CTLA4、TIGIT),或可以干扰本发明的异源表达的结合蛋白的结合活性(例如,内源性TCR结合非肿瘤相关抗原并且干扰特异性结合肿瘤相关抗原的修饰的免疫细胞的抗原特异性受体)。因此,减少或消除此类内源基因或蛋白质的表达或活性可以改善同种异体宿主环境中修饰的免疫细胞的活性、耐受性和持久性,并且可以允许细胞的普遍给予(例如,向任何接受者,无论是否HLA型)。

[0183] 在某些实施例中,本发明的宿主细胞(例如,经修饰的免疫细胞)包含编码PD-1、LAG-3、CTLA4、TIM3、TIGIT、HLA复合物组分(例如,编码 α_1 巨球蛋白、 α_2 巨球蛋白、 α_3 巨球蛋白、 β_1 微球蛋白或 β_2 微球蛋白的基因)、TCR组分(例如,编码TCR可变区或TCR恒定区的基因)的一种或多种基因的染色体基因敲除(参见例如,Torikai et al.,Nature Sci.Rep.6:21757(2016);Torikai et al.,Blood 119(24):5697(2012)和Torikai et al.,Blood 122(8):1341(2013),其基因编辑技术,组合物和过继细胞疗法通过引用整体并入本文)。例如,在一些实施例中,使用CRISPR/Cas9系统产生染色体基因敲除,并且可以涉及用表达CRISPR/Cas9系统的慢病毒(例如,pLentiCRISPRv2;Torikai et al.,Blood(2016))转染修饰的免疫细胞,所述CRISPR/Cas9系统靶向PD-1、LAG-3、CTLA4、HLA组分或TCR组分、或其任何组合。用于设计表达用于抑制内源表达的免疫细胞蛋白的CRISPR/Cas9系统的慢病毒的引物包括引物对,所述引物对例如包含具有SEQ ID No:22和23、24和25、26和27、以及28和29中所示核苷酸序列的正向和反向引物。

[0184] 在某些实施例中,转染以表达本发明的BCMA特异性结合蛋白(例如,T-ChARM、CAR、

包含至少一个BCMA结合域的多特异性结合蛋白、包含至少一个BCMA结合域的双特异性结合蛋白)的宿主T细胞是功能性T细胞,例如病毒特异性T细胞、肿瘤抗原特异性细胞毒性T细胞、幼稚T细胞、记忆干细胞T细胞、中枢或效应记忆T细胞、或CD4⁺CD25⁺调节性T细胞。

[0185] 可以将一种或多种促进表达本发明的BCMA特异性结合蛋白的T细胞增殖的生长因子细胞因子加入培养物中。细胞因子可以是人的或非人的。可用于促进T细胞增殖的示例性生长因子细胞因子包括IL-2,IL-15,IL-21等。

[0186] 用途

[0187] 可以用如本发明所述BCMA靶向免疫疗法或表达BCMA特异性结合蛋白的细胞联合 γ -分泌酶抑制剂(GSI)治疗的疾病,包括癌症(例如,表达BCMA的癌症)、免疫疾病(例如,自身免疫)、或与衰老相关的疾病(如衰老)。过继性免疫和基因治疗对于各种类型的癌症(Morgan et al., Science 314:126, 2006; Schmitt et al., Hum. Gene Ther. 20:1240, 2009; June, J. Clin. Invest. 117:1466, 2007)和传染病(Kitchen et al., PLoS One 4: 38208, 2009; Rossi et al., Nat. Biotechnol. 25:1444, 2007; Zhang et al., PLoS Pathog. 6:e1001018, 2010; Luo et al., J. Mol. Med. 89:903, 2011)是有希望的治疗方法。

[0188] 适合于本文公开的组合物和方法的癌症是在其细胞表面上表达或能够表达BCMA的癌症。可以治疗的示例性癌症类型包括骨髓瘤(例如多发性骨髓瘤)、白血病(例如浆细胞白血病)、淋巴瘤(例如淋巴浆细胞淋巴瘤)、浆细胞瘤、Waldenström巨球蛋白血症。其他可能表达BCMA的癌症包括乳腺癌和肺支气管肺癌。在某些实施例中,适合于BCMA特异性结合蛋白和GSI的联合疗法的增殖性失调是某些类型的B细胞癌,包括浆细胞失调(例如,多发性骨髓瘤)。

[0189] 炎症和自身免疫疾病包括关节炎、类风湿性关节炎、幼年类风湿性关节炎、骨关节炎、多软骨炎、银屑病关节炎、银屑病、皮炎、多发性肌炎/皮肌炎、包涵体肌炎、炎性肌炎、中毒性表皮坏死松解症、系统性硬皮病和硬化症、CREST综合征、炎症性肠病疾病、克罗恩病、溃疡性结肠炎、呼吸窘迫综合征、成人呼吸窘迫综合征(ARDS)、脑膜炎、脑炎、葡萄膜炎、结肠炎、肾小球肾炎、过敏性病况、湿疹、哮喘、涉及T细胞浸润和慢性炎症反应的病况、动脉粥样硬化、自身免疫性心肌炎、白细胞粘附缺陷、系统性红斑狼疮(SLE)、亚急性皮肤红斑狼疮、盘状红斑狼疮、狼疮性脊髓炎、狼疮性脑炎、青少年糖尿病、多发性硬化、过敏性脑脊髓炎、视神经脊髓炎、风湿热、Sydenham舞蹈病、细胞因子和T淋巴细胞介导的与急性和迟发性过敏反应相关的免疫应答、结核病、结节病、肉芽肿病包括韦格纳肉芽肿病和Churg-Strauss病、粒细胞缺乏症、血管炎(包括过敏性血管炎/脉管炎、ANCA和类风湿性血管炎)、再生障碍性贫血、Diamond Blackfan贫血、免疫性溶血性贫血包括自身免疫性溶血性贫血(AIHA)、恶性贫血、纯红细胞再生障碍(PRCA)、因子VIII缺乏、血友病A、自身免疫性中性粒细胞减少症、全血细胞减少症、白细胞减少症、涉及白细胞渗出的疾病、中枢神经系统(CNS)炎性失调、多器官损伤综合征、重症肌无力、抗原-抗体复合物介导的疾病、抗肾小球基底膜疾病、抗磷脂抗体综合征、过敏性神经炎、Behcet病、Castleman综合征、Goodpasture综合征、Lambert-Eaton肌无力综合征、Reynaud综合征、Sjorgen综合征、Stevens-Johnson综合征、实体器官移植排斥反应、移植物抗宿主病(GVHD)、大疱性类天疱疮、天疱疮、自身免疫性多发性内分泌病、血清阴性脊柱关节病、Reiter病、僵硬综合征、巨细胞动脉炎、免疫复合性肾炎、IgA肾病、IgM多发性神经病或IgM介导的神经病变、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、

血栓性血小板减少性紫癜 (TTP)、过敏性紫癜、自身免疫性血小板减少症、睾丸和卵巢自身免疫性疾病包括自身免疫性睾丸炎和卵巢炎、原发性甲状腺功能减退症；自身免疫性内分泌疾病包括自身免疫性甲状腺炎、慢性甲状腺炎 (桥本氏甲状腺炎)、亚急性甲状腺炎、特发性甲状腺功能减退症、艾迪生病、格雷夫斯病、自身免疫性多腺体综合征 (或多腺内分泌综合征)、I型糖尿病也称为胰岛素依赖型糖尿病 (IDDM) 和 Sheehan 综合征；自身免疫性肝炎、淋巴间质性肺炎 (HIV)、闭塞性细支气管炎 (非移植)、非特异性间质性肺炎 (NSIP)、格林-巴利综合征、大血管炎 (包括风湿性多肌痛和巨细胞 (大动脉) 动脉炎)、中血管血管炎 (包括川崎病和结节性多动脉炎)、结节性多动脉炎 (PAN) 强直性脊柱炎、伯格氏病 (IgA 肾病)、急进性肾小球肾炎、原发性胆汁性肝硬化、腹腔口炎性腹泻 (麸质肠病)、冷球蛋白血症、与肝炎相关的冷球蛋白血症、肌萎缩侧索硬化症 (ALS)、冠状动脉疾病、家族性地中海热、显微镜下多血管炎、Cogan 综合征、Whiskott-Aldrich 综合征和血栓闭塞性脉管炎。

[0190] 在具体的实施例中,如本文公开的,用BCMA结合蛋白与 γ -分泌酶抑制剂联合治疗受试者的方法包括治疗多发性骨髓瘤、浆细胞瘤、浆细胞白血病、Waldenström 巨球蛋白血症、B细胞淋巴瘤和淋巴浆细胞淋巴瘤。

[0191] 本发明的BCMA特异性结合蛋白,例如CAR或T-ChARM,可以以细胞结合形式给予受试者(例如,对靶细胞群(成熟T细胞(例如,CD8⁺或CD4⁺T细胞))或T细胞谱系的其他细胞)的基因治疗)。在一个具体实施例中,向受试者给予的表达BCMA特异性结合蛋白(例如,BCMA特异性CAR或T-ChARM)的T细胞谱系的细胞是同基因、同种异体或自体细胞。

[0192] 本发明的方法包括给予在免疫细胞表面(例如T细胞)上表达的BCMA特异性结合分子和给予 γ -分泌酶抑制剂(GSI)的步骤。在某些实施例中,所述联合可以在同一药学上可接受的载体中同时给予,或以单独制剂形式给予(但同时给予)。同时给予意味着每种组分同时或在彼此的8-12小时内给药。在超过第一组分后12小时给予第二组分将认为是顺序给予。在其他实施例中,BCMA特异性免疫治疗剂和GSI可以以任何顺序和任何组合顺序给予(例如,相隔一天、两天、三天、四天、五天、六天、七天、八天或九天;相隔一周、两周、三周或四周;相隔一周、两周、三周、四周、五周、六周、七周、八周或九周;或相隔一年、两年、三年、四年、五年、六年或更多年)。在特定实施例中,当顺序给予时,首先给予GSI,然后给予BCMA靶向免疫疗法(可溶性或细胞形式)。在其他实施例中,首先给予BCMA靶向免疫疗法(可溶性或细胞形式),然后给予GSI。在特定实施例中,首先给予BCMA靶向免疫疗法,其包含特异性结合BCMA的经修饰的免疫细胞(例如,BCMA特异性T细胞如CAR-T、T-ChARM、双特异性、多特异性T细胞),然后给予GSI(例如,在BCMA免疫疗法的数小时、数天、数周、数月或数年内)。在进一步的实施例中,(a)向受试者给予BCMA靶向免疫疗法,包含含有特异性结合BCMA的结合蛋白的修饰的免疫细胞(例如,BCMA特异性T细胞如CAR-T、T-ChARM、双特异性、多特异性T细胞);(b)一段时间后(例如,约5天至约一周、约一周至约两周、约两周至约三周、约一周至约一个月、约一个月至约六个月、约三个月至约一年、或根据需要更长时间),探测或检查来自受试者的受试者或组织中先前给予的包含特异性结合BCMA的结合蛋白的经修饰的免疫细胞的存在或持续性,和(c)在检测到BCMA免疫疗法的存在或持续后,然后给予GSI。

[0193] 在一些实施例中,在BCMA靶向免疫疗法之前、同时,给予受试者至少一次GSI,在BCMA靶向免疫疗法之后,给予受试者至少一次GSI(例如,至少两次、三次或四次)。在特定实施例中,本发明的组合疗法包括BCMA靶向免疫疗法,和约0.01 μ M GSI至约5 μ M GSI、约0.03 μ

M GSI至约1.5 μ M GSI、约0.05 μ M GSI至约2.5 μ M GSI、或约0.1 μ M GSI至约1.0 μ M GSI的给药。在某些实施例中，与单独给予这些疗法相比，包含特异性结合BCMA的修饰的免疫细胞和GSI的联合疗法，包含较低量的特异性结合BCMA的免疫细胞、GSI或两者。

[0194] 例如，作为背景并且不希望受理论束缚，在过继免疫疗法期间，通过用一种或多种化学治疗剂或治疗进行的先前免疫抑制调节可以促进给予的表达BCMA特异性结合蛋白的细胞的植入。在本文所述的任何实施例中，该方法还包括在给予BCMA靶向免疫疗法或表达BCMA特异性结合蛋白的免疫细胞和GSI的同时或之前预调节受试者。在具体的实施例中，预调节方案是免疫抑制调节，其包括消耗内源性淋巴细胞（也称为淋巴细胞清除，其可以是非清髓性的或清髓性的）。示例性淋巴细胞清除可以通过单独的环磷酰胺、环磷酰胺与氟达拉滨的组合，通过使用对淋巴细胞具有细胞毒性的其他试剂或治疗（或者全身照射）或其任何组合来实现。

[0195] 结合分子，抑制剂或组合组合物可以口服、局部、透皮、胃肠外，通过吸入喷雾、阴道、直肠或通过颅内注射或其任何组合而给药。当单独给予时，BCMA靶向免疫疗法和GSI可以通过相同途径或通过不同途径给予。例如，在某些实施例中，肠胃外给予BCMA靶向免疫疗法并且口服给予GSI，其可以同时或顺序给予。本文所用的术语“肠胃外”包括皮下注射、静脉内、肌肉内、脑池内注射或输注技术。还考虑通过静脉内、皮内、肌肉内、乳房内、腹膜内、鞘内、眼球后、肺内注射和/或在特定部位手术植入给予。通常，组合物基本上不含热原，以及可能对接受者有害的其他杂质。注射或输注，尤其是静脉内注射，优选用于给予BCMA靶向免疫疗法。

[0196] 在其他实施例中，BCMA特异性结合蛋白、GSI或两者可以以可溶形式（例如，抗体）给予受试者。可溶性TCR也是本领域已知的（参见，例如，Molloy et al., Curr.Opin.Pharmacol.5:438,2005、美国专利No.6,759,243）。

[0197] 包括本发明的BCMA靶向免疫疗法和 γ -分泌酶抑制剂的联合疗法的药物组合物可以以适合于待治疗（或预防）的疾病或病症的方式给予，如医学领域的技术人员所确定的。组合物的合适剂量、合适的持续时间和给药频率将通过诸如患者的病况，疾病的大小、类型和严重程度，活性成分的特定形式和给药方法等因素来确定。本发明提供了药物组合物，其包含表达BCMA特异性结合蛋白如CAR或T-ChARM的细胞，和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。合适的赋形剂包括水、盐水、右旋糖、甘油等及其组合。

[0198] 本发明内容的一个优点是可以使用标签盒的同源结合配偶体，耗尽给予患者的BCMA特异性结合蛋白如CAR或T-ChARM的表达细胞。在某些实施例中，本发明提供了通过使用对标签盒特异的抗体、使用对标签盒特异的同源结合配偶体、或通过使用表达CAR并对标签盒具有特异性的第二T细胞来消耗表达BCMA特异性T-ChARM的T细胞的方法。在某些实施例中，标签盒允许表达本发明的BCMA特异性T-ChARM的T细胞的免疫耗竭。可以使用对标签盒特异的耗尽剂来完成对工程化T细胞的消除。例如，如果使用Strep标签，则可以使用与细胞毒性试剂（例如毒素、放射性金属）各自融合或缀合的抗Strep标签抗体、抗Strep标签scFv或链霉素，或者可以使用抗Strep标签/抗CD3双特异性scFv、或抗Strep标签CAR T细胞。

[0199] 另一方面，本发明提供了选择性促进表达本发明的BCMA特异性T-ChARM的重组T细胞增殖的方法。在某些实施例中，该方法包括使用标签结合配偶体（例如抗体）选择性离体

增殖表达BCMA特异性T-ChARM的T细胞。在进一步的实施例中,该方法包括用标签结合配偶体(例如抗体)扩增功能性T细胞(例如,病毒特异性、TAA(肿瘤相关抗原)特异性CTL,或特异性T细胞亚群如幼稚T细胞、记忆干细胞T细胞、中枢或效应记忆T细胞、CD4+CD25+调节性T细胞),该方法可选地在共刺激分子结合配偶体(例如抗CD27或抗CD28抗体)存在下进行。

[0200] 在更进一步的实施例中,当表达本发明的BCMA特异性T-ChARM时,BCMA特异性T-ChARM允许体内选择性促进T细胞增殖。在某些实施例中,表达包含标签盒的CAR的T细胞允许在接触表达配体的细胞(例如,包括T细胞抑制细胞配体PD-L1、PD-L2)时体内扩增CAR T细胞。此类扩增的T细胞可用于本文所述的疾病治疗方法。在某些实施例中,体内诱导表达本文公开的BCMA特异性T-ChARM的细胞的增殖或扩增,其可以用标签盒结合配偶体(例如抗标签抗体)和可选的共刺激分子结合配偶体(例如抗CD27或抗CD28抗体)诱导。

[0201] 在某些另外的实施例中,表达如本文公开的BCMA特异性T-ChARM的细胞在体内活化,例如在肿瘤部位。例如,包含标签盒结合配偶体(例如抗标签抗体)的组合物(例如,藻酸盐、基底膜基质(Matrigel®)、生物聚合物或其他基质)或载体(例如,微珠、纳米颗粒或其他固体表面),和共刺激分子结合配偶体(例如抗CD27或抗CD28抗体)可用于在肿瘤(例如,实体瘤)的位点局部激活表达如本文所公开的BCMA特异性T-ChARM的T细胞。

[0202] 在某些实施例中,可以通过使用与标签盒特异性结合的抗体(例如,抗标签抗体)或通过特异性结合标签盒序列的其他同源结合蛋白(例如,与Strep标签结合的链霉素)在体内检测或跟踪表达BCMA特异性T-ChARM的重组细胞,其中标签盒的结合配偶体与荧光染料、放射性示踪剂、氧化铁纳米颗粒或本领域已知的其他成像剂缀合,用于通过X射线、CT扫描、MRI-扫描、PET扫描、超声、流式细胞术、近红外成像系统或其他成像模式来检测(参见,例如,Yu et al.,*Theranostics* 2:3,2012)。

[0203] 在进一步的实施例中,表达本发明的BCMA特异性T-ChARM的细胞可以用于诊断方法或成像方法,包括与本文鉴定的适应症或病症有关的方法。

[0204] 在一些实施例中,方法包括与BCMA特异性结合蛋白联合(例如,同时,分开或顺序)给予GSI,所述结合蛋白可包含例如BCMA特异性抗体或其抗原结合部分,如抗体-药物缀合物或双特异性或多特异性结合蛋白,如可用于预靶向放射免疫疗法的那些(参见,例如,Green et al.,*Blood* 131:611(2018))。

[0205] 实例

[0206] 实例1

[0207] BCMA特异性嵌合抗原受体的设计和测试

[0208] 制备抗BCMA CAR以检查它们对多发性骨髓瘤和其他失调的免疫治疗的有用性。用含有来自C115D5.3(“C11”)抗体和A7D12.2(“A7”)抗体的V_H和V_L区的scFv构建抗BCMA CAR,其包括IgG4铰链区(间隔)、CD28跨膜结构域、4-1BB共刺激结构域和CD3 ζ 效应子结构域。scFv以“HL”和“LH”朝向产生(参见图1A)。用编码抗BCMA CAR的表达构建体转导人T细胞并检查功能特征。如图1B所示,表达C11 CAR和A7 CAR的T细胞在与BCMA表达靶细胞共培养时增殖,尽管C11 CAR似乎比A7 CAR表达T细胞稍强地增殖。C11 CAR-T细胞还应答于靶细胞系(抗原转染的K562细胞或表达BCMA的MM细胞系;图1C)产生更多的细胞因子,并且与A765 LH CAR-T细胞相比具有更强的针对靶细胞的特异性杀伤活性(图1D)。

[0209] 产生另外的A7和C11 CAR,其具有不同的胞内组分,包括含有4-1BB共刺激结构域

的CAR (图1E, 上图) 和含有CD28共刺激结构域的CAR (图1E, 下图)。胞外间隔区域的长度也变化以改善CAR表达T细胞和BCMA⁺靶细胞之间的相互作用, 包括短 (例如, 12个氨基酸、48个氨基酸和66个氨基酸长度)、中 (例如, 长度为157个氨基酸) 和长 (例如, 228个氨基酸长度) 间隔。48个氨基酸和157个氨基酸间隔CAR各自包括两 (2) 个Strep-Tag盒, 而66个氨基酸间隔包括三 (3) 个Strep-Tag盒 (参见图1F)。标记的嵌合抗原受体如图1F和1G中所示的含Strep-Tag盒的CAR在本文中称为T-ChARM。

[0210] 转导人T细胞以表达T-ChARM (参见实例2) 并分析其功能。间隔的长度对包含衍生自抗BCMA抗体C11 D5.3的scFv的T-ChARM构建体具有影响, 其中, 中 (约65个氨基酸; 参见图1H) 的C11 3ST、C11 2STint和C11Lo) 至长 (约200个氨基酸) 间隔最适合这种结合域。选出C113ST_4-1BB和C113ST_CD28作为表现最佳的构建体 (图1H-1J), 并与先前公开的抗BCMA CAR (“BCMA-2”; Carpenter et al. Clin. Cancer Res. 19:2048, 2013) 进行比较。对于每种T-ChARM/CAR构建体, EGFRt在原代T细胞上的表达是相似的, 并且如通过用抗STII单克隆抗体染色所示, 对于含有STII序列的那些, 证实了T-ChARM的表面表达 (图1K)。当与靶细胞共培养时, 表达C113ST T-ChARM的T细胞产生更多细胞因子 (图1L、1M) 并且比表达BCMA-2的T细胞增殖更强 (图1N)。还确定表达C113ST T-ChARM的T细胞可识别并裂解CD138⁺患者MM细胞 (数据未显示)。表达C113ST T-ChARM或BCMA-2 CAR的T细胞不具有针对非抗原表达K562细胞的细胞溶解活性 (图1O), 但有效裂解转导以表达BCMA抗原的K562细胞 (图1P), 证明工程化的T细胞特异性识别抗原。

[0211] 实例2

[0212] 重组T细胞的生产 and BCMA特异性T-CHARM的表达

[0213] 使用CD8⁺/CD4⁺T细胞分离试剂盒 (Miltenyi Biotec) 从正常人供体的PBMC分离CD8⁺和CD4⁺T细胞, 根据制造商的说明用抗CD3/CD28珠 (Life Technologies) 活化, 并用CAR编码慢病毒 (epHIB7) 上清液转导, 所述上清液通过活化后第3天使用PsPAX2和pMD2G包装质粒 (MOI=3) (补充有0.8μg/mL聚凝胺 (Millipore, Bedford, MA)) 瞬时转染HEK293T细胞, 通过32°C、2,100rpm离心45分钟而生成。将T细胞在RPMI、10%人血清、2mM L-谷氨酰胺和1%青霉素-链霉素 (CTL培养基) 中扩增, 每48小时补充重组人 (rh) IL-2至终浓度50U/mL。扩增后, 将每个转导的T细胞系的等分试样用生物素缀合的抗EGFR抗体和链霉亲和素-PE (Miltenyi, Auburn, CA) 染色。通过在FACS-Aria细胞分选仪 (Becton Dickinson) 上分选来分离tEGFR⁺T细胞。然后以1:7的T细胞:LCL比率, 用经照射的 (8,000rad) CD19⁺B-LCL刺激tEGFR⁺T细胞亚群, 并在CTL培养基中扩增8天, 每48小时加入50U/mL rh IL-2, 或使用表达T-ChARMs的细胞的快速扩增方案 (Riddell and Greenberg, J. Immunol. Methods 128:189, 1990), 其中T-ChARM包含衍生自抗BCMA抗体A7或C11D5.3的scFv。

[0214] 以下缀合的抗体用于流式细胞术表型分析和分析: CD4、CD8、CD25、CD137、CD45、膜联蛋白V、CD62L、CD27、CD28 (BD Biosciences)、抗Streptag II抗体 (Genscript)、EGFR抗体 (ImClone Systems Incorporated, Branchburg, NJ); 链霉亲和素-PE (BD Biosciences, San Jose, CA)。根据制造商的指示, 用碘化丙锭 (PI, BD Biosciences) 进行染色, 用于活/死细胞鉴别。在FACS Canto II上进行流式分析, 在FACS AriaII (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) 上进行分选纯化, 并使用FlowJo软件 (Treestar, Ashland, OR) 分析数据。

[0215] 为了检查BCMA特异性T-ChARM的细胞表面表达, 对转导的T细胞进行EGFRt表达分

选,并通过用荧光染料标记的抗Streptag mAb染色来评估。EGFR染色的平均荧光强度(MFI)在用每种BCMA特异性T-ChARM和CD19-Short CAR转导的T细胞上相似。将标签引入CAR以产生T-ChARM不会干扰转基因表达(数据未显示)。抗StrepTag mAb特异性染色用各种BCMA特异性T-ChARM转导的T细胞,与每个T-ChARM中标签序列的位置或数量无关。

[0216] 实例3

[0217] 可溶性BCMA (sBCMA) 抑制BCMA特异性CAR T细胞活性

[0218] 检查了针对大多数骨髓瘤的BCMA靶向T细胞疗法的潜在有效性。因为骨髓瘤细胞表面BCMA的脱落可能阻碍T细胞识别,所以在骨髓瘤细胞系培养期间在上清液中测量可溶性BCMA水平。洗涤U266骨髓瘤细胞并在培养基中铺板1、3、5和24小时。收获培养基上清液并通过ELISA测定sBCMA。数据显示上清液中sBCMA水平随时间的增加(图2A)。接下来,检查了原发性患者多发性骨髓瘤(MM)细胞上BCMA表达的程度,和与患者MM细胞接触的BCMA特异性T-ChARM T细胞所产生的细胞因子。图2B显示了参考细胞系(RPMI,左图)和来自具有不同BCMA表达水平的原代患者MM细胞的样品的表面BCMA表达。图2C的饼图显示,对于大多数患者,发现来自19个不同患者的MM细胞表面上的BCMA表达是阳性的,尽管有一些患者样品显示中至低/无表面BCMA表达(~25%)。此外,图2D显示,与用低BCMA患者MM细胞培养相比,当与表达高水平表面BCMA的患者MM细胞一起培养时,T-ChARM T细胞产生更多的IFN- γ 。

[0219] 骨髓瘤细胞经常表达PD-L1,据信其通过与T细胞上的PD-1结合而抑制T细胞功能(Freeman et al. J. Exp. Med. 192 (7) :1027 (2000))。还研究了PD-L1影响BCMA特异性T-ChARM T细胞的可能性。患者样品的流式细胞术显示PD-L1也在79%的样品上表达,其中有47%PD-L1^{hi}、32%PD-L1^{int}和21%PD-L1^{low/neg}(图2E和2F)。没有观察到BCMA和PD-L1表达之间的相关性。图2G显示当与表达低水平PD-L1而不是高水平PD-L1的患者MM细胞一起培养时,T-ChARM T细胞产生更多的IFN- γ ,尽管这种趋势没有统计学意义。

[0220] 通过将sBCMA添加到表达BCMA特异性T-ChARM的T细胞和用编码全长BCMA(K562/BCMA⁺)的多核苷酸转导的K562细胞的共培养物中来检查sBCMA的作用。给予外源性sBCMA,检测对BCMA特异性T-ChARM T细胞效应子功能的剂量依赖性抑制,来测量释放到培养基上清液中的IFN- γ (图2H、2I)。另外,MM细胞系在24小时内显示出培养上清液sBCMA的显著增加(图2J)。

[0221] 为了检查高水平的sBCMA是否可能抑制BCMA特异性T-ChARM T细胞的活性,检查患者骨髓(BM)血清的sBCMA水平。发现患者BM具有高水平的sBCMA,其与疾病负担大致相关,如通过存在的CD138⁺细胞的百分比所确定的(图2K)。为了测试sBCMA是否与T-ChARM T细胞结合,将T细胞与渐进水平的重组BCMA一起温育,然后使用与APC缀合的BCMA-Fc染色。如图2L所示,染色随着更高水平的重组BCMA而降低,这表明sBCMA可能具有不利影响BCMA特异性T-ChARM T细胞功能。

[0222] 为了证实T-ChARM表达,将C113ST T-ChARM T细胞和对照抗CD19 CAR T细胞("FMC63")与Fc-BCMA一起温育,并染色EGFRt(CAR/T-ChARM转导标志)和CD4,显示T-ChARM由细胞表达(图2M)。EGFRt和其他T细胞表面分子的染色未受影响(数据未显示)。

[0223] 为了确定sBCMA与T-ChARM的脱落和结合是否抑制T细胞功能,将BCMA-Fc加入T细胞/靶细胞系共培养物中,导致BCMA靶向T-ChARM T细胞而非对照抗CD19 CAR T细胞识别(IFN- γ 产生和CD4表达)大大降低(与表达CD19抗原的K562细胞一起培养(图2N))。对BCMA

T-ChARM T细胞的作用是剂量依赖性的(图2O、2P)。加入未与Fc融合的重组BCMA也以剂量依赖性方式抑制IFN- γ 产生,但不抑制T-ChARM T细胞裂解K562 BCMA⁺细胞(图2Q),这可能是由于靶细胞的表面上的高抗原密度。

[0224] 实例4

[0225] γ -分泌酶抑制剂对MM BCMA水平的影响

[0226] 为了检查 γ -分泌酶抑制对骨髓瘤细胞上的BCMA水平的影响,使用 γ -分泌酶抑制剂(GSI)R04929097。当与 γ -分泌酶抑制剂(GSI)R04929097(使用的浓度范围为0.001 μ M至1.0 μ M)温育时,BCMA在各种骨髓瘤细胞系上快速上调(图3A-3D)。

[0227] 为了检查GSI对表面BCMA表达动力学的影响,将U266骨髓瘤细胞在各种浓度的GSI R04929097(0.01 μ M,0.1 μ M和1.0 μ M)存在下温育1、3、5和24小时,并通过流式细胞术评估细胞表面BCMA表达。在GSI存在下,BCMA表达以剂量依赖性方式增加(图3E)。上调在1.0 μ M GSI的培养物中持续7天(图3F)。

[0228] 为了测试GSI对MM中BCMA脱落的影响,洗涤三种不同的骨髓瘤细胞系(MM1.R、U266和8226),并在不同浓度的GSI R04929097(0.01 μ M、0.1 μ M和1.0 μ M)存在下在培养基中铺板24小时。收获培养基上清液并通过ELISA测定sBCMA。在GSI存在下,上清液中sBCMA水平以剂量依赖性方式降低(图3G和3H)。

[0229] 为了检查随时间对可溶性BCMA(sBCMA)水平的影响,洗涤U266细胞并在各种浓度的GSI R04929097(0.01 μ M、0.1 μ M和1.0 μ M)存在下在培养基中铺板1、3、5和24小时。收获培养基上清液并通过ELISA测定可溶性BCMA(sBCMA)。数据显示当存在GSI时,上清液中可溶性BCMA水平的剂量依赖性降低(图3I)。

[0230] 接下来,检查从MM细胞培养物中去除GSI的效果。如图3J和3K所示,去除1.0 μ M R04929097后表面BCMA水平降低,而去除GSI时上清液sBCMA增加,但当GSI保留时没有增加。这些数据表明GSI对表面BCMA脱落的可逆抑制作用。最后,通过向培养物中添加1.0 μ M R04929097不影响测试的MM细胞系的活力(图3L)。

[0231] 然后在来自患者的原发性骨髓瘤样品上测试GSI对BCMA表达的影响。从患者骨髓样品中富集CD138⁺骨髓瘤细胞,在各种浓度的GSI R04929097(0.01 μ M至10 μ M)存在下温育3小时,并通过流式细胞术评估表面BCMA表达(图3M和3R)。肿瘤细胞上的BCMA平均荧光强度(MFI)表示为相对于没有R04929097温育的肿瘤细胞的倍数增加。在肿瘤细胞上观察到BCMA的剂量依赖性上调(图3N),而对几种其他细胞表面分子(包括CS1、CD86、PDL1、CD80和CD38)的水平没有影响(图3O-3Q)。

[0232] 实例5

[0233] γ -分泌酶抑制剂改善表达BCMAS特异性T-ChARM的T细胞对Bcma⁺骨髓瘤细胞的识别

[0234] 为了检查GSI针对BCMA⁺多发性骨髓瘤的CAR T细胞活性的影响,在含有不同浓度的GSI R04929097(0.003 μ M至3.0 μ M)的培养基中与原代人骨髓瘤肿瘤细胞共培养24小时后,测量BCMA CAR-T细胞(BCMA特异性T-ChARM C11 3ST-CD28和BCMA特异性T-ChARM C11 3ST-41BB)或对照CD19sh CAR(短间隔)T细胞产生的IL2(图4A)。用GSI处理导致BCMA T-ChARM T细胞的IL-2产量的剂量依赖性增加。此外,测量了在不同浓度的R04929097下与骨髓瘤细胞共培养的BCMA T-ChARM T细胞的IFN γ 产量,IFN γ 产量在GSI存在下也增加(图4B)。

这些数据表明,当用 γ -分泌酶抑制剂预处理时,多发性骨髓瘤细胞更好地刺激BCMA特异性T-ChARM T细胞,所述 γ -分泌酶抑制剂上调肿瘤细胞上的BCMA表达。最后,在GSI R0492097存在下与原发性人骨髓瘤肿瘤细胞共培养3天后,CFSE标记的BCMA特异性T-ChARM T细胞的增殖以剂量依赖性方式增加(图4C)。

[0235] 不希望受理论束缚,使用GSI增强骨髓瘤细胞上的BCMA以改善CAR-T细胞识别的潜在警告,是高浓度的GSI可抑制T细胞信号传导和效应子功能。参见Eagar et al., *Immunity* 20 (4) :407, 2004。为了在靶配体表达保持稳定的情况下评估GSI对CAR T细胞的潜在影响,在GSI (0.01 μ M至100 μ M)存在下将CD19 CAR-T细胞与Raji或K562/CD19⁺靶细胞共培养,并且测量活力和效应子功能。在该浓度范围内,24小时后对CD19抗原表达(图5A)或CAR-T细胞活力没有影响(图5B)。当与K562 CD19⁺细胞共培养时,发现GSI R04929097在浓度>1 μ M时抑制CD19 CAR-T细胞效应子功能,如通过测量IL-2(图5C,上图)和IFN γ (图5C,下图)产量(另见图5D-5F)所确定的。然而,CD19 CAR-T细胞特异性杀死靶细胞的能力不受GSI浓度的影响(图5G)。CD19 CAR-T细胞在10 μ M GSI R04929097存在下也应答于靶细胞刺激而增殖,尽管比不存在GSI R04929097时效率低(图5H)。为了进一步研究GSI对CAR-T细胞分裂的剂量效应,将GSI R04929097的剂量滴定添加到CD19 CAR-T和靶细胞的共培养物中。CAR-T细胞分裂基本上不受影响或仅受添加治疗剂量的GSI (0.01 μ M-1 μ M)的轻微影响,而较高的非治疗剂量(10 μ M)的GSI确实可检测地抑制增殖(图5I)。在有(图5J)或没有外源IL-2(图5K)的培养物中,在GSI存在下在8天的扩增中培养的CD19 CAR-T细胞未显示出减少。此外,在存在(图5L)或不存在(图5M)外源IL-2的扩增后用靶细胞再次刺激时,在存在5 μ M、0.5 μ M或不存在GSI的情况下,扩增的T细胞没有显示出IFN- γ 产量的显著差异。CAR-T细胞组之间的IL-2产量也没有显著差异(图5N)。总体而言,治疗水平的GSI不影响T细胞功能,包括细胞因子产量、细胞裂解活性和增殖。

[0236] 接下来,检查GSI对含有BCMA特异性T-ChARM的T细胞的T细胞功能的影响。原发性骨髓瘤肿瘤样品的GSI处理极大地改善了共培养的T-ChARM T细胞的IFN- γ 产量(图5O、5P和5Q)和CD8表达(图5O),在用0.1 μ M GSI或更高的GSI处理后观察到了效果,并且还增加了T细胞的增殖(图5R)。

[0237] 这些数据表明联合BCMA特异性CAR-T细胞和用以增加多发性骨髓瘤细胞上BCMA水平的GSI的临床效用。这可以通过促进消除表达低水平BCMA的肿瘤细胞而在治疗多发性骨髓瘤方面提供优势或甚至具有协同效应。数据还显示 γ -分泌酶抑制剂的一系列浓度促进肿瘤细胞的BCMA表达而不影响T细胞活性。

[0238] 实例6

[0239] MM异种移植模型中GSI活性的体内研究

[0240] 为了研究实例4中描述的GSI R04929097的sBCMA抑制作用是否可以在体内复制,如图6A所示测试人MM的小鼠异种移植模型。简言之,免疫缺陷NOD/SCID γ (NSG)小鼠(杰克逊实验室)在第-1天接受亚致死剂量照射(275rad),然后在第二天(第0天)接受 5×10^6 MM.1R细胞。在第19天和第20天通过口服强饲法给予GSI R04929097 (30mg/kg)。在第二次强饲GSI后的不同时间处死小鼠,取血液和骨髓样品进行分析。GSI给药之后是肿瘤细胞上的表面BCMA表达的快速增加(第二次管饲后4小时,>3倍)(图6B)和sBCMA的同时减少(图6C)。在第二次强饲处理后48小时内观察到的效果通常会降低。

[0241] 实例7

[0242] 靶向MM的GSI+CAR T细胞联合治疗的体内研究

[0243] 研究了GSI疗法改善体内抗BCMA CAR T细胞疗法的能力。在与实例6中描述的实验类似的实验中,在第-21天对NSG小鼠进行亚致死剂量照射,然后在第-20天给予人MM细胞(5×10^6 MM.1R^{ff1uc}) (参见图7A)。在第-1天通过口服强饲法给予第一剂量的GSI (30mg/kg R04929097)。在第0天,给小鼠注射次优剂量的C11 3ST T-ChARM T细胞(0.33×10^6 个细胞; CD4:CD8 1:1)并接受第二剂量的GSI。在第+1天、第+8天和第+9天给予另外剂量的GSI。在整个实验中进行生物发光成像(BLI),并监测小鼠的存活。如图7B、7C和7E(左图)所示,与仅接受T细胞的组相比,接受GSI+T细胞的组具有减少的发光和更多没有可检测肿瘤的小鼠(未显示仅接受T细胞的组的BLI数据)。量化的发光数据(图7C和7E(左图))表明,当肿瘤开始生长出时(“mock+BCMA T细胞”),初始T-ChARM T细胞效应在大约第9天开始逆转。通过与GSI R04929097(“R049+BCMA T细胞”)组合延长抗肿瘤作用,但该处理组中的肿瘤也最终生长出。成像数据与小鼠的存活一致(图7D和7E(右图)),在死亡之前,接受联合治疗的小鼠存活的时间长于接受T细胞的组。在某些实施例中,当与抗BCMA CAR T细胞联合使用时,重复GSI治疗(至少2至至少约5次多达至少约25次),其中GSI处理可在给予抗BCMA CAR T细胞同时、之前或之后给予。

[0244] 实例8

[0245] GSI改善双特异性抗BCMA融合蛋白对BCMA+MM细胞的结合

[0246] 构建了对BCMA和另一种抗原具有特异性并且带有YFP(黄色荧光蛋白)标签的双特异性融合蛋白。在有或没有GSI的情况下,将双特异性融合蛋白添加到培养物中的BCMA表达H929 MM细胞(0.5×10^6 个细胞)。通过流式细胞术评估结合。如图8所示,GSI的添加改善了BCMA结合双特异性融合蛋白的结合,但对不靶向BCMA的对照双特异性融合蛋白的结合没有影响。这些数据表明,使用GSI可以增强或改善涉及靶向BCMA的双特异性分子的免疫疗法。

[0247] 可以组合上述各种实施例以提供进一步的实施例。本说明书中提及和/或在申请数据表中列出的所有美国专利、美国专利申请公开、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物均通过引用整体并入本文。如果需要,可以修改实施例的各方面以采用各种专利、申请和出版物的概念来提供其他实施例。

[0248] 根据以上详细描述,可以对实施例进行这些和其他改变。通常,在以下权利要求中,所使用的术语不应解释为将权利要求限制于说明书和权利要求中公开的特定实施例,而是应该解释为包括所有可能的实施例以及这样的权利要求有机的等同物的全部范围。因此,权利要求不受本发明的限制。

SEQUENCE LISTING

<110> 弗雷德哈钦森癌症研究中心

S·R·里德尔

D·格林

T·希尔

<120> 用于治疗BCMA相关癌症和自身免疫性失调的联合疗法

<130> 360056.445W0

<140> PCT

<141> 2018-02-16

<150> US 62/582,270

<151> 2017-11-06

<150> US 62/406,612

<151> 2017-02-17

<160> 34

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 1

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 2

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 3

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 13

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 14

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 14

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Val Ile
 20 25 30

Gly Ala His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Ala Ala Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg
 85 90 95

Ile Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 15

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 15

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Val Ile
 20 25 30

Gly Ala His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Ala Ala Ile Tyr Ser Cys Leu Gln Ser Arg
 85 90 95
 Ile Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 16

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 16

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Met Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Val Ile
 20 25 30
 Gly Ala His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Arg Val Gln Ala Glu Asp Ala Ala Ile Tyr Ser Cys Leu Gln Ser Arg
 85 90 95
 Ile Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 17

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 17

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe
 50 55 60
 Arg Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 18

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 18

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe
 50 55 60
 Arg Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 19

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 21

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 21

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Ser Ile Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe
 50 55 60

Arg Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 22

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 22

caccggagaa tcaaaatcgg tgaat 25

<210> 23

<211> 25

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列
<400> 23
aaacattcac cgattttgat tctcc 25
<210> 24
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列
<400> 24
caccgcagtt gtgtgacacg gaag 24
<210> 25
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列
<400> 25
aaaccttccg tgtcacacaa ctgc 24
<210> 26
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列
<400> 26
caccggcaaa ggtgagtgag acttt 25
<210> 27
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列
<400> 27
aaacaaagtc tcaactcacct ttgcc 25
<210> 28

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 28

caccggtttc tgcagccgct ttggg 25

<210> 29

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 29

aaaccccaaaa gcggtgcag aaacc 25

<210> 30

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 G4S 接头

<400> 30

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 31

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<220>

<221> 变体

<222> (1) ... (20)

<223>氨基酸1-2中任何一个可以不存在或者可以存在多达10倍,条件是氨基酸1和2不是都不存在

<400> 31

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser

1 5 10 15

Ser Ser Ser Ser

20

<210> 32

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 32

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

10

<210> 33

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 33

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1

5

<210> 34

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 34

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1

5

10

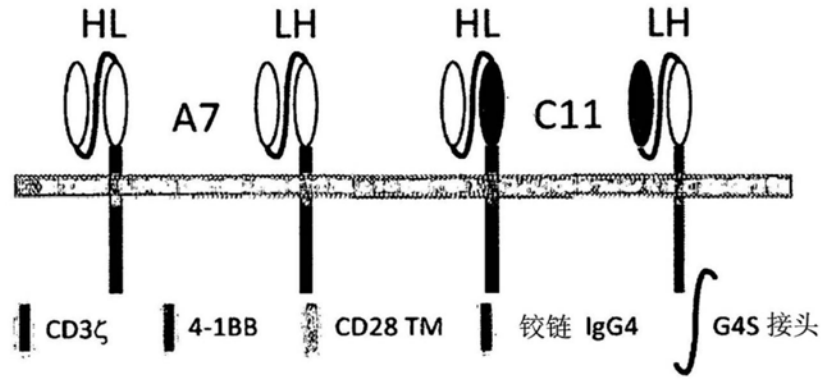


图1A

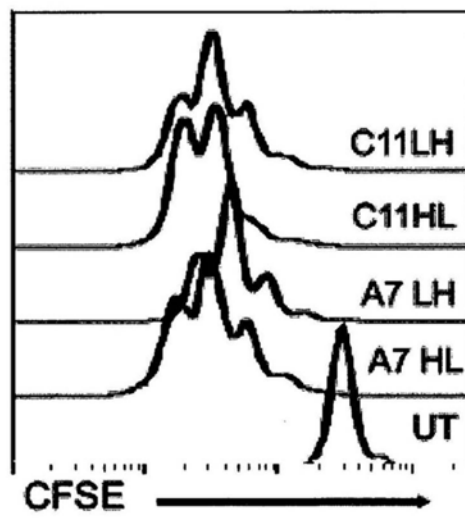


图1B

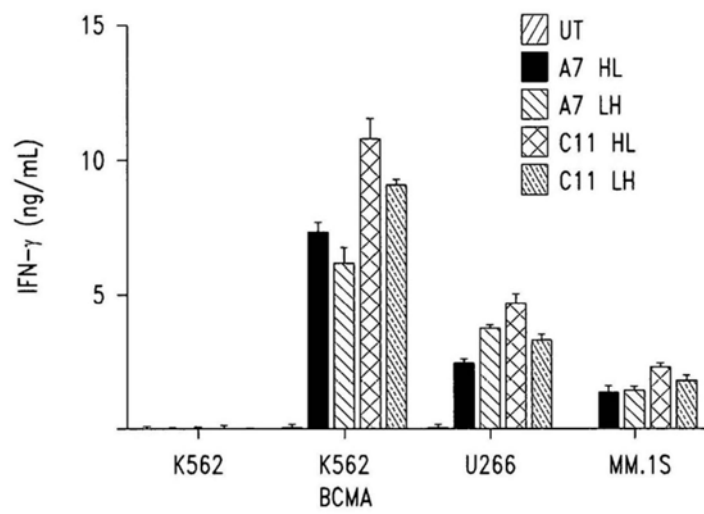


图1C

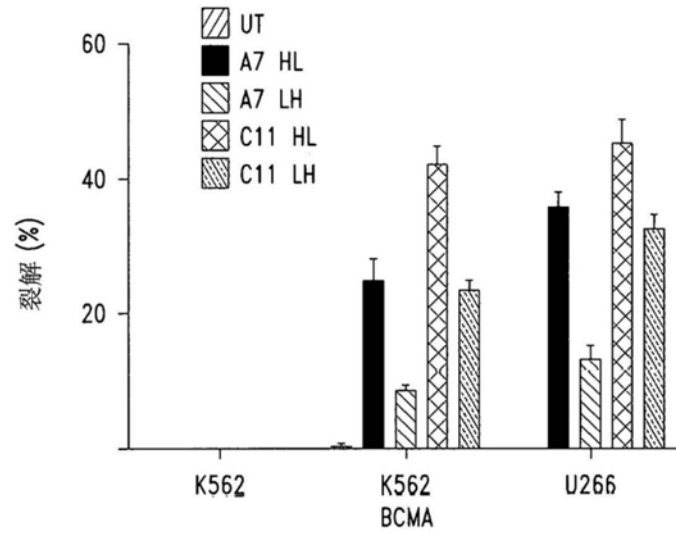


图1D

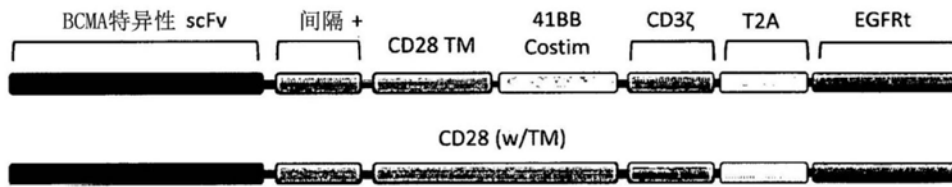


图1E

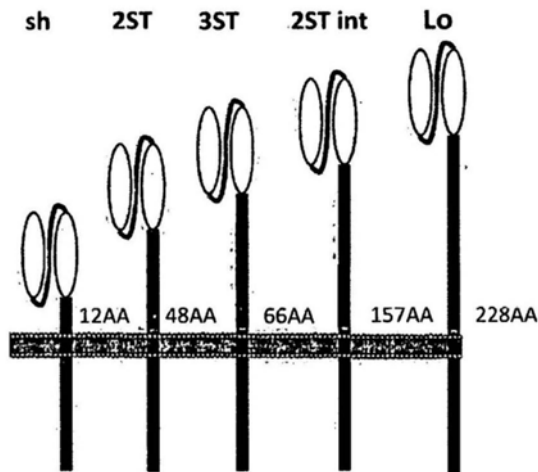


图1F

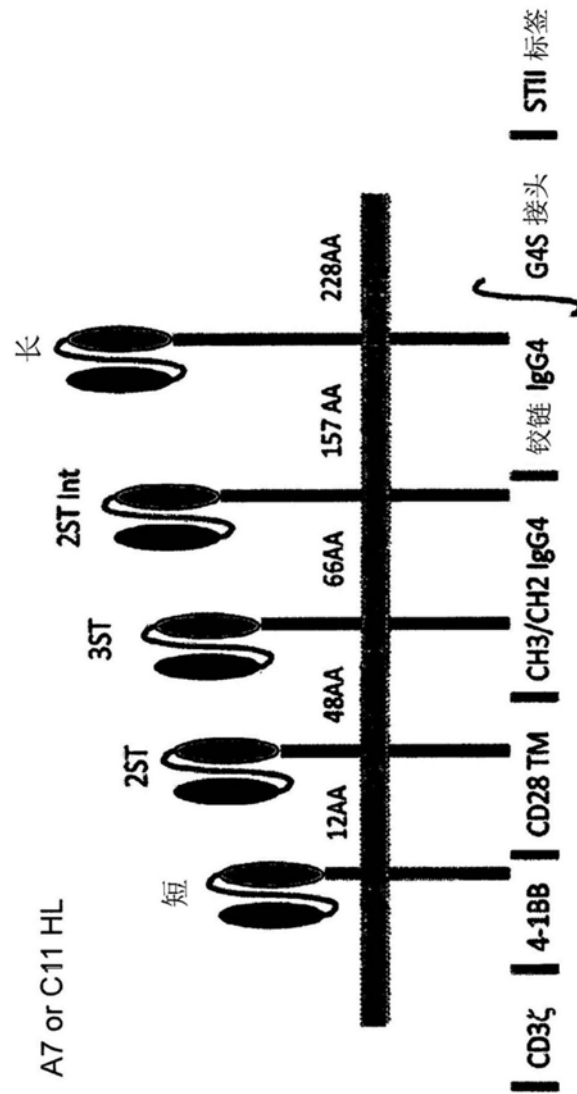


图1G

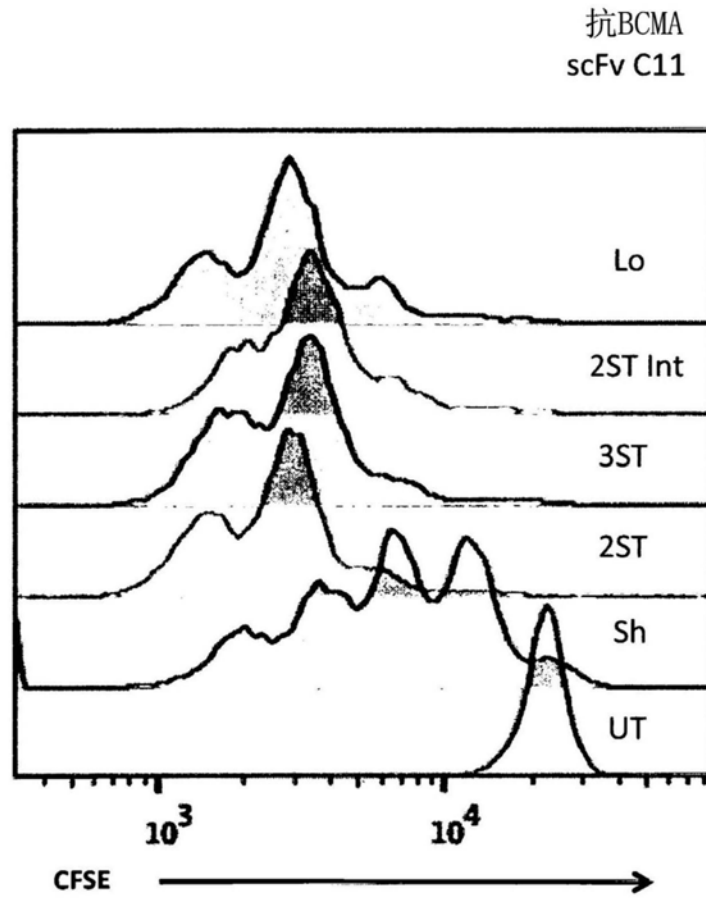


图1H

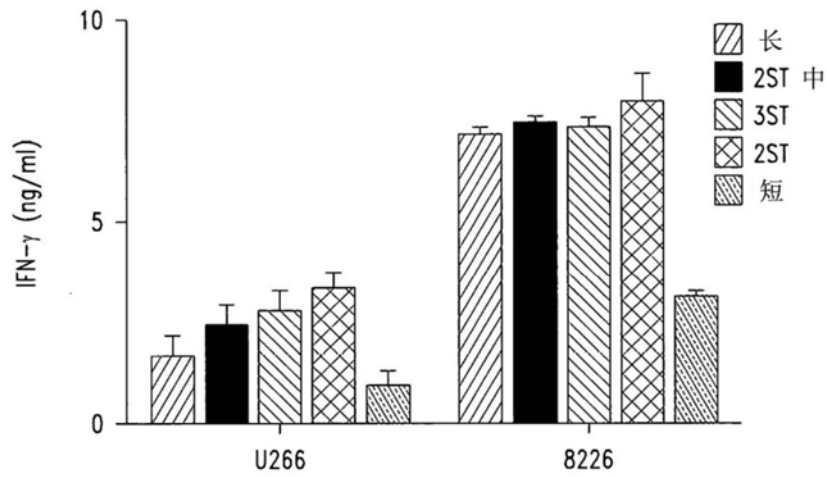


图1I

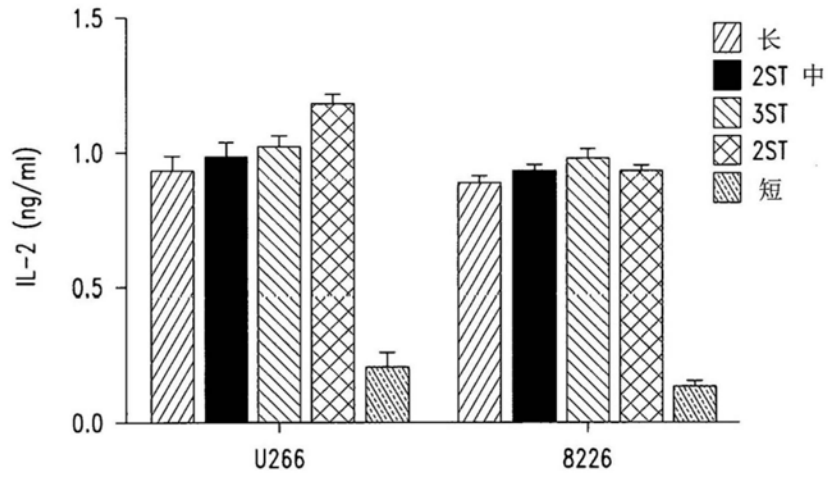


图1J

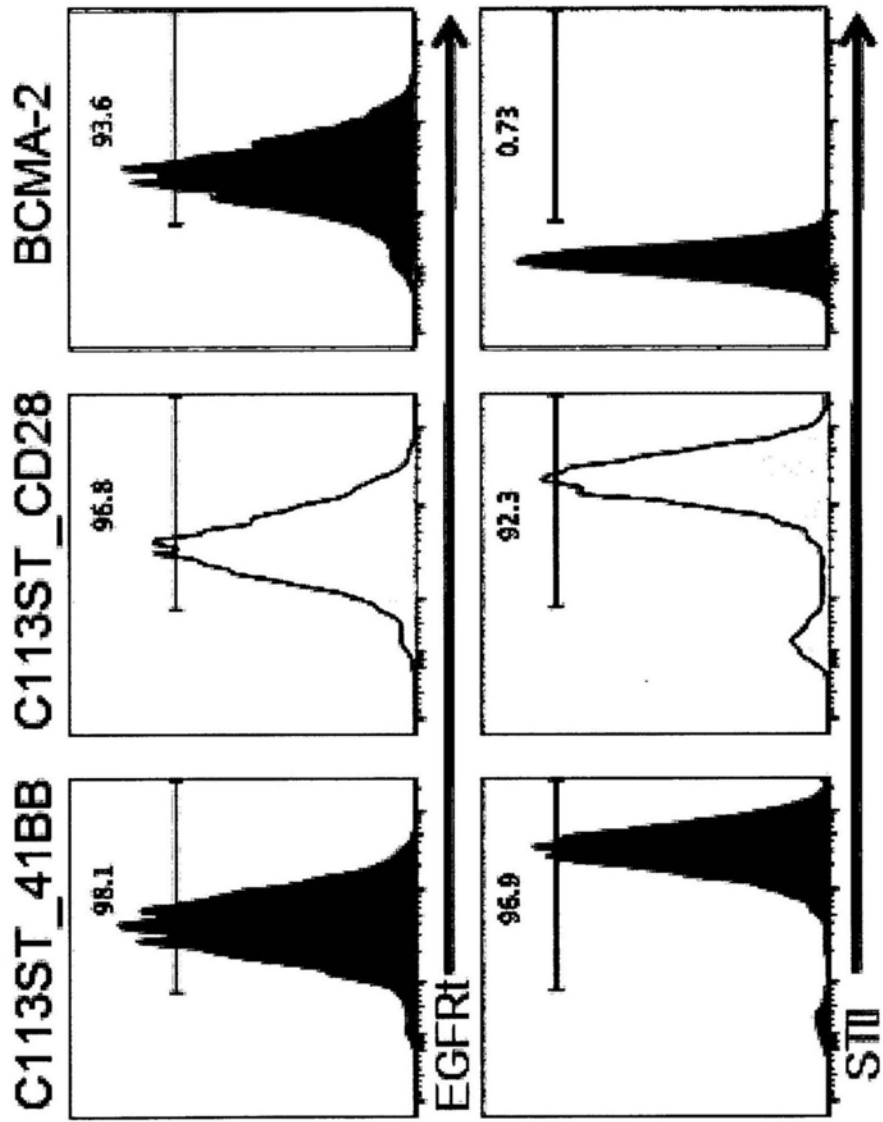


图1K

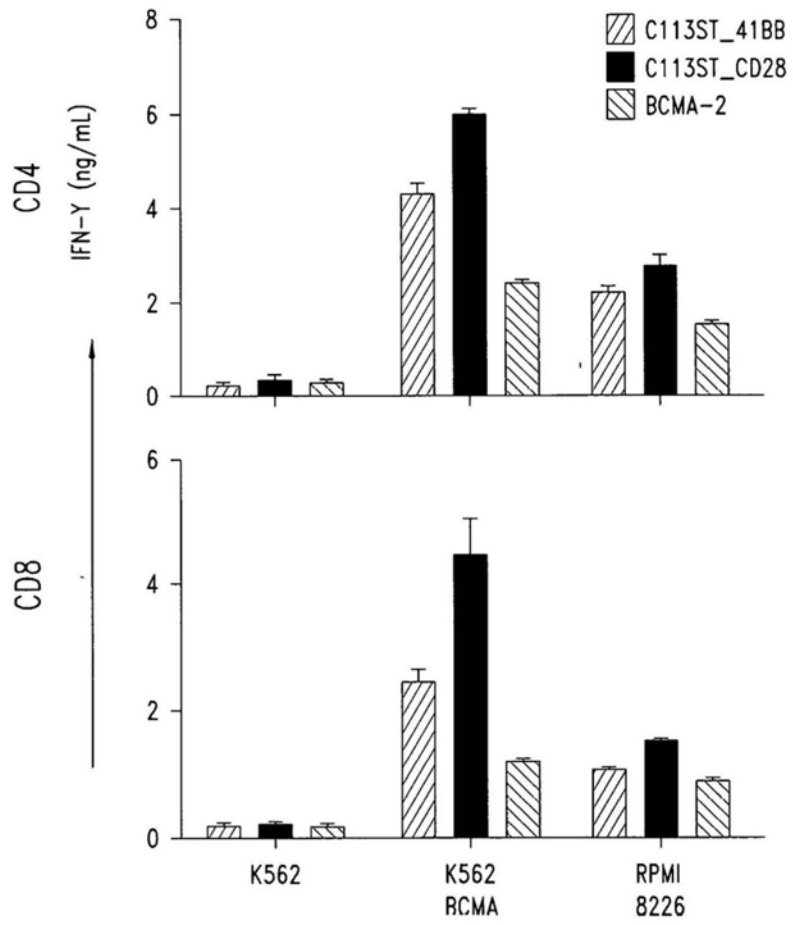


图1L

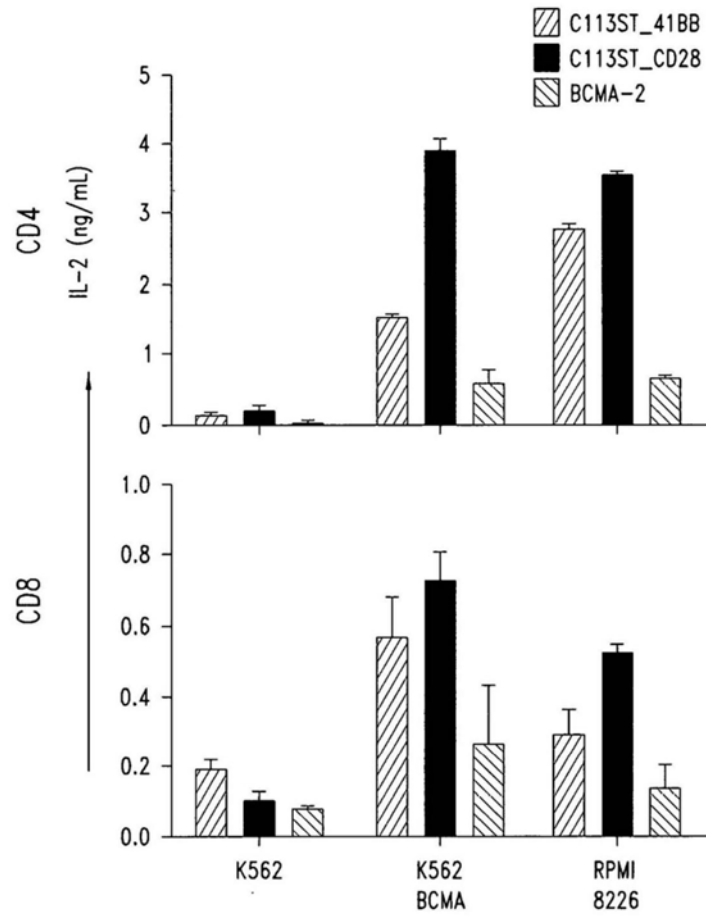


图1M

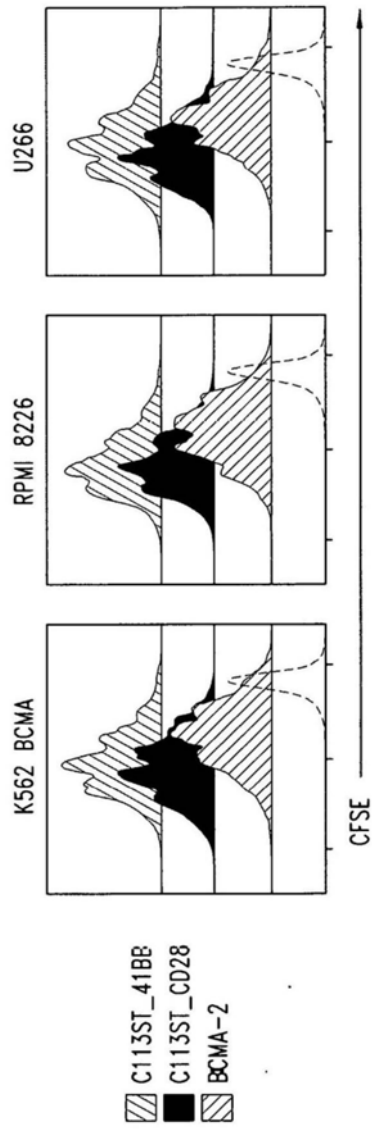


图1N

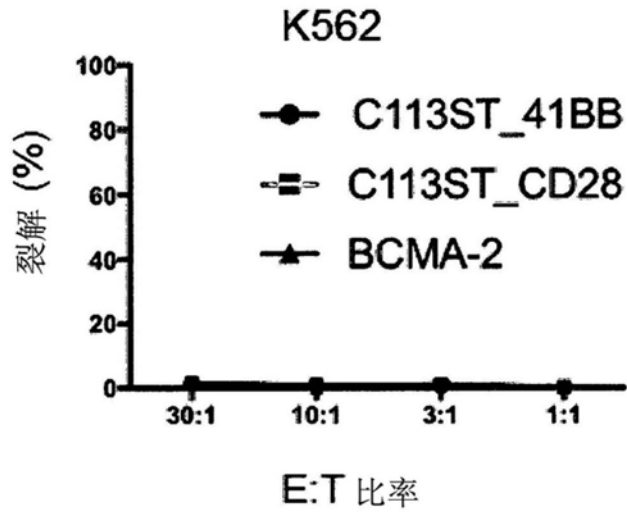


图10

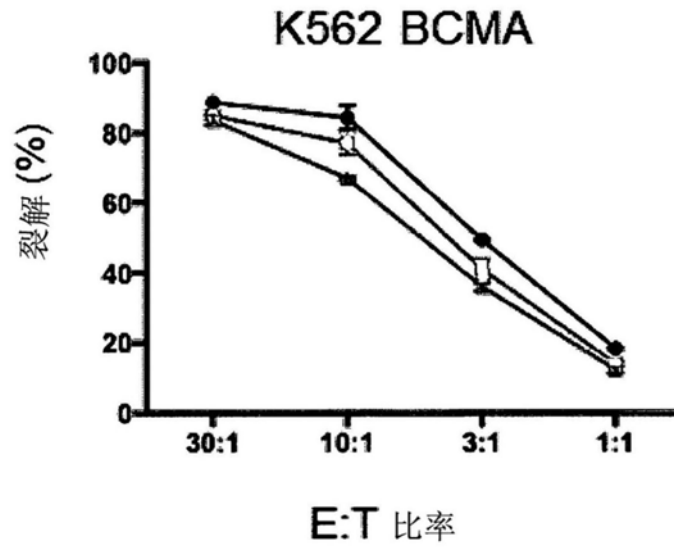


图1P

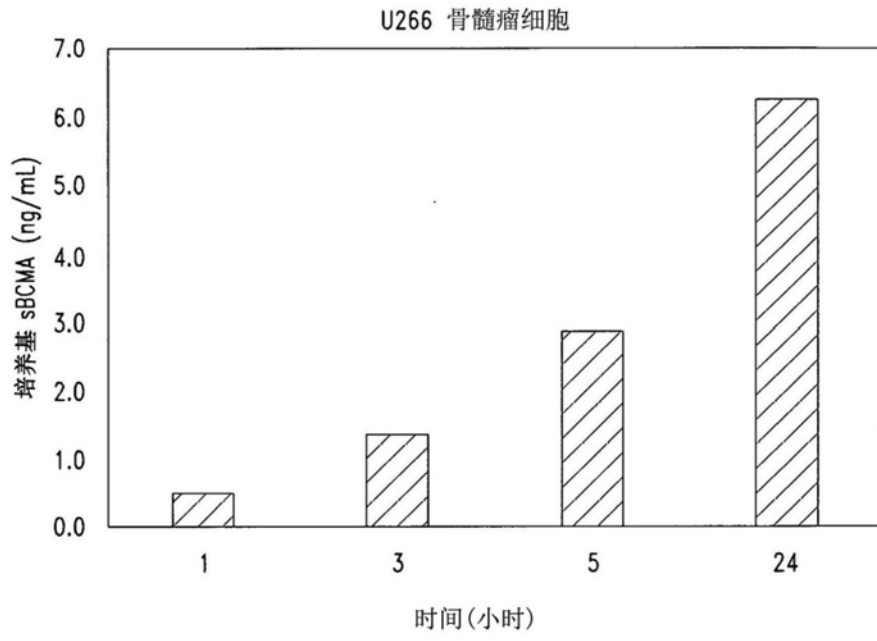


图2A

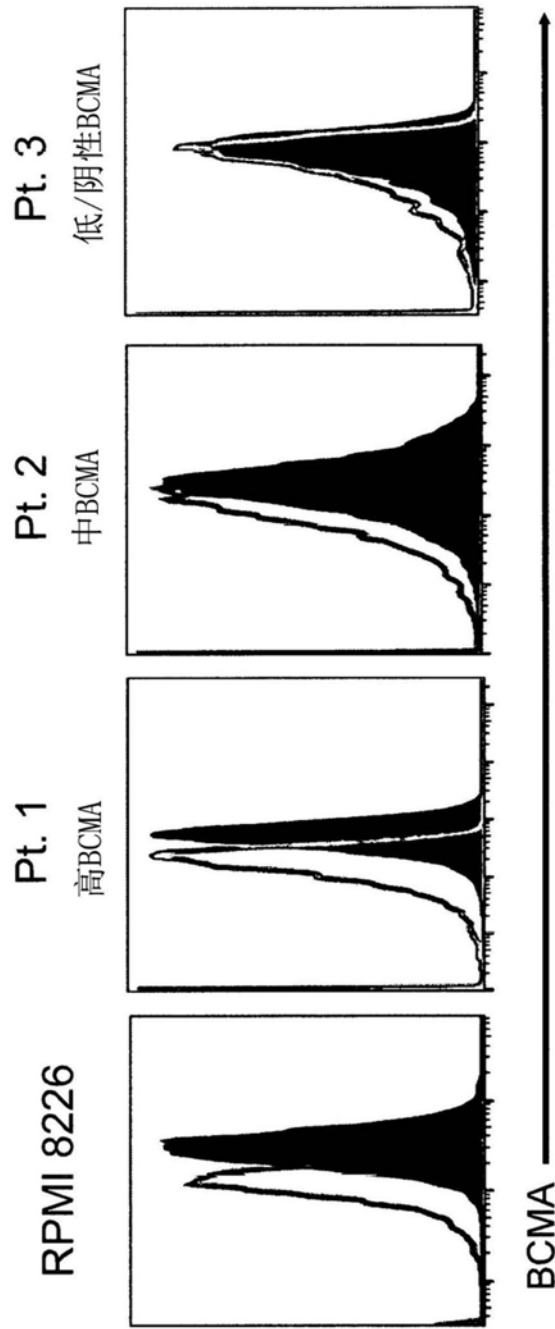


图2B

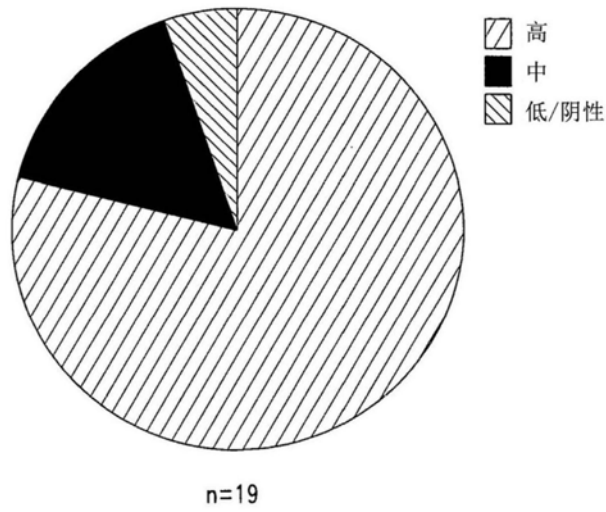


图2C

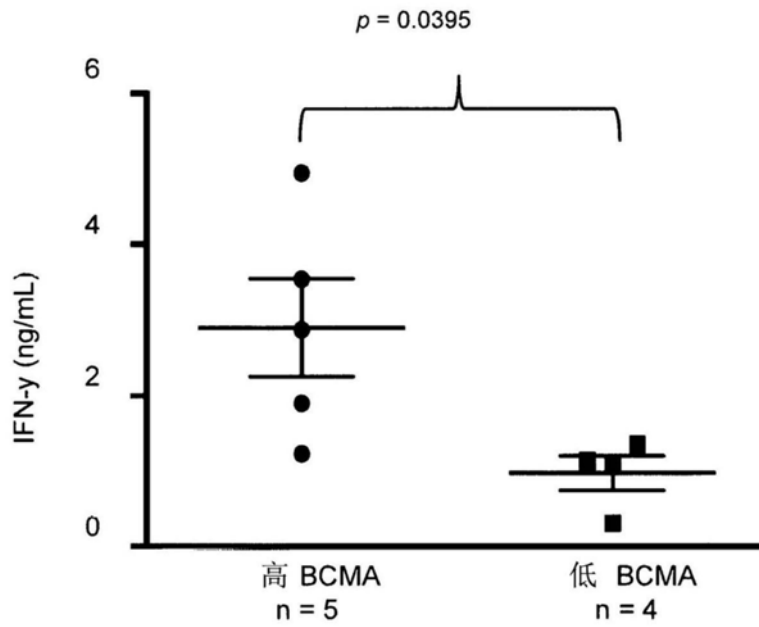


图2D

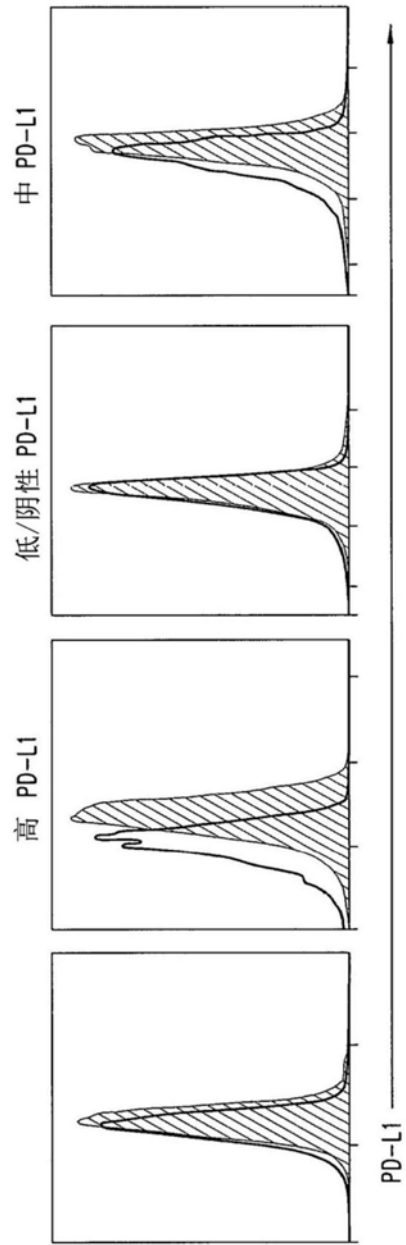


图2E

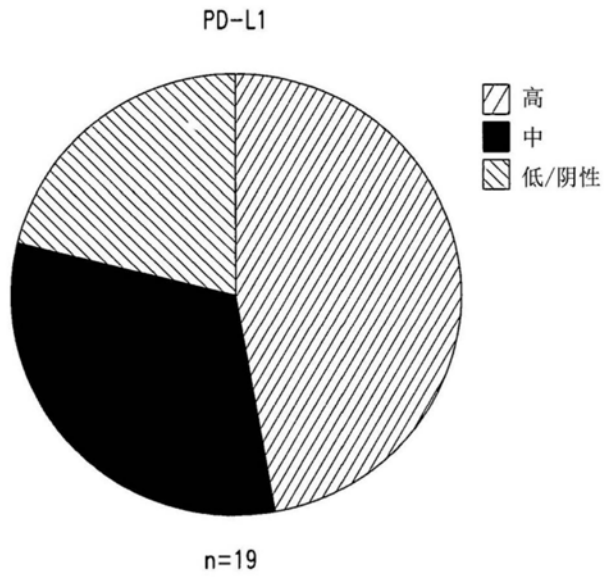


图2F

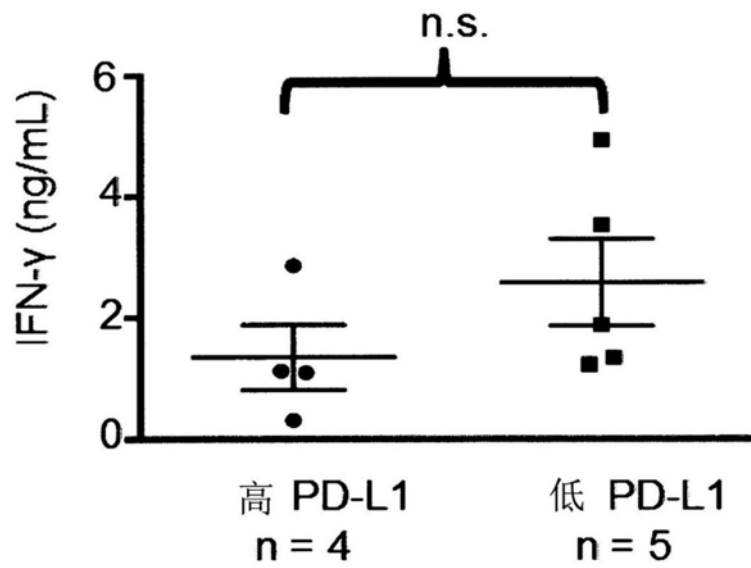


图2G

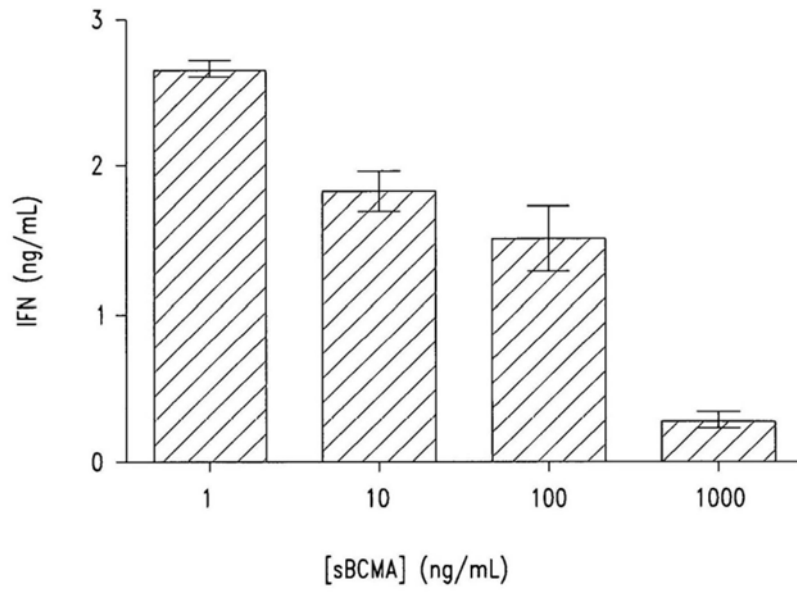


图2H

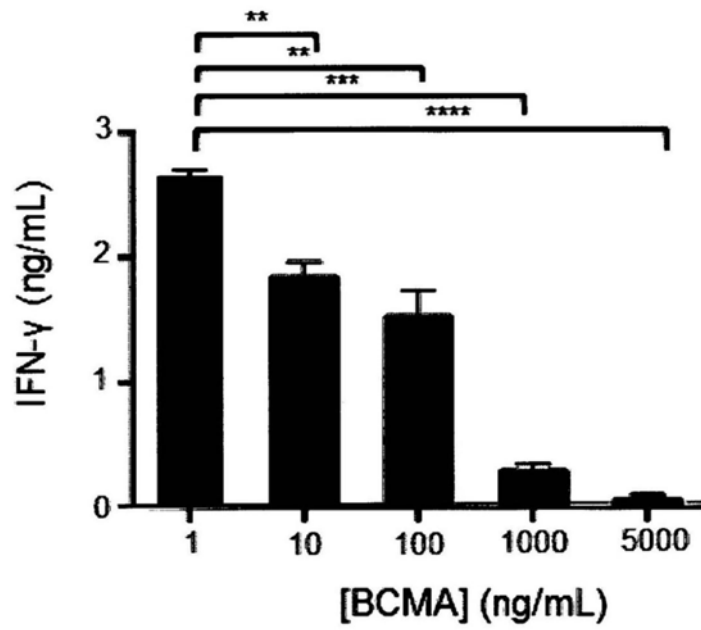


图2I

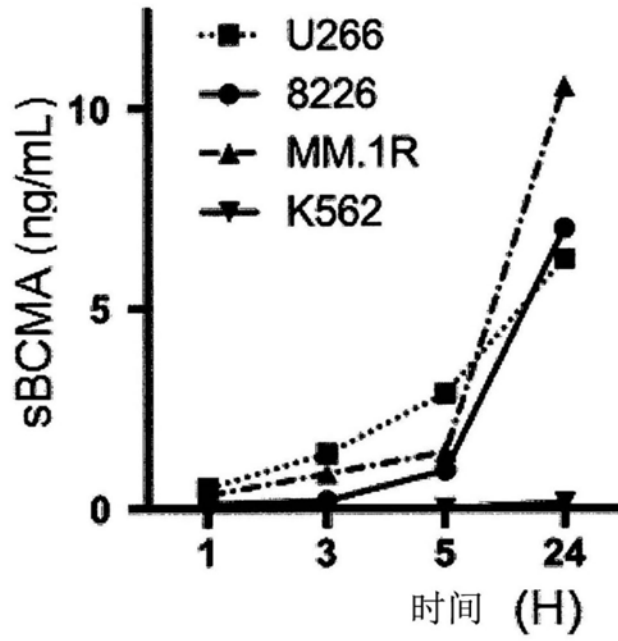


图2J

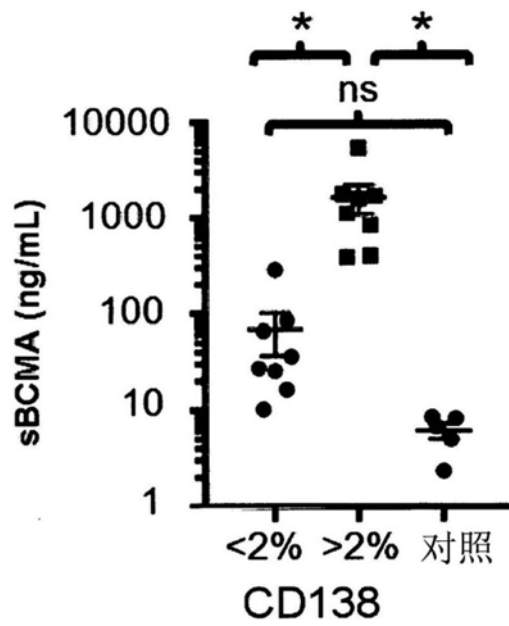


图2K

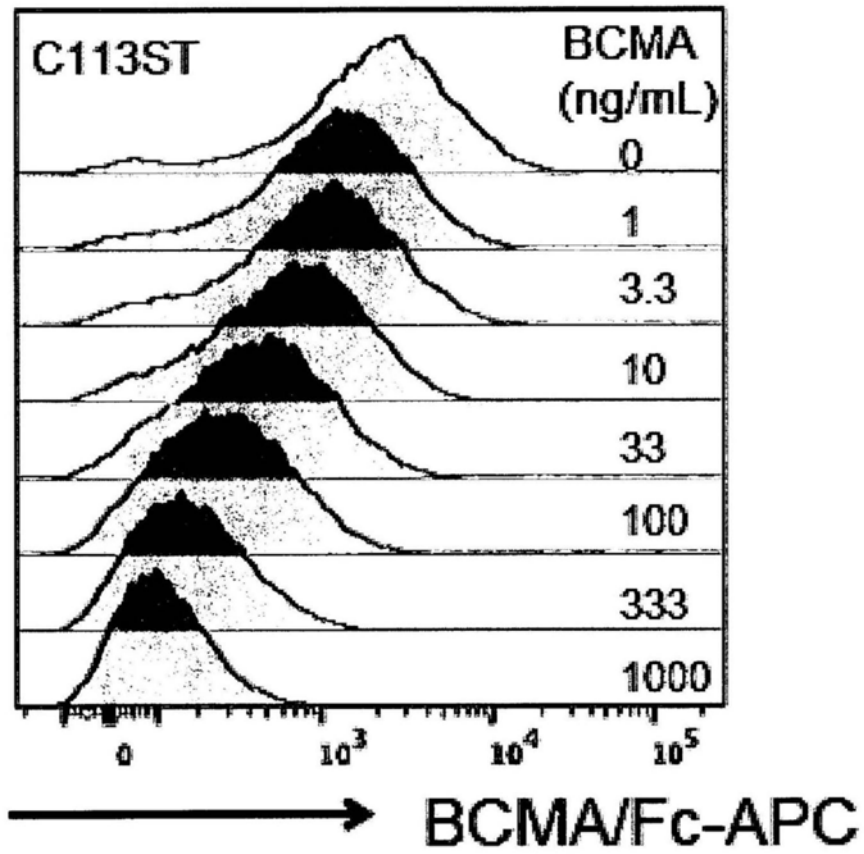


图2L

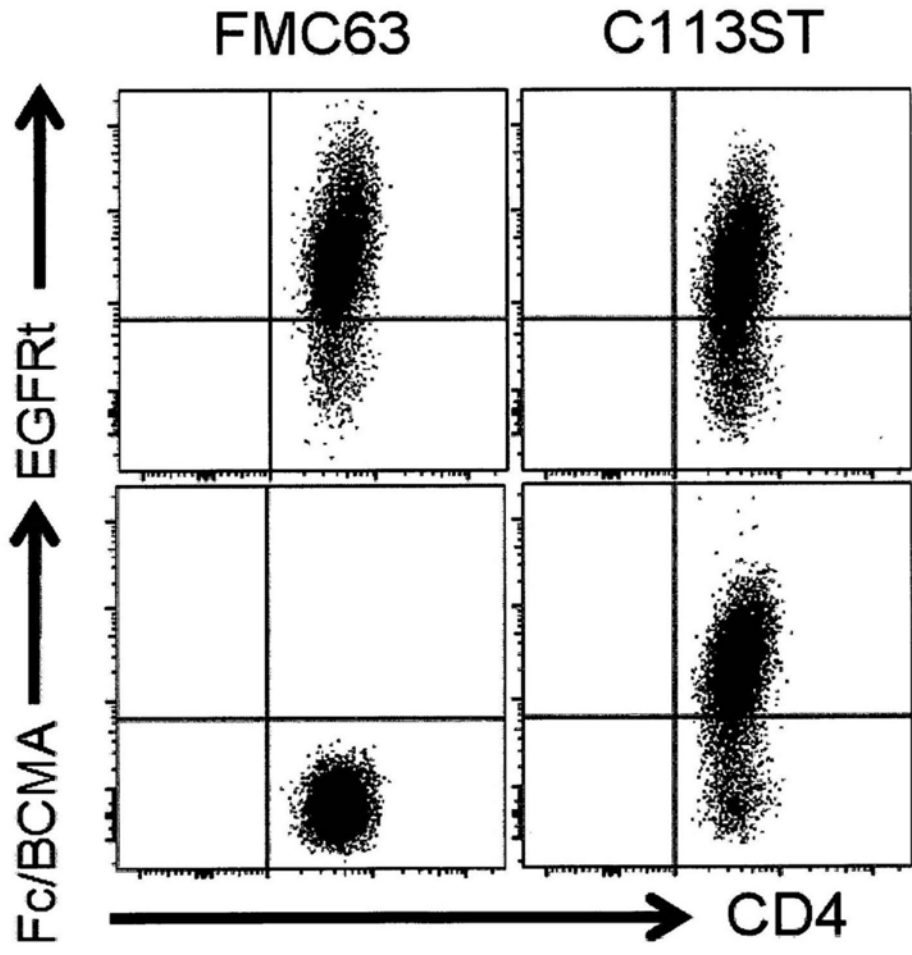


图2M

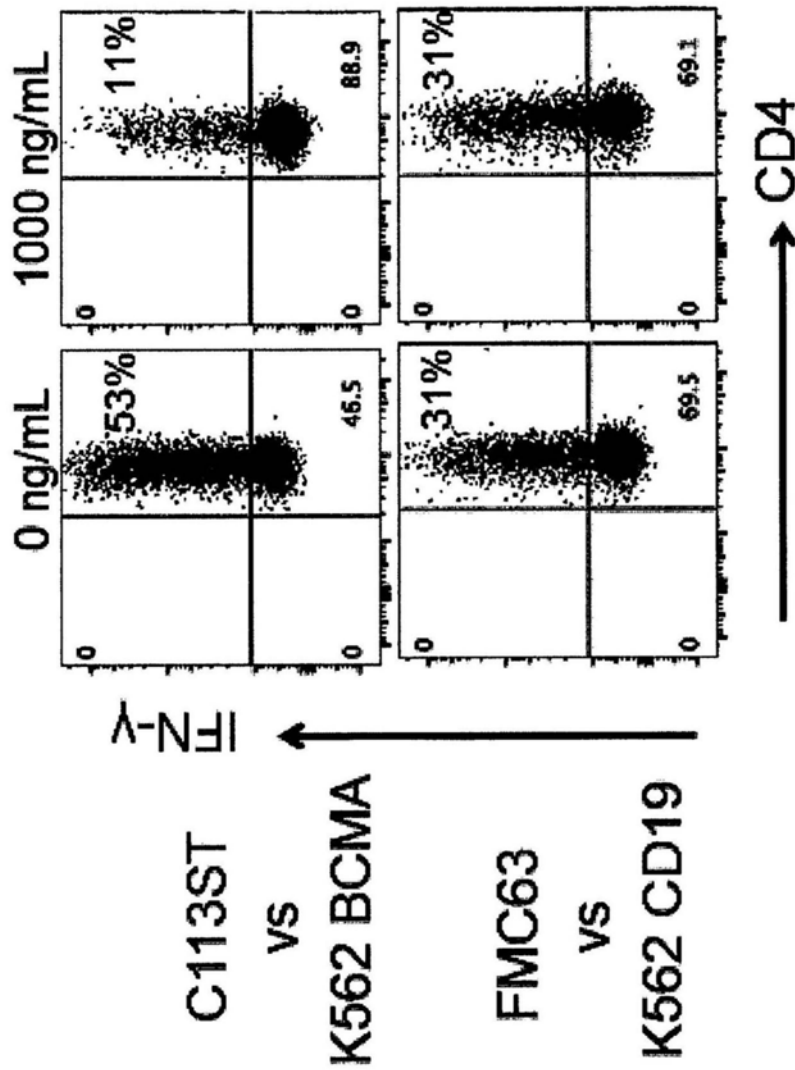


图2N

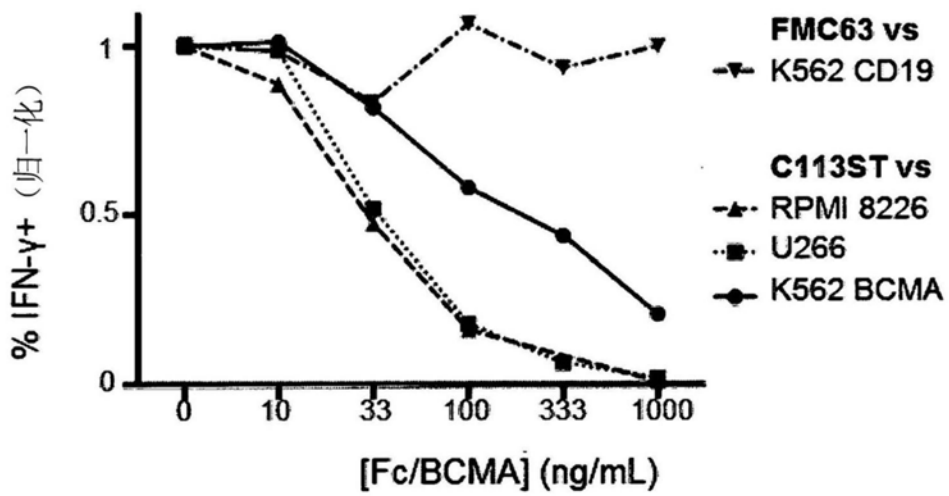


图20

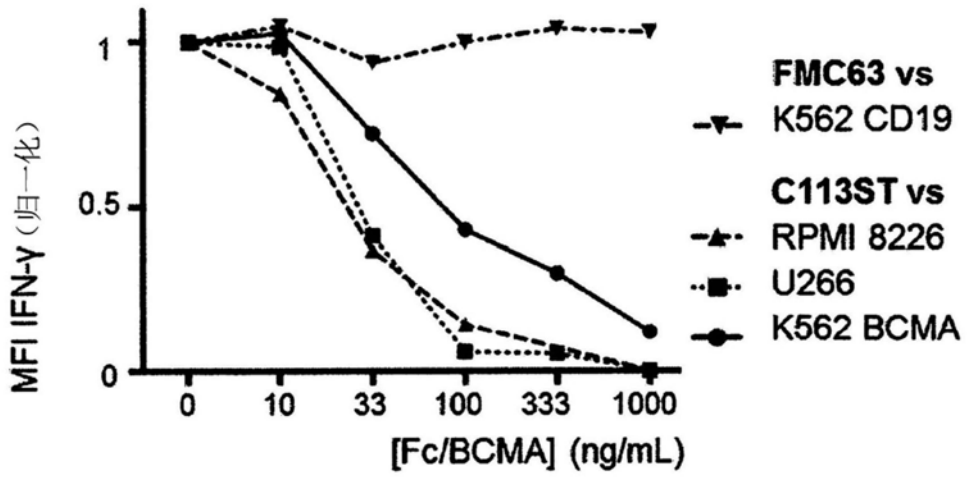


图2P

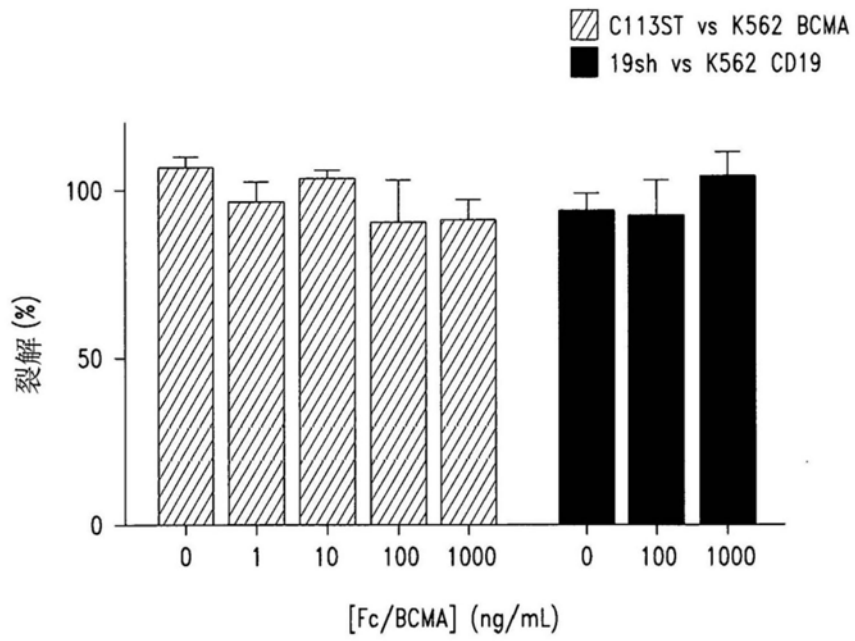


图2Q

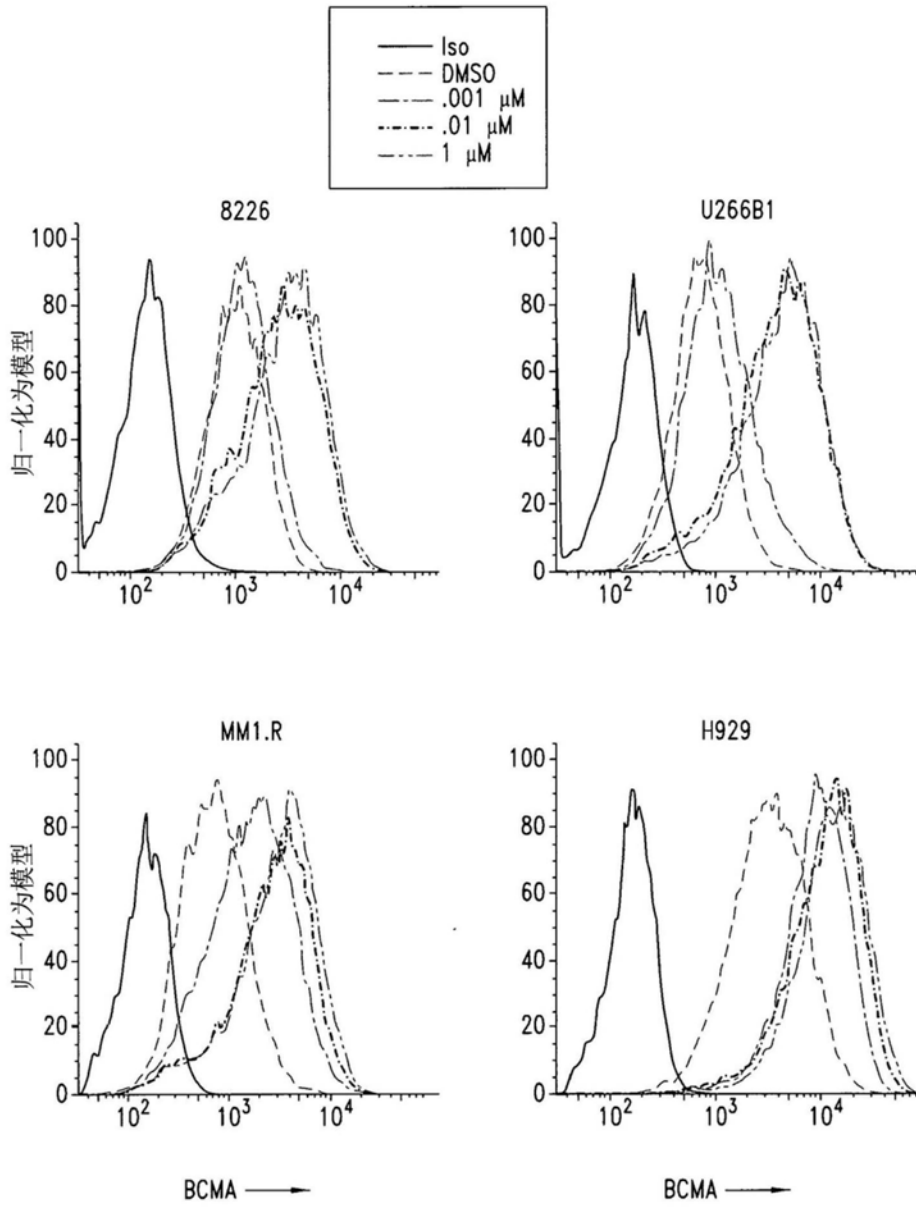


图3A

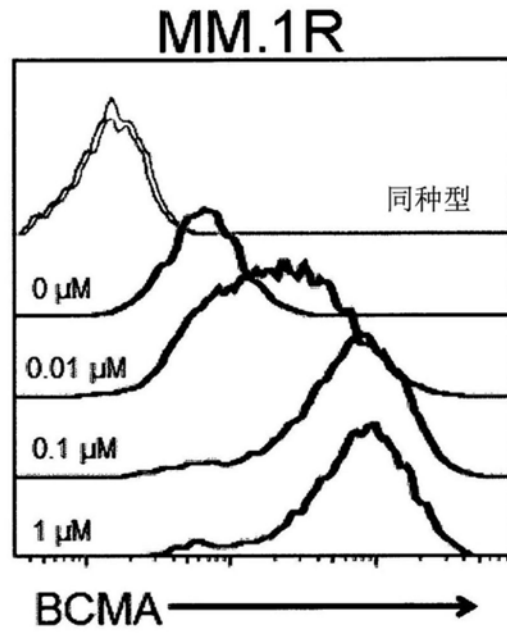


图3B

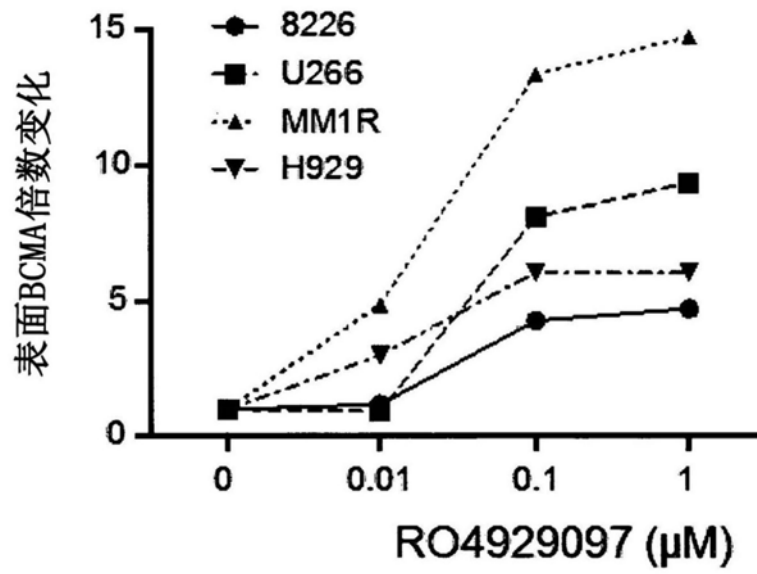


图3C

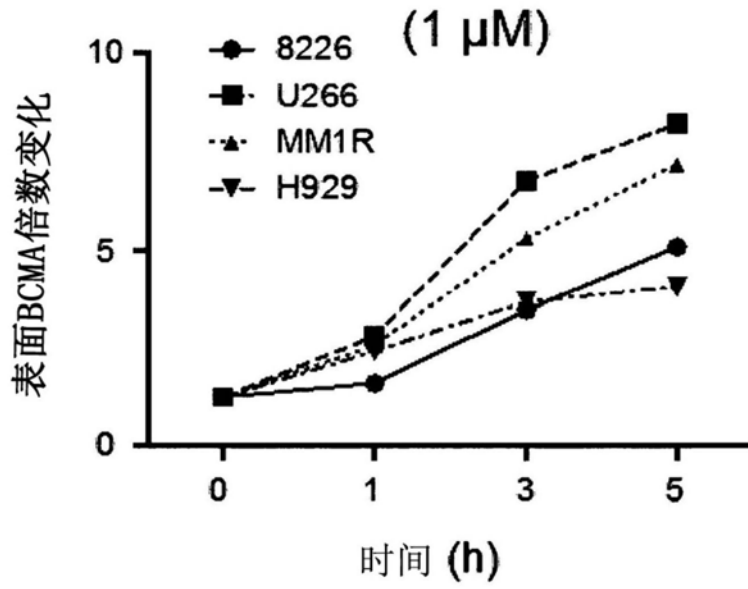


图3D

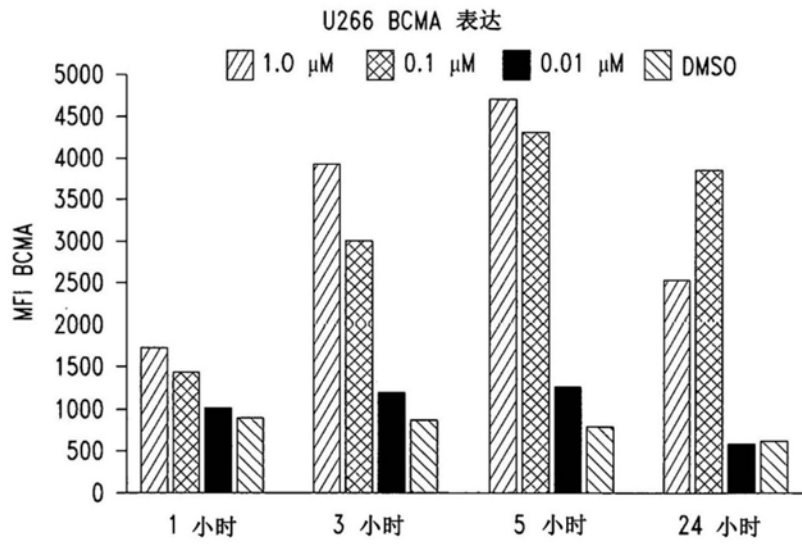


图3E

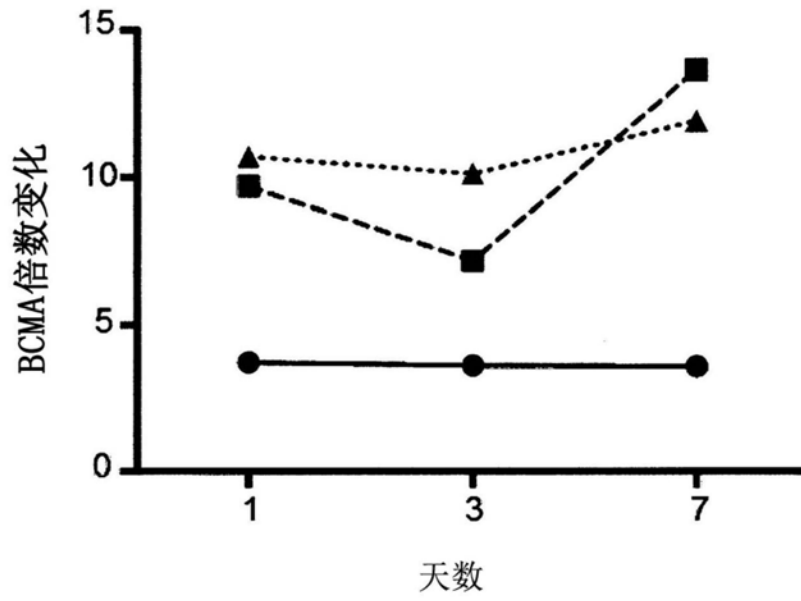


图3F

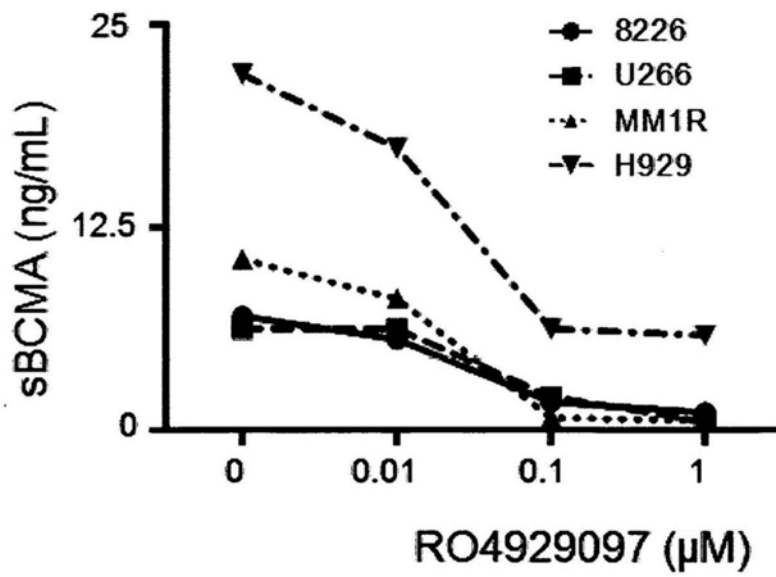


图3G

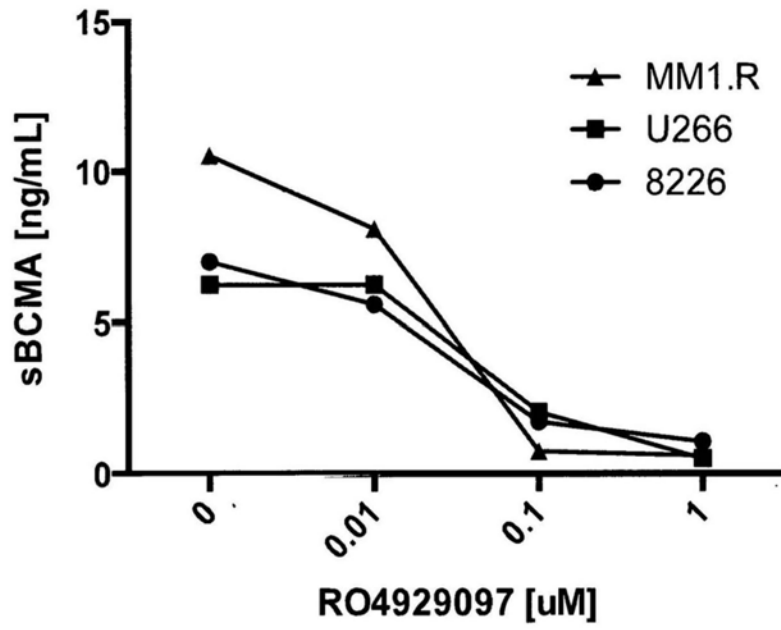


图3H

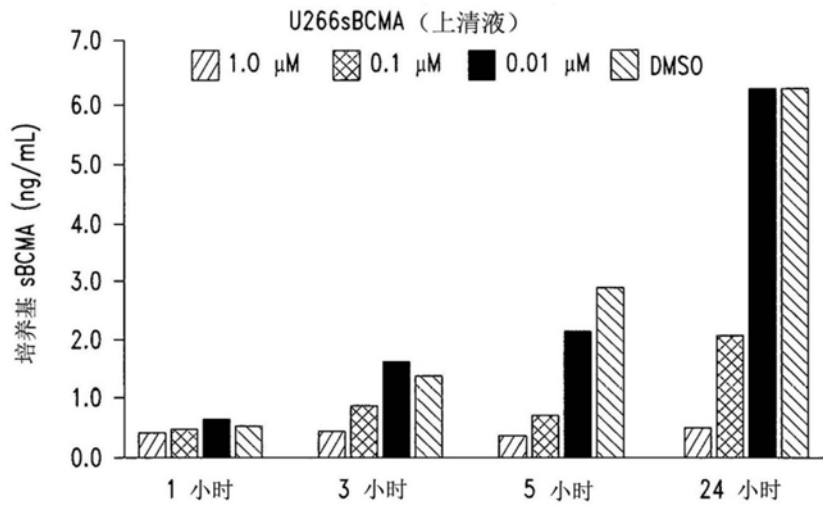


图3I

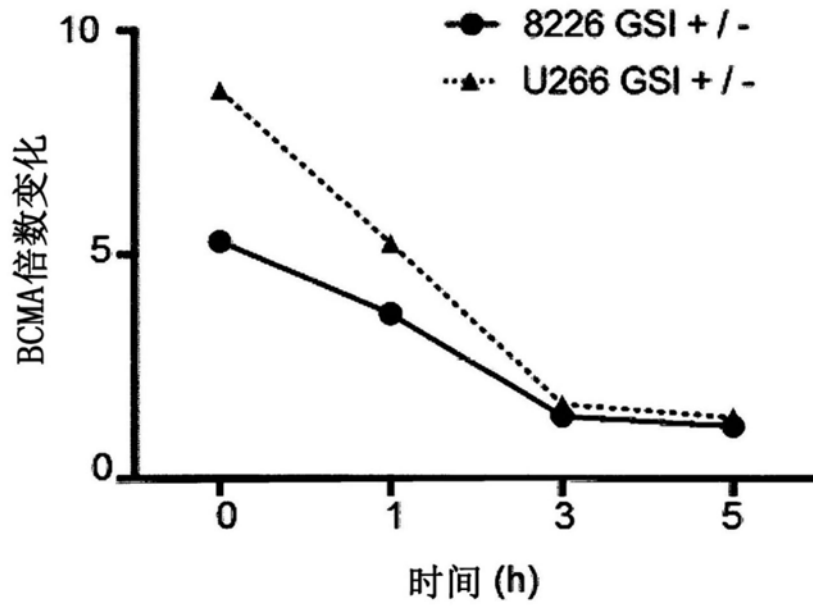


图3J

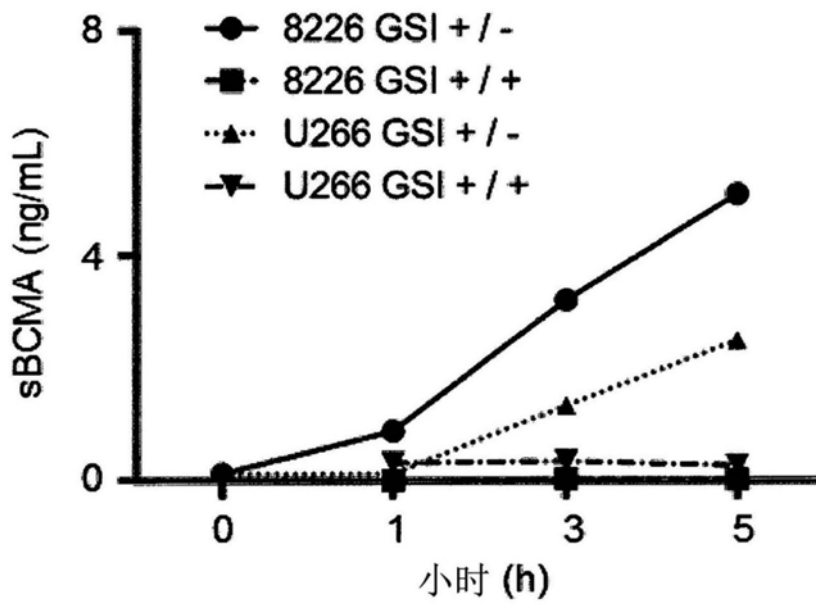


图3K

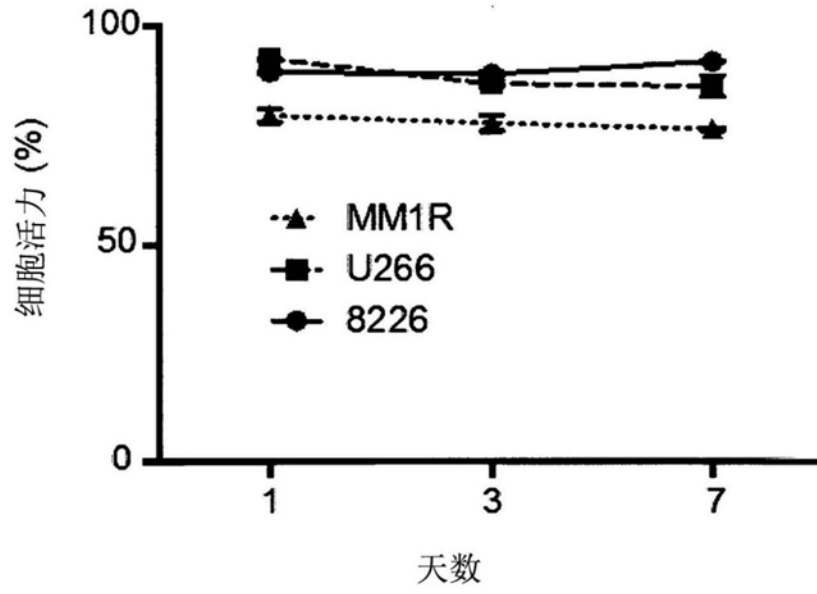


图3L

患者 MM

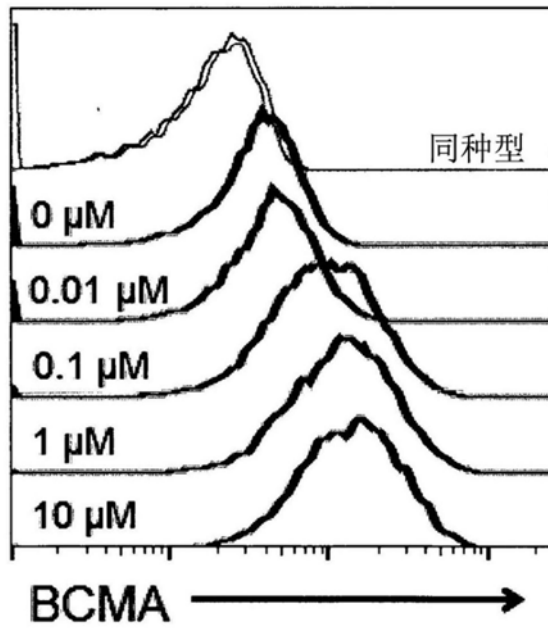


图3M

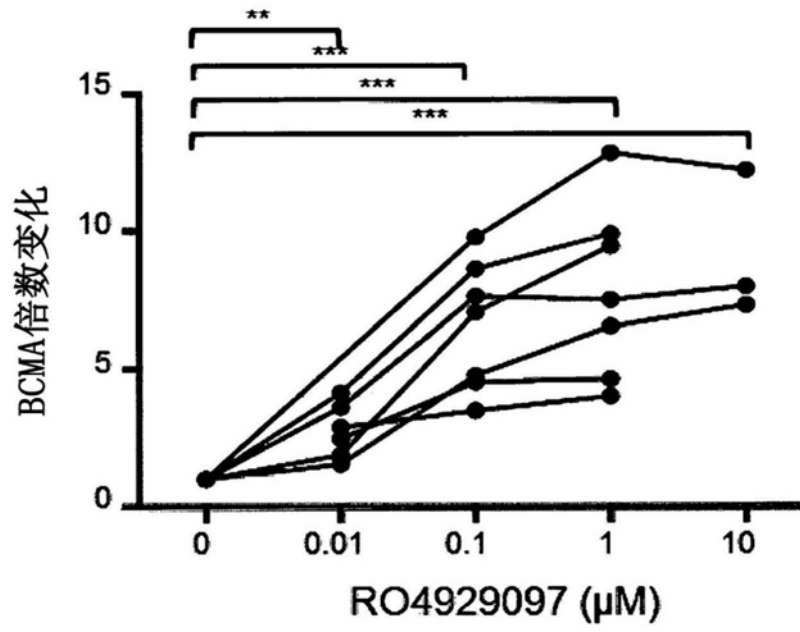


图3N

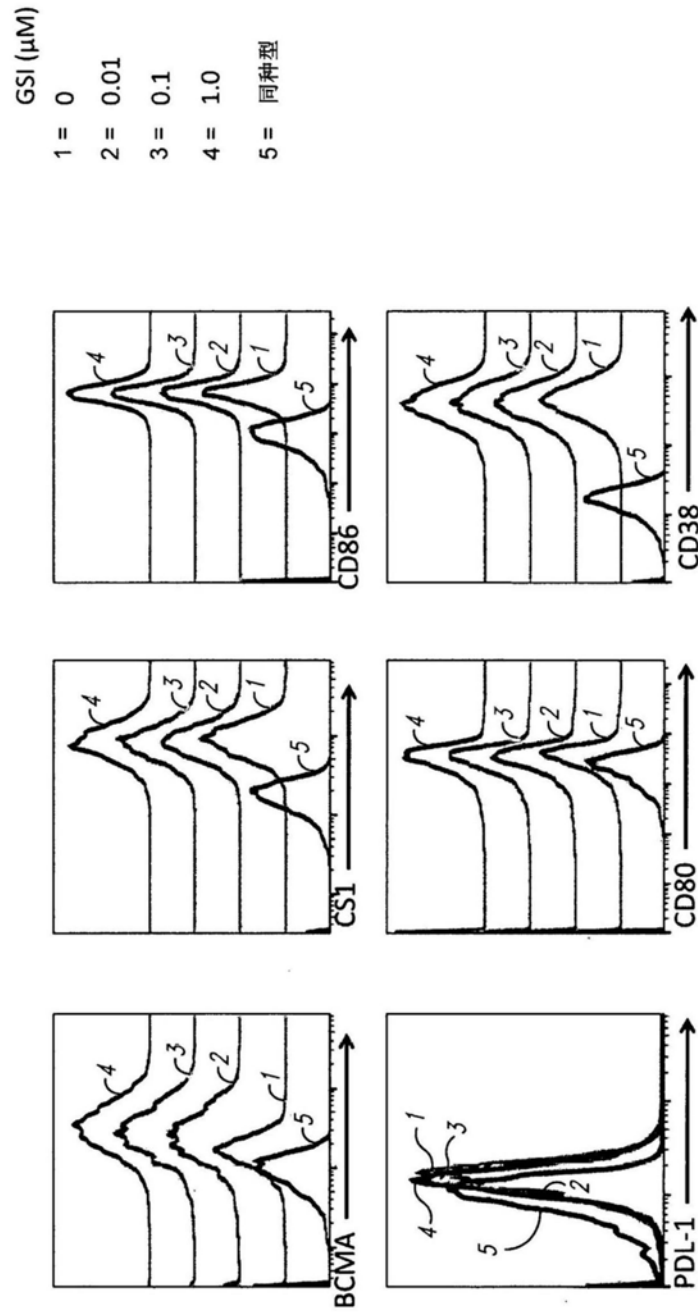


图30

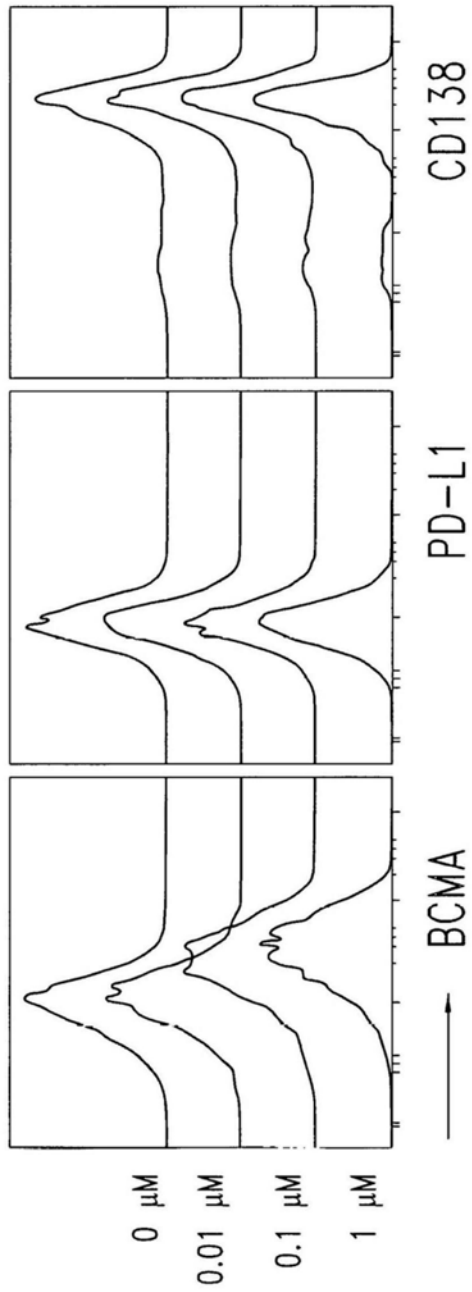


图3P

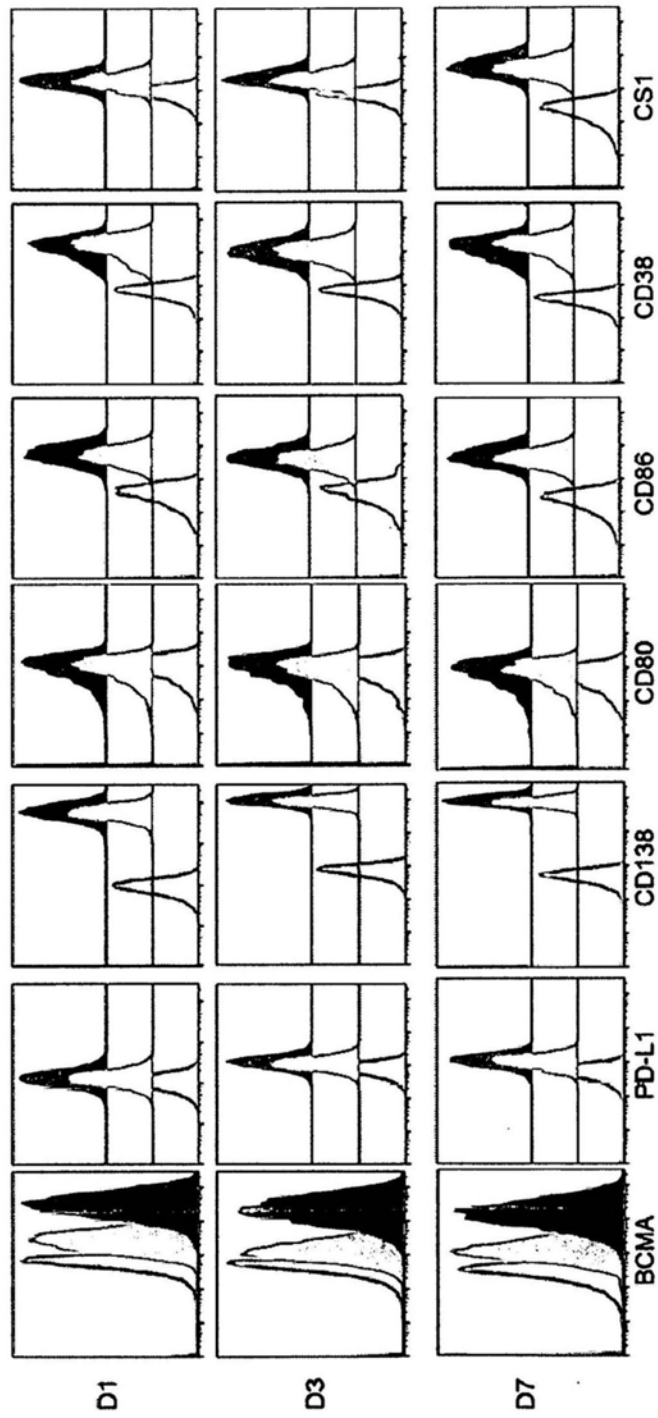


图3Q

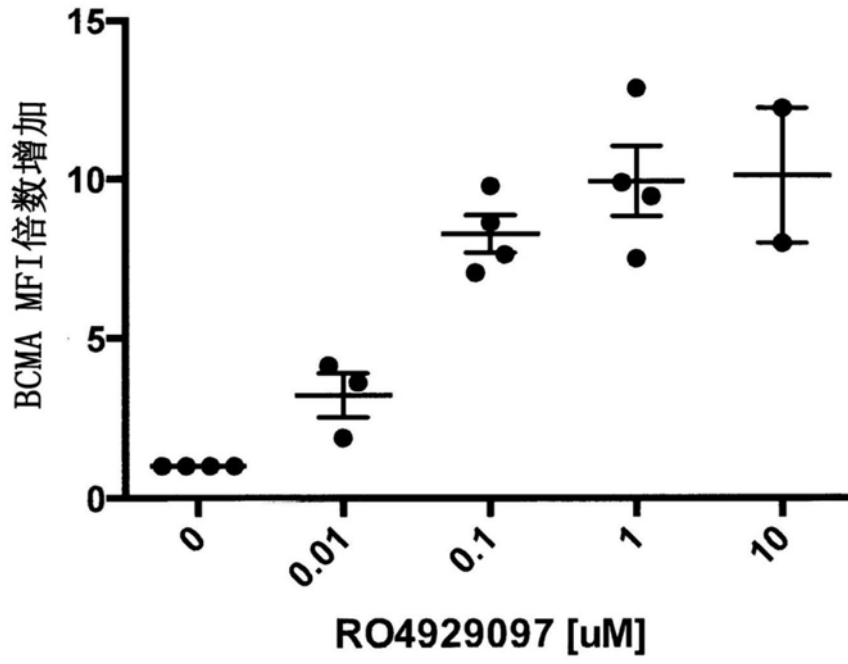


图3R

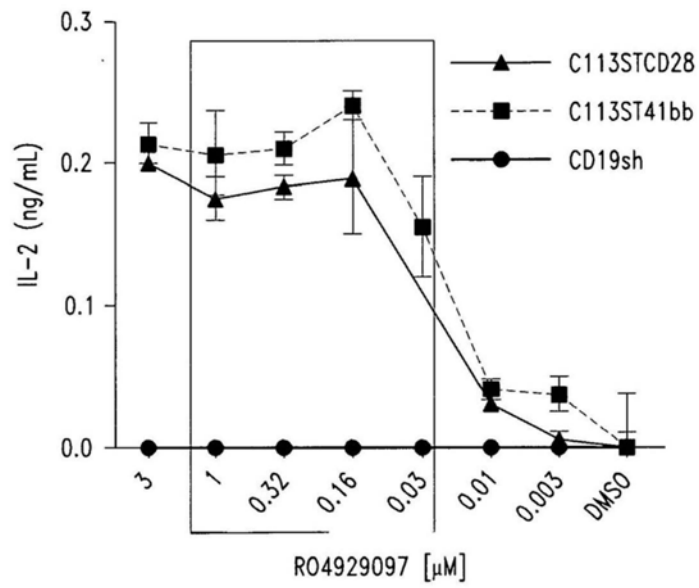


图4A

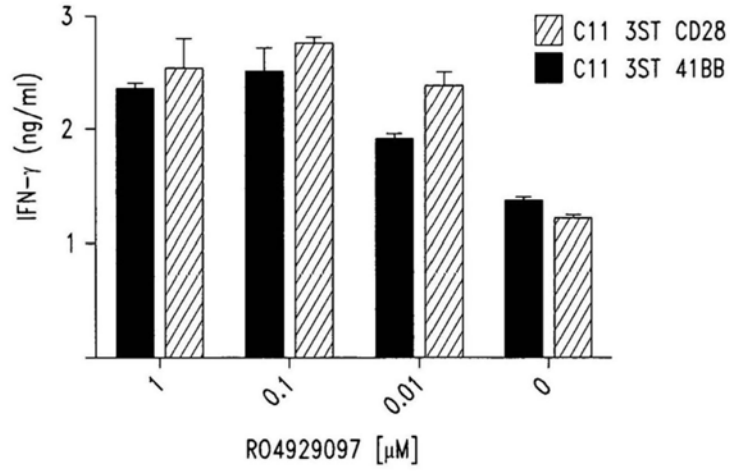


图4B

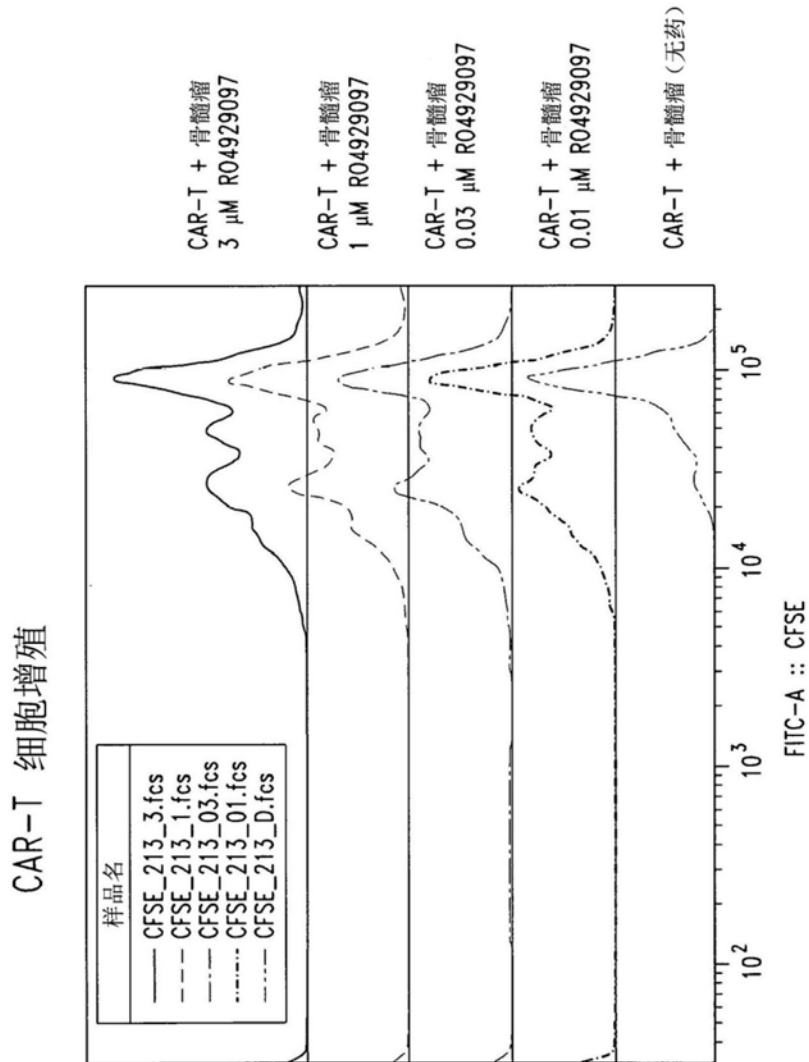


图4C

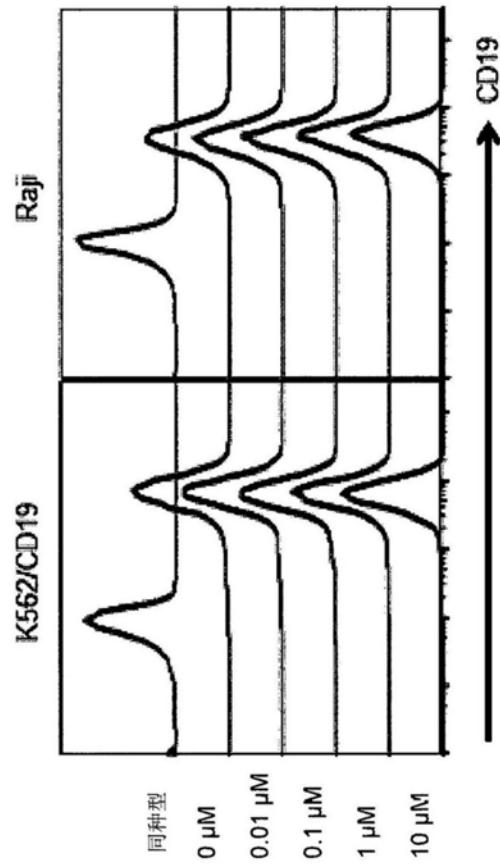


图5A

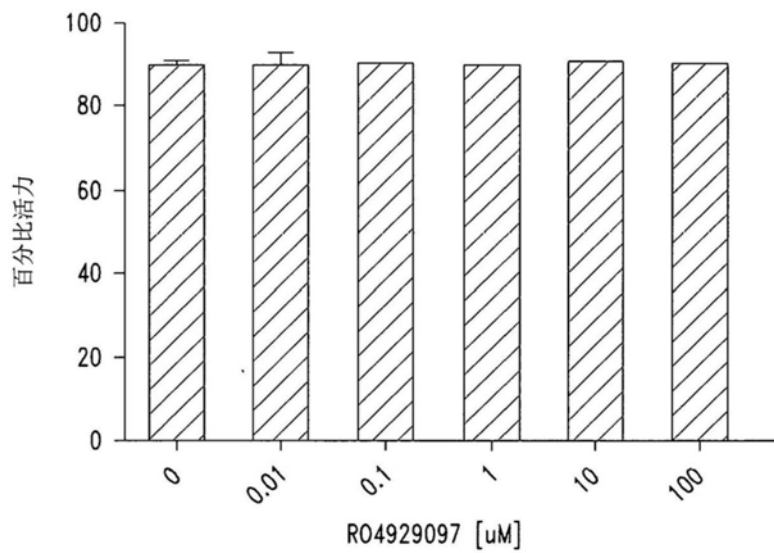
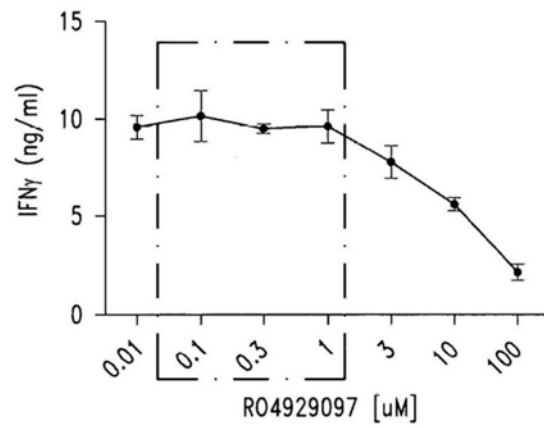
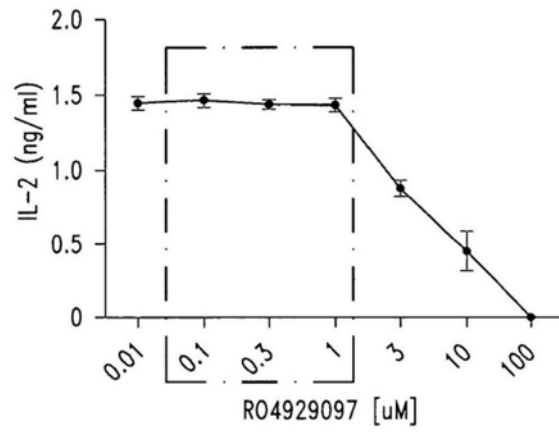


图5B



[] = 治疗窗口

图5C

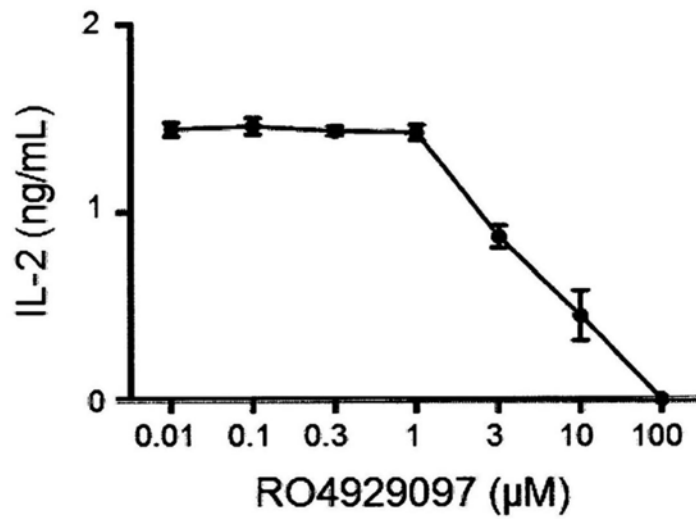


图5D

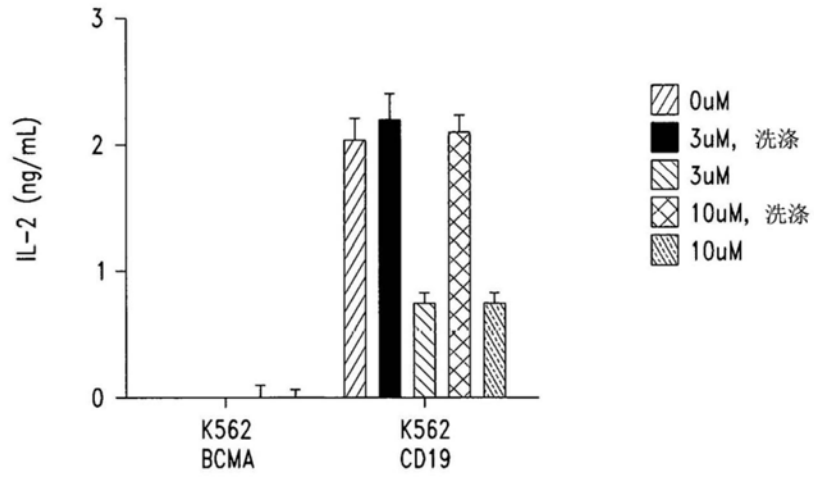


图5E

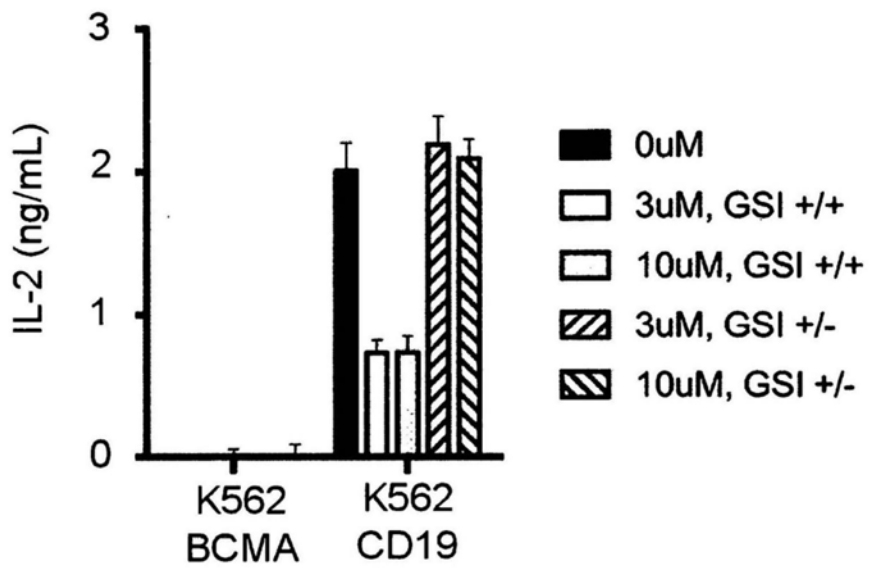


图5F

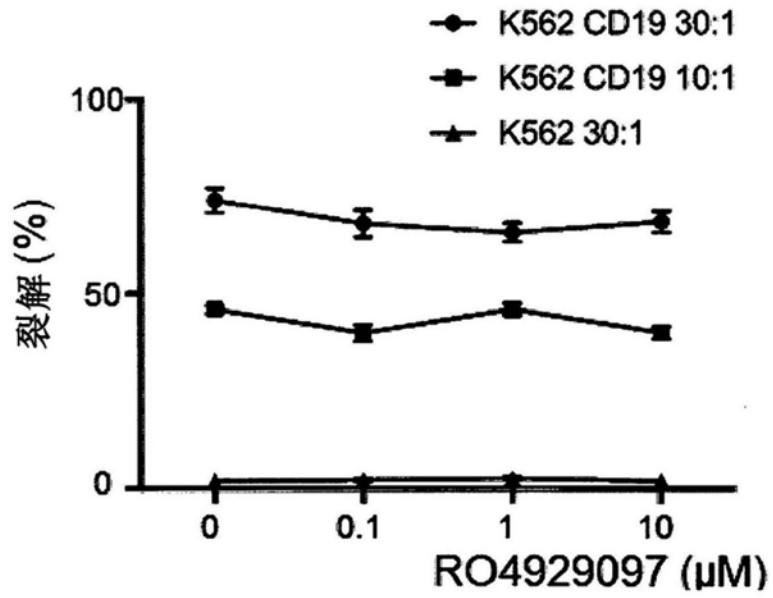


图5G

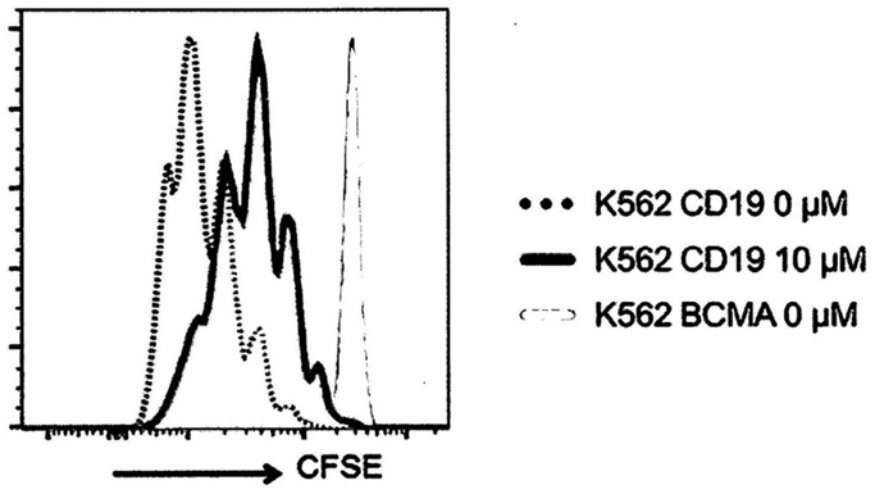


图5H

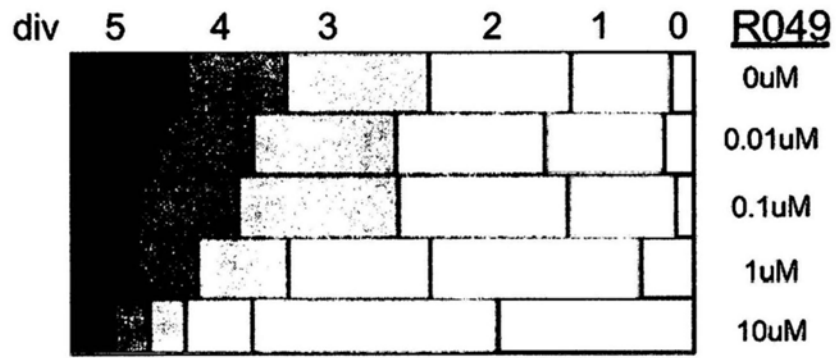


图5I

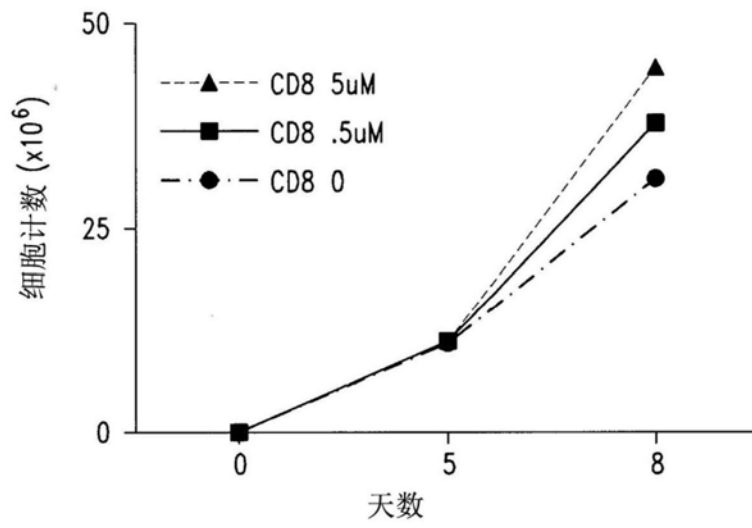


图5J

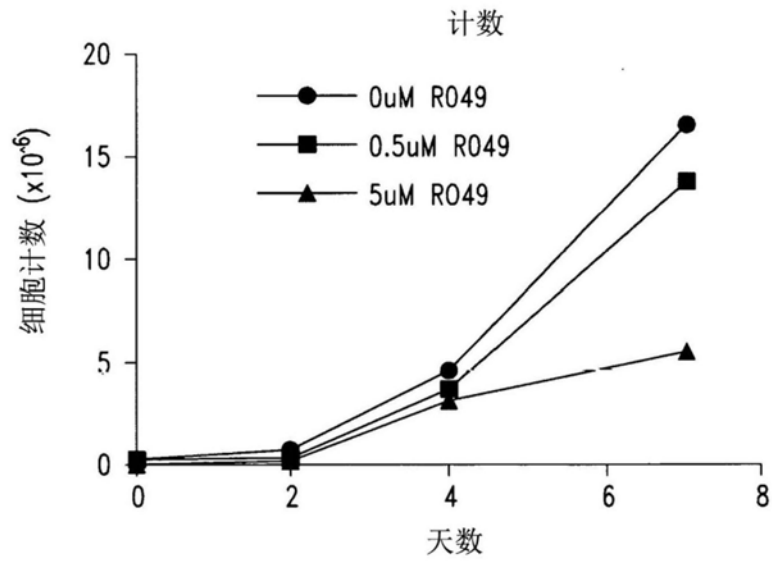


图5K

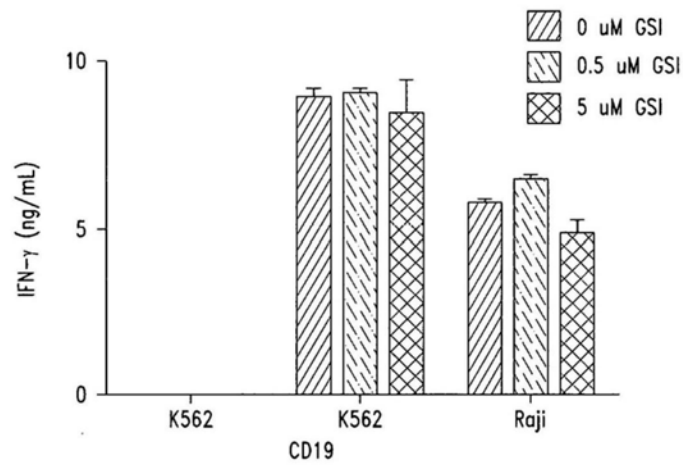


图5L

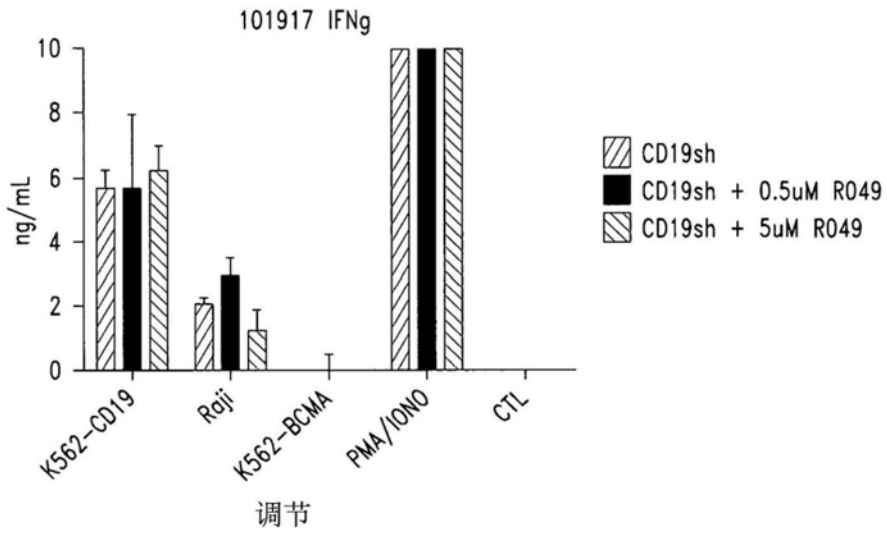


图5M

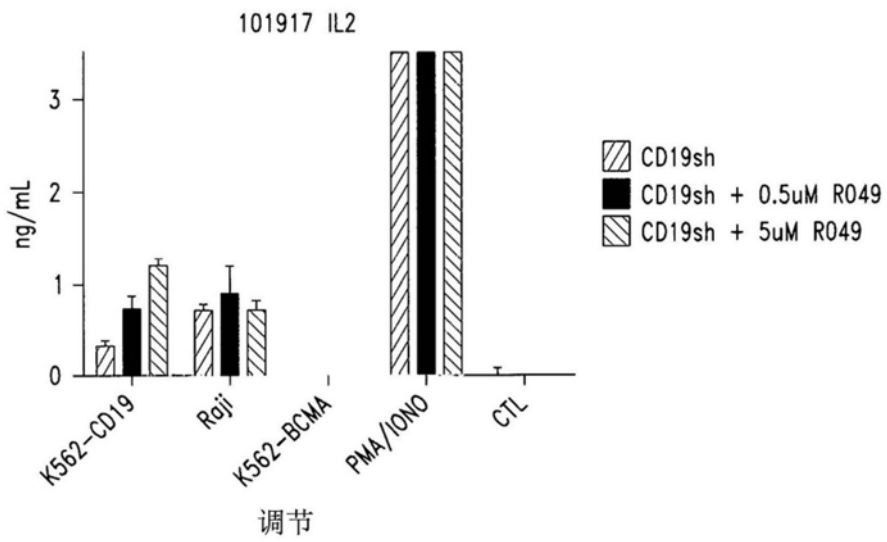


图5N

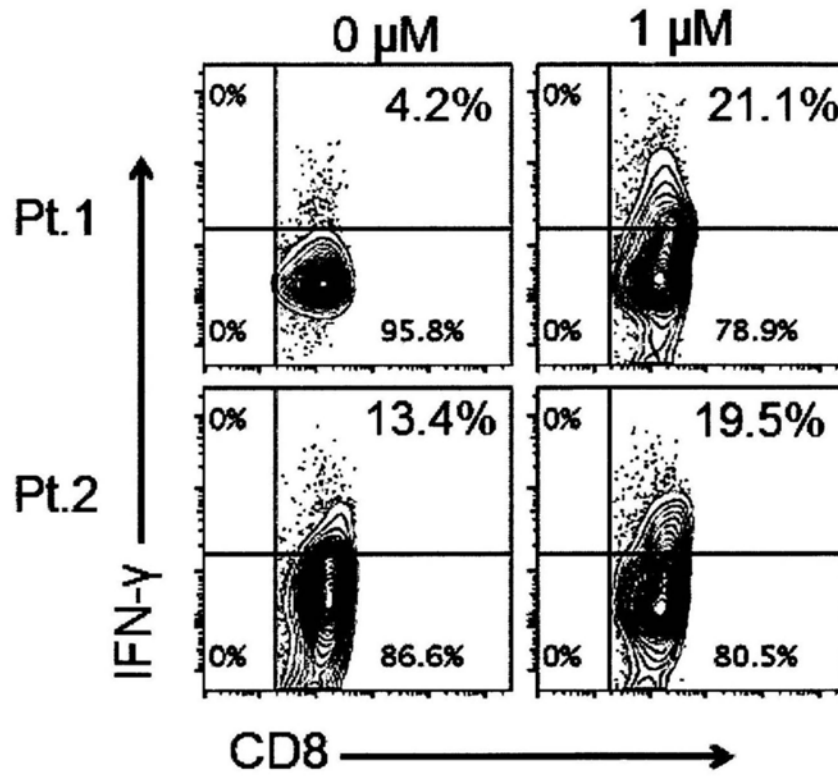


图50

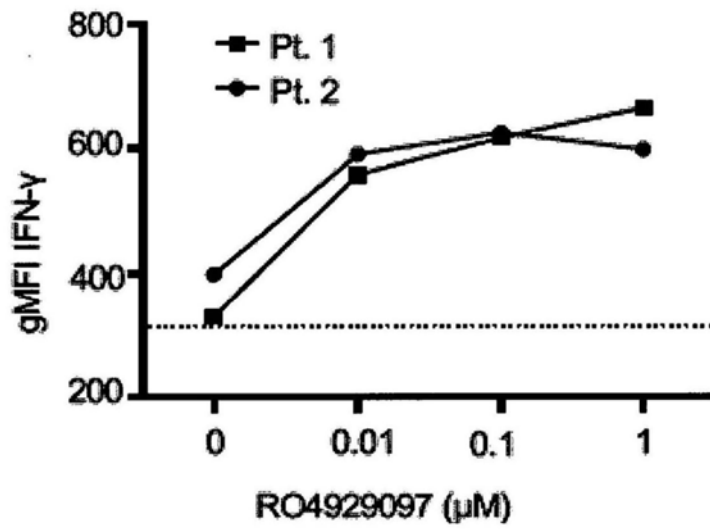


图5P

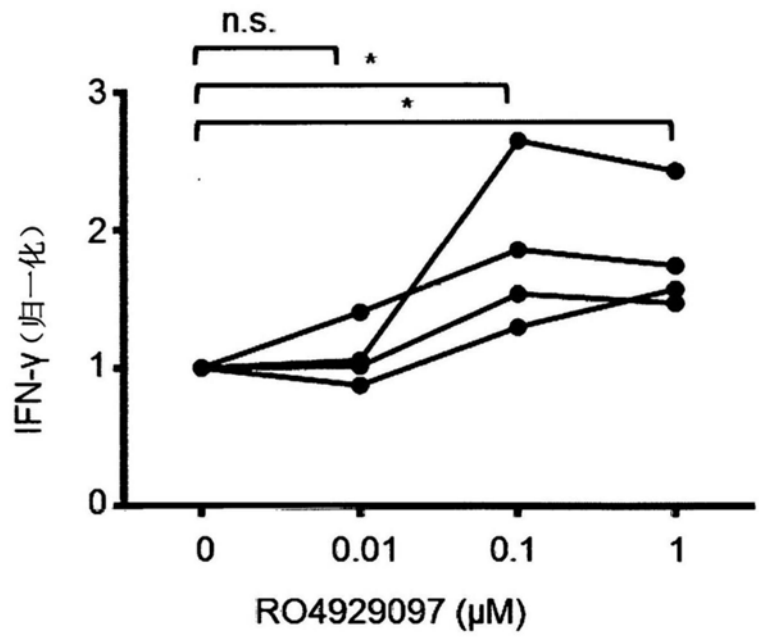


图5Q

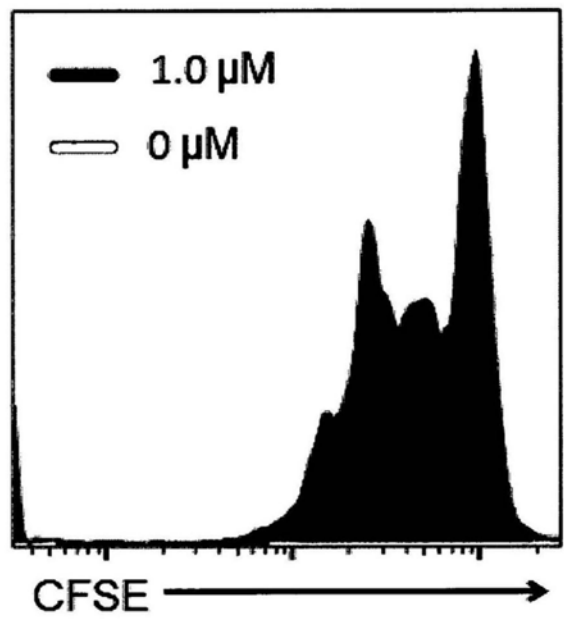


图5R

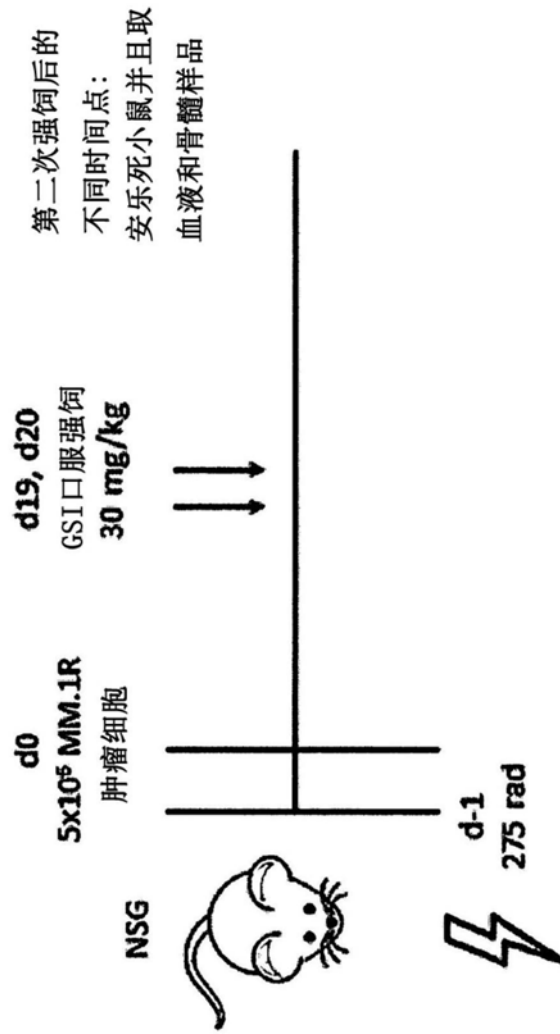


图6A

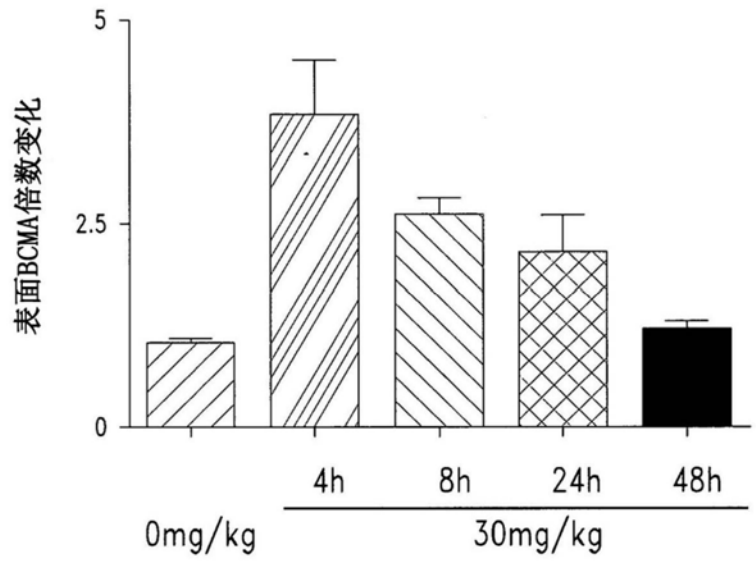


图6B

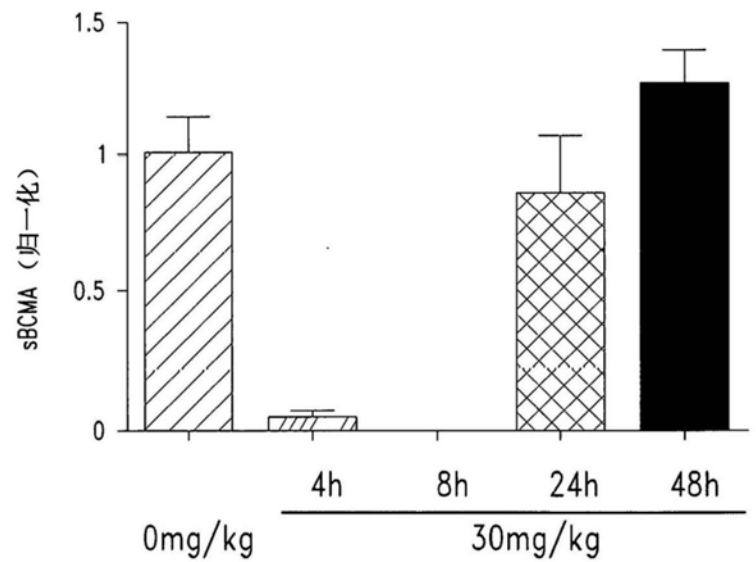


图6C

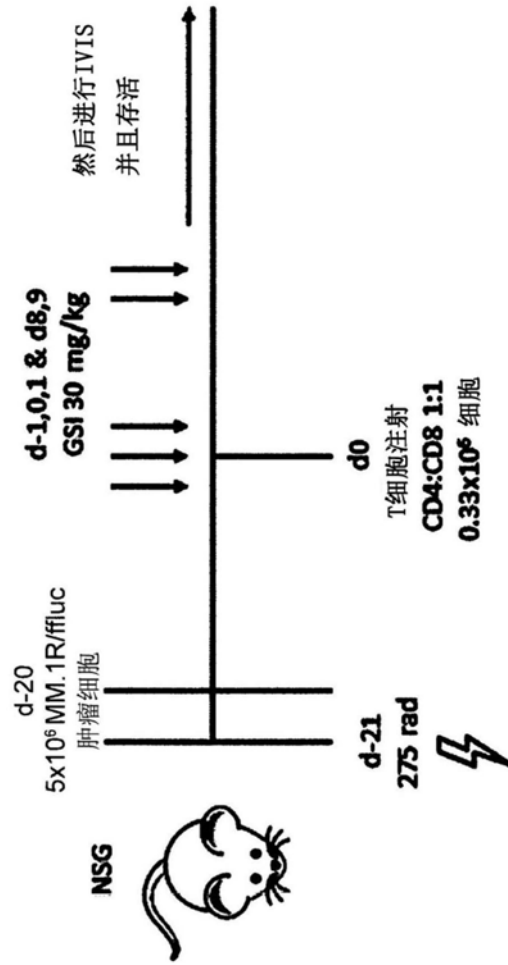


图7A

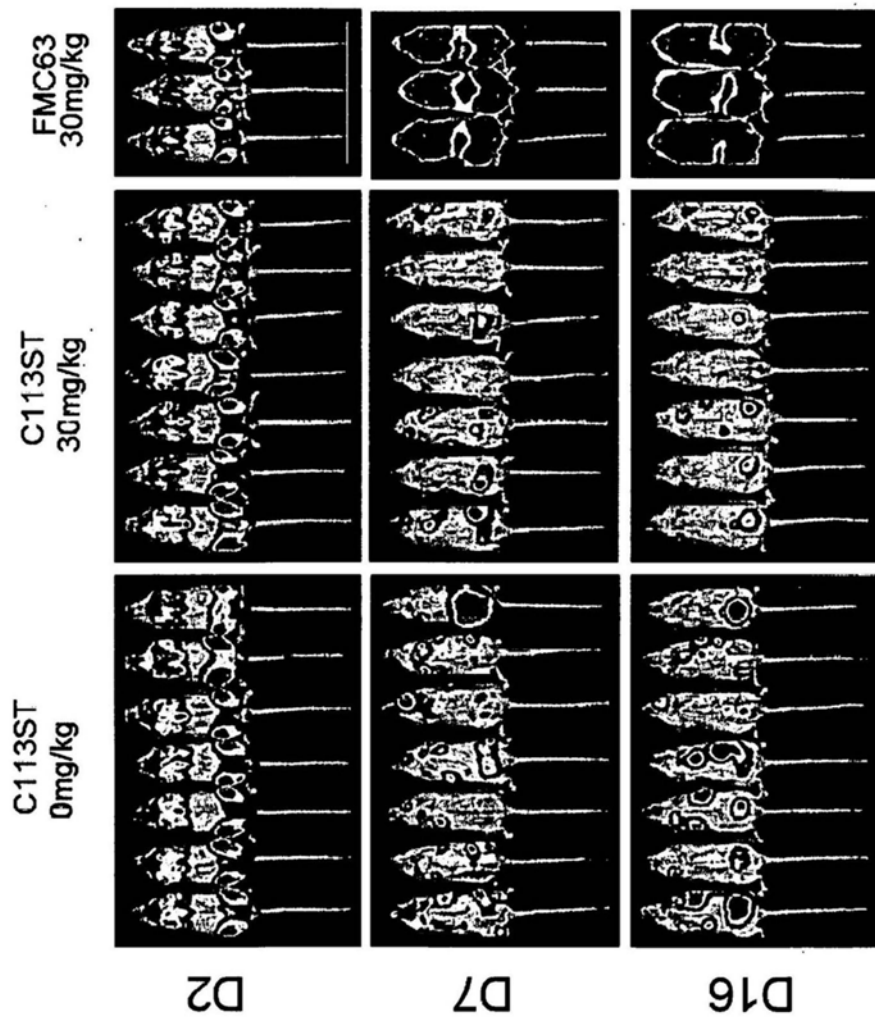


图7B

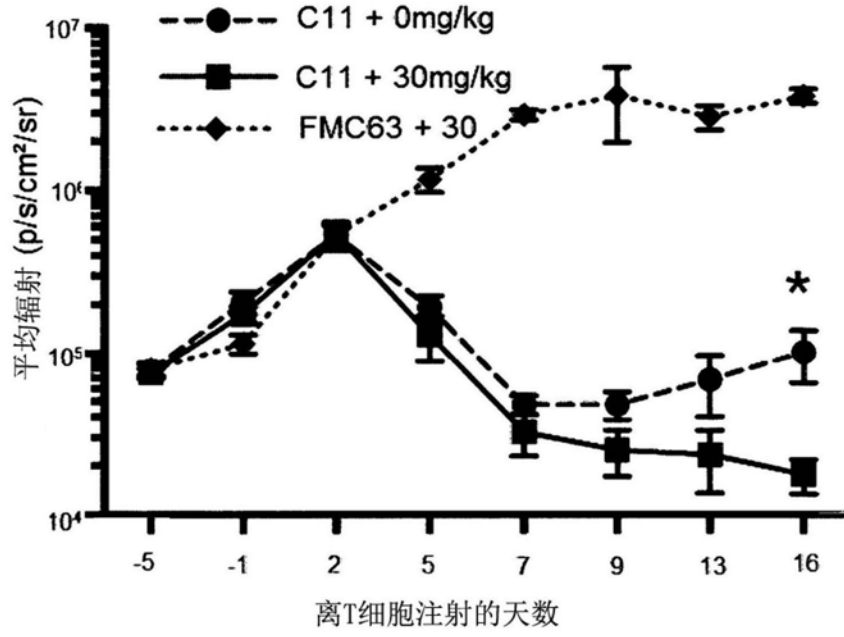


图7C

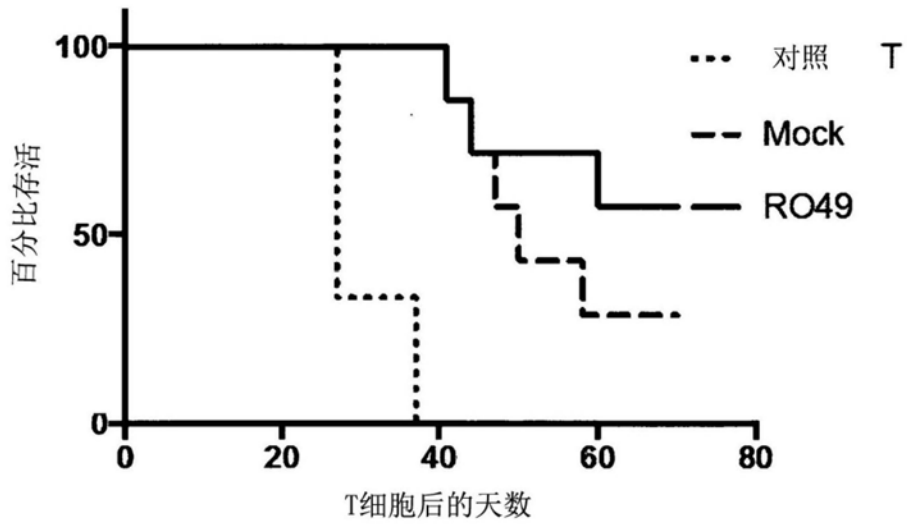


图7D

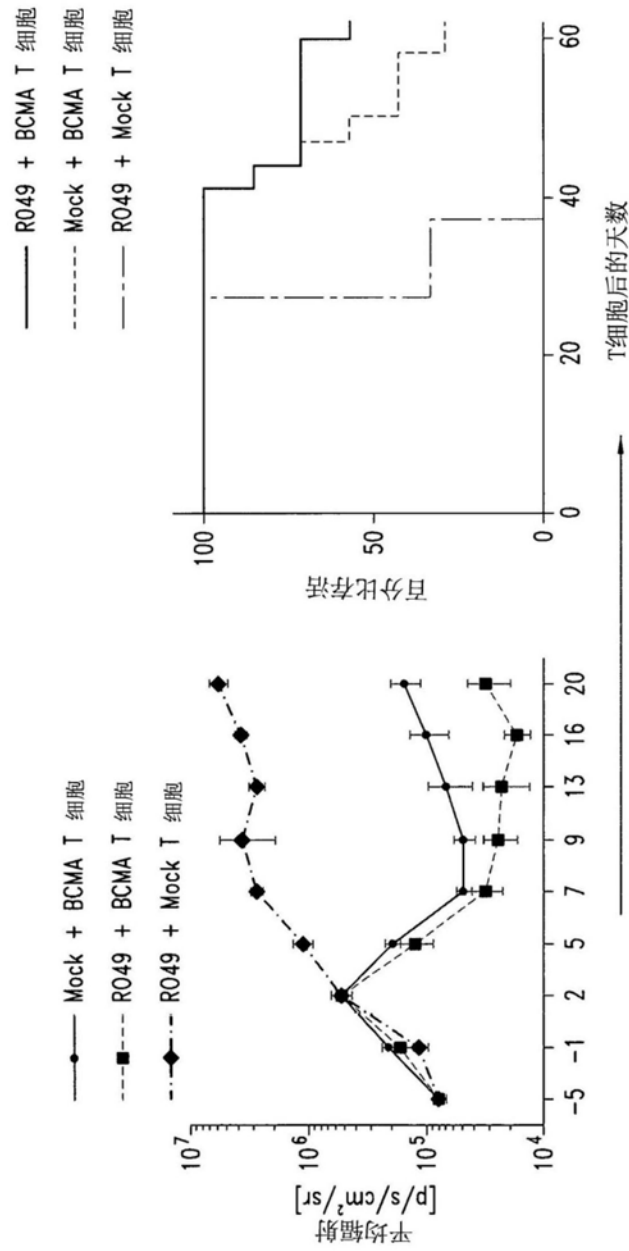


图7E

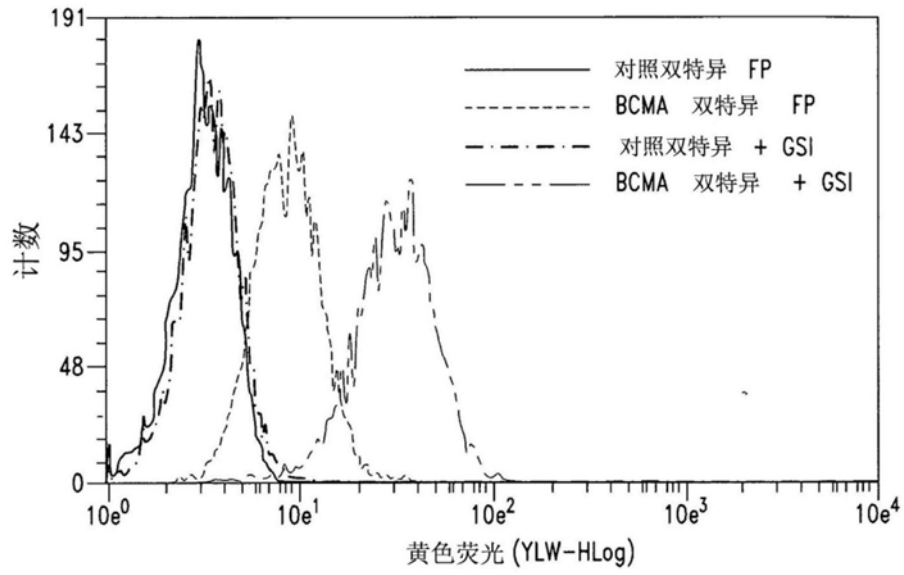


图8