



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114269777 A

(43) 申请公布日 2022. 04. 01

(21) 申请号 202080047342.2

(22) 申请日 2020.04.24

(30) 优先权数据

62/839,175 2019.04.26 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.12.27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/029768 2020.04.24

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2020/219843 EN 2020.10.29

(71) 申请人 北卡罗来纳大学教堂山分校

地址 美国北卡罗来纳州

(72) 发明人 苏立山

(74) 专利代理机构 南京苏创专利代理事务所

(普通合伙) 32273

代理人 王华

(51) Int.Cl.

C07K 14/725 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 5/0783 (2006.01)

A61K 35/17 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书29页

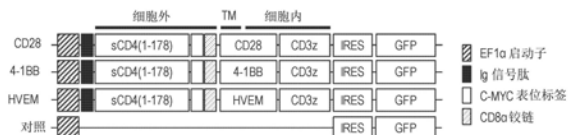
序列表5页 附图34页

(54) 发明名称

嵌合抗原受体构建体及其在CAR-T细胞中的用途

(57) 摘要

本发明涉及嵌合抗原受体(CAR)组合物及其在癌症和抗病毒免疫疗法中的使用方法。特别是,本发明的CAR包含共刺激信号(CSS)域,所述共刺激信号(CSS)域包含疱疹病毒侵入介体蛋白(HVEM)或其功能片段或变体。包含这种HVEM CSS的CAR表现出增强的效应子功能。



1. 一种嵌合抗原受体 (CAR), 包含抗原结合域、跨膜域、T细胞受体域和包含疱疹病毒侵入介体 (HVEM) 蛋白或与其具有至少90%同一性的其功能片段或变体的共刺激信号 (CSS) 域。

2. 根据权利要求1所述的CAR, 其中所述HVEM CSS域包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或其功能片段。

3. 根据权利要求1或2所述的CAR, 其中所述CSS域还包括CD28 CSS域、4-1BB CSS域、OX-40 CSS域、ICOS CSS域、与任意所述CSS域具有至少90%同一性的其功能片段或变体, 或它们的任意组合。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的CAR, 其中所述T细胞受体域包含CD3 ζ 信号域或与其具有至少90%同一性的功能片段或变体。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的CAR, 其中相对于不包含CSS域的CAR, 所述CSS域促进与增加的糖酵解和线粒体呼吸相关的增强的效应子功能。

6. 根据权利要求5所述的CAR, 其中CAR-T糖酵解增加至少25%。

7. 根据权利要求5所述的CAR, 其中线粒体呼吸增加至少25%。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的CAR, 其中所述抗原结合域包含单价抗体片段。

9. 根据权利要求8所述的CAR, 其中所述单价抗体片段包含单链可变片段 (scFv) 或Fab片段。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的CAR, 其中所述抗原结合域靶向病毒颗粒和/或癌细胞表面上存在的抗原。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述的CAR, 其中所述抗原结合域包含可溶性CD4蛋白或与其具有至少90%同一性的功能片段或变体。

12. 根据权利要求1-10中任一项所述的CAR, 其中所述抗原结合域包含靶向表面蛋白CAIX的单价抗体片段。

13. 根据权利要求1-10中任一项所述的CAR, 其中所述抗原结合域包含靶向表面蛋白aDG2的单价抗体片段。

14. 一种编码权利要求1-13中任一项所述CAR的核酸分子。

15. 根据权利要求14所述的核酸分子, 包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列或与其具有至少90%同一性的序列。

16. 一种包含权利要求14或15所述核酸分子的载体。

17. 一种包含权利要求1-13中任一项所述CAR的细胞。

18. 一种细胞, 包含权利要求14或15所述的核酸分子和/或权利要求16所述的载体。

19. 根据权利要求17或18所述的细胞, 其中所述细胞选自 $\alpha\beta$ T细胞、自然杀伤 (NK) 细胞、细胞毒性T淋巴细胞 (CTL)、调节性T细胞、自然杀伤T (NKT) 细胞、Th17细胞、 $\gamma\delta$ T细胞, 以及它们的任意组合。

20. 一种组合物, 其包含在药学上可接受的载体中的权利要求1-13中任一项所述的CAR、权利要求14或15所述的核酸分子、权利要求16所述的载体和/或权利要求17-19中任一项所述的细胞。

21. 一种在有需要的受试者中提供针对靶的免疫反应的方法, 所述方法包括向受试者施用有效剂量的权利要求1-13中任一项所述的CAR、权利要求14或15所述的核酸分子、权利

要求16所述的载体和/或权利要求17-19中任一项所述的细胞,从而提供针对受试者体内靶的免疫反应。

22. 一种在有需要的受试者中提供针对靶的免疫反应的方法,所述方法包括:

从患有癌症和/或感染的受试者获取T细胞;

采用权利要求14或15所述的核酸分子或权利要求16所述的载体转染T细胞;

培养转染的T细胞;和

向受试者施用培养的转染T细胞,

从而提供针对受试者体内靶的免疫反应。

23. 根据权利要求21或22所述的方法,其中所述靶是癌细胞或传染原。

24. 一种促进细胞对抗原的反应性的方法,所述方法包括采用权利要求14或15所述的核酸分子或权利要求16所述的载体转染细胞以产生细胞表面上包含抗原结合域的转染细胞,其中抗原结合域与抗原特异性结合,从而促进细胞对抗原的反应性。

25. 一种在有需要的受试者中治疗感染的方法,所述方法包括向受试者施用有效剂量的权利要求1-11中任一项所述的CAR、权利要求14或15所述的核酸分子、权利要求16所述的载体和/或权利要求17-19中任一项所述的细胞,从而治疗受试者的感染。

26. 一种在有需要的受试者中治疗感染的方法,所述方法包括:

从患有感染的受试者获取T细胞;

采用权利要求14或15所述的核酸分子或权利要求16所述的载体转染T细胞;

培养转染的T细胞;和

向患有感染的受试者施用培养的转染T细胞,

从而治疗受试者的感染。

27. 根据权利要求25或26所述的方法,其中所述感染是HIV。

28. 一种在有需要的受试者中治疗癌症的方法,所述方法包括向受试者施用有效剂量的权利要求1-13中任一项所述的CAR、权利要求14或15所述的核酸分子、权利要求16所述的载体和/或权利要求17-19中任一项所述的细胞,从而治疗受试者的癌症。

29. 一种在有需要的受试者中治疗癌症的方法,所述方法包括:

从患有癌症的受试者获取T细胞;

采用权利要求14或15所述的核酸分子或权利要求16所述的载体转染T细胞;

培养转染的T细胞;和

向患有实体瘤的受试者施用培养的转染T细胞,

从而治疗受试者的癌症。

30. 根据权利要求28或29所述的方法,其中所述癌症是实体瘤。

31. 根据权利要求28-30中任一项所述的方法,其中所述癌症是肾癌或神经母细胞瘤。

嵌合抗原受体构建体及其在CAR-T细胞中的用途

优先权声明

[0001] 根据《美国法典》第35章§119(e)条,本申请要求2019年4月26日提交的No.62/839,175的美国临时申请的权益,通过引用,该申请全文纳入本申请中。

关于电子提交序列表的声明

[0002] 根据37C.F.R.§1.821提交的ASCII文本格式的序列列表,名称为5470-846W0_ST25.txt,大小为10,703字节,于2020年4月22日生成,并通过EFS-Web提交,以代替纸质副本。该序列列表在此通过引用纳入本申请的说明书中。

技术领域

[0003] 本发明涉及嵌合抗原受体(CAR)组合物及其在癌症和抗病原体免疫疗法中的使用方法。

政府支持

[0004] 本发明得到美国政府支持,是美国国立卫生研究院拨款项目AI077454中完成的发明。美国政府享有本发明的某些权利。

背景技术

[0005] 嵌合抗原受体(CAR),也称为嵌合免疫受体、嵌合T细胞受体或人工T细胞受体,是将新的特异性与免疫细胞结合从而靶向癌细胞的工程化受体。通常,这些受体将单克隆抗体的特异性移植到T细胞上。这些受体被称为嵌合受体,因为它们是来自不同来源的各部分的融合。CAR-T细胞疗法是指使用此类转化细胞主要用于癌症治疗的疗法。

[0006] CAR-T细胞设计的基本原理涉及组合抗原结合和T细胞激活功能的重组受体。CAR-T细胞的一般前提是人工产生靶向患病细胞(例如癌细胞)上发现的标记物的T细胞。科学家可以从一个人身上取出T细胞,对它们进行基因改造,然后将它们放回患者体内,以便它们攻击患病的细胞。一旦T细胞经设计成为CAR-T细胞,它就会充当“活的药物”。

[0007] CAR-T细胞在细胞外配体识别域和细胞内信号分子之间建立联系,进而激活T细胞。细胞外配体识别域通常是单链可变片段(scFv)。CAR-T细胞疗法安全性的一个重要方面是如何确保仅靶向癌细胞而不靶向正常细胞。CAR-T细胞的特异性取决于靶向分子的选择。

[0008] 例如,在癌症治疗中,CAR-T细胞既可以来自患者自己的血液(自体)或可以来自另一个健康供体(同种异体)。这些T细胞经过基因工程改造以表达人工T细胞受体,通过该受体靶向癌症抗原。该过程与MHC无关,因此大大提高了靶向效率。CAR-T细胞经编程靶向存在于肿瘤表面上的抗原。当它们与肿瘤上的抗原接触时,CAR-T细胞通过信号肽被激活,增殖并产生细胞毒性。CAR-T细胞通过广泛刺激细胞增殖,增加细胞对其他活细胞的毒性程度,即细胞毒性,并导致对生物体中其他细胞有影响的免疫系统细胞分泌的因子的产生增加等机制破坏癌细胞。这些因子称为细胞因子,包括白细胞介素、干扰素和生长因子。

[0009] 最近,CAR-T细胞疗法被认为是其他癌症类型(例如实体瘤)和/或疾病(例如慢性病毒感染(例如HIV))的一种治疗选择。因此,随着CAR-T细胞疗法可能应用的扩展,本领域

不断需要改进当前的CAR-T细胞疗法,以产生下一代CAR-T细胞疗法药物及其成分。

发明内容

[0010] 本发明提供嵌合抗原受体 (CAR) 的组合物及其使用方法,其中共刺激信号 (CSS) 包含疱疹病毒侵入介体 (HVEM) 蛋白,也称为CD270。CAR中的CSS在调节用于癌症(如实体瘤)和病原体感染(如慢性病毒或细菌感染)等多种疾病的CAR转导T细胞 (CAR-T细胞) 的免疫活性时很重要。与CSS域不包含HVEM的CAR相比,包含HVEM CSS的CAR表现出与明显更高的糖酵解和线粒体呼吸相关的增强的效应子功能,并诱导相当比例的中央和效应子记忆亚群。因此,可以采用重编程CAR-T细胞能量代谢通过HVEM共刺激来改善CAR-T细胞功能。

[0011] 因此,本发明的一个方面涉及一种嵌合抗原受体 (CAR),其包含抗原结合域、跨膜域、T细胞受体域和包含疱疹病毒侵入介体 (HVEM) 蛋白或与其具有至少90%同一性的功能片段或变体的共刺激信号 (CSS) 域。

[0012] 本发明的另一个方面涉及一种编码本发明CAR的核酸分子。

[0013] 本发明的另一个方面涉及一种包含本发明核酸分子的载体。

[0014] 本发明的又一个方面涉及一种包含本发明CAR的细胞。

[0015] 本发明的另一个方面涉及包含本发明的核酸分子和/或本发明的载体的细胞。

[0016] 本发明的另一个方面涉及在药学上可接受的载体中包含本发明的CAR、本发明的核酸分子、本发明的载体和/或本发明的细胞的组合物。

[0017] 本发明的又一方面涉及在有需要的受试者中提供针对靶的免疫反应的方法,所述方法包括向受试者施用有效剂量的本发明的CAR、本发明的核酸分子、本发明的载体和/或本发明的细胞,从而提供针对受试者中所述靶的免疫反应。

[0018] 本发明的另一方面涉及在有需要的受试者中提供针对靶的免疫反应的方法,所述方法包括:从患有癌症和/或感染的受试者获得T细胞,采用本发明的核酸分子或本发明的载体转染T细胞,培养转染的T细胞,并向受试者施用培养的转染T细胞,从而在受试者中提供针对所述靶的免疫反应。

[0019] 本发明的这些方面和其它方面在下面本发明的具体实施方式中进行更详细的说明。

附图说明

[0020] 图1A-1H。CAR的共刺激信号决定了人类T细胞系中CAR-T细胞的活性。(图1A) 是CAR表达慢病毒载体构建体的示意图。各种CAR包含结合HIV Env蛋白作为抗原识别域的人CD4 (sCD4) 的胞外域,并且共刺激信号序列不同。(图1B) 是分析转导人T细胞系中CAR表达的设门策略。GFP⁺转导的细胞被设门(下图),并用于通过流式细胞术使用抗-c-myc标签抗体分析CAR表达(上图)。显示了每个转导细胞的典型点图和CAR直方图。慢病毒转导实现了类似的转导效率(亦参见图7A和7B)。(图1C) 示出了携带不同CSS的GFP⁺细胞(y-轴)中CAR的平均荧光强度(MFI) (n=5)。**P<0.05(单向方差分析;bonfferoni事后分析)。(图1D) CAR (50kDa,上图)、内源性CD3 ζ (18kDa,中图)和肌动蛋白(43kDa,下图)在携带不同CSS的CAR转导T细胞系中的表达水平通过分别使用抗-CD3 ζ 和抗-肌动蛋白抗体的蛋白质印迹法测定。(图1E) 转导的(CD3⁺GFP⁺)或未转导的(CD3⁺GFP⁻)T细胞中激活的(CD69⁺)细胞频率通过与表

达GFP (CHO-GFP) 或HIV-Env/GFP的靶细胞的共培养试验测定 (亦参见图7C)。示出了与携带CD28 (阴影柱状图)、4-1BB (灰色柱状图) 和HVEM (黑色柱状图) CSS的CAR-T细胞共培养试验的平均值和标准偏差 ($n=6$)。*** $P<0.05$ (双向方差分析; bonfferoni 事后分析)。(图1F) 采用ELISA测定的共培养试验中IL-2的分泌情况。示出了与携带CD28 (阴影柱状图)、4-1BB (灰色柱状图) 和HVEM (黑色柱状图) CSS的CAR-T细胞共培养试验的平均值和标准偏差 ($n=5$)。*** $P<0.05$ (双向方差分析; bonfferoni 事后分析)。(图1G) 活化CAR-T细胞的频率 (y-轴) 与CAR表达水平 (x-轴) 之间的线性回归分析。(图1H) 共培养试验中抗原刺激的CAR-T细胞分泌的IL-2 (y-轴) 与CAR表达水平 (x-轴) 之间的线性回归分析。

[0021] 图2A-2C。HVEM共刺激在人CAR-T细胞中表现出最高的CAR表达。(图2A) 携带不同CSSD的CAR-T细胞的细胞表面CAR表达对比。柱状图示出了来自两个不同供体的原代CD8 T细胞的两个独立实验的平均值和标准偏差 ($n=6$)。*** $P<0.05$ (单向方差分析; bonfferoni 事后分析)。(图2B) 携带不同CSS的CAR-T细胞的CAR表达对比。采用抗c-myc标签抗体通过流式细胞术分析GFP⁺转导的原代人CD8 T细胞中的CAR表达。示出了来自两个不同供体的GFP⁺细胞中CAR表达 (x-轴) 的代表性直方图。每个直方图中的数字表示CAR的MFI。(图2C) 携带不同CSS的人CAR-T细胞中CAR (50kDa, 上图)、内源性CD3 ζ (18kDa, 中图) 和肌动蛋白 (43kDa, 下图) 的表达水平通过分别使用抗-CD3 ζ 和抗-肌动蛋白抗体的蛋白质印迹法测定。

[0022] 图3A-3D。HVEM共刺激在人CAR-T细胞中表现出最高的效应子功能。(图3A) 将携带不同CSS的人CAR-T细胞与CHO-GFP (空心圆) 或CHO-Env-GFP (实心圆) 细胞以效应子:靶为10:1、5:1和1:1的条件共培养。结果示出了使用来自两个不同健康人类供体的原代CD8 T细胞进行的两次独立实验的平均值 ($n=6$)。(图3B) 示出了在效应子:靶为10:1条件下共培养试验中采用ELISA测定的IL-2 (第1个图)、TNF- α (第2个图) 和IFN- γ (第3个图) 的分泌情况 ($n=6$)。*** $P<0.05$ (单向方差分析; bonfferoni 事后分析)。(图3C) 在效应子:靶为10:1条件下, 携带不同CSS的人CAR-T细胞的细胞毒性比较。*** $P<0.05$ (单向方差分析; bonfferoni 事后分析)。(图3D) 共培养试验中TNF- α 分泌 (y-轴) 与携带不同CSS的人CAR-T细胞中CAR表达水平 (x-轴) 之间的线性回归分析。(IL-2、IFN- γ 或细胞毒性) 的线性回归分析亦参见图8A-8C。

[0023] 图4A-4E。4-1BB和HVEM共刺激可避免CAR-T细胞耗竭。(图4A) 示出了携带不同CSS的GFP⁺转导细胞上PD-1 (x-轴) 和LAG-3 (y-轴) 的细胞表面表达的代表性图。每个图中的数字表示CAR-T细胞中每个群体的频率。(图4B) 柱状图示出了每个携带不同CSS的CAR-T细胞中的耗竭 (PD-1⁺/LAG-3⁺) 群体。柱状图示出了来自两个不同健康人类供体的原代CD8 T细胞的两个独立实验的平均值和标准偏差 ($n=6$)。*** $P<0.05$ (单向方差分析; bonfferoni 事后分析)。(图4C) 共培养试验中携带不同CSS的人CAR-T细胞中TNF- α 分泌 (y-轴) 与耗竭 (PD-1⁺/LAG-3⁺) CAR-T细胞的频率 (x-轴) 之间的线性回归分析。(IL-2、IFN- γ 或细胞毒性) 的线性回归分析亦参见图9A-9C。(图4D) 柱状图表明, HVEM CAR-T细胞表现出更低频率的表达一种或两种抑制性受体的群体。(图4E) 具有HVEM-衍生的CSSD的CAR-T细胞避免了CAR-T细胞耗竭。代表性图示出了具有不同CSSD的CAR-T细胞上PD-1 (x-轴) 和LAG-3 (y-轴) 的细胞表面表达。每个图中的数字表示具有不同CSSD的CAR-T细胞中每个群体的百分数。

[0024] 图5A-5D。共刺激信号影响记忆T细胞群的平衡。(图5A) 示出了在携带不同CSS的GFP⁺细胞上CD45RO (x-轴) 和CCR7 (y-轴) 的细胞表面表达的代表性图。每个图中的数字表示

CAR-T细胞中每个群体的频率。(图5B)柱状图总结了每个携带不同CSS的CAR-T细胞中的初始(T_N :CCR7⁺CD45RO⁻)、中央记忆(T_{CM} :CCR7⁺CD45RO⁺)、效应记忆(T_{EM} :CCR7⁻CD45RO⁺)和终末分化效应记忆(T_{EMRA} :CCR7⁻CD45RO)群体的频率。(图5C)柱状图示出了携带不同CSS的CAR-T细胞的 T_{CM} 和 T_{EM} 频率(y-轴)。(图5D)柱状图示出了携带不同CSS的CAR-T细胞的 T_{CM} 和 T_{EM} 群体(T_{CM} 相对 T_{EM})之比。结果示出了使用来自两个不同供体的原代CD8⁺T细胞进行的两次独立实验的平均值(n=6)。**P<0.05(单向方差分析;bonfferoni事后分析)。

[0025] 图6A-6H.HVEM共刺激将CAR-T细胞能量代谢重新编程为更活跃的状态。(图6A)携带不同CSS的人类CAR-T细胞在基础代谢条件下和响应线粒体抑制剂时的耗氧率(OCR)。数据是对来自两个不同健康人类供体的差异分选细胞进行的两次实验的总结,并以平均值和标准偏差绘图。(图6B)基础OCR水平测定。(图6C)基础细胞外酸化率(ECAR)水平测定。(图6D)ATP产生量定义为(添加寡霉素前的最后速率测量值)-(添加寡霉素后的最小速率测量值)。(图6E)最大OCR水平测定。(图6F)备用呼吸测定。(图6G)非有丝分裂呼吸测定。(图6H)质子漏测定。柱状图示出了使用来自两个不同健康人类供体的细胞进行的两次独立实验的平均值和标准偏差。**P<0.05(单向方差分析;bonfferoni事后分析)。

[0026] 图7A-7C.慢病毒转导实现了类似的转导效率。(图7A)CAR转导的Jurkat E6.1细胞的典型点图。转导效率和CAR表达通过GFP表达(y-轴)和抗c-myc标签抗体染色(x-轴),然后采用流式细胞术测定。图中的数字表示每个细胞群的频率。(图7B)携带所示CSS的CAR转导的Jurkat E6.1细胞中GFP⁺转导细胞(y-轴)的频率。示出了平均值和标准偏差(n=5)。(图7C)测定共培养试验中CAR-T细胞活化的设门策略。共培养试验中抗原-活化的CAR-T细胞的分析策略。将靶细胞(HIV gp120⁺GFP⁺CHO细胞)与CAR转导的Jurkat E6.1细胞共培养。共培养后GFP(y-轴)与CD3(x-轴)的代表性点图(左图)。根据GFP/CD3表达将转导细胞与靶细胞分离,并用于分析CD69表达(中图和右图)。代表性图示出了与靶细胞共培养后未转导(CD3⁺GFP⁻,中图)或转导(CD3⁺GFP⁺,右图)效应细胞中活化(CD69⁺)细胞的频率。每个图中的数字表示活化细胞群的频率。

[0027] 图8A-8C.携带不同CSS的人CAR-T细胞中效应子功能和CAR表达水平之间的线性回归分析。该图代表IL-2分泌(图8A)、IFN- γ 分泌(图8B)或细胞毒性(图8C)(y-轴)和CAR表达水平(x-轴)之间的线性回归分析结果。结果示出了使用来自两个不同健康人类供体的原代CD8⁺T细胞进行的两次独立实验的平均值(n=6)。

[0028] 图9A-9C.携带不同CSS的人类CAR-T细胞效应子功能与人类CAR-T细胞耗竭之间的线性回归分析。该图代表IL-2分泌(图9A)、IFN- γ 分泌(图9B)或细胞毒性(图9C)(y-轴)和CAR表达水平(x-轴)之间的线性回归分析结果。结果示出了使用来自两个不同健康人类供体的原代CD8⁺T细胞进行的两次独立实验的平均值(n=6)。

[0029] 图10A-10B.通过CD45RO和CCR7的表面表达分析记忆T细胞亚群。(图10A)使用具有不同CSS的CAR-T细胞增加中央记忆T细胞。(图10B)具有CD28⁻和4-1BB⁻衍生的CSS的CAR-T细胞分别增加了效应记忆T细胞和中央记忆T细胞。

[0030] 图11A-11C.人类CAR-T细胞中基于HVEM的CAR表达。(图11A)各种表达CAR的慢病毒载体构建体的示意图。各种CAR包含结合肾细胞肿瘤相关跨膜蛋白碳酸酐酶IX(CAIX)作为细胞外抗原识别域的抗CAIX-scFV,并且共刺激信号序列不同。(图11B)CAR-转导人类细胞的典型点图。CAR-T细胞中转导效率和CAR表达通过抗c-myc标签抗体染色(x-轴),然后采用

流式细胞术测定。图中的数字表示每个细胞群的频率。(图11C)示出了具有不同CSS的CAR-T细胞中c-myc的平均荧光强度(MFI)(y-轴)。

[0031] 图12A-12C.HVEM-CAR在人类CAR-T细胞中表现出最高的效应子功能:表达肿瘤相关跨膜碳酸酐酶IX(CAIX)的两种人肾癌细胞系+不表达CAIX的对照肾癌细胞系。(图12A)转导的人肾癌细胞系ACHN、Ketr-3和OSRC中CAR表达的设门和分析。(图12B)数据示出了人类CAR-T细胞杀死肾癌细胞的动力学。(图12C)示出了人类CAR-T细胞杀死肾癌细胞的汇总数据。(图12D)在与人肾癌细胞系Ketr-3共培养的试验中,通过ELISA测量携带不同CSS的人CAR-T细胞的IFN- γ (左图)和IL-2(右图)分泌。(图12E)在与人肾癌细胞系OSRC-2共培养的试验中,通过ELISA测量携带不同CSS的人CAR-T细胞的IFN- γ (左图)和IL-2(右图)分泌。

[0032] 图13A-13C.HVEM-CAR T细胞表现出更高的代谢活性。(图13A) Seahorse分析检测的各种CAR-T细胞的OCR。(图13B)基础OCR。(图13C)最大OCR。

[0033] 图14A-14C.HVEM-CAR T细胞在小鼠体内表现出有效的抗肾肿瘤效果。(图14A)示意图示出了小鼠人肾癌(RC)治疗设计。(图14B)汇总数据示出了第14天NSG小鼠外周血中的人类CAR-T细胞。(图14C) CAR-T治疗后人肾癌细胞肺转移NSG小鼠的总体存活率。

[0034] 图15A-15C.HVEM-CAR T-细胞在体内表现出更好的扩增。(图15A)体外转导后CAR-T细胞的百分数。(图14B)第14天NSG小鼠外周血中的人类CAR-T细胞。(图14C)人类T细胞的汇总数据,以总小鼠血细胞的百分数(左图)或人类T细胞计数/100 μ l小鼠血液(右图)表示。

[0035] 图16.终止时转移灶减少的小鼠肺照片。

[0036] 图17.终止时转移灶减少的小鼠肺组织病理。

[0037] 图18.第三代CAR的示意图。所有构建体都包含HVEM共刺激域以及来自41BB、CD28、ICOS或OX40蛋白的细胞质域。在最后三个构建体中,接头被置于pRRL-VRC01-CD8-HVEM-OX40-CD3z构建体中的HVEM和OX40域之间,或者CD3z域中的ITAM 3基序突变为PD-1 ITIM。

具体实施方式

[0038] 现在,将参考示出本发明优选实施例的附图对本发明进行更详细的说明。但是,本发明可以采用各种不同形式实施,并且不应认为本发明限于本文提出的实施例。相反,提供这些实施例是为了充分全面地公开本发明,本领域技术人员应全面了解本发明的范围。

[0039] 除非特别规定,本发明使用的所有术语(包括技术名词和科学术语)的意义与本发明所属领域技术人员通常理解的相同。本发明说明中使用的术语仅仅是为了描述特定实施例,并不是用于限制本发明。通过引用,本文引用的所有出版物、专利申请、专利公开和其它参考文献有关其引用句子和/或段落有关的教导整体都纳入本申请中。

[0040] 除非特别说明,本文核苷酸序列仅以从左至右5'至3'方向的单链显示。本文核苷酸和氨基酸按照IUPAC-IUB生化命名委员会推荐的方式表示,或(氨基酸)按照37CFR§1.822和惯用法以单字母代码或三字母代码表示。

[0041] 除非另外说明,本领域技术人员熟知的标准方法可用于克隆基因、扩增和检测核酸等。这些技术是本领域技术人员熟悉的。参见,例如,Sambrook et al.,Molecular Cloning:A Laboratory Manual 4th Ed.(Cold Spring Harbor,NY,2012);Ausubel et al.Currem Protocols in Molecular Biology(Green Publishing Associates,Inc.and John Wiley&Sons,Inc.,New York)。

[0042] 在本发明的说明书和所附权利要求书中,除非上下文中清楚表明,否则,单数形式“一”、“这个”也包括复数形式。

[0043] 本文所述“和/或”指的是和包括一个或多个相关列出项目的任何和所有可能组合,及缺少替代(“或”)中阐明的组合。

[0044] 此外,提到可测量值,如本发明抗体、化合物或试剂的数量、剂量、时间、温度等时使用的词语“大约”指的是包括规定数值 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 或甚至 $\pm 0.1\%$ 的变化范围。

[0045] 正如应用于本发明氨基和/或核苷酸序列时,词语“基本上由.....组成”(和语法变化形式)指的是氨基和/或核苷酸序列由所提出序列(例如,SEQ ID NO)及所提出序列N-端和/或C-端和/或5'端和/或3'端上共10个或更少数量(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)的其它氨基酸和/或核苷酸组成,从而氨基和/或核苷酸序列与其靶结合的能力并未显著改变。例如,所述共十个或更少数量的其它核苷酸包括加在一起的5'端和3'端上的其它核苷酸的总数。正如应用于核苷酸序列结合时那样,词语“显著改变”指的是与所提出序列组成的核苷酸序列的结合亲和力相比,结合亲和力提高或降低至少大约50%或更高。

[0046] 在本发明的范围内,术语“抗体”是指全长免疫球蛋白及其片段。所述全长免疫球蛋白可以是单克隆、多克隆、嵌合、人源化、饰面(veneered)或人抗体。

[0047] 术语“抗体片段”包括保留所述免疫球蛋白靶向特异性的全长免疫球蛋白部分。许多但并非所有抗体片段至少部分缺乏全长免疫球蛋白的恒定区(Fc区)。在一些实施例中,抗体片段通过消化全长免疫球蛋白产生。抗体片段也可以是包含部分免疫球蛋白或免疫球蛋白链的合成或重组构建体(参见例如Holliger,P.and Hudson,J.Engineered antibody fragments and the rise of single domains.Nature Biotechnology 2005,vol.23, no.9,p.1126-1136)。抗体片段的实例包括但不限于scFv、Fab、Fv、Fab'、F(ab')₂片段、dAb、VHH、纳米抗体、V(NAR)或最小识别单元。“单链可变片段”或“单链抗体”或“scFv”是一种类型的抗体片段。scFv是融合蛋白,包含通过接头连接的免疫球蛋白的VH和VL。因此,它们缺乏全长免疫球蛋白中存在的恒定Fc区,但保留了原始免疫球蛋白的特异性。

[0048] 正如本文所述,用于识别抗体VH和VL中氨基酸残基位置的编号系统与Honegger, A.and Plückthun,A.Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains:An automatic modelling and analysis tool.Journal of Molecular Biology 2001,vol.309,p.657-670描述的“AHo”系统对应。该出版物进一步提供了AHo和Kabat系统之间的转换表(Kabat,E.A.,et al.Sequences of Proteins of Immunological Interest.第5版。由美国卫生与人类服务部编辑.NIH Publications,1991.p.91-3242)。

[0049] 本文所述“核酸”、“核苷酸序列”和“多核苷酸”可互换使用,涵盖RNA和DNA,包括cDNA、基因组DNA、mRNA、合成的(例如,化学合成的)DNA或RNA及RNA和DNA的嵌合体。术语多核苷酸、核苷酸序列或核酸是指不考虑链长的核苷酸链。

[0050] 术语“片段”理解为是指相对于参考核酸或核苷酸序列长度缩短的核苷酸序列,并且包含、基本上由和/或由与参考核酸或核苷酸序列相同的连续核苷酸的核苷酸序列组成。在适当的情况下,本发明所述的核酸片段可以包含在它是其组成部分的更大的多核苷酸中。在一些实施例中,所述片段可包含、基本上由和/或由长度至少是本发明所述核酸或核苷酸序列的大约6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个连续

核苷酸的寡核苷酸组成。

[0051] 本文使用的术语“同一性”是指两种蛋白质或核酸之间的序列匹配性。将要比较的蛋白质或核酸序列比对以获得最大的同一性，例如使用生物信息学工具，如EMBOSS Needle（双序列比对；可从www.ebi.ac.uk获得）。当要比较的序列中的相同位置被相同的核碱基或氨基酸残基占据时，则相应的分子在该位置是相同的。因此，“同一性百分数”是匹配位置的数量除以比较位置的数量再乘以100%的函数。例如，如果10个序列位置中有6个相同，则同一性是60%。两个蛋白质序列之间的同一性百分数可以例如采用Needleman和Wunsch算法（Needleman, S.B. and Wunsch, C.D. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *Journal of Molecular Biology* 1970, vol. 48, p. 443-453）测定，该算法已被合并到EMBOSS Needle中，采用BLOSUM62矩阵，“空位开放罚分”10，“空位扩展罚分”0.5，错误的“末端空位罚分”和“末端空位开放罚分”10及“末端空位扩展罚分”0.5。具有相同的一级氨基酸或核酸序列的两个分子是相同的，而与任何化学和/或生物修饰无关。例如，根据该定义，具有相同一级氨基酸序列但不同糖基化模式的两种抗体是相同的。例如，根据该定义，在核酸的情况下，具有相同序列但不同连接组分（例如硫代磷酸酯代替磷酸酯）的两个分子是相同的。

[0052] 本文所述的术语“变体”是指由于一个或多个氨基酸残基或核碱基的加入（包括插入）、缺失和/或取代而与亲代序列不同，同时保留本文所公开的亲代序列的至少一种所需活性的氨基酸或核酸序列。在CAR的情况下，所述所需活性可能包括特异性靶结合。类似地，当与亲代序列相比时，可以通过一个或多个核碱基的加入、缺失和/或取代来修饰变体核酸序列，但编码的CAR保留如上所述的所需活性。变体可以是天然存在的，例如等位基因变体或剪接变体，或者可以是人工构建的。

[0053] 此外，本文所述“一个或多个”是指1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个等。

[0054] 本文所述本发明可以治疗的“受试者”包括用于医学和/或治疗目的的人类受试者和用于兽医和药物筛选和开发目的的动物受试者。其他合适的动物受试者通常是哺乳动物受试者，例如灵长类、牛、绵羊、山羊、猪、马、猫、犬、兔、啮齿动物（例如，大鼠和小鼠）等。最优选的是人类受试者。人类受试者包括胎儿、新生儿、婴儿、少年、成人和老年受试者。

[0055] 本文所述术语“抗肿瘤作用”是指可表现为肿瘤体积缩小、肿瘤细胞数量减少、增殖率降低、转移数量减少、预期寿命延长和/或与癌症状况相关的各种生理症状改善的生物学作用。“抗肿瘤作用”还可以通过本发明的肽、多核苷酸、细胞和抗体首先延迟肿瘤发生的能力来表现。

[0056] 本文所述术语“自体”是指源自同一个体的任何材料，稍后将所述材料重新引入该个体。

[0057] “同种异体”是指源自同一物种不同动物的移植物。

[0058] “异种”是指源自不同物种动物的移植物。

[0059] 本文所述术语抗体的“抗原结合部分”或“抗原结合片段”（或简称为“抗体部分”或“抗体片段”）是指保留与抗原特异性结合能力的抗体的一个或多个片段、部分或结构域。已经表明，全长抗体的片段可以执行抗体的抗原结合功能。包含在术语抗体的“抗原-结合部分”内的结合片段的实例包括(i) Fab片段，其是由VL、VH、CL1和CH1结构域组成的单价片段；

(ii) $F(ab')_2$ 片段, 其是二价片段, 包含通过铰链区的二硫键连接的两个 $F(ab)'$ 片段; (iii) 由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段; (iv) 由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段; (v) 由一个 VH 结构域组成的 dAb 片段 (Ward et al. (1989) Nature 241:544-546); 及 (vi) 分离的互补决定区 (CDR)。此外, 虽然 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 由不同的基因编码, 但它们可以使用重组方法通过合成接头连接起来, 使它们成为其中 VL 和 VH 区配对形成单价分子的单个连续链 (称为单链 Fv (scFv); 参见例如, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; 和 Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)。所述单链抗体也包含在术语抗体的“抗原结合部分”内。其他形式的单链抗体, 如双抗体, 也包括在内 (参见, 例如 Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448)。

[0060] 术语“表位”是指与抗体分子可变区中的特异性抗原结合位点 (称为互补位) 相互作用的抗原决定簇。单个抗原可能具有多个表位。表位可以是构象的或线性的。构象表位由来自一条 (或多条) 线性多肽链不同区段的空间上并列的氨基酸产生。线性表位是由多肽链中相邻氨基酸残基产生的表位。在某些实施例中, 表位可包括其他部分, 例如抗原上的糖、磷酸基或磺酰基。

[0061] 本文所述“抗体重链”是指以其天然构象存在于所有抗体分子中的两类多肽链中的较大者。

[0062] 本文所述“抗体轻链”是指以其天然构象存在于所有抗体分子中的两类多肽链中的较小者, κ 和 λ 轻链是指两种主要的抗体轻链同种型。

[0063] 本文所述术语“抗原”或“Ag”定义为激发免疫反应的分子。这种免疫反应可能涉及抗体的产生, 或特异性免疫活性细胞的激活, 或两者兼而有之。本领域技术人员将理解的是, 任何大分子, 包括几乎所有蛋白质或肽, 都可以作为抗原。此外, 抗原可以来自重组或基因组 DNA。本领域技术人员将理解的是, 包含编码引发免疫反应的蛋白质的核苷酸序列或部分核苷酸序列的任何 DNA 因此编码本文所述的“抗原”。此外, 本领域技术人员将理解的是, 抗原不需要仅由基因的全长核苷酸序列编码。显然, 本发明包括但不限于使用一种以上基因的部分核苷酸序列, 并且这些核苷酸序列以各种组合排列以引发所需的免疫反应。此外, 本领域技术人员将理解的是, 抗原根本不需要由“基因”编码。很明显, 抗原可以合成或来源于生物样品。生物样品可以包括但不限于组织样品、肿瘤样品、细胞或生物流体。

[0064] 本文所述“氨基酸”是指在 α 碳上具有游离羧基和游离未取代氨基的化合物, 其可以通过肽键连接以形成本文所述的肽活性剂。氨基酸可以是标准的或非标准的、天然的或合成的, 其实例 (及其缩写) 包括但不限于:

Asp=D=天冬氨酸

Ala=A=丙氨酸

Arg=R=精氨酸

Asn=N=天冬酰胺

Cys=C=半胱氨酸

Gly=G=甘氨酸

Glu=E=谷氨酸

Gln=Q=谷氨酰胺

His=H=组氨酸

Ile=I=异亮氨酸
Leu=L=亮氨酸
Lys=K=赖氨酸
Met=M=蛋氨酸
Phe=F=苯丙氨酸
Pro=P=脯氨酸
Ser=S=丝氨酸
Thr=T=苏氨酸
Trp=W=色氨酸
Tyr=Y=酪氨酸
Val=V=缬氨酸
Om=鸟氨酸
Nal=2-萘丙氨酸
Nva=正缬氨酸
Nle=正亮氨酸
Thi=2-噻吩丙氨酸
Pcp=4-氯苯丙氨酸
Bth=3-苯并噻吩丙氨酸
Bip=4,4'-联苯丙氨酸
Tic=四氢异喹啉-3-羧酸
Aib=氨基异丁酸
Anb= α -氨基正丁酸
Dip=2,2-二苯基丙氨酸
Thz=4-噻唑基丙氨酸

[0065] 本文提到的所有肽序列都根据通常的约定编写,其中N-末端氨基酸在左侧,C-末端氨基酸在右侧。两个氨基酸残基之间的短线(或无线)表示肽键。

[0066] “碱性氨基酸”是指在pH值为6.0时带正电的任何氨基酸,包括但不限于R、K和H。“芳香族氨基酸”是指在与 α 碳偶联的侧链中具有芳香族基团的任何氨基酸,包括但不限于F、Y、W和H。

[0067] 本文所述的术语“可检测部分”包括任何合适的可检测基团,例如放射性标记(例如 ^{35}S 、 ^{125}I 、 ^{131}I 等)、酶标记(例如,辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等)、荧光标记(例如,荧光素、绿色荧光蛋白等)等等正如本领域熟知并根据已知技术使用的那样。

[0068] “免疫反应”指的是受试者对抗原存在的反应,可能包括以下至少一种反应:产生抗体、发展免疫力、发展对抗原的超敏反应和发展耐受性。

[0069] 本文所述术语“增强免疫反应”是指与不存在本发明CAR的情况下受试者对抗原存在的反应相比,在本发明CAR存在下受试者对抗原存在的反应增加和/或放大。

[0070] 词语“治疗”指的是受试者疾病的严重程度降低或至少部分改善或改进,至少一种临床症状实现某种减轻、缓解或减少。

[0071] 本文所述“有效剂量”是提供所需效果的剂量。

[0072] 本文所述“治疗有效”剂量是为受试者提供某些改善或好处的剂量。或者，“治疗有效”剂量是减轻、缓解或减少受试者至少一种临床症状的剂量。本领域技术人员将了解的是，治疗效果并不需要是全面的或治愈的，只要为受试者提供某些好处即可。

[0073] 嵌合抗原受体 (CAR) 是一种人工抗原受体，由抗原结合域和能够模拟 T 细胞受体介导信号通路的信号转导域组成。靶分子的天然配体或抗体的单链可变区已被用作 CAR 的抗原结合域。CAR 的优势在于其可以识别确定的靶，而无需抗原处理或主要组织相容性复合体 (MHC) 限制的抗原呈递，从而导致表达 CAR 的 T 细胞 (CAR-T 细胞) 可能作为有用的工具用于范围广泛的患者的过继性免疫治疗 (Dotti et al., *Immunol.Rev.* 257 (1) :107 (2014))。表达以 CD3 ζ 作为信号转导域的第一代 CAR 的 T 细胞经常变得没有反应性，无法引发有效的免疫反应 (Kershaw et al., *Clin.Cancer Res.* 12 (20 Pt 1) :6106 (2006))。为了解决这个问题，已经开发出具有一个和两个来自 CD28、4-1BB 或 ICOS 的共刺激信号 (CSS) 域的第二代和第三代 CAR (Dotti et al., *Immunol.Rev.* 257 (1) :107 (2014))。这些具有模块化结构的 CAR 已被证明可以成功模拟 T 细胞受体介导的抗原刺激信号转导，从而导致 CAR-T 细胞的增殖和激活 (Maus et al., *Blood* 123 (17) :2625 (2014))。

[0074] 使用靶向 CD19 的 CAR-T 细胞对 B 细胞恶性肿瘤进行过继性免疫治疗的临床试验显示出有希望的结果 (Maude et al., *Blood* 125 (26) :4017 (2015))，并且这种细胞 2017 年获得了美国食品和药物管理局的批准，提示进一步扩大临床应用的可能性 (Miller et al., *Oncol.Res.Treat.* 38 (12) :683 (2015))。然而，CAR-T 细胞的过继转移对实体瘤的治疗效果不如对淋巴恶性肿瘤的治疗效果显著 (Newick et al., *Mol Ther.Oncolytics* 3:16006 (2016))。为了提高对实体瘤的治疗效果，改变肿瘤微环境可能会有所帮助，因为最近有报道称，促进 CAR-T 细胞肿瘤浸润的乙酰肝素酶增加了抗肿瘤作用 (Camana et al., *Nat.Med.* 21 (5) :524 (2015))。为了提高 CAR-T 细胞介导的免疫疗法的实用性，可能还需要进一步改善 CAR-T 细胞的效应子功能和特性。共刺激是 T 细胞发挥有效效应子功能的关键事件，并由共刺激分子介导。共刺激分子分为两大家族：CD28 家族，包括 CD28 和 ICOS，以及肿瘤坏死因子受体超家族 (TNFRSF)，包括 4-1BB (TNFRSF9) 和疱疹病毒侵入介体 (HVEM, TNFRSF14)。到目前为止，源自 CD28 或 4-1BB 的 CSS 域已普遍用于构建 CAR。之前的一项研究表明，表达具有 4-1BB 衍生 CSS 域的第二代 CAR 的 T 细胞在大多数患者的血液中持续存在超过 6 个月，而具有 CD28 衍生 CSS 域的 CAR-T 细胞 3 个月几乎检测不到 (Zhang et al., *Oncotarget* 6 (32) :33961 (2015))。此外，4-1BB 介导的共刺激选择性诱导线粒体生物发生和氧化代谢产生能量，从而增强分化和增加中央记忆 T 细胞的体外持久性 (Kawalekar et al., *Immunity* 44 (2) :380 (2016))。此外，4-1BB 介导的共刺激避免了强直信号诱导的 T 细胞耗竭 (Long et al., *Nat.Med.* 21 (6) :581 (2015))。因此，在第二代 CAR 的背景下，源自 TNFRSF 的 CSS 域的功能似乎比源自 CD28 家族的 CSS 域更好。

[0075] 越来越多的报告表明了 TNFRSF 的另一个成员 HVEM 在效应 CD8⁺T 细胞效应子功能和记忆 T 细胞发育中的作用。CD8⁺T 细胞中 HVEM 缺乏被证明会严重损害效应 CD8⁺T 细胞的存活和保护性免疫记忆的发育 (Flynn et al., *PLoS One* 8 (10) :e77991 (2013))。据报道，B 和 T 淋巴细胞衰减因子 (HVEM 的配体之一)，与 CD8⁺T 细胞上表达的 HVEM 相互作用，也可促进细菌感染时的存活和记忆生成 (Steinberg et al., *PLoS One* 8 (10) :e77992 (2013))。此外，表达抗 HVEM 单链抗体的肿瘤细胞诱导共培养 T 细胞的有效增殖和细胞因子产生 (Park et al.,

Cancer Immunol.Immunother.61 (2) :203 (2012)),表明HVEM可以作为T细胞中有效的CSS。但是,目前还没有关于HVEM是否可以作为CAR-T细胞中有用的共刺激信号的报道。

[0076] 识别CAR模块中有效的CSS是应用CAR-T细胞疗法治疗各种疾病,例如实体瘤和病原体感染(例如慢性病毒或细菌感染)的关键要求之一。本发明人开发了第二代CAR,其中包括作为靶向1型人类免疫缺陷病毒(HIV-1)表面包膜蛋白(Env)的抗原结合域的CD4(称为可溶性CD4(sCD4))胞外域以及源自CD28、4-1BB或HVEM的CSS域(图1A)。使用携带不同CSS的sCD4-CAR,本发明人观察到CAR转导的T细胞功能与由人T细胞系和原代CD8⁺T细胞制成的CAR-T细胞上的CAR表达之间的关联性。这种关联性依赖于CAR中的CSS,表明HVEM CSS提供了最有效的CSS。表型和代谢分析表明,HVEM CSS诱导了同等比例的中央和效应记忆表型,具有明显更高的糖酵解和线粒体呼吸。此外,HVEM CSS避免了CAR-T细胞耗竭。这些结果出人意料且令人惊讶,表明CAR中的CSS通过调节能量代谢影响CAR-T细胞的活性和特征,并提供了第一个证据表明HVEM可能是开发有效CAR-T细胞的有用的CSS。

[0077] 因此,本发明涉及一种嵌合抗原受体(CAR),其包含抗原结合域、跨膜域、T细胞受体域和包含疱疹病毒侵入介体(HVEM)蛋白或其功能片段的共刺激信号(CSS)域。

[0078] CSS域对于促进T-细胞受体域的细胞内信号,从而启动T细胞活化和增殖非常重要。因此,这种信号的促进可以取决于选择的CSS域和/或其组合。例如,在本发明中,包含HVEM蛋白或其功能片段或变体的CSS域促进T细胞活化和增殖。特别是,相对于不包含本发明的HVEM CSS域的CAR,本发明的HVEM CSS促进与增加糖酵解和线粒体呼吸相关的增强效应子功能。

[0079] 在一些实施例中,与不包含本发明的HVEM CSS域的CAR-T细胞相比,包含本发明的HVEM CSS域的CAR-T细胞的CAR-T糖酵解增加至少大约50%至大约100%、大约60%至大约90%或大约70%至大约80%(或至少大约50%、大约60%、大约70%、大约80%、大约90%或大约95%)。在一些实施例中,与不包含本发明的HVEM CSS域的CAR-T细胞相比,包含本发明的HVEM CSS域的CAR-T细胞的线粒体呼吸增加至少大约50%至大约100%、大约60%至大约90%或大约70%至大约80%(或至少大约50%、大约60%、大约70%、大约80%、大约90%或大约95%)。

[0080] 在一些实施例中,HVEM CSS域包含、基本上由或由以下氨基酸序列组成: WVVWFLSGSL VIVIVCSTVG LIICVKRRKP RGDVVKVIVS VQRKRQEAEGEATVIEALQA PPDVTTVAVE ETIPSFTGRS PNH(SEQ ID NO:1)或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%同一性的功能片段或变体。在一些实施例中,HVEM CSS包含、基本上由或由具有以下氨基酸的HVEM片段组成:

LVIVIVCSTVGLIICVKRRKPRGDVVKVIVSVQRKRQEAEGEATVIEALQAPPDVTTVAVEETIPSFT (SEQ ID NO:2)或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%同一性的变体。

[0081] 在一些实施例中,CSS域还包括一个或多个(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10个等)其它的CSS域、其变体和/或片段。非限制性实例包括任意组合的CD28 CSS域、4-1BB CSS域、OX-40CSS域、ICOS域或任何其他CSS域和/或与它们具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%同一性的现在已知的或以后识别的功能片段或变体。在一些实施例中,接头可存在于两个或多个域之间,例如,3-12残基接头,例如,5-8残基接

头。示例性构建体如图18所示。

[0082] T细胞受体域是一个信号域,它将受体配体结合事件转导为部分激活T细胞的细胞内信号。缺乏适当的共刺激信号,该事件不足以实现有用的T细胞激活和增殖。本发明的T细胞受体域的一个非限制性实例是T细胞受体 ζ 链的T细胞受体域(例如,CD3 ζ)。在一些实施例中,本发明的CAR的T细胞受体域包含、基本上由、或由CD3 ζ 信号域或衍生自T细胞受体的相关T细胞受体域或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%同一性的功能片段或变体。在一些实施例中,CD3 ζ 域中的ITAM 3基序可以突变为PD-1 ITIM。相关T细胞受体的实例包括但不限于含有一级细胞质信号序列的ITAM,例如TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79B和/或CD66d。

[0083] 跨膜域对于整个CAR的稳定性非常重要。在一些实施例中,跨膜域可以是跨越细胞(例如T细胞)膜的疏水性 α 螺旋。在一些实施例中,跨膜域可以来自任何I型跨膜蛋白,例如CD4、CD28或HVEM或与它们具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%同一性的功能片段或变体。在一些实施例中,跨膜蛋白是CD28或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%同一性的功能片段。

[0084] 可选择抗原结合域,以识别在与特定疾病状态相关的靶细胞上充当细胞表面标记物的配体(即抗原)。在一些实施例中,抗原结合域包含单价抗体片段。在一些实施例中,单价抗体片段包含单链可变片段(scFv)或Fab片段。在一些实施例中,单价抗体片段的分子量是大约25至大约30kDa(或大约25kDa、大约26kDa、大约27kDa、大约28kDa、大约29kDa或30kDa)。在一些实施例中,单价抗体片段具有通过柔性接头(例如,VL-接头-VH或VH-接头-VL)以任一方向连接的VH和VL结构域。在一些实施例中,方向是VL-接头-VH,其中轻链可变区位于多肽的N-末端,而重链可变区位于多肽的C-末端。柔性接头通常包含10个至大约25个氨基酸,例如甘氨酸,以赋予柔性,和/或丝氨酸和/或苏氨酸,以提高溶解度)。例如,在一些实施例中,采用(GGGGS)₃接头(SEQ ID NO:3)或其变体。也可以采用具有三到五个重复的所述基序的变体。其它合适的接头在例如Alfthan,K.Properties of a single-chain antibody containing different linker peptides.Protein Engineering 1995,vol.8, no.7,p.725-731中进行了描述,通过引用,该文献整体纳入本发明中。

[0085] 本发明CAR的抗原结合域靶向的疾病可以是癌症和/或病原体感染(例如,慢性病毒或细菌感染)。在一些实施例中,抗原结合域靶向癌细胞和/或病毒颗粒表面上存在的抗原。示例性癌细胞和肿瘤细胞抗原在S.A.Rosenberg(Immunity 10:281(1991))中进行了描述。其它示例性癌抗原和肿瘤抗原包括但不限于:BRCA1基因产物、BRCA2基因产物、gp100、酪氨酸酶、GAGE-1/2、BAGE、RAGE、LAGE、NY-ESO-1、CDK-4、p-连环蛋白、MUM-1、Caspase-8、KIAA0205、HPVE、SART-1、PRAME、p15、黑色素瘤肿瘤抗原(Kawakami et al.(1994) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:3515;Kawakami et al.,(1994) J.Exp.Med.,180:347;Kawakami et al.(1994) CancerRes.54:3124)、MART-1、gp100、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、CEA、TRP-1、TRP-2、P-15、酪氨酸酶(Brichard et al.(1993) J.Exp.Med.178:489);HER-2/神经基因产物(美国专利No.4,968,603)、CA 125、LK26、FB5(内皮唾液酸蛋白)、TAG 72、AFP、CA19-9、NSE、DU-PAN-2、CA50、Span-1、CA72-4、HCG、STN(唾液酸化Tn抗原)、c-erbB-2蛋白、PSA、L-CanAg、雌激素受体、牛奶脂肪球蛋白、p53肿瘤抑制蛋白(Levine,(1993) Ann.Rev.Biochem.62:623);粘蛋白抗原(国际专利公开No.WO 90/05142);端粒酶;核基质

蛋白;前列腺酸性磷酸酶;乳头状瘤病毒抗原;和/或现在已知或以后发现的与以下癌症(例如实体瘤)相关的抗原:黑色素瘤、腺癌、胸腺瘤、淋巴瘤(例如,非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤)、肉瘤、肺癌、肝癌、结肠癌、白血病、子宫癌、乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、肾癌、胰腺癌、脑癌、神经母细胞瘤和任何其他现在已知或以后确定的癌症或恶性疾病(参见,例如,Rosenberg (1996) Ann.Rev.Med.47:481-91)。

[0086] 在一些实施例中,抗原结合域靶向癌细胞表面上存在的抗原。在一些实施例中,抗原结合域靶向肾癌细胞表面上存在的抗原。肾癌细胞包括但不限于来自肾细胞癌、移行细胞癌、肾母细胞瘤、肾肉瘤和/或转移性肾癌的细胞。

[0087] 在一些实施例中,抗原结合域靶向选自但不限于以下肾细胞癌(RCC)细胞表面上存在的抗原:透明细胞RCC、乳头状RCC、嫌色RCC、集合管RCC和/或未分类RCC。在一些实施例中,肾细胞癌细胞选自但不限于Ketr-3和/或ORSC-2或ACHN肾癌细胞系。示例性肾癌抗原包括但不限于本领域已知的或将来确定的肾癌细胞表面上的任何表面蛋白和/或多肽。

[0088] 在一些实施例中,本发明的抗原结合域靶向表面蛋白碳酸酐酶IX(CAIX)。在一些实施例中,靶向表面蛋白碳酸酐酶IX(CAIX)的本发明抗原结合域包含单价抗体片段,所述单价抗体片段包含抗CAIX scFv的氨基酸序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%同一性的变体。

[0089] 在一些实施例中,抗原结合域靶向神经母细胞瘤细胞表面上存在的抗原。在一些实施例中,神经母细胞瘤细胞来自PDX细胞系,但也可采用其他神经母细胞瘤细胞系。示例性神经母细胞瘤抗原包括但不限于本领域已知的或将来确定的神经母细胞瘤细胞表面上存在的任何表面蛋白和/或多肽。在一些实施例中,本发明的抗原结合域靶向表面蛋白二唾液酸神经节苷脂GD2。在一些实施例中,靶向表面蛋白二唾液酸神经节苷脂GD2(aGD2)的本发明抗原结合域包含单价抗体片段,所述单价抗体片段包含aGD2的氨基酸序列或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%同一性的变体。

[0090] 在一些实施例中,抗原结合域靶向病毒颗粒表面上存在的抗原。病毒颗粒的实例包括但不限于流感病毒、马传染性贫血病毒、猿猴免疫缺陷病毒(SIV)、人类免疫缺陷病毒(HIV)、拉沙热病毒、单纯疱疹病毒、水痘带状疱疹病毒、巨细胞病毒、爱泼斯坦-巴尔病毒、天花病毒、腺病毒、乳头瘤病毒、细小病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、呼吸道合胞病毒、副流感病毒、冠状病毒、风疹病毒、狂犬病病毒、人类T细胞嗜淋巴细胞病毒、小核糖核酸病毒、嗜肝DNA病毒、黄病毒、三角病毒、杯状病毒、脊髓灰质炎病毒、寨卡病毒、西尼罗河病毒、SARS、风疹、诺如病毒、人类乳头瘤病毒、疟疾、人类T淋巴细胞病毒和/或幽门螺杆菌。

[0091] 示例性病毒抗原包括但不限于上述病毒颗粒表面上存在的任何表面蛋白和/或多肽。此类表面蛋白和/或多肽的实例包括但不限于寨卡病毒包膜域-3、寨卡病毒包膜N、WNV包膜、WNV Pre-M、VZV ORF9、VZV ORF26、CoV-NL63、CoV-229E、风疹E1、诺如病毒组-1 P-结构域、诺如病毒组-2P-结构域、HPV 11、HPV 16、HPV 18、HPV 6、HPV16 E6、疟疾Pf. MSP1、Malaria Pv.MSP1、拉沙病毒衣壳、拉沙病毒GP1、北京H1N1、加利福尼亚H1N1、新喀里多尼亚H1N1、HTLV-1包膜、HTLV-1 gp21、HTLV-1花叶、HIV 0型-包膜、HIV 0型gp41、HIV-1包膜、HIV-1 gag p17、p24、HIV-1 gp120CM、CagA Pylori、Omp Pylori、HP-NAP、HAV P2C、HAV P2C-P3A、HAV P2C-P3B、HAV P3C、HAV VP1、HAV VP1-P2A(669-782a.a.)、HAV VP1-P2A(722-830a.a.)、HAV VP3、HAV VP4-VP2、HSV 2gG、HSV-1 gD和/或HSV-2gB。在一些实施例中,病毒

颗粒是HIV颗粒。在一些实施例中，抗原结合域靶向HIV颗粒的表面受体，例如但不限于人类免疫缺陷病毒HIV-1的包膜蛋白ENV。

[0092] 在一些实施例中，本发明的靶向人免疫缺陷病毒HIV-1的表面包膜蛋白ENV的抗原结合域包含可溶性CD4蛋白或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%同一性的功能片段或变体。在一些实施例中，可溶性CD4蛋白是人可溶性CD4蛋白，其包含、基本上由或由以下氨基酸序列组成：

MNRGVPFRHL LLVLQLALLP AATQGKKVVL GKKGDTVELT CTASQKKSIIQ
 FHWKNSNQIK ILGNQGSFLT KGPSKLNDA D SRRSLWDQGN FPLIKNLKIIE
 DSDTYICEVED QKEEVQLLVFG LTANS DTHLL QGQSLTLTLES PPGSSPSVQC
 RSPRGKNIQG GKTL SVS QLEL QDSGTWTCTVLQNQKKVEFKIDIVVLA (SEQ ID NO:4)

或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%同一性的功能片段或变体。

[0093] 在一些实施例中，抗原结合域和跨膜域通过间隔序列连接。可以使用多种不同的间隔序列。例如，在一些实施例中，间隔序列是包含低于100、90、80、70、60、50、40、30、20或10个氨基酸的短间隔序列。在一些实施例中，间隔序列可包括Fc区的至少一部分，例如CH3域的人Fc区的铰链部分或其变体。在一些实施例中，间隔序列包括免疫球蛋白（例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）铰链区的全部或部分，即位于免疫球蛋白的CH1和CH2结构域之间的序列（例如，IgG4 Fc铰链或CD8铰链、CD28铰链IgG4 (HL-CH3) 或IgG4 (L235E, N297Q)。在一些实施例中，间隔序列包含、基本上由或由具有以下氨基酸序列的CD8铰链区组成：AGEQKLISEEDLGALSNSIM YFSHFVPVFL PAKPTTTPAP RPPTPAPTIA SQPLSLRPEA SRPAAGGAVH TRGLD (SEQ ID NO:5)。

[0094] 在进一步的实施例中，本发明的CAR还可单独或以任意组合包含本领域已知的可检测部分和/或效应分子，其非限制性实例包括药物、毒素、小分子、抗体和/或抗体片段。在一些实施例中，本发明的CAR包含抗c-myc标签。

[0095] 在一些实施例中，本发明的CAR包含、基本上由或由以下氨基酸序列组成：

MNRGVPFRHL LLVLQLALLP AATQGKKVVL GKKGDTVELT CTASQKKSIIQ
 FHWKNSNQIK ILGNQGSFLT KGPSKLNDR D SRRSLWDQG NFPLIKNLKI
 IEDSDTYICE VEDQKEEVQL LVFGLTANS D THLLQGQSLTL TLESPPGSSP
 SVQCRSPRGK NIQGGKTL SV S QLELQDSGT WTCTVLQNQK KVEFKIDIVV
 LAAGEQKLISEEDLGALSNS IMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRP
 EASRPAAGGA VHTRGLDWVW WFLSGSLVIV IVCSTVGLII CVKRRKPRGD
 VVKVIVSVQR KRQEAEGEAT VIEALQAPPD VTTVAVEETI PSFTGRSPNH
 RVKFSRSADA PAYQQGQNQL YNELNLGRRE EYDVLDKRRG RDPEMGGKPR
 RKNPQEGLYN ELQKDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGHDGLY QGLSTATKDT
 YDALHMQALP PR (SEQ ID NO:6) 或与其具有至少90%、91%、92%、93%、

94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%同一性的序列。

[0096] 本发明另外提供编码本发明CAR的核酸分子。在一些实施例中，所述核酸分子包含、基本上由或由以下核苷酸序列组成：

atgaaccggggagtccttttaggcacttgcttctggtgctgcaactggcgctcctccagcagccactcagggaagaaagtggctgg
gcaaaaaaggggatacagtggaaactgacctgtacagcttcccagaagaagagcatacaattccactggaaaaactccaacagataaaga
ttctgggaaatcagggtccttctaactaaaggtccatccaagctgaatgatcgcgctgactcaagaagaagcctttgggaccaaggaac
ttccccctgatcatcaagaatctaagatagaagactcagatactfacatctgtgaagtggaggaccagaaggaggagtgcaattgctagt
ttcggattgactgccaactctgacaccacctgcttcaggggagagcctgacctgacctggagagccccctggtagtagcccctcagt
gcaatgtaggagtcgaagggtaaaaacatacagggggggaagacctctccgtgtctcagctggagctccaggatagtgccacctgga
catgcactgtctgcagaaccagaagaaggtggagtcaaaatagacatcgtggctagctgaattcagcagaagctgatcagcgagga
ggacctgggcccctgagcaacagcatcatgtacttcagccactcgtgccctgttctctgcccgcaagcccaccaccacccccgcccc
ccgccccccacccccgccccaccatgccagccagccctgagcctgcgccccgaggccagccgccccgcccggcgccgccc
tgcacaccgcccctggactgggtgtggtggtcctgagcggcagcctggtgatcgtgatcgtgtgcagcaccgtgggctgatcatctg
cgtgaagcggcgaagccccgcccgcacgtggtgaaaggtgatcgtgagcgtgcagcgaagcggcaggaggccgagggcgagggcc
acctgatcagggccctgcaggccccccccgacctgaccaccgtggcctggaggagaccatccccagcttaccggccgagcccca
accaccgctgaagttcagccgcagcggcagccccgcctaccagcagggccagaaccagctgtacaacgagctgaacctgggcc
ggcgcgaggagtacagctgctggacaagcggcggcggcgaacccgagatggggcgaagccccgcccgaagaacccccagga
gggctgtacaacgagctgcagaaggacaagatggccgagggcctacagcagatcggcatgaagggcgagcggcccggcgaag
gccacgagggcctgtaccagggcctgagcaccgcccaagacacctacgacgcccctgcacatgcagggcctgccccccgctaa

(SEQ ID NO:7) 或与其具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或99.5%同一性的序列。

[0097] 本发明进一步提供包含本发明核酸分子的载体。载体包括但不限于质粒载体、噬菌体载体、病毒载体或粘粒载体。本发明的T淋巴细胞可以在T淋巴细胞中产生CAR的条件下，例如采用病毒载体转导。载体的选择通常取决于其被引入其中的宿主细胞。

[0098] 在一些实施例中，本发明提供包含本发明CAR的细胞，并且在一些实施例中，本发明提供包含本发明的核酸分子和/或载体的细胞。本发明细胞的非限制性实例包括 α T细胞、自然杀伤(NK)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、调节性T细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、Th17细胞、 γ δ T细胞，以及它们的任意组合。

[0099] 在一些实施例中，本发明提供包含识别并结合癌细胞和/或病毒颗粒表面上存在的抗原的CAR的细胞毒性T淋巴细胞。例如，在一些实施例中，细胞毒性T淋巴细胞包含识别并结合人类免疫缺陷病毒HIV-1的表面包膜蛋白ENV的CAR。在一些实施例中，细胞毒性T淋巴细胞包含识别并结合癌细胞表面蛋白(例如肾癌细胞表面蛋白(即CAIX)和/或神经母细胞瘤细胞表面蛋白(即aGD2)的CAR。然后，细胞毒性T淋巴细胞可以采用病毒载体转导或采用包含编码本发明CAR的核苷酸序列的质粒或核酸构建体转染，在一些实施例中，核苷酸序列可以是临床上用于其他CAR-T细胞的任何慢病毒或逆转录病毒载体。

[0100] 在某些实施例中，本发明包括经工程改造包含CAR的T淋巴细胞，所述CAR包含对癌细胞和/或病毒颗粒表面上存在的抗原(例如，人类免疫缺陷病毒HIV-1的表面包膜蛋白ENV、CAIX和/或sGD2)具有特异性的抗原结合片段、跨膜域(例如CD28)、T细胞受体域(例如CD3 ζ)，和包含本发明HVEM蛋白或与其具有至少90%同一性的功能片段或变体的CSS域。在特定实施例中，抗原的单克隆抗体片段(例如人类免疫缺陷病毒HIV-1的表面包膜蛋白ENV、CAIX和/或sGD2)是单链可变片段(scFv)。

[0101] 在某些实施例中，本发明提供对癌细胞和/或病毒颗粒表面上存在的抗原(例如，

人类免疫缺陷病毒HIV-1的表面包膜蛋白ENV、CAIX、aGD2)具有特异性的细胞,其中所述细胞在细胞表面具有CAR,其通过将源自例如CD4蛋白、CAIX、aGD2和/或其片段的细胞外抗原结合域与源自T细胞受体 ζ 链的T细胞受体域,及包含HVEM蛋白或与其具有至少90%同一性的功能片段或变体的CSS域连接而产生。

[0102] 在本发明进一步的实施例中,提供一种用于促进细胞对抗原的反应性的方法,所述方法包括采用本发明的核酸分子和/或本发明的载体转染细胞以产生细胞表面上包含抗原结合域的转染细胞,其中抗原结合域与抗原特异性结合,从而促进细胞对抗原的反应性。本文所述“反应性”是指细胞与抗原结合后促进免疫反应的能力。与没有本发明CAR的细胞相比,采用本发明的CAR修饰的细胞可以促进增强的免疫反应(例如,更强、更快和/或更有效的免疫反应)。在一些实施例中,抗原在癌细胞和/或病毒颗粒表面上存在。在一些实施例中,抗原在病毒颗粒(例如HIV颗粒)上存在。在一些实施例中,抗原在癌细胞例如实体瘤(例如肾癌)上存在。在一些实施例中,细胞是细胞毒性T淋巴细胞。

[0103] 在进一步的实施例中,本发明在药学上可接受的载体中提供一种组合物(例如,药物组合物),其包含、基本上由或由本发明的CAR、本发明的核酸分子、本发明的载体和/或本发明的细胞组成。

[0104] 在进一步的实施例中,本发明提供在有需要的受试者中提供针对靶(例如癌细胞和/或传染原)的免疫反应的方法。在一些实施例中,所述方法包括向受试者施用有效剂量的本发明的CAR和/或本发明的核酸分子和/或本发明的载体,和/或本发明的细胞,从而提供针对受试者体内靶的免疫反应。在一些实施例中,所述靶是传染原,施用本发明的CAR和/或本发明的核酸分子和/或本发明的载体和/或本发明的细胞治疗受试者的感染。在一些实施例中,所述靶是癌症,施用本发明的CAR和/或本发明的核酸分子和/或本发明的载体和/或本发明的细胞治疗受试者的癌症。在一些实施例中,所述癌症包括实体瘤。

[0105] 在一些实施例中,所述方法包括施用包含本发明的CAR的工程化T细胞(即T淋巴细胞)。制备包含本发明CAR的工程化T淋巴细胞的方法是本领域技术人员熟知的。例如,在一些实施例中,细胞毒性淋巴细胞(即T细胞)可以从具有针对靶(例如,癌细胞和/或传染原)的免疫力受损和/或存在免疫受损风险的受试者获得。在一些实施例中,所述受试者患有癌症。在一些实施例中,所述受试者存在感染。在一些实施例中,采用本领域熟知的技术(例如,Ficoll密度梯度离心,然后进行阴性选择以去除不需要的细胞)从外周血中分离细胞毒性淋巴细胞(即T细胞)。

[0106] 通过采用编码本发明CAR的本发明的表达载体和/或核酸分子转染淋巴细胞群,可以将细胞毒性淋巴细胞工程化从而表达本发明的CAR。用于制备表达本发明CAR的转染淋巴细胞群的适当方法是本领域技术人员熟知的,包括但不限于逆转录病毒、慢病毒(病毒介导的CAR基因递送系统)、睡美人(sleeping beauty)和/或piggybac(转座子/转座酶系统,包括非病毒介导的CAR基因传递系统)。

[0107] 转染的淋巴细胞在适合将被引入到受试者(例如人)体内的细胞群的条件培养。具体考虑包括使用不含任何动物产品(如牛血清)的培养基。其他考虑因素包括灭菌条件,以避免细菌、真菌和支原体的污染。在一些实施例中,在向受试者施用之前,可以将培养的转染淋巴细胞沉淀、洗涤并重新悬浮在药学上可接受的载体或稀释剂中。向受试者施用转染的淋巴细胞可以提供或增强针对靶(例如,癌细胞和/或传染原)的免疫反应。在一些实施

例中,向受试者施用转染的淋巴细胞可以治疗受试者的癌症和/或病原体感染。在一些实施例中,受试者是人类。在一些实施例中,治疗的病原体感染是慢性病毒感染,例如HIV。

[0108] 在一些实施例中,治疗的靶是癌症。在一些实施例中,治疗的癌症包括实体瘤。在一些实施例中,治疗的癌症是肾癌。示例性肾癌包括但不限于肾细胞癌、移行细胞癌、肾母细胞瘤、肾肉瘤和/或转移性肾癌。在一些实施例中,肾癌是肾细胞癌(RCC)。在一些实施例中,肾细胞癌包括但不限于透明细胞RCC、乳头状RCC、嫌色RCC、集合管RCC和/或未分类RCC。

[0109] 在一些实施例中,本发明的方法包括向有需要的受试者施用有效剂量的本发明的CAR和/或本发明的核酸分子和/或本发明的载体,和/或本发明的细胞治疗癌症(即肾癌)。在一些实施例中,治疗导致肿瘤尺寸缩小。在一些实施例中,相对于未治疗的肿瘤,肿瘤大小/体积缩小至少大约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。在一些实施例中,治疗导致受试者生存率增加。在一些实施例中,相对于未治疗的受试者,生存率增加至少大约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。

[0110] 在一些实施例中,本发明的方法包括向有需要的受试者施用有效剂量的本发明的CAR和/或本发明的核酸分子和/或本发明的载体,和/或本发明的细胞减少受试者体内癌细胞的数量。在一些实施例中,相对于未治疗的受试者,癌细胞的数量减少至少大约2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍。

[0111] 本发明的CAR修饰T细胞可以单独施用,或者作为与稀释剂和/或其他成分组合的药物组合物施用。简而言之,本发明的药物组合物可包含本文所述的细胞群以及一种或多种药学上或生理学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。所述组合物可单独或组合包含缓冲液,例如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水、无菌盐水等;碳水化合物如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇;蛋白质;多肽或氨基酸,如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂,例如EDTA和/或谷胱甘肽;佐剂(例如氢氧化铝)和/或防腐剂。本发明的药物组合物可以以适合于所治疗和/或所预防疾病的方式施用。施用的数量和频率将由例如受试者的状况以及受试者疾病的类型和严重程度等因素决定,尽管在一些实施例中,适当的剂量可以通过临床试验来确定。

[0112] 当指出“免疫有效剂量”、“抗肿瘤有效剂量”、“肿瘤抑制有效剂量”或“治疗剂量”时,本发明组合物的准确施用量可以由医生根据年龄、体重、肿瘤大小、感染或转移程度以及患者(受试者)状况的个体差异确定。在一些实施例中,包含本发明细胞的药物组合物可以大约 10^3 至大约 10^{10} 个细胞/kg体重的剂量施用,并且在一些实施例中,所述剂量可以是大约 10^5 至大约 10^8 个细胞/kg体重或大约 10^6 至大约 10^8 个细胞/kg体重,包括这些范围内的所有整数值(例如, 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9)。

[0113] 本发明的细胞组合物可以按这些剂量多次施用(例如,每小时一次、每天四次、每天三次、每天两次、每天一次、每周两次、每周三次、每周一次、每月一次、每两个月一次、每半年一次、每年一次等)。

本发明的细胞可以通过使用免疫疗法中公知的输注技术施用(参见例如Rosenberg et al. *New Eng. J. of Med.* 319:1676 (1988))。医学领域的技术人员可以通过监测受试者的疾病症状并相应地调整治疗很容易确定特定受试者的最佳剂量和治疗方案。

[0114] 在一些实施例中,可能需要向受试者施用活化的T细胞,然后随后重新抽血(或进行血液分离),如本文所述从其活化T细胞,并用这些活化和扩增的T细胞重新输注到受试者

体内。这个过程可以进行多次,例如每周或每几周一次。在某些实施例中,T细胞可以从大约10cc至大约400cc的抽血中被激活。在某些实施例中,T细胞从20cc、30cc、40cc、50cc、60cc、70cc、80cc、90cc或100cc的抽血中被激活。使用这种多次抽血/多次回输方案可用于选择出某些T细胞群,但并不受此理论的束缚。

[0115] 本发明组合物的施用可以以任何方式进行,包括通过气雾吸入、注射、摄取、输注、植入和/或移植。本发明的组合物可以经皮下、皮内、瘤内、结内、髓内、肌内、静脉内(i.v.)注射和/或腹膜内向患者施用。在一些实施例中,本发明的T细胞组合物可经皮内或皮下注射向受试者施用。在一些实施例中,本发明的T细胞组合物可经静脉内注射向受试者施用。在一些实施例中,T细胞组合物可以直接注射到肿瘤、淋巴结和/或感染部位。

[0116] 在本发明的一些实施例中,使用本文所述的方法或本领域已知的其他方法将T细胞扩增至治疗水平,激活和扩增的细胞可以以相关治疗方式的任意数量联合(例如,之前、同时和之后)施用于受试者。在一些实施例中,取决于所治疗的疾病,本发明的CAR和/或核酸分子和/或工程化T细胞可以与其他治疗选择(例如,药物和/或手术)组合使用。

[0117] 本发明在以下非限制性实施例中更详细地进行解释。提供以下实施例以更全面地说明本发明的优选实施方案。然而,它们决不应被解释为限制本发明的广泛范围。

实例

实例1:共刺激信号决定人类T细胞系中CAR-T细胞的活性。

[0118] 据报道,对应于CD4胞外域(氨基酸1至148)的人sCD4分子通过结合HIV Env gp120选择性靶向HIV感染细胞(Chaudhary et al., Nature 335(6188):369(1988))。为了产生靶向HIV Env的CAR,慢病毒载体被制成表达sCD4-CAR并结合不同的CSS(图1A)。使用抗c-Myc标签抗体通过流式细胞术分析GFP⁺转导的Jurkat E6.1细胞中的CAR表达(图1B-1C)。虽然转导细胞之间的转导率没有明显差异(图7A-7B),但发现在携带不同CSS的CAR-T细胞中,细胞表面sCD4-CAR的表达水平不同(图2C)。在携带不同CSS的CAR-T细胞中内源性CD3 ζ 和肌动蛋白表达水平相似的情况下,全细胞裂解液中CAR的表达水平在携带不同CSS的CAR-T细胞中也不同(图2C)。因此,这些数据表明CAR的表达水平取决于CSS。

[0119] 为了确定携带不同CSS的CAR-T的功能活性,建立了与表达HIV Env的靶细胞的共培养试验。将靶细胞(CHO-GFP或CHO-Env-GFP)与CAR-T细胞以1:2的比例共培养24小时。收集含有上清液的细胞,并通过离心法澄清用于IL-2ELISA。剩余的细胞用于流式细胞术分析,以确定抗原依赖性刺激后的CD69表达。靶细胞(CD3⁻GFP⁺)能够与效应细胞(CD3⁺)分离(图7C,左图)。GFP⁻和GFP⁺效应细胞活化均通过CD69上调确定(图7C,中图和右图)。如图1E所示,在与CHO-GFP细胞共培养后,在GFP⁻和GFP⁺效应细胞中都观察到最小的活化。虽然在GFP⁻效应细胞中观察到最小的活化,但在与CHO-Env-GFP细胞共培养后,在所有CAR-T细胞中都发现了明显的效应细胞活化。在与表达HIV-Env的靶细胞而不是仅表达GFP的靶细胞共培养后,也观察到IL-2分泌(图1F-1H)。这些数据表明,本研究中制备的CAR-T细胞以抗原依赖性方式活化。此外,发现在携带不同CSS的CAR-T细胞中,效应细胞活化和IL-2分泌都不同(图3B)。为了确定CAR表达水平与CAR-T细胞活性之间的关系,进行了线性回归分析。发现活化CAR-T细胞频率和IL-2分泌与CAR表达水平之间存在明显的相关性(图3D)。线性回归分析清楚地表明,这种相关性依赖于CSS的衍生。总之,这些数据表明CSS决定了人类T细胞系中的CAR-T细胞活性。

实例2:HVEM-CAR共刺激在人类CAR-T细胞中表现出最高的CAR表达。

[0120] 为了考察在人CAR-T细胞中是否也观察到在T细胞系中观察到的CSS的影响,使用原代人CD8⁺T细胞开发了携带不同CSS的CAR-T细胞。CAR转导的CD8⁺T细胞根据GFP表达进行分选,用于分析效应子功能和特征。CAR在细胞表面和全细胞裂解液中的表达水平在携带不同CSS的CAR-T细胞中不同(图2A-2C),这与在CAR转导的T细胞系中观察到的趋势相似(图1B和1D)。这些数据还表明,HVEM共刺激导致的CAR表达在本研究测试的人类CAR-T细胞中最高。

实例3:HVEM-CAR共刺激在人类CAR-T细胞中表现出最高的效应子功能。

[0121] 为了考察CAR表达水平的差异是否与原代细胞环境中CAR-T细胞的效应子功能相关,测量了与靶细胞共培养后的细胞毒活性和细胞因子分泌。如图3A所示,T细胞对表达HIV Env的靶细胞表现出抗原特异性细胞毒活性。这些数据还表明,细胞毒活性取决于CSS,并且在本研究测试的CAR-T细胞中,携带HVEM共刺激的CAR-T细胞表现出最高的细胞毒活性(图3C)。在细胞因子分泌中,例如IL-2、TNF- α 和IFN- γ 观察到相同的趋势(图3B)。有趣的是,在携带CD28共刺激的CAR-T细胞中几乎没有观察到细胞因子分泌,这与之前报道的携带CD28 CSS的GD2 CAR-T细胞的结果相似(Long et al., Nat. Med. 21 (6) :581 (2015))。为了确定CAR表达水平与CAR-T细胞效应子功能之间的关系,我们进行了线性回归分析。与人类T细胞系的结果一致,观察到CAR表达与CAR-T细胞效应子功能之间的明显相关性(图3D和图8A-8C)。这些相关性取决于CSS的衍生。因此,这些数据表明CAR中CSS的衍生可以决定CAR-T细胞的功能活性,并且HVEM共刺激表现出与人类CAR-T细胞中常用的CSS相比最高的效应子功能。

实例4:TNFRSF共刺激避免CAR-T细胞耗竭。

[0122] 如图3A-3D所示,功能活性取决于CAR中CSS的衍生。我们和其他人已经表明,携带CD28共刺激的CAR-T细胞表现出受损的效应子功能,导致我们假设CAR中的CSS可能会影响CAR-T细胞耗竭。耗竭的T细胞具有较低的增殖和细胞因子产生能力,与高凋亡率相关,并表达高水平的抑制性受体,如PD-1和LAG-3 (Virgin et al., Cell 2009; 138 (1) :30 (2009); Wherry, Nat. Immunol. 12 (6) :492 (2011))。因此,考察了携带不同CSS的CAR-T细胞中耗竭群体(PD-1⁺/LAG-3⁺)的频率(图4A)。携带CD28 CSS的CAR-T细胞表现出增加的耗竭群体,而携带4-1BB或HVEM CSS的CAR-T细胞表现出明显较少的耗竭群体(图4B和4D)。线性回归分析显示,在携带不同CSS的CAR-T细胞中,效应子功能与耗竭群体的频率之间存在明显的相关性,表明TNFRSF共刺激避免了CAR-T细胞耗竭(图4C和图9A-9C)。

实例5:CAR中的CSS影响记忆T细胞亚群的平衡。

[0123] 有人提出CAR-T细胞中记忆亚群的比例影响CAR-T细胞在体内的持久性(Sommermeier et al., Leukemia 30 (2) :492 (2016); Busch et al., Semin. Immunol. 28 (1) :28 (2016))。为了了解CSS和记忆表型之间的关系,CD45RO和CCR7的表面表达被作为记忆T细胞亚群的标记物进行分析(Boots et al., Nat. Rev. Rheumatol. 9 (10) :604 (2013))。结果表明CSS影响记忆T细胞亚群的发育(图5A和5B)。受影响最显著的记忆群体是中央(T_{CM}: CD45RO⁺CCR7⁺)和效应(T_{EM}: CD45RO⁺CCR7⁻)记忆群体(图5C)。携带4-1BB CSS的CAR-T细胞包括显著增强的T_{CM}群体,而CD28CSS诱导更少的T_{CM}群体(图5D)。有趣的是,携带HVEM CSS的CAR-T细胞包括同等比例的T_{CM}和T_{EM}群体(图5D)。这些数据表明,CAR中的CSS影响记忆T细胞群体的平衡。

实施例6:HVEM共刺激将CAR-T细胞能量代谢重新编程为更活跃的状态。

[0124] 虽然最近的一份报告表明CAR信号域重新编程T细胞代谢 (Kawalekar et al., *Immunity* 44 (2):380 (2016)),但尚不清楚HVEM CSS是否可以差异地调节细胞代谢。在基础条件下测量携带不同CSS的CAR-T细胞和对照T细胞的耗氧率(OCR),然后顺序添加寡霉素(一种ATP合酶抑制剂)、羰基氰-4(三氟甲氧基)苯腙(FCCP;从ATP产生解偶耗氧)、鱼藤酮与抗霉素A(分别为电子传递链复合体I和III的抑制剂),以分析线粒体和非线粒体机制对氧消耗的相对贡献(图6A)。结果表明,具有不同CSS的CAR-T细胞和对照T细胞在作为线粒体呼吸指标的基础OCR水平方面存在显著差异。具有CD28 CSS的CAR-T细胞的OCR水平低于对照T细胞的OCR水平。相比之下,与带有CD28 CSS的CAR-T细胞和对照T细胞相比,携带4-1BB或HVEM CSS的CAR-T细胞表现出增强的OCR(图6B)。令人惊讶的是,作为糖酵解指标的基础胞外酸化率(ECAR)仅在携带HVEM CSS的CAR-T细胞中显著增加。ATP产生量和最大OCR水平显示与基础OCR水平结果相同的趋势(图6C-6E)。其他研究包括测定备用呼吸能力(图6F)、非有丝分裂呼吸(图6G)和质子漏(图6H)。这些数据表明,携带CD28的CAR-T细胞表现出低能量状态,而4-1BB CSS在CAR-T细胞中诱导增强的线粒体呼吸。此外,携带HVEM CSS的CAR-T细胞表现出增强的糖酵解和线粒体呼吸,表明HVEM共刺激在CAR-T细胞中诱导了更活跃的状态。

实例7:实例1-6的结果讨论。

[0125] 抗-HIV-1 CAR是使用sCD4作为抗原识别域开发的,在信号域中具有不同的CSS。使用该系统作为模型,结果表明,CAR中的CSS决定了人类T细胞系和人类原代CD8⁺T细胞衍生的CAR-T细胞中的CAR-T细胞活性。还发现了效应子功能、记忆亚群的发育、T细胞耗竭和能量代谢之间的相互作用,表明CAR中的CSS显著影响CAR-T细胞的功能和特征。特别是,HVEM共刺激通过重新编程能量代谢增强了CAR-T细胞的效应子功能。这些研究表明CSS的选择会影响CAR-T细胞功能和特征的命运,HVEM可能是产生有效CAR-T细胞的有希望的候选者,不仅可以对抗实体瘤,还可以对抗持续性传染病。

[0126] 这些数据表明,CAR-T细胞活性与CAR转导的T细胞系和人类CAR-T细胞中的CAR表达相关。这并不奇怪,因为在一定范围内细胞表面CAR密度越高,有利于在抗原刺激下诱导越高的CAR-T细胞活化。令人惊讶的是,在携带不同CSS的CAR-T细胞中,CAR表达水平和CAR-T细胞活性明显不同。使用全细胞裂解液的蛋白质印迹分析也表明了不同CSS中CAR表达的差异,这表明在不同CSS中CAR表达水平本身而不是稳定性可能有所不同。CSS之间这种差异的一种解释可能是由于诱导了不同的信号通路。CD28共刺激诱导PI3K-Akt通路,而4-1BB共刺激主要由激活c-Jun N-末端激酶(JNK)和p38的TNFR-相关因子(TRAF)介导(Kim et al., *Mol.Cells* 10 (3):247 (2000);Cannons et al., *J.Immunol.*165 (11):6193 (2000))。此外,包括4-1BB和HVEM在内的TNFRSF成员均能够激活替代NF- κ B通路(Hauer et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 102 (8):2874 (2005))。信号通路的这些变化导致转录和翻译变化(Mehta et al., *Nat.Rev.Immunol.*17 (10):608 (2017)),导致T细胞活化状态和CAR表达水平的差异。

[0127] 在体外扩增过程中,某些CAR-T细胞中可以诱导不依赖抗原的强直信号,导致T细胞分化和耗竭。CAR-T细胞耗竭已被证明是由CD28共刺激诱导的,而4-1BB共刺激可以避免这种耗竭(图4A和4B)(Long et al., *Nat.Med.*21 (6):581 (2015))。在这些研究中,HVEM共刺

激也可以避免CAR-T细胞耗竭,这表明TNFRSF共刺激可能对避免CAR-T细胞耗竭很重要(图4C和图9A-9C)。最近的报告表明, γ 逆转录病毒LTR启动子的增强表达会导致T细胞凋亡,而降低自我失活慢病毒载体中EF1 α 启动子的CAR表达会减弱这种毒性(Gomes-Silva et al., *Cell Rep.* 21(1):17(2017))。即使CAR表达来自慢病毒载体中的EF1 α 启动子,CD28共刺激也会诱导CAR-T细胞耗竭。这些数据表明,不仅CAR表达水平而且CSS的衍生也会影响CAR-T细胞耗竭的诱导。为了支持这一假设,PD-1/Shp2复合物选择性结合CD28并使CD28去磷酸化,从而导致T细胞扩增和耗竭减少(Hui et al., *Science* 355(6332):1428(2017))。因此,CAR-T细胞体外扩增过程中的CD28共刺激可能偏向于诱导T细胞耗竭。

[0128] 与之前的发现一致,CD28共刺激表现出低能量代谢,效应记忆亚群增加,而4-1BB共刺激诱导与中央记忆亚群增加相关的更高的线粒体呼吸。这些数据还表明,HVEM共刺激表现出与类似频率的中央和效应记忆亚群发育相关的增强的线粒体呼吸和糖酵解。这些数据表明不同的共刺激调节特定的代谢途径,并影响记忆亚群的发育(Kawalekar et al., *Immunity* 44(2):380(2016))。特别是,本研究中测试的TNFRSF共刺激包括4-1BB和HVEM,其可招募不同的TRAF,并可能以不同的幅度激活NF- κ B通路,导致不同的能量代谢水平、记忆亚群发育和效应子功能。此外,CAR表达水平还与能量状态相关(图2A-2C和6A-6E),表明不同的信号通路可能会影响能量代谢水平以满足代谢需求。例如,翻译是细胞中最耗能的过程(Lindqvist et al., *Curr. Opin. Genet. Dev.* 48:104(2018); Topisirovic et al., *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 76:355(2011); Buttgereit et al., *Biochem. J.* 312(Pt 1):163(1995))。

[0129] HIV-1感染可以通过抗逆转录病毒疗法(ART)控制但无法根除,因为ART无法消除潜伏的感染细胞,这表明HIV感染患者应终生接受有效的ART。最近的根除尝试集中在通过免疫机制杀死在ART期间持续存在的潜伏感染细胞。为了实现这一目标,已成功开发出一种HIV特异性免疫毒素或HIV特异性CAR-T细胞来杀死HIV感染细胞(Denton et al., *PLoS Pathog.* 10(1):e1003872(2014); Sahu et al., *Virology* 446(1-2):268(2013); Liu et al., *J. Virol.* 89(13):6685(2015); Ali et al., *J. Virol.* 90(15):6999(2016); Liu et al., *J. Virol.* 90(21):9712(2016); Leibman et al., *PLoS Pathog.* 13(10):e1006613(2017))。广泛中和抗体(bNAb)也已被证明可以通过抗体依赖性细胞毒性消除HIV感染细胞(Bruel et al., *Nat. Commun.* 7:10844(2016))。这些研究表明,可以通过靶向细胞毒疗法消除HIV感染细胞。此外,已经提出了“休克和杀死”方法,即通过HIV特异性CTL或bNAb杀死药理学上重新激活的潜伏感染细胞(Halper-Stromberg et al., *Cell* 158(5):989(2014))。然而,据报道,由于逃逸突变,需要广泛的CTL反应来清除潜伏的HIV-1(Deng et al., *Nature* 517(7534):381(2015)),这表明靶向保守区似乎有利于清除潜伏的HIV-1。与这一想法一致,最近的一份报告称,基于CD4的CAR-T细胞比基于TCR或基于bNAb的CAR-T细胞更有效地控制HIV。此外,使用HIV治疗模型,体外和体内实验表明,携带4-1BB共刺激的CAR-T细胞比携带CD28共刺激的CAR-T细胞更有效(Leibman et al., *PLoS Pathog.* 13(10):e1006613(2017))。本文表明,携带HVEM共刺激的CAR-T细胞比携带CD28或4-1BB共刺激的CAR-T细胞更有效,表明携带HVEM共刺激的CAR-T细胞可能更有益于控制HIV复制。

[0130] 目前的数据表明,CAR中的CSS决定了CAR-T细胞的效应子功能和特征。如本研究所示,与CAR设计中常用的CSS(如CD28和4-1BB)相比,HVEM共刺激诱导了与卓越特性相关的增

强的效应子功能。这表明HVEM可能是开发具有卓越功能和特性的CAR-T细胞的有希望的候选者。通过在CAR的背景下测试一组CSS,我们可能会发现更有效的CSS,从而扩展CAR的设计用于未来的CAR-T细胞疗法。

[0131] 总之,这些结果表明,与广泛使用的共刺激(如CD28或4-1BB)相比,HVEM共刺激用于制造CAR-T细胞,阐明了该CSS可用于设计更有效的CAR-T细胞。本研究为调节和创造具有所需功能和特性的CAR-T细胞迈出了第一步。

实例8:实验模型和受试者详细信息

A. 受试者详细信息

人体样品采集

[0132] 人类外周血样品取自健康供体。根据Dokkyo医科大学科学伦理委员会批准的方案,通过Ficoll-Paque(宾夕法尼亚州匹兹堡通用电气医疗保健生命科学公司)密度梯度法制备来自健康供体的外周血单核细胞(PBMC)。获得了所有受试者的知情同意。

细胞系

[0133] 培养基、MEM、DMEM和RPMI(马萨诸塞州沃尔瑟姆市Thermo Fisher Scientific公司)添加10%胎牛血清(FBS)(Thermo Fisher Scientific公司)、2mM谷氨酰胺(Thermo Fisher Scientific公司)、10U/mL青霉素和10 μ g/mL链霉素(Thermo Fisher Scientific公司),分别简称为M10、D10和R10。CHO细胞及其转染子保存在补充有非必需氨基酸的M10(M10-NEAA)中。将293FT细胞在D10中培养,通过DS Pharma从欧洲认证细胞培养物保藏中心(European Collection of Authenticated Cell Cultures)获得的Jurkat E6.1细胞保持在R10中。所有细胞均在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂条件下培养。

原代细胞培养

[0134] PBMC在添加5%FBS、10mM HEPES的AIM-V(Thermo Fisher Scientific公司)(完全AIM-V)中培养1个晚上,以去除塑料粘附的单核细胞。单核细胞耗尽的PBMC用于转导实验。细胞在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂条件下培养。

[0135] 另一个方法是采用培养基、MEM、DMEM和RPMI(马萨诸塞州沃尔瑟姆市Thermo Fisher Scientific公司),它们添加有10%FBS(Thermo Fisher Scientific公司)、2mM谷氨酰胺(Thermo Fisher Scientific公司)、10U/mL青霉素和10 μ g/mL链霉素(Thermo Fisher Scientific公司),分别简称为M10、D10和R10。CHO细胞及其转染子保存在补充有非必需氨基酸的M10(M10-NEAA)中。将293FT细胞在D10中培养,通过DS Pharma从欧洲认证细胞培养物保藏中心(European Collection of Authenticated Cell Cultures)获得的Jurkat E6.1细胞保持在R10中。来自健康供体的人外周血单核细胞(PBMC)通过Ficoll-Paque(宾夕法尼亚州匹兹堡通用电气医疗保健生命科学公司)密度梯度法制备,并在补充5%FBS、10mM HEPESAIM-V(Thermo Fisher Scientific公司)(简称完全AIM-V)中培养1晚上,以去除塑料粘附的单核细胞。单核细胞耗尽的PBMC用于转导实验。所有细胞均在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂条件下培养。

B. 详细方法

载体构建

[0136] 为了引入多个限制性内切酶位点,将DNA接头引入到慢病毒载体质粒pTK643-CMV-IRES-GFP/灭瘟素(BSD)内。含有XbaI-XhoI-BsiWI-BstBI-BamHI限制性内切酶位点的DNA接

头是通过将两种寡聚DNA L1和L2以1:1的摩尔比在70℃下培养10分钟并在室温下放置2小时制备。将接头DNA插入到XbaI/BamHI消化的pTK643-CMV-IRES-GFP/BSD (pTK643-CMV-MCS-IRES-GFP/BSD) 内。

[0137] 为了制备sCD4 (人CD4的1-148个氨基酸) DNA片段,使用ISOGEN (日本东京Nippon Gene) 从Jurkat E6.1细胞中提取的总RNA,根据制造商的说明由ReverTra Ace (日本大阪TOYOBO) 用于cDNA合成。使用KOD-FX (TOYOBO) 扩增含有XbaI/EcoRI位点的sCD4 DNA片段。纯化的DNA片段与Ampli Taq (Thermo Fisher Scientific公司) 在72℃培养10分钟以添加A尾。将A尾DNA片段连接到pGEM-T easy载体 (威斯康星州普洛麦格) 内。使用BigDye Terminator v3.1循环测序试剂盒 (Thermo Fisher Scientific公司) 验证序列。为了制备表达sCD4-CAR的慢病毒载体,将XbaI/EcoRI消化的sCD4 DNA片段和包含由Genscript (新泽西州皮斯卡塔韦) 人工合成的不同CSS (CD28、4-1BB或HVEM) 的EcoRI/BamHI消化的DNA片段连接到XbaI/BamHI消化的pTK643-EF1a-IRES-GFP/BSD内。

[0138] 为了制备表达慢病毒载体质粒的HIV Env (NL4-3株),将XbaI/XhoI消化的pRE11-NL43 (Noriaki Hosoya博士提供),连接到XbaI/XhoI消化的pTK643-CMV-MCS-IRES-GFP/BSD内。

重组慢病毒产生

[0139] 如前所述并进行一些修改产生重组慢病毒 (Cockrell et al., Mol Ther. 14 (2) : 276 (2006))。简而言之,293FT细胞在胶原蛋白包被的10cm培养皿 (日本静冈IWAKI) 上培养,融合度为80%至90%。培养基采用不含抗生素、含25μM氯喹 (德国达姆施塔特市SIGMA) 的D10代替。关于填充ΔNRF的载体,使用以下质粒数量:15μg慢病毒载体质粒、10μg ΔNRF和5μg pMD.G。通过聚乙烯亚胺“MAX” (宾夕法尼亚州沃灵顿市Polysciences) 以2:1的DNA:PEI比将质粒共转染到293FT细胞中。将上清液采用含有5mM丁酸钠 (日本大阪WAKO) 和10μM毛喉素 (日本东京Tokyo Chemical Industry) 的D10替换。转染48小时后收集含有重组慢病毒的培养上清液,通过离心和0.45μm过滤澄清 (德国达姆施塔特市Millipore公司)。采用Himac CR21N (日本东京Hitachi Koki) 通过18000rpm高速离心3小时浓缩重组慢病毒。

慢病毒载体转导

[0140] 含有慢病毒的上清液分别用于将CAR/GFP基因转导到Jurkat E6.1细胞中,将HIV Env基因转导到CHO细胞中。简而言之,将6孔板中的200万个Jurkat E6.1细胞或半融合CHO细胞在8μg/mL聚凝胺存在下暴露于1mL含有未浓缩慢病毒的上清液。将细胞在22℃下以5500rpm离心3小时以增强病毒感染。去除上清液后,将细胞在CO₂培养箱中于37℃培养48小时。培养基更换为补充有10μg/mL BSD的培养基。然后,将转导的细胞维持在含有10μg/mL BSD的培养基中,直到进行以下测定。

[0141] 通过在FACS Aria II (美国新泽西州富兰克林湖区Becton Dickinson) 上进行细胞分选,用抗人CD3-APC、CD4-PE和CD8PE/Cy7抗体 (加利福尼亚州圣地亚哥Biolegend) 从单核细胞耗尽的PBMC中分离人原代CD8 T细胞,纯度通常超过95%。纯化的CD8 T细胞用抗CD3/CD28磁珠 (Thermo Fisher Scientific) 以3:1磁珠:细胞比激活3天,完全AIM-V补充有40U/mL重组人IL-2 (通过国立变态反应与传染病研究所艾滋病科NIH AIDS试剂计划从La Roche Inc.的Maurice Gately,Hoffmann博士获取)。去除抗CD3/CD28磁珠后,根据制造商的说明,在第3天和第4天,使用Retronectin (日本志贺TAKARA公司) 包被的板,采用慢病毒

载体转导活化的CD8⁺ T细胞。此后,每2-3天更换一次含有300U/mL IL-2的培养基(完全AIM-V),直到生长出足够数量的细胞用于细胞分选。

流式细胞术

[0142] 除非另外说明,流式细胞术中使用的抗体均来自Biolegend。使用抗c-myc标签抗体(德克萨斯州达拉斯Santa Cruz Biotechnology公司)和然后采用抗小鼠Igs-PE(安捷伦科技公司)分析转导的Jurkat E6.1细胞上的CAR表达。采用抗人CD3-APC抗体、CD69-PE抗体和GFP分析共培养试验中CAR转导的Jurkat E6.1细胞的活化(设门策略参见图7A和7B)。采用生物素化抗c-myc标签抗体(Biolegend),然后采用链霉亲和素-PE(TONBO biosciences)、抗人PD-1-APC抗体、抗人LAG-3-PE/Cy7抗体(eBioscience)和GFP分析人CAR-T细胞的CAR表达和T细胞耗竭。采用CD45RO-PE、CD8-PE-Cy7、CCR7-APC和GFP分析CAR-T细胞的记忆表型。离心后的细胞采用FACS缓冲液(含有2%FBS和0.02%叠氮化钠的PBS)中的抗体溶液重悬,并在冰上培养30分钟。采用冰冷的FACS缓冲液洗涤后,采用1%多聚甲醛/PBS固定细胞。将染色细胞固定并采用FACS Calibur(Becton Dickinson)分析。

蛋白质印迹分析

[0143] 将500万个细胞用冰冷的PBS洗涤一次,重新悬浮在添加Complete Mini(德国曼海姆Roche公司)和1mM PMSF的150 μ l RIPA缓冲液(10mM TrisHCl (pH7.4)、1%NP-40、0.1%脱氧胆酸钠、0.1%SDS、0.15M NaCl、1mM EDTA)中,并在冰上培养30分钟。将通过离心澄清的细胞裂解液(20 μ l)与NuPAGE LDS样品缓冲液(Thermo Fisher Scientific)和0.1M DTT混合,并在95 $^{\circ}$ C下煮沸5分钟。煮沸的样品在NuPAGE 10%Bis-Tris凝胶(Thermo Fisher Scientific)中通过电泳分离并转移到Immobilon P膜(Millipore)上。该膜用封闭缓冲液(5%脱脂奶粉和0.1%Tween-20的TBS溶液)封闭30分钟。封闭的膜与在封闭缓冲液中稀释的抗肌动蛋白抗体(I-19)或抗-CD3 ζ 抗体(F-3)(Santa Cruz Biotechnology)在4 $^{\circ}$ C下培养1个晚上。然后将膜与在封闭缓冲液中稀释的抗山羊IgG-HRP(Millipore)或抗小鼠IgG-HRP(GE Healthcare Life Sciences)一起培养。在所有抗体培养步骤后,采用0.1%Tween-20/TBS洗涤膜。采用Lumi-Light PLUS(Roche)作为底物观察免疫反应性,并采用Light-Capture II(日本东京ATTO)进行检测。

共培养试验

[0144] 通过与靶细胞(CHO-GFP或CHO-Env-GFP)共培养来测定CAR转导的Jurkat E6.1细胞的活化和IL-2分泌。在96孔平底板的每孔中接种10万个靶细胞。加入20万个CAR-T细胞并共培养1个晚上。第二天,收获包含细胞的培养上清液。通过在4 $^{\circ}$ C下以3000rpm离心5分钟来分离细胞和无细胞上清液。根据制造商的说明,使用人IL-2 ELISA MAX Deluxe(Biolegend)测量上清液中的IL-2分泌。剩余的细胞用于通过流式细胞术测定CD69表达。

[0145] 为了确定CAR-T细胞的细胞毒性,在96孔平底板的每个孔中接种1万个靶细胞。加入不同比例的靶:效应子的CAR-T细胞,在每孔0.2mL的无酚红R10中与NEAA共培养。培养1晚上后,收集上清液并在4 $^{\circ}$ C下以3000rpm离心10分钟以去除细胞碎片。根据制造商的说明,使用CytoTox 96非放射性细胞毒性测定(威斯康星州麦迪逊Promega公司)测定上清液中乳酸脱氢酶的释放。在细胞分选和培养后纯度不同的情况下,添加未转导的T细胞以确保CAR⁺T细胞的数量和T细胞总数在各CAR-T细胞组中保持一致。收集的上清液还用于根据制造商的说明,使用人IL-2、TNF- α 、IFN- γ ELISA MAX Deluxe(均来自Biolegend)测定IL-2、TNF- α 和

IFN- γ 分泌。

能量代谢分析

[0146] 使用细胞外通量分析仪XFp(安捷伦科技公司)分析CAR-T细胞的线粒体功能。根据制造商的说明,采用CellTak(Corning)包被细胞培养微孔板的每个孔。为了测定线粒体功能,将携带不同CSSD的分选CAR-T细胞悬浮在添加5.5mM葡萄糖、2mM L-谷氨酰胺和1mM丙酮酸钠的XF RPMI培养基中,每孔接种30万个细胞。将平板以200x g离心1分钟,并在37°C下在非-CO₂培养箱中培养30-60分钟。在培养期间,仪器XFp及其检测试剂盒根据制造商的说明进行校准。在基础条件下和采用1 μ M寡霉素、1 μ M FCCP和1 μ M鱼藤酮/抗霉素A(XFp Cell Mito Stress Kit,安捷伦科技公司)处理后测量耗氧率(OCR)。每个条件下进行四次测定。ATP产生量定义为(添加寡霉素前的最后速率测量值)-(添加寡霉素后的最小速率测量值)。

统计分析

[0147] 前面已经对统计分析进行描述(Nunoya et al., J. Infect. Dis. 209(7):1039(2014))。采用Bonferroni多重比较检验进行非配对单向或双向方差分析(ANOVA),进行线性回归分析,并使用GraphPad Prism计算R²值(加利福尼亚州圣地亚哥GraphPad Software)。P值小于0.05被认为具有统计学意义。

实例9:携带疱疹病毒侵入介体共刺激信号域的嵌合抗原受体T细胞表现出功能效力。

[0148] 嵌合抗原受体(CAR)包含一个细胞外抗原结合域和一个细胞内信号转导域(Dotti et al., Immunol. Rev. 257:107(2014))。具有CD3 ζ 作为CAR信号转导域的第一代CAR转导T细胞(CAR-T)经常变得没有反应性,无法引发有效的免疫反应(Kershaw et al., Clin. Cancer Res. 12:6106(2006))。第二代和第三代CAR-T细胞是通过在CAR中分别添加一个和两个共刺激信号域(CSSD)而开发的(Dotti et al., Immunol. Rev. 257:107(2014))。这些具有模块化结构的CAR分子已被证明可以成功模拟T细胞受体介导的同源抗原刺激信号转导,从而导致CAR-T细胞的增殖和激活(Maus et al., Blood 123:2625(2014))。

[0149] 使用CD19靶向CAR-T细胞的免疫疗法对B细胞恶性肿瘤表现出显著疗效(Maude et al., Blood 125:4017(2015))。为了扩展各种临床应用的可能性(Maldini et al., Nat. Rev. Immunol. 18:605(2018)),可能有必要进一步提高CAR-T细胞的功效。已知假设来自共刺激分子的CSSD的信号传导是表现有效的CAR-T细胞功效的关键事件(Dotti et al., Immunol. Rev. 257:107(2014))。但是,在很大程度上,CSSD对CAR-T细胞功能和特性的影响仍然不为人所知。共刺激分子可分为两大家族:CD28家族,包括CD28和ICOS,以及肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRSF),包括4-1BB和疱疹病毒侵入介体(HVEM)。到目前为止,源自CD28或4-1BB的CSSD已普遍用于构建CAR(Miller et al., Oncol. Res. Treat. 38:683(2015))。之前的一项研究表明,具有4-1BB衍生CSSD的第二代CAR-T细胞在大多数患者的血液中持续存在超过6个月,而具有CD28衍生CSSD的CAR-T细胞3个月后几乎检测不到(Zhang et al., Oncotarget 6:33961(2015))。此外,4-1BB共刺激诱导向中央记忆亚群的分化增强,且体外持久性增加(Kawalekar et al., Immunity 44:380(2016))。4-1BB共刺激还已被证明可以增加线粒体生物合成和氧化代谢产生能量,并避免强直信号诱导的T细胞耗竭(Long et al., Nat. Med. 21:581(2015))。因此,在第二代CAR-T细胞的背景下,源自TNFRSF的CSSD的功能似乎比源自CD28家族的CSSD更好。

[0150] 越来越多的报告表明HVEM (TNFRSF的另一个成员) 在CD8⁺T细胞的效应子功能和记忆发育中的可能作用。例如,CD8⁺T细胞中HVEM缺乏被证明会严重损害效应CD8⁺T细胞的存活和保护性免疫记忆的发育 (Flynn et al., PLoS One 8:e77991 (2013))。据报道,在CD8⁺T细胞上表达的HVEM与B-和T-淋巴细胞衰减因子之间的相互作用在对细菌感染做出反应时可促进存活和免疫记忆产生 (Steinberg et al., PLoS One 8:e77992 (2013))。此外,表达抗-HVEM单链抗体的肿瘤细胞诱导共培养T细胞的有效增殖和细胞因子产生 (Park et al., Cancer Immunol. Immunother. 61:203 (2012))。这些发现表明HVEM在T细胞中充当有效的共刺激分子,表明源自HVEM的CSSD也可能在CAR-T细胞中 useful。

实例10: CAR与HVEM衍生CSSD在人T细胞系中有效表达。

[0151] 据报道,sCD4 (对应于人CD4的1-148个氨基酸) 通过与HIV Env结合选择性靶向HIV感染细胞 (Chaudhary et al., Nature 335:369 (1988))。为了生成靶向HIV Env的CAR-T细胞,构建了表达携带源自CD28、4-1BB或HVEM的CSSD的CAR的慢病毒载体 (图1A)。流式细胞术分析表明,不同慢病毒载体的Jurkat E6.1细胞转导率相似 (图7A-7B)。另一方面,GFP⁺细胞表面的CAR表达水平差异很大 (图1B),并且在具有HVEM衍生CSSD的CAR-T细胞中最高 (图1C)。蛋白质印迹分析还显示,在全细胞裂解液中,具有HVEM衍生CSSD的CAR的数量大于具有CD28或4-1BB衍生CSSD的CAR (图1D)。

实例11: 表达具有HVEM衍生CSSD的CAR的人类T细胞系在同源抗原刺激下被有效激活

[0152] 为了考察具有不同CSSD的CAR转导Jurkat E6.1细胞的功能,将CD3⁻靶细胞 (CHO-GFP或CHO-Env-GFP) 与已用CAR-表达慢病毒载体转导的CD3⁺Jurkat E6.1细胞共培养 (图7C,左图)。然后,考察GFP⁻和成功转导的GFP⁺Jurkat E6.1细胞的CD69上调 (T细胞活化的指标) (图7C,右图)。如图1E所示,在与对照CHO-GFP细胞共培养后,在GFP⁻或GFP⁺Jurkat E6.1细胞中未观察到显著激活。当CHO-Env-GFP细胞用作靶细胞时,GFP⁺而非GFP⁻Jurkat E6.1细胞被有效激活 (图1E)。此外,培养上清液中IL-2的测量表明,CAR转导Jurkat E6.1细胞在与CHO-Env-GFP细胞共培养后会诱导IL-2分泌,但与对照CHO-GFP细胞共培养则没有诱导IL-2分泌 (图1E)。这些数据表明,本研究中构建的CAR表达载体转导的人类T细胞在同源抗原刺激下被特异性激活。线性回归分析表明,同源抗原刺激后活化T细胞的百分数和IL-2分泌与细胞表面CAR表达水平相关 (图1G和图1H)。此外,在本研究中使用的背景下,具有HVEM衍生CSSD的CAR-T细胞诱导抗原依赖性T细胞活化的能力优于具有CD28或4-1BB衍生CSSD的CAR-T细胞。

实例12: 具有HVEM衍生CSSD的人原代T细胞衍生CAR-T细胞表现出强大的效应子功能

[0153] 为了更详细地比较具有不同CSSD的CAR-T细胞,采用表达CAR的慢病毒载体转导人类原代CD8⁺,并分析其效应子功能。与Jurkat E6.1细胞中的观察结果相似 (FIGS 1B-1D),具有HVEM衍生CSSD的CAR-T细胞的细胞表面和全细胞裂解液中的CAR表达水平最高,而具有CD28衍生CSSD的CAR-T细胞则最低 (图2B-2C)。还比较了具有不同CSSD的CAR-T细胞的效应子功能。尽管全部三种CAR-T细胞都对表达HIV Env的靶细胞产生抗原特异性细胞毒活性,但具有HVEM衍生CSSD的CAR-T细胞表现出最高的活性 (图3A)。类似地,与本研究中测试的其他CAR-T细胞相比,具有HVEM衍生CSSD的CAR-T细胞分泌了最高水平的细胞因子,例如IL-2、

TNF- α 和IFN- γ (图3D)。与Jurkat E6.1细胞中的观察结果(图1G和1H)相比,通过细胞毒活性和细胞因子分泌衡量的CAR-T细胞的效应子功能与细胞表面上的CAR表达水平相关(图3D和8A-8C)。因此,具有HVEM衍生CSSD的CAR-T细胞似乎很高效。

实例13:携带HVEM衍生CSSD的CAR-T细胞有效分化为中央和效应记忆亚群

[0154] 已经表明,CAR-T细胞中各记忆亚群的相对比例会影响它们在体内的功能和持久性(Sommermeier et al.,*Leukemia* 30:492 (2016);Busch et al.,*Semin.Immunol.*28:28 (2016))。特别重要的保护性免疫记忆亚群被称为中央记忆(T_{CM} , $CD45RO^+CCR7^+$)和效应记忆(T_{EM} , $CD45RO^+CCR7^-$)T细胞(Boots et al.,*Nat.Rev.Rheumatol.*9:604 (2013))。因此,通过CD45RO和CCR7的表面表达来分析记忆T细胞亚群的比例(图10A和10B)。对照T细胞主要包含 T_{EM} 亚群,而携带不同CSSD的CAR-T细胞显示出更大百分数的 T_{CM} 亚群(图10A)。比较携带不同CSSD的各种CAR-T细胞,其中携带CD28-和4-1BB衍生CSSD的CAR-T细胞分别主要含 T_{EM} 和 T_{CM} 亚群(F图10B)。有趣的是,携带HVEM衍生CSSD的CAR-T细胞含有相同百分数的 T_{CM} 和 T_{EM} 亚群(图10B),表明HVEM衍生CSSD有效地诱导了 T_{EM} 和 T_{CM} 亚群。

实例14:携带HVEM衍生CSSD的CAR-T细胞可避免T细胞耗竭

[0155] 众所周知,长期刺激T细胞会导致耗竭,其特征是增殖减少、细胞因子产生水平降低、细胞凋亡率高和抑制性受体表达,例如程序性细胞死亡1(PD-1)和淋巴细胞活化基因3(LAG)-3(Virgin et al.,*Cell* 138:30 (2009);Wherry,*Nat.Immunol.*12:492 (2011))。为了确定CSSD对T细胞耗竭的影响,考察了PD-1⁺、LAG-3⁺和PD-1⁺/LAG-3⁺耗竭T细胞群的百分数(图4E)。结果表明,携带CD28衍生CSSD的CAR-T细胞含有相对较大百分数的耗竭T细胞,而携带4-1BB衍生CSSD的CAR-T细胞含有显著降低的耗竭T细胞百分数(图9A-9C)。此外,在本研究测试的CAR-T细胞中,携带HVEM衍生CSSD的CAR-T细胞含有最低百分数的耗竭T细胞(图9A-9C)。有趣的是,携带HVEM衍生CSSD的CAR-T细胞的PD-1⁺或LAG-3⁺细胞的百分数分别大于和小于携带4-1BB衍生CSSD的CAR-T细胞。总之,携带HVEM衍生CSSD的CAR-T细胞避免了T细胞耗竭。

实例15:携带HVEM衍生CSSD的CAR-T细胞表现出重新编程的能量代谢

[0156] 最近的研究表明,T细胞耗竭伴随着能量代谢不足(Fisicaro et al.,*Nat.Med.*23:327 (2017);Bensch et al.,*Immunity* 45:358 (2016))。因此,在基础条件下和顺序添加试剂后,比较了具有不同CSSD的CAR-T细胞的代谢状态,以分析线粒体和非线粒体耗氧机制的相对贡献(图6A)。线粒体呼吸和糖酵解可以分别通过耗氧率(OCR)和细胞外酸化率(ECAR)来衡量。携带HVEM衍生CSSD的CAR-T细胞表现出最高水平的基础OCR,其次是携带4-1BB衍生CSSD的CAR-T细胞和对照T细胞,而那些携带CD28衍生CSSD的CAR-T细胞表现出最低水平的基础OCR(图6B-6E)。还通过添加ATP合酶抑制剂寡霉素来测量与ATP相关的呼吸和通过添加羰基氰-4(三氟甲氧基)苯腙(FCCP;从ATP产生解偶耗氧)来测量最大OCR水平(图6A)。结果表明,不同CAR-T细胞中ATP相关的呼吸和最大OCR水平与基础OCR水平类似地升高(图6C和6D)。有趣的是,仅携带HVEM衍生CSSD的CAR-T细胞的基础ECAR显著增加(图6E)。这些数据表明,携带CD28衍生CSSD的CAR-T细胞表现出低能量状态,而携带4-1BB衍生CSSD的CAR-T细胞诱导更高的线粒体呼吸。因此,携带HVEM衍生CSSD的CAR-T细胞也诱导增强的糖酵解。这些结果表明HVEM衍生CSSD可能导致能量代谢的重新编程。

实例16:实例10-15的讨论

[0157] 开发了表达由sCD4作为抗原识别域,以及CD28、4-1BB或HVEM衍生CSSD组成的CAR的慢病毒载体。采用这些载体转导人T细胞系和原代T细胞,证明CAR构建体中的CSSD是细胞表面CAR表达水平的关键决定因素,细胞表面CAR表达水平似乎与CAR-T细胞的活性和效应子功能相关。本研究还表明,T细胞耗竭、能量代谢和记忆T细胞亚群的诱导也受到CAR构建体中CSSD的影响。在本研究考察的CSSD中,HVEM衍生CSSD导致最高水平的CAR表达、最有效的CAR-T细胞效应子功能、避免衰竭和平衡诱导中央和效应记忆T细胞亚群,与糖酵解和线粒体呼吸升高相关。这项研究的结果表明,HVEM衍生CSSD可能有助于在特定情况下产生有效的CAR-T细胞。

[0158] 目前尚不清楚CSSD如何控制细胞表面CAR的表达水平。由于全细胞裂解液中CAR分子的数量与细胞表面表达水平相关,CSSD可能会影响CAR的合成而不是运输。除其他可能性外,不同的CSSD可能会激活不同的信号通路,从而导致不同水平的基因表达。例如,CD28介导的共刺激诱导PI3K-Akt通路,而4-1BB介导的共刺激主要通过TNFR相关因子激活JNK和p38(Kim et al.,Mol.Cells 10:247(2000);Cannons et al.,J.Immunol.165:6193(2000))。还已经表明,4-1BB和HVEM能够激活替代的NF-KB通路(Hauer et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 102:2874(2005))。信号通路的这些差异可能会在转录或翻译水平上影响CAR的表达(Mehta et al.,Nat.Rev.Immunol.17:608(2017))。

[0159] 已经证明,体外扩增过程中不依赖抗原的强直信号会导致携带CD28衍生CSSD的CAR-T细胞耗竭,而携带4-1BB衍生CSSD的CAR-T细胞则相对难以耗竭(Long et al.,Nat.Med.21:581(2015))。目前的研究不仅证实了这些观察结果,而且还证明了HVEM衍生CSSD可以避免CAR-T细胞耗竭。此外,这些数据表明,CAR构建体中的各种CSSD可以通过对抑制性受体表达的不同影响来影响T细胞耗竭的程度(图4D)。由于4-1BB和HVEM都被归在TNFRSF中,因此,源自TNFRSF而不是源自CD28家族的CSSD可能会使CAR-T细胞避免衰竭。

人们建议采用线粒体动力学通过代谢编程来控制T细胞的命运(Buck et al.,Cell 166:63(2016))。此外,据报道,4-1BB-介导的共刺激可通过增加中央记忆亚群来增强线粒体呼吸(Kawalekar et al.,Immunity 44:380(2016))。目前的结果与这些先前的研究一致,并且还表明HVEM衍生CSSD增强了糖酵解和线粒体呼吸,以及相对较低的T细胞耗竭水平。还已经表明,各种T细胞亚群需要不同的代谢程序来支持其功能(Araki et al.,Nature 460:108(2009);Pearce et al.,Nature 460:103(2009);Rao et al.,Immunity 32:67(2010))。目前的数据表明,共刺激信号影响CAR-T细胞向中央和效应记忆T细胞亚群的分化,并且HVEM衍生CSSD诱导有效和平衡的分化。不同的共刺激信号可能以不同的方式影响代谢程序,以分化特定的记忆T细胞亚群。

[0160] 新型抗HIV药物的开发和抗逆转录病毒疗法(ART)的进展极大地改善了HIV感染患者的预后。然而,由于潜伏感染细胞的持续存在,ART尚未成功地完全清除患者体内的HIV。为了实现这一目标,已经提出了所谓的“休克和杀死”方法,该方法将潜伏感染细胞的药理学再激活和免疫疗法与HIV特异性CTL或广泛中和抗体(bNAbs)相结合(Halper-Stromberg et al.,Cell 158:989(2014))。在该方案中,靶向HIV-1 Env保守区域的基于CD4的CAR-T细胞可能比基于TCR或基于bNAbs的CAR-T细胞更有用,后者无法识别带有逃逸突变的抗原。事实上,最近的一项研究报告了携带4-1BB-衍生CSSD的CAR-T细胞在HIV治疗的体外和体内模型中的颇有前景的结果(Leibman et al.,PLoS Pathog.13:e1006613(2017))。本研究的结

果强烈表明,具有HVEM衍生CSSD的基于CD4的CAR-T细胞显示出比CD28-或4-1BB-衍生CSSD更有效的效应功能,也可能是一种HIV感染“休克和杀死”治疗的有用工具。

[0161] 总之,目前的结果表明,CAR中的CSSD是CAR-T细胞效应子功能和特征的关键决定因素,表明CAR中的CSSD对于设计更有效的CAR-T细胞非常重要。此外,HVEM衍生CAR-T细胞可能是产生有效CAR-T细胞的颇有前景的候选者。

实例17:CAIX CAR表达研究

[0162] 使用抗CAIX scFv和不同的CSS域制备了几种CAR构建体,如图11A所示。由四种构建体转导的c-myc+人CAR-T细胞的FACS检测结果如图11B所示。平均表面c-myc表达水平(MFI)如图11C所示。

[0163] 采用三种靶肾/肾癌细胞系考察CAIX CAR-T细胞的有效性。ACHN是没有CAIX表达的阴性对照。正如FACS所检测到的那样,Ketr-3表达较高的CAIX,OSRC-2表达较低的CAIX(图12A)。与其他CAR-T细胞相比,CAIX-HVEM CAR-T细胞更有效地杀死CAIX+靶细胞(图12B和12C)。与其他CAR-T细胞相比,CAIX-HVEM CAR-T细胞在与CAIX+靶细胞共培养时也产生了更多的IL-2和IFN- γ (Ketr-3(图12D)和OSCR-2(图12E))。

[0164] 通过Seahorse实验分析纯化的c-myc+CAR-T细胞,以测定其代谢活性。图13A示出了通过Seahorse实验测定的各种CAR-T细胞的耗氧率(OCR)。基于HVEM的CAIX CAR-T细胞显示出更高的基础OCR(图13B)和更高的最大OCR(图13C)。

实例18:体内肾癌研究

[0165] 使用实例16的CAIX CAR-T细胞在NPG小鼠中开展肾癌治疗研究。研究设计如图14A所示。在第1天给小鼠静脉注射 1×10^6 个OSCR-2人肾癌细胞。在第7天静脉注射 1×10^7 个CAR-T细胞。图14B示出了第14天小鼠外周血中人CAR-T细胞水平。小鼠的总体存活率如图14C所示。基于HVEM的CAIX CAR-T细胞提供比其他CAR-T细胞明显更好的存活率。

[0166] 在如图16所示的指定时间点考察了6只小鼠/组中的肺转移性肿瘤。HVEM CAR-T组的小鼠在注射肿瘤90天后终止,而其他组的小鼠在注射肿瘤50天后终止。白色斑块表示肺部转移性肿瘤。基于HVEM的CAIX CAR-T细胞提供比其他CAR-T细胞明显减少的肿瘤转移。图17示出了1只小鼠/组终止时的代表性苏木精/伊红肺组织病理学。只有HVEM CAR-T组显示功能性肺结构,而所有其他组显示严重浸润的肺,伴随肺结构和功能丧失。

[0167] 在重复实验中,在肿瘤注射后14天和CAR-T细胞转移后7天观察到类似的HVEM-CAR T体内扩增结果。图15A示出了体外转导后CAR-T(myc+)细胞的百分数。图15B示出了CAR-T细胞转移后第7天小鼠血液中人CAR-T细胞的水平。图15C示出了人类T细胞占小鼠总血细胞百分数(左)或人类T细胞计数/100 μ l小鼠血液的汇总数据。HVEM CAR-T细胞在体内表现出更好的扩增。

[0168] 上述说明是为了阐明本发明,不应视为限制本发明。本发明由下述权利要求定义,与上述权利要求相当的内容也包括在本发明中。

Pro Ser Phe Thr

65

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

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

1 5 10 15

<210> 4

<211> 202

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

Met Asn Arg Gly Val Pro Phe Arg His Leu Leu Leu Val Leu Gln Leu

1 5 10 15

Ala Leu Leu Pro Ala Ala Thr Gln Gly Lys Lys Val Val Leu Gly Lys

20 25 30

Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln Lys Lys Ser

35 40 45

Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn Gln Ile Lys Ile Leu Gly Asn

50 55 60

Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys Leu Asn Asp Ala Asp

65 70 75 80

Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln Gly Asn Phe Pro Leu Ile Ile Lys

85 90 95

Asn Leu Lys Ile Glu Asp Ser Asp Thr Tyr Ile Cys Glu Val Glu Asp

100 105 110

Gln Lys Glu Glu Val Gln Leu Leu Val Phe Gly Leu Thr Ala Asn Ser

115 120 125

Asp Thr His Leu Leu Gln Gly Gln Ser Leu Thr Leu Thr Leu Glu Ser

130 135 140

Pro Pro Gly Ser Ser Pro Ser Val Gln Cys Arg Ser Pro Arg Gly Lys

145 150 155 160

Asn Ile Gln Gly Gly Lys Thr Leu Ser Val Ser Gln Leu Glu Leu Gln

165 170 175

Asp Ser Gly Thr Trp Thr Cys Thr Val Leu Gln Asn Gln Lys Lys Val

180 185 190

Glu Phe Lys Ile Asp Ile Val Val Leu Ala

Ser Pro Pro Gly Ser Ser Pro Ser Val Gln Cys Arg Ser Pro Arg Gly
 145 150 155 160
 Lys Asn Ile Gln Gly Gly Lys Thr Leu Ser Val Ser Gln Leu Glu Leu
 165 170 175
 Gln Asp Ser Gly Thr Trp Thr Cys Thr Val Leu Gln Asn Gln Lys Lys
 180 185 190
 Val Glu Phe Lys Ile Asp Ile Val Val Leu Ala Ala Gly Glu Gln Lys
 195 200 205
 Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr
 210 215 220
 Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr
 225 230 235 240
 Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro
 245 250 255
 Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Ser Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val
 260 265 270
 His Thr Arg Gly Leu Asp Trp Val Trp Trp Phe Leu Ser Gly Ser Leu
 275 280 285
 Val Ile Val Ile Val Cys Ser Thr Val Gly Leu Ile Ile Cys Val Lys
 290 295 300
 Arg Arg Lys Pro Arg Gly Asp Val Val Lys Val Ile Val Ser Val Gln
 305 310 315 320
 Arg Lys Arg Gln Glu Ala Glu Gly Glu Ala Thr Val Ile Glu Ala Leu
 325 330 335
 Gln Ala Pro Pro Asp Val Thr Thr Val Ala Val Glu Glu Thr Ile Pro
 340 345 350
 Ser Phe Thr Gly Arg Ser Pro Asn His Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser
 355 360 365
 Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu
 370 375 380
 Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg
 385 390 395 400
 Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln
 405 410 415
 Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
 420 425 430
 Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp
 435 440 445
 Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala

450	455	460				
Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg						
465	470					
<210> 7						
<211> 1422						
<212> DNA						
<213> 人工序列(Artificial Sequence)						
<400> 7						
atgaaccggg	gagtcccttt	taggcaacttg	cttctggtgc	tgcaactggc	gctcctccca	60
gcagccactc	agggaaagaa	agtgggtgctg	ggcaaaaaag	gggatacagt	ggaactgacc	120
tgtacagctt	cccagaagaa	gagcatacaa	ttcactgga	aaaactccaa	ccagataaag	180
attctgggaa	atcagggtc	cttcttaact	aaaggtccat	ccaagctgaa	tgatcgcgct	240
gactcaagaa	gaagcctttg	ggaccaagga	aacttcccc	tgatcatcaa	gaatcttaag	300
atagaagact	cagatactta	catctgtgaa	gtggaggacc	agaaggagga	ggtgcaattg	360
ctagtgttcg	gattgactgc	caactctgac	accacctgc	ttcaggggca	gagcctgacc	420
ctgaccttgg	agagcccccc	tggtagtagc	ccctcagtgc	aatgtaggag	tccaaggggt	480
aaaaacatac	agggggggaa	gaccctctcc	gtgtctcagc	tggagctcca	ggatagtggc	540
acctggacat	gcactgtctt	gcagaaccag	aagaaggtgg	agttcaaaat	agacatcgtg	600
gtgctagctg	aattcgagca	gaagctgatc	agcgaggagg	acctgggcgc	cctgagcaac	660
agcatcatgt	acttcagcca	cttcgtgcc	gtgttctgc	ccgccaagcc	caccaccacc	720
cccgcccccc	gccccccac	ccccgcccc	accatcgcca	gccagcccct	gagcctgcgc	780
cccgaggcca	gccgccccgc	cgccggcggc	gccgtgcaca	cccgcggcct	ggactgggtg	840
tggtggttcc	tgagcggcag	cctggtgatc	gtgatcgtgt	gcagcacctg	gggctgatc	900
atctgcgtga	agcggccaa	gccccgcggc	gacgtggtga	aggtgatcgt	gagcgtgcag	960
cgcaagcgcc	aggaggccga	gggcgaggcc	accgtgatcg	aggccctgca	ggcccccccc	1020
gacgtgacca	ccgtggccgt	ggaggagacc	atccccagct	tcaccggccg	cagccccaac	1080
caccgcgtga	agttcagccg	cagcggccac	gccccgcct	accagcaggg	ccagaaccag	1140
ctgtacaacg	agctgaacct	gggccgccgc	gaggagtacg	acgtgctgga	caagcgccgc	1200
ggccgcgacc	ccgagatggg	cggcaagccc	cgccgcaaga	acccccagga	gggctgtac	1260
aacgagctgc	agaaggacaa	gatggccgag	gcctacagcg	agatcggcat	gaagggcgag	1320
cgccgcccgc	gcaagggcca	cgacggcctg	taccagggcc	tgagcaccgc	caccaaggac	1380
acctacgacg	ccctgcacat	gcaggccctg	ccccccgct	aa	1422	

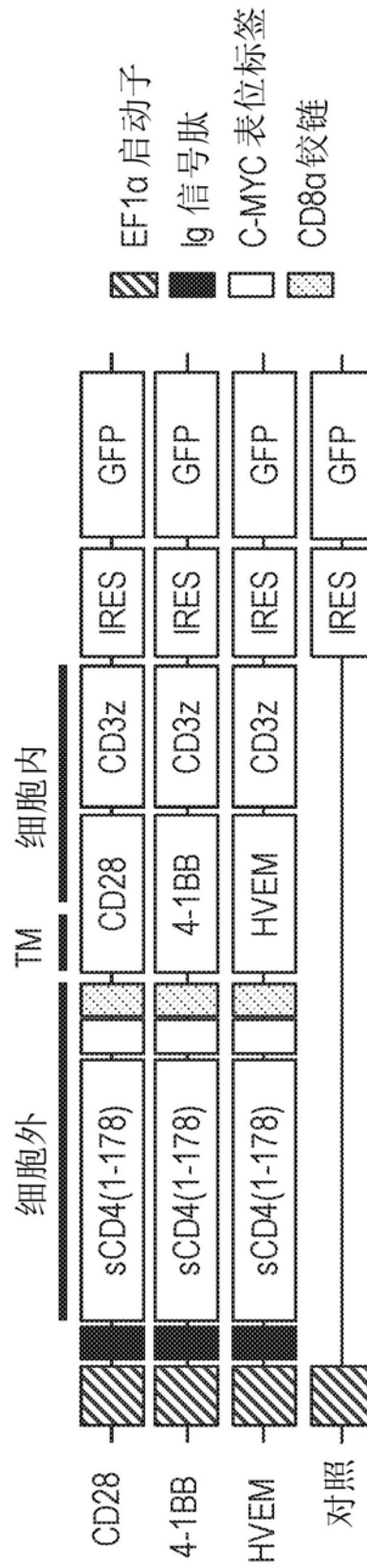


图1A

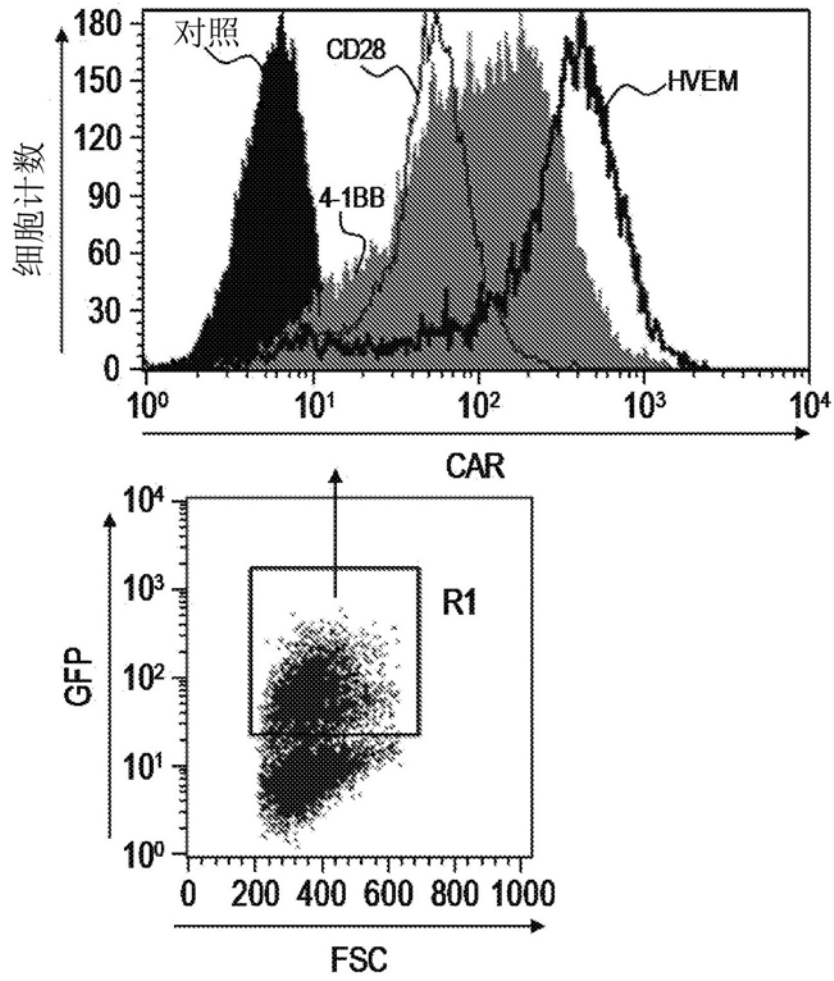


图1B

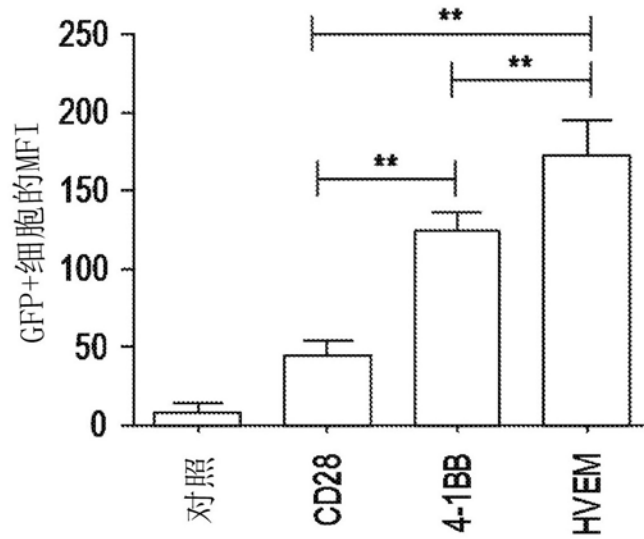


图1C

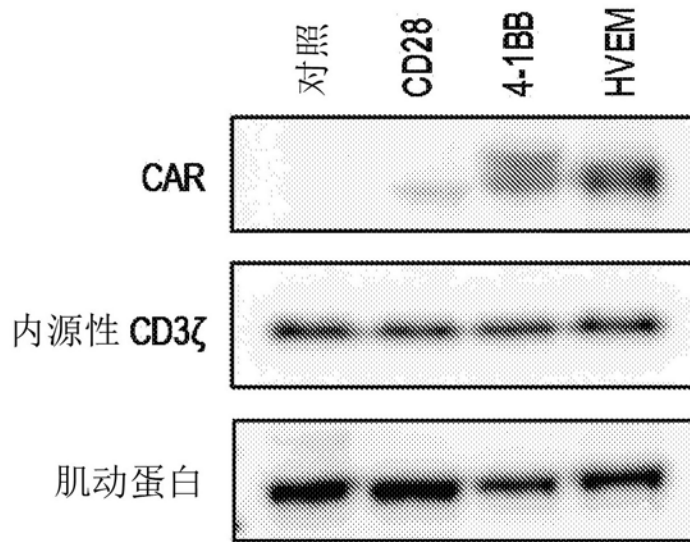


图1D

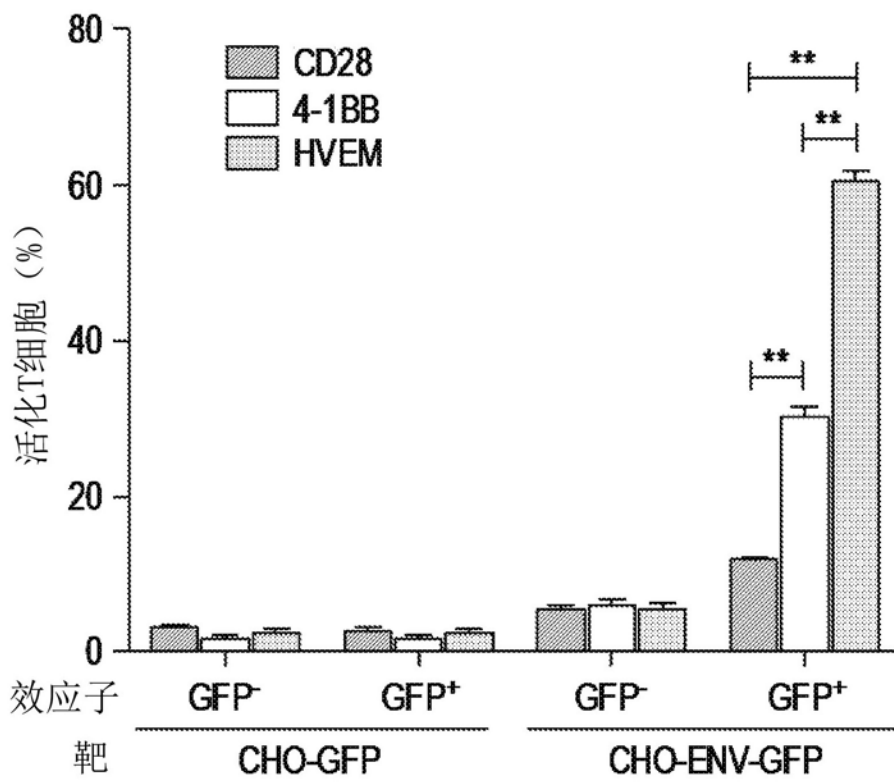


图1E

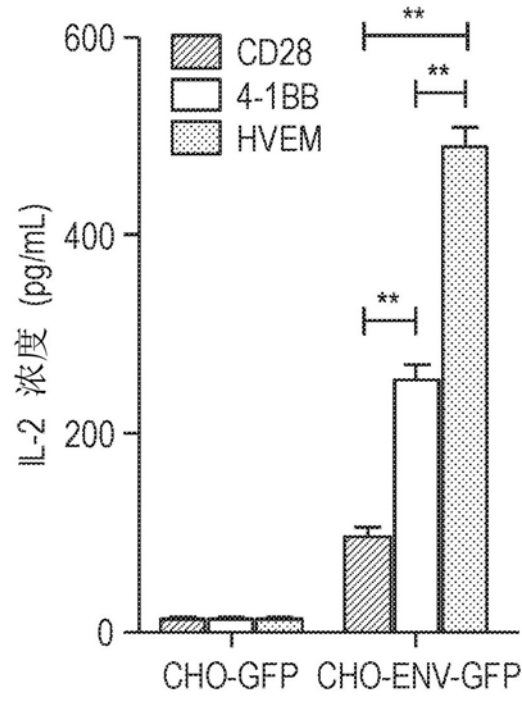


图1F

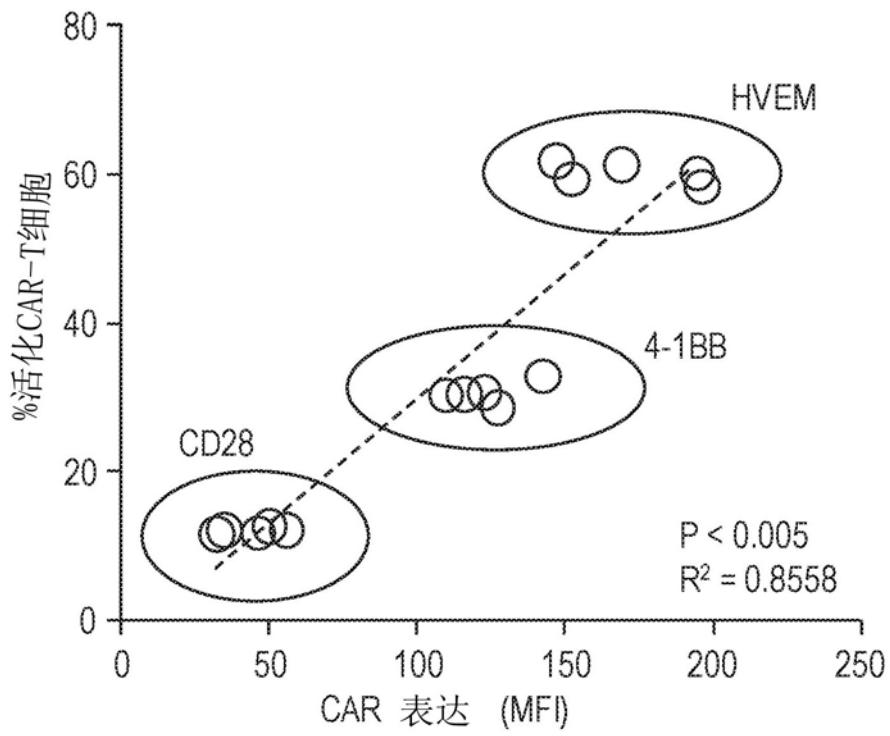


图1G

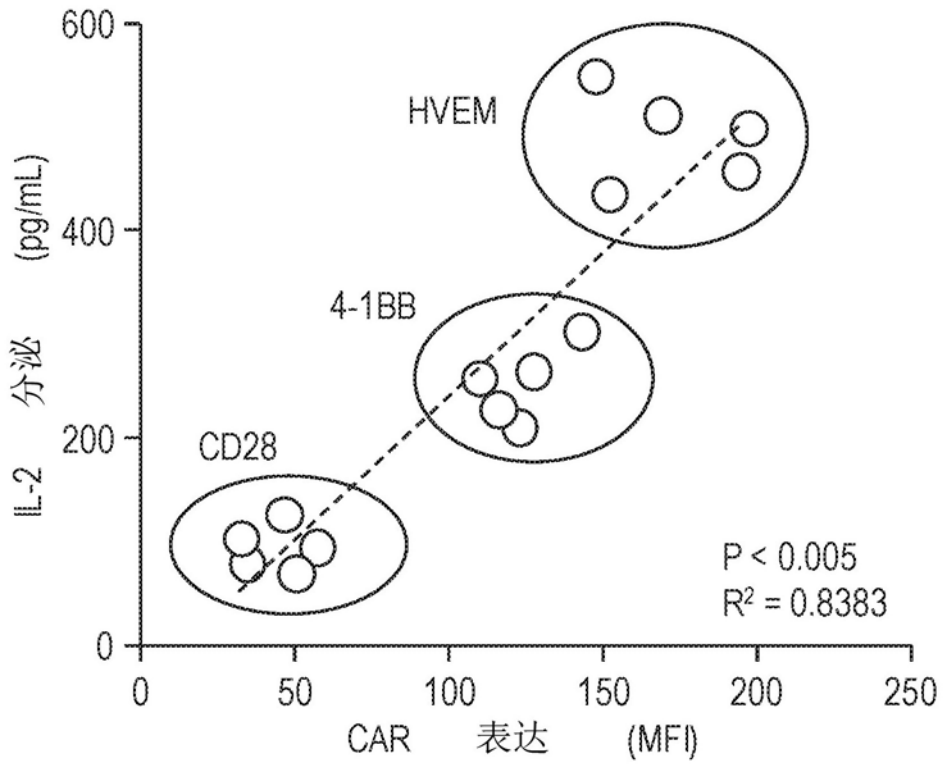


图1H

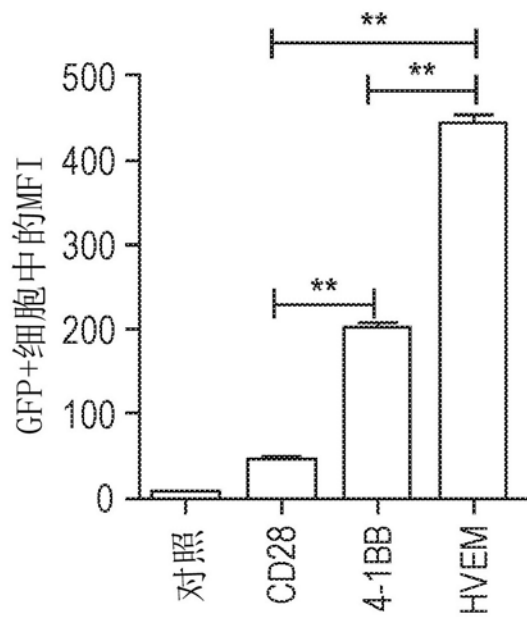


图2A

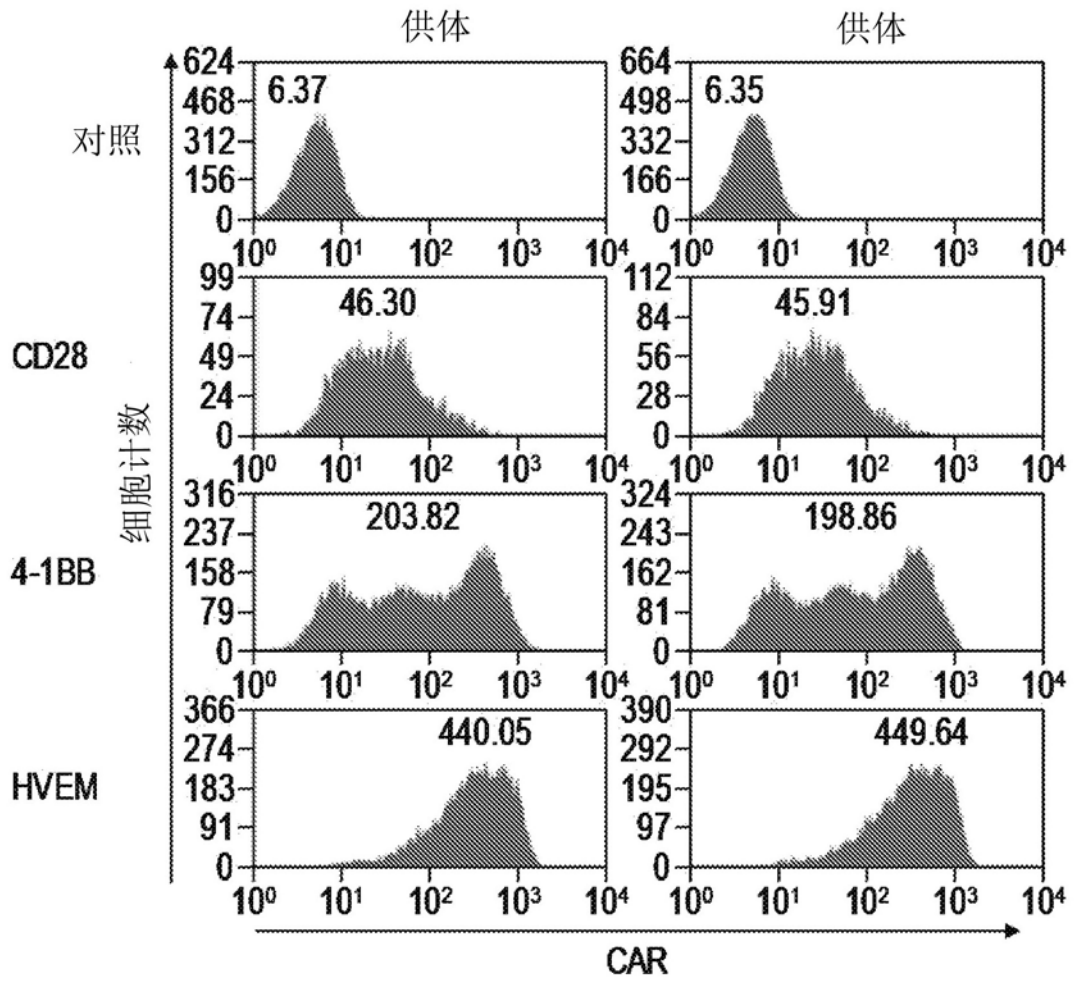


图2B

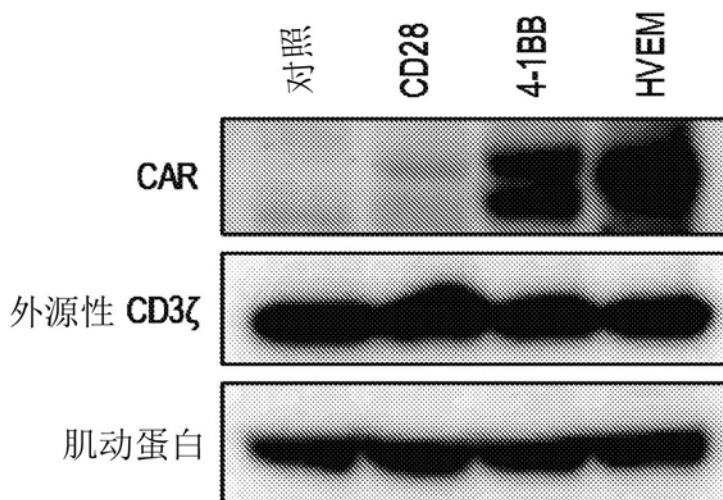


图2C

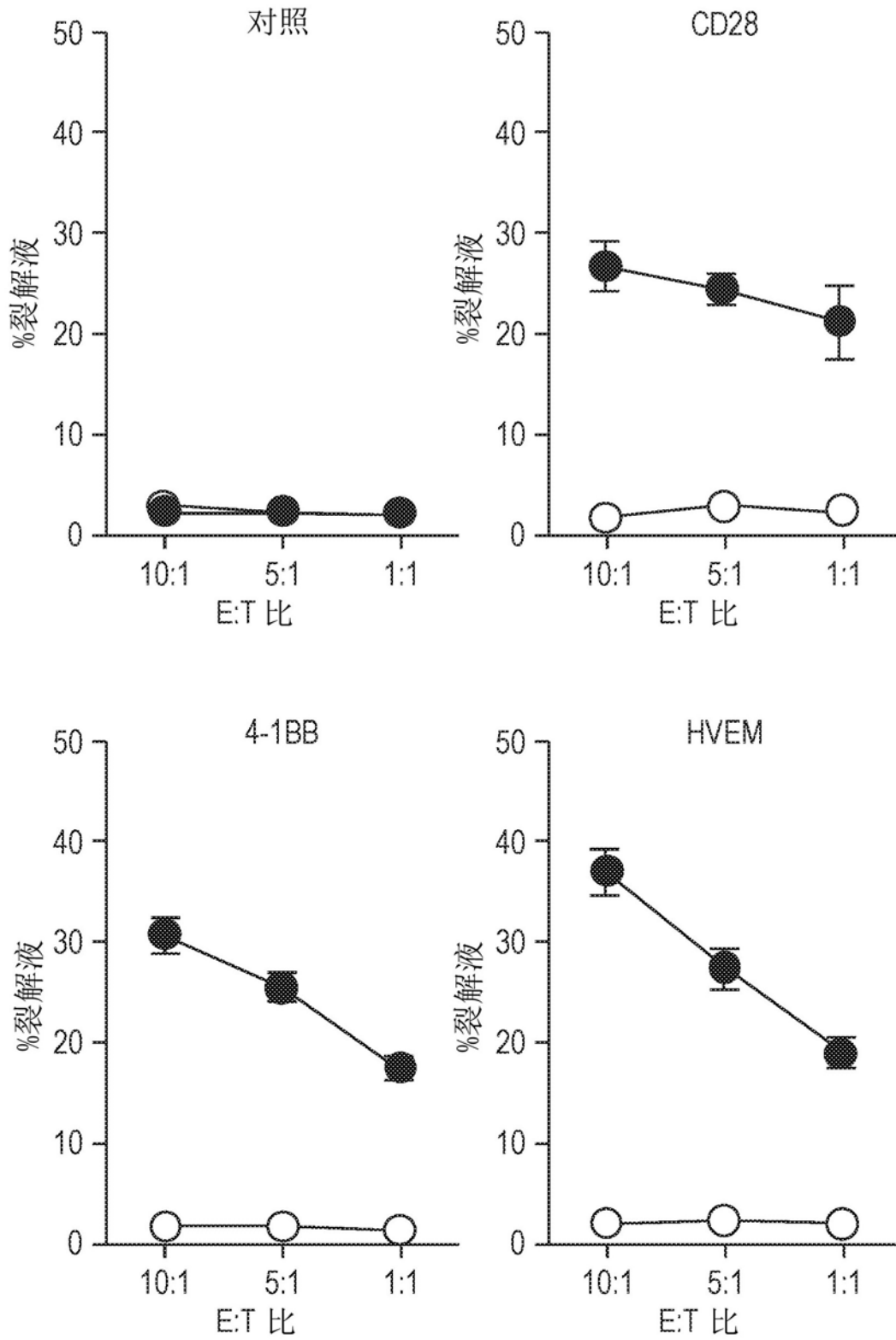


图3A

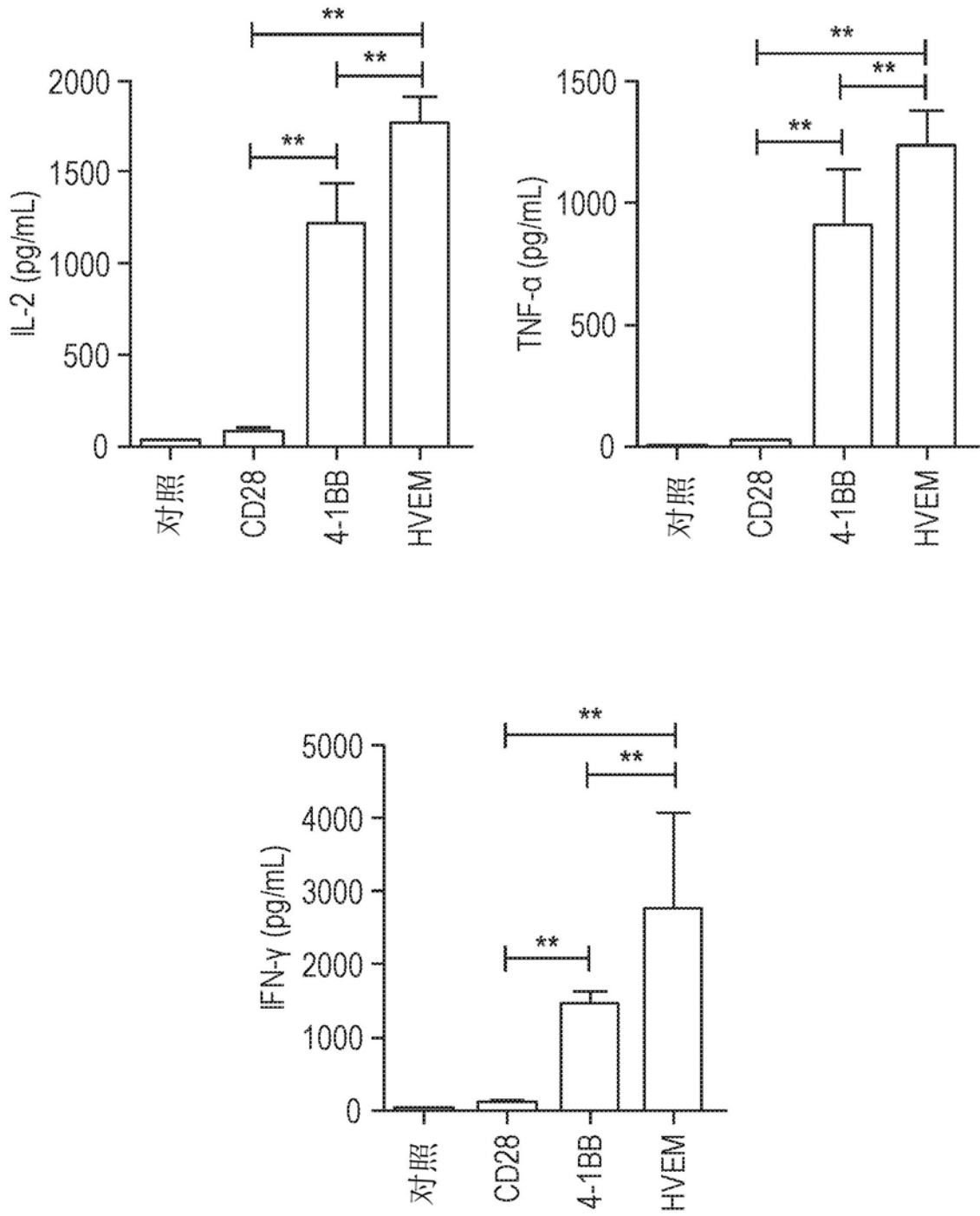


图3B

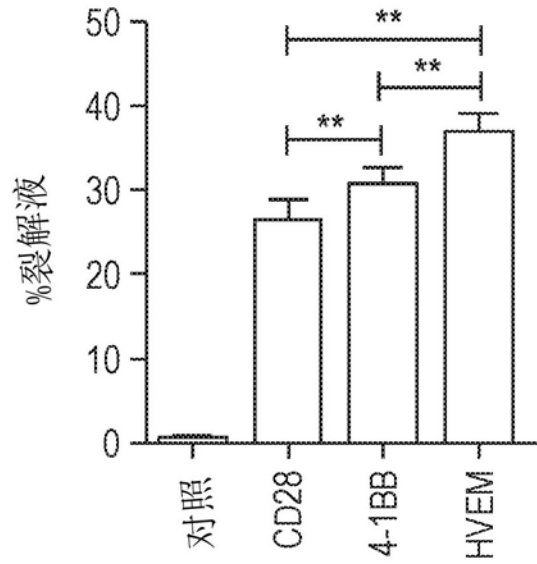


图3C

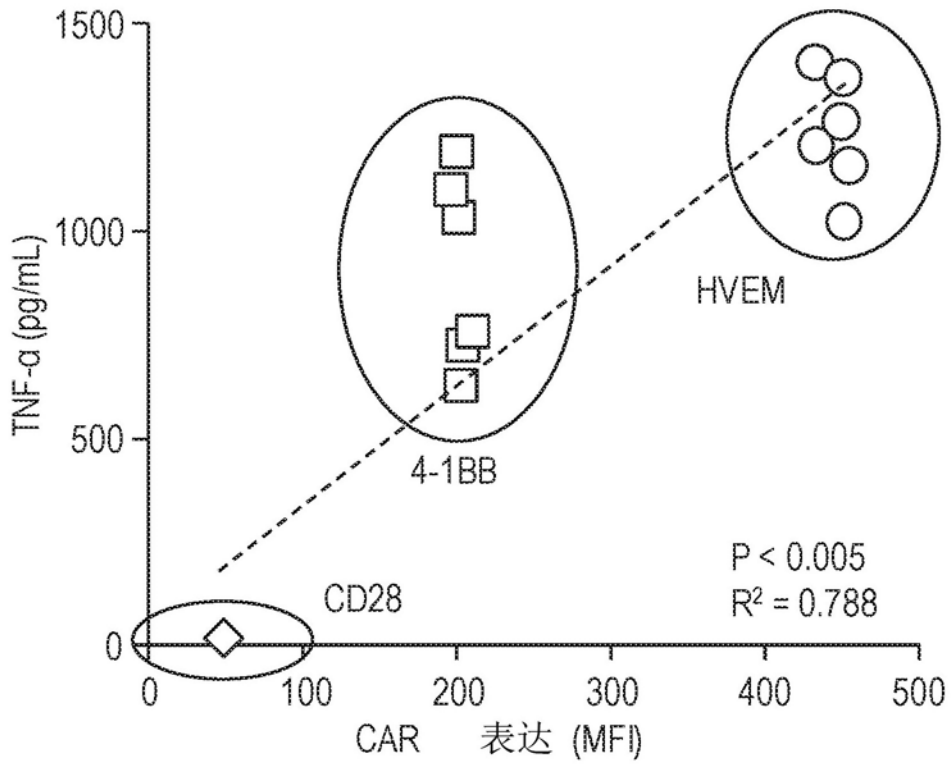


图3D

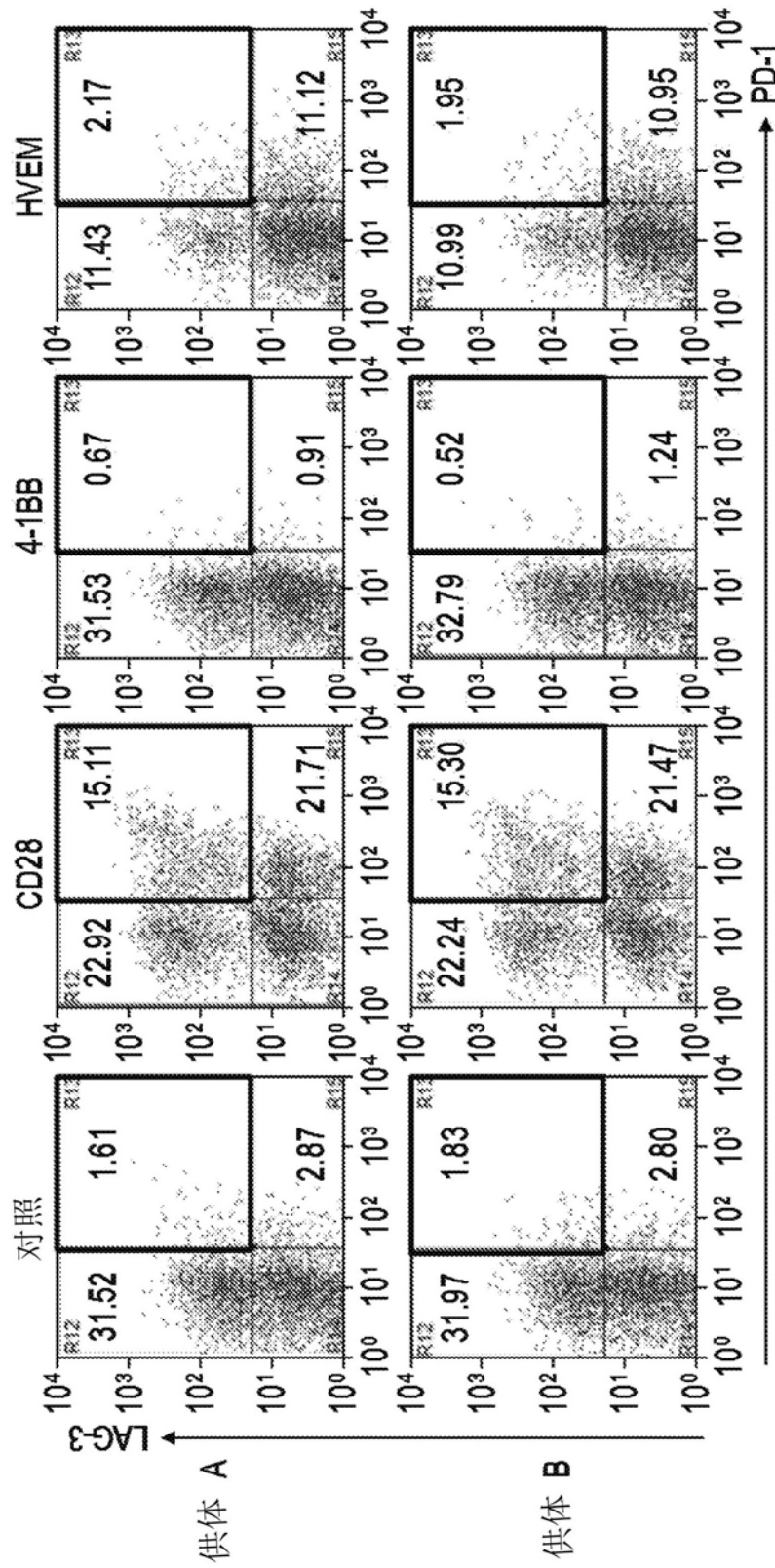


图4A

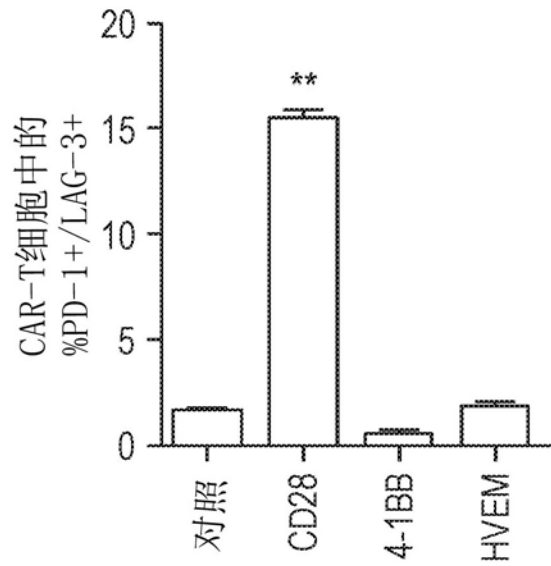


图4B

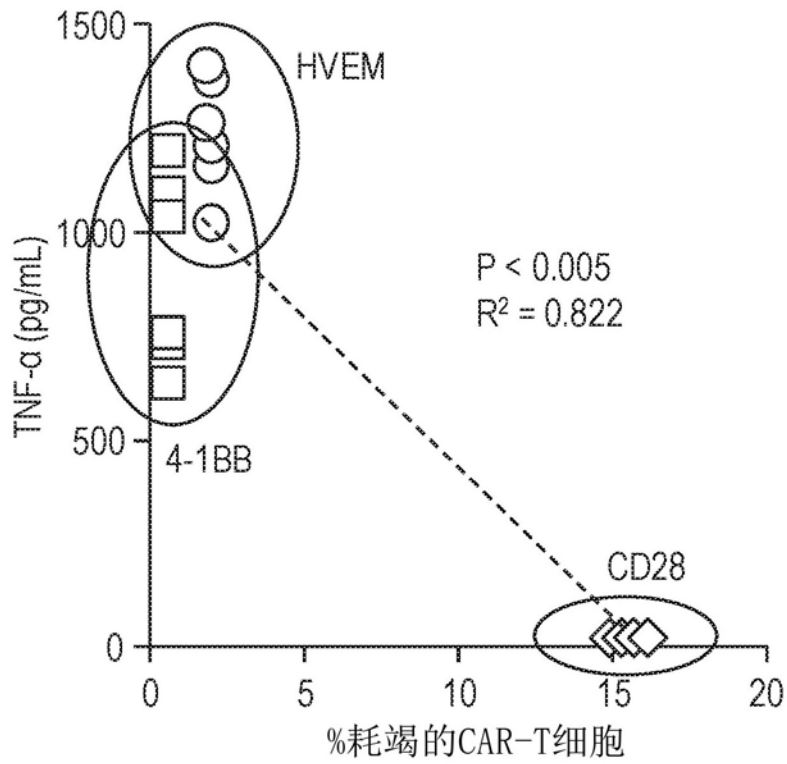


图4C

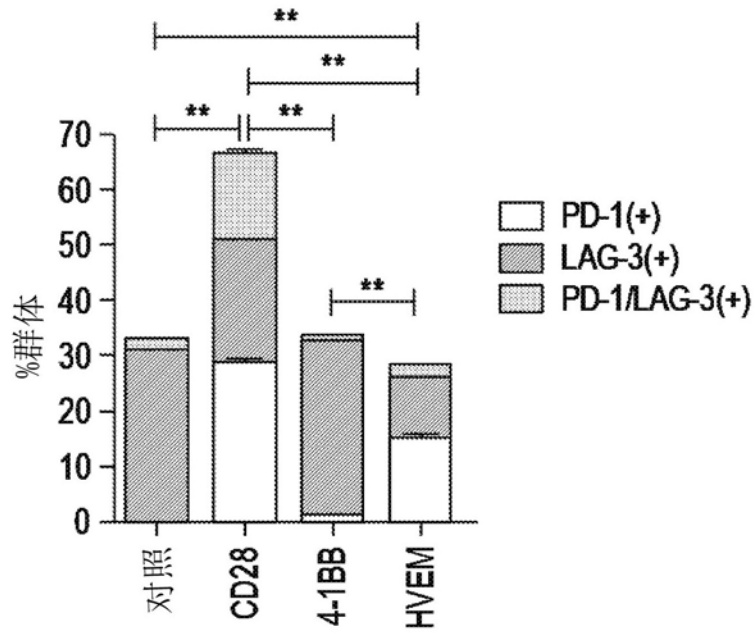


图4D

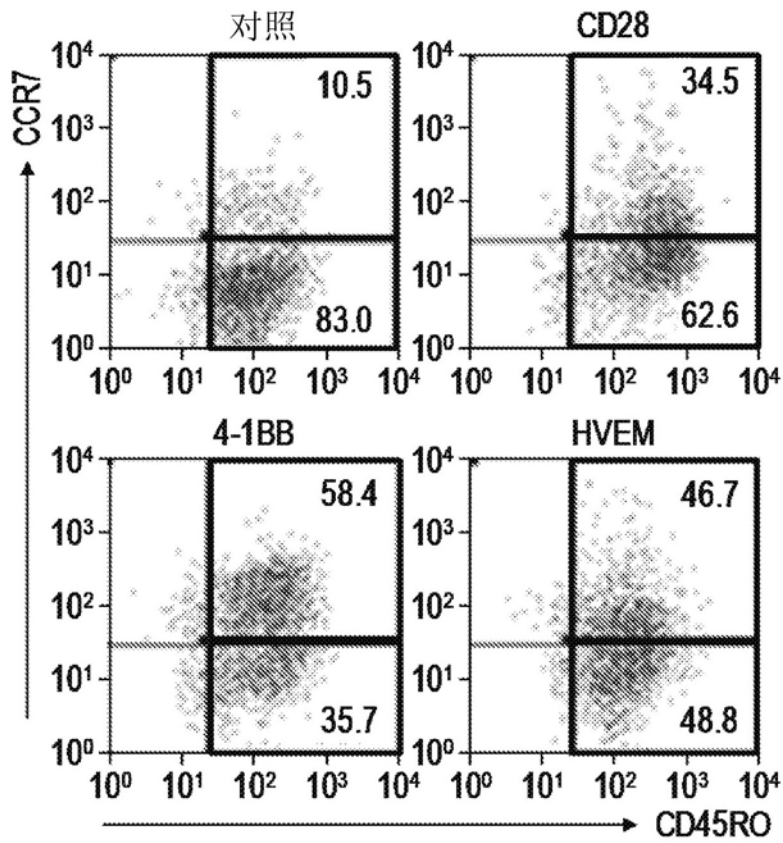


图4E

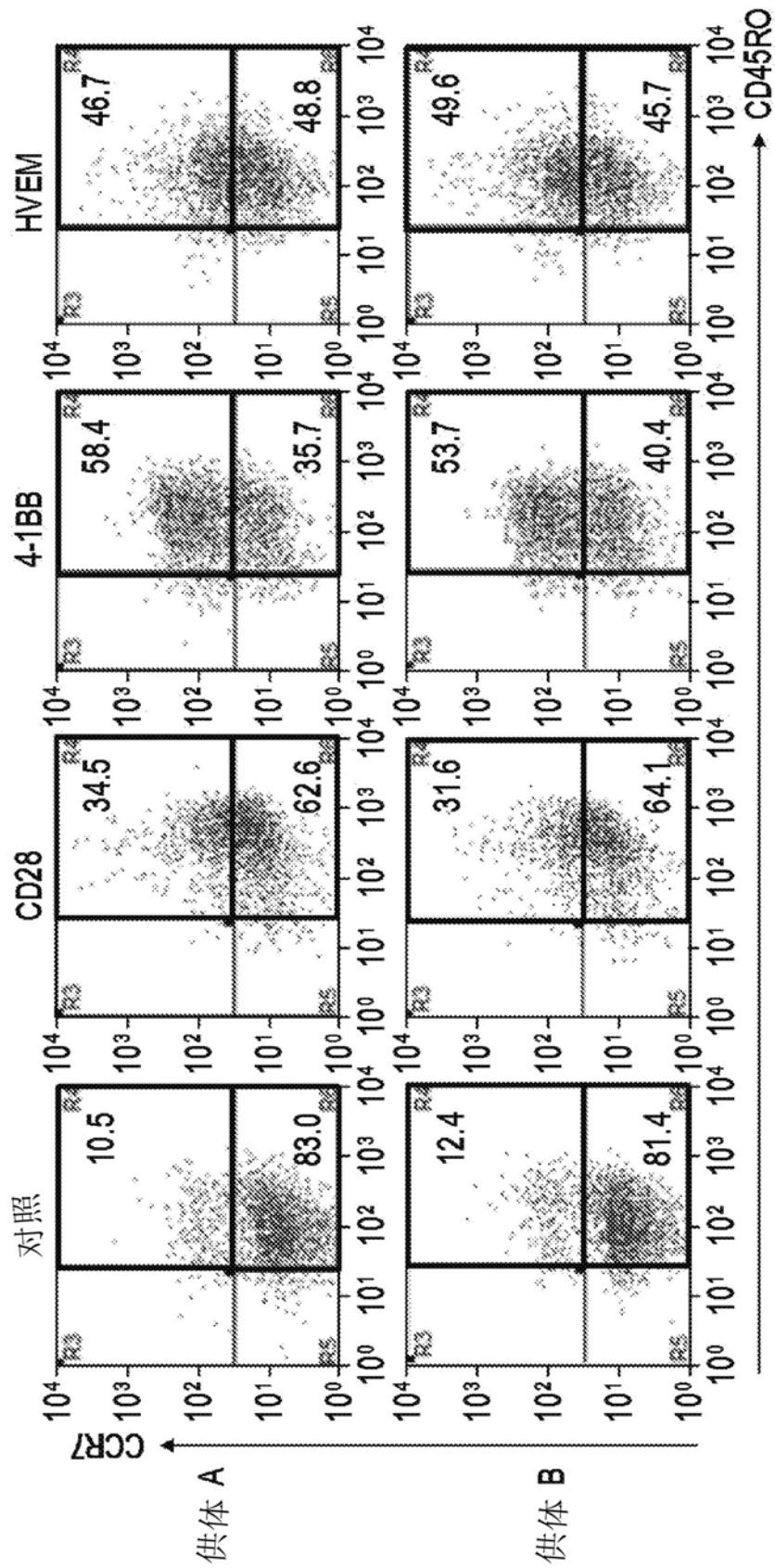


图5A

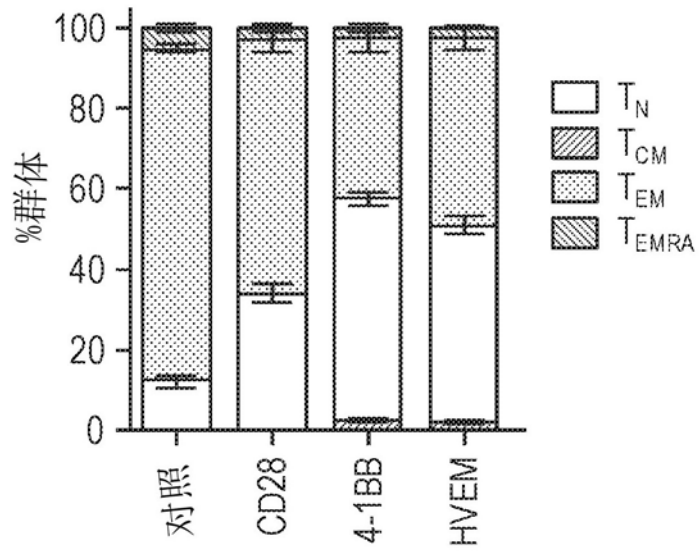


图5B

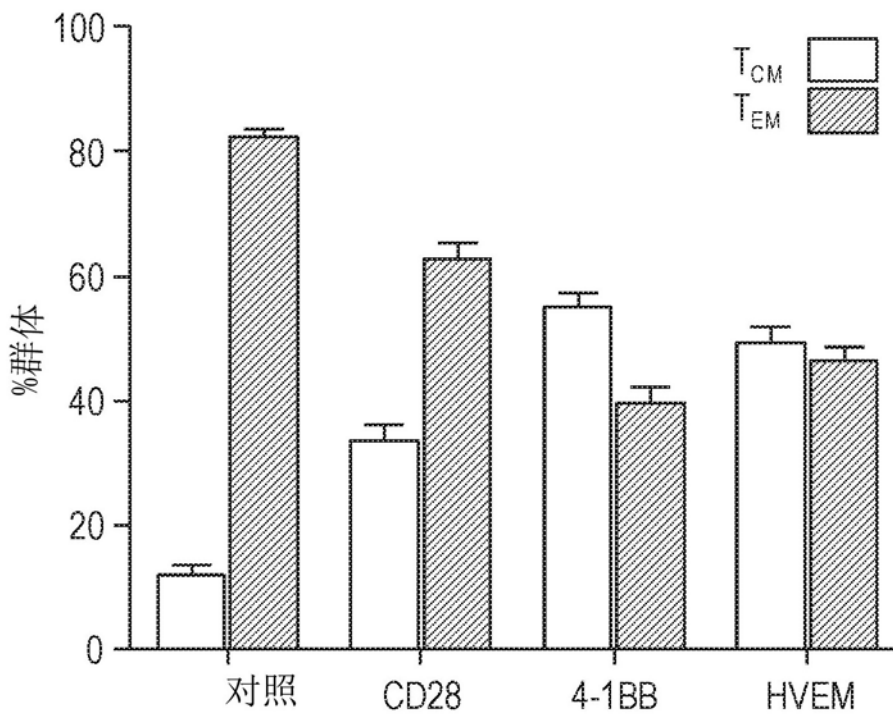


图5C

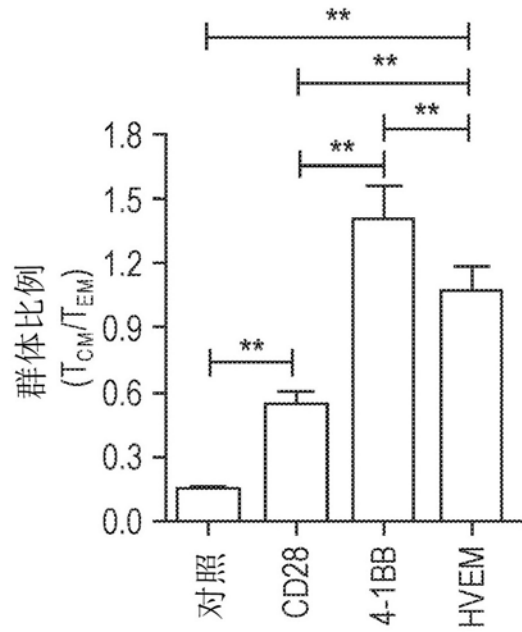


图5D

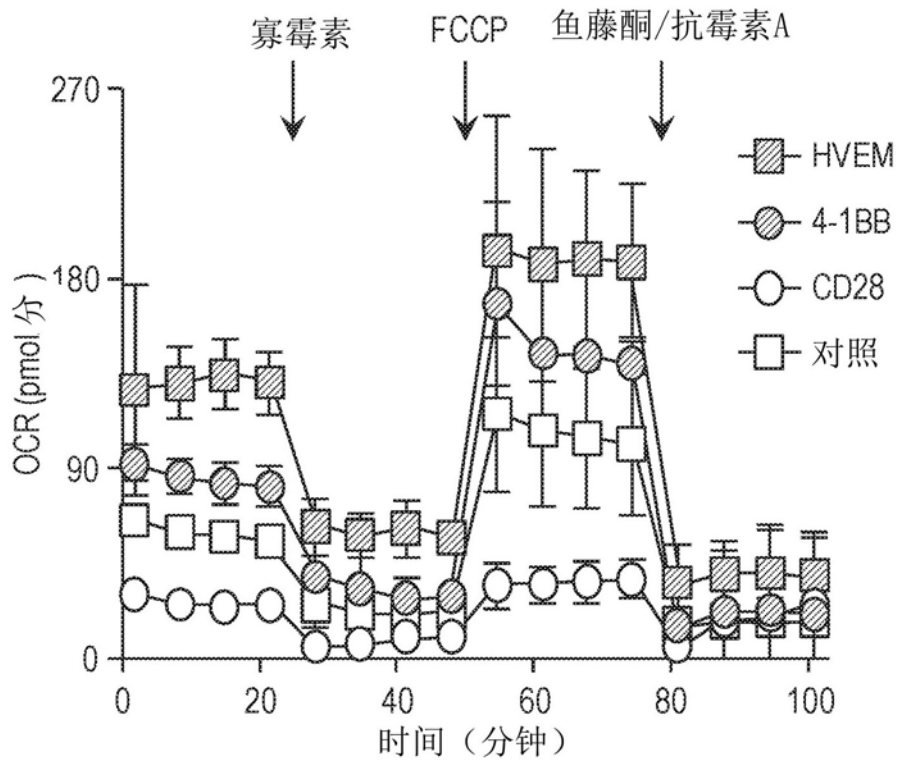
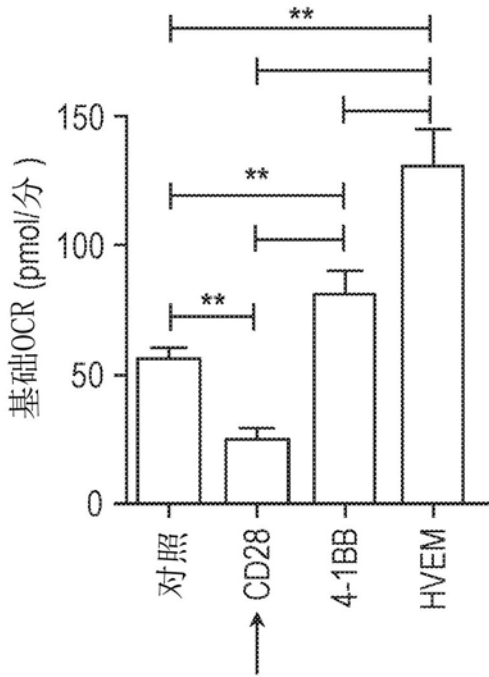
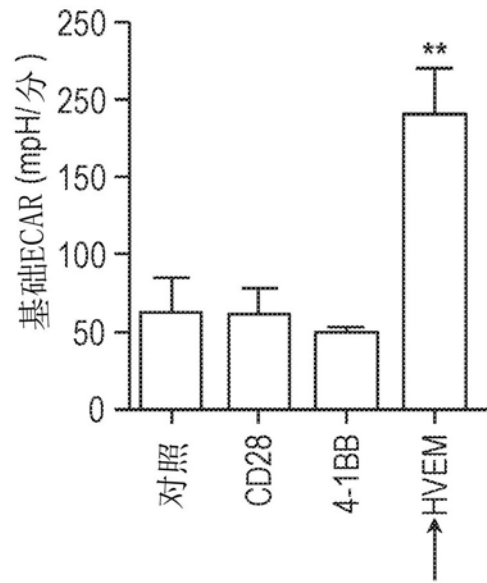


图6A



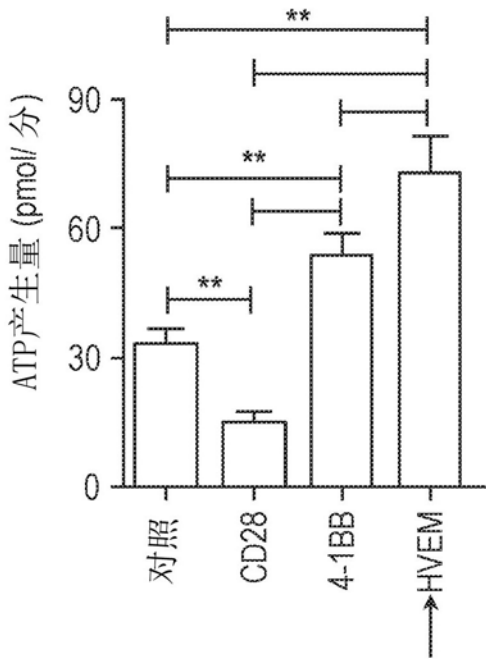
CD28 CAR-T的基础OCR更低

图6B



HVEM CAR-T的糖酵解更高

图6C



ATP产生量(ATP相关呼吸)

图6D

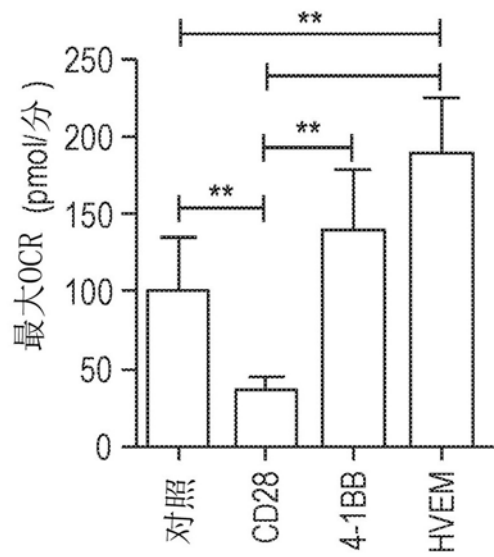


图6E

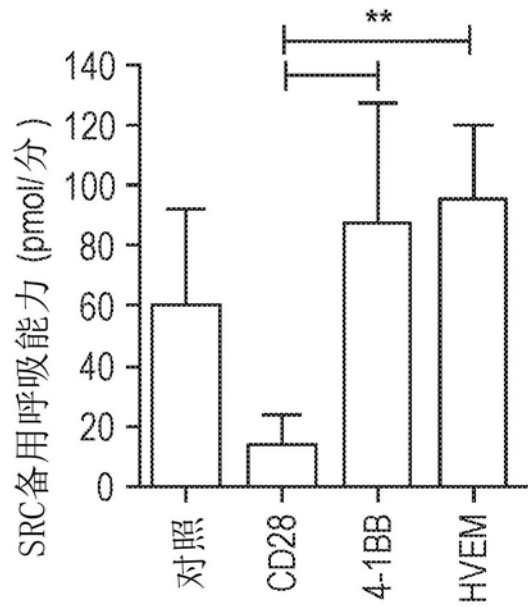


图6F

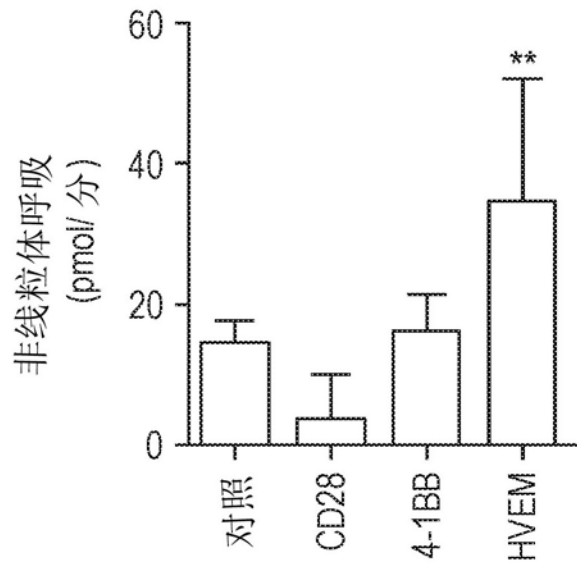


图6G

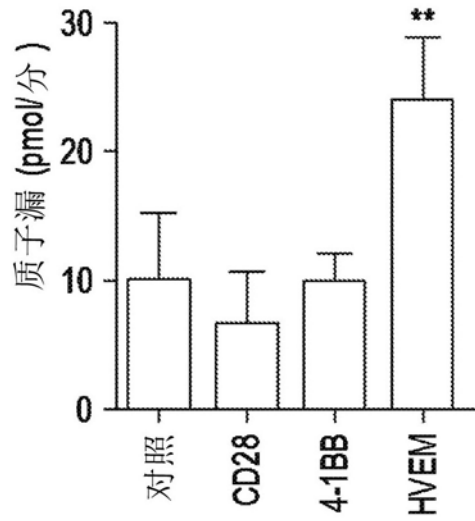


图6H

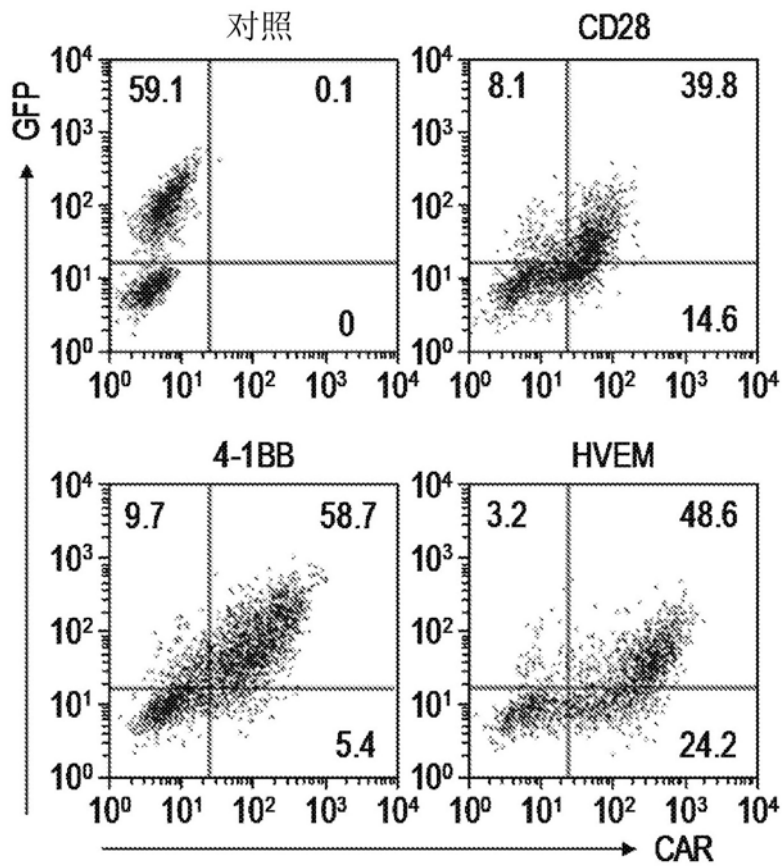


图7A

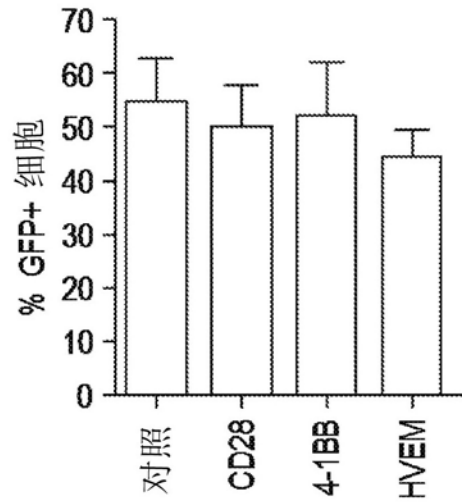


图7B

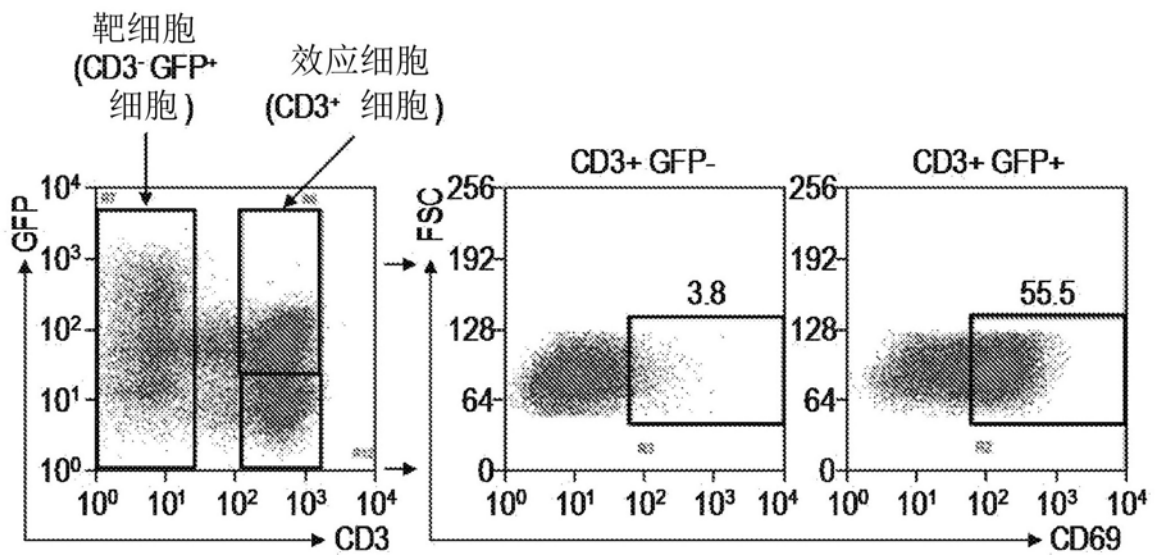


图7C

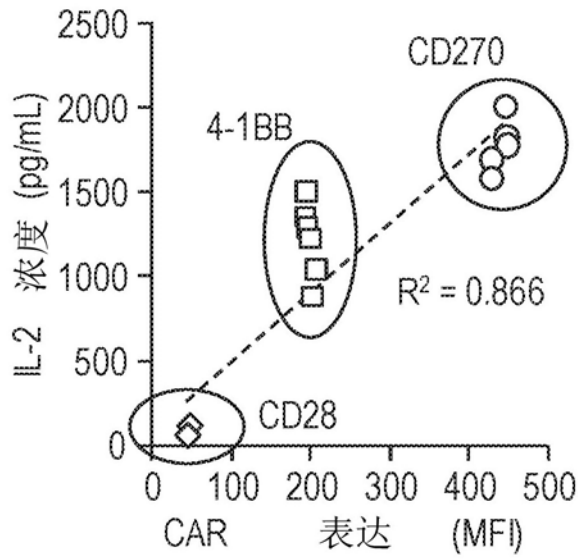


图8A

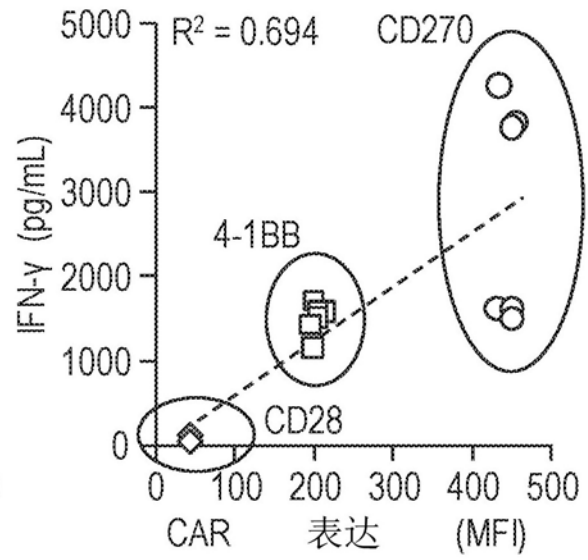


图8B

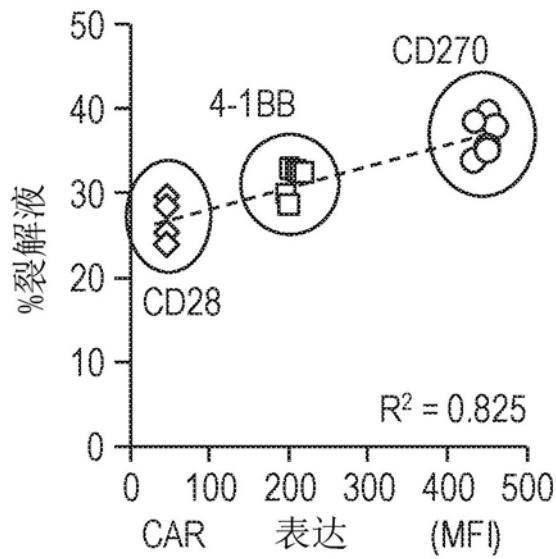


图8C

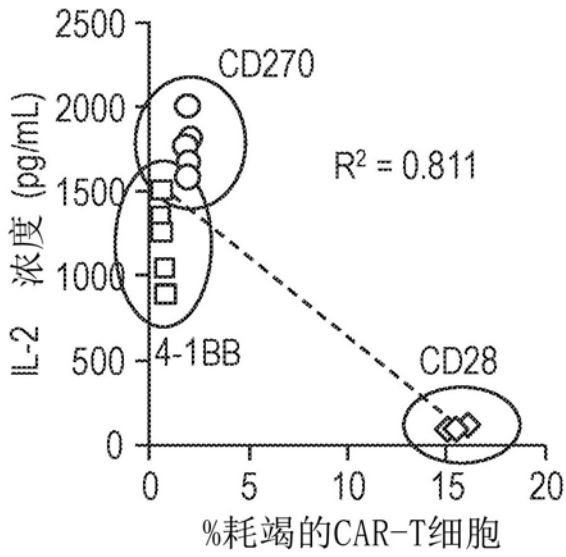


图9A

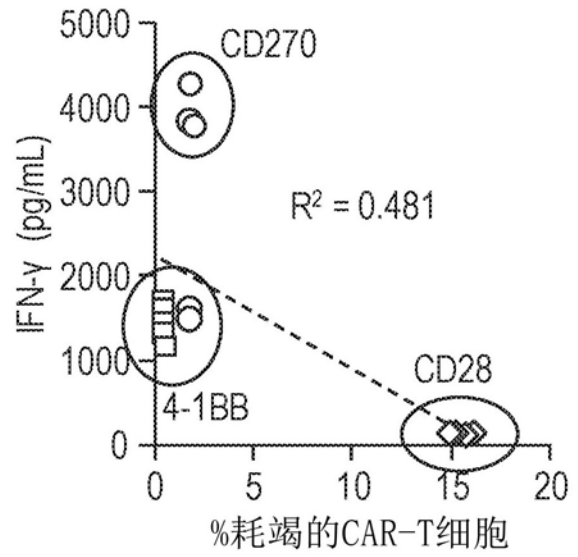


图9B

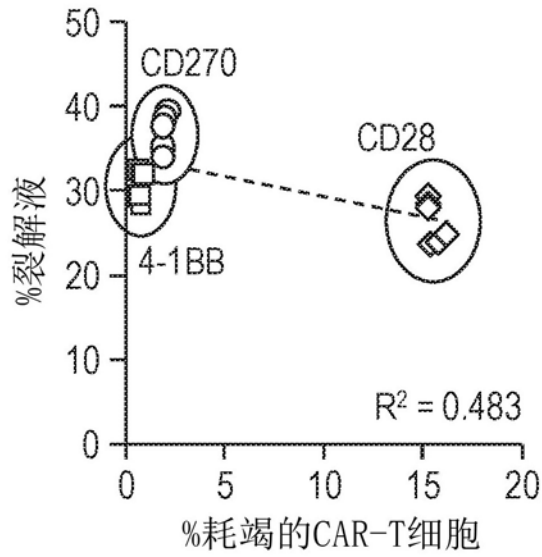


图9C

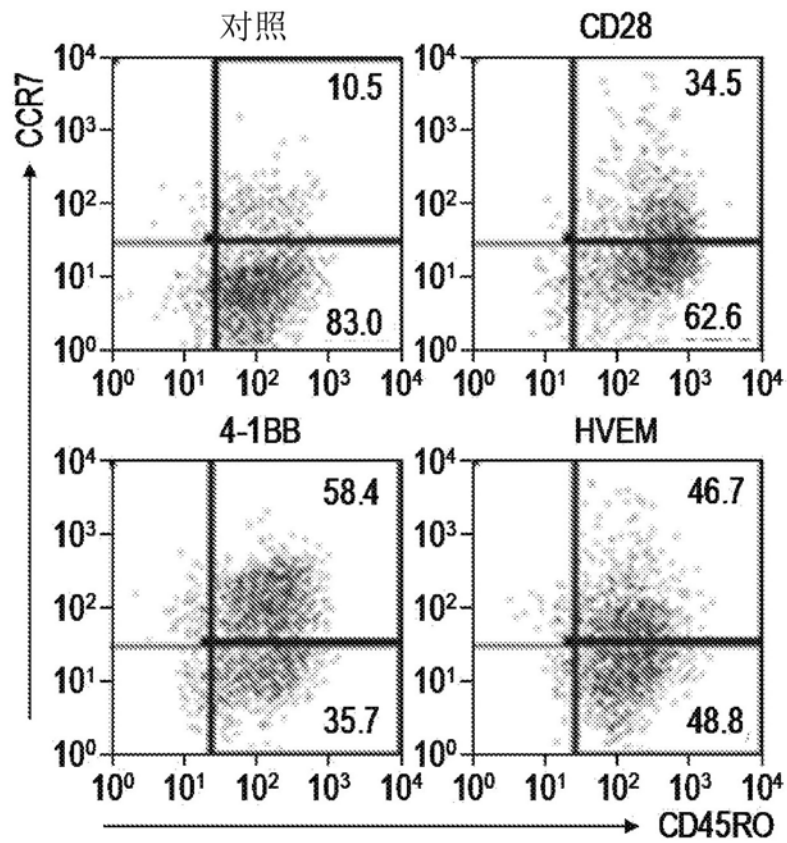


图10A

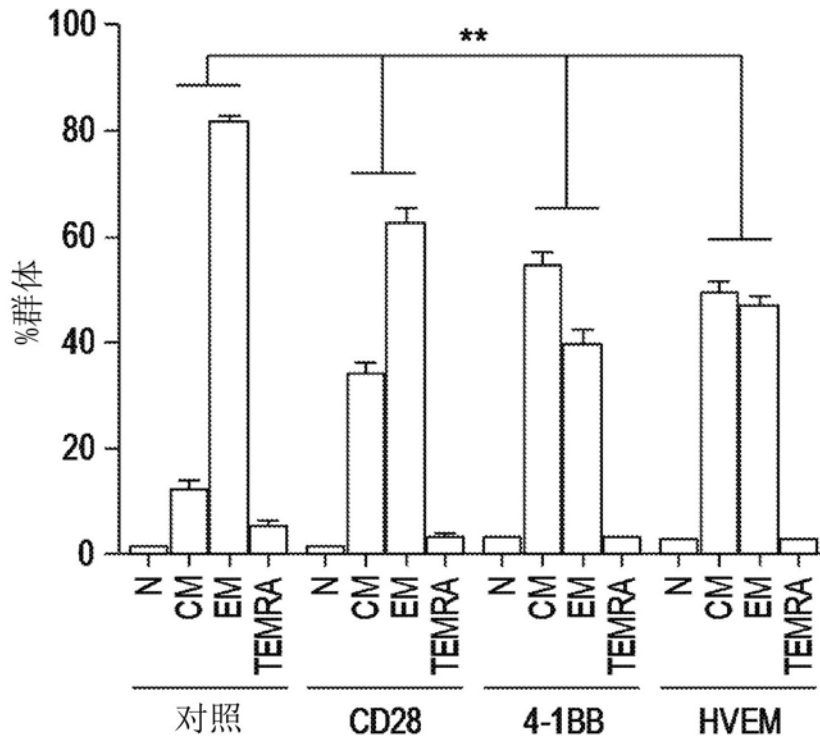


图10B

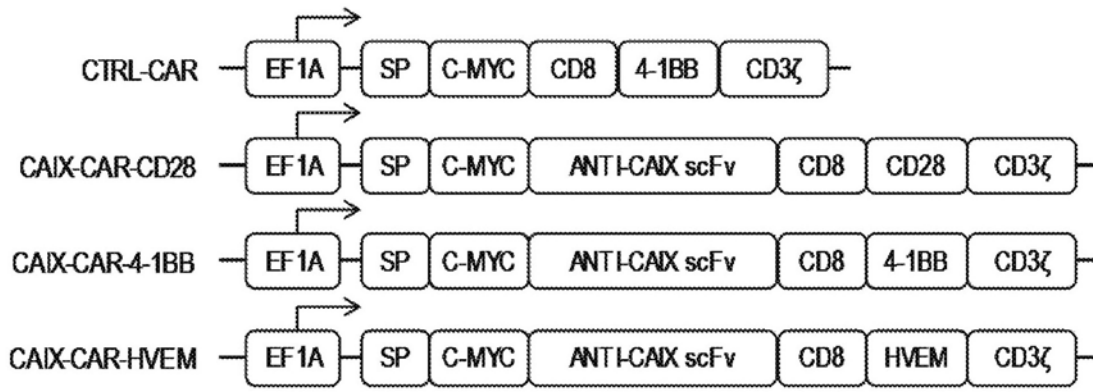


图11A

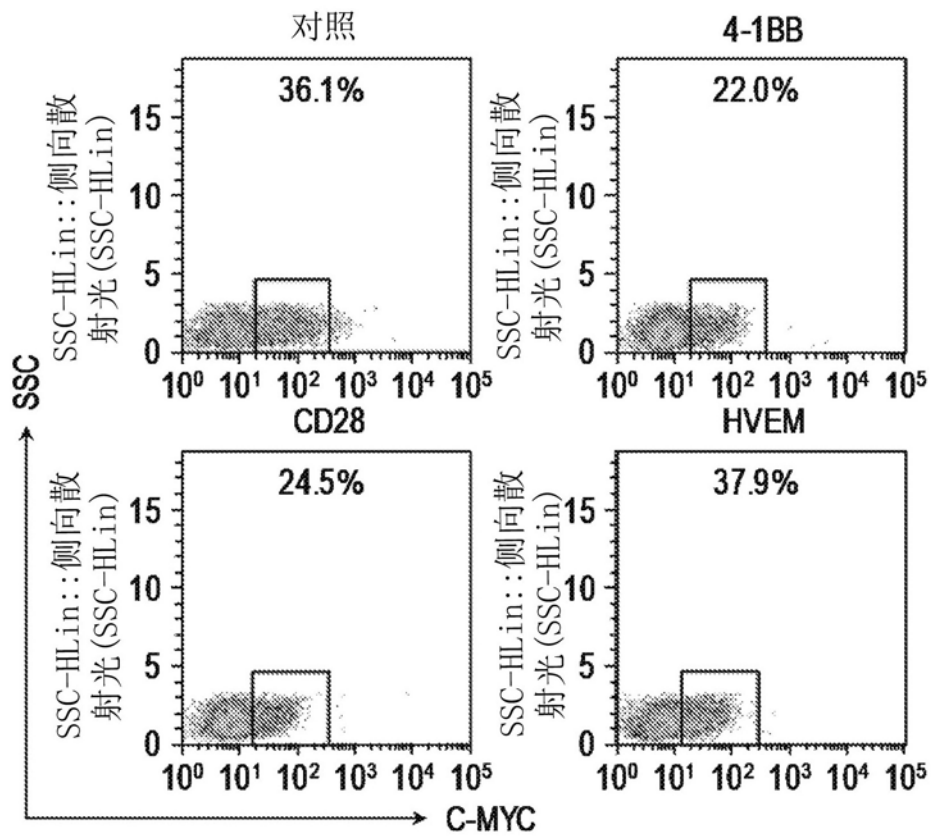


图11B

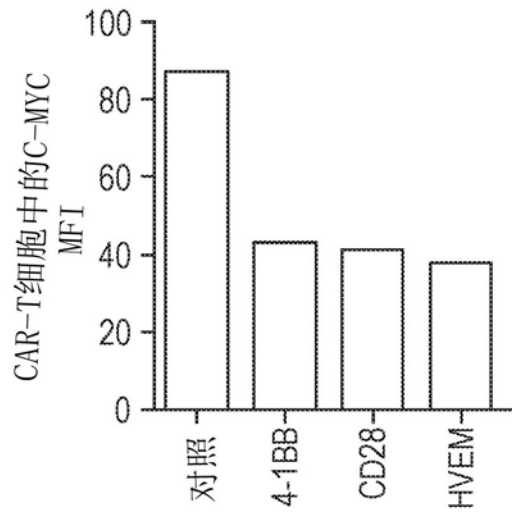


图11C

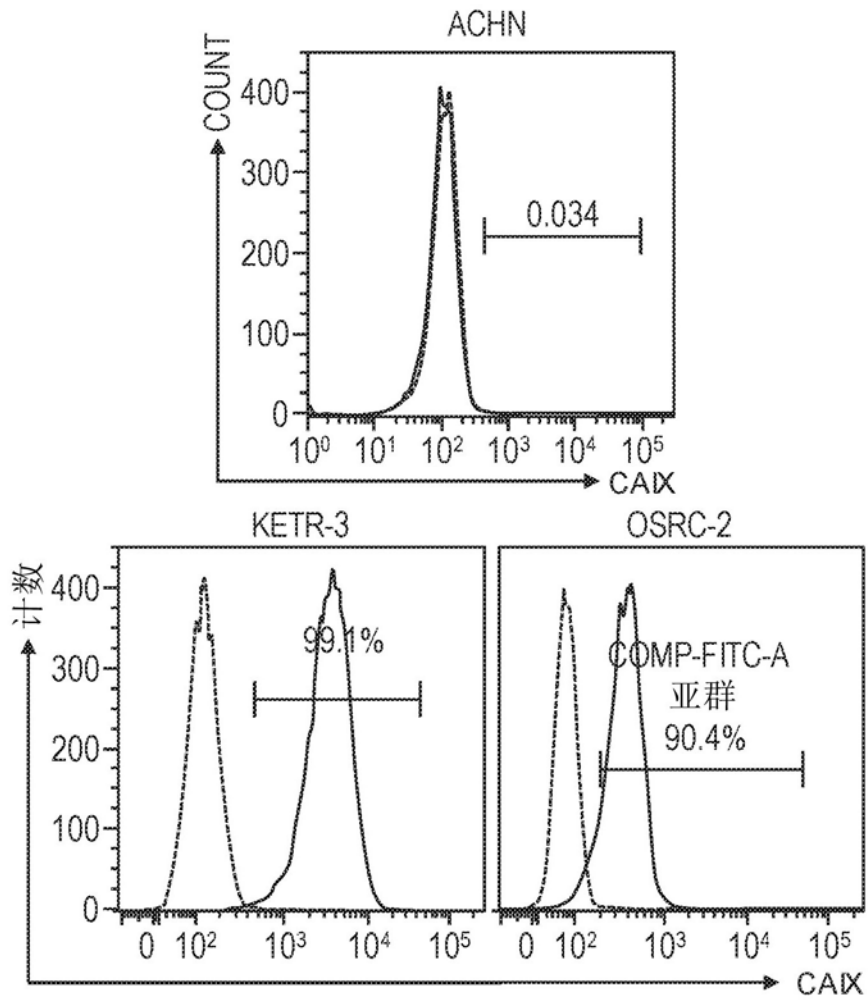


图12A

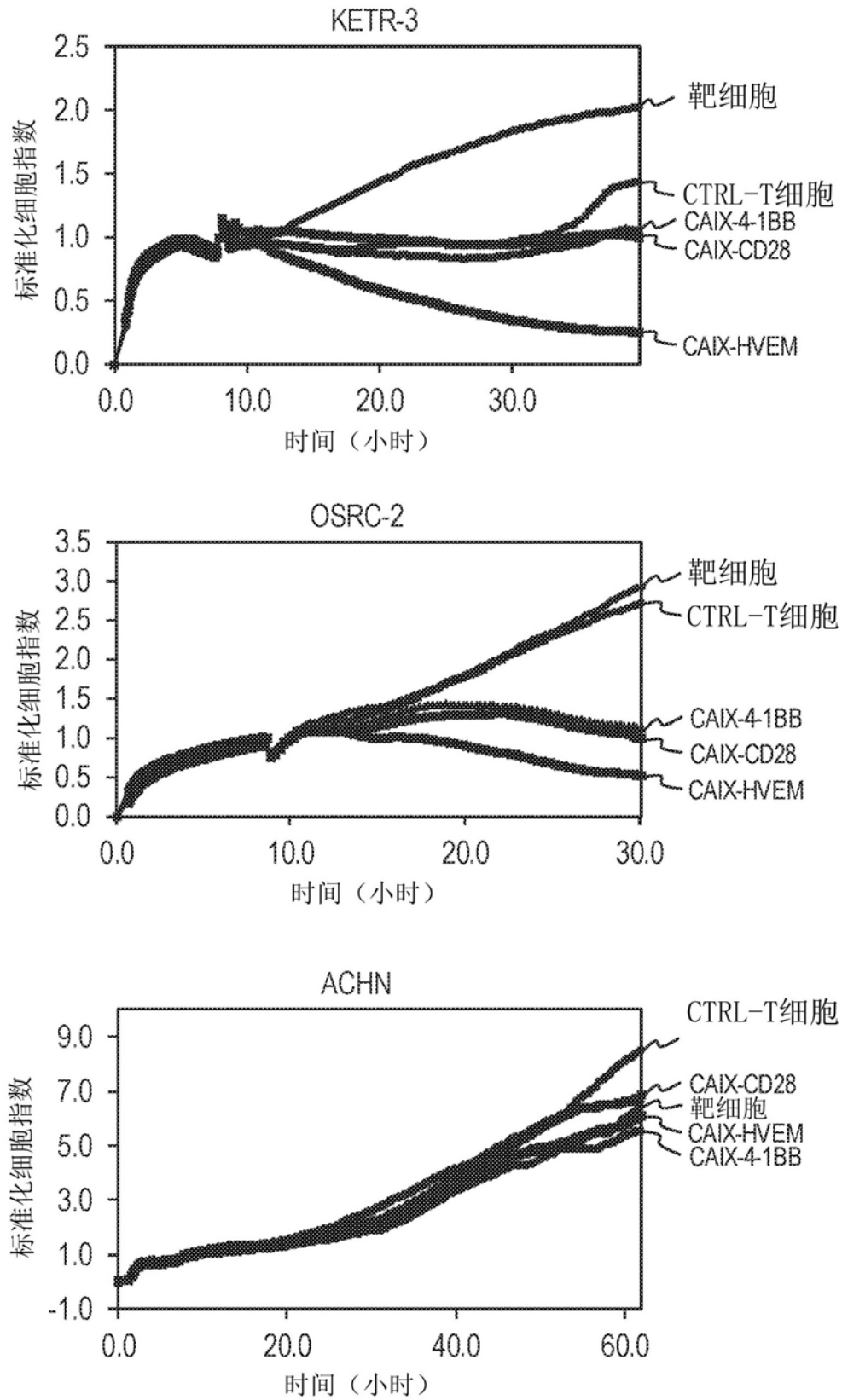


图12B

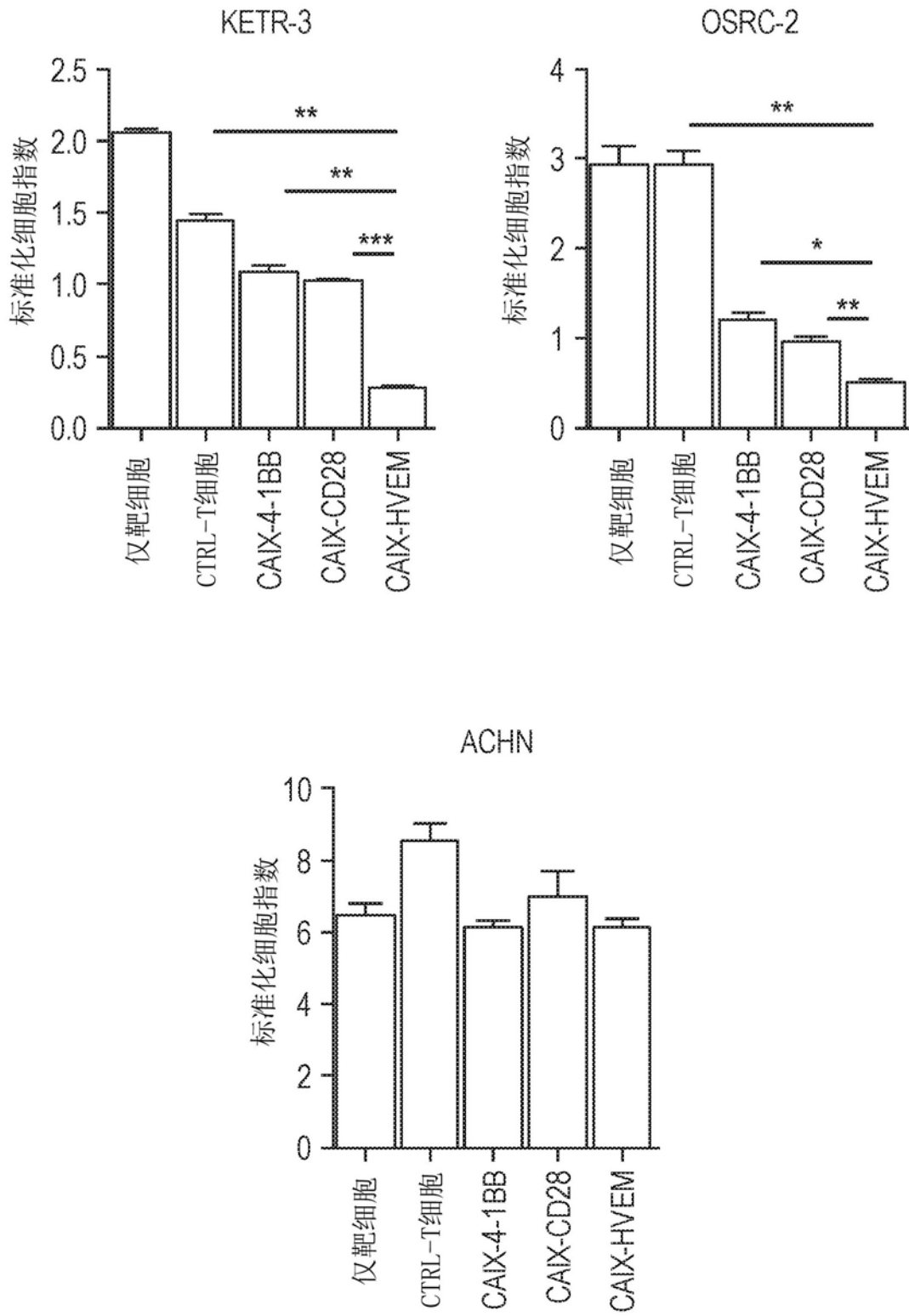


图12C

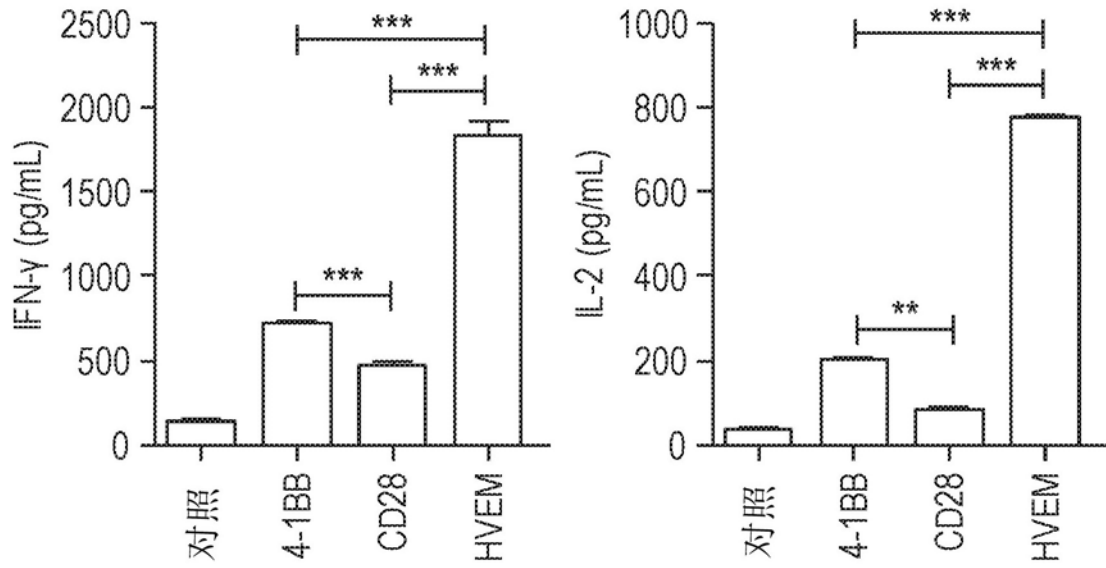


图12D

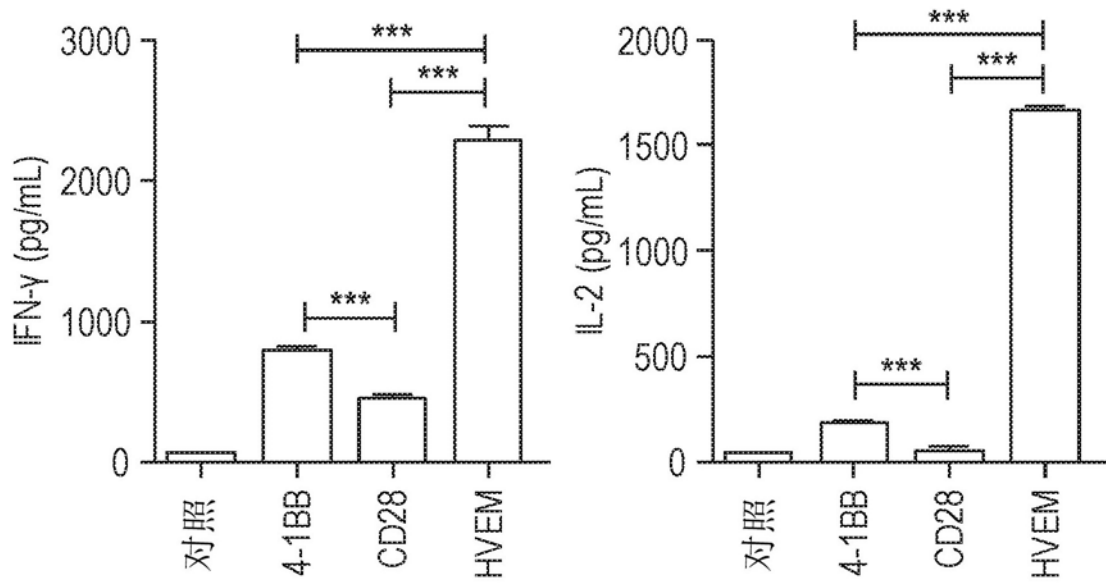


图12E

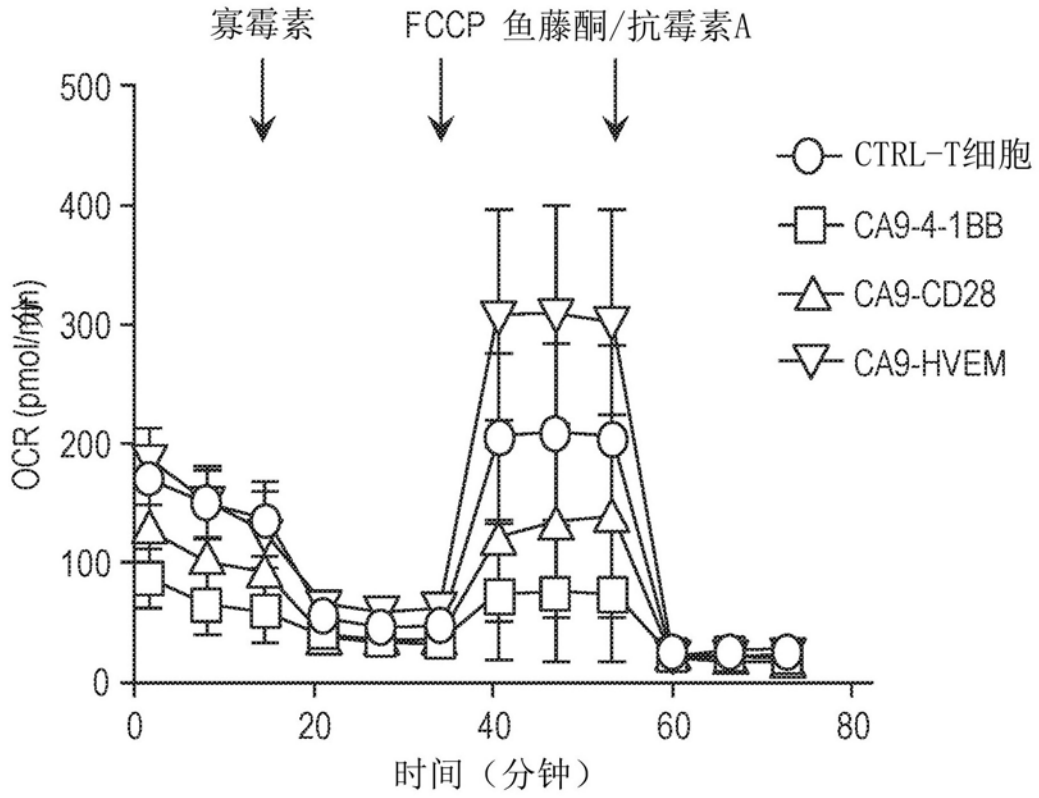


图13A

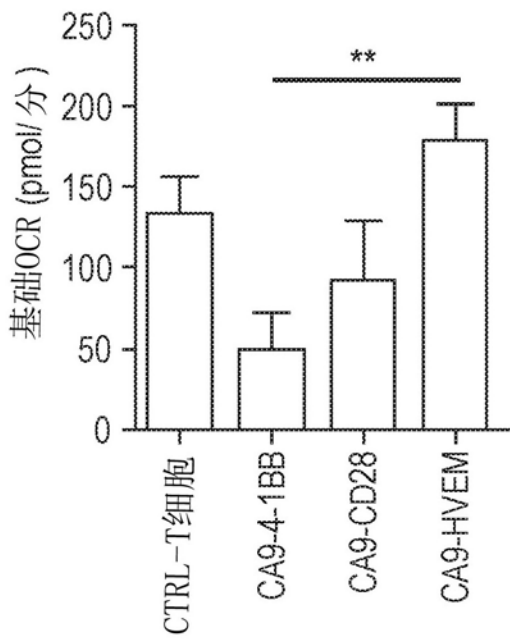


图13B

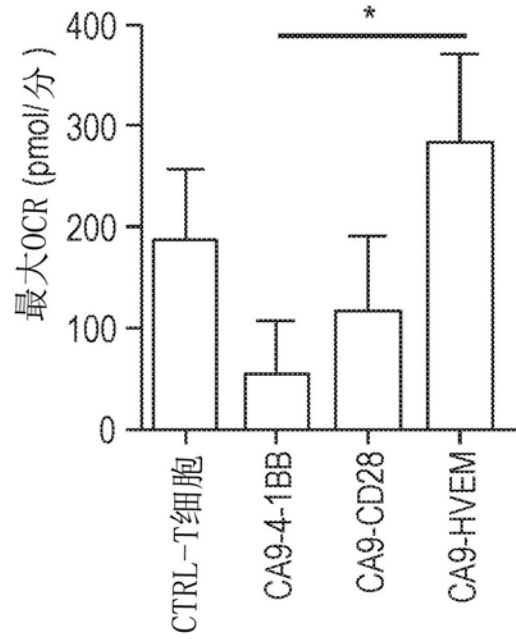


图13C

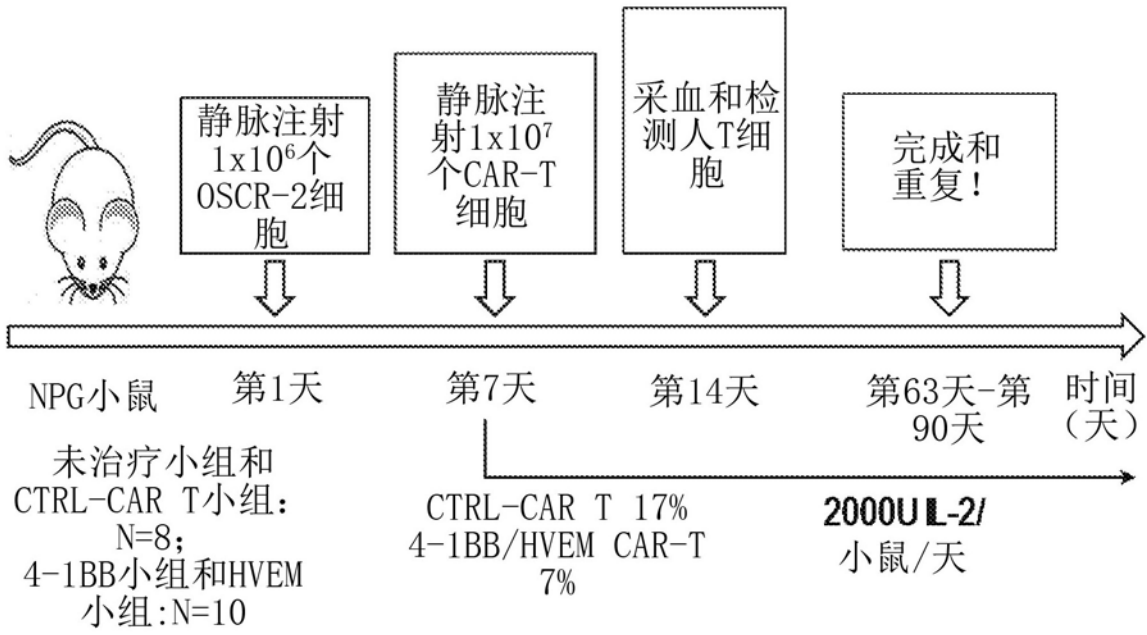


图14A

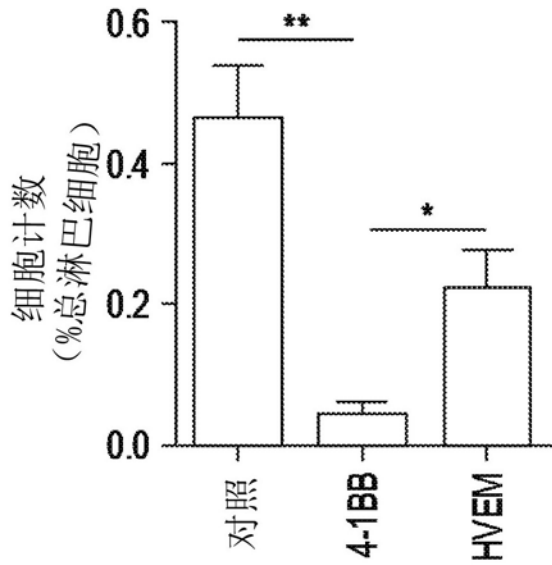


图14B

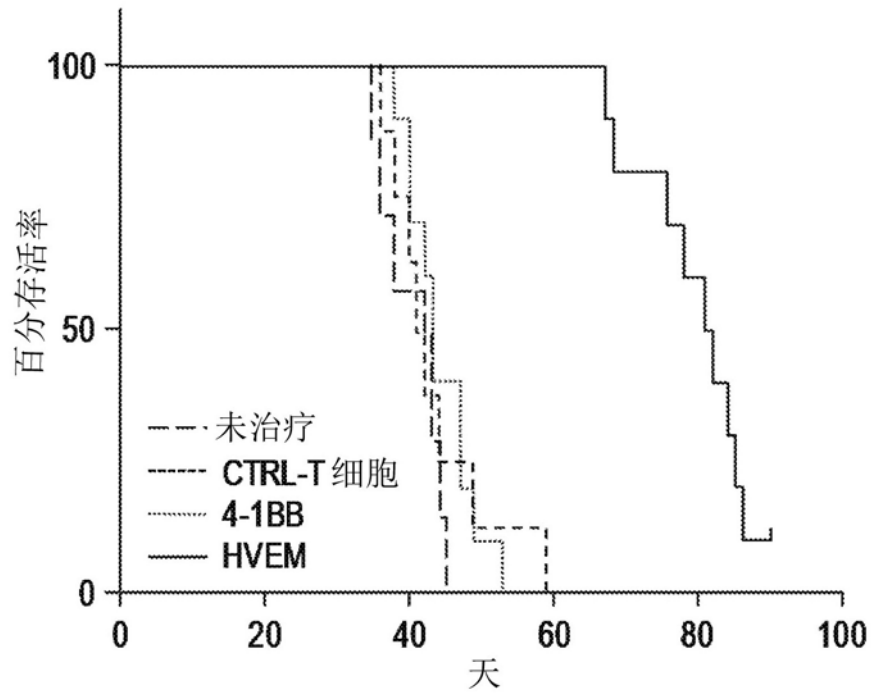


图14C

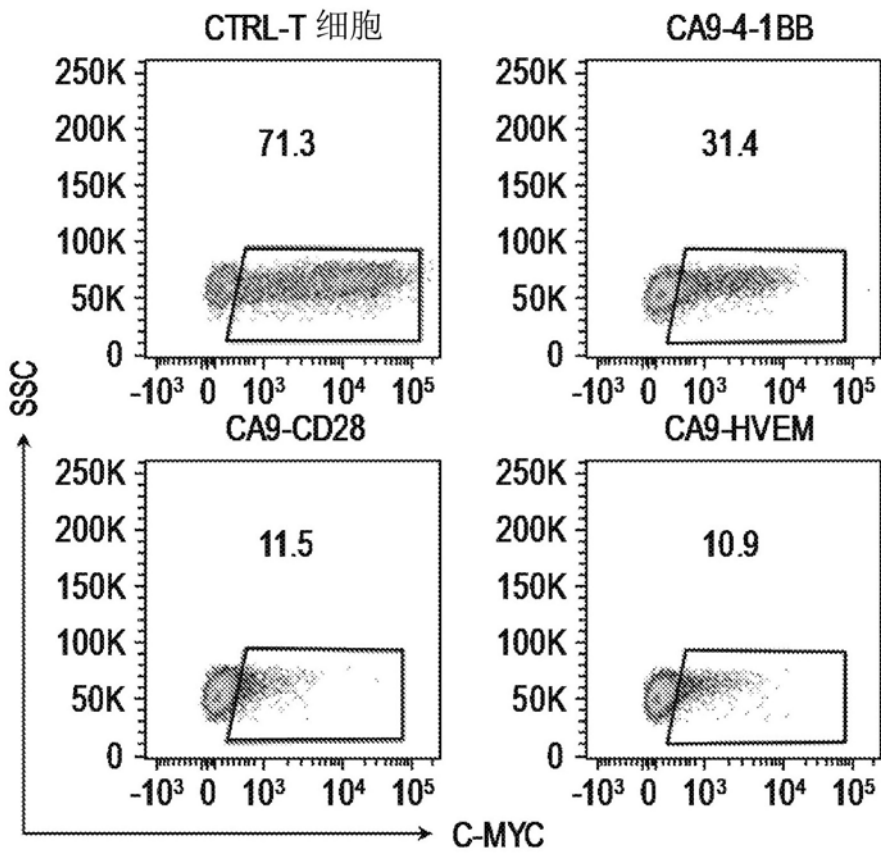


图15A

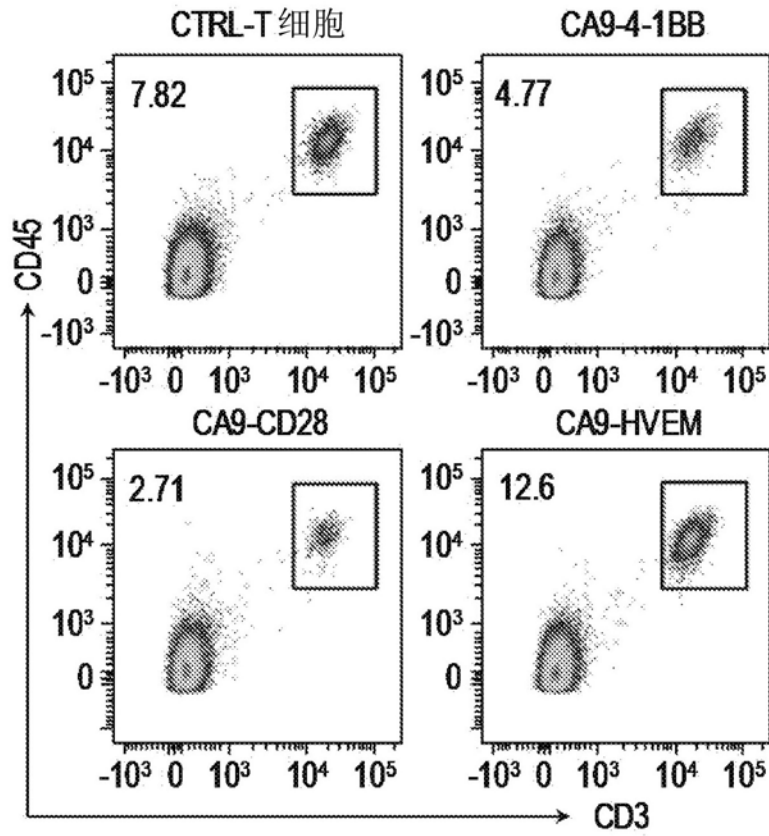


图15B

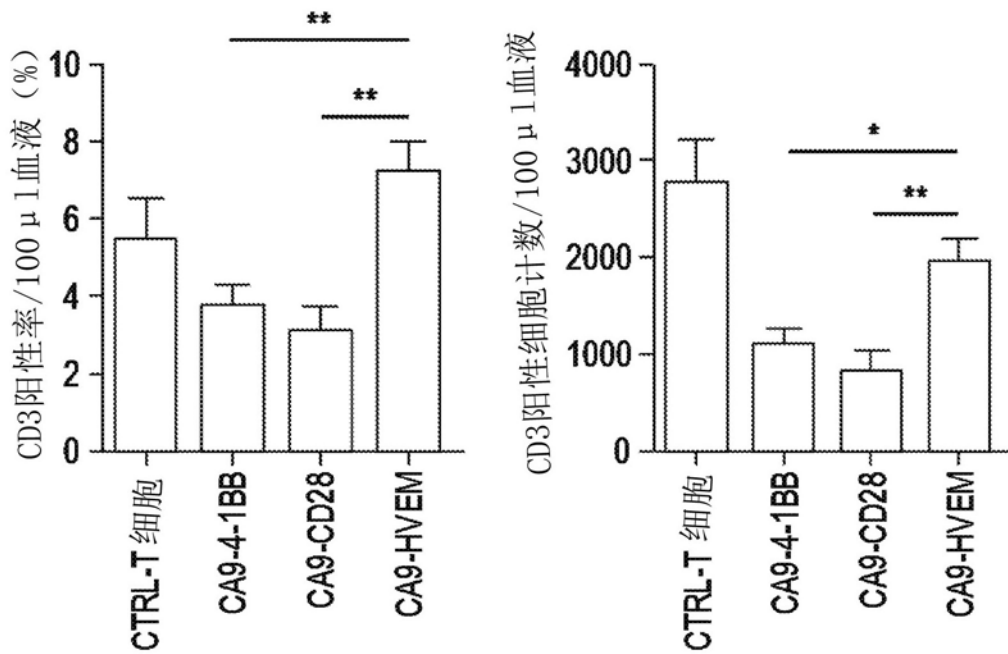


图15C

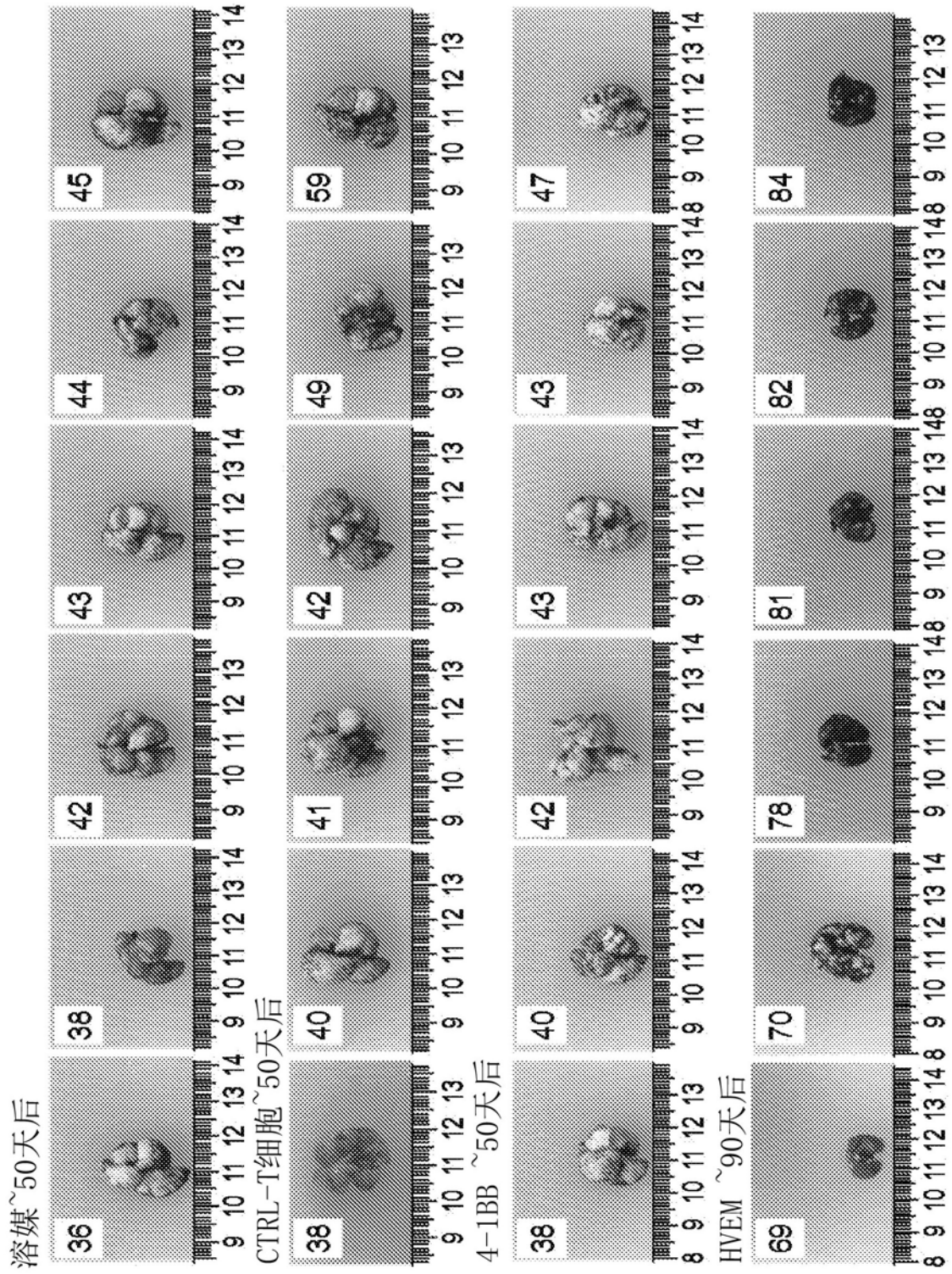


图16

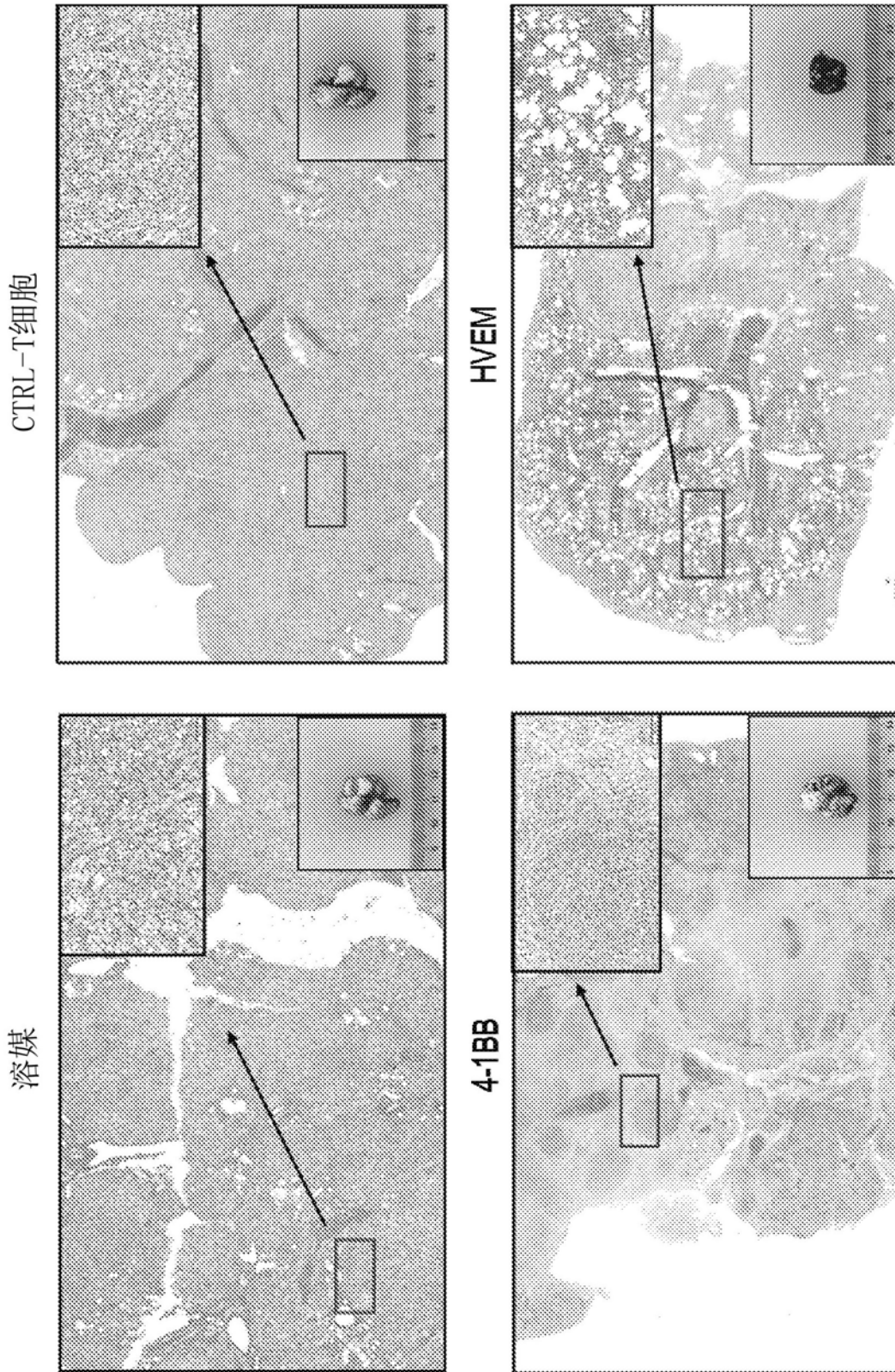


图17

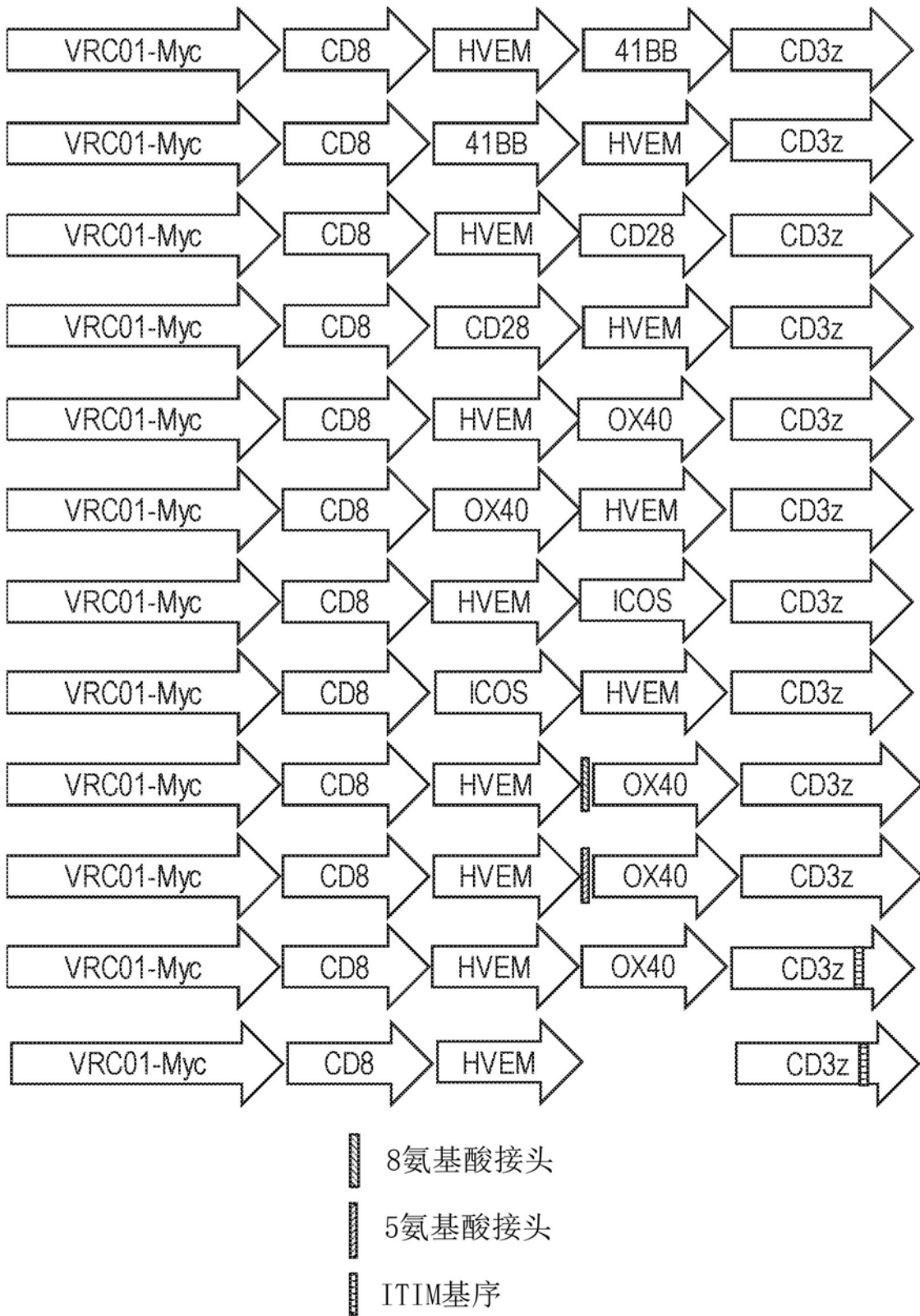


图18