



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111433354 A

(43)申请公布日 2020.07.17

(21)申请号 201880075793.X

(22)申请日 2018.09.26

(30)优先权数据

62/563,336 2017.09.26 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.05.22

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/052799 2018.09.26

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/067504 EN 2019.04.04

(71)申请人 朗沃德大学

地址 美国弗吉尼亚州

(72)发明人 A·巴伯

(74)专利代理机构 上海华诚知识产权代理有限公司 31300

代理人 李晓

(51)Int.Cl.

C12N 5/0783(2006.01)

C07K 14/705(2006.01)

C07K 14/725(2006.01)

C07K 16/28(2006.01)

C07K 16/30(2006.01)

权利要求书1页 说明书21页

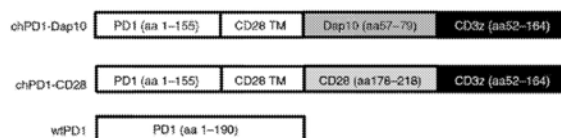
序列表5页 附图9页

(54)发明名称

作为免疫疗法的PD1特异性嵌合抗原受体

(57)摘要

本文提供了通过T细胞的过继细胞转移用于治疗PDL1和/或PDL2阳性癌症的方法和组合物,所述T细胞经基因工程改造以表达PD1特异性嵌合抗原受体。可包含共刺激结构域(例如Dap10)以增强功效。



1. 一种嵌合抗原受体 (CAR) 多肽, 所述CAR多肽包含:
胞外结合结构域, 所述胞外结合结构域对程序性死亡配体1 (PDL1) 和程序性死亡配体2 (PDL2) 中的至少一个具有特异性;
跨膜结构域; 以及
胞质信号域。
2. 根据权利要求1所述的CAR多肽, 其中, 所述胞外结构域是程序性死亡受体1 (PD1) 胞外结构域。
3. 根据权利要求1或2所述的CAR多肽, 其中, 所述胞质信号域是CD3 δ 胞质结构域。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的CAR多肽, 其中, 所述CAR多肽还包含DNAX活化蛋白10 (Dap10) 共刺激结构域。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的CAR多肽, 其中, 所述多肽包含与SEQ ID NO:3具有至少90%同一性的序列。
6. 一种载体, 其中, 所述载体包含权利要求1至5中任一项所述的CAR多肽。
7. T淋巴细胞, 其中, 所述T淋巴细胞经基因修饰以表达权利要求1至5中任一项所述的CAR。
8. 一种用于过继细胞转移的组合物, 其中, 所述组合物包含权利要求7所述的T淋巴细胞和药学上可接受的载体。
9. 根据权利要求8所述的组合物, 其中, 所述组合物还包含一种以上化学治疗剂或放射治疗剂。
10. 一种治疗有需要的受试者的癌症的方法, 其中, 所述癌症的细胞表达PDL1和PDL2中的至少一种, 所述方法包括:
向受试者施用治疗有效量的用于过继细胞转移的组合物, 所述组合物包含经基因修饰以表达CAR的T淋巴细胞, 所述CAR包含:
胞外结合结构域, 所述胞外结合结构域对程序性死亡配体1 (PDL1) 和程序性死亡配体2 (PDL2) 中的至少一个具有特异性;
跨膜结构域; 以及
胞质信号域。
11. 根据权利要求10所述的方法, 其中, 所述胞外结构域是程序性死亡受体1 (PD1) 胞外结构域。
12. 根据权利要求10或11所述的方法, 其中, 所述胞质信号域是CD3 δ 胞质结构域。
13. 根据权利要求10至12中任一项所述的方法, 其中, 所述CAR还包含Dap10共刺激结构域。
14. 根据权利要求10至13中任一项所述的方法, 其中, 所述CAR包含与SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的序列。
15. 根据权利要求10至14中任一项所述的方法, 其中, 所述癌症选自: 淋巴瘤、黑色素瘤、骨髓瘤、胰腺癌、乳腺癌和卵巢癌。
16. 根据权利要求10至15中任一项所述的方法, 其中, 所述方法还包括施用一种以上化学治疗剂或放射治疗剂的步骤。

作为免疫疗法的PD1特异性嵌合抗原受体

技术领域

[0001] 本公开总体上涉及靶向PD1配体的嵌合抗原受体,以及表达该受体的基因工程T细胞,用于治疗癌症。特别地,嵌合抗原受体可包含共刺激结构域(例如Dap10),以增强治疗效果。

背景技术

[0002] 用嵌合抗原受体(CAR)工程化T细胞是提高T细胞抗肿瘤功效的一种方法。CAR用于重定向T细胞特异性,并允许MHC非依赖性识别肿瘤相关抗原,从而增强肿瘤靶向性。使用CAR修饰的T细胞进行癌症治疗的优势包括能够识别多种肿瘤类型、克服肿瘤用于逃避免疫检测的机制以及增强T细胞功能。但是,T细胞上抑制性受体表达的上调和肿瘤微环境中抑制性配体的表达限制了CAR T细胞应答和疗效。

[0003] 在癌症患者中,免疫应答的负调节通常在T细胞的持续活化后发生。一种在抑制抗肿瘤T细胞应答中起重要作用的此类抑制性受体是程序性死亡受体1(PD1,CD279),它在T细胞活化后不久被上调,并抑制T细胞受体和CD28信号下游的多个T细胞功能,包括增殖、细胞因子产生和细胞毒性。PD1受体与两种不同的配体结合,即程序性死亡配体1(PDL1,B7-H1,CD274)和程序性死亡配体2(PDL2,B7-DC,CD273),二者在许多类型的实体瘤和血液系统恶性肿瘤(包括淋巴瘤)中均过表达。需要靶向PD1配体的有效疗法。

发明内容

[0004] 本公开提供了靶向PD1配体并适用于过继性T细胞疗法的CAR。

[0005] 本公开的一个方面提供了一种CAR多肽,包含:对程序性死亡配体1(PDL1)和程序性死亡配体2(PDL2)中的至少一个具有特异性的胞外结合结构域;跨膜结构域;以及胞质信号域(cytoplasmic signaling domain)。在一些实施方式中,胞外结构域是程序性死亡受体1(PD1)胞外结构域(extracellular domain)。在一些实施方式中,胞质信号域是CD3 δ 胞质结构域。在一些实施方式中,CAR多肽还包含DNAX活化蛋白10(Dap10)共刺激结构域。在一些实施方式中,该多肽包含与SEQ ID NO:3具有至少90%同一性的序列。

[0006] 本公开的另一方面提供了经基因修饰以表达本公开的CAR的T淋巴细胞。

[0007] 本公开的另一方面提供了用于过继细胞转移的组合物,该组合物包含本公开的T淋巴细胞和药学上可接受的载体。在一些实施方式中,该组合物还包含一种以上化学治疗剂或放射治疗剂。

[0008] 本公开的另一方面提供了治疗有此需要的受试者的癌症的方法,其中,所述癌症的细胞表达PDL1和PDL2中的至少一种,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本公开的用于过继细胞转移的组合物。在一些实施方式中,所述癌症选自:淋巴瘤、黑色素瘤、骨髓瘤、胰腺癌、乳腺癌和卵巢癌。

附图说明

[0009] 图1A-F:嵌合程序性死亡1(chPD1) T细胞以PD1依赖性方式裂解表达程序性死亡配体(PDL)的RMA细胞。(a) chPD1-Dap10、chPD1-CD28和野生型(wt) PD1受体的代表性载体图。(b) 未转导的鼠效应T细胞、wtPD1 T细胞或chPD1(黑色) T细胞用抗PD1或同种型对照抗体染色,或(c) 鼠chPD1 T细胞用抗PDL1或抗PDL2或同种型对照抗体染色,使用流式细胞术进行分析。(d) RMA细胞用抗PDL1或抗PDL2或同种型对照抗体染色,使用流式细胞仪进行分析。(e) 以指定的效应细胞:靶细胞(E:T)比率(1:1,5:1,25:1),将未转导T细胞(正方形)、wtPD1 T细胞(三角形)或chPD1 T细胞(圆形)与RMA细胞用作效应细胞,使用乳酸脱氢酶测定法检测细胞裂解。与未转导的T细胞或wtPD1 T细胞相比,在所有E:T比率下,chPD1 T细胞均具有显著更高的特异性裂解(* $P < 0.0001$)。(f) 为了显示PD1受体依赖性,在与肿瘤细胞一起孵育之前,将wtPD1 T细胞或chPD1 T细胞与抗PD1抗体(空心符号)或对照IgG抗体(实心符号)一起孵育。在所有比率下,阻断PD1受体与对照组相比均显著降低了chPD1 T细胞针对肿瘤细胞的细胞毒性(* $P < 0.001$)。数据表示为平均值 $\pm$ SD且代表至少三个实验。

[0010] 图2A-B:RMA细胞与嵌合程序性死亡1(chPD1) T细胞一起培养使得分泌促炎性细胞因子。与RMA细胞一起培养或用培养基培养未转导的T细胞、表达野生型(wt) PD1的T细胞(黑色)或表达chPD1的T细胞(空心)。24小时后,通过ELISA测定无细胞上清液中的(a) 促炎性细胞因子干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和白细胞介素-2(IL-2)以及(b) 抗炎性细胞因子IL-10的分泌。与RMPD细胞一起培养时,与wtPD1 T细胞相比,chPD1 T细胞产生更高水平的促炎性细胞因子和降低水平的抗炎性细胞因子(* $P < 0.001$)。数据表示为平均值 $\pm$ SD且代表至少三个实验。

[0011] 图3A-D:用嵌合程序性死亡1(chPD1) T细胞进行治疗使得RMA-GFP荷瘤小鼠(RMA-GFP-bearing mice)的肿瘤负荷减少且存活率增加。在第0天,将RMA-GFP细胞(2×10^6) 静脉内(i.v.)注入B6小鼠。在(a) 2天、(b) 5天后,用单剂PBS或野生型(wt) PD1 T细胞(黑色)或chPD1 T细胞(空心) (5×10^6) 对小鼠进行静脉内(i.v.)治疗,或者在第5天和第8天后,用两剂wtPD1 T细胞或chPD1 T细胞对小鼠进行静脉内治疗。注射RMA-GFP细胞13天后处死小鼠,通过计算脾脏和淋巴结中RMA-GFP细胞的数量确定肿瘤负荷($n=6$)。(d) 在第5天和第12天后,用两剂wtPD1 T细胞或chPD1 T细胞对小鼠进行静脉内治疗,确定小鼠的存活率($n=7$)。与wtPD1 T细胞或PBS相比,chPD1 T细胞显著减少了RMA肿瘤负荷并提高了存活率(* $P < 0.01$)。数据表示为平均值 $\pm$ SD且代表两个独立实验。

[0012] 图4A-C:与chPD1-CD28 T细胞相比,嵌合程序性死亡1(chPD1)-Dap10 T细胞分泌升高水平的促炎性细胞因子和降低水平的抗炎性细胞因子。表达野生型(wt) PD1的T细胞(黑色)、表达chPD1-Dap10的T细胞(空心)或表达chPD1-CD28的T细胞与RMA细胞一起培养或用培养基培养。24小时后,通过ELISA或LEGENDplex分析测定无细胞上清液中(a) 细胞因子和(b) 趋化因子的分泌。当与RMA细胞一起培养时,与wtPD1 T细胞或chPD1-CD28 T细胞相比,chPD1-Dap10 T细胞产生更高水平的促炎性细胞因子和降低水平的抗炎性细胞因子(* $P < 0.01$)。(c) 以指定的效应细胞:靶细胞(E:T)比率(1:1,5:1,25:1),将wtPD1 T细胞(三角形)、chPD1-Dap10 T细胞(圆形)或chPD1-CD28 T细胞(菱形)与RMA细胞一起用作效应细胞,使用乳酸脱氢酶测定法测定细胞裂解。数据表示为平均值 $\pm$ SD且代表至少三个实验。

[0013] 图5A-B:包含Dap10共刺激结构域可在嵌合程序性死亡1(chPD1) T细胞中诱导中枢

记忆表型。表达野生型 (wt) PD1 的 T 细胞 (黑色)、表达 chPD1-Dap10 的 T 细胞 (空心) 或表达 chPD1-CD28 的 T 细胞与 RMA 细胞一起培养或用培养基培养。24 小时后, (a) 通过 RT-PCR 检测控制效应 (细胞) 分化和中枢记忆 (细胞) 分化的基因的表达, 或 (b) 通过流式细胞术检测细胞表面标志物的表达。与在培养基中培养相比, 用 RMA 细胞刺激可改变基因或细胞表面标志物的表达 (* $P < 0.01$)。数据表示为平均值 $\pm$ SD 且代表至少两个实验。

[0014] 图 6A-C: 与用 chPD1-CD28 T 细胞治疗相比, 用嵌合程序性死亡 1 (chPD1)-Dap10 T 细胞治疗使得更大地减轻肿瘤负荷并增加 RMA-GFP 荷瘤小鼠存活。在第 0 天, 将 RMA-GFP 细胞 (2×10^6) 静脉内 (i.v.) 注入 B6 小鼠。在第 5 天和第 8 天后, 用两剂野生型 (wt) PD1 T 细胞 (黑色)、chPD1-Dap10 T 细胞 (空心) 或 chPD1-CD28 T 细胞 (5×10^6) 对小鼠进行静脉内治疗。(a) 注射 RMA-GFP 细胞 13 天后处死小鼠, 通过计算脾脏和淋巴结中 RMA-GFP 细胞的数量确定肿瘤负荷 ($n=6$)。(b) 确定小鼠的存活率 ($n=6$)。与 wtPD1 T 细胞相比, chPD1-CD28 T 细胞显著减少了 RMA 肿瘤负荷并提高了存活率 (* $P < 0.01$)。与 chPD1-CD28 T 细胞相比, chPD1-Dap10 T 细胞显著降低了 RMA 肿瘤负荷并提高了存活率 (* $P < 0.01$)。(c) 在注射肿瘤细胞后 5 天, 用 5×10^6 Ly5.1⁺chPD1-Dap10 T 细胞 (空心) 或 chPD1-CD28 T 细胞对 RMA 荷瘤小鼠进行静脉内治疗。在 T 细胞注射后的各个时间点分离脾脏和淋巴结细胞, 计算 Ly5.1⁺CD3⁺ 细胞的百分比 ($n=4$)。与 chPD1-CD28 T 细胞相比, chPD1-Dap10 T 细胞在体内的持久性增加 (* $P < 0.01$)。数据表示为平均值 $\pm$ SD 且代表两个独立实验。

具体实施方式

[0015] 利用宿主免疫系统对抗癌症的免疫疗法为癌症的治疗提供了重要的选择。T 细胞通过靶向并消除患病细胞来保护个体免受疾病。可分离出肿瘤特异性 T 细胞, 然后在体外活化和扩增, 然后重新注入患者体内以介导癌症消退, 这一过程称为过继性 T 细胞疗法。

[0016] 本文提供了靶向 PD1 配体 (即, 靶向 PDL1 或 PDL2 中的至少一种) 的 CAR。嵌合 PD1 受体 (chPD1) 多肽可包含: 对 PDL1 和 PDL2 中的至少一种具有特异性的胞外结合结构域; 跨膜结构域; 以及胞质信号域。

[0017] 如本文所用, 术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换使用, 并且指具有通过肽键共价连接的氨基酸残基的化合物。蛋白质或肽必须包含至少两个氨基酸, 对蛋白质或肽序列可包含的最大氨基酸数量没有限制。多肽包括具有通过肽键彼此连接的两个以上氨基酸的任何肽或蛋白质。如本文所用, 该术语指短链 (其在本领域中通常也被称为肽、寡肽和寡聚体) 和长链 (其在本领域中通常被称为蛋白质, 其有很多类型)。

[0018] 例如, “多肽”包括生物活性片段、基本上同源的多肽、寡肽、同源二聚体 (homodimer)、异源二聚体 (heterodimer)、多肽的变体、经修饰的多肽、衍生物、类似物、融合蛋白等。多肽包括天然肽、重组肽、合成肽或它们的组合。

[0019] 对 PDL1 和 PDL2 中的至少一个具有特异性 (即, 靶向、识别或结合) 的细胞外结合域可为 PD1 (CD279) 受体的胞外结构域。PD1 受体是发现于细胞 (例如 T 淋巴细胞) 表面的蛋白质, 在调节免疫系统对个体的自身细胞的应答方面起作用。在人类中, PD1 蛋白由 PDCD1 基因编码。SEQ ID NO: 1 提供了 PD1 的代表性氨基酸序列。在一些实施方式中, 该结构域包含 PD1 的氨基酸 1-155 或由 PD1 的氨基酸 1-155 组成。

[0020] 跨膜结构域包括跨细胞膜的疏水性多肽。特别地, 跨膜结构域从细胞膜的一侧 (细

胞外)一直延伸到细胞膜的另一侧(细胞内或细胞质)。跨膜结构域可为 α 螺旋或 β 桶或它们的组合的形式。跨膜结构域可包括具有多个跨膜区段的多起源(polytopic)蛋白,各个跨膜区段 α -螺旋、 β 折叠或它们的组合。

[0021] 在一个实施方式中,使用与CAR中的结构域之一天然相关的跨膜结构域。在另一个实施方式中,可通过氨基酸取代来选择或修饰跨膜结构域,以避免此类结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合,以使与受体复合物的其他成员的相互作用最小化。

[0022] 例如,跨膜结构域包括T细胞受体 α 链或 β 链、CD3 δ 链、CD28、CD3、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、ICOS、CD154、它们的功能衍生物以及它们的组合的跨膜结构域。

[0023] 人工设计的跨膜结构域是主要包含疏水残基(例如亮氨酸和缬氨酸)的多肽。在一个实施方式中,在合成跨膜结构域的各个末端发现苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体(triplet)。

[0024] 在胞外配体结合结构域与靶标结合后,CAR的胞质信号域可能负责细胞内信号转导,从而活化或抑制免疫细胞和免疫应答。换言之,信号转导结构域(signal transducing domain)可能负责表达CAR的免疫细胞的至少一种正常效应功能的活化或失活。因此,术语“胞质信号域”指转导效应信号功能信号并指导细胞执行专门功能的蛋白质部分。用于本公开的CAR的信号转导结构域的实例可为:T细胞受体和协同受体(co-receptor)的细胞质序列(它们协同作用以在抗原受体结合后启动信号转导),以及这些序列的任何衍生物或变体,以及具有相同功能的任何合成序列。细胞质信号序列可包含信号基序(signaling motif),这些基序被称为免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM,immunoreceptor tyrosine-based activation motif)。ITAM是定义明确的信号基序,发现于作为syk/zap70类酪氨酸激酶的结合位点的多种受体的胞质区尾段。作为非限制性实例,ITAM的实例可包括衍生自TCR δ 、FcR γ 、FcR β 、FcR ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的那些。在一些实施方式中,CAR的信号转导结构域包含CD3 δ 信号域。在一些实施方式中,信号转导结构域包含CD3 δ 的氨基酸52-164或由CD3 δ 的氨基酸52-164组成。

[0025] 在一些实施方式中,PD1的抑制域(inhibitory domain)被胞质信号域的活化域(activating domain)取代,从而将负性PD1信号转换为T细胞的活化信号。这应降低PD1的免疫抑制作用,而在与PD1配体相互作用时诱导抗肿瘤免疫力。

[0026] 在CAR T细胞中包含共刺激结构域可增强T细胞功能,包括细胞因子分泌、分化、细胞毒性、增殖和存活。与本发明的CAR相容的共刺激受体包括但不限于:来自Dap10、CD28、OX40、ICOS、4-1BB(CD137)、NKG2C和NKG2D的功能域以及活性片段、功能衍生物以及它们的组合。如实施例1所示,CD28和Dap10活化许多相似的通路,包括磷脂酰肌醇-3激酶、AKT/蛋白激酶B和丝裂原活化蛋白激酶。然而,CD28和Dap10刺激似乎对效应T细胞具有独特的作用,包括信号转导通路(包括 β -连环蛋白、核因子- κ B和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR))的差别激活,使得不同的细胞因子分泌和T细胞分化。具体地,与CD28相比,通过Dap10的共刺激诱导CD8 T细胞记忆分化和促炎性细胞因子分泌(但不诱导抗炎性细胞因子分泌),二者似乎均为成功CAR T细胞治疗的优选特征。因此,在一些实施方式中,在CAR中包含Dap10共刺激结构域可能优于CD28。

[0027] 本文所公开多肽的功能保守的衍生物或变体可由可在多肽(和编码该多肽的DNA

序列)的结构内进行的修饰和改变产生,且仍获得具有所需特性的功能分子(例如杀肿瘤和/或免疫刺激作用)。功能保守的衍生物也可由保留其功能的多肽片段组成。

[0028] 因此,功能保守的衍生物或变体是蛋白质中给定氨基酸残基已被改变而不改变多肽的整体构象和功能的那些,包括但不限于用具有相似性质(例如,极性、氢键电势、酸性、碱性、疏水性、芳香性等)的氨基酸替代氨基酸。除保守氨基酸之外,蛋白质中的氨基酸可能有所不同,因此,功能相似的任何两种蛋白质根据比对方案(例如聚类方法)确定的蛋白质或氨基酸序列相似性百分比可能有所不同(例如可能为70%至99%),其中,相似性基于MEGALIGN算法。功能保守的衍生物还包括与所比较的天然蛋白或亲本蛋白具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%或更多氨基酸同一性(由BLAST或FASTA算法确定)且与所比较的天然蛋白或亲本蛋白具有相同或基本相似的特性或功能的多肽。例如,某些氨基酸可代替蛋白质结构中其他氨基酸而不会明显丧失杀肿瘤作用。由于决定蛋白质的生物学功能活性的是蛋白质的相互作用能力和性质,因此可在蛋白质序列中(当然也可在DNA编码序列中)进行某些氨基酸取代,但仍可获得具有类似特性的蛋白质。因此预期,可对本公开的多肽序列或编码所述多肽的相应DNA序列进行各种改变,而不会明显丧失其生物学活性。所述杀肿瘤活性和免疫刺激活性可通过本领域众所周知的各种技术(例如实施例中所提及的测定法)来评估。

[0029] 如上所述,保守氨基酸取代因此通常基于氨基酸侧链取代基的相对相似性,例如它们的疏水性、亲水性、电荷、大小等。考虑了上述几个特征的示例性取代是本领域技术人员众所周知的并包括:精氨酸和赖氨酸;谷氨酸和天冬氨酸;丝氨酸和苏氨酸;谷氨酰胺和天冬酰胺;以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。

[0030] 可将本发明的多核苷酸克隆到载体中。“载体”是包括分离的多核苷酸并且可用于将分离的多核苷酸递送至细胞内部的物质的组成。许多载体是本领域已知的,包括但不限于:线性多核苷酸、与离子化合物或两性分子化合物相关的多核苷酸、质粒、噬菌粒、粘粒和病毒。病毒包括噬菌体、噬菌体衍生物。因此,术语“载体”包括自主复制的质粒或病毒。该术语也应解释为包括有助于将核酸转移到细胞中的非质粒化合物和非病毒化合物,例如聚赖氨酸化合物、脂质体等。病毒载体的实例包括但不限于:腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体等。

[0031] 在一个实施方式中,载体包括克隆载体、表达载体、复制载体、探针产生载体、整合载体和测序载体。在一个实施方式中,载体是病毒载体。在一个实施方式中,病毒载体是逆转录病毒载体或慢病毒载体。在一个实施方式中,病毒转导工程化的细胞以表达多核苷酸序列。

[0032] 可用作载体的病毒包括但不限于:逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒和慢病毒。通常,合适的载体包含在至少一种生物中起作用的复制起点、启动子序列、方便的限制性内切核酸酶位点和一种以上选择标记。

[0033] 例如,嵌合抗原受体多核苷酸的表达可使用表达载体来实现,所述表达载体包括但不限于SFFV或人延伸因子(EF) 11a启动子、CAG启动子(具有CMV增强子的鸡 β -肌动蛋白启动子)、人延伸因子(EF) 1a启动子中的至少一种。所使用的强度较低/表达较低的启动子的实例可包括但不限于:猿猴病毒40(SV40)早期启动子、巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子、泛素C(UBC)启动子和磷酸甘油酸激酶1(PGK)启动子或它们的一部分。例如,嵌合抗原受体

的诱导型表达可使用四环素反应性启动子来实现,所述启动子包括但不限于:TRE3GV (Tet 反应元件,包括所有世代,优选第三代)、诱导型启动子(Clontech Laboratories,山景城,加利福尼亚州)或它们的一部分或它们的组合。

[0034] 将基因引入细胞并在细胞中表达的方法是本领域已知的。在表达载体的情况下,载体可通过本领域中任何方法容易地引入宿主细胞,例如哺乳动物细胞、细菌细胞、酵母细胞或昆虫细胞。例如,可通过物理方法、化学方法或生物方法将表达载体转移到宿主细胞。

[0035] 过继性T细胞疗法涉及从个体血液中分离T细胞,将那些T细胞基因工程化以表达本发明的CAR。然后,离体培养工程化的T细胞,输回到个体中。然后,CAR T细胞可结合癌细胞上的靶向抗原,杀死癌细胞。

[0036] 本公开的实施方式提供了工程化的细胞(例如T细胞/T淋巴细胞),其表达本文所述的CAR多肽或本文所述的编码该CAR多肽的多核苷酸。“工程化的细胞”指通过添加、修饰基因序列、DNA序列或RNA序列或蛋白质或多肽而修饰、转化或操纵的任何生物的任何细胞。本公开的分离的细胞、宿主细胞和基因工程化的细胞包括分离的免疫细胞,例如含有编码CAR或CAR复合物的DNA序列或RNA序列并在细胞表面表达嵌合受体的NK细胞和T细胞。例如,分离的宿主细胞和工程化的细胞可用于增强NK细胞活性或T淋巴细胞活性、治疗癌症和治疗感染性疾病。

[0037] 可以使用能够表达和/或能够将如本文公开的嵌合抗原受体多肽整合到其膜中的任何细胞。在一个实施方式中,工程化的细胞包括免疫调节细胞。

[0038] 免疫调节细胞包括T细胞(或T淋巴细胞),例如CD4⁺ T细胞(辅助T细胞)、CD8⁺ T细胞(细胞毒性T细胞,CTL)和记忆T细胞或记忆干细胞T细胞。在另一个实施方式中,T细胞包括天然杀伤性T细胞(NK T细胞)。

[0039] 本公开的一个实施方式提供了治疗有此需要的受试者的癌症的方法,其中,所述癌症的细胞表达PDL1和PDL2中的至少一种,该方法包括向受试者施用治疗有效量的组合物,所述组合物包含经基因工程改造以表达本公开的CAR的T细胞。

[0040] 取决于细胞的性质,可以多种方式将细胞引入宿主生物体(例如哺乳动物)。在具体实施方式中,可将细胞引入肿瘤部位,尽管在替代实施方式中,细胞移向(hone)癌症或者可被修饰以移向癌症。所用细胞数量将取决于多种情况、引入目的、细胞寿命、所用方案(例如施用次数)、细胞增殖能力、重组构建体的稳定性等。所述细胞可以以分散剂(dispersion)的形式施用,通常在目标部位或在目标部位附近注射。细胞可在生理可接受的培养基中。

[0041] 在特定实施方式中,例如,施用途径可为静脉内、动脉内、腹膜内或皮下。多个施用可采用相同途径或采用不同途径。在一些实施方式中,多个剂量(例如2剂、3剂、4剂、5剂或更多剂)在一段时间(例如2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天或更多天)内施用。

[0042] 输注CAR T细胞后的不利影响(adverse effect)之一是引发免疫活化,称为细胞因子释放综合征(CRS)。在一些实施方式中,使用不诱导选自IFN- γ 、GM-CSF、IL-10和IL-6的一种以上细胞因子升高的共刺激结构域。在一些实施方式中,将诸如托珠单抗(tocilizumab) (IL-6拮抗剂)的CRS治疗剂与本发明的CAR同时或相继施用。在一些实施方式中,放射疗法和/或化学疗法与本发明的CAR同时或相继施用。

[0043] 如本文所用,术语“癌症”、“过度增殖”和“肿瘤”指具有自主生长能力的细胞,即以

快速增殖的细胞生长为特征的非正常状态或状况。过度增殖和肿瘤的疾病状态可分类为病理性的(即表征或构成疾病状态)或者可分类为非病理性的(即偏离正常状态但不与疾病状态相关)。该术语旨在包括所有类型的癌性生长或致癌过程、转移性组织或恶性转化的细胞、组织或器官,而与组织病理学类型或侵入性阶段无关。

[0044] 术语“癌症转移”具有本领域中的一般含义,指肿瘤从一个器官或部位扩散到另一不相邻器官或部位。

[0045] 使用本发明的疗法可以靶向表达PDL1和PDL2中的至少一种的任何癌症或转移性癌症,所述癌症或转移性癌症包括但不限于:淋巴瘤、黑色素瘤、骨髓瘤、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、脑癌、肝癌、肾癌、肺癌、脾癌、胆囊癌、肛门癌、睾丸癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、骨癌和结肠癌。

[0046] 术语“受试者”和“患者”在本文中可互换使用,指患有癌症或疑似患有癌症、具有患癌风险或易患癌症的动物(例如哺乳动物)。这些术语可指人类。该术语还包括饲养用于食物、运动或作为宠物的家畜,包括马、牛、绵羊、家禽、鱼、猪、猫、狗和动物园动物、山羊、猿类(例如大猩猩或黑猩猩)和啮齿类动物(例如大鼠和小鼠)。典型受试者包括易患癌症、患有癌症或曾患有癌症的人。

[0047] 如本文所用,术语“治疗”或“处理”指逆转、减轻、抑制该术语所适用的病症或病状的进展,或改善此种病症或病状的一种以上症状。例如,本公开的治疗可减慢所述癌症的生长、减少所述癌症中的肿瘤细胞的数量、减少肿瘤负荷或消除所述癌症。

[0048] “治疗有效量”指以适用于任何药物治疗的合理的受益/风险比治疗癌症(例如,限制肿瘤生长或减慢或阻断肿瘤转移)的分子的足够量。然而,应理解,本公开的分子和组合物的每日总用量将由主治医师在合理的医学判断范围内决定。任何特定受试者的具体治疗有效剂量水平将取决于多种因素,包括:被治疗的疾病和疾病的严重程度;所使用的特定多肽的活性;所使用的具体组合物;受试者的年龄、体重、总体健康状况、性别和饮食;施用时间、施用途径和所使用的特定多肽的排泄速率;治疗的持续时间;与所使用的特定多肽组合或同时使用的药物;以及例如医学领域众所周知的因素。例如,以低于实现所需治疗效果所需剂量的水平开始化合物的剂量并逐渐增加剂量直至实现所需效果,这在本领域技术范围内。

[0049] 本文所述的T细胞疗法可与标准治疗方法(例如放射疗法、激素疗法)组合。在一些实施方式中,本公开的T淋巴细胞可与一种以上化学治疗剂或放射治疗剂顺序地或同时地施用。

[0050] 在一个实施方式中,所述化学治疗剂或放射治疗剂是用作抗癌剂的治疗活性剂。例如,所述抗癌剂包括但不限于:氟达拉滨(fludarabine)、吉西他滨(gemcitabine)、卡培他滨(capecitabine)、甲氨蝶呤(methotrexate)、巯基嘌呤(mercaptopurine)、硫鸟嘌呤(thioguanine)、羟基脲(hydroxyurea)、阿糖胞苷(cytarabine)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、异环磷酰胺(ifosfamide)、亚硝基脲(nitrosourea)、铂配合物类(例如顺铂、卡铂和奥沙利铂)、丝裂霉素(mitomycin)、达卡巴嗪(dacarbazine)、丙卡巴肼(procarbazine)、鬼臼毒素类(例如依托泊苷和替尼泊苷)、喜树碱类(camptothecins)(例如伊立替康(irinotecan)和托泊替康(topotecan))、博来霉素(bleomycin)、多柔比星(doxorubicin)、伊达比星(idarubicin)、柔红霉素(daunorubicin)、放线菌素D

(dactinomycin)、普卡霉素(plicamycin)、米托蒽醌(mitoxantrone)、L-天冬酰胺酶、多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、5-氟尿嘧啶、5-氟尿嘧啶联合亚叶酸(leucovorin)、紫杉烷类(taxanes)(例如多西他赛(docetaxel)和紫杉醇(paclitaxel))、左旋咪唑(levamisole)、雌莫司汀(estramustine)、氮芥(nitrogen mustard)、亚硝基脲类(例如卡莫司汀(carmustine)和洛莫斯汀(lomustine))、长春花生物碱类(vinca alkaloids)(例如长春花碱(vinblastine)、长春新碱(vincristine)、长春地辛(vindesine)和长春瑞滨(vinorelbine))、甲磺酸伊马替尼(imatinib mesylate)、六甲嘧胺(hexamethylmelamine)、激酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、ATP酶抑制剂、酪氨酸磷酸化抑制剂、蛋白酶抑制剂、除莠霉素A(herbimycin A)、染料木素(genistein)、erbstatin和薰草菌素A(lavendustin A)。在一个实施方式中,其他抗癌剂可选自但不限于以下种类的药剂中的一种或组合:烷化剂类、植物生物碱类、DNA拓扑异构酶抑制剂类、抗叶酸剂类、嘧啶类似物类、嘌呤类似物类、DNA抗代谢物类、紫杉烷类、鬼臼毒素类、激素治疗剂类、类维生素A、光敏剂类或光动力治疗剂类、血管生成抑制剂类、抗有丝分裂剂类、异戊二烯化抑制剂类、细胞周期抑制剂类、放线菌素、博来霉素、蒽环类、MDR抑制剂类和Ca²⁺ATP酶抑制剂类。

[0051] 其他抗癌剂可选自但不限于:细胞因子、趋化因子、生长因子、生长抑制因子、激素、可溶性受体、诱饵受体、单克隆抗体或多克隆抗体、单特异性抗体、双特异性抗体或多特异性抗体、单体(monobody)、多体(polybody)。

[0052] 其他治疗活性剂可为镇吐剂(antiemetic agent)。合适的镇吐剂包括但不限于:甲氧氯普胺(metoclopramide)、多潘立酮(domperidone)、普鲁氯嗪(prochlorperazine)、异丙嗪(promethazine)、氯丙嗪(chlorpromazine)、曲美苄胺(trimethobenzamide)、昂丹司琼(ondansetron)、格拉司琼(granisetron)、羟嗪(hydroxyzine)、乙酰亮氨酸(acetylleucine)、阿立必利(alizapride)、阿扎司琼(azasetron)、苯喹胺(benzquinamide)、乙苯海拉明(bietanautine)、溴必利(bromopride)、布克利嗪(buclicine)、氯波必利(clebopride)、赛克利嗪(cyclizine)、乘晕宁(dimenhydrinate)、地芬尼多(diphenidol)、多拉司琼(dolasetron)、敏克静(meclizine)、美沙拉妥(methallatal)、美托哌丙嗪(metopimazine)、大麻隆(nabilone)、匹哌马嗪(pipamazine)、东莨菪碱(scopolamine)、舒必利(sulpiride)、四氢大麻酚(tetrahydrocannabinol)、硫乙拉嗪(thiethylperazine)、硫丙拉嗪(thiopropazine)和托烷司琼(tropisetron)。在一个优选实施方式中,镇吐剂是格拉司琼或昂丹司琼。

[0053] 在另一个实施方式中,其他治疗活性剂可为阿片类(opioid)或非阿片类(non-opioid)镇痛剂。合适的阿片类镇痛剂包括但不限于:吗啡、海洛因、氢化吗啡酮、氢可酮(hydrocodone)、羟吗啡酮、羟考酮(oxycodone)、美托酮(metopon)、阿朴吗啡(apomorphine)、丁丙诺啡(buprenorphine)、度冷丁(meperidine)、洛哌丁胺(loperamide)、依索庚嗪(ethoheptazine)、倍他罗定(betaprodine)、地芬诺酯(diphenoxylate)、芬太尼(fentanyl)、舒芬太尼(sufentanil)、阿芬太尼(alfentanil)、瑞芬太尼(remifentanil)、羟甲左吗喃(levorphanol)、右美沙芬(dextromethorphan)、安替比林(phenazone)、pemazocine、环佐辛(cyclazocine)、美沙酮(methadone)、异美沙酮(isomethadone)和丙氧芬(propoxyphene)。合适的非阿片类镇痛剂包括但不限于:阿司匹林、塞来昔布(celecoxib)、罗非昔布(rofecoxib)、双氯芬酸(diclofenac)、二氟尼柳

(diflunisal)、依托度酸(etodolac)、非诺洛芬(fenoprofen)、氟比洛芬(flurbiprofen)、布洛芬(ibuprofen)酮洛芬(ketoprofen)、吲哚美辛(indomethacin)、酮咯酸(ketorolac)、甲氯芬那酸(meclofenamate)、甲灭酸(mefenamic acid)、萘丁美酮(nabumetone)、萘普生(naproxen)、吡罗昔康(piroxicam)和舒林酸(sulindac)。

[0054] 在另一个实施方式中,其他治疗活性剂可为抗焦虑剂。合适的抗焦虑剂包括但不限于:丁螺环酮(buspirone)和苯二氮类(benzodiazepines)(例如安定(diazepam)、劳拉西泮(lorazepam)、奥沙西泮(oxazepam)、氟氮卓(clorazepate)、氯硝西泮(clonazepam)、利眠宁(chlordiazepoxide)和阿普唑仑(alprazolam))。

[0055] 如本文中所使用的,术语“放射治疗剂”旨在指本领域技术人员已知的可有效地治疗或改善癌症的任何放射治疗剂,而无限制。例如,放射治疗剂可为诸如在近距放射疗法(brachytherapy)或放射性核素疗法中施用的那些。此类方法可可选地进一步包括施用一种以上其他癌症疗法,例如但不限于化学疗法和/或另一种放射疗法。

[0056] 本公开的另一方面涉及药物组合物,该药物组合物包含本公开的T淋巴细胞和药学上可接受的载体。“药学上”或“药学上可接受”指当适当地施用于受试者(例如人)时,不会产生不利反应、过敏反应或其他不良反应的分子实体和组合物。药学上可接受的载体或赋形剂指任何类型的无毒的固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、包囊材料或制剂助剂。

[0057] 为维持稳定性,本公开的T淋巴细胞可包含在生理盐水、磷酸盐缓冲盐水(PBS),培养基等中。

[0058] 在一些实施方式中,药物组合物包含载体,该载体对于能被注射的制剂而言是药学上可接受的。特别地,这些载体可为等渗无菌盐溶液(磷酸二氢钠或磷酸氢二钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙或氯化镁等或此类盐的混合物)或干燥(特别是冷冻干燥)的组合物(根据情况,通过加入无菌水或生理盐水可配制成可注射溶液)。

[0059] 适用于注射用途的药物形式包括:无菌水溶液或分散剂;制剂,包括芝麻油、花生油或丙二醇水溶液;以及无菌粉剂,用于临时制备无菌注射液或分散剂。在所有情况下,该(药物)形式必须为无菌且必须以易于注射的程度流动。它必须在生产和储存条件下稳定,并且必须以防止微生物(例如细菌和真菌)污染的形式进行保存。

[0060] 包含本公开的化合物(作为游离碱或药理学上可接受的盐)的溶液可在水中适当地与表面活性剂(例如羟丙基纤维素)混合而制备。分散剂也可在甘油、液体聚乙二醇及其混合物中和在油中制备。在常规的储存和使用条件下,这些制剂含有防腐剂以防止微生物的生长。

[0061] 药学上可接受的盐包括:酸加成盐(用蛋白质的游离氨基形成),该酸加成盐用无机酸(例如盐酸或磷酸)或有机酸(例如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等)形成。用游离羧基形成的盐也可衍生自无机碱(例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁)和有机碱(例如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等)。

[0062] 载体也可作为溶剂或分散介质,其包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、它们的合适的混合物和植物油。例如,可通过使用包衣(例如卵磷脂)、通过维持所需的粒度(在分散剂的情况下)和通过使用表面活性剂,来维持适当的流动性。可通过各种抗菌剂和抗真菌剂(例如,对羟基苯甲酸酯类(paraben)、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等)来预防微生物的作用。在许多情况下,优选包含等渗剂(例如糖类或氯化钠)。可通过

在组合物中使用延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸铝和明胶),来实现可注射组合物的延长吸收。

[0063] 无菌注射溶液通过如下方式制备:根据需要将所需量的T淋巴细胞以及上文所列其他几种成分掺入适当的溶剂中,然后过滤灭菌。通常,通过将各种灭菌活性成分掺入无菌载体中来制备分散剂,所述无菌载体包含基本分散介质和来自上文所列那些的所需其他成分。在用无菌粉剂制备无菌注射溶液的情况下,优选的制备方法为真空干燥技术和冷冻干燥技术,该技术由预先无菌过滤的活性成分和任何其他所需成分的溶液产生活性成分和任何其他所需成分的粉末。

[0064] 还考虑制备更多或高度浓缩的溶液用于直接注射,其中,设想使用DMSO作为溶剂会导致极快的渗透,从而将高浓度的活性剂递送至小的肿瘤区域。

[0065] 配制后,将以与剂型相容的方式且以治疗有效量来施用溶液。制剂易于以多种剂型(例如上述可注射溶液的类型)施用,但也可使用药物释放胶囊等。

[0066] 对于水溶液形式的肠胃外施用,例如,视需要,溶液应适当地缓冲,且首先用足够的盐水或葡萄糖使液体稀释剂等渗。这些特定的水溶液特别适合于静脉内施用、肌肉施用、皮下施用和腹膜内施用。就此而言,根据本公开,可使用的无菌水性介质将是本领域技术人员已知的。根据治疗对象的状况,必然会发生一些剂量变化。在任何情况下,负责施用的人员将确定用于个体受试者的适当剂量。

[0067] 除配制用于肠胃外施用(例如静脉内注射或肌肉注射)的本公开的组合物之外,其他药学上可接受的形式包括:例如,用于口服施用的片剂或其他固体;脂质体制剂;定时释放胶囊;以及目前使用的任何其他形式。

[0068] 试剂盒中可包含本文所述的任何组合物。在一个非限制性实例中,试剂盒中可包含一种以上用于细胞疗法的细胞(该细胞具有本公开的重组表达的CAR)和/或用于产生一种以上用于细胞疗法的细胞的试剂。试剂盒组分提供在适当的容器中。在具体实施方式中,试剂盒包含重组工程试剂,例如载体、引物、酶(限制酶、连接酶、聚合酶等)、缓冲液、核苷酸等。

[0069] 试剂盒的某些组分可包装在水性介质中或以冻干形包装。通常,试剂盒的容器装置将包括至少一个小瓶(vial)、试管、烧瓶、瓶(bottle)、注射器或其他容器装置,组分可(优选适当等分地)放置在这些容器装置中。如果试剂盒中存在一种以上组分,则试剂盒通常还将包含可分别放入其他组分的第二容器、第三容器或其他另外的容器。但是,小瓶中可包含各种组分的组合。通常,本公开的试剂盒还将包括以紧密封闭的方式容纳组分的装置,以用于商售。此类容器可包括将所需的小瓶保留在其中的注模塑料容器或吹模塑料容器。

[0070] 应理解,本发明不限于所描述的特定实施方式,因为这些实施方式当然可进行改变。还应理解,本文中使用的术语仅出于描述特定实施方式的目的,而并非旨在进行限制,因为本发明的范围将仅由所附权利要求书限制。

[0071] 本说明书中引用的所有出版物和专利均通过引用并入本文(就如同各个单独的出版物或专利均被具体地和单独地指出通过引用并入本文一样),并通过引用并入本文以公开和描述与引用出版物相关的方法和/或材料。任何出版物的引用均针对其在申请日之前的公开,并不应被解释为承认本发明无权凭借在先发明而早于此出版物。此外,提供的公布日期可能与实际公布日期有所不同,实际公布日期可能需要独立进行确认。

[0072] 在提供值的范围的情况下,应理解为,除非上下文另有明确规定,否则在该范围的上限和下限之间每个中间值(直至下限单位的十分之一)和该规定范围内的任何其他规定值或中间值均涵盖在本发明内。在遵守所述范围内任何明确排除的限制的情况下,这些较小范围的上限和下限可独立地涵盖在较小范围内并且也涵盖在本发明内。在所述范围包括一个或两个极限的情况下,除那些所包括的极限中的一个或两个之外的范围也涵盖于在本发明内。

[0073] 应注意,如本文和所附权利要求书中所使用的,单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数指示物,除非上下文另外明确指出。还应注意,权利要求书可被撰写为排除任何可选要素。因此,该陈述旨在作为与权利要求要素的叙述相结合的排他性术语(例如“只”、“仅”等)的使用或“否定”限制的使用的引用基础。

[0074] 在阅读本公开后,对本领域技术人员而言将显而易见的是,本文所述和所示的每个单独的实施方式具有分立的组分和特征,在不脱离本发明的范围或精神的情况下,这些组分和特征可容易地从该实施方式中分离出来或与其他几个实施方式中的任何特征进行组合。任何所述方法可按照所述事件顺序进行或按照逻辑上可能的任何其他顺序进行。

[0075] 实施例

[0076] 通过以下非限制性实施例进一步描述本发明,所述非限制性实施例进一步举例说明本发明,不旨在也不应解释为限制本发明的范围。

[0077] 实施例1:表达嵌合PD1-Dap10受体的鼠T细胞的过继转移作为淋巴瘤的免疫疗法。

[0078] 概要

[0079] T细胞的过继转移是一种有前途的癌症疗法,嵌合抗原受体的表达可增强肿瘤识别能力和T细胞效应功能。本文提供了鼠嵌合PD1受体(chPD1),其包含与CD3 δ 的胞质结构域融合的PD1胞外结构域。此外,嵌合抗原受体疗法使用各种共刺激结构域来增强功效。因此,比较在chPD1受体中包含Dap10或CD28共刺激结构域,以确定哪个结构域在鼠淋巴瘤模型中诱导最佳抗肿瘤免疫力。chPD1 T细胞分泌促炎性细胞因子并裂解RMA淋巴瘤细胞。chPD1 T细胞的过继转移显著减少了已建立的肿瘤,并导致淋巴瘤小鼠的无瘤生存(tumor-free survival)。比较含有Dap10结构域或CD28结构域的chPD1受体时,两种受体均诱导促炎性细胞因子的分泌;然而,chPD1-CD28 T细胞也分泌抗炎性细胞因子,而chPD1-Dap10 T细胞却不分泌抗炎性细胞因子。此外,与诱导效应记忆表型的chPD1-CD28相比,chPD1-Dap10诱导中枢记忆T细胞表型。与chPD1-CD28 T细胞相比,chPD1-Dap10 T细胞还具有更高的体内持久性和抗肿瘤功效。因此,chPD1 T细胞的过继转移代表了淋巴瘤的一种新型疗法,在嵌合抗原受体中包含Dap10共刺激结构域可诱导抗肿瘤疗法中偏好的细胞因子分泌情况和T细胞分化表型。

[0080] 材料和方法

[0081] wtPD1和chPD1构建体的产生

[0082] CD3 δ 、PD1、CD28和Dap10的鼠cDNA克隆购自OriGene(Rockville,MD)。chPD1-Dap10受体和chPD1-CD28受体使用Phusion®高保真DNA聚合酶(New England BioLabs,Ipswich,MA)通过重叠PCR而产生。为产生chPD1-Dap10受体,将鼠PD1受体的胞外结构域[氨基酸(aa) 1-155]在框架内融合到CD28的跨膜区(aa 141-177)以及Dap10的胞质结构域(aa 57-79)和CD3 δ 的胞质结构域(aa 52-164)。为产生chPD1-CD28受体,将鼠PD1受体的胞外结构域(aa

1-155) 在框架内融合到CD28的跨膜结构域(aa 141-177) 和胞质结构域(aa 178-218) 以及CD3 δ 的胞质结构域(aa 52-164)。为产生野生型PD1 (wtPD1) 受体, 使用了PD1受体(aa 1-190) 的胞外结构域和跨膜结构域。使用质粒和构建体的NotI和EcoRI消化物, 将所有构建体克隆到pQCXIN逆转录病毒表达载体中, 随后将所有构建体连接到载体中。根据生产商的说明(Clontech, Mountain View, CA), 使用EcoPack 2-293细胞系表达亲嗜性逆转录病毒上清液。Xfect聚合物用于将EcoPack 2-293细胞与来自RetroX-Q Vector Set (Clontech) 的pEco包膜载体和pQCXIN逆转录病毒表达载体共转染。在转导原代鼠T细胞之前, 使用RetroX浓缩器浓缩亲嗜逆转录病毒上清液。

[0083] wtPD1受体和chPD1受体在T细胞中的表达

[0084] 雄性C57BL/6 (B6) 和B6.SJL-Ptprc^a (Ly5.1同类系 (congenic)) 小鼠购自Taconic Biosciences (纽约州哈德森)。在每个实验开始时, 小鼠为8周龄至12周龄。所有动物工作均按照朗沃德大学机构动物使用和护理委员会 (Longwood University's Institutional Animal Use and Care Committee) 的规定进行且获得其批准。用伴刀豆球蛋白A (1 μ g/mL) 活化来自B6或Ly5.1同类系小鼠的脾细胞18小时。通过在8 μ g/mL聚凝胺和25U/mL重组人白细胞介素-2 (IL-2) 存在下以1000g离心1小时来转导T细胞 (0.5×10^6 个细胞/mL), 随后培养T细胞6小时, 然后去除逆转录病毒上清液, 用新鲜的完全RPMI-1640培养基代替, 该完全RPMI-1640培养基中补充有10%热灭活的胎牛血清、100U/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素、1mM丙酮酸盐、10mM HEPES、0.1mM非必需氨基酸和50 μ M 2-巯基乙醇。感染两天之后, 用含有G418 (0.5mg/mL) 和25U/mL重组人IL-2的完全RPMI-1640培养基筛选T细胞另外3天。使用Histopaque-1083 (Sigma, 圣路易斯, 密苏里州) 分离活细胞, 在无G418的情况下扩增另外2天, 然后进行功能分析。

[0085] RT-PCR

[0086] 根据制造商的说明 (Promega, 麦迪逊, 威斯康星州), 使用SV总RNA分离试剂盒从RMA细胞或T细胞中分离总RNA。使用随机六聚体引物 (Fermentas, 沃尔瑟姆, 马萨诸塞州), 使用RevertAid First Strand cDNA合成试剂盒产生cDNA。作为RT-PCR的模板, 使用100ng cDNA来检测PDL1、PDL2和 β -actin (β -肌动蛋白) 的基因表达。使用Maxima SYBRGreen qPCR Master Mix (Thermo Scientific, 沃尔瑟姆, 马萨诸塞州) 和基因特异性引物:

β -actin F 5'-GTGTGATGGTGGGAATGGGTCAGA-3' (SEQ ID NO: 4),

[0087] β -actin R 5'-TACGACCAGAGGCATACAGGGACA-3' (SEQ ID NO: 5),

PDL1 F 5'-GCTCCAAAGGACTTGTACGTG-3' (SEQ ID NO: 6),

PDL1 R 5'-TGATCTGAAGGGCAGCATTTC-3' (SEQ ID NO: 7),

[0088] PDL2 F 5'-CTGCCGATACTGAACCTGAGC-3' (SEQ ID NO: 8),

PDL2 R 5'-GCGGTCAAAATCGCACTC-3' (SEQ ID NO: 9)。

[0089] 上文描述了T细胞分化基因T-bet、BLIMP1、Eomes和BCL6的基因特异性引物。引物购自Integrated DNATechnologies (科勒维尔, 爱荷华州)。

[0090] 流式细胞术

[0091] 使用流式细胞术检测RMA细胞和T细胞上PDL1和PDL2的表达以及T细胞上PD1的表

达。用别藻蓝蛋白标记的抗PDL1抗体(克隆10F.9G2)、藻红蛋白标记的抗PDL2抗体(克隆TY25)或藻红蛋白标记的抗PD1抗体(克隆RMP1-30)或同种型对照对细胞进行染色。对于T细胞分化研究,wtPD1 T细胞或chPD1 T细胞(2×10^5 个细胞/孔)用RMA细胞(2×10^5 个细胞/孔)刺激24小时,通过流式细胞术分析细胞表面标志物的表达。用藻红蛋白偶联的抗CD127抗体(克隆A7R34)或抗KLRG1抗体(克隆2F1/KLRG1)和别藻蓝蛋白偶联的抗CD62L抗体(克隆MEL-14)或同种型对照对细胞进行染色。为分析T细胞表面表达,用CFSE标记RMA细胞,然后进行孵育,门分选出(gate out)CFSE⁺细胞。所有抗体均购自BioLegend(圣地亚哥,加利福尼亚州)。使用Accuri C6流式细胞仪检测细胞荧光。

[0092] chPD1 T细胞产生的细胞因子和细胞毒性

[0093] 在圆底96孔板中,将chPD1 T细胞、wtPD1 T细胞和未转导的T细胞(10^5)与RMA细胞(10^5)一起培养或用培养基培养。24小时后,根据制造商的说明(BioLegend)通过ELISA检测无细胞上清液中干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、IL-2和IL-10的存在。根据制造商的说明,还使用小鼠T辅助细胞因子和小鼠促炎性趋化因子LEGENDplex测定法(BioLegend)检测无细胞上清液中细胞因子和趋化因子的分泌。

[0094] 为测定肿瘤细胞的裂解,在各种效应细胞:靶细胞比率(E:T为25:1、5:1和1:1)下,将chPD1 T细胞、wtPD1 T细胞和未转导的T细胞(10^5)与RMA一起培养。5小时后,根据制造商的说明,使用乳酸脱氢酶细胞毒性测定试剂盒(Pierce,沃尔瑟姆,马萨诸塞州)检测特异性裂解。为阻断PD1受体,在添加靶细胞之前,将T细胞与抗PD1单克隆抗体(克隆RMP1-14,20 μ g/mL,低内毒素,无叠氮化物的LEAF纯化,BioLegend)或同种型对照单克隆抗体在37 $^{\circ}$ C下预孵育2小时。

[0095] 用转基因T细胞对小鼠进行治疗

[0096] RMA和RMA-GFP细胞在完全RPMI-1640中生长。将RMA-GFP细胞(2×10^6)静脉注射到B6小鼠中。对于肿瘤负荷实验,在注射肿瘤2天或5天后给小鼠静脉内施用一剂wtPD1或chPD1修饰的T细胞(5×10^6),或者在注射肿瘤5天和8天后给小鼠静脉内施用两剂T细胞。为测定肿瘤负荷,在注射肿瘤13天后收集脾脏和淋巴结(腋、臂和腹股沟)。机械提取(tease)淋巴组织,用ACK裂解缓冲液(0.15mol/L NH₄Cl,1mmol/L KHCO₃,0.1mmol/L)裂解红细胞。计数细胞,通过流式细胞术确定GFP⁺细胞的百分比。通过用GFP⁺细胞的百分比乘以细胞总数来确定肿瘤细胞的总数。为进行存活研究,在注射肿瘤细胞5天和8天后用wtPD1 T细胞或chPD1 T细胞(5×10^6)对小鼠进行治疗。密切严密监视小鼠的健康,在观察到应激迹象(呼吸困难、拖腿、驼背或毛皮皱褶)时处死小鼠。为分析T细胞存活,在注射肿瘤细胞5天后,用同类系Ly5.1⁺chPD1-Dap10 T细胞或chPD1-CD28 T细胞(5×10^6)静脉处理RMA荷瘤小鼠,在注射T细胞1天、3天、7天、10天、14天或18天后处死小鼠。用FcR阻断剂(block)和小鼠 γ -球蛋白(Jackson ImmunoResearch,西格罗夫,宾夕法尼亚州)孵育脾脏细胞和淋巴结细胞以防止非特异性结合,用藻红蛋白偶联的抗CD3抗体和别藻蓝蛋白偶联的抗CD45.1抗体(克隆A20)对细胞进行染色,通过流式细胞仪分析细胞。

[0097] 统计分析

[0098] 比较多个组时,使用非配对双尾学生t检验或采用事后Tukey检验的方差分析进行统计分析。使用Shapiro-Wilk检验确定数据为正态分布。程序R用于数据的统计分析。所有

实验用至少两组独立的T细胞一式三份地进行, P 值 <0.05 被认为是显著的。对于生存研究, 使用对数秩检验和PRISM软件 (GRAPHPAD软件, 圣地亚哥, 加利福尼亚州) 绘制Kaplan-Meier生存曲线并进行分析。

[0099] 结果

[0100] chPD1 T细胞以PD1依赖性方式分泌促炎性细胞因子并裂解表达PDL的RMA细胞

[0101] 为靶向肿瘤细胞上表达的PD1配体, 通过将PD1受体的胞外区与Dap10共刺激受体的胞内区和CD3 δ 的胞内区融合来产生chPD1受体 (图1a)。还产生wtPD1受体作为对照, 所述wtPD1受体由PD1受体的胞外结构域和跨膜结构域组成。与未转导的活化T细胞相比, PD1受体在细胞表面表达的增加表明chPD1受体和wtPD1受体在活化的鼠T细胞中成功表达 (图1b)。wtPD1 T细胞和chPD1 T细胞均由活化的CD4 $^{+}$ ($\sim 10\%$) 和CD8 $^{+}$ ($\sim 90\%$) T细胞的混合物组成。

[0102] 有时活化的T细胞表达PDL1, 这可能导致chPD1 T细胞相互杀伤⁹。因此, 在chPD1 T细胞上评估PDL1和PDL2的表达。对于所有检测的T细胞批次, 获得的chPD1 T细胞数量与wtPD1 T细胞数量相似。此外, 未在chPD1 T细胞和wtPD1 T细胞上观察到显著的PDL1或PDL2表达 (图1c)。最后, 当仅在培养基中培养wtPD1 T细胞或chPD1 T细胞时, 未观察到显著细胞死亡。这些数据表明chPD1 T细胞不表达显著水平的PDL。

[0103] 为确定鼠淋巴瘤细胞系RMA是否为chPD1 T细胞的潜在靶标, 检测PDL1和PDL2的表达。如通过流式细胞仪测定的, RMA细胞表达细胞表面PDL1和PDL2 (图1d)。还对PD1配体进行RT-PCR, RMA细胞表达PDL1和PDL2的mRNA。chPD1 T细胞裂解的RMA细胞显著多于表达wtPD1受体的T细胞或未转导的效应T细胞 (图1e)。此种裂解取决于PD1受体, 因为在测定之前用阻断的抗PD1抗体孵育T细胞可消除chPD1 T细胞对肿瘤细胞的杀伤作用 (图1f)。

[0104] 除肿瘤细胞裂解之外, T细胞还分泌促炎性细胞因子以增强抗肿瘤免疫力^{15,30}。与未转导的T细胞或wtPD1 T细胞相比, 当与RMA细胞培养时, chPD1 T细胞分泌显著量的促炎性细胞因子IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF和IL-2, 但不分泌抗炎性细胞因子IL-10 (图2)。综上, 这些数据表明RMA细胞表达PD1配体, chPD1受体的表达诱导RMA鼠淋巴瘤细胞系的促炎性细胞因子分泌和裂解。

[0105] chPD1 T细胞治疗使得肿瘤负荷减轻且RMA-GFP荷瘤小鼠存活率增加

[0106] 当将RMA肿瘤细胞静脉内注射到小鼠体内时, RMA肿瘤细胞会运输到脾脏和淋巴结; 因此, 该模型概括了同基因 (syngeneic) 免疫小鼠中人淋巴瘤的特征³¹。因此, 研究了体内使用chPD1 T细胞作为淋巴瘤治疗的潜力。由于PD1的配体也可在健康组织中表达, 首先检测了chPD1 T细胞的安全性。当与从幼稚小鼠中分离的脾细胞、肝细胞或肺细胞一起培养时, chPD1 T细胞不会裂解或分泌IFN- γ 。此外, 注射chPD1 T细胞后, 首次接受试验的小鼠 (naive mice) 未显示出任何不良症状或血清IFN- γ 水平升高, 这表明chPD1 T细胞未靶向健康组织。接下来, 为检测chPD1 T细胞的抗肿瘤功效, 在注射肿瘤细胞2天后, 用单剂量的chPD1 T细胞治疗淋巴瘤荷瘤小鼠, 检测脾脏和淋巴结中的肿瘤负荷 (图3a)。与用PBS或wtPD1 T细胞治疗的小鼠相比, 用chPD1 T细胞治疗的小鼠的RMA肿瘤负荷显著降低。用PBS或wtPD1 T细胞治疗的小鼠的肿瘤负荷无显著差异, 表明wtPD1 T细胞并未降低肿瘤负荷。

[0107] 为检测chPD1 T细胞针对更好建立的肿瘤负荷的体内治疗功效, 在注射肿瘤细胞5天后用wtPD1 T细胞或chPD1 T细胞治疗小鼠。尽管在chPD1 T细胞治疗的小鼠的脾脏和淋

巴结中肿瘤细胞为仍可检测到的较低水平,使用chPD1 T细胞治疗可显著减少这些建立的肿瘤(图3b)。由于先前研究表明多次用CAR T细胞治疗可增强抗肿瘤功效,在注射肿瘤细胞5天和8天后,给荷瘤小鼠注射两剂wtPD1 T细胞或chPD1 T细胞^{3,30-32}。用两剂chPD1 T细胞进行治疗的小鼠的肿瘤细胞的肿瘤水平未检出(图3c)。此外,与用wtPD1 T细胞治疗的小鼠(其在注射肿瘤细胞20天后死于肿瘤)相比,用两剂chPD1 T细胞治疗的小鼠存活率显著提高,且淋巴瘤荷瘤小鼠的长期无瘤生存率为70%(图3d)。这些数据表明,对建立的淋巴瘤进行chPD1 T细胞治疗可提高生存率,多剂chPD1 T细胞使得荷瘤小鼠能长期生存。

[0108] 与chPD1-CD28 T细胞相比,chPD1-Dap10 T细胞分泌的促炎性细胞因子水平升高且分泌的抗炎性细胞因子水平降低

[0109] CAR中包含共刺激结构域可增强T细胞抗肿瘤效应功能,各个共刺激受体对T细胞都有独特的作用^{15,16}。因此,为将包含Dap10结构域与包含另一个共刺激受体进行比较,制作了chPD1受体,它包含CD28的胞质结构域而非Dap10的胞质结构域(图1a)。共刺激受体之间通常存在差异的一种效应功能是诱导分泌细胞因子的能力²⁶⁻²⁸。因此,比较了chPD1-Dap10 T细胞和chPD1-CD28 T细胞分泌促炎性细胞因子和抗炎性细胞因子的能力。尽管IFN- γ 的分泌相似,但chPD1-Dap10 T细胞分泌的促炎性细胞因子TNF- α 、GM-CSF、IL-17和IL-21的量更高。相比之下,chPD1-CD28 T细胞分泌更多的IL-2和T辅助2型/抗炎性细胞因子IL-5和IL-10(图4a)。chPD1-Dap10 T细胞和chPD1-CD28 T细胞还分泌了相似量的调控活化的炎症趋化因子,正常T细胞表达和分泌(RANTES)巨噬细胞炎症蛋白1 α 和炎症蛋白1 β 。尽管两个CAR的细胞因子分泌情况不同,但chPD1-Dap10 T细胞和chPD1-CD28 T细胞在T细胞增殖、存活或肿瘤细胞裂解方面没有显著差异(图4c)。因此,由这些受体诱导的效应功能存在一些显著差异,尤其是在诱导差异性细胞因子分泌方面。

[0110] 包含Dap10共刺激结构域可诱导chPD1 T细胞的中枢记忆表型

[0111] 对CAR T细胞功效重要的另一个特征是T细胞的分化表型。含有CD28的CAR通常会诱导效应记忆细胞表型或效应细胞表型且不能在体内存活很长时间,而诱导中枢记忆表型的CAR通常在体内持续更长的时间且通常具有更强的抗肿瘤功效³。最近,刺激自然杀伤细胞2D族(NKG2D)/Dap10被证明可在鼠效应CD8细胞中诱导中枢记忆表型,因此比较chPD1-Dap10 T细胞和chPD1-CD28 T细胞的分化表型²⁹。当与RMA细胞一起培养时,chPD1-CD28 T细胞增加了参与效应细胞分化的转录因子、T-bet和BLIMP-1的基因表达,而chPD1-Dap10 T细胞增加了支持中枢记忆分化的转录因子、Eomes和BCL-6的表达(图5a)。此外,chPD1-Dap10 T细胞表达与中枢记忆表型相关的细胞表面标志物(CD127^{hi}、CD62L^{hi}、KLRG1^{lo}),而chPD1-CD28 T细胞表达效应记忆表型标志物(CD127^{lo}、CD62L^{lo}、KLRG1^{hi}) (图5b)。这些数据表明chPD1-Dap10和chPD1-CD28受体诱导不同的T细胞表型,这可能有助于改变体内的抗肿瘤功效。

[0112] 与chPD1-CD28 T细胞相比,用chPD1-Dap10 T细胞治疗可更大程度地减少肿瘤负荷并提高RMA-GFP荷瘤小鼠的存活率

[0113] 为比较chPD1-Dap10 T细胞和chPD1-CD28 T细胞的体内治疗效果,荷瘤小鼠用两剂wtPD1 T细胞、chPD1-Dap10 T细胞或chPD1-CD28 T细胞进行治疗。chPD1-Dap10 T细胞或chPD1-CD28 T细胞治疗可显著降低肿瘤负荷,但与chPD1-CD28 T细胞相比,chPD1-Dap10 T细胞更显著地减轻了肿瘤负荷(图6a)。此外,与用chPD1-CD28 T细胞治疗的小鼠(14%小

鼠)相比,用两剂chPD1-Dap10 T细胞治疗可得到更高百分比的小鼠长期无瘤生存率(66%小鼠)(图6b)。增强chPD1-Dap10 T细胞抗肿瘤功效的一个潜在因素是,它们在荷瘤淋巴瘤小鼠的脾脏和淋巴结中的体内持久性增加(图6c)。在注射T细胞14天后,脾脏和淋巴结中仍可通过流式细胞术检测到Ly5.1⁺chPD1-Dap10 T细胞,而在注射T细胞10天后未检测到chPD1-CD28 T细胞。综上所述,这些数据表明,在这种淋巴瘤小鼠模型中,chPD1 T细胞可减少肿瘤负荷并提高生存率,并且与包含CD28的chPD1受体相比,包含Dap10共刺激结构域可提高体内治疗效果。

[0114] 讨论

[0115] 引入CAR极大地提高了T细胞疗法对癌症的潜在疗效。^{1,3,33}然而,T细胞上抑制性受体表达(包括PD1受体的表达)的上调和肿瘤微环境中抑制性配体的表达限制了CAR T细胞的应答和功效^{9,34-36}。本研究表明,新型chPD1受体的表达增强了小鼠淋巴瘤模型中T细胞的抗肿瘤功效。我们的结果表明,chPD1受体转导的T细胞靶向肿瘤上的PDL表达,且与PDL的相互作用诱导活化T细胞而非抑制T细胞。在淋巴瘤荷瘤小鼠中,表达chPD1的T细胞分泌促炎性细胞因子、裂解表达PDL的肿瘤细胞、减轻肿瘤负荷并增加无瘤生存率。此外,与含有CD28共同刺激结构域的chPD1受体相比,含有Dap10共同刺激结构域的chPD1受体在功能上更为优越。

[0116] 正在开发许多保护T细胞免受PD1抑制的新的机制。据显示,除PD1阻断之外,PD1-CD28转换受体(switch receptor)(该受体将PD1的胞质结构域替换为CD28的胞质结构域)的表达可防止T细胞抑制³⁷⁻⁴⁰。当与肿瘤特异性T细胞受体或CAR共同表达时,PD1-CD28转换受体诱导T细胞活化,这由细胞外信号调节的激酶磷酸化、细胞因子分泌、增殖、颗粒酶B表达和抗肿瘤功能增强所表明³⁷⁻⁴⁰。我们研究的主要目标是检测表达CAR的T细胞的功效,所述CAR将PD1胞外结构域直接连接到Dap10或CD28和CD3 δ 的胞内结构域,从而在同一受体内提供活化信号和共刺激信号,并消除在T细胞中共表达两种受体的需要。此外,先前许多PD1转换受体研究均在免疫缺陷小鼠模型中检测了人T细胞的抗肿瘤功效^{37,38}。然而,CAR T细胞往往需要诱导宿主免疫反应才能发挥完整的抗肿瘤功效^{15,30-32}。此外,在免疫缺陷小鼠中测试人CAR T细胞的功效并未研究其他免疫细胞(包括髓样抑制细胞和调节性T细胞)在抗肿瘤免疫应答中的作用。因此,产生鼠类chPD1受体允许研究免疫活性宿主中chPD1 T细胞的功效,并代表了T细胞可能遇到的患者体内的肿瘤微环境。

[0117] CAR中包含共刺激结构域可提高抗肿瘤功效,大多数CAR T细胞临床试验使用的是由CD3 δ 和CD28或4-1BB共刺激结构域组成的第二代CAR^{1,3,4,15,16,33,41}。在具有CD28信号域或4-1BB信号域的CAR T细胞之间观察到的一个区别是,包含4-1BB会诱导中枢记忆表型,这些T细胞在体内持续时间更长且具有更强的抗肿瘤效力,而具有CD28-CAR的T细胞会诱导效应记忆细胞表型或效应细胞表型且不能在体内存活很长的时间^{3,42}。在表达含有4-1BB的CAR的T细胞中,中枢记忆表型的诱导部分是由独特的代谢特征(包括呼吸能力增强、脂肪酸氧化增加和线粒体生物发生增强)所引起,而具有CD28结构域的CAR T细胞诱导效应记忆细胞且具有增强的糖酵解特征⁴²。在最近的研究中,包含Dap10共刺激结构域会诱导优异的体内抗肿瘤免疫力。不受理论的束缚,这可能是由中枢记忆表型的诱导和chPD1-Dap10 T细胞的体内存活率提高所引起。最近,NKG2D/Dap10的刺激据显示会在鼠效应CD8细胞中诱导中枢记忆表型,部分是由于mTOR的差异化活化²⁹。值得注意的是,mTOR会活化T细胞中的特定代谢

途径(例如有氧糖酵解);与CD28共刺激相比,通过NKG2D/Dap10的活化显示出更弱的mTOR活化^{29,43}。因此,mTOR活化的诱导、代谢和细胞分化可能是CAR T细胞成功的关键特征。

[0118] 在临床中,注入CAR T细胞后的不利影响之一是引发免疫活化,称为细胞因子释放综合征^{44,45}。这可能包括输注CAR T细胞后的细胞因子(包括IFN- γ 、GM-CSF、IL-10和IL-6)的升高,细胞因子的急剧增加通常与过继转移细胞的扩增和活化有关⁴⁵。在本研究中,观察到chPD1-Dap10 T细胞和chPD1-CD28 T细胞之间的一个差异是细胞因子的差异表达,其中, chPD1-Dap10 T细胞分泌更多量的促炎性细胞因子TNF- α 、GM-CSF、IL-17和IL-21,而chPD1-CD28 T细胞分泌更多的IL-2和T辅助2型/抗炎药细胞因子IL-5和IL-10(图4)。尽管促炎性细胞因子的分泌对于抗肿瘤免疫是有益,但抗炎性细胞因子的同时分泌会抑制免疫应答,挑战可能在于选择合适的CAR设计以减轻或预防不受控制的炎症而不妨碍T细胞的抗肿瘤功效。接受chPD1 T细胞的荷瘤小鼠在治疗后未显示出任何不利影响且可长期存活;然而,细胞因子释放综合征的严重程度可能取决于输注时的疾病负担⁴⁴⁻⁴⁷。尽管chPD1-Dap10 T细胞的炎性细胞因子高分泌可能有助于其更强的抗肿瘤功效,人们可监测具有更高肿瘤负荷的小鼠的细胞因子释放综合征的症状,以确定促炎性细胞因子的分泌是否会引起破坏性炎症。此外, chPD1-Dap10 T细胞可与防止细胞因子释放综合征的药物(例如IL-6R阻断剂)联合使用。

[0119] 在本研究中,在chPD1受体中包含Dap10共刺激结构域不会诱导IL-10分泌,而在chPD1受体中包含CD28结构域中则会诱导IL-10分泌。已显示,CD28诱导的IL-10分泌通过下调抗原呈递细胞上的MHC分子、CD28配体和细胞间粘附分子-1来改变T细胞抗肿瘤应答⁴⁸。因此,宿主T-细胞应答受到抑制,促炎性细胞因子的分泌受到抑制。此外,一些研究显示,抗炎性细胞因子的分泌不仅抑制CAR T细胞效力,还诱导慢性毒性⁴⁹。因此,不受理论的束缚, chPD1-Dap10 T细胞的IL-10分泌减少可能有助于增强其体内抗肿瘤功效。

[0120] 总之,开发了出一种新型chPD1受体,该受体可在免疫活性小鼠淋巴瘤模型中诱导强烈的抗肿瘤T细胞应答并诱导长期无瘤生存。由包含Dap10共刺激受体而强烈诱导的促炎性细胞因子可能对抗肿瘤治疗有益。

[0121] 实施例2:表达嵌合PD1-Dap10受体的人T细胞作为免疫疗法。

[0122] 肿瘤反应性T细胞的过继转移是针对许多癌症的有前景的抗肿瘤疗法。为增强T细胞对肿瘤的识别,可产生嵌合抗原受体(CAR)(其由与识别肿瘤抗原的受体融合的信号域组成),并在T细胞中表达。如实施例1所示,因为PD1受体的配体在许多癌症类型中表达,PD1是新嵌合抗原受体的靶标。在本研究中,开发了由PD1受体胞外结构域和CD3 δ 活化结构域组成的人嵌合PD1受体(chPD1)。如实施例1中所述, chPD1受体中也包括Dap10共刺激结构域。CAR的核酸序列示于SEQ ID NO:2,氨基酸序列示于SEQ ID NO:3。为确定此种新型CAR是否可靶向多种肿瘤,检测了chPD1 T细胞针对人淋巴瘤、黑色素瘤、骨髓瘤、胰腺癌、乳腺癌和卵巢癌细胞系的抗肿瘤功效。在检测的八种细胞系中,所有细胞系均在其细胞表面表达PD1配体,使其成为chPD1 T细胞的潜在靶标。chPD1受体在人T细胞表面成功表达,并且chPD1 T细胞的表达诱导所有肿瘤细胞系发生显著的肿瘤细胞裂解,并分泌促炎性细胞因子(IFN γ 、TNF α 、IL-2、GM-CSF、IL-17和IL-21)。因此, chPD1-Dap10 T细胞的过继转移代表了一种治疗多种类型癌症的新型治疗策略。

[0123] 参考文献

- [0124] 1 Johnson LA, June CH. Driving gene-engineered T cell immunotherapy of cancer. *Cell Res* 2017;27:38-58.
- [0125] 2 Chmielewski M, Hombach AA, Abken H. Antigen-specific T-cell activation independently of the MHC: chimeric antigen receptor-redirected T cells. *Front Immunol* 2013;4:371.
- [0126] 3 Holzinger A, Barden M, Abken H. The growing world of CAR T cell trials: a systematic review. *Cancer Immunol Immunother* 2016;65:1433-50.
- [0127] 4 Yong CS, Dardalhon V, Devaud C, Taylor N, Darcy PK, Kershaw MH. CAR T-cell therapy of solid tumors. *Immunol Cell Biol* 2017;95:356-63.
- [0128] 5 Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol* 2011;12:492-9.
- [0129] 6 Speiser DE, Ho PC, Verdeil G. Regulatory circuits of T cell function in cancer. *Nat Rev Immunol* 2016;16:599-611.
- [0130] 7 Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE, June CH, Riley JL. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol* 2004;173:945-54.
- [0131] 8 Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, Wunderlich JR, Dudley ME, White DE, Rosenberg SA. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* 2009;114:1537-44.
- [0132] 9 Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012;12:252-64.
- [0133] 10 Kamphorst AO, Ahmed R. Manipulating the PD-1 pathway to improve immunity. *Curr Opin Immunol* 2013;25:381-8.
- [0134] 11 Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD. Immune checkpoint blockade in cancer therapy. *J Clin Oncol* 2015;33:1974-82.
- [0135] 12 Bardhan K, Anagnostou T, Boussiotis VA. The PD1:PD-L1/2 pathway from discovery to clinical implementation. *Front Immunol* 2016;7:550.
- [0136] 13 Xia Y, Jeffrey Medeiros L, Young KH. Signaling pathway and dysregulation of PD1 and its ligands in lymphoid malignancies. *Biochim Biophys Acta* 2016;1865:58-71.
- [0137] 14 Ansell SM. Where do programmed death-1 inhibitors fit in the management of malignant lymphoma? *J Oncol Pract* 2016;12:101-6.
- [0138] 15 Redeker A, Arens R. Improving adoptive T cell therapy: the particular role of T cell costimulation, cytokines, and post-transfer vaccination. *Front Immunol* 2016;7:345.
- [0139] 16 Hombach AA, Holzinger A, Abken H. The weal and woe of costimulation in the adoptive therapy of cancer with chimeric antigen receptor (CAR)-redirected T cells. *Curr Mol Med* 2013;13:1079-88.

- [0140] 17 Savoldo B,Ramos CA,Liu E,Mims MP,Keating MJ,Carrum G et al.CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients.J Clin Invest 2011;121:1822-6.
- [0141] 18 Kowolik CM,Topp MS,Gonzalez S,Pfeiffer T,Olivares S,Gonzalez N et al.CD28 costimulation provided through a CD19 specific chimeric antigen receptor enhances in vivo persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells.Cancer Res 2006;66:10995-1004.
- [0142] 19 Sadelain M,Brentjens R,Riviere I.The basic principles of chimeric antigen receptor design.Cancer Discov 2013;3:388-98.
- [0143] 20 Benitez AC,Dai Z,Mann HH,Reeves RS,Margineantu DH,Gooley TA et al.Expression,signaling proficiency,and stimulatory function of the NKG2D lymphocyte receptor in human cancer cells.Proc Natl Acad Sci USA 2011;108:4081-6.
- [0144] 21 Kim EH,Sullivan JA,Plisch EH,Tejera MM,Jatzek A,Choi KY et al.Signal integration by Akt regulates CD8 T cell effector and memory differentiation.J Immunol 2012;188:4305-14.
- [0145] 22 Colombetti S,Basso V,Mueller DL,Mondino A.Prolonged TCR/CD28 engagement drives IL-2-independent T cell clonal expansion through signaling mediated by the mammalian target of rapamycin.J Immunol 2006;176:2730-8.
- [0146] 23 Upshaw JL,Leibson PJ.NKG2D-mediated activation of cytotoxic lymphocytes:unique signaling pathways and distinct functional outcomes.Semin Immunol 2006;18:167-75.
- [0147] 24 Maasho K,Opoku-Anane J,Marusina AI,Coligan JE,Borrego F.NKG2D is a costimulatory receptor for human naive CD8⁺T cells.J Immunol 2005;174:4480-4.
- [0148] 25 Markiewicz MA,Carayannopoulos LN,Naidenko OV,Matsui K,Burack WR,Wise EL et al.Costimulation through NKG2D enhances murine CD8⁺CTL function: similarities and differences between NKG2D and CD28 costimulation.J Immunol 2005;175:2825-33.
- [0149] 26 Rajasekaran K,Xiong V,Fong L,Gorski J,Malarkannan S.Functional dichotomy between NKG2D and CD28-mediated co-stimulation in human CD8⁺T cells.PLoS ONE 2010;5:e12635.
- [0150] 27 Barber A,Sentman CL.NKG2D receptor regulates human effector T-cell cytokine production.Blood 2011;117:6571-81.
- [0151] 28 Whitman E,Barber A.NKG2D receptor activation of NF- κ B enhances inflammatory cytokine production in murine effector CD8⁺T cells.Mol Immunol 2015;63:268-78.
- [0152] 29 McQueen B,Trace K,Whitman E,Bedsworth T,Barber A.NKG2D and CD28 receptors differentially activate mTOR to alter murine effector CD8⁺T cell differentiation.Immunology 2016;147:305-20.

- [0153] 30 Barber A,Zhang T,Sentman CL.Immunotherapy with chimeric NKG2D receptors leads to long-term tumor-free survival and development of host antitumor immunity in murine ovarian cancer.J Immunol 2008;180:72-8.
- [0154] 31 Zhang T,Barber A,Sentman CL.Chimeric NKG2D modified T cells inhibit systemic T-cell lymphoma growth in a manner involving multiple cytokines and cytotoxic pathways.Cancer Res2007;67:11029-36.
- [0155] 32 Barber A,Sentman CL.Chimeric NKG2D T cells require both T cell-and host-derived cytokine secretion and perforin expression to increase tumor antigen presentation and systemic immunity.J Immunol 2009;183:2365-72.
- [0156] 33 Lim WA,June CH.The principles of engineering immune cells to treat cancer.Cell 2017;168:724-40.
- [0157] 34 Ito T,Ueno T,Clarkson MR,Yuan X,Jurewicz MM,Yagita H et al.Analysis of the role of negative T cell costimulatory pathways in CD4 and CD8 T cell-mediated alloimmune responses in vivo.J Immunol 2005;174:6648-56.
- [0158] 35 Blank C,Mackensen A.Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion:an update on implications for chronic infections and tumor evasion.Cancer Immunol Immunother2007;56:739-45.
- [0159] 36 Morales-Kastresana A,Labiano S,Quetglas JI,Melero I.Better performance of CARs deprived of the PD-1 brake.Clin Cancer Res 2013;19:5546-8.
- [0160] 37 Prosser ME,Brown CE,Shami AF,Forman SJ,Jensen MC.Tumor PD-L1 co-stimulates primary human CD8⁺cytotoxic T cells modified to express a PD1:CD28 chimeric receptor.Mol Immunol2012;51:263-72.
- [0161] 38 Ankri C,Shamalov K,Horovitz-Fried M,Mauer S,Cohen CJ.Human T cells engineered to express a programmed death 1/28 costimulatory retargeting molecule display enhanced antitumor activity.J Immunol 2013;191:4121-9.
- [0162] 39 Liu X,Ranganathan R,Jiang S,Fang C,Sun J,Kim S et al.A chimeric switch-receptor targeting PD1 augments the efficacy of second-generation CAR T cells in advanced solid tumors.Cancer Res2016;76:1578-90.
- [0163] 40 Kobold S,Grassmann S,Chaloupka M,Lampert C,Wenk S,Kraus F et al.Impact of a new fusion receptor on PD-1-mediated immunosuppression in adoptive T cell therapy.J Natl Cancer Inst 2015;107:djv146.
- [0164] 41 Hombach AA,Abken H.Of chimeric antigen receptors and antibodies: OX40 and 41BB costimulation sharpen up T cell-based immunotherapy of cancer.Immunotherapy 2013;5:677-81.
- [0165] 42 Kawalekar OU,O'Connor RS,Fraietta JA,Guo L,McGettigan SE,Posey AD et al.Distinct signaling of coreceptors regulates specific metabolism pathways and impacts memory development in CAR T cells.Immunity 2016;44:380-90.

- [0166] 43 Yang K, Chi H. mTOR and metabolic pathways in T cell quiescence and functional activation. *Semin Immunol* 2012;24:421-8.
- [0167] 44 Lee DW, Gardner R, Porter DL, Louis CU, Ahmed N, Jensen M et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood* 2014;124:188-95.
- [0168] 45 Bonifant CL, Jackson HJ, Brentjens R, Curran KJ. Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Mol Ther Oncolytics* 2016;3:16011.
- [0169] 46 Davila ML, Riviere I, Wang X, Bartido S, Park J, Curran K et al. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med* 2014;6:224ra25.
- [0170] 47 Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, Cui YK, Delbrook C, Feldman SA et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 2015;385:517-28.
- [0171] 48 Hombach AA, Heiders J, Foppe M, Chmielewski M, Abkem H. O_x40 costimulation by a chimeric antigen receptor abrogates CD28 and IL-2 induced IL-10 secretion by redirected CD4 T cells. *Oncoimmunology* 2012;1:458-66.
- [0172] 49 Cheadle EJ, Sheard V, Rothwell DG, Bridgeman JS, Ashton G, Hanson V et al. Differential role of Th1 and Th2 cytokines in autotoxicity driven by CD19-specific second-generation chimeric antigen receptor T cells in a mouse model. *J Immunol* 2014;192:3654-65.
- [0173] 尽管本发明的优选实施方式已描述了本发明,但是本领域技术人员将认识到,本发明可在所附权利要求书的精神和范围内进行变型来实施。

SEQUENCE LISTING

<110> 朗沃德大学 (LONGWOOD UNIVERSITY)

<120> 作为免疫疗法的PD1特异性嵌合抗原受体

<130> 14860001TA

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 288

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

```

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
1           5           10           15
Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
           20           25           30
Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
           35           40           45
Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
           50           55           60
Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
65           70           75           80
Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
           85           90           95
Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
          100          105          110
Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
          115          120          125
Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
          130          135          140
Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
145          150          155          160
Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
          165          170          175
Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
          180          185          190
Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
          195          200          205
Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly

```

210	215	220
Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro		
225	230	235
Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly		240
	245	250
Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg		255
	260	265
Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu		270
275	280	285

<210> 2

<211> 1079

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成嵌合抗原受体

<400> 2

```

agttttccctt ccgctcacct ccgcctgagc agtggagaag gcggcactct ggtggggctg 60
ctccaggcat gcagatccca caggcgccct ggccagtcgt ctgggcggtg ctacaactgg 120
gctggcggcc aggatggttc ttagactccc cagacaggcc ctggaacccc cccaccttct 180
ccccagccct gctcgtggtg accgaagggg acaacgccac cttcacctgc agctttctcca 240
acacatcgga gagcttcgtg ctaaactggt accgcatgag cccagcaac cagacggaca 300
agctggccgc cttccccgag gaccgcagcc agcccgcca ggactgccgc ttccgtgtca 360
cacaactgcc caacgggcgt gacttccaca tgagcgtggt cagggcccg cgcaatgaca 420
gcggcaccta cctctgtggg gccatctccc tggccccaa ggcgagatc aaagagagcc 480
tgcgggcaga gctcagggtg acagagagaa gggcagaagt gcccacagcc caccacagcc 540
cctcaccag gccagccggc cagttccaaa ccctggtgat ctacatctgg gcgcccttgg 600
ccgggacttg tggggtcctt ctctgtcac tggttatcac cctgtgcgca cgcccacgcc 660
gcagccccgc ccaagaagat ggcaaagtct acatcaacat gccaggcagg ggcggtgtca 720
ttctcactgc cttgttcctg agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc 780
agcagggccca gaaccagctc tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg 840
ttttggacaa gagacgtggc cgggacctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc 900
ctcaggaagg cctgtacaat gaactgcaga aagataagat ggcgagggcc tacagtgaga 960
ttgggatgaa aggcgagcgc cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca 1020
gtacagccac caaggacacc tacgacgcc ttcacatgca ggccctgccc cctcgctaa 1079

```

<210> 3

<211> 337

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成嵌合抗原受体

<400> 3

```

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
1           5           10           15
Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
           20           25           30
Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
           35           40           45
Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
           50           55           60
Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
65           70           75           80
Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
           85           90           95
Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
           100          105          110
Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
           115          120          125
Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
           130          135          140
Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
145          150          155          160
Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Ile Tyr Ile Trp Ala Pro
           165          170          175
Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu
           180          185          190
Cys Ala Arg Pro Arg Arg Ser Pro Ala Gln Glu Asp Gly Lys Val Tyr
           195          200          205
Ile Asn Met Pro Gly Arg Gly Gly Val Ile Leu Thr Ala Leu Phe Leu
210          215          220
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
225          230          235          240
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
           245          250          255
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
           260          265          270
Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
           275          280          285
Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu

```

290	295	300
Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr		
305	310	315
Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro		
	325	330
		335

Arg

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成引物

<400> 4

gtgtgatggg ggggaatgggt caga 24

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成引物

<400> 5

tacgaccaga ggcatacagg gaca 24

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成引物

<400> 6

gctccaaagg acttgtacgt g 21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成引物

<400> 7

tgatctgaag ggcagcattt c 21

<210> 8

<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成引物
<400> 8
ctgccgatac tgaacctgag c 21
<210> 9
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成引物
<400> 9
gcggtcaaaa tcgcactc 18

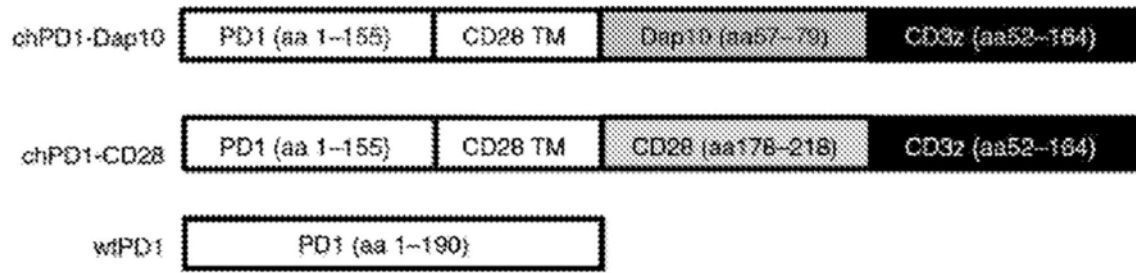


图1A

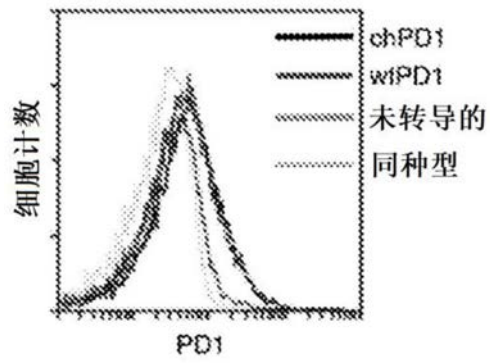


图1B

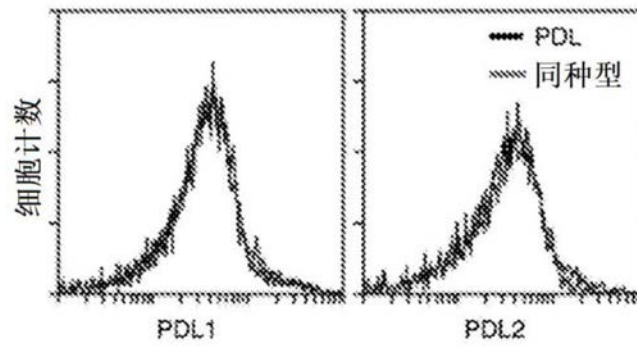


图1C

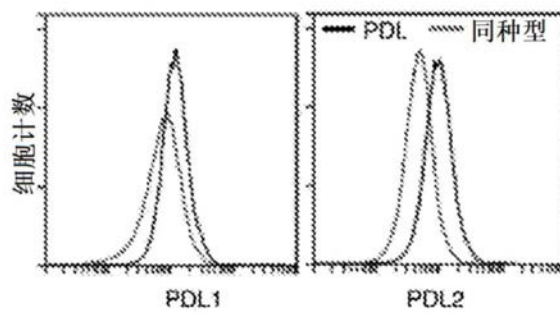


图1D

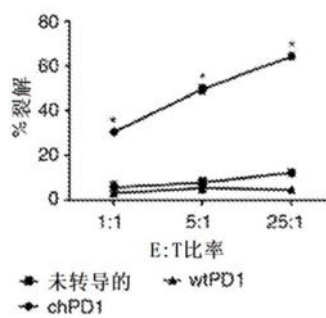


图1E

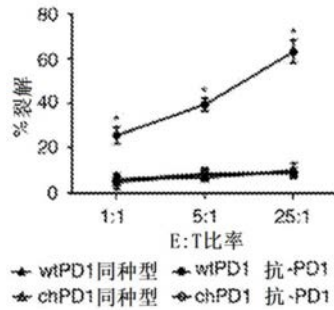


图1F

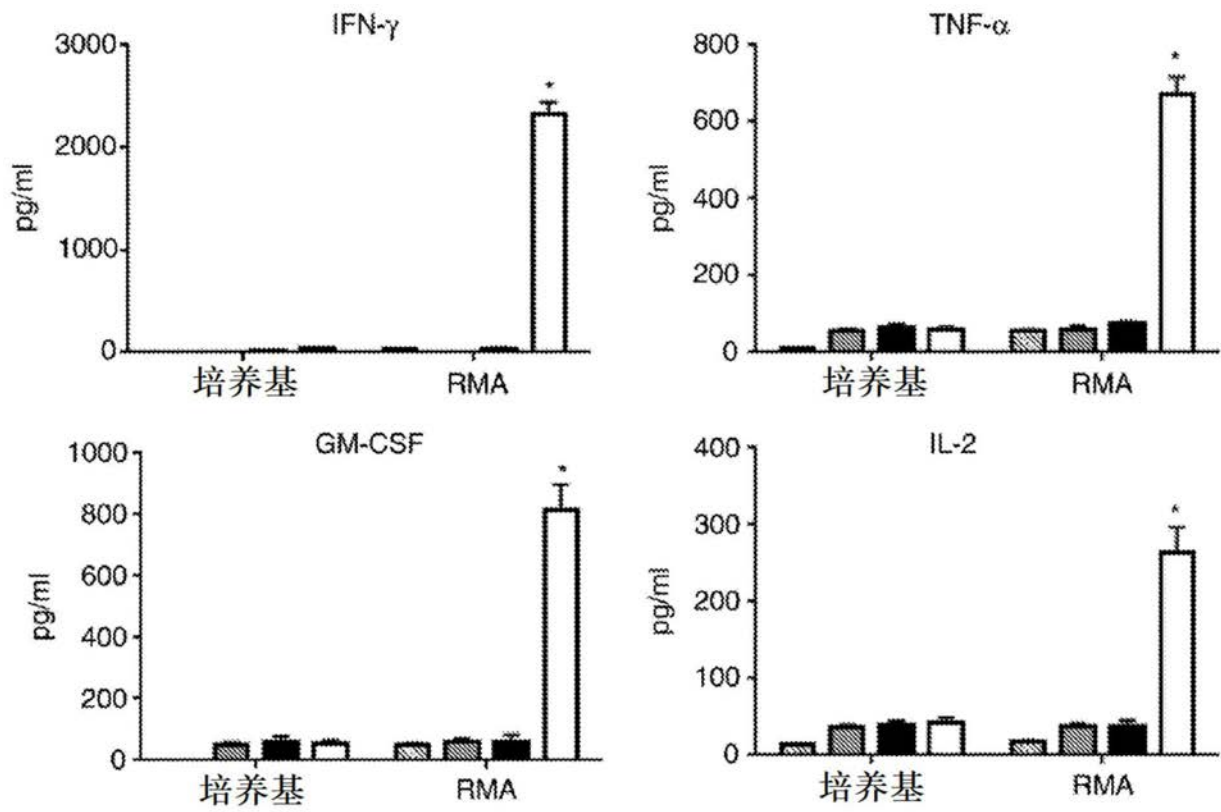


图2A

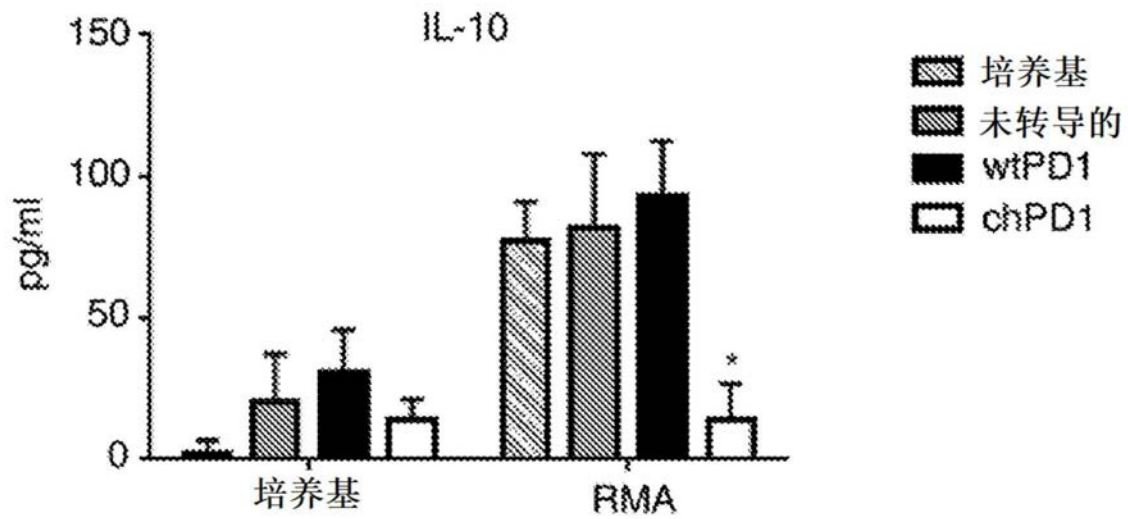


图2B

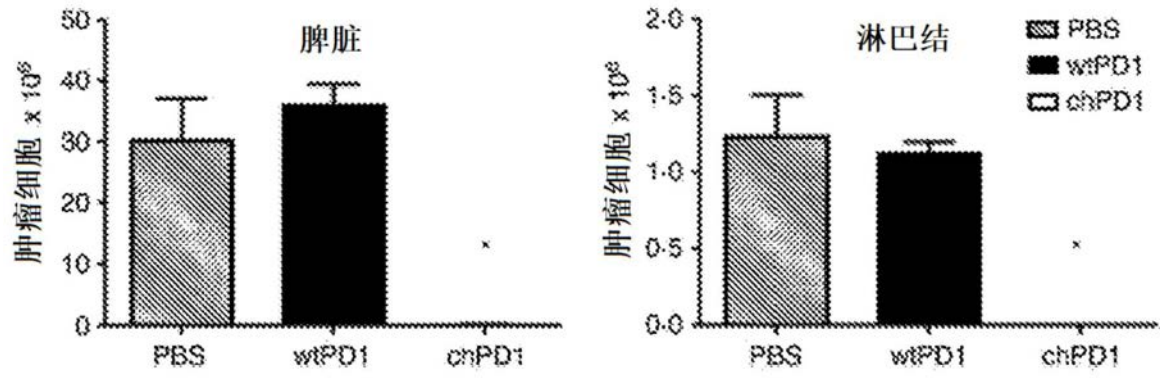


图3A

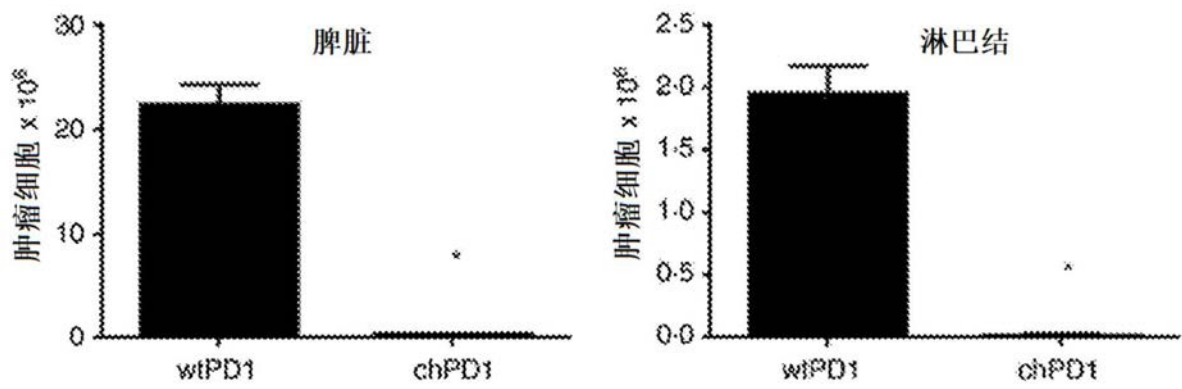


图3B

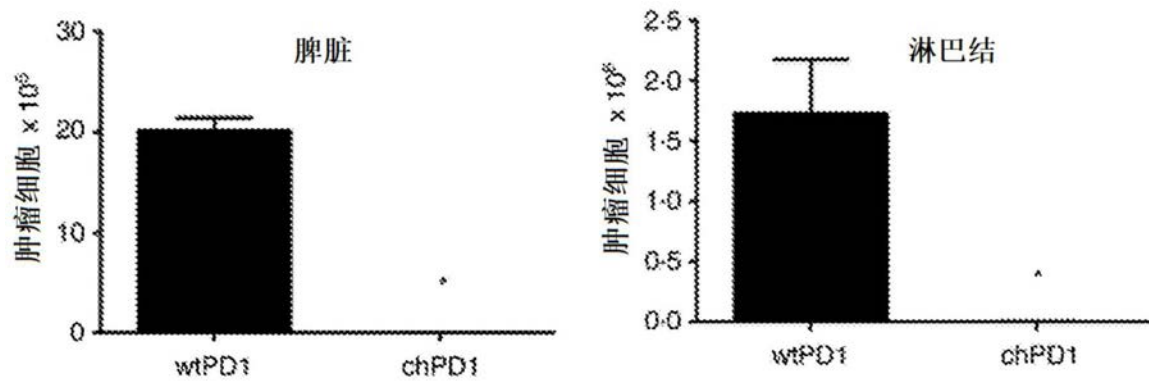


图3C

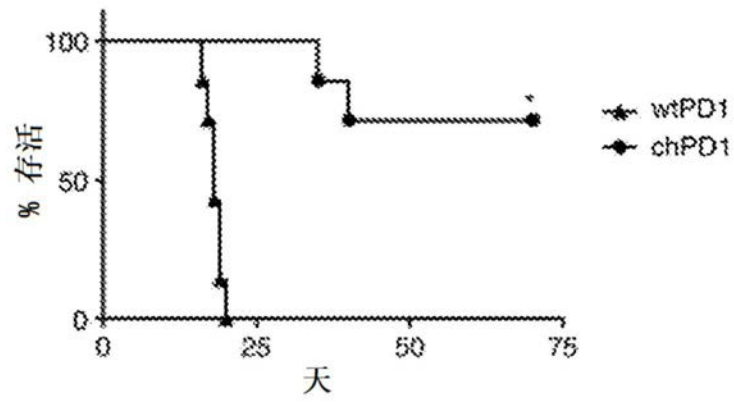


图3D

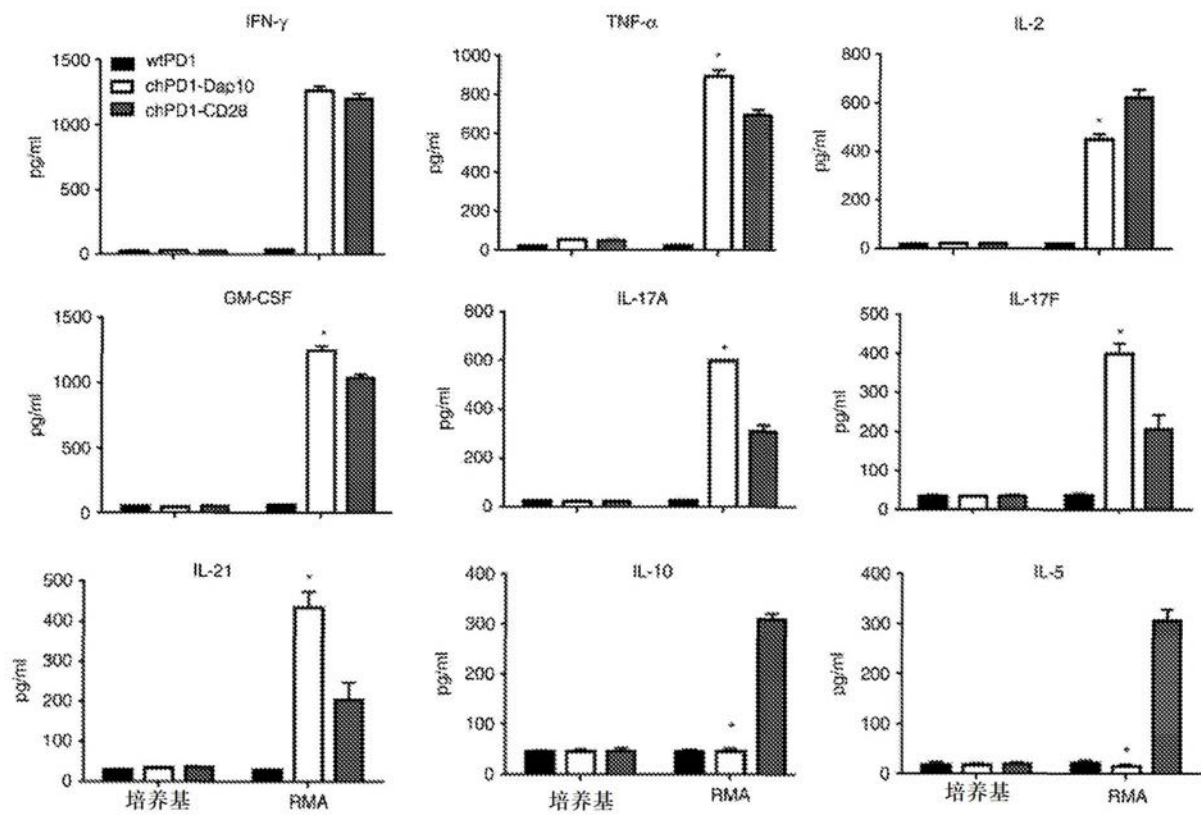


图4A

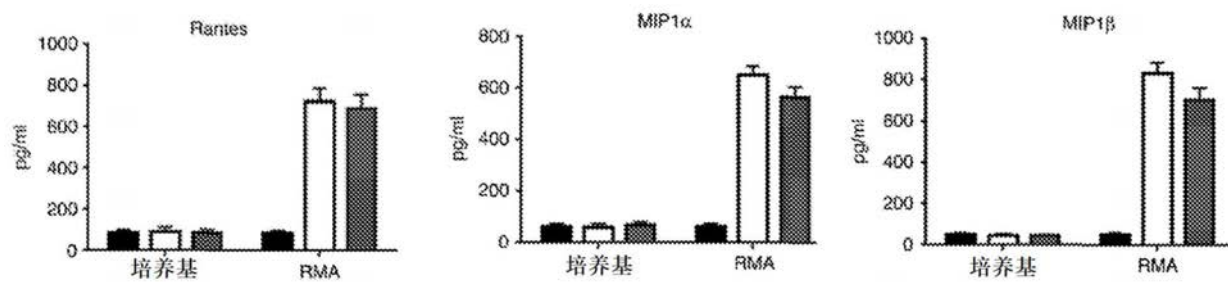


图4B

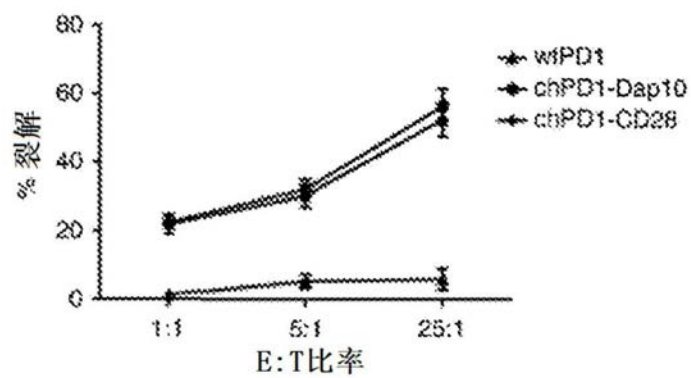


图4C

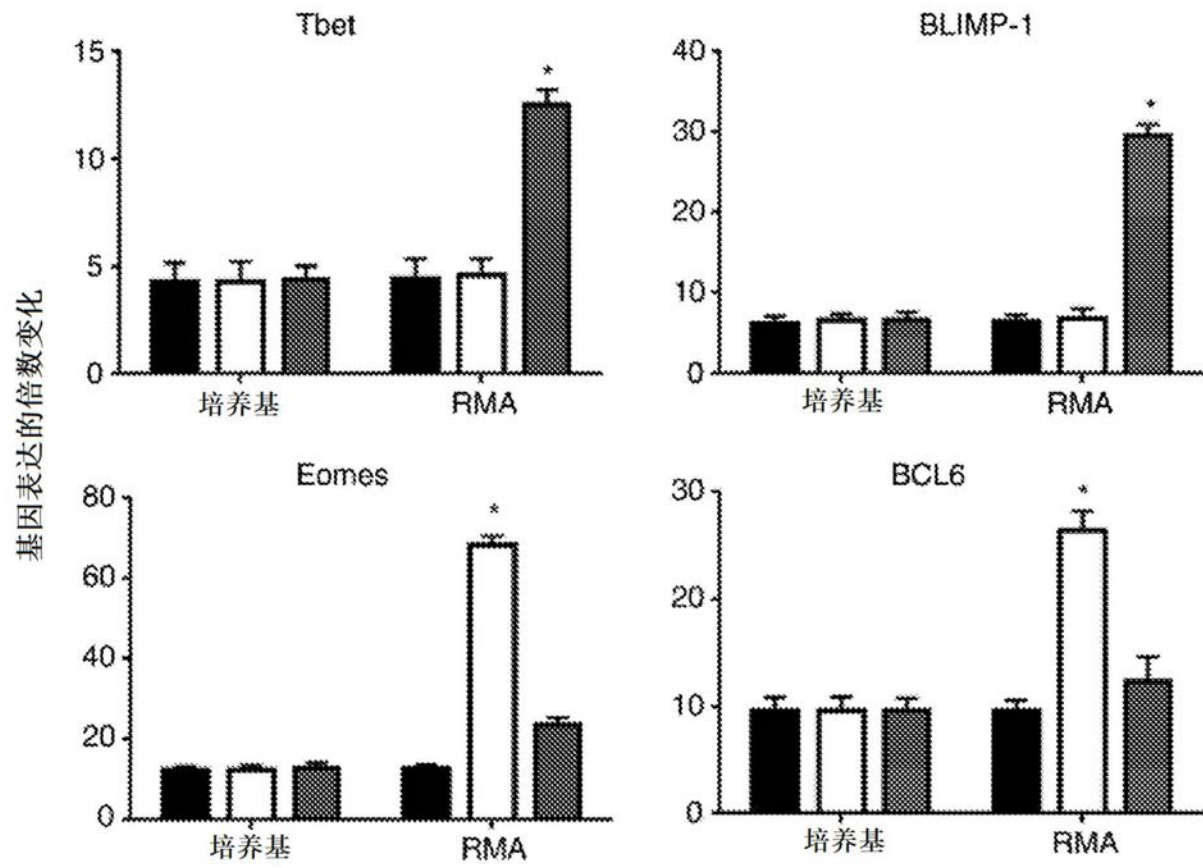


图5A

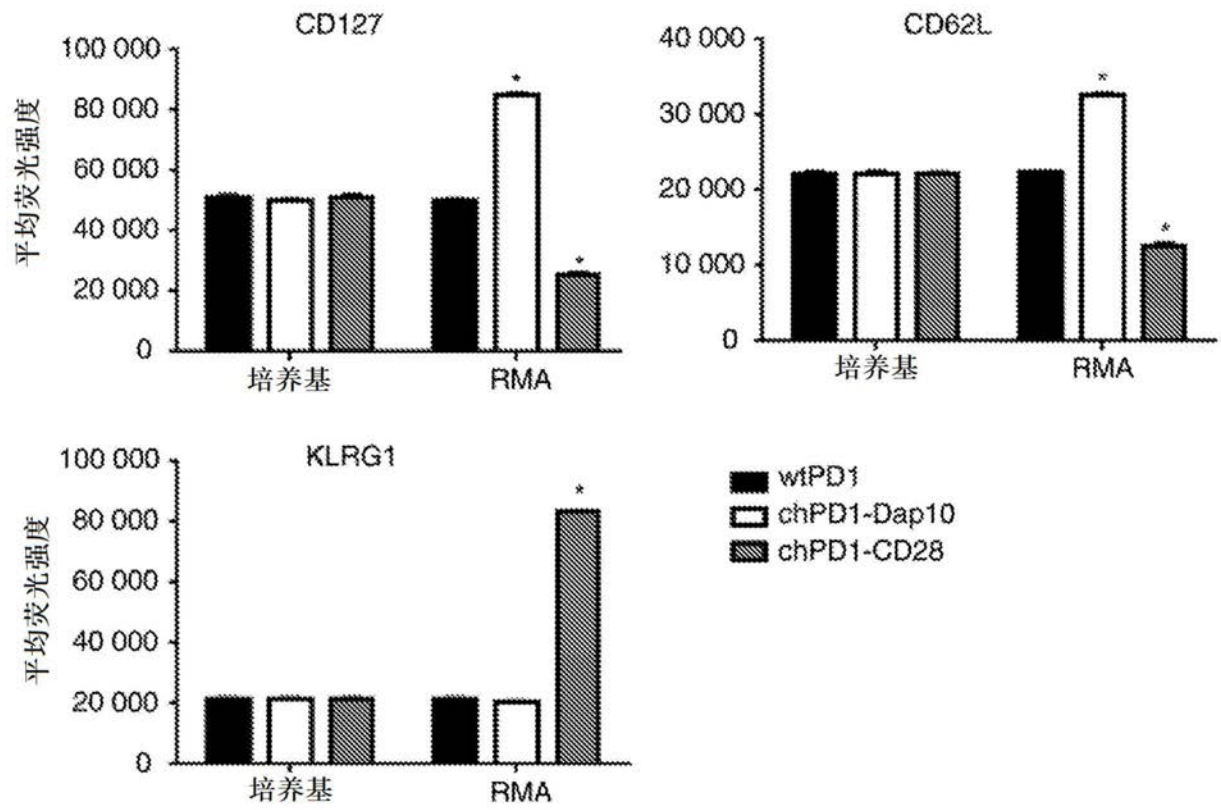


图5B

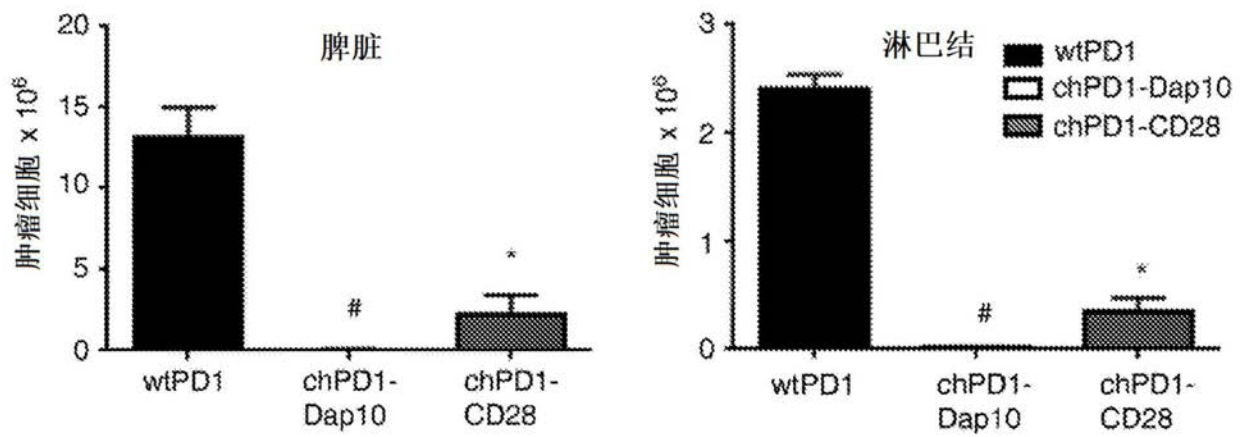


图6A

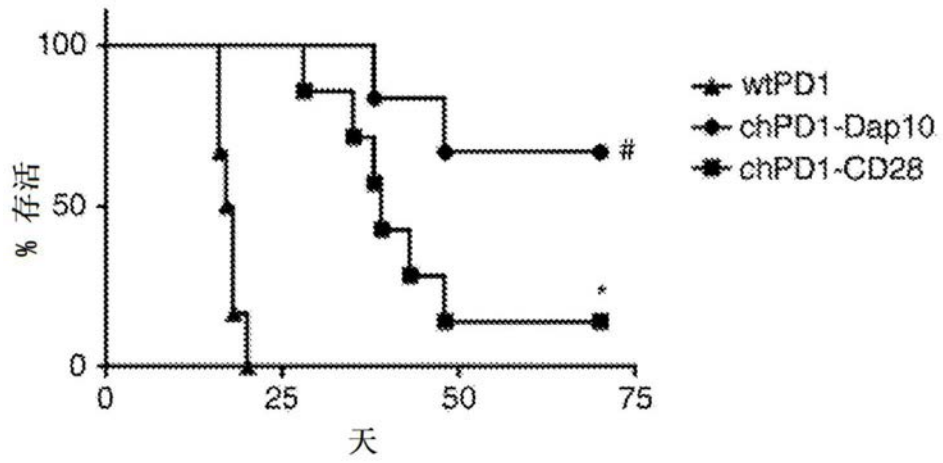


图6B

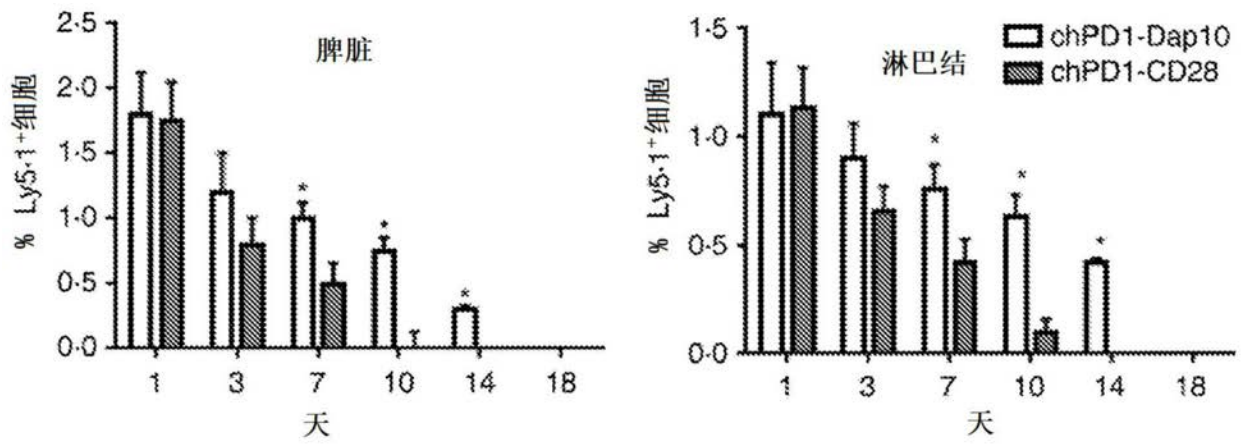


图6C