(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113811604 A
(43)申请公布日 2021.12.17

(21)申请号 202080032042.7

(22)申请日 2020.03.25

(30)优先权数据
62/826,856 2019.03.29 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.10.28

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/024671 2020.03.25

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/205359 EN 2020.10.08

(71)申请人 得克萨斯大学体系董事会
地址 美国得克萨斯

(72)发明人 K·雷兹瓦尼 E·施帕尔 刘恩莉

(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
代理人 陈晓娜

(51)Int.Cl.
C12N 5/0783(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)
C07K 14/705(2006.01)
C07K 14/52(2006.01)
C12N 15/85(2006.01)

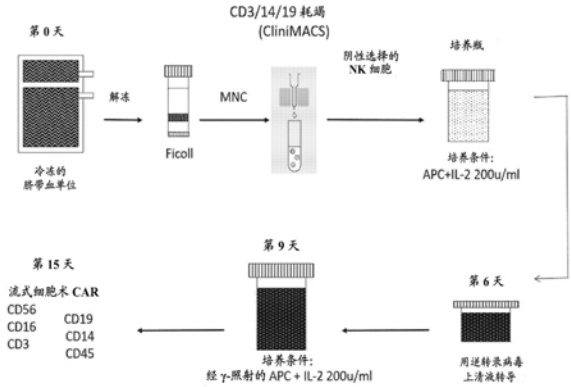
权利要求书3页 说明书69页
序列表3页 附图76页

(54)发明名称

CAR-NK细胞的产生方法及其用途

(57)摘要

本申请提供用于扩增表达嵌合抗原受体和/或T细胞受体的NK细胞的方法。本申请进一步提供通过施用所述CAR NK细胞来治疗疾病的方法。



CN 113811604 A

1.产生经改造以表达一种或多种嵌合抗原受体(CAR)和/或一种或多种T细胞受体(TCR)的自然杀伤(NK)细胞的离体方法,所述方法包括:

(a)在人工呈递细胞(APC)和至少一种细胞因子的存在下培养NK细胞起始群体;

(b)向所述NK细胞中引入一种或多种CAR和/或TCR表达载体;以及

(c)在透气式生物反应器中在APC和至少一种细胞因子的存在下扩增所述NK细胞,由此得到经改造的NK细胞的扩增群体。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述透气式生物反应器是G-Rex100M。

3.根据权利要求1或2所述的方法,其中所述方法不包括在步骤(c)过程中去除或添加任何培养基组分。

4.根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述方法不包括进行HLA匹配。

5.根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述经改造的NK细胞表达CAR。

6.根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述经改造的NK细胞表达TCR。

7.根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述经改造的NK细胞表达CAR和TCR。

8.根据权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述NK细胞起始群体从脐带血、外周血、骨髓、$CD34^+$细胞、诱导性多能干细胞(iPSC)或NK细胞系获得。

9.根据权利要求1-8中任一项所述的方法,其中所述NK细胞起始群体从脐带血获得。

10.根据权利要求9所述的方法,其中所述脐带血之前经过冷冻。

11.根据权利要求9所述的方法,其中所述脐带血之前没有经过冷冻。

12.根据权利要求9所述的方法,其中所述脐带血从健康供体获得。

13.根据权利要求9所述的方法,其中所述NK细胞起始群体通过使用ficoll-paque密度梯度分离单核细胞而获得。

14.根据权利要求13所述的方法,所述方法还包括耗竭单核细胞中的CD3、CD14和/或CD19细胞,从而获得NK细胞起始群体。

15.根据权利要求13所述的方法,所述方法还包括耗竭单核细胞中的CD3、CD14和CD19细胞,从而获得NK细胞起始群体。

16.根据权利要求14或15所述的方法,其中耗竭包括进行磁力分选。

17.根据权利要求1-16中任一项所述的方法,其中所述APC是经γ-照射的APC。

18.根据权利要求1-17中任一项所述的方法,其中所述APC是通用APC(uAPC)。

19.根据权利要求18所述的方法,其中所述uAPC被改造以表达:(1)CD48和/或CS1(CD319),(2)膜结合的白介素-21(mbIL-21),和(3)41BB配体(41BBL)。

20.根据权利要求1-19中任一项所述的方法,其中所述NK细胞和APC以1:1至1:10的比率存在。

21.根据权利要求1-19中任一项所述的方法,其中所述NK细胞和APC以1:2的比率存在。

22.根据权利要求1-21中任一项所述的方法,其中所述至少一种细胞因子是IL-2、IL-7、IL-12、IL-21、IL-15或IL-18。

23.根据权利要求1-21中任一项所述的方法,其中所述至少一种细胞因子是IL-2。

24.根据权利要求1-23中任一项所述的方法,其中NK细胞的培养和/或扩增在2、3或4种细胞因子的存在下进行。

25.根据权利要求24所述的方法,其中所述细胞因子选自IL-2、IL-7、IL-12、IL-21、IL-

15和IL-18。

26.根据权利要求1-24中任一项所述的方法，其中所述至少一种细胞因子以100-300U/mL的浓度存在。

27.根据权利要求1-24中任一项所述的方法，其中所述至少一种细胞因子以200U/mL的浓度存在。

28.根据权利要求1-27中任一项所述的方法，其中引入包括转导或电穿孔。

29.根据权利要求28所述的方法，其中所述转导是重组人纤维连接蛋白转导。

30.根据权利要求29所述的方法，其中所述转导具有至少20％的效率。

31.根据权利要求1-30中任一项所述的方法，其中所述CAR和/或TCR表达构建体是慢病毒载体或逆转录病毒载体。

32.根据权利要求1-31中任一项所述的方法，其中经改造的NK细胞的群体是符合GMP的。

33.根据权利要求1-32中任一项所述的方法，其中所述方法导致至少2000倍的扩增。

34.根据权利要求1-33中任一项所述的方法，其中步骤(a)-(c)在少于2周内进行。

35.根据权利要求1-34中任一项所述的方法，其中所述NK细胞是同种异体的。

36.根据权利要求1-35中任一项所述的方法，其中所述NK细胞是自体的。

37.根据权利要求1-36中任一项所述的方法，其中所述CAR和/或TCR具有针对以下各项的抗原特异性:CD70、BCMA、CD5、CD33、CD47、CD99、CLL1、CD38、U5snRNP200、CD200、BAFF-R、CD19、CD319/CS1、ROR1、CD20、癌胚抗原、甲胎蛋白、CA-125、MUC-1、上皮肿瘤抗原、黑素瘤相关抗原、突变的p53、突变的ras、HER2/Neu、ERBB2、叶酸结合蛋白、HIV-1包膜糖蛋白gp120、HIV-1包膜糖蛋白gp41、GD2、CD123、CD23、CD30、CD56、c-Met、间皮素、GD3、HERV-K、IL-11Rα、κ链、λ链、CSPG4、ERBB2、WT-1、EGFRvIII、TRAIL/DR4、VEGFR2或其组合。

38.根据权利要求1-37中任一项所述的方法，其中所述CAR和/或表达构建体还表达细胞因子。

39.根据权利要求38所述的方法，其中所述细胞因子是IL-15、IL-21或IL-2。

40.根据权利要求1-39中任一项所述的方法，所述方法还包括冷冻保存经改造的NK细胞的群体。

41.扩增的NK细胞的群体，其根据权利要求1-40中任一项所述的方法产生。

42.药物组合物，其包含权利要求41所述的经改造的NK细胞的群体和药用承载体。

43.组合物，其包含有效量的权利要求42所述的经改造的NK细胞，其用于治疗受试者中的疾病或病症。

44.包含有效量的权利要求1-40中任一项所述的经改造的NK细胞的组合物用于治疗受试者中免疫相关的病症的用途。

45.治疗受试者中免疫相关的病症的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的权利要求1-40中任一项所述的经改造的NK细胞。

46.根据权利要求45所述的方法，其中所述方法不包括在受试者与供体之间进行HLA匹配。

47.根据权利要求45所述的方法，其中所述NK细胞在受试者与供体之间是KIR-配体不匹配的。

48.根据权利要求45-47中任一项所述的方法，其中不存在HLA匹配不导致移植物抗宿主疾病或毒性。

49.根据权利要求45-48中任一项所述的方法，其中所述免疫相关的病症是癌症、自体免疫病症、移植物抗宿主疾病、同种异体移植排斥或炎性病状。

50.根据权利要求45-48中任一项所述的方法，其中所述免疫相关的病症是炎性病状，并且免疫细胞基本上不具有糖皮质激素受体的表达。

51.根据权利要求50所述的方法，其中所述受试者已被施用或正被施用类固醇疗法。

52.根据权利要求45-51中任一项所述的方法，其中所述NK细胞是自体的。

53.根据权利要求45-51中任一项所述的方法，其中所述NK细胞是同种异体的。

54.根据权利要求45-53中任一项所述的方法，其中所述免疫相关的病症是癌症。

55.根据权利要求54所述的方法，其中所述癌症是实体癌症或血液学恶性病。

56.根据权利要求45-55中任一项所述的方法，所述方法还包括施用至少第二治疗剂。

57.根据权利要求56所述的方法，其中所述至少第二治疗剂包括化学疗法、免疫疗法、手术、放射疗法或生物疗法。

58.根据权利要求56所述的方法，其中所述NK细胞和/或所述至少第二治疗剂经静脉内、动脉内、腹膜内、气管内、肿瘤内、肌内、内窥镜方式、病灶内、颅内、经皮、皮下、区域性、通过直接注射、通过输注或其组合施用。

59.治疗受试者中的感染的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的通过权利要求1-40中任一项产生的经改造的NK细胞。

60.根据权利要求59所述的方法，其中所述方法不包括在受试者与供体之间进行HLA匹配。

61.根据权利要求59所述的方法，其中所述方法不包括在受试者与供体之间进行HLA匹配。

62.根据权利要求59-61中任一项所述的方法，其中不存在HLA匹配不导致移植物抗宿主疾病或毒性。

63.根据权利要求59-62中任一项所述的方法，其中所述NK细胞在受试者与供体之间是KIR-配体不匹配的。

64.根据权利要求59-63中任一项所述的方法，其中所述感染是病毒感染、细菌感染或真菌感染。

65.根据权利要求59-64中任一项所述的方法，其中所述NK细胞相对于受试者是自体的。

66.根据权利要求59-64中任一项所述的方法，其中所述NK细胞相对于受试者是同种异体的。

CAR-NK细胞的产生方法及其用途

[0001] 本申请要求于2019年3月29日提交的美国临时专利申请系列号62/826,856的优先权,该申请通过引用整体结合在本文中。

背景技术

1.技术领域

[0002] 本发明整体上涉及免疫学和医学领域。更具体而言,本发明涉及扩增自然杀伤(NK)细胞的方法。

[0003] 2.相关技术描述

[0004] 尽管在诊断和可用于经诊断患有癌症的患者的治疗选项中已有技术进步,但是预后仍然经常保持不良且许多患者不能被治愈。免疫疗法有希望向诊断患有各种肿瘤的患者提供强效而具有靶向性的治疗,其具有根除恶性肿瘤细胞而不破坏正常组织的潜力。理论上,免疫系统的T细胞能够识别对肿瘤细胞具有特异性的蛋白质模式并且通过多种效应机制介导其破坏。过继T细胞疗法是一种尝试,以利用和放大患者自身T细胞的肿瘤根除能力,并且接着在效应子有效消除残余肿瘤然而不损害健康组织的状态下使这些效应子返回至患者。尽管该方法在肿瘤免疫学领域不是新方法,但在过继T细胞疗法临床使用中的许多缺点损害该方法在癌症治疗中的完全应用。例如,嵌合抗原受体T细胞(CART细胞)是患者特异性的且不得不基于个别病例针对各个患者生产。

[0005] 另一方面,源自脐带血(CB)的自然杀伤(NK)细胞提供用于免疫疗法的细胞的现成来源并且还利用NK细胞针对许多肿瘤的固有细胞毒性。虽然已在源自外周血的CAR NK细胞上进行了研究,但是这些细胞用对于“现成的”方法还不理想。这是因为在每个病例必须鉴定供体用于NK细胞捐献。

[0006] 还已经研究了经CAR改造的NK92细胞;然而,NK92为源自淋巴瘤患者的NK细胞系,该患者缺少对NK细胞的细胞毒性重要的多种NK细胞受体。此外,因为该细胞系源自患有淋巴瘤的患者,因此必须在输注之前对细胞进行照射。NK细胞受体的这种缺少和对照射的需要显著损害细胞增殖和持久的能力,使其有效性低于表达全部NK细胞受体的经CAR修饰的CB-NK细胞。因此,对于高效产生用于临床疗法的CAR NK细胞的方法存在尚未满足的需求。

发明内容

[0007] 在一个实施方案中,本发明提供与针对医学病状(诸如癌症)的疗法相关的方法和组合物。在特定实施方案中,所述方法和组合物涉及免疫疗法和/或细胞疗法。在具体的实施方案中,本发明涉及用于产生经改造以表达嵌合抗原受体(CAR)和/或T细胞受体(TCR)的自然杀伤(NK)细胞的离体方法,所述方法包括在人工呈递细胞(APC)或其他饲养细胞和至少一种细胞因子的存在下培养NK细胞的起始群体;向NK细胞中引入CAR和/或TCR表达载体;并且在APC及至少一种细胞因子的存在下将NK细胞在透气式生物反应器中扩增,从而获得经改造的NK细胞的扩增群体。在一些方面中,所述透气式生物反应器为G-Rex®100M。在

某些方面中，该方法不包括进行HLA匹配。在一些替代情况下，该方法的任何或所有步骤在气体在不存在透气式生物反应器下发生。

[0008] 在一些方面中，所述经改造的NK细胞表达CAR。在某些方面中，所述经改造的NK细胞表达TCR。在特定方面中，所述经改造的NK细胞表达CAR和TCR或多种抗原受体。在特定方面中，所述经改造的NK细胞的群体遵从GMP。在特定方面中，完整的方法在小于2周，诸如8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天内进行。在其他方面中，完整的方法可花费3、4周或更多周。在一些方面中，所述NK细胞相对于个体是同种异体的。在其他方面中，所述NK细胞相对于个体是自体的。

[0009] 在一些方面中，该NK细胞的起始群体获自脐带血、外周血、骨髓、$CD34^+$细胞或iPSC。在特定方面中，该NK细胞的起始群体获自脐带血。在一些方面中，该脐带血先前已冷冻。在某些方面中，该NK细胞的起始群体通过使用ficoll-paque密度梯度分离单核细胞获得。在一些方面中，该方法进一步包括耗尽CD3、CD14和/或CD19细胞的单核细胞以获得NK细胞的起始群体。在一些方面中，该方法进一步包括耗尽CD3、CD14和CD19细胞的单核细胞以获得NK细胞的起始群体。在特定方面中，耗尽包括进行磁性分选。在其他方面中，NK细胞可使用分选、磁珠选择或其他方法阳性选择以获得NK细胞的起始群体。

[0010] 在某些方面中，所述APC是经γ照射的APC。在一些方面中，所述APC是通用APC(uAPC)。在一些方面中，所述uAPC经改造以表达：(1)CD48和/或CS1(CD319)，(2)膜结合的白介素-21(mbIL-21)，和(3)41BB配体(41BBL)。在特定方面中，所述NK细胞和APC以1:1至1:100的比率存在，诸如以1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9或1:10的比率存在。在某些方面中，所述NK细胞和APC以1:2的比率存在。

[0011] 在一些方面中，至少一种细胞因子是IL-2、IL-21、IL-15或IL-18。在某些方面中，NK细胞的培养和/或扩增在2、3或4种细胞因子的存在下进行。在一些方面中，所述细胞因子选自由IL-2、IL-21、IL-15和IL-18组成的组。在一些方面中，至少一种细胞因子(诸如IL-2)以100至300U/mL的浓度存在，诸如以100、125、150、175、200、225、250、275或300U/mL的浓度存在。在某些方面中，所述至少一种细胞因子以200U/mL的浓度存在。

[0012] 在某些方面中，引入CAR和/或TCR包括转导或电穿孔。在一些方面中，转导为重组人纤维连接蛋白(retronectin)转导。在特定方面中，转导具有至少20％，诸如至少25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、66％、67％、68％、69％、70％、71％、72％、73％、74％、75％或更高的效率。在一些方面中，CAR和/或TCR表达构建体是慢病毒载体或逆转录病毒载体。在某些方面中，所述方法导致至少1000倍的扩增，诸如至少1100倍、1200倍、1300倍、1400倍、1500倍、1600倍、1700倍、1800倍、1900倍、2000倍、2100倍、2200倍、2300倍、2400倍、2500倍或更高的扩增。

[0013] 在一些方面中，CAR和/或TCR具有针对以下抗原特异性：CD19、CD319/CS1、BCMA、CD38、CLL1、CD70、ROR1、CD20、CD5、CD70、CD20、癌胚抗原、甲胎蛋白、CA-125、MUC-1、上皮肿瘤抗原、黑色素瘤相关抗原、突变的p53、突变的ras、HER2/Neu、ERBB2、叶酸结合蛋白、HIV-1包膜糖蛋白gp120、HIV-1包膜糖蛋白gp41、GD2、CD123、CD23、CD30、CD56、c-Met、间皮素、GD3、HERV-K、IL-11Rα、κ链、λ链、CSPG4、ERBB2、WT-1、EGFRvIII、TRAIL/DR4和/或VEGFR2。在一些方面中，CAR和/或表达构建体进一步表达一种细胞因子或者2、3或4种细胞因子。在某些方面中，所述细胞因子为IL-15、IL-21、IL-18或IL-2。

[0014] 在另外的方面中，所述方法进一步包括将经改造的NK细胞的群体冷冻保存。在一些方面中，所述经改造的NK细胞经冷冻保存。本文中进一步提供经冷冻保存的NK细胞的群体。

[0015] 在另一实施方案中，提供根据本发明实施方案的方法产生的经改造的NK细胞的群体。本文中进一步提供医药组合物，其包含所述实施方案的经改造的NK细胞的群体和药学可接受的承载体。另一实施方案提供包含有效量的所述实施方案的经改造的NK细胞的组合物，其用于治疗受试者的疾病或病症。本文还提供包含有效量的所述实施方案的经改造的NK细胞的组合物的用途，其用于治疗受试者的免疫相关的病症。

[0016] 另一实施方案提供一种治疗受试者的免疫相关的病症的方法，其包括向所述受试者施用有效量的所述实施方案的经改造的NK细胞。在某些方面中，该方法不包括进行HLA匹配。在特定方面中，所述NK细胞是在受试者与供体之间不匹配的KIR配体。在特定方面中，该方法不包括进行HLA匹配。在特定方面中，HLA匹配不存在不会导致移植物抗宿主疾病或毒性。

[0017] 在一些方面中，免疫相关的病症是癌症、自体免疫病症、移植物抗宿主疾病、同种异体移植排斥或炎性病状。在某些方面中，所述免疫相关的病症是炎性病状，且所述免疫细胞基本上不表达糖皮质激素受体。在一些方面中，所述受试者已经或正在接受施用类固醇疗法。在一些方面中，所述NK细胞是自体的。在某些方面中，所述NK细胞是同种异体的。

[0018] 在特定方面中，所述免疫相关的病症为癌症。在一些方面中，所述癌症为实体癌或血液恶性病。

[0019] 在另外的方面中，所述方法进一步包括施用至少第二治疗剂。在一些方面中，所述至少第二治疗剂包括化疗、免疫疗法、手术、放射疗法或生物疗法。在特定方面中，所述NK细胞和/或至少第二治疗剂经静脉内、经腹膜内、经气管内、经鞘内、经肿瘤内、经肌肉内、经内视镜、经病灶内、经皮、经皮下、局部或通过直接注射或输注施用。可按顺序或同时施用组合疗法。

[0020] 另一实施方案提供一种治疗受试者的任何类型的感染的方法，其包括向该受试者施用有效量的所述实施方案的经改造的NK细胞。在某些方面中，所述方法不包括进行HLA匹配。在特定方面中，所述NK细胞是在受试者与供体之间不匹配的KIR配体。在特定方面中，所述方法不包括进行HLA匹配。在一些方面中，所述NK细胞是在个体与受试者之间不匹配的KIR配体。在特定方面中，HLA匹配不存在不会导致移植物抗宿主疾病或毒性。在一些方面中，所述NK细胞是自体的。在某些方面中，所述NK细胞是同种异体的。

[0021] 本发明的其他目标、特征和优点将从下列详细描述变得显而易见。然而，应了解，当指示本发明的较佳实施方案时，详细描述和特定实施例仅以举例说明的方式提供，因为通过该详细描述，在本发明的精神和范围内的各种变化和修改对于本领域技术人员而言将是显而易见的。

附图说明

[0022] 下列附图形成本说明书的一部分且被包含以进一步证实本发明的某些方面。通过参考这些附图中的一副或多副与本文中呈现的特定实施方案的详细描述组合可以更好地理解本发明。

[0023] 图1:临床GMP级CAR-NK转导和扩增。

[0024] 图2:在培养14天后自5种不同CB单位产生的GMP级经CAR转导CB-NK细胞的特征。

[0025] 图3:CAR NK细胞在烧瓶相对G-Rex®生物反应器中的扩增。

[0026] 图4:经不同NK细胞制剂处理的组中的小鼠的平均生存期(天)。

[0027] 图5:经Raji肿瘤植入和经不同NK细胞制剂处理的小鼠的存活百分比。

[0028] 图6:经Raji肿瘤植入和经不同NK细胞制剂处理的小鼠的生存的比较。

[0029] 图7:经指定NK细胞制剂处理的小鼠的生物荧光成像。

[0030] 图8:阻断KIR-HLA相互作用对CAR NK细胞对抗肿瘤靶标的活性的影响。

[0031] 图9:表1.基线患者的特征。

[0032] 图10:表2.11名研究患者中的不良事件。

[0033] 图11:对CAR-NK疗法及缓解后治疗的临床反应。显示11名患者的临床结果和后续疗法,所述患者在研究中用抗CD19嵌合抗原受体(CAR)自然杀伤(NK)细胞治疗。根据国际研究会对慢性淋巴细胞白血病的2018标准和对非霍奇金淋巴瘤的2014Lugano分类证实并评估反应。所示的反应包括部分反应(PR)及完全反应(CR);MRD表示最小残留疾病,如以多参数流式细胞术所评估的,具有或不具有骨髓(BM)浸润。患者3接受4个剂量(x4)的利妥昔单抗(rituximab);针对患者5和7,白色虚线指示缓解后疗法的持续时间。HSCT表示造血干细胞移植。

[0034] 图12A和12B:输注后CAR-NK细胞的持久性。图12A显示外周血样品中的CAR-NK细胞测量,如根据由患者接受的CAR-NK细胞剂量以定量聚合酶链式反应测定所评估的。3个拷贝/微克DNA的水平灰线表示该测定的定量下限。实心水平条指示针对各剂量水平在各个时间点的中值拷贝数。在单次输注CAR-NK细胞后,可在所有11名患者中检测到CAR序列。所述值增加并在外周血中保持可检测到长至输注后1年,不管剂量水平如何。超过输注后14天未观察到所施用细胞剂量与CAR-NK拷贝数之间的关系,这表明CAR-NK细胞的持久性通过经输注的细胞的体内增殖驱动。随访时长在患者间变化。图12B显示根据患者对疗法的反应,针对11名患者在输注后前28天CAR-NK细胞的峰值拷贝数。与不具有反应的患者相比,在第30天具有反应的患者在输注后具有显著更高的CAR-NK细胞拷贝数峰值(中值,31,744相对903个拷贝/微克;P=0.02)。黑色水平条指示中值。

[0035] 图13A至13C:GMP级CAR-NK细胞以穿孔素依赖性方式杀死原发性CLL靶标。图13A显示与配对的离体扩增的未转导的NK细胞(NT-NK细胞;黑色线)相比,GMP级iC9/CAR19/IL-15转导的CB NK细胞(红色线)对原发性CLL靶标(n=4)的裂解。***表示p<0.0001,**p<0.01。图13B表示用concanomycin A(CMA)处理后穿孔素(红色圆)的平均荧光强度的变化倍数,如下述计算:与CMA培养后的穿孔素MFI/与CMA培养后的穿孔素MFI。测量NK细胞表面上的CD56(黑色圆)和CAR(绿色圆)的MFI水平作为对照,并且用CMA处理后(n=3)保持不变。图13C显示在用CMA处理之前(实心圆)和之后(空心圆)GMP级iC9/CAR19/IL-15转导的CBNK细胞对原发性CLL靶标(n=4)的裂解;**表示p<0.01,*p<0.05。

[0036] 图14:患者5的放射反应。来自患者5的FDG PET-CT扫描在研究募集时、在接受CAR-NK细胞输注之前(上一行)和在接受CAR-NK细胞输注后29天(下一行)进行。右上角投射影像显示在膈膜以上和以下的结节中的FDG摄入。右上中间图显示在增大的肠系膜结节(深色箭头)中具有异常摄入的FDG PET-CT扫描。左上中间PET-CT扫描显示增大的肠系膜结节(浅色

箭头)。左上“融合的”PETCT扫描显示定位于肠系膜腺病的FDG摄入。右下角投射影像显示在膈膜以上和以下的结节中的FDG摄入的解析。右下中间图显示在增大的肠系膜结节(深色箭头)中不具有摄入的FDG PET-CT扫描。左下中间PET-CT扫描显示稳定的增大的肠系膜结节(浅色箭头)。左下“融合”PET-CT扫描显示在肠系膜腺病中没有FDG摄人(箭头)。

[0037] 图15:根据CB CAR-NK细胞与接受者之间的HLA错配程度,CAR-NK细胞在输注后的持久性。通过qPCR评估在输注后在多个时间点自患者收集的外周血样品中iC9/CAR19/IL-15修饰的CB-NK细胞的持久性和扩增。绿点表示接受部分HLA匹配的CAR-NK产品(4/6HLA匹配)的九名患者的外周血样品中的CAR-NK拷贝数。红点表示接受非HLA匹配之产品(1/6或2/6HLA匹配)的两名患者的CAR-NK拷贝数。黑色虚线表示PCR测定的检测水平。

[0038] 图16A至16D:通过多参数流式细胞术检测CAR-NK细胞。图16A显示用于检测代表性患者(患者6,在CAR-NK输注后第+3天)外周血中供体CAR-NK细胞的流式细胞术门控策略。使用FSC-A和SSC-A选择淋巴细胞(i);使用SSCW相对SSC-H排除下一个双值(doublets)(ii);使用活细胞/死细胞染料鉴别活细胞(iii);然后通过针对CD45+细胞进行门控来选择活群体内的造血细胞(iv);通过针对CD33阴性和CD14阴性细胞进行门控来排除骨髓细胞(v);通过针对CD3-和CD56+细胞进行门控来鉴别NK细胞(vi)。在CD3-CD56+亚组内,基于供体特异性HLA-抗原的表达鉴别源自脐带血的NK细胞(vii)。使用针对人类IgG铰链的CH2-CH3结构域的抗体(109606088/Jackson Immuno Rsch)进一步测定供体NK细胞上的CAR表达(viii)。通过CD19和/或CD20表达通过针对CD45+CD33-CD14-淋巴细胞群体进行门控来鉴别B细胞(ix)。图16B显示使用上述门控策略针对患者6在输注后第8、14和21天的CAR-NK频率。图16C显示针对患者8在输注后第3、14和21天的CAR-NK频率。图16D显示针对患者10在输注后第3、7和14天的CAR-NK频率。PBMC:外周血单核细胞,FSC-A:前向散射-面积,FSC-H:前向散射-高度,SSC-A:侧向散射-面积,SSC-H:侧向散射-高度。

[0039] 图17:用于检测代表性患者淋巴结中的CAR-NK细胞的连续手动门控策略。流式细胞术数据显示用于检测患者6淋巴结中的供体CAR NK细胞的门控策略。在CAR-NK输注后105天进行活组织检查以研究单个淋巴结中残留的FDG活性。基于FSC-A和SSC-A选择淋巴细胞群体(i);使用SSC-W相对SSC-H排除下一个双值(ii);使用活细胞/死细胞染料鉴别活细胞(iii);然后通过针对CD45+细胞进行门控来选择活群体内的造血细胞(iv);通过针对CD33阴性和CD14阴性细胞进行门控来排除骨髓细胞(v);通过针对CD3-和CD56+细胞进行门控来鉴别NK细胞(vi)。在CD3-CD56+亚组内,基于供体特异性HLA-抗原的表达鉴别源自脐带血的NK细胞(在此情况下,CAR NK细胞是HLAA3阳性的并且接受者是HLA-A3阴性的)(vii)。PBMC:外周血单核细胞,FSC-A:前向散射-面积,FSC-H:前向散射-高度,SSC-A:侧向散射-面积,SSC-H:侧向散射-高度。

[0040] 图18:在代表性患者的外周血、骨髓和淋巴结中的CAR-NK拷贝数。该图显示通过qPCR在各个时间点在患者8的外周血(绿色圆)、骨髓(红色圆)和淋巴结(黑色圆)中测量的CAR-NK拷贝数。在CAR-NK输注后第56天进行淋巴结活组织检查以研究单个淋巴结中的残留FDG活性。活组织检查显示具有钙化的坏死团块并且没有淋巴瘤的迹象。可通过qPCR在淋巴结(118,897.4个拷贝/μg)中检测到CAR-NK转录体,与在相同时间段期间收集的外周血和骨髓样品相比,淋巴结中的水平显著更高(>25倍)。

[0041] 图19:CAR-NK细胞在输注后在外周血和骨髓样品中的持久性。该图显示通过qPCR

评估的外周血和骨髓样品中的CAR-NK细胞的测量。绿点和红点各自表示外周血和骨髓样品。绿色(外周血)和红色(骨髓)实线表示在各个时间点的中值拷贝数。在外周血和骨髓中以相似的水平可检测到CAR-NK转录体。

[0042] 图20:在CAR-NK输注后检测表达供体CAR的T细胞的门控策略。用于检测代表性患者(患者6,在CAR-NK输注后,第+8天,小图i至viii,和第+21天,小图ix和x)外周血中的供体T-细胞和源自供体的表达CAR的T-细胞的流式细胞术门控策略。使用FSC-A和SSC-A选择淋巴细胞门控(i);使用SSC-W相对SSC-H排除下一个双值(ii);使用活细胞/死细胞染料鉴别活细胞(iii);然后通过针对CD45+细胞进行门控来选择活群体内的造血细胞(iv);通过针对CD33阴性和CD14阴性细胞进行门控来排除骨髓细胞(v);通过针对CD3+CD56-细胞进行门控来鉴别T-细胞(vi)。在CD3+亚组内,基于供体特异性HLA-抗原的表达鉴别源自脐带血的T-细胞(vii)。使用针对人类IgG铰链之CH2-CH3结构域的抗体(109606088/Jackson Immuno Rsch)进一步测定供体T-细胞上的CAR表达。百分比指示表达CAR分子的CD3+T细胞的频率(viii)。该小图显示通过在CAR NK输注后第8天(vii和viii)和第+21天(ix和x)自患者收集之PBMC样品中CAR+供体T细胞的最小污染。在具有可获得的连续样品的两名另外的患者中发现相似结果(数据未显示)。PBMC:外周血单核细胞,FSC-A:前向散射-面积,FSC-H:前向散射-高度,SSC-A:侧向散射-面积,SSC-H:侧向散射-高度。

[0043] 图21A至21R:外周血中的炎性细胞因子的水平。小图显示在CAR-NK输注后外周血样品中的炎性细胞因子的时间过程。水平线表示中值。

[0044] 图22A至22B:患者特征。

[0045] 图23:输注的CAR-NK细胞产品的特征。

[0046] 图24:在随访期间的CAR-NK细胞持久性。使用qPCR在外周血中测量CAR-NK持久性。

[0047] 图25:在CAR-NK输注后的多个时间点,患者样品中的供体特异性抗体的测量。(-)指示结果是不可得的。

[0048] 图26A至26B:经CAR19-CD28-zeta-2A-IL15载体转导的CB-NK细胞的抗白血病功能。(图26A)CB NK细胞(下图)相较于未经转导的NK细胞(上图)的转导效率(85%)。转导是稳定的。(图26B)与针对K562细胞具有同等效应子功能的未转导(NT)的离体扩增和活化的NK细胞相比,CAR-NK细胞更有效地杀死CD19+Raji肿瘤和原发性CLL。$P<0.001$(iC9/CAR.CD19/IL15+Raji相对NT-NKs+Raji);$P<0.001$(iC9/CAR.CD19/IL15+CLL相对NT-NKs+CLL);P=ns(iC9/CAR.CD19/IL15+K562相对NT-NKs+K562)。

[0049] 图27A至27C:经iC9/CAR.19/IL15转导的CB NK细胞的体内归巢、增殖和抗肿瘤活性。(图27A)与经CAR.19转导的CB-NK细胞或NT-NK细胞相比,经C9/CAR.19/IL15转导的eGFP-FFLuc标记的CB-NK细胞更有效地归巢至疾病部位(肝、脾、骨髓[BM])。(图27B)将经iC9/CAR.19/IL15转导的CB-NK细胞输注至植入荧光素酶标记的Raji细胞的NSG小鼠导致肿瘤根除,如由体内生物发光成像所证实的。颜色指示发光强度(红色,最高;蓝色,最低)。(图27C)与未经转导或经缺少IL-15的CAR.CD19构建体转导的CB-NK细胞的体内抗肿瘤活性相比,单一剂量的经iC9/CAR.19/IL15转导的CB NK的体内抗肿瘤活性显著更佳。P=0.001(iC9/CAR.CD19/IL15+Raji相对NT-NKs+Raji);P=0.044(iC9/CAR.CD19/IL15+Raji相对CAR.CD19+Raji);P=0.006(CAR.CD19+Raji相对NT-NKs+Raji)P=0.182(NT-NKs+Raji相对单独的Raji)。

[0050] 图28A至28B:经IL-15转导的CB-NK细胞不显示自发或失调生长的征兆。(图28A)经iC9/CAR.19/IL15转导的CB NK细胞在体外培养的6周内停止扩增,没有自发生长的迹象。(图28B)肠系膜淋巴结的显微摄影显示在任何实验小鼠(为NSG小鼠的典型)中没有淋巴细胞的残留淋巴组织。脾的图像显示缺乏淋巴细胞(黑色箭头)且由不同阶段的红细胞和骨髓系列细胞(包括巨核细胞和满载血铁黄蛋白的巨噬细胞)组成的造血组织包围的初步外周小动脉淋巴组织。骨髓含有正常造血细胞并且没有异常淋巴细胞。H&E染色,放大200倍(x200)。载玻片来自用经iC9/CAR.19/IL15转导的CB NK细胞处理的NSG小鼠的两个代表组。

[0051] 图29:经iC9.CAR.19.CD28.CD3ζ.IL15转导的CB NK细胞的IL-15产生;经iC9.CAR.19.CD28.CD3ζ.IL15转导的CB NK细胞响应于体外抗原刺激而产生IL-15。

[0052] 图30A至30B:诱导型胱天蛋白酶-9自杀基因的活化消除iC9/CAR.19/IL15+CB-NK细胞。(图30A)向iC9-CAR-IL15+CB-NK细胞培养物中添加10nM AP1903在4小时内诱导转基因细胞的细胞凋亡/坏死(右下图),如通过膜联蛋白-V-7AAD染色所评估的。NT,未经转导的CB-NK细胞;CAR,经iC9/CAR.19/IL15转导的NK细胞;(图30B)静脉内植入Raji细胞且输注iC9/CAR.19/IL15+CB-NK细胞的NSG小鼠在10-14天后用两个剂量的AP1903二聚化因子(50μg)处理(间隔两天,腹膜内(i.p.))。3天后在测试的所有器官中,表达iC9/CAR.19/IL15的NK细胞实质上减少。

具体实施方式

[0053] 使用经靶向CD19+淋巴癌的逆转录病毒载体转导的源自人类脐带血的自然杀伤(CB-NK)细胞已经观察到令人鼓舞的临床结果。已产生靶向骨髓瘤、多发性骨髓瘤和实体肿瘤癌抗原的许多另外的CAR-NK细胞构建体。在一些实施方案中,本发明提供稳健扩增NK细胞的方法。所述细胞可从经冷冻或解冻的CB单位获得并在含有与抗原呈递细胞(APC,诸如通用抗原呈递细胞(uAPC))或其他饲养细胞和细胞因子(诸如白介素(IL)-2)的共培养物的透气式生物反应器中扩增。

[0054] 使用CAR NK细胞用于临床疗法的一个限制是因为其数量少和在解冻存活差。本研究通过使用用于CAR NK细胞离体扩增的符合GMP的策略来解决这两个限制。本方法导致两周内扩增2200倍的中值,具有约66%的优异CAR转导效率。使用该策略,可以产生多至400个剂量的$1x10^6$个CAR NK细胞/kg用于患者的治疗。

[0055] 因此,本发明的某些实施方案提供涉及意欲用于细胞疗法和免疫疗法的临床级NK细胞的制备、扩增、质量控制和功能表征的方法和组合物。用于输注至患者的临床相关数目的NK细胞的生长和建模同时满足时间限制甚至在最佳环境中也极具挑战性。所公开的方法和组合物详述NK细胞制备的方法,可实现的NK细胞扩增的详情和动力学,和证实成功的细胞建模的分子表征。

[0056] 本方法提供具有CAR构建体的NK细胞的高且一致的转导水平和高度强效CB-CAR-NK细胞的快速生产,所述细胞可以新鲜输注或冷冻用于随后的输注。本文中所提供的冷冻的CAR-NK细胞产品为真正“现成”细胞疗法,其可经解冻并输注至患者,而没有因生产需要的延误。

[0057] 此外,本研究已证实输注不与患者HLA匹配的NK细胞和CAR-NK细胞的安全性。因此,不再需要HLA匹配和解冻产品的稳健功效的组合导致使用基于CAR的疗法的样式变换,

其中CAR-NK细胞现在可以制备成“现成”的产品，其可作为床旁产品输注。本策略还可以适用于来自任何来源(包括外周血、骨髓、造血干细胞、诱导性多能干细胞或NK细胞系)的NK细胞。

[0058] 在特定方面中，所述NK细胞可自与APC(诸如基于K-562的饲养细胞)或其他饲养细胞(诸如淋巴母细胞系或珠)和一种或多种细胞因子(包括IL-2、IL-15、IL-12、IL21或IL-18)共培养的健康供体的脐带CB分离。然后可将所述NK细胞用逆转录病毒、慢病毒、腺病毒或腺相关病毒载体转导，或用靶向血液癌症和实体癌症的睡美人(sleeping beauty)或背驮式(piggy-back)构建体电穿孔。然后可将经转导的细胞进一步在含有与APC或其他饲养细胞和IL-2或其他细胞因子的共培养物的透气式生物反应器中扩增以获得强效的经CAR转导的CB-NK细胞。这些细胞可以新鲜输注，或可以冷冻在稍后的日期用于解冻和输注。

[0059] 用于同种异体设置下输注的CAR-T细胞必须是HLA匹配的或经遗传操纵以移除T细胞受体以防止致死性GVHD。先前的研究已使用CB单位产生临床NK细胞和CAR-NK细胞产品，出于安全性和符合对CB移植匹配的要求，所述产品在4/6HLA抗原匹配。然而，在本研究中，将2名患者用源自同种异体CB的NK细胞处理，所述细胞在任何抗原均不与患者HLA匹配却没有毒性。其经安全输注，无GVHD或其他毒性，与4/6HLA匹配的NK细胞相比，在患者中具有相当的持久性。这已建立不需要任何HLA匹配的使用CB单位产生NK和CAR-NK细胞产品的当前平台。从用于NK细胞生产的CB库随机选择CB单位显著扩增可用的CB单位数量，并且通过消除对患者HLA分型然后与CB单位匹配的需求而改善疗法的时程和物流(logistics)。

[0060] 在另外的方面中，本方法可包括鉴别和选择用于CAR NK产生的CB单位，所述CB单位针对杀伤细胞免疫球蛋白受体(KIR)配体分型并不与接受者匹配(错配)。由KIR-配体错配导致的同种异体反应性可通过与CAR介导的肿瘤细胞识别协同而进一步增强经CAR转导的NK细胞的活性。事实上，本研究已显示使用HLA阻断抗体来阻断KIR-配体相互作用可显著增强CAR-NK介导的CLL靶标的细胞毒性(图8)。

[0061] 本发明经CAR转导的NK细胞可提供用于许多癌症(包括液体和实体肿瘤二者)的免疫疗法的细胞的现成来源。源自CB的NK细胞的逆转录病毒转导允许经改造的细胞的更长持久性和提高的功效，以在许多癌症的免疫疗法中使用且通过靶向自体反应性B或T细胞而潜在地用于治疗感染(包括病毒、细菌和真菌感染)和自体免疫病症。

[0062] I.定义

[0063] 如本文所用，关于指定组分“基本上不含”在本文中用于意指没有任一种指定组分被有意配制在组合物中和/或仅作为污染物或以痕量存在。由组合物的任何非预期污染产生的指定组分的总量因此远低于0.05％，优选地低于0.01％。更优选的是这样的组合物，其中指定组分的量用标准分析方法检测不到。

[0064] 当在本说明书中使用时，“一种”或“一个”可意指一种或多种或者一个或多个。当在权利要求书中与词语“包含”结合使用时，词语“一种”或“一个”可以意指一种或多于一种或者一个或多于一个。

[0065] 尽管本申请支持“或”仅指备选物和“和/或”，但在权利要求书中使用时，术语“或”用来意指“和/或”，除非明确指示仅指备选物或备选物是相互排斥的。如本文中所用，“另一种”可意指至少第二种或更多种。

[0066] 在整个申请中，术语“约”用于表示：值包括用于确定该值的装置、方法固有的误差

变化或在研究对象之间存在的变化。

[0067] “免疫病症”、“免疫相关病症”或“免疫介导的病症”是指其中免疫反应在疾病的发展或进展中起关键作用的病症。免疫介导的病症包括自体免疫病症、同种异体移植排斥、移植物抗宿主疾病和炎性病况以及过敏性病况。

[0068] “免疫反应”为免疫系统的细胞(诸如B细胞或T细胞或先天性免疫细胞)对刺激物的反应。在一个实施方案中,该反应特异性针对特定的抗原(“抗原特异性反应”)。

[0069] “自体免疫病症”是指这样的疾病,其中免疫系统对作为正常宿主的一部分的抗原(即,自体抗原)产生免疫反应(例如,B-细胞或T-细胞反应),随后产生组织损伤。自体抗原可以源自宿主细胞或可以源自共生生物体,诸如正常定殖在粘膜表面的微生物(称作共生生物体)。

[0070] “治疗”疾病或病况是指指执行方案,其可包括向患者施用一种或多种药物,以努力减轻疾病的迹象或症状。所需的治疗效果包括降低疾病进展速率、改善或减轻疾病病况和缓解或改良预后。减轻可在疾病或病况的迹象或症状出现之前以及在它们出现之后发生。因此,“治疗”可以包括“预防”或“防止”疾病或非所需的病况。另外,“治疗”不需要完全减轻迹象或症状,不需要治愈,且特别包括对患者仅具有边际效应的方案。

[0071] 如在整个申请中使用的术语“治疗效益”或“治疗有效的”是指相对于此病况的医学治疗促进或增强受试者的健康的任何事物。这包括但不限于疾病迹象或症状的频率或严重性的降低。例如,癌症治疗可涉及例如肿瘤尺寸减小、肿瘤侵袭性降低、癌症生长速率降低或预防转移。癌症治疗还可指延长癌症患者的生存期。

[0072] “受试者”和“患者”是指人类或非人类(诸如灵长类动物、哺乳动物和脊椎动物)。在特定实施方案中,受试者是人类。

[0073] 词组“药学上或药理学上可接受的”是指在按需要向动物(诸如人类)施用时不产生不良、过敏或其他不适当反应的分子实体和组合物。依据本发明,包含抗体或额外活性成分的药物组合物的制剂将是本领域技术人员所知的。此外,对于动物(例如人类)施用,应理解,制剂应该满足FDA生物标准办公室(FDA Office of Biological Standards)所要求的无菌性、致热原性、一般安全性和纯度标准。

[0074] 如本文所用,“药学上可接受的承载体”包括任何以及所有水性溶剂(例如,水,醇/水溶液,盐水溶液,肠胃外介质,诸如氯化钠、林格氏右旋糖(Ringer’sdextrose)等)、非水溶剂(例如,丙二醇、聚乙二醇、植物油和可注射有机酯,诸如油酸乙酯)、分散介质、包衣、表面活性剂、抗氧化剂、防腐剂(例如,抗细菌剂或抗真菌剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体)、等渗剂、吸收延迟剂、盐、药物、药物稳定剂、凝胶、粘合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、染料、流体和营养补充剂,类似物质以及它们的组合,这些是本领域普通技术人员已知的。根据熟知的参数调整药物组合物中的各种组分的pH和准确浓度。

[0075] 术语“单倍体分型或组织分型”是指用于例如通过判定特定受试者的淋巴细胞上表达哪种HLA基因座(或哪些HLA基因座)来鉴别个体的单倍体型或组织型的方法。HLA基因位于作为6号染色体短臂上的区域的主要组织相容性复合体(MHC)中,且参与细胞与细胞的相互作用、免疫反应、器官移植、癌症发展和疾病易感性。存在六个对移植重要的基因座,命名为HLA-A、HLA-B、HLA-C和HLA-DR、HLA-DP以及HLA-DQ。在各基因座处,可存在若干不同等位基因中的任一者。

[0076] 广泛用于单倍体分型的方法使用聚合酶链式反应(PCR)以将受试者的DNA与编码MHC抗原的基因的已知区段进行比较。这些基因的这些区域的可变性决定受试者的组织型或单倍体型。血清学方法亦用于检测细胞表面上的血清学定义的抗原。可通过已知的血清学技术来测定HLA-A、HLA-B和HLA-C决定簇。简言之,将来自受试者的淋巴细胞(从新鲜外周血分离)与识别所有已知HLA抗原的抗血清一起培育。使细胞铺展于具有含有各种抗血清的微孔的盘中。将细胞孵育30分钟,随后再进行60分钟的补体孵育(complement incubation)。如果淋巴细胞在其表面上具有由抗血清中的抗体识别的抗原,则淋巴细胞被裂解。可添加染料以显示细胞膜渗透性的变化和细胞死亡。通过裂解破坏的细胞的图案指示组织学不相容性的程度。举例而言,如果在含有针对HLA-A3的抗血清的孔中来自测试HLA-A3的个人的淋巴细胞受到破坏,则对于该抗原型测试为阳性。

[0077] 术语“抗原呈递细胞(APC)”是指能够呈递呈现可被免疫系统的特定效应细胞识别的肽-MHC复合物形式的一种或多种抗原、且由此诱导针对所呈递的一种或多种抗原的有效细胞免疫反应的一类细胞。术语“APC”涵盖完整细胞,诸如巨噬细胞、B细胞、内皮细胞、活化的T细胞和树突状细胞,或能够呈递抗原的自然存在的或合成的分子,诸如与ÿ2-微球蛋白复合的纯化的MHC I类分子。

[0078] II.改造的NK细胞

[0079] 在某些实施方案中,本发明提供用于生产经改造的抗原受体(例如,CAR和/或TCR)NK细胞的方法,其包括:将细胞与人工呈递细胞(APC)和细胞因子一起培育,将所述细胞用CAR构建体转导,并且在APC和细胞因子的存在下扩增所述细胞。该CAR和/或TCR构建体可以是逆转录病毒或慢病毒载体或可经电穿孔。该方法可包括自脐带血、外周血、骨髓、CD34+细胞或iPSC(特别是自脐带血)获得起始细胞群体。然后可使起始细胞群体经受Ficoll-Paque密度梯度以获得单核细胞(MNC)。然后可将所述MNC耗竭CD3、CD14和/或CD19细胞用于NK细胞的阴性选择或可通过CD56选择阳性进行选择。然后可将NK细胞用APC和细胞因子(诸如IL-2、IL-21和IL-18)培育,接着CAR转导,诸如逆转录病毒转导。可将所述改造的NK细胞进一步在经照射的APC和细胞因子(诸如IL-2)的存在下扩增。

[0080] 用于本方法的APC可以为基于K-562的饲养细胞、淋巴母细胞细胞系或通用抗原呈递细胞(uAPC),或不是基于细胞的方法,例如使用珠、细胞颗粒或外来体。本文中“UAPC”是指针对免疫细胞、特别是NK细胞的最佳扩增设计的抗原呈递细胞。所述UAPC可通过共刺激分子的独特组合产生,以克服抑制信号且诱导最佳和特异性NK细胞杀伤功能。示例性APC通过在NK细胞敏感性K562抗原呈递细胞系(APC)中强制表达膜结合的白介素21(mbIL-21)和4-1BB配体(称作克隆46)而产生。在另一个实施方案中,UAPC通过在K562细胞中强制表达mbIL-21、4-1BB配体和CD48(称作通用APC(UAPC))而产生。在另一个实施方案中,UAPC通过在K562细胞中强制表达mbIL-21、4-1BB配体和CS1(称作UAPC2)而产生。可以产生UAPC以表达mbIL-21、41BBL和NK-细胞特异性抗原,诸如SLAM家族抗原。

[0081] 在不存在完全HLA-匹配下,与现成的CAR T细胞相比,本发明的改造和扩增的NK细胞引起移植物抗宿主疾病(GVHD)的可能性更小。此外,源自CB的改造的NK细胞(诸如CAR NK或TCR NK细胞)可用于产生用于免疫疗法的NK细胞的库,而不需要募集用于NK细胞收集的供体。

[0082] 在某些实施方案中,NK细胞通过本领域熟知的方法源自人类外周血单核细胞

(PBMC)、未经刺激的白细胞去除术产品(PBSC)、人类胚胎干细胞(hESC)、诱导性多能干细胞(iPSC)、骨髓或脐带血。具体而言,NK细胞可自脐带血(CB)、外周血(PB)、骨髓或干细胞分离。在特定实施方案中,所述免疫细胞从汇集的CB分离。所述CB可从2、3、4、5、6、7、8、10个或更多个单位汇集。所述免疫细胞可以是自体的或同种异体的。经分离的NK细胞可以是与待施用细胞疗法的个体匹配的单倍型。NK细胞可以通过特定表面标记物(诸如人类中的CD16和CD56)检测。

[0083] 在某些方面中,NK细胞的起始群体可通过使用Ficoll密度梯度离心来分离单核细胞而获得。可以耗竭细胞培养物中表达CD3、CD14和/或CD19的任何细胞,且可以对细胞培养物进行表征以确定$CD56^+/CD3^-$细胞或NK细胞的百分比。

[0084] 可以在存在本发明的APC(特别是照射的APC,诸如UAPC)的情况下扩增细胞。扩增可持续约2至30天或更久,诸如3至20天,特别是12至16天,诸如12、13、14、15、16、17、18或19天,特别约14天。NK细胞和APCS可以以约3:1至1:3,诸如2:1、1:1、1:2,特别约1:2的比率存在。扩增培养物可以进一步包含细胞因子以促进扩增,所述细胞因子诸如IL-2、IL-21和/或IL-18。细胞因子可以约10-500U/mL,诸如100-300U/mL,特别约200U/mL的浓度存在。可在扩增培养物中补给细胞因子,诸如每2至3天补给。可至少再次向培养物中添加APC,诸如在CAR转导后再次添加。

[0085] 在扩增之后,免疫细胞可以立即进行输注或可以进行储存,诸如通过冷冻保存来储存。在某些方面中,细胞可以作为在约1、2、3、4、5天内的混合群体(bulk population)离体繁殖数天、数周或数月。

[0086] 在一个实施方案中,细胞的起始群体为通过ficoll密度梯度自单个CB单位分离的MNC。然后可将细胞洗涤和耗竭CD3、CD14和CD19阳性细胞,诸如通过使用CliniMACS免疫磁珠(Miltenyi Biotec)进行。可收集未经标记的富集的CB-NK细胞,用CliniMACS缓冲液洗涤,计数和与经照射(例如,100Gy)的APC,诸如以1:2比率组合。可将细胞培养物(例如,$1x10^6$个细胞/mL)转移至含有NK完全培养基(例如,90%干细胞生长培养基,10%FBS,2mM L-谷氨酰胺)和IL-2(诸如50至500U/mL、诸如100至300U/mL、诸如200U/mL)的细胞培养烧瓶中。可将细胞在37℃下在5%CO_2中培育。在第3天,可通过离心收集细胞并将其重悬于包含IL-2(诸如50至500U/mL,诸如100至300U/mL,诸如200U/mL)的NK完全培养基中(例如,$1x10^6$个细胞/mL)进行培养基更换。可将细胞在37℃下在5%CO_2中培育。在第5天,用于重组人纤维连接蛋白(Retronectin)转导所需的孔的数目可通过培养物中的CB-NK细胞的数目确定。可将重组人纤维连接蛋白溶液涂布在24孔培养板的孔中。可将所述板密封并储存在4℃冰箱中。

[0087] 在第6天,可如第0天所述进行第二次NK选择,然后进行CB-NK细胞转导。可将所述细胞用CliniMACS缓冲液洗涤,离心并以$0.5x10^6$/mL重悬在具有IL-2(诸如100-1000,特别是600U/mL)的NK完全培养基中。然后可将重组人纤维连接蛋白板用NK完全培养基洗涤和在37℃下培育直至使用。可将各孔中的NK完全培养基用逆转录病毒上清液替换,接着在32℃下将板离心。然后可将逆转录病毒上清液吸出并用新鲜逆转录病毒上清液替换。可将含有$0.5x10^6$个细胞和600U/mL IL-2的CB-NK细胞悬浮液添加至各孔,并且可以将板离心。然后可将板在37℃与5%CO_2下培育。在第9天,可将经CAR转导的CB-NK细胞自转导板移除,通过离心收集并在具有200U/mL IL-2的NK完全培养基中用经照射(例如,100Gy)的aAPC(诸如以

1:2的比率)刺激。将细胞培养瓶在37℃与5％CO_2下培育。在第12天,可进行培养基更换。在第14天,可通过离心收集细胞,可将上清液吸出并可以将细胞重悬在包含200U/mL IL-2的新鲜NK完全培养基中。将细胞培养瓶在37℃与5％CO_2下培育。如果存在超过1x10^5个CD3+细胞/kg,则可使用CliniCliniMACS CD3试剂进行CD3+细胞的磁性免疫耗竭。在第15天,收获细胞,制备最终产品用于输注或冷冻保存。

[0088] 经扩增的NK细胞可以分泌I型细胞因子(诸如干扰素γ、肿瘤坏死因子α和颗粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF),它们活化先天性免疫细胞和适应性免疫细胞两者)以及其他细胞因子和趋化因子。这些细胞因子的测量可用于测定NK细胞的活化状态。另外,本领域中已知的用于测定NK细胞活化的其他方法可用于表征本发明的NK细胞。

[0089] B.生物反应器

[0090] NK细胞可在功能性封闭系统(诸如生物反应器)中扩增。扩增可以在透气式生物反应器中进行,所述透气式生物反应器诸如G-Rex®细胞培养装置。生物反应器可以支持平均体积450mL中1x10^9至3x10^9个总细胞。

[0091] 生物反应器可根据一般类别进行分组,包括:静态生物反应器、搅拌瓶式生物反应器、旋转壁容器式生物反应器、中空纤维生物反应器和直接灌注式生物反应器。在生物反应器内,细胞可以是游离的或固定化的、接种在多孔三维支架(水凝胶)上的。

[0092] 中空纤维生物反应器可以用于提高培养期间的质量转移。中空纤维生物反应器是基于中空纤维的3D细胞培养系统,所述中空纤维是以平行阵列布置的较小半透性毛细管膜,其典型截留分子量(molecular weight cut-off,MWCO)范围为10至30kDa。这些中空纤维膜通常捆扎且容纳于管状聚碳酸酯外壳内,从而形成中空纤维生物反应器筒。在还装配有入口端口和出口端口的筒内有两个隔室:中空纤维内的毛细管内(IC)空间和围绕中空纤维的毛细管外(EC)空间。

[0093] 由此,对于本发明,生物反应器可为中空纤维生物反应器。中空纤维生物反应器可将细胞包埋在纤维的管腔内,在管腔外空间灌注培养基;或备选地,中空纤维生物反应器可经由中空纤维提供气体和培养基灌注,而细胞在管腔外空间内生长。

[0094] 中空纤维应适合于在生物反应器中递送营养物以及移除废料。中空纤维可呈任何形状,例如可呈圆形和管状或呈同心环的形式。中空纤维可由可再吸收或不可再吸收的膜制成。例如,中空纤维的适合组分包括聚对二氧环己酮(polydioxanone)、聚乳酸交酯、聚乳酸羟基乙酸、聚乙醇酸、聚乳酸、聚乙醇酸/碳酸三亚甲酯、纤维素、甲基纤维素、纤维素聚合物、纤维素酯、再生纤维素、普洛尼克(pluronic)、胶原蛋白、弹性蛋白及其混合物。

[0095] 生物反应器可在接种细胞之前预致敏。预致敏可包括用缓冲液(诸如PBS)冲洗。预致敏还可以包括用细胞外基质蛋白(诸如纤连蛋白)涂布生物反应器。接着可用培养基(诸如αMEM)洗涤生物反应器。

[0096] 在特定实施方案中,本发明方法使用G-Rex®生物反应器。G-Rex®烧瓶的底部为透气膜,细胞驻留在该透气膜上。因此,细胞处于高度氧化的环境中,从而允许细胞生长至高密度。该系统容易扩大规模,且需要较低频率的培养操作。G-Rex®烧瓶与标准组织培养箱和细胞实验室设备兼容,从而减少开始ACT程序所需要的专用设备和资本投资。

[0097] 细胞可以如下的密度接种在生物反应器中:约100至1000个细胞/cm^2,诸如约150

个细胞/cm^2，约200个细胞/cm^2，约250个细胞/cm^2，约300个细胞/cm^2，诸如约350个细胞/cm^2，诸如约400个细胞/cm^2，诸如约450个细胞/cm^2，诸如约500个细胞/cm^2，诸如约550个细胞/cm^2，诸如约600个细胞/cm^2，诸如约650个细胞/cm^2，诸如约700个细胞/cm^2，诸如约750个细胞/cm^2，诸如约800个细胞/cm^2，诸如约850个细胞/cm^2，诸如约900个细胞/cm^2，诸如约950个细胞/cm^2，或约1000个细胞/cm^2。具体地，细胞可以约400至500个细胞/cm^2、诸如约450个细胞/cm^2的细胞密度接种。

[0098] 接种在生物反应器中的细胞的总数目可为约$1.0x10^6$至约$1.0x10^8$个细胞，诸如约$1.0x10^6$至$5.0.0x10^6$、$5.0x10^6$至$1.0x10^7$、$1.0x10^7$至$5.0x10^7$、$5.0x10^7$至$1.0x10^8$个细胞。在特定方面中，接种在生物反应器中的细胞的总数目为约$1.0x10^7$至约$3.0x10^7$，诸如约$2.0x10^7$个细胞。

[0099] 细胞可接种在任何适合的培养细胞的培养基中，许多此类培养基是可商购的。示例性培养基包括DMEM、RPMI、MEM、培养基199、HAMS等。在一个实施方案中，培养基为αMEM培养基，特别是补充有L-谷氨酰胺的αMEM。培养基可补充有以下中的一种或多种：生长因子、细胞因子、激素、或B27、抗生素、维生素和/或小分子药物。特别地，培养基可以不含血清。

[0100] 在一些实施方案中，可在室温下孵育细胞。培养箱可以加湿，且具有约5％CO_2和约1％O_2的气氛。在一些实施方案中，CO_2浓度可在约1-20％、2-10％或3-5％的范围内。在一些实施方案中，O_2浓度可在约1-20％、2-10％或3-5％的范围内。

[0101] C.基因工程改造的抗原受体

[0102] 本发明的NK细胞可以被基因工程改造以表达抗原受体，如改造的TCR和/或CAR。例如，NK细胞经修饰以表达具有针对癌症抗原的抗原特异性的TCR。在NK细胞中可以添加多种CAR和/或TCR(诸如针对不同抗原)。

[0103] 合适的修饰方法在本领域中是已知的。例如，参见Sambrook和Ausubel，同前所述。例如，可以使用Heemskerk等人，2008和Johnson等人，2009所述的转导技术转导细胞，以使其表达具有针对癌症抗原的抗原特异性的TCR。

[0104] 编码全长TCRα和β(或γ和δ)链的RNA的电穿孔可用作替代方案，以克服关于逆转录病毒转导的与内源性TCR链的配对所引起的自体反应性的长期问题。即使此替代配对在瞬时转染策略中出现，可能产生的自体反应性T细胞也将在一定时间后失去该自体反应性，原因在于所引入的TCR α和β链仅瞬时表达。当引入的TCR α和β链表达减弱时，仅正常的自体T细胞留下来。当通过稳定的逆转录病毒转导来引入全长TCR链时，情况并非如此，稳定的逆转录病毒转导从来不会失去所引入的TCR链，从而在患者中引起恒定存在的自体反应性。

[0105] 在一些实施方案中，细胞包含一种或多种通过基因工程改造引入的编码一种或多种抗原受体的核酸和所述核酸的基因工程改造的产物。在一些实施方案中，所述核酸是异源的，即，通常不存在于细胞或从所述细胞获得的样品中，所述核酸如从另一种生物体或细胞获得的核酸，例如，在被改造的细胞和/或该细胞所来源的生物体中通常不发现所述核酸。在一些实施方案中，所述核酸不是天然存在的，诸如在自然中不能发现的核酸(例如，嵌合核酸)。

[0106] 在一些实施方案中，CAR包含与抗原特异性结合的细胞外抗原识别结构域。在一些实施方案中，所述抗原是表达在细胞表面上的蛋白质。在一些实施方案中，CAR是TCR样CAR，抗原是经处理的肽抗原，诸如细胞内蛋白质的肽抗原，类似TCR，其在主要组织相容性复合

体(MHC)分子的情形下在细胞表面上被识别。

[0107] 示例性的抗原受体,包括CAR和重组TCR,以及用于改造受体和将所述受体引入细胞中的方法,包括例如在以下中记载的那些:国际专利申请公开号WO200014257,WO2013126726,WO2012/129514,WO2014031687,WO2013/166321,WO2013/071154,WO2013/123061;美国专利申请公开号US2002131960,US2013287748,US20130149337;美国专利号:6,451,995,7,446,190,8,252,592,8,339,645,8,398,282,7,446,179,6,410,319,7,070,995,7,265,209,7,354,762,7,446,191,8,324,353和8,479,118,以及欧洲专利申请号EP2537416,和/或Sadelain等人,2013;Davila等人,2013;Turtle等人,2012;Wu等人,2012中所述的那些。在一些方面中,基因工程改造的抗原受体包括美国专利号7,446,190中记载的CAR,和国际专利申请公开号WO/2014055668A1中记载的那些。

[0108] 1.嵌合抗原受体

[0109] 在一些实施方案中,CAR包含:a)细胞内信号传导结构域,b)跨膜结构域,和c)包含抗原结合区的细胞外结构域。

[0110] 在一些实施方案中,经改造的抗原受体包括CAR,所述CAR包括活化或刺激性CAR、共刺激性CAR(参见WO2014/055668)和/或抑制性CAR(iCAR,参见Fedorov等人,2013)。CAR通常包括连接至(在一些方面中经由接头和/或跨膜结构域)一种或多种细胞内信号传导组分的细胞外抗原(或配体)结合结构域。此类分子通常模仿或近似通过天然抗原受体的信号、通过此类受体与共刺激性受体的组合的信号和/或通过单独的共刺激性受体的信号。

[0111] 本发明的某些实施方案涉及核酸的用途,包括编码抗原特异性CAR多肽的核酸,包括已经人源化以降低免疫原性的CAR(hCAR),所述CAR包含细胞内信号传导结构域、跨膜结构域和包含一个或多个信号传导基序的细胞外结构域。在某些实施方案中,CAR可识别包含一种或多种抗原之间的共享空间的表位。在某些实施方案中,结合区可包含单克隆抗体的互补决定区、单克隆抗体的可变区和/或其抗原结合片段。在另一实施方案中,该特异性来源于结合至受体的肽(例如细胞因子)。

[0112] 预期人类CAR核酸可以是用于增强用于人类患者的细胞免疫疗法的人类基因。在一个特定实施方案中,本发明包括全长CAR cDNA或编码区。抗原结合区或抗原结合结构域可以包含源于特定人类单克隆抗体的单链可变片段(scFv)的V_H和V_L链的片段,诸如美国专利7,109,304中记载的那些,该专利通过引用并入本文中。该片段也可以是人类抗原特异性抗体的任何数目的不同抗原结合结构域。在更特定的实施方案中,该片段是由针对用于在人类细胞中表达的人类密码子应用而优化的序列编码的抗原特异性scFv。

[0113] 重排可以是多聚的,诸如双抗体或多聚体。多聚体最可能由轻链和重链的可变部分交叉配对为双抗体而形成。构建体的铰链部分可具有多种选择,从完全缺失至保留第一半胱氨酸、至脯氨酸取代而非丝氨酸取代、至截断至第一半胱氨酸。Fc部分可缺失。稳定和/或二聚化的任何蛋白质均可供用于此目的。人们可以仅使用Fc结构域中的一种,例如来自人类免疫球蛋白的CH2或CH3结构域。还可以使用已经修饰以改良二聚化的人类免疫球蛋白的铰链区、CH2区和CH3区。人们还可以仅使用免疫球蛋白的铰链部分。人们还可使用CD8α的部分。

[0114] 在一些实施方案中,CAR核酸包含编码其他共刺激性受体的序列,所述共刺激性受体诸如跨膜结构域和经修饰的CD28细胞内信号传导结构域。其他共刺激性受体包括(但不

限于)CD28、CD27、OX-40(CD134)、DAP10、DAP12和4-1BB(CD137)中的一种或多种。除了通过CD3ζ引发的初级信号以外,通过插入到人类CAR中的人类共刺激性受体提供的额外信号对于NK细胞的完全活化具有重要性且可以帮助改良过继免疫疗法的体内持久性和治疗成功性。

[0115] 在一些实施方案中,CAR经构建具有针对特定抗原(或标记物或配体)的特异性,所述特定抗原诸如在待由过继疗法靶向的特定细胞类型中表达的抗原,例如癌症标记物,和/或意欲诱导抑制反应的抗原,诸如在正常或非病变细胞类型上表达的抗原。因此,CAR在其细胞外部分中通常包含一种或多种抗原结合分子,诸如一种或多种抗原结合片段、结构域或部分,或一种或多种抗体可变结构域和/或抗体分子。在一些实施方案中,CAR包括抗体分子的一个或多个抗原结合部分,诸如来源于单克隆抗体(mAb)的可变重链(VH)和可变轻链(VL)的单链抗体片段(scFv)。

[0116] 在嵌合抗原受体的某些实施方案中,受体的抗原特异性部分(其可称为包含抗原结合区的细胞外结构域)包含肿瘤相关抗原或病原体特异性抗原结合结构域。抗原包括通过模式识别受体(诸如Dectin-1)识别的碳水化合物抗原。肿瘤相关抗原可以是任何种类的,只要其在肿瘤细胞的细胞表面上表达。肿瘤相关抗原的示例性实施方案包括CD19、CD20、癌胚抗原、甲胎蛋白、CA-125、MUC-1、CD56、EGFR、c-Met、AKT、Her2、Her3、上皮肿瘤抗原、黑素瘤相关抗原、突变的p53、突变的ras等。在某些实施方案中,当存在低量的肿瘤相关抗原时,CAR可以与细胞因子共表达以改良持久性。例如,CAR可与IL-15共表达。

[0117] 编码嵌合受体的开放阅读框的序列可以获自基因组DNA来源、cDNA来源,或可以经合成(例如经由PCR合成),或其组合。取决于基因组DNA的尺寸和内含子的数目,可能需要使用cDNA或其组合,原因在于:发现内含子使mRNA稳定。此外,可进一步有利地使用内源性或外源性非编码区来使mRNA稳定。

[0118] 预期嵌合构建体可以作为裸DNA或在合适的载体中引入至免疫细胞中。通过电穿孔使用裸DNA稳定转染细胞的方法为本领域中已知的。参见例如美国专利号6,410,319。裸DNA一般指编码嵌合受体的DNA,该DNA以对于表达适当的定向包含在质粒表达载体中。

[0119] 备选地,病毒载体(例如逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体或慢病毒载体)可以用于将嵌合构建体引入至免疫细胞中。根据本发明方法使用的适合的载体在免疫细胞中是非复制的。已知大量载体是基于病毒的,其中维持在细胞中的病毒的拷贝数足够低以维持细胞活力,诸如例如基于HIV、SV40、EBV、HSV或BPV的载体。

[0120] 在一些方面中,抗原特异性结合或识别组分连接至一个或多个跨膜和细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,CAR包括融合至CAR的细胞外结构域的跨膜结构域。在一个实施方案中,使用与CAR中的结构域之一天然缔合的跨膜结构域。在一些情况下,跨膜结构域经选择或由氨基酸取代修饰以避免此类结构域结合至相同或不同表面膜蛋白质的跨膜结构域,以使与受体复合物的其他成员的相互作用降至最低。

[0121] 在一些实施方案中,跨膜结构域来源于天然或合成来源。在天然来源的情况下,在一些方面中,结构域来源于任何膜结合的蛋白或跨膜蛋白。跨膜区包括来源于以下(即,至少包含以下的一个或多个跨膜区)的那些:T细胞受体的α、β或ζ链,CD28,CD3ζ,CD3ε,CD3γ,CD3δ,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD 16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD86,CD 134,CD137,CD154,ICOS/CD278,GITR/CD357,NKG2D和DAP分子。备选地,在一些实施方案中,跨膜结构域

为合成的。在一些方面中，合成的跨膜结构域主要包含疏水性残基，诸如亮氨酸和缬氨酸。在一些方面中，将在合成的跨膜结构域的各末端处发现苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体。

[0122] 在某些实施方案中，本文所公开的用于遗传修饰免疫细胞(诸如NK细胞)的平台技术包括：(i)使用电穿孔装置(例如核转染仪)的非病毒基因转移，(ii)经由胞内结构域(例如CD28/CD3-ζ、CD137/CD3-ζ或其他组合)传导信号的CAR，(iii)具有可变长度的胞外结构域的CAR，所述胞外结构域将抗原识别结构域连接至细胞表面，以及在一些情况下，(iv)能够稳健地且在数值上扩增CAR^+免疫细胞的衍生自K562的人工抗原呈递细胞(aAPC)(Singh等人，2008；Singh等人，2011)。

[0123] 2.T细胞受体(TCR)

[0124] 在一些实施方案中，经基因工程改造的抗原受体包括重组TCR和/或从天然存在的T细胞克隆的TCR。“T细胞受体”或“TCR”指含有可变α和β链(也分别称为TCRα和TCRβ)或可变γ和δ链(也分别称为TCRγ和TCRδ)且能够特异性结合已与MHC受体结合的抗原肽的分子。在一些实施方案中，TCR呈αβ形式。

[0125] 通常，以αβ或γδ形式存在的TCR一般在结构上是相似的，但是表达它们的T细胞可以具有不同的解剖位置或功能。TCR可存在于细胞表面上或以可溶性形式存在。一般而言，TCR存在于一般负责识别与主要组织相容性复合体(MHC)分子结合的抗原的T细胞(或T淋巴细胞)的表面上。在一些实施方案中，TCR还可以包含恒定结构域、跨膜结构域和/或短胞质尾区(参见例如Janeway等人，1997)。例如，在一些方面中，TCR的各条链可具有一个N端免疫球蛋白可变结构域、一个免疫球蛋白恒定结构域、跨膜区和C端末端处的短胞质尾区。在一些实施方案中，TCR与参与调控信号转导的CD3复合物的恒定蛋白相缔合。除非另外说明，否则术语“TCR”应理解为涵盖其功能性TCR片段。该术语还涵盖完整或全长TCR，包括呈αβ形式或γδ形式的TCR。

[0126] 因此，出于本发明的目的，提及TCR包括任何TCR或功能性片段，诸如与结合在MHC分子中的特定抗原肽(即，MHC-肽复合物)结合的TCR的抗原结合部分。可互换使用的TCR的“抗原结合部分”或“原结合片段”是指含有TCR的结构性结构域的一部分但结合完整TCR所结合的抗原(例如MHC-肽复合物)的分子。在一些情况下，抗原结合部分含有TCR的可变结构域，诸如TCR的可变α链和可变β链，其足以形成结合位点用于结合至特异性MHC-肽复合物，诸如其中一般每条链含有三个互补决定区。

[0127] 在一些实施方案中，TCR链的可变结构域缔合以形成环或类似于免疫球蛋白的互补决定区(CDR)，其通过形成TCR分子的结合位点赋予抗原识别且决定肽特异性，并且决定肽特异性。通常，如免疫球蛋白，CDR由框架区(FR)分隔(参见例如Jores等人，1990；Chothia等人，1988；Lefranc等人，2003)。在一些实施方案中，CDR3是负责识别经处理抗原的主要CDR，尽管α链的CDR1也已显示与抗原肽的N端部分相互作用，而β链的CDR1与肽的C端部分相互作用。认为CDR2识别MHC分子。在一些实施方案中，β链的可变区可含有另一高变(HV4)区。

[0128] 在一些实施方案中，所述TCR链含有恒定结构域。例如，与免疫球蛋白类似，TCR链(例如，α-链、β-链)的细胞外部分可以含有两个免疫球蛋白结构域、一个在N端的可变结构域(例如，V_a或Vp；通常是基于Kabat编号的氨基酸1-116，Kabat等人，“Sequences of Proteins of Immunological Interest,US Dept.Health and Human Services,Public

Health Service National Institutes of Health,1991,第5版)、以及一个与细胞膜相邻的恒定结构域(例如,α链恒定结构域或C_a,通常是基于Kabat的氨基酸117-259;β-链恒定结构域或Cp,通常是基于Kabat的氨基酸117-295)。例如,在某些情况下,由两条链形成的TCR的细胞外部分含有两个近膜端恒定结构域和两个含有CDR的远膜端可变结构域。TCR结构域的恒定结构域含有短连接序列,其中半胱氨酸残基形成二硫键,在两条链之间形成连接。在一些实施方案中,TCR可以具有在α链和β链的每一个中的额外半胱氨酸残基,使得TCR在恒定结构域中含有两个二硫键。

[0129] 在一些实施方案中,所述TCR链可以含有一个跨膜结构域。在一些实施方案中,所述跨膜结构域是带正电荷的。在一些情况下,所述TCR链含有一个胞质尾区。在一些情况下,所述结构允许TCR与其他分子(如CD3)结合。例如,含有具有跨膜区的恒定结构域的TCR可以将蛋白锚定在细胞膜中并与CD3信号传导器(apparatus)或复合物的恒定亚基结合。

[0130] 一般来说,CD3是可以具有三条不同链(γ、δ和ε)(在哺乳动物中)和ζ链的多蛋白复合物。例如,在哺乳动物中,所述复合物可以含有一个CD3γ链、一个CD3δ链、两个CD3ε链以及CD3ζ链的同源二聚体。CD3γ、CD3δ和CD3ε链是含有单个免疫球蛋白结构域的免疫球蛋白超家族的高度相关的细胞表面蛋白。CD3γ、CD3δ和CD3ε链的跨膜区带负电荷,这是允许这些链与带正电荷的T细胞受体链结合的特征。CD3γ、CD3δ和CD3ε链的胞内尾区各自含有单个保守基序(称为基于免疫受体酪氨酸的活化基序或ITAM),而每个CD3ζ链具有三个保守基序。通常,ITAM参与TCR复合物的信号传导能力。这些辅助分子具有带负电荷的跨膜区,并在将信号从TCR传送到细胞中发挥作用。CD3链和ζ链与TCR一起形成所谓的T细胞受体复合物。

[0131] 在一些实施方案中,所述TCR可以是两条链α和β(或任选地γ和δ)的异源二聚体,或者它可以是单链TCR构建体。在一些实施方案中,所述TCR是含有例如通过一个或多个二硫键连接的两条独立链(α和β链或γ和δ链)的异源二聚体。在一些实施方案中,鉴定针对靶抗原(例如癌症抗原)的TCR并将其引入细胞中。在一些实施方案中,编码TCR的核酸可从多种来源获得,例如通过公众可得到的TCR DNA序列的聚合酶链式反应(PCR)扩增。在一些实施方案中,TCR获自生物来源,例如获自细胞,例如获自T细胞(例如细胞毒性T细胞)、T细胞杂交瘤或其他公众可获得的来源。在一些实施方案中,T细胞可获自体内分离的细胞。在一些实施方案中,可以从患者分离高亲和性T细胞克隆,并分离TCR。在一些实施方案中,T细胞可以是培养的T细胞杂交瘤或克隆。在一些实施方案中,已经在用人免疫系统基因(例如人白细胞抗原系统或HLA)改造的转基因小鼠中产生了针对靶抗原的TCR克隆。参见例如肿瘤抗原(参见,例如,Parkhurst等人,2009和Cohen等人,2005)。在一些实施方案中,噬菌体展示用于分离针对靶抗原的TCR(参见,例如,Varela-Rohena等人,2008和Li,2005)。在一些实施方案中,TCR或其抗原结合部分可根据TCR序列的知识合成地产生。

[0132] D.抗原呈递细胞

[0133] 抗原呈递细胞包括巨噬细胞、B淋巴细胞和树突状细胞,它们通过各自对特定MHC分子的表达区分。APC内化抗原且在其外部细胞膜上再表达该抗原的一部分以及MHC分子。MHC是具有多个基因座的较大基因复合物。MHC基因座编码两个主要类别的MHC膜分子,称为I类和II类MHC。T辅助淋巴细胞一般识别与MHC II类分子缔合的抗原,T细胞毒性淋巴细胞识别与MHC I类分子缔合的抗原。MHC在人类中称为HLA复合物,在小鼠中称为H-2复合物。

[0134] 在某些情况下,aAPC适用于制备实施方案的治疗性组合物和细胞疗法产品。关于制备和使用抗原递呈系统的一般指导参见例如美国专利号6,225,042、6,355,479、6,362,001和6,790,662;美国专利申请公开号2009/0017000和2009/0004142;以及国际公开号WO2007/103009。

[0135] aAPC系统可以包含至少一种外源性辅助分子。可以采用任何合适数目和组合的辅助分子。辅助分子可选自诸如共刺激性分子和粘附分子的辅助分子。示例性共刺激性分子包括CD86、CD64(FcγRI)、41BB配体和IL-21。粘附分子可包括:碳水化合物结合糖蛋白,诸如选择素;跨膜结合糖蛋白,诸如整联蛋白;钙依赖性蛋白,诸如钙粘素;以及单次跨膜免疫球蛋白(Ig)超家族蛋白,诸如细胞间粘附分子(ICAM);所述粘附分子促进例如细胞与细胞或细胞与基质的接触。示例性粘附分子包括LFA-3和ICAM,诸如ICAM-1。用于选择、克隆、制备和表达示例性辅助分子(包括共刺激性分子和粘附分子)的技术、方法和试剂示例于例如美国专利号6,225,042、6,355,479和6,362,001。

[0136] E.抗原

[0137] 在由经遗传工程改造的抗原受体靶向的抗原中的是在待通过过继细胞疗法靶向的疾病、病状或细胞类型的情形下表达的那些抗原。在疾病和病状中的是增殖性、赘生性和恶性疾病和病症,包括癌症和肿瘤,包括血液癌症、免疫系统癌症,例如淋巴瘤、白血病和/或骨髓瘤,例如B、T和骨髓白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤。在一些实施方案中,相比于正常或非靶向细胞或组织,抗原选择性地在疾病或病状的细胞(例如肿瘤或病原性细胞)上表达或过表达。在其他实施方案中,抗原在正常细胞上表达和/或在经工程改造的细胞上表达。

[0138] 任何合适的抗原可用于本发明的方法中。示例性抗原包括但不限于来自感染原的抗原分子、自体/自身抗原、肿瘤/癌症相关抗原和肿瘤新抗原(Linnemann等人,2015)。在特定方面中,抗原包括NY-ESO、EGFRvIII、Muc-1、Her2、CA-125、WT-1、Mage-A3、Mage-A4、Mage-A10、TRAIL/DR4和CEA。在特定方面中,针对两种或更多种抗原受体的抗原包括但不限于CD19、EBNA、WT1、CD123、NY-ESO、EGFRvIII、MUC1、HER2、CA-125、WT1、Mage-A3、Mage-A4、Mage-A10、TRAIL/DR4和/或CEA。这些抗原的序列在本领域中已知的,例如:CD19(登录号NG_007275.1)、EBNA(登录号NG_002392.2)、WT1(登录号NG_009272.1)、CD123(登录号NC_000023.11)、NY-ESO(登录号NC_000023.11)、EGFRvIII(登录号NG_007726.3)、MUC1(登录号NG_029383.1)、HER2(登录号NG_007503.1)、CA-125(登录号NG_055257.1)、WT1(登录号NG_009272.1)、Mage-A3(登录号NG_013244.1)、Mage-A4(登录号NG_013245.1)、Mage-A10(登录号NC_000023.11)、TRAIL/DR4(登录号NC_000003.12)和/或CEA(登录号NC_000019.10)。

[0139] 肿瘤相关抗原可衍生自前列腺癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肺癌、胰腺癌、肾癌、间皮瘤癌症、卵巢癌或黑素瘤癌症。示例性肿瘤相关抗原或肿瘤细胞衍生抗原包括MAGE1、3和MAGE4(或其他MAGE抗原,例如国际专利公开号WO99/40188中所公开的那些);PRAME;BAGE;RAGE,Lage(还称为NY ESO 1);SAGE;和HAGE或GAGE。肿瘤抗原的这些非限制性实例表达于广泛的肿瘤类型,例如黑素瘤、肺癌、肉瘤和膀胱癌中。参见例如美国专利号6,544,518。前列腺癌肿瘤相关抗原包括例如前列腺特异性膜抗原(PSMA)、前列腺特异性抗原(PSA)、前列腺酸性磷酸盐、NKX3.1和前列腺的六跨膜上皮抗原(STEAP)。

[0140] 其他肿瘤相关抗原包括Plu-1、HASH-1、HasH-2、Cripto和Criptin。另外,肿瘤抗原可为自身肽激素,例如全长促性腺激素释放激素(GnRH),其为一种用于治疗多种癌症的长

度为10个氨基酸的短肽。

[0141] 肿瘤抗原包括衍生自特征在于肿瘤相关抗原表达，例如HER-2/neu表达的癌症的肿瘤抗原。感兴趣的肿瘤相关抗原包括谱系特异性肿瘤抗原，例如黑素细胞-黑素瘤谱系抗原MART-1/Melan-A、gp100、gp75、mda-7、酪氨酸酶和酪氨酸酶相关蛋白质。举例说明性肿瘤相关抗原包括但不限于衍生自或包含以下中的任何一个或多个的肿瘤抗原：p53、Ras、c-Myc、细胞质丝氨酸/苏氨酸激酶(例如A-Raf、B-Raf和C-Raf、细胞周期蛋白依赖性激酶)、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A10、MAGE-A12、MART-1、BAGE、DAM-6、-10、GAGE-1、-2、-8、GAGE-3、-4、-5、-6、-7B、NA88-A、MART-1、MC1R、Gp100、PSA、PSM、酪氨酸酶、TRP-1、TRP-2、ART-4、CAMEL、CEA、Cyp-B、hTERT、hTRT、iCE、MUC1、MUC2、磷酸肌醇3-激酶(PI3K)、TRK受体、PRAME、P15、RU1、RU2、SART-1、SART-3、Wilms肿瘤抗原(WT1)、AFP、-连环蛋白/m、胱天蛋白酶-8/m、CEA、CDK-4/m、ELF2M、GnT-V、G250、HSP70-2M、HST-2、KIAA0205、MUM-1、MUM-2、MUM-3、肌球蛋白/m、RAGE、SART-2、TRP-2/INT2、707-AP、膜联蛋白II、CDC27/m、TPI/mbcr-abl、BCR-ABL、干扰素调节因子4(IRF4)、ETV6/AML、LDLR/FUT、Pml/RAR、肿瘤相关钙信号转导蛋白1(TACSTD1)TACSTD2、受体酪氨酸激酶(例如表皮生长因子受体(EGFR)(特别地，EGFRvIII)、血小板衍生生长因子受体(PDGFR)、血管内皮生长因子受体(VEGFR))、细胞质酪氨酸激酶(例如src-家族、syk-ZAP70家族)、整联蛋白连接激酶(ILK)、转录的信号转导蛋白和活化因子STAT3、STATS和STATE、低氧诱导因子(例如HIF-1和HIF-2)、核因子-κB(NF-B)、Notch受体(例如Notch1-4)、c-Met、雷帕霉素的哺乳动物靶标(mTOR)、WNT、细胞外信号调节激酶(ERK)和其调节亚基、PMSA、PR-3、MDM2、间皮素、肾细胞癌-5T4、SM22-α、碳酸酐酶I(CAI)和IX(CAIX)(还称为G250)、STEAD、TEL/AML1、GD2、蛋白酶3、hTERT、肉瘤移位断点、EphA2、ML-IAP、EpCAM、ERG(TMPRSS2 ETS融合基因)、NA17、PAX3、ALK、雄激素受体、细胞周期蛋白B1、聚唾液酸、MYCN、RhoC、GD3、岩藻糖基GM1、间皮素(mesothelian)、PSCA、sLe、PLAC1、GM3、BORIS、Tn、GLoboH、NY-BR-1、RGsS、SART3、STn、PAX5、OY-TES1、精子蛋白17、LCK、HMWMAA、AKAP-4、SSX2、XAGE 1、B7H3、豆荚蛋白、TIE2、Page4、MAD-CT-1、FAP、MAD-CT-2、fos相关抗原1、CBX2、CLDN6、SPANX、TPTE、ACTL8、ANKRD30A、CDKN2A、MAD2L1、CTAG1B、SUNC1、LRRN1和个体基因型(idiotype)。

[0142] 抗原可包括表位区或表位肽，其衍生自肿瘤细胞中突变的基因或衍生自相比于正常细胞在肿瘤细胞中以不同水平转录的基因，例如端粒酶、存活素、间皮素、突变的ras、bcr/abl重排、Her2/neu、突变的或野生型p53、细胞色素P450 1B1、和异常表达的内含子序列，例如N-乙酰氨基葡萄糖转移酶-V；在骨髓瘤和B细胞淋巴瘤中产生独特个体基因型的免疫球蛋白基因的克隆重排；包括衍生自肿瘤病毒过程的表位区或表位肽的肿瘤抗原，例如人类乳头状瘤病毒蛋白E6和E7；埃巴病毒蛋白LMP2；具有肿瘤选择性表达的非突变癌胚蛋白，例如癌胚抗原和甲胎蛋白。

[0143] 在其他实施方案中，抗原获自或衍生自病原性微生物或机会性病原性微生物(在本文中还称作传染病微生物)，例如病毒、真菌、寄生物和细菌。在某些实施方案中，衍生自此类微生物的抗原包括全长蛋白质。

[0144] 其抗原预期用于本文所述的方法的举例说明性病原性生物体包括人类免疫缺陷病毒(HIV)、单纯疱疹病毒(HSV)、呼吸道合胞病毒(RSV)、巨细胞病毒(CMV)、埃巴病毒(EBV)、A型、B型和C型流感病毒、水泡性口炎病毒(VSV)、水泡性口炎病毒(VSV)、多瘤病毒

(例如BK病毒和JC病毒)、腺病毒、包括抗甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant Staphylococcus aureus,MRSA)的葡萄球菌属(Staphylococcus)物种和包括肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)的链球菌属(Streptococcus)物种。如本领域技术人员将理解的,衍生自这些和其他病原性微生物、用作如本文所描述的抗原的蛋白质和编码蛋白质的核苷酸序列可在出版物和公开数据库例如GENBANK®、SWISS-PROT®和TREMBL®中确定。

[0145] 衍生自人类免疫缺陷病毒(HIV)的抗原包括以下中的任一个:HIV病毒粒子结构蛋白(例如gp120、gp41、p17、p24),蛋白酶,逆转录酶或由tat、rev、nef、vif、vpr和vpu编码的HIV蛋白。

[0146] 衍生自单纯疱疹病毒(例如HSV1和HSV2)的抗原包括但不限于表达自HSV晚期基因的蛋白质。晚期基因的组主要编码形成病毒粒子的蛋白质。此类蛋白质包括形成病毒衣壳的五种蛋白质(UL):UL6、UL18、UL35、UL38和主要衣壳蛋白UL19、UL45和UL27,其中每一个可用作如本文所述的抗原。预期用作本文中的抗原的其他示例性HSV蛋白包括ICP27(H1、H2)、糖蛋白B(gB)和糖蛋白D(gD)蛋白。HSV基因组包含至少74个基因,各自编码可潜在地用作抗原的蛋白质。

[0147] 衍生自巨细胞病毒(CMV)的抗原包括CMV结构蛋白、在病毒复制的即刻早期和早期期间表达的病毒抗原、糖蛋白I和III、衣壳蛋白、外壳蛋白、低基质蛋白pp65(ppUL83)、p52(ppUL44)、IE1和1E2(UL123和UL122)、来自UL128-UL150的基因簇的蛋白质产物(Rykman等人,2006)、包膜糖蛋白B(gB)、gH、gN和pp150。如本领域技术人员应该理解的,用作本文所述的抗原的CMV蛋白质可在公开数据库,例如GENBANK®、SWISS-PROT®和TREMBL®中确定(参见例如Bennekov等人,2004;Loewendorf等人,2010;Marschall等人,2009)。

[0148] 预期用于某些实施方案的衍生自埃巴病毒(Epstein-Ban virus,EBV)的抗原包括EBV溶解蛋白gp350和gp110、在潜伏周期感染期间产生的EBV蛋白,包括埃巴核抗原(EBNA)-1、EBNA-2、EBNA-3A、EBNA-3B、EBNA-3C、EBNA-前导蛋白(EBNA-LP)和潜伏膜蛋白(LMP)-1、LMP-2A和LMP-2B(参见例如Lockey等人,2008)。

[0149] 预期用于本文中的衍生自呼吸道合胞病毒(RSV)的抗原包括由RSV基因组编码的十一种蛋白质或其抗原性片段中的任一个:NS1、NS2、N(核衣壳蛋白)、M(基质蛋白)SH、G和F(病毒外壳蛋白)、M2(第二基质蛋白)、M2-1(延伸因子)、M2-2(转录调节)、RNA聚合酶和磷蛋白P。

[0150] 预期使用的衍生自水泡性口炎病毒(VSV)的抗原包括由VSV基因组编码的五种主要蛋白和其抗原性片段中的任一个:大蛋白(L)、糖蛋白(G)、核蛋白(N)、磷蛋白(P)和基质蛋白(M)(参见例如Rieder等人,1999)。

[0151] 预期用于某些实施方案的衍生自流感病毒的抗原包括血凝素(HA)、神经氨酸苷酶(NA)、核蛋白(NP)、基质蛋白M1和M2、NS1、NS2(NEP)、PA、PB1、PB1-F2和PB2。

[0152] 示例性病毒抗原还包括但不限于腺病毒多肽、甲病毒多肽、杯状病毒多肽(例如杯状病毒衣壳抗原)、冠状病毒多肽、犬瘟热病毒多肽、埃博拉病毒多肽、肠病毒多肽、黄病毒多肽、肝炎病毒(AE)多肽(乙型型肝炎核心或表面抗原、丙型肝炎病毒E1或E2糖蛋白、核心

或非结构蛋白)、疱疹病毒多肽(包括单纯疱疹病毒或水痘带状疱疹病毒糖蛋白)、感染性腹膜炎病毒多肽、白血病病毒多肽、马尔堡病毒多肽、正粘病毒多肽、乳头瘤病毒多肽、副流感病毒多肽(例如血凝素和神经氨酸苷酶多肽)、副粘病毒多肽、细小病毒多肽、瘟病毒多肽、小核糖核酸病毒多肽(例如脊髓灰质炎病毒衣壳多肽)、痘病毒多肽(例如牛痘病毒多肽)、狂犬病病毒多肽(例如狂犬病病毒糖蛋白G)、呼肠孤病毒多肽、反转录病毒多肽和轮状病毒多肽。

[0153] 在某些实施方案中,抗原可为细菌抗原。在某些实施方案中,感兴趣的细菌抗原可为分泌的多肽。在其他某些实施方案中,细菌抗原包括使多肽的一个或多个部分暴露于细菌的外细胞表面上的抗原。

[0154] 预期使用的衍生自葡萄球菌属物种(包括抗甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA))的抗原包括毒性调节子,例如Agr系统、Sar和Sae、Arl系统、Sar同系物(Rot、MgrA、SarS、SarR、SarT、SarU、SarV、SarX、SarZ和TcaR)、Srr系统和TRAP。可充当抗原的其他葡萄球菌蛋白质包括C1p蛋白质、HtrA、MsrR、顺乌头酸酶、CcpA、SvrA、Msa、CfvA和CfvB(参见例如Staphylococcus:Molecular Genetics,2008Caister Academic Press,Ed.Jodi Lindsay)。金黄色葡萄球菌的两个物种(N315和Mu50)的基因组已测序并且公开可用,例如在PATRIC(PATRIC:The VBI PathoSystems Resource Integration Center,Snyder等人,2007)。如本领域技术人员将理解,用作抗原的葡萄球菌蛋白质还可在其他公开数据库例如GenBank®、Swiss-Prot®和TrEMBL®中确定。

[0155] 预期用于本文所述的某些实施方案的衍生自肺炎链球菌的抗原包括肺炎链球菌溶血素、PspA、胆碱-结合蛋白A(CbpA)、NanA、NanB、SpnHL、PavA、LytA、Pht和菌毛蛋白(RrgA;RrgB;RrgC)。肺炎链球菌的抗原性蛋白质也是本领域中已知的并且可在一些实施方案中用作抗原(参见例如Zysk等人,2000)。肺炎链球菌的毒性菌株的完整基因组序列已测序,并且如本领域技术人员应理解的,本文中所用的肺炎链球菌蛋白质还可在其他公开数据库例如GENBANK®、SWISS-PROT®和TREMBL®中确定。用于根据本公开内容的抗原的尤其感兴趣的蛋白质包括预测暴露于肺炎双球菌表面的毒性因子和蛋白质(参见例如Frolet等人,2010)。

[0156] 可用作抗原的细菌抗原的实例包括但不限于放线菌(Actinomyces)多肽、芽孢杆菌(Bacillus)多肽、拟杆菌(Bacteroides)多肽、鲍特氏菌(Bordetella)多肽、巴尔通体(Bartonella)多肽、疏螺旋体(Borrelia)多肽(例如伯氏疏螺旋体(B.burgdorferi)OspA)、布鲁氏菌(Brucella)多肽、弯曲杆菌(Campylobacter)多肽、嗜二氧化碳噬细胞菌(Capnocytophaga)多肽、衣原体(Chlamydia)多肽、棒状杆菌(Corynebacterium)多肽、柯克斯氏体(Coxiella)多肽、嗜皮菌(Dermatophilus)多肽、肠球菌(Enterococcus)多肽、埃利希体(Ehrlichia)多肽、埃希菌(Escherichia)多肽、弗朗西斯氏菌(Francisella)多肽、梭杆菌(Fusobacterium)多肽、血巴通氏体(Haemobartonella)多肽、嗜血杆菌(Haemophilus)多肽(例如b型流感嗜血杆菌外膜蛋白质)、螺旋杆菌(Helicobacter)多肽、克雷伯氏菌(Klebsiella)多肽、L-型细菌多肽、钩端螺旋体(Leptospira)多肽、李斯特菌(Listeria)多肽、分枝杆菌(Mycobacteria)多肽、支原体(Mycoplasma)多肽、奈瑟氏菌(Neisseria)多肽、新立克次体(Neorickettsia)多肽、诺卡氏菌(Nocardia)多肽、巴氏杆菌(Pasteurella)多肽、消化球菌(Peptococcus)多肽、消化链球菌(Peptostreptococcus)多肽、肺炎球菌

(Pneumococcus)多肽(即肺炎链球菌(S.pneumoniae)多肽)(参见本文描述)、变形杆菌(Proteus)多肽、假单胞菌(Pseudomonas)多肽、立克次体(Rickettsia)多肽、罗克利马体(Rochalimaea)多肽、沙门氏菌(Salmonella)多肽、志贺菌(Shigella)多肽、葡萄球菌(Staphylococcus)多肽、A组链球菌(Streptococcus)多肽(例如酿脓链球菌(S.pyogenes)M蛋白)、B组链球菌(无乳链球菌(S.agalactiae))多肽、密螺旋体(Treponema)多肽和耶尔森菌(Yersinia)多肽(例如鼠疫耶尔森菌(Y pestis)F1和V抗原)。

[0157] 真菌抗原的实例包括但不限于犁头霉(Absidia)多肽、枝顶孢(Acremonium)多肽、交链孢(Alternaria)多肽、曲霉菌(Aspergillus)多肽、蛙粪霉菌(Basidiobolus)多肽、离蠕孢(Bipolaris)多肽、芽生菌(Blastomyces)多肽、念珠菌(Candida)多肽、球孢子菌(Coccidioides)多肽、耳霉(Conidiobolus)多肽、隐球菌(Cryptococcus)多肽、弯孢霉(Curvalaria)多肽、表皮癣菌(Epidermophyton)多肽、外瓶霉(Exophiala)多肽、地丝菌(Geotrichum)多肽、组织胞浆菌(Histoplasma)多肽、马杜拉分支菌(Madurella)多肽、马拉色菌(Malassezia)多肽、小孢子菌(Microsporum)多肽、丛梗孢(Moniliella)多肽、被孢霉(Mortierella)多肽、毛霉菌(Mucor)多肽、拟青霉菌(Paecilomyces)多肽、青霉菌(Penicillium)多肽、单胞瓶霉(Phialemonium)多肽、瓶霉(Phialophora)多肽、原壁菌(Prototheca)多肽、假霉样真菌(Pseudallescheria)多肽、假微座孢(Pseudomicrodochium)多肽、腐霉菌(Pythium)多肽、鼻孢子菌(Rhinosporidium)多肽、根霉菌(Rhizopus)多肽、齿梗孢(Scolecobasidium)多肽、孢子丝菌(Sporothrix)多肽、匍柄霉(Stemphylium)多肽、毛癣菌(Trichophyton)多肽、毛孢子菌(Trichosporon)多肽和木丝霉(Xylohypha)多肽。

[0158] 原生动物寄生虫抗原的实例包括但不限于巴倍虫(Babesia)多肽、肠袋虫(Balantidium)多肽、贝诺虫(Besnoitia)多肽、隐胞子虫(Cryptosporidium)多肽、艾美球虫(Eimeria)多肽、脑胞内原虫(Encephalitozoon)多肽、内阿米巴(Entamoeba)多肽、梨形鞭毛虫(Giardia)多肽、哈蒙德虫(Hammondia)多肽、肝簇虫(Hepatozoon)多肽、等孢子球虫(lsospora)多肽、利什曼原虫(Leishmania)多肽、微孢子虫(Microsporidia)多肽、新孢子虫(Neospora)多肽、小孢子虫(Nosema)多肽、五鞭毛滴虫(Pentatrichomonas)多肽、疟原虫(Plasmodium)多肽。蠕虫寄生虫抗原的实例包括但不限于棘唇线虫(Acanthocheilonema)多肽、猫圆线虫(Aelurostrongylus)多肽、钩虫(Ancylostoma)多肽、血管圆线虫(Angiostrongylus)多肽、蛔虫(Ascaris)多肽、布鲁丝线虫(Brugia)多肽、仰口线虫(Bunostomum)多肽、毛细线虫(Capillaria)多肽、夏氏线虫(Chabertia)多肽、古柏线虫(Cooperia)多肽、环体线虫(Crenosoma)多肽、网尾线虫(Dictyocaulus)多肽、膨结线虫(Dioctophyme)多肽、棘唇线虫(Dipetalonema)多肽、裂头绦虫(Diphyllobothrium)多肽、Diplydium多肽、恶丝虫(Dirofilaria)多肽、龙线虫(Dracunculus)多肽、蛲虫(Enterobius)多肽、类丝虫(Filaroides)多肽、血矛线虫(Haemonchus)多肽、兔唇蛔虫(Lagochilascaris)多肽、罗阿丝虫(Loa)多肽、曼森线虫(Mansonella)多肽、米勒线虫(Muellerius)多肽、侏体吸虫(Nanophyetus)多肽、板口线虫(Necator)多肽、细颈线虫(Nematodirus)多肽、结节线虫(Oesophagostomum)多肽、盘尾丝虫(Onchocerca)多肽、后睾吸虫(Opisthorchis)多肽、奥斯特线虫(Ostertagia)多肽、副丝虫(Parafilaria)多肽、并殖吸虫(Paragonimus)多肽、副蛔虫(Parascaris)多肽、泡翼线虫(Physaloptera)多肽、原

圆线虫(Protostrongylus)多肽、腹腔丝虫(Setaria)多肽、旋尾线虫(Spirocerca)多肽、迭宫绦虫(Spirometra)多肽、冠丝虫(Stephanofilaria)多肽、类圆线虫(Strongyloides)多肽、圆线虫(Strongylus)多肽、吸吮线虫(Thelazia)多肽、弓蛔线虫(Toxascaris)多肽、弓蛔虫(Toxocara)多肽、旋毛虫(Trichinella)多肽、毛圆线虫(Trichostrongylus)多肽、鞭虫(Trichuris)多肽、钩虫(Uncinaria)多肽和吴策线虫(Wuchereria)多肽。(例如恶性疟原虫(P.falciparum)环孢子(PfCSP))、孢子体表面蛋白2(PfSSP2)、肝状态抗原1的羧基末端(PfLSA1 c-端)和输出蛋白1(PfExp-1)、肺囊虫(Pneumocystis)多肽、肉孢子虫(Sarcocystis)多肽、血吸虫(Schistosoma)多肽、泰累尔梨浆虫(Theileria)多肽、弓形虫(Toxoplasma)多肽和锥虫(Trypanosoma)多肽。

[0159] 体外寄生虫抗原的实例包括但不限于来自以下的多肽(包括抗原以及过敏原):跳蚤;蜱,包括硬蜱和软蜱;苍蝇,例如蠓、蚊子、白蛉、黑蝇、马蝇、角蝇、鹿蝇、采采蝇、螯蝇、引起蝇蛆病的蝇和库蠓;蚂蚁;蜘蛛,虱子;螨虫;以及蝽类(true bug),例如床虱和猎蝽。

[0160] F.自杀基因

[0161] 本公开内容的免疫细胞的CAR可包含一种或多种自杀基因。如本文所用,术语“自杀基因”定义为在施用前药时实现基因产物向杀死其宿主细胞的化合物的转变的基因。可使用的自杀基因/前药组合的实例为单纯疱疹病毒-胸苷激酶(HSV-tk)和更昔洛韦、阿昔洛韦或FIAU;氧化还原酶和环己酰亚胺;胞嘧啶脱氨酶和5-氟胞嘧啶;胸苷激酶胸苷酸激酶(Tdk::Tmk)和AZT;和脱氧胞苷激酶和胞嘧啶阿拉伯糖苷。在具体的实施方案中,自杀基因是突变TNF-α,其是膜结合的并且可以被药物或抗体靶向。

[0162] 可使用大肠杆菌(E.coli)嘌呤核苷磷酸化酶,一种所谓的自杀基因,其将前药6-甲基嘌呤脱氧核糖苷转化为有毒嘌呤6-甲基嘌呤。与前药疗法一起使用的自杀基因的其他实例是大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶基因和HSV胸苷激酶基因。

[0163] 示例性自杀基因包括CD20、CD52、EGFRv3、突变TNF-α(包括膜结合的TNF-α)或诱导型胱天蛋白酶9。在一个实施方案中,EGFR变体III(EGFRv3)的截短形式可用作可通过西妥昔单抗(Cetuximab)切除的自杀抗原。可用于本公开内容中的本领域已知的其他自杀基因包括:嘌呤核苷磷酸化酶(PNP)、细胞色素p450酶(CYP)、羧肽酶(CP)、羧酸酯酶(CE)、硝基还原酶(NTR)、鸟嘌呤核糖基转移酶(XGRTP)、糖苷酶、甲硫氨酸-α,γ-裂解酶(MET)和胸苷磷酸化酶(TP)。

[0164] G.递送方法

[0165] 本领域技术人员将有能力通过标准重组技术(例如参见Sambrook等人,2001和Ausubel等人,1996)构建载体用于表达本公开内容的抗原受体。载体包括但不限于:质粒、黏粒、病毒(噬菌体、动物病毒和植物病毒)和人工染色体(例如,YAC),诸如反转录病毒载体(例如,来源于莫罗尼鼠类白血病病毒载体(MoMLV)、MSCV、SFFV、MPSV、SNV等的载体)、慢病毒载体(例如,来源于HIV-1、HIV-2、SIV、BIV、FIV等的载体)、腺病毒(Ad)载体(包括其复制胜任形式、复制缺陷形式和无肠形式)、腺相关病毒(AAV)载体、猴病毒40(SV-40)载体、牛乳头瘤病毒载体、埃巴病毒载体、疱疹病毒载体、牛痘病毒载体、哈维鼠肉瘤病毒(Harvey murine sarcoma virus)载体、鼠类乳房肿瘤病毒载体、劳斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus)载体、小病毒载体、脊髓灰质炎病毒载体、水泡性口炎病毒载体、maraba病毒载体和B组腺病毒enadenotucirev载体。

[0166] a.病毒载体

[0167] 本发明的某些方面中可提供编码抗原受体的病毒载体。在生成重组病毒载体时，通常用异源(或非天然)蛋白质的基因或编码序列来替换非必需基因。病毒载体是利用病毒序列将核酸且有可能将蛋白质引入细胞中的一类表达构建体。某些病毒经由受体介导的内吞作用感染细胞或进入细胞并整合至宿主细胞基因组中并且稳定且有效表达病毒基因的能力使其成为用于将外源核酸转移至细胞(例如，哺乳动物细胞)中的有吸引力的候选者。下文描述可用于递送本发明的某些方面的核酸的病毒载体的非限制性实例。

[0168] 慢病毒为复合反转录病毒，除常见反转录病毒基因gag、pol和env以外，慢病毒还含有其他具有调节或结构性功能的基因。慢病毒载体在本领域中是熟知的(参见例如美国专利6,013,516和5,994,136)。

[0169] 重组慢病毒载体能够感染非分裂细胞，且可用于体内和体外基因转移以及核酸序列表达。例如，美国专利5,994,136中描述了能够感染非分裂细胞的重组慢病毒，其中适合的宿主细胞经两个或更多个具有包装功能(即gag、pol和env以及rev和tat)的载体转染，该专利通过引用并入本文中。

[0170] b.调节元件

[0171] 包括在适用于本发明的载体中的表达盒尤其含有(在5’至3’方向上)可操作地连接于蛋白质编码序列的真核转录启动子、包括间隔序列的剪接信号和转录终止/聚腺苷酸化序列。控制真核细胞中的蛋白质编码基因的转录的启动子和增强子由多个基因元件构成。细胞机构能够聚集和整合由各元件输送的调节信息，从而允许不同基因进化不同的、通常为复合的转录调节模式。在本发明的上下文中所使用的启动子包括组成型、诱导型及组织特异型启动子。

[0172] (i)启动子/增强子

[0173] 本文所提供的表达构建体包含驱动抗原受体表达的启动子。启动子一般包含用于定位RNA合成的起始位点的序列。其最佳已知实例为TATA盒，但在一些缺乏TATA盒的启动子，诸如哺乳动物末端脱氧核苷酸转移酶基因的启动子和SV40晚期基因的启动子中，叠加起始位点本身的离散元件有助于固定起始的位置。额外启动子元件调节转录起始频率。通常，这些元件位于起始位点上游30110bp区中，但许多启动子已显示也含有起始位点下游的功能元件。为使编码序列“处在启动子控制下”，将转录阅读框的转录起始位点的5’端置于所选择的启动子的“下游”(即3’端)。“上游”启动子刺激DNA的转录且促进所编码RNA的表达。

[0174] 启动子元件之间的间距通常是灵活的，使得当元件相对彼此倒置或移动时保留启动子功能。在tk启动子中，启动子元件之间的间距可在活性开始下降前增加至相隔50bp。取决于启动子，个别元件似乎可以合作地或独立地起活化转录作用。启动子可以或可以不与“增强子”结合使用，增强子指参与核酸序列的转录活化的顺式作用调节序列。

[0175] 启动子可为天然与核酸序列缔合的一种启动子，如可通过分离位于编码区段和/或外显子上游的5’非编码序列获得。此类启动子可称为“内源的”。类似地，增强子可为天然与核酸序列缔合、位于该序列下游或上游的一种增强子。备选地，某些优势将通过将编码核酸区段置于重组或异源启动子控制下来获得，重组或异源启动子指在其天然环境中通常不与核酸序列缔合的启动子。重组或异源增强子也指在其天然环境中通常不与核酸序列缔合

的增强子。此类启动子或增强子可包括其他基因的启动子或增强子,以及自任何其他病毒或原核或真核细胞分离的启动子或增强子,和非“天然存在的”启动子或增强子,即含有不同转录调节区的不同元件和/或改变表达的突变。例如,最常用于重组DNA构建的启动子包括β内酰胺酶(青霉素酶)、乳糖及色氨酸(trp-)启动子系统。除合成地产生启动子和增强子的核酸序列以外,可结合本文所公开的组合物使用重组克隆和/或核酸扩增技术(包括PCR™)产生序列。此外,预期也可以采用引导非核细胞器(诸如粒线体、叶绿体等)内的序列的转录和/或表达的控制序列。

[0176] 自然地,使用有效引导在选择用于表达的细胞器、细胞类型、组织、器官或生物体中的DNA区段的表达的启动子和/或增强子将是重要的。分子生物学领域的技术人员一般知晓使用启动子、增强子和细胞型组合进行蛋白质表达(参见例如Sambrook等人,1989,其通过引用并入本文中)。所用启动子可以是组成型的、组织特异型的、诱导型的和/或适用于在适当条件下引导所引入的DNA区段的高水平表达,诸如在重组蛋白质和/或肽的大规模产生方面有利。启动子可以是异源的或内源的。

[0177] 另外,任何启动子/增强子组合(根据例如真核启动子数据库(Eukaryotic Promoter Data Base,EPDB),通过万维网epd.isb-sib.ch/访问)也可用于驱动表达。使用T3、T7或SP6细胞质表达系统是另一个可能的实施方案。如果提供适当的细菌聚合酶(作为递送复合物的一部分或作为额外的基因表达构建体),则真核细胞可以支持从某些细菌启动子的细胞质转录。

[0178] 启动子的非限制性实例包括早期或晚期病毒启动子,诸如SV40早期或晚期启动子、巨细胞病毒(CMV)即时早期启动子、劳斯肉瘤病毒(RSV)早期启动子;真核细胞启动子,诸如β肌动蛋白启动子、GADPH启动子、金属硫蛋白启动子;和串联的反应元件启动子,诸如环状AMP反应元件启动子(cre)、血清反应元件启动子(sre)、佛波醇酯启动子(TPA)和靠近最小TATA盒的反应元件启动子(tre)。也有可能使用人类生长激素启动子序列(例如Genbank登录号X05244,核苷酸283-341所描述的人类生长激素最小启动子)或小鼠乳房肿瘤启动子(可购自ATCC,目录号ATCC 45007)。在某些实施方案中,启动子为CMV IE、dectin-1、dectin-2、人类CD11c、F4/80、SM22、RSV、SV40、Ad MLP、β-肌动蛋白、MHC I类或MHC II类启动子,然而适用于驱动治疗性基因表达的任何其他启动子可以适用于实施本发明。

[0179] 在某些方面中,本发明的方法亦还涉及增强子序列,即增加启动子活性且具有以顺式方式起作用的潜能的核酸序列,且不考虑核酸序列的方向,甚至跨越相对较长距离(与靶启动子相距多达几千个碱基)。然而,增强子功能不一定受限于这样长的距离,因为其也可非常接近所给定的启动子起作用。

[0180] (ii)起始信号和连接表达

[0181] 特定起始信号也可用于本发明中所提供的表达构建体中用以编码序列的有效翻译。这些信号包括ATG起始密码子或相邻序列。可能需要提供包括ATG起始密码子的外源性翻译控制信号。本领域普通技术人员将容易地能够判定此情形且提供必需的信号。熟知起始密码子必须在所要编码序列的阅读框的“框内”,以确保整个插入物的翻译。外源性翻译控制信号和起始密码子可为天然或合成的。表达效率可通过包括适当转录增强子元件来增强。

[0182] 在某些实施方案中,使用内部核糖体进入位点(IRES)元件的用途产生多基因或多

顺反子信息。IRES元件能够绕过5'甲基化封端依赖性翻译的核糖体扫描模型且在内部位点开始翻译。已描述来自小核糖核酸病毒家族的两个成员(脊髓灰质炎和脑心肌炎)的IRES元件以及来自哺乳动物信息的IRES。IRES元件可连接至异源开放阅读框。多个开放阅读框可转录在一起,各自通过IRES分隔,产生多顺反子信息。借助于IRES元件,各开放阅读框可接近核糖体以便有效翻译。可以使用单一启动子/增强子转录单一信息来有效表达多个基因。

[0183] 另外,某些2A序列元件可用于在本发明中所提供的构建体中产生基因的连接表达或共表达。例如,裂解序列可用于通过连接开放阅读框以形成单一顺反子来共表达基因。示例性裂解序列为F2A(口蹄疫病毒2A)或"2A样"序列(例如,Thosea asigna病毒2A;T2A)。

[0184] (iii)复制起点

[0185] 为了在宿主细胞中繁殖载体,其可含有一个或多个复制位点起点(常常称为"ori"),例如,对应于如上文所描述的EBV的oriP,或在程序化中具有类似或提高功能的经基因工程改造的oriP的核酸序列,其为复制起始的特定核酸序列。备选地,可以采用如上文所述的其他染色体外复制病毒或自主复制序列(ARS)的复制起点。

[0186] c.选择和可筛选标记物

[0187] 在一些实施方案中,含有本发明的构建体的细胞可通过在表达载体中包括标记物进行体外或体内鉴别。此类标记物将赋予细胞可鉴别的变化,允许容易地鉴别含有所述表达载体的细胞。一般而言,选择标记物是赋予允许选择的特性的一种标记物。阳性选择标记物是该标记物的存在允许其选择的一种标记物,而阴性选择标记物是其存在阻止其选择的一种标记物。阳性选择标记物的实例为抗药性标记物。

[0188] 通常包含药物选择标记物有助于克隆和鉴定转化体,例如,赋予对新霉素、嘌呤霉素、潮霉素、DHFR、GPT、博来霉素(zeocin)和组氨醇的抗性的基因是有用的选择标记物。除了赋予允许基于条件的实施区分转化体的表型的标记物之外,还预期了其他类型的标记物,包括可筛选标记物,例如以比色分析为基础的GFP。备选地,可以使用可筛选的酶作为阴性选择标记物,例如单纯疱疹病毒胸苷激酶(tk)或氯霉素乙酰转移酶(CAT)。本领域技术人员还知晓如何使用免疫标记物,可能与FACS分析结合使用。所使用的标记物被认为并不重要,只要它能够与编码基因产物的核酸同时表达即可。选择和可筛选标记物的其他例子是本领域技术人员公知的。

[0189] d.核酸递送的其他方法

[0190] 除病毒递送编码抗原受体的核酸以外,以下为将重组基因递送至给定宿主细胞的其他方法,且由此被视为在本发明中。

[0191] 如本文所描述或如本领域普通技术人所知晓的,可使用任何适合的用于转化细胞的核酸递送方法来将诸如DNA或RNA的核酸引入本发明的免疫细胞中。此类方法包括但不限于:直接递送DNA,诸如通过离体转染、通过注射,包括显微注射;通过电穿孔;通过磷酸钙沉淀;通过使用DEAE-葡聚糖接着使用聚乙二醇;通过直接音波加载;通过脂质体介导的转染和受体介导的转染;通过微弹轰击;通过与碳化硅纤维一起进行搅拌;通过农杆菌介导的转化;通过干化/抑制介导的DNA摄取;以及这些方法的任何组合。经由应用诸如这些方法的技术,可以稳定或暂时地转化细胞器、细胞、组织或生物体。

[0192] H.基因表达的修饰

[0193] 在一些实施方案中,本发明的免疫细胞经修饰以具有某些基因(诸如糖皮质激素

受体、TGFβ受体(例如,TGFβ-RII)和/或CISH)的改变的表达。在一个实施方案中,所述免疫细胞可经修饰以表达显性阴性TGFβ受体II(TGFβRIIDN),其可作为细胞因子贮库起作用以耗竭内源TGFβ。

[0194] 细胞因子信号传导是造血细胞的正常功能所必需的。SOCS家族蛋白在细胞因子信号传导的负调节中起着重要作用,充当固有制动剂(brake)。CIS(由CISH基因编码的SOCS蛋白家族的成员)已被鉴定为小鼠NK细胞中的重要检查点分子。因此,在一些实施方案中,本发明涉及免疫细胞中的CISH敲除以改善诸如NK细胞和$CD8^+$ T细胞中的细胞毒性。此方法可单独或与其他检查点抑制剂组合使用以改善抗肿瘤活性。

[0195] 在一些实施方案中,改变的基因表达通过实现基因的破坏,诸如敲除、插入、错义或移码突变(诸如双等位基因移码突变)、所有或部分基因(例如,一个或多个外显子或其部分)的缺失、和/或敲入进行。例如,改变的基因表达可通过序列特异性或靶向性核酸酶,包括DNA结合靶向性核酸酶(诸如锌指核酸酶(ZFN)和转录活化子样效应子核酸酶(TALEN)),和专门设计以靶向基因或其部分的序列的RNA指导的核酸酶(诸如CRISPR相关核酸酶(Cas))实现。

[0196] 在一些实施方案中,基因的表达、活性和/或功能的改变通过破坏基因进行。在一些方面中,与不存在基因修饰或不存在为实现修饰而引入的组分的条件下的表达相比,基因经修饰使得其表达减少至少或约20、30或40%,一般而言至少或约50、60、70、80、90或95%。

[0197] 在一些实施方案中,该改变是短暂的或可逆的,使得基因的表达在晚期时间得以恢复。在其他实施方案中,该改变不是可逆的或短暂的,例如,是永久的。

[0198] 在一些实施方案中,基因改变通过诱导基因的一个或多个双链断裂和/或一个或多个单链断裂、通常以靶向方式进行。在一些实施方案中,所述双链或单链断裂由核酸酶,例如,核酸内切酶,诸如基因靶向核酸酶进行。在一些方面中,在基因的编码区中,例如,在外显子中诱导所述断裂。例如,在一些实施方案中,诱导发生在编码区的N端部分附近,例如,在第一外显子中、在第二外显子中、或在后续的外显子中。

[0199] 在一些方面中,双链或单链断裂经由细胞修复过程,诸如通过非同源末端连接(NHEJ)或同源介导的修复(HDR)经历修复。在一些方面中,该修复过程是易错的且导致基因破坏,诸如移码突变,例如,双等位基因移码突变,其可导致基因的完全敲除。例如,在一些方面中,该破坏包括诱导缺失、突变和/或插入。在一些实施方案中,该破坏导致早期终止密码子的存在。在一些方面中,插入、缺失、易位、移码突变和/或过早终止密码子的存在导致基因的表达、活性和/或功能的破坏。

[0200] 在一些实施方案中,基因改变是使用反义技术实现,诸如通过RNA干扰(RNAi)、短干扰RNA(siRNA)、短发夹(shRNA)和/或核酶用于选择性阻抑或抑制基因表达。siRNA技术为RNAi,其采用具有与从该基因转录的mRNA的核苷酸序列同源的序列和与该核苷酸序列互补的序列的双链RNA分子。siRNA一般与从该基因转录的mRNA的一个区同源/互补,或可为包含与不同区同源/互补的多个RNA分子的siRNA。在一些方面中,该siRNA包含在多顺反子构建体中。

[0201] 2.ZFP和ZFN

[0202] 在一些实施方案中,DNA靶向分子包括DNA结合蛋白,诸如融合至效应蛋白(诸如核

酸内切酶)的一个或多个锌指蛋白(ZFP)或转录活化子样蛋白(TAL)。实例包括ZFN、TALE和TALEN。

[0203] 在一些实施方案中,DNA靶向分子包括以序列特异性方式结合至DNA的一个或多个锌指蛋白(ZFP)或其结构域。ZFP或其结构域为蛋白质或较大蛋白质内的结构域,其通过一个或多个锌指(结合结构域内的氨基酸序列的区,该结合结构域的结构通过锌离子的配位稳定)以序列特异性方式结合DNA。术语锌指DNA结合蛋白经常被缩写为锌指蛋白或ZFP。ZFP为靶向特定DNA序列(通常长度为9至18个核苷酸,通过个体"指"的组装产生)的人工ZFP结构域。、

[0204] ZFP包含其中单指结构域长度为约30个氨基酸且含有α螺旋的那些,该α螺旋含有通过锌与单个β转角的两个半胱氨酸配位的两个不变组氨酸残基,且具有2、3、4、5或6个指。一般而言,ZFP的序列特异性可通过在锌指识别螺旋的四个螺旋位置(-1、2、3和6)处进行氨基酸取代而改变。因此,在一些实施方案中,ZFP或含ZFP的分子不是天然存在的,例如,经改造以结合至选择的靶位点。

[0205] 在一些实施方案中,该DNA靶向分子为或包含融合至DNA裂解结构域以形成锌指核酸酶(ZFN)的锌指DNA结合结构域。在一些实施方案中,融合蛋白包含来自至少一个liS型限制酶的裂解结构域(或裂解一半结构域)和可经改造或可不经改造的一个或多个锌指结合结构域。在一些实施方案中,该裂解结构域来自liS型限制核酸内切酶Fok I。Fok I一般催化DNA的双链裂解,在一条链上自其识别位点的9个核苷酸处和在另一链上自其识别位点的13个核苷酸处裂解。

[0206] 许多基因特异性的改造的锌指可商购获得。例如Sangamo Biosciences(Richmond,CA,USA)与Sigma-Aldrich(St.Louis,MO,USA)合作已开发用于锌指构建的平台(CompoZr),允许研究者完全绕开锌指构建和验证,并提供针对上千种蛋白质的特异性靶向的锌指(Gaj等人,2013,31(7),397-405)。在一些实施方案中,使用可商购的锌指或经定制设计。(参见,例如,Sigma-Aldrich目录编号CSTZFND、CSTZFN、Ctil-1KT和PZD0020)。

[0207] 3.TAL、TALE和TALEN

[0208] 在一些实施方案中,DNA靶向分子包含天然存在或经改造(非天然产生)的转录活化子样蛋白(TAL)DNA结合结构域,诸如在转录活化子样蛋白效应子(TALE)蛋白中,参见,例如,美国专利公开号2011/0301073,其全文以引用的方式并入本文中。

[0209] TALE DNA结合结构域或TALE是包含一个或多个TALE重复结构域/单元的多肽。所述重复结构域参与TALE与其同源靶DNA序列的结合。单个"重复单元"(亦称作"重复序列")通常长度为33至35个氨基酸且展示与天然存在的TALE蛋白质内的其他TALE重复序列至少一些序列同源性。各TALE重复单元包含1或2个DNA结合残基,通常在该重复序列的位置12和/或13处组成重复序列可变二残基(RVD)。已测定用于这些TALE的DNA识别的天然(规范)密码,使得位置12和13处的HD序列导致结合至胞嘧啶(C),NG结合至T、NI至A、NN结合至G或A,NO结合至T和非规范(非典型)RVD,也是已知的。在一些实施方案中,TALE可以通过设计具有对靶DNA序列特异性的TAL阵列而靶向至任何基因。靶序列一般以胸苷开始。

[0210] 在一些实施方案中,该分子为DNA结合核酸内切酶,诸如TALE核酸酶(TALEN)。在一些方面中,该TALEN为融合蛋白,其包含衍生自TALE的DNA结合结构域和裂解核酸靶序列的核酸酶催化结构域。

[0211] 在一些实施方案中,TALEN识别和裂解基因的靶序列。在一些方面中,DNA的裂解导致双链断裂。在一些方面中,所述断裂刺激同源重组或非同源末端连接(NHEJ)的速率。一般而言,NHEJ为不完美修复过程,其经常导致裂解位点处的DNA序列的变化。在一些方面中,修复机制涉及保持两个DNA末端通过直接再结合或经由所谓微观同源性介导的末端连接再连接。在一些实施方案中,经由NHEJ的修复导致小的插入或缺失且可用于破坏,从而抑制该基因。在一些实施方案中,该修饰可以是至少一个核苷酸的取代、缺失或添加。在一些方面中,其中已经发生裂解诱导的诱变事件(即,NHEJ事件后续的诱变事件)的细胞可通过本领域中熟知的方法鉴别和/或选择。

[0212] 在一些实施方案中,TALE重复序列经组装以特异性靶向基因。(Gaj等人,2013)。已构建靶向18,740种人类蛋白质编码基因的TALEN文库(Kim等人,2013)。经定制设计的TALE阵列可从Cellectis Bioresearch(Paris,France)、Transposagen Biopharmaceuticals(Lexington,KY,USA)和Life Technologies(Grand Island,NY,USA)商购获得。具体而言,靶向CD38的TALEN可商购获得(参见Gencopoeia,目录号HTN222870-1、HTN222870-2和HTN222870-3)。示例性的分子记述在例如美国专利公开号US 2014/0120622和2013/0315884中。

[0213] 在一些实施方案中,TALEN经引入作为通过一个或多个质粒载体编码的反式基因。在一些方面中,该质粒载体可含有选择标记物,其提供对接受该载体的细胞的鉴别和/或选择。

[0214] 4.RGENs(CRISPR/Cas系统)

[0215] 在一些实施方案中,使用一个或多个DNA结合核酸进行改变,诸如经由RNA指导的核酸内切酶(RGEN)改变。例如,可使用规律成簇的间隔短回文重复序列(CRISPR)和CRISPR相关(Cas)蛋白进行改变。一般而言,“CRISPR系统”整体上是指参与CRISPR相关(“Cas”)基因的表达或指导该基因的活性的转录体和其他组件,包括编码Cas基因的序列、tracr(反式活化CRISPR)序列(例如,tracrRNA或活性部分tracrRNA)、tracr配对序列(在内源CRISPR系统的情况下,包含“直接重复序列”和经tracrRNA加工的部分直接重复序列)、指导序列(在内源CRISPR系统的情况下,也称作“间隔子”)和/或来自CRISPR基因座的其他序列和转录体。

[0216] CRISPR/Cas核酸酶或CRISPR/Cas核酸酶系统可以包括:非编码RNA分子(指导)RNA,其序列特异性地结合至DNA;和Cas蛋白(例如,Cas9),其具有核酸酶功能性(例如,两个核酸酶结构域)。CRISPR系统的一个或多个元件可源自I型、II型或III型CRISPR系统,例如,源自包含内源CRISPR系统的特定生物体,诸如酿脓链球菌(Streptococcus pyogenes)。

[0217] 在一些方面中,将Cas核酸酶和gRNA(包括特异性针对靶序列的crRNA和经固定的tracrRNA的融合体)引入细胞。一般而言,gRNA的5’端处的靶位点利用互补碱基配对将Cas核酸酶靶向至该靶位点,例如,基因。靶位点可基于其紧邻前间隔序列邻近基序(PAM)序列5’的位置进行选择,诸如通常为NGG或NAG。在此方面,gRNA通过修饰指导RNA的前20、19、18、17、16、15、14、14、12、11或10个核苷酸以对应于靶DNA序列而靶向至所需序列。一般而言,CRISPR系统通过促进在靶序列的位点处形成CRISPR复合体的元件来表征。通常,“靶序列”一般是指设计指导序列与其具有互补性的序列,其中靶序列与指导序列之间的杂交促进CRISPR复合体的形成。不需要完全互补,条件是存在充分的互补性足以引起杂交和促进

CRISPR复合体的形成。

[0218] CRISPR系统可以诱导靶位点处的双链断裂(DSB),接下来是如本文中所讨论的破坏或改变。在其他实施方案中,视作“切口酶”的Cas9变体用于在靶位点处将单链切口。可使用成对切口酶,例如以提高特异性,各自通过一对不同gRNA靶向序列指导,使得在引入切口的同时引入5’突出端。在其他实施方案中,催化活性丧失的Cas9融合至异源效应子结构域(诸如转录抑制子或活化子)以影响基因表达。

[0219] 靶序列可以包含任何多核苷酸,诸如DNA或RNA多核苷酸。靶序列可以定位在细胞的细胞核或细胞质中,诸如在细胞的细胞器内。一般而言,可用于重组到包含靶序列的靶向基因座中的序列或模板被称作“编辑模板”或“编辑多核苷酸”或“编辑序列”。在一些方面中,外源模板多核苷酸可被称作编辑模板。在一些方面中,重组为同源重组。

[0220] 通常,在内源CRISPR系统的情况下,CRISPR复合体(包含杂交至靶序列和与一个或多个Cas蛋白复合的指导序列)的形成导致靶序列内或附近(例如,在距离靶序列1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50或更多个碱基对内)的一条或两条链的裂解。可包含野生型tracr序列的所有或部分(例如,野生型tracr序列的约20、26、32、45、48、54、63、67、85个或更多个核苷酸或超过约20、26、32、45、48、54、63、67、85个或更多个核苷酸)或由其组成的tracr序列也可以形成CRISPR复合体的部分,诸如通过沿着tracr序列的至少一部分杂交至tracr配对序列的所有或部分(其以可操作方式连接至指导序列)。tracr序列具有与tracr配对序列的充分互补性以足以杂交和参与CRISPR复合体的形成,诸如当最佳比对时,沿着tracr配对序列的长度至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%的序列互补性。

[0221] 可以将驱动CRISPR系统中的一个或多个元件表达的一个或多个载体引入细胞中,使得CRISPR系统的元件的表达指导CRISPR复合体在一个或多个靶位点处的形成。也可以将组分作为蛋白质和/或RNA递送至细胞中。例如,Cas酶、连接至tracr-配对序列的指导序列和tracr序列可以各自以可操作方式连接至分开载体的分开调节元件。备选地,可将从相同或不同调节元件表达的元件中的两各或更多个组合在单个载体中,其中一个或多个另外的载体提供不包含在第一载体中的CRISPR系统的任何组分。该载体可以包含一个或多个插入位点,诸如限制核酸内切酶识别序列(也称作“克隆位点”)。在一些实施方案中,一个或多个插入位点位于一个或多个载体的一个或多个序列元件的上游和/或下游。当使用多个不同指导序列时,单个表达构建体可用于使CRISPR活性靶向细胞内的多个不同的、相对应的靶序列。

[0222] 载体可以包含可操作地连接至编码CRISPR酶(诸如Cas蛋白)的酶编码序列的调节元件。非限制性的Cas蛋白的实例包括:Cas1,Cas1B,Cas2,Cas3,Cas4,Cas5,Cas6,Cas7,Cas8,Cas9(也称为Csn1和Csx12),Cas10,Csy1,Csy2,Csy3,Cse1,Cse2,Csc1,Csc2,Csa5,Csn2,Csm2,Csm3,Csm4,Csm5,Csm6,Cmr1,Cmr3,Cmr4,Cmr5,Cmr6,Csb1,Csb2,Csb3,Csx17,Csx14,Csx10,Csx16,CsaX,Csx3,Csx1,Csx15,Csf1,Csf2,Csf3,Csf4,其同源物,或其修饰的形式。这些酶是已知的;例如,酿脓链球菌Cas9蛋白的氨基酸序列可见于SwissProt数据库登录号Q99ZW2。

[0223] CRISPR酶可以是Cas9(例如,来自酿脓链球菌或肺炎链球菌)。CRISPR酶可指导靶序列位置处(诸如靶序列内和/或靶序列的互补序列内)的一条或两条链的裂解。载体可编码相对于对应野生型酶突变的CRISPR酶,使得突变的CRISPR酶缺少裂解含有靶序列的靶多

核苷酸的一条或两条链的能力。例如，来自酿脓链球菌的Cas9的RuvC I催化结构域中的天冬氨酸至丙氨酸取代(D10A)将Cas9由裂解两条链的核酸酶转化为切口酶(裂解单条链)。在一些实施方案中，Cas9切口酶可与指导序列(例如，分别靶向DNA靶标的有义链和反义链的两个指导序列)组合使用。此组合允许两条链被切口和用于诱导NHEJ或HDR。

[0224] 在一些实施方案中，编码CRISPR酶的酶编码序列针对在特定细胞(诸如真核细胞)中表达进行密码子优化。真核细胞可以是特定生物体的细胞或可以源自特定生物体，诸如哺乳动物，包括(但不限于)人类、小鼠、大鼠、兔、狗或非人类灵长类动物。一般而言，密码子优化是指通过将天然序列的至少一个密码子用在感兴趣的宿主细胞的基因中更频繁或最频繁使用的密码子替换同时维持天然氨基酸序列而修饰核酸序列用以增加在所述宿主细胞中的表达的过程。各种物种展示对具体氨基酸的特定密码子的特定偏好性。密码子偏好性(在生物体之间的密码子使用差异)经常与信使RNA(mRNA)的翻译效率相关，其继而被认为尤其依赖于正在翻译的密码子的性质和特定转运RNA(tRNA)分子的可利用性。所选tRNA在细胞中的优势一般为肽合成中最频繁使用的密码子的反映。因此，可以基于密码子优化定制基因，用于在给定生物体中的最佳基因表达。

[0225] 一般而言，指导序列为具有与靶多核苷酸的充分互补性以足以与靶序列杂交和指导CRISPR复合体与靶序列的序列特异性结合的任何多核苷酸。在一些实施方案中，当使用适当的比对算法最佳比对时，指导序列与其对应靶序列之间的互补性的程度为约50％、60％、75％、80％、85％、90％、95％、97.5％、99％或更多或超过约50％、60％、75％、80％、85％、90％、95％、97.5％、99％或更多。

[0226] 用于NR3CS(糖皮质激素受体)的示例性gRNA序列包括Ex3 NR3C1 sG1 5-TGC TGT TGA GGA GCT GGA-3(SEQ ID NO:1)和Ex3 NR3C1 sG2 5-AGC ACA CCA GGC AGA GTT-3(SEQ ID NO:2)。用于TGF-β受体2的示例性gRNA序列包括EX3 TGFBR2 sG1 5-CGG CTG AGG AGC GGA AGA-3(SEQ ID NO:3)和EX3 TGFBR2 sG2 5-TGG-AGG-TGA-GCA-ATC-CCC-3(SEQ ID NO:4)。T7启动子、靶序列和重叠序列可以具有序列TTAATACGACTCACTATAGG(SEQ ID NO:5)+靶序列+gttttagagctagaaatagc(SEQ ID NO:6)。

[0227] 可使用用于比对序列的任何适当算法来确定最佳比对，该算法的非限制性实例包括Smith-Waterman算法、Needleman-Wunsch算法、基于Burrows-Wheeler Transform的算法(例如，Burrows Wheeler Aligner)、Clustal W、Clustal X、BLAT、Novoalign(Novocraft Technologies，ELAND(Illumina，San Diego，Calif.)、SOAP(在soap.genomics.org.cn可用)和Maq(在maq.sourceforge.net可用)。

[0228] CRISPR酶可以是包含一个或多个异源蛋白结构域的融合蛋白的一部分。CRISPR酶融合蛋白可以包含任何另外的蛋白质序列，和任选地在任两个结构域之间的接头序列。可融合至CRISPR酶的蛋白质结构域的实例包括(不限于)表位标签、报告基因序列和具有下列活性中的一者或多者的蛋白质结构域：甲基化酶活性、脱甲基酶活性、转录活化活性、转录抑制活性、转录释放因子活性、组蛋白修饰活性、RNA裂解活性和核酸结合活性。表位标签的非限制性实例包括组氨酸(His)标签、V5标签、FLAG标签、流感血凝素(HA)标签、Myc标签、VSV-G标签和硫氧还蛋白(Trx)标签。报告基因的实例包括(但不限于)谷胱甘肽-5-转移酶(GST)、辣根过氧化物酶(HRP)、氯霉素乙酰基转移酶(CAT)β半乳糖苷酶、β-葡糖醛酸酶、荧光素酶、绿色荧光蛋白(GFP)、HcRed、DsRed、青色荧光蛋白(CFP)、黄色荧光蛋白(YFP)和自

发荧光蛋白(包括蓝色荧光蛋白(BFP))。CRISPR酶可以融合至编码蛋白质或蛋白质片段的基因序列,所述蛋白质或蛋白质片段结合DNA分子或结合其他细胞分子,包括(但不限于)麦芽糖结合蛋白(MBP)、S-标签、Lex A DNA结合结构域(DBD)融合体、GAL4A DNA结合结构域融合体、和单纯疱疹病毒(HSV)BP16蛋白融合体。可以形成包含CRISPR酶的融合蛋白的一部分的另外的结构域记述在US20110059502中,其以引用的方式并入本文中。

[0229] III.治疗方法

[0230] 在一些实施方案中,本公开内容提供用于免疫疗法的方法,其包括施用有效量的本公开内容的NK细胞,在一个实施方案中,医学疾病或病症通过转移引发免疫反应的NK细胞群体来治疗。在本公开内容的某些实施方案中,癌症或感染通过转移引发免疫反应的NK细胞群体来治疗。本文提供用于治疗个体的癌症或延缓其进展的方法,其包括向个体施用有效量的抗原特异性的细胞疗法。本发明的方法可以应用于治疗免疫病症(包括自体免疫性或同种免疫性)、实体癌症、血液癌症和病毒感染。

[0231] 本发明的治疗方法适用的肿瘤包括任何恶性细胞类型,诸如发现于实体肿瘤或血液肿瘤中的那些恶性细胞。示例性实体肿瘤可以包括但不限于选自由以下组成的组的器官的肿瘤:胰脏、结肠、盲肠、胃、大脑、头部、颈部、卵巢、肾、喉、肉瘤、肺、膀胱、黑素瘤、前列腺和乳房。示例性血液肿瘤包括骨髓肿瘤、T细胞或B细胞恶性疾病、白血病、淋巴瘤、母细胞瘤、骨髓瘤等。可使用本文所提供的方法治疗的癌症的其他实例包括但不限于肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌及肺鳞状癌)、腹膜癌、胃癌(包括胃肠癌和胃肠基质癌)、胰脏癌、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、各种类型的头颈癌和黑素瘤。

[0232] 所述癌症可具体说来具有以下组织学类型,不过其不限于这些:赘生物,恶性的;癌瘤;癌瘤,未分化的;巨细胞和梭形细胞癌;小细胞癌;乳头状癌;鳞状细胞癌;淋巴上皮癌;基底细胞癌;毛基质癌;移行细胞癌;乳头状移行细胞癌;腺癌;胃泌素瘤,恶性的;胆管癌;肝细胞癌;联合肝细胞癌与胆管癌;小梁状腺癌;腺样囊性癌;腺瘤性息肉腺癌;腺癌,家族性结肠息肉病;实体癌;类癌瘤,恶性的;细支气管肺泡腺癌;乳头状腺癌;嫌色细胞癌;嗜酸细胞癌;嗜酸性腺癌;嗜碱细胞癌;透明细胞腺癌;粒细胞癌;滤泡状腺癌;乳头状和滤泡状腺癌;无包膜形成的硬化性癌;肾上腺皮质癌;子宫内膜样癌;皮肤附属器癌;大汗腺腺癌;皮脂腺癌;盯聍腺腺癌;粘液表皮样癌;囊腺癌;乳头状囊腺癌;乳头状浆液性囊腺癌;粘液性囊腺癌;粘液腺癌;印戒细胞癌;浸润性导管癌;髓样癌;小叶癌;炎性癌;佩吉特氏病,乳房;腺泡细胞癌;腺鳞状上皮癌;腺癌伴鳞状化生;胸腺瘤,恶性的;卵巢间质肿瘤,恶性的;泡膜细胞瘤,恶性的;颗粒细胞瘤,恶性的;睾丸母细胞瘤,恶性的;塞尔托利细胞癌;莱迪希细胞瘤,恶性的;脂质细胞瘤,恶性的;副神经节瘤,恶性的;乳房外副神经节瘤,恶性的;嗜铬细胞瘤;血管球肉瘤;恶性黑素瘤;无黑素性黑素瘤;浅表扩散性黑素瘤;雀斑型恶性黑素瘤;肢端雀斑样黑素瘤(acral lentiginous melanomas);结节性黑素瘤;巨大色素痣中的恶性黑素瘤;上皮样细胞黑素瘤;蓝痣,恶性的;肉瘤;纤维肉瘤;纤维组织细胞瘤,恶性的;粘液肉瘤;脂肪肉瘤;平滑肌肉瘤;横纹肌肉瘤;胚胎性横纹肌肉瘤;泡状横纹肌肉瘤;间质性肉瘤;混合肿瘤,恶性的;米勒管混合肿瘤;肾母细胞瘤;肝母细胞瘤;癌肉瘤;间质瘤,恶性的;布伦纳瘤,恶性的;叶状肿瘤,恶性的;滑膜肉瘤;间皮瘤,恶性的;无性细胞瘤;胚胎癌;畸胎瘤,恶性的;卵巢甲状腺瘤,恶性的;绒膜癌;中肾瘤,恶性的;血管肉瘤;血管内

皮瘤，恶性；卡波西肉瘤；血管外皮细胞瘤，恶性；淋巴管肉瘤；骨肉瘤；皮质旁骨肉瘤；软骨肉瘤；软骨母细胞瘤，恶性；间叶性软骨肉瘤；骨巨细胞瘤；尤因氏肉瘤；牙源性肿瘤，恶性；成釉细胞牙肉瘤；成釉细胞瘤，恶性；成釉细胞纤维肉瘤；松果体瘤，恶性；脊索瘤；神经胶质瘤，恶性；室鼓膜瘤；星形细胞瘤；原浆性星形细胞瘤；纤维型星形细胞瘤；星形母细胞瘤；成胶质细胞瘤；少突神经胶质瘤；成少突神经胶质细胞瘤；原始神经外胚层；小脑肉瘤；节细胞神经母细胞瘤；神经母细胞瘤；视网膜母细胞瘤；嗅神经源性肿瘤；脑膜瘤，恶性；神经纤维肉瘤；神经鞘瘤，恶性；粒细胞瘤，恶性；恶性淋巴瘤；霍奇金病；霍奇金；副肉芽肿；恶性淋巴瘤，小淋巴细胞性；恶性淋巴瘤，大细胞、弥漫性；恶性淋巴瘤，滤泡性；蕈样真菌病；其他指定的非霍奇金淋巴瘤；B-细胞淋巴瘤；低级/滤泡性非霍奇金淋巴瘤(NHL)；小淋巴细胞性(SL)NHL；中级/滤泡性NHL；中级弥漫性NHL；高级免疫母细胞性NHL；高级淋巴母细胞性NHL；高级小非分裂细胞NHL；大包块病NHL；套细胞淋巴瘤；AIDS-相关的淋巴瘤；Waldenstrom巨球蛋白血症；恶性组织细胞病；多发性骨髓瘤；肥大细胞肉瘤；免疫增生性小肠病；白血病；淋巴性白血病；浆细胞性白血病；红白血病；淋巴肉瘤细胞白血病；骨髓性白血病；嗜碱细胞性白血病；嗜酸粒性白血病；单核细胞性白血病；肥大细胞白血病；巨核母细胞白血病；骨髓肉瘤；毛细胞白血病；慢性淋巴细胞白血病(CLL)；急性淋巴母细胞白血病(ALL)；急性髓性白血病(AML)；和慢性髓母细胞性白血病。

[0233] 特定实施方案涉及白血病的治疗方法。白血病为血液或骨髓癌症且特征在于血细胞(通常白血细胞(白细胞))的异常增殖(倍增产生)。其为称为血液赘瘤的广泛群组的疾病的一部分。白血病为广义术语，涵盖一系列疾病。白血病在临床上及病理上分成其急性和慢性形式。

[0234] 在本发明的某些实施方案中，将免疫细胞递送至有需要的个体，诸如患有癌症或感染的个体。随后，细胞增强个体的免疫系统以攻击各个癌细胞或病原性细胞。在一些情况下，向个体提供一次或多次剂量的免疫细胞。在向个体提供两次或更多次剂量的免疫细胞的情况下，施用之间的持续时间应足以允许在个体中繁殖的时间，且在特定实施方案中，剂量之间的持续时间为1、2、3、4、5、6、7天或更多天。

[0235] 本公开内容的某些实施方案提供治疗或预防免疫调节病症的方法。在一个实施方案中，受试者患有自体免疫疾病。自体免疫疾病的非限制性实例包括：斑秃，强直性脊柱炎，抗磷脂综合征，自身免疫性艾迪生病，肾上腺的自身免疫性疾病，自身免疫性溶血性贫血，自身免疫性肝炎，自身免疫性卵巢炎和睾丸炎，自身免疫性血小板减少症，白塞氏病，大疱性类天疱疮，心肌病，乳糜泻性皮炎(celiac spate-dermatitis)，慢性疲劳免疫功能障碍综合症(CFIDS)，慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病，Churg-Strauss综合征，瘢痕性类天疱疮，CREST综合征，冷凝集素病，克罗恩病，盘状狼疮，原发性混合性冷球蛋白血症，纤维肌痛-纤维肌炎，肾小球肾炎，格雷夫斯病，格林-巴利病，桥本氏甲状腺炎，特发性肺纤维化，特发性血小板减少性紫癜(ITP)，IgA神经病，青少年关节炎，扁平苔藓，红斑性狼疮，美尼尔病，混合性结缔组织病，多发性硬化，1型或免疫介导的糖尿病，重症肌无力，肾病综合征(例如微小病变，局灶性肾小球硬化或膜性肾病)，寻常型天疱疮，恶性贫血，结节性多动脉炎，多发性软骨炎，多腺综合征，风湿性多发性肌痛，多发性肌炎和皮肌炎，原发性无丙种球蛋白血症，原发性胆汁性肝硬化，银屑病，银屑病关节炎，雷诺现象，雷特综合症，类风湿性关节炎，结节病，硬皮病，干燥综合征，僵人综合征，系统性红斑狼疮，红斑狼疮，溃疡性结肠

炎,葡萄膜炎,血管炎(例如结节性多动脉炎,大动脉炎,颞动脉炎/巨细胞性动脉炎或疱疹样皮炎性血管炎),白癜风和韦格纳肉芽肿病。因此,可以使用本文公开的方法治疗的自身免疫性疾病的一些实例包括但不限于多发性硬化症,类风湿性关节炎,系统性红斑狼疮,I型糖尿病,克罗恩病;溃疡性结肠炎,重症肌无力,肾小球肾炎,强直性脊柱炎,血管炎或银屑病。受试者还可以患有过敏性疾病,例如哮喘。

[0236] 在另一个实施方案中,受试者是移植的器官或干细胞的接受者,并且免疫细胞用于预防和/或治疗排斥。在特定实施方案中,受试者患有移植物抗宿主疾病或有发展该疾病的风险。GVHD是使用或含有来自相关或不相关供体的干细胞的任何移植的可能并发症。存在两种GVHD:急性的和慢性的。急性GVHD出现在移植后的前三个月内。急性GVHD的征兆包括手和脚上出现可能扩散并变得更严重的微红色的皮疹,并且具有皮肤剥落或起泡。急性GVHD还可能影响胃和肠,在这种情况下会出现痉挛、恶心和腹泻。皮肤和眼睛发黄(黄疸)表明急性GVHD已经影响肝脏。慢性GVHD根据其严重程度进行分级:阶段/等级1是轻微的;阶段/等级4是严重的。慢性GVHD在移植后三个月或之后发展。慢性GVHD的症状与急性GVHD的症状相似,但此外,慢性GVHD还可能影响眼睛中的粘液腺、口腔中的唾液腺以及润滑胃粘膜和肠道的腺体。可以利用本文公开的任何免疫细胞的群体。移植器官的实例包括实体器官移植物,例如肾脏、肝脏、皮肤、胰腺、肺和/或心脏,或细胞移植物,例如胰岛、肝细胞、成肌细胞、骨髓或造血或其他干细胞。移植物可以是复合移植物,例如面部的组织。免疫细胞可以在移植之前、与移植同时或在移植之后施用。在一些实施方案中,免疫细胞在移植前施用,例如在移植前至少1小时、至少12小时、至少1天、至少2天、至少3天、至少4天、至少5天、至少6天、至少1周、至少2周、至少3周、至少4周或至少1个月施用。在一个具体的非限制性实例中,治疗有效量的免疫细胞的施用在移植前3-5天进行。

[0237] 在一些实施方案中,可以在免疫细胞疗法之前向受试者施用非清髓性淋巴细胞清除性化学疗法(nonmyeloablative lymphodepleting chemotherapy)。非清髓性淋巴细胞清除性化学疗法可以是任何合适的此类疗法,其可以通过任何合适的途径进行施用。非清髓性淋巴细胞清除性化学疗法可包括,例如,施用环磷酰胺和氟达拉滨,特别是如果癌症是黑素瘤(其可以是转移性的)时。施用环磷酰胺和氟达拉滨的示例性途径是静脉内施用。同样,可以施用任何合适剂量的环磷酰胺和氟达拉滨。在特定方面,施用约60mg/kg的环磷酰胺两天,此后施用约25mg/m^2的氟达拉滨五天。

[0238] 在某些实施方案中,将促进免疫细胞的生长和活化的生长因子与免疫细胞同时或在免疫细胞后施用至受试者。免疫细胞生长因子可以是促进免疫细胞的生长和活化的任何合适的生长因子。合适的免疫细胞生长因子的实例包括白介素(IL)-2、IL-7、IL-15和IL-12,它们可以单独使用或以多种组合(例如IL-2和IL-7,IL-2和IL-15,IL-7和IL-15,IL-2、IL-7和IL-15,IL-12和IL-7,IL-12和IL-15或IL-12和IL2)使用。

[0239] 治疗有效量的免疫细胞可以通过多种途径施用,包括肠胃外施用,例如静脉内、腹膜内、肌内、胸骨内或关节内注射或输注。

[0240] 用于过继细胞疗法的免疫细胞的治疗有效量是在被治疗的受试者中达到期望效果的量。例如,这可以是抑制进展或引起自身免疫或同种免疫疾病的消退所必需的或能够缓解由自身免疫疾病引起的症状(例如疼痛和炎症)的免疫细胞的量。它可能是缓解与炎症相关的症状(例如疼痛、水肿和体温升高)所必需的量。它也可以是减少或防止移植的器官

的排斥所必需的量。

[0241] 可以以与用于疾病相一致的治疗方案施用免疫细胞群体，例如在一到几天内单次或几次剂量以改善疾病状态或在延长的时间内的定期剂量以抑制疾病进展并预防疾病复发。制剂中使用的精确剂量还取决于施用途径以及疾病或病症的严重性，并且应根据从业者的判断和每个患者的情况来决定。免疫细胞的治疗有效量将取决于所治疗的受试者、病痛的严重程度和类型以及施用方式。在一些实施方案中，可用于治疗人受试者的剂量范围为至少3.8×10^4、至少3.8×10^5、至少3.8×10^6、至少3.8×10^7、至少3.8×10^8、至少3.8×10^9、或至少3.8×10^{10}个免疫细胞/m^2。在某些实施方案中，用于治疗人受试者的剂量范围为约3.8×10^9至约3.8×10^{10}个免疫细胞/m^2。在另外的实施方案中，免疫细胞的治疗有效量可以为约5×10^6个细胞/kg体重至约7.5×10^8个细胞/kg体重，例如约2×10^7个细胞至约5×10^8个细胞/kg体重，或约5×10^7个细胞至约2×10^8个细胞/kg体重。免疫细胞的确切数量由本领域技术人员根据受试者的年龄、体重、性别和生理状况来容易地确定。可以从由体外或动物模型测试系统得出的剂量反应曲线外推得出有效剂量。

[0242] 免疫细胞可以与一种或多种其他治疗剂组合施用以治疗免疫介导的病症。组合疗法可包括但不限于一种或多种抗微生物剂(例如，抗生素、抗病毒剂和抗真菌剂)，抗肿瘤剂(例如，氟尿嘧啶，甲氨蝶呤，紫杉醇，氟达拉滨，依托泊苷，阿霉素或长春新碱)，免疫消耗剂(例如氟达拉滨，依托泊苷，阿霉素或长春新碱)，免疫抑制剂(例如，硫唑嘌呤或糖皮质激素，例如地塞米松或泼尼松)，抗炎剂(例如，糖皮质激素，例如氢化可的松、地塞米松或泼尼松，或非甾体抗炎剂，例如乙酰水杨酸、布洛芬或萘普生钠)，细胞因子(例如白介素10或转化生长因子-β)，激素(例如雌激素)或疫苗。另外，可以施用免疫抑制剂或致耐受剂，包括但不限于钙调神经磷酸酶抑制剂(例如，环孢菌素和他克莫司)；mTOR抑制剂(例如，雷帕霉素)；霉酚酸酯，抗体(例如识别CD3、CD4、CD40、CD154、CD45、IVIG或B细胞)；化疗剂(例如，甲氨蝶呤，苏消安，白消安)；辐照；或趋化因子，白介素或其抑制剂(例如BAFF，IL-2，抗IL-2R，IL-4，JAK激酶抑制剂)。取决于所需的效果，可以在施用免疫细胞之前、期间或之后施用此类另外的药剂。细胞和试剂的这种施用可以通过相同的途径或通过不同的途径，并且可以在相同的部位或在不同的部位施用。

[0243] IV.药物组合物

[0244] 本文还提供包含免疫细胞(例如，T细胞或NK细胞)和药学上可接受的承载体的药物组合物和制剂。

[0245] 本文所述的药物组合物和制剂可通过将具有所需纯度的活性成分(例如抗体或多肽)与一种或多种任选的药学上可接受的承载体(Remington's Pharmaceutical Sciences第22版，2012)混合来制备，其呈冻干制剂或水溶液的形式。药学上可接受的承载体通常在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒，并且包括但不限于：缓冲液，例如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸；抗氧化剂，包括抗坏血酸和甲硫氨酸；防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵；六甲基氯化铵；苯扎氯铵；苄索氯铵；苯酚、丁醇或苄醇；对羟基苯甲酸烷基酯(alkyl paraben)，例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯；邻苯二酚；间苯二酚；环己醇；3-戊醇；和间甲酚)；低分子量(少于约10个残基)多肽；蛋白质，例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物，例如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸；单糖、二糖和其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂，例

如EDTA;糖,例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;盐形成抗衡离子(counter-ion),例如钠;金属配合物(例如锌蛋白配合物);和/或非离子表面活性剂,例如聚乙二醇(PEG)。本文的示例性药学上可接受的承载体进一步包括间质药物分散剂,例如可溶性中性活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),例如人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白,例如rHuPH20(HYLENEX®,Baxter International,Inc.)。某些示例性sHASEGP(包括rHuPH20)和使用方法描述于美国专利公开号2005/0260186和2006/0104968中。一方面,将sHASEGP与一种或多种另外的糖胺聚糖酶例如软骨素酶组合。

[0246] V.组合疗法

[0247] 在某些实施方案中,本实施方案的组合物和方法涉及与至少一种另外的疗法组合的免疫细胞群体。另外的疗法可以是放射疗法、手术(例如,肿块切除术和乳房切除术)、化学疗法、基因疗法、DNA疗法、病毒疗法、RNA疗法、免疫疗法、骨髓移植、纳米疗法、单克隆抗体疗法或前述的组合。另外的疗法可以是辅助治疗或新辅助疗法的形式。

[0248] 在一些实施方案中,另外的疗法是小分子酶抑制剂或抗转移剂的施用。在一些实施方案中,另外的疗法是副作用限制剂(例如,旨在减少治疗的副作用的发生和/或严重性的药剂,例如抗恶心剂等)的施用。在一些实施方案中,另外的疗法是放射疗法。在一些实施方案中,另外的疗法是手术。在一些实施方案中,另外的疗法是放射疗法和手术的组合。在一些实施方案中,另外的疗法是γ辐照。在一些实施方案中,另外的疗法是靶向PBK/AKT/mTOR路径疗法、HSP90抑制剂、微管蛋白抑制剂、细胞凋亡抑制剂和/或化学预防剂。另外的疗法可以是本领域已知的一种或多种化学治疗剂。

[0249] 可以相对于另外的癌症疗法(例如免疫检查点疗法)在之前、期间、之后或以各种组合施用免疫细胞疗法。施用间隔可以从同时至数分钟至数天至数周。在其中免疫细胞疗法与另外的治疗剂分开地提供给患者的实施方案中,通常将确保在每次递送的时间之间不会度过相当长的一段时间,使得两种化合物将仍然能够发挥对患者有利的联合作用。在这样的情况下,预期可以在彼此约12至24或72小时内,更具体地在彼此约6-12小时内为患者提供抗体疗法和抗癌疗法。在某些情况下,可能期望将治疗时间显著延长,其中在各自施用之间经过几天(2、3、4、5、6或7天)至几周(1、2、3、4、5、6、7或8周)。

[0250] 可以采用各种组合。对于下面的实例,免疫细胞疗法为“A”,抗癌疗法为“B”:

[0251] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

[0252] B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

[0253] B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

[0254] 考虑到试剂的毒性(如果有的话),本实施方案的任何化合物或疗法向患者的施用将遵循用于施用此类化合物的一般方案。因此,在一些实施方案中,存在监测归因于组合疗法的毒性的步骤。

[0255] 1.化学疗法

[0256] 根据本发明的实施方案可以使用多种化学治疗剂。术语“化学疗法”是指使用药物治疗癌症。“化学治疗剂”用于意指在癌症治疗中施用的化合物或组合物。这些试剂或药物通过其在细胞内的活性模式分类,例如其是否并且在哪一阶段影响细胞周期。备选地,试剂可基于其直接交联DNA、插入DNA中或通过影响核酸合成来诱导染色体和有丝分裂失常的能力来表征。

[0257] 化学治疗剂的实例包括:烷化剂诸如塞替派和环磷酰胺;磺酸烷基酯诸,如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡;氮丙啶类,诸如苯佐替派(benzodopa)、卡波醌、美妥替派(meturedopa)和乌瑞替派(uredopa);乙烯亚胺和甲基蜜胺,包括六甲蜜胺、三亚乙基蜜胺、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酰胺和三羟甲基蜜胺;番荔枝内酯(acetogenin)(尤其是布拉他辛(bullatacin)和布拉他辛酮(bullatacinone));喜树碱(包括合成的类似物托泊替康);苔藓抑素;卡利他汀(callystatin);CC-1065(包括它的合成类似物阿多来新、卡泽来新和比泽来新);念珠藻环肽(尤其是念珠藻环肽1和念珠藻环肽8);多拉司他汀;杜卡霉素(包括合成类似物KW-2189和CB1-TM1);软珊瑚醇;水鬼蕉碱(pancratistatin);sarcodictyin;海绵抑素;氮芥类,诸如苯丁酸氮芥、萘氮芥、氯磷酰胺(cholophosphamide)、雌莫司汀、异环磷酰胺、氮芥、盐酸氧化氮芥、美法仑、新氮芥、苯芥胆甾醇、泼尼莫司汀、曲磷胺和乌拉莫司汀;硝基脲类,诸如卡莫司汀、氯脲菌素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀和雷莫司汀;抗生素类,诸如烯二炔抗生素(例如卡奇霉素,尤其是卡奇霉素γlI和卡奇霉素ωI1);达内霉素,包括达内霉素A;二膦酸盐类,诸如氯膦酸盐;埃斯波霉素;以及新制癌菌素生色团和有关的色蛋白烯二炔抗生素生色团、阿克拉霉素(aclacinomysin)、放线菌素、氨茴霉素(authrarnycin)、偶氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素C、卡柔比星(carabicin)、洋红霉素、嗜癌霉素、色霉素、更生霉素、柔红霉素、地托比星、6-重氮基-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星(包括吗啉代-多柔比星、氰基吗啉代-多柔比星、2-吡咯啉代-多柔比星和脱氧多柔比星)、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素类诸如丝裂霉素C、麦考酚酸、诺拉霉素、橄榄霉素、培洛霉素、泊非霉素(potfiromycin)、嘌罗霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑霉素、链佐星、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星;抗代谢药,诸如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,诸如二甲叶酸、蝶罗呤和三甲曲沙;嘌呤类似物,诸如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤和硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,诸如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮杂尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、二脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨和氟尿苷;雄激素类,诸如卡普睾酮、屈他雄酮丙酸盐、环硫雄醇、美雄烷和睾内酯;抗肾上腺类,诸如米托坦和曲洛司坦;叶酸补充剂,诸如亚叶酸(frolinic acid);醋葡醛内酯;醛磷酰胺糖苷;氨基酮戊酸;恩尿嘧啶;安吖啶;bestrabucil;比生群;依达曲沙(edatraxate);地磷酰胺(defofamine);秋水仙胺;地吖醌;依氟鸟氨酸(elformithine);依利醋铵;埃博霉素;依托格鲁;硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;氯尼达明;美坦辛类,诸如美坦辛和安丝菌素;米托胍腙;米托蒽醌;莫哌达醇;尼曲吖啶;喷司他丁;蛋氨氮芥;吡柔比星;洛索蒽醌;鬼臼酸;2-乙基酰肼;丙卡巴肼;PSK多糖复合物;雷佐生;根霉素;西佐喃;锗螺胺;替奴佐酸;三亚胺醌;2,2′,2″-三氯三乙胺;单端孢霉烯类(尤其是T-2毒素、疣孢菌素(verracurin)A、杆孢菌素A和蛇行菌素);乌拉坦(urethan);长春地辛;达卡巴嗪;甘露莫司汀;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌泊溴烷;加西托星(gacytosine);阿糖胞苷(“Ara-C”);环磷酰胺;紫杉烷类,例如,紫杉醇和多西他赛;吉西他滨;6-硫鸟嘌呤;巯嘌呤;铂配位络合物,诸如顺铂、奥沙利铂和卡铂;长春碱;铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌;长春新碱;长春瑞滨;诺肖林;替尼泊苷;依达曲沙;道诺霉素;氨基蝶呤;希罗达;伊班膦酸盐;伊立替康(例如,CPT-11);拓扑异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);维A酸类,诸如视黄酸;卡培他滨;卡铂、丙卡巴肼、普卡霉素、吉西他滨、诺维本、法呢基-蛋白转移酶抑制剂、反铂,和上述任一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0258] 2.放射疗法

[0259] 造成DNA损伤并已广泛使用的其他因素包括通常被称为γ射线、X射线的那些和/或放射性同位素向肿瘤细胞的定向递送。还考虑了其他形式的DNA损伤因素，例如微波、质子束照射(美国专利5,760,395和4,870,287)和UV照射。最可能的是，所有这些因素对DNA、DNA前体、DNA的复制和修复以及染色体的组装和维持造成宽范围的损害。X射线的剂量范围为从以50-200伦琴的日剂量持续长时间段(3至4周)至2000-6000伦琴的单次剂量。放射性同位素的剂量范围宽泛地变化，并且取决于同位素的半衰期、发射的辐射的强度和类型以及肿瘤细胞的摄取。

[0260] 3.免疫疗法

[0261] 熟练的技术人员会理解，另外的免疫疗法可以与实施方案的方法组合或结合使用。在癌症治疗的情形下，免疫治疗剂通常依赖于使用免疫效应细胞和分子以靶向并破坏癌细胞。利妥昔单抗(RITUXAN®)是这样的一个实例。免疫效应物可以是例如对肿瘤细胞表面上的一些标记物特异性的抗体。所述抗体单独地可以充当治疗的效应物，或者它可以募集其他细胞以实际影响细胞杀伤。抗体还可以与药物或毒素(化学治疗剂、放射性核素、蓖麻蛋白A链、霍乱毒素、百日咳毒素等)缀合并且充当靶向剂。靶向地，效应物可以是直接地或间接地与肿瘤细胞靶标相互作用的携带表面分子的淋巴细胞。多种效应细胞包括细胞毒性T细胞和NK细胞。

[0262] 已经出现抗体-药物缀合物作为癌症治疗剂开发的突破性方案。癌症是世界上死亡的主要原因之一。抗体-药物缀合物(ADC)包含与杀死细胞的药物共价连接的单克隆抗体(MAb)。该方案将MAb针对其抗原靶标的高特异性与高效细胞毒性药物组合，从而产生将货物(药物)递送至具有富集水平抗原的肿瘤细胞的“武装”MAb。药物的靶向递送还使其在正常组织中的暴露最小化，从而导致降低的毒性和提高的治疗指数。FDA对两种ADC药物的批准(2011年ADCETRIS®(本妥昔单抗(Brentuximab vedotin))和2013年KADCYLA®(曲妥珠单抗美坦新或T-DM1))验证了该方案。目前存在超过30种ADC药物候选物处于癌症治疗的临床试验的各个阶段(Leal等人，2014)。随着抗体工程和接头-货物优化变得越来越成熟，新ADC的发现和开发越来越依赖于适合于该方案的新靶标的鉴定和验证以及靶向MAb的产生。ADC靶标的两个标准是在肿瘤细胞中上调的/高水平的表达和稳健内化。

[0263] 在免疫疗法的一个方面，肿瘤细胞必须带有一些适合靶向的标记物，即，所述标记物不存在于大多数其他细胞上。存在许多肿瘤标记物，并且这些肿瘤标记物中的任一种可能适合用于在本发明实施方案的上下文中的靶向。常见的肿瘤标记物包括CD20、癌胚抗原、酪氨酸酶(p97)、gp68、TAG-72、HMFG、唾液酸基路易斯抗原、MucA、MucB、PLAP、层粘连蛋白受体、erb B和p155。免疫疗法的一个替代方面是将抗癌作用与免疫刺激作用组合。还存在免疫刺激性分子，包括：细胞因子，诸如IL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、γ-IFN，趋化因子，诸如MIP-1、MCP-1、IL-8，和生长因子，诸如FLT3配体。

[0264] 目前在研究或在使用中的免疫疗法的实例是免疫佐剂，例如，牛分枝杆菌(Mycobacterium bovis)、恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)、二硝基氯苯和芳族化合物(美国专利5,801,005和5,739,169；Hui和Hashimoto,1998；Christodoulides等人，1998)；细胞因子疗法，例如，干扰素α、β和γ、IL-1、GM-CSF和TNF(Bukowski等人,1998；Davidson等人,1998；Hellstrand等人,1998)；基因疗法，例如，TNF、IL-1、IL-2和p53(Qin等

人,1998;Austin-Ward和Villaseca,1998;美国专利5,830,880和5,846,945);和单克隆抗体,例如,抗-CD20、抗-神经节苷脂GM2和抗-p185(Hollander,2012;Hanibuchi等人,1998;美国专利5,824,311)。考虑一种或更多种抗癌疗法可以与本文所述的抗体疗法一起使用。

[0265] 在一些实施方案中,所述免疫疗法可以是免疫检验点抑制剂。免疫检验点调高信号(例如共刺激性分子)或调低信号。可通过免疫检验点阻断而靶向的抑制性免疫检验点包括:腺苷A2A受体(A2AR)、B7-H3(也被称作CD276)、B和T淋巴细胞衰减剂(BTLA)、细胞毒性T-淋巴细胞相关的蛋白4(CTLA-4、也被称作CD152)、吲哚胺2,3-双加氧酶(IDO)、杀伤细胞免疫球蛋白(KIR)、淋巴细胞活化基因-3(LAG3)、程序性死亡1(PD-1)、T-细胞免疫球蛋白结构域和粘蛋白结构域3(TIM-3)和T细胞活化的V结构域Ig抑制剂(VISTA)。具体地,免疫检验点抑制剂靶向PD-1轴和/或CTLA-4。

[0266] 免疫检验点抑制剂可以是药物,例如小分子、重组形式的配体或受体,或者特别是抗体,例如人抗体(例如,国际专利公开WO2015016718;Pardoll,Nat Rev Cancer,12(4):252-64,2012;二者通过引用并入本文)。可以使用免疫检验点蛋白或其类似物的已知抑制剂,特别是可以使用嵌合的、人源化的或人形式的抗体。如技术人员将知晓的,替代和/或等同名称可以用于在本公开内容中提及的某些抗体。在本公开内容的上下文中,这样的替代和/或等同名称是可互换的。例如已知的是,帕姆单抗(lambrolizumab)也以替代和等同名称MK-3475和帕博丽珠单抗(pembrolizumab)为人所知。

[0267] 在一些实施方案中,所述PD-1结合拮抗剂是抑制PD-1与其配体结合配偶体结合的分子。在一个具体的方面,所述PD-1配体结合配偶体是PDL1和/或PDL2。在另一个实施方案中,PDL1结合拮抗剂是抑制PDL1与其结合配偶体结合的分子。在一个具体的方面,PDL1结合配偶体是PD-1和/或B7-1。在另一个实施方案中,PDL2结合拮抗剂是抑制PDL2与其结合配偶体结合的分子。在一个具体的方面,PDL2结合配偶体是PD-1。拮抗剂可以是抗体、其抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋白或寡肽。示例性抗体描述于美国专利号US8735553、US8354509和US8008449中,它们都通过引用并入本文。用于用在本文提供的方法中的其他PD-1轴拮抗剂是本领域已知的,例如描述于美国专利申请号US20140294898、US2014022021和US20110008369中,它们都通过引用并入本文。

[0268] 在一些实施方案中,所述PD-1结合拮抗剂是抗-PD-1抗体(例如,人抗体、人源化抗体或嵌合抗体)。在一些实施方案中,所述抗-PD-1抗体选自纳武单抗(nivolumab)、帕博丽珠单抗(pembrolizumab)和CT-011。在一些实施方案中,所述PD-1结合拮抗剂是免疫粘附素(例如,含有与恒定区(例如,免疫球蛋白序列的Fc区)融合的PDL1或PDL2的细胞外或PD-1结合部分的免疫粘附素)。在一些实施方案中,所述PD-1结合拮抗剂是AMP-224。纳武单抗(也被称作MDX-1106-04、MDX-1106、ONO-4538、BMS-936558和OPDIVO®)是在WO2006/121168中描述的抗-PD-1抗体。帕博丽珠单抗(也被称作MK-3475、Merck 3475、帕姆单抗、KEYTRUDA®和SCH-900475)是在WO2009/114335中描述的抗-PD-1抗体。CT-011(也被称作hBAT或hBAT-1)是在WO2009/101611中描述的抗-PD-1抗体。AMP-224(也被称作B7-DCIg)是在WO2010/027827和WO2011/066342中描述的PDL2-Fc融合可溶性受体。

[0269] 可以在本文提供的方法中被靶向的另一种免疫检验点是细胞毒性T-淋巴细胞-相关的蛋白4(CTLA-4),也被称作CD152。人CTLA-4的完整cDNA序列具有Genbank登录号L15006。CTLA-4存在于T细胞表面上并且当与抗原呈递细胞表面上的CD80或CD86结合时充

当“关闭”开关。CTLA4是免疫球蛋白超家族的一个成员，其在辅助性T细胞的表面上表达并向T细胞传递抑制信号。CTLA4与T细胞共刺激性蛋白CD28类似，并且这两种分子都结合抗原呈递细胞上的CD80和CD86(也分别称为B7-1和B7-2)。CTLA4向T细胞传递抑制信号，而CD28传递刺激信号。细胞内CTLA4也存在于调节性T细胞中并且可能对其功能是重要的。通过T细胞受体和CD28的T细胞活化会导致增加的CTLA-4(B7分子的抑制性受体)表达。

[0270] 在一些实施方案中，所述免疫检验点抑制剂是抗-CTLA-4抗体(例如，人抗体、人源化抗体或嵌合抗体)、其抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋白或寡肽。

[0271] 使用本领域众所周知的方法，可以产生适用于本发明方法的抗-人-CTLA-4抗体(或由此衍生出的VH和/或VL结构域)。备选地，可以使用本领域公认的抗-CTLA-4抗体。例如，在以下文献中公开的抗-CTLA-4抗体可以用在本文公开的方法中：US 8,119,129,WO 01/14424,WO 98/42752;WO 00/37504(CP675,206，也被称作曲美木单抗;以前的替西木单抗)，美国专利号6,207,156;Hurwitz等人(1998)Proc Natl Acad Sci USA 95(17):10067-10071;Camacho等人(2004)J Clin Oncology 22(145):摘要号2505(抗体CP-675206);和Mokyr等人(1998)Cancer Res 58:5301-5304。每篇上述公开物的教导通过引用并入本文。也可以使用与这些本领域公知的抗体中的任一种竞争结合CTLA-4的抗体。例如，在国际专利申请号WO2001014424、WO2000037504和美国专利号8,017,114(都通过引用并入本文)中描述了人源化的CTLA-4抗体。

[0272] 一种示例性的抗-CTLA-4抗体是伊匹木单抗(也被称作10D1、MDX-010、MDX-101和Yervoy®)或其抗原结合片段及变体(参见，例如，WO 01/14424)。在其他实施方案中，所述抗体包含伊匹木单抗的重链和轻链CDR或VR。因此，在一个实施方案中，所述抗体包含伊匹木单抗的VH区域的CDR1、CDR2和CDR3结构域，以及伊匹木单抗的VL区域的CDR1、CDR2和CDR3结构域。在另一个实施方案中，所述抗体与上述抗体竞争结合CTLA-4上的相同表位和/或结合至CTLA-4上的相同表位。在另一个实施方案中，所述抗体与上述抗体具有至少约90％可变区氨基酸序列同一性(例如，与伊匹木单抗具有至少约90％、95％或99％的可变区同一性)。

[0273] 用于调节CTLA-4的其他分子包括例如在美国专利号US5844905、US5885796和国际专利申请号WO1995001994和WO1998042752(都通过引用并入本文)中描述的CTLA-4配体和受体，以及例如在美国专利号US8329867(通过引用并入本文)中描述的免疫粘附素。

[0274] 4.手术

[0275] 大约60％的患有癌症的人将经历某种类型的手术，包括预防性、诊断性或分期、治愈性和姑息性手术。治愈性手术包括其中将全部或一部分癌性组织物理去除、切除和/或破坏的切除术，并且可以与其他疗法(例如本发明实施方案的治疗、化学疗法、放射疗法、激素疗法、基因疗法、免疫疗法和/或替代疗法)结合使用。肿瘤切除术表示至少一部分肿瘤的物理去除。除肿瘤切除术之外，通过手术的治疗包括激光手术、冷冻手术、电手术和用显微镜控制的手术(Mohs氏手术)。

[0276] 在切除一部分或全部癌性细胞、组织或肿瘤之后，可以在体内形成腔。通过灌注、直接注射或向该区域局部施用另外的抗癌疗法，可以实现治疗。可以重复这样的治疗，例如每1、2、3、4、5、6或7天，或者每1、2、3、4和5周，或者每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月。这些治疗也可以具有不同剂量。

[0277] 5.其他药剂

[0278] 考虑可以将其他药剂与本发明实施方案的某些方面组合使用以提高治疗的治疗效果。这些其他药剂包括影响细胞表面受体和GAP连接的上调的药剂、细胞生长抑制剂和分化剂、细胞粘附抑制剂、增加过度增殖细胞对细胞凋亡诱导剂的敏感性的药剂或其他生物药剂。通过提高GAP连接数目实现的细胞间信号传导的增加，会增加对相邻过度增殖细胞群体的抗过度增殖作用。在其他实施方案中，细胞生长抑制剂或分化剂可以与本发明实施方案的某些方面组合使用以提高治疗的抗过度增殖效力。考虑细胞粘附抑制剂以提高本发明实施方案的效力。细胞粘附抑制剂的实例是粘着斑激酶(FAK)抑制剂和洛伐他汀。进一步考虑增加过度增殖细胞对细胞凋亡的敏感性的其他试剂(例如抗体c225)可以与本发明实施方案的某些方面组合使用以提高治疗效力。

[0279] VI.制品或试剂盒

[0280] 本文还提供了包含免疫细胞的制品或试剂盒。制品或试剂盒可进一步包括包装插页，该包装插页包含用于使用NK细胞以治疗或延迟个体中癌症的进展或增强患有癌症的个体的免疫功能的说明。本文所述的任何抗原特异性免疫细胞可包括在制品或试剂盒中。合适的容器包括例如瓶子、小药瓶、袋子和注射器。容器可以由多种材料(例如玻璃、塑料(例如聚氯乙烯或聚烯烃)或金属合金(例如不锈钢或哈氏合金))形成。在一些实施方案中，容器容纳制剂，并且在容器上或与容器相关的标签可以指示使用说明。制品或试剂盒还可以包括从商业和用户角度来看合乎需要的其他材料，包括其他缓冲液，稀释剂，过滤器，针头，注射器和带有使用说明的包装插页。在一些实施方案中，制品还包括一种或多种其他药剂(例如化学治疗剂和抗肿瘤剂)。用于一种或多种药剂的合适容器包括例如瓶子、小药瓶、袋子和注射器。

[0281] VII.实施例

[0282] 包括以下实施例以证明本发明的具体实施方案。本领域技术人员应该理解，以下实施例中公开的技术代表本发明人发现的在本发明方法的实践中发挥良好作用的技术，因此可以认为构成本发明实践的具体方式。然而，根据本公开内容，本领域技术人员应当理解，可以在不背离本发明主题的精神和范围的情况下在所公开的特定实施方案中进行许多改变，并且仍可获得类似或相似的结果。

[0283] 实施例1-CAR NK细胞扩增

[0284] NK细胞源自脐带血，通过将其遗传改造以表达可增强其抗肿瘤活性而不增加移植物抗宿主疾病(GVHD)的风险的肿瘤特异性嵌合抗原受体(CAR)而重指导其特异性，因此提供用于疗法(诸如表达靶标的任意癌症的免疫疗法)的细胞的“现成”来源。

[0285] NK细胞从健康供体的脐带血(CB)分离，并与抗原呈递细胞(APC)和一种或多种细胞因子共培养，所述细胞因子包括IL-2、IL-15、IL21或IL-18。然后，将NK细胞用用于CAR的逆转录病毒载体转导。然后将经转导的细胞进一步在具有APC和IL-2的共培养物中扩增以获得经CAR转导的CB-NK细胞。这些细胞可以用于新鲜输注，或可以在含有细胞因子的培养基中冷冻用于后期解冻和输注。图1中概述用于产生CAR CB-NK细胞的程序。

[0286] 具体而言，在第0天，从单一CB单位分离单核细胞，将其洗涤并使用CliniMACS免疫磁珠(Miltenyi Biotec)耗竭CD3、CD14和CD19阳性细胞。收集未经标记的、富集的CB-NK细胞，用CliniMACS缓冲液洗涤，计数，并与经照射的(100Gy)APC以1:2的比率(1个NK细胞:2个

APC)组合。将细胞混合物(1x10^6个细胞/ml)转移至含有NK细胞完全培养基(NKCCM)(90％干细胞生长培养基,10％FBS,2mM L-谷氨酰胺)和IL-2(200U/mL)的细胞培养瓶中。

[0287] 将细胞在37℃下5％CO_2中培育。在第3天,通过离心收集细胞并将其重悬在含有IL-2(200U/mL)的NKCCM(1x10^6个细胞/ml)中进行培养基更换。然后将细胞在37℃下5％CO_2中培育。在第5天,通过培养物中的CB-NK细胞的数目确定转导所需的孔的数目。将重组人纤维连接蛋白溶液涂布在24孔培养板中。将板密封并储存在4℃冰箱中。

[0288] 在第6天,如第0天所述进行第二次NK细胞选择,之后进行CB-NK细胞转导。将细胞用CliniMACS缓冲液洗涤,离心并以0.5x10^6/ml重悬在含有600U/ml IL-2的NKCCM中。然后将重组人纤维连接蛋白板用NKCCM洗涤,在37℃下培育直至使用。将各孔中的NKCCM用逆转录病毒上清液替换,接着在32℃下将板离心。然后,将逆转录病毒上清液吸出并用新鲜逆转录病毒上清液替换。将含有0.5x10^6个细胞和600U/mL IL-2的CB-NK细胞悬浮液添加至各孔,将板离心。然后将板在37℃与5％CO_2下培育。

[0289] 在第9天,将CAR转导的CB-NK细胞从转导板移除,通过离心收集,在符合GMP的G-Rex®生物反应器中在含有200U/ml IL-2(终浓度)的NKCCM中用经照射的(100Gy)aAPC以1:2的比率(1个NK细胞:2个APC)刺激,在37℃和5％CO_2下培育。在第12天,添加IL-2。在第15天,收获细胞,制备最终产品用于输注或冷冻保存。

[0290] 在NK细胞转导后,在整个培养期间使用G-Rex®生物反应器而非组织培养瓶增加CAR NK细胞扩增的稳健性和再现性,同时相较于烧瓶的更开放体系减少微生物污染的机会。此外,其还显著缩短技术专家的时间,因为利用培养瓶体系,技术专家不得不每2至3天操作培养物。利用G-Rex®,如上所述喂养细胞一次,然后使细胞不受干扰直至第15天收获。如图3中所示,从含有2800万个细胞的转导的CB细胞级分,在G-Rex®生物反应器中产生7.67x10^9个CAR NK细胞的中值,相比较而言,烧瓶中产生0.91x10^9个CAR NK细胞(p＝0.014)。这表示在转导后与烧瓶中的78倍扩增相比,在G-Rex®生物反应器中得到中值为274倍的扩增(p＝0.037)(从培养的第6天至第15天)。利用任一程序,转导效率为约67％的优异中值(范围在48至87％)。因此,在NK细胞转导步骤后使用G-Rex®生物反应器提供CAR NK细胞生产的优异策略。

[0291] 将扩增的CB CAR-NK细胞在具有5％DMSO的符合GMP的NK细胞冷冻保存培养基混合物中冷冻,并使用速率控制方法在液氮中冷冻。体外铬释放测定证实:利用新鲜的相对冷冻的CAR-NK细胞,对Raji和K562细胞系二者产生相当的杀伤作用。使用异种NSG小鼠模型的体内杀伤测定也证实:冷冻的相对新鲜的NK细胞针对Raji肿瘤具有相当的抗肿瘤活性,如使用荧光素酶标记的Raji细胞的生物发光成像所评估的。

[0292] 图4显示用在体内NSG研究中使用的7种不同治疗方案(treatment arm)和相关对照的存活。植入Raji肿瘤并用冷冻的CAR-NK细胞处理的小鼠具有的存活与接受新鲜的CAR-NK细胞的动物的存活相当。图5显示这些动物的生存曲线,图6显示统计分析的细节。图7显示生物发光成像数据,其显示用新鲜的CAR-NK细胞或利用本发明新型冷冻保存培养基混合物冷冻的CAR-NK细胞处理的携带Raji的小鼠中最强效的抗肿瘤活性。

[0293] 使用此策略,可以从每个脐带血单位产生超过100个剂量的1x10^6个CAR NK细胞/Kg用于治疗患者。因此,经CAR转导的源自脐带血的NK细胞可提供NK细胞的现成来源,所述

NK细胞可识别和攻击多种癌症，包括液体肿瘤和实体肿瘤。源自脐带血的自然杀伤细胞的逆转录病毒转导允许改造的细胞更长久的持续性和提高的功效，以用于多种癌症的免疫疗法和潜在地用于治疗多种病毒感染。

[0294] 实施例2-在CD19阳性淋巴瘤中使用CAR转导的自然杀伤细胞

[0295] 本实例涉及1和2期试验的结果，其中向患有复发或难治性CD19阳性癌症(非霍奇金淋巴瘤或慢性淋巴细胞白血病[CLL])的11名患者施用源自脐带血的HLA不匹配的抗CD19 CAR-NK细胞。将NK细胞用表达编码抗CD19CAR、白介素-15和作为安全开关的诱导型胱天蛋白酶9的基因的逆转录病毒载体转导。将细胞离体扩增，并在淋巴细胞清除性化学疗法之后，以三个剂量(1×10^5、1×10^6或1×10^7个CAR-NK细胞/千克体重)中之一以单次输注施用。如本文中所述，CAR-NK细胞的施用与细胞因子释放综合征、神经毒性或移植物抗宿主疾病的发展不相关，并且不存在炎性细胞因子(包括白介素-6)的水平超过基线的增加。未达到最大耐受剂量。接受治疗的11名患者中，8名(73％)具有反应；这些患者中，7名(4名患有淋巴瘤和3名患有CLL)具有完全缓解，1名具有Richter转化组分的缓解但是具有持久的CLL。反应是快速的且在所有剂量水平下在输注后30天内可以观察到。输注的CAR-NK细胞在低水平下扩增和持续至少12个月。

[0296] 研究设计和患者

[0297] 本实例提供本研究中前11名患者的信息，数据截止于2019年4月。简言之，患者经历每天用氟达拉滨(以30mg/m^2体表面积的剂量)和环磷酰胺(以300mg/m^2的剂量)持续连续3天的清除淋巴细胞性化学疗法，接着以1×10^5个细胞、1×10^6个细胞和1×10^7个细胞/kg体重的渐增剂量以单次输注试验的CAR-NK细胞。在第30天评估后，在治疗医师的裁量下允许进行缓解后疗法。

[0298] 前9名患者接受与接受者的HLA基因型部分匹配(HLA基因座A、B和DRβ1处的4/6匹配)的CAR-NK产品(图9和图22A和22B)。然后修改方案以允许进行不考虑HLA匹配的治疗，其为在患者10和11中所用的程序。当可能时，利用杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)配体错配选择脐带血单位用于CAR-NK产生(Mehta和Rezvani，2016)。(供体与接受者之间的KIR错配可通过称作缺失自我识别的过程增强NK细胞固有的[非CAR介导]的抗肿瘤活性。)对疗法的临床反应基于国际研究会对慢性淋巴细胞白血病的2018标准(Hallek等人，2018)和对非霍奇金淋巴瘤的2014Lugano分类(Cheson等人，2014)。(实例3中提供进一步的细节。)

[0299] 从脐带血制备CAR-NK细胞

[0300] 在实例3的方法部分中提供关于CAR-NK细胞制备的全部细节。简言之，将脐带血单元解冻，纯化NK细胞并将其在改造的K562饲养细胞和白介素-2的存在下培养。在第6天，将细胞用编码抗CD19 CAR、CD28.CD3ζ信号传导胞内域、白介素-15和诱导型胱天蛋白酶9的基因的逆转录病毒载体转导(Hoyos等人，2010)。将细胞扩增并在第15天收获用于新鲜输注。输注产品的最终CAR-NK转导效率为49.0％(范围在22.7至66.5)。在体外测试CAR-NK细胞，其以穿孔素依赖性方式杀死原发性CLL靶标(图13)。输注产品中的中值CD3阳性T细胞含量为500个细胞/kg(范围在30至8000)，产品中具有中值为0.01％(范围在0.01至0.002)的污染CAR T细胞(图23)。

[0301] 统计学分析

[0302] 利用Wilcoxon秩和检验来检验对疗法的反应与CAR-NK细胞水平之间的关联。认为

小于0.05的P值指示统计学显著性。

[0303] 患者的特征

[0304] 从2017年6月至2019年2月,根据方案募集15名连续患者。在这些患者中,4名在开始治疗之前由于疾病进展、移植物抗宿主疾病的发展、不存在可检测的疾病和产品的细菌污染而退出(各1名患者)。因此,11名患者接受单次剂量的CAR-NK细胞(图9和图22A和22B)。患者的中值年龄为60岁(范围在47至70岁)。11名患者已接受中值为4的疗法线(即,4条疗法线,范围在3至11)。五名患者患有CLL(包括具有Richter转化或加速CLL的2名),所有患者都具有疾病进展史,同时接受依鲁替尼(ibrutinib)加最少3条其他疗法线;所有5名患者具有高风险遗传特征。六名患者患有淋巴瘤,包括2名患有弥漫性大B细胞淋巴瘤和4名具有滤泡形式;这些患者中的3名经历高级淋巴瘤的转化。在6名患有淋巴瘤的患者中,4名在自体造血干细胞移植后经历疾病进展,2名患有难治性疾病。

[0305] 安全性

[0306] 在输注CAR-NK细胞后,患者中无一具有细胞因子释放综合征、神经毒性或噬血细胞性淋巴组织细胞增多症的症状。此外,尽管患者与其CAR-NK产品之间HLA不匹配,但是没有观察到移植物抗宿主疾病的任何病例。如所期望的,所有患者具有短暂和可逆的血液毒性事件,其主要与淋巴细胞清除性化学疗法相关。不能确定CAR-NK细胞的输注是否有助于血液毒性。不存在肿瘤溶解综合征或3或4级非血液毒性的情况。未达到CAR-NK细胞的最大耐受剂量。表2如图10列出了研究中观察到的所有不良事件。没有患者进入加护病房(ICU)以管理与CAR-NK细胞相关的不良事件。然而,患者2进入ICU以治疗进展性淋巴瘤,随后死亡。鉴于研究中不存在严重毒性,本发明人没有活化胱天蛋白酶9安全开关(使用rimiducid)以消除CAR-NK细胞。

[0307] 治疗反应

[0308] 在13.8个月的中值随访期(范围在2.8至20.0),8名患者(73%)具有客观反应,包括7名患者具有完全反应(3名患有CLL和4名患有淋巴瘤)(图11)。患有具有Richter转化的CLL的另一名患者(患者5)具有高级淋巴瘤的完全缓解,根据在CAR-NK输注后30天进行的正电子发射断层扫描——计算机断层扫描术(PET-CT)不存在具有氟脱氧葡萄糖摄入的病变,但是继续具有血球减少(cytopenia),伴有CLL的骨髓浸润(图14)。虽然该患者最终具有完全反应,同时接受了缓解后疗法(见下文),本发明人没有将此反应归因于CAR-NK疗法。在所有8名患者中,对治疗的反应在输注后的第一个月期间发生。在接受治疗的11名患者中,5名接受KIR配体不匹配的产品。

[0309] 缓解后疗法

[0310] 对CAR-NK疗法具有反应的8名患者中,5名经历缓解后疗法(图11)。患者3(其患有CLL)在输注后9个月具有后续最小残留疾病,如外周血的流式细胞术所检测的,并接受利妥昔单抗。患者7(其也患有CLL)具有临床完全反应,但是具有持久性最小残留疾病,并在输注后6周开始接受来那度胺(lenalidomide)作为免疫调节剂。患者8(其患有转化型滤泡性淋巴瘤)和患者11(其患有滤泡性淋巴瘤)在CAR-NK疗法后经历造血干细胞移植,同时完全反应而无最小残留疾病的迹象。患者5(其患有具有Ritchter转化的CLL)具有高级淋巴瘤的缓解,但是具有持久的CLL并接受维奈托克(venetoclax)。尽管患者3、5和7继续具有最小残留疾病的阳性结果,所有这些患者存活并且在最后评估日期完全缓解。

[0311] B细胞发育不全

[0312] 因为B-细胞发育不全已用作抗CD19 CART-细胞活性的代理,因此在输注CAR-NK细胞后测量患者的外周血中CD19阳性B细胞的频率。除了患者1和5之外的所有患者在募集时具有与先前B-细胞耗竭疗法相关的B-细胞发育不全。在患者1中,B-细胞发育不良在CAR-NK疗法和淋巴细胞清除性化学疗法后发展。患者5在外周血中具有持久的CLL,尽管相对于高级转化已经具有完全反应,直至该患者接受维奈托克。患者3具有与最小残留疾病的复发阳性一致的B-细胞恢复的迹象。其余患者中在随访期期间都没有恢复正常的B-细胞计数。

[0313] CAR-NK扩增、迁移和持久性

[0314] 使用定量实时聚合酶链式反应测定,根据载体转基因拷贝数/微克基因组DNA来测量CAR-NK细胞的体内扩增。早在输注后3天观察到扩增,其中CAR-NK细胞持续至少12个月(图12A和图24)。在输注后3至14天测量峰值CAR-NK拷贝数,其是剂量依赖性的。超过第14天,在外周血转录物水平或在CAR-NK细胞的持久性方面未注意到剂量相关的差异。如用CAR-T细胞治疗的患者中所报告的(Turtle等人,2017;Neelapu等人,2017;Maude等人,2014),与对疗法没有反应的那些患者相比,本研究中对疗法有反应的患者具有显著更高的CAR-NK细胞的早期扩增(图12B)。根据与接受者HLA不匹配的程度,未观察到CAR-NK细胞的持久性方面的差异(图9中的表1和图15)。这些结果通过流式细胞术得以证实(图16)(Muftuoglu等人,2018)。

[0315] 在能得到淋巴结样品的2名患者中,与骨髓或外周血相比,在淋巴结中发现更多的CAR-NK细胞(图17和18),该发现支持CAR-NK细胞归巢在疾病部位的观念。在具有可得样品的10名患者的骨髓和外周血中检测到相似水平的CAR-NK细胞(图19)。

[0316] 产品中最小数目的污染CAR表达T细胞在输注后没有导致可检测的CART-细胞扩增,CD3+T细胞也没有导致移植物抗宿主疾病的发展(图20)。在不具有反应或具有复发的患者中,CAR-NK细胞仍在低水平下可检测,尽管肿瘤细胞中有CD19表达,在某些实施例中其指示替代免疫逃避机制(储如CAR-NK耗竭的诱导)的存在。尚未进行具有复发的患者中残留CAR-NK细胞的功能研究。在复发时,持久性CAR-NK细胞在体内没有扩增。

[0317] 血清细胞因子的分析

[0318] 测量来自连续外周血样品的上清液中的炎性细胞因子以及白介素-15,白介素-15通过用于产生CAR-NK细胞的逆转录病毒载体编码。没有观察到炎性细胞因子(例如,白介素-6和肿瘤坏死因子α)的水平相较于基线水平的增加,也不存在白介素-15的全身水平超过处理前值的增加,其指示白介素-15在输注后不通过外周血中的CAR-NK细胞释放至实质性全身水平(图21)。

[0319] 针对供体的同种免疫抗体反应的诱导

[0320] 所有患者接受HLA不匹配的CAR-NK产品。患者1至9接受具有4/6HLA分子的部分匹配的产品,然而患者10和11是非HLA匹配的CAR-NK细胞的接受者。因此,本发明人监测供体特异性HLA抗体的诱导。在进行测试时的所有时间点,未观察到针对输注产品的错配的HLA等位基因的抗体诱导(图25)。未评估宿主细胞反应。

[0321] 实施例3-补充材料

[0322] CAR-NK细胞制备

[0323] 先前描述了iC9/CAR19/IL15 CAR-NK细胞的临床前开发(Hoyos等人,2010;Liu等

人,2018)。用于CAR-NK细胞产生的临床CB单位获自MD安德森癌症中心(MDACC)CB库。在MDACC GMP设施中制备CAR-NK细胞。简言之,将脐带单位解冻,通过CD3、CD19和CD14阴性选择(Miltenyi珠)纯化NK细胞,并在表达膜结合的IL-21和4-1BB配体的经改造的K562饲养细胞和外源IL-2(200U/ml)的存在下培养。在第6天,将细胞用携带针对CD19、CD28跨膜域和CD28.CD3ζ信号传导胞内域的单链变体片段(scFv)与人类IL15基因和诱导型胱天蛋白酶-9自杀基因的组合的逆转录病毒载体转导。将三种基因使用源自口蹄疫疾病病毒的2A序列肽连接在一起,并克隆到SFG逆转录病毒载体中以产生iC9/CAR.19/IL15逆转录病毒载体(Hoyos等人,2010;Liu等人,2018)。将细胞再扩增9天并在第15天收获用于新鲜输注。

[0324] 研究设计

[0325] 在本发明人的机构进行I至II期临床试验,并设计试验,以鉴别最佳剂量和评估iC9/CAR19/IL15 CB-NK细胞的递增剂量作为复发/难治性CD19阳性恶性病的治疗的安全性和功效。使用逐次调适性I至II期EffTox基于权衡的设计,将剂量递增(Thall和Cook,2004;Thall等人,2006;Thall等人,2014)。将剂量限制性毒性定义为在细胞输注2周内发生CRS(需要转移至加护病房)或在输注40天内发展出III至IV级急性GVHD或与NK-CAR细胞输注相关的3至5级过敏反应。出于EffTox模型的目的,将功效定义为患者存活且在CAR-NK细胞输注后第30天至少部分缓解。

[0326] 收集并报告在输注后前40天内的所有不良事件,不论其是否归因于CAR-NK细胞疗法。自治疗后第40天直至12个月,收集并报告所有视为与CAR-NK细胞至少可能相关的不良事件。此外,所有患者均登记参与IRB批准的长期随访研究(持续15年)。EffTox剂量可接受性规则涵盖0.50的剂量限制性毒性的概率上限(基于CAR-T细胞经验,我们预测20%的患者将发展剂量限制性CRS)和0.25的功效的概率下限。用于计算权衡轮廓的三对等效权衡概率为(0.35,0)、(0.55,0.30)、(1,0.075)。分别基于假设的先前平均值Prob(毒性|剂量)=0.35、0.40、0.45,和Prob(功效|剂量)=0.15、0.20、0.25,计算先前的超参数,其中整体先前有效样品大小=1。人们可以最低剂量水平(10^5个细胞/kg)开始治疗最多36名患者(在至多3个大小为12的群组中);由EffTox方法选择后续剂量,并且当递增时,不会略过未经试验的剂量水平。使用MDACC生物统计临床试验部门执行网站https://biostatistics.mdanderson.org/ClinicalTrialConduct/执行EffTox设计。

[0327] 临床试验修正和患者募集

[0328] 在2017年6月至2019年2月间,连续募集15名患者(4名筛选失败,11名接受疗法)到方案中。患者依序参与从CAR NK输注日至开始针对各群组内下一名患者的准备方案的14天交错间隔,和将剂量递增至下一个剂量水平的2周间隔。在2019年3月,认为研究的剂量发现部分已完成,并修正方案,以允许以10^7个细胞/kg的剂量重复进行CAR-NK细胞输注。本发明的实施例2和3报告在研究的剂量发现部分中,11名患者接受单次输注CAR-NK细胞治疗。此报告的数据截止日是2019年4月。临床试验的设计是追踪患者12个月,之后依据针对接受基因工程改造的细胞产品治疗的患者的IRB批准的长期随访研究追踪患者。所有患者同意参与长期随访研究。

[0329] 反应评估

[0330] 在输注4、8、12、16、26、48和52周后,并且如果临床指示,则更频繁地进行骨髓检查和PET-CT成像。使用分别针对NHL和CLL患者的Lugano和iWCLL标准定义反应(Cheson等人,

2014;Hallek等人,2008;Hallek等人,2018)。在MDACC CLIA认证的血液病理学实验室中使用6色流式细胞术以10-4个有核细胞或更好的敏感性评价所有骨髓样品的MRD状态。如果患者具有至少两个连续的阴性评估,则认为其是MRD阴性的。

[0331] 用于霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤的反应评估的标准(Lugano标准)(Cheson等人,2014)

[0332] 完全反应

[0333]

	基于 PET-CT 的反应	基于 CT 的反应
淋巴结和淋巴外部位	完全代谢反应: 在 5PS†上评分 1、2 或 3_具有或不具有残留团块。应知晓,在具有高生理摄入或具有脾或骨髓内的活化(例如,利用血疗法或骨髓集落刺激因子)的 Waldeyer 环或结外部位中,摄入可能较正常纵隔和/或肝更大。在这一情况下,如果初始侵袭的部位处的摄入不大于周围正常组织,则可推断完全代谢反应,即使该组织具有高的生理摄入	完全放射反应(下列中的所有) 靶结节/结节团块必须消退至 LDi<1.5cm, 无疾病的淋巴外部位
未测量的病变	不适用	不存在
器官增大	不适用	消退至正常
新病变	无	无

[0334]

骨髓	骨髓中没有 FDG-avid 疾病的迹象	形态学正常;如果不确定,则为 IHC 阴性

[0335] 部分反应

[0336]

	基于 PET-CT 的反应	基于 CT 的反应
淋巴结和淋巴外部位	部分代谢反应 评分 4 或 5†，与基线相比具有减少的摄入和任何大小的一个或多个残留团块 在中期期间，这些发现表明对应的疾病 在治疗结束时，这些发现指示残留疾病 残留疾病	部分缓解(下列中的所有) 在至多 6 个靶标可测量结节和结外部位的 SPD 减少>50% 当病变太小而不能在 CT 上测量时，指定 5mm x 5mm 作为缺省值 当不再可见时，0 x 0mm 对于>5mm x 5mm，但是小于正常的结节，使用实际测量值用于计算
未测量的病变	不适用	不存在/正常，消退，但没有增加
器官增大	不适用	脾必须在超出正常的长度上消退 50%
新病变	无	无
骨髓	残留摄入比正常骨髓高，但是与基线相比减少（与化学疗法导致的反应性变化相容的弥漫性摄入是允许的）。如果在淋巴结反应的情形下骨髓中存在持久性的病灶变化，则应该考虑利用 MRI 或活组织检查或间隔扫描进行进一步的评估。	不适用

[0337] 无反应或稳定疾病

[0338]

	基于 PET-CT 的反应	基于 CT 的反应
靶结节/结节团块，结外病变	无代谢反应 评分 4 或 5，在治疗中期期间或结束时，FDG 摄入没有从基线的显著变化	稳定的疾病 至多 6 个显性可测量的结节和结外部位的 SPD 从基线有<50%的减少； 不满足进展性疾病的标准标准

[0339]

未测量的病变	不适用	无符合进展的增加
器官增大	不适用	无符合进展的增加
新病变	无	无
骨髓	没有从基线的编号	不适用

[0340] 进展性疾病

[0341]

	基于 PET-CT 的反应	基于 CT 的反应
单个靶结节/结节团块 结外病变	进展性代谢疾病 评分 4 或 5，具有摄入强度从基线的增加，和/或 在中期期间或治疗结束评估时，新的 FDG-avid 病灶与淋巴瘤一致	进展性疾病需要下列 PPD 进展中的至少一个： 单个结节/病变必须具有下述异常： LDi>1.5cm，和 从 PPD 最低点增加>50%， LD 或 Sdi 从最低点的增加： 针对病变<2cm，0.5cm 针对病变>2cm，1.0cm 在脾肿大的情况下，脾长度的增加必须大于其先前超过基线的增加程度的 50%（例如，15cm 脾必须增加至>16cm）。如果无先前的脾肿大，则必须从基线增加至少 2cm 新发或复发的脾肿大
未测量的病变	无	先前存在的未测量的病变有新的或明显的进展
新病变	新的 FDG-avid 病灶与淋巴瘤一致，而非另一种病因学（例如，感染、炎症）。如果关于新病变的病因学是不确定的，则可以考虑活组织检查或间隔扫描	先前解决的病变再生长。在任意轴向新结节>1.5cm 在任意轴向新结外部位>1.0cm;如果在任意轴向<1.0cm,则其存在必须明确且必须归因于淋巴瘤 任何大小的可评估疾病明确地归因于淋巴瘤

[0342]

骨髓	新发或复发的 FDG-avid 病灶	新发或复发的侵袭

[0343] 缩略语:5PS,5分量表;CT,计算机断层扫描术;FDG,氟脱氧葡萄糖;IHC,免疫组织化学;LDi,病变的最长横向直径;MRI,磁共振成像;PET,正电子发射断层扫描术;PPD,LDi和垂直直径的交叉乘积;SDi,垂直于LDi的最短轴;SPD,针对多个病变的垂直直径的乘积的和。*在多名患者中3分指示利用标准治疗的良好预后,尤其是如果在中期扫描时。然而,在涉及PET的试验中(其中研究递减),可优选地认为3分为反应不足(以避免治疗不足)。测量的显性病变:选择最大显性结节、结节团块和结外病变中至多六个已在两个参数中明确可测量。结节应优选地来自身体的不同区,且在适当的情况下应包含纵隔和腹膜后区。非结节病变包括实体器官(例如,肝、脾、肾、肺)中的病变、GI侵袭、癌病变或触诊所指示的病变。未测量的病变:应认为未选择作为测量的显性疾病(实际上是可评估的)的任何疾病是未测量

的疾病。这些部位包括未选择作为显性或可测量或者不满足可量测要求但是仍认为异常、以及实际可评估的疾病的任何结节、结节团块和结外部位，其为难以定量跟踪测量的疑似疾病的任何部位，包括胸腔积液、腹水、骨病变、软脑膜病、腹部肿块和不能通过成像证实和跟踪的其他病变。在Waldeyer环或结外部位(例如，GI道、肝、骨髓)中，FDG摄入可较具有完全代谢反应的纵隔中更大，但是不应高于周围正常生理摄入(例如，由于化学疗法或骨髓生长因子所致的骨髓活化)。†PET 5PS:1，无高于背景的摄入;2，摄入<纵隔;3，摄入>纵隔但是<肝;4，摄入适度>肝;5，摄入显著高于肝和/或新病变;X，不可能与淋巴瘤相关的新摄入区域。

[0344] 关于CLL的iwCLL反应标准(Hallek等人，2018)

[0345] 完全缓解

[0346] CR需要全部下列标准：

[0347] 1.外周血淋巴细胞(通过血液和分类计数评价)<$4x10^9$/L。

[0348] 2.通过身体检查，不存在明显的淋巴结病变。在临床试验中，如果先前异常，则需要对颈部、腹部、骨盆和胸部进行CT扫描。淋巴结的最长直径应该<1.5cm。一旦确定如此，在临床检查或血液检测发现疾病进展明显之前，不应该需要进一步的成像。

[0349] 3.通过身体检查，无脾肿大或肝肿大。在临床试验中，在反应评估时应该进行腹部CT扫描，并且腹部CT扫描应该不显示淋巴结病和脾肿大的迹象。

[0350] 4.不存在疾病相关的全身症状。

[0351] 5.嗜中性粒细胞≥$1.5x10^9$/L。

[0352] 6.血小板≥$100x10^9$/L。

[0353] 7.血红蛋白≥11.0g/dL(无红细胞输血)。

[0354] 一些患者满足CR的所有标准，但是具有与CLL明显不相关但是与药物毒性相关的持久贫血症、血小板减少症或中性粒细胞减少症。应认为这些患者是不同的缓解类别，具有不完全骨髓恢复的CR(CRi)。

[0355] 部分缓解

[0356] 为定义部分缓解，如有先前的异常，则需要改善组A中至少2个参数和组B中1个参数(下表)。如果在治疗前组A和B两组中仅有1个参数异常，则仅需要改善1个参数。

[0357]

组A				组B		
淋巴结	肝和/或脾大小	全身症状	淋巴细胞计数	血小板计数	血红蛋白	骨髓
减少≥50%(与基线比较)	减少≥50%(与基线比较)	任何	与基线相比减少≥50%	≥$100x10^9$/L或与基线相比增加≥50%	≥11 g/dL或与基线相比增加≥50%	存在CLL细胞或B-淋巴结

[0358] 进展性疾病

[0359] 在疗法期间或之后的进展性疾病的特征在于下列中的至少1个(当与最低点比较时)：

[0360] 1.任何新病变的出现，诸如增大的淋巴结(>1.5cm)、脾肿大、肝肿大或其他器官浸润。

[0361] 2.任何先前淋巴结的最大测定直径(>1.5cm)增加>50%。

[0362] 3.脾大小增加≥50%或脾肿大重新出现。在脾肿大的情况下,脾长度的增加必须大于等于(≥)其之前超过基线增加程度的50%。如果在基线处没有观察到先前的脾肿大或者如果脾肿大经治疗得以解决,则与基线相比,脾必须增加至少2cm。

[0363] 4.肝大小的增加大于等于(≥)触诊定义的肋缘下肝增大程度的50%,或重新出现肝肿大。

[0364] 5.血液淋巴细胞的数目增加50%或更多,具有至少5x10^9个/L的B淋巴细胞。

[0365] 6.转化成更具侵入性的组织学(Richter综合征)

[0366] 7.出现血细胞减少症(中性粒细胞减少症、贫血或血小板减少症),所述血细胞减少症直接归因于CLL并且与自身血细胞减少症不相关。

[0367] a.Hb水平减少≥2g/dL或<10g/dL

[0368] b.血小板计数减少≥50%或<100x10^9个/L

[0369] 8.在连续活组织检查中骨髓中的CCL细胞增加≥50%.

[0370] 稳定的疾病

[0371] 尚未实现CR或部分缓解的患者和没有表现出PD的患者被认为患有稳定的疾病。

[0372] 复发

[0373] 将复发定义为在之前以实现CR或部分缓解的上述标准持续≥6个月的患者中疾病进展的迹象。

[0374] 针对原发性CLL靶标的CAR-NK细胞的细胞毒性

[0375] 将来自4名不同CLL患者的PBMC解冻,并加湿培养箱中在37℃/5%CO_2下在SCGM培养基中以2x10^6个PBMC/ml的浓度用CD40L(2ng/ml)预活化过夜。在v型底96孔板中进行4小时^{51}Cr-释放测定。简言之,将0.5x10^6个CLL细胞重悬在1ml SCGM中,并在加湿培养箱中在37℃/5%CO_2下,用100微居里的^{51}Cr标记2小时。标记后,将细胞用PBS洗涤两次,重悬在SCGM中,然后用作靶标进行分析。将配对的未经转导的(NT)和经CAR转导的NK细胞(CAR-NK)用作效应子,采用不同的效应子-靶细胞比率(E:T)。特异性裂解百分比定义为[(测试孔的平均值)-(自发释放孔的平均值)/(最大释放孔的平均值)-(自发释放孔的平均值)]x100。使用Student配对t-检验计算统计显著性。

[0376] 针对原发性CLL靶标的穿孔素依赖性CAR-NK细胞的细胞毒性分析

[0377] 使用刀豆素A(Concanamycin A,CMA)防止穿孔素的成熟并耗竭穿孔素的NK细胞(Kataoka等人,1996)。简言之,在加湿培养箱中在37℃/5%CO_2下,将2x10^6个CD19-CAR转导的NK细胞用100nM CMA(Fisher)或DMSO(Sigma)(作为媒介物对照)处理2小时。使用针对穿孔素的单克隆抗体(来自BioLegen的dG9克隆),通过流式细胞术评估CAR-NK细胞中的穿孔素表达(Makedonas等人,2009)。穿孔素表达的变化通过比较在CMA的存在或不存在下CD56+CAR-NK细胞中的穿孔素MFI而定义。使用如上所述的^{51}Cr释放测定确定利用或不利用CMA预处理的CAR NK细胞针对原发性CLL靶标的细胞毒性。使用Student配对t-检验计算统计显著性。

[0378] qPCR

[0379] 使用QIAamp DNA血液小试剂盒(QIAamp DNA Blood Mini Kit,Qiagen),按照制造商的建议提取基因组DNA。使用Applied Biosystems 7500快速实时PCR系统,通过定量PCR

(qPCR)测定每微克基因组DNA的载体转基因拷贝数。使用TaqMan®通用PCR主混合液和基于DNA的定制设计的掺入5'报告基因(FAM)和3'非荧光淬灭剂(NFQ)的Applied Biosystems™TaqMan®MGB(小凹槽结合剂)探针,实时检测扩增的靶标,并使用标准曲线定量。将载体转基因的定量拷贝数/反应报告为拷贝数/1μg DNA。使用7500软件v2.3分析荧光数据。

[0380] 引物探针序列的实例:

[0381] 正向引物:GAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCA(SEQ ID NO:7)

[0382] 反向引物:AGCGTATTACCCTGTTGGCAAA(SEQ ID NO:8)

[0383] TaqMan FAM-MGB探针:CCTGGAGCAAGAAG(SEQ ID NO:9)

[0384] 所述引物和探针是定制的,并且由Thermo Fisher Scientific合成。

[0385] 血清细胞因子的分析

[0386] 使用购自Thermofisher(Vienna,Austria)的Procartaplex试剂盒,按照制造商的使用说明,对在CAR-NK输注之前和之后收集的系列外周血样品的血清测量细胞因子。

[0387] 通过多参数流式细胞术对CAR-NK细胞进行表型分型和追踪

[0388] 为测定外周血中的源自CB的CAR-NK细胞的持久性和其到骨髓和淋巴结的运送,使用两步策略。首先,本发明人利用患者与供体之间已存在的HLA-错配鉴别输注的源自脐带血的NK细胞;接下来使用CAR特异性抗体鉴别供体NK细胞群体内表达CAR的细胞。简言之,使用针对错配HLA等位基因的荧光色素缀合抗体开发流动嵌合体分析。此外,将针对人类IgG铰链的CH2-CH3结构域的抗CAR抗体(109606088/Jackson Immuno Rsch)用在构建体中作为检测CAR NK细胞的第二方法。将细胞在室温下用包含在1ml PBS中的活细胞/死细胞染料(Tonbo BioScience:13-0868-T100)染色20分钟。然后将细胞通过在室温下以400xg离心5分钟用含有PBS和1%热失活FBS的流动缓冲液洗涤两次。接下来,将细胞在4℃下用AF-647缀合抗CAR(109606088/Jackson Immuno Rsch)抗体染色20分钟。将细胞洗涤,在4℃下用相关抗HLA抗体染色10分钟。然后将细胞在室温下用含有CD19 PE-Cy5、CD20 FITC、CD3 APC-Cy7、CD14 BUV395、CD33 BUV395(均购自BD Biosciences)、CD45 BV510(BeckMan Coulter)、CD56 PE-TX Red(BeckMan Coulter)和CD16 BV650(Biolegend)的荧光标记的抗体的混合物培育15分钟。然后将细胞通过以400xg离心进行洗涤,并用1%多聚甲醛固定。在BD LSRFortessa X-20仪器上进行流式细胞术,使用FlowJo软件(10.0.8版本,TreeStar)分析数据。用于检测HLA阳性CAR阳性NK细胞的门控策略示于图16中。

[0389] 检测淋巴结样品中的CAR-NK

[0390] 将细针淋巴结活组织检查样品收集在PBS中。通过切碎在两个磨砂端载玻片之间的样品来制备样品的单细胞悬浮液。将细胞悬浮液通过50微米筛网过滤,离心,计数,将$1x10^6$个细胞用包含在PBS中的活细胞/死细胞染料染色。在活力染色后,将细胞在含有1%FBS的PBS中洗涤一次,并用包含在PBS-FBS缓冲液中的AF-647缀合抗CAR(109606088/Jackson Immuno Rsch)抗体染色(4℃,20分钟)。接下来,将细胞在PBS-FBS缓冲液中洗涤,并顺次用HLA特异性抗体(4℃,10分钟)接着针对CD19 PE-Cy5、CD20 FITC、CD3 APC-Cy7、CD14 BUV395、CD33 BUV395(均购自BD Biosciences)、CD45 BV510(BeckMan Coulter)、CD56 PE-TX Red(BeckMan Coulter)和CD16 BV650(Biolegend)的抗体的混合物染色。将细

胞在2%多聚甲醛中固定并在X20 Fortessa分析仪上分析。

[0391] 供体特异性抗体(DSA)测量

[0392] 在CAR-NK输注之前和在CAR-NK输注后的多个时间点,针对供体特异性抗HLA抗体的存在,对11名患者中的10名进行筛选。如果筛选是阳性的,则在Luminex®平台上使用半定量固相抗体检测来测定抗体的特异性。

[0393] 实施例4-在患有复发的/难治性B淋巴细胞恶性病的患者中与淋巴细胞清除性化学疗法联合的源自脐带血的CAR改造的NK细胞的剂量递增研究I/II期的实施例

[0394] 本实施例涉及CAR.CD19-CD28-zeta-2A-iCasp9-IL15转导的CB-NK细胞在患有复发的/难治性CD19+B淋巴细胞恶性病的患者中的安全性和功效的测定。此实施例允许评估总反应率(完全和部分反应率)、经输注的同种异体供体CAR转导的源自CB的NK细胞在接受者中的持久性的定量和综合免疫重建研究的性能。

[0395] 背景

[0396] 本实施例描述用于研究新型免疫治疗策略的临床试验,其使用改造的自然杀伤(NK)细胞改善患有复发的或难治性CD19+B细胞恶性病的患者的无肿瘤生存期。美国每年平均有69,740例非霍奇金淋巴瘤(NHL)新病例、15,680例慢性淋巴细胞白血病(CLL)新病例和6070例急性淋巴母细胞白血病(ALL)新病例,估计年死亡率分别为19,020、4580和1,430(http:/www.cancer.org)。总生存率(OS)主要通过症状的病期(disease stage at presentation)和对化学疗法的反应确定。针对在前线疗法后复发的患者的标准疗法为同种异体造血干细胞移植(HSCT)。基于HSCT时的化疗敏感性,第二次完全缓解的患者的期望OS为25%。因此,存在对开发针对患有晚期B谱系恶性病的患者的新型疗法的急迫且未满足的需求,尤其是因为在同种异体HSCT后的复发通常是致命的。

[0397] 慢性淋巴细胞白血病(CLL)为美国成人白血病的最常见形式,占所有白血病的25%。美国每年有超过15,000例CLL新病例和4,500例因CLL的死亡。该疾病的自然史多样。仅具有淋巴细胞增多的患者具有大于10年的中值生存期,然而具有由贫血或血小板减少症表现的骨髓衰竭迹象的那些患者具有仅2至3年的中值生存期。因为尚没有治疗被显示是治愈性的,也不存在特定治疗延长生存期的客观证据,所以治疗被延误(Cheson和Cassileth,1990)。NCI资助的CLL工作组提议下列适应证用于开始治疗:1)在前6个月内体重减轻大于10%;2)可归因于进展性疾病的极端疲劳;3)发烧或盗汗而无感染的迹象;4)恶化的贫血(Rai III期)或血小板减少症(Rai IV期);5)大量淋巴结病(>10cm)或快速进展性淋巴细胞增多(淋巴细胞倍增时间<6个月);或6)前淋巴细胞或Richter转化。新近诊断的CLL的目前治疗包括单独或组合的化学疗法和抗体疗法。正在开发多种新型方法,诸如使用依鲁替尼治疗CLL的靶向疗法(Burger等人,2015;Byrd等人,2015),但是该疾病尚不可治愈。此外,甚至于完全反应后,大多数患者仍保持免疫异常和最小残留疾病。最终,在80%的CLL患者中发生导致感染性并发症的慢性免疫抑制,且其成为死亡的主要原因。同种异体干细胞移植在一些CLL患者中可能是治愈性的,但是成功有限,主要由于与手术相关的死亡率和发病率的高发生率。非清髓性同种异体移植方案有前景,但是患者资格受匹配的同胞供体的可得性的限制。

[0398] 历史上需要治疗的患有CLL的患者的初始治疗使用烷基化剂,特别是苯丁酸氮芥(chlorambucil),单独或与皮质类固醇组合使用。总反应率为50至70%;然而,完全缓解率

低(5至20％)。较新的药剂如嘌呤类似物,特别是氟达拉滨,作为初始治疗具有较高反应率(Rai等人,2000)。比较基于烷基化剂的疗法与单药剂氟达拉滨的随机化试验已显示:使用核苷类似物具有更高的完全反应率和更长的无疾病生存期(Rai等人,2000;Johnson等人,1996),但是没有显示生存优点。美国食品和药物管理局(FDA)批准氟达拉滨用于治疗患有B细胞CLL的患者,所述患者在用至少一种基于烷基化剂的方案治疗期间无反应或有疾病进展。

[0399] 已显示组合方案(诸如环磷酰胺、氟达拉滨和利妥昔单抗)提高反应率(Keating等人,2005),但是这些方案是高度免疫抑制性的,尚未证实有长期益处。依鲁替尼是Bruton's酪氨酸激酶(BTK)(其为TEC酪氨酸激酶家族的成员和B细胞受体信号传导路径中的关键酶)的共价抑制剂(Honigberg等人,2010)。依鲁替尼作为单药疗法,以及与免疫疗法或化学疗法组合,是用于包括CLL的淋巴细胞恶性病的非常有效的疗法(Burger等人,2015;Byrd等人,2013)。然而,在依鲁替尼失效后的结果令人沮丧的,停药后的生存期仅为3.1个月(Jain等人,2015)。

[0400] 急性淋巴母细胞白血病。同种异体HCT是用于选定组ALL患者的治愈性方法。总生存率(OS)范围在30％至60％,取决于移植时患者病期和风险特性(Fielding等人,2009;Golstone等人,2008)。越来越多地,最小残留疾病(MRD)在HCT之前和之后均变成复发的重要预测因子(Gokbuget等人,2012)。在MD安德森癌症中心(MD Anderson Cancer Center)处于缓解的一系列149名移植的ALL患者中,通过多参数流式细胞术免疫表型分型(FCI)(灵敏度为0.01％)测量的在HCT时出现症状的MRD患者与MRD阴性的患者相比具有更短的PFS,28％相对47％,p＝.08(4)。此外,在HCT后测量的具有MRD的135名患者中,20名变成MRD阳性,并且这些患者中的18名于3.8个月的中值内发展明显的血液复发(Zhou等人,2014)。应注意,在HCT后具有明显复发的32名患者中,41％不具有之前的MRD,表明HCT后的阳性MRD基本上证实了最终复发,但是高风险患者在HCT后的阴性MRD也不排除复发(Leung等人,2012;Bar等人,2014)。所述发现印证了相似的公开研究。超出第二次缓解移植的患者常规具有显著更低的PFS和OS率。在经白消安和氯法拉滨(clofarabine)化疗调理接着匹配的同胞(MSD)或匹配的无血缘关系供体(MUD)移植治疗的97名患者(CR1:51名,CR2:29名,其他:17名)的研究中,CR1的患者与其他相比具有显著更好的无疾病生存率(DFS)。针对CR1的患者,2年DFS率为61％,其中9/51患者在中值9个月复发,针对CR2,2年DFS率为40％,其中10/29在中值3个月复发,针对具有更晚期疾病的患者,2年DFS率为33％,其中3/17在中值3个月进展。来自国际血液和骨髓移植研究中心(the Center for International Blood and Marrow Transplant Research,CIBMTR)的数据证实所述发现。在1996年与2001年之间,在小于20岁的患者中,OS范围为:从针对超过第一次缓解移植的患者的25％至针对第一次缓解中同胞移植的50％。类似地,在大于20岁的成年患者中,在第一次缓解中进行同胞移植中注意到最佳结果,OS为60％,相比较而言,如果超出CR1进行移植(CIBMTR登记),则OS为35％。针对在HCT后复发的患者不存在有效治疗选项。多个公开的系列研究报告这些患者小于10％的存活率,与所用的治疗模式无关,中值生存期为2至3个月(Fielding等人,2009;Poon等人,2013)。迄今为止,为降低HCT后的复发率采用的最常见策略通常涉及一些形式的免疫操作,范围从供体淋巴细胞输注(DLI)至第二次移植(Sullivan等人,1989;Poon等人,2013;Bader等人,2004)。然而,虽然已经一致地显示发展移植物抗宿主疾病(GVHD)的B-ALL

患者具有较少的复发风险(Appelbaum,1997),但在这些患者群体中,DLI没有显示可预见的功效;缓解率小于10%,且与GVHD的高发生率相关联(Passweg等人,1998)。应注意,当预防施用DLI以防止复发时,ALL中发生对DLI的最佳反应(Bader等人,2004);此方法已在儿科患者中得到证实,但是在成年人中尚未报告关于预防性DLI的数据。因此,对于用于同种异体HCT后有高复发风险的患者的有效疗法,存在未满足的需求,其中将高风险定义为阳性MRD和/或超出第一次完全缓解的疾病。

[0401] 非霍奇金淋巴瘤(NHL)。在美国,B细胞淋巴瘤占所报告的病例的80至85%。在2013年,估计约69,740例NHL新病例和超过19,000例与该疾病相关的死亡发生。非霍奇金淋巴瘤为最流行的血液恶性病,是男性和女性中新发癌症的第七名,占所有新发癌症病例的4%和与癌症相关的死亡的3%(SEER 2014)。弥漫性大B细胞淋巴瘤:弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)为NHL的最常见亚型,占NHL病例的约30%。美国每年有大约22,000例新诊断的DLBCL。DLBCL的第一线疗法通常包括含蒽环类(anthracycline)的方案与利妥昔单抗(Coiffier等人,2002)。对R-CHOP(利妥昔单抗、环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼龙)的第一线客观反应率和完全反应(CR)率分别为约80%和50%。然而,约三分之一的患者患有初始疗法难治的疾病或在R-CHOP后复发(Sehn等人,2005)。针对在对第一线疗法反应后复发的那些患者,约40至60%的患者可利用另外的化学疗法实现第二反应。针对年轻和健康患者,第二线疗法的目标为实现使患者有资格进行自体干细胞移植(ASCT)的反应。针对有资格移植的患者的第二线疗法的护理标准包括利妥昔单抗和组合化学疗法,诸如RICE(利妥昔单抗、异环磷酰胺、卡铂、和依托泊苷)或RDHAP(利妥昔单抗、地塞米松、阿糖胞苷和顺铂)。在患有DLBCL的有资格移植的患者中进行的RICE相对RDHAP的大型随机试验(CORAL研究)中,63%的患者实现对任一方案的客观反应,具有26%CR率。对第二线疗法反应且认为足够健康以能够移植的患者接受高剂量化疗和ASCT的巩固。此组合可治愈约50%的移植患者(Gisselbrecht等人,2010)。ASCT失败的患者具有极差预后且无治愈选项。大多数第二线患者由于化疗难治性疾病、年龄或共存病(诸如心脏病、肺病、肝病或肾病)而无资格进行ASCT。无移植资格的抢救患者不具有对其可用的治愈选项。不存在复发/难治性DLBCL的标准定义。此试验将募集患有化疗难治性淋巴瘤的患者,如通过对之前的生物或组合化学疗法没能实现甚至短暂或部分反应或通过在ASCT后早期复发所证实的。

[0402] 转化型滤泡性淋巴瘤(TFL)。滤泡性淋巴瘤(FL)是一种B细胞淋巴瘤,为最常见的不活跃(生长缓慢)形式的NHL,占所有NHL的约20%至30%。一些患有FL的患者将在组织学上转化(TFL)为DLBCL,其更有侵袭性且与差的结果相关。向DLBCL的组织转化以大约3%的年速率下发生持续15年,其中转化的风险在随后几年继续下降。组织转化的生物学机制未知。TFL的初始治疗受针对滤泡性淋巴瘤的先前疗法影响,但是一般包括含蒽环类的方案与利妥昔单抗以消除疾病的侵袭性组分(NCCN实践指南2014)。复发/难治性TFL的治疗选项与DLBCL中的那些类似。鉴于这些疾病的低流行性,尚未进行在这些患者群组中的大规模前瞻性随机研究。患有化疗难治性疾病的患者具有与患有难治性DLBCL的那些患者相似或更差的预后。

[0403] 套细胞淋巴瘤(MCL),是B-细胞淋巴瘤的不可治愈亚型,占美国所有非霍奇金淋巴瘤病例的7%(Connors,2013)。大多数MCL患者在前线疗法后经历疾病进展,在复发后具有约1至2年的中值总生存期;因此,迫切需要MCL的新型疗法。依鲁替尼是Bruton's酪氨酸激

酶(BTK)的第一类每日一次的口服共价抑制剂,最近由FDA批准用于治疗该疾病。虽然在复发/难治性MCL中的结果与其他标准疗法相比是优越的和前所未有的(Wang等人,2013),但是大多数患者于单药剂依鲁替尼后经历疾病进展并在12个月内死亡(Wang等人,2015;Cheah等人,2015)。使用基于免疫细胞的疗法,包括同种异体干细胞移植(allo-SCT),患有复发/难治性MCL的患者可实现长期缓解和治愈(Hamadani等人,2013)。此外,我们已报道在接受自体SCT接着利妥昔单抗、BCNU、依托泊苷ara-C、美法仑(R-BEAM)疗法的选定MCL患者中有前景的结果(Tam等人,2009)。然而,在患有依鲁替尼耐药性疾病的MCL患者中,标准同种异体和自体移植的结果不是最理想的,明确需要更有效的疗法。总之,患有难治性、侵袭性B淋巴细胞恶性病的受试者具有巨大未满足的医疗需求,在这些群体中要保证新型治疗。

[0404] NK细胞:

[0405] 自然杀伤(NK)细胞是移植物抗白血病(GVL)反应的重要组分(Rugged等人,2002;Savani等人,2006),其对于预防HSCT后的复发是关键的。各成熟NK细胞表达宽范围的活化和抑制杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR),其特异性针对不同的HLA I类分子(Lanier,2008;Yawata等人,2008;Caligiuri,2008)。NK细胞识别和杀死恶性细胞的能力通过在由抑制性KIR与其同源HLA I类配体的结合产生的抑制性信号与来自活化受体的活化信号之间复杂且了解甚少的相互作用控制(Rugged等人,2002;Caligiuri,2008;Ljunggren等人,1990)。NK细胞反应通过两种主要效应子功能介导:靶细胞的直接细胞溶解以及趋化因子和细胞因子的产生。通过后一种机制(例如,干扰素-γ),NK细胞参与过继T细胞反应的成型,可能通过幼稚T细胞与从发炎的外周组织迁移至次级淋巴室的NK细胞之间的直接相互作用和通过对树突状细胞(DC)的间接作用进行(Martin-Fontecha等人,2004;Krebs等人,2009)。

[0406] 从脐带血的GMP级NK细胞扩增。先前研究主要使用新鲜获得的外周血NK细胞。循环外周血NK细胞的低数目严重限制其治疗效用。本发明人已开发离体扩增来自脐带血(CB)的NK细胞的系统,其使用表达膜结合的IL-21、4-1BB配体、CD64(FcγRI)和CD86(克隆9.mbIL21)的GMP级基于K562的人工抗原呈递细胞(aAPC)可靠地产生用于过继免疫疗法的GMP级CB-NK细胞的临床相关剂量(Denman等人,2012)。脐带血是用于细胞免疫疗法的NK细胞的新型吸引人的来源。已收集细胞,储存和立即可用。可针对HLA类型、KIR基因表达和其他因素最佳选择脐带血供体。产生CB NK细胞的方法已由FDA批准。我们目前的方案产生平均3127倍的NK扩增(范围在1640至4931倍)(图26A),具有极少的CD3+细胞(平均值$4.50x10^6$)(图26B)。

[0407] 经离体扩增的CB-NK细胞的功能表型和其针对骨髓性白血病靶标的细胞毒性活性。扩增的CB-NK细胞展示完整阵列的活化和抑制受体,继续强烈表达脱中胚蛋白(eomesodermin,Eomes)和T-bet(FIG.26C-26D)(Gill等人,2012;Intlekofer等人,2005),NK细胞成熟和活化所需的两种因子,以剂量依赖性方式裂解骨髓靶细胞(图26E),并且在过继转移至非肥胖糖尿病重症联合免疫缺陷-γnull(NSG)小鼠后,可归巢到骨髓、肝、脾和多个性淋巴组织(图27)。

[0408] 源自CB的NK细胞的遗传修饰以增强其抗白血病的活性

[0409] 嵌合抗原受体(CAR)已广泛使用于重引导T细胞针对白血病的特异性(Sadelain等人,2003;Rosenberg等人,2008;June等人,2009),在患有急性淋巴母细胞白血病(ALL)的患

者中具有显著的临床反应(Brentjens等人,2013;Kalos等人,2011;Maude等人,2015)。这些输注主要受自体环境的限制,因为来自异种基因来源的活化的T细胞可能增加GVHD的风险。在本实例中,人们可测试改造的源自CB的NK细胞作为T细胞的替代物用于B-淋巴细胞恶性病的免疫疗法的安全性和功效。源自CB的NK细胞具有超过T细胞的多个潜在优点:(i)同种异体NK细胞不应引起GVHD,如由鼠模型以及患有白血病和实体恶性病的经单倍体相合或源自CB的NK细胞治疗的患者中的观察结果所预测(Olson等人,2010;Rubnitz等人,2010;Miller等人,2005);(ii)成熟NK细胞具有几周的有限寿命,允许抗肿瘤活性同时降低长期不良事件(诸如由对正常组织的肿瘤靶向/肿瘤脱靶毒性(on-target/off-tumor toxicity)引起的延长的血细胞减少)的概率,或恶性病转化的风险;(iii)不像T-细胞,NK细胞亦具有通过其天然受体杀死抗原阴性靶细胞的活性,潜在防止免疫逃脱机制;(iv)针对各患者的自体同源T细胞产品的产生物流繁琐且受限制(Ruggeri等人,2002;Rubnitz等人,2010)。使用储存在大型全球脐带血库库存中的冷冻现成CB单位来产生NK细胞具有广泛可扩缩性的潜力,而利用源自自体同源外周血的T细胞或NK细胞产品,这是不可能的。

[0410] 因此,为改善冷冻和离体扩增的CB NK细胞的持久性和抗白血病效力,本发明人将其用逆转录病毒载体iC9.CAR19-CD28-zeta-2A-IL15(iC9/CAR.19/IL15)遗传修饰,该载体(i)掺入CAR-CD19的基因以重引导其对CD19的特异性;(ii)异位产生IL-15,其为一种对NK细胞生存和增殖关键的细胞因子(Hoyos等人,2010;Tagaya等人,1996),和(iii)表达自杀基因,基于诱导型胱天蛋白酶-9(iC9)(Di等人,2011),其可经药理学活化以视需要消除转基因细胞。初始数据显示,CB-NK细胞可经稳定转导以表达CAR分子(图29A)。使用标准^{51}Cr-释放测定,我们发现经iC9/CAR.19/IL15转导的CB-NK细胞具有针对CD19+Raji细胞和原发性CLL细胞的特异性细胞毒性活性(n=18;图29B)。NK-CAR和未经转导的NK细胞显示针对K562细胞的同等效应功能,指示CB-NK细胞的遗传修饰不改变其针对NK敏感性靶标的固有细胞毒性(图29B)。

[0411] 接下来使用NSG小鼠Raji异种移植物模型评价经iC9/CAR.19/IL15修饰的CB-NK细胞在体内的输送和持久性。将NT和经iC9/CAR.19/IL15转导的CB-NK细胞输注于植入Raji细胞的小鼠中。如图30A中所示,iC9/CAR.19/IL15+CBNK细胞归巢到脾、肝脏和骨髓(肿瘤浸润的部位),而在构建体中没有IL-15基因的CAR.CD19+CB-NK细胞以及NT CB-NK细胞在肿瘤部位中几乎不可检测到。

[0412] 经iC9/CAR.19/IL15转导的CB-NK细胞发挥增强的体内抗肿瘤活性。为研究经iC9/CAR.19/IL15转导的CB-NK细胞的体内抗肿瘤活性,我们以2x10^{5}个/小鼠对NSG小鼠注射FFLuc标记的Raji细胞。在同一天,小鼠接受对照NT、CAR.19或经iC9/CAR.19/IL15转导的CB-NK细胞的一次静脉内输注(10x10^{6}个/小鼠)。通过测量肿瘤生物发光随时间的变化来监测肿瘤生长。如图30B中所示,肿瘤生物发光在经Raji细胞植入并用对照NT CB-NK细胞处理的小鼠中快速增加。相比而言,CAR.19+或iC9/CAR.19/IL15+CB-NK细胞的输注导致生存期相较于NT CB-NK细胞的效应显著延长(分别P=0.006和P=0.001)。应注意,iC9/CAR.19/IL15+CB-NK细胞控制肿瘤扩增并延长生存(图30C),较缺少IL-15基因的CAR.CD19构建体显著更好,强调IL-15对增强的抗肿瘤活性的重要贡献。

[0413] 经iC9/CAR.19/IL15转导的CB-NK细胞不显示自发或失调生长的体外或体内征兆。为研究载体中的IL-15基因可导致经转导的CB-NK细胞的自发或失调生长的可能性,我们将

经iC9/CAR.19/IL15转导的CB-NK细胞在不添加外源IL-2或克隆9.mbIL21刺激下在完全无血清干细胞生长培养基(SCGM)中培养42天(n＝5)。对活细胞计数,每三天通过用新鲜完全SCGM更换培养基来传代。如图28A中所示,经iC9/CAR.19/IL15转导的CB-NK细胞培养物历时6周不显示异常生长的任何征兆,之后细胞停止扩增。在培养至多17周(n＝7)的经iC9/CAR.19/IL15转导的CB NK细胞上进行的核型分型无法检测到任何染色体变化(数据未显示)。本发明人还在CAR转导和离体扩增之前(在基线)和在CAR转导和离体扩增后至多22周对成对CB-NK细胞(n＝6)进行染色体和SNP微阵列分析,未观察到遗传不稳定的任何证据。利用超过10个月的追踪,我们未观察到用iC9/CAR.19/IL15或CAR.19转导的CB-NK细胞处理的小鼠中的自发生长或白血病转化的任何证据。组织病理学检查没有揭示这些小鼠的任何组织中的任何淋巴细胞浸润、增殖或淋巴瘤。在来自两组动物的所有NSG小鼠中,脾和淋巴结的初级淋巴组织无淋巴细胞(图28B),这些小鼠的骨髓中也不存在任何淋巴细胞浸润或增殖。血液测试指示白细胞和淋巴细胞的正常数目,且在两组小鼠中无淋巴细胞白血病的证据。

[0414] 由经CAR转导的NK细胞产生IL-15

[0415] 为验证iC9/CAR.19/IL15+CB-NK细胞可以产生IL-15,在CD19+CLL B细胞的存在或不存在下,将对照NTCB-NK和iC9/CAR.19/IL15+CB-NK淋巴细胞一式三份培养,在培养24、48和72小时后收集培养物上清液以测量IL15释放。如图29中所示,IL15在从单独或与CLL靶标培养的未经转导的CB-NK细胞收集的上清液中不可检测到。相比而言,iC9/CAR.19/IL15+CB-NK细胞在抗原刺激的不存在下产生少量IL15[平均15.05pg/ML/10^6个细胞(范围6.2至23.47pg/ML)],其随着抗原刺激显著增加[平均27.61pg/mL/10^6个细胞(范围15.82至38.18pg/mL)](P＝0.02)。检查经iC9/CAR.19/IL15转导的NK细胞在经Raji细胞植入的NSG小鼠中体内产生IL-15的能力。NK细胞扩增高度(在扩增后2周)的IL-15水平的血清水平为40至50pg/mL,与培养细胞的上清液中检测到的水平相当。

[0416] 已在临床环境中使用外源重组人类IL-15(RhIL-15)。在患有转移性黑色素瘤或肾细胞癌的患者中最近的1期研究中,向患有转移性恶性黑色素瘤或转移性肾细胞癌的患者施用3.0、1.0和0.3μg/kg/天的IL-15的团式输注持续12个连续日(Conlon等人,2015)。显示RhIL-15活化NK细胞、单核细胞、γδ和CD8 T细胞。3.0-、1.0-和0.3-μg/kg/天的剂量分别导致43,800±18,300、15,900±1,900和1,260±350pg/mL的最大血清浓度(Cmax)。在接受3.0和1.0μg/kg/天的患者中观察到的剂量限制性毒性为3级低血压、血小板减少症、以及ALT和AST的升高,导致测定的最大耐受剂量为0.3μg/kg/天。在我们的临床研究中未观察到与通过经iC9/CAR.19/IL15转导的CB-NK细胞的IL-15释放相关的毒性。这可能因为通过经转导的NK细胞产生的IL-15的水平比外源IL-15处理的临床试验中达成的水平低平均2至3个对数。

[0417] 在通过暴露于小分子二聚化因子(dimerizer)活化自杀基因后消除iC9/CAR.19/IL15+CB-NK细胞。为抵消通过转导的CB-NK细胞的炎性细胞因子释放或不受控制的NK细胞生长介导的过量毒性的可能性,我们将基于诱导型胱天蛋白酶-9基因的自杀基因并入构建体中(Di等人,2011)。如图30A中所示,向iC9/CAR.19/IL15转导的CB-NK细胞的培养物中添加少至10nM的小分子二聚化因子在4小时内诱导60％的转基因细胞的细胞凋亡/坏死,如由膜联蛋白-V和7AAD染色所评估的,但是对NT CB-NK细胞的活力无影响。自杀基因在体内也

是有效的。将小鼠静脉内植入Raji肿瘤细胞并用经iC9/CAR.19/IL15转导的CB-NK细胞处理。在NK细胞局部化和稍后在不同肿瘤部位处扩增10至14天后，施用小分子二聚化因子AP1903(50μg，腹膜内，间隔2天)(图30B，左图)，导致经处理小鼠的血液和组织中的iC9/CAR.19/IL15转导的CB-NK细胞的显著减少(图30B，右图)，指示转基因细胞的体内消除。

[0418] 评价经iC9/CAR.19/IL15转导的CB-NK细胞在患有复发/难治性B-淋巴细胞恶性病中的患者中的安全性和功效的临床试验。

[0419] 此为评价经iC9/CAR.19/IL15转导的CB-NK细胞在患有复发/难治性B-淋巴细胞恶性病(ALL、CLL、NHL)的患者中的安全性和相对功效的I/II期剂量递增试验。此临床研究将利用通过CAR CB-NK细胞产生的协同抗肿瘤活性和通过淋巴细胞清除性方案诱导的有利的淋巴细胞减少的环境(Dudley等人，2002；Dudley等人，2005)。因此，将患者用环磷酰胺以300mg/m/天的剂量5处理3天。在第0天，输注一次经iC9/CAR.19/IL15转导的CB-NK细胞的递增剂量(107/kg至10/kg)以确定经iC9/CAR.19/IL15转导的CB-NK细胞可安全输注至患有复发/难治性B-淋巴细胞恶性病的患者中的最高剂量，如由标准NCI毒性标准所定义。4/6、5/6或6/6HLAI类(血清学)和II类(分子)抗原与患者匹配的CB单位用于CB-NK扩增和CAR转导。所述CB单位可获自MD安德森脐带血库。

[0420] 为深入了解经过继转移的iC9/CAR.19/IL15转导的CB-NK细胞的持久性、功能和抗白血病潜力，人们可进行一系列表型和功能测定。人们可通过Q-PCR，使用特异性扩增独特CAR转基因的引物对评价连续获得的PB样品中经过继输注的基因修饰的NK细胞的扩增量级和持久性的持续时间，灵敏度为检测1/10,000CAR+NK细胞。如果存在足够数目的循环NK细胞，则我们将通过流式细胞术使用特异性针对iC9/CAR.19/IL15的CH2-CH3区的mAb定量，灵敏度为检测1/1,000CAR+NK细胞。将流式细胞术测量与细胞表面NK活化和抑制性受体表达的分析结合。人们可使用^{51}Cr释放测定、CD107a脱粒化(Rubio等人，2003；Rezvani等人，2009)、细胞因子释放(通过针对IFNγ和IL-2的细胞内细胞因子分析测定)和趋化因子释放(MIP1-α和MIP-1β)，针对表达CD19的细胞系和在治疗之前自接受者收集和储存的原发性CD19+肿瘤细胞(当可获得时)，评价CD19重引导的效应子功能的维持。

[0421] 为抵消任何潜在并发症(Porter等人，2011；Grupp等人，2013)，人们可将基于诱导型胱天蛋白酶-9基因(例如)的自杀基因并入CAR19载体(Hoyos等人，2010)中。如图30中所示，添加小分子二聚化因子AP1903诱导转基因细胞的快速细胞凋亡，使得在延长的B淋巴细胞减少的情况下，可引入二聚化因子以诱导经CAR19转导的CB-NK细胞的细胞凋亡，从而允许B细胞的正常恢复。如果发现经转导的NK细胞诱导GVHD，则该策略也将是有用的。

[0422] 患者资格性的实例

[0423] 纳入标准：

[0424] 1.患有CD19阳性B-淋巴细胞恶性病(ALL、CLL、NHL)病史的患者，其已接受至少2线标准化学免疫疗法或靶向疗法且患有持久性疾病。

[0425] 2.患有ALL、CLL、NHL且在标准疗法或干细胞移植后复发疾病的患者。

[0426] 3.在开始淋巴细胞清除性化疗时距最后一次细胞毒性化疗至少3周的患者。患者可继续酪氨酸激酶抑制剂或其他靶向疗法直至在施用淋巴细胞清除性化疗之前的至少两周。

[0427] 4.Karnofsky/Lansky性能量表>70。

[0428] 5.适当器官功能：

[0429] a.肾：肌氨酸酐清除率(如由Cockcroft Gault所评估)>/＝60cc/min。

[0430] b.肝：ALT/AST</＝2.5 x ULN or</＝5 x ULN(如果存在有记录的肝转移)，总胆红素</＝1.5mg/dL，排除患有吉尔伯特氏(Gilbert's)综合征的受试者，其总胆红素必须</＝3.0mg/dL。

[0431] c.心脏：心脏射血分数>/＝50％，无心包积液的迹象，如由ECHO或MUGA所测定的，且无临床显著ECG发现。

[0432] d.肺：无临床显著胸腔积液，在室内空气中基线氧饱和>92％。

[0433] 6.能提供书面知情同意书。

[0434] 7.年龄在7至80岁。

[0435] 8.能有孩子的所有参与者必须在研究时实行有效节育。对于女性患者，可接受的节育形式包括：激素节育、子宫内装置、具有杀精剂的膈膜、具有杀精剂的避孕套或禁欲，持续研究的时长。如果参与者是女性且怀孕或疑似怀孕，其必须立即通知其医生。如果参与者在此研究期间怀孕，其将离开此研究。能有孩子的男性必须在研究时使用有效节育。如果男性参与者在研究时成为孩子的父亲或疑似其成为孩子的父亲，则其必须立即通知其医生。

[0436] 9.签署长期随访协议PA17-0483的同意书。

[0437] 排除标准：

[0438] 1.定义为非绝经后的育龄女性为βHCG阳性持续24个月或无先前手术绝育或哺乳期女性。

[0439] 2.已知HIV阳性血清学。

[0440] 3.存在来自先前治疗的3级或更高级的毒性。

[0441] 4.存在需要静脉内(IV)抗微生物剂用于管理的真菌、细菌、病毒或其他感染。注释：如果对主动治疗有反应，则允许简单UTI和无并发症的细菌性咽炎。

[0442] 5.存在活跃的神经病症。

[0443] 6.伴有其他研究药剂的使用。

[0444] 治疗计划的实例

[0445] 淋巴细胞清除性化学疗法(住院患者)：

[0446] 在以下时或在以下之前

[0447] D-15开始NK细胞产生

[0448] D-6接纳入院/IV水合

[0449] D-5氟达拉滨30mg/m^2 IV/环磷酰胺300mg/m^2 IV/

[0450] 美司钠(Mesna)300mg/m^2 IV

[0451] D-4氟达拉滨30mg/m^2 IV/环磷酰胺300mg/m^2 IV/

[0452] 美司钠300mg/m^2 IV

[0453] D-3氟达拉滨30mg/m^2 IV/环磷酰胺300mg/m^2 IV/

[0454] 美司钠300mg/m^2 IV

[0455] D-2休息

[0456] D-1休息

[0457] D0输注经iC9/CAR.19/IL15转导的CB-NK细胞(按照剂量水平)

[0458] 在D7与D14之间输注经iC9/CAR.19/IL15转导的CB-NK细胞(按照剂量水平)*

[0459] 淋巴细胞清除性化学疗法(门诊患者):

[0460] 在以下时或在以下之前

[0461] D-15开始NK细胞产生

[0462] D-5氟达拉滨30mg/m^2 IV/环磷酰胺300mg/m^2 IV/美司钠300mg/m^2 IV

[0463] D-4氟达拉滨30mg/m^2 IV/环磷酰胺300mg/m^2 IV/美司钠300mg/m^2 IV

[0464] D-3氟达拉滨30mg/m^2 IV/环磷酰胺300mg/m^2 IV/美司钠300mg/m^2 IV

[0465] D-2休息

[0466] D-1休息

[0467] D0输注经iC9/CAR.19/IL15转导的CB-NK细胞(按照剂量水平)

[0468] 在D7与D14之间输注经iC9/CAR.19/IL15转导的CB-NK细胞(按照剂量水平)*

[0469] *如果在初始NK细胞输注后的前7天期间未观察到DLT,则可在第7天与第14天之间使用与初始提供的相同NK细胞剂量向患者提供第2次NK细胞输注。

[0470] 可测试三个剂量水平:10E5、10E6和10E7/kg体重。针对体重高于其理想体重>20%的患者,按照调整的体重进行CAR NK细胞输注的剂量给药。针对体重高于其理想体重小于或等于20%的患者,使用实际体重。

[0471] 如果患者在方案评估后复发或患有持久疾病,则可提供另外的CAR NK输注。如果第一次细胞生产有剩余的细胞,则可使用这些细胞或可选择新脐带单元用于CAR NK产生。如果在先前测试的45天内或经医师裁量,则不需要重复预筛选测试。

[0472] 针对体重高于其理想体重>20%的患者,按照调整的体重进行环磷酰胺的剂量给药。针对体重高于其理想体重小于或等于20%的患者,使用实际体重。

[0473] 在D0静脉内施用NK细胞输注。苯海拉明(Benadryl)25mg po或IV和泰诺(Tylenol)650mg po。除非需要生理替代物,否则禁忌使用类固醇。

[0474] 受试者可作为住院患者或门诊患者进行CAR NK输注的,这取决于病床的可用性和/或患者的临床状况。按照细胞疗法的BMT护理标准获得所有患者的生命体征(体温、心率、血压和呼吸速率)。

[0475] • 大约每15分钟开始CAR NK输注,进行四次(x4)

[0476] • 然后大约每30分钟(x2)或直至CAR NK输注完成后1小时。

[0477] • 然后大约每小时,如由患者的病状所指示。

[0478] NK细胞可以通过下述方法获得:

[0479] 可将冷冻脐带血单位解冻,可将单核细胞通过Ficoll密度梯度离心分离。NK细胞将经CAR转导并使用APC饲养细胞在液体培养物中产生14至22天,如化学、制造和控制(Chemistry,Manufacturing and Controls(CMC))中详细所述。

[0480] NK产品释放标准

[0481] 针对用于再输注的经扩增NK细胞的释放可能需要下列最低标准:

[0482] StatGram染色:“未观察到生物体”。

[0483] CAR+NK细胞:>15%

[0484] CD3+数目:<2e5个CD3+细胞/kg

[0485] CD32+细胞数目(aAPV):<5%

[0486] NK细胞(CD16+/56+):>80％

[0487] 可视检查:“没有污染的迹象”(浑浊度:培养基颜色的变化)

[0488] 内毒素测定:<5EU/Kg

[0489] 活力:≥70％。

[0490] 可监测的其他参数包括细菌和真菌的无菌培养。如果存在超过$2x10^5$个CD3+细胞/kg,则可进行第二轮CD3耗竭。可降低输注的细胞剂量,使得经输注的CD3+细胞<$2x10^5$个/kg。如果没有产生足够的CAR+NK细胞剂量,则将输注所有可用的细胞。如果此针对本研究的MTD发现阶段中的患者发生,则其不计数在任何群组中。如果产生多于所需NK剂量的细胞,则另外的NK细胞可经冷冻保存用于未来输注或可用于研究。如果由于微生物污染不能释放CAR NK细胞,则将选择另一脐带血单位,重新开始生产。如果患者已完成淋巴细胞清除性化疗,则其可在CAR NK输注之前需要第二剂量的淋巴细胞清除性化疗。

[0491] 冷冻细胞:可将在D-15之前开始生产的CAR NK细胞冷冻保存,在满足释放标准后释放用于输注。可在DO按照GMP标准操作程序,将经冷冻保存的细胞解冻用于输注。因为已在前9名患者中显示新鲜输注的CAR NK细胞的安全性、功效和体内扩增和持久性,人们可使用冷冻的和现成的CAR NK产品,并用经冷冻的CAR NK产品以$1x10^7$个/kg的最高剂量治疗另外3名患者。使用effTox方法评估此方法的安全性和功效。人们可在输注后约第+1、+3和+7天寻找存活NK细胞的存在。如果水平与我们利用新鲜CAR NK细胞所观察到的那些水平相当,则我们将使用经冷冻的CAR NK细胞进行研究的II期部分。

[0492] 针对细胞因子释放综合征(CRS)、神经毒性或GVHD施用二聚化因子AP1903

[0493] 可采取步骤以解决CRS、神经毒性和GVHD。针对对标准支持措施无反应的2级CRS或2级神经毒性,人们可视需要施用托西珠单抗(Tocilizumab)8mg/kg IVq 6小时持续多至3个剂量/24小时。针对3级CRS和3级神经毒性,除了托西珠单抗外,还可施用单次剂量的AP1903(0.4mg/kg,以静脉内输注历时约2小时)。AP1903剂量基于公开的Pk数据,其显示在0.01mg/kg至1.0mg/kg剂量范围下血浆浓度为10至1275ng/mL(65),其中在给药后0.5小时和2小时时血浆含量降至最大值的18％和7％。二聚化因子亦可用于治疗I至IV级GVHD。在接受胱天蛋白蛋白酶9+T细胞和然后AP1903的患有GVHD的患者中的反应,反应在前24至48小时内发生。在12小时内不经历降级或CRS或神经毒性至2级或更低的患者可接受第二剂量的AP1903,但也将接受高剂量的类固醇。

[0494] 评价:在研究之前或过程中的任意时间:HLA分型(高分辨率A、B、DR)。

[0495] 可在研究募集的30天内获得下列评价:历史和身体检查;CBC w/diff和血小板、总胆红素、SGPT、碱性磷酸酶、LDH、白蛋白、总蛋白质、BUN、肌氨酸酐、葡萄糖、电解质、PT/PTT、类型和筛选、免疫球蛋白水平(IGG、IGM、IGA)和细胞因子组3(IL6、IFNγ、TNFα);HIV血清学;ECHO或MUGA;如果临床指示,则进行肺功能测试;胸部x-射线;尿分析;脑CT;按照临床指示进行PET/CT扫描;按照临床指示进行骨髓抽吸;EKG。

[0496] 在开始淋巴细胞清除性化疗的7天内的评价:

[0497] 历史和身体检查,包括体重和生命体征。

[0498] 实验室检查:CBC w/diff和血小板、总胆红素、SGPT、碱性磷酸酶、LDH、白蛋白、总蛋白质、BUN、肌氨酸酐、葡萄糖、电解质和细胞因子分析。若为育龄女性参与者,则进行血清妊娠测试。

[0499] 可以在CAR-NK输注后第0天、第3天(+/-1天)、第7天(+/-2天)、第14天(+/-2天)、和第21天(+/-3天)、第4周(+/-5天)、第8周(+/-5天)、第12周(+/-5天)、第16周(+/-14天)、第6个月(+/-28天)、第9个月(+/-28天)和1年(+/-28天)获得下列评价：

[0500] 仅在第7天(+/-2天)进行身体检查,包括体重和生命体征。

[0501] CBC w/diff和血小板、化学研究组和细胞因子分析。

[0502] 在所有时间点,除仅如临床指示在第6个月(+/-28天)、第9个月(+/-28天)和第12个月(+/-28天)外,细胞因子组3(IL6、IFNγ、TNFα)。

[0503] 仅在第4周(+/-5天)和12周(+/-5天)的HLA抗体。

[0504] 研究实验室:CAR NK检测、表达型和功能。

[0505] 可在CAR-NK输注后第4周(+/-5天)、第8周(+/-5天)、第12周(+/-5天)、第16周(+/-14天)、和6个月(+/-28天)、第9个月(+/-28天)和第12个月(+/-28天)获得下列评价：

[0506] 按照临床指示的PET/CT扫描。

[0507] 可在CAR-NK输注后第7天(+/-2)、第4周(+/-5天)、第8周(+/-5天)、第12周(+/-5天)、第16周(+/-14天)、第6个月(+/-28天)、第9个月(+/-28天)和1年(+/-28天)获得下列评价：

[0508] 按照临床指示的骨髓抽吸和/或活组织检查。

[0509] 研究实验室:5至10mL骨髓抽吸物。

[0510] 淋巴结活组织检查

[0511] 如果患者具有诊断性淋巴结活组织检查,如果可用,则可分析样品的一部分。

[0512] 对NKCAR细胞的RCR测试

[0513] 在第-4天通过GMP实验室进行针对NK培养细胞的RCR测试。如果RCR结果恢复阳性,则不能输注NK CAR细胞。然后患者必须退出研究。如果结果延迟,则NK培养可再继续一周。

[0514] 参见图34中的评价表。在该情况中,时间框窗口:第3天(+/-1天)、第7天(+/-2天)、第14天(+/-2天)、和第21天(+/-3天)、第4周(+/-5天)、第8周(+/-5天)、第12周(+/-14天)、第16周(+/-14天)、和第6个月(+/-28天)、第9个月(+/-28天)、和第12个月(+/-28天)。1历史和身体检查,CBC,化学研究组:在开始淋巴细胞清除性化疗的30天和7天内。妊娠测试:在开始淋巴细胞清除性化疗的7天内。2仅在第7天(+/-2天)进行身体检查。3如临床指示。作为研究实验室z代码的部分绘制。将样品分批和约每3个月运行得出结果。4细胞因子组3:在CAR NK输注之前第0天。5作为协议LAB00-099的部分绘制。6有复制能力的逆转录病毒(RCR):在NK细胞输注后约1、3和6个月,然后每6个月一次持续5年,然后之后一年一次持续10年,按照长期随访研究PA17-0483进行。

[0515] 可根据本发明在无不适当实验下进行和执行本文中所公开和要求的所有方法。虽然已根据优选实施方案描述了本发明的组合物和方法,对本领域技术人员显而易见的是,可在不背离本发明的观念、精神和范围下,在方法和步骤中或本文中所述方法的步骤的顺序中进行变化。更具体而言,显然在化学和生理上均相关的某些药剂可替代本文所述的药剂,同时将达成相同或相似的结果。对本领域技术人员显而易见的所有这些相似替代和修改被视为在如由随附权利要求书所定义的本发明的精神、范围和观念内。

[0516] 参考文献

[0517] 以下参考文献特别地通过引用并入本文中至其对本文所述内容提供示例性程序

或其他细节补充的程度。

[0518] Appelbaum,Leukemia 1997;11Suppl 4:S15-S17.

[0519] Arora等人Blood.2012;119(1):296.

[0520] Austin-Ward and Villaseca,Revista Medica de Chile,126(7):838-845,1998.

[0521] Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology,Greene Publishing Associates and John Wiley&Sons,NY,1994.

[0522] Bader等人J.Clin.Oncol.2004;22:1696-1705.

[0523] Bar等人Leuk.Res.Treatment.2014;2014:421723.

[0524] Bennekov等人,Mt.Sinai J.Med.71(2):86-93,2004.

[0525] Brentjens等人,Sci.Transl.Med.2013;5:177ra38.

[0526] Bukowski等人,Clinical Cancer Res.,4(10):2337-2347,1998.

[0527] Burger等人N.Engl.J.Med.2015;373:2425-2437.

[0528] Byrd等人N.Engl.J.Med.2013;369:32-42.

[0529] Byrd等人Blood 2015;125:2497-2506.

[0530] Caligiuri,Blood 2008;112:461-469.

[0531] Camacho等人J Clin Oncology 22(145):Abstract No.2505(antibody CP-675206),2004.

[0532] Campbell,Curr.Top.Microbiol.Immunol.,298:23-57,2006.

[0533] Cheah等人,Ann.Oncol.2015;26:1175-1179.

[0534] Cheson等人J.Clin.Oncol.1990;8:813-819.

[0535] Cheson等人J Clin Oncol 2014;32:3059-68.

[0536] Chothia等人,EMBO J.7:3745,1988.

[0537] Christodoulides等人,Microbiology,144(Pt 11):3027-3037,1998.

[0538] Cohen等人J Immunol.175:5799-5808,2005.

[0539] Coiffier.N.Engl.J.Med.2002;346:235-242.

[0540] Conlon等人J.Clin.Oncol.2015;33:74-82.

[0541] Connors,Mod.Pathol.2013;26Suppl 1:S111-S118.

[0542] Davidson等人,J.Immunother.,21(5):389-398,1998.

[0543] Davila等人PLoS ONE 8(4):e61338,2013.

[0544] Denman等人,PLoS.One.2012;7:e30264.

[0545] Di等人,N.Engl.J.Med.2011;365:1673-1683.

[0546] Doulatov等人,Cell Stem Cell.10:120-36,2012.

[0547] Dudley等人Science 2002;298:850-854.

[0548] Dudley等人J.Clin.Oncol.2005;23:2346-2357.

[0549] European patent application number EP2537416

[0550] Fedorov等人,Sci.Transl.Medicine,5(215),2013.

[0551] Fielding等人Blood 2016-0641pg.68 2009;113:4489-4496.

[0552] Frolet等人,BMC Microbiol.10:190(2010).

[0553] Gaj等人,Trends in Biotechnology 31(7),397-405,2013.
[0554] Gill等人,Blood.2012Jun 14;119(24):5758-68.
[0555] Gisselbrecht等人J.Clin.Oncol.2010;28:4184-4190.
[0556] Gokbuget等人Blood 2012;120:1868-1876.
[0557] Goldstone等人Blood 2008;111:1827-1833.
[0558] Gribben,Best.Pract.Res.Clin.Haematol.2007;20:513-527.
[0559] Grupp等人N.Engl.J.Med.2013;368:1509-1518.
[0560] Hallek等人Blood 2008;111(12):5446-5456.
[0561] Hallek等人Blood 2018;131:2745-60.
[0562] Hamadani等人,Biol.Blood Marrow Transplant.2013;19:625-631.
[0563] Hanibuchi等人,Int.J.Cancer,78(4):480-485,1998.
[0564] Heemskerk等人Hum Gene Ther.19:496-510,2008.
[0565] Hellstrand等人,Acta Oncologica,37(4):347-353,1998.
[0566] Hollander,Front.Immun.,3:3,2012.
[0567] Honigberg等人Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 2010;107:13075-13080.
[0568] Hoyos等人Leukemia 2010;24:1160-70.
[0569] Hubert等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 96 14523-28,1999.
[0570] Hui and Hashimoto,Infection Immun.,66(11):5329-5336,1998.
[0571] Hurwitz等人Proc Natl Acad Sci USA 95(17):10067-10071,1998.
[0572] Ibrahim等人,Bayesian Survival Analysis.Springer,NY,2001.2015.
[0573] 国际专利公开号WO 00/37504
[0574] 国际专利公开号WO 01/14424
[0575] 国际专利公开号WO 2007/069666
[0576] 国际专利公开号WO 2007/069666
[0577] 国际专利公开号WO 98/42752
[0578] 国际专利公开号WO/2014055668
[0579] 国际专利公开号WO1995001994
[0580] 国际专利公开号WO1998042752
[0581] 国际专利公开号WO2000037504
[0582] 国际专利公开号WO200014257
[0583] 国际专利公开号WO2001014424
[0584] 国际专利公开号WO2006/121168
[0585] 国际专利公开号WO2007/103009
[0586] 国际专利公开号WO2009/101611
[0587] 国际专利公开号WO2009/114335
[0588] 国际专利公开号WO2010/027827
[0589] 国际专利公开号WO2011/066342
[0590] 国际专利公开号WO2012/129514
[0591] 国际专利公开号WO2013/071154

[0592] 国际专利公开号WO2013/123061
[0593] 国际专利公开号WO2013/166321
[0594] 国际专利公开号WO2013126726
[0595] 国际专利公开号WO2014/055668
[0596] 国际专利公开号WO2014031687
[0597] 国际专利公开号WO2015016718
[0598] 国际专利公开号WO99/40188
[0599] Intlekofer等人,Nat.Immunol.2005;6:1236-1244.
[0600] Iuliucci,等人Journal of Clinical Pharmacology 41,870-879(2001).
[0601] Jain等人Blood 2015;125:2062-2067.
[0602] Janeway et al,Immunobiology:The Immune System in Health and Disease, 3rd Ed.,Current Biology Publications,p.433,1997.
[0603] Johnson等人Lancet 1996;347:1432-1438.
[0604] Johnson等人Blood 114:535-46,2009.
[0605] Jores等人,PNAS U.S.A.87:9138,1990.
[0606] June等人,Nat.Rev.Immunol.2009;9:704-716.
[0607] Kalos等人,Sci.Transl.Med.2011;3:95ra73.
[0608] Kaplan,EL and Meier,P,J.American Statistical Association 53:457-481, 1958.2015.
[0609] Kataoka等人J Immunol 1996;156(10):3678.
[0610] Keating等人J.Clin.Oncol.2005;23:4079-4088.
[0611] Kim等人,Nature Biotechnology 31,251-258,2013.
[0612] Kirchmaier and Sugden,J.Virol.,72(6):4657-4666,1998.
[0613] Krebs.Blood 2009;113:6593-6602.
[0614] Kuruvilla等人Leuk.Lymphoma 2008;49:1329-1336.
[0615] Lanier LL.Nat.Immunol.2016-0641pg.70,2008;9:495-502.
[0616] Leal,M.,Ann N Y Acad Sci 1321,41-54,2014.
[0617] Lefranc等人,Dev.Comp.Immunol.27:55,2003.
[0618] Leung等人Blood 2012;120:468-472.
[0619] Li等人Nat Biotechnol.23:349-354,2005.
[0620] Li等人Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:4275-4279,1992.
[0621] Linnemann,C.等人Nat Med 21,81-85,2015.
[0622] Liu等人Leukemia 2018;32(2):520-531.
[0623] Ljunggren等人,Immunol.Today 1990;11:237-244.
[0624] Lockey等人,Front.Biosci.13:5916-27,2008.
[0625] Loewendorf等人,J.Intern.Med.267(5):483-501,2010.
[0626] Ludwig等人Nature Biotech.,(2):185-187,2006a.
[0627] Ludwig等人Nature Methods,3(8):637-646,2006b.
[0628] Marschall等人,Future Microbiol.4:731-42,2009.

[0629] Martin-Fontecha等人Nat.Immunol.2004;5:1260-1265.

[0630] Maude等人N Engl J Med;371:1507-17,2014.

[0631] Maude等人,Blood 2015;125:4017-4023.

[0632] Mehta RS,Rezvani K.Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2016;2016:106-18.

[0633] Miller等人Blood 2005;105:3051-3057.

[0634] Mokyr等人Cancer Res 58:5301-5304,1998.

[0635] Muftuoglu等人N Engl J Med 2018;379:1443-51.

[0636] Neelapu等人N Engl J Med 2017;377:2531-44.

[0637] Notta等人,Science,218-221,2011.

[0638] Olson等人,Blood 2010;115:4293-4301.

[0639] Pardoll,Nat Rev Cancer,12(4):252-64,2012

[0640] Parkhurst等人Clin Cancer Res.15:169-180,2009.

[0641] Passweg等人Bone Marrow Transplant.2016-0641,pg.69 1998;21:153-158.

[0642] Poon等人Bone Marrow Transplant.2013;48:666-670.

[0643] Poon等人Biol.Blood Marrow Transplant.2013;19:1059-1064.

[0644] Porter等人,N.Engl.J.Med.2011;365:725-733.

[0645] Qin等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,95(24):14411-14416,1998.

[0646] Rai等人N.Engl.J.Med.2000;343:1750-1757.

[0647] Rezvani等人Blood 2009;113:2245-2255.

[0648] Rieder等人,J.Interferon Cytokine Res.(9):499-509,2009.

[0649] Rosenberg等人,Nat.Rev.Cancer 2008;8:299-308.

[0650] Rubio等人Nat.Med.2003;9:1377-1382.

[0651] Rubnitz等人,J.Clin.Oncol.2010;28:955-959.

[0652] Ruggeri等人Science 2002;295:2097-2100.

[0653] Rykman,等人,J.Virol.80(2):710-22,2006.

[0654] Sadelain等人,Nat.Rev.Cancer 2003;3:35-45.

[0655] Sadelain等人,Cancer Discov.3(4):388-398,2013.

[0656] Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,3rd ed.,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,N.Y.2001.

[0657] Savani等人,Blood 2006;107:1688-1695.

[0658] Sehn等人,J Clin Oncol.2005Aug 1;23(22):5027-33.

[0659] Shah等人,PLoS One.2013Oct 18;8(10):e76781.

[0660] Singh等人,Cancer Research,68:2961-2971,2008.

[0661] Singh等人,Cancer Research,71:3516-3527,2011.

[0662] Sullivan等人N.Engl.J.Med.1989;320:828-834.

[0663] Tagaya等人Immunity.1996;4:329-336.

[0664] Takahashi等人,Cell,126(4):663-76,2007.

[0665] Tam等人,Blood 2009;113:4144-4152.

[0666] Terakura等人Blood.1:72-82,2012.
[0667] Thall and Cook JD.Biometrics 2004;60(3):684-693.
[0668] Thall等人J Biopharm Stat 2006;16(5):623-638.
[0669] Thall等人Clin Trials 2014;11(6):657-666.
[0670] Turtle等人,Curr.Opin.Immunol.,24(5):633-39,2012.
[0671] Turtle等人J Clin Oncol 2017;35:3010-20.
[0672] 美国专利号4,870,287
[0673] 美国专利号5,739,169
[0674] 美国专利号5,760,395
[0675] 美国专利号5,801,005
[0676] 美国专利号5,824,311
[0677] 美国专利号5,830,880
[0678] 美国专利号5,844,905
[0679] 美国专利号5,846,945
[0680] 美国专利号5,885,796
[0681] 美国专利号5,994,136
[0682] 美国专利号6,013,516
[0683] 美国专利号6,103,470
[0684] 美国专利号6,207,156
[0685] 美国专利号6,225,042
[0686] 美国专利号6,355,479
[0687] 美国专利号6,362,001
[0688] 美国专利号6,410,319
[0689] 美国专利号6,416,998
[0690] 美国专利号6,544,518
[0691] 美国专利号6,790,662
[0692] 美国专利号7,109,304
[0693] 美国专利号7,442,548
[0694] 美国专利号7,446,190
[0695] 美国专利号7,598,364
[0696] 美国专利号7,989,425
[0697] 美国专利号8,008,449
[0698] 美国专利号8,017,114
[0699] 美国专利号8,058,065
[0700] 美国专利号8,071,369
[0701] 美国专利号8,119,129
[0702] 美国专利号8,129,187
[0703] 美国专利号8,183,038
[0704] 美国专利号8,268,620

[0705] 美国专利号8,329,867
[0706] 美国专利号8,354,509
[0707] 美国专利号8,546,140
[0708] 美国专利号8,691,574
[0709] 美国专利号8,735,553
[0710] 美国专利号8,741,648
[0711] 美国专利号8,900,871
[0712] 美国专利号9,175,268
[0713] 美国专利公开号2010/0210014
[0714] 美国专利公开号12/478,154
[0715] 美国专利公开号2002131960
[0716] 美国专利公开号2003/0211603
[0717] 美国专利公开号2005/0260186
[0718] 美国专利公开号2006/0104968
[0719] 美国专利公开号2009/0004142
[0720] 美国专利公开号2009/0017000
[0721] 美国专利公开号2009/0246875
[0722] 美国专利公开号2011/0104125
[0723] 美国专利公开号2011/0301073
[0724] 美国专利公开号20110008369
[0725] 美国专利公开号2012/0276636
[0726] 美国专利公开号2013/0315884
[0727] 美国专利公开号20130149337
[0728] 美国专利公开号2013287748
[0729] 美国专利公开号2014/0120622
[0730] 美国专利公开号2014022021
[0731] 美国专利公开号20140294898
[0732] Varela-Rohena等人Nat Med.14:1390-1395,2008.
[0733] Wang等人J Immunother.35(9):689-701,2012.
[0734] Wang等人,N.Engl.J.Med.2013;369:507-516.
[0735] Wang等人,Blood 2015;126:739-745.
[0736] Wu等人,Adv.Cancer Res.,90:127-56,2003.
[0737] Wu等人,Cancer,18(2):160-75,2012.
[0738] Yamanaka等人,Cell,131(5):861-72,2007.
[0739] Yawata等人,Blood 2008;112:2369-2380.
[0740] Yu等人,Science,318:1917-1920,2007.
[0741] Zhou等人Clin.Lymphoma Myeloma.Leuk.2014;14:319-326.
[0742] Zysk等人,Infect.Immun.68(6):3740-43,2000.

序列表

<110> 得克萨斯大学体系董事会

(BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM)

<120> CAR-NK细胞的产生方法及其用途

<130> UTSC.P1186WO-1001118789

<140>

<141>

<150> 62/826,856

<151> 2019-03-29

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明:合成的寡核苷酸

<400> 1

tgctgttgag gagctgga 18

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明:合成的寡核苷酸

<400> 2

agcacaccag gcagagtt 18

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明:合成的寡核苷酸

<400> 3

cggctgagga gcggaaga 18

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的说明:合成的寡核苷酸
<400> 4
tggaggtgag caatcccc 18
<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的说明:合成的寡核苷酸
<400> 5
ttaatacgac tcactatagg 20
<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的说明:合成的寡核苷酸
<400> 6
gttttagagc tagaaatagc 20
<210> 7
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的说明:合成的引物
<400> 7
gaacagatta ttctctcacc attagca 27
<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的说明:合成的引物
<400> 8
agcgtattac cctgttggca aa 22
<210> 9
<211> 14

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明:合成的探针

<400> 9

cctggagcaa gaag 14

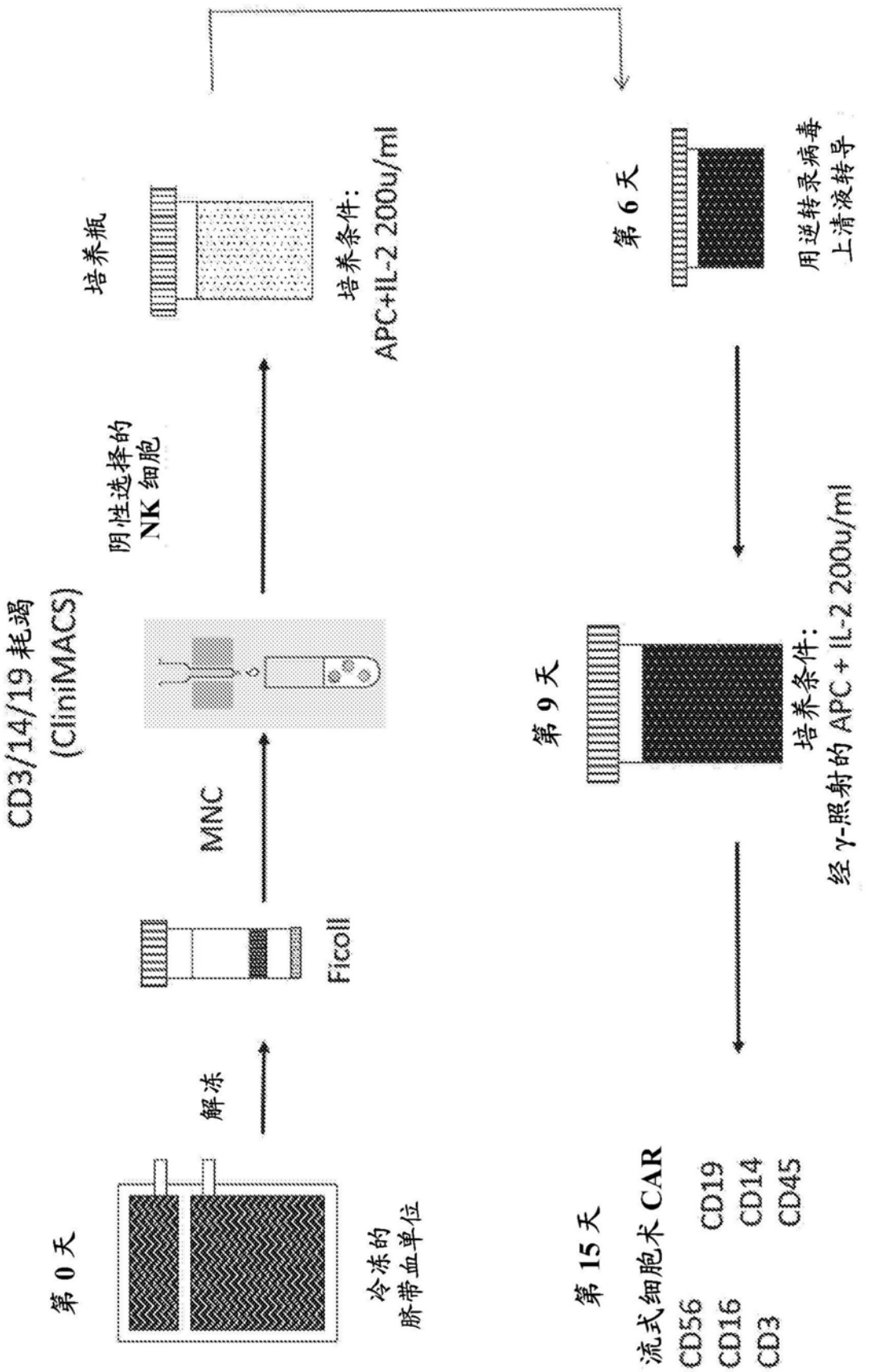

第 0 天
冷冻的
脐带血单位
解冻
Ficoll
MNC
CD3/14/19 耗竭
(CliniMACS)
阴性选择的
NK 细胞
培养瓶
培养条件:
APC+IL-2 200u/ml
第 6 天
用逆转录病毒
上清液转导
第 9 天
培养条件:
经 γ-照射的 APC + IL-2 200u/ml
第 15 天
流式细胞术 CAR
CD56 CD19
CD16 CD14
CD3 CD45

图1

	起始细胞数目 ($x10^6$)	NK 扩增倍数	第 14 天的 NK 绝对计数 ($\times10^{10}$)	CAR 转导效率(%)
CAR-CBNK#1	20	564.3	1.13	66.6
CAR-CBNK#2	20	843.7	1.7	87.4
CAR-CBNK#3	20	7369.6	15.3	64.4
CAR-CBNK#4	20	2514.3	5.0	47.8
CAR-CBNK#5	20	2221.8	4.4	67.5
中值	20	2221.8	4.4	66.6

图2

在烧瓶中培养		
	培养结束时的 TNC ($\times 10^6$)	转导后的扩增倍数
运行1	1190	198
运行2	455	114
运行3	909	130
运行4	79	2
运行5	2841	203
运行6	957	68
运行7	3000	214
运行8	2180	78
运行9	50.5	51
运行10	30	30
运行11	27.2	27
中值	909	78
最小值	27	2
最大值	3000	214

在 Grex 生物反应器中的培养		
	培养结束时的 TNC ($\times 10^6$)	转导后的扩增倍数
运行12	1652	236
运行13	7661	274
运行14	8238	294
运行15	9906	354
运行16	2994	107
中值	7661	274
最小值	1652	107
最大值	9906	354

$P = 0.037$（对于转导后的扩增倍数）

$P = 0.014$（对于培养结束时的 TNC）

图3

组	注射的细胞	平均值	STD
组 1	仅 **Raji-FFLuc**	22.6	1.78
组 2	新鲜的 NT-NKs + Raji-FFLuc	22.7	1.30
组 3	冷冻的：标准冷冻培养基 NT-NKs + Raji-FFLuc	22.83	.76
组 4	冷冻的：新型冷冻培养基 NT-NKs + Raji-FFLuc	22.6	1.34
组 5	新鲜的 CAR-NKs + Raji-FFLuc	27.7	2.41
组 6	冷冻的：标准冷冻培养基 CAR-NKs + Raji-FFLuc	24.5	1.58
组 7	冷冻的：新型冷冻培养基 CAR-NKs + Raji-FFLuc	28	2.32

图4

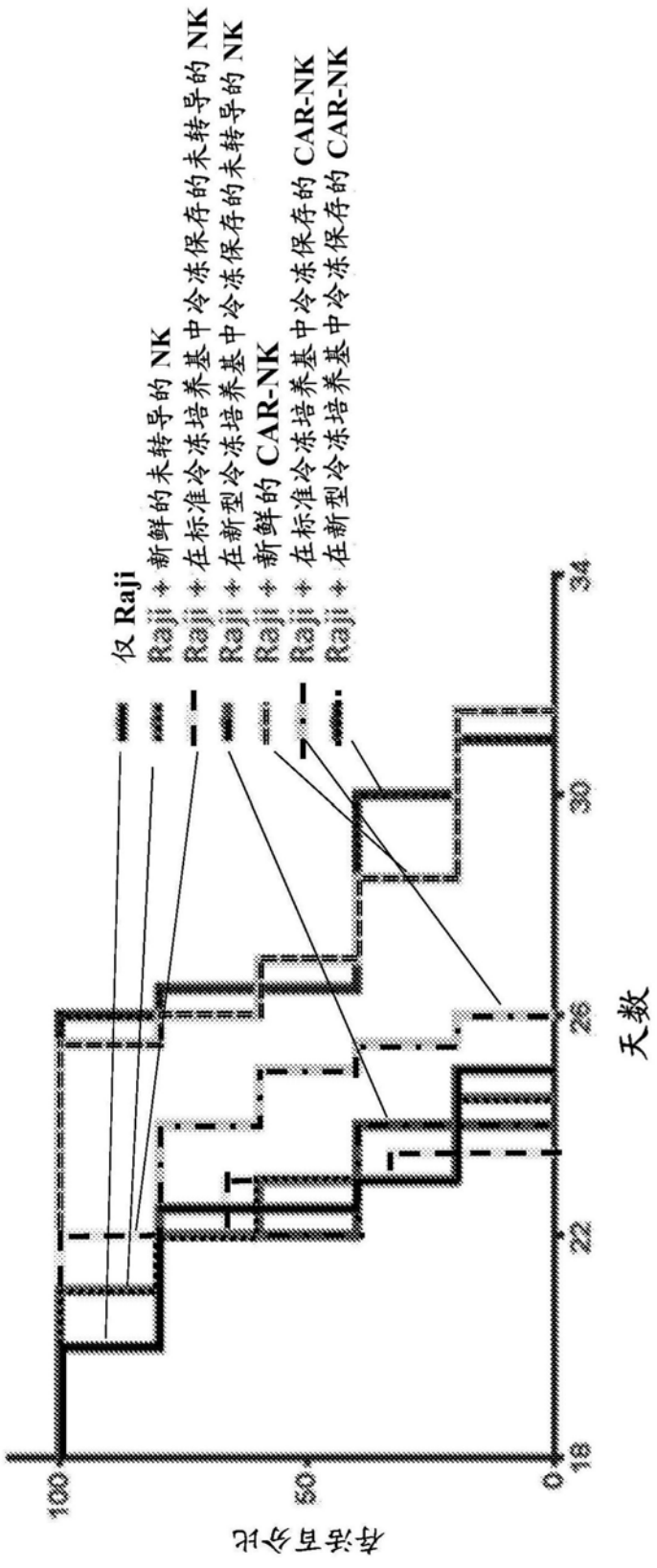
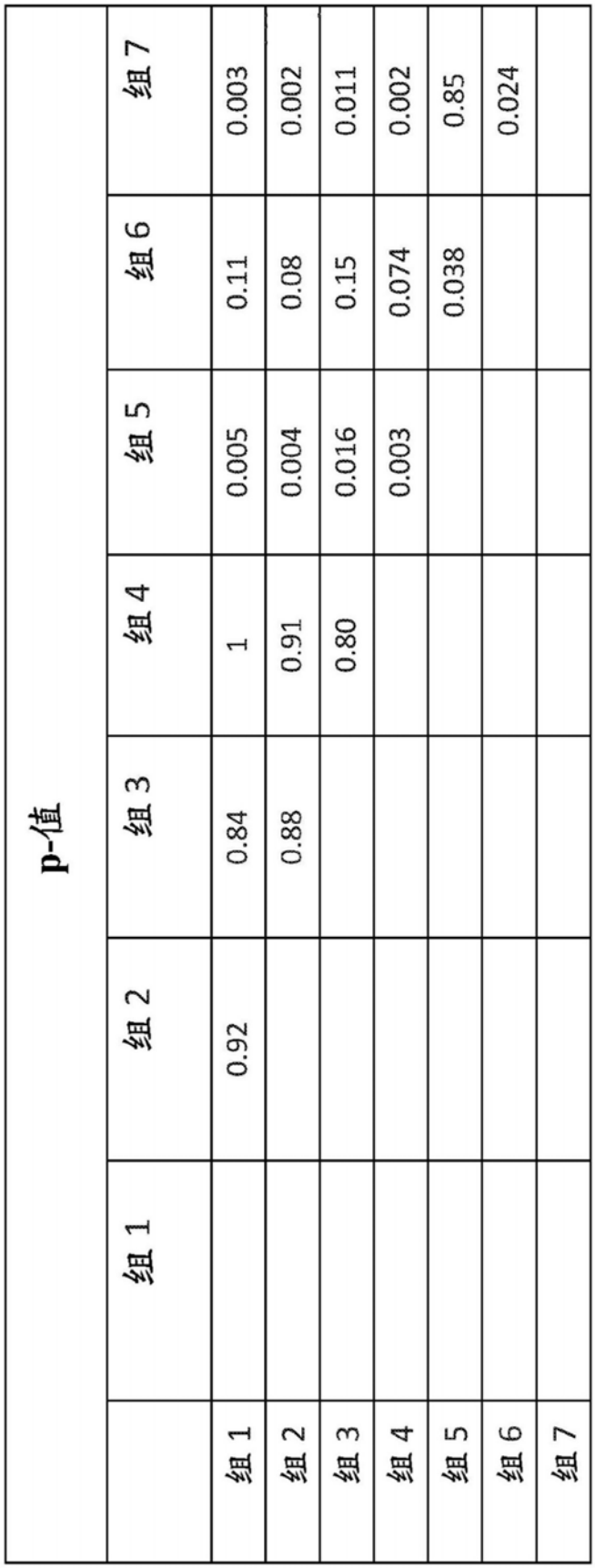

仅 Raji
Raji + 新鲜的未转导的 NK
Raji + 在标准冷冻培养基中冷冻保存的未转导的 NK
Raji + 在新型冷冻培养基中冷冻保存的未转导的 NK
Raji + 新鲜的 CAR-NK
Raji + 在标准冷冻培养基中冷冻保存的 CAR-NK
Raji + 在新型冷冻培养基中冷冻保存的 CAR-NK
存活百分比
100
50
0
18
22
26
30
34
天数

图5



p-值	组 1	组 2	组 3	组 4	组 5	组 6	组 7
组 1		0.92	0.84	1	0.005	0.11	0.003
组 2			0.88	0.91	0.004	0.08	0.002
组 3				0.80	0.016	0.15	0.011
组 4					0.003	0.074	0.002
组 5						0.038	0.85
组 6							0.024
组 7							

图6

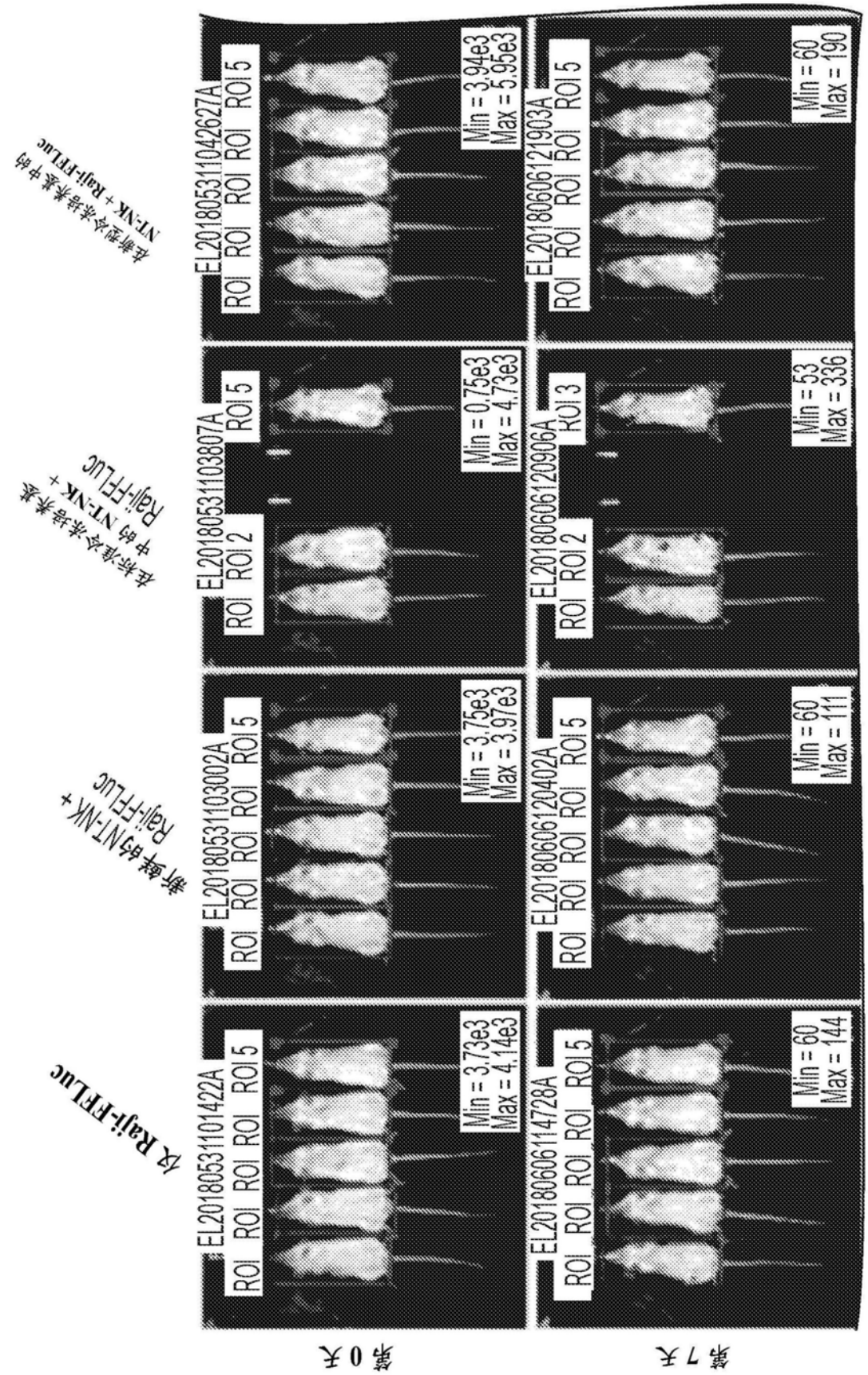

第0天
第7天
在Raji-FFLuc
新鲜的NT-NK+ Raji-FFLuc
在标准冷冻培养基中的NT-NK+ Raji-FFLuc
在新型冷冻培养基中的NT-NK + Raji-FFLuc
EL2018053110422A
ROI ROI ROI ROI ROI 5
Min = 3.73e3
Max = 4.14e3
EL2018053103002A
ROI ROI ROI ROI ROI 5
Min = 3.75e3
Max = 3.97e3
EL2018053103807A
ROI ROI 2
ROI 5
Min = 0.75e3
Max = 4.73e3
EL2018053110426 27A
ROI ROI ROI ROI ROI 5
Min = 3.94e3
Max = 5.95e3
EL2018060614728A
ROI ROI ROI ROI 5
Min = 60
Max = 144
EL2018060120402A
ROI ROI ROI ROI ROI 5
Min = 60
Max = 111
EL2018060120906A
ROI ROI 2
ROI 3
Min = 53
Max = 336
EL2018060121903A
ROI ROI ROI ROI ROI 5
Min = 60
Max = 190

图7

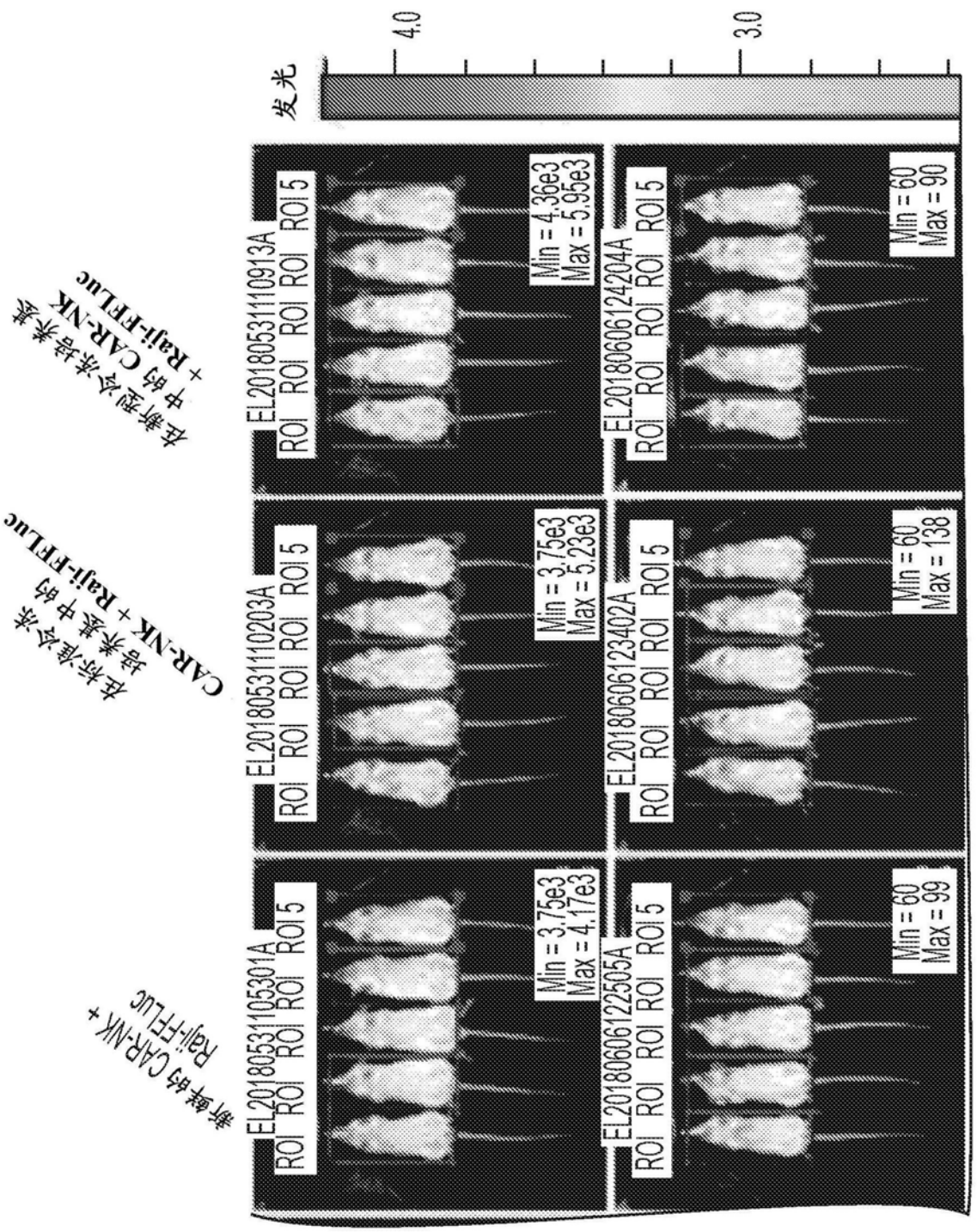

发光
4.0
3.0
新鲜的 CAR-NK + Raji-FFLuc
本标准冷冻 培养基中的 CAR-NK + Raji-FFLuc
本新型冷冻培养基中的 CAR-NK + Raji-FFLuc
EL201805311105301A
EL201805311110203A
EL201805311110913A
EL201806061122505A
EL201806061123402A
EL201806061124204A
ROI ROI ROI ROI ROI 5
Min = 3.75e3
Max = 4.17e3
Min = 3.75e3
Max = 5.23e3
Min = 4.36e3
Max = 5.95e3
Min = 60
Max = 99
Min = 60
Max = 138
Min = 60
Max = 90

图7 (续)

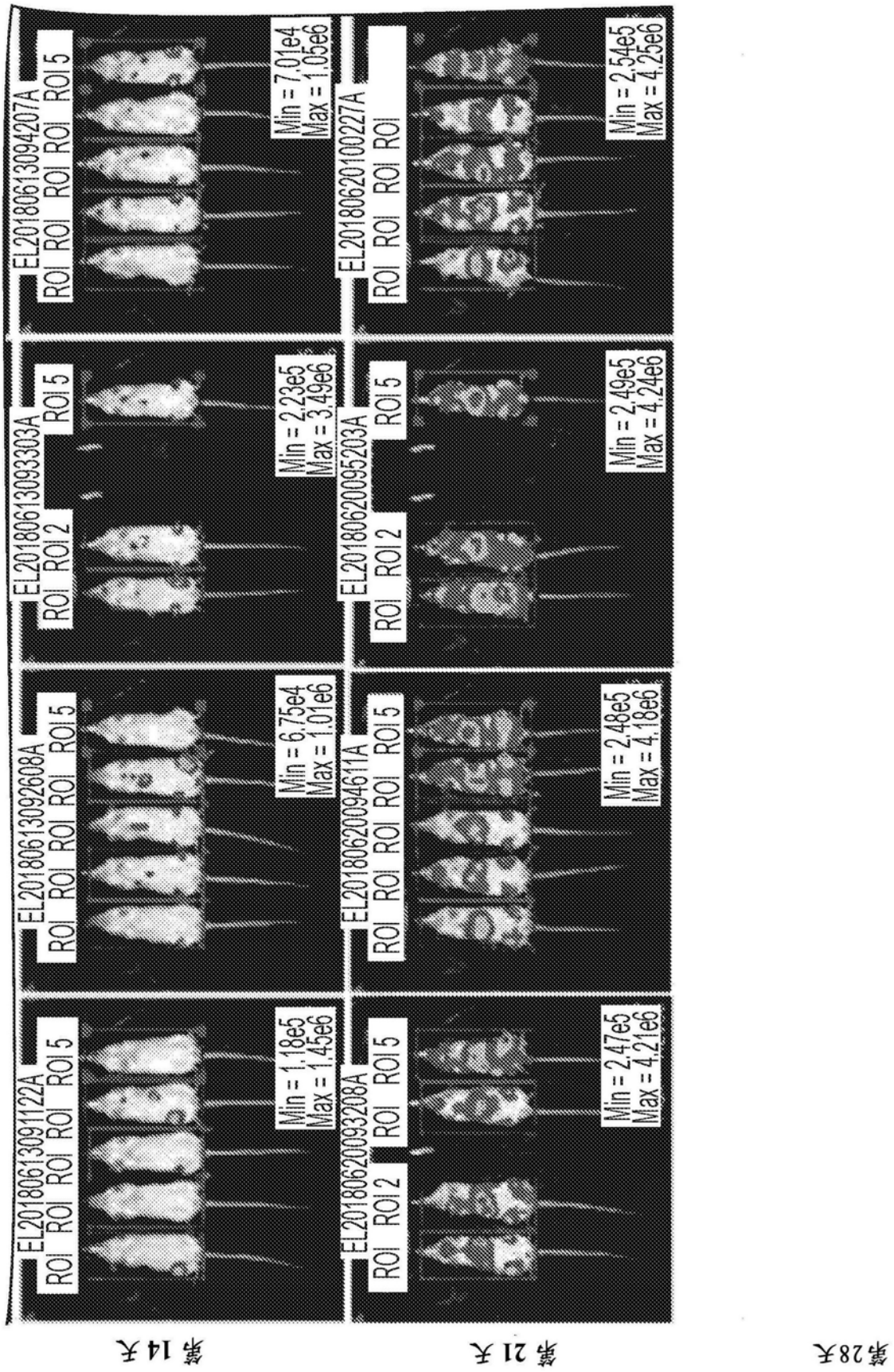

第14天
第21天
第28天
EL20180613091122A
ROI ROI ROI ROI ROI 5
Min = 1.18e5
Max = 1.45e6
EL20180613092608A
ROI ROI ROI ROI ROI 5
Min = 6.75e4
Max = 1.01e6
EL20180613093303A
ROI ROI 2 ROI 5
Min = 2.23e5
Max = 3.49e6
EL20180613094207A
ROI ROI ROI ROI ROI 5
Min = 7.01e4
Max = 1.05e6
EL20180620093208A
ROI ROI 2 ROI ROI 5
Min = 2.47e5
Max = 4.21e6
EL20180620094611A
ROI ROI ROI ROI ROI 5
Min = 2.48e5
Max = 4.18e6
EL20180620095203A
ROI ROI 2 ROI 5
Min = 2.49e5
Max = 4.24e6
EL20180620100227A
ROI ROI ROI ROI
Min = 2.54e5
Max = 4.25e6

图7(续)

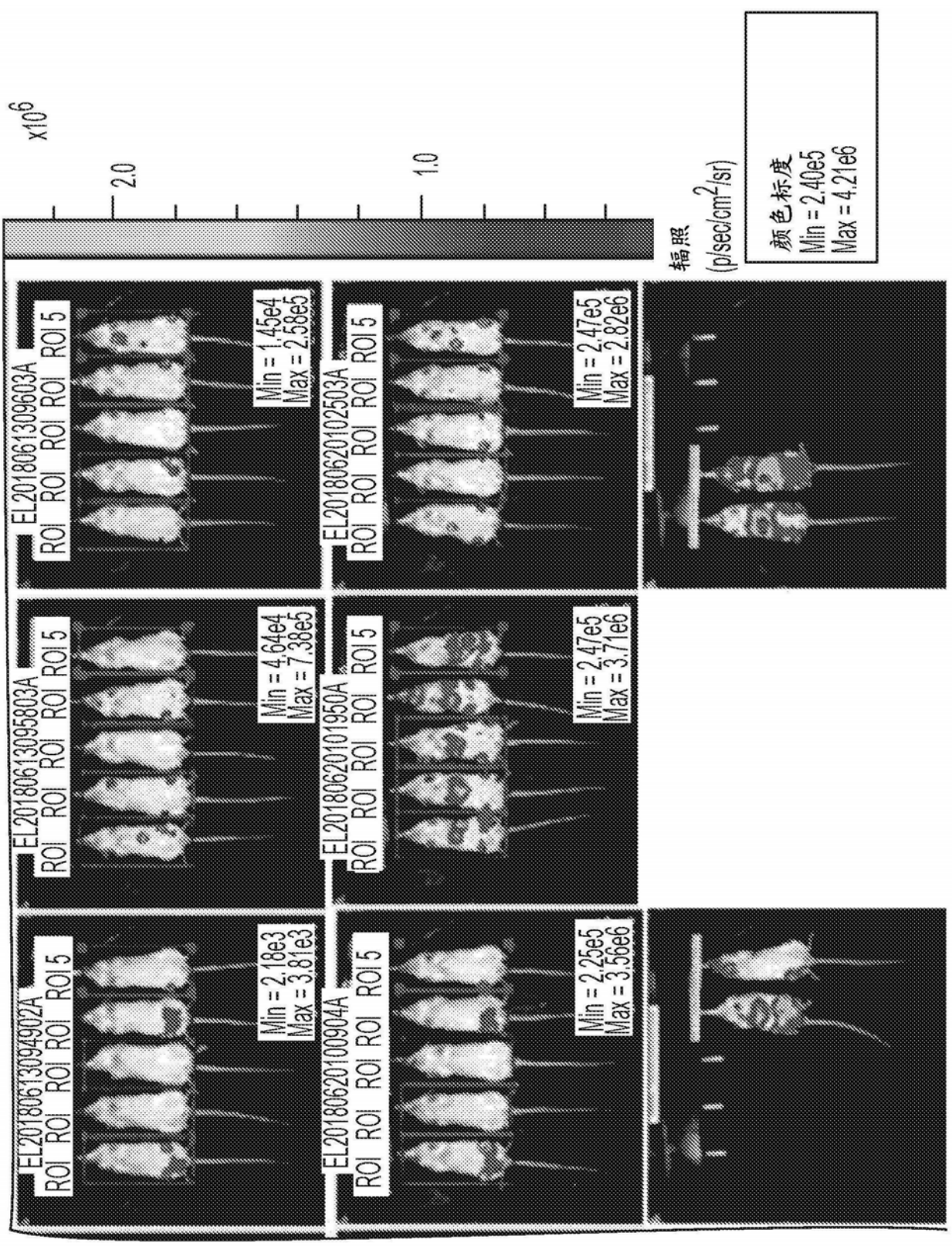

x10^6
2.0
1.0
辐照
(p/sec/cm^2/sr)
颜色标度
Min = 2.40e5
Max = 4.21e6
EL20180613094902A
ROI ROI ROI ROI ROI 5
Min = 2.18e3
Max = 3.81e3
EL20180613095803A
ROI ROI ROI ROI ROI 5
Min = 4.64e4
Max = 7.38e5
EL20180613096603A
ROI ROI ROI ROI ROI 5
Min = 1.45e4
Max = 2.58e5
EL20180620100904A
ROI ROI ROI ROI 5
Min = 2.25e5
Max = 3.56e6
EL20180620101950A
ROI ROI ROI ROI 5
Min = 2.47e5
Max = 3.71e6
EL20180620102503A
ROI ROI ROI ROI ROI 5
Min = 2.47e5
Max = 2.82e6

图7(续)

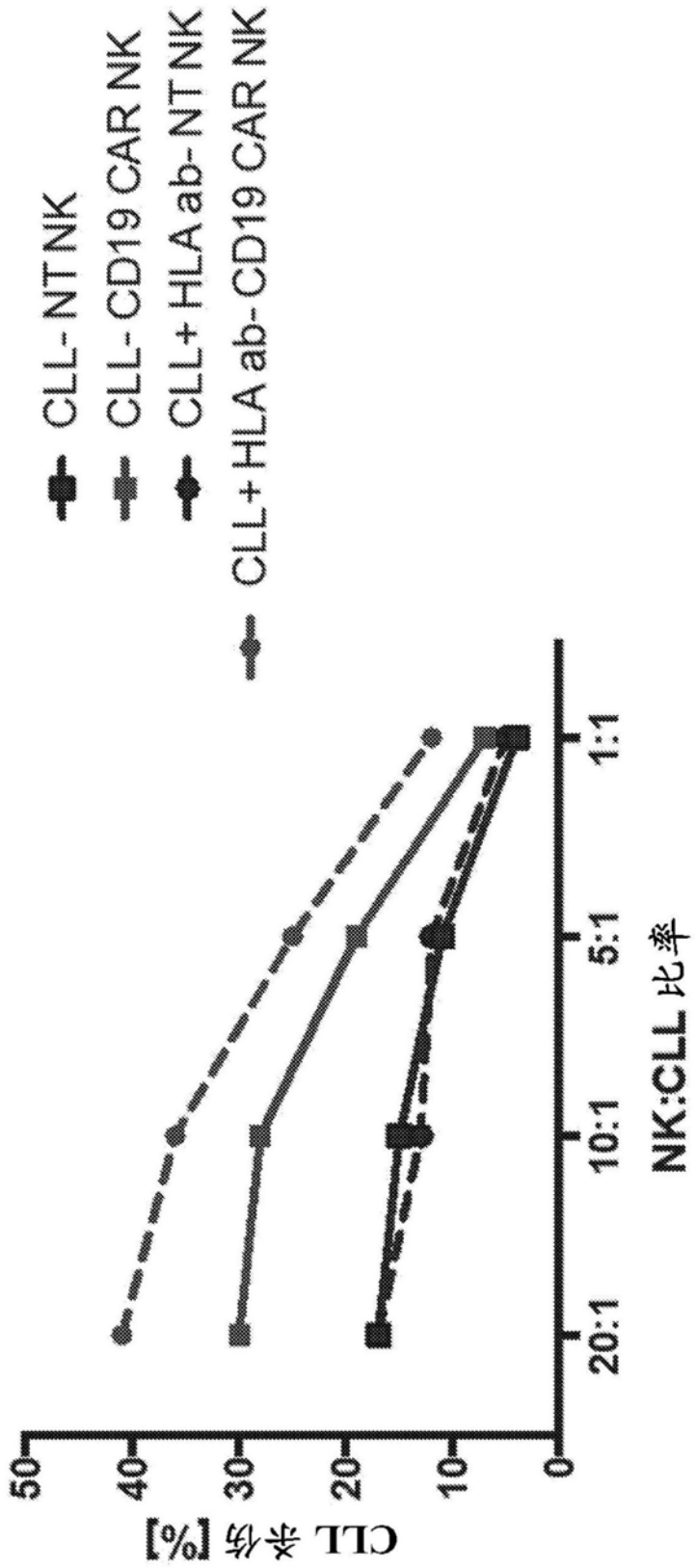

CLL- NT NK
CLL- CD19 CAR NK
CLL+ HLA ab- NT NK
CLL+ HLA ab- CD19 CAR NK
CLL 杀伤 [%]
50
40
30
20
10
0
20:1
10:1
5:1
1:1
NK:CLL 比率

图8

表 1. 基线时患者的特征。*

患者编号	剂量水平 细胞/kg	年龄 岁	性别	诊断	先前疗法线数目	HSCT、依鲁替尼或维奈托克无效	HLA 等位基因匹配†数目/总数目	KIR 配体错配‡
1	1x10^5	47	男性	转化型滤泡性淋巴瘤	3	自体 HSCT	4/6	否
2	1x10^5	59	男性	弥漫性大 B 细胞淋巴瘤	6	NA	4/6	是
3	1x10^5	59	女性	慢性淋巴细胞白血病	4	依鲁替尼、维奈托克	4/6	否
4	0.25x10^6§	56	男性	慢性淋巴细胞白血病	5	依鲁替尼	4/6	是
5	1x10^6	61	男性	具有 Richter 转化的慢性淋巴细胞白血病	5	依鲁替尼	4/6	是
6	1x10^6	59	女性	加速型慢性淋巴细胞白血病	5	依鲁替尼、维奈托克	4/6	否
7	1x10^6	66	女性	慢性淋巴细胞白血病	4	依鲁替尼	4/6	是
8	1x10^7	64	男性	转化型滤泡性淋巴瘤	11	自体 HSCT	4/6	否
9	1x10^7	70	男性	弥漫性大 B 细胞淋巴瘤	4	自体 HSCT	4/6	否
10	1x10^7	61	女性	转化型滤泡性淋巴瘤	4	自体 HSCT	2/6	否
11	1x10^7	60	男性	滤泡性淋巴瘤(病灶等级 3B)	4	NA	1/6	是

* 接受抗 CD19 嵌合抗原受体自然杀伤（CAR-NK）细胞的所有 11 名患者患有具有高风险细胞遗传学或分子特征的疾病。HSCT 表示造血干细胞移植，NA 表示不适用，因为该患者没有接受任一种所列的疗法。

† 所列出的是捐赠的脐带血单位与患者之间在 HLA 基因座 A、B 和 D Rβ1 处的 HLA 匹配的数目。

‡ 供体杀伤细胞免疫球蛋白样受体（KIR）和接受者 HLA 之间的错配与同种异体 HSCT 后减少的复发风险相关。

§ 患者 4 接受的剂量低于指定剂量组中的其他患者，原因在于可用于输血的细胞数量不足。

图9

表 2.11 名研究患者中的不良事件。*

不良事件	1 或 2 级	3 级	4 级
		患者数目	
细胞因子释放综合征	0	0	0
移植物抗宿主病	0	0	0
神经学事件	0	0	0
血液学事件			
中性粒细胞减少症	1	2	8
淋巴细胞减少症	1	0	10
血小板减少症	8	0	0
贫血	7	2	0
新血管事件			
胸痛	2	0	0
高血压	0	1	0
心房颤动	1	0	0
心动过速	4	0	0
体质事件			
疲劳	3	0	0
失眠	2	0	0
感染			
细菌感染	1	0	0
病毒感染	1	1	0
杂病			
视力模糊	1	0	0
头痛或头晕	2	0	0
胸腔积液	1	0	0
皮肤变色	1	0	0
肌肉或骨痛	2	0	0
实验室值			
升高的肌酸酐	3	0	0
升高的丙氨酸氨基转移酶	1	0	0
升高的 C 反应蛋白	2	0	0
升高的铁蛋白	4	0	0
高血糖症	1	0	0
升高的乳酸脱氢酶	2	0	0
低白蛋白血症	2	0	0
电解质异常	2	1	0

*所列出的是从输注 CAR-NK 细胞时直至第 40 天在 11 名患者中报告的所有不良事件，不管研究者是否将所述事件归因于治疗。没有列出由原始疾病引起的异常。

图10

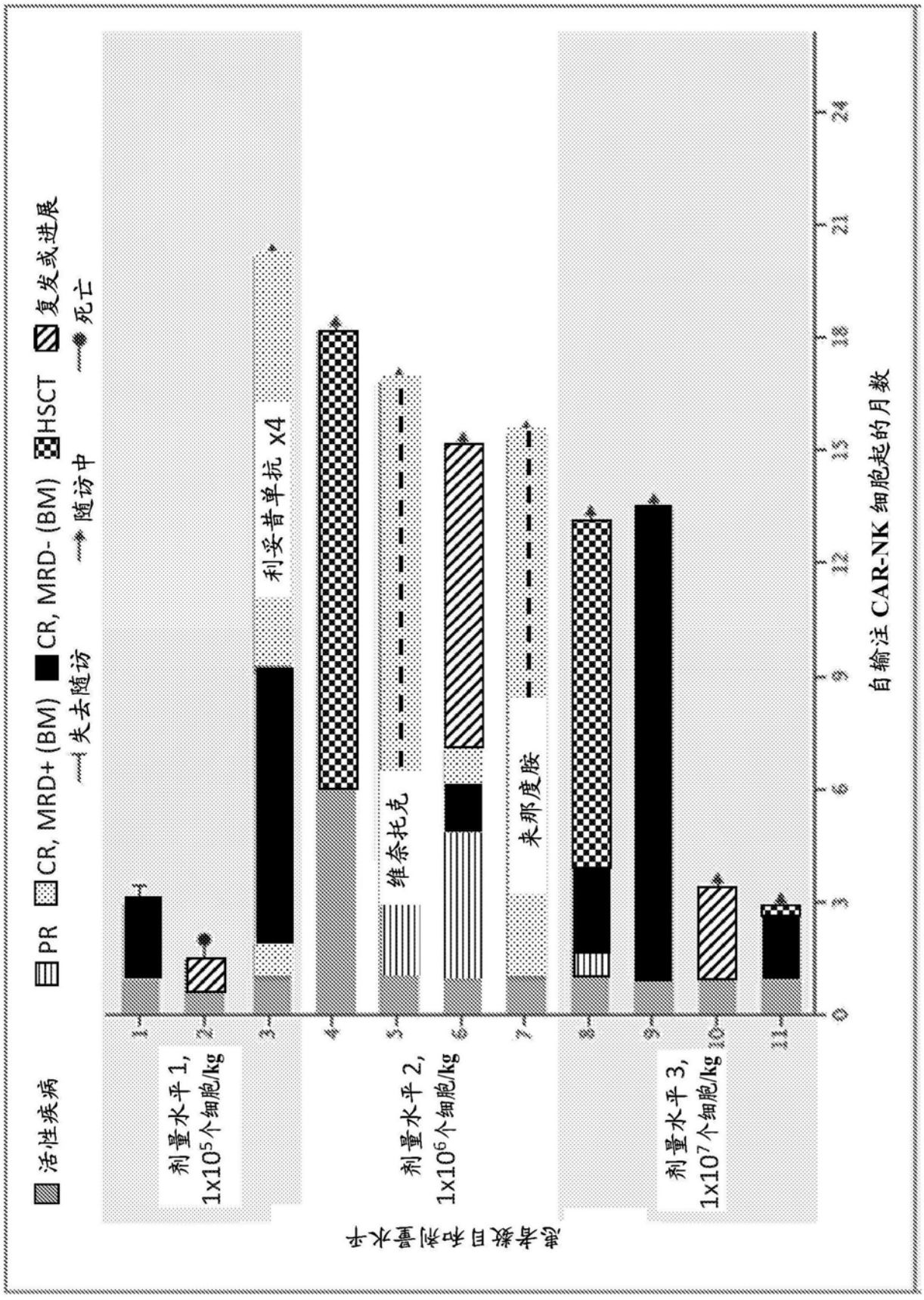

活性疾病
PR
CR, MRD+ (BM)
CR, MRD- (BM)
HSCT
复发或进展
失去随访
随访中
死亡
剂量水平 1,
1x10^5个细胞/kg
剂量水平 2,
1x10^6个细胞/kg
剂量水平 3,
1x10^7个细胞/kg
利妥昔单抗 x4
维奈托克
来那度胺
0
3
6
9
12
15
18
21
24
自输注 CAR-NK 细胞起的月数

图11

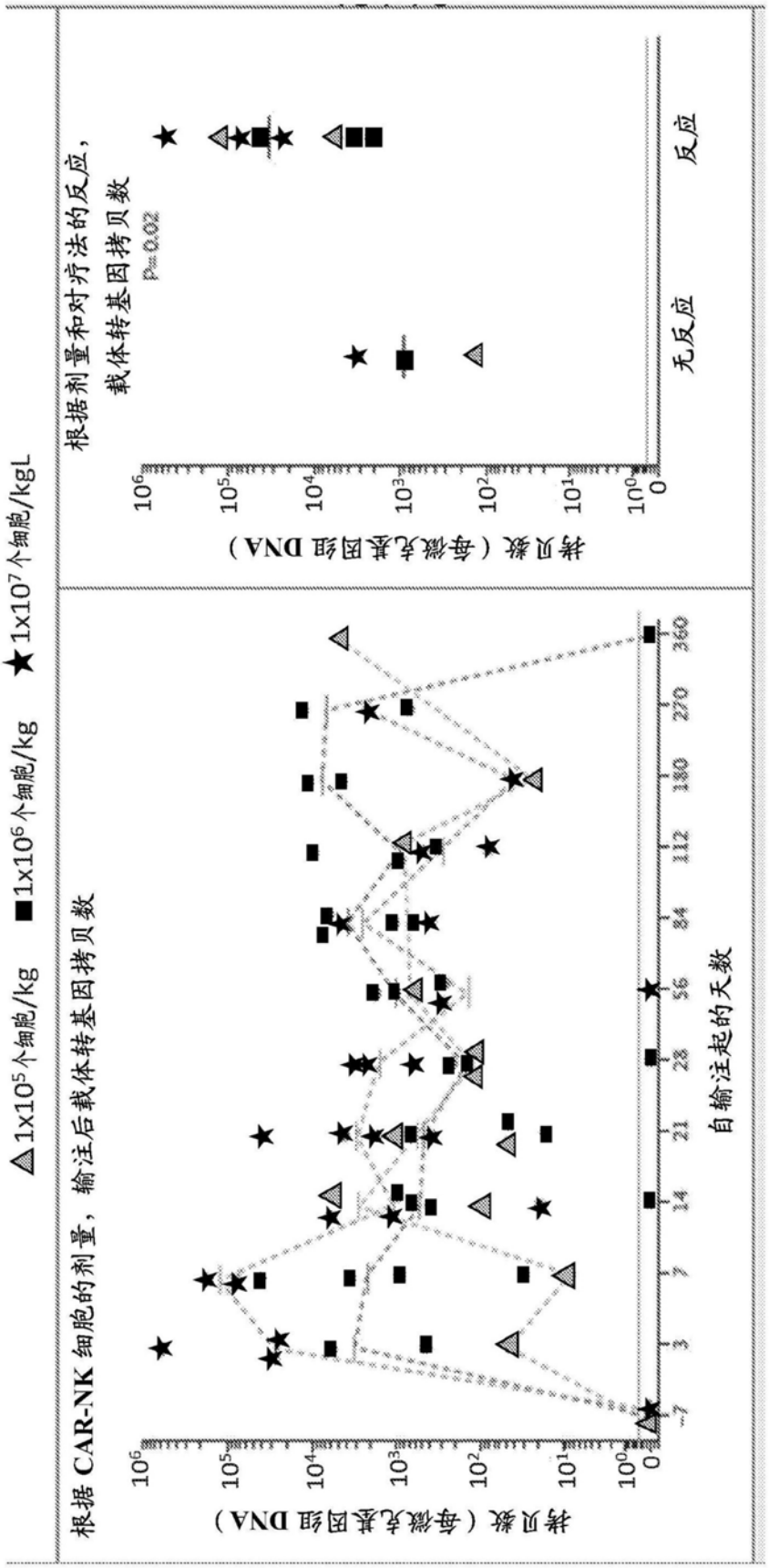

△1x10⁵个细胞/kg ■1x10⁶个细胞/kg ★1x10⁷个细胞/kgL
根据 CAR-NK 细胞的剂量，输注后载体转基因拷贝数
拷贝数（每微克基因组 DNA）
自输注起的天数
根据剂量和对疗法的反应，
载体转基因拷贝数
P=0.02
无反应
反应

图 12A

图 12B

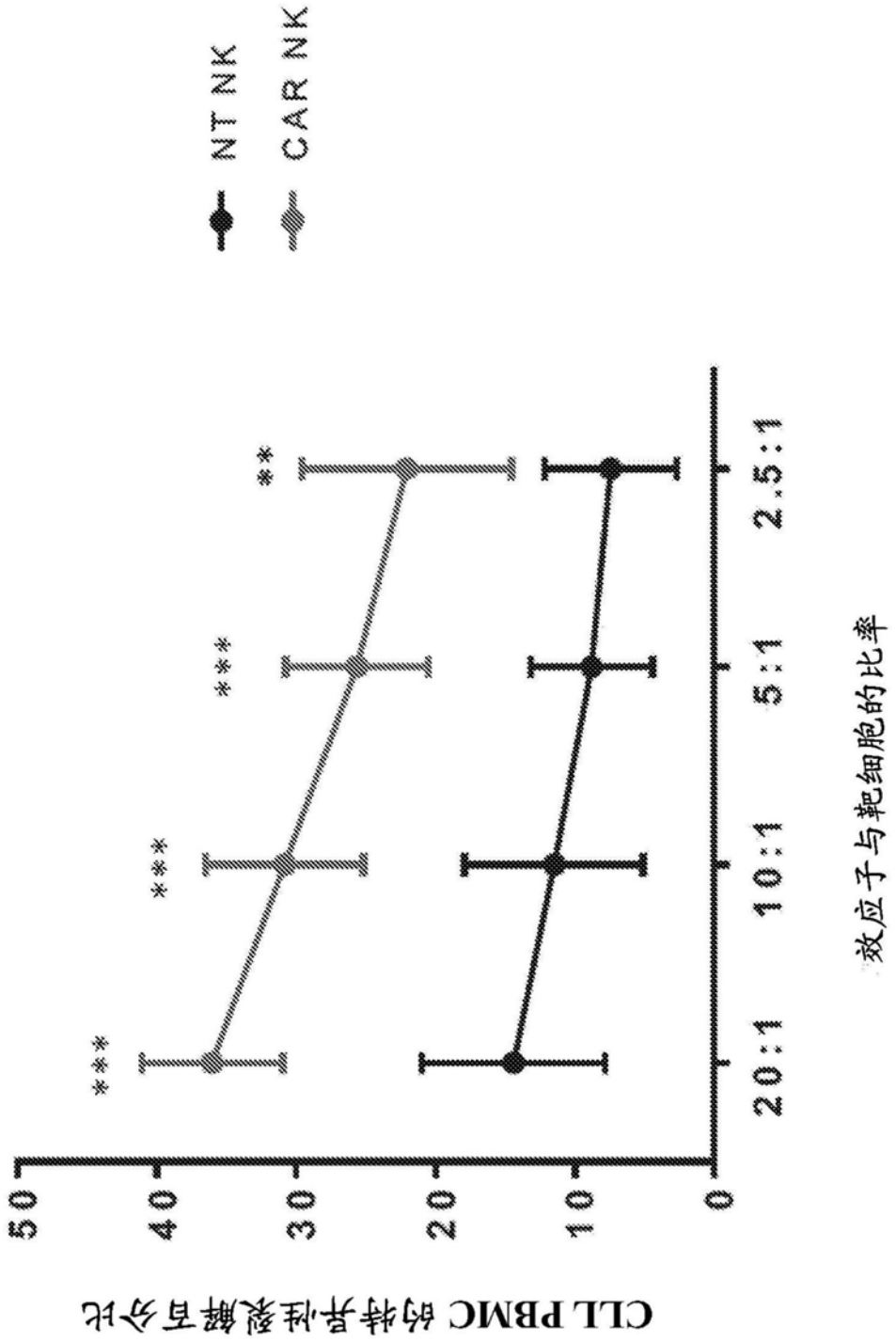

NT NK
CAR NK
CLL PBMC 的特异性裂解百分比
效应子与靶细胞的比率
20:1
10:1
5:1
2.5:1
0
10
20
30
40
50
***
***
***
**

图13A

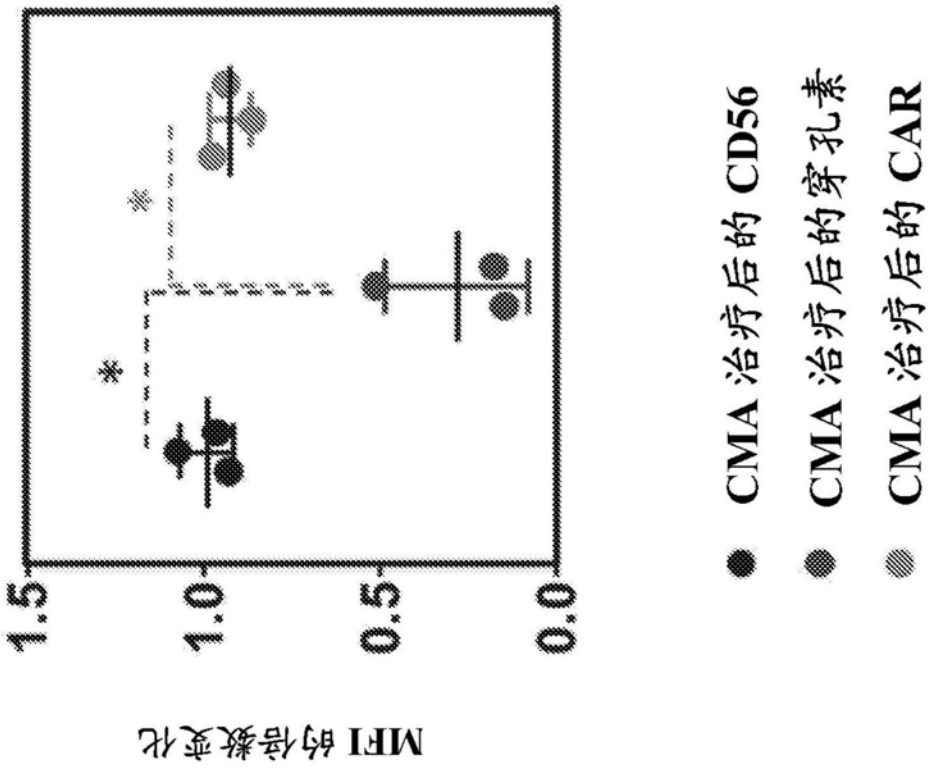


图13B

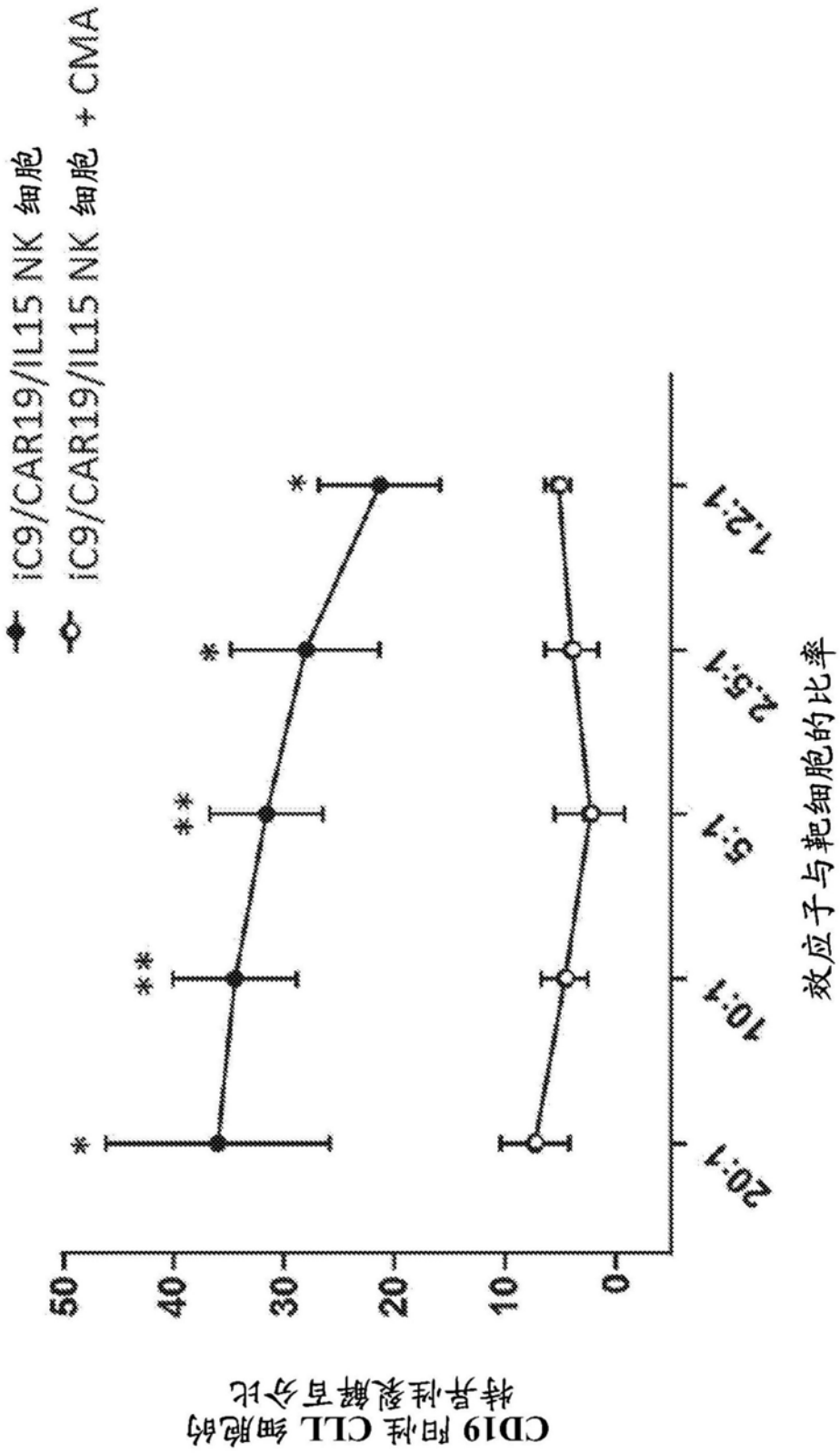

iC9/CAR19/IL15 NK 细胞
iC9/CAR19/IL15 NK 细胞 + CMA
CD19 阳性 CLL 细胞的
特异性裂解百分比
效应子与靶细胞的比率
50
40
30
20
10
0
20:1
10:1
5:1
2.5:1
1.2:1
*
**
**
*
*

图13C

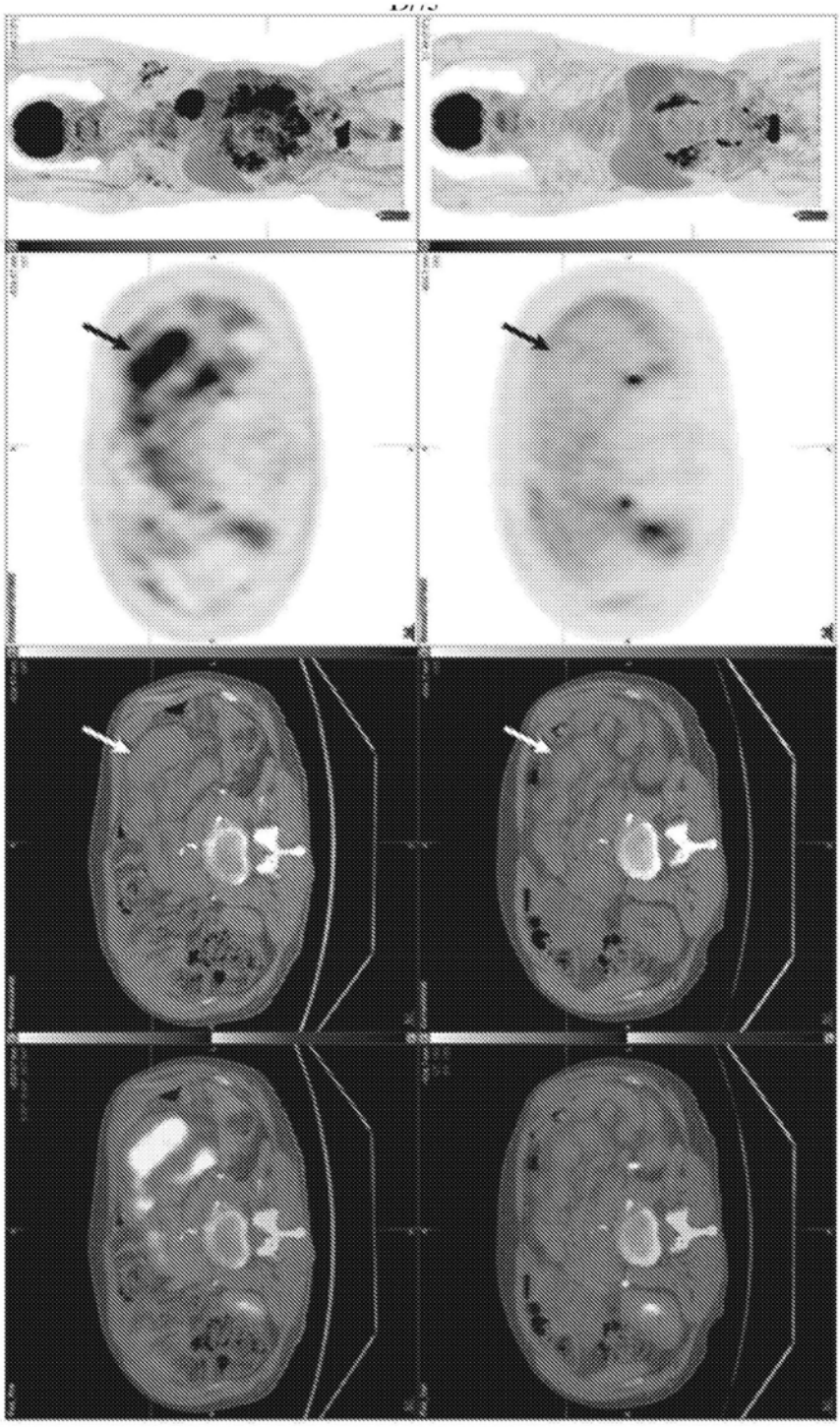


图14

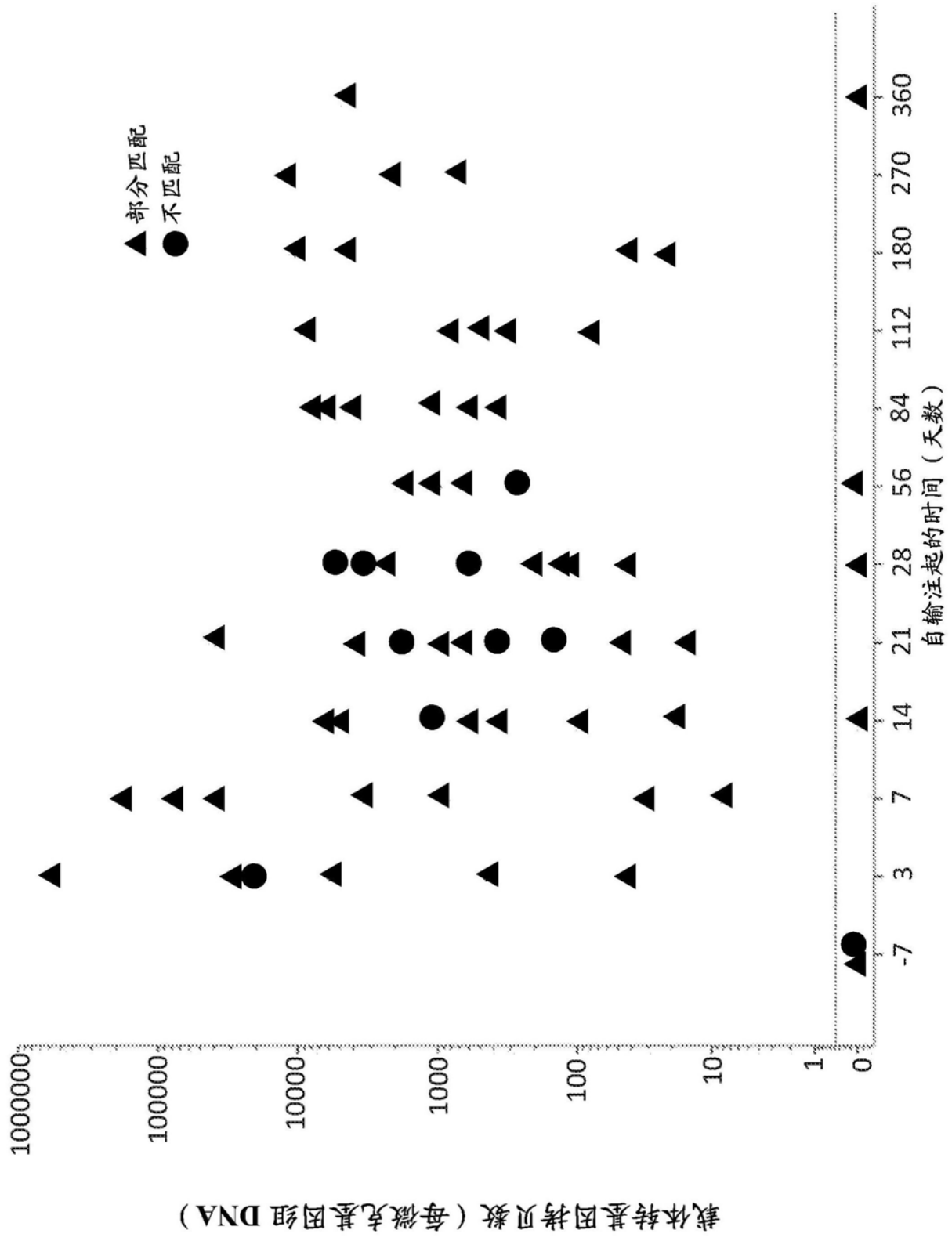

载体转基因拷贝数（每微克基因组 DNA）
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
0
-7
3
7
14
21
28
56
84
112
180
270
360
自输注起的时间（天数）
部分匹配
不匹配

图15

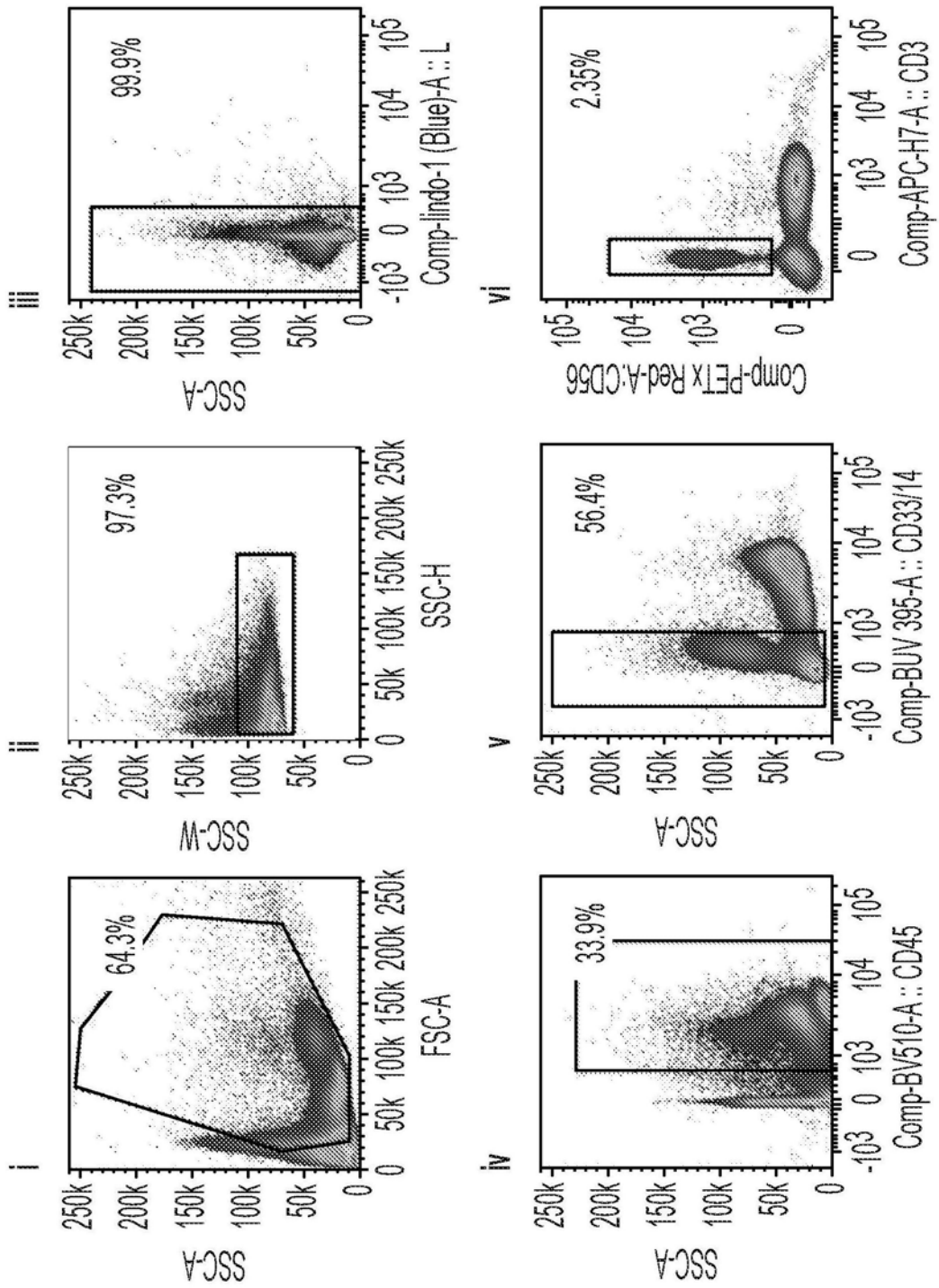

i
64.3%
SSC-A
FSC-A
ii
97.3%
SSC-W
SSC-H
iii
99.9%
SSC-A
Comp-lindo-1 (Blue)-A :: L
iv
33.9%
SSC-A
Comp-BV510-A :: CD45
v
56.4%
SSC-A
Comp-BUV 395-A :: CD33/14
vi
2.35%
Comp-PETx Red-A::CD56
Comp-APC-H7-A :: CD3

图16A

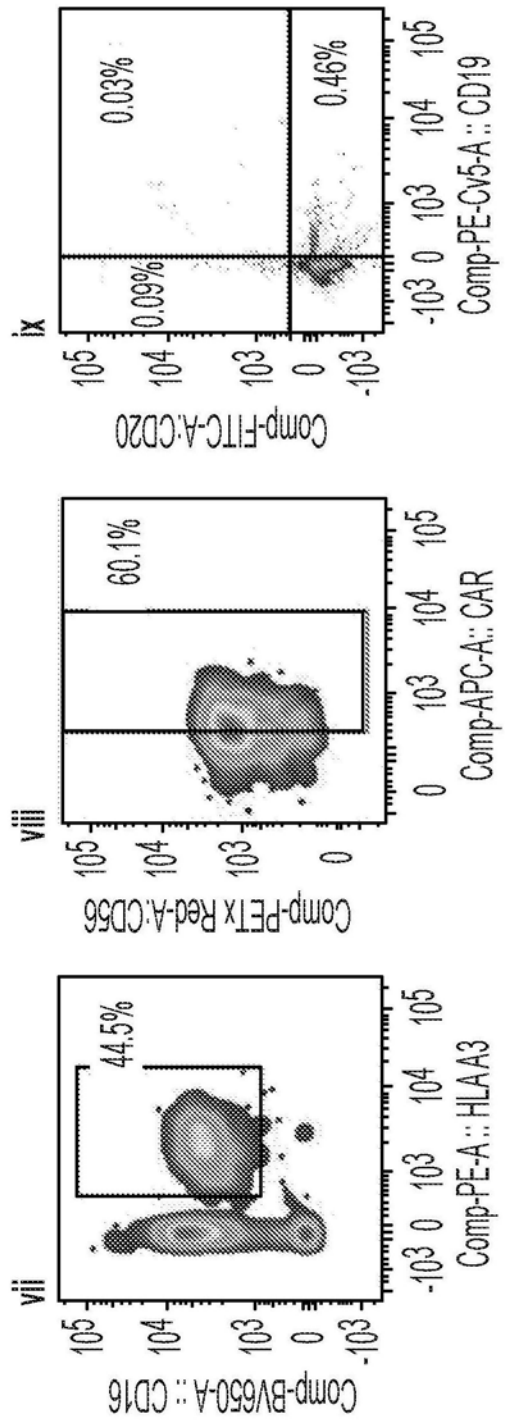

ix
0.03%
0.09%
0.46%
Comp-FITC-A::CD20
Comp-PE-Cy5-A :: CD19
viii
60.1%
Comp-PETx Red-A::CD56
Comp-APC-A:: CAR
vii
44.5%
Comp-BV650-A :: CD16
Comp-PE-A :: HLA A3

图16A(续)

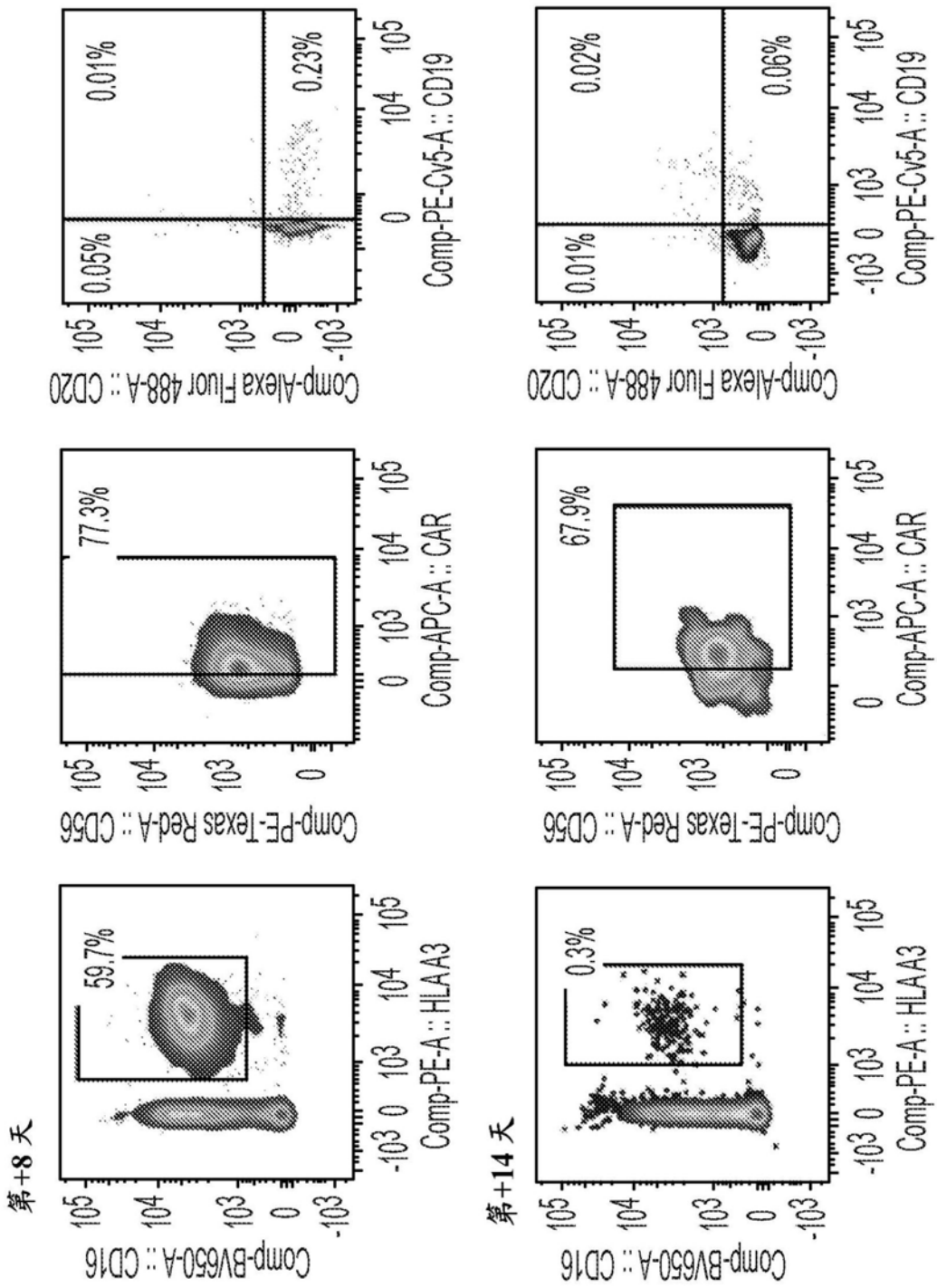

第+8 天
第+14 天
Comp-BV650-A :: CD16
Comp-PE-A :: HLA A3
59.7%
0.3%
Comp-PE-Texas Red-A :: CD56
Comp-APC-A :: CAR
77.3%
67.9%
Comp-Alexa Fluor 488-A :: CD20
Comp-PE-Cy5-A :: CD19
0.05%
0.01%
0.23%
0.01%
0.02%
0.06%

图16B

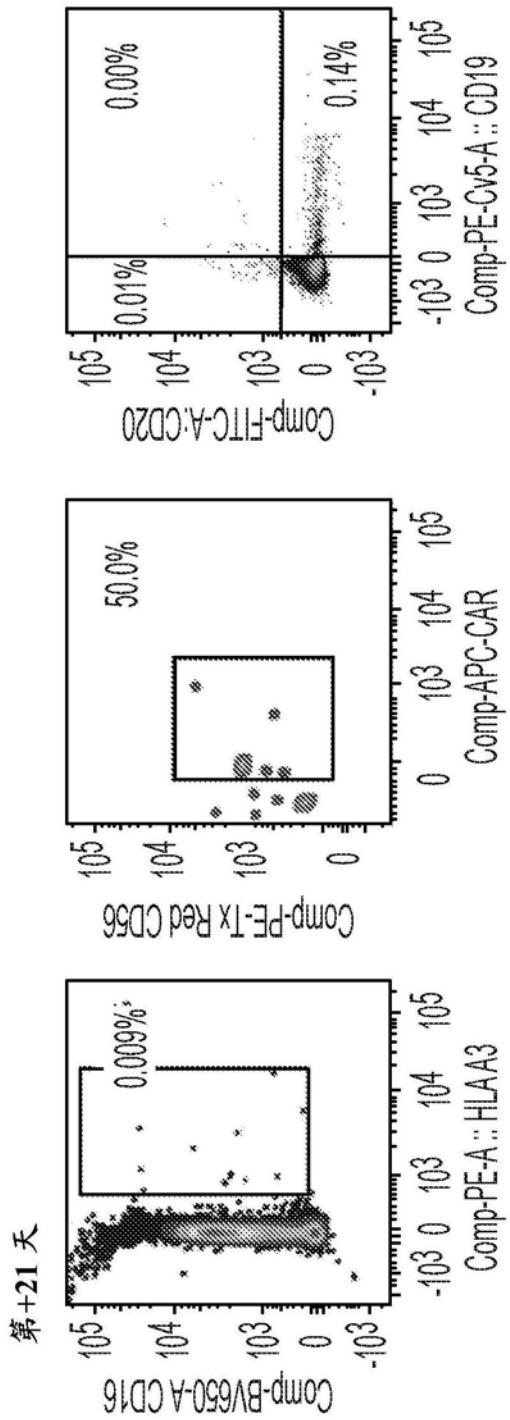

第+21 天
Comp-BV650-A CD16
Comp-PE-A :: HLA A3
0.009%
Comp-PE-Tx Red CD56
Comp-APC-CAR
50.0%
Comp-FITC-A::CD20
Comp-PE-Cy5-A :: CD19
0.01%
0.00%
0.14%

图16B(续)

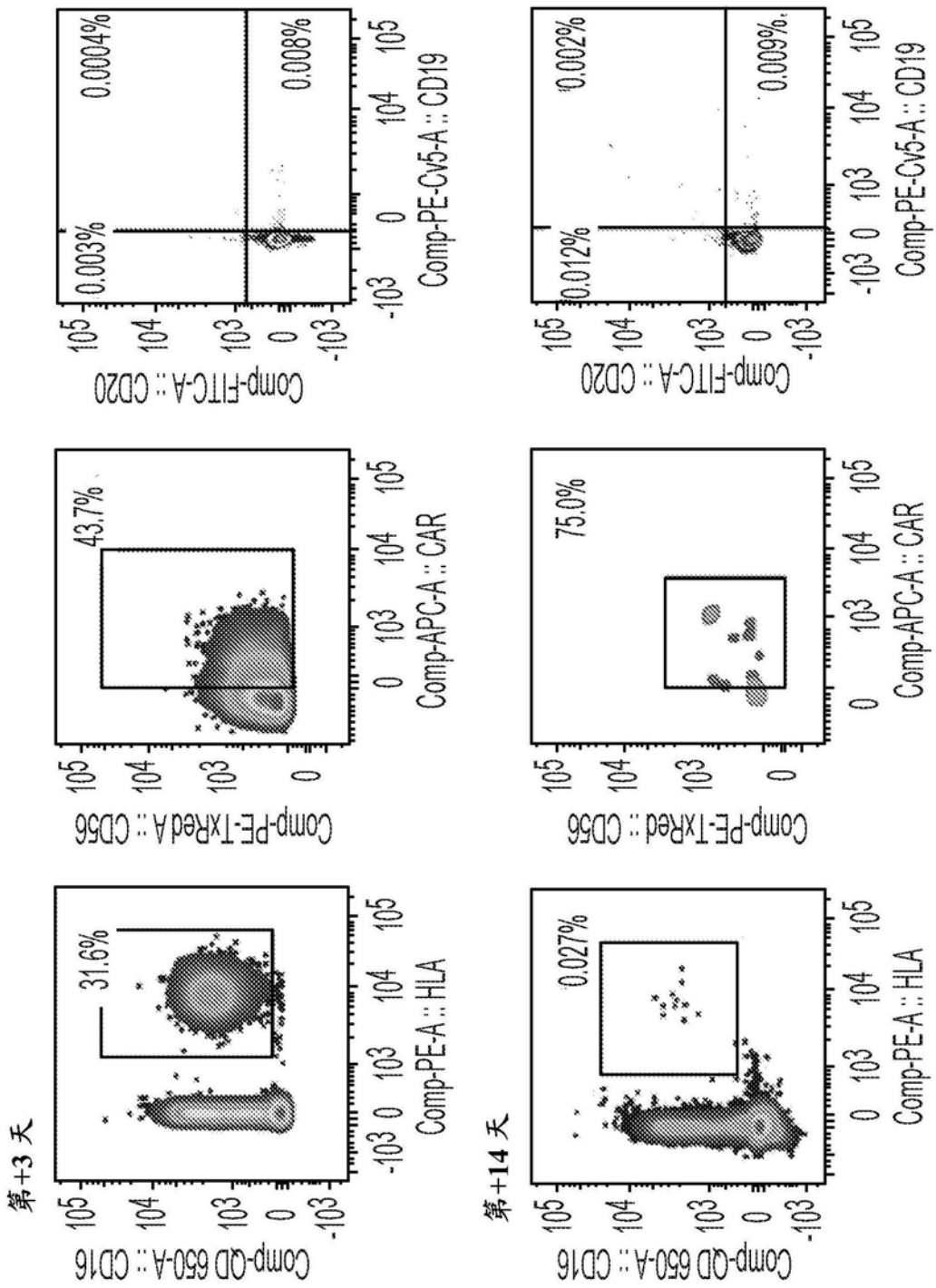

第+3 天
第+14 天
Comp-QD 650-A :: CD16
Comp-PE-A :: HLA
31.6%
0.027%
Comp-PE-TxRed A :: CD56
Comp-APC-A :: CAR
43.7%
75.0%
Comp-FITC-A :: CD20
Comp-PE-Cy5-A :: CD19
0.003%
0.0004%
0.008%
0.012%
0.002%
0.009%

图16C

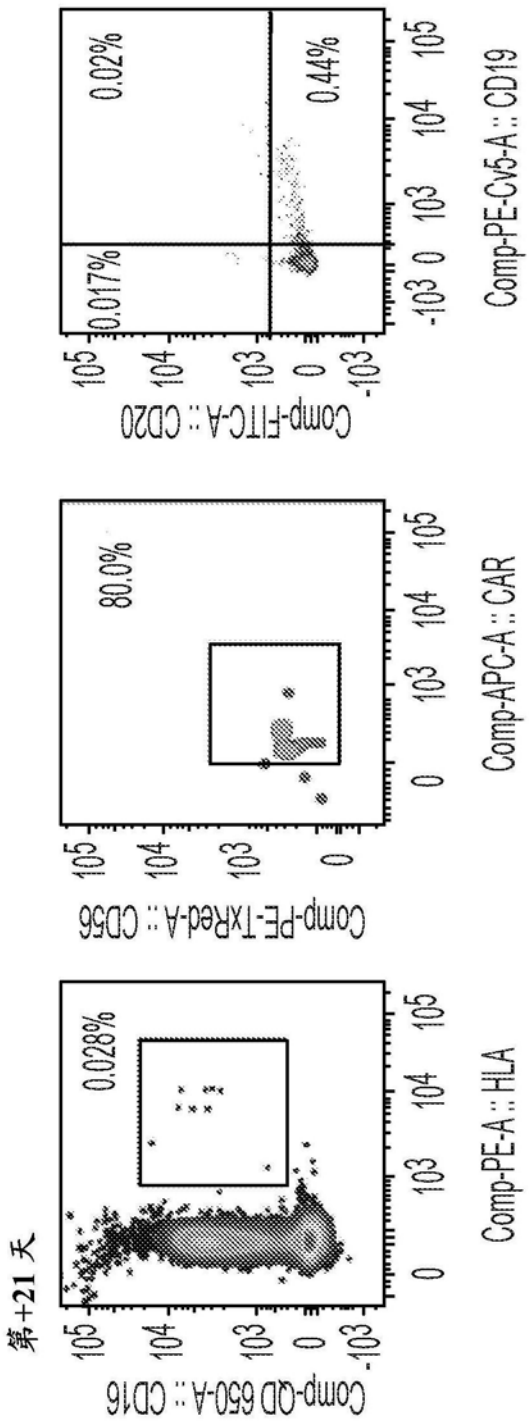

第+21 天
0.028%
80.0%
0.017%
0.02%
0.44%
Comp-QD 650-A :: CD16
Comp-PE-A :: HLA
Comp-PE-TxRed-A :: CD56
Comp-APC-A :: CAR
Comp-FITC-A :: CD20
Comp-PE-Cy5-A :: CD19

图16C(续)

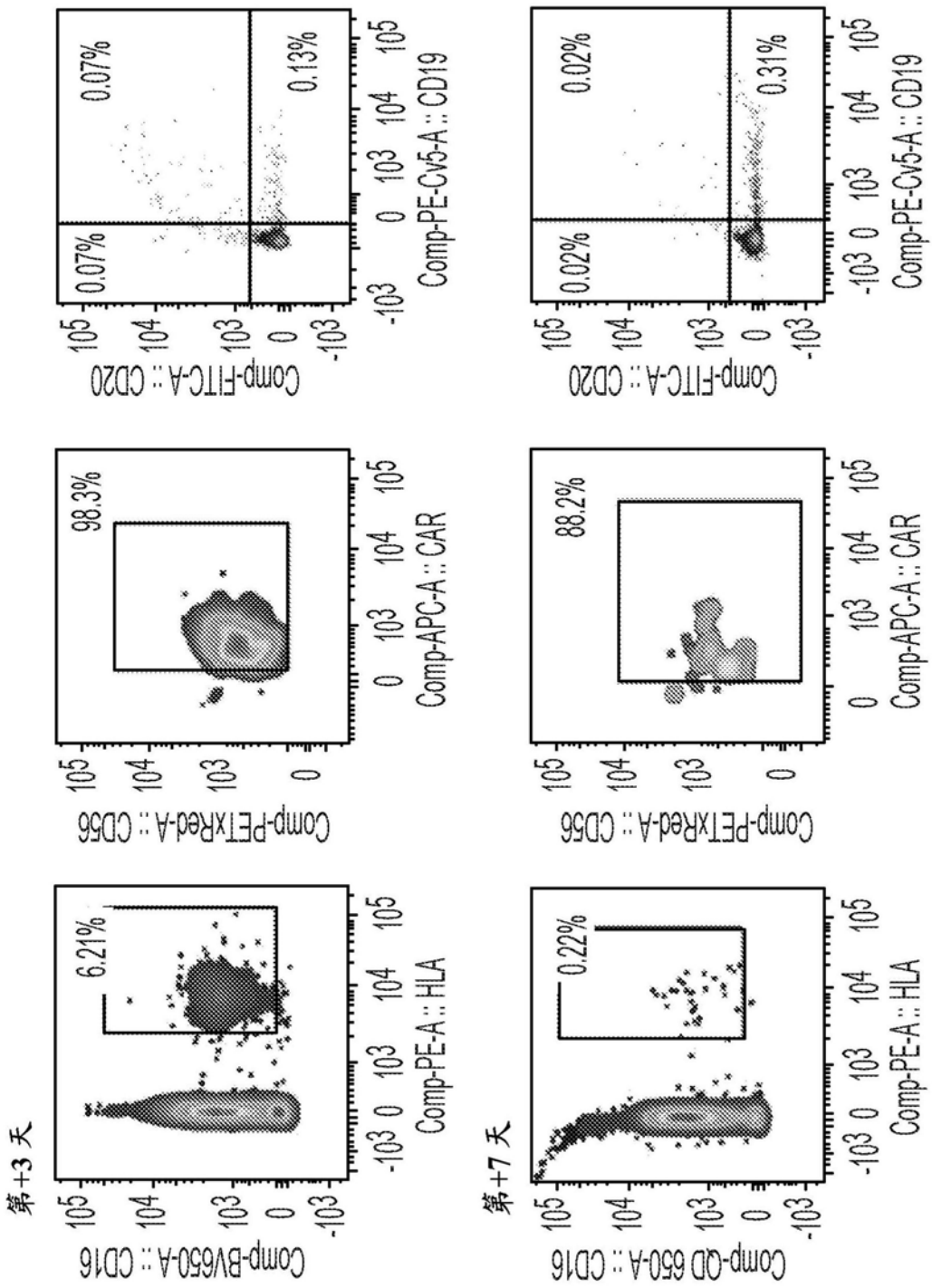

第+3 天
第+7 天
Comp-BV650-A :: CD16
Comp-PE-A :: HLA
6.21%
Comp-PETxRed-A :: CD56
Comp-APC-A :: CAR
98.3%
Comp-FITC-A :: CD20
Comp-PE-Cy5-A :: CD19
0.07%
0.07%
0.13%
Comp-QD 650-A :: CD16
0.22%
88.2%
0.02%
0.02%
0.31%

图16D

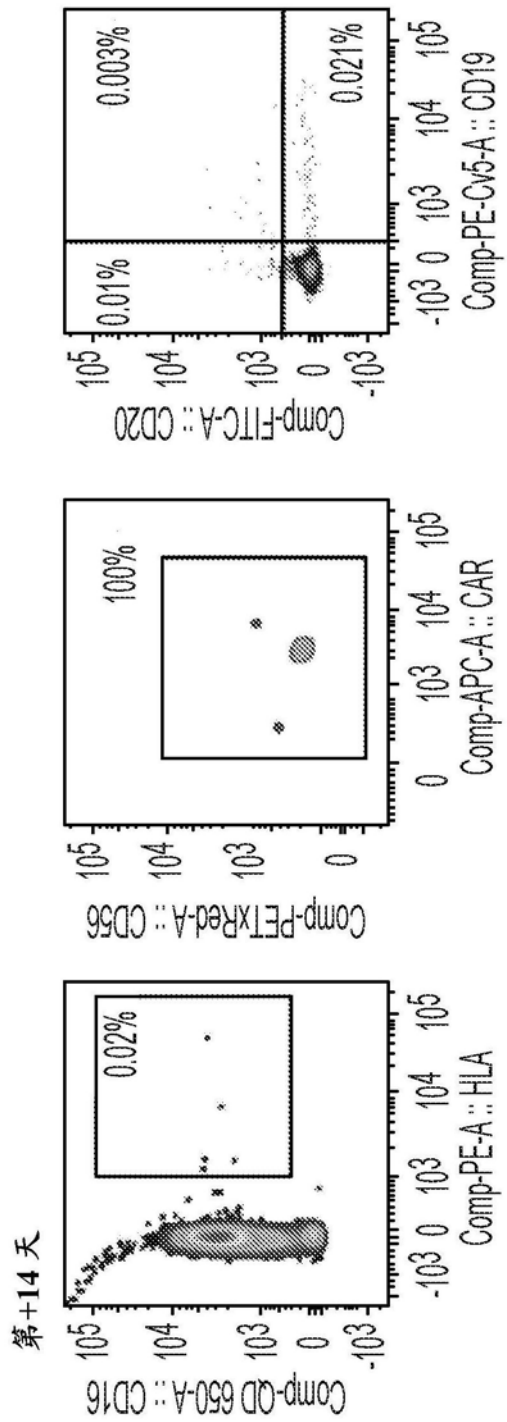

第+14天
Comp-QD 650-A :: CD16
Comp-PE-A :: HLA
0.02%
Comp-PETxRed-A :: CD56
Comp-APC-A :: CAR
100%
Comp-FITC-A :: CD20
Comp-PE-Cy5-A :: CD19
0.01%
0.003%
0.021%

图16D(续)

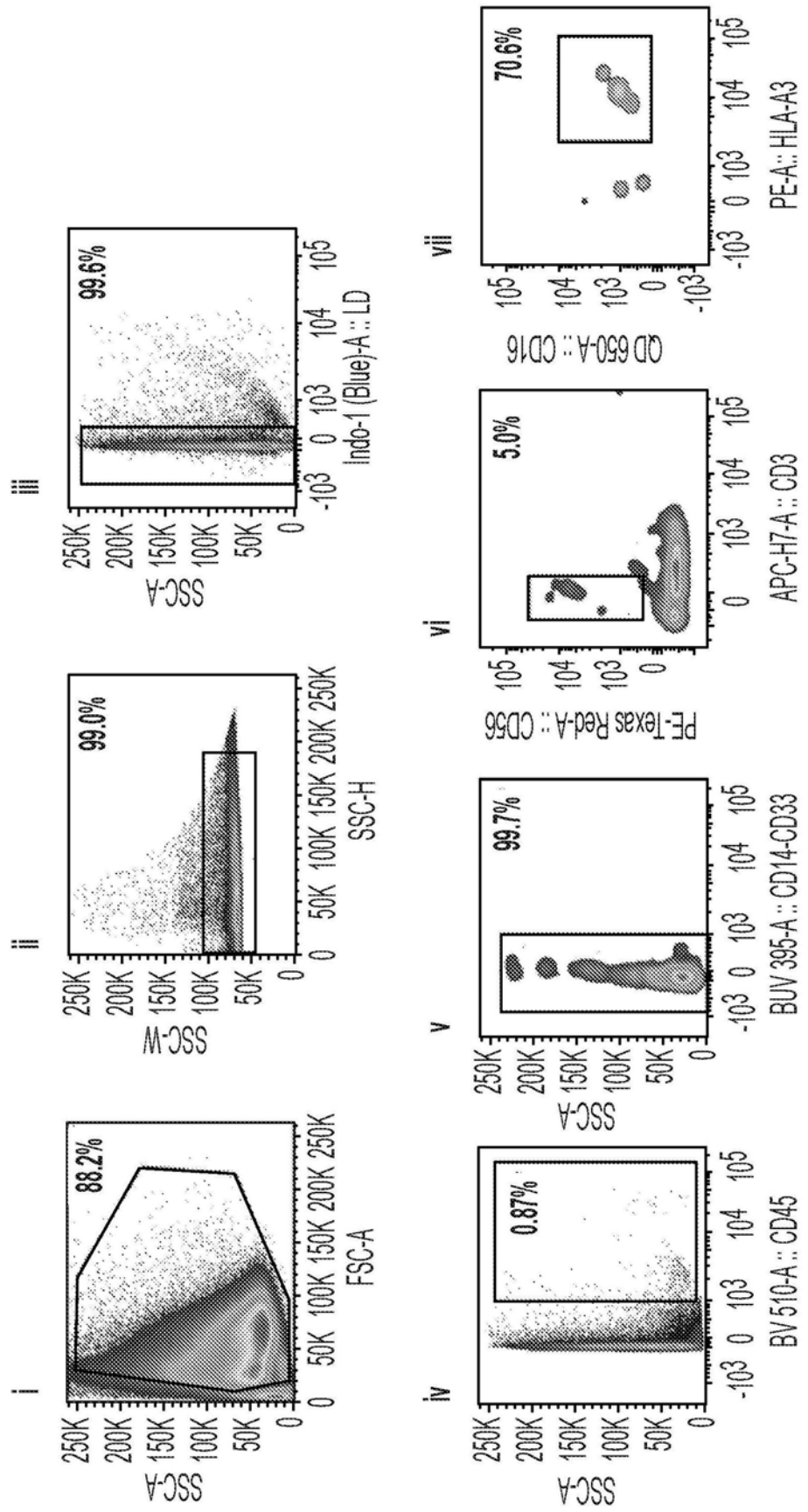

i
88.2%
SSC-A
FSC-A
ii
99.0%
SSC-W
SSC-H
iii
99.6%
SSC-A
Indo-1 (Blue)-A :: LD
iv
0.87%
SSC-A
BV 510-A :: CD45
v
99.7%
SSC-A
BUV 395-A :: CD14-CD33
vi
5.0%
PE-Texas Red-A :: CD56
APC-H7-A :: CD3
vii
70.6%
QD 650-A :: CD16
PE-A :: HLA-A3

图17

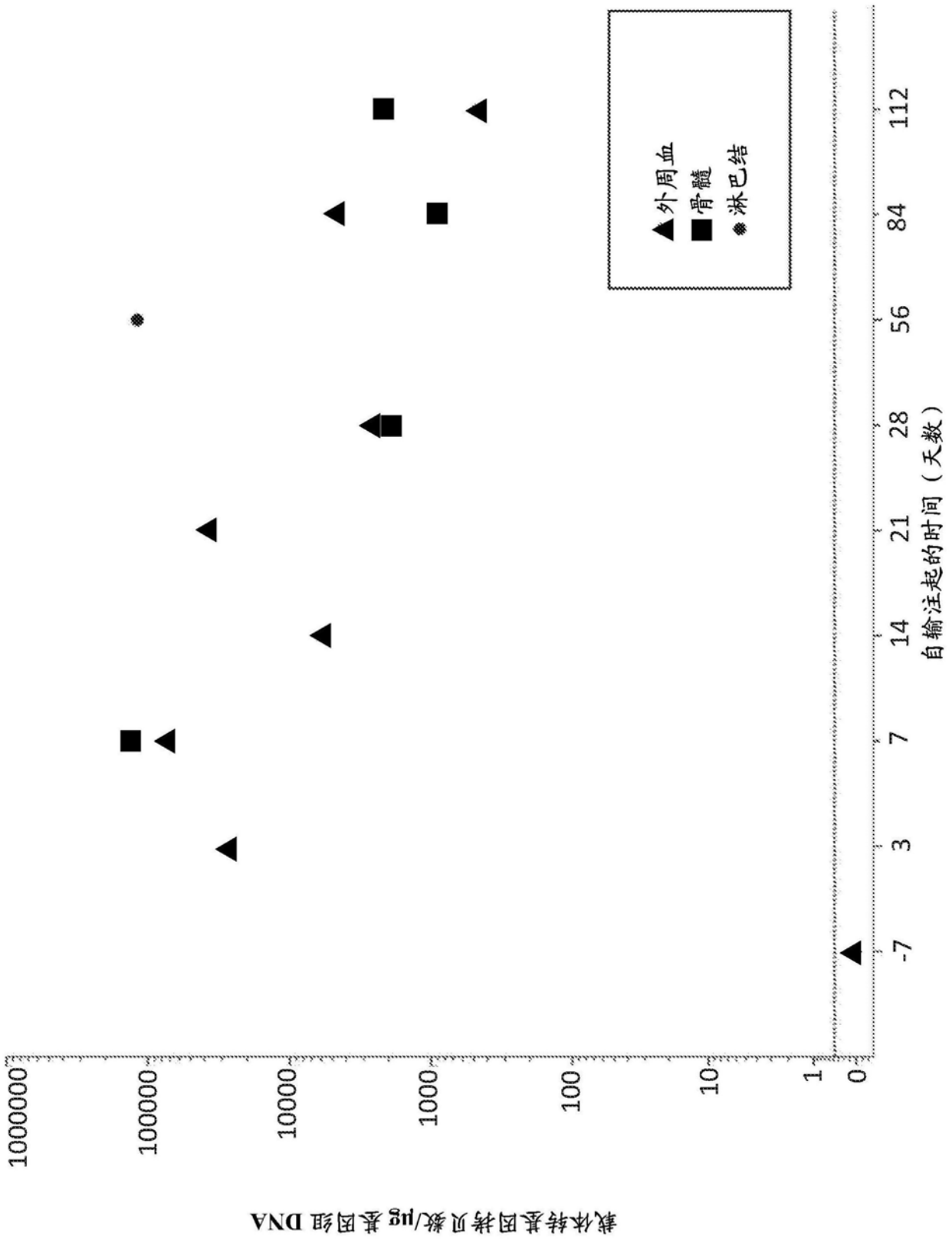

载体转基因拷贝数/μg 基因组 DNA
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
0
-7
3
7
14
21
28
56
84
112
自输注起的时间（天数）
外周血
骨髓
淋巴结

图18

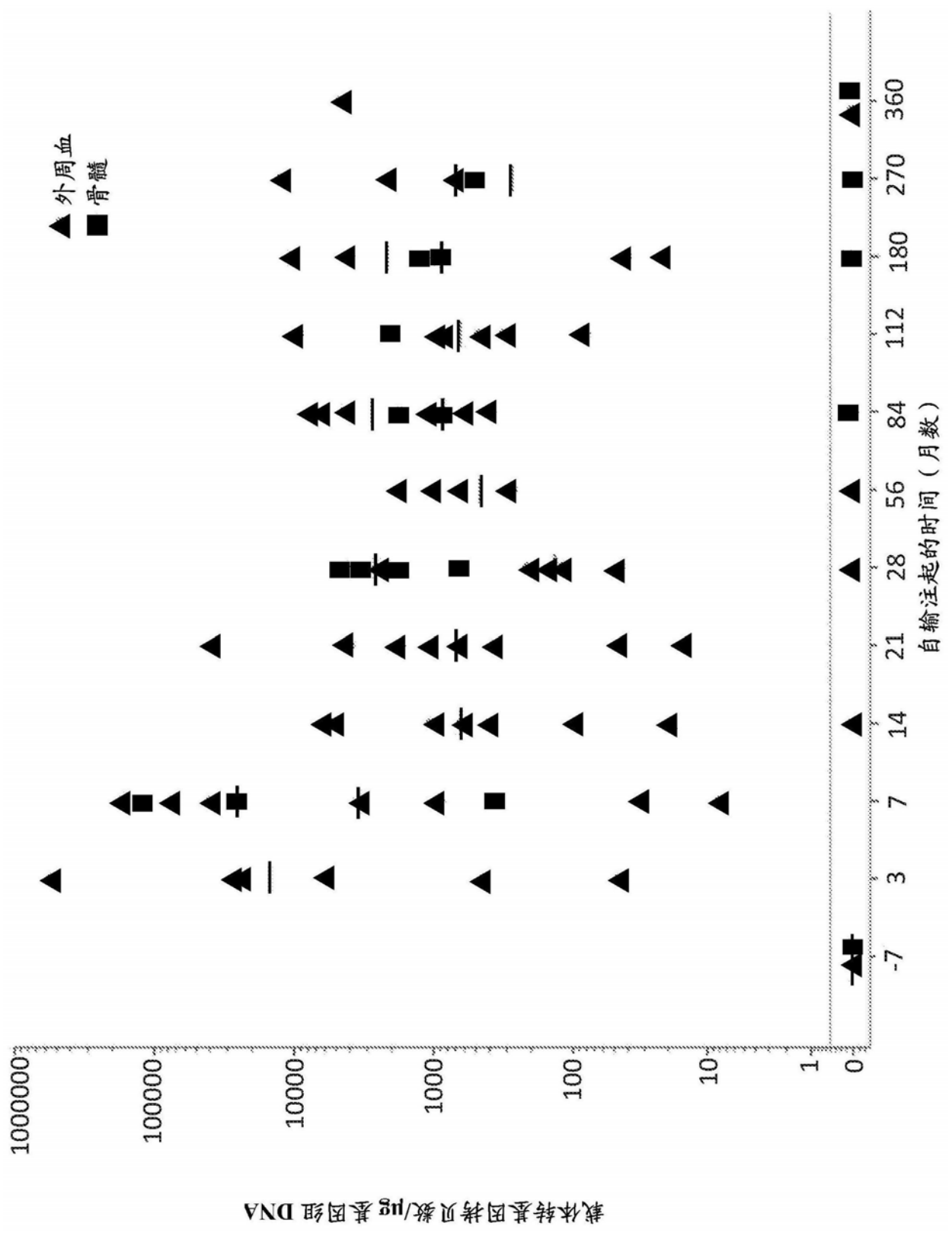

外周血
骨髓
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
0
-7
3
7
14
21
28
56
84
112
180
270
360
自输注起的时间（月数）
载体转基因拷贝数/μg 基因组 DNA

图19

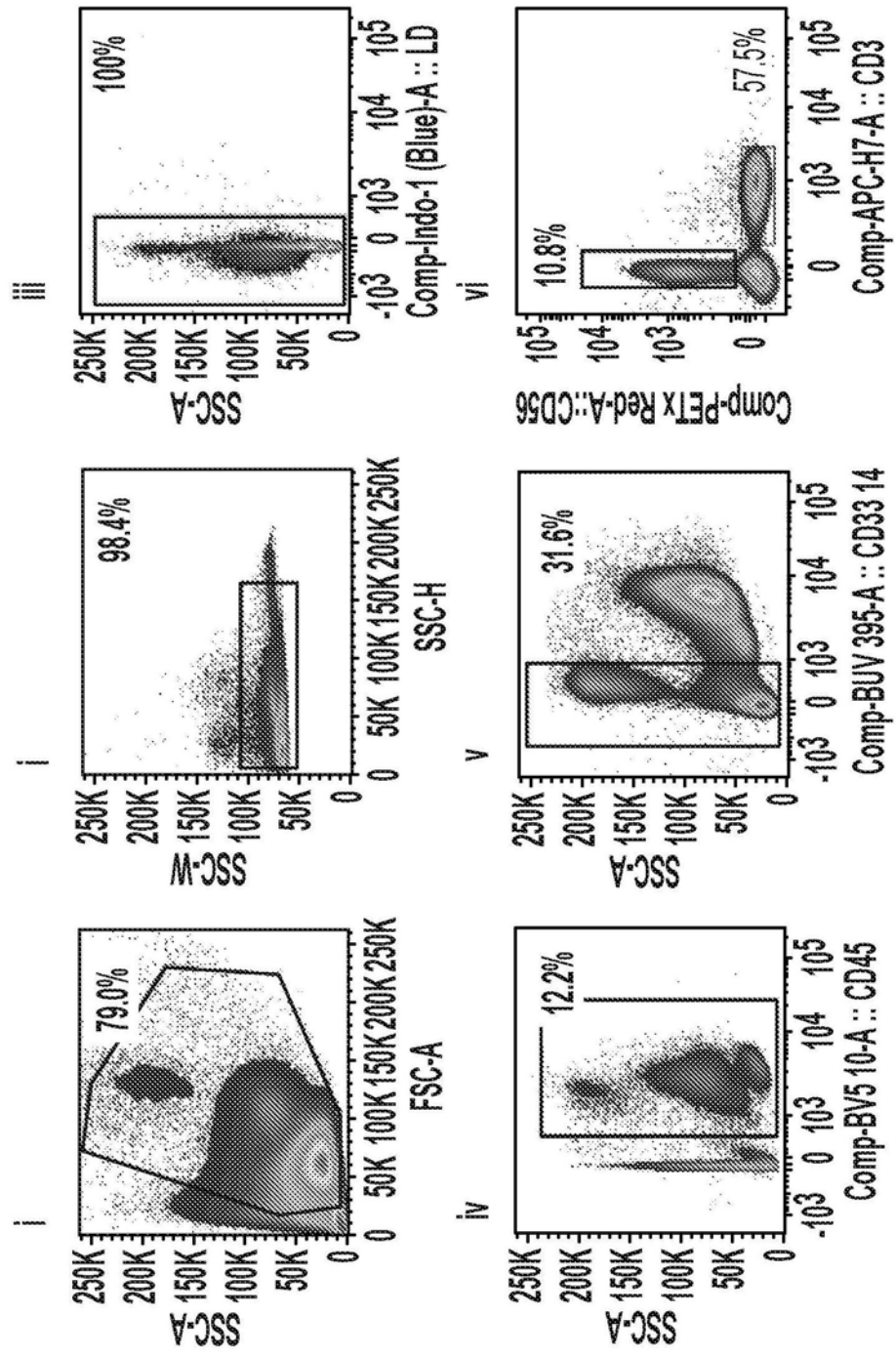

i
79.0%
SSC-A
FSC-A
ii
98.4%
SSC-W
SSC-H
iii
100%
SSC-A
Comp-Indo-1 (Blue)-A :: LD
iv
12.2%
SSC-A
Comp-BV510-A :: CD45
v
31.6%
SSC-A
Comp-BUV395-A :: CD3314
vi
10.8%
57.5%
Comp-PETx Red-A::CD56
Comp-APC-H7-A :: CD3

图20

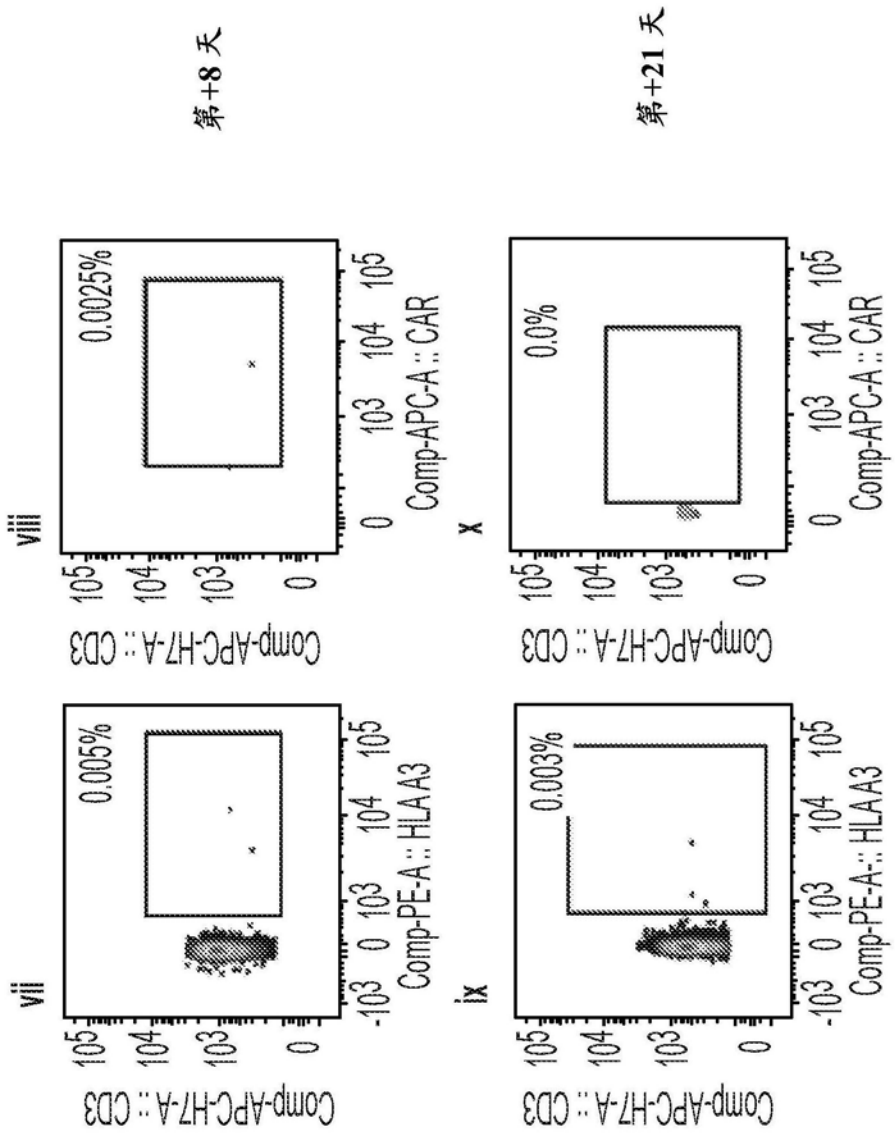

第+8 天
第+21 天
viii
0.0025%
Comp-APC-A :: CAR
Comp-APC-H7-A :: CD3
x
0.0%
Comp-APC-A :: CAR
Comp-APC-H7-A :: CD3
vii
0.005%
Comp-PE-A :: HLA A3
Comp-APC-H7-A :: CD3
ix
0.003%
Comp-PE-A :: HLA A3
Comp-APC-H7-A :: CD3

图20(续)

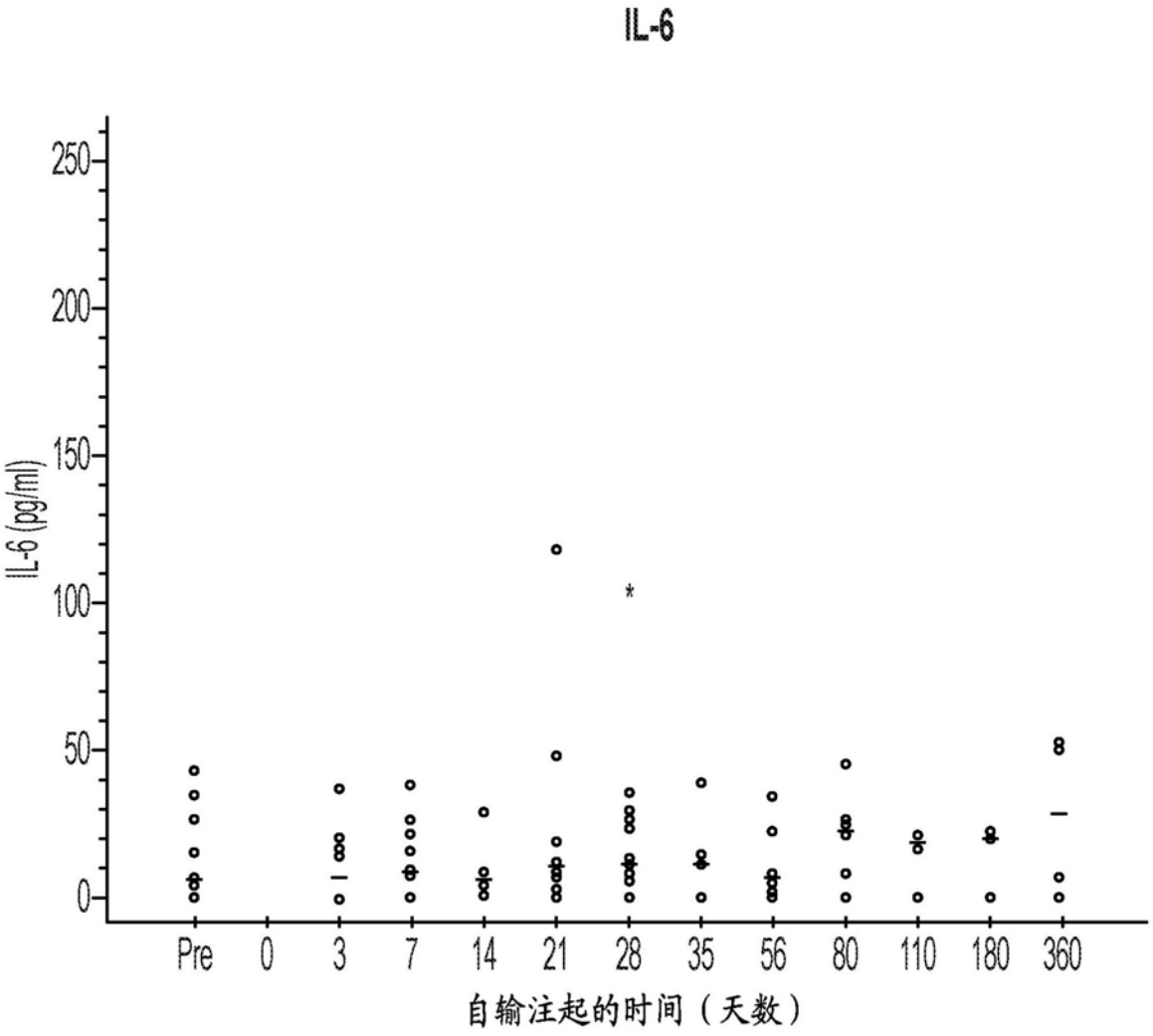

IL-6
IL-6 (pg/ml)
250
200
150
100
50
0
Pre
0
3
7
14
21
28
35
56
80
110
180
360
自输注起的时间（天数）

图21A

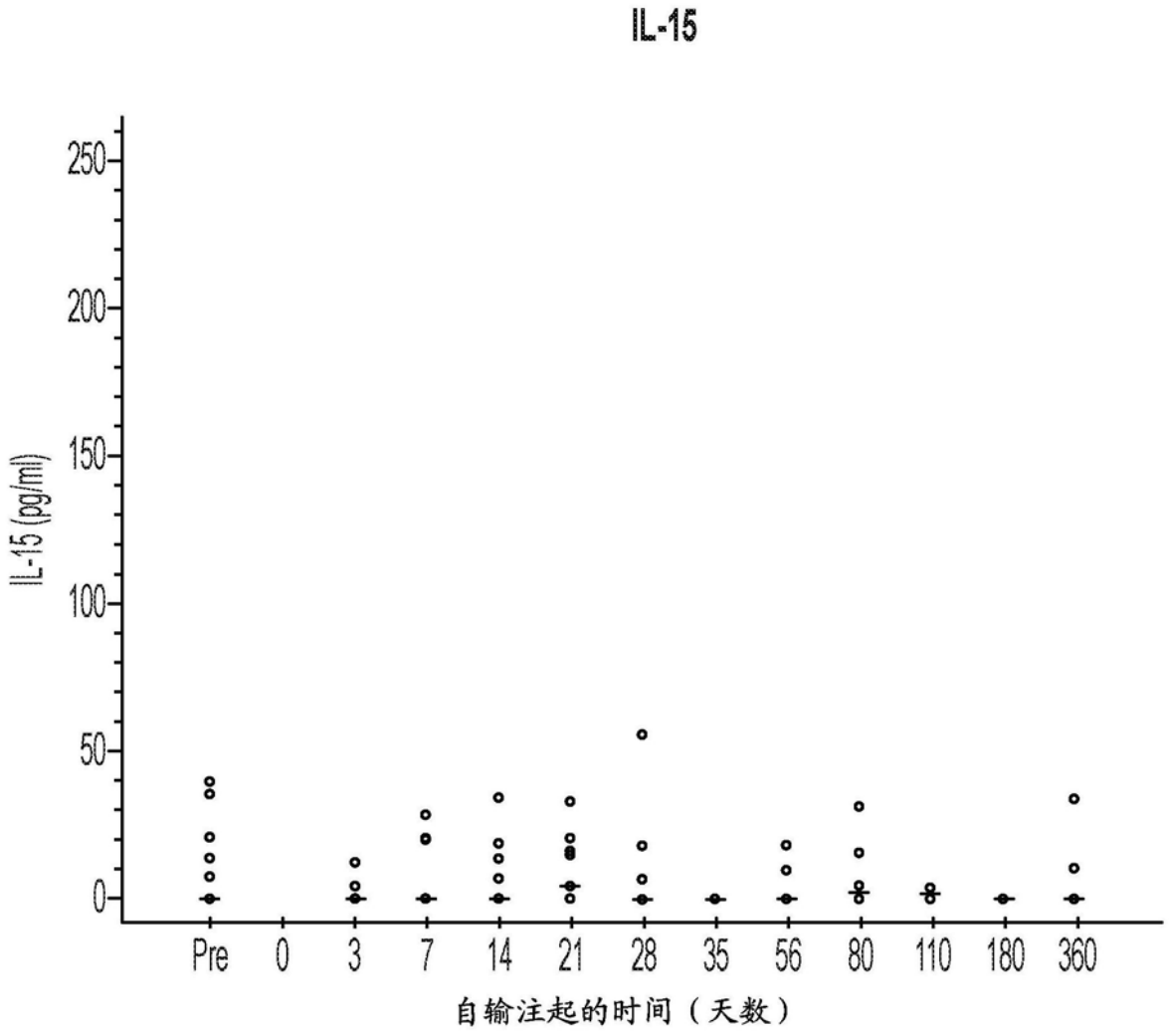

IL-15
IL-15 (pg/ml)
250
200
150
100
50
0
Pre
0
3
7
14
21
28
35
56
80
110
180
360
自输注起的时间（天数）

图21B

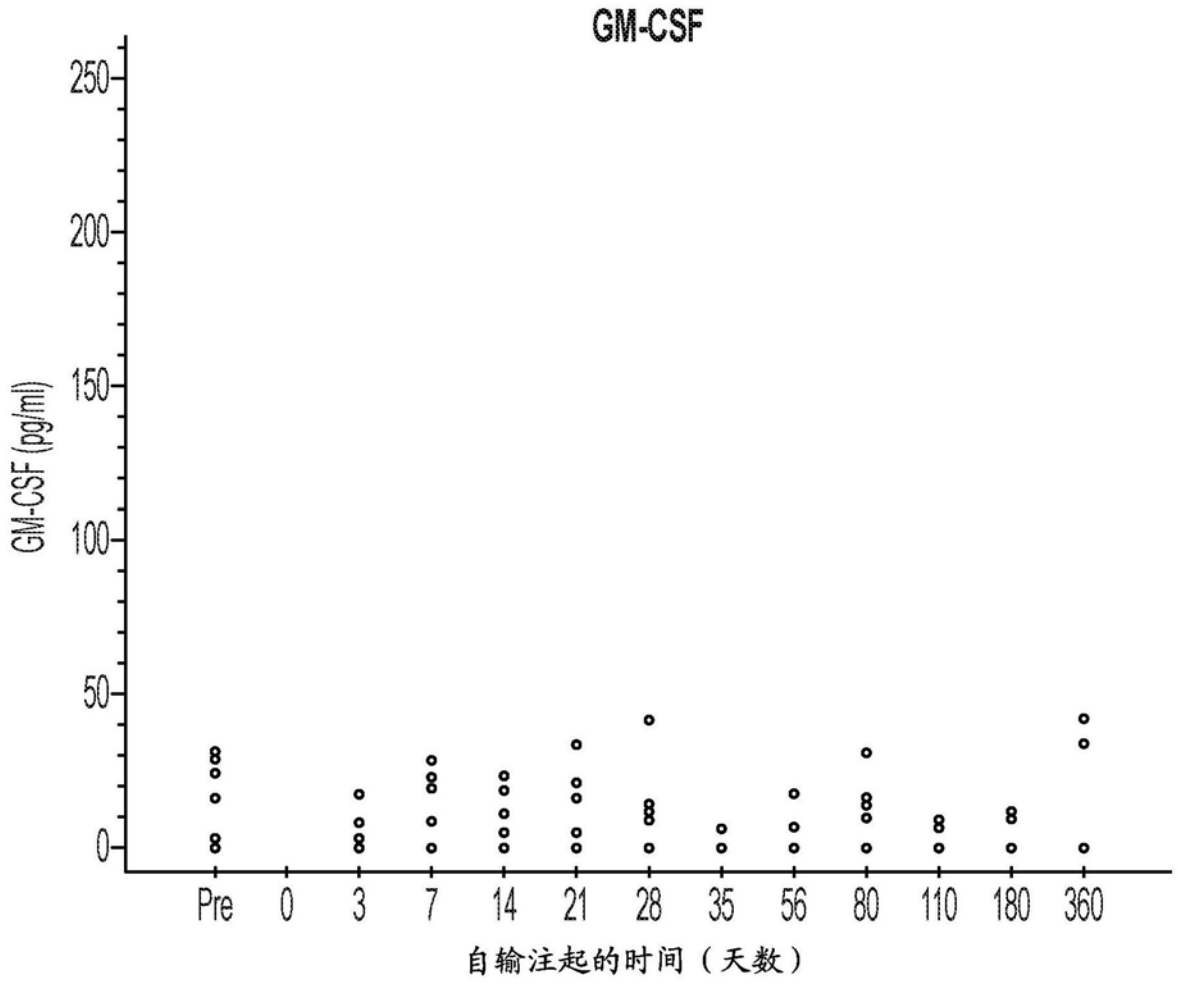

GM-CSF
GM-CSF (pg/ml)
250
200
150
100
50
0
Pre
0
3
7
14
21
28
35
56
80
110
180
360
自输注起的时间（天数）

图21C

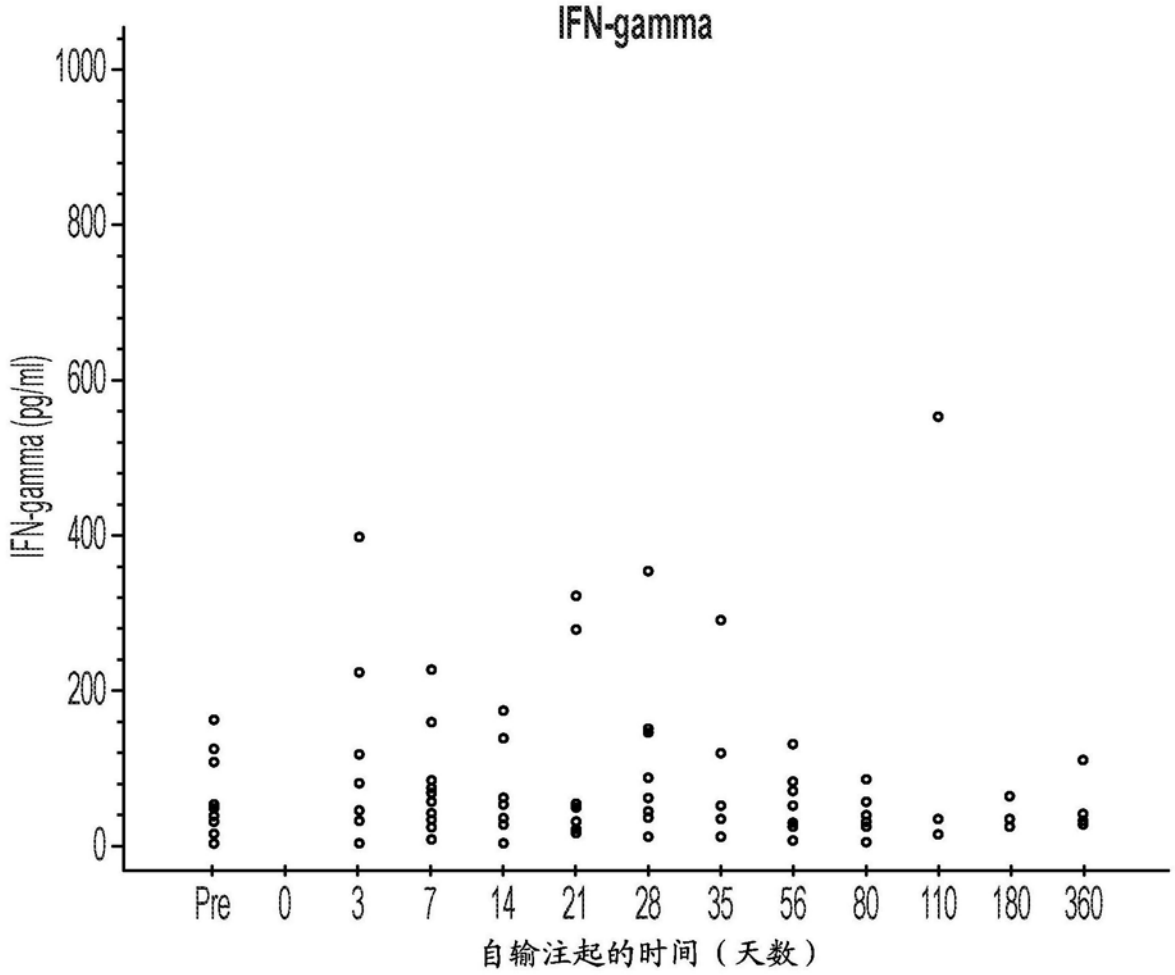

IFN-gamma
IFN-gamma (pg/ml)
1000
800
600
400
200
0
Pre
0
3
7
14
21
28
35
56
80
110
180
360
自输注起的时间（天数）

图21D

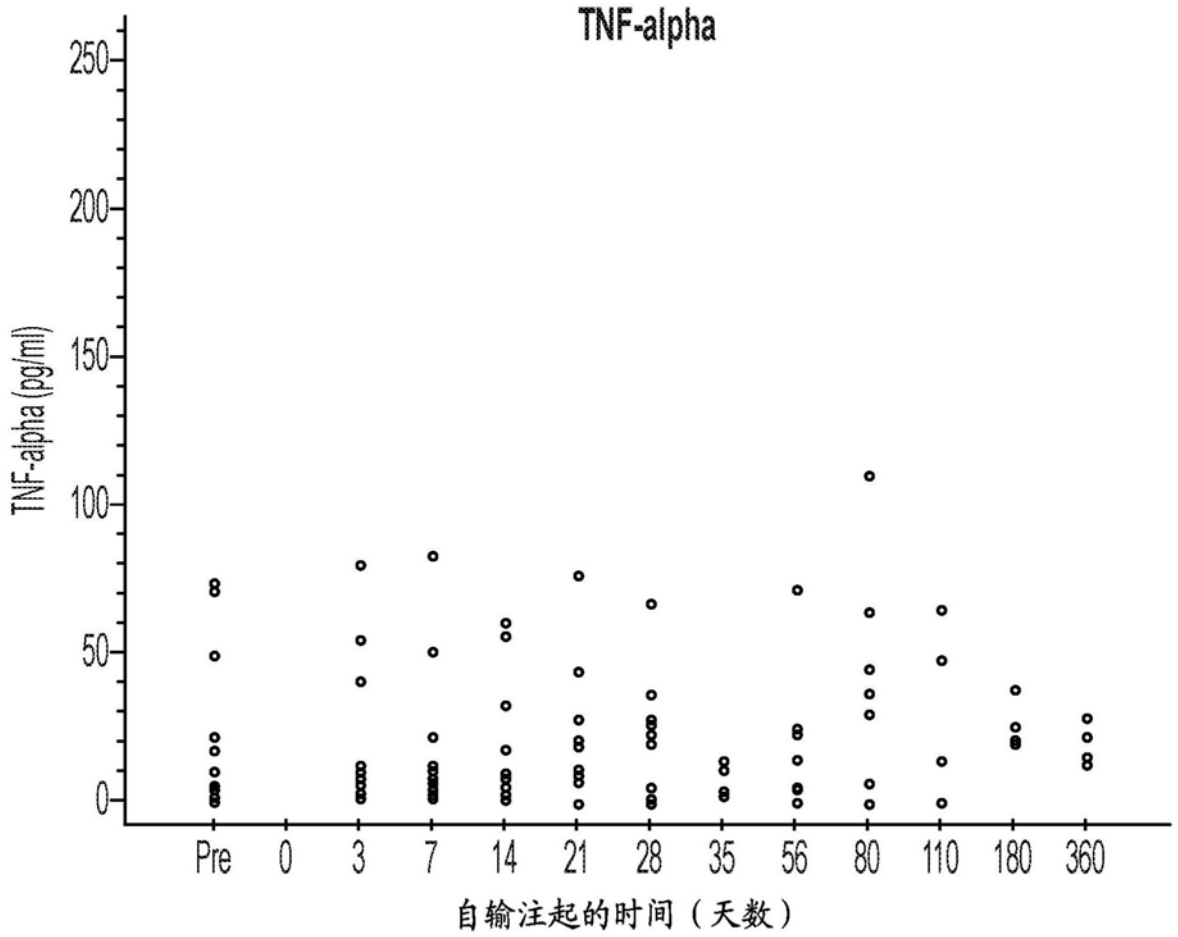

TNF-alpha
TNF-alpha (pg/ml)
250
200
150
100
50
0
Pre
0
3
7
14
21
28
35
56
80
110
180
360
自输注起的时间（天数）

图21E

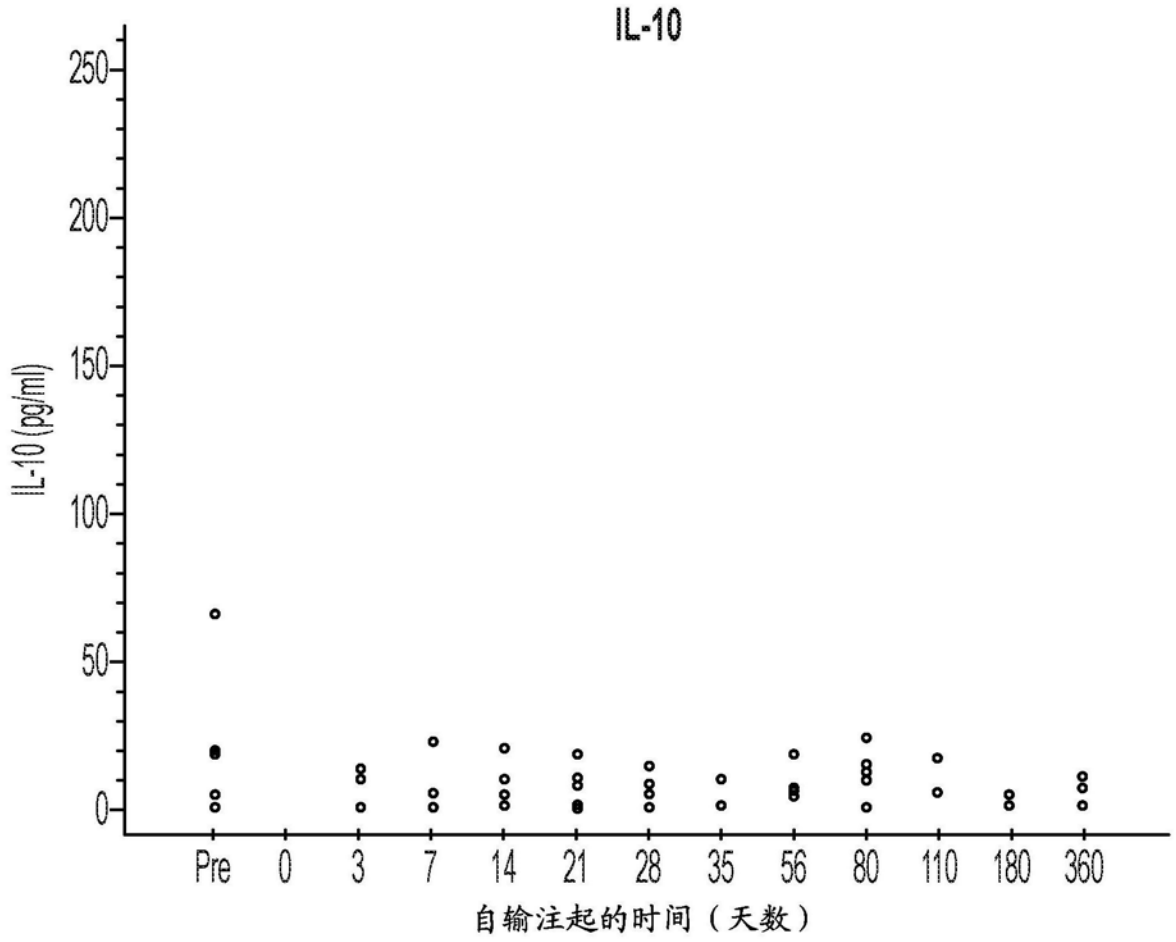

IL-10
IL-10 (pg/ml)
250
200
150
100
50
0
Pre
0
3
7
14
21
28
35
56
80
110
180
360
自输注起的时间（天数）

图21F

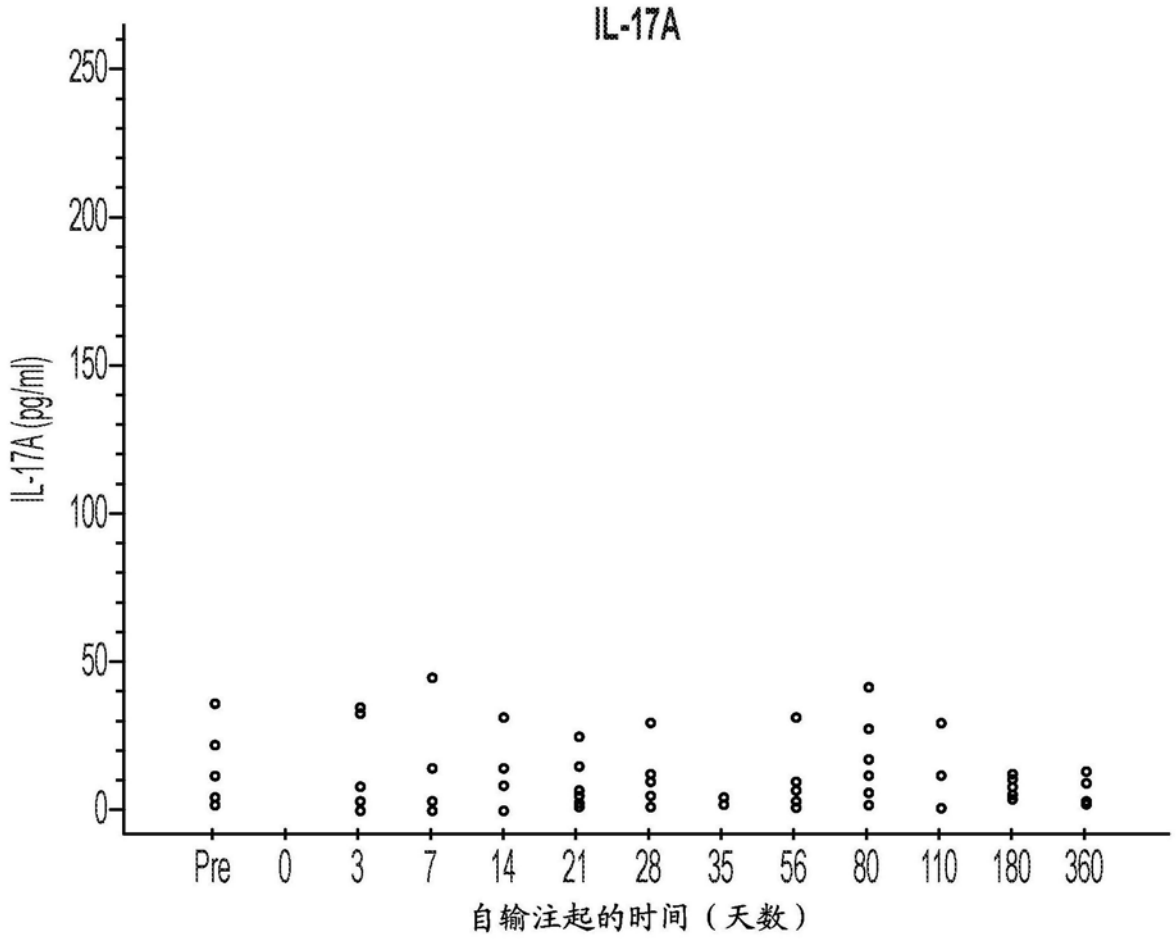

IL-17A
IL-17A (pg/ml)
250
200
150
100
50
0
Pre
0
3
7
14
21
28
35
56
80
110
180
360
自输注起的时间（天数）

图21G

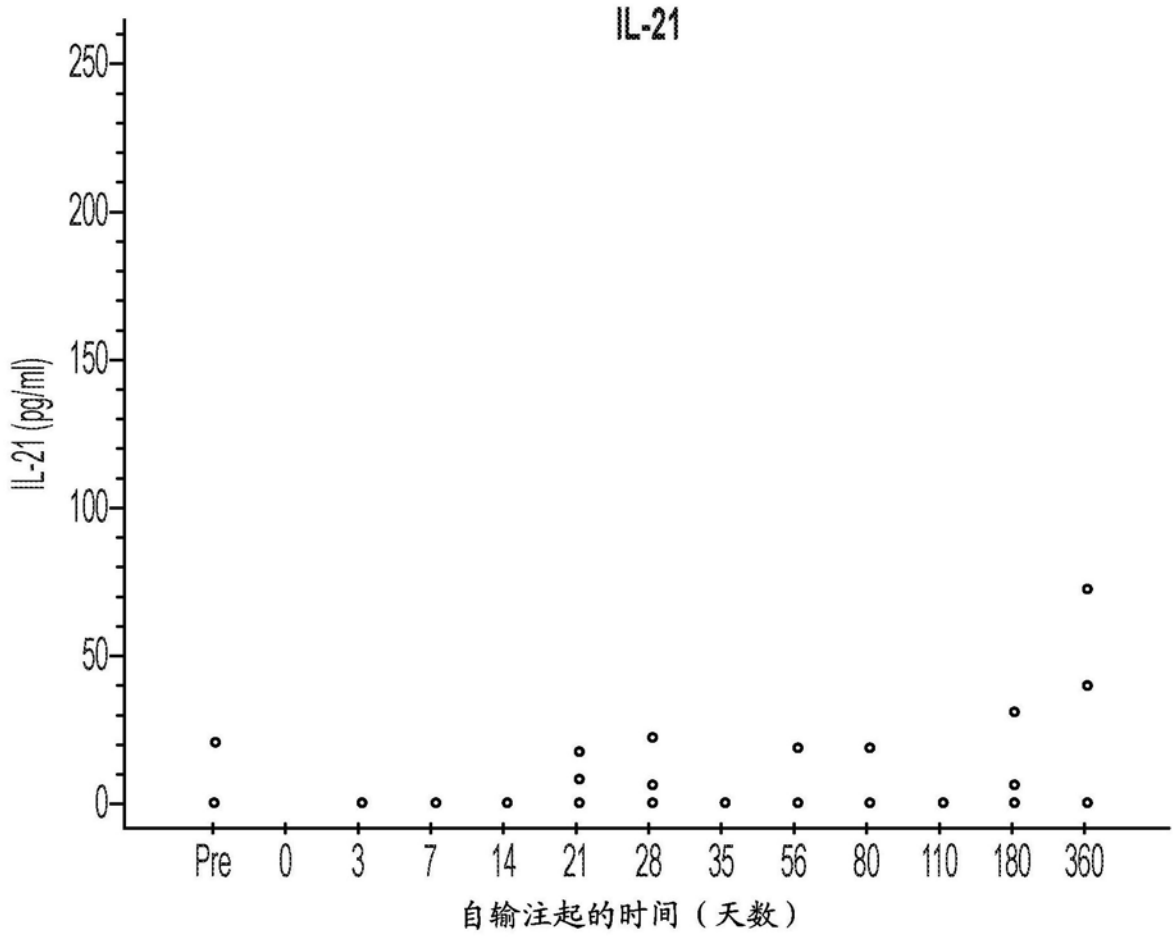

IL-21
IL-21 (pg/ml)
250
200
150
100
50
0
Pre
0
3
7
14
21
28
35
56
80
110
180
360
自输注起的时间（天数）

图21H

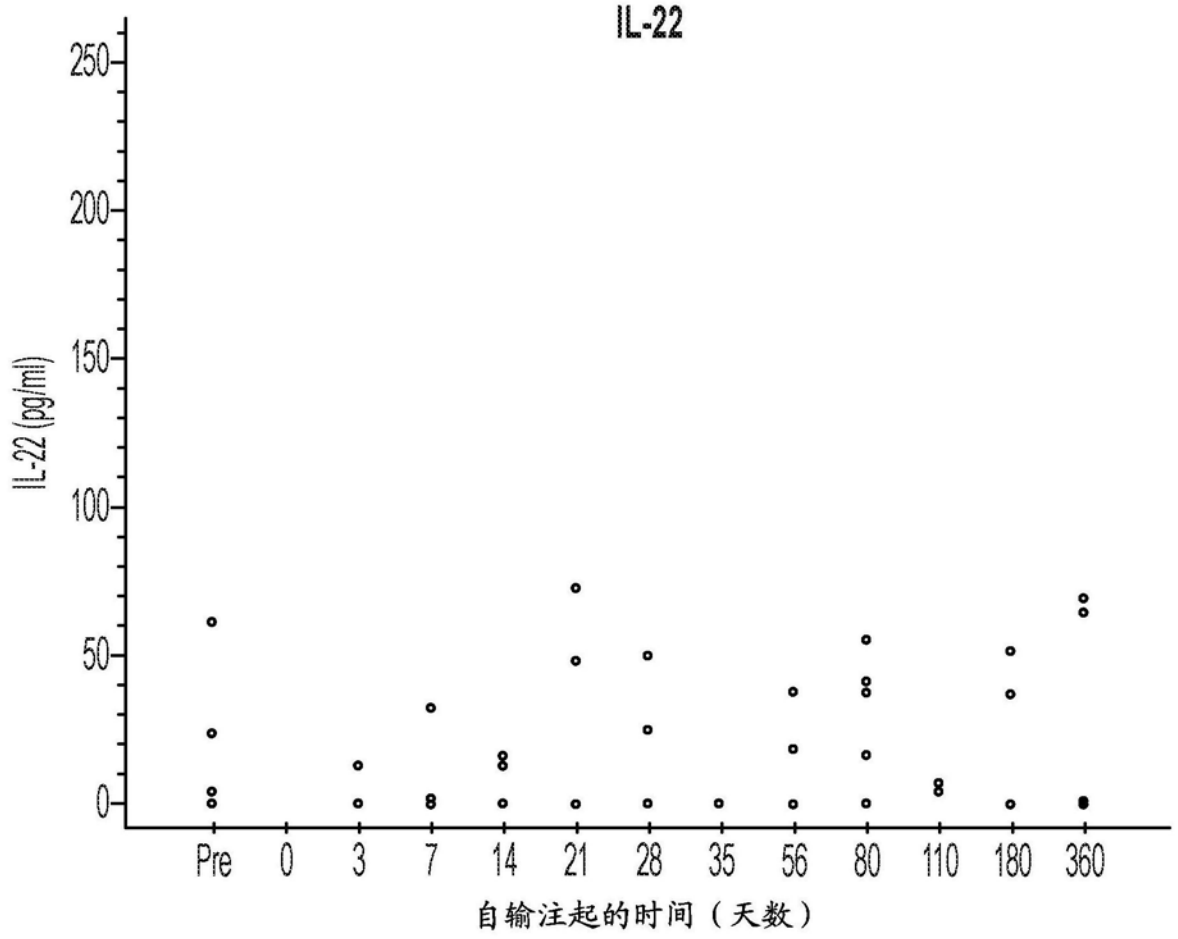

IL-22
IL-22 (pg/ml)
250
200
150
100
50
0
Pre
0
3
7
14
21
28
35
56
80
110
180
360
自输注起的时间（天数）

图21I

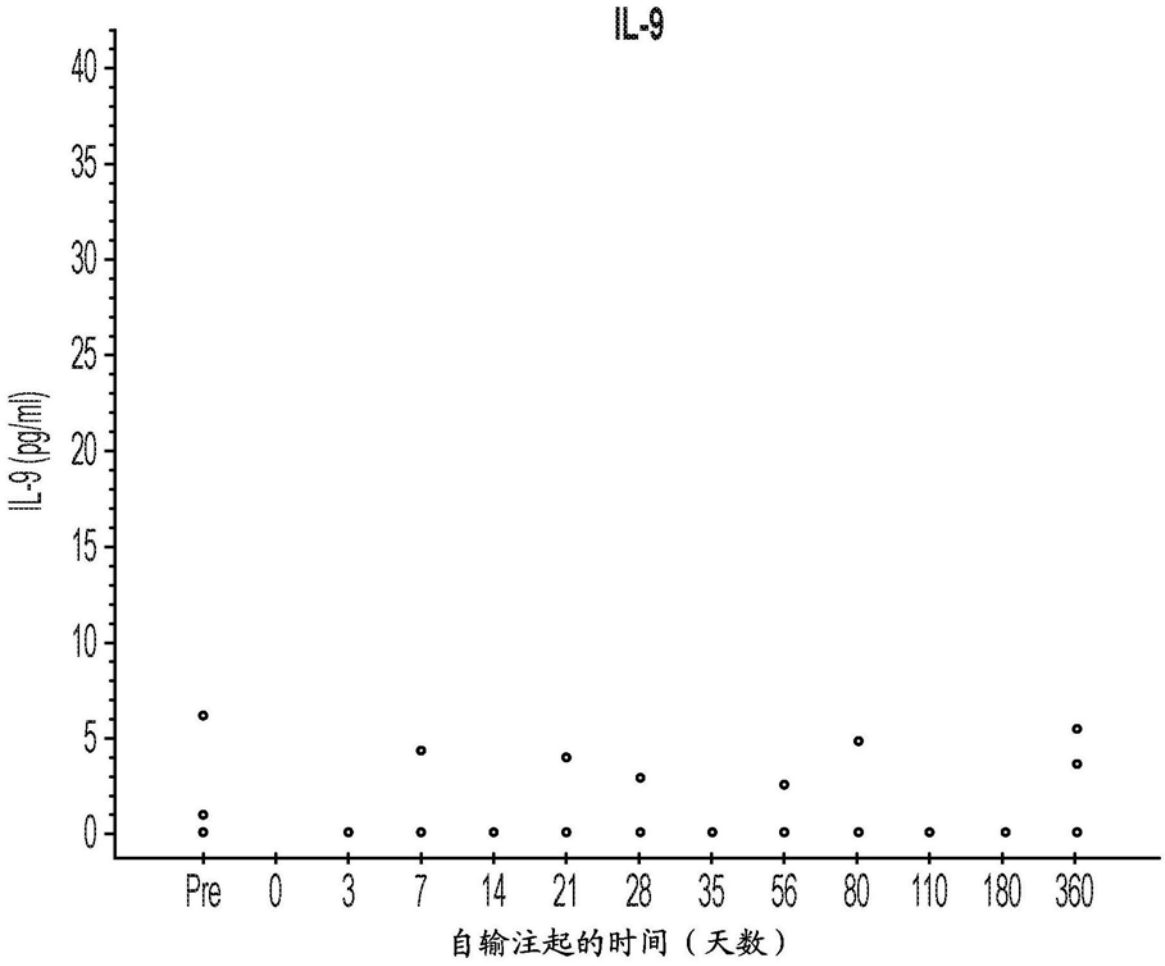

IL-9
IL-9 (pg/ml)
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Pre
0
3
7
14
21
28
35
56
80
110
180
360
自输注起的时间（天数）

图21J

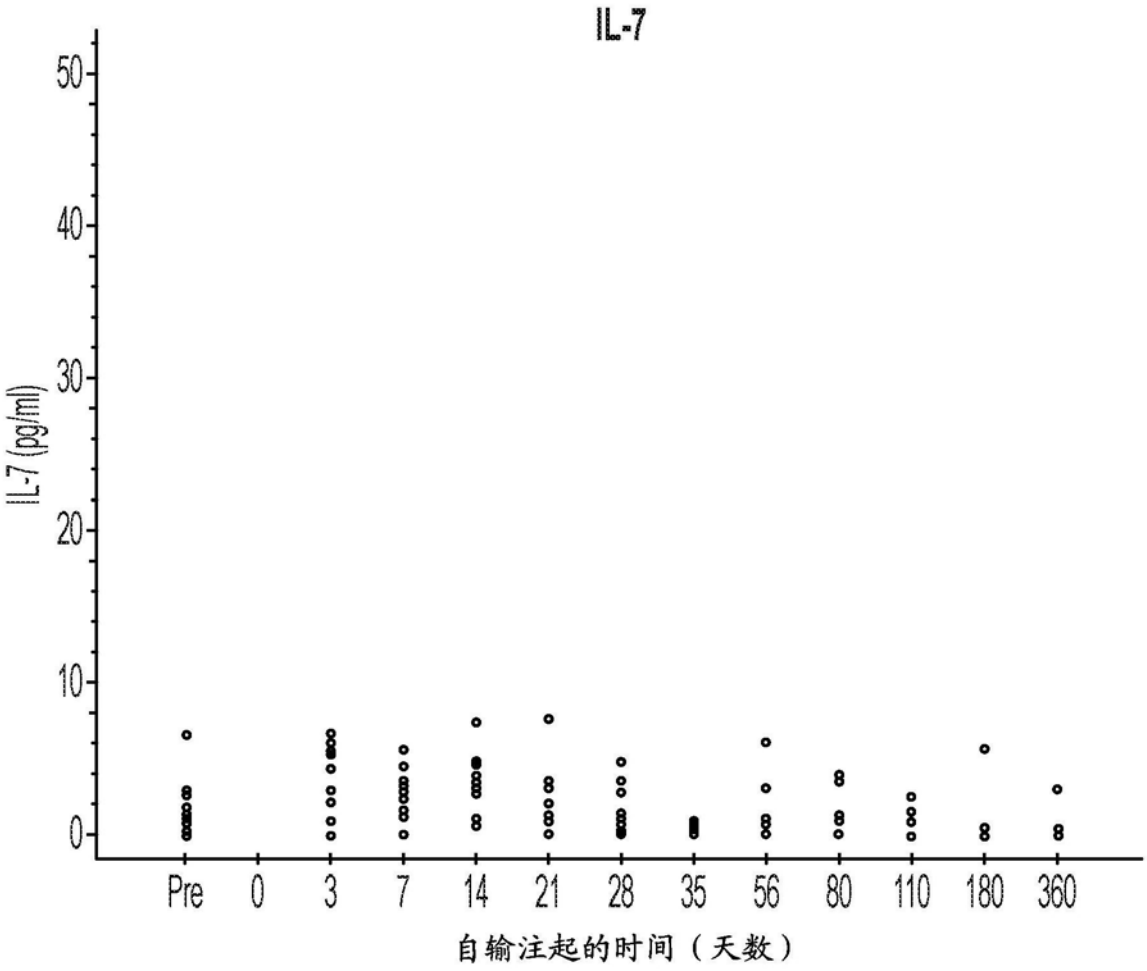

IL-7
IL-7 (pg/ml)
50
40
30
20
10
0
Pre
0
3
7
14
21
28
35
56
80
110
180
360
自输注起的时间（天数）

图21K

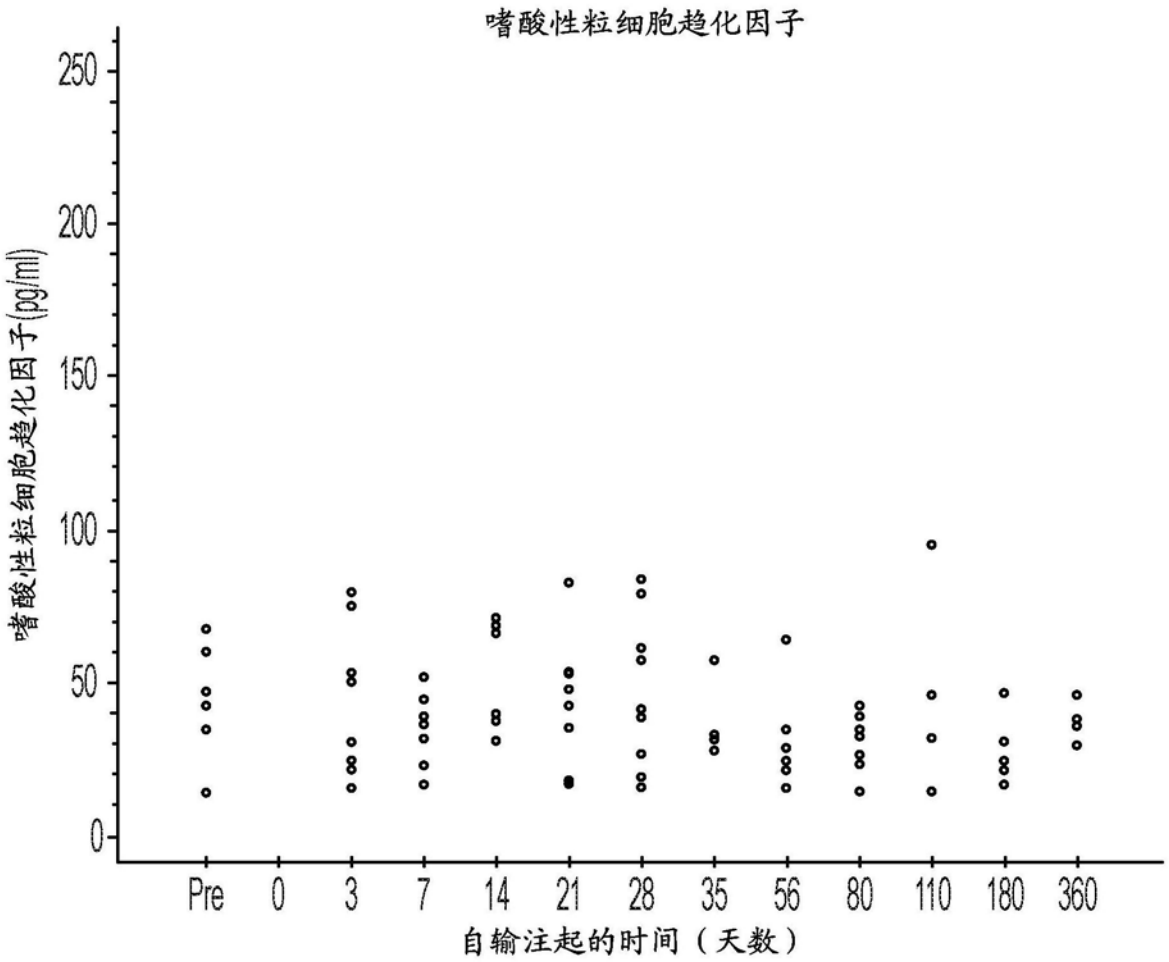

嗜酸性粒细胞趋化因子
嗜酸性粒细胞趋化因子(pg/ml)
250
200
150
100
50
0
Pre
0
3
7
14
21
28
35
56
80
110
180
360
自输注起的时间（天数）

图21L

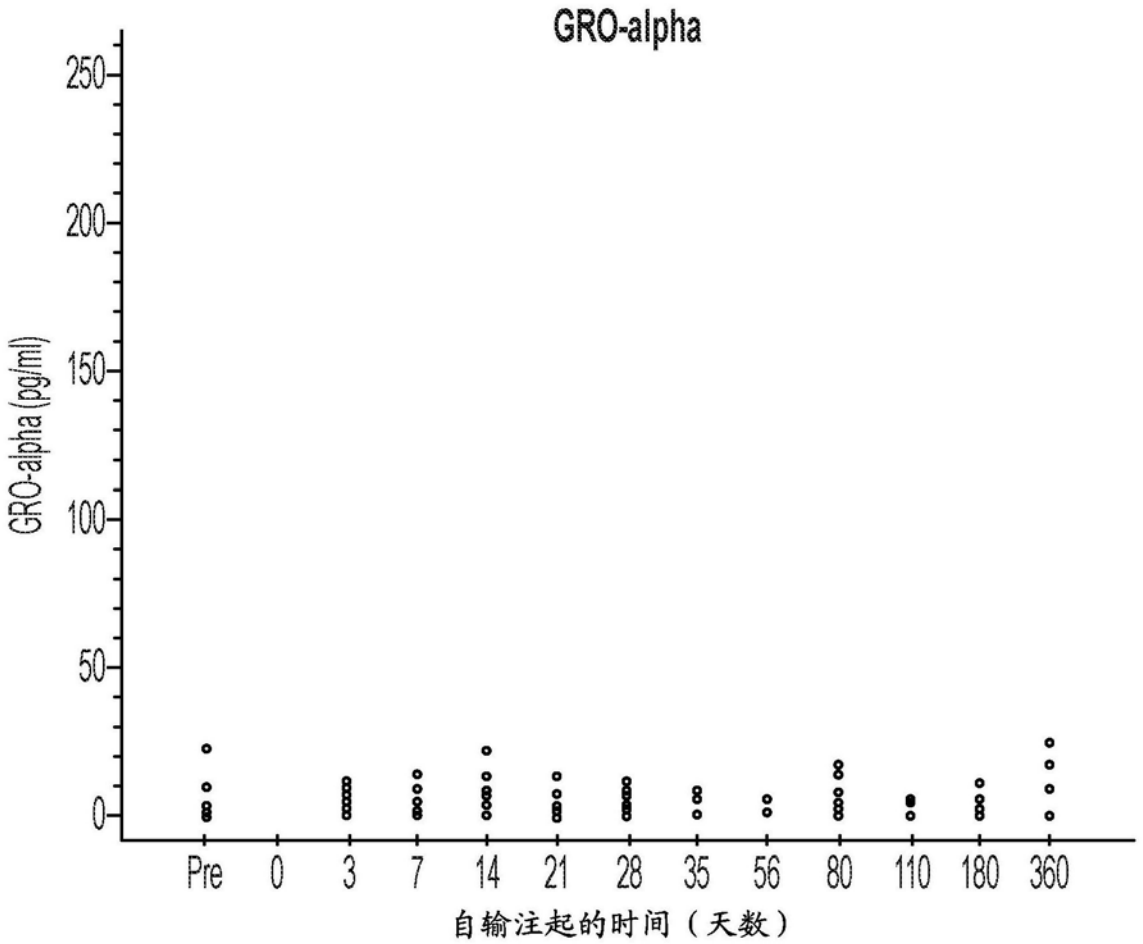

GRO-alpha
GRO-alpha (pg/ml)
250
200
150
100
50
0
Pre
0
3
7
14
21
28
35
56
80
110
180
360
自输注起的时间（天数）

图21M

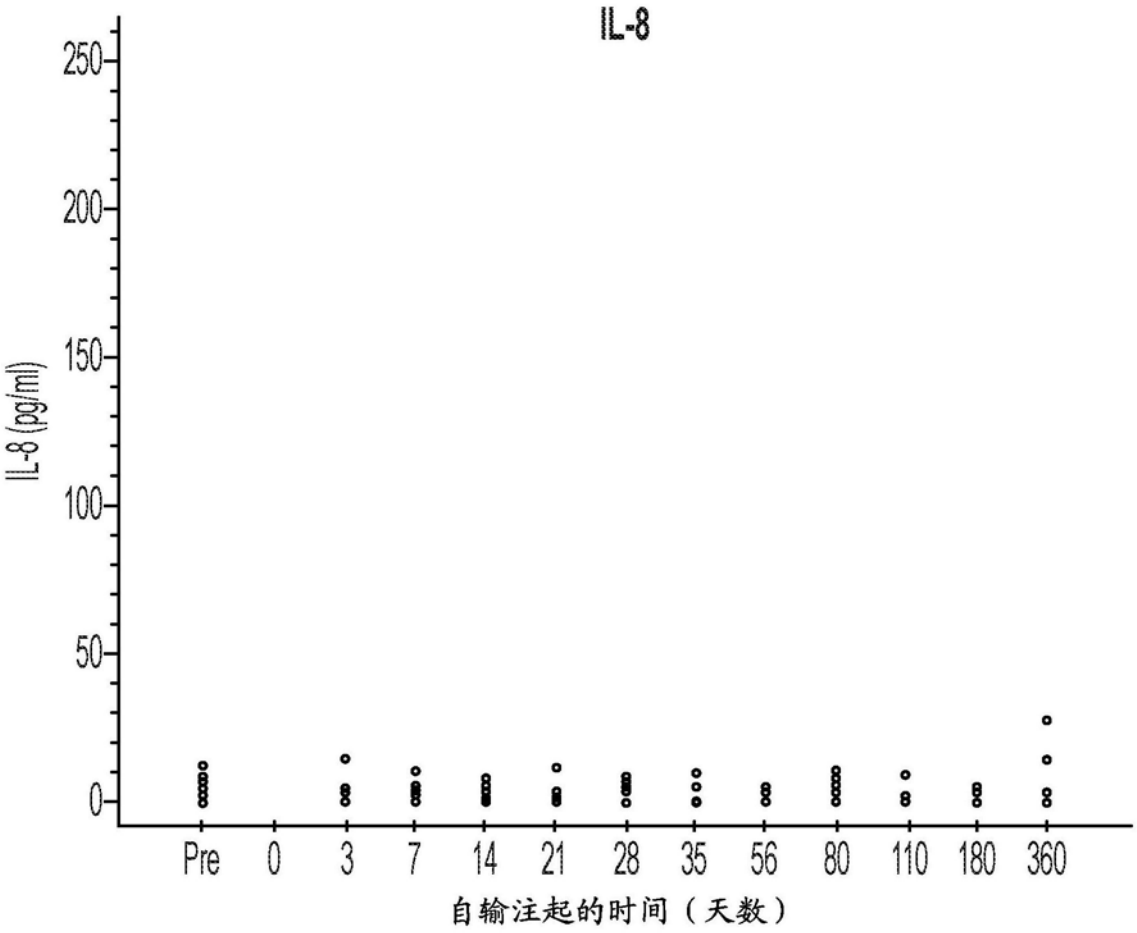

IL-8
IL-8 (pg/ml)
250
200
150
100
50
0
Pre
0
3
7
14
21
28
35
56
80
110
180
360
自输注起的时间（天数）

图21N

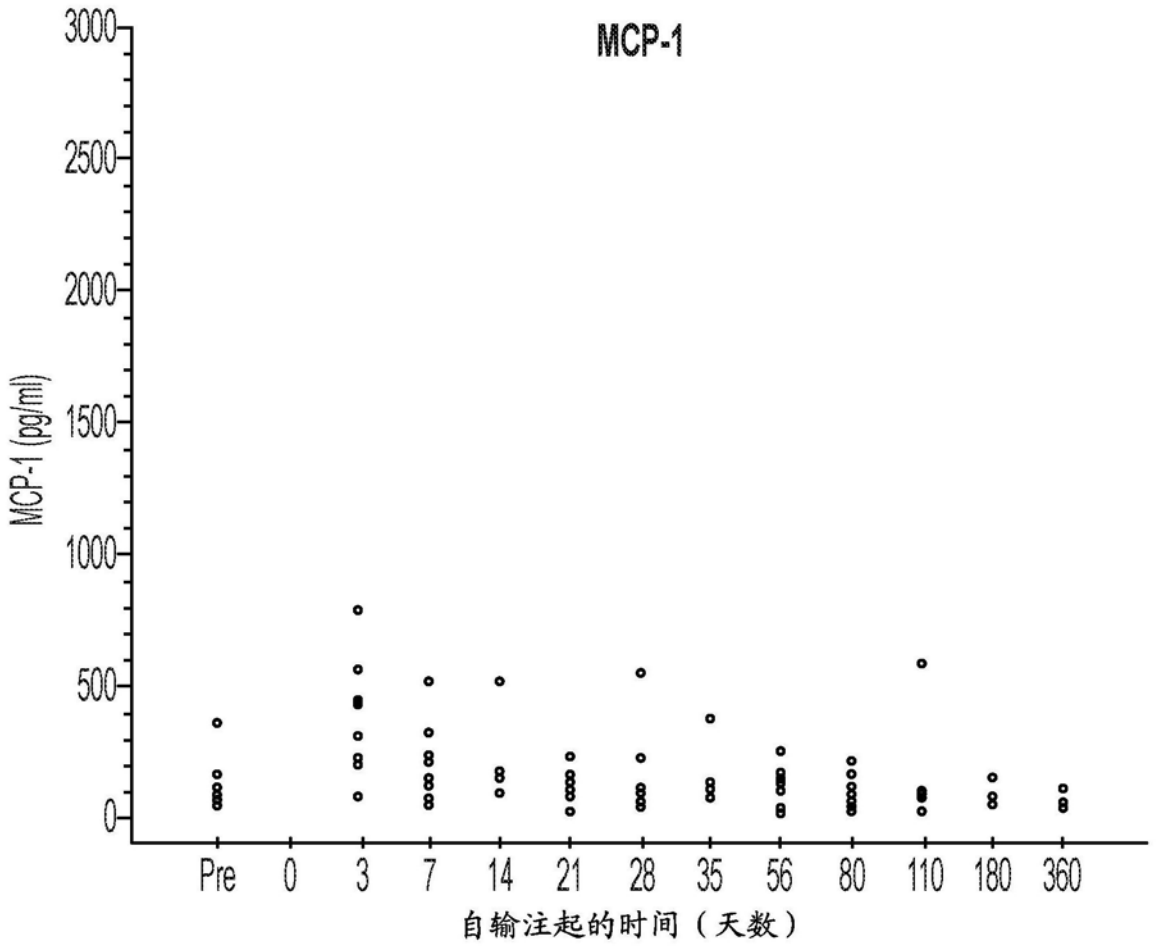

MCP-1
MCP-1 (pg/ml)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Pre
0
3
7
14
21
28
35
56
80
110
180
360
自输注起的时间（天数）

图210

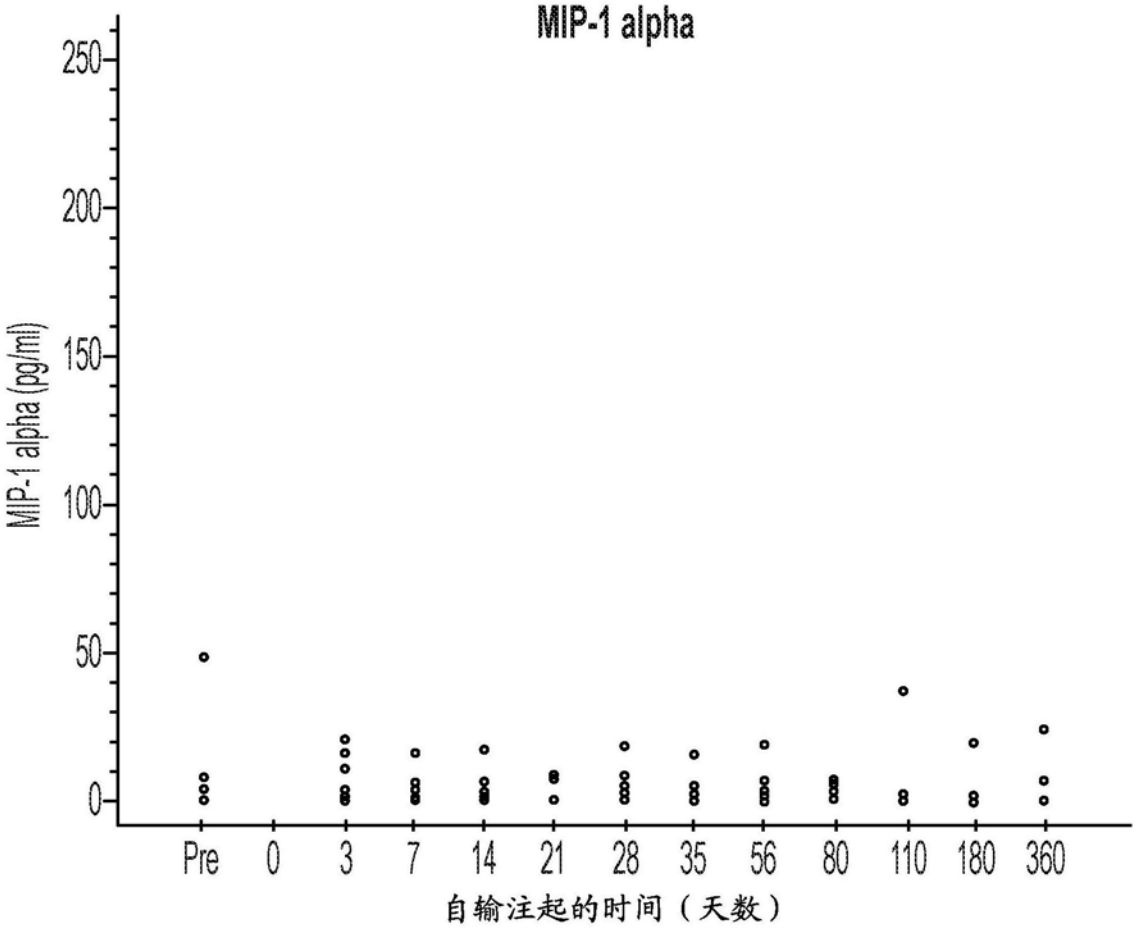

MIP-1 alpha
MIP-1 alpha (pg/ml)
250
200
150
100
50
0
Pre
0
3
7
14
21
28
35
56
80
110
180
360
自输注起的时间（天数）

图21P

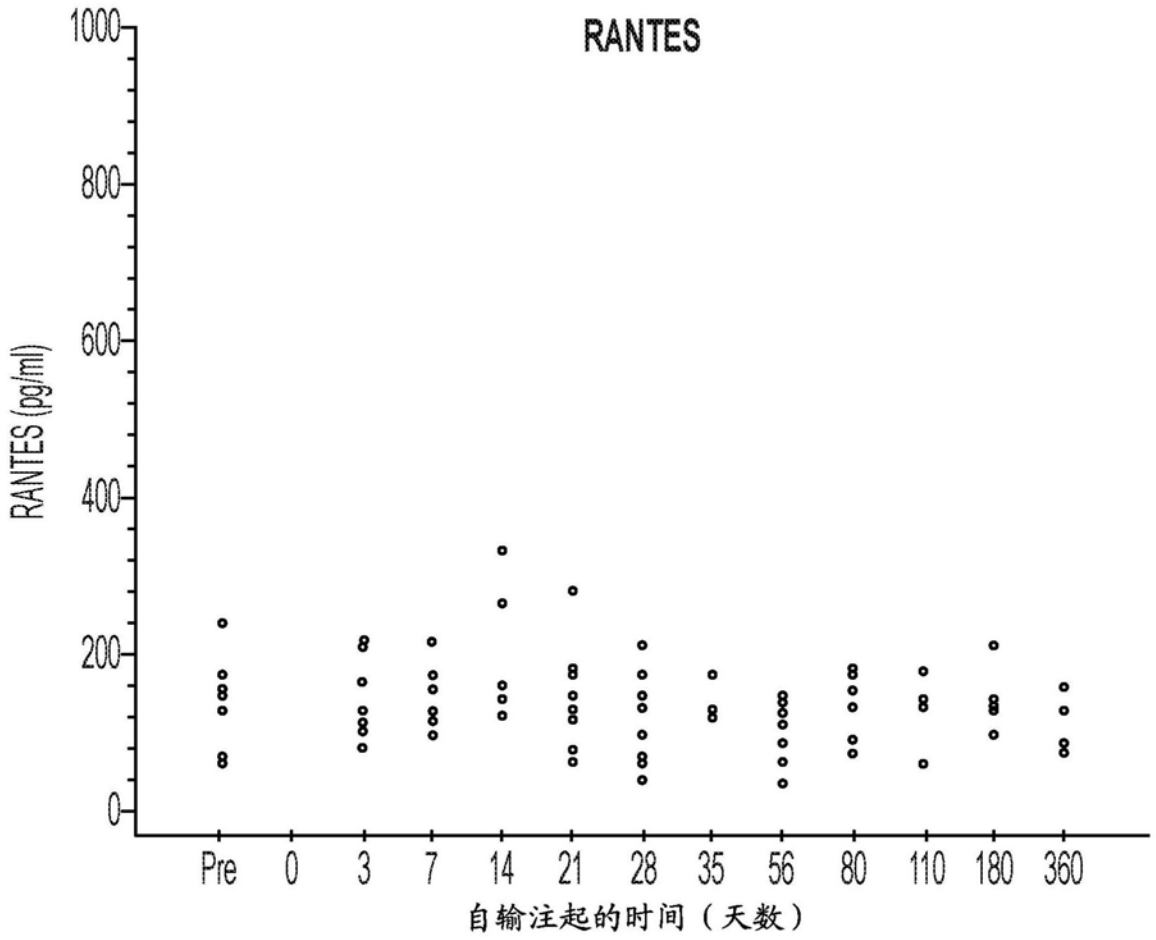

RANTES
RANTES (pg/ml)
1000
800
600
400
200
0
Pre
0
3
7
14
21
28
35
56
80
110
180
360
自输注起的时间（天数）

图21Q

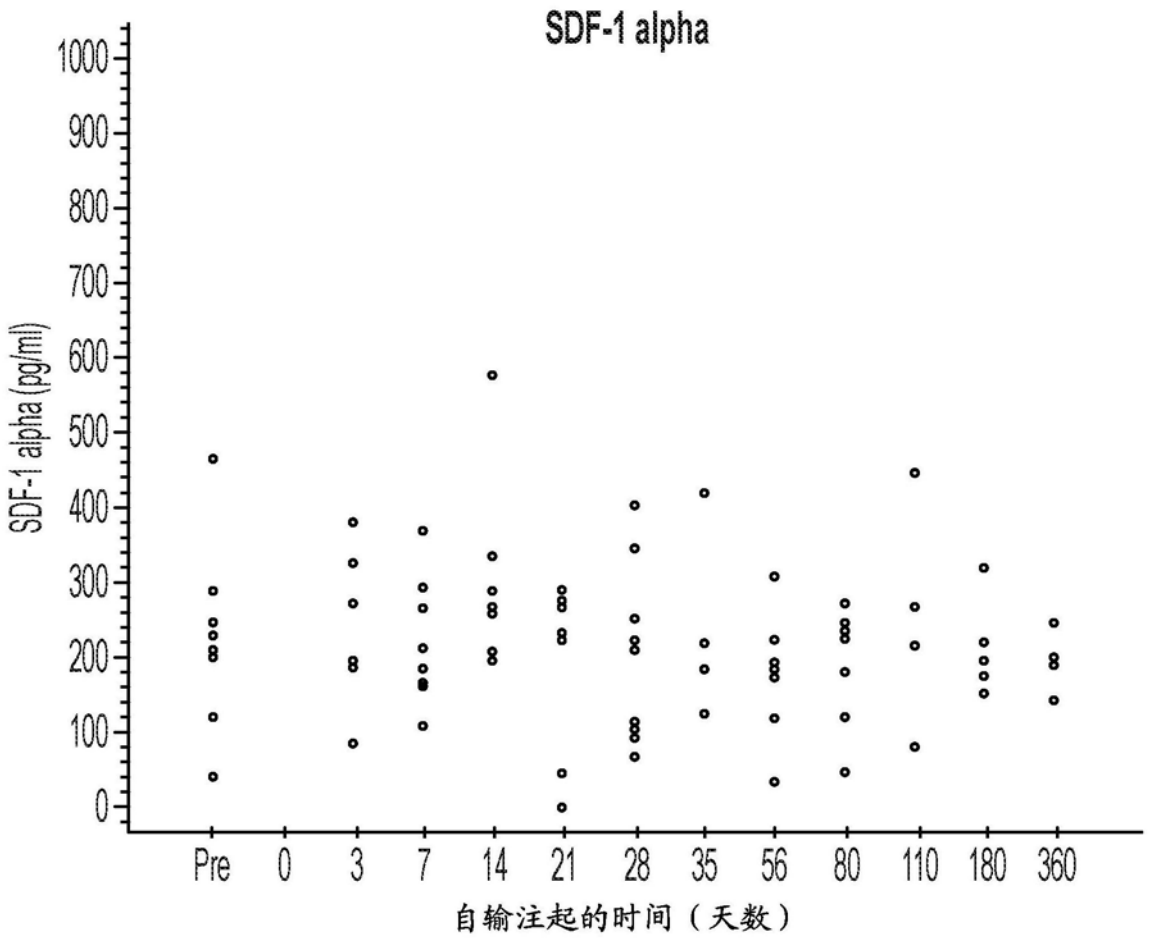

SDF-1 alpha
SDF-1 alpha (pg/ml)
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
Pre
0
3
7
14
21
28
35
56
80
110
180
360
自输注起的时间（天数）

图21R

临床特征	患者编号 1	2	3	4	5
年龄/性别	47/M	59/M	59/F	56/M	61/M
诊断	转化型滤泡性淋巴瘤	具有滤泡组分的DLBCL	CLL	CLL	CLL/Richter转化
细胞遗传学/分子	双命中(C-MYC和BCL-2)	复杂的细胞遗传学	包含17p缺失的复杂的细胞遗传学 IGHV未突变	包含17p缺失的复杂的细胞遗传学 IGHV未突变	复杂的细胞遗传学 TP53和NOTCH1突变 IGHV未突变
先前治疗线的数目	3	6	4	5	5
原发性难治性疾病	否	是	否	否	否
对第二线或后续疗法是难治的	否	是	是	否	是
对两个连续治疗线是难治的	否	是	是	否	否
复发的次数	2	对所有6条治疗线是难治的	2	4	3
CNS状态	否	否	否	否	否
ECOG	0	2	0	0	1
依鲁替尼无效	N/A	N/A	是	是	是
维奈托克无效	N/A	N/A	是	否	否
先前的自体HSCT	是	否	否	否	否
骨髓侵袭	否	否	MRD+	MRD+	是

图22A

患者编号					
6	7	8	9	10	11
59/F	66/F	64/M	70/M	61/F	60/M
CLL/ 加速的 CLL	CLL	转化型 滤泡性 淋巴瘤	具有滤泡 组分的 **DLBCL**	转化型 滤泡性 淋巴瘤	滤泡性 淋巴瘤 **(病灶等级 3B)**
包含 **17p** 缺失 的复杂的 细胞遗传学 **IGHV** 未突变	del(11) (q21;q23) **IGHV** 未突变	复杂的细胞 遗传学	t(14;18) (IgH/BCL2) **c-MYC** 和 **BCL6** 过表达	t(14;18) (IgH/BCL2)	t(14;18) (IgH/BCL2) **c-MYC** 和 **BCL6** 过表达
5	4	11	4	4	4
否	否	否	否	否	否
是	是	是	否	否	是
否	否	否	否	否	否
3	0*	5	2	2	2
否	否	否	否	否	否
0	0	0	0	0	0
是	是	N/A	N/A	N/A	N/A
是	否	N/A	N/A	N/A	N/A
否	否	是	是	是	否
MRD-	是	否	否	MRD+	否

图22A(续)

	患者编号				
临床特征	1	2	3	4	5
恶性病侵袭的说明	在膈膜以上和以下的多室腺病	在膈膜以上和以下的多室腺病侵袭多个骨和肝	在膈膜以上和以下的多室腺病	在膈膜以上和以下的多室腺病	在膈膜以上和以下的多室腺病
在脐带供体与患者之间的HLA等位基因匹配**	4/6	4/6	4/6	4/6	4/6
KIR配体mm(是/否)	否	是	否	是	是
CAR-NK剂量水平	10^5个细胞/kg	10^5个细胞/kg	10^5个细胞/kg	10^6个细胞/kg***	10^6个细胞/kg

*该患者对前三条疗法线不耐受并且是第四条疗法线难治的

**CB单位与患者之间在HLA基因座A、B和DRβ1处的HLA匹配数目

***该患者仅接受0.25×10^6个细胞/kg

图22B

患者编号					
6	7	8	9	10	11
在膈膜以上和以下的多室腺病	巨大肠系膜腺病	在膈膜以上和以下的多室腺病	肠系膜融合腺病	在膈膜以上和以下的多室腺病侵袭肾上腺和右股骨二者	多发性上腹、腹膜和盆腔腺病
4/6	4/6	4/6	4/6	2/6	1/6
否	是	否	否	否	是
10^6个细胞/kg	10^6个细胞/kg	10^7个细胞/kg	10^7个细胞/kg	10^7个细胞/kg	10^7个细胞/kg

图22B(续)

患者编号	输注的 NK-CAR 剂量/Kg	CAR-NK 转导效率(%)	输注的 CD3+ T 细胞/Kg	CD3+ T-细胞 (%)	CAR+CD3+ T-细胞 (%)
1	$1x10^5$	62.3	30	0.02	0.01
2	$1x10^5$	63.3	500	0.28	0.20
3	$1x10^5$	22.7	100	0.03	0.006
4	$0.25x10^6$	43.3	300	0.05	0.03
5	$1x10^6$	38.6	300	0.01	0.008
6	$1x10^6$	49.0	900	0.04	0.02
7	$1x10^6$	66.4	200	0.01	0.02
8	$1x10^7$	63.0	5000	0.03	0.008
9	$1x10^7$	35.5	3000	0.01	0.002
10	$1x10^7$	50.7	8000	0.04	0.01
11	$1x10^7$	41.6	1000	0.005	0.002

图23

自 CAR-NK 细胞输注起的时间（天数）	随访的患者数目	具有有效样品的患者数目	具有有效样品和可检测的 CAR-NK 细胞的患者数目
-7	11	11	0 (0%)
3	11	6	6 (100%)
7	11	7	7 (100%)
14	11	9	8 (89%)
21	11	9	9 (100%)
28	11	9	8 (89%)
56	10	6	5 (83%)
84	7	6	6 (100%)
112	6	6	6 (100%)
180	5	4	4 (100%)
270	4	3	3 (100%)
360	4	2	1 (50%)

图24

患者编号	基线	第+30 天	第+90 至+130 天	第+180 天	第+360 天
1	-	-	-	-	-
2	阴性	-	-	-	-
3	阴性	-	-	-	阴性
4	阴性	-	阴性	-	-
5	阴性	-	-	-	-
6	阴性	阴性	阴性	-	-
7	阴性	阴性	-	-	-
8	阴性	阴性	阴性	-	-
9	阴性	阴性	-	-	-
10	阴性	阴性	-	阴性	-
11	阴性	阴性	-	-	-

图25

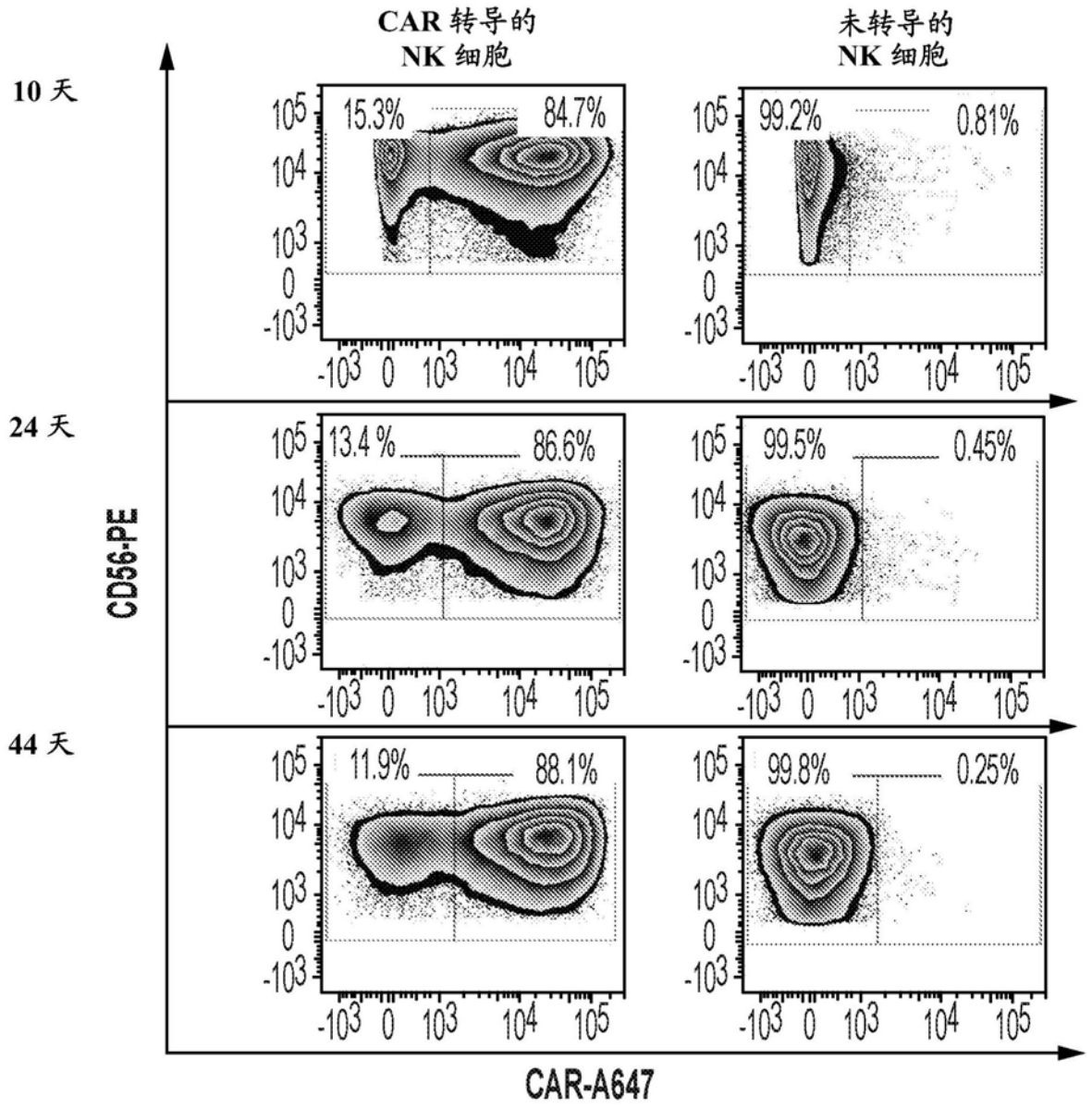

CAR 转导的
NK 细胞
未转导的
NK 细胞
10 天
24 天
44 天
15.3%
84.7%
99.2%
0.81%
13.4 %
86.6%
99.5%
0.45%
11.9%
88.1%
99.8%
0.25%
CD56-PE
CAR-A647

图26A

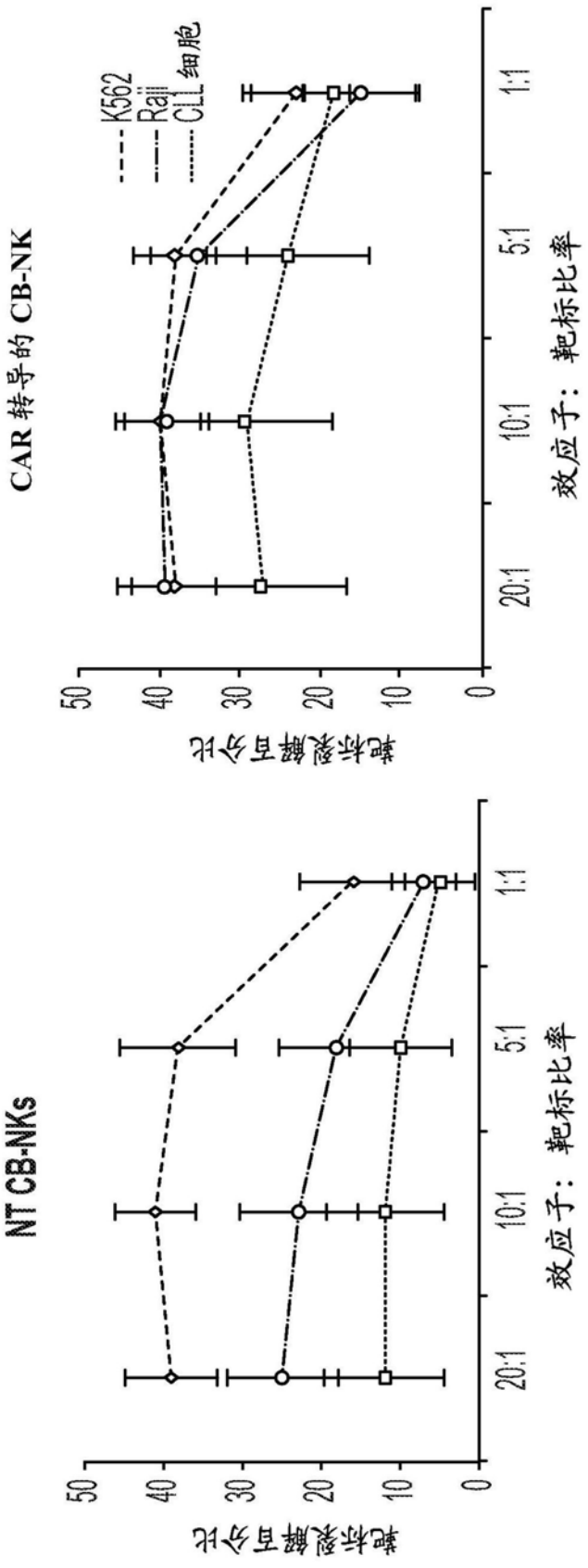

CAR 转导的 CB-NK
K562
Raji
CLL 细胞
靶标裂解百分比
效应子：靶标比率
NT CB-NKs
靶标裂解百分比
效应子：靶标比率

图26B

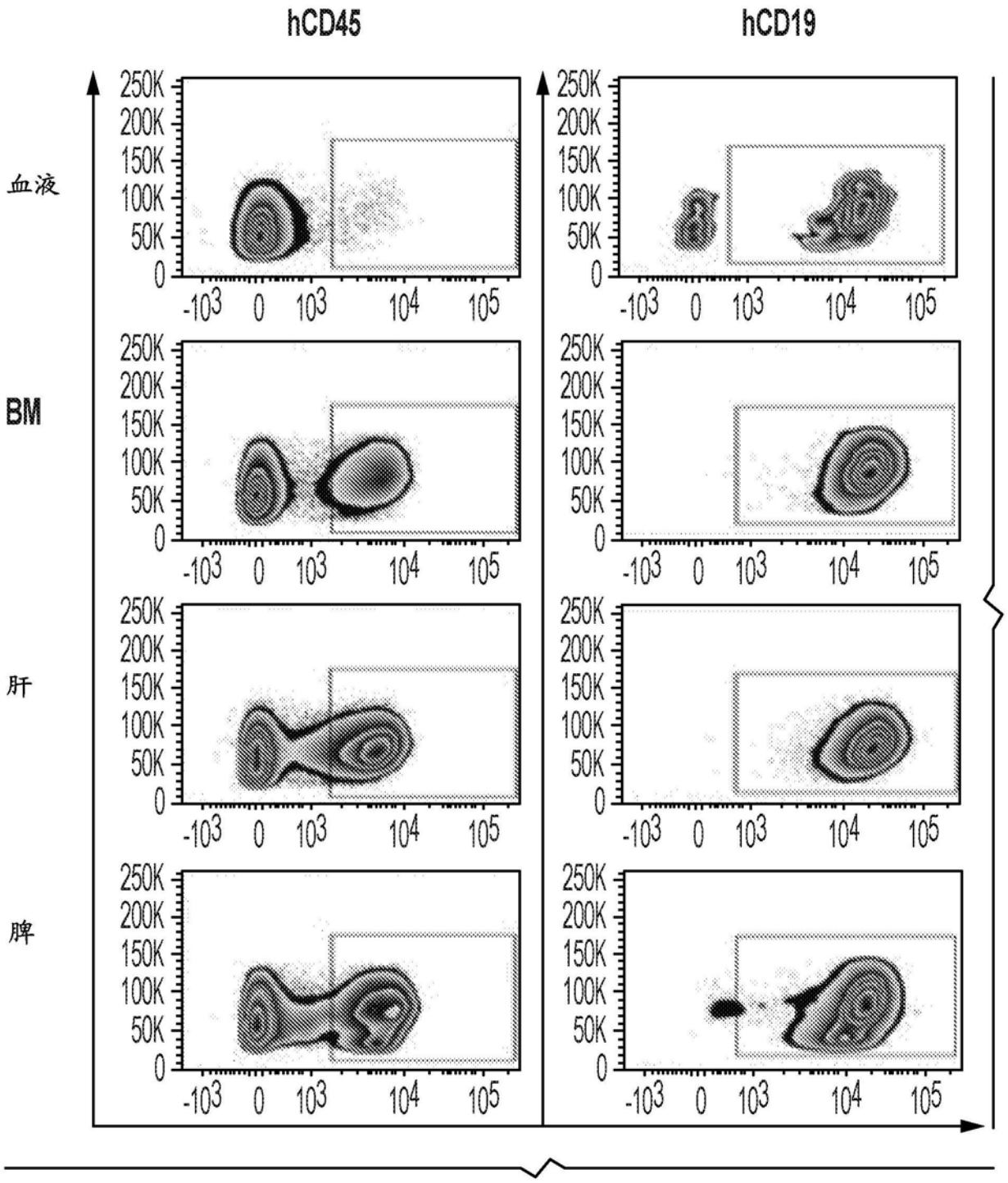


图27A

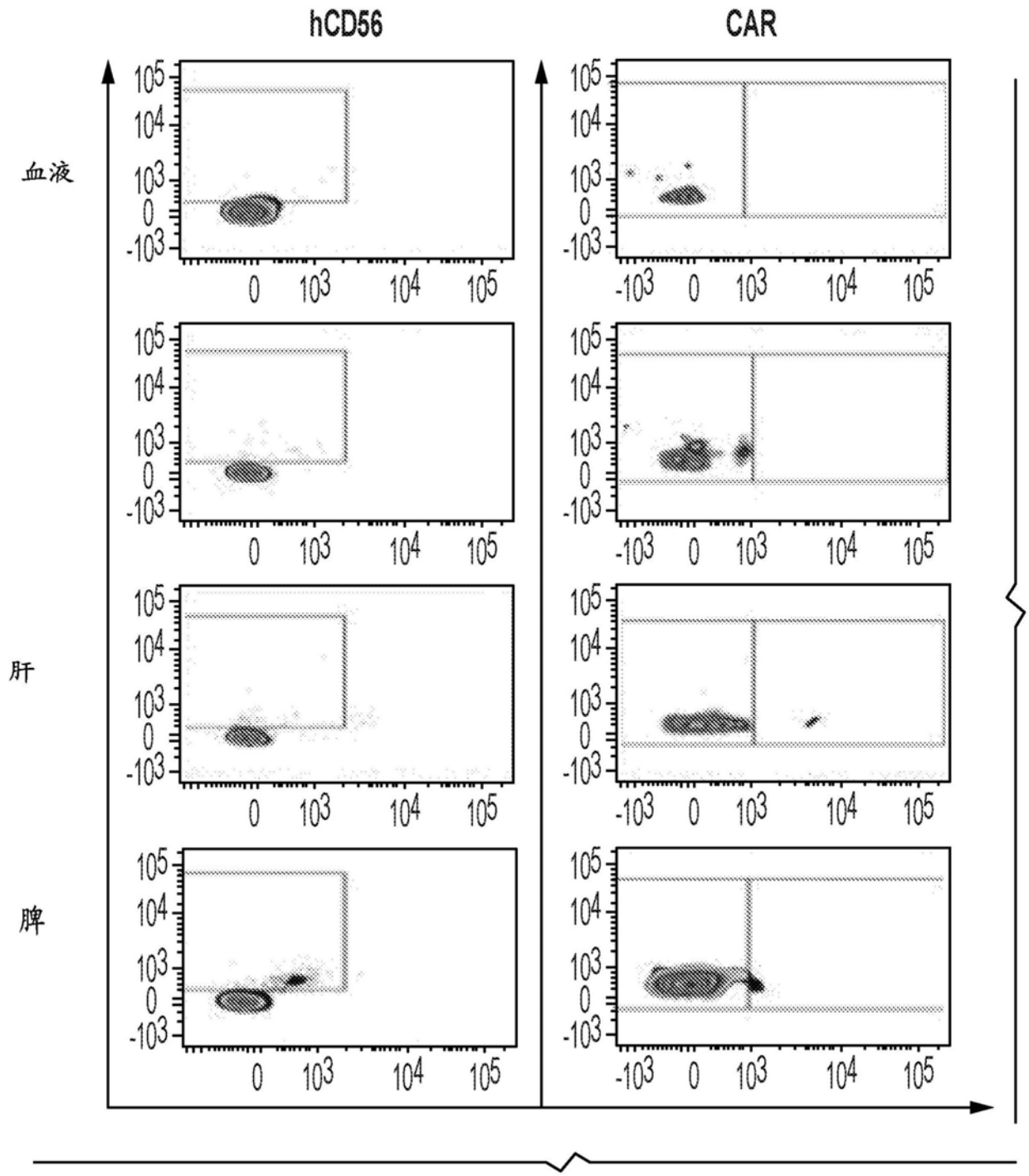


图27A(续)

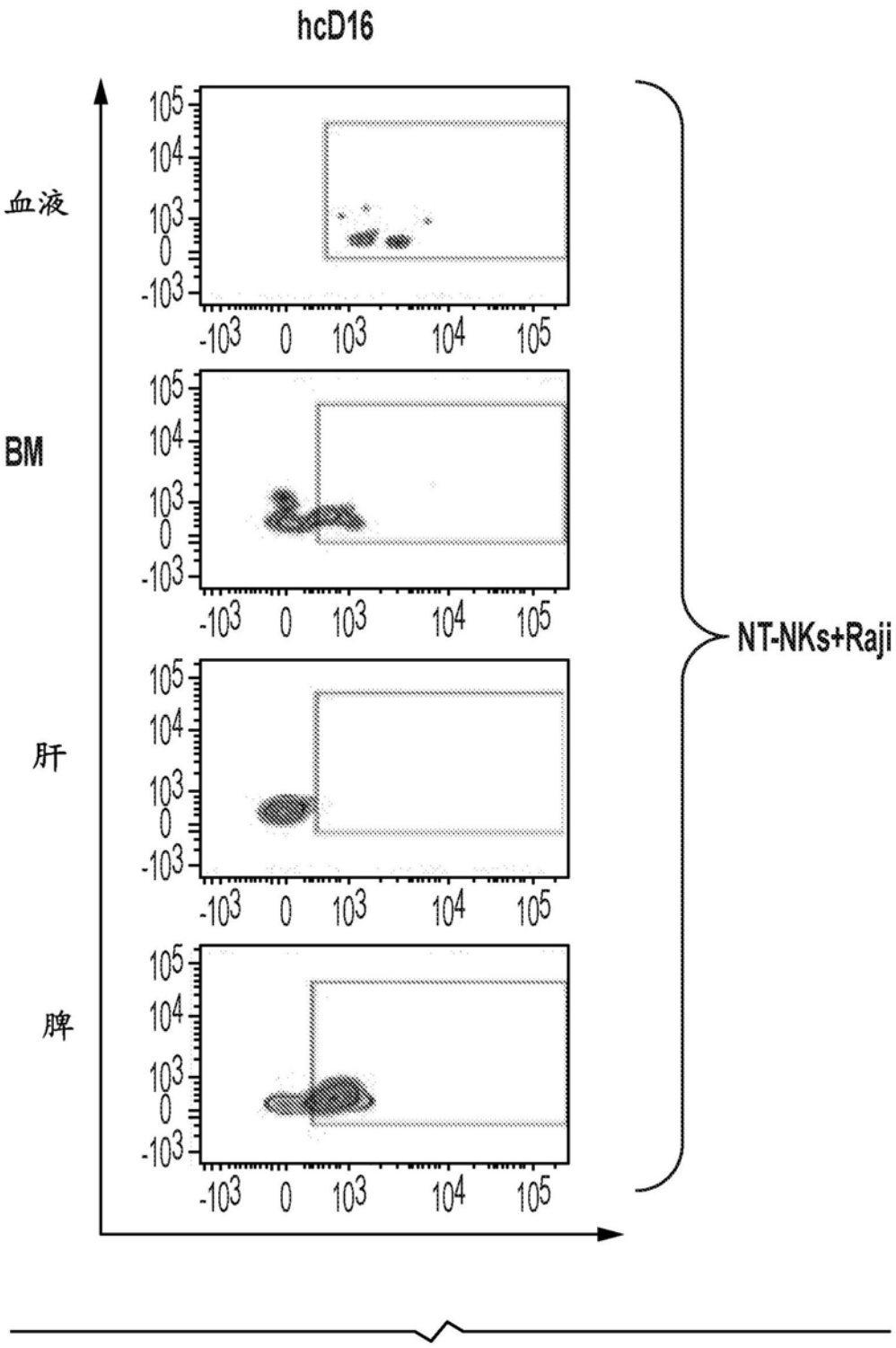


图27A(续)

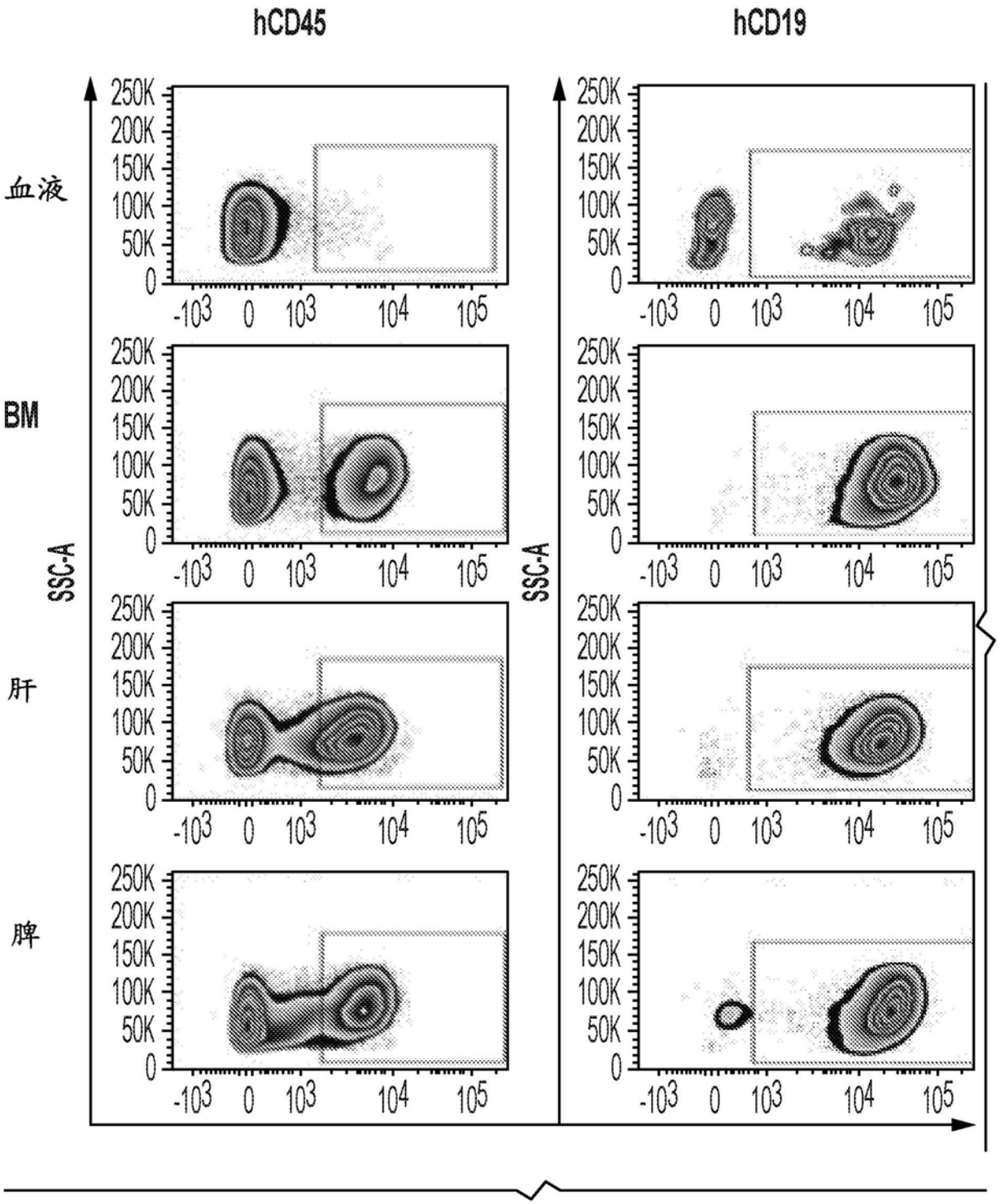

hCD45
hCD19
血液
BM
肝
脾
SSC-A
SSC-A
250K
200K
150K
100K
50K
0
-10^3
0
10^3
10^4
10^5

图27A(续)

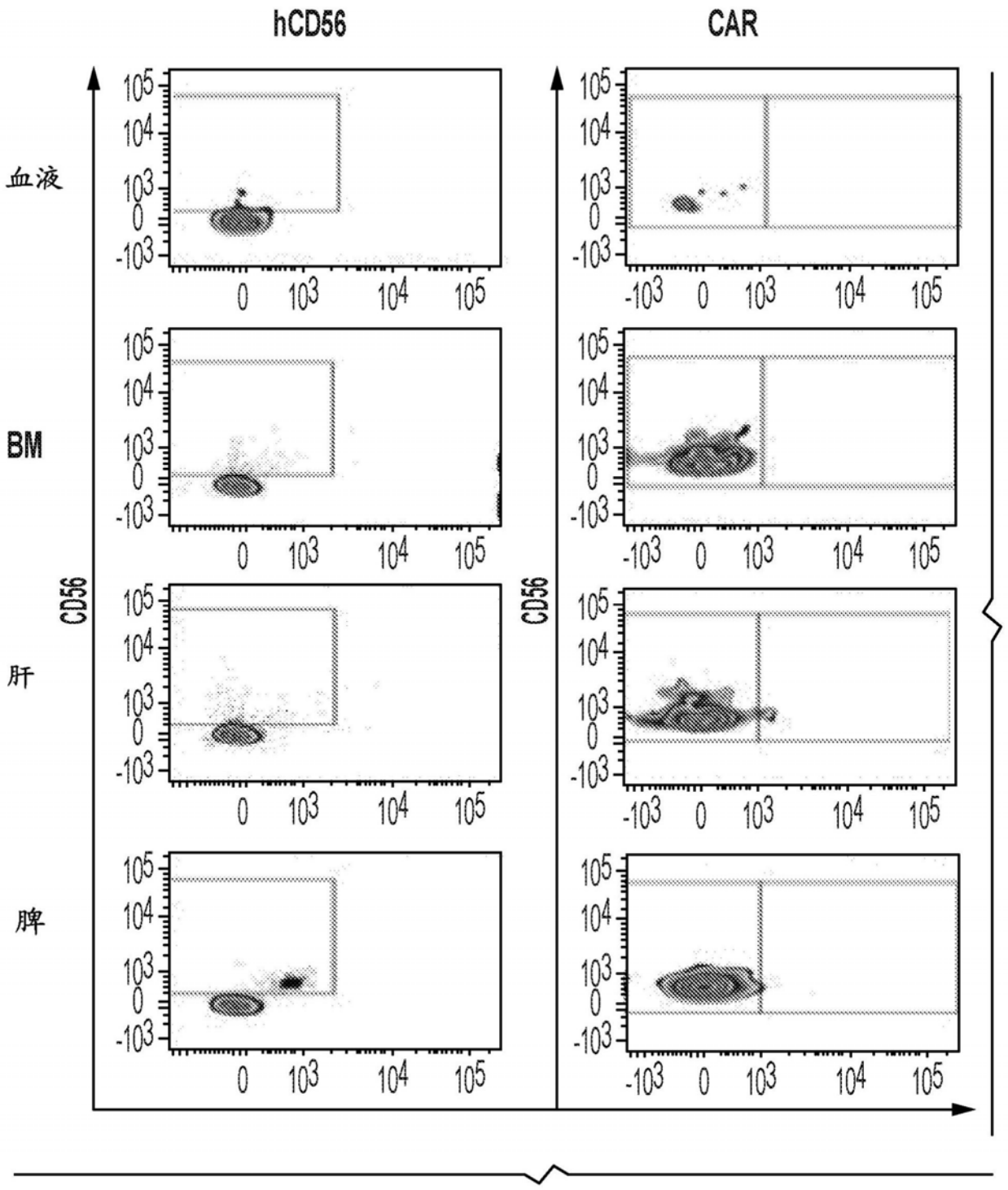


图27A(续)

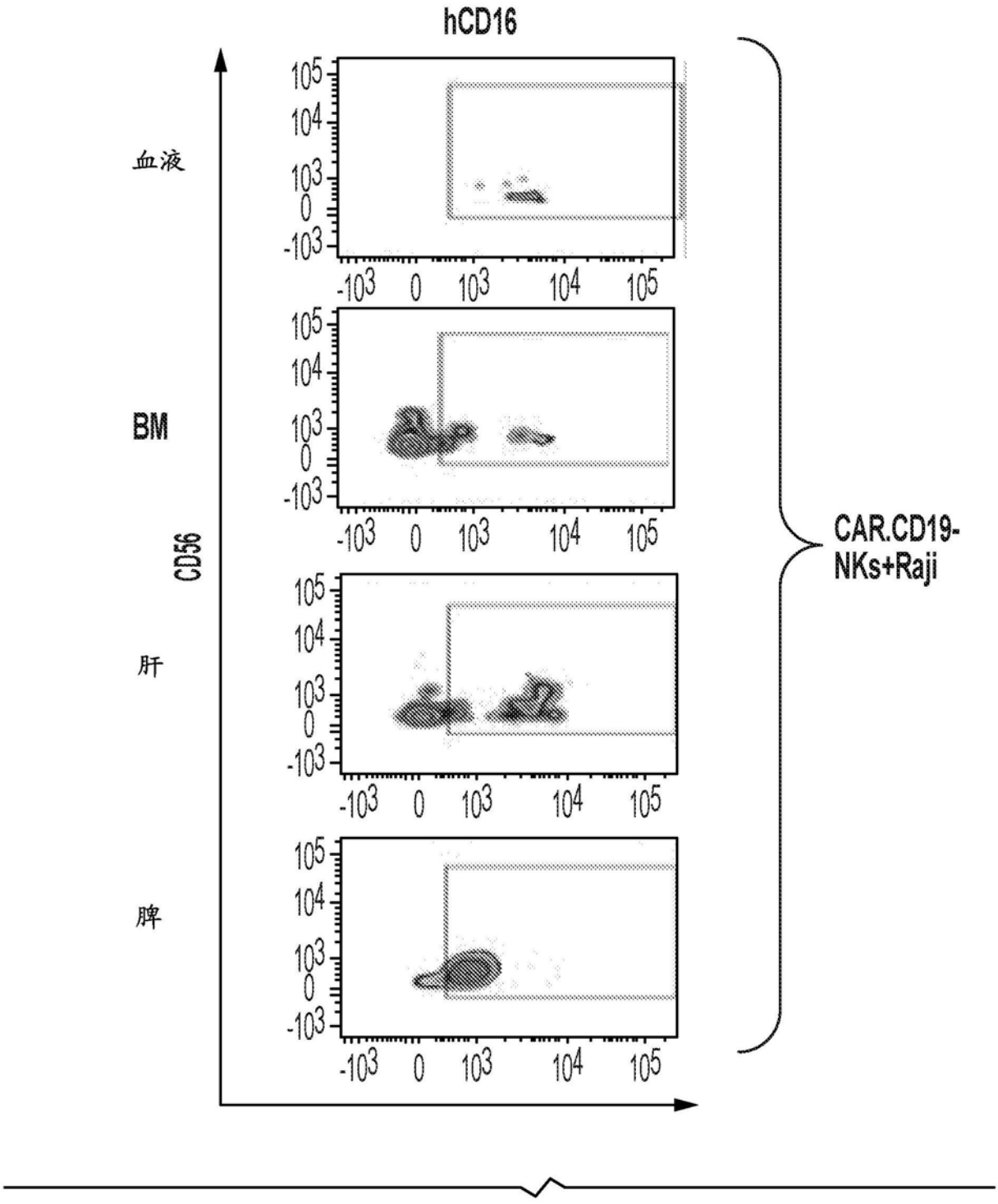

hCD16
血液
BM
肝
脾
CD56
CAR.CD19-
NKs+Raji
105
104
103
0
-103
-103
0
103
104
105

图27A(续)

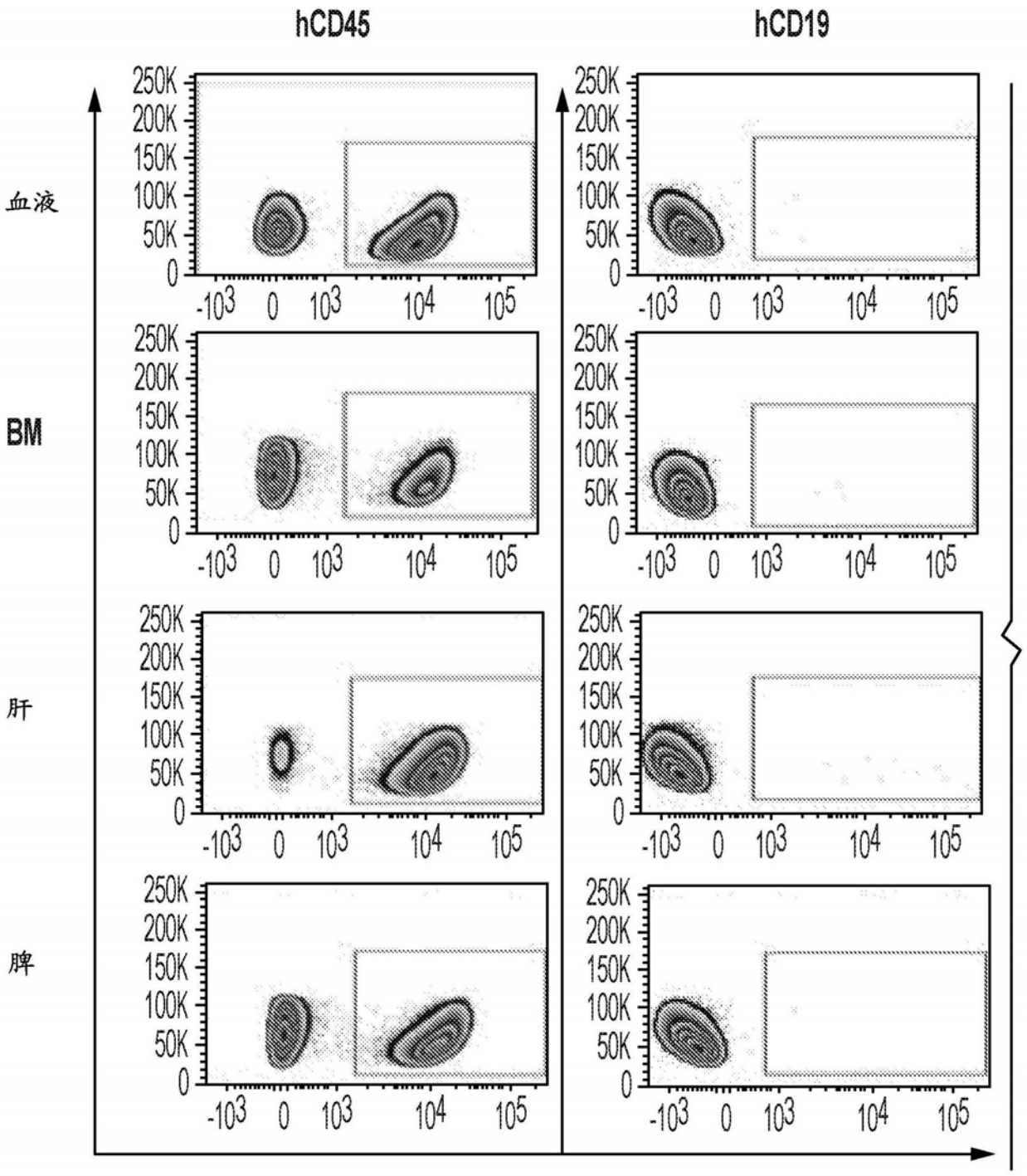


图27A(续)

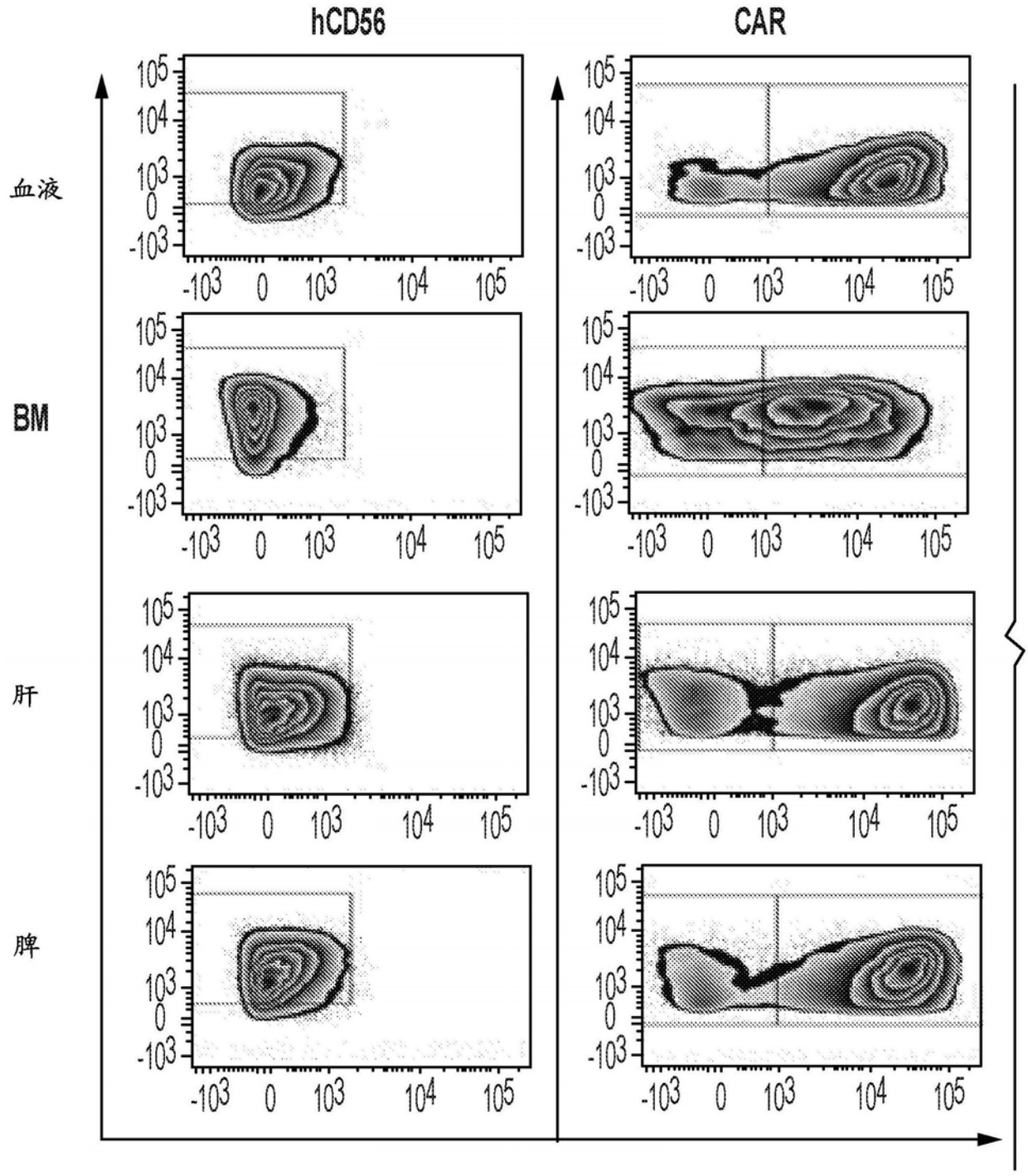


图27A(续)

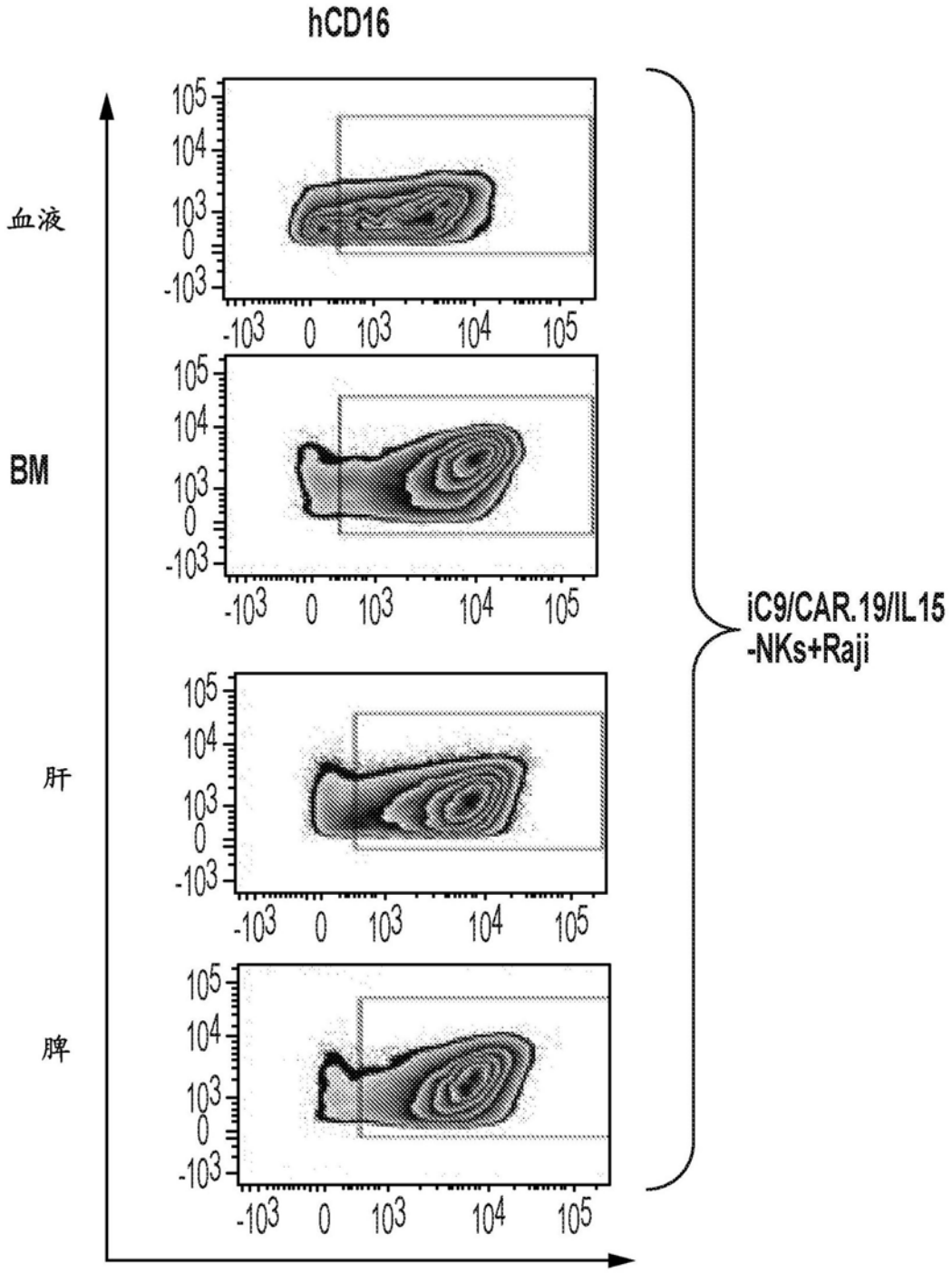


图27A(续)

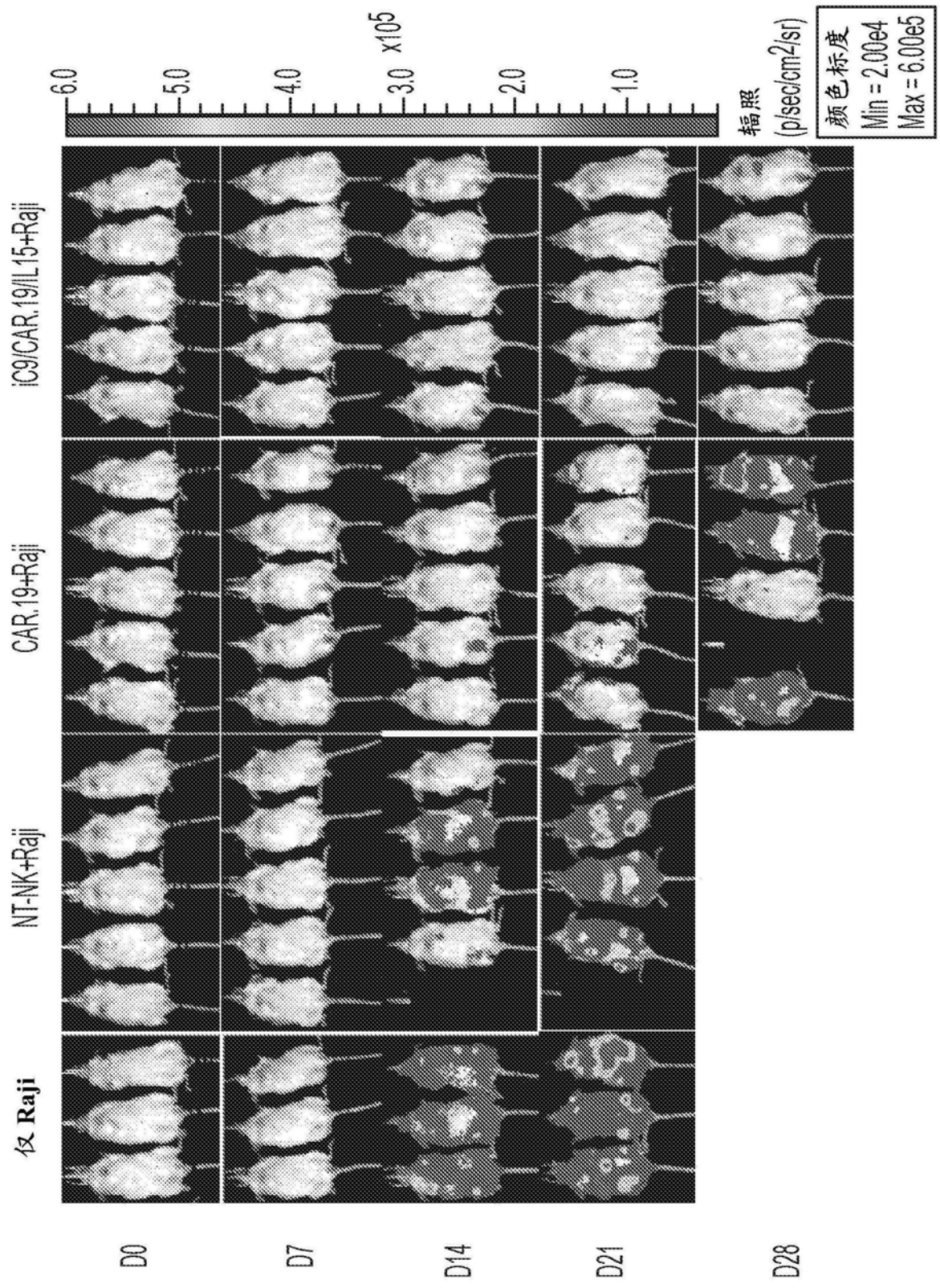

仅 Raji
NT-NK+Raji
CAR.19+Raji
iC9/CAR.19/IL15+Raji
D0
D7
D14
D21
D28
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
x10^5
辐照
(p/sec/cm2/sr)
颜色标度
Min = 2.00e4
Max = 6.00e5

图27B

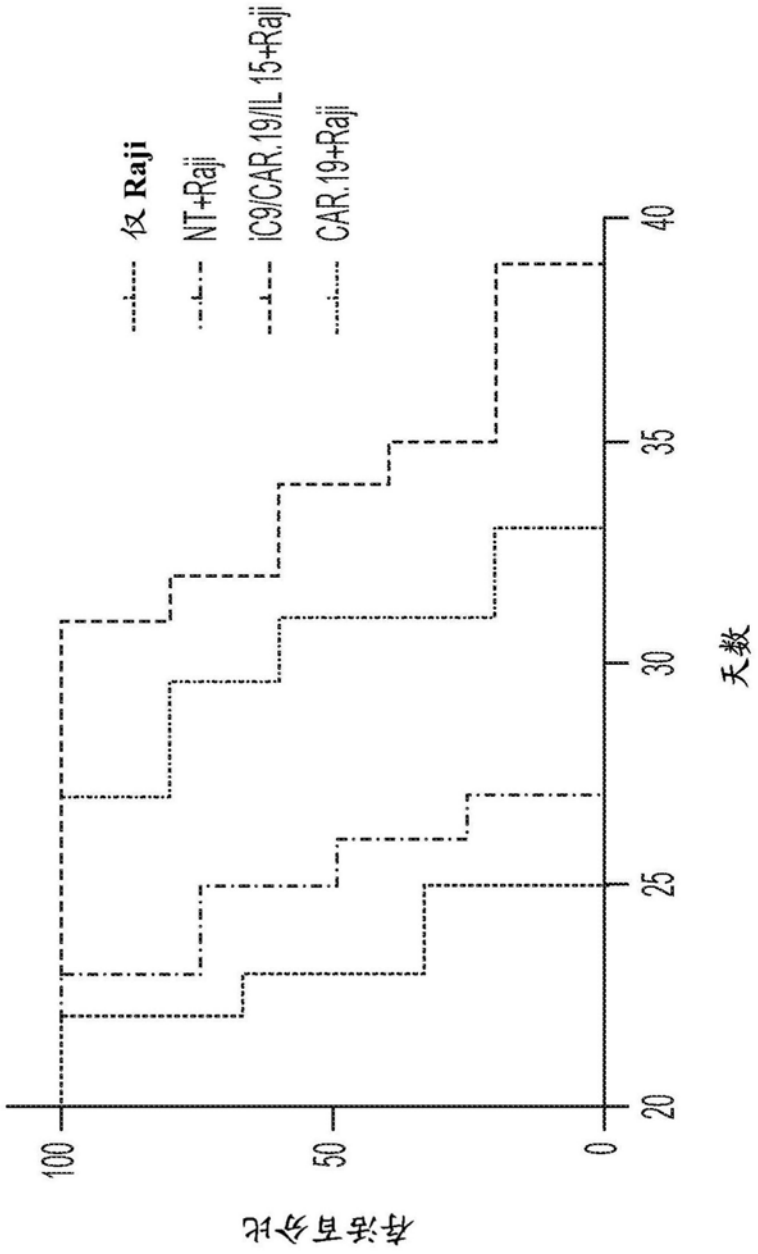

仅 Raji
NT+Raji
iC9/CAR.19/IL 15+Raji
CAR.19+Raji
存活百分比
100
50
0
20
25
30
35
40
天数

图27C

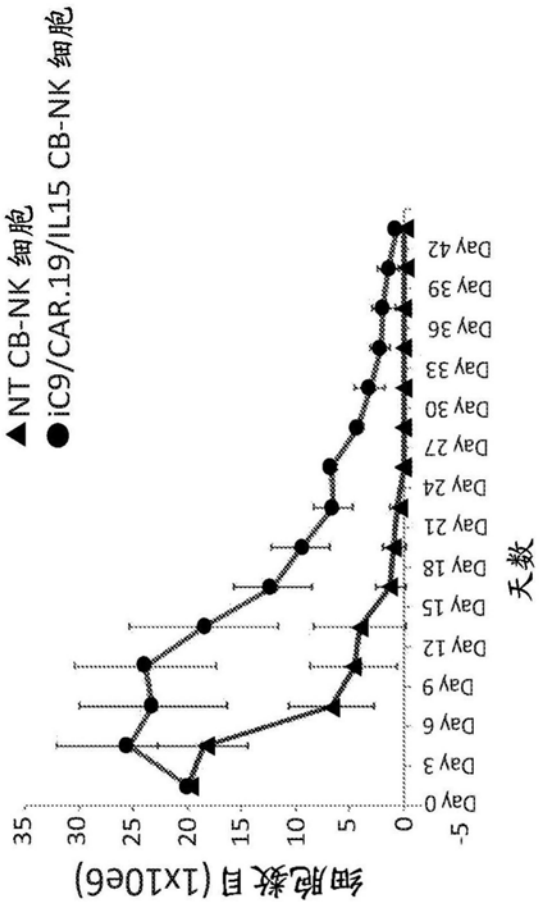

▲NT CB-NK 细胞
●iC9/CAR.19/IL15 CB-NK 细胞
细胞数目(1x10e6)
35
30
25
20
15
10
5
0
-5
Day 0
Day 3
Day 6
Day 9
Day 12
Day 15
Day 18
Day 21
Day 24
Day 27
Day 30
Day 33
Day 36
Day 39
Day 42
天数

图28A

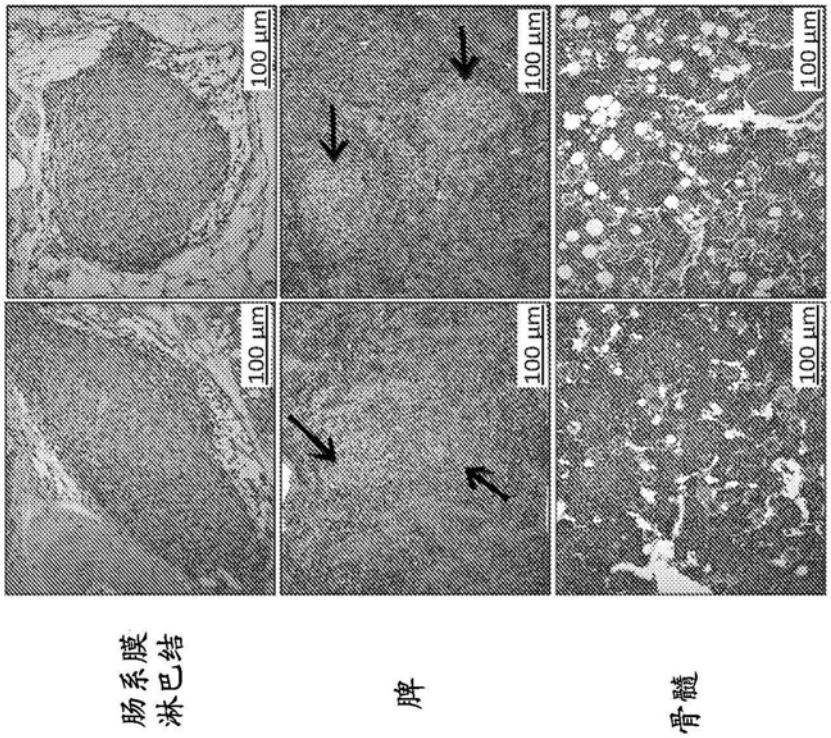


图28B

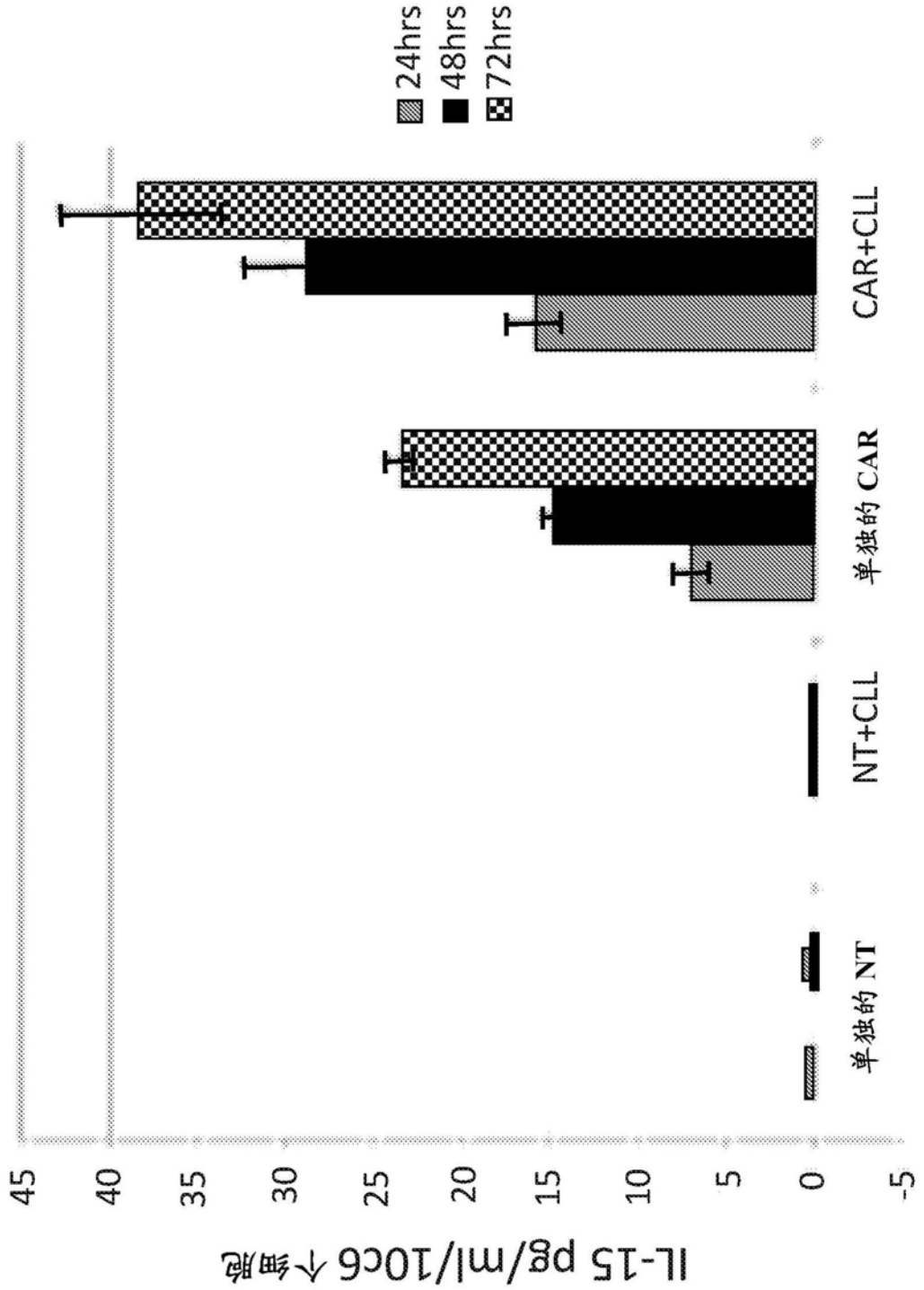

24hrs
48hrs
72hrs
CAR+CLL
单独的 CAR
NT+CLL
单独的 NT
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
-5
IL-15 pg/ml/10c6 个细胞

图29

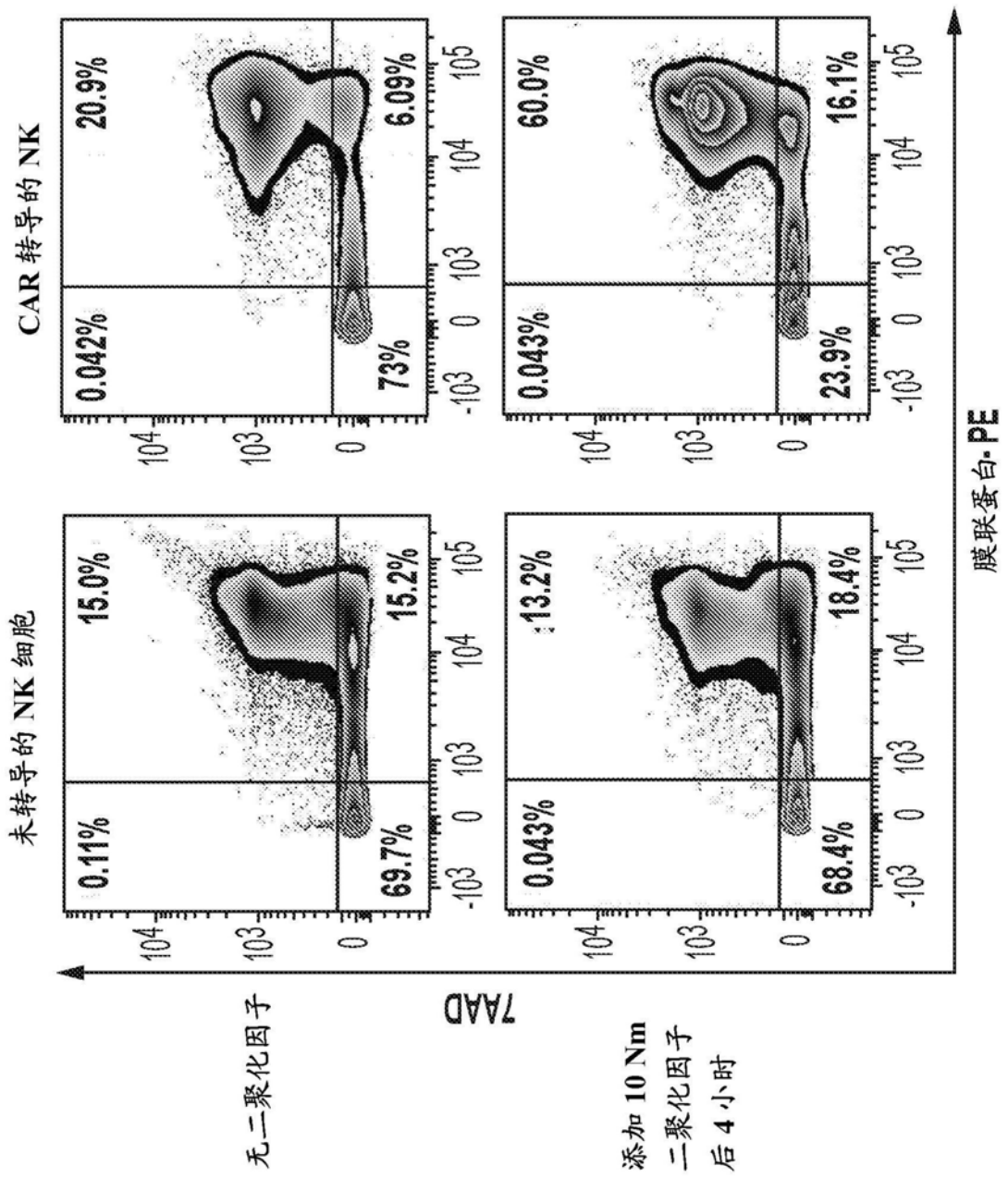

未转导的 NK 细胞
CAR 转导的 NK
0.11%
15.0%
69.7%
15.2%
0.042%
20.9%
73%
6.09%
0.043%
13.2%
68.4%
18.4%
0.043%
60.0%
23.9%
16.1%
7AAD
膜联蛋白-PE
无二聚化因子
添加 10 Nm
二聚化因子
后 4 小时

图30A

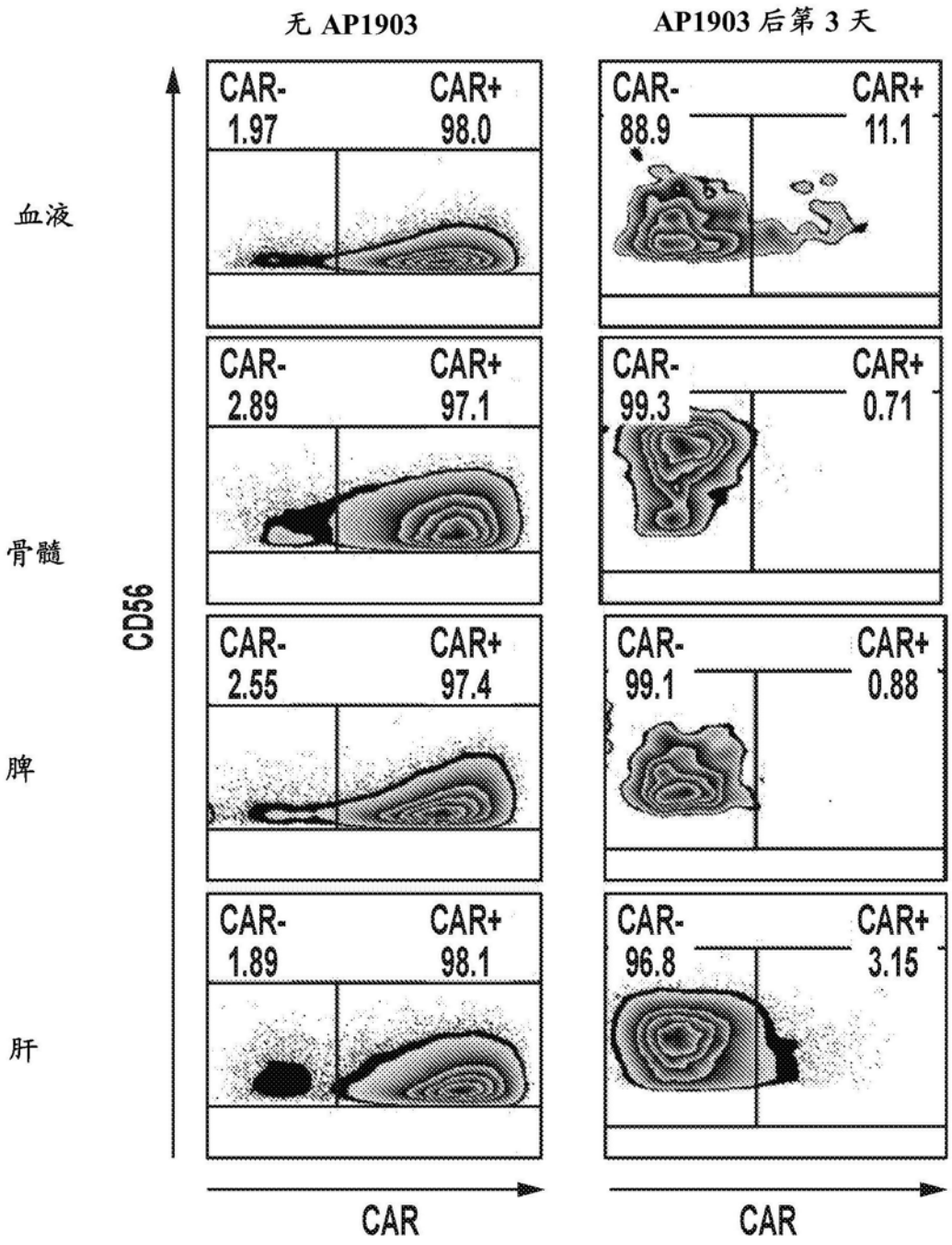

无 AP1903
AP1903 后第 3 天
血液
骨髓
脾
肝
CD56
CAR-
CAR+
1.97
98.0
88.9
11.1
2.89
97.1
99.3
0.71
2.55
97.4
99.1
0.88
1.89
98.1
96.8
3.15
CAR
CAR

图30B