



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110997902 A

(43)申请公布日 2020.04.10

(21)申请号 201880053053.6

C·古多 L·佩斯

(22)申请日 2018.06.20

G·阿尔莫兹尼

(30)优先权数据

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256

17305757.1 2017.06.20 EP

代理人 孟凡宏 谢燕军

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

(51)Int.Cl.

2020.02.14

C12N 5/078(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2018/066387 2018.06.20

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/234370 EN 2018.12.27

(71)申请人 居里研究所

地址 法国巴黎

申请人 国家医疗保健研究所

国家科学研究中心

(72)发明人 S·阿米格瑞纳 E·皮亚乔

权利要求书1页 说明书29页 附图4页

(54)发明名称

SUV39H1缺陷的免疫细胞

(57)摘要

本发明涉及Suv39h1缺陷的工程化免疫细胞。优选地,所述工程化免疫细胞还包含特异性结合靶抗原的基因工程化抗原受体。本发明还涉及获得基因工程化免疫细胞的方法,其包括抑制免疫细胞中Suv39h1的表达和/或活性的步骤;并且还任选地包括将特异性结合靶抗原的基因工程化抗原受体引入所述免疫细胞的步骤。本发明还涵盖所述工程化免疫细胞在过继治疗,特别是癌症的治疗中的用途。

1. 一种工程化免疫细胞,其是Suv39h1缺陷的。
2. 根据权利要求1所述的工程化免疫细胞,其还包含特异性结合靶抗原的基因工程化抗原受体。
3. 根据权利要求1或2所述的工程化免疫细胞,其是T细胞或NK细胞。
4. 根据权利要求1-3中任一项所述的工程化免疫细胞,其是CD4或CD8+T细胞。
5. 根据权利要求1-4中任一项所述的工程化免疫细胞,其分离自受试者。
6. 根据权利要求5所述的工程化免疫细胞,其中所述受试者患有癌症,或处于患癌的风险中。
7. 根据权利要求1-6中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述工程化免疫细胞中Suv39h1的活性和/或表达被选择性地抑制或阻断。
8. 根据权利要求1-7中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述工程化免疫细胞表达编码无功能Suv39h1蛋白的Suv39h1核酸。
9. 根据权利要求2-8中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述靶抗原在癌细胞上表达和/或为通用肿瘤抗原。
10. 根据权利要求2-9中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述基因工程化抗原受体是嵌合抗原受体(CAR),其包含特异性结合靶抗原的细胞外抗原识别结构域。
11. 根据权利要求2-10中任一项所述的细胞,其中所述基因工程化抗原受体是T细胞受体(TCR)。
12. 一种产生基因工程化免疫细胞的方法,其包括抑制免疫细胞中Suv39h1的表达和/或活性的步骤;并且还任选地包括将特异性结合靶抗原的基因工程化抗原受体引入所述免疫细胞的步骤。
13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述抑制Suv39h1表达和/或活性包括将细胞与至少一种抑制Suv39h1的表达和/或活性和/或破坏Suv39h1基因的试剂接触。
14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述试剂选自小分子抑制剂;抗体衍生物;适配子;阻断转录或翻译的核酸分子;或基因编辑剂。
15. 根据权利要求1-11中任一项所述或根据权利要求12-14中任一项所述的方法获得的工程化免疫细胞或包含所述工程化免疫细胞的组合物在癌症的过继细胞疗法中的用途。

SUV39H1缺陷的免疫细胞

技术领域

[0001] 本发明涉及过继治疗领域。本发明提供过继转移后具有增强的存活、重构潜力和中央记忆表型的Suv39h1缺陷的免疫细胞。

背景技术

[0002] 采用配备重组T细胞受体 (TCR) 和嵌合抗原受体 (CAR) 技术的T细胞的过继T细胞疗法 (ATCT) 在针对许多机构的若干恶性肿瘤的早期临床测试中显示出非常令人鼓舞的活性 (Kershaw MH, Westwood JA, Darcy PK. Nat Rev Cancer. 2013;13:525-541)。

[0003] 一个新兴的主题是治疗性T细胞的有效移植和长期存留与积极的治疗结果相关。若干临床前研究表明, 初始和早期分化的T细胞具有增强的长期存留的能力 (Berger C et al., J Clin Invest. 2008;118:294-305; Hinrichs CS et al., Proc Natl Acad Sci. 2009;106:17469-17474; Tanel A et al., Expert Rev Vaccines. 2009;8(3):299-312) 并且可以引起有效的抗肿瘤应答 (Gattinoni L et al., J Clin Investig. 2005;115:1616-1626; Lugli E et al. J Clin Invest. 2013;123:594-599)。此外, 过继转移细胞的增加的存留似乎取决于中央记忆T细胞 (TCM) 群的获得 (Powell DJ et al., Blood. 2005;105(1):241-50; Huang J, Khong HT et al. J Immunother. 2005;28:258-267)。

[0004] 稳定的基因转移已在临床上常规实现, 特别是通过使用 γ 逆转录病毒载体通过 CAR (例如参见 Guest RD et al., Cancer Immunol Immunother. 2014;63:133-145) 和 TCR (尤其参见 Johnson LA et al., Blood. 2009;114(3):535-46) 转导多克隆T细胞, 其中这些工程化细胞在移植CAR T细胞超过10年的患者中没有显示出明显的不良安全适应症 (Scholler J et al., Sci Transl Med. 2012;4:132ra153)。

[0005] 为了通过逆转录病毒载体或慢病毒进行有效转导, 需要使原代T细胞活跃增殖 (Stacchini A et al., Leuk Res. 1999;23:127-136), 这通常是通过静置的原代T细胞进行有丝分裂刺激来实现的。

[0006] 但是, 一旦激活, T细胞将以不可逆的线性方式向效应子 (TE) 表型发展 (Mahnke YD et al., Eur J Immunol. 2013;43:2797-2809; Farber DL. Semin Immunol. 2009;21:84-91)。因此, 逆转录病毒或慢病毒转导的促有丝分裂激活促使T细胞从初始型向TE表型分化。与离体培养方案相结合, 将转导的T细胞数量扩展至临床应用所需的数量 (约 10^9 - 10^{11}), T细胞趋向于更具分化的表型, 这对于全身性留存而言不是最佳的。

[0007] 因此, 尽管在过去的几年中, 包括基于CAR T细胞疗法的过继性T细胞疗法在治疗某些血液系统癌症方面取得了显著的治疗成功, 但仅在少数血液癌症类型和少数实体瘤类型中显示出有效性。已经假设, 过继转移后有限的T细胞存活可能导致治疗功效低下。

[0008] 因此, 本领域仍然需要在过继转移后表现出增强的中央记忆表型和增强的存活的经修饰或工程化的T细胞。特别是, 仍然需要提供可用于过继治疗的免疫细胞, 特别是T细胞, 这显著地支持有效且大规模的癌症治疗。

[0009] 发明简述

[0010] 现在,发明人令人惊讶地发现,Suv39h1缺陷的T细胞在过继转移后携带增强的中央记忆表型和增强的存活。特别地,发明人表明,Suv39h1缺陷的T细胞以提高的效率积聚并重编程到表达CD44和CD62L两者的长寿中央记忆T细胞中。因而,本发明涉及修饰或工程化的免疫细胞,特别是修饰的T细胞,其中Suv39h1被灭活。

[0011] 因而,所述修饰或工程化的免疫细胞因其在过继治疗中的用途而引起极大兴趣。因此,本发明更具体地涉及Suv39h1缺陷的工程化或修饰的免疫细胞,其中免疫细胞优选还包含特异性结合靶抗原的基因工程化抗原受体。

[0012] 典型地,权利要求1的工程化免疫细胞是T细胞或NK细胞,特别是CD4⁺或CD8⁺ T细胞。优选的细胞可以选自T_N细胞、TSC_M、TC_M或TE_M细胞及它们的组合。

[0013] 典型地,工程化免疫细胞也分离自受试者。优选地,所述受试者患有癌症,或处于患癌的风险中。

[0014] 基因工程化抗原受体特异性结合的靶抗原优选在癌细胞上表达和/或为通用肿瘤抗原。

[0015] 基因工程化抗原受体可以是嵌合抗原受体(CAR),其包含特异性结合靶抗原的细胞外抗原识别结构域。基因工程化抗原受体也可以是T细胞受体(TCR)。

[0016] 优选地,在所述工程化免疫细胞中Suv39h1的活性和/或表达被选择性地抑制或阻断。在一个实施方案中,所述工程化免疫细胞表达编码无功能Suv39h1蛋白的Suv39h1核酸。

[0017] 本发明还涉及产生基因工程化免疫细胞的方法,其包括抑制免疫细胞中Suv39h1的表达和/或活性的步骤;以及任选地将特异性结合靶抗原的基因工程化抗原受体引入免疫细胞的步骤。

[0018] 优选地,抑制Suv39h1活性和/或表达包括将细胞与至少一种抑制Suv39h1的表达和/或活性和/或破坏Suv39h1基因的试剂接触或进行接触。所述试剂可以选自小分子抑制剂;抗体衍生物;适配子;阻断转录或翻译的核酸分子;或基因编辑剂。

[0019] 本发明还涉及如本文所述的工程化免疫细胞或包含所述工程化免疫细胞的组合物在过继细胞疗法,特别是癌症的过继疗法中的用途。

[0020] 发明详述

[0021] 定义

[0022] 本文中术语“抗体”以最广义使用,并且包括多克隆和单克隆抗体,包括完整抗体和功能性(抗原结合)抗体片段,包括片段抗原结合(Fab)片段、F(ab')₂片段、Fab'片段、Fv片段、重组IgG(rIgG)片段、能够特异性结合抗原的可变重链(VH)区、单链抗体片段(包括单链可变片段(scFv))和单结构域抗体(例如sdAb、sdFv、纳米抗体)片段。该术语涵盖基因工程化和/或其他修饰的免疫球蛋白形式,诸如胞内抗体、肽抗体、嵌合抗体、完全人抗体、人源化抗体和杂缀合物抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、双抗体、三抗体和四抗体、串联di-scFv、串联tri-scFv。除非另有说明,否则术语“抗体”应理解为涵盖其功能性抗体片段。该术语还涵盖完整的或全长的抗体,包括任何类别或亚类的抗体,包括IgG及其亚类、IgM、IgE、IgA和IgD。

[0023] “抗体片段”是指除完整抗体以外的分子,其包含结合完整抗体所结合的抗原的完整抗体的一部分。抗体片段的实例包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;双抗体;线性抗体;可变重链(VH)区;单链抗体分子(诸如scFvs)和单结构域VH单抗体;以及由抗体

片段形成的多特异性抗体。在具体实施方案中,抗体是包含可变重链区和/或可变轻链区的单链抗体片段,诸如scFv。

[0024] “单结构域抗体”是包含抗体的全部或一部分重链可变域或全部或一部分轻链可变域的抗体片段。在某些实施方案中,单结构域抗体是人单结构域抗体。

[0025] 如本文所用,基因表达的“抑制”是指与不存在抑制的基因产物的表达水平相比,消除或减少了由主题基因编码的一种或多种基因产物在细胞中的表达。示例性的基因产物包括由该基因编码的mRNA和蛋白质产物。在某些情况下,抑制是短暂或可逆的,而在其他情况下,抑制是永久的。尽管可能会产生截短或无功能的产物,但在某些情况下会抑制功能性或全长的蛋白质或mRNA。在本文的一些实施方案中,与表达相反,基因活性或功能被抑制。通常通过人工方法,即通过添加或引入化合物、分子、复合物或组合物,和/或通过破坏基因的核酸或与基因相关的核酸(诸如在DNA水平上)来诱导基因抑制。用于基因抑制的示例性方法包括基因沉默、敲低、敲除和/或基因破坏技术,诸如基因编辑。实例包括反义技术,诸如RNAi、siRNA、shRNA和/或核酶,其通常会导致表达的瞬时减少;以及基因编辑技术,其会导致靶向基因失活或破坏,例如通过诱导断裂和/或同源重组。

[0026] 如本文所用,基因的“破坏”是指在DNA水平上基因序列的变化。实例包括插入、突变和删除。典型地,破坏导致基因编码的正常或“野生型”产物的表达的抑制和/或完全不表达。这种基因破坏的实例是基因或基因的一部分的插入、移码和错义突变、缺失、敲入和敲除,包括整个基因的缺失。这种破坏可发生在编码区,例如在一个或多个外显子中,导致不能产生全长产物、功能性产物或任何产物,诸如通过插入终止密码子。这种破坏也可以通过启动子或增强子或其他影响转录激活的区域的破坏而发生,从而阻止基因转录。基因破坏包括基因靶向,包括通过同源重组的靶向基因失活。

[0027] 本发明的细胞

[0028] 典型地,根据本发明的细胞是真核细胞,诸如哺乳动物细胞(在本发明中也称为动物细胞),例如人细胞。

[0029] 更特别地,本发明的细胞源自血液、骨髓、淋巴或淋巴器官(特别是胸腺),并且是免疫系统的细胞(即免疫细胞),诸如先天或适应性免疫的细胞。例如,髓或淋巴细胞,包括淋巴细胞,典型地是T细胞和/或NK细胞。

[0030] 优选地,根据本发明,细胞特别是淋巴细胞,包括T细胞、B细胞和NK细胞。

[0031] 根据本发明的细胞也可以是免疫细胞祖细胞,诸如淋巴祖细胞,更优选地是T细胞祖细胞。

[0032] 典型地,T细胞祖细胞表达一组共有标志物,包括CD44、CD117、CD135和Sca-1,也可以参见Petrie HT,Kincade PW.Many roads,onedestination for T cell progenitors.The Journal of Experimental Medicine.2005;202(1):11-13。

[0033] 典型地,细胞是原代细胞,诸如直接从受试者中分离和/或从受试者中分离并冷冻的细胞。

[0034] 针对治疗的受试者,本发明的细胞可以是同种异体的和/或自体的。

[0035] 在一些实施方案中,细胞包括T细胞或其他细胞类型的一个或多个亚组,诸如完整T细胞群、CD4+细胞、CD8+细胞及其亚群,诸如由功能、激活状态、成熟度、分化潜力、扩增、再循环、定位和/或存留能力、抗原特异性、抗原受体的类型、在特定器官或区室中的存在、标

志物或细胞因子分泌谱和/或分化程度定义的那些。

[0036] T细胞和/或CD4⁺和/或CD8⁺ T细胞的亚型和亚群是初始T (T_N) 细胞、效应T细胞 (T_{EFF})、记忆T细胞及其亚型,诸如干细胞记忆T (TSC_M)、中央记忆T (TC_M)、效应记忆T (TE_M) 或终末分化的效应记忆T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL)、未成熟T细胞、成熟T细胞、辅助性T细胞、细胞毒性T细胞、粘膜相关性不变T (MAIT) 细胞、天然存在的和适应性调节性T (Treg) 细胞、辅助性T细胞 (诸如TH1细胞、TH2细胞、TH3细胞、TH17细胞、TH9细胞、TH22细胞)、卵泡辅助性T细胞、 α/β T细胞和 δ/γ T细胞。优选地,根据本发明的细胞是由于抑制了Suv39h1而具有干/记忆特性和更高的重构能力的T_{EFF}细胞,以及T_N细胞,TSC_M、TC_M、TE_M细胞及它们的组合。

[0037] 在一些实施方案中,使一个或多个T细胞群富集或耗尽对一种或多种特定标志物 (例如表面标志物) 呈阳性或表达高水平的细胞,或对一种或多种标志物呈阴性或表达相对较低水平的细胞。在一些情况下,这些标志物是在某些T细胞群 (诸如非记忆细胞) 上不存在或以相对较低的水平表达,但在某些其他T细胞群 (诸如记忆细胞) 上存在或以相对较高的水平表达的那些。在一个实施方案中,使细胞 (诸如,CD8⁺细胞或T细胞,例如,CD3⁺细胞) 富集 (即阳性选择) 对CD117、CD135、CD45RO、CCR7、CD28、CD27、CD44、CD127和/或CD62L阳性或表达高表面水平的CD117、CD135、CD45RO、CCR7、CD28、CD27、CD44、CD127和/或CD62L的细胞和/或耗尽 (例如,阴性选择) 对CD45RA阳性或表达高表面水平的CD45RA的细胞。在一些实施方案中,使细胞富集或耗尽对CD122、CD95、CD25、CD27和/或IL7-Ra (CD127) 阳性或表达高表面水平的CD122、CD95、CD25、CD27和/或IL7-Ra (CD127) 的细胞。在一些实例中,使CD8⁺ T细胞富集对CD45RO阳性 (或对CD45RA阴性) 和对CD62L阳性的细胞。

[0038] 例如,根据本发明,细胞可以包括CD4⁺ T细胞群和/或CD8⁺ T细胞亚群,例如富集中央记忆 (TC_M) 细胞的亚群。或者,该细胞可以是其他类型的淋巴细胞,包括自然杀伤 (NK) 细胞、MAIT细胞、先天淋巴细胞 (ILC) 和B细胞。

[0039] 根据本发明用于工程化的细胞和含有细胞的组合物分离自样品,特别是生物样品,例如获自受试者或衍生自受试者。典型地,受试者需要细胞疗法 (过继性细胞疗法) 和/或是将要接受细胞疗法的受试者。受试者优选是哺乳动物,特别是人。在本发明的一个实施方案中,所述受试者患有癌症。

[0040] 样品包括直接取自受试者的组织、流体和其他样品,以及来自一个或多个处理步骤 (诸如分离、离心、基因工程 (例如病毒载体转导))、洗涤和/或孵化的样品。生物样品可以是直接获自生物来源的样品或经加工的样品。生物样品包括但不限于体液,诸如血液、血浆、血清、脑脊髓液、滑液、尿液和汗液;组织和器官样品,包括由其衍生的加工样品。优选地,从其衍生或分离细胞的样品是血液或血液来源的样品,或衍生自单采血液分离术或白细胞分离术产物。示例性样品包括全血、外周血单核细胞 (PBMC)、白细胞、骨髓、胸腺、组织活检、肿瘤、白血病、淋巴瘤、淋巴结、肠相关淋巴组织、粘膜相关淋巴组织、脾脏、其他淋巴组织和/或由其衍生的细胞。在细胞疗法 (典型地是过继性细胞疗法) 下,样品包括自体 and 同种异体来源的样品。

[0041] 在一些实施方案中,细胞衍生自细胞系,例如T细胞系。这些细胞也可以获自异种来源,诸如小鼠、大鼠、非人灵长类动物或猪。优选地,该细胞是人细胞。

[0042] Suv39h1缺陷的细胞

[0043] 如本文所用,术语“Suv39h1”或“H3K9-组蛋白甲基转移酶Suv39h1”在本领域中具有其一般含义,并且是指组蛋白甲基转移酶“色斑3-9抑制因子同源物1(果蝇)”,其使用单甲基化的H3-Lys-9作为底物特异性地使组蛋白H3的Lys-9残基三甲基化(还可参见Aagaard L, Laible G, Selenko P, Schmid M, Dorn R, Schotta G, Kuhfittig S, Wolf A, Lebersorger A, Singh PB, Reuter G, Jenuwein T (Jun 1999). "Functional mammalian homologues of the Drosophila PEV-modifier Su(var)3-9 encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M3 1". EMB J 18(7):1923-38.)。所述组蛋白甲基转移酶也称为MG44、KMT1A、SUV39H、SUV39H1、组蛋白赖氨酸N-甲基转移酶SUV39H1、H3-K9-HMTase 1、OTTHUMP00000024298、Su(var)3-9同源物1、赖氨酸N-甲基转移酶1A、组蛋白H3-K9甲基转移酶1、位置效应色斑3-9同源物、组蛋白赖氨酸N-甲基转移酶或H3赖氨酸9特异性1。人Suv39h1甲基转移酶在UNIPROT中称为O43463,由位于染色体x上的基因Suv39h1 (NCBI中的基因ID:6839) 编码。根据本发明的术语Suv39h1还涵盖SUV39H1的所有直系同源物,诸如SU(VAR)3-9。

[0044] 如本文所用,根据本发明的表达“Suv39h1缺陷的”是指在根据本发明的细胞中抑制或阻断Suv39h1活性(即,组蛋白H3的Lys-9被H3K9-组蛋白甲基转移酶甲基化)。

[0045] 根据本发明,“抑制Suv39h1活性”是指与不被抑制的Suv39h1蛋白的活性或水平相比,Suv39h1活性降低至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%或更多。优选地,抑制Suv39h1活性导致在细胞中不存在实质上可检测到的Suv39h1活性。

[0046] 抑制Suv39h1活性也可以通过抑制Suv39h1基因表达或通过Suv39h1基因破坏来实现。根据本发明,相对于在不存在所述抑制的情况下通过该方法产生的相同细胞,所述抑制使Suv39h1在细胞中,特别是在本发明的免疫细胞中的表达降低至少50、60、70、80、90或95%。基因破坏也可导致Suv39h1蛋白的表达降低或导致非功能性Suv39h1蛋白的表达。

[0047] “非功能性”Suv39h1蛋白是指如上所述的具有降低的活性或缺乏可检测活性的蛋白。

[0048] 因此,根据本发明的细胞中Suv39h1活性的抑制剂可以选自天然的或不具有通过H3K9-组蛋白甲基转移酶抑制组蛋白H3的Lys-9的甲基化的能力或抑制H3K9-组蛋白甲基转移酶SUV39H1基因表达的任何化合物或试剂。

[0049] 抑制根据本发明的免疫细胞中的Suv39h1可以是永久且不可逆的或短暂或可逆的。但是,优选Suv39h1抑制是永久且不可逆的。抑制细胞中的Suv39h1可以如下所述地在将细胞注入目标患者之前或之后实现。

[0050] 根据本发明的基因工程化细胞

[0051] 在一些实施方案中,细胞包含通过基因工程引入的编码一种或多种抗原受体的一种或多种核酸。

[0052] 典型地,核酸是异源的(即,例如,其在待工程化的细胞和/或衍生出这种细胞的生物中通常不存在)。在一些实施方案中,核酸不是天然存在的,包括编码来自多种不同细胞类型的各种结构域的核酸的嵌合组合。

[0053] 根据本发明的抗原受体是基因工程化的T细胞受体(TCR)及其组分,以及功能性非TCR抗原受体,诸如嵌合抗原受体(CAR)。

[0054] 嵌合抗原受体(CAR)

[0055] 在一些实施方案中,工程化抗原受体包含嵌合抗原受体(CAR),包括激活或刺激性CAR、共刺激性CAR(参见W02014/055668)和/或抑制性CAR(iCARs,参见Fedorov et al., Sci.Transl.Medicine,5(215)(2013年12月))。

[0056] 嵌合抗原受体(CAR)(也称为嵌合免疫受体、嵌合T细胞受体、人工T细胞受体)是工程化受体,其可将任意特异性移植到免疫效应细胞(T细胞)上。典型地,这些受体用于将单克隆抗体的特异性移植到T细胞上,通过逆转录病毒载体促进其编码序列的转移。

[0057] 在一些方面,CAR通常通过接头和/或跨膜结构域包含与一种或多种细胞内信号传导组分连接的细胞外抗原(或配体)结合结构域。这种分子典型地模拟或近似于通过天然抗原受体的信号、通过这种受体与共刺激受体组合的信号和/或仅通过共刺激受体的信号。

[0058] 在一些实施方案中,构建CAR以对特定抗原(或标志物或配体)具有特异性,诸如在待通过过继治疗靶向的特定细胞类型中表达的抗原,诸如癌症标志物。因此,CAR典型地在其细胞外部分中包含一个或多个抗原结合分子,诸如一个或多个抗原结合片段、结构域或部分,或一个或多个抗体可变结构域,和/或抗体分子。

[0059] 用来结合抗原的部分通常分为三类:衍生自抗体的单链抗体片段(scFv)、选自文库的Fab或与其同源受体结合的天然配体(对于第一代CAR)。Sadelain M,Brentjens R,Riviere I中特别报道了这些类别中的每一个的成功实例。嵌合抗原受体(CAR)设计的基本原理参见Cancer discovery.2013;3(4):388-398(特别参见表1)并且包括在本申请中。通常使用衍生自鼠免疫球蛋白的scFv,因为它们很容易衍生自特征明确的单克隆抗体。

[0060] 典型地,CAR包括抗体分子的一个或多个抗原结合部分,诸如衍生自单克隆抗体(mAb)的可变重链(VH)和可变轻链(VL)的单链抗体片段(scFv)。

[0061] 在一些实施方案中,CAR包含特异性结合抗原的抗体重链结构域,诸如待靶向的细胞或疾病(诸如肿瘤细胞或癌细胞)的癌症标志物或细胞表面抗原,诸如本文所述或本领域已知的任何靶抗原。

[0062] 在一些实施方案中,CAR含有特异性识别在细胞表面上表达的抗原(诸如完整抗原)的抗体或抗原结合片段(例如scFv)。

[0063] 在一些实施方案中,CAR含有TCR样抗体,诸如抗体或抗原结合片段(例如scFv),其特异性识别以MHC-肽复合物呈递于细胞表面的细胞内抗原,诸如肿瘤相关抗原。在一些实施方案中,识别MHC-肽复合物的抗体或其抗原结合部分可以作为重组受体(诸如抗原受体)的一部分在细胞上表达。抗原受体中存在功能性非TCR抗原受体,诸如嵌合抗原受体(CAR)。通常,含有表现出针对肽-MHC复合物的TCR样特异性的抗体或抗原结合片段的CAR也可以称为TCR样CAR。

[0064] 在一些方面,抗原特异性结合或识别组分与一个或多个跨膜和细胞内信号传导结构域连接。在一些实施方案中,CAR包括与CAR的细胞外结构域融合的跨膜结构域。在一个实施方案中,使用与CAR中的结构域之一天然相关的跨膜结构域。在一些情况下,通过氨基酸取代选择或修饰跨膜结构域,以避免这些结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合,以使与受体复合物的其他成员的相互作用最小化。

[0065] 在一些实施方案中,跨膜结构域衍生自天然或合成来源。如果来源是天然的,该结构域可以衍生自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。跨膜区域包括衍生自(即至少包含其跨膜区域)T细胞受体、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD 16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、

CD86、CD 134、CD137、CD 154的 α 、 β 或 ζ 链的那些。跨膜结构域也可以是合成的。

[0066] 在一些实施方案中,存在短的寡或多肽接头,例如长度为2至10个氨基酸的接头,并在CAR的跨膜结构域和细胞质信号结构域之间形成连接。

[0067] CAR通常包括至少一种或多种细胞内信号传导组分。典型地,第一代CAR具有CD3 ζ 链的胞内结构域,它是来自内源TCR的主要信号传递者。典型地,第二代CAR还包含从各种共刺激蛋白受体(例如CD28、41BB、ICOS)到CAR胞质尾的细胞内信号传导结构域,以向T细胞提供其他信号。临床前研究表明,第二代改善了T细胞的抗肿瘤活性。最近,第三代CAR结合了多个信号传导结构域,诸如CD3 ζ -CD28-41BB或CD3 ζ -CD28-OX40,以增强功效。

[0068] 例如,CAR可以包括TCR复合物的细胞内组分,诸如介导T细胞活化和细胞毒性的TCR CD3 ζ 链,例如CD3 ζ 链。因此,在一些方面,抗原结合分子与一个或多个细胞信号传导模块连接。在一些实施方案中,细胞信号传导模块包括CD3跨膜结构域、CD3细胞内信号传导结构域和/或其他CD跨膜结构域。CAR还可以进一步包括一种或多种其他分子(诸如Fc受体 γ 、CD8、CD4、CD25或CD16)的一部分。

[0069] 在一些实施方案中,一旦连接CAR,CAR的细胞质结构域或细胞内信号传导结构域激活正常效应子功能或相应的非工程化免疫细胞(典型地为T细胞)的应答的至少一种。例如,CAR可以诱导T细胞的功能,诸如溶细胞活性或T辅助活性、细胞因子或其他因子的分泌。

[0070] 在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包括T细胞受体(TCR)的细胞质序列,并且在一些方面还包括在天然情况下与此类受体配合作用以在抗原受体结合后启动信号转导的共受体、和/或此类分子的任何衍生物或变体和/或具有相同功能能力的任何合成序列的那些。

[0071] 在某些方面,T细胞活化被描述为由两类细胞质信号传导序列介导:通过TCR启动抗原依赖性初级活化的细胞(初级细胞质信号传导序列);以及以抗原非依赖性方式起作用以提供次级或共刺激信号(次级细胞质信号传导序列)的细胞。在一些方面,CAR包括这种信号传导组分的一个或两个。

[0072] 在一些方面,CAR包括初级细胞质信号传导序列,其以刺激方式或抑制方式调节TCR复合物的初级激活。以刺激方式起作用的主要细胞质信号传导序列可含有信号传导基序,其被称为基于免疫受体酪氨酸的活化基序或ITAM。含有初级细胞质信号传导序列的ITAM的实例包括衍生自TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CDS、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的序列。在一些实施方案中,CAR中的细胞质信号传导分子含有细胞质信号传导结构域、其部分或衍生自CD3 ζ 的序列。

[0073] CAR还可以包括共刺激受体的信号传导结构域和/或跨膜部分,诸如CD28、4-1BB、OX40、DAP10和ICOS。在某些方面,相同的CAR包括激活组分和共刺激组分两者。或者,活化结构域由一个CAR提供,而共刺激由识别另一种抗原的另一种CAR提供。

[0074] CAR或其他抗原受体也可以是抑制性CAR(例如iCAR),并且包括削弱或抑制应答(诸如免疫应答)的细胞内组分。此类细胞内信号传导组分的实例是在免疫检查点分子上发现的那些,包括PD-1、CTLA4、LAG3、BTLA、OX2R、TIM-3、TIGIT、LAIR-1、PGE2受体、EP2/4腺苷受体(包括A2AR)。在一些方面,工程化细胞包括抑制性CAR,其包括这种抑制性分子的信号传导结构域或衍生自这种抑制性分子的信号传导结构域,从而其起到削弱其应答的作用。当由激活受体(例如CAR)识别的抗原也表达或也可以表达在正常细胞表面上时,这种CAR例

如用于减少脱靶效应的可能性。

[0075] TCR

[0076] 在一些实施方案中,基因工程化的抗原受体包括从天然存在的T细胞克隆的重组T细胞受体 (TCR) 和/或TCR。

[0077] “T细胞受体”或“TCR”是指含有可变 α 和 β 链(分别称为TCRa和TCRp)或可变 γ 和 δ 链(分别称为TCR γ 和TCR δ)的分子,且其能够特异性结合与MHC受体结合的抗原肽。在一些实施方案中,TCR为 $\alpha\beta$ 形式。典型地,以 $\alpha\beta$ 和 $\gamma\delta$ 形式存在的TCR通常在结构上相似,但是表达它们的T细胞可能具有不同的解剖位置或功能。TCR可以在细胞表面上或以可溶形式被发现。通常,TCR在通常负责识别结合主要组织相容性复合物(MHC)分子的抗原的T细胞(或T淋巴细胞)表面上被发现。在一些实施方案中,TCR还可以含有恒定结构域、跨膜结构域和/或短细胞质尾(例如参见Janeway et al., Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3rd Ed., Current Biology Publications, p.4:33, 1997)。例如,在一些方面,TCR的每条链可具有一个N末端免疫球蛋白可变结构域、一个免疫球蛋白恒定结构域、跨膜区域和在C末端的短细胞质尾。在一些实施方案中,TCR与参与介导信号转导的CD3复合物的不变蛋白相关。除非另有说明,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的TCR,包括 $\alpha\beta$ 形式或 $\gamma\delta$ 形式的TCR。

[0078] 因此,出于本文的目的,提及的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。可以互换使用的TCR的“抗原结合部分”或“抗原结合片段”是指含有TCR的一部分结构域,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,其足以形成结合特异性MHC-肽复合物的结合位点,诸如通常每条链包含三个互补决定区的结合位点。

[0079] 在一些实施方案中,TCR链的可变结构域缔合以形成类似于免疫球蛋白的环或互补决定区(CDR),其赋予抗原识别并通过形成TCR分子的结合位点来确定肽特异性。典型地,如免疫球蛋白一样,CDR被框架区(FR)隔开(例如参见Jores et al., Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 87:9138, 1990; Chothia et al., EMBO J. 7:3745, 1988; see also Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003)。在一些实施方案中,尽管已显示 α 链的CDR1与抗原肽的N末端部分相互作用,而 β 链的CDR1与肽的C末端部分相互作用,但是CDR3是负责识别经加工抗原的主要CDR。CDR2被认为可以识别MHC分子。在一些实施方案中, β 链的可变区可以含有其他高变(HV4)区。

[0080] 在一些实施方案中,TCR链含有恒定结构域。例如,如免疫球蛋白一样,TCR链的细胞外部分(例如, α -链、 β -链)可以在N末端含有两个免疫球蛋白结构域、一个可变结构域(例如,V α 或V β ;典型地基于Kabat编号的氨基酸1-116, Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5th ed.)以及与细胞膜相邻的一个恒定结构域(例如 α -链恒定结构域或C α ,典型地基于Kabat的氨基酸117-259、 β -链恒定结构域或C β ,典型地基于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膜近端恒定结构域和两个含有CDR的膜远端可变结构域。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,从而在两条链之

间形成连接。在一些实施方案中,TCR可在 α 和 β 链的每一个中具有额外的半胱氨酸残基,使得TCR在恒定结构域中含有两个二硫键。

[0081] 在一些实施方案中,TCR链可含有跨膜结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域带正电。在某些情况下,TCR链含有细胞质尾巴。在某些情况下,该结构允许TCR与其他分子(如CD3)缔合。例如,含有带有跨膜区的恒定结构域的TCR可以将蛋白质锚定在细胞膜中,并与CD3信号传导装置或复合物的不变亚基缔合。

[0082] 通常,CD3是在哺乳动物和 ζ 链中可以具有三个不同的链(γ , δ 和 ϵ)的多蛋白复合物。例如,在哺乳动物中,复合物可含有CD3 γ 链、CD35链、两个CD3s链和CD3 ζ 链的同二聚体。CD3 γ 、CD35和CD3s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。CD3 γ 、CD35和CD3s链的跨膜区域带负电,这是允许这些链与带正电的T细胞受体链缔合的特征。CD3 γ 、CD35和CD3s链的胞内尾各自含有单个保守的基序,称为基于免疫受体酪氨酸的激活基序或ITAM,而每个CD3 ζ 链均具有三个。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域,并在将信号从TCR传播到细胞中发挥作用。CD3和 ζ 链与TCR一起形成所谓的T细胞受体复合物。

[0083] 在一些实施方案中,TCR可以是两条链 α 和 β (或任选地 γ 和 δ)的异二聚体,或者它可以是单链TCR构建体。在一些实施方案中,TCR是含有两个分开的链(诸如通过一个或多个二硫键连接)的异二聚体(α 和 β 链或 γ 和 δ 链)。

[0084] 示例性抗原受体,包括CAR和重组TCR,以及将所述受体工程化并引入细胞的方法,包括例如在国际专利申请公开号W0200014257、W02013126726、W02012/129514、W02014031687、W02013/166321、W02013/071154、W02013/123061;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中描述的那些,和/或Sadelain et al.,Cancer Discov.2013April;3(4):388-398;Davila et al.(2013)PLoS ONE 8(4):e61338;Turtle et al.,Curr.Opin.Immunol.,2012October;24(5):633-39;Wu et al.,Cancer,2012March 18(2):160-75描述的那些。在一些方面,基因工程化的抗原受体包括如美国专利号:7,446,190中描述的CAR,以及国际专利申请公开号:W0/2014055668A1中描述的那些。

[0085] 抗原

[0086] 在基因工程化抗原受体靶向的抗原中,存在通过过继细胞疗法靶向的疾病、病症或细胞类型的情况下表达的抗原。这些疾病和病症包括增生性、赘生性和恶性疾病和病症,更特别是癌症。

[0087] 癌症可以是实体癌或“液体肿瘤”,诸如影响血液、骨髓和淋巴系统的癌症,也称为造血系统和淋巴组织的肿瘤,其特别包括白血病和淋巴瘤。例如,液体肿瘤包括急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)和慢性淋巴细胞性白血病(CLL)(包括各种淋巴瘤,诸如套细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、腺瘤、鳞状细胞癌、喉癌、胆囊癌和胆管癌、视网膜癌(诸如成视网膜细胞瘤))。

[0088] 实体癌尤其包括影响选自下组的器官之一的癌症:结肠、直肠、皮肤、子宫内膜、肺(包括非小细胞肺癌)、子宫、骨骼(诸如骨肉瘤、软骨肉瘤、尤因肉瘤、纤维肉瘤、巨细胞瘤、

釉质瘤和脊索瘤)、肝、肾、食道、胃、膀胱、胰腺、子宫颈、脑(诸如脑膜瘤、胶质母细胞瘤、低级别星形细胞瘤、少突胶质细胞瘤、垂体瘤、神经鞘瘤和转移性脑癌)、卵巢、乳房、头颈部、睾丸、前列腺和甲状腺。

[0089] 优选地,根据本发明的癌症是如上所述的影响血液、骨髓和淋巴系统的癌症。典型地,癌症是多发性骨髓瘤或与多发性骨髓瘤相关。

[0090] 根据本发明的疾病还涵盖感染性疾病或病症,例如但不限于病毒、逆转录病毒、细菌和原生动物感染、免疫缺陷、巨细胞病毒(CMV)、爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)、腺病毒、BK多瘤病毒;自身免疫或炎性疾病或病症,诸如关节炎(例如类风湿性关节炎(RA))、I型糖尿病、系统性红斑狼疮(SLE)、炎性肠病、牛皮癣、硬皮病、自身免疫性甲状腺疾病、格雷夫病、克罗恩病、多发性硬化症、哮喘和/或与移植相关的疾病或病症。

[0091] 在一些实施方案中,抗原是多肽。在一些实施方案中,它是碳水化合物或其他分子。在一些实施方案中,与正常或非靶向细胞或组织相比,抗原在疾病或病症的细胞(例如肿瘤或致病性细胞)上选择性表达或过表达。在其他实施方案中,抗原在正常细胞上表达和/或在工程化细胞上表达。在一些这样的实施方案中,本文提供的多靶点和/或基因破坏方法用于改进特异性和/或功效。

[0092] 在一些实施方案中,抗原是通用肿瘤抗原。术语“通用肿瘤抗原”是指免疫原性分子,诸如蛋白质,其通常在肿瘤细胞中比在非肿瘤细胞中以更高的水平表达,并且还在不同来源的肿瘤中表达。在一些实施方案中,通用肿瘤抗原在人癌症中的表达超过30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%或更多的。在一些实施方案中,通用肿瘤抗原在至少三种、至少四种、至少五种、至少六种、至少七种、至少八种或更多种不同类型的肿瘤中表达。在某些情况下,通用肿瘤抗原可以在非肿瘤细胞(诸如正常细胞中)表达,但是其表达水平低于在肿瘤细胞中的表达水平。在某些情况下,通用肿瘤抗原在非肿瘤细胞中根本不表达,诸如在正常细胞中不表达。例如,示例性通用肿瘤抗原包括人端粒酶逆转录酶(hTERT)、survivin、小鼠双微体2同源物(MDM2)、细胞色素P450 1B1(CYP1B)、HER2/neu、Wilms肿瘤基因1(WT1)、livin、甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)、粘蛋白16(MUC16)、MUC1、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、p53或细胞周期蛋白(D1)。包括通用肿瘤抗原的肿瘤抗原的肽表位是本领域已知的,并且在某些方面,可用于产生MHC限制性抗原受体,诸如TCR或TCR样CAR(例如,参见公开的PCT申请号W02011009173或W02012135854和公开的美国申请号US20140065708)。

[0093] 在一些方面,抗原在多发性骨髓瘤上表达,诸如CD38、CD138和/或CS-1。其他示例性多发性骨髓瘤抗原包括CD56、TIM-3、CD33、CD123和/或CD44。针对这种抗原的抗体或抗原结合片段是已知的,例如包括美国专利号8,153,765;8,603,477;8,008,450;美国公开申请号US20120189622和公开的国际PCT申请号W02006099875、W02009080829或W0201209261中描述的那些。在一些实施方案中,该抗体或其抗原结合片段(例如scFv)可用于产生CAR。

[0094] 在一些实施方案中,抗原可以是在癌细胞或肿瘤细胞上表达或上调的抗原,但也可以在免疫细胞(诸如静止或活化的T细胞)中表达。例如,在某些情况下,据报道hTERT、survivin和其他通用肿瘤抗原的表达存在于淋巴细胞中,包括活化的T淋巴细胞(例如,参见Wenget al.(1996) J Exp.Med.,183:2471-2479;Hathcock et al.(1998) JImmunol,160:5702-5706;Liu et al.(1999) Proc.Natl Acad Sci.,96:5147-5152;Turksma et al.(2013) Journal of Translational Medicine,11:152)。同样,在某些情况下,CD38和其他

肿瘤抗原也可以在免疫细胞(诸如T细胞)中表达,诸如在活化的T细胞中上调。例如,在一些方面,CD38是已知的T细胞活化标志物。

[0095] 在本文提供的一些实施方案中,可以将免疫细胞(诸如T细胞)工程化以抑制或破坏免疫细胞中编码抗原的基因,从而使所表达的基因工程化抗原受体在免疫细胞自身表达的情况下不会特异性结合抗原。因此,在一些方面,这可以避免脱靶效应,诸如工程化的免疫细胞与其自身的结合,这可能降低例如与过继细胞疗法有关的工程化的免疫细胞的功效。

[0096] 在一些实施方案中,诸如在抑制性CAR的情况下,靶标是脱靶标志物,诸如不在患病细胞或待靶向的细胞上表达但在正常或未患病细胞上表达的抗原,在相同工程化细胞中,所述正常或未患病细胞还表达被激活或刺激受体靶向的疾病特异性靶标。这种抗原的示例是MHC分子,诸如I类MHC分子,例如,其与治疗其中这些分子被下调但在非靶向细胞中保持表达的疾病或病症有关。

[0097] 在一些实施方案中,工程化的免疫细胞可以含有靶向一种或多种其他抗原的抗原。在一些实施方案中,一种或多种其他抗原是肿瘤抗原或癌症标志物。在一些实施方案中,通过提供的免疫细胞上的抗原受体靶向的其他抗原可以包括孤儿酪氨酸激酶受体ROR1、tEGFR、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、间皮素、CEA和乙肝表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3或4、FBP、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、 κ 轻链、路易斯Y、L1细胞粘附分子、MAGE-A1、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、瘤胎抗原、ROR1、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、Her2/neu、雌激素受体、孕激素受体、ephrinB2、CD 123、CS-1、c-Met、GD-2和MAGE A3、CE7、Wilms Tumor 1(WT-1)、细胞周期蛋白(诸如细胞周期蛋白A1(CCNA1))、和/或生物素化分子,和/或由HIV、HCV、HBV或其他病原体表达的分子。

[0098] 在一些实施方案中,CAR结合病原体特异性抗原。在一些实施方案中,CAR对病毒抗原(诸如HIV、HCV、HBV等)、细菌抗原和/或寄生虫抗原具有特异性。

[0099] 在一些实施方案中,将本发明细胞基因工程化以在细胞上表达两个或更多个基因工程化的受体,每个受体识别不同的抗原,并且典型地,每个受体包括不同的细胞内信号传导组分。例如,在国际专利申请公开号W0 2014055668 A1中描述了这种多靶点策略(描述了活化和共刺激CAR的组合,例如,靶向单独存在于靶标(例如正常细胞)之外,但仅一起存在于待治疗的疾病或病症的细胞上的两种不同抗原)和Fedorov等,Sci.Transl.Medicine,5(215)(2013年12月)(描述了表达活化和抑制性CAR的细胞,诸如其中活化CAR结合在正常或未患病细胞和待治疗的疾病或病症细胞上均表达的一种抗原,而抑制性CAR结合仅在正常细胞或不需要治疗的细胞上表达的另一种抗原的那些)。

[0100] 在某些情况下,刺激因子(例如淋巴因子或细胞因子)的过表达可能对受试者有毒。因此,在某些情况下(诸如在过继免疫疗法中施用),工程化细胞包括使细胞易于在体内进行负选择的基因片段。例如,在一些方面,将细胞工程化,使得可以由于施用其的患者体内状况的改变而将其消除。负选择表型可以由插入赋予对所施用试剂(例如化合物)的敏感性的基因所致。负选择基因包括赋予更昔洛韦敏感性的单纯疱疹病毒I型胸苷激酶(HSV-1TK)基因(Wigler et al.,Cell 11:223,1977);细胞次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶(HPRT)基

因；细胞腺嘌呤磷酸核糖基转移酶 (APRT) 基因；细菌胞嘧啶脱氨酶 (Mullen et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA.89:33 (1992))。

[0101] 在本发明的其他实施方案中，细胞 (例如T细胞) 未进行工程化以表达重组受体，而是包括对所需抗原具有特异性的天然存在的抗原受体，诸如在孵育步骤中体外或离体培养的肿瘤浸润淋巴细胞和/或T细胞，以促进具有特定抗原特异性的细胞的扩增。例如，在一些实施方案中，通过分离肿瘤特异性T细胞 (例如自体肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL)) 来产生用于过继细胞疗法的细胞。在某些情况下，使用自体肿瘤浸润淋巴细胞直接靶向人肿瘤可以介导肿瘤消退 (参见Rosenberg SA, et al. (1988) N Engl J Med.319:1676-1680)。在一些实施方案中，从切除的肿瘤中提取淋巴细胞。在一些实施方案中，此类淋巴细胞在体外扩增。在一些实施方案中，将此类淋巴细胞与淋巴因子 (例如，IL-2) 一起培养。在一些实施方案中，此类淋巴细胞介导自体肿瘤细胞的特异性裂解，但不介导同种异体肿瘤或自体正常细胞的特异性裂解。

[0102] 在另外的核酸中，例如用于引入的基因是那些诸如通过促进转移的细胞的活力和/或功能来改进治疗功效的基因；提供基因标志物以选择和/或评估细胞，诸如评估体内存活或定位的基因；例如，如Lupton S.D. et al., Mol. and Cell Biol., 11:6 (1991)；和 Riddell et al., Human Gene Therapy 3:319-338 (1992) 所述，通过使细胞易于在体内进行负选择来改进安全性的基因；还可参见Lupton等的PCT/US91/08442和PCT/US94/05601的公开，其描述了衍生自将显性阳性选择性标志物与阴性选择性标志物融合的双功能选择性融合基因的用途。例如参见Riddell等，美国专利号6,040,177第14-17栏。

[0103] 获得根据本发明的细胞的方法

[0104] 本发明还涉及产生修饰或工程化的免疫细胞的方法，其包括抑制免疫细胞中Suv39h1的表达和/或活性的步骤。

[0105] 优选地，获得根据本发明的细胞的方法还包括将特异性结合靶抗原的基因工程化抗原受体引入所述免疫细胞的步骤。

[0106] Suv39h1的表达和/或活性的抑制以及特异性结合免疫细胞中的靶抗原的基因工程化抗原受体的引入可以同时或以任何顺序依次进行。

[0107] Suv39h1的抑制

[0108] 根据本发明，工程化的免疫细胞可以与至少一种抑制或阻断Suv39h1的表达和/或活性的试剂接触。

[0109] 所述试剂可以选自小分子抑制剂。典型地阻断或抑制Suv39h1表达或活性的抗体衍生物，诸如胞内抗体、纳米抗体或亲和抗体；典型地阻断或抑制Suv39h1表达或活性的适配子；阻断转录或翻译的核酸分子，诸如与Suv39h1互补的反义分子；RNA干扰剂 (诸如小干扰RNA (siRNA)、小发夹RNA (shRNA)、microRNA (miRNA) 或piwiRNA (piRNA)；核酶或它们的组合。

[0110] 所述至少一种试剂也可以是外源核酸，其包含a) 与Suv39h1基因组核酸序列杂交的工程化的非天然存在的簇状规则间隔的短回文重复序列 (CRISPR) 向导RNA和/或b) 编码CRISPR蛋白 (典型地，是II型Cas9蛋白) 的核苷酸序列，任选其中将细胞转基因以用于表达Cas9蛋白。该试剂还可以是锌指蛋白 (ZFN) 或TAL蛋白。

[0111] 术语“有机小分子”是指大小与通常在药物中使用的有机分子相当的分子。该术语

排除生物大分子(例如蛋白质、核酸等)。优选的有机小分子的尺寸范围为至多约5000Da,更优选至多2000Da,最优选至多约1000Da。

[0112] 在一个具体实施方案中,H3K9-组蛋白甲基转移酶SUV39H1的抑制剂是毛壳素(chametocin,CAS 28097-03-2),如Greiner D,Bonaldi T,Eskeland R,Roemer E,Imhof A. "Identification of a specific inhibitor of the histone methyltransferase SUV (VAR) 3-9".Nat Chem Biol.2005Aug;1(3):143-5.;Weber,H.P.,et al,"The molecular structure and absolute configuration of chaetocin",Acta Cryst,B28,2945-2951 (1972);Udagawa,S.,et al,"The production of chaetoglobosins,sterigmatocystin, 0-methylsterigmatocystin,and chaetocin by Chaetomium spp.and related fungi", Can.J.microbiol,25,170-177 (1979);和Gardiner,D.M.,et al,"The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins:distribution,mode of action,functions and biosynthesis",Microbiol,151,1021-1032 (2005)所述。例如,毛壳素可从Sigma Aldrich商购获得。

[0113] Suv39h1的抑制剂也可以是ETP69 (Rac-(3S,6S,7S,8aS)-6-(苯并[d][1,3]二氧-5-基)-2,3,7-三甲基-1,4-二氧六氢-6H-3,8a-表二硫代吡咯并[1,2-a]吡嗪-7-腈)、表二硫代二酮哌嗪生物碱脂蛋白A的外消旋类似物(参见W02014066435,还参见Baumann M, Dieskau AP,Loertscher BM,et al.Tricyclic Analogues of Epidithiodioxopiperazine Alkaloids with Promising In Vitro and In Vivo Antitumor Activity.Chemical science(Royal Society of Chemistry:2010).2015;6: 4451-4457,and Snigdha S,Prieto GA,Petrosyan A,et al.H3K9me3 Inhibition Improves Memory,Promotes Spine Formation,and Increases BDNF Levels in the Aged Hippocampus.The Journal of Neuroscience.2016;36(12):3611-3622)。

[0114] 化合物的抑制活性可以使用各种方法确定,如Greiner D.Et al.Nat Chem Biol.2005Aug;1(3):143-5or Eskeland,R.et al.Biochemistry 43,3740-3749 (2004)所述。

[0115] 细胞中Suv39h1的抑制可以在目标患者中注射之前或之后实现。在一些实施方案中,如之前所定义的抑制是在向受试者施用细胞之后在体内进行的。典型地,本文定义的Suv39h1抑制剂可以包括在含有细胞的组合物中。也可以在向受试者施用细胞之前、同时或之后分别施用Suv39h1。

[0116] 典型地,可以通过将本发明的细胞与含有至少一种如上所述的药理抑制剂的组合物一起孵育来实现本发明Suv39h1的抑制。所述抑制剂包括在体外抗肿瘤T细胞的扩增过程中,从而在过继转移后改变了它们的重构、存活和治疗功效。

[0117] 根据本发明的细胞中Suv39h1的抑制可以通过胞内抗体实现。胞内抗体是在同一细胞中产生后在细胞内与其抗原结合的抗体(例如参见以下综述,Marschall AL,Dübel S and Böldicke T "Specific in vivo knockdown of protein function by intrabodies",MAbs.2015;7(6):1010-35.but see also Van Impe K,Bethuyne J,Cool S,Impens F,Ruano-Gallego D,De Wever O,Vanloo B,Van Troys M,Lambein K, Boucherie C,et al."A nanobody targeting the F-actin capping protein CapG restrains breast cancer metastasis".Breast Cancer Res 2013;15:R116;Hyland S,

Beerli RR,Barbas CF,Hynes NE,Wels W..“Generation and functional characterization of intracellular antibodies interacting with the kinase domain of human EGF receptor.Oncogene 2003;22:1557-67”;Lobato MN,Rabbitts TH. “Intracellular antibodies and challenges facing their use as therapeutic agents”.Trends Mol Med 2003;9:390-6,and Donini M,Morea V,Desiderio A, Pashkoulov D,Villani ME,Tramontano A,Benvenuto E.“Engineering stable cytoplasmic intrabodies with designed specificity”.J Mol Biol.2003Jul 4;330 (2):323-32.)。

[0118] 可以通过从现有的杂交瘤克隆中克隆相应的cDNA来生成胞内抗体,或更方便的是,新的scFvs/Fab可以选自体外展示技术(诸如噬菌体展示),所述技术从一开始就提供编码抗体的必要基因,并允许对抗体精细特异性进行更详细的预先设计。另外,可以采用细菌-、酵母-、哺乳动物细胞表面展示和核糖体展示。但是,用于选择特异性抗体的最常用的体外展示系统是噬菌体展示。在称为淘选(亲和力选择)的过程中,通过将抗体噬菌体库与抗原一起孵育来选择重组抗体噬菌体。重复该过程数次,以得到包含针对几乎任何可能的靶标的特异性抗原结合剂的富集抗体库。迄今,体外组装的重组人抗体文库已经产生了数千种新型重组抗体片段。要注意的是,通过细胞质胞内抗体敲低特定蛋白质的前提是通过抗体结合将抗原中和/失活。产生合适抗体的五种不同方法已经出现:1)体内选择真核生物(诸如酵母)和原核生物(诸如大肠杆菌)中的功能性胞内抗体(抗原依赖性和独立性);2)产生抗体融合蛋白以改进胞质稳定性;3)使用特定的框架以改进胞质稳定性(例如,通过在稳定的抗体框架中嫁接CDR或引入合成的CDR);4)使用单结构域抗体以改进胞质稳定性;和5)选择不含二硫键的稳定的胞内抗体。在如上所述的Marschall,A.L et al.,mAbs 2015中特别详细地描述了那些方法。

[0119] 胞内抗体最常用的形式是scFv,其由通过短而灵活的接头序列(通常为(Gly4Ser)3)保持在一起的H链和L链可变抗体结构域(VH和VL)组成,以避免需要分别表达和组装完整IgG或Fab分子的2条抗体链。或者,已经使用了Fab格式,其另外包含重链的C1结构域和轻链的恒定区。最近,描述了一种新的胞内抗体的可能形式,scFab。scFab形式有望将可用的Fab基因更容易地亚克隆到细胞内表达载体中,但是,与完善的scFv形式相比,是否提供任何优势还有待观察。除scFv和Fab外,双特异性形式已用作胞内抗体。与单特异性抗体对应物相比,靶向ER的双特异性Tie-2x VEGFR-2抗体证明具有延长的半衰期。开发了双特异性跨膜胞内抗体作为特定形式以同时识别表皮生长因子的胞内和胞外表位,其结合相关单特异性抗体的独特特征,即抑制自身磷酸化和配体结合。

[0120] 特别适用于细胞质表达的另一胞内抗体形式是衍生自骆驼或由一个人VH结构域或人VL结构域组成的单结构域抗体(也称为纳米抗体)。这些单结构域抗体通常具有有利的特性,例如高稳定性;良好的溶解性;易于文库克隆和选择;在大肠杆菌和酵母中的高表达产量。

[0121] 用表达质粒转染或用重组病毒进行病毒转导后,可以在靶细胞内表达胞内抗体基因。典型地,选择旨在提供最佳的胞内抗体转染和生产水平。可以通过免疫印迹检测产生的抗体来分析成功的转染和随后的胞内抗体产生,但是,为了评估正确的胞内抗体/抗原相互作用,可以使用与相应抗原和胞内抗体表达质粒瞬时共转染的来自HEK 293细胞提取物的

共免疫沉淀。

[0122] 根据本发明的细胞中Suv39h1的抑制也可以用抑制或阻断Suv39h1表达或活性的适配子来实现。适配子是在分子识别方面代表抗体的替代物的一类分子。适配子是寡核苷酸(DNA或RNA)或寡肽序列,其具有以高亲和力和特异性识别几乎任何种类的靶分子的能力。

[0123] 寡核苷酸适配子可通过随机序列文库的指数富集(SELEX)通过配体的系统进化来分离,如Tuerk C.和Gold L.,1990所述。所述随机序列文库可通过DNA的组合化学合成获得。在该文库中,每个成员都是唯一序列的线性低聚物,最终经过化学修饰。此类分子的可能修饰、用途和优势已在Jayasena S.D.,1999中进行了综述。

[0124] 肽适配子由平台蛋白(诸如大肠杆菌硫氧还蛋白A)展示的受构象约束的抗体可变区组成,所述蛋白通过两种杂交方法从组合文库中选择(Colas P,Cohen B,Jessen T,Grishina I,McCoy J,Brent R.“Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin-dependent kinase 2”.Nature.1996Apr 11;380(6574):548-50)。

[0125] 根据本发明的细胞中Suv39h1的抑制也可以通过亲和抗体分子来实现。亲和抗体是经工程化以模仿单克隆抗体以高亲和力结合大量靶蛋白或肽的小蛋白,因而是抗体模拟物家族的成员(参见综述Löfblom J,Feldwisch J,Tolmachev V,Carlsson J,Ståhl S,Frejd FY.Affibody molecules:engineered proteins for therapeutic,diagnostic and biotechnological applications.FEBS Lett.2010Jun 18;584(12):2670-80)。亲和抗体分子基于葡萄球菌蛋白A的免疫球蛋白结合区中B结构域的工程化变体(Z结构域),理论上可与任何给定靶标特异性结合。亲和抗体分子文库通常通过螺旋1和2中包含Z结构域原始Fc结合表面的13个氨基酸位置的组合随机化而构建。典型地,将文库展示在噬菌体上,然后针对所需靶标进行生物淘选。如果初级亲和力增加,亲和力成熟通常会导致改进的结合剂,并且可以通过螺旋改组或序列比对结合定向组合诱变来实现。新近鉴定出的具有改变了结合表面的分子通常保持了原始的螺旋结构以及高稳定性,尽管已经报道了具有有趣性质的独特例外。由于其小尺寸和快速折叠特性,可以通过化学肽合成来生产亲和抗体分子。

[0126] 在本发明的其他实施方案中,可以通过使用RNA干扰(RNAi)(诸如短干扰RNA(siRNA)、短发夹RNA(shRNA)或核酶的敲低)来通过基因压制/抑制来实现对Suv39h1活性的抑制。siRNA技术包括利用双链RNA分子的基于RNAi的技术,所述分子具有与从基因转录的mRNA的核苷酸序列同源的序列,以及与核苷酸序列互补的序列。siRNA通常与从该基因转录的mRNA的一个区域同源/互补,或者可以是包括与不同区域同源/互补的多个RNA分子的siRNA。

[0127] 包括反义RNA分子和反义DNA分子的反义寡核苷酸将直接阻断H3K9-组蛋白甲基转移酶Suv39h1的翻译,从而阻止蛋白质翻译或增加mRNA降解,从而降低H3K9-组蛋白甲基转移酶SUV39H1的水平及其在细胞中的活性。例如,可以例如通过常规磷酸二酯技术合成至少约15个碱基并与编码H3K9-组蛋白甲基转移酶SUV39H1的mRNA转录物序列的独特区域互补的反义寡核苷酸,并通过例如静脉内注射或输注施用。使用反义技术特异性抑制序列已知的基因的基因表达的方法是本领域众所周知的(例如,参见美国专利号6,566,135;6,566,

131;6,365,354;6,410,323;6,107,091;6,046,321;和5,981,732)。

[0128] 本文所用的“RNA干扰剂”定义为通过RNA干扰(RNAi)干扰或抑制靶标生物标志物基因的表的任何试剂。这种RNA干扰剂包括但不限于与本发明的靶基因(例如Suv39h1)同源的包括RNA分子的核酸分子、或其片段、短干扰RNA(siRNA)和通过RNA干扰(RNAi)干扰或抑制靶核酸的表的小分子。

[0129] 小抑制性RNA(siRNA)也可以用作表达抑制剂以用于本发明。H3K9-组蛋白甲基转移酶SUV39H1基因表达可以通过使受试者或细胞与小双链RNA(dsRNA)或引起小双链RNA产生的载体或构建体接触来降低,从而使H3K9-组蛋白甲基转移酶SUV39H1基因表达被特异性抑制(即RNA干扰或RNAi)。对于序列已知的基因,选择合适的dsRNA或dsRNA编码载体的方法是本领域众所周知的(例如,参见Tuschl,T.et al.(1999);Elbashir,S.M.et al.(2001);Hannon,GJ.(2002);McManus,MT.et al.(2002);Brummelkamp,TR.et al.(2002);

[0130] 美国专利号6,573,099和6,506,559;和国际专利公开号WO 01/36646、WO 99/32619和WO 01/68836)。有利地,本发明的siRNA的全部或部分磷酸二酯键是经保护的。通常使用本领域已知的方法通过化学途径来实现这种保护。例如,磷酸二酯键可以通过硫醇或胺官能团或通过苯基保护。有利地,本发明的siRNA的5'-和/或3'-末端也例如使用上述保护磷酸二酯键的技术来保护。siRNA序列有利地包含至少十二个连续的二核苷酸或其衍生物。

[0131] 如本文所用,相对于本发明核酸序列的术语“siRNA衍生物”是指与促红细胞生成素或其片段具有至少90%的同一性百分比的核酸,优选至少95%,例如至少98%,更优选至少98%。

[0132] 如本文所用,两个核酸序列之间的表述“同一性百分比”是指在待比较的两个序列之间,以所述序列的最佳比对获得的相同核酸的百分比,该百分比纯粹是统计的,并且这两个序列之间的差异随机分布在核酸序列上。如本文所用,“最佳比对”或“优化比对”是指所确定的同一性百分比(见下文)最高的比对。通常通过比较根据最佳比对事先已经比对的这些序列来实现两个核酸序列之间的序列比较;该比较是在比较段上实现的,以便识别和比较相似的局部区域。除了手动操作外,还可以通过使用由SMITH和WATERMAN开发的全局同源性算法(Ad.App.Math.,vol.2,p:482,1981)、通过使用由NEDDLEMAN和WUNSCH开发的局部同源性算法(J.Mol.Biol,vol.48,p:443,1970)、通过使用由PEARSON和LIPMAN开发的相似性方法(Proc.Natl.Acd.Sci.USA,vol.85,p:2444,1988)、通过使用采用这些算法的计算机软件(Wisconsin Genetics software Package,Genetics Computer Group,575Science Dr.,Madison,WI USA中的GAP、BESTFIT、BLAST P、BLAST N、FASTA、TFASTA)、通过使用MUSCLE多重比对算法(Edgar,Robert C,Nucleic Acids Research,vol.32,p:1792,2004)来实现最佳序列比对。为了获得最佳的局部比对,最好使用BLAST软件。通过比较优化比对的这两个序列来测定两个核酸序列之间的同一性百分比,核酸序列能够相对于参考序列包含添加或缺失以获得这两个序列之间的优化比对。通过以下计算同一性百分比:测定这两个序列之间相同位置的数目,然后将该数目除以比较位置的总数目,然后将所得结果乘以100以获得这两个序列之间的同一性百分比。

[0133] shRNA(短发夹RNA)也可以作为表达抑制剂用于本发明。典型地,shRNA由短反义链(例如19-25个核苷酸),接着是5-9个核苷酸环和类似的有义链组成。或者,有义链可以在核

苷酸环结构之前,反义链可以在核苷酸环结构之后。

[0134] 核酶也可以作为表达抑制剂用于本发明。核酶是能够催化RNA特异性切割的酶促RNA分子。核酶的作用机制涉及核酶分子与互补靶标RNA的序列特异性杂交,接着是内切核酸切割。因此,特异且有效地催化H3K9-组蛋白甲基转移酶SUV39H1 mRNA序列的内切核酸切割的工程化发夹或锤头基序核酶分子在本发明的范围内是有用的。首先通过扫描靶分子的核酶切割位点来初步鉴定任何潜在的RNA靶标中的特定核酶切割位点,这些位点典型地包括以下序列:GUA、GUU和GUC。一旦鉴定,就可以评估对应于含有切割位点的靶基因区域的约15至20个核糖核苷酸之间的短RNA序列的预测结构特征,例如二级结构,这会使寡核苷酸序列不合适。

[0135] 可用作表达抑制剂的反义寡核苷酸和核酶均可通过已知方法制备。这些包括用于化学合成的技术,诸如通过固相亚磷酸胺化学合成。或者,可以通过体外或体内转录编码RNA分子的DNA序列来产生反义RNA分子。可以将这种DNA序列掺入多种载体中,这些载体掺入了合适的RNA聚合酶启动子(诸如T7或SP6聚合酶启动子)。作为增加细胞内稳定性和半衰期的手段,可以引入本发明寡核苷酸的各种修饰。可能的修饰包括但不限于在分子的5'和/或3'末端添加核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸的侧翼序列,或在寡核苷酸骨架内使用硫代磷酸酯或2'-O-甲基而不是磷酸二酯酶连锁。

[0136] 本发明的反义寡核苷酸、siRNA、shRNA和核酶可单独或与载体结合在体内递送。从最广泛的意义上讲,“载体”是能够促进反义寡核苷酸、siRNA、shRNA或核酶核酸向细胞,优选向表达H3K9-组蛋白甲基转移酶SUV39H1的细胞转移的媒介。优选地,相对于将导致不存在载体的降解程度,载体将核酸运输至降解降低的细胞。通常,可用于本发明的载体包括但不限于质粒、噬菌粒、病毒、衍生自病毒或细菌来源的其他媒介,这些媒介已经通过反义寡核苷酸、siRNA、shRNA或核酶核酸序列的插入或掺入而被控制。病毒载体是优选的载体类型,包括但不限于来自以下病毒的核酸序列:逆转录病毒,诸如莫洛尼鼠白血病病毒、哈维鼠肉瘤病毒、鼠乳腺肿瘤病毒和劳斯肉瘤病毒;腺病毒,腺伴随病毒;SV40型病毒;多瘤病毒;爱泼斯坦-巴尔病毒;乳头瘤病毒;疱疹病毒;牛痘病毒;脊髓灰质炎病毒;和RA病毒(诸如逆转录病毒)。可以容易地采用未命名但本领域已知的其他载体。

[0137] 优选的病毒载体基于其中非必需基因已被目标基因替代的非细胞病变真核病毒。非细胞病变病毒包括逆转录病毒(例如慢病毒),其生命周期涉及将基因组病毒RNA逆转录成DNA,随后将原病毒整合到宿主细胞DNA中。逆转录病毒已被批准用于人类基因治疗试验。最有用的是那些复制缺陷型逆转录病毒(即,能够引导所需蛋白质的合成,但是不能制造感染性颗粒)。这种遗传改变的逆转录病毒表达载体对于体内基因的高效转导具有一般用途。Kriegler,1990and inMurry,1991提供了产生复制缺陷型逆转录病毒的标准方案(包括将外源遗传物质掺入质粒、转染衬有质粒的包装细胞、由包装细胞系生产重组逆转录病毒、从组织培养基中收集病毒颗粒,和用病毒颗粒感染靶细胞)。

[0138] 对于某些应用而言,优选的病毒是腺病毒和腺相关病毒(AAV),它们是已被批准用于人类基因治疗的双链DNA病毒。实际上,已知12种不同的AAV血清型(AAV1-12),每种都具有不同的组织嗜性(Wu,Z Mol Ther 2006;14:316-27)。重组AAV衍生自依赖性细小病毒AAV2(Choi,VW J Virol 2005;79:6801-07)。可以将腺相关病毒1-12型工程化为复制缺陷型,并且能够感染多种细胞类型和物种(Wu,Z Mol Ther 2006;14:316-27)。它还具有如下

优点:诸如热和脂质溶剂稳定性;包括造血细胞的多种谱系细胞的高转导频率;并且没有过度感染抑制作用,因此可以进行多个系列的转导。据报道,腺相关病毒可以以位点特异性方式整合到人细胞DNA中,从而使插入诱变的可能性和特征在于逆转录病毒感染的插入基因表达的可变性最小。另外,在没有选择压力的情况下,在组织培养中对野生型腺相关病毒感染进行了100次以上代,这表明腺相关病毒基因组整合是相对稳定的事件。腺相关病毒也可以以染色体外的方式起作用。

[0139] 其他载体包括质粒载体。质粒载体已在本领域中广泛描述,并且是本领域技术人员众所周知的。例如参见Sambrook等,1989。在最近几年中,质粒载体已被用于将抗原编码基因体内递送至细胞的DNA疫苗。它们对此特别有利,因为它们与许多病毒载体没有相同的安全问题。但是,这些具有与宿主细胞相容的启动子的质粒可以表达来自质粒内可操作编码的基因的肽。一些常用的质粒包括pBR322、pUC18、pUC19、pRC/CMV、SV40和pBlueScript。其他质粒是本领域普通技术人员众所周知的。另外,可以使用限制酶和连接反应来定制设计质粒,以去除并添加特定的DNA片段。可以通过各种肠胃外、粘膜和局部途径递送质粒。例如,可以通过肌内、皮内、皮下或其他途径注射DNA质粒。也可以通过鼻内喷雾剂或滴剂、直肠栓剂和口服施用。也可以使用基因枪将其施用于表皮或粘膜表面。可以将质粒提供于水溶液中,将其干燥至金颗粒上,或者与另一种DNA递送系统结合,包括但不限于脂质体、树状聚合物、蜗状递送载体和微包封。

[0140] 根据本发明的反义寡核苷酸、siRNA、shRNA或核酶核酸序列通常在异源调节区(例如异源启动子)的控制下。所述启动子可以对Muller神经胶质细胞、小胶质细胞、内皮细胞、周细胞和星形胶质细胞具有特异性。例如,可以通过谷氨酰胺合成酶基因的启动子获得Muller神经胶质细胞中的特异性表达。诸如,所述启动子也可以是病毒启动子,例如CMV启动子或任何合成的启动子。

[0141] Suv39h1的基因抑制或破坏

[0142] 根据本发明的细胞中Suv39h1的抑制也可以通过抑制或破坏Suv39h1基因来实现,诸如通过缺失,例如缺失整个基因、外显子或区域,和/或被外源序列取代,和/或通过基因内(典型地,在基因的外显子内)的突变,例如移码或错义突变。在一些实施方案中,破坏导致过早的终止密码子被掺入基因中,使得Suv39h1蛋白不被表达或是非功能性的。破坏通常在DNA水平上进行。破坏通常是永久性的、不可逆的或非暂时性的。

[0143] 在一些实施方案中,使用基因编辑剂,诸如与该基因特异性结合或杂交的靶向DNA的分子,诸如DNA结合蛋白或DNA结合核酸,或含有它们的复合物、化合物或组合物,来实现基因破坏或抑制。在一些实施方案中,靶向DNA的分子包含DNA结合结构域,例如锌指蛋白(ZFP) DNA结合结构域、转录激活因子样蛋白(TAL)或TAL效应子(TALE) DNA结合结构域、簇状规则间隔的短回文重复(CRISPR) DNA结合结构域或来自大范围核酸酶的DNA结合结构域。

[0144] 锌指、TALE和CRISPR系统结合结构域可以被“工程化”以结合预定的核苷酸序列。

[0145] 在一些实施方案中,靶向DNA的分子、复合物或组合包含DNA结合分子和一个或多个另外的结构域,诸如效应子结构域,以促进基因的抑制或破坏。例如,在一些实施方案中,通过包含DNA结合蛋白及其异源调控结构域或其功能片段的融合蛋白来进行基因破坏。

[0146] 典型地,另外的结构域是核酸酶结构域。因此,在一些实施方案中,使用工程化蛋白,诸如核酸酶和含核酸酶的复合物或融合蛋白,通过基因或基因组编辑来促进基因破坏,

所述工程化蛋白由与非特异性DNA切割分子(诸如核酸酶)融合或复合的序列特异性DNA结合结构域组成。

[0147] 这些靶向的嵌合核酸酶或含核酸酶的复合物通过诱导靶向的双链断裂或单链断裂、刺激细胞DNA修复机制(包括易于出错的非同源末端连接(NHEJ)和同源性引导的修复(HDR))进行精确的基因修饰。在一些实施方案中,核酸酶是核酸内切酶,诸如锌指核酸酶(ZFN)、TALE核酸酶(TALEN)、RNA引导的核酸内切酶(RGEN),诸如CRISPR相关(Cas)蛋白或大范围核酸酶。这样的系统在本领域中是众所周知的(例如,参见美国专利号8,697,359; Sander and Joung (2014) Nat. Biotech. 32:347-355; Hale et al. (2009) Cell 139:945-956; Karginov and Hannon (2010) Mol. Cell 37:7; U.S. Pat. Publ. 2014/0087426 and 2012/0178169; Boch et al. (2011) Nat. Biotech. 29:135-136; Boch et al. (2009) Science 326:1509-1512; Moscou and Bogdanove (2009) Science 326:1501; Weber et al. (2011) PLoS One 6:e19722; Li et al. (2011) Nucl. Acids Res. 39:6315-6325; Zhang et al. (2011) Nat. Biotech. 29:149-153; Miller et al. (2011) Nat. Biotech. 29:143-148; Lin et al. (2014) Nucl. Acids Res. 42:e47)。根据本领域众所周知的方法,这种遗传策略可以使用组成型表达系统或诱导型表达系统。

[0148] ZFP和ZFN; TAL、TALE和TALEN

[0149] 在一些实施方案中,靶向DNA的分子包括与效应蛋白(诸如核酸内切酶)融合的DNA结合蛋白,诸如一种或多种锌指蛋白(ZFP)或转录激活剂样蛋白(TAL)。实例包括ZFN、TALE和TALEN。参见Lloyd et al., Frontiers in Immunology, 4(221), 1-7 (2013)。

[0150] 在一些实施方案中,靶向DNA的分子包含一种或多种以序列特异性方式结合DNA的锌指蛋白(ZFP)或其结构域。ZFP或其结构域是蛋白质或较大蛋白质内的结构域,其通过结合结构域内氨基酸序列的一个或多个锌指区域以序列特异性方式结合DNA,所述结构域的结构通过锌离子配位而稳定。通常,可以通过在锌指识别螺旋上的四个螺旋位置(-1、2、3和6)上进行氨基酸取代来改变ZFP的序列特异性。因此,在一些实施方案中,ZFP或含ZFP的分子是非天然存在的,例如,经工程化以结合选择的靶位点。例如,参见Beerli et al. (2002) Nature Biotechnol. 20:135-141; Pabo et al. (2001) Ann. Rev. Biochem. 70:313-340; Isalan et al. (2001) Nature Biotechnol. 19:656-660; Segal et al. (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12:632-637; Choo et al. (2000) Curr. Opin. Struct. Biol. 10:411-416。

[0151] 在一些实施方案中,靶向DNA的分子是或包含与DNA切割结构域融合以形成锌指核酸酶(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种IIS型限制酶的切割结构域(或切割半结构域)和一个或多个可以工程化或可以不工程化的锌指结合结构域。在一些实施方案中,切割结构域来自IIS型限制性核酸内切酶FokI。例如,参见美国专利号5,356,802; 5,436,150和5,487,994; 以及Li et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4275-4279; Li et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2764-2768; Kim et al. (1994a)

[0152] Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:883-887; Kim et al. (1994b) J. Biol. Chem. 269:31,978-31,982。

[0153] 在一些方面,例如在靶基因(即Suv39h1)的编码区中的预定位点上,ZFN有效地产

生双链断裂 (DSB)。典型的靶向基因区域包括外显子、编码N末端区域的区域、第一外显子、第二外显子以及启动子或增强子区域。在一些实施方案中,ZFN的瞬时表达促进工程化细胞中靶基因的高效和永久破坏。特别地,在一些实施方案中,ZFN的递送导致基因的永久破坏,效率超过50%。许多基因特异性工程化锌指可商购获得。例如,Sangamo Biosciences (Richmond,CA,USA) 与Sigma-Aldrich (St.Louis,MO,USA) 合作开发了锌指构造平台 (CompoZr),其允许研究人员完全绕开锌指的构造和验证,并提供数千种蛋白质的特异性靶向的锌指。Gaj et al.,Trends in Biotechnology,2013,31 (7),397-405。在一些实施例中,使用可商购的锌指或定制设计可商购的锌指(例如,参见Sigma-Aldrich catalog numbers CSTZFND,CSTZFN,CTI1-1KT,and PZD0020)。

[0154] 在一些实施方案中,靶向DNA的分子包含天然存在或工程化的(非天然存在的)转录激活因子样蛋白 (TAL) DNA结合结构域,诸如在转录激活因子样蛋白效应 (TALE) 蛋白中。例如,参见美国专利公开号20110301073。在一些实施方案中,分子是DNA结合核酸内切酶,诸如TALE核酸酶 (TALEN)。在一些方面,TALEN是包含衍生自TALE的DNA结合结构域和核酸酶催化结构域以切割核酸靶序列的融合蛋白。在一些实施方案中,将TALE DNA结合结构域工程化以结合编码靶抗原和/或免疫抑制分子的基因内的靶序列。例如,在一些方面,TALE DNA结合结构域可以靶向CD38和/或腺苷受体,诸如A2AR。

[0155] 在一些实施方案中,TALEN识别并切割基因中的靶序列。在某些方面,DNA的切割导致双链断裂。在一些方面,断裂刺激同源重组或非同源末端连接 (NHEJ) 的速率。通常,NHEJ是不完善的修复过程,通常会导致切割位点的DNA序列发生变化。在某些方面,修复机制涉及通过直接重新连接 (Critchlow and Jackson,Trends BiochemSci.1998Oct;23 (10):394-8) 或通过所谓的微同源性介导的末端连接重新结合两个DNA末端的残基。在一些实施方案中,经由NHEJ的修复导致小的插入或缺失,并可用于破坏并由此抑制基因。在一些实施方案中,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,可以通过本领域中众所周知的方法来鉴定和/或选择其中发生裂解诱导的诱变事件(即与NHEJ事件连续的诱变事件)的细胞。

[0156] 可以组装TALE重复序列以特异性靶向Suv39h1基因 (Gaj et al.,Trends in Biotechnology,2013,31 (7),397-405)。已建立针对18,740种人蛋白质编码基因的TALEN文库 (Kim et al.,Nature Biotechnology.31,251-258 (2013))。定制设计的TALE阵列可通过Cellestis Bioresearch (Paris,France)、Transposagen Biopharmaceuticals (Lexington,KY,USA) 和Life Technologies (Grand Island,NY,USA) 商购。具体地,靶向CD38的TALEN是可商购的(参见Gencopoeia,目录号HTN222870-1、HTN222870-2和HTN222870-3,可在万维网上获得,网址为www.genecopoeia.com/product/search/detail.php?prt=26&cid=&key=HTN222870)。描述了示例性分子,例如在美国专利公开号US 2014/0120622和2013/0315884中。

[0157] 在一些实施方案中,TALEN作为由一种或多种质粒载体编码的转基因引入。在一些方面,质粒载体可以含有选择标志物,其提供用于鉴定和/或选择接受所述载体的细胞。

[0158] RGEN (CRISPR/Cas系统)

[0159] 可以使用一种或多种DNA结合核酸来进行基因抑制,诸如通过RNA引导的核酸内切酶 (RGEN) 的破坏,或通过另一种RNA引导的效应分子进行的其他形式的抑制。例如,在一些

实施方案中,可以使用簇状规则间隔的短回文重复 (CRISPR) 和CRISPR相关蛋白进行基因抑制。参见Sander and Joung, *Nature Biotechnology*, 32 (4) :347-355。

[0160] 一般而言,“CRISPR系统”泛指与CRISPR相关 (“Cas”) 基因的表达或引导其活性有关的转录本和其他元件,包括编码Cas基因、tracr (反式激活CRISPR) 序列 (例如tracrRNA或活性部分tracrRNA)、tracr配对序列 (在内源CRISPR系统中涵盖“直接重复”和tracrRNA加工的部分直接重复)、向导序列 (在内源CRISPR系统中也称为“间隔子”) 和/或来自CRISPR基因座的其他序列和转录本。

[0161] 典型地,CRISPR/Cas核酸酶或CRISPR/Cas核酸酶系统包括序列特异性结合DNA的非编码RNA分子 (向导) RNA和具有核酸酶功能的CRISPR蛋白 (例如两个核酸酶结构域)。CRISPR系统的一个或多个元件可以衍生自I型、II型或III型CRISPR系统,诸如Cas核酸酶。优选地,CRISPR蛋白是cas酶,诸如Cas9。Cas酶在本领域中是众所周知的;例如,化脓链球菌Cas9蛋白的氨基酸序列可以在SwissProt数据库中以登录号Q99ZW2找到。在一些实施方案中,将Cas核酸酶和gRNA引入细胞中。在一些实施方案中,CRISPR系统在靶位点诱导DSB,随后如本文所述进行破坏。在其他实施方案中,被认为是“切割酶”的Cas9变体可用于在靶位点切割单链。例如,成对的切割酶也可以用于提高特异性,每个酶由一对不同的gRNA靶向序列引导。还在其他实施方案中,可将无催化活性的Cas9融合至异源效应子结构域,诸如转录抑制剂,以影响基因表达。

[0162] 通常,CRISPR系统的特征在于促进靶序列位点处的CRISPR复合物形成的元件。典型地,在形成CRISPR复合物的情况下,“靶序列”通常是指设计为其具有互补性的向导序列的序列,其中靶序列和向导序列之间的杂交促进CRISPR复合物的形成。如果存在足够的互补性以引起杂交并促进CRISPR复合物的形成,则不一定需要完全互补。靶序列可以包含任何多核苷酸,诸如DNA或RNA多核苷酸。通常,可用于重组为包含靶序列的靶基因座的序列或模板被称为“编辑模板”或“编辑多核苷酸”或“编辑序列”。在一些方面,外源模板多核苷酸可称为编辑模板。在一些方面,重组是同源重组。

[0163] 在一些实施方案中,将驱动CRISPR系统的一种或多种元件的表达的一种或多种载体引入细胞,以使得CRISPR系统的元件的表达引导CRISPR复合物在一个或多个靶位点处的形成。例如,Cas酶、连接至tracr-配对序列的向导序列和可各自可操作地连接至单独载体上的单独调控元件的tracr序列。或者,可以将由相同或不同调控元件表达的两个或多个元件组合在单个载体中,其中一个或多个额外载体提供不包含在第一载体中的CRISPR系统的任何组分。在一些实施方案中,可以在任何合适的方向上排列在单个载体中组合的CRISPR系统元件。在一些实施方案中,CRISPR酶、向导序列、tracr伴侣序列和tracr序列可操作地连接至同一启动子并由同一启动子表达。在一些实施方案中,载体包含与编码CRISPR酶的酶编码序列 (诸如Cas蛋白) 可操作地连接的调控元件。

[0164] 在一些实施方案中,将与向导序列结合 (和任选地与向导序列复合) 的CRISPR酶递送至细胞。典型地,CRISPR/Cas9技术可用于敲低工程化细胞中Suv39h1的基因表达。例如,可以将Cas9核酸酶和Suv39h1基因特异性的向导RNA引入细胞,例如,使用慢病毒递送载体或多种用于转移到细胞的已知递送方法或媒介的任何一种,诸如多种用于递送Cas9分子和向导RNA的多种已知方法或媒介的任何一种 (另参见下文)。

[0165] 递送编码基因破坏分子和复合物的核酸

[0166] 在一些实施方案中,将编码DNA靶向分子、复合物或组合的核酸施用或引入细胞。典型地,基于病毒和非病毒的基因转移方法可用于将编码CRISPR、ZFP、ZFN、TALE和/或TALEN系统的组分的核酸引入培养的细胞。

[0167] 在一些实施方案中,由于将编码多肽的多核苷酸引入细胞,因此多肽在细胞中原位合成。在一些方面,多肽可以在细胞外产生,然后被引入细胞内。

[0168] 将多核苷酸构建体引入动物细胞的方法是已知的,并且作为非限制性实例,包括将多核苷酸构建体整合到细胞的基因组中的稳定转化方法、没有将多核苷酸构建体整合到细胞的基因组中的瞬时转化方法、以及病毒介导的方法。

[0169] 在一些实施方案中,可通过例如重组病毒载体(例如逆转录病毒、腺病毒)、脂质体等将多核苷酸引入细胞。瞬时转化方法包括显微注射、电穿孔或粒子轰击。所述核酸以表达载体的形式施用。优选地,表达载体是逆转录病毒表达载体、腺病毒表达载体、DNA质粒表达载体或AAV表达载体。

[0170] 核酸的非病毒递送方法包括脂质转染、核转染、显微注射、生物弹药、病毒体、脂质体、免疫脂质体、聚阳离子或脂质、核酸缀合物、裸露的DNA、人工病毒体和试剂增强的DNA吸收。脂质转染在例如美国专利号5,049,386、4,946,787;和4,897,355中描述,和商售的脂质转染试剂(例如TransfectamTM和LipofectinTM)。适用于多核苷酸的有效受体识别脂质转染的阳离子脂质和中性脂质包括Feigner的WO 91/17424;WO 91/16024的那些。可以递送到细胞(例如体外或离体施用)或靶组织(例如体内施用)。

[0171] 基于RNA或DNA病毒的系统包括逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺相关病毒和用于基因转移的单纯疱疹病毒载体。

[0172] 有关基因治疗程序的综述,参见Anderson,Science 256:808-813(1992);Nabel&Feigner,TIBTECH 11:211-217(1993);Mitani&Caskey,TIBTECH 11:162-166(1993);Dillon.TIBTECH 11:167-175(1993);Miller,Nature 357:455-460(1992);Van Brunt,Biotechnology6(10):1149-1154(1988);Vigne,Restorative Neurology and Neuroscience 8:35-36(1995);Kremer&Perricaudet,British Medical Bulletin 51(1):31-44(1995);Haddada et al.,in Current Topics in Microbiology and Immunology Doerfler and Bohm(eds)(1995);and Yu et al.,Gene Therapy 1:13-26(1994)。

[0173] 可将包括但不限于谷胱甘肽-5-转移酶(GST)、辣根过氧化物酶(HRP)、氯霉素乙酰转移酶(CAT) β -半乳糖苷酶、 β -葡萄糖醛酸苷酶、荧光素酶、绿色荧光蛋白(GFP)、HcRed、DsRed、蓝绿色荧光蛋白(CFP)、黄色荧光蛋白(YFP)和包括蓝色荧光蛋白(BFP)的自发荧光蛋白的报道基因引入细胞中,以编码作为标志物的基因产物,所述标志物用于测量基因产物的表达的改变或修饰。

[0174] 细胞制备

[0175] 细胞分离包括根据本领域熟知技术的一个或多个基于制备和/或非亲和力的细胞分离步骤。例如,在一些实施例中,在一种或多种试剂的存在下洗涤、离心和/或孵育细胞,以去除不需要的组分,富集所需组分,裂解或去除对特定试剂敏感的细胞。在一些实施例中,基于一种或多种性质,诸如密度、粘附性质、尺寸、敏感性和/或对特定组分的抗性来分离细胞。

[0176] 在一些实施方案中,细胞制备包括在分离、孵育和/或工程化之前或之后冷冻(例

如冷冻保存)细胞的步骤。在一些方面,可以使用多种已知的冷冻溶液和参数中的任何一种。

[0177] 典型地,在基因工程和/或Suv39h1抑制之前或与之相关的条件下孵育细胞。

[0178] 孵育步骤可以包括培养、孵育、刺激、激活、扩增和/或增殖。

[0179] 在向目标患者注射细胞后,还可以在体内实现根据本发明的Suv39h1的抑制。典型地,使用如前所述的药理抑制剂进行suv39h1的抑制。

[0180] 还可以在刺激、激活和/或扩增步骤期间根据前述方法进行Suv39h1的抑制。例如,在过继转移给患者之前,在Suv39h1的药理抑制剂存在下,体外扩增PBMC或纯化的T细胞或纯化的NK细胞或纯化的淋巴祖细胞。在一些实施方案中,在刺激条件或刺激剂存在下,将组合物或细胞孵育。此类条件包括设计以诱导群体中细胞的增殖、扩增、活化和/或存活,模拟抗原暴露和/或引发细胞以进行基因工程(诸如用于引入基因工程化抗原受体)的那些。

[0181] 孵育条件可以包括一种或多种特定培养基、温度、氧含量、二氧化碳含量、时间、试剂(例如营养素、氨基酸、抗生素、离子)和/或刺激因子(诸如细胞因子、趋化因子、抗原、结合伴侣、融合蛋白、重组可溶性受体)和设计以激活细胞的任何其他试剂。

[0182] 在一些实施方案中,刺激条件或试剂包括能够激活TCR复合物的细胞内信号传导结构域的一种或多种试剂,例如配体。在一些方面,所述试剂在T细胞中开启或启动TCR/CD3细胞内信号传导级联。这样的试剂可包括抗体,诸如对TCR组分和/或共刺激受体具有特异性的那些,例如与固体载体(诸如珠)结合的抗CD3,抗CD28,和/或一种或多种细胞因子。任选地,扩增方法还可以包括将抗CD3和/或抗CD28抗体添加到培养基中的步骤(例如,以至少约0.5ng/ml的浓度)。在一些实施方案中,刺激剂包括IL-2和/或IL-15,例如,IL-2浓度为至少约10单位/mL。

[0183] 在某些方面,根据诸如Riddell等的美国专利号6,040,177,Klebanoff et al.,J Immunother.2012;35(9):651-660,Terakura et al.,Blood.2012;117:72-82,和/或Wang et al.J Immunother.2012;35(9):689-701中描述的技术进行孵育。

[0184] 在一些实施方案中,通过将饲养细胞(诸如非分裂外周血单核细胞(PBMC))添加至培养起始组合物来扩增T细胞(例如,使得对于待扩增的初始群体中的每个T淋巴细胞,所得细胞群体均含有至少约5、10、20或40或更多个PBMC饲养细胞);并孵育培养物(例如,持续足以扩增T细胞数目的时间)。在一些方面,非分裂饲养细胞可以包含 γ -辐照的PBMC饲养细胞。在一些实施方案中,用约3000-3600rads的 γ 射线辐照PBMC以阻止细胞分裂。在一些方面,在添加T细胞群之前将饲养细胞添加至培养基。

[0185] 在一些实施方案中,刺激条件包括适合于人T淋巴细胞生长的温度,例如,至少约25摄氏度,通常至少约30摄氏度,并且通常至少约37摄氏度。任选地,孵育还可以包括添加非分裂的EBV转化的淋巴母细胞(LCL)作为饲养细胞。可以用约6000-10,000rads的 γ 射线照射LCL。在一些方面,以任何合适的量提供LCL饲养细胞,诸如LCL饲养细胞与初始T淋巴细胞的比率为至少约10:1。

[0186] 在实施方案中,通过用抗原刺激初始或抗原特异性T淋巴细胞来获得抗原特异性T细胞,诸如抗原特异性CD4⁺和/或CD8⁺ T细胞。例如,可以通过从受感染的受试者中分离T细胞并用相同抗原在体外刺激细胞来产生巨细胞病毒抗原的抗原特异性T细胞系或克隆。

[0187] 在一些方面,该方法包括评估一种或多种标志物在经工程化细胞或待工程化细胞

的表面上表达。在一个实施方案中,该方法包括评估寻求通过过继细胞疗法靶向的一种或多种靶抗原(例如,基因工程化抗原受体识别的抗原)的表面表达,例如通过基于亲和力的检测方法,诸如通过流式细胞仪。

[0188] 细胞遗传工程的载体和方法

[0189] 在一些方面,基因工程涉及将编码遗传工程化成分或其他用于引入的成分(诸如编码基因破坏蛋白或核酸的成分)的核酸引入细胞。

[0190] 通常,将CAR工程化为免疫细胞(例如,T细胞)需要培养细胞以允许转导和扩增。转导可以利用多种方法,但是需要稳定的基因转移以在克隆扩增和持久工程化细胞中实现持续的CAR表达。

[0191] 在一些实施方案中,通过首先刺激细胞生长,例如T细胞生长、增殖和/或活化,然后转导活化的细胞,并在培养中扩增至足以用于临床应用的数目来实现基因转移。

[0192] 引入遗传工程化成分(例如抗原受体,例如CAR)的各种方法是众所周知的,并且可以与所提供的方法和组合物一起使用。示例性方法包括用于转移编码受体的核酸的那些,包括通过病毒(例如逆转录病毒或慢病毒)、转导、转座子和电穿孔。

[0193] 在一些实施方案中,使用重组感染性病毒颗粒(诸如衍生自猿猴病毒40(SV40)、腺病毒、腺相关病毒(AAV)的载体)将重组核酸转移到细胞中。在一些实施方案中,使用重组慢病毒载体或逆转录病毒载体(诸如 γ -逆转录病毒载体)将重组核酸转移到T细胞中(例如,参见Koste et al.(2014)Gene Therapy 2014Apr 3.;Carlens et al.(2000)Exp Hematol 28(10):1137-46;Alonso-Camino et al.(2013)Mol Ther Nucl Acids 2,e93;Park et al.,Trends Biotechnol.2011November;29(11):550-557)。

[0194] 在一些实施方案中,逆转录病毒载体具有长末端重复序列(LTR),例如衍生自莫洛尼鼠白血病病毒(MoMLV)、骨髓增生肉瘤病毒(MPSV)、鼠胚胎干细胞病毒(MESV)、鼠干细胞病毒(MSCV)、脾聚焦形成病毒(SFFV)或腺相关病毒(AAV)的逆转录病毒载体。大多数逆转录病毒载体衍生自鼠逆转录病毒。在一些实施方案中,逆转录病毒包括衍生自任何禽或哺乳动物细胞来源的那些。典型地,逆转录病毒是两亲性的,这意味着它们能够感染包括人的若干物种的宿主细胞。在一个实施方案中,待表达的基因取代了逆转录病毒gag、pol和/或env序列。已经描述了许多示例性逆转录病毒系统(例如,美国专利号5,219,740;6,207,453;5,219,740;Miller and Rosman(1989)BioTechniques 7:980-990;Miller,A.D.(1990)Human Gene Therapy 1:5-14;Scarpa et al.(1991)Virology 180:849-852;Burns et al.(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:8033-8037;和Boris-Lawrie and Temin(1993)Cur.Opin.Genet.Develop.3:102-109)。

[0195] 慢病毒转导的方法也是已知的。例如,示例性方法描述于Wang et al.(2012)J.Immunother.35(9):689-701;Cooper et al.(2003)Blood.101:1637-1644;Verhoeyen et al.(2009)Methods Mol Biol.506:97-114;和Cavalieri et al.(2003)Blood.102(2):497-505。

[0196] 在一些实施方案中,重组核酸通过电穿孔转移到T细胞中(例如,参见Chicaybam et al,(2013)PLoS ONE 8(3):e60298和Van Tedeloo et al.(2000)Gene Therapy 7(16):1431-1437)。在一些实施方案中,重组核酸通过转位转移到T细胞中(例如,参见Manuri et al.(2010)Hum Gene Ther 21(4):427-437;Sharma et al.(2013)Molec Ther Nucl Acids

2,e74;和Huang et al.(2009)Methods Mol Biol 506:115-126)。在免疫细胞中引入和表达遗传物质的其他方法包括磷酸钙转染(例如,如Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,New York,N.Y.所描述的);原生质体融合;阳离子脂质体介导的转染;钨颗粒促进的微粒轰击(Johnston,Nature,346:776-777(1990));和磷酸锆DNA共沉淀(Brash et al.,Mol.Cell Biol.,7:2031-2034(1987))。

[0197] 用于转移编码基因工程化产物的基因工程化核酸的其他方法和载体在例如国际专利申请公开号W02014055668和美国专利号7,446,190中描述。

[0198] 本发明的组合物

[0199] 本发明还包括含有本文所述和/或通过提供的方法产生的细胞的组合物。典型地,所述组合物是用于施用(诸如用于过继细胞疗法)的药物组合物和制剂。

[0200] 本发明的药物组合物通常包含至少一种本发明的工程化免疫细胞和药学上可接受的载体。

[0201] 如本文所用,术语“药学上可接受的载体”包括与药物施用相容的盐水、溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。可以将补充活性化合物进一步掺入组合物中。在一些方面,药物组合物中载体的选择部分地由特定的工程化CAR或TCR、表达CAR或TCR的载体或细胞、以及通过用于施用表达CAR的所述载体或宿主细胞的特定方法来确定。因此,存在多种合适的制剂。例如,药物组合物可以含有防腐剂。例如,合适的防腐剂可包括对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸钠和苯扎氯铵。在一些方面,使用两种或更多种防腐剂的混合物。典型地,防腐剂或其混合物以占组合物总重量的约0.0001-约2%的量存在。

[0202] 将药物组合物配制成与其预期的施用途径相容。

[0203] 治疗方法

[0204] 本发明还涉及之前定义的细胞在过继疗法(特别是过继T细胞疗法)中的用途,典型地,在治疗有此需要的受试者的癌症中的用途。

[0205] 如本文所用,“治疗”定义为向有此需要的患者应用或施用本发明的细胞或包含细胞的组合物,目的是治愈、愈合、减轻、缓解、改变、补救、改善、改进或影响疾病(诸如癌症)或疾病(例如癌症)的任何症状。特别地,术语“治疗”是指降低或减轻至少一种与疾病(诸如癌症)相关的不良临床症状,例如疼痛、肿胀、低血细胞计数等。

[0206] 关于癌症治疗,术语“治疗”也指减缓或逆转肿瘤性不受控制的细胞增殖的进展,即缩小现有肿瘤和/或中止肿瘤生长。术语“治疗”还指在受试者的癌症或肿瘤细胞中诱导凋亡。

[0207] 本发明的受试者(即患者)是哺乳动物,典型地,是灵长类动物,诸如人。在一些实施方案中,灵长类动物是猴或猿。受试者可以是男性或女性,并且可以是任何合适的年龄,包括婴儿、少年、青少年、成人和老年受试者。在一些实施方案中,受试者是非灵长类哺乳动物,诸如啮齿动物。在一些实施例中,患者或受试者是用于疾病、过继细胞疗法和/或用于评估毒性结果(诸如细胞因子释放综合征(CRS))的经验证的动物模型。在本发明的一些实施方案中,所述受试者患有癌症、处于患癌的风险中、或处于癌症缓解中。

[0208] 癌症可以是实体癌或“液体肿瘤”,诸如影响血液、骨髓和淋巴系统的癌症,也称为造血系统和淋巴组织的肿瘤,特别包括白血病和淋巴瘤。例如,液体肿瘤包括急性骨髓性白

血病 (AML)、慢性骨髓性白血病 (CML)、急性淋巴细胞性白血病 (ALL) 和慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) (包括各种淋巴瘤, 诸如套细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、腺瘤、鳞状细胞癌、喉癌、胆囊癌和胆管癌、视网膜癌 (诸如成视网膜细胞瘤))。

[0209] 实体癌尤其包括影响选自下组的器官之一的癌症: 结肠、直肠、皮肤、子宫内膜、肺 (包括非小细胞肺癌)、子宫、骨骼 (诸如骨肉瘤、软骨肉瘤、尤因肉瘤、纤维肉瘤、巨细胞瘤、釉质瘤和脊索瘤)、肝、肾、食道、胃、膀胱、胰腺、子宫颈、脑 (诸如脑膜瘤、胶质母细胞瘤、低级星形细胞瘤、少突胶质细胞瘤、垂体瘤、神经鞘瘤和转移性脑癌)、卵巢、乳房、头颈部、睾丸、前列腺和甲状腺。

[0210] 优选地, 根据本发明的癌症是如上所述的影响血液、骨髓和淋巴系统的癌症。典型地, 该癌症是多发性骨髓瘤或与多发性骨髓瘤相关。

[0211] 在一些实施方案中, 所述受试者患有感染性疾病或病症或处于感染性疾病或病症的风险中, 诸如但不限于病毒、逆转录病毒、细菌和原生动物感染、免疫缺陷、巨细胞病毒 (CMV)、爱泼斯坦-巴尔病毒 (EBV)、腺病毒、BK多瘤病毒。在一些实施方案中, 该疾病或病症是自身免疫或炎性疾病或病症, 诸如关节炎 (例如类风湿性关节炎 (RA))、I型糖尿病、系统性红斑狼疮 (SLE)、炎性肠病、牛皮癣、硬皮病、自身免疫性甲状腺疾病、格雷夫病、克罗恩病、多发性硬化症、哮喘、和/或与移植相关的疾病或病症。

[0212] 本发明还涉及治疗方法, 尤其是过继细胞疗法, 优选过继T细胞疗法, 其包括向有此需要的受试者施用前述组合物。

[0213] 在一些实施方案中, 将细胞或组合物施用于受试者, 诸如患有如上所述的癌症或任何一种疾病或处于罹患如上所述的癌症或任何一种疾病的风险中的受试者。在一些方面, 这些方法由此通过减轻表达由工程化细胞识别的抗原的癌症中的肿瘤负担来治疗 (例如改善) 疾病或病症 (诸如与癌症有关的疾病或病症) 的一种或多种症状。

[0214] 用于过继细胞疗法的细胞施用方法是已知的, 并且可以与所提供的方法和组合物结合使用。例如, 过继T细胞疗法在例如Gruenberg等的美国专利申请公开号2003/0170238; Rosenberg的美国专利号4,690,915; Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol.8 (10):577-85) 中有所描述。例如, 参见Themeli et al. (2013) Nat Biotechnol.31 (10):928-933; Tsukahara et al. (2013) Biochem Biophys Res Commun 438 (1):84-9; Davila et al. (2013) PLoS ONE 8 (4):e61338。

[0215] 在一些实施方案中, 通过自体转移进行细胞疗法, 例如过继细胞疗法, 例如过继T细胞疗法, 其中从将接受细胞疗法的受试者或从来自此类受试者的样品中分离和/或以其他方式制备细胞。因此, 在一些方面, 所述细胞衍生自需要治疗的受试者 (例如患者), 并且在分离和加工后将所述细胞施用于同一受试者。

[0216] 在一些实施方案中, 通过同种异体转移进行细胞疗法, 例如过继细胞疗法, 例如过继T细胞疗法, 其中从将接受或最终接受细胞疗法的受试者以外的受试者 (例如, 第一受试者) 分离和/或以其他方式制备细胞。在该实施方案中, 然后将细胞施用给同种的不同受试者 (例如第二受试者)。在一些实施方案中, 第一和第二受试者在遗传上相同。在一些实施方案中, 第一和第二受试者在遗传上相似。在一些实施方案中, 第二受试者表达与第一受试者相同的HLA类别或超型。

[0217] 向有此需要的受试者施用至少一种根据本发明的细胞可以与一种或多种其他治

疗剂组合或与另一种治疗干预组合,以同时或以任何顺序依次进行。在一些情况下,将这些细胞与另一种在时间上足够接近的疗法共同施用,以使细胞群增强一种或多种其他治疗剂的效果,反之亦然。在一些实施方案中,在一种或多种其他治疗剂之前施用细胞群。在一些实施方案中,在一种或多种其他治疗剂之后施用细胞群。

[0218] 对于癌症治疗,组合的癌症治疗可以包括但不限于化疗剂、激素、抗血管生成剂、放射标记的化合物、免疫疗法、手术、冷冻疗法和/或放疗。

[0219] 免疫疗法包括但不限于免疫检查点调节剂(即抑制剂和/或激动剂)、单克隆抗体、癌症疫苗。

[0220] 优选地,在根据本发明的过继T细胞疗法中施用细胞与施用免疫检查点调节剂相结合。最优选地,免疫检查点调节剂包含抗PD-1和/或抗PDL-1抑制剂。

[0221] 本发明还涉及包含本文所述的工程化免疫细胞的组合物在制备用于治疗受试者的癌症、感染性疾病或病症、自身免疫性疾病或病症或炎症性疾病或病症的药物中的用途。

附图说明

[0222] 图1:Suv39h1缺陷小鼠的中央记忆CD8⁺ T细胞数目增加。A.门控脾CD8⁺ T细胞的代表性FACS点图。B.在不同的造血室(黑圈,Suv39h1 KO;白圈:WT同窝)中测量中央记忆CD8⁺ T细胞的百分比。

[0223] 图2:内源性抗原特异性Suv39h1 KO CD8⁺ T细胞中的干性和记忆特征。Suv39h1缺陷的Kb-OVA+CD8⁺ T细胞具有干细胞样和记忆基因表达特征。显示了基因集富集分析(GSEA)。

[0224] 图3:Suv39h1缺陷的CD8T细胞的存活率和自我更新增加。A.实验设置显示从WT和Suv39h1 KO LM-OVA感染小鼠分离的同基因CD45.2 Kb-OVA五聚体+CD8⁺ T细胞向初始受体CD45.1小鼠的转移(1:CD8⁺ T亚群的分类和转移(D0);2:自我更新和分化的分析(D40-44)。在过继转移后40天,用LM-OVA攻击初始小鼠,4天后,通过FACS分析Kb-OVA五聚体+CD8⁺ T细胞。B.显示了供体和受体CD8⁺ T细胞的代表性FACS图。C.测量了回收的CD8⁺ T细胞的总数,结果是来自两个独立实验的合并数据。

[0225] 图4:Suv39h1缺陷的CD8+OT-1细胞控制肿瘤的生长。(A)接种7天后,将经处理的IL-2/OVA Suv39h1-KO CD45.2 OT-1和同窝WT细胞静脉内转移入携带受体的肿瘤小鼠内,并腹膜内注射抗PD-1抗体(Bio X Cell,RMP-14)。将经处理的IL-2/OVA同窝WT(B)和Suv39h1-KO OT-1细胞(C)的肿瘤生长曲线过继转移至携带受体的肿瘤小鼠。

具体实施方式

[0226] 结果

[0227] 材料和方法:

[0228] 同窝和Suv39h1-KO小鼠经静脉感染 5×10^3 CFU,并在40天后用表达OVA(LM-OVA,衍生自野生型品系140403s)的 2×10^6 CFU重组单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)攻击。使细菌在TSB培养基(BD Bioscience)中生长直至对数早期,并用OD₆₀₀的光度计评估其生长。将初始dump-CD44^高Kb^b-OVA⁺CD8⁺ T细胞和相关的亚群进行FACS分选。对于每个分析的亚群,我们收集了3或4个生物学重复样本。根据制造商的方案,使用

Rneasy Micro Kit (QUIGEN) 提取RNA。包括柱DNA酶处理 (QUIGEN)。对于每种情况,根据标准 Affymetrix 方案采用RNA合成cDNA。标记的DNA在Affymetrix小鼠Gene 2.1ST上杂交,并在 Affymetrix GeneTitan设备上处理。

[0229] 微阵列数据分析

[0230] 使用来自Bioconductor的软件包将微阵列数据处理为R (3.0.0版)。使用原始数据 CEL文件,并使用ArrayQualityMetrics软件包进行质量控制分析。原始数据使用oligo软件包中可用的RMA方法预处理。将没有注释的探针从分析中删除。使用limma软件包进行适度的t检验,并使用采用Benjamini Hochberg方法的多次检验来调节p值。最后,如果调节的p值低于5%,我们认为是统计学上显著的。

[0231] 基因集富集分析。使用来自Molecular Signatures DataBase (MSigDB database v5.1, <http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/index.jsp>) 的具有免疫学标记 (C7) 和C2 (监管的) 基因集的基因进行基因组富集分析 (GSEA)。下载了带有基因符号信息的GMT文件。GCT文件由总共41345个探针组成,并已导入GSEA。GSEA运行时使用默认参数,但排列数量 (n=10000) 除外。如前所述完成BubbleGUM分析。

[0232] 按如下进行在Suv39h1缺失的CD8+OT-1细胞中的肿瘤生长的分析:

[0233] 将来自雄性Suv39h1-KO CD45.2 OT-1 (在H2-Kb MHC I类环境中特异于OVA257-264肽SIINFEKL) 和同窝WT小鼠的总脾和淋巴结在完全培养基 (补充有10%FBS、青霉素-链霉素和L-谷氨酰胺的RPMI 1640) 中培养3天,然后再用100UI/ml IL-2和1ug/mlOVA257-264肽激活3天。

[0234] 对于肿瘤接种,将 1×10^6 个EL4-OVA淋巴瘤细胞皮下注射到CD45.1/C57BL/6雄性小鼠的右侧腹中,并且在7天后,小鼠静脉内注射 2×10^6 IL-2/OVA处理的Suv39h1-KO CD45.2 OT-1或同窝WT细胞。

[0235] 小鼠腹膜内注射抗PD1 (Bio X Cell, RMP-14), 以7.5mg/Kg体重/剂量的剂量施用,在2周内每周两次。使用手动卡尺测量肿瘤生长。

[0236] 结果:

[0237] 1) 我们的结果表明,与从野生型小鼠获得的细胞群相比,在从Suv39h1-KO小鼠获得的细胞群中,具有“干细胞样”表型的早期祖细胞积聚,并且以更高的效率重编程为表达CD44和CD62L的长寿中央记忆T细胞。如图1所示,在Suv39h1缺陷小鼠中,中央记忆T细胞 (表达CD44和CD62L) 的比例和数量均增加。

[0238] 2) 使用转录组学分析理解这种特殊表型的机制:

[0239] 将野生型和Suv39h1缺陷小鼠用表达OVA的单核细胞增生李斯特菌免疫,并在免疫后第7天,使用分选流式细胞术分离OVA特异性T细胞。

[0240] 对细胞进行Affymetrix分析后,我们发现来自Suv39h1的效应T细胞表达更高水平的mRNA,所述mRNA编码干细胞相关蛋白 (CD8+ T干细胞样记忆标记 (86个基因): Abcb1a Irf8 Rest Abcb1b Jarid2 Rif1 Alpl Kat6a Rnf138 Antxr2 Klf4 Rras Arl4c Ldha Sall4 Atr Ldhd Satb1 Baalc Ldhd Setbp1 Baspl Ldhd Setdb1 Bcl6 Lect1 Skil Bub1 Lpin1 Smarcd1 Ccr7 Ly6a Sox2 Ccr9 Ly6e Spon1 Cd27 Map3k8 Stat3 Cxcr6 Mapk12 Tbx3 Dock9 Mcm3ap Tcf3 Dusp9 Mcoln2 Tc11 Eomes Myc Tdgf1 Esrrb Nanog Tert Evl Ncor2 Tigit Fas Nr0b1 Tnfaip2 Fgf2 Nr1d2 Tnfrsf1b Fut4 P2ry14 Traf1 Gzmk Pax6

Traf4 Hand1 Pcgf2 Trib2 Hesx1 Plekha5 Txnip Ier3 Podxl Zfp42 Il2rb Pou5f1 Zfx Il17r Pou6f1 Zic3 Irf4 Prkce)。

[0241] 我们的结论是：来自受单核细胞增生李斯特菌感染后刺激的Suv39h1缺陷小鼠的OVA特异性T细胞表达“干细胞”样mRNA标记。

[0242] 3) Suv39h1缺陷的CD8⁺ T细胞在体内显示出增加的存活率 and 自我更新。

[0243] 将分离自WT和Suv39h1 KO LM-OVA感染的小鼠的同基因CD45.2 Kb-OVA五聚体+CD8⁺ T细胞转移到初始受体CD45.1小鼠中。过继转移40天后，将初始受体小鼠用LM-OVA攻击，并在4天后通过FACS分析Kb-OVA五聚体+CD8⁺ T细胞。

[0244] 如图3所示，结果表明Suv39h1缺陷的细胞表达的“干细胞样”标记的水平增加。在过继转移后，它们还可以更好地存活并更有效地重新增殖 (re-populate) 野生型小鼠。

[0245] 4) Suv39h1缺失的CD8⁺OT-1细胞控制体内肿瘤的生长

[0246] 图4B和4C显示，与接受类似处理但具有WT OT-1细胞的小鼠相比，用Suv39h1-KO OT-1细胞过继转移并用抗PD1单克隆抗体处理的小鼠更好地控制肿瘤的生长。值得注意的是，到肿瘤注射后第30天，每5只WT OT-1转移小鼠中有4只显示出生长中的肿瘤，而每5只注射Suv39h1-KO OT-1细胞的小鼠中只有1只显示出生长中的肿瘤。

[0247] 结论

[0248] 基于过继T细胞转移的治疗途径中，CD8⁺ T细胞中Suv39h1活性的缺乏与更好的抗肿瘤功效相关。

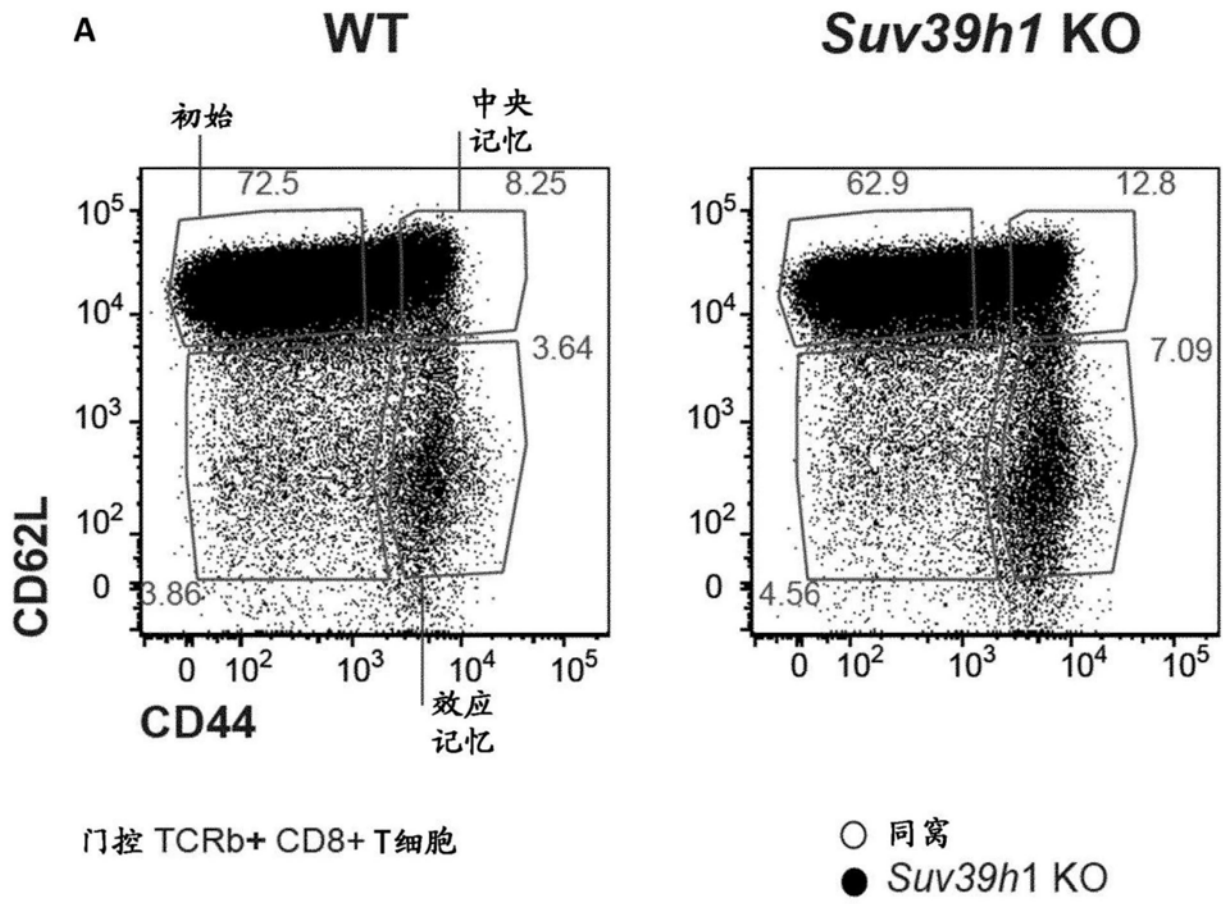
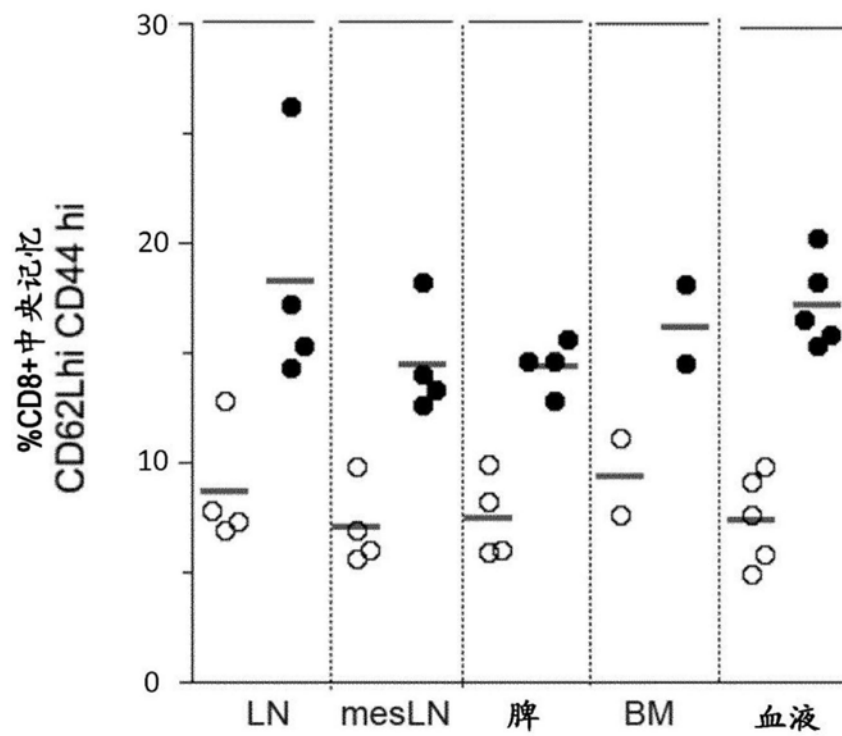
**B**

图1

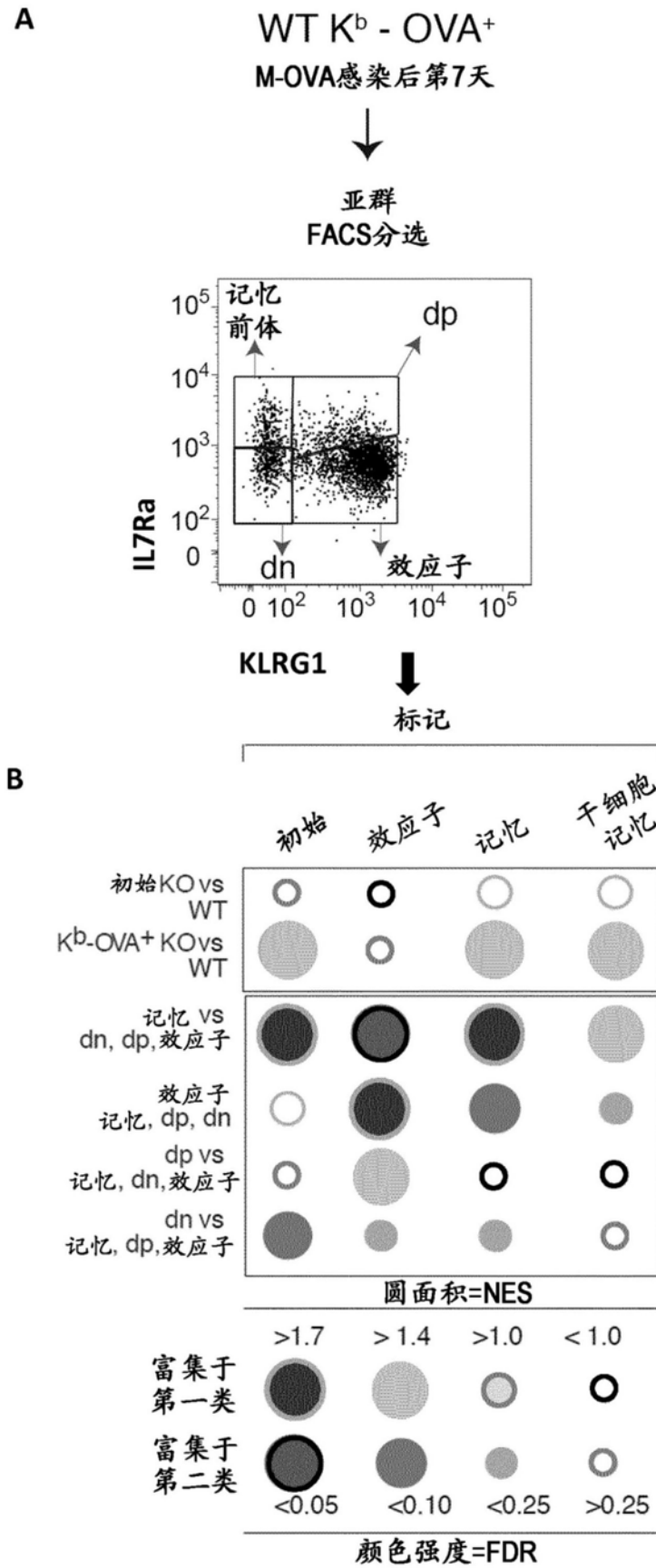


图2

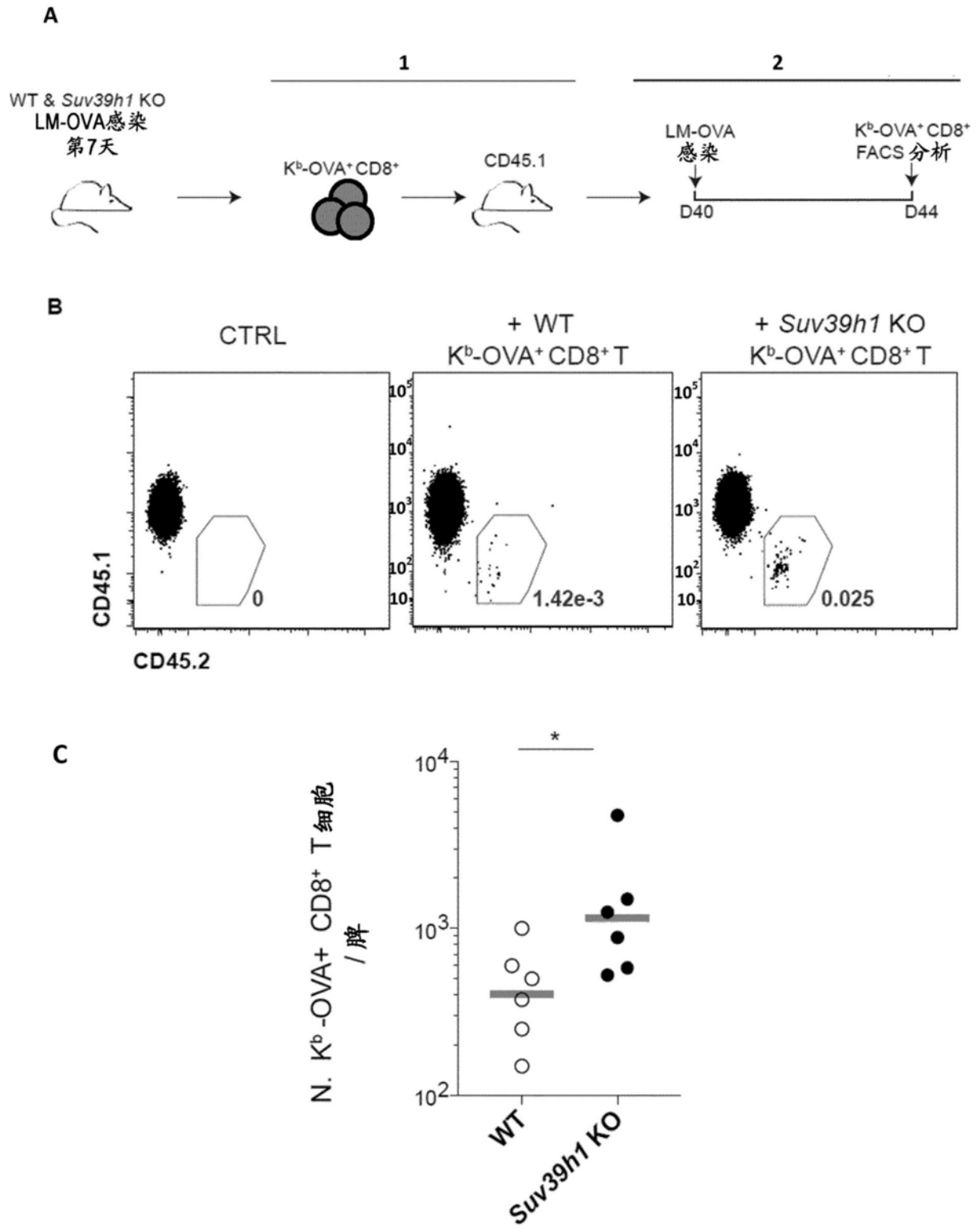


图3

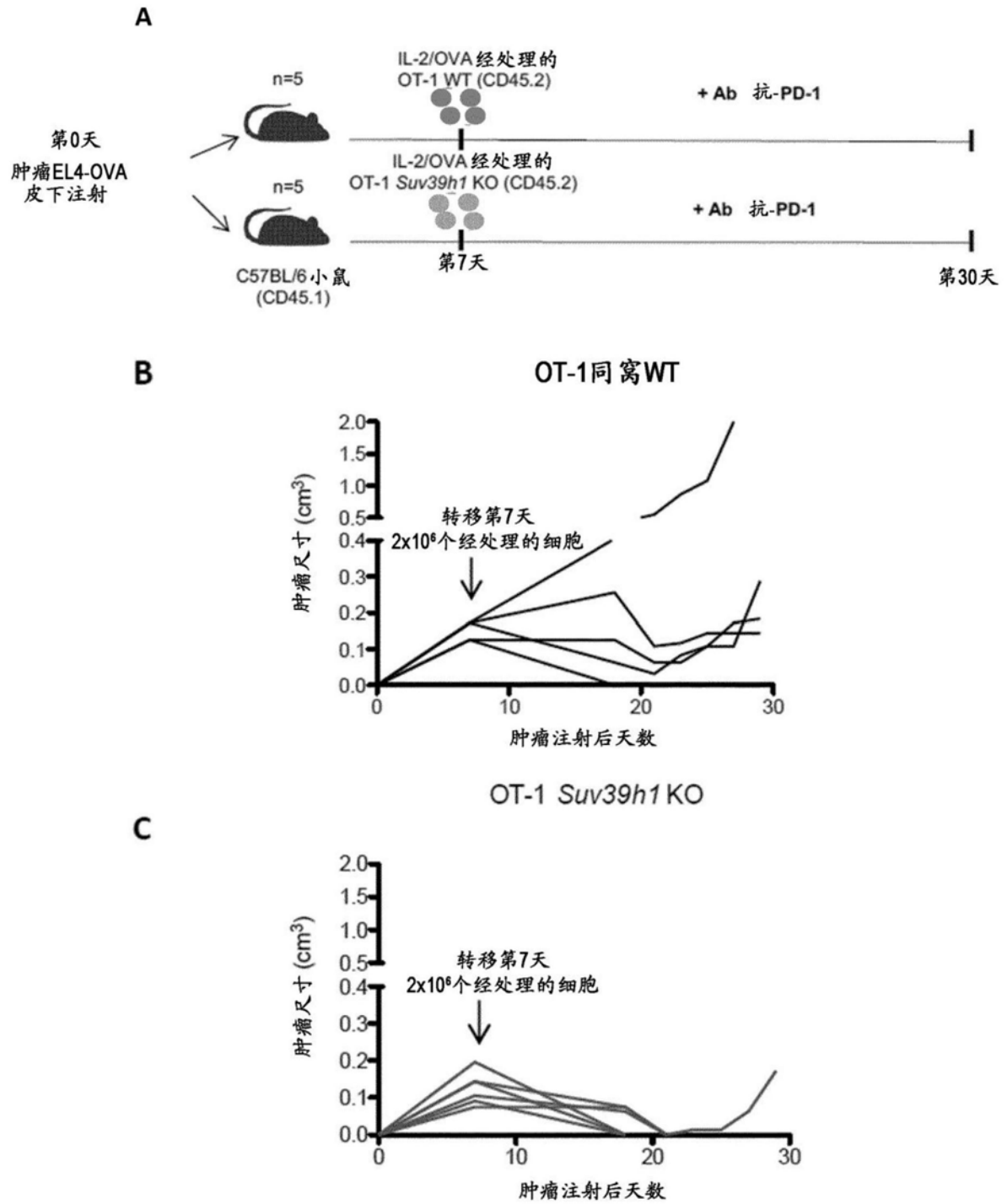


图4