

(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 110536700 A

(43)申请公布日 2019.12.03

(21)申请号 201880025945.5

(74)专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理

(22)申请日 2018.04.19

有限责任公司 11290

(30)优先权数据

代理人 王芬 张淑珍

62/487,358 2017.04.19 US

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61P 35/00(2006.01)

2019.10.18

C07K 14/705(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

C07K 14/725(2006.01)

PCT/US2018/028427 2018.04.19

C07K 16/28(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

C07K 16/30(2006.01)

W02018/195348 EN 2018.10.25

(71)申请人 南加利福尼亚大学

权利要求书2页 说明书26页

地址 美国加利福尼亚州

序列表1页 附图37页

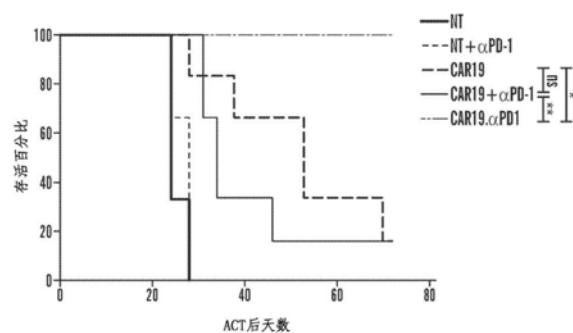
(72)发明人 王品 纳特纳雷·西里翁 李思

(54)发明名称

用于治疗癌症的组合物和方法

(57)摘要

本文描述了含有编码嵌合抗原受体(CAR)和检查点抑制剂的核酸的基因修饰的组合物,以及使用该组合物治疗癌症的方法。



1. 一种细胞，所述细胞包含编码嵌合抗原受体(CAR)和检查点抑制剂(CPI)的核酸。
2. 如权利要求1所述的细胞，其中，所述CAR靶向：分化簇(CD)19、CD22、CD23、骨髓增生性白血病蛋白(MPL)、CD30、CD32、CD20、CD70、CD79b、CD99、CD123、CD138、CD179b、CD200R、CD276、CD324、Fc受体样5(FcRH5)、CD171、CS-1(信号传导淋巴细胞激活分子家族7、SLAMF7)、C型凝集素样分子-1(CL1-1)、CD33、钙粘蛋白1、钙粘蛋白6、钙粘蛋白16、钙粘蛋白17、钙粘蛋白19、表皮生长因子受体变体III(EGFRviii)、神经节苷脂GD2、神经节苷脂GD3、人白细胞抗原A2(HLA-A2)、B细胞成熟抗原(BCMA)、Tn抗原、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)、FMS样酪氨酸激酶3(FLT3)、成纤维细胞激活蛋白(FAP)、肿瘤相关糖蛋白(TAG)-72、CD38、CD44v6、癌胚抗原(CEA)、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、B7-H3(CD276)、KIT、白介素13受体亚基α-2(IL-13Ra2)、白介素11受体亚基α(IL11Ra)、间皮素、前列腺干细胞抗原(PSCA)、血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)、Lewis Y、CD24，血小板衍生生长因子受体β(PDGFR-β)、蛋白酶丝氨酸21(PRSS21)、唾液酸糖脂阶段特异性胚胎抗原4(SSEA-4)、CD20、免疫球蛋白Fc区、组织因子、叶酸受体α、表皮生长因子受体2(ERBB2)、粘蛋白1(MUC1)、表皮生长因子受体(EGFR)、神经小粘附分子(NCAM)、蛋白酶、前列腺酸性磷酸酶(PAP)、延伸因子2突变型(ELF2M)、Ephrin B2、胰岛素样生长因子I受体(IGF-1受体)、碳酸酐酶IX(CAIIX)、潜伏膜蛋白2(LMP2)、黑素细胞蛋白gp100、bcr-abl、酪氨酸酶、促红细胞生成素产生肝细胞癌A2(EphA2)、岩藻糖基化单唾液酸神经节苷脂(岩藻糖基GM1)、唾液酸化Lewis a(sLea)、神经节苷脂GM3、转谷氨酰胺酶5(TGS5)、高分子量黑色素瘤相关抗原(HMWMAA)、邻乙酰基GD2神经节苷脂、叶酸受体β、TEM1/CD248、肿瘤内皮标记相关蛋白7(TEM7R)、claudin 6(CLDN6)、甲状腺刺激激素受体(TSHR)、T细胞受体(TCR)-β1恒定链、TCR β2恒定链、TCR γ-δ、G蛋白偶联受体C类5组成员D(GPRC5D)、CXORF61蛋白、CD97、CD179a、间变性淋巴瘤激酶(ALK)、聚唾液酸、胎盘特异性1(PLAC1)、糖类抗原GloboH、乳腺分化抗原NY-BR-1、uroplakin-2(UPK2)、甲型肝炎病毒细胞受体1(HAVCR1)、肾上腺素受体β3(ADRB3)、泛连接蛋白3(PANX3)、G蛋白偶联受体20(GPR20)、淋巴细胞抗原6家族成员K(LY6K)、嗅觉受体家族51亚家族E成员2(OR51E2)、T细胞受体γ链可变阅读框蛋白(TARP)、Wilms肿瘤抗原1蛋白(WT1)、肿瘤-睾丸抗原NY-ESO-1、肿瘤-睾丸抗原LAGE-1a、legumain、人乳头瘤病毒(HPV)E6、HPV E7、人T淋巴营养病毒(HTLV1)-Tax、卡波西氏肉瘤相关疱疹病毒糖蛋白(KSHV)K8.1蛋白、爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)编码的糖蛋白350(EBB gp350)、HIV1包膜糖蛋白gp120、多元自动化基因组工程(MAGE)-A1、易位-Ets-白血病病毒(ETV)蛋白6-AML、精子蛋白17、X抗原家族成员(XAGE)1、跨膜酪氨酸蛋白激酶受体Tie 2、黑色素瘤肿瘤-睾丸抗原MAD-CT-1、黑色素瘤肿瘤-睾丸抗原MAD-CT-2、Fos相关抗原1、p53、p53突变体、prostein、生存速和端粒酶、前列腺癌肿瘤抗原-1(PCTA-1)/半乳糖凝集素8、MelanA/MART1、Ras突变体、人端粒酶逆转录酶(hTERT)、δ-样3(DLL3)、滋养层细胞表面抗原2(TROP2)、蛋白酪氨酸激酶7(PTK7)、鸟苷酸环化酶C(GCC)、甲胎蛋白(AFP)、肉瘤易位断裂点、黑色素瘤凋亡抑制剂(ML-IAP)、ERG(TMPRSS2 ETS融合基因)、N-乙酰氨基葡萄糖基转移酶V(NA17)、配对盒蛋白Pax-3(PAX3)、雄激素受体、细胞周期蛋白B1、v-myc禽骨髓细胞瘤病毒基因神经母细胞瘤衍生同源物(MYCN)、Ras同源家族成员C(RhoC)、酪氨酸酶相关蛋白2(TRP-2)、细胞色素P4501B1(CYP1B1)、CCCTC结合因子(锌指蛋白)样(BORIS或印记位点的调节物的兄弟(Brother of the Regulator of Imprinted Sites))、T细胞识别的鳞状细胞

癌抗原3 (SART3)、PAX5、前顶体蛋白结合蛋白sp32 (0Y-TES1)、淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶 (LCK)、A激酶锚蛋白4 (AKAP-4)、滑膜肉瘤、X断裂点2 (SSX2)、晚期糖基化终产物受体 (RAGE-1)、肾ubiquitous 1 (RU1)、RU2、肠道羧基酯酶、热休克蛋白70-2突变型 (mut hsp70-2)、CD79a、CD79b、CD72、白细胞相关免疫球蛋白样受体1 (LAIR1)、IgA受体Fc片段 (FCAR)、白细胞免疫球蛋白样受体亚家族A成员2 (LILRA2)、CD300分子样家族成员f (CD300LF)、C型凝集素结构域家族12成员A (CLEC12A)、骨髓基质细胞抗原2 (BST2)、含EGF样模块粘蛋白样激素受体样2 (EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 2, EMR2)、淋巴细胞抗原75 (LY75)、磷脂酰肌醇聚糖-3 (GPC3)、Fc受体样5 (FCRL5)、免疫球蛋白λ样多肽1 (IGLL1)、FITC、促黄体生成激素受体 (LHR)、卵泡刺激激素受体 (FSHR)、绒毛膜促性腺激素受体 (CGHR)、CC趋化因子受体4 (CCR4)、神经节苷脂GD3、信号传导淋巴细胞激活分子 (SLAM) 家族成员6 (SLAMF6)、SLAMF4、促黄体生成激素受体 (LHR)、卵泡刺激激素受体 (FSHR)、绒毛膜促性腺激素受体 (CGHR) 或它们的组合。

3. 如权利要求1所述的细胞，其中，所述检查点抑制剂靶向PD-1。
4. 如权利要求4所述的细胞，其中，所述检查点抑制剂为抗PD-1scFv。
5. 如权利要求1所述的细胞，其中，所述检查点抑制剂靶向以下中的任一种或多种：PD-1、LAG-3、TIM3、B7-H1、CD160、P1H、2B4、CEACAM-1、CEACAM-3、CEACAM-5、TIGIT、CTLA-4、BTLA 和LAIR1。
6. 如权利要求1所述的细胞，其中，所述细胞为T淋巴细胞 (T细胞)。
7. 如权利要求1所述的细胞，其中，所述细胞为自然杀伤 (NK) 细胞。
8. 如权利要求1所述的细胞，其中，组成性表达所述CPI。
9. 如权利要求5所述的细胞，其中，组成性表达所述抗PD-1scFv。
10. 一种核酸，所述核酸包含编码嵌合抗原受体 (CAR) 的第一多核苷酸和编码检查点抑制剂 (CPI) 的第二多核苷酸。
11. 由如权利要求10所述的核酸编码的多肽。
12. 一种载体，所述载体包含如权利要求10所述的核酸。
13. 一种药物组合物，所述包含如权利要求1-9中任一项所述的细胞。
14. 一种用于治疗癌症的方法，所述方法包括向有需要的受试者给予治疗有效量的如权利要求1-9中任一项所述的细胞。
15. 如权利要求15所述的方法，其中，所述癌症为肺癌。
16. 如权利要求15所述的方法，所述方法进一步包括向所述受试者给予治疗有效量的现有疗法，所述现有疗法包括化学疗法或放射。
17. 如权利要求17所述的方法，其中，将所述细胞和所述现有疗法顺序或同时给予。

用于治疗癌症的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 根据35U.S.C§119(e),本申请包括要求2017年4月19日提交的美国临时申请号62/487,358的优先权,以引用的方式将其整体并入在此。

[0003] 关于联邦政府资助的研究或开发的声明

[0004] 本发明是在美国国立卫生研究院授予的Grant No.AI068978和No.EB017206的政府支持下完成的。美国政府拥有本发明的某些权利。

技术领域

[0005] 本文描述了包含含有嵌合抗原受体(CAR)和检查点抑制剂(checkpoint inhibitor,CPI)的T细胞的组合物,以及使用该组合物治疗癌症的方法。

背景技术

[0006] 将本文中的所有出版物以引用的方式并入,其程度如同将每个单独的出版物或专利申请具体且单独地指示为以引用的方式并入一样。下面的描述包括对于理解本发明可能有用的信息。这并不是承认本文提供的任何信息都是现有技术或者与目前所请求保护的发明相关,或者任何明确或隐含地引用的出版物都是现有技术。

[0007] 过继细胞转移(adoptive cell transfer,ACT)是一种用于癌症的免疫疗法模式,已在血液恶性肿瘤和恶性黑色素瘤的治疗中展示出显著的成功。一种特别有效的ACT形式(使用表达嵌合抗原受体(CAR)的基因修饰T细胞来特异性靶向肿瘤相关抗原(TAA),例如CD19和GD2)在治疗例如B细胞恶性肿瘤和神经母细胞瘤的疾病的临床试验中显示出令人鼓舞的结果。

[0008] 与天然存在的T细胞受体(TCR)不同,CAR是由融合有细胞内T细胞信号传导结构域和共刺激结构域的细胞外抗原识别结构域组成的人工受体。CAR可以不依赖于主要组织相容性类别(MHC)的方式直接并选择性地识别细胞表面TAA。尽管CAR T细胞疗法在血液恶性肿瘤患者中取得了有记载的成功,但在实体瘤中仅观察到不太大的响应。这可能部分归因于在实体瘤中免疫抑制性微环境的建立。此类环境涉及多种内在抑制性途径的上调,所述内在抑制性途径由与肿瘤中它们的同源(cognate)配体反应的T细胞中的抑制性受体(IR)的表达增加介导。

[0009] 到目前为止,已经在T细胞中表征了若干种IR,例如CTLA-4、T细胞Ig粘蛋白3(T cell Ig mucin-3,TIM-3)、淋巴细胞活化基因3(LAG-3)和程序性死亡1(PD-1)。这些分子在慢性疾病和癌症中T细胞持续激活后上调,并且它们促进T细胞功能障碍和耗竭,从而导致肿瘤逃避免疫检测。与其它IR不同,PD-1在T细胞激活后不久即上调,转而通过与它的两个配体(PD-L1或PD-L2)相互作用来抑制T细胞效应物功能。PD-L1在T细胞、B细胞、巨噬细胞和树突细胞(DC)上组成性表达。还证实PD-L1在种类繁多的实体瘤中大量表达。相反,正常组织中PD-L1的表达是不可检测的。由于其在免疫抑制中的关键作用,PD-1是近期研究的焦点,旨在中和其对T细胞的负面影响并增强抗肿瘤反应。临床研究表明,PD-1阻断显著增强

结肠癌、肾癌和肺癌以及黑色素瘤中的肿瘤消退。

[0010] 因此,本发明的目的是提供调节肿瘤诱导的CAR T细胞机能减退、并且可以逆转或抑制抑制性受体的组合物。

[0011] 本发明的另一目的是提供制备和使用调节或避免肿瘤诱导的CAR T细胞机能减退的组合物的方法。

发明内容

[0012] 结合系统、组合物和方法对如下实施方式及其方面进行描述和说明,其意在示例和说明,而并不对范围进行限制。

[0013] 提供了细胞,所述细胞包含编码嵌合抗原受体(CAR)和检查点抑制剂(CPI)二者的核酸,或者包含编码CAR的核酸和编码CPI的核酸。在多种实施方式中,提供了分泌检查点抑制剂的CAR-T细胞。

[0014] 在多种实施方式中,提供了分泌靶向PD-1的检查点抑制剂(CPI)的CAR-T细胞(表示为CAR. α PD1-T细胞),并证实了它们在人肺癌异种移植小鼠模型中的功效。尽管嵌合抗原受体(CAR)工程化的T细胞疗法在血液恶性肿瘤患者中响应良好,但在实体瘤治疗中结果远远不能令人满意,部分是由于免疫抑制性肿瘤微环境的发展。在一些方面,为了克服PD-1信号传导在CAR T细胞中的抑制作用,使用具有连续产生单链可变片段(scFv)形式的抗PD-1抗体的能力的基因工程化CAR T细胞。在肿瘤模型中,抗PD-1scFv的表达和分泌中断PD-1与其配体PD-L1的接合,并防止CAR T细胞被抑制和耗竭。在CD19肿瘤模型中,由CAR T细胞分泌抗PD-1scFv显著提高了CAR T细胞根除已建立的实体瘤的能力。

[0015] 典型地,如通过抗原特异性刺激后IFN- γ 的产生和T细胞增殖所测量的,CAR. α PD1-T细胞表现出效应物功能和扩增能力。使用异种移植小鼠模型,CAR. α PD1-T细胞的抗肿瘤功效优于单独的CAR-T细胞或CAR-T细胞与抗PD-1抗体的联用。肿瘤浸润淋巴细胞的扩增和功能能力进一步支持了CAR. α PD1-T细胞增强的肿瘤根除。

[0016] 在多种实施方式中,CAR. α PD1-T细胞分泌人抗PD-1CPI,所述人抗PD-1CPI有效结合PD-1并逆转PD-1/PD-L1相互作用对T细胞功能的抑制作用。通过连续分泌的抗PD-1引起的PD-1阻断防止T细胞耗竭,并在体外(in vitro)和体内(in vivo)均显著增强T细胞扩增和效应物功能。在异种移植小鼠模型中,抗PD-1的分泌增强了CAR-T细胞的抗肿瘤活性并延长了总生存。与亲本CAR-T细胞相比,具有组成性抗PD-1分泌的CAR. α PD1-T细胞更少耗竭,更具功能性和扩增性,并且在根除肿瘤方面更有效。

[0017] 提供了一种方法,在该方法中,向有需要的受试者给予含有编码CAR和CPI的核酸的细胞,以增强抗肿瘤免疫力和/或以治疗癌症(尤其是减少实体瘤)。

附图说明

[0018] 在参考的附图中对示例性的实施方式进行说明。本文公开的实施方式和附图意图被视为说明性的、而非限制性的。

[0019] 图1A-图1E描绘了CAR19和CAR19. α PD1的构成和特征。图1A示出了亲本抗CD19 CAR(CAR19)和分泌抗PD-1的抗CD19 CAR(CAR19. α PD1)构建体的示意性表示。图1B示出了两种CAR在人T细胞中的表达。将两组CAR T细胞用生物素化的蛋白L染色,随后用FITC缀合的链

霉亲和素染色来检测细胞表面上的CAR表达。使用了可行的CD3⁺淋巴细胞门控策略。NT表示未转导的T细胞,用作对照。图1C和图1D示出了在来自CAR19 T细胞培养物或CAR19.αPD1 T细胞培养物的上清液中分泌的抗PD-1抗体的表达,通过蛋白质印迹(1C)和ELISA(1D)进行分析。图1E示出了关于指定的处理,表达IFN-γ的CD8⁺ T细胞在总CD8⁺ T细胞中的百分比(n=4,平均值±SEM;**P<0.01)。

[0020] 图2A-图2D描绘了抗PD-1表达增强了CAR T细胞的抗原特异性免疫应答。图2A示出了将CAR19 T细胞和CAR19.αPD1 T细胞与H292-CD19细胞共培养不同的持续时间。通过ELISA测量IFN-γ的产生(n=5,平均值±SEM;ns,不显著,P>0.05;*P<0.05)。图2B示出了两种CAR对靶细胞的细胞毒性。将两组CAR T细胞与H292-CD19细胞以1:1、5:1、10:1和20:1的效应物-靶标比例共培养6小时,并测量针对H292-CD19的细胞毒性。将未转导(NT)的T细胞用作对照。图2C示出了抗原特异性刺激后两种CAR的增殖。将两组CAR T细胞均用CFSE预染色。然后将染色的T细胞与H292-CD19细胞以1:1的效应物-靶标比例共培养96小时,并测量CFSE的强度。将未转导(NT)的T细胞用作对照。对应于图2C,图2D以柱状图示出了未转导(NT)的T细胞、CAR19 T细胞和CAR19.αPD1 T细胞的增殖速率的汇总统计数据(n=4,平均值±SEM;*P<0.05)。

[0021] 图3A-图3F描绘了分泌抗PD-1scFv防止CAR T细胞耗竭。将CAR19 T细胞和CAR19.αPD1 T细胞与H292-CD19细胞共培养24小时。图3A示出了通过流式细胞术测量的PD-1表达。每个子图中示出了CD8⁺T细胞。对表达PD-1的CD8 T细胞进行门控,并在每个散布图中示出了它们在总CD8⁺ T细胞中的百分比。图3B以柱状图示出了三个平行试验(triplicate)的汇总统计数据(n=3,均值±SEM;**P<0.01;***P<0.001)。图3C示出了通过流式细胞术测量的LAG-3表达。以柱状图示出了表达LAG-3的CD8 T细胞在总CD8⁺ T细胞中的百分比(n=3,平均值±SEM;ns,不显著,P>0.05;**P<0.01)。图3D示出了通过流式细胞术测量的TIM-3表达。以柱状图示出了表达TIM-3的CD8 T细胞在总CD8⁺ T细胞中的百分比(n=3,平均值±SEM;ns,不显著,P>0.05)。图3E和图3F描绘了将CAR19 T细胞和CAR19.αPD1 T细胞与H292-CD19细胞或SKOV3-CD19细胞共培养24小时。通过流式细胞术对PD-L1表达进行测量。以柱状图示出了表达PD-L1的CD8 T细胞在总CD8⁺ T细胞中的百分比(图3E)以及表达PD-L1的CD4 T细胞在总CD4⁺ T细胞中的百分比(图3F)(n=3,平均值±SEM;*P<0.05;**P<0.01;***P<0.001)。

[0022] 图4A-图4D描绘了分泌抗PD-1scFv的CAR T细胞的过继转移增强了已建立的肿瘤的生长抑制。图4A示出了用于肿瘤激发(tumor challenge)、T细胞过继转移和抗体处理的实验程序的示意性表示。用 3×10^6 的H292-CD19肿瘤细胞对NSG小鼠进行s.c.激发。在第20天,当肿瘤长至~100mm³时,通过i.v.注射过继转移 1×10^6 的CAR19 T细胞或CAR19.αPD1 T细胞。T细胞输注后一天,开始抗PD-L1抗体处理,并在指定的日期继续该处理。每隔一天对肿瘤体积进行测量。图4B示出了用以下方案处理的小鼠的肿瘤生产曲线:未转导(NT),NT加抗PD-1注射,CAR19,CAR19加抗PD-1注射,或CAR19.αPD1。数据表示为在指定时间点的平均肿瘤体积±平均值的标准差(SEM)(n=8;*P<0.05;***P<0.001)。图4C示出了各处理组在处理后第17天时肿瘤减少的瀑布图分析。图4D示出了在指定处理后携带H292-CD19的NSG小鼠的存活。使用Kaplan-Meier方法绘制总生存曲线,并使用log-rank(Mantel-Cox)检验进行比较(n=6;ns,不显著,P>0.05;*P<0.05;**P<0.01)。

[0023] 图5A-图5C描绘了在体内分泌抗PD-1的CAR T细胞比亲本CAR T细胞更有效地扩增。在治疗后的第2天(5A)或第10天(5B),通过流式细胞术研究在携带H292-CD19肿瘤小鼠的肿瘤、血液、脾脏和骨髓中人CD45⁺ T细胞的百分比,所述小鼠过继转移有未转导(NT)的T细胞、CAR19 T细胞或CAR19.αPD1 T细胞(n=3,平均值±SEM;*P<0.05;***P<0.001)。图5C示出了不同组的肿瘤、血液、脾脏和骨髓中人CD45⁺T细胞的百分比的代表性FACS散布图。

[0024] 图6A-图6G描绘了在局部肿瘤部位处,分泌抗PD-1的CAR T细胞比亲本CAR T细胞更具功能性。图6A示出了用于肿瘤激发、T细胞过继转移和抗体处理的实验程序的示意性表示。用 3×10^6 的H292-CD19肿瘤细胞对NSG小鼠进行s.c.激发。在第20天,通过i.v.注射过继转移 3×10^6 的CAR19 T细胞或CAR19.αPD1 T细胞。T细胞过继转移后一天,开始抗PD-1抗体处理,并在指定的日期继续该处理。然后在第8天对小鼠实施安乐死以用于分析。图6B示出了通过流式细胞术表征的携带H292-CD19肿瘤小鼠的肿瘤、血液、脾脏和骨髓中人CD45⁺ T细胞的百分比,所述小鼠过继转移有CAR19 T细胞或CAR19.αPD1 T细胞,或者所述小鼠经由CAR19 T细胞与注射抗PD-1抗体一起进行处理。图6C示出了肿瘤中CD8⁺ TIL与CD4⁺ TIL的比例(n=3,平均值±SEM;ns,不显著,P>0.05;*P<0.05;***P<0.001)。图6D示出了表达PD-1的CD8TIL在总CD8⁺ TIL中的百分比(n=3,平均值±SEM;*P<0.05)。收获TIL并通过抗CD3抗体/抗CD28抗体(6E)或靶细胞H292-CD19(6F)离体(ex vivo)刺激6小时。通过流式细胞术研究了表达细胞内IFN-γ的肿瘤中CAR T细胞的百分比(n=3,平均值±SEM;*P<0.05;**P<0.01)。图6G示出了使用ELISA评价的血清中的分泌的抗PD-1scFv和注射的抗PD-1抗体(n=3,平均值±SEM;**P<0.01;***P<0.001)。

[0025] 图7A描绘了在有布雷菲德菌素A(Brefeldin A)或没有布雷菲德菌素A下培养24小时后,由CAR19.αPD1 T细胞(1×10^6)产生的抗PD-1scFv。图7B描绘了在CAR19.αPD1 T细胞扩增过程中抗PD-1scFv的表达。在T细胞转导后的四个不同时间点(包括第4天、第7天、第10天和第12天)测量分泌的scFv的浓度。在T细胞扩增过程中,维持细胞密度在每ml约 2×10^6 - 4×10^6 。图7C描绘了将人T细胞用抗CD3/CD28珠激活48小时,然后在补充有10ng/ml人IL-2的T细胞培养基中培养两周。然后用同型对照(isotype control)抗体或抗PD-1抗体对激活的T细胞进行染色。图7D描绘了将激活的人T细胞与1ml的CAR19.αPD1 T细胞培养物上清液孵育30min。用PBS洗涤T细胞一次,然后用抗HA抗体染色。

[0026] 图8描绘了通过流式细胞术测定的H292-CD19和SKOV3-CD19上PD-L1的表达。

[0027] 图9A描绘了将CAR19 T细胞和CAR19.αPD1 T细胞与SKOV3-CD19细胞共培养不同的持续时间。通过ELISA测量IFN-γ的产生(n=5,平均值±SEM;ns,不显著,P>0.05;*P<0.05)。图9B描绘了将与抗PD-1(0.6μg/ml)一起或不与抗PD-1一起的CAR19 T细胞以及CAR19.αPD1 T细胞与H292-CD19细胞共培养24小时或72小时。通过ELISA测量IFN-γ的产生(n=4,平均值±SEM;ns,不显著,P>0.05;***P<0.001)。

[0028] 图10描绘了抗原特异性刺激3天后未转导(NT)的T细胞、CAR19 T细胞和CAR19.αPD1 T细胞的群体倍增(n=3,平均值±SEM;**P<0.01)。

[0029] 图11A描绘了抗PD-1scFv对PD-1检测抗体的结合的阻断活性。将人T细胞用抗CD3/CD28珠激活48小时,然后在补充有10ng/ml人IL-2的TCM中培养两周。然后将激活的T细胞与1ml的CAR19.αPD1 T细胞培养物上清液或对照培养基孵育30min。用PBS洗涤T细胞一次,然后用抗PD-1抗体染色。图11B描绘了抗原特异性刺激24小时后,CAR19 T细胞和CAR19.αPD1

T细胞上PD-1的相对转录表达(n=3,平均值±SEM;***P<0.001)。

[0030] 图12A和图12B描绘了抗原特异性刺激24小时后关于CD8⁺PD-L1⁺T细胞(12A)以及CD8⁺LAG-3⁺ T细胞和CD8⁺TIM-3⁺ T细胞(12B)的代表性门控方案和绘图。

[0031] 图13A-图13E描绘了将CAR19 T细胞和CAR19.αPD1 T细胞与H292-CD19细胞共培养24小时。通过流式细胞术测量PD-1(13A)、LAG-3(13B)和TIM-3(13C)的表达。以柱状图示出了表达PD-1、LAG-3或TIM-3的CD4 T细胞在总CD4⁺ T细胞中的百分比(n=3,平均值±SEM;ns,不显著,P>0.05;**P<0.01)。在(T激活和转导后)T细胞扩增过程中CAR19 T细胞和CAR19.αPD1 T细胞二者中PD-1(13D)和LAG-3(13E)的表达。

[0032] 图14A描绘了CD8⁺ T细胞与CD4⁺ T细胞在过继转移进入小鼠之前的比例。图14B描绘了来自用CAR19.αPD1 T细胞处理的小鼠的CD8⁺ T细胞与CD4⁺ T细胞的比例(n=3,平均值±SEM;**P<0.01)。图14C描绘了通过ELISA测量的血清中IFN-γ的表达。

具体实施方式

[0033] 本文引用的所有参考文献都以引用的方式以其整体并入,如同进行了完全阐述一样。除非另外定义,本文使用的技术术语和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。Allen等,Remington:The Science and Practice of Pharmacy 22nd ed.,Pharmaceutical Press(2012年9月15日);Hornyk等,Introduction to Nanoscience and Nanotechnology,CRC Press(2008);Singleton和Sainsbury,Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3rd ed.,revised ed.,J.Wiley& Sons(New York,NY 2006);Smith,March's Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 7th ed.,J.Wiley& Sons(New York,NY 2013);Singleton,Dictionary of DNA and Genome Technology 3rd ed.,Wiley-Blackwell(2012年11月28日);以及Green和Sambrook,Molecular Cloning:A Laboratory Manual 4th ed.,Cold Spring Harbor Laboratory Press(Cold Spring Harbor,NY 2012)为本领域技术人员提供了本申请中使用的许多术语的一般性指导。关于如何制备抗体的参考文献,参见Greenfield,Antibodies A Laboratory Manual 2nd ed.,Cold Spring Harbor Press(Cold Spring Harbor NY,2013);Köhler和Milstein,Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion,Eur.J.Immunol.1976 Jul,6 (7):511-9;Queen和Selick,Humanized immunoglobulins,美国专利No.5,585,089(1996Dec);以及Riechmann等,Reshaping human antibodies for therapy,Nature 1988 Mar 24,332 (6162):323-7。

[0034] 本领域技术人员将认识到许多可用于本发明的实践中的与本文所描述的方法和材料类似或等同的方法和材料。通过与附图(其通过示例的方式说明了本发明的实施方式的各种特征)结合的以下详细描述,本发明的其它特征和优点将变得显而易见。实际上,本发明决不限于所描述的方法和材料。为方便起见,在此收集了本文在说明书、实施例和所附权利要求中使用的某些术语。

[0035] 除非另有说明或上下文有所暗示,以下术语和短语包括下面提供的含义。除非另有明确说明或从上下文中显而易见,下面的术语和短语不排除该术语或短语在其所属领域中已获得的含义。提供定义来帮助描述具体实施方式,并不旨在限制所要求保护的发明,因

为本发明的范围仅由权利要求限制。除非另外定义,本文使用的所有技术术语和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。

[0036] 定义

[0037] 如本文所使用的术语“包含/包括 (comprising/comprises)”用于提及在实施方式中有用的组合物、方法及它们各自的组成部分,仍对包含未指明的要素(无论是否有用)保持开放。本领域技术人员将理解,总体而言,本文使用的术语通常旨在作为“开放性”术语(例如,术语“包括(including)”应解释为“包括但不限于”、术语“具有”应解释为“至少具有”、术语“包括/includes)”应解释为“包括但不限于”等)。

[0038] 除非另有说明,在描述本申请的具体实施方式的上下文中(特别是在权利要求的上下文中)使用的术语“一个/一种(a/an)”和“该/所述”以及类似的用法可被解释为涵盖单数和复数两者。本文中对数值范围的列举仅旨在用作分别提及落入该范围内的每个单独的值的速记方法。除非本文另有指定,将每个单独的值并入说明书,如同其在本文中被单独列举一样。除非本文另有指定或上下文有明显矛盾,本文所述的所有方法均能够以任意合适的顺序进行。针对本文的某些实施方式提供的任意的和所有的实例或示例性语言(例如“如”)的使用仅旨在更好地说明本申请,而非对另外要求保护的本申请的范围构成限制。缩写“例如(e.g.)”衍生自拉丁文“exempli gratia”,在本文中用于指定非限制性实例。因此,缩写“e.g.”与“例如(for example)”是同义词。不应将说明书中的任何语言解释为指定对申请的实践必要的任何未要求保护的要素。

[0039] 如本文所使用的术语“约”指可测量的值(如量、持续时间等),并且涵盖给定值的±20%、±10%、±5%、±1%、±0.5%或±0.1%的变化。

[0040] 本文所使用的“嵌合抗原受体”或“CAR/CARS”指将抗原特异性移植至细胞(例如T细胞,如初始(*naïve*)T细胞、中枢记忆T细胞、效应记忆T细胞或它们的组合)上的工程化受体。CAR也称为人工T细胞受体、嵌合T细胞受体或嵌合免疫受体。在各种实施方式中,CAR为重组多肽,其包含抗原特异性结构域(ASD)、铰链区(HR)、跨膜结构域(TMD)、共刺激结构域(CSD)和细胞内信号传导结构域(ISD)。

[0041] “抗原特异性结构域”(ASD)指CAR中特异性结合靶细胞上的抗原的部分。在一些实施方式中,CAR的ASD包含抗体或其功能等同物或其片段或其衍生物。靶向区域可以包含全长重链、Fab片段、单链Fv(scFv)片段、二价单链抗体或双抗体(diabodies),它们中的每一种都对靶抗原而言是特异性的。在一些实施方式中,如本领域技术人员将理解的,几乎任何以高亲和力结合给定抗原的分子都可以用作ASD。在一些实施方式中,ASD包括T细胞受体(TCR)或其部分。

[0042] 本文所使用的“铰链区”(HR)指在ASD和TMD之间的亲水区域。铰链区包括但不限于:抗体的Fc片段或其片段或衍生物、抗体的铰链区或其片段或衍生物、抗体的CH2区域、抗体的CH3区域、人工间隔区序列(*artificial spacer sequence*),或它们的组合。铰链区的实例包括但不限于CD8a铰链以及由可小到例如IgG(例如人IgG4)的CH1和CH3结构域或Gly3结构域的多肽制成的人工间隔区。在一些实施方式中,铰链区为下述中的任一种或多种:(i) IgG4的铰链区、CH2区和CH3区,(ii) IgG4的铰链区,(iii) IgG4的铰链区和CH2区,(iv) CD8a的铰链区,(v) IgG1的铰链区、CH2区和CH3区,(vi) IgG1的铰链区或(vi) IgG1的铰链区和CH2区。其它铰链区域对于本领域技术人员将是显而易见的,并且可以与本发明的替代实

施方式结合使用。

[0043] 本文所使用的“跨膜结构域”(TMD)指CAR中跨越质膜的区域。本发明的CAR的跨膜结构域为跨膜蛋白(例如I型跨膜蛋白)的跨膜区域、人工疏水序列或它们的组合。其它跨膜结构域对于本领域技术人员将是显而易见的，并且可以与本发明的替代实施方式结合使用。在一些实施方式中，CAR的TMD包含选自以下物质的跨膜结构域的跨膜结构域：T细胞受体的 α 链、 β 链或 ζ 链，CD28, CD3 ϵ , CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1(CD1 1a, CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), CD160, CD19, IL2R β , IL2R γ , IL7R α , ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD1 1d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD1 1a, LFA-1, ITGAM, CD1 1b, ITGAX, CD1 1c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D和/或NKG2C。

[0044] 本文所使用的“共刺激结构域”(CSD)指CAR中增强记忆细胞的增殖、生存和/或发育的部分。本发明的CAR可包括一个或多个共刺激结构域。各个共刺激结构域包含任一种或多种下述物质的共刺激结构域：例如，TNFR超家族成员、CD28、CD137(4-1BB)、CD134(OX40)、Dap10、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40或它们的组合。其它共刺激域(例如，来自其它蛋白的)对本领域技术人员而言将是显而易见的，并且可以与本发明的替代实施方式结合使用。

[0045] 本文所使用的“细胞内信号传导结构域”(ISD)或“胞浆结构域”指CAR中转导效应物功能信号并指导细胞执行其的专门功能的部分。转导效应物功能信号的结构域的实例包括但不限于：T细胞受体复合物的 ζ 链或任何其同源物(homolog)(例如，h链、FceR1g和b链、MB1(Iga)链、B29(Igb)等)，人CD3 ζ 链，CD3多肽(D、d和e)，syk家族酪氨酸激酶(Syk、ZAP 70等)，src家族酪氨酸激酶(Lck、Fyn、Lyn等)，以及参与T细胞转导的其它分子(例如CD2、CD5和CD28)。其它胞内信号传导结构域对本领域技术人员而言将是显而易见的，并且可以与本发明的替代实施方式结合使用。

[0046] 本文所使用的“接头”(L)或“接头结构域”或“接头区”指长度为约1至100个氨基酸的寡肽或多肽区域，所述寡肽或多肽区域将本发明的CAR的任何结构域/区域连接在一起。接头可以由例如甘氨酸和丝氨酸的柔性残基组成，以使相邻的蛋白结构域相对于彼此自由移动。当期望确保两个相邻结构域彼此之间不发生空间干扰时，可使用较长的接头。接头可为可切割的或不可切割的。可切割的接头的实例包括2A接头(例如T2A)、2A样接头或其功能等同物，以及它们的组合。在一些实施方式中，接头包括小RNA病毒2A样接头(picornaviral 2A-like linker)、猪捷申病毒(porcine teschovirus)(P2A)的CHYSEL序列、Thosse asigna病毒(T2A)，或它们的组合、变体和功能等同物。在其它实施方式中，接头序列可包含Asp-Val/Ile-Glu-X-Asn-Pro-Gly^(2A)-Pro^(2B)(SEQ ID N0:1)基序，其在2A甘氨酸和2B脯氨酸之间产生切割。其它接头对本领域技术人员而言将是显而易见的，并且可以与本发明的替代实施方式结合使用。

[0047] 本文所使用的“自体”细胞指如下细胞：所述细胞衍生自与随后该细胞被返回给予

的个体相同的个体。

[0048] 如本文所使用的“基因修饰细胞”、“重定向细胞”、“基因工程化细胞”或“修饰细胞”指表达CAR和检查点抑制剂的细胞。在一些实施方式中，基因修饰细胞包含编码CAR的载体和编码一种或多种检查点抑制剂的载体，其中，两种载体是不同的。在一些实施方式中，基因修饰细胞包含编码CAR和一种或多种检查点抑制剂的载体。在一些实施方式中，基因修饰细胞包含编码CAR的第一载体和编码检查点抑制剂的第二载体。在一个实施方式中，基因修饰细胞为T淋巴细胞(T细胞)。在一个实施方式中，基因修饰细胞为自然杀伤(NK)细胞。

[0049] 本文所使用的“免疫细胞”指哺乳动物免疫系统的细胞，包括但不限于抗原呈递细胞、B细胞、嗜碱性粒细胞、细胞毒性T细胞、树突细胞、嗜酸性粒细胞、粒细胞、辅助T细胞、白细胞、淋巴细胞、巨噬细胞、肥大细胞、记忆细胞、单核细胞、自然杀伤细胞、中性粒细胞、吞噬细胞、浆细胞和T细胞。

[0050] 本文使用的“免疫效应细胞”指T细胞和自然杀伤(NK)细胞。

[0051] 如本文所使用的“免疫应答”指免疫(immunities)，包括但不限于先天免疫、体液免疫、细胞免疫、免疫、炎症应答、获得性(适应性)免疫、自身免疫和/或过度活跃的免疫。

[0052] 如本文所使用的“CD4淋巴细胞”指表达CD4的淋巴细胞，即CD4⁺淋巴细胞。CD4淋巴细胞可为表达CD4的T细胞。

[0053] 如本文所使用的术语“抗体”指具有Fc(可结晶的片段)区域或Fc区域的FcRn结合片段(在本文中称为“Fc片段”或“Fc结构域”)的单克隆或多克隆抗原结合片段或完整的免疫球蛋白。可通过重组DNA技术或通过完整抗体的酶促或化学切割产生抗原结合片段。抗原结合片段尤其包括Fab、Fab'、F(ab')2、Fv、dAb、互补决定区(CDR)片段、单链抗体(scFv)、单结构域抗体、嵌合抗体、双抗体以及多肽(该多肽含有足以向该多肽赋予特异性抗原结合的免疫球蛋白的至少一部分)。Fc结构域包含有助于两类或三类抗体的两条重链的部分。可通过重组DNA技术或通过完整抗体的酶促切割(例如木瓜蛋白酶切割)或经由完整抗体的化学切割来产生Fc结构域。

[0054] 本文所使用的术语“抗体片段”指仅包含完整抗体的一部分的蛋白片段，通常包含完整抗体的抗原结合位点并因此保留结合抗原的能力。由本定义涵盖的抗体片段的实例包括：(i) Fab片段，其具有VL、CL、VH和CH1结构域；(ii) Fab'片段，其为在CH1结构域的C末端具有一个或多个半胱氨酸残基的Fab片段；(iii) Fd片段，其具有VH和CH1结构域；(iv) Fd'片段，其具有VH和CH1结构域以及在CH1结构域的C末端具有一个或多个半胱氨酸残基；(v) Fv片段，其具有抗体单臂的VL和VH结构域；(vi) dAb片段(Ward等，Nature 341, 544-546 (1989))，其由VH结构域构成；(vii) 分离的CDR区；(viii) F(ab')2片段，其为包含在铰链区由二硫桥连接的两个Fab'片段的二价片段；(ix) 单链抗体分子(例如，单链Fv；scFv)(Bird等，Science 242:423-426 (1988)；以及Huston等，PNAS (USA) 85:5879-5883 (1988))；(x) 带有两个抗原结合位点的“双抗体”，其包含与相同多肽链中与轻链可变域(VL)连接的重链可变域(VH)(参见，例如，EP 404,097；WO 93/11161；以及Hollinger等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 90:6444-6448 (1993))；(xi)“线性抗体”，其包含一对串联的Fd区段(VH-CH1-VH-CH1)，所述Fd区段与互补轻链多肽一起形成抗原结合区域对(Zapata等，Protein Eng. 8 (10) :1057-1062 (1995)；以及U.S.Pat.No.5,641,870)。

[0055] 本文所使用的“单链可变片段”、“单链抗体可变片段”或“scFv”抗体是指包含通过

接头肽相接的仅重链(V_H)和轻链(V_L)的可变区的抗体形式。scFv能够作为单链多肽表达。scFv保留了其衍生自的完整抗体的特异性。只要保留了scFv对靶标抗原的特异性,轻链和重链可为任何顺序,例如, V_H -接头- V_L 或 V_L -接头- V_H 。

[0056] 如本文所使用的“治疗剂”指用于例如治疗、抑制、预防、减轻疾病作用、降低疾病严重性、降低发展出疾病的可能性、减缓疾病进展和/或治愈疾病的药剂。治疗剂所靶向的疾病包括但不限于传染病、癌、肉瘤、淋巴瘤、白血病、生殖细胞肿瘤、胚细胞瘤、在各种免疫细胞上表达的抗原以及在与各种血液疾病和/或炎性疾病相关的细胞上表达的抗原。

[0057] “癌症”和“癌性的”指或描述哺乳动物中通常以不受调节的细胞生长为特征的生理状况。术语“癌症”意在包括所有类型的癌性生长或致癌过程、转移性组织或恶性转化的细胞、组织或器官,而不考虑组织病理学类型或侵袭阶段。实体瘤的实例包括各种器官系统的恶性肿瘤(例如肉瘤、腺癌和癌),如影响肝、肺、乳腺、淋巴、胃肠(例如结肠)、泌尿生殖道(例如肾、尿路上皮细胞)、前列腺和咽的实体瘤。腺癌包括恶性肿瘤,如多数结肠癌、直肠癌、肾细胞癌、肝癌、非小细胞肺癌、小肠癌和食道癌。在一个实施方式中,癌症为黑色素瘤,例如晚期黑色素瘤。使用本发明的方法和组合物也可治疗或预防上述癌症的转移性病变。可治疗的其它癌症的实例包括骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头部或颈部癌、皮肤或眼内恶性黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛门区域癌、胃癌、睾丸癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、慢性或急性白血病(包括急性髓性白血病、慢性髓性白血病、急性淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病)、儿童实体瘤、淋巴细胞淋巴瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)赘生物(neoplasm)、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管新生、脊髓轴(spinal axis)肿瘤、脑干胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮样癌、鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤、环境诱发的癌症(包括由石棉诱发的癌症)以及所述癌症的组合。可以使用本文所述的抗体分子影响转移性癌症(例如表达PD-L1的转移性癌症(Iwai等(2005)Int.Immunol.17:133-144))的治疗。

[0058] 本文所使用的术语“分离的”是指基本上不含其它材料的分子或生物材料或细胞材料。在一个方面,术语“分离的”是指分别与存在于天然来源中的其它DNA或RNA、或蛋白或多肽、或细胞或细胞器、或组织或器官分离的核酸(例如DNA或RNA)、或蛋白或多肽(例如抗体或其衍生物)、或细胞或细胞器、或组织或器官。术语“分离的”还指在通过重组DNA技术产生时基本不含细胞材料、病毒材料或培养基的核酸或肽,或者在化学合成时基本不含化学前体或其它化学品的核酸或肽。此外,“分离的核酸”意在包括不以片段的形式天然存在并且不会在天然状态发现的核酸片段。术语“分离的”在本文中还用于指与其它细胞蛋白分离的多肽,并且意在包括纯化的多肽和重组的多肽。术语“分离的”在本文中还用于指与其它细胞或组织分离的细胞或组织,并且意在包括培养的细胞或组织和工程化的细胞或组织。

[0059] 本文所使用的“裸DNA”是指以适宜的方向克隆在合适的表达载体中用以表达的编码CAR的DNA。可使用的病毒载体包括但不限于SIN慢病毒载体、逆转录病毒载体、泡沫病毒载体(foamy virus vectors)、腺相关病毒(AAV)载体、杂交载体和/或质粒转座子(例如睡美人转座子系统)或基于整合酶的载体系统。可以与本发明的替代实施方式结合使用的其它载体对于本领域技术人员而言将是显而易见的。

[0060] 本文所使用的“靶细胞”是指疾病中所涉及的并且可由本发明的基因修饰细胞(包

括但不限于基因修饰的T细胞、NK细胞、造血干细胞、多能干细胞和胚胎干细胞)靶向的细胞。其它靶细胞对于本领域技术人员而言将是显而易见的,并且可以与本发明的替代实施方式结合使用。

[0061] 术语“T细胞”和“T淋巴细胞”在本文中是可互换的并且同义地使用。实例包括但不限于初始T细胞、中枢记忆T细胞、效应记忆T细胞或它们的组合。

[0062] 本文所使用的“载体”、“克隆载体”和“表达载体”是指可通过其将多核苷酸序列(例如外源基因)导入宿主细胞以转化该宿主并促进所导入的序列表达(例如转录和翻译)的运载体。载体包括质粒、噬菌体、病毒等。

[0063] 如本文所使用的术语“给予/给药/施用”指通过导致药剂至少部分定位在期望部位的方法或途径将本文公开的药剂置于受试者中。

[0064] “有益结果”可包括但不限于减弱或缓和疾病病情的严重性、防止疾病病情恶化、治愈疾病病情、防止疾病病情发展、降低患者发展出疾病病情的机会以及延长患者的寿命或预期寿命。作为非限制性实例,“有益结果”或“期望结果”可为一种或多种症状的缓和、缺陷程度的缩减、癌症进展的稳定(即不恶化)状态、转移或侵袭的延迟或减缓以及与癌症相关的症状的改善或减弱。

[0065] 如本文所使用的术语“治疗(treat/treatment/treating)”或“改善”指治疗性治疗,其中目的是逆转、缓和、改善、抑制、减缓或停止与疾病或病症有关的病情的进展或严重性。术语“治疗”包括减轻或缓和病情、疾病或病症(例如癌症)的至少一种副作用或症状。如果一种或多种症状或临床标志物减少,则治疗是大体上“有效的”。或者,如果疾病进展减少或停止,则治疗是“有效的”。也就是说,“治疗”不仅包括症状或标志物的改善,还包括在无治疗的情况下预期会出现的症状的进展或恶化的中止(或至少减缓)。有益或期望的临床结果包括但不限于可检测或不可检测的一种或多种症状的缓和、疾病程度的缩减、疾病的稳定(即不恶化)状态、疾病进展的延迟或减缓、疾病状态的改善或减弱以及缓解(无论部分还是全部)。术语疾病的“治疗”还包括提供疾病的症状或副作用的缓和(包括姑息治疗)。在一些实施方式中,癌症的治疗包括减小肿瘤体积、减少癌细胞数量、抑制癌症转移、增加预期寿命、降低癌细胞增殖、降低癌细胞存活或改善与癌性病情相关的各种生理症状。

[0066] 如本文所使用的“病情(conditions)”和“疾病病情”可包括癌症、肿瘤或传染病。在示例性实施方式中,病情包括但不限于任何形式的恶性赘生细胞增殖性(malignant neoplastic cell proliferative)病症或疾病。在示例性实施方式中,病情包括以下病情中的任一种或多种:肾癌、黑色素瘤、前列腺癌、乳腺癌、成胶质细胞瘤、肺癌、结肠癌或膀胱癌。

[0067] 如本文所使用的术语“有效量”或“治疗有效量”指用以减少疾病或病症的至少一种或更多症状的包含本文公开的一种或多种肽或其突变体、变体、类似物或衍生物的药物组合物的量,并涉及用以提供期望效果的药理组合物的足够量。如本文所使用的短语“治疗有效量”是指以适用于任何医学治疗的合理的收益/风险比治疗病症的组合物的足够量。

[0068] 治疗上或预防上显著的症状减少为例如与对照或未治疗的受试者或者给予本文所述的寡肽之前的受试者状态相比较,在测量的参数中至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约125%、至少约150%或更多的减少。测量的或可测量的参数包括临幊上可检

测的疾病标志物(例如生物标志物升高或降低的水平)以及与糖尿病的症状或标志物的临
床上接受的量表相关的参数。然而,应理解的是,本文公开的组合物和制剂的每日总用量将
由主治医师在合理的医学判断范围内决定。所需的确切量将根据诸如所治疗疾病的类型以
及受试者的性别、年龄和体重等因素而变化。

[0069] 如本文所使用的“哺乳动物”指哺乳动物(Mammalia)纲的任何成员,包括但不限于
人和非人灵长类动物(如黑猩猩以及其它猿和猴物种);农场动物(如牛、绵羊、猪、山羊和
马);家养哺乳动物(如犬和猫);实验室动物(包括啮齿动物,如小鼠、大鼠和豚鼠)等。该术语
不表示特定的年龄或性别。因此,成年受试者和新生受试者以及胎儿(无论雄性/男性或
雌性/女性)都旨在包括在该术语的范围内。

[0070] 具有抗肿瘤活性的CAR-T细胞在免疫抑制性肿瘤微环境中经常耗竭。PD-1受体是
介导T细胞耗竭的主要效应物。先前的研究表明,在同系乳腺癌小鼠模型中与抗HER2 CAR-T
细胞结合时,抗PD-1抗体治疗增强抗肿瘤活性。但是,获取实质性的和持续的功效需要连续
给药以及大量抗体,经常导致严重的系统性毒性。因此,代替系统性给予抗PD-1抗体,我们
工程化了抗PD-1自分泌CAR. α PD1-T细胞,与单独注射CAR-T细胞或联合注射抗PD-1抗体与
CAR-T细胞相比,所述抗PD-1自分泌CAR. α PD1-T细胞更少耗竭、更具功能性和扩增性、且在
介导肿瘤根除方面更有效。我们的研究为将CPI治疗与CAR-T细胞疗法结合用于实体瘤的免
疫疗法提供了一种有效且安全的策略。

[0071] 因此,本文提供了细胞(例如遗传修饰细胞),所述细胞包含编码嵌合抗原受体
(CAR)和检查点抑制剂二者的核酸,或分别编码CAR和CPI的核酸。在多种实施方式中,所述
细胞表达CAR和检查点抑制剂。在一个实施方式中,所述细胞为T淋巴细胞(T细胞)。在一个
实施方式中,所述细胞为自然杀伤(NK)细胞。在多种实施方式中,组成性表达所述检查点抑
制剂(例如,抗PD-1scFv)。

[0072] 在一些实施方式中,所述细胞(例如遗传修饰细胞)表达靶向在致病细胞或疾病相
关细胞上表达的任一种或多种靶标的CAR,所述靶标包括但不限于:CD19、CD22、CD23、MPL、
CD30、CD32、CD20、CD70、CD79b、CD99、CD123、CD138、CD179b、CD200R、CD276、CD324、FcRH5、
CD171、CS-1、CLL-1(CLECL1)、CD33、CDH1、CDH6、CDH16、CDH17、CDH19、EGFRviii、FcRH5、GD2、
GD3、HLA-A2、BCMA、Tn Ag、PSMA、ROR1、FLT3、FAP、TAG72、CD38、CD44v6、CEA、EPCAM、B7H3、
KIT、IL-13Ra2、IL11Ra、间皮素、PSCA、VEGFR2、Lewis Y、CD24、PDGFR- β 、PRSS21、SSEA-4、
CD20、免疫球蛋白Fc区、组织因子(Tissue Factor)、叶酸受体 α 、ERBB2(Her2/neu)、MUC1、
EGFR、NCAM、Prostase、PAP、ELF2M、Ephrin B2、IGF-I受体、CAIX、LMP2、gp100、bcr-ab1、酪氨
酸酶、EphA2、岩藻糖基GM1、sLea、GM3、TGS5、HMWMAA、邻乙酰基-GD2、叶酸受体 β 、TEM1/
CD248、TEM7R、CLDN6、TSHR、TCR- β 1恒定链、TCR β 2恒定链、TCR γ - δ 、GPRC5D、CXorf61、CD97、
CD179a、ALK、聚唾液酸、PLAC1、GloboH、NY-BR-1、UPK2、HAVCR1、ADRB3、PANX3、GPR20、LY6K、
OR51E2、TARP、WT1、NY-ESO-1、LAGE-1a、legumain、HPV E6、E7、HTLV1-Tax、KSHV K8.1蛋白、
EBB gp350、HIV1-包膜糖蛋白gp120、MAGE-A1、MAGE A1、ETV6-AML、精子蛋白17、XAGE1、Tie
2、MAD-CT-1、MAD-CT-2、Fos相关抗原1、p53、p53突变体、prostein、生存素和端粒酶、PCTA-
1/半乳糖凝集素8、MelanA/MART1、Ras突变体、hTERT、DLL3、TROP2、PTK7、GCC、AFP、肉瘤易位
断裂点(sarcoma translocation breakpoints)、ML-IAP、ERG (TMPRSS2 ETS融合基因)、
NA17、PAX3、雄激素受体、细胞周期蛋白B1、MYCN、RhoC、TRP-2、CYP1B1、BORIS、SART3、PAX5、

OY-TES1、LCK、AKAP-4、SSX2、RAGE-1、RU1、RU2、肠道羧基酯酶、mut hsp70-2、CD79a、CD79b、CD72、LAIR1、FCAR、LILRA2、CD300LF、CLEC12A、BST2、EMR2、LY75、GPC3、FCRL5、IGLL1、FITC、促黄体生成激素受体 (Leuteneizing hormone receptor, LHR)、卵泡刺激素受体 (FSHR)、绒毛膜促性腺激素受体 (CGHR)、CCR4、GD3、SLAMF6、SLAMF4、FITC、促黄体生成激素受体 (LHR)、卵泡刺激素受体 (FSHR)、绒毛膜促性腺激素受体 (CGHR)、CCR4、GD3、SLAMF6、SLAMF4或它们的组合。

[0073] 在一个实施方式中，所述细胞 (例如基因修饰细胞) 表达靶向CD19的CAR。

[0074] 在一些实施方式中，所述细胞 (例如基因修饰细胞) 表达靶向PD-1、LAG-3、TIM3、B7-H1、CD160、P1H、2B4、CEACAM (例如CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、TIGIT、CTLA-4、BTLA和LAIR1中任一个或多个的检查点抑制剂。在一些实施方式中，所述检查点抑制剂为靶向PD-1、LAG-3、TIM3、B7-H1、CD160、P1H、2B4、CEACAM (例如CEACAM-1、CEACAM-3和/或CEACAM-5)、TIGIT、CTLA-4、BTLA和LAIR1中任一个或多个的抗体或其片段。

[0075] 在一个实施方式中，所述细胞 (例如基因修饰细胞) 表达靶向PD-1的检查点抑制剂。在一个实施方式中，所述检查点抑制剂为抗PD-1scFv。

[0076] 在一个实施方式中，所述细胞 (例如基因修饰细胞) 表达靶向CD19的CAR和靶向PD-1的检查点抑制剂，其中，所述靶向PD-1的检查点抑制剂为抗PD-1-scFv。

[0077] 本文还提供了核酸，所述核酸包含编码本文所述的CAR的第一多核苷酸和编码本文所述的检查点抑制剂的第二多核苷酸。本文还提供了由本文所述的一种或多种核酸编码的多肽。本文进一步提供了包含本文所述的一种或多种核酸的载体。

[0078] 本文进一步提供了在有需要的受试者中治疗癌症、抑制癌症、预防癌症转移和/或减少癌症严重程度的方法。该方法包括向有需要的受试者给予治疗有效量的包含编码嵌合抗原受体和检查点抑制剂二者的核酸 (或分别编码CAR和CPI的核酸) 的细胞，以在受试者中治疗癌症、抑制癌症、预防癌症转移和/或减少癌症严重程度。在一个示例性的实施方式中，所述癌症为肺癌。

[0079] 本文进一步提供了在有需要的受试者中治疗癌症、抑制癌症、预防癌症转移和/或减少癌症严重程度的方法。该方法包括向受试者给予治疗有效量的组合物，以在受试者中治疗癌症、抑制癌症、预防癌症转移和/或减少癌症严重程度，所述组合物包含含有编码嵌合抗原受体 (CAR) 和检查点抑制剂二者的核酸的细胞或含有分别编码CAR和检查点抑制剂的核酸的细胞。在一个示例性的实施方式中，所述癌症为肺癌。

[0080] 本文进一步提供了在有需要的受试者中治疗肺癌、抑制肺癌、预防肺癌转移和/或减少肺癌严重程度的方法。该方法包括向受试者给予治疗有效量的组合物，以在受试者中治疗肺癌、抑制肺癌、预防肺癌转移和/或减少肺癌严重程度，所述组合物包含含有编码CD19特异性嵌合抗原受体和PD-1特异性检查点抑制剂 (例如抗PD-1-scFv) 二者的核酸的细胞，或含有分别编码CD19特异性CAR和PD-1特异性检查点抑制剂的核酸的细胞。

[0081] 在多种实施方式中，所述方法进一步包括向受试者给予治疗有效量的现有疗法 (现有治疗剂)，其中，所述现有疗法与本文所述的组合物顺序或同时给予。

[0082] 在一些实施方式中，本文所述的细胞 (基因修饰细胞) 可与现有疗法组合用于治疗方案，所述现有疗法包括但不限于手术，化学疗法，放射，免疫抑制剂 (例如环孢菌素、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤、霉酚酸酯 (mycophenolate) 和FK506)，抗体，或其它免疫清除剂 (例如

CAMPATH、抗CD3抗体或其它抗体疗法),细胞毒素,氟达拉滨(fludarabine),环孢菌素,FK506,雷帕霉素,霉酚酸,类固醇,FR901228,细胞因子,以及辐射,肽疫苗,例如Izumoto等2008J Neurosurg 108:963-971中所描述的。在一个实施方式中,本文所述的表达CAR的细胞可以与化疗剂组合使用。示例性化疗剂包括蒽环霉素(anthracycline)(例如阿霉素(如脂质体阿霉素)),长春花生物碱(例如长春碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨),烷化剂(例如环磷酰胺、氮烯咪胺(decarbazine)、马法兰(melphalan)、异环磷酰胺、替莫唑胺),免疫细胞抗体(例如阿仑单抗(alemtuzamab)、吉妥珠单抗、利妥昔单抗、奥法木单抗(ofatumumab)、托西莫单抗(tositumomab)、本妥昔单抗(brentuximab)),抗代谢物(包括例如叶酸拮抗剂、嘧啶类似物、嘌呤类似物和腺苷脱氨酶抑制剂(例如氟达拉滨)),mTOR抑制剂,TNFR糖皮质激素诱导TNFR相关蛋白(GITR)激动剂,蛋白酶体抑制剂(例如阿克拉霉素A、胶霉毒素或硼替佐米(bortezomib)),免疫调节剂(如沙利度胺或沙利度胺衍生物(例如来那度胺))。

[0083] 当指定“治疗有效量”时,待给予的本发明组合物的精确量可由医生在考虑患者(受试者)的年龄、体重、肿瘤尺寸、感染或转移程度以及病情的个体差异的情况下确定。在一些实施方式中,基因修饰细胞的治疗有效量以 10^4 个细胞/kg体重~ 10^9 个细胞/kg体重的剂量给予,在一些情况下以 10^5 个细胞/kg体重~ 10^6 个细胞/kg体重的剂量给予(包括这些范围内的所有整数值)。T细胞组合物也能够以这些剂量多次给予。可通过使用在免疫治疗中公知的输注技术(参见,例如,Rosenberg等,New Eng.J.of Med.319:1676,1988)给予细胞。可以通过注射到病变部位(例如,瘤内注射)来给予细胞。

[0084] 在一个实施方式中,例如使用体外转录将CAR和CPI导入免疫效应细胞(例如,T细胞、NK细胞)中,并且让受试者(例如,人)接受包含本发明的CAR和CPI的免疫效应细胞(例如,T细胞,NK细胞)的初始给药以及包含本发明的CAR和CPI的免疫效应细胞(例如,T细胞、NK细胞)的一次或多次后续给药,其中,所述一次或多次后续给药在前次给药后少于15天执行,例如14天、13天、12天、11天、10天、9天、8天、7天、6天、5天、4天、3天或2天。在一个实施方式中,每周向受试者(例如,人)执行多于一次的包含本发明的CAR和CPI的免疫效应细胞(例如,T细胞、NK细胞)的给药,例如每周执行2次、3次或4次包含本发明的CAR和CPI的免疫效应细胞(例如,T细胞、NK细胞)的给药。在一个实施方式中,受试者(例如,人受试者)每周接受多于一次的包含本发明的CAR和CPI的免疫效应细胞(例如,T细胞、NK细胞)的给药(例如每周2次、3次或4次给药)(在本文也称为一个周期),随后一周不进行免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞)给药,然后每周向受试者执行一次以上额外的包含本发明的CAR或CPI的免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞)给药(例如,一次以上的免疫效应细胞(例如,T细胞、NK细胞)给药)。在另一实施方式中,受试者(例如,人受试者)接受多于一个周期的包含CAR和CPI的免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞),每个周期之间的时间少于10天、9天、8天、7天、6天、5天、4天或3天。在一个实施方式中,将包含CAR和CPI的免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞)隔天给予,每周三次给予。在一个实施方式中,将包含本发明的CAR和CPI的免疫效应细胞(例如T细胞、NK细胞)给予至少两周、三周、四周、五周、六周、七周、八周或更多周。

[0085] 在一些实施方式中,本文所述的治疗方法进一步包括顺序或同时向受试者给予现有疗法。现有癌症治疗的实例包括但不限于主动监测、观察、手术干预、化学疗法、免疫疗法、放射疗法(例如外照射、立体定向放射外科手术(伽玛刀)和分次立体定向放射疗法

(FSR))、局灶疗法、全身疗法、疫苗疗法、病毒疗法、分子靶向疗法或它们的组合。

[0086] 在一些实施方式中,用于制备基因修饰细胞(如本文所述,包含编码一种或多种CAR和一种或多种CPI的一种或多种核酸)的方法包括获得细胞群并选择表达CD3、CD28、CD4、CD8、CD45RA和/或CD45RO中任一种或多种的细胞。在某些实施方式中,提供的免疫效应细胞群是CD3⁺和/或CD28⁺。

[0087] 在一个实施方式中,用于制备遗传修饰细胞(如本文所述,包含编码一种或多种CAR和一种或多种CPI的一种或多种核酸)的方法包括获得细胞群并通过例如使用对于CD25具有特异性的抗体来富集CD25⁺ T调节性细胞。从细胞群体富集CD25⁺ T调节性细胞的方法对本领域技术人员而言将是显而易见的。在一些实施方式中,富含Treg的细胞包含少于30%、20%、10%、5%或更少的非Treg细胞。在一些实施方式中,将编码本文所述的CAR和CPI的载体转染到富含Treg的细胞中。表达CAR和CPI的富含Treg的细胞可用于诱导对CAR靶向的抗原的耐受。

[0088] 在一些实施方式中,该方法进一步包括在将包含本文所述的编码CAR和CPI的核酸的载体转染到细胞中之后,使细胞群扩增。在实施方式中,使细胞群体扩增8天或更短的时段。在某些实施方式中,使细胞群在培养中扩增5天,并且所得的细胞比在相同培养条件下培养9天所扩增的相同细胞更有效力。在其它实施方式中,与在相同培养条件下在培养9天所扩增的相同细胞相比,培养5天所扩增的细胞群在抗原刺激后显示出至少一倍、两倍、三倍或四倍的细胞倍增增加。在一些实施方式中,使细胞群在包括一种或多种白介素的恰当的培养基中扩增,导致在14天的扩增时段中细胞增加至少200倍、250倍、300倍或350倍(通过流式细胞术测量)。

[0089] 在多种实施方式中,扩增的细胞包含本文所述的一种或多种CAR和一种或多种CPI。

[0090] 药物组合物

[0091] 在各种实施方式中,本发明提供药物组合物。该药物组合物包含本文所述的含有编码CAR和检查点抑制剂的核酸的细胞。根据本发明的药物组合物可含有任何药学上可接受的赋形剂。“药学上可接受的赋形剂”意为在制备通常安全、无毒和期望的药物组合物中有用的赋形剂,并且包括对于兽医学用途以及对于人类制药用途而言可接受的赋形剂。此类赋形剂可为固体、液体、半固体,或在气溶胶组合物的情况下可为气态的。赋形剂的实例包括但不限于淀粉、糖、微晶纤维素、稀释剂、造粒剂、润滑剂、粘合剂、崩解剂、润湿剂、乳化剂、着色剂、脱模剂、包被剂、甜味剂、调味剂、芳香剂、防腐剂、抗氧化剂、增塑剂、胶凝剂、增稠剂、硬化剂、凝固剂、悬浮剂、表面活性剂、保湿剂、载体、稳定剂及它们的组合。

[0092] 在各种实施方式中,根据本发明的药物组合物可被配制为用于经由任何给予途径递送。“给予途径”可指本领域已知的任何给予途径,包括但不限于气溶胶、经鼻、经口、经粘膜、透皮、肠胃外或肠内。“肠胃外”指通常与注射相关的给予途径,包括眶内、输注、动脉内、囊内、心内、皮内、肌肉内、腹膜内、肺内、脊柱内、胸骨内、鞘内、子宫内、静脉内、蛛网膜下、囊下、皮下、经粘膜或经气管。经由肠胃外途径,组合物可处于用于输注或用于注射的溶液或悬浮液的形式,或者作为冻干粉末。经由肠胃外途径,组合物可处于用于输注或用于注射的溶液或悬浮液的形式。经由肠内途径,药物组合物可处于允许受控释放的片剂、凝胶胶囊、糖衣片剂、糖浆、悬浮液、溶液、粉末、颗粒、乳液、微球或纳米球或脂质囊泡或聚合物囊

泡的形式。通常，通过注射给予组合物。用于此类给予的方法是本领域技术人员已知的。

[0093] 根据本发明的药物组合物可含有任何药学上可接受的载体。如本文所使用的“药学上可接受的载体”指药学上可接受的材料、组合物或媒介物 (vehicle)，其涉及将感兴趣的化合物从身体的一个组织、器官或部分携带或运输到身体的另一组织、器官或部分。例如，载体可为液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或包封材料或它们的组合。载体的每种组分必须为“药学上可接受的”，因为其必须与制剂的其它成分相容。载体也必须适合用于与任何可能与之接触的组织或器官接触，这意味着其必须不能携带毒性、刺激、过敏反应、免疫原性或任何其它过度超过其治疗益处的并发症的风险。

[0094] 还可将根据本发明的药物组合物包封、压片或者制备成乳液或糖浆，用于口服给予。可加入药学上可接受的固体载体或液体载体以增强或稳定组合物或促进组合物的制备。液体载体包括糖浆、花生油、橄榄油、甘油、盐水、醇和水。固体载体包括淀粉、乳糖、硫酸钙、二水合物、石膏粉、硬脂酸镁或硬脂酸、滑石、果胶、阿拉伯胶、琼脂或明胶。载体还可包括单独或含蜡的持续释放材料，如甘油单硬脂酸酯或甘油二硬脂酸酯。

[0095] 按照常规药学技术制造药物制剂，对于片剂形式根据需要涉及研磨、混合、制粒和压制；或对于硬明胶胶囊形式涉及研磨、混合和填充。当使用液体载体时，制剂将处于糖浆、酏剂、乳液或者水性或非水性悬浮液的形式。可直接p.o.或填充至软明胶胶囊来给予此类液体制剂。

[0096] 可将根据本发明的药物组合物以治疗有效量递送。精确的治疗有效量是在给定受试者的治疗功效方面将产生最有效结果的组合物的量。该量将依赖于多种因素而变化，所述因素包括但不限于治疗化合物的特征（包括活性、药代动力学、药效学以及生物利用度）、受试者的生理状况（包括年龄、性别、疾病类型和阶段、一般身体状况、对给定剂量的应答性以及药物类型）、制剂中药学上可接受的载体的性质以及给予途径。临床和药理学领域的技术人员将能够通过常规实验确定治疗有效量，例如通过对受试者对给予化合物的应答进行监测并相应地调整剂量。有关其它指导，请参阅Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro ed., 第20版, Williams & Wilkins PA, 美国) (2000)。

[0097] 在向患者给予前，可将助剂 (formulants) 添加至rAAV载体、用rAAV载体转染的细胞或用转染细胞调制的上清液。液体制剂可能是优选的。例如，此类助剂可包括油、聚合物、维生素、碳水化合物、氨基酸、盐、缓冲剂、白蛋白、表面活性剂、膨松剂 (bulking agent) 或它们的组合。

[0098] 碳水化合物助剂包括糖或糖醇，如单糖、二糖或多糖或水溶性葡聚糖。糖类或葡聚糖可包括果糖、右旋糖、乳糖、葡萄糖、甘露糖、山梨糖、木糖、麦芽糖、蔗糖、葡聚糖、普鲁兰多糖、糊精、 α 和 β 环糊精、可溶性淀粉、羟乙基淀粉和羧甲基纤维素或它们的混合物。“糖醇”定义为具有-OH基团的C4~C8烃，包括半乳糖醇、肌醇、甘露糖醇、木糖醇、山梨糖醇、甘油和阿拉伯糖醇。可单独使用或组合使用上述这些糖或糖醇。只要糖或糖醇可溶于含水制剂中，对使用量无固定限制。在一个实施方式中，糖或糖醇浓度为1.0w/v%~7.0w/v%，更优选2.0w/v%~6.0w/v%。

[0099] 氨基酸助剂包括左旋 (L) 形式的肉毒碱、精氨酸和甜菜碱；但也可加入其它氨基酸。

[0100] 在一些实施方式中，作为助剂的聚合物包括具有2,000~3,000的平均分子量的聚

乙烯吡咯烷酮(PVP),或具有3,000~5,000的平均分子量的聚乙二醇(PEG)。

[0101] 还优选在组合物中使用缓冲剂以使冻干前或复溶后溶液中的pH改变最小化。可使用大多数的任何生理缓冲液,包括但不限于柠檬酸盐、磷酸盐、琥珀酸盐和谷氨酸盐缓冲液或它们的混合物。在一些实施方式中,浓度为0.01摩尔~0.3摩尔。在EP No.270,799和EP No.268,110中示出了可加入至制剂中的表面活性剂。

[0102] 用于增加循环半衰期的另一药物递送系统是脂质体。Gabizon等,Cancer Research (1982) 42:4734;Cafiso,Biochem Biophys Acta (1981) 649:129;以及Szoka,Ann Rev Biophys Eng (1980) 9:467中讨论了制备脂质体递送系统的方法。其它药物递送系统是本领域已知的,并且在例如Poznansky等,DRUG DELIVERY SYSTEMS (R.L.Juliano,ed., Oxford,N.Y.1980),pp.253-315;M.L.Poznansky,Pharm Revs (1984) 36:277中进行了描述。

[0103] 在制备液体药物组合物后,可将其冻干以防止降解以及保持无菌。用于冻干液体组合物的方法是本领域普通技术人员已知的。可在刚要使用之前用无菌稀释剂(例如林格氏溶液、蒸馏水或无菌盐水)对组合物进行复溶,所述无菌稀释剂可包含另外的成分。复溶后,使用本领域技术人员已知的方法向受试者给予组合物。

[0104] 试剂盒

[0105] 在多种实施方式中,本发明提供了用于治疗癌症的包含组合物的试剂盒,所述组合物包含如本文所述的含有编码一种或多种CAR和一种或多种CPI的核酸的细胞。

[0106] 试剂盒是材料或组分的集合,包括至少一种本发明组合物(例如,本文所述的包含编码一种或多种CAR和一种或多种CPI的核酸的基因修饰细胞)。因此,在一些实施方式中,如上所述,试剂盒包含组合物,所述组合物含有与治疗剂复合的药物递送分子。

[0107] 本发明的试剂盒中配置的组分的确切性质取决于其预期目的。在一个实施方式中,该试剂盒为人受试者而特别配置。在进一步的实施方式中,该试剂盒为兽医学应用而配置,以治疗例如但不限于农场动物、家养动物和实验动物的受试者。

[0108] 所述试剂盒中可包含使用说明。“使用说明”通常包含描述在使用试剂盒的组分以实现期望的结果(例如在受试者中治疗癌症、减轻癌症的严重程度、抑制癌症)中所采用的技术的有形表达。仍根据本发明,“使用说明”可包含描述组合物的制备和/或至少一种方法参数(通常用于预期目的)的有形表达,例如组合物的相对量、剂量要求和给药说明等。任选地,所述试剂盒还包含其它有用的组分,例如,测量工具、稀释剂、缓冲剂、药学上可接受的载体、注射器或本领域技术人员将容易认识到的其它有用的用具。

[0109] 可将以任何用于保持其可操作性和实用性的方便且适当的方式存储的试剂盒中组装的材料或组件提供给从业者。例如,组分可以是溶解形式、脱水形式或冻干形式;它们可以室温温度、冷藏温度或冷冻温度提供。组分通常包含在合适的包装材料中。如本文所使用的短语“包装材料”是指用于容纳试剂盒内容物(例如本发明的组合物等)的一种或多种物理结构体。包装材料通过公知的方法构建,优选提供无菌、无污染物的环境。如本文所使用的术语“包装”是指能够承装单个试剂盒组分的合适的固体基质或材料,例如玻璃、塑料、纸、箔等。因此,例如,包装可以是用于容纳适当量的包含一定体积的AAV1-P0-ICE载体的组合物的玻璃小瓶。包装材料通常具有指示试剂盒和/或其组分的内容物和/或目的的外部标签。

[0110] 实施例

[0111] 以下实施例不旨在将权利要求的范围限制于本发明，而是旨在作为某些实施方式的示例。本领域技术人员想到的示例性方法的任何变化均旨在落入本发明的范围内。

[0112] 实施例1

[0113] 实验方法

[0114] 小鼠。六至八周大的雌性NOD.Cg-Prkdc^{scid}IL2Rg^{tm1Wj1}.Sz (NSG) 小鼠购自Jackson 实验室 (Farmington, CT)。所有动物研究均按照NIH的动物护理和使用委员会指南实施，并在NCI的动物护理和使用委员会批准的方案下进行。

[0115] 细胞培养和抗体。细胞系SKOV3和293T获取自ATCC。肺癌系NCI-H292由Ite Laird-Offringa博士(南加州大学,Los Angeles,CA)友情提供。H292-CD19和SKOV3-CD19细胞系通过用编码人CD19的cDNA的慢病毒载体转导亲本NCI-H292和SKOV3细胞产生。用抗人CD19抗体(BioLegend, San Diego, CA)对转导的H292和SKOV3细胞进行染色，并分选以产生相对纯的CD19过表达细胞群。将SKOV3、SKOV3-CD19、NCI-H292和H292-CD19细胞维持在R10培养基(由补充有10%胎牛血清(FBS)、2mM L-谷氨酰胺、10mM HEPES、100U/ml青霉素和100μg/ml链霉素的RPMI-1640培养基组成)中。将293T细胞培养在D10培养基(由补充有10%FBS、2mM L-谷氨酰胺、10mM HEPES、100U/ml青霉素和100μg/ml链霉素的DMEM培养基组成)中。以上所有细胞培养基和补充物均购自Hyclone (Logan, UT)。将人外周血单核细胞(PBMC)培养在T细胞培养基(TCM)(由补充有5%人AB血清(GemCell, West Sacramento, CA)、1%HEPES(Gibco, Grand Island, NY), 1%Pen-Strep(Gibco), 1%GlutaMax(Gibco)和0.2%N-乙酰半胱氨酸(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)的X-Vivo 15培养基(Lonza, Walkersville, MD)组成)中。

[0116] 本研究中使用的一抗包括生物素化的蛋白L(GeneScript, Piscataway, NJ);PE-抗CD45、PE-Cy5.5-抗CD3、FITC-抗CD4、Pacific BlueTM-抗CD8、FITC-抗CD8、PE-抗IFN-γ、Brilliant Violet 421TM-抗PD-1、PE-抗PD-L1、PerCP/Cy5.5-抗LAG-3和PE-抗TIM-3(BioLegend, San Diego, CA);以及兔抗HA标签抗体(Abcam, Cambridge, MA)。使用的二抗为FITC缀合的链霉亲和素(BioLegend, San Diego, CA)和山羊抗兔IgG-HRP(Santa Cruz, San Jose, CA)。用于蛋白质印迹分析的SuperSignal[®] West Femto最大灵敏度底物购自Thermo Fisher Scientific(Waltham, MA)。

[0117] 质粒构建。如先前所述,编码抗CD19 CAR(CAR)的逆转录病毒载体基于Wolfgang Uckert教授友情提供的MP71逆转录病毒载体进行构建(Engels B等,2003.Retroviral vectors for high-level transgene expression in T lymphocytes.Hum Gene Ther 14:1155-68)。然后,基于抗CD19 CAR生成了编码抗CD19 CAR和抗PD-1scFv的载体(CAR.αPD1)。CAR.αPD1载体的插入物以读码框架5'端至3'端由以下成分组成:抗CD19 CAR、EcoRI位点、衍生自人IL-2的前导序列、抗PD-1scFv轻链可变区、GS接头、抗PD-1scFv重链可变区、HA标签序列和NotI位点。

[0118] CAR.αPD1载体中的抗PD-1scFv部分衍生自对人PD-1有特异性的人单克隆抗体5C4的氨基酸序列(Alan J.Korman MS, Changyu Wang, Mark J.Selby, Bingliana Chen, Josephine M.Cardarelli.2011.United States)。使用在线密码子优化工具对scFv的相应DNA序列进行密码子优化以使它在人细胞中最佳表达,并由Integrated DNA Technologies (Coralville, IA)合成。然后经由Gibson组装方法通过EcoRI位点将抗PD-1scFv连接到CD19 CAR载体中。

[0119] 逆转录病毒载体的产生。使用标准磷酸钙沉淀方案通过瞬时转染293T细胞制备逆转录病毒载体。用37.5 μ g的逆转录病毒骨架质粒与18.75 μ g的包膜质粒pGALV和30 μ g的编码gag-pol的包装质粒一起,对在15cm组织培养皿中培养的293T细胞进行转染。转染后48小时收获病毒上清液,并在使用前通过0.45 μ m过滤器(Corning,Corning,NY)进行过滤。

[0120] T细胞转导和扩增。冷冻的人PBMC从AllCells(Alameda,CA)获得。PBMC在TCM中解冻并静置一夜。在逆转录病毒转导之前,通过与50ng/ml的OKT3、50ng/ml的抗CD28抗体和10ng/ml的重组人IL-2(PeproTech,Rocky Hill,NJ)一起培养,将PBMC激活2天。为了转导,通过在32℃下以2000 \times g离心2小时将新鲜收获的逆转录病毒上清液旋转加载(spin-loaded)至每孔包被有15 μ g的retronectin(Clontech Laboratories,Mountain View,CA)的非组织培养处理的12孔板上。载体的旋转加载用新鲜的病毒上清液重复一次。将激活的PBMC以 5×10^5 个细胞/ml的浓度重悬于补充有10ng/ml的重组人IL-2的新鲜TCM中,并添加到加载了载体的板中。将板在32℃以1000 \times g旋转10分钟,并在37℃和5%CO₂下孵育过夜。第二天重复相同的转导程序。在离体扩增过程中,每两天补充培养基并将细胞密度调节至 5×10^5 /ml。

[0121] 表面免疫染色和流式细胞术。为了检测细胞表面上抗CD19 CAR的表达,将细胞用蛋白L染色。在FACS染色之前,收获 5×10^5 个细胞,并用FACS缓冲液(含5%牛血清白蛋白组分V的PBS)洗涤3次。然后在4℃下用1 μ g生物素化的蛋白L将细胞染色30分钟。将细胞用FACS缓冲液洗涤3次,然后与处于FACS缓冲液中的0.1 μ g FITC缀合的链霉亲和素在4℃孵育10分钟。洗涤细胞并用TransFix细胞抗原稳定剂(Thermo Scientific,Waltham,MA)在4℃下固定10分钟。然后将细胞洗涤两次,并在4℃下用抗CD3、抗CD4和抗CD8染色10分钟。洗涤细胞并重悬于PBS中。使用MACSQuant细胞计数器(Miltenyi Biotec, San Diego, CA)评估荧光,并使用FlowJo软件(Tree Star,Ashland,OR)分析所有FACS数据。

[0122] 细胞内细胞因子染色。用GolgiPlug(BD Biosciences,San Jose,CA)在96孔圆底板中于37℃和5%CO₂下以1:1的比例将T细胞(1×10^6)与靶细胞一起培养6小时。将PE-Cy5.5-抗CD3、FITC-抗CD4、Pacific blue-CD8、PE-抗IFN- γ 和PE-抗Ki67抗体用于细胞内染色。根据制造商的说明,使用Cytofix/Cytoperm Fixation and Permeabilization试剂盒(BD Biosciences)来使细胞膜有渗透性并进行细胞内染色。

[0123] 蛋白质印迹分析。收集细胞培养上清液,并按照制造商的说明用Pierce™抗HA磁珠(Thermo Scientific,Waltham,MA)纯化抗PD-1scFv。然后将纯化的抗体进行SDS-PAGE,并转移到硝酸纤维素膜(Thermo Scientific,Waltham,MA)上用于蛋白质印迹分析。如先前所述(Xu S等,2012. Discovery of an orally active small-molecule irreversible inhibitor of protein disulfide isomerase for ovarian cancer treatment. Proc Natl Acad Sci U S A 109:16348-53),用抗HA标签抗体(Abcam,Cambridge,MA)对蛋白质印迹进行分析。

[0124] ELISA。根据制造商的说明,使用人IFN- γ ELISA试剂盒(BD Biosciences,San Jose,CA)测量IFN- γ 。简要地,将96孔ELISA板(Thermo Scientific,Waltham,MA)在4℃下用200ng/孔的针对指定的蛋白的捕获抗体包被过夜。第二天,将板用洗涤缓冲液(含有0.05%Tween 20的PBS)洗涤,并在室温下用分析缓冲液(含有10%FBS的PBS)封闭2小时。将等体积的血清或细胞培养上清液加入板中,并在室温下孵育2小时。然后将板洗涤并在室温

下与检测抗体孵育1小时。为了测量抗PD-1抗体和分泌的抗PD-1 scFv，使用重组人PD-1 (rhPD-1) 对板进行预包被。山羊抗小鼠 IgG1-HRP 和抗HA标签抗体分别用作检测抗体。

[0125] 竞争性阻断分析。将96孔测定板 (Thermo Scientific, Waltham, MA) 在4℃下用3 μ g/ml的抗人CD3抗体包被过夜。在第二天，吸出孔的上清，并用每孔100 μ l的PBS洗涤孔一次。添加处于100 μ l PBS中的10 μ g/ml的rhPD-L1/Fc (R&D Systems, Minneapolis, MN)。然后在每孔中添加处于10 μ l PBS中的100 μ g/ml的山羊抗人 IgG Fc抗体。将测定板在37℃下孵育4小时。收获人T细胞，洗涤一次，然后在TCM中重悬至 1×10^6 细胞/ml。吸出测定板的孔。然后，向每个孔中加入100 μ l人T细胞悬液 (1×10^5) 和100 μ l转导后3天的CAR或CAR.αPD1 T细胞培养上清液 (补充有GolgiPlug (BD Biosciences))。将板覆盖并在37℃和5% CO₂下孵育过夜。孵育后，收获T细胞并用IFN-γ 细胞内染色。

[0126] 特异性细胞裂解分析。通过比较靶细胞 (H292-CD19) 的存活与阴性对照细胞 (NCI-H292) 的存活来测量靶细胞的裂解。先前已经描述了该方法 (Kochenderfer JN等, 2009. Construction and preclinical evaluation of an anti-CD19 chimeric antigen receptor. J Immunother 32:689-702)。通过将NCI-H292细胞以 1.5×10^6 细胞/ml的浓度悬浮于具有5 μ M用于监测细胞运动的荧光染料CellTracker Orange (5(6)-(((4-氯甲基)苯甲酰)氨基)四甲基罗丹明) (CMTMR) (Invitrogen, Carlsbad, CA) 的R10培养基中，对该细胞进行标记。将细胞在37℃下孵育30分钟，然后洗涤两次并悬浮在新鲜的R10培养基中。通过将H292-CD19细胞以 1×10^6 细胞/ml的浓度悬浮在具有5 μ M羧基荧光素琥珀酰亚胺酯 (CFSE) 荧光染料的PBS+0.1% BSA中，对细胞进行标记。将细胞在37℃下孵育30分钟。孵育后，向细胞悬液中加入相同体积的FBS，然后在室温下孵育2分钟。然后将细胞洗涤两次并悬浮在新鲜的R10培养基中。对于有效应CAR-T细胞的各个培养，将等量的NCI-H292和H292-CD19细胞 (各 5×10^4) 合并在同一孔中。在圆底96孔板中按以下效应物-靶标比例以三个平行试验建立共培养：1:1和5:1。根据制造商的说明 (BD Biosciences)，将培养物在37℃下孵育4小时，然后进行7-AAD标记。进行流式细胞术分析以量化剩余的存活靶细胞 (7-AAD阴性)。对于每个共培养，通过将活H292-CD19细胞的百分比除以活NCI-H292细胞的百分比来确定H292-CD19细胞的存活百分比。在仅包含靶细胞和阴性对照细胞而没有效应细胞的孔中，计算H292-CD19细胞百分比与NCI-H292细胞百分比的比，并用于校正在起始细胞数目和自发细胞死亡方面的变化。以三次平行重复测定细胞毒性，并以平均值±SEM表示。

[0127] 细胞增殖。将 3×10^5 H292-CD19细胞悬浮在D10培养基中，然后接种到6孔板中。一旦靶细胞附着，收获未转导的T细胞、CAR T细胞和CAR.αPD1 T细胞，并用PBS洗涤两次。然后通过将细胞以浓度为 1×10^6 细胞/ml悬浮于具有10 μ M CFSE的PBS中，对细胞进行标记，并在37℃下孵育60分钟。孵育后，将细胞洗涤两次并悬浮在新鲜的TCM中。将相等数量的T细胞添加到靶细胞中用于共培养。共培养以效应物-靶标比例为1:1设置三个平行试验。将培养物在37℃下孵育96小时。进行流式细胞术分析以量化T细胞上CFSE的强度。对增殖速率进行三次平行重复测定，并以平均值±SEM表示。

[0128] 肿瘤模型和过继转移。在6至8周龄时，给小鼠皮下接种 3×10^6 H292-CD19细胞，并且在10-13天后，当平均肿瘤尺寸达到100-120mm³时，用处于100 μ l PBS中的 1×10^6 或 3×10^6 CAR转导T细胞的i.v. 过继转移处理小鼠。通过添加供体匹配的非转导T细胞，在两个CAR组中将CAR表达归一化至20%。每周对肿瘤生长进行两次监测。肿瘤的尺寸通过卡尺进行测

量，并通过以下公式进行计算： $W^2 \times L / 2$ 。当小鼠表现出明显的体重减轻、肿瘤溃疡或肿瘤尺寸大于 1000mm^3 时，对小鼠进行安乐死。

[0129] 统计分析。统计分析在GraphPad Prism版本5.01中进行。进行了有单向ANOVA与Tukey多重比较，以评估体外分析中不同组之间的差异。使用有重复测量的单向ANOVA (Tukey的多重比较方法) 对肿瘤的生长曲线进行分析。小鼠生存曲线通过Kaplan-Meier分析 (具有Bonferroni校正的log-rank检验) 进行评价。小于0.05的P值被认为统计学显著。结果的显著性定义为：ns=不显著， $P > 0.05$ ；*， $P < 0.05$ ；**， $P < 0.01$ ；***， $P < 0.001$ 。

[0130] 分泌抗PD-1抗体的抗CD19 CAR-T细胞的特征

[0131] 在本研究中使用的逆转录病毒载体构建体的示意性表示在图1A中示出。将编码抗CD19 CAR的逆转录病毒载体指定为CAR19，所述抗CD19 CAR由抗CD19 scFv、CD8铰链、CD28跨膜结构域和细胞内共刺激结构域以及细胞内CD3ζ结构域组成。将编码抗CD19 CAR和分泌抗PD-1scFv的逆转录病毒载体指定为CAR19.αPD1。用每种构建体转导人PBMC以测试CAR在原代淋巴细胞中的表达。如图1B中所见，在人T细胞中两种构建体均观察到了CAR表达，尽管分泌抗PD-1的CAR19 T细胞在细胞表面表达的CAR水平略低。通过对转导后三天的细胞上清进行蛋白质印迹分析和ELISA，评估抗PD-1的表达和分泌。我们观察到抗PD-1可以成功地由转导有CAR19.αPD1的T细胞表达和分泌(图1C和图1D)。

[0132] 为了评价CAR19.αPD1 T细胞分泌的抗PD-1scFv的结合活性和阻断功能，进行了竞争性结合和阻断分析。测量细胞内IFN-γ以评估T细胞的活性。如图1E所示，当用抗CD3抗体刺激T细胞时，IFN-γ的表达上调，而重组人PD-L1(rhPD-L1)的存在导致显著较低的IFN-γ的表达。但是，添加来自CAR19.αPD1 T细胞的细胞培养上清可有效逆转rhPD-L1对T细胞的抑制作用，并显着增加IFN-γ的产生(图1E)。

[0133] 分泌抗PD-1抗体增强CAR-T细胞的抗原特异性免疫应答

[0134] 为了通过抗原特异性刺激进一步评估分泌抗PD-1的CAR19 T细胞的效应物功能，将CAR19 T细胞和CAR19.αPD1 T细胞均与H292-CD19或SKOV3-CD19靶细胞(两者均显示具有高的PD-L1表面表达)共培养不同的持续时间(图8)。然后收获不同时间点的T细胞，并通过ELISA测量上清液中的细胞功能标志物IFN-γ。抗原刺激24小时后，我们发现CAR19 T细胞和CAR19.αPD1 T细胞(分泌或不分泌抗PD-1)都具有相似的IFN-γ分泌量(图2A和图9A)。然而，在72小时后，在用H292-CD19细胞刺激后，与亲本CAR19 T细胞相比CAR19.αPD1 T细胞分泌的IFN-γ显著更高(图2A)。类似的，在抗原刺激96小时后，分泌抗PD-1的CAR19 T细胞表达的IFN-γ与亲本CAR19 T细胞所表达的IFN-γ相比显著更多(图2A和图9A)。

[0135] 然后，通过6小时的细胞毒性分析检测了工程化T细胞的溶细胞功能。在效应物/靶标(E/T)比分别为1、5、10和20情况下，评价了CAR19 T细胞和CAR19.αPD1 T细胞对H292-CD19细胞的细胞毒性活性。我们发现，与未转导的T细胞相比，CAR19 T细胞和CAR19.αPD1 T细胞均介导了显著的靶细胞细胞裂解，尤其是在较高的E/T比下。然而，CAR19 T细胞和CAR19.αPD1 T细胞在溶细胞活性方面差异很小(图2B)。然后，在将工程化T细胞与靶H292-CD19细胞共培养96小时后，通过基于羧基荧光素双乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)的增殖分析对T细胞的增殖进行了评价。我们观察到，与未转导的T细胞相比，CAR19和CAR19.αPD1 T细胞的抗原特异性刺激均导致明显更高的增殖水平。此外，与CAR19 T细胞($57.9 \pm 10.2\%$)相比，CAR19.αPD1 T细胞的增殖率($75.9 \pm 5.5\%$)显著更高(图2C和图2D)。通过细胞扩增进一

步评估细胞增殖潜能。通过抗原特异性刺激,显示与未转导的T细胞相比,CAR19和CAR19. α PD1 T细胞均显著扩增。值得一提的是,与亲本CAR19 T细胞(2.4 ± 0.2)相比,CAR19. α PD1 T细胞中的细胞倍增数目显著更高(3.2 ± 0.3) (图10)。

[0136] 分泌抗PD-1可减轻抗原刺激后CAR T细胞的耗竭

[0137] 已经证实人GD2和小鼠HER2 CAR T细胞上的PD-1表达在抗原特异性激活之后增加,并且发现PD-1阻断下调了T细胞中PD-1的表达。为了评估分泌的抗PD-1 scFv防止人T细胞耗竭的作用,将工程化的CAR T细胞与H292-CD19或SKOV3-CD19靶细胞共培养24小时,然后关于T细胞耗竭标记物PD-1进行染色。我们发现抗原特异性刺激后,CAR19和CAR19. α PD1 T细胞中PD-1的表达均显著上调。相比之下,CAR19. α PD1 T细胞上的PD-1表达上调明显低于亲本CAR19 T细胞上的表达上调(图3A、图3B和图13A-图13C)。但是,没有抗原特异性刺激的情况下,CAR19和CAR19. α PD1 T细胞中PD-1的表达在T细胞扩增过程中均维持在相似且稳定的水平(图13D和图13E)。

[0138] 为了进一步确定CAR19. α PD1 T细胞中PD-1的较低表达是由于分泌的抗PD-1 scFv对PD-1检测抗体的结合的阻断功能还是PD-1的下调,在用抗PD-1抗体染色细胞之前,我们将激活的T细胞与对照培养基或CAR19. α PD1 T细胞培养上清液孵育30min。我们发现,分泌的抗PD-1 scFv能够阻断约20%的PD-1检测抗体的结合(图11A)。随后,我们将CAR19或CAR19. α PD1 T细胞与靶细胞H292-CD19共培养24小时。然后收获两种T细胞,并通过q-PCR测量PD-1的转录表达。我们观察到在CAR19. α PD1 T细胞中PD-1的表达明显低于亲本CAR19 T细胞中的PD-1的表达(图11B)。这确实证实了CAR19. α PD1 T细胞下调了PD-1表达。

[0139] 除PD-1外,其它细胞表面抑制分子也在诱导T细胞耗竭和限制CAR-T细胞疗法的抗肿瘤功效中扮演重要角色,所述分子包括淋巴细胞活化基因3蛋白(LAG-3)、T细胞免疫球蛋白结构域和含粘蛋白结构域蛋白3(TIM-3;也称为HAVCR2)和细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)。为了评价其它T细胞耗竭标志物的表达是否受CAR刺激调节,我们测量了CAR工程化T细胞上LAG-3和TIM-3的表达。与PD-1类似,我们发现与非转导T细胞相比,抗原刺激后CAR19和CAR19. α PD1 T细胞二者上LAG-3和TIM-3的表达均显著上调。与CAR19 T细胞相比,CAR19. α PD1 T细胞在用H292-CD19细胞刺激后表达的LAG-3和TIM-3略低。此外,在SKOV3-CD19刺激下,CAR19. α PD1 T细胞具有显著低于CAR19 T细胞的LAG-3表达,而它们具有相似的TIM-3表达(图3C、图3D、图12A、图13A-图13C)。相比之下,没有抗原特异性刺激的情况下,CAR19和CAR19. α PD1 T细胞中的LAG-3以相似的水平表达,并且在T细胞扩增过程中保持稳定(图13D和图13E)。

[0140] 已经证实,PD-1阻断可促进用PD-L1阴性靶细胞激活后的GD2 CAR T细胞的存活,这表明表达PD-1的T细胞与表达PD-1配体(例如PD-L1)的T细胞之间的相互作用可能有助于阻抑T细胞功能(Gargett T等,2016. GD2-specific CAR T Cells Undergo Potent Activation and Deletion Following Antigen Encounter but can be Protected From Activation-induced Cell Death by PD-1 Blockade. Molecular Therapy 24:1135-49)。因此,在本实验中,我们还测量了CAR19和CAR19. α PD1 T细胞中PD-L1的表达,并发现它在抗原特异性刺激后明显增加。但是,PD-L1在CAR19. α PD1 T细胞中的表达显著低于在CAR19 T细胞中的表达(图3E、图3F和图12B)。

[0141] 抗PD-1工程化CAR T细胞显示增强的抗肿瘤反应性

[0142] 为了评价CAR19.αPD1 T细胞的抗肿瘤功效,我们将 1×10^6 个CAR工程化的T细胞过继转移至携带有已建立的H292-CD19皮下肿瘤($\sim100\text{mm}^3$)的NSG小鼠中。动物研究的实验程序在图4A中示出。图4B中的数据证明,在整个实验过程中,与未转导的T细胞处理或未转导的T细胞联合抗-PD-1抗体处理相比,所有三个抗CD19 CAR T细胞组均显示出肿瘤尺寸降低。然而,与亲本CAR19 T细胞处理或CAR19 T细胞联合抗PD-1抗体处理相比,CAR19.αPD1 T细胞处理显著增强了抗肿瘤作用,其作用早在T细胞输注后1周变得明显(图4B)。值得注意的是,在过继细胞转移后17天,我们观察到用CAR19.αPD1 T细胞处理的小鼠的肿瘤几乎消失。在亲本CAR19 T细胞组或联用组中,6只小鼠中有4只($\sim70\%$)仍然具有进展或稳定的疾病状态,并且仅经历了小于30%的肿瘤尺寸降低(图4C)。还评价了荷瘤小鼠的整体生存。显示出与单独的亲本CAR19 T细胞处理(17%)或抗PD-1抗体与CAR19 T细胞的联用处理(17%)相比,CAR19.αPD1 T细胞处理显著延长了长期生存(100%)(图4D)。

[0143] 抗PD-1工程化CAR T细胞可比亲本CAR T细胞在体内扩增更多

[0144] 接下来,在体内评估了CAR T细胞的移植和扩增。输注T细胞后两天,对小鼠实施安乐死,并收获包括肿瘤、血液、脾脏和骨髓在内的不同器官和组织用于人T细胞染色。我们发现所有组中的T细胞几乎都没有扩增,并且在所有检查的组织中观察到少于2%的T细胞。大多数T细胞(1%-2%)居住(home)于脾脏,而一定百分比的循环T细胞(0.1%-0.5%)在血液中。转移的T细胞在肿瘤和骨髓中的浸润水平较低。此外,在所有检查的组织中,未转导的T细胞和CAR转导的T细胞之间的T细胞百分比显示出很小的差异(图5A)。然而,输注T细胞一周后,在第10天,我们在所有检查的组织中观察到CAR T细胞显著扩增,而未转导的T细胞几乎没有。值得注意的是,与我们的体外数据一致,与亲本CAR19 T细胞相比,CAR19.αPD1 T细胞具有显著更高的扩增速率,尤其是在肿瘤、脾脏和血液中(图5B和图5C)。

[0145] 抗PD-1工程化CAR T细胞在已建立的肿瘤部位导致T细胞耗竭的逆转和较高的T细胞效应物功能

[0146] 为了进一步确定在CAR19.αPD1 T细胞疗法后观察到的增强的抗肿瘤作用是否与肿瘤部位处CAR T细胞功能的增强相关,在接受 3×10^6 CAR T细胞之前用H292-CD19肿瘤激发小鼠。实验设计在图6A中示出。T细胞输注后八天,我们对小鼠实施安乐死,并使用流式细胞术分析肿瘤、血液、脾脏和骨髓中的T细胞。与CAR T细胞处理相比,我们观察到注射的抗PD-1抗体对体内T细胞扩增的增强作用很小。然而,与我们先前的观察结果一致(图5B),用CAR19.αPD1方案处理的小鼠的T细胞在肿瘤、血液和脾脏中以较高的速率增殖(图6B)。已经显示肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)中细胞毒性CD8⁺ T细胞的数量对触发抗肿瘤免疫力和自发肿瘤控制是关键。因此,在TIL中分析了CD8⁺ T细胞与CD4⁺ T细胞的比例。与亲本CAR19 T细胞相比,结果显示CAR19.αPD1 T细胞具有显著更高的CD8⁺ T细胞与CD4⁺ T细胞的比例,而与CAR T细胞单一疗法相比,联用疗法具有相似的CD8⁺ T细胞与CD4⁺ T细胞的比例(图6C)。类似的,在血液和脾脏中,CAR19.αPD1 T细胞处理中CD8⁺与CD4⁺的比例也显著高于亲本CAR19 T细胞单一疗法和联用处理组中的比例(图6C),尽管在T细胞输注前CAR19和CAR19.αPD1 T细胞之间的CD8⁺ T细胞与CD4⁺ T细胞比差异很小(图14A)。进一步,我们评估了肿瘤浸润CD8⁺ T细胞上的PD-1表达,并发现注射和分泌的抗PD-1抗体均可显著降低PD-1的表达(图6D)。我们还进行了离体培养,并用抗CD3/CD28抗体或靶细胞H292-CD19激活TIL。我们观察到,与亲本CAR19 T细胞处理或CAR19 T细胞联合系统性抗PD-1抗体处理相比,过继转移的CAR19.

α PD1 T细胞中IFN- γ 的表达显著更高。在CAR T细胞单一疗法和联用疗法之间,观察到IFN- γ 表达的差异很小(图6E和图6F)。此外,我们测量了血清中IFN- γ 和抗PD-1抗体的表达,并且发现所有组之间的IFN- γ 表达差异很小(图14C)。值得注意的是,与CAR19 T细胞处理相比,CAR19. α PD1 T细胞疗法具有显著更高的血清抗PD-1浓度,尽管该浓度比系统性抗PD-1抗体注射的血清抗PD-1浓度低15倍以上(图6G)。

[0147] 过继T细胞疗法已成为一种有前景的免疫治疗方法。它已在血液恶性肿瘤患者中获得成功的应答。然而,在实体瘤的治疗中,结果前景不太乐观,部分由于免疫抑制性微环境的建立和免疫抑制特性。已证实PD-1/PD-L1调节途径对TIL的抗肿瘤应答特别具有拮抗作用。预后不良的实体瘤显示PD-L1表达上调,而TIL显示PD-1上调。这两个结果的组合作用导致肿瘤逃逸。然而,这可以通过使用靶向PD-1/PD-L1途径的检查点抑制剂(CPI)来破坏。因此,随后的研究设计用于研究输注的CAR T细胞(在激活后显示出PD-1上调)中的PD-1/PD-L1阻断作用。

[0148] 尽管有其它PD-1/PD-L1抑制方法(例如细胞内PD-1shRNA和PD-1显性负受体),用PD-1或PD-L1抗体治疗一直是受关注的话题,并且在动物模型和临床试验中都进行了广泛的研究。确实,两种抗体均导致肿瘤生长的明显抑制。然而,抗体治疗具有多种限制。例如,其需要多次和连续抗体给予以获得持续的功效。而且,抗体的大尺寸会阻止它们进入肿瘤块并遇到浸润的PD-1阳性T细胞。为了解决这些低效现象,需要多次大剂量的免疫调节药物或抗体的治疗,但这可能会导致从轻度腹泻到自身免疫性肝炎、肺炎和结肠炎的副作用。此外,已证实抗体的Fc部分可通过激活通常分别表达Fc α RI和Fc γ RIIA/Fc γ RIIC的巨噬细胞和天然杀伤细胞内的细胞毒性信号而引起免疫细胞消耗。因此,在本研究中,我们集中精力于对CAR T细胞进行工程化以分泌和输送高浓度的针对PD-1的人scFv,旨在改变免疫抑制性肿瘤微环境、防止肿瘤诱导的机能减退并增强输注的CAR T细胞的抗肿瘤免疫。

[0149] 本文中,我们工程化出分泌人抗PD-1scFv的人抗CD19 CAR T细胞,并证明抗PD-1scFv可以被CAR19. α PD1 T细胞有效表达和分泌。分泌的scFvs成功结合至细胞表面上的PD-1,并逆转了PD-1/PD-L1相互作用对T细胞功能的抑制作用。通过组成性分泌的抗PD-1scFv的PD-1阻断在体外降低了T细胞的耗竭并显著增强了T细胞增殖和效应物功能。我们使用异种移植小鼠模型的研究也表明,与亲本CAR19 T细胞相比时,CAR19. α PD1 T细胞进一步增强抗肿瘤活性并延长总体生存。从机制上,我们观察到CAR19. α PD1 T细胞具有较大的体内扩增。此外,在局部肿瘤部位,CAR19. α PD1 T细胞显示比亲本CAR19 T细胞更少耗竭、更具功能性。

[0150] 在TCR或BCR激活存在下,PD-1及其配体PD-L1或PD-L2的接合转导抑制信号并阻抑T细胞功能。在本研究中,重组人PD-L1蛋白(rhPD-L1)的存在在体外激活分析中显著抑制了T细胞激活。为了检查CAR19. α PD1 T细胞分泌的抗PD-1scFv的结合和阻断活性,我们在rhPD-L1蛋白的存在下,将T细胞与来自CAR19 T细胞或CAR19. α PD-1T细胞的细胞培养上清液一起培养。我们观察到来自CAR19. α PD1 T细胞的上清液拯救了T细胞功能并显著增加IFN- γ 的产生,表明分泌的抗PD-1可以成功结合PD-1并逆转PD-1/PD-L1相互作用对T细胞功能的抑制作用。

[0151] PD-1/PD-L1途径通过T细胞参与细胞因子产生的调节,抑制IFN- γ 、TNF- α 和IL-2的产生。已证实人GD2和抗HER2 CAR T细胞的PD-1表达在抗原特异性激活后增加,并且证实

了PD-1阻断作用在PD-L1⁺靶细胞存在的情况下增强T细胞效应物功能并增加IFN-γ的产生。因此,在研究本中,为了比较CAR19 T细胞和CAR19.αPD1 T细胞的功能能力,我们将T细胞与PD-L1⁺癌细胞系H292-CD19或SKOV3-CD19共培养,并发现分泌抗PD-1的CAR19 T细胞与亲本CAR19 T细胞相比产生显著更高水平的IFN-γ。除了细胞因子生产外,PD-1还可以抑制T细胞增殖。通过在PD-L1⁺癌细胞存在下的CAR特异性刺激,我们发现CAR19.αPD1 T细胞具有与亲本CAR19 T细胞相比显著更高的增殖速率。综上所述,这些数据暗示与单独的CAR19 T细胞相比,PD-1/PD-L1信号传导阻断导致更具功能性的具有更高的增殖能力的CAR19.αPD1 T细胞。

[0152] 为了更好地理解分泌的抗PD-1如何影响CAR19.αPD1 T细胞的功能,我们将CAR19 T细胞和CAR19.αPD1 T细胞暴露至PD-L1⁺靶细胞,并检查了T细胞耗竭标志物的表达,包括PD-1、LAG-3和TIM-3。与亲本CAR19 T细胞相比,我们观察到CAR19.αPD1 T细胞上PD-1表达明显更低,同时其它耗竭标志物(例如LAG-3)表达较低。CAR19.αPD1 T细胞中PD-1表达的降低可能是由于PD-1表面表达下调和抗体阻断的双重作用所致。已报道了肿瘤浸润性T细胞上的PD-1上调是高表达PD-L1的肿瘤中导致T细胞耗竭的主要因素。PD-1的下调可能有助于逆转T细胞耗竭和增强T细胞效应物功能,这由CAR19.αPD1 T细胞的IFN-γ产生增加予以了支持。此外,抗原刺激后其它耗竭标志物(例如LAG-3)的较低表达水平也可能有助于CAR19.αPD1 T细胞的较高功能。我们的观察结果与最近的研究一致,表明多种抑制性受体的共表达是T细胞耗竭的主要特点。此外,我们发现在抗原特异性刺激的CAR T细胞上PD-L1表达显著增加,也可能通过T细胞-T细胞的相互作用导致T细胞耗竭。值得注意的是,相比之下,我们观察到CAR19.αPD1 T细胞上PD-L1的表达水平显著较低。这些数据表明,CAR19.αPD1 T细胞上受抑制的PD-1和PD-L1表达上调可能有助于减少肿瘤细胞诱导的和/或T细胞诱导的耗竭,从而进一步增强T细胞效应物功能及其抗肿瘤免疫。

[0153] 我们的体内研究表明,与PD-1/PD-L1阻断无关地,CAR T细胞治疗可抑制肿瘤的生长。与CAR19 T细胞治疗或CAR19 T细胞与系统性抗PD-1抗体联合治疗(其中67%的小鼠仍患有稳定的或进展的疾病)相比,我们观察到CAR19.αPD1 T细胞治疗可在大约两周内达到多于90%的肿瘤根除。为了了解CAR19.αPD1 T细胞增强的抗肿瘤功效的潜在机制,我们分析了体内过继转移的T细胞的扩增。与我们的体外数据一致,我们发现在包括肿瘤、血液、脾脏和骨髓在内的所有检查组织中分泌抗PD-1的CAR T细胞均显著比亲本CAR T细胞扩增得多。此外,TIL中细胞毒性CD8⁺ T细胞群对触发抗肿瘤免疫是关键。先前的研究表明,PD-1信号传导参与调节CD8⁺ TIL的扩增和功能。在本研究中,在离体刺激时较大的表达IFN-γ的CD8⁺ TIL群以及CAR19.αPD1 T细胞组中CD8⁺比CD4⁺ TIL的比较高表明CAR19.αPD1 T细胞与亲本CAR19 T细胞相比更具功能性和可扩增性。

[0154] 有趣的是,在这项研究中,我们证明了系统性抗PD-1抗体注射对增强CAR T细胞疗法的抗肿瘤功效几乎没有作用。在同系HER2⁺自身抗原肿瘤模型中,最近的研究表明,在乳腺癌治疗中高剂量(250μg/小鼠的抗PD-1抗体)PD-1阻断能够增强抗HER2 CAR T细胞的抗肿瘤活性。然而,较低剂量(200μg/小鼠)的抗PD-1抗体对CAR T细胞疗法的作用有限。在本研究中,以低剂量(125μg/小鼠)注射,抗PD-1抗体未能抑制肿瘤生长或增强CAR T细胞的抗肿瘤功效。该观察结果表明,可能需要大剂量的抗PD-1抗体(经常引起系统性毒性)以获得实质的抗肿瘤功效。我们测量了循环抗PD-1抗体的量,发现在联用治疗组中有大量的循环

注射抗体($\sim 0.7\mu\text{g}/\text{ml}$)，而CAR19. α PD1 T细胞治疗组中的量低15倍。尽管给予的和自分泌的抗PD-1抗体均可在体内有效降低并阻断CD8 $^{+}$ T细胞的PD-1表达，但全身注射的抗PD-1抗体对增加溶细胞性CD8 $^{+}$ TIL群或增强离体刺激后TIL的IFN- γ 产生几乎没有作用。该结果表明，在当前剂量下注射的抗体对增大输注的T细胞功能几乎没有作用。它也解释了我们观察到的注射PD-1阻断在增强CAR T细胞疗法的抗肿瘤活性中的失败。鉴于局部肿瘤组织中分泌的抗PD-1浓度低以及效应物功能的增大，CAR T细胞分泌的抗PD-1可提供更安全且更有效的方法来阻断PD-1信号传导并增强CAR T细胞的功能能力。

[0155] 作为结论，在异种移植小鼠模型中，CAR19. α PD1 T细胞表现出T细胞耗竭减轻、T细胞扩增增强以及对人实体瘤的CAR T细胞治疗得到改善。在具有免疫能力的条件下，我们推测，鉴于PD-1阻断对调控肿瘤微环境的持久作用，抗PD-1工程化的CAR T细胞在诱导肿瘤根除上可能更强。此外，我们预见在应该探索的下一步之中是将抗PD-1 scFv工程进靶向其它通常具有高PD-L1表达的肿瘤相关抗原的CAR构建体中以实现更好的抗肿瘤免疫治疗，例如间皮素或HER-2(用以治疗卵巢癌或乳腺癌)。

[0156] 上述多种方法和技术提供了实施该申请的多种方式。当然，应当理解的是，根据本文所述的任何特定实施方式，所述的所有目标和优点未必都能实现。因此，例如，本领域技术人员将认识到，可通过实现或优化如本文教导的一个优点或一组优点而不必实现如本文教导或暗示的其它目标或优点的方式来实施本方法。本文提及了多种替代方式。应当理解的是，一些优选的实施方式具体包括一种、另一种或多种特征，而其它的实施方式则具体地排除一种、另一种或多种特征，然而还有其它实施方式通过包括一种、另一种或多种有利特征而缓和特定的特征。

[0157] 此外，技术人员将认识到来自不同实施方式的多种特征的适用性。相似地，本领域的普通技术人员能够以多种组合采用上述公开的多种要素、特征和步骤以及各此类要素、特征或步骤的其它已知等同物，以根据本文所述的原理实施方法。在多种要素、特征和步骤之中，一些将被具体地包括在不同的实施方式之中，而其它的则被具体地排除在不同的实施方式之外。

[0158] 虽然本申请已在一些实施方式和实施例的上下文中进行了公开，但是本领域的技术人员将会理解的是，本申请的实施方式延伸到具体公开的实施方式之外，并延伸至其它替代性实施方式和/或用途以及其修改物和等同物。

[0159] 本文对这一申请的优选实施方式进行了描述，包括本发明人已知的用于实施本申请的最佳模式。在本领域的普通技术人员阅读上述说明时，这些优选实施方式的变型将变得显而易见。在考虑之列的是，技术人员可在适当时采用此类变型，并且本申请可按本文具体描述之外的方式加以实践。因此，如可适用的法律所允许的，这一申请的许多实施方式包括所附权利要求书中列出的主题的所有修改物和等同物。此外，除非在本文中另外指明，或除非与上下文明显冲突，本申请涵盖上述要素在其所有可能的变型中的任何组合。

[0160] 除了如下，将本文中参考的所有专利、专利申请、专利申请的公开文本以及其它材料(诸如文章、书籍、说明书、出版物、文件、事物和/或类似物)由此都以此种引用方式整体并入本文，用于所有目的：与相同材料相关的任何审查文件历史、与本文件不一致或冲突的任何相同材料、或可能对当前或随后与本文件相关的权利要求书的最广范围具有限制作用的任何相同材料。举例来说，如果与任何并入的材料相关的术语的描述、定义和/或用途同

与本文件相关的术语的描述、定义和/或用途之间存在任何不一致或冲突，应以本文件中的术语的描述、定义和/或用途为准。

[0161] 应当理解的是，本文所公开的申请的实施方式是对本申请实施方式的原理的说明。可采用的其它修改形式可在本申请的范围内。因此，举例来说，而非加以限制，本申请的实施方式的替代构造可根据本文的教导而使用。因此，本申请的实施方式不限于如精确地示出和描述的内容。

[0162] 在上面的详细说明中描述了本发明的多个实施方式。虽然这些描述直接描述上面的实施方式，但是应该理解，本领域技术人员可对本文示出和描述的特定的实施方式构想出修改和/或变化。落入本发明说明书范围内的任何此类修改或变化也意图包括在其中。除非特别指出，否则，本发明人的意图是说明书和权利要求书中的词汇和短语都被赋予适用领域的普通技术人员所知晓的普通含义和惯用含义。

[0163] 已经给出了本申请人在提交申请时所知道的本发明的多个实施方式的前述描述，并意在用于说明和描述的目的。本描述并不意在详尽无遗，也并不意在将本发明限于所公开的精确形式，并且根据上述教导，许多修改和变化都是可能的。所描述的实施方式是用来解释本发明的原理及其实际应用，并用来使本领域其他技术人员能够按多种实施方式及适合于所预期的特定用途的多种修改来利用本发明。因此，并不意在将本发明限制至所公开的用于实施本发明的特定实施方式。

[0164] 虽然已经示出和描述本发明的特定实施方式，但是对于本领域技术人员来说显而易见的是，根据本文中的教导，在不背离本发明及其较宽泛的方面的情况下可以作出改变和修改，并且因此，所附权利要求书将在它们的范围内涵盖所有此类落在本发明的真正精神和范围内的改变和修改。

序列表

<110> UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA
WANG, Pin
SIRIWON, Natnaree
LI, Si
<120> 用于治疗癌症的组合物和方法
<130> 065715-000091W000
<150> 62/487,358
<151> 2017-04-19
<160> 1
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成的构建体
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)
<223> Xaa可为Val或Ile
<220>
<221> misc_feature
<222> (4) .. (4)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
<400> 1
Asp Xaa Glu Xaa Asn Pro Gly Pro
1 5

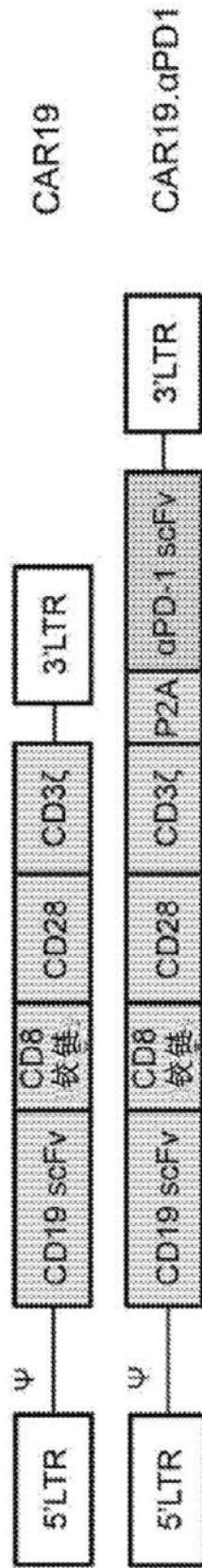


图1A

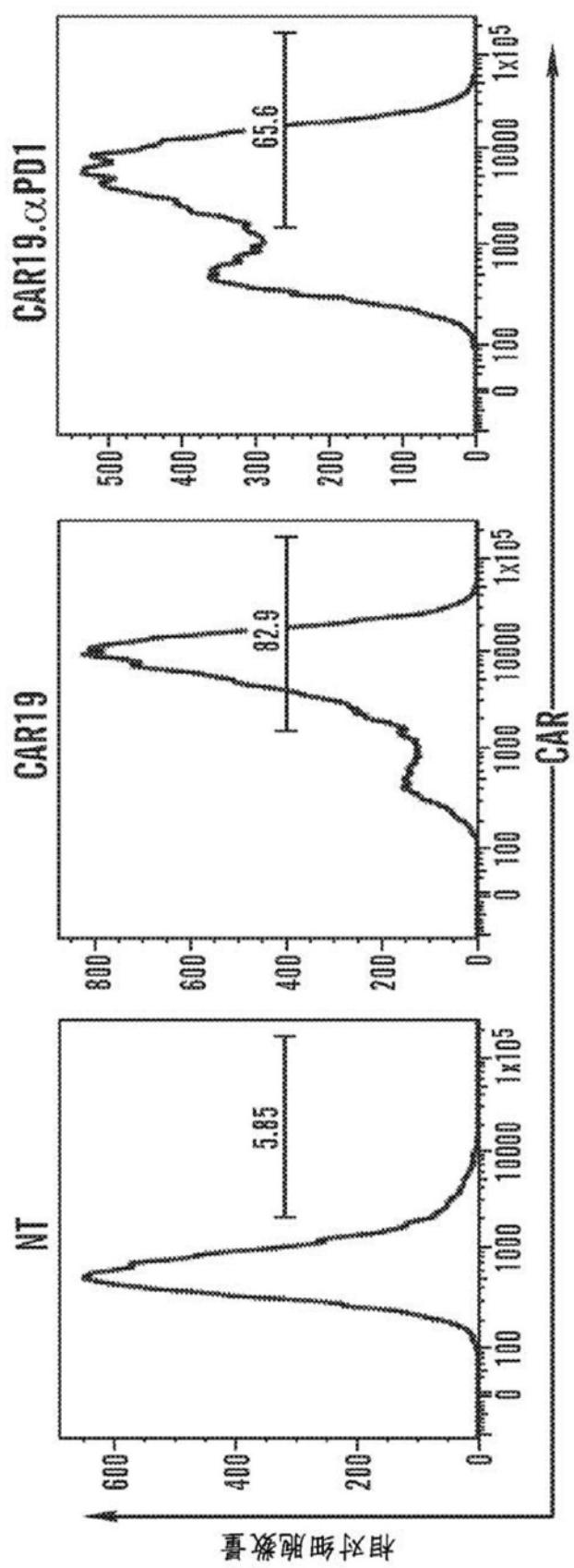


图1B

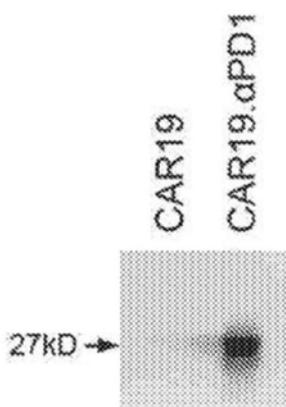


图1C

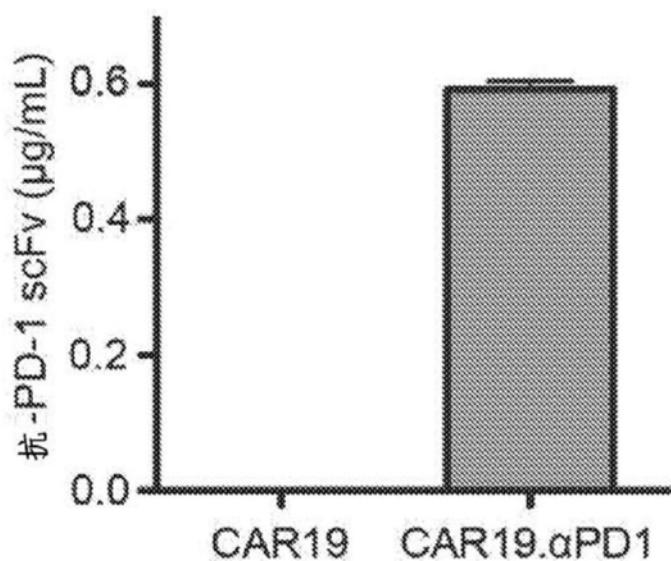


图1D

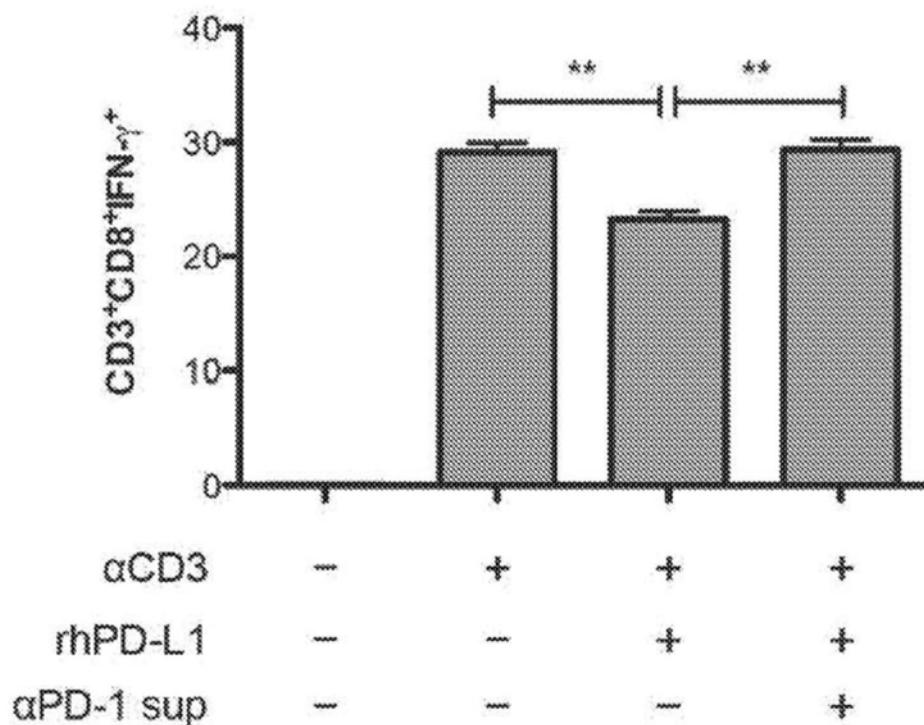


图1E

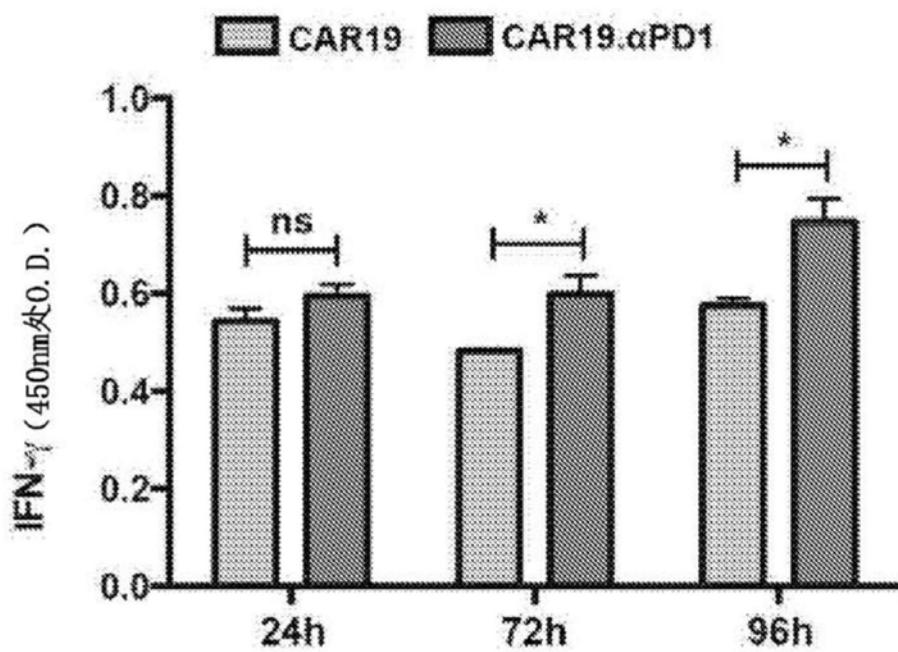


图2A

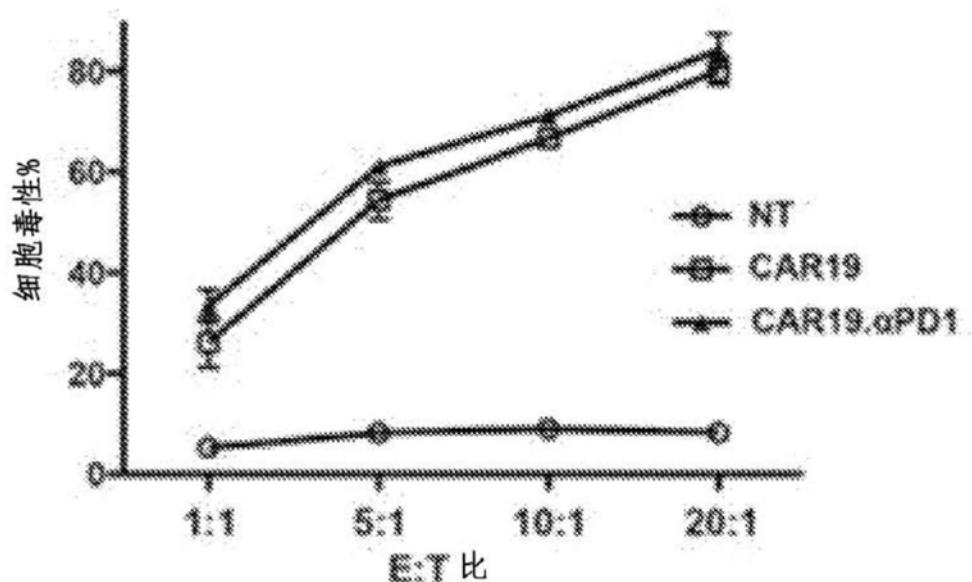


图2B

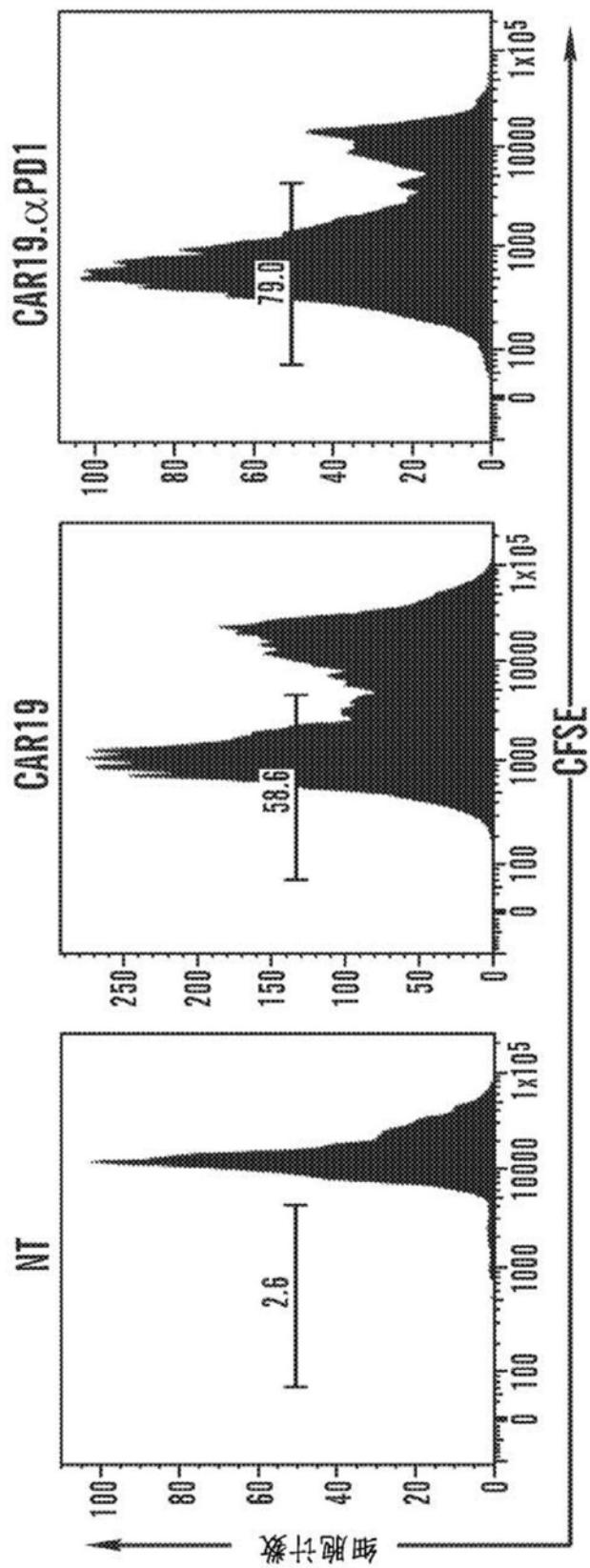


图2C

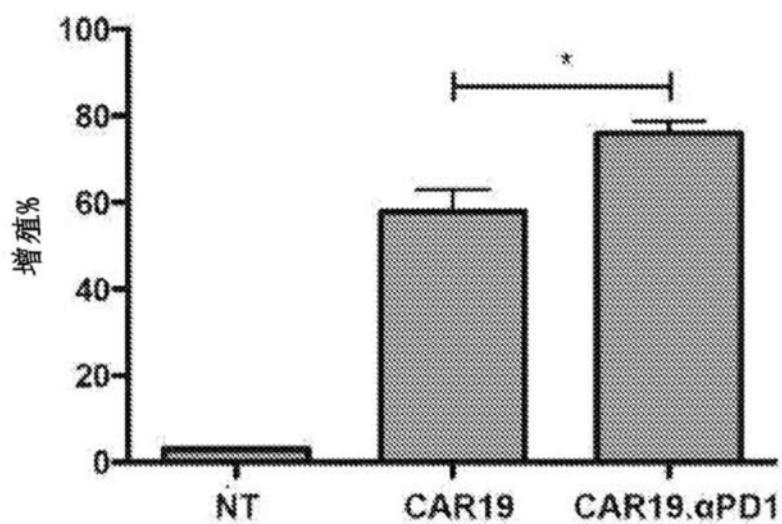


图2D

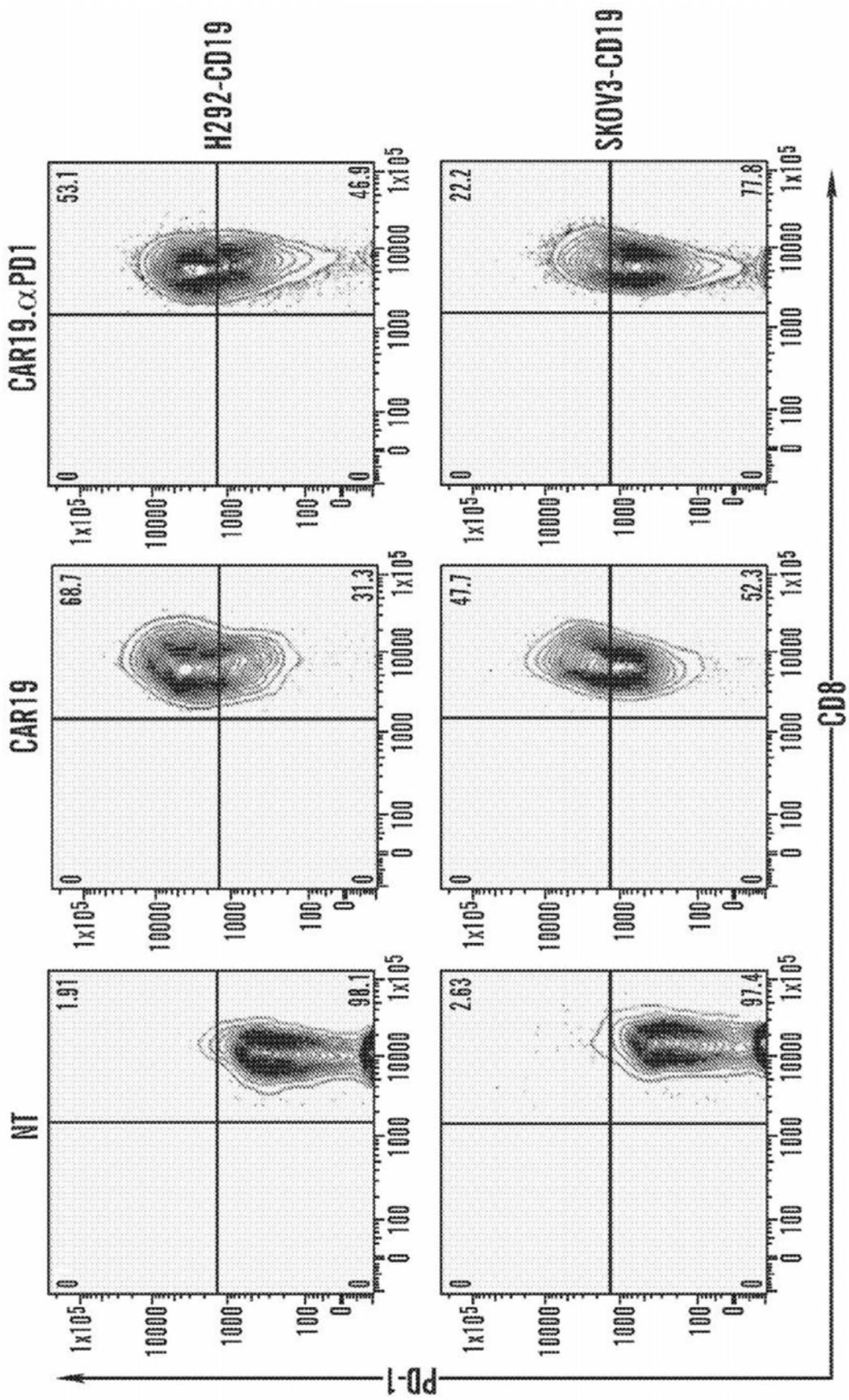


图3A

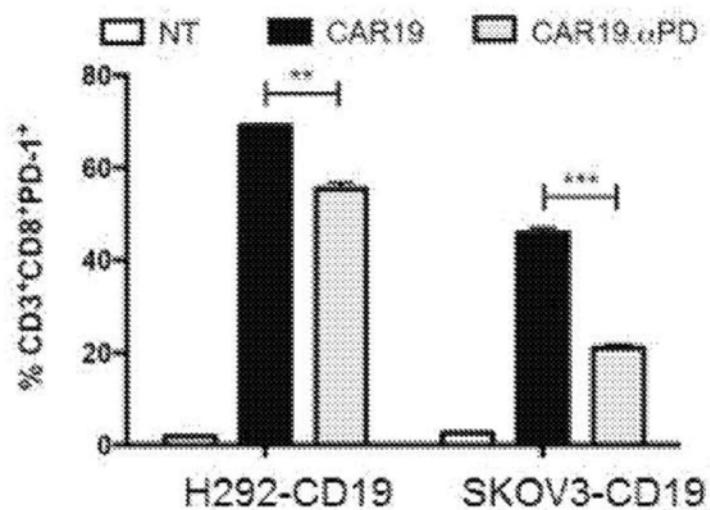


图3B

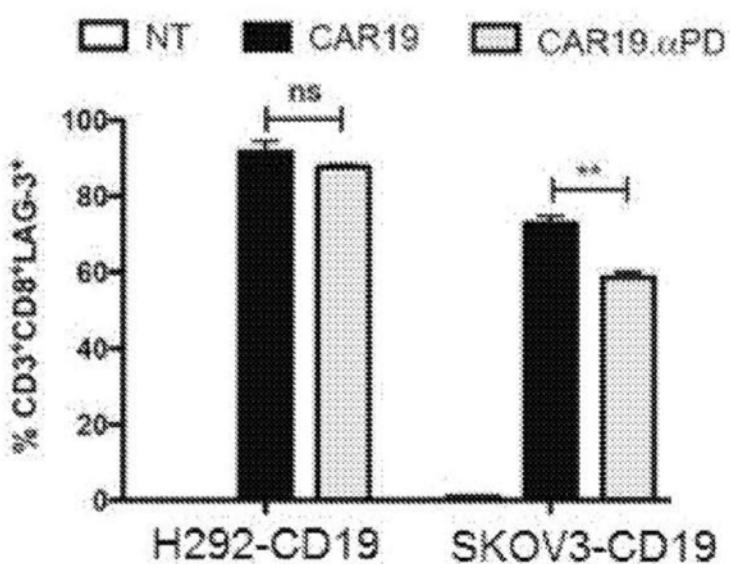


图3C

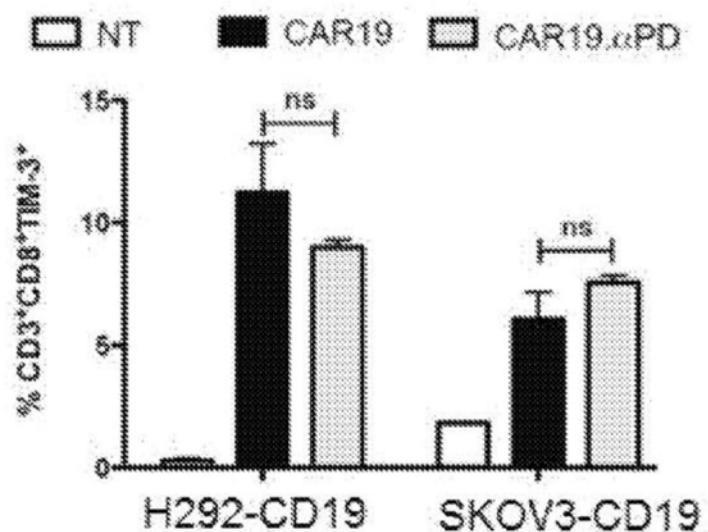


图3D

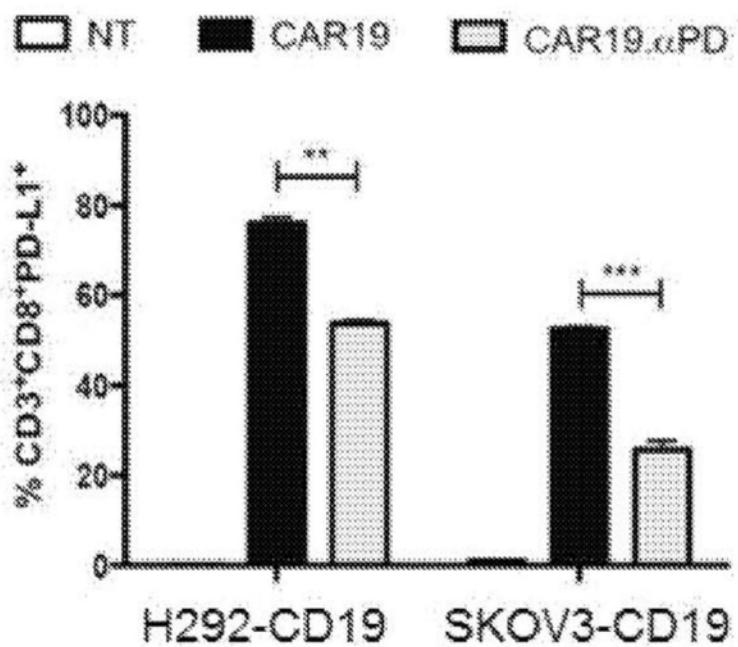


图3E

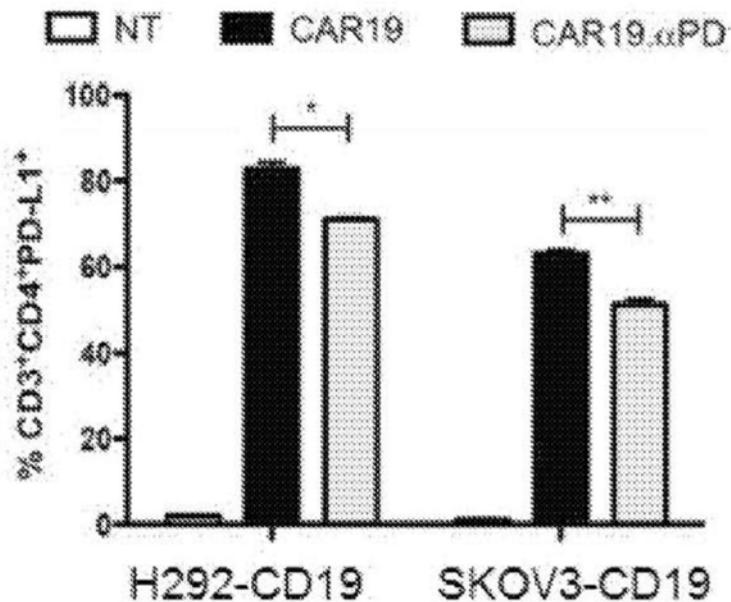


图3F

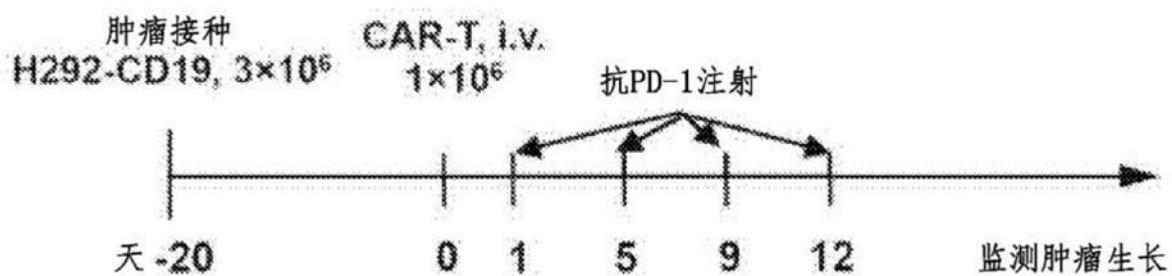


图4A

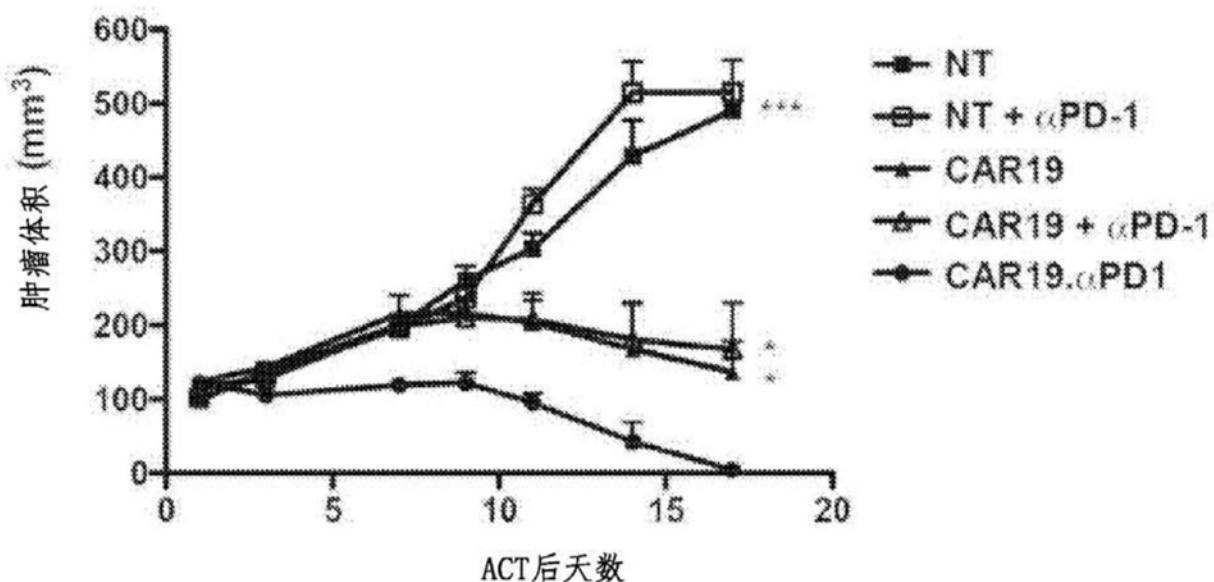


图4B

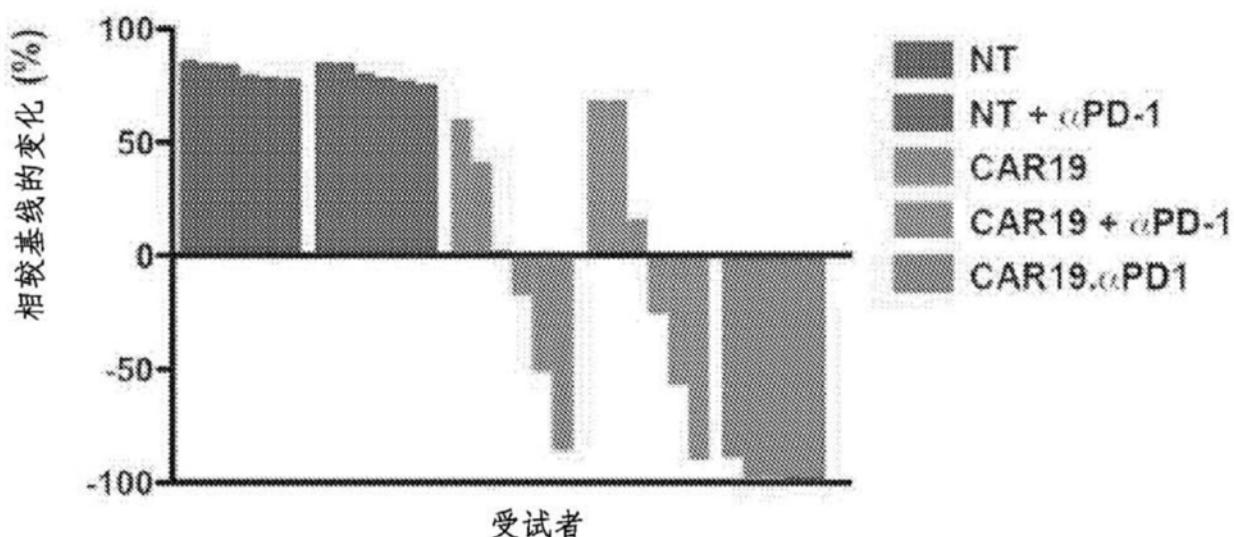


图4C

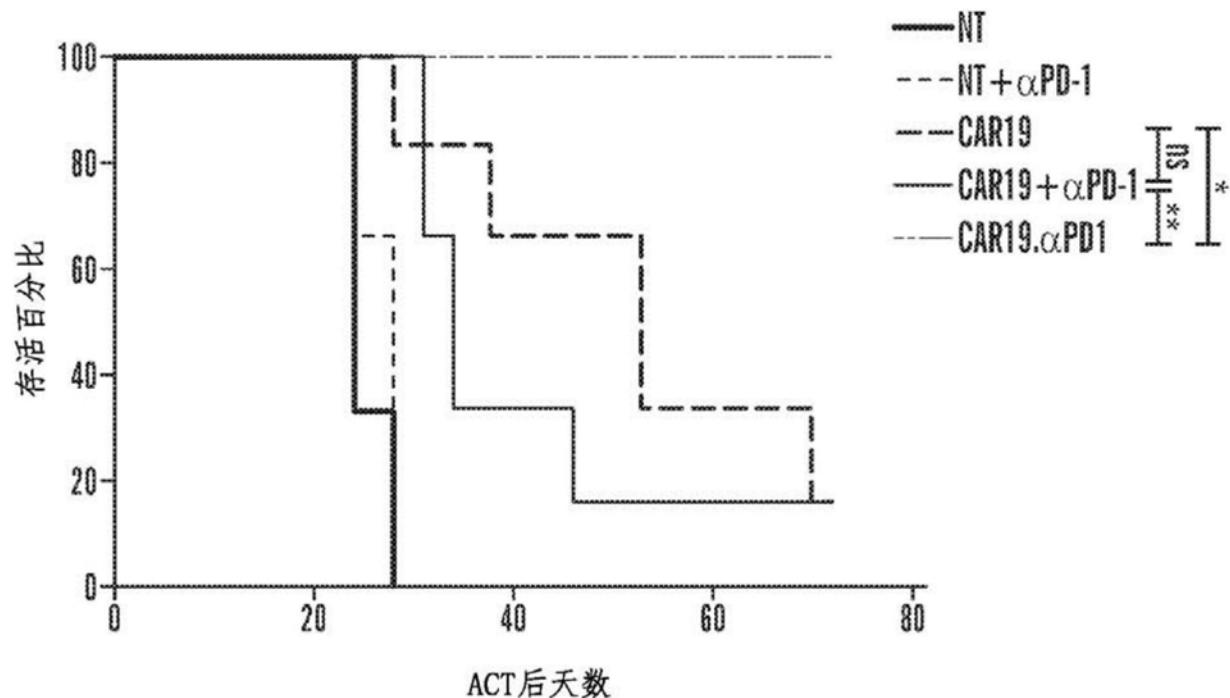


图4D

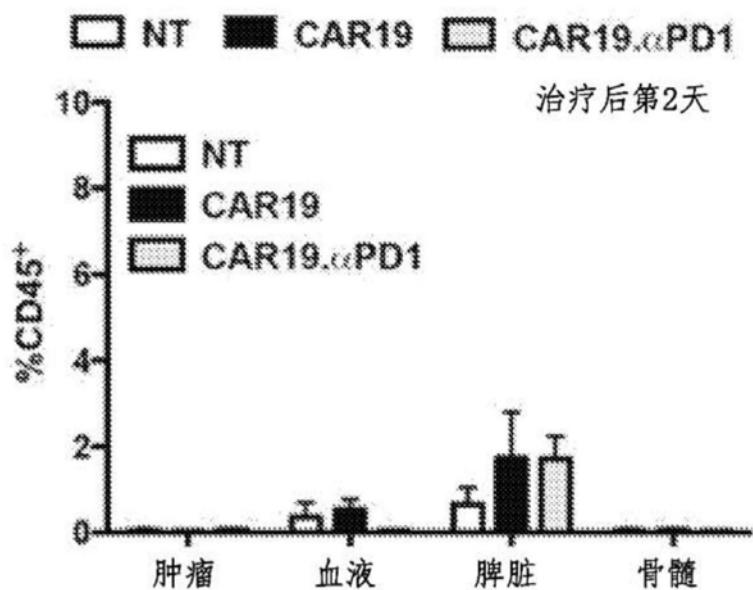


图5A

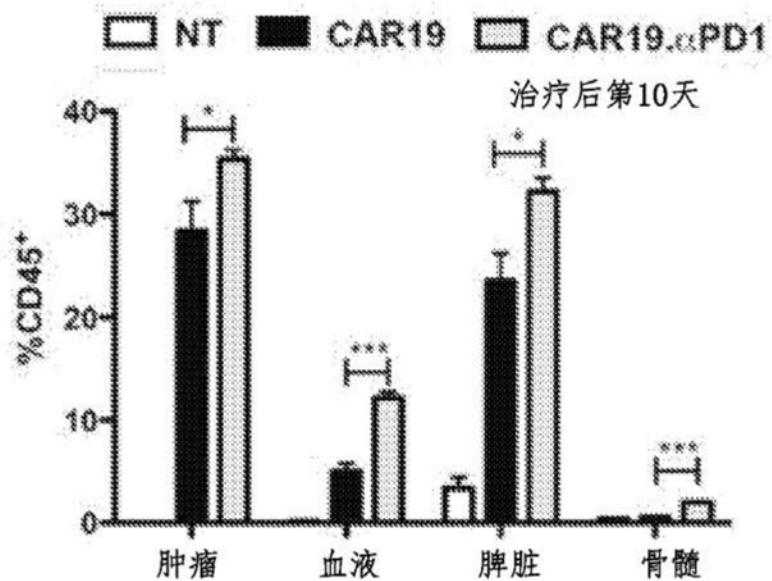


图5B

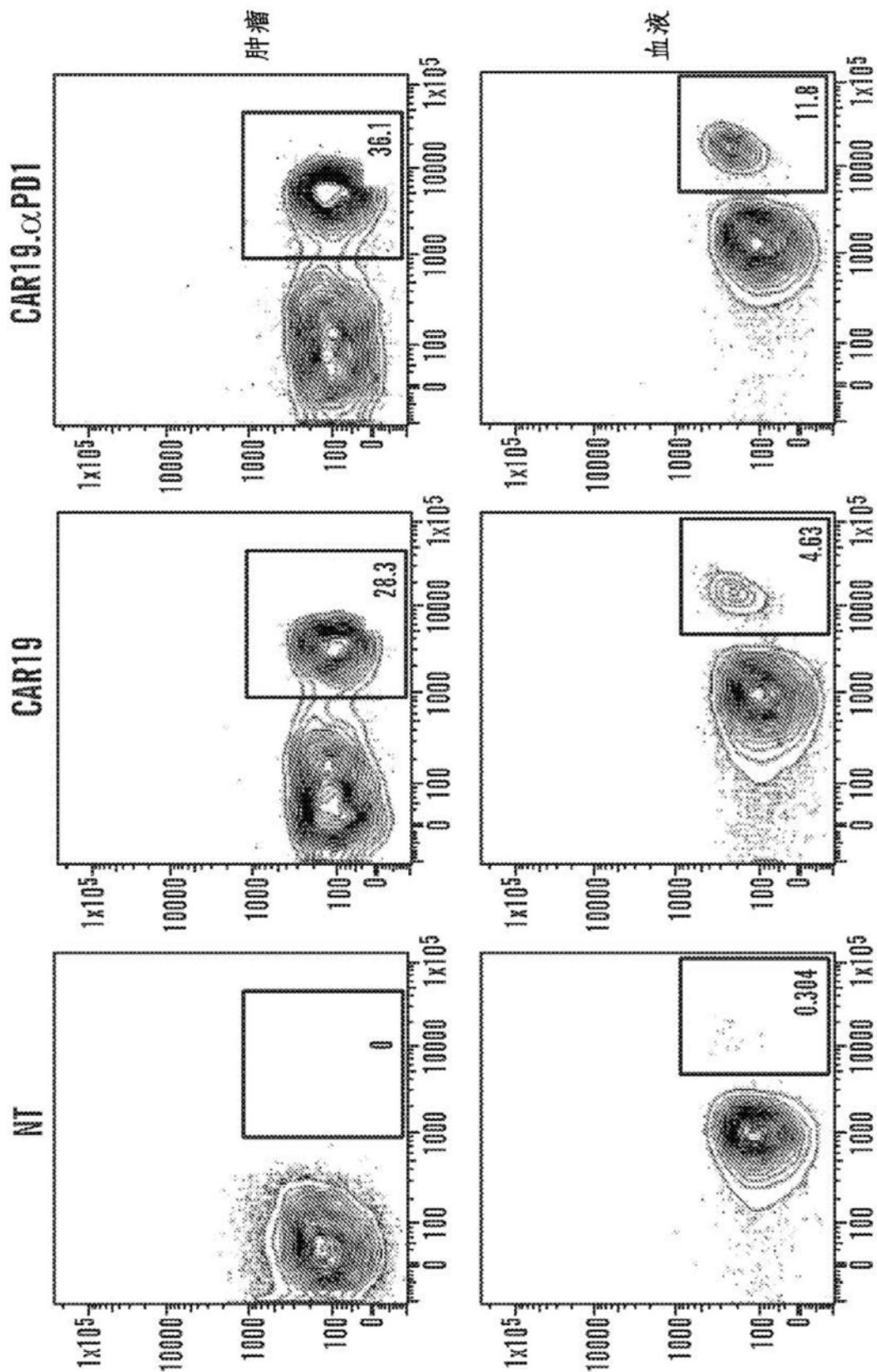


图5C

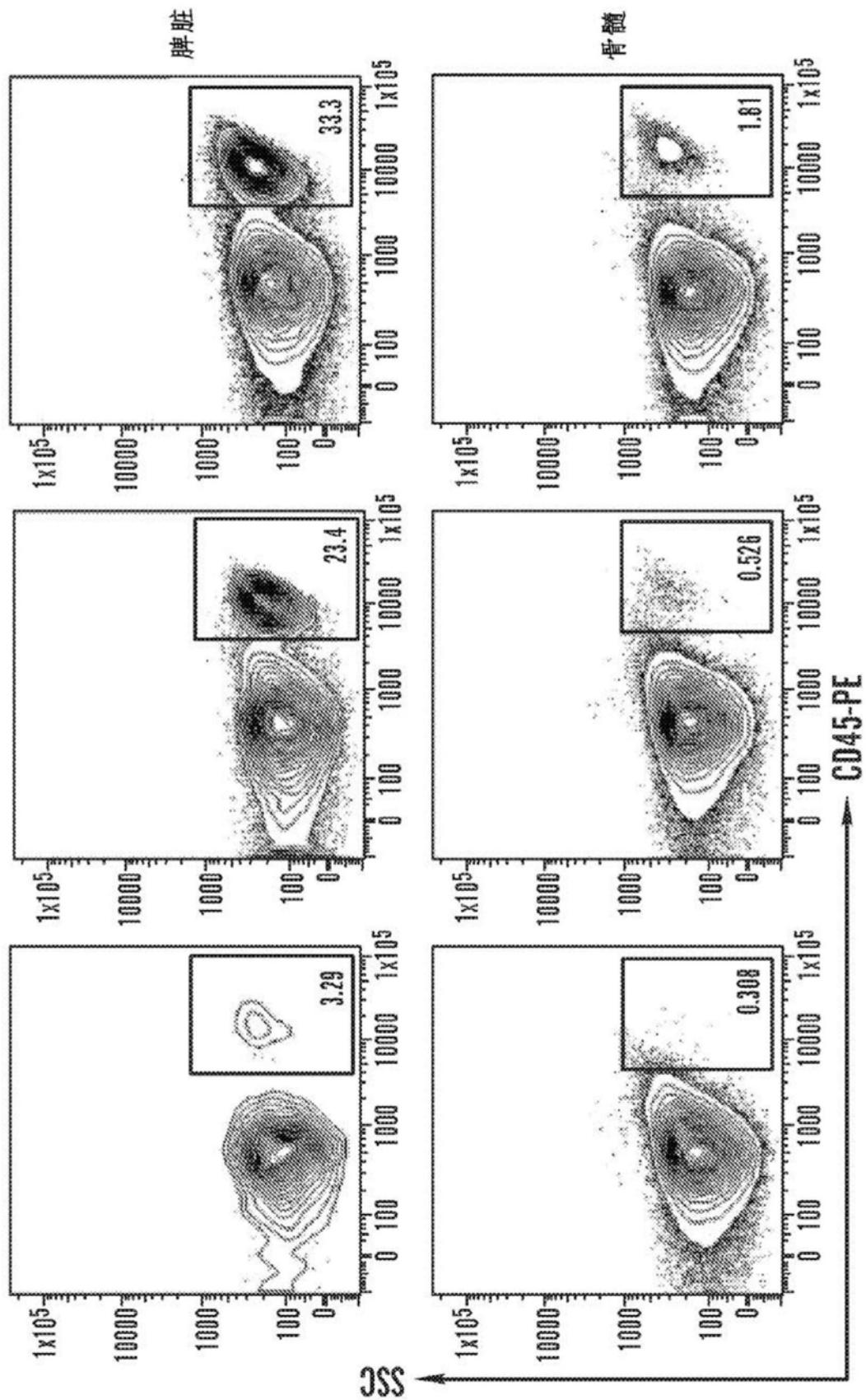


图5C(续)

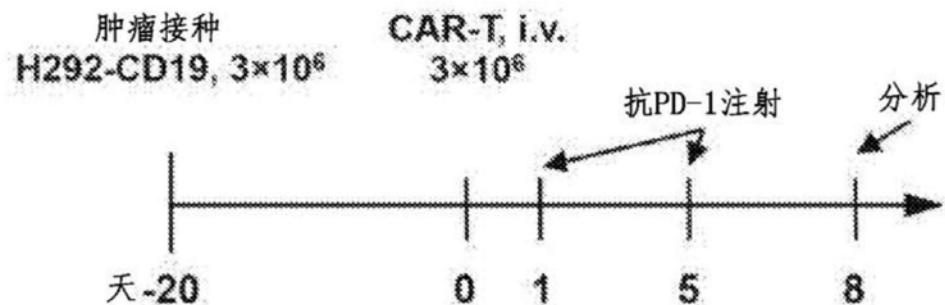


图6A

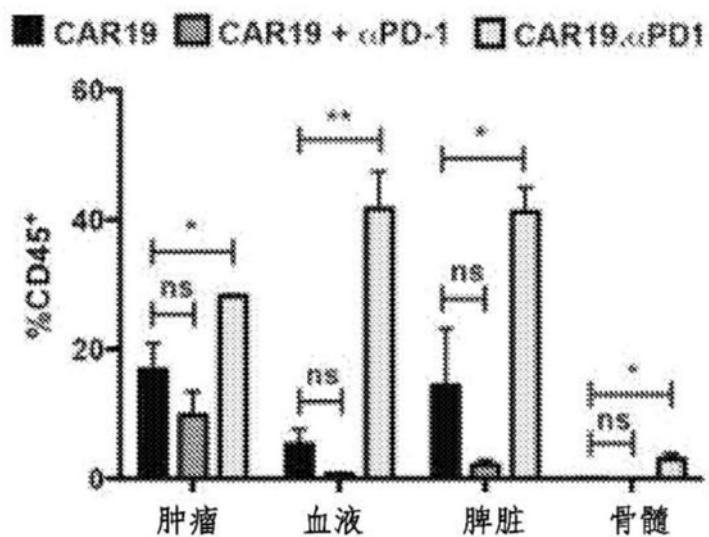


图6B

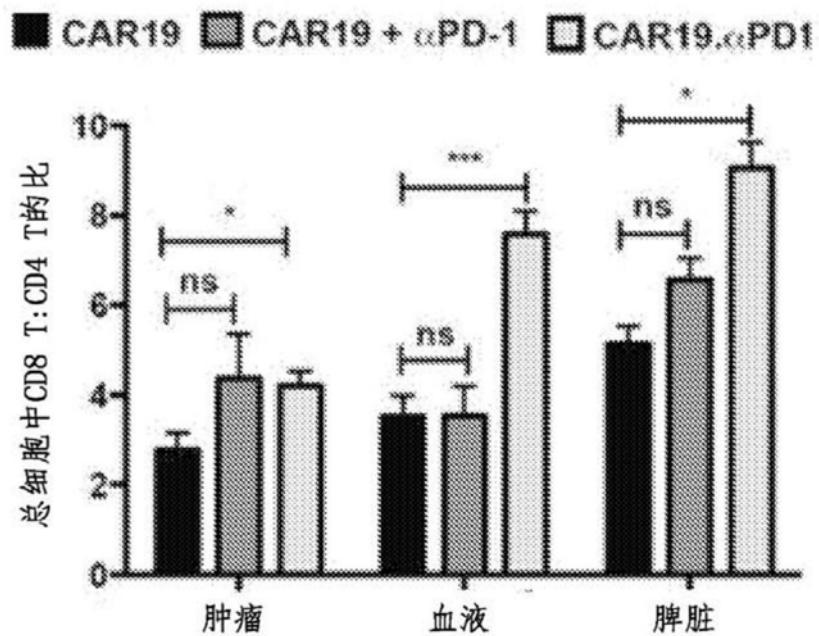


图6C

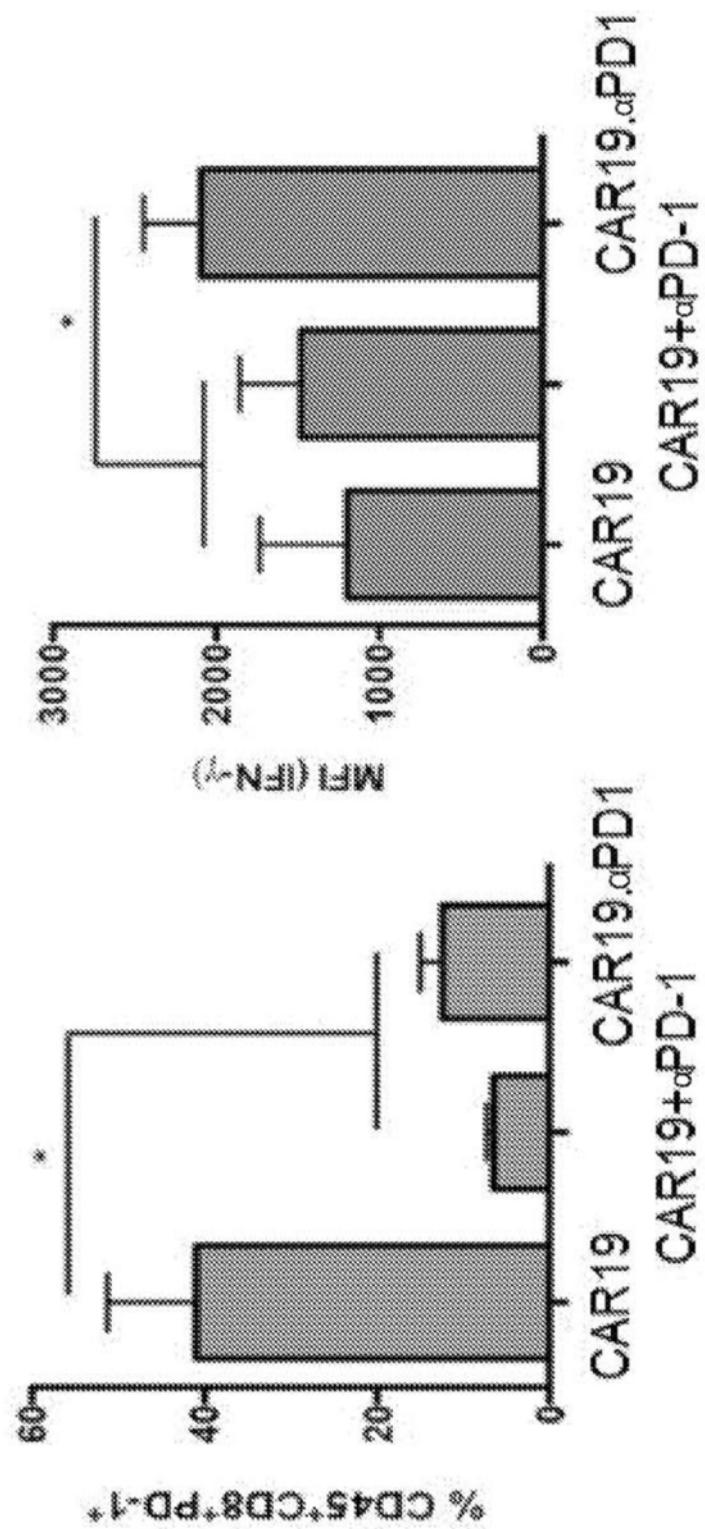


图6E

图6D

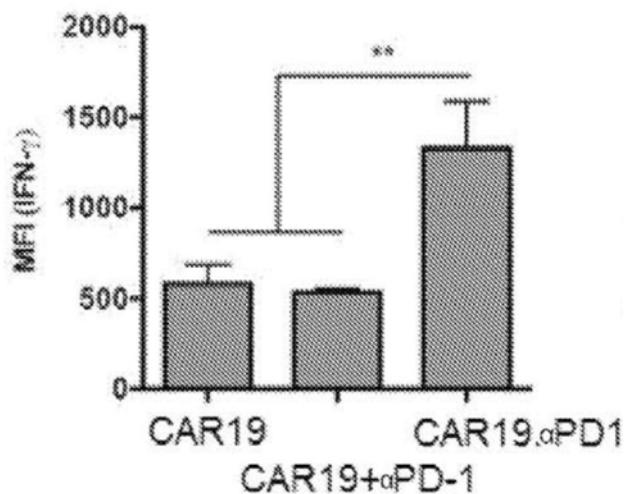


图6F

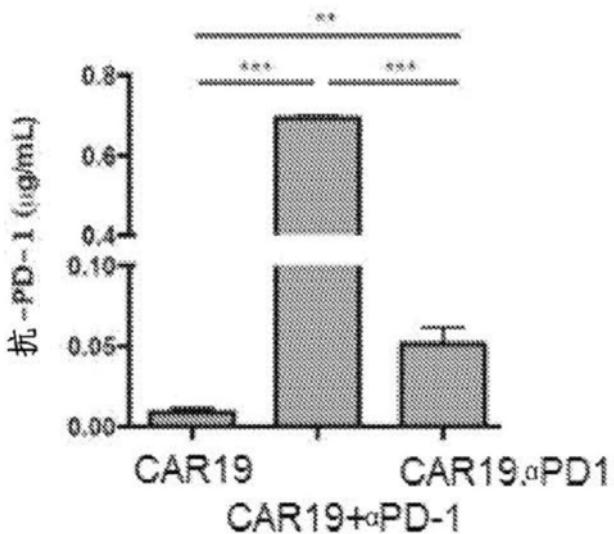


图6G

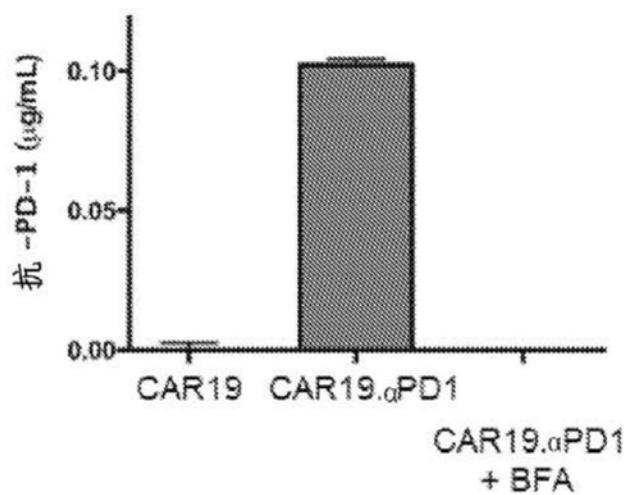


图7A

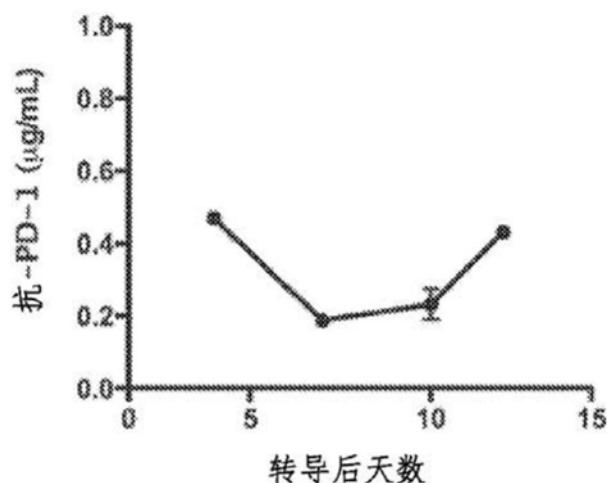


图7B

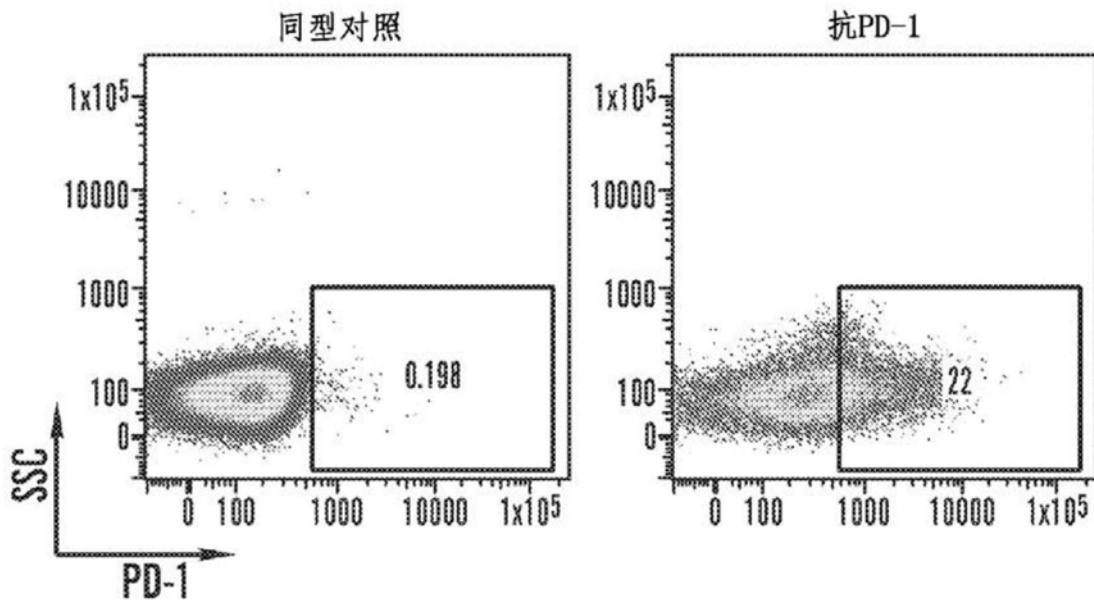


图7C

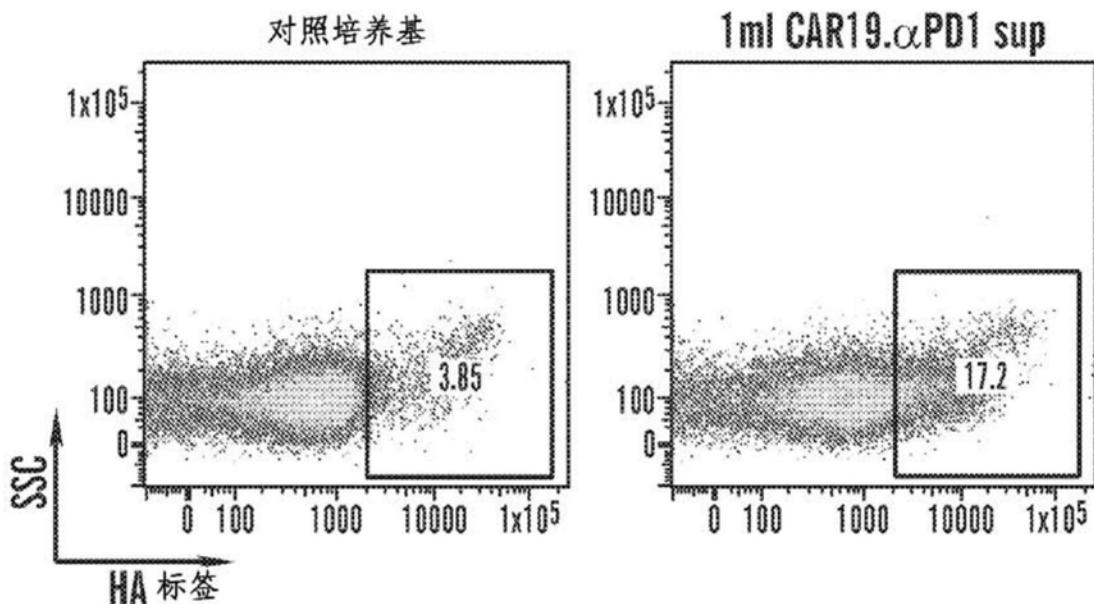


图7D

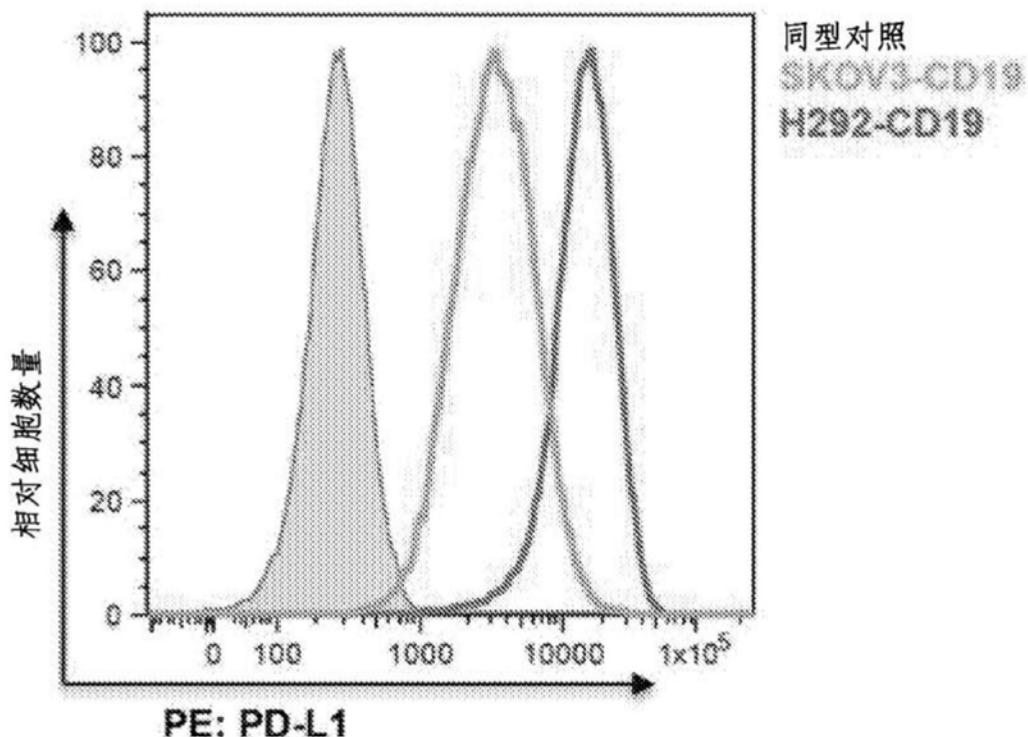


图8

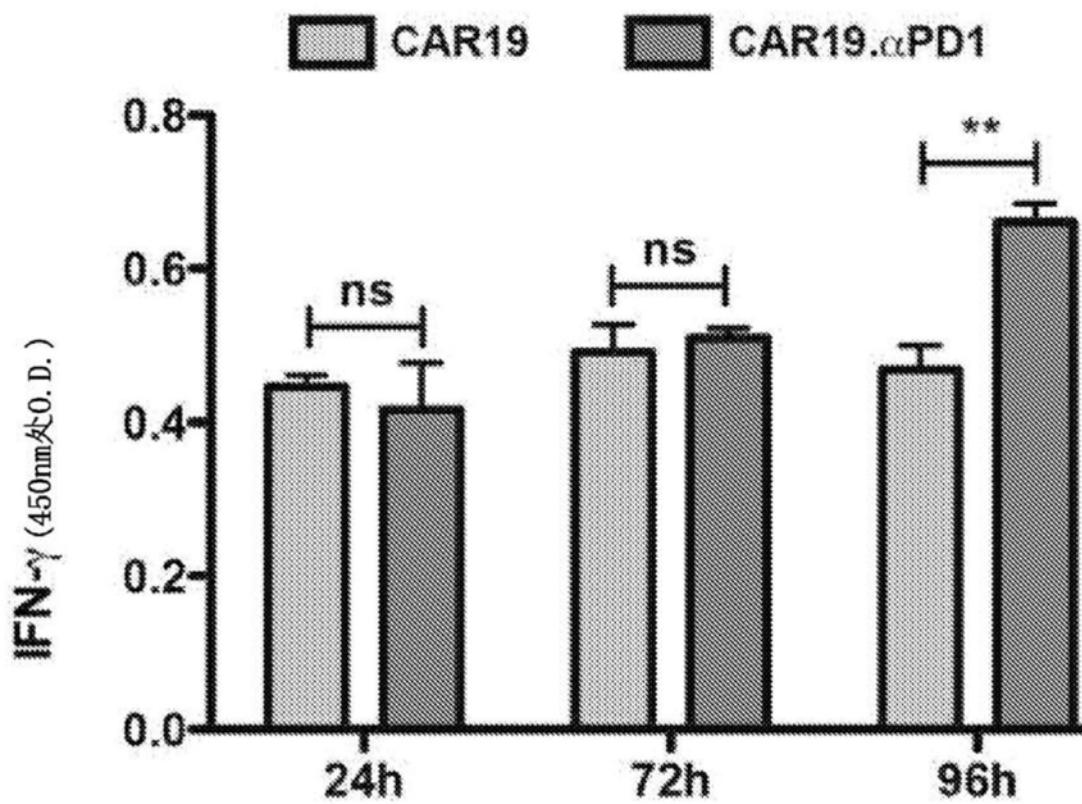


图9A

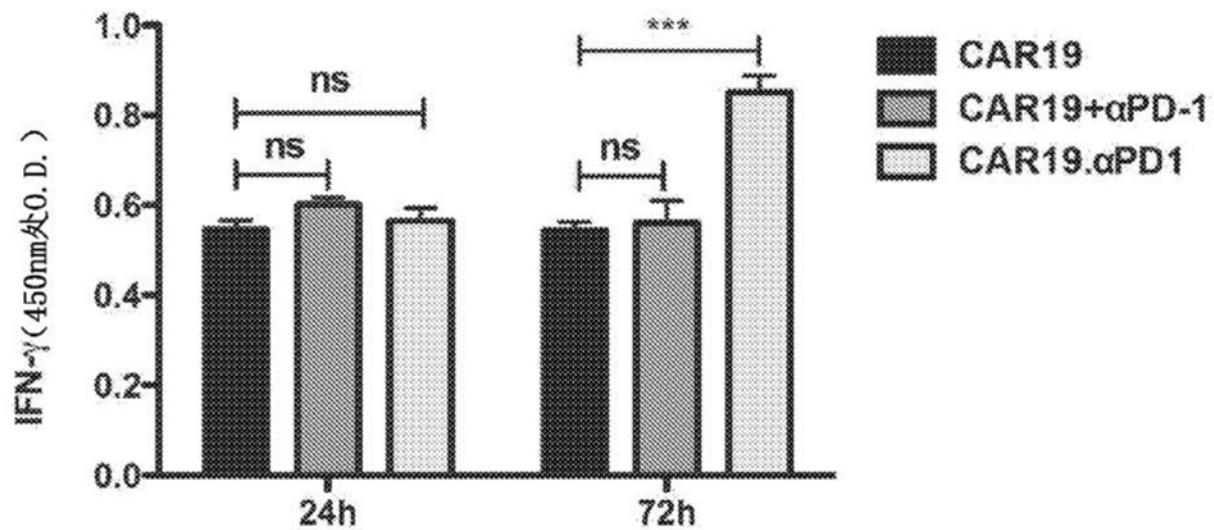


图9B

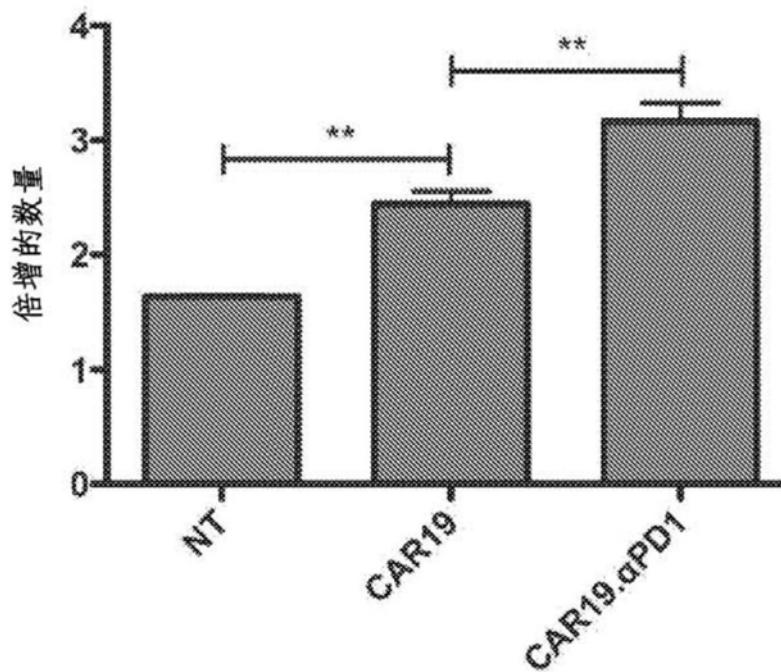


图10

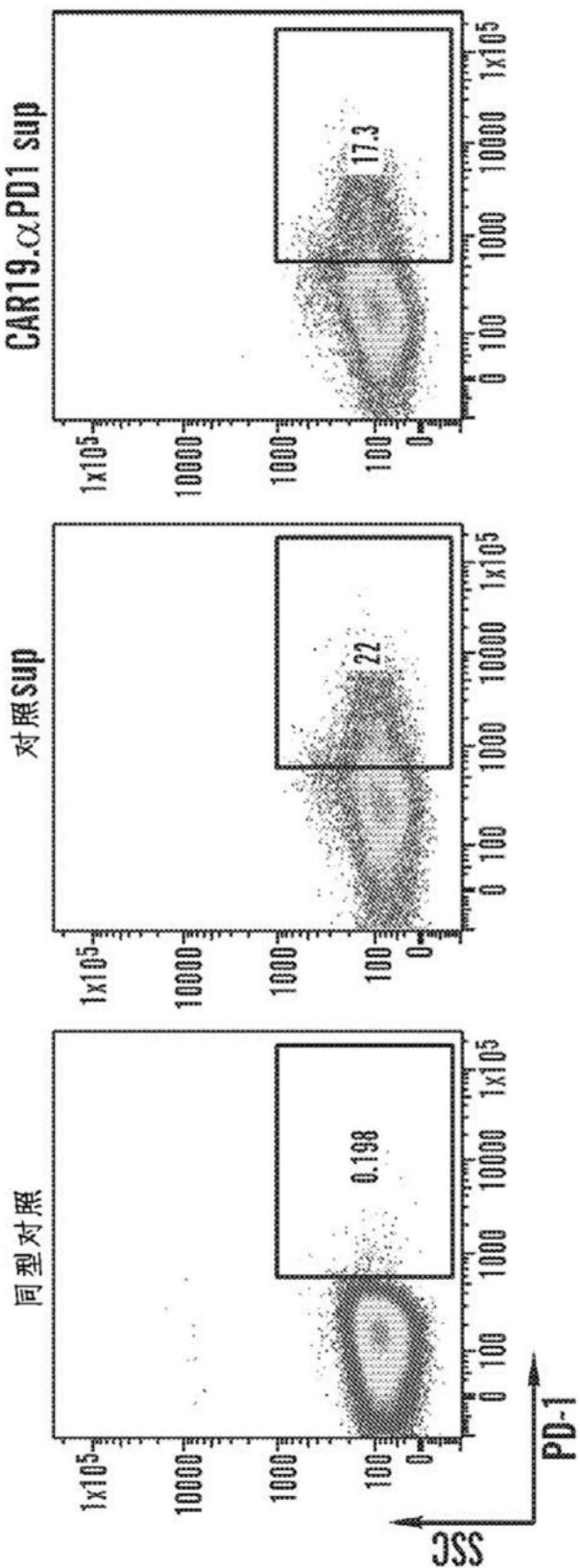


图 11A

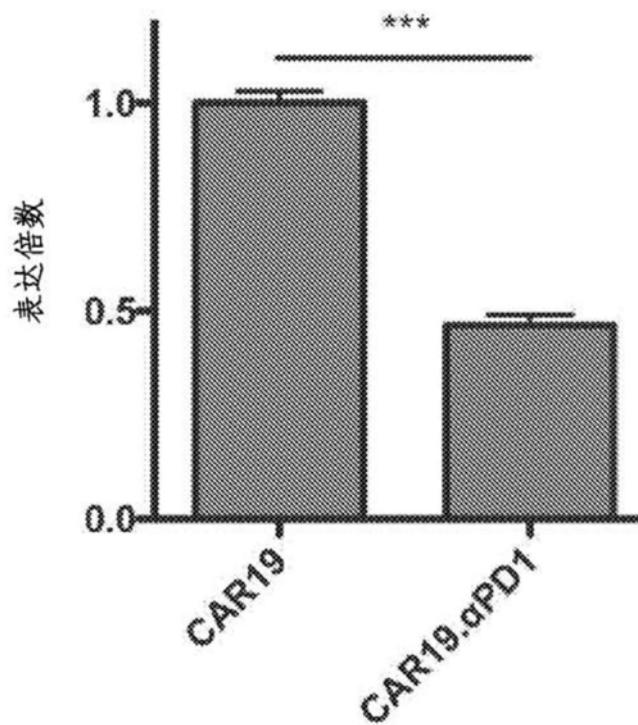


图11B

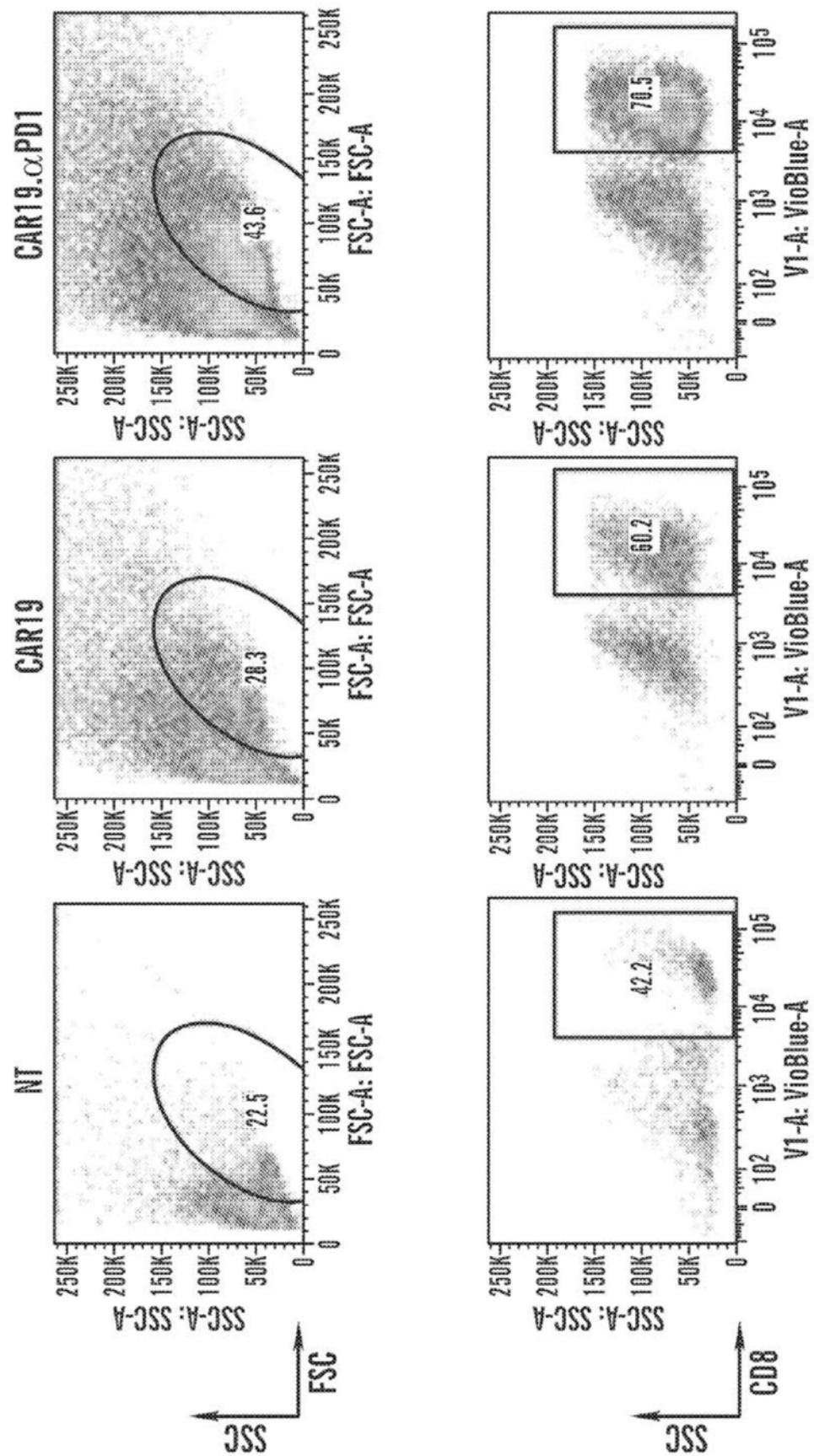


图12A

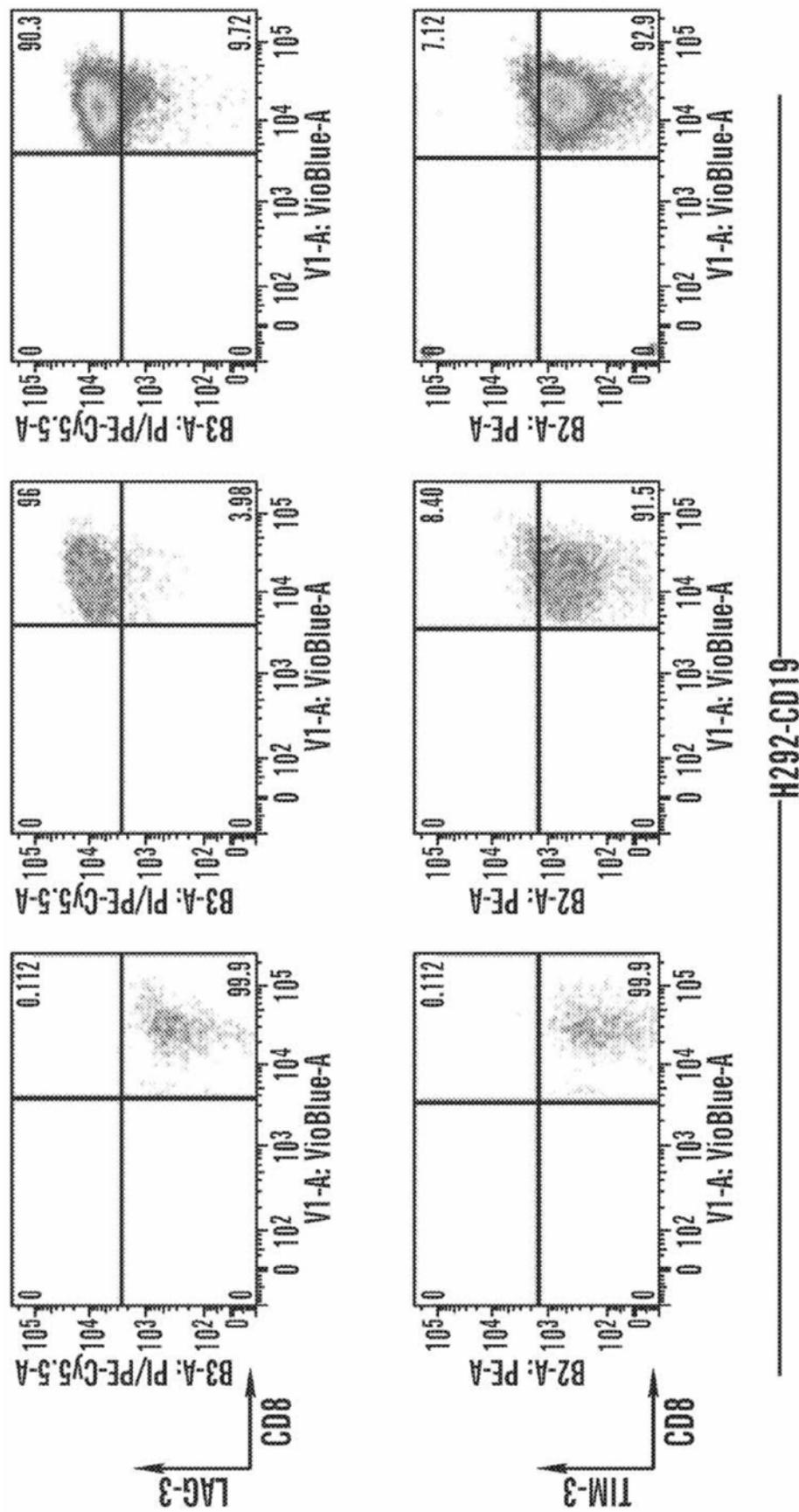


图12A(续)

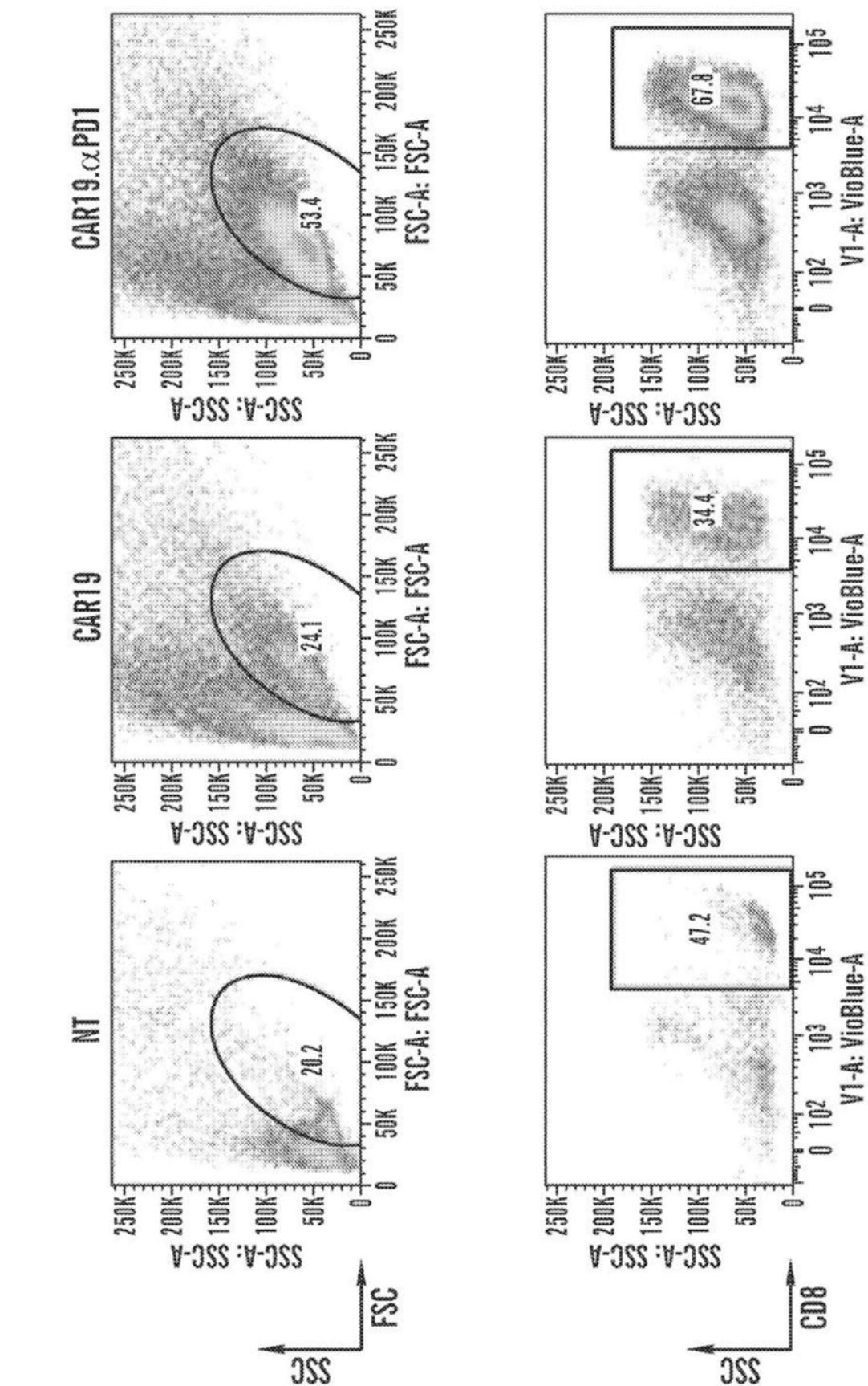


图12A(续)

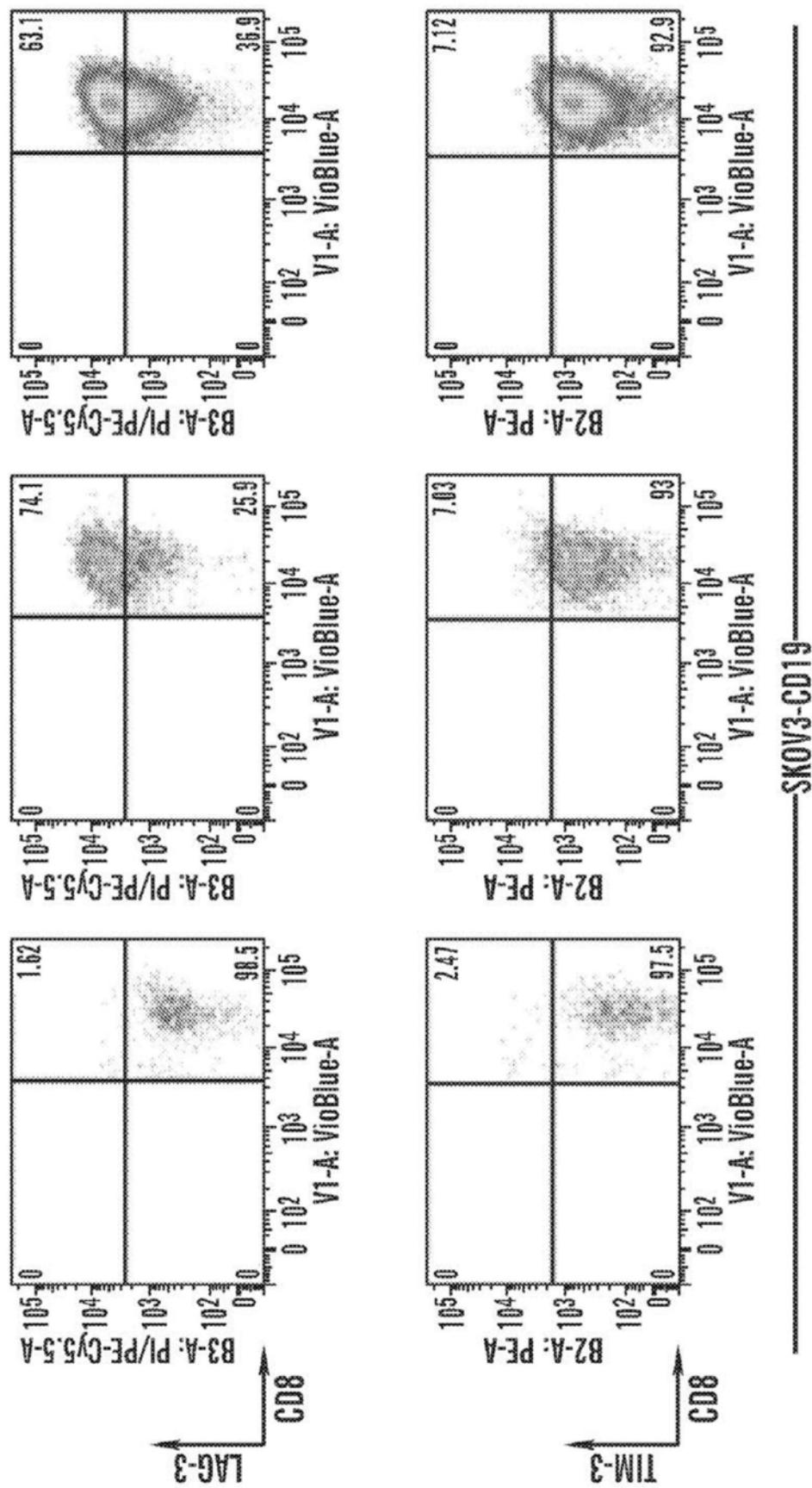


图12A(续)

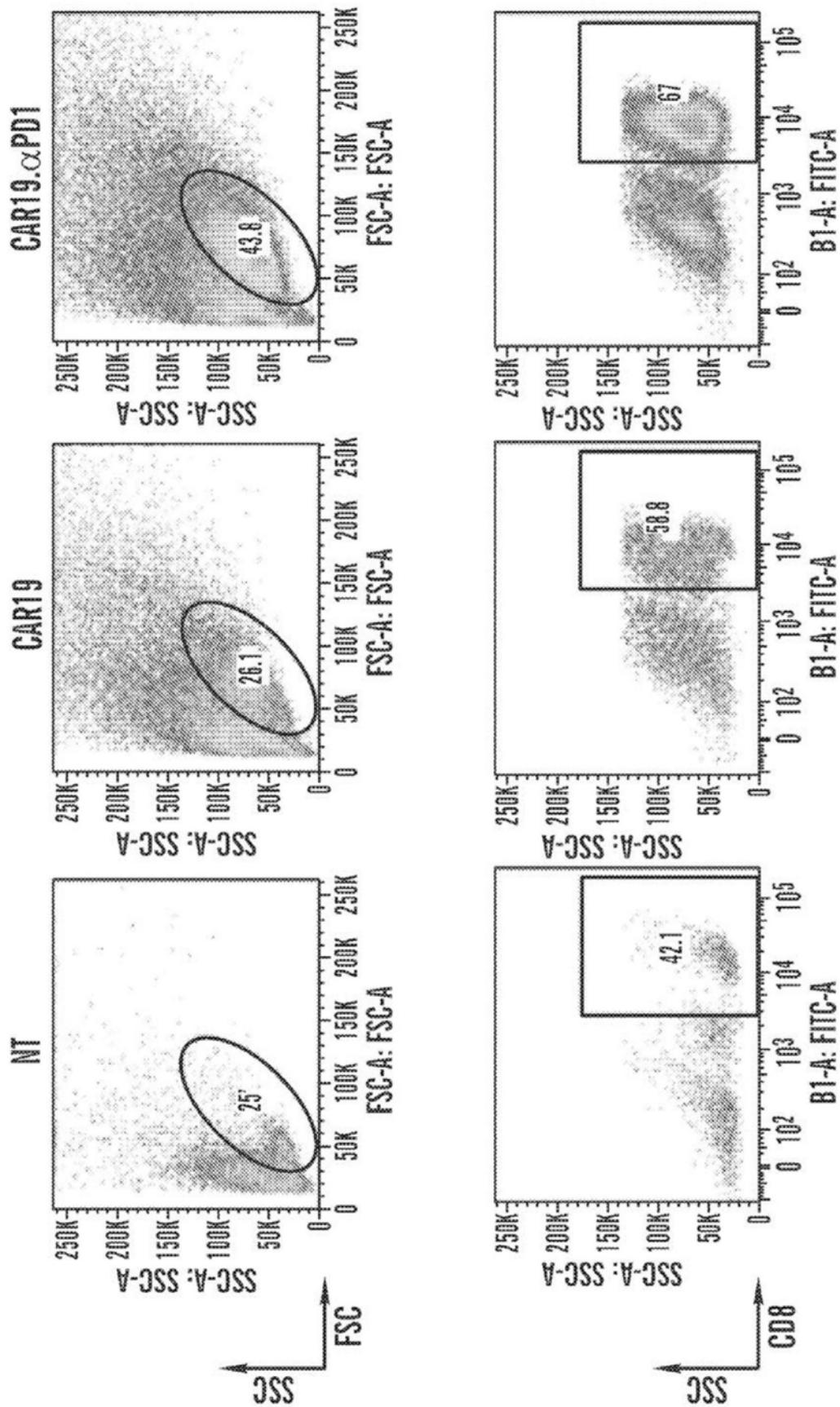


图12B

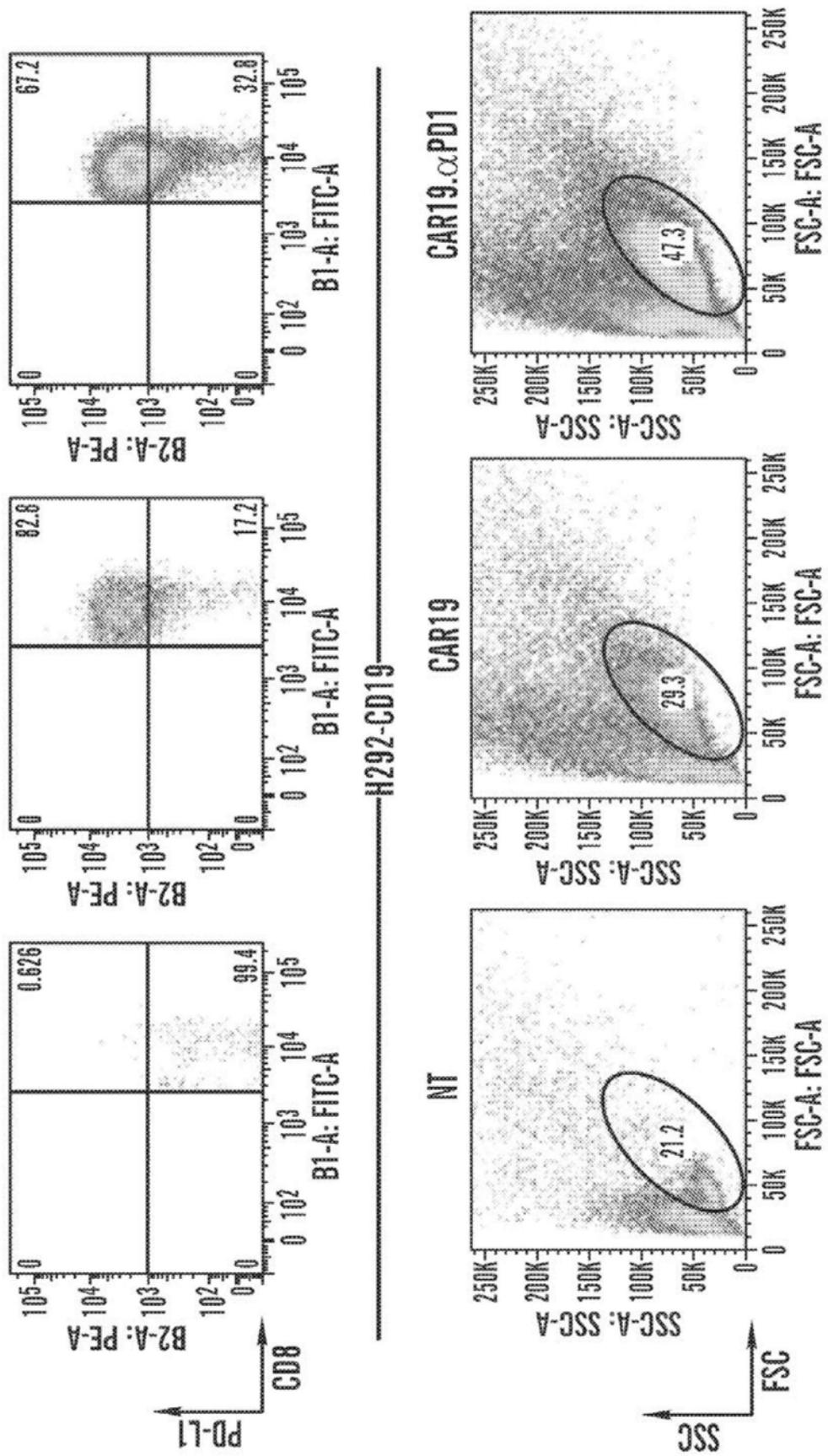


图12B(续)

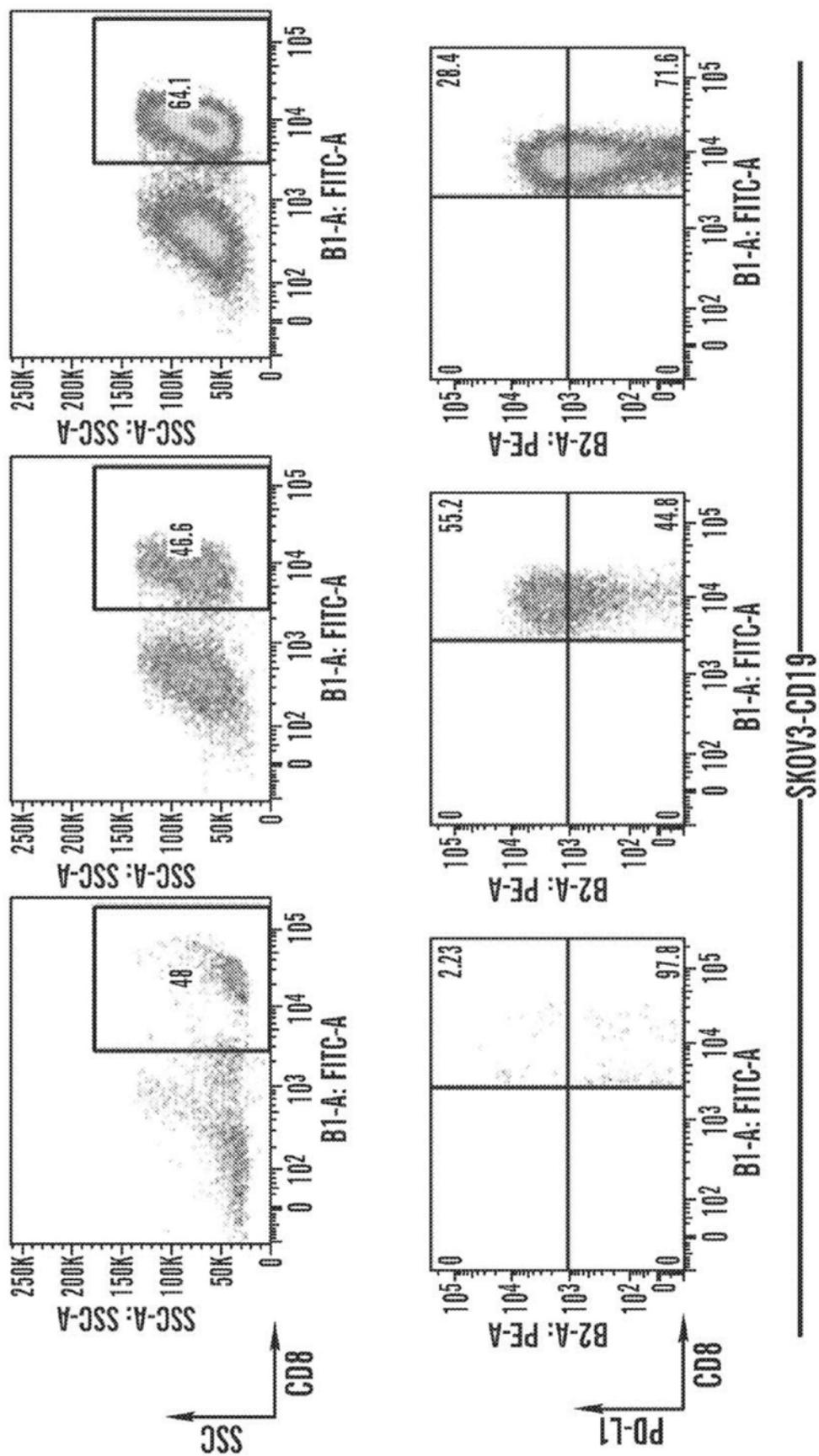


图12B(续)

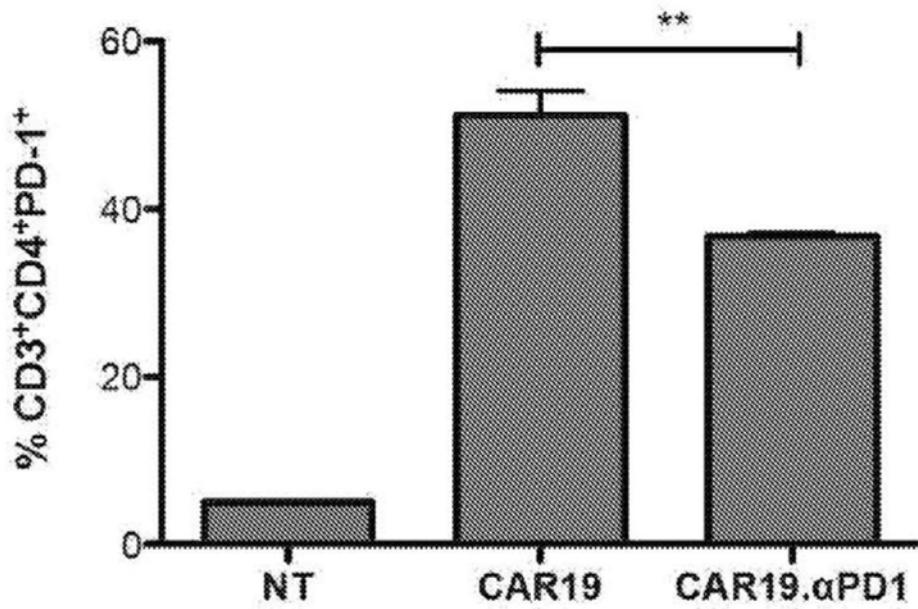


图13A

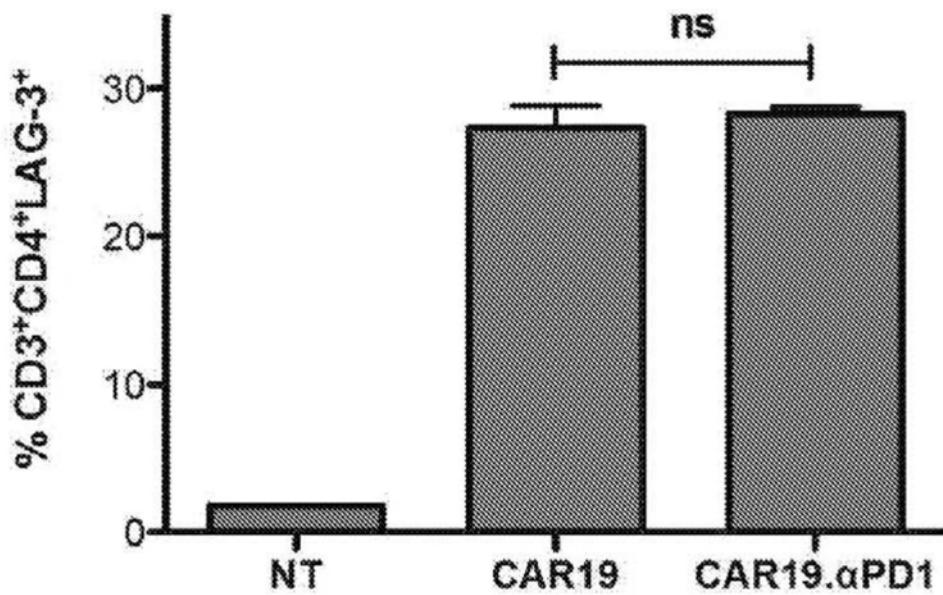


图13B

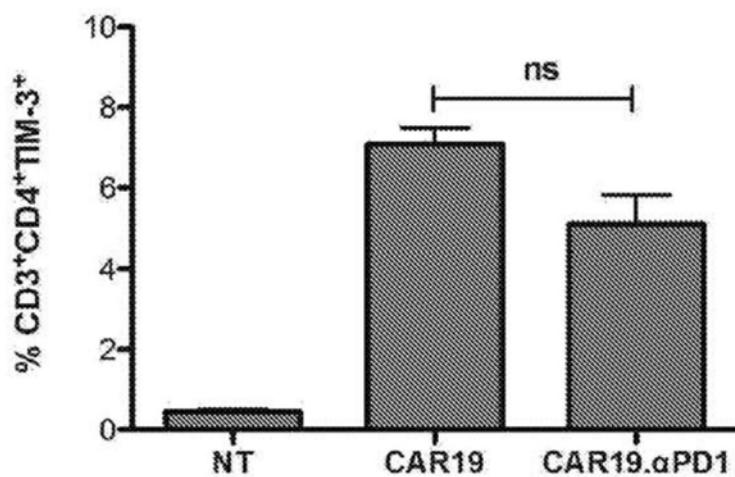


图13C

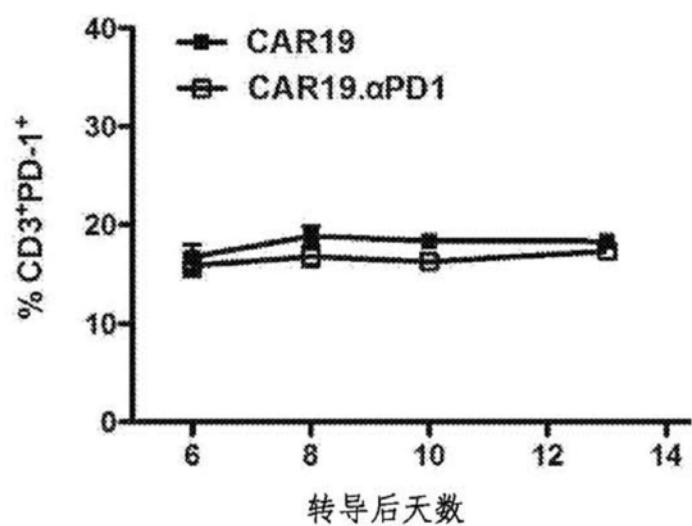


图13D

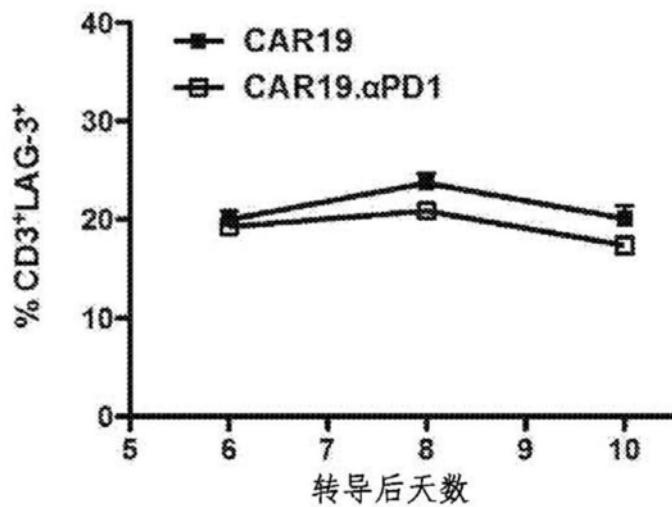


图13E

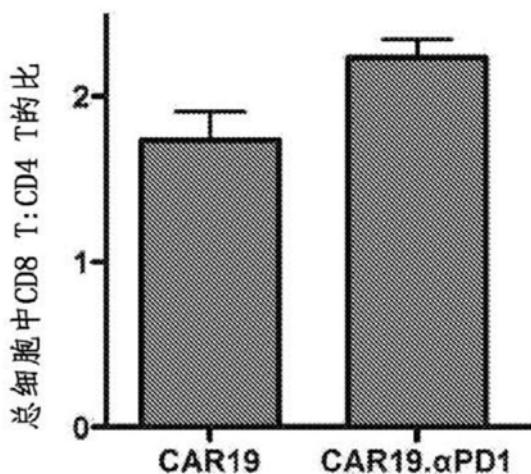


图14A

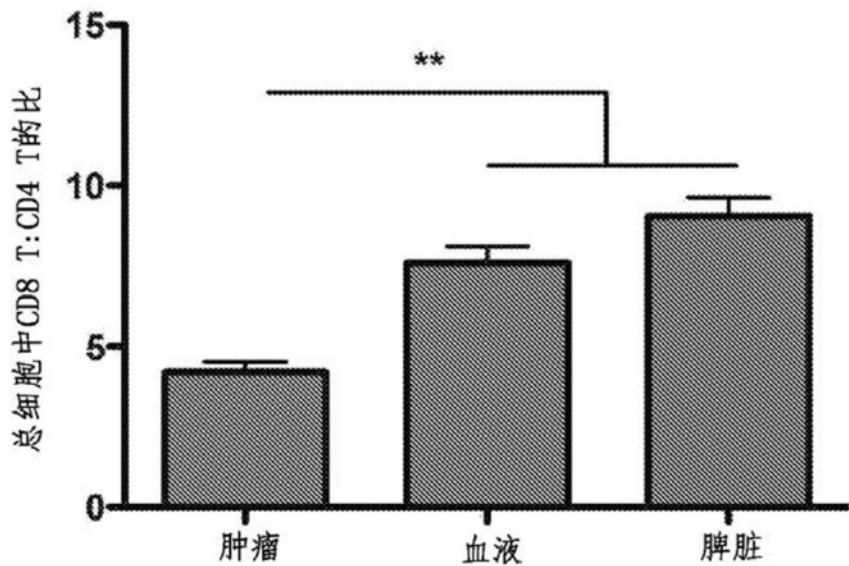


图14B

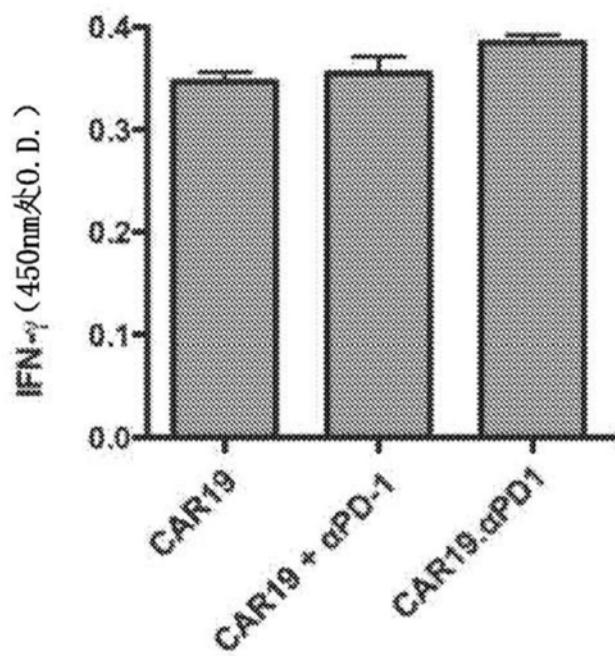


图14C