



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110139669 A

(43)申请公布日 2019.08.16

(21)申请号 201780082035.6

0 • 巴图雷维奇 H • 吉伦特沃特

(22)申请日 2017.11.03

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

(30)优先权数据

代理人 封新琴

62/417,312 2016.11.03 US

62/429,735 2016.12.03 US

62/574,706 2017.10.19 US

(51)Int.Cl.

A61K 39/00(2006.01)

A61K 31/00(2006.01)

A61K 35/17(2006.01)

C12N 5/0783(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.07.02

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/060060 2017.11.03

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/085731 EN 2018.05.11

(71)申请人 朱诺治疗学股份有限公司

地址 美国华盛顿州

权利要求书22页 说明书124页

(72)发明人 M • 朴茨 R • A • 塞尔门 J • 秦

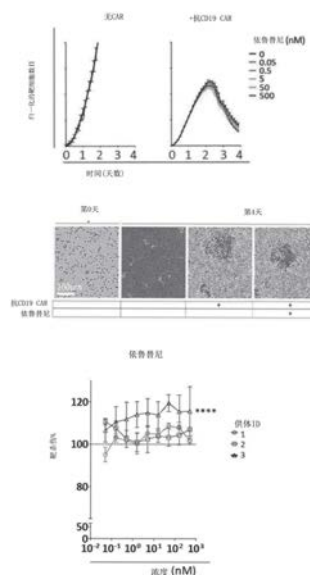
序列表15页 附图41页

(54)发明名称

T细胞疗法和BTK抑制剂的组合疗法

(57)摘要

本文提供了涉及免疫疗法(诸如过继性细胞疗法,例如T细胞疗法)和TEK家族激酶(诸如BTK或ITK)的抑制剂的方法、组合物和用途。所提供的方法、组合物和用途包括用于组合疗法的方法、组合物和用途,该组合疗法涉及一种或多种此类抑制剂连同另一药剂(诸如靶向T细胞的免疫治疗剂(诸如治疗性抗体,例如多特异性(例如啮合T细胞的)抗体))和/或基因工程化T细胞(诸如表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞))的施用或使用。还提供了制造工程化T细胞、组合物的方法、施用至受试者的方法、供在该方法中使用的核酸、制品和试剂盒。在一些方面中,该方法的特征和细胞提供用于过继性细胞疗法的T细胞和/或增殖或由免疫治疗剂募集的内源性T细胞的增强或提高的活性、功效、持久性、扩增。



1. 一种治疗的方法,所述方法包括:

(1) 向患有癌症的受试者施用T细胞,所述T细胞特异性识别或特异性结合与所述癌症相关的、或在所述癌症的细胞上表达或存在的抗原和/或由特异性靶向所述癌症且已经或待施用至所述受试者的治疗剂包含的标签;和

(2) 向所述受试者施用TEC家族激酶的抑制剂,其中

所述癌症不是B细胞恶性肿瘤,不是B细胞白血病或淋巴瘤,是非血液癌或是实体肿瘤;和/或

所述抗原不是B细胞抗原;和/或

所述抗原不是选自由CD19、CD20、CD22和ROR1组成的组的B细胞抗原。

2. 一种治疗的方法,所述方法包括向患有癌症的受试者施用T细胞,所述T细胞特异性识别或特异性结合与所述癌症相关的、或在所述癌症的细胞上表达或存在的抗原和/或由特异性靶向所述癌症且已经或待施用至所述受试者的治疗剂包含的标签,所述受试者已经施用TEC家族激酶的抑制剂,其中:

所述癌症不是B细胞恶性肿瘤,不是B细胞白血病或淋巴瘤,是非血液癌症或是实体肿瘤;和/或

所述抗原不是B细胞抗原;和/或

所述抗原不是选自由CD19、CD20、CD22和ROR1组成的组的B细胞抗原。

3. 一种治疗的方法,所述方法包括向患有癌症的受试者施用TEC家族激酶的抑制剂,所述受试者已经施用T细胞,所述T细胞特异性识别或特异性结合与所述疾病或病况相关的、或在所述疾病或病况的细胞上表达或存在的抗原和/或由特异性靶向所述癌症且已经或待施用至所述受试者的治疗剂包含的标签,其中

所述癌症不是B细胞恶性肿瘤,不是B细胞白血病或淋巴瘤,是非血液癌或是实体肿瘤;和/或

所述抗原不是B细胞抗原;和/或

所述抗原不是选自由CD19、CD20、CD22和ROR1组成的组的B细胞抗原。

4. 权利要求1-3任一项的方法,其中:

所述抗原不是选自由CD19、CD20、CD22和ROR1组成的组的B细胞抗原;和/或

所述癌症不表达选自由CD19、CD20、CD22和ROR1组成的组的B细胞抗原和/或 κ 轻链。

5. 权利要求1-4任一项的方法,其中所述癌症不表达CD19,由所述细胞特异性识别或靶向的抗原不是CD19,和/或所述T细胞不包含特异性结合CD19的重组受体和/或所述T细胞包含嵌合抗原受体(CAR),所述嵌合抗原受体不包含抗CD19抗原结合结构域。

6. 权利要求1-5任一项的方法,其中由所述细胞特异性识别或靶向的抗原选自下列之中: Her2、L1-CAM、间皮素、CEA、乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3或4、erbB二聚体、EGFR vIII、FBP、FCRL5、FCRH5、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、Lewis Y、L1-细胞粘附分子(L1-CAM)、黑色素瘤相关抗原(MAGEMAGE-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、黑色素瘤优先表达的抗原(PRAME)、生存素、EGP2、EGP40、TAG72、B7-H6、IL-13受体 α 2(IL-13Ra2)、CA9、GD3、HMW-MAA、CD171、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2 NY-ESO-1、PSCA、叶酸受体- α 、CD44v6、CD44v7/8、avb6整合素、8H9、NCAM、VEGF受体、5T4、胎儿AchR、NKG2D配体、CD44v6、双抗原和与通用标

签相关联的抗原、癌症-睾丸抗原、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、G蛋白偶联的受体5D (GPCR5D)、瘤胚共同抗原、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原 (CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、雌激素受体、黄体酮受体、肝配蛋白B2、CD123、c-Met、GD-2、0-乙酰化GD2 (OGD2)、CE7、肾母细胞瘤1 (WT-1)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、CCL-1、CD138和病原体特异性抗原。

7. 一种治疗的方法,所述方法包括:

(1) 向患有癌症受试者施用T细胞,所述T细胞特异性识别或特异性结合与所述癌症相关的抗原,所述抗原选自B细胞成熟抗原 (BCMA)、Her2、L1-CAM、间皮素、CEA、乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3或4、erbB二聚体、EGFR vIII、FBP、FCRL5、FCRH5、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、 κ 轻链、Lewis Y、L1-细胞粘附分子 (L1-CAM)、黑色素瘤相关抗原 (MAGE) -A1、MAGE-A3、MAGE-A6、黑色素瘤优先表达的抗原 (PRAME)、生存素、EGP2、EGP40、TAG72、B7-H6、IL-13受体a2 (IL-13Ra2)、CA9、GD3、HMW-MAA、CD171、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2 NY-ESO-1、PSCA、叶酸受体-a、CD44v6、CD44v7/8、avb6整合素、8H9、NCAM、VEGF受体、5T4、胎儿AchR、NKG2D配体、CD44v6、双抗原和与通用标签相关联的抗原、癌症-睾丸抗原、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、G蛋白偶联的受体5D (GPCR5D)、瘤胚共同抗原、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原 (CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、雌激素受体、黄体酮受体、肝配蛋白B2、CD123、c-Met、GD-2、0-乙酰化GD2 (OGD2)、CE7、肾母细胞瘤1 (WT-1)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、CCL-1、CD138和病原体特异性抗原;和

(2) 向所述受试者施用TEC家族激酶的抑制剂。

8. 一种治疗的方法,所述方法包括向患有癌症的受试者施用特异性识别或特异性结合与所述癌症相关的抗原的T细胞,所述抗原选自B细胞成熟抗原 (BCMA)、Her2、L1-CAM、间皮素、CEA、乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3或4、erbB二聚体、EGFR vIII、FBP、FCRL5、FCRH5、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、 κ 轻链、Lewis Y、L1-细胞粘附分子、(L1-CAM)、黑色素瘤相关抗原 (MAGE) -A1、MAGE-A3、MAGE-A6、黑色素瘤优先表达的抗原 (PRAME)、生存素、EGP2、EGP40、TAG72、B7-H6、IL-13受体a2 (IL-13Ra2)、CA9、GD3、HMW-MAA、CD171、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2 NY-ESO-1、PSCA、叶酸受体-a、CD44v6、CD44v7/8、avb6整合素、8H9、NCAM、VEGF受体、5T4、胎儿AchR、NKG2D配体、CD44v6、双抗原和与通用标签相关联的抗原、癌症-睾丸抗原、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、G蛋白偶联的受体5D (GPCR5D)、瘤胚共同抗原、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原 (CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、雌激素受体、黄体酮受体、肝配蛋白B2、CD123、c-Met、GD-2、0-乙酰化GD2 (OGD2)、CE7、肾母细胞瘤1 (WT-1)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、CCL-1、CD138和病原体特异性抗原,其中所述受试者已经施用TEC家族激酶的抑制剂。

9. 一种治疗的方法,所述方法包括向患有癌症的受试者施用TEC家族激酶的抑制剂,所述受试者已经施用特异性识别或特异性结合与所述癌症相关的抗原的T细胞,所述抗原选自B细胞成熟抗原 (BCMA)、Her2、L1-CAM、间皮素、CEA、乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3或4、erbB二聚体、EGFR vIII、FBP、FCRL5、FCRH5、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α

2、kdr、 κ 轻链、Lewis Y、L1-细胞粘附分子、(L1-CAM)、黑色素瘤相关抗原 (MAGE) -A1、MAGE-A3、MAGE-A6、黑色素瘤优先表达的抗原 (PRAME)、生存素、EGP2、EGP40、TAG72、B7-H6、IL-13 受体 α 2 (IL-13Ra2)、CA9、GD3、HMW-MAA、CD171、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2 NY-ESO-1、PSCA、folate受体-a、CD44v6、CD44v7/8、 α v β 6整合素、8H9、NCAM、VEGF受体、5T4、胎儿 AchR、NKG2D配体、CD44v6、双抗原和与通用标签相关联的抗原,癌症-睾丸抗原、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、G蛋白偶联的受体5D (GPCR5D)、瘤胚共同抗原、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原 (CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、雌激素受体、黄体酮受体、肝配蛋白B2、CD123、c-Met、GD-2、O-乙酰化GD2 (OGD2)、CE7、肾母细胞瘤1 (WT-1)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、CCL-1、CD138和病原体特异性抗原。

10. 权利要求6-9任一项的方法,其中所述抗原是病原体特异性抗原,所述病原体特异性抗原病毒抗原、细菌抗原或寄生虫抗原。

11. 一种治疗的方法,所述方法包括:

(1) 向患有癌症的受试者施用组合物,所述组合物包含T细胞,所述T细胞特异性识别或特异性结合与所述癌症相关的或在所述癌症的细胞上表达或存在的抗原和/或由特异性靶向所述癌症且已经或待施用至所述受试者的治疗剂包含的标签;和

(2) 向所述受试者施用TEC家族激酶的抑制剂;

其中:

(i) 所述受试者和/或所述癌症 (a) 对布鲁顿氏酪氨酸激酶 (BTK) 的抑制有抗性和/或 (b) 包含对通过所述抑制剂的抑制有抗性的细胞群;

(ii) 所述受试者和/或所述癌症包含编码BTK的核酸中的突变,任选地,其中所述突变能够降低或阻止通过所述抑制剂和/或通过依鲁替尼 (ibrutinib) 的BTK的抑制,任选地,其中所述突变是C481S;

(iii) 所述受试者和/或所述癌症包含编码磷脂酶C γ 2 (PLC γ 2) 的核酸中的突变,任选地,其中所述突变导致组成性信号传导活性,任选地,其中所述突变是R665W或L845F;

(iv) 在开始 (1) 中的施用时在开始 (2) 中的施用,所述受试者已经在用所述抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗后缓解后复发,或已经认为所述受试者对用所述抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗是难治的;

(v) 在开始 (1) 中的施用时在开始 (2) 中的施用,所述受试者已经在用所述抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗后续进展,任选地,其中所述受试者表现出进行性疾病,作为对所述既往治疗的最佳应答或对所述既往治疗的既往应答后的进展;和/或

(vi) 在开始 (1) 中的施用时在开始 (2) 中的施用,所述受试者在用所述抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗持续至少6个月后表现出低于完全应答 (CR) 的应答。

12. 一种治疗的方法,所述方法包括向患有癌症的受试者施用组合物,所述组合物包含T细胞,所述T细胞特异性识别或特异性结合与所述癌症相关的、或在所述癌症的细胞上表达或存在的抗原和/或由特异性靶向所述癌症且已经或待施用至所述受试者的治疗剂包含的标签,所述受试者已经施用TEC家族激酶的抑制剂用于在连同施用所述包含T细胞的组合物的组合疗法中使用,其中:

(i) 所述受试者和/或所述癌症 (a) 对布鲁顿氏酪氨酸激酶 (BTK) 的抑制有抗性和/或 (b) 包含对通过所述抑制剂的抑制有抗性的细胞群;

(ii) 所述受试者和/或所述癌症包含编码BTK的核酸中的突变,任选地,其中所述突变能够降低或阻止通过所述抑制剂和/或通过依鲁替尼的BTK的抑制,任选地,其中所述突变是C481S;

(iii) 所述受试者和/或所述癌症包含编码磷脂酶C γ 2 (PLC γ 2) 的核酸中的突变,任选地,其中所述突变导致组成性信号传导活性,任选地,其中所述突变是R665W或L845F;

(iv) 在开始施用TEC家族激酶的抑制剂和开始施用包含T细胞的组合物时,所述受试者已经在用所述抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗后缓解后复发,或已经认为所述受试者对用所述抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗是难治的;

(v) 在开始施用所述TEC家族激酶的抑制剂和开始施用所述包含T细胞的组合物时,所述受试者在用所述抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗后已经进展,任选地,其中所述受试者表现出进行性疾病,作为对所述既往治疗的最佳应答或对所述既往治疗的既往应答后的进展;和/或

(vi) 在开始施用所述TEC家族激酶的抑制剂和开始施用所述包含T细胞的组合物时,所述受试者在用所述抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗持续至少6个月后表现出低于完全应答(CR)的应答。

13. 一种治疗的方法,所述方法包括向患有癌症的受试者施用TEC家族激酶的抑制剂,所述受试者已经施用包含T细胞的组合物,所述T细胞特异性识别或特异性结合与所述癌症相关的、或在所述癌症的细胞上表达或存在的抗原和/或由特异性靶向所述癌症且已经或待施用至所述受试者的治疗剂包含的标签,其中:

(i) 所述受试者和/或所述癌症 (a) 对布鲁顿氏酪氨酸激酶 (BTK) 的抑制有抗性和/或 (b) 包含对通过所述抑制剂的抑制有抗性的细胞群;

(ii) 所述受试者和/或所述癌症包含编码BTK的核酸中的突变,任选地,其中所述突变能够降低或阻止通过所述抑制剂和/或通过依鲁替尼的BTK的抑制,任选地,其中所述突变是C481S;

(iii) 所述受试者和/或所述癌症包含编码磷脂酶C γ 2 (PLC γ 2) 的核酸中的突变,任选地,其中所述突变导致组成性信号传导活性,任选地,其中所述突变是R665W或L845F;

(iv) 在开始施用所述包含T细胞的组合物和开始施用所述TEC家族激酶的抑制剂时,所述受试者已经在用所述抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗后缓解后复发,或已经认为所述受试者对用所述抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗是难治的;

(v) 在开始施用所述包含T细胞的组合物和开始施用所述TEC家族激酶的抑制剂时,所述受试者已经在用所述抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗后进展,任选地,其中所述受试者表现出进行性疾病,作为对所述既往治疗的最佳应答或对所述既往治疗的既往应答后的进展;和/或

(vi) 在开始施用所述包含T细胞的组合物和开始施用所述TEC家族激酶的抑制剂时,所述受试者在用所述抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗持续至少6个月后表现出低于完全应答(CR)的应答。

14. 权利要求11-13任一项的方法,其中所述细胞群是或包含B细胞群和/或不包含T细胞。

15. 权利要求1-14任一项的方法,其中所述T细胞包含肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)或包

含表达特异性结合所述抗原的重组受体的基因工程化T细胞。

16. 权利要求15的方法,其中所述T细胞包含表达特异性结合所述抗原的重组受体的基因工程化T细胞,所述受体任选为嵌合抗原受体。

17. 一种治疗的方法,所述方法包括:

(1) 向患有癌症的受试者施用包含T细胞的组合物,所述T细胞对于所述受试者是自体的且表达重组受体,所述重组受体特异性结合与所述癌症相关的抗原和/或由特异性靶向所述癌症且已经或待施用至所述受试者的治疗剂包含的标签;且

(2) 向所述受试者施用TEC家族激酶的抑制剂,

其中,在多次抗原特异性刺激后的体外测定中,相较于参考T细胞群或参考或阈值水平,所述T细胞和/或来自所述受试者的未经工程化以表达所述重组受体的自体T细胞显示或已经观察到显示降低水平的指示T细胞功能、健康或活性的因子。

18. 一种治疗的方法,所述方法包括向患有癌症的受试者施用包含T细胞的组合物,所述T细胞对于所述受试者是自体的且表达重组受体,所述重组受体特异性结合与所述癌症相关的抗原和/或由特异性靶向所述癌症且已经或待施用至所述受试者的治疗剂包含的标签,所述受试者已经施用TEC家族激酶的抑制剂,其中,在多次抗原特异性刺激后的体外试验中,相较于参考T细胞群或参考或阈值水平,所述T细胞和/或来自所述受试者的未经工程化以表达所述重组受体的自体T细胞显示或已经观察到显示降低水平的指示T细胞功能、健康或活性的因子。

19. 一种治疗的方法,所述方法包括向患有癌症的受试者施用TEC家族激酶的抑制剂,所述受试者已经施用T细胞,所述T细胞对于所述受试者是自体的且表达重组受体,所述重组受体特异性结合与所述癌症相关的抗原和/或由特异性靶向所述癌症且已经或待施用至所述受试者的治疗剂包含的标签,其中,在多次抗原特异性刺激后的体外试验中,相较于参考T细胞群或参考或阈值水平,所述T细胞和/或来自所述受试者的未经工程化以表达所述重组受体的自体T细胞显示或已经观察到显示降低水平的指示T细胞功能、健康或活性的因子。

20. 权利要求17-19任一项的方法,其中:

所述参考T细胞群是来自不患有或不疑似患有所述癌症的受试者的血液的T细胞群;

所述参考或阈值是如在相同体外试验中测定的对来自不患有或不疑似患有所述癌症的受试者的血液的T细胞群观察到的平均值;或

所述参考或阈值是如在相同体外试验中测定的对来自患有所述癌症的其他受试者的血液的T细胞群观察到的平均值。

21. 权利要求17-20任一项的方法,其中所述因子是或包含细胞扩增、细胞存活、抗原特异性细胞毒性、和/或细胞因子分泌的程度。

22. 权利要求17-21任一项的方法,其中相较于所述参考群或水平,在相同的试验中,当在单轮刺激和/或少于所述多轮的若干轮刺激后评估时,所述因子的水平未降低。

23. 权利要求17-22任一项的方法,其中所述多轮刺激包含至少3、4或5轮和/或在至少10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25天的时期内进行。

24. 权利要求16-23任一项的方法,其中所述重组受体是转基因T细胞受体 (TCR) 或功能性非T细胞受体。

25. 权利要求16-24任一项的方法,其中所述重组受体是嵌合受体,所述嵌合受体任选是嵌合抗原受体(CAR)。

26. 一种治疗的方法,所述方法包括:

(1) 向患有癌症的受试者施用包含表达嵌合受体的细胞的组合物,所述嵌合受体任选是嵌合抗原受体(CAR),其中所述受体特异性结合与所述癌症相关的不是CD19、CD20、CD22或ROR1的抗原和/或特异性结合由特异性靶向所述癌症且已经或待施用至所述受试者的治疗剂包含的标签;和

(2) 向所述受试者施用TEC家族激酶的抑制剂。

27. 一种治疗的方法,所述方法包括向患有癌症的受试者施用包含表达嵌合受体的细胞的组合物,所述嵌合受体任选是嵌合抗原受体(CAR),其中所述受体特异性结合与所述癌症相关的不是CD19、CD20、CD22或ROR1的抗原和/或特异性结合由特异性靶向所述癌症且已经或待施用至所述受试者的治疗剂包含的标签,所述受试者已经施用TEC家族激酶的抑制剂。

28. 一种治疗的方法,所述方法包括向患有癌症的受试者施用TEC家族激酶的抑制剂,所述受试者已经施用包含表达嵌合受体的细胞的组合物,所述嵌合受体任选是嵌合抗原受体(CAR),其中所述受体特异性结合与所述癌症相关的不是CD19、CD20、CD22或ROR1的抗原和/或特异性结合由特异性靶向所述癌症且已经或待施用至所述受试者的治疗剂包含的标签。

29. 权利要求26-29任一项的方法,其中所述嵌合抗原受体(CAR)包含特异性结合所述抗原的细胞外抗原识别结构域和包含ITAM的细胞内信号传导结构域。

30. 权利要求29的方法,其中所述细胞内信号传导结构域包含CD3- ζ (CD3 ζ) 链的细胞内结构域。

31. 权利要求29或权利要求30的方法,其中所述嵌合抗原受体(CAR)还包含共刺激信号传导区。

32. 权利要求31的方法,其中所述共刺激信号传导区包含CD28或4-1BB的信号传导结构域。

33. 权利要求31或权利要求32的方法,其中所述共刺激结构域是CD28的结构域。

34. 一种治疗癌症的方法,所述方法包括:

(1) 向患有癌症的受试者施用包含表达嵌合受体的细胞的组合物,所述嵌合受体任选是嵌合抗原受体,其中所述嵌合受体包含包含抗体或其抗原结合片段的细胞外结构域,作为或包含人CD28的跨膜部分的跨膜结构域和包含人4-1BB或人CD28的信号传导结构域和人CD3 ζ 的信号传导结构域的细胞内信号传导结构域;且

(2) 向所述受试者施用TEC家族激酶的抑制剂。

35. 权利要求7-34任一项的方法,其中所述癌症是B细胞恶性肿瘤。

36. 权利要求35的方法,其中所述B细胞恶性肿瘤是白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。

37. 权利要求35或权利要求36的方法,其中所述B细胞恶性肿瘤是急性成淋巴细胞白血病(ALL)、成人ALL、慢性成淋巴细胞白血病(CLL)、小淋巴细胞白血病(SLL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)或急性髓样白血病(AML)。

38. 权利要求35-37任一项的方法,其中所述B细胞恶性肿瘤是CLL或SLL。

39. 权利要求35-37任一项的方法,其中,在开始施用所述包含T细胞的组合物和开始施用所述TEC家族激酶的抑制剂时或之前,所述受试者具有或经鉴定为具有B细胞恶性肿瘤,其中:

(i) 一种或多种细胞遗传异常,任选为至少两种或三种细胞遗传异常,任选地,其中至少一种细胞遗传异常是17p缺失;

(ii) TP53突变;和/或

(iii) 未突变的免疫球蛋白重链可变区(IGHV)。

40. 权利要求35-39任一项的方法,其中在开始施用所述包含T细胞的组合物和开始施用所述TEC家族激酶的抑制剂时或之前,所述受试者已经用一种或多种用于治疗B细胞恶性肿瘤的在先疗法治疗失败,已经在用一种或多种用于治疗B细胞恶性肿瘤的在先疗法治疗后缓解后复发,或已经变得对一种或多种用于治疗B细胞恶性肿瘤的在先疗法是难治的,所述在先疗法任选是除了另一剂量的表达所述重组受体的细胞之外的一种、两种或三种在先疗法,任选地,其中至少一种在先疗法是用所述抑制剂或BTK抑制剂疗法的既往治疗。

41. 权利要求11-40任一项的方法,其中所述既往治疗是用依鲁替尼的既往治疗。

42. 权利要求7-34任一项的方法,其中所述癌症不是表达B细胞抗原的癌症,是非血液癌症,不是B细胞恶性肿瘤,不是B细胞白血病,或是实体肿瘤。

43. 权利要求1-34和42任一项的方法,其中所述癌症是肉瘤、癌、淋巴瘤、白血病或骨髓瘤,任选地,其中所述癌症是非霍奇金淋巴瘤(NHL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、CLL、SLL、ALL或AML。

44. 权利要求1-34、42和43任一项的方法,其中所述癌症是胰腺癌、膀胱癌、结直肠癌、乳腺癌、前列腺癌、肾癌、肝细胞癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、胰腺癌、直肠癌、甲状腺癌、子宫癌、胃癌、食管癌、头颈癌、黑色素瘤、神经内分泌癌、CNS癌、脑肿瘤、骨癌或软组织肉瘤。

45. 权利要求1-10和17-44任一项的方法,其中:

(i) 所述受试者和/或所述癌症(a)对布鲁顿氏酪氨酸激酶(BTK)的抑制有抗性和/或(b)包含对通过所述抑制剂的抑制有抗性的细胞群;

(ii) 所述受试者和/或所述癌症包含编码BTK的核酸中的突变,任选地,其中所述突变能够降低或阻止通过所述抑制剂和/或通过依鲁替尼的BTK的抑制,任选地其中所述突变是C481S;

(iii) 所述受试者和/或所述癌症包含编码磷脂酶C γ 2 (PLC γ 2)的核酸中的突变,任选地,其中所述突变导致组成性信号传导活性,任选地,其中所述突变是R665W或L845F;

(iv) 在开始施用所述TEC家族激酶的抑制剂和开始施用所述包含T细胞的组合物时,所述受试者已经在用所述抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗后缓解后复发,或已经认为所述受试者对用所述抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗是难治的;

(v) 在开始施用所述TEC家族激酶的抑制剂和开始施用所述包含T细胞的组合物时,所述受试者已经在用所述抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗后进展,任选地,其中所述受试者表现出进行性疾病,作为对所述既往治疗的最佳应答或对所述既往治疗的既往应答后的进展;和/或

(vi) 在开始施用所述TEC家族激酶的抑制剂和开始施用所述包含T细胞的组合物时,所述受试者在用所述抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗持续至少6个月后表现出低于

完全应答(CR)的应答。

46. 权利要求45的方法,其中所述细胞群是或包含B细胞群和/或不包含T细胞。

47. 权利要求11-14和权利要求45-46任一项的方法,其中在编码BTK的核酸中的突变包含在位置C481处的替代,任选是C481S或C481R,和/或在位置T474处的替代,任选是T474I或T474M。

48. 权利要求11-47任一项的方法,其中所述T细胞识别或靶向选自下列的抗原: ROR1、B细胞成熟抗原(BCMA)、tEGFR、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、间皮素、CEA和乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD3、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3或4、erbB二聚体、EGFR vIII、FBP、FCRL5、FCRH5、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、 κ 轻链、Lewis Y、L1-细胞粘附分子(L1-CAM)、黑色素瘤相关抗原(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、黑色素瘤优先表达的抗原(PRAME)、生存素、EGP2、EGP40、TAG72、B7-H6、IL-13受体 α 2(IL-13Ra2)、CA9、GD3、HMW-MAA、CD171、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2 NY-ESO-1、PSCA、叶酸受体-a、CD44v6、CD44v7/8、avb6整合素、8H9、NCAM、VEGF受体、5T4、胎儿AChR、NKG2D配体、CD44v6、双抗原和与通用标签相关联的抗原、癌症-睾丸抗原、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、G蛋白偶联的受体5D(GPCR5D)、瘤胚共同抗原、ROR1、TAG72、VEGF-R2、瘤胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、Her2/neu、雌激素受体、黄体酮受体、肝配蛋白B2、CD123、c-Met、GD-2、O-乙酰化GD2(OGD2)、CE7、肾母细胞瘤1(WT-1)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、CCL-1、CD138、和病原体特异性抗原。

49. 权利要求1-48任一项的方法,其中:

所述抑制剂抑制一种或多种酪氨酸激酶,每种酪氨酸激酶单独地选自下组: 布鲁顿氏酪氨酸激酶(Btk)、IL2可诱导的T胞激酶(ITK)、在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶(TEC)、在染色体X上的酪氨酸激酶骨髓激酶(BMX)和T细胞X染色体激酶(TXK; 静息淋巴细胞激酶,RLK); 和/或

所述TEC家族激酶包含一种或多种选自下组的TEC家族激酶: 布鲁顿氏酪氨酸激酶(Btk)、IL2可诱导的T细胞激酶(ITK)、在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶(TEC)、在染色体X上的酪氨酸激酶骨髓激酶(BMX)和T细胞X染色体激酶(TXK; 静息淋巴细胞激酶,RLK); 和/或

所述TEC家族激酶是或包含Btk。

50. 权利要求1-49任一项的方法,其中所述抑制剂抑制ITK或以小于或小于约1000nM、900nM、800nM、600nM、500nM、400nM、300nM、200nM、100nM或更低的半数最大抑制浓度(IC₅₀)抑制ITK。

51. 权利要求1-50任一项的方法,其中:

所述TEC家族激酶不由所述癌症的细胞表达,通常不在或不疑似在衍生所述癌症的细胞中表达,和/或

所述癌症对所述抑制剂不敏感; 和/或

至少多个所述T细胞表达所述TEC家族激酶; 和/或

所述TEC家族激酶在T细胞中表达; 和/或

所述TEC家族激酶通常不在T细胞中表达。

52. 权利要求1-51任一项的方法,其中所述抑制剂是小分子、肽、蛋白、抗体或其抗原结

合片段、抗体模拟物、适配体或核酸分子。

53. 权利要求49-52任一项的方法,其中所述抑制剂不可逆地降低或消除所述酪氨酸激酶的激活、特异性结合所述酪氨酸激酶的活性位点中的结合位点,所述结合位点包含对应于SEQ ID NO:18中所示的序列中的残基C481的氨基酸残基,和/或降低或消除所述酪氨酸激酶的自磷酸化活性。

54. 权利要求1-53任一项的方法,其中所述抑制剂是依鲁替尼。

55. 权利要求1-54任一项的方法,其中所述抑制剂与所述包含所述T细胞的组合物同时施用或在开始施用所述包含所述T细胞的组合物后施用。

56. 权利要求1-55任一项的方法,其中所述抑制剂在开始施用所述T细胞后施用。

57. 权利要求55或权利要求56的方法,其中所述抑制剂在开始施用所述T细胞的1小时、2小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时或1周内,或约1小时、2小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时或1周内施用。

58. 权利要求55-57任一项的方法,其中所述抑制剂在下列时间施用:

相较于在开始施用所述T细胞后的在前时间点时的受试者中的细胞数量,在来自所述受试者的血液中可检测的T细胞疗法的细胞的数目降低;

在血液中可检测的T细胞疗法的细胞的数目少于或少于约在开始施用所述T细胞后的受试者的血液中可检测的T细胞疗法的细胞的峰值或最大数目的1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、50倍或100倍或更低;和/或

在所述受试者的血液中可检测到所述T细胞疗法的细胞的峰值或最大水平后的某时,在来自所述受试者的血液中可检测的所述T细胞的或衍生自所述T细胞的细胞数目少于所述受试者的血液中的总外周血单核细胞(PBMC)的10%以下、5%以下、1%以下或0.1%以下。

59. 权利要求58的方法,其中所述增加或降低是增加或降低了大于或大于约1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍或更多。

60. 权利要求1-59任一项的方法,其中在开始施用所述T细胞后,所述抑制剂施用持续最多达2天、最多达7天、最多达14天、最多达21天、最多达30天或一个月、最多达60天或两个月、最多达90天或三个月、最多达6个月或最多达1年的一段时间。

61. 权利要求1-60任一项的方法,其中在开始施用所述T细胞后,所述抑制剂施用最多达3个月或最多达90天。

62. 权利要求1-61任一项的方法,其中从至少在开始施用所述T细胞后起,所述抑制剂的施用是连续的,直至:

相较于正好在施用所述抑制剂之前的在前时间点的受试者中的细胞数目或相较于施用所述T细胞疗法后的在前时间点,在来自所述受试者的血液中可检测的施用的T细胞的或衍生自施用的T细胞的细胞数目是增加的;

在血液中可检测的所述T细胞的或衍生自所述T细胞的细胞数目在2.0倍(更大或更少)的在开始施用所述T细胞后的受试者的血液中观察到的峰值或最大数目内;

在来自所述受试者的血液中可检测的所述T细胞的细胞数目大于或大于约10%、15%、20%、30%、40%、50%或60%的所述受试者的血液中的总外周血单核细胞(PBMC);和/或

相较于紧接施用所述T细胞之前时或紧接施用所述抑制剂之前时的肿瘤负荷,所述受

试者表现出肿瘤负荷的减少;和/或

所述受试者表现出完全缓解或临床缓解。

63. 权利要求1-62任一项的方法,其中所述抑制剂口服、皮下或静脉内施用。

64. 权利要求63的方法,其中所述抑制剂口服施用。

65. 权利要求1-64任一项的方法,其中所述抑制剂每日六次、每日五次、每日四次、每日三次、每日两次、每日一次、每隔一日、一周三次或一周至少一次地施用。

66. 权利要求65的方法,其中所述抑制剂每日一次或一天两次地施用。

67. 权利要求1-66任一项的方法,其中所述抑制剂以至少或至少约50mg/天、100mg/天、150mg/天、175mg/天、200mg/天、250mg/天、280mg/天、300mg/天、350mg/天、400mg/天、420mg/天、450mg/天、500mg/天、600mg/天、700mg/天、800mg/天或更多的总每日剂量施用。

68. 权利要求67的方法,其中所述抑制剂以至少或至少约或约或420mg/天的总每日剂量施用。

69. 权利要求1-67任一项的方法,其中所述抑制剂以少于或约少于或约或420mg每天的数量,任选地以至少或至少约280mg/天的量施用。

70. 权利要求1-69任一项的方法,其中所述T细胞疗法包含为CD4⁺或CD8⁺的T细胞。

71. 权利要求1-70任一项的方法,其中所述T细胞疗法包含对于所述受试者是自体的细胞。

72. 权利要求1-71任一项的方法,其中所述T细胞疗法包含对于所述受试者是同种异体的T细胞。

73. 权利要求1-72任一项的方法,其中所述T细胞疗法包括施用包含一定数目的细胞的剂量,所述细胞数目介于或介于约 5×10^5 个细胞/kg所述受试者的体重和 1×10^7 个细胞/kg之间、 0.5×10^6 个细胞/kg和 5×10^6 个细胞/kg之间、介于或介于约 0.5×10^6 个细胞/kg和 3×10^6 个细胞/kg之间、介于或介于约 0.5×10^6 个细胞/kg和 2×10^6 个细胞/kg之间、介于或介于约 0.5×10^6 个细胞/kg和 1×10^6 个细胞/kg之间、介于或介于约 1.0×10^6 个细胞/kg所述受试者的体重和 5×10^6 个细胞/kg之间、介于或介于约 1.0×10^6 个细胞/kg和 3×10^6 个细胞/kg之间、介于或介于约 1.0×10^6 个细胞/kg和 2×10^6 个细胞/kg之间、介于或介于约 2.0×10^6 个细胞/kg所述受试者的体重和 5×10^6 个细胞/kg之间、介于或介于约 2.0×10^6 个细胞/kg和 3×10^6 个细胞/kg之间,或者介于或介于约 3.0×10^6 个细胞/kg所述受试者的体重和 5×10^6 个细胞/kg之间,每个数值包括在内。

74. 权利要求1-72任一项的方法,其中所述T细胞疗法包括施用一定剂量的细胞,所述剂量包含少于或少于约或约或 1×10^8 个总表达重组受体的细胞,任选CAR⁺细胞,总T细胞或总外周血单核细胞(PBMC),诸如少于或约少于或约或 5×10^7 、少于或少于约或约或 2.5×10^7 、少于或少于约或约或 1.0×10^7 、少于或少于约或约或 5.0×10^6 、少于或少于约或约或 1.0×10^6 、少于或少于约或约或 5.0×10^5 、或者少于或少于约或约或 1×10^5 个总表达重组受体的细胞,任选CAR⁺细胞、总T细胞、或总外周血单核细胞(PBMC)。

75. 权利要求1-72和74任一项的方法,其中所述T细胞疗法包括施用一定剂量的细胞,所述剂量包含 1×10^5 至 1×10^8 个总表达重组受体的细胞,此数值包括在内,任选CAR⁺细胞、总T细胞、或总外周血单核细胞(PBMC),诸如 1×10^5 至 5×10^7 、 1×10^5 至 2.5×10^7 、 1×10^5 至 1.0×10^7 、 1×10^5 至 5.0×10^6 、 1×10^5 至 1.0×10^6 、 1.0×10^5 至 5.0×10^5 、 5.0×10^5 至 5×10^7 、

5×10^5 至 2.5×10^7 、 5×10^5 至 1.0×10^7 、 5×10^5 至 5.0×10^6 、 5×10^5 至 1.0×10^6 、 1.0×10^6 至 5×10^7 、 1×10^6 至 2.5×10^7 、 1×10^6 至 1.0×10^7 、 1×10^6 至 5.0×10^6 、 5.0×10^6 至 5×10^7 、 5×10^6 至 2.5×10^7 、 5×10^6 至 1.0×10^7 、 1.0×10^7 至 5×10^7 、 1×10^7 至 2.5×10^7 或 2.5×10^7 至 5×10^7 个总表达重组受体的细胞,每个数值包括在内,任选CAR+细胞、总T细胞、或总外周血单核细胞(PBMC)。

76. 权利要求1-75任一项的方法,其中所述细胞的剂量包含明确比例的表达重组受体的CD4⁺细胞与表达重组受体的CD8⁺细胞和/或明确比例的CD4⁺细胞与CD8⁺细胞,所述比例任选地为大约1:1或介于大约1:3和大约3:1之间。

77. 权利要求1-76任一项的方法,其中施用的细胞的剂量少于其中在不施用所述抑制剂的情况下施用所述T细胞疗法的方法中的剂量。

78. 权利要求77的方法,其中所述剂量至少1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍或10倍。

79. 权利要求1-78任一项的方法,其中所述T细胞以单剂量施用,所述单剂量任选是包含所述细胞的单个药物组合物。

80. 权利要求1-79任一项的方法,其中所述T细胞作为分剂量施用,其中在不多于三天的时间内单剂量的细胞以多个组合物施用,所述多个组合物共同包含所述剂量的所述细胞,和/或所述方法进一步包括施用一个或多个额外剂量的所述T细胞。

81. 权利要求1-80任一项的方法,其中所述方法进一步包括在施用所述T细胞之前施用淋巴细胞清除性化学疗法,和/或其中在施用所述T细胞之前,所述受试者已经接受淋巴细胞清除性化学疗法。

82. 权利要求81的方法,其中所述淋巴细胞清除性化学疗法包括向所述受试者施用氟达拉滨和/或环磷酰胺。

83. 权利要求82的方法,其中所述淋巴细胞清除性疗法包括以约200-400mg/m²任选地以或约300mg/m²施用环磷酰胺,所述数值包括在内,和/或以约20-40mg/m²任选地以30mg/m²施用氟达拉滨,每种每日施用,持续2-4天,任选地持续3天。

84. 权利要求82或权利要求83的方法,其中所述淋巴细胞清除性疗法包括以或约300mg/m²施用环磷酰胺和以约30mg/m²施用氟达拉滨,每种每日施用,持续3天。

85. 权利要求1-84任一项的方法,所述方法进一步包括:

向所述受试者施用免疫调节剂,其中所述细胞的施用和所述免疫调节剂的施用同时地、分开地或以单个组合物、或依次地以任一顺序地进行。

86. 权利要求85的方法,其中所述免疫调节剂能够抑制或阻断分子的功能,或涉及所述分子的信号传导途径,其中所述分子是免疫抑制性分子和/或其中所述分子是免疫检查点分子。

87. 权利要求86的方法,其中所述免疫检查点分子或途径选自:PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、LAG-3、TIM3、VISTA、腺苷2A受体(A2AR)或腺苷,或涉及任何前述的途径。

88. 权利要求85-87任一项的方法,其中所述免疫调节剂是或包含抗体,其任选是抗体片段、单链抗体、多特异性抗体或免疫缀合物。

89. 权利要求88的方法,其中:

所述抗体特异性结合所述免疫检查点分子或其配体或受体;和/或

所述抗体能够阻断或削弱所述免疫检查点分子和其配体或受体之间的相互作用。

90. 权利要求1-89任一项的方法,其中相较于在不存在所述抑制剂的情况下将所述T细胞疗法施用至所述受试者的方法,所述T细胞疗法在所述受试者中表现出增强的或延长的扩增和/或持久性。

91. 权利要求1-89任一项的方法,其中相较于在不存在所述抑制剂的情况下将所述T细胞疗法施用至所述受试者的可比较的方法中观察到的降低,所述方法在更大程度上和/或持续更长时期降低肿瘤负荷。

92. 一种组合,其包含:

表达重组受体的基因工程化T细胞,所述重组受体结合除B细胞抗原之外的或除选自由CD19、CD20、CD22和ROR1组成的组的B细胞抗原之外的抗原,和
TEC家族激酶的抑制剂。

93. 权利要求92的组合,其中所述抗原选自下列之中:Her2、L1-CAM、间皮素、CEA、乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3或4、erbB二聚体、EGFR vIII、FBP、FCRL5、FCRH5、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、Lewis Y、L1-细胞粘附分子(L1-CAM)、黑色素瘤相关抗原(MAGEMAGE-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、黑色素瘤优先表达的抗原(PRAME)、生存素、EGP2、EGP40、TAG72、B7-H6、IL-13受体a2(IL-13Ra2)、CA9、GD3、HMW-MAA、CD171、G250/CAIX、HLA-AIMAGE A1、HLA-A2 NY-ESO-1、PSCA、叶酸受体-a、CD44v6、CD44v7/8、avb6整合素、8H9、NCAM、VEGF受体、5T4、胎儿AchR、NKG2D配体、CD44v6、双抗原和与通用标签相关联的抗原、癌症-睾丸抗原、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、G蛋白偶联的受体5D(GPCR5D)、瘤胚共同抗原、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、雌激素受体、黄体酮受体、肝配蛋白B2、CD123、c-Met、GD-2 O-乙酰化GD2(OGD2)、CE7、肾母细胞瘤1(WT-1)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、CCL-1、CD138,和病原体特异性抗原。

94. 权利要求92或权利要求93的组合,其中所述抗原是病原体特异性抗原,所述病原体特异性抗原是病毒抗原、细菌抗原或寄生虫抗原。

95. 权利要求92-94任一项的组合,其中所述重组受体是转基因T细胞受体(TCR)或功能性非T细胞受体。

96. 权利要求92-95任一项的组合,其中所述重组受体是嵌合受体,其任选是嵌合抗原受体(CAR)。

97. 权利要求92-96任一项的组合,其中所述重组受体包含特异性结合所述抗原的细胞外抗原识别结构域和包含ITAM的细胞内信号传导结构域。

98. 权利要求97任一项的组合,其中所述细胞内信号传导结构域包含CD3- ζ (CD3 ζ)链的细胞内结构域。

99. 权利要求97或权利要求98的组合,其中所述重组受体还包含共刺激信号传导区。

100. 权利要求99的组合,其中所述共刺激信号传导区包含CD28或4-1BB的信号传导结构域。

101. 权利要求99或权利要求100的组合,其中所述共刺激结构域是CD28的结构域。

102. 权利要求79-88任一项的组合,其中:

所述抑制剂抑制一种或多种酪氨酸激酶,每种酪氨酸激酶单独地选自下组:布鲁顿氏酪氨酸激酶(Btk)、IL2可诱导的T细胞激酶(ITK)、在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶(TEC)、

在染色体X上的酪氨酸激酶骨髓激酶 (BMX) 和T细胞X染色体激酶 (TXK; 静息淋巴细胞激酶, RLK); 和/或

所述TEC家族激酶包含一种或多种TEC家族激酶, 所述TEC家族激酶选自下组: 布鲁顿氏酪氨酸激酶 (Btk)、IL2可诱导的T细胞激酶 (ITK)、在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶 (TEC)、在染色体X上的酪氨酸激酶骨髓激酶 (BMX) 和T细胞X染色体激酶 (TXK; 静息淋巴细胞激酶, RLK); 和/或

所述TEC家族激酶是或包含Btk。

103. 权利要求92-102任一项的组合, 其中:

所述TEC家族激酶不由所述癌症的细胞表达, 通常不在或不疑似在衍生所述癌症的细胞中表达, 和/或

所述癌症对所述抑制剂不敏感; 和/或

至少多个所述T细胞表达所述TEC家族激酶; 和/或

所述TEC家族激酶在T细胞中表达; 和/或

所述TEC家族激酶通常不在T细胞中表达。

104. 权利要求92-103任一项的组合, 其中所述抑制剂是小分子、肽、蛋白、抗体或其抗原结合片段、抗体模拟物、适配体或核酸分子。

105. 权利要求92-104任一项的组合, 其中所述抑制剂不可逆地降低或消除所述酪氨酸激酶的激活, 特异性结合所述酪氨酸激酶的活性位点中的结合位点, 所述结合位点包含对应于SEQ ID NO:18中所示的序列中的残基C481, 和/或降低或消除所述酪氨酸激酶的自磷酸化活性。

106. 权利要求92-105任一项的组合, 其中所述抑制剂是依鲁替尼。

107. 权利要求92-106任一项的组合, 所述组合配制成同一组合物。

108. 权利要求92-107任一项的组合, 所述组合配制成分开的组合物。

109. 一种试剂盒, 其包含权利要求92-108任一项的组合和用于向所述受试者施用所述基因工程化细胞和所述TEC家族激酶的抑制剂用于治疗癌症的说明书。

110. 一种试剂盒, 其包含:

组合物, 所述组合物包含治疗有效量的表达重组受体的基因工程化T细胞, 所述重组受体结合除B细胞抗原之外的或除选自由CD19、CD20、CD22和ROR1组成的组的B细胞抗原之外的抗原; 和

用于向受试者施用在与TEC家族激酶抑制剂组合疗法中的所述基因工程化细胞用于治疗癌症的说明书。

111. 一种试剂盒, 其包含:

组合物, 所述组合物包含治疗有效量的TEC家族激酶的抑制剂; 和

用于向受试者施用在与TEC家族激酶抑制剂组合疗法中的所述基因工程化细胞用于治疗癌症的说明书, 所述T细胞表达重组受体, 所述重组受体结合除B细胞抗原之外的或除选自由CD19、CD20、CD22和ROR1组成的组的B细胞抗原之外的抗原。

112. 权利要求109-111任一项的试剂盒, 其中所述癌症不是表达B细胞抗原的癌症, 是非血液癌症, 不是B细胞恶性肿瘤, 不是B细胞白血病, 或是实体肿瘤。

113. 权利要求109-112任一项的试剂盒, 其中所述癌症是肉瘤、癌、淋巴瘤、白血病或骨

髓瘤,任选地,其中所述癌症是非霍奇金淋巴瘤(NHL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、CLL、SLL、ALL或AML。

114. 权利要求109-113任一项的试剂盒,其中所述癌症是胰腺癌、膀胱癌、结直肠癌,乳腺癌、前列腺癌、肾癌、肝细胞癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、胰腺癌、直肠癌、甲状腺癌、子宫癌、胃癌、食管癌、头颈癌、黑色素瘤、神经内分泌癌、CNS癌、脑肿瘤、骨癌或软组织肉瘤。

115. 权利要求109-114任一项的试剂盒,其中所述说明书规定所述施用是针对受试者,其中:

(i) 所述受试者和/或所述癌症(a)对布鲁顿氏酪氨酸激酶(BTK)的抑制有抗性和/或(b)包含对通过所述抑制剂的抑制有抗性的细胞群;

(ii) 所述受试者和/或所述癌症包含编码BTK的核酸中的突变,任选地,其中所述突变能够降低或阻止通过所述抑制剂和/或通过依鲁替尼的BTK的抑制,任选地,其中所述突变是C481S;

(iii) 所述受试者和/或所述癌症包含编码磷脂酶C γ 2 (PLC γ 2)的核酸中的突变,任选地,其中所述突变导致组成性信号传导活性,任选地,其中所述突变是R665W或L845F;

(iv) 在开始施用所述包含T细胞的组合物和开始施用所述TEC家族激酶的抑制剂时,所述受试者已经在用所述抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗后缓解后复发,或已经认为所述受试者对用所述抑制剂和/或对于用BTK抑制剂疗法的既往治疗是难治的;

(v) 在开始施用所述包含T细胞的组合物和开始施用所述TEC家族激酶的抑制剂时,所述受试者已经在用所述抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗进展,任选地,其中所述受试者表现出进行性疾病,作为对所述既往治疗的最佳应答或对所述既往治疗的既往应答后的进展;和/或

(vi) 在开始施用所述TEC家族激酶的抑制剂和开始施用所述包含T细胞的组合物时,所述受试者在用所述抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗持续至少6个月后表现出低于完全应答(CR)的应答。

116. 一种试剂盒,其包含:

组合物,所述组合物包含治疗有效量的TEC家族激酶的抑制剂;和

用于向受试者施用在与基因工程化T细胞组合疗法中的所述TEC家族激酶的抑制剂用于治疗癌症的说明书,所述基因工程化T细胞特异性识别或特异性结合与所述癌症相关的、或在所述癌症的细胞上表达或存在的抗原和/或由特异性靶向所述癌症且已经或待施用至所述受试者的治疗剂包含的标签,其中所述说明书规定:

(i) 所述受试者和/或所述癌症(a)对布鲁顿氏酪氨酸激酶(BTK)有抗性和/或(b)包含对通过所述抑制剂的抑制有抗性的细胞群;

(ii) 所述受试者和/或所述癌症包含编码BTK的核酸中的突变,任选地,其中所述突变能够降低或阻止通过所述抑制剂和/或通过依鲁替尼的BTK的抑制,任选地,其中所述突变是C481S;

(iii) 所述受试者和/或所述癌症包含编码磷脂酶C γ 2 (PLC γ 2)的核酸中的突变,任选地,其中所述突变导致组成性信号传导活性,任选地,其中所述突变是R665W或L845F;

(iv) 在开始施用所述包含T细胞的组合物和开始施用所述TEC家族激酶的抑制剂时,所述受试者已经在用所述抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗后缓解后复发,或已经认

为所述受试者对用所述抑制剂和/或对于用BTK抑制剂疗法的既往治疗是难治的；

(v) 在开始施用所述包含T细胞的组合物和开始施用所述TEC家族激酶的抑制剂时，所述受试者已经在用所述抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗后续展，任选地，其中所述受试者表现出进行性疾病，作为对所述既往治疗的最佳应答或对所述既往治疗的既往应答后的进展；和/或

(vi) 在开始施用所述TEC家族激酶的抑制剂和开始施用所述包含T细胞的组合物时，所述受试者在用所述抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗持续至少6个月后表现出低于完全应答 (CR) 的应答。

117. 一种试剂盒，其包含：

组合物，所述组合物包含治疗有效量的基因工程化T细胞，所述基因工程化T细胞特异性识别或特异性结合与所述癌症相关的、或在所述癌症的细胞上表达或存在的抗原和/或由特异性靶向所述癌症且已经或待施用至所述受试者的治疗剂包含的标签；和

用于向受试者施用在与TEC家族激酶抑制剂组合疗法中的所述基因工程化细胞用于治疗癌症的说明书，其中所述说明书规定：

(i) 所述受试者和/或所述癌症 (a) 对布鲁顿氏酪氨酸激酶 (BTK) 有抗性和/或 (b) 包含对通过所述抑制剂的抑制有抗性的细胞群；

(ii) 所述受试者和/或所述癌症包含编码BTK的核酸中的突变，任选地，其中所述突变能够降低或阻止通过所述抑制剂和/或通过依鲁替尼的BTK的抑制，任选地，其中所述突变是C481S；

(iii) 所述受试者和/或所述癌症包含编码磷脂酶C γ 2 (PLC γ 2) 的核酸中的突变，任选地，其中所述突变导致组成性信号传导活性，任选地，其中所述突变是R665W或L845F；

(iv) 在开始施用所述包含T细胞的组合物和开始施用所述TEC家族激酶的抑制剂时，所述受试者已经在用所述抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗后缓解后复发，或认为所述受试者对用所述抑制剂和/或对于用BTK抑制剂疗法的既往治疗是难治的；

(v) 在开始施用所述包含T细胞的组合物和开始施用所述TEC家族激酶的抑制剂时，所述受试者已经在用所述抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗后续展，任选地，其中所述受试者表现出进行性疾病，作为对所述既往治疗的最佳应答或对所述既往治疗的既往应答后的进展；和/或

(vi) 在开始施用所述TEC家族激酶的抑制剂和开始施用所述包含T细胞的组合物时，所述受试者在用所述抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗持续至少6个月后表现出低于完全应答 (CR) 的应答。

118. 权利要求115-117任一项的试剂盒，其中所述细胞群是或包含B细胞群和/或不包含T细胞。

119. 权利要求116-118任一项的试剂盒，其中所述癌症是B细胞恶性肿瘤。

120. 权利要求119的方法，其中所述B细胞恶性肿瘤是白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。

121. 权利要求119或权利要求120的方法，其中所述B细胞恶性肿瘤是急性成淋巴细胞白血病 (ALL)、成人ALL、慢性成淋巴细胞白血病 (CLL)、小淋巴细胞性白血病 (SLL)、非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL) 或急性髓样白血病 (AML)。

122. 权利要求119-121任一项的方法，其中所述B细胞恶性肿瘤是CLL或SLL。

123. 权利要求116-122任一项的方法,其中所述T细胞识别或靶向选自B细胞成熟抗原(BCMA)、CD19、CD20、CD22和ROR1的抗原。

124. 权利要求116-123任一项的方法,其中所述说明书规定所述施用是针对具有B细胞恶性肿瘤的受试者,所述B细胞恶性肿瘤是或经鉴定具有:

(i) 一种或多种细胞遗传异常,任选至少两种或三种细胞遗传异常,任选地,其中至少一种细胞遗传异常是17p缺失;

(ii) TP53突变;和/或

(iii) 未突变的免疫球蛋白重链可变区(IGHV)。

125. 权利要求116-124任一项的方法,其中所述说明书规定所述施用是针对受试者,所述受试者已经用一种或多种用于治疗B细胞恶性肿瘤的在先疗法治疗失败,已经在用一种或多种用于治疗B细胞恶性肿瘤的在先疗法治疗后缓解后复发,或已经变得对一种或多种用于治疗B细胞恶性肿瘤的在先疗法是难治的,所述一种或多种在先疗法任选是除了另一剂量的表达所述重组受体的细胞之外的一种、两种或三种在先疗法,任选地,其中至少一种在先疗法是用所述抑制剂或BTK抑制剂疗法的既往治疗。

126. 权利要求116-125任一项的方法,其中所述既往治疗是用依鲁替尼的既往治疗。

127. 权利要求115或权利要求118的试剂盒,其中在编码BTK的核酸中的突变包含在位置C481处的替代,任选是C481S或C481R,和/或在位置T474处的替代,任选是T474I或T474M。

128. 权利要求110-127任一项的试剂盒,其中所述抗原选自下列之中:Her2、L1-CAM、间皮素、CEA、乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3或4、erbB二聚体、EGFR vIII、FBP、FCRL5、FCRH5、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、Lewis Y、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、黑色素瘤相关抗原(MAGEMAGE-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、黑色素瘤优先表达的抗原(PRAME)、生存素、EGP2、EGP40、TAG72、B7-H6、IL-13受体a2(IL-13Ra2)、CA9、GD3、HMW-MAA、CD171、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2 NY-ESO-1、PSCA、叶酸受体-a、CD44v6、CD44v7/8、avb6整合素、8H9、NCAM、VEGF受体、5T4、胎儿AchR、NKG2D配体、CD44v6、双抗原和与通用标签相关联的抗原、癌症-睾丸抗原、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、G蛋白偶联的受体5D(GPCR5D)、瘤胚共同抗原、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、雌激素受体、黄体酮受体、肝配蛋白B2、CD123、c-Met、GD-2 O-乙酰化GD2(OGD2)、CE7、肾母细胞瘤1(WT-1)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、CCL-1、CD138和病原体特异性抗原。

129. 权利要求110-128任一项的试剂盒,其中所述抗原是病原体特异性抗原,所述病原体特异性抗原是病毒抗原、细菌抗原或寄生虫抗原。

130. 权利要求110-129任一项的试剂盒,其中所述重组受体是转基因T细胞受体(TCR)或功能性非T细胞受体。

131. 权利要求110-130任一项的试剂盒,其中所述重组受体是嵌合受体,其任选是嵌合抗原受体(CAR)。

132. 权利要求110-131任一项的试剂盒,其中所述重组受体包含特异性结合所述抗原的细胞外抗原识别结构域和包含ITAM的细胞内信号传导结构域。

133. 权利要求132的试剂盒,其中所述细胞内信号传导结构域包含CD3- ζ (CD3 ζ)链的细胞内结构域。

134. 权利要求132或权利要求133的试剂盒,其中所述重组受体还包含共刺激信号传导区。

135. 权利要求134的试剂盒,其中所述共刺激信号传导区包含CD28或4-1BB的信号传导结构域。

136. 权利要求134或权利要求135的试剂盒,其中所述共刺激结构域是CD28的结构域。

137. 权利要求110-136任一项的试剂盒,其中:

所述抑制剂抑制一种或多种酪氨酸激酶,每种酪氨酸激酶单独地选自下组:布鲁顿氏酪氨酸激酶(Btk)、IL2可诱导的T胞激酶(ITK)、在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶(TEC)、在染色体X上的酪氨酸激酶骨髓激酶(BMX)和T细胞X染色体激酶(TXK;静息淋巴细胞激酶,RLK);和/或

所述TEC家族激酶包含一种或多种TEC家族激酶,所述TEC家族激酶选自:布鲁顿氏酪氨酸激酶(Btk)、IL2可诱导的T细胞激酶(ITK)、在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶(TEC)、在染色体X上的酪氨酸激酶骨髓激酶(BMX)和T细胞X染色体激酶(TXK;静息淋巴细胞激酶,RLK);和/或

所述TEC家族激酶是或包含Btk。

138. 权利要求110-137任一项的试剂盒,其中:

所述TEC家族激酶不由所述癌症的细胞表达,通常不在或不疑似在衍生所述癌症的细胞中表达,和/或

所述癌症对所述抑制剂不敏感;和/或

至少多个所述T细胞表达所述TEC家族激酶;和/或

所述TEC家族激酶在T细胞中表达;和/或

所述TEC家族激酶通常不在T细胞中表达。

139. 权利要求110-138任一项的试剂盒,其中所述抑制剂是小分子、肽、蛋白、抗体或其抗原结合片段、抗体模拟物、适配体或核酸分子。

140. 权利要求110-139任一项的试剂盒,其中所述抑制剂不可逆地降低或消除所述酪氨酸激酶的激活、特异性结合所述酪氨酸激酶的活性位点中的结合位点,所述结合位点包含对应于SEQ ID NO:18中所示的序列中的残基C481的氨基酸残基,和/或降低或消除所述酪氨酸激酶的自磷酸化活性。

141. 权利要求110-140任一项的试剂盒,其中所述抑制剂是依鲁替尼。

142. 权利要求110-141任一项的试剂盒,其中所述说明书规定与所述包含T细胞的组合物同时施用或在开始施用所述包含T细胞的组合物后施用。

143. 权利要求110-142任一项的试剂盒,其中所述说明书规定在开始施用所述T细胞后施用所述抑制剂。

144. 权利要求142或权利要求143的试剂盒,其中所述说明书规定在开始施用所述T细胞的1小时、2小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时或1周内,或约1小时、2小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时或1周内施用所述抑制剂。

145. 权利要求142-144任一项的试剂盒,其中所述说明书规定在下列时间施用所述抑制剂,其中:

相较于在开始施用所述T细胞后的在前时间点时的受试者中的细胞数量,在来自所述

受试者的血液中可检测的T细胞疗法的细胞的数目降低；

在血液中可检测的T细胞疗法的细胞的数目少于或约在开始施用所述T细胞后的受试者的血液中可检测的T细胞疗法的细胞的峰值或最大数目的1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、50倍或100倍或更低；和/或

在所述受试者的血液中可检测到所述T细胞疗法的细胞的峰值或最大水平后的某时，在来自所述受试者的血液中可检测的所述T细胞的或衍生自所述T细胞的细胞数目少于所述受试者的血液中的总外周血单核细胞(PBMC)的10%以下、5%以下、1%以下或0.1%以下。

146. 权利要求145的试剂盒，其中所述增加或降低是增加或降低了大于或大于约1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍或更多。

147. 权利要求109-146任一项的试剂盒，其中所述说明书用于在开始施用所述T细胞后，施用所述抑制剂持续最多达2天、最多达7天、最多达14天、最多达21天、最多达一个月或30天、最多达两个月或60天、最多达三个月或90天、最多达6个月或最多达1年的一段时间。

148. 权利要求109-147任一项的试剂盒，其中所述说明书规定在开始施用所述T细胞后，施用所述抑制剂最多达或持续至少3个月或90天。

149. 权利要求109-148任一项的试剂盒，其中所述说明书规定从至少开始施用所述T细胞后起，施用所述抑制剂，直至：

相较于正好在施用所述抑制剂之前的在前时间点的受试者中的细胞数目或相较于施用所述T细胞疗法后的在前时间点，在来自所述受试者的血液中可检测的施用的T细胞的或衍生自施用的T细胞的细胞数目是增加的；

在血液中可检测的所述T细胞的或衍生自所述T细胞的细胞数目在2.0倍(更大或更少)的在开始施用所述T细胞后的受试者的血液中观察到的峰值或最大数目内；

在来自所述受试者的血液中可检测的所述T细胞的细胞数目大于或大于约10%、15%、20%、30%、40%、50%或60%的所述受试者的血液中的总外周血单核细胞(PBMC)；和/或

相较于紧接施用所述T细胞之前时或紧接施用所述抑制剂之前时的肿瘤负荷，所述受试者表现出肿瘤负荷的减少；和/或

所述受试者表现出完全缓解或临床缓解。

150. 权利要求109-149任一项的试剂盒，其中所述说明书规定口服、皮下或静脉内施用所述抑制剂。

151. 权利要求150的试剂盒，其中所述说明书规定口服施用所述抑制剂。

152. 权利要求109-151任一项的试剂盒，其中所述说明书规定每日六次、每日五次、每日四次、每日三次、每日两次、每日一次、每隔一日、一周三次或一周至少一次地施用所述抑制剂。

153. 权利要求152的试剂盒，其中所述说明书规定每日一次或一天两次地施用所述抑制剂。

154. 权利要求109-153任一项的试剂盒，其中所述说明书规定以至少或至少约50mg/天、100mg/天、150mg/天、175mg/天、200mg/天、250mg/天、280mg/天、300mg/天、350mg/天、400mg/天、420mg/天、450mg/天、500mg/天、600mg/天、700mg/天、800mg/天或更多的总每日剂量施用所述抑制剂。

155. 权利要求109-153任一项的试剂盒,其中所述说明书规定以至少或约至少或约或420mg/天的每日剂量施用所述抑制剂。

156. 权利要求109-154任一项的试剂盒,其中所述说明书规定以少于或约少于或约或420mg每天的量,任选地以至少或至少约或约或280mg每天的量施用所述抑制剂。

157. 权利要求109-156任一项的试剂盒,其中所述基因工程化T细胞包含是CD4⁺或CD8⁺的T细胞。

158. 权利要求109-157任一项的试剂盒,其中所述基因工程化T细胞包含对于所述受试者是自体的细胞。

159. 权利要求109-158任一项的试剂盒,其中所述基因工程化T细胞包含对于所述受试者是同种异体的T细胞。

160. 权利要求109-159任一项的试剂盒,其中所述说明书规定以包含一定数目的细胞的剂量施用基因工程化T细胞,所述细胞的数目介于或介于约 5×10^5 细胞/kg所述受试者的体重和 1×10^7 细胞/kg之间、 0.5×10^6 细胞/kg和 5×10^6 细胞/kg之间、介于或介于约 0.5×10^6 细胞/kg和 3×10^6 细胞/kg之间、介于或介于约 0.5×10^6 细胞/kg和 2×10^6 细胞/kg之间、介于或介于约 0.5×10^6 细胞/kg和 1×10^6 cell/kg、介于或介于约 1.0×10^6 细胞/kg所述受试者的体重和 5×10^6 细胞/kg之间、介于或介于约 1.0×10^6 细胞/kg和 3×10^6 细胞/kg之间、介于或介于约 1.0×10^6 细胞/kg和 2×10^6 细胞/kg之间、介于或介于约 2.0×10^6 细胞/kg所述受试者的体重和 5×10^6 细胞/kg之间、介于或介于约 2.0×10^6 细胞/kg和 3×10^6 细胞/kg之间、或介于或介于约 3.0×10^6 细胞/kg所述受试者的体重和 5×10^6 细胞/kg之间,包括每个数值。

161. 权利要求109-159任一项的试剂盒,其中所述说明书规定施用一定剂量的基因工程化T细胞,所述剂量包含少于或少于约或约或 1×10^8 个总表达重组受体的细胞,任选CAR⁺细胞、总T细胞或总外周血单核细胞(PBMC),诸如少于或约少于或约或 5×10^7 、少于或少于约或约或 2.5×10^7 、少于或少于约或约或 1.0×10^7 ,少于或少于约或约或 5.0×10^6 、少于或少于约或约或 1.0×10^6 、少于或少于约或约或 5.0×10^5 、或少于或少于约或约或 1×10^5 个总表达重组受体的细胞,任选CAR⁺细胞、总T细胞或总外周血单核细胞(PBMC)。

162. 权利要求109-159和161任一项的试剂盒,其中所述说明书规定以一定剂量施用基因工程化T细胞,所述剂量包含 1×10^5 至 1×10^8 个总表达重组受体的细胞,包括此数值,任选CAR⁺细胞、总T细胞或总外周血单核细胞(PBMC),诸如 1×10^5 至 5×10^7 、 1×10^5 至 2.5×10^7 、 1×10^5 至 1.0×10^7 、 1×10^5 至 5.0×10^6 、 1×10^5 至 1.0×10^6 、 1.0×10^5 至 5.0×10^5 、 5.0×10^5 至 5×10^7 、 5×10^5 至 2.5×10^7 、 5×10^5 至 1.0×10^7 、 5×10^5 至 5.0×10^6 、 5×10^5 至 1.0×10^6 、 1.0×10^6 至 5×10^7 、 1×10^6 至 2.5×10^7 、 1×10^6 至 1.0×10^7 、 1×10^6 至 5.0×10^6 、 5.0×10^6 至 5×10^7 、 5×10^6 至 2.5×10^7 、 5×10^6 至 1.0×10^7 、 1.0×10^7 至 5×10^7 、 1×10^7 至 2.5×10^7 或 2.5×10^7 至 5×10^7 个总表达重组受体的细胞,包括每个数值,任选CAR⁺细胞、总T细胞、或总外周血单核细胞(PBMC)。

163. 权利要求109-162任一项的试剂盒,其中所述说明书规定所述细胞剂量包含明确比例的表达重组受体的CD4⁺细胞与表达重组受体的CD8⁺细胞和/或明确比例的CD4⁺细胞与CD8⁺细胞,所述比例任选地为大约1:1或介于大约1:3和大约3:1之间。

164. 权利要求109-163任一项的试剂盒,其中所述说明书规定施用一定剂量的细胞,所述剂量少于在不施用所述抑制剂的情况下施用所述T细胞疗法中的剂量。

165. 权利要求164的试剂盒,其中所述剂量至少1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍或10倍。

166. 权利要求109-165任一项的试剂盒,其中所述说明书规定以单剂量施用所述T细胞,所述单剂量任选是包含所述细胞的单个药物组合物。

167. 权利要求109-166任一项的试剂盒,其中所述说明书规定作为分剂量施用所述T细胞,其中在不多于三天的时间内单剂量的细胞以多个组合物施用,所述多个组合物共同包含所述剂量的所述细胞,和/或所述说明书进一步规定施用一个或多个额外剂量的所述T细胞。

168. 权利要求109-167任一项的试剂盒,其中所述说明书进一步规定在施用所述T细胞之前施用淋巴细胞清除性化学疗法,和/或其中规定所述施用是针对在施用所述T细胞之前已经接受淋巴细胞清除性化学疗法的受试者。

169. 权利要求168的试剂盒,其中所述淋巴细胞清除性化学疗法包括向所述受试者施用氟达拉滨和/或环磷酰胺。

170. 权利要求168或权利要求169的试剂盒,其中所述淋巴细胞清除性疗法包括以约200-400mg/m²任选地以或约300mg/m²施用环磷酰胺,包括所述数值,和/或以约20-40mg/m²任选地以30mg/m²施用氟达拉滨,每种每日施用,持续2-4天,任选地持续3天。

171. 权利要求168-170任一项的试剂盒,其中所述淋巴细胞清除性疗法包括以或以约300mg/m²施用环磷酰胺和以约30mg/m²施用氟达拉滨,每种每日施用,持续3天。

172. 权利要求109-171任一项的试剂盒,其中所述说明书进一步规定向所述受试者施用免疫调节剂,其中所述细胞的施用和所述免疫调节剂的施用同时地、分开地或以单个组合物、或依次地以任一顺序地进行。

173. 权利要求172的试剂盒,其中所述免疫调节剂能够抑制或阻断分子的功能,或涉及所述分子的信号传导途径,其中所述分子是免疫抑制性分子和/或其中所述分子是免疫检查点分子。

174. 权利要求173的试剂盒,其中所述免疫检查点分子或途径选自下组:PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、LAG-3、TIM3、VISTA、腺苷2A受体(A2AR)、或腺苷,或涉及任何前述的途径。

175. 权利要求172-174任一项的试剂盒,其中所述免疫调节剂是或包含抗体,所述抗体任选是抗体片段、单链抗体、多特异性抗体或免疫缀合物。

176. 权利要求175的试剂盒,其中:

所述抗体特异性结合所述免疫检查点分子或其配体或受体;和/或

所述抗体能够阻断或削弱所述免疫检查点分子和其配体或受体之间的相互作用。

177. 权利要求176的试剂盒,其中所述组合物经配制用于单剂量施用。

178. 权利要求176的试剂盒,其中所述组合物经配制用于多剂量施用。

179. 一种工程化表达重组受体的免疫细胞的方法,所述方法包括:

使包含T细胞的细胞群与TEC家族激酶的抑制剂接触;和

在使得所述重组受体表达的条件下将编码重组受体的核酸引入至所述T细胞群。

180. 权利要求179的方法,其中所述重组受体结合配体,所述配体任选是抗原或通用标签。

181. 权利要求179或权利要求180的方法,其中所述重组受体是T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)。

182. 权利要求179-181任一项的方法,其中所述细胞群是或包含外周血单核细胞。

183. 权利要求179-182任一项的方法,其中所述细胞群是或包含T细胞。

184. 权利要求183的方法,其中所述T细胞是CD4⁺和/或CD8⁺。

185. 权利要求179-184任一项的方法,其中所述细胞群从受试者任选人受试者中分离。

186. 权利要求179-185任一项的方法,其中所述接触在所述引入之前或期间发生。

187. 一种产生基因工程化T细胞的方法,其包括将编码重组受体的核酸分子引入至原代T细胞,其中所述T细胞来自已经施用TEC家族激酶的抑制剂的受试者中。

188. 权利要求187的方法,其中所述受试者已经在引入所述核酸分子之前不多于30天、20天、10天、9天、8天、7天、6天、5天、4天、3天、2天、或1天施用所述抑制剂。

189. 权利要求187或权利要求188的方法,其中:

所述抑制剂抑制一种或多种酪氨酸激酶,每种酪氨酸激酶单独地选自下组:布鲁顿氏酪氨酸激酶(Btk)、IL2可诱导的T细胞激酶(ITK)、在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶(TEC)、在染色体X上的酪氨酸激酶骨髓激酶(BMX)和T细胞X染色体激酶(TXK;静息淋巴细胞激酶,RLK);和/或

所述TEC家族激酶包含一种或多种选自下组的TEC家族激酶:布鲁顿氏酪氨酸激酶(Btk)、IL2可诱导的T细胞激酶(ITK)、在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶(TEC)、在染色体X上的酪氨酸激酶骨髓激酶(BMX)和T细胞X染色体激酶(TXK;静息淋巴细胞激酶,RLK);和/或

所述TEC家族激酶是或包含Btk。

190. 权利要求187-189任一项的方法,其中:

所述TEC家族激酶不由所述癌症的细胞表达,不在或不疑似在衍生所述癌症的细胞中表达,和/或

所述癌症对所述抑制剂不敏感;和/或

至少多个所述T细胞表达所述TEC家族激酶;和/或

所述TEC家族激酶在T细胞中表达;和/或

所述TEC家族激酶通常不在T细胞中表达。

191. 权利要求187-190任一项的方法,其中所述抑制剂是小分子、肽、蛋白、抗体或其抗原结合片段、抗体模拟物、适配体或核酸分子。

192. 权利要求187-191任一项的方法,其中所述抑制剂不可逆地降低或消除所述酪氨酸激酶的激活、特异性结合所述酪氨酸激酶的活性位点中的结合位点,所述结合位点包含对应于SEQ ID NO:18中所示的序列中的残基C481的氨基酸残基,和/或降低或消除所述酪氨酸激酶的自磷酸化活性。

193. 权利要求187-192任一项的方法,其中所述抑制剂是依鲁替尼。

194. 权利要求187-193任一项的方法,其中所述抑制剂口服、皮下或静脉内施用。

195. 权利要求194的方法,其中所述抑制剂口服施用。

196. 权利要求187-195任一项的方法,其中所述抑制剂每日六次、每日五次、每日四次、每日三次、每日两次、每日一次、每隔一日、一周三次或一周至少一次地施用。

197. 权利要求196的方法,其中所述抑制剂每日一次或每天两次地施用。

198. 权利要求187-197任一项的方法,其中所述抑制剂以至少或至少约50mg/天、100mg/天、150mg/天、175mg/天、200mg/天、250mg/天、300mg/天、350mg/天、400mg/天、

450mg/天、500mg/天、600mg/天、700mg/天、800mg/天或更多的总每日剂量施用。

199. 权利要求187-198任一项的方法, 其中所述抑制剂以少于或约少于或约或420mg每天的量施用。

200. 权利要求187-199任一项的方法, 其中所述T细胞包含CD4+或CD8+细胞。

T细胞疗法和BTK抑制剂的组合疗法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 此申请要求2016年11月3日提交的标题为“Combination Therapy of a T Cell Therapy and a BTK Inhibitor”的美国临时申请号62/417,312、2016年12月3日提交的标题为“Combination Therapy of a T Cell Therapy and a BTK Inhibitor”的美国临时申请号No.62/429,735和2017年10月19日提交的标题为“Combination Therapy of a T Cell Therapy and a BTK Inhibitor”的美国临时申请号No.62/574,706的优先权,所述每个美国临时申请的内容通过提述以其整体并入。

[0003] 通过提述并入序列表

[0004] 本申请连同电子形式的序列表一起提交。以标题为735042005240SeqList.TXT的文件提供该序列表,其创建于2017年10月24日,其大小为25,608个字节。电子形式的序列表中的信息通过提述以其整体并入。

技术领域

[0005] 在一些方面,本公开涉及包括免疫疗法(诸如过继性细胞疗法,例如T细胞疗法)和TEK家族激酶(诸如BTK或ITK)的抑制剂的方法、组合物和用途。所提供的方法、组合物和用途包括用于组合疗法的方法、组合物和用途,该组合疗法涉及一种或多种此类抑制剂连同另一药剂(诸如靶向T细胞的免疫治疗剂(诸如治疗性抗体,例如多特异性(例如啮合T细胞的)抗体)和/或基因工程化T细胞(诸如表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞))的施用或使用。还提供了制造工程化细胞、细胞、组合物的方法,施用至受试者的方法、供在这些方法中使用的核酸、制品和试剂盒。在一些方面,这些方法和细胞的特征提供用于过继性细胞疗法的T细胞的增强或提高的活性、功效、持久性、扩增和/或增殖或由免疫治疗剂募集的内源性T细胞的增强或提高的活性、功效、持久性、扩增和/或增殖。

背景技术

[0006] 各种策略可用于免疫疗法,例如施用工程化T细胞用于过继性疗法。例如,策略可用于工程化表达基因工程化抗原受体(诸如CAR)的T细胞和将含有此类细胞的组合物施用至受试者。提供了满足此类需要的方法、细胞、组合物、试剂盒和系统。

[0007] 概述

[0008] 本文提供了与施用免疫疗法或免疫治疗剂相关联的增强或调节T细胞的增殖和/或活性的方法,所述免疫疗法或免疫治疗剂诸如包含用于过继性细胞疗法的细胞的组合物,所述过继性细胞疗法例如诸如T细胞疗法(例如表达CAR的T细胞)或能够募集一种或多种T细胞或其他免疫细胞的啮合T细胞的治疗剂(诸如双特异性或多特异性药剂或抗体)。在一些实施方案中,该方法一般涉及施用该免疫疗法或免疫治疗剂与TEC家族激酶的抑制剂的组合疗法,所述免疫疗法或免疫治疗剂诸如包含用于过继性细胞疗法的细胞(例如诸如T细胞疗法(例如表达CAR的T细胞)或啮合T细胞的治疗剂)和(诸如Btk抑制剂(例如依鲁替尼))的组合物。

[0009] 本文提供了治疗的方法,该方法涉及(1)向患有癌症的受试者施用T细胞,所述T细胞特异性识别或特异性结合与该癌症相关的或在该癌症的细胞上表达或存在的抗原和/或由特异性靶向该癌症且已经或待施用至该受试者的治疗剂包含的标签;和(2)向该受试者施用TEC家族激酶的抑制剂,其中该癌症不是B细胞恶性肿瘤,不是B细胞白血病或淋巴瘤,是非血液癌或是实体肿瘤;和/或该抗原不是B细胞抗原;和/或该抗原不是选自由CD19、CD20、CD22和ROR1组成的组的B细胞抗原。

[0010] 在一些方面中,提供了治疗的方法,该方法涉及向患有癌症的受试者施用T细胞,所述T细胞特异性识别或特异性结合与该癌症相关的或在该癌症的细胞上表达或存在的抗原和/或由特异性靶向该癌症且已经或待施用至该受试者的治疗剂包含的标签,所述受试者已经施用TEC家族激酶的抑制剂,其中:该癌症不是B细胞恶性肿瘤,不是B细胞白血病或淋巴瘤,是非血液癌或是实体肿瘤;和/或该抗原不是B细胞抗原;和/或该抗原不是选自由CD19、CD20、CD22和ROR1组成的组的B细胞抗原。

[0011] 在一些方面中,提供了治疗的方法,该方法涉及对向患有癌症的受试者施用TEC家族激酶的抑制剂,所述受试者已经施用了T细胞,该T细胞特异性识别或特异性结合与该疾病或病况相关的或在该疾病或病况的细胞上表达或存在的抗原和/或由特异性靶向该癌症且已经或待施用至该受试者的治疗剂包含的标签,其中该癌症不是B细胞恶性肿瘤,不是B细胞白血病或淋巴瘤,是非血液癌或是实体肿瘤;和/或该抗原不是B细胞抗原;和/或该抗原不是选自由CD19、CD20、CD22和ROR1组成的组的B细胞抗原。

[0012] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该抗原不是选自由CD19、CD20、CD22和ROR1组成的组的B细胞抗原;和/或该癌症不表达选自由CD19、CD20、CD22和ROR1组成的组的B细胞抗原和/或 κ 轻链。

[0013] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该癌症不表达CD19,由该细胞特异性识别的或靶向的抗原不是CD19,和/或该T细胞不包含特异性结合CD19的重组受体和/或该T细胞包含嵌合抗原受体(CAR),该嵌合抗原受体不包含抗CD19抗原结合结构域。

[0014] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,由该细胞特异性识别或靶向的抗原选自下列之中:Her2、L1-CAM、间皮素、CEA、乙型肝炎表面抗原,抗叶酸受体、CD23、CD24、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3或4、erbB二聚体、EGFR vIII、FBP、FCRL5、FCRH5、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、Lewis Y、L1-细胞粘附分子(L1-CAM)、黑色素瘤相关抗原(MAGEMAGE-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、黑色素瘤优先表达的抗原(PRAME)、生存素、EGP2、EGP40、TAG72、B7-H6、IL-13受体 α 2(IL-13Ra2)、CA9、GD3、HMW-MAA、CD171、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2NY-ESO-1、PSCA、叶酸受体- α 、CD44v6、CD44v7/8、avb6整合素、8H9、NCAM、VEGF受体、5T4、胎儿AChR、NKG2D配体、CD44v6、双抗原和与通用标签相关联的抗原、癌症-睾丸抗原、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、G蛋白偶联的受体5D(GPCR5D)、瘤胚共同抗原、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、雌激素受体、黄体酮受体、肝配蛋白B2、CD123、c-Met、GD-20-乙酰化GD2(OGD2)、CE7、肾母细胞瘤1(WT-1)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、CCL-1、CD138和病原体特异性抗原。

[0015] 在一些方面中,提供了治疗的方法,该方法涉及:(1)向患有癌症受试者施用T细胞,该T细胞特异性识别或特异性结合与该癌症相关联的抗原,该抗原选自B细胞成熟抗原

(BCMA)、Her2、L1-CAM、间皮素、CEA、乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3或4、erbB二聚体、EGFR vIII、FBP、FCRL5、FCRH5、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、 κ 轻链、Lewis Y、L1-细胞粘附分子、(L1-CAM)、黑色素瘤相关抗原(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、黑色素瘤优先表达的抗原(PRAME)、生存素、EGP2、EGP40、TAG72、B7-H6、IL-13受体a2(IL-13Ra2)、CA9、GD3、HMW-MAA、CD171、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2NY-ESO-1、PSCA、叶酸受体-a、CD44v6、CD44v7/8、avb6整合素、8H9、NCAM、VEGF受体、5T4、胎儿AChR、NKG2D配体、CD44v6、双抗原和与通用标签相关联的抗原、癌症-睾丸抗原、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、G蛋白偶联的受体5D(GPCR5D)、瘤胚共同抗原、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、雌激素受体、黄体酮受体、肝配蛋白B2、CD123、c-Met、GD-2、0-乙酰化GD2(OGD2)、CE7、肾母细胞瘤1(WT-1)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、CCL-1、CD138和病原体特异性抗原；和(2)向该受试者施用TEC家族激酶的抑制剂。

[0016] 在一些方面中，提供了治疗的方法，该方法涉及向患有癌症的受试者施用特异性识别或特异性结合与该癌症相关联的抗原的T细胞，该抗原选自B细胞成熟抗原(BCMA)、Her2、L1-CAM、间皮素、CEA、乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3或4、erbB二聚体、EGFR vIII、FBP、FCRL5、FCRH5、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、 κ 轻链、Lewis Y、L1-细胞粘附分子(L1-CAM)、黑色素瘤相关抗原(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、黑色素瘤优先表达的抗原(PRAME)、生存素、EGP2、EGP40、TAG72、B7-H6、IL-13受体a2(IL-13Ra2)、CA9、GD3、HMW-MAA、CD171、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2NY-ESO-1、PSCA、叶酸受体-a、CD44v6、CD44v7/8、avb6整合素、8H9、NCAM、VEGF受体、5T4、胎儿AChR、NKG2D配体、CD44v6、双抗原和与通用标签相关联的抗原、癌症-睾丸抗原、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、G蛋白偶联的受体5D(GPCR5D)、瘤胚共同抗原、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、雌激素受体、黄体酮受体、肝配蛋白B2、CD123、c-Met、GD-2、0-乙酰化GD2(OGD2)、CE7、肾母细胞瘤1(WT-1)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、CCL-1、CD138和病原体特异性抗原，其中该受试者已经施用TEC家族激酶的抑制剂。

[0017] 在一些方面中，提供了治疗的方法，该方法涉及向患有癌症的受试者施用TEC家族激酶的抑制剂，所述受试者已经施用特异性识别或特异性结合与该癌症相关联的抗原的T细胞，该抗原选自B细胞成熟抗原(BCMA)、Her2、L1-CAM、间皮素、CEA、乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3或4、erbB二聚体、EGFR vIII、FBP、FCRL5、FCRH5、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、 κ 轻链、Lewis Y、L1-细胞粘附分子、(L1-CAM)、黑色素瘤相关抗原(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、黑色素瘤优先表达的抗原(PRAME)、生存素、EGP2、EGP40、TAG72、B7-H6、IL-13受体a2(IL-13Ra2)、CA9、GD3、HMW-MAA、CD171、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2NY-ESO-1、PSCA、folate受体-a、CD44v6、CD44v7/8、avb6整合素、8H9、NCAM、VEGF受体、5T4、胎儿AChR、NKG2D配体、CD44v6、双抗原和与通用标签相关联的抗原，癌症-睾丸抗原、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、G蛋白偶联的受体5D(GPCR5D)、瘤胚共同抗原、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、雌激

素受体、黄体酮受体、肝配蛋白B2、CD123、c-Met、GD-2,0-乙酰化GD2 (OGD2)、CE7、肾母细胞瘤1 (WT-1)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、CCL-1、CD138和病原体特异性抗原。

[0018] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该抗原是病原体特异性抗原,该病原体特异性抗原是病毒抗原、细菌抗原或寄生虫抗原。

[0019] 在一些方面中,提供了治疗的方法,该方法涉及(1)向患有癌症的受试者施用组合物,该组合物包含T细胞,该T细胞特异性识别或特异性结合与该癌症相关联的或在该癌症的细胞上表达或存在的抗原和/或由特异性靶向该癌症且已经或待施用至该受试者的治疗剂包含的标签;和(2)向该受试者施用TEC家族激酶的抑制剂。在一些实施方案中,(i)该受试者和/或该癌症(a)对布鲁顿氏酪氨酸激酶(BTK)的抑制有抗性和/或(b)包含对通过该抑制剂的抑制有抗性的细胞群;(ii)该受试者和/或该癌症包含编码BTK的核酸中的突变,任选地,其中该突变能够降低或阻止通过该抑制剂和/或通过依鲁替尼抑制BTK,任选地,其中该突变是C481S;(iii)该受试者和/或该癌症包含编码磷脂酶C γ 2 (PLC γ 2)的核酸中的突变,任选地,其中该突变导致组成性信号传导活性,任选地,其中该突变是R665W或L845F;(iv)在(1)中开始施用和在(2)中开始施用,该受试者已经在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法治疗后缓解后又复发,或认为该受试者对用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗是难治的;(v)在(1)中开始施用和在(2)中开始施用,该受试者已经在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗进展,任选地,其中该受试者表现出进行性疾病,作为对该既往治疗的最佳应答或对该既往治疗的既往应答后的进展;和/或(vi)在(1)中开始施用和在(2)中开始施用,该受试者在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗持续至少6个月后表现出低于完全应答(CR)的应答。

[0020] 在一些方面中,提供了治疗的方法,该方法涉及向患有癌症的受试者施用组合物,该组合物包含T细胞,该T细胞特异性识别或特异性结合与该癌症相关联的或在该癌症的细胞上表达或存在的抗原和/或由特异性靶向该癌症且已经或待施用至该受试者的治疗剂包含的标签,所述受试者已经施用TEC家族激酶的抑制剂用于在与施用包含T细胞的组合物的组合疗法中使用,其中:(i)该受试者和/或该癌症(a)对布鲁顿氏酪氨酸激酶(BTK)的抑制有抗性和/或(b)包含对通过该抑制剂的抑制有抗性的细胞群;(ii)该受试者和/或该癌症包含编码BTK的核酸中的突变,该突变能够降低或阻止通过该抑制剂和/或通过依鲁替尼的BTK的抑制,任选地,其中该突变是C481S;(iii)该受试者和/或该癌症包含编码磷脂酶C γ 2 (PLC γ 2)的核酸中的突变,任选地,其中该突变导致组成性信号传导活性,任选地,其中该突变是R665W或L845F;(iv)在开始施用TEC家族激酶的抑制剂和开始施用包含T细胞的组合物时,该受试者已经在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗后缓解后又复发,或已经认为该受试者对用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗是难治的;(v)在开始施用TEC家族激酶的抑制剂和开始施用包含T细胞的组合物时,该受试者在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗后已经进展,任选地,其中该受试者表现出进行性疾病,作为对该既往治疗的最佳应答或对该既往治疗的既往应答后的进展;和/或(vi)在开始施用TEC家族激酶的抑制剂和开始施用包含T细胞的组合物时,该受试者在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗持续至少6个月后表现出低于完全应答(CR)的应答。

[0021] 在一些方面中,提供了治疗的方法,该方法涉及向患有癌症的受试者施用TEC家族激酶的抑制剂,所述受试者已经施用组合物,该组合物包含T细胞,该T细胞特异性识别或特

异性结合与该癌症相关联的或与在该癌症的细胞上表达或存在的抗原和/或由特异性靶向该癌症且已经或待施用至该受试者的治疗剂包含的标签,其中:(i) 该受试者和/或该癌症(a) 对布鲁顿氏酪氨酸激酶(BTK)的抑制有抗性和/或(b) 包含对通过该抑制剂的抑制有抗性的细胞群;(ii) 该受试者和/或该癌症包含编码BTK的核酸中的突变,任选地,其中该突变能够降低或阻止通过该抑制剂和/或通过依鲁替尼的BTK的抑制,任选地,其中该突变是C481S;(iii) 该受试者和/或该癌症包含编码磷脂酶C γ 2 (PLC γ 2)的核酸中的突变,任选地,其中该突变导致组成性信号传导活性,任选地,其中该突变是R665W或L845F;(iv) 在开始施用包含T细胞的组合物和开始施用TEC家族激酶的抑制剂时,该受试者已经在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗后缓解后又复发,或已经认为该受试者对用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗是难治的;(v) 在开始施用包含T细胞的组合物和开始施用TEC家族激酶的抑制剂时,该受试者已经在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗进展,任选地,其中该受试者表现出进行性疾病,作为对该既往治疗的最佳应答或对该既往治疗的既往应答后的进展;和/或(vi) 在开始施用包含T细胞的组合物和开始施用TEC家族激酶的抑制剂时,该受试者在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗持续至少6个月后表现出低于完全应答(CR)的应答。

[0022] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该细胞群是或包含B细胞群和/或不包含T细胞。

[0023] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该T细胞包含肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)或包含表达特异性结合该抗原的重组受体的基因工程化T细胞。在一些实施方案中,该T细胞包含表达特异性结合该抗原的重组受体的基因工程化T细胞,该受体任选为嵌合抗原受体。

[0024] 在一些方面中,提供了治疗的方法,该方法涉及(1) 向患有癌症的受试者施用组合物,该组合物包含T细胞,该T细胞对于该受试者是自体的且表达重组受体,该重组受体特异性结合与该癌症相关联的抗原和/或由特异性靶向该癌症且已经或待施用至该受试者的治疗剂包含的标签;和(2) 向该受试者施用TEC家族激酶的抑制剂,其中,在多轮的抗原特异性刺激后的体外试验中,相较于T细胞的参考群或者参考或阈水平,该T细胞和/或来自该受试者的未经工程化以表达该重组受体的自体T细胞显示或已经观察到显示降低水平的指示T细胞功能、健康或活性的因子。

[0025] 在一些方面中,提供了治疗的方法,该方法涉及向患有癌症的受试者施用组合物,该组合物包含T细胞,该T细胞对该受试者是自体的且表达重组受体,该重组受体特异性结合与该癌症相关联的抗原和/或由特异性靶向该癌症且已经或待施用至该受试者的治疗剂包含的标签,所述受试者已经施用TEC家族激酶的抑制剂,其中,在多轮抗原特异性刺激后的体外试验中,相较于T细胞的参考群或参考或阈水平,该T细胞和/或来自该受试者的未经工程化以表达该重组受体的自体T细胞显示或已经观察到显示降低水平的指示T细胞功能、健康或活性的因子。

[0026] 在一些方面中,提供了治疗的方法,该方法涉及向患有癌症的受试者施用TEC家族激酶的抑制剂,所述受试者已经施用T细胞,该T细胞对于该受试者是自体的且表达重组受体,该重组受体特异性结合与该癌症相关联的抗原和/或由特异性靶向该癌症且已经或待施用至该受试者的治疗剂包含的标签,其中,在多轮抗原特异性刺激后的体外试验中,相较

于T细胞的参考群或参考或阈水平,该T细胞和/或来自该受试者的未经工程化以表达该重组受体的自体T细胞显示或已经观察到显示降低水平的指示T细胞功能、健康或活性的因子。

[0027] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该T细胞的参考群是来自不患有或不疑似患有该癌症的受试者的血液的T细胞群;该参考或阈值是在体外试验中以相同方式测定的对来自不患有或不疑似患有该癌症的受试者的血液的T细胞群观察到的平均值;或该参考或阈值是在体外试验中以相同方式测定的对来自其他患有该癌症的受试者的T细胞群观察到的平均值。

[0028] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该因子是或包括细胞扩增、细胞存活、抗原特异性细胞毒性和/或细胞因子分泌的程度。

[0029] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,在相同的试验中,当在单轮刺激和/或少于该多轮的若干轮刺激后评估时,相较于该参考群或水平,该因子的水平未降低。

[0030] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该多轮刺激包含至少3、4或5轮和/或在至少10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25天的时间内进行。

[0031] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该重组受体是转基因T细胞受体 (TCR) 或功能性非T细胞受体。

[0032] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该重组受体是嵌合受体,其任选是嵌合抗原受体 (CAR)。

[0033] 在一些方面中,提供了治疗的方法,该方法涉及:(1)向患有癌症的受试者施用组合物,该组合物包含表达嵌合受体的细胞,该嵌合受体任选是嵌合抗原受体 (CAR),其中该受体特异性结合与该癌症相关联的非CD19、CD20、CD22或ROR1的抗原和/或特异性结合由特异性靶向该癌症且已经或待施用至该受试者的治疗剂包含的标签;和(2)向该受试者施用TEC家族激酶的抑制剂。

[0034] 在一些方面中,提供了治疗的方法,该方法涉及向患有癌症的受试者施用组合物,该组合物包含表达嵌合受体的细胞,该嵌合受体任选是嵌合抗原受体 (CAR),其中该受体特异性结合与该癌症相关联的非CD19、CD20、CD22或ROR1的抗原和/或特异性结合由特异性靶向该癌症且已经或待施用至该受试者的治疗剂包含的标签,所述受试者已经施用TEC家族激酶的抑制剂。

[0035] 在一些方面中,提供了治疗的方法,该方法涉及向患有癌症的受试者施用TEC家族激酶的抑制剂,所述受试者已经施用组合物,该组合物包含表达嵌合受体的细胞,该嵌合受体任选是嵌合抗原受体 (CAR),其中该受体特异性结合与该癌症相关联的非CD19、CD20、CD22或ROR1的抗原和/或特异性结合由特异性靶向该癌症且已经或待施用至该受试者的治疗剂包含的标签。

[0036] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该嵌合抗原受体 (CAR) 包含特异性结合该抗原的细胞外抗原识别结构域和包含ITAM的细胞内信号传导结构域。

[0037] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含CD3- ζ (CD3 ζ) 链的细胞内结构域。

[0038] 在一些实施方案中,该嵌合抗原受体 (CAR) 进一步包含共刺激信号传导区。

[0039] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该共刺激信号传导区包含CD28或4-1BB的信号传导结构域。

[0040] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该共刺激结构域是CD28的结构域。

[0041] 在一些方面中,提供了治疗的方法,该方法涉及 (1) 向患有癌症的受试者施用组合物,该组合物包含表达嵌合受体的细胞,该嵌合受体任选是嵌合抗原受体,其中该嵌合受体包含包含抗体或其抗原结合片段的细胞外结构域、是或包含人CD28的跨膜部分的跨膜结构域、和包含人4-1BB或人CD28的信号传导域和人CD3 ζ 的信号传导结构域的细胞内信号传导结构域;和 (2) 向该受试者施用TEC家族激酶的抑制剂。

[0042] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该癌症是B细胞恶性肿瘤。在一些实施方案中,该B细胞恶性肿瘤是白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。在一些实施方案中,该B细胞恶性肿瘤是急性成淋巴细胞白血病 (ALL)、成人ALL、慢性成淋巴细胞白血病 (CLL)、小淋巴细胞白血病 (SLL)、非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL) 或急性髓样白血病 (AML)。在一些实施方案中,该B细胞恶性肿瘤是CLL或SLL。

[0043] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,在开始施用包含T细胞的组合物和开始施用TEC家族激酶的抑制剂时或之前,该受试者患有或经鉴定为患有B细胞恶性肿瘤,在该B细胞恶性肿瘤中: (i) 一种或多种细胞遗传异常,任选至少两种或三种细胞遗传异常,任选地,其中至少一种细胞遗传异常是17p缺失; (ii) TP53突变;和/或 (iii) 未突变的免疫球蛋白重链可变区 (IGHV)。在一些实施方案中,在开始施用包含T细胞的组合物和开始施用TEC家族激酶的抑制剂时或之前,该受试者已经用一种或多种用于治疗B细胞恶性肿瘤的在先疗法治疗失败,已经在用一种或多种用于治疗B细胞恶性肿瘤的在先疗法治疗后缓解后又复发,或已经变得对一种或多种用于治疗B细胞恶性肿瘤的在先疗法是难治的,任选是除了另一剂量的表达该重组受体的细胞之外的一种、两种或三种在先疗法,任选地,其中至少一种在先疗法是用该抑制剂或BTK抑制剂疗法的既往治疗。在一些实施方案中,该既往治疗是用依鲁替尼的既往治疗。

[0044] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该癌症不是表达B细胞抗原的癌症,是非血液癌,不是B细胞恶性肿瘤,不是B细胞白血病,或是实体肿瘤。

[0045] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该癌症是肉瘤、癌、淋巴瘤、白血病或骨髓瘤,任选地,其中该癌症是非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL)、CLL、SLL、ALL或AML。

[0046] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该癌症是胰腺癌、膀胱癌、结直肠癌、乳腺癌、前列腺癌、肾癌、肝细胞癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、胰腺癌、直肠癌、甲状腺癌、子宫癌、胃癌、食管癌、头颈癌、黑色素瘤、神经内分泌癌、CNS癌、脑肿瘤、骨癌或软组织肉瘤。

[0047] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中, (i) 该受试者和/或该癌症 (a) 对布鲁顿氏酪氨酸激酶 (BTK) 的抑制有抗性和/或 (b) 包含对通过该抑制剂的抑制有抗性的细胞群; (ii) 该受试者和/或该癌症包含编码BTK的核酸中的突变,任选地,其中该突变能够降低或阻止通过该抑制剂和/或通过依鲁替尼的BTK的抑制,任选地,其中该突变是

C481S; (iii) 该受试者和/或该癌症包含编码磷脂酶C γ 2 (PLC γ 2) 的核酸中的突变, 任选地, 其中该突变导致组成性信号传导活性, 任选地, 其中该突变是R665W或L845F; (iv) 在开始施用TEC家族激酶的抑制剂和开始施用包含T细胞的组合物时, 该受试者已经在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗后缓解后又复发, 或已经认为该受试者对用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗是难治的; (v) 在开始施用TEC家族激酶的抑制剂和开始施用该包含T细胞的组合物时, 该受试者已经在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗进展, 任选地, 其中该受试者表现出进行性疾病, 作为对该既往治疗的最佳应答或对该既往治疗的既往应答后的进展; 和/或 (vi) 在开始施用TEC家族激酶的抑制剂和开始施用包含T细胞的组合物时, 该受试者在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗持续至少6个月后表现出低于完全应答 (CR) 的应答。

[0048] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中, 该细胞群是或包含B细胞群和/或不包含T细胞。

[0049] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中, 编码BTK的核酸中的突变包含在位置C481处的替代, 任选为C481S或C481R, 和/或在位置T474处的替代, 任选为T474I或T474M。

[0050] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中, 该T细胞识别或靶向选自下列的抗原: ROR1、B细胞成熟抗原 (BCMA)、tEGFR、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、间皮素、CEA、和乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3或4、erbB二聚体、EGFR vIII, FBP、FCRL5、FCRH5, 胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、 κ 轻链、Lewis Y、L1细胞粘附分子、(L1-CAM)、黑色素瘤相关抗原 (MAGE) -A1、MAGE-A3、MAGE-A6、黑色素瘤优先表达的抗原 (PRAME)、生存素、EGP2、EGP40、TAG72、B7-H6、IL-13受体 α 2 (IL-13Ra2)、CA9、GD3、HMW-MAA、CD171、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2NY-ESO-1、PSCA、叶酸受体-a、CD44v6、CD44v7/8、avb6整合素、8H9、NCAM、VEGF受体、5T4、胎儿AChR、NKG2D配体、CD44v6、双抗原、和与通用标签相关联的抗原、癌症-睾丸抗原、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、G蛋白偶联的受体5D (GPCR5D)、瘤胚共同抗原、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、黄体酮受体、肝配蛋白B2、CD123、c-Met、GD-2、A2、CCL-1、CD138和病原体特异性抗原。

[0051] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中, 该抑制剂抑制一种或多种酪氨酸激酶, 每种酪氨酸激酶单独地选自下组: 布鲁顿氏酪氨酸激酶 (Btk)、IL2可诱导的T细胞激酶 (ITK)、在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶 (TEC)、在染色体X上的酪氨酸激酶骨髓激酶 (BMX)、和T细胞X染色体激酶 (TXK; 静息淋巴细胞激酶, RLK); 和/或该TEC家族激酶包含一种或多种选自下组的TEC家族激酶: 布鲁顿氏酪氨酸激酶 (Btk)、IL2IL2可诱导的T细胞激酶 (ITK)、在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶 (TEC)、在染色体X上的酪氨酸激酶骨髓激酶 (BMX)、T细胞X染色体激酶 (TXK; 静息淋巴细胞激酶, RLK); 和/或该TEC家族激酶是或包含Btk。

[0052] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中, 该抑制剂抑制ITK或以小于或小于约1000nM、900nM、800nM、600nM、500nM、400nM、300nM、200nM、100nM或更低的半数最大抑制浓度 (IC50) 抑制ITK。

[0053] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该TEC家族激酶不由该癌症的细胞表达,通常不在或不疑似在衍生该癌症的细胞中表达;和/或该癌症对该抑制剂不敏感;和/或至少多个该T细胞表达该TEC家族激酶;和/或该TEC家族激酶通常不在T细胞中表达。

[0054] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该抑制剂是小分子、肽、蛋白、抗体或其抗原结合片段、抗体模拟物、适配体、或核酸分子。

[0055] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该抑制剂不可逆地降低或消除该酪氨酸激酶的激活,特异性结合该酪氨酸激酶的活性位点中的结合位点,该结合位点包含对应于SEQ ID NO:18中所示的序列中的残基C481的氨基酸残基,和/或降低或消除该酪氨酸激酶的自磷酸化活性。

[0056] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该抑制剂是依鲁替尼。

[0057] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该抑制剂与含有该T细胞的组合物同时施用或在开始施用含有该T细胞的组合物随后施用。在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该抑制剂在开始施用该T细胞随后施用。

[0058] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该抑制剂在开始施用该T细胞的1小时、2小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时或1周内,或约1小时、2小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时或1周内施用。

[0059] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该抑制剂在下列时间施用:相较于在开始施用该T细胞后的在前时间点时的受试者中的细胞数量,在来自该受试者的血液中可检测的T细胞疗法的细胞的数目降低;在血液中可检测的T细胞疗法的细胞的数目少于或少于约在开始施用所述T细胞后的受试者的血液中可检测的T细胞疗法的细胞的峰值或最大数目的1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、50倍或100倍或更低;和/或在该受试者的血液中可检测到该T细胞疗法的细胞的峰值或最大水平后的某时,在来自该受试者的血液中可检测的该T细胞的或衍生自该T细胞的细胞数目少于该受试者的血液中的总外周血单核细胞(PBMC)的10%以下、5%以下、1%以下或0.1%以下。在一些实施方案中,该增加或降低是增加或降低了大于或大于约1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍或更多。

[0060] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,在开始施用该T细胞后,施用该抑制剂(诸如每日施用)持续最长达2天、最长达7天、最长达14天、最长达21天、最长达30天或一个月、最长达60天或两个月、最长达90天或三个月、最长达6个月或最长达1年的一段时间。在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,在开始施用该T细胞后,施用该抑制剂最长达3个月。

[0061] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,从至少在开始施用该T细胞后起,该抑制剂的施用是连续的,直至:相较于正好在施用该抑制剂之前的在前时间点的受试者中的细胞数目或相较于施用该T细胞疗法后的在前时间点,施用的T细胞的或衍生自施用的T细胞的在来自该受试者的血液中可检测的细胞数目是增加的;该T细胞的或衍生自该T细胞的在血液中可检测的细胞数目在2.0倍(更大或更少)的在开始施用该T细胞后的受试者的血液中观察到的峰值或最大数目内;在来自该受试者的血液中该T细胞的可检测的细胞数目大于或大于约10%、15%、20%、30%、40%、50%或60%的该受试者的血液中的总外周血单核细胞(PBMC);和/或相较于紧接施用该T细胞之前时或紧接施用该抑制剂之前时

的肿瘤负荷,该受试者表现出肿瘤负荷的减少;和/或该受试者表现出完全缓解或临床缓解。

[0062] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该抑制剂口服、皮下或静脉内施用。在一些实施方案中,该抑制剂口服施用。在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该抑制剂每日六次、每日五次、每日四次、每日三次、每日两次、每日一次、每隔一日、一周三次或一周至少一次地施用。在一些实施方案中,该抑制剂每日一次或一天两次地施用。

[0063] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该抑制剂以至少或至少约50mg/天、100mg/天、150mg/天、175mg/天、200mg/天、250mg/天、280mg/天、300mg/天、350mg/天、400mg/天、420mg/天、450mg/天、500mg/天、600mg/天、700mg/天、800mg/天或更多的总每日剂量施用。在一些实施方案中,该抑制剂以至少或至少约或约或420mg/天的总每日剂量施用。在一些实施方案中,该抑制剂少于或约少于或约或420mg每天的量施用。在一些实施方案中,该抑制剂以达或约,或至少达或约280mg每天的量施用。在一些实施方案中,该抑制剂以不多于280mg每天的量施用。

[0064] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该T细胞疗法包括T细胞,该T细胞是CD4+或CD8+。在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该T细胞疗法含有细胞,该细胞对该受试者是自体的。在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该T细胞疗法含有T细胞,该T细胞对该受试者是同种异体的。

[0065] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该T细胞疗法包括施用含有一定数目的细胞的剂量,该细胞数目介于或介于约 5×10^5 个细胞/kg该受试者的体重和 1×10^7 个细胞/kg之间、 0.5×10^6 个细胞/kg和 5×10^6 个细胞/kg之间、介于或介于约 0.5×10^6 个细胞/kg和 3×10^6 个细胞/kg之间、介于或介于约 0.5×10^6 个细胞/kg和 2×10^6 个细胞/kg之间、介于或介于约 0.5×10^6 个细胞/kg和 1×10^6 个细胞/kg之间、介于或介于约 1.0×10^6 个细胞/kg该受试者的体重和 5×10^6 个细胞/kg之间、介于或介于约 1.0×10^6 个细胞/kg和 3×10^6 个细胞/kg之间、介于或介于约 1.0×10^6 个细胞/kg和 2×10^6 个细胞/kg之间,介于或介于约 2.0×10^6 个细胞/kg该受试者的体重和 5×10^6 个细胞/kg、介于或介于约 2.0×10^6 个细胞/kg和 3×10^6 个细胞/kg之间,或介于或介于约 3.0×10^6 个细胞/kg该受试者的体重和 5×10^6 个细胞/kg之间,每个数值包括在内。

[0066] 在任何所提供的方法、组合和制品的一些实施方案中,该T细胞疗法包括施用一定剂量的细胞,该细胞剂量包含少于或少于约或约或 1×10^8 个总表达重组受体的细胞,任选是CAR+细胞,总T细胞或总外周血单核细胞(PBMC),诸如少于或约少于或约或 5×10^7 、少于或少于约或约或 2.5×10^7 、少于或少于约或约或 1.0×10^7 、少于或少于约或约或 5.0×10^6 、少于或少于约或约或 1.0×10^6 、少于或少于约或约或 5.0×10^5 ,或少于或少于约或约或 1×10^5 个总表达重组受体的细胞,任选是CAR+细胞、总T细胞或总外周血单核细胞(PBMC)。在一些实施方案中,该T细胞疗法包括施用一定剂量的细胞,该细胞剂量包含 1×10^5 至 1×10^8 个总表达重组受体的细胞,此数值包括在内,任选是CAR+细胞,总T细胞,或总外周血单核细胞(PBMC),诸如 1×10^5 至 5×10^7 、 1×10^5 至 2.5×10^7 、 1×10^5 至 1.0×10^7 、 1×10^5 至 5.0×10^6 、 1×10^5 至 1.0×10^6 、 1.0×10^5 至 5.0×10^5 、 5.0×10^5 至 5×10^7 、 5×10^5 至 2.5×10^7 、 5×10^5 至 1.0×10^7 、 5×10^5 至 5.0×10^6 、 5×10^5 至 1.0×10^6 、 1.0×10^6 至 5×10^7 、 1×10^6 至 2.5×10^7 、 1×10^6 至

1.0×10^7 、 1×10^6 至 5.0×10^6 、 5.0×10^6 至 5×10^7 、 5×10^6 至 2.5×10^7 、 5×10^6 至 1.0×10^7 、 1.0×10^7 至 5×10^7 、 1×10^7 至 2.5×10^7 或 2.5×10^7 至 5×10^7 个总表达重组受体的细胞,每个数值包括在内,任选是CAR+细胞、总T细胞或总外周血单核细胞(PBMC)。

[0067] 在任何所提供的方法、组合和制品的一些实施方案中,该细胞剂量包含明确比例的表达重组受体的CD4+细胞与表达重组受体的CD8+细胞和/或明确比例的CD4+细胞与CD8+细胞,该比例任选地为近似1:1或介于近似1:3和近似3:1之间。

[0068] 在任何所提供的方法、组合和制品的一些实施方案中,施用的细胞剂量少于其中在不施用该抑制剂的情况下施用该T细胞疗法的方法中的剂量。在一些实施方案中,该剂量至少1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍或10倍。

[0069] 在任何所提供的方法、组合和制品的一些实施方案中,该T细胞以单剂量施用,其任选是含有该细胞的单一药物组合物。在其他实施方案中,该T细胞作为分剂量施用,其中在不多于三天的时间内,单剂量的细胞以多个组合物施用,该组合物共同含有该剂量的细胞,和/或该方法进一步包括施用一个或多个额外剂量的该T细胞。

[0070] 在任何所提供的方法、组合和制品的一些实施方案中,该方法进一步包括在施用该T细胞之前施用淋巴细胞清除性化疗,和/或其中该受试者在施用该T细胞之前已经接受淋巴细胞清除性化疗。在一些实施方案中,该淋巴细胞清除性化疗包括向该受试者施用氟达拉滨(fludarabine)和/或环磷酰胺(cyclophosphamide)。在一些实施方案中,该淋巴细胞清除性疗法包括以约200–400mg/m²施用环磷酰胺,任选地以或约300mg/m²,此数值包括在内,和/或以约20–40mg/m²施用氟达拉滨,任选地以30mg/m²,上述每种剂量每日施用,持续2–4天,任选地持续3天。在一些实施方案中,该淋巴细胞清除性疗法包括以或以约300mg/m²施用环磷酰胺和以约30mg/m²施用氟达拉滨,每种每日施用,持续3天。

[0071] 在任何所提供的方法、组合和制品的一些实施方案中,该方法进一步包括:向该受试者施用免疫调节剂,其中该细胞的施用和该免疫调节剂的施用同时地、分开地或以单个组合物、或依次地以任一顺序地进行。

[0072] 在任何所提供的方法、组合和制品的一些实施方案中,该免疫调节剂能够抑制或阻断分子的功能或涉及该分子的信号传导途径,其中该分子是免疫抑制性分子和/或其中该分子是免疫检查点分子。在一些实施方案中,该免疫检查点分子或途径选自下列:PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、LAG-3、TIM3、VISTA、腺苷2A受体(A2AR)或腺苷或者涉及任何前述的途径。在一些实施方案中,该免疫调节剂是或包含抗体,其任选是抗体片段、单链抗体、多特异性抗体或免疫缀合物。在一些实施方案中,该抗体特异性结合免疫检查点分子或其配体或受体;和/或该抗体能够阻断或削弱该免疫检查点分子和其配体或受体之间的相互作用。

[0073] 在任何所提供的方法、组合和制品的一些实施方案中,相较于在不存在该抑制剂的情况下将该T细胞使用至该受试者的方法,该T细胞疗法在该受试者中表现出增强的或延长的扩增和/或持久性。

[0074] 在任何所提供的方法、组合和制品的一些实施方案中,相较于在不存在该抑制剂的情况下将该T细胞疗法施用至该受试者的可比较的方法中观察到的降低,该方法或组合物或制品在更大程度上和/或持续更长时间降低或能够降低肿瘤负荷。

[0075] 本文提供了组合,该组合包括:表达重组受体的基因工程化T细胞和TEC家族激酶

的抑制剂,该重组受体结合除B细胞抗原外的或除选自CD19、CD20、CD22和ROR1的B细胞抗原外的抗原。

[0076] 在所提供的任何组合的一些实施方案中,该抗原选自下列之中:Her2、L1-CAM、间皮素、CEA、乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3或4、erbB二聚体、EGFR vIII、FBP、FCRL5、FCRH5、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、Lewis Y、L1-细胞粘附分子(L1-CAM)、黑色素瘤相关抗原(MAGEMAGE-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、黑色素瘤优先表达的抗原(PRAME)、生存素、EGP2、EGP40、TAG72、B7-H6、IL-13受体 α 2(IL-13Ra2)、CA9、GD3、HMW-MAA、CD171、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2NY-ESO-1、PSCA、叶酸受体-a、CD44v6、CD44v7/8、avb6整合素、8H9、NCAM、VEGF受体、5T4、胎儿AChR、NKG2D配体、CD44v6、双抗原、和与通用标签相关联的抗原、癌症-睾丸抗原、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、G蛋白偶联的受体5D(GPCR5D)、瘤胚共同抗原、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、雌激素受体、黄体酮受体、肝配蛋白B2、CD123、c-Met、GD-20-乙酰化GD2(OGD2)、CE7、肾母细胞瘤1(WT-1)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、CCL-1、CD138和病原体特异性抗原。在一些实施方案中,该抗原是病原体特异性抗原,该病原体特异性抗原是病毒抗原、细菌抗原或寄生虫抗原。

[0077] 在所提供的任何组合的一些实施方案中,该重组受体是转基因T细胞受体(TCR)或功能性非T细胞受体。在一些实施方案中,该重组受体是嵌合受体,其任选是嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,该重组受体含有特异性结合该抗原的细胞外抗原识别结构域和含有ITAM的细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,该细胞内信号传导结构域含有CD3- ζ (CD3 ζ)链的细胞内结构域。在所提供的任何组合的一些实施方案中,该重组受体进一步含有共刺激信号传导区。在一些实施方案中,该共刺激信号传导区含有CD28或4-1BB的信号传导结构域。在一些实施方案中,该共刺激结构域是CD28的结构域。

[0078] 在所提供的任何组合的一些实施方案中,该抑制剂抑制一种或多种酪氨酸激酶,每种酪氨酸激酶单独地选自:布鲁顿氏酪氨酸激酶(Btk)、IL-2可诱导的T细胞激酶(ITK)、在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶(TEC)、在染色体X上的酪氨酸激酶骨髓激酶(BMX)和T细胞X染色体激酶(TXK;静息淋巴细胞激酶,RLK);和/或该TEC家族激酶含有一种或多种选自以下的TEC家族激酶:布鲁顿氏酪氨酸激酶(Btk)、IL2可诱导的T-细胞激酶(ITK)、在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶(TEC)、在染色体X上的酪氨酸激酶骨髓激酶(BMX)和T细胞X染色体激酶(TXK;静息淋巴细胞激酶,RLK);和/或该TEC家族激酶是或包括Btk。

[0079] 在所提供的任何组合的一些实施方案中,该TEC家族激酶不由该癌症的细胞表达,通常不在或不疑似在衍生该癌症的细胞中表达,和/或该癌症对该抑制剂不敏感;和/或至少多个该T细胞表达该TEC家族激酶;和/或该TEC家族激酶在T细胞中表达;和/或该TEC家族激酶通常不在T细胞中表达。

[0080] 在本文所提供的任何组合的一些实施方案中,该抑制剂是小分子、肽、蛋白、抗体或其抗原结合片段、抗体模拟物、或核酸分子。

[0081] 在本文所提供的任何组合的一些实施方案中,该抑制剂不可逆地降低或消除该酪氨酸激酶的激活,特异性结合该酪氨酸激酶的活性位点中的结合位点,该结合位点包含对应于SEQ ID NO:18中所示的序列中的残基C481,和/或降低或消除该酪氨酸激酶的自磷酸

化活性。在本文所提供的任何组合的一些实施方案中,该抑制剂是依鲁替尼。

[0082] 在本文所提供的任何组合的一些实施方案中,该组合配制在同一组合物中。在其它实施方案中,该组合配制在分开的组合物中。

[0083] 本文提供了试剂盒和制品,诸如用于实施任何实施方案的试剂盒和制品,诸如含有本文所提供的任何组合和用于向受试者施用该基因工程化细胞和该抑制剂或TEC家族激酶的抑制剂用于治疗癌症的说明书的试剂盒和制品。

[0084] 本文提供了含有组合物和说明书的试剂盒,该组合物含有治疗有效量的表达重组受体的基因工程化T细胞,该重组受体结合除B细胞抗原外的或除选自CD19、CD20、CD22和ROR1的B细胞抗原外的抗原;该说明书用于向受试者施用在与TEC家族激酶抑制剂组合疗法中的该基因工程化细胞用于治疗癌症。

[0085] 本文提供了试剂盒和制品,诸如用于实施任何实施方案的试剂盒和制品,诸如含有组合物和说明书的试剂盒和制品,该组合物含有治疗有效量的TEC家族激酶的抑制剂;和用于向受试者施用在与基因工程化T细胞组合疗法中的TEC家族激酶抑制剂用于治疗癌症,所述T细胞表达重组受体,该重组受体结合除B细胞抗原外的或除选自CD19、CD20、CD22和ROR1的B细胞抗原外的抗原。在一些实施方案中,该癌症不是表达B细胞抗原的癌症,是非血液癌症,不是B细胞恶性肿瘤,不是B细胞白血病,或是实体肿瘤。在一些实施方案中,该癌症是肉瘤、癌、淋巴瘤、白血病或骨髓瘤,任选地,其中该癌症是非霍奇金淋巴瘤(NHL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、CLL、SLL、ALL或AML。在一些实施方案中,该癌症是胰腺癌、膀胱癌、结直肠癌,乳腺癌、前列腺癌、肾癌、肝细胞癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、胰腺癌、直肠癌、甲状腺癌、子宫癌、胃癌、食管癌、头颈癌、黑色素瘤、神经内分泌癌、CNS癌、脑肿瘤、骨癌或软组织肉瘤。

[0086] 在一些实施方案中,该说明书规定该施用是针对受试者的,其中(i)该受试者和/或该癌症(a)对布鲁顿氏酪氨酸激酶(BTK)的抑制有抗性和/或(b)含有对通过该抑制剂的抑制有抗性的细胞群;(ii)该受试者和/或该癌症含有编码BTK的核酸中的突变,任选地,其中该突变能够降低或阻止通过该抑制剂和/或通过依鲁替尼的BTK的抑制,任选地,其中该突变是C481S;(iii)该受试者和/或该癌症包含编码磷脂酶C γ 2(PLC γ 2)的核酸中的突变,任选地,其中该突变导致组成性信号传导活性,任选地,其中该突变是R665W或L845F;(iv)在开始施用包含T细胞的组合物和开始施用TEC家族激酶的抑制剂时,该受试者已经在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗后缓解后又复发,或已经认为该受试者对用该抑制剂和/或对于用BTK抑制剂疗法的既往治疗是难治的;(v)在开始施用包含T细胞的组合物和开始施用TEC家族激酶的抑制剂时,该受试者已经在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗后续进展,任选地,其中该受试者表现出进行性疾病,作为对该既往治疗的最佳应答或对该既往治疗的既往应答后的进展;和/或(vi)在开始施用TEC家族激酶的抑制剂和开始施用包含T细胞的组合物时,该受试者在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗持续至少6个月后表现出低于完全应答(CR)的应答。

[0087] 还提供了试剂盒,该试剂盒含有包含治疗有效量的TEC家族激酶的抑制剂的组合物;和用于向受试者施用在与基因工程化T细胞组合疗法中的TEC家族激酶抑制剂用于治疗癌症的说明书,该基因工程化T细胞特异性识别或特异性结合与该癌症相关联的或在该癌症的细胞上表达或存在的抗原和/由特异性靶向该癌症且已经或待施用至该受试者的治疗

剂包含的标签,其中该说明书规定:(i)该受试者和/或该癌症(a)对布鲁顿氏酪氨酸激酶(BTK)有抗性和/或(b)包含对通过该抑制剂的抑制有抗性的细胞群;(ii)该受试者和/或该癌症包含编码BTK的核酸中的突变,任选地,其中该突变能够降低或阻止通过该抑制剂和/或通过依鲁替尼的BTK的抑制,任选地,其中该突变是C481S;(iii)该受试者和/或该癌症包含编码磷脂酶C γ 2 (PLC γ 2)的核酸中的突变,任选地,其中该突变导致组成性信号传导活性,任选地,其中该突变是R665W或L845F;(iv)在开始施用包含T细胞的组合物和开始施用TEC家族激酶的抑制剂时,该受试者已经在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗后缓解后又复发,或已经认为该受试者对用该抑制剂和/或对于用BTK抑制剂疗法的既往治疗是难治的;(v)在开始施用包含T细胞的组合物和开始施用TEC家族激酶的抑制剂时,该受试者已经在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗进展,任选地,其中该受试者表现出进行性疾病,作为对该既往治疗的最佳应答或对该既往治疗的既往应答后的进展;和/或(vi)在开始施用TEC家族激酶的抑制剂和开始施用包含T细胞的组合物时,该受试者在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗持续至少6个月后表现出低于完全应答(CR)的应答。

[0088] 还提供了试剂盒,该试剂盒含有包含治疗有效量的基因工程化T细胞的组合物,该基因工程化T细胞特异性识别或特异性结合与该癌症相关联的或在该癌症的细胞上表达或存在的抗原和/或由特异性靶向该癌症且已经或待施用至该受试者的治疗剂包含的标签;和用于向受试者施用在与TEC家族激酶的抑制剂组合疗法中的该基因工程化细胞来治疗癌症的说明书,其中该说明书规定:(i)该受试者和/或该癌症(a)对布鲁顿氏酪氨酸激酶(BTK)有抗性和/或(b)包含对通过该抑制剂的抑制有抗性的细胞群;(ii)该受试者和/或该癌症包含编码BTK的核酸中的突变,任选地,其中该突变能够降低或阻止通过该抑制剂和/或通过依鲁替尼的BTK的抑制,任选地,其中该突变是C481S;(iii)该受试者和/或该癌症包含编码磷脂酶C γ 2 (PLC γ 2)的核酸中的突变,任选地,其中该突变导致组成性信号传导活性,任选地,其中该突变是R665W或L845F;(iv)在开始施用包含T细胞的组合物和开始施用TEC家族激酶的抑制剂时,该受试者已经在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗后缓解后又复发,或已经认为该受试者对用该抑制剂和/或对于用BTK抑制剂疗法的既往治疗是难治的;(v)在开始施用包含T细胞的组合物和开始施用TEC家族激酶的抑制剂时,该受试者已经在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗进展,任选地,其中该受试者表现出进行性疾病,作为对该既往治疗或对该既往治疗的既往应答后的进展的最佳应答;和/或(vi)在开始施用TEC家族激酶的抑制剂和开始施用包含T细胞的组合物时,该受试者在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗持续至少6个月后表现出低于完全应答(CR)的应答。

[0089] 在一些实施方案中,该细胞群是或包括B细胞群和/或不包括T细胞。

[0090] 在一些实施方案中,该癌症是B细胞恶性肿瘤或是B细胞来源的癌症。在一些实施方案中,该B细胞恶性肿瘤是白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。在一些实施方案中,该B细胞恶性肿瘤是急性成淋巴细胞白血病(ALL)、成人ALL、慢性成淋巴细胞白血病(CLL)、小淋巴细胞性白血病(SLL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)或急性髓样白血病(AML)。在一些实施方案中,该B细胞恶性肿瘤是CLL或SLL。

[0091] 在一些实施方案中,该T细胞识别或靶向选自B细胞成熟抗原(BCMA)、CD19、CD20、

CD22和ROR1的抗原。

[0092] 在一些实施方案中,该说明书规定该施用是针对具有B细胞恶性肿瘤的受试者,该B细胞恶性肿瘤是或经鉴定具有:(i)一种或多种细胞遗传异常,任选至少两种或三种细胞遗传异常,任选地,其中至少一种细胞遗传异常是17p缺失;(ii) TP53突变;和/或(iii)未突变的免疫球蛋白重链可变区(IGHV)。在一些实施方案中,该说明书规定该施用是针对以下受试者,该受试者用一种或多种用于治疗B细胞恶性肿瘤的在先疗法治疗已经失败,已经在用一种或多种用于治疗B细胞恶性肿瘤的在先疗法治疗后缓解后又复发,或已经变得对一种或多种用于治疗B细胞恶性肿瘤的在先疗法是难治的,该在先疗法任选是除了另一剂量的表达该重组受体的细胞之外的一种、两种或三种在先疗法,任选地,其中至少一种在先疗法是用该抑制剂或BTK抑制剂疗法的既往治疗。在一些实施方案中,该既往治疗是用依鲁替尼的既往治疗。

[0093] 在一些实施方案中,编码BTK的核酸中的突变包括在位置C481处的替代,任选是C481S或C481R,和/或在位置T474处的替代,任选是T474I或T474M。

[0094] 所提供的任何实施方案的一些实施方案中,该抗原选自:Her2、L1-CAM、间皮素、CEA、乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3或4、erbB二聚体、EGFR vIII、FBP、FCRL5、FCRH5、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、Lewis Y、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、黑色素瘤相关抗原(MAGEMAGE-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、黑色素瘤优先表达的抗原(PRAME)、生存素、EGP2、EGP40、TAG72、B7-H6、IL-13受体a2(IL-13Ra2)、CA9、GD3、HMW-MAA、CD171、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2NY-ESO-1、PSCA、叶酸受体-a、CD44v6、CD44v7/8、avb6整合素、8H9、NCAM、VEGF受体、5T4、胎儿AchR、NKG2D配体、CD44v6、双抗原、和与通用标签相关联的抗原、癌症-睾丸抗原、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、G蛋白偶联的受体(GPCR5D)、瘤胚共同抗原、TAG72、VEGF-R2、瘤胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、雌激素受体、黄体酮受体、肝配蛋白B2、CD123、c-Met、GD-20-乙酰化GD2(OGD2)、CE7、肾母细胞瘤1(WT-1)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、CCL-1、CD138和病原体特异性抗原。在一些实施方案中,该抗原是病原体特异性抗原,该病原体特异性抗原是病毒抗原、细菌抗原或寄生虫抗原。

[0095] 在任何所提供的实施方案的一些实施方案中,该重组受体是转基因T细胞受体(TCR)或功能性非T细胞受体。在一些实施方案中,该重组受体是嵌合受体,其任选是嵌合抗原受体(CAR)。在本文任何实施方案的一些实施方案中,该重组受体含有特异性结合该抗原的细胞外抗原识别结构域和含有ITAM的细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,该细胞内信号传导结构域含有CD3- ζ (CD3 ζ)链的细胞内结构域。在本文任何实施方案的一些实施方案中,该重组受体进一步含有共刺激信号传导区。在本文任何实施方案的一些实施方案中,该共刺激信号传导区包含CD28或4-1BB的信号传导结构域。在一些实施方案中,该共刺激结构域是CD28的结构域。

[0096] 在任何所提供的实施方案的一些实施方案中,该抑制剂抑制一种或多种酪氨酸激酶,每种酪氨酸激酶单独地选自:布鲁顿氏酪氨酸激酶(Btk)、IL2可诱导的T胞激酶(ITK)、在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶(TEC)、在染色体X上的酪氨酸激酶骨髓激酶(BMX)和T细胞X染色体激酶(TXK;静息淋巴细胞激酶,RLK);和/或该TEC家族激酶包括选自以下的一种或

多种TEC家族激酶：布鲁顿氏酪氨酸激酶 (Btk)、IL2可诱导的T细胞激酶 (ITK)、在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶 (TEC)、在染色体X上的酪氨酸激酶骨髓激酶 (BMX) 和T细胞X染色体激酶 (TXK；静息淋巴细胞激酶,RLK)；和/或该TEC家族激酶是或包括Btk。

[0097] 在任何所提供的实施方案的一些实施方案中，该TEC家族激酶不由该癌症的细胞表达，通常不在或不疑似在衍生该癌症的细胞中表达；和/或该癌症对该抑制剂不敏感；和/或至少多个该T细胞表达该TEC家族激酶；和/或该TEC家族激酶在T细胞中表达；和/或该TEC家族激酶通常不在T细胞中表达。

[0098] 在任何所提供的实施方案的一些实施方案中，该抑制剂是小分子、肽、蛋白、抗体或其抗原结合片段、抗体模拟物、适配体或核酸分子。在本文的任何实施方案的一些实施方案中，该抑制剂不可逆地降低或消除该酪氨酸激酶的活性，特异性结合该酪氨酸激酶的活性位点中的结合位点，该结合位点包含对应于SEQ ID NO:18中所示的序列中的残基C481的氨基酸残基，和/或降低或消除该酪氨酸激酶的自磷酸化活性。在本文的任何实施方案的一些实施方案中，该抑制剂是依鲁替尼。

[0099] 在任何所提供的试剂盒或制品的一些实施方案中，该说明书规定与开始施用包含该T细胞的组合物同时施用或在开始施用包含该T细胞的组合物随后施用该抑制剂。在一些实施方案中，该说明书规定在开始施用该T细胞随后施用该抑制剂。在一些实施方案中，该说明书规定在开始施用该T细胞的1小时、2小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时或1周内施用该抑制剂。

[0100] 在本文提供的任何试剂盒或制品的一些实施方案中，该说明书规定在下列时间施用该抑制剂，其中：相较于在开始施用该T细胞后的在前时间点时的受试者中的细胞数量，在来自该受试者的血液中可检测的T细胞疗法的细胞的数目降低；在血液中可检测的T细胞疗法的细胞的数目少于或少于约在开始施用所述T细胞后的受试者的血液中可检测的T细胞疗法的细胞的峰值或最大数目的1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、50倍或100倍或更低；和/或在该受试者的血液中可检测到该T细胞疗法的细胞的峰值或最大水平后的某时，在来自该受试者的血液中可检测的该T细胞的或衍生自该T细胞的细胞数目少于该受试者的血液中的总外周血单核细胞 (PBMC) 的10%以下、5%以下、1%以下或0.1%以下。

[0101] 在任何所提供的实施方案的一些实施方案中，其中该增加或降低是增加或降低了大于或大于约1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍或更多。

[0102] 在任何所提供的试剂盒或制品的一些实施方案中，该说明书用于在开始施用该T细胞后，施用该抑制剂持续最多达2天、最多达7天、最多达14天、最多达21天、最多达一个月或30天、最多达两个月或60天、最多达三个月或90天、最多达6个月或最多达1年的一段时间。在本文的任何试剂盒的一些实施方案中，该说明书规定在开始施用该T细胞后，施用该抑制剂最多达或持续至少3个月或90天。

[0103] 在任何所提供的试剂盒的一些实施方案中，该说明书规定从至少在开始施用该T细胞后起，施用该抑制剂，直至：相较于正好在施用该抑制剂之前的在前时间点的受试者或相较于在施用该T细胞疗法后的在前时间点，在来自该受试者的血液中可检测的施用的T细胞的或衍生自施用的T细胞的细胞数目增加；在血液中可检测的该T细胞的或衍生自该T细胞的细胞数目在2.0倍 (更大或更少) 的开始施用该T细胞后受试者的血液中观察到的峰值或最大数目内；在来自该受试者的血液中可检测的该T细胞的细胞数目大于或大于约

10%、15%、20%、30%、40%、50%或60%的该受试者的血液中的总外周血单核细胞(PBMC);和/或相较于紧接施用该T细胞之前时或紧接施用该抑制剂之前时的肿瘤负荷,该受试者表现出肿瘤负荷的减少;和/或该受试者表现出完全缓解或临床缓解。

[0104] 在任何所提供的试剂盒或物品的一些实施方案中,该说明书规定该抑制剂口服、皮下或静脉内施用。在一些实施方案中,该说明书规定口服施用该抑制剂。

[0105] 在本文的任何试剂盒的一些实施方案中,该说明书规定施用该抑制剂每日六次、每日五次、每日四次、每日三次、每日两次、每日一次、每隔一日、一周三次或一周至少一次。在一些实施方案中,该说明书规定施用该抑制剂每日一次或一天两次。

[0106] 在任何所提供的试剂盒或物品的一些实施方案中,该说明书规定以至少或至少约50mg/天、100mg/天、150mg/天、175mg/天、200mg/天、250mg/天、280mg/天、300mg/天、350mg/天、400mg/天、420mg/天、450mg/天、500mg/天、600mg/天、700mg/天、800mg/天或更多的总每日剂量施用该抑制剂。在一些实施方案中,该说明书规定以至少或约至少或约或420mg/天的每日剂量施用该抑制剂。在一些实施方案中,该说明书规定以少于或约少于或约或420mg每天的量,任选地以至少或至少约或约或280mg每天的量施用该抑制剂。在一些实施方案中,该抑制剂以不多于280mg每天的量施用。在一些实施方案中,该说明书规定以约或至少280mg每天的量施用该抑制剂。

[0107] 在任何本文的实施方案的一些实施方案中,该基因工程化T细胞包括为CD4+或CD8+的T细胞。在一些实施方案中,该基因工程化T细胞包括对该受试者是自体的细胞。在一些实施方案中,该基因工程化T细胞包括对该受试者是同种异体的T细胞。

[0108] 在任何本文的试剂盒或物品的一些实施方案中,该说明书规定以含有一定数目的细胞的剂量施用基因工程化T细胞,该细胞的数目介于或介于约 5×10^5 个细胞/kg该受试者的体重和 1×10^7 个细胞/kg之间、 0.5×10^6 个细胞/kg和 5×10^6 个细胞/kg之间、介于或介于约 0.5×10^6 个细胞/kg和 3×10^6 个细胞/kg之间、介于或介于约 0.5×10^6 个细胞/kg和 2×10^6 个细胞/kg之间、介于或介于约 0.5×10^6 个细胞/kg和 1×10^6 个细胞/kg之间、介于或介于约 1.0×10^6 个细胞/kg该受试者的体重和 5×10^6 个细胞/kg之间、介于或介于约 1.0×10^6 个细胞/kg和 3×10^6 个细胞/kg之间、介于或介于约 1.0×10^6 个细胞/kg和 2×10^6 个细胞/kg之间、介于或介于约 2.0×10^6 个细胞/kg该受试者的体重和 5×10^6 个细胞/kg之间、介于或介于约 2.0×10^6 个细胞/kg和 3×10^6 个细胞/kg之间、或介于或介于约 3.0×10^6 个细胞/kg该受试者的体重和 5×10^6 个细胞/kg,每个数值包括在内。

[0109] 在任何本文的试剂盒的一些实施方案中,该说明书规定以一定剂量施用基因工程化T细胞,该剂量包含少于或少于约或约或 1×10^8 个总表达重组受体的细胞,任选是CAR+细胞、总T细胞或总外周血单核细胞(PBMC),诸如少于或约少于或约或 5×10^7 、少于或少于约或约或 2.5×10^7 、少于或少于约或约或 1.0×10^7 、少于或少于约或约或 5.0×10^6 、少于或少于约或约或 1.0×10^6 、少于或少于约或约或 5.0×10^5 、或少于或少于约或约或 1×10^5 个总表达重组受体的细胞,任选是CAR+细胞、总T细胞或总外周血单核细胞(PBMC)。在一些实施方案中,该说明书规定以一定剂量施用基因工程化T细胞,该剂量包含 1×10^5 至 1×10^8 (此数值包括在内)个总表达重组受体的细胞,任选是CAR+细胞、总T细胞或总外周血单核细胞(PBMC),诸如 1×10^5 至 5×10^7 、 1×10^5 至 2.5×10^7 、 1×10^5 至 1.0×10^7 、 1×10^5 至 5.0×10^6 、 1×10^5 至 1.0×10^6 、 1.0×10^5 至 5.0×10^5 、 5.0×10^5 至 5×10^7 、 5×10^5 至 2.5×10^7 、 5×10^5 至 1.0×10^7 、 $5 \times$

10^5 至 5.0×10^6 、 5×10^5 至 1.0×10^6 、 1.0×10^6 至 5×10^7 、 1×10^6 至 2.5×10^7 、 1×10^6 至 1.0×10^7 、 1×10^6 至 5.0×10^6 、 5.0×10^6 至 5×10^7 、 5×10^6 至 2.5×10^7 、 5×10^6 至 1.0×10^7 、 1.0×10^7 至 5×10^7 、 1×10^7 至 2.5×10^7 或 2.5×10^7 至 5×10^7 个总表达重组受体的细胞,各个数值包括在内,任选是CAR+细胞、总T细胞或总外周血单核细胞(PBMC)。在一些实施方案中,该说明书规定细胞剂量包含明确比例的表达重组受体的CD4+细胞与表达重组受体的CD8+细胞和/或明确比例CD4+细胞与CD8+细胞,该比例任选地为大约1:1或介于大约1:3和大约3:1之间。

[0110] 在任何本文的试剂盒的一些实施方案中,该说明书规定施用一定剂量的细胞,该剂量少于在不施用该抑制剂的情况下施用T细胞疗法中的剂量。在一些实施方案中,该剂量至少至少1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍或10倍。

[0111] 在任何本文的试剂盒的一些实施方案中,该说明书规定以单剂量施用该T细胞,其任选是含有该细胞的单个药物组合物。在其他实施方案中,该说明书规定作为分剂量施用该T细胞,其中在不多于三天的时间内,单剂量的细胞以多个组合物施用,该多个组合物共同包含该剂量的细胞,和/或该说明书进一步规定施用一个或多个额外剂量的该T细胞。

[0112] 在任何本文的试剂盒的一些实施方案中,该说明书进一步规定在施用该T细胞之前施用淋巴细胞清除性疗法和/或其中规定该施用是针对在施用该T细胞之前已经接受淋巴细胞清除性疗法的受试者。在一些实施方案中,该淋巴细胞清除性疗法包括施用氟达拉滨和/或环磷酰胺至该受试者。在一些实施方案中,该淋巴细胞清除性疗法包括以约200-400mg/m²任选地以或约300mg/m²(该数值包括在内)施用环磷酰胺,和/或以约20-40mg/m²任选地以30mg/m²施用氟达拉滨,每种每日施用持续2-4天,任选地持续3天。在一些实施方案中,该淋巴细胞清除性疗法包括以或约300mg/m²施用环磷酰胺和以约30mg/m²施用氟达拉滨,每种每日施用,持续3天。

[0113] 在任何本文的试剂盒的一些实施方案中,该说明书进一步规定施用免疫调节剂至该受试者,其中该细胞的施用和该免疫调节剂的施用同时地、分开地或以单个组合物、或依次地,以任一顺序地进行。

[0114] 在任何本文的实施方案的一些实施方案中,该免疫调节剂能够抑制或阻断分子的功能或涉及所述分子的信号传导途径,其中该分子是免疫抑制性分子和/或其中该分子是免疫检查点分子。在一些实施方案中,该免疫检查点分子或途径选自PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、LAG-3、TIM3、VISTA、腺苷2A受体(A2AR)或腺苷,或者涉及任何前述的途径。在一些实施方案中,该免疫调节剂是或包含抗体,其任选是抗体片段、单链抗体、多特异性抗体、或免疫缀合物。

[0115] 在任何本文的试剂盒的一些实施方案中,该抗体特异性结合该免疫检查点分子或其配体或受体;和/或该抗体能够阻断或削弱该免疫检查点分子和其配体或受体之间的相互作用。

[0116] 在任何本文的试剂盒的一些实施方案中,该组合物经配制用于单剂量施用。在任何本文的试剂盒的一些实施方案中,该组合物经配制用于多剂量施用。

[0117] 本文提供了工程化表达重组受体的免疫细胞的方法,该方法包括:使含有T细胞的细胞群与TEC家族激酶的抑制剂接触;并在使得表达重组受体的条件下将编码该重组受体的核酸引入至T细胞群。

[0118] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该重组受体结合配体,任

选是抗原或通用标签。在一些实施方案中,该重组受体是T细胞受体 (TCR) 或嵌合抗原受体 (CAR)。

[0119] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该细胞群是或包括外周血单核细胞。在一些实施方案中,该细胞群是或包括T细胞。在一些实施方案中,该T细胞是CD4⁺和/或CD8⁺。

[0120] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该细胞群从受试者任选人受试者中分离。

[0121] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该接触在该引入之前或期间发生。

[0122] 本文提供了产生基因工程化T细胞的方法,该方法包括将编码重组受体的核酸分子引入至原代T细胞,其中该T细胞来自已经施用TEC家族激酶的抑制剂的受试者。

[0123] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该受试者已经在引入该核酸分子之前不多于30天、20天、10天、9天、8天、7天、6天、5天、4天、3天、2天或1天时施用该抑制剂。

[0124] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该抑制剂抑制一种或多种酪氨酸激酶,每种酪氨酸激酶单独地选自:布鲁顿氏酪氨酸激酶 (Btk)、IL2可诱导的T细胞激酶 (ITK)、在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶 (TEC)、在染色体X上的酪氨酸激酶骨髓激酶 (BMX) 和T细胞X染色体激酶 (TXK; 静息淋巴细胞激酶,RLK); 和/或该TEC家族激酶包括一种或多种选自下组的TEC家族激酶:布鲁顿氏酪氨酸激酶 (Btk)、IL2可诱导的T细胞激酶 (ITK)、在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶 (TEC)、在染色体X上的酪氨酸激酶骨髓激酶 (BMX) 和T细胞X染色体激酶 (TXK; 静息淋巴细胞激酶,RLK); 和/或该TEC家族激酶是或包括Btk。

[0125] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该TEC家族激酶不由该癌症的细胞表达,通常不在或不疑似在衍生该癌症的细胞中表达,和/或该癌症对该抑制剂不敏感;和/或至少多个该T细胞表达该TEC家族激酶;和/或该TEC家族激酶在T细胞中表达;和/或该TEC家族激酶通常不在T细胞中表达。

[0126] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该抑制剂是小分子、肽、蛋白、抗体或其抗原结合片段、抗体模拟物、适配体或核酸分子。

[0127] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该抑制剂不可逆地降低或消除该酪氨酸激酶的激活,特异性结合该酪氨酸激酶的活性位点中的结合位点,该结合位点包含对应于SEQ ID NO:18中示出的序列中的残基C481的氨基酸残基,和/或降低或消除该酪氨酸激酶的自磷酸化活性。在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该抑制剂是依鲁替尼。

[0128] 在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该抑制剂口服、皮下或静脉内施用。在一些实施方案中,该抑制剂口服施用。在任何所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中,该抑制剂每日六次、每日五次、每日四次、每日三次、每日两次、每日一次、每隔一日、一周三次或一周至少一次地施用。在一些实施方案中,该抑制剂每日一次或每天两次地施用。在一些实施方案中,该抑制剂以至少或至少约50mg/天、100mg/天、150mg/天、175mg/天、200mg/天、250mg/天、300mg/天、350mg/天、400mg/天、450mg/天、500mg/天、600mg/天、700mg/天、800mg/天或更多的总每日剂量施用。在一些实施方案中,该抑制剂以

少于或约少于或约或420mg每天的量施用。在一些实施方案中,该抑制剂以约或至少280mg每天的量施用。在一些实施方案中,该抑制剂以不多于280mg每天的量施用。

[0129] 在本文提供的任何方法的一些实施方案中,该T细胞包括CD4⁺或CD8⁺细胞。

[0130] 附图简述

[0131] 图1A显示归一化的靶细胞数目的图,其评估在一式三份的孔中与CAR T细胞和依鲁替尼共培养时的靶特异性溶细胞活性(平均值±SEM)。

[0132] 图1B显示在细胞毒性测试的起始和结束时靶细胞与CAR T细胞以2.5:1的效应物与靶标比例(E:T)共培养靶细胞(NucLight Red K562.CD19细胞)的代表性图像。

[0133] 图1C显示依鲁替尼对抗CD19CAR T细胞的溶细胞活性的剂量作用。该图显示来自三个独立供体的数据,且对未处理的对照(100%)归一化。描述了平均值±SEM,且表明统计学上显著差异 $P<0.00001$ (***)。

[0134] 图2A显示在存在或不存在指定浓度的依鲁替尼的情况下培养CD4⁺和CD8⁺细胞后CAR T细胞上CD25、CD28、CD39和CD95的表达。

[0135] 图2B显示在依鲁替尼的存在下开始刺激后四天内来自一个供体衍生的细胞的CAR T细胞的TCM(CCR7+CD45RA⁻)和TEM(CCR7-CD45RA⁻)的百分比的代表性结果。

[0136] 图2C和图2D显示在存在或不存在指定浓度的依鲁替尼的情况下分别培养CD4⁺和CD8⁺T细胞后,CAR-T细胞上CD69、CD107a和PD-1的表达。

[0137] 图3A描述了在存在或不存在依鲁替尼的情况下从一个供体生成的CAR-T细胞在4天内的细胞因子产生的动力学代表图。图3B描述了,在2个独立实验中,相较于不存在依鲁替尼的情况下,在存在依鲁替尼的情况下刺激CAR-T细胞2天后的细胞因子产生的变化百分比。

[0138] 图4A显示在不存在依鲁替尼(对照)或存在50nM或500nM的依鲁替尼的情况下,在连续刺激测定中每轮再刺激后CAR-T细胞数的倍数变化。图4B显示在不存在依鲁替尼(对照)或在存在50nM或500nM依鲁替尼的情况下在连续刺激测定中每轮再刺激后的CAR-T细胞数目的加倍数。图4C在存在或不存在依鲁替尼的情况下在连续刺激测定中,第4天和第18天时分别为在1轮和5轮再刺激后的细胞数目。

[0139] 图5A显示在依鲁替尼存在下刺激T细胞后TH1表面标记物的代表性FACS图。

[0140] 图5B显示了对于在存在或不存在依鲁替尼的情况下培养的T细胞,通过流式细胞术测定的观察到的TH1细胞随时间的百分比。

[0141] 图5C显示在各种浓度的依鲁替尼的存在下刺激的T细胞培养物中TH1细胞的百分比。

[0142] 图5D显示在依鲁替尼的存在下在连续刺激的第0、11、18和21天时CD25、CD38、CD39和CD45RO的表达。显示了来自一个供体衍生的细胞的CAR T细胞的代表性结果。

[0143] 图5E显示在依鲁替尼的存在下在连续刺激的第0、11、18和21天CD62L、CD69、CD107a和PD-1的表达。显示了来自一个供体衍生的细胞的CAR T细胞的代表性结果。

[0144] 图6A显示在经鉴定对BTK抑制有抗性的播散性肿瘤异种移植小鼠模型中,相较于媒介物处理,依鲁替尼处理对肿瘤负荷的作用。图6B显示在存在或不存在依鲁替尼或媒介物对照的情况下,用来自两个不同供体衍生的细胞的CAR+T细胞处理的小鼠中肿瘤注射后的更大时间点的相同研究的结果。图6A和图6B中的结果描绘了随时间的如通过生物发光测

量的平均辐射亮度所指示的肿瘤生长。

[0145] 图6C显示Kaplan meier曲线,其描绘了在存在或不存在依鲁替尼的情况下施用CAR-T细胞的荷瘤小鼠的存活。图6D显示在存在或不存在依鲁替尼或媒介物对照的情况下用来自两种不同供体衍生的细胞的CAR-T细胞处理的小鼠中肿瘤注射后更大时间点的相同研究中的存活结果。

[0146] 图7A显示Kaplan meier曲线,其描绘了单独或与经由饮用水施用的每日施用依鲁替尼组合施用了从两个不同供体生成的CAR-T细胞的荷瘤小鼠的观察到的存活。显示了统计学上的显著差异, $P<0.001$ (***)。

[0147] 图7B显示了施用由两个不同供体生成的CAR-T细胞和用经由饮用水施用的依鲁替尼处理的小鼠中的肿瘤生长随时间的变化,如通过生物发光测量的平均辐射亮度指示的。显示了统计学上显著差异,双因素ANOVA $P<0.05$ (*)、 $P<0.01$ (**)。

[0148] 图7C显示在经或未经依鲁替尼处理的小鼠的血液、骨髓和脾脏中的CAR-T细胞的水平。

[0149] 图7D显示在经或未经依鲁替尼处理后CAR-T细胞转移后第19天的血液中的细胞的数目。统计学上显著差异显示为 $*p<0.05$ 。

[0150] 图7E显示用或不用依鲁替尼处理的小鼠的血液、骨髓和脾脏中的肿瘤细胞计数。统计学上显著差异显示为 $P<0.001$ (***) 和 $P<0.0001$ (****)。

[0151] 图8A描绘了从CAR-T细胞并且与依鲁替尼或对照组合转移后第12天的动物的骨髓中收获的CAR工程化T细胞上的表面标记物的T-分布随机邻域嵌入(t-SNE)高维分析。

[0152] 图8B描绘了衍生自从CAR-T细胞和依鲁替尼或媒介物对照转移后第12天的动物的骨髓中收获的CAR-工程化T细胞的T-分布随机邻域嵌入(t-SNE)高维分析的4个群。

[0153] 图8C描绘了直方图,其显示来自4门控t-SNE的CD4、CD8、CD62L、CD45RA、CD44和CXCR3的个体表达谱,其覆盖在总群的表达(阴影直方图)上。

[0154] 图8D描绘了来自对照小鼠或用依鲁替尼处理的小鼠的每个t-SNE群的百分比和倍数变化。

[0155] 图9A显示在不存在依鲁替尼(对照)或在50nM或500nM依鲁替尼的存在下,在CAR-工程化细胞的21天培养期间,在连续刺激测定中群加倍的数目,该CAR-工程化细胞由获自具有弥漫大B细胞淋巴瘤(DLBCL)的受试者的细胞生成。箭头指示当计数CART细胞并添加新靶细胞连同依鲁替尼时的每轮再刺激的时间点。

[0156] 图9B显示在存在或不存在依鲁替尼的情况下在16天的连续再刺激后基因工程化CAR-T细胞对表达CD19的靶细胞的溶细胞活性。将百分比杀伤归一化至未处理的对照(100%)。数据显示为来自一式两份孔的平均值 \pm SEM。统计学上显著差异表示为 $P<0.001$ (***)、 $P<0.0001$ (****)。

[0157] 图10A是描绘相较于对照,来自经500nM依鲁替尼处理的CAR T细胞连续刺激的第18天时差异表达的基因的火山图。显著差异上调的基因位于右侧虚线的右侧,显著差异下调的基因位于左侧虚线的左侧($FDR<0.05$, $abslog_2FC>0.5$)。

[0158] 图10B是描绘对照和500nM依鲁替尼组中来自图10A的23个差异表达基因的归一化的表达(每个供体+条件中每百万的平均转录物,每个基因归一化的z-得分)的热图。

[0159] 图10C描绘了相较于对照,来自经50nM依鲁替尼处理的CAR T细胞连续刺激的第18

天时表达的基因的火山图。

[0160] 图10D描绘了对照组和50nM依鲁替尼处理组中CAR T细胞连续刺激的第18天时的归一化的基因表达变化(如图10B中所述归一化)的热图。

[0161] 图11A-11E描绘了相较于对照,用50nM或500nM依鲁替尼处理的连续刺激的CAR T细胞的每个条件的供体和每个条件的实验总结的所示基因的表达(TPM,每百万转录物)箱形图谱。

[0162] 图12A是在18天的连续刺激后来自一个供体衍生的细胞的CAR T细胞中CD62L表达的代表性直方图,如通过流式细胞术测量的。

[0163] 图12B描绘了18天的连续刺激后,来自一个供体衍生的细胞的CD62L+CAR T细胞百分比归一化至对照的倍数变化,如通过流式细胞术测量的。数据来自两个独立的实验(平均值±SEM)。

[0164] 详述

[0165] 本文提供与施用免疫疗法或免疫治疗剂相关的增强或调节T细胞的增殖和/或活性的方法,该免疫疗法或免疫治疗剂诸如包含用于过继性细胞疗法的细胞的组合物,该过继性细胞疗法例如诸如T细胞疗法(例如,表达CAR的T细胞)或能够募集一种或多种T细胞或其它免疫细胞的啮合T细胞的治疗剂,诸如双特异性或多特异性药剂或抗体。在一些实施方案中,该组合疗法涉及施用TEC家族的激酶的抑制剂(诸如Btk抑制剂,例如依鲁替尼)和施用该免疫疗法或免疫治疗剂,该免疫疗法或免疫治疗剂诸如包含用于过继性细胞疗法的细胞的组合物,例如诸如T细胞疗法(例如表达CAR的T细胞)或啮合T细胞的治疗剂。

[0166] 在本申请中提及的所有出版物(包括专利文献、科学文章和数据库)出于所有目的通过提述以其整体并入本文,其程度如同每个单独出版物通过提述单独并入的程度。如果本文陈述的定义与通过提述并入本文的专利、申请、公开的申请和其他出版物中陈述的定义相反或不一致,则本文陈述的定义优先于通过提述并入本文的定义。

[0167] 本文所用的栏目标题仅出于组织的目的,且不解释为限制所述主题。

[0168] I. 综述

[0169] 本文提供组合疗法,该组合疗法涉及施用涉及T细胞功能或活性的免疫疗法(诸如T细胞疗法)和TEC家族的激酶的抑制剂,诸如布鲁顿氏酪氨酸激酶(Btk)或IL2可诱导的T细胞激酶(ITK)的抑制剂,例如依鲁替尼。

[0170] 基于T细胞的疗法,诸如过继性T细胞疗法(包括涉及施用表达对感兴趣的疾病或病症特异的嵌合受体(诸如嵌合抗原受体(CAR)和/或其它重组抗原受体)的细胞的过继性T细胞疗法以及其它过继性免疫细胞和过继性T细胞疗法)可有效治疗癌症和其它疾病和病状。在T细胞的表面上工程化表达重组受体,诸如嵌合抗原受体(CAR),能够重定向T细胞的特异性。在临床研究中,CAR-T细胞,例如抗CD19CAR-T细胞,已经在白血病和淋巴瘤患者中生成持久的完全应答(Porter等人(2015) Sci Transl Med., 7:303ra139; Kochenderfer (2015) J. Clin. Oncol., 33:540-9; Lee等人(2015) Lancet, 385:517-28; Maude等人(2014) N Engl J Med, 371:1507-17)。

[0171] 在某些情况中,过继性细胞疗法的可行方法可能并不总是完全令人满意的。在一些情况中,最佳功效可取决于施用的细胞的识别和结合靶标(例如靶抗原),运输、定位到或成功进入受试者、肿瘤和其环境中的合适位点的能力。在一些情况中,最佳功效可取决于施

用的细胞的下列能力:经激活、扩增、发挥多种效应子功能(包括多种因子(诸如细胞因子)的细胞毒性杀伤和分泌)、持续(包括长期)、转变、转化或参与重编程为某些表型状态(例如长期记忆、较少分化和效应子状态)、避免或降低疾病的局部微环境中的免疫抑制情况、在清除和重暴露至靶配体或抗原后提供有效且强劲的回忆应答、和避免或降低耗竭、无效能、外周耐受、终末分化、和/或分化成抑制性状态。

[0172] 在一些情况中,可通过施用淋巴细胞清除性疗法或用淋巴细胞清除性疗法预处理提高应答,相较于未进行该预处理或使用不同的淋巴细胞消除性疗法进行预处理的方法,其在一些方面中在施用后增加该细胞的持久性和/或功效该淋巴细胞消除性疗法通常包括施用氟达拉滨,通常与另一种化学疗法或其它药剂诸如环磷酰胺组合,其可以以任一顺序依次地或同时地施用。在最近的I/II期临床研究中,急性成淋巴细胞白血病(ALL)、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)和慢性淋巴细胞白血病(CLL)患者中完全应答(CR)分别是94%、47%和50%,且相较于接受环磷酰胺但未接收氟达拉滨的患者,接收环磷酰胺和氟达拉滨淋巴细胞消除的患者的无病生存率更大(Cameron等人(2016) *J Clin Oncol*, 34(增补;摘要102))。在一些方面中,然而,即使使用淋巴细胞消除性疗法,CAR-T细胞疗法在所有受试者中并不总是始终有效的。

[0173] 在一些方面中,相较于某些可替换的方法,所提供的方法和用途提供或实现提高的或更持久的应答或功效,诸如,在特定组的经治疗的受试者中。在一些实施方案中,该方法凭借施用免疫疗法或免疫治疗剂(诸如包含用于过继性细胞疗法的细胞的组合物,例如,诸如T细胞疗法(例如表达CAR的T细胞)或啮合T细胞的治疗剂,诸如双特异性或多特异性药剂或抗体)和TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂或ITK抑制剂,例如依鲁替尼)是有益的。

[0174] 所提供的方法基于TEC家族激酶的抑制剂(例如依鲁替尼)提高T细胞功能的观察结果,该功能包括涉及T细胞的扩增、增殖和持久性的功能。依鲁替尼是不可逆的小分子抑制剂(SMI),其阻断布鲁顿氏酪氨酸激酶(Btk)的活性且还表现出对ITK的活性。依鲁替尼经获批用于复发性难治性背景中套细胞淋巴瘤(MCL)和瓦登史东氏巨球蛋白血症(Davids等人(2014) *Future Oncol.*, 10:957-67)。在一些情况中,B细胞受体(BCR)信号传导途径的异常激活是B细胞恶性肿瘤(诸如MCL和CLL)背后的主要机制,由此慢性Btk信号传导可通过促进B细胞存活和异常激活的NF- κ B和MAP激酶起始磷酸化作用级联反应。因此,利用TEC家族激酶抑制剂(诸如Btk抑制剂,例如依鲁替尼)的现有方法用于治疗B细胞恶性肿瘤。

[0175] 所提供的发现表明该抑制剂在涉及T细胞(诸如涉及施用过继性T细胞疗法)的方法中的组合疗法实现T细胞疗法的功能提高。在一些实施方案中,该细胞疗法(例如,施用工程化T细胞)与TEC家族激酶抑制剂(例如,BTK抑制剂和/或Itk抑制剂(诸如此类激酶的选择性和/或不可逆的抑制剂)的组合提高或增强该T细胞疗法的一种或多种功能和/或作用,诸如持久性、扩增、细胞毒性和/或治疗效果,例如,杀伤或降低肿瘤或其他疾病的负荷或靶细胞的能力。在一些实施方案中,本文中的观察结果表明,TEC家族激酶抑制剂,诸如BTK抑制剂和/或Itk抑制剂(诸如此类激酶的选择性和/或不可逆的抑制剂),例如依鲁替尼,可以在较高浓度时抑制CAR T激活,而在较低浓度时增加激活。

[0176] 在一些方面中,可观察到此类作用,尽管该肿瘤或疾病或靶细胞本身对该抑制剂、对靶向该激酶的抑制剂(该抑制剂对该激酶具有选择性)不敏感、有抗性和/或在其他情况

中未充分应答,和/或对TEC家族激酶的抑制有抗性,任选地,对通过该抑制剂抑制该TEC家族激酶有抗性,和/或对另一TEC家族激酶的抑制有抗性和/或对TEC家族激酶的另一抑制剂(相较于由该抑制剂靶向(或为该抑制剂的主要靶标)的一种或多种激酶,其任选为一个不同的TEC家族激酶)有抗性。例如,在一些实施方案中,该癌症对该该抑制剂、或对通过该抑制剂或另一抑制剂(例如,通过依鲁替尼)的该TEC家族激酶的抑制不敏感或已经变得有抗性。因此,在一些实施方案中,所提供的方法、用途和组合疗法包括在认为此类受试者已经对该抑制剂是难治或抗性的,和/或对既往施用此类抑制剂的治疗未充分应答的情况下,在已经施用该抑制剂或TEC家族激酶的另一抑制剂(例如依鲁替尼)的受试者中,结合免疫疗法(例如T细胞疗法,诸如CAR+T细胞)施用该抑制剂。在一些实施方案中,既往施用该抑制剂涉及用依鲁替尼的治疗。在一些实施方案中,该组合疗法、方法和用途包括在受试者中与涉及T细胞的疗法(例如CAR+T细胞)组合持续施用依鲁替尼,该受试者既往已经接受依鲁替尼的施用,但缺少(或未结合)T细胞疗法和/或缺少工程化T细胞疗法,和/或缺少针对与由所提供的疗法、方法或用途靶向的疾病或靶标相同的疾病或靶标的工程化T细胞疗法。

[0177] 在一些实施方案中,该方法和组合导致T细胞疗法的T细胞的T细胞功能或表型的提高,例如,固有的T细胞功能和/或固有的T细胞表型的提高。在一些方面中,此类提高在不损害或基本上不损害一个或多个其它期望的功能特性(例如,CAR-T细胞功能性)的情况下产生。在一些实施方案中,相较于在其他方面相同但不存在该抑制剂的条件培养的此类细胞,与该抑制剂的组合,虽然提高T细胞的一种或多种效果或功能属性,但不降低该细胞经激活、分泌一种或多种需要的细胞因子、扩增和/或持久性的能力,例如,如在体外测定中测量的。

[0178] 因此,在一些实施方案中,所提供的方法可增强CAR-T细胞疗法,该CAR-T细胞疗法在一些方面中可提高治疗患有癌症的受试者的效果,该癌症对其他疗法具有抗性或是难治的,是侵袭性或高风险癌症,和/或相较于另一种类型的癌症,该癌症会或可能对在不具有该抑制剂的情况下施用的CAR-T细胞疗法表现出相对较低的应答率。

[0179] 在一些实施方案中,该方法可用于治疗B细胞恶性肿瘤或血液恶性肿瘤,且特别是在这类恶性肿瘤中,其中对单独或不作为如本文所提供的组合物疗法一起地使用免疫疗法((例如T细胞疗法,诸如CAR-T细胞)诸如所提供的实施方案中使用的免疫疗法)或TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK的抑制剂)的治疗的应答(例如完全应答)不能完全满足或相较于其他B细胞恶性肿瘤或其他受试者中的相似治疗已是相对低。在一些实施方案中,该B细胞恶性肿瘤是下列B细胞恶性肿瘤,其中当单独或以另一种组合(其不同于本文所提供的组合疗法和/或不是与基于TEC家族激酶抑制剂的疗法的组合)施用时的免疫疗法或免疫治疗剂(诸如包括用于过继性细胞疗法的细胞的组合物,例如,诸如T细胞疗法(例如表达CAR的T细胞)或啮合T细胞的治疗剂)的治疗导致CR少于或少于约60%、少于约50%或少于约45%的经治疗的受试者。在一些实施方案中,该受试者和/或该B细胞恶性肿瘤是下列受试者和/或B细胞恶性肿瘤:其对用该抑制剂和/或BTK抑制剂疗法(例如依鲁替尼)治疗不应答和/或认为其已经对该抑制剂和/或BTK抑制剂疗法(例如依鲁替尼)治疗是难治的或具有抗性,其是侵袭性或高风险癌症和/或更多具有一种或多种指示用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法(例如依鲁替尼)的治疗后的不良预后和/或效果不良的特征(例如标记物)。

[0180] 在一些实施方案中,本文提供的组合疗法供在具有癌症的受试者中使用,其中在

施用所提供的组合疗法时,诸如在施用该免疫疗法或免疫治疗剂(例如T细胞疗法,诸如表达CAR的T细胞,或啮合T细胞的治疗剂)时和在施用该抑制剂(例如TEK家族激酶的抑制剂,诸如BTK的抑制剂,例如依鲁替尼)时,该受试者不对用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗应答,和/或认为该受试者已经对用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗是难治的或具有抗性。在一些实施方案中,所提供的用该抑制剂和免疫疗法的组合疗法在具有疾病或病况例如B细胞恶性肿瘤的受试者中进行,其中,在开始该组合疗法时,该受试者具有在施用此类先前抑制剂但不存在涉及T细胞(例如CAR-T细胞)疗法的情况下后正在进展的疾病,诸如具有进行性疾病(PD)作为最佳应答,或在既往应答后正在进展的疾病。

[0181] 在一些实施方案中,所提供的具有TEK家族激酶抑制剂(例如依鲁替尼)和T细胞疗法(例如CAR-T细胞)的组合疗法在具有疾病或病况例如B细胞恶性肿瘤的受试者中进行,其中,在开始所提供的组合疗法时,该受试者在既往接受该抑制剂和/或BTK抑制剂疗法例如依鲁替尼持续至少6个月后具有低于完全应答(CR)的应答。

[0182] 在一些方面中,用于用所提供的组合疗法治疗的受试者表现出或经鉴定表现出该疾病或病况的一种或多种高风险特征和/或表现出侵袭性疾病或与不良预后或效果相关的疾病。在一些方面中,B细胞恶性肿瘤(诸如淋巴瘤,例如CLL或SLL)的高风险特征,包括一种或多种指示该疾病的严重性或预后的分子标记(诸如一种或多种遗传标记)的存在,(参见例如Parker和Strout(2011)Discov.Med.,11:115-23)。在一些实施方案中,该受试者具有B细胞恶性肿瘤,该B细胞恶性肿瘤具有或经鉴定具有一种或多种细胞遗传学异常,诸如两种或三种或更多种染色体异常,诸如17p缺失、11q缺失、三染色体性12、和/或13q缺失,例如通过荧光原位杂交(FISH)检测的。在一些实施方案中,该受试者具有B细胞恶性肿瘤,该B细胞恶性肿瘤具有或经鉴定具有一种或多种基因突变,诸如TP53突变、NOTCH1突变、SF3B1突变和BIRC3突变,诸如使用基于单核苷酸多态性测定的方法、变性高效液相色谱法(DHPLC)、酵母中分离等位基因的功能分析(FASAY)、或通过包括直接测序或下一代测序方法在内的测序评估的。在一些实施方案中,该受试者具有B细胞恶性肿瘤,该B细胞恶性肿瘤具有或经鉴定具有未突变的免疫球蛋白重链可变区(IGHV)。IGH的可变区的突变状态具有预后价值,其中未突变的IGH(相较于种系<2%)与侵袭性疾病相关(Hamblin,Best Pract.Res.Clin.Haematol.20:455-468(2007))。认为如通过流式细胞术评估的CD38和ZAP70表达是IGH突变状态的替代。在一些实施方案中,该受试者具有B细胞恶性肿瘤,该B细胞恶性肿瘤表现出包括3种或更多种染色体异常(17p缺失、TP53突变和/或未突变的IGHV)在内的高风险特征。

[0183] 在一些实施方案中,本文提供的组合疗法供在具有癌症的受试者中使用,其中该受试者和/或该癌症对BTK的抑制有抗性,或包含对通过该抑制剂的抑制有抗性的细胞群。在一些实施方案中,该受试者表现出靶激酶中(诸如BTK)的突变,或该靶激酶的途径的下游分子中的突变,致使该受试者对用该抑制剂和/或BTK抑制剂疗法的治疗有抗性。致使受试者对用BTK抑制剂或TEK家族激酶的另一抑制剂有抗性或难治性的突变是已知的,参见例如Woyach等人(2014)N Engl J.Med.370:2286-94和Liu等人(2015)Blood,126:61-8。在一些实施方案中,本文提供的组合疗法供在具有癌症的受试者中使用,其中该受试者和/或该癌症包含核酸编码BTK的核酸中的突变或中断,诸如能够降低或阻止通过该抑制剂(例如依鲁替尼)抑制BTK的突变。在一些实施方案中,该受试者含有BTK的C481S突变。在一些实施方

案中,本文提供的组合疗法供在具有癌症的受试者中使用,其中该受试者和/或该癌症包含编码PLC γ 2的核酸中的突变或中断,诸如获得可导致自发信号传导的功能突变。在一些实施方案中,该受试者含有PLC γ 2中的R665W和/或L845F突变。

[0184] 在一些情况中,在用一种或多种用于治疗该癌症的在先疗法(诸如至少两种或三种在先疗法)治疗后,该受试者已不能获得完全应答(CR),具有稳定的或进行性疾病和/或已经在对该一种或多种在先疗法应答后复发。在一些实施方案中,该在先疗法中的至少一种是用该抑制剂或BTK抑制剂疗法(诸如依鲁替尼)的既往治疗。在一些实施方案中,该受试者正在接受持续至少六个月的该抑制剂或BTK抑制剂疗法,其应答低于CR和/或表现出高风险特征,诸如复杂的细胞遗传学异常(3种或更多种染色体异常)(17p缺失、TP53突变或未突变的IGHV)。

[0185] 在一些实施方案中,某些癌症,诸如NHL(例如高风险或侵袭性NHL),诸如DLBCL,和/或慢性淋巴细胞白血病(CLL)可与固有T细胞功能缺陷或降低相关,在一些情况中,其受该疾病本身影响。例如,许多癌症(诸如CLL和NHL,例如DLBCL)的发病机理可与免疫缺陷相关,导致促进肿瘤生长和免疫逃避,诸如由于T细胞的免疫抑制,例如受肿瘤微环境中的一种或多种因子驱动。在一些情况中,减轻从此类患者的癌症中获得的固有T细胞缺陷以用于与过继性细胞疗法联合施用,可以为过继性T细胞疗法(例如CAR-T细胞疗法)提供更为有效的应答。

[0186] 在一些实施方案中,所提供的方法用于治疗受试者中的癌症,其中相较于参考T细胞群或参考或阈值水平(例如来自不具有或不疑似具有癌症的受试者的T细胞,诸如来自健康或正常受试者的T细胞),此类受试者的T细胞显示或已经观察显示降低水平的指示T细胞功能、健康或活性的因子。在一些实施方案中,所提供的方法用于治疗经鉴定具有高风险NHL和/或侵袭性NHL、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、原发性纵膈大B细胞淋巴瘤(PMBCL)、富集T细胞/组织细胞的大B细胞淋巴瘤(TCHRBCL)、伯基特氏淋巴瘤、套细胞淋巴瘤(MCL)、和/或滤泡淋巴瘤(FL)的受试者。例如,如本文所示的,在示例性BTK抑制剂依鲁替尼的存在下,来自具有DLBCL的受试者的经工程化的T细胞表现出更高的T细胞功能活性,这表明在该抑制剂的存在下增强T细胞的功能。在所提供的方法的一些实施方案中,经施用的工程化T细胞对于该受试者是自体的。在一些实施方案中,该受试者具有DLBCL。在一些实施方案中,所提供的方法用于治疗具有慢性淋巴细胞白血病(CLL)的受试者。

[0187] 用于治疗血液恶性肿瘤CLL的方法在本文提供的方法中,CLL的特征在于血液、骨髓和淋巴组织中克隆衍生的B淋巴细胞例如CD19+的逐渐积累。虽然考虑到与CLL相同的疾病在一些情况中小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)用于指由淋巴结病(淋巴结中发现的癌细胞)表征时的疾病,而在CLL中癌细胞主要在血液和骨髓中发现。出于本文的目的,除非另有说明,否则对CLL的提述包括SLL。在一些实施方案中,CLL包括已经具有根据iwCLL标准(Hallek (2008) Blood, 111:5446-5456)的可测量的疾病CLL(例如淋巴细胞增多 $>5 \times 10^9/L$,可测量的淋巴结、肝和/或脾肿大)记录的受试者。在一些实施方案中,SLL包括具有淋巴结病和/或脾肿大和外周血中 $<5 \times 10^9 CD19+CD5+$ 克隆B淋巴细胞/L($<5000/\mu L$)的受试者,诊断具有可测量的疾病,如通过活检证实的SLL的至少一个最大横径 $>1.5cm$ 的病变所确定的。如一些研究报道的,具有进行性CLL的患者通常具有不良预后,其总生存期小于一年(Jain等人(2016) Expt.Rev.Hematol., 9:793-801)。

[0188] 用BTK抑制剂疗法特别是依鲁替尼治疗CLL,是目前用于CLL患者的一线获批的疗法。虽然部分应答(PR)可持续很长时间,但研究发现大约25%的既往治疗的CLL患者停用依鲁替尼(Jain等人(2015)Blood,125:2062-2067;Maddocks(2015)JAMAOncol.,1:80-87;Jain等人(2017)Cancer,123:2268-2273)。在一些情况中,依鲁替尼的停用是由于CLL的进展或Richter转化。因进行性疾病(PD)停用依鲁替尼的大部分患者是具有高风险特征(诸如del(17p)(17p缺失)、复杂核型或细胞遗传学异常和未突变的免疫球蛋白重链可变区(IGHV))的患者。进一步地,BTK中的突变或下游效应子磷脂酶C γ 2(PLC γ 2)可在依鲁替尼治疗期间出现,且与依鲁替尼抗性和最终复发相关(Woyach等人(Woyach等人(2014)N.Engl.J.Med.,370:2286-2294)。在87%的依鲁替尼治疗基础上复发的CLL患者中观察到此类突变。此类受试者中需要替代疗法。

[0189] 在一些实施方案中,所提供的方法还包括其中该癌症不是B细胞恶性肿瘤,不是B细胞白血病或淋巴瘤,是非血液癌或是实体肿瘤;和/或该抗原不是B细胞抗原,诸如不是CD19、CD20、CD22、和ROR1的方法。在一些实施方案中,该组合疗法包括对具有实体肿瘤(诸如肉瘤或癌)的受试者施用1) T细胞,其特异性识别和/或靶向与该癌症相关的抗原和/或通用标签上存在的抗原和2) TEC家族激酶的抑制剂,例如BTK抑制剂或ITK抑制剂,例如依鲁替尼。在一些实施方案中,由该T细胞识别或靶向的抗原是Her2、L1-CAM、间皮素、CEA、乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3或4、erbB二聚体、EGFR vIII、FBP、FCRL5、FCRH5、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、Lewis Y、L1-细胞粘附分子(L1-CAM)、黑色素瘤相关抗原(MAGEMAGE-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、黑色素瘤优先表达的抗原(PRAME)、生存素、EGP2、EGP40、TAG72、B7-H6、IL-13受体a2(IL-13Ra2)、CA9、GD3、HMW-MAA、CD171、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2NY-ESO-1、PSCA、叶酸受体-a、CD44v6、CD44v7/8、avb6integrin、8H9、NCAM、VEGF受体、5T4、胎儿AchR、NKG2D配体、CD44v6、双抗原和与通用标签相关联的抗原、癌症-睾丸抗原、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、G蛋白偶联的受体5D(GPCR5D)、瘤胚共同抗原、TAG72、VEGF-R2、瘤胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、雌激素受体、黄体酮受体、肝配蛋白B2、CD123、c-Met、GD-20-乙酰化GD2(OGD2)、CE7、肾母细胞瘤1(WT-1)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、CCL-1、CD138、或病原体特异性抗原。

[0190] 在一些实施方案中,TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂,例如依鲁替尼)在与开始施用T细胞疗法(例如CAR-T细胞)之前、同时和/或之后施用。在一些方面中,该抑制剂每日施用。在一些方面中,施用(诸如每日施用)TEC家族激酶抑制剂(例如BTK抑制剂,例如依鲁替尼)在与开始施用T细胞疗法(例如CAR-T细胞)之前、同时和/或之后开始,且持续直至预定天数。在一些方面中,该预定天数是开始施用该T细胞疗法后的预定天数。在一些实施方案中,施用该抑制剂,诸如每日施用,直至在施用该T细胞(例如表达CAR的T细胞)后,该T细胞疗法(CAR-T细胞)的水平在该受试者的血液或疾病位点中为峰值或最大(例如Cmax)水平时或之后。在一些方面中,该抑制剂(例如依鲁替尼)的施用在开始施用该T细胞疗法后持续至少或至少约14天,至少或至少约30天,至少或至少约60天,至少或至少约90天,至少或至少约120天或至少或至少约180天。在一些实施方案中,该抑制剂(例如依鲁替尼)的施用在开始施用该T细胞疗法(例如CAR-T细胞)后持续至少或约至少或约90天。在一些方面中,在停止施用该抑制剂时,观察到该受试者中该T细胞的持久性。在一些实施方案中,在停

止施用该抑制剂时,该受试者可评估以评定该受试者是否从施用该抑制剂(例如TEC家族激酶,例如BTK抑制剂,例如依鲁替尼)的施用中获益。在一些实施方案中,在停止施用该抑制剂时,该受试者经评估以评定该受试者是否取得应答或指示应答的特定程度或效果,诸如在一些实施方案中,其是CR。在一些此类实施方案中,如果受试者尚未取得CR或指示应答或指示应答的可能性或其它效果的其它效果,所提供的方法、组合物、制品或用途考虑、规定、或涉及停止该抑制剂或其施用。在一些此类实施方案中,如果受试者尚未实现CR,所提供的方法考虑继续施用该抑制剂。因此,在一些方面中,所提供的方法和与其它实施方案避免或减少延长或过度延长施用该抑制剂。在一些方面中,此类延长施用在其他方面中可导致一种或多种非期望的效果或增加一种或多种非期望的效果的可能性,诸如副作用或破坏或降低正在施用该疗法的受试者(诸如该患者)的生活质量。在一些方面中,一组施用的预定的时间段(诸如最小时间段)可增加患者顺应性的可能性或该抑制剂将会根据说明书或根据该方法使用的可能性,特别是在每日施用的情况中。

[0191] 在所提供的方法的一些实施方案中,相较于参考组合物的经施用的细胞,经施用的基因工程化细胞的一种或多种特性可以是提高的或增加的或更好的,例如受试者中这类施用的细胞的增加的或更长的扩增和/或持久性,或在用抗原再刺激时增加的或更好的回忆应答。在一些实施方案中,该增加可以是至少1.2倍、至少1.5倍、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、或至少10倍的此类特性或特征的增加,相较于施用参考细胞组合物时的相同特性或特征。在一些实施方案中,一种或多种此类特性或特征的增加可在施用基因工程化细胞后的一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、或12个月内被观察到或出现。

[0192] 在一些实施方案中,参考细胞组合物可以是来自不具有或不疑似具有该癌症的受试者的血液的T细胞的组合物,或是除了尚未在TEC家族激酶的抑制剂存在下孵育或施用之外在相同或基本上相同的条件下获得、分离、生成、产生、孵育和/或施用的T细胞群。在一些实施方案中,该参考细胞组合物含有基本上相同的基因工程化细胞,其包括相同的重组受体例如CAR的表达。在一些方面中,此类T细胞经相同或基本相同地处理,诸如相似地制造、相似地配制、以相同或约相同的剂量施用,或其他相似因子。

[0193] 在一些实施方案中,具有增加的持久性的基因工程化细胞在施用它的受试者中表现出更好的效能。在一些实施方案中,相较于通过替代方法(诸如涉及施用参考细胞组合物)取得的持久性,施用后该受试者中基因工程化细胞(诸如表达CAR的T细胞)的持久性更久。在一些实施方案中,该持久性增加了至少或约至少1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或更多。

[0194] 在一些实施方案中,施用的细胞的持久性的程度或范围可在对受试者施用后检测或定量。例如,在一些方面中,定量PCR(qPCR)用于评定受试者的血液或血清或器官或组织(例如疾病位点)中表达该重组受体的细胞(例如表达CAR的细胞)的数量。在一些方面中,将持久性定量为每微克DNA中编码该受体(例如CAR)的DNA或质粒的拷贝,或定量为(例如)血液或血清的每微升样品中表达受体(例如表达CAR的)的细胞的数目,或每微升样品(例如血液或血清)或每总数的外周血单核细胞(PBMC)或白细胞中表达受体(例如表达CAR)的细胞的数目,或每微升样品中T细胞的数量。在一些实施方案中,还可进行通常使用对该受体特异的抗体检测表达该受体的细胞的流式细胞术测定法。基于细胞的测定法还可用于监测功

能性细胞的数目或百分比,诸如能够结合和/或中和和/或诱导针对该疾病或病况或表达由该受体识别的抗原的细胞的应答(例如细胞毒性应答)的细胞。在任何此类实施方案中,与该重组受体(例如表达CAR的细胞)相关的另一标记物的表达范围或水平可用于将该经施用的细胞与受试者中的内源性细胞区分开。

[0195] 还提供用于工程化、制备、和产生该细胞的方法,含有该细胞和/或抑制剂的组合物,和含有该细胞和/或抑制剂和用于使用、产生和施用(诸如依照所提供的组合疗法方法)该细胞和/或抑制剂的试剂盒和设备。

[0196] II. 组合疗法

[0197] 本文提供用于治疗疾病或病症(例如癌症或增殖性疾病)的组合疗法的方法,该方法包括对受试者施用1) TEC家族激酶的抑制剂和2) 免疫疗法或免疫治疗剂的组合疗法,该免疫疗法或免疫治疗剂诸如过继性免疫细胞疗法,例如T细胞疗法(例如表达CAR的细胞,例如T细胞)或啮合T细胞的或免疫调节性疗法,例如募集多特异性T细胞的抗体和/或检查点抑制剂。在一些实施方案中,该免疫疗法是包含T细胞的过继性免疫细胞疗法,该T细胞特异性识别和/或靶向与疾病或病症(例如癌症或增殖性疾病)相关的抗原。还提供组合和制品诸如试剂盒,该组合和制品含有包含该T细胞疗法的组合物和/或包含TEC家族激酶的抑制剂的组合物,和此类组合物和组合用于治疗或预防疾病、病况、和病症(包括癌症)的用途。

[0198] 在一些实施方案中,此类方法可包括在施用(例如开始施用)该T细胞疗法(例如表达CAR的T细胞)或其它疗法诸如啮合T细胞的疗法之前、同时、期间、过程期间(包括一次和/或定期的过程期间)、和/或随后施用该抑制剂。在一些实施方案中,该施用可涉及依次或间歇性施用该抑制剂和/或该免疫疗法或免疫治疗剂,例如T细胞疗法。

[0199] 在一些实施方案中,该细胞疗法是过继性细胞疗法。在一些实施方案中,该细胞疗法是或包含肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)疗法、转基因TCR疗法或表达重组受体的细胞疗法(任选为T细胞疗法),其任选是表达嵌合抗原受体(CAR)的细胞疗法。在一些实施方案中,该疗法靶向CD19或是靶向B细胞的疗法。在一些实施方案中,该细胞和用于施用该细胞的剂量方案可包括“细胞的施用”下的下列分部A中所述的任何细胞和剂量方案。

[0200] 在一些实施方案中,TEC家族激酶中的抑制剂抑制TEC家族的一种或多种激酶,包括布鲁顿氏酪氨酸激酶(Btk)、IL2可诱导的T细胞激酶(ITK)、tec蛋白酪氨酸激酶(TEC)、BMX非受体酪氨酸激酶(Etk)、和TXK酪氨酸激酶(TXK)。在一些实施方案中,该抑制剂是布鲁顿氏酪氨酸激酶(Btk)抑制剂。在一些实施方案中,该细胞和用于施用该抑制剂的剂量方案可包括“抑制剂的施用”下的下列分部B中所述的任何细胞和剂量方案。

[0201] 在一些实施方案中,提供该免疫疗法(诸如T细胞疗法(例如表达CAR的T细胞)或啮合T细胞的疗法)和抑制剂作为用于施用至该受试者的药物组合物。在一些实施方案中,该药物组合物含有治疗有效量的一种或两种用于组合疗法的药剂,例如如所述的过继性细胞疗法的T细胞和抑制剂。在一些实施方案中,该药剂经配制用于以分开的药物组合物施用。在一些实施方案中,本文提供的任何药物组合物可配制成为适合每轮施用的剂量形式。

[0202] 在一些实施方案中,该组合疗法(其包括施用该免疫疗法(例如T细胞疗法,包括工程化细胞,诸如CAR-T细胞疗法)和该抑制剂)施用至具有待治疗的疾病或病况(例如癌症)的或处于具有该疾病或病况(例如癌症)的风险的受试者或患者。在一些方面中,该方法治疗,例如,改善该疾病或病况的一种或多种症状,诸如通过减轻表达由该免疫疗法或免疫治

疗剂识别的(例如由工程化T细胞识别的)抗原的癌症中的肿瘤负荷。

[0203] 在一些实施方案中,经治疗的该疾病或病况可以是抗原的表达与疾病状况或病症的病因学相关和/或涉及其病因学(例如,导致、加剧或以其他方式涉及此类疾病、病况或病症)的任何疾病或病症。示例性疾病和病况可包括恶性肿瘤或细胞的转化相关联的疾病或病况(例如癌症)、自身免疫或炎症性疾病、或传染性疾病(例如通过细菌、病毒其它病原体导致的)。示例性抗原(其包括与经治疗的各种疾病和病况相关的抗原)包括本文所述的任何抗原。在特定的实施方案中,在组合疗法的工程化细胞上表达的重组受体(包括嵌合抗原受体或转基因TCR)特异性结合与该疾病或病况相关的抗原。

[0204] 在一些实施方案中,该疾病或病况是肿瘤,诸如实体瘤、淋巴瘤、白血病、血液肿瘤、转移瘤、或其它癌症或肿瘤类型。

[0205] 在一些实施方案中,该癌症或增殖性疾病是B细胞恶性肿瘤或血液恶性肿瘤。在一些实施方案中,该方法可用于治疗骨髓瘤、淋巴瘤或白血病。在一些实施方案中,该方法可用于治疗非霍奇金淋巴瘤(NHL)、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、急性髓样白血病(AML)、或骨髓瘤,例如多发性骨髓瘤(MM)。在一些实施方案中,该方法可用于治疗MM或DBCBL。在一些实施方案中,该癌症是CLL,CLL可包括SLL。

[0206] 在一些实施方案中,与该疾病或病症相关的抗原选自下组:ROR1、B细胞成熟抗原(BCMA)、tEGFR、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、间皮素、CEA、和乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3、或4、erbB二聚体、EGFR vIII、FBP、FCRL5、FCRH5、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、G蛋白偶联的受体5D(GPCR5D)、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、 κ 轻链、Lewis Y、L1-细胞细胞粘附分子、(L1-CAM)、黑色素瘤相关抗原(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、黑色素瘤优先表达的抗原(PRAME)、生存素、EGP2、EGP40、TAG72、B7-H6、IL-13受体a2(IL-13Ra2)、CA9、GD3、HMW-MAA、CD171、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2NY-ESO-1、PSCA、叶酸受体-a、CD44v6、CD44v7/8、avb6整合素、8H9、NCAM、VEGF受体、5T4、胎儿AchR、NKG2D配体、CD44v6、双抗原、和与通用标签相关联的抗原、癌症-睾丸抗原、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、G蛋白偶联的受体5D(GPCR5D)、瘤胚共同抗原、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、黄体酮受体、肝配蛋白B2、CD123、c-Met、GD-2、O-乙酰化GD2(OGD2)、CE7、肾母细胞瘤1(WT-1)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、CCL-1、CD138、和病原体特异性抗原。在一些实施方案中,该抗原是通用标签相关联或是通用标签。

[0207] 在一些实施方案中,该癌症或增殖性疾病不是表达B细胞抗原的癌症。在一些实施方案中,该B细胞抗原选自CD19、CD20、CD22和ROR1组成的组。在一些实施方案中,该癌症或增殖性疾病是非血液癌。在一些实施方案中,该癌症或增殖性疾病是实体瘤。在一些实施方案中,该癌症或增殖性疾病不表达CD19、CD20、CD22或ROR1。在一些实施方案中,所提供的方法采用不靶向或特异性结合CD19、CD20、CD22或ROR1的表达重组受体的T细胞(例如CAR-T细胞)。

[0208] 在一些实施方案中,该方法可用于治疗非血液癌,诸如实体瘤。在一些实施方案中,该方法可用于治疗膀胱癌、肺癌、脑癌、黑色素瘤(例如小细胞肺癌、黑色素瘤)、乳腺癌、

宫颈癌、卵巢癌、结直肠癌、胰腺癌、子宫内膜癌、食管癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、皮肤癌、甲状腺癌或子宫癌。在一些实施方案中,该癌症或增殖性疾病是癌症,该癌症是胰腺癌、膀胱癌、结直肠癌、乳腺癌、前列腺癌、肾癌、肝细胞癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、胰腺癌、直肠癌、甲状腺癌、子宫癌、胃癌、食管癌、头颈癌、黑色素瘤、神经内分泌癌、CNS癌、脑肿瘤、骨癌或软组织肉瘤。

[0209] 在一些实施方案中,该疾病或病况是传染性疾病或病况,诸如,但不限于,病毒、逆转录病毒、细菌、和原生动物传染、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,该疾病或病况是自身免疫或炎症性疾病或病况,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)、炎症性肠病、银屑病、硬皮症、自身免疫甲状腺疾病、格雷夫斯病、克罗恩氏病、多发性硬化症、哮喘、和/或与移植相关的疾病或病况。

[0210] 在一些实施方案中,本文提供的组合疗法受试者中进行,该受试者既往已经用该抑制剂或TEC家族激酶的另一种抑制剂(例如BTK抑制剂,诸如依鲁替尼)治疗,但不施用施用T细胞疗法(例如CAR+T细胞)或啮合T细胞的疗法。在一些情况中,在此类既往治疗后,该受试者在接受此类既往治疗持续至少6个月是难治的、产生抗性、已在缓解后复发、未取得CR,和/或表现出侵袭性疾病和/或该癌症的高风险特征。因此,应理解的是所提供的组合疗法可在既往已经接受该抑制剂或TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂,诸如依鲁替尼)的施用的受试者中进行。提及施用本公开中的抑制剂的时间,是指依照所提供的组合疗法方法,其相对于免疫疗法或免疫治疗剂(例如T细胞疗法(例如CAR+T细胞)或啮合T细胞的疗法)的施用抑制剂的时间,且不排除该受试者已经额外地既往施用了该抑制剂或TEC家族激酶的另一种抑制剂(例如依鲁替尼)的可能性。

[0211] 对于预防或治疗疾病,合适剂量的TEC家族激酶的抑制剂和/或免疫疗法(诸如T细胞疗法(例如表达CAR的T细胞)或啮合T细胞的疗法)可取决于待治疗的疾病的类型、特定的抑制剂、细胞和/或在细胞上表达的重组受体、疾病的严重性和过程、施用途径、出于预防性或治疗性目的是否施用该抑制剂和/或该免疫疗法(例如T细胞疗法)、既往疗法、施用频率、受试者的临床史和对该细胞的反应、和主治医生的判断。该组合物和细胞在一些实施方案中适合一次或在一系列治疗中施用至该受试者。描述了所提供的组合疗法的示例性剂量方案和时间表。

[0212] 在一些实施方案中,该免疫疗法(例如T细胞疗法)和该TEC家族激酶的抑制剂作为又一组合治疗的部分施用,其可与另一治疗性干预同时地或以任何顺序依次地施用。在一些背景中,该免疫疗法(例如工程化T细胞,诸如表达CAR的T细胞)与另一疗法以足够接近的时间共施用使得免疫疗法增强一种或多种额外治疗剂的作用,或反之亦然。在一些实施方案中,该细胞在该一种或多种额外的治疗剂之前施用。在一些实施方案中,该免疫疗法(例如工程化T细胞,诸如表达CAR的T细胞)在该一种或多种额外的治疗剂之后施用。在一些实施方案中,该组合疗法方法进一步包括淋巴细胞清除性疗法,诸如施用化学治疗剂。在一些实施方案中,该组合疗法进一步包括施用另一种治疗剂,诸如抗癌剂、检查点抑制剂、或另一种免疫调节剂。用途包括组合疗法在此类方法和治疗中的用途,和此类组合物在制备药物以便进行此类组合疗法方法的用途。在一些实施方案中,该方法和用途由此治疗该受试者中的疾病或病况或病症(诸如癌症或增殖性疾病)。

[0213] 在施用该免疫疗法(例如T细胞疗法,诸如CAR-T细胞疗法)和/或TEC家族激酶的抑制剂之前、期间或随后,在一些实施方案中的免疫疗法的生物活性(例如该工程化细胞群的生物活性)例如通过许多已知方法中的任何一种测量。要评定的参数包括工程化的细胞破坏靶细胞的能力、T细胞活性的持久性和其他测量,诸如使用本领域已知的任何合适的方法(诸如以下部分IV中进一步描述的测定法)测量的。在一些实施方案中,该细胞(用于基于T细胞的疗法施用的T细胞)的生物活性通过测定(诸如在用抗原再刺激时)细胞毒性细胞杀伤、表达和/或分泌一种或多种细胞因子、增殖或扩增来测量。在一些方面中,该生物活性通过评定疾病负荷和/或临床效果(诸如肿瘤负荷或负担的降低)来测量。在一些实施方案中,该组合疗法的一种或两种药剂的施用和/或该疗法的任何重复的施用可基于在施用该组合疗法的一种或两种药剂之前、期间、过程期间、或之后的测定法的结果来确定。

[0214] 在一些实施方案中,相较于仅涉及该抑制剂或该细胞疗法的单一疗法的治疗,该抑制剂结合该细胞疗法的组合作用可以是协同的。例如,在一些实施方案中,本文所提供的方法、组合物和制品导致所期望的治疗效果的增加或改善,诸如减少或抑制一种或多种与癌症相关联的症状的增加或改善。

[0215] 在一些实施方案中,该抑制剂增加该工程化T细胞(诸如CART-细胞)的扩增或增殖。在一些实施方案中,施用至受试者后可在体内观察到扩增或增殖的增加。在一些实施方案中,工程化T细胞(例如CART-细胞)的数目的增加增加为大于或大于约1.2倍、1.5倍、2.0倍、3.0倍、4.0倍、5.0倍、6.0倍、7.0倍、8.0倍、9.0倍、10.0倍或更多。

[0216] A. 免疫疗法(例如T细胞疗法或啮合T细胞的疗法)的施用

[0217] 在本文提供的该方法、组合物、组合、试剂盒和用途的一些实施方案中,该组合疗法包括对受试者施用免疫疗法,诸如T细胞疗法(例如表达CAR的T细胞)或啮合T细胞的疗法。此类疗法可在施用如所述的TEK家族激酶的一种或多种抑制剂之前、随后、同时施用。

[0218] 在一些实施方案中,该免疫疗法是基于细胞的疗法,该基于细胞的疗法是或包括施用靶向病变(诸如肿瘤或癌症)的表面上表达的分子的细胞(诸如免疫细胞,例如T细胞或NK细胞)。在一些实施方案中,该免疫细胞表达T细胞受体(TCR)或其它抗原结合受体。在一些实施方案中,该免疫细胞表达重组受体,诸如转基因TCR或嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,该细胞对于该受试者是自体的。在一些实施方案中,该细胞对于该受试者是同种异体的。以下描述了供在所提供的方法中使用的此类细胞疗法(例如T细胞疗法)的示例。

[0219] 1. 啮合T细胞疗法

[0220] 在一些实施方案中,该免疫疗法是或包含啮合T细胞的疗法,该啮合T细胞的疗法是或包含能够结合在T细胞上表达的表面分子的结合分子。在一些实施方案中,该表面分子是T细胞的激活组成,诸如T细胞受体复合物的组成。在一些实施方案中,该表面分子是CD3或是CD2。在一些实施方案中,该啮合T细胞的疗法是或包含抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,该啮合T细胞的疗法是双特异性抗体,其含有至少一种结合T细胞的激活组成(例如T细胞表面分子,例如CD3或CD2)的抗原结合域和至少一种结合靶细胞上的表面抗原(诸如肿瘤或癌症细胞上的表面抗原,例如如本文所述的所列的抗原中的任一种,例如CD19)的抗原结合域。在一些实施方案中,此类抗体与其两个靶标的同时或近乎同时结合可导致该靶细胞和T细胞之间暂时的相互作用,从而导致T细胞的激活,例如细胞毒性活性,和该靶细胞的裂解。

[0221] 在此类示例性双特异性抗体中,T细胞衔接器是双特异性T细胞衔接器(BiTE)分子,其含有通过柔性接头融合的scFv分子(参见例如Nagorsen和Bauerle,Exp Cell Res 317,1255-1260(2011);串联scFv分子,其经由例如柔性接头彼此融合,且进一步含有由能够稳定交联的第一和第二亚基组成的Fc域(WO2013026837);双体抗体和其衍生物,其包括串联双抗体(Holliger等,ProtEng 9,299-305(1996);Kipriyanov等,J Mol Biol 293,41-66(1999));双亲和力重定向(DART)分子,其可包括具有C末端二硫桥的双抗体形式;或三功能单抗(triomab),其包括全杂交小鼠/大鼠IgG分子(Seimetz等,Cancer Treat Rev 36,458-467(2010))。在一些实施方案中,该啮合T细胞的疗法是博纳吐单抗(blinatumomab)或AMG 330。任何此类T细胞衔接器可用于所提供的方法中。

[0222] 2.T细胞疗法

[0223] 在一些方面中,该T细胞疗法是或包含肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)疗法、转基因TCR疗法或包含基因工程化细胞的T细胞疗法,诸如表达重组受体的细胞疗法。在一些实施方案中,该重组受体特异性结合配体,诸如与疾病或病况相关联的配体,例如与肿瘤或癌症的细胞相关联的或在肿瘤或癌症的细胞上表达的配体。在一些实施方案中,该T细胞疗法包括施用经工程化以表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞。

[0224] 在一些实施方案中,所提供的细胞表达和/或经工程化以表达受体,诸如重组受体(包括含有配体结合域或其结合片段的重组受体)和T细胞受体(TCR)和其组成,和/或功能性非TCR抗原受体,诸如嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,该重组受体含有特异性结合抗原的细胞外配体结合域。在一些实施方案中,该重组受体是CAR,该CAR含有特异性结合抗原的细胞外抗原识别域。在一些实施方案中,该配体(诸如抗原)是在细胞的表面上表达的蛋白。在一些实施方案中,该CAR是TCR样CAR且该抗原是经加工的肽抗原,诸如细胞内蛋白的肽抗原,其(像TCR)在主要组织相容性复合物(MHC)分子的背景下在细胞表面上被识别。

[0225] 在以下部分III中描述了工程化细胞,包括含有重组受体的工程化细胞。示例性重组受体(包括CAR和重组TCR),以及用于工程化细胞和将该受体导入细胞的方法包括下列中描述的受体和方法,例如,国际专利申请公开号WO200014257、WO2013126726、WO2012/129514、WO2014031687、WO2013/166321、WO2013/071154、WO2013/123061美国专利申请公开号US2002131960、US2013287748、US20130149337、美国专利号:6,451,995、7,446,190、8,252,592、8,339,645、8,398,282、7,446,179、6,410,319、7,070,995、7,265,209、7,354,762、7,446,191、8,324,353、和8,479,118,和欧洲专利申请号EP2537416,和/或Sadelain等,Cancer Discov.2013April;3(4):388-398;Davila等(2013)PLoS ONE 8(4):e61338;Turtle等,Curr.Opin.Immunol.,2012October;24(5):633-39;Wu等,Cancer,2012March 18(2):160-75。在一些方面中,该基因工程化抗原受体包括美国专利号:7,446,190中所述和国际专利申请公开号:WO/2014055668A1中所述的CAR。

[0226] 用于施用供过继性细胞疗法的工程化细胞的方法是已知的且可与所提供的方法和组合物一起使用。例如,过继性T细胞疗法方法在下列中描述: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)。参见,例如,Themeli等,(2013)Nat Biotechnol.31(10):928-933;Tsukahara等,(2013)Biochem Biophys Res Commun 438(1):84-9;Davila等,

(2013) PLoS ONE 8 (4) :e61338。

[0227] 在一些实施方案中,该细胞疗法(例如过继性T细胞疗法)通过自体转移进行,其中该细胞是经分离的和/或以其他方式从接受该细胞疗法的受试者中制备,或来自衍生自此类受试者的样品。因此,在一些方面中,该细胞衍生自需要治疗和该细胞的受试者(例如患者),该细胞在分离且加工后,施用至同一受试者。

[0228] 在一些实施方案中,该细胞疗法(例如过继性T细胞疗法)通过同种异体转移进行,其中该细胞经分离和/或以其他方式从除接受或最终接受该细胞疗法的受试者(例如第一受试者)外的受试者中制备。在此类实施方案中,之后该细胞施用至同一物种的不同受试者,例如第二受试者。在一些实施方案中,该第一和第二受试者在遗传学上是相同的。在一些实施方案中,该第一和第二受试者在遗传学上是相似的。在一些实施方案中,该第二受试者表达与该第一受试者相同的HLA类别或超型。

[0229] 该细胞可通过任何合适的方式施用。该细胞以取得治疗作用(诸如肿瘤负荷的降低)的给药方案施用。给药和施用可部分取决于TEC家族激酶的抑制剂的施用表,该TEC家族激酶的抑制剂可在开始施用该T细胞疗法之前、之后和/或同时施用。该T细胞疗法的多种给药计划包括但不限于在各种时间点时的单次或多次施用、推注施用、和脉输注。

[0230] a. 组合物和配制剂

[0231] 在一些实施方案中,T细胞疗法(诸如包含具有重组抗原受体(例如CAR或TCR)的工程化细胞的此类T细胞疗法)的细胞剂量作为组合物或配制剂提供,诸如药物组合物或配制剂。此类组合物可依照所提供的方法使用,诸如用于预防或治疗疾病、病况、和病症。

[0232] 在一些实施方案中,该T细胞疗法(诸如工程化T细胞(例如CART细胞))与药物可接受的载剂一起配制。在一些方面中,该载剂的选择部分地通过特定细胞或药剂和/或通过施用的方法确定。因此,存在多种合适的配制剂。例如,该药物组合物可含有防腐剂。合适的防腐剂可包括,例如,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。在一些方面中,使用两种或多种防腐剂的混合物。防腐剂或其混合物通常按总组合物的重量计的约0.0001%至约2%的量存在。例如通过Remington的Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) 描述了载剂。药物可接受的载剂在所采用的剂量和浓度处对接受者通常是无毒的,且包括但不限于:缓冲液,诸如磷酸盐、柠檬酸盐、和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白,诸如血清白蛋白、明胶、或免疫球蛋白;亲水聚合物诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸、或赖氨酸;单糖,二糖,和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂诸如EDTA;糖诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐抗衡离子诸如钠;金属复合物(例如Zn-蛋白复合物);和/或非离子表面活性剂诸如聚乙二醇(PEG)。

[0233] 在一些方面中,缓冲剂包括在该组合物中。适合的缓冲剂包括,例如,柠檬酸、柠檬酸钠、磷酸、磷酸钾和多种其它酸和盐。在一些方面中,使用两种或多种缓冲剂的混合物。缓冲剂或其混合物通常按总组合物重量计的约0.001%至约4%的量存在。用于制备可施用的药物组合物的方法是已知的。示例性方法更具体地描述于,例如,Remington: The Science

and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005)。

[0234] 该配制剂可包括水溶液。该配制剂或组合物还可含有一种以上的活性成分, 该活性成分对正在用该细胞或药剂预防或治疗的特定适应症、疾病或病况有用, 其中各自的活性不会不利地影响彼此。此类活性成分适合以对预期目的有效的量组合存在。因此, 在一些实施方案中, 该药物组合物进一步包括其它药物活性药剂或药物, 诸如化学治疗剂, 例如天冬酰胺酶、白消安、卡铂、顺铂、柔红霉素 (daunorubicin)、多柔比星 (doxorubicin)、氟尿嘧啶、吉西他滨 (gemcitabine)、羟基脲、甲氨蝶呤 (methotrexate)、紫杉醇 (paclitaxel)、利妥昔单抗 (rituximab)、长春碱 (vinblastine)、长春新碱 (vincristine) 等。

[0235] 在一些实施方案中, 该药物组合物含有有效治疗或预防该疾病或病况的量的细胞, 诸如治疗有效量或预防有效量。在一些实施方案中, 治疗或预防功效通过定期评估经治疗的受试者来监测。对于数天或更长时间的重复施用 (其取决于病况), 重复治疗直至出现疾病症状的所期望的抑制。然而, 其它剂量方案可能是有用的或可确定。所期望的剂量可通过单次推注施用该组合物, 或通过多次推注施用该组合物, 或通过连续输注施用该组合物来递送。

[0236] 该细胞可使用标准施用技术、配制剂和/或设备施用。提供了用于储存和施用该组合物的配制剂和设备, 诸如注射器和药水瓶。关于细胞, 施用可以是自体的或异体的。例如, 免疫应答细胞或祖细胞可从一位受试者中获得, 且施用至同一受试者或不同的、相容的受试者。外周血衍生的免疫应答细胞或它们的后代 (例如体内、离体或体外衍生的) 可经由局部注射施用, 包括导管施用、全身性注射、局部注射、静脉注射、或非肠道施用。当施用治疗组合物 (例如含有经基因修饰的免疫应答细胞的药物组合物) 时, 其通常配制成单位剂量可注射的形式 (溶液、悬浮液、乳液)。

[0237] 配制剂包括用于口服、静脉内、腹膜内、皮下、肺部、透皮、肌内、鼻内、口腔、舌下或栓剂施用的配制剂。在一些实施方案中, 该药剂或细胞群经非肠道施用。如本文所用的术语“非肠道”包括静脉内、肌内、皮下、直肠、阴道和腹膜内施用。在一些实施方案中, 该药剂或细胞群使用通过静脉内、腹膜内或皮下注射的外周全身性递送施用至受试者。

[0238] 在一些实施方案中, 组合物作为无菌液体制剂提供, 例如, 等渗水溶液、悬浮液、乳液、分散液或粘性组合物, 该无菌液体制剂在一些方面中可缓冲至选择的pH。液体制剂通常比凝胶、其他粘性组合物和固体组合物更容易制备。因此, 液体组合物稍微更方便施用, 特别是通过注射。另一方面, 粘性组合物可在提供与特定组织的更长接触时间的合适的粘度范围内配制。液体或粘性组合物可包含载剂, 该载剂可以是含有 (例如) 水、盐水、磷酸盐缓冲的盐水、多元醇 (例如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇) 及其合适的混合物的溶剂或分散介质。

[0239] 无菌可注射的溶液可通过将该细胞并入溶剂中来配制, 诸如与合适的载体、稀释剂或赋形剂诸如无菌水、生理盐水、葡萄糖、葡萄糖等混合。该组合物还可被冻干。该组合物可含有辅助物质诸如润湿剂、分散剂或乳化剂 (例如甲基纤维素)、pH缓冲剂、胶凝剂或粘度增强剂、防腐剂、调味剂、着色剂等, 这取决于施用途径和所期望的制剂。在一些方面中, 可以参考标准文章来制备适合的制剂。

[0240] 可添加增强该组合物的稳定性和无菌性的多种添加剂, 该添加剂包括抗菌防腐剂、抗氧化剂、螯合剂和缓冲液。防止微生物的作用可通过多种抗细菌剂和抗真菌剂确保,

例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等。可注射药物形式的延长吸收可通过使用延迟吸收的药剂(例如单硬脂酸铝和明胶)来实现。

[0241] 用于体内施用的配制剂通常是无菌。无菌性可例如通过穿过无菌过滤膜的过滤容易地完成。

[0242] 为了预防或治疗疾病,合适的剂量可取决于待治疗的疾病的类型、药剂的类型、细胞或重组受体的类型、疾病的严重性和过程、该药剂或细胞是否出于预防或治疗目的被施用、既往治疗、受试者的临床史和对该药剂或该细胞的应答、和主治医生的判断。在一些实施方案中,该组合物适合以一次或在一系列的治疗内施用至该受试者。

[0243] 在一些情况中,该细胞疗法作为包含该细胞的单个药物组合物施用。在一些实施方案中,给定剂量通过单次推注施用该细胞或药剂来施用。在一些实施方案中,其通过多次推注施用该细胞或药剂来施用,例如,在不多于3天的时间内,或通过连续输注施用该细胞或药剂。

[0244] b. 剂量表和施用

[0245] 在一些实施方案中,细胞的剂量依照所提供的组合疗法方法施用至受试者。在一些实施方案中,剂量的大小或时间根据该受试者中的特定疾病或病况确定。鉴于所提供的描述,根据经验确定特定疾病的剂量的大小或时间在技术人员的水平内。

[0246] 在某些实施方案中,该细胞,或亚型细胞的单个群以约10万至约1000亿个细胞的范围和/或每千克该受试者体重约10万至约1000亿个细胞的细胞量施用至该受试者,诸如,例如10万至约500亿个细胞(例如约500万个细胞、约2500万个细胞、约5亿个细胞、约10亿个细胞、约50亿细胞、约200亿个细胞、约300亿个细胞、约400亿个细胞、或由任何两个前述值定义的范围),100万至约5000万个细胞(例如约500万个细胞、约2500万个细胞、约5亿个细胞、约10亿个细胞、约50亿个细胞、约200亿个细胞、约300亿个细胞、约400亿个细胞,或由任何两个前述值定义的范围),诸如约1000万至约1000亿个细胞(例如约2000万个细胞、约3000万个细胞、约4000万个细胞、约6000万个细胞、约7000万个细胞、约8000万个细胞、约9000万个细胞、约100亿个细胞、约250亿个细胞、约500亿个细胞、约750亿个细胞、约900亿个细胞,或由任何两个前述值定义的范围),且在一些情况中,约1亿个细胞至约500亿个细胞(例如约1.20亿个细胞、约2.50亿个细胞、约3.50亿个细胞、约4.50亿个细胞、约6.50亿个细胞、约8亿个细胞、约9亿个细胞、约30亿个细胞、约300亿个细胞、约450亿个细胞)或介于这些范围和/或每千克该受试者的体重中的任何值。剂量可根据该疾病或病症和/或患者和/或其它治疗的特有属性变化。在一些实施方案中,此类值是指表达重组受体的细胞的数目;在其它实施方案中,它们指T细胞或PBMC或施用的总细胞的数目。

[0247] 在一些实施方案中,该细胞疗法包括施用包含一定数目的细胞的剂量,该细胞数目至少为或至少约为或为或为约 0.1×10^6 个细胞/kg该受试者的体重、 0.2×10^6 个细胞/kg、 0.3×10^6 个细胞/kg、 0.4×10^6 个细胞/kg、 0.5×10^6 个细胞/kg、 1×10^6 个细胞/kg、 2.0×10^6 个细胞/kg、 3×10^6 个细胞/kg或 5×10^6 个细胞/kg。

[0248] 在一些实施方案中,该细胞疗法包括施用包含一定数目的细胞的剂量,该细胞数目介于或介于约 0.1×10^6 个细胞/kg该受试者的体重和 1.0×10^7 个细胞/kg之间、介于或介于约 0.5×10^6 个细胞/kg和 5×10^6 个细胞/kg之间、介于或介于约 0.5×10^6 个细胞/kg和 3×10^6 个细胞/kg之间、介于或介于约 0.5×10^6 个细胞/kg和 2×10^6 个细胞/kg之间、介于或介于约

0.5x 10⁶个细胞/kg和1x 10⁶细胞/kg之间、介于或介于约1.0x 10⁶个细胞/kg该受试者的体重和5x 10⁶个细胞/kg之间、介于或介于约1.0x 10⁶个细胞/kg和3x10⁶个细胞/kg之间、介于或介于约1.0x 10⁶个细胞/kg和2x 10⁶个细胞/kg之间、介于或介于约2.0x 10⁶个细胞/kg该受试者的体重和5x 10⁶个细胞/kg之间、介于或介于约2.0x 10⁶个细胞/kg和3x 10⁶个细胞/kg之间或介于或介于约3.0x 10⁶个细胞/kg该受试者的体重和5x 10⁶个细胞/kg,每个数值包括在内。

[0249] 在一些实施方案中,该细胞剂量包含介于2x 10⁵或约2x 10⁵个该细胞/kg和2x 10⁶或约2x 10⁶个该细胞/kg之间,诸如介于4x 10⁵或约4x 10⁵个该细胞/kg和1x 10⁶或约1x 10⁶个该细胞/kg之间或介于6x 10⁵或约6x10⁵个该细胞/kg和8x 10⁵或约8x 10⁵个该细胞/kg之间。在一些实施方案中,该细胞剂量包含不多于2x 10⁵个该细胞(例如表达抗原的,诸如表达CAR的细胞)每千克体重的该受试者(细胞/kg),诸如不多于3x 10⁵个细胞/kg或约3x 10⁵个细胞/kg,不多于4x 10⁵个细胞/kg或约4x 10⁵个细胞/kg、不多于5x 10⁵个细胞/kg或约5x 10⁵个细胞/kg、不多于6x 10⁵个细胞/kg或约6x 10⁵个细胞/kg、不多于7x 10⁵个细胞/kg或约7x 10⁵个细胞/kg,不多于8x 10⁵个细胞/kg或约8x 10⁵个细胞/kg、不多于9x 10⁵个细胞/kg或约9x 10⁵个细胞/kg,不多于1x 10⁶个细胞/kg或约1x 10⁶个细胞/kg,或不多于2x 10⁶个细胞/kg或约2x 10⁶个细胞/kg。在一些实施方案中,该细胞剂量包含至少或至少约或为或约2x 10⁵个该细胞(例如表达抗原的,诸如表达CAR的细胞)每千克该受试者的体重(细胞/kg),诸如至少或至少约或为或约3x 10⁵个细胞/kg、至少或至少约或为或约4x 10⁵个细胞/kg、至少或至少约或为或约5x 10⁵个细胞/kg、至少或至少约或为或约6x10⁵个细胞/kg、至少或至少约或为或约7x 10⁵个细胞/kg、至少或至少约或为或约8x 10⁵个细胞/kg、至少或至少约或为或约9x 10⁵个细胞/kg、至少或至少约或为或约1x 10⁶个细胞/kg或至少或至少约或为或约2x 10⁶个细胞/kg。

[0250] 在某些实施方案中,该细胞或单个群的亚型细胞以100万至1000亿个细胞的范围和/或每千克体重100万至1000亿个细胞的量施用,诸如,例如,100万至约500亿个细胞(例如约500万个细胞、约2500万个细胞、约5亿个细胞、约10亿个细胞、约50亿个细胞、约200亿个细胞、约300亿个细胞、约400亿个细胞或由任何两个前述值定义的范围),诸如约1000万至约1000亿个细胞(例如约2000万个细胞、约3000万个细胞、约4000万个细胞、约6000万个细胞、约7000万个细胞、约8000万个细胞、约9000万个细胞、约100亿个细胞、约250亿个细胞、约500亿个细胞、约750亿个细胞、约900亿个细胞或由任何两个前述值定义的范围),且在一些情况中,为约1亿个细胞至约500亿个细胞(例如约1.2亿个细胞、约2.5亿个细胞、约3.5亿个细胞、约4.5亿个细胞、约6.5亿个细胞、约8亿个细胞、约9亿个细胞,约30亿个细胞、约300亿个细胞、约450亿个细胞)或介于这些范围和/或每千克该受试者的体重中的任何值。剂量可根据该疾病或病症和/或患者和/或其它治疗的特有属性变化。

[0251] 在一些实施方案中,该细胞剂量是细胞的平坦剂量或细胞的固定剂量,使得细胞剂量不依赖于或基于受试者的体表面积或体重。

[0252] 在一些实施方案中,例如,当该受试者是人时,该剂量包括少于约1x10⁸个总表达重组受体(例如CAR)的细胞、T细胞或外周血单核细胞(PBMC),例如,以约1x 10⁶至5x 10⁸个此类细胞的范围,诸如2x 10⁶、5x 10⁶、1x 10⁷、5x 10⁷、1x 10⁸或5x 10⁸个总此类细胞,或任何两个前述值之间的范围。在一些实施方案中,当该受试者是人时,该剂量包括介于约1x

10^6 和 5×10^8 之间个总表达重组受体(例如CAR)的细胞,例如,以约 1×10^7 至 2×10^8 个此类细胞的范围,诸如 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 或 1.5×10^8 个总此类细胞,或任何两个前述值之间的范围。在一些实施方案中,该患者被施用多个剂量,且每个剂量或总剂量可以在任何前述值内。在一些实施方案中,该细胞剂量包括施用 1×10^5 至 5×10^8 ,或约 1×10^5 至 5×10^8 个总表达重组受体的T细胞或总T细胞, 1×10^5 至 1×10^8 个总表达重组受体的T细胞或总T细胞, 5×10^5 至 1×10^7 或约 5×10^5 至 1×10^7 个总表达重组受体的T细胞或总T细胞,或 1×10^6 至 1×10^7 或约 1×10^6 至 1×10^7 个总表达重组受体的T细胞或总T细胞,每个数值包括在内。

[0253] 在一些实施方案中,该剂量的T细胞包括CD4+T细胞、CD8+T细胞或CD4+和CD8+T细胞。

[0254] 在一些实施方案中,例如,当该受试者是人时,该剂量(包括包括CD4+和CD8+T细胞的剂量)的CD8+T细胞包括介于约 1×10^6 和 1×10^8 之间个总表达重组受体(例如CAR)的CD8+细胞,例如,以约 5×10^6 至 1×10^8 个此类细胞的范围,诸如 1×10^7 、 2.5×10^7 、 5×10^7 、 7.5×10^7 、 1×10^8 或 5×10^8 个总此类细胞,或任何两个前述值之间的范围。在一些实施方案中,该患者被施用多剂量,且每个剂量或总剂量可以在任何前述值内。在一些实施方案中,该细胞剂量包括施用 1×10^7 至 0.75×10^8 或约 1×10^7 至 0.75×10^8 个总表达重组受体的CD8+T细胞、 1×10^7 至 2.5×10^7 或约 1×10^7 至 2.5×10^7 个总表达重组受体的CD8+T细胞、 1×10^7 至 0.75×10^8 或约 1×10^7 至 0.75×10^8 个总表达重组受体的CD8+T细胞,每个数值包括在内。在一些实施方案中,该细胞剂量包括施用 1×10^7 、 2.5×10^7 、 5×10^7 、 7.5×10^7 、 1×10^8 或 5×10^8 ,或约 1×10^7 、 2.5×10^7 、 5×10^7 、 7.5×10^7 、 1×10^8 或 5×10^8 个总表达重组受体的CD8+T细胞。

[0255] 在一些实施方案中,该细胞(例如表达重组受体的T细胞)剂量作为单剂量施用至该受试者或在两周、一个月、三个月、六个月、一年或更长时间内仅施用一次。

[0256] 在过继性细胞疗法的背景下,施用规定“剂量”的细胞涵盖施用该规定量或数目的细胞作为单个组合物和/或单次不间断的施用,例如作为单次注射或连续输注,且还涵盖施用该规定量或数目的细胞作为分剂量,其在指定的时间段内(诸如不超过3天),以多个单独的组合物或输注提供。因此,在一些背景中,该剂量是单次或连续施用指定数目的细胞,在单个时间点给予或开始。在一些背景中,然而,该剂量在不多于三天的时间内(诸如每天一次达三天或达两天)以多次注射或输注,或通过在一天的时间内的多次输注施用。

[0257] 因此,在一些方面中,该剂量的细胞以单个药物组合物施用。在一些实施方案中,该剂量的该细胞以多个组合物施用,该多个组合物共同含有该剂量的该细胞。

[0258] 在一些实施方案中,术语“分剂量”是指分开的剂量,使其在多于一天内给药。此类型的给药涵盖在本方法中,且被认为是单剂量。在一些实施方案中,分剂量的细胞在不多于三天的时间内以多个组合物施用,该组合物包含该剂量的该细胞。

[0259] 因此,该细胞剂量可作为分剂量施用,例如随时间施用的分剂量。例如,在一些实施方案中,该剂量可在2天或3天内施用受试者。用于分次给药的示例性方法包括在第一天施用25%的该剂量并在第二天施用剩余75%的该剂量。在其它实施方案中,33%的该剂量可在第一天施用且剩余67%在第二天施用。在一些方面中,10%的该剂量在第一天施用,30%的该剂量在二天施用,且60%的该剂量在第三天施用。在一些实施方案中,该分剂量不覆盖在3天以上。

[0260] 在一些实施方案中,该剂量的细胞可通过施用多个组合物或溶液(诸如含有该剂

量的一些细胞的第一和第二组合物或溶液,任选为多个,每个)施用。在一些方面中,该多个组合物任选在某个时间段内()单独地或独立地施用,每个组合物含有不同细胞群和/或细胞亚型。例如,该细胞群或细胞亚型可分别包括CD8⁺和CD4⁺T细胞和/或分别富集CD8⁺和CD4⁺的群,例如,各自独立地包括经基因工程化以表达该重组受体的细胞的CD4⁺和/或CD8⁺T细胞。在一些实施方案中,开始施用该剂量包括施用包含一定剂量的CD8⁺T细胞或一定剂量的CD4⁺T细胞的第一组合物和施用包含其它剂量的CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞的第二组合物。

[0261] 在一些实施方案中,该组合物或剂量的施用,例如施用多个细胞组合物,涉及单独地施用该细胞组合物。在一些方面中,该单独施用可同时地或以任何顺序依次地进行。在一些实施方案中,该剂量包含第一组合物和第二组合物,且该第一组合物和第二组合物间隔0至12小时、间隔0至6小时或0至2小时施用。在一些实施方案中,该第一组合物的施用的开始和该第二组合物的施用的开始间隔不多于2小时、不多于1小时或不多于30分钟,间隔不多于15分钟、不多于10分钟或不多于5分钟进行。在一些实施方案中,该第一组合物的施用的开始和/或完成和该第二组合物的施用的完成和/或开始间隔不多于2小时、不多于1小时或不多于30分钟,间隔不多于15分钟、不多于10分钟或不多于5分钟进行。

[0262] 在一些组合物中,该第一组合物,例如该剂量的第一组合物,包含CD4⁺T细胞。在一些组合物中,该第一组合物,例如该剂量的第一组合物,包含CD8⁺T细胞。在一些实施方案中,该第一组合物在该第二组合物之前施用。

[0263] 在一些实施方案中,细胞剂量或细胞组合物包括表达重组受体的CD4⁺细胞与表达重组受体的CD8⁺细胞和/或CD4⁺细胞与CD8⁺细胞的明确比例或目标比例,其比例任选是近似1:1或介于近似1:3和近似3:1之间,诸如近似1:1。在一些方面中,以不同细胞群的目标比例或所期望的比例(诸如CD4⁺:CD8⁺比例或CAR⁺CD4⁺:CAR⁺CD8⁺比例,例如1:1)施用组合物或剂量涉及施用含有该群中的一种的细胞组合物,且然后施用包含该群中的其它种的单独细胞组合物,其中该施用以或近似地以该目标或所期望的比例。在一些方面中,以明确的比例施用细胞剂量或组合物导致T细胞疗法的改善的扩增、持久性和/或抗肿瘤活性。

[0264] 在一些实施方案中,该受试者接受该细胞的多个剂量,例如两个或更多个剂量或多个连续剂量。在一些实施方案中,将两个剂量施用至受试者。在一些实施方案中,该受试者接受连续剂量,例如第二剂量,该连续剂量在第一剂量后近似4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21天施用。在一些实施方案中,多个连续剂量在第一剂量之后施用,使得额外剂量在施用该连续剂量后施用。在一些方面中,以额外剂量施用至该受试者的细胞数目与第一剂量和/或连续剂量相同或相似。在一些实施方案中,该额外剂量大于先前剂量。

[0265] 在一些方面中,第一和/或连续剂量的大小基于一种或多种标准确定,诸如受试者对在先治疗(例如化学疗法)的应答,受试者中的疾病负荷,诸如肿瘤负担、体积、大小或程度、转移范围或类型、该受试者发展有毒结果(例如CRS、巨噬细胞激活综合征、肿瘤溶解综合征、神经毒性和/或对施用的细胞和/或重组受体的宿主免疫应答)的阶段和/或可能性或发病率。

[0266] 在一些方面中,施用该第一剂量和施用该连续剂量之间的时间为约9至约35天、约14至约28天,或15至27天。在一些实施方案中,该连续剂量的施用在施用该第一剂量后的多于约14天且少于约28天的时间点。在一些方面中,该第一和连续剂量之间的时间为约21天。

在一些实施方案中,额外剂量(例如连续剂量)在施用该连续剂量后施用。在一些方面中,该额外的连续剂量在施用在先剂量后至少约14且少于约28天施用。在一些实施方案中,该额外的剂量在该在先剂量后少于约14天施用,例如在该在先剂量后4、5、6、7、8、9、10、11、12或13天。在一些实施方案中,剂量在该在先剂量后少于约14天不施用和/或剂量在该在先剂量后多于约28天不施用。

[0267] 在一些实施方案中,细胞(例如表达重组受体的细胞)剂量包含两个剂量(例如双倍剂量),包含第一剂量的该T细胞和连续剂量的该T细胞,其中该第一剂量和该第二剂量的一个剂量或二者包括施用分剂量的T细胞。

[0268] 在一些实施方案中,该细胞剂量通常足够大以有效减轻疾病负荷。

[0269] 在一些实施方案中,该细胞以期望的剂量施用,该期望的剂量在一些方面中包括期望剂量或数目的细胞或细胞类型和/或期望比例的细胞类型。因此,细胞的剂量在一些实施方案中基于细胞的总数目(或每kg体重的数目)和单个群或亚型的期望比例,诸如CD4⁺与CD8⁺比例。在一些实施方案中,细胞的剂量基于个体群或个体细胞类型中的细胞的期望的总数目(或每kg体重的数目)。在一些实施方案中,该剂量基于此类特征的组合,诸如个体群中的总细胞的期望数目、期望比例和细胞的期望的总数目。

[0270] 在一些实施方案中,细胞群或细胞亚型(诸如CD8⁺和CD4⁺T细胞)在总细胞(诸如期望剂量的T细胞)的期望剂量的耐受差异处或之内施用。在一些方面中,该期望剂量是细胞的期望数目或每单位的被施用了该细胞的受试者体重的细胞的期望数目,例如细胞/kg。在一些方面中,该期望的剂量为或高于细胞的最小数目或每单位体重的细胞的最小数目。在一些方面中,在以期望剂量施用的总细胞中,个体群或亚型以期望的或近似期望的输出比率(例如CD4⁺与CD8⁺比率)存在,例如在此类比例的某个耐受差异或误差内。

[0271] 在一些实施方案中,该细胞在细胞的单个群或细胞亚型的一个或多个的期望剂量的耐受差异处或之内施用,诸如期望剂量的CD4⁺细胞和/或期望剂量的CD8⁺细胞。在一些方面中,期望剂量是该亚型或群的细胞的期望数目,或每单位的被施用了该细胞的受试者体重的此类细胞的期望数目,例如细胞/kg。在一些方面中,期望剂量为或高于该群或亚型的细胞最小数目或每单位体重的该群或亚型的细胞的最小数目。

[0272] 因此,在一些实施方案中,该剂量基于总细胞的期望的固定剂量和期望比例,和/或基于个体亚型或亚群中的一个或多个(例如每个)的期望的固定剂量。因此,在一些实施方案中,该剂量基于T细胞的期望的固定或最小剂量和CD4⁺与CD8⁺细胞的期望比例,和/或基于CD4⁺和/或CD8⁺细胞的期望的固定或最小剂量。

[0273] 在一些实施方案中,该细胞在多个细胞群或亚型(诸如CD4⁺和CD8⁺细胞或亚型)的期望的输出比例的耐受范围处或之内施用。在一些方面中,该期望比例可以是具体比例或可以是比例范围。例如,在一些实施方案中,该期望比例(例如CD4⁺与CD8⁺细胞的比例)在5:1或约5:1和5:1或约5:1之间(或大于约1:5且少于约5:1)或在1:3或约1:3和3:1或约3:1之间(或大于约1:3且少于约3:1),诸如2:1或约2:1和1:5或约1:5之间(或大于约1:5且少于约2:1),诸如达或约5:1、4.5:1、4:1、3.5:1、3:1、2.5:1、2:1、1.9:1、1.8:1、1.7:1、1.6:1、1.5:1、1.4:1、1.3:1、1.2:1、1.1:1、1:1、1:1.1、1:1.2、1:1.3、1:1.4、1:1.5、1:1.6、1:1.7、1:1.8、1:1.9、1:2、1:2.5、1:3、1:3.5、1:4、1:4.5、或1:5。在一些方面中,该耐受差异在约1%、约2%、约3%、约4%、约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约

45%、约50%的期望比例之中,包括这些范围之间的任何值。

[0274] 在一些方面中,剂量的大小基于一个或多个标准确定,诸如该受试者对在先治疗(例如化学疗法)的应答,受试者中的疾病负荷,诸如肿瘤负担、体积、大小或程度、转移范围或类型、受试者发展有毒结果(例如CRS、巨噬细胞激活综合征、肿瘤溶解综合征、神经毒性和/或对施用的细胞和/或重组受体的宿主免疫应答)的阶段、和/或可能性或发病率。

[0275] 在一些实施方案中,与该细胞组合施用TEK家族激酶的抑制剂能够增加(在一些情况中显著增加)该细胞的扩增或增殖,且因此较低剂量的细胞可施用至受试者。在一些情况中,所提供的方法允许较低剂量的待施用的此类细胞,以取得与在不施用TEK家族激酶的抑制剂的情况下施用该细胞疗法的方法中的剂量相同的或更好的功效,诸如比在不施用TEK家族激酶的抑制剂的情况下施用该细胞疗法的方法中的剂量少至少1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍或10倍。

[0276] 在一些实施方案中,例如,该更低的剂量含有每千克体重的受试者少于约 5×10^6 个细胞、表达重组受体(例如CAR)的细胞、T细胞和/或PBMC,诸如每千克受试者的体重少于约 4.5×10^6 、 4×10^6 、 3.5×10^6 、 3×10^6 、 2.5×10^6 、 2×10^6 、 1.5×10^6 、 1×10^6 、 5×10^5 、 2.5×10^5 或 1×10^5 个此类细胞。在一些实施方案中,该更低的剂量含有每千克受试者的体重少于约 1×10^5 、 2×10^5 、 5×10^5 或 1×10^6 个此类细胞,或任何两个上述值之间的范围内的值。在一些实施方案中,此类值是指表达重组受体的细胞的数目;在其它实施方案中,它们是指施用的T细胞或PBMC或总细胞的数目。

[0277] 在一些实施方案中,一个或多个随后剂量的细胞可施用至受试者。在一些实施方案中,该随后剂量的细胞在开始施用第一剂量的细胞后大于或大于约7天、14天、21天、28天或35天施用。该随后剂量的细胞可多于该第一剂量、近似地与该第一剂量相同或少于该第一剂量。在一些实施方案中,该T细胞疗法的施用,诸如第一和/或第二剂量的细胞的施用,可重复。

[0278] 在一些实施方案中,开始施用该细胞疗法(例如细胞剂量或细胞的分剂量的第一剂量)在施用TEK家族激酶的抑制剂前(之前)、与施用TEK家族激酶的抑制剂同时地或在施用TEK家族激酶的抑制剂后(随后地或之后)施用。

[0279] 在一些实施方案中,该剂量的细胞,或该随后剂量的细胞与起始或开始施用TEC家族激酶的抑制剂同时或在起始或开始施用TEC家族激酶的抑制剂后依照该组合疗法方法施用。在一些实施方案中,该剂量的细胞,或该随后剂量的细胞在起始或开始施用TEC家族激酶的抑制剂后0至90天,诸如0至30天、0至15天、0至6天、0至96小时、0至24小时、0至12小时、0至6小时或0至2小时、2小时至30天、2小时至15天、2小时至6天、2小时至96小时、2小时至24小时、2小时至12小时、2小时至6小时、6小时至90天、6小时至30天、6小时至15天、6小时至6天、6小时至96小时、6小时至24小时、6小时至12小时、12小时至90天、12小时至30天、12小时至15天、12小时至6天、12小时至96小时、12小时至24小时、24小时至90天、24小时至30天、24小时至15天、24小时至6天、24小时至96小时、96小时至90天、96小时至30天、96小时至15天、96小时至6天、6天至90天、6天至30天、6天至15天、15天至90天、15天至30天或30天至90天依照所提供的组合疗法施用。在一些实施方案中,该剂量的细胞在起始或开始施用TEC家族激酶的抑制剂后至少或约至少或约1小时、2小时、6小时、12小时、24小时、2天、3天、6天、12天、15天、30天、60天或90天依照所提供的组合疗法施用。

[0280] 在一些实施方案中,该剂量的细胞在取得TEC家族激酶的抑制剂的一种或多种作用时施用。

[0281] 在一些实施方案中,该剂量的细胞,或该随后剂量的细胞在起始或开始施用TEC家族激酶的抑制剂之前依照所提供的组合疗法施用。在一些实施方案中,该剂量的细胞在施用TEC家族激酶的抑制剂之前至少或至少约1小时、至少或至少约2小时、至少或至少约3小时、至少或至少约6小时、至少或至少约12小时、至少或至少约1天、至少或至少约2天、至少或至少约3天、至少或至少约4天、至少或至少约5天、至少或至少约6天、至少或至少约7天、至少或至少约12天、至少或至少约14天、至少或至少约15天、至少或至少约21天、至少或至少约28天、至少或至少约30天、至少或至少约35天、至少或至少约42天、至少或至少约60天或至少或至少约90天依照所提供的组合疗法施用。

[0282] 在一些实施方案中,依照所提供的组合疗法施用TEC家族激酶的抑制剂是在该免疫疗法(例如T细胞疗法,诸如CAR-T细胞疗法)的在先施用与或可能与T细胞的降低的功能性(相较于正好开始该免疫疗法(例如T细胞疗法,诸如CAR-T细胞疗法)之前的或开始该免疫疗法后的在前时间点的T细胞的功能性)相关联的时间。在一些实施方案中,该方法涉及,在施用该剂量的T细胞疗法(例如过继性T细胞疗法)的细胞之后,但在施用TEC家族激酶的抑制剂之前,评估来自该受试者的样品的T细胞的一个或多个功能,诸如该细胞的扩增或持久性,例如如通过血液中的水平或量,或如本文所述的其他表型或期望的效果(例如诸如部分III中所述的)测定的。用于测定或评估该组合疗法的方案的多种参数在部分III中描述。

[0283] B. 抑制剂的施用

[0284] 所提供的组合疗法方法、组合物、组合、试剂盒和用途涉及施用TEC家族激酶的抑制剂,其可在施用该免疫治疗剂或免疫疗法(例如T细胞疗法,例如施用表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞)之前、随后、期间、与施用该免疫治疗剂或免疫疗法(例如T细胞疗法,例如施用表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞)同时或近似同时地、依次地和/或间歇地施用。

[0285] 在一些实施方案中,该组合疗法中的抑制剂是酪氨酸激酶(诸如激酶的TEC家族的成员,其在一些情况中涉及细胞因子受体、淋巴细胞表面抗原、异源三聚体G蛋白偶联的受体和整合素分子的细胞内信号传导机制)的抑制剂。在一些实施方案中,该组合疗法中的抑制剂是激酶的TEC家族的一个或多个成员的抑制剂,该TEC家族成员包括布鲁顿氏酪氨酸激酶(Btk)、IL2可诱导的T-细胞激酶(ITK)、tec蛋白酪氨酸激酶(TEC)、BMX非受体酪氨酸激酶(Etk)和TXK酪氨酸激酶(TXK)。在一些实施方案中,该抑制剂是布鲁顿氏酪氨酸激酶(Btk)抑制剂。在一些实施方案中,该抑制剂是IL2可诱导的T细胞激酶(ITK)抑制剂。在一些实施方案中,该抑制剂既是Btk又是ITK抑制剂,诸如依鲁替尼。

[0286] 在一些实施方案中,该抑制剂是一种或多种TEC家族激酶的不可逆的抑制剂。在一些实施方案中,该抑制剂是Btk的不可逆的抑制剂。

[0287] 在一些实施方案中,该抑制剂以少于或少于约1000nM、少于或少于约900nM、少于或少于约800nM、少于或少于约700nM、少于或少于约600nM、少于或少于约500nM、少于或少于约400nM、少于或少于约300nM、少于或少于约200nM、少于或少于约100nM、少于或少于约90nM、少于或少于约80nM、少于或少于约70nM、少于或少于约60nM、少于或少于约50nM、少于或少于约40nM、少于或少于约30nM、少于或少于约20nM、少于或少于约10nM、少于或少于约9nM、少于或少于约8nM、少于或少于约7nM、少于或少于约6nM、少于或少于约5nM,少于或

于约4nM、少于或少于约3nM、少于或少于约2nM、少于或少于约1nM、少于或少于约0.9nM、少于或少于约0.8nM、少于或少于约0.7nM、少于或少于约0.6nM、少于或少于约0.5nM、少于或少于约0.4nM、少于或少于约0.3nM、少于或少于约0.2nM或少于或少于约0.1nM的半数最大抑制浓度 (IC₅₀) 抑制BTK。

[0288] 在一些实施方案中,该抑制剂以少于或少于约1000nM、少于或少于约900nM、少于或少于约800nM、少于或少于约700nM、少于或少于约600nM、少于或少于约500nM、少于或少于约400nM、少于或少于约300nM、少于或少于约200nM、少于或少于约100nM、少于或少于约90nM、少于或少于约80nM、少于或少于约70nM、少于或少于约60nM、少于或少于约50nM、少于或少于约40nM、少于或少于约30nM、少于或少于约20nM、少于或少于约10nM、少于或少于约9nM、少于或少于约8nM、少于或少于约7nM、少于或少于约6nM、少于或少于约5nM、少于或少于约4nM、少于或少于约3nM、少于或少于约2nM、少于或少于约1nM、少于或少于约0.9nM、少于或少于约0.8nM、少于或少于约0.7nM、少于或少于约0.6nM、少于或少于约0.5nM、少于或少于约0.4nM、少于或少于约0.3nM、少于或少于约0.2nM或少于或少于约0.1nM的解离常数(Kd)结合BTK。

[0289] 在一些实施方案中,该抑制剂对BTK的抑制常数(K_i)为少于或少于约1000nM、少于或少于约900nM、少于或少于约800nM、少于或少于约700nM、少于或少于约600nM、少于或少于约500nM、少于或少于约400nM、少于或少于约300nM、少于或少于约200nM、少于或少于约100nM、少于或少于约90nM、少于或少于约80nM、少于或少于约70nM、少于或少于约60nM、少于或少于约50nM、少于或少于约40nM、少于或少于约30nM、少于或少于约20nM、少于或少于约10nM、少于或少于约9nM、少于或少于约8nM、少于或少于约7nM、少于或少于约6nM、少于或少于约5nM、少于或少于约4nM、少于或少于约3nM、少于或少于约2nM、少于或少于约1nM、少于或少于约0.9nM、少于或少于约0.8nM、少于或少于约0.7nM、少于或少于约0.6nM、少于或少于约0.5nM、少于或少于约0.4nM、少于或少于约0.3nM、少于或少于约0.2nM或少于或少于约0.1nM。

[0290] 在一些实施方案中,该抑制剂以少于或等于约1000nM、少于或等于约900nM、少于或等于约800nM、少于或等于约700nM、少于或等于约600nM、少于或等于约500nM、少于或等于约400nM、少于或等于约300nM、少于或等于约200nM、少于或等于约100nM、少于或等于约90nM、少于或等于约80nM、少于或等于约70nM、少于或等于约60nM、少于或等于约50nM、少于或等于约40nM、少于或等于约30nM、少于或等于约20nM、少于或等于约10nM、少于或等于约9nM、少于或等于约8nM、少于或等于约7nM、少于或等于约6nM、少于或等于约5nM、少于或等于约4nM、少于或等于约3nM、少于或等于约2nM、少于或等于约1nM、少于或等于约0.9nM、少于或等于约0.8nM、少于或等于约0.7nM、少于或等于约0.6nM、少于或等于约0.5nM、少于或等于约0.4nM、少于或等于约0.3nM、少于或等于约0.2nM或少于或等于约0.1nM的半数最大抑制浓度 (IC₅₀) 抑制ITK。

[0291] 在一些实施方案中,该抑制剂以少于或少于约1000nM、少于或少于约900nM、少于或少于约800nM、少于或少于约700nM、少于或少于约600nM、少于或少于约500nM、少于或少于约400nM、少于或少于约300nM、少于或少于约200nM、少于或少于约100nM、少于或少于约90nM、少于或少于约80nM、少于或少于约70nM、少于或少于约60nM、少于或少于约50nM、少于或少于约40nM、少于或少于约30nM、少于或少于约20nM、少于或少于约10nM、少于或少于约

9nM、少于或至少约8nM、少于或至少约7nM、少于或至少约6nM、少于或至少约5nM、少于或至少约4nM、少于或至少约3nM、少于或至少约2nM、少于或至少约1nM、少于或至少约0.9nM、少于或至少约0.8nM、少于或至少约0.7nM、少于或至少约0.6nM、少于或至少约0.5nM、少于或至少约0.4nM、少于或至少约0.3nM、少于或至少约0.2nM或少于或至少约0.1nM的解离常数(Kd)结合ITK。

[0292] 在一些实施方案中,该抑制剂对ITK的抑制常数(Ki)为少于或至少约1000nM、少于或至少约900nM、少于或至少约800nM、少于或至少约700nM、少于或至少约600nM、少于或至少约500nM、少于或至少约400nM、少于或至少约300nM、少于或至少约200nM、少于或至少约100nM、少于或至少约90nM、少于或至少约80nM、少于或至少约70nM、少于或至少约60nM、少于或至少约50nM、少于或至少约40nM、少于或至少约30nM、少于或至少约20nM、少于或至少约10nM、少于或至少约9nM、少于或至少约8nM、少于或至少约7nM、少于或至少约6nM、少于或至少约5nM、少于或至少约4nM、少于或至少约3nM、少于或至少约2nM、少于或至少约1nM、少于或至少约0.9nM、少于或至少约0.8nM、少于或至少约0.7nM、少于或至少约0.6nM、少于或至少约0.5nM、少于或至少约0.4nM、少于或至少约0.3nM、少于或至少约0.2nM或少于或至少约0.1nM。

[0293] 在一些实施方案中,该抑制剂抑制Btk和ITK二者。在一些实施方案中,该抑制剂以少于或至少约1000nM、少于或至少约900nM、少于或至少约800nM、少于或至少约700nM、少于或至少约600nM、少于或至少约500nM、少于或至少约400nM、少于或至少约300nM、少于或至少约200nM、少于或至少约100nM、少于或至少约90nM、少于或至少约80nM、少于或至少约70nM、少于或至少约60nM、少于或至少约50nM、少于或至少约40nM、少于或至少约30nM、少于或至少约20nM、少于或至少约10nM、少于或至少约9nM、少于或至少约8nM、少于或至少约7nM、少于或至少约6nM、少于或至少约5nM、少于或至少约4nM、少于或至少约3nM、少于或至少约2nM、少于或至少约1nM、少于或至少约0.9nM、少于或至少约0.8nM、少于或至少约0.7nM、少于或至少约0.6nM、少于或至少约0.5nM、少于或至少约0.4nM、少于或至少约0.3nM、少于或至少约0.2nM或少于或至少约0.1nM的半数最大抑制浓度(IC50)抑制Btk和ITK二者。

[0294] 在一些实施方案中,该抑制剂以少于或至少约1000nM、少于或至少约900nM、少于或至少约800nM、少于或至少约700nM、少于或至少约600nM、少于或至少约500nM、少于或至少约400nM、少于或至少约300nM、少于或至少约200nM、少于或至少约100nM、少于或至少约90nM、少于或至少约80nM、少于或至少约70nM、少于或至少约60nM、少于或至少约50nM、少于或至少约40nM、少于或至少约30nM、少于或至少约20nM、少于或至少约10nM、少于或至少约9nM、少于或至少约8nM、少于或至少约7nM、少于或至少约6nM、少于或至少约5nM、少于或至少约4nM、少于或至少约3nM、少于或至少约2nM、少于或至少约1nM、少于或至少约0.9nM、少于或至少约0.8nM、少于或至少约0.7nM、少于或至少约0.6nM、少于或至少约0.5nM、少于或至少约0.4nM、少于或至少约0.3nM、少于或至少约0.2nM或少于或至少约0.1nM的解离常数(Kd)结合Btk和ITK二者。

[0295] 在一些实施方案中,该抑制剂对Btk和ITK二者的抑制常数(Ki)为少于或至少约1000nM、少于或至少约900nM、少于或至少约800nM、少于或至少约700nM、少于或至少约600nM、少于或至少约500nM、少于或至少约400nM、少于或至少约300nM、少于或至少约

200nM、少于或少于约100nM、少于或少于约90nM、少于或少于约80nM、少于或少于约70nM、少于或少于约60nM、少于或少于约50nM、少于或少于约40nM、少于或少于约30nM、少于或少于约20nM、少于或少于约10nM、少于或少于约9nM、少于或少于约8nM、少于或少于约7nM、少于或少于约6nM、少于或少于约5nM、少于或少于约4nM、少于或少于约3nM、少于或少于约2nM、少于或少于约1nM、少于或少于约0.9nM、少于或少于约0.8nM、少于或少于约0.7nM、少于或少于约0.6nM、少于或少于约0.5nM、少于或少于约0.4nM、少于或少于约0.3nM、少于或少于约0.2nM或少于或少于约0.1nM。

[0296] 在一些实施方案中,使用体外测定法测量或测定IC₅₀、K_d和/或K_i。用于评估或定量或测量如所述的蛋白酪氨酸激酶抑制剂的活性的测定法在本领域中是已知的。此类测定法可在体外进行且包括用于评估药剂抑制具体生物或生物化学功能的能力的测定法。在一些实施方案中。在一些实施方案中,可进行激酶活性研究。蛋白酪氨酸激酶催化末端磷酸基团从三磷酸腺苷(ATP)转移到激酶本身或另一种蛋白质底物的酪氨酸残基的羟基上。在一些实施方案中,激酶活性可通过在ATP的存在下使激酶与底物(例如抑制剂)孵育来测量。在一些实施方案中,通过具体激酶对磷酸化底物的测量可以通过几种报告系统评估,包括比色、放射性和荧光检测(Johnson, S.A. & T. Hunter (2005) Nat. Methods 2:17.)。在一些实施方案中,可评估抑制剂对特定激酶的亲和力,诸如通过使用竞争配体结合测定法(Ma等人, Expert Opin Drug Discov. 2008 Jun; 3 (6): 607-621)。根据这些测定法,可计算半数最大抑制浓度(IC₅₀)。IC₅₀是将生物或生物化学应答或功能降低其最大值的50%的浓度。在一些情况中,诸如在激酶活性研究中,IC₅₀是使靶激酶活性抑制50%所需的化合物浓度。在一些情况中,解离常数(K_d)和/或抑制常数(K_i值)可额外地或替代地测定。IC₅₀和K_d可通过本领域已知的许多方式计算。抑制常数(K_i值)根据Cheng-Prusoff等式由IC₅₀和K_d值计算: $K_i = IC_{50} / (1 + L / K_d)$, 其中L是抑制剂的浓度(Biochem Pharmacol 22:3099-3108, 1973)。K_i是未标记的抑制剂的浓度,该抑制剂将导致在缺少配体或其它竞争物的情况下结合位点的50%的占有率。

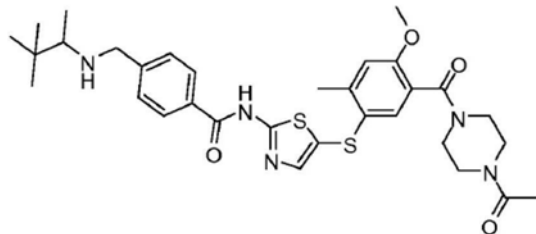
[0297] 在一些实施方案中,该抑制剂是小分子。

[0298] 在一些实施方案中,该抑制剂是酪氨酸蛋白激酶的抑制剂,该激酶在酪氨酸激酶的活性位点附近具有可接近的半胱氨酸残基。在一些实施方案中,一种或多种TEC家族激酶的抑制剂与蛋白酪氨酸激酶上的半胱氨酸残基形成共价键。在一些实施方案中,该半胱氨酸残基是Cys 481残基。在一些实施方案中,该半胱氨酸残基是Cys 442残基。在一些实施方案中,该抑制剂是不可逆的Btk抑制剂,其结合Cys 481。在一些实施方案中,该抑制剂是ITK抑制剂,其结合Cys442。在一些实施方案中,该抑制剂包含迈克尔(Michael)受体部分,其与酪氨酸激酶的合适的半胱氨酸残基形成共价键。在一些实施方案中,相对于还含有可评估的-SH部分的其它生物分子,该迈克尔受体部分优选地结合酪氨酸激酶蛋白的合适的半胱氨酸侧链。

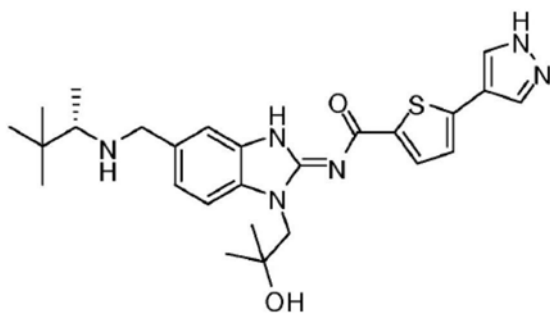
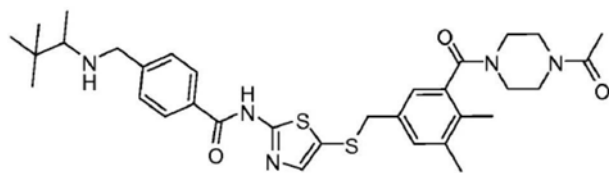
[0299] 在一些实施方案中,该抑制剂是下列中描述的Itk抑制剂化合物:PCT申请号W02002/0500071、W02005/070420、W02005/079791、W02007/076228、W02007/058832、W02004/016610、W02004/016611、W02004/016600、W02004/016615、W02005/026175、W02006/065946、W02007/027594、W02007/017455、W02008/025820、W02008/025821、W02008/025822、W02011/017219、W02011/090760、W02009/158571、W02009/051822、W02014/082085、W02014/

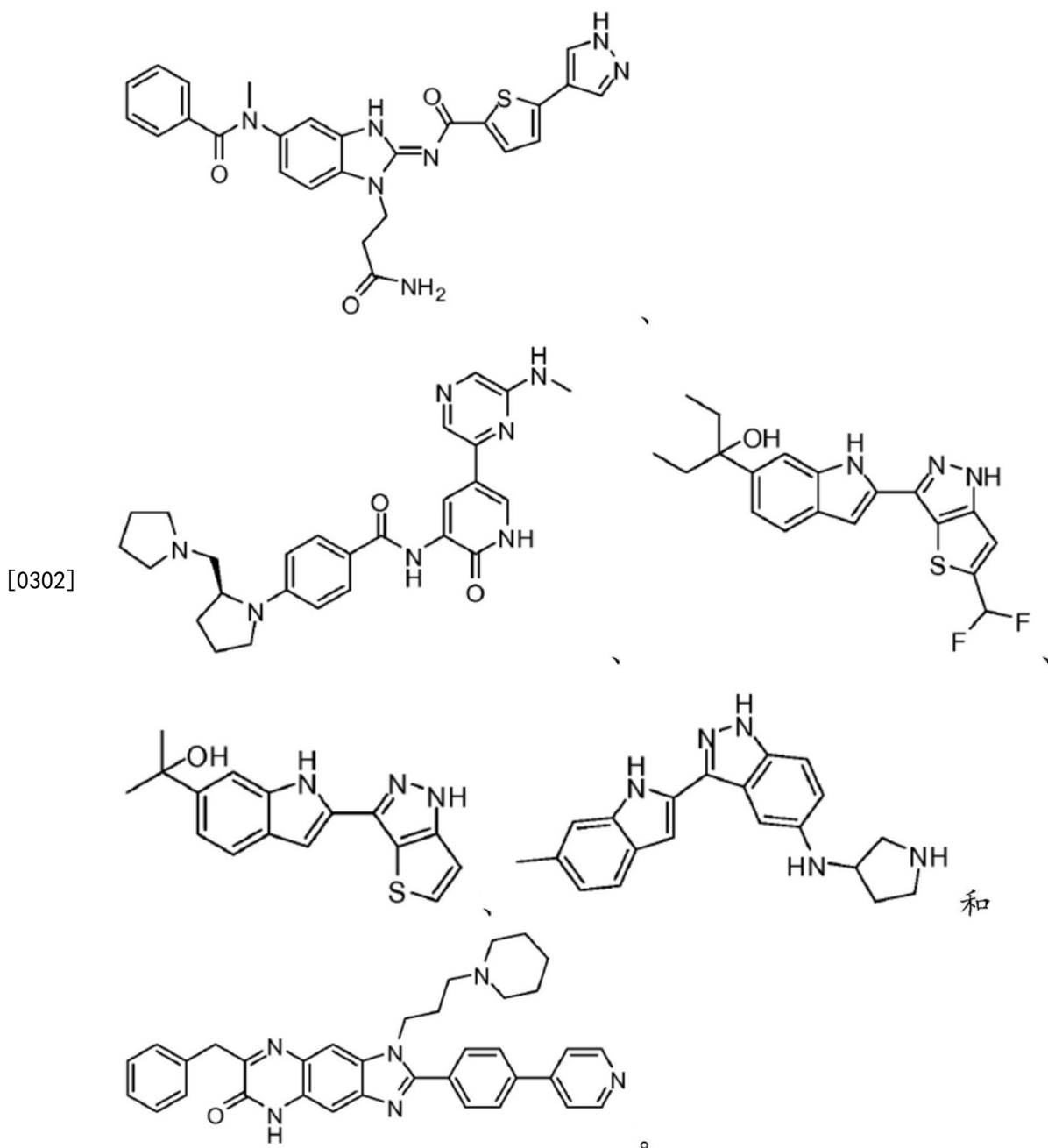
093383、W02014/105958和W02014/145403,其中各个通过提述以其整体并入。在一些实施方案中,该抑制剂是美国申请号US20110281850、US2014/0256704、US20140315909和US20140303161中描述的Itk抑制剂,其中各个通过提述以其整体并入。在一些实施方案中,该抑制剂是美国专利号8,759,358中描述的Itk抑制剂,其通过提述以其整体并入。

[0300] 在一些实施方案中,该抑制剂具有选自下列的结构:

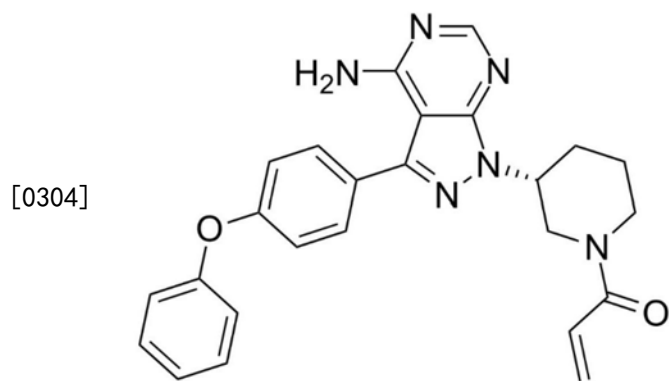


[0301]





[0303] 在一些实施方案中,该抑制剂是BTK抑制剂,其是下列化合物:



[0305] 或其药物可接受的盐。

[0306] 在一些实施方案中,该抑制剂是下列中描述的抑制剂:美国专利号7,514,444;8,

008,309;8,476,284;8,497,277;8,697,711;8,703,780;8,735,403;8,754,090;8,754,091;8.957,079;8,999,999;9,125,889;9,181,257;或9,296,753。在一些实施方案中,该抑制剂是或包含依鲁替尼。

[0307] BTK和/或ITK的示例性抑制剂在本领域中是已知的。在一些实施方案中,该抑制剂是下列中描述的抑制剂:Byrd等,N Engl J Med.2016;374(4):323-32;Cho等,J Immunol.2015,doi:10.4049/jimmunol.1501828;Zhong等,J.Biol.Chem.,2015,290(10):5960-78;Hendriks等,Nature,2014,14:219-232;Akinleye等,Journal of Hematology&Oncology 2013,6:59;Wang等,ACS Med Chem Lett.2012Jul 26;3(9):705-9;Howard等,J Med Chem.2009Jan 22;52(2):379-88;Anastassiasdis等,Nat Biotechnol.2011Oct30;29(11):1039-45;Davis,等,Nat Biotechnol,2011;29:1046-51;Bamborough等,J Med Chem.2008Dec 25;51(24):7898-914;Roth等,J Med Chem.2015;58:1053-63;Galkin等,Proc Natl Acad Sci U S A.2007;104:270-5;Singh等,J Med Chem.2012;55:3614-43;Hall等,J Med Chem.2009May 28;52(10):3191-204;Zhou等,Nature.2009Dec 24;462(7276):1070-4;Zapf等,J Med Chem.2012;55:10047-63;Shi等,Bioorg Med Chem Lett,2014;24:2206-11;Illig,等,J Med Chem.2011;54:7860-83;和美国专利申请公开号:20140371241。

[0308] 非限制性实例包括依鲁替尼(PL-32765);PRN694;Spebrutinib(CC-292或AVL-292);PCI-45292;RN-486;化合物2c;AT9283;BML-275;多韦替尼(Dovitinib)(TKI258);Foretinib(GSK1363089);**Gö6976**;GSK-3抑制剂IX;GSK-3抑制剂XIII;Hesperadin;IDR E804;K-252a;来他替尼(Lestaurtinib)(CEP701);尼达尼布(Nintedanib)(BIBF 1120);NVP-TAE684;R406;SB218078;星孢菌素(Staurosporine)(AM-2282);舒尼替尼(Sunitinib)(SU11248);Syk抑制剂;WZ3146;WZ4002;BDBM50399459(CHEMBL2179805);BDBM50399460(CHEMBL2179804);BDBM50399458(CHEMBL2179806);BDBM50399461(CHEMBL2179790);BDBM50012060(CHEMBL3263640);BDBM50355504(CHEMBL1908393);BDBM50355499(CHEMBL1908395::CHEMBL1908842)。

[0309] 1. 组合物和配制剂

[0310] 在本文提供的组合疗法方法、组合物、组合、试剂盒和用途的一些实施方案中,该组合疗法可以一个或多个组合物(例如含有TEC家族激酶的抑制剂(例如Btk抑制剂)和/或细胞疗法(例如T细胞疗法)的药物组合物)施用。

[0311] 在一些实施方案中,该组合物,例如含有TEC家族激酶的抑制剂(例如Btk抑制剂)的药物组合物,可包括与TEC家族激酶的抑制剂(例如Btk抑制剂)和/或该细胞一起施用的载剂,诸如稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介物。适合的药物载剂的实例描述于E.W.Martin的“Remington's Pharmaceutical Sciences”。此类组合物将含有治疗有效量的酪氨酸激酶抑制剂(例如Btk抑制剂),其通常以纯化的形式,连同适合量的载剂,以便提供用于适当施用至患者的形式。此类药物载剂可以是无菌液体,诸如水和油(包括石油、动物、植物或合成来源的油,例如花生油、大豆油、矿物油和芝麻油)。盐水溶液和葡萄糖水溶液和甘油溶液也可用作液体载体,特别是用于可注射溶液。该药物组合物可含有下列中的任一种或多种:稀释剂、佐剂、抗粘附剂、粘合剂、糖衣、填充剂、调味剂、着色剂、润滑剂、助流剂、防腐剂、去垢剂、吸收剂、乳化剂、药物赋形剂、pH缓冲剂或甜味剂及其组合。在一些实施方案中,该药物

组合物可以是液体、固体、冻干粉末、凝胶形式和/或其组合。在一些方面中,载剂的选择部分地由特定的抑制剂和/或由施用方法确定。

[0312] 在所采用的剂量和浓度下,药物可接受的载剂通常对于接受者是无毒的,且包括但不限于:缓冲液,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白,诸如血清白蛋白、明胶、或免疫球蛋白;亲水聚合物诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸、或赖氨酸;单糖,二糖,和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂诸如EDTA;糖诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐抗衡离子诸如钠;金属复合物(例如Zn-蛋白复合物);和/或非离子表面活性剂诸如聚乙二醇(PEG),稳定剂和/或防腐剂。含有酪氨酸激酶抑制剂(例如Btk抑制剂)的组合物还可以是冻干的。

[0313] 在一些实施方案中,该药物组合物可经配制用于通过本领域技术人员已知的任何途径的施用,包括肌内、静脉内、皮内、病灶内、腹膜内注射、皮下、瘤内、硬膜外、鼻的、口服、阴道的、直肠的、外用的、局部的、耳的、吸入、口腔的(例如舌下)和经皮的施用或任何途径。在一些实施方案中,其它模式的施用也可考虑。在一些实施方案中,该施用通过推注输注,通过注射,例如静脉内或皮下注射、眼内注射、眼周注射,视网膜下注射、玻璃体内注射、经中隔注射、巩膜下注射、脉络膜注射、前房内注射、subconjunctival注射、结膜下注射,眼球筋膜囊下注射,眼球后部注射,球周注射或后路巩膜下递送。在一些实施方案中,施用通过非肠道、肺内和鼻内,且,如果需要局部治疗,可病灶内施用。非肠道输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内、或皮下施用。在一些实施方案中,给定剂量通过单次推注施用来施用。在一些实施方案中,其通过例如在不多于3天的时间内的多次推注施用来施用,或通过连续输注施用。

[0314] 在一些实施方案中,该施用可以是局部的、外用的或全身性的,这取决于治疗的位点。在一些实施方案中,局部施用至需要治疗的区域可通过,例如,但不限于,手术期间的局部输注、外用应用(例如手术后配合伤口敷料),通过注射,依靠导管,依靠栓剂或依靠植入管完成。在一些实施方案中,组合物还可与其他生物活性药剂依次地或间歇地或在一组合物中施用。在一些实施方案中,施用还可包括控释系统,其包括控释配制剂和控释装置,诸如依靠泵。在一些实施方案中,该施用是口服的。

[0315] 在一些实施方案中,药物和治疗活性化合物及其衍生物通常以单位剂量形式或多剂量形式配制和施用。每个单位剂量含有足以产生预期治疗作用的预定数量的治疗活性化合物,该剂量与所需药物载剂、媒介物或稀释剂相关联。在一些实施方案中,单位剂量形式包括但不限于,片剂、胶囊、丸剂、粉末、颗粒剂、无菌非肠道溶液或悬浮液和口服溶液或悬浮液和含有适合量的该化合物或其药物可接受的衍生物的油水乳剂。单位剂量形式可被包含在安瓿和注射器或单独包装的片剂或胶囊中。单位剂量形式可以以其分数或倍数施用。在一些实施方案中,多剂量形式是多个相同的单位剂量形式,该单位剂量被包装于单个容器中,待以分离的单位剂量形式施用。多剂量形式的实例包括药水瓶、片剂或胶囊瓶或品脱或加仑瓶。

[0316] 2. 抑制剂剂量表

[0317] 在一些实施方案中,所提供的组合疗法方法涉及对该受试者施用治疗有效量的TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂)和细胞疗法,诸如T细胞疗法(例如表达CAR的T细胞)或啮合T细胞的疗法。在一些实施方案中,TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂)在施用细胞疗法(诸如T细胞疗法(例如表达CAR的T细胞)或啮合T细胞的疗法)之前、随后、期间、过程期间、与施用细胞疗法(诸如T细胞疗法(例如表达CAR的T细胞)或啮合T细胞的疗法)同时、近似同时、依次地和/或间歇地施用。在一些实施方案中,该方法涉及在施用该T细胞疗法之前施用TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂)。在其它实施方案中,该方法涉及在施用该T细胞疗法后,施用TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂)。在一些实施方案中,在开始该T细胞疗法后,TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂)并不进一步施用。在一些实施方案中,该剂量表包括在开始该T细胞疗法之前或之后施用TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂)。在一些实施方案中,该剂量表包括与该T细胞疗法一起同时施用TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂)。

[0318] 在一些实施方案中,TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂)以多剂量多次地施用。在一些实施方案中,TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂)施用一次。在一些实施方案中,TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂)在开始施用细胞疗法(例如T细胞疗法,诸如CAR-T细胞疗法)之前或随后每日六次、每日五次、每日四次、每日三次、每日两次、每日一次、每隔一天、每隔两天、一周两次、一周一次或仅一次施用。在一些实施方案中,TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂)在施用细胞疗法(例如T细胞疗法,诸如CAR-T细胞疗法)之前、期间、过程期间,和/或细胞疗法(例如T细胞疗法,诸如CAR-T细胞疗法)的施用期后以多剂量定期地施用。在一些实施方案中,TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂)在施用细胞疗法(例如T细胞疗法,诸如CAR-T细胞疗法)之前以一个或多个剂量定期地施用。在一些实施方案中,TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂)在施用细胞疗法(例如T细胞疗法,诸如CAR-T细胞疗法)后以一个或多个剂量定期地施用。在一些实施方案中,一个或多个剂量的TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂)可与一定剂量的细胞疗法(例如T细胞疗法,诸如CAR-T细胞疗法)的施用同时发生。

[0319] 在一些实施方案中,TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂)的施用的剂量、频率、持续时间、时机和/或顺序基于本文所述的筛选步骤和/或评估治疗效果(例如本文部分IV中所述的效果)的结果的特定阈值或标准确定。

[0320] 在一些实施方案中,该方法涉及对既往已经被施用了治疗有效量的抑制剂的受试者施用该细胞疗法。在一些实施方案中,该抑制剂在施用一定剂量的表达重组受体的细胞至受试者之前施用至受试者。在一些实施方案中,用该抑制剂的治疗发生在与开始施用该剂量的细胞相同的时间。在一些实施方案中,该抑制剂在开始施用该剂量的细胞后施用。在一些实施方案中,该抑制剂在细胞疗法之前的足够时间施用,使得该组合疗法的治疗作用增加。

[0321] 在一些实施方案中,TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂)在施用细胞疗法(例如T细胞疗法,诸如CAR-T细胞疗法)之前和/或与施用细胞疗法(例如T细胞疗法,诸如CAR-T细胞疗法)同时施用。在一些实施方案中,TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂)在开始细胞疗法(例如T细胞疗法,诸如CAR-T细胞疗法)之前0至90天或约0至90天,诸如0至30天、0至15天、0至6天、0至96小时、0至24小时、0至12小时、0至6小时或0至2小时、2小时至30天、2小

时至15天、2小时至6天、2小时至96小时、2小时至24小时、2小时至12小时、2小时至6小时、6小时至90天、6小时至30天、6小时至15天、6小时至6天、6小时至96小时、6小时至24小时、6小时至12小时、12小时至90天、12小时至30天、12小时至15天、12小时至6天、12小时至96小时、12小时至24小时、24小时至90天、24小时至30天、24小时至15天、24小时至6天、24小时至96小时、96小时至90天、96小时至30天、96小时至15天、96小时至6天、6天至90天、6天至30天、6天至15天、15天至90天、15天至30天或30天至90天施用。在一些方面中,TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂)在开始细胞疗法(例如T细胞疗法,诸如CAR-T细胞疗法)之前不多于约96小时、72小时、48小时、24小时、12小时、6小时、2小时或1小时施用。

[0322] 在一些实施方案中,TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂)在开始施用细胞疗法(例如T细胞疗法,诸如CAR-T细胞疗法)之前至少或约至少1小时、至少或约至少2小时、至少或约至少6小时、至少或约至少12小时、至少或约至少1天、至少或约至少2天、至少或约至少3天、至少或约至少4天、至少或约至少5天、至少或约至少6天、至少或约至少7天、至少或至少约12天、至少或约至少14天、至少或至少约15天、至少或约至少21天、至少或至少约24天、至少或约至少28天、至少或约至少30天、至少或约至少35天或至少或约至少42天、至少或约至少60天或至少或约至少90天施用。在一些实施方案中,TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂)在开始施用细胞疗法(例如T细胞疗法,诸如CAR-T细胞疗法)之前最多2天、最多3天、最多4天、最多5天、最多6天、最多7天、最多8天、最多12天、最多14天、最多15天、最多21天、最多24天、最多28天、最多30天、最多35天、最多42天、最多60天或最多90天施用。

[0323] 在一些任何此类实施方案中,在该实施方案中TEC家族激酶的抑制剂在细胞疗法(例如T细胞疗法,诸如CAR-T细胞疗法)之前给予,施用TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂)定期地持续,直至开始细胞疗法和/或开始细胞疗法后的一段时间。

[0324] 在一些实施方案中,TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂)在施用细胞疗法(例如T细胞疗法,诸如CAR-T细胞疗法)后施用,或进一步地施用。在一些实施方案中,TEC家族激酶的抑制剂在开始施用细胞疗法(例如T细胞疗法)后的在或在约1小时、2小时、6小时、12小时、24小时、48小时、96小时、4天、5天、6天或7天、14天、15天、21天、24天、28天、30天、36天、42天、60天、72天或90天内施用。在一些实施方案中,所提供的方法涉及在开始施用细胞疗法后持续(诸如定期地)施用TEC家族激酶的抑制剂。

[0325] 在一些实施方案中,TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂)在施用细胞疗法(例如T细胞疗法,诸如CAR-T细胞疗法)后施用,诸如每日施用,持续最多或最多约1天、最多或最多约2天、最多或最多约3天、最多或最多约4天、最多或最多约5天、最多或最多约6天、最多或最多约7天、最多或最多约12天、最多或最多约14天、最多或最多约21天、最多或最多约24天、最多或最多约28天、最多或最多约30天、最多或最多约35天,最多或最多约42天、最多或最多约60天或最多或最多约90天、最多或最多约120天、最多或最多约180天、最多或最多约240天、最多或最多约360天、或最多或最多约720天或以上。

[0326] 在一些任何此类以上实施方案中,TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂)在开始施用细胞疗法(例如T细胞疗法,诸如CAR-T细胞疗法)之前或之后施用。

[0327] 在一些实施方案中,TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂)在开始细胞疗法之后一天几次、一天两次、每日、每隔一天、一周三次、一周两次或一周一次地施用。在一些实施方案中,TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂)每日施用。在一些实施方案中,TEC家族激

酶的抑制剂(例如BTK抑制剂)一天两次地施用。在一些实施方案中,TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂)一天三次地施用。在其它实施方案中,TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂)每隔一日地施用。

[0328] 在一些实施方案中,TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂)每日施用,持续7、14、21、28、35或42天的周期。在一些实施方案中,TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂)一天两次地施用,持续7、14、21、28、35、或42天的周期。在一些实施方案中,TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂)一天三次施用,持续7、14、21、28、35或42天的周期。在一些实施方案中,TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂)每隔一天地施用,持续7、14、21、28、35或42天的周期。在一些实施方案中,施用TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂),诸如每日施用,持续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24个周期。

[0329] 在本文提供的方法的一些实施方案中,TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂)和细胞疗法(例如T细胞疗法,诸如CAR-T细胞疗法)同时地或近似同时地施用。

[0330] 在一些实施方案中,TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂)以下列剂量施用:从或从约每kg受试者体重(mg/kg)0.2mg至200mg/kg、0.2mg/kg至100mg/kg、0.2mg/kg至50mg/kg、0.2mg/kg至10mg/kg、0.2mg/kg至1.0mg/kg、1.0mg/kg至200mg/kg、1.0mg/kg至100mg/kg、1.0mg/kg至50mg/kg、1.0mg/kg至10mg/kg、10mg/kg至200mg/kg、10mg/kg至100mg/kg、10mg/kg至50mg/kg、50mg/kg至200mg/kg、50mg/kg至100mg/kg或100mg/kg至200mg/kg。在一些实施方案中,该抑制剂以下列剂量施用:每kg受试者体重约0.2mg(mg/kg)至50mg/kg、0.2mg/kg至25mg/kg、0.2mg/kg至10mg/kg、0.2mg/kg至5mg/kg、0.2mg/kg至1.0mg/kg、1.0mg/kg至50mg/kg、1.0mg/kg至25mg/kg、1.0mg/kg至10mg/kg、1.0mg/kg至5mg/kg、5mg/kg至50mg/kg、5mg/kg至25mg/kg、5mg/kg至10mg/kg或10mg/kg至25mg/kg。

[0331] 在一些实施方案中,TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂)以下列剂量施用:从或从约25mg至2000mg、25mg至1000mg、25mg至500mg、25mg至200mg、25mg至100mg、25mg至50mg、50mg至2000mg、50mg至1000mg、50mg至500mg、50mg至200mg、50mg至100mg、100mg至2000mg、100mg至1000mg、100mg至500mg、100mg至200mg、200mg至2000mg、200mg至1000mg、200mg至500mg、500mg至2000mg、500mg至1000mg或1000mg至2000mg,每个数值包括在内。

[0332] 在一些实施方案中,该抑制剂是依鲁替尼,其以下列剂量施用:从或从约50mg至420mg、50mg至400mg、50mg至380mg、50mg至360mg、50mg至340mg、50mg至320mg、50mg至300mg、50mg至280mg、100mg至400mg、100mg至380mg、100mg至360mg、100mg至340mg、100mg至320mg、100mg至300mg、100mg至280mg、100mg至200mg、140mg至400mg、140mg至380mg、140mg至360mg、140mg至340mg、140mg至320mg、140mg至300mg、140mg至280mg、140mg至200mg、180mg至400mg、180mg至380mg、180mg至360mg、180mg至340mg、180mg至320mg、180mg至300mg、180mg至280mg、200mg至400mg、200mg至380mg、200mg至360mg、200mg至340mg、200mg至320mg、200mg至300mg、200mg至280mg、220mg至400mg、220mg至380mg、220mg至360mg、220mg至340mg、220mg至320mg、220mg至300mg、220mg至280mg、240mg至400mg、240mg至380mg、240mg至360mg、240mg至340mg、240mg至320mg、240mg至300mg、240mg至280mg、280mg至420mg或300mg至400mg,每个数值包括在内。

[0333] 在一些实施方案中,TEC家族激酶的抑制剂(例如BTK抑制剂)以下列总每日剂量施用:至少或至少约50mg/天、100mg/天、150mg/天、175mg/天、200mg/天、250mg/天、280mg/天、

300mg/天、350mg/天、400mg/天、420mg/天、440mg/天、460mg/天、480mg/天、500mg/天、520mg/天、540mg/天、560mg/天、580mg/天或600mg/天。在一些实施方案中,该抑制剂以420mg/天或约420mg/天的量施用。在一些实施方案中,该抑制剂以少于或至少约420mg/天且至少约或至少280mg/天的量施用。在一些实施方案中,该抑制剂以每天为或约,或至少为或约280mg的量施用。在一些实施方案中,该抑制剂以每天不多于280mg的量施用。

[0334] 在一些实施方案中,该抑制剂每日一次地施用。在一些实施方案中,该抑制剂每日两次地施用。

[0335] 在任何前述实施方案中,依鲁替尼可口服施用。

[0336] 在一些实施方案中,剂量(诸如每日剂量)以一个或多个分剂量(诸如2、3或4个剂量)施用,或以单个配制剂施用。在药物可接受的载剂的存在下,或在其它治疗剂的存在下,该抑制剂可单独施用。

[0337] 本领域技术人员将认识到,可以使用较高或较低剂量的该抑制剂,例如这取决于特定药剂和施用途径。在一些实施方案中,该抑制剂可单独或以药物组合物的形式施用,其中该化合物与一种或多种药物可接受的载剂、赋形剂或稀释剂成混合液(admixture)或混合物(mixture)。在一些实施方案中,该抑制剂可全身性或局部地施用至待治疗的器官或组织。施用的示例性途径包括但不限于,外用、注射(诸如皮下、肌肉、皮内、腹膜内、瘤内和静脉内)、口服、舌下、直肠的、经皮、鼻内的、阴道的和吸入途径。在一些实施方案中,施用途径为口服的、非肠道的、直肠的、鼻的、外用的、或眼睛途径,或通过吸入。在一些实施方案中,该抑制剂口服施用。在一些实施方案中,该抑制剂以固体剂型口服施用,诸如胶囊、片剂和粉末,或以液体剂型,诸如酏剂、糖浆剂和混悬剂。

[0338] 一旦患者疾病的改善已经发生,该剂量可被调整用于预防或维持治疗。例如,施用的剂量或频率,或二者,可根据症状降低,降低至维持期望的治疗或预防作用时的水平。如果症状已经减轻至合适的水平,治疗可停止。然而,一经症状的任何复发,患者可能需要长期间歇治疗。患者还可能需长期慢性治疗。

[0339] C. 淋巴细胞清除治疗

[0340] 在一些方面中,所提供的方法可进一步包括施用一种或多种淋巴细胞清除性疗法,诸如在开始施用免疫疗法(诸如T细胞疗法(例如表达CAR的T细胞)或啮合T细胞的疗法)之前或与开始施用免疫疗法(诸如T细胞疗法(例如表达CAR的T细胞)或啮合T细胞的疗法)同时。在一些实施方案中,该淋巴细胞清除性疗法包括施用磷酰胺,诸如环磷酰胺。在一些实施方案中,该淋巴细胞清除性疗法可包括施用氟达拉滨。

[0341] 在一些方面中,用免疫缺失(例如淋巴细胞清除)疗法预处理受试者可改善过继性细胞疗法(ACT)的作用。用淋巴细胞清除剂(包括环孢霉素(cyclosporine)和氟达拉滨的组合)预处理已经有效地改善了细胞疗法中的转移的肿瘤浸润性淋巴(TIL)细胞的功效,包括改善该转移的细胞的应答和/或持久性。参见,例如,Dudley等,Science,298,850-54(2002);Rosenberg等,Clin Cancer Res,17(13):4550-4557(2011)。同样地,在CAR+T细胞的背景下,一些研究已经体现了淋巴细胞清除剂,最常见的是环磷酰胺、氟达拉滨、苯达莫司汀或其组合,有时连同低剂量辐射。参见Han等Journal of Hematology&Oncology,6:47(2013);Kochenderfer等,Blood,119:2709-2720(2012);Kalos等,Sci Transl Med,3(95):95ra73(2011);临床实验研究记录号:NCT02315612;NCT01822652。

[0342] 可进行此类预处理,目标是降低可能抑制该疗法功效的多种效果中的一种或多种的风险。这些风险包括称之为“细胞因子库(cytokine sink)”的现象,其中T细胞、B细胞、NK细胞与TIL竞争体内稳态和激活的细胞因子,例如IL-2、IL-7和/或IL-15;通过调节性T细胞、NK细胞或免疫细胞系统的其它细胞的抑制;肿瘤微环境中的负调节子的影响。Muranski等,Nat Clin Pract Oncol.December;3(12):668-681(2006)。

[0343] 因此,在一些实施方案中,所提供的方法进一步涉及施用淋巴细胞清除性疗法至受试者。在一些实施方案中,该方法涉及在开始施用该剂量的细胞之前施用该淋巴细胞清除性疗法至受试者。在一些实施方案中,该淋巴细胞清除性疗法含有化学治疗剂诸如氟达拉滨和/或环磷酰胺。在一些实施方案中,施用该细胞和/或该淋巴细胞清除性疗法经由门诊病人递送进行。

[0344] 在一些实施方案中,该方法包括在开始施用该剂量的细胞之前施用预处理剂(诸如淋巴细胞清除或化学治疗剂,诸如环磷酰胺、氟达拉滨或其组合)至受试者。例如,可在第一或随后剂量之前至少2天(诸如在第一或随后剂量之前至少3、4、5、6或7天)对该受试者施用预处理剂。在一些实施方案中,在开始施用该剂量的细胞之前不多于7天(诸如在开始施用该剂量的细胞之前不多于6、5、4、3或2天)对该受试者施用预处理剂。在一些实施方案中,在开始施用该剂量的细胞之前2和7天之间(包括该数值,诸如在2、3、4、5、6或7天时)对该受试者施用预处理剂。

[0345] 在一些实施方案中,该受试者用环磷酰胺以介于或介于约20mg/kg和100mg/kg之间(诸如介于或介于约40mg/kg和80mg/kg之间)的剂量预处理。在一些方面中,该受试者用或用约60mg/kg的环磷酰胺预处理。在一些实施方案中,该环磷酰胺可以以单剂量施用或可以以多剂量施用,诸如每日、每隔一天或每隔两天给予。在一些实施方案中,该环磷酰胺每日一次施用持续一天或两天。在一些实施方案中,当该淋巴细胞清除剂包含环磷酰胺时,对该受试者施用介于或介于约100mg/m²和500mg/m²之间(诸如介于或介于约200mg/m²和400mg/m²之间或250mg/m²和350mg/m²之间,包括每个数值)的剂量的环磷酰胺。在一些情况中,对该受试者施用约300mg/m²的环磷酰胺。在一些实施方案中,该环磷酰胺可以以单剂量施用或可以以多剂量施用,诸如每日、每隔一天或每隔两天给予。在一些实施方案中,环磷酰胺每日施用,诸如持续1-5天,例如持续3至5天。在一些情况中,在开始该细胞疗法之前对该受试者施用约300mg/m²的环磷酰胺,每日施用持续3天。

[0346] 在一些实施方案中,当该淋巴细胞清除剂包含氟达拉滨时,对该受试者施用介于或介于约1mg/m²和100mg/m²之间(诸如介于或介于约10mg/m²和75mg/m²之间、15mg/m²和50mg/m²之间、20mg/m²和40mg/m²之间、24mg/m²和35mg/m²之间、20mg/m²和30mg/m²之间或24mg/m²和26mg/m²之间)的剂量的氟达拉滨。在一些情况中,对该受试者施用25mg/m²的氟达拉滨。在一些情况中,对该受试者施用约30mg/m²的氟达拉滨。在一些实施方案中,氟达拉滨可以以单剂量施用或可以以多剂量施用,诸如每日、每隔一天或每隔两天给予。在一些实施方案中,氟达拉滨每日施用,诸如持续1-5天,例如持续3至5天。在一些情况中,在开始该细胞疗法之前,对该受试者施用约30mg/m²的氟达拉滨,每日施用持续3天。

[0347] 在一些实施方案中,该淋巴细胞清除剂包含药剂的组合,诸如环磷酰胺和氟达拉滨的组合。因此,该药剂组合可包括任何剂量或施用表(诸如上述剂量或施用表)的环磷酰胺和任何剂量或施用表(诸如上述剂量或施用表)的氟达拉滨。例如,在一些方面中,在该剂

量的细胞之前,对该受试者施用60mg/kg ($\sim 2\text{g}/\text{m}^2$) 的环磷酰胺和3至5个剂量的25mg/ m^2 氟达拉滨。在一些实施方案中,对该受试者施用约300mg/ m^2 环磷酰胺和约30mg/ m^2 氟达拉滨,每种药剂每日施用持续3天。在一些实施方案中,该预处理施用表在开始施用该剂量的细胞之前2和7天之间(包括每个数值,诸如在2、3、4、5、6或7天时)结束。

[0348] 在一个示例性剂量方案中,在接受第一剂量之前,受试者在施用细胞和环磷酰胺和氟达拉滨(CY/FLU)的淋巴细胞清除预处理化学疗法前1天接受激酶抑制剂,该淋巴细胞清除预处理化学疗法在第一剂量的表达CAR的细胞前至少两天且通常在施用细胞前不多于7天施用。在一些情况中,例如,环磷酰胺在施用Btk抑制剂后24至27天给予。在预处理治疗后,对受试者施用如上所述的剂量的表达CAR的T细胞。

[0349] 在一些实施方案中,在输注该剂量的细胞之前施用该预处理剂改善治疗效果。例如,在一些方面中,预处理改善用该剂量的治疗功效或增加受试者中表达重组受体的细胞(例如表达CAR的细胞,诸如表达CAR的T细胞)的持久性。在一些实施方案中,预处理治疗增加无病生存期,诸如在该剂量的细胞后的给定一段时间后生存且未表现出微小残留病变或分子可检测病变的受试者的百分比。在一些实施方案中,达到无病生存期中值的时间增加。

[0350] 一旦该细胞施用至受试者(例如人),在一些方面中,工程化细胞群的生物活性通过许多已知方法中的任一种测量。用以评定的参数包括工程化的或天然T细胞或其它免疫细胞对抗原的特异性结合,在体内的情况中例如通过成像,或在离体的情况中例如通过ELISA或流式细胞术。在某些实施方案中,该工程化细胞破坏靶细胞的能力可使用本领域中已知的任何适合的方法测量,诸如下列中所述的细胞毒性测定法,例如Kochenderfer等, *J. Immunotherapy*, 32 (7) :689-702 (2009), 和Herman等 *J. Immunological Methods*, 285 (1) :25-40 (2004)。在某些实施方案中,该细胞的生物活性还可通过测定某些细胞因子(诸如CD107a、IFN γ 、IL-2、和TNF)的表达和/或分泌来测量。在一些方面中,该生物活性通过评定临床效果(诸如肿瘤负荷或负担的降低)测量。在一些方面中,评定该细胞的毒性效果、持久性和/或扩增,和/或宿主免疫应答的存在或缺少。

[0351] 在一些实施方案中,在输注该剂量的细胞之前施用该预处理剂改善治疗效果,诸如通过改善用该剂量的治疗功效或增加表达重组受体的细胞(例如表达CAR的细胞,诸如表达CART细胞)在受试者中的持久性。因此,在一些实施方案中,在具有Btk抑制剂和细胞疗法的组合疗法的方法中给予的预处理剂的剂量高于无Btk抑制剂的方法中给予的剂量。

[0352] III. T细胞疗法和工程化细胞

[0353] 在一些实施方案中,依照所提供的组合疗法方法使用的T细胞疗法包括施用表达重组受体的工程化的细胞,该重组受体经设计以识别和/或特异性结合与疾病或病况相关联的分子并导致应答,诸如结合此类分子后,针对此类分子的免疫应答。该受体可包括嵌合受体(例如嵌合抗原受体(CAR))和其它转基因抗原受体(包括转基因T细胞受体(TCR))。

[0354] 在一些实施方案中,该细胞含有或经工程化以含有工程化的受体(例如工程化的抗原受体,诸如嵌合抗原受体(CAR))或T细胞受体(TCR)。还提供此类细胞群,含有此类细胞和/或富含此类细胞的组合物(诸如其中某种类型的细胞(诸如T细胞或CD8⁺或CD4⁺细胞)经富集或选择的组合物)。其中,该组合物是用于施用的药物组合物和配制剂,诸如用于过继性细胞疗法。还提供了用于施用该细胞和组合物至受试者(例如患者)的治疗方法。

[0355] 因此,在一些实施方案中,该细胞包括一种或多种经由基因工程导入的核酸,且从

而表达此类核酸的重组的或基因工程化的产物。在一些实施方案中,基因转移通过首次刺激细胞完成,诸如通过使其与诱导应答(诸如增殖、存活和/或激活)的刺激物组合,例如通过表达细胞因子或激活标记物测量的,随后转导激活的细胞,并在培养中扩增至足以用于临床应用的数目。

[0356] A. 重组受体

[0357] 该细胞通常表达重组受体(诸如包括功能性非TCR抗原受体(例如嵌合抗原受体(CAR))的抗原受体)和其它抗原结合受体(诸如转基因T细胞受体(TCR))。其中,该受体也是其它嵌合受体。

[0358] 3. 嵌合抗原受体(CAR)

[0359] 示例性抗原受体(包括CAR)和用于工程化和将此类受体导入细胞中的方法包括下列中所述的抗原受体和方法,例如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,和欧洲专利申请号EP2537416和/或Sadelain等人,Cancer Discov.,3(4):388-398(2013);Davila等人,PLoS ONE 8(4):e61338(2013);Turtle等人,Curr.Opin.Immunol.,24(5):633-39(2012);Wu等人,Cancer,18(2):160-75(2012)。在一些方面中,该抗原受体包括如美国专利号7,446,190和国际专利申请公开号W0/2014055668A1中所述的CAR。CAR的实例包括如任何前述出版物中公开的CAR,诸如W02014031687、US 8,339,645、US 7,446,179、US 2013/0149337、美国专利号7,446,190、美国专利号8,389,282、Kochenderfer等人,Nature Reviews ClinicalOncology,10,267-276(2013);Wang等人,J.Immunother.35(9):689-701(2012);和Brentjens等人,Sci Transl Med.5(177)(2013)。还参见W02014031687、US8,339,645、US 7,446,179、US 2013/0149337、美国专利号7,446,190和美国专利号8,389,282。该嵌合受体(诸如CAR)通常包括细胞外抗原结合域(诸如抗体分子的一部分),通常是抗体的可变重(V_H)链区和/或可变轻(V_L)链区,例如scFv抗体片段。

[0360] 在一些实施方案中,由该受体靶向的抗原是多肽。在一些实施方案中,其是碳水化合物或其它分子。在一些实施方案中,相较于正常或非靶向的细胞或组织,该抗原选择性地在该疾病或病况的细胞(例如肿瘤或病原性细胞)上表达或在该疾病或病况的细胞(例如肿瘤或病原性细胞)上过表达。在其它实施方案中,该抗原在正常细胞上表达和/或在工程化的细胞上表达。

[0361] 在一些实施方案中,由该受体靶向的抗原包括孤儿酪氨酸激酶受体 $\alpha\text{v}\beta 6$ 整合素($\alpha\text{v}\beta 6$ 整合素)、B细胞成熟抗原(BCMA)、B7-H6、碳酸酐酶9(CA9,也称之为CAIX或G250)、癌症-睾丸抗原、癌症/睾丸抗原1B(CTAG,也称之为NY-ESO-1和LAGE-2)、癌胚抗原(CEA)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、C-C基序趋化因子配体1(CCL-1)、ROR1、截短的表皮生长因子蛋白(tEGFR)、Her2、L1-细胞黏附分子、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、间皮素、CEA、和乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD138、CD171、表皮生长因子蛋白(EGFR)、III型表皮生长因子受体突变(EGFR vIII)、上皮糖蛋白2(EGP-2)、EGP-4、上皮糖蛋白40(EPG-40)、肝配蛋白B2、肝配蛋白e受体A2(EPha2)、ErbB2、3或4、雌

激素受体、叶酸结合蛋白 (FBP)、叶酸受体 α 、Fc受体样5 (FCRL5; 也称之为Fc受体同系物5或FCRH5) 胎儿乙酰胆碱受体 (胎儿AChR)、神经节苷脂GD2, 0-乙酰化GD2 (OGD2)、神经节苷脂GD3、人高分子量黑色素瘤相关的抗原 (HMW-MAA)、乙型肝炎表面抗原, 人白细胞抗原A1 (HLA-AI)、人白细胞抗原A2 (HLA-A2)、IL-22受体 α (IL-22R- α)、IL-13受体 α 2 (IL-13R- α 2)、激酶插入域受体 (kdr)、 κ 轻链、Lewis Y、L1-CAM的CE7表位、富含亮氨酸重复含有8家族成员A (LRRC8A)、Lewis Y、黑色素瘤相关的抗原 (MAGE) -A1、MAGE-A6、间皮素、鼠巨细胞病毒 (CMV)、粘蛋白1 (MUC1)、MUC16、PSCA、自然杀伤细胞2组成员D (NKG2D) 配体、黑色素A (MART-1)、糖蛋白100 (gp100)、G蛋白偶联的受体5D (GPCR5D)、神经细胞黏附分子 (NCAM)、瘤胚共同抗原、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR1)、生存素、滋养细胞糖蛋白 (TPBG也称为5T4)、肿瘤相关的糖蛋白72 (TAG72)、血管表皮生长因子受体 (VEGFR)、血管表皮生长因子受体2 (VEGF-R2)、癌胚抗原 (CEA)、前列腺特异性抗原、黑色素瘤优先表达的抗原 (PRAME)、前列腺特异性抗原、前列腺干细胞抗原 (PSCA)、前列腺特异性表面抗原 (PSMA)、Her2/neu (受体酪氨酸激酶erbB2)、Her3 (erb-B3)、Her4 (erb-B4)、erbB二聚体、雌激素受体、黄体酮受体、肝配蛋白B2、CD123、c-Met、GD-2和MAGE A3、CE7、肾母细胞瘤1 (WT-1)、细胞周期蛋白, 诸如细胞周期蛋白A1 (CCNA1) 或与通用标签相关联的抗原和/或生物素化分子, 和/或由HIV、HCV、HBV或其它病原体表达的分子。

[0362] 在一些实施方案中, 该CAR结合病原体特异性抗原。在一些实施方案中, 该CAR对病毒性抗原 (诸如HIV、HCV、HBV等)、细菌抗原和/或寄生虫抗原特异。

[0363] 在一些实施方案中, 该重组受体 (例如CAR) 的抗体部分进一步包括免疫球蛋白恒定区的至少一部分 (诸如铰链区, 例如IgG4铰链区, 和/或 C_{H1} / C_L 和/或Fc区)。在一些实施方案中, 该恒定区或部分是人IgG的, 诸如IgG4或IgG1的。在一些方面中, 该恒定区的部分充当抗原识别组成 (例如scFv) 和跨膜域之间的间隔区。相较于缺少间隔区, 该间隔区的长度可提供抗原结合后的增加的细胞应答性。示例性间隔区 (例如铰链区) 包括国际专利申请公开号W02014031687中所述的间隔区。在一些实例中, 该间隔区的长度为或为约12个氨基酸, 或其长度不多于12个氨基酸。示例性间隔区包括具有至少约10至229个氨基酸、约10至200个氨基酸、约10至175个氨基酸、约10至150个氨基酸、约10至125个氨基酸、约10至100个氨基酸、约10至75个氨基酸、约10至50个氨基酸、约10至40个氨基酸、约10至30个氨基酸、约10至20个氨基酸或约10至15个氨基酸的间隔区, 且包括任何所列的范围的端点之间的整数的。在一些实施方案中, 间隔区具有约12个氨基酸或更少、约119个氨基酸或更少或约229氨基酸或更少。示例性间隔区包括单独的IgG4铰链、与 C_{H2} 和 C_{H3} 域连接的IgG4铰链, 或与 $CH3$ 域连接的IgG4铰链。示例性间隔区包括但不限于Hudecek等人, Clin. Cancer Res., 19:3153 (2013)、国际专利申请公开号W02014031687、美国专利号8,822,647或公开的申请号US2014/0271635中所述的间隔区。

[0364] 在一些实施方案中, 该恒定区或部分是人IgG的, 诸如IgG4或IgG1。在一些实施方案中, 该间隔区具有序列ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:1中列出的), 且由SEQ ID NO:2中列出的序列编码。在一些实施方案中, 该间隔区具有SEQ ID NO:3中列出的序列。在一些实施方案中, 该间隔区具有SEQ ID NO:4中列出的序列。在一些实施方案中, 该恒定区或部分是人IgD的。在一些实施方案中, 该间隔区具有SEQ ID NO:5中列出的序列。在一些实施方案中, 该间隔区具有下列氨基酸的序列, 该氨基酸序列与SEQ ID NO:1、3、4或5中的任一个具有至少

85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性。

[0365] 此抗原识别域通常与一个或多个细胞内信号传导组成连接,诸如,在CAR的情况下,通过抗原受体复合物(诸如TCR复合物)和/或经由另一细胞表面受体的信号模拟激活的信号传导组成。因此,在一些实施方案中,该抗原结合组成(例如抗体)与一种或多种跨膜和细胞内的信号传导域连接。在一些实施方案中,该跨膜域与细胞外域融合。在一个实施方案中,使用天然地与受体(例如CAR)中的一个域相关联的跨膜域。在一些情况中,该跨膜域通过氨基酸替代经选择或修饰以避免此类域与其跨膜域或不同表面膜蛋白的结合来最小化与该受体复合物的其它成员相互作用。

[0366] 在一些实施方案中,该跨膜域衍生自天然来源或衍生自合成来源。当该来源是天然的时,在一些方面中,该域衍生自任何膜结合的或跨膜蛋白。跨膜区包括衍生自下列的跨膜区(即至少包含下列的跨膜区):T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD 134、CD137、或CD154。可替换地,在一些实施方案中,该跨膜域是合成的。在一些方面中,该合成的跨膜域主要包含疏水性残基,诸如亮氨酸和缬氨酸。在一些方面中,苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体在合成的跨膜域的每端处发现。在一些实施方案中,连接是通过接头、间隔区和/或跨膜域的。

[0367] 其中,该细胞内信号传导域是模拟或接近通过天然抗原受体的信号、通过此类受体与共刺激受体结合的信号,和/或仅通过共刺激受体的信号的细胞内信号传导域。在一些实施方案中,短的寡或多肽接头(例如长度介于2和10个氨基酸之间的接头,诸如含有甘氨酸和丝氨酸的接头,例如甘氨酸-丝氨酸二联体)是存在的,且在CAR的跨膜域和细胞质信号传导域之间形成连接。

[0368] 该受体(例如CAR)通常至少包括一种细胞内信号传导组成。在一些实施方案中,该受体包括TCR复合物的细胞内组成,诸如介导T细胞激活和细胞毒性的TCR CD3链,例如CD3 ζ 链。因此,在一些方面中,该抗原结合部分与一种或多种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跨膜域、CD3细胞内信号传导域和/或其它CD跨膜域。在一些实施方案中,该受体(例如CAR)进一步包括一种或多种额外分子(诸如Fc受体 γ 、CD8、CD4、CD25或CD16)的一部分。例如,在一些方面中,该CAR或其它嵌合受体包括CD3- ζ (CD3- ζ)或Fc受体 γ 和CD8、CD4、CD25或CD16之间的嵌合分子

[0369] 在一些实施方案中,一经连接CAR或其它嵌合受体,该受体的细胞质域或细胞内信号传导域至少激活正常效应子功能或免疫细胞(例如经工程化以表达CAR的T细胞)的应答中的一种。例如,在一些情况中,CAR诱导T细胞的功能,诸如细胞毒性活性或T辅助细胞活性,诸如分泌细胞因子或其它因子。在一些实施方案中,抗原受体组成或共刺激分子的细胞内信号传导域的截短部分用于取代完整的免疫刺激链,例如,如果该截短部分转导效应子功能信号的话。在一些实施方案中,该细胞内信号传导域包括T细胞受体(TCR)的细胞质序列,且在一些方面中,还包括共受体的细胞质序列,其在天然背景中与此类受体协同作用以在抗原受体结合后开始信号转导。

[0370] 在天然TCR的背景中,完全激活通常不仅需要通过TCR的信号传导,还需要共刺激新号。因此,在一些实施方案中,为了促进完全激活,用于生成继发或共刺激新号的组成还包括在CAR中。在其它实施方案中,CAR并不包括用于生成共刺激信号的组成。在一些方面

中,额外的CAR在同一细胞中表达,且提供生成继发或共刺激信号的组成。

[0371] 在一些方面中,将T细胞激活描述为通过两类细胞质信号传导序列介导:通过TCR开始抗原依赖性初级激活的细胞质信号传导序列(初级细胞质信号传导序列),和以抗原非依赖性方式起作用以提供继发或共刺激信号的细胞质信号传导序列(继发细胞质信号传导序列)。在一些方面中,该CAR包括此类信号传导组成中的一种或两种。

[0372] 在一些方面中,该CAR包括初级细胞质信号传导序列,其调控TCR复合物的初级激活。以刺激方法作用的初级细胞质信号传导序列可含有信号传导基序,其称为基于免疫受体酪氨酸激活基序或ITAM。含有初级细胞质信号传导序列的ITAM的实例包括衍生自下列的ITAM:TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD8、CD22、CD79a、CD79b和CD66d。在一些实施方案中,CAR中的细胞质信号传导分子含有衍生自CD3 ζ 的细胞质信号传导域、其部分、或序列。

[0373] 在一些实施方案中,该CAR包括共刺激受体(诸如CD28、4-1BB、OX40、DAP10和ICOS)的信号传导域和/或跨膜部分。在一些方面中,同一CAR包括激活和共刺激组成二者。

[0374] 在一些实施方案中,该激活域包括在一个CAR中,然而,该共刺激组成通过识别另一抗原的另一CAR提供。在一些实施方案中,该CAR包括激活或刺激性CAR、共刺激性CAR,二者在同一细胞上表达(参见W02014/055668)。在一些方面中,该细胞包括一种或多种刺激性或激活CAR和/或共刺激性CAR。在一些实施方案中,该细胞进一步包括抑制剂性CAR(iCAR,参见Fedorov等人,Sci.Transl.Medicine,5(215)(2013),诸如识别除与疾病或病症相关联的和/或疾病或病症特有的抗原外的抗原的CAR,因此,通过靶向疾病的CAR递送的激活信号通过抑制性CAR与其配体的结合来减少或抑制,例如,以减少脱靶作用。

[0375] 在某些实施方案中,该细胞内信号传导域包含与CD3(例如CD3- ζ)细胞内域连接的CD28跨膜和信号传导域。在一些实施方案中,该细胞内信号传导域包含嵌合的CD28和CD137(4-1BB、TNFRSF9)共刺激域,其与CD3 ζ 细胞内域连接。

[0376] 在一些实施方案中,该CAR涵盖细胞质部分中的一种或多种(例如两种或更多种)共刺激域和的激活域,例如初级激活域。示例性CAR包括CD3- ζ 、CD28和4-1BB的细胞内组成。

[0377] 在一些实施方案中,该CAR或其它抗原受体进一步包括标记物,和/或表达CAR或其它抗原受体的细胞进一步包括替代标记物,诸如细胞表面标记物,其可用于确认表达该受体的细胞的转导或工程化,诸如截短的形式的细胞表面受体,诸如截短的EGFR(tEGFR)。在一些方面中,该标记物,例如替代标记物,包括CD34、NGFR或表皮生长因子受体的全部或部分(例如截短形式)(例如tEGFR)。在一些实施方案中,编码该标记物的核酸与编码接头序列(诸如可切割的接头序列,例如T2A)的多核苷酸可操作地连接。例如,标记物和(任选为)接头序列可以是下列中公开的任一种:PCT公开号W02014031687。例如,该标记物可以是截短的EGFR(tEGFR),其任选地与接头序列连接,诸如T2A可切割的接头序列。截短的EGFR(例如tEGFR)的示例性多肽包含SEQ ID NO:7中列出的氨基酸序列或与SEQ ID NO:7具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性的氨基酸序列。示例性T2A接头序列包含SEQ ID NO:6中列出的氨基酸序列或与SEQ ID NO:6具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性的氨基酸序列。

[0378] 在一些实施方案中,该标记物是天然存在于T细胞上或非天然存在于T细胞表面上的分子或其部分,例如细胞表面蛋白。在一些实施方案中,该分子是非自身分子,例如非自

身蛋白,即由未将细胞过继转移到其中的宿主的免疫系统识别为“自身”的分子。

[0379] 在一些实施方案中,该标记物未起到治疗功能和/或未产生除了用作基因工程的标记物,例如用于选择成功工程化的细胞外的作用。在其它实施方案中,该标记物可以是治疗分子或在其他方面中发挥一些期望的作用的分子,诸如用于在体内计数的细胞的配体,诸如在过继转移和用配体计数时增强和/或抑制细胞的应答的共刺激或免疫检查点分子

[0380] 在一些情况中,CAR是指第一、第二和/或第三代CAR。在一些方面中,第一代CAR是抗原结合时仅提供CD3链诱导的信号信号的CAR;在一些方面中,第二代CAR是提供此类信号和共刺激信号的CAR,诸如包括来自共刺激受体(诸如CD28或CD137)的细胞内信号传导域的CAR;在一些方面中,第三代CAR包括不同共刺激受体的多个共刺激域的CAR。

[0381] 在一些实施方案中,该嵌合抗原受体包括含有抗体或抗体片段的细胞外部分。在一些方面中,该嵌合抗原受体包括含有抗体或片段的细胞外部分和细胞内信号传导域。在一些实施方案中,该抗体或片段包括scFv和含有ITAM的细胞内域。在一些方面中,该细胞内信号传导域包括CD3- ζ (CD3 ζ) 链的 ζ 链的信号传导域。在一些实施方案中,该嵌合抗原受体包括连接细胞外域和细胞内信号传导域的跨膜域。在一些方面中,该跨膜域含有CD28的跨膜部分。在一些实施方案中,该嵌合抗原受体含有T细胞共刺激分子的细胞内域。该细胞外域和跨膜域可直接地或间接地连接。在一些实施方案中,该细胞外域和跨膜通过间隔区连接,诸如本文所述的任何间隔区。在一些实施方案中,该受体含有该跨膜域从其衍生的分子的细胞外部分,诸如CD28细胞外部分。在一些实施方案中,该嵌合抗原受体含有衍生自T细胞共刺激分子的细胞内域或其功能变体,诸如跨膜域和细胞内信号传导域之间的细胞内域。在一些方面中,该T细胞共刺激分子是CD28或41BB。

[0382] 例如,在一些实施方案中,该CAR含有抗体(例如抗体片段)、跨膜域(其是或含有CD28的跨膜部分或其功能性变体)和含有CD28的信号传导部分或其功能性变体的细胞内信号传导域和CD3 ζ 信号传导部分或其功能性变体。在一些实施方案中,该CAR含有抗体(例如抗体片段)、跨膜域(其是或含有CD28的跨膜部分或其功能性变体),和含有4-1BB的信号传导部分或其功能性变体的细胞内信号传导域和CD3 ζ 的信号传导部分或其功能性变体。在一些此类实施方案中,该受体进一步包括含有Ig分子的一部分(诸如人Ig分子,诸如Ig铰链,例如IgG4铰链)的间隔区,诸如仅铰链的间隔区。

[0383] 在一些实施方案中,该重组受体(例如CAR)的跨膜域是或包括人CD28(例如登记号P01747.1)的跨膜域或其变体,诸如包含SEQ ID NO:8中列出的氨基酸序列或与SEQ ID NO:8具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列的跨膜域;在一些实施方案中,含有该重组受体的一部分的跨膜域包含SEQ ID NO:9中列出的氨基酸序列或与其具有至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0384] 在一些实施方案中,该重组受体(例如CAR)的细胞内信号传导组成含有人CD28的细胞内共刺激信号传导域或其功能性变体或部分,诸如具有天然CD28蛋白的位置186-187处的LL至GG替代的域。例如,该胞内信号传导域可包含SEQ ID NO:10或11中列出的氨基酸序列或与SEQ ID NO:10或11具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,该

细胞内域包含4-1BB(例如登记号Q07011.1)的细胞内共刺激信号传导域或其功能性变体或,诸如SEQ ID NO:12中列出的氨基酸序列或与SEQ ID NO:12具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0385] 在一些实施方案中,该重组受体(例如CAR)的细胞内信号传导域包含人CD3 ζ 刺激性信号传导域或其功能性变体,诸如人CD3 ζ (登记号P20963.2)的同种型3的112AA细胞质域或如美国专利号7,446,190或美国专利号8,911,993中所述的CD3 ζ 信号传导域。例如,在一些实施方案中,该细胞内信号传导域包含SEQ ID NO:13、14或15中列出的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:13、14或15具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0386] 在一些方面中,该间隔区仅含有IgG的铰链区,诸如仅IgG4或IgG1的铰链,诸如仅SEQ ID NO:1中列出的间隔区的铰链。在其它实施方案中,该间隔区是或含有Ig铰链(例如IgG4衍生的铰链),其任选地与CH2和/或CH3域连接。在一些实施方案中,该间隔区是Ig铰链(例如IgG4铰链),其与CH2和CH3域连接,诸如SEQ ID NO:4中列出的。在一些实施方案中,该间隔区是Ig铰链(例如IgG4铰链),其仅与CH3域连接,诸如SEQ ID NO:3中列出的。在一些实施方案中,该间隔区是或包含富含甘氨酸-丝氨酸的序列或其它柔性接头诸如已知的柔性接头。

[0387] 例如,在一些实施方案中,该CAR包括抗体(诸如抗体片段,包括scFv)、间隔区(诸如含有免疫球蛋白分子的一部分的间隔区,诸如铰链区和/或重链分子的一种或多种恒定区,诸如含有间隔区的Ig铰链)、含有CD28衍生的跨膜域的全部或一部分的跨膜域、CD28-衍生的细胞内信号传导域和CD3 ζ 信号传导域。在一些实施方案中,该CAR包括抗体或片段(诸如scFv)、间隔区(诸如任何的含有间隔区的Ig铰链)、CD28衍生的跨膜域、4-1BB衍生的细胞内信号传导域和a CD3 ζ 衍生的信号传导域。

[0388] 在一些实施方案中,单个启动子可指导RNA的表达,所述RNA在单个开放阅读框(ORF)中含有两个或三个基因(例如其编码涉及调节代谢途径的分子和编码重组受体),该两个或三个基因通过编码自切割肽的序列(例如2A序列)或蛋白酶识别位点(例如弗林蛋白酶)使彼此分开。因此,该ORF编码单个多肽,该多肽在翻译期间(在2A的情况中)或之后加工成单独的蛋白。在一些情况中,该肽(诸如T2A)可导致核糖体跳跃(核糖体跳跃)合成2A元件C末端的肽键,导致2A序列末端与下一个肽下游之间的分离(参见,例如deFelipe. Genetic Vaccines and Ther. 2:13 (2004) 和deFelipe等人Traffic 5:616-626 (2004))。在一些实施方案中,编码此类CAR构建体的核酸分子进一步包括编码T2A核糖体跳跃元件的序列和/或tEGFR序列,例如编码CAR序列的下游。许多2A元件是已知的。可用于本文公开的方法和核酸的2A序列的实例不限于,来自美国专利申请号20070116690中所述的口蹄疫病毒(F2A,例如SEQ ID NO:24)、马鼻肺炎病毒(E2A,例如SEQ ID NO:23)、Thosea asigna病毒(T2A,例如SEQ ID NO:6或20),和猪捷申病毒-1(P2A,例如SEQ ID NO:21或22)的2A序列。在一些实施方案中,该序列编码SEQ ID NO:6中列出的T2A核糖体跳跃元件,或与SEQ ID NO:6具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,表达抗原受体(例如CAR)的T细胞还可经生成以表达截短的EGFR(EGFRt)作为非免疫原性选择表位(例如通过导入编码由T2A核糖

体开关分离的CAR和EGFRt的构建体以表达来自同一构建体的两种蛋白),其然后可用作标记物以检测此类细胞(参见例如美国专利号8,802,374)。在一些实施方案中,该序列编码SEQ ID NO:7中列出的tEGFR序列,或与SEQ ID NO:7具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0389] 由施用至该受试者的细胞表达的重组受体(诸如CAR)通常识别或特异性结合分子,该分子在正在治疗的疾病或病况或其细胞中表达,与正在治疗的疾病或病况或其细胞相关联,和/或对正在治疗的疾病或病况或其细胞特异。特异性结合该分子(例如抗原)时,该受体通常递送免疫刺激信号(诸如ITAM转导的信号)至该细胞,从而促进靶向该疾病或病况的免疫应答。例如,在一些实施方案中,该细胞表达特异性结合抗原的CAR,该抗原由该疾病或病况的细胞或组织表达,或与该疾病或病况相关联。

[0390] 4. TCR

[0391] 在一些实施方案中,提供工程化细胞(诸如T细胞),其表达T细胞受体(TCR)或其抗原结合部分,其识别靶多肽(诸如肿瘤、病毒性或自身免疫蛋白的抗原)的肽表位或T细胞表位。

[0392] 在一些实施方案中,“T细胞受体”或“TCR”是含有可变 α 和 β 链(还分别称为TCR α 和TCR β)或可变 γ 和 δ 链(也分别称为TCR α 和TCR β)或其抗原结合部分的分子,且其能够特异性结合与MHC分子结合的肽。在一些实施方案中,该TCR是 $\alpha\beta$ 的形式。典型地,以 $\alpha\beta$ 和 $\gamma\delta$ 形式存在的TCR通常在结构上是相似的,但是表达它们的T细胞可具有不同的解剖学位置或功能。TCR可在细胞表面上或以可溶的形式存在。通常,TCR在T细胞(或T淋巴细胞)的表面上存在,TCR通常负责识别与主要组织相容性复合物(MHC)分子结合的抗原。

[0393] 除非另有规定,否则术语“TCR”应理解为包含完整TCR以及其抗原结合部分或抗原结合片段。在一些实施方案中,该TCR是完整或全长TCR,其包括 $\alpha\beta$ 形式或 $\gamma\delta$ 形式的TCR。在一些实施方案中,该TCR是抗原结合部分,其少于全长TCR但结合与MHC分子结合(诸如结合MHC肽复合物)的特异性肽。在一些情况中,TCR的抗原结合部分或片段可仅含有全长或完整TCR的结构域的一部分,但还能结合完整TCR结合的肽表位,诸如MHC肽复合物。在一些情况中,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,足以形成结合特异性MHC-肽复合物的结合位点。通常,TCR的可变链含有涉及识别肽、MHC和/或MHC-肽复合物的互补决定区。

[0394] 在一些实施方案中,该TCR的可变结构域含有高可变环,或互补决定区(CDR),其通常是抗原识别和结合能力和特异性的主要贡献者。在一些实施方案中,TCR的CDR或其组合形成给定TCR分子的全部或基本上全部的抗原结合位点。TCR链的可变区的多个CDR通常通过框架区(FR)分开,相较于CDR,框架区通常在TCR分子中显示出较小的可变性(参见,例如Jores等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.U.S.A.87:9138,1990;Chothia等人,EMBOJ.7:3745,1988;还参见Lefranc等人,Dev.Comp.Immunol.27:55,2003)。在一些实施方案中,CDR3是负责抗原结合或特异性的主要CDR,或是指定TCR可变区上的三个CDR中用于抗原识别和/或与肽-MHC复合物的处理肽部分相互作用最重要的CDR。在一些情况中, α 链的CDR1可与某些抗原肽的N末端部分相互作用。在一些情况中, β 链的CDR1可与该肽的C末端部分相互作用。在一些情况中,CDR2对与MHC-肽复合物的MHC部分的相互作用或识别MHC-肽复合物的MHC部分

作用最强,或者是负责与MHC-肽复合物的MHC部分的相互作用或识别MHC-肽复合物的MHC部分的主要CDR。在一些实施方案中, β 链的可变区可含有一个另外的高可变区(CDR4或HVR4),该高可变区通常涉及超抗原结合且不涉及抗原识别(Kotb(1995) *Clinical Microbiology Reviews*, 8:411-426)。

[0395] 在一些实施方案中,TCR还可含有恒定域、跨膜结构域和/或短细胞质尾(参见,例如Janeway等人, *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 4:33, 1997)。在一些方面中,该TCR的每条链可具有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,和C末端终端处的短细胞质尾。在一些实施方案中,TCR与涉及介导信号转导的CD3复合物的不变蛋白相关联。

[0396] 在一些实施方案中,TCR链含有一个或多个恒定结构域。例如,指定TCR链(例如 α 链或 β 链)的细胞外部分可含有两个免疫球蛋白样结构域,诸如邻近细胞膜的可变域(例如V α 或V β ;典型的是基于Kabat编号的氨基酸1至116, Kabat等人“*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5th ed.)和恒定域(例如 α 链恒定结构域或C α ,典型的是基于Kabat编号的链的位置117至259;或 β 链恒定结构域或C β ,典型的是基于Kabat的链的位置117至295)。例如,在一些情况中,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膜远端可变结构域,该可变域每个含有CDR。该TCR的恒定结构域可含有短连接序列,其中半胱氨酸残基形成二硫键,从而连接该TCR的两条链。在一些实施方案中,TCR可在 α 和 β 链的每一条中具有额外的半胱氨酸残基,使得该TCR在恒定结构域中含有两个二硫键。

[0397] 在一些实施方案中,该TCR链含有跨膜域。在一些实施方案中,该跨膜域带正电荷。在一些情况中,该TCR链含有细胞质尾。在一些情况中,该结构使TCR与其它分子(例如CD3)和其亚基相关联。例如,含有具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相关联。CD3信号传导亚基(例如CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 和CD3 ζ 链)的细胞内尾含有一个或多个基于免疫受体酪氨酸的激活基序或ITAM,其涉及TCR复合物的信号传导能力。

[0398] 在一些实施方案中,该TCR可以是两条链 α 和 β (或任选是 γ 和 δ)的异质二聚体或其可以是单链TCR构建体。在一些实施方案中,该TCR是含有(诸如通过一个或多个二硫键)连接的两条分离的链(α 和 β 链或 γ 和 δ 链)的异质二聚体。

[0399] 在一些实施方案中,该TCR可从已知的TCR序列生成,诸如V α 、 β 链的序列,对于这些序列,基本上全长的编码序列是容易获得的。用于从细胞来源获得全长TCR序列(包括V链序列)的方法是熟知的。在一些实施方案中,编码TCR的核酸可以从各种来源获得,诸如通过聚合酶链式反应(PCR)扩增在指定的一个或多个细胞中的或从指定的一个或多个细胞分离的编码TCR的核酸,或合成公众可获得的TCR DNA序列。

[0400] 在一些实施方案中,该TCR获自生物来源,诸如获自细胞,诸如获自T细胞(例如细胞毒性T细胞)、T细胞杂交瘤或其它合成公众可获得的来源。在一些实施方案中,该T细胞可获自体内分离的细胞。在一些实施方案中,该TCR是胸腺选择的TCR。在一些实施方案中,该TCR是新表位限制性TCR。在一些实施方案中,该T细胞可以是培养的T细胞杂交瘤或克隆。在一些实施方案中,该TCR或其抗原结合部分可以从该TCR的序列知识中合成产生。

[0401] 在一些实施方案中,该TCR从通过筛选针对靶多肽抗原或其靶T细胞表位的候选TCR文库鉴定或选择的TCR产生。TCR文库可通过扩增来自分离自受试者的T细胞的V α 和V β 库产生,包括存在于PBMC、脾脏或其它淋巴器官中的细胞。在一些情况中,T细胞可扩增自可扩增自肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)。在一些实施方案中,TCR文库可生成自CD4⁺或CD8⁺细胞。在一些实施方案中,该TCR可扩增自健康受试者正常T细胞来源,即正常TCR文库。在一些实施方案中,该TCR扩增自患病受试者(即患病的TCR文库)的T细胞来源。在一些实施方案中,简并引物用于(诸如通过RT-PCR)扩增获自人的样品(诸如T细胞)中的V α 和V β 的基因库。在一些实施方案中,scTv文库可以从幼稚的V α 和V β 文库组装,其中扩增产物经克隆或组装以通过接头分离。根据该受试者和细胞的来源,该文库可以是HLA等位基因特异性的。可替代地,在一些实施方案中,TCR文库以通过亲本或绞架TCR分子的诱变或多样化产生。在一些方面中,对该TCR进行(例如 α 或 β 链的)定向进化,诸如通过突变。在一些方面中,改变该TCR的CDR内的特定残基。在一些实施方案中,选择的TCR可通过亲和力成熟来修饰。在一些实施方案中,抗原特异性T细胞可以诸如通过筛选以评估针对该肽的CTL活性选择。在一些方面中,TCR(例如在抗原特异性T细胞上存在的TCR)可诸如通过结合活性选择,例如针对抗原的特定亲合力或亲合力。

[0402] 在一些实施方案中,该TCR或其抗原结合部分是已经经修饰或工程化的TCR或其抗原结合部分。在一些实施方案中,定向进化的方法用于生成具有改变的特性的TCR,诸如具有更高的针对特异性MHC肽复合物的亲合力。在一些实施方案中,定向进化通过展示方法实现,其包括但不限于,酵母展示(Holler等人,(2003) Nat Immunol, 4, 55-62;Holler等人,(2000) Proc Natl Acad Sci U S A, 97, 5387-92),噬菌体展示(Li等人,(2005) Nat Biotechnol, 23, 349-54),或T细胞展示(Chervin et al., (2008) J Immunol Methods, 339, 175-84)。在一些实施方案中,展示方法涉及工程化或修饰已知的、亲本或参考TCR。例如,在一些情况中,野生型TCR可用作用于产生突变的TCR的模板,在改突变的TCR中,TCR的一个或多个残基经突变,且选择具有期望特性的突变体,诸如对期望的抗原更高的亲合力。

[0403] 在一些实施方案中,用于产生或生成感兴趣的TCR的靶多肽的肽是已知的或可容易地由本领域技术人员鉴定。在一些实施方案中,适用于生成TCR或抗原结合部分的肽可感兴趣的靶多肽(诸如下文所述的靶多肽)中的HLA限制性基序的存在确定。在一些实施方案中,肽使用本领域技术人员已知的计算机预测模型鉴定。在一些实施方案中,为了预测MHC I类结合位点,此类模型包括但不限于,ProPred1(Singh和Raghava (2001) Bioinformatics 17(12):1236-1237和SYFPEITHI(参见Schuler等人,(2007) Immunoinformatics Methods in Molecular Biology, 409(1):75-932007)。在一些实施方案中,该MHC限制性表位是HLA-A0201,其在近似39-46%的所有高加索人中表达,因此代表用于制备TCR或其他MHC-肽结合分子的MHC抗原的合适选择。

[0404] 使用计算机预测模型的HLA-A0201结合基序和蛋白酶体和免疫蛋白酶体的切割位点是本领域技术人员已知的。为了预测MHC I类结合位点,此类模型包括但不限于,ProPred1(其更具体地描述于Singh和Raghava, ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. BIOINFORMATICS 17(12):1236-12372001),和SYFPEITHI(参见Schuler等人, SYFPEITHI, Database for Searching and T-Cell Epitope Prediction. in Immunoinformatics Methods in Molecular Biology, vol 409(1):75-932007)。

[0405] 在一些实施方案中,该TCR或其抗原结合部分可以是重组产生的天然蛋白或其突变形式,在该突变形式中,一个或多个特性(诸如结合特征)已经改变。在一些实施方案中,TCR可衍生自各种动物物种中的一种,诸如人、小鼠、大鼠或其它哺乳动物。TCR可以是细胞结合的或可溶的形式。在一些实施方案中,出于所提供的方法的目的,该TCR以细胞结合的形式在细胞的表面上表达。

[0406] 在一些实施方案中,该TCR是全长TCR。在一些实施方案中,该TCR是抗原结合部分。在一些实施方案中,该TCR二聚TCR(dTCR)。在一些实施方案中,该TCR是单链TCR(sc-TCR)。在一些实施方案中,dTCR或scTCR具有如WO 03/020763、WO 04/033685、WO2011/044186中所述的构造。

[0407] 在一些实施方案中,该TCR含有对应于跨膜序列的序列。在一些实施方案中,该TCR含有对应于细胞质序列的序列。在一些实施方案中,该TCR能够形成具有CD3的TCR复合物。在一些实施方案中,任何的该TCR(包括dTCR或scTCR),可与在T细胞的表面上产生激活的TCR的信号传导域连接。在一些实施方案中,该TCR在细胞的表面上表达。

[0408] 在一些实施方案中,dTCR含有第一多肽和第二多肽,其中对应于TCR α 链可变区序列的序列与对应于TCR α 链恒定区细胞外序列的序列的N末端融合,且其中对应于TCR β 链可变区序列的序列与对应于TCR β 链恒定区细胞外序列的序列的N末端融合,该第一和第二多肽通过二硫键连接。在一些实施方案中,该键可对应于天然二聚体 $\alpha\beta$ TCR中存在的天然链间二硫键。在一些实施方案中,该链间二硫键不存在于天然TCR中。例如,在一些实施方案中,一个或多个半胱氨酸可并入dTCR多肽对的恒定区细胞外序列中。在一些情况中,天然和非天然二硫键都是合意的。在一些实施方案中,该TCR含有跨膜序列以锚定至膜。

[0409] 在一些实施方案中,dTCR含有TCR α 链和TCR β 链,该TCR α 链含有可变 α 域、恒定 α 域和附着于恒定 α 域的C末端的第一二聚化基序,该TCR β 链包含可变 β 域、恒定 β 域和附着于恒定 β 域的C末端的第一二聚化基序,其中该第一和第二二聚化基序容易相互作用以在该第一二聚化基序中的氨基酸和将TCR α 链和TCR β 链连接在一起的第二二聚基序中的氨基酸之间形成共价键。

[0410] 在一些实施方案中,该TCR是scTCR。典型地,scTCR可使用本领域技术人员已知的方法生成,参见例如,Soo Hoo, W.F. 等人,PNAS (USA) 89,4759 (1992); Wülfing, C. 和 Plückthun, A., J. Mol. Biol. 242,655 (1994); Kurucz, I. 等人,PNAS (USA) 90 3830 (1993); 国际公开的PCT号WO 96/13593,WO 96/18105,W099/60120,W099/18129,WO 03/020763,W02011/044186; 和Schlueter, C.J. 等人, J. Mol. Biol. 256,859 (1996)。在一些实施方案中,scTCR含有经导入的非天然二硫链间键以促进TCR链的关联(参见例如国际公开的PCT号WO 03/020763)。在一些实施方案中,scTCR是非二硫连接的截短的TCR,在该TCR中,与其C-末端融合的异源亮氨酸拉链促进链关联(参见例如国际公开的PCT号W099/60120)。在一些实施方案中,scTCR含有经由肽接头与TCR β 可变域共价连接的TCR α 可变域(参见例如,国际公开的PCT号W099/18129)。

[0411] 在一些实施方案中,scTCR含有第一区段、第二区段和接头序列,该第一区段由对应于TCR α 链可变区的氨基酸序列构成,该第二区段由对应于TCR β 链可变区序列的氨基酸序列构成的,该TCR β 链可变区序列与对应于TCR β 链恒定域细胞外序列的氨基酸序列的N末端融合,该接头序列连接该第一区段的C末端与该第二区段的N末端。

[0412] 在一些实施方案中, scTCR含有第一区段和第二区段, 和(任选地)接头序列, 该第一区段由与 α 链细胞外恒定域序列的N末端融合的链可变区序列构成, 该第二区段由与 α 链 β 链细胞外恒定和跨膜序列的N末端融合的 β 链可变区序列构成, 该接头序列连接该第一区段的C末端与该第二区段的N末端。

[0413] 在一些实施方案中, scTCR含有第一区段和第二区段, 和(任选地)接头序列, 该第一区段由与 β 链细胞外恒定域序列的N末端融合的TCRB链可变区序列构成, 该第二区段由与序列 α 链细胞外恒定和跨膜序列的N末端融合的 α 链可变区序列构成, 该接头序列连接该第一区段的C末端与该第二区段的N末端。

[0414] 在一些实施方案中, 连接该第一和第二TCR区段的scTCR的接头可以是能够形成单个多肽链的任何接头, 同时保留TCR结合特异性。在一些实施方案中, 该接头序列可以, 例如, 具有式-P-AA-P-, 其中P是脯氨酸且AA表示其中氨基酸是甘氨酸和丝氨酸的氨基酸序列。在一些实施方案中, 该第一和第二区段配对, 使得其可变区序列定向用于此类结合。因此, 在一些情况中, 该接头具有足够长度以跨越该第一区段的C末端与该第二区段的N末端之间的距离, 或反之亦然, 但其不能太长以阻断或降低scTCR对靶配体的结合。在一些实施方案中, 该接头可含有10至45个氨基酸或约10至45个氨基酸, 诸如10至30个氨基酸或26至41个氨基酸残基, 例如29、30、31或32个氨基酸。在一些实施方案中, 该接头具有式-PGGG-(SGGG) 5-P-, 其中P是脯氨酸, G是甘氨酸且S是丝氨酸(SEQ ID NO:16)。在一些实施方案中, 该接头具有序列GSADDAKKDAKKDGKS(SEQ ID NO:17)。

[0415] 在一些实施方案中, 该scTCR含有共价二硫键, 其连接 α 链的恒定域的免疫球蛋白区的残基和 β 链的恒定域的免疫球蛋白区的残基。在一些实施方案中, 天然TCR中的链间二硫键是不存在的。例如, 在一些实施方案中, 一个或多个半胱氨酸并入至该scTCR多肽的第一和第二区段的恒定如细胞外序列中。在一些情况中, 天然和非天然二硫键都可以是合意的。

[0416] 在含有导入的链间的二硫键的dTCR或scTCR的一些实施方案中, 该天然二硫键是不存在的。在一些实施方案中, 一个或多个形成天然链间二硫键的半胱氨酸经替代成另一残基, 诸如成丝氨酸或丙氨酸。在一些实施方案中, 导入的二硫键可通过使该第一和第二区段上的非半胱氨酸残基突变成半胱氨酸形成。TCR的示例性非天然二硫键描述于公开的国际PCT号W02006/000830中。

[0417] 在一些实施方案中, 该TCR或其抗原结合片段表现出具有对靶抗原的平衡结合常数的亲和力介于或介于约 10^{-5} 和 10^{-12} M之间及本文中的所有单个数值和范围。在一些实施方案中, 该靶抗原是MHC-肽复合物或配体。

[0418] 在一些实施方案中, 编码TCR(诸如 α 和 β 链)的核酸, 可通过PCR、克隆或其它合适的方式扩增, 且克隆至合适的表达载体。该表达载体可以是任何合适的重组表达载体, 且可用于转化或转染任何合适的宿主。合适的载体包括经设计用于繁殖或扩增或用于表达或用于二者的载体, 诸如质粒和病毒。

[0419] 在一些实施方案中, 该载体可以是pUC系列(Fermentas Life Sciences)、pBluescript系列(Stratagene, LaJolla, Calif.)、pET系列(Novagen, Madison, Wis.)、pGEX系列(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)或pEX系列(Clontech, Palo Alto, Calif.)载体。在一些情况中, 噬菌体载体(诸如 λ G10、 λ GT11、 λ ZapII(Stratagene)、 λ EMBL4和 λ NM1149)

也可使用。在一些实施方案中,植物表达载体可使用且包括pBI01、pBI101.2、pBI101.3、pBI121和pBIN19(Clontech)。在一些实施方案中,动物表达载体包括pEUK-C1、pMAM和pMAMneo(Clontech)。在一些实施方案中,使用病毒载体,诸如逆转录病毒载体。

[0420] 在一些实施方案中,该重组表达载体使用标准重组DNA技术制备。在一些实施方案中,载体可含有调控性序列,诸如转录和翻译起始密码子和终止密码子,该调控性序列对待施用该载体至其中的宿主类型特异(例如细菌、真菌、植物或动物),其适当地并且考虑载体是基于DNA还是基于RNA而被引入其中。在一些实施方案中,该载体可含有与编码TCR或抗原结合部分(或其它MHC-肽结合分子)的核苷酸序列可操作连接的非天然启动子。在一些实施方案中,该启动子可以是非病毒启动子或病毒启动子,诸如巨细胞病毒(CMV)启动子、SV40启动子、RSV启动子和在鼠干细胞病毒的长末端重复中发现的启动子。也考虑了本领域技术人员已知的其它启动子。

[0421] 在一些实施方案中,为了生成编码TCR的载体,该 α 和 β 链从表达感兴趣的TCR的T细胞克隆分离的总cDNA中PCR扩增且克隆至表达载体中。在一些实施方案中,该 α 和 β 链克隆至同一载体中。在一些实施方案中,该 α 和 β 链克隆至不同载体中。在一些实施方案中,该生成的 α 和 β 链并入逆转录病毒载体(例如慢病毒)中。

[0422] 5. 多靶向

[0423] 在一些实施方案中,该细胞和方法包括多靶向策略,诸如在该细胞上表达两种或更多种基因工程化受体,每种受体识别不同抗原的相同且通常各自包括不同的细胞内信号传导组成。此类多靶向策略描述于,例如,PCT公开号W0 2014055668A1(其描述了激活和共刺激性CAR的组合,例如靶向两种不同抗原,这两种抗原在脱靶(例如正常细胞)上单独存在但在待治疗的疾病或病况的细胞上一起存在)和Fedorov等人.,Sci.Transl.Medicine,5(215)(2013)(描述表达激活和抑制性CAR的细胞,诸如激活CAR结合在正常或非患病细胞上表达的且在待治疗的疾病或病况的细胞上表达的抗原,而抑制性CAR结合另一种仅在正常细胞或不期望治疗的细胞上表达的抗原)。

[0424] 例如,在一些实施方案中,该细胞包括表达第一基因工程化抗原受体(例如CAR或TCR)的受体,通常一旦特异性结合由该第一受体识别的抗原(例如第一抗原)该第一基因工程化抗原受体能够诱导对该细胞的激活信号。在一些实施方案中,该细胞进一步包括第二基因工程化抗原受体(例如CAR或TCR),例如嵌合共刺激受体,通常一旦特异性结合由该第二受体识别的第二抗原,该第二基因工程化抗原受体能够诱导对免疫细胞的共刺激信号。在一些实施方案中,该第一抗原和第二抗原是相同的。在一些实施方案中,该第一抗原和第二抗原是不同的。

[0425] 在一些实施方案中,该第一和/或第二基因工程化抗原受体(例如CAR或TCR)能够诱导对该细胞的激活信号。在一些实施方案中,该受体包括含有ITAM或ITAM样基序的细胞内信号传导组成。在一些实施方案中,由该第一受体诱导的激活涉及细胞中信号转导或蛋白表达的改变,这导致起始免疫应答,诸如ITAM磷酸化作用和/或开始ITAM介导的信号转导级联,形成免疫突触和/或被结合的受体附近的分子(例如CD4或CD8等)的聚簇,一种或多种转录因子(诸如NF- κ B和/或AP-1)的激活和/或诱导因子(诸如细胞因子)的基因表达、增殖和/或存活。

[0426] 在一些实施方案中,该第一和/或第二受体包括共刺激受体(诸如CD28、CD137(4-

1BB)、OX40和/或ICOS)的细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,该第一和第二受体包括不同的共刺激受体的细胞内信号传导结构域。在一个实施方案中,该第一受体含有CD28共刺激信号传导区且该第二受体含有4-1BB共刺激信号传导区,或反之亦然。

[0427] 在一些实施方案中,该第一和/或第二受体包括含有ITAM或ITAM样基序的细胞内信号传导结构域和共刺激受体的细胞内信号传导结构域二者。

[0428] 在一些实施方案中,该第一受体含有含有ITAM或ITAM样基序的细胞内信号传导结构域,且该第二受体含有共刺激受体的细胞内信号传导结构域。与在同一细胞中诱导的激活信号组合的共刺激性信号是导致免疫应答(诸如强劲和持续的免疫应答,诸如增强的基因表达、分泌细胞因子和其它因子)和T细胞介导的效应子功能(诸如细胞杀伤)的信号。

[0429] 在一些实施方案中,仅连接该第一受体或仅连接该第二受体均不会诱导强劲的免疫应答。在一些方面中,如果仅连接一种受体,该细胞变得对抗原有耐受性或无反应,或受抑制,和/或不经诱导以增殖或分泌因子或执行效应子功能。然而在一些此类实施方案中,当连接该多个受体时,诸如一旦遇到表达该第一和第二抗原的细胞,就实现期望的应答,诸如完全免疫激活或刺激,例如通过分泌一种或多种细胞因子、增殖、持久性和/或执行免疫效应子功能(诸如靶细胞的细胞毒性杀伤)指示的。

[0430] 在一些实施方案中,该两种受体分别诱导对该细胞的激活和抑制性信号,使得这两种受体中的一种与其抗原的结合可激活细胞或诱导应答,但该第二抑制性受体与其抗原的结合诱导压制或抑制该应答的信号。实例是激活性CAR和抑制性CAR或iCAR的组合。可使用此类策略,例如,在该策略中该激活性CAR结合在疾病或病况中表达但也在正常细胞上表达的抗原,而该抑制性受体结合另一种抗原,该抗原在正常细胞上表达但不在该疾病或病况的细胞上表达。

[0431] 在一些实施方案中,在与特定疾病或病况相关的抗原在非疾病细胞上表达和/或在工程化细胞本身上表达的情况中,采用该多靶向策略,所述表达是瞬时的(例如当刺激与基因工程相关联时)或永久地。在此类情况中,通过要求两个分开且独立的特异性抗原受体连接,可提高特异性、选择性和/或功效。

[0432] 在一些实施方案中,该多个抗原(例如该第一和第二抗原)在正在被靶向的细胞、组织或疾病或病况上表达,诸如在癌症细胞上表达。在一些方面中,该细胞、组织、疾病或病况是多发性骨髓瘤或多发性骨髓瘤细胞。在一些实施方案中,该多种抗原中的一种或多种通常也在不期望细胞疗法靶向的细胞诸如正常或非疾病细胞或组织和/或该工程化细胞本身上表达。在此类实施方案中,通过要求多种受体连接以实现该细胞的应答,而实现特异性和/或功效。

[0433] B. 用于基因工程的细胞和细胞的制备

[0434] 其中,表达受体和通过提供的方法施用的细胞是工程化细胞。基因工程通常涉及将编码重组的或工程化组成的核酸导入含有该细胞的组合物中,诸如通过逆转录病毒转导、转染或转化。

[0435] 在一些实施方案中,该核酸是异源的,即其正常不存在于获自该细胞的细胞或样品中,诸如获自另一生物体或细胞的细胞或样品,其例如,不在经工程化的细胞和/或产生此类细胞的生物体中发现。在一些实施方案中,该核酸不是天然存在的,诸如未在自然中发现的核酸,包括包含编码来自多种不同细胞类型的各种域的核酸的嵌合组合的核酸。

[0436] 该细胞通常是真核细胞,诸如哺乳动物细胞,和典型的是人细胞。在一些实施方案中,该细胞衍生自血液、骨髓、淋巴或淋巴样器官,是免疫系统的细胞,诸如固有或过继性免疫细胞,例如髓样或淋巴样细胞,包括淋巴细胞,典型的是T细胞和/或NK细胞。其它示例性细胞包括干细胞,诸如多能和多能性干细胞,其包括诱导多能性干细胞(iPSC)。该细胞典型是原代细胞,诸如直接从受试者分离和/或从受试者分离并冷冻的细胞。在一些实施方案中,该细胞包括T细胞的一种或多种亚群或其它细胞类型,诸如全T细胞群、CD4⁺细胞、CD8⁺细胞和其亚群,诸如通过功能、激活状态、成熟、分化潜力、扩增、再循环、定位和/或持久能力、抗原特异性、抗原受体类型、特定器官或区室中的存在、标记或细胞因子分泌谱和/或分化程度定义的亚群或细胞类型。关于待治疗的受试者,该细胞可以是同种异体的和/或自体的。其中,该方法包括现成的方法。在一些方面中,诸如对于现成的技术,该细胞是多能性和/或多能的,诸如干细胞,诸如诱导多能性干(iPSC)。在一些实施方案中,该方法包括从该受试者分离细胞、制备、处理、培养和/或工程化它们,并在冷冻保存之前或之后,将它们再导入同一受试者中。

[0437] 其中,T细胞的和/或CD4⁺的和/或CD8⁺T细胞的亚型和亚群是幼稚T(T_N)细胞、效应T细胞(T_{EFF})、记忆T细胞和其亚型,诸如干细胞记忆T(T_{SCM})、中枢记忆T(T_{CM})、效应记忆T(T_{EM})或终末分化效应记忆T细胞、肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)、未成熟T细胞、成熟T细胞、辅助T细胞、细胞毒性T细胞、黏膜相关恒定T(MAIT)细胞、天然存在和适应性调节T(Treg)细胞、辅助T细胞,诸如TH1细胞、TH2细胞、TH3细胞、TH17细胞、TH9细胞、TH22细胞、滤泡辅助T细胞、 α/β T细胞和 δ/γ T细胞。

[0438] 在一些实施方案中,该细胞是自然杀伤(NK)细胞。在一些实施方案中,该细胞是单核细胞或粒细胞,例如髓样细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、树突细胞、肥大细胞、嗜酸性细胞和/或嗜碱性细胞。

[0439] 在一些实施方案中,该细胞包括一种或多种经由基因工程导入的核酸,且从而表达此类核酸的重组或基因工程化产物。在一些实施方案中,该核酸是异源的,即其正常不存在于获自该细胞的细胞或样品中,诸如获自另一生物体或细胞的细胞或样品,其例如,不在经工程化的细胞和/或衍生自此类细胞的器官中发现。在一些实施方案中,该核酸不是天然存在的,诸如未在自然中发现的核酸,包括包含编码来自多种不同细胞类型的各种域的核酸的嵌合组合的核酸。

[0440] 在一些实施方案中,制备该工程化细胞包括一种或多种培养和/或制备步骤。用于导入编码该转基因受体(诸如CAR)的核酸的细胞可从样品中分离,诸如生物样品,例如获自或衍生自受试者的样品。在一些实施方案中,该细胞从其中分离的受试者是具有该疾病或病况或需要细胞疗法或将其施用细胞疗法的受试者。在一些实施方案中,该受试者是需要特定治疗性干预的人,诸如过继性细胞疗法,其中细胞经分离、加工和/或工程化。

[0441] 因此,在一些实施方案中,该细胞是原代细胞,例如原代人细胞。该样品包括组织、流体和直接取自该受试者的其它样品,以及由一个或多个处理步骤产生的样品,例如分离、离心、基因工程(例如用病毒载体转导)、洗涤和/或孵育。该生物样品可以是直接获自生物来源的样品或经处理的样品。生物样品包括但不限于,体液(诸如血液、血浆、血清、脑脊液、滑液、尿液和汗液)、组织和器官样品,包括衍生于其的经处理的样品。

[0442] 在一些方面中,该细胞从其中衍生或分离的样品是血液或血液衍生的样品,或是

或衍生自血浆分离置换法或白细胞分离法产物。示例性样品包括全血、外周血单核细胞(PBMC)、粒细胞、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、肝、肺、胃、肠、结肠、肾、胰腺、乳腺、骨、前列腺、子宫颈、睾丸、卵巢、扁桃体或其他器官,和/或由其衍生的细胞。在细胞疗法(例如过继性细胞疗法)的情况下,样品包括来自自体的或同种异体来源的样品。

[0443] 在一些实施方案中的细胞衍生自细胞系,例如T细胞系。在一些实施方案的细胞获自异种来源,例如获自小鼠、大鼠、非人灵长动物和猪。

[0444] 在一些实施方案中,该细胞的分离包括一个或多个制备和/或基于非亲和力的细胞分离步骤。在一些实例中,细胞经洗涤、离心和/或在一种或多种试剂的存在下孵育,例如,以去除不需要的组成,富集期望的组成,裂解或去除对特定试剂敏感的细胞。在一些实例中,基于一种或多种特性分离细胞,诸如密度、粘附特性、大小、对特定组成的敏感度和/或抗性。

[0445] 在一些实例中,来自受试者的循环血液的细胞例如通过血浆分离置换法或白细胞分离法获得。在一些方面中,该样品含有淋巴细胞,其包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其它有核白细胞,红细胞和/或血小板,且在一些方面中,含有除红细胞和血小板外的细胞。

[0446] 在一些实施方案中,从该受试者收集的血细胞经洗涤,例如以去除血浆级分并将该细胞至于合适的缓冲液或培养基,用于随后的处理步骤。在一些实施方案中,该细胞用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤。在一些实施方案中,洗涤溶液缺少钙和/或镁和/或许多或全部二价阳离子。在一些方面中,洗涤步骤根据制造商的说明书通过半自动“流通”离心机(例如,Cobe 2991细胞处理器,Baxter)完成。在一些方面中,洗涤步骤根据制造商的说明书通过正切流动过滤(TFF)完成。在一些实施方案中,该细胞在洗涤后重悬在各种生物相容的缓冲液中,诸如,例如无 Ca^{++} / Mg^{++} 的PBS。在某些实施方案中,去除血液细胞样品的组成,且细胞直接重悬在培养基中。

[0447] 在一些实施方案中,该方法包括基于密度的细胞分离方法,诸如通过裂解红细胞并通过Percoll或Ficoll梯度离心从外周血制备白细胞。

[0448] 在一些实施方案中,该分离方法包括基于一种或多种具体分子(诸如表面标记物,例如表面蛋白、细胞内标记物或核酸)在细胞中的表达或存在分离不同的细胞类型。在一些实施方案中,用于基于此类标记物的分离的任何已知的方法可以使用。在一些实施方案中,该分离是基于亲和力或免疫亲和力的分离。例如,在一些方面中的分离包括基于细胞的表达或表达一种或多种标记物(典型的是细胞表面标记物)的水平分离细胞和细胞群,例如,通过与抗体或特异性结合此类标记物的结合配偶体孵育,随后通常通过洗涤步骤并从尚未结合该抗体或结合配偶体的那些细胞中分离已经结合该抗体或结合配偶体的细胞。

[0449] 此类分离步骤可以基于阳性选择(其中保留已经结合试剂的细胞供进一步使用)和/或阴性选择(其中保留尚未结合该抗体或结合配偶体的细胞)。在一些实例中,保留两种级分供进一步使用。在一些方面中,在没有可用于特异性鉴定异质群中的细胞类型的抗体的情况下,阴性选择可以是特别有用的,使得分离最好基于由期望的群以外的细胞表达的标记物进行。

[0450] 该分离不需要导致100%富集或去除特定细胞群或表达特定标记物的细胞。例如,特定类型的细胞(诸如表达标记物的细胞)的阳性选择或富集是指增加此类细胞的数目或

百分比,但不必导致不表达该标记物的细胞的完全缺少。同样地,特定类型的细胞(诸如表达标记物的细胞)的阴性选择、去除或耗竭是指降低此类细胞的数目或百分比,但不必导致所有此类细胞的完全去除。

[0451] 在一些实例中,当来自一个步骤的阳性或阴性选择的级分进行另一分离步骤时,进行多轮分离步骤,诸如随后的阳性或阴性选择。在一些实例中,单个分离步骤可同时地耗竭表达多个标记物的细胞,诸如通过使细胞与多个抗体或结合配偶体孵育,每种抗体或结合配偶体对于阴性选择靶向的标记物是特异性的。同样地,多个细胞类型可通过使细胞与多个抗体或在各种细胞类型上的表达的结合配偶体孵育同时地经阳性选择。

[0452] 例如,在一些方面中,T细胞的特定亚群,诸如阳性的或表达高水平的一种或多种表面标记物的细胞(例如CD28⁺、CD62L⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺和/或CD45RO⁺T细胞),通过阳性或阴性选择技术分离。

[0453] 例如,CD3⁺、CD28⁺T细胞可使用抗CD3/抗CD28缀合的磁珠(例如DYNABEADS® M-450 CD3/CD28T Cell Expander)进行阳性选择。

[0454] 在一些实施方案中,分离通过由阳性选择富集特定细胞群或由阴性选择耗竭特定细胞群来进行。在一些实施方案中,阳性或阴性选择通过使细胞与一种或多种抗体或其它结合剂孵育来完成,该结合剂特异性结合在经阳性或阴性选择的细胞上表达或分别以相对较高的水平(高标记物)表达(标记物⁺)的一种或多种表面标记物。

[0455] 在一些实施方案中,通过阴性选择非T细胞(诸如B细胞、单核细胞或其它白细胞)上表达的标记物(诸如CD14),将T细胞与PBMC样品分离。在一些方面中,CD4⁺或CD8⁺选择步骤用于分离CD4⁺辅助和CD8⁺细胞毒性T细胞。此类CD4⁺和CD8⁺群可通过针对标记物的阳性或阴性选择进一步分选为亚群,该标记物在一种或多种幼稚、记忆和/或效应T细胞亚群上表达或以相对较高程度表达。

[0456] 在一些实施方案中,CD8⁺细胞进一步富集或耗竭幼稚、中枢记忆、效应记忆和/或中枢记忆干细胞,诸如通过基于与相应亚群相关联的表面抗原的阳性或阴性选择。在一些实施方案中,进行富集中枢记忆T(T_{CM})细胞以增加功效,诸如以提高施用后的长期存活、扩增和/或移植,在一些方面中,其在此类亚群中特别强劲。参见Terakura等人,Blood.1:72-82(2012);Wang et al.,J Immunother.35(9):689-701(2012)。在一些实施方案中,使富集TCM的CD8⁺T细胞和CD4⁺T细胞组合进一步增强功效。

[0457] 在实施方案中,记忆T细胞在CD8⁺外周血液淋巴细胞的CD62L⁺和CD62L⁻两种亚群中存在。PBMC可富集或耗竭CD62L⁻CD8⁺和/或CD62L⁺CD8⁺级分,诸如使用抗CD8和抗CD62L抗体。

[0458] 在一些实施方案中,中枢记忆T(T_{CM})细胞的富集基于CD45RO、CD62L、CCR7、CD28、CD3和/或CD 127的阳性或高表面表达;在一些方面中,其基于表达或高表达CD45RA和/或颗粒酶B细胞的阴性选择。在一些方面中,富集TCM细胞的CD8⁺群的分离通过耗竭表达CD4、CD14、CD45RA的细胞和阳性选择或富集表达CD62L细胞进行。在一个方面中,中枢记忆T(T_{CM})细胞的富集从基于CD4表达选择的阴性级分的细胞(其基于CD14和CD45RA的表达进行阴性选择)和基于CD62L的阳性选择开始进行。在一些方面中,此类选择同时进行,且在其它方面中,以任一顺序依次进行。在一些方面中,用于制备CD8⁺细胞群或亚群的相同的基于CD4表达的选择步骤也用于生成CD4⁺细胞群或亚群,使得来自基于CD4的分离的阳性和阴性级分经保留且用于该方法的随后步骤,任选地在一个或多个进一步阳性或阴性选择步骤

后。

[0459] 在特定的实例中, PBMC的样品或其它白细胞样品进行CD4⁺细胞的选择, 其中保留阴性和阳性两种级分。然后, 阴性级分进行基于CD14和CD45RA或CD19的表达的阴性选择, 和基于中枢记忆T细胞的标记物特性 (诸如CD62L或CCR7) 的阳性选择, 其中阳性和阴性选择以任一顺序进行。

[0460] 通过鉴定具有细胞表面抗原的细胞群, 将CD4⁺T辅助细胞分选为幼稚、中枢记忆和效应细胞。CD4⁺淋巴细胞可通过标准方法获得。在一些实施方案中, 幼稚CD4⁺T淋巴细胞是CD45RO⁻、CD45RA⁺、CD62L⁺、CD4⁺T细胞。在一些实施方案中, 中枢记忆CD4⁺细胞是CD62L⁺和CD45RO⁺。在一些实施方案中, 效应CD4⁺细胞是CD62L⁻和CD45RO⁻。

[0461] 在一个实例中, 为了通过阴性选择富集CD4⁺细胞, 单克隆抗体混合物典型地包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。在一些实施方案中, 该抗体或结合配偶体与固体支持物或基质结合, 诸如磁珠或顺磁珠, 以允许阳性和/或阴性选择的细胞分离。例如, 在一些实施方案中, 该细胞和细胞群使用免疫磁性 (或亲和力磁性) 分离技术 (评述于 *Methods in Molecular Medicine*, vol.58:Metastasis Research Protocols, Vol.2:Cell Behavior In vitro and In vivo, p 17-25 Edited by:S.A.Brooks and U.Schumacher © Humana Press Inc., Totowa, NJ) 分离。

[0462] 在一些方面中, 待分离的细胞的样品或组合物与小的、可磁化的或磁响应性材料孵育, 诸如磁响应性粒子或微粒, 诸如顺磁珠 (例如诸如Dynalbeads或MACS珠)。该磁响应性材料 (例如粒子) 通常直接地或间接地附着至结合配偶体 (例如抗体), 该结合配偶体特异性结合在期望经分离 (例如期望经阴性或阳性选择) 的细胞、细胞群上存在的分子 (例如表面标记物) 的。

[0463] 在一些实施方案中, 该磁粒子或珠包含与特异性结合成员 (诸如抗体或其它结合配偶体) 结合的磁响应性材料。存在许多熟知的用于磁分离方法中的磁响应性材料。适合的磁粒子包括Molday, 美国专利号4,452,773, 和欧洲专利说明书EP 452342 B中描述的磁粒子, 其通过提述并入本文。其他实例是胶体大小的粒子, 诸如Owen美国专利号4,795,698和Liberti等人, 美国专利号5,200,084中所述的胶体大小的粒子。

[0464] 孵育通常在抗体或结合配偶体或分子 (诸如二抗或其他试剂, 其特异性结合此类抗体或结合配偶体) 特异性结合细胞表面分子 (如果其在样品中的细胞上存在的话) 的条件下进行, 所述抗体或结合配偶体附着至磁粒子或珠。

[0465] 在一些方面中, 该样品置于磁场中, 且具有附着于其上的磁响应性或可磁化粒子的这些细胞将会吸引至磁体并与未标记的细胞分离。对于阳性选择, 保留吸引至磁体上的细胞; 对于阴性选择, 保留未受吸引的细胞 (未标记的细胞)。在一些方面中, 阳性和阴性选择的组合在同一选择步骤期间进行, 其中阳性和阴性级分经保留, 并进一步经处理或进行进一步分离步骤。

[0466] 在某些实施方案中, 该磁响应性粒子包被在一抗或其他结合配偶体、二抗体、凝集素、酶或抗生蛋白链菌素中。在某些实施方案中, 该磁粒子经由包被对一种或多种标记物特异的一抗附着至细胞。在某些实施方案中, 该细胞 (而不是珠) 用一抗或结合配偶体标记, 且然后, 添加细胞类型特异性的二抗或其它结合配偶体 (例如抗生蛋白链菌素) 包被的磁粒子。在某些实施方案中, 抗生蛋白链菌素包被的磁粒子用于与生物素化的一抗或二抗缀合。

[0467] 在一些实施方案中,将该磁响应性粒子附着至随后待孵育的细胞,培养和/或工程化;在一些方面中,将该粒子附着至用于施用至患者的细胞。在一些实施方案中,该可磁化或磁响应性粒子从该细胞中去除。用于从细胞中去除可磁化粒子的方法是已知的且包括(例如)竞争非标记的抗体的用途,和与可切割的接头缀合的可磁化粒子或抗体。在一些实施方案中,该可磁化粒子是可生物降解的。

[0468] 在一些实施方案中,该基于亲和力的选择是经由磁激活的细胞分选术(MACS)(Miltenyi Biotec, Auburn, CA)的。磁激活的细胞分选术(MACS)系统能够高纯度选择具有附着于其的磁化粒子的细胞。在某些实施方案中,MACS以下列模式操作,其中在应用外部磁场后,非靶和靶种类依次地经洗脱。即,附着至磁化粒子的细胞保持在原位,然而未附着的种类经洗脱。然后,在此第一次洗脱步骤完成后,捕获在磁场中并阻止经洗脱的种类以一些方式释放,使得它们可以洗脱和回收。在某些实施方案中,该非靶细胞是标记的且从异质细胞群中耗竭。

[0469] 在某些实施方案中,分离(isolation)或分开(separation)使用执行本发明的一次或多次分离、细胞制备、分离、处理、孵育、培养和/或配制的系统、装置或设备进行。在一些方面中,该系统用于在封闭或无菌环境中执行这些步骤中的每一个,例如,以最小化误差、用户操作和/或污染。在一个实例中,该系统是PCT公开号W02009/072003或US 20110003380 A1中所述的系统。

[0470] 在一些实施方案中,该系统或设备在集成或独立系统中和/或以自动化或可程序化方式执行分离、处理、工程化和/或配制步骤中的一个或多个(例如所有)。在一些方面中,该系统或设备包括与该系统或设备通信的计算机和/或计算机程序,其允许用户程序指令、控制处理、分离、工程化和/或配制步骤,评估处理、分离、工程化和/或配制步骤的效果,和/或调整处理、分离、工程化和/或配制步骤的各方面。

[0471] 在一些方面中,该分离和/或其它步骤使用,例如,用于在临床规模水平上自动化分离细胞的CliniMACS系统(Miltenyi Biotec)在封闭和无菌系统进行。组成可包括集成的微计算机、磁分离单位、蠕动泵和各种夹管阀。在一些方面中,该集成的计算机控制仪器的所有组成并指导该系统以标准次序进行重复的程序。在一些方面中,该磁分离单位包括可移动的永磁体和用于选择柱的支架。该蠕动泵控制整个管道组的流速,并与夹管阀一起,确保缓冲液通过该系统的受控流动和细胞的连续悬浮。

[0472] 在一些方面中,该CliniMACS系统使用抗体偶联的可磁化粒子,其在无菌、无热原的溶液中提供。在一些实施方案中,在用磁粒子标记细胞后,该细胞经洗涤以去除过量的粒子。然后,细胞制备袋与管道组连接,该管道组反过来与含有缓冲液的袋和细胞收集袋连接。该管道组由预装配的无菌管道组成,该无菌管道包括前置柱和分离柱,且一次性使用。在开始分离程序后,该系统自动地将细胞样品应用到分离柱上。标记的细胞保留在柱内,而未标记的细胞通过一系列洗涤步骤去除。在一些实施方案中,用于本文所述方法的细胞群是未标记的并且不保留在柱中。在一些实施方案中,用于本文所述方法的细胞群是标记的并且保留在柱中。在一些实施方案中,在去除磁场后,用于本文所述方法的细胞群从柱中洗脱,并收集在细胞收集袋中。

[0473] 在某些实施方案中,分离和/或其它步骤使用CliniMACS Prodigy系统(Miltenyi Biotec)进行。在一些方面中,该CliniMACS Prodigy系统配置由细胞处理单元,该单元允许

通过离心自动洗涤和分级分离细胞。该CliniMACS Prodigy系统还可包括机载相机和图像识别软件,其通过辨别源细胞产物的宏观层来确定最佳细胞分级终点。例如,外周血液自动分离成红血球、白细胞和血浆层。该CliniMACS Prodigy系统还可包括集成的细胞培养室,其实现细胞培养方案,诸如,例如细胞分化和扩增、抗原装载和长期细胞培养。输入口可以允许无菌去除和培养基的补充,且可使用集成显微镜监测细胞。参见,例如Klebanoff等人, *J Immunother.* 35 (9) :651-660 (2012), Terakura et al., *Blood*. 1:72-82 (2012), and Wang et al., *J Immunother.* 35 (9) :689-701 (2012)。

[0474] 在一些实施方案中,本文所述的细胞群经由流式细胞术收集和富集(或耗竭),其中多个细胞表面标记物染色的细胞在流体流中携带。在一些实施方案中,本文所述的细胞群经由制备规模的(FACS)分选术收集和富集(或耗竭)。在某些实施方案中,本文所述的细胞群通过利用微机电系统(MEMS)芯片结合基于FACS的检测系统来收集和富集(或耗竭)(参见,例如WO 2010/033140, Cho等人, *Lab Chip* 10, 1567-1573 (2010); 和Godin等人, *J Biophoton.* 1 (5) :355-376 (2008)。在两种情况中,细胞可以用多种标记物标记,该标记物允许以高纯度分离明确定义的T细胞亚群。

[0475] 在一些实施方案中,该抗体或结合配偶体是用一种或多种可检测的标记物标记的,以促进阳性和/或阴性选择的分离。例如,分离可基于与荧光标记的抗体的结合。在一些实例中,基于对一种或多种细胞表面标记物特异的抗体或其他结合配偶体的结合的细胞分离在流体流中进行,诸如通过荧光激活的细胞分选术(FACS),包括制备规模的(FACS)和/或微机电系统(MEMS)芯片,例如结合流式细胞检测系统。此类方法允许同时基于多个标记物进行阳性和阴性选择。

[0476] 在一些实施方案中,制备方法包括在分离、孵育和/或工程化之前或之后冷冻(例如冷冻保存)细胞的步骤冷冻步骤。在一些实施方案中,该冷冻和随后的解冻步骤去除了粒细胞,且在一定程度上去除细胞群中的单核细胞。在一些实施方案中,该细胞悬浮在冷冻溶液中,例如在洗涤步骤后去除血浆和血小板。在一些方面中,可使用各种已知冷冻溶液和参数中的任何一种。一个实例涉及使用含有20%DMSO和8%人血清白蛋白(HSA)的PBS,或其他合适的细胞冷冻培养基。然后用培养基1:1稀释,使得DMSO和HSA的最终浓度分别为10%和4%。然后通常将细胞以每分钟1°的速率冷冻至-80℃并储存在液氮储罐的气相中。

[0477] 在一些实施方案中,在基因工程之前,或与基因工程细胞有关时,孵育和/或培养细胞。该孵育步骤可包括培养(culture)、培养(cultivation)、刺激、激活和/或繁殖。该孵育和/或工程化可在培养皿中进行,诸如单位、室、孔、柱、管、管道组、阀、药水瓶、培养碟、袋或用于培养细胞的其他容器。在一些实施方案中,该组合物或细胞在刺激条件或刺激性药剂的存在下孵育。此类条件包括经设计用于诱导群中细胞的增殖、扩增、激活和/或存活,模拟抗原暴露和/或引发细胞用于基因工程(诸如用于导入重组抗原受体)的那些条件。

[0478] 该条件可包括特定培养基、温度、氧含量、二氧化碳含量、时间、药剂(例如营养素、氨基酸、抗生素、离子和/或刺激性因子诸如细胞因子、趋化因子、抗原、结合配偶体、融合蛋白、重组可溶受体和任何其它经设计以激活细胞的药剂)中的一种或多种。

[0479] 在一些实施方案中,该刺激条件或药剂包括一种或多种药剂,例如配体,其能够激活TCR复合物的细胞内信号传导域。在一些方面中,该药剂开启或开始T细胞中的TCR/CD3细胞内信号传导级联。此类药剂可包括抗体,诸如对TCR组成和/或共刺激受体特异的抗体,例

如抗CD3。在一些实施方案中,该刺激条件包括一种或多种药剂,例如配体,其能够刺激共刺激受体,例如,抗CD28。在一些实施方案中,此类药剂和/或配体可结合固体支持物,诸如珠,和/或一种或多种细胞因子。任选地,该扩增方法可进一步包含添加抗CD3和/或抗CD28抗体至培养基的步骤(例如以至少约0.5ng/ml的浓度)。在一些实施方案中,该刺激剂包括IL-2、IL-15和/或IL-7。在一些方面中,IL-2浓度为至少约10个单位/mL。

[0480] 在一些方面中,依照下列中所述的技术进行孵育:诸如Riddell等人的美国专利号6,040,177、Klebanoff等人,J Immunother.35(9):651-660(2012)、Terakura等人,Blood.1:72-82(2012)和/或Wang等人,J Immunother.35(9):689-701(2012)。

[0481] 在一些实施方案中,T细胞通过添加培养开始组合物饲养细胞(诸如非分裂的外周血单核细胞(PBMC))(例如,使得所得细胞群含有至少约5、10、20、或40或更多个PBMC饲养细胞,用于初始种群中每个T淋巴细胞的扩增);且孵育培养物(例如达足以扩增一定数目的T细胞的时间)来扩增。在一些方面中,该非分裂的饲养细胞可包含 γ 辐射的PBMC饲养细胞。在一些实施方案中,该PBMC用 γ 射线以约3000至3600拉德的范围辐射以预防细胞分裂。在一些方面中,在添加T细胞群之前,将该饲养细胞添加至培养基。

[0482] 在一些实施方案中,该刺激条件包括适于人T淋巴细胞的生长的温度,例如,至少约25摄氏度,通常至少约30度,且一般在或约37摄氏度。任选地,该孵育可进一步包括添加非分裂的EBV转化的成淋巴细胞样细胞(LCL)作为饲养细胞。LCL可用 γ 射线以约6000至10,000拉德的范围辐射。在一些方面中,该LCL饲养细胞以任何合适的量提供,诸如LCL饲养细胞与初始T淋巴细胞的比例为至少约10:1。

[0483] 在实施方案中,抗原特异性T细胞(诸如抗原特异性CD4⁺和/或CD8⁺T细胞)通过用抗原刺激幼稚或抗原特异性T淋巴细胞获得。例如,针对巨细胞病毒抗原的抗原特异性T细胞系或克隆通过从感染的受试者中分离T细胞并用相同的抗原体外刺激细胞生成。

[0484] C.用于基因工程的载体和方法

[0485] 在细胞中导入编码重组受体的核酸分子可使用许多已知载体中的任一种进行。此类载体包括病毒和非病毒系统,包括慢病毒和 γ 逆转录病毒系统,以及基于转座子的系统诸如基于PiggyBac或睡美人的基因转移系统。示例性方法包括转移编码受体的核酸的方法,包括经由病毒,例如逆转录病毒或慢病毒、转导、转座子和电转。

[0486] 在一些实施方案中,基因转移通过首先刺激细胞来完成,例如通过将该细胞与诱导应答(诸如增殖、存活和/或激活)的刺激物组合(例如通过细胞因子或激活标记物的表达测量的),随后转导经激活的细胞,和扩增培养物至足以用于临床应用的数目。

[0487] 在一些实施方案中,在基因转移之前或期间,该细胞在TEC家族激酶的抑制剂(诸如Btk抑制剂,包括本文所述的任何抑制剂)的存在下孵育或培养。在一些实施方案中,该TEC家族激酶抑制剂在细胞制造过程期间添加,例如,在工程化CAR-T细胞的过程期间。在一些方面中,该抑制剂的存在可提高产生的细胞群的质量。在一些方面中,TEC家族激酶的抑制剂(例如Btk抑制剂)可增加细胞的增殖或扩增,或可该改变一种或多种信号传导途径,从而导致细胞具有较少分化的或较少激活的表面表型,尽管表现出显著扩增和/或效应子功能。

[0488] 在一些情况中,过表达刺激性因子(例如淋巴因子或细胞因子)可能对受试者有毒。因此,在一些情况中,工程化细胞包括导致细胞易于在体内进行阴性选择(例如在过继

性免疫疗法中施用)的基因片段。例如在一些方面中,该细胞经工程化使得它们经排除,导致经施用的患者的体内情况的改变。阴性可选择的表型可由插入赋予对施用药剂(例如化合物)敏感性的基因形成。阴性可选择的基因包括I型单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-I TK)基因(Wigler等人,细胞2:223,1977),其赋予更昔洛韦(ganciclovir)敏感性;细胞次黄嘌呤磷酸核糖转移酶(HPRT)基因、细胞腺嘌呤磷酸核糖转移酶基因(APRT)基因、细菌胞嘧啶脱氨酶(Mullen等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.89:33(1992))。

[0489] 在一些实施方案中,使用重组感染病毒颗粒将重组核酸转移至细胞,诸如,例如,衍生自猿猴病毒40(SV40)、腺病毒、腺相关病毒(AAV)的载体。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将重组核酸转移至T细胞,诸如 γ -逆转录病毒载体(参见,例如Koste等人(2014)Gene Therapy 2014Apr 3.doi:10.1038/gt.2014.25;Carlens等人(2000)ExpHematol 28(10):1137-46;Alonso-Camino等人(2013)Mol Ther Nucl Acids 2,e93;Park等人,Trends Biotechnol.2011November 29(11):550-557。

[0490] 在一些实施方案中,该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毒(MoMLV)、骨髓增生性肉瘤病毒(MPSV)、鼠胚胎干细胞病毒(MESV)、鼠干细胞病毒(MSCV)、脾脏病灶形成病毒(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,该逆转录病毒包括衍生自任何鸟类或哺乳动物细胞来源的逆转录病毒。该逆转录病毒通常是双嗜性的,这意味着它们能够感染几种物种(包括人)的宿主细胞。在一个实施方案中,待表达的基因取代逆转录病毒gag、pol和/或env序列。已经描述了许多说明性逆转录病毒系统(例如美国专利号5,219,740;6,07,453;5,219,740;Miller和Rosman(1989)BioTechniques 7:980-990;Miller,A.D.(1990)Human Gene Therapy 1:5-14;Scarpa等人(1991)Virology 180:849-852;Burns等人(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:8033-8037;和Boris-Lawrie和Temin(1993)Cur.Opin.Genet.Develop.3:102-109。

[0491] 慢病毒转导的方法是已知的。示例性方法描述于,例如,Wan等人(2012)J.Immunother.35(9):689-701;Coope等人(2003)Blood.101:1637-1644;Verhoeyen等人(2009)Methods Mol Biol.506:97-114;和Cavalieri等人(2003)Blood.102(2):497-505。

[0492] 在一些实施方案中,重组核酸经由电转转移至T细胞中(参见,例如,Chicaybam等人,(2013)PLoS ONE8(3):e60298和Van Tedeloo等人(2000)Gene Therapy 7(16):1431-1437)。在一些实施方案中,重组核酸经由转座转移至T细胞(参见,例如Manuri等人(2010)Hum Gene Ther 21(4):427-437;Sharma等人(2013)Molec Ther Nucl Acids 2,e74;和Huang等人(2009)Methods Mol Biol 506:115-126)。在免疫细胞中导入并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.中描述的)、原生质体融合、阳离子脂质体介导的转染;钨粒子促进微粒子轰击(Johnston,Nature,346:776-777(1990));和磷酸锆DNA共沉淀(Brash et al.,Mol.Cell Biol.,7:2031-2034(1987))。

[0493] 用于转移编码重组产物的核酸的其他方法和载体是,例如,国际专利申请,公开号W02014055668和美国专利号7,446,190中所述的方法。

[0494] 在一些实施方案中,该细胞(例如T细胞)可在扩增期间或之后转染有T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)。例如,这种用于导入期望的受体的基因的转染可用任何合适

的逆转录病毒载体进行。该基因修饰的细胞群可从初始刺激物(例如CD3/CD28刺激物)中释放且随后用第二种类型的刺激物(例如经由从头导入的受体)刺激。此第二种类型的刺激物可包括肽/MHC分子形式的抗原刺激物,基因导入的受体的同源(交联)配体(例如CAR的天然配体)或在新受体的框架内直接结合(例如通过识别受体内的恒定区)的任何配体(诸如抗体)。参见,例如Cheadle等人,“Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy”*Methods Mol Biol.* 2012;907:645-66或Barrett等人,Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer *Annual Review of Medicine* Vol.65:333-347 (2014)。

[0495] 在一些情况中,可以使用不需要激活细胞(例如T细胞)的载体。在一些此类情况中,该细胞在激活之前可经选择和/或转导。因此,该细胞在培养该细胞之前或随后工程化,且在一些情况中可以在与至少部分培养的同时或期间进行。

[0496] 在一些方面中,该细胞进一步经工程化以促进细胞因子或其它因子的表达。其中,额外的核酸(例如用于导入的基因)是用以提高疗法功效的核酸,诸如通过促进转移的细胞的生存能力和/或功能;提供用于选择和/或评价细胞的遗传标记物的基因,诸如用以评估体内存活或定位;用以提高安全性的基因,例如,通过使细胞易于在体内进行阴性选择,如由Lupton S.D.等人,*Mol. and Cell Biol.*, 11:6 (1991);和Riddell等人,*Human Gene Therapy* 3:319-338 (1992)所述的;还参见由Lupton等人的PCT/US91/08442和PCT/US94/05601的公开,其描述了衍生自使将显性阳性选择标记与阴性可选择标记融合的双功能性可选择的融合基因的用途。参见,例如Riddell等人,美国专利号6,040,177,第14-17栏。

[0497] IV. 示例性治疗效果和用于此效果的方法

[0498] 在本文提供的方法、组合物、组合、试剂盒和用途的一些实施方案中,提供的组合疗法导致一种或多种治疗效果,诸如与任何一种或多种与该疗法或治疗相关的参数相关的特征,如以下所述的。在一些实施方案中,该组合疗法可进一步包括一种或多种筛选步骤以鉴定用于用组合疗法的治疗和/或继续该组合疗法的受试者,和/或用于评估治疗效果和/或监测治疗效果的步骤。在一些实施方案中,该用于评估治疗效果的步骤可包括步骤用以评估和/或用以监测治疗和/或用以鉴定受试者用于施用该疗法的进一步或剩余步骤和/或重复疗法。在一些实施方案中,该筛选步骤和/或评估治疗效果可用于确定本文提供的组合疗法的剂量、频率、持续时间、时机和/或顺序。

[0499] 在一些实施方案中,本文所述的任何筛选步骤和/或治疗效果的评估可在提供的组合疗法的一个或多个步骤施用之前、期间、过程期间或随后使用,例如施用免疫疗法(诸如T细胞疗法(例如表达CAR的T细胞)或啮合T细胞的疗法)和/或TEC家族激酶的抑制剂。在一些实施方案中,评估在执行任何提供的方法或用途之前、期间、过程期间或之后进行。在一些实施方案中,该评估执行该方法或施用或使用该制品或组合物之前进行。在一些实施方案中,评估在执行该方法的一个或多个步骤之后进行。在一些实施方案中,该评估在施用施用提供的组合疗法的一个或多个步骤之前执行,例如,以筛选和鉴定适于和/或易于接受该组合疗法的患者。在一些实施方案中,该评估在施用提供的组合疗法的一个或多个步骤期间、过程期间或随后执行,例如,以评估中间或最终治疗效果,例如以确定治疗功效和/或以确定是否继续或重复该治疗和/或以确定是否施用该组合疗法的剩余步骤。

[0500] 在一些实施方案中,治疗效果包括提高的免疫功能,例如用于基于细胞的疗法施用的T细胞的免疫功能和/或体内中的内源性T细胞的免疫功能。在一些实施方案中,示例性

治疗效果包括但不限于,增强的细胞增殖、增强的T细胞功能性活性、免疫细胞表型标记物表达(诸如与施用至受试者的工程化T细胞(例如CAR-T细胞)相关的此类特征)的变化。在一些实施方案中,示例性治疗效果包括减少的疾病负荷(例如肿瘤负荷)、改善的临床效果和/或增强的疗法功效。

[0501] 在一些实施方案中,该筛选步骤和/或治疗效果的评估包括评估用于基于细胞的疗法施用的T细胞的存活和/或功能。在一些实施方案中,该筛选步骤和/或治疗效果的评估包括评估细胞因子或生长因子的水平。在一些实施方案中,该筛选步骤和/或治疗效果的评估包括评估疾病负荷和/或改善,例如评估肿瘤负荷和/或临床效果。在一些实施方案中,该筛选步骤和/或治疗效果的评估中的任一个可包括本文所述的和/或本领域已知的评估方法和/或测定法中的任一个,且可例如在施用该组合疗法的一个或多个步骤之前、期间、过程期间或随后执行一次或多次。可在所提供的方法、组合物和制品的一些实施方案中评估的示例性的与治疗效果相关联的参数组包括外周血液免疫细胞群谱和/或肿瘤负荷。

[0502] 在一些实施方案中,该方法或用途或组合物或制品影响受试者中细胞疗法的功效。在一些实施方案中,相较于在不施用该抑制剂的情况下的方法中取得的细胞的持久性、扩增和/或存在,在施用该方法中的剂量的细胞与抑制剂后的受试者中的表达重组受体(例如表达CAR)的细胞的持久性、扩增和/或存在更强。在该免疫疗法方法或方式或疗法(诸如T细胞疗法(例如表达CAR的T细胞)或啮合T细胞的疗法)的一些实施方案,参数的评估包括相较于在不存在TEC家族激酶的抑制剂的情况下施用该免疫疗法至受试者的方法,评估用于免疫疗法施用的T细胞(例如T细胞疗法)的受试者中的扩增和/或持久性。在一些实施方案中,该方法导致相较于在不存在该抑制剂的情况下施用T细胞疗法至该受试者的方法,施用的T细胞表现出在该受试者中增加的或延长的扩增和/或持久性。

[0503] 在一些实施方案中,相较于在不存在该抑制剂的情况下施用一定剂量的表达重组受体的细胞至该受试者的方法,施用该TEC激酶的抑制剂减少受试者中疾病负荷,例如肿瘤负荷。在一些实施方案中,相较于在不存在该抑制剂的情况下施用一定剂量的表达重组受体的细胞至该受试者的方法,施用该TEC家族的激酶的抑制剂减少受试者中的母细胞骨髓(balast marrow)。在一些实施方案中,施用该TEC家族激酶的抑制剂导致与在不存在该抑制剂的情况下施用一定剂量的表达重组受体的细胞至该受试者的方法相比改善的临床效果,例如客观应答率(ORR)、无疾病进展生存期(PFS)和总生存期(OS)。

[0504] 在一些实施方案中,可在施用该组合疗法的一个或多个步骤之前筛选受试者。例如,可在施用该组合疗法之前,根据该疾病和/或疾病负荷(例如肿瘤负荷)的特性筛选受试者,以确定施用该组合疗法的适宜性、响应能力和/或敏感性。在一些实施方案中,该筛选步骤和/或治疗效果的评估可用于确定本文提供的组合疗法的剂量、频率、持续时间、时机和/或顺序。

[0505] 在一些实施方案中,在施用该组合疗法的一个步骤后筛选受试者,以确定和鉴定受试者以接受该组合疗法的剩余步骤和/或以监测该疗法的功效。在一些实施方案中,在施用该抑制剂之前和/或之后,评估施用的T细胞的数量、水平或量,和/或施用的T细胞的增殖和/或活性。

[0506] 在一些实施方案中,施用TEC家族激酶的抑制剂直至该受试者的血液中的工程化细胞的浓度或数目为(i)每微升至少或至少约10个工程化细胞,(ii)总数目的外周血液单

核细胞 (PBMC) 的至少20%、30%、40%或50%，(iii) 至少或至少约 1×10^5 个工程化细胞；或 (iv) 每微克DNA至少5,000个拷贝的编码重组受体的DNA；和/或在开始(a)中的施用后第90天，表达CAR的细胞在受试者的血液或血清中是可检测的；和/或在开始(a)中的施用后第90天，受试者的血液含有至少20%的表达CAR的细胞，每微升至少10个表达CAR的细胞或至少 1×10^4 个表达CAR的细胞。

[0507] 在一些实施方案中，施用TEC家族激酶的抑制剂直至对治疗有临床益处(诸如总肿瘤体积减少至少或大于50%)、其中可检测的肿瘤已经消失的完全应答(CR)、无进展生存期或无病疾病生存期超过6个月或超过1年或更长时间。

[0508] 在一些实施方案中，测定或评估到相较于不同评估时间点、不同情况、参考点和/或不同受试者中的同一参数或效果的水平、值或测量值，参数或效果的水平、值或测量值的变化和/或修改(例如增加、提高、减少或降低)。例如，在一些实施方案中，可以测定到相较于不同条件(例如在施用该TEC家族激酶的抑制剂之前或之后)中同一参数，可测定特定参数(例如样品中工程化T细胞的数目)的倍数变化(例如增加或减少)。在一些实施方案中，测定两种或多种参数的水平、值或测量值，且比较相对水平。在一些实施方案中，经测定的参数的水平、值或测量值与来自对照样品或未处理的样品的水平、值或测量值比较。在一些实施方案中，经测定的参数的水平、值或测量值与来自同一受试者但不同时间点的样品的水平比较。在单个参数的定量中获得的值可被组合用于疾病评估的目的，例如通过使用多参数分析对参数的水平、值或测量值形成算术或逻辑运算。在一些实施方案中，可计算两种或多种具体参数的比例。

[0509] A.T细胞暴露、持久性和增殖

[0510] 在一些实施方案中，与疗法或治疗效果相关的参数(其包括可被评估用于筛选步骤和/或治疗效果的评估和/或监测治疗效果的参数)是或包括T细胞(例如为了基于T细胞的疗法施用的T细胞)的暴露、持久性和增殖的评估。在一些实施方案中，提供的方法、组合物或制品中的细胞的增加的暴露或延长的扩增和/或持久性和/或细胞的细胞表型或功能性活性的变化，例如用于免疫疗法(例如T细胞疗法)施用的细胞，可通过评估体外或离体的T细胞的特性而测量。在一些实施方案中，在施用本文提供的组合疗法的一个或多个步骤之前或之后，此类测定法可用于测定或确认用于免疫疗法(例如T细胞疗法)的T细胞的功能。

[0511] 在一些实施方案中，TEC家族激酶的抑制剂的施用经设计以促进受试者暴露于该细胞(例如为了基于T细胞的疗法施用的T细胞)，诸如通过促进它们随时间的扩增和/或持久性。在一些实施方案中，该T细胞疗法在受试者中表现出与不存在该TEC家族激酶的抑制剂(例如依鲁替尼)的情况下施用T细胞疗法至受试者的方法相比增加的或延长的扩增和/或持久性。

[0512] 在一些实施方案中，该提供的方法增加该受试者对施用的细胞的暴露(例如随时间的细胞的增加的数目或持续时间)和/或提高免疫疗法(例如T细胞疗法)的功效和治疗效果。在一些方面中，相较于其它方法，该方法有利之处在于更大和/或更长程度的对表达重组受体的细胞(例如表达CAR的细胞)的暴露提高治疗效果。此类效果可包括患者存活和缓解，甚至在具有严重肿瘤负荷的个体中。

[0513] 在一些实施方案中，相较于在不存在该抑制剂的情况下仅施用该T细胞，施用该TEC家族激酶的抑制剂可增加受试者中对该细胞(例如为了基于T细胞的疗法施用的T细胞)

的暴露的最大值、总数和/或持续时间。在一些方面中,在疾病负荷(和因此更高的抗原量)和/或更多侵袭性或抗性癌症的背景中,施用TEC家族激酶的抑制剂(例如Btk抑制剂,诸如依鲁替尼)增强功效,相较于在相同背景中不存在该抑制剂的情况下仅施用该T细胞,其可导致免疫抑制、无效能和/或耗竭(其可阻止该细胞的扩增和/或持久性)。

[0514] 在一些实施方案中,检测在施用T细胞之后和在施用TEC家族激酶的抑制剂之前、期间和/或之后的受试者中的表达重组受体的细胞(例如为了基于T细胞的疗法施用的表达CAR的细胞)的持久性和/或数量。在一些情况中,测定施用的细胞(例如过继转移的细胞)的药物动力学以评估该施用细胞的利用度,例如生物利用度。用于测该过继转移的细胞的药物动力学的方法可包括从已经施用工程化细胞的受试者抽取外周血,以及确定外周血中工程化细胞的数目或比例。

[0515] 在一些方面中,定量PCR(qPCR)用于评估受试者中血液或血清或器官或组织样品(例如疾病位点,例如肿瘤样品)中表达重组受体的细胞(例如为了基于T细胞的疗法施用的表达CAR的细胞)的数量。在一些方面中,持久性被定量为每微克DNA的编码受体(例如CAR)的DNA或质粒的拷贝数,或定量为每微升样品(例如每微升血液或血清)或每微升样品的每总数的外周血单核细胞(PBMC)或白细胞或T细胞的表达受体(例如表达CAR)的细胞的数目。

[0516] 在一些方面中,可评估或监测样品中表达重组受体的细胞(例如表达CAR的细胞)的百分比或比例。用于选择和/或分离细胞的方法可包括使用嵌合抗原受体(CAR)特异性抗体(例如Brentjens等人,Sci.Transl.Med.2013Mar;5(177):177ra38)、蛋白L(Zheng等人,J.Transl.Med.2012Feb;10:29)、表位标签(诸如Strep-标签序列,其直接导入CAR中的特异性位点,其中用于Strep-标签的结合试剂用于直接评估CAR(Liu等人(2016)Nature Biotechnology,34:430;国际专利申请公开号W02015095895))和特异性结合CAR多肽的单克隆抗体(参见国际专利申请公开号W02014190273)。在一些情况中,非固有的标记基因可以与工程化细胞疗法结合使用以允许检测或选择细胞,且在一些情况中还可以促进细胞自杀。在一些情况中,截短的表皮生长因子受体(EGFRt)可与感兴趣的转基因(CAR或TCR)在转导的细胞中共表达(参见例如美国专利号8,802,374)。EGFRt可含有由抗体西妥昔单抗(Erbix®)或其它治疗性抗EGFR抗体或结合分子识别的表位,该结合分子可用于鉴定或选择已经工程化具有EGFRt构建体和另一重组受体(诸如嵌合抗原受体(CAR))的细胞,和/或用于消除或分离表达该受体的细胞。参见美国专利号8,802,374和Liu等人,Nature Biotech.2016April;34(4):430-434)。

[0517] 在一些实施方案中,在施用该T细胞(例如表达CAR的T细胞)后4、14、15、27或28天,或至少4、14、15、27或28天,在该受试者检测该细胞。在一些方面中,在施用该T细胞(例如表达CAR的T细胞)和/或该TEC家族激酶的抑制剂后2、4或6周或至少2、4或6周,或3、6或12、18、或24或30或36个月,或1、2、3、4、5或更多年,检测该细胞。

[0518] 在一些实施方案中,与通过替代方法例如涉及在不存在该抑制剂的情况下仅施用免疫疗法例如仅施用该T细胞(例如表达CAR的T细胞)的方法取得的持久性相比,在通过该方法施用T细胞(例如表达CAR的T细胞)和/或TEC家族激酶的抑制剂后受试者中表达受体的细胞(例如表达CAR的细胞)的持久性更好。

[0519] 指示扩增和/或持久性的暴露(例如细胞(例如为了T细胞疗法施用的T细胞)的数目)可根据下列规定:受试者暴露至其的细胞的最大数目、超过一定数量或百分比的可检测

细胞或细胞的持续时间、细胞数目相对于时间的曲线下面积和/或其组合和其指示物。此类效果可使用已知的方法评估,诸如qPCR以检测与特定样品(例如血液、血清、血浆或组织,诸如肿瘤样品)中核酸或DNA的总量相比编码重组受体的核酸的拷贝数目,和/或流式细胞测定法,其通常使用对该受体特异的抗体检测表达受体的细胞。基于细胞的测定法也可用于检测功能性细胞的数目或百分比,诸如能够结合和/或中和和/或诱导针对疾病或病况的细胞的应答(例如细胞毒性应答)或表达由该受体识别的抗原的细胞。

[0520] 在一些方面中,该受试者对该细胞的增加的暴露包括该细胞的增加的扩增。在一些实施方案中,与其它方法诸如涉及在不施用该抑制剂的情况下施用该T细胞(例如表达CAR的T细胞)的方法相比,在施用T细胞(例如表达CAR的T细胞)后和/或在施用TEC家族激酶的抑制剂后,表达受体的细胞(例如表达CAR的细胞)在受试者中扩增。在一些方面中,该方法导致更多的细胞扩增。

[0521] 在一些方面中,该方法导致施用的细胞的高体内增殖,例如,如通过流式细胞术测量的。在一些方面中,检测到细胞的高峰比例。例如,在一些实施方案中,在施用T细胞(例如表达CAR的T细胞)和/或TEC家族激酶的抑制剂后的峰值或最大水平处,在受试者的血液或疾病位点或其白细胞级分(例如PBMC级分或T细胞级分)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%或至少约90%的该细胞表达该重组受体,例如CAR。

[0522] 在一些实施方案中,该方法导致该受试者的血液或血清或其它体液或器官或组织中的最大浓度,该最大浓度为每微克DNA至少100、500、1000、1500、2000、5000、10,000或15,000个拷贝的编码该受体(例如CAR)的核酸,或每总数目的外周血单核细胞(PBMC)、总数目的单核细胞、总数目的T细胞或总微升数目至少0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8或0.9个表达受体(例如表达CAR)的细胞。在一些实施方案中,表达该受体的细胞检测为该受试者的血液中总PBMC的至少10%、20%、30%、40%、50%或60%,和/或在T细胞(例如表达CAR的T细胞)和/或TEC家族激酶的抑制剂后持续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、24、36、48或52周,或在此类施用后持续1、2、3、4或5或更多年处于这样的水平。

[0523] 在一些方面中,该方法导致(例如该受试者的血清、血浆、血液或组织,例如肿瘤样品中)每微克DNA的编码该重组受体(例如CAR)的核酸的拷贝数增加至少2倍、至少4倍、至少10倍或至少20倍。

[0524] 在一些实施方案中,在施用T细胞(例如表达CAR的T细胞),或在施用TEC家族激酶的抑制剂后至少20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59或60或更多天,表达该受体的细胞受试者的血清、血浆、血液或组织(例如肿瘤样品)是(例如通过规定的方法诸如基于qPCR或流式细胞术的检测方法)可检测的,在施用T细胞(例如表达CAR的T细胞)和/或TEC家族激酶的抑制剂后持续至少或至少约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24或更多周。

[0525] 在一些方面中,每微升至少约 1×10^2 、至少约 1×10^3 、至少约 1×10^4 、至少约 1×10^5 或至少约 1×10^6 或至少约 5×10^6 或至少约 1×10^7 或至少约 5×10^7 或至少约 1×10^8 个表达重组受体(例如表达CAR)的细胞,和/或至少10、25、50、100、200、300、400或500或1000个表达受体细胞,例如每微升至少10个,是可检测或存在于受试者或其流体、血浆、血清、组织或区

室,诸如其血液(例如外周血)或疾病位点(例如肿瘤)中。在一些实施方案中,在施用T细胞(例如表达CAR的T细胞),和/或在施用TEC家族激酶的抑制剂后持续至少约20天、至少约40天或至少约60天,或至少约3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月,或至少2或3年,这样的数目或浓度的细胞在该受试者中是可检测的。这样的细胞数目可通过基于流式细胞术或基于定量PCR的方法检测并使用已知方法外推至总细胞数。参见例如,Brentjens等人Sci Transl Med. 2013 5(177)、Park等人Molecular Therapy 15(4):825-833(2007)、Savoldo等人,JCI 121(5):1822-1826(2011)、Davila等人,(2013) PLoS ONE 8(4):e61338, Davila等人., Oncoimmunology 1(9):1577-1583(2012)、Lamers, Blood 2011 117:72-82, Jensen等人, Biol Blood Marrow Transplant 2010 September; 16(9):1245-1256, Brentjens等人, Blood 2011 118(18):4817-4828.。

[0526] 在一些方面中,在施用细胞(例如表达CAR的T细胞)和/或TEC家族激酶的抑制剂后约1周、约2周、约3周、约4周、约5周、或至少约6周、或至少约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月或至少2或3年,如通过免疫组织化学、PCR和/或流式细胞术测量的(例如外周血或骨髓或其它区室中)每100个细胞的编码重组受体的核酸的拷贝数目(例如载体拷贝数目)为至少0.01个、至少0.1个、至少1个或至少10个。在一些实施方案中,在施用T细胞(例如表达CAR的细胞)和/或TEC家族激酶的抑制剂后约1周、约2周、约3周或至少约4周时,或在这样的施用后至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月或至少2或3年时,每微克基因组DNA的表达受体(例如CAR)的载体的拷贝数目为至少100、至少1000、至少5000或至少10,000或至少15,000或至少20,000。

[0527] 在一些方面中,在施用该细胞(例如在开始施用该T细胞(例如表达CAR的T细胞)后)和/或TEC家族激酶的抑制剂后至少约3个月、至少约6个月、至少约12个月、至少约1年、至少约2年、至少约3年、或多于3年时,由该细胞表达的受体(例如CAR)可通过定量PCR(qPCR)或通过流式细胞术在受试者、其血浆、血清、血液、组织和/或疾病位点(例如肿瘤位点)检测。

[0528] 在一些实施方案中,与经由在不施用该抑制剂的情况下对该受试者施用T细胞(例如表达CAR的T细胞)的替代的剂量方案取得的曲线下面积,在施用T细胞(例如表达CAR的T细胞)和/或TEC家族激酶的抑制剂后,受试者的流体、血浆、血清、血液、组织、器官和/或疾病位点(例如肿瘤位点)中表达受体(例如CAR)的细胞的浓度相对于时间的曲线下面积(AUC)更大。

[0529] 在一些方面中,该方法导致施用的细胞的高体内增殖,例如,如通过流式细胞术测量的。在一些方面中,检测到该细胞的高峰比例。例如,在一些实施方案中,在T细胞(例如表达CAR的T细胞)和/或TEC家族激酶的抑制剂后受试者的血液、血浆、血清、组织或疾病位点或其白细胞级分(例如PBMC级分或T细胞级分)中的峰值或最大水平处,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%或至少约90%的该细胞表达重组受体,例如CAR。

[0530] 在一些方面中,该施用TEC家族激酶的抑制剂的受试者中的一些剂量的细胞的增加的或延长的扩增和/或持久性与受试者中肿瘤相关效果的获益相关联。在一些实施方案中,该肿瘤相关效果包括受试者重肿瘤负荷的减少或母细胞骨髓的减少。在一些实施方案中,在施用该方法后,该肿瘤负荷减少了或减少了至少或至少约10%、20%、30%、40%、

50%、60%、70%、80%、90%或100%。在一些实施方案中,疾病负荷、肿瘤大小、肿瘤体积、肿瘤质量和/或肿瘤负担或容量在施用该剂量的细胞后相较于已经用不涉及施用TEC家族激酶的抑制剂的方法治疗的受试者降低了至少或至少约50%、60%、70%、80%、90%或更多。

[0531] B.T细胞功能活性

[0532] 在一些实施方案中,与疗法或治疗效果相关联的参数(其包括评估筛选步骤和/或评估治疗效果和/或监测治疗效果的参数),包括T细胞的一种或多种活性、表型、增殖或功能。在一些实施方案中,可使用本领域中已知的用于评估T细胞(例如为了T细胞疗法施用的T细胞)的活性、表型、增殖或功能的测定法。施用该细胞和/或TEC家族激酶的抑制剂之前和/或随后,一些实施方案中的工程化细胞群的生物活性例如通过许多已知的方法中的任一种测量。用以评估的参数包括工程化或天然T细胞或其它免疫细胞与抗原在体内(例如通过成像)或离体(例如通过ELISA或流式细胞术)特异性结合。在某些实施方案中,工程化细胞破坏靶细胞的能力可使用本领域已知的任何方法测量,诸如,例如Kochenderfer等人, *J. Immunotherapy*, 32 (7) :689-702 (2009), 和Herman等人, *J. Immunological Methods*, 285 (1) :25-40 (2004) 中所述的细胞毒性测定法。在某些实施方案中,细胞的生物活性通过测定表达和/或一种或多种细胞因子的分泌测量,诸如CD107a、IFN γ 、IL-2、GM-CSF和TNF α ,和/或通过评估溶细胞活性。

[0533] 在一些实施方案中,用于T细胞(例如为了T细胞疗法施用的T细胞)的活性、表型、增殖和/或功能的测定法包括但不限于ELISPOT、ELISA、细胞增殖、细胞毒性淋巴细胞(CTL)测定法、与T细胞表位、抗原或配体的结合或细胞内细胞因子染色,增殖测定法,淋巴因子分泌测定法,直接细胞毒性测定法和有限稀释法。在一些实施方案中,可测量T细胞的增殖应答,例如通过并入通过将³H-胸苷、BrdU (5-溴-2'-脱氧尿苷) 或2'-脱氧-5-乙炔基尿苷(EdU) 掺入其DNA或染料稀释测定中,使用染料诸如羧基荧光素二乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)、CellTrace Violet或膜染料PKH26。

[0534] 在一些实施方案中,评估T细胞(例如为了T细胞疗法施用的T细胞)的活性、表型、增殖和/或功能包括测量来自T细胞的细胞因子产生和/或测量来自该受试者的生物样品(例如血浆、血清、血液和/或组织样品,例如肿瘤样品)中的细胞因子产生。在一些情况中,此类测量的细胞因子可包括但不限于白介素-2 (IL-2)、干扰素- γ (IFN γ)、白介素-4 (IL-4)、TNF- α (TNF α)、白介素-6 (IL-6)、白介素-10 (IL-10)、白介素-12 (IL-12)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、CD107a和/或TGF- β (TGF β)。用以测量细胞因子的测定法是本领域熟知的,且包括但不限于ELISA、细胞内细胞因子染色、流式细胞小球微阵列术、RT-PCR、ELISPOT、流式细胞术和在测试样品存在下测试对相关细胞因子有应答的细胞的响应能力(例如增殖)的生物测定法。

[0535] 在一些实施方案中,评估T细胞(例如为了T细胞疗法施用的T细胞)的活性、表型、增殖和/或功能包括评估细胞表型,例如特定细胞表面标记物的表达。在一些实施方案中,评估T细胞(例如为了T细胞疗法施用的T细胞)的T细胞激活标记物的表达、T细胞耗竭标记物和/或T细胞分化标记物。在一些实施方案中,在施用之前评估细胞表型。在一些实施方案中,在施用后评估细胞表型。用于评估的T细胞激活标记物、T细胞耗竭标记物和/或T细胞分化标记物包括本领域已知的针对特定T细胞亚群的任何标记物,例如CD25、CD38、人白细胞

抗原-DR (HLA-DR)、CD69、CD44、CD137、KLRG1、CD62L^低、CCR7^低、CD71、CD2、CD54、CD58、CD244、CD160、程序细胞死亡蛋白1 (PD-1)、淋巴细胞激活基因3蛋白 (LAG-3)、T细胞免疫球蛋白域和粘蛋白域蛋白3 (TIM-3)、细胞毒T淋巴细胞抗原-4 (CTLA-4)、带T淋巴细胞衰减因子 (BTLA) 和/或T细胞免疫球蛋白和基于免疫受体酪氨酸抑制性基序域 (TIGIT) (参见,例如 Liu等人,Cell Death and Disease (2015) 6,e1792)。在一些实施方案中,评估的细胞表面标记物是CD25、PD-1和/或TIM-3。在一些实施方案中,评估的细胞表面标记物是CD25。

[0536] 在一些方面中,检测表达水平包括执行体外测定。在一些实施方案中,该体外测定是免疫测定,基于适配体的测定,组织学或细胞学测定法或mRNA表达水平测定。在一些实施方案中,该一种或多种因子、效应子、酶和/或表面标志物中的每种中的一种或多种的参数或参数通过酶联免疫吸附测定 (ELISA)、免疫印迹、免疫沉淀、放射免疫分析 (RIA)、免疫染色、流式细胞术测定、表面等离子体共振 (SPR)、化学发光测定、侧流免疫测定,抑制测定或亲合力测定来检测。在一些实施方案中,检测细胞因子和/或表面标记物使用特异性结合至少一种生物标记物的结合试剂测定。在一些情况中,该结合试剂是抗体或其抗原结合片段、适配体或核酸探针。

[0537] 在一些实施方案中,施用该抑制剂增加循环CART细胞的水平。在一些实施方案中,用该激酶抑制剂的治疗使T细胞的发展向Th1免疫细胞表型倾斜。在一些实施方案中,用依鲁替尼或式 (II) 的化合物的治疗可使CART细胞向已经与增加的CAR T体内持久性相关联的更多记忆样表型倾斜 (Busch,

[0538] D.H.,等人 (2016) Semin Immunol, 28 (1):28-34)。

[0539] C. 疾病负荷、应答、功效和存活

[0540] 在一些实施方案中,与疗法或治疗效果相关的参数 (其包括被评估用于筛选步骤和/或评估治疗效果和/或监测治疗效果的参数) 包括肿瘤或疾病负荷。施用该免疫疗法,诸如T细胞疗法 (例如表达CAR的T细胞) 或啮合T细胞的疗法和/或TEC家族激酶的抑制剂,可降低或防止受试者中疾病或病况的扩张或负荷。例如,当该疾病或病况是肿瘤时,该方法通常降低骨髓或分子可检测的癌症中的肿瘤大小、体积、转移、母细胞 (blast) 百分比和/或改善预后或存活或与肿瘤负荷相关的其他症状。

[0541] 在一些实施方案中,较于其中在不施用TEC家族激酶的抑制剂的情况下给予免疫疗法 (诸如T细胞疗法 (例如表达CAR的细胞) 或啮合T细胞的疗法) 的替代方法,该提供的方法导致经治疗的受试者中减少的肿瘤负荷。肿瘤负荷实际上没有必要在接受该组合疗法的所有受试者中减少,但肿瘤负荷在经治疗的受试者中平均降低,诸如基于临床数据,其中大多数用此类组合疗法治疗的受试者表现出降低的肿瘤负荷,诸如至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多的用该组合疗法治疗的受试者表现出降低的肿瘤负荷。

[0542] 疾病负荷可涵盖受试者或受试者的器官、组织或体液例如肿瘤或另一位置 (例如,其将指示转移) 的器官或组织中的疾病细胞的总数目。例如,在某些血液恶性肿瘤的背景中,可在血液、淋巴或骨髓中检测和/或定量肿瘤细胞。在一些实施方案中,疾病负荷可包括肿瘤的质量、转移的数目或范围和/或骨髓中存在的母细胞的百分比。

[0543] 在一些实施方案中,该受试者具有骨髓瘤、淋巴瘤或白血病。在一些实施方案中,该受试者具有非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、急性成淋巴细胞白血病 (ALL)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL) 或骨髓瘤,例如多发性骨髓瘤 (MM)。在一些实施方案

中,该受试者具有MM或DBCBL。

[0544] 在一些实施方案中,该受试者具有实体瘤。

[0545] 在MM的情况中,评估疾病负荷的程度的示例性参数包括诸如克隆浆细胞的数目(例如>10%骨髓活组织检查或来自其它组织的活组织检查中的任何数量;浆细胞瘤)、血清或尿液中单克隆蛋白(副蛋白)的存在、感觉与浆细胞病症相关的终末器官损伤的证据(例如高钙血症(纠正钙>2.75mmol/l);可归因于骨髓瘤的肾功能不全;贫血(血红蛋白<10g/dl);和/或骨病变(溶解性病变或伴有压缩性骨折的骨质疏松症))的参数。

[0546] 在DLBCL的情况中,评估疾病负荷的程度的示例性参数包括诸如细胞形态(例如中心母细胞、成免疫细胞和间变性细胞(anaplastic cell))、基因表达、miRNA表达和蛋白表达(例如BCL2、BCL6、MUM1、LM02、MYC和p21的表达)的参数。

[0547] 在白血病的状况中,疾病负荷的程度可通过血液或骨髓中的残留白血病而测定。在一些实施方案中,如果在骨髓中存在大于或等于5%的母细胞,则受试者表现出形态学疾病,例如,如通过光学显微镜检测。在一些实施方案中,如果骨髓中的母细胞少于5%,则受试者表现出完全或临床缓解。在一些实施方案中,对于白血病,受试者可表现出完全缓解,但存在一小比例的形态学上不可检测(通过光学显微镜技术)的残留白血病细胞。

[0548] 在一些实施方案中,相较于施用该免疫疗法(例如T细胞疗法)和/或抑制剂之前的即刻的疾病负荷,该方法和/或施用免疫疗法(诸如T细胞疗法(例如表达CAR的T细胞)或啮合T细胞的疗法)和/或TEC家族激酶的抑制剂减少疾病负荷。

[0549] 在一些方面中,施用免疫疗法(例如T细胞疗法)和/或TEC家族激酶的抑制剂可预防疾病负荷的增加,且这可通无疾病负荷的变化来证明。

[0550] 在一些实施方案中,与使用替代疗法(诸如该受试者在不存在施用TEC家族激酶的抑制剂的情况下仅接受免疫疗法(例如仅T细胞疗法)的方法)的可比较方法中观察到的降低相比,该方法降低该疾病或病况的负荷(例如肿瘤细胞的数目、肿瘤的大小、患者生存的持续时间或无事件生存期)至较大程度和/或持续较长时间段。在一些实施方案中,与单独施用每种药剂(例如施用该抑制剂至尚未接受免疫疗法(例如T细胞疗法)的受试者;或施用免疫疗法(例如T细胞疗法)至尚未接受该抑制剂的受试者)产生的降低相比,在施用免疫疗法(例如T细胞疗法)和TEC家族激酶的抑制剂的组合疗法后,疾病负荷降低至较大程度或持续较长持续时间。

[0551] 在一些实施方案中,检测、评估或测量该受试者中疾病或病况的负荷。在一些方面中,疾病负荷可通过检测受试者中或受试者的器官、组织或体液(诸如血液或血清)中疾病或疾病相关细胞(例如肿瘤细胞)的总数目来检测。在一些实施方案中,疾病负荷(例如肿瘤负荷)通过测量实体肿瘤的质量和/或转移的数目或范围来评估。在一些方面中,评估受试者的存活、某个时间段内的存活、存活程度、无事件或无症状生存的存在或持续时间、或无复发存活。在一些实施方案中,评估疾病或病况的任何症状。在一些实施方案中,规定疾病或病况负荷的量度。在一些实施方案中,用于测定的示例性参数包括指示疾病或病况(例如肿瘤)的改善或提高的特定临床效果。此类参数包括:疾病控制的持续时间,其包括完全应答(CR)、部分应答(PR)或疾病稳定(SD)(参见,例如Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (RECIST)指南)、客观应答率(ORR)、无进展生存期(PFS)和总生存期(OS)。可设定参数的具体阈值以确定本文提供的组合疗法的方法的功效。

[0552] 在一些方面中,受试者(诸如具有某种淋巴瘤的受试者)中的应答率基于Lugano标准(Cheson等人,(2014) JCO 32(27):3059-3067;Johnson等人,(2015) Radiology 2:323-338;Cheson,B.D.(2015) Chin Clin Oncol 4(1):5)。在一些方面中,应答评估利用任何临床、血液学和/或分子方法。在一些方面中,使用Lugano标准评估的应答涉及酌情地使用正电子发射断层扫描(PET)-计算机断层扫描(CT)和/或CT。PET-CT评估可进一步包括使用针对FDG-avid淋巴瘤的氟脱氧葡萄糖(FDG)。在一些方面中,当将PET-CT用于评估FDG-avid组织学中应答时,可以使用5分量表。在一些方面中,该5分量表包含下列标准:1,背景以上没有摄取;2,摄取 \leq 纵隔;3,摄取 $>$ 纵隔但 \leq 肝脏;4,摄取适度 $>$ 肝脏;5,摄取明显高于肝脏和/或新病变;X,不太可能与淋巴瘤有关的新的摄取区域。

[0553] 在一些方面中,使用Lugano标准描述的完全应答涉及在各种可测量位点的完全代谢应答和完全放射学应答。在一些方面中,这些位点包括淋巴结和淋巴外位点,其中当使用PET-CT时,在5分量表上具有或不具有残余质量时,将CR描述为1、2或3的得分。在一些方面中,在具有高生理摄取或脾或骨髓内激活(例如用化学疗法或髓样集落刺激因子)的Waldeyer环或淋巴结外部位中,摄取可能大于正常纵隔和/或肝脏。在这种情况下,如果初始受累位点的摄取不大于周围正常组织,即使该组织具有高生理摄取,也可以推断完全代谢反应。在一些方面中,使用CT评估在淋巴结中的应答,其中将CR描述为没有疾病的淋巴结外部位,且靶结节/淋巴结肿块必须退化到 $\leq 1.5\text{cm}$ 的病变(LDi)的最大横向直径。进一步的评估位点包括骨髓,其中基于PET-CT的评估应指示缺乏骨髓中FDG-avid的证据,且基于CT的评估应指示正常形态,如果不确定的话其应该是IHC阴性的话。其它位点可包括器官扩大的评估,其应该回归正常。在一些方面中,评估未测量的病变和新的病变,在CR的情况下其应该不存在(Cheson等人,(2014) JCO 32(27):3059-3067;Johnson等人,(2015) Radiology 2:323-338;Cheson,B.D.(2015) Chin Clin Oncol 4(1):5)。

[0554] 在一些方面中,使用Lugano标准描述的部分应答(PR)涉及在各种可测量位点的部分代谢应答和部分放射学应答。在一些方面中,这些位点包括淋巴结和淋巴结外位点,其中当使用PET-CT时,将PR描述为4或5的得分,与基线和任何大小的残余质量相比具有降低的摄取。暂时地,此类发现可指示应答的疾病。在治疗结束时,此类发现可指示残留的疾病。在一些方面,使用CT在淋巴结中评估应答,其中将PR描述为多达6个靶可测量结节和淋巴结外位点的SPD中 $\geq 50\%$ 降低。如果病变太小而无法在CT上测量,则将 $5\text{mm} \times 5\text{mm}$ 规定为默认值;如果病变不再可见,则该值为 $0\text{mm} \times 0\text{mm}$;对于 $>5\text{mm} \times 5\text{mm}$ 但比正常小的结节,使用实际测量值用于计算。评估的其它位点包括骨髓,其中基于PET-CT的评估应指示残余摄取高于正常骨髓中的摄取,但与基线相比降低(与允许的化学疗法的反应性变化相容的弥散摄取)。在一些方面中,如果在结节应答的情况下骨髓中存在持续的局灶性变化,则应考虑进行MRI或活组织检查或间隔扫描的进一步评估。在一些方面中,其它位点可包括器官扩大的评估,其中脾脏必须退化超过正常 $>50\%$ 的长度。在一些方面中,评估非测量的病变和新的病变,其在PR的情况中应在不存在/正常、退化,但不增加。还可使用基于PET-CT和/或基于CT的评估测量无应答/疾病稳定(SD)或疾病进展(PD)。(Cheson等人,(2014) JCO 32(27):3059-3067;Johnson等人,(2015) Radiology 2:323-338;Cheson,B.D.(2015) Chin Clin Oncol 4(1):5)。

[0555] 在一些方面中,无进展生存期(PFS)描述为疾病(诸如癌症)的治疗期间和之后受

试者携带该疾病生存但不会恶化的时间长度。在一些方面中,客观应答(OR)描述为可测量的应答。在一些方面中,客观应答率(ORR)描述为取得CR或PR的患者的比例。在一些方面中,总生存期(OS)描述为从疾病(例如癌症)的诊断日期或治疗开始,经诊断患有该疾病的受试者仍然存活的时间长度。在一些方面中,无事件生存期(EFS)描述为癌症治疗结束后,受试者仍保持不存在该治疗意欲预防或延迟的某些并发症或事件的时间长度。这些事件可包括癌症的复发或某些症状的发作(诸如来自扩散到骨骼的癌症的骨痛)或死亡。

[0556] 在一些实施方案中,应答持续时间(DOR)的测量包括从记录肿瘤应答至疾病进展的时间。在一些实施方案中,用于评估应答的该参数可包括持续应答,例如,开始疗法的一段时间后持续存在的应答。在一些实施方案中,持续应答由开始疗法后的大约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18或24个月时的应答率表示。在一些实施方案中,该应答持续大于3个月或大于6个月。

[0557] 在一些方面中,RECIST标准用于测定客观肿瘤应答;在一些方面中,在实体肿瘤中。(Eisenhauer等人,European Journal of Cancer 45 (2009) 228-247)。在一些方面中,RECIST标准用于测定靶病变的客观肿瘤应答。在一些方面中,使用RECIST标准测定的完全应答描述为所有靶病变和任何病理性淋巴结(无论是靶标或非靶标)的消失必须在短轴上减少到<10mm。在其它方面中,使用RECIST标准测定的部分应答描述为靶病变直径总和至少减少30%,以基线总和直径作为参考。在其它方面中,疾病进展(PD)描述为靶病变的直径总和至少增加20%,以研究中的最小总和为参考(这包括基线总和,如果基线总和是研究中最小的)。除了相对20%的增加,该总和还必须证明至少5mm的绝对增加(在一些方面中,一个或多个新病变的出现也视为进展)。在其它方面中,疾病稳定(SD)描述为既没有足够的收缩率来获得PR也没有足够的增加来获得PD的资格,以研究时的最小总和直径作为参考。

[0558] 在一些方面中,受试者(诸如具有CLL的受试者)中的应答率基于关于慢性淋巴细胞白血病(IWCLL)应答标准的国际研讨会(Hallek等人,Blood 2008, Jun 15;111(12): 5446-5456)。在一些方面中,这些标准描述如下:完全应答(CR),其在一些方面中需要通过免疫表型不存在外周血克隆淋巴细胞,不存在淋巴结病,不存在肝肿大或脾肿大,不存在全身症状和令人满意的血细胞计数;伴不完全髓恢复的完全缓解(CRi),其在一些方面中描述为上述的CR,但没有正常的血细胞计数;部分缓解(PR),其在一些方面中描述为淋巴细胞计数 $\geq 50\%$ 下降,淋巴结病 $\geq 50\%$ 的减少或肝或脾脏 $\geq 50\%$ 的减少,连同外周血细胞计数的提高;疾病进展(PD),其在一些方面中描述为淋巴细胞计数 $\geq 50\%$ 的提高,提高至 $>5 \times 10^9/L$,淋巴结病 $\geq 50\%$ 的增加,肝或脾脏大小 $\geq 50\%$ 的增加,Richter转化,或由于CLL引起的新的血细胞减少;和疾病稳定,其在一些方面中描述为不符合CR、CRi、PR或PD的标准。

[0559] 在一些实施方案中,该受试者表现出CR或OR如果,在开始施用一定剂量的细胞的1个月内,该受试者中的淋巴结大小小于或约20mm,小于或约10mm或少于或约10mm。

[0560] 在一些实施方案中,在受试者的骨髓中(或在大于50%、60%、70%、80%、90%或更多的根据该方法治疗的受试者的骨髓中)检测不到CLL的指数克隆。在一些实施方案中,CLL的指数克隆通过IgH深度测序评估。在一些实施方案中,在施用该细胞后在或约或至少在或至少约1、2、3、4、5、6、12、18或24个月时未检测到克隆指数。

[0561] 在一些实施方案中,如果骨髓中存在大于或等于5%的母细胞,例如,如通过光学显微镜检测的,诸如骨髓中存在大于或等于10%的母细胞,骨髓中存在大于或等于20%的

母细胞,骨髓中存在大于或等于30%的母细胞,骨髓中存在大于或等于40%的母细胞或骨髓中存在大于或等于50%的母细胞,则受试者表现出形态学疾病。在一些实施方案中,如果骨髓中存在少于5%的母细胞,则受试者表现出完全或临床缓解。

[0562] 在一些实施方案中,受试者可表现出完全缓解,但存在一小比例的形态学不可检测(通过光学显微技术)的残留白血病细胞。如果受试者表现出骨髓中小于5%的母细胞且表现出分子可检测的癌症,则称受试者表现出微量残留病(MRD)。在一些实施方案中,分子可检测的癌症可使用各种分子技术中的任一种评估,所述分子技术允许灵敏地检测小数目的细胞。在一些方面中,MRD可经由IgHV深度测序以及外周血和骨髓的流式细胞术测量。在一些方面中,此类技术包括PCR测定,其可测定独特的Ig/T细胞受体基因重排或由染色体易位产生的融合转录物。在一些实施方案中,流式细胞术可用于基于白血病特异性免疫表型鉴定癌症细胞。在一些实施方案中,分子检测癌症可检测出100,000个正常细胞中低至1个白血病细胞。在一些实施方案中,如果(例如通过PCR或流式细胞术)检测到100,000个细胞中至少或大于1个白血病细胞,则受试者表现出可分子检测的MRD。在一些实施方案中,受试者的疾病负荷是分子不可检测的或是MRD⁻,使得,在一些情况中,使用PCR或流式细胞术技术不能在受试者中检测到白血病细胞。

[0563] 在一些方面中,依照提供的方法和/或依照提供的制品或组合物施用,通常降低或阻止受试者中疾病或病况的扩大或负荷。例如,当该疾病或病况是肿瘤时,该方法通常降低肿瘤大小、体积、转移、骨髓中或分子可检测的癌症中的母细胞的百分比和/或改善预后或存活或与肿瘤负荷相关的其它症状。

[0564] 疾病负荷可涵盖受试者中或受试者的器官、组织或体液诸如肿瘤的器官或组织或另一位点(例如,其将指示转移)中该疾病的细胞的总数目。例如,在某些血液恶性肿瘤的背景中,肿瘤细胞可在血液或骨髓中检测或定量。在一些实施方案中,疾病负荷可包括肿瘤的质量、转移的数目或程度和/或骨髓中存在的母细胞的百分比。

[0565] 在一些实施方案中,受试者具有白血病。疾病负荷的程度可通过评估血液或骨髓中残留的白血病来测定。

[0566] 在一些方面中,在施用免疫疗法(例如T细胞疗法)之前,在施用免疫疗法(例如T细胞疗法)之后但在施用TEC家族激酶的抑制剂之后,在施用TEC家族激酶的抑制剂之后但在施用免疫疗法(例如T细胞疗法)之前,和/或在施用免疫疗法(例如T细胞疗法)和该抑制剂二者之后,测量或检测疾病负荷。在多次施用该组合疗法的一个或多个步骤的背景中,一些实施方案中的疾病负荷可在施用任何步骤、剂量和/或施用周期之前或之后,或在施用任何步骤、剂量和/或施用周期之间的时间测量。

[0567] 在一些实施方案中,相较于在施用TEC激酶的抑制剂和免疫疗法(例如T细胞疗法)之前的即刻,通过提供的方法该负荷降低了或降低了至少或至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。在一些实施方案中,在施用免疫疗法(例如T细胞疗法)和TEC家族激酶的抑制剂之后,相较于在施用免疫疗法(例如T细胞疗法)和/或该抑制剂之前的即刻,疾病负荷、肿瘤大小、肿瘤体积、肿瘤质量和/或肿瘤负担或肿块降低了至少或至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多。

[0568] 在一些实施方案中,通过该方法的疾病负荷的降低包含诱导形态完全缓解,例如,如在施用(例如开始)该组合疗法之后1个月、2个月、3个月或多于3个月时评估的。

[0569] 在一些方面中, (例如如通过多参数流式细胞术测量的) 微量残留病的测定是阴性, 或微量残留病的水平少于约0.3%、少于约0.2%、少于约0.1%, 或少于约0.05%。

[0570] 在一些实施方案中, 与其它方法相比, 受试者的无事件生存率或总体生存率通过该方法改善。例如, 在一些实施方案中, 在本文提供的组合疗法的方法后6个月, 通过该方法治疗的受试者的无事件生存率或概率大于约40%、大于约50%、大于约60%、大于约70%、大于约80%、大于约90%或大于约95%。在一些方面中, 总生存率大于约40%、大于约50%、大于约60%、大于约70%、大于约80%、大于约90%或大于约95%。在一些实施方案中, 用该方法治疗的受试者表现出无事件生存、无复发生存或生存至少6个月、或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10年。在一些实施方案中, 提高了达到进展的时间, 诸如达到进展的时间大于或约6个月, 或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10年。

[0571] 在一些实施方案中, 在通过该方法的治疗后, 相较于其它方法, 复发的概率降低了。例如, 在一些实施方案中, 在该组合疗法的方法后6个月的复发的概率少于约80%、少于约70%、少于约60%、少于约50%、少于约40%、少于约30%、少于约20%或少于约10%。

[0572] V. 制品和试剂盒

[0573] 还提供含有TEC家族激酶的抑制剂 (诸如Btk抑制剂, 例如依鲁替尼) 和用于免疫疗法的组分 (例如抗体或其抗原结合片段或T细胞疗法 (例如工程化细胞)) 和/或其组合物的制品。该制品可包括容器和容器上的或与容器相关联的标签或包装插页。适合的容器包括, 例如瓶、药水瓶、注射器、IV溶液袋等。该容器可由各种材料形成, 诸如玻璃或塑料。在一些实施方案中, 该容器装有组合物, 该组合物本身或与另一种有效治疗, 预防和/或诊断病况的组合物组合。在一些实施方案中, 该容器具有无菌入口。示例性容器包括静脉内溶液袋, 药水瓶, 包括具有可通过用于注射的针头刺穿的塞子, 或用于口服施用药剂的瓶或药水瓶的容器。标签或包装插页可指示该组合物用于治疗疾病或病况。

[0574] 该制品可包括 (a) 第一容器, 其具有其中含有的组合物, 其中该组合物包括用于免疫疗法 (例如T细胞疗法) 的抗体或工程化细胞; 和 (b) 第二容器, 其具有其中含有的组合物, 其中该组合物包括第二药剂, 诸如TEC家族激酶的抑制剂。该制品进一步包括包装插页, 其指示该组合物可用于治疗特定病况。替换地, 或额外地, 该制品可进一步包括包含药物可接受的缓冲液的另一或相同容器。它可进一步包括其它材料, 诸如其它缓冲液、稀释剂、填充剂、针头和/或注射器。

[0575] VI. 定义

[0576] 除非另有规定, 否则本文所用的所有技术术语、符号和其它技术和科学术语或术语旨在具有与所要求保护的主体所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。在一些情况中, 为了清楚和/或为了便于参考而在本文中定义具有通常理解的含义的术语, 且本文中不包含的此类定义不应被解释为表示与本领域通常理解的实质性差异。

[0577] 如本文所用的, “受试者” 是哺乳动物, 诸如人或其它动物, 且通常是人。在一些实施方案中, 施用免疫调节性多肽、工程化细胞或组合物的该受试者例如患者是哺乳动物, 通常是灵长类动物, 诸如人。在一些实施方案中, 该灵长类动物是猴或猿。该受试者可以是雄性或雌性, 且可以是任何适合的年龄, 包括幼儿、青少年、青春期、成年人和老年受试者。在一些实施方案中, 该受试者是非灵长类哺乳动物, 诸如啮齿动物。

[0578] 如本文所用, “治疗 (treatment)” (和其语法变化, 诸如“治疗 (treat)” 或“治疗

(treating)”)是指完全或部分改善或减轻疾病或病况或病症,或与其相关的症状、不良反应或效果或表型。理想的治疗作用包括但不限于,预防疾病的发生或复发、症状的缓解、减少疾病的任何直接或间接的病理后果、预防转移、降低疾病进展速率,改善或缓解疾病状态和缓解或改善预后。该术语不暗示着完全治愈疾病或完全消除任何症状或对所有症状或效果的作用。

[0579] 如本文所用,“延迟疾病的发展”意指推迟、阻碍、减缓、延缓、稳定、抑制和/或推迟疾病(例如癌症)的发展。此延迟可以具有不同的时间长度,这取决于疾病的历史和/或经治疗的个体。对于本领域技术人员显而易见的是,足够或显著的延迟实际上可包括预防,因为个体不会发展疾病。例如,可延迟晚期癌症,诸如转移的发展。

[0580] 如本文所用,“预防”包括提供关于可能易患疾病但尚未经诊断患有该疾病的受试者中该疾病的发生或复发的预防。在一些实施方案中,提供的细胞和组合物用于延迟疾病的发展和用于减慢疾病的进展。

[0581] 如本文所用,“抑制”功能或活性是在与除了感兴趣的条件或参数之外的其他相同条件相比时,或者与另一个条件相比时,减少功能或活动。例如,与不存在抑制肿瘤生长的细胞的情况下的肿瘤生长速率相比,抑制肿瘤生长的细胞降低了肿瘤的生长速率。

[0582] 在施用的上下文中,“有效量的”药剂(例如药物制剂、细胞或组合物)是指在必要的剂量/量和时间段内有效实现期望的结果(诸如治疗或预防结果)的量。

[0583] “治疗有效量”的药剂(例如药物制剂或工程化细胞)是指在必要的剂量和时间段内有效实现期望的治疗结果(诸如治疗疾病、病况或病症的结果)和/或治疗的药代动力学或药效动力学作用的量。该治疗有效量可根据诸如疾病阶段、受试者的年龄、性别和体重的因素,和施用的免疫调节性多肽或工程化细胞而变化。在一些实施方案中,该提供的方法涉及以有效量例如治疗有效量施用免疫调节性多肽、工程化细胞或组合物。

[0584] “预防有效量”是指在必要的剂量和时间段内有效实现期望的预防结果的量。通常但不是必须的,因为在疾病之前或疾病的早期阶段在受试者中使用预防剂量,预防有效量将小于治疗有效量。

[0585] 术语“药物制剂”是指此类形式的制剂,该制剂允许其中含有的活性成分的生物活性是有效的,且该制剂不含有对于施用该配制剂的受试者具有不可接受的毒性的额外的组分。

[0586] “药物可接受的载剂”是指除了活性成分外的药物配制剂中的成分,其对受试者无毒。药物可接受的载剂包括但不限于缓冲液、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0587] 如本文所用,核苷酸或氨基酸位置“对应于”公开序列(如序列表中所述的序列)中的核苷酸或氨基酸位置的表述,是指在与公开序列比对时使用标准比对算法(诸如GAP算法)最大化同一性而鉴定的核苷酸或氨基酸位置。通过比对序列,本领域技术人员可鉴定对应的残基,例如,使用保守和相同氨基酸残基作为指导。通常,为了鉴定对应的位置,比对氨基酸序列使得获得最高级匹配(参见,例如:Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic

Press,1987;和Sequence Analysis Primer,Gribskov,M.和Devereux,J.,eds.,M Stockton Press,New York,1991;Carrillo等人(1988)SIAM J Applied Math 48:1073)。

[0588] 如本文所用,术语“载体”是指能够繁殖与其连接的另一核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体以及掺入已引入它的宿主细胞基因组中的载体。某些载体能够指导与其可操作连接的核酸的表达。此类载体在本文中被称为“表达载体”。其中,该载体是病毒载体,诸如逆转录病毒,例如, γ 逆转录病毒和慢病毒载体。

[0589] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换地使用且是指外源核酸已经引入至其中的细胞,包括此类细胞的后代。宿主细胞包括“转化子”和“转化的细胞”,其包括原代转化的细胞和由其衍生的后代,而不考虑传代次数。后代可能与亲代细胞的核酸含量不完全相同,但可含有突变。本文包括具有与最初转化细胞中筛选或选择的相同功能或生物活性的突变子代。

[0590] 如本文所用,细胞或细胞群对于特定标志物是“阳性”的陈述是指在该细胞上或该细胞中存在可检测的特定标志物(通常是表面标志物)。当提及表面标志物时,该术语是指通过流式细胞术检测的表面表达的存在,例如,通过用特异性结合该标志物的抗体染色并检测该抗体,其中该染色可通过流式细胞术检测,其水平基本上高于在另外相同条件下用同种型匹配的对照进行相同程序检测到的染色,和/或基本上类似于已知对该标志物阳性的细胞的水平,和/或基本上高于已知对该标志物为阴性的细胞的水平。

[0591] 如本文所用,细胞或细胞群对特定标志物是“阴性的”的陈述是指特定标志物(通常是表面标志物)在细胞上或细胞中不存在实质上可检测的存在。当提及表面标志物时,该术语是指通过流式细胞术检测的表面表达的不存在,例如,通过用特异性结合该标志物的抗体染色并检测所述抗体,其中,该染色通过流式细胞术检测不到,其水平基本上高于在另外相同条件下用同种型匹配的对照进行相同程序检测到的染色,和/或基本上低于已知对该标志物为阳性的细胞的水平,和/或与已知对该标志物为阴性的细胞相比基本相似的水平。

[0592] 如本文所用,当相对于氨基酸序列(参考多肽序列)使用时,“百分比(%)氨基酸序列同一性”和“百分比同一性”定义为候选序列(例如主题抗体或片段)中氨基酸残基(其余参考多肽序列中的氨基酸残基相同)的百分比,如果需要,在比对序列和引入缺口后,以实现最大的序列同一性百分比,且不考虑任何保守取代作为序列同一性的一部分。出于测定百分比氨基酸序列同一性百分比目的的比对可通过本领技术范围内的各种方式实现,例如,使用公众可用的软件诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或

[0593] Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可测定用于比对序列的合适的参数,其包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。

[0594] 如本文所用,除非另有明确规定,否则单数形式“a”、“an”和“the”包括复数指示物。例如,“a”或“an”意指“至少一个”或“一或多”。应理解的是,本文所述的方面和变化包括“组成”和/或“基本上由……组成”方面和变化。

[0595] 贯穿本公开,所要求保护的主题的各个方面以范围格式呈现。应当理解,范围形式的描述仅仅是为了方便和简洁,且不应解释为对要求保护的主题的范围的不可变化的限制。因此,应该认为范围的描述具体公开了所有可能的子范围以及该范围内的各个数值。例如,在提供一系列值的情况下,应理解,在该范围的上限和下限之间的每个中间值以及在所

述范围内的任何其他所述或中间值包含在所要求保护的主体内。这些较小范围的上限和下限可以独立地包括在较小范围内,并且还包含在要求保护的主体内,受所述范围内的任何特别排除的限制。在所述范围包括一个或两个限制的情况下,排除那些包括的限制中的一个或两个的范围也包括在所要求保护的主体中。无论范围的广度如何,这都适用。

[0596] 本文使用的术语“约”是指本技术领域技术人员容易知道的相应值的通常误差范围。这里对“约”值或参数的提及包括(并描述)针对该值或参数本身的实施方案。例如,涉及“约X”的描述包括“X”的描述。

[0597] 如本文所用,组合物是指两种或更多种产物、物质或化合物(包括细胞)的任何混合物。它可以是溶液、悬浮液、液体、粉末、糊剂、水性、非水性或其任何组合。

[0598] VII. 示例性实施方案

[0599] 所提供的实施方案包括:

[0600] 1. 一种治疗的方法,该方法包括:

[0601] (1) 向患有癌症的受试者施用T细胞,该T细胞特异性识别或特异性结合与该癌症相关的、或在该癌症的细胞上表达或存在的抗原和/或由特异性靶向该癌症且已经或待施用至该受试者的治疗剂包含的标签;和

[0602] (2) 向该受试者施用TEC家族激酶的抑制剂,其中

[0603] 该癌症不是B细胞恶性肿瘤,不是B细胞白血病或淋巴瘤,是非血液癌或是实体肿瘤;和/或

[0604] 该抗原不是B细胞抗原;和/或

[0605] 该抗原不是选自CD19、CD20、CD22和ROR1组成的组的B细胞抗原。

[0606] 2. 一种治疗的方法,该方法包括向患有癌症的受试者施用T细胞,该T细胞特异性识别或特异性结合与该癌症相关的、或在该癌症的细胞上表达或存在的抗原和/或由特异性靶向该癌症且已经或待施用至该受试者的治疗剂包含的标签,该受试者已经施用TEC家族激酶的抑制剂,其中:

[0607] 该癌症不是B细胞恶性肿瘤,不是B细胞白血病或淋巴瘤,是非血液癌症或是实体肿瘤;和/或

[0608] 该抗原不是B细胞抗原;和/或

[0609] 该抗原不是选自CD19、CD20、CD22和ROR1组成的组的B细胞抗原。

[0610] 3. 一种治疗的方法,该方法包括向患有癌症的受试者施用TEC家族激酶的抑制剂,该受试者已经施用T细胞,该T细胞特异性识别或特异性结合与该疾病或病况相关的、或在该疾病或病况的细胞上表达或存在的抗原和/或由特异性靶向该癌症且已经或待施用至该受试者的治疗剂包含的标签,其中

[0611] 该癌症不是B细胞恶性肿瘤,不是B细胞白血病或淋巴瘤,是非血液癌或是实体肿瘤;和/或

[0612] 该抗原不是B细胞抗原;和/或

[0613] 该抗原不是选自CD19、CD20、CD22和ROR1组成的组的B细胞抗原。

[0614] 4. 实施方案1-3任一项的方法,其中:

[0615] 该抗原不是选自CD19、CD20、CD22和ROR1组成的组的B细胞抗原;和/或

[0616] 该癌症不表达选自CD19、CD20、CD22和ROR1组成的组的B细胞抗原和/或κ轻链。

[0617] 5. 实施方案1-4任一项的方法, 其中该癌症不表达CD19, 由该细胞特异性识别或靶向的抗原不是CD19, 和/或该T细胞不包含特异性结合CD19的重组受体和/或该T细胞包含嵌合抗原受体(CAR), 该嵌合抗原受体不包含抗CD19抗原结合结构域。

[0618] 6. 实施方案1-5任一项的方法, 其中由该细胞特异性识别或靶向的抗原选自下列之中: Her2、L1-CAM、间皮素、CEA、乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3或4、erbB二聚体、EGFR vIII、FBP、FCRL5、FCRH5、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、Lewis Y、L1-细胞粘附分子(L1-CAM)、黑色素瘤相关抗原(MAGEMAGE-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、黑色素瘤优先表达的抗原(PRAME)、生存素、EGP2、EGP40、TAG72、B7-H6、IL-13受体a2(IL-13Ra2)、CA9、GD3、HMW-MAA、CD171、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2NY-ESO-1、PSCA、叶酸受体-a、CD44v6、CD44v7/8、avb6整合素、8H9、NCAM、VEGF受体、5T4、胎儿AchR、NKG2D配体、CD44v6、双抗原和与通用标签相关联的抗原、癌症-睾丸抗原、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、G蛋白偶联的受体5D(GPCR5D)、瘤胚共同抗原、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、雌激素受体、黄体酮受体、肝配蛋白B2、CD123、c-Met、GD-2、0-乙酰化GD2(OGD2)、CE7、肾母细胞瘤1(WT-1)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、CCL-1、CD138和病原体特异性抗原。

[0619] 7. 一种治疗的方法, 该方法包括:

[0620] (1) 向患有癌症受试者施用T细胞, 该T细胞特异性识别或特异性结合与该癌症相关的抗原, 该抗原选自B细胞成熟抗原(BCMA)、Her2、L1-CAM、间皮素、CEA、乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3或4、erbB二聚体、EGFR vIII、FBP、FCRL5、FCRH5、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、 κ 轻链、Lewis Y、L1-细胞粘附分子(L1-CAM)、黑色素瘤相关抗原(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、黑色素瘤优先表达的抗原(PRAME)、生存素、EGP2、EGP40、TAG72、B7-H6、IL-13受体a2(IL-13Ra2)、CA9、GD3、HMW-MAA、CD171、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2NY-ESO-1、PSCA、叶酸受体-a、CD44v6、CD44v7/8、avb6整合素、8H9、NCAM、VEGF受体、5T4、胎儿AchR、NKG2D配体、CD44v6、双抗原和与通用标签相关联的抗原、癌症-睾丸抗原、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、G蛋白偶联的受体5D(GPCR5D)、瘤胚共同抗原、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、雌激素受体、黄体酮受体、肝配蛋白B2、CD123、c-Met、GD-2、0-乙酰化GD2(OGD2)、CE7、肾母细胞瘤1(WT-1)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、CCL-1、CD138和病原体特异性抗原; 和

[0621] (2) 向该受试者施用TEC家族激酶的抑制剂。

[0622] 8. 一种治疗的方法, 该方法包括向患有癌症的受试者施用特异性识别或特异性结合与该癌症相关的抗原的T细胞, 该抗原选自B细胞成熟抗原(BCMA)、Her2、L1-CAM、间皮素、CEA、乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3或4、erbB二聚体、EGFR vIII、FBP、FCRL5、FCRH5、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、 κ 轻链、Lewis Y、L1-细胞粘附分子、(L1-CAM)、黑色素瘤相关抗原(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、黑色素瘤优先表达的抗原(PRAME)、生存素、EGP2、EGP40、TAG72、B7-H6、IL-13受体a2(IL-13Ra2)、CA9、GD3、HMW-MAA、CD171、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2NY-ESO-1、PSCA、叶酸受体-a、CD44v6、CD44v7/8、avb6

整合素、8H9、NCAM、VEGF受体、5T4、胎儿AchR、NKG2D配体、CD44v6、双抗原和与通用标签相关联的抗原、癌症-睾丸抗原、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、G蛋白偶联的受体5D (GPCR5D)、瘤胚共同抗原、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原 (CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、雌激素受体、黄体酮受体、肝配蛋白B2、CD123、c-Met、GD-2、0-乙酰化GD2 (OGD2)、CE7、肾母细胞瘤1 (WT-1)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、CCL-1、CD138和病原体特异性抗原,其中该受试者已经施用TEC家族激酶的抑制剂。

[0623] 9. 一种治疗的方法,该方法包括向患有癌症的受试者施用TEC家族激酶的抑制剂,该受试者已经施用特异性识别或特异性结合与该癌症相关的抗原的T细胞,该抗原选自B细胞成熟抗原 (BCMA)、Her2、L1-CAM、间皮素、CEA、乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3或4、erbB二聚体、EGFR vIII、FBP、FCRL5、FCRH5、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、 κ 轻链、Lewis Y、L1-细胞粘附分子、(L1-CAM)、黑色素瘤相关抗原 (MAGE) -A1、MAGE-A3、MAGE-A6、黑色素瘤优先表达的抗原 (PRAME)、生存素、EGP2、EGP40、TAG72、B7-H6、IL-13受体 α 2 (IL-13Ra2)、CA9、GD3、HMW-MAA、CD171、G250/CAIX、HLA-AI MAGEA1、HLA-A2NY-ESO-1、PSCA、folate受体- α 、CD44v6、CD44v7/8、avb6整合素、8H9、NCAM、VEGF受体、5T4、胎儿AchR、NKG2D配体、CD44v6、双抗原和与通用标签相关联的抗原,癌症-睾丸抗原、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、G蛋白偶联的受体5D (GPCR5D)、瘤胚共同抗原、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原 (CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、雌激素受体、黄体酮受体、肝配蛋白B2、CD123、c-Met、GD-2、0-乙酰化GD2 (OGD2)、CE7、肾母细胞瘤1 (WT-1)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、CCL-1、CD138和病原体特异性抗原。

[0624] 10. 实施方案6-9任一项的方法,其中该抗原是病原体特异性抗原,该病原体特异性抗原是病毒抗原、细菌抗原或寄生虫抗原。

[0625] 11. 一种治疗的方法,该方法包括:

[0626] (1) 向患有癌症的受试者施用组合物,该组合物包含T细胞,该T细胞特异性识别或特异性结合与该癌症相关的或在该癌症的细胞上表达或存在的抗原和/或由特异性靶向该癌症且已经或待施用至该受试者的治疗剂包含的标签;和

[0627] (2) 向该受试者施用TEC家族激酶的抑制剂;

[0628] 其中:

[0629] (i) 该受试者和/或该癌症 (a) 对布鲁顿氏酪氨酸激酶 (BTK) 的抑制有抗性和/或 (b) 包含对通过该抑制剂的抑制有抗性的细胞群;

[0630] (ii) 该受试者和/或该癌症包含编码BTK的核酸中的突变,任选地,其中该突变能够降低或阻止通过该抑制剂和/或通过依鲁替尼 (ibrutinib) 的BTK的抑制,任选地,其中该突变是C481S;

[0631] (iii) 该受试者和/或该癌症包含编码磷脂酶C γ 2 (PLC γ 2) 的核酸中的突变,任选地,其中该突变导致组成性信号传导活性,任选地,其中该突变是R665W或L845F;

[0632] (iv) 在开始 (1) 中的施用时和在开始 (2) 中的施用时,该受试者已经在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗后缓解后复发,或已经认为该受试者对用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗是难治的;

[0633] (v) 在开始 (1) 中的施用时和在开始 (2) 中的施用时,该受试者已经在用该抑制剂

和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗后续进展,任选地,其中该受试者表现出进行性疾病,作为对该既往治疗的最佳应答或对该既往治疗的既往应答后的进展;和/或

[0634] (vi) 在开始(1)中的施用时在开始(2)中的施用时,该受试者在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗持续至少6个月后表现出低于完全应答(CR)的应答。

[0635] 12.一种治疗的方法,该方法包括向患有癌症的受试者施用组合物,该组合物包含T细胞,该T细胞特异性识别或特异性结合与该癌症相关的、或在该癌症的细胞上表达或存在的抗原和/或由特异性靶向该癌症且已经或待施用至该受试者的治疗剂包含的标签,该受试者已经施用TEC家族激酶的抑制剂用于在连同施用该包含T细胞的组合物的组合疗法中使用,其中:

[0636] (i) 该受试者和/该癌症(a)对布鲁顿氏酪氨酸激酶(BTK)的抑制有抗性和/或(b)包含对通过该抑制剂的抑制有抗性的细胞群;

[0637] (ii) 该受试者和/或该癌症包含编码BTK的核酸中的突变,任选地,其中该突变能够降低或阻止通过该抑制剂和/或通过依鲁替尼的BTK的抑制,任选地,其中该突变是C481S;

[0638] (iii) 该受试者和/或该癌症包含编码磷脂酶C γ 2 (PLC γ 2)的核酸中的突变,任选地,其中该突变导致组成性信号传导活性,任选地,其中该突变是R665W或L845F;

[0639] (iv) 在开始施用TEC家族激酶的抑制剂和开始施用包含T细胞的组合物时,该受试者已经在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗后缓解后复发,或已经认为该受试者对用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗是难治的;

[0640] (v) 在开始施用该TEC家族激酶的抑制剂和开始施用该包含T细胞的组合物时,该受试者在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗后已经进展,任选地,其中该受试者表现出进行性疾病,作为对该既往治疗的最佳应答或对该既往治疗的既往应答后的进展;和/或

[0641] (vi) 在开始施用该TEC家族激酶的抑制剂和开始施用该包含T细胞的组合物时,该受试者在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗持续至少6月后表现出低于完全应答(CR)的应答。

[0642] 13.一种治疗的方法,该方法包括向患有癌症的受试者施用TEC家族激酶的抑制剂,该受试者已经施用包含T细胞的组合物,该T细胞特异性识别或特异性结合与该癌症相关的、或在该癌症的细胞上表达或存在的抗原和/或由特异性靶向该癌症且已经或待施用至该受试者的治疗剂包含的标签,其中:

[0643] (i) 该受试者和/或该癌症(a)对布鲁顿氏酪氨酸激酶(BTK)的抑制有抗性和/或(b)包含对通过该抑制剂的抑制有抗性的细胞群;

[0644] (ii) 该受试者和/或该癌症包含编码BTK的核酸中的突变,任选地,其中该突变能够降低或阻止通过该抑制剂和/或通过依鲁替尼的BTK的抑制,任选地,其中该突变是C481S;

[0645] (iii) 该受试者和/或该癌症包含编码磷脂酶C γ 2 (PLC γ 2)的核酸中的突变,任选地,其中该突变导致组成性信号传导活性,任选地,其中该突变是R665W或L845F;

[0646] (iv) 在开始施用该包含T细胞的组合物和开始施用该TEC家族激酶的抑制剂时,该受试者已经在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗后缓解后复发,或已经认为该

受试者对用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗是难治的；

[0647] (v) 在开始施用该包含T细胞的组合物和开始施用该TEC家族激酶的抑制剂时，该受试者已经在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗后续展，任选地，其中该受试者表现出进行性疾病，作为对该既往治疗的最佳应答或对该既往治疗的既往应答后的进展；和/或

[0648] (vi) 在开始施用该包含T细胞的组合物和开始施用该TEC家族激酶的抑制剂时，该受试者在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗持续至少6个月后表现出低于完全应答 (CR) 的应答。

[0649] 14. 实施方案11-13任一项的方法，其中该细胞群是或包含B细胞群和/或不包含T细胞。

[0650] 15. 实施方案1-14任一项的方法，其中该T细胞包含肿瘤浸润性淋巴细胞 (TIL) 或包含表达特异性结合该抗原的重组受体的基因工程化T细胞。

[0651] 16. 实施方案15的方法，其中该T细胞包含表达特异性结合该抗原的重组受体的基因工程化T细胞，该受体任选为嵌合抗原受体。

[0652] 17. 一种治疗的方法，该方法包括：

[0653] (1) 向患有癌症的受试者施用包含T细胞的组合物，该T细胞对于该受试者是自体的且表达重组受体，该重组受体特异性结合与该癌症相关的抗原和/或由特异性靶向该癌症且已经或待施用至该受试者的治疗剂包含的标签；且

[0654] (2) 向该受试者施用TEC家族激酶的抑制剂，

[0655] 其中，在轮抗原特异性刺激后的体外测定中，相较于参考T细胞群或参考或阈值水平，该T细胞和/或来自该受试者的未经工程化以表达该重组受体的自体T细胞显示或已经观察到显示降低水平的指示T细胞功能、健康或活性的因子。

[0656] 18. 一种治疗的方法，该方法包括向患有癌症的受试者施用包含T细胞的组合物，该T细胞对于该受试者是自体的且表达重组受体，该重组受体特异性结合与该癌症相关的抗原和/或由特异性靶向该癌症且已经或待施用至该受试者的治疗剂包含的标签，该受试者已经施用TEC家族激酶的抑制剂，其中，在轮抗原特异性刺激后的体外试验中，相较于参考T细胞群或参考或阈值水平，该T细胞和/或来自该受试者的未经工程化以表达该重组受体的自体T细胞显示或已经观察到显示降低水平的指示T细胞功能、健康或活性的因子。

[0657] 19. 一种治疗的方法，该方法包括向患有癌症的受试者施用TEC家族激酶的抑制剂，该受试者已经施用T细胞，该T细胞对于该受试者是自体的且表达重组受体，该重组受体特异性结合与该癌症相关的抗原和/或由特异性靶向该癌症且已经或待施用至该受试者的治疗剂包含的标签，其中，在轮抗原特异性刺激后的体外试验中，相较于参考T细胞群或参考或阈值水平，该T细胞和/或来自该受试者的未经工程化以表达该重组受体的自体T细胞显示或已经观察到显示降低水平的指示T细胞功能、健康或活性的因子。

[0658] 20. 实施方案17-19任一项的方法，其中：

[0659] 该参考T细胞群是来自不患有或不疑似患有该癌症的受试者的血液的T细胞群；

[0660] 该参考或阈值是如在相同体外试验中测定的对来自不患有或不疑似患有该癌症的受试者的血液的T细胞群观察到的平均值；或

[0661] 该参考或阈值是如在相同体外试验中测定的对来自患有该癌症的其他受试者的

血液的T细胞群观察到的平均值。

[0662] 21. 实施方案17-20任一项的方法, 其中该因子是或包含细胞扩增、细胞存活、抗原特异性细胞毒性、和/或细胞因子分泌的程度。

[0663] 22. 实施方案17-21任一项的方法, 其中相较于该参考群或水平, 在相同的试验中, 当在单轮刺激和/或少于该多轮的若干轮刺激后评估时, 该因子的水平未降低。

[0664] 23. 实施方案17-22任一项的方法, 其中该多轮刺激包含至少3、4或5轮和/或在至少10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25天的时期内进行。

[0665] 24. 实施方案16-23任一项的方法, 其中该重组受体是转基因T细胞受体 (TCR) 或功能性非T细胞受体。

[0666] 25. 实施方案16-24任一项的方法, 其中该重组受体是嵌合受体, 该嵌合受体任选是嵌合抗原受体 (CAR)。

[0667] 26. 一种治疗的方法, 该方法包括:

[0668] (1) 向患有癌症的受试者施用包含表达嵌合受体的细胞的组合物, 该嵌合受体任选是嵌合抗原受体 (CAR), 其中该受体特异性结合与该癌症相关的不是CD19、CD20、CD22或ROR1的抗原和/或特异性结合由特异性靶向该癌症且已经或待施用至该受试者的治疗剂包含的标签; 和

[0669] (2) 向该受试者施用TEC家族激酶的抑制剂。

[0670] 27. 一种治疗的方法, 该方法包括向患有癌症的受试者施用包含表达嵌合受体的细胞的组合物, 该嵌合受体任选是嵌合抗原受体 (CAR), 其中该受体特异性结合与该癌症相关的不是CD19、CD20、CD22或ROR1的抗原和/或特异性结合由特异性靶向该癌症且已经或待施用至该受试者的治疗剂包含的标签, 该受试者已经施用TEC家族激酶的抑制剂。

[0671] 28. 一种治疗的方法, 该方法包括向患有癌症的受试者施用TEC家族激酶的抑制剂, 该受试者已经施用包含表达嵌合受体的细胞的组合物, 该嵌合受体任选是嵌合抗原受体 (CAR), 其中该受体特异性结合与该癌症相关的不是CD19、CD20、CD22或ROR1的抗原和/或特异性结合由特异性靶向该癌症且已经或待施用至该受试者的治疗剂包含的标签。

[0672] 29. 实施方案26-29任一项的方法, 其中该嵌合抗原受体 (CAR) 包含特异性结合该抗原的细胞外抗原识别结构域和包含ITAM的细胞内信号传导结构域。

[0673] 30. 实施方案29的方法, 其中该细胞内信号传导结构域包含CD3- ζ (CD3 ζ) 链的细胞内结构域。

[0674] 31. 实施方案29或实施方案30的方法, 其中该嵌合抗原受体 (CAR) 还包含共刺激信号传导区。

[0675] 32. 实施方案31的方法, 其中该共刺激信号传导区包含CD28或4-1BB的信号传导结构域。

[0676] 33. 实施方案31或实施方案32的方法, 其中该共刺激结构域是CD28的结构域。

[0677] 34. 一种治疗癌症的方法, 该方法包括:

[0678] (1) 向患有癌症的受试者施用包含表达嵌合受体的细胞的组合物, 该嵌合受体任选是嵌合抗原受体, 其中该嵌合受体包含包含抗体或其抗原结合片段的细胞外结构域, 作为或包含人CD28的跨膜部分的跨膜结构域和包含人4-1BB或人CD28的信号传导结构域和人CD3 ζ 的信号传导结构域的细胞内信号传导结构域; 且

- [0679] (2) 向该受试者施用TEC家族激酶的抑制剂。
- [0680] 35. 实施方案7-34任一项的方法, 其中该癌症是B细胞恶性肿瘤。
- [0681] 36. 实施方案35的方法, 其中该B细胞恶性肿瘤是白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。
- [0682] 37. 实施方案35或实施方案36的方法, 其中该B细胞恶性肿瘤是急性成淋巴细胞白血病(ALL)、成人ALL、慢性成淋巴细胞白血病(CLL)、小淋巴细胞白血病(SLL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)或急性髓样白血病(AML)。
- [0683] 38. 实施方案35-37任一项的方法, 其中该B细胞恶性肿瘤是CLL或SLL。
- [0684] 39. 实施方案35-37任一项的方法, 其中, 在开始施用该包含T细胞的组合物和开始施用该TEC家族激酶的抑制剂时或之前, 该受试者具有或经鉴定为具有B细胞恶性肿瘤, 其中:
- [0685] (i) 一种或多种细胞遗传异常, 任选为至少两种或三种细胞遗传异常, 任选地, 其中至少一种细胞遗传异常是17p缺失;
- [0686] (ii) TP53突变; 和/或
- [0687] (iii) 未突变的免疫球蛋白重链可变区(IGHV)。
- [0688] 40. 实施方案35-39任一项的方法, 其中在开始施用该包含T细胞的组合物和开始施用该TEC家族激酶的抑制剂时或之前, 该受试者已经用一种或多种用于治疗B细胞恶性肿瘤的在先疗法治疗失败, 已经在用一种或多种用于治疗B细胞恶性肿瘤的在先疗法治疗后缓解后复发, 或已经变得对一种或多种用于治疗B细胞恶性肿瘤的在先疗法是难治的, 该在先疗法任选是除了另一剂量的表达该重组受体的细胞之外的一种、两种或三种在先疗法, 任选地, 其中至少一种在先疗法是用该抑制剂或BTK抑制剂疗法的既往治疗。
- [0689] 41. 实施方案11-40任一项的方法, 其中该既往治疗是用依鲁替尼的既往治疗。
- [0690] 42. 实施方案7-34任一项的方法, 其中该癌症不是表达B细胞抗原的癌症, 是非血液癌症, 不是B细胞恶性肿瘤, 不是B细胞白血病, 或是实体肿瘤。
- [0691] 43. 实施方案1-34和42任一项的方法, 其中该癌症是肉瘤、癌、淋巴瘤、白血病或骨髓瘤, 任选地, 其中该癌症是非霍奇金淋巴瘤(NHL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、CLL、SLL、ALL或AML。
- [0692] 44. 实施方案1-34、42和43任一项的方法, 其中该癌症是胰腺癌、膀胱癌、结直肠癌、乳腺癌、前列腺癌、肾癌、肝细胞癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、胰腺癌、直肠癌、甲状腺癌、子宫癌、胃癌、食管癌、头颈癌、黑色素瘤、神经内分泌癌、CNS癌、脑肿瘤、骨癌或软组织肉瘤。
- [0693] 45. 实施方案1-10和17-44任一项的方法, 其中:
- [0694] (i) 该受试者和/或该癌症(a) 对布鲁顿氏酪氨酸激酶(BTK)的抑制有抗性和/或(b) 包含对通过该抑制剂的抑制有抗性的细胞群;
- [0695] (ii) 该受试者和/或该癌症包含编码BTK的核酸中的突变, 任选地, 其中该突变能够降低或阻止通过该抑制剂和/或通过依鲁替尼的BTK的抑制, 任选地其中该突变是C481S;
- [0696] (iii) 该受试者和/或该癌症包含编码磷脂酶C γ 2(PLC γ 2)的核酸中的突变, 任选地, 其中该突变导致组成性信号传导活性, 任选地, 其中该突变是R665W或L845F;
- [0697] (iv) 在开始施用该TEC家族激酶的抑制剂和开始施用该包含T细胞的组合物时, 该受试者已经在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗后缓解后复发, 或已经认为该受试者对用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗是难治的;

[0698] (v) 在开始施用该TEC家族激酶的抑制剂和开始施用该包含T细胞的组合物时,该受试者已经在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗后续进展,任选地,其中该受试者表现出进行性疾病,作为对该既往治疗的最佳应答或对该既往治疗的既往应答后的进展;和/或

[0699] (vi) 在开始施用该TEC家族激酶的抑制剂和开始施用该包含T细胞的组合物时,该受试者在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗持续至少6个月后表现出低于完全应答(CR)的应答。

[0700] 46. 实施方案45的方法,其中该细胞群是或包含B细胞群和/或不包含T细胞。

[0701] 47. 实施方案11-14和实施方案45-46任一项的方法,其中在编码BTK的核酸中的突变包含在位置C481处的替代,任选是C481S或C481R,和/或在位置T474处的替代,任选是T474I或T474M。

[0702] 48. 实施方案11-47任一项的方法,其中该T细胞识别或靶向选自下列的抗原: ROR1、B细胞成熟抗原(BCMA)、tEGFR、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、间皮素、CEA和乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD3、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3或4、erbB二聚体、EGFR vIII、FBP、FCRL5、FCRH5、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、 κ 轻链、Lewis Y、L1-细胞粘附分子(L1-CAM)、黑色素瘤相关抗原(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、黑色素瘤优先表达的抗原(PRAME)、生存素、EGP2、EGP40、TAG72、B7-H6、IL-13受体 α 2(IL-13Ra2)、CA9、GD3、HMW-MAA、CD171、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2NY-ESO-1、PSCA、叶酸受体- α 、CD44v6、CD44v7/8、avb6整合素、8H9、NCAM、VEGF受体、5T4、胎儿AchR、NKG2D配体、CD44v6、双抗原和与通用标签相关联的抗原、癌症-睾丸抗原、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、G蛋白偶联的受体5D(GPCR5D)、瘤胚共同抗原、ROR1、TAG72、VEGF-R2、瘤胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、Her2/neu、雌激素受体、黄体酮受体、肝配蛋白B2、CD123、c-Met、GD-2、O-乙酰化GD2(OGD2)、CE7、肾母细胞瘤1(WT-1)、细胞周期蛋白,细胞周期蛋白A2、CCL-1、CD138、和病原体特异性抗原。

[0703] 49. 实施方案1-48任一项的方法,其中:

[0704] 该抑制剂抑制一种或多种酪氨酸激酶,每种酪氨酸激酶单独地选自下组:布鲁顿氏酪氨酸激酶(Btk)、IL2可诱导的T胞激酶(ITK)、在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶(TEC)、在染色体X上的酪氨酸激酶骨髓激酶(BMX)和T细胞X染色体激酶(TXK;静息淋巴细胞激酶,RLK);和/或

[0705] 该TEC家族激酶包含一种或多种选自下组的TEC家族激酶:布鲁顿氏酪氨酸激酶(Btk)、IL2可诱导的T细胞激酶(ITK)、在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶(TEC)、在染色体X上的酪氨酸激酶骨髓激酶(BMX)和T细胞X染色体激酶(TXK;静息淋巴细胞激酶,RLK);和/或

[0706] 该TEC家族激酶是或包含Btk。

[0707] 50. 实施方案1-49任一项的方法,其中该抑制剂抑制ITK或以小于或小于约1000nM、900nM、800nM、600nM、500nM、400nM、300nM、200nM、100nM或更低的半数最大抑制浓度(IC₅₀)抑制ITK。

[0708] 51. 实施方案1-50任一项的方法,其中:

[0709] 该TEC家族激酶不由该癌症的细胞表达,通常不在或不疑似在衍生该癌症的细胞

中表达,和/或

[0710] 该癌症对该抑制剂不敏感;和/或

[0711] 至少多个该T细胞表达该TEC家族激酶;和/或

[0712] 该TEC家族激酶在T细胞中表达;和/或

[0713] 该TEC家族激酶通常不在T细胞中表达。

[0714] 52.实施方案1-51任一项的方法,其中该抑制剂是小分子、肽、蛋白、抗体或其抗原结合片段、抗体模拟物、适配体或核酸分子。

[0715] 53.实施方案49-52任一项的方法,其中该抑制剂不可逆地降低或消除该酪氨酸激酶的激活、特异性结合该酪氨酸激酶的活性位点中的结合位点,该结合位点包含对应于SEQ ID NO:18中所示的序列中的残基C481的氨基酸残基,和/或降低或消除该酪氨酸激酶的自磷酸化活性。

[0716] 54.实施方案1-53任一项的方法,其中该抑制剂是依鲁替尼。

[0717] 55.实施方案1-54任一项的方法,其中该抑制剂与该包含该T细胞的组合物同时施用或在开始施用该包含该T细胞的组合物后施用。

[0718] 56.实施方案1-55任一项的方法,其中该抑制剂在开始施用该T细胞后施用。

[0719] 57.实施方案55或实施方案56的方法,其中该抑制剂在开始施用该T细胞的1小时、2小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时或1周内,或约1小时、2小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时或1周内施用。

[0720] 58.实施方案55-57任一项的方法,其中该抑制剂在下列时间施用:

[0721] 相较于在开始施用该T细胞后的在前时间点时的受试者中的细胞数量,在来自该受试者的血液中可检测的T细胞疗法的细胞的数目降低;

[0722] 在血液中可检测的T细胞疗法的细胞的数目少于或少于约在开始施用所述T细胞后的受试者的血液中可检测的T细胞疗法的细胞的峰值或最大数目的1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、50倍或100倍或更低;和/或

[0723] 在该受试者的血液中可检测到该T细胞疗法的细胞的峰值或最大水平后的某时,在来自该受试者的血液中可检测的该T细胞的或衍生自该T细胞的细胞数目少于该受试者的血液中的总外周血单核细胞(PBMC)的10%以下、5%以下、1%以下或0.1%以下。

[0724] 59.实施方案58的方法,其中该增加或降低是增加或降低了大于或大于约1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍或更多。

[0725] 60.实施方案1-59任一项的方法,其中在开始施用该T细胞后,该抑制剂施用持续最多达2天、最多达7天、最多达14天、最多达21天、最多达30天或一个月、最多达60天或两个月、最多达90天或三个月、最多达6个月或最多达1年的一段时间。

[0726] 61.实施方案1-60任一项的方法,其中在开始施用该T细胞后,该抑制剂施用最多达3个月或最多达90天。

[0727] 62.实施方案1-61任一项的方法,其中从至少在开始施用该T细胞后起,该抑制剂的施用是连续的,直至:

[0728] 相较于正好在施用该抑制剂之前的在前时间点的受试者中的细胞数目或相较于施用该T细胞疗法后的在前时间点,在来自该受试者的血液中可检测的施用的T细胞的或衍生自施用的T细胞的细胞数目是增加的;

[0729] 在血液中可检测的该T细胞的或衍生自该T细胞的细胞数目在2.0倍(更大或更少)的在开始施用该T细胞后的受试者的血液中观察到的峰值或最大数目内;

[0730] 在来自该受试者的血液中可检测的该T细胞的细胞数目大于或大于约10%、15%、20%、30%、40%、50%或60%的该受试者的血液中的总外周血单核细胞(PBMC);和/或

[0731] 相较于紧接施用该T细胞之前时或紧接施用该抑制剂之前时的肿瘤负荷,该受试者表现出肿瘤负荷的减少;和/或

[0732] 该受试者表现出完全缓解或临床缓解。

[0733] 63.实施方案1-62任一项的方法,其中该抑制剂口服、皮下或静脉内施用。

[0734] 64.实施方案63的方法,其中该抑制剂口服施用。

[0735] 65.实施方案1-64任一项的方法,其中该抑制剂每日六次、每日五次、每日四次、每日三次、每日两次、每日一次、每隔一日、一周三次或一周至少一次地施用。

[0736] 66.实施方案65的方法,其中该抑制剂每日一次或一天两次地施用。

[0737] 67.实施方案1-66任一项的方法,其中该抑制剂以至少或至少约50mg/天、100mg/天、150mg/天、175mg/天、200mg/天、250mg/天、280mg/天、300mg/天、350mg/天、400mg/天、420mg/天、450mg/天、500mg/天、600mg/天、700mg/天、800mg/天或更多的总每日剂量施用。

[0738] 68.实施方案67的方法,其中该抑制剂以至少或至少约或约或420mg/天的总每日剂量施用。

[0739] 69.实施方案1-67任一项的方法,其中该抑制剂以少于或约少于或约或420mg每天的量,任选地以至少或至少约280mg/天的量施用。

[0740] 70.实施方案1-69任一项的方法,其中该T细胞疗法包含为CD4+或CD8+的T细胞。

[0741] 71.实施方案1-70任一项的方法,其中该T细胞疗法包含对于该受试者是自体的细胞。

[0742] 72.实施方案1-71任一项的方法,其中该T细胞疗法包含对于该受试者是同种异体的T细胞。

[0743] 73.实施方案1-72任一项的方法,其中该T细胞疗法包括施用包含一定数目的细胞的剂量,该细胞数目介于或介于约 5×10^5 个细胞/kg该受试者的体重和 1×10^7 个细胞/kg之间、 0.5×10^6 个细胞/kg和 5×10^6 个细胞/kg之间、介于或介于约 0.5×10^6 个细胞/kg和 3×10^6 个细胞/kg之间、介于或介于约 0.5×10^6 个细胞/kg和 2×10^6 个细胞/kg之间、介于或介于约 0.5×10^6 个细胞/kg和 1×10^6 个细胞/kg之间、介于或介于约 1.0×10^6 个细胞/kg该受试者的体重和 5×10^6 个细胞/kg之间、介于或介于约 1.0×10^6 个细胞/kg和 3×10^6 个细胞/kg之间、介于或介于约 1.0×10^6 个细胞/kg和 2×10^6 个细胞/kg之间、介于或介于约 2.0×10^6 个细胞/kg该受试者的体重和 5×10^6 个细胞/kg之间、介于或介于约 2.0×10^6 个细胞/kg和 3×10^6 个细胞/kg之间,或者介于或介于约 3.0×10^6 个细胞/kg该受试者的体重和 5×10^6 个细胞/kg之间,每个数值包括在内。

[0744] 74.实施方案1-72任一项的方法,其中该T细胞疗法包括施用一定剂量的细胞,该剂量包含少于或少于约或约或 1×10^8 个总表达重组受体的细胞,任选CAR+细胞,总T细胞或总外周血单核细胞(PBMC),诸如少于或约少于或约或 5×10^7 、少于或少于约或约或 2.5×10^7 、少于或少于约或约或 1.0×10^7 、少于或少于约或约或 5.0×10^6 、少于或少于约或约或 1.0×10^6 、少于或少于约或约或 5.0×10^5 、或者少于或少于约或约或 1×10^5 个总表达重组受

体的细胞,任选CAR+细胞、总T细胞、或总外周血单核细胞(PBMC)。

[0745] 75.实施方案1-72和74任一项的方法,其中该T细胞疗法包括施用一定剂量的细胞,该剂量包含 1×10^5 至 1×10^8 个总表达重组受体的细胞,此数值包括在内,任选CAR+细胞、总T细胞、或总外周血单核细胞(PBMC),诸如 1×10^5 至 5×10^7 、 1×10^5 至 2.5×10^7 、 1×10^5 至 1.0×10^7 、 1×10^5 至 5.0×10^6 、 1×10^5 至 1.0×10^6 、 1.0×10^5 至 5.0×10^5 、 5.0×10^5 至 5×10^7 、 5×10^5 至 2.5×10^7 、 5×10^5 至 1.0×10^7 、 5×10^5 至 5.0×10^6 、 5×10^5 至 1.0×10^6 、 1.0×10^6 至 5×10^7 、 1×10^6 至 2.5×10^7 、 1×10^6 至 1.0×10^7 、 1×10^6 至 5.0×10^6 、 5.0×10^6 至 5×10^7 、 5×10^6 至 2.5×10^7 、 5×10^6 至 1.0×10^7 、 1.0×10^7 至 5×10^7 、 1×10^7 至 2.5×10^7 或 2.5×10^7 至 5×10^7 个总表达重组受体的细胞,每个数值包括在内,任选CAR+细胞、总T细胞、或总外周血单核细胞(PBMC)。

[0746] 76.实施方案1-75任一项的方法,其中该细胞的剂量包含明确比例的表达重组受体的CD4⁺细胞与表达重组受体的CD8⁺细胞和/或明确比例的CD4⁺细胞与CD8⁺细胞,该比例任选地为大约1:1或介于大约1:3和大约3:1之间。

[0747] 77.实施方案1-76任一项的方法,其中施用的细胞的剂量少于其中在不施用该抑制剂的情况下施用该T细胞疗法的方法中的剂量。

[0748] 78.实施方案77的方法,其中该剂量至少1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍或10倍。

[0749] 79.实施方案1-78任一项的方法,其中该T细胞以单剂量施用,该单剂量任选是包含该细胞的单个药物组合物。

[0750] 80.实施方案1-79任一项的方法,其中该T细胞作为分剂量施用,其中在不多于三天的时间内单剂量的细胞以多个组合物施用,该多个组合物共同包含该剂量的该细胞,和/或该方法进一步包括施用一个或多个额外剂量的该T细胞。

[0751] 81.实施方案1-80任一项的方法,其中该方法进一步包括在施用该T细胞之前施用淋巴细胞清除性化学疗法,和/或其中在施用该T细胞之前,该受试者已经接受淋巴细胞清除性化学疗法。

[0752] 82.实施方案81的方法,其中该淋巴细胞清除性化学疗法包括向该受试者施用氟达拉滨和/或环磷酰胺。

[0753] 83.实施方案82的方法,其中该淋巴细胞清除性疗法包括以约200-400mg/m²任选地以或约300mg/m²施用环磷酰胺,该数值包括在内,和/或以约20-40mg/m²任选地以30mg/m²施用氟达拉滨,每种每日施用,持续2-4天,任选地持续3天。

[0754] 84.实施方案82或实施方案83的方法,其中该淋巴细胞清除性疗法包括以或约300mg/m²施用环磷酰胺和以约30mg/m²施用氟达拉滨,每种每日施用,持续3天。

[0755] 85.实施方案1-84任一项的方法,该方法进一步包括:

[0756] 向该受试者施用免疫调节剂,其中该细胞的施用和该免疫调节剂的施用同时地、分开地或以单个组合物、或依次地以任一顺序地进行。

[0757] 86.实施方案85的方法,其中该免疫调节剂能够抑制或阻断分子的功能,或涉及该分子的信号传导途径,其中该分子是免疫抑制性分子和/或其中该分子是免疫检查点分子。

[0758] 87.实施方案86的方法,其中该免疫检查点分子或途径选自:PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、LAG-3、TIM3、VISTA、腺苷2A受体(A2AR)或腺苷,或涉及任何前述的途径。

[0759] 88.实施方案85-87任一项的方法,其中该免疫调节剂是或包含抗体,其任选是抗

体片段、单链抗体、多特异性抗体或免疫缀合物。

[0760] 89. 实施方案88的方法, 其中:

[0761] 该抗体特异性结合该免疫检查点分子或其配体或受体; 和/或

[0762] 该抗体能够阻断或削弱该免疫检查点分子和其配体或受体之间的相互作用。

[0763] 90. 实施方案1-89任一项的方法, 其中相较于在不存在该抑制剂的情况下将该T细胞疗法施用至该受试者的方法, 该T细胞疗法在该受试者中表现出增强的或延长的扩增和/或持久性。

[0764] 91. 实施方案1-89任一项的方法, 其中相较于在不存在该抑制剂的情况下将该T细胞疗法施用至该受试者的可比较的方法中观察到的降低, 该方法在更大程度上和/或持续更长时期降低肿瘤负荷。

[0765] 92. 一种组合, 其包含:

[0766] 表达重组受体的基因工程化T细胞, 该重组受体结合除B细胞抗原之外的或除选自由CD19、CD20、CD22和ROR1组成的组的B细胞抗原之外的抗原, 和

[0767] TEC家族激酶的抑制剂。

[0768] 93. 实施方案92的组合, 其中该抗原选自下列之中: Her2、L1-CAM、间皮素、CEA、乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3或4、erbB二聚体、EGFR vIII、FBP、FCRL5、FCRH5、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、Lewis Y、L1-细胞粘附分子(L1-CAM)、黑色素瘤相关抗原(MAGEMAGE-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、黑色素瘤优先表达的抗原(PRAME)、生存素、EGP2、EGP40、TAG72、B7-H6、IL-13受体 α 2(IL-13Ra2)、CA9、GD3、HMW-MAA、CD171、G250/CAIX、HLA-AI、MAGEA1、HLA-A2NY-ESO-1、PSCA、叶酸受体- α 、CD44v6、CD44v7/8、avb6整合素、8H9、NCAM、VEGF受体、5T4、胎儿AChR、NKG2D配体、CD44v6、双抗原和与通用标签相关联的抗原、癌症-睾丸抗原、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、瘤胚共同抗原、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、雌激素受体、黄体酮受体、肝配蛋白B2、CD123、c-Met、GD-20-乙酰化GD2(OGD2)、CE7、肾母细胞瘤1(WT-1)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、CCL-1、CD138, 和病原体特异性抗原。

[0769] 94. 实施方案92或实施方案93的组合, 其中该抗原是病原体特异性抗原, 该病原体特异性抗原病毒抗原、细菌抗原或寄生虫抗原。

[0770] 95. 实施方案92-94任一项的组合, 其中该重组受体是转基因T细胞受体(TCR)或功能性非T细胞受体。

[0771] 96. 实施方案92-95任一项的组合, 其中该重组受体是嵌合受体, 其任选是嵌合抗原受体(CAR)。

[0772] 97. 实施方案92-96任一项的组合, 其中该重组受体包含特异性结合该抗原的细胞外抗原识别结构域和包含ITAM的细胞内信号传导结构域。

[0773] 98. 实施方案97任一项的组合, 其中该细胞内信号传导结构域包含CD3- ζ (CD3 ζ)链的细胞内结构域。

[0774] 99. 实施方案97或实施方案98的组合, 其中该重组受体还包含共刺激信号传导区。

[0775] 100. 实施方案99的组合, 其中该共刺激信号传导区包含CD28或4-1BB的信号传导结构域。

- [0776] 101. 实施方案99或实施方案100的组合, 其中该共刺激结构域是CD28的结构域。
- [0777] 102. 实施方案79-88任一项的组合, 其中:
- [0778] 该抑制剂抑制一种或多种酪氨酸激酶, 每种酪氨酸激酶单独地选自下组: 布鲁顿氏酪氨酸激酶 (Btk)、IL2可诱导的T细胞激酶 (ITK)、在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶 (TEC)、在染色体X上的酪氨酸激酶骨髓激酶 (BMX) 和T细胞X染色体激酶 (TXK; 静息淋巴细胞激酶, RLK); 和/或
- [0779] 该TEC家族激酶包含一种或多种TEC家族激酶, 该TEC家族激酶选自下组: 布鲁顿氏酪氨酸激酶 (Btk)、IL2可诱导的T细胞激酶 (ITK)、在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶 (TEC)、在染色体X上的酪氨酸激酶骨髓激酶 (BMX) 和T细胞X染色体激酶 (TXK; 静息淋巴细胞激酶, RLK); 和/或
- [0780] 该TEC家族激酶是或包含Btk。
- [0781] 103. 实施方案92-102任一项的组合, 其中:
- [0782] 该TEC家族激酶不由该癌症的细胞表达, 通常不在或不疑似在衍生该癌症的细胞中表达, 和/或
- [0783] 该癌症对该抑制剂不敏感; 和/或
- [0784] 至少多个该T细胞表达该TEC家族激酶; 和/或
- [0785] 该TEC家族激酶在T细胞中表达; 和/或
- [0786] 该TEC家族激酶通常不在T细胞中表达。
- [0787] 104. 实施方案92-103任一项的组合, 其中该抑制剂是小分子、肽、蛋白、抗体或其抗原结合片段、抗体模拟物、适配体或核酸分子。
- [0788] 105. 实施方案92-104任一项的组合, 其中该抑制剂不可逆地降低或消除该酪氨酸激酶的激活, 特异性结合该酪氨酸激酶的活性位点中的结合位点, 该结合位点包含对应于SEQ ID NO:18中所示的序列中的残基C481, 和/或降低或消除该酪氨酸激酶的自磷酸化活性。
- [0789] 106. 实施方案92-105任一项的组合, 其中该抑制剂是依鲁替尼。
- [0790] 107. 实施方案92-106任一项的组合, 该组合配制成同一组合物。
- [0791] 108. 实施方案92-107任一项的组合, 该组合配制成分开的组合物。
- [0792] 109. 一种试剂盒, 其包含实施方案92-108任一项的组合和用于向该受试者施用该基因工程化细胞和该TEC家族激酶的抑制剂用于治疗癌症的说明书。
- [0793] 110. 一种试剂盒, 其包含:
- [0794] 组合物, 该组合物包含治疗有效量的表达重组受体的基因工程化T细胞, 该重组受体结合除B细胞抗原之外的或除选自由CD19、CD20、CD22和ROR1组成的组的B细胞抗原之外的抗原; 和
- [0795] 用于向受试者施用在与TEC家族激酶抑制剂组合疗法中的该基因工程化细胞用于治疗癌症的说明书。
- [0796] 111. 一种试剂盒, 其包含:
- [0797] 组合物, 该组合物包含治疗有效量的TEC家族激酶的抑制剂; 和
- [0798] 用于向受试者施用在与TEC家族激酶抑制剂组合疗法中的该基因工程化细胞用于治疗癌症的说明书, 该T细胞表达重组受体, 该重组受体结合除B细胞抗原之外的或除选自

由CD19、CD20、CD22和ROR1组成的组的B细胞抗原之外的抗原。

[0799] 112. 实施方案109-111任一项的试剂盒, 其中该癌症不是表达B细胞抗原的癌症, 是非血液癌症, 不是B细胞恶性肿瘤, 不是B细胞白血病, 或是实体肿瘤。

[0800] 113. 实施方案109-112任一项的试剂盒, 其中该癌症是肉瘤、癌、淋巴瘤、白血病或骨髓瘤, 任选地, 其中该癌症是非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL)、CLL、SLL、ALL或AML。

[0801] 114. 实施方案109-113任一项的试剂盒, 其中该癌症是胰腺癌、膀胱癌、结直肠癌, 乳腺癌、前列腺癌、肾癌、肝细胞癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、胰腺癌、直肠癌、甲状腺癌、子宫癌、胃癌、食管癌、头颈癌、黑色素瘤、神经内分泌癌、CNS癌、脑肿瘤、骨癌或软组织肉瘤。

[0802] 115. 实施方案109-114任一项的试剂盒, 其中该说明书规定该施用是针对受试者, 其中:

[0803] (i) 该受试者和/或该癌症 (a) 对布鲁顿氏酪氨酸激酶 (BTK) 的抑制有抗性和/或 (b) 包含对通过该抑制剂的抑制有抗性的细胞群;

[0804] (ii) 该受试者和/或该癌症包含编码BTK的核酸中的突变, 任选地, 其中该突变能够降低或阻止通过该抑制剂和/或通过依鲁替尼的BTK的抑制, 任选地, 其中该突变是C481S;

[0805] (iii) 该受试者和/或该癌症包含编码磷脂酶C γ 2 (PLC γ 2) 的核酸中的突变, 任选地, 其中该突变导致组成性信号传导活性, 任选地, 其中该突变是R665W或L845F;

[0806] (iv) 在开始施用该包含T细胞的组合物和开始施用该TEC家族激酶的抑制剂时, 该受试者已经在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗后缓解后复发, 或已经认为该受试者对用该抑制剂和/或对于用BTK抑制剂疗法的既往治疗是难治的;

[0807] (v) 在开始施用该包含T细胞的组合物和开始施用该TEC家族激酶的抑制剂时, 该受试者已经在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗后续进展, 任选地, 其中该受试者表现出进行性疾病, 作为对该既往治疗的最佳应答或对该既往治疗的既往应答后的进展; 和/或

[0808] (vi) 在开始施用该TEC家族激酶的抑制剂和开始施用该包含T细胞的组合物时, 该受试者在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗持续至少6个月后表现出低于完全应答 (CR) 的应答。

[0809] 116. 一种试剂盒, 其包含:

[0810] 组合物, 该组合物包含治疗有效量的TEC家族激酶的抑制剂; 和

[0811] 用于向受试者施用在与基因工程化T细胞组合疗法中的该TEC家族激酶的抑制剂用于治疗癌症的说明书, 该基因工程化T细胞特异性识别或特异性结合与该癌症相关的、或在该癌症的细胞上表达或存在的抗原和/或由特异性靶向该癌症且已经或待施用至该受试者的治疗剂包含的标签, 其中该说明书规定:

[0812] (i) 该受试者和/或该癌症 (a) 对布鲁顿氏酪氨酸激酶 (BTK) 有抗性和/或 (b) 包含对通过该抑制剂的抑制有抗性的细胞群;

[0813] (ii) 该受试者和/或该癌症包含编码BTK的核酸中的突变, 任选地, 其中该突变能够降低或阻止通过该抑制剂和/或通过依鲁替尼的BTK的抑制, 任选地, 其中该突变是C481S;

[0814] (iii) 该受试者和/或该癌症包含编码磷脂酶C γ 2 (PLC γ 2) 的核酸中的突变, 任选地, 其中该突变导致组成性信号传导活性, 任选地, 其中该突变是R665W或L845F;

[0815] (iv) 在开始施用该包含T细胞的组合物和开始施用该TEC家族激酶的抑制剂时, 该受试者已经在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗后缓解后复发, 或已经认为该受试者对用该抑制剂和/或对于用BTK抑制剂疗法的既往治疗是难治的;

[0816] (v) 在开始施用该包含T细胞的组合物和开始施用该TEC家族激酶的抑制剂时, 该受试者已经在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗后续展, 任选地, 其中该受试者表现出进行性疾病, 作为对该既往治疗的最佳应答或对该既往治疗的既往应答后的进展; 和/或

[0817] (vi) 在开始施用该TEC家族激酶的抑制剂和开始施用该包含T细胞的组合物时, 该受试者在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗持续至少6个月后表现出低于完全应答 (CR) 的应答。

[0818] 117. 一种试剂盒, 其包含:

[0819] 组合物, 该组合物包含治疗有效量的基因工程化T细胞, 该基因工程化T细胞特异性识别或特异性结合与该癌症相关的、或在该癌症的细胞上表达或存在的抗原和/或由特异性靶向该癌症且已经或待施用至该受试者的治疗剂包含的标签; 和

[0820] 用于向受试者施用在与TEC家族激酶抑制剂组合疗法中的该基因工程化细胞用于治疗癌症的说明书, 其中该说明书规定:

[0821] (i) 该受试者和/或该癌症 (a) 对布鲁顿氏酪氨酸激酶 (BTK) 有抗性和/或 (b) 包含对通过该抑制剂的抑制有抗性的细胞群;

[0822] (ii) 该受试者和/或该癌症包含编码BTK的核酸中的突变, 任选地, 其中该突变能够降低或阻止通过该抑制剂和/或通过依鲁替尼的BTK的抑制, 任选地, 其中该突变是C481S;

[0823] (iii) 该受试者和/或该癌症包含编码磷脂酶C γ 2 (PLC γ 2) 的核酸中的突变, 任选地, 其中该突变导致组成性信号传导活性, 任选地, 其中该突变是R665W或L845F;

[0824] (iv) 在开始施用该包含T细胞的组合物和开始施用该TEC家族激酶的抑制剂时, 该受试者已经在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗后缓解后复发, 或认为该受试者对用该抑制剂和/或对于用BTK抑制剂疗法的既往治疗是难治的;

[0825] (v) 在开始施用该包含T细胞的组合物和开始施用该TEC家族激酶的抑制剂时, 该受试者已经在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗后续展, 任选地, 其中该受试者表现出进行性疾病, 作为对该既往治疗的最佳应答或对该既往治疗的既往应答后的进展; 和/或

[0826] (vi) 在开始施用该TEC家族激酶的抑制剂和开始施用该包含T细胞的组合物时, 该受试者在用该抑制剂和/或用BTK抑制剂疗法的既往治疗持续至少6个月后表现出低于完全应答 (CR) 的应答。

[0827] 118. 实施方案115-117任一项的试剂盒, 其中该细胞群是或包含B细胞群和/或不包含T细胞。

[0828] 119. 实施方案116-118任一项的试剂盒, 其中该癌症是B细胞恶性肿瘤。

[0829] 120. 实施方案119的方法, 其中该B细胞恶性肿瘤是白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。

[0830] 121. 实施方案119或实施方案120的方法, 其中该B细胞恶性肿瘤是急性成淋巴细胞白血病(ALL)、成人ALL、慢性成淋巴细胞白血病(CLL)、小淋巴细胞性白血病(SLL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)或急性髓样白血病(AML)。

[0831] 122. 实施方案119-121任一项的方法, 其中该B细胞恶性肿瘤是CLL或SLL。

[0832] 123. 实施方案116-122任一项的方法, 其中该T细胞识别或靶向选自B细胞成熟抗原(BCMA)、CD19、CD20、CD22和ROR1的抗原。

[0833] 124. 实施方案116-123任一项的方法, 其中该说明书规定该施用是针对具有B细胞恶性肿瘤的受试者, 该B细胞恶性肿瘤是或经鉴定具有:

[0834] (i) 一种或多种细胞遗传异常, 任选至少两种或三种细胞遗传异常, 任选地, 其中至少一种细胞遗传异常是17p缺失;

[0835] (ii) TP53突变; 和/或

[0836] (iii) 未突变的免疫球蛋白重链可变区(IGHV)。

[0837] 125. 实施方案116-124任一项的方法, 其中该说明书规定该施用是针对受试者, 该受试者已经用一种或多种用于治疗B细胞恶性肿瘤的在先疗法治疗失败, 已经在用一种或多种用于治疗B细胞恶性肿瘤的在先疗法治疗后缓解后复发, 或已经变得对一种或多种用于治疗B细胞恶性肿瘤的在先疗法是难治的, 该一种或多种在先疗法任选是除了另一剂量的表达该重组受体的细胞之外的一种、两种或三种在先疗法, 任选地, 其中至少一种在先疗法是用该抑制剂或BTK抑制剂疗法的既往治疗。

[0838] 126. 实施方案116-125任一项的方法, 其中该既往治疗是用依鲁替尼的既往治疗。

[0839] 127. 实施方案115或实施方案118的试剂盒, 其中在编码BTK的核酸中的突变包含在位置C481处的替代, 任选是C481S或C481R, 和/或在位置T474处的替代, 任选是T474I或T474M。

[0840] 128. 实施方案110-127任一项的试剂盒, 其中该抗原选自下列之中: Her2、L1-CAM、间皮素、CEA、乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3或4、erbB二聚体、EGFR vIII、FBP、FCRL5、FCRH5、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、Lewis Y、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、黑色素瘤相关抗原(MAGEMAGE-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、黑色素瘤优先表达的抗原(PRAME)、生存素、EGP2、EGP40、TAG72、B7-H6、IL-13受体 α 2(IL-13Ra2)、CA9、GD3、HMW-MAA、CD171、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2NY-ESO-1、PSCA、叶酸受体- α 、CD44v6、CD44v7/8、avb6整合素、8H9、NCAM、VEGF受体、5T4、胎儿AchR、NKG2D配体、CD44v6、双抗原和与通用标签相关联的抗原、癌症-睾丸抗原、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、G蛋白偶联的受体5D(GPCR5D)、瘤胚共同抗原、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、雌激素受体、黄体酮受体、肝配蛋白B2、CD123、c-Met、GD-20-乙酰化GD2(OGD2)、CE7、肾母细胞瘤1(WT-1)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、CCL-1、CD138和病原体特异性抗原。

[0841] 129. 实施方案110-128任一项的试剂盒, 其中该抗原是病原体特异性抗原, 该病原体特异性抗原病毒抗原、细菌抗原或寄生虫抗原。

[0842] 130. 实施方案110-129任一项的试剂盒, 其中该重组受体是转基因T细胞受体(TCR)或功能性非T细胞受体。

[0843] 131. 实施方案110-130任一项的试剂盒, 其中该重组受体是嵌合受体, 其任选是嵌

合抗原受体 (CAR)。

[0844] 132. 实施方案110-131任一项的试剂盒, 其中该重组受体包含特异性结合该抗原的细胞外抗原识别结构域和包含ITAM的细胞内信号传导结构域。

[0845] 133. 实施方案132的试剂盒, 其中该细胞内信号传导结构域包含CD3- ζ (CD3 ζ) 链的细胞内结构域。

[0846] 134. 实施方案132或实施方案133的试剂盒, 其中该重组受体还包含共刺激信号传导区。

[0847] 135. 实施方案134的试剂盒, 其中该共刺激信号传导区包含CD28或4-1BB的信号传导结构域。

[0848] 136. 实施方案134或实施方案135的试剂盒, 其中该共刺激结构域是CD28的结构域。

[0849] 137. 实施方案110-136任一项的试剂盒, 其中:

[0850] 该抑制剂抑制一种或多种酪氨酸激酶, 每种酪氨酸激酶单独地选自下组: 布鲁顿氏酪氨酸激酶 (Btk)、IL2可诱导的T胞激酶 (ITK)、在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶 (TEC)、在染色体X上的酪氨酸激酶骨髓激酶 (BMX) 和T细胞X染色体激酶 (TXK; 静息淋巴细胞激酶, RLK); 和/或

[0851] 该TEC家族激酶包含一种或多种TEC家族激酶, 该TEC家族激酶选自: 布鲁顿氏酪氨酸激酶 (Btk)、IL2可诱导的T细胞激酶 (ITK)、在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶 (TEC)、在染色体X上的酪氨酸激酶骨髓激酶 (BMX) 和T细胞X染色体激酶 (TXK; 静息淋巴细胞激酶, RLK); 和/或

[0852] 该TEC家族激酶是或包含Btk。

[0853] 138. 实施方案110-137任一项的试剂盒, 其中:

[0854] 该TEC家族激酶不由该癌症的细胞表达, 通常不在或不疑似在衍生该癌症的细胞中表达, 和/或

[0855] 该癌症对该抑制剂不敏感; 和/或

[0856] 至少多个该T细胞表达该TEC家族激酶; 和/或

[0857] 该TEC家族激酶在T细胞中表达; 和/或

[0858] 该TEC家族激酶通常不在T细胞中表达。

[0859] 139. 实施方案110-138任一项的试剂盒, 其中该抑制剂是小分子、肽、蛋白、抗体或其抗原结合片段、抗体模拟物、适配体或核酸分子。

[0860] 140. 实施方案110-139任一项的试剂盒, 其中该抑制剂不可逆地降低或消除该酪氨酸激酶的激活、特异性结合该酪氨酸激酶的活性位点中的结合位点, 该结合位点包含对应于SEQ ID NO:18中所示的序列中的残基C481的氨基酸残基, 和/或降低或消除该酪氨酸激酶的自磷酸化活性。

[0861] 141. 实施方案110-140任一项的试剂盒, 其中该抑制剂是依鲁替尼。

[0862] 142. 实施方案110-141任一项的试剂盒, 其中该说明书规定与该包含T细胞的组合物同时施用或在开始施用该包含T细胞的组合物后施用。

[0863] 143. 实施方案110-142任一项的试剂盒, 其中该说明书规定在开始施用该T细胞后施用该抑制剂。

[0864] 144. 实施方案142或实施方案143的试剂盒, 其中该说明书规定在开始施用该T细胞的1小时、2小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时或1周内, 或约1小时、2小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时或1周内施用该抑制剂。

[0865] 145. 实施方案142-144任一项的试剂盒, 其中该说明书规定在下列时间施用该抑制剂, 其中:

[0866] 相较于在开始施用该T细胞后的在前时间点时的受试者中的细胞数量, 在来自该受试者的血液中可检测的T细胞疗法的细胞的数目降低;

[0867] 在血液中可检测的T细胞疗法的细胞的数目少于或少于约在开始施用所述T细胞后的受试者的血液中可检测的T细胞疗法的细胞的峰值或最大数目的1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、50倍或100倍或更低; 和/或

[0868] 在该受试者的血液中可检测到该T细胞疗法的细胞的峰值或最大水平后的某时, 在来自该受试者的血液中可检测的该T细胞的或衍生自该T细胞的细胞数目少于该受试者的血液中的总外周血单核细胞 (PBMC) 的10%以下、5%以下、1%以下或0.1%以下。

[0869] 146. 实施方案145的试剂盒, 其中该增加或降低是增加或降低了大于或大于约1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍或更多。

[0870] 147. 实施方案109-146任一项的试剂盒, 其中该说明书用于在开始施用该T细胞后, 施用该抑制剂持续最多达2天、最多达7天、最多达14天、最多达21天、最多达一个月或30天、最多达两个月或60天、最多达三个月或90天、最多达6个月或最多达1年的一段时间。

[0871] 148. 实施方案109-147任一项的试剂盒, 其中该说明书规定在开始施用该T细胞后, 施用该抑制剂最多达或持续至少3个月或90天。

[0872] 149. 实施方案109-148任一项的试剂盒, 其中该说明书规定从至少开始施用该T细胞后起, 施用该抑制剂, 直至:

[0873] 相较于正好在施用该抑制剂之前的在前时间点的受试者中的细胞数目或相较于施用该T细胞疗法后的在前时间点, 在来自该受试者的血液中可检测的施用的T细胞的或衍生自施用的T细胞的细胞数目是增加的;

[0874] 在血液中可检测的该T细胞的或衍生自该T细胞的细胞数目在2.0倍 (更大或更少) 的在开始施用该T细胞后的受试者的血液中观察到的峰值或最大数目内;

[0875] 在来自该受试者的血液中可检测的该T细胞的细胞数目大于或大于约10%、15%、20%、30%、40%、50%或60%的该受试者的血液中的总外周血单核细胞 (PBMC); 和/或

[0876] 相较于紧接施用该T细胞之前时或紧接施用该抑制剂之前时的肿瘤负荷, 该受试者表现出肿瘤负荷的减少; 和/或

[0877] 该受试者表现出完全缓解或临床缓解。

[0878] 150. 实施方案109-149任一项的试剂盒, 其中该说明书规定口服、皮下或静脉内施用该抑制剂。

[0879] 151. 实施方案150的试剂盒, 其中该说明书规定口服施用该抑制剂。

[0880] 152. 实施方案109-151任一项的试剂盒, 其中该说明书规定每日六次、每日五次、每日四次、每日三次、每日两次、每日一次、每隔一日、一周三次或一周至少一次地施用该抑制剂。

[0881] 153. 实施方案152的试剂盒, 其中该说明书规定每日一次或一天两次地施用该抑

制剂。

[0882] 154. 实施方案109-153任一项的试剂盒, 其中该说明书规定以至少或至少约50mg/天、100mg/天、150mg/天、175mg/天、200mg/天、250mg/天、280mg/天、300mg/天、350mg/天、400mg/天、420mg/天、450mg/天、500mg/天、600mg/天、700mg/天、800mg/天或更多的总每日剂量施用该抑制剂。

[0883] 155. 实施方案109-153任一项的试剂盒, 其中该说明书规定以至少或约至少或约或420mg/天的每日剂量施用该抑制剂。

[0884] 156. 实施方案109-154任一项的试剂盒, 其中该说明书规定以少于或约少于或约或420mg每天的量, 任选地以至少或至少约或约或280mg每天的量施用该抑制剂。

[0885] 157. 实施方案109-156任一项的试剂盒, 其中该基因工程化T细胞包含是CD4+或CD8+的T细胞。

[0886] 158. 实施方案109-157任一项的试剂盒, 其中该基因工程化T细胞包含对于该受试者是自体的细胞。

[0887] 159. 实施方案109-158任一项的试剂盒, 其中该基因工程化T细胞包含对于该受试者是同种异体的T细胞。

[0888] 160. 实施方案109-159任一项的试剂盒, 其中该说明书规定以包含一定数目的细胞的剂量施用基因工程化T细胞, 该细胞的数目介于或介于约 5×10^5 细胞/kg该受试者的体重和 1×10^7 细胞/kg之间、 0.5×10^6 细胞/kg和 5×10^6 细胞/kg之间、介于或介于约 0.5×10^6 细胞/kg和 3×10^6 细胞/kg之间、介于或介于约 0.5×10^6 细胞/kg和 2×10^6 细胞/kg之间、介于或介于约 0.5×10^6 细胞/kg和 1×10^6 cell/kg、介于或介于约 1.0×10^6 细胞/kg该受试者的体重和 5×10^6 细胞/kg之间、介于或介于约 1.0×10^6 细胞/kg和 3×10^6 细胞/kg之间、介于或介于约 1.0×10^6 细胞/kg和 2×10^6 细胞/kg之间、介于或介于约 2.0×10^6 细胞/kg该受试者的体重和 5×10^6 细胞/kg之间、介于或介于约 2.0×10^6 细胞/kg和 3×10^6 细胞/kg之间、或介于或介于约 3.0×10^6 细胞/kg该受试者的体重和 5×10^6 细胞/kg之间, 包括每个数值。

[0889] 161. 实施方案109-159任一项的试剂盒, 其中该说明书规定施用一定剂量的基因工程化T细胞, 该剂量包含少于或少于约或约或 1×10^8 个总表达重组受体的细胞, 任选CAR+细胞、总T细胞或总外周血单核细胞(PBMC), 诸如少于或约少于或约或 5×10^7 、少于或少于约或约或 2.5×10^7 、少于或少于约或约或 1.0×10^7 、少于或少于约或约或 5.0×10^6 、少于或少于约或约或 1.0×10^6 、少于或少于约或约或 5.0×10^5 、或少于或少于约或约或 1×10^5 个总表达重组受体的细胞, 任选CAR+细胞、总T细胞或总外周血单核细胞(PBMC)。

[0890] 162. 实施方案109-159和161任一项的试剂盒, 其中该说明书规定以一定剂量施用基因工程化T细胞, 该剂量包含 1×10^5 至 1×10^8 个总表达重组受体的细胞, 包括此数值, 任选CAR+细胞、总T细胞或总外周血单核细胞(PBMC), 诸如 1×10^5 至 5×10^7 、 1×10^5 至 2.5×10^7 、 1×10^5 至 1.0×10^7 、 1×10^5 至 5.0×10^6 、 1×10^5 至 1.0×10^6 、 1.0×10^5 至 5.0×10^5 、 5.0×10^5 至 5×10^7 、 5×10^5 至 2.5×10^7 、 5×10^5 至 1.0×10^7 、 5×10^5 至 5.0×10^6 、 5×10^5 至 1.0×10^6 、 1.0×10^6 至 5×10^7 、 1×10^6 至 2.5×10^7 、 1×10^6 至 1.0×10^7 、 1×10^6 至 5.0×10^6 、 5.0×10^6 至 5×10^7 、 5×10^6 至 2.5×10^7 、 5×10^6 至 1.0×10^7 、 1.0×10^7 至 5×10^7 、 1×10^7 至 2.5×10^7 或 2.5×10^7 至 5×10^7 个总表达重组受体的细胞, 包括每个数值, 任选CAR+细胞、总T细胞、或总外周血单核细胞(PBMC)。

[0891] 163. 实施方案109-162任一项的试剂盒, 其中该说明书规定该细胞剂量包含明确比例的表达重组受体的CD4⁺细胞与表达重组受体的CD8⁺细胞和/或明确比例的CD4⁺细胞与CD8⁺细胞, 该比例任选地为大约1:1或介于大约1:3和大约3:1之间。

[0892] 164. 实施方案109-163任一项的试剂盒, 其中该说明书规定施用一定剂量的细胞, 该剂量少于在不施用该抑制剂的情况下施用该T细胞疗法中的剂量。

[0893] 165. 实施方案164的试剂盒, 其中该剂量至少1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍或10倍。

[0894] 166. 实施方案109-165任一项的试剂盒, 其中该说明书规定以单剂量施用该T细胞, 该单剂量任选是包含该细胞的单个药物组合物。

[0895] 167. 实施方案109-166任一项的试剂盒, 其中该说明书规定作为分剂量施用该T细胞, 其中在不多于三天的时间内单剂量的细胞以多个组合物施用, 该多个组合物共同包含该剂量的该细胞, 和/或该说明书进一步规定施用一个或多个额外剂量的该T细胞。

[0896] 168. 实施方案109-167任一项的试剂盒, 其中该说明书进一步规定在施用该T细胞之前施用淋巴细胞清除性化学疗法, 和/或其中规定该施用是针对在施用该T细胞之前已经接受淋巴细胞清除性化学疗法的受试者。

[0897] 169. 实施方案168的试剂盒, 其中该淋巴细胞清除性化学疗法包括向该受试者施用氟达拉滨和/或环磷酰胺。

[0898] 170. 实施方案168或实施方案169的试剂盒, 其中该淋巴细胞清除性疗法包括以约200-400mg/m²任选地以或约300mg/m²施用环磷酰胺, 包括该数值, 和/或以约20-40mg/m²任选地以30mg/m²施用氟达拉滨, 每种每日施用, 持续2-4天, 任选地持续3天。

[0899] 171. 实施方案168-170任一项的试剂盒, 其中该淋巴细胞清除性疗法包括以或以约300mg/m²施用环磷酰胺和以约30mg/m²施用氟达拉滨, 每种每日施用, 持续3天。

[0900] 172. 实施方案109-171任一项的试剂盒, 其中该说明书进一步规定向该受试者施用免疫调节剂, 其中该细胞的施用和该免疫调节剂的施用同时地、分开地或以单个组合物、或依次地以任一顺序地进行。

[0901] 173. 实施方案172的试剂盒, 其中该免疫调节剂能够抑制或阻断分子的功能, 或涉及该分子的信号传导途径, 其中该分子是免疫抑制性分子和/或其中该分子是免疫检查点分子。

[0902] 174. 实施方案173的试剂盒, 其中该免疫检查点分子或途径选自下组: PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、LAG-3、TIM3、VISTA、腺苷2A受体(A2AR)、或腺苷, 或涉及任何前述的途径。

[0903] 175. 实施方案172-174任一项的试剂盒, 其中该免疫调节剂是或包含抗体, 该抗体任选是抗体片段、单链抗体、多特异性抗体或免疫缀合物。

[0904] 176. 实施方案175的试剂盒, 其中:

[0905] 该抗体特异性结合该免疫检查点分子或其配体或受体; 和/或

[0906] 该抗体能够阻断或削弱该免疫检查点分子和其配体或受体之间的相互作用。

[0907] 177. 实施方案176的试剂盒, 其中该组合物经配制用于单剂量施用。

[0908] 178. 实施方案176的试剂盒, 其中该组合物经配制用于多剂量施用。

[0909] 179. 一种工程化表达重组受体的免疫细胞的方法, 该方法包括:

[0910] 使包含T细胞的细胞群与TEC家族激酶的抑制剂接触; 和

- [0911] 在使得该重组受体表达的条件下将编码重组受体的核酸引入至该T细胞群。
- [0912] 180. 实施方案179的方法, 其中该重组受体结合配体, 该配体任选是抗原或通用标签。
- [0913] 181. 实施方案179或实施方案180的方法, 其中该重组受体是T细胞受体 (TCR) 或嵌合抗原受体 (CAR)。
- [0914] 182. 实施方案179-181任一项的方法, 其中该细胞群是或包含外周血单核细胞。
- [0915] 183. 实施方案179-182任一项的方法, 其中该细胞群是或包含T细胞。
- [0916] 184. 实施方案183的方法, 其中该T细胞是CD4⁺和/或CD8⁺。
- [0917] 185. 实施方案179-184任一项的方法, 其中该细胞群从受试者任选人受试者中分离。
- [0918] 186. 实施方案179-185任一项的方法, 其中该接触在该引入之前或期间发生。
- [0919] 187. 一种产生基因工程化T细胞的方法, 其包括将编码重组受体的核酸分子引入至原代T细胞, 其中该T细胞来自已经施用TEC家族激酶的抑制剂的受试者中。
- [0920] 188. 实施方案187的方法, 其中该受试者已经在引入该核酸分子之前不多于30天、20天、10天、9天、8天、7天、6天、5天、4天、3天、2天、或1天施用该抑制剂。
- [0921] 189. 实施方案187或实施方案188的方法, 其中:
- [0922] 该抑制剂抑制一种或多种酪氨酸激酶, 每种酪氨酸激酶单独地选自下组: 布鲁顿氏酪氨酸激酶 (Btk)、IL2可诱导的T细胞激酶 (ITK)、在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶 (TEC)、在染色体X上的酪氨酸激酶骨髓激酶 (BMX) 和T细胞X染色体激酶 (TXK; 静息淋巴细胞激酶, RLK); 和/或
- [0923] 该TEC家族激酶包含一种或多种选自下组的TEC家族激酶: 布鲁顿氏酪氨酸激酶 (Btk)、IL2可诱导的T细胞激酶 (ITK)、在肝细胞癌中表达的酪氨酸激酶 (TEC)、在染色体X上的酪氨酸激酶骨髓激酶 (BMX) 和T细胞X染色体激酶 (TXK; 静息淋巴细胞激酶, RLK); 和/或
- [0924] 该TEC家族激酶是或包含Btk。
- [0925] 190. 实施方案187-189任一项的方法, 其中:
- [0926] 该TEC家族激酶不由该癌症的细胞表达, 不在或不疑似在衍生该癌症的细胞中表达, 和/或
- [0927] 该癌症对该抑制剂不敏感; 和/或
- [0928] 至少多个该T细胞表达该TEC家族激酶; 和/或
- [0929] 该TEC家族激酶在T细胞中表达; 和/或
- [0930] 该TEC家族激酶通常不在T细胞中表达。
- [0931] 191. 实施方案187-190任一项的方法, 其中该抑制剂是小分子、肽、蛋白、抗体或其抗原结合片段、抗体模拟物、适配体或核酸分子。
- [0932] 192. 实施方案187-191任一项的方法, 其中该抑制剂不可逆地降低或消除该酪氨酸激酶的激活、特异性结合该酪氨酸激酶的活性位点中的结合位点, 该结合位点包含对应于SEQ ID NO:18中所示的序列中的残基C481的氨基酸残基, 和/或降低或消除该酪氨酸激酶的自磷酸化活性。
- [0933] 193. 实施方案187-192任一项的方法, 其中该抑制剂是依鲁替尼。
- [0934] 194. 实施方案187-193任一项的方法, 其中该抑制剂口服、皮下或静脉内施用。

- [0935] 195. 实施方案194的方法, 其中该抑制剂口服施用。
- [0936] 196. 实施方案187-195任一项的方法, 其中该抑制剂每日六次、每日五次、每日四次、每日三次、每日两次、每日一次、每隔一日、一周三次或一周至少一次地施用。
- [0937] 197. 实施方案196的方法, 其中该抑制剂每日一次或每天两次地施用。
- [0938] 198. 实施方案187-197任一项的方法, 其中该抑制剂以至少或至少约50mg/天、100mg/天、150mg/天、175mg/天、200mg/天、250mg/天、300mg/天、350mg/天、400mg/天、450mg/天、500mg/天、600mg/天、700mg/天、800mg/天或更多的总每日剂量施用。
- [0939] 199. 实施方案187-198任一项的方法, 其中该抑制剂以少于或约少于或约或420mg每天的量施用。
- [0940] 200. 实施方案187-199任一项的方法, 其中该T细胞包含CD4+或CD8+细胞。

实施例

- [0941] 仅用于示例性说明目的包括下列实施例, 并不旨在限制本发明的范围。
- [0942] 实施例1: 在依鲁替尼的存在下表达CAR的T细胞表型和功能的评估
- [0943] 在体外研究中评估在Btk抑制剂(依鲁替尼)的存在下表达CAR的细胞的性能。
- [0944] 为了生成表达CAR的T细胞, 从三个健康人供体受试者中通过基于免疫亲和的富集分离T细胞, 且来自每个供体的细胞被激活并用编码抗CD19CAR的病毒载体转导。该CAR含有抗CD19scFv、Ig衍生的间隔区、人CD28衍生的跨膜结构域、人4-1BB衍生的细胞内信号传导结构域和人CD3 ζ 衍生的信号传导结构域。编码该CAR的核酸构建体还包括用作转导标记物的截短的EGFR (tEGFR) 序列, 其通过自切割的T2A序列与该CAR序列分开。
- [0945] 对于每个供体单独地将表达CAR的CD4+和CD8+细胞以1:1混合, 且在各种条件下体外评估每个供体的合并细胞。
- [0946] A. 溶细胞活性
- [0947] 如上所述生成的CAR T细胞以一式三份铺板在聚D-赖氨酸平板上, 然后与抗依鲁替尼的表达CD19的靶细胞(经转导表达CD19的K562细胞, K562-CD19)以2.5:1的效应物与靶标(E:T)比例共培养。该靶细胞用NucLightRed (NLR) 标记, 以允许通过显微术追踪靶细胞。依鲁替尼以5000、500、50、5和0.5nM(反映覆盖观察到为超生理(500nM)的剂量和C_{max}(227nM)的剂量范围)的浓度添加至该培养物。在存在靶细胞和不存在依鲁替尼的情况下孵育的CAR-T细胞用作“未处理的”对照。如通过红色荧光信号(使用IncuCyte®活细胞分析系统, Essen Bioscience)测定的, 通过在四天的时间内测量有活力的靶细胞的损失来评估溶细胞活性。通过测量归一化的靶细胞计数随时间的曲线下面积(AUC)并通过定义0%值(仅靶细胞)和100%值(CAR+T细胞与靶细胞在媒介物对照中共培养)来归一化AUC的倒数(1/AUC)值来评估靶杀伤的百分比(%)。
- [0948] 如通过显微术显示的, 在靶细胞生长的初始时期, 观察到来自所有供体的抗CD19CAR T细胞在4天的时期内减少了靶细胞数目, 因此证明在测定中有效杀伤(图1A)。在细胞毒性测定的起始和结束时与CAR T细胞共培养的靶细胞的代表性图像在图1B中显示。如图1C中显示的, 使用曲线下面积(AUC)计算通过依鲁替尼处理的相对于未处理的对照的CAR-T细胞杀伤靶细胞的归一化显示在针对两个供体的测定中, 依鲁替尼(即使当浓度增加至超生理水平(500nM)时)未显著影响抗CD19表达CAR的T细胞的溶细胞活性。依鲁替尼的添

加(在共培养期间在所有测试浓度下)不抑制该抗CD19CAR T细胞的溶细胞功能。然而,在用依鲁替尼处理的一个供体中观察到稍微增加的靶细胞杀伤($P<0.0001$) (图1C)。

[0949] B. CAR-T细胞表面标记物的表达。

[0950] 为了评估在依鲁替尼的存在下培养的抗CD19CAR T细胞的多种表型标记物,在CAR⁺、CD4⁺和CD8⁺细胞(来自三个供体)上的一组激活标记物在用经照射的表达CD19的K562靶细胞刺激后在4天内追踪。如上述生成的CAR-T细胞以100,000个细胞/孔铺板在96孔聚-D-赖氨酸包被的平板上。以2.5:1的效应物与靶标比例添加经照射的K562-CD19靶细胞。在培养期间,在不存在依鲁替尼的情况下或在存在浓度为5000、500、50、5和0.5nM的依鲁替尼的情况下,培养细胞持续多达4天。在1、2、3和4天时收集细胞,且通过流式细胞术分析该细胞的T细胞激活和分化表面标记物CD69、CD107a、PD-1、CD25、CD38、CD39、CD95、CD62L、CCR7、CD45RO和截短的EGFR (CAR转导的细胞的替代标记物)。

[0951] 在3个不同的抗CD19CAR T细胞供体中,浓度为5000、500、50、5和0.5nM的依鲁替尼对截短的EGFR替代标记物的表达,对任何激活标记物CD25、CD38、CD39、CD95和CD62L,或对本研究中评估的任何T细胞表型标记物 (CCR7、CD62L和CD45RO) 均没有显著影响,这与在此测定中依鲁替尼不显著地影响T细胞的激活状态和/或分化/亚型的结论一致。图2A描述了对示例性标记物的结果。图2B中的结果显示如通过CCR7和CD45RA的表达评估的,用依鲁替尼处理不影响作为中枢(TCM) 或效应(TEM) 记忆性亚组细胞的表型。如图2C和图2D中显示的,当在依鲁替尼的存在下分别培养CD4⁺或CD8⁺细胞时,CD69、CD107a或PD-1的表达水平有略微降低。在所测试的抑制剂的最高(超生理) 浓度下观察到表达此类标记物的抗CD19CAR T细胞百分比的略微降低。

[0952] C. 细胞因子产生

[0953] 通过评估CAR-T细胞和经照射的K562-CD19靶细胞的共培养物的上清液中的细胞因子水平,来评估在存在或不存在依鲁替尼的情况下培养的抗CD19CAR T细胞的细胞因子的产生。如上所述生成的CAR-T细胞以100,000个细胞/孔铺板在96孔Poly-D-赖氨酸包被的平板上,其中向该平板以2.5:1的效应物与靶标比例添加经照射的靶细胞(K562-CD19)。在不存在依鲁替尼的情况下或存在0.5、5、50或500nM依鲁替尼的情况下,培养细胞持续多达4天,持续多达4天的培养期。在1、2、3和4天时每24小时收集培养物上清液,且使用Meso Scale Discovery (MSD) 的细胞因子试剂盒从培养物上清液中测量IFN γ 、IL-2、TNF α 、IL-4和IL-10。

[0954] 图3A描绘了从供体2产生的CAR-T细胞在4天内细胞因子产生的动力学的代表性图。图3B描绘了在2个独立实验中刺激2天后细胞因子产生的绝对变化。如图3A和图3B中显示的,生理浓度的依鲁替尼未显著降低细胞因子浓度。在对50nM依鲁替尼的反应中,观察到IFN- γ 和IL-2的一些增加。50nM的依鲁替尼稍微增加了一些供体中的细胞因子产生,且在500nM依鲁替尼的情况中观察到IL-2平均下降19.6%或1200pg/mL ($P<0.05$) (图3B)。

[0955] D. 连续再刺激

[0956] 在一些方面中,细胞在重复刺激后离体扩增的能力可以指示CAR-T细胞持续存在的能力(例如,在初始激活后) 和/或指示体内功能和/或适应性(Zhao等人(2015) Cancer Cell, 28:415-28)。如上所述生成的抗CD19CAR⁺T细胞一式三份以100,000个细胞/孔铺板在96孔Poly-D-赖氨酸包被的平板上,且以2.5:1的效应物与靶标比例添加经照射的靶细胞

(K562-CD19)。将细胞在500nM和50nM依鲁替尼的存在下刺激,每3-4天收集,计数,且在每轮将细胞数重置为初始接种密度后,使用相同的培养条件和添加的浓度的依鲁替尼培养,以用新靶细胞再刺激。在25天培养期间内进行总共7轮刺激。

[0957] 对于每轮刺激,测定细胞数目的倍数变化(图4A)和加倍数目(图4B)。如图4A和4B中显示的,如在细胞数量的倍数变化或群体加倍的数目中所观察到的,依鲁替尼的存在不影响(例如不抑制)抗CD19CAR T细胞的初始生长。如图4B显示的,通过刺激18天,在多轮再刺激后,然而,观察到在所评估的两种浓度处的依鲁替尼都导致抗CD19CAR T细胞的增加的细胞数目和群体加倍,所述抗CD19CAR T细胞是通过工程化衍生自评估的三个供体中的两个的T细胞产生的。相较于衍生自其他供体的细胞,衍生自这两个供体的细胞在不存在依鲁替尼的情况下在连续再刺激测定中表现较差。图4C总结了对于三个供体在依鲁替尼存在下刺激后第4天(1轮再刺激)和第18天(5轮再刺激)的培养物中的细胞的数目的结果。如所显示的,观察到18天的连续刺激测定后细胞数量的统计上显著增加。特别是,在五轮刺激后(第18天),以最高浓度的依鲁替尼处理的来自供体2的CAR T细胞相对于对照细胞具有显著($P<0.05$)增加的细胞计数。对于以最高的测试浓度的依鲁替尼处理的供体3,也观察到不显著的增加的细胞计数。在此背景下,增加的细胞计数可以指示优越的增殖能力或存活率且没有区分。当在所有对照条件下评估细胞计数时,衍生自供体2和3的细胞在此测定中表现出比供体1细胞差的性能。而且,与衍生自其他供体的细胞相比,衍生自可观察到差异的两个供体的细胞通常在连续再刺激测定中不存在依鲁替尼的情况下表现较差。显而易见地,这些性能较差的供体在此测定中受益于依鲁替尼的治疗。该结果指示,指示存活或增殖能力或对于存活或增殖能力重要的一种或多种因子受损的T细胞可受益于与TEC家族激酶抑制剂(诸如依鲁替尼)的组合。例如,此类T细胞与激酶抑制剂(诸如依鲁替尼)的组合在抗原相遇后可提高T细胞功能和/或持久性。

[0958] E. TH1表型

[0959] 进行测定,其证明当在依鲁替尼存在下培养时,抗CD19CAR T细胞向TH1表型倾斜。已经观察到依鲁替尼通过抑制ITK限制 T_H2 CD4T细胞激活和增殖(Honda, F., 等人(2012) *Nat Immunol*, 13(4):369-78)。如上所述进行连续再刺激测定,且将细胞在各时间收集并通过流式细胞术分析以评估TH1-表型(评估为 $CD4+CXCR3+CRTH2-$) T细胞或TH2-表型(评估为 $CD4+CXCR3-CRTH2+$)的百分比。分别在有和没有指示浓度的依鲁替尼的情况下培养的细胞的代表性图显示在图5A中,且在连续再刺激过程中和在各种浓度的依鲁替尼下培养后的TH1细胞的百分比分别显示在图5B和图5C中。

[0960] 观察到在此测定中依鲁替尼的存在增加观察到在连续刺激后表现出TH1表型的CAR+T细胞的百分比,且随着依鲁替尼浓度的增加观察到影响更大。在18天连续刺激期间,衍生自三个不同供体中的每一个的细胞中的CAR T TH1细胞的百分比增加(图5B)。500nM依鲁替尼进一步增加TH1细胞的百分比($P<0.01$) (图5C)。

[0961] 在从连续刺激测定中分离的CAR T细胞中未观察到依鲁替尼对额外的CAR T激活或记忆标记物的显著影响(图5D和5E)。

[0962] F. 基因表达分析

[0963] 在如上所述的连续刺激18天期间,在存在或不存在依鲁替尼(50nM或500nM)的情况下培养的抗CD19CAR T细胞中评估多种基因的表达。在连续刺激后第18天,从抗CD19CAR

T细胞中分离RNA,对594个基因进行Nanostring Immune V2组测试。每个基因的log2(倍数变化)相对于 $-\log_{10}$ (原始p-值)作图,该 $-\log_{10}$ 衍生自非标定持家基因的ANOVA测试,该持家基因对于治疗与对照的计数数据进行归一化。结果指示在连续刺激期间用依鲁替尼处理不显著改变基因表达。

[0964] 实施例2:在存在布鲁顿氏酪氨酸激酶抑制剂的情况下表达CAR的T细胞的抗肿瘤活性的增强

[0965] 通过用CD19+Nalm-6播散性肿瘤系注射NOD/Scid/gc-/- (NSG) 小鼠产生播散性肿瘤异种移植小鼠模型,该小鼠模型经鉴定对BTK抑制有抗性。

[0966] 在第0天,NSG小鼠静脉内注射 5×10^5 个表达萤火虫萤光素酶的Nalm-6细胞。在第4天开始和研究期间的每天,小鼠用媒介物对照处理或用依鲁替尼处理,在每种情况中,通过以25mg/kg qd每日口服强饲(P.O.)。为了能够评估使用该抑制剂的组合疗法的作用,来自两个不同供体的次优剂量的抗CD19 CAR T细胞(实质上如上所述通过转导衍生自人供体受试者的样品的细胞生成)在第5天以每只小鼠 5×10^5 个CAR+T细胞的浓度静脉内注射至每只小鼠。对照组中的小鼠施用媒介物对照或依鲁替尼但不施用CAR-T细胞。每组监测八只(N=8)小鼠。

[0967] 在如上所述的处理后,通过生物发光成像测量肿瘤随时间的生长,并测量平均辐射亮度(p/s/cm²/sr)。评估经处理的小鼠随时间的存活。

[0968] 图6A中显示用依鲁替尼和CAR T细胞处理的小鼠随时间的肿瘤生长的结果。在图6B中显示了来自两个不同供体的肿瘤注射后在更大时间点监测肿瘤生长的相同研究的结果的分析。如所显示的,与媒介物处理相比,仅依鲁替尼处理在该依鲁替尼抗性模型中对肿瘤负荷没有影响。与之相比,相较于用CAR-T细胞和媒介物对照处理的小鼠,施用CAR-T细胞和依鲁替尼的小鼠表现出显著地降低的肿瘤生长($p < 0.001$,***; $p < 0.0001$ ***)。

[0969] 如通过Kaplan Meier曲线显示的,CAR T和依鲁替尼的组合增加了荷瘤小鼠的存活,Kaplan Meier曲线显示用依鲁替尼和CAR T细胞处理的荷瘤小鼠的存活。如图6C中显示的,代表性结果显示,相较于接受次优的抗CD19CAR T细胞剂量+媒介物的组,用CAR-T细胞和依鲁替尼处理的小鼠表现出增加的存活中值。在使用通过转导从其他供体受试者的血液中分离的T细胞产生的抗CD19CAR T细胞的复制研究中观察到相似的效果。在图6D中显示来自两个不同供体的肿瘤注射后更大时间点的监测存活的相同研究的结果的分析,其显示也观察到相较于CAR T和媒介物条件,CAR T和依鲁替尼的组合施用导致显著增加的存活($p < 0.001$,***)。

[0970] 实施例3:在TEC家族激酶的抑制剂的存在下表达CAR的T细胞表型、功能和体外抗肿瘤活性的评估

[0971] 实施例2中描述的NSG小鼠在第0天静脉内注射 5×10^5 个表达萤火虫萤光素酶的Nalm-6细胞。在第4天开始且在研究期间的每天,小鼠用媒介物对照处理或者每天用在饮用水(D.W.)中的依鲁替尼以25mg/kg/天处理。桥接实验证实,通过饮用水施用依鲁替尼等价于口服强饲(数据未显示)。为了能够评估使用该抑制剂的组合疗法的作用,次优剂量的抗CD19CAR T细胞在第5天以 5×10^5 /小鼠静脉内注射。作为对照,在不施用CAR-T细胞或抑制剂的情况下,对小鼠施用媒介物对照。

[0972] 在如上所述的处理后,测定经处理的小鼠的肿瘤生长和存活百分比。如图7A中所

示,相较于接受次优的抗CD19CAR T细胞剂量+媒介物的组,用抗CD19CAR-T细胞和依鲁替尼处理的小鼠表现出增加的存活中值 ($p<0.001$)。相较于仅与媒介物一起施用的CAR T,与CAR T组合施用的依鲁替尼还显著地 ($P<0.001$) 降低了肿瘤生长(图7B)。使用通过工程化衍生自两个不同供体的T细胞产生的抗CD19CAR-T细胞的结果相似。

[0973] 在来自小鼠的血液、骨髓和脾中分析CAR+T细胞的药代动力学分析,该小鼠已经接受来自一个供体衍生的细胞的抗CD19CAR+T细胞,且已经用媒介物或依鲁替尼处理(每组3只小鼠)。在CAR+T细胞转移后第7、12、19和26天,分析样品以评估CAR T细胞(基于使用抗EGFR抗体的替代标记物的表达)和/或肿瘤细胞的存在和水平。如图7C中显示的,相较于用CAR+T细胞和媒介物处理的小鼠,在用依鲁替尼处理的小鼠中观察到循环CAR+T细胞的显著增加,这与在依鲁替尼的存在下血液中CAR-T细胞的更多扩增一致。在CAR-T细胞转移后第19天,在用依鲁替尼处理后,观察到血液中细胞数目的显著增加(图7D: $*p<0.05$)。如图7E中显示,相较于仅使用媒介物,CAR+细胞处理与依鲁替尼处理组合的小鼠的血液、骨髓或脾中检测到的肿瘤细胞显著减少。

[0974] 还对在施用CAR T后第12天从已经接受CAR+T细胞的小鼠和已经用媒介物或依鲁替尼处理的小鼠中收获的血液、骨髓和脾细胞进行离体免疫表型分析(每组 $n=3$ 只小鼠)。通过流式细胞术评估细胞的表面标记物CD44、CD45RA、CD62L、CD154、CXCR3、CXCR4和PD-1,并使用FlowJo软件进行T分布随机邻域嵌入(t-SNE)高维分析。如图8A中显示,相较于仅使用媒介物(对照),观察到从已经接受CAR-T细胞与依鲁替尼组合的动物的骨髓中分离的CAR+T细胞的表型变化。使用基于每组三只小鼠的汇总分析的多变量t-SNE FACS分析,鉴定了4个不同的群簇集(图8B)。在图8C中显示了FAC直方图,其显示来自图8B中的4门控t-SNE的CD4、CD8、CD62L、CD45RA、CD44和CXCR3的个体表达谱,其覆盖在总群的表达(阴影)上。

[0975] 在图8D中显示对照小鼠或用依鲁替尼处理的小鼠中的每个t-SNE群的百分比和倍数变化。统计学上显著的差异表示为 $P<0.95$ (*)、 $P<0.01$ (**)、 $P<0.001$ (***)、 $P<0.0001$ (****)。

[0976] 在CAR T转移后第12天,相较于对照小鼠,在CAR T处理的还施用了依鲁替尼的小鼠的骨髓中观察到CD8+CD44^{hi} CXCR3^{hi} CD45RA^{lo} CD62L^{hi} (群2)和CD4+CD44^{hi} CXCR3^{int} CD45RA^{hi} CD62L^{hi} (群4)的增加(图8A-8C)。在依鲁替尼处理的动物中观察到群4的更大的增加(相较于CAR-T细胞的4.4%,其为15.2%) (图8C)。

[0977] 实施例4: 布鲁顿氏酪氨酸激酶(BTK)抑制剂增强从弥漫性大B-细胞淋巴瘤(DLBCL)患者中制造的表达CAR的T细胞的溶细胞功能

[0978] 除了从两个不同的具有弥漫性大B-细胞淋巴瘤(DLBCL)的人受试者中分离T细胞,基本上如实施例1中所述生成抗CD19CAR-T细胞。如实施例1.D所述,通过在存在500和50nM依鲁替尼的情况下使CAR-T细胞与K562-CD19靶细胞以2.5:1的效应物与靶标比例共培养、每3-4天收获细胞、并在重置细胞数目后在相同条件下再刺激而对细胞进行连续再刺激。在21天培养期间对细胞进行连续再刺激,并监测细胞扩增和细胞毒性活性。如图9A中显示,在21天的培养期间观察到衍生自每个个体受试者的细胞的细胞扩增,如通过细胞加倍数目确定的。依鲁替尼不抑制衍生自任一患者的CART细胞的增殖(图9A),该观察结果与来自健康供体衍生的CAR T细胞的先前数据一致。如图9B中显示,由衍生自每个个体受试者的细胞制造的CAR-T细胞在16天的连续刺激后在500nM依鲁替尼存在下证实了溶细胞功能的增加(图

9B)。在衍生自一名患者的细胞中,在50nM依鲁替尼的情况下,在16天的连续刺激后观察到溶细胞活性的增加($P<0.01$) (图9B)。此溶细胞活性的增加与来自健康供体细胞的结果一致(图1C、D)。

[0979] 实施例5:通过用依鲁替尼处理的表达CAR的T细胞的RNA-Seq对分子标签的评估

[0980] 从衍生自三个不同供体的单个表达CAR的细胞中分离RNA,该细胞已经在依鲁替尼(50nM、500nM)或对照(0nM)存在下在连续刺激测定中处理18天。使用RNEasy Micro试剂盒(Qiagen)进行RNA分离。对样品进行测序,并将RNASeq读段定位到人类基因组(GRCh38)并与GENCODE发行24基因模型比对。生成并评估RNAseq质量度量以确认样品之间的一致性。通过施加0.5的log2倍变化截断值和0.05的Benjamini-Hochberg调整的错误发现率(FDR)截断值来鉴定差异表达的基因。

[0981] 如图10A中的火山图中显示的,500nM依鲁替尼显著地($FDR<0.05$, $absLog_2FC>0.5$)改变编码23个蛋白的基因的表达。图10B显示了图10A中鉴定的23个基因的基因表达变化的热图。尽管不显著,但在50nM情况下观察到相似的趋势(图10C和10D)。图11A-E示出了在用不同浓度的抑制剂(50nM或500nM)或对照处理后,示例性基因的基因表达的箱形图。在差异表达的基因中,基因(诸如颗粒酶A(图11A)和CD38(图11C))的减少和SEL/CD62L(图11A)的增加与依鲁替尼抑制末端效应样基因(terminal-effector-like gene)同时增强与记忆发展相关联的基因的效果一致。更进一步地,RNA-Seq揭示了依鲁替尼改变了与促进TH1分化相关的基因,包括MSC(已知抑制TH2编程)的上调(Wu, C., 等人(2017) Nat Immunol, 18 (3) : 344-353), 和HES6、HIC1、LZTFL1、NRIP1、CD38和RARRES3(其与经鉴定用以抑制TH1发育的ATRA/视黄酸信号传导途径相关联)的下调(Britschgi, C., 等人(2008) Br J Haematol, 141 (2) : 179-87; Jiang, H., 等人(2016) J Immunol, 196 (3) : 1081-90; Heim, K.C., 等人(2007) Mol Cancer, 6 : 57; Nijhof, I.S., 等人(2015) Leukemia, 29 (10) : 2039-49; Zirner, B., 等人(2005) Oncogene, 24 (33) : 5246-51) (图11E-B-D)。为了支持RNA-Seq结果,在供体2和3中连续刺激18天后,通过流式细胞术观察到CD62L表达的显著增加(图12A和12B)。总之,这些结果支持长期依鲁替尼治疗可能导致CAR T中增加的TH1和记忆样表型。

[0982] 本发明不旨在将范围限制到特定公开的实施方案,提供该实施方案例如用以示例性说明本发明的多个方面。根据本文的描述和教导,对所述组合物和方法的各种修改将变得显而易见。在不脱离本公开的真实范围和精神的情况下,此类变化可实践且旨在落入本公开的范围。

[0983] 序列

[0984]

SEQ ID NO.	序列	说明
1	ESKYGPPCPPCP	间隔区 (IgG4 铰链) (aa) 智人
2	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCCTTGCC CT	间隔区 (IgG4 铰链) (nt) 智人
3	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLGK	铰链 -CH3 间 隔区 智人
4	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLGK	铰链 -CH2- CH3间隔区 智人
5	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRN TGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLG VYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTW EVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSHSRLTLPRSL WNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAQAPVKL SLNLLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLED QREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPS PQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYVTDH	IgD-铰链-Fc 智人
6	LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR	T2A 人工的

[0985]

7	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHI LPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQ AWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLN ITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLF GTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCW GPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVE NSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYID GPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLC HPNCTYGCTGPGLEGCP TNGPKIPSIATGMVGALLL LLVVALGIGLFM	tEGFR 人工的
8	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (登记号 P10747 的 氨 基酸153-179) 智人
9	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPS KPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (登记号 P10747 的 氨 基酸114-179) 智人
10	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKH YQPYAPPRD FAAYRS	CD28 (P10747 的氨基酸180- 220) 智人
11	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKH YQPYAPPR DFAAYRS	CD28 (LL 至 GG) 智人
12	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE EGGCEL	4-1BB (Q07011.1 的 氨基酸 214- 255) 智人
13	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL	CD3 ζ

[0986]

	DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALP PR	智人
14	RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALP PR	CD3ζ 智人
15	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALP PR	CD3ζ 智人
16	PGGG-(SGGGG)5-P-其中P是脯氨酸，G 是甘氨酸和S 是丝氨酸	接头
17	GSADDAKKDAAKKDGS	接头
18	MAAVILESIFLKRSQQKKKTSPLNFKKRLFLT VHK LSYYEYDFERGRRGSKKGSIDVEKITCVETV VPEKN PPPERQIPRRGEESSEMEQISIIERFPYPFQVVYDEGP LYVFSPTHEELRKRWIHLKKNVIRYNSDLVQKYHPCF WIDGQYLCCSQ TAKNAMGCQILENRNGSLKPGSSH RKTKKPLPPTPEEDQILKKPLPPEPAAAPVSTSELKK VVALYDYM PMNANDLQLRKGDEYFILEESNLPWW RARDKNGQEGYIPS NYVTEAEDSIEMYEWYSKHM TRSQA EQLLKQEGKEGGFIVRDSSKAGKYTVSVFA KSTGDPQG VIRHYVVCSTPQSQYYLAEKHLFSTIPE LINYHQHNSAGLISRLKYPVSQQKNAPSTAGLGY GSWEIDPKDLTFLKELGTGQFGVVKY GKWRGQYD VAIKMIKEGSMSEDEFIEEAKVMMNLSHEKLVQLY GVCTKQRPIFIITEY MANGCLLNYLREMRHRFQTQ QLLEMCKDVCEAMEYLESKQFLHRDLAARNCLVN DQGVVKVSD FGLSRYVLDDEYTSSVGSKFPVRWSP PEVLMYSKFSSKSDIWA FGVLMWEIYSLGKMPYER	酪氨酸蛋白激 酶BTK 智人

[0987]

	FTNSETAEHIAQGLRLYRPHLASEKVYTIMYSCWHE KADERPTFKILLSNILDVMDEES	
19	AACTGAGTGGCTGTGAAAGGGTGGGGTTTGCTCA GACTGTCCTTCCTCTCTGGACTGTAAGAATATGTC TCCAGGGCCAGTGTCTGCTGCGATCGAGTCCCAC CTTCCAAGTCCTGGCATCTCAATGCATCTGGGAA GCTACCTGCATTAAGTCAGGACTGAGCACACAGG TGAAGTCCAGAAAGAAGAAGCTATGGCCGCAGT GATTCTGGAGAGCATCTTTCTGAAGCGATCCCAA CAGAAAAAGAAAACATCACCTCTAAACTTCAAG AAGCGCCTGTTTCTCTTGACCGTGCACAACTCT CCTACTATGAGTATGACTTTGAACGTGGGAGAAG AGGCAGTAAGAAGGGTTCAATAGATGTTGAGAAG ATCACTTGTGTTGAAACAGTGGTTCCTGAAAAAA ATCCTCCTCCAGAAAGACAGATTCCGAGAAGAGG TGAAGAGTCCAGTGAAATGGAGCAAATTTCAATC ATTGAAAGGTTCCCTTATCCCTTCCAGGTTGTATAT GATGAAGGGCCTCTCTACGTCTTCTCCCCAACTG AAGAACTAAGGAAGCGGTGGATTCACCAGCTCA AAAACGTAATCCGGTACAACAGTGATCTGGTTCA GAAATATCACCTTGCTTCTGGATCGATGGGCAGT ATCTCTGCTGCTCTCAGACAGCCAAAAATGCTATG GGCTGCCAAATTTTGAGAACAGGAATGGAAGCT TAAAACCTGGGAGTTCTCACCGGAAGACAAAAA AGCCTCTTCCCCCAACGCCTGAGGAGGACCAGAT CTTGAAAAAGCCACTACCGCCTGAGCCAGCAGC AGCACCAGTCTCCACAAGTGAGCTGAAAAAGGT TGTGGCCCTTTATGATTACATGCCAATGAATGCAA ATGATCTACAGCTGCGGAAGGGTGATGAATATTTT ATCTTGGAGGAAAGCAACTTACCATGGTGGAGAG CACGAGATAAAAATGGGCAGGAAGGCTACATTCC	酪氨酸蛋白激 酶BTK 智人

[0988]

<p>TAGTAACTATGTCACTGAAGCAGAAGACTCCATA GAAATGTATGAGTGGTATTCCAAACACATGACTC GGAGTCAGGCTGAGCAACTGCTAAAGCAAGAGG GGAAAGAAGGAGGTTTCATTGTCAGAGACTCCA GCAAAGCTGGCAAATATACAGTGTCTGTGTTTGC TAAATCCACAGGGGACCCTCAAGGGGTGATACGT CATTATGTTGTGTGTTCCACACCTCAGAGCCAGTA TTACCTGGCTGAGAAGCACCTTTTCAGCACCATC CCTGAGCTCATTA ACTACCATCAGCACA ACTCTGC AGGACTCATATCCAGGCTCAAATATCCAGTGTCTC AACAAAACAAGAATGCACCTTCCACTGCAGGCCT GGGATACGGATCATGGGAAATTGATCCAAAGGAC CTGACCTTCTTGAAGGAGCTGGGGACTGGACAAT TTGGGGTAGTGAAGTATGGGAAATGGAGAGGCCA GTACGACGTGGCCATCAAGATGATCAAAGAAGGC TCCATGTCTGAAGATGAATTCATTGAAGAAGCCA AAGTCATGATGAATCTTTCCCATGAGAAGCTGGT GCAGTTGTATGGCGTCTGCACCAAGCAGCGCCCC ATCTTCATCATCACTGAGTACATGGCCAATGGCTG CCTCCTGAACTACCTGAGGGAGATGCGCCACCGC TTCCAGACTCAGCAGCTGCTAGAGATGTGCAAGG ATGTCTGTGAAGCCATGGAATACCTGGAGTCAA GCAGTTCCTTCACCGAGACCTGGCAGCTCGAAAC TGTTTGGTAAACGATCAAGGAGTTGTTAAAGTATC TGATTTCGGCCTGTCCAGGTATGTCCTGGATGATG AATACACAAGCTCAGTAGGCTCCAAATTTCCAGT CCGGTGGTCCCCACCGGAAGTCCTGATGTATAGC AAGTTCAGCAGCAAATCTGACATTTGGGCTTTTG GGGTTTTGATGTGGGAAATTTACTCCCTGGGGAA GATGCCATATGAGAGATTTACTAACAGTGAGACTG CTGAACACATTGCCCAAGGCCTACGTCTCTACAG</p>	
---	--

[0989]

	GCCTCATCTGGCTTCAGAGAAGGTATATACCATCA TGTACAGTTGCTGGCATGAGAAAGCAGATGAGCG TCCCACCTTTCAAATTCTTCTGAGCAATATTCTAG ATGTCATGGATGAAGAATCCTGAGCTCGCCAATA AGCTTCTTGGTTCTACTTCTCTTCTCCACAAGCCC CAATTTCACTTTCTCAGAGGAAATCCCAAGCTTA GGAGCCCTGGAGCCTTTGTGCTCCCACTCAATAC AAAAAGGCCCTCTCTACATCTGGGAATGCACCT CTTCTTTGATTCCCTGGGATAGTGGCTTCTGAGCA AAGGCCAAGAAATTATTGTGCCTGAAATTTCCCG AGAGAATTAAGACAGACTGAATTTGCGATGAAAA TATTTTTTAGGAGGGAGGATGTAAATAGCCGCACA AAGGGGTCCAACAGCTCTTTGAGTAGGCATTTGG TAGAGCTTGGGGGTGTGTGTGTGGGGGTGGACCG AATTTGGCAAGAATGAAATGGTGTCTATAAAGATG GGAGGGGAGGGTGTTTTGATAAAATAAAATTACT AGAAAGCTTGAAAGTC	
20	EGRGSLTLCGDVEENPGP	T2A
21	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
22	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
23	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
24	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A

序列表

<110> 朱诺治疗学股份有限公司

PORTS, Michael

SALMON, Ruth

QIN, Jim Shi Xiang

BATUREVYCH, Alex

GILLENWATER, Heidi

<120> T细胞疗法和BTK抑制剂的组合疗法

<130> 735042005240

<140> 尚未指定

<141> 与此同时

<150> 62/417,312

<151> 2016-11-03

<150> 62/429,735

<151> 2016-12-03

<150> 62/574,706

<151> 2017-10-19

<160> 24

<170> FastSEQ的Windows版本4.0

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> 间隔区 (IgG4铰链)

<400> 1

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 2

<211> 36

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<223> 间隔区 (IgG4铰链)

<400> 2

gaatctaagt acggaccgcc ctgccccct tgcct 36

<210> 3

<211> 119

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> 铰链-CH3间隔区

<400> 3

```

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Gly Gln Pro Arg
1          5          10          15
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
          20          25          30
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
          35          40          45
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
          50          55          60
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
65          70          75          80
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
          85          90          95
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
          100          105          110
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
          115

```

<210> 4

<211> 229

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> 铰链-CH2-CH3间隔区

<400> 4

```

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1          5          10          15
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
          20          25          30
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
          35          40          45
Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
          50          55          60
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
65          70          75          80
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

```

				85					90					95			
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser		
				100					105					110			
Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro		
				115					120					125			
Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln		
				130					135					140			
Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala		
145									150					155			160
Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr		
				165					170					175			
Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu		
				180					185					190			
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser		
				195					200					205			
Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser		
				210					215					220			
Leu	Ser	Leu	Gly	Lys													
225																	
<210>	5																
<211>	282																
<212>	PRT																
<213>	智人																
<220>																	
<223>	IgD-铰链-Fc																
<400>	5																
Arg	Trp	Pro	Glu	Ser	Pro	Lys	Ala	Gln	Ala	Ser	Ser	Val	Pro	Thr	Ala		
1				5					10					15			
Gln	Pro	Gln	Ala	Glu	Gly	Ser	Leu	Ala	Lys	Ala	Thr	Thr	Ala	Pro	Ala		
				20					25					30			
Thr	Thr	Arg	Asn	Thr	Gly	Arg	Gly	Gly	Glu	Glu	Lys	Lys	Lys	Glu	Lys		
				35					40					45			
Glu	Lys	Glu	Glu	Gln	Glu	Glu	Arg	Glu	Thr	Lys	Thr	Pro	Glu	Cys	Pro		
				50					55					60			
Ser	His	Thr	Gln	Pro	Leu	Gly	Val	Tyr	Leu	Leu	Thr	Pro	Ala	Val	Gln		
65									70					75			80
Asp	Leu	Trp	Leu	Arg	Asp	Lys	Ala	Thr	Phe	Thr	Cys	Phe	Val	Val	Gly		
				85					90					95			
Ser	Asp	Leu	Lys	Asp	Ala	His	Leu	Thr	Trp	Glu	Val	Ala	Gly	Lys	Val		

100	105	110
Pro Thr Gly Gly Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Arg His Ser Asn Gly		
115	120	125
Ser Gln Ser Gln His Ser Arg Leu Thr Leu Pro Arg Ser Leu Trp Asn		
130	135	140
Ala Gly Thr Ser Val Thr Cys Thr Leu Asn His Pro Ser Leu Pro Pro		
145	150	155
Gln Arg Leu Met Ala Leu Arg Glu Pro Ala Ala Gln Ala Pro Val Lys		
165	170	175
Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser Asp Pro Pro Glu Ala Ala Ser		
180	185	190
Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe Ser Pro Pro Asn Ile Leu Leu		
195	200	205
Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu Val Asn Thr Ser Gly Phe Ala Pro		
210	215	220
Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro Gly Ser Thr Thr Phe Trp Ala Trp Ser		
225	230	235
Val Leu Arg Val Pro Ala Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Thr Tyr Thr		
245	250	255
Cys Val Val Ser His Glu Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn Ala Ser Arg		
260	265	270
Ser Leu Glu Val Ser Tyr Val Thr Asp His		
275	280	

<210> 6

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> T2A

<400> 6

Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp		
1	5	10
Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg		
20		

<210> 7

<211> 335

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> tEGFR

<400> 7

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

290	295	300
Thr Asn Gly Pro Lys Ile	Pro Ser Ile Ala Thr	Gly Met Val Gly Ala
305	310	315 320
Leu Leu Leu Leu Leu Val	Val Ala Leu Gly Ile	Gly Leu Phe Met
325	330	335
<210> 8		
<211> 27		
<212> PRT		
<213> 智人		
<220>		
<223> CD28		
<300>		
<308> UniProt登录号P10747		
<309> 1989-07-01		
<400> 8		
Phe Trp Val Leu Val Val	Val Gly Gly Val Leu Ala	Cys Tyr Ser Leu
1	5	10 15
Leu Val Thr Val Ala Phe	Ile Ile Phe Trp Val	
20	25	
<210> 9		
<211> 66		
<212> PRT		
<213> 智人		
<220>		
<223> CD28		
<300>		
<308> UniProt登录号P10747		
<309> 1989-07-01		
<400> 9		
Ile Glu Val Met Tyr Pro	Pro Pro Tyr Leu Asp Asn	Glu Lys Ser Asn
1	5	10 15
Gly Thr Ile Ile His Val	Lys Gly Lys His Leu Cys	Pro Ser Pro Leu
20	25	30
Phe Pro Gly Pro Ser Lys	Pro Phe Trp Val Leu Val	Val Val Gly Gly
35	40	45
Val Leu Ala Cys Tyr Ser	Leu Leu Val Thr Val Ala	Phe Ile Ile Phe
50	55	60
Trp Val		
65		

<210> 10

<211> 41

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> CD28

<300>

<308> UniProt登录号P10747

<309> 1989-07-01

<400> 10

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr

1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro

20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

35 40

<210> 11

<211> 41

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> CD28

<400> 11

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr

1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro

20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

35 40

<210> 12

<211> 42

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> 4-1BB

<300>

<308> UniProt登录号Q07011.1

<309> 1995-02-01

<400> 12

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
 1 5 10 15
 Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
 20 25 30
 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
 35 40

<210> 13

<211> 112

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> CD3ζ

<400> 13

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
 1 5 10 15
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 20 25 30
 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 35 40 45
 Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 50 55 60
 Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 65 70 75 80
 Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 85 90 95
 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 100 105 110

<210> 14

<211> 112

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> CD3ζ

<400> 14

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Glu Pro Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
 1 5 10 15
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 20 25 30
 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys

35	40	45
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys		
50	55	60
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg		
65	70	75
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala		
85	90	95
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
100	105	110

<210> 15

<211> 112

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> CD3ζ

<400> 15

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly
1 5 10 15
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
50 55 60
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65 70 75 80
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<220>

<221> REPEAT

<222> (5) ... (9)

<223> SGGGG重复5次

<400> 16

Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Pro

1 5 10

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 17

Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Gly Lys

1 5 10 15

Ser

<210> 18

<211> 659

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> 酪氨酸蛋白激酶BTK

<400> 18

Met Ala Ala Val Ile Leu Glu Ser Ile Phe Leu Lys Arg Ser Gln Gln

1 5 10 15

Lys Lys Lys Thr Ser Pro Leu Asn Phe Lys Lys Arg Leu Phe Leu Leu

20 25 30

Thr Val His Lys Leu Ser Tyr Tyr Glu Tyr Asp Phe Glu Arg Gly Arg

35 40 45

Arg Gly Ser Lys Lys Gly Ser Ile Asp Val Glu Lys Ile Thr Cys Val

50 55 60

Glu Thr Val Val Pro Glu Lys Asn Pro Pro Pro Glu Arg Gln Ile Pro

65 70 75 80

Arg Arg Gly Glu Glu Ser Ser Glu Met Glu Gln Ile Ser Ile Ile Glu

85 90 95

Arg Phe Pro Tyr Pro Phe Gln Val Val Tyr Asp Glu Gly Pro Leu Tyr

100 105 110

Val Phe Ser Pro Thr Glu Glu Leu Arg Lys Arg Trp Ile His Gln Leu

115 120 125

Lys Asn Val Ile Arg Tyr Asn Ser Asp Leu Val Gln Lys Tyr His Pro

130 135 140

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

450	455	460
Thr Lys Gln Arg Pro Ile Phe Ile Ile Thr Glu Tyr Met Ala Asn Gly		
465	470	475
Cys Leu Leu Asn Tyr Leu Arg Glu Met Arg His Arg Phe Gln Thr Gln		480
	485	490
Gln Leu Leu Glu Met Cys Lys Asp Val Cys Glu Ala Met Glu Tyr Leu		495
	500	505
Glu Ser Lys Gln Phe Leu His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Leu		510
	515	520
Val Asn Asp Gln Gly Val Val Lys Val Ser Asp Phe Gly Leu Ser Arg		525
	530	535
Tyr Val Leu Asp Asp Glu Tyr Thr Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Pro		540
545	550	555
Val Arg Trp Ser Pro Pro Glu Val Leu Met Tyr Ser Lys Phe Ser Ser		560
	565	570
Lys Ser Asp Ile Trp Ala Phe Gly Val Leu Met Trp Glu Ile Tyr Ser		575
	580	585
Leu Gly Lys Met Pro Tyr Glu Arg Phe Thr Asn Ser Glu Thr Ala Glu		590
	595	600
His Ile Ala Gln Gly Leu Arg Leu Tyr Arg Pro His Leu Ala Ser Glu		605
	610	615
Lys Val Tyr Thr Ile Met Tyr Ser Cys Trp His Glu Lys Ala Asp Glu		620
625	630	635
Arg Pro Thr Phe Lys Ile Leu Leu Ser Asn Ile Leu Asp Val Met Asp		640
	645	650
		655

Glu Glu Ser

<210> 19

<211> 2611

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<223> 酪氨酸蛋白激酶BTK

<400> 19

aactgagtgg ctgtgaaagg gtggggtttg ctcagactgt ccttcctctc tggactgtaa 60
 gaatatgtct ccagggccag tgtctgtctgc gatcgagtcc caccttccaa gtcttggeat 120
 ctcaatgcat ctgggaagct acctgcatta agtcaggact gagcacacag gtgaactcca 180
 gaaagaagaa gctatggccg cagtgattct ggagagcatc tttctgaagc gatcccaaca 240
 gaaaaagaaa acatcacctc taaacttcaa gaagcgcttg tttctcttga ccgtgcacaa 300
 actctcctac tatgagtatg actttgaacg tgggagaaga ggcagtaaga agggttcaat 360

```

agatgttgag aagatcacctt gtgttgaaac agtggttcct gaaaaaaatc ctcctccaga 420
aagacagatt ccgagaagag gtgaagagtc cagtgaatg gagcaaattt caatcattga 480
aaggttccct tatcccttcc aggttgtata tgatgaaggg cctctctacg tcttctcccc 540
aactgaagaa ctaaggaagc ggtggattca ccagctcaa aacgtaatcc ggtacaacag 600
tgatctgggt cagaaatata acccttgctt ctggatcgat gggcagtatc tctgctgctc 660
tcagacagcc aaaaatgcta tgggctgcca aattttggag aacaggaatg gaagcttaaa 720
acctgggagt tctcaccgga agacaaaaaa gcctcttccc ccaacgcctg aggaggacca 780
gatcttgaaa aagccactac cgcctgagcc agcagcagca ccagtctcca caagtgaact 840
gaaaaagggt gtggcccttt atgattacat gccaatgaat gcaaatgata tacagctgag 900
gaagggtgat gaatatatta tcttggagga aagcaactta ccatggtgga gagcacgaga 960
taaaaatggg caggaaggtt acattcctag taactatgtc actgaagcag aagactccat 1020
agaaatgtat gagggtgatt ccaaacacat gactcggagt caggctgagc aactgctaaa 1080
gcaagagggg aaagaaggag gtttcattgt cagagactcc agcaaagctg gcaaatatac 1140
agtgtctgtg ttgtctaaat ccacagggga ccctcaaggg gtgatacgta attatgttgt 1200
gtgttccaca cctcagagcc agtattacct ggctgagaag caccttttca gcaccatccc 1260
tgagctcatt aactaccatc agcacaactc tgcaggactc atatccaggc tcaaatatcc 1320
agtgtctcaa caaaacaaga atgcaccttc cactgcaggc ctgggatacg gatcatggga 1380
aattgatcca aaggacctga ctttcttgaa ggagctgggg actggacaat ttggggtagt 1440
gaagtatggg aatggagag gccagtaga cgtggccatc aagatgatca aagaaggctc 1500
catgtctgaa gatgaattca ttgaagaagc caaagtcata atgaatcttt cccatgagaa 1560
gctggtgcag ttgtatggcg tctgcaccaa gcagcgcccc atcttcatca tcaactagta 1620
catggccaat ggctgcctcc tgaactacct gagggagatg cgccaccgct tccagactca 1680
gcagctgcta gagatgtgca aggatgtctg tgaagccatg gaatacctgg agtcaaagca 1740
gttccttcac cgagacctgg cagctcgaaa ctgttttgta aacgatcaag gagttgttaa 1800
agtatctgat ttcggcctgt ccaggtatgt cctggatgat gaatacaca gctcagtagg 1860
ctccaaattt ccagtcagggt ggtccccacc ggaagtccct atgtatagca agttcagcag 1920
caaactctgac atttgggctt ttggggtttt gatgtgggaa atttactccc tggggaagat 1980
gccatatgag agatttacta acagtgagac tgctgaacac attgccaag gcctacgtct 2040
ctacaggcct catctggctt cagagaaggt atataccatc atgtacagtt gctggcatga 2100
gaaagcagat gagcgtccca ctttcaaaat tcttctgagc aatattctag atgtcatgga 2160
tgaagaatcc tgagctcgcc aataagcttc ttggttttac ttctcttctc cacaagcccc 2220
aatttcactt tctcagagga aatcccaagc ttaggagccc tggagccttt gtgctccac 2280
tcaatacaaaa aaggccccctc tctacatctg ggaatgcacc tcttctttga ttccctggga 2340
tagtggtctc tgagcaaagg ccaagaaatt attgtgcctg aaatttcccg agagaattaa 2400
gacagactga atttgcgatg aaaatatttt ttaggagggg ggatgtaaat agccgcacaa 2460
aggggtccaa cagctctttg agtaggcatt tggtagagct tgggggtgtg tgtgtggggg 2520
tggaaccgaat ttggcaagaa tgaaatggtg tcataaagat gggaggggag ggtgttttga 2580
taaaataaaa ttactagaaa gcttgaaagt c 2611

```

<210> 20

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> T2A

<400> 20

Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro

1 5 10 15

Gly Pro

<210> 21

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> P2A

<400> 21

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

1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 22

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> P2A

<400> 22

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

1 5 10 15

Pro Gly Pro

<210> 23

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> E2A

<400> 23

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

1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro

20

<210> 24

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F2A

<400> 24

Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val

1

5

10

15

Glu Ser Asn Pro Gly Pro

20

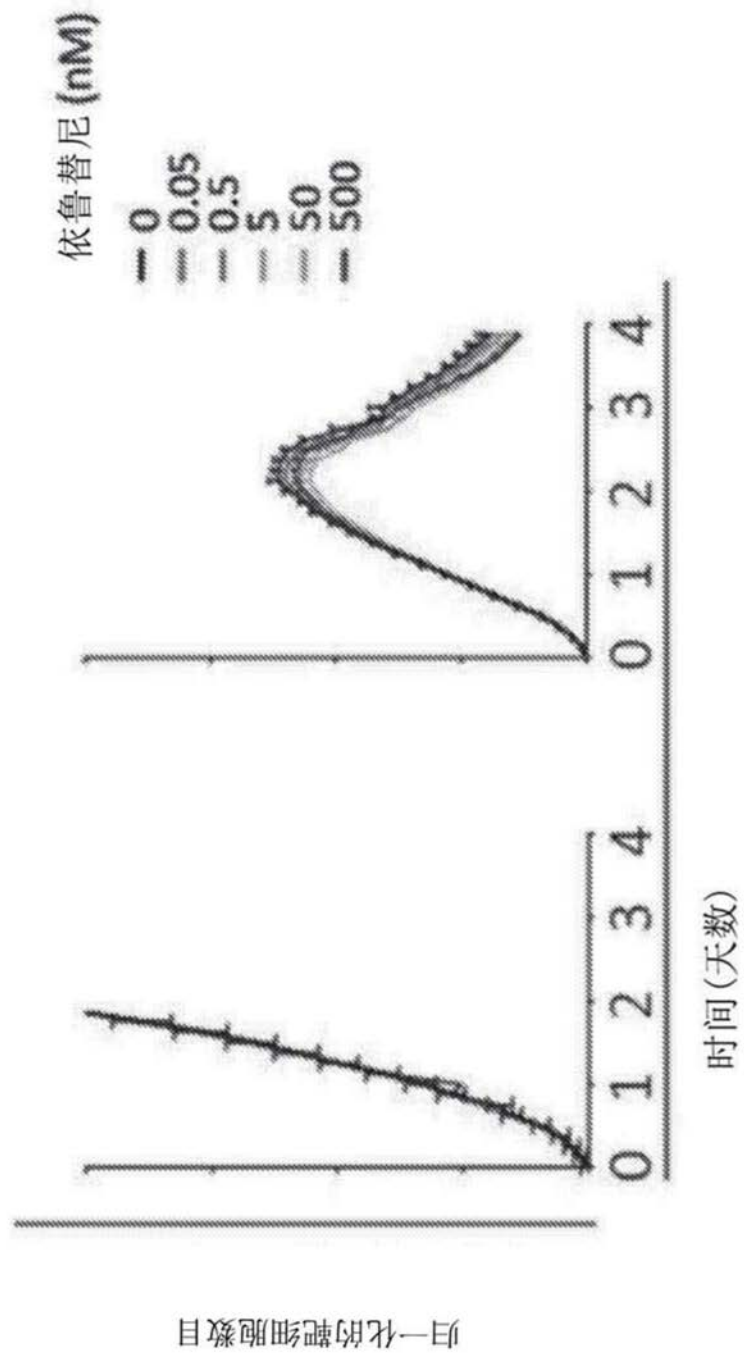


图1A

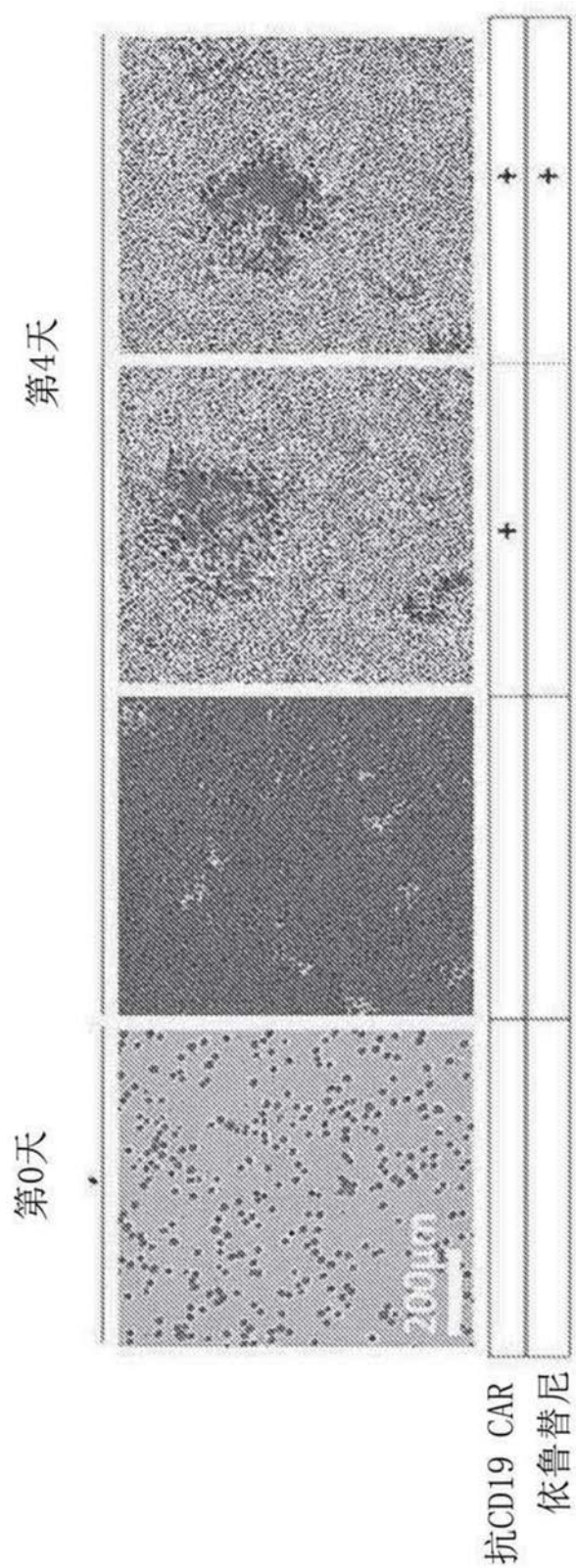


图1B

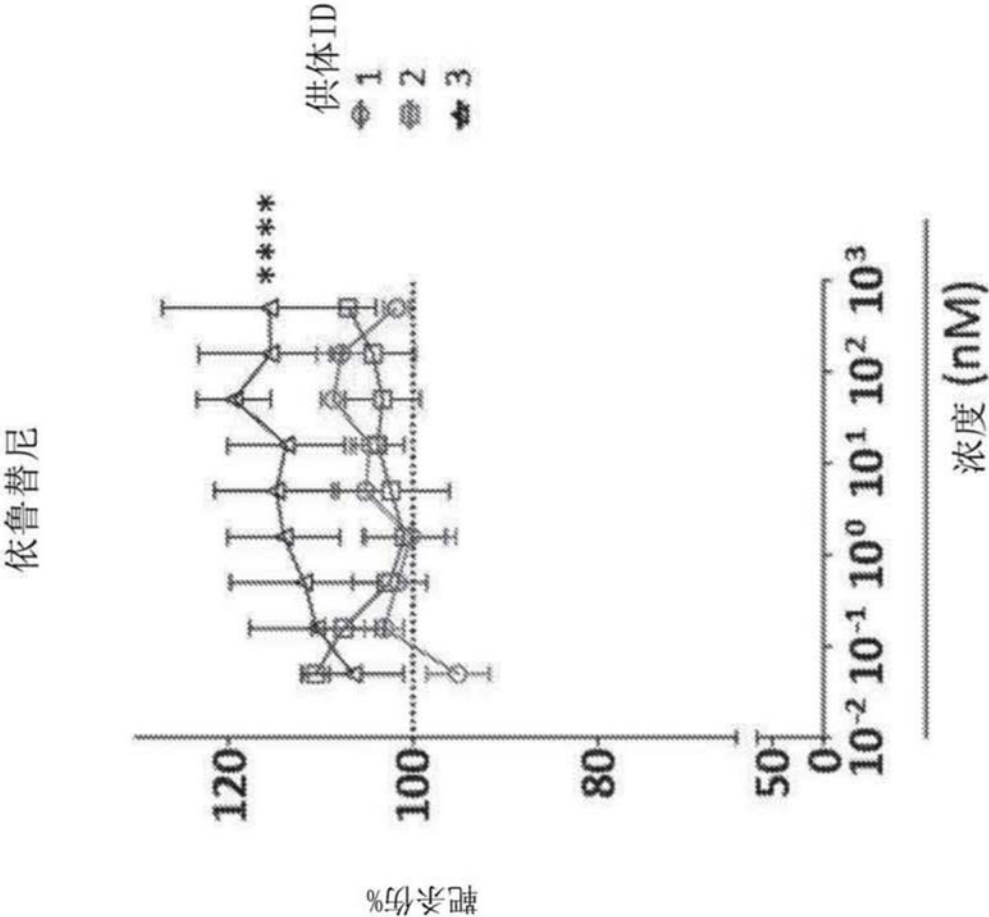


图1C

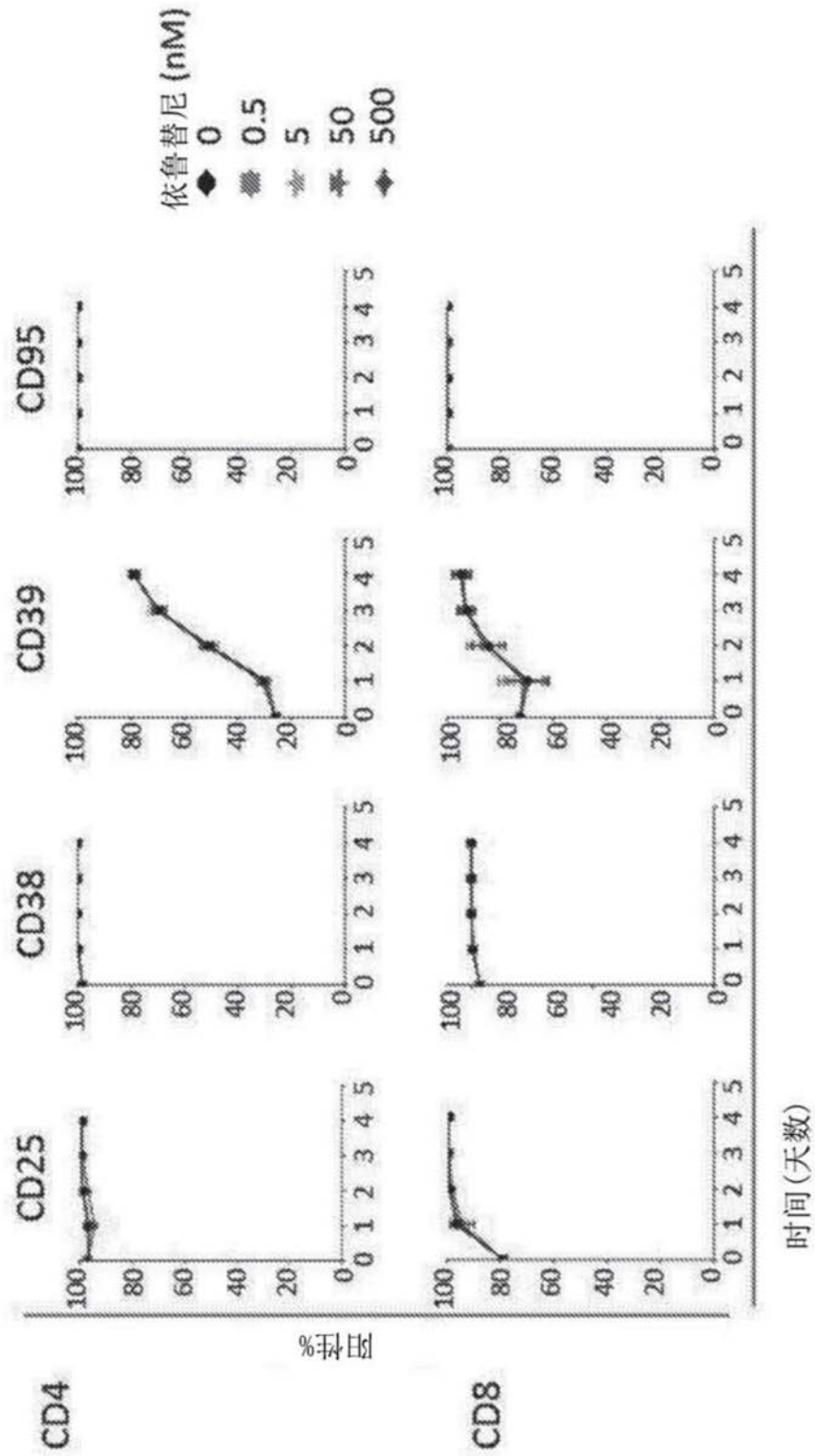


图2A

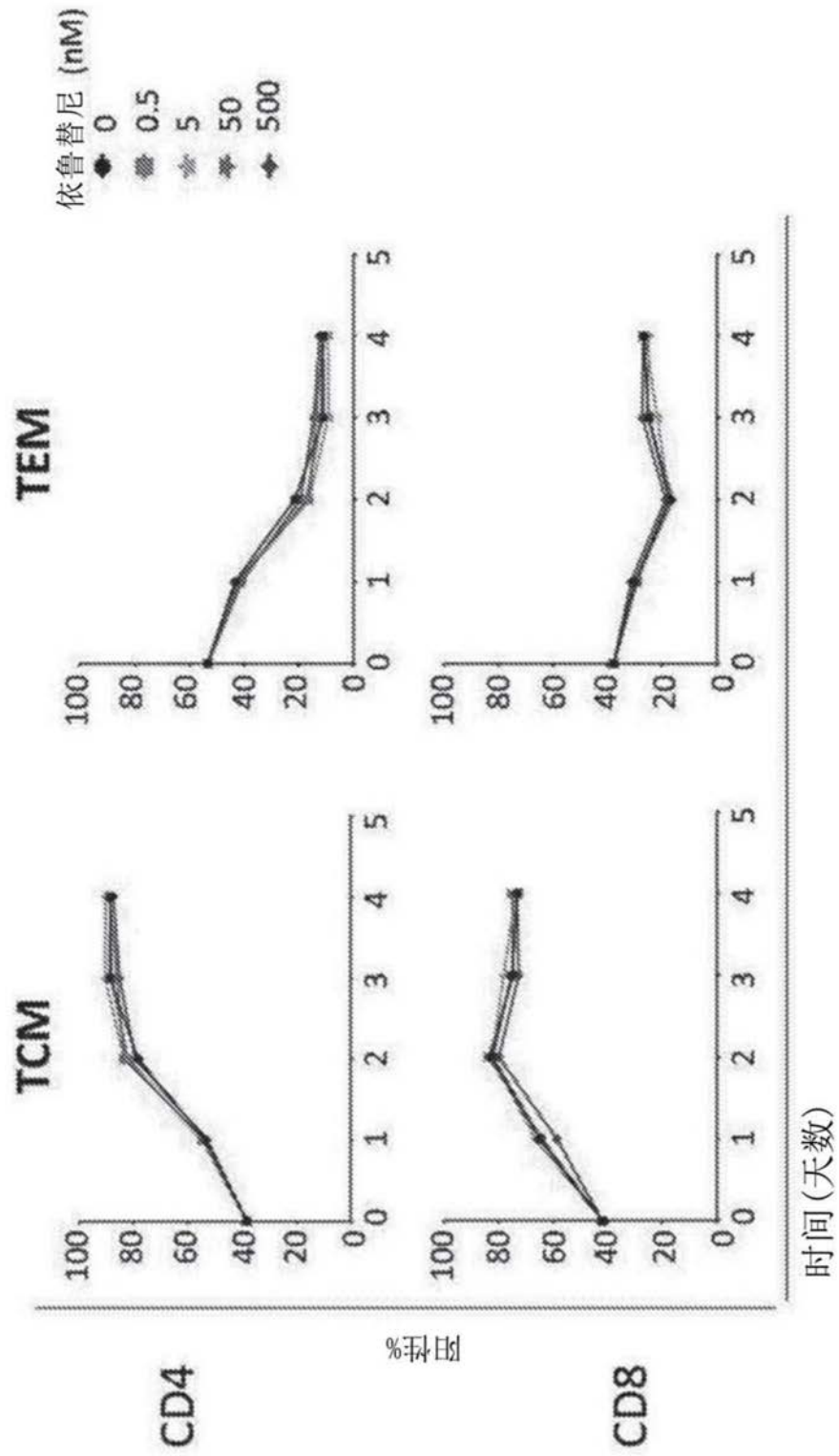


图2B

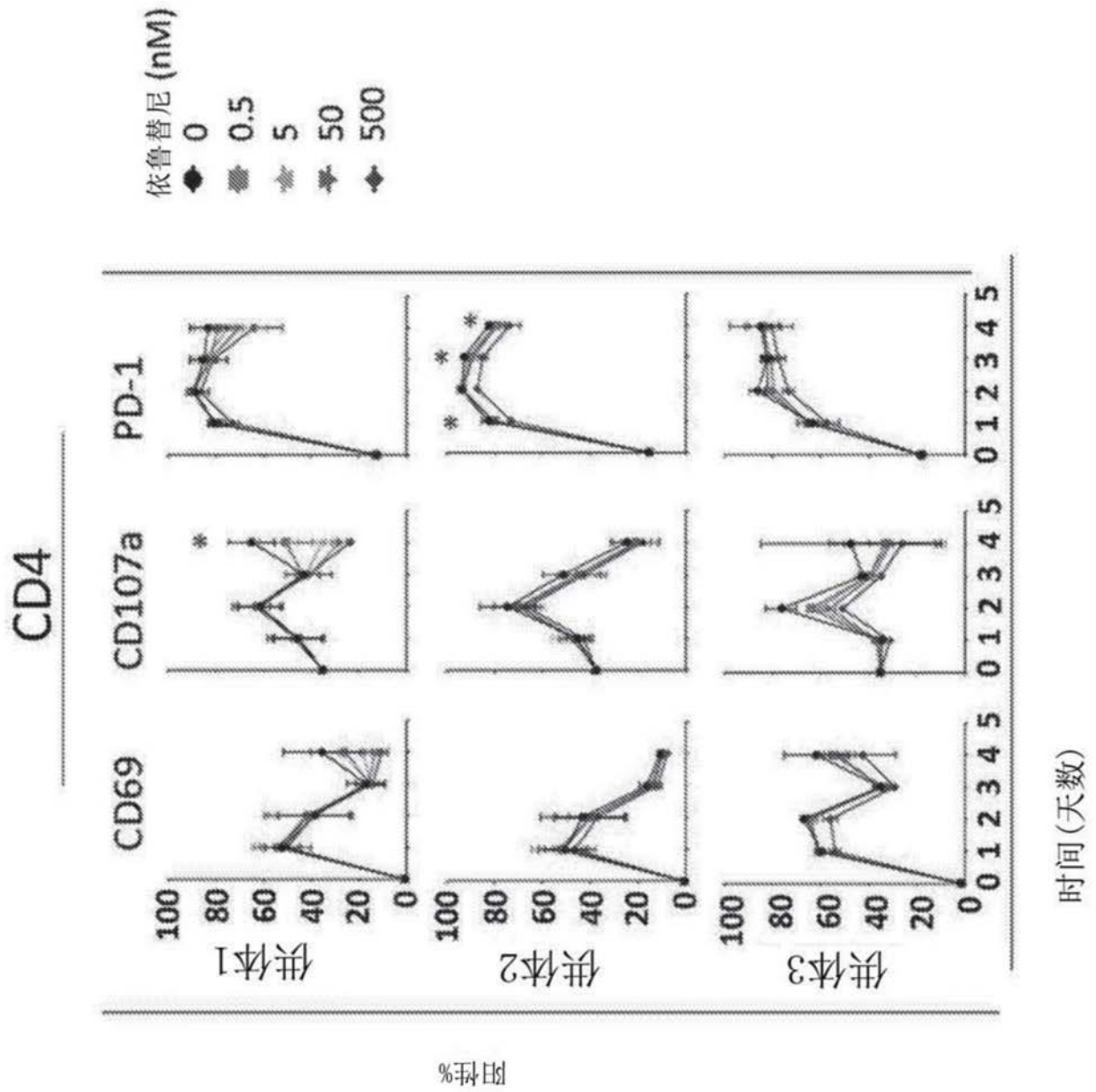


图2C

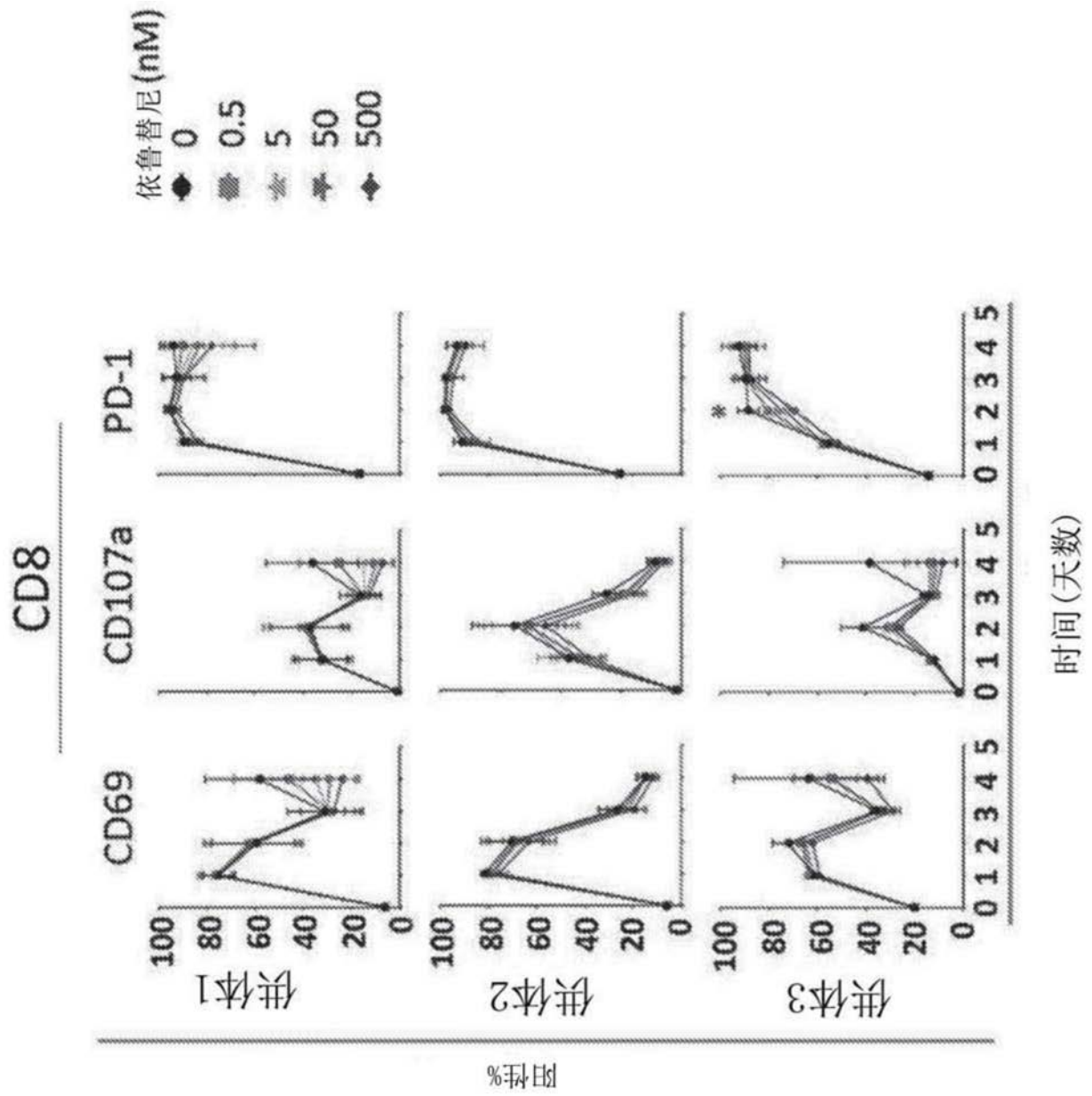


图2D

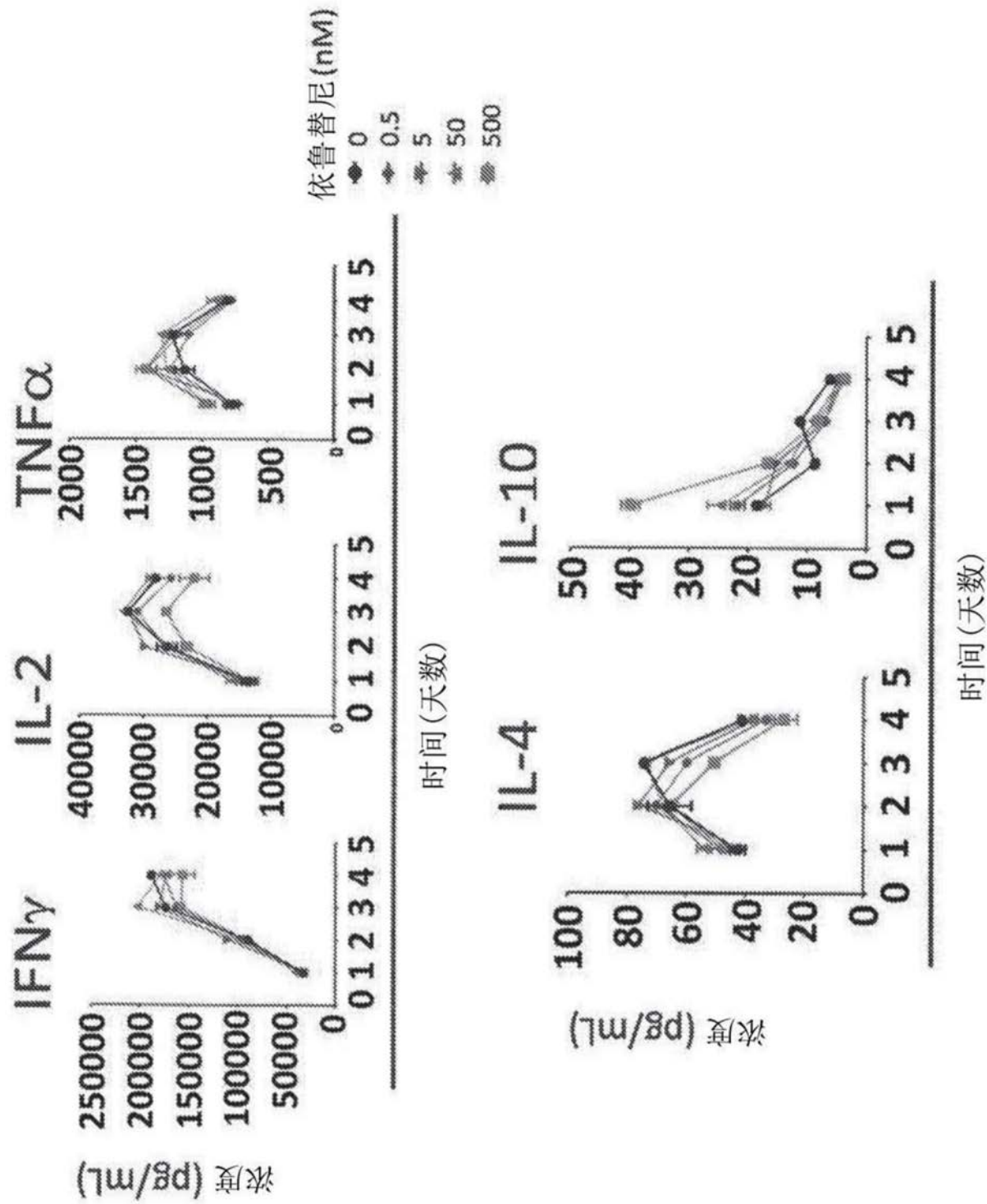


图3A

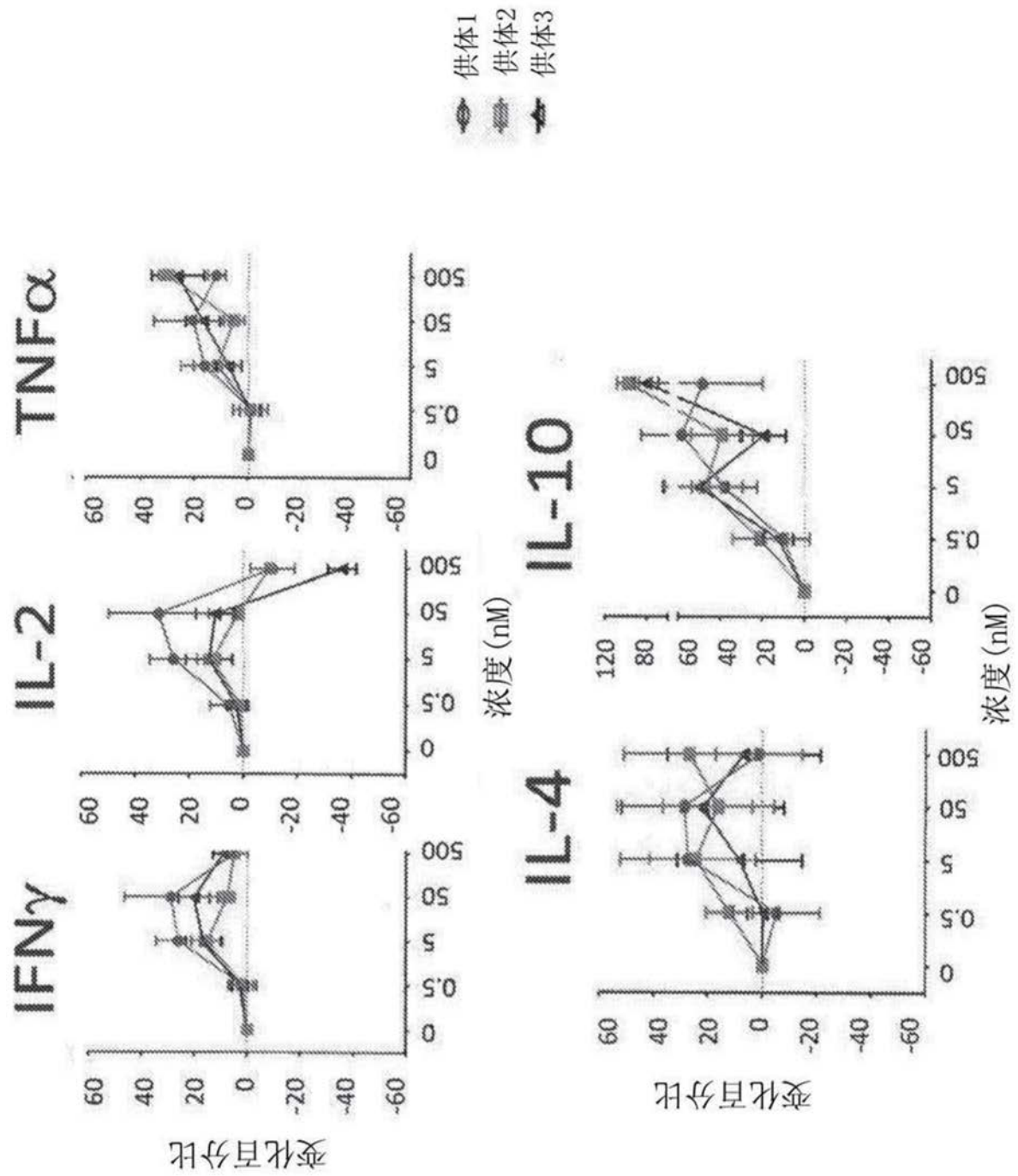


图3B

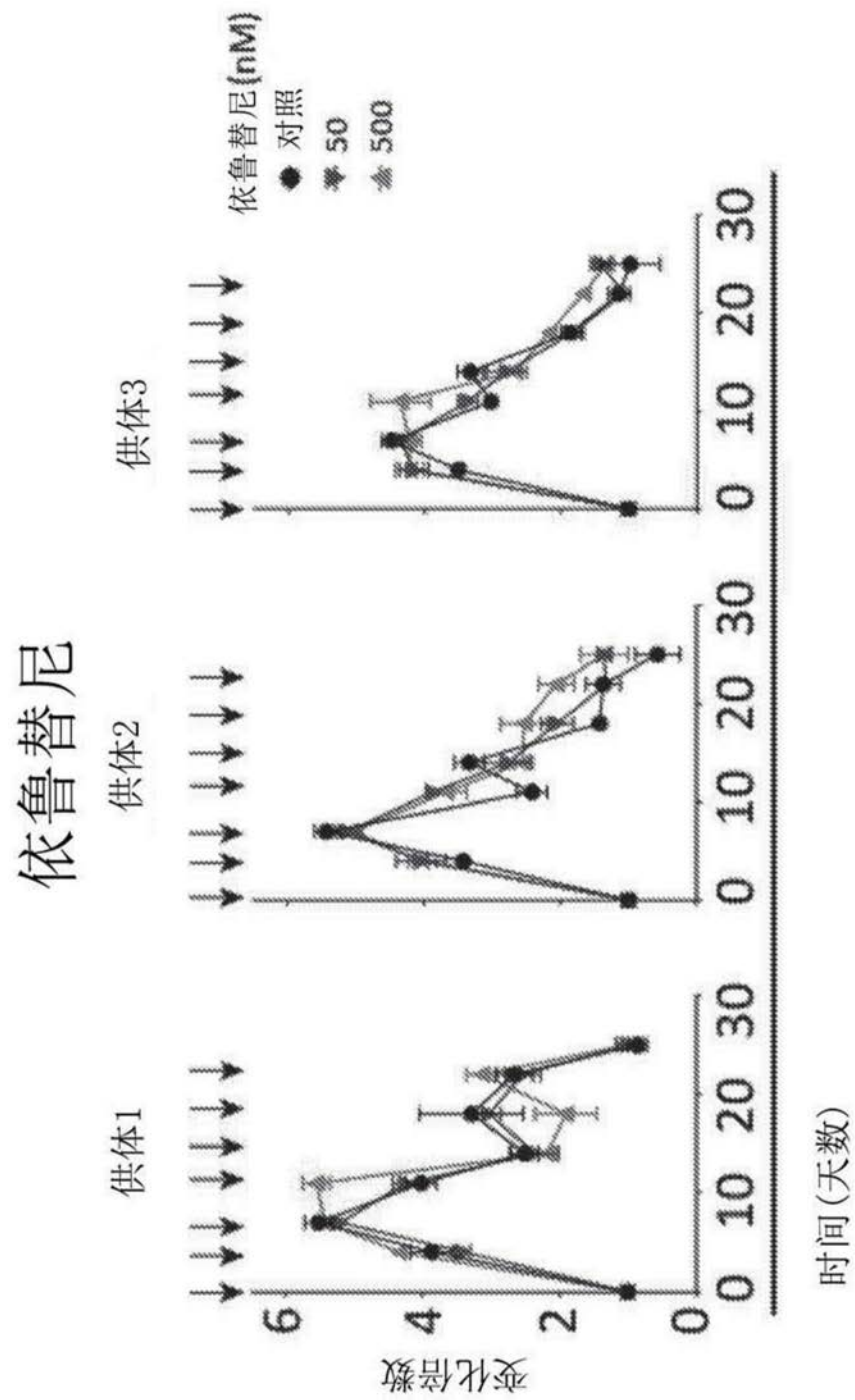


图4A

依鲁替尼

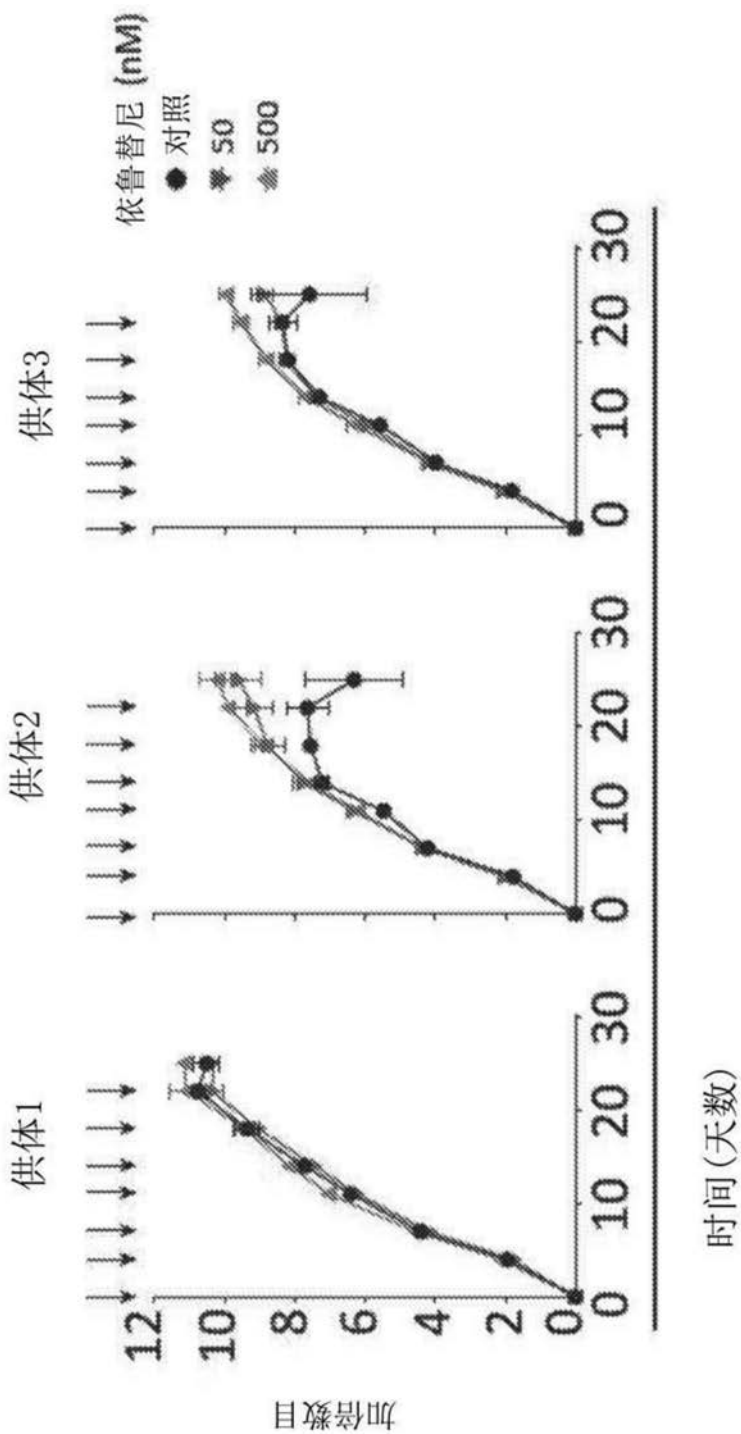


图4B

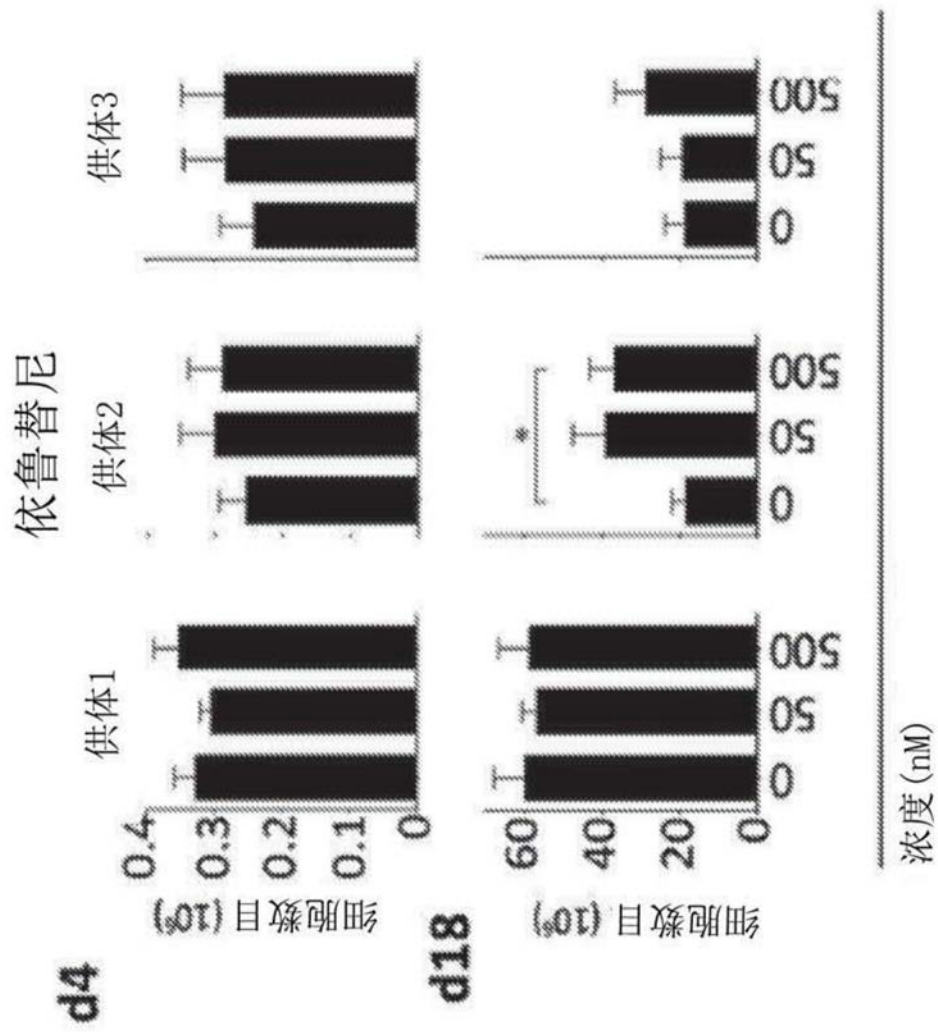


图4C

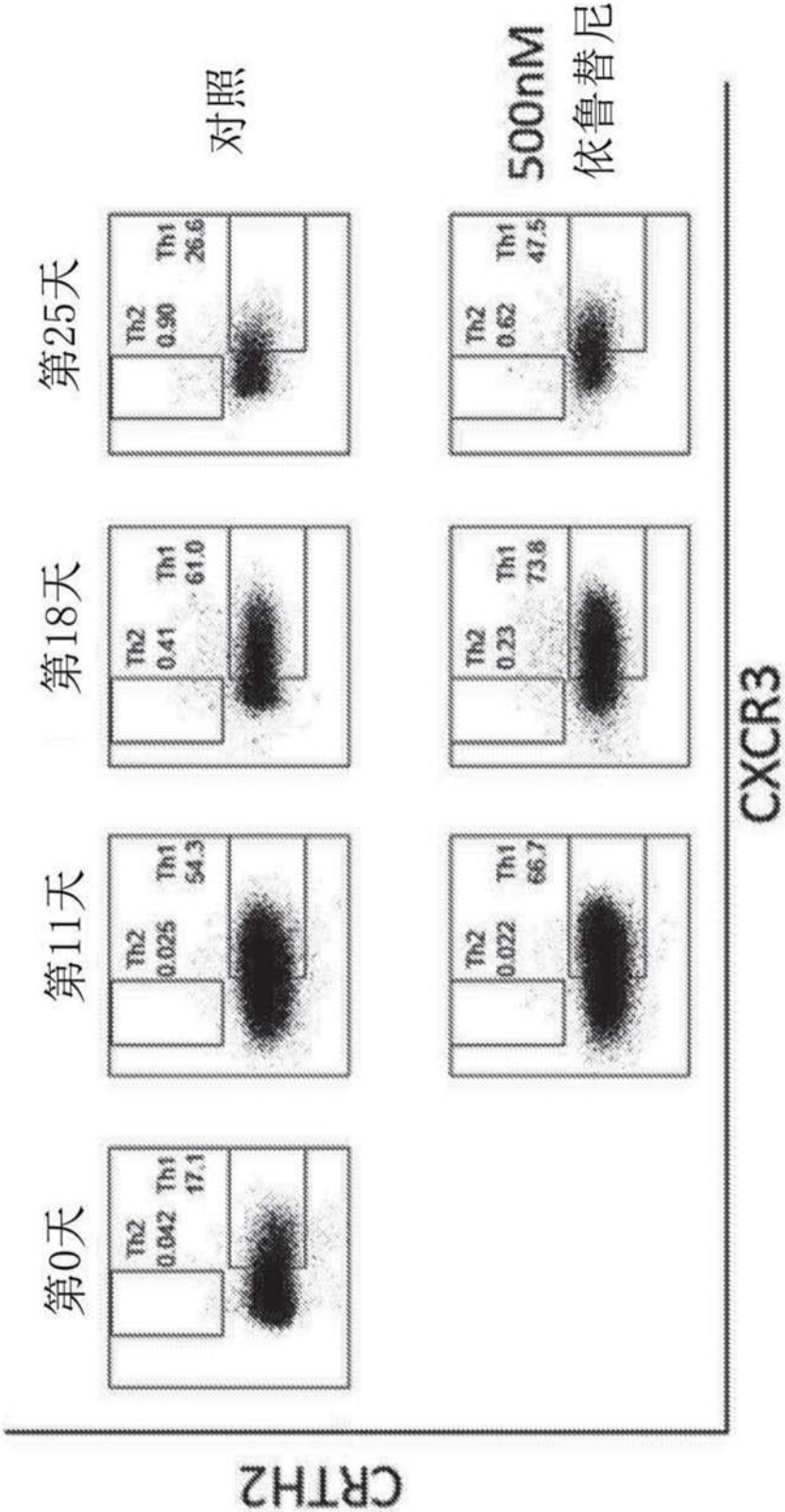


图5A

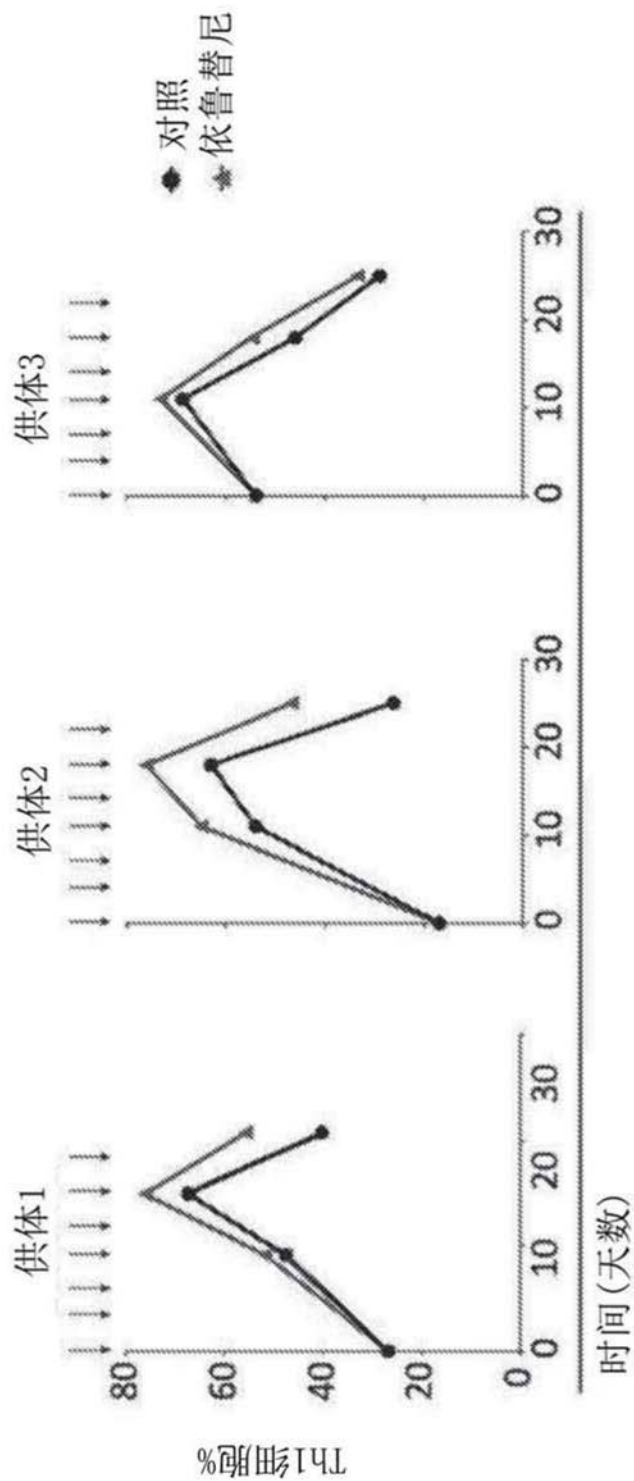


图5B

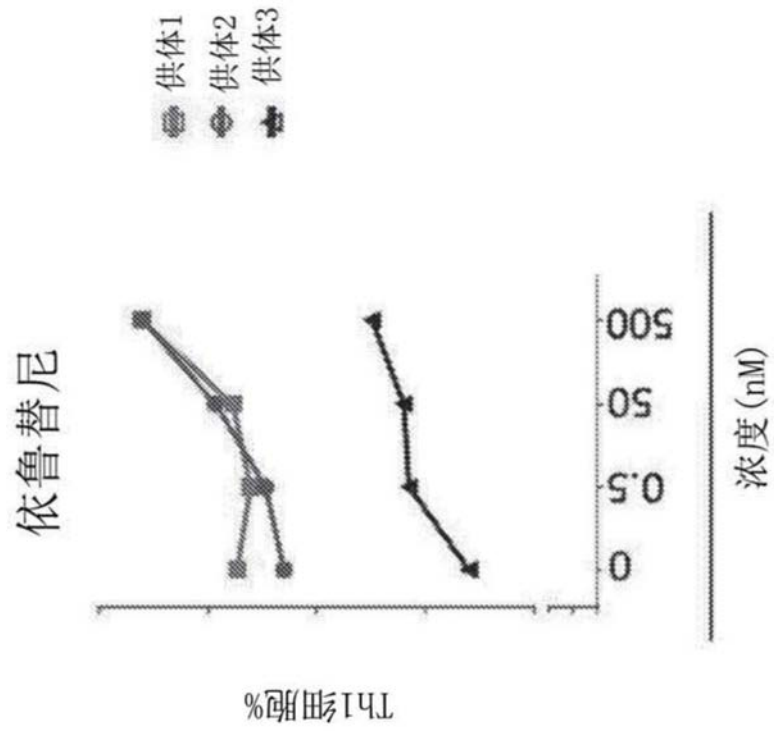


图5C

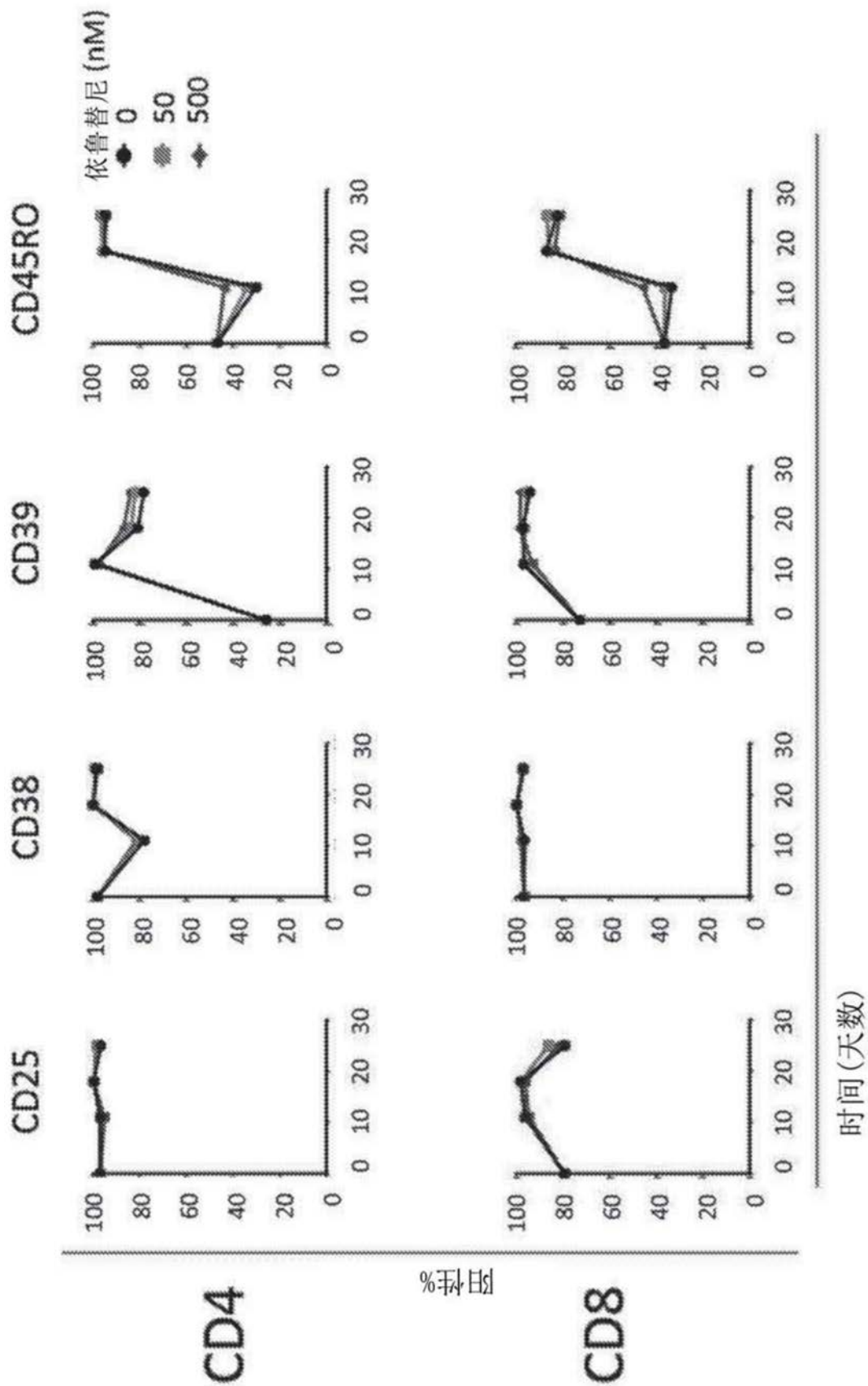


图5D

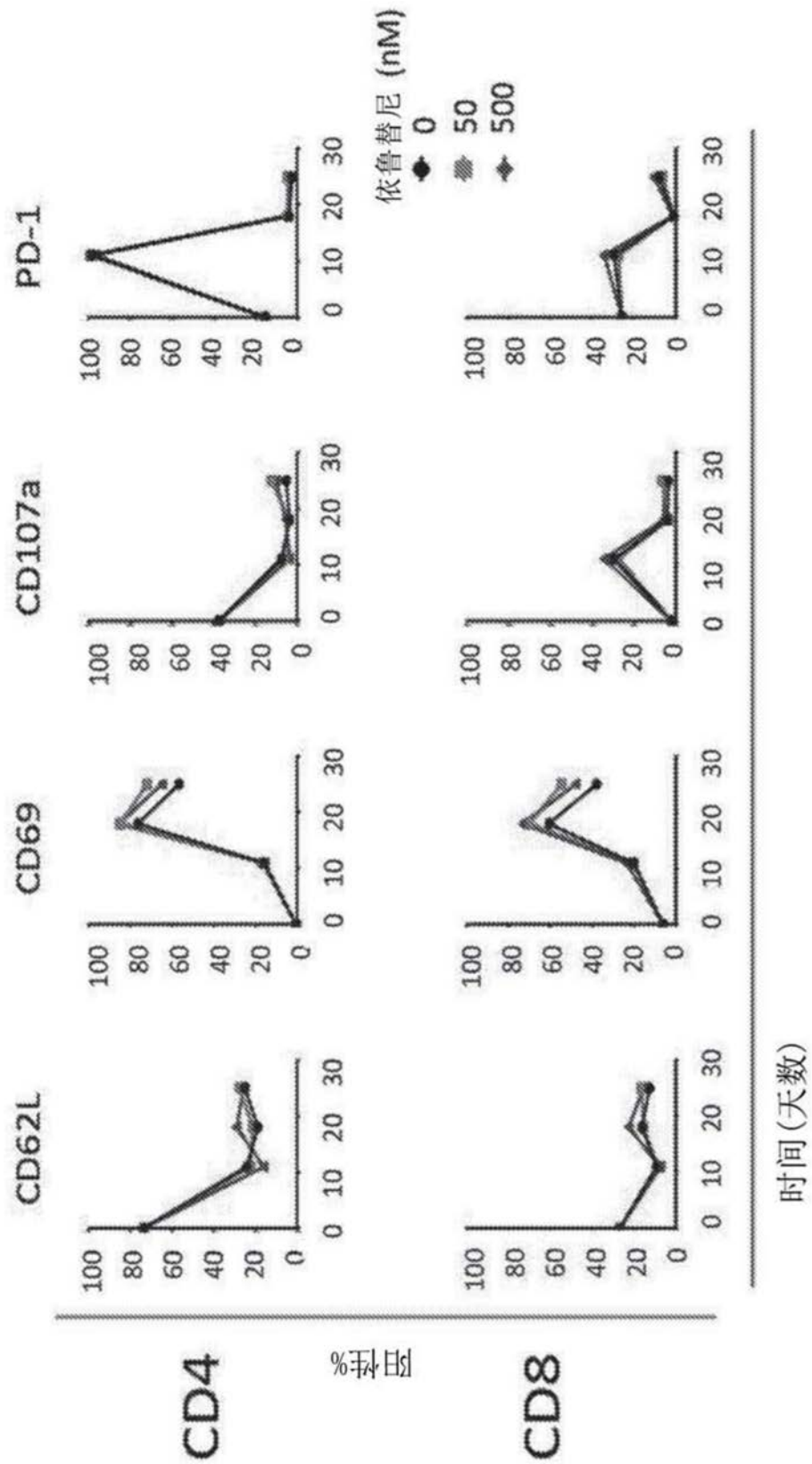


图5E

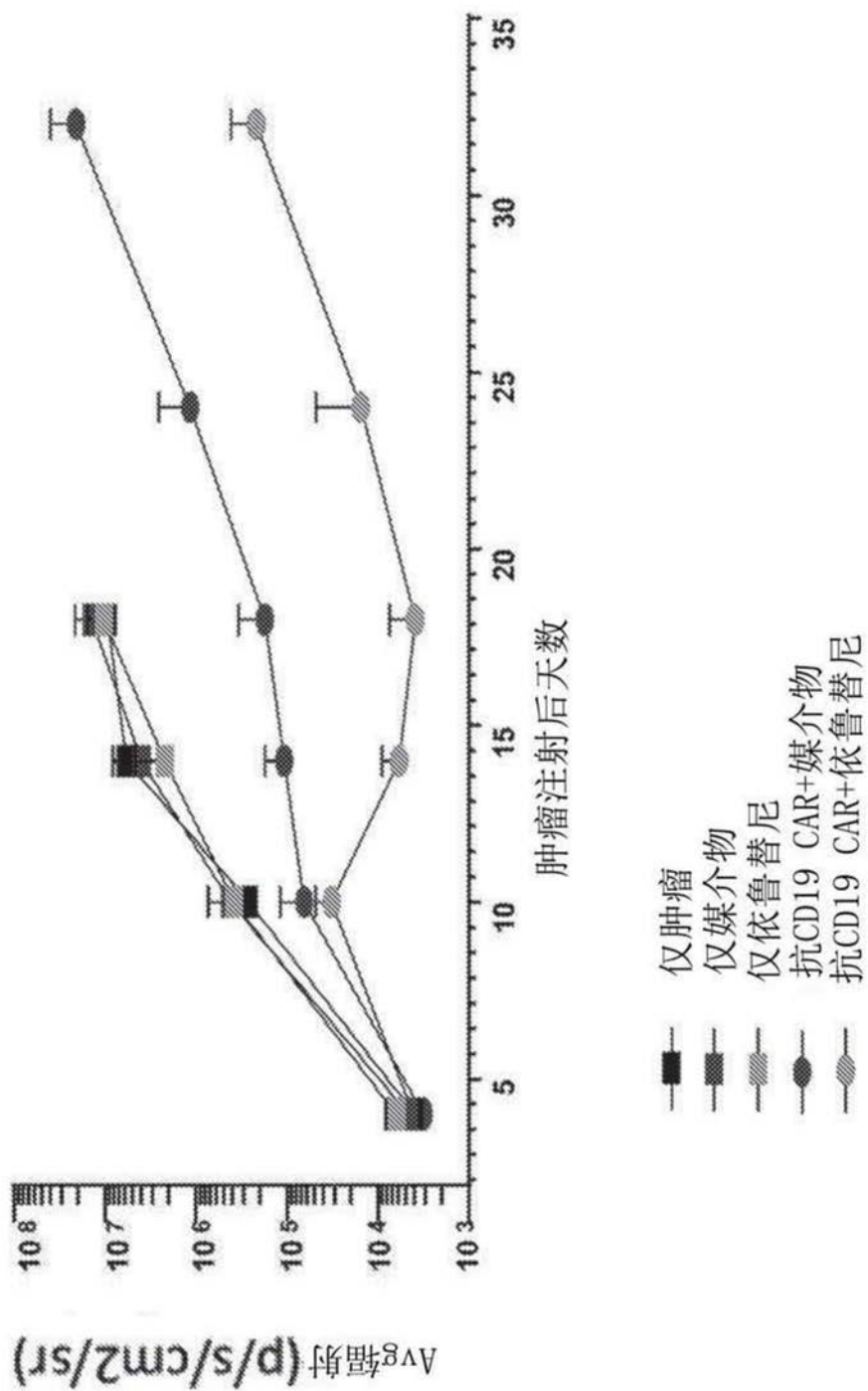


图6A

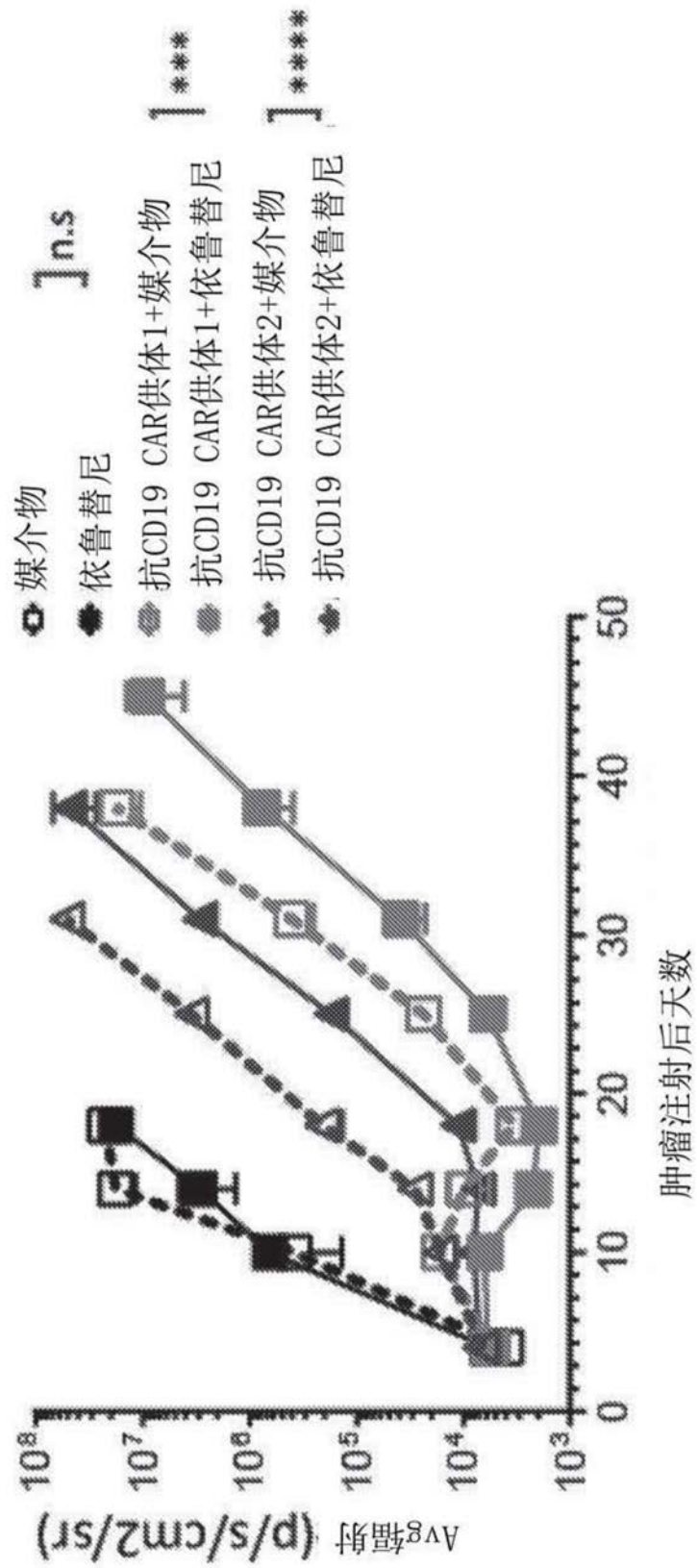


图6B

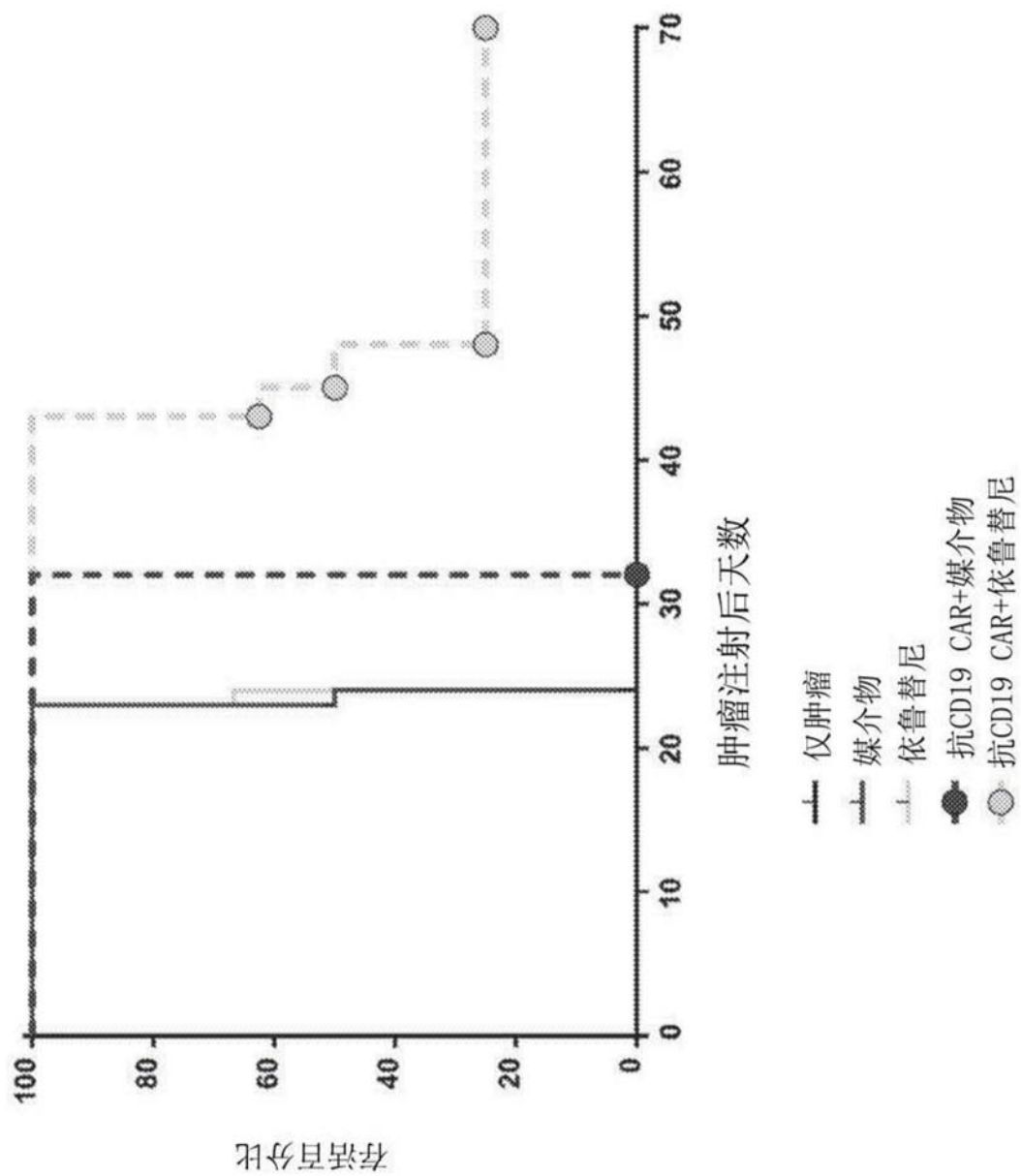


图6C

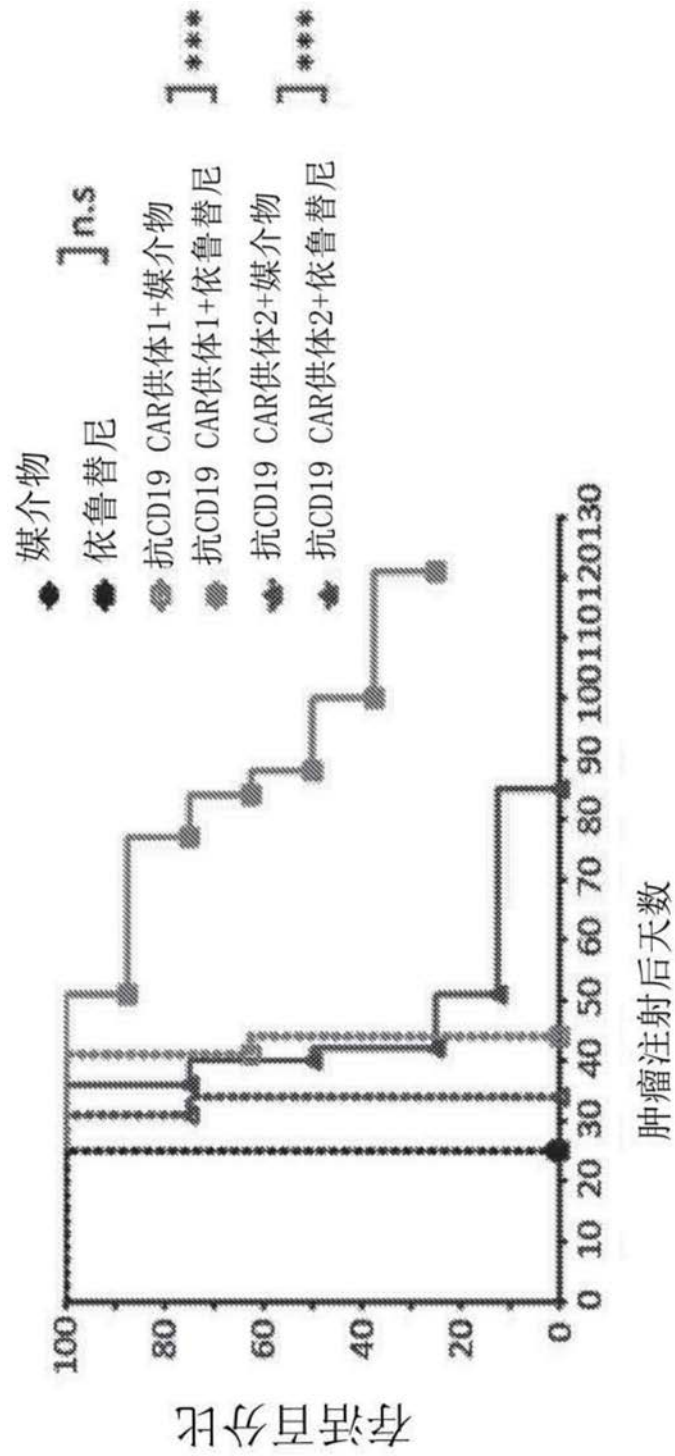


图6D

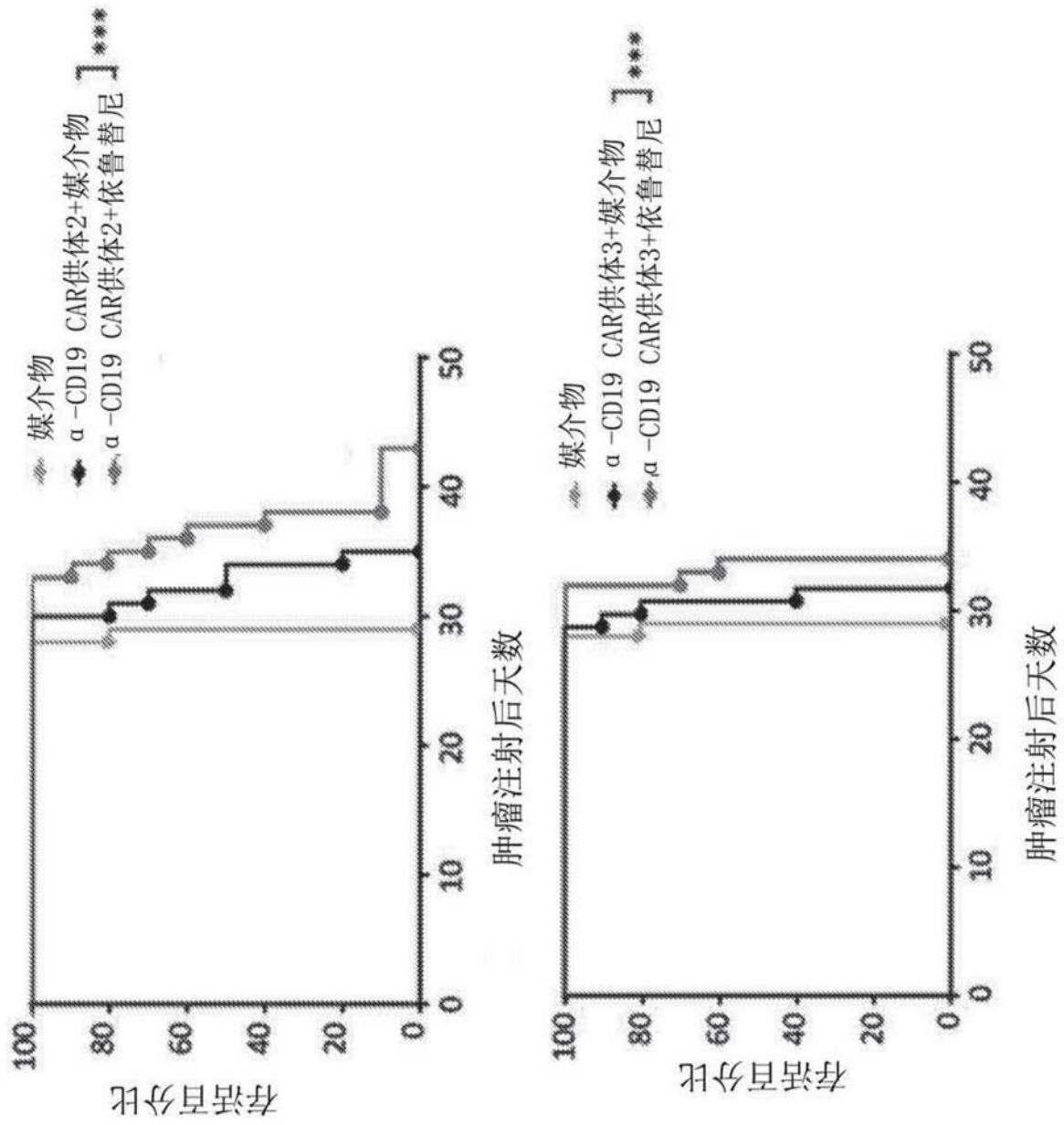


图7A

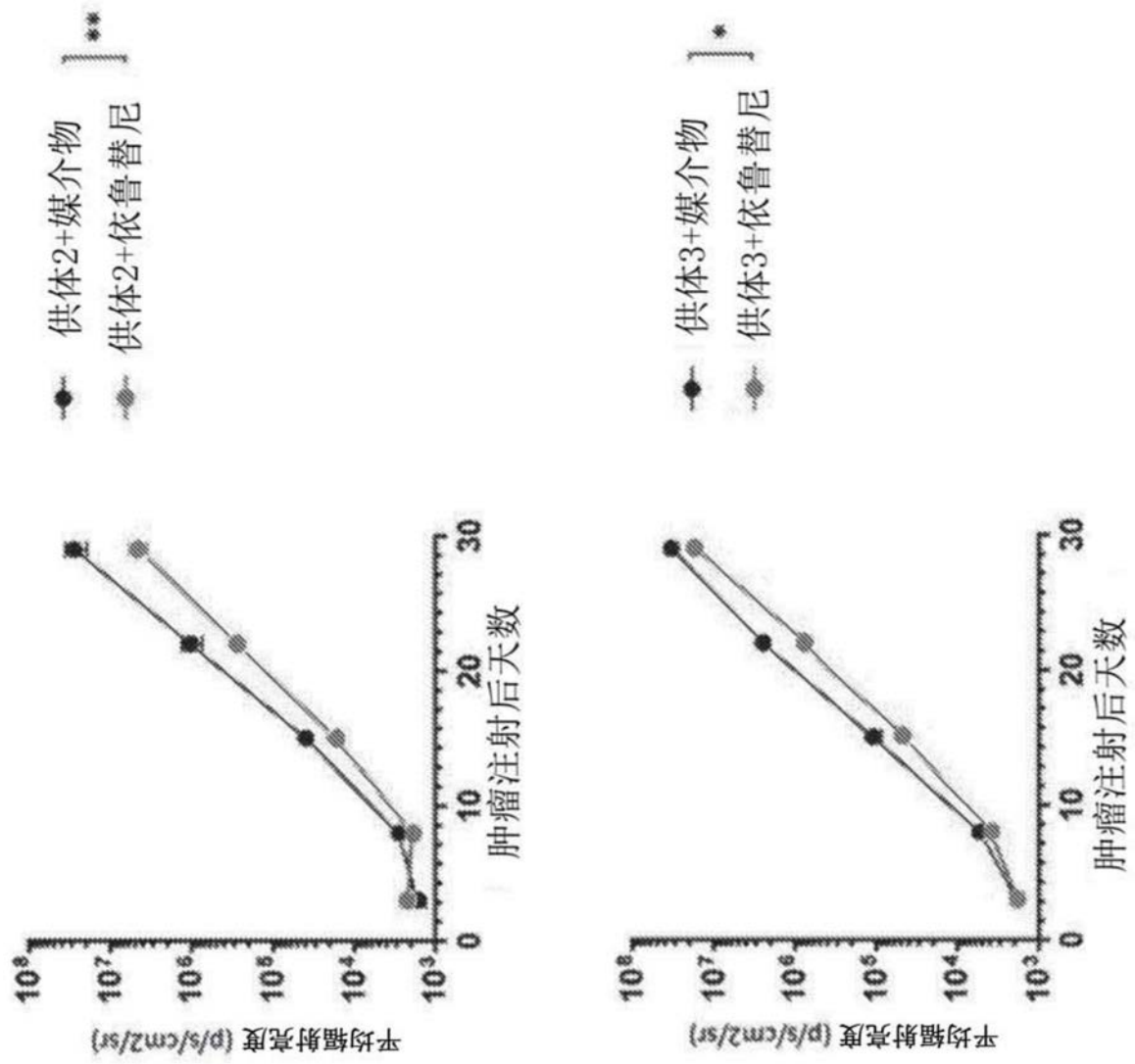


图7B

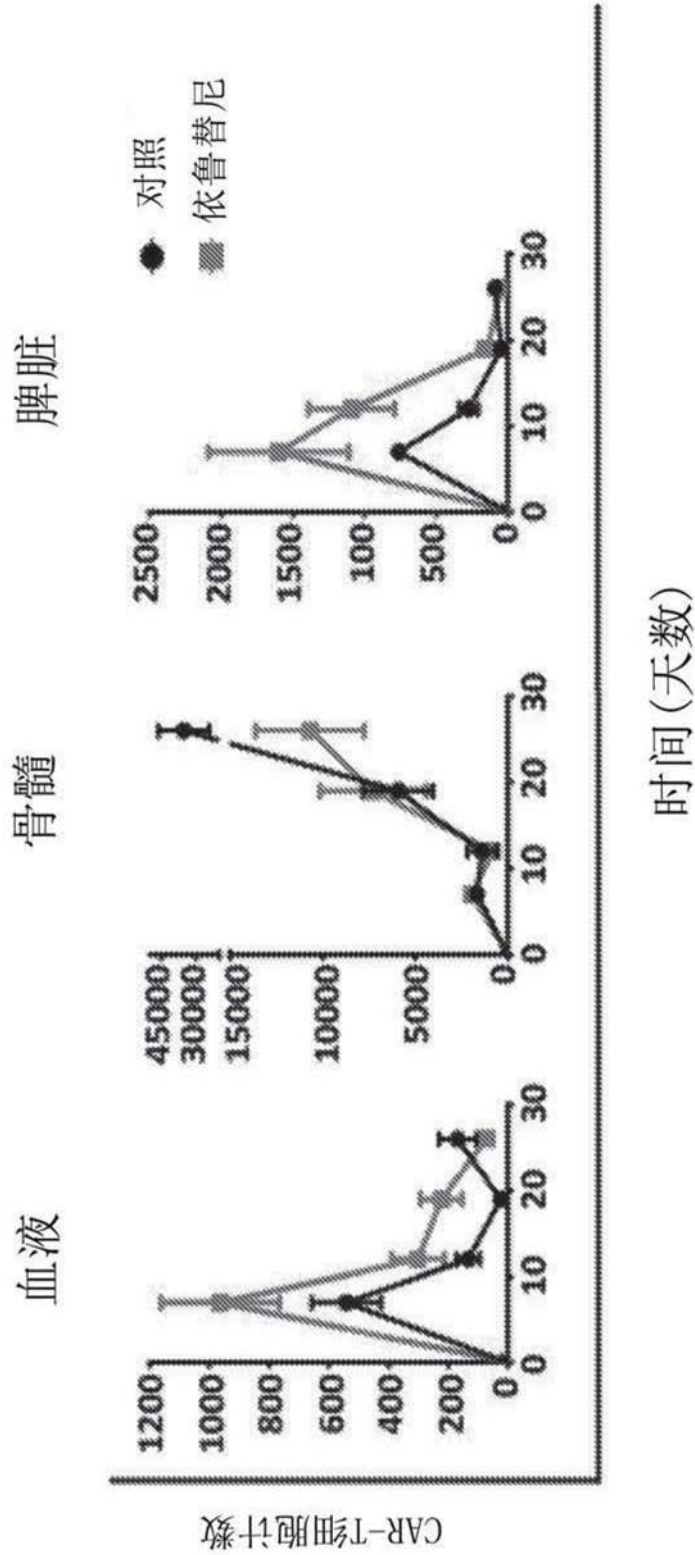


图7C

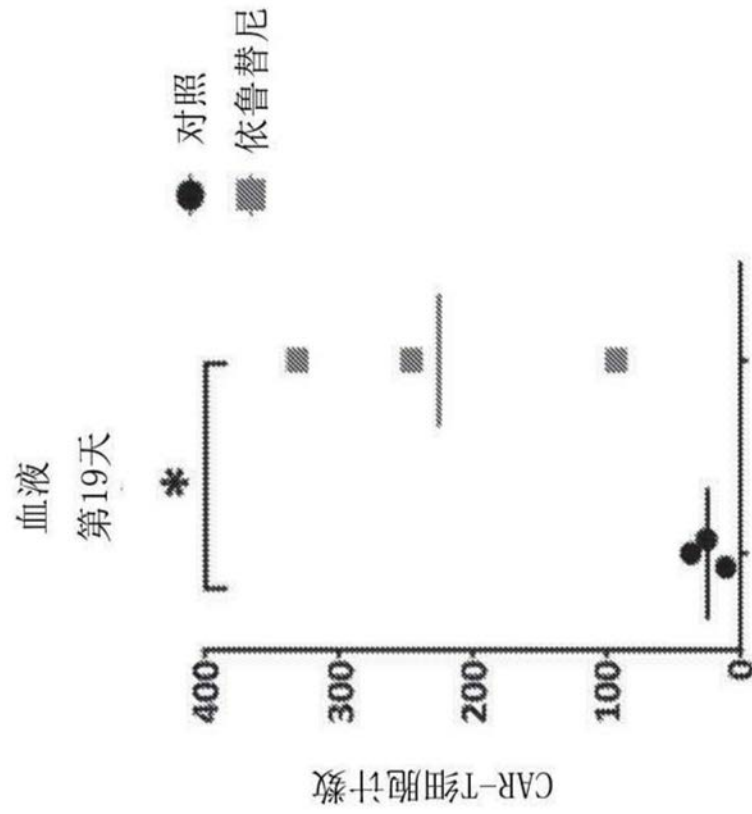


图7D

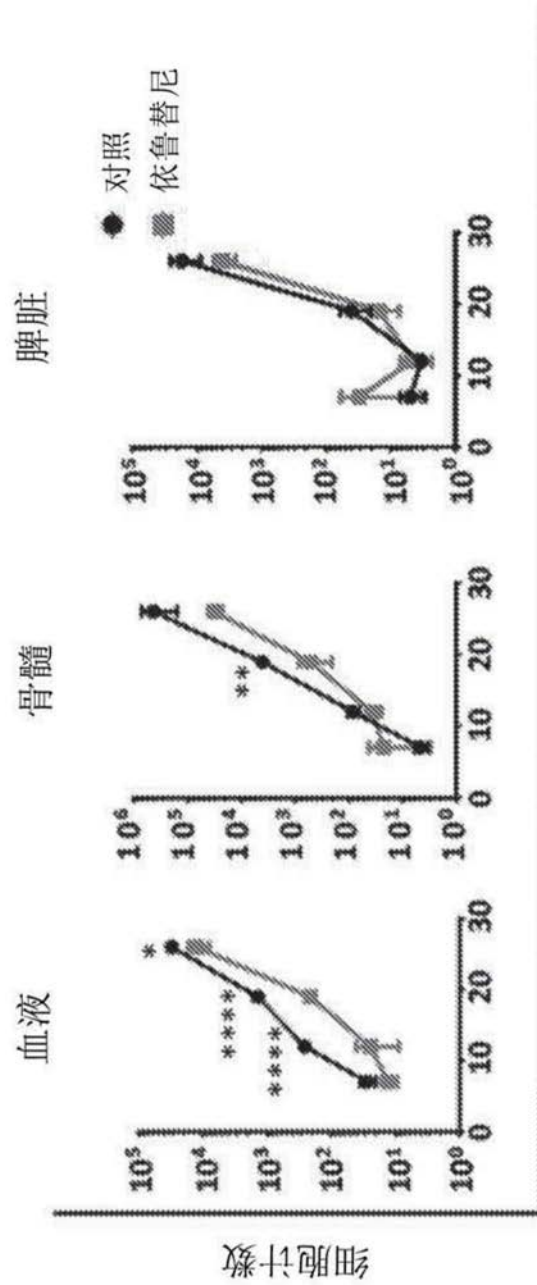
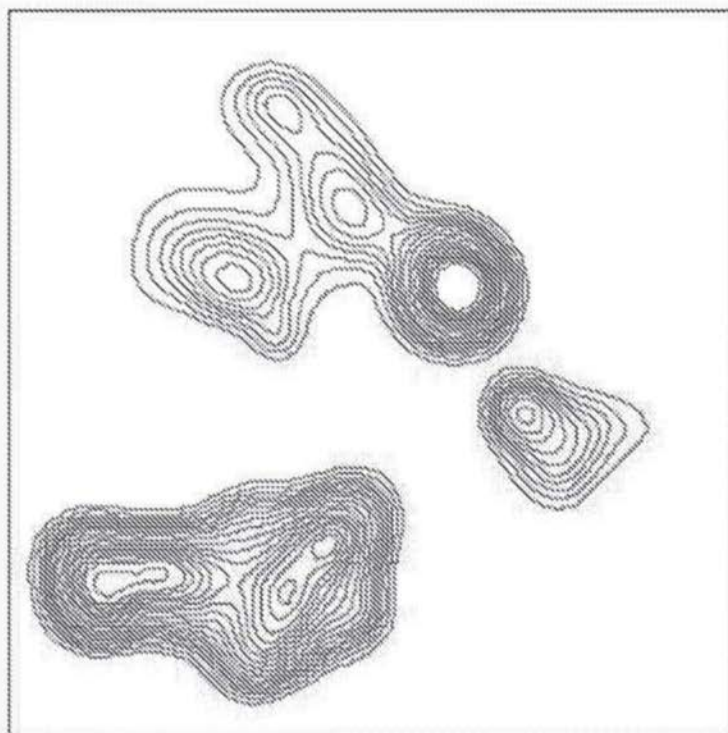


图7E

依鲁替尼



对照

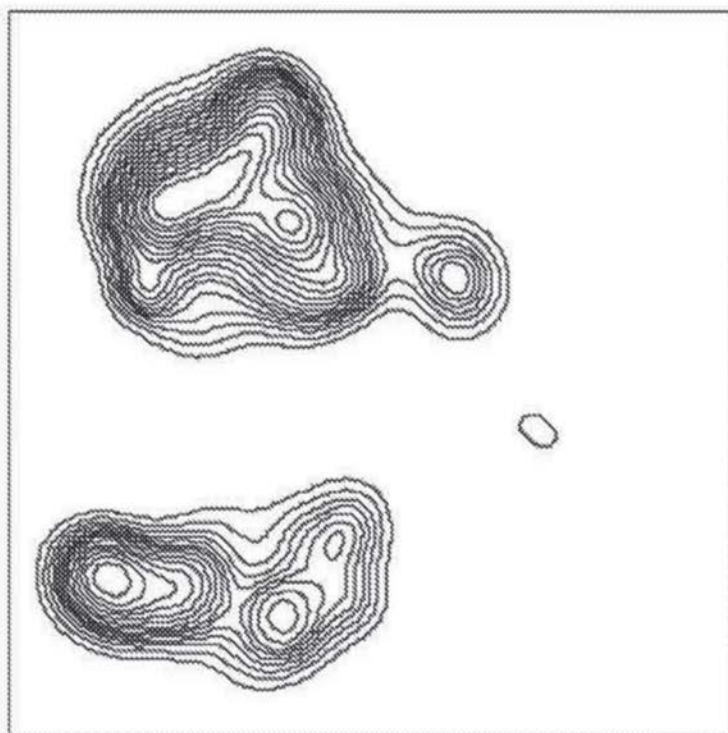
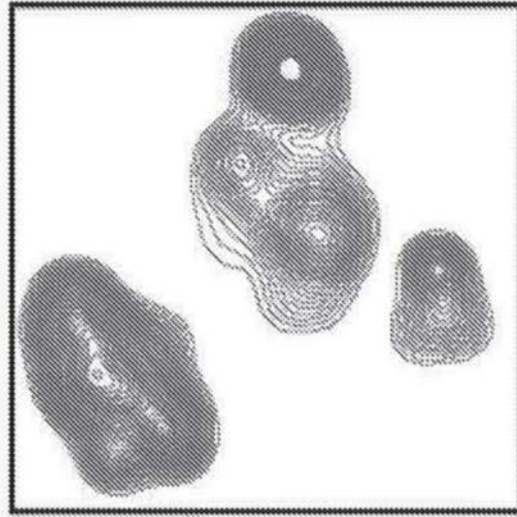
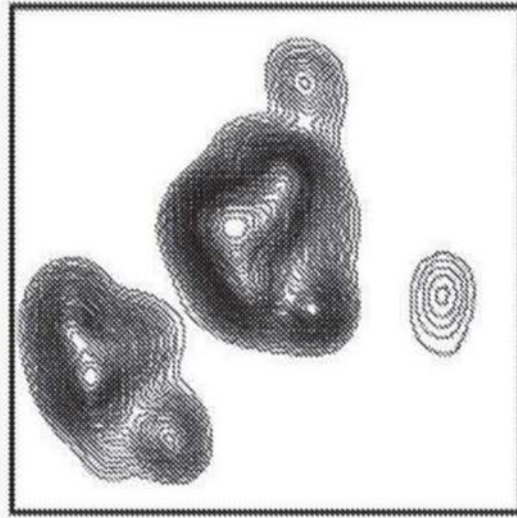


图8A

依鲁替尼



媒介物



t-SNE群

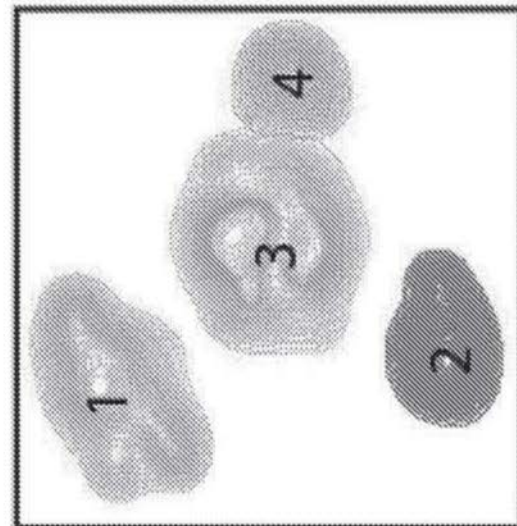


图8B

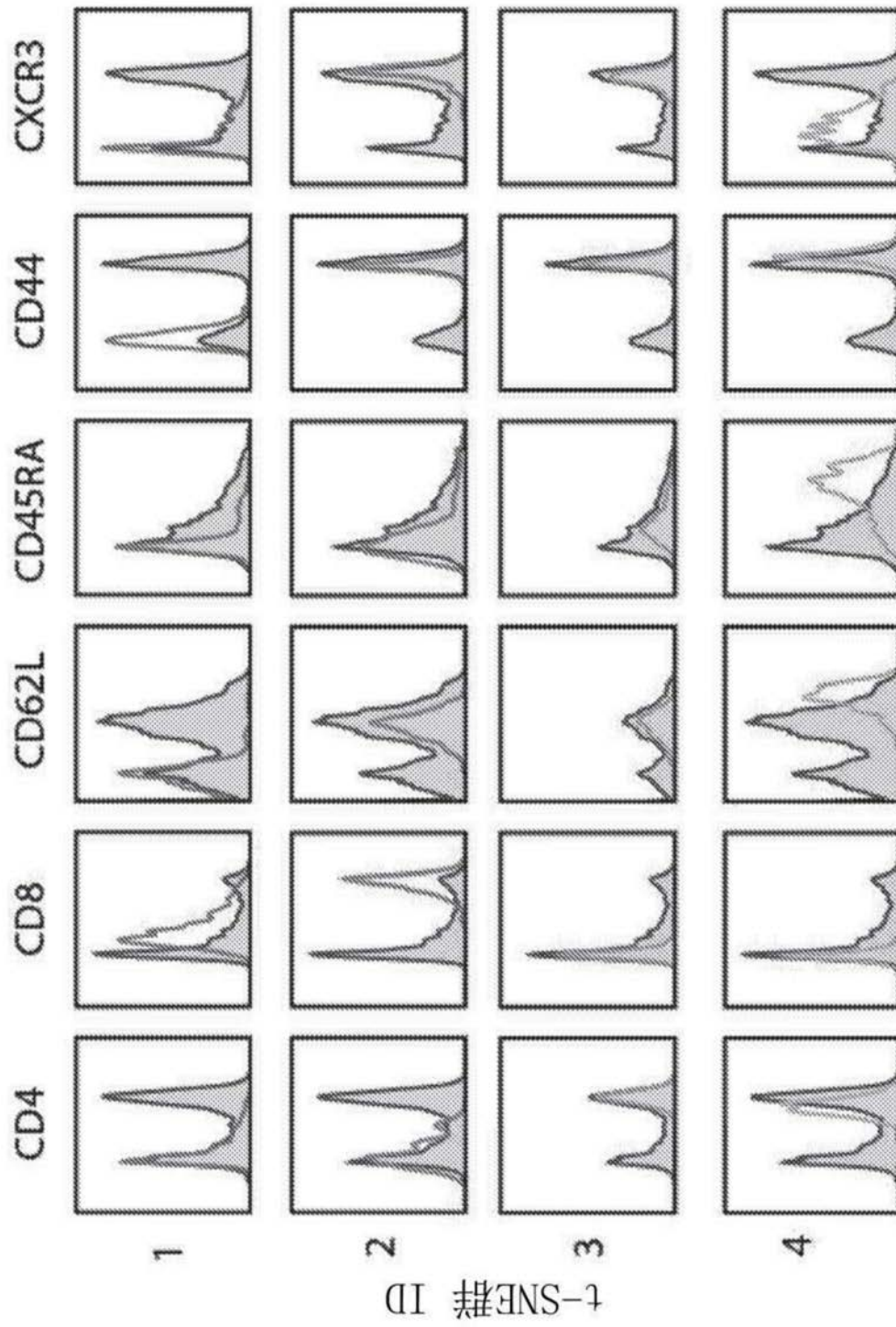


图8C

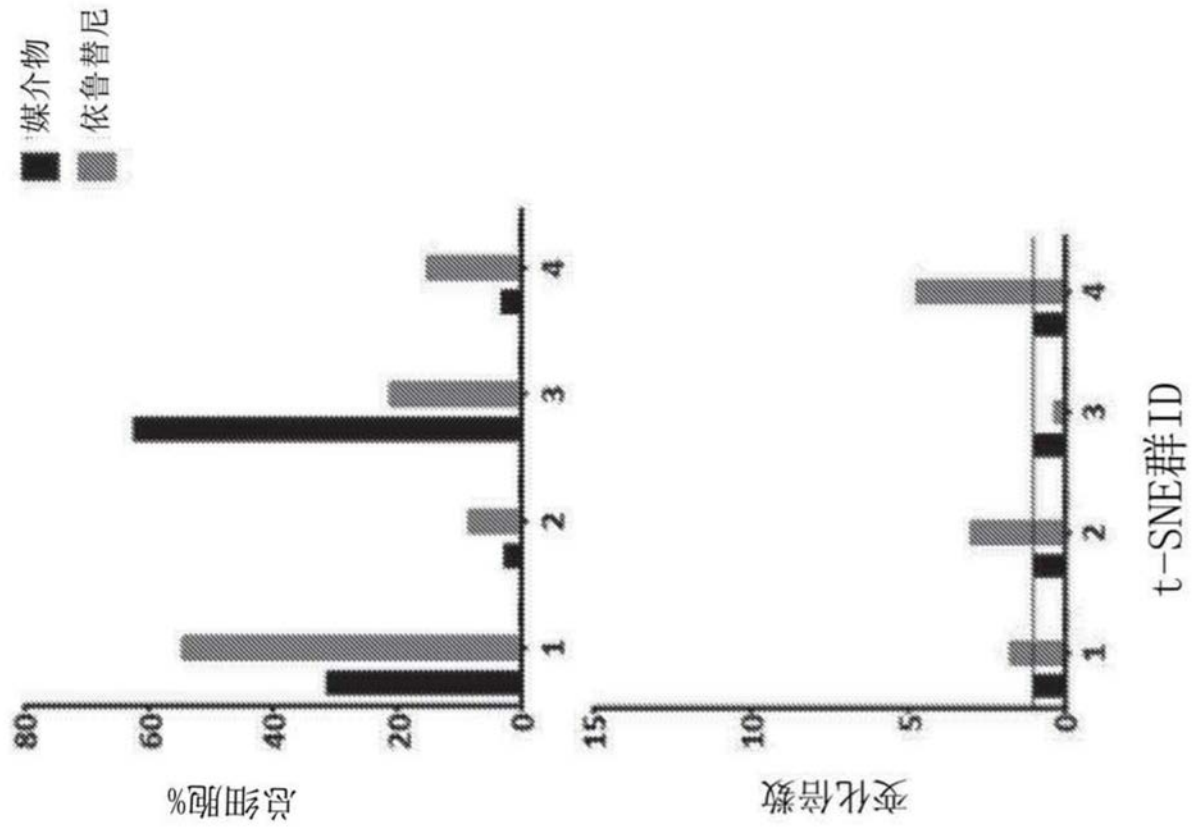


图8D

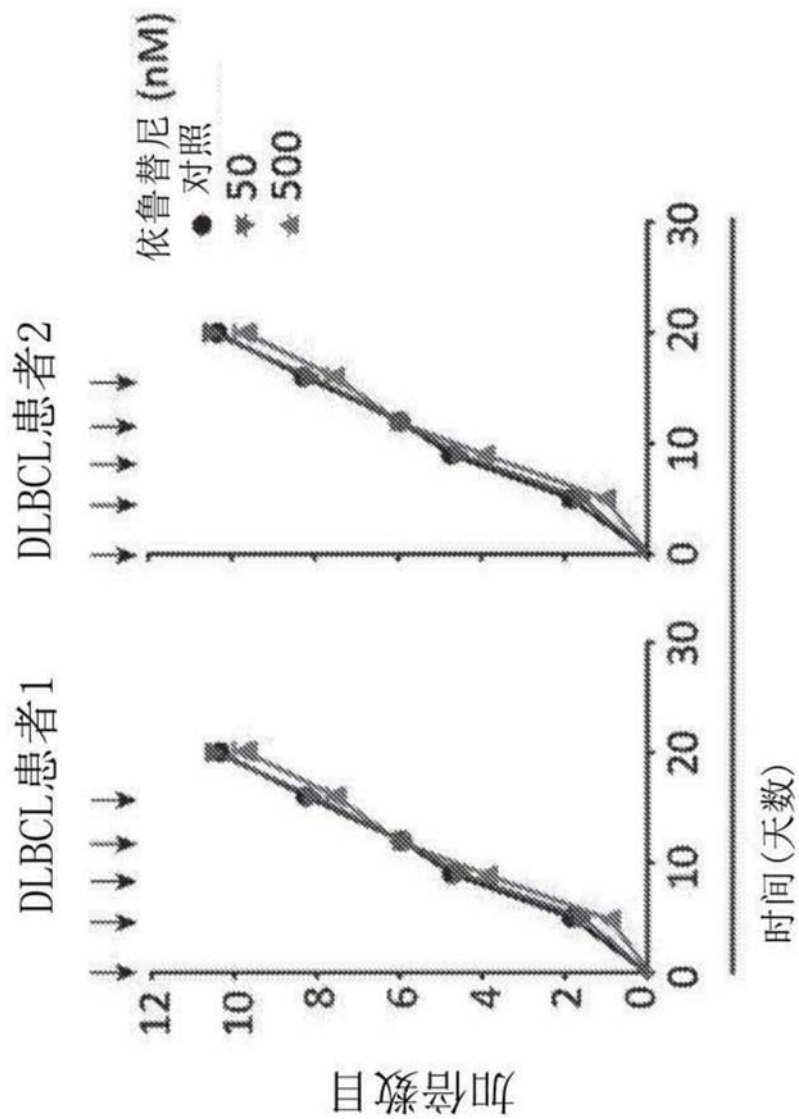


图9A

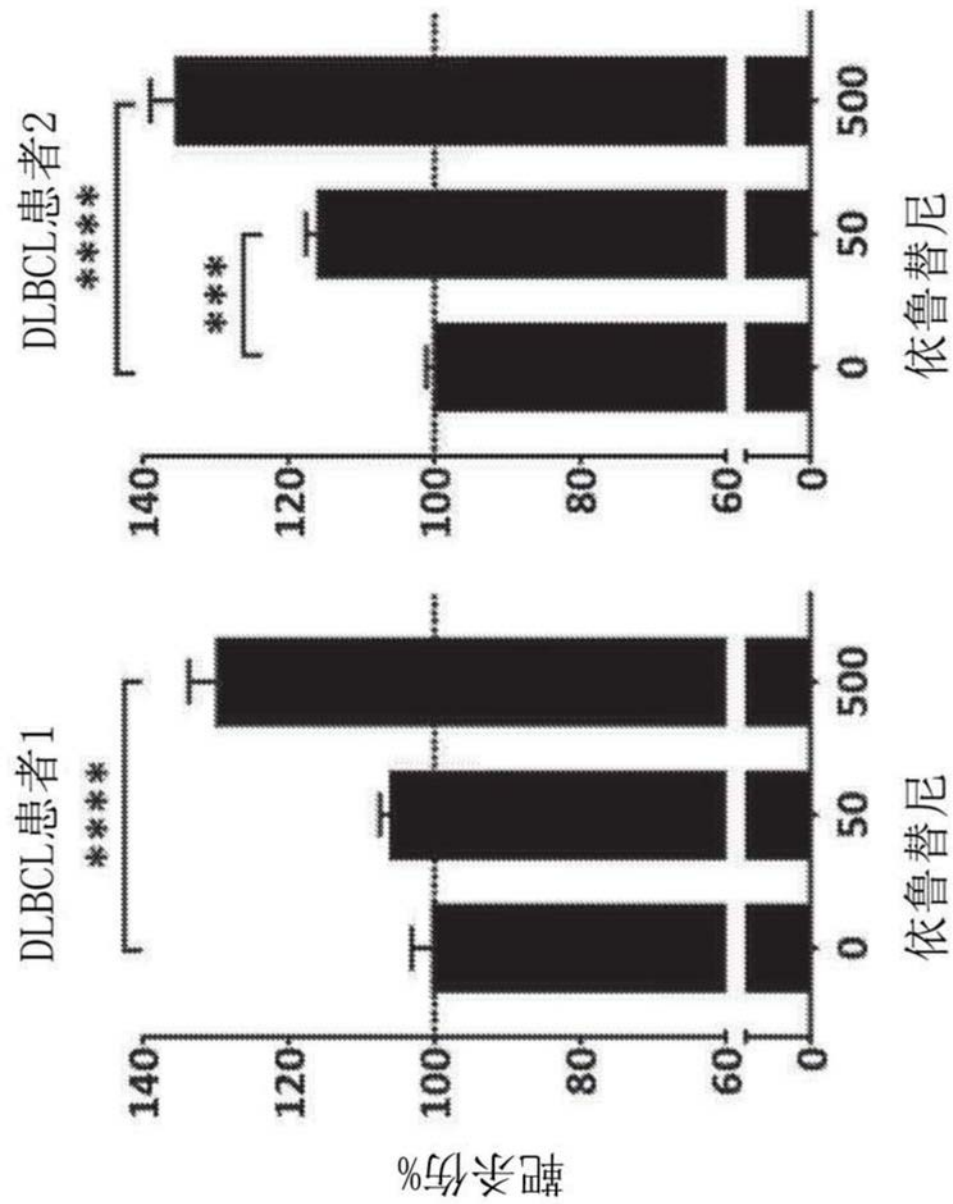


图9B

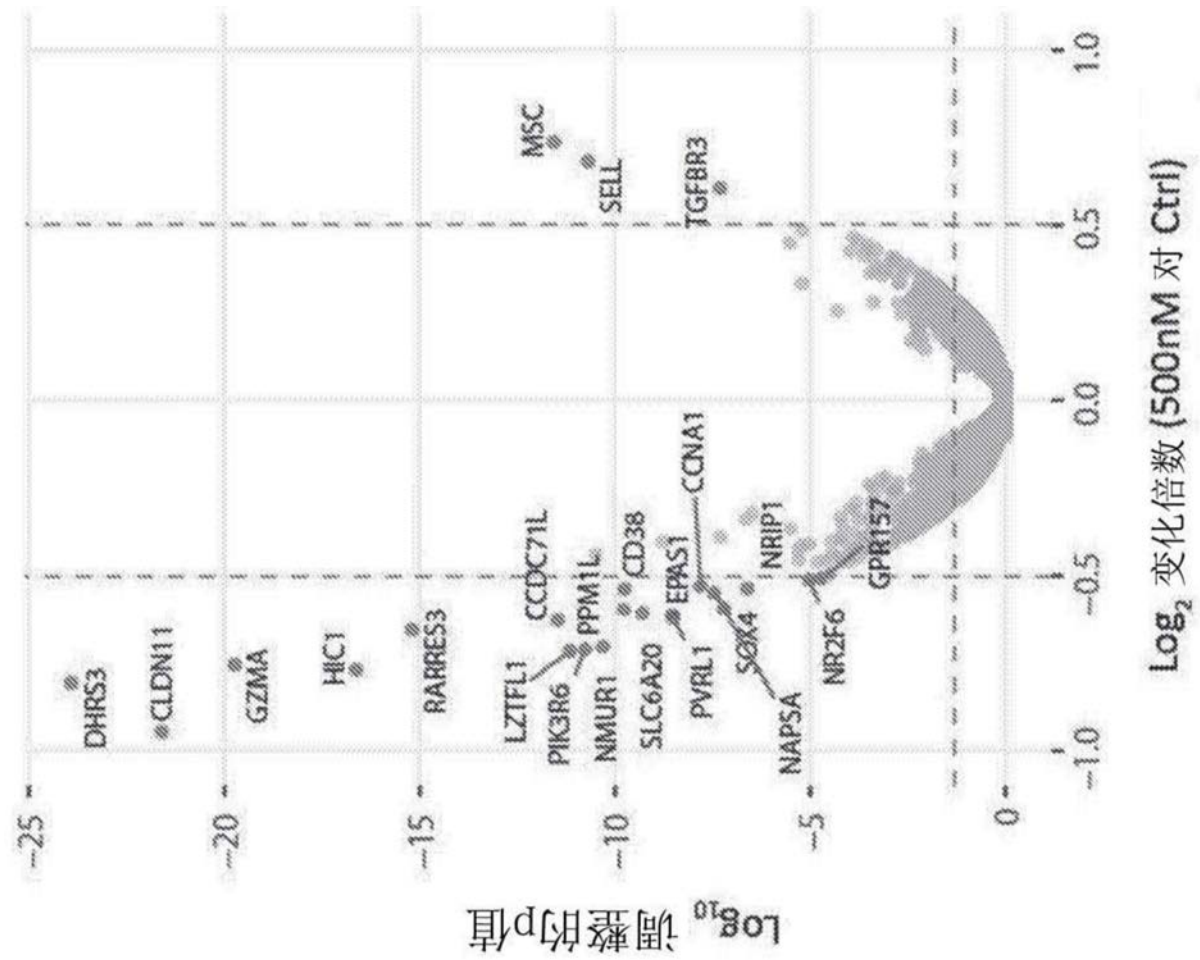


图10A

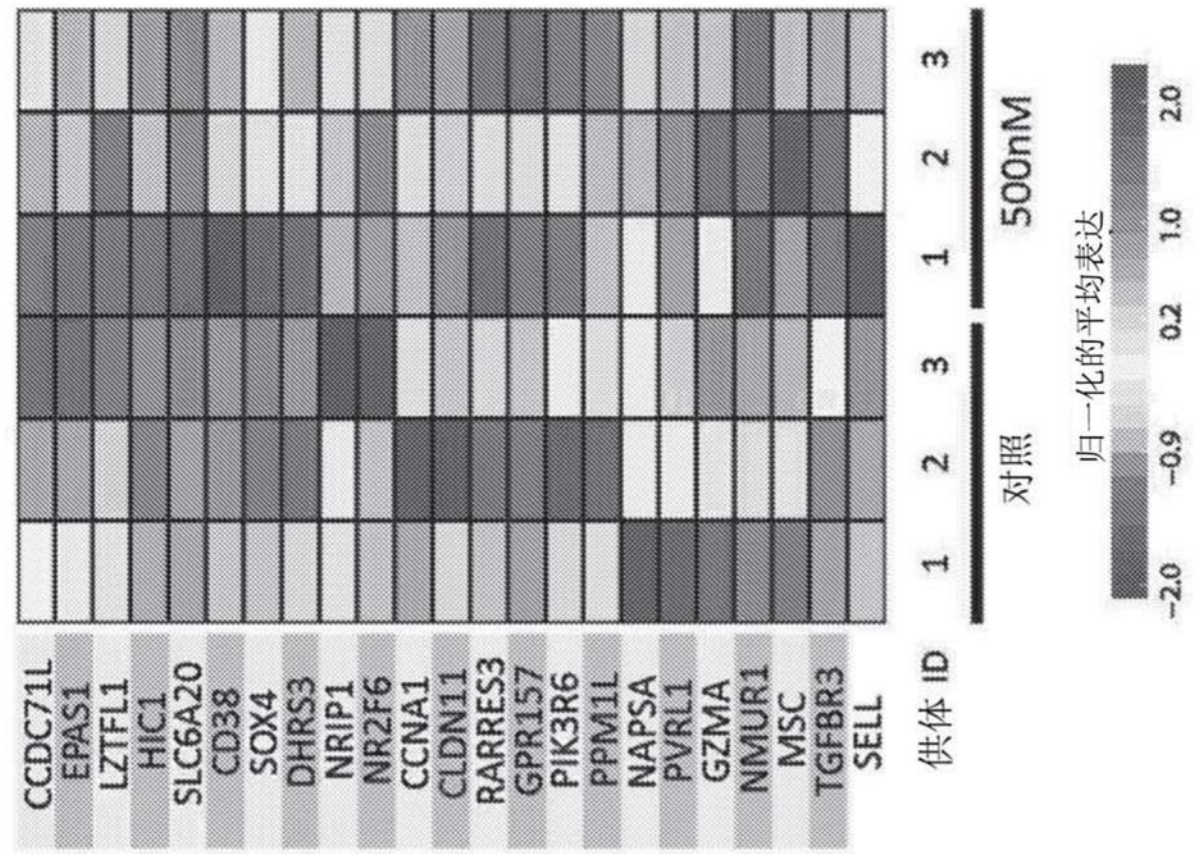


图10B

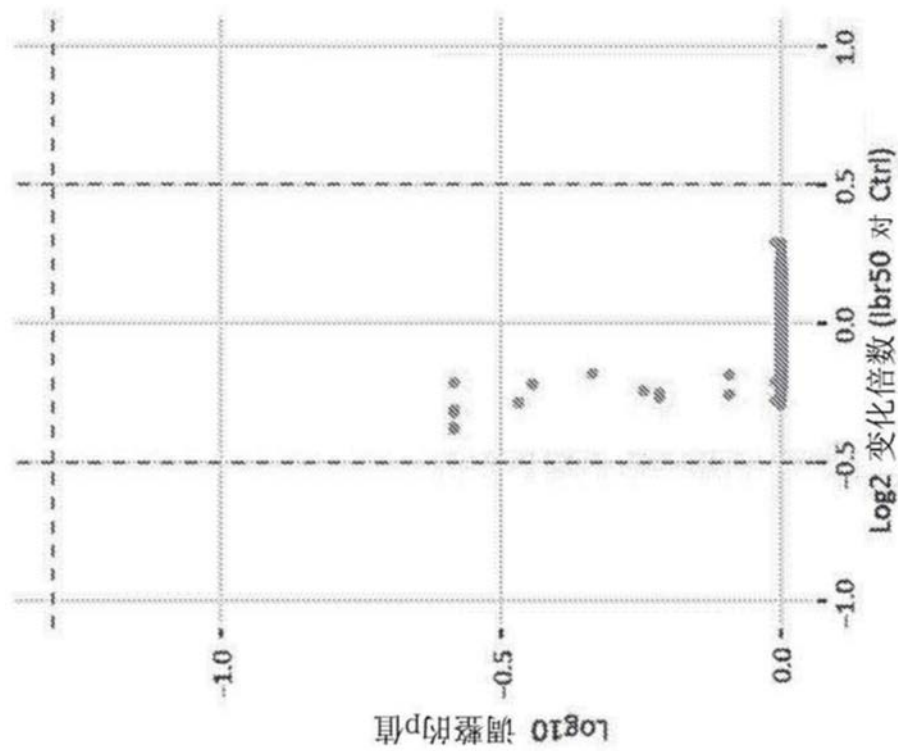


图10C

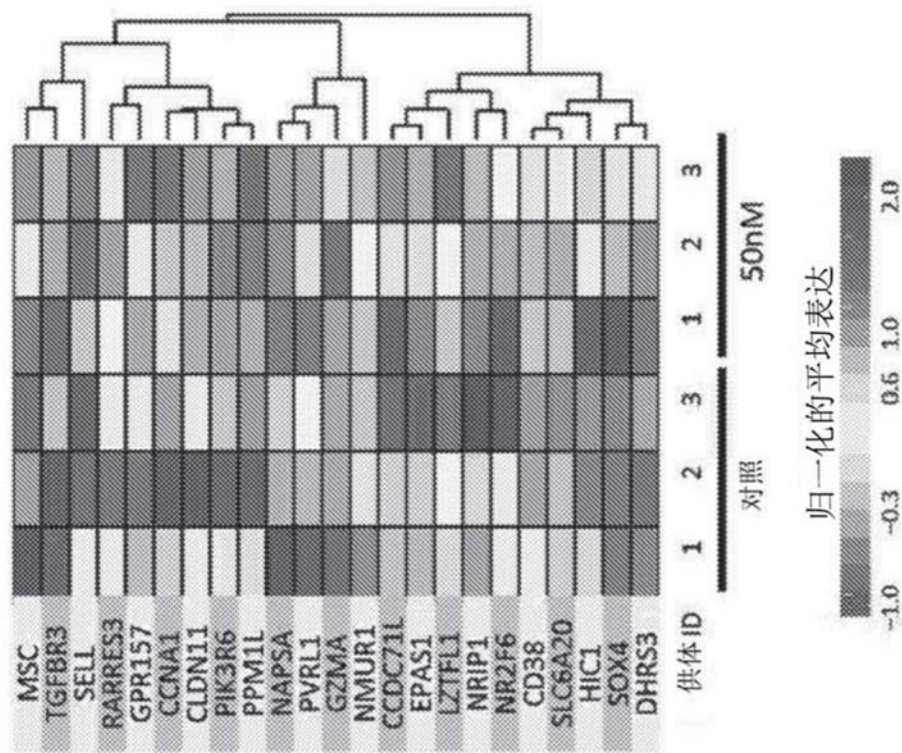


图10D

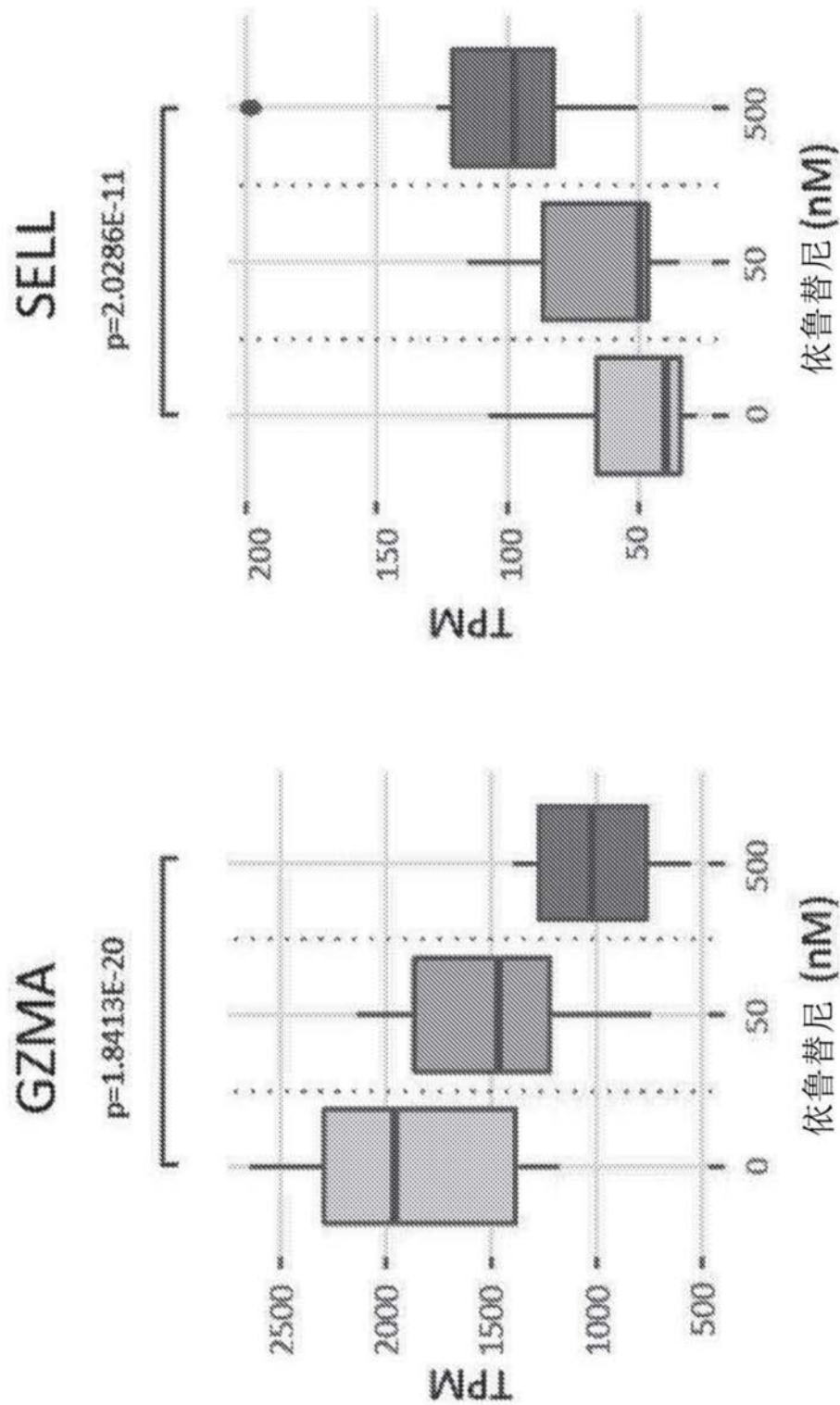


图11A

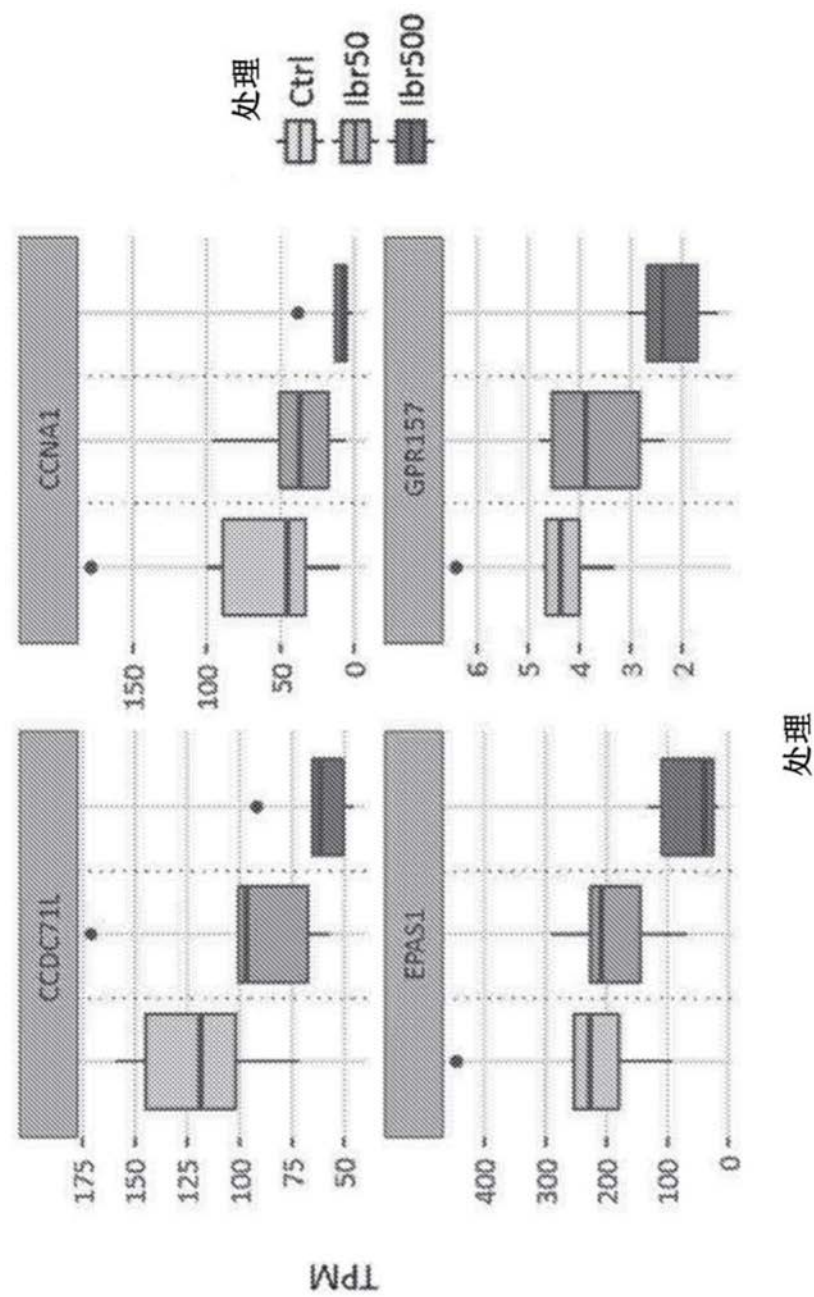


图11B

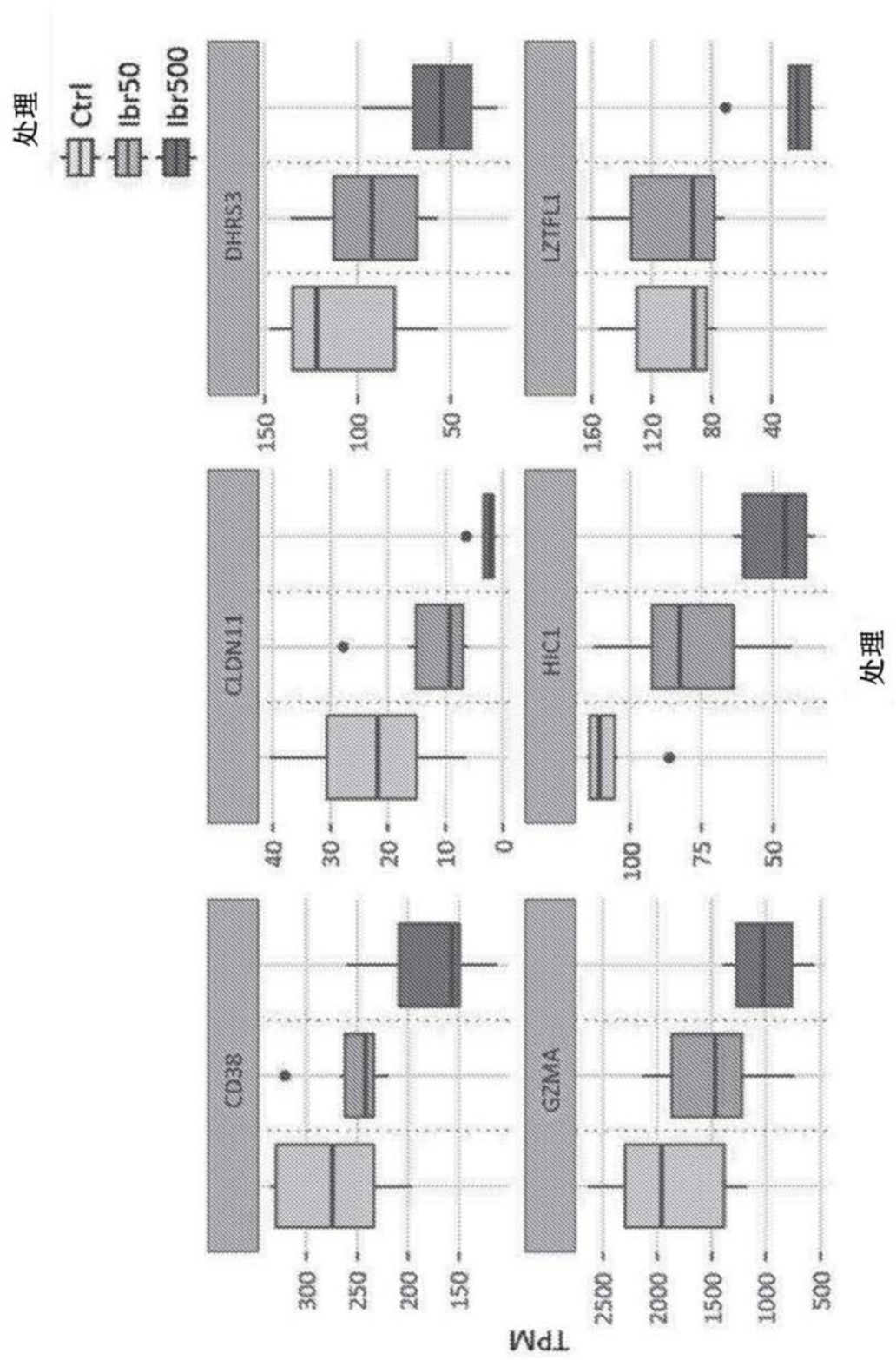


图11C

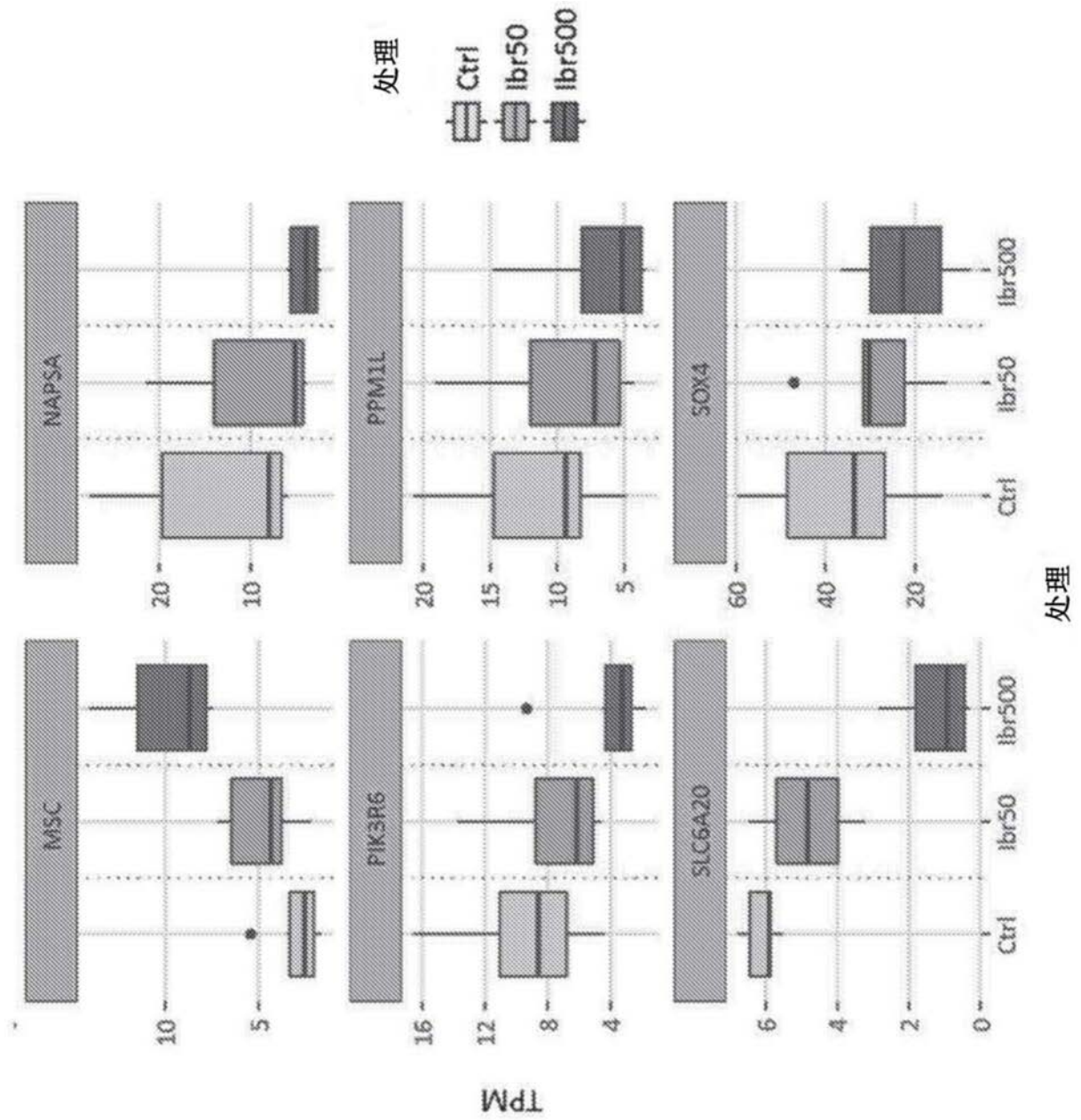


图11D

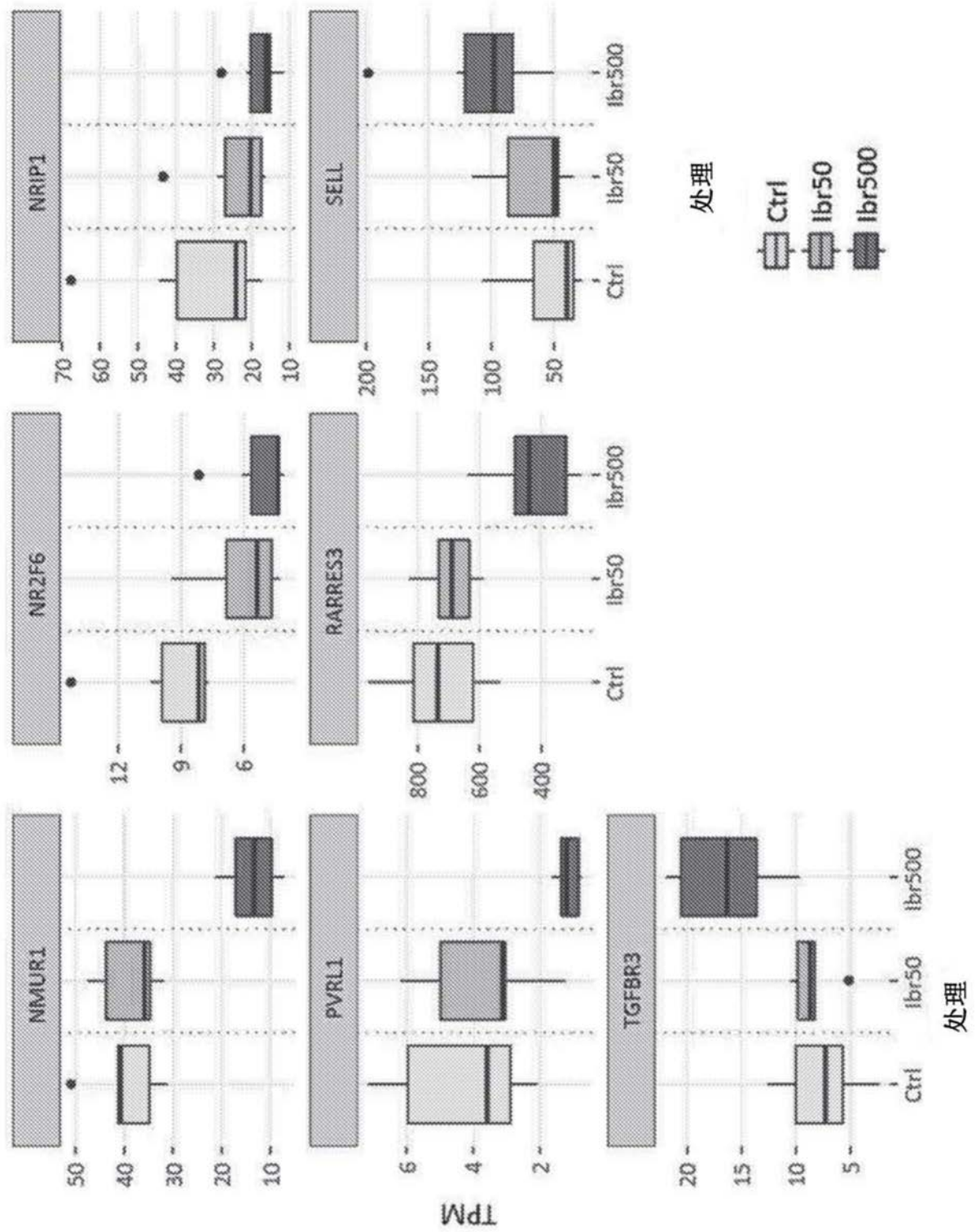


图11E

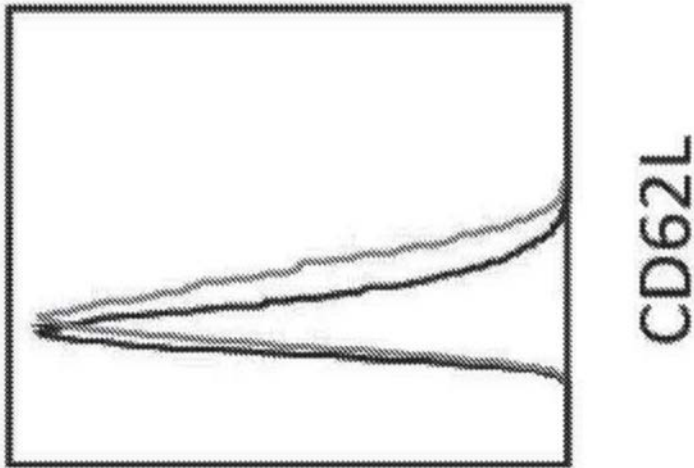


图12A

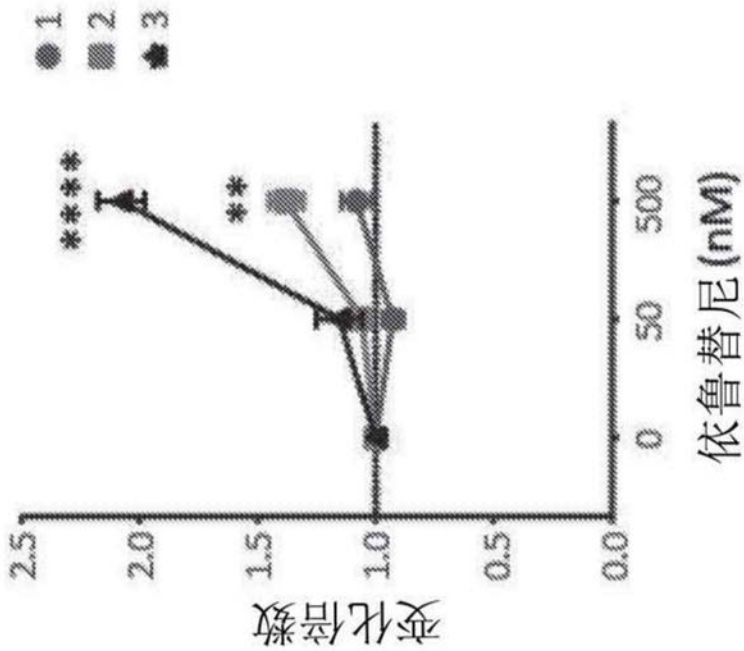


图12B