(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116096433 A
(43)申请公布日 2023.05.09

(21)申请号 202180052236.8
(22)申请日 2021.06.28
(30)优先权数据
63/045,641 2020.06.29 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.02.23
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/039418 2021.06.28
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/005994 EN 2022.01.06
(71)申请人 纪念斯隆凯特琳癌症中心
地址 美国纽约
(72)发明人 S·拉森 D·维奇 S·切尔
O·乌尔费利 G·杨
S·克雷布斯 M·达切克
D·舍因伯格 N·K·张
B·桑蒂奇
(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴
(51)Int.Cl.
A61K 51/04(2006.01)

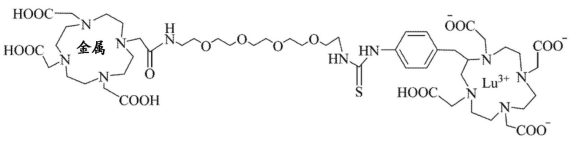
权利要求书7页 说明书57页 附图10页

(54)发明名称

表达C825的免疫细胞及其诊断用途

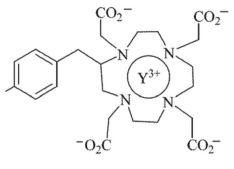
(57)摘要

本文提供了包含表达靶向肿瘤抗原的嵌合抗原受体以及抗DOTA C825抗原结合片段的工程化免疫细胞的组合物。本发明技术的工程化免疫细胞被配置为与可以与诊断用放射性药物(例如^{111}In)复合的DOTA半抗原结合。本文还公开了用于确定本文所述的工程化免疫细胞的体内生物分布、活力和扩增的方法。



变形杆菌属-Dota

(金属 = ^{111}In 等)



苄基-DOTA

CN 116096433 A

1.一种工程化免疫细胞,所述工程化免疫细胞包含:

(a)包含SEQ ID NO:35-39、41或42中任一个的氨基酸序列的抗DOTA C825抗原结合片段和/或编码所述抗DOTA C825抗原结合片段的核酸;以及

(b)与靶抗原结合的受体和/或编码所述受体的核酸。

2.根据权利要求1所述的工程化免疫细胞,其中所述受体是T细胞受体。

3.根据权利要求1或2所述的工程化免疫细胞,其中所述受体是天然细胞受体。

4.根据权利要求1或2所述的工程化免疫细胞,其中所述受体是非天然细胞受体。

5.根据权利要求1-4中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述受体是嵌合抗原受体。

6.根据权利要求5所述的工程化免疫细胞,其中所述编码所述抗DOTA C825抗原结合片段的核酸包含用于所述抗DOTA C825抗原结合片段的分泌的前导序列。

7.根据权利要求1-6中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述编码所述抗DOTA C825抗原结合片段的核酸与启动子可操作地连接。

8.根据权利要求7所述的工程化免疫细胞,其中所述启动子是组成型启动子。

9.根据权利要求7所述的工程化免疫细胞,其中所述启动子是条件性启动子。

10.根据权利要求9所述的工程化免疫细胞,其中所述条件性启动子由所述受体与所述靶抗原的结合诱导。

11.根据权利要求1-10中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述靶抗原是肿瘤抗原。

12.根据权利要求1-11中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述编码所述受体的核酸与组成型启动子可操作地连接。

13.根据权利要求5-12中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述嵌合抗原受体包含(i)细胞外抗原结合结构域;(ii)跨膜结构域;以及(iii)细胞内结构域。

14.根据权利要求13所述的工程化免疫细胞,其中所述细胞外抗原结合结构域与所述靶抗原结合。

15.根据权利要求11-14中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述肿瘤抗原选自5T4、α5β1-整合素、707-AP、A33、AFP、ART-4、B7H4、BAGE、Bcl-2、β-连环素、BCMA、Bcr-abl、MN/CIX抗体、CA125、CA19-9、CAMEL、CAP-1、CASP-8、CD4、CD5、CD19、CD20、CD21、CD22、CD25、CDC27/m、CD33、CD37、CD45、CD52、CD56、CD80、CD123、CDK4/m、CEA、c-Met、CS-1、CT、Cyp-B、细胞周期蛋白B1、DAGE、DAM、EBNA、EGFR、ErbB3、ELF2M、EMMPRIN、EpCam、肝配蛋白B2、雌激素受体、ETV6-AML1、FAP、铁蛋白、叶酸结合蛋白、GAGE、G250、GD-2、GM2、GnT-V、gp75、gp100(Pmel17)、HAGE、HER-2/neu、HLA-A*0201-R170I、HPV E6、HPV E7、Ki-67、HSP70-2M、HST-2、hTERT(或hTRT)、iCE、IGF-1R、IL-2R、IL-5、KIAA0205、LAGE、LDLR/FUT、LRP、MAGE、MART、MART-1/黑色素A、MART-2/Ski、MC1R、间皮素、MUC、MUC16、MUM-1-B、myc、MUM-2、MUM-3、NA88-A、NYESO-1、NY-Eso-B、p53、蛋白酶-3、p190小bcr-abl、Pml/RARα、PRAME、孕酮受体、PSA、PSCA、PSM、PSMA、ras、RAGE、RU1或RU2、RORI、SART-1或SART-3、存活蛋白、TEL/AML1、TGFβ、TPI/m、TRP-1、TRP-2、TRP-2/INT2、生腱蛋白、TSTA酪氨酸酶、VEGF和WT1。

16.根据权利要求13-15中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述细胞外抗原结合结构域包含单链可变片段(scFv)。

17.根据权利要求13-16中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述细胞外抗原结合结构域包含人scFv。

18.根据权利要求13-17中任一项所述的工程化免疫细胞，其中所述细胞外抗原结合结构域包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4的CD19 scFv。

19.根据权利要求13-18中任一项所述的工程化免疫细胞，其中所述细胞外抗原结合结构域包含与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4具有至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％序列同一性的CD19 scFv。

20.根据权利要求13-19中任一项所述的工程化免疫细胞，其中所述细胞外抗原结合结构域包含与所述细胞外抗原结合结构域的N端共价连接的信号肽。

21.根据权利要求13-20中任一项所述的工程化免疫细胞，其中所述跨膜结构域包含CD8跨膜结构域。

22.根据权利要求13-21中任一项所述的工程化免疫细胞，其中所述细胞内结构域包含一个或多个共刺激结构域。

23.根据权利要求22所述的工程化免疫细胞，其中所述一个或多个共刺激结构域选自CD28共刺激结构域、CD3ζ链、4-1BBL共刺激结构域或其任何组合。

24.根据权利要求1-23中任一项所述的工程化免疫细胞，其中所述工程化免疫细胞是淋巴细胞。

25.根据权利要求24所述的工程化免疫细胞，其中所述淋巴细胞是T细胞、B细胞或自然杀伤(NK)细胞。

26.根据权利要求25所述的工程化免疫细胞，其中所述T细胞是CD4+T细胞或CD8+T细胞。

27.根据权利要求1-26中任一项所述的工程化免疫细胞，其中所述工程化免疫细胞是肿瘤浸润淋巴细胞。

28.根据权利要求1-27中任一项所述的工程化免疫细胞，其中所述工程化免疫细胞源自自体供体或同种异体供体。

29.一种多肽，所述多肽包含嵌合抗原受体以及包含SEQ ID NO:35-39、41或42中任一个的氨基酸序列的抗DOTA C825抗原结合片段。

30.根据权利要求29所述的多肽，所述多肽还包含位于所述抗DOTA C825抗原结合片段与所述嵌合抗原受体之间的自切割肽。

31.根据权利要求30所述的多肽，其中所述自切割肽是P2A自切割肽。

32.根据权利要求29-31中任一项所述的多肽，其中所述抗DOTA C825抗原结合片段包含用于所述抗DOTA C825抗原结合片段的分泌的前导序列。

33.根据权利要求29-32中任一项所述的多肽，其中所述嵌合抗原受体包含(i)细胞外抗原结合结构域;(ii)跨膜结构域;以及(iii)细胞内结构域。

34.根据权利要求33所述的多肽，其中所述细胞外抗原结合结构域与肿瘤抗原结合。

35.根据权利要求34所述的多肽，其中所述肿瘤抗原选自MUC16、间皮素、CD19、WT1、PSCA和BCMA。

36.根据权利要求33-35中任一项所述的多肽，其中所述细胞外抗原结合结构域包含单链可变片段(scFv)。

37.根据权利要求33-36中任一项所述的多肽，其中所述细胞外抗原结合结构域包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4的CD19 scFv。

38.根据权利要求33-37中任一项所述的多肽，其中所述细胞外抗原结合结构域包含与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4具有至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％序列同一性的CD19 scFv。

39.根据权利要求33-38中任一项所述的多肽，其中所述跨膜结构域包含CD8跨膜结构域。

40.根据权利要求33-39中任一项所述的多肽，其中所述细胞内结构域包含一个或多个共刺激结构域。

41.根据权利要求40所述的多肽，其中所述一个或多个共刺激结构域选自CD28共刺激结构域、CD3ζ链、4-1BBL共刺激结构域或其任何组合。

42.一种编码根据权利要求29-41中任一项所述的多肽的核酸。

43.根据权利要求42所述的核酸，其中所述编码所述多肽的核酸与启动子可操作地连接。

44.根据权利要求43所述的核酸，其中所述启动子是组成型启动子。

45.根据权利要求43所述的核酸，其中所述启动子是条件性启动子。

46.根据权利要求45所述的核酸，其中所述条件性启动子是由所述嵌合抗原受体与抗原结合可诱导的。

47.一种载体，所述载体包含根据权利要求42-46中任一项所述的核酸。

48.根据权利要求47所述的载体，其中所述载体是病毒载体或质粒。

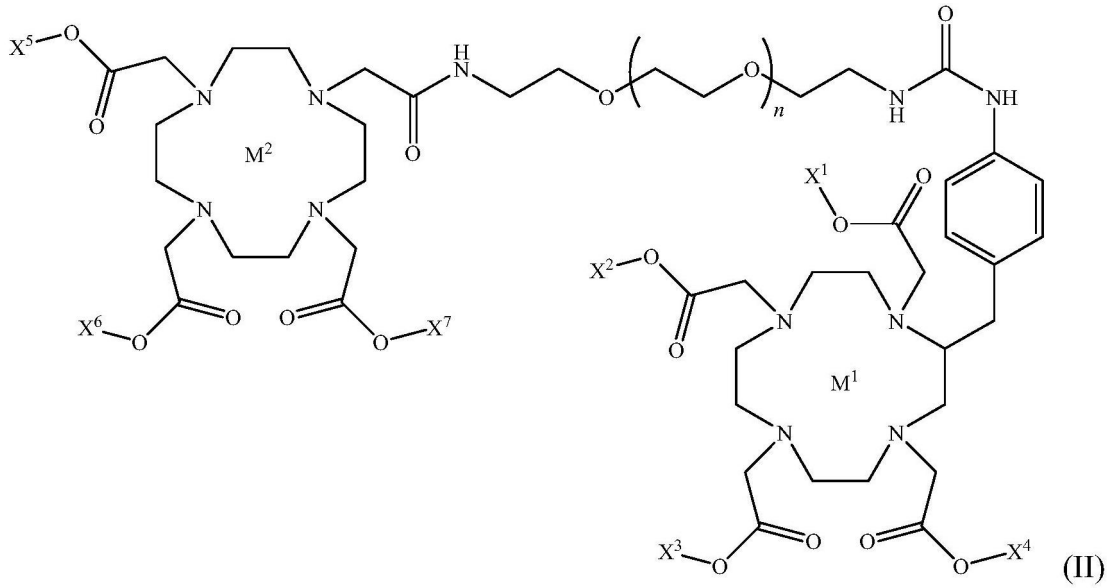
49.根据权利要求47所述的载体，其中所述载体是逆转录病毒载体。

50.一种宿主细胞，所述宿主细胞包含根据权利要求42-46中任一项所述的核酸或根据权利要求47-49中任一项所述的载体。

51.一种包含根据权利要求1-28中任一项所述的工程化免疫细胞和DOTA半抗原的复合物，其中所述工程化免疫细胞被配置为与所述DOTA半抗原和肿瘤抗原结合。

52.根据权利要求51所述的复合物，其中所述DOTA半抗原是苄基-DOTA、NH2-苄基(Bn)DOTA、DOTA-去铁胺、DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH2、Ac-Lys(HS G)D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH2、DOTA-D-Asp-D-Lys(HSG)-D-Asp-D-Lys(HSG)-NH2、DOTA-D-Glu-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH2、DOTA-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH2、DOTA-D-Ala-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH2、DOTA-D-Ph e-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-NH2、Ac-D-Phe-D-Lys(DOTA)-D-Tyr-D-Lys(DOTA)-NH2、Ac-D-Phe-D-Lys(DTPA)-D-Tyr-D-Lys(DTPA)-NH2、Ac-D-Phe-D-Lys(Bz-DTPA)-D-Tyr-D-Lys(Bz-DTPA)-NH2、Ac-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Lys(Tscg-Cys)-NH2、DOTA-D-Phe-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Lys(Tscg-Cys)-NH2、(Tscg-Cys)-D-Phe-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Lys(DOTA)-NH2、Tscg-D-Cys-D-Glu-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH2、(Tscg-Cys)-D-Glu-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH2、Ac-D-Cys-D-Lys(DOTA)-D-Tyr-D-Ala-D-Lys(DOTA)-D-Cys-NH2、Ac-D-Cys-D-Lys(DTPA)-D-Tyr-D-Lys(DTPA)-NH2、Ac-D-Lys(DTPA)-D-Tyr-D-Lys(DTPA)-D-Lys(Tscg-Cys)-NH2、Ac-D-Lys(DOTA)-D-Tyr-D-Lys(DOTA)-D-Lys(Tscg-Cys)-NH2、DOTA-RGD、DOTA-PEG-E(c(RGDyK))2、DOTA-8-AOC-BBN、DOTA-PESIN、p-NO2-苄基-DOTA、DOTA-生物素-肌氨酸(DOTA-生物素)、1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸单(N-羟基琥珀酰亚胺酯)(DOTA-NHS)或DOTATyrLysDOTA。

53.根据权利要求51所述的复合物,其中所述DOTA半抗原具有式II或其药学上可接受的盐的结构



(II)

其中

M^1是$^{175}Lu^{3+}$、$^{45}Sc^{3+}$、$^{69}Ga^{3+}$、$^{71}Ga^{3+}$、$^{89}Y^{3+}$、$^{113}In^{3+}$、$^{115}In^{3+}$、$^{139}La^{3+}$、$^{136}Ce^{3+}$、$^{138}Ce^{3+}$、$^{140}Ce^{3+}$、$^{142}Ce^{3+}$、$^{151}Eu^{3+}$、$^{153}Eu^{3+}$、$^{159}Tb^{3+}$、$^{154}Gd^{3+}$、$^{155}Gd^{3+}$、$^{156}Gd^{3+}$、$^{157}Gd^{3+}$、$^{158}Gd^{3+}$或$^{160}Gd^{3+}$;

M^2是放射性核素阳离子;

X^1、X^2、X^3和X^4各自独立地是孤对电子(即提供氧阴离子)或H;

X^5、X^6和X^7各自独立地是孤对电子(即提供氧阴离子)或H;并且

n是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或22。

54.根据权利要求51-53中任一项所述的复合物,其中M^2是^{111}In、^{67}Ga、^{51}Cr、^{58}Co、^{99m}Tc、^{103m}Rh、^{195m}Pt、^{119}Sb、^{161}Ho、^{189m}Os、^{192}Ir、^{201}Tl、^{203}Pb、^{89}Zr、^{68}Ga或^{64}Cu。

55.一种用于在有需要的受试者中检测肿瘤的方法,所述方法包括

(a)向所述受试者施用有效量的根据权利要求54所述的复合物,其中所述复合物被配置为定位于表达由所述复合物的工程化免疫细胞识别的肿瘤抗原的肿瘤;以及

(b)通过检测由所述复合物发射的高于参考值的放射性水平来检测所述受试者中肿瘤的存在。

56.一种用于在有需要的受试者中检测肿瘤的方法,所述方法包括

(a)向所述受试者施用有效量的根据权利要求11-28中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述工程化免疫细胞被配置为定位于表达由所述工程化免疫细胞识别的肿瘤抗原的肿瘤;

(b)向所述受试者施用有效量的放射性标记的DOTA半抗原,其中所述放射性标记的DOTA半抗原被配置为与所述工程化免疫细胞表达的抗DOTA C825抗原结合片段结合;以及

(c)通过检测由所述放射性标记的DOTA半抗原发射的高于参考值的放射性水平来检测所述受试者中肿瘤的存在。

57.根据权利要求55或56所述的方法,其中使用正电子发射断层成像或单光子发射计算机断层成像检测由所述复合物或所述放射性标记的DOTA半抗原发射的放射性水平。

58.根据权利要求55-57中任一项所述的方法，其中在施用所述复合物或所述放射性标记的DOTA半抗原后4至24小时之间检测由所述复合物或所述放射性标记的DOTA半抗原发射的放射性水平。

59.根据权利要求55-58中任一项所述的方法，其中由所述复合物或所述放射性标记的DOTA半抗原发射的放射性水平表示为每克组织的注射剂量百分比(%ID/g)。

60.根据权利要求55-59中任一项所述的方法，其中肿瘤与正常组织之间的放射性水平的比率为约2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、15:1、20:1、25:1、30:1、35:1、40:1、45:1、50:1、55:1、60:1、65:1、70:1、75:1、80:1、85:1、90:1、95:1或100:1。

61.根据权利要求55-60中任一项所述的方法，其中所述受试者被诊断患有或疑似患有癌症。

62.根据权利要求61所述的方法，其中所述癌症选自肾上腺癌、膀胱癌、血液癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、上皮癌、子宫颈癌、结肠癌、结直肠癌、子宫体癌、耳鼻喉(ENT)癌、子宫内膜癌、食管癌、胃肠道癌、头颈癌、霍奇金病、肠癌、肾癌、喉癌、白血病、肝癌、淋巴结癌、淋巴瘤、肺癌、黑色素瘤、间皮瘤、骨髓瘤、鼻咽癌、神经母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、口腔癌、卵巢癌、胰腺癌、阴茎癌、咽癌、前列腺癌、直肠癌、肉瘤、精原细胞瘤、皮肤癌、胃癌、畸胎瘤、睾丸癌、甲状腺癌、子宫癌、阴道癌、血管肿瘤、及其转移。

63.根据权利要求55-62中任一项所述的方法，其中静脉内、肿瘤内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眼眶内、真皮内、腹膜内、经气管、皮下、脑室内、口服或鼻内施用所述复合物、所述工程化免疫细胞或所述放射性标记的DOTA半抗原。

64.根据权利要求55-63中任一项所述的方法，其中将所述复合物、所述工程化免疫细胞或所述放射性标记的DOTA半抗原施用于所述受试者的脑脊液或血液中。

65.一种用于监测受试者中工程化免疫细胞的生物分布的方法，所述方法包括：

(a)向所述受试者施用有效量的根据权利要求1-28中任一项所述的工程化免疫细胞，其中所述工程化免疫细胞被配置为定位于表达由所述工程化免疫细胞识别的靶抗原的组织；

(b)向所述受试者施用有效量的放射性标记的DOTA半抗原，其中所述放射性标记的DOTA半抗原被配置为与所述工程化免疫细胞表达的抗DOTA C825抗原结合片段结合；以及

(c)通过检测由所述放射性标记的DOTA半抗原发射的高于参考值的放射性水平来确定所述受试者中工程化免疫细胞的生物分布。

66.一种用于监测受试者中工程化免疫细胞的生物分布的方法，所述方法包括：

(a)向所述受试者施用有效量的复合物，所述复合物包含根据权利要求1-28中任一项所述的工程化免疫细胞以及放射性标记的DOTA半抗原，其中所述复合物被配置为定位于表达由所述工程化免疫细胞识别的靶抗原的组织；以及

(b)通过检测由所述放射性标记的DOTA半抗原发射的高于参考值的放射性水平来确定所述受试者中工程化免疫细胞的生物分布。

67.一种用于监测受试者中工程化免疫细胞的活力的方法，所述方法包括：

(a)向所述受试者施用有效量的根据权利要求1-28中任一项所述的工程化免疫细胞，其中所述工程化免疫细胞被配置为定位于表达由所述工程化免疫细胞识别的靶抗原的组织；

(b)向所述受试者施用有效量的放射性标记的DOTA半抗原,其中所述放射性标记的DOTA半抗原被配置为与所述工程化免疫细胞表达的抗DOTA C825抗原结合片段结合;

(c)检测由所述放射性标记的DOTA半抗原在第一时间点发射的高于参考值的放射性水平;

(d)检测由所述放射性标记的DOTA半抗原在第二时间点发射的高于参考值的放射性水平;以及

(e)当由所述放射性标记的DOTA半抗原在所述第二时间点发射的放射性水平与在所述第一时间点观察到的放射性水平可比时,确定所述受试者中的工程化免疫细胞是有活力的。

68.根据权利要求67所述的方法,所述方法还包括在步骤(d)前向所述受试者施用第二有效量的放射性标记的DOTA半抗原。

69.一种用于监测受试者中工程化免疫细胞的活力的方法,所述方法包括:

(a)向所述受试者施用有效量的复合物,所述复合物包含根据权利要求1-28中任一项所述的工程化免疫细胞以及放射性标记的DOTA半抗原,其中所述复合物被配置为定位于表达由所述工程化免疫细胞识别的靶抗原的组织;

(b)检测由所述放射性标记的DOTA半抗原在第一时间点发射的高于参考值的放射性水平;

(c)检测由所述放射性标记的DOTA半抗原在第二时间点发射的高于参考值的放射性水平;以及

(d)当由所述放射性标记的DOTA半抗原在所述第二时间点发射的放射性水平与在所述第一时间点观察到的放射性水平可比时,确定所述受试者中的工程化免疫细胞是有活力的。

70.一种用于监测受试者中工程化免疫细胞的扩增的方法,所述方法包括:

(a)向所述受试者施用有效量的根据权利要求1-28中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述工程化免疫细胞被配置为定位于表达由所述工程化免疫细胞识别的靶抗原的组织;

(b)向所述受试者施用第一有效量的放射性标记的DOTA半抗原,其中所述放射性标记的DOTA半抗原被配置为与所述工程化免疫细胞表达的抗DOTA C825抗原结合片段结合;

(c)检测由所述放射性标记的DOTA半抗原在第一时间点发射的高于参考值的放射性水平;

(d)在步骤(c)后向所述受试者施用第二有效量的放射性标记的DOTA半抗原;

(e)检测由所述放射性标记的DOTA半抗原在第二时间点发射的高于参考值的放射性水平;以及

(f)当由所述放射性标记的DOTA半抗原在所述第二时间点发射的放射性水平相对于在所述第一时间点观察到的放射性水平更高时,确定所述受试者中的工程化免疫细胞已扩增。

71.根据权利要求65-70中任一项所述的方法,其中使用正电子发射断层成像或单光子发射计算机断层成像检测由所述复合物或所述放射性标记的DOTA半抗原发射的放射性水平。

72.根据权利要求65-71中任一项所述的方法，其中静脉内、腹膜内、皮下、肌内或肿瘤内施用所述工程化免疫细胞、所述放射性标记的DOTA半抗原或所述复合物。

73.根据权利要求65-72中任一项所述的方法，其中所述癌症是上皮癌、肉瘤、黑色素瘤或造血系统癌症。

74.根据权利要求65-73中任一项所述的方法，其中所述癌症选自肾上腺癌、膀胱癌、血液癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、上皮癌、子宫颈癌、结肠癌、结直肠癌、子宫体癌、耳鼻喉(ENT)癌、子宫内膜癌、食管癌、胃肠道癌、头颈癌、霍奇金病、肠癌、肾癌、喉癌、白血病、肝癌、淋巴结癌、淋巴瘤、肺癌、黑色素瘤、间皮瘤、骨髓瘤、鼻咽癌、神经母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、口腔癌、卵巢癌、胰腺癌、阴茎癌、咽癌、前列腺癌、直肠癌、肉瘤、精原细胞瘤、皮肤癌、胃癌、畸胎瘤、睾丸癌、甲状腺癌、子宫癌、阴道癌、血管肿瘤、及其转移。

75.一种试剂盒，所述试剂盒包含根据权利要求1-28中任一项所述的工程化免疫细胞以及用于诊断或监测癌症进展的说明书。

表达C825的免疫细胞及其诊断用途

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2020年6月29日提交的美国临时专利申请号63/045,641的权益和优先权,将其内容通过引用以其整体并入本文。

技术领域

[0002] 本发明技术总体上涉及包括表达靶向肿瘤抗原的嵌合抗原受体以及抗DOTA C825抗原结合片段的工程化免疫细胞的组合物。本文还公开了用于确定本文公开的组合物的体内生物分布、活力和扩增的方法。

政府支持声明

[0003] 本发明是在由美国国立卫生研究院/美国国家癌症研究所授予的CA55349和CA23766下在美国政府支持下完成的。政府拥有本发明中的某些权利。

背景技术

[0004] 下文提供对本发明技术背景的说明仅仅是为了帮助理解本发明技术,并且不承认所述说明描述或构成针对本发明技术的现有技术。

[0005] 嵌合抗原受体(CAR)T细胞疗法将T细胞重定向,以在抗原表达细胞的存在下激活并随后杀死抗原表达细胞。这通过将抗原特异性单链可变片段(scFv)与内源性T细胞激活信号传导结构域偶联实现。CAR T细胞增强免疫细胞识别并破坏单独的癌细胞的能力。

[0006] CAR T细胞疗法对于血液和淋巴结的肿瘤(即白血病和淋巴瘤)曾经尤其有效。然而,许多肿瘤对CAR T细胞疗法的反应不好,尤其是结肠、肺和乳房的实体瘤。D'Aloia等人,Cell Death&Disease 9,282(2018);Singh等人,Semin Cancer Biol.S1044-579X(19)30398-0(2019)。一个原因可能是,由于包括使免疫监视和攻击转向的肿瘤微环境在内的各种抗性机制,CAR-T细胞无法到达肿瘤。其他挑战包括异质性表达的肿瘤靶抗原和CAR-T细胞在肿瘤位点处的受损的长期持久性。

[0007] 因此,迫切需要准确并可靠地"追踪"或"跟踪"患者体内的CAR-T细胞的方法。

发明内容

[0008] 本文公开了用于确定具有任何免疫特异性的工程化免疫细胞的体内生物分布、活力和扩增的方法。

[0009] 在某些实施方案中,本文提供了包含表达抗DOTA C825抗原结合片段和与肿瘤抗原结合的受体的工程化免疫细胞的组合物。在一些实施方案中,所述受体是T细胞受体。在一些实施方案中,所述受体是天然受体(例如天然T细胞受体)。在一些实施方案中,所述受体是非天然受体(例如非天然T细胞受体),例如工程化受体,如嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,所述工程化免疫细胞包含抗DOTA C825抗原结合片段和/或编码所述抗DOTA C825抗原结合片段的核酸。在一些实施方案中,所述工程化免疫细胞包含嵌合抗原受体和/或编码所述嵌合抗原受体的核酸。在一些实施方案中,编码所述抗DOTA C825抗原结合片段

的核酸与启动子可操作地连接。所述启动子可以是组成型启动子或条件性启动子。在一些实施方案中，所述条件性启动子是通过所述受体(例如CAR)与抗原(如肿瘤抗原)结合可诱导的。在一些实施方案中，所述嵌合抗原受体包含(i)细胞外抗原结合结构域；(ii)跨膜结构域；以及(iii)细胞内结构域。在一些实施方案中，所述细胞外抗原结合结构域与肿瘤抗原结合。在一些实施方案中，所述肿瘤抗原选自5T4、α5β1-整合素、707-AP、A33、AFP、ART-4、B7H4、BAGE、Bcl-2、β-连环素、BCMA、Bcr-abl、MN/C IX抗体、CA125、CA19-9、CAMEL、CAP-1、CASP-8、CD4、CD5、CD19、CD20、CD21、CD22、CD25、CDC27/m、CD33、CD37、CD45、CD52、CD56、CD80、CD123、CDK4/m、CEA、c-Met、CS-1、CT、Cyp-B、细胞周期蛋白B1、DAGE、DAM、EBNA、EGFR、ErbB3、ELF2M、EMMPRIN、EpCam、肝配蛋白B2、雌激素受体、ETV6-AML1、FAP、铁蛋白、叶酸结合蛋白、GAGE、G250、GD-2、GM2、GnT-V、gp75、gp100(Pmel 17)、HAGE、HER-2/neu、HLA-A*0201-R170I、HPV E6、HPV E7、Ki-67、HSP70-2M、HST-2、hTERT(或hTRT)、iCE、IGF-1R、IL-2R、IL-5、KIAA0205、LAGE、LDLR/FUT、LRP、MAGE、MART、MART-1/黑色素A(melan-A)、MART-2/Ski、MC1R、间皮素、MUC、MUC16、MUM-1-B、myc、MUM-2、MUM-3、NA88-A、NYESO-1、NY-Eso-B、p53、蛋白酶-3、p190小bcr-abl、Pml/RARα、PRAME、孕酮受体、PSA、PSCA、PSM、PSMA、ras、RAGE、RU1或RU2、RORI、SART-1或SART-3、存活蛋白、TEL/AML1、TGFβ、TPI/m、TRP-1、TRP-2、TRP-2/INT2、生腱蛋白、TSTA酪氨酸酶、VEGF和WT1。

[0010] 在一些实施方案中，所述嵌合抗原受体的细胞外抗原结合结构域包含单链可变片段(scFv)。在一些实施方案中，所述嵌合抗原受体的细胞外抗原结合结构域包含人scFv。在一些实施方案中，所述嵌合抗原受体的细胞外抗原结合结构域包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4的CD19 scFv。在一些实施方案中，所述嵌合抗原受体的细胞外抗原结合结构域包含与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4具有至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％序列同一性的CD19 scFv。在一些实施方案中，所述嵌合抗原受体的细胞外抗原结合结构域包含与所述细胞外抗原结合结构域的N端共价连接的信号肽。在一些实施方案中，所述嵌合抗原受体的跨膜结构域包含CD8跨膜结构域。在一些实施方案中，所述嵌合抗原受体的细胞内结构域包含一个或多个共刺激结构域。在一些实施方案中，所述一个或多个共刺激结构域选自CD28共刺激结构域、CD3ζ链、4-1BBL共刺激结构域或其任何组合。在一些实施方案中，所述免疫细胞是淋巴细胞。在一些实施方案中，所述淋巴细胞是T细胞、B细胞或自然杀伤(NK)细胞。在一些实施方案中，所述T细胞是$CD4^+$T细胞或$CD8^+$T细胞。在一些实施方案中，所述免疫细胞是肿瘤浸润淋巴细胞。在一些实施方案中，所述免疫细胞源自自体供体或同种异体供体。

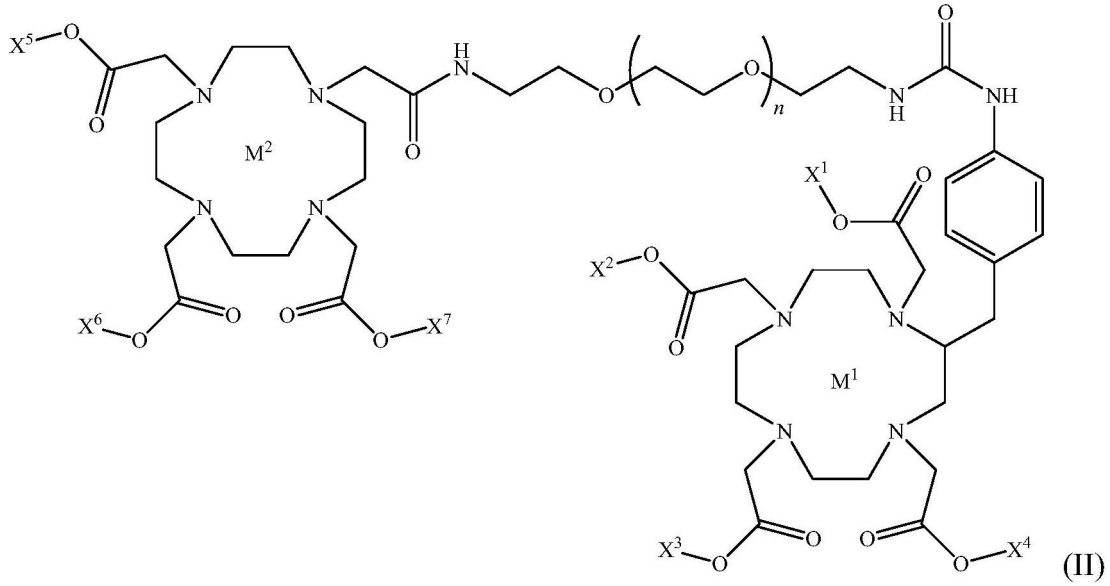
[0011] 还提供了包含抗DOTA C825抗原结合片段和嵌合抗原受体的多肽。在一些实施方案中，所述多肽还包含位于所述抗DOTA C825抗原结合片段与所述嵌合抗原受体之间的自切割肽。在一些实施方案中，所述自切割肽是P2A自切割肽。在一些实施方案中，所述抗DOTA C825抗原结合片段包含用于所述抗DOTA C825抗原结合片段的分泌的信号肽。在一些实施方案中，所述抗DOTA C825抗原结合片段包含SEQ ID NO:35-39、41或42中任一个的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述抗DOTA C825抗原结合片段是scFv。另外地或可替代地，在一些实施方案中，所述嵌合抗原受体包含(i)抗原结合结构域；(ii)跨膜结构域；以及(iii)细胞内结构域。在一些实施方案中，所述嵌合抗原受体的抗原结合结构域与肿瘤抗原结合。在一些实施方案中，所述肿瘤抗原选自BCMA、CD19、间皮素、MUC16、PSCA、WT1和PRAME。在一些

实施方案中，所述嵌合抗原受体的抗原结合结构域包含单链可变片段(scFv)。在一些实施方案中，所述嵌合抗原受体的细胞外抗原结合结构域包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4的CD19 scFv。在一些实施方案中，所述嵌合抗原受体的细胞外抗原结合结构域包含与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4具有至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％序列同一性的CD19 scFv。在一些实施方案中，所述嵌合抗原受体的跨膜结构域包含CD8跨膜结构域。在一些实施方案中，所述嵌合抗原受体的细胞内结构域包含一个或多个共刺激结构域。在一些实施方案中，所述嵌合抗原受体的一个或多个共刺激结构域选自CD28共刺激结构域、CD3ζ链、4-1BBL共刺激结构域或其任何组合。

[0012] 还提供了编码任何本文公开的多肽的核酸。在一些实施方案中，编码所述多肽的核酸与启动子可操作地连接。所述启动子可以是组成型启动子或条件性启动子。在一些实施方案中，所述条件性启动子是通过CAR与抗原结合可诱导的。还提供了包含本文公开的任何核酸的载体。在一些实施方案中，所述载体是病毒载体或质粒。在一些实施方案中，所述载体是逆转录病毒载体。

[0013] 还提供了包含本文公开的多肽、核酸或载体的宿主细胞。

[0014] 在另一方面，本公开文本提供了包含本文所述的任何工程化免疫细胞和DOTA半抗原的复合物，其中所述工程化免疫细胞被配置为与所述DOTA半抗原和肿瘤抗原结合。示例性DOTA半抗原包括但不限于苄基-DOTA、NH_2-苄基(Bn)DOTA、DOTA-去铁胺、DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH_2、Ac-Lys(HSG)D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH_2、DOTA-D-Asp-D-Lys(HSG)-D-Asp-D-Lys(HSG)-NH_2、DOTA-D-Glu-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH_2、DOTA-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH_2、DOTA-D-Ala-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH_2、DOTA-D-Phe-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-NH_2、Ac-D-Phe-D-Lys(DOTA)-D-Tyr-D-Lys(DOTA)-NH_2、Ac-D-Phe-D-Lys(DTPA)-D-Tyr-D-Lys(DTPA)-NH_2、Ac-D-Phe-D-Lys(Bz-DTPA)-D-Tyr-D-Lys(Bz-DTPA)-NH_2、Ac-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Lys(Tscg-Cys)-NH_2、DOTA-D-Phe-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Lys(Tscg-Cys)-NH_2、(Tscg-Cys)-D-Phe-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Lys(DOTA)-NH_2、Tscg-D-Cys-D-Glu-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH_2、(Tscg-Cys)-D-Glu-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH_2、Ac-D-Cys-D-Lys(DOTA)-D-Tyr-D-Ala-D-Lys(DOTA)-D-Cys-NH_2、Ac-D-Cys-D-Lys(DTPA)-D-Tyr-D-Lys(DTPA)-NH_2、Ac-D-Lys(DTPA)-D-Tyr-D-Lys(DTPA)-D-Lys(Tscg-Cys)-NH_2、Ac-D-Lys(DOTA)-D-Tyr-D-Lys(DOTA)-D-Lys(Tscg-Cys)-NH_2、DOTA-RGD、DOTA-PEG-E(c(RGDyK))$_2$、DOTA-8-AOC-BBN、DOTA-PESIN、p-NO2-苄基-DOTA、DOTA-生物素-肌氨酸(DOTA-生物素)、1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸单(N-羟基琥珀酰亚胺酯)(DOTA-NHS)和DOTATyrLysDOTA。在本发明技术的复合物的某些实施方案中，DOTA半抗原具有式II或其药学上可接受的盐的结构



(II)

其中

M^1是$^{175}Lu^{3+}$、$^{45}Sc^{3+}$、$^{69}Ga^{3+}$、$^{71}Ga^{3+}$、$^{89}Y^{3+}$、$^{113}In^{3+}$、$^{115}In^{3+}$、$^{139}La^{3+}$、$^{136}Ce^{3+}$、$^{138}Ce^{3+}$、$^{140}Ce^{3+}$、$^{142}Ce^{3+}$、$^{151}Eu^{3+}$、$^{153}Eu^{3+}$、$^{159}Tb^{3+}$、$^{154}Gd^{3+}$、$^{155}Gd^{3+}$、$^{156}Gd^{3+}$、$^{157}Gd^{3+}$、$^{158}Gd^{3+}$或$^{160}Gd^{3+}$；

M^2是放射性核素阳离子；

X^1、X^2、X^3和X^4各自独立地是孤对电子(即提供氧阴离子)或H；

X^5、X^6和X^7各自独立地是孤对电子(即提供氧阴离子)或H；并且n是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或22。

[0015] 在本文公开的复合物的任何和所有实施方案中，M^2包括^{111}In、^{67}Ga、^{51}Cr、^{58}Co、^{99m}Tc、^{103m}Rh、^{195m}Pt、^{119}Sb、^{161}Ho、^{189m}Os、^{192}Ir、^{201}Tl、^{203}Pb、^{89}Zr、^{68}Ga或^{64}Cu。

[0016] 在一方面，本公开文本提供了用于检测有需要的受试者中的肿瘤(例如实体瘤或液体瘤)的方法，所述方法包括(a)向所述受试者施用有效量的本发明技术的任何复合物，其中所述复合物被配置为定位于表达由所述复合物的工程化免疫细胞识别的肿瘤抗原的肿瘤；以及(b)通过检测由所述复合物发射的高于参考值的放射性水平来检测所述受试者中肿瘤的存在。还公开了用于检测有需要的受试者中的肿瘤(例如实体瘤或液体瘤)的方法，所述方法包括(a)向所述受试者施用有效量的本文所述的任何工程化免疫细胞，其中所述工程化免疫细胞被配置为定位于表达由所述工程化免疫细胞识别的肿瘤抗原的肿瘤；(b)向所述受试者施用有效量的放射性标记的DOTA半抗原，其中所述放射性标记的DOTA半抗原被配置为与所述工程化免疫细胞表达的抗DOTA C825抗原结合片段结合；以及(c)通过检测由所述放射性标记的DOTA半抗原发射的高于参考值的放射性水平来检测所述受试者中肿瘤的存在。在本文公开的方法的一些实施方案中，使用正电子发射断层成像或单光子发射计算机断层成像检测由所述复合物或所述放射性标记的DOTA半抗原发射的放射性水平。

[0017] 另外地或可替代地，在一些实施方案中，在施用所述复合物或所述放射性标记的DOTA半抗原后4至24小时之间检测由所述复合物或所述放射性标记的DOTA半抗原发射的放射性水平。在某些实施方案中，由所述复合物或所述放射性标记的DOTA半抗原发射的放射性水平表示为每克组织的注射剂量百分比(%ID/g)。另外地或可替代地，在一些实施方案

中，肿瘤与正常组织之间的放射性水平的比率为约2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、15:1、20:1、25:1、30:1、35:1、40:1、45:1、50:1、55:1、60:1、65:1、70:1、75:1、80:1、85:1、90:1、95:1或100:1。在一些实施方案中，所述受试者是人。

[0018] 在本文公开的方法的任何前述实施方案中，静脉内、肿瘤内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眼眶内、真皮内、腹膜内、经气管、皮下、脑室内、口服或鼻内施用所述复合物、所述工程化免疫细胞或所述放射性标记的DOTA半抗原。另外地或可替代地，在一些实施方案中，将所述复合物、所述工程化免疫细胞或所述放射性标记的DOTA半抗原施用于所述受试者的脑脊液或血液中。

[0019] 在一方面，本公开文本提供了用于监测受试者中的工程化免疫细胞的生物分布的方法，所述方法包括：(a)向所述受试者施用有效量的本文公开的任何工程化免疫细胞，其中所述工程化免疫细胞被配置为定位于表达由所述工程化免疫细胞识别的靶抗原的组织；(b)向所述受试者施用有效量的放射性标记的DOTA半抗原，其中所述放射性标记的DOTA半抗原被配置为与所述工程化免疫细胞表达的抗DOTA C825抗原结合片段结合；以及(c)通过检测由所述放射性标记的DOTA半抗原发射的高于参考值的放射性水平来确定所述受试者中工程化免疫细胞的生物分布。在另一方面，本公开文本提供了用于监测受试者中工程化免疫细胞的生物分布的方法，所述方法包括：(a)向所述受试者施用有效量的复合物，所述复合物包含本发明技术的任何工程化免疫细胞以及放射性标记的DOTA半抗原，其中所述复合物被配置为定位于表达由所述工程化免疫细胞识别的靶抗原的组织；以及(b)通过检测由所述放射性标记的DOTA半抗原发射的高于参考值的放射性水平来确定所述受试者中工程化免疫细胞的生物分布。

[0020] 在又另一方面，本公开文本提供了用于监测受试者中的工程化免疫细胞的活力的方法，所述方法包括：(a)向所述受试者施用有效量的本文公开的任何工程化免疫细胞，其中所述工程化免疫细胞被配置为定位于表达由所述工程化免疫细胞识别的靶抗原的组织；(b)向所述受试者施用有效量的放射性标记的DOTA半抗原，其中所述放射性标记的DOTA半抗原被配置为与所述工程化免疫细胞表达的抗DOTA C825抗原结合片段结合；(c)检测由所述放射性标记的DOTA半抗原在第一时间点发射的高于参考值的放射性水平；(d)检测由所述放射性标记的DOTA半抗原在第二时间点发射的高于参考值的放射性水平；以及(e)当由所述放射性标记的DOTA半抗原在所述第二时间点发射的放射性水平与在所述第一时间点观察到的放射性水平可比时，确定所述受试者中的工程化免疫细胞是有活力的。在一些实施方案中，所述方法还包括在步骤(d)前向所述受试者施用第二有效量的放射性标记的DOTA半抗原。本文还公开了用于监测受试者中的工程化免疫细胞的活力的方法，所述方法包括：(a)向所述受试者施用有效量的复合物，所述复合物包含本文所述的任何工程化免疫细胞以及放射性标记的DOTA半抗原，其中所述复合物被配置为定位于表达由所述工程化免疫细胞识别的靶抗原的组织；(b)检测由所述放射性标记的DOTA半抗原在第一时间点发射的高于参考值的放射性水平；(c)检测由所述放射性标记的DOTA半抗原在第二时间点发射的高于参考值的放射性水平；以及(d)当由所述放射性标记的DOTA半抗原在所述第二时间点发射的放射性水平与在所述第一时间点观察到的放射性水平可比时，确定所述受试者中的工程化免疫细胞是有活力的。

[0021] 在又另一方面，本公开文本提供了用于监测受试者中的工程化免疫细胞的扩增的

方法，所述方法包括：(a)向所述受试者施用有效量的本文所述的任何工程化免疫细胞，其中所述工程化免疫细胞被配置为定位于表达由所述工程化免疫细胞识别的靶抗原的组织；(b)向所述受试者施用第一有效量的放射性标记的DOTA半抗原，其中所述放射性标记的DOTA半抗原被配置为与所述工程化免疫细胞表达的抗DOTA C825抗原结合片段结合；(c)检测由所述放射性标记的DOTA半抗原在第一时间点发射的高于参考值的放射性水平；(d)在步骤(c)后向所述受试者施用第二有效量的放射性标记的DOTA半抗原；(e)检测由所述放射性标记的DOTA半抗原在第二时间点发射的高于参考值的放射性水平；以及(f)当由所述放射性标记的DOTA半抗原在所述第二时间点发射的放射性水平相对于在所述第一时间点观察到的放射性水平更高时，确定所述受试者中的工程化免疫细胞已扩增。

[0022] 在本文公开的方法的任何和所有实施方案中，使用正电子发射断层成像或单光子发射计算机断层成像检测由所述复合物或所述放射性标记的DOTA半抗原发射的放射性水平。另外地或可替代地，在本文公开的方法的任何前述实施方案中，静脉内、腹膜内、皮下、肌内或肿瘤内施用所述工程化免疫细胞、所述放射性标记的DOTA半抗原或所述复合物。

[0023] 在本文公开的方法的任何和所有实施方案中，所述受试者患有癌症或肿瘤或有患癌症或肿瘤的风险。在一些实施方案中，所述癌症或肿瘤是上皮癌、肉瘤、黑色素瘤或造血系统癌症。在一些实施方案中，所述癌症或肿瘤选自肾上腺癌、膀胱癌、血液癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、上皮癌、子宫颈癌、结肠癌、结直肠癌、子宫体癌、耳鼻喉(ENT)癌、子宫内膜癌、食管癌、胃肠道癌、头颈癌、霍奇金病、肠癌、肾癌、喉癌、白血病、肝癌、淋巴结癌、淋巴瘤、肺癌、黑色素瘤、间皮瘤、骨髓瘤、鼻咽癌、神经母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、口腔癌、卵巢癌、胰腺癌、阴茎癌、咽癌、前列腺癌、直肠癌、肉瘤、精原细胞瘤、皮肤癌、胃癌、畸胎瘤、睾丸癌、甲状腺癌、子宫癌、阴道癌、血管肿瘤及其转移。在一些实施方案中，所述受试者是人。

[0024] 本文还公开了含有适合用于诊断或监测患者中癌症进展的组分的试剂盒。在某些实施方案中，所述试剂盒包含至少一种本发明技术的工程化免疫细胞以及使用说明书。在一些实施方案中，所述试剂盒包含DOTA半抗原(例如本文公开的任何DOTA半抗原)、至少一种本发明技术的工程化免疫细胞以及使用说明书。

附图说明

[0025] 图1示出示例性DOTA半抗原：苄基-DOTA和变形杆菌属-DOTA(Pr)的结构。

[0026] 图2A-图2C示出具有C825(皮摩尔结合亲和力，半抗原捕获scFv抗体)的膜表达的C825-CD19 CAR-T细胞的放射性半抗原捕获成像结果。图2A示出使用[^{111}In]Pr-DOTA结合以量化在C825-CD19 CAR-T细胞中的C825表达的体外饱和结合曲线。图2B示出在右肩患有s.c.Raji GFP-fluc肿瘤的NSG小鼠。在静脉内注射CAR-T细胞($2.5x10^6$)后十天，向所述小鼠注射^{111}In-放射性半抗原用于体内追踪CAR T细胞(CD19 CAR+C825或仅对照CD19 CAR)。图2C示出注射^{111}In-放射性半抗原后18h收集的SPECT/CT图像。示出了针对用C825+CD19 CAR T细胞或仅用对照CD19 CAR T细胞治疗的动物的MIP图像。

[0027] 图3A-图3C示出用C825和CD19-CAR两者以病毒转导原代人T细胞的三种不同策略。图3A示出用两种单一构建体的转导，一种编码具有GFP报告物的C825(上)并且一种编码CD19 CAR(下)。图3B示出双顺反子构建体，其编码由P2A切割位点隔开的具有跨膜结构域和GFP报告物的C825和CD19 CAR。图3C示出双顺反子构建体，其编码由P2A切割位点隔开的具

有Thy1 GPI连接和His标签报告物的C825和CD19 CAR。原代人T细胞的转导的代表性流式图示出在右侧。

[0028] 图4A示出逆转录病毒载体SFG-Thor、SFG-19BBz(CAR)和SFG-C825的示意性结构。图4B示出,如通过体外4h细胞毒性测定所测量的,SFG-Thor T细胞与SFG-19BBz(CAR)T细胞在杀死CD19(+)Raji肿瘤细胞方面无区别。将SFG-C825和非转导(NT)T细胞包括在内作为阴性对照。(n=3-4个供体)。图4C示出[^{111}In]InPr在1h时的体外结合。此代表性数据组证明所述放射性标记的DOTA探针与表达C825的T细胞的特异性结合,但是在SFG-19BBz(CAR)和NT T细胞中未观察到显著摄取。(所有实验在37℃下一式三份地进行)。数据是平均值±SD。图4D示出[^{111}In]InPr与SFG-Thor T细胞(n=3次独立测定;示出代表性例子)的体外结合动力学。图4E示出用于评估靶向肿瘤细胞的T细胞的体内研究的示例性方案。将^{68}Ga-NODAGA-Pr(100mCu,700pmol)用作放射性示踪物并在T细胞施用(1×10^6)后10天施用。图4F示出在^{68}Ga-NODAGA-Pr注射后(p.i.)1h时描绘SFG-Thor T细胞在肿瘤处(右肩,红箭头)的归巢和积累的示例性最大强度投影(MIP)图像。在SFG-19BBz(CAR)T细胞施用(蓝箭头)后在肿瘤位点处未注意到高于背景的摄取。图4G使用基于图像的生物分布示出肿瘤中平均摄取以及肿瘤本底比值(TNR)(SFG-Thor:n=4;SFG-19BBz(CAR):n=2)。**,P<0.01。

[0029] 图5A-图5B示出用^{86}Y-DOTABn对本发明技术的工程化CAR T细胞的体内追踪。图5A示出在确立治疗失败的s.c.Raji肿瘤小鼠模型中在体内追踪工程化T细胞(3×10^6个细胞)的示例性方案。在肿瘤接种后七天,对小鼠静脉内注射3×10^6个huC825-19BBz或3×10^6个19BBz T细胞。在施用T细胞后第17天,对展现出持续增加的肿瘤负荷(表明治疗失败)的小鼠静脉内注射^{86}Y-DOTA-Bn(3.7MBq;40pmol),以评估所移植T细胞的持久性和定位。图5B示出在注射后1h、3h和16h的最大强度投影(MIP)以及轴向PET/CT图像,描绘了huC825-19BBz-CAR T细胞在肿瘤处(橙色圈)的积累。在注射后3h观察到最高肿瘤内T细胞摄取,为4.9% ID/g(相比于对照0.8% ID/g)。在对照小鼠中的肿瘤处未注意到高于背景的摄取(19BBz CAR;绿圈)。注意到了肾示踪物的快速显著清除。

具体实施方式

[0030] 应理解,下文以不同详细程度描述了本发明方法的某些方面、模式、实施方案、变化形式和特征,以提供对本发明技术的实质理解。

[0031] 本公开文本不受限于本申请中描述的具体实施方案,所述具体实施方案旨在作为对本公开文本的单独方面的单一说明。本文将不描述本公开文本的所有各种实施方案。如本领域技术人员将清楚的是,可以在不背离本公开文本的精神和范围的情况下,对本公开文本进行多种修改和改变。除在本文列举的那些方法和设备之外,通过前述描述,在本公开文本的范围内的功能上等效的方法和设备对于本领域技术人员将是清楚的。此类修改和改变旨在落入所附权利要求的范围内。本公开文本仅受所附权利要求以及这些权利要求有权要求的等效物的全部范围限制。

[0032] 应当理解,本公开文本不限于具体用途、方法、试剂、化合物、组合物或生物系统,当然它们可以改变。还应理解,本文所用的术语仅用于描述具体实施方案的目的,并不旨在是限制性的。

[0033] 在实践本发明方法时,使用了分子生物学、蛋白质生物化学、细胞生物学、微生物

学和重组DNA中的许多常规技术。参见例如Sambrook和Russell编(2001)Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第3版;the series Ausubel等人编(2007)Current Protocols in Molecular Biology;the series Methods in Enzymology(Academic Press,Inc.,N.Y.);MacPherson等人(1991)PCR 1:A Practical Approach(IRL Press at Oxford University Press);MacPherson等人(1995)PCR 2:A Practical Approach;Harlow和Lane编(1999)Antibodies,ALaboratory Manual;Freshney(2005)Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique,第5版;Gait编(1984)Oligonucleotide Synthesis;美国专利号4,683,195;Hames和Higgins编(1984)Nucleic Acid Hybridization;Anderson(1999)Nucleic Acid Hybridization;Hames和Higgins编(1984)Transcription and Translation;Immobilized Cells and Enzymes(IRL Press(1986));Perbal(1984)A Practical Guide to Molecular Cloning;Miller和Calos编(1987)Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(Cold Spring Harbor Laboratory);Makrides编(2003)Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells;Mayer和Walker编(1987)Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology(Academic Press,London);以及Herzenberg等人编(1996)Weir's Handbook of Experimental Immunology。

[0034] 本发明技术的组合物包括工程化免疫细胞,所述工程化免疫细胞表达可用于确定本文所述的工程化免疫细胞的体内生物分布、活力和扩增的靶向肿瘤抗原的嵌合抗原受体和抗DOTA C825抗原结合片段。

定义

[0035] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语均具有与本公开文本所属领域的技术人员通常所理解的含义。以下参考文献为技术人员提供了本公开文本中使用的许多术语的通用定义。Singleton等人,Dictionary of Microbiology and Molecular Biology(第2版,1994);The Cambridge Dictionary of Science and Technology(Walker编,1988);The Glossary of Genetics,第5版,R.Rieger等人(编),Springer Verlag(1991)以及Hale&Marham,The Harper Collins Dictionary of Biology(1991)。如本文所用,除非另有说明,否则以下术语具有以下赋予它们的含义。本文所用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,而不旨在限制本公开文本。

[0036] 如本文所用,单数形式“一个/一种”(“a”)、“一个/一种”(“an”)和“所述”(“the”)也旨在包括复数形式,除非上下文另有明确说明。

[0037] 如本文所用,术语“约”或“大约”意指由本领域普通技术人员确定的特定值在可接受的误差范围内,这将部分地取决于所述值是如何测定或确定的,即,测量系统的限制。例如,根据本领域的实践,“约”可以意指在3个或超过3个标准差内。可替代地,“约”可以意指给定值的至多20%、至多10%、至多5%或至多1%的范围。可替代地,特别是关于生物系统或过程,所述术语可以意指在值的数量级以内、在值的5倍以内或在值的2倍以内。

[0038] 如本文所用,术语向受试者“施用”药剂包括将药剂引入或递送至受试者以执行其预期功能的任何途径。可以通过任何合适的途径进行施用,所述途径包括但不限于静脉内、肌内、腹膜内、皮下和如本文描述的其他合适途径。施用包括自我施用和由另一个人施用。

[0039] 术语“氨基酸”是指天然存在的氨基酸和非天然存在的氨基酸以及以与天然存在的氨基酸相似的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然编码的氨基酸为20种常

见氨基酸(丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸、和缬氨酸)以及焦赖氨酸(pyrolysine)和硒代半胱氨酸。氨基酸类似物是指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构(即,α碳与氢、羧基、氨基和R基团结合)的试剂,如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砜、甲硫氨酸甲基锍。此类类似物具有经修饰的R基团(如正亮氨酸)或经修饰的肽主链,但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。在一些实施方案中,形成多肽的氨基酸呈D形式。在一些实施方案中,形成多肽的氨基酸呈L形式。在一些实施方案中,第一多个形成多肽的氨基酸呈D形式,并且第二多个氨基酸呈L形式。

[0040] 氨基酸在本文中由其通常已知的三字母符号或由IUPAC-IUB生化命名委员会推荐的单字母符号表示。同样,核苷酸由其通常接受的单字母代码表示。

[0041] 如本文所用,术语“类似物”是指具有参考多肽或核酸分子的功能的结构相关的多肽或核酸分子。

[0042] 如本文所用,术语“抗体”不仅意指完整抗体分子,而且还意指保留免疫原结合能力的抗体分子片段。此类片段在本领域中也是熟知的,并且通常既体外使用,也体内使用。因此,如本文所用,术语“抗体”不仅意指完整的免疫球蛋白分子,而且还意指熟知的活性片段$F(ab')_2$和Fab。缺少完整抗体的Fc片段的$F(ab')_2$和Fab片段从循环中清除得更快,并且可以小于完整抗体的非特异性组织结合(Wahl等人,J.Nucl.Med.24:316-325(1983))。抗体可以包括整个天然抗体、单克隆抗体、人抗体、人源化抗体、驼源化(camelised)抗体、多特异性抗体、双特异性抗体、嵌合抗体、Fab、Fab’、单链V区片段(scFv)、单结构域抗体(例如,纳米抗体和单结构域骆驼科抗体)、VNAR片段、双特异性T细胞衔接器(BiTE)抗体、微抗体、二硫键连接的Fv(sdFv)、和抗独特型(抗Id)抗体、胞内抗体、融合多肽、非常规抗体和以上任何抗体的抗原结合片段。特定地,抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性片段,即含有抗原结合位点的分子。免疫球蛋白分子可以是任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类(例如,IgGl、IgG2、IgG3、IgG4、IgAl和IgA2)或子类的。

[0043] 在某些实施方案中,抗体是包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白。每条重链由重链可变区(在本文缩写为V_H)和重链恒定区(C_H)构成。重链恒定区由三个结构域即C_H1、C_H2和C_H3构成。每条轻链由轻链可变区(在本文缩写为V_L)和轻链恒定区C_L构成。轻链恒定区由一个结构域C_L构成。V_H和V_L区域可以进一步细分为具有高变性的区域,称为互补决定区(CDR),散布有更保守的区域,称为框架区(FR)。每个V_H和V_L由三个CDR和四个FR构成,按照以下顺序从氨基端到羧基端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,所述宿主组织或因子包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1 q)。如本文可互换使用的,术语抗体的“抗原结合部分”、“抗原结合片段”或“抗原结合区”是指抗体的结合抗原并赋予抗体抗原特异性的区域或部分;抗原结合蛋白(例如抗体)的片段包括抗体的保留特异性结合抗原(例如,肽/HLA复合物)的能力的一种或多种片段。已经显示抗体的抗原结合功能可以由全长抗体的片段执行。术语抗体的“抗体片段”内涵盖的抗原结合部分的例子包括:Fab片段,即由V_L、V_H、C_L和C_H1结构域组成的单价片段;$F(ab)_2$片段,即包含由铰链区的二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;由V_H和C_H1结构域组成的Fd片段;由抗体单臂的V_L和V_H结构域组成的Fv片段;由V_H

结构域组成的dAb片段(Ward等人,Nature 341:544-546,1989);和分离的互补决定区(CDR)。“分离的抗体”或“分离的抗原结合蛋白”是已经被鉴定并且与其天然环境的组分分开和/或回收的抗体或抗原结合蛋白。“合成抗体”或“重组抗体”通常使用重组技术或使用本领域技术人员已知的肽合成技术来产生。

[0044] 抗体和抗体片段可以全部或部分地源自哺乳动物(例如,人、非人灵长类、山羊、豚鼠、仓鼠、马、小鼠、大鼠、兔子和绵羊)或非哺乳动物类产生抗体的动物(例如,鸡、鸭、鹅、蛇以及有尾目两栖动物)。抗体和抗体片段可以在动物体内产生或在动物体外产生,如从酵母或噬菌体产生(例如,作为单抗体或抗体片段或作为抗体文库的一部分)。

[0045] 此外,尽管Fv片段的两个结构域V_L和V_H由单独的基因编码,但是可以使用重组方法通过合成接头将它们连接,所述合成接头使得它们能被制成单个蛋白质链,在所述单个蛋白质链中V_L和V_H区配对形成单价分子。这些称为单链Fv(scFv);参见例如,Bird等人,Science 242:423-426(1988);以及Huston等人,Proc.Natl.Acad.Sci.85:5879-5883(1988)。这些抗体片段是使用本领域普通技术人员已知的常规技术获得的,并且以与完整抗体相同的方式针对效用筛选片段。

[0046] 如本文所用,“抗原”是指抗体可以选择性地结合的分子。所述靶抗原可以是蛋白质(例如,抗原肽)、碳水化合物、核酸、脂质、半抗原或其他天然存在或合成的化合物。也可以向动物受试者施用抗原以在所述受试者中产生免疫应答。

[0047] “结合亲和力”意指分子(例如,抗体)的单个结合位点与所述分子的结合配偶体(例如,抗原)之间的总非共价相互作用的强度。不希望受理论的束缚,亲和力取决于在抗体的结合位点与抗原决定簇之间的立体化学配合的紧密度、它们之间的接触区域的尺寸、和带电荷和疏水基团的分布。亲和力也包括术语“亲合力”,所述亲合力是指在形成可逆复合物(例如,单价或多价的)后抗原-抗体键的强度。用于计算抗体对抗原的亲和力的方法是本领域已知的,包括使用结合实验来计算亲和力。分子X对其配偶体Y的亲和力通常可以由解离常数(K_d)表示。低亲和力复合物含有通常倾向于容易从抗原解离的抗体,而高亲和力复合物含有通常倾向于更长时间地保持与抗原结合的抗体。功能测定(例如,流式细胞术测定)中的抗体活性也反映了抗体亲和力。可以使用功能测定(例如,流式细胞术测定)在表型上表征和比较抗体和亲和力。

[0048] 如本文所用,“CDR”被定义为抗体的互补决定区氨基酸序列,其作为免疫球蛋白重链和轻链的高变区。参见例如,Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,4th U.S.Department of Health and Human Services,National Institutes of Health(1987)。通常,抗体在可变区中包含三个重链和三个轻链CDR或CDR区。CDR提供大多数接触残基,以使抗体与抗原或表位结合。在某些实施方案中,使用Kabat系统描绘CDR区(Kabat,E.A.等人Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242(1991))。

[0049] 如本文所用,术语“细胞群体”是指表达相似或不同表型的至少两个细胞的组。在非限制性例子中,细胞群体可以包含表达相似或不同表型的至少约10个、至少约100个、至少约200个、至少约300个、至少约400个、至少约500个、至少约600个、至少约700个、至少约800个、至少约900个、至少约1000个细胞、至少约10,000个细胞、至少约100,000个细胞、至

少约1×10^{6}个细胞、至少约1×10^{7}个细胞、至少约1×10^{8}个细胞、至少约1×10^{9}个细胞、至少约1×10^{10}个细胞、至少约1×10^{11}个细胞、至少约1×10^{12}个细胞或更多个细胞。

[0050] 如本文所用，术语“嵌合共刺激受体”或“CCR”是指与抗原结合并且提供共刺激信号但不提供T细胞激活信号的嵌合受体。

[0051] 如本文所用，术语“保守序列修饰”是指不显著影响或改变当前公开的包含氨基酸序列的CAR(例如，CAR的细胞外抗原结合结构域)的结合特征的氨基酸修饰。保守修饰可以包括氨基酸取代、添加和缺失。可以通过本领域已知的标准技术(如定点诱变和PCR介导的诱变)将修饰引入当前公开的CAR的人scFv中。氨基酸可以根据其理化特性(如电荷和极性)分为若干组。保守氨基酸取代是其中氨基酸残基被具有相同基团的氨基酸残基替代的取代。例如，氨基酸可以按电荷归类：带正电荷的氨基酸包括赖氨酸、精氨酸、组氨酸；带负电荷的氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸；以及中性电荷氨基酸包括丙氨酸、天冬酰胺、半胱氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。另外，氨基酸可以通过极性分类：极性氨基酸包括精氨酸(碱性极性)、天冬酰胺、天冬氨酸(酸性极性)、谷氨酸(酸性极性)、谷氨酰胺、组氨酸(碱性极性)、赖氨酸(碱性极性)、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸；非极性氨基酸包括丙氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸和缬氨酸。因此，CDR区中的一个或多个氨基酸残基可以被同一组中的其他氨基酸残基替代，并且可以使用本文描述的功能测定来测试改变的抗体的保留功能(即，在上面(c)至(l)中列出的功能)。在某些实施方案中，改变指定序列或CDR区中不超过一个、不超过两个、不超过三个、不超过四个、不超过五个残基。

[0052] 如本文所用，“对照”是实验中出于比较目的使用的替代样品。对照可以是“阳性”或“阴性”的。

[0053] 如本文所用，术语“共刺激信号传导结构域”或“共刺激结构域”是指CAR的包含共刺激分子的细胞内结构域的部分。共刺激分子是除抗原受体或Fc受体以外的细胞表面分子，其在与抗原结合后提供T淋巴细胞的有效激活和功能所需的第二信号。此类共刺激分子的例子包括CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40(CD134)、CD30、CD40、PD-1、ICOS(CD278)、LFA-1、CD2、CD7、LIGHT、NKD2C、B7-H2和特异性结合CD83的配体。因此，尽管本公开文本提供了衍生自CD28和4-1BB的示例性共刺激结构域，但是考虑了用于与本文所述的CAR一起使用的其他共刺激结构域。包含一个或多个共刺激信号传导结构域可以增强表达CAR受体的T细胞的功效和扩增。细胞内信号传导和共刺激信号传导结构域可以以任何顺序串联连接至跨膜结构域的羧基端。

[0054] 如本文所用，术语“疾病”是指损害或干扰细胞、组织或器官的正常功能的任何病症或障碍。疾病的例子包括瘤形成或细胞的病原体感染。

[0055] 如本文所用，术语“有效量”是指在施用后足以实现有益的或所希望的结果的药剂的量。向所述受试者施用的药剂的量可以取决于个体的特征(如总体健康状况、年龄、性别、体重)、施用的工程化免疫细胞的有效浓度以及对药物的耐受性。技术人员将能够根据这些和其他因素确定合适的剂量。可以将有效量以一个或多个剂量施用于受试者。

[0056] 如本文所用，术语“表达”是指多核苷酸转录成mRNA的过程和/或转录的mRNA随后被翻译成肽、多肽或蛋白质的过程。如果所述多核苷酸源自基因组DNA，则在真核细胞中表

达可以包括mRNA的剪接。可以通过测量细胞或组织样品中mRNA或蛋白质的量来确定基因的表达水平。在一方面，可以将来自一个样品的基因的表达水平直接与来自对照或参考样品的所述基因的表达水平进行比较。在另一方面，可以将来自一个样品的基因的表达水平直接与施用本文公开的组合物后来自相同样品的所述基因的表达水平进行比较。术语“表达”还是指以下事件中的一种或多种：(1)在细胞内由DNA序列产生RNA模板(例如通过转录)；(2)在细胞内加工RNA转录物(例如，通过剪接、编辑、5’帽形成和/或3’端形成)；(3)在细胞内将RNA序列翻译成多肽或蛋白质；(4)在细胞内对多肽或蛋白质的翻译后修饰；(5)将多肽或蛋白质呈递在细胞表面上；以及(6)从细胞分泌或呈递或释放多肽或蛋白质。可以使用本领域已知的任何方法(包括例如确定从宿主细胞产生的多肽的量的方法)来评估多肽的表达水平。此类方法可以包括但不限于通过ELISA、凝胶电泳后的考马斯(Coomassie)蓝染色、劳瑞(Lowry)蛋白测定和布拉德福德(Bradford)蛋白测定定量细胞裂解物中的多肽。

[0057] 如本文所用，“F(ab)”是指与抗原结合但是单价的并且没有Fc部分的抗体结构片段，例如，被木瓜蛋白酶消化的抗体产生两个F(ab)片段和一个Fc片段(例如，重(H)链恒定区；不结合抗原的Fc区)。

[0058] 如本文所用，“$F(ab')_2$”是指通过对完整IgG抗体进行胃蛋白酶消化而产生的抗体片段，其中此片段具有两个抗原结合(ab’)(二价)区，其中每个(ab’)区包含两个单独的氨基酸链(用于结合抗原的通过S-S键连接的H链的一部分和轻(L)链)并且其中其余的H链部分连接在一起。可以将“F(ab’)2”片段分为两个单独的Fab’片段。

[0059] 如本文所用，术语“异源核酸分子或多肽”是指通常不存在于细胞或从细胞获得的样品中的核酸分子(例如，cDNA、DNA或RNA分子)或多肽。这种核酸可来自另一种生物体，或者它可以是例如在细胞或样品中通常不表达的mRNA分子。

[0060] 如本文所用，“宿主细胞”是用于接收、维持、繁殖和扩增载体的细胞。宿主细胞也可以用于表达由载体编码的多肽。当宿主细胞分裂时，载体中含有的核酸被复制，从而扩增核酸。

[0061] 如本文所用，术语“免疫细胞”是指在受试者的免疫应答中起作用的任何细胞。免疫细胞来源于造血系统并且包括淋巴细胞，如B细胞和T细胞；自然杀伤细胞；髓样细胞(如单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞以及粒细胞)。如本文所用，术语“工程化免疫细胞”是指经遗传修饰的免疫细胞。如本文所用，术语“天然免疫细胞”是指天然存在于免疫系统中的免疫细胞。

[0062] 如本文所用，术语“增加”意指正改变至少约5％，包括但不限于正改变约5％、约10％、约25％、约30％、约50％、约75％或约100％。

[0063] 如本文所用，术语“分离的细胞”是指与天然伴随细胞的分子组分和/或细胞组分分开的细胞。

[0064] 如本文所用，术语“分离的”、“纯化的”或“生物学上纯的”是指这样的材料，所述材料在不同程度上不含以其天然状态发现的通常伴随它的组分。“分离”表示与原始来源或环境的分开程度。“纯化”表示高于分离的分开程度。“纯化的”或“生物学上纯的”蛋白质充分不含其他材料，使得任何杂质均不实质性影响蛋白质的生物学特性或引起其他不利后果。即，如果当前公开的主题的核酸或多肽当通过重组DNA技术生产时基本上不含细胞材料、病毒材料或培养基或者当化学合成时基本上不含化学前体或其他化学品，则它是纯化的。纯

度和均质性典型地使用分析化学技术(例如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱法)来确定。术语“纯化的”可以表示核酸或蛋白质在电泳凝胶中基本上产生一个条带。对于可以经受修饰(例如,磷酸化或糖基化)的蛋白质,不同的修饰可以产生不同的分离的蛋白质,可以将所述分离的蛋白质单独地纯化。

[0065] 如本文所用,术语“配体”是指与受体结合的分子。特别地,配体与另一细胞上的受体结合,从而允许细胞与细胞间的识别和/或相互作用。

[0066] 术语“接头”是指接连或连接两个序列(例如,连接两个多肽结构域)的合成序列(例如,氨基酸序列)。在一些实施方案中,接头含有1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸残基。

[0067] 术语“淋巴细胞”是指来源于包括组织特异性和特化种类的淋巴样祖细胞的所有未成熟、成熟、未分化和分化的白细胞群体,并且以非限制性例子方式涵盖B细胞、T细胞、NKT细胞和NK细胞。在一些实施方案中,淋巴细胞包括所有B细胞谱系,包括前B细胞、祖B细胞、早期祖B细胞、晚期祖B细胞、大前B细胞、小前B细胞、未成熟B细胞、成熟B细胞、血浆B细胞、记忆B细胞、B-1细胞、B-2细胞和无变应性AN1/T3细胞群体。

[0068] 如本文所用,术语“调节”意指正或负改变。示例性的调节包括约1%、约2%、约5%、约10%、约25%、约50%、约75%或约100%的变化。

[0069] 如本文所用,术语“瘤形成”是指以细胞或组织的病理增生及其随后向其他组织或器官的迁移或侵袭为特征的疾病。瘤形成生长通常是不受控制和进行性的,并且在不会引发正常细胞繁殖或会导致正常细胞繁殖停止的条件下发生。瘤形成可以影响多种细胞类型、组织或器官,包括但不限于选自以下的器官:膀胱、结肠、骨、脑、乳房、软骨、神经胶质、食道、输卵管、胆囊、心脏、肠、肾、肝、肺、淋巴结、神经组织、卵巢、胸膜、胰腺、前列腺、骨骼肌、皮肤、脊髓、脾、胃、睾丸、胸腺、甲状腺、气管、泌尿生殖道、输尿管、尿道、子宫和阴道或其组织或细胞类型。瘤形成包括癌症,如肉瘤、上皮癌或浆细胞瘤(浆细胞的恶性肿瘤)。

[0070] 如本文所用,关于核酸序列、区、元件或结构域的“可操作地连接”意指核酸区在功能上彼此相关。例如,可以将编码前导肽的核酸与编码多肽的核酸可操作地连接,由此可以转录和翻译核酸以表达功能性融合蛋白,其中前导肽影响融合多肽的分泌。在一些情况下,编码第一多肽(例如,前导肽)的核酸与编码第二多肽的核酸可操作地连接,并且核酸被转录为单个mRNA转录物,但是mRNA转录物的翻译可以导致表达两种多肽之一。例如,琥珀终止密码子可以位于编码第一多肽的核酸与编码第二多肽的核酸之间,使得当引入部分琥珀抑制细胞时,所得单个mRNA转录物可以被翻译以产生含有第一多肽和第二多肽的融合蛋白或者可以被翻译以仅产生第一多肽。在另一个例子中,启动子可以与编码多肽的核酸可操作地连接,由此启动子调节或介导核酸的转录。

[0071] 如本文所用,两个氨基酸序列之间的“同源性百分比”等同于两个序列之间的同一性百分比。两个序列之间的同一性百分比是序列共有的相同位置的数目的函数(即,同源性%=相同位置的数/总位置数×100),考虑了空位的数目以及每个空位的长度,需要引入这些空位以进行两个序列的最佳比对。可使用数学算法来完成序列比较和两个序列之间同一性百分比的确定。

[0072] 两个氨基酸序列之间的同源性百分比可以使用E.Meyers和W.Miller的算法测定(Comput.Appl.Biosci.,4:1 1-17(1988)),已使用PAM120权重残基表、空位长度罚分12以及空位罚分4将所述算法并入ALIGN程序(版本2.0)。此外,可以使用已并入GCG软件包(可以

在www.gcg.com上获得)中的GAP程序中的Needleman和Wunsch(J.Mol.Biol.48:444-453(1970))的算法,使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵以及16、14、12、10、8、6或4的空位权重和1、2、3、4、5或6的长度权重来确定两个氨基酸序列之间的同源性百分比。

[0073] 另外地或可替代地,当前公开的主题的氨基酸序列可以进一步用作“查询序列”,以在公共数据库中进行检索从而例如鉴定相关序列。可以使用Altschul等人(1990)J.Mol.Biol.215:403-10的XBLAST程序(版本2.0)来进行此类检索。可以用XBLAST程序进行BLAST蛋白质检索,得分=50,字长=3,以获得与本文公开的指定序列同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的空位比对,可以如Altschul等人,(1997)Nucleic Acids Res.25(17):3389-3402中所述的使用空位BLAST(Gapped BLAST)。当使用BLAST和空位BLAST程序时,可以使用各程序(例如,XBLAST和NBLAST)的默认参数。

[0074] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文可互换使用,以指代氨基酸残基的聚合物。所述术语适用于天然存在的氨基酸聚合物以及其中一个或多个氨基酸残基是非天然存在的氨基酸(例如,氨基酸类似物)的氨基酸聚合物。所述术语涵盖任何长度的氨基酸链,包括全长蛋白质,其中氨基酸残基通过共价肽键连接。

[0075] 如本文所用,术语“减少”意指负改变至少约5%,包括但不限于负改变约5%、约10%、约25%、约30%、约50%、约75%或约100%。

[0076] 如本文所用,核酸分子的调节区意指正或负影响可操作连接的基因的表达的顺式作用核苷酸序列。调节区包括赋予基因的诱导(即,需要用于增加转录的物质或刺激物)表达的核苷酸序列。当诱导剂存在或浓度增加时,基因表达可以增加。调节区还包括赋予基因表达的阻遏的序列(即,物质或刺激物降低转录)。当阻遏物存在或浓度增加时,基因表达可以降低。已知调节区影响、调节或控制许多体内生物学活性,包括细胞增殖、细胞生长和死亡、细胞分化和免疫调节。调节区典型地与一种或多种反式作用蛋白结合,这导致基因转录增加或减少。

[0077] 基因调节区的具体例子是启动子和增强子。启动子是位于转录或翻译起始位点周围的序列,典型地定位在翻译起始位点的5’端。启动子通常位于翻译起始站点的1Kb内,但也可以位于更远的地方,例如2Kb、3Kb、4Kb、5Kb或更高、最高达并且包括10Kb。已知当定位在基因的5’或3’处时或当定位在外显子或内含子中或一部分时,增强子影响基因表达。增强子还可以在距基因显著距离处(例如在距约3Kb、5Kb、7Kb、10Kb、15Kb或更大距离处)起作用。除了启动子区之外,调节区还包括但不限于促进翻译、内含子剪接信号、维持基因的正确阅读框以允许mRNA的框内翻译的序列,以及终止密码子、前导序列和融合伴侣序列,用于产生多基因或多顺反子信息、聚腺苷酸化信号以提供目的基因和终止密码子的转录物的适当聚腺苷酸化的内部核糖体结合位点(IRES)元件,并且可以任选地包含在表达载体中。

[0078] 如本文所用,术语“样品”是指从受试者获得的临床样品。在某些实施方案中,从生物来源获得样品(即,“生物样品”),如从受试者收集的组织、体液或微生物。样品来源包括但不限于粘液、痰液、支气管肺泡灌洗液(BAL)、支气管洗涤液(BW)、全血、体液、脑脊液(CSF)、尿液、血浆、血清或组织。

[0079] 如本文所用,术语引用多肽时的“分泌的”意指经由分泌途径通过内质网、高尔基体并且作为在细胞质膜上瞬时融合的囊泡(将蛋白质释放到细胞外部)而从细胞释放的多肽。小分子(如药物)也可以通过细胞膜扩散到细胞外部而被分泌。

[0080] 如本文所用,术语“单链可变片段”或“scFv”是免疫球蛋白(例如,小鼠或人)的重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L)(共价连接以形成V_H::V_L异二聚体)的融合蛋白。重链(V_H)和轻链(V_L)直接接合或通过肽编码接头(例如,约10、15、20、25个氨基酸)接合,所述肽编码接头将V_H的N端与VL的C端连接,或者将V_H的C端与V_L的N端连接。接头通常富含甘氨酸以获得柔性,并且富含丝氨酸或苏氨酸以获得溶解性。接头可以连接细胞外抗原结合结构域的重链可变区和轻链可变区。在某些实施方案中,接头包含具有SEQ ID NO:1中列出的序列的氨基酸,所述序列如以下所提供的:GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:1)。在某些实施方案中,编码SEQ ID NO:1的氨基酸序列的核酸序列在以下提供的SEQ ID NO:2中列出:ggcggcggcggatctggaggtggtggctcaggtggcggaggctcc(SEQ ID NO:2)。接头的其他例子包括GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(即$[G_4S]_4$)(SEQ ID NO:33)或GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS(即$[G_4S]_6$)(SEQ ID NO:34)。

[0081] 尽管去除恒定区并引入接头,但是scFv蛋白保留原始免疫球蛋白的特异性。单链Fv多肽抗体可以从包含V_H和V_L编码序列的核酸表达,如Huston等人,Proc.Nat.Acad.Sci.USA,85:5879-5883(1988)所述。还参见美国专利号5,091,513、5,132,405和4,956,778;以及美国专利公开号20050196754和20050196754。具有抑制活性的拮抗性scFv已被描述(参见,例如,Zhao等人,Hybridoma(Larchmt)27(6):455-51(2008);Peter等人,J Cachexia Sarcopenia Muscle(2012);Shieh等人,J Imunol 183(4):2277-85(2009);Giomarelli等人,Thromb Haemost 97(6):955-63(2007);Fife等人,J Clin Invst 116(8):2252-61(2006);Brocks等人,Immunotechnology 3(3):173-84(1997);Moosmayer等人,Ther Immunol 2(10):31-40(1995))。具有刺激活性的激动性scFv已被描述(参见,例如,Peter等人,J Biol Chem25278(38):36740-7(2003);Xie等人,Nat Biotech 15(8):768-71(1997);Ledbetter等人,Crit Rev Immunol 17(5-6):427-55(1997);Ho等人,Bio Chim Biophys Acta 1638(3):257-66(2003))。

[0082] 如本文所用,术语“特异性地结合”或“与……特异性地结合”或“特异性地靶向”是指识别并结合目的分子(例如,抗原)但基本上不识别并结合其他分子的分子(例如,多肽或其片段)。如本文所用,术语“特异性结合”特定分子(例如,抗原)、与所述特定分子“特异性地结合”或对所述特定分子具有“特异性”可以例如通过分子对其所结合的分子的K_d为约10^{-4}M、10^{-5}M、10^{-6}M、10^{-7}M、10^{-8}M、10^{-9}M、10^{-10}M、10^{-11}M或10^{-12}M来展现。

[0083] 如本文所用,术语“受试者”、“个体”或“患者”可互换使用并且是指个体有机体、脊椎动物或哺乳动物并且可以包括人、非人灵长类动物、啮齿动物等(例如,有待成为特定医学干预的接受者或从其中收获细胞)。在某些实施方案中,所述个体、患者或受试者是人。

[0084] 术语“基本上同源的”或“基本上相同的”意指展现出相对于参考氨基酸序列(例如,本文描述的任何一种氨基酸序列)或核酸序列(例如,本文描述的任何一种核酸序列)至少50%或更大同源性或同一性的多肽或核酸分子。例如,相对于用于比较的序列(例如,野生型或天然序列),此类序列在氨基酸水平或核酸上是至少约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%或约99%同源或相同的。在一些实施方案中,相对于用于比较的序列,基本上同源或基本上相同的多肽含有一个或多个氨基酸的氨基酸取代、插入或缺失。在一些实施方案中,基本上同源或基本上相同的多肽含有一个或多个非天然氨基酸或氨基酸类似物(包括D-氨基酸和逆反氨基)以替代同源序列。

[0085] 通常使用序列分析软件(例如,威斯康星大学生物技术中心(大学大道1710,麦迪逊,威斯康星州53705)遗传计算组的序列分析软件包(Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group,University of Wisconsin Biotechnology Center)、BLAST、BESTFIT、GAP或PILEUP/PRETTYBOX程序)来测量序列同源性或序列同一性。此类软件通过对不同的取代、缺失和/或其他修饰分配同源性程度而将相似的序列进行匹配。在确定同一性程度的示例性方法中,可使用BLAST程序,其中在e^{-3}与e^{-100}之间的概率得分指示密切相关的序列。

[0086] 当前公开的主题中有用的核酸分子包括编码多肽或其片段的任何核酸分子。在某些实施方案中,当前公开的主题中有用的核酸分子包括编码抗体或其抗原结合部分的核酸分子。此类核酸分子无需与内源核酸序列100%相同,但是通常会展现显著同一性。与内源序列具有"显著同源性"或"显著同一性"的多核苷酸通常能够与双链核酸分子的至少一条链杂交。"杂交"意指在各种严格条件下在互补多核苷酸序列(例如,本文描述的基因)或其部分之间配对以形成双链分子。(参见,例如,Wahl,G.M.和S.L.Berger,Methods Enzymol.152:399(1987);Kimmel,A.R.Methods Enzymol.152:507(1987))。例如,严格的盐浓度通常是小于约750mM NaCl和75mM柠檬酸三钠、小于约500mM NaCl和50mM柠檬酸三钠、或小于约250mM NaCl和25mM柠檬酸三钠。低严格杂交可以在不存在有机溶剂例如甲酰胺的情况下获得,而高严格杂交可以在存在至少约35%w/v甲酰胺或至少约50%w/v甲酰胺的情况下获得。严格的温度条件将通常包括至少约30℃、至少约37℃或至少约42℃的温度。变化的另外的参数,如杂交时间、洗涤剂(例如,十二烷基硫酸钠(SDS))浓度以及载体DNA的包括或排除对本领域技术人员是熟知的。各种严格水平通过按需组合这些各种条件实现。在某些实施方案中,杂交将在30℃下在750mM NaCl、75mM柠檬酸三钠和1%w/v SDS中发生。在某些实施方案中,杂交将在37℃下在500mM NaCl、50mM柠檬酸三钠、1%w/v SDS、35%w/v甲酰胺和100μg/ml变性鲑鱼精DNA(ssDNA)中发生。在某些实施方案中,杂交将在42℃下在250mM NaCl、25mM柠檬酸三钠、1%w/v SDS、50%w/v甲酰胺和200μg ssDNA中发生。有用的这些条件的变化对本领域技术人员是易于清楚的。

[0087] 对于多数应用,杂交后的洗涤步骤也将在严格性方面变化。洗涤严格性条件可以由盐浓度以及温度限定。如上,洗涤严格性可以通过降低盐浓度或通过提高温度来提高。例如,用于所述洗涤步骤的严格盐浓度将为小于约30mM NaCl和3mM柠檬酸三钠、或小于约15mM NaCl和1.5mM柠檬酸三钠。用于所述洗涤步骤的严格温度条件将通常包括至少约25℃、至少约42℃或至少约68℃的温度。在某些实施方案中,洗涤步骤将在25℃下在30mM NaCl、3mM柠檬酸三钠和0.1%w/v SDS中发生。在某些实施方案中,洗涤步骤将在42℃下在15mM NaCl、1.5mM柠檬酸三钠和0.1%w/v SDS中发生。在某些实施方案中,洗涤步骤将在68℃下在15mM NaCl、1.5mM柠檬酸三钠和0.1%w/v SDS中发生。这些条件的另外的变化对本领域技术人员是易于清楚的。杂交技术对本领域技术人员是熟知的并且描述在例如Benton和Davis(Science 196:180(1977));Grunstein和Rogness(Proc.Natl.Acad.Sci.,USA 72:3961(1975));Ausubel等人(Current Protocols in Molecular Biology,Wiley Interscience,New York,2001);Berger和Kimmel(Guide to Molecular Cloning Techniques,1987,Academic Press,New York)以及Sambrook等人,Molecular Cloning:ALaboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York中。

[0088] 如本文所用,关于例如合成核酸分子或合成基因或合成肽的“合成”是指通过重组方法和/或通过化学合成方法产生的核酸分子或多肽分子。如本文所用,“通过使用重组DNA方法的重组手段产生”意指使用熟知的分子生物学方法来表达由克隆DNA编码的蛋白质。

[0089] 如本文所用,术语“T细胞”包括幼稚(naïve)T细胞、$CD4^+$T细胞、$CD8^+$T细胞、记忆T细胞、激活的T细胞、无变应性T细胞、耐受T细胞、嵌合B细胞、和抗原特异性T细胞。

[0090] 如本文所用,“肿瘤浸润淋巴细胞”或“TIL”是指已离开血流并且迁移到肿瘤中的白细胞。

[0091] 如本文所用,“载体”是可复制的核酸,当将载体转化到适当的宿主细胞中时,可以从所述可复制的核酸表达一种或多种异源蛋白质。对载体的提及包括通常可以典型地通过限制性消化和连接将编码多肽或其片段的核酸引入其中的那些载体。对载体的提及还包括含有编码多肽的核酸的那些载体。载体用于将编码多肽的核酸引入宿主细胞中,以扩增核酸或表达/展示由核酸编码的多肽。载体典型地保持游离状态,但是可以被设计成实现将基因或其一部分整合到基因组染色体中。还考虑了作为人工染色体的载体,如酵母人工染色体和哺乳动物人工染色体。此类媒介物的选择和使用是本领域技术人员熟知的。载体还包括“病毒载体”(“virus vector”或“viral vector”)。病毒载体是与外源基因可操作地连接以将外源基因转移(作为媒介物或穿梭物)到细胞中的工程化病毒。如本文所用,“表达载体”包括能够表达与调节序列(如启动子区)可操作地连接的DNA的载体,所述调节序列能够实现此类DNA片段的表达。此类另外的片段可以包括启动子和终止子序列,并且可以任选地包含一个或多个复制起点、一个或多个选择性标记物、增强子、聚腺苷酸化信号等。表达载体通常衍生自质粒或病毒DNA,或可以含有这两种元件。因此,表达载体是指在引入适当的宿主细胞后导致克隆DNA的表达的重组DNA或RNA构建体,如质粒、噬菌体、重组病毒或其他载体。适当的表达载体是本领域技术人员熟知的,并且包括在真核细胞和/或原核细胞中可复制的那些以及保持游离状态的那些或整合到宿主细胞基因组中的那些。

概述

[0092] 如本文所述,可以将免疫细胞工程化,以组成性地或有条件地表达与DOTA半抗原结合的抗DOTA C825抗原结合片段。在一些实施方案中,所述工程化免疫细胞另外地表达用于将免疫细胞递送至靶位点的嵌合抗原受体。所述抗DOTA C825抗原结合片段的表达使得可以追踪CAR T细胞并且鉴定肿瘤细胞位点。不希望被理论束缚,相信本发明技术的工程化免疫细胞可用于监测所述工程化免疫细胞随时间的体内分布。

[0093] 本文提供的方法使得可以根据希望的应用模块化使用宽范围的CAR与肿瘤特异性抗体的组合。本文所述的工程化免疫细胞可以与各种肿瘤特异性抗体组合应用。肿瘤特异性抗体在本领域中是已知的。示例性的肿瘤特异性抗体包括但不限于靶向Her2、EGFR、PSMA、CD20、CD33、CD38或WT1的抗体。在一些实施方案中,肿瘤特异性抗体是曲妥珠单抗、西妥昔单抗、ESK1、利妥昔单抗、达雷木单抗或林妥珠单抗。

[0094] 在一些实施方案中,本文提供的工程化免疫细胞表达与靶抗原(如肿瘤抗原以及抗DOTA C825抗原结合片段)结合的T细胞受体(TCR)或其他细胞表面配体。在一些实施方案中,所述T细胞受体是野生型或天然的T细胞受体。在一些实施方案中,所述T细胞受体是嵌合T细胞受体(CAR)。

[0095] 在本文提供的示例性实施方案中,本文提供的工程化免疫细胞表达与CD19肿瘤抗

原结合的T细胞受体(TCR)(例如CAR)或其他细胞表面配体。在一些实施方案中,本文提供的工程化免疫细胞表达与在MHC分子背景下呈递的CD19肿瘤抗原结合的T细胞受体(TCR)(例如CAR)或其他细胞表面配体。在一些实施方案中,本文提供的工程化免疫细胞表达与在HLA-A2分子背景下呈递的CD19肿瘤抗原结合的T细胞受体(TCR)(例如CAR)或其他细胞表面配体。

[0096] 在本文提供的示例性实施方案中,本文提供的工程化免疫细胞表达与"黑色素瘤优先表达抗原"(PRAME)肿瘤抗原结合的T细胞受体(TCR)(例如CAR)或其他细胞表面配体。在一些实施方案中,本文提供的工程化免疫细胞表达与在MHC分子背景下呈递的PRAME肿瘤抗原结合的T细胞受体(TCR)(例如CAR)或其他细胞表面配体。在一些实施方案中,所述PRAME肿瘤抗原在HLA-A2分子的背景下呈递。PRAME蛋白是参与分化、增殖阻滞和细胞凋亡的目前不可成药的视黄酸受体结合蛋白。在蛋白酶体加工后,$PRAME^{300-309}$肽(ALYVDSLFFL)(SEQ ID NO:32)在HLA-I单倍型HLA*A02:01(HLA-A2)的背景下呈递在细胞表面上。

[0097] 在本文提供的示例性实施方案中,本文提供的工程化免疫细胞表达与肾母细胞瘤蛋白1(WT1)肿瘤抗原结合的T细胞受体(TCR)(例如CAR)或其他细胞表面配体。在一些实施方案中,本文提供的工程化免疫细胞表达与在MHC分子背景下呈递的WT1肿瘤抗原结合的T细胞受体(TCR)(例如CAR)或其他细胞表面配体。在一些实施方案中,本文提供的工程化免疫细胞表达与在HLA-A2分子背景下呈递的WT1肿瘤抗原结合的T细胞受体(TCR)(例如CAR)或其他细胞表面配体。

[0098] 在本文提供的示例性实施方案中,本文提供的工程化免疫细胞表达与间皮素肿瘤抗原结合的T细胞受体(TCR)(例如CAR)或其他细胞表面配体。在一些实施方案中,本文提供的工程化免疫细胞表达与在MHC分子背景下呈递的间皮素肿瘤抗原结合的T细胞受体(TCR)(例如CAR)或其他细胞表面配体。在一些实施方案中,本文提供的工程化免疫细胞表达与在HLA-A2分子背景下呈递的间皮素肿瘤抗原结合的T细胞受体(TCR)(例如CAR)或其他细胞表面配体。

[0099] 在本文提供的示例性实施方案中,本文提供的工程化免疫细胞表达与MUC16肿瘤抗原结合的T细胞受体(TCR)(例如CAR)或其他细胞表面配体。在一些实施方案中,本文提供的工程化免疫细胞表达与在MHC分子背景下呈递的MUC16肿瘤抗原结合的T细胞受体(TCR)(例如CAR)或其他细胞表面配体。在一些实施方案中,本文提供的工程化免疫细胞表达与在HLA-A2分子背景下呈递的MUC16肿瘤抗原结合的T细胞受体(TCR)(例如CAR)或其他细胞表面配体。

[0100] 在本文提供的示例性实施方案中,本文提供的工程化免疫细胞表达与前列腺干细胞抗原(PSCA)肿瘤抗原结合的T细胞受体(TCR)(例如CAR)或其他细胞表面配体。在一些实施方案中,本文提供的工程化免疫细胞表达与在MHC分子背景下呈递的PSCA肿瘤抗原结合的T细胞受体(TCR)(例如CAR)或其他细胞表面配体。在一些实施方案中,本文提供的工程化免疫细胞表达与在HLA-A2分子背景下呈递的PSCA肿瘤抗原结合的T细胞受体(TCR)(例如CAR)或其他细胞表面配体。

[0101] 在本文提供的示例性实施方案中,本文提供的工程化免疫细胞表达与B细胞成熟抗原(BCMA)肿瘤抗原结合的T细胞受体(TCR)(例如CAR)或其他细胞表面配体。在一些实施方案中,本文提供的工程化免疫细胞表达与在MHC分子背景下呈递的BCMA肿瘤抗原结合的T

细胞受体(TCR)(例如CAR)或其他细胞表面配体。在一些实施方案中,本文提供的工程化免疫细胞表达与在HLA-A2分子背景下呈递的BCMA肿瘤抗原结合的T细胞受体(TCR)(例如CAR)或其他细胞表面配体。

[0102] 本文提供的表达抗原受体(例如嵌合抗原受体)的工程化免疫细胞(例如CART细胞)与抗DOTA C825抗原结合片段的组合可用于监测所述工程化免疫细胞随时间的体内分布。

[0103] 此外,当工程化免疫细胞在肿瘤位点遇到肿瘤特异性抗原时,所述工程化免疫细胞将广泛增殖(例如100次或更多次),由此显著增加所述抗DOTA C825抗原结合片段的产生。所述工程化免疫细胞(例如CAR T细胞)可以通过将免疫细胞用编码嵌合抗原和抗DOTA C825抗原结合片段的核酸在体内转导而容易地产生。

[0104] 所述抗DOTA C825抗原结合片段的VH的氨基酸序列可以是:

HVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTDYGVHWVRQAPGKGLEWLGVIWSGGGTAYNTALISRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGSYPYNYFDAWGCGTLVTVSS(SEQ ID NO:35)。

[0105] 所述抗DOTA C825抗原结合片段的VL的氨基酸序列可以是:

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTASNYANWVQQKPGQCPRGLIGGHNNRPPGVPARFSGSLLGGKAALTLLGAQPEDEAEYYCALWYSDHWVIGGGTKLTVLG(SEQID NO:36)

[0106] 所述抗DOTA C825抗原结合片段可以包含选自以下的氨基酸序列:

HVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTDYGVHWVRQAPGKGLEWLGVIWSGGGTAYNTALISRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGSYPYNYFDAWGCGTLVTVSS**GGGGSGGGGSGGGGS**QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTASNYANWVQQKPGQCPRGLIGGHNNRPPGVPARFSGSLLGGKAALTLLGAQPEDEAEYYCALWYSDHWVIGGGTKLTVLG（SEQ ID NO:37）;以及

HVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTDYGVHWVRQAPGKGLEWLGVIWSGGGTAYNTALISRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGSYPYNYFDAWGCGTLVTVSS**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTASNYANWVQQKPGQCPRGLIGGHNNRPPGVPARFSGSLLGGKAALTLLGAQPEDEAEYYCALWYSDHWVIGGGTKLTVLG（SEQ ID NO:38）。

*(G4S)3接头序列以粗体示出。

[0107] 在一些实施方案中,所述抗DOTA C825抗原结合片段是scFv、Fab或(Fab)2。

[0108] 本发明技术的示例性构建体包括如表3A中所述的双转导构建体。表3A中所述的构建体的氨基酸序列在下文示出:

[0109] C825-铰链-GFP

TMNRGVPFRHLLLVLQLALLPAATQGHVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTD
YGVHWVRQAPGKGLEWLGVIWSGGGTAYNTALISRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE
DTAVYYCARRGSYPYNYFDAWGCGTLVTVSS*GGGGSGGGGSGGGGS*QAVVTQEPSL
TVSPGGTVTLTCGSSTGAVTASNYANWVQQKPGQCPRGLIGGHNNRPPGVPARFSGS
LLGGKAALTLLGAQPEDEAEYYCALWYSDHWVIGGGTKLTVLGDLEPKSPDKTHTCP
PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKAAA**MALI**
VLGGVAGLLLFIGLGIFFCVRCRHMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGE
GEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMP
EGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNS
HNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQS
ALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYK (SEQ ID NO: 39)

*C825 scFv的VH和VL序列加下划线，(G4S)3接头序列以斜体示出，并且跨膜结构域用粗体示出。

[0110] 19BBz CAR

MALPVTALLLPLALLLHAEVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQ
RPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFC
ARKTISSVVDFYFDYWGQGTTVTVSS*GGGGSGGGGSGGGGS*DIELTQSPKFMSTSVGD
RVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTI
TNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKRAAA**PTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS**
LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCN*KRGRKKL*
*LYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL****RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL***
NLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER
RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 40)

*CD19 scFv的VH和VL序列加下划线，(G4S)3接头序列以斜体示出，并且跨膜结构域用黑体示出，41BB以斜体并加下划线示出，并且CD3ζ多肽加下划线并用粗体示出。

[0111] 本发明技术的其他示例性构建体包括图3B-图3C中所述的构建体。图3B-图3C中所述的构建体的氨基酸序列在下文示出：

TMNRGVPFRHLLLVLQLALLPAATQGHVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTD
YGVHWVRQAPGKGLEWLGVIWSGGGTAYNTALISRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE
DTAVYYCARRGSYPYNYFDAWGCGTLVTVSS*GGGGSGGGGSGGGGS*QAVVTQEPSL
TVSPGGTVTLTCGSSTGAVTASNYANWVQQKPGQCPRGLIGGHNNRPPGVPARFSGS
LLGGKAALTLLGAQPEDEAEYYCALWYSDHWVIGGGTKLTVLGKDPKAAA**MALIVL**
GGVAGLLLFIGLGIFFCVRCRHMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGE
GDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEG
YVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHN
VYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSAL
SKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYKATNFSLLKQAGDVEENPGPALPVTAL
LLPLALLLHAEVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLE
WIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSV
VDFYFDYWGQGTTVTVSS*GGGGSGGGGSGGGGS*DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCK
ASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKD
LADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKRAAA**PTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACR**
PAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCN*KRGRKKLLYIFKQPF*
*MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL**RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREE***
YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD
GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 41)

TMNRGVPFRHLLLVLQLALLPAATQGHVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTD
YGVHWVRQAPGKGLEWLGVIWSGGGTAYNTALISRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE
DTAVYYCARRGSYPYNYFDAWGCGTLVTVSS*GGGGSGGGGSGGGGS*QAVVTQEPSL
TVSPGGTVTLTCGSSTGAVTASNYANWVQQKPGQCPRGLIGGHNNRPPGVPARFSGS
LLGGKAALTLLGAQPEDEAEYYCALWYSDHWVIGGGTKLTVLGHHHHHHDKLVKC
EGISLLAQNTSWLLLLLLSLSLLQATDFMSLATNFSLLKQAGDVEENPGPMALPVTAL
LLPLALLLHAEVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLE
WIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSV
VDFYFDYWGQGTTVTVSS*GGGGSGGGGSGGGGS*DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCK
ASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKD
LADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKRAAA**PTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACR**
PAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCN*KRGRKKLLYIFKQPF*
*MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL**RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE***
YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD
GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 42)

*C825 scFv和CD19 scFv的VH和VL序列加下划线，(G4S)3接头序列以斜体示出，跨膜结构域用粗体示出，41BB以斜体并加下划线示出，并且CD3ζ多肽加下划线并用粗体示出。

靶向配体和靶抗原

[0112] 在一些实施方案中，本文提供的工程化免疫细胞表达与靶抗原(如肿瘤抗原)结合的T细胞受体(TCR)或其他细胞表面配体。细胞表面配体可以是将免疫细胞引导至靶位点(例如，肿瘤位点)的任何分子。示例性细胞表面配体包括例如内源性受体、工程化受体或实现将免疫细胞靶向靶位点的其他特异性配体。在一些实施方案中，所述受体是T细胞受体。在一些实施方案中，所述T细胞受体是与靶抗原结合的野生型或天然的T细胞受体。在一些实施方案中，受体(例如，T细胞受体)是非天然受体(例如，对免疫细胞不是内源性的)。在一些实施方案中，受体是与靶抗原结合的嵌合抗原受体(CAR)(例如T细胞CAR)。

[0113] 在一些实施方案中，所述靶抗原由肿瘤细胞表达。在一些实施方案中，所述靶抗原在肿瘤细胞的表面上表达。在一些实施方案中，所述靶抗原是细胞表面受体。在一些实施方案中，所述靶抗原是细胞表面糖蛋白。在一些实施方案中，所述靶抗原由肿瘤细胞分泌。在一些实施方案中，所述靶抗原定位于肿瘤微环境。在一些实施方案中，所述靶抗原定位于细胞外基质或肿瘤微环境的间质。在一些实施方案中，所述靶抗原由一种或多种位于细胞外

基质内或肿瘤微环境的间质内的细胞表达。

[0114] 在一些实施方案中，所述靶抗原是选自以下的肿瘤抗原：5T4、α5β1-整合素、707-AP、A33、AFP、ART-4、B7H4、BAGE、Bcl-2、β-连环素、BCMA、Bcr-abl、MN/CIX抗体、CA125、CA19-9、CAMEL、CAP-1、CASP-8、CD4、CD5、CD19、CD20、CD21、CD22、CD25、CDC27/m、CD33、CD37、CD45、CD52、CD56、CD80、CD123、CDK4/m、CEA、c-Met、CS-1、CT、Cyp-B、细胞周期蛋白B1、DAGE、DAM、EBNA、EGFR、ErbB3、ELF2M、EMMPRIN、EpCam、肝配蛋白B2、雌激素受体、ETV6-AML1、FAP、铁蛋白、叶酸结合蛋白、GAGE、G250、GD-2、GM2、GnT-V、gp75、gp100(Pmel 17)、HAGE、HER-2/neu、HLA-A*0201-R170I、HPV E6、HPV E7、Ki-67、HSP70-2M、HST-2、hTERT(或hTRT)、iCE、IGF-1R、IL-2R、IL-5、KIAA0205、LAGE、LDLR/FUT、LRP、MAGE、MART、MART-1/黑色素A(melan-A)、MART-2/Ski、MC1R、间皮素、MUC、MUC16、MUM-1-B、myc、MUM-2、MUM-3、NA88-A、NYESO-1、NY-Eso-B、p53、蛋白酶-3、p190小bcr-abl、Pml/RARα、PRAME、孕酮受体、PSA、PSCA、PSM、PSMA、ras、RAGE、RU1或RU2、RORI、SART-1或SART-3、存活蛋白、TEL/AML1、TGFβ、TPI/m、TRP-1、TRP-2、TRP-2/INT2、生腱蛋白、TSTA酪氨酸酶、VEGF和WT1。在某些实施方案中，所述靶抗原是选自BCMA、CD19、间皮素、MUC16、PSCA、WT1和PRAME的肿瘤抗原。

[0115] 在一些实施方案中，靶抗原是在MHC分子的背景下呈递的肿瘤抗原。在一些实施方案中，MHC蛋白是MHC I类蛋白。在一些实施方案中，MHC I类蛋白是HLA-A、HLA-B或HLA-C分子。在一些实施方案中，靶抗原是在HLA-A2分子的背景下呈递的肿瘤抗原。可以采用IgG1、去岩藻糖化Fc形式、双特异性、BiTE以及CAR T细胞形式或其部分，如本文所述用于识别在MHC分子的背景下存在于靶细胞(例如，肿瘤细胞)表面上的靶抗原。

嵌合抗原受体

[0116] 在一些实施方案中，本文提供的工程化免疫细胞表达至少一种嵌合抗原受体(CAR)。CAR是工程化受体，其将目的特异性移植或赋予到免疫效应细胞上。例如，CAR可以用于将单克隆抗体的特异性移植到免疫细胞(如T细胞)上。在一些实施方案中，通过核酸载体(如逆转录病毒载体)促进CAR的编码序列的转移。

[0117] 当前存在三代CAR。在一些实施方案中，本文提供的工程化免疫细胞表达“第一代”CAR。“第一代”CAR典型地由T细胞受体(TCR)链的以下部分融合构成：细胞外抗原结合结构域(例如，单链可变片段(scFv))与跨膜结构域融合，所述跨膜结构域与细胞质/细胞内结构域融合。“第一代”CAR典型地具有来自CD3ζ链的细胞内结构域，它是来自内源性TCR的信号的主要发送者。“第一代”CAR可以提供从头抗原识别并且通过单个融合分子中的其CD3ζ链信号传导结构域引起$CD4^+$和$CD8^+$T细胞两者的激活，与HLA介导的抗原呈递无关。

[0118] 在一些实施方案中，本文提供的工程化免疫细胞表达“第二代”CAR。“第二代”CAR将来自各种共刺激分子(例如，CD28、4-1BB、ICOS、OX40)的细胞内结构域添加到CAR的细胞质尾部以向T细胞提供另外的信号。“第二代”CAR包括提供共刺激(例如，CD28或4-1BB)和激活(例如，CD3ζ)两者的那些。

[0119] 在一些实施方案中，本文提供的工程化免疫细胞表达“第三代”CAR。“第三代”CAR包括提供多共刺激(例如，CD28和4-1BB)和激活(例如，CD3ζ)的那些。

[0120] 根据当前公开的主题，本文提供的工程化免疫细胞的CAR包含细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和细胞内结构域。

[0121] CAR的细胞外抗原结合结构域。在某些实施方案中，CAR的细胞外抗原结合结构域

特异性结合肿瘤抗原。在某些实施方案中，所述细胞外抗原结合结构域源自与肿瘤抗原结合的单克隆抗体(mAb)。在一些实施方案中，所述细胞外抗原结合结构域包含scFv。在一些实施方案中，所述细胞外抗原结合结构域包含任选交联的Fab。在一些实施方案中，所述细胞外结合结构域包含$F(ab)_2$。在一些实施方案中，任何前述分子包含在具有异源序列的融合蛋白中以形成细胞外抗原结合结构域。在某些实施方案中，所述细胞外抗原结合结构域包含与肿瘤抗原特异性结合的人scFv。在某些实施方案中，通过用肿瘤抗原-Fc融合蛋白筛选scFv噬菌体文库来鉴定scFv。

[0122] 在某些实施方案中，当前公开的CAR的细胞外抗原结合结构域对肿瘤抗原(例如，哺乳动物肿瘤抗原，如人肿瘤抗原)具有高结合特异性和高结合亲和力。例如，在一些实施方案中，CAR的细胞外抗原结合结构域(例如体现在人scFv或其类似物中)以约1×10^{-5}M或更小的解离常数(K_d)与特定的肿瘤抗原结合。在某些实施方案中，所述K_d是约5×10^{-6}M或更小、约1×10^{-6}M或更小、约5×10^{-7}M或更小、约1×10^{-7}M或更小、约5×10^{-8}M或更小、约1×10^{-8}M或更小、约5×10^{-9}或更小、约4×10^{-9}或更小、约3×10^{-9}或更小、约2×10^{-9}或更小或约1×10^{-9}M或更小。在某些非限制性实施方案中，所述K_d是约3×10^{-9}M或更小。在某些非限制性实施方案中，所述K_d是约3×10^{-9}至约2×10^{-7}。

[0123] 当前公开的靶向肿瘤抗原的CAR的细胞外抗原结合结构域(例如体现在人scFv或其类似物中)的结合可以通过例如酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、FACS分析、生物测定(例如，生长抑制)或蛋白质印迹测定来确认。这些测定中的每一种通常通过采用对特别感兴趣的蛋白质-抗体复合物具有特异性的被标记的试剂(例如，抗体或scFv)来检测所述感兴趣的复合物的存在。例如，可以将scFv放射性标记并且用于放射免疫测定(RIA)(参见例如，Weintraub,B.,Principles of Radioimmunoassays,Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques,The Endocrine Society,1986年3月，将其通过引用并入本文)。放射性同位素可以通过如使用γ计数器或闪烁计数器的此类装置或通过放射自显影术来检测。在某些实施方案中，将靶向肿瘤抗原的CAR的细胞外抗原结合结构域用荧光标记物标记。荧光标记物的非限制性例子包括绿色荧光蛋白(GFP)、蓝色荧光蛋白(例如，EBFP、EBFP2、Azurite和mKalamal)、青色荧光蛋白(例如，ECFP、Cerulean和CyPet)和黄色荧光蛋白(例如，YFP、黄水晶、Citrine和YPet)。在某些实施方案中，将当前公开的靶向肿瘤抗原的CAR的人scFv用GFP标记。

[0124] 在一些实施方案中，表达的CAR的细胞外抗原结合结构域与由肿瘤细胞表达的肿瘤抗原结合。在一些实施方案中，表达的CAR的细胞外抗原结合结构域与在肿瘤细胞表面上表达的肿瘤抗原结合。在一些实施方案中，表达的CAR的细胞外抗原结合结构域与在肿瘤细胞表面上表达的肿瘤抗原与MHC蛋白的组合结合。在一些实施方案中，MHC蛋白是MHC I类蛋白。在一些实施方案中，MHC I类蛋白是HLA-A、HLA-B或HLA-C分子。在一些实施方案中，表达的CAR的细胞外抗原结合结构域与在肿瘤细胞表面上表达的未与MHC蛋白组合的肿瘤抗原结合。

[0125] 在一些实施方案中，表达的CAR的细胞外抗原结合结构域与选自以下的肿瘤抗原结合：5T4、α5β1-整合素、707-AP、A33、AFP、ART-4、B7H4、BAGE、Bcl-2、β-连环素、BCMA、Bcr-abl、MN/C IX抗体、CA125、CA19-9、CAMEL、CAP-1、CASP-8、CD4、CD5、CD19、CD20、CD21、CD22、CD25、CDC27/m、CD33、CD37、CD45、CD52、CD56、CD80、CD123、CDK4/m、CEA、c-Met、CS-1、CT、

Cyp-B、细胞周期蛋白B1、DAGE、DAM、EBNA、EGFR、ErbB3、ELF2M、EMMPRIN、EpCam、肝配蛋白B2、雌激素受体、ETV6-AML1、FAP、铁蛋白、叶酸结合蛋白、GAGE、G250、GD-2、GM2、GnT-V、gp75、gp100(Pmel 17)、HAGE、HER-2/neu、HLA-A*0201-R170I、HPV E6、HPV E7、Ki-67、HSP70-2M、HST-2、hTERT(或hTRT)、iCE、IGF-1R、IL-2R、IL-5、KIAA0205、LAGE、LDLR/FUT、LRP、MAGE、MART、MART-1/黑色素A(melan-A)、MART-2/Ski、MC1R、间皮素、MUC、MUC16、MUM-1-B、myc、MUM-2、MUM-3、NA88-A、NYESO-1、NY-Eso-B、p53、蛋白酶-3、p190小bcr-abl、Pml/RARα、PRAME、孕酮受体、PSA、PSCA、PSM、PSMA、ras、RAGE、RU1或RU2、RORI、SART-1或SART-3、存活蛋白、TEL/AML1、TGFβ、TPI/m、TRP-1、TRP-2、TRP-2/INT2、生腱蛋白、TSTA酪氨酸酶、VEGF和WT1。在某些实施方案中,表达的CAR的细胞外抗原结合结构域与选自BCMA、CD19、间皮素、MUC16、PSCA、WT1和PRAME的肿瘤抗原结合。示例性细胞外抗原结合结构域以及产生此类结构域和相关CAR的方法描述在以下中:例如WO2016/191246、WO 2017/023859、WO 2015/188141、WO 2015/070061、WO 2012/135854、WO 2014/055668(将其通过引用以其整体并入),包括其中提供的序列表。

[0126] 在一些实施方案中,表达的CAR的细胞外抗原结合结构域与CD19肿瘤抗原结合。在一些实施方案中,表达的CAR的细胞外抗原结合结构域与在MHC分子背景下呈递的CD19肿瘤抗原结合。在一些实施方案中,表达的CAR的细胞外抗原结合结构域与在HLA-A2分子背景下呈递的CD19肿瘤抗原结合。

[0127] 在一些实施方案中,表达的CAR的细胞外抗原结合结构域与“黑色素瘤优先表达抗原”(PRAME)肿瘤抗原结合。在一些实施方案中,表达的CAR的细胞外抗原结合结构域与在MHC分子背景下呈递的PRAME肿瘤抗原结合。在一些实施方案中,表达的CAR的细胞外抗原结合结构域与在HLA-A2分子背景下呈递的PRAME肿瘤抗原结合。

[0128] 在一些实施方案中,表达的CAR的细胞外抗原结合结构域与WT1(肾母细胞瘤蛋白1)肿瘤抗原结合。在一些实施方案中,表达的CAR的细胞外抗原结合结构域与在MHC分子背景下呈递的WT1肿瘤抗原结合。在一些实施方案中,细胞外抗原结合结构域与在HLA-A2分子背景下呈递的WT1肿瘤抗原结合。

[0129] 在一些实施方案中,表达的CAR的细胞外抗原结合结构域与MUC16肿瘤抗原结合。在一些实施方案中,表达的CAR的细胞外抗原结合结构域与在MHC分子背景下呈递的MUC16肿瘤抗原结合。在一些实施方案中,细胞外抗原结合结构域与在HLA-A2分子背景下呈递的MUC16肿瘤抗原结合。

[0130] 在一些实施方案中,表达的CAR的细胞外抗原结合结构域与间皮素肿瘤抗原结合。在一些实施方案中,表达的CAR的细胞外抗原结合结构域与在MHC分子背景下呈递的间皮素肿瘤抗原结合。在一些实施方案中,细胞外抗原结合结构域与在HLA-A2分子背景下呈递的间皮素肿瘤抗原结合。

[0131] 在一些实施方案中,表达的CAR的细胞外抗原结合结构域与BCMA(B细胞成熟抗原)肿瘤抗原结合。在一些实施方案中,表达的CAR的细胞外抗原结合结构域与在MHC分子背景下呈递的BCMA肿瘤抗原结合。在一些实施方案中,细胞外抗原结合结构域与在HLA-A2分子背景下呈递的BCMA肿瘤抗原结合。

[0132] 在一些实施方案中,表达的CAR的细胞外抗原结合结构域与PSCA(前列腺干细胞抗原)肿瘤抗原结合。在一些实施方案中,表达的CAR的细胞外抗原结合结构域与在MHC分子背

景下呈递的PSCA肿瘤抗原结合。在一些实施方案中，细胞外抗原结合结构域与在HLA-A2分子背景下呈递的PSCA肿瘤抗原结合。

[0133] 在某些实施方案中，所述细胞外抗原结合结构域(例如人scFv)包含重链可变区和轻链可变区，二者任选地通过在所述重链可变区与所述轻链可变区之间的接头序列(例如接头肽(例如SEQ ID NO:1))连接。在某些实施方案中，细胞外抗原结合结构域是具有V_H和V_L区的人scFv-Fc融合蛋白或全长人IgG。

[0134] 在某些实施方案中，细胞外抗原结合结构域包含与CD19抗原结合的人scFv。在一些实施方案中，所述scFv包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的多肽。EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVDFYFDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKR(SEQ ID NO:3)。

[0135] 在一些实施方案中，所述scFv包含具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的多肽。MALPVTALLLPLALLLHAEVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVDFYFDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKR(SEQ ID NO:4)

[0136] 在一些实施方案中，所述scFv包含具有与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4至少80％、至少85％、至少90％或至少95％相同的氨基酸序列的多肽。例如，所述scFv包含具有与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4约80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％相同的氨基酸序列的多肽。

[0137] 在一些实施方案中，所述scFv由具有SEQ ID NO:5的核酸序列的核酸编码。GAGGTGAAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCCTCAGTGAAGATTTCCTGCAAGGCTTCTGGCTATGCATTCAGTAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTATCCTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTCAAGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCGGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAAAGACCATTAGTTCGGTAGTAGATTTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGACATTGAGCTCACCCAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACCACTGATTTACTCGGCAACCTACCGGAACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACTAACGTGCAGTCTAAAGACTTGGCAGACTATTTCTGTCAACAATATAACAGGTATCCGTACACGTCCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGGGCGGCCGCA(SEQ ID NO:5)。

[0138] 在一些实施方案中，所述scFv由具有SEQ ID NO:6的核酸序列的核酸编码。ATGGCTCTCCCAGTGACTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCATGCAGAGGTGAAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCCTCAGTGAAGATTTCCTGCAAGGCTTCTGGCTATGCATTCAGTAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTATCCTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTCAAGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCGGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAAAGACCATTAGTTCGGTAGTAGATTTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGG

ATCTGACATTGAGCTCACCCAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAG
GCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACCACTGATTTACT
CGGCAACCTACCGGAACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCAT
CACTAACGTGCAGTCTAAAGACTTGGCAGACTATTTCTGTCAACAATATAACAGGTATCCGTACACGTCCGGAGGG
GGGACCAAGCTGGAGATCAAACGG(SEQ ID NO:6)

[0139] 在一些实施方案中,所述scFv由具有与SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6至少80%、至少85%、至少90%或至少95%相同的核酸序列的核酸编码。在一些实施方案中,所述scFv由具有SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6的核酸序列的核酸编码。在一些实施方案中,所述scFv由具有与SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的核酸序列的核酸编码。

[0140] 在某些非限制性实施方案中,当前公开的CAR的细胞外抗原结合结构域可以包含将细胞外抗原结合结构域的重链可变区和轻链可变区连接的接头。如本文所用,术语“接头”是指共价附接两个或更多个多肽或核酸以使得它们彼此连接的官能团(例如,化学的或多肽)。如本文所用,“肽接头”是指用于将两种蛋白偶联在一起(例如,偶联V_H和V_L结构域)的一个或多个氨基酸。在某些实施方案中,所述接头包含具有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:34中列出的序列的氨基酸。在某些实施方案中,编码SEQ ID NO:1的氨基酸序列的核苷酸序列在SEQ ID NO:2中列出。

[0141] 另外,所述细胞外抗原结合结构域可以包含引导新生蛋白进入内质网的前导物或信号肽。如果CAR要被糖基化并且锚定在细胞膜中,则信号肽或前导物可以是至关重要的。信号序列或前导物可以是存在于新合成的蛋白的N端的肽序列(约5、约10、约15、约20、约25或约30个氨基酸长),所述肽序列引导所述蛋白进入分泌途径。

[0142] 在某些实施方案中,所述信号肽共价连接至所述细胞外抗原结合结构域的N端。在某些实施方案中,所述信号肽包括包含具有如下提供的SEQ ID NO:7中列出的序列的氨基酸的CD8信号多肽:MALPVTALLLPLALLLHAARP(SEQ ID NO:7)。

[0143] 编码SEQ ID NO:7的氨基酸序列的核苷酸序列在以下提供的SEQ ID NO:8中列出:atggccctgccagtaacggctctgctgctgccacttgctctgctcctccatgcagccaggcct(SEQ ID NO:8)。

[0144] 在某些实施方案中,所述信号肽包括包含具有如下提供的SEQ ID NO:9中列出的序列的氨基酸的CD8信号多肽:MALPVTALLLPLALLLHA(SEQ ID NO:9)。

[0145] 编码SEQ ID NO:9的氨基酸序列的核苷酸序列在以下提供的SEQ ID NO:10中列出:

ATGGCTCTCCCAGTGACTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCATGCA(SEQ ID NO:10)。

[0146] CAR的跨膜结构域。在某些非限制性实施方案中,所述CAR的跨膜结构域包含跨越膜的至少一部分的疏水性α螺旋。不同的跨膜结构域导致不同的受体稳定性。抗原识别后,受体聚簇,并且信号被传递到细胞。根据当前公开的主题,所述CAR的跨膜结构域可以包含CD8多肽、CD28多肽、CD3ζ多肽、CD4多肽、4-1BB多肽、OX40多肽、ICOS多肽、CTLA-4多肽、PD-1多肽、LAG-3多肽、2B4多肽、BTLA多肽、合成肽(例如,不基于与免疫应答相关的蛋白质的跨膜肽)或其组合。

[0147] 在某些实施方案中,当前公开的CAR的跨膜结构域包含CD28多肽。所述CD28多肽可

以具有与具有NCBI参考号:PI0747或NP006130的序列(SEQ ID NO:11)至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或100%同源的氨基酸序列或其片段,和/或可以任选地包含高达一个或高达两个或高达三个保守氨基酸取代。在某些实施方案中,所述CD28多肽可以具有作为SEQ ID NO:11的连续部分的氨基酸序列,其长度为至少20或至少30或至少40或至少50、并且高达220个氨基酸。可替代地或另外地,在非限制性各种实施方案中,所述CD28多肽具有SEQ ID NO:11的氨基酸1至220、1至50、50至100、100至150、114至220、150至200或200至220的氨基酸序列。在某些实施方案中,当前公开的CAR包含含有CD28多肽的跨膜结构域和含有共刺激信号传导区(所述共刺激信号传导区包含CD28多肽)的细胞内结构域。在某些实施方案中,跨膜结构域和细胞内结构域中包含的CD28多肽具有SEQ ID NO:11的氨基酸114至220的氨基酸序列。

[0148] 以下提供了SEQ ID NO:11:

MLRLLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVV YGNYSQQLQVYSKTGFNCDGKLGNESVTFYLQNLYVNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO:11)

[0149] 根据当前公开的主题,“CD28核酸分子”是指编码CD28多肽的多核苷酸。在某些实施方案中,当前公开的CAR的跨膜结构域和细胞内结构域(例如共刺激信号传导区)中包含的编码CD28多肽(SEQ ID NO:11的氨基酸114至220)的CD28核酸分子包含具有如下提供的SEQ ID NO:12中列出的序列的核酸:attgaagttatgtatcctcctccttacctagacaatgagaagagc aatggaaccattatccatgtgaaagggaaacacctttgtccaagtcccctatttcccggaccttctaagccctttt gggtgctggtggtggttggtggagtcctggcttgctatagcttgctagtaacagtggcctttattatttctgggt gaggagtaagaggagcaggctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgccgccccgggcccacccgcaag cattaccagccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatcgctcc(SEQ ID NO:12)

[0150] 在某些实施方案中,跨膜结构域包含CD8多肽。所述CD8多肽可以具有与如下提供的SEQ ID NO:13至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源的氨基酸序列(本文中的同源性可以使用如BLAST或FASTA的标准软件来确定)或其片段,和/或可以任选地包含高达一个或高达两个或高达三个保守氨基酸取代。在某些实施方案中,所述CD8多肽可以具有作为SEQ ID NO:13的连续部分的氨基酸序列,其长度为至少20或至少30或至少40或至少50、并且高达235个氨基酸。可替代地或另外地,在各种实施方案中,所述CD8多肽具有SEQ ID NO:13的氨基酸1至235、1至50、50至100、100至150、150至200或200至235的氨基酸序列。

[0151] MALPVTALLLPLALLLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSGCSWLFQPRGAAASPT FLLYLSQNKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYYFCSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPR PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRP VVKSGDKPSLSARYV(SEQ ID NO:13)

[0152] 在某些实施方案中,跨膜结构域包含含有具有如下提供的SEQ ID NO:14中列出的序列的氨基酸的CD8多肽:

[0153] PTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITL YCN(SEQ ID NO:14)

[0154] 根据当前公开的主题，“CD8核酸分子”是指编码CD8多肽的多核苷酸。在某些实施方案中，当前公开的CAR的跨膜结构域中包含的编码CD8多肽的CD8核酸分子(SEQ ID NO:14)包含具有如下提供的SEQ ID NO:15中列出的序列的核酸。

[0155] CCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACCCCGGCGCCCACGATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCCTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCTTTACTGCAAC(SEQ ID NO:15)

[0156] 在某些非限制性实施方案中，CAR还可包含将细胞外抗原结合结构域与跨膜结构域连接的间隔区。所述间隔区可以足够灵活，以允许抗原结合结构域在不同方向上定向以促进抗原识别，同时保留所述CAR的激活活性。在某些非限制性实施方案中，所述间隔区可以是来自IgG1的铰链区、免疫球蛋白的CH_2CH_3区和CD3的部分、CD28多肽(例如，SEQ ID NO:11)的一部分、CD8多肽(例如，SEQ ID NO:13)的一部分、以上中任一种的变型(所述变型与其至少约80％、至少约85％>、至少约90％或至少约95％同源)或合成间隔序列。在某些非限制性实施方案中，所述间隔区可以具有在约1-50个(例如，5-25、10-30或30-50个)氨基酸之间的长度。

[0157] CAR的细胞内结构域。在某些非限制性实施方案中，所述CAR的细胞内结构域可以包含CD3ζ多肽，其可以激活或刺激细胞(例如，淋巴谱系的细胞，例如T细胞)。CD3ζ包含3个ITAM，并且在结合抗原后将激活信号传递至所述细胞(例如，淋巴谱系的细胞，例如T细胞)。所述CD3ζ多肽可以具有与具有NCBI参考号:NP_932170的序列(SEQ ID NO:16)至少约85％、约90％、约95％、约96％、约97％、约98％、约99％或约100％同源的氨基酸序列或其片段，和/或可以任选地包含高达一个或高达两个或高达三个保守氨基酸取代。在某些实施方案中，所述CD3ζ多肽可以具有作为SEQ ID NO:17的连续部分的氨基酸序列，其长度为至少20或至少30或至少40或至少50、并且高达164个氨基酸。可替代地或另外地，在各种实施方案中，所述CD3ζ多肽具有SEQ ID NO:17的氨基酸1至164、1至50、50至100、100至150或150至164的氨基酸序列。在某些实施方案中，CD3ζ多肽具有SEQ ID NO:17的氨基酸52至164的氨基酸序列。

[0158] 以下提供了SEQ ID NO:17：

MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR(SEQ ID NO:17)

[0159] 在某些实施方案中，所述CD3ζ多肽具有以下提供的SEQ ID NO:18中列出的氨基酸序列：

RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR(SEQ ID NO:18)

[0160] 在某些实施方案中，所述CD3ζ多肽具有以下提供的SEQ ID NO:19中列出的氨基酸序列：

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR(SEQ ID NO:19)

[0161] 根据当前公开的主题，“CD3ζ核酸分子”是指编码CD3ζ多肽的多核苷酸。在某些实

施方案中,当前公开的CAR的细胞内结构域中包含的编码CD3ζ多肽的CD3ζ核酸分子(SEQ ID NO:18)包含如下提供的如SEQ ID NO:20中列出的核苷酸序列。

agagtgaagttcagcaggagcgcagagccccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgcccccctcgcg(SEQ ID NO:20)

[0162] 在某些实施方案中,当前公开的CAR的细胞内结构域中包含的编码CD3ζ多肽(SEQ ID NO:19)的CD3ζ核酸分子包含如下提供的如SEQ ID NO:21中列出的核苷酸序列。

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA(SEQ ID NO:21)

[0163] 在某些非限制性实施方案中,所述CAR的细胞内结构域还包含至少一个信号传导区。所述至少一个信号传导区可以包括CD28多肽、4-1BB多肽、OX40多肽、ICOS多肽、DAP-10多肽、PD-1多肽、CTLA-4多肽、LAG-3多肽、2B4多肽、BTLA多肽、合成肽(不基于与免疫应答相关的蛋白)或其组合。

[0164] 在某些实施方案中,信号传导区是共刺激信号传导区。

[0165] 在某些实施方案中,所述共刺激信号传导区包含至少一种共刺激分子,所述至少一种共刺激分子可以提供最佳的淋巴细胞激活。如本文所用,“共刺激分子”是指淋巴细胞对抗原的有效应答所需的除抗原受体或其配体外的细胞表面分子。所述至少一个共刺激信号传导区可以包含CD28多肽、4-1BB多肽、OX40多肽、ICOS多肽、DAP-10多肽或其组合。所述共刺激分子可以与共刺激配体结合,所述共刺激配体是在细胞表面表达的蛋白,所述蛋白在与其受体结合后产生共刺激反应,即,实现当抗原与其CAR分子结合时提供的刺激的细胞内反应。共刺激配体包括但不限于CD80、CD86、CD70、OX40L、4-1BBL、CD48、TNFRSF14和PD-L1。作为一个例子,4-1BB配体(即,4-1BBL)可以与4-1BB(也称为“CD 137”)结合以提供细胞内信号,所述细胞内信号与CAR信号组合诱导CAR^{+}T细胞的效应细胞功能。U.S.7,446,190中披露了包含细胞内结构域的CAR,所述细胞内结构域包含共刺激信号传导区,所述共刺激信号传导区包含4-1BB、ICOS或DAP-10,将所述文献通过引用以其整体并入本文。在某些实施方案中,所述CAR的细胞内结构域包含共刺激信号传导区,所述共刺激信号传导区包含CD28多肽。在某些实施方案中,所述CAR的细胞内结构域包含共刺激信号传导区,所述共刺激信号传导区包含两种共刺激分子:CD28和4-1BB或CD28和OX40。

[0166] 所述4-1BB多肽可以具有与具有NCBI参考号:P41273或NP_001552的序列(SEQ ID NO:22)至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或100%同源的氨基酸序列或其片段,和/或可以任选地包含高达一个或高达两个或高达三个保守氨基酸取代。

[0167] 以下提供了SEQ ID NO:22:

MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGK

SVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKL LYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL(SEQ ID NO:22)。

[0168] 在某些实施方案中,所述4-1BB共刺激结构域具有以下提供的SEQ ID NO:23中列出的氨基酸序列:KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL(SEQ ID NO:23)

[0169] 根据当前公开的主题,“4-1BB核酸分子”是指编码4-1BB多肽的多核苷酸。在某些实施方案中,当前公开的CAR的细胞内结构域中包含的编码4-1BB多肽的4-1BB核酸分子(SEQ ID NO:23)包含如下提供的如SEQ ID NO:24中列出的核苷酸序列。

AAACGGGGCAGAAAGAAGCTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCA AGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG(SEQ ID NO:24)

[0170] OX40多肽可以具有与具有NCBI参考号:P43489或NP 003318的序列(SEQ IDNO:25)至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或100%同源的氨基酸序列或其片段,和/或可以任选地包含高达一个或高达两个或高达三个保守氨基酸取代。

[0171] 以下提供了SEQ ID NO:25:

MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNGMVSRCSRSQNTVCRPCG PGFYNDVVSSKPCKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPW TNCTLAGKHTLQPASNSSDAICEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPRTSQGPSTRPVEVPGGRAVAAILG LGLVLGLLGPLAILLALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI(SEQ ID NO:25)

[0172] 根据当前公开的主题,“OX40核酸分子”是指编码OX40多肽的多核苷酸。

[0173] ICOS多肽可以具有与具有NCBI参考号:NP_036224的序列(SEQ ID NO:26)至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或100%同源的氨基酸序列或其片段,和/或可以任选地包含高达一个或高达两个或高达三个保守氨基酸取代。

[0174] 以下提供了SEQ ID NO:26:

MKSGLWYFFLFCLRIKVLTGEINGSANYEMFIFHNGGVQILCKYPDIVQQFKMQLLKGGQILCDLTKT KGSGNTVSIKSLKFCHSQLSNNSVSFFLYNLDHSHANYYFCNLSIFDPPPFKVTLTGGYLHIYESQLCCQLKFWLP IGCAAFVVVCILGCILICWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRAVNTAKKSRLTDVTL(SEQ ID NO:26)

[0175] 根据当前公开的主题,“ICOS核酸分子”是指编码ICOS多肽的多核苷酸。

[0176] 根据当前公开的主题,CTLA-4多肽可以具有与UniProtKB/Swiss-Prot参考号:P16410.3(SEQ ID NO:27)至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源(本文中的同源性可以使用如BLAST或FASTA的标准软件来确定)的氨基酸序列或其片段,和/或可以任选地包含高达一个或高达两个或高达三个保守氨基酸取代。

[0177] 以下提供了SEQ ID NO:27:

MACLGFQRHKAQLNLATRTWPCTLLFFLLFIPVFCKAMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATE VRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYYLGIG NGTQIYVIDPEPCPDSDFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKMLKKRSPLTTGVYVKMPPTEPECEKQFQPYFI PIN(SEQ ID NO:27)

[0178] 根据当前公开的主题,“CTLA-4核酸分子”是指编码CTLA-4多肽的多核苷酸。

[0179] 根据当前公开的主题,PD-1多肽可以具有与NCBI参考号:NP_005009.2(SEQ ID NO:28)至少约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同源的氨基酸序列或其片段,和/或可以任选地包含高达一个或高达两个或高达三个保守氨基酸取代。

[0180] 以下提供了SEQ ID NO:28：

MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWY RMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRV TERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFS VDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL(SEQ ID NO:28)

[0181] 根据当前公开的主题，“PD-1核酸分子”是指编码PD-1多肽的多核苷酸。

[0182] 根据当前公开的主题，LAG-3多肽可以具有与UniProtKB/Swiss-Prot参考号：P18627.5(SEQ ID NO:29)至少约85％、约90％、约95％、约96％、约97％、约98％、约99％或约100％同源的氨基酸序列或其片段，和/或可以任选地包含高达一个或高达两个或高达三个保守氨基酸取代。

[0183] 以下提供了SEQ ID NO:29：

MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPLQPGAEVPVVWAQEGAPAQLPCSPTIPLQDLSLLRRAGVTWQHQPD SGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRYTVLSVGPGGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADA GEYRAAVHLRDRALSCRLRLRLGQASMTASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQGRVPVRESPHHH LAESFLFLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLEPPTPLTVYAGAGSRVGLPCRLPAGVGTRSFLTA KWTPPGGGPDLLVTGDNGDFTLRLEDVSQAQAGTYTCHIHLQEQQLNATVTLAIITVTPKSFGSPGSLGKLLCEVT PVSGQERFVWSSLDTPSQRSFSGPWLEAQEAQLLSQPWQCQLYQGERLLGAAVYFTELSSPGAQRSGRAPGALPAG HLLLFLILGVLSLLLLVTGAFGFHLWRRQWRPRRFSALEQGIHPPQAQSKIEELEQEPEPEPEPEPEPEPEPEPEPEQL (SEQ ID NO:29)

[0184] 根据当前公开的主题，“LAG-3核酸分子”是指编码LAG-3多肽的多核苷酸。

[0185] 根据当前公开的主题，2B4多肽可以具有与UniProtKB/Swiss-Prot参考号：Q9BZW8.2(SEQ ID NO:30)至少约85％、约90％、约95％、约96％、约97％、约98％、约99％或约100％同源的氨基酸序列或其片段，和/或可以任选地包含高达一个或高达两个或高达三个保守氨基酸取代。

[0186] 以下提供了SEQ ID NO:30：

MLGQVVTLILLLLLKVYQGKGCQGSADHVVSISGVPLQLQPNSIQTKVDSIAWKKLLPSQNGFHHILK WENGSLPSNTSNDRFSFIVKNLSLLIKAAQQQDSGLYCLEVTSISGKVQTATFQVFVFESLLPDKVEKPRLQGQGK ILDRGRCQVALSCLVSRDGNVSYAWYRGSKLIQTAGNLTYLDEEVDINGTHTYTCNVSNPVSWESHTLNLTQDCQN AHQEFRFWPFLVIIVILSALFLGTLACFCVWRRKRKEKQSETSPKEFLTIYEDVKDLKTRRNHEQEQTFPGGGSTI YSMIQSQSSAPTSQEPAYTLYSLIQPSRKSGSRKRNHSPSFNSTIYEVIGKSQPKAQNPARLSRKELENFDVYS (SEQ ID NO:30)

[0187] 根据当前公开的主题，“2B4核酸分子”是指编码2B4多肽的多核苷酸。

[0188] 根据当前公开的主题，BTLA多肽可以具有与UniProtKB/Swiss-Prot参考号：Q7Z6A9.3(SEQ ID NO:31)至少约85％>、约90％、约95％、约96％、约97％、约98％、约99％或约100％同源的氨基酸序列或其片段，和/或可以任选地包含高达一个或高达两个或高达三个保守氨基酸取代。

[0189] 以下提供了SEQ ID NO:31：

MKTLPAMLGTGKLFWVFFLIPYLDIWNIHGKESCDVQLYIKRQSEHSILAGDPFELECPVKYCANRPH

VTWCKLNGTTCVKLEDRQTSWKEEKNISFFILHFEPVLPNDNGSYRCSANFQSNLIESHSTTLYVTDVKSASERPS KDEMASRPWLLYRLLPLGGLPLLITTCFCLFCCLRRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLL SETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASLNHSVIGPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS(SEQ ID NO:31)

[0190] 根据当前公开的主题,“BTLA核酸分子”是指编码BTLA多肽的多核苷酸。

示例性CAR和C825抗原结合片段构建体

[0191] 在某些实施方案中,所述CAR和所述抗DOTA C825抗原结合片段表达为由自切割接头(如P2A接头)连接的单一多肽。在某些实施方案中,所述CAR和所述抗DOTA C825抗原结合片段表达为两个分开的多肽。

[0192] 在某些实施方案中,所述CAR包含含有与人肿瘤抗原特异性结合的人scFv的细胞外抗原结合区、含有CD28多肽和/或CD8多肽的跨膜结构域以及含有CD3ζ多肽和共刺激信号传导区(所述共刺激信号传导区含有4-1BB多肽)的细胞内结构域。所述CAR还包含共价连接至所述细胞外抗原结合结构域的N端的信号肽或前导物。所述信号肽包含具有SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:9中列出的序列的氨基酸。在某些实施方案中,所述人scFv选自抗BCMA scFv、抗CD19 scFv、抗间皮素scFv、抗MUC16 scFv、抗PSCA scFv、抗WT1 scFv和抗PRAME scFv。

[0193] 在一些实施方案中,编码所述CAR和所述抗DOTA C825抗原结合片段的核酸与诱导型启动子可操作地连接。在一些实施方案中,编码所述CAR和所述抗DOTA C825抗原结合片段的核酸与组成型启动子可操作地连接。在一些实施方案中,编码所述CAR的核酸和编码所述抗DOTA C825抗原结合片段的核酸与两种分开的启动子可操作地连接。在一些实施方案中,编码所述CAR的核酸与组成型启动子可操作地连接,并且编码所述抗DOTA C825抗原结合片段的核酸与组成型启动子可操作地连接。在一些实施方案中,编码所述CAR的核酸与组成型启动子可操作地连接,并且编码所述抗DOTA C825抗原结合片段的核酸与诱导型启动子可操作地连接。

[0194] 在一些实施方案中,所述诱导型启动子是在CAR T细胞中可激活的合成Notch启动子,其中所述CAR的细胞内结构域含有当所述CAR与肿瘤抗原的接合诱导膜内蛋白水解时从膜内释放的转录调节因子(参见例如Morsut等人,Cell 164(4):780-791(2016))。因此,工程化免疫细胞与肿瘤抗原结合后诱导了所述抗DOTA C825抗原结合片段的转录。

[0195] 当前公开的主题还提供编码本文所述CAR/抗DOTA C825抗原结合片段构建体或其功能性部分的分离的核酸分子。在某些实施方案中,所述分离的核酸分子编码抗CD19靶向性CAR、P2A自切割肽以及本文提供的抗DOTA C825抗原结合片段,所述CAR包含与人CD19多肽特异性结合的人scFv、含有CD8多肽的跨膜结构域以及含有CD3ζ多肽和共刺激信号传导区(所述共刺激信号传导区包含4-1BB多肽)的细胞内结构域。

[0196] 在某些实施方案中,所述分离的核酸分子编码包含与人CD19多肽特异性结合的人scFv的靶向抗CD19的CAR,所述人scFv与合成的Notch跨膜结构域和细胞内可切割转录因子融合。在某些实施方案中,所述分离的核酸分子编码可由合成的Notch系统的转录因子的释放诱导的抗DOTA C825抗原结合片段。

[0197] 在某些实施方案中,所述分离的核酸分子编码抗MUC16靶向性CAR、P2A自切割肽以及本文提供的抗DOTA C825抗原结合片段,所述CAR包含与人MUC16多肽特异性结合的人scFv、含有CD8多肽的跨膜结构域以及含有CD3ζ多肽和共刺激信号传导区(所述共刺激信号

传导区包含4-1BB多肽)的细胞内结构域。

[0198] 在某些实施方案中,所述分离的核酸分子编码抗间皮素靶向性CAR、P2A自切割肽以及本文提供的抗DOTA C825抗原结合片段,所述CAR包含与人间皮素多肽特异性结合的人scFv、含有CD8多肽的跨膜结构域以及含有CD3ζ多肽和共刺激信号传导区(所述共刺激信号传导区包含4-1BB多肽)的细胞内结构域。

[0199] 在某些实施方案中,所述分离的核酸分子编码抗WT1靶向性CAR、P2A自切割肽以及本文提供的抗DOTA C825抗原结合片段,所述CAR包含与人WT1多肽特异性结合的人scFv、含有CD8多肽的跨膜结构域以及含有CD3ζ多肽和共刺激信号传导区(所述共刺激信号传导区包含4-1BB多肽)的细胞内结构域。

[0200] 在某些实施方案中,所述分离的核酸分子编码抗PSCA靶向性CAR、P2A自切割肽以及本文提供的抗DOTA C825抗原结合片段,所述CAR包含与人PSCA多肽特异性结合的人scFv、含有CD8多肽的跨膜结构域以及含有CD3ζ多肽和共刺激信号传导区(所述共刺激信号传导区包含4-1BB多肽)的细胞内结构域。

[0201] 在某些实施方案中,所述分离的核酸分子编码抗BCMA靶向性CAR、P2A自切割肽以及本文提供的抗DOTA C825抗原结合片段,所述CAR包含与人BCMA多肽特异性结合的人scFv、含有CD8多肽的跨膜结构域以及含有CD3ζ多肽和共刺激信号传导区(所述共刺激信号传导区包含4-1BB多肽)的细胞内结构域。

[0202] 在某些实施方案中,所述分离的核酸分子编码当前公开的CAR构建体的功能性部分。如本文所用,术语"功能性部分"是指CAR的任何部分、部位或片段,所述部分、部位或片段保留靶向性CAR(亲本CAR)的生物活性。在某些实施方案中,编码靶向肿瘤抗原的CAR的功能性部分的分离的核酸分子可以编码如下蛋白,其包含亲本CAR的例如约10%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、和约95%或更多。

免疫细胞

[0203] 当前公开的主题提供了工程化免疫细胞,所述工程化免疫细胞表达抗DOTA C825抗原结合片段和包含细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和细胞内结构域的T细胞受体(例如CAR)或其他配体,其中所述细胞外抗原结合结构域特异性地结合如上所描述的肿瘤抗原(包括肿瘤受体或配体)。在某些实施方案中,可以将免疫细胞用当前公开的CAR/抗DOTA C825抗原结合片段构建体转导,使得所述细胞表达所述CAR和所述抗DOTA C825抗原结合片段。

[0204] 当前公开的主题的工程化免疫细胞可以是淋巴谱系或髓样谱系的细胞。包含B细胞、T细胞和自然杀伤(NK)细胞的淋巴谱系提供抗体的产生、细胞免疫系统的调节、血液中外源因子的检测、宿主外源的细胞的检测等。淋巴谱系的免疫细胞的非限制性例子包括T细胞、自然杀伤(NK)细胞、胚胎干细胞和多能干细胞(例如,可以从其中分化出淋巴样细胞的那些)。T细胞可以是在胸腺中成熟的淋巴细胞,并且主要负责细胞介导的免疫力。T细胞参与适应性免疫系统。当前公开的主题的T细胞可以是任何类型的T细胞,包括但不限于T辅助细胞、细胞毒性T细胞、记忆T细胞(包括中央记忆T细胞、干细胞样记忆T细胞(或干样(stem-like)记忆T细胞)、和两种类型的效应记忆T细胞:例如,T_{EM}细胞和TEMRA细胞)、调节性T细胞(也称为抑制T细胞)、自然杀伤T细胞、粘膜相关恒定T细胞、和γδT细胞。细胞毒性T细胞

(CTL或杀伤T细胞)是能够诱导感染的体细胞或肿瘤细胞死亡的T淋巴细胞亚群。在某些实施方案中,表达CAR的T细胞表达Foxp3以实现并且维持T调节表型。

[0205] 自然杀伤(NK)细胞可以是作为细胞介导的免疫力的一部分的淋巴细胞,并且在先天免疫应答过程中起作用。NK细胞不需要事先激活来对靶细胞执行其细胞毒性作用。

[0206] 当前公开的主题的工程化免疫细胞可以表达与肿瘤抗原特异性结合的细胞外抗原结合结构域(例如,人scFv、任选交联的Fab或$F(ab)_2$)。在一些实施方案中,免疫细胞是淋巴细胞,如T细胞、B细胞或自然杀伤(NK)细胞。在某些实施方案中,工程化免疫细胞是T细胞。T细胞可以是$CD4^+$T细胞或$CD8^+$T细胞。在某些实施方案中,T细胞是$CD4^+$T细胞。在某些实施方案中,T细胞是$CD8^+$T细胞。

[0207] 当前公开的工程化免疫细胞可以进一步包含至少一种重组或外源共刺激配体。例如,可以进一步将当前公开的工程化免疫细胞用至少一种共刺激配体转导,使得工程化免疫细胞共表达或被诱导以共表达靶向肿瘤抗原的CAR和至少一种共刺激配体。靶向肿瘤抗原的CAR与至少一种共刺激配体之间的相互作用提供了对于免疫细胞(例如,T细胞)的完全激活重要的非抗原特异性信号。共刺激配体包括但不限于肿瘤坏死因子(TNF)超家族成员和免疫球蛋白(Ig)超家族配体。TNF是参与全身性炎症的细胞因子,并且刺激急性期反应。其主要作用是调节免疫细胞。TNF超家族成员共有许多共同特征。TNF超家族的大多数成员都被合成为II型跨膜蛋白(细胞外C端),其含有短的细胞质节段和相对长的细胞外区。TNF超家族成员包括但不限于神经生长因子(NGF)、CD40L(CD40L)/CD 154、CD137L/4-1BBL、TNF-α、CD134L/OX40L/CD252、CD27L/CD70、Fas配体(FasL)、CD30L/CD153、肿瘤坏死因子β(TNFP)/淋巴毒素-α(LT-α)、淋巴毒素-β(LT-β)、CD257/B细胞激活因子(BAFF)/BLYS/THANK/TALL-1、糖皮质激素诱导的TNF受体配体(GITRL)、TNF相关凋亡诱导配体(TRAIL)以及LIGHT(TNFSF14)。免疫球蛋白(Ig)超家族是参与细胞的识别、结合或粘附过程的细胞表面和可溶性蛋白的大组。这些蛋白质与免疫球蛋白-它们具有免疫球蛋白结构域(折叠)-共用结构特征。免疫球蛋白超家族配体包括但不限于CD80和CD86(这两个配体均是针对CD28的)或PD-L1/(B7-H1)(为针对PD-1的配体)。在某些实施方案中,所述至少一种共刺激配体选自4-1BBL、CD80、CD86、CD70、OX40L、CD48、TNFRSF14、PD-L1、及其组合。在某些实施方案中,工程化免疫细胞包含一种重组共刺激配体,其为4-1BBL。在某些实施方案中,工程化免疫细胞包含两种重组共刺激配体,其为4-1BBL和CD80。包含至少一种共刺激配体的CAR描述在美国专利号8,389,282中,将所述专利通过引用以其整体并入。

[0208] 此外,当前公开的工程化免疫细胞可以进一步包含至少一种外源细胞因子。例如,可以进一步将当前公开的工程化免疫细胞用至少一种细胞因子转导,使得所述工程化免疫细胞分泌所述至少一种细胞因子以及表达靶向肿瘤抗原的CAR。在某些实施方案中,所述至少一种细胞因子选自IL-2、IL-3、IL-6、IL-7、IL-11、IL-12、IL-15、IL-17、和IL-21。在某些实施方案中,细胞因子是IL-12。

[0209] 所述工程化免疫细胞可以从外周供体淋巴细胞中产生。工程化免疫细胞(例如,T细胞)可以是自体的、非自体的(例如,同种异体的)或体外衍生自工程化祖细胞或干细胞。

[0210] 在某些实施方案中,当前公开的工程化免疫细胞(例如,T细胞)每个细胞表达约1至约5、约1至约4、约2至约5、约2至约4、约3至约5、约3至约4、约4至约5、约1至约2、约2至约3、约3至约4或约4至约5个载体拷贝数的当前公开的靶向肿瘤抗原的CAR和/或抗DOTA C825

抗原结合片段。

[0211] 例如，工程化免疫细胞中CAR表达水平越高，工程化免疫细胞展现出的细胞毒性和细胞因子产生就越大。具有高的靶向肿瘤抗原的CAR的表达水平的工程化免疫细胞(例如，T细胞)可以诱导抗原特异性细胞因子的产生或分泌和/或对具有低的靶向肿瘤抗原的CAR表达水平(例如，约2,000个或更少、约1,000个或更少、约900个或更少、约800个或更少、约700个或更少、约600个或更少、约500个或更少、约400个或更少、约300个或更少、约200个或更少、约100个或更少肿瘤抗原结合位点/细胞)的组织或细胞展现出细胞毒性。另外地或可替代地，当前公开的工程化免疫细胞(例如，T细胞)的细胞毒性和细胞因子的产生与靶组织或靶细胞中肿瘤抗原的表达水平成比例。例如，靶标中人肿瘤抗原的表达水平越高，工程化免疫细胞展现出的细胞毒性和细胞因子产生就越高。

[0212] 未纯化的免疫细胞来源可以是本领域中已知的任何来源，如骨髓、胎儿、新生儿或成年或其他造血细胞来源，例如胎儿肝、外周血或脐带血。可以采用各种技术来分离细胞。例如，阴性选择方法可以最初除去非免疫细胞。单克隆抗体特别可用于鉴定与特定细胞谱系和/或分化阶段相关的标记物，以用于阳性和阴性选择两者。

[0213] 最初可以通过相对粗的分离除去大部分终末分化的细胞。例如，磁性珠粒分离最初可以用于除去大量无关细胞。合适地，在细胞分离之前，将除去全部造血细胞的至少约80％，通常至少70％。

[0214] 用于分离的程序包括但不限于密度梯度离心；重置；与修饰细胞密度的颗粒偶联；用抗体包被的磁性珠粒磁分离；亲和力色谱法；与mAb连接或联合使用的细胞毒性剂(包括但不限于补体和细胞毒素)；以及用附接至固体基质(例如板、芯片)的抗体、淘洗或任何其他便利技术淘选。

[0215] 用于分离和分析的技术包括但不限于流式细胞术，其可以具有不同的复杂程度，例如，多个颜色通道、低角度和钝角光散射检测通道、阻抗通道。

[0216] 通过采用与死细胞相关的染料，如碘化丙啶(PI)，可以针对死细胞来选择细胞。通常，将细胞收集在包含2％胎牛血清(FCS)或0.2％牛血清白蛋白(BSA)的培养基或任何其他合适的(例如无菌)等渗培养基中。

[0217] 在一些实施方案中，工程化免疫细胞包含一种或多种另外的修饰。例如，在一些实施方案中，工程化免疫细胞包含并且表达(转导以表达)抗原识别受体，所述抗原识别受体与不同于所选肿瘤抗原的第二抗原结合。除了当前公开的CAR之外，工程化免疫细胞上还包含抗原识别受体可以增加所述CAR或包含它的工程化免疫细胞在靶细胞上的亲合力，尤其是，所述CAR是对特定肿瘤抗原具有低结合亲和力(例如，约2×10^{-8}M或更大、约5×10^{-8}M或更大、约8×10^{-8}M或更大、约9×10^{-8}M或更大、约1×10^{-7}M或更大、约2×10^{-7}M或更大或约5×10^{-7}M或更大的K_d)的CAR。

[0218] 在某些实施方案中，所述抗原识别受体是嵌合共刺激受体(CCR)。CCR描述在Krause等人，J.Exp.Med.188(4):619-626(1998)以及US 20020018783中，将文献内容通过引用以其整体并入。CCR模拟共刺激信号，但与CAR不同，不提供T细胞激活信号，例如，CCR缺少CD3ζ多肽。在抗原呈递细胞上不存在天然共刺激配体的情况下，CCR提供共刺激，例如CD28样信号。组合抗原识别(即，使用CCR与CAR的组合)可以加强针对双重抗原表达T细胞的T细胞反应性，从而改善选择性肿瘤靶向。Kloss等人描述了一种策略，所述策略整合了组合

抗原识别、分离的信号传导、以及至关重要地T细胞激活和共刺激的强度平衡，以产生T细胞，所述T细胞消除表达抗原组合的靶细胞，同时保留单独地表达每种抗原的细胞(Kloss等人，Nature Biotechnology 31(l):71-75(2013))。用这种方法，T细胞激活需要CAR介导的对一种抗原的识别，而共刺激是由对第二抗原具有特异性的CCR独立介导的。为了实现肿瘤选择性，组合抗原识别方法将T细胞激活的效率降低到在没有通过同时CCR识别第二抗原所提供的救援的情况下其无效的水平。在某些实施方案中，CCR包含与不同于所选肿瘤抗原的抗原结合的细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域、和共刺激信号传导区，所述共刺激信号传导区包含至少一种共刺激分子，包括但不限于CD28、4-1BB、OX40、ICOS、PD-1、CTLA-4、LAG-3、2B4、和BTLA。在某些实施方案中，CCR的共刺激信号传导区包含一种共刺激信号传导分子。在某些实施方案中，所述一种共刺激信号传导分子是CD28。在某些实施方案中，所述一种共刺激信号传导分子是4-1BB。在某些实施方案中，CCR的共刺激信号传导区包含两种共刺激信号传导分子。在某些实施方案中，所述两种共刺激信号传导分子是CD28和4-1BB。选择第二抗原，使得所选肿瘤抗原和第二抗原两者的表达都限于靶细胞(例如，癌组织或癌细胞)。与CAR相似，所述细胞外抗原结合结构域可以是scFv、Fab、$F(ab)_2$或具有异源序列的融合蛋白，以形成所述细胞外抗原结合结构域。在某些实施方案中，CCR包含与CD138结合的scFv、包含CD28多肽的跨膜结构域、和包含两种共刺激信号传导分子的共刺激信号传导区，所述两种共刺激信号传导分子是CD28和4-1BB。

[0219] 在某些实施方案中，抗原识别受体是截短的CAR。“截短的CAR”与CAR的区别在于缺少细胞内信号传导结构域。例如，截短的CAR包含细胞外抗原结合结构域和跨膜结构域，并且缺少细胞内信号传导结构域。根据当前公开的主题，截短的CAR对在靶细胞(例如，骨髓瘤细胞)上表达的第二抗原具有高结合亲和力。截短的CAR起粘附分子的作用，所述粘附分子增强当前公开的CAR、尤其是对肿瘤抗原具有低结合亲和力的CAR的亲合力，从而改善当前公开的CAR或包含它的工程化免疫细胞(例如，T细胞)的功效。在某些实施方案中，截短的CAR包含与CD138结合的细胞外抗原结合结构域、包含CD8多肽的跨膜结构域。当前公开的T细胞包含或被转导以表达当前公开的靶向肿瘤抗原的CAR和靶向CD138的截短的CAR。在某些实施方案中，靶细胞是实体瘤细胞。在一些实施方案中，将工程化免疫细胞进一步修饰以抑制一种或多种基因的表达。在一些实施方案中，通过基因组编辑来进一步修饰工程化免疫细胞。已经描述了用于靶向切割基因组DNA的各种方法和组合物。此类靶向切割事件可以用于例如诱导靶向诱变，诱导细胞DNA序列的靶向缺失，以及促进在预定染色体基因座处的靶向重组。参见例如美国专利号7,888,121、7,972,854、7,914,796、7,951,925、8,110,379、8,409,861、8,586,526；美国专利公开案20030232410、20050208489、20050026157、20050064474、20060063231、201000218264、20120017290、20110265198、20130137104、20130122591、20130177983以及20130177960，将其披露内容通过引用以其整体并入。这些方法通常涉及使用工程化切割系统来诱导靶DNA序列中的双链断裂(DSB)或切口，使得通过产生错误的过程(如非同源末端连接(NHEJ))修复断裂或使用修复模板(同源性定向修复或HDR)修复可以导致基因敲除或插入目的序列(靶向整合)。可以通过以下方式进行切割：使用特异性核酸酶(如工程化锌指核酸酶(ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN))或使用CRISPR/Cas系统与工程化crRNA/tracr RNA(“单一指导RNA”)来指导特异性切割。在一些实施方案中，将工程化免疫细胞修饰以破坏或减少内源性T细胞受体基因的表达(参见例如

WO 2014153470,将其通过引用以其整体并入)。在一些实施方案中,将工程化免疫细胞修饰以导致破坏或抑制PD1、PDL-1或CTLA-4(参见例如美国专利公开案20140120622)或本领域已知的其他免疫抑制因子(Wu等人(2015)Oncoimmunology 4(7):e1016700,Mahoney等人(2015)Nature Reviews Drug Discovery 14,561-584)。

载体

[0220] 许多表达载体是可获得的并且是本领域技术人员已知的,并且可以用于表达本文提供的多肽。表达载体的选择将受到宿主表达系统的选择的影响。此类选择完全在技术人员的技术水平内。通常,表达载体可以包含转录启动子以及任选地增强子、翻译信号以及转录和翻译终止信号。用于稳定转化的表达载体典型地具有选择性标记物,其允许选择和维持转化的细胞。在一些情况下,复制起点可以用于扩增细胞中载体的拷贝数。

[0221] 载体还可以含有与连接的核酸分子可操作地连接的另外的核苷酸序列,例如像用于诸如定位的表位标签(例如,hexa-his标签或myc标签、血凝素标签)或用于纯化的标签(例如,GST融合体),和用于引导蛋白质分泌和/或膜缔合的序列。

[0222] 抗体或其抗原结合片段的表达可以通过本领域已知的任何启动子/增强子来控制。合适的细菌启动子是本领域熟知的,并且在下文描述。用于哺乳动物细胞、酵母细胞和昆虫细胞的其他合适启动子是本领域熟知的,并且以下示例了一些。用于引导异源核酸表达的启动子的选择取决于特定的应用,并且在技术人员的技术水平内。可以使用的启动子包括但不限于含有SV40早期启动子的真核表达载体(Bernoist和Chambon,Nature 290:304-310(1981))、劳斯肉瘤病毒的3'长末端重复序列中含有的启动子(Yamamoto等人Cell 22:787-797(1980))、疱疹胸苷激酶启动子(Wagner等人Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75:1441-1445(1981))、金属硫蛋白基因的调节序列(Brinster等人Nature 296:39-42(1982))、原核表达载体如β内酰胺酶启动子(Jay等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75:5543(1981))或tac启动子(DeBoer等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 50:21-25(1983));还参见"Useful Proteins from Recombinant Bacteria":in Scientific American 242:79-94(1980));含有胭脂碱合成酶启动子的植物表达载体(Herrera-Estrella等人,Nature 505:209-213(1984))或花椰菜花叶病毒35S RNA启动子(Gardner等人,Nucleic Acids Res.9:2871(1981))以及光合成酶核酮糖二磷酸羧化酶的启动子(Herrera-Estrella等人,Nature 510:1 15-120(1984));来自酵母菌和其他真菌的启动子元件(如Gal4启动子)、醇脱氢酶启动子、磷酸甘油激酶启动子、碱性磷酸酶启动子以及以下展现出组织特异性并已在转基因动物中使用的动物转录控制区:在胰腺腺泡细胞中有活性的弹性蛋白酶I基因控制区(Swift等人,Cell 55:639-646(1984);Ornitz等人,Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.50:399-409(1986);MacDonald,Hepatology 7:425-515(1987));在胰岛β细胞中有活性的胰岛素基因控制区(Hanahan等人,Nature 515:115-122(1985))、在淋巴样细胞中有活性的免疫球蛋白基因控制区(Grosschedl等人,Cell 55:647-658(1984);Adams等人,Nature 515:533-538(1985);Alexander等人,Mol.Cell Biol.7:1436-1444(1987))、在睾丸、乳房、淋巴样和肥大细胞中有活性的小鼠乳腺肿瘤病毒控制区(Leder等人,Cell 15:485-495(1986))、在肝脏中有活性的白蛋白基因控制区(Pinckert等人,Genes and Devel.1:268-276(1987))、在肝脏中有活性的甲胎蛋白基因控制区(Krumlauf等人,Mol.Cell.Biol.5:1639-403(1985);Hammer等人,Science 255:53-58(1987))、在肝脏中有

活性的α1-抗胰蛋白酶基因控制区(Kelsey等人,Genes and Devel.7:161-171(1987))、在髓样细胞中有活性的β珠蛋白基因控制区(Magram等人,Nature 515:338-340(1985);Kollias等人,Cell 5:89-94(1986))、在脑的少突胶质细胞中有活性的髓鞘碱性蛋白基因控制区(Readhead等人,Cell 15:703-712(1987))、在骨骼肌中有活性的肌球蛋白轻链-2基因控制区(Shani,Nature 514:283-286(1985))以及在下丘脑的促性腺激素细胞中有活性的促性腺激素释放激素基因控制区(Mason等人,Science 254:1372-1378(1986))。

[0223] 除启动子之外,表达载体典型地含有转录单位或表达盒,所述转录单位或表达盒含有在宿主细胞中表达抗体或其一部分所需的所有另外的元件。典型的表达盒含有与编码抗体链的核酸序列可操作地连接的启动子以及转录物的有效聚腺苷酸化、核糖体结合位点、和翻译终止所需的信号。盒的另外元件可以包括增强子。另外,盒典型地在结构基因的下游含有转录终止区,以提供有效的终止。终止区可以从与启动子序列相同的基因获得,或者可以从不同的基因获得。

[0224] 一些表达系统具有提供基因扩增的标记物,如胸苷激酶和二氢叶酸还原酶。可替代地,不涉及基因扩增的高产率表达系统也是合适的,如在昆虫细胞中使用杆状病毒载体,具有在多面体启动子或其他强杆状病毒启动子的引导下编码种系抗体链的核酸序列。

[0225] 本领域技术人员已知的用于将DNA片段插入载体的任何方法都可以用于构建含有编码本文提供的任何多肽的核酸的表达载体。这些方法可以包括体外重组DNA和合成技术以及体内重组体(基因重组)。插入克隆载体中可以例如通过将DNA片段连接到具有互补的粘性末端的克隆载体中来完成。如果克隆载体中不存在用于将DNA片段化的互补限制性酶切位点,则可以对DNA分子的末端进行酶促修饰。可替代地,任何希望的位点可以通过将核苷酸序列(接头)连接到DNA末端上产生,这些连接的接头可以含有编码限制性内切酶识别序列的特异性化学合成核酸。

[0226] 可用于产生本文提供的多肽的示例性质粒载体含有强启动子,如HCMV极早期增强子/启动子或MHC I类启动子;增强转录物的加工的内含子,如HCMV极早期基因内含子A;以及聚腺苷酸化(poly A)信号,如晚期SV40 polyA信号。

[0227] 可以通过将基本上均质的细胞组合物用重组DNA或RNA构建体转导来实现工程化免疫细胞(例如,T细胞、NK细胞)的遗传修饰。载体可以是逆转录病毒载体(例如,γ逆转录病毒的),其用于将DNA或RNA构建体引入宿主细胞基因组中。例如,可以将编码靶向肿瘤抗原的CAR和抗DOTA C825抗原结合片段的多核苷酸克隆到逆转录病毒载体中,并且可以从其内源性启动子、逆转录病毒长末端重复序列或替代性内部启动子驱动表达。

[0228] 也可以使用非病毒载体或RNA。可以使用随机染色体整合或靶向整合(例如,使用核酸酶、转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)、锌指核酸酶(ZFN)和/或规律间隔成簇短回文重复序列(CRISPR)或转基因表达(例如,使用天然或化学修饰的RNA)。

[0229] 对于所述细胞的起始遗传修饰以提供表达靶向肿瘤抗原的CAR和抗DOTA C825抗原结合片段的细胞,通常使用逆转录病毒载体进行转录,然而可以使用任何其他合适的病毒载体或非病毒递送系统。为了随后对细胞进行遗传修饰以提供包括包含至少两种共刺激性配体的抗原呈递复合物的细胞,逆转录病毒基因转移(转导)同样被证明是有效的。逆转录病毒载体和适当的包装系的组合也是合适的,其中衣壳蛋白将具有感染人细胞的功能。已知产生兼向性病毒的各种细胞系,包括但不限于PA12(Miller等人Mol.Cell.Biol.5:

431-437(1985));PA317(Miller等人,Mol.Cell.Biol.6:2895-2902(1986))以及CRIP(Danos等人Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:6460-6464(1988))。非兼向性颗粒也是合适的,例如用VSVG、RD114或GALV包膜和本领域已知的任何其他包膜假型化的颗粒。

[0230] 可能的转导方法还包括将细胞与生产细胞直接共培养(例如通过Bregni等人,Blood 80:1418-1422(1992)的方法)或与单独的病毒上清液或含或不含适当生长因子和聚阳离子的浓载体原液一起培养(例如通过Xu等人,Exp.Hemat.22:223-230(1994)和Hughes等人,J.Clin.Invest.89:1817(1992)的方法)。

[0231] 转导的病毒载体可以用于在工程化免疫细胞中表达共刺激配体和/或分泌细胞因子(例如,4-1BBL和/或IL-12)。在一些实施方案中,选择的载体展现出高感染效率以及稳定整合和表达(参见例如Cayouette等人,Human Gene Therapy 8:423-430(1997);Kido等人,Current Eye Research 15:833-844(1996);Bloomer等人,Journal of Virology 71:6641-6649,1997;Naldini等人,Science 272:263 267(1996)以及Miyoshi等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.94:10319,(1997))。可以使用的其他病毒载体包括例如腺病毒载体、慢病毒载体以及腺相关病毒载体、痘苗病毒、牛乳头瘤病毒或疱疹病毒(如EB病毒)(还参见例如Miller的载体,Human Gene Therapy 15-14,(1990);Friedman,Science 244:1275-1281(1989);Eglitis等人,BioTechniques 6:608-614,(1988);Tolstoshev等人,Current Opinion in Biotechnology 1:55-61(1990);Sharp,The Lancet 337:1277-1278(1991);Cornetta等人,Nucleic Acid Research and Molecular Biology 36:311-322(1987);Anderson,Science 226:401-409(1984);Moen,Blood Cells 17:407-416(1991);Miller等人,Biotechnology 7:980-990(1989);Le Gal La Salle等人,Science 259:988-990(1993)以及Johnson,Chest 107:77S-83S(1995))。逆转录病毒载体发展特别好并且已经用于临床环境中(Rosenberg等人,N.Engl.J.Med 323:370(1990);Anderson等人,美国专利号5,399,346)。

[0232] 在某些非限制性实施方案中,表达当前公开的靶向肿瘤抗原的CAR的载体是逆转录病毒载体,例如癌瘤逆转录病毒载体。

[0233] 非病毒方法也可以用于在细胞中表达蛋白质。例如,可以通过以下方式将核酸分子引入细胞中:在脂质体转染的存在下施用核酸(Feigner等人,Proc.Nat'l.Acad.Sci.U.S.A.84:7413,(1987);Ono等人,Neuroscience Letters 17:259(1990);Brigham等人,Am.J.Med.Sci.298:278,(1989);Staubinger等人,Methods in Enzymology 101:512(1983))、去唾液酸血清类粘蛋白多聚赖氨酸缀合(Wu等人,Journal of Biological Chemistry 263:14621(1988);Wu等人,Journal of Biological Chemistry 264:16985(1989))或通过在手术条件下显微注射(Wolff等人,Science 247:1465(1990))。用于基因转移的其他非病毒手段包括使用磷酸钙、DEAE葡聚糖、电穿孔和原生质体融合进行体外转染。脂质体对于将DNA递送到细胞中也可能是潜在有益的。向受试者的受影响组织中移植正常基因也可以通过以下方式来完成:将正常核酸转移到离体的可培养的细胞类型(例如,自体或异源原代细胞或其后代),之后将细胞(或其后代)注射到靶组织中或全身注射。重组受体也可以使用转座酶或靶核酸酶(例如,锌指核酸酶、大范围核酸酶或TALE核酸酶)衍生或获得。瞬时表达可以通过RNA电穿孔获得。

[0234] cDNA表达可以从任何合适的启动子(例如,人巨细胞病毒(CMV)、猿猴病毒40

(SV40)或金属硫蛋白启动子)引导,并且通过任何适当的哺乳动物调节元件或内含子(例如,延伸因子1a增强子/启动子/内含子结构)调节。例如,如果希望的话,已知优先在特定细胞类型中引导基因表达的增强子可以用于引导核酸的表达。所使用的增强子可以包括但不限于被表征为组织或细胞特异性增强子的那些。可替代地,如果使用基因组克隆,则可以通过同源调节序列或,如果希望的话,通过衍生自异源来源的调节序列(包括上面描述的任何启动子或调节元件)来介导调节。

[0235] 可以使所得细胞在与未修饰的细胞类似的条件下生长,由此可以扩增修饰的细胞并且将其用于多种目的。

多肽及类似物和多核苷酸

[0236] 当前公开的主题还包括与肿瘤抗原(例如,人肿瘤抗原)特异性结合的细胞外抗原结合结构域(例如,scFv(例如,人scFv)、Fab或$(Fab)_2$)、CD3ζ、CD8、CD28等,多肽或其片段,以及编码它们的在工程化免疫细胞中表达的多核苷酸。当前公开的主题提供了用于通过产生序列的改变来优化氨基酸序列或核酸序列的方法。此类改变可以包括某些突变、缺失、插入或翻译后修饰。当前公开的主题进一步包括当前公开的主题的任何天然存在的多肽的类似物。类似物与当前公开的主题的天然存在的多肽的差异可以是氨基酸序列差异、翻译后修饰或两者。当前公开的主题的类似物通常可以展现出与当前公开的主题的天然存在的氨基酸序列的全部或一部分至少约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或更大的同一性或同源性。序列比较的长度为至少约5、约10、约15、约20、约25、约50、约75、约100或更多个氨基酸残基。同样,在确定同一性程度的示例性方法中,可以使用BLAST程序,其中在e^{-3}与e^{-100}之间的概率得分指示密切相关的序列。修饰包括多肽的体内和体外化学衍生化,例如乙酰化、羰基化、磷酸化或糖基化;此类修饰可以在多肽合成或加工期间或在用分离的修饰酶处理后发生。类似物与当前公开的主题的天然存在的多肽的区别还可以是一级序列的改变。它们包括遗传变体-自然的和诱导的两者(例如,通过辐射或暴露于乙烷甲基硫酸盐进行随机诱变或通过如Sambrook,Fritsch和Maniatis,Molecular Cloning:ALaboratory Manual(第2版),CSH Press,1989,或Ausubel等人(同上)中描述的位点特异性诱变产生)。还包括环化的肽、分子和类似物,其含有除L-氨基酸外的残基,例如D-氨基酸或非天然存在的或合成氨基酸(例如β或γ氨基酸)。

[0237] 除全长多肽之外,当前公开的主题还提供了当前公开的主题的任何一种多肽或肽结构域的片段。片段可以是至少约5、约10、约13或约15个氨基酸。在一些实施方案中,片段是至少约20个连续氨基酸、至少约30个连续氨基酸或至少约50个连续氨基酸。在一些实施方案中,片段是至少约60至约80、约100、约200、约300或更多个连续氨基酸。当前公开的主题的片段可以通过本领域普通技术人员已知的方法产生,或者可以由正常蛋白质加工(例如,从新生多肽中除去生物活性不需要的氨基酸,或通过可变mRNA剪接或替代性蛋白质加工事件除去氨基酸)产生。

[0238] 非蛋白质类似物具有设计为模拟本发明技术的蛋白质的功能活性的化学结构。根据当前公开的主题的方法施用此类类似物。此类类似物可以超过原始多肽的生理活性。类似物设计的方法在本领域中是熟知的,并且可以根据此类方法通过以下方式进行类似物的合成:修饰化学结构以使所得类似物当在工程化免疫细胞中表达时增强原始多肽的功能。这些化学修饰包括但不限于取代替代性R基团和改变参考多肽的特定碳原子处的饱和度。

蛋白类似物可以较为耐受体内降解，导致在施用后更延长的作用。用于测量功能活性的测定包括但不限于以下实施例中描述的那些。

[0239] 根据当前公开的主题，编码与肿瘤抗原(例如，人肿瘤抗原)特异性结合的细胞外抗原结合结构域(例如，scFv(例如，人scFv)、Fab或$(Fab)_2$)、CD3、CD8、CD28的多核苷酸可以通过密码子优化进行修饰。密码子优化可以改变天然存在的基因序列和重组基因序列两者，以在任何给定的表达系统中实现最高可能的生产力水平。蛋白质表达的不同阶段中涉及的因素包括密码子适应性、mRNA结构、以及转录和翻译中的各种顺式元件。本领域技术人员已知的任何合适的密码子优化方法或技术可以用于修饰当前公开的主题的多核苷酸，包括但不限于OptimumGene™、Encor优化和Blue Heron。

施用

[0240] 可以将当前公开的主题的表达靶向肿瘤抗原的CAR和抗DOTA C825抗原结合片段的工程化免疫细胞全身地或直接提供给受试者以诊断或监测瘤形成的进展。在某些实施方案中，将工程化免疫细胞直接注射到目的器官(例如，受瘤形成影响的器官)中。可替代地或另外地，将工程化免疫细胞例如通过向循环系统(例如，肿瘤脉管系统)或实体瘤中施用来间接提供到目的器官中。可以在施用细胞和组合物之前、期间或之后提供扩增和分化剂，以增加体内或体外T细胞的产生。

[0241] 可以在任何生理上可接受的媒介物中全身地或区域地，通常在血管内、腹膜内、鞘内或胸膜内施用当前公开的主题的工程化免疫细胞，但也可以将它们引入骨或其中细胞可以找到用于再生和分化的适当位置的其他便利位点(例如，胸腺)中。在某些实施方案中，可以施用至少1×10^5个细胞，最终达到1×10^{10}个或更多。在某些实施方案中，可以施用至少1×10^6个细胞。包含工程化免疫细胞的细胞群体可以包含纯化的细胞群体。本领域技术人员可以使用各种熟知的方法，如荧光激活细胞分选(FACS)，容易地确定细胞群体中工程化免疫细胞的百分比。包含工程化免疫细胞的细胞群体中的纯度范围可以是约50％至约55％、约55％至约60％、约65％至约70％、约70％至约75％、约75％至约80％、约80％至约85％、约85％至约90％、约90％至约95％或约95％至约100％。剂量可以由本领域技术人员容易调节(例如，纯度降低可能需要剂量增加)。可以通过注射、导管等引入工程化免疫细胞。如果希望的话，也可以包括因子，包括但不限于白介素，例如IL-2、IL-3、IL 6、IL-11、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21以及其他白介素；集落刺激因子，如G-、M-和GM-CSF；干扰素，例如γ-干扰素。

[0242] 在某些实施方案中，当前公开的主题的组合物包括药物组合物，所述药物组合物包含表达靶向肿瘤抗原的CAR和抗DOTA C825抗原结合片段的工程化免疫细胞以及药学上可接受的载体。施用可以是自体的或非自体的。例如，表达靶向肿瘤抗原的CAR和抗DOTA C825抗原结合片段的工程化免疫细胞和包含它们的组合物可以从一名受试者获得，并且向同一受试者或不同的相容受试者施用。当前公开的主题的外周血衍生的T细胞或其后代(例如，体内、离体或体外衍生的)可以经由局部注射(包括导管施用)、全身注射、局部注射、静脉内注射或肠胃外施用来施用。当施用当前公开的主题的药物组合物(例如，包含表达靶向肿瘤抗原的CAR的工程化免疫细胞的药物组合物)时，可以将其配制成单位剂量可注射形式(溶液、混悬剂、乳剂)。

配制品

[0243] 表达靶向肿瘤抗原的CAR和抗DOTA C825抗原结合片段的工程化免疫细胞和包含

它们的组合物可以便利地以无菌液体制剂的形式提供，所述无菌液体制剂例如等渗水溶液、混悬剂、乳剂、分散体或粘性组合物，它们可以被缓冲至所选pH。液体制剂一般比凝胶、其他粘性组合物和固体组合物制备起来更容易。另外地，液体组合物稍微更方便施用，尤其是通过注射。在另一方面，粘性组合物可以配制在适当的粘度范围内，以提供与特定组织的更长的接触时间段。液体或粘性组合物可以包含载体，所述载体可以是溶剂或分散介质，其含有例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、多元醇(例如，甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)及其合适的混合物。

[0244] 无菌可注射溶液可以通过将当前公开的主题的组合物(例如，包含工程化免疫细胞的组合物)掺入所需量的适当溶剂以及(根据需要)各种量的其他成分中来制备。可以将此类组合物与合适的载体、稀释剂或赋形剂(如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等)混合。所述组合物也可以是冻干的。组合物可以含有辅助物质，如润湿剂、分散剂或乳化剂(例如，甲基纤维素)、pH缓冲剂、胶凝或粘度增强添加剂、防腐剂、调味剂、颜料等，取决于施用途径和所希望的制剂。可以参考标准文本如“REMINGTON'SPHARMACEUTICAL SCIENCE”，第17版，1985(通过引用并入本文)，无需过度的实验来制备合适的制剂。

[0245] 可以添加各种增强所述组合物的稳定性和无菌性的添加剂，包括抗微生物防腐剂、抗氧化剂、螯合剂和缓冲液。防止微生物的作用可以通过不同的抗细菌和抗真菌剂(例如，对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、抗坏血酸等)来确保。可以通过使用延迟吸收的药剂(例如单硬脂酸铝和明胶)实现可注射药物形式的延长吸收。然而，根据当前公开的主题，所使用的任何媒介物、稀释剂或添加剂将必须与当前公开的主题的工程化免疫细胞相容。

[0246] 组合物可以是等渗的，即它们可以具有与血液和泪液相同的渗透压。当前公开的主题的组合物的所希望的等渗性可以使用氯化钠或其他药学上可接受的药剂(如右旋糖、硼酸、酒石酸钠、丙二醇或其他无机或有机溶质)来实现。氯化钠是合适的，特别是对于含有钠离子的缓冲液而言。

[0247] 如果希望，可以使用药学上可接受的增稠剂将组合物的粘度维持在所选水平。可以使用甲基纤维素，因为它容易且经济地可获得并且易于处理。其他合适的增稠剂包括，例如黄原胶、羧甲基纤维素、羟丙基纤维素、卡波姆等。增稠剂的浓度可以取决于所选药剂。重要的一点是使用将达到所选粘度的量。显然，合适的载体和其他添加剂的选择将取决于确切的施用途径和特定剂型(例如，液体剂型)的性质(例如，是否要将组合物配制成溶液、混悬剂、凝胶或其他液体形式，如延时释放(time release)形式或液体填充的形式)。

[0248] 本领域技术人员应认识到，组合物的组分应选择为是化学惰性的，并且将不影响如当前公开的主题中所描述的工程化免疫细胞的活力或功效。对于化学和制药原理的技术人员而言，这不会带来问题，或者通过参考标准文本或通过简单的实验(不涉及过度的实验)从本公开文本和本文引用的文献中可以容易避免问题。

[0249] 关于当前公开的主题的工程化免疫细胞的用途的一个考虑是实现最佳作用所需的细胞数量。待施用的细胞的数量将根据受试者变化。在某些实施方案中，将从约10^2至约10^{12}、从约10^3至约10^{11}、从约10^4至约10^{10}、从约10^5至约10^9或从约10^6至约10^8个当前公开的主题的工程化免疫细胞施用于受试者。可以以甚至更小的数目施用更有效的细胞。在一些实施方案中，将至少约1×10^8、约2×10^8、约3×10^8、约4×10^8、约5×10^8、约1×10^9、约5×10^9、约1×10^{10}、约5×10^{10}、约1×10^{11}、约5×10^{11}、约1×10^{12}或更多个当前公开的主题的工程化

免疫细胞施用于人受试者。可以基于单独针对每个受试者的因素(包括其大小、年龄、性别、体重、和特定受试者的状况)来精确确定什么将被认为是有效剂量。本领域技术人员从本公开文本和本领域知识中可以容易地确定剂量。通常,以无毒性或患者耐受的剂量施用工程化免疫细胞。

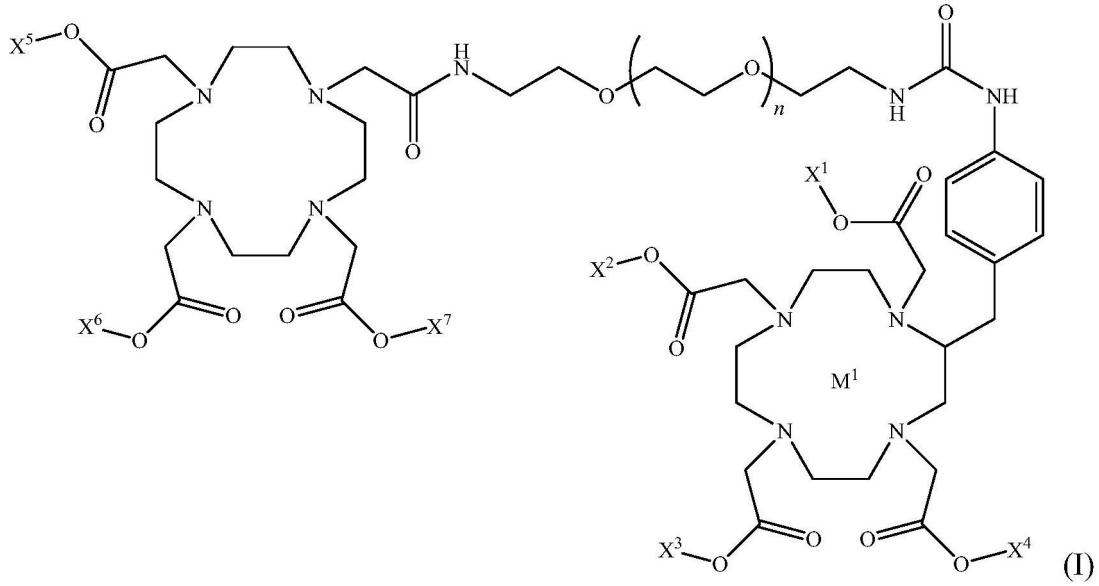
[0250] 技术人员可以容易地确定在当前公开的主题的方法中施用的组合物中细胞和任选的添加剂、媒介物和/或载体的量。典型地,任何添加剂(除一种或多种活性细胞和/或一种或多种试剂外)以按重量计从约0.001%至约50%的量)溶液存在于磷酸盐缓冲盐水中,并且活性成分以微克量级至毫克量级存在,如从约0.0001wt%至约5wt%、从约0.0001wt%至约1wt%、从约0.0001wt%至约0.05wt%、从约0.001wt%至约20wt%、从约0.01wt%至约10wt%或从约0.05wt%至约5wt%。对于待向动物或人施用的任何组合物以及对于任何特定的施用方法,应确定毒性,如通过在合适的动物模型(例如,啮齿动物,如小鼠)中确定致死剂量(LD)和LD50;以及引发合适应答的一种或多种组合物的剂量、其中组分的浓度和施用一种或多种组合物的时间设定。根据技术人员的知识、本公开文本和本文引用的文献,此类确定不需要过度的实验。而且,无需过度实验即可确定依序施用的时间。

DOTA半抗原组合物

[0251] DOTA是形成在生理学条件下不可逆的稳定金属复合物的大环螯合剂。DOTA具有405道尔顿的分子量并且展现出快速扩散和肾清除。

[0252] DOTA半抗原的例子包括但不限于苄基-DOTA、NH_2-苄基(Bn)DOTA、DOTA-去铁胺、DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH_2、Ac-Lys(HSG)D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH_2、DOTA-D-Asp-D-Lys(HSG)-D-Asp-D-Lys(HSG)-NH_2、DOTA-D-Glu-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH_2、DOTA-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH_2、DOTA-D-Ala-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH_2、DOTA-D-Phe-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-NH_2、Ac-D-Phe-D-Lys(DOTA)-D-Tyr-D-Lys(DOTA)-NH_2、Ac-D-Phe-D-Lys(DTPA)-D-Tyr-D-Lys(DTPA)-NH_2、Ac-D-Phe-D-Lys(Bz-DTPA)-D-Tyr-D-Lys(Bz-DTPA)-NH_2、Ac-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Lys(Tscg-Cys)-NH_2、DOTA-D-Phe-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Lys(Tscg-Cys)-NH_2、(Tscg-Cys)-D-Phe-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Lys(DOTA)-NH_2、Tscg-D-Cys-D-Glu-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH_2、(Tscg-Cys)-D-Glu-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH_2、Ac-D-Cys-D-Lys(DOTA)-D-Tyr-D-Ala-D-Lys(DOTA)-D-Cys-NH_2、Ac-D-Cys-D-Lys(DTPA)-D-Tyr-D-Lys(DTPA)-NH_2、Ac-D-Lys(DTPA)-D-Tyr-D-Lys(DTPA)-D-Lys(Tscg-Cys)-NH_2、Ac-D-Lys(DOTA)-D-Tyr-D-Lys(DOTA)-D-Lys(Tscg-Cys)-NH_2、DOTA-RGD、DOTA-PEG-E(c(RGDyK))$_2$、DOTA-8-AOC-BBN、DOTA-PESIN、p-NO2-苄基-DOTA、DOTA-生物素-肌氨酸(DOTA-生物素)、1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸单(N-羟基琥珀酰亚胺酯)(DOTA-NHS)和DOTATyrLysDOTA。参见Orcutt等人,Mol Imaging Biol.(2011)Apr;13(2):215-221;Cheal SM等人(2017)J Nucl Med,58(11):1735-42(用β发射体描述DOTA半抗原);Cheal SM等人(2018)J Nucl Med,59:123(α发射体)。DOTA和其变体螯合广泛的金属(包括顺磁性金属)和放射性核素。示例性金属包括铟、镓、钆、钕、铽、铜、铋等。

[0253] 在一些实施方案中,DOTA半抗原具有式I或其药学上可接受的盐的结构

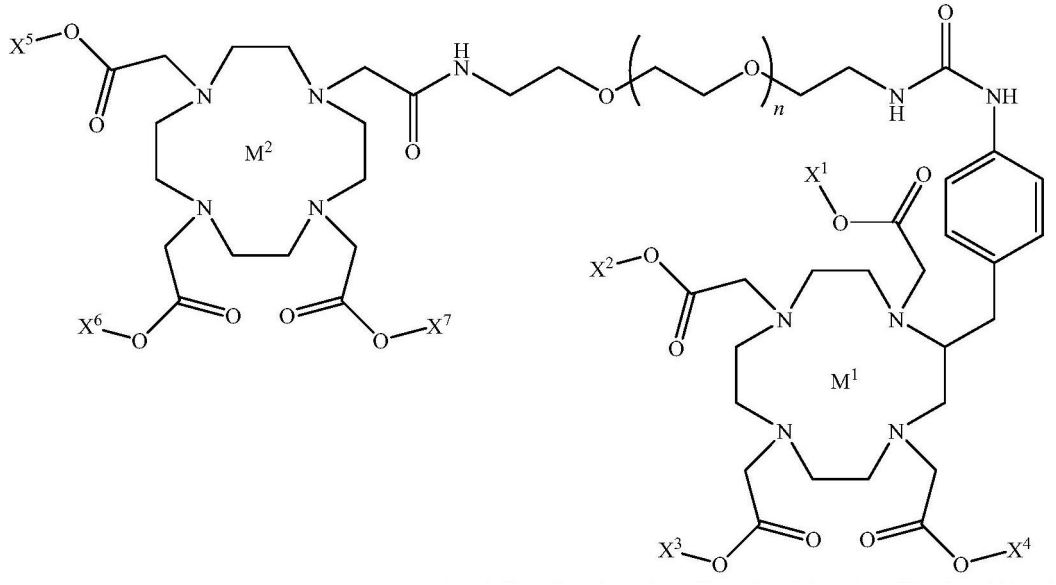


(I)

其中M^1是$^{175}Lu^{3+}$、$^{45}Sc^{3+}$、$^{69}Ga^{3+}$、$^{71}Ga^{3+}$、$^{89}Y^{3+}$、$^{113}In^{3+}$、$^{115}In^{3+}$、$^{139}La^{3+}$、$^{136}Ce^{3+}$、$^{138}Ce^{3+}$、$^{140}Ce^{3+}$、$^{142}Ce^{3+}$、$^{151}Eu^{3+}$、$^{153}Eu^{3+}$、$^{159}Tb^{3+}$、$^{154}Gd^{3+}$、$^{155}Gd^{3+}$、$^{156}Gd^{3+}$、$^{157}Gd^{3+}$、$^{158}Gd^{3+}$或$^{160}Gd^{3+}$;X^1、X^2、X^3和X^4各自独立地是孤对电子(即提供氧阴离子)或H;X^5、X^6和X^7各自独立地是孤对电子(即提供氧阴离子)或H;并且n是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或22。在某些实施方案中,n是3。

[0254] 在DOTA半抗原的一些实施方案中,X^1、X^2、X^3和X^4中的至少两个各自独立地是孤对电子。在DOTA半抗原的某些实施方案中,X^1、X^2、X^3和X^4中的三个各自独立地是孤对电子,并且剩余的X^1、X^2、X^3或X^4是H。

[0255] 另外地或可替代地,在一些实施方案中,本公开文本提供了包含式I的任一上述DOTA半抗原以及放射性核素阳离子的双螯合物。在一些实施方案中,式I的DOTA半抗原可以以约1pM-1nM(例如,约1-10pM;1-100pM;5-50pM;100-500pM;或500pM-1nM)的K_d结合放射性核素阳离子。在一些实施方案中,K_d在约1nM至约1pM的范围内,例如不超过约1nM、950pM、900pM、850pM、800pM、750pM、700pM、650pM、600pM、550pM、500pM、450pM、400pM、350pM、300pM、250pM、200pM、150pM、100pM、90pM、80pM、70pM、60pM、50pM、40pM、30pM、20pM、10pM、9pM、8pM、7pM、6pM、5pM、4pM、3pM、2.5pM、2pM或1pM。在一些实施方案中,所述双螯合物具有式(II)



(II)

或是其药学上可接受的盐，其中M^1是$^{175}Lu^{3+}$、$^{45}Sc^{3+}$、$^{69}Ga^{3+}$、$^{71}Ga^{3+}$、$^{89}Y^{3+}$、$^{113}In^{3+}$、$^{115}In^{3+}$、$^{139}La^{3+}$、$^{136}Ce^{3+}$、$^{138}Ce^{3+}$、$^{140}Ce^{3+}$、$^{142}Ce^{3+}$、$^{151}Eu^{3+}$、$^{153}Eu^{3+}$、$^{159}Tb^{3+}$、$^{154}Gd^{3+}$、$^{155}Gd^{3+}$、$^{156}Gd^{3+}$、$^{157}Gd^{3+}$、$^{158}Gd^{3+}$或$^{160}Gd^{3+}$；M^2是放射性核素阳离子；X^1、X^2、X^3和X^4各自独立地是孤对电子(即提供氧阴离子)或H；X^5、X^6和X^7各自独立地是孤对电子(即提供氧阴离子)或H；并且n是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或22。在某些实施方案中，n是3。在所述双螯合物的一些实施方案中，X^5、X^6和X^7中的至少两个各自独立地是孤对电子。另外地或可替代地，在双螯合物的一些实施方案中，放射性核素阳离子是二价阳离子或三价阳离子。

[0256] 在本文公开的DOTA半抗原的任何和所有实施方案中，M^2是^{111}In、^{67}Ga、^{51}Cr、^{58}Co、^{99m}Tc、^{103m}Rh、^{195m}Pt、^{119}Sb、^{161}Ho、^{189m}Os、^{192}Ir、^{201}Tl、^{203}Pb、^{89}Zr、^{68}Ga或^{64}Cu。

[0257] 在另一方面，本公开文本提供了包含本文提供的工程化免疫细胞和DOTA半抗原的复合物，其中所述工程化免疫细胞被配置为与所述DOTA半抗原和肿瘤抗原结合。本公开文本还提供了包含双螯合物(例如式II的双螯合物)和工程化免疫细胞的复合物，其中所述工程化免疫细胞被配置为与所述DOTA半抗原和肿瘤抗原结合。在本文公开的复合物的任何以上实施方案中，所述工程化免疫细胞表达抗DOTA C825抗原结合片段(参见Cheal等人，Mol Cancer Ther.13(7):1803-12(2014))。另外地或可替代地，在本文公开的复合物的任何以上实施方案中，所述工程化免疫细胞表达具有G54C取代的抗DOTA C825抗原结合片段。

[0258] 在本文公开的复合物的任何以上实施方案中，所述肿瘤抗原选自5T4、α5β1-整合素、707-AP、A33、AFP、ART-4、B7H4、BAGE、Bcl-2、β-连环素、BCMA、Bcr-abl、MN/C IX抗体、CA125、CA19-9、CAMEL、CAP-1、CASP-8、CD4、CD5、CD19、CD20、CD21、CD22、CD25、CDC27/m、CD33、CD37、CD45、CD52、CD56、CD80、CD123、CDK4/m、CEA、c-Met、CS-1、CT、Cyp-B、细胞周期蛋白B1、DAGE、DAM、EBNA、EGFR、ErbB3、ELF2M、EMMPRIN、EpCam、肝配蛋白B2、雌激素受体、ETV6-AML1、FAP、铁蛋白、叶酸结合蛋白、GAGE、G250、GD-2、GM2、GnT-V、gp75、gp100(Pmel 17)、HAGE、HER-2/neu、HLA-A*0201-R170I、HPV E6、HPV E7、Ki-67、HSP70-2M、HST-2、hTERT(或hTRT)、iCE、IGF-1R、IL-2R、IL-5、KIAA0205、LAGE、LDLR/FUT、LRP、MAGE、MART、MART-1/黑色素A、MART-2/Ski、MC1R、间皮素、MUC、MUC16、MUM-1-B、myc、MUM-2、MUM-3、NA88-A、NYESO-1、

NY-Eso-B、p53、蛋白酶-3、p190小bcr-abl、Pml/RARα、PRAME、孕酮受体、PSA、PSCA、PSM、PSMA、ras、RAGE、RU1或RU2、RORI、SART-1或SART-3、存活蛋白、TEL/AML1、TGFβ、TPI/m、TRP-1、TRP-2、TRP-2/INT2、生腱蛋白、TSTA酪氨酸酶、VEGF和WT1。另外地或可替代地，在所述复合物的一些实施方案中，所述工程化免疫细胞的抗DOTA C825抗原结合片段以低于或等于以下的K_d与DOTA半抗原结合：100nM-95nM、95-90nM、90-85nM、85-80nM、80-75nM、75-70nM、70-65nM、65-60nM、60-55nM、55-50nM、50-45nM、45-40nM、40-35nM、35-30nM、30-25nM、25-20nM、20-15nM、15-10nM、10-5nM、5-1nM、1nM-950pM、950pM-900pM、900pM-850pM、850pM-800pM、800pM-750pM、750pM-700pM、700pM-650pM、650pM-600pM、600pM-550pM、550pM-500pM、500pM-450pM、450pM-400pM、400pM-350pM、350pM-300pM、300pM-250pM、250pM-200pM、200pM-150pM、150pM-100pM、100pM-50pM、50pM-40pM、40pM-30pM、30pM-20pM、20pM-10pM、9pM、8pM、7pM、6pM、5pM、4pM、3pM、2.5pM、2pM、1.5pM或1pM。

本发明技术的诊断方法

[0259] 在一方面，本公开文本提供了用于检测有需要的受试者中的肿瘤(例如实体瘤或液体瘤)的方法，所述方法包括(a)向所述受试者施用有效量的本发明技术的任何复合物，其中所述复合物被配置为定位于表达由所述复合物的工程化免疫细胞识别的肿瘤抗原的肿瘤；以及(b)通过检测由所述复合物发射的高于参考值的放射性水平来检测所述受试者中肿瘤的存在。还公开了用于检测有需要的受试者中的肿瘤(例如实体瘤或液体瘤)的方法，所述方法包括(a)向所述受试者施用有效量的本文所述的任何工程化免疫细胞，其中所述工程化免疫细胞被配置为定位于表达由所述工程化免疫细胞识别的肿瘤抗原的肿瘤；(b)向所述受试者施用有效量的放射性标记的DOTA半抗原，其中所述放射性标记的DOTA半抗原被配置为与所述工程化免疫细胞表达的抗DOTA C825抗原结合片段结合；以及(c)通过检测由所述放射性标记的DOTA半抗原发射的高于参考值的放射性水平来检测所述受试者中肿瘤的存在。

[0260] 另外地或可替代地，在本文公开的方法的一些实施方案中，使用正电子发射断层成像或单光子发射计算机断层成像检测由所述复合物或所述放射性标记的DOTA半抗原发射的放射性水平。

[0261] 在本文公开的方法的一些实施方案中，所述受试者被诊断患有或疑似患有癌症。癌症的例子包括但不限于肾上腺癌、膀胱癌、血液癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、上皮癌、子宫颈癌、结肠癌、结直肠癌、子宫体癌、耳鼻喉(ENT)癌、子宫内膜癌、食管癌、胃肠道癌、头颈癌、霍奇金病、肠癌、肾癌、喉癌、白血病、肝癌、淋巴结癌、淋巴瘤、肺癌、黑色素瘤、间皮瘤、骨髓瘤、鼻咽癌、神经母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、口腔癌、卵巢癌、胰腺癌、阴茎癌、咽癌、前列腺癌、直肠癌、肉瘤、精原细胞瘤、皮肤癌、胃癌、畸胎瘤、睾丸癌、甲状腺癌、子宫癌、阴道癌、血管肿瘤、及其转移。

[0262] 在本文公开的方法的任何前述实施方案中，静脉内、肿瘤内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眼眶内、真皮内、腹膜内、经气管、皮下、脑室内、口服或鼻内施用所述复合物、所述工程化免疫细胞或所述放射性标记的DOTA半抗原。另外地或可替代地，在一些实施方案中，将所述复合物、所述工程化免疫细胞或所述放射性标记的DOTA半抗原施用于所述受试者的脑脊液或血液中。

[0263] 另外地或可替代地，在一些实施方案中，在施用所述复合物或所述放射性标记的

DOTA半抗原后2至120小时之间检测由所述复合物或所述放射性标记的DOTA半抗原发射的放射性水平。在某些实施方案中，由所述复合物或所述放射性标记的DOTA半抗原发射的放射性水平表示为每克组织的注射剂量百分比(%ID/g)。参考值可通过如下方法来计算：测量存在于非肿瘤(正常)组织中的放射性水平，并且计算存在于非肿瘤(正常)组织中的平均放射性水平±标准差。在一些实施方案中，所述参考值是标准摄取值(SUV)。参见Thie JA,J Nucl Med.45(9):1431-4(2004)。另外地或可替代地，在一些实施方案中，肿瘤与正常组织之间的放射性水平的比率为约2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、15:1、20:1、25:1、30:1、35:1、40:1、45:1、50:1、55:1、60:1、65:1、70:1、75:1、80:1、85:1、90:1、95:1或100:1。在一些实施方案中，所述受试者是人。

[0264] 可以在施用表达抗DOTA C825抗原结合片段的工程化免疫细胞后1分钟至4天或更多天数之间的任何时间施用所述放射性标记的DOTA半抗原。例如，在一些实施方案中，在施用表达抗DOTA C825抗原结合片段的工程化免疫细胞后1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、10分钟、15分钟、20分钟、25分钟、30分钟、35分钟、40分钟、45分钟、50分钟、55分钟、1小时、1.25小时、1.5小时、1.75小时、2小时、2.5小时、3小时、3.5小时、4小时、4.5小时、5小时、5.5小时、6小时、6.5小时、7小时、7.5小时、8小时、8.5小时、9小时、9.5小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、23小时、24小时、48小时、72小时、96小时或其中的任何范围，施用所述放射性标记的DOTA半抗原。可替代地，可以在施用表达抗DOTA C825抗原结合片段的工程化免疫细胞后4天或更多天之后的任何时间施用所述放射性标记的DOTA半抗原。

[0265] 在一方面，本公开文本提供了用于监测受试者中的工程化免疫细胞的生物分布的方法，所述方法包括：(a)向所述受试者施用有效量的本文公开的任何工程化免疫细胞，其中所述工程化免疫细胞被配置为定位于表达由所述工程化免疫细胞识别的靶抗原的组织；(b)向所述受试者施用有效量的放射性标记的DOTA半抗原，其中所述放射性标记的DOTA半抗原被配置为与所述工程化免疫细胞表达的抗DOTA C825抗原结合片段结合；以及(c)通过检测由所述放射性标记的DOTA半抗原发射的高于参考值的放射性水平来确定所述受试者中工程化免疫细胞的生物分布。在另一方面，本公开文本提供了用于监测受试者中工程化免疫细胞的生物分布的方法，所述方法包括：(a)向所述受试者施用有效量的复合物，所述复合物包含本发明技术的任何工程化免疫细胞以及放射性标记的DOTA半抗原，其中所述复合物被配置为定位于表达由所述工程化免疫细胞识别的靶抗原的组织；以及(b)通过检测由所述放射性标记的DOTA半抗原发射的高于参考值的放射性水平来确定所述受试者中工程化免疫细胞的生物分布。

[0266] 在又另一方面，本公开文本提供了用于监测受试者中的工程化免疫细胞的活力的方法，所述方法包括：(a)向所述受试者施用有效量的本文公开的任何工程化免疫细胞，其中所述工程化免疫细胞被配置为定位于表达由所述工程化免疫细胞识别的靶抗原的组织；(b)向所述受试者施用有效量的放射性标记的DOTA半抗原，其中所述放射性标记的DOTA半抗原被配置为与所述工程化免疫细胞表达的抗DOTA C825抗原结合片段结合；(c)检测由所述放射性标记的DOTA半抗原在第一时间点发射的高于参考值的放射性水平；(d)检测由所述放射性标记的DOTA半抗原在第二时间点发射的高于参考值的放射性水平；以及(e)当由所述放射性标记的DOTA半抗原在所述第二时间点发射的放射性水平与在所述第一时间点

观察到的放射性水平可比时，确定所述受试者中的工程化免疫细胞是有活力的。在一些实施方案中，所述方法还包括在步骤(d)前向所述受试者施用第二有效量的放射性标记的DOTA半抗原。本文还公开了用于监测受试者中的工程化免疫细胞的活力的方法，所述方法包括：(a)向所述受试者施用有效量的复合物，所述复合物包含本文所述的任何工程化免疫细胞以及放射性标记的DOTA半抗原，其中所述复合物被配置为定位于表达由所述工程化免疫细胞识别的靶抗原的组织；(b)检测由所述放射性标记的DOTA半抗原在第一时间点发射的高于参考值的放射性水平；(c)检测由所述放射性标记的DOTA半抗原在第二时间点发射的高于参考值的放射性水平；以及(d)当由所述放射性标记的DOTA半抗原在所述第二时间点发射的放射性水平与在所述第一时间点观察到的放射性水平可比时，确定所述受试者中的工程化免疫细胞是有活力的。

[0267] 在又另一方面，本公开文本提供了用于监测受试者中的工程化免疫细胞的扩增的方法，所述方法包括：(a)向所述受试者施用有效量的本文所述的任何工程化免疫细胞，其中所述工程化免疫细胞被配置为定位于表达由所述工程化免疫细胞识别的靶抗原的组织；(b)向所述受试者施用第一有效量的放射性标记的DOTA半抗原，其中所述放射性标记的DOTA半抗原被配置为与所述工程化免疫细胞表达的抗DOTA C825抗原结合片段结合；(c)检测由所述放射性标记的DOTA半抗原在第一时间点发射的高于参考值的放射性水平；(d)在步骤(c)后向所述受试者施用第二有效量的放射性标记的DOTA半抗原；(e)检测由所述放射性标记的DOTA半抗原在第二时间点发射的高于参考值的放射性水平；以及(f)当由所述放射性标记的DOTA半抗原在所述第二时间点发射的放射性水平相对于在所述第一时间点观察到的放射性水平更高时，确定所述受试者中的工程化免疫细胞已扩增。

[0268] 在本文公开的方法的任何和所有实施方案中，使用正电子发射断层成像或单光子发射计算机断层成像检测由所述复合物或所述放射性标记的DOTA半抗原发射的放射性水平。另外地或可替代地，在本文公开的方法的任何前述实施方案中，肿瘤内、静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眼眶内、真皮内、腹膜内、经气管、皮下、脑室内、口服或鼻内施用所述工程化免疫细胞、所述放射性标记的DOTA半抗原或所述复合物。在本文公开的方法的一些实施方案中，静脉内、肿瘤内、腹膜内、皮下、肌内或肿瘤内施用一种或多种工程化免疫细胞、放射性标记的DOTA半抗原或复合物。

[0269] 在本文公开的方法的任何和所有实施方案中，受试者患有选自上皮癌、肉瘤、黑色素瘤或造血系统癌症的癌症或肿瘤。在一些实施方案中，所述癌症或肿瘤选自肾上腺癌、膀胱癌、血液癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、上皮癌、子宫颈癌、结肠癌、结直肠癌、子宫体癌、耳鼻喉(ENT)癌、子宫内膜癌、食管癌、胃肠道癌、头颈癌、霍奇金病、肠癌、肾癌、喉癌、白血病、肝癌、淋巴结癌、淋巴瘤、肺癌、黑色素瘤、间皮瘤、骨髓瘤、鼻咽癌、神经母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、口腔癌、卵巢癌、胰腺癌、阴茎癌、咽癌、前列腺癌、直肠癌、肉瘤、精原细胞瘤、皮肤癌、胃癌、畸胎瘤、睾丸癌、甲状腺癌、子宫癌、阴道癌、血管肿瘤及其转移。

试剂盒

[0270] 本发明技术提供了含有适合用于诊断患者中癌症的组分的试剂盒。

[0010] 在一方面，所述试剂盒包含单位剂型的包括工程化免疫细胞的组合物，所述工程化免疫细胞包含靶向肿瘤抗原的受体(例如CAR)和抗DOTA C825抗原结合片段。在特定的实施方案中，所述细胞进一步表达至少一种共刺激配体。在一些实施方案中，所述试剂盒包括

无菌容器，此类容器可以是盒、安瓿、瓶、小瓶、管、袋、小袋、泡罩包装或本领域已知的其他合适的容器形式。此类容器可以由塑料、玻璃、层压纸、金属箔或适合于容纳药物的其他材料制成。

[0011] 如果希望的话，可以将工程化免疫细胞与用于向患有瘤形成或有发展瘤形成(例如，实体瘤)风险的受试者施用工程化免疫细胞的说明书一起提供。在某些实施方案中，所述说明书包括以下中的至少一个：诊断剂的说明；用于诊断或监测瘤形成(例如，实体瘤)的进展或其症状的剂量安排和施用；注意事项；警告；适应证；禁忌证；过量给药信息；不良反应；动物药理学；临床研究和/或引用。这些说明书可以直接印在容器上(当存在时)，或者作为标签应用在容器上，或者作为单独的纸页、小册子、卡片或折叠页提供在容器中或与其一起提供。

[0271] 在另一方面，本发明技术的试剂盒包含DOTA半抗原(例如Bn-DOTA、NH_2-苄基(Bn)DOTA、式II的双螯合物或本文所述的任何DOTA半抗原等)、本发明技术的至少一种工程化免疫细胞以及使用说明书。所述试剂盒可以还包含一种或多种放射性核素，如^{111}In、^{67}Ga、^{51}Cr、^{58}Co、^{99m}Tc、^{103m}Rh、^{195m}Pt、^{119}Sb、^{161}Ho、^{189m}Os、^{192}Ir、^{201}Tl、^{203}Pb、^{89}Zr、^{68}Ga或^{64}Cu。

[0272] 在一些实施方案中，本发明技术的所述至少一种工程化免疫细胞与肿瘤抗原靶标(例如BCMA、CD19、间皮素、MUC16、PSCA、WT1和PRAME)结合。可以以含有所述抗体的无菌液体配制品或冻干制剂的预填充注射器或自动注射笔的形式提供本发明技术的所述至少一种工程化免疫细胞(例如，Kivitz等人，Clin.Ther.28:1619-29(2006))。

[0273] 可以包括能够通过施用途径递送试剂盒组分的装置。此类装置的例子包括注射器(用于肠胃外施用)或吸入装置。

[0274] 所述试剂盒组分可以包装在一起或分开在两个或更多个容器中。在一些实施方案中，所述容器可以是小瓶，其含有DOTA半抗原和/或工程化免疫细胞组合物的适合于重构的无菌冻干配制品。试剂盒还可以含有一种或多种适合于重构和/或稀释其他试剂的缓冲液。可以使用的其他容器包括但不限于小袋、托盘、盒、管等。试剂盒组分可以无菌地包装并维持在所述容器内。

实施例

实施例1：材料和方法

[0275] CAR T细胞转导。图3A-图3C示出用C825和CD19-CAR两者以病毒转导原代人T细胞的三种不同策略。图3A示出用两种单一构建体的转导，一种编码具有GFP报告物的C825(上)并且一种编码CD19 CAR(下)。图3B示出双顺反子构建体，其编码由P2A切割位点隔开的具有跨膜结构域和GFP报告物的C825和CD19 CAR。图3C示出双顺反子构建体，其编码由P2A切割位点隔开的具有Thy1 GPI连接和His标签报告物的C825和CD19CAR。原代人T细胞的转导的代表性流式图示出在右侧。

实施例2：异种移植模型中本发明技术的工程化CAR T细胞的体内追踪

[0276] 将CD-19CAR-T细胞用表达半抗原捕获抗体C825的专用超高亲和力膜转导。将这些细胞纯化并在体内使用之前通过图2A中所示的饱和结合测定使用[^{111}In]Pr-DOTA放射性半抗原系统测试表面载体表达。将表达CD19的Raji淋巴瘤、人B细胞(伯基特类型)淋巴瘤用作免疫缺陷小鼠中的淋巴瘤性肿瘤，用于CD19靶向。图2B示出在右肩患有s.c.Raji GFP-fluc肿瘤的NSG小鼠。在静脉内注射CAR-T细胞($2.5x\ 10^6$)后十天，向所述小鼠注射[^{111}In]Pr-

DOTA放射性半抗原用于体内追踪CAR T细胞(CD19 CAR+C825或仅对照CD19 CAR)。如图2C中所示,用表达C825 scFv的CD19 CAR T细胞治疗的动物示出在荷载Raji肿瘤的异种移植物中有效的肿瘤靶向。CAR-T细胞以经由肾清除的优化药理学高效地捕获放射性半抗原螯合物(数据未示出)。

[0277] 图4A示出逆转录病毒载体SFG-Thor、SFG-19BBz(CAR)和SFG-C825的示意性结构。图4B示出,如通过体外4h细胞毒性测定所测量的,SFG-Thor T细胞与SFG-19BBz(CAR)T细胞在杀死CD19(+)Raji肿瘤细胞方面无区别。这些结果证明,将CD19特异性CAR T细胞用人源化C825 scFv转导未负面影响其靶向和裂解CD19(+)肿瘤靶标细胞的能力。图4C示出[^{111}In]InPr在1h时的体外结合。此代表性数据组证明所述放射性标记的DOTA探针与表达C825的T细胞的特异性结合,但是在SFG-19BBz(CAR)和NT T细胞中未观察到显著摄取。(所有实验在37℃下一式三份地进行)。数据是平均值±SD。图4D示出[^{111}In]InPr与SFG-Thor T细胞(n=3次独立测定;示出代表性例子)的体外结合动力学。图4E示出用于评估靶向肿瘤细胞的T细胞的体内研究的示例性方案。将^{68}Ga-NODAGA-Pr(100mCu,700pmol)用作放射性示踪物并在荷载CD19(+)Raji异种移植物的NSG小鼠中施用T细胞(1×10^6个T细胞)后10天施用。图4F示出在^{68}Ga-NODAGA-Pr注射后(p.i.)1h时描绘SFG-Thor T细胞在肿瘤处(右肩,红箭头)的归巢和积累的示例性最大强度投影(MIP)图像。在SFG-19BBz(CAR)T细胞施用(蓝箭头)后在肿瘤位点处未注意到高于背景的摄取。图4G使用基于图像的生物分布示出肿瘤中平均摄取以及肿瘤本底比值(TNR)(SFG-Thor:n=4;SFG-19BBz(CAR):n=2)。**,P<0.01。

[0278] 图5A示出在确立治疗失败的s.c.Raji肿瘤小鼠模型中在体内追踪工程化T细胞(3×10^6个细胞)的示例性方案。在肿瘤接种后七天,对小鼠静脉内注射3×10^6个huC825-19BBz或3×10^6个19BBz T细胞。在施用T细胞后第17天,对展现出持续增加的肿瘤负荷(表明治疗失败)的小鼠静脉内注射^{86}Y-DOTA-Bn(3.7MBq;40pmol),以评估所移植T细胞的持久性和定位。图5B示出在注射后1h、3h和16h的最大强度投影(MIP)以及轴向PET/CT图像,描绘了huC825-19BBz-CAR T细胞在肿瘤处(橙色圈)的积累。在注射后3h观察到最高肿瘤内T细胞摄取,为4.9%ID/g(相比于对照0.8% ID/g)。在对照小鼠中的肿瘤处未注意到高于背景的摄取(19BBz CAR;绿圈)。注意到了肾示踪物的快速显著清除。

[0279] 这些结果证明,本发明技术的工程化免疫细胞可用在用于确定所述工程化免疫细胞的体内生物分布、活力和扩增的方法中。

示例性实施方案

[0280] 可以根据以下非限制性实施方案描述本公开文本:

[0281] 实施方案1:本申请在一方面提供了一种工程化免疫细胞,所述工程化免疫细胞包含:(a)包含SEQ ID NO:35-39、41或42中任一个的氨基酸序列的抗DOTA C825抗原结合片段和/或编码所述抗DOTA C825抗原结合片段的核酸;以及(b)与靶抗原结合的受体和/或编码所述受体的核酸。

[0282] 实施方案2:根据实施方案1所述的工程化免疫细胞,其中所述受体是T细胞受体。

[0283] 实施方案3:根据实施方案1或2所述的工程化免疫细胞,其中所述受体是天然细胞受体。

[0284] 实施方案4:根据实施方案1或2所述的工程化免疫细胞,其中所述受体是非天然细胞受体。

[0285] 实施方案5:根据实施方案1-4中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述受体是嵌合抗原受体。

[0286] 实施方案6:根据实施方案5所述的工程化免疫细胞,其中所述编码所述抗DOTA C825抗原结合片段的核酸包含用于所述抗DOTA C825抗原结合片段的分泌的前导序列。

[0287] 实施方案7:根据实施方案1-6中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述编码所述抗DOTA C825抗原结合片段的核酸与启动子可操作地连接。

[0288] 实施方案8:根据实施方案7所述的工程化免疫细胞,其中所述启动子是组成型启动子。

[0289] 实施方案9:根据实施方案7所述的工程化免疫细胞,其中所述启动子是条件性启动子。

[0290] 实施方案10:根据实施方案9所述的工程化免疫细胞,其中所述条件性启动子由所述受体与所述靶抗原的结合诱导。

[0291] 实施方案11:根据实施方案1-10中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述靶抗原是肿瘤抗原。

[0292] 实施方案12:根据实施方案1-11中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述编码所述受体的核酸与组成型启动子可操作地连接。

[0293] 实施方案13:根据实施方案5-12中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述嵌合抗原受体包含(i)细胞外抗原结合结构域;(ii)跨膜结构域;以及(iii)细胞内结构域。

[0294] 实施方案14:根据实施方案13所述的工程化免疫细胞,其中所述细胞外抗原结合结构域与所述靶抗原结合。

[0295] 实施方案15:根据实施方案11-14中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述肿瘤抗原选自5T4、α5β1-整合素、707-AP、A33、AFP、ART-4、B7H4、BAGE、Bcl-2、β-连环素、BCMA、Bcr-abl、MN/C IX抗体、CA125、CA19-9、CAMEL、CAP-1、CASP-8、CD4、CD5、CD19、CD20、CD21、CD22、CD25、CDC27/m、CD33、CD37、CD45、CD52、CD56、CD80、CD123、CDK4/m、CEA、c-Met、CS-1、CT、Cyp-B、细胞周期蛋白B1、DAGE、DAM、EBNA、EGFR、ErbB3、ELF2M、EMMPRIN、EpCam、肝配蛋白B2、雌激素受体、ETV6-AML1、FAP、铁蛋白、叶酸结合蛋白、GAGE、G250、GD-2、GM2、GnT-V、gp75、gp100(Pmel 17)、HAGE、HER-2/neu、HLA-A*0201-R170I、HPV E6、HPV E7、Ki-67、HSP70-2M、HST-2、hTERT(或hTRT)、iCE、IGF-1R、IL-2R、IL-5、KIAA0205、LAGE、LDLR/FUT、LRP、MAGE、MART、MART-1/黑色素A、MART-2/Ski、MC1R、间皮素、MUC、MUC16、MUM-1-B、myc、MUM-2、MUM-3、NA88-A、NYESO-1、NY-Eso-B、p53、蛋白酶-3、p190小bcr-abl、Pml/RARα、PRAME、孕酮受体、PSA、PSCA、PSM、PSMA、ras、RAGE、RU1或RU2、RORI、SART-1或SART-3、存活蛋白、TEL/AML1、TGFβ、TPI/m、TRP-1、TRP-2、TRP-2/INT2、生腱蛋白、TSTA酪氨酸酶、VEGF和WT1。

[0296] 实施方案16:根据实施方案13-15中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述细胞外抗原结合结构域包含单链可变片段(scFv)。

[0297] 实施方案17:根据实施方案13-16中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述细胞外抗原结合结构域包含人scFv。

[0298] 实施方案18:根据实施方案13-17中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述细胞外抗原结合结构域包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4的CD19 scFv。

[0299] 实施方案19:根据实施方案13-18中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述细胞外抗原结合结构域包含与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的CD19 scFv。

[0300] 实施方案20:根据实施方案13-19中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述细胞外抗原结合结构域包含与所述细胞外抗原结合结构域的N端共价连接的信号肽。

[0301] 实施方案21:根据实施方案13-20中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述跨膜结构域包含CD8跨膜结构域。

[0302] 实施方案22:根据实施方案13-21中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述细胞内结构域包含一个或多个共刺激结构域。

[0303] 实施方案23:根据实施方案22所述的工程化免疫细胞,其中所述一个或多个共刺激结构域选自CD28共刺激结构域、CD3ζ链、4-1BBL共刺激结构域或其任何组合。

[0304] 实施方案24:根据实施方案1-23中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述工程化免疫细胞是淋巴细胞。

[0305] 实施方案25:根据实施方案24所述的工程化免疫细胞,其中所述淋巴细胞是T细胞、B细胞或自然杀伤(NK)细胞。

[0306] 实施方案26:根据实施方案25所述的工程化免疫细胞,其中所述T细胞是CD4+T细胞或CD8+T细胞。

[0307] 实施方案27:根据实施方案1-26中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述工程化免疫细胞是肿瘤浸润淋巴细胞。

[0308] 实施方案28:根据实施方案1-27中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述工程化免疫细胞源自自体供体或同种异体供体。

[0309] 实施方案29:一种多肽,所述多肽包含嵌合抗原受体以及包含SEQ ID NO:35-39、41或42中任一个的氨基酸序列的抗DOTA C825抗原结合片段。

[0310] 实施方案30:根据实施方案29所述的多肽,所述多肽还包含位于所述抗DOTA C825抗原结合片段与所述嵌合抗原受体之间的自切割肽。

[0311] 实施方案31:根据实施方案30所述的多肽,其中所述自切割肽是P2A自切割肽。

[0312] 实施方案32:根据实施方案29-31中任一项所述的多肽,其中所述抗DOTA C825抗原结合片段包含用于所述抗DOTA C825抗原结合片段的分泌的前导序列。

[0313] 实施方案33:根据实施方案29-32中任一项所述的多肽,其中所述嵌合抗原受体包含(i)细胞外抗原结合结构域;(ii)跨膜结构域;以及(iii)细胞内结构域。

[0314] 实施方案34:根据实施方案33所述的多肽,其中所述细胞外抗原结合结构域与肿瘤抗原结合。

[0315] 实施方案35:根据实施方案34所述的多肽,其中所述肿瘤抗原选自MUC16、间皮素、CD19、WT1、PSCA和BCMA。

[0316] 实施方案36:根据实施方案33-35中任一项所述的多肽,其中所述细胞外抗原结合结构域包含单链可变片段(scFv)。

[0317] 实施方案37:根据实施方案33-36中任一项所述的多肽,其中所述细胞外抗原结合结构域包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4的CD19 scFv。

[0318] 实施方案38:根据实施方案33-37中任一项所述的多肽,其中所述细胞外抗原结合

结构域包含与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4具有至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％序列同一性的CD19 scFv。

[0319] 实施方案39:根据实施方案33-38中任一项所述的多肽,其中所述跨膜结构域包含CD8跨膜结构域。

[0320] 实施方案40:根据实施方案33-39中任一项所述的多肽,其中所述细胞内结构域包含一个或多个共刺激结构域。

[0321] 实施方案41:根据实施方案40所述的多肽,其中所述一个或多个共刺激结构域选自CD28共刺激结构域、CD3ζ链、4-1BBL共刺激结构域或其任何组合。

[0322] 实施方案42:一种编码根据实施方案29-41中任一项所述的多肽的核酸。

[0323] 实施方案43:根据实施方案42所述的核酸,其中所述编码所述多肽的核酸与启动子可操作地连接。

[0324] 实施方案44:根据实施方案43所述的核酸,其中所述启动子是组成型启动子。

[0325] 实施方案45:根据实施方案43所述的核酸,其中所述启动子是条件性启动子。

[0326] 实施方案46:根据实施方案45所述的核酸,其中所述条件性启动子是由所述嵌合抗原受体与抗原结合可诱导的。

[0327] 实施方案47:一种载体,所述载体包含根据实施方案42-46中任一项所述的核酸。

[0328] 实施方案48:根据实施方案47所述的载体,其中所述载体是病毒载体或质粒。

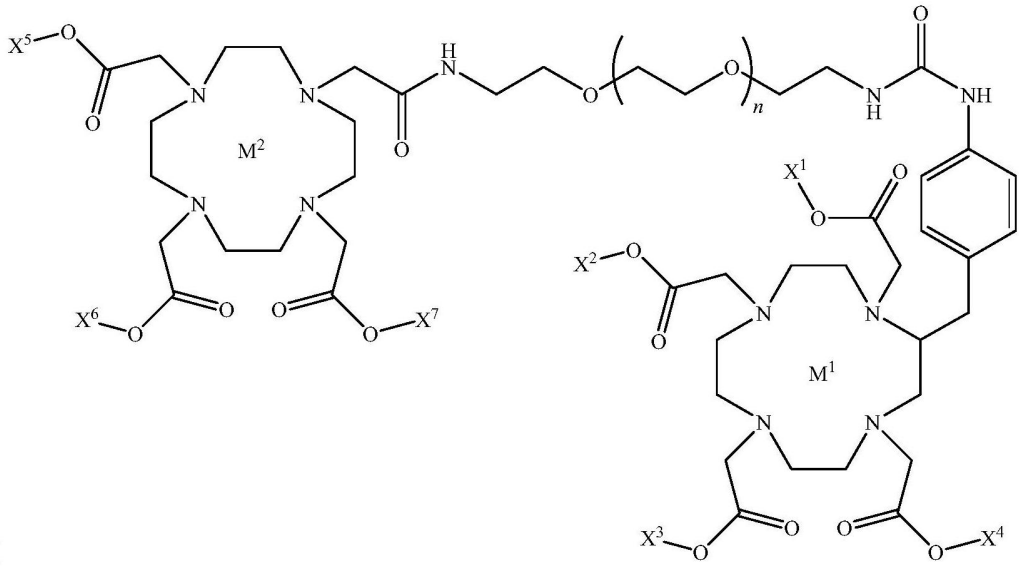
[0329] 实施方案49:根据实施方案47所述的载体,其中所述载体是逆转录病毒载体。

[0330] 实施方案50:一种宿主细胞,所述宿主细胞包含根据实施方案42-46中任一项所述的核酸或根据实施方案47-49中任一项所述的载体。

[0331] 实施方案51:一种复合物,所述复合物包含根据实施方案1-28中任一项所述的工程化免疫细胞和DOTA半抗原,其中所述工程化免疫细胞被配置为与所述DOTA半抗原和肿瘤抗原结合。

[0332] 实施方案52:根据实施方案51所述的复合物,其中所述DOTA半抗原是苄基-DOTA、NH2-苄基(Bn)DOTA、DOTA-去铁胺、DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH2、Ac-Lys(HSG)D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH2、DOTA-D-Asp-D-Lys(HSG)-D-Asp-D-Lys(HSG)-NH2、DOTA-D-Glu-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH2、DOTA-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH2、DOTA-D-Ala-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH2、DOTA-D-Phe-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-NH2、Ac-D-Phe-D-Lys(DOTA)-D-Tyr-D-Lys(DOTA)-NH2、Ac-D-Phe-D-Lys(DTPA)-D-Tyr-D-Lys(DTPA)-NH2、Ac-D-Phe-D-Lys(Bz-DTPA)-D-Tyr-D-Lys(Bz-DTPA)-NH2、Ac-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Lys(Tscg-Cys)-NH2、DOTA-D-Phe-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Lys(Tscg-Cys)-NH2、(Tscg-Cys)-D-Phe-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Lys(DOTA)-NH2、Tscg-D-Cys-D-Glu-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH2、(Tscg-Cys)-D-Glu-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH2、Ac-D-Cys-D-Lys(DOTA)-D-Tyr-D-Ala-D-Lys(DOTA)-D-Cys-NH2、Ac-D-Cys-D-Lys(DTPA)-D-Tyr-D-Lys(DTPA)-NH2、Ac-D-Lys(DTPA)-D-Tyr-D-Lys(DTPA)-D-Lys(Tscg-Cys)-NH2、Ac-D-Lys(DOTA)-D-Tyr-D-Lys(DOTA)-D-Lys(Tscg-Cys)-NH2、DOTA-RGD、DOTA-PEG-E(c(RGDyK))2、DOTA-8-AOC-BBN、DOTA-PESIN、p-NO2-苄基-DOTA、DOTA-生物素-肌氨酸(DOTA-生物素)、1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸单(N-羟基琥珀酰亚胺酯)(DOTA-NHS)或DOTATyrLysDOTA。

[0333] 实施方案53:根据实施方案51所述的复合物,其中所述DOTA半抗原具有式



或其药学上可接受的盐的结构,其中M^1是$^{175}Lu^{3+}$、$^{45}Sc^{3+}$、$^{69}Ga^{3+}$、$^{71}Ga^{3+}$、$^{89}Y^{3+}$、$^{113}In^{3+}$、$^{115}In^{3+}$、$^{139}La^{3+}$、$^{136}Ce^{3+}$、$^{138}Ce^{3+}$、$^{140}Ce^{3+}$、$^{142}Ce^{3+}$、$^{151}Eu^{3+}$、$^{153}Eu^{3+}$、$^{159}Tb^{3+}$、$^{154}Gd^{3+}$、$^{155}Gd^{3+}$、$^{156}Gd^{3+}$、$^{157}Gd^{3+}$、$^{158}Gd^{3+}$或$^{160}Gd^{3+}$;M^2是放射性核素阳离子;X^1、X^2、X^3和X^4各自独立地是孤对电子(即提供氧阴离子)或H;X^5、X^6和X^7各自独立地是孤对电子(即提供氧阴离子)或H;并且n是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或22。

II (II)

[0334] 实施方案54:根据实施方案51-53中任一项所述的复合物,其中M^2是^{111}In、^{67}Ga、^{51}Cr、^{58}Co、^{99m}Tc、^{103m}Rh、^{195m}Pt、^{119}Sb、^{161}Ho、^{189m}Os、^{192}Ir、^{201}Tl、^{203}Pb、^{89}Zr、^{68}Ga或^{64}Cu。

[0335] 实施方案55:一种用于检测有需要的受试者中的肿瘤的方法,所述方法包括(a)向所述受试者施用有效量的根据实施方案54所述的复合物,其中所述复合物被配置为定位于表达由所述复合物的工程化免疫细胞识别的肿瘤抗原的肿瘤;以及(b)通过检测由所述复合物发射的高于参考值的放射性水平来检测所述受试者中肿瘤的存在。

[0336] 实施方案56:一种用于检测有需要的受试者中的肿瘤的方法,所述方法包括(a)向所述受试者施用有效量的根据实施方案11-28中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述工程化免疫细胞被配置为定位于表达由所述工程化免疫细胞识别的肿瘤抗原的肿瘤;(b)向所述受试者施用有效量的放射性标记的DOTA半抗原,其中所述放射性标记的DOTA半抗原被配置为与所述工程化免疫细胞表达的抗DOTA C825抗原结合片段结合;以及(c)通过检测由所述放射性标记的DOTA半抗原发射的高于参考值的放射性水平来检测所述受试者中肿瘤的存在。

[0337] 实施方案57:根据实施方案55或56所述的方法,其中使用正电子发射断层成像或单光子发射计算机断层成像来检测由所述复合物或所述放射性标记的DOTA半抗原发射的放射性水平。

[0338] 实施方案58:根据实施方案55-57中任一项所述的方法,其中在施用所述复合物或所述放射性标记的DOTA半抗原后4至24小时之间检测由所述复合物或所述放射性标记的DOTA半抗原发射的放射性水平。

[0339] 实施方案59:根据实施方案55-58中任一项所述的方法,其中由所述复合物或所述放射性标记的DOTA半抗原发射的放射性水平表示为每克组织的注射剂量百分比(%ID/g)。

[0340] 实施方案60:根据实施方案55-59中任一项所述的方法,其中肿瘤与正常组织之间的放射性水平的比率为约2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、15:1、20:1、25:1、30:1、35:1、40:1、45:1、50:1、55:1、60:1、65:1、70:1、75:1、80:1、85:1、90:1、95:1或100:1。

[0341] 实施方案61:根据实施方案55-60中任一项所述的方法,其中所述受试者被诊断为患有或疑似患有癌症。

[0342] 实施方案62:根据实施方案61所述的方法,其中所述癌症选自肾上腺癌、膀胱癌、血液癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、上皮癌、子宫颈癌、结肠癌、结直肠癌、子宫体癌、耳鼻喉(ENT)癌、子宫内膜癌、食管癌、胃肠道癌、头颈癌、霍奇金病、肠癌、肾癌、喉癌、白血病、肝癌、淋巴结癌、淋巴瘤、肺癌、黑色素瘤、间皮瘤、骨髓瘤、鼻咽癌、神经母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、口腔癌、卵巢癌、胰腺癌、阴茎癌、咽癌、前列腺癌、直肠癌、肉瘤、精原细胞瘤、皮肤癌、胃癌、畸胎瘤、睾丸癌、甲状腺癌、子宫癌、阴道癌、血管肿瘤、及其转移。

[0343] 实施方案63:根据实施方案55-62中任一项所述的方法,其中静脉内、肿瘤内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眼眶内、真皮内、腹膜内、经气管、皮下、脑室内、口服或鼻内施用所述复合物、所述工程化免疫细胞或所述放射性标记的DOTA半抗原。

[0344] 实施方案64:根据实施方案55-63中任一项所述的方法,其中将所述复合物、所述工程化免疫细胞或所述放射性标记的DOTA半抗原施用于所述受试者的脑脊液或血液中。

[0345] 实施方案65:一种用于监测受试者中的工程化免疫细胞的生物分布的方法,所述方法包括:(a)向所述受试者施用有效量的根据实施方案1-28中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述工程化免疫细胞被配置为定位于表达由所述工程化免疫细胞识别的靶抗原的组织;(b)向所述受试者施用有效量的放射性标记的DOTA半抗原,其中所述放射性标记的DOTA半抗原被配置为与所述工程化免疫细胞表达的抗DOTA C825抗原结合片段结合;以及(c)通过检测由所述放射性标记的DOTA半抗原发射的高于参考值的放射性水平来确定所述受试者中工程化免疫细胞的生物分布。

[0346] 实施方案66:一种用于监测受试者中的工程化免疫细胞的生物分布的方法,所述方法包括:(a)向所述受试者施用有效量的复合物,所述复合物包含根据实施方案1-28中任一项所述的工程化免疫细胞和放射性标记的DOTA半抗原,其中所述复合物被配置为定位于表达由所述工程化免疫细胞识别的靶抗原的组织;以及(b)通过检测由所述放射性标记的DOTA半抗原发射的高于参考值的放射性水平来确定所述受试者中工程化免疫细胞的生物分布。

[0347] 实施方案67:一种用于监测受试者中的工程化免疫细胞的活力的方法,所述方法包括:(a)向所述受试者施用有效量的根据实施方案1-28中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述工程化免疫细胞被配置为定位于表达由所述工程化免疫细胞识别的靶抗原的组织;(b)向所述受试者施用有效量的放射性标记的DOTA半抗原,其中所述放射性标记的DOTA半抗原被配置为与所述工程化免疫细胞表达的抗DOTA C825抗原结合片段结合;(c)检测由所述放射性标记的DOTA半抗原在第一时间点发射的高于参考值的放射性水平;(d)检测由所述放射性标记的DOTA半抗原在第二时间点发射的高于参考值的放射性水平;以及(e)当由所述放射性标记的DOTA半抗原在所述第二时间点发射的放射性水平与在所述第一时间点观察到的放射性水平可比时,确定所述受试者中的工程化免疫细胞是有活力的。

[0348] 实施方案68:根据实施方案67所述的方法,所述方法还包括在步骤(d)前向所述受

试者施用第二有效量的放射性标记的DOTA半抗原。

[0349] 实施方案69:一种用于监测受试者中的工程化免疫细胞的活力的方法,所述方法包括:(a)向所述受试者施用有效量的复合物,所述复合物包含根据实施方案1-28中任一项所述的工程化免疫细胞以及放射性标记的DOTA半抗原,其中所述复合物被配置为定位于表达由所述工程化免疫细胞识别的靶抗原的组织;(b)检测由所述放射性标记的DOTA半抗原在第一时间点发射的高于参考值的放射性水平;(c)检测由所述放射性标记的DOTA半抗原在第二时间点发射的高于参考值的放射性水平;以及(d)当由所述放射性标记的DOTA半抗原在所述第二时间点发射的放射性水平与在所述第一时间点观察到的放射性水平可比时,确定所述受试者中的工程化免疫细胞是有活力的。

[0350] 实施方案70:一种用于监测受试者中的工程化免疫细胞的扩增的方法,所述方法包括:(a)向所述受试者施用有效量的根据实施方案1-28中任一项所述的工程化免疫细胞,其中所述工程化免疫细胞被配置为定位于表达由所述工程化免疫细胞识别的靶抗原的组织;(b)向所述受试者施用第一有效量的放射性标记的DOTA半抗原,其中所述放射性标记的DOTA半抗原被配置为与所述工程化免疫细胞表达的抗DOTA C825抗原结合片段结合;(c)检测由所述放射性标记的DOTA半抗原在第一时间点发射的高于参考值的放射性水平;(d)在步骤(c)后向所述受试者施用第二有效量的放射性标记的DOTA半抗原;(e)检测由所述放射性标记的DOTA半抗原在第二时间点发射的高于参考值的放射性水平;以及(f)当由所述放射性标记的DOTA半抗原在所述第二时间点发射的放射性水平相对于在所述第一时间点观察到的放射性水平更高时,确定所述受试者中的工程化免疫细胞已扩增。

[0351] 实施方案71:根据实施方案65-70中任一项所述的方法,其中使用正电子发射断层成像或单光子发射计算机断层成像来检测由所述复合物或所述放射性标记的DOTA半抗原发射的放射性水平。

[0352] 实施方案72:根据实施方案65-71中任一项所述的方法,其中静脉内、腹膜内、皮下、肌内或肿瘤内施用所述工程化免疫细胞、所述放射性标记的DOTA半抗原或所述复合物。

[0353] 实施方案73:根据实施方案65-72中任一项所述的方法,其中所述癌症是上皮癌、肉瘤、黑色素瘤或造血系统癌症。

[0354] 实施方案74:根据实施方案65-73中任一项所述的方法,其中所述癌症选自肾上腺癌、膀胱癌、血液癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、上皮癌、子宫颈癌、结肠癌、结直肠癌、子宫体癌、耳鼻喉(ENT)癌、子宫内膜癌、食管癌、胃肠道癌、头颈癌、霍奇金病、肠癌、肾癌、喉癌、白血病、肝癌、淋巴结癌、淋巴瘤、肺癌、黑色素瘤、间皮瘤、骨髓瘤、鼻咽癌、神经母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、口腔癌、卵巢癌、胰腺癌、阴茎癌、咽癌、前列腺癌、直肠癌、肉瘤、精原细胞瘤、皮肤癌、胃癌、畸胎瘤、睾丸癌、甲状腺癌、子宫癌、阴道癌、血管肿瘤、及其转移。

[0355] 实施方案75:一种试剂盒,所述试剂盒包含根据实施方案1-28中任一项所述的工程化免疫细胞以及用于诊断或监测癌症进展的说明书。

等效内容

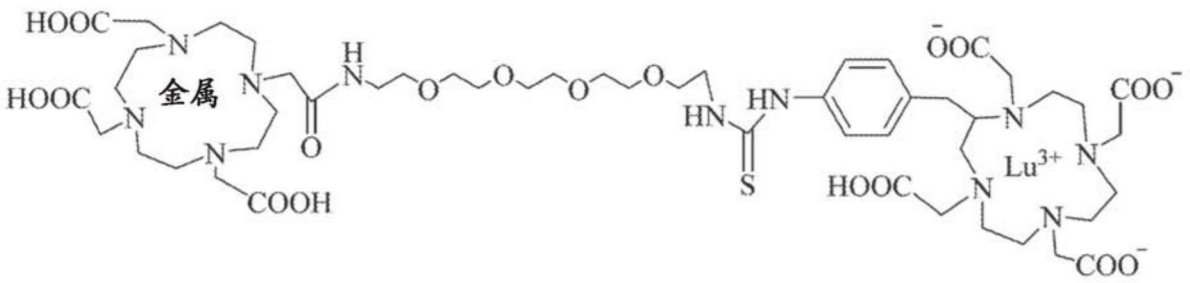
[0356] 本发明技术并非受限于本申请中描述的具体实施方案,所述实施方案旨在作为本发明技术的单独方面的单一说明。如本领域技术人员将清楚的是,可以在不背离本发明技术的精神和范围的情况下,对本发明技术进行许多修改和改变。本领域技术人员根据前述描述将清楚,除了本文列举的方法和设备外,在本发明技术范围内的功能上等效的方法和

设备。此类修改和改变旨在落入本发明技术的范围内。应理解，本发明技术并不限于具体方法、试剂、化合物、组合物或生物系统，它们当然可以改变。还应理解，本文所用的术语仅用于描述具体实施方案的目的，并不旨在是限制性的。

[0357] 另外，在本公开文本的特征或方面按马库什群组(Markush group)来描述的情况下，本领域技术人员将认识到，本公开文本因此也按马库什群组的任何单独成员或成员亚组来描述。

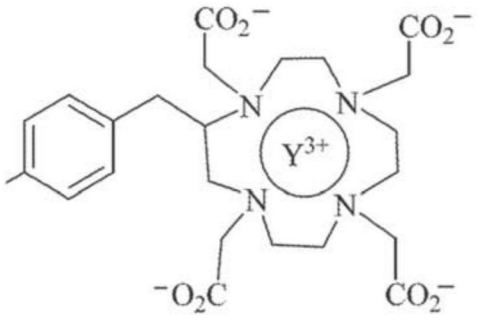
[0358] 如由本领域技术人员将理解，出于任何和所有目的，特别是就提供书面描述而言，本文公开的所有范围还涵盖其任何和所有可能的子范围和子范围的组合。任何所列范围都可容易地识别为充分描述相同范围并且使得相同范围能分解为至少相等的二分之一、三分之一、四分之一、五分之一、十分之一等。作为非限制性例子，本文中论述的每个范围可容易地分解为下三分之一、中三分之一和上三分之一等。同样如本领域技术人员可理解，所有诸如“高达”、“至少”、“大于”、“小于”等言辞都包括所述数字并且涉及随后可分解为如上所述的子范围的范围。最后，如本领域技术人员可理解，范围包括每一个别成员。因此，例如，具有1-3个细胞的组是指具有1、2或3个细胞的组。类似地，具有1-5个细胞的组是指具有1、2、3、4或5个细胞的组等等。

[0359] 本文所提及或引用的所有专利、专利申请、临时申请和出版物都通过引用以其整体而并入，包括所有图形和表格，并入程度使其不会与本说明书的明确传授内容不一致。



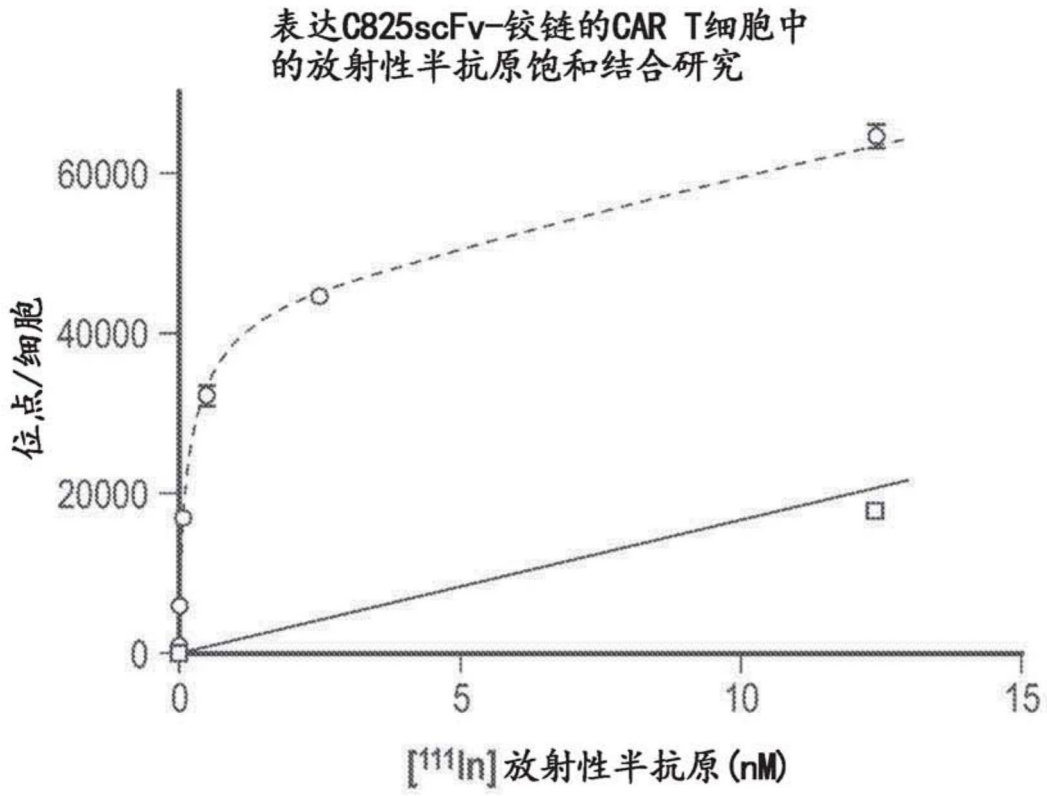
变形杆菌属-Dota

(金属 = ^{111}In 等)



苄基-DOTA

FIG.1



一个位点-总结合和非特异性结合	
最佳拟合值	
Bmax	43547
Kd	0.1704
拟合优度	
自由度	
R平方	0.99

FIG.2A

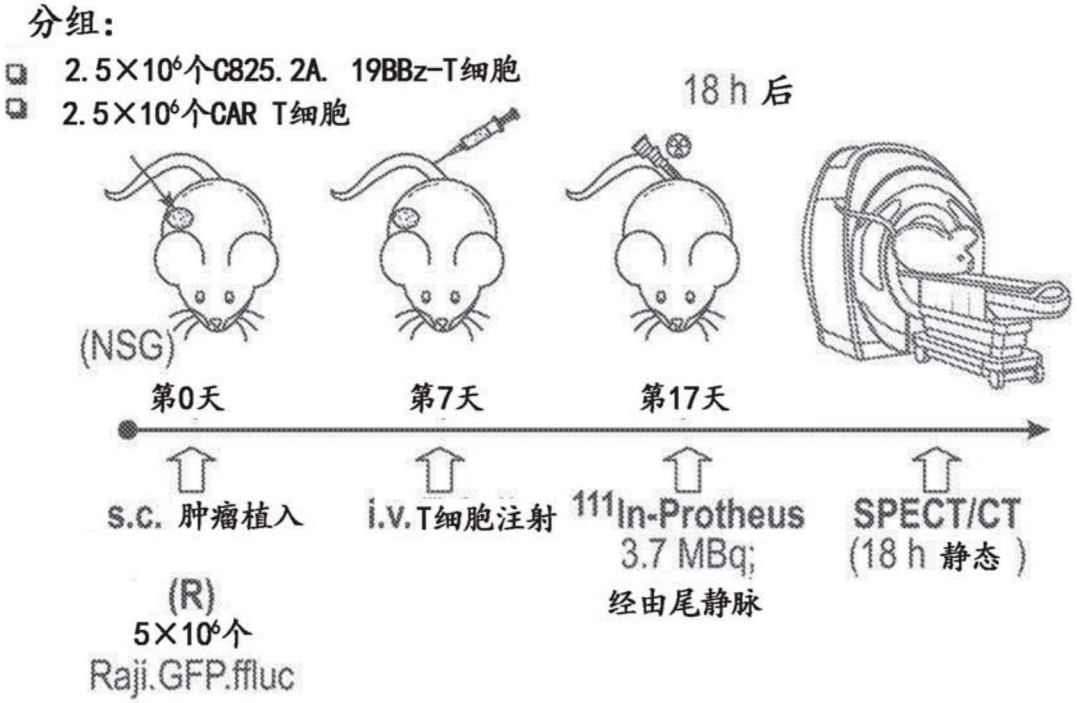

分组：
2.5×10⁶个C825.2A. 19BBz-T细胞
2.5×10⁶个CAR T细胞
18 h 后
(NSG)
第0天
第7天
第17天
s.c. 肿瘤植入
i.v.T细胞注射
¹¹¹In-Protheus
3.7 MBq;
经由尾静脉
SPECT/CT
(18 h 静态)
(R)
5×10⁶个
Raji.GFP.ffluc

FIG.2B

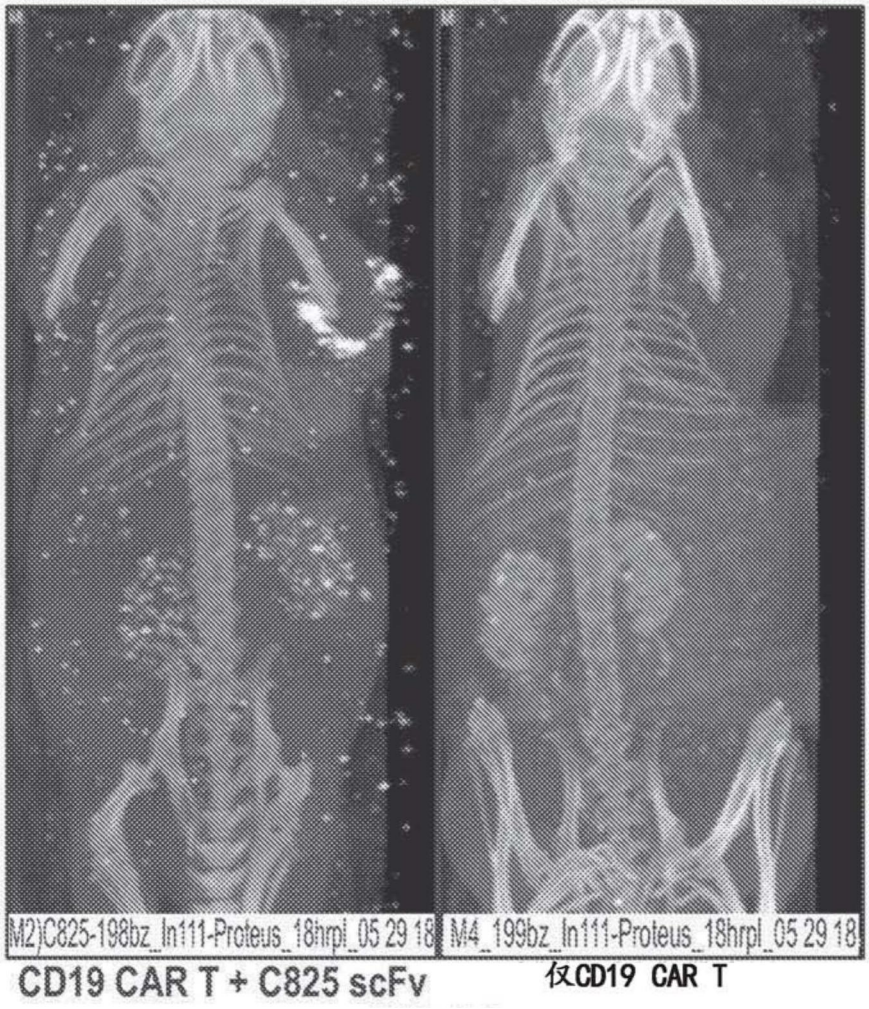

M2)C825-198bz_In111-Proteus_18hrpl_05 29 18
M4_199bz_In111-Proteus_18hrpl_05 29 18
CD19 CAR T + C825 scFv
仅CD19 CAR T

FIG.2C

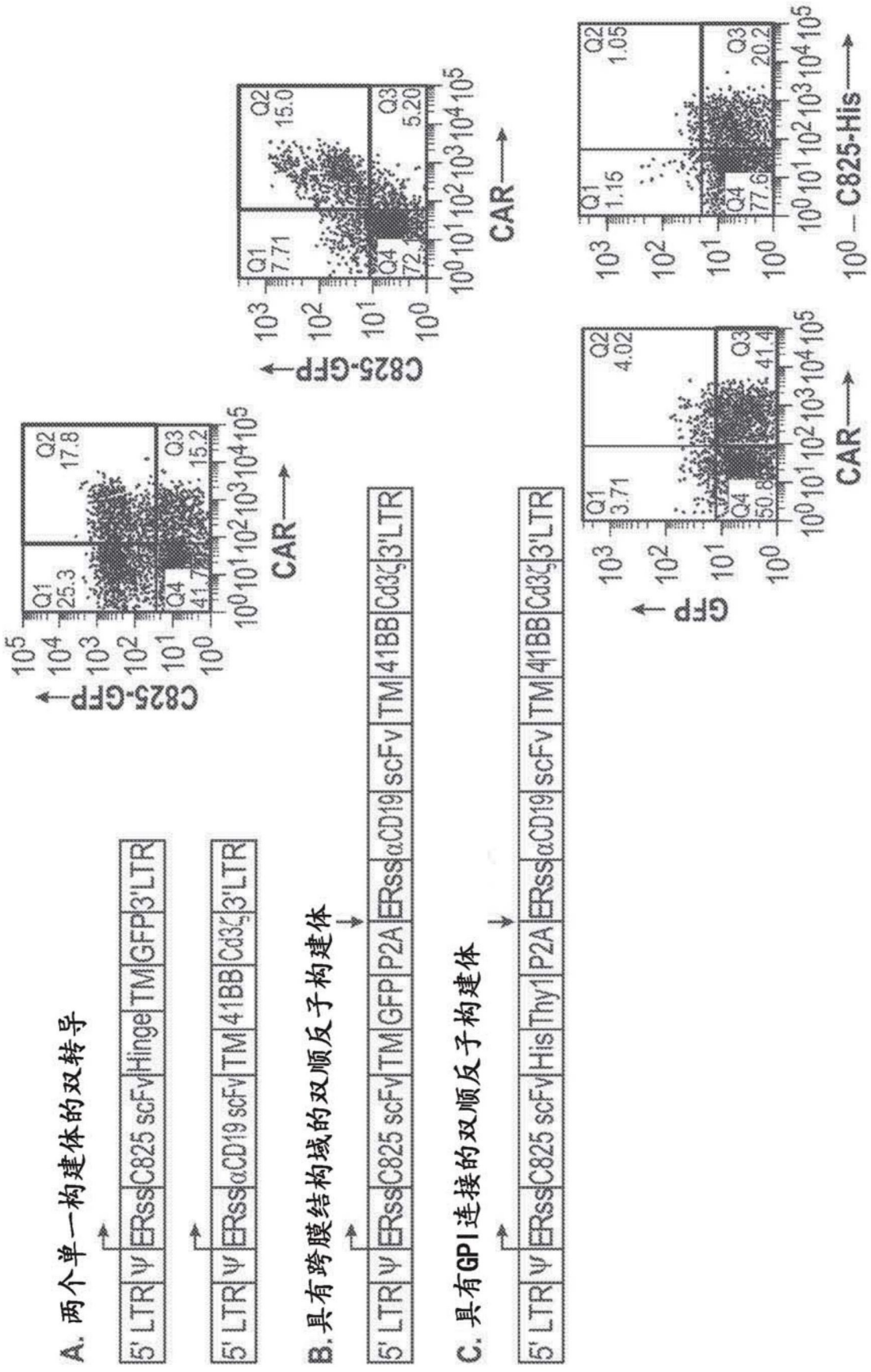

A. 两个单一构建体的双转导
5' LTR Ψ ERss C825 scFv Hinge TM GFP 3'LTR
5' LTR Ψ ERss αCD19 scFv TM 41BB Cd3ζ 3'LTR
B. 具有跨膜结构域的双顺反子构建体
5' LTR Ψ ERss C825 scFv TM GFP P2A ERss αCD19 scFv TM 41BB Cd3ζ 3'LTR
C. 具有GPI连接的双顺反子构建体
5' LTR Ψ ERss C825 scFv His Thy1 P2A ERss αCD19 scFv TM 41BB Cd3ζ 3'LTR
C825-GFP
CAR
Q1 25.3
Q2 17.8
Q4 41.7
Q3 15.2
Q1 7.71
Q2 15.0
Q4 72.1
Q3 5.20
Q1 3.71
Q2 4.02
Q4 50.8
Q3 41.4
Q1 1.15
Q2 1.05
Q4 77.6
Q3 20.2
C825-His

FIG.3

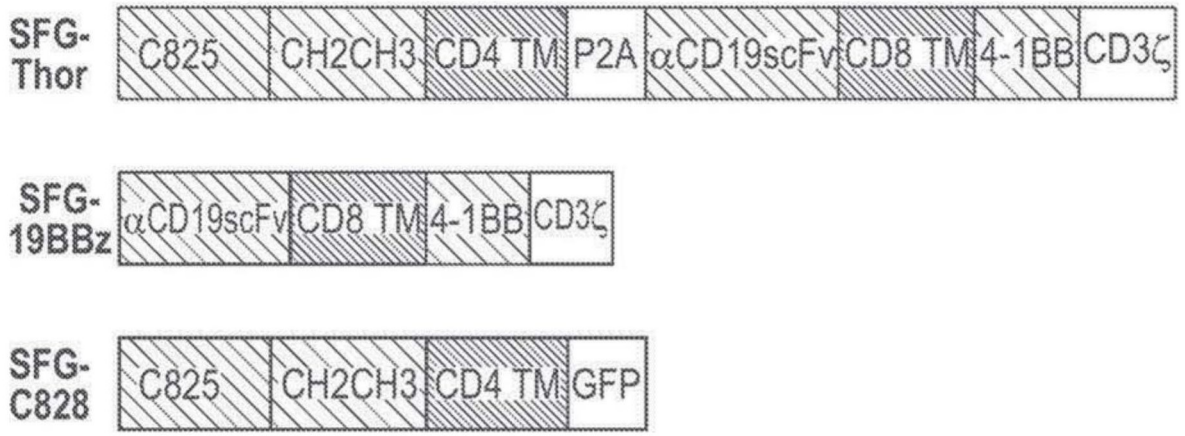

SFG-Thor
C825
CH2CH3
CD4 TM
P2A
αCD19scFv
CD8 TM
4-1BB
CD3ζ
SFG-19BBz
αCD19scFv
CD8 TM
4-1BB
CD3ζ
SFG-C828
C825
CH2CH3
CD4 TM
GFP

FIG.4A

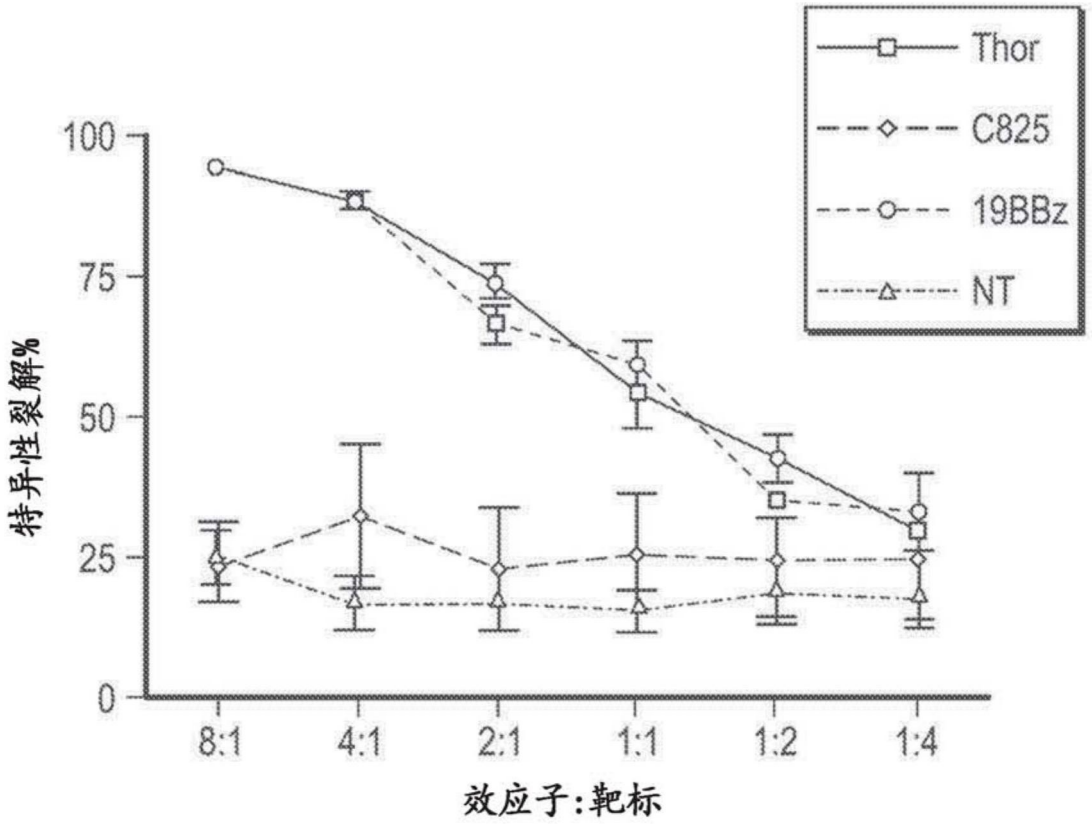

Thor
C825
19BBz
NT
特异性裂解%
100
75
50
25
0
8:1
4:1
2:1
1:1
1:2
1:4
效应子:靶标

FIG.4B

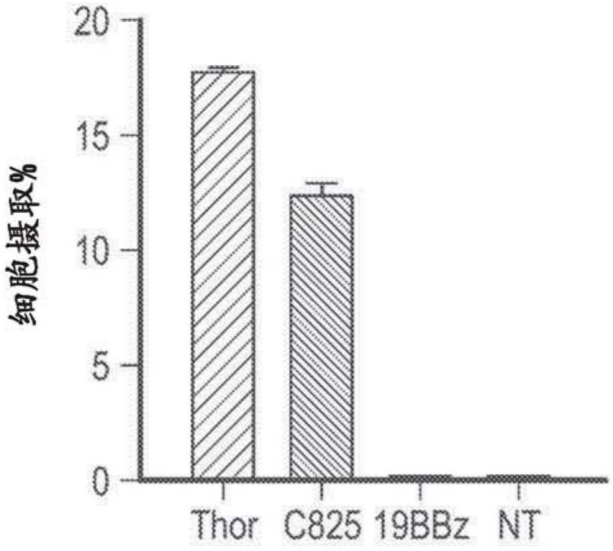

细胞摄取%
20
15
10
5
0
Thor
C825
19BBz
NT

FIG.4C

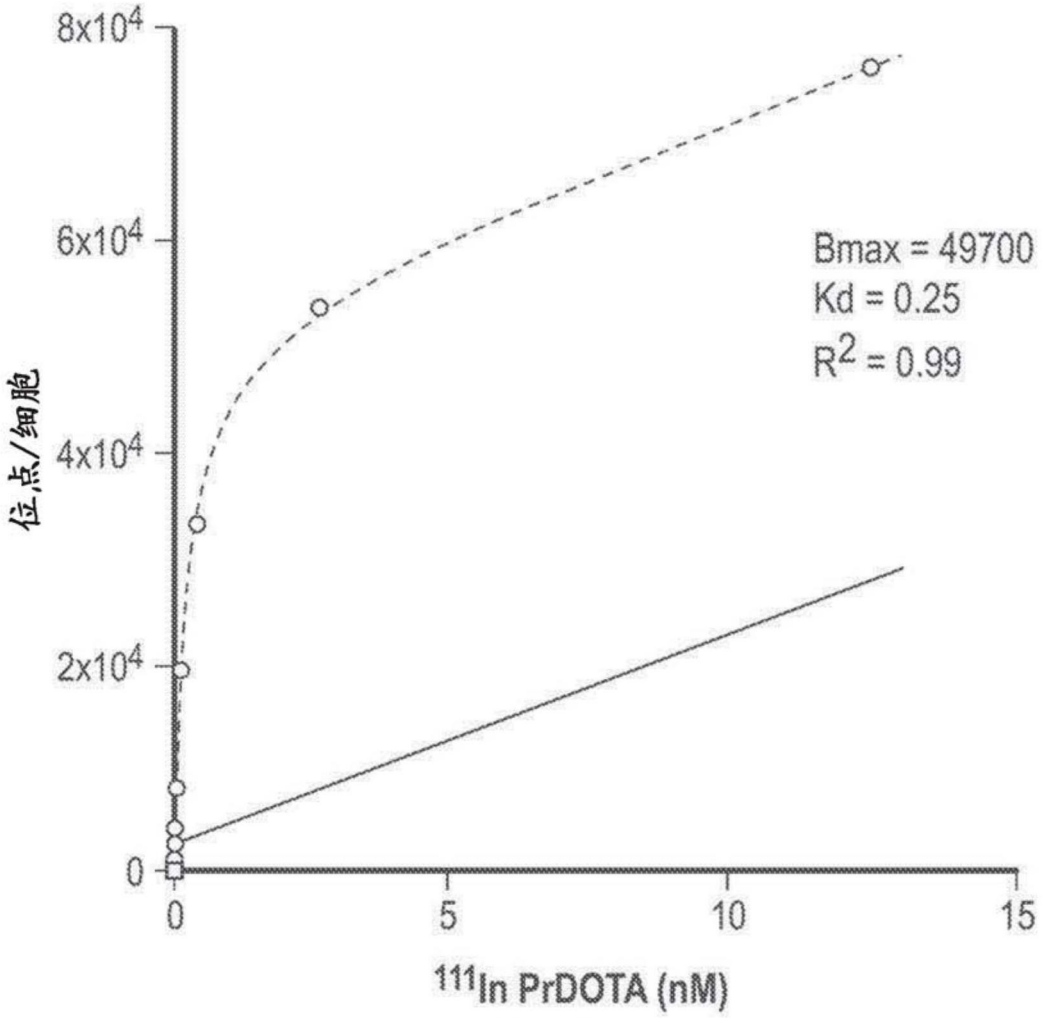

位点/细胞
8x10^4
6x10^4
4x10^4
2x10^4
0
0
5
10
15
111In PrDOTA (nM)
Bmax = 49700
Kd = 0.25
R2 = 0.99

FIG.4D

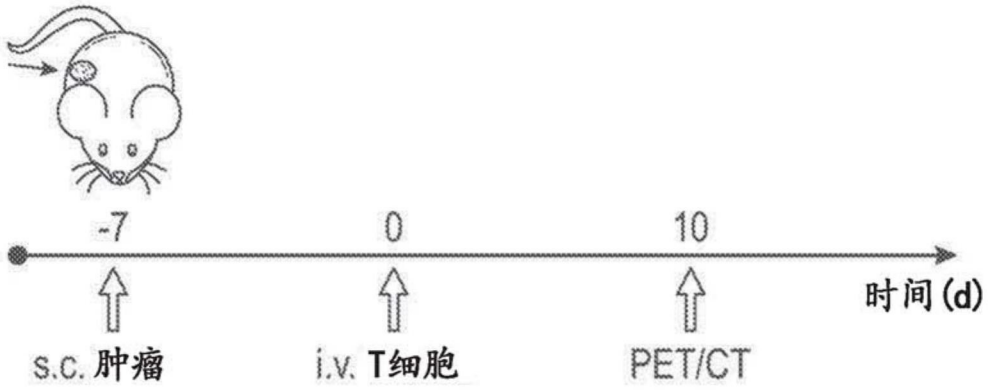


FIG.4E

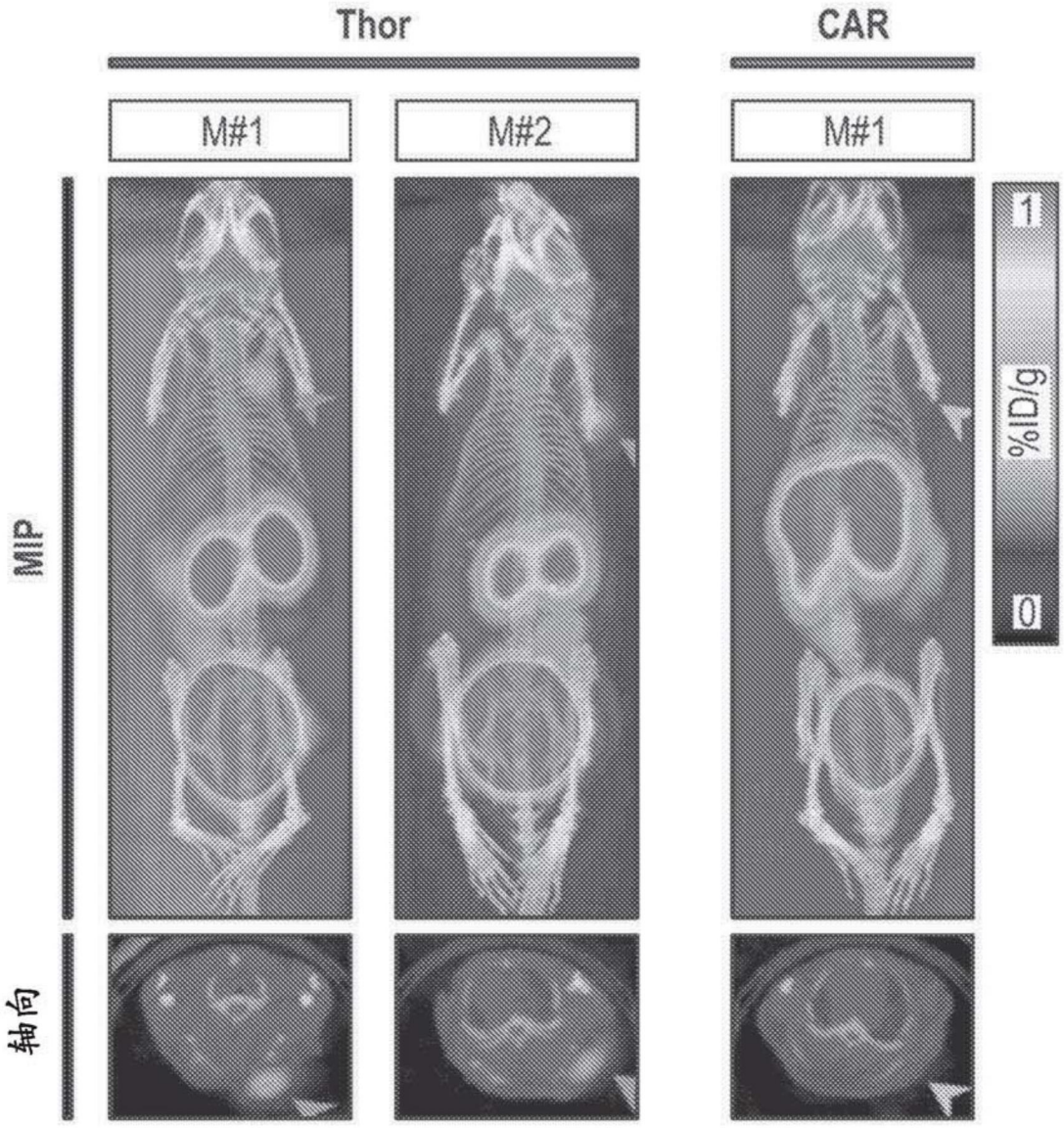


FIG.4F

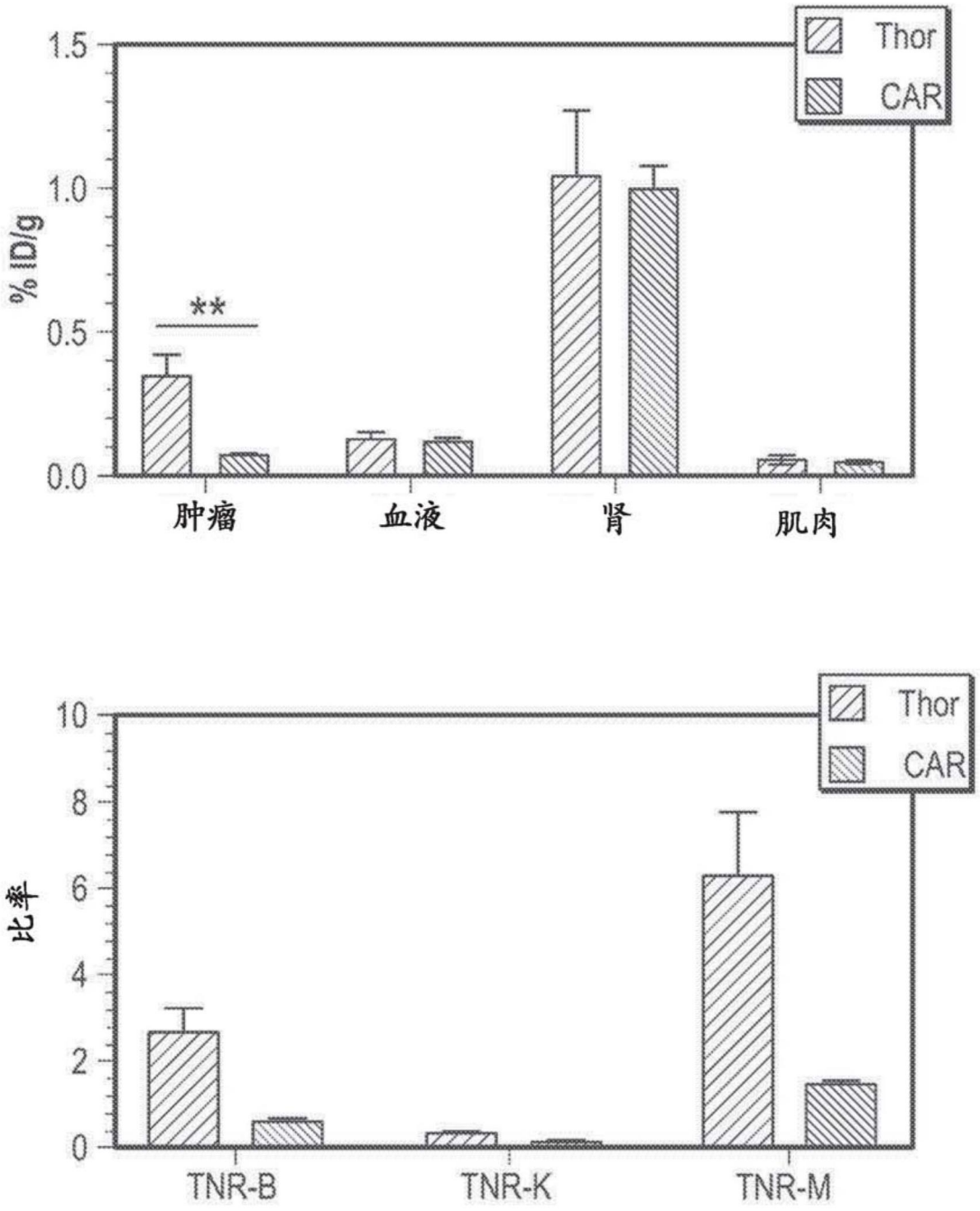

Thor
CAR
1.5
1.0
0.5
0.0
% ID/g
**
肿瘤
血液
肾
肌肉
Thor
CAR
10
8
6
4
2
0
比率
TNR-B
TNR-K
TNR-M

FIG.4G

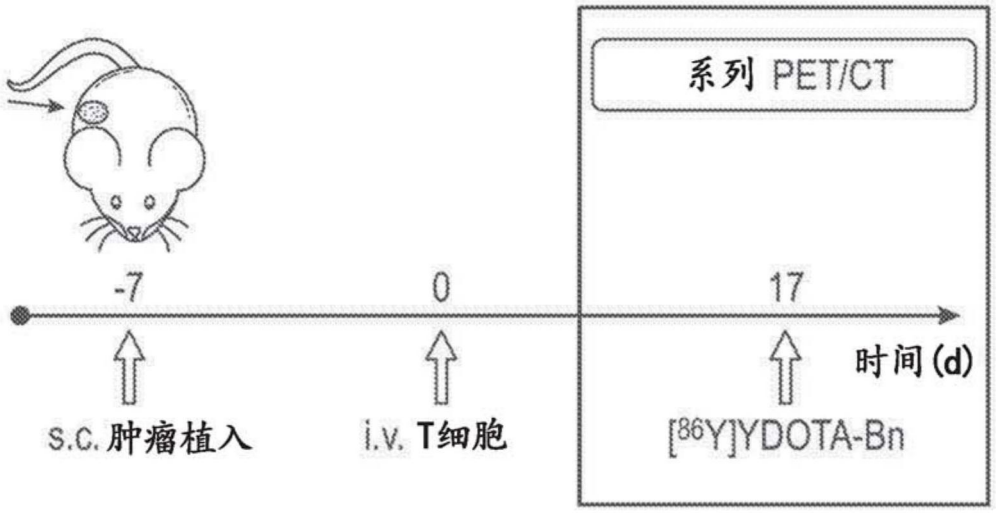

系列 PET/CT
-7
0
17
时间(d)
s.c. 肿瘤植入
i.v. T细胞
[86Y]YDOTA-Bn

FIG.5A

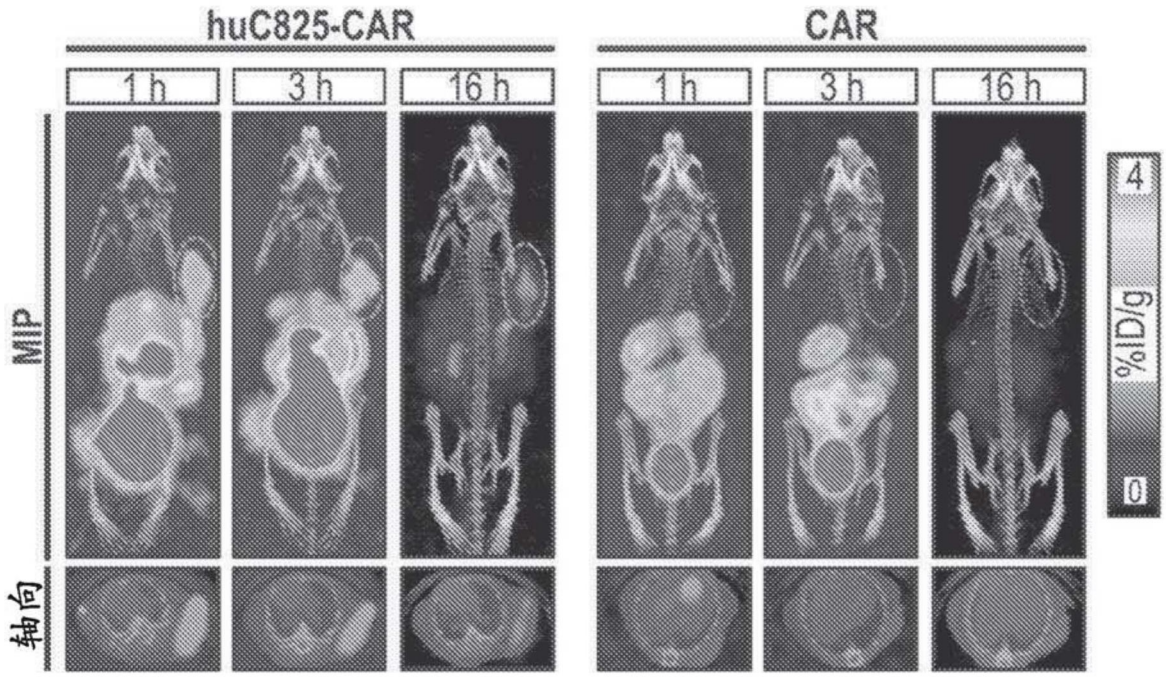

huC825-CAR
CAR
1 h
3 h
16 h
1 h
3 h
16 h
MIP
轴向
4
%ID/g
0

FIG.5B