(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108348620 A
(43)申请公布日 2018.07.31

(21)申请号 201680062620.5

(22)申请日 2016.09.28

(30)优先权数据
62/233,908 2015.09.28 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.04.25

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/054076 2016.09.28

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/058850 EN 2017.04.06

(71)申请人 明尼苏达大学董事会
地址 美国明尼苏达州

(72)发明人 B·R·布拉泽 R·P·弗林 C·A·朋内尔

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100
代理人 陶家蓉 余颖

(51)Int.Cl.
A61K 48/00(2006.01)
C12N 15/00(2006.01)
C07H 21/04(2006.01)

权利要求书2页 说明书9页
序列表2页 附图9页

(54)发明名称

嵌合抗原受体(CAR)T细胞作为获得自体免疫和同种免疫的治疗性干预

(57)摘要

本申请提供治疗自体免疫疾病和同种免疫疾病的方法和物质。特别是,提供了含有治疗有效量的修饰人T细胞群的药物组合物,其中人T细胞经修饰而包含编码嵌合抗原受体(CAR)构建物的核酸序列,其中CAR构建物包含抗原结合结构域,其中抗原结合结构域对自体免疫疾病或同种免疫疾病人患者B细胞、浆细胞或浆母细胞上表达的配体特异性;以及一种治疗人患者自体免疫或同种免疫疾病的方法,该方法包括给予药物组合物。

CN 108348620 A

1.一种治疗人患者自体免疫或同种免疫疾病的方法,所述方法包括:

给予人患者药物组合物,所述药物组合物包含治疗有效量的修饰人T细胞群,所述人T细胞经修饰而包含编码嵌合抗原受体(CAR)构建物的核酸序列,所述CAR构建物包含抗原结合结构域,所述抗原结合结构域对自体免疫疾病或同种免疫疾病人患者B细胞、浆细胞或浆母细胞上表达的配体特异性。

2.如权利要求1所述的方法,所述T细胞与所述人患者自体同源。

3.如权利要求1所述的方法,所述T细胞与所述人患者同种异体。

4.如前述权利要求中任一项所述的方法,所述自体免疫疾病或同种免疫疾病人患者B细胞、浆细胞或浆母细胞上表达的配体选自:CD10、CD19、CD20、CD22、CD24、CD27、CD38、CD45R、CD138、CD319和BCMA。

5.如前述权利要求中任一项所述的方法,所述自体免疫疾病选自:慢性移植物抗宿主疾病(GVHD)、狼疮、关节炎、免疫复合物肾小球肾炎、古德帕斯丘综合征、葡萄膜炎、肝炎、系统性硬化症或硬皮病、I型糖尿病、多发性硬化症、冷凝集素病、寻常型天疱疮、格雷夫斯病、自身免疫性溶血性贫血、血友病A、原发性干燥综合征、血栓性血小板减少性紫癜、视神经脊髓炎、埃文综合征、IgM介导的神经病变、冷球蛋白血症、皮肌炎、特发性血小板减少症、强直性脊柱炎、大疱性类天疱疮、获得性血管性水肿、慢性荨麻疹、抗磷脂脱髓鞘性多神经病、和自体免疫血小板减少症或嗜中性白血球减少症或纯红细胞再生障碍。

6.如前述权利要求中任一项所述的方法,所述同种免疫疾病选自:造血器官或实体器官移植、输血所致同种致敏反应或异源致敏反应,妊娠合并胎儿同种致敏反应,新生儿同种免疫性血小板减少症,新生儿溶血病,外来抗原致敏反应,例如接受酶或蛋白替代治疗的遗传性或获得性缺陷疾病中随替代发生的外来抗原致敏反应。

7.如前述权利要求中任一项所述的方法,所述修饰T细胞在所述人患者体内复制。

8.如前述权利要求中任一项所述的方法,所述修饰T细胞在所述人患者体内形成记忆T细胞,所述记忆T细胞针对表达所述抗原结合结构域所识别配体的B细胞、浆细胞或浆母细胞。

9.如前述权利要求中任一项所述的方法,所述修饰T细胞在所述人患者内持续的时间选自:用药后至少3个月,用药后至少4个月,用药后至少5个月,用药后至少6个月,用药后至少7个月,用药后至少8个月,用药后至少9个月,用药后至少10个月,用药后至少11个月,用药后至少12个月,用药后至少2年和用药后至少3年。

10.如前述权利要求中任一项所述的方法,所述有效量T细胞为约10^4至约10^9细胞/kg人患者体重。

11.如前述权利要求中任一项所述的方法,所述有效量T细胞为约10^5至约10^6细胞/kg人患者体重。

12.如前述权利要求中任一项所述的方法,所述抗原结合结构域为抗体或其抗原结合片段。

13.如权利要求12所述的方法,所述抗原结合片段是Fab或scFv。

14.如前述权利要求中任一项所述的方法,所述修饰T细胞静脉内给予所述人患者。

15.一种嵌合抗原受体(CAR)构建物,所述CAR构建物包含抗原结合结构域、铰链区、跨膜结构域、信号传导结构域、以及可选的共刺激信号传导区,所述抗原结合结构域对自体免

疫疾病或同种免疫疾病人患者B细胞、浆细胞或浆母细胞上表达的配体特异性。

嵌合抗原受体(CAR)T细胞作为获得自体免疫和同种免疫的治疗性干预

[0001] 相关申请的交叉援引

[0002] 本申请据35U.S.C.119(e)要求2015年9月28日申请的62/233,908号美国申请的优先权。

[0003] 获得联邦政府资助的研发

[0004] 本发明得到国立卫生研究院给予的政府资助P01 CA142106。政府对本发明享有一定的权利。

技术领域

[0005] 本文主要涉及免疫学,具体涉及嵌合抗原受体(CAR)T细胞技术。

背景技术

[0006] 目前,自体免疫疾病和同种免疫疾病的治疗方法有限,并且通常仅处理症状而非疾病本身。因此,针对自体免疫疾病和同种免疫疾病的新疗法将大有裨益。

[0007] 发明内容概述

[0008] 一方面,本文提供治疗人患者自体免疫或同种免疫疾病的方法。所述方法主要包括给予人患者药物组合物。如本文所述,所述药物组合物通常包括治疗有效量的修饰人T细胞群,所述人T细胞经修饰而包含编码嵌合抗原受体(CAR)构建物的核酸序列。如本文所述,所述CAR构建物包括抗原结合结构域,该抗原结合结构域对自体免疫疾病或同种免疫疾病人患者B细胞、浆细胞或浆母细胞上表达的配体特异性。

[0009] 某些实施方式中,所述T细胞与所述人患者自体同源。某些实施方式中,所述T细胞与所述人患者同种异体。某些实施方式中,所述自体免疫疾病或同种免疫疾病人患者B细胞、浆细胞或浆母细胞上表达的配体选自:CD10、CD19、CD20、CD22、CD24、CD27、CD38、CD45R、CD138、CD319和BCMA。

[0010] 代表性自体免疫疾病包括但不限于:慢性移植物抗宿主疾病(GVHD)、狼疮、关节炎、免疫复合物肾小球肾炎、古德帕斯丘综合征(Goodpasture)、葡萄膜炎、肝炎、系统性硬化症或硬皮病、I型糖尿病、多发性硬化症、冷凝集素病、寻常型天疱疮、格雷夫斯(Grave's)病、自身免疫性溶血性贫血、血友病A、原发性干燥综合征、血栓性血小板减少性紫癜、视神经脊髓炎、埃文综合征、IgM介导的神经病变、冷球蛋白血症、皮肌炎、特发性血小板减少症、强直性脊柱炎、大疱性类天疱疮、获得性血管性水肿、慢性荨麻疹、抗磷脂脱髓鞘性多神经病、和自体免疫血小板减少症或嗜中性白血球减少症或纯红细胞再生障碍。代表性同种免疫疾病包括但不限于:造血器官或实体器官移植、输血所致同种致敏反应或异源致敏反应,妊娠合并胎儿同种致敏反应,新生儿同种免疫性血小板减少症,新生儿溶血病,外来抗原致敏反应,例如接受酶或蛋白替代治疗、血液制品和基因治疗的遗传性或获得性缺陷疾病中随替代发生的外来抗原致敏反应。

[0011] 某些实施方式中,所述修饰T细胞在所述人患者体内复制。某些实施方式中,所述

修饰T细胞在所述人患者中形成记忆T细胞，所述记忆T细胞针对表达所述抗原结合结构域所识别配体的B细胞、浆细胞或浆母细胞。某些实施方式中，所述修饰T细胞在人患者中持续一段时间(例如：用药后至少3个月，用药后至少4个月，用药后至少5个月，用药后至少6个月，用药后至少7个月，用药后至少8个月，用药后至少9个月，用药后至少10个月，用药后至少11个月，用药后至少12个月，用药后至少2年和用药后至少3年)。

[0012] 某些实施方式中，有效量T细胞为约10^4至约10^9细胞/kg人患者体重(例如，约10^5至约10^6细胞/kg人患者体重)。某些实施方式中，所述修饰T细胞静脉内给予人患者。

[0013] 某些实施方式中，所述抗原结合结构域是抗体或其抗原结合片段。某些实施方式中，抗原结合片段是Fab或scFv。

[0014] 另一方面，本发明提供嵌合抗原受体(CAR)构建物。所述CAR构建物通常包括抗原结合结构域、铰链区、跨膜结构域、信号传导结构域、以及可选的共刺激信号传导区。如本文所述，所述抗原结合结构域对自体免疫疾病或同种免疫疾病人患者B细胞、浆细胞或浆母细胞上表达的配体特异性。

[0015] 除非另作说明，本文中科技术语的意义与本文方法和组合物所述领域普通技术人员通常所理解的相同。虽然后文描述了合适的方法和材料，与之类似或等同的方法和材料皆可用于实施或测试所述方法和组合物。此外，所述材料、方法和举例都仅为说明而非限定。本文提及的出版物、专利申请、专利以及其他参考文献都通过援引全文纳入。

附图说明

[0016] 图1A的散点图显示x轴所示基因型的小鼠外周血内CD45R B细胞的频率。每个符号代表不同的小鼠。“***”表示具有统计学显著性、$p<0.001$的组间差异。

[0017] 图1B的散点图显示x轴所示基因型的小鼠外周血内(m)CD19B细胞的频率。每个符号代表不同的小鼠。“***”表示具有统计学显著性、$p<0.001$的组间差异。

[0018] 图1C的散点图显示据人CD19蛋白表达测定的B细胞频率，与用另一B细胞特异性标志物CD45R和小鼠CD19测定的值一致。每个符号代表不同的小鼠。“***”表示具有统计学显著性、$p<0.001$的组间差异。

[0019] 图1D显示，通过测量中等荧光强度(MFI)来测定人CD19在小鼠B细胞上的表达。每个符号代表不同的小鼠。“***”表示具有统计学显著性、$p<0.001$的组间差异。

[0020] 图2线形图显示以编码人CD19-特异性CAR的构建物逆病毒转导的小鼠T细胞在体外、在合适的培养条件下显著扩增。Y轴显示相对于第1天起始细胞数的5天细胞数扩增倍数。

[0021] 图3A显示特异性裂解百分比，表示仅人CD19+肿瘤靶细胞而非混合了人CD19阴性肿瘤细胞的杀伤率。两种细胞的数量于添加不同数量CART-19细胞后4小时和14小时测定。效应CART-19细胞与人CD19+肿瘤靶细胞之比(E:T比)为0至10。

[0022] 图3B的柱状图显示CART-19细胞在体外没有脱靶细胞毒性。由以下事实为证：含不同数量CART-19细胞的孔内TBL12(人CD19阴性)肿瘤细胞数量相近；TBL12细胞在体外添加CART-19细胞后4小时和14小时进行计数。

[0023] 图4A的照片显示：huCD19TG+/-小鼠中，CAR T-19细胞(绿)清除B细胞(红)。

[0024] 图4B的照片显示：对照huCD19TG+/-小鼠中，CAR T细胞(绿)存在但没有扩增到图

4A中所示的程度，B细胞(红)数量充沛未被清除。

[0025] 图5A的柱状图显示移植后60天测定的机械通气插管小鼠的肺阻力。移植后60天，使用Flexivent系统(Scireq)通过全身体积描记术测量肺功能。全部小鼠接受骨髓移植术。没有补充T细胞的情况下，小鼠没有发生慢性GVHD，将其作为骨髓移植术(BMT)对照。接受BM+T细胞的小鼠被给予补充T细胞来诱导慢性GVHD。第28天，所示各组不接受其他治疗或接受供体T细胞，所述供体T细胞经转导而表达抗CD19 ScFv CAR或绿荧光蛋白(GFP)对照蛋白，如图2体外扩增，然后按照0.3x 10^6CAR-T细胞或GFP-T细胞的剂量体内输注。高阻力提示慢性GVHD被CAR缓解，但GFP T细胞不能。**P≤0.01;****P≤0.0001。

[0026] 图5B的柱状图显示图5A试验中60天后小鼠的肺弹性。慢性GVHD小鼠的高弹性提示丧失的反冲性能被CAR-T细胞恢复，但GFP T细胞不能。**P≤0.01;***P≤0.001。

[0027] 图5C的柱形图显示图5A试验中60天后的肺顺应性。慢性GVHD小鼠的低肺顺应性提示肺硬化被CAR-T细胞修复，但GFP-T细胞不能。**P≤0.01;***P≤0.001;****P≤0.0001。

[0028] 图6的散点图显示hCD19+细胞在移植后4天(来自CD4-淋巴细胞)持续存在于受体小鼠中。

[0029] 图7显示小鼠存活率。

[0030] 图8显示小鼠体重。

[0031] 图9显示移植后的小鼠临床评分。

[0032] 详细说明

[0033] 本文描述了可用于治疗人患者自体免疫疾病或同种免疫疾病的免疫治疗方法。所述方法通常包括给予所述人患者药物组合物，所述药物组合物包含有效量的修饰人T细胞。本文中，修饰T细胞指经修饰而包含嵌合抗原受体(CAR)编码核酸序列的T细胞。所述修饰T细胞常被称为CAR-T细胞。CAR-T细胞之外，可用修饰人T细胞，所述修饰人T细胞指T细胞受体基因经修饰而识别B细胞、浆细胞或浆母细胞上抗原(或肽)的T细胞。

[0034] CAR-T细胞是本领域已知的，通常包含CAR构建物。对B细胞、浆细胞或浆母细胞上各种配体特异性的至少一个抗原结合结构域的编码核酸之外，典型的CAR构建物还包括编码信号肽(例如，scFv轻链的天然信号肽，scFv重链的天然信号肽)、铰链区(例如来自CD8α、CD3或IgG1的)、跨膜结构域(例如来自CD8α、CD3ζ或CD28的)、信号传导结构域(例如来自CD3ζ或CD28的)以及视需要包含的共刺激信号传导结构域(例如来自CD27、CD28或OX40的)的核酸。见，例如美国专利8,822,647和9,328,156。适用于本文所述CAR构建物的抗原结合结构域是适用于治疗自体免疫疾病或同种免疫疾病的那些。

[0035] 制造CAR构建物和CAR-T细胞的方法是本领域已知的。制造CAR构建物的方法通常包括标准重组技术和分子生物学技术。然后，可用已知的转染技术将CAR构建物导入T细胞。或者，可用例如锌指核酸酶(例如美国专利8,956,828)修饰T细胞受体基因。

[0036] 用已知方法将CAR构建物导入T细胞。某些情形中，所述T细胞与所述患者自体同源(来自该患者，用CAR构建物修饰，然后回输给该患者)，但在另一些情形中，所述T细胞与所述患者同种异体(来自相关或非相关个体)。

[0037] 本文所述方法可应用于自体免疫疾病和同种免疫疾病。自体免疫疾病的非限制性举例包括：慢性移植物抗宿主疾病(GVHD)、狼疮、关节炎、免疫复合物肾小球肾炎、古德帕斯丘综合征(Goodpasture)、葡萄膜炎、肝炎、系统性硬化症或硬皮病、I型糖尿病、多发性硬化

症、冷凝集素病、寻常型天疱疮、格雷夫斯(Grave's)病、自身免疫性溶血性贫血、血友病A、原发性干燥综合征、血栓性血小板减少性紫癜、视神经脊髓炎、埃文综合征、IgM介导的神经病变、冷球蛋白血症、皮肌炎、特发性血小板减少症、强直性脊柱炎、大疱性类天疱疮、获得性血管性水肿、慢性荨麻疹、抗磷脂脱髓鞘性多神经病、和自体免疫血小板减少症或嗜中性白血球减少症或纯红细胞再生障碍。同种免疫疾病的非限制性举例包括:造血器官或实体器官移植或输血所致同种致敏反应(见,例如Blazar等,2015,Am.J.Transplant.,15(4):931-41)或异源致敏反应,妊娠合并胎儿同种致敏反应,新生儿同种免疫性血小板减少症,新生儿溶血病,外来抗原致敏反应,例如接受酶或蛋白替代治疗、血制品和基因治疗的遗传性或获得性缺陷疾病中随替代发生的外来抗原致敏反应。

[0038] 对B细胞、浆细胞或浆母细胞上的配体特异性的抗原结合结构域可用于本文所述治疗自体免疫疾病或同种免疫疾病的方法。例如,CAR构建物可包含特异性针对例如CD19、CD20、CD22、CD138、BCMA、CD319、CD10、CD24、CD27、CD38或CD45R等的抗原结合结构域。此外,CAR构建物可包含特异性针对例如自体免疫特异性抗原等的抗原结合结构域。自体免疫特异性抗原包括例如导致系统性红斑狼疮(SLE)、格雷夫斯病、乳糜泻、1型糖尿病、类风湿关节炎(RA)、结节病、肖格伦综合征(Sjögren's syndrome)、多发性肌炎(PM)和皮肌炎(DM)的抗原。见,例如,Ellebrecht等,2016,Science,353:179-84。

[0039] 代表性CAR构建物的核酸序列如SEQ ID NO:1所示。SEQ ID NO:1所述CAR构建物含有一CD19特异性的抗原结合结构域(SEQ ID NO:1的核苷酸(nt)1-810),但本领域技术人员可以看出,表达任意数量抗原结合结构域的CAR构建物均可用于本文所述的方法。例如,Uckun等,2011,Brit.J.Hematol.,153:15-23;美国专利申请US2012/0141505和美国专利US5,484,892、US5,573,924、US6,379,668、US7,744,877、US8,362,211、US9,023,999和US9,034,324记载了一系列抗原结合结构域的序列,均可用于本文所述的组合物(例如CAR构建物)和方法。

[0040] 可以理解,抗原结合结构域可以是例如免疫球蛋白、或T细胞受体(TCR)α或β链的抗原结合结构域,或者,抗原结合结构域可以是抗原结合片段(例如scFv或Fab)。可以理解,CAR构建物可设计成具有组成性或诱导性表达CAR的元件,从而进一步控制CAR-T细胞的治疗能力。

[0041] 本文中,有效量的CAR-T细胞指这样的量:对人患者达到期望的治疗终点(例如,人患者中症状减轻、缓解或消除,自身抗体或同种抗体减少或消除)而无毒性。仅为举例,给予人患者的有效量CAR-T细胞可以是指约10^4至约10^9个CAR-T细胞(例如约10^5至约10^6个CAR-T细胞)/kg人患者体重。可以理解,CAR-T细胞通常静脉内给予人患者。

[0042] 本文中,"治疗"逆转、缓解或抑制自体免疫或同种免疫疾病的进展或自体免疫或同种免疫疾病的一种或多种症状。可以理解的是,确定治疗目的(例如患者是否治愈)是否实现的一个或多个具体的治疗终点取决于该患者是否患自体免疫或同种免疫疾病以及自体免疫或同种免疫疾病的具体类型。此外,许多自体免疫和同种免疫疾病的症状是广泛的,非特异性的和/或弥漫性的,所以,具体的一个或多个治疗终点还取决于具体各患者自体免疫或同种免疫疾病的表现(例如病患组织或器官、疾病的严重性或急慢性或同时存在的一种以上疾病)。仅为举例,Lee等(2015,Biol.Blood Marrow Transplant.,21:984-999)和Jagasia等(2015,Biol.Blood Marrow Transplant.,21:389-401)提供了GVHD的治疗和临

床指南。

[0043] 本领域技术人员知道，修饰T细胞在人患者体内复制提示治疗成功。此外，本领域技术人员知道，人患者体内记忆T细胞的形成也是成功的指标之一。本领域技术人员知道，修饰T细胞在用药后可在人患者中持续存在至少3个月(例如至少4个月、至少5个月、至少6个月、至少7个月、至少8个月、至少9个月、至少10个月、至少11个月、至少12个月、至少2年，或用药后至少3年)。

[0044] 免疫治疗之外，本文所述的方法还可用于研究细胞机制的B细胞区室破坏。例如，可以对化合物进行筛选以鉴定那些能够清除B细胞(例如，T细胞因此接收不到致病的准确信号)或预防或干扰B细胞介导抗体产生所需的B细胞与T细胞之间协同作用的化合物。可筛选的代表性化合物包括但不限于：细胞、药物、小分子、核酸(例如，DNA、RNA(例如，干扰RNA(RNAi)；例如，shRNA或siRNA)、蛋白质、肽和小分子。

[0045] 本发明可能用到传统生物学、微生物学、生物化学和重组DNA技术。这些技术在文献中有广泛的记载。以下通过实施例来进一步说明本发明，这些实施例对于权利要求中所述的方法和组合物没有限定的意义。

实施例

[0046] 实施例1—评价人CD19-特异性CART细胞的目标上/肿瘤外毒性的小鼠模型的优化

[0047] 采用仅在健康B细胞中表达人CD19转基因(huCD19TG)的小鼠。这些细胞应在转入人CD19-特异性CAR T细胞后被杀伤，并且应测定目标上/肿瘤外毒性。这是与人CD19-特异性CAR T细胞人临床试验中所见目标上/肿瘤外毒性最接近的动物模型。

[0048] 第一个决定是采用huCD19TG纯合子(+/+)还是半纯合子(+/-)的小鼠。两个关键标准是huCD19TG表达的B细胞频率和B细胞水平。我们的目标是选择对人的情形模拟最佳的小鼠。huCD19TG小鼠的基础背景是C57BL/6。后文的实验描述了如何测定B细胞频率和huCD19TG表达水平。

[0049] 面部静脉穿刺采血，每只小鼠75-200μl。从野生型($huCD19TG^{-/-}$)、半纯合子($huCD19TG^{+/-}$)和纯合子($CD19^{+/+}$)小鼠采血，采集在含抗凝剂肝素的1.5ml Eppendorf管中。将对B细胞特异性蛋白特异性的荧光标记抗体加入每鼠75μl血样中。抗体的特异性为小鼠CD19(B细胞特异性标志)、人CD19(转基因所编码)和小鼠CD45R(B细胞特异性标志)。血样于室温避光孵育15-30分钟。用1X ACK裂解缓冲液裂解红血细胞。留下的白血细胞在FACS缓冲液内清洗两次。

[0050] 用流式细胞术分析各样本，测定淋巴细胞群中的B细胞频率。为此，根据其特征性前向散射(FSC)和侧向散射(SSC)光特性选择淋巴细胞。前向散射测定大小，侧散射测量细胞内复杂性。表达小鼠CD19、人CD19和小鼠CD45R的淋巴细胞频率通过将淋巴细胞门中的抗体结合细胞除以淋巴细胞门中的细胞总数来测定。

[0051] 图1A、1B和1C中的数据以散点图呈现，其中，y轴显示抗体结合性淋巴细胞的频率，x轴显示淋巴细胞来源。图1D中的数据显示$huCD19TG^{+/+}$和$huCD19TG^{+/-}$小鼠外周血B细胞上的人CD19蛋白表达相对水平。MFI即中等荧光强度的缩写，是特异性抗体结合的直接量度，因此是由抗体检测的蛋白质细胞表面量的间接量度(此处人CD19)。

[0052] 野生型(-/-)、huCD19半纯合子(+/-)和huCD19纯合子(+/+)小鼠外周血淋巴细胞

中的平均B细胞频率分别为43％、26％和10％。用小鼠CD45R或小鼠CD19鉴定外周血B细胞时，频率均如上所述。用人CD19鉴定huCD19TG$^{+/+}$和huCD19TG$^{+/-}$小鼠外周B细胞，频率如上所述。需要说明的是，野生型小鼠(huCD19TG$^{-/-}$)不表达人CD19蛋白，因此没有可用抗人CD19抗体测得的淋巴细胞。huCD19TG半纯合子(+/-)小鼠外周血B细胞的人CD19表达水平约为huCD19TG纯合子(+/+)小鼠外周血B细胞的一半。与此表达水平关联的是，纯合子基因组内的huCD19TG拷贝数是半纯合子huCD19TG小鼠的两倍。

[0053] 基于图1数据，决定采用huCD19TG半纯合子(+/-)小鼠而非huCD19TG纯合子(+/+)小鼠作为过继转移人CD19-特异性CAR T细胞的接受者，因为半纯合子小鼠的外周血B细胞频率更接近正常非转基因小鼠的外周血B细胞频率。肿瘤治疗实验中，可将肿瘤上的人CD19表达水平匹配huCD19TG半纯合子(+/-)外周血B细胞上的水平，以更好地模拟人的情形。

[0054] 实施例2—含编码人CD19-特异性嵌合抗原受体(CAR)的逆病毒感染原代小鼠淋巴细胞和这些细胞的体外扩增

[0055] 临床实验中曾用的CAR构建物、hCD19CAR得自Michael Jensen博士(University of Washington,Seattle)。见，例如SEQ ID NO:1，含有CD19RscFv部分(SEQ ID NO:1的nt 1-810)，IgG4铰链部分(SEQ ID NO:1的nt 811-846)，CD28tm部分(SEQ ID NO:1的nt 847-930)，4-1BB部分(SEQ ID NO:1的nt 931-1056)，ζ部分(SEQ ID NO:1的nt 1057-1392)，T2A部分(SEQ ID NO:1的nt 1393-1464)和EGFRt部分(SEQ ID NO:1的nt 1465-2538)。对一种已公开的扩增小鼠T细胞并用逆病毒感染的方法进行如下所述的修改。

[0056] 逆病毒转导之前的T细胞富集

[0057] 用磁珠从小鼠脾细胞负向富集常规CD3+α/βT细胞。脾细胞单细胞悬液与生物素化的髓系细胞(CD11b、CD11c)、B细胞(CD19、CD45R)、NK细胞(NK1)、γ/δT细胞和调节性T细胞(CD25)特异性抗体一起孵育。加入与链霉亲和素缀合的铁粒子。被生物素化抗体特异性结合的细胞于是包裹铁离子。将含有细胞/铁粒子的试管置于强磁场中，由此去除非结合细胞。“负向富集”的细胞含91-95％CD3$^+$ T细胞。遵循内部实验室方案扩增并感染小鼠T细胞(见下文)。

[0058] T细胞扩增/逆病毒转导

[0059] 计算珠:细胞之比2:1所需的微珠量(Gibco,Life Technologies的Dynabeads小鼠T激活剂CD3/CD28)。在FACS中或15mL试管中，将微珠稀释在～3mL PBS+2％FCS中洗珠。将悬浮微珠置于MPC-50磁体内，让微珠在管壁上汇集1分钟。用PBS+2％FCS溶液抽吸样品，并将管从磁体中取出。将微珠重悬于新鲜的PBS+2％FCS4，再洗两次。最后一次洗涤之后，将微珠重悬于1mL完全RPMI(DMEM)。将洗涤、重悬的微珠加入T细胞，确保最后的细胞浓度为2x 10^6细胞/mL，微珠与细胞之比为2:1。在细胞溶液内补充100IU/mL rHuman IL-2。向组织培养物处理的24孔板的各孔加入2mL细胞溶液。细胞于37℃、5％CO_2孵育48小时。

[0060] 为了制备离心病毒接种(spinoculation)#1(第0天)，用PBS中的100μg/mL RetroNectin包被24孔组织培养板。样本室温孵育3小时，或4℃孵育过夜过夜。

[0061] 如下所述，用离心病毒接种#1(第1天)所得上清液进行鼠T细胞转导。吸取一定体积各情况的样本合并在适当大小的Falcon管中，计数-1日的T细胞数。将细胞低速离心(例如1200rpm 10分钟)，然后以2x 10^6细胞/mL的浓度重悬于添加了100IU rHuman IL-2的完全RPMI(DMEM)。离心病毒接种之前，从RetroNectin包被的平板吸去RN/PBS溶液。各孔再用

1mL PBS洗涤和抽吸一次。向各孔加入1mL事先新鲜制备或重融的病毒上清液(或稀释液)。加入病毒上清液后立即加入1mL T细胞。每孔含总体积2mL的2x 10^6T细胞和病毒上清液。这个或这些板立即2,000g(2960rpm)、30℃离心1小时(第一离心病毒接种)。细胞于37℃、5%CO_2孵育过夜。

[0062] 为了离心病毒接种#2(第2天),吸取各孔中的培养基,注意不要扰动孔底的T细胞。取出的培养基的量等于第1天加入的病毒的量。各孔补入1mL新鲜或重融的病毒上清液(或稀释液)。培养板2,000g(2960rpm)、30℃离心1小时(第二离心病毒接种)。细胞于37℃、5%CO_2孵育过夜。

[0063] 第3天,从各孔取0.5-1mL培养基,补入0.5-1mL新鲜的完全RPMI(DMEM)培养基(其中添加了100IU rHuman IL-2),第4-7天,每日或隔日计数T细胞,将T细胞浓度维持在1-2x 10^6细胞/mL,实现最佳扩增和活力。每种情况保留1-2孔用于计数而不进行最后的ACT。第5天,通过FACS分析T细胞转导效率。以适当方式收获细胞进行功能试验。第7天,通过FACS分析T细胞转导效率。最高效率一般可见于第6天至第7天。收获细胞进行功能试验,通常在过继转移当日。

[0064] 如图2所示,这些实验显示成功实现体外逆病毒转导和扩增。

[0065] 实施例3—CAR T细胞的体外功能及其杀伤人CD19+靶细胞的能力

[0066] 将人CD19基因和编码绿荧光蛋白(GFP)及荧光素酶的报道基因转入小鼠B细胞肿瘤TBL12。所得衍生细胞称为TBL12.huCD19。亲本TBL12和TBL12.huCD19衍生细胞都表达小鼠CD19,但仅衍生细胞系TBL12.huCD19表达人CD19和GFP。这种两蛋白都可由流式细胞术检测。

[0067] 在24孔组织培养板中,将等量的TBL12和TBL12.huCD19肿瘤细胞与不同数量转导实验第7天的CAR T细胞合并。细胞一起于37℃孵育4小时或者14小时,然后如下所述进行流式细胞术分析。在各FACS管中,对一定体积的细胞加入一定数量的CountBright珠。按照mCD19+目标(两个TBL12细胞系都是mCD19+)门控分选,测定GFP+和GFP-细胞的量(GFP+=TBL12.hCD19,GFP-=TBL12)。每种情况取三次测量值。

[0068] 如下计算特异性裂解百分比。靶细胞总数/FACS管("d"):a/b=c/d,其中,a=采集到的微珠事件数量(5000),b=总珠数/FACS管(18800珠,基于20μl、940珠/μl);c=GFP+或GFP-门控群内的细胞数;d=门控细胞总数/FACS管。用门控细胞绝对数("d")计算TBL12/TBL12.hCD19之比。特异性裂解百分比=(1-[对照比/实验比])x 100,其中,对照=E:T之比为0:1的样本中的TBL12/TBL12.hCD19之比,实验=E:T之比为1:1、3:1、10:1的样本中的TBL12/TBL12.hCD19之比。

[0069] 图3A数据为不同效应细胞(CAR T细胞)与靶细胞之比(x轴)的TBL12.huCD19靶细胞特异性裂解百分比(y轴)。所示数据为平均特异性裂解百分比(来自三份样本)±标准差。图3B数据为不同实验条件下的TBL12(亲本,非靶细胞)细胞绝对数/孔。黑色柱为培养4小时后的细胞数,白色空心柱为培养14小时后的细胞数。组内全部E:T比都显著区别于对照(0:1)(图3A);组间E:T比彼此显著不同(图3A);给定培养时间内各处理组的TBL12细胞数没有显著差异(图3B)。

[0070] 如图3A和3B所示,体外实验中,抗人CAR T细胞特异性杀伤带CD19的人肿瘤目标。

[0071] 实施例4—huCD19TG$^{+/-}$小鼠内CAR T细胞的体内功能和它们杀伤人CD19+B细胞的

能力

[0072] 给huCD19TG$^{+/-}$小鼠静脉内注射抗人CD19 CAR T细胞(0.3x 10^6)或转导了编码报道蛋白GFP(0.3x 10^6)的对照T细胞。4天后，小鼠安乐死，摘取脾脏冷冻在最佳切割温度组织培养基中。在低温恒温器上切成薄片(10μm)，固定，用荧光标记的抗体染色，所述抗体为内源性B细胞特异性抗体或过继转移T细胞特异性抗体。用20X放大共聚焦显微镜捕获组织图像。

[0073] 图4A显示huCD19TG$^{+/-}$小鼠脾脏内CAR T细胞大面积累积(绿)，未测得内源性B细胞(红)。图4B显示对照huCD19TG$^{+/-}$小鼠的脾脏，其注射的T细胞与CAR T细胞相同处理，区别仅在于转导的是编码GFP而非抗CD19 CAR的逆病毒。内源性B细胞(红)充沛，可测得浸润性T细胞(绿)但没有扩展到图4A中的程度。图4A和4B中的实验结果显示，体外扩增的工程CAR T细胞转入huCD19TG$^{+/-}$小鼠后杀伤人CD19^{+}B细胞。因此，huCD19TG$^{+/-}$模型适合用于评价目标上/肿瘤外毒性。

[0074]

组	N	TBI	调理处理	接受者	BM	脾细胞 (纯化T 细胞)	处理
		-1 日	-2 日和-3 日		第 0 天	第 0 天	第 28 天
1	10	830X	120 mg/kg 环磷酰胺	B10.BR	10^7 B6 CD19 Tg	--	--
2	10	830X	120 mg/kg 环磷酰胺	B10.BR	10^7 B6 CD19 Tg	0.8 x 10^5 B6 WT	--
3	10	830X	120 mg/kg 环磷酰胺	B10.BR	10^7 B6 CD19 Tg	0.8 x 10^5 B6 WT	CAR CD19 T 细胞，静脉内
4	10	830X	120 mg/kg 环磷酰胺	B10.BR	10^7 B6 CD19 Tg	0.8 x 10^5 B6 WT	转导 GFP T 细胞，静脉内

[0075] 实施例5—CAR CD19调节性T细胞(Treg)在hCD19小鼠中降低aGVHD严重程度和发病率

[0076] 用EasySep CD4阴性选择和CD25阳性选择从115个野生型(WT)B6小鼠的LN+SP纯化调节性T细胞。分析显示，所得产物含99.9％CD4+CD25+。纯化后，调节性T细胞用平板上结合的抗CD3+(2μg)和CD28+抗体(4μg)活化4天。

[0077] 然后用常规方法向调节性T细胞内转导CAR hCD19-EGFR或对照RV-EGFR。转导后第5天，因为效率低用相同方法对细胞进行第二次转导。转导后第7天，对CAR hCD19调节性T细胞和对照调节性T细胞的转导效率均约30％。转导后第7天，两组的纯度均为>93％，CAR hCD19调节性T细胞的得率为26.75x 10^6，调节性T细胞的得率为22.5x 10^6。

[0078]

组	N	供体	接受者	X-射线	BM	T-细胞剂量	调节性 T 细胞剂量
1	5	BALB/c	hCD19-tg B6	1100	10^7	0	0
2	5	BALB/c	hCD19-tg B6	1100	10^7	2.5 x 10^6	0

[0079]

3	5	BALB/c	hCD19-tg B6	1100	10^7	2.5 x 10^6	1.25 x 10^6 对照 RV 调节性 T 细胞
4	5	BALB/c	hCD19-tg B6	1100	10^7	2.5 x 10^6	1.25 x 10^6 hCD19-CAR 调节性 T 细胞

[0080] 图5显示60天后的肺功能;图5A显示没有或有慢性GVHD的小鼠以及第28天接受CAR-T细胞或GFP-T细胞处理的慢性GVHD小鼠的肺阻力。高阻力提示慢性GVHD被CAR-T细胞而不是GFP-T细胞逆转;图5B显示没有或有慢性GVHD的小鼠以及第28天接受CAR-T细胞或GFP-T细胞处理的慢性GVHD小鼠的肺弹性。高弹性提示慢性GVHD被CAR-T细胞逆转,但GFP-T细胞不能;图5C显示没有或有慢性GVHD的移植小鼠以及第28天接受CAR-T细胞或GFP-T细胞处理的慢性GVHD小鼠内肺顺应性低。顺应性低提示慢性GVHD被CAR-T细胞逆转,但GFP-T细胞不能。

[0081] 图6显示hCD19+细胞在移植后4天(来自CD4-淋巴细胞)持续存在于受体小鼠中。图7显示,与仅移植骨髓和T细胞的小鼠或移植骨髓和对照调节性T细胞的小鼠相比,添加CAR CD19调节性T细胞提高移植小鼠的存活。图8显示,移植小鼠的减重相似,不论转入的是T细胞和/或CAR CD19调节性T细胞。值得注意的是,图9显示,移植骨髓、T细胞和CAR CD19调节性T细胞的小鼠临床评分优于仅转移骨髓的小鼠,其临床评分与移植骨髓和T细胞的小鼠或移植骨髓、T细胞和对照调节性T细胞的小鼠相似。尽管CAR-T细胞引起体重减轻而GFP-T细胞不会,且临床发现与CD19杂合子小鼠中的细胞因子释放综合征一致,出人意料的是,CAR-T细胞和GFP-T细胞对存活率都没有不利影响。

[0082] 应该理解,虽然本文已经结合多个不同方面描述了本申请方法和组合物,但以上各个方面的描述旨在说明而不是限制本申请方法和组合物的范围。其他方面,优点和修改都属于权利要求的范围之内。

[0083] 本文所述的方法和组合物可用于、可与其连用、可用于制备、或者是本文所述方法和组合物的产物。这些和其他材料在本文中公开,并且应理解,公开这些方法和组合物的组合,子集,相互作用,组等。也就是说,尽管对这些组合物和方法的各种个体和集体组合和排列可能没有明确公开和引用,但是每个都属于本文中具体考虑和描述的内容。例如,如果公开和讨论某具体组合物或具体方法,讨论了多个组合物或方法,这包括所有的各种组合,除非另外说明。同样,视为包括并公开了各元素的各种亚集或组合。

序列表

<110> 明尼苏达大学董事会(Regents of the University of Minnesota)

<120> 嵌合抗原受体(CAR)T细胞作为获得自体免疫和同种免疫的治疗性干预

<130> 09531-0361WO1

<150> 62/233,908

<151> 2015-09-28

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2538

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成性产生的构建体

<400> 1

gccgccacca tgctgctgct ggtgaccagc ctgctgctgt gcgagctgcc ccaccccgcc 60
tttctgctga tccccgacat ccagatgacc cagaccacct ccagcctgag cgccagcctg 120
ggcgaccggg tgaccatcag ctgccgggcc agccaggaca tcagcaagta cctgaactgg 180
tatcagcaga agcccgacgg caccgtcaag ctgctgatct accacaccag ccggctgcac 240
agcggcgtgc ccagccggtt tagcggcagc ggctccggca ccgactacag cctgaccatc 300
tccaacctgg aacaggaaga tatcgccacc tacttttgcc agcagggcaa cacactgccc 360
tacacctttg gcggcggaac aaagctggaa atcaccggca gcacctccgg cagcggcaag 420
cctggcagcg gcgagggcag caccaagggc gaggtgaagc tgcaggaaag cggccctggc 480
ctggtggccc ccagccagag cctgagcgtg acctgcaccg tgagcggcgt gagcctgccc 540
gactacggcg tgagctggat ccggcagccc cccaggaagg gcctggaatg gctgggcgtg 600
atctggggca gcgagaccac ctactacaac agcgccctga agagccggct gaccatcatc 660
aaggacaaca gcaagagcca ggtgttcctg aagatgaaca gcctgcagac cgacgacacc 720
gccatctact actgcgccaa gcactactac tacggcggca gctacgccat ggactactgg 780
ggccagggca ccagcgtgac cgtgagcagc gaatctaagt acggaccgcc ctgccccccc 840
tgccctatgt tctgggtgct ggtggtggtc ggaggcgtgc tggcctgcta cagcctgctg 900
gtcaccgtgg ccttcatcat cttttgggtg aaacggggca gaaagaaact cctgtatata 960
ttcaaacaac catttatgag accagtacaa actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc 1020
cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt gaactgcggg tgaagttcag cagaagcgcc 1080
gacgcccctg cctaccagca gggccagaat cagctgtaca acgagctgaa cctgggcaga 1140
agggaagagt acgacgtcct ggataagcgg agaggccggg accctgagat gggcggcaag 1200
cctcggcgga agaaccccca ggaaggcctg tataacgaac tgcagaaaga caagatggcc 1260
gaggcctaca gcgagatcgg catgaagggc gagcggaggc ggggcaaggg ccacgacggc 1320
ctgtatcagg gcctgtccac cgccaccaag gatacctacg acgccctgca catgcaggcc 1380

ctgcccccaa ggctcgaggg cggcggagag ggcagaggaa gtcttctaac atgcggtgac 1440
gtggaggaga atcccggccc taggatgctt ctcctggtga caagccttct gctctgtgag 1500
ttaccacacc cagcattcct cctgatccca cgcaaagtgt gtaacggaat aggtattggt 1560
gaatttaaag actcactctc cataaatgct acgaatatta aacacttcaa aaactgcacc 1620
tccatcagtg gcgatctcca catcctgccg gtggcattta ggggtgactc cttcacacat 1680
actcctcctc tggatccaca ggaactggat attctgaaaa ccgtaaagga aatcacaggg 1740
tttttgctga ttcaggcttg gcctgaaaac aggacggacc tccatgcctt tgagaaccta 1800
gaaatcatac gcggcaggac caagcaacat ggtcagtttt ctcttgcagt cgtcagcctg 1860
aacataacat ccttgggatt acgctccctc aaggagataa gtgatggaga tgtgataatt 1920
tcaggaaaca aaaatttgtg ctatgcaaat acaataaact ggaaaaaact gtttgggacc 1980
tccggtcaga aaaccaaaat tataagcaac agaggtgaaa acagctgcaa ggccacaggc 2040
caggtctgcc atgccttgtg ctcccccgag ggctgctggg gcccggagcc cagggactgc 2100
gtctcttgcc ggaatgtcag ccgaggcagg gaatgcgtgg acaagtgcaa ccttctggag 2160
ggtgagccaa gggagtttgt ggagaactct gagtgcatac agtgccaccc agagtgcctg 2220
cctcaggcca tgaacatcac ctgcacagga cggggaccag acaactgtat ccagtgtgcc 2280
cactacattg acggccccca ctgcgtcaag acctgcccgg caggagtcat gggagaaaac 2340
aacaccctgg tctggaagta cgcagacgcc ggccatgtgt gccacctgtg ccatccaaac 2400
tgcacctacg gatgcactgg gccaggtctt gaaggctgtc caacgaatgg gcctaagatc 2460
ccgtccatcg ccactgggat ggtgggggcc ctcctcttgc tgctggtggt ggccctgggg 2520
atcggcctct tcatgtga 2538

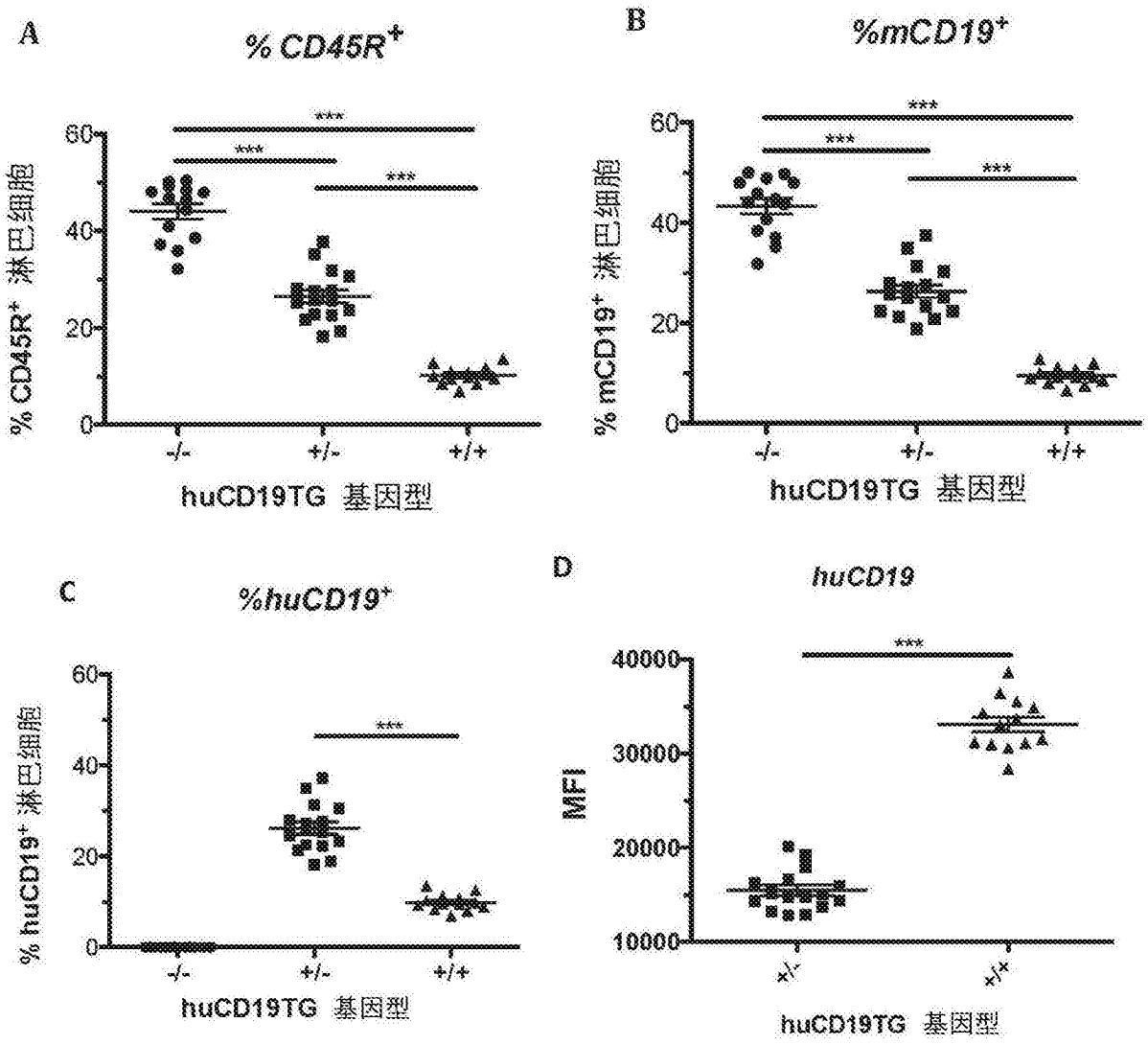

A
% CD45R+
% CD45R+ 淋巴细胞
60
40
20
0
***
***
***
-/-
+/-
+/+
huCD19TG 基因型
B
%mCD19+
% mCD19+ 淋巴细胞
60
40
20
0
***
***
***
-/-
+/-
+/+
huCD19TG 基因型
C
%huCD19+
% huCD19+ 淋巴细胞
60
40
20
0
***
-/-
+/-
+/+
huCD19TG 基因型
D
huCD19
MFI
40000
30000
20000
10000
***
X/Y
X/X
huCD19TG 基因型

图1

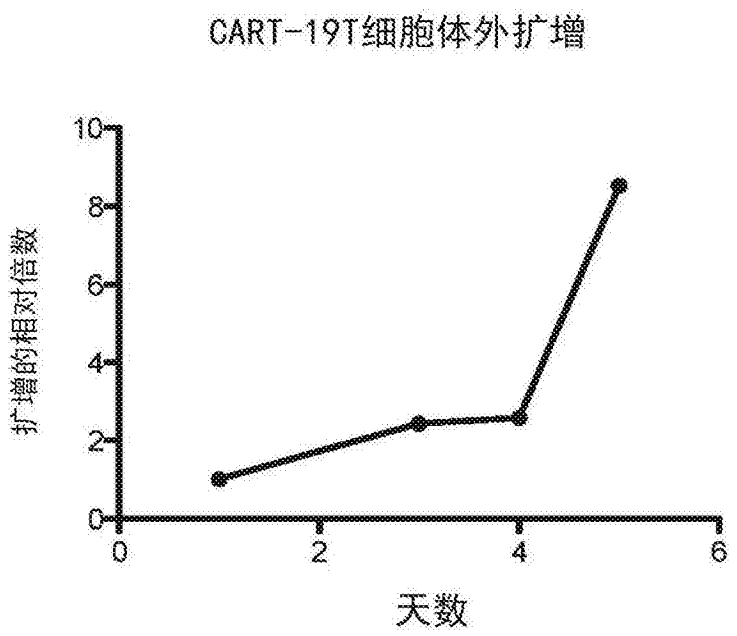

CART-19T细胞体外扩增
扩增的相对倍数
10
8
6
4
2
0
0
2
4
6
天数

图2

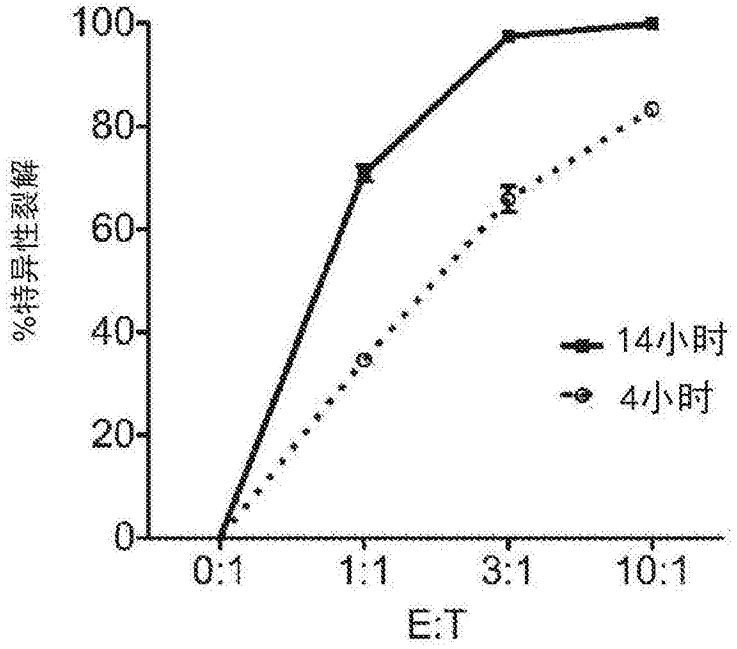

%特异性裂解
100
80
60
40
20
0
0:1
1:1
3:1
10:1
E:T
14小时
4小时

图3A

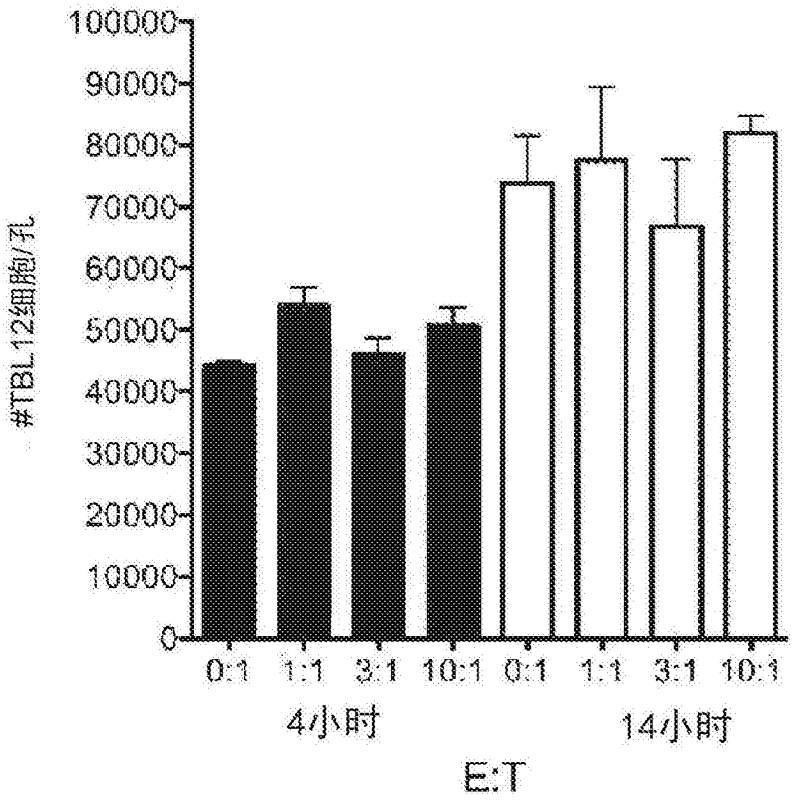

100000
90000
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
#TBL12细胞/孔
0:1
1:1
3:1
10:1
0:1
1:1
3:1
10:1
4小时
14小时
E:T

图3B

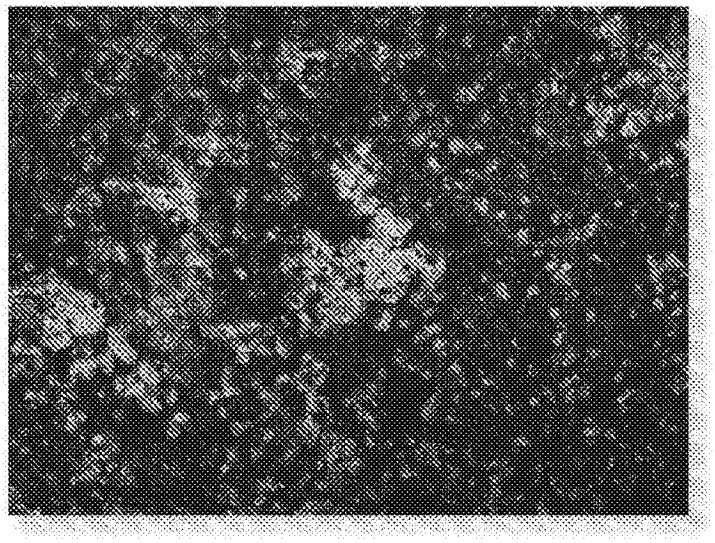


图4A



图4B

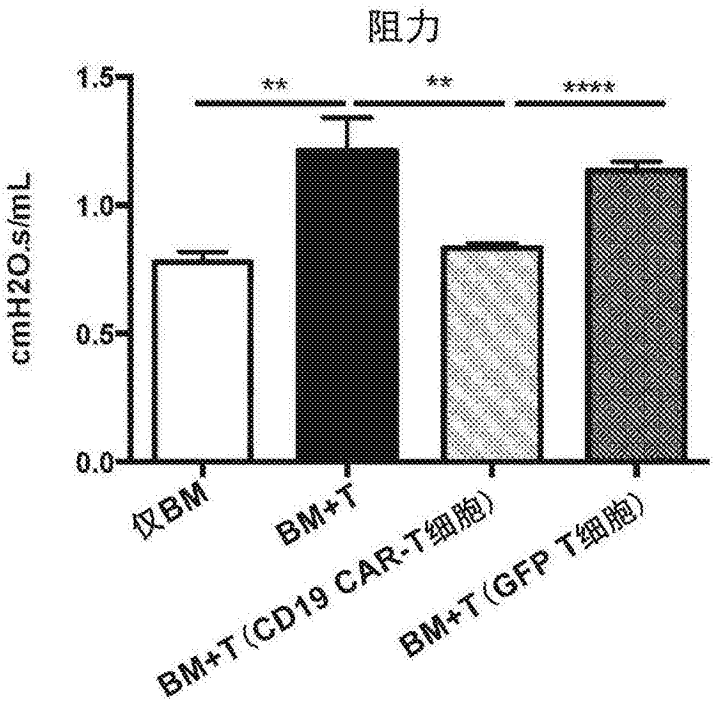


图5A

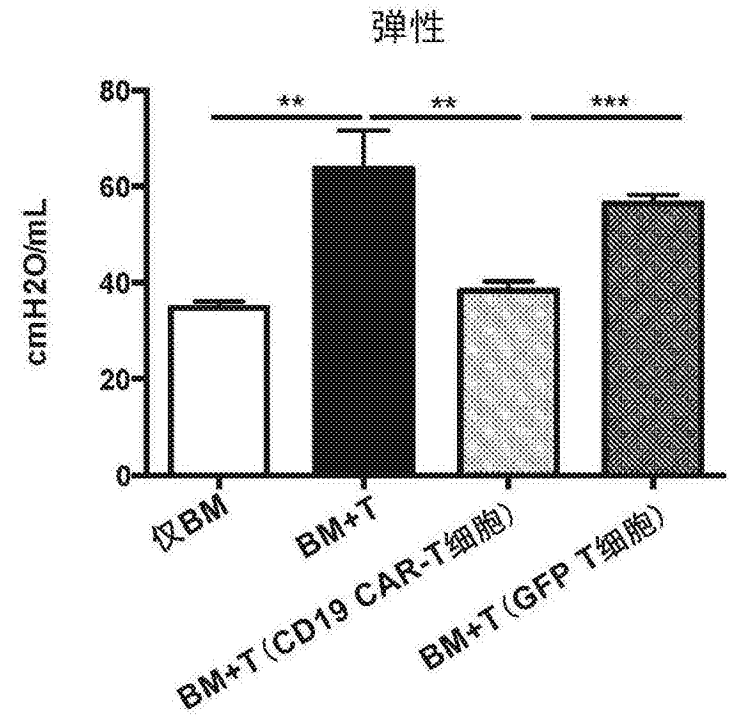

弹性
80
60
40
20
0
cmH2O/mL
**
**
***
仅BM
BM+T
BM+T(CD19 CAR-T细胞)
BM+T(GFP T细胞)

图5B

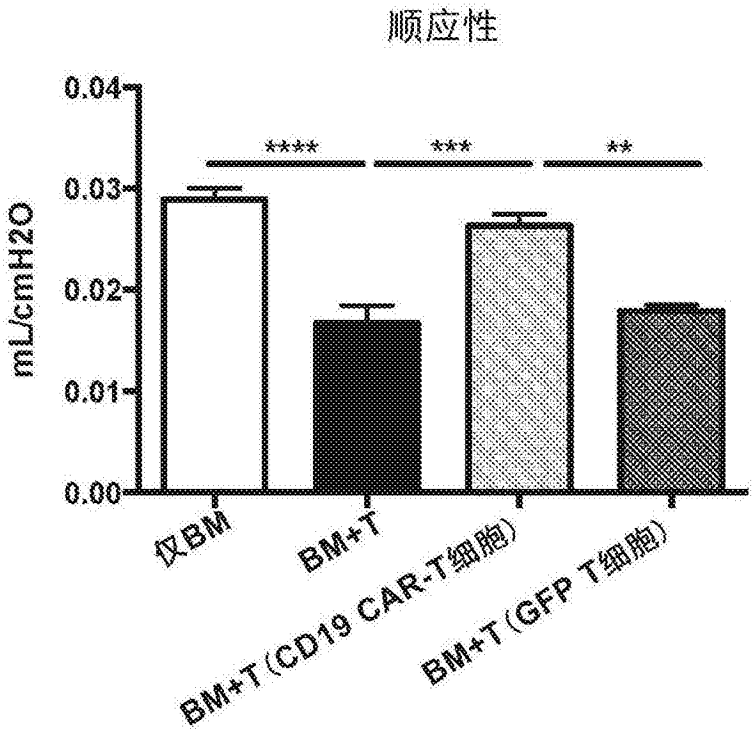

顺应性
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
mL/cmH2O
****
***
**
仅BM
BM+T
BM+T(CD19 CAR-T细胞)
BM+T(GFP T细胞)

图5C

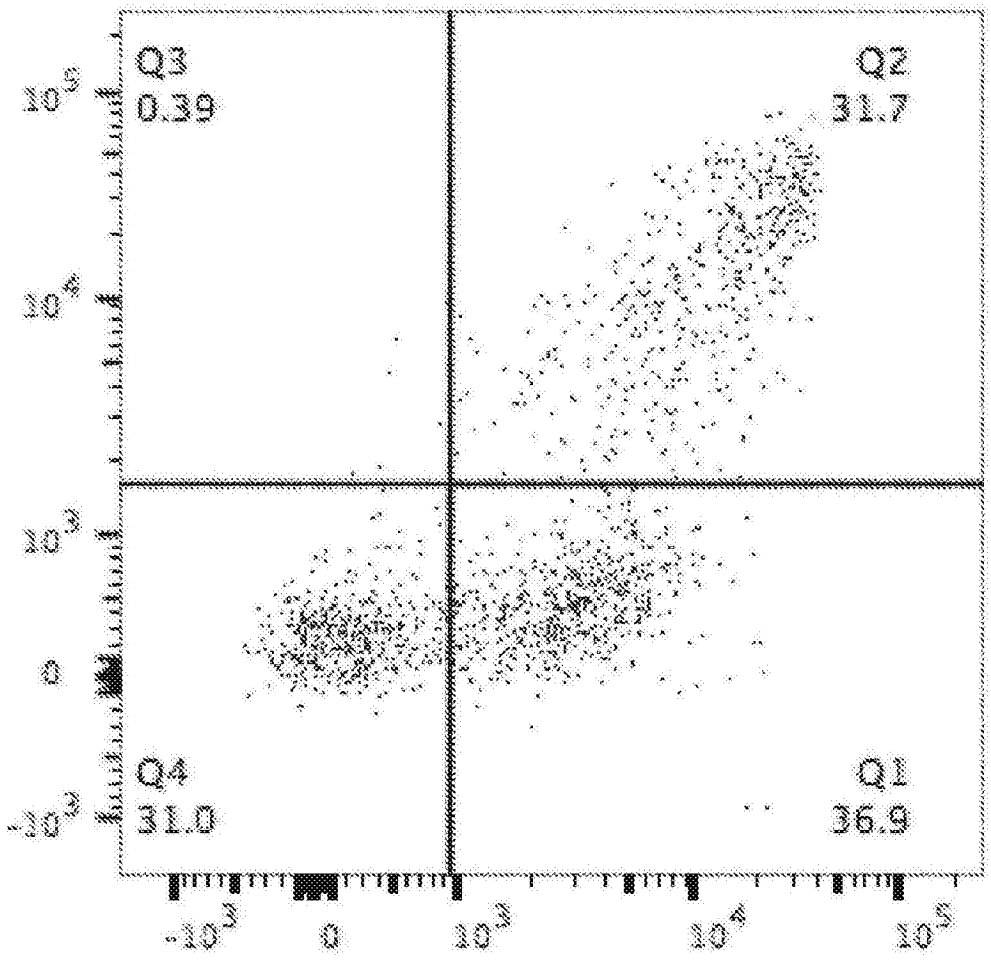


图6

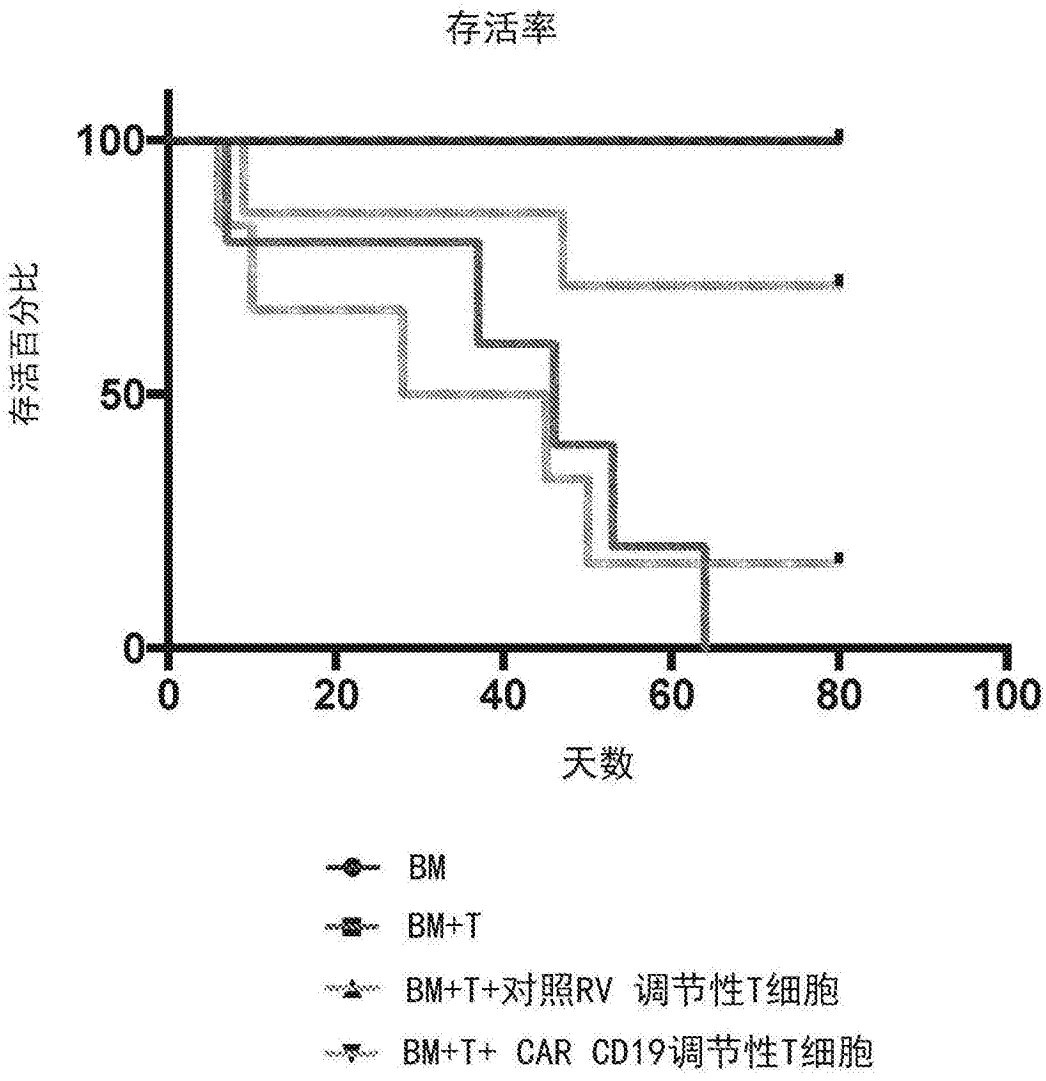

存活率
100
50
0
存活百分比
0
20
40
60
80
100
天数
BM
BM+T
BM+T+对照RV 调节性T细胞
BM+T+ CAR CD19调节性T细胞

图7

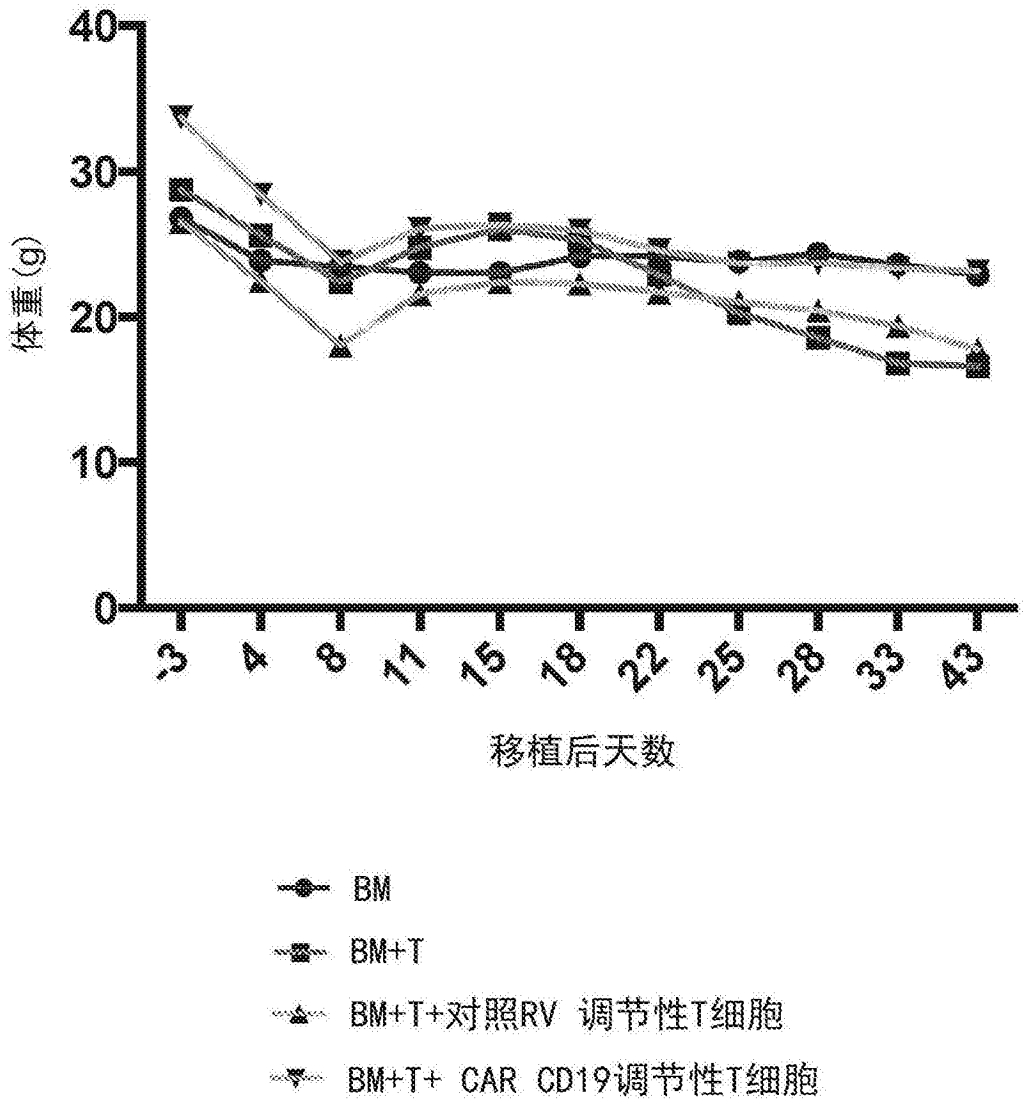

40
30
20
10
0
体重(g)
3
4
8
11
15
18
22
25
28
33
43
移植后天数
BM
BM+T
BM+T+对照RV 调节性T细胞
BM+T+ CAR CD19调节性T细胞

图8

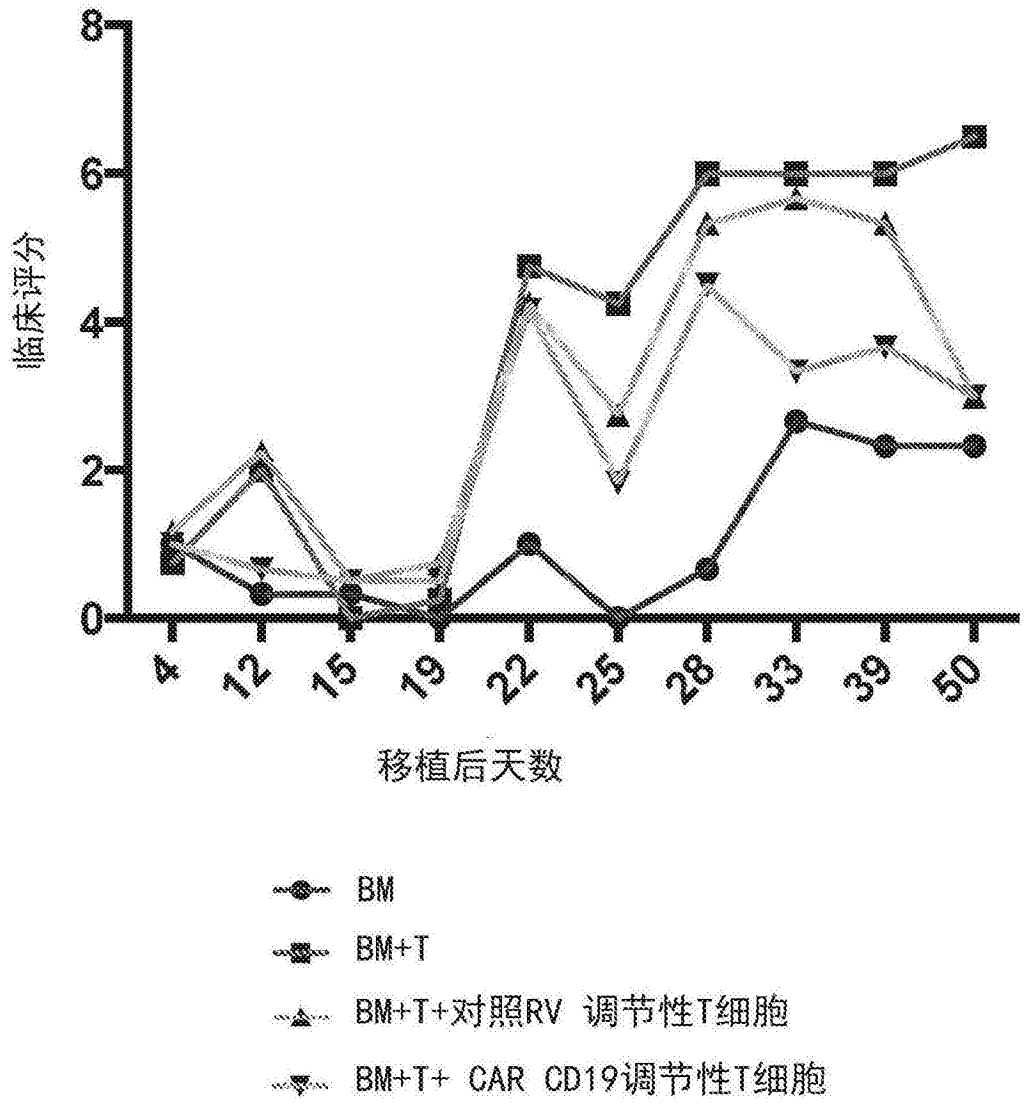

8
6
4
2
0
临床评分
4
12
15
19
22
25
28
33
39
50
移植后天数
BM
BM+T
BM+T+对照RV 调节性T细胞
BM+T+ CAR CD19调节性T细胞

图9