



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108495927 A

(43)申请公布日 2018.09.04

(21)申请号 201680079790.4

(22)申请日 2016.11.22

(30)优先权数据

62/258,712 2015.11.23 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.07.23

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/063257 2016.11.22

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/091546 EN 2017.06.01

(71)申请人 波士顿大学董事会

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 威尔逊·翁 赵章桓

(74)专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理有限公司 11290

代理人 董世豪 张淑珍

(51)Int.Cl.

G12N 5/071(2006.01)

C07K 16/28(2006.01)

C07K 14/705(2006.01)

C07K 16/18(2006.01)

C07K 14/725(2006.01)

G12N 5/16(2006.01)

G12N 9/90(2006.01)

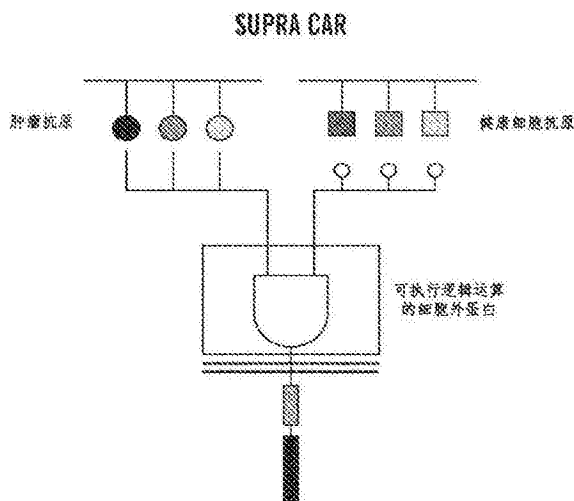
权利要求书8页 说明书63页 附图34页

(54)发明名称

嵌合抗原受体相关的方法和组合物

(57)摘要

本文描述的是嵌合抗原受体(CAR)平台,该平台能够(a)作为打开/关闭开关(具有保持状态/titrability的能力),(b)检测多种抗原并且执行逻辑运算,和/或(c)独立地调节多个信号转导通路。本文提供的组合物允许优化CAR T细胞疗法所需的控制和区分程度。本文还描述了包含该组合物的细胞以及这些组合物和/或细胞在癌症治疗中的用途。



1. 一种包含多组分嵌合抗原受体 (CAR) 的组合物;所述多组分CAR包含:
 - a. 第一识别多肽,所述第一识别多肽包含1) 对第一靶配体而言特异性的抗体试剂和2) 蛋白质相互作用结构域;以及
 - b. 信号转导多肽,所述信号转导多肽包含1) 能够与所述第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域特异性结合的细胞外蛋白质相互作用结构域和2) 细胞内T细胞受体 (TCR) 信号转导结构域。
2. 如权利要求1所述的组合物,其中,所述蛋白质相互作用结构域是亮氨酸拉链结构域。
3. 如权利要求2所述的组合物,其中,一个亮氨酸拉链结构域是BZip (RR),且第二亮氨酸拉链结构域是AZip (EE)。
4. 如权利要求1所述的组合物,其中,所述蛋白质相互作用结构域是PSD95-Dlg1-zo-1 (PDZ) 结构域。
5. 如权利要求1所述的组合物,其中,一个蛋白质相互作用结构域是链霉亲和素,且第二蛋白质相互作用结构域是链霉亲和素结合蛋白 (SBP)。
6. 如权利要求1所述的组合物,其中:
 - a. 一个蛋白质相互作用结构域是mTOR的FKBP结合结构域 (FRB),且第二蛋白质相互作用结构域是FK506结合蛋白 (FKBP);
 - b. 一个蛋白质相互作用结构域是亲环素-Fas融合蛋白 (CyP-Fas),且第二蛋白质相互作用结构域是FK506结合蛋白 (FKBP);
 - c. 一个蛋白质相互作用结构域是钙调神经磷酸酶A (CNA),且第二蛋白质相互作用结构域是FK506结合蛋白 (FKBP);
 - d. 一个蛋白质相互作用结构域是赤霉素不敏感型 (GIA),且第二蛋白质相互作用结构域是赤霉素不敏感矮化1型 (GID1);
 - e. 一个蛋白质相互作用结构域是Snap标签,且第二蛋白质相互作用结构域是Halo标签;或者
 - f. 一个蛋白质相互作用结构域是T14-3-3-cdeltaC,且第二蛋白质相互作用结构域是PMA2的C端肽 (CT52)。
7. 如权利要求1所述的组合物,其中,一个蛋白质相互作用结构域是PYL,且第二蛋白质相互作用结构域是ABI。
8. 如权利要求1所述的组合物,其中,一个蛋白质相互作用结构域是核苷酸标签,且第二蛋白质相互作用结构域是锌指结构域。
9. 如权利要求8所述的组合物,其中,所述识别多肽的蛋白质相互作用结构域是核苷酸标签,且所述信号转导多肽的细胞外蛋白质相互作用结构域是锌指结构域。
10. 如权利要求8-9中任一项所述的组合物,其中,所述核苷酸标签是DNA标签。
11. 如权利要求8-10中任一项所述的组合物,其中,所述DNA标签是dsDNA标签。
12. 如权利要求1-11中任一项所述的组合物,所述组合物进一步包含第二识别多肽,所述第二识别多肽包含1) 对第二靶配体而言特异性的抗体试剂和2) 与所述信号转导多肽的蛋白质相互作用结构域竞争结合所述第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域的蛋白质相互作用结构域。

13. 如权利要求12所述的组合物,其中,比起所述信号转导多肽的蛋白质相互作用结构域与所述第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域的亲和力,所述第二识别多肽的蛋白质相互作用结构域与所述第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域具有更大的亲和力。

14. 如权利要求12-13中任一项所述的组合物,其中,通过所述第二识别多肽识别的靶配体在健康细胞和/或非靶细胞上发现而未在病变细胞和/或靶细胞上发现。

15. 如权利要求1-11中任一项所述的组合物,所述组合物进一步包含第二识别多肽,所述第二识别多肽包含1)对第二靶配体而言特异性的抗体试剂和2)蛋白质相互作用结构域;并且其中,所述信号转导多肽进一步包含与所述第二识别多肽的蛋白质相互作用结构域特异性结合的次级蛋白质相互作用结构域。

16. 如权利要求15所述的组合物,其中,比起所述信号转导多肽的第一蛋白质相互作用结构域与所述第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域的亲和力,所述信号转导多肽的次级蛋白质相互作用结构域与所述第二识别多肽的蛋白质相互作用结构域的亲和力更弱。

17. 如权利要求15-16中任一项所述的组合物,其中,所述第一识别多肽和所述第二识别多肽各自包含次级蛋白质相互作用结构域;并且其中,所述次级蛋白质相互作用结构域彼此特异性地结合。

18. 一种包含多组分嵌合抗原受体(CAR)的组合物;所述多组分CAR包含:

a. 第一识别多肽,所述第一识别多肽包含1)对第一靶配体而言特异性的抗体试剂和2)核苷酸标签的第一部分;

b. 第二识别多肽,所述第二识别多肽包含1)对第二靶配体而言特异性的抗体试剂和2)所述核苷酸标签的第二部分;以及

c. 信号转导多肽,所述信号转导多肽包含1)能够与通过所述核苷酸标签的各个部分的结合形成的完整的核苷酸标签特异性结合的细胞外锌指结构域和2)细胞内T细胞受体(TCR)信号转导结构域;

其中,除非所述核苷酸标签的各个部分彼此结合,否则不能被锌指结构域特异性地结合。

19. 如权利要求18所述的组合物,其中,所述核苷酸标签的第一部分是ssDNA,且所述核苷酸标签的第二部分是互补的ssDNA。

20. 如权利要求18-19中所述的组合物,所述组合物进一步包含第三识别多肽,所述第三识别多肽编码1)对第三靶配体而言特异性的抗体试剂和2)所述核苷酸标签的第三部分;

其中,所述核苷酸标签的各个部分或者各个部分的成对组合不能被所述锌指结构域特异性结合,但当所有三个部分彼此结合时,产生的复合体可以被所述锌指结构域特异性地结合。

21. 如权利要求20所述的组合物,其中,1)所述核苷酸标签的第一部分是ssDNA;并且2)所述核苷酸标签的第二部分和第三部分是ssDNA,所述第二部分和第三部分各自与所述第一部分互补;并且3)所述核苷酸标签的第二部分和第三部分具有相互不重叠的序列。

22. 一种包含多组分嵌合抗原受体(CAR)的组合物;所述多组分CAR包含:

a. 第一识别多肽,所述第一识别多肽包含1)对第一靶配体而言特异性的抗体试剂和2)第一核苷酸标签;

b. 第二识别多肽,所述第二识别多肽包含1)对第二靶配体而言特异性的抗体试剂和2)

第二核苷酸标签;以及

c. 信号转导多肽,所述信号转导多肽包含1) 能够与所述第一核苷酸标签特异性结合的细胞外锌指结构域和2) 细胞内T细胞受体(TCR) 信号转导结构域;

其中,当所述核苷酸标签彼此结合时,不能被锌指结构域特异性地结合。

23. 如权利要求22所述的组合物,其中,所述第一核苷酸标签形成发夹环结构,并且其中,所述第二核苷酸标签与包含所述发夹环的一条腿的部分和所述发夹环的环的部分的所述第一核苷酸标签的部分互补。

24. 如权利要求22-23中任一项所述的组合物,其中,所述第二靶配体在健康细胞和/或非靶细胞上发现而未在病变细胞和/或靶细胞上发现。

25. 如权利要求1-24中任一项所述的组合物,其中,靶配体是在病变细胞和/或靶细胞上发现的配体。

26. 如权利要求1-24中任一项所述的组合物,其中,通过能够与信号转导多肽特异性结合的识别多肽特异性结合的靶配体是在病变细胞和/或靶细胞上发现的配体。

27. 如权利要求1-26中任一项所述的组合物,其中,通过能够与信号转导多肽特异性结合的识别多肽特异性结合的靶配体是在病变细胞和/或靶细胞上发现而未在健康细胞和/或非靶细胞上发现的配体。

28. 如权利要求1-27中任一项所述的组合物,其中,所述病变细胞是癌细胞。

29. 如权利要求1-28中任一项所述的组合物,其中,所述抗体试剂选自于由如下所组成的组:

免疫球蛋白分子、单克隆抗体、嵌合抗体、CDR移植抗体、人类抗体、人源化抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、二硫键连接的Fv、scFv、单域抗体、双价抗体、多特异性抗体、双重特异性抗体、抗独特型抗体和双特异性抗体。

30. 如权利要求1-29中任一项所述的组合物,其中,所述细胞内TCR信号转导结构域是来自选自于由如下所组成的组中的蛋白的信号转导结构域:

TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54(ICAM)、CD83、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD150(SLAMF1)、CD152(CTLA4)、CD223(LAG3)、CD270(HVEM)、CD273(PD-L2)、CD274(PD-L1)、CD278(ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C SLP76、TRIM、ZAP70和41BB。

31. 如权利要求1-30中任一项所述的组合物,根据权利要求1-30中任一项所述,所述组合物进一步包含第二多组分CAR。

32. 如权利要求31所述的组合物,其中,第二多组分CAR的抗体试剂特异性地结合至不同于通过所述第一多组分CAR的抗体试剂结合的靶配体。

33. 如权利要求30-32中任一项所述的组合物,其中,所述第二多组分CAR的细胞内T细胞受体(TCR) 信号转导结构域抑制T细胞活性。

34. 如权利要求33所述的组合物,其中,抑制T细胞活性的所述第二多组分CAR的细胞内T细胞受体(TCR) 信号转导结构域包含选自于由如下所组成的组中的多肽的信号转导结构域:

PD1、CTLA4、BTLA、KIR、LAG-3、TIM-3、A2aR、LAIR-1和TGIT。

35. 如权利要求33-34中任一项所述的组合物,其中,通过能够与所述第二多组分CAR的

信号转导多肽特异性结合的识别多肽特异性结合的靶配体是在健康细胞/或非靶细胞上发现的配体。

36. 如权利要求33-34中任一项所述的组合物,其中,通过能够与所述第二多组分CAR的信号转导多肽特异性结合的识别多肽特异性结合的靶配体是在健康细胞和/或非靶细胞上发现而未在病变细胞和/或靶细胞上发现的配体。

37. 如权利要求1-36中任一项所述的组合物,其中,所述信号转导多肽存在于细胞的膜上。

38. 如权利要求37所述的组合物,其中,所述一个或多个识别多肽存在于细胞外间隙。

39. 一种表达权利要求1-38中任一项所述的组合物的工程化细胞。

40. 如权利要求1-39中任一项所述的细胞或组合物,其中,所述细胞是T细胞、NK细胞或者NKT细胞。

41. 如权利要求1-40中任一项所述的细胞或组合物,其中,所述细胞是T细胞。

42. 一种杀死靶细胞的方法,所述方法包括用权利要求1-41中任一项所述的组合物或细胞接触所述靶细胞。

43. 一种治疗疾病的方法,所述方法包括向需要治疗的受试者给予权利要求1-41中任一项所述的组合物或细胞。

44. 如权利要求42所述的方法,其中,所述疾病选自于由如下所组成的组:

癌症;实体癌;乳腺癌;肺癌;急性淋巴细胞白血病;多发性骨髓瘤和难治多发性骨髓瘤。

45. 一种治疗癌症的方法,所述方法包括向需要治疗的受试者给予权利要求1-41中任一项所述的组合物或细胞。

46. 如权利要求45所述的方法,其中,所述细胞对受试者而言是自体的。

47. 如权利要求46所述的方法,其中,所给予的细胞源自和/或传代自从受试者获得的细胞,并且所述细胞经离体修饰以包含至少一种多组分CAR。

48. 一种工程化的细胞,所述细胞包含多组分嵌合抗原受体(CAR)信号转导多肽,所述信号转导多肽包含1)细胞外蛋白质相互作用结构域和2)细胞内T细胞受体(TCR)信号转导结构域。

49. 如权利要求48所述的细胞,其中,所述蛋白质相互作用结构域是亮氨酸拉链结构域。

50. 如权利要求49所述的细胞,其中,所述亮氨酸拉链结构域是BZip(RR)或AZip(EE)。

51. 如权利要求48所述的细胞,其中,所述蛋白质相互作用结构域是PSD95-Dlg1-zo-1(PDZ)结构域。

52. 如权利要求48所述的细胞,其中,所述蛋白质相互作用结构域是链霉亲和素或者链霉亲和素结合蛋白(SBP)。

53. 如权利要求48所述的细胞,其中,所述蛋白质相互作用结构域是mTOR的FKBP结合结构域(FRB)或者FK506结合蛋白(FKBP)。

54. 如权利要求48所述的细胞,其中,所述蛋白质相互作用结构域是PYL或者ABI。

55. 如权利要求48所述的细胞,其中,所述蛋白质相互作用结构域是核苷酸标签或者锌指结构域。

56. 如权利要求55所述的细胞,所述核苷酸标签是DNA标签。
57. 如权利要求56所述的细胞,其中,所述DNA标签是dsDNA标签。
58. 如权利要求55所述的细胞,其中,所述蛋白质相互作用结构域是锌指结构域。
59. 如权利要求48-58中任一项所述的细胞,其中,所述信号转导多肽存在于所述细胞的膜上。
60. 如权利要求48-59中任一项所述的细胞,其中,所述细胞是T细胞、NK细胞或者NKT细胞。
61. 如权利要求48-60中任一项所述的细胞,其中,所述细胞是T细胞。
62. 如权利要求48-61中任一项所述的细胞,其中,所述细胞内TCR信号转导结构域是来自选自由如下所组成的组中的蛋白的信号转导结构域:
TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54 (ICAM)、CD83、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD150 (SLAMF1)、CD152 (CTLA4)、CD223 (LAG3)、CD270 (HVEM)、CD273 (PD-L2)、CD274 (PD-L1)、CD278 (ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C SLP76、TRIM、ZAP70和41BB。
63. 如权利要求48-62中任一项所述的细胞,其中,所述信号转导多肽进一步包含与第二识别多肽的蛋白质相互作用结构域特异性结合的次级蛋白质相互作用结构域。
64. 如权利要求48-62中任一项所述的细胞,根据权利要求48-62中任一项所述,所述细胞进一步包含第二多组分CAR信号转导肽。
65. 一种治疗疾病的方法,所述方法包括向需要治疗的受试者给予:
权利要求48-64中任一项所述的细胞;以及
第一识别多肽,所述第一识别多肽包含1) 对第一靶配体而言特异性的抗体试剂和2) 能够与信号转导多肽的蛋白质相互作用结构域特异性结合的蛋白质相互作用结构域。
66. 如权利要求65所述的方法,其中,所述抗体试剂选自由如下所组成的组:
免疫球蛋白分子、单克隆抗体、嵌合抗体、CDR移植抗体、人类抗体、人源化抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、二硫键连接的Fv、scFv、单域抗体、双价抗体、多特异性抗体、双重特异性抗体、抗独特型抗体和双特异性抗体。
67. 如权利要求65-66中任一项所述的方法,其中,所述细胞对受试者而言是自体的。
68. 如权利要求65-67中任一项所述的方法,其中,所给予的细胞源自和/或传代自从受试者获得的细胞,并且所述细胞经离体修饰以包含至少一种多组分CAR。
69. 如权利要求65-68中任一项所述的方法,其中,所述蛋白质相互作用结构域是亮氨酸拉链结构域。
70. 如权利要求69所述的方法,其中,一个亮氨酸拉链结构域是BZip (RR),且第二亮氨酸拉链结构域是AZip (EE)。
71. 如权利要求65-68中任一项所述的方法,其中,所述蛋白质相互作用结构域是PSD95-Dlg1-zo-1 (PDZ) 结构域。
72. 如权利要求65-68中任一项所述的方法,其中,一个蛋白质相互作用结构域是链霉亲和素,且第二蛋白质相互作用结构域是链霉亲和素结合蛋白 (SPB)。
73. 如权利要求65-68中任一项所述的方法,其中:
a. 一个蛋白质相互作用结构域是mTOR的FKBP结合结构域 (FRB),且第二蛋白质相互作用

用结构域是FK506结合蛋白 (FKBP)；

b. 一个蛋白质相互作用结构域是亲环素-Fas融合蛋白 (CyP-Fas)，且第二蛋白质相互作用结构域是FK506结合蛋白 (FKBP)；

c. 一个蛋白质相互作用结构域是钙调神经磷酸酶A (CNA)，且第二蛋白质相互作用结构域是FK506结合蛋白 (FKBP)；

d. 一个蛋白质相互作用结构域是赤霉素不敏感型 (GIA)，且第二蛋白质相互作用结构域是赤霉素不敏感矮化1型 (GID1)；

e. 一个蛋白质相互作用结构域是Snap标签，且第二蛋白质相互作用结构域是Halo标签；或者

f. 一个蛋白质相互作用结构域是T14-3-3-cdeltaC，且第二蛋白质相互作用结构域是PMA2的C端肽 (CT52)。

74. 如权利要求74所述的方法，其中：

a. 当一个蛋白质相互作用结构域是mTOR的FKBP结合结构域 (FRB) 且第二蛋白质相互作用结构域是FK506结合蛋白 (FKBP) 时，该方法进一步包括给予他克莫司、rapalog或者依维莫司；

b. 当一个蛋白质相互作用结构域是亲环素-Fas融合蛋白 (CyP-Fas) 且第二蛋白质相互作用结构域是FK506结合蛋白 (FKBP) 时，该方法进一步包括给予FKCsA；

c. 当一个蛋白质相互作用结构域是钙调神经磷酸酶A (CNA) 且第二蛋白质相互作用结构域是FK506结合蛋白 (FKBP) 时，该方法进一步包括给予FK506；

d. 当一个蛋白质相互作用结构域是赤霉素不敏感型 (GIA) 且第二蛋白质相互作用结构域是赤霉素不敏感矮化1型 (GID1) 时，该方法进一步包括给予赤霉素；

e. 当一个蛋白质相互作用结构域是Snap标签且第二蛋白质相互作用结构域是Halo标签时，该方法进一步包括给予HaXS；或者

f. 当一个蛋白质相互作用结构域是T14-3-3-cdeltaC且第二蛋白质相互作用结构域是PMA2的C端肽 (CT52) 时，该方法进一步包括给予壳梭孢素。

75. 如权利要求65-68中任一项所述的方法，其中，一个蛋白质相互作用结构域是PYL，且第二蛋白质相互作用结构域是ABI。

76. 如权利要求65-68中任一项所述的方法，其中，所述识别多肽的蛋白质相互作用结构域是核苷酸标签，且信号转导多肽的细胞外蛋白质相互作用结构域是锌指结构域。

77. 如权利要求76所述的方法，其中，所述核苷酸标签是DNA标签。

78. 如权利要求77所述方法，其中，所述DNA标签是dsDNA标签。

79. 如权利要求65-78中任一项所述的方法，所述方法进一步包括给予：

第二识别多肽，所述第二识别多肽包含1) 对第二靶配体而言特异性的抗体试剂和2) 与信号转导多肽的蛋白质相互作用结构域竞争结合所述第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域的蛋白质相互作用结构域。

80. 如权利要求79所述的方法，其中，比起所述信号转导多肽的蛋白质相互作用结构域与所述第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域的亲和力，所述第二识别多肽的蛋白质相互作用结构域与所述第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域具有更大的亲和力。

81. 如权利要求79-80中任一项所述的方法，其中，由所述第二识别多肽识别的靶配体

在健康细胞和/或非靶细胞上发现而未在病变细胞和/或靶细胞上发现。

82. 如权利要求65-78中任一项所述的方法,所述方法进一步包括给予第二识别多肽,所述第二识别多肽包含1)对第二靶配体而言特异性的抗体试剂和2)蛋白质相互作用结构域;并且其中,所述信号转导多肽进一步包含与所述第二识别多肽的蛋白质相互作用结构域特异性结合的次级蛋白质相互作用结构域。

83. 如权利要求82所述的方法,其中,比起所述信号转导多肽的第一蛋白质相互作用结构域与所述第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域的亲和力,所述信号转导多肽的次级蛋白质相互作用结构域与所述第二识别多肽的蛋白质相互作用结构域的亲和力更弱。

84. 如权利要求82-83中任一项所述的方法,其中,所述第一识别多肽和所述第二识别多肽各自包含次级蛋白质相互作用结构域;并且其中,所述次级蛋白质相互作用结构域彼此特异性地结合。

85. 如权利要求65-78中任一项所述的方法,所述方法进一步包括给予:

c. 第一识别多肽,所述第一识别多肽包含1)对第一靶配体而言特异性的抗体试剂和2)核苷酸标签的第一部分;

d. 第二识别多肽,所述第二识别多肽包含1)对第二靶配体而言特异性的抗体试剂和2)所述核苷酸标签的第二部分;

其中,所述信号转导多肽包含1)能够与通过所述核苷酸标签的各个部分的结合形成的完整的核苷酸标签特异性结合的细胞外锌指结构域;并且其中,除非核苷酸标签的各个部分相互结合,否则不能被锌指结构域特异性地结合。

86. 如权利要求85所述的方法,其中,所述核苷酸标签的第一部分是ssDNA,且所述核苷酸标签的第二部分是互补的ssDNA。

87. 如权利要求85-86中任一项所述的方法,所述方法进一步包括给予第三识别多肽,所述第三识别多肽编码1)对第三靶配体而言特异性的抗体试剂和2)所述核苷酸标签的第三部分;

其中,所述核苷酸标签的各个部分或者各个部分的成对组合不能被锌指结构域特异性结合,但当所有三个部分相互结合时,产生的复合体可以被锌指结构域特异性地结合。

88. 如权利要求87所述的方法,其中,1)所述核苷酸标签的第一部分是ssDNA;并且2)所述核苷酸标签的第二部分和第三部分是ssDNA,所述第二部分和第三部分各自与所述第一部分互补;并且3)所述核苷酸标签的第二部分和第三部分具有相互不重叠的序列。

89. 如权利要求65-78中任一项所述的方法,所述方法包括给予:

c. 第一识别多肽,所述第一识别多肽包含1)对第一靶配体而言特异性的抗体试剂和2)第一核苷酸标签;

d. 第二识别多肽,所述第二识别多肽包含1)对第二靶配体而言特异性的抗体试剂和2)第二核苷酸标签;

其中,所述信号转导多肽包含1)能够与所述第一核苷酸标签特异性结合的细胞外锌指结构域;并且其中,当所述核苷酸标签相互结合时,不能被锌指结构域特异性地结合。

90. 如权利要求89所述的方法,其中,所述第一核苷酸标签形成发夹环结构,并且其中,所述第二核苷酸标签与包含所述发夹环的一条腿的部分和所述发夹环的环的部分的所述第一核苷酸标签的部分互补。

91. 如权利要求89-90中任一项所述的方法,其中,所述第二靶配体在健康细胞和/或非靶细胞上发现而未在病变细胞和/或靶细胞上发现。

92. 如权利要求65-91中任一项所述的方法,其中,所述靶配体是在病变细胞和/或靶细胞上发现的配体。

93. 如权利要求65-92中任一项所述的方法,其中,通过能够与信号转导多肽特异性结合的识别多肽特异性结合的靶配体是在病变细胞和/或靶细胞上发现的配体。

94. 如权利要求65-93中任一项所述的方法,其中,通过能够与信号转导多肽特异性结合的识别多肽特异性结合的靶配体是在病变细胞和/或靶细胞上发现而未在健康细胞和/或非靶细胞上发现的配体。

95. 如权利要求65-94中任一项所述的方法,其中,所述病变细胞是癌细胞。

96. 如权利要求65-95中任一项所述的方法,其中,所述细胞是权利要求64所述的细胞并且向受试者进一步给予第二识别多肽,所述第二识别多肽包含1) 对第二靶配体而言特异性的抗体试剂和2) 能够与第二信号转导多肽的蛋白质相互作用结构域特异性结合的蛋白质相互作用结构域。

97. 如权利要求96所述的方法,其中,所述第二多组分CAR信号转导多肽的细胞内T细胞受体(TCR)信号转导结构域抑制T细胞活性。

98. 如权利要求96所述的方法,其中,通过能够与所述第二信号转导多肽特异性结合的识别多肽特异性结合的靶配体是在健康细胞和/或非靶细胞上发现的配体。

99. 如权利要求96-98中任一项所述的方法,其中,通过能够与所述第二信号转导多肽特异性结合的识别多肽特异性结合的靶配体是在健康细胞和/或非靶细胞上发现而未在病变细胞和/或靶细胞上发现的配体。

嵌合抗原受体相关的方法和组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 根据35U.S.C. §119 (e), 本申请要求2015年11月23日递交的美国临时申请No. 62/258,712的权益, 以引用的方式将其内容整体并入本文。

[0003] 政府支持

[0004] 本发明是在由美国国立卫生研究院资助的项目No. 186574的政府支持下完成的。美国政府对本发明拥有一定的权利。

[0005] 序列列表

[0006] 本申请包含以ASCII格式电子提交的序列列表, 并在此以引用的方式将其整体并入。所述ASCII副本(创建于2016年11月17日)被命名为701586-082751-PCT_SL.txt, 且大小为1780字节。

技术领域

[0007] 本文描述的技术涉及嵌合抗原受体(CAR), 例如多组分CAR。

背景技术

[0008] 治疗癌症的一种方法是免疫疗法, 代替向患者提供对癌症细胞有毒的药物, 该方法向患者提供的是促进机体自身的免疫系统来更有效地攻击癌症本身的疗法。T细胞是免疫系统的一部分, 负责识别机体内的外来细胞或者病变细胞的存在, 并杀死病变细胞或者募集其它免疫细胞的帮助来完成该目标。

[0009] T细胞通过使用其细胞表面上称为T细胞受体(TCR)的受体来识别它们的靶细胞。TCR具有识别部分和信号转导部分。当识别部分结合至在病变细胞存在的情况下于体内形成的天然复合体时, 信号转导部分被激活, 导致T细胞发挥杀伤活性或者募集其它免疫细胞来破坏病变细胞。

[0010] 称为“CAR-T”的疗法试图帮助T细胞识别癌症细胞。这通过在基因学上改造T细胞而使其表达嵌合抗原受体(CAR)实现。CAR是改造的TCR, 其中天然的识别部分被移除, 取而代之的是合成的识别部分, 该识别部分被设计通过非常特异性地检测对癌症细胞而言独特的分子(例如癌症细胞标记物)的存在而用于更有效地识别癌症细胞。这些CAR-T细胞随后被给予至癌症患者。在患者体内, 其合成的CAR分子将结合至表达标记物的癌症细胞, 并且在进行结合时, 激活T细胞, 引起患者的自身免疫系统攻击癌症。

发明内容

[0011] 尽管传统的CAR-T是强大的工具, 但其明显缺乏灵活性。例如, 当给予CAR-T细胞时, 一旦它发现癌症细胞将会立即激活免疫系统, 并且这种激活将会持续直至癌症被根除或者T细胞死亡。在一些患者中, 可能期望免疫系统的激活被延迟或者关闭, 例如如果免疫系统激活导致副作用或者待给予另一疗法。另外, CAR-T受限于对癌症细胞上的单一标记物的识别。使用多个标记物需要多种不同的CAR, 并且一旦细胞被改造并给予至患者就不可能

改变其识别的何种标记物以及多少标记物。

[0012] 本文描述的是改进的CAR-T技术,其涉及多组分CAR。在多组分CAR中,CAR的信号转导部分和识别部分被分开并作为两种不同的多肽存在。多组分CAR的识别部分自身可以结合至癌症细胞标记物,但是不会激活T细胞。多组分CAR的信号转导部分自身不能被启动,并因此不会激活T细胞。然而,当识别多肽和信号转导多肽一起存在时,它们可以相互结合并随后作为完整的CAR发挥作用。

[0013] CAR的结构方面的这一改变使CAR更为灵活。例如,如果将T细胞改造为只具有多组分CAR的信号转导部分并随后给予至受试者时,医生可以提供多组分CAR的识别部分作为独立的药物,使得医生能够控制何时激活免疫系统以及激活多久。此外,如果特定的癌症细胞标记物的使用被证明是无效的或者没有达到预期效果,医生可以通过仅给予新的识别多肽即可转而使用第二识别多肽。这与传统的CAR-T方法形成对比,传统的CAR-T需要设计整个新的CAR-T细胞和/或者强制患者等待由初始的CAR-T细胞导致的副作用结束。

[0014] 另外,本文描述的是多组分CAR,这使得非常先进的疗法成为可能。例如,本文描述的技术通过使用多种识别分子,当其识别标记物1或者标记物2时,都可以向免疫系统下达指令以进行激活。或者,当标记物1(在癌症细胞上发现)被识别,但在相同位置没有标记物3(在健康细胞上发现)被识别时,指令可被下达给免疫系统以进行激活。这种执行逻辑运算的能力使得CAR-T疗法能够以相当低的成本、并且以传统的CAR-T疗法不能的方式被调整至个体患者的需求。

[0015] 在任何所述实施方式的一个方面,本文描述的是包含多组分嵌合抗原受体(CAR)的组合物;该多组分CAR包含:a)第一识别多肽,该第一识别多肽包含1)对第一靶配体而言特异性的抗体试剂和2)蛋白质相互作用结构域;以及b)信号转导多肽,该信号转导多肽包含1)可以特异性地结合第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域的细胞外蛋白质相互作用结构域和2)细胞内T细胞受体(TCR)信号转导结构域。在任何所述方面的一些实施方式中,蛋白质相互作用结构域是亮氨酸拉链结构域。在任何所述方面的一些实施方式中,一个亮氨酸拉链结构域是BZip(RR),且第二亮氨酸拉链结构域是AZip(EE)。在任何所述方面的一些实施方式中,蛋白质相互作用结构域是PSD95-Dlg1-zo-1(PDZ)结构域。在任何所述方面的一些实施方式中,一个蛋白质相互作用结构域是链霉亲和素,且第二蛋白质相互作用结构域是链霉亲和素结合蛋白(SBP)。在任何所述方面的一些实施方式中,一个蛋白质相互作用结构域是mTOR的FKBP结合结构域(FRB),且第二蛋白质相互作用结构域是FK506结合蛋白(FKBP);一个蛋白质相互作用结构域是亲环素-Fas融合蛋白(CyP-Fas),且第二蛋白质相互作用结构域是FK506结合蛋白(FKBP);一个蛋白质相互作用结构域是钙调神经磷酸酶A(CNA),且第二蛋白质相互作用结构域是FK506结合蛋白(FKBP);一个蛋白质相互作用结构域是赤霉素不敏感型(GIA),且第二蛋白质相互作用结构域是赤霉素不敏感矮化1型(gibberellin insensitive dwarf1;GID1);一个蛋白质相互作用结构域是Snap标签,且第二蛋白质相互作用结构域是Halo标签;或者一个蛋白质相互作用结构域是T14-3-3-cdeltaC,且第二蛋白质相互作用结构域是PMA2的C端肽(CT52)。在任何所述方面的一些实施方式中,一个蛋白质相互作用结构域是PYL,且第二蛋白质相互作用结构域是ABI。在任何所述方面的一些实施方式中,一个蛋白质相互作用结构域是核苷酸标签,且第二蛋白质相互作用结构域是锌指结构域。在任何所述方面的一些实施方式中,识别多肽的蛋白质相互

作用结构域是核苷酸标签,且信号转导多肽的细胞外蛋白质相互作用结构域是锌指结构域。在任何所述方面的一些实施方式中,核苷酸标签是DNA标签。在任何所述方面的一些实施方式中,DNA标签是dsDNA标签。

[0016] 在任何所述方面的一些实施方式中,该组合物进一步包含第二识别多肽,该第二识别多肽包含1)对第二靶配体而言特异性的抗体试剂和2)与信号转导多肽的蛋白质相互作用结构域竞争结合第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域的蛋白质相互作用结构域。在任何所述方面的一些实施方式中,比起信号转导多肽的蛋白质相互作用结构域与第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域的亲和力,第二识别多肽的蛋白质相互作用结构域与第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域具有更大的亲和力。在任何所述方面的一些实施方式中,通过第二识别多肽识别的靶配体在健康细胞和/或非靶细胞上发现而未在病变细胞和/或靶细胞上发现。

[0017] 在任何所述方面的一些实施方式中,该组合物进一步包含第二识别多肽,所述第二识别多肽包含1)对第二靶配体而言特异性的抗体试剂和2)蛋白质相互作用结构域;并且信号转导多肽进一步包含与第二识别多肽的蛋白质相互作用结构域特异性结合的次级蛋白质相互作用结构域。在任何所述方面的一些实施方式中,比起信号转导多肽的第一蛋白质相互作用结构域与第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域的亲和力,信号转导多肽的次级蛋白质相互作用结构域与第二识别多肽的蛋白质相互作用结构域的亲和力更弱。在任何所述方面的一些实施方式中,第一识别多肽和第二识别多肽各自包含次级蛋白质相互作用结构域;并且次级蛋白质相互作用结构域彼此特异性地结合。

[0018] 在任何所述实施方式的一个方面,本文描述了包含多组分嵌合抗原受体(CAR)的组合物;该多组分CAR包含:a)第一识别多肽,所述第一识别多肽包含1)对第一靶配体而言特异性的抗体试剂和2)核苷酸标签的第一部分;b)第二识别多肽,所述第二识别多肽包含1)对第二靶配体而言特异性的抗体试剂和2)核苷酸标签的第二部分;以及c)信号转导多肽,所述信号转导多肽包含1)能够与通过核苷酸标签的各个部分的结合形成的完整的核苷酸标签特异性结合的细胞外锌指结构域和2)细胞内T细胞受体(TCR)信号转导结构域;其中,除非核苷酸标签的各个部分相互结合,否则不能被锌指结构域特异性地结合。在任何所述方面的一些实施方式中,该核苷酸标签的第一部分是ssDNA,且该核苷酸标签的第二部分是互补的ssDNA。在任何所述方面的一些实施方式中,该组合物进一步包含第三识别多肽,所述第三识别多肽编码1)对第三靶配体而言特异性的抗体试剂和2)核苷酸标签的第三部分;其中,核苷酸标签的各个部分或者各个部分的成对组合不能被锌指结构域特异性地结合,但当所有三个部分相互结合时,产生的复合体可以被锌指结构域特异性地结合。在任何所述方面的一些实施方式中,1)该核苷酸标签的第一部分是ssDNA;并且2)该核苷酸标签的第二部分和第三部分是ssDNA,该第二部分和第三部分各自与第一部分互补,并且3)该核苷酸标签的第二部分和第三部分具有相互不重叠的序列。

[0019] 在任何所述实施方式的一个方面,本文描述的是包含多组分嵌合抗原受体(CAR)的组合物;该多组分CAR包含:a)第一识别多肽,所述第一识别多肽包含1)对第一靶配体而言特异性的抗体试剂和2)第一核苷酸标签;b)第二识别多肽,所述第二识别多肽包含1)对第二靶配体而言特异性的抗体试剂和2)第二核苷酸标签;以及c)信号转导多肽,所述信号转导多肽包含1)能够与第一核苷酸标签特异性结合的细胞外锌指结构域和2)细胞内T细胞

受体 (TCR) 信号转导结构域;其中,当核苷酸标签相互结合时,该核苷酸标签不能被锌指结构域特异性结合。在任何所述方面的一些实施方式中,第一核苷酸标签形成发夹环结构,并且其中,第二核苷酸标签与第一核苷酸标签(包含发夹环的一条腿的部分和发夹环的环的部分)的部分互补。在任何所述方面的一些实施方式中,第二靶配体在健康细胞和/或非靶细胞上发现而未在病变细胞和/或靶细胞上发现。

[0020] 在任何所述方面的一些实施方式中,靶配体是在病变细胞和/或靶细胞上发现的配体。在任何所述方面的一些实施方式中,通过识别多肽(可以与信号转导多肽特异性结合)特异性结合的靶配体是在病变细胞和/或靶细胞上发现的配体。在任何所述方面的一些实施方式中,通过识别多肽(可以与信号转导多肽特异性结合)特异性结合的靶配体是在病变细胞和/或靶细胞上发现而未在健康细胞和/或非靶细胞上发现的配体。在任何所述方面的一些实施方式中,病变细胞是癌细胞。

[0021] 在任何所述方面的一些实施方式中,抗体试剂选自于由如下所组成的组:免疫球蛋白分子、单克隆抗体、嵌合抗体、CDR移植抗体、人类抗体、人源化抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、二硫键连接的Fv、scFv、单域抗体、双价抗体(diabody)、多特异性抗体、双重特异性抗体(dualspecific antibody)、抗独特型抗体和双特异性抗体(bispecific antibody)。在任何所述方面的一些实施方式中,细胞内TCR信号转导结构域是来自选自于由如下所组成的组中的蛋白的信号转导结构域:TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54(ICAM)、CD83、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD150(SLAMF1)、CD152(CTLA4)、CD223(LAG3)、CD270(HVEM)、CD273(PD-L2)、CD274(PD-L1)、CD278(ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C1、SLP76、TRIM、ZAP70和41BB。

[0022] 在任何所述方面的一些实施方式中,根据任何所述实施方式,该组合物进一步包含第二多组分CAR。在任何所述方面的一些实施方式中,第二多组分CAR的抗体试剂特异性结合至不同于通过第一多组分CAR的抗体试剂结合的靶配体。在任何所述方面的一些实施方式中,第二多组分CAR的细胞内T细胞受体(TCR)信号转导结构域抑制T细胞活性。在任何所述方面的一些实施方式中,抑制T细胞活性的第二多组分CAR的细胞内T细胞受体(TCR)信号转导结构域包含选自于由PD1、CTLA4、BTLA、KIR、LAG-3、TIM-3、A2aR、LAIR-1和TGIT所组成的组中的多肽的信号转导结构域。在任何所述方面的一些实施方式中,通过识别多肽(可以与第二多组分CAR的信号转导多肽特异性结合)特异性结合的靶配体是在健康细胞和/或非靶细胞上发现的配体。在任何所述方面的一些实施方式中,通过识别多肽(可以与第二多组分CAR的信号转导多肽特异性结合)特异性结合的靶配体是在健康细胞和/或非靶细胞上发现而未在病变细胞和/或靶细胞上发现的配体。

[0023] 在任何所述方面的一些实施方式中,信号转导多肽存在于细胞的膜上。在任何所述方面的一些实施方式中,一个或多个识别多肽存在于细胞外间隙。

[0024] 在任何所述实施方式的一个方面,本文描述了表达上述实施方式任一者所述的组合物的工程化的细胞。在任何所述实施方式的一个方面,本文描述了工程化的细胞,该工程化的细胞包含编码上述实施方式的任一者所述的组合物的核酸序列。在任何所述方面的一些实施方式中,细胞是T细胞、NK细胞或者NKT细胞。在任何所述方面的一些实施方式中,细胞是T细胞。

[0025] 在任何所述实施方式的一个方面,本文描述了杀死靶细胞的方法,该方法包括用

上述实施方式的任一者的组合物或细胞接触靶细胞。在任何所述实施方式的一个方面,本文描述了治疗疾病的方法,包括向需要治疗的受试者给予上述实施方式的任一者的组合物或细胞。在任何所述方面的一些实施方式中,该疾病选自于由以下所组成的组:癌症;实体癌;乳腺癌;肺癌;急性淋巴细胞白血病;多发性骨髓瘤和难治性多发性骨髓瘤。在任何所述实施方式的一个方面,本文描述的是治疗癌症的方法,包括向需要治疗的受试者给予上述实施方式的任一者的组合物或细胞。在任何所述方面的一些实施方式中,该细胞对受试者而言是自体的。在任何所述方面的一些实施方式中,所给予的细胞源自和/或传代自从受试者获得的细胞,并且该细胞经离体修饰以包含至少一种多组分CAR。

[0026] 在任何所述实施方式的一个方面,本文描述的是工程化的细胞,该工程化的细胞包含多组分嵌合抗原受体(CAR)信号转导多肽,该信号转导多肽包含1)细胞外蛋白质相互作用结构域和2)细胞内T细胞受体(TCR)信号转导结构域。在任何所述方面的一些实施方式中,该蛋白质相互作用结构域是亮氨酸拉链结构域。在任何所述方面的一些实施方式中,该亮氨酸拉链结构域是BZip(RR)或AZip(EE)。在任何所述方面的一些实施方式中,该蛋白质相互作用结构域是PSD95-Dlg1-zo-1(PDZ)结构域。在任何所述方面的一些实施方式中,该蛋白质相互作用结构域是链霉亲和素或者链霉亲和素结合蛋白(SBP)。在任何所述方面的一些实施方式中,该蛋白质相互作用结构域是mTOR的FKBP结合结构域(FRB)或者FK506结合蛋白(FKBP)。在任何所述方面的一些实施方式中,该蛋白质相互作用结构域是PYL或者ABI。在任何所述方面的一些实施方式中,该蛋白质相互作用结构域是核苷酸标签或者锌指结构域。在任何所述方面的一些实施方式中,该核苷酸标签是DNA标签。在任何所述方面的一些实施方式中,该DNA标签是dsDNA标签。在任何所述方面的一些实施方式中,该蛋白质相互作用结构域是锌指结构域。在任何所述方面的一些实施方式中,该信号转导多肽存在于细胞的膜上。在任何所述方面的一些实施方式中,该细胞是T细胞、NK细胞或者NKT细胞。在任何所述方面的一些实施方式中,该细胞是T细胞。在任何所述方面的一些实施方式中,细胞内TCR信号转导结构域是来自选自于由如下所组成的组中的蛋白的信号转导结构域:TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54(ICAM)、CD83、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD150(SLAMF1)、CD152(CTLA4)、CD223(LAG3)、CD270(HVEM)、CD273(PD-L2)、CD274(PD-L1)、CD278(ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C SLP76、TRIM、ZAP70和41BB。在任何所述方面的一些实施方式中,该信号转导多肽进一步包含与第二识别多肽的蛋白质相互作用结构域特异性结合的次级蛋白质相互作用结构域。在任何所述方面的一些实施方式中,该细胞进一步包含任何上述实施方式所述的第二多组分CAR信号转导肽。

[0027] 在任何所述实施方式的一个方面,本文描述了治疗疾病的方法,该方法包括向需要治疗的受试者给予:细胞,该细胞包含多组分嵌合抗原受体(CAR)信号转导多肽;以及第一识别多肽,该第一识别多肽包含1)对第一靶配体而言特异性的抗体试剂和2)能够与信号转导多肽的蛋白质相互作用结构域特异性结合的蛋白质相互作用结构域。在任何所述方面的一些实施方式中,该抗体试剂选自于由以下所组成的组:免疫球蛋白分子、单克隆抗体、嵌合抗体、CDR移植抗体、人类抗体、人源化抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、二硫键连接的Fv、scFv、单域抗体、双价抗体、多特异性抗体、双重特异性抗体、抗独特型抗体和双特异性抗体。在任何所述方面的一些实施方式中,该细胞对受试者而言是自体的。在任何所述方面的

一些实施方式中,所给予的细胞源自和/或传代自从受试者获得的细胞,并且该细胞经离体修饰以包含至少一种多组分CAR。在任何所述方面的一些实施方式中,该蛋白质相互作用结构域是亮氨酸拉链结构域。在任何所述方面的一些实施方式中,一个亮氨酸拉链结构域是BZip (RR),且第二亮氨酸拉链结构域是AZip (EE)。在任何所述方面的一些实施方式中,该蛋白质相互作用结构域是PSD95-Dlg1-zo-1 (PDZ) 结构域。在任何所述方面的一些实施方式中,一个蛋白质相互作用结构域是链霉亲和素,且第二蛋白质相互作用结构域是链霉亲和素结合蛋白 (SPB)。在任何所述方面的一些实施方式中,一个蛋白质相互作用结构域是mTOR的FKBP结合结构域 (FRB),且第二蛋白质相互作用结构域是FK506结合蛋白 (FKBP);一个蛋白质相互作用结构域是亲环素-Fas融合蛋白 (CyP-Fas),且第二蛋白质相互作用结构域是FK506结合蛋白 (FKBP);一个蛋白质相互作用结构域是钙调神经磷酸酶A (CNA),且第二蛋白质相互作用结构域是FK506结合蛋白 (FKBP);一个蛋白质相互作用结构域是赤霉素不敏感型 (GIA),且第二蛋白质相互作用结构域是赤霉素不敏感矮化1型 (GID1);一个蛋白质相互作用结构域是Snap标签,且第二蛋白质相互作用结构域是Halo标签;或者一个蛋白质相互作用结构域是T14-3-3-cdeltaC,且第二蛋白质相互作用结构域是PMA2的C端肽 (CT52)。在任何所述方面的一些实施方式中,当一个蛋白质相互作用结构域是mTOR的FKBP结合结构域 (FRB),且第二蛋白质相互作用结构域是FK506结合蛋白 (FKBP)时,该方法进一步包括给予他克莫司、rapalog或者依维莫司;当一个蛋白质相互作用结构域是亲环素-Fas融合蛋白 (CyP-Fas),且第二蛋白质相互作用结构域是FK506结合蛋白 (FKBP)时,该方法进一步包括给予FKCsA;当一个蛋白质相互作用结构域是钙调神经磷酸酶A (CNA),且第二蛋白质相互作用结构域是FK506结合蛋白 (FKBP)时,该方法进一步包括给予FK506;当一个蛋白质相互作用结构域是赤霉素不敏感型 (GIA),且第二蛋白质相互作用结构域是赤霉素不敏感矮化1型 (GID1)时,该方法进一步包括给予赤霉素;当一个蛋白质相互作用结构域是Snap标签,且第二蛋白质相互作用结构域是Halo标签时,该方法进一步包括给予HaXS;或者当一个蛋白质相互作用结构域是T14-3-3-cdeltaC,且第二蛋白质相互作用结构域是PMA2的C端肽 (CT52)时,该方法进一步包括给予壳梭孢素。在任何所述方面的一些实施方式中,一个蛋白质相互作用结构域是PYL,且第二蛋白质相互作用结构域是ABI。在任何所述方面的一些实施方式中,识别多肽的蛋白质相互作用结构域是核苷酸标签,且信号转导多肽的细胞外蛋白质相互作用结构域是锌指结构域。在任何所述方面的一些实施方式中,该核苷酸标签是DNA标签。在任何所述方面的一些实施方式中,该DNA标签是dsDNA标签。在任何所述方面的一些实施方式中,该方法进一步包括给予第二识别多肽,该第二识别多肽包含1) 对第二靶配体而言特异性的抗体试剂和2) 与信号转导多肽的蛋白质相互作用结构域竞争结合第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域的蛋白质相互作用结构域。在任何所述方面的一些实施方式中,比起信号转导多肽的蛋白质相互作用结构域与第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域的亲和力,第二识别多肽的蛋白质相互作用结构域与第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域具有更大的亲和力。在任何所述方面的一些实施方式中,通过第二识别多肽识别的靶配体在健康细胞和/或非靶细胞上发现而未在病变细胞和/或靶细胞上发现。

[0028] 在任何所述方面的一些实施方式中,该方法进一步包括给予:第二识别多肽,所述第二识别多肽包含1) 对第二靶配体而言特异性的抗体试剂和2) 蛋白质相互作用结构域;并且信号转导多肽进一步包含与第二识别多肽的蛋白质相互作用结构域特异性结合的次级

蛋白质相互作用结构域。在任何所述方面的一些实施方式中,比起信号转导多肽的第一蛋白质相互作用结构域与第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域的亲合力,信号转导多肽的次级蛋白质相互作用结构域与第二识别多肽的蛋白质相互作用结构域的亲合力更弱。在任何所述方面的一些实施方式中,第一和第二识别多肽各自包含次级蛋白质相互作用结构域;并且其中,该次级蛋白质相互作用结构域彼此特异性地结合。

[0029] 在任何所述方面的一些实施方式中,该方法进一步包括给予:a) 第一识别多肽,该第一识别多肽包含1) 对第一靶配体而言特异性的抗体试剂和2) 核苷酸标签的第一部分;b) 第二识别多肽,所述第二识别多肽包含1) 对第二靶配体而言特异性的抗体试剂和2) 核苷酸标签的第二部分;其中,信号转导多肽包含1) 能够与通过核苷酸标签的各个部分的结合形成的完整的核苷酸标签特异性结合的细胞外锌指结构域;并且其中,除非核苷酸标签的各个部分相互结合,否则不能被锌指结构域特异性结合。在任何所述方面的一些实施方式中,该核苷酸标签的第一部分是ssDNA,且核苷酸标签的第二部分是互补的ssDNA。在任何所述方面的一些实施方式中,该方法进一步包括给予第三识别多肽,所述第三识别多肽编码1) 对第三靶配体而言特异性的抗体试剂和2) 核苷酸标签的第三部分;其中,核苷酸标签的各个部分或者各个部分的成对组合不能被锌指结构域特异性结合,但当所有三个部分相互结合时,产生的复合体可以被锌指结构域特异性地结合。在任何所述方面的一些实施方式中,1) 核苷酸标签的第一部分是ssDNA;并且2) 核苷酸标签的第二部分和第三部分是ssDNA,该第二部分和第三部分各自与第一部分互补;并且3) 核苷酸标签的第二部分和第三部分具有相互不重叠的序列。

[0030] 在任何所述方面的一些实施方式中,该方法包括给予:a) 第一识别多肽,该第一识别多肽包含1) 对第一靶配体而言特异性的抗体试剂和2) 第一核苷酸标签;b) 第二识别多肽,该第二识别多肽包含1) 对第二靶配体而言特异性的抗体试剂和2) 第二核苷酸标签;其中,信号转导多肽包含1) 能够与第一核苷酸标签特异性结合的细胞外锌指结构域;并且其中,当核苷酸标签相互结合时,不能被锌指结构域特异性地结合。在任何所述方面的一些实施方式中,第一核苷酸标签形成发夹环结构,并且其中,第二核苷酸标签与包含发夹环的一条腿的部分和发夹环的环的部分的第一核苷酸标签的部分互补。在任何所述方面的一些实施方式中,第二靶配体在健康细胞和/或非靶细胞上发现而未在病变细胞和/或靶细胞上发现。

[0031] 在任何所述方面的一些实施方式中,该靶配体是在病变细胞和/或靶细胞上发现的配体。在任何所述方面的一些实施方式中,通过能够与信号转导多肽特异性结合的识别多肽特异性结合的靶配体是在病变细胞和/或靶细胞上发现的配体。在任何所述方面的一些实施方式中,通过能够与信号转导多肽特异性结合的识别多肽特异性结合的靶配体是在病变细胞和/或靶细胞上发现而未在健康的和/或非靶细胞上发现的配体。在任何所述方面的一些实施方式中,该病变细胞是癌细胞。

[0032] 在任何所述方面的一些实施方式中,该细胞包含第二多组分CAR信号转导多肽,并且向受试者进一步给予第二识别多肽,该第二识别多肽包含1) 对第二靶配体而言特异性的抗体试剂和2) 能够与第二信号转导多肽的蛋白质相互作用结构域特异性结合的蛋白质相互作用结构域。在任何所述方面的一些实施方式中,该第二多组分CAR信号转导多肽的细胞内T细胞受体(TCR)信号转导结构域抑制T细胞活性。在任何所述方面的一些实施方式中,通

过能够与第二信号转导多肽特异性结合的识别多肽特异性结合的靶配体是在健康细胞和/或非靶细胞上发现的配体。在任何所述方面的一些实施方式中,通过能够与第二信号转导多肽特异性结合的识别多肽特异性结合的靶配体是在健康细胞和/或非靶细胞上发现而未在病变细胞和/或靶细胞上发现的配体。

附图说明

[0033] 图1A-图1B描述了多种CAR设计的示意图。图1A描述了临床上采用CAR的过继性免疫疗法。图1B描述了多种现有CAR设计的对比。scFv是单链抗体。CD3 ζ ,来自CD3 ζ 链的T细胞受体信号转导结构域。

[0034] 图2A-图2B描述了SUPRA CAR平台设计的示意图。图2A描述了SUPRA如何允许整合多种抗原信号。图2B显示SUPRA可以通过使用亮氨酸拉链或者锌指结构作为可编程的相互作用结构域而被实现。

[0035] 图3A-图3C描述了亮氨酸拉链CAR的设计、逻辑运算和T细胞信号转导的正交调控。图3A描述了亮氨酸拉链CAR设计的示意图。将会在该项目中使用的亮氨酸拉链由酸性的(AZip)结构域和碱性的(BZip)结构域组成。与BZip具有不同亲和力的AZip是可以获得的。图3B显示逻辑运算例如非门可以使用zipCAR创建。图3C显示zipCAR可以被制成与正交拉链结合,从而允许多种T细胞信号转导通路的独立调控。

[0036] 图4显示了由zipCAR引起的原代CD4T细胞的活化。当与表达RR或者EE拉链的细胞混合时,表达Bzip (RR) CAR的CD4T细胞进行IFN- γ 和IL-2的分泌。只有表达EE拉链 (RR的互补对)的细胞会激活Bzip CAR。

[0037] 图5显示了由抗体-拉链融合蛋白和靶肿瘤细胞引起的原代CD4T细胞的活化。将抗Her2-拉链融合蛋白添加到包含RR-CAR修饰的CD4T细胞和表达Her2的肿瘤细胞的培养基。包含EE拉链的抗体-拉链融合蛋白可以刺激原代T细胞产生IFN- γ 。

[0038] 图6A-图6D描述了显示出SUPRA CAR设计中的37个亮氨酸拉链交叉反应性的热度图(heatmap)。图6A显示对各亮氨酸拉链测试与其自身以及其它亮氨酸拉链的结合。选择这些拉链来覆盖对其它拉链而言的宽范围的亲和力和特异性。CAR中的亮氨酸拉链对之间的相互作用通过NFAT转录活性来测量。编号1-37是指先前文献中描述的不同的亮氨酸拉链[Reinke等,(2010)]。顶部的编号代表在效应细胞上表达的亮氨酸拉链,而侧面的编号代表在靶细胞上表达的亮氨酸拉链。图6B显示出从图6A示出的数据中鉴定出三个正交对。图6C显示出从相同的数据集中鉴定出另外4个潜在的正交拉链对。注意到当效应细胞表达亮氨酸拉链11且靶细胞表达亮氨酸拉链33时,未观察到NFAT活化。然而,当将表达亮氨酸拉链33的效应细胞与表达亮氨酸拉链11的靶细胞共培养时,高的NFAT转录活性被测量到。潜在地,亮氨酸拉链33可以用来在效应细胞上表达,并且使用亮氨酸拉链11与scFv融合,scFv可以靶向癌症细胞。图6D显示出BZIP和AZIP之间的不同的结合亲和力引起不同的NFAT转录活性。两个亮氨酸拉链对之间的结合亲和力是从先前报道的数据得到。

[0039] 图7显示了用小分子诱导物引起的表达FKBP CAR的Jurkat T细胞的活化。当该工程化的T细胞与在表面上表达FRB的靶细胞混合时,小分子的rapalog的添加引起NFAT转录响应的活化。

[0040] 图8A-图8C描述了锌指CAR的设计、逻辑运算和T细胞信号转导的正交调控。图8A描

AZIP zipFv进行的Jurkat活化的图表。如所示出的,通过对抗Her2-BZIP zipFv进行竞争可以降低活化。改变拉链亲和力可以调节降低的水平。非竞争性BZIP (syn6) 不会降低zipCAR活化。

[0051] 图19A-图19C显示了在SUPRA CAR平台中使用正交亮氨酸拉链和PD-1信号转导结构域。图19C描述了用于产生具有CD3 ζ 、CD28以及4-1BB作为细胞内信号转导结构域的zipCAR的37个拉链(既有AZIP又有BZIP)的热度图。通过慢病毒转导将各zipCAR转导入含有NFAT转录报告基因(pNFAT-GFP)的Jurkat T细胞中。当zipCAR被激活时,pNFAT-GFP报告基因被激活并且产生GFP表达。GFP表达用流式细胞术定量。通过与表达另一拉链的“死亡(dead)”版本(不与任何信号结构域融合的)的Jurkat靶细胞系共培养检测各拉链。针对对所有其它拉链而言的靶细胞系测试每个zipCAR,从而鉴定可以用于SUPRA CAR平台中的正交拉链对。图19B显示了基于Jurkat T细胞中的NFAT转录活性将拉链的三个正交对进行鉴定。图19C显示了将PD-1细胞内信号转导结构域融合至抗间皮素scFv(非zipCAR),并且显示了PD-1可以抑制Jurkat T细胞中的抗HER2CAR活性。

[0052] 图20描述了来自调控不同通路的SUPRA CAR的示例性行为。

[0053] 图21描述了整合人T细胞中的多通路PiggyBAC。将各自表达GFP、mCherry或者BFP的三种piggyBAC载体和三种分开的不同的抗生素抗性基因同时整合入Jurkat T细胞中。在选择三种抗生素后,多于85%的细胞表达全部的三种荧光报告蛋白。

具体实施方式

[0054] 本文描述的是嵌合抗原受体(CAR),其中CAR的识别部分和信号转导部分是分开多肽。构成完整的CAR的两个分开的多肽可以相互作用并且通过蛋白质相互作用结构域形成完整的CAR。这允许能够进行复杂的逻辑运算的灵活的、模块化的CAR-T治疗,为免疫疗法提供了更精确且更有效的方法。

[0055] 在任何所述实施方式的一个方面是多组分嵌合抗原受体(CAR)和/或包含多组分CAR的组合物。多组分CAR在本文中也不同地称为SMART CAR或SUPRA。

[0056] 如本文所使用的“嵌合抗原受体”或“CAR”是指人工构建的杂合多肽,该杂合多肽包含连接至细胞信号转导结构域和/或细胞活化结构域的抗原结合结构域(例如抗体的抗原结合部分(例如scFv))。在一些实施方式中,该细胞信号转导结构域可以是T细胞信号转导结构域。在一些实施方式中,该细胞活化结构域可以是T细胞活化结构域。CAR能够利用单克隆抗体的抗原结合特性以非MHC限制性的方式将T细胞和其它免疫细胞的特异性和反应性重定向至所选择的靶标。非MHC限制性的抗原识别给予表达CAR的T细胞与抗原处理无关的识别抗原的能力,因此绕过了肿瘤逃逸的主要机制。此外,当在T细胞内表达时,CAR有利地不与内源性T细胞受体(TCR)的 α 链和 β 链二聚化。通常地,CAR的细胞外结合结构域由源自鼠或人源的单克隆抗体的可变重链区和轻链区进行融合的单链可变片段(scFv)组成。或者,可使用的scFv源自Fab(而不是来自抗体,例如,从Fab文库获得),在各种实施方式中,将这一scFv融合至跨膜结构域,并随后融合至细胞内信号转导结构域。“第一代”CAR包括那些仅在抗原结合时提供CD3 ζ 信号的CAR,“第二代”CAR包括那些同时提供共刺激作用(例如CD28或CD137)和活化作用(CD3Q)的CAR。“第三代”CAR包括那些提供多种共刺激作用(例如CD28和CD137)和活化作用(CD3Q)的CAR。在各种实施方式中,选择对抗原而言具有高亲和力

或亲合力的CAR。可以在如下中发现对CAR的进一步讨论,例如,Maus等,Blood 2014 123: 2624-35;Reardon等,Neuro-Oncology 2014,16,1441-1458;Hoyos等,Haematologica 2012,97,1622;Byrd等,J Clin Oncol 2014,32,3039-47;Maher等,Cancer Res 2009,69, 4559-4562;以及Tamada等,Clin Cancer Res 2012,18,6436-6445,以引用的方式将其各自整体并入本文。

[0057] 如本文所使用的“多组分CAR”是指包含至少两个分开的多肽的CAR,两个多肽都不能独自同时进行配体识别和信号转导活化。在一些实施方式中,该至少两个分开的多肽各自包含允许相互作用(例如,分开的多肽的结合)的蛋白质相互作用结构域。在一些实施方式中,该至少两个分开的多肽中的一个是具有细胞内T细胞受体(TCR)信号转导结构域的跨膜多肽,并且该至少两个分开的多肽中的第二个是具有配体结合结构域的细胞外多肽。在一些实施方式中,多组分CAR可以包含两个、三个、四个、五个或更多个分开的多肽。

[0058] 在实施方式的一个方面,本文描述的是多组分嵌合抗原受体(CAR);该多组分CAR包含:a)第一识别多肽,该第一识别多肽包含1)对第一靶配体而言特异性的抗体试剂和2)蛋白质相互作用结构域;以及b)信号转导多肽,该信号转导多肽包含1)能够与第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域特异性结合的细胞外蛋白质相互作用结构域和2)细胞内T细胞受体(TCR)信号转导结构域。

[0059] 如本文所使用的“识别多肽”是指具有配体结合结构域的细胞外多肽。在一些实施方式中,该配体结合结构域可以是抗体试剂。在一些实施方式中,该识别多肽可以进一步包含蛋白质相互作用结构域。

[0060] 如本文所使用的“信号转导多肽”是指具有细胞内T细胞受体(TCR)信号转导结构域的跨膜多肽。在一些实施方式中,该信号转导多肽可以进一步包含蛋白质相互作用结构域。在一些实施方式中,该信号转导多肽可以进一步包含细胞外蛋白质相互作用结构域。

[0061] 如本文所使用的“蛋白质相互作用结构域”是指允许两个分开的多肽彼此特异性结合的结构域。本文其它地方提供了许多示例性的蛋白质相互作用结构域以及蛋白质相互作用结构域对。在一些实施方式中,多组分CAR的多肽的蛋白质相互作用结构域可以特异性地结合(例如,蛋白质相互作用结构域中的一个可以特异性地结合)至多组分CAR的第二蛋白质相互作用结构域。在一些实施方式中,当存在两个分开的蛋白质相互作用结构域时,可以发生特异性结合。在一些实施方式中,当存在三个以上的分开的蛋白质相互作用结构域时,可以发生特异性结合。示例性的蛋白质相互作用结构域在本领域中是已知的并且可以用于本文所述的方面的实施方式中。

[0062] 在本文所述的任何方面的一些实施方式中,蛋白质相互作用结构域可以是亮氨酸拉链结构域。亮氨酸拉链结构域是一类通常见于转录因子中的蛋白质-蛋白质相互作用结构域,其特征在于通过 α -螺旋将亮氨酸残基均匀地间隔开。亮氨酸拉链可以形成异源二聚体或同源二聚体。许多亮氨酸拉链结构域以及它们彼此结合的能力在本领域中是已知的并且在如下中被进一步讨论,例如,Reinke等,JACS 2010,132,6025-31和Thomposon等,ACS Synth Biol 2012,1,118-129中,以引用的方式将其各自整体并入本文。在一些实施方式中,一个亮氨酸拉链结构域是BZip(RR),且第二亮氨酸拉链结构域是AZip(EE)。在一些实施方式中,BZip(RR)亮氨酸拉链结构域的序列为MDPDLEIRAAFLRQRNTALRTEVAELEQEVQRLENEVSQYETRYGPLGGGK(SEQ ID NO:2)。在一些实施方

式中，A Z i p (E E) 亮氨酸拉链结构域的序列为 MDPDL E I E A A F L E R E N T A L E T R V A E L R Q R V Q R L R N R V S Q Y R T R Y G P L G G G K (S E Q I D N O : 3) 。进一步的示例性亮氨酸拉链结构域在Reinke等, JACS 2010 132:6025-31中描述, 以引用的方式将其各自整体并入本文。例如, 合适的亮氨酸拉链结构域可以包括SYNZIP1至SYNZIP48, 以及BATF、FOS、ATF4、ATF3、BACH1、JUND、NFE2L3和HEPTAD。例如, 在Reinke等的图1中, 对这些结构域的不同组合的结合亲和力进行了描述。在一些实施方式中, 合适的亮氨酸拉链结构域对具有1000nM以下的解离常数(Kd)。在一些实施方式中, 合适的亮氨酸拉链结构域对具有100nM以下的解离常数(Kd)。在一些实施方式中, 合适的亮氨酸拉链结构域对具有10nM以下的解离常数(Kd)。在一些实施方式中, 合适的亮氨酸拉链结构域对具有1nM以下的解离常数(Kd)。

[0063] 进一步的示例性的蛋白质相互作用结构域对可以包括:a) PSD95-Dlg1-zo-1 (PDZ) 结构域;b) 链霉亲和素结构域和链霉亲和素结合蛋白 (SBP) 结构域; 以及c) PYL结构域和ABI结构域。

[0064] 在本文描述的任何方面的一些实施方式中, 该蛋白质相互作用结构域可以是化学诱导的蛋白质相互作用结构域, 例如, 仅在第三分子 (例如小分子或药物) 存在时才会特异性结合的结构域。示例性的化学诱导的蛋白质相互作用结构域对可以包括:mTOR (FRB) 的FKBP结合结构域和FK506结合蛋白 (FKBP) (其结合由他克莫司、依维莫司或rapalog激活); 亲环素-Fas融合蛋白 (CyP-Fas) 和FK506结合蛋白 (FKBP) (其结合由FKCsA激活); 钙调神经磷酸酶A (CNA) 和FK506结合蛋白 (FKBP) (其结合由FK506激活); 赤霉素不敏感型 (GIA) 和赤霉素不敏感矮化1型 (GID1) (其结合由赤霉素激活); Snap-标签和Halo标签 (其结合由HaXS激活); 以及T14-3-3-cdeltaC和PMA2的C端肽 (CT52) (其结合由壳梭孢素激活)。化学诱导的蛋白质相互作用结构域的进一步描述可见于本领域中, 例如, Miyamoto等, Nat Chem Biol 2012, Mar 25, 8 (5), 465-470以及Belshaw等, PNAS 1996, 93, 4604-4607。以引用的方式将其各自整体并入本文。

[0065] 在本文描述的任何方面的一些实施方式中, 蛋白质相互作用结构域可以包含至少一个核苷酸标签和至少一个锌指结构域。锌指结构域的特征在于锌离子的配位, 以稳定其三级结构。存在于锌指中的具体的折叠可以变化。在一些实施方式中, 锌指结构域可以是核苷酸结合的锌指结构域。在一些实施方式中, 锌指结构域可以是DNA结合的锌指结构域。在一些实施方式中, 识别多肽的蛋白质相互作用结构域是核苷酸标签并且信号转导多肽的细胞外蛋白质相互作用结构域是锌指结构域。在一些实施方式中, 核苷酸标签可以是DNA标签。在一些实施方式中, 核苷酸标签可以是包含所使用的锌指结构域的整体识别序列的dsDNA标签。示例性的锌指结构域及其同源核苷酸标签在本领域中加以描述, 例如, Mali等, Nature Methods 2013 10:403-406; 以引用的方式将其整体并入本文。在一些实施方式中, 锌指结构域可以是在Mali等, Nature Methods 2013, 10, 403-406中描述的sZF15。

[0066] 就可以在无第三多肽时特异性结合的单一识别多肽和单一信号转导多肽而言, 本文描述的多组分CAR将在靶配体的存在下活化。从而在靶配体的附近诱导T细胞活性。本文进一步描述了能够进行逻辑运算的多组分CAR, 例如, 充当与逻辑门、或逻辑门或者非逻辑门的多组分CAR。

[0067] 在一些方面, 本文描述的是允许与逻辑门的多组分CAR。在这些方面, 多组分CAR的激活仅在两个靶配体存在的情况下发生; 单一靶配体的识别不足以激活。这种多组分CAR可

以允许较大的特异性并减少脱靶效应。作为靶细胞或组织的良好标记物的任何单一配体都可能出现在受试者中的其它地方,导致脱靶效应。然而,要求识别两个分开的标记物配体降低了脱靶活性的几率。在任何实施方式的一个方面,本文描述的是多组分嵌合抗原受体(CAR);该多组分CAR包含:a)第一识别多肽,该第一识别多肽包含1)对第一靶配体而言特异性的抗体试剂和2)核苷酸标签的第一部分;b)第二识别多肽,该第二识别多肽包含1)对第二靶配体而言特异性的抗体试剂和2)核苷酸标签的第二部分;以及c)信号转导多肽,该信号转导多肽包含1)能够与通过核苷酸标签的各个部分的结合形成的完整的核苷酸标签特异性结合的细胞外锌指结构域和2)细胞内T细胞受体(TCR)信号转导结构域;其中,除非核苷酸标签的各个部分相互结合,否则不能被锌指结构域特异性结合。在一些实施方式中,核苷酸标签的第一部分是ssDNA,且核苷酸标签的第二部分是互补的ssDNA,从而当两个标签杂交时,它们形成可通过锌指结构域特异性结合的dsDNA。在一些实施方式中,核苷酸标签的第一部分是具有第一突出端的dsDNA,且核苷酸标签的第二部分具有互补突出端的dsDNA,从而使得dsDNA均不包含锌指结合所需的整个识别序列,并且当突出端杂交时,形成包含锌指结合所需的整个识别序列的单个dsDNA。图8A-图8C描述了包含锌指结构域的示例性的多组分CAR。

[0068] 在一些实施方式中,本文描述的是多组分嵌合抗原受体(CAR);该多组分CAR包含:a)第一识别多肽,该第一识别多肽包含1)对第一靶配体而言特异性的抗体试剂和2)核苷酸标签的第一部分;b)第二识别多肽,该第二识别多肽包含1)对第二靶配体而言特异性的抗体试剂和2)核苷酸标签的第二部分;c)第三识别多肽,该第三识别多肽编码1)对第三靶配体而言特异性的抗体试剂和2)核苷酸标签的第三部分;以及d)信号转导多肽,该信号转导多肽包含1)能够与通过核苷酸标签的各个部分的结合形成的完整的核苷酸标签特异性结合的细胞外锌指结构域和2)细胞内T细胞受体(TCR)信号转导结构域;其中,除非核苷酸标签的各个部分相互结合,否则不能被锌指结构域特异性结合。例如,核苷酸标签上的各个部分或各个部分的成对组合不能被锌指结构域特异性结合,但当所有三个部分相互结合时,产生的复合体可以被锌指结构域特异性结合。在一些实施方式中,1)核苷酸标签的第一部分是ssDNA;以及2)核苷酸标签的第二部分和第三部分是ssDNA,该第二部分和第三部分各自与第一部分互补,并且3)核苷酸标签的第二部分和第三部分具有相互不重叠的序列。在本文考虑之列的是用于调节锌指结构域结合的三个核苷酸标签的额外布置,例如,使用DNA折纸术。本领域中描述了此类布置,参见例如,Wei等,Nature 2012,485,623-626;Ke等,Science 2012,338,1177-1183以及Douglas等,Nature 2009,459,414-418。以引用的方式将其各自整体并入本文。

[0069] 本文描述了与逻辑门多组分CAR的进一步的实施方式。在一个方面,包含含有蛋白质相互作用结构域的识别多肽和含有蛋白质相互作用结构域的信号转导多肽的多组分CAR可以进一步包含第二识别多肽,该第二识别多肽包含1)对第二靶配体而言特异性的抗体试剂和2)蛋白质相互作用结构域;其中,信号转导多肽进一步包含与第二识别多肽的蛋白质相互作用结构域特异性结合的次级蛋白质相互作用结构域。在一些实施方式中,比起信号转导多肽的第一蛋白质相互作用结构域与第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域的亲合力,信号转导多肽的次级蛋白质相互作用结构域与第二识别多肽的蛋白质相互作用结构域的亲合力更弱。如本文其它地方所述,蛋白质相互作用结构域的相对亲合力可以由本领域

技术人员很容易地确定,并且对于许多特定的蛋白质相互作用结构域而言,该相对亲和力是本领域中已知的。在一些实施方式中,第一识别多肽和第二识别多肽各自包含次级蛋白质相互作用结构域,并且次级蛋白质相互作用结构域彼此特异性地结合。

[0070] 在本文所述的任何方面的一些实施方式中,本文所述的多组分CAR可以包括非逻辑门(参见,例如图8B)。例如,通过第二识别多肽识别第二靶配体可以防止信号转导多肽与第一识别多肽相互作用(例如特异性结合)。此类实施方式可以允许抑制在不适当的组织和/或脱靶组织中的T细胞活性。例如,第二靶配体可以是对T细胞活性特别敏感的组织标记物,是脱靶活性的已知区域,和/或与期望的靶组织共享标记物。在一些实施方式中,在非门多组分CAR中,第二靶配体不是在靶组织和/或细胞中(例如,在癌症细胞中或癌症细胞上)发现的配体。在一些实施方式中,非逻辑门多组分CAR的第二靶配体在健康细胞和/或非靶细胞上发现而未在病变细胞和/或靶细胞上发现。在一个方面,本文描述的是a) 识别多肽,该识别多肽包含1) 对第一靶配体而言特异性的抗体试剂和2) 第一核苷酸标签;b) 第二识别多肽,该第二识别多肽包含1) 对第二靶配体而言特异性的抗体试剂和2) 第二核苷酸标签;以及c) 信号转导多肽,该信号转导多肽包含1) 能够与第一核苷酸标签特异性结合的细胞外锌指结构域和2) 细胞内T细胞受体(TCR) 信号转导结构域;其中,当核苷酸标签相互结合时,其不能被锌指结构域特异性结合。核苷酸对的此类对的各种2维和3维的构型在本领域中是已知的,例如,参见本文其它地方讨论的DNA折纸术。在一个示例性的实施方式中,第一核苷酸标签形成发夹环结构,且第二核苷酸标签与包含发夹环的一条腿的部分和发夹环的环的部分的第一核苷酸标签的部分互补。因此,在不存在第二核苷酸标签时,第一核苷酸标签包含可以被同源的锌指结合的dsDNA部分。在第二核苷酸标签存在时,标签杂交,促使第一核苷酸标签从发夹环结构展开并产生缺乏相同的同源锌指所必需的识别序列的dsDNA分子。例如在图8B中以图表的方式描述了这种布置。

[0071] 本文描述了非逻辑门多组分CAR的其它实施方式。在一个方面,如本文所述的多组分CAR(例如包含具有蛋白质相互作用结构域的第一识别多肽的CAR)可以进一步包含第二识别多肽,该第二识别多肽包含1) 对第二靶配体而言特异性的抗体试剂和2) 与信号转导多肽的蛋白质相互作用结构域竞争结合第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域的蛋白质相互作用结构域。在一个方面,本文描述的是非逻辑门多组分嵌合抗原受体(CAR);该多组分CAR包含:a) 第一识别多肽,该第一识别多肽包含1) 对第一靶配体而言特异性的抗体试剂和2) 蛋白质相互作用结构域;b) 信号转导多肽,该信号转导多肽包含1) 能够与第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域特异性结合的细胞外蛋白质相互作用结构域和2) 细胞内T细胞受体(TCR) 信号转导结构域;以及c) 第二识别多肽,该第二识别多肽包含1) 对第二靶配体而言特异性的抗体试剂和2) 与信号转导多肽的蛋白质相互作用结构域竞争结合第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域的蛋白质相互作用结构域。在一些实施方式中,第二识别多肽识别的靶配体在健康细胞和/或非靶细胞上发现而未在病变细胞和/或靶细胞上发现。在一些实施方式中,比起信号转导多肽的蛋白质相互作用结构域与第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域的亲和力,第二识别多肽的蛋白质相互作用结构域与第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域具有更大的亲和力。相对结合亲和力可通过实验确定,例如通过本领域已知的结合亲和力试验,并且对于本文描述的蛋白质相互作用结构域的多种组合而言相对结合亲和力是已知的,参见例如,Reinke等,JACS 2010,132,6025-31。以引用的方式将其整体并入

本文。在一些实施方式中,识别多肽的蛋白质相互作用结构域的结合亲和力可以比第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域与信号转导多肽的相互作用结构域的结合亲和力大至少2倍。在一些实施方式中,识别多肽的蛋白质相互作用结构域的结合亲和力可以比第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域与信号转导多肽的相互作用结构域的结合亲和力大至少5倍。在一些实施方式中,识别多肽的蛋白质相互作用结构域的结合亲和力可以比第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域与信号转导多肽的相互作用结构域的结合亲和力大至少10倍。

[0072] 如本文所使用的“靶配体”是指可以由配体结合结构域结合的细胞中或细胞上的分子。这种分子的非限制性的实例可以包括多肽、脂质、糖等。在一些实施方式中,靶配体可以是细胞外分子。在一些实施方式中,靶配体可以是细胞表面分子。

[0073] 在一些实施方式中,例如,那些同具有单一识别多肽的多组分CAR或与门多组分CAR相关的实施方式,靶配体(例如第一靶配体和/或第二靶配体)可以是在靶组织中表达的配体。在一些实施方式中,靶配体可以在靶组织和/或细胞中组成型地表达。在一些实施方式中,靶配体可以专门在靶组织和/或细胞中表达。在一些实施方式中,靶配体可以在靶组织和/或细胞中以比其它组织和/或细胞更高的水平表达。由于在涉及具有单一识别多肽的多组分CAR或与门多组分CAR的实施方式中靶配体的识别可引起T细胞活化(例如包含靶配体的细胞的细胞杀伤活性),能够以期望和/或治疗性的方式选择靶配体以靶向T细胞活性,例如通过靶向癌症细胞。在一些实施方式中,靶配体是在病变细胞和/或靶细胞中/上发现的配体。在一些实施方式中,通过能够与信号转导多肽特异性结合的识别多肽或者作为与门多组分CAR的一部分的识别多肽特异性结合的靶配体是在病变细胞和/或靶细胞中/上发现的配体。在一些实施方式中,通过能够与信号转导多肽特异性结合的识别多肽或者作为与门多组分CAR的一部分的识别多肽特异性结合的靶配体是在病变细胞和/或靶细胞上而未在健康细胞和/或非靶细胞上发现的配体。在一些实施方式中,病变细胞是癌细胞。在一些实施方式中,通过能够与信号转导多肽特异性结合的识别多肽或者作为与门多组分CAR的一部分的识别多肽特异性结合的靶配体在癌症细胞表面上发现。在一些实施方式中,例如,与结合至正常细胞相比,能够与信号转导多肽特异性结合的识别多肽或者作为与门多组分CAR的一部分的识别多肽特异性地结合至癌症细胞的表面上的靶配体。

[0074] 在一些实施方式中,根据关于第一多组分CAR的本文所述的任何方面和实施方式,本文所述的组合物和/或细胞可以进一步包含第二多组分CAR。通过非限制性实例的方式,第二CAR可以设计成特异性结合(并且例如,被激活或被抑制)至与第一多组分CAR特异性结合(并且例如,被激活或被抑制)的靶配体不同的靶配体。这可以为本文所述的方法提供增加的特异性、减少的脱靶效应和/或减少的有效剂量。在一些实施方式中,第二多组分CAR的抗体试剂特异性地结合至与第一多组分CAR的抗体试剂特异性结合的靶配体不同的靶配体。

[0075] 在一些实施方式中,第二多组分CAR可以包含抑制性细胞内T细胞受体(TCR)信号转导结构域,例如,抑制T细胞活性的信号转导结构域。在这种实施方式中,第二多组分因此可以设计成与第一多组分CAR相反地操作,例如,当第一多组分CAR允许T细胞活性的激活时,第二多组分允许抑制T细胞的激活。抑制性细胞内TCR信号转导结构域在本领域中是已知的并且作为非限制性实例可以包括PD1、CTLA4、BTLA、KIR、LAG-3、TIM-3、A2aR、LAIR-1以

及TGIT。在一些实施方式中,通过能够与包含抑制性细胞内TCR信号转导结构域的第二多组分CAR的信号转导多肽特异性结合的识别多肽特异性结合的靶配体是在健康细胞和/或非靶细胞上发现的配体。在一些实施方式中,通过能够与包含抑制性细胞内TCR信号转导结构域的第二多组分CAR的信号转导多肽特异性结合的识别多肽特异性结合的靶配体是在健康细胞和/或非靶细胞上发现而未在病变细胞和/或靶细胞上发现的配体。在一些实施方式中,根据本文描述的任何实施方式,包含抑制性细胞内TCR信号转导结构域的第二多组分CAR可以是或逻辑门,并且第二靶配体可以在病变(例如恶性肿瘤)细胞中/上发现的配体或对病变(例如恶性肿瘤)细胞而言特异性的配体。

[0076] 在任何方面的一些实施方式中,配体结合结构域可以包含抗体试剂或实质上由抗体试剂组成。在一些实施方式中,该抗体试剂可以是免疫球蛋白分子、单克隆抗体、嵌合抗体、CDR移植抗体、人类抗体、人源化抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、二硫键连接的Fv、scFv、单域抗体、双价抗体、多特异性抗体、双重特异性抗体、抗独特型抗体和/或双特异性抗体。

[0077] 在一些实施方式中,细胞内TCR信号转导结构域可以是T细胞活化结构域。在一些实施方式中,细胞内TCR信号转导结构域是来自选自于由如下所组成的组中的蛋白的信号转导结构域:TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54(ICAM)、CD83、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD150(SLAMF1)、CD152(CTLA4)、CD223(LAG3)、CD270(HVEM)、CD273(PD-L2)、CD274(PD-L1)、CD278(ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C SLP76、TRIM、ZAP70以及41BB。

[0078] 本文所述的多组分CAR可以允许细胞活性(例如T细胞活性、NK细胞活性以及NKT细胞活性)的调节,例如由此类细胞介导和/或执行的细胞杀伤活性。因此,在一些实施方式中,本文所述的一种或多种多组分CAR可以存于细胞中/上。在一些实施方式中,信号转导多肽存在于细胞的膜上。在一些实施方式中,一种或多种识别多肽存在于细胞外间隙中,例如,识别多肽可以由细胞表达并分泌,或者该细胞可以由从另一来源(例如合成学上生产的或通过另一细胞生产并且任选在接触步骤之前纯化或处理的)提供的识别多肽接触。

[0079] 在一个方面,本文描述的是表达和/或包含如本文所述的一种或多种多组分CAR(例如,至少一种信号转导多肽和至少一种识别多肽)的工程化细胞。在一些实施方式中,该细胞是T细胞、NK细胞或NKT细胞。在一些实施方式中,该细胞是T细胞。同时表达和/或包含多组分CAR的至少一种识别多肽和信号转导多肽的此类细胞在本文中称为“完整的多组分CAR”细胞。在一些实施方式中,完整的多组分CAR细胞同时表达多组分CAR的至少一种识别多肽和信号转导多肽。在一些实施方式中,完整的多组分CAR细胞包含同时编码多组分CAR的至少一种识别多肽和信号转导多肽的核酸序列。

[0080] 在本文所述的任何方面,例如涉及完整或部分的多组分CAR细胞的那些方面,识别多肽和/或信号转导多肽可处于诱导型和/或阻抑型启动子的控制下。此类启动子允许多肽的表达根据期望而言增加或减少,并且与组成型启动子相反。术语“组成型活性启动子”是指在给定细胞内始终表达的基因的启动子。用于哺乳动物细胞中的示例性启动子包括巨细胞病毒(CMV)等。术语“诱导型启动子”是指可以响应于给定信号(例如试剂的添加或减少)而表达的基因的启动子。诱导型启动子的非限制性实例是在特定的组织类型中被调节的启动子、由类固醇激素调节的启动子、由多肽激素(例如,借助于信号转导通路)调节的启动子或者由异源的多肽调节的启动子(例如,四环素诱导型系统,“Tet-On”和“Tet-Off”,参见例

如,Clontech Inc.,CA,Gossen and Bujard,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89,5547,1992以及 Paillard,Human Gene Therapy 9,983,1989。以引用的方式将其各自整体并入本文)。在一些实施方式中,多肽的表达可以被精确地调节,例如,通过使用对某些生理调节剂(例如,循环葡萄糖水平或激素(Docherty等,1994,FASEB J.8,20-24))敏感的诱导型调节序列。适用于控制细胞或哺乳动物中的表达的此类诱导型表达系统包括,例如通过蜕皮激素、雌激素、黄体酮、四环素、二聚的化学诱导剂以及异丙基- β -D1-硫代半乳糖吡喃糖苷(IPTG)进行的调节。基于多肽的预期用途,本领域技术人员将能够选择适当的调控/启动子序列。

[0081] 在一些实施方式中,一种或多种识别多肽或信号转导多肽的表达可以是组成型的。在一些实施方式中,一种或多种识别多肽或信号转导多肽的表达可以是瞬时的。瞬时表达可以通过例如使用瞬时和/或诱导型表达启动子或通过使用瞬时载体(例如那些不会并入到基因组中和/或持续存在于靶细胞中的载体)实现。作为非限制性实例,可将病毒(例如牛乳头瘤病毒(BPV-1)或爱泼斯坦-巴尔病毒(pHEBo、pREP衍生的和p205))的衍生物用于在真核细胞中瞬时表达核酸。对于其它的合适的表达系统以及一般的重组程序,参见 Sambrook、Fritsch和Maniatis编著的Molecular Cloning A Laboratory Manual,第2版(Cold Spring Harbor Laboratory Press:1989)第16章和17章;以引用的方式将其整体并入本文。在一些实施方式中,多组分CAR的信号转导多肽可被组成型表达,而识别多肽可被瞬时表达。在一些实施方式中,多组分CAR的识别多肽可被组成型表达,而信号转导多肽可被瞬时表达。

[0082] 在一个方面,本文描述的是杀灭靶细胞的方法,该方法包括用根据本文描述的任何实施方式的完整的多组分CAR细胞接触靶细胞。在一些实施方式中,靶细胞可以是病变细胞,例如癌症细胞。在一个方面,本文描述的是治疗疾病的方法,该方法包括给予根据本文描述的任何实施方式的完整的多组分CAR细胞。在一些实施方式中,疾病可以是癌症、实体癌、乳腺癌、肺癌、急性淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤或者难治性多发性骨髓瘤。在一个方面,本文描述的是治疗癌症的方法,该方法包括给予根据本文描述的任何实施方式的完整的多组分CAR细胞。在一些实施方式中,完整的多组分CAR细胞对于受试者而言可以是自体的。在一些实施方式中,完整的多组分CAR细胞可以源自和/或传代自从受试者获得的细胞并且经离体修饰以包含至少一个多组分CAR,例如,经遗传学上工程化以包含同时编码多组分CAR的至少一个识别多肽和信号转导多肽的核酸序列。在一些实施方式中,该方法可以进一步包括如下步骤:从受试者获得细胞(例如T细胞、NK细胞或NKT细胞或者其祖细胞)、改造该细胞以包含同时编码多组分CAR的至少一个识别多肽和信号转导多肽的核酸序列,并随后向受试者给予该细胞。

[0083] 在一个方面,本文描述的是表达和/或包含根据本文描述的任何实施方式的一种或多种多组分CAR信号转导多肽的工程化细胞。在一些实施方式中,细胞是T细胞、NK细胞或NKT细胞。在一些实施方式中,细胞是T细胞。表达和/或包含多组分CAR信号转导多肽的此类细胞在本文中称为“部分的多组分CAR”细胞。在一些实施方式中,部分的多组分CAR细胞不表达,例如,并不包含编码多组分CAR识别多肽的核酸序列。在一些实施方式中,部分的多组分CAR细胞包含编码至少一种多组分CAR信号转导多肽的核酸序列。在一些实施方式中,多组分CAR信号转导多肽存在于细胞的膜上,例如,作为跨膜蛋白以可检测的水平表达。在一些实施方式中,信号转导多肽进一步包含与第二识别多肽的蛋白质相互作用结构域特异性

结合的次级蛋白质相互作用结构域,例如,信号转导多肽是本文其它地方描述的和门多组分CAR的一部分。在一些实施方式中,该细胞可以进一步包含第二多组分CAR信号转导多肽,例如,信号转导多肽是根据本文描述的任何实施方式的第二多组分CAR的一部分。

[0084] 在一个方面,本文描述的是杀灭靶细胞的方法,该方法包括用根据本文描述的任何实施方式的部分的多组分CAR细胞接触靶细胞,并且用多组分CAR的至少一个识别多肽接触靶细胞。在一些实施方式中,靶细胞可以是病变细胞,例如癌症细胞。在一个方面,本文描述的是治疗疾病的方法,该方法包括向需要治疗的受试者给予:部分的多组分CAR细胞和第一识别多肽,该第一识别多肽包含1)对第一靶配体而言特异性的抗体试剂和2)能够与部分的多组分CAR的信号转导多肽的蛋白质相互作用结构域特异性结合的蛋白质相互作用结构域。在一些实施方式中,部分的多组分CAR细胞对于受试者而言可以是自体的。在一些实施方式中,部分的多组分CAR细胞可以源自和/或传代自从受试者获得的细胞并且经离体修饰以包含至少一个部分的多组分CAR,例如,经遗传学上工程化以包含编码多组分CAR的信号转导多肽的核酸序列。在一些实施方式中,该方法可以进一步包括如下步骤:从受试者获得细胞(例如T细胞、NK细胞或NKT细胞或者其祖细胞)、改造该细胞以包含编码多组分CAR的信号转导多肽的核酸序列,并随后向受试者给予该细胞。

[0085] 在一些实施方式中,部分的多组分CAR细胞包含根据本文描述的任何实施方式的非门多组分CAR。在一些实施方式中,给予部分的多组分CAR细胞以及第一识别多肽的受试者可以被进一步给予第二识别多肽,该第二识别多肽包含1)对第二靶配体而言特异性的抗体试剂和2)与信号转导多肽的蛋白质相互作用结构域竞争结合第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域的蛋白质相互作用结构域。在一些实施方式中,由第二识别多肽识别的靶配体是在健康细胞和/或非靶细胞上发现而未在病变细胞和/或靶细胞上发现。在一些实施方式中,比起信号转导多肽的蛋白质相互作用结构域与第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域的亲和力,第二识别多肽的蛋白质相互作用结构域与第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域具有更大的亲和力。在一些实施方式中,第一识别多肽包含1)对第一靶配体而言特异性的抗体试剂和2)第一核苷酸标签;并且第二识别受体包含1)对第二靶配体而言特异性的抗体试剂以及2)第二核苷酸标签;其中,信号转导多肽包含1)能够与第一核苷酸标签特异性结合的细胞外锌指结构域;并且其中当核苷酸标签相互结合时,其不能被锌指结构域特异性结合。在一些实施方式中,第一核苷酸标签形成发夹环结构,并且其中第二核苷酸标签与包含发夹环的一条腿的一部分和发夹环的环的部分的第一核苷酸标签的部分互补。在一些实施方式中,第二靶配体在健康细胞和/或非靶细胞上发现而未在病变细胞和/或靶细胞上发现。

[0086] 在一些实施方式中,部分的多组分CAR细胞包含根据本文描述的任何实施方式的与门多组分CAR。在一些实施方式中,给予部分的多组分CAR细胞以及第一识别多肽的受试者可以被进一步给予第二识别多肽,该第二识别多肽包含1)对第二靶配体而言特异性的抗体试剂和2)蛋白质相互作用结构域;其中,信号转导多肽进一步包含与第二识别多肽的蛋白质相互作用结构域特异性结合的次级蛋白质相互作用结构域。在一些实施方式中,第一识别多肽和第二识别多肽各自包含次级蛋白质相互作用结构域;其中,次级蛋白质相互作用结构域相互特异性结合。在一些实施方式中,比起信号转导多肽的第一蛋白质相互作用结构域与第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域的亲和力,信号转导多肽的次级蛋白质相

相互作用结构域与第二识别多肽的蛋白质相互作用结构域的亲和力更弱。在一些实施方式中,第一识别多肽包含1)对第一靶配体而言特异性的抗体试剂以及2)核苷酸标签的第一部分;并且第二识别多肽包含1)对第二靶配体而言特异性的抗体试剂以及2)核苷酸标签的第二部分;其中,信号转导多肽包含1)能够与通过核苷酸标签的各个部分的结合形成的完整的核苷酸标签特异性结合的细胞外锌指结构域;并且其中,除非核苷酸标签的各个部分相互结合,否则不能被锌指结构域特异性结合。在一些实施方式中,核苷酸标签的第一部分是ssDNA,且核苷酸标签的第二部分是互补的ssDNA。在一些实施方式中,该方法可包括给予第三识别多肽,该第三识别多肽包含1)对第三靶配体而言特异性的抗体试剂和2)核苷酸标签的第三部分;其中,核苷酸标签的各个部分或者各个部分的成对组合不能被锌指结构域特异性结合,但当所有三个部分相互结合时,所产生的复合体可以被锌指结构域特异性结合。在一些实施方式中,1)核苷酸标签的第一部分是ssDNA;并且2)核苷酸标签的第二部分和第三部分是ssDNA,第二部分和第三部分各自与第一部分互补;且3)核苷酸标签的第二部分和第三部分具有相互不重叠的序列。

[0087] 在一些实施方式中,部分的多组分CAR细胞可以包含作为根据本文描述的任何实施方式的第二多组分CAR的一部分的第二信号转导多肽。在一些实施方式中,向受试者进一步给予第二识别多肽,该第二识别多肽包含1)对第二靶配体而言特异性的抗体试剂和2)能够与第二信号转导多肽的蛋白质相互作用结构域特异性结合的蛋白质相互作用结构域。在一些实施方式中,第二多组分CAR信号转导多肽的细胞内T细胞受体(TCR)信号转导结构域抑制T细胞活性。在一些实施方式中,通过能够与第二信号转导多肽特异性结合的识别多肽特异性结合的靶配体是在健康细胞和/或非靶细胞上发现的配体。在一些实施方式中,通过能够与第二信号转导多肽特异性结合的识别多肽特异性结合的靶配体是在健康细胞和/或非靶细胞上发现而未在病变细胞和/或靶细胞上发现的配体。

[0088] 在本文描述的任何方法的一些实施方式中,多组分CAR的成对的蛋白质相互作用结构域可以包含化学诱导的结合结构域并且该方法可进一步包括给予诱导结构域的结合的化合物。在一些实施方式中,当一个蛋白质相互作用结构域是mTOR的FKBP结合结构域(FRB)且第二蛋白质相互作用结构域是FK506结合蛋白(FKBP)时,该方法进一步包括给予他克莫司、rapalog或者依维莫司。在一些实施方式中,当一个蛋白质相互作用结构域是亲环素-Fas融合蛋白(CyP-Fas)且第二蛋白质相互作用结构域是FK506结合蛋白(FKBP)时,该方法进一步包括给予FKCsA。在一些实施方式中,当一个蛋白质相互作用结构域是钙调神经磷酸酶A(CNA)且第二蛋白质相互作用结构域是FK506结合蛋白(FKBP)时,该方法进一步包括给予FK506。在一些实施方式中,当一个蛋白质相互作用结构域是赤霉素不敏感型(GIA)且第二蛋白质相互作用结构域是赤霉素不敏感矮化1型(GID1)时,该方法进一步包括给予赤霉素。在一些实施方式中,当一个蛋白质相互作用结构域是Snap标签且第二蛋白质相互作用结构域是Halo标签时,该方法进一步包括给予HaXS;在一些实施方式中,当一个蛋白质相互作用结构域是T14-3-3-cdeltaC且第二蛋白质相互作用结构域是PMA2的C端肽(CT52)时,该方法进一步包括给予壳梭孢素。

[0089] 在本文所述的任何方面的一些实施方式中,多组分CAR的识别多肽和/或信号转导多肽可以被工程化。在本文所述的任何方面的一些实施方式中,多组分CAR的识别多肽和/或信号转导多肽可以被转基因。在本文所述的任何方面的一些实施方式中,多组分CAR的识

别多肽和/或信号转导多肽可以被重组。在本文所述的任何方面的一些实施方式中,多组分CAR的识别多肽和/或信号转导多肽对细胞而言可以是异源的。在本文所述的任何方面的一些实施方式中,多组分CAR的识别多肽和/或信号转导多肽对T细胞而言可以是异源的。在本文所述的任何方面的一些实施方式中,多组分CAR的识别多肽和/或信号转导多肽对人类T细胞而言可以是异源的。在本文所述的任何方面的一些实施方式中,多组分CAR的识别多肽和/或信号转导多肽对细胞而言可以是外源性的。在本文所述的任何方面的一些实施方式中,多组分CAR的识别多肽和/或信号转导多肽对T细胞而言可以是外源性的。在本文所述的任何方面的一些实施方式中,多组分CAR的识别多肽和/或信号转导多肽对人类T细胞而言可以是外源性的。

[0090] 在本文特别考虑之列的是,本文描述的每个单独的实施方式可以组合(例如在单个细胞中)。作为非限制性的实例,单个细胞可以包含第一完整的多组分CAR和第二部分的多组分CAR,其中各多组分CAR可以是根据本文所述的任何实施方式而定。

[0091] 在一些实施方式中,本文描述的方法涉及CAR免疫细胞疗法,例如CAR-T疗法。标准CAR-T和相关的疗法涉及表达特异性地结合至靶细胞类型(例如癌症细胞)的CAR的免疫细胞(例如T细胞)的过继性细胞转移以治疗受试者。在一些实施方式中,作为疗法的一部分给予的细胞对受试者而言可以是自体的。在一些实施方式中,作为疗法的一部分给予的细胞对受试者而言不是自体的。在一些实施方式中,如本文所述,将细胞进行工程化和/或基因修饰以表达多组分CAR或其部分。CAR-T疗法的进一步讨论可以见于如下中,例如Maus等, *Blood* 2014,123,2624-35;Reardon等, *Neuro-Oncology* 2014,16,1441-1458;Hoyos等, *Haematologica* 2012,97,1622;Byrd等, *J Clin Oncol* 2014,32,3039-47;Maher等, *Cancer Res* 2009,69,4559-4562以及Tamada等, *Clin Cancer Res* 2012,18,6436-6445。以引用的方式将其各自整体并入本文。

[0092] 在一些实施方式中,本文所述的技术涉及注射器或者导管(包括器官特异性导管;例如肾脏导管、胆导管、心脏导管等),该导管包含临床有效量的本文所述的组合物。

[0093] 在一些实施方式中,本文描述的方法涉及用本文所述的一种或多种多组分CAR治疗患有或被诊断为患有癌症的受试者。可通过医师使用现有的诊断癌症的方法鉴定患有癌症的受试者。表征这些病症并辅助诊断的癌症的症状和/或并发症在本领域中是公知的,并且包括但不限于肿瘤的存在、器官功能损伤或衰竭、异常的血细胞计数、体重减轻等。可能有助于诊断例如癌症的测试包括但不限于血细胞计数、X射线以及CT扫描。癌症的家族史或者暴露至癌症的危险因素(例如吸烟或者辐射暴露)也可以辅助确定受试者是否有可能患有癌症或辅助作出癌症的诊断。

[0094] 如本文所使用的,术语“癌症”通常涉及一类疾病或病症,其中异常细胞不受控制的分裂并且可以侵袭邻近的组织。癌症细胞也可以通过血液系统和淋巴系统扩散到机体的其它部分。存在多种主要类型的癌症。癌是起始于皮肤或者内衬或覆盖内脏器官的组织中的癌症。肉瘤是起始于骨、软骨、脂肪、肌肉、血管或其它结缔组织或支持组织的癌症。白血病是始于例如骨髓的造血组织并且引起大量的异常血细胞产生并进入血液的癌症。淋巴瘤和多发性骨髓瘤是起始于免疫系统的细胞的癌症。中枢神经系统癌症是起始于脑组织和脊髓组织的癌症。

[0095] 如本文所使用的术语“恶性的”是指其中的一群肿瘤细胞显示出一种或多种不受

控制的生长(例如超出正常限度的分裂)、侵袭(例如侵入并破坏邻近的组织)和转移(例如通过淋巴和血液扩散到机体的其它位置)的癌症。如本文所使用的术语“转移”是指癌症从机体的一个部分扩散到另一部分。由已扩散的细胞形成的肿瘤称为“转移性肿瘤”或“转移瘤”。转移性肿瘤含有与原始(原发性)肿瘤中的细胞相似的细胞。

[0096] 如本文所使用的术语“良性的”或“非恶性的”是指可以长的更大但不会扩散到机体其它部分的肿瘤。良性肿瘤是自限性的并且通常不会侵袭或转移。

[0097] “癌症细胞”或“肿瘤细胞”是指癌性生长物或组织的单个细胞。肿瘤通常是指由细胞的异常生长形成的肿块或病变,其可以是良性的、癌前病变的或者恶性的。大多数癌症细胞形成肿瘤,但一些(例如白血病)并不必然形成肿瘤。对于形成肿瘤的那些癌症细胞,术语癌症(细胞)和肿瘤(细胞)可互换使用。

[0098] 患有癌症或肿瘤的受试者是具有存在于受试者的机体中的客观上可测量的癌症细胞的受试者。该定义包括恶性的、活跃增殖的癌症,以及潜在的休眠肿瘤或微转移肿瘤。从其原始位置迁移并播种于其它重要器官的癌症最终可能通过受影响器官的功能恶化而导致受试者死亡。造血系统癌症(如白血病)能够竞争超过受试者中的正常造血区域,从而导致造血功能衰竭(以贫血症、血小板减少症和嗜中性粒细胞减少症的形式),最终导致死亡。

[0099] 可向患有或被诊断为患有癌症的受试者给予本文描述的组合物和方法。在一些实施方式中,本文描述的方法包括向受试者给予有效量的本文所述的组合物以减轻癌症的症状。如本文所使用的,“减轻癌症的症状”是改善癌症相关的任何病症或症状。与等同的未处理的对照相比,通过任何标准技术进行测量,这种降低为至少5%、10%、20%、40%、50%、60%、80%、90%、95%、99%或者更多。本领域技术人员已知将本文描述的组合物给予至受试者的各种方法。这些方法可以包括但不限于口服给予、肠胃外给予、静脉内给予、肌内给予、皮下给予、透皮给予、呼吸道(气雾剂)给予、肺部给予、皮肤给予、局部给予、注射给予或瘤内给予。给予可以是局部的或全身的。

[0100] 在本文考虑之列的组合物的给予能够以任何便利的方式进行,包括通过气雾吸入、注射、摄食、输血、植入或移植。在优选的实施方式中,组合物经肠胃外给予。如本文所使用的短语“肠胃外给予”和“胃肠外给予”是指除肠道给予和局部给予以外的给予模式,通常通过注射,并且包括但不限于血管内、静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眼眶内、瘤内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内和胸骨内注射和输注。在一个实施方式中,通过直接注射到肿瘤、淋巴结或感染部位中向受试者给予在本文考虑之列的组合物。

[0101] 通常可以说,包含本文所述的细胞(例如T细胞或多组分CAR细胞)的药物组合物能够以 10^2 至 10^{10} 个细胞/kg体重、优选 10^5 至 10^6 个细胞/kg体重(包括这些范围内的所有整数值的)剂量给予。细胞的数量将取决于组合物预期的最终用途以及其中包含的细胞类型。对于本文提供的用途,细胞通常处于1升或更小的体积,可以是500毫升或更少,甚至250毫升或100毫升或更少。因此,期望的细胞的密度通常大于 10^6 个细胞/ml,并且通常大于 10^7 个细胞/ml,一般为 10^8 个细胞/ml或更大。临床相关数量的免疫细胞可以分配到多次输注中,累积等于或超过 10^5 个、 10^6 个、 10^7 个、 10^8 个、 10^9 个、 10^{10} 个、 10^{11} 个或 10^{12} 个细胞。在本发明的一些方面,特别是因为所有输注的细胞将被重定向至特定的靶抗原,所以可以给予处于 10^6

个/千克(每位患者 10^6 个- 10^{11} 个)的范围内的更低数量的细胞。能够以处于这些范围内的剂量多次给予表达多组分CAR的细胞组合物。对于正在接受治疗的患者而言,细胞可以是同种异体的、同基因的、异种的或自体的。如果期望的话,治疗还可以包括给予如本文所述的促细胞分裂剂(例如PHA)或淋巴因子、细胞因子和/或趋化因子(例如IFN- γ 、IL-2、IL-12、TNF- α 、IL-18和TNF- β 、GM-CSF、IL-4、IL-13、Flt3-L、RANTES、MIP1 α 等)以增强免疫应答的诱导。在一些实施方式中,剂量可以从约 1×10^5 个细胞/kg体重至约 1×10^8 个细胞/kg体重。在一些实施方式中,剂量可以从约 1×10^6 个细胞/kg体重至约 1×10^7 个细胞/kg体重。在一些实施方式中,剂量可以是约 1×10^6 个细胞/kg体重。在一些实施方式中,可以给予一剂细胞。在一些实施方式中,细胞的剂量可以重复,例如,一次、两次或多次。在一些实施方式中,细胞的剂量可以按例如每日、每周或每月给予。

[0102] 药剂的剂量范围取决于效力,并且涵盖足够大的量以产生期望的效果,例如减缓肿瘤生长或减小肿瘤尺寸。剂量不应太大以至于造成不可接受的不良副作用。通常,剂量将随患者的年龄、状况和性别而变化,并且可由本领域技术人员确定。在任何并发症的情况下,也可以由个体医师调整剂量。在一些实施方式中,剂量从0.001mg/kg体重至0.5mg/kg体重变化。在一些实施方式中,剂量从5 μ g/kg体重至100 μ g/kg体重变化。或者,可以滴定剂量范围以维持血清水平处于1 μ g/mL至1000 μ g/mL之间。对于全身给予,受试者可被给予例如如下的治疗量:0.1mg/kg、0.5mg/kg、1.0mg/kg、2.0mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、40mg/kg、50mg/kg或更多。

[0103] 上述剂量的给予可以重复。在一些实施方式中,该剂量一日给予一次或一日给予多次,例如但不限于一日三次。在一些实施方式中,上述剂量每日给予持续数周或数月。治疗的持续时间取决于受试者的临床进展和对治疗的反应性。

[0104] 在一些实施方式中,剂量可以从约2mg/kg至约15mg/kg。在一些实施方式中,剂量可以是约2mg/kg。在一些实施方式中,剂量可以是约4mg/kg。在一些实施方式中,剂量可以是约5mg/kg。在一些实施方式中,剂量可以是约6mg/kg。在一些实施方式中,剂量可以是约8mg/kg。在一些实施方式中,剂量可以是约10mg/kg。在一些实施方式中,剂量可以是约15mg/kg。在一些实施方式中,剂量可以从约100mg/m²至约700mg/m²。在一些实施方式中,剂量可以是约250mg/m²。在一些实施方式中,剂量可以是约375mg/m²。在一些实施方式中,剂量可以是约400mg/m²。在一些实施方式中,剂量可以是约500mg/m²。

[0105] 在一些实施方式中,该剂量可以静脉内注射给予。在一些实施方式中,静脉内给予可以从约10分钟至约3小时的时间段内进行的输注。在一些实施方式中,静脉内给予可以从约30分钟至约90分钟的时间段内进行的输注。

[0106] 在一些实施方式中,该剂量可以大约每周给予。在一些实施方式中,该剂量可以每周给予。在一些实施方式中,该剂量可以每周给予,持续约12周至约18周。在一些实施方式中,该剂量可以大约每2周给予。在一些实施方式中,该剂量可以大约每3周给药。在一些实施方式中,剂量可以大约每2周给予约2mg/kg至约15mg/kg。在一些实施方式中,剂量可以大约每3周给予约2mg/kg至约15mg/kg。在一些实施方式中,剂量可以大约每2周静脉内给予约2mg/kg至约15mg/kg。在一些实施方式中,剂量可以大约每3周静脉内给予约2mg/kg至约15mg/kg。在一些实施方式中,剂量可以大约每周静脉内给予约200mg/m²至约400mg/m²。在一些实施方式中,剂量可以大约每2周静脉内给予约200mg/m²至约400mg/m²。在一些实施方式

中,剂量可以大约每3周静脉内给予约200mg/m²至约400mg/m²。在一些实施方式中,给予总计约2个至约10个剂量。在一些实施方式中,给予总计4个剂量。在一些实施方式中,给予总计5个剂量。在一些实施方式中,给予总计6个剂量。在一些实施方式中,给予总计7个剂量。在一些实施方式中,给予总计8个剂量。在一些实施方式中,给予总计进行约4周至约12周。在一些实施方式中,给予总计进行约6周。在一些实施方式中,给予总计进行约8周。在一些实施方式中,给予总计进行约12周。在一些实施方式中,初始剂量可以比后续剂量多约1.5至约2.5倍。

[0107] 在一些实施方式中,剂量可以从约1mg至约2000mg。在一些实施方式中,剂量可以是约3mg。在一些实施方式中,剂量可以是约10mg。在一些实施方式中,剂量可以是约30mg。在一些实施方式中,剂量可以是约1000mg。在一些实施方式中,剂量可以是约2000mg。在一些实施方式中,剂量可以是每日通过静脉内输注给予约3mg。在一些实施方式中,剂量可以是每日通过静脉内输注给予约10mg。在一些实施方式中,剂量可以是每周3次通过静脉内输注给予约30mg。

[0108] 治疗有效量是足以产生统计学上显著的、可测量的肿瘤大小变化、肿瘤生长等的药剂的量(疗效测量在下文中描述)。这种有效量可以在临床试验以及动物研究中评判。

[0109] 药剂可以通过注射或通过随时间而逐渐输注来静脉内给予。对于给予途径给定合适的剂型,例如,可以静脉内、鼻内、通过吸入、腹膜内、肌内、皮下、腔内给予用于本文所述的方法和组合物中的药剂,并且如果期望的话,可以通过蠕动方式、或通过本领域技术人员已知的其它方式递送。优选将本文中使用的化合物口服、静脉内或肌内给予至患有癌症的患者。直接向肿瘤局部给予也是特别在考虑之列的。

[0110] 例如,含有至少一种药剂的治疗组合物能够以单位剂量常规给予。当提及治疗组合物而使用时,术语“单位剂量”是指适合作为受试者的单位剂量的物理离散单位,各单位含有经运算以产生期望治疗效果的预确定量的活性物质,所述活性物质与所需的生理学上可接受的稀释剂(例如载体或赋形剂)结合。

[0111] 以与剂型相容的方式并以治疗有效量给予组合物。待给予的量和时机取决于待治疗的受试者、受试者的系统利用活性成分的能力以及期望的治疗效果的程度。

[0112] 在受试者被给予部分的多组分CAR细胞和识别多肽的实施方式中,部分的多组分CAR细胞和识别多肽可以一起给予或分开给予。在受试者被分开给予部分的多组分CAR细胞和识别多肽的实施方式中,可以根据本文所述的任何剂量和给予途径/程序分别给予各组合物。

[0113] 需要给予的有效成分的精确量取决于从业者的判断并且对每个个体都是特定的。然而,全身应用的合适的剂量范围在本文中被公开并取决于给予途径。合适的给予方案也是可变的,但是以其后有以一个小时或多个小时间隔通过随后的注射或其它给予进行的重复给予的初始给予为特点。或者,在考虑之列的是足以维持处于对在体内治疗而指定的范围内的血液中的浓度的连续静脉内输注。

[0114] 在一些实施方式中,该方法进一步包括给予本文所述的药物组合物连同作为组合物的一部分的一种或多种额外的化疗剂、生物制剂、药物或治疗。在一些这样的实施方式中,化疗剂、生物制剂、药物或治疗选自于由放射疗法、手术、抗体试剂和/或小分子所组成的组。

[0115] 在本文所述方法的一些实施方式中,该方法进一步包括向正在给予本文所述的药物组合物的受试者给予一种或多种化疗剂。化疗剂的非限制性实例可以包括:烷化剂,例如噻替派和CYTOXAN®环磷酰胺;烷基磺酸盐,例如白消安、英丙舒凡和噻消安;氮杂环丙烷,例如苯并多巴(benzodopa)、卡波醌、美妥替哌(meturedopa)和uredopa;乙撑亚胺和甲基三聚氰胺,包括六甲蜜胺、三乙撑蜜胺、三乙烯磷酰胺(triethylenephosphoramidate)、三亚乙基硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)和三羟甲基蜜胺(trimethylolmelamine);番荔枝素(acetogenins)(特别是泡番荔枝辛和bullatacinone);喜树碱(包括合成的类似物拓扑替康);苔藓抑素;callystatin;CC-1065(包括其阿多来新、卡折来新和比折来新合成类似物);cryptophycins(特别是cryptophycin 1和cryptophycin 8);多拉司他汀;杜洛霉素(包括合成类似物KW-2189和CB1-TM1);软珊瑚素(eleutherobin);pancratistatin;珊瑚类二萜(sarcodictyin);海绵抑制素;氮芥类,如苯丁酸氮芥、萘氮芥、cholophosphamide、雌氮芥、异环磷酰胺、氮芥(mechlorethanmine)、氧化氮芥盐酸盐(mechlorethanmine oxide hydrochloride)、美法仑、新恩比兴、苯芥胆甾醇、泼尼莫司汀、曲洛磷胺、乌拉莫司汀;亚硝基脲如卡莫司汀、氯脲霉素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀和雷莫司汀;抗生素,如烯二炔抗生素(例如卡奇霉素,尤其是卡奇霉素 γ II和卡奇霉素 ω II(参见例如Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994))); dynemicin, 包括dynemicin A;双膦酸盐,例如氯膦酸盐;埃斯培拉霉素(esperamicin);以及新制癌菌素发色团和相关的色蛋白烯二炔抗生素发色团)、aclacinomysins、放线菌素、authramycin、重氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素C、carabycin、caminomycin、嗜癌素、色霉素(chromomycinis)、放线菌素D、柔红霉素、地托比星、6-重氮-5-氧-L-正亮氨酸、ADRIAMYCIN®阿霉素(包括吗啉代阿霉素、氰基吗啉代阿霉素、2-吡咯啉阿霉素和脱氧阿霉素)、表阿霉素、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素例如丝裂霉素C、麦可酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、培洛霉素、potfiromycin、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑菌素、链脲菌素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他汀、佐柔比星;抗代谢物如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物如二甲叶酸、甲氨蝶呤、蝶罗呤、三甲曲沙;嘌呤类似物如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷;雄激素如卡普睾酮、丙酸甲雄烷酮、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯;抗肾上腺素如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦;叶酸补充剂如frolinic acid;醋葡醛内酯;醛磷酰胺糖苷;氨基乙酰丙酸;恩尿嘧啶;安吡啶;bestrabucil;比生群;edatraxate;defofamine;地美可辛;地吡醌;elformithine;依利醋胺;埃博霉素;依托格鲁;硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;lonidainine;美登木素生物碱,如美登素和安丝菌素;米托胍脲;米托蒽醌;mopidanmol;nitraerine;喷司他汀;蛋氨酸;吡柔比星;洛索蒽醌;鬼臼酸;2-乙酰肼;甲基苄肼;PSK®多糖复合物(JHS Natural Products, Eugene, Oreg.);雷佐生;根霉素;sizofuran;螺喹;细交链孢菌酮酸;三乙撑亚胺苯醌;2, 2', 2''-三氯三乙基胺;单端孢霉烯族毒素(特别是T-2毒素、verracurin A、杆孢菌素A和anguidine);氨基甲酸乙酯;长春地辛;达卡巴嗪;甘露醇氮芥;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌泊溴烷;gacytosine;阿拉伯糖苷("Ara-C");环磷酰胺;塞替派;紫杉烷类例如TAXOL®紫杉醇(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ)、ABRAXANE® Cremophor-free、紫杉醇的白蛋白工程化的纳米颗粒制剂(American Pharmaceutical Partners,

Schaumberg, I11) 和 TAXOTERE® 多西他赛 (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, 法国); 苯丁酸氮芥; GEMZAR® 吉西他滨; 6-硫鸟嘌呤; 巯嘌呤; 甲氨蝶呤; 铂类似物如顺铂、奥沙利铂和卡铂; 长春碱; 铂; 依托泊苷 (VP-16); 异环磷酰胺; 米托蒽醌; 长春新碱; NAVELBINE® 长春瑞滨; 诺消灵; 替尼泊苷; 依达曲沙; 柔红霉素; 氨基喋呤; 希罗达; 伊班膦酸盐; 伊立替康 (Camptosar, CPT-11) (包括伊立替康与 5-FU 和亚叶酸的治疗方案); 拓扑异构酶抑制剂 RFS2000; 二氟甲基鸟氨酸 (DMFO); 类视黄醇如视黄酸; 卡培他滨; 考布他汀; 亚叶酸 (LV); 奥沙利铂, 包括奥沙利铂治疗方案 (FOLFOX); 拉帕替尼 (Tykerb®); 减少细胞增殖的 PKC- α 、Raf、H-Ras、EGFR (例如厄洛替尼 (Tarceva®)) 和 VEGF-A 的抑制剂以及上述任一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0116] 如本文所使用的术语“细胞毒性药剂”是指抑制或阻碍细胞功能和/或引起细胞破坏的物质。该术语旨在包括放射性同位素 (例如, At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³² 和 Lu 的放射性同位素), 化疗剂和毒素, 例如小分子毒素或者细菌、真菌、植物或动物来源的酶促活性毒素, 包括其片段和/或变体。

[0117] 如本文所使用的, 术语“化疗”或“化疗剂”是指在治疗以异常的细胞生长为特征的疾病中具有治疗有效性的任何化学药剂。此类疾病包括肿瘤、瘤和癌症以及以增生性生长为特征的疾病。如本文所使用的化疗剂涵盖化学药剂和生物药剂。这些药剂的功能是抑制癌细胞用于持续生存所依赖的细胞活性。化疗剂的种类包括烷化/生物碱药剂、抗代谢物、激素或激素类似物以及各种抗癌药物。大部分 (如果不是全部) 这些药剂对癌症细胞是直接有毒的并且不需要免疫刺激。在一个实施方式中, 化疗剂是用于治疗瘤如实体瘤的药剂。在一个实施方式中, 化疗剂是放射性分子。本领域技术人员可以容易地辨别使用的化疗剂 (例如参见 Slapak 和 Kufe, Principles of Cancer Therapy, Chapter 86 in Harrison's Principles of Internal Medicine, 第14版; Perry 等, Chemotherapy, Ch.17 in Abeloff, Clinical Oncology, 第2版, 2000 Churchill Livingstone, Inc; Baltzer L, Berkery R (编著): Oncology Pocket Guide to Chemotherapy, 第二版, St. Louis, Mosby-Year Book, 1995; Fischer DS, Knobf MF, Durivage HJ (编著): The Cancer Chemotherapy Handbook, 第4版, St. Louis, Mosby-Year Book, 1993)。本文所述的双特异性多肽药剂和多特异性多肽药剂可以与另外的化疗剂联合使用。

[0118] “放疗”是指使用定向的 γ 射线或 β 射线以诱导对细胞的充分损伤, 从而限制其正常发挥功能或完全破坏细胞的能力。将理解的是, 在本领域中将会有许多已知方法来确定治疗的剂量和持续时间。典型的治疗是作为一次性给予而提供, 典型的剂量范围是每天 10 单位至 200 单位 (Grays)。

[0119] 在一些实施方式中, 本文描述的方法可以进一步包括向受试者给予额外的免疫疗法。如本文所使用的“免疫疗法”是指设计用于诱导患者自身免疫系统以对抗肿瘤的多种成套的治疗策略, 并且包括但不限于用于浅表性膀胱癌的膀胱内 BCG 免疫疗法; 产生特异性免疫应答的疫苗 (例如用于恶性黑色素瘤和肾细胞癌); Sipuleucel-T 用于前列腺癌用途, 其中来自患者的树突细胞负载前列腺酸磷酸酶肽以诱导针对前列腺来源细胞的特异性免疫应答; 给予细胞因子、生长因子和/或刺激一种或多种免疫细胞类型的信号转导分子 (例如白细胞介素); 在重新引入患者之前的离体扩增和/或肿瘤抗原特异性的淋巴细胞和/或树突细胞的刺激; 咪喹莫特; 过继性细胞转移和/或例如在国际专利公开 WO 2003/063792 和美

国专利No.8,329,660中描述的方法。在一些实施方式中,免疫疗法刺激NK应答。在一些实施方式中,免疫疗法是过继性细胞转移方法,例如,过继性免疫疗法。

[0120] 在一些实施方式中,本文所述的方法可进一步包括向受试者给予额外的抗体、其抗原结合部分或包含CAR的T细胞。在一些实施方式中,本文所述的方法可进一步包括向受试者给予细胞因子。基于抗体和细胞因子的疗法是本领域已知的,并且作为非限制性实例可以包括阿仑单抗、贝伐单抗、brentuximab vedotin、西妥昔单抗、吉妥单抗(gemtuzumab)、替伊莫单抗(ibritumomab tiuxetan)、伊匹单抗、奥法木单抗、pantibumumab、利妥昔单抗、托西莫单抗、曲妥珠单抗、白细胞介素-2和干扰素- α 。

[0121] 可由熟练的临床医生确定癌症的给定的治疗的功效。然而,在用本文所述的药剂治疗后,如果例如肿瘤的任何或所有的征象或症状以有益的方式改变或者其它临床上接受的症状改善,或甚至减轻例如至少10%,该治疗被认为是“有效治疗”(如本文所使用的术语)。通过住院治疗或需要医学干预评估的个体恶化的失败(即疾病进展停止),也可以测量功效。测量这些指标的方法对于本领域技术人员是已知的和/或在本文中所述的。

[0122] 对于疾病的治疗而言的有效量是指当给予至有需要的哺乳动物时,足以产生如本文所定义的术语的有效治疗的量。可以通过评估例如癌症的机体指标(例如肿瘤大小、肿瘤质量、肿瘤密度、血管生成、肿瘤增长率等)来确定药剂的功效。

[0123] 有效量、毒性和治疗效果可以通过细胞培养或实验动物中的标准药理学程序来确定,例如用于确定LD50(对群体的50%而言致死的剂量)和ED50(在群体的50%中治疗有效的剂量)的程序。剂量可以根据使用的剂型和使用的给予途径而变化。毒性和治疗效果之间的剂量比是治疗指数,并且可以表示为比值LD50/ED50。表现出大的治疗指数的组合物和方法是优选的。治疗有效剂量可以从细胞培养物测定开始估算。另外,可以在动物模型中制定剂量以达到在细胞培养中或合适的动物模型中确定的诱导IC50(即活性成分的浓度,其达到症状的半数最大抑制)的循环血浆浓度范围。例如,可以通过高效液相色谱测量血浆中的水平。任何特定剂量的效果可以通过合适的生物测定法来监测,例如肿瘤大小或生长的测定等。该剂量可以由医生确定,并根据需要进行调整以适应观察到的治疗效果。

[0124] 通过住院治疗或需要医学干预评估个体恶化的失败(即疾病进展停止),也可以测量功效。测量这些指标的方法对于本领域技术人员是已知的和/或如本文所述的。治疗包括对个体或动物的疾病的任何治疗(一些非限制性实例包括人或动物),并且包括:(1)抑制疾病,例如预防症状(例如疼痛或炎症)的恶化;或(2)缓解疾病的严重程度,例如引起症状消退。对于疾病的治疗而言的有效量是指当给予至有需要的受试者时足以产生对该疾病而言的如本文所定义的术语的有效治疗的量。可以通过评估病症或期望的反应的物理指标(例如抑制肿瘤生长)来确定药剂的功效。通过测量这些参数中的任何一个或参数的任何组合,监测给予和/或治疗的功效完全在本领域技术人员的能力范围内。可以在本文描述的病症的动物模型例如癌症的治疗中评估功效。当使用实验动物模型时,当观察到标志物(例如,肿瘤大小)在统计学上显著变化时,治疗的功效被证明。

[0125] 在一些实施方式中,本文所述的技术涉及包含如本文所述的多组分CAR(或其部分,或包含多组分CAR的细胞)和任选的药学上可接受的载体的药物组合物。在一些实施方式中,药物组合物的活性成分包含如本文所述的多组分CAR(或其部分,或包含多组分CAR的细胞)。在一些实施方式中,药物组合物的活性成分基本上由如本文所述的多组分CAR(或其

部分,或包含多组分CAR的细胞)组成。在一些实施方式中,药物组合物的活性成分由如本文所述的多组分CAR(或其部分,或包含多组分CAR的细胞)组成。药学上可接受的载体和稀释剂包括生理盐水、缓冲水溶液、溶剂和/或分散介质。这些载体和稀释剂的使用在本领域中是众所周知的。可用作药学上可接受的载体的材料的一些非限制性实例包括:(1)糖,如乳糖、葡萄糖和蔗糖;(2)淀粉,如玉米淀粉和马铃薯淀粉;(3)纤维素及其衍生物,如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、乙基纤维素、微晶纤维素和纤维素乙酸酯;(4)粉末状黄蓍胶;(5)麦芽;(6)明胶;(7)润滑剂,如硬脂酸镁、月桂基硫酸钠和滑石;(8)赋形剂,如可可脂和栓剂蜡;(9)油,如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;(10)二醇类,如丙二醇;(11)多元醇,如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇(PEG);(12)酯,如油酸乙酯和月桂酸乙酯;(13)琼脂;(14)缓冲剂,如氢氧化镁和氢氧化铝;(15)海藻酸;(16)无热原水;(17)等渗盐水;(18)林格氏溶液;(19)乙醇;(20)pH缓冲溶液;(21)聚酯,聚碳酸酯和/或聚酐;(22)膨胀剂,如多肽和氨基酸(23)血清组分,如血清白蛋白、HDL和LDL;(22)C₂-C₁₂醇,如乙醇;以及(23)药制剂中使用的其它无毒相容性物质。润湿剂、着色剂、脱模剂、包衣剂、甜味剂、调味剂、芳香剂、防腐剂和抗氧化剂也可以存在于制剂中。术语如“赋形剂”、“载体”、“药学上可接受的载体”等在本文中可互换使用。在一些实施方式中,如本文所述,载体抑制活性剂的降解。

[0126] 在一些实施方式中,包含如本文所述的多组分CAR(或其部分,或包含多组分CAR的细胞)的药物组合物可以是肠胃外剂型。由于肠胃外剂型的给予通常绕过患者对抗污染物的天然防御,肠胃外剂型优选是无菌的或能够在给予患者之前被灭菌。肠胃外剂型的例子包括但不限于准备好用于注射的溶液、准备好被溶解或悬浮于药学上可接受的媒介中的用于注射的干燥产品、准备好用于注射的悬浮液和乳剂。另外,可以制备用于给予至患者的控释肠胃外剂型,包括但不限于DUROS®型剂型和剂量倾卸。

[0127] 可用于提供如本文所公开的多组分CAR(或其部分,或包含多组分CAR的细胞)的肠胃外剂型的合适媒介对本领域技术人员是众所周知的。实例包括但不限于:无菌水;注射用水USP;生理盐水;葡萄糖溶液;水性媒介,例如但不限于氯化钠注射液、林格氏注射液、右旋糖注射液、右旋糖和氯化钠注射液以及乳酸盐林格氏注射液;与水混溶的媒介,例如但不限于乙醇、聚乙二醇和丙二醇;以及非水性媒介,例如但不限于玉米油、棉籽油、花生油、芝麻油、油酸乙酯、肉豆蔻酸异丙酯以及苯甲酸苄酯。改变或修改药学上可接受的活性成分的盐的溶解度的化合物也可以被掺入本公开的肠胃外剂型(包括常规的和控释的肠胃外剂型)中。

[0128] 例如,还可以将药物组合物配制成为适于口服给予的分散剂型,例如但不限于片剂(包括但不限于刻痕片剂或包衣片剂)、丸剂、囊片、胶囊、可咀嚼片剂、粉末包装、扁囊剂、锭剂、糯米纸囊剂、气溶胶喷雾剂或液体,例如但不限于糖浆剂、酏剂、处于水性溶液中的悬液剂或溶液剂、非水性液体、水包油乳剂或油包水乳剂。这样的组合物含有预定量的本文公开的化合物的药学上可接受的盐,并且可以通过本领域技术人员熟知的药学方法制备。通常参见Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第21版, Lippincott, Williams, and Wilkins, Philadelphia PA (2005)。

[0129] 常规剂型通常提供从制剂的快速或即时的药物释放。根据药物的药理学和药代动力学,常规剂型的使用会导致患者血液和其它组织中的药物浓度的大幅波动。这些波动可

能影响许多参数,例如剂量频率、作用开始、功效持续时间、治疗血液水平的维持、毒性、副作用等。有利地,控释制剂可用于控制药物的作用开始、作用持续时间、治疗窗内的血浆水平和血液峰值水平。具体而言,可以使用控释或缓释剂型或制剂来确保实现药物的最大有效性,同时使潜在的不利影响和安全性问题最小化,这在药物剂量不足(即低于最低治疗水平)以及超过药物的毒性水平时都可能会发生。在一些实施方式中,组合物能够以持续释放制剂给予。

[0130] 控释药学产品具有改善药物治疗的共同目标,这优于其非控释对应物所达到的目标。理想的是,在药物治疗中使用最佳设计的控释制剂的特征在于在最短的时间内通过使用最少量的药物物质来治愈或控制病症。控释制剂的优势包括:1) 药物活性的延长;2) 减少的剂量频率;3) 增加的患者依从性;4) 使用总量较少的药物;5) 减少局部或全身性副作用;6) 药物积累的最小化;7) 血液水平波动的减少;8) 治疗功效的改善;9) 增强作用的减小或药物活性的丧失;以及10) 改善疾病或病症的控制速度。Kim, Cherng-ju, Controlled Release Dosage Form Design, 2 (Technomic Publishing, Lancaster, Pa.: 2000)。

[0131] 大多数控释制剂被设计为开始释放一定量的药物(活性成分),及时产生期望的治疗效果,然后逐渐并持续地释放另外量的药物以维持该水平的治疗或预防效果至延长的一段时间。为了在体内维持这种恒定的药物水平,药物必须从剂型中以代替从机体代谢和排泄的药物量的速度被释放。可以通过各种条件来刺激活性成分的控释,所述条件包括但不限于pH、离子强度、渗透压、温度、酶、水以及其它生理条件或化合物。

[0132] 各种已知的控释或缓释剂型、配方和装置可适用于本公开的盐和组合物。实例包括但不限于在美国专利号:3,845,770、3,916,899、3,536,809、3,598,123、4,008,719、5,674,533、5,059,595、5,591,767、5,120,548、5,073,543、5,639,476、5,354,556、5,733,566以及6,365,185B1中描述的那些。将其各自通过引用的方式并入本文。这些剂型可以使用例如羟丙基甲基纤维素、其它聚合物基质、凝胶、可渗透膜、渗透系统(例如OROS[®](Alza Corporation, Mountain View, Calif. USA))或者使用提供不同比例的期望的释放曲线的上述物质的组合物,而被用于提供一种或多种活性成分的缓慢释放或控释。

[0133] 为了方便起见,以下提供说明书、实施例和所附权利要求中使用的一些术语和短语的含义。除非另有说明或从上下文暗示,否则以下术语和短语包含下面提供的含义。提供这些定义是为了帮助描述特定实施方式,并且不旨在限制要求保护的发明,因为本发明的适用范围范围仅由权利要求限制。除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。如果本领域术语的使用与本文提供的定义之间存在明显差异,以说明书中提供的定义为准。

[0134] 为了方便起见,在此收集本文、说明书、实施例和所附权利要求中使用的某些术语。

[0135] 术语“减少”、“降低”、“下降”或“抑制”在本文中全部用于意指统计学上显著的量的减少。在一些实施方式中,“降低”、“下降”或“减少”或“抑制”通常表示与参比水平相比(例如不存在给定治疗),降低至少10%,并且可以包括例如,减少至少约10%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或更多。如本文所使用的“减少”或“抑制”不包括与参

比水平相比完全抑制或减少。“完全抑制”是与参比水平相比的100%抑制。降低可以优选降低至在对没有给定紊乱的个体而言的正常范围内的可接受的水平。

[0136] 术语“增加的”、“增加”、“增强”或“激活”在本文中全部用于意指统计学上显著的增加。在一些实施方式中,术语“增加的”、“增加”、“增强”或“激活”可以表示与参比水平相比增加至少10%,例如增加至少约20%或至少约30%、或至少约40%、或至少约50%、或至少约60%、或至少约70%、或至少约80%、或至少约90%或直到并包括100%的增加、或与参比水平相比在10%至100%之间的任何增加,或者至少约2倍、或者至少约3倍、或者至少约4倍、或者至少约5倍、或至少约10倍的增加、或者与参比水平相比,在2倍至10倍或更大之间的任何增加。在标记物或症状的背景中,“增加”是这种水平的统计学上显著的增加。

[0137] 如本文所使用的“受试者”是指人或动物。通常动物是脊椎动物,如灵长类动物、啮齿动物、家畜或狩猎动物。灵长类动物包括黑猩猩、cynomologous猴、蜘蛛猴和猕猴,例如恒河猴。啮齿动物包括小鼠、大鼠、土拨鼠、雪貂、兔子和仓鼠。家畜和狩猎动物包括奶牛、马、猪、鹿、野牛、水牛;猫科动物,例如家猫;犬科动物,例如狗、狐狸、狼;禽类,例如鸡、鹌鹑、鸵鸟;以及鱼类,如鳟鱼、鲈鱼和鲑鱼。在一些实施方式中,受试者是哺乳动物,例如灵长类动物(例如人)。术语“个体”、“患者”和“受试者”在本文中可互换使用。

[0138] 优选地,受试者是哺乳动物。哺乳动物可以是人类、非人灵长类动物、小鼠、大鼠、狗、猫、马或牛,但不限于这些实例。除人以外的哺乳动物可以有利地用作代表癌症动物模型的受试者。受试者可以是雄性或雌性。

[0139] 受试者可以是先前已经诊断为或被认定正在遭受或患有需要治疗的病症(例如癌症)或者一种或多种与这种病症相关的并发症,并且任选已经接受了癌症或者与癌症相关的一种或多种并发症的治疗。或者,受试者也可以是先前未被诊断为患有癌症或者与癌症相关的一种或多种并发症的受试者。例如,受试者可以是显示出癌症或者与癌症有关的一种或多种并发症的一种或多种危险因素受试者,或不表现出危险因素的受试者。

[0140] 针对特定病症的“需要治疗的受试者”可以是患有该病症的受试者、被诊断为患有该病症的受试者或处于发展出该病症的风险中的受试者。

[0141] 在一些实施方式中,编码如本文所述的多组分CAR或其部分的核酸由载体包含。在本文所述的一些方面,编码如本文所述的多组分CAR或其部分的核酸序列或其任何组件被可操作地连接至载体。如本文使用的术语“载体”是指设计用于递送至宿主细胞或用于在不同宿主细胞之间转移的核酸构建体。如本文所使用的载体可以是病毒性的或非病毒性的。术语“载体”包括当与适当的控制元件关联时能够复制并且可以将基因序列转移至细胞的任何遗传元件。载体可以包括但不限于克隆载体、表达载体、质粒、噬菌体、转座子、粘粒、染色体、病毒、病毒粒子等。

[0142] 如本文所使用的术语“表达载体”是指从连接至载体上的转录调控序列的序列直接表达RNA或多肽的载体。表达的序列通常但不必然与细胞异源。表达载体可以包含额外的元件,例如,表达载体可以具有两个复制系统,从而使其可以保持在两个生物体中,例如在人类细胞中表达且在原核宿主中克隆和扩增。术语“表达”是指在产生RNA和蛋白质以及适当时产生分泌蛋白质中涉及的细胞进程,包括但不限于可应用至例如转录、转录加工、翻译和蛋白质折叠、修饰和加工。“表达产物”包括从基因转录的RNA和通过翻译从基因转录的mRNA获得的多肽。术语“基因”是指当与合适的调控序列可操作地连接时,在体外或体内转

录(DNA)为RNA的核酸序列。该基因可能包含或可能不包含编码区之前和之后的区域,例如,5'非翻译(5'UTR)或“前导”序列和3'UTR或“尾”序列,以及各个编码区段(外显子)之间的插入序列(内含子)。

[0143] 如本文所使用的术语“病毒载体”是指核酸载体构建体,其包含病毒来源的至少一个元件并且具有包装成病毒载体颗粒的能力。病毒载体可以含有编码如本文所述的多组分CAR或其部分的核酸来代替非必需的病毒基因。载体和/或颗粒可以用于在体外或体内将任何核酸转移入细胞的目的。许多形式的病毒载体在本领域是已知的。

[0144] “重组载体”是指包含异源核酸序列或能够在体内表达的“转基因”的载体。应该理解的是,在一些实施方式中,本文描述的载体可以与其它合适的组合物和疗法组合。在一些实施方式中,载体是游离型的。使用合适的游离型载体提供了在受试者体内在高拷贝数的额外的染色体DNA中维持感兴趣的核苷酸的手段,从而消除了染色体整合的潜在影响。

[0145] 如本文所使用的术语“核酸”或“核酸序列”是指并入了核糖核酸、脱氧核糖核酸或其类似物的单元的任何分子,优选聚合分子。核酸可以是单链或双链的。单链核酸可以是变性的双链DNA的一条核酸链。或者,它可以是不来自任何双链DNA的单链核酸。在一个方面,核酸可以是DNA。在另一方面,核酸可以是RNA。适当的核酸分子是DNA,包括基因组DNA或cDNA。其它适当的核酸分子是RNA,包括mRNA。

[0146] 如本文所使用的在本文中可以互换使用的术语“蛋白质”和“多肽”指代通过相邻残基的 α -氨基和羧基之间的肽键彼此连接的一系列氨基酸残基。术语“蛋白质”和“多肽”是指氨基酸的聚合物,包括经修饰的氨基酸(例如磷酸化、糖化、糖基化等)和氨基酸类似物,不管其大小或功能。“蛋白质”和“多肽”通常用于提及相对大的多肽,而术语“肽”通常用于提及小的多肽,但是本领域中这些术语的使用重叠。当提及基因产物及其片段时,术语“蛋白质”和“多肽”在本文中可互换使用。因此,示例性的多肽或蛋白质包括前述的基因产物、天然存在的蛋白质、同系物、直系同源物、旁系同源物、片段和其它等价物、变体、片段和类似物。

[0147] 如本文所使用的“抗体”是指IgG、IgM、IgA、IgD或IgE分子或其抗原特异性抗体片段(包括但不限于Fab、F(ab')₂、Fv、二硫键连接的Fv、scFv、单域抗体、封闭的构象多特异性抗体、二硫键连接的scfv、双价抗体),无论是衍生自天然产生抗体的任何物种,还是通过重组DNA技术产生的;是否是从血清、B细胞、杂交瘤、转染瘤、酵母或细菌中分离出来。

[0148] 如本文所描述的“抗原”是通过抗体试剂上的结合位点结合的分子。通常,抗原被抗体配体结合并能够在体内产生抗体应答。抗原可以是多肽、蛋白质、核酸或其它分子或其部分。术语“抗原决定簇”是指由抗原结合分子识别的抗原上的表位,且更具体而言是指所述分子的抗原结合位点。

[0149] 如本文所使用的术语“抗体试剂”是指包含至少一个免疫球蛋白可变结构域或免疫球蛋白可变结构域序列并且特异性结合给定抗原的多肽。抗体试剂可以含有包含抗体的抗原结合结构域的抗体或多肽。在一些实施方式中,抗体试剂可以包括单克隆抗体或含有单克隆抗体的抗原结合结构域的多肽。例如,抗体可包含重链(H)可变区(在此缩写为VH)和轻链(L)可变区(在此缩写为VL)。在另一实例中,抗体包含两个重链(H)可变区和两个轻链(L)可变区。术语“抗体试剂”包括抗体的抗原结合片段(例如单链抗体、Fab和sFab片段、F(ab')₂、Fd片段、Fv片段、scFv和结构域抗体(dAb)片段(参见,例如de Wildt等,Eur

J. Immunol 1996, 26 (3), 629-39。以引用的方式将其整体并入本文) 以及完整的抗体。抗体可具有IgA、IgG、IgE、IgD、IgM (以及其亚型和组合) 的结构特征。抗体可以来自任何来源, 包括小鼠、兔、猪、大鼠和灵长类动物(人以及非人灵长类动物) 和灵长类化抗体。抗体还包括 midibodies、人源化抗体、嵌合抗体等。

[0150] VH和VL区可以进一步细分为称为“互补决定区”(“CDR”) 的高变区, 其中穿插有更保守的区域(称为“框架区”(“FR”))。框架区和CDR的范围已经被精确定义(参见Kabat, E. A. 等, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, 美国卫生与公众服务部, NIH公开号91-3242以及Chothia, C. 等, (1987) J. Mol. Biol, 196, 901-917。以引用的方式将其整体并入本文)。每个VH和VL通常由三个CDR和四个FR组成, 按照以下顺序从氨基端到羧基端排列: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0151] 在本文中可互换使用的术语“抗原结合片段”或“抗原结合结构域”用于指保留特异性地结合至感兴趣的靶点的能力的全长抗体的一个或多个片段。涵盖在术语全长抗体的“抗原结合片段”内的结合片段的实例包括: (i) Fab片段, 由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段; (ii) F(ab')₂片段, 包含在铰链区的通过二硫键连接的两个Fab片段的二价片段; (iii) 由VH和CH1结构域组成的Fd片段; (iv) 由抗体的单个臂的VL和VH结构域组成的Fv片段, (v) dAb片段(Ward等, (1989) Nature, 341, 544-546。以引用的方式将其整体并入本文), 其由VH结构域或VL结构域组成; 以及(vi) 保留特异性抗原结合功能的独立的互补决定区(CDR)。

[0152] 如本文所使用的术语“特异性结合”是指两个分子、化合物、细胞和/或颗粒之间的化学相互作用, 其中第一实体以比其与第三非靶实体更高的特异性和亲和力与第二靶实体结合。在一些实施方式中, 特异性结合可以指第一实体与第二靶实体的亲和力是其与第三非靶实体的亲和力的至少10倍、至少50倍、至少100倍、至少500倍、至少1000倍或更大。对于给定靶标而言特异性的试剂是在所使用的测定条件下对该靶标表现出特异性结合的试剂。

[0153] 此外, 并且如本文所描述的, 可以进一步优化用于人类治疗的重组人源化抗体以降低潜在的免疫原性, 同时保持功能活性。就此而言, 功能活性是指能够展示与本文所述的重组抗体或其抗体试剂相关的一种或多种已知功能活性的多肽。这种功能活性包括例如结合到靶标的能力。

[0154] “癌症细胞”是体内、离体或组织培养中的癌性的、癌前的或转化的细胞, 其具有并不必然涉及新的遗传物质的摄取的自发的或诱导的表型改变。虽然转化可以产生自转化病毒的感染以及新基因组核酸的整合或外源核酸的摄取, 但也可以自发地或暴露于致癌物后产生, 从而使内源基因突变。转化/癌症与以下有关, 例如, 形态学改变、细胞永生、异常的生长控制、集落形成、锚定非依赖性、恶性、失去接触抑制和生长密度限制、生长因子或血清独立性、肿瘤特异性标记物、侵袭性或转移以及在合适的动物宿主例如裸鼠中的肿瘤生长。参见例如, Freshney, CULTURE ANIMAL CELLS: MANUAL BASIC TECH (第3版, 1994)。如本文所使用的术语“癌症”是指干扰机体器官和系统的正常功能的细胞的不受控的生长。患有癌症或肿瘤的受试者是具有存在于受试者体内的客观上可测量的癌症细胞的受试者。此定义包括良性和恶性的癌症, 以及休眠的肿瘤或微转移。从其原始位置迁移并播种重要器官的癌症最终会通过受影响器官的功能恶化而导致受试者死亡。

[0155] 如本文所使用的“肿瘤”是指干扰身体器官和系统的正常功能的肿瘤细胞的不受

控制的生长。术语“癌症”和“恶性肿瘤”是指转移性的肿瘤,也就是它已经变成侵袭性的,在远离原始肿瘤部位的组织中播种肿瘤生长。患有癌症或肿瘤的受试者是具有存在于受试者体内的客观上可测量的癌症细胞的受试者。此定义包括良性肿瘤和恶性癌症,以及潜在的休眠肿瘤或微转移。从其原始位置迁移并播种另外的重要器官的癌症通过受影响的器官的功能恶化而最终导致受试者死亡。造血系统癌症(如白血病)能够超出受试者中的正常造血区域,从而导致造血功能衰竭(以贫血、血小板减少和中性粒细胞减少症的形式)最终导致死亡。

[0156] 癌症的例子包括但不限于癌、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤、白血病、基底细胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脑和CNS癌症、乳腺癌、腹膜癌、宫颈癌、绒毛膜癌、结肠和直肠癌、结缔组织癌症、消化系统的癌症、子宫内膜癌、食管癌、眼癌、头颈癌、胃癌(包括胃肠癌)、胶质母细胞瘤(GBM)、肝癌、肝细胞瘤、上皮内肿瘤、肾癌或肾脏癌、喉癌、白血病、肝肿瘤、肺癌(例如,小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺的腺癌和肺的鳞状癌)、淋巴瘤(包括霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤)、黑色素瘤、骨髓瘤、神经母细胞瘤、口腔癌(例如唇、舌、口和咽)、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、直肠癌、呼吸系统的癌症、唾液腺癌、肉瘤、皮肤癌、鳞状细胞癌、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、子宫或子宫内膜癌、泌尿系统的恶性肿瘤、外阴癌以及其它癌和肉瘤、以及B细胞淋巴瘤(包括低级/滤泡性非霍奇金淋巴瘤(NHL)、小淋巴细胞性(SL)NHL、中间级/滤泡性NHL、中间级扩散性NHL、高级成免疫细胞性NHL、高级成淋巴细胞性NHL、高级小型非裂化细胞性NHL、大肿块病NHL、套细胞淋巴瘤、AIDS相关淋巴瘤、以及Waldenstrom巨球蛋白血症、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、毛细胞白血病、慢性髓细胞白血病、以及移植后淋巴细胞增生性紊乱(PTLD);以及与斑痣病、瘤腺体(如与脑肿瘤相关的)以及梅格斯氏综合征相关的异常的血管增生。

[0157] 如本文所使用的术语“治疗”、“疗法”、“处理”或“改善”是指治疗性的处理,其中目的是逆转、缓解、改善、抑制、减缓或停止与疾病或紊乱(例如,癌症)有关的病症的进展或严重程度。术语“治疗”包括减轻或缓解与例如癌症相关的病症、疾病或紊乱的至少一种不利作用或症状。如果一种或多种症状或临床标记物减少,治疗通常是“有效的”。或者,如果疾病的进展减缓或停止,则治疗是“有效的”。也就是说,“治疗”不仅包括症状或标记物的改善,还包括与没有治疗时预期的相比,停止或至少减缓症状的进展或恶化。有益或期望的临床结果包括但不限于,减轻一种或多种症状、减少疾病的程度、稳定(即不恶化)疾病状态、延迟或减缓疾病进展、改善或缓和疾病状态、缓解(不论部分或全部)和/或降低死亡率,无论是可检测的或不可检测的。术语疾病的“治疗”还包括缓解疾病的症状或副作用(包括姑息治疗)。

[0158] 如本文所使用的术语“药物组合物”是指活性剂与药学上可接受的载体(例如,药学工业中常用的载体)联合。短语“药学上可接受的”在本文中用于指在合理的医学判断范围内,适用于与人类和动物的组织接触而没有过多的毒性、刺激性、过敏反应或其它问题或并发症,具有合理的利益/风险比相称的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0159] 如本文所使用的术语“给予”是指通过引起药剂在期望部位的至少部分递送的方法或途径将本文公开的化合物置于受试者中。包含本文公开的化合物的药物组合物可以通过任何产生受试者的有效治疗的适当的途径给予。

[0160] 术语“统计学上显著”或“显著”是指统计显著性,并且通常意指两个标准偏差

(2SD)或更大的差异。

[0161] 除了的操作实例中或另有指示的情况下,本文所使用的表示成分的量或反应条件的所有数字应理解为在所有情况下均由术语“约”修饰。当与百分率相连时,术语“约”可以表示 $\pm 1\%$ 。

[0162] 如本文所使用的术语“包含”或“包括”用于指代对于方法或组合物而言必不可少的组合物、方法以及其相应组件,而且对于包含未指定的必要或非必要的要素而言是开放性的。

[0163] 术语“由……组成”是指如本文所述的组合物、方法及其相应组件,其排除了在该实施方式的描述中没有列举的任何元素。

[0164] 如本文所使用的术语“基本上由……组成”是指给定的实施方式所需的那些元素。该术语允许存在不实质影响该实施方式的基础和新颖性或功能性特征的元件的存在。

[0165] 除非上下文另外明确指出,否则单数术语“一”、“一个”和“该”包括复数指代。类似地,除非上下文另有明确指示,词语“或”旨在包括“和”。尽管可以在本公开的实践或测试中使用与本文描述的方法和材料类似的方法和材料,但是下面描述了合适的方法和材料。缩写“e.g.”源自拉丁文*exempli gratia*,并在此用于表示非限制性实例。因此,缩写“e.g.”与术语“例如”同义。

[0166] 除非本文另有明确定义,与本申请相关使用的科学和技术术语应具有本公开所属领域的普通技术人员所通常理解的含义。应理解的是,本发明不限于本文所述的特定的方法学、方案和试剂等,并且这些可能会变化。本文所使用的术语仅用于描述特定实施方式的目的,并且不打算限制本发明的范围,本发明的范围仅由权利要求书所定义。免疫学和分子生物学常用术语的定义可以参见The Merck Manual of Diagnosis and Therapy,第19版,由Merck Sharp&Dohme Corp.出版,2011 (ISBN 978-0-911910-19-3),Robert S.Porter等(编);The Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine,Blackwell Science Ltd.出版,1999-2012 (ISBN 9783527600908);以及Robert A.Meyers(编),Molecular Biology and Biotechnology:a Comprehensive Desk Reference,由VCH Publishers,Inc.出版,1995 (ISBN 1-56081-569-8);Immunology by Werner Luttmann,由Elsevier出版,2006;Janeway's Immunobiology,Kenneth Murphy,Allan Mowat,Casey Weaver(编),Taylor&Francis Limited,2014 (ISBN 0815345305,9780815345305);Lewin's Genes XI,由Jones&Bartlett Publishers出版,2014 (ISBN-1449659055);Michael Richard Green and Joseph Sambrook,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第4版,Cold Spring Harbor Laboratory出版社,Cold Spring Harbor,N.Y.,USA (2012) (ISBN 1936113414);Davis等,Basic Methods in Molecular Biology,Elsevier Science Publishing Inc.,New York,USA (2012) (ISBN 044460149X);Laboratory Methods in Enzymology:DNA,Jon Lorsch(编),Elsevier,2013 (ISBN 0124199542);Current Protocols in Molecular Biology (CPMB),Frederick M.Ausubel(编),John Wiley and Sons,2014 (ISBN 047150338X,9780471503385);Current Protocols in Protein Science (CPPS),John E.Coligan(编),John Wiley and Sons,Inc.,2005;以及Current Protocols in Immunology (CPI) (John E.Coligan,ADA M Kruisbeek,David H Margulies,Ethan M Shevach,Warren Strobe,(编) John Wiley and Sons,Inc.,2003 (ISBN 0471142735,

9780471142737);以引用的方式将其内容全部整体并入本文。

[0167] 本领域技术人员可以容易地识别使用的化疗剂(例如参见Physicians' Cancer Chemotherapy Drug Manual 2014,Edward Chu,Vincent T.DeVita Jr.,Jones&Bartlett Learning;Principles of Cancer Therapy,Chapter 85in Harrison's Principles of Internal Medicine,第18版;Therapeutic Targeting of Cancer Cells:Era of Molecularly Targeted Agents and Cancer Pharmacology,Chs.28-29in Abeloff's Clinical Oncology,2013Elsevier;以及Fischer D S(编):The Cancer Chemotherapy Handbook,第4版,St.Louis,Mosby-Year Book,2003)。

[0168] 本文在本发明的各个方面的描述内定义了其它术语。

[0169] 出于描述和公开的目的,将本申请全文中引用的所有专利和其它出版物,包括参考文献、授权专利、公开的专利申请以及共同未决的专利申请以引用的方式明确地并入本文,例如,在此类出版物中描述的可与本文所述技术关联使用的方法学。这些出版物仅由于它们的公开早于本申请的申请日而提供。在这一方面没有任何内容应被视作承认本发明人没有资格借助于先前的发明或因为任何其它原因而将此类的公开提前。所有关于这些文件的日期的声明或关于这些文件的内容的表述是基于申请人可获得的信息,并不构成关于这些文件的日期或内容的正确性的任何承认。

[0170] 本公开的実施方式的描述并非旨在穷举或将本公开限制为所公开的精确形式。虽然本文中出于说明的目的描述了本公开的具体实施方式和实例,但是相关领域的技术人员将认识到,在本公开的范围内的各种等同的修改是可能的。例如,虽然方法步骤或功能以给定的顺序呈现,但替代实施方式可以以不同的顺序执行功能,或者可以基本上同时执行功能。本文提供的公开的教导可适当地应用于其它程序或方法。本文描述的各种实施方式可以组合以提供进一步的实施方式。如果需要,可以修改本公开的各方面以使用上述参考文献和申请的组合物、功能和概念来提供本公开的进一步的实施方式。此外,出于生物功能等同性的考虑,可以对蛋白质结构进行一些不影响生物或化学作用的在种类或数量方面的改变。可以根据具体的描述对本公开做出这些改变以及其它改变。所有这些修改旨在被包括在所附的权利要求的范围内。

[0171] 任何前述实施方式的特定元件可以被其它实施方式中的元素结合或替代。此外,尽管已经在某些实施方式的上下文中描述了与本公开的这些实施方式相关的益处,其它实施方式也可以表现出这样的益处,并且并非所有的实施方式都需要必须展现出落入本公开的范围内的益处。

[0172] 表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞(单链可变片段(scFv)和受体信号转导结构域的融合)在临床试验中显示出针对B细胞恶性肿瘤的显著的成功^[1,2]。然而,CAR T细胞由于脱靶和过度激活而可能具有毒性。本文描述了通过提供多种T细胞信号传导通路的组合的、暂时的和逻辑控制的通用方法来提供CAR T细胞的改进的安全性和有效性的方法和组合物。

[0173] 在一个实施方式中,可以通过使用已经开发的能够检测两种抗原的CAR来增强特异性^[3-6]。检测多于两种的抗原的能力可以进一步提高肿瘤特异性。此外,即使当CAR T细胞处于靶位时,当T细胞的过度活化导致细胞因子释放综合征时仍然可能发生不利的副作用。杀伤(Ki11)和打开(ON)开关已经开发出来以减轻其中的一些副作用。然而,这些开关主要用作主开关,并因此缺乏精细的控制。由于天然的T细胞活化的控制是通过多种共刺激和共

抑制信号传导通路的平衡实现的,所以提供对这些信号传导通路的可调和暂时性的控制的策略对于优化CAR T细胞性能是重要的。

[0174] 本文描述了通用CAR平台,其有能力(a)用作打开/关闭(ON/OFF)开关,(b)检测多种抗原并执行逻辑运算,以及(c)独立调节多个信号转导通路,将提供用于优化CAR T细胞疗法的必要控制。本文描述的分离的、通用的、可编程的和可重构的(SUPRA) CAR平台用于此目的。重要的是,SUPRA CAR平台可以适应新的靶标,而无需对患者的T细胞进一步操作。SUPRA CAR平台是由在T细胞上表达的通用受体和靶向肿瘤的scFv接头分子组成的双组分受体系统(图12)。通用受体由细胞内信号转导结构域和作为细胞外结构域的亮氨酸拉链融合而产生(zipCAR)。接头分子由同源亮氨酸拉链和scFv的融合产生(zipFv)。zipFv上的scFv结合至抗原,并且亮氨酸拉链结合并激活T细胞上的zipCAR。该系统还用作可调开关(具有zipFv作为可滴定诱导物)。然而,与其它现有的分离的CAR系统^[8-11]不同,本文描述的是正交的zipCAR/zipFv对,其允许独立地控制多个信号转导通路并执行逻辑操作。

[0175] 本文描述的是:

[0176] SUPRA CAR平台作为打开/关闭(ON/OFF)开关的特性。从各种设计参数如何影响T细胞激活的角度提供了SUPRA CAR的设计规则。

[0177] 用SUPRA CAR平台开发出组合的逻辑运算。蛋白质工程化的方法被用于开发在单个受体中产生一组2-Input布尔逻辑门的亮氨酸拉链结合中的协同性和竞争性。

[0178] 分别控制多个信号转导通路(信号转导混合器)的SUPRA CAR的开发。构建正交的zipCAR以独立地控制CD3 ζ 以及共刺激(例如CD28和4-1BB)和共抑制(例如PD-1)信号转导通路,从而用于组合的和暂时的调节。

[0179] SUPRA CAR平台在体外和小鼠模型中进行测试。模块化设计提供了高水平的特异性、灵活性和精确性,并提供了改善细胞癌症免疫疗法的安全性和有效性的工具。

[0180] CAR T细胞疗法。肿瘤靶向T细胞向患者的转移是癌症免疫疗法的有前景的方法^[1,2]。特别是,CAR修饰的T细胞已经显示出对急性淋巴细胞白血病的空前的功效,在临床试验中观察到约90%的完全缓解^[1,2]。不管这些令人鼓舞的结果,可对CAR T细胞疗法进行改进已被广泛用于这种癌症和其它癌症。特别是,改善CAR T细胞的特异性以及限制CAR T细胞的毒性而不危害功效。

[0181] 见于目前的临床试验中的CAR设计由固定的、抗原特异性的scFv组成,所述scFv融合至源自T细胞受体(TCR)和其它共刺激受体(例如CD28和4-1BB)的细胞内信号转导结构域。这些CAR只能检测一种抗原,并因此限制了它们从健康组织中辨别肿瘤的能力。事实上,对用表达抗Her2CAR的T细胞治疗的患有转移性结肠癌的患者而言,观察到死亡,因为T细胞识别健康的肺上皮细胞上的低水平的Her2^[12]。虽然正在进行巨大努力来鉴别肿瘤特异性的生物标记物,但它仍然是非常具有挑战性的目标。另外,如果由于不表达靶抗原的克隆的爆发导致患者复发,目前的CAR的固定设计使得其难以转换靶标。此外,靶向单一抗原的CAR对于异源的肿瘤也可能具有有限的功效。因此,能够检测多种抗原、智能地识别癌症与健康组织并适应肿瘤生长的动态和异质性的系统是非常期望的。

[0182] 目前的CAR设计在T细胞激活的强度和时机方面也是死板的。此外,这种设计在治疗过程中增加或消除信号转导结构域是很困难的。因此,这种固定设计严重地限制了T细胞功能可被调节的程度。虽然含有CD28或4-1BB的CAR在临床试验中已经证明是成功的,但是

对信号转导结构域的当前选择是否理想是不确定的。例如,表达具有CD28结构域的CAR的T细胞具有更快且更强的杀肿瘤活性,但具有更短的体内持续性。相比之下,具有包含4-1BB结构域的CAR的T细胞具有较慢的杀肿瘤动力学,但在体内更好地增殖和存活^[13,14]。另外,固定的CAR设计还会以相同的水平同时触发CAR上的所有信号转导通路。然而,在一个实施方式中,最佳CAR T细胞应答将涉及以不同水平和时间尺度激活的不同通路。例如,在天然的T细胞激活条件下,例如在流感感染期间,直到TCR和CD28通路的初始诱导后48-72小时,4-1BB信号转导才被激活^[15-17]。在这样的实施方式中,CAR T细胞应答涉及在不同时间激活不同的信号转导通路。鉴于天然的T细胞激活是涉及许多共刺激信号转导通路的动态过程,允许以动态方式调谐单独的共刺激(或共同抑制)通路的CAR系统(很像T细胞信号转导的音乐混合器)将极大地促进T细胞应答的优化。

[0183] 即使当CAR T细胞能够恰当地靶向肿瘤并达到完全缓解时,可以观察到不利的副作用(ASE)。CAR T细胞疗法的最常见的副作用是细胞因子释放综合征(CRS),其是由与失控的T细胞活化和增殖相关的细胞因子升高导致的炎症症状的组合。虽然CRS的管理已经改善^[2],但CRS仍然是挑战性的和危险的并发症。事实上,在最近的抗CD19CAR T细胞试验中,患者由于CRS相关并发症而死亡^[18]。除了CRS之外,在用CART细胞治疗的许多患者中也观察到神经毒性^[1,2],并且在最近的试验中有4名患者由于脑水肿而死亡。鉴于这些威胁生命的副作用的多样性和复杂性,预防它们而不是管理它们是重要的。最小化ASE发展的一种方式是对CAR T细胞活化的时机、水平和持续性进行控制。这可以通过调节注射入患者中的T细胞的量来实现。然而,由于T细胞仍然可能增殖,它可能会延迟而不是消除CRS。一种补充的策略是将开关引入T细胞,使得它们的活性可以用分子的给予来滴定,类似于打开/关闭(ON/OFF)开关。在一个实施式中,可以引入“杀死”开关。

[0184] 组合抗原检测(sensing)是改善CAR T细胞疗法的肿瘤特异性的一种策略。在工程化的T细胞中执行简单的逻辑运算已经存在多种技术。例如,两种不同的抗原特异性scFv已经一起融合入一个CAR中,因此允许任一种抗原触发T细胞活化^[3,4]。这些系统重演了或逻辑门,并且可以减少肿瘤逃逸的机会,因为需要肿瘤对两种抗原的突变以避免CAR T细胞的检测。但是,这种串联的scFv CAR设计只能执行或逻辑。除或门之外,还创建了与逻辑组合CAR系统^[5,6],籍此用具有针对一种抗原的特异性的活化缺陷型CAR和具有对第二抗原的特异性的嵌合共刺激受体对T细胞进行转导。此外,共刺激信号转导结构域可以用来自抑制性受体(如PD-119)的结构域替代。这些策略虽然成功,但允许至多两种CAR添加在一起,并且不能扩展以包含更多种抗原。

[0185] 目前的大多数组合CAR系统被设计用于搜索和攻击显示出一种或两种特异性抗原的细胞。然而,一些癌症细胞可能通过缺乏抗原而不是存在抗原而被分类。例如,许多癌症细胞下调HLA表达以逃避T细胞应答^[22]。NK细胞可以检测并杀死缺失HLA的细胞^[23]。这种免疫机制是强有力的,因为HLA在大多数细胞类型中广泛表达,并因此HLA的缺失可被解释为异常和恶性的。然而,在一些癌症^[24]中下调的表面标记物仅表达于组织的子集中。因此,为了精确检测缺失非普遍存在的抗原的癌症细胞,还必须能够检测指定或排除感兴趣的细胞类型的抗原。这表示A而不是B(A蕴含非B)或者异或(XOR)的逻辑。可以执行这些运算的CAR平台将能够使用新的机制检测扩展范围的肿瘤。此类系统还将扩大可被CAR T细胞靶向的抗原集,并因此改善对新颖且足够的肿瘤抗原的需求。

[0186] 除了改进肿瘤特异性外,控制CAR T细胞活化水平的时机和强度对于提高工程化的T细胞免疫疗法的安全性至关重要。药物诱导型自杀基因(即杀伤开关),如诱导型半胱天冬酶9^[25]或人单纯疱疹病毒胸苷激酶(human simplex virus thymidine kinase)^[26],使得小分子诱导剂的加入触发自杀基因并杀死表达它们的工程化的T细胞。如果CRS发展并且变得危及生命,这些特征允许临床医生杀死CAR T细胞。然而,发展出CRS后杀灭CAR T细胞是否可以缓解ASE仍然不确定。在利用药物可控的CAR的可选方法中,通过小分子的添加可以允许CAR转导信号^[27,28]。这种打开(ON)开关系统可以提供以剂量依赖性方式调节T细胞活化的时序控制。

[0187] 还可以用作打开(ON)开关的另一CAR设计是分离的受体构型,其中抗原识别基序(通常是肿瘤特异性scFv)与CAR的信号转导基序分离开,在这种构型中,分离开的受体结构域可以通过生物分子相互作用彼此募集。这种分离开的CAR构型还允许大量待被靶向的抗原,而不用重新工程化免疫细胞,因为它使用通用受体作为所有相互作用的共同基础。其它实施方式可用于将抗原识别基序募集至工程化的T细胞上的信号转导基序。这种分离开的CAR设计的最简单版本是通过融合CD16细胞外结构域和细胞内TCR信号转导结构域而完成的。CD16是结合至人IgG抗体的恒定区的低亲和力Fc受体。加入适当的抗体触发CD16CAR T细胞的活化,从而也起到打开(ON)开关的作用^[11]。虽然方便,但这种CD16CAR通过与患者产生的内源性抗体结合可能具有许多潜在的脱靶效应。因此,除了CD16和Fc对之外,优选使用额外的预防措施,其它的异二聚化结构域(如链霉亲和素和生物素^[10]、FITC和抗FITC scFv^[8]或肽和抗肽scFv^[9])也已经用于产生分离的CAR。在这些设计中,链霉亲和素或scFv融合至TCR信号转导结构域并显示在T细胞表面上。用生物素、FITC或合成肽修饰的肿瘤特异性抗体充当了表达分离的CAR的T细胞和癌症细胞之间的接头分子,并用于触发T细胞应答。迄今为止,这些系统仅用于一次控制一种CAR。正交的募集对将允许多个信号转导通路的同时控制,从而允许组合的检测和不同通路活性的精细平衡。

[0188] 分离的、通用的、可编程的和可重构的(SUPRA) CAR平台。对于这项工作,本文描述的SUPRA CAR平台包括以下功能:

[0189] 打开/关闭(ON/OFF)开关;

[0190] 基于抗原检测的逻辑决策;以及

[0191] 不同信号转导通路的独立和多路调谐。

[0192] SUPRA平台使用亮氨酸拉链作为CAR的细胞外部分以及使用各种信号转导蛋白作为细胞内结构域(图12)。同源亮氨酸拉链融合至抗原特异性scFv抗体。抗体/拉链融合物的给予激活T细胞,并因此以剂量依赖的方式用作打开(ON)开关。亮氨酸拉链是一类可以通过电荷相互作用形成异质结构的蛋白质结构域^[29]。亮氨酸拉链有利于SUPRA平台,因为许多正交的亮氨酸拉链对可用,因此为设计工作提供了大量候选物^[28]。亮氨酸拉链结构域也可以被工程化为相互竞争相同的结合配偶体,从而允许抑制作用和“非”功能性(图12)。此外,我们可以使用亮氨酸拉链对之间的不同的亲和力来策划复杂功能,如或、蕴含非、与、异或(图12)。存在8种可能的2-Input布尔逻辑行为(并不是持续活动的)(存在16种可能的2-Input布尔逻辑门。然而,只有其中8种(假、A、B、或、与、A蕴含非B、B蕴含非A以及异或)在没有输入时是不活动的。

[0193] 此外,多个正交对允许具有分离的信号转导结构域的CAR(例如CD3 ζ 、CD28、4-1BB、

PD-1),因此使得能够独立且可调的控制这些通路(图12)。各单独的CAR可以容易地与靶向不同抗原的scFv配对,从而允许组合的和逻辑的抗原检测。体外表征可以将SUPRA CAR平台响应(例如细胞毒性、细胞因子产生和记忆T细胞形成)映射到设计参数(例如,zipCAR表达水平、zipFv浓度、scFv亲和力和拉链亲和力)。本文所述的功能也可以在小鼠异种移植肿瘤模型中进行体内测试。

[0194] 当前的CAR设计具有有限的控制和运算能力。这些缺陷使得目前的CAR易受到过度激活的危险,并降低CAR对健康组织与肿瘤细胞进行区分的能力。本文描述的是通过使用例如SUPRA CAR平台独立地调节T细胞中的多个信号转导通路来解决控制和运算能力的方法和组合物,其提供逻辑和信号转导混合器功能。

[0195] 这些方法和组合物提供了以下优势,例如它们提供了首要功能丰富的以如下为特征的通用的CAR平台:打开/关闭(ON/OFF)开关、逻辑检测和集成(integration)、大于2个抗原的处理以及对不同信号转导通路的独立调节。这些特征从未在单个系统中一起显示。特别是,本文提供了使用CAR的T细胞中的多个信号转导通路的首次独立调谐。本文描述的是不同参数如何能够影响分离的通用CAR系统,这对于设计可滴定的打开/关闭(ON/OFF)CAR开关将是有益的。本文进一步描述的是用CAR生成第一完整组的2-Input布尔逻辑门,包括或逻辑门、蕴含非逻辑门、与逻辑门以及异或逻辑门。这种逻辑行为对于改善CAR T细胞对抗癌细胞的特异性以及防止肿瘤逃逸是非常有用的。另外,从合成生物学角度来看,一些逻辑行为是有趣的,因为它们很难进行工程化。例如,异或逻辑门是最难以工程化的一个,因为每个输入信号都能够激活和阻抑输出,这取决于其它输入的存在。另外,本文描述了首个CAR系统的开发,其可以整合来自癌细胞和健康细胞的大于2种抗原以控制多个信号转导通路。在CAR T细胞系统中首次有可能分别控制CD3 ζ 、CD28、4-1BB以及PD-1的信号传导,并探索每个通路的激活时机和强度如何影响CAR T细胞应答和记忆T细胞形成。

[0196] 试剂和DNA构建体:可以开发许多zipCAR和zipFv来系统性地绘制亲和力、受体表达水平和SUPRA CAR平台的性质之间的相关性。因此,从结果中得出的结论将源自广泛组的试剂和条件的总和,而不是其它研究中常见的少数试剂。这将有助于确保来自某些试剂的异常不会完全掩盖SUPRA CAR的功能。

[0197] 原代T细胞:在一些实施方式中,原代T细胞将从许多匿名捐献者分离。来自一个捐献者的T细胞的结果将通过来自另一异性捐献者的T细胞进行验证。

[0198] 动物:雄性和雌性小鼠都将使用以减少由于小鼠的性别造成的偏倚。

[0199] 度量标准:本文描述了新的、无偏倚的度量标准,以确定逻辑行为的功能有效性(请参阅下文的详细信息)。为了确保透明度并促进数据共享,还开发了创新的方式来显示基于网络的数据表中的遗传电路的关键规格和性能(可在万维网的datasheets.synbiotools.org/上获得)。

[0200] SUPRA CAR平台作为打开/关闭开关的表征

[0201] 关键问题: SUPRA平台的设计参数与T细胞应答之间的关系是什么?本文描述的是(1) zipCAR表达水平、(2) 亮氨酸拉链亲和力、(3) scFv亲和力以及(4) zipFv浓度是如何最终在体外针对抗原表达细胞以及在体内针对肿瘤影响T细胞活化的系统性特征(图14A)。

[0202] 体外SUPRA CAR的系统表征以深入了解设计规则。可以确定如何改变以下参数影响SUPRA CAR T细胞活化:

[0203] (1) ZipCAR表达水平:通过慢病毒转导以不同的多重感染将zipCAR导入原代人类T细胞中,以产生由3种独立水平的zipCAR表达组成的T细胞。可以用mCherry或myc染色测量来验证zipCAR的表达。

[0204] (2) 亮氨酸拉链亲和力:已经鉴定了至少3种不同的能够以不同的亲和力结合至zipCAR BZIP的亮氨酸拉链(AZIP),并且可以使用这些AZIP构建zipFv(图14B)。

[0205] (3) scFv亲和力:至少3种具有不同亲和力的抗-Her2scFv可获得,可用于生成zipFv(图14C)。与3个亮氨酸拉链对一起,至少可以纯化9个独特的zipFvs。蛋白质可以在HEK293T细胞中表达并分泌到培养基中。可以用FPLC从细胞培养上清液中纯化zipFv。

[0206] (4) ZipFv浓度:可以使用不同量的zipFv(例如5 μ g/ml、0.5 μ g/mL或50ng/mL)以探索SUPRA CAR平台的剂量依赖性质。

[0207] 上述的各条件都可以用3种效应细胞:靶标(E:T)比例(1:1、10:1、1:10)进行测试。选择用于本实验的靶癌症细胞系是称为SK-BR-3的Her2+乳腺癌细胞系,因为它是异种移植肿瘤模型中使用的标准乳腺癌细胞^[36]。用荧光素酶修饰SK-BR-3系以帮助体外细胞毒性检测和体内成像。对于这个实验,不同数量的SK-BR-3细胞可以接种在96孔板上并生长过夜。可将工程化的T细胞和zipFv在第二天添加至含有SK-BR-3细胞的96孔板。待添加的zipFv的浓度和T细胞的数量可以根据条件而变化。T细胞活化可以例如通过使用标准ELISA测定法测量培养基中的细胞因子IL-2和IFN- γ 的产生来定量。通过荧光素酶测定法^[14]定量剩余的活细胞(即,未被T细胞杀死的细胞)可以测量针对SK-BR-3细胞的细胞毒性。可以测量T细胞表面上的CD69表达以确定被激活的T细胞的百分比。

[0208] 验证体内活性和参数相关性的小鼠研究。可以在小鼠异种移植肿瘤模型中检测各种参数如何影响SUPRA平台的抗肿瘤活性。为了测试SUPRA平台在小鼠异种移植肿瘤模型中的性能,可将表达荧光素酶的SK-BR-3细胞植入免疫缺陷小鼠(NOD scid γ (NSG),4-6周龄, Jackson实验室)。500万个癌症细胞可以腹膜内(ip)植入。在肿瘤建立的14-20天后,可通过ip注射引入500万个表达zipCAR的CD8+T细胞。1天后,通过ip注射可以引入具有不同的拉链和scFv亲和力的抗体。对于每种情况,可以将六只小鼠分为一组(3只雄性和3只雌性小鼠)以减少由于小鼠性别造成的偏倚。肿瘤生长可以通过荧光素酶和IVIS成像来测量。3周后,可处死小鼠,并收集骨髓和脾细胞以通过流式细胞术确定总的T细胞和其它T细胞亚群(例如中央记忆细胞)的数量。基于上述实验条件,显示出SUPRA系统的确可以缓解肿瘤小鼠模型中的肿瘤负荷(图15A和图15B)。SUPRA平台的效率与表达全长Her2CAR的T细胞相当。此外,表达zipCAR的T细胞在没有相应的zipFv的情况下没有显著减小肿瘤尺寸。

[0209] 本文描述了体外和体内的SUPRA CAR设计参数与工程化T细胞的抗肿瘤活性之间的关系映射。这可以提供关于如何在未来的临床前和临床研究中有效使用SUPRA系统的设计规则。

[0210] 用SUPRA CAR平台开发组合逻辑操作

[0211] 存在8种可能的2-Input-1-Output逻辑门,其中无输入状态(0,0)不产生输出(图16)。这些逻辑门不会产生连续活化的T细胞,这是安全有效的T细胞疗法的要求。不希望受理论的束缚,在本文考虑之列的是scFv和亮氨酸拉链的亲和力可以在确定某些逻辑行为(例如异或门、蕴含非门以及与门)的结果中起重要作用。亲和力太强或太弱可能会危害系统的性能。因此,为了将这些逻辑操作设计成zipCAR,可以使用亮氨酸拉链库和蛋白质工程

化方法以创建可以通过协作竞争或结合来实现逻辑运算的zipCAR和zipFv。可以确定拉链/scFv亲和力和癌症细胞的CAR T逻辑检测之间的关系。在所有设计中,只有一个zipCAR将被引入到T细胞中。为了显示逻辑行为,我们可以设计靶向Her2或Ax1的zipFv。Ax1是在许多癌症中过表达的受体酪氨酸激酶^[37]。已经开发出针对Ax1的新型CAR(图17),而针对Ax1的scFv可以用于生成zipFv。

[0212] 三种建议的受体门(假、仅A和仅B)可用作其它逻辑设计的对照。或门允许两个抗原中的一个或两个触发T细胞应答。因此,或门可用于防止肿瘤逃逸,因为肿瘤需要两种抗原的突变以避免被工程化的T细胞检测。与门通过需要两种抗原存在于相同肿瘤中以激活T细胞应答可以改善肿瘤靶向特异性。蕴含非门用于检测以抗原之一的丢失为标志的肿瘤。类似地,异或门可以检测其表面特性通过两种抗原中的任一者的丧失而区分的肿瘤细胞。注意这种类型的抑制与下面描述的其中的配体结合触发PD-1信号转导通路的抑制性CAR(iCAR)设计不同。这种设计代表了iCAR的替代策略,并且不会冒险将T细胞推入无活性状态。

[0213] zipCAR中的逻辑操作的设计和表征受体设计:

[0214] 假门、仅A门和仅B门(图16):这些逻辑行为在本实例中用作其它逻辑设计的对照,并且已在上文进行了描述。

[0215] 或门(图16):或门是用SUPRA平台可以实现的最简单的逻辑之一。两个输入信号中的任一个或两个的存在可以触发T细胞应答。为了用SUPRA实现这种逻辑行为,zipCAR可被首先通过慢病毒转导引入原代T细胞中。可以使用具有相同的亮氨酸拉链、但具有靶向Her2或Ax1的scFv的两个zipFv。注意这个或门设计可以轻松扩展以适应更多的抗原输入,而无需进一步的T细胞工程化。

[0216] 蕴含非B门和B蕴含非A门(图16):在蕴含非逻辑门中,只有一个输入可以触发输出,并且第二输入的存在关闭系统。例如,A蕴含非B意味着只有具有抗原A的癌症细胞才会触发应答。不表达抗原、单独表达抗原B或者表达抗原A和抗原B的细胞不会激活SUPRA CAR。为了用SUPRA实现这种逻辑行为,可以设计具有不同的亮氨酸拉链(例如Her2-AZIP和Ax1-BZIP-弱)的两个zipFv。Ax1 zipFv上的弱的BZIP可以结合至Her2-AZIP zipFv,但比起zipCAR上的BZIP而言具有较弱的亲和力。当只有Her2存在于细胞上时,Her2-AZIP将结合至受体并触发T细胞活化。然而,当Her2和Ax1都存在于相同细胞上时,scFv-抗原结合可提供使Her2-AZIP与Ax1-BZIP-弱竞争性饱和和所需的邻近的协同性,并且T细胞不能被激活。本文证明了竞争性的拉链结合可以有效地阻止zipCAR激活。生成四个抗Her2zipFv,一个具有AZIP(活化),且另外三个具有BZIP(强烈地或较弱地结合AZIP)。抗-Her2-AZIP zipFv可以激活zipCAR,并且抗Her2-BZIP能够以剂量依赖的方式强烈地抑制由抗-Her2-AZIP触发的激活(图18)。

[0217] 具有不同的亲和力的2个Ax1 scFv和5个Her2scFv^[38]是可以获得的。可构建使用scFv和BZIP亲和性变体的组合的蕴含非门的抑制性scFv的变体。激活的zipFv上的AZIP的特性保持不变。zipCAR上的BZIP也保持不变。拉链可以源自如本文其它地方所述的已经测试过的拉链库。基于文献^[30]中描述的蛋白质工程化原理,通过改变拉链上的相互作用残基,可以生成更多的拉链变体。

[0218] 与门(图16):为了生成与门,可以创建与zipCAR结合较弱的两个zipFv,但当两个

zipFv由于这两个zipFv之间的协同作用在相同的细胞上结合抗原时,其可以与zipCAR结合的更紧密。可将两个正交的BZIP拉链附着到zipCAR上。两个相应的AZIP可以附着至各zipFv。最后,正交的异二聚体相互作用结构域也可以连接至各zipFv以允许两个zipFv之间的弱的相互作用。zipFv和zipCAR之间的弱的相互作用的这一组合可以提供确保zipCAR T细胞仅在两个zipFv都存在时才被激活所必需的协同性。PDZ结构域及其相应的配体可用作zipFv上的正交的异二聚体相互作用结构域,因为可获得许多弱相互作用的PDZ/配体对^[39]并且已用于信号转导蛋白或转录因子中的工程化协同性^[40-42]。可以生成由PDZ和拉链结构域组成的zipCAR和zipFv的小的文库,以识别可以用作与门的一组结构域。

[0219] 异或(图16):同与门类似,为了生成异或门,可以将两个正交的BZIP拉链附着至zipCAR上。可将对应的正交的AZIP拉链附着至zipFv上,从而使各自可以结合不同的BZIP上的受体。此外,各zipFv也可以配备另一zipFv的BZIP-弱,从而使两个zipFv的存在不会激活该受体。然而,BZIP-弱的亲和力足够弱,从而使得它需要通过抗原进行协同结合,并且不允许zipFv在溶液中结合。因此,当两个ZipFv通过它们的scFv结合至相同细胞时,它们只会相互抑制,并因此防止两个zipFv都激活zipCAR。与其它逻辑门类似,可以生成一系列的具有对AZIP而言的不同亲和力的BZIP的zipFv,以确定最佳设计。

[0220] 受体表征

[0221] 可通过慢病毒转导将ZipCAR引入原代T细胞(即CD4和CD8)。可以用myc染色和流式细胞术定量zipCAR的表达。ZipFv可以在HEK293T细胞中产生并用FPLC纯化。为了确定体外SUPRA系统的逻辑行为,可以通过将工程化的T细胞和zipFv与表达(a)无配体、(b)仅Her2、(c)仅Ax1或(d)Her2和Ax1的SK-BR-3细胞混合来激活系统。可以用Her2的CRISPR-Cas9敲除生成无配体SK-BR-3系。可通过慢病毒转导将Ax1引入SK-BR-3。这4个SK-BR-3系代表用于这个目的的4种可能的布尔逻辑输入。每个系统可以用3个E:T比例进行测试。除了拉链和scFv的亲和力之外,zipFv浓度和zipCAR表达可以变化。可以通过测量细胞因子的产生(即IL-2和IFN- γ)、针对肿瘤细胞的细胞毒性和T细胞上的CD69表达来监测T细胞活化。

[0222] 为了定量地确定这些非偏倚受体的逻辑性能,已经开发了称为矢量接近度(VP)的度量标准。VP测量回路的生物学实施与来自其预期的真值表的其理想的实施之间的偏差。真值表和所获得的实验结果在四维矢量空间中分别表示为矢量、真值表和信号矢量。这两个矢量之间的角度误差(VP角度度量标准)运算为 0° 意味着数据完美地表示预期的真值表,而 90° 意味着数据显示出完全不正确的输出(对预期的真值表的反向响应)。对于任何实施的回路,其VP角度是从所有的16个可能的2-Input布尔逻辑真值表中测量,并且结果按升序排顺序。该排顺序的列表中的预期的真值表的排名(rank)被定义为回路的VP总体排名。注意到每个输出测量(例如细胞毒性、细胞因子、CD69)都有其自己的VP角度和总体排名。如果回路具有对所有的输出而言的最好的(即最小的)VP总体排名,则该回路在此测量下被称为功能有效。最好的受体是功能上有效的受体,并且具有打开(ON)和关闭(OFF)状态(动态范围)之间最大的差异。

[0223] 小鼠异种移植肿瘤模型中的zipCAR的逻辑行为的表征。可以使用相当标准的体内肿瘤模型,其中通过ip注射将上述4种SK-BR-3癌症细胞系引入分开的小鼠组中。将这些细胞系植入NSG小鼠中,并允许肿瘤生长2周。通过ip注射将500万个含有zipCAR的T细胞引入小鼠中。ZipFv也在1天后通过ip注射进行注射。对于具有zipFv的多个功能集合的一些门,

对其中的至少两个集合进行测试,以确定哪种在体内更好地工作。对于每种组合,将五只小鼠分组在一起。用荧光素酶和IVIS成像仪测量肿瘤生长。3周后,处死小鼠,并收集骨髓和脾细胞,从而通过流式细胞术确定不同的T细胞亚群的数量。对于各条件,将六只小鼠分组在一起(3只雄性小鼠和3只雌性小鼠)以减少由于小鼠性别造成的偏倚。测试8种可能的2-Input逻辑受体,并使用VP度量标准来客观地确定体内受体的逻辑性能。

[0224] 本文描述的是用于执行任何当前的CAR设计无法比拟的逻辑操作的一组zipCAR和zipFv的设计和表征,从而交付了向癌症患者提供精确的药物的智能平台。

[0225] 诸如拉链之间的接头长度和拉链的顺序的参数可以变化,以确定最佳的zipCAR设计。

[0226] 该设计还可以被修饰以包括3个拉链,从而使得3个输入可以被相同的受体处理并且可以实现更复杂的逻辑。此外,提供了具有不同的亲和力的PDZ-配体对和亮氨酸拉链的文库,以便它们可以被用于更复杂的SUPRA CAR设计。

[0227] 开发SUPRA CAR以控制多个信号转导通路

[0228] 触发共刺激通路(例如CD28和4-1BB)可引起快速杀肿瘤活性以及更多的中央T细胞形成。仅在工程化T细胞上激活PD-1信号转导通路可缓和CAR T细胞的过度活化并降低发展出不良副作用的风险。可对具有不同的细胞内信号转导结构域和亮氨酸拉链的正交zipCAR进行检查,以解决各通路的强度和活化时机如何促成总体的T细胞应答、T细胞分化和抗肿瘤效应。

[0229] 设计、构建和表征具有不同的信号转导结构域的正交zipCAR。

[0230] 已经在Jurkat T细胞中的SUPRA CAR平台内筛选了40个亮氨酸拉链对^[43](图19A),并且已经鉴定了与SUPRA平台相容的3个正交拉链对(图19B)。这些拉链可用于创建具有CD3 γ 、CD28、4-1BB和PD-1信号转导结构域的正交zipCAR。如上所述,使用慢病毒载体将这些zipCAR转入T细胞中。例如,本文展示了具有抑制Jurkat T细胞中的不同的CAR的活化的PD-1细胞内信号转导结构域的抑制性CAR的产生(图19C)。

[0231] 测试CD3 γ 、CD28和4-1BB zipCAR:为了证实具有不同的信号转导结构域的zipCAR如何在T细胞中发挥作用,通过慢病毒转导用zipCAR转导人类CD4和CD8原代T细胞。在开始表征实验之前,使细胞达到静息状态(~12天)。为了测试zipCAR CD28和4-1BB结构域的功能性,将含有这些结构域的zipCAR分别引入已经稳定表达仅含有CD3 ζ 信号转导结构域的抗Her2CAR的T细胞中。将这些zipCAR的行为与已经包含各自的信号转导结构域的全长(传统的)Her2-CAR进行比较。用抗myc染色和流式细胞术证实zipCAR的表达。在杀伤测定中,使用表达Her2和荧光素酶的K562细胞作为抗原呈递细胞。添加相应的抗Her2zipFv以激活zipCAR。另外,抗体浓度可以变化,并且生成具有不同的拉链亲和力的zipFv以确定这些参数如何影响T细胞应答。对T细胞的IL-2产生和CD69表达进行测量以确定活化水平。通过细胞计数监测T细胞增殖。与4-1BB^[13,14]的活化相比,CD28的活化导致更高百分比的中央记忆T细胞。因此,通过流式细胞术监测表面标记物如CCR7和CD45RO以确定具有和没有刺激时的中央记忆T细胞或效应记忆T细胞的相对水平。

[0232] 测试PD-1zipCAR:为了证实具有PD-1信号转导结构域的zipCAR是否可以抑制T细胞活化,通过慢病毒转导将zipCAR引入已经含有抗Her2CAR的原代T细胞中。将T细胞用Her2+K562细胞激活并用zipFv抑制。抗体浓度和拉链亲和力可以变化,并且这些参数可以用于

影响T细胞应答的抑制。通过测量IL-2产生、CD69表达和增殖来监测抑制。

[0233] 在体外的zipCAR的多路控制的表征。使用zipCAR的不同的信号转导通路的组合控制:为了显示出在相同的T细胞中的信号转导通路的单独的控制,通过两个连续的慢病毒转导将3个具有各种信号转导结构域的zipCAR引入原代T细胞中。各zipCAR也具有正交拉链和表位标签。图20中描述了2组zipCAR。根据附着至各scFv的zipFv,这个zipCAR集合展示了各种各样的行为。在图20中,逻辑操作和表型是通过假设所有三个zipFv靶向不同的抗原来产生3-input逻辑行为而得出。然而,这些zipCAR可容易地适应靶向更少的抗原。另外,并非所有的zipCAR都需要同时激活。

[0234] 可以生成针对Her2、Ax1和间皮素的zipFv。伴随着三种不同的输入配体,存在8种可能的组合:(1)无配体、(2)仅Her2、(3)仅Ax1、(4)仅间皮素、(5)Her2+Ax1、(6)Her2+间皮素、(7)Ax1+间皮素、或(8)Her2+Ax1+间皮素。通过在K562细胞系中稳定地过表达Her2、Ax1和/或间皮素的细胞外部分,可以产生所有8种可能的靶细胞系。这组新的K562系也组成型地表达荧光素酶和mCherry基因。荧光素酶可用于体外细胞毒性测定和体内成像,而mCherry标记细胞用于流式细胞术分析。监测中央记忆T细胞表面标记物和细胞因子的产生以及针对癌症细胞系的细胞毒性。

[0235] 个体通路的多路剂量应答曲线:配备不同的信号转导通路的正交zipCAR提供了独特的机会以不同水平激活每个通路,这是目前的固定CAR设计无法实现的特性。对于图20中概述的两组zipCAR,每个通路的体外剂量-应答分析可以用包含全部三种zipCAR以及对每种zipCAR而言的5种不同的zipFv浓度的T细胞进行。在这一实验中,每个zipFv具有相同的抗Her2scFv。靶细胞是Her2+K562细胞。通过ELISA和K562细胞的细胞毒性测量细胞因子的产生(即IL-2和IFN- γ)。还测量了表面标记物如CCR7和CD45RO,以确定具有和没有刺激时的中央记忆T细胞和效应记忆T细胞的相对水平。

[0236] 个体通路的时序控制。除了激活的不同水平之外,通过正交的zipCAR管理的各通路可在不同的时间被触发。CD28和4-1BB激活的相对时机可影响CAR T细胞应答和记忆T细胞形成。控制CD3 ζ 和CD28的zipCAR可在实验开始时被同时激活。然后,在CD3 ζ 和CD28的初始激活后0h、8h、16h、24h、48h、72h或96h使用Her2+K562细胞和抗Her2zipFv将控制4-1BB的zipCAR激活。此外,通过ELISA和细胞毒性测量细胞因子的产生。还对表面标记物(如CCR7和CD45RO)进行测量,以确定中央记忆T细胞或效应记忆T细胞的相对水平。

[0237] 小鼠异种移植肿瘤模型中的zipCAR的多路控制的表征。在体内用一组正交zipCAR可以实现对T细胞信号转导的多路控制。zipCAR含有myc、FLAG或HA表位标签,并被克隆到2种慢病毒载体中。为了分析两组zipCAR,通过两个连续的转导将慢病毒引入人原代T细胞中。用抗表位标签染色和流式细胞术证实zipCAR的表达。将8种工程化的K562细胞皮下植入NSG小鼠中并使其生长2周。然后,通过ip注射将含有zipCAR的T细胞引入小鼠中。将所有三个zipFv在1天后通过尾静脉注射进行注射。对于各条件,将六只小鼠分组在一起(3只雄性小鼠和3只雌性小鼠)以减少由于小鼠性别造成的偏倚。通过荧光素酶检测和IVIS成像来测量肿瘤生长。3周后,处死小鼠,并收获骨髓和脾细胞以通过流式细胞术确定不同的T细胞亚群的数量。

[0238] 为了评估在体内SUPRA系统的多路剂量-应答曲线,使用上述相同组的T细胞,但将三个zipFv以不同剂量注射到小鼠中。肿瘤细胞是仅表达Her2的K562。实验的剩余部分与上

面描述的相同。

[0239] 为了在体内评估SUPRA系统的时序控制,再次使用相同组的T细胞,但在添加用于CD3 ζ 和CD28的zipFv后0h、24h、48h、72h或96h加入用于4-1BB的zipFv。所植入的肿瘤细胞是仅表达Her2的K562。实验的剩余部分将与上面描述的相同。

[0240] 本文描述的是可以灵活地控制人类T细胞中的多个信号转导通路的正交zipCAR的集合。当需要精确的治疗肿瘤时(例如,一种抗原不足以描述肿瘤),这些zipCAR是新类别的CAR的基础。当与上面提到的受体设计相结合时,可用的逻辑操作的数量增多允许有效识别肿瘤细胞。

[0241] 为了增强转基因如CAR的慢病毒转导效率,通常在转导程序之前进行T细胞受体(TCR)的活化。TCR的活化可使记忆T细胞形成的分析变得复杂,因为活化步骤可以驱使T细胞分化成不同的记忆细胞。引入转基因的另一方法是通过编码转基因的体外转录的RNA的瞬时转染。在本文考虑之列的是将zipCAR克隆到专门设计用于体外RNA转录的载体中^[44]。zipCAR RNA可以使用可商购的试剂盒生成,并通过核转染而转染入静息的原代CD4T细胞或CD8T细胞。

[0242] 在进一步考虑之列的是zipCAR可以通过转座酶(例如PiggyBAC^[45]或Sleeping Beauty^[46])递送。这些系统具有高得多的基因递送能力,并且本文显示出使用PiggyBAC可以将3种单独的质粒同时整合到人类T细胞中(图21)。

[0243] 参考文献

[0244] 1.Maude,S.L.et al.Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia.N Engl J Med 371,1507-1517 (2014).

[0245] 2.Davila,M.L.et al.Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia.Sci Transl Med 6,224ra225 (2014).

[0246] 3.Zah,E.,Lin,M.Y.,Silva-Benedict,A.,Jensen,M.C.&Chen,Y.Y.T Cells Expressing CD19/CD20 Bispecific Chimeric Antigen Receptors Prevent Antigen Escape by Malignant B Cells.Cancer Immunol Res 4,498-508 (2016).

[0247] 4.Grada,Z.et al.TanCAR:A Novel Bispecific Chimeric Antigen Receptor for Cancer Immunotherapy.Mol Ther Nucleic Acids 2,e105 (2013).

[0248] 5.Kloss,C.C.,Condomines,M.,Cartellieri,M.,Bachmann,M.&Sadelain,M.Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells.Nat Biotechnol 31,71-75 (2013).

[0249] 6.Lanitis,E.et al.Chimeric antigen receptor T Cells with dissociated signaling domains exhibit focused antitumor activity with reduced potential for toxicity in vivo.Cancer Immunol Res1,43-53 (2013).

[0250] 7.Chen,L.&Flies,D.B.Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition.Nat Rev Immunol 13,227-242 (2013).

[0251] 8.Ma,J.S.et al.Versatile strategy for controlling the specificity and activity of engineered T cells.Proc Natl Acad Sci USA 113,E450-458 (2016).

- [0252] 9.Rodgers,D.T.et al.Switch-mediated activation and retargeting of CAR-T cells for B-cell malignancies.Proc Natl Acad Sci USA 113,E459-468 (2016) .
- [0253] 10.Urbanska,K.et al.A universal strategy for adoptive immunotherapy of cancer through use of a novel T-cell antigen receptor.Cancer Res 72,1844-1852 (2012) .
- [0254] 11.Kudo,K.et al.T lymphocytes expressing a CD16 signaling receptor exert antibody-dependent cancer cell killing.Cancer Res 74,93-103 (2014) .
- [0255] 12.Morgan,R.A.et al.Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2.Mol Ther 18,843-851 (2010) .
- [0256] 13.Kawalekar,O.U.et al.Distinct Signaling of Coreceptors Regulates Specific Metabolism Pathways and Impacts Memory Development in CAR T Cells.Immunity 44,380-390 (2016) .
- [0257] 14.Zhao,Z.et al.Structural Design of Engineered Costimulation Determines Tumor Rejection Kinetics and Persistence of CAR T Cells.Cancer Cell 28,415-428 (2015) .
- [0258] 15.Bertram,E.M.,Lau,P.&Watts,T.H.Temporal segregation of 4-1BB versus CD28-mediated costimulation:4-1BB ligand influences T cell numbers late in the primary response and regulates the size of the T cell memory response following influenza infection.J Immunol 168,3777-3785 (2002) .
- [0259] 16.Vinay,D.S.&Kwon,B.S.Role of 4-1BB in immune responses.Semin Immunol 10,481-489 (1998) .
- [0260] 17.Weinberg,A.D.,Vella,A.T.&Croft,M.OX-40:life beyond the effector T cell stage.Semin Immunol 10,471-480 (1998) .
- [0261] 18.Turtle,C.J.et al.Therapy of B Cell Malignancies with CD19-Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells of Defined Subset Composition.Blood 124,384-384 (2014) .
- [0262] 19.Fedorov,V.D.,Themeli,M.&Sadelain,M.PD-1-and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses.Sci Transl Med 5,215ra172 (2013) .
- [0263] 20.Morsut,L.et al.Engineering Customized Cell Sensing and Response Behaviors Using Synthetic Notch Receptors.Cell 164,780-791 (2016) .
- [0264] 21.Roybal,K.T.et al.Precision Tumor Recognition by T Cells With Combinatorial Antigen-Sensing Circuits.Cell 164,770-779 (2016) .
- [0265] 22.Hicklin,D.J.,Marincola,F.M.&Ferrone,S.HLA class I antigen downregulation in human cancers:T-cell immunotherapy revives an old story.Mol Med Today 5,178-186 (1999) .
- [0266] 23.Waldhauer,I.&Steinle,A.NK cells and cancer

immunosurveillance. *Oncogene* 27,5932–5943 (2008).

[0267] 24. Bourseau-Guilmain, E. et al. Hypoxia regulates global membrane protein endocytosis through caveolin-1 in cancer cells. *Nat Commun* 7,11371 (2016).

[0268] 25. Di Stasi, A. et al. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med* 365,1673–1683 (2011).

[0269] 26. Bonini, C. et al. HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* 276,1719–1724 (1997).

[0270] 27. Wu, C.Y., Roybal, K.T., Puchner, E.M., Onuffer, J. & Lim, W.A. Remote control of therapeutic T cells through a small molecule-gated chimeric receptor. *Science* 350,aab4077 (2015).

[0271] 28. Juillerat, A. et al. Design of chimeric antigen receptors with integrated controllable transient functions. *Sci Rep* 6,18950 (2016).

[0272] 29. Vinson, C., Acharya, A. & Taparowsky, E. J. Deciphering B-ZIP transcription factor interactions in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1759,4–12 (2006).

[0273] 30. Moll, J.R., Ruvinov, S.B., Pastan, I. & Vinson, C. Designed heterodimerizing leucine zippers with a ranger of pIs and stabilities up to 10 (-15)M. *Protein Sci* 10,649–655 (2001).

[0274] 31. Bashor, C.J., Helman, N.C., Yah, S. & Lim, W.A. Using engineered scaffold interactions to reshape MAP kinase pathway signaling dynamics. *Science* 319, 1539–1543 (2008).

[0275] 32. Siuti, P., Yazbek, J. & Lu, T.K. Synthetic circuits integrating logic and memory in living cells. *Nat Biotechnol* 31,448–452 (2013).

[0276] 33. Bonnet, J., Yin, P., Ortiz, M.E., Subsoontorn, P. & Endy, D. Amplifying Genetic Logic Gates. *Science* (2013).

[0277] 34. Auslander, S., Auslander, D., Muller, M., Wieland, M. & Fussenegger, M. Programmable single-cell mammalian biocomputers. *Nature* 487,123–127 (2012).

[0278] 35. Gaber, R. et al. Designable DNA-binding domains enable construction of logic circuits in mammalian cells. *Nat Chem Biol* 10,203–208 (2014).

[0279] 36. Cho, H.M. et al. Enhanced inhibition of murine tumor and human breast tumor xenografts using targeted delivery of an antibody-endostatin fusion protein. *Mol Cancer Ther* 4,956–967 (2005).

[0280] 37. Wu, X. et al. AXL kinase as a novel target for cancer therapy. *Oncotarget* 5,9546–9563 (2014).

[0281] 38. Schier, R. et al. Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site. *J Mol Biol* 263,551–567 (1996).

[0282] 39. Stiffler, M. A. et al. PDZ domain binding selectivity is optimized across the mouse proteome. *Science* 317, 364–369 (2007).

[0283] 40. Dueber, J. E., Mirsky, E. A. & Lim, W. A. Engineering synthetic signaling proteins with ultrasensitive input/output control. *Nature biotechnology* 25, 660–662 (2007).

[0284] 41. Dueber, J. E., Yeh, B. J., Chak, K. & Lim, W. A. Reprogramming control of an allosteric signaling switch through modular recombination. *Science* 301, 1904–1908 (2003).

[0285] 42. Khalil, A. S. et al. A synthetic biology framework for programming eukaryotic transcription functions. *Cell* 150, 647–658 (2012).

[0286] 43. Reinke, A. W., Grant, R. A. & Keating, A. E. A synthetic coiled-coil interactome provides heterospecific modules for molecular engineering. *J Am Chem Soc* 132, 6025–6031 (2010).

[0287] 44. Zhao, Y. et al. Multiple injections of electroporated autologous T cells expressing a chimeric antigen receptor mediate regression of human disseminated tumor. *Cancer Res* 70, 9053–9061 (2010).

[0288] 45. Wilson, M. H., Coates, C. J. & George, A. L., Jr. Piggy Bac transposon-mediated gene transfer in human cells. *Mol Ther* 15, 139–145 (2007).

[0289] 46. Hackett, P. B., Largaespada, D. A. & Cooper, L. J. A transposon and transposase system for human application. *Mol Ther* 18, 674–683 (2010).

[0290] 通过以下实例进一步说明本文所述的技术, 所述实例决不应被解释为进一步限制。

[0291] 本文所描述的技术的一些实施方式可以根据以下编号的段落中的任一者定义:

[0292] 1. 一种包含多组分嵌合抗原受体 (CAR) 的组合物; 所述多组分 CAR 包含:

[0293] a. 第一识别多肽, 所述第一识别多肽包含 1) 对第一靶配体而言特异性的抗体试剂和 2) 蛋白质相互作用结构域; 以及

[0294] b. 信号转导多肽, 所述信号转导多肽包含 1) 能够与所述第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域特异性结合的细胞外蛋白质相互作用结构域和 2) 细胞内 T 细胞受体 (TCR) 信号转导结构域。

[0295] 2. 如段落 1 所述的组合物, 其中, 所述蛋白质相互作用结构域是亮氨酸拉链结构域。

[0296] 3. 如段落 2 所述的组合物, 其中, 一个亮氨酸拉链结构域是 BZip (RR), 且第二亮氨酸拉链结构域是 AZip (EE)。

[0297] 4. 如段落 1 所述的组合物, 其中, 所述蛋白质相互作用结构域是 PSD95-Dlg1-zo-1 (PDZ) 结构域。

[0298] 5. 如段落 1 所述的组合物, 其中, 一个蛋白质相互作用结构域是链霉亲和素, 且第二蛋白质相互作用结构域是链霉亲和素结合蛋白 (SBP)。

[0299] 6. 如段落 1 所述的组合物, 其中:

[0300] a. 一个蛋白质相互作用结构域是 mTOR 的 FKBP 结合结构域 (FRB), 且第二蛋白质相

相互作用结构域是FK506结合蛋白 (FKBP)；

[0301] b. 一个蛋白质相互作用结构域是亲环素-Fas融合蛋白 (CyP-Fas)，且第二蛋白质相互作用结构域是FK506结合蛋白 (FKBP)；

[0302] c. 一个蛋白质相互作用结构域是钙调神经磷酸酶A (CNA)，且第二蛋白质相互作用结构域是FK506结合蛋白 (FKBP)；

[0303] d. 一个蛋白质相互作用结构域是赤霉素不敏感型 (GIA)，且第二蛋白质相互作用结构域是赤霉素不敏感矮化1型 (GID1)；

[0304] e. 一个蛋白质相互作用结构域是Snap标签，且第二蛋白质相互作用结构域是Ha1o标签；或者

[0305] f. 一个蛋白质相互作用结构域是T14-3-3-cdeltaC，且第二蛋白质相互作用结构域是PMA2的C端肽 (CT52)。

[0306] 7. 如段落1所述的组合物，其中，一个蛋白质相互作用结构域是PYL，且第二蛋白质相互作用结构域是ABI。

[0307] 8. 如段落1所述的组合物，其中，一个蛋白质相互作用结构域是核苷酸标签，且第二蛋白质相互作用结构域是锌指结构域。

[0308] 9. 如段落8所述的组合物，其中，所述识别多肽的蛋白质相互作用结构域是核苷酸标签，且所述信号转导多肽的细胞外蛋白质相互作用结构域是锌指结构域。

[0309] 10. 如段落8-9中任一段所述的组合物，其中，所述核苷酸标签是DNA标签。

[0310] 11. 如段落8-10中任一段所述的组合物，其中，所述DNA标签是dsDNA标签。

[0311] 12. 如段落1-11中任一段所述的组合物，所述组合物进一步包含第二识别多肽，所述第二识别多肽包含1) 对第二靶配体而言特异性的抗体试剂和2) 与所述信号转导多肽的蛋白质相互作用结构域竞争结合所述第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域的蛋白质相互作用结构域。

[0312] 13. 如段落12所述的组合物，其中，比起所述信号转导多肽的蛋白质相互作用结构域与所述第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域的亲和力，所述第二识别多肽的蛋白质相互作用结构域与所述第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域具有更大的亲和力。

[0313] 14. 如段落12-13中任一段所述的组合物，其中，通过所述第二识别多肽识别的靶配体在健康细胞和/或非靶细胞上发现而未在病变细胞和/或靶细胞上发现。

[0314] 15. 如段落1-11中任一段所述的组合物，所述组合物进一步包含第二识别多肽，所述第二识别多肽包含1) 对第二靶配体而言特异性的抗体试剂和2) 蛋白质相互作用结构域；并且其中，所述信号转导多肽进一步包含与所述第二识别多肽的蛋白质相互作用结构域特异性结合的次级蛋白质相互作用结构域。

[0315] 16. 如段落15所述的组合物，其中，比起所述信号转导多肽的第一蛋白质相互作用结构域与所述第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域的亲和力，所述信号转导多肽的次级蛋白质相互作用结构域与所述第二识别多肽的蛋白质相互作用结构域的亲和力更弱。

[0316] 17. 如段落15-16中任一段所述的组合物，其中，所述第一识别多肽和所述第二识别多肽各自包含次级蛋白质相互作用结构域；并且其中，所述次级蛋白质相互作用结构域彼此特异性地结合。

[0317] 18. 一种包含多组分嵌合抗原受体 (CAR) 的组合物；所述多组分CAR包含：

[0318] a. 第一识别多肽,所述第一识别多肽包含1)对第一靶配体而言特异性的抗体试剂和2)核苷酸标签的第一部分;

[0319] b. 第二识别多肽,所述第二识别多肽包含1)对第二靶配体而言特异性的抗体试剂和2)所述核苷酸标签的第二部分;以及

[0320] c. 信号转导多肽,所述信号转导多肽包含1)能够与通过所述核苷酸标签的各个部分的结合形成的完整的核苷酸标签特异性结合的细胞外锌指结构域和2)细胞内T细胞受体(TCR)信号转导结构域;

[0321] 其中,除非所述核苷酸标签的各个部分彼此结合,否则不能被锌指结构域特异性地结合。

[0322] 19.如段落18所述的组合物,其中,所述核苷酸标签的第一部分是ssDNA,且所述核苷酸标签的第二部分是互补的ssDNA。

[0323] 20.如段落18-19中所述的组合物,所述组合物进一步包含第三识别多肽,所述第三识别多肽编码1)对第三靶配体而言特异性的抗体试剂和2)所述核苷酸标签的第三部分;

[0324] 其中,所述核苷酸标签的各个部分或者各个部分的成对组合不能被所述锌指结构域特异性结合,但当所有三个部分彼此结合时,产生的复合体可以被所述锌指结构域特异性地结合。

[0325] 21.如段落20所述的组合物,其中,1)所述核苷酸标签的第一部分是ssDNA;并且2)所述核苷酸标签的第二部分和第三部分是ssDNA,所述第二部分和第三部分各自与第一部分互补;并且3)所述核苷酸标签的第二部分和第三部分具有相互不重叠的序列。

[0326] 22.一种包含多组分嵌合抗原受体(CAR)的组合物;所述多组分CAR包含:

[0327] a. 第一识别多肽,所述第一识别多肽包含1)对第一靶配体而言特异性的抗体试剂和2)第一核苷酸标签;

[0328] b. 第二识别多肽,所述第二识别多肽包含1)对第二靶配体而言特异性的抗体试剂和2)第二核苷酸标签;以及

[0329] c. 信号转导多肽,所述信号转导多肽包含1)能够与所述第一核苷酸标签特异性结合的细胞外锌指结构域和2)细胞内T细胞受体(TCR)信号转导结构域;

[0330] 其中,当所述核苷酸标签彼此结合时,不能被锌指结构域特异性地结合。

[0331] 23.如段落22所述的组合物,其中,所述第一核苷酸标签形成发夹环结构,并且其中,所述第二核苷酸标签与包含发夹环的一条腿的部分和发夹环的环的部分的所述第一核苷酸标签的部分互补。

[0332] 24.如段落22-23中任一段所述的组合物,其中,所述第二靶配体在健康细胞和/或非靶细胞上发现而未在病变细胞和/或靶细胞上发现。

[0333] 25.如段落1-24中任一段所述的组合物,其中,靶配体是在病变细胞和/或靶细胞上发现的配体。

[0334] 26.如段落1-24中任一段所述的组合物,其中,通过能够与信号转导多肽特异性结合的识别多肽特异性结合的靶配体是在病变细胞和/或靶细胞上发现的配体。

[0335] 27.如段落1-26中任一段所述的组合物,其中,通过能够与信号转导多肽特异性结合的识别多肽特异性结合的靶配体是在病变细胞和/或靶细胞上发现而未在在健康细胞和/或非靶细胞上发现的配体。

- [0336] 28. 如段落1-27中任一段所述的组合物,其中,所述病变细胞是癌细胞。
- [0337] 29. 如段落1-28中任一段所述的组合物,其中,所述抗体试剂选自于由如下所组成的组:
- [0338] 免疫球蛋白分子、单克隆抗体、嵌合抗体、CDR移植抗体、人类抗体、人源化抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、二硫键连接的Fv、scFv、单域抗体、双价抗体、多特异性抗体、双重特异性抗体、抗独特型抗体和双特异性抗体。
- [0339] 30. 如段落1-29中任一段所述的组合物,其中,所述细胞内TCR信号转导结构域是来自选自于由如下所组成的组中的蛋白的信号转导结构域:
- [0340] TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54 (ICAM)、CD83、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD150 (SLAMF1)、CD152 (CTLA4)、CD223 (LAG3)、CD270 (HVEM)、CD273 (PD-L2)、CD274 (PD-L1)、CD278 (ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C SLP76、TRIM、ZAP70和41BB。
- [0341] 31. 如段落1-30中任一段所述的组合物,根据段落1-30中任一段所述,所述组合物进一步包含第二多组分CAR。
- [0342] 32. 如段落31所述的组合物,其中,第二多组分CAR的抗体试剂特异性地结合至不同的靶配体,而非通过第一多组分CAR的抗体试剂结合的靶配体。
- [0343] 33. 如段落30-32中任一段所述的组合物,其中,所述第二多组分CAR的细胞内T细胞受体 (TCR) 信号转导结构域抑制T细胞活性。
- [0344] 34. 如段落33所述的组合物,其中,抑制T细胞活性的所述第二多组分CAR的细胞内T细胞受体 (TCR) 信号转导结构域包含选自于由如下所组成的组中的多肽的信号转导结构域:
- [0345] PD1、CTLA4、BTLA、KIR、LAG-3、TIM-3、A2aR、LAIR-1和TGIT。
- [0346] 35. 如段落33-34中任一段所述的组合物,其中,通过能够与所述第二多组分CAR的信号转导多肽特异性结合的识别多肽特异性结合的靶配体是在健康细胞和/或非靶细胞上发现的配体。
- [0347] 36. 如段落33-34中任一段所述的组合物,其中,通过能够与所述第二多组分CAR的信号转导多肽特异性结合的识别多肽特异性结合的靶配体是在健康细胞和/或非靶细胞上发现而未在病变细胞和/或靶细胞上发现的配体。
- [0348] 37. 如段落1-36中任一段所述的组合物,其中,所述信号转导多肽存在于细胞的膜上。
- [0349] 38. 如段落37所述的组合物,其中,所述一个或多个识别多肽存在于细胞外间隙。
- [0350] 39. 一种表达段落1-38中任一段所述的组合物的工程化细胞。
- [0351] 40. 如段落1-39中任一段所述的细胞或组合物,其中,所述细胞是T细胞、NK细胞或者NKT细胞。
- [0352] 41. 如段落1-40中任一段所述的细胞或组合物,其中,所述细胞是T细胞。
- [0353] 42. 一种杀死靶细胞的方法,所述方法包括用段落1-41中任一段所述的组合物或细胞接触所述靶细胞。
- [0354] 43. 一种治疗疾病的方法,所述方法包括向需要治疗的受试者给予段落1-41中任一段所述的组合物或细胞。

- [0355] 44. 如段落42所述的方法,其中,所述疾病选自于由如下所组成的组:
- [0356] 癌症;实体癌;乳腺癌;肺癌;急性淋巴细胞白血病;多发性骨髓瘤和难治多发性骨髓瘤。
- [0357] 45. 一种治疗癌症的方法,所述方法包括向需要治疗的受试者给予段落1-41中任一段所述的组合物或细胞。
- [0358] 46. 如段落45所述的方法,其中,所述细胞对受试者而言是自体的。
- [0359] 47. 如段落46所述的方法,其中,所给予的细胞源自和/或传代自从受试者获得的细胞,并且所述细胞经离体修饰以包含至少一种多组分CAR。
- [0360] 48. 一种工程化的细胞,所述细胞包含多组分嵌合抗原受体(CAR)信号转导多肽,所述信号转导多肽包含1) 细胞外蛋白质相互作用结构域和2) 细胞内T细胞受体(TCR)信号转导结构域。
- [0361] 49. 如段落48所述的细胞,其中,所述蛋白质相互作用结构域是亮氨酸拉链结构域。
- [0362] 50. 如段落49所述的细胞,其中,所述亮氨酸拉链结构域是BZip (RR) 或AZip (EE)。
- [0363] 51. 如段落48所述的细胞,其中,所述蛋白质相互作用结构域是PSD95-Dlg1-zo-1 (PDZ) 结构域。
- [0364] 52. 如段落48所述的细胞,其中,所述蛋白质相互作用结构域是链霉亲和素或者链霉亲和素结合蛋白(SBP)。
- [0365] 53. 如段落48所述的细胞,其中,所述蛋白质相互作用结构域是mTOR的FKBP结合结构域(FRB) 或者FK506结合蛋白(FKBP)。
- [0366] 54. 如段落48所述的细胞,其中,所述蛋白质相互作用结构域是PYL或者ABI。
- [0367] 55. 如段落48所述的细胞,其中,所述蛋白质相互作用结构域是核苷酸标签或者锌指结构域。
- [0368] 56. 如段落55所述的细胞,所述核苷酸标签是DNA标签。
- [0369] 57. 如段落56所述的细胞,其中,所述DNA标签是dsDNA标签。
- [0370] 58. 如段落55所述的细胞,其中,所述蛋白质相互作用结构域是锌指结构域。
- [0371] 59. 如段落48-58中任一段所述的细胞,其中,所述信号转导多肽存在于细胞的膜上。
- [0372] 60. 如段落48-59中任一段所述的细胞,其中,所述细胞是T细胞、NK细胞或者NKT细胞。
- [0373] 61. 如段落48-60中任一段所述的细胞,其中,所述细胞是T细胞。
- [0374] 62. 如段落48-61中任一段所述的细胞,其中,所述细胞内TCR信号转导结构域是来自选自于由如下所组成的组中的蛋白的信号转导结构域:
- [0375] TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54 (ICAM)、CD83、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD150 (SLAMF1)、CD152 (CTLA4)、CD223 (LAG3)、CD270 (HVEM)、CD273 (PD-L2)、CD274 (PD-L1)、CD278 (ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C SLP76、TRIM、ZAP70和41BB。
- [0376] 63. 如段落48-62中任一段所述的细胞,其中,所述信号转导多肽进一步包含与第二识别多肽的蛋白质相互作用结构域特异性结合的次级蛋白质相互作用结构域。

[0377] 64.如段落48-62中任一段所述的细胞,根据段落48-62中任一段所述,所述细胞进一步包含第二多组分CAR信号转导肽。

[0378] 65.一种治疗疾病的方法,所述方法包括向需要治疗的受试者给予:

[0379] 段落48-64中任一段所述的细胞;以及

[0380] 第一识别多肽,所述第一识别多肽包含1)对第一靶配体而言特异性的抗体试剂和2)能够与信号转导多肽的蛋白质相互作用结构域特异性结合的蛋白质相互作用结构域。

[0381] 66.如段落65所述的方法,其中,所述抗体试剂选自于由如下所组成的组:

[0382] 免疫球蛋白分子、单克隆抗体、嵌合抗体、CDR移植抗体、人类抗体、人源化抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、二硫键连接的Fv、scFv、单域抗体、双价抗体、多特异性抗体、双重特异性抗体、抗独特型抗体和双特异性抗体。

[0383] 67.如段落65-66中任一段所述的方法,其中,所述细胞对受试者而言是自体的。

[0384] 68.如段落65-67中任一段所述的方法,其中,所给予的细胞源自和/或传代自从受试者获得的细胞,并且所述细胞经离体修饰以包含至少一种多组分CAR。

[0385] 69.如段落65-68中任一段所述的方法,其中,所述蛋白质相互作用结构域是亮氨酸拉链结构域。

[0386] 70.如段落69所述的方法,其中,一个亮氨酸拉链结构域是BZip (RR),且第二亮氨酸拉链结构域是AZip (EE)。

[0387] 71.如段落65-68中任一段所述的方法,其中,所述蛋白质相互作用结构域是PSD95-Dlg1-zo-1 (PDZ) 结构域。

[0388] 72.如段落65-68中任一段所述的方法,其中,一个蛋白质相互作用结构域是链霉亲和素,且第二蛋白质相互作用结构域是链霉亲和素结合蛋白 (SPB)。

[0389] 73.如段落65-68中任一段所述的方法,其中:

[0390] a.一个蛋白质相互作用结构域是mTOR的FKBP结合结构域 (FRB),且第二蛋白质相互作用结构域是FK506结合蛋白 (FKBP);

[0391] b.一个蛋白质相互作用结构域是亲环素-Fas融合蛋白 (CyP-Fas),且第二蛋白质相互作用结构域是FK506结合蛋白 (FKBP);

[0392] c.一个蛋白质相互作用结构域是钙调神经磷酸酶A (CNA),且第二蛋白质相互作用结构域是FK506结合蛋白 (FKBP);

[0393] d.一个蛋白质相互作用结构域是赤霉素不敏感型 (GIA),且第二蛋白质相互作用结构域是赤霉素不敏感矮化1型 (GID1);

[0394] e.一个蛋白质相互作用结构域是Snap标签,且第二蛋白质相互作用结构域是Halo标签;或者

[0395] f.一个蛋白质相互作用结构域是T14-3-3-cdeltaC,且第二蛋白质相互作用结构域是PMA2的C端肽 (CT52)。

[0396] 74.如段落74所述的方法,其中:

[0397] a.当一个蛋白质相互作用结构域是mTOR的FKBP结合结构域 (FRB) 且第二蛋白质相互作用结构域是FK506结合蛋白 (FKBP) 时,该方法进一步包括给予他克莫司、rapalog或者依维莫司;

[0398] b.当一个蛋白质相互作用结构域是亲环素-Fas融合蛋白 (CyP-Fas) 且第二蛋白质

相互作用结构域是FK506结合蛋白 (FKBP) 时,该方法进一步包括给予FKCsA;

[0399] c. 当一个蛋白质相互作用结构域是钙调神经磷酸酶A (CNA) 且第二蛋白质相互作用结构域是FK506结合蛋白 (FKBP) 时,该方法进一步包括给予FK506;

[0400] d. 当一个蛋白质相互作用结构域是赤霉素不敏感型 (GIA) 且第二蛋白质相互作用结构域是赤霉素不敏感矮化1型 (GID1) 时,该方法进一步包括给予赤霉素;

[0401] e. 当一个蛋白质相互作用结构域是Snap标签且第二蛋白质相互作用结构域是Halo标签时,该方法进一步包括给予HaXS;或者

[0402] f. 当一个蛋白质相互作用结构域是T14-3-3-cdeltaC且第二蛋白质相互作用结构域是PMA2的C端肽 (CT52) 时,该方法进一步包括给予壳梭孢素。

[0403] 75. 如段落65-68中任一段所述的方法,其中,一个蛋白质相互作用结构域是PYL,且第二蛋白质相互作用结构域是ABI。

[0404] 76. 如段落65-68中任一段所述的方法,其中,所述识别多肽的蛋白质相互作用结构域是核苷酸标签,且信号转导多肽的细胞外蛋白质相互作用结构域是锌指结构域。

[0405] 77. 如段落76所述的方法,其中,所述核苷酸标签是DNA标签。

[0406] 78. 如段落77所述方法,其中,所述DNA标签是dsDNA标签。

[0407] 79. 如段落65-78中任一段所述的方法,所述方法进一步包括给予:

[0408] 第二识别多肽,所述第二识别多肽包含1) 对第二靶配体而言特异性的抗体试剂和2) 与信号转导多肽的蛋白质相互作用结构域竞争结合第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域的蛋白质相互作用结构域。

[0409] 80. 如段落79所述的方法,其中,比起所述信号转导多肽的蛋白质相互作用结构域与所述第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域的亲合力,所述第二识别多肽的蛋白质相互作用结构域与第二识别多肽的蛋白质相互作用结构域具有更大的亲合力。

[0410] 81. 如段落79-80中任一段所述的方法,其中,由所述第二识别多肽识别的靶配体在健康细胞和/或非靶细胞上发现而未在病变细胞和/或靶细胞上发现。

[0411] 82. 如段落65-78中任一段所述的方法,所述方法进一步包括给予第二识别多肽,所述第二识别多肽包含1) 对第二靶配体而言特异性的抗体试剂和2) 蛋白质相互作用结构域;并且其中,所述信号转导多肽进一步包含与所述第二识别多肽的蛋白质相互作用结构域特异性结合的次级蛋白质相互作用结构域。

[0412] 83. 如段落82所述的方法,其中,比起所述信号转导多肽的第一蛋白质相互作用结构域与所述第一识别多肽的蛋白质相互作用结构域的亲合力,所述信号转导多肽的次级蛋白质相互作用结构域与所述第二识别多肽的蛋白质相互作用结构域的亲合力更弱。

[0413] 84. 如段落82-83中任一段所述的方法,其中,所述第一识别多肽和所述第二识别多肽各自包含次级蛋白质相互作用结构域;并且其中,所述次级蛋白质相互作用结构域彼此特异性地结合。

[0414] 85. 如段落65-78中任一段所述的方法,所述方法进一步包括给予:

[0415] a. 第一识别多肽,所述第一识别多肽包含1) 对第一靶配体而言特异性的抗体试剂和2) 核苷酸标签的第一部分;

[0416] b. 第二识别多肽,所述第二识别多肽包含1) 对第二靶配体而言特异性的抗体试剂和2) 核苷酸标签的第二部分;

[0417] 其中,所述信号转导多肽包含1)能够与通过核苷酸标签的各个部分的结合形成的完整的核苷酸标签特异性结合的细胞外锌指结构域;并且其中,除非核苷酸标签的各个部分相互结合,否则不能被锌指结构域特异性地结合。

[0418] 86.如段落85所述的方法,其中,所述核苷酸标签的第一部分是ssDNA,且所述核苷酸标签的第二部分是互补的ssDNA。

[0419] 87.如段落85-86中任一段所述的方法,所述方法进一步包括给予第三识别多肽,所述第三识别多肽编码1)对第三靶配体而言特异性的抗体试剂和2)所述核苷酸标签的第三部分;

[0420] 其中,所述核苷酸标签的各个部分或者各个部分的成对组合不能被锌指结构域特异性结合,但当所有三个部分相互结合时,产生的复合体可以被锌指结构域特异性地结合。

[0421] 88.如段落87所述的方法,其中,1)所述核苷酸标签的第一部分是ssDNA;并且2)所述核苷酸标签的第二部分和第三部分是ssDNA,所述第二部分和第三部分各自与所述第一部分互补;并且3)所述核苷酸标签的第二部分和第三部分具有相互不重叠的序列。

[0422] 89.如段落65-78中任一段所述的方法,所述方法包括给予:

[0423] a. 第一识别多肽,所述第一识别多肽包含1)对第一靶配体而言特异性的抗体试剂和2)第一核苷酸标签;

[0424] b. 第二识别多肽,所述第二识别多肽包含1)对第二靶配体而言特异性的抗体试剂和2)第二核苷酸标签;

[0425] 其中,所述信号转导多肽包含1)能够与所述第一核苷酸标签特异性结合的细胞外锌指结构域;并且其中,当所述核苷酸标签相互结合时,不能被锌指结构域特异性地结合。

[0426] 90.如段落89所述的方法,其中,所述第一核苷酸标签形成发夹环结构,并且其中,所述第二核苷酸标签与包含所述发夹环的一条腿的部分和所述发夹环的环的部分的所述第一核苷酸标签的部分互补。

[0427] 91.如段落89-90中任一段所述的方法,其中,所述第二靶配体在健康细胞和/或非靶细胞上发现而未在病变细胞和/或靶细胞上发现。

[0428] 92.如段落65-91中任一段所述的方法,其中,所述靶配体是在病变细胞和/或靶细胞上发现的配体。

[0429] 93.如段落65-92中任一段所述的方法,其中,通过能够与信号转导多肽特异性结合的识别多肽特异性结合的靶配体是在病变细胞和/或靶细胞上发现的配体。

[0430] 94.如段落65-93中任一段所述的方法,其中,通过能够与信号转导多肽特异性结合的识别多肽特异性结合的靶配体是在病变细胞和/或靶细胞上发现而未在健康细胞和/或非靶细胞上发现的配体。

[0431] 95.如段落65-94中任一段所述的方法,其中,所述病变细胞是癌细胞。

[0432] 96.如段落65-95中任一段所述的方法,其中,所述细胞是段落64所述的细胞并且向所述受试者进一步给予第二识别多肽,所述第二识别多肽包含1)对第二靶配体而言特异性的抗体试剂和2)能够与所述第二信号转导多肽的蛋白质相互作用结构域特异性结合的蛋白质相互作用结构域。

[0433] 97.如段落96所述的方法,其中,所述第二多组分CAR信号转导多肽的细胞内T细胞受体(TCR)信号转导结构域抑制T细胞活性。

[0434] 98.如段落96所述的方法,其中,通过能够与所述第二信号转导多肽特异性结合的识别多肽特异性结合的靶配体是在健康细胞和/或非靶细胞上发现的配体。

[0435] 99.如段落96-98中任一段所述的方法,其中,通过能够与所述第二信号转导多肽特异性结合的识别多肽特异性结合的靶配体是在健康细胞和/或非靶细胞上发现而未在病变细胞和/或靶细胞上发现的配体。

[0436] 实施例

[0437] 实施例1

[0438] 过继性T细胞疗法正在变成用于癌症治疗的颠覆传统的技术。向患者转移表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞已经在针对B细胞恶性肿瘤的临床试验中显示出显著的成功,并且引起近年来一些主要的商业投资交易。虽然有希望,但癌症特异性仍然是主要限制,因为它依赖于鉴定单一肿瘤相关生物标记物。现有的CAR系统只能整合两种抗原并且没有进一步增强能力。本文提供了可以检测大量的癌症靶标、运行复杂的逻辑运算以及执行癌症细胞杀伤的新的CAR平台(本文称为多组分CAR或SMART CAR)。

[0439] 此外,本文描述的CAR被设计为模块化的,从而使得可以在体内适应新的靶标而无需对患者的T细胞进行进一步的基因操作。这种高度模块化的设计提供了无可比拟的特异性和灵活性,并具有对癌症的基于细胞的疗法的变革性影响。本文描述的技术通过使其可根据患者自身的需求进行调整而使得过继性T细胞疗法更加强大。由于一旦施用后难以对治疗进行改变,用现有的CAR进行的治疗对于选择组的患者而言是切实可行的。用本文描述的多组分CAR进行的治疗允许改变床边疗法的活性的手段,为医生提供了简单有效的手段来控制过继性T细胞治疗。

[0440] 表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞向患者的转移是用于癌症免疫疗法的有前途的方法。该治疗方法基于具有合成的免疫受体的T细胞的基因重编程,该受体指导所述T细胞破坏恶性肿瘤细胞。CAR通常由作为胞外抗原识别结构域的单链可变片段(scFv)抗体和触发T细胞活化的信号转导细胞质结构域组成(图1A)。靶向至CD19的表达CAR的T细胞已成功显示出在临床试验中治愈白血病,其中多达92%的患者在治疗后进入持续地完全缓解。虽然有前途,但这种技术也有缺点。从携带CAR的T细胞对表达低水平的靶向肿瘤抗原的正常宿主组织作出应答的临床试验中出现了致死性事件。抗CD19CAR比其它CAR更成功的原因是因为CD19CAR的脱靶效应是可预期到的且易控制的。CD19表达主要限于B细胞。尽管表达CD19CAR的T细胞会破坏健康细胞和恶性B细胞,但长期B细胞缺乏用免疫球蛋白替代疗法是易控制的。

[0441] 不幸的是,对于大部分其它肿瘤来说情况并非如此,其中癌症抗原仅发现于非常受限组的组织中。为了对抗危险的脱靶问题,开发出了组合的受体方法,其中将两种不同的抗原识别抗体分别融合至TCR和共刺激结构域,从而使得仅具有两种抗原的肿瘤才能触发完全的T细胞活化程序。然而,这种方法只允许两种抗原同时被识别,因此严重限制了这种方法的潜力。

[0442] 本文描述的CAR平台(在本文中也称为SMART CAR)允许T细胞使用多种生物标记物检测癌症细胞,并且基于这些标记物执行复杂的组合逻辑运算。这种运算能力几乎不可能在任何其它形式的治疗剂(例如生物制剂和小分子)中实现,并且将确保极高的肿瘤特异性。

[0443] 值得注意的是,现有的CAR技术依赖于发现明确地将癌症细胞与健康细胞进行区分的单独的生物标记物或的“魔法弹”,这已被证明是非常具有挑战性的。事实上,对其它的癌症采用CAR技术的主要瓶颈是找到适当的靶标。本文描述的技术极大增加了可靶向的癌症抗原的数量,从而改变了过继性免疫疗法领域。

[0444] 嵌合抗原受体是癌症抗原特异性单链抗体与来自T细胞受体(TCR)和/或其它共刺激途径的细胞内信号转导结构域的融合。现有的CAR技术仅依靠单链抗体识别一种抗原,这限制了它们的特异性。如果可以同时检测更多的癌症抗原,特异性可以极大提高。本文描述的技术允许识别多种抗原。此外,有助于识别正常组织的抗原也可以被本文所述的T细胞检测到,从而使得这些抗原在健康细胞上的存在抑制T细胞活化。因此,本文所述的能够检测来自癌症细胞和正常细胞的抗原并且执行复杂的组合逻辑运算的技术极大地提高了特异性。

[0445] 本文描述的是使用可编程相互作用来执行分子运算的多组分CAR。在一些实施方式中,在当前的受体设计中使用的亮氨酸拉链是可以电荷相互作用形成异聚结构的蛋白质结构域。在这个新的CAR设计中,亮氨酸拉链代替CAR上的细胞外结构域,且同源的亮氨酸拉链融合至抗体。当同源的亮氨酸拉链相互结合时,它们可以激活CAR的信号转导活性。亮氨酸拉链结构域也可以被工程化为相互竞争相同的结合配偶体,从而允许抑制和“关闭”功能。此外,多个正交对允许独立地控制不同的信号转导结构域(例如PD-1、CTLA-4)。同样,亮氨酸拉链对之间的不同亲和力允许复杂功能的工程化。例如,可以调整zipCAR的输出信号的强度,并且亮氨酸拉链对之间的弱的相互作用允许使用协作行为,从而允许“与门”功能。

[0446] 例如,将两种jurkat细胞系用两种不同的慢病毒载体转导。一种jurkat细胞系表达具有融合至mCherry的信号转导结构域(CD3 ζ)的zipCAR。另一jurkat细胞系表达具有同源的亮氨酸拉链的zipCAR,并且既无信号转导结构域(CD3 ζ),也未融合至mCherry。观察到表达具有信号转导结构域的zipCAR的Jurkat T细胞能够通过表达同源的zipCAR的细胞相互作用来激活并启动信号转导通路。这显示了原代T细胞中的zipCAR的功能(数据未示出)。

[0447] 在进一步的实例中,纯化了含有靶向HER2的单链可变片段(scFv)的抗体,所述HER2连接至可以结合至zipCAR的亮氨酸拉链。证实zipCAR可以通过原代CD4+T细胞(经测量的分泌的细胞因子)以及Jurkat细胞系(经测量的NFAT启动子活性)中的纯化抗体活化(数据未示出)。

[0448] 此外,本文描述的是可用于控制不同的信号转导结构域(例如共刺激、共抑制信号转导结构域)的多个正交的亮氨酸拉链对。

[0449] 与使用抗体、链霉亲和素或CD16作为细胞外结构域的现有技术相比,亮氨酸拉链的当前用途允许复杂的分子运算。

[0450] 可以选择许多亮氨酸-拉链结构域以允许检测多个输入。也可以操纵和/或选择信号转导结构域,从而使得可以控制不同的通路。另外,亮氨酸拉链相互作用的亲和力的变化允许活化强度的控制。最后,在本文考虑之列的是任何蛋白质-蛋白质相互作用结构域可以取代亮氨酸拉链结构域,例如PDZ结构域、SBP(链霉亲和素结合蛋白)-链霉亲和素或者药物诱导型FKBP-FRB对或PYL-ABI对。

[0451] 实施例2

[0452] 在一些实施方式中,本文描述的多组分CAR使用锌指蛋白作为CAR的细胞外部分(zfCAR)以及使用各种信号转导蛋白作为细胞内通讯结构域。此外,可将锌指蛋白进行工程化,从而以高亲和力和特异性结合至预定的双链DNA序列。抗体可以用任何DNA序列标记。总之,当抗体结合至抗原时,zfCAR将结合至DNA并触发T细胞活化。这一分离的系统非常灵活,因为zfCAR不需要针对不同的抗原重新设计。另外,本文描述的技术可以执行现有系统不能复制的复杂的分子运算。例如,不同的抗体可以与不同的互补的单链DNA序列结合,其中只有在所有的抗体都存在的情况下,才会形成适当的双链DNA,这对结合至锌指而言是需要的。该构型代表多输入的与门。通过使用仅三种抗体,本文所述的系统已经超过了曾经通过CAR证实的大多数的抗原识别(2)。此外,可以制成DNA序列以破坏结合至锌指结构域的双链DNA,从而形成非门。这些中断的DNA序列可被附着到结合至正常细胞的抗体,从而阻止T细胞攻击健康组织。总之,在基于CAR的治疗中,首次可以实现高度复杂的逻辑运算。

[0453] zfCAR的另一独特特征是锌指蛋白可被容易地设计成结合至不同的DNA序列。因此,可将多个正交zfCAR用激活不同的信号转导通路的不同的细胞内信号转导结构域来进行工程化。这种设计存在至少两个优点。1)它允许检测更多的抗原并将其整合到整体的T细胞应答中。2)可以独立地控制不同的信号转导通路,从而提供高度定制化的调节T细胞应答的方法。也可以使用抑制性信号转导通路,从而提供可以进一步提高安全性和特异性的“关闭”开关。通过合并生物科学、DNA纳米技术、合成生物学这三个新兴领域以及过继性免疫疗法,本文提供了开创性的受体技术,有望极大改善癌症治疗。

[0454] 可以使用多个锌指结构域以允许检测多个输入。信号转导结构域可以变化,以便可以控制不同的通路。另外,锌指与DNA的亲和力可以变化以控制活化的强度。在一些实施方式中,锌指结构域可以用另一蛋白质-蛋白质相互作用结构域取代。

[0455] 实施例3:分离的、通用的、可编程的以及可重构的(SUPRA) CAR平台

[0456] 本文描述的是通过开发可以运行多路抗原靶向、运行逻辑运算并执行癌症细胞杀伤的CAR平台,对基于CAR的疗法的特异性和安全性的改进。在本文所述的示例性的实施方式中,将异二聚体亮氨酸拉链蛋白用作对TCR胞内信号转导结构域而言的胞外结构域以产生通用受体。受体可以通过由单链抗体和同源的亮氨酸拉链结构域组成的融合蛋白激活。抗体-拉链融合物充当抗原和工程化的T细胞之间的接头分子。抗体提供抗原特异性,并且亮氨酸拉链的特性决定激活哪个受体。该CAR平台允许工程化的T细胞靶向体内新靶点,而无需进一步对T细胞进行基因操作。这种模块化设计提供了特异性、灵活性和可编程性。

[0457] 表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞向患者的转移是用于癌症免疫疗法的有前途的方法^[1,2]。该治疗方法基于具有合成的免疫受体的T细胞的基因重编程,该受体指导所述T细胞破坏恶性肿瘤细胞。CAR通常由作为胞外抗原识别结构域的单链可变片段(scFv)抗体和触发T细胞活化的细胞质信号转导结构域组成(图1A)。靶向至CD19的表达CAR的T细胞已成功显示出在临床试验中治愈白血病,其中多达90%的患者在治疗后进入持续地完全缓解。虽然有前途,但这种技术也有缺点。从携带CAR的T细胞对表达低水平的靶向肿瘤抗原的正常宿主组织作出应答的临床试验中出现了致死性事件^[3]。抗CD19CAR比其它CAR更成功的原因是因为CD19CAR的脱靶效应是可预期到的且易控制的。CD19表达主要限于B细胞。尽管表达CD19CAR的T细胞会破坏健康细胞和恶性B细胞,但长期B细胞缺乏用免疫球蛋白替代疗法

是易控制的。不幸的是,对于大部分其它肿瘤来说情况并非如此,其中癌症抗原仅发现于非常受限组的组织中。

[0458] 为了对抗危险的脱靶问题,开发出了组合的受体方法,其中将两种不同的抗原识别抗体分别融合至TCR和共刺激结构域,从而使得仅具有两种抗原的肿瘤才能触发完全的T细胞活化程序^[4,5](图1B)。然而,这种方法只允许两种抗原同时被识别,并因此严重限制了这种方法的潜力。此外,其他人已经示出具有不同的抗原特异性的两种scFv可以融合到一个CAR中,从而允许两种抗原中的任一种触发T细胞活化^[6]。该系统重演了或逻辑,并且可以减少肿瘤逃逸的机会,因为需要对两种抗原进行突变。然而,目前这种串联的抗体CAR设计只能执行或逻辑。如果可以同时检测更多的癌症抗原,特异性可以极大提高。此外,识别正常组织的抗原也应通过T细胞检测到,从而使得这些抗原在健康细胞上的存在抑制T细胞活化。因此,可以容纳多个输入并执行复杂的逻辑的策略将是期望的。

[0459] 使用“固定的”CAR设计的另一挑战是如果不同的抗原将通过工程化的T细胞靶向,则必须创建一组新的受体,并且需要用新受体再次修饰患者的T细胞。

[0460] 因此,正在开发分离的或通用的CAR设计,其中将CAR分成两部分:受体部分和抗体部分。受体部分在细胞表面上表达,具有募集结构域。该受体不能识别抗原。抗体部分用细胞上的受体可识别的配体或同源的结合结构域修饰。抗体将结合至癌症细胞,并且抗体上的配体将募集并激活表达相应的受体的T细胞。分离的CAR构型允许一大组的抗原被靶向,而不需要对受体和免疫细胞进行重新工程化。两种不同的策略可用于将抗原识别基序募集至T细胞上的信号转导基序,并且它们为这一项目提供了灵感(图1b)。分离的CAR设计的最简单版本用CD16细胞外结构域与细胞内TCR信号转导结构域的融合完成^[7]。CD16是结合至单克隆抗体的恒定区的低亲和力Fc受体。因此,通过制药公司生产的许多单克隆抗体可用于过继性免疫疗法而无需修改。虽然方便,但这种CD16CAR可通过结合至患者产生的内源性抗体而具有许多潜在的脱靶效应。

[0461] 为了解决过继性免疫疗法中的抗原特异性限制,本文开发了分离的、通用的、可编程的和可重构的(SUPRA)CAR平台(图2A)。SUPRA平台使用可编程的生物分子相互作用结构域作为CAR的细胞外部分并且使用各种信号转导蛋白作为细胞内结构域(图2B)。特别地,将亮氨酸拉链(可以通过电荷相互作用形成异聚结构的蛋白质结构域)用于受体的设计。在这个新的CAR设计中,亮氨酸拉链代替CAR上的细胞外结构域,并且将同源的亮氨酸拉链融合至抗体(图3A)。亮氨酸拉链是SUPRA平台的良好候选物,因为可获得许多亮氨酸拉链的正交对,因此为我们的设计工作提供了大量候选物。还可对亮氨酸拉链结构域进行结构化以相互竞争相同的结合配偶体,从而允许抑制和“关闭”功能(图3B)。此外,融合至scFv的亮氨酸拉链与zipCAR之间的弱的相互作用允许与门功能以执行多路的抗原靶向。此外,亮氨酸拉链对之间的不同的亲和力允许复杂功能的工程化。此外,多个正交对允许独立地控制不同的信号转导结构域(例如PD-1、CTLA-4)(图3C)。

[0462] 通过用CAR转导原代CD4T细胞测试SUPRA CAR的活性,所述CAR由作为细胞外结构域的BZip(RR)^[9]和作为细胞内结构域的来自CD28、41BB和CD3z的信号转导结构域组成。还生成了在表面上表达AZip(EE)或BZip(RR)亮氨酸拉链结构域的Jurkat T细胞系。当细胞系混合在一起时,表达zipCAR的工程化的CD4T细胞能够通过与在表面上表达AZip(EE)结构域的Jurkat T细胞相互作用而激活并启动信号转导通路(图4)。

[0463] 生产含有靶向HER2的单链可变片段(scFv)的经纯化的抗体,所述HER2连接至可结合至zipCAR的亮氨酸拉链。当与表达Her2的K562细胞混合时,BZip CAR(RR)可以通过原代CD4+T细胞中的经纯化的抗体(经测量的分泌细胞因子)而活化(图5)。此外,鉴定出可以用于控制不同的信号转导结构域(如共刺激信号转导结构域、共抑制信号转导结构域)的至少3个亮氨酸拉链对的正交对^[10](图6a)。信号转导结构域可以被取代,从而使得不同的通路可以通过本文描述的受体独立地控制。亮氨酸拉链的亲合力可以变化以控制活化强度。事实上,显示出较弱的结合拉链对导致T细胞的较弱的活化(图6B、图6D)。最后,任何蛋白质-蛋白质相互作用结构域都可以取代亮氨酸拉链结构域,例如PDZ结构域、SBP(链霉亲和素结合蛋白)-链霉亲和素或药物诱导型FKBP-FRB对、PYL-ABI对。事实上,示出了FKBP和FRB可以用作细胞外募集结构域并通过添加雷帕霉素类似物活化T细胞(图7)。FRB结构域可以融合至抗体,从而对T细胞的活化产生另一控制。小分子药物不太稳定,因此可以比抗体更快地通过机体清除,并在停止给药后允许更快的关闭。

[0464] 可用于SUPRA平台中的另一可编程的相互作用结构域是锌指结构域。锌指结构域已经在细胞表面上表达,用于通过DNA将细胞条码化^[11]。此外,可以将锌指蛋白质工程化,从而以高亲和力和特异性结合至预定的双链DNA序列。另外,抗体可以使用可商购的试剂盒和服务以任意DNA序列标记。总之,当DNA-抗体缀合物结合至癌症细胞时,锌指CAR(zfCAR)可以结合至DNA并触发T细胞活化(图8A)。此外,通过DNA纳米技术的发展,DNA可以被编程以进行难以被其它系统复制的复杂的分子运算。例如,抗体可以与不同的互补单链DNA序列缀合,其中只有在所有的抗体存在的情况下才会形成合适的双链DNA,这是结合至锌指蛋白所必需的(图8B)。该构型代表多输入与门。通过使用仅三种抗体,可以比任何已开发的CAR系统识别更多的抗原。此外,可以制作DNA序列以破坏结合至锌指结构域的双链DNA,从而形成非门。这些中断的DNA序列可以附着至与来自正常细胞的抗原结合的抗体,从而阻止T细胞攻击健康组织(图8C)。总之,在基于CAR的治疗中,可以实现复杂的逻辑运算。本文证实了可以用DNA激活zfCAR(图8D)。

[0465] 本文描述的CAR平台相对于其它技术提供至少两个不同的优点。第一,从锌指和亮氨酸拉链容易获得许多正交募集对。这些正交对允许独立控制不同的信号转导通路,并对T细胞信号转导进行精细调控以实现最佳应答。第二,本文描述的CAR平台可以通过细胞外编程的分子相互作用执行复杂的逻辑运算。这种运算能力几乎不可能在任何其它形式的治疗剂(例如生物制剂和小分子)中实现,并且允许极高的肿瘤特异性。

[0466] 参考文献

[0467] 1 Davila,M.L.et al.Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia.Science translational medicine 6,224ra225,(2014).

[0468] 2 Grupp,S.A.et al.Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia.N Engl J Med 368,1509-1518,(2013).

[0469] 3 Morgan,R.A.et al.Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2.Mol Ther 18,843-851,(2010).

[0470] 4 Kloss,C.C.,Condomines,M.,Cartellieri,M.,Bachmann,M.&Sadelain,

M. Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells. *Nat Biotechnol* 31,71-75, (2013).

[0471] 5 Lanitis, E. et al. Chimeric antigen receptor T Cells with dissociated signaling domains exhibit focused antitumor activity with reduced potential for toxicity in vivo. *Cancer Immunol Res* 1,43-53, (2013).

[0472] 6 Grada, Z. et al. TanCAR: A Novel Bispecific Chimeric Antigen Receptor for Cancer Immunotherapy. *Mol Ther Nucleic Acids* 2, e105, (2013).

[0473] 7 Kudo, K. et al. T lymphocytes expressing a CD16 signaling receptor exert antibody-dependent cancer cell killing. *Cancer Res* 74,93-103, (2014).

[0474] 8 Urbanska, K. et al. A universal strategy for adoptive immunotherapy of cancer through use of a novel T-cell antigen receptor. *Cancer Res* 72,1844-1852, (2012).

[0475] 9 Moll, J. R., Ruvinov, S. B., Pastan, I. & Vinson, C. Designed heterodimerizing leucine zippers with a range of pIs and stabilities up to 10⁻¹⁵ M. *Protein Sci* 10,649-655, (2001).

[0476] 10 Reinke, A. W., Grant, R. A. & Keating, A. E. A synthetic coiled-coil interactome provides heterospecific modules for molecular engineering. *J Am Chem Soc* 132,6025-6031, (2010).

[0477] 11 Mali, P. et al. Barcoding cells using cell-surface programmable DNA-binding domains. *Nat Methods* 10,403-406, (2013).

[0478] 12. Thompson, K. E. et al. SYNZIP Protein Interaction Toolbox: in Vitro and in Vivo Specifications of Heterospecific Coiled-Coil Interaction Domains. *ACS Synth. Biol.* 1,118-129, (2012)

[0479] 实施例4

[0480] 使用CRISPR来激活靶基因的表达可以通过包含在组成型启动子下表达的基因的序列的慢病毒整合来过表达基因。尽管可能使用这种设计过表达一个或两个可以促进肿瘤中的T细胞功能的基因,但肿瘤微环境可能需要更多相关的系统,该系统可以一次过表达许多基因以对抗限制T细胞的许多挑战。使用慢病毒整合以直接转导多个基因将变得效率低下,需要时间用于病毒整合和筛选以确保基因已被表达。此外,慢病毒整合在多轮感染后失效,使其成为用于整合大量的组成型表达的基因的不理想的候选物。

[0481] 在本文考虑之列的是CRISPR可用于T细胞中的多重表达。II型CRISPR系统依赖于称为Cas9的DNA核酸酶,该酶切割DNA的靶向序列。这些靶标通过与靶向DNA序列互补的指导RNA (sgRNA) 限定。靶向的要求非常简单:靶序列必须直接位于短的PAM序列之前,这可能与NGG一样简单。gRNA结合至反式激活crRNA (tracrRNA) 以形成复合体,该复合体可将Cas9引导至指定的序列。

[0482] CRISPR系统已通过如下被革新用于基因激活:移除核酸酶能力以制备核酸酶缺陷的Cas9 (dCas9) 并将其连接到如VP64的激活结构域。另外,设计单个指导RNA (sgRNA) 以模拟gRNA/tracrRNA系统,从而仅需要一个RNA组件来靶向期望序列。可以将sgRNA设计成将

dCas9靶向至启动子,其中VP64可以启动基因表达(图10A)。使用CRISPR来调节基因表达有多个优势。由于对于待靶向的序列而言的要求是存在相邻的PAM序列,因此很容易找到许多潜在的靶标。此外,这些指导RNA可以使用III型CRISPR系统进行包装以用于多重激活,该系统使用称为Csy4的酶以在28个核苷酸长度的切割位点处(41)切割RNA。在该系统中,含有所有指导RNA的单个转录本可以在一个启动子下表达。指导RNA可以通过切割位点彼此间隔开,并且Csy4可以将单个转录本切割成不同的指导RNA。由于指导RNA的尺寸小,许多可以被包装在一个慢病毒质粒中以产生引起多个基因过表达的系统。

[0483] 可以靶向影响T细胞活性、增殖和凋亡的多个基因。为了促进增殖,可以靶向至如下的靶白细胞介素-2 (IL-2),该白细胞介素-2是T细胞的生长和增殖所必需的并且已经用于扩增T细胞群以用于离体的过继性T细胞疗法(12)。在一些实施方式中,增加IL-2的T细胞亲和力的IL-2受体的 α 链(42)可以被过表达。还在考虑之列的是T-细胞活性可以通过过表达白细胞介素-12 (IL-12)来表达,所述白细胞介素-12驱使CD4T细胞朝向活化CD8T细胞的Th1表型(43)。类似地,在考虑之列的是干扰素 γ (IFN γ)的过表达,所述干扰素 γ 还促进Th1表型并激活巨噬细胞(44)。

[0484] 为了抗争肿瘤促进T细胞凋亡的能力,可以过表达诱导凋亡抑制因子(45)的白细胞介素-15 (IL-15)。除了这些因素之外,可以过表达IL-7受体的 α 链和肿瘤坏死因子 α (TNF α),该IL-7受体的 α 链促进CD8T细胞记忆,并且肿瘤坏死因子 α (TNF α)是抑制肿瘤发生的细胞因子(46,47)。通过使用ZiFit web工具来识别与PAM序列相邻的序列,可以设计靶向控制每种基因的表达的内源启动子的潜在的sgRNA。可以设计指导RNA,以便总体上指导RNA涵盖启动子的长度。

[0485] 可以在例如用单独的指导sgRNA和dCas9-VP64瞬时转染的Jurkat中表达指导RNA。取决于靶标,可以使用ELISA、抗体或qRT-PCR来监测各个基因的表达。已经观察到,使用sgRNA的组合来靶向内源基因比起使用单个sgRNA更有效,并且可以识别和测试良好地用于激活启动子的组合。

[0486] 模拟肿瘤微环境为了示出使用这些sgRNA来增加肿瘤微环境中的T细胞活性,可以模拟T细胞在体外面临的许多挑战。例如,在培养基中的包含TGF- β 和PD-L引入了下调T细胞活性的因子。色氨酸和精氨酸耗竭的培养基可刺激肿瘤微环境中的营养物质的缺乏。此外,下调T细胞活性的其它细胞如Tregs、或分泌吲哚胺2,3-双加氧酶(IDO)(其在微环境中参与对T细胞的毒性)的细胞的引入可用于模拟肿瘤微环境。另外,可以使用低氧、低pH系统。T细胞在该模拟的微环境中的行为可以被确定并与表达sgRNA的细胞相比较。慢病毒整合可用于创建表达dCas9-VP64的Jurkat的稳定细胞系和最佳激活该基因的sgRNA组合。这些T细胞可以暴露至模拟的肿瘤微环境,并且使用T细胞计数、活/死测定以及CD69活化标记物的监测对它们的增殖和活化进行比较。

[0487] 设计和测试多路的活化系统。可以使用Csy4切割系统构建多重因子的组合。可将三个组件(dCas9-VP64、Csy4和多路的指导RNA)在慢病毒骨架中表达,添加荧光标签以追踪整合。这些构建体可以整合到Jurkat细胞中,使用荧光标签以分选已接受系统的所有组件的细胞。开发用于测量T细胞活性和增殖的模拟的肿瘤微环境和测定法可用于确定创造用于肿瘤微环境的更好的T细胞的最佳组合。由于T细胞信号转导是复杂的,并且依赖于我们靶向的基因之间的许多相互作用,因此将确定某些因素是否能够协同作用,以及在同时靶

向两种基因的方面是否存在冗余 (redundancy)。

[0488] 原代细胞和小鼠中的测试原代细胞可以用多重活化系统转导。使用在Jurkat上测试的模拟的T细胞微环境和测定,可以监测T细胞的活化。此外,人工抗原呈递细胞可用于测试原代CD8T细胞杀死剥夺微环境 (deprived environment) 中的癌症细胞的能力。该系统可以在小鼠中进一步测试以证明增加T细胞的活性和增殖能力可增强它们在体内杀死肿瘤的能力。

[0489] 在一些实施方式中,降低的转染效率可以通过使用转座子来执行CRISPR或作为将多个基因整合入T细胞中的方法来解决 (48)。

[0490] 重要的是指导RNA对感兴趣的启动子而言是特异性的。特别是,观察到的需要多个指导RNA来激活单个基因表明了CRISPR激活可能是特异性的。在观察到脱靶激活的情况下,可以鉴定更加特异性的sgRNA的不同组合。也可以使用期望基因的转座子整合,其将允许过表达而无基因激活。

[0491] 虽然增加促进活化和增殖的因子的表达可有助于肿瘤微环境的设置,但增加的T细胞活性可能触发对周围组织而言有毒性的高的免疫应答。在小鼠模型中追踪这个问题很重要。解决这个问题一个策略是使dCas9可诱导,以便可以控制靶向基因的激活。本文证明了CRISPR系统可以激活Hek中的质粒基因,设计指导RNA以打开Tet特异性或Gal4特异性启动子(图11)。这些结果证实了CRISPR在哺乳动物细胞中激活基因的用途。

[0492] 参考文献

[0493] 41.Nissim L,Perli SD,Fridkin A,Perez-Pinera P,Lu T.An integrated RNA and CRISPR/Cas toolkit for multiplexed synthetic circuits and endogenous gene regulation in human cells.2014Apr.

[0494] 42.Willeford DM,Chen J,Ferry JA,Davidson L,Ma A.Interleukin-2 receptor α chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment.Immunity.1995.

[0495] 43.Melero I,Mazzolini G,Narvaiza I,Qian C,Chen L,Prieto J.IL-12gene therapy for cancer:in synergy with other immunotherapies.2001Mar;22(3):113-5.

[0496] 44.Windbichler GH,Hausmaninger H,Stummvoll W,Graf AH,Kainz C,Lahodny J,et al.Interferon-gamma in the first-line therapy of ovarian cancer:a randomizedphase III trial.2000Mar;82(6):1138-44.PMCID:PMC2363351.

[0497] 45.Klebanoff CA,Finkelstein SE,Surman DR,Lichtman MK,Gattinoni L,Theoret MR,et al.IL-15enhances the in vivo antitumor activity of tumor-reactive CD8+T Cells.2004Feb 17;101(7):1969-74.

[0498] 46.Kaech SM,Tan JT,Wherry EJ,Konieczny BT,Surh CD,Ahmed R.Selective expression of the interleukin 7receptor identifies effector CD8T cells that give rise to long-lived memory cells.2003Nov 16;4(12):1191-8.

[0499] 47.Lejeune FJ,Rüegg C,Liénard D.Clinical applications of TNF- α in cancer.1998Oct;10(5):573-80.

[0500] 48.Kahlig KM,Saridey SK,Kaja A,Daniels MA,George AL,Wilson MH.Multiplexed transposon-mediated stable gene transfer in human

cells.2010Jan 26;107(4):1343-8.

[0501] 实施例5

[0502] 通过将细胞外BZIP亮氨酸拉链^[30]结构域与作为细胞内信号转导结构域的CD28、4-1BB和CD3 ζ 进行融合得到SUPRA CAR平台。还将mCherry荧光蛋白和myc表位标签融合至BZIP CAR(zipCAR)以促进转导效率测量。通过用含有zipCAR的慢病毒修饰人类原代CD4T细胞来测试该SUPRA CAR的活性。对含有连接到AZIP亮氨酸拉链的抗-Her2scFv的zipFv进行纯化。这个zipFv可以结合到zipCAR和Her2。当与表达Her2的K562细胞混合时,可以通过原代CD4+T细胞中的经纯化的抗Her2zipFv将zipCAR激活(如通过分泌的细胞因子进行的测量)(图13A)。相比之下,具有BZIP结构域的抗Her2zipFv不会激活zipCAR和T细胞。为了测试SUPRA CAR介导针对癌症细胞的细胞毒性的能力,将SUPRA CAR转导入人类原代CD8T细胞以及与表达Her2的zipFv和K562细胞混合的SUPRA CAR CD8T细胞中(图13B)。结果,SUPRA CAR平台在本文中被证明以剂量依赖性方式引起靶癌症细胞的杀伤。仅zipFv不会引起任何显著的细胞杀伤,从而证实细胞杀伤是由工程化的T细胞和zipCAR介导的。

[0503] 对亮氨酸拉链(图14B)和scFv(图14C)的亲合力进行变化,以控制zipCAR的激活强度。通过改变拉链对的结合亲合力,可以调节具有zipCAR的人类原代CD8T细胞对癌症细胞的应答。此外,还证明了通过改变scFv对抗原的亲合力可以调节原代CD8T细胞针对靶癌症细胞的杀伤作用。

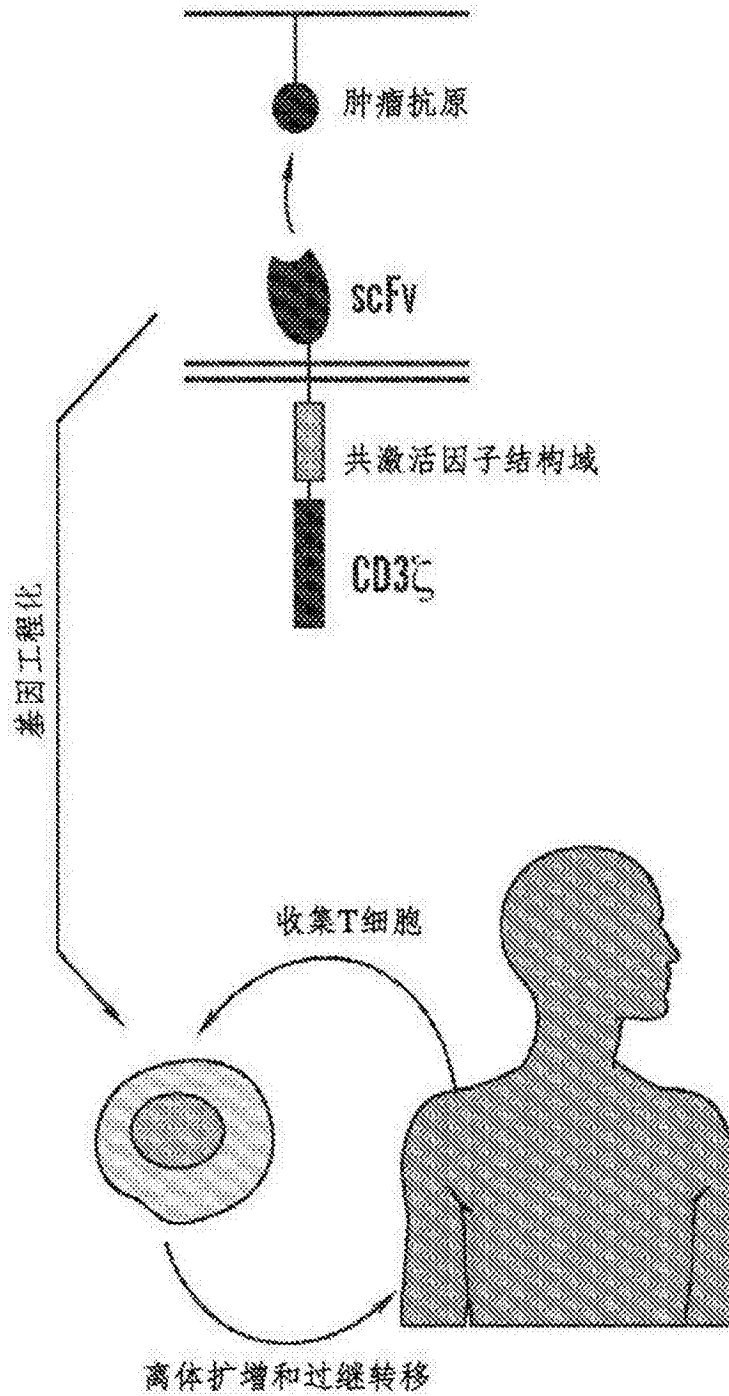


图1A

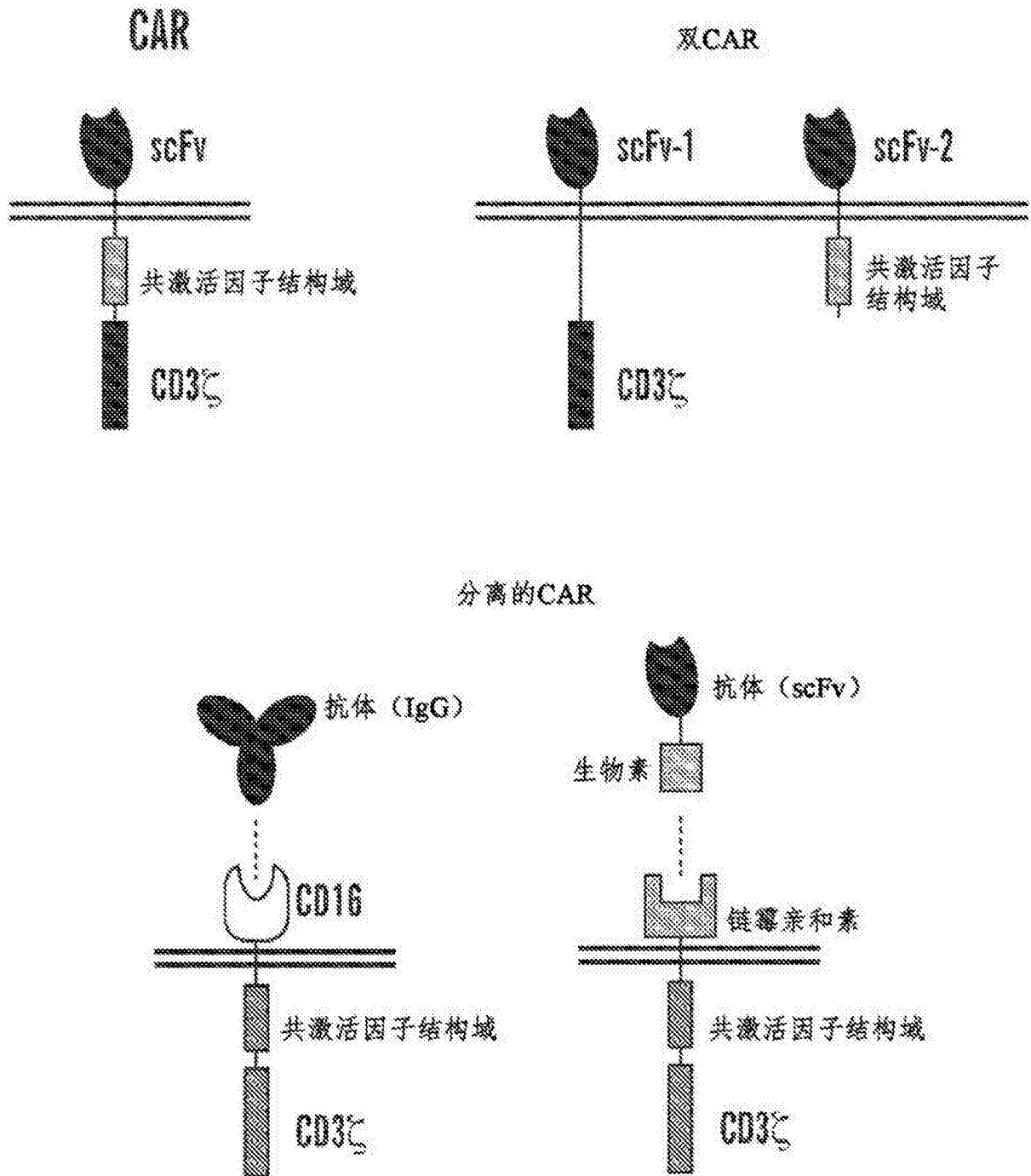


图1B

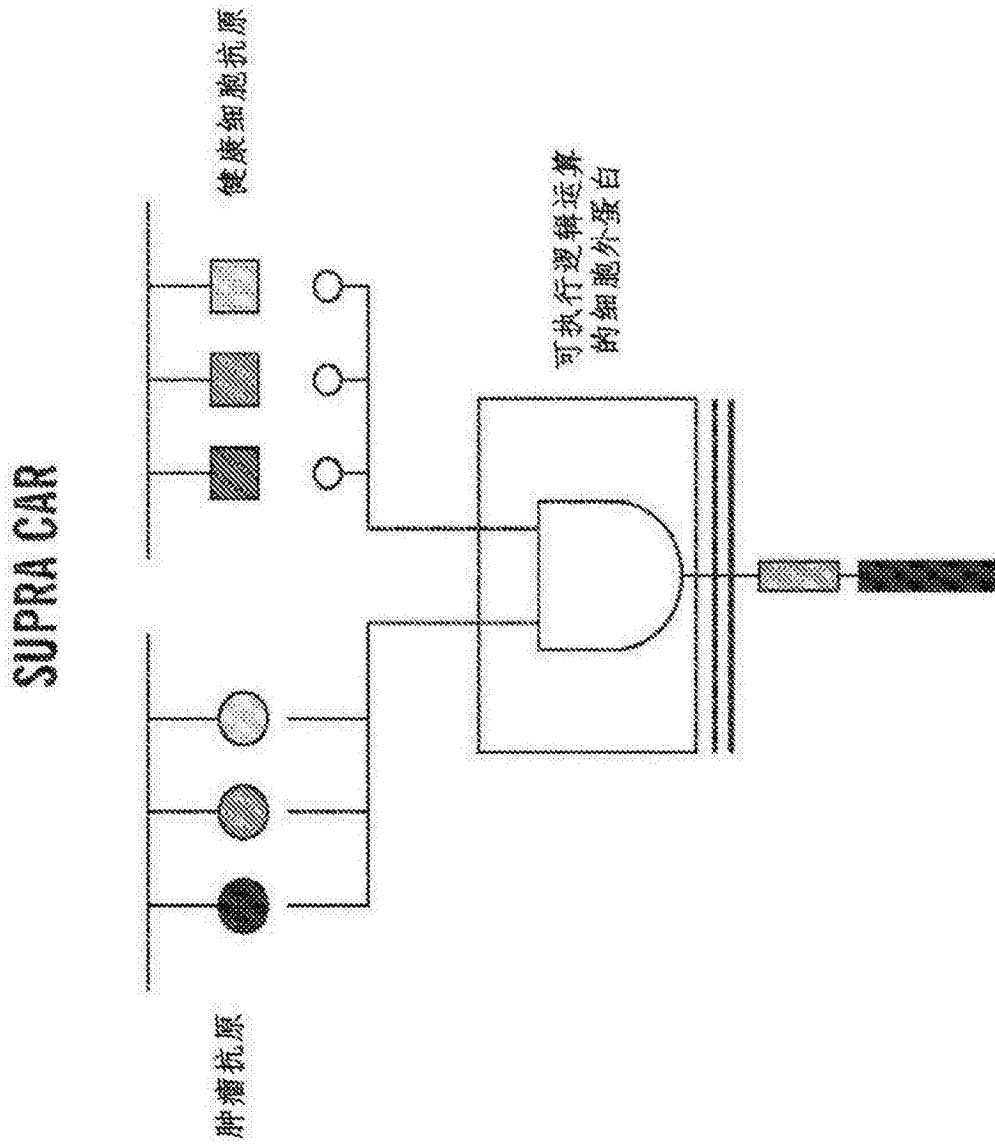


图2A

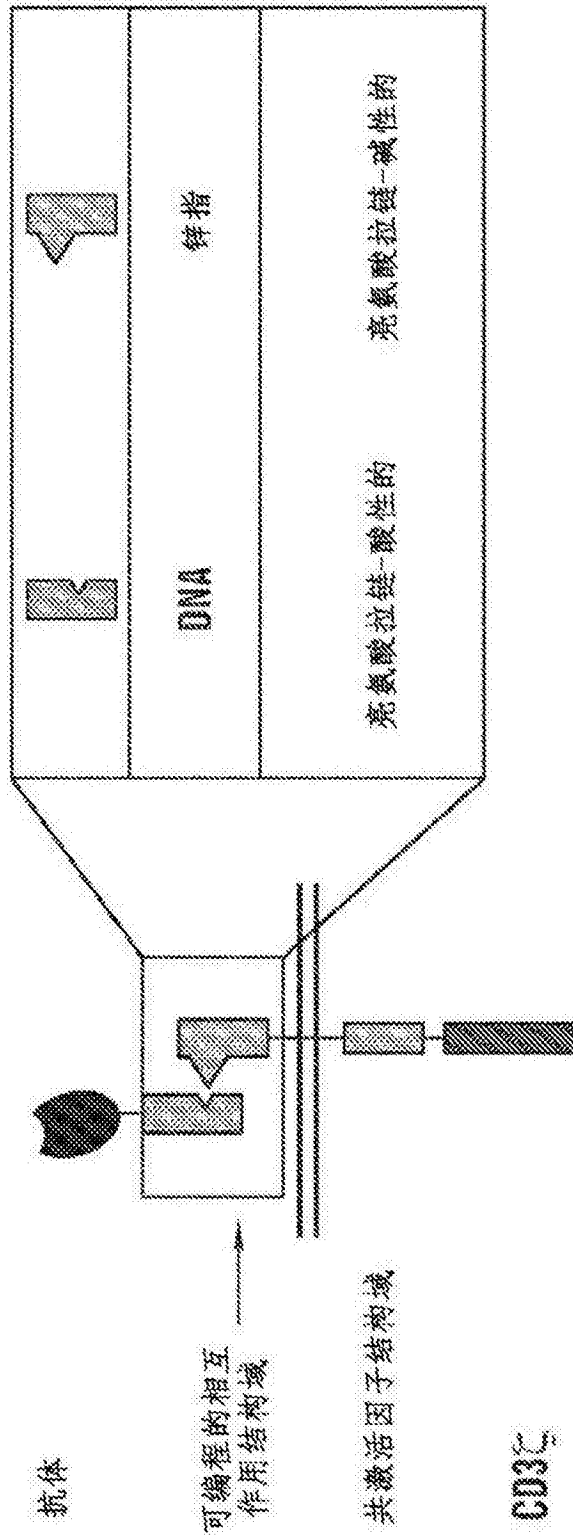


图2B

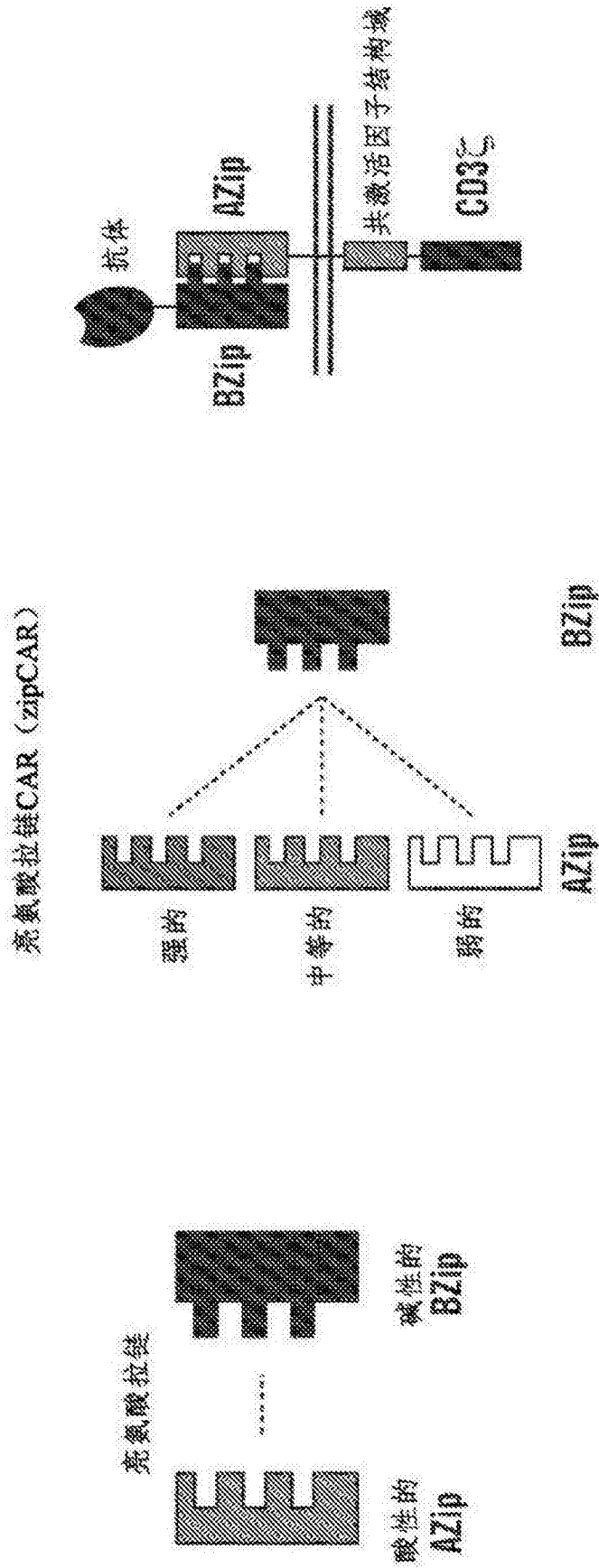


图3A

zipCAR逻辑运算

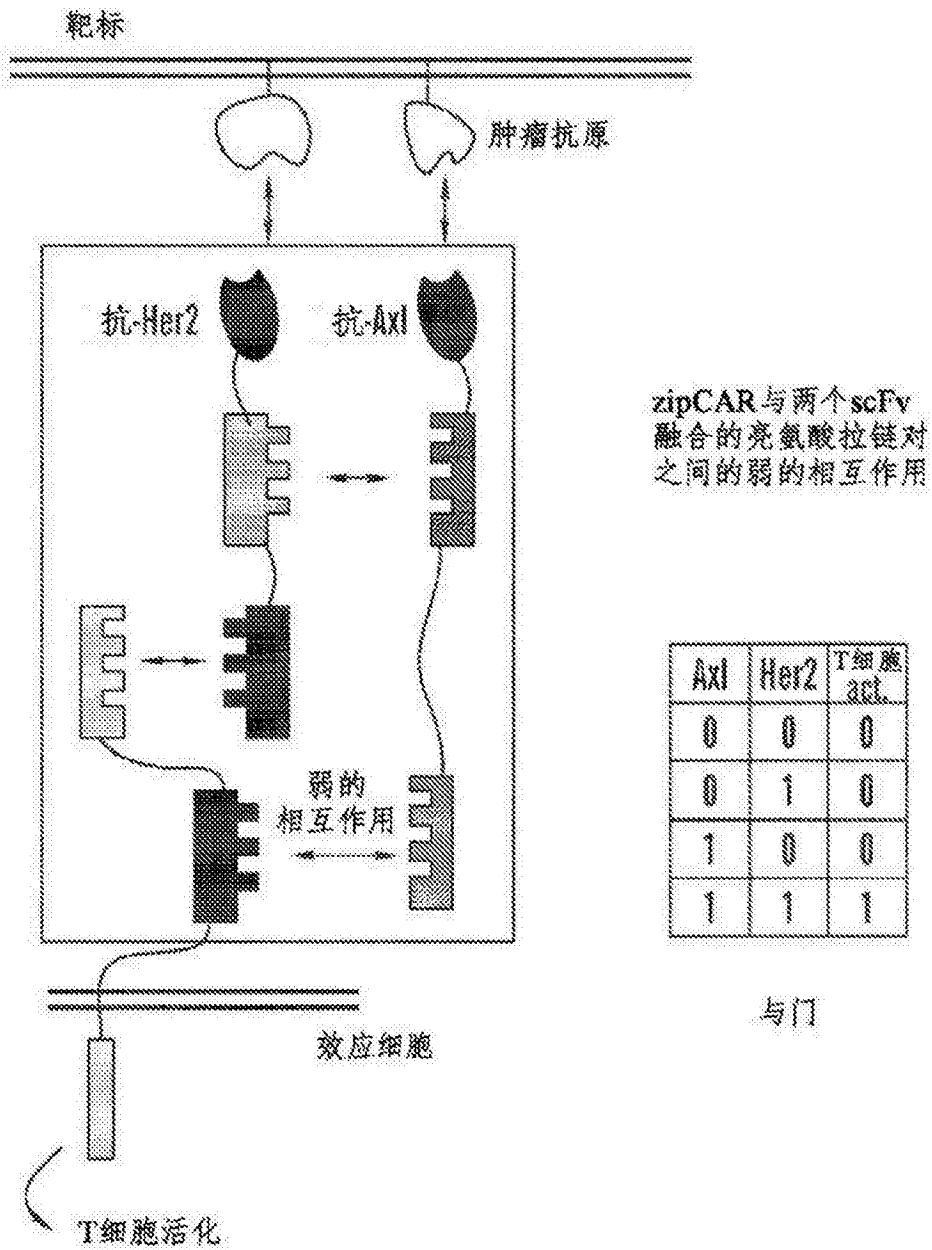
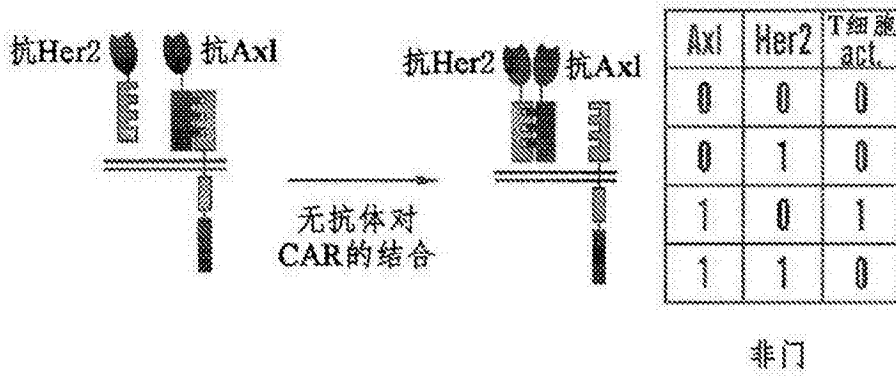


图3B

zipCAR的信号转导的正交控制

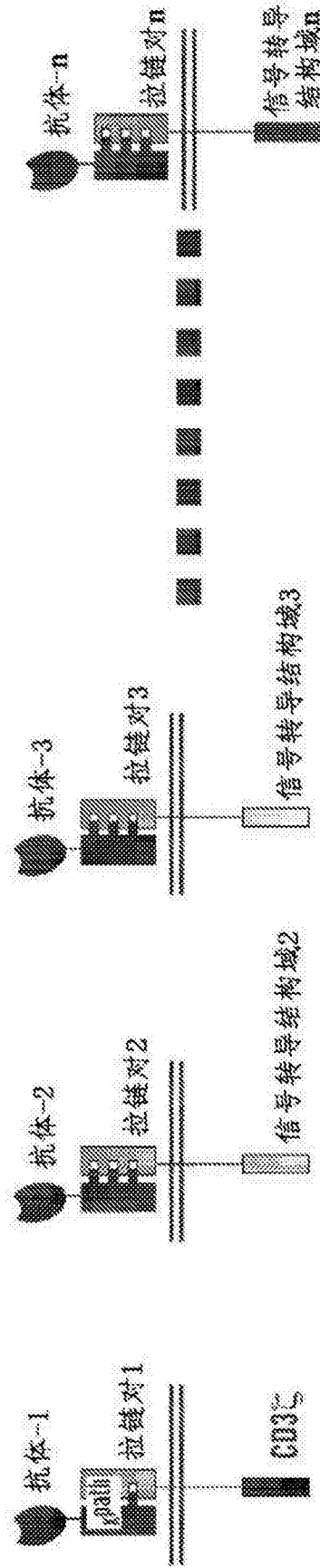


图3C

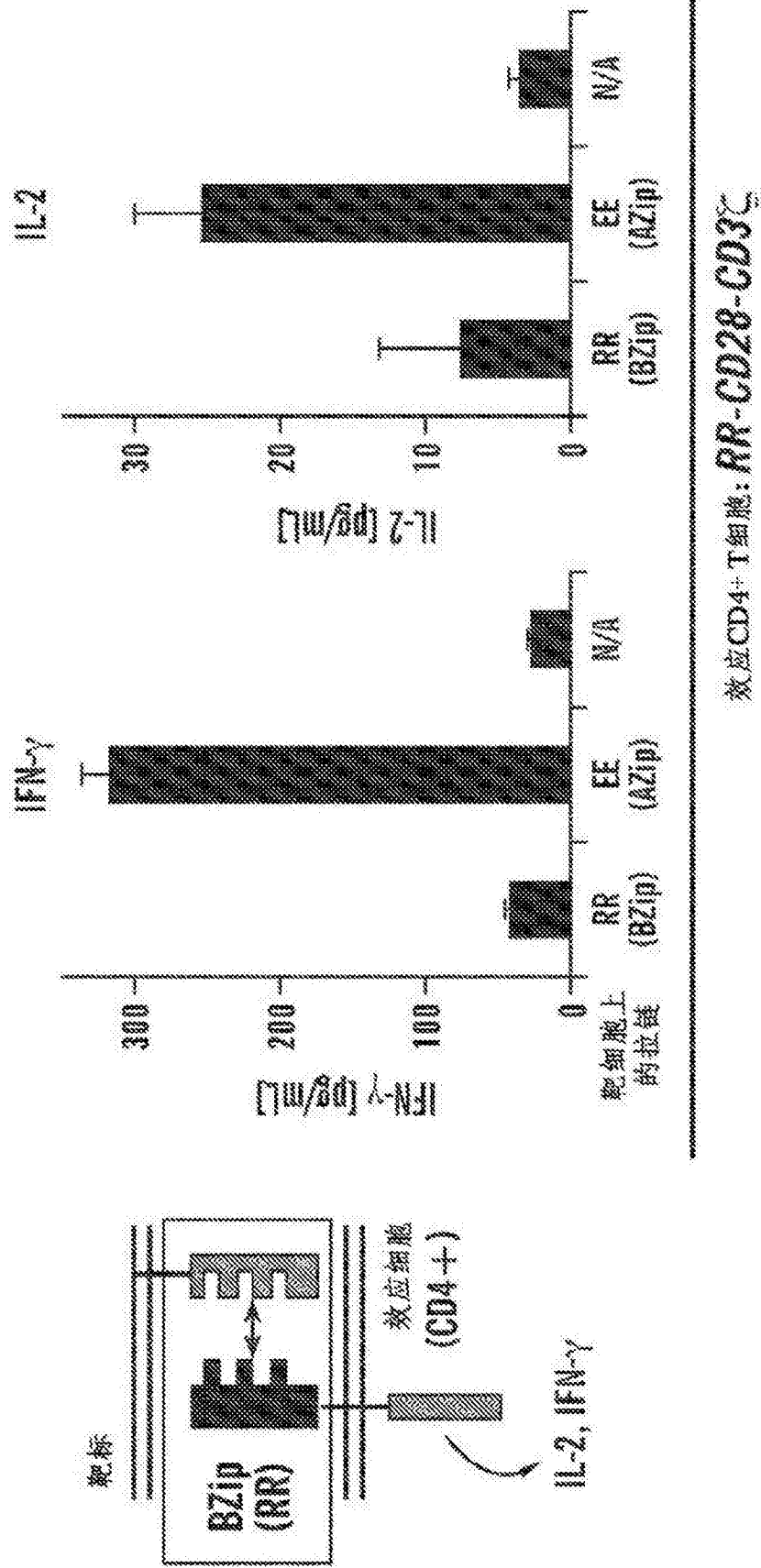


图4

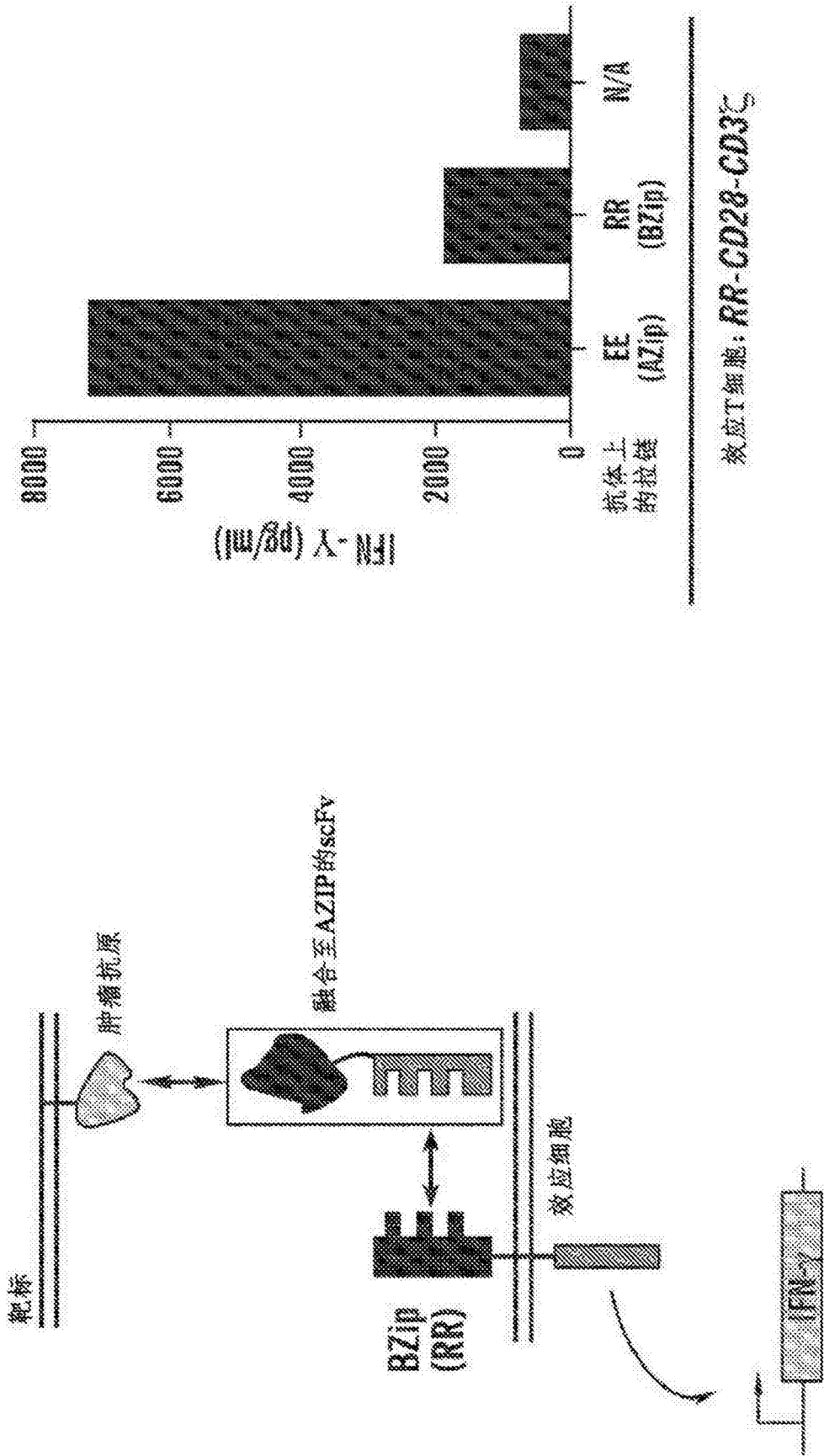


图5

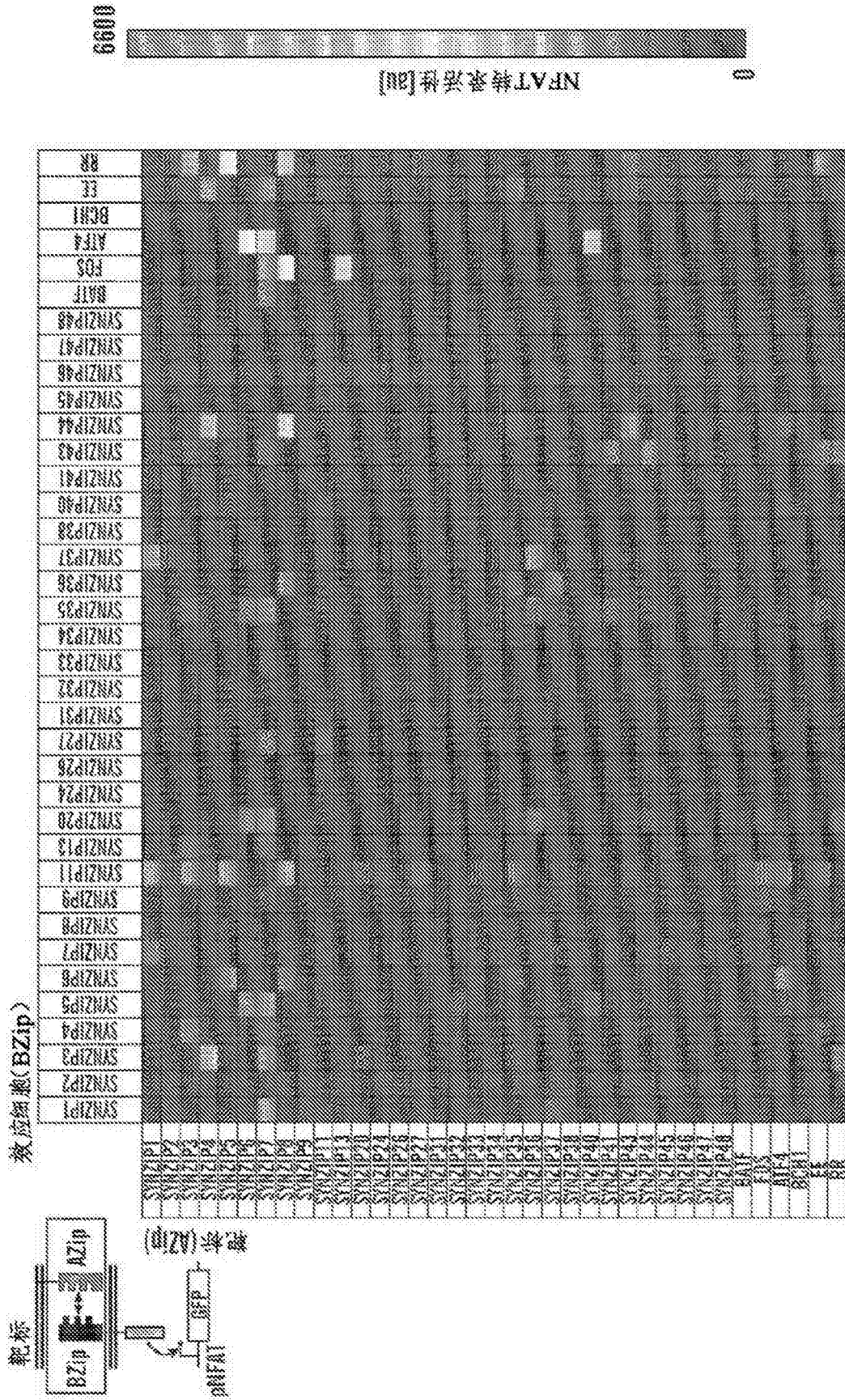


图6A

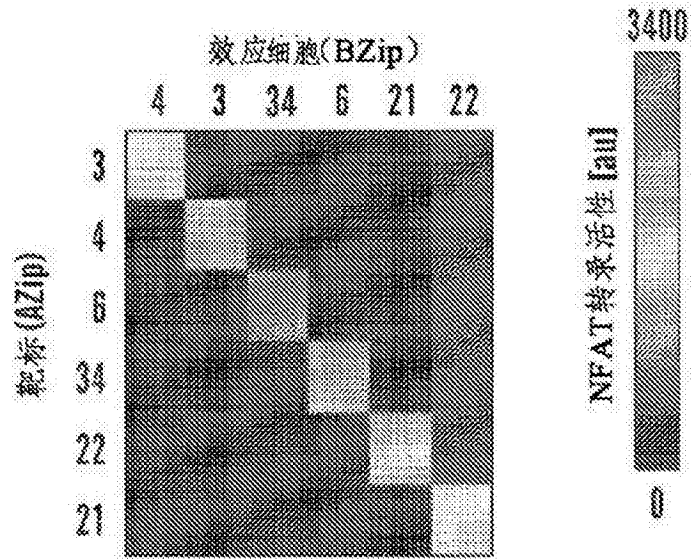


图6B

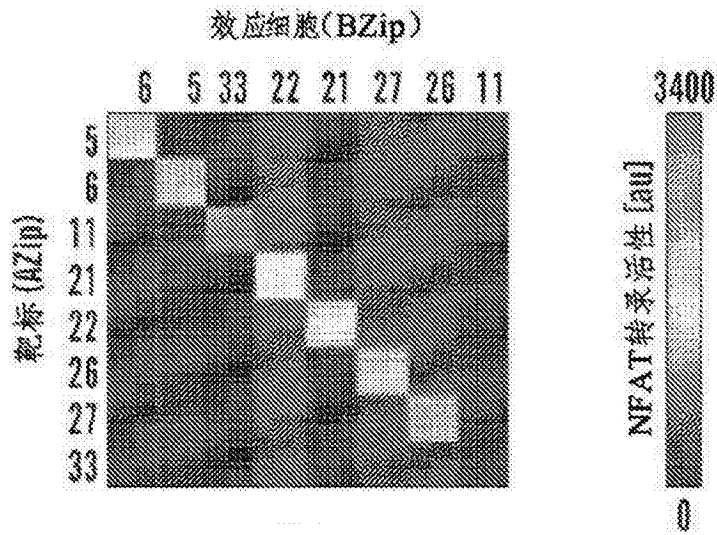


图6C

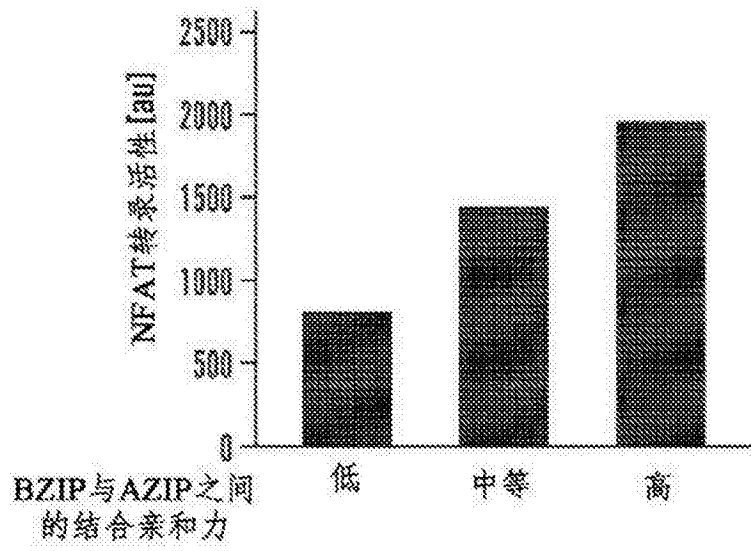


图6D

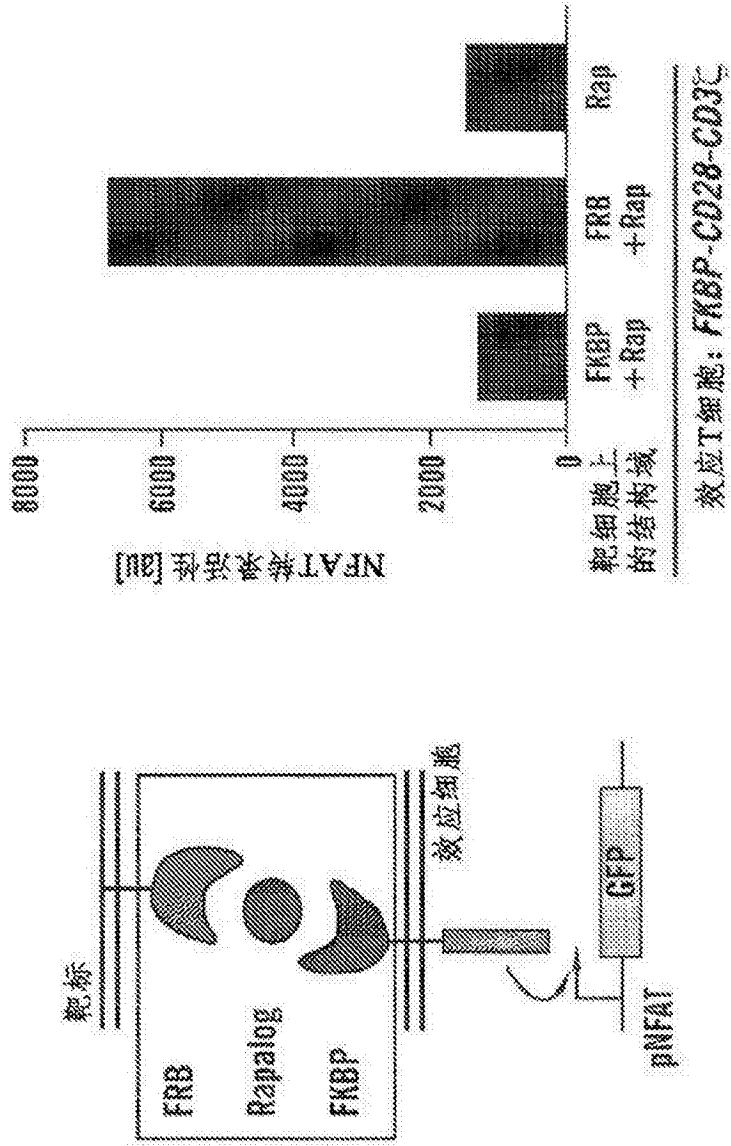


图7

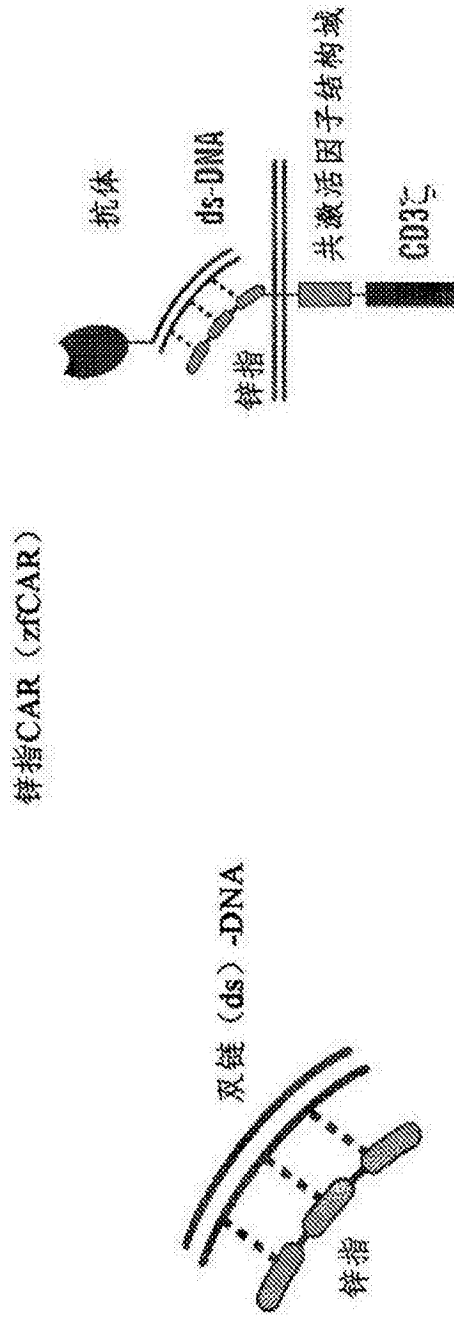
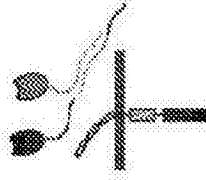


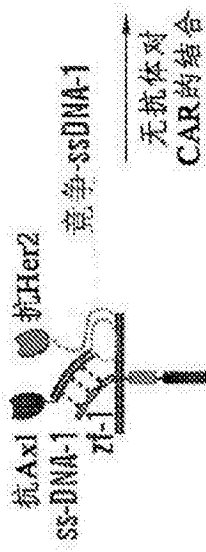
图8A

ZFCAR 逻辑运算

Axl	Her2	T细胞 ssDNA
0	0	0
0	1	0
1	0	1
1	1	0

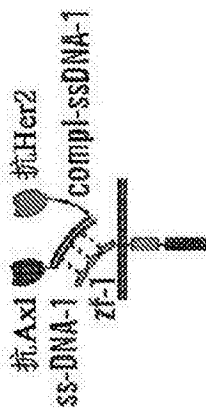


非门



无抗体对
CAR的结合

Axl	Her2	T细胞 ssDNA
0	0	0
0	1	0
1	0	0
1	1	1



与门

图8B

zFCAR的信号转导的正交调控

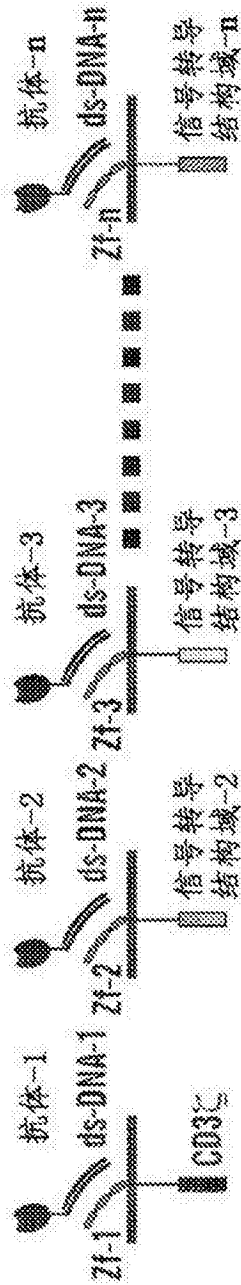


图8C

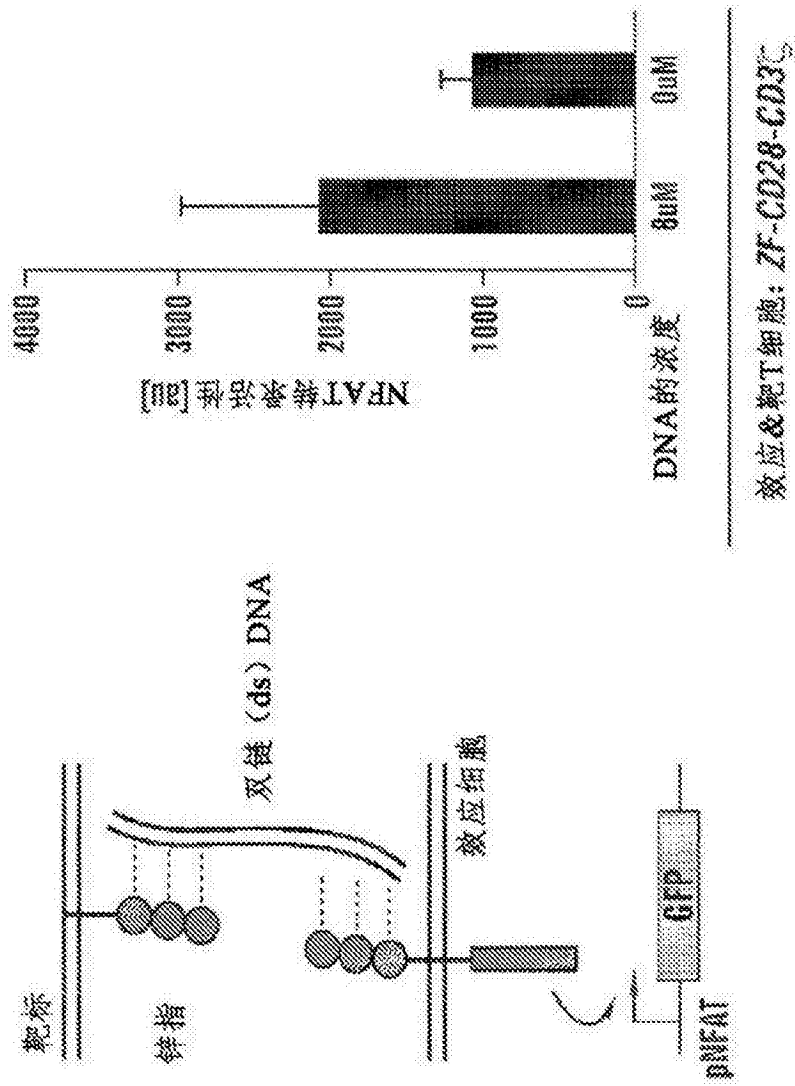


图9

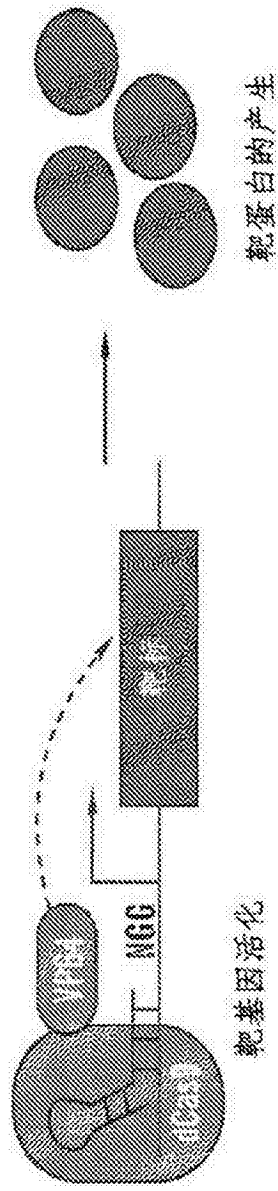


图10A

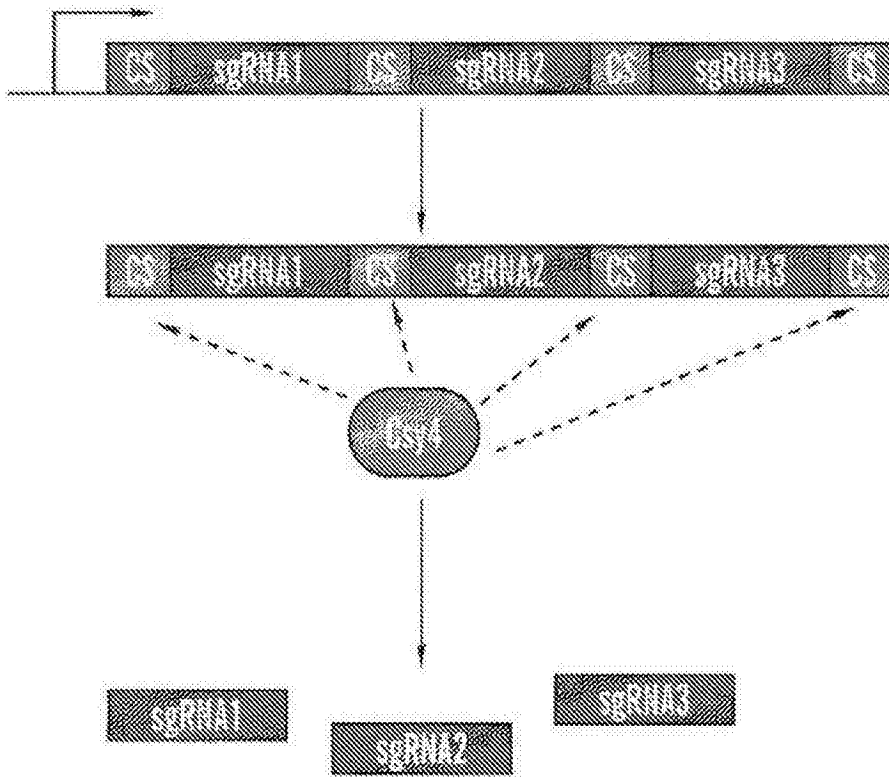


图10B

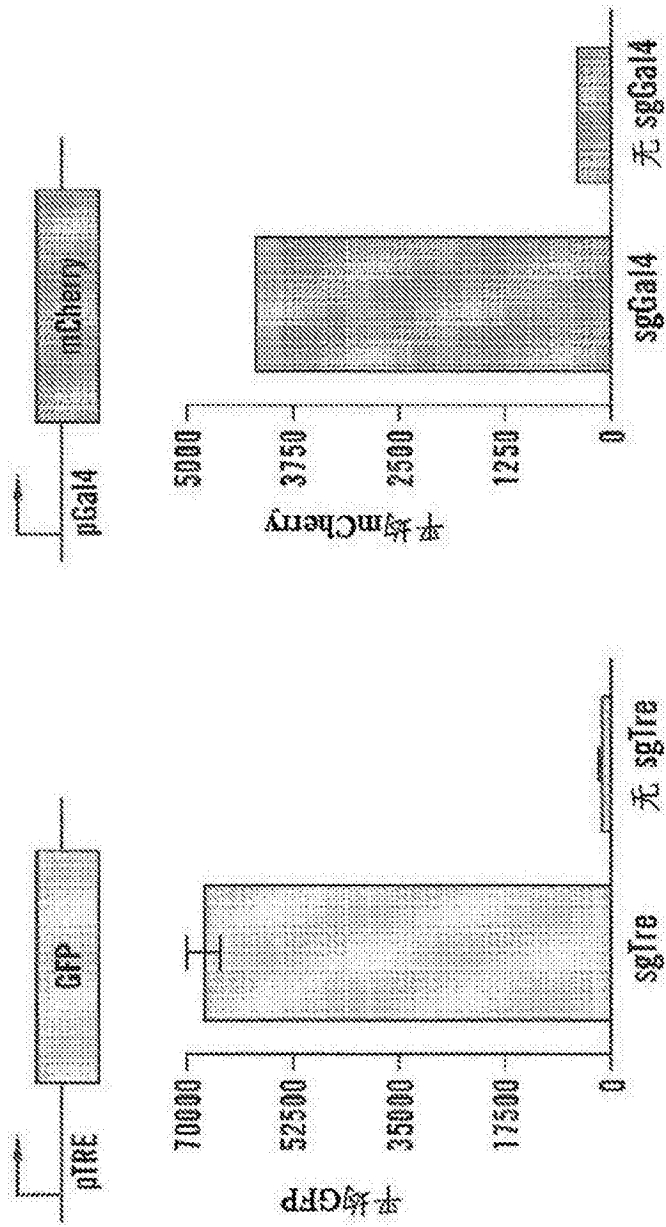


图11

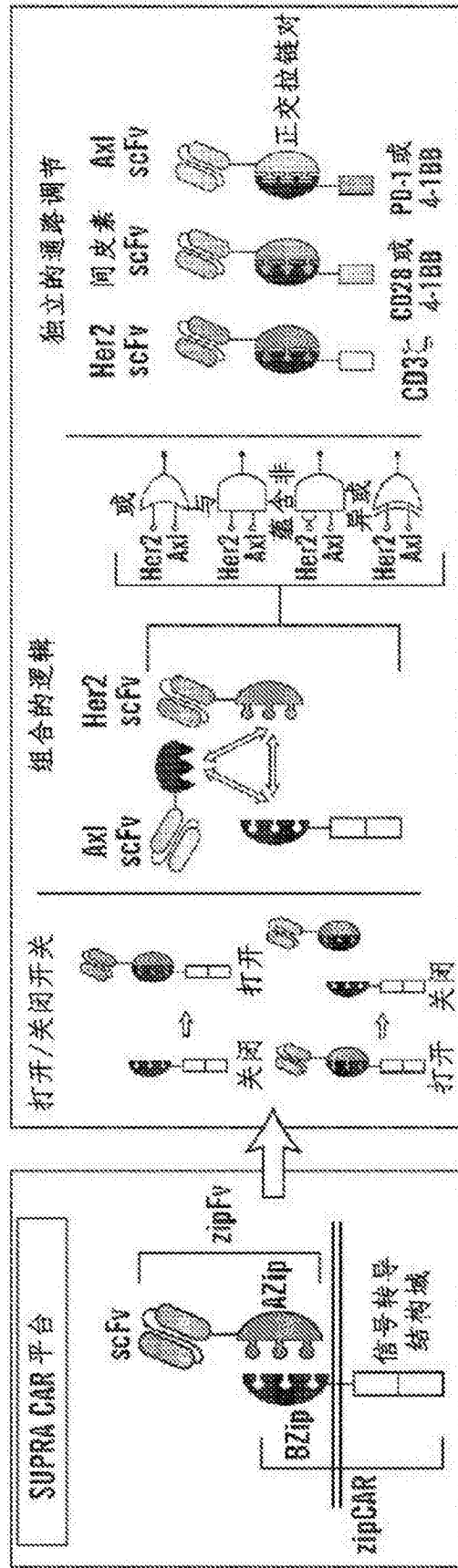


图12

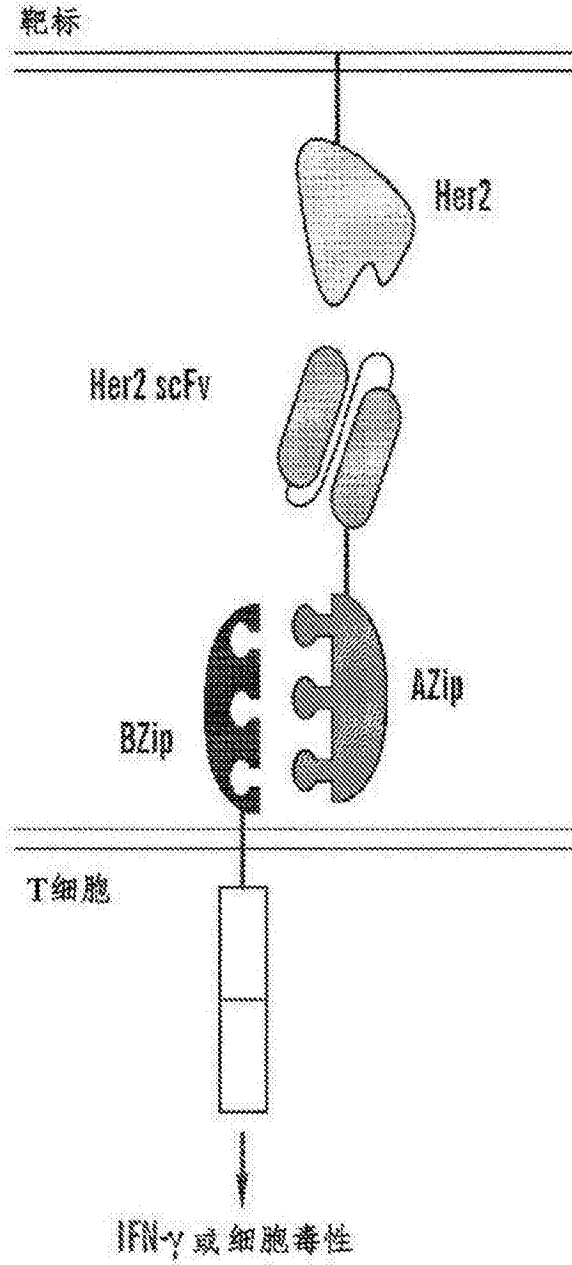


图13A

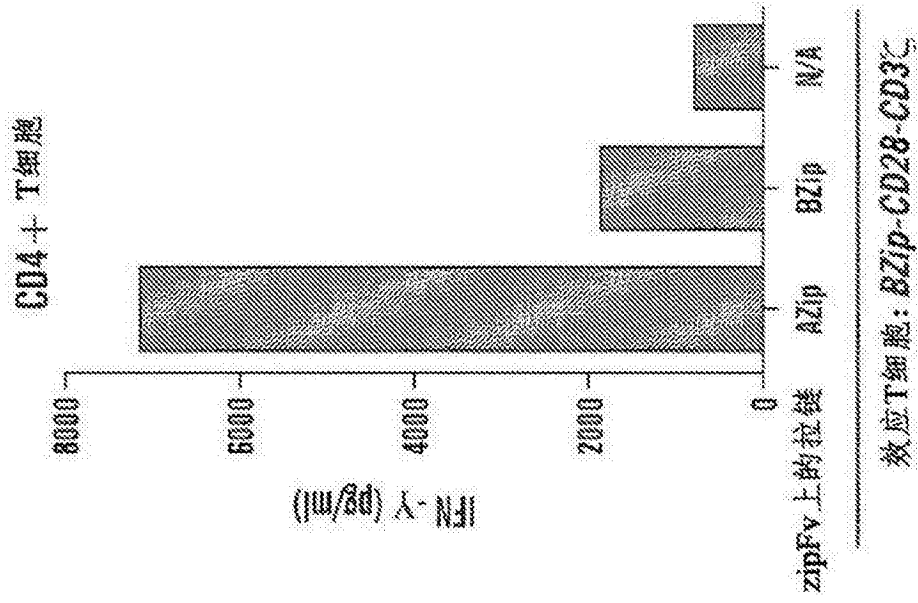


图13B

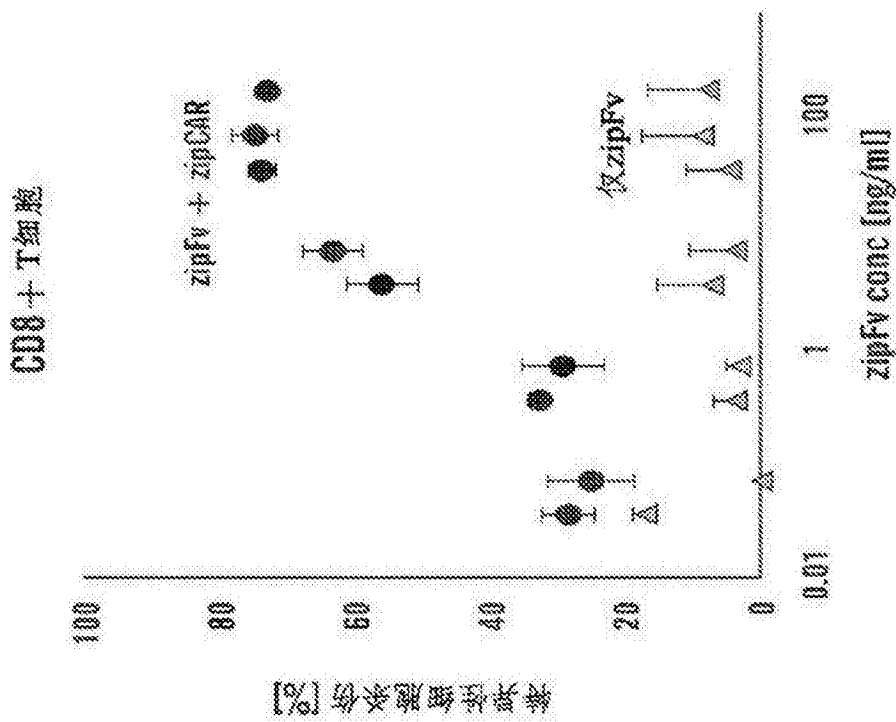


图13C

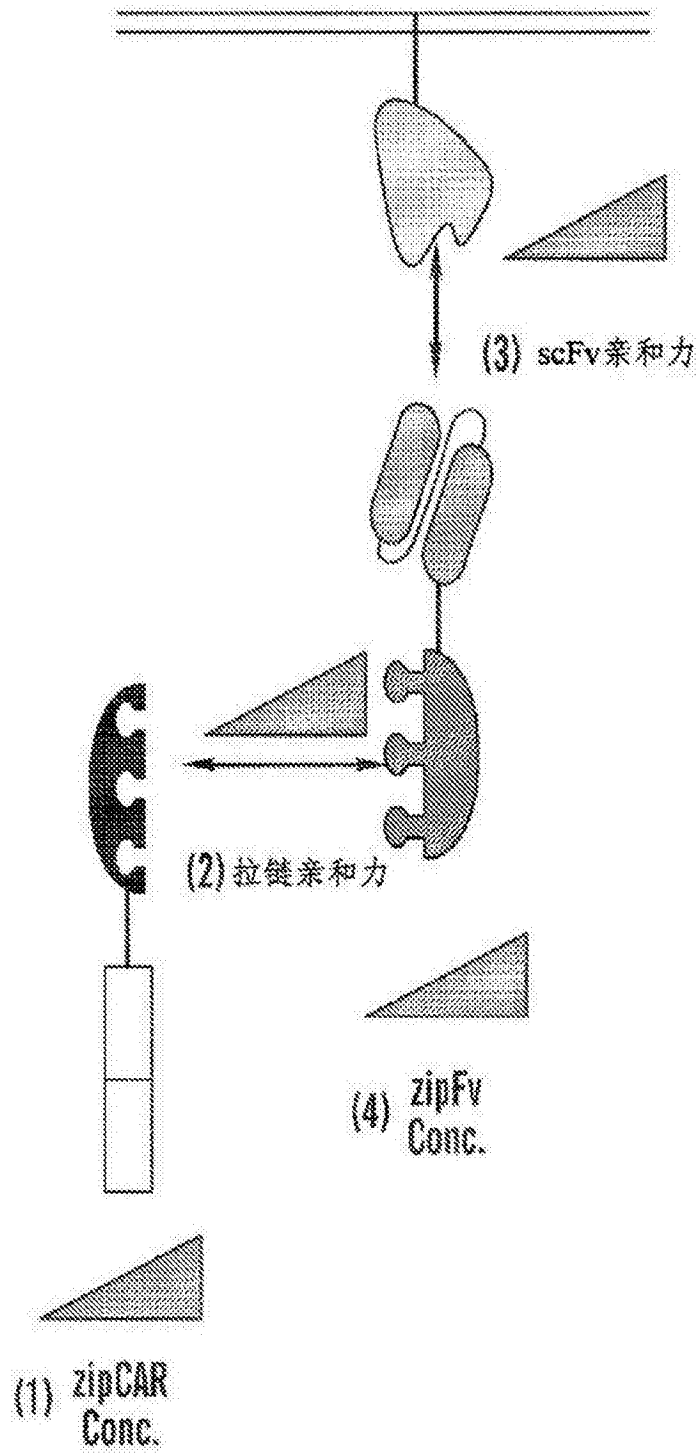


图14A

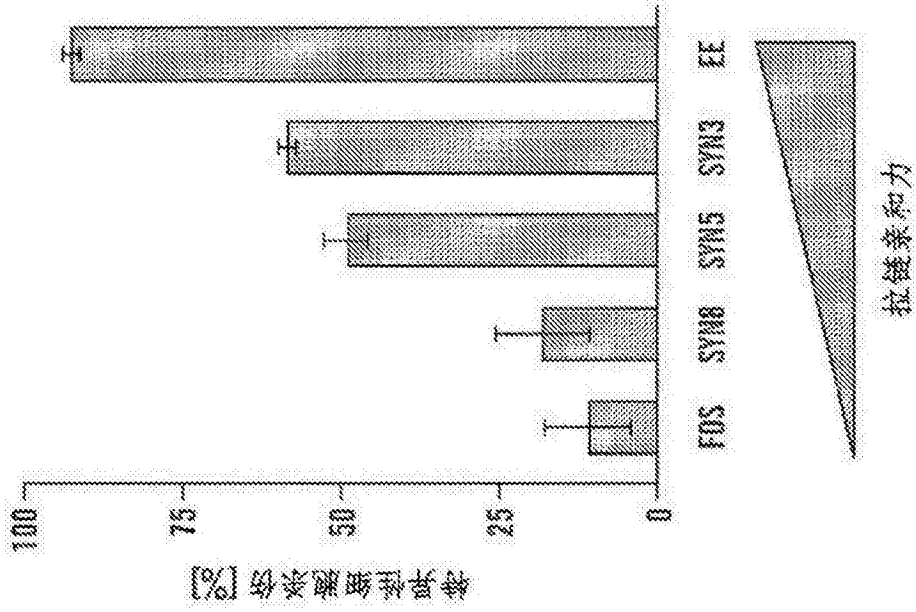


图14B

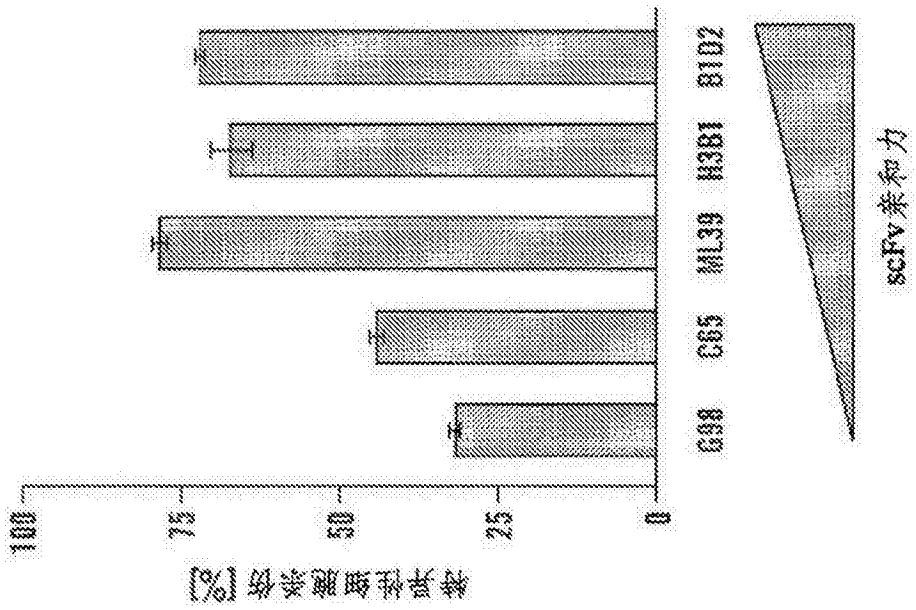


图14C

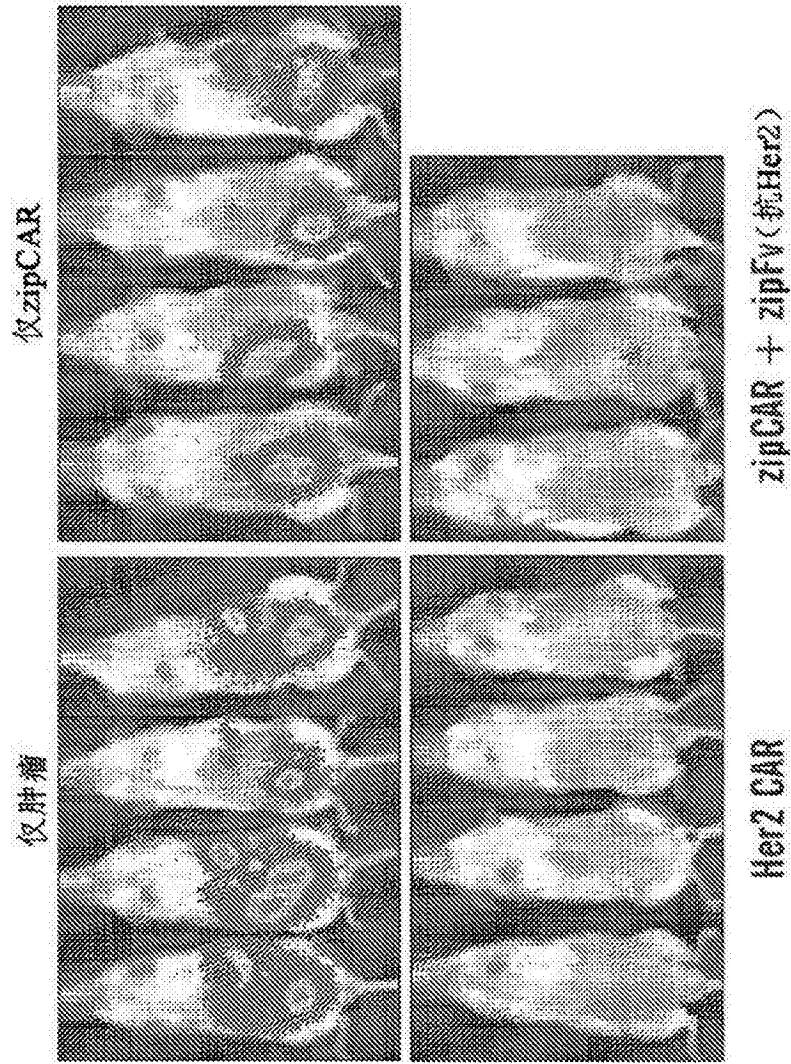


图15A

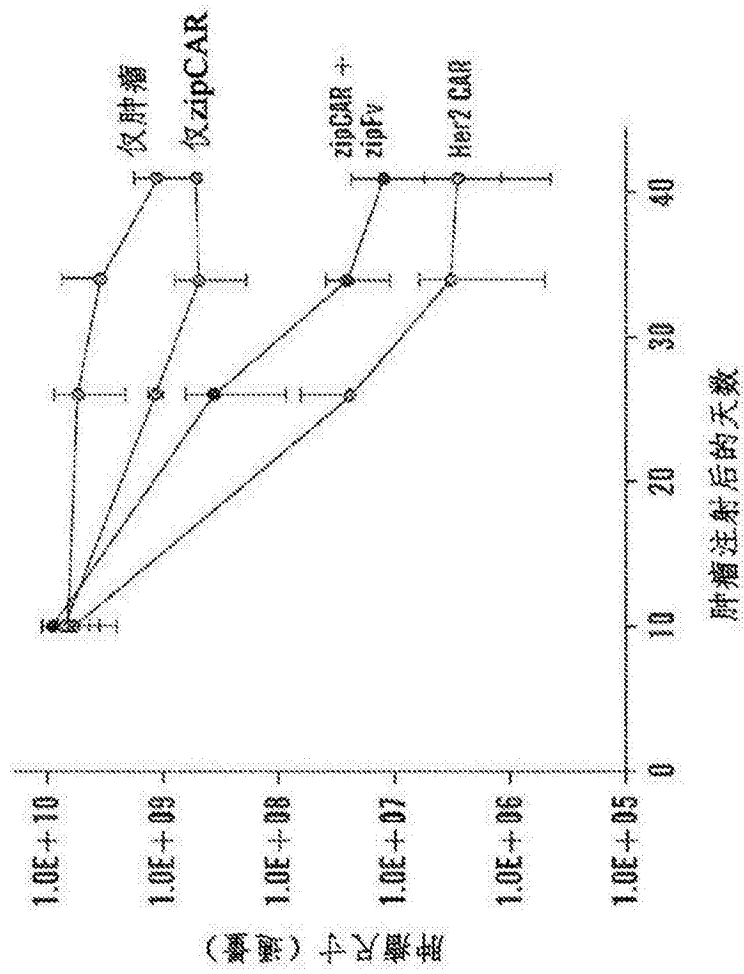


图15B

逻辑门		真值表			SUPRA设计		
名称	符号	输入		输出	ZipCAR	αHer2-ZipFv	αAxl-ZipFv
		A Her2	B Axl	Y Act			
假		0	0	0	BZip1-CAR		
		1	0	0			
		0	1	0			
		1	1	0			
A		0	0	0	BZip1-CAR	αHer2-AZip1	
		1	0	0			
		0	1	0			
		1	1	0			
B		0	0	0	BZip1-CAR		αAxl-AZip1
		1	0	0			
		0	1	0			
		1	1	0			
或		0	0	0	BZip1-CAR	αHer2-AZip1	αAxl-AZip1
		1	0	1			
		0	1	1			
		1	1	1			
A蕴含非B		0	0	0	BZip1-CAR	αHer2-AZip1	αAxl-BZip1
		1	0	0			
		0	1	0			
		1	1	0			
B蕴含非A		0	0	0	BZip1-CAR	αHer2-BZip1	αAxl-AZip1
		1	0	0			
		0	1	0			
		1	1	0			
与		0	0	0	BZip2-BZip1-CAR	αHer2-PDZ-BZip1	αAxl-PL-BZip1
		1	0	0			
		0	1	0			
		1	1	0			
异或		0	0	0	BZip2-BZip1-CAR	αHer2-AZip1-BZip2	αAxl-BZip1-AZip2
		1	0	1			
		0	1	1			
		1	1	0			

图16

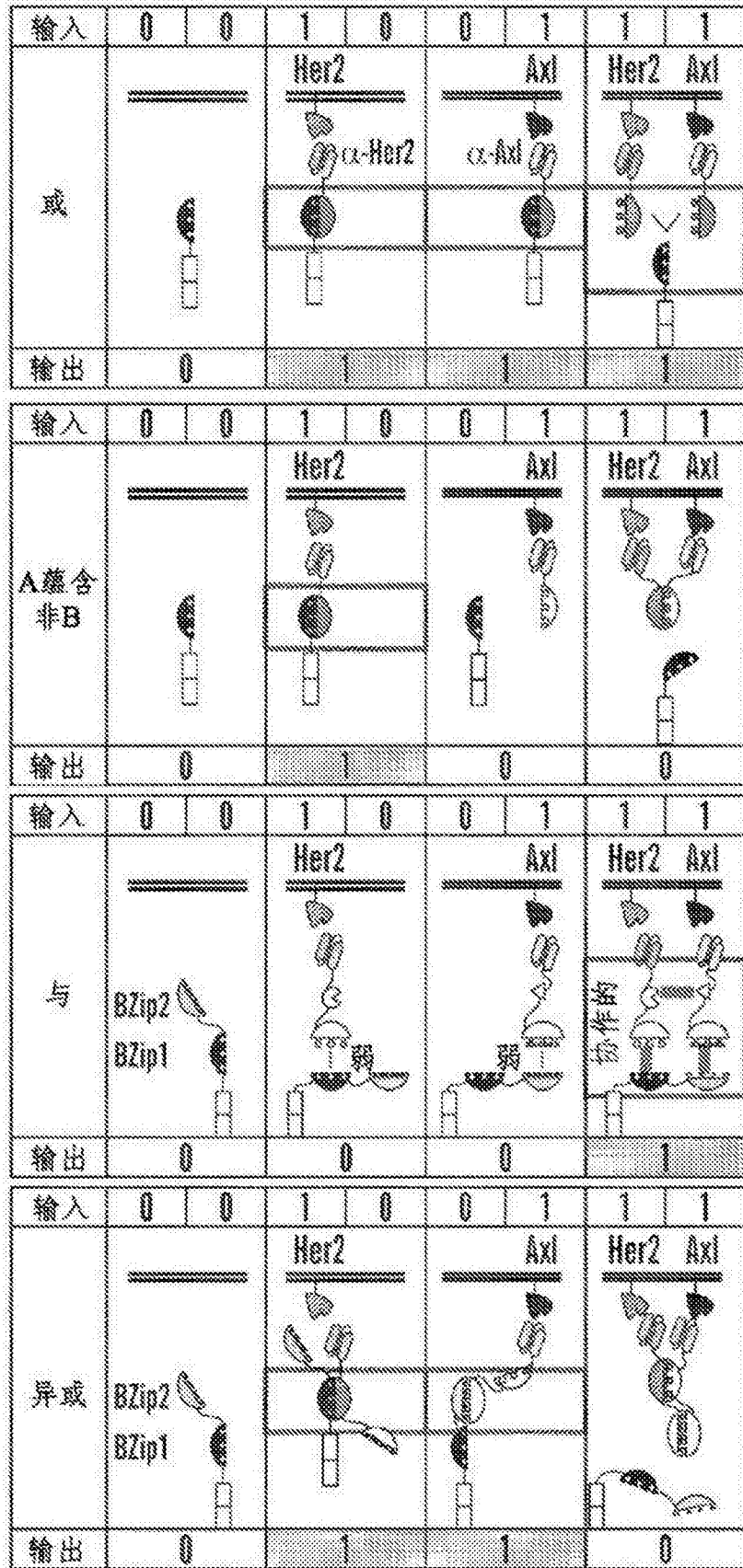


图16 (续)

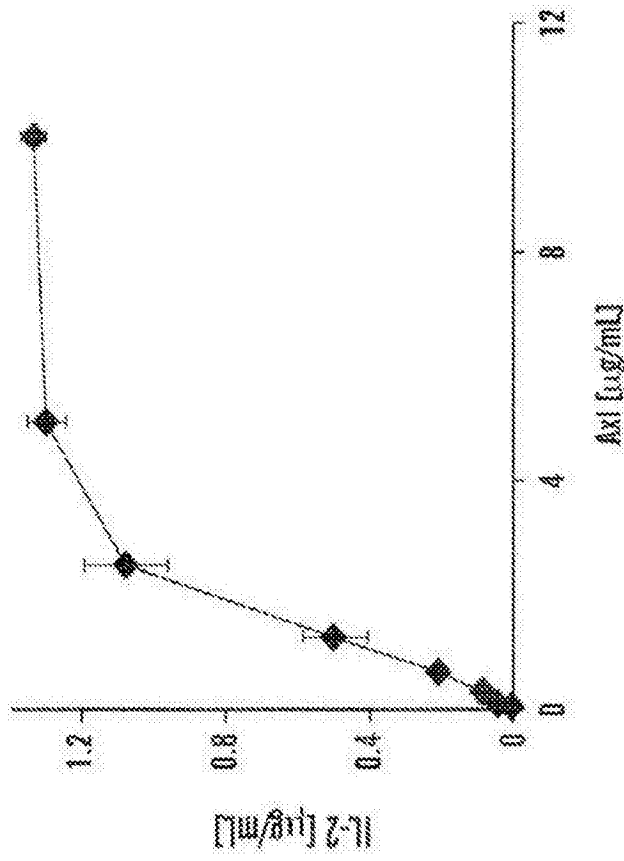


图17

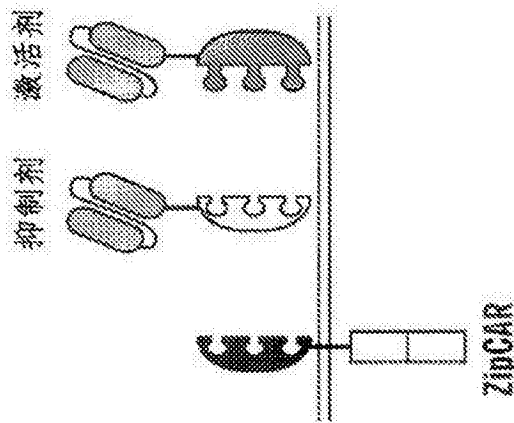
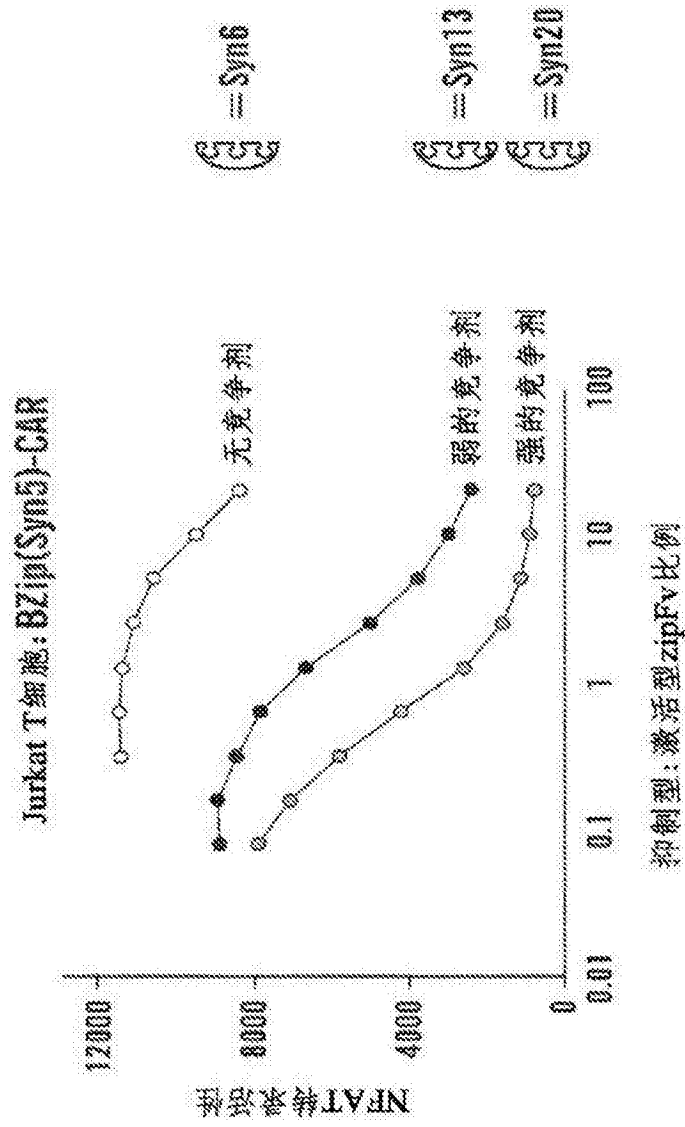


图18

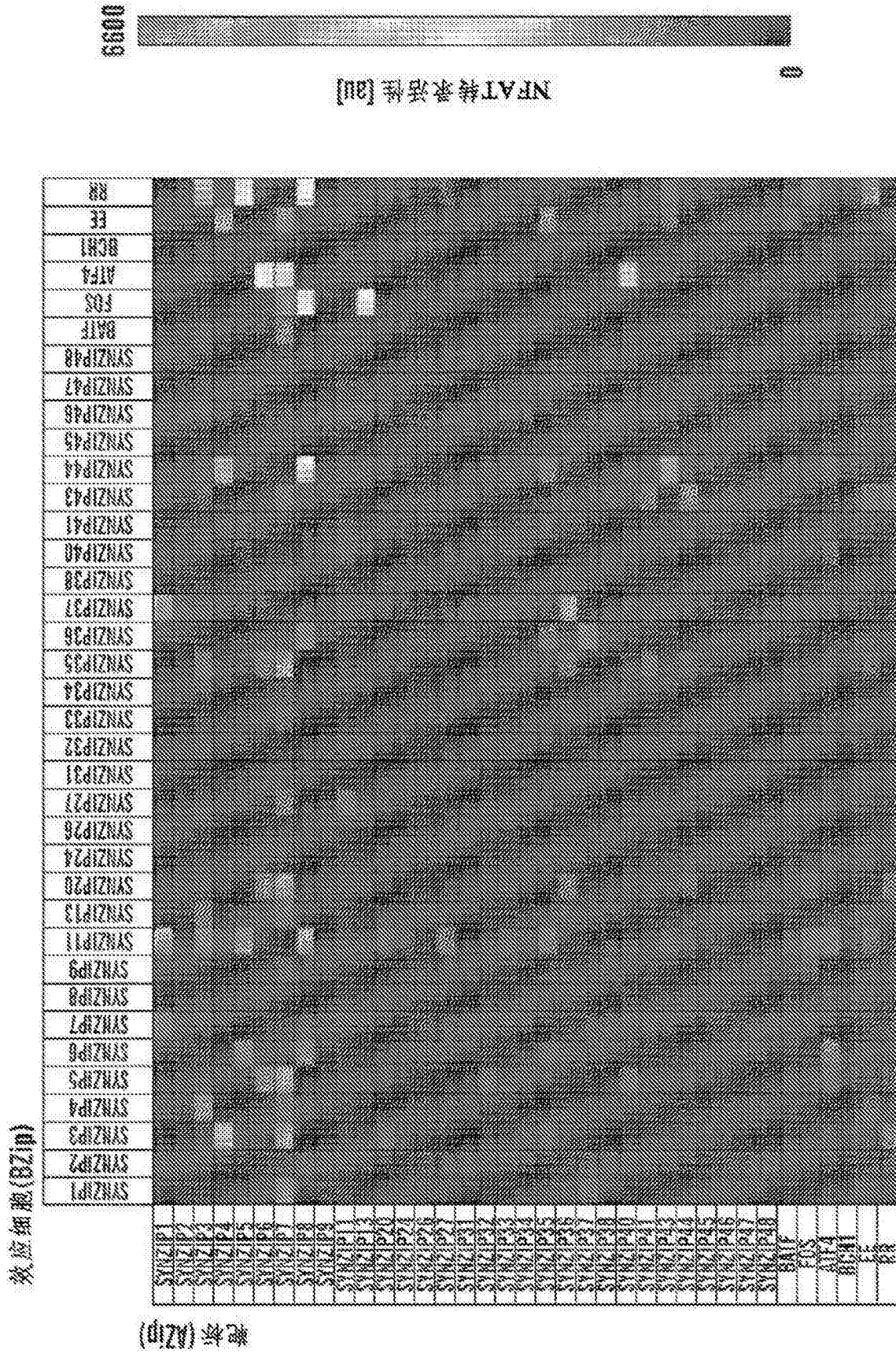


图19A

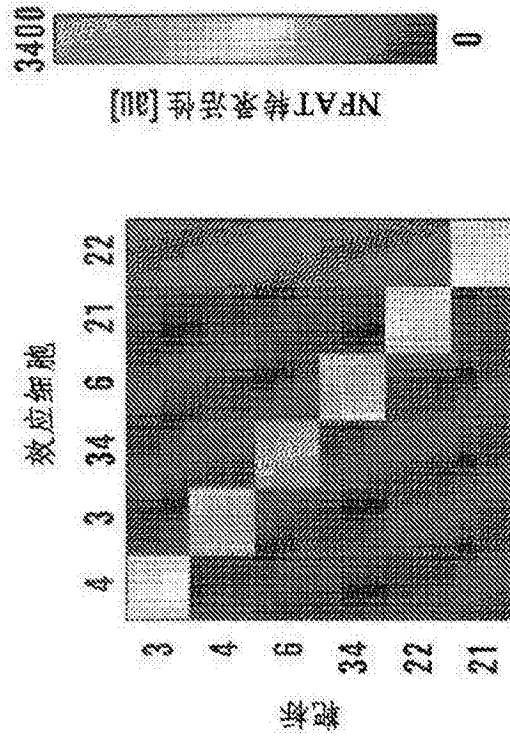


图19B

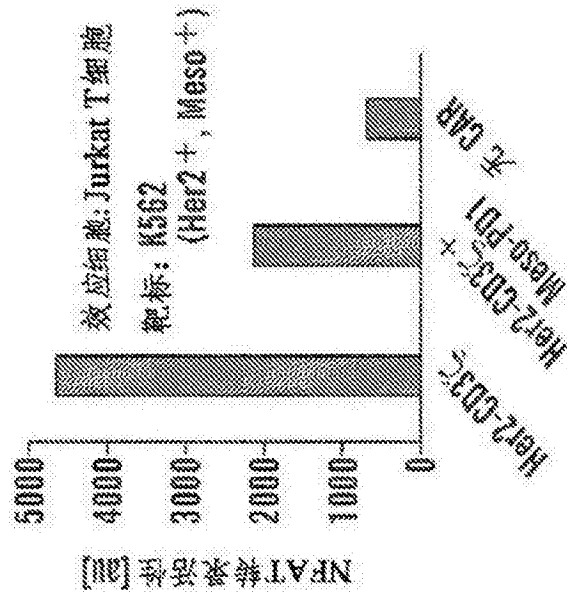


图19C

设置	zipCARs			表型
	A	B	C	
1	CD3z	CD28	4-1BB	(A与B) 将具有更快的杀肿瘤动力学而 (A与C) 将更持久
2	CD3z	CD28	PD-1	(A与B) 将具有更快的杀肿瘤动力学而C可 抑制T细胞活化

图20

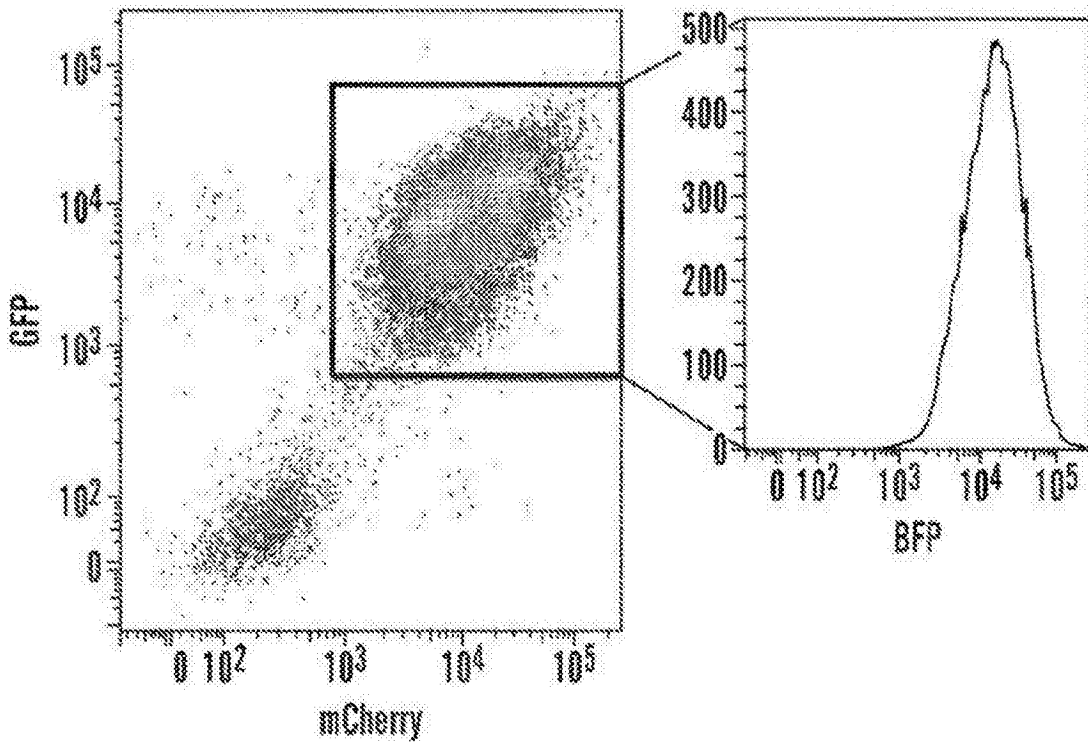


图21