



(10) 申请公布号 CN 115551522 A

(43) 申请公布日 2022. 12. 30

(21) 申请号 202180024929.6

(22) 申请日 2021.03.25

(30) 优先权数据

63/001,275 2020.03.28 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.09.27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/024123 2021.03.25

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/202232 EN 2021.10.07

(71) 申请人 得克萨斯大学体系董事会

地址 美国得克萨斯

(72) 发明人 K·雷兹瓦尼 M·山雷

D·马林科斯达 H·沙伊姆

E·施帕尔

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所

有限公司 11038

专利代理师 李程达

(51) Int.Cl.

A61K 35/17 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

G07K 16/28 (2006.01)

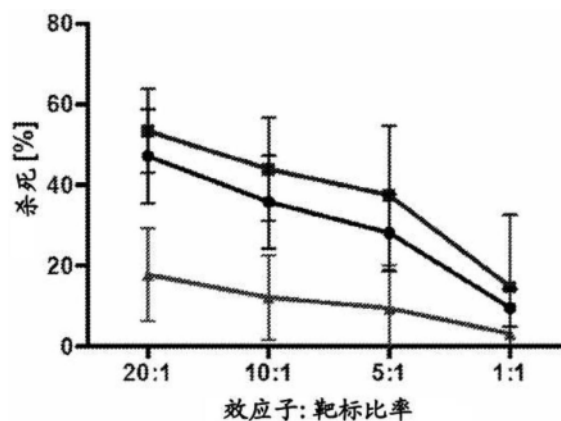
权利要求书2页 说明书34页 附图8页

(54) 发明名称

用于治疗癌症的细胞免疫疗法

(57) 摘要

本公开内容的实施方案涵盖包含免疫效应细胞例如天然杀伤(NK)细胞的组合物,其中所述细胞包含一种或多种外源提供的白细胞介素(IL),并且其中所述细胞任选地包含一种或多种工程化受体。在具体实施方案中,IL不是IL-15,而是IL-12、IL-21或两者。NK细胞可用于治疗任何类型的癌症,至少包括胶质母细胞瘤。



1. 一种包含天然杀伤 (NK) 细胞的组合物, 所述NK细胞包含一种或多种外源提供的白细胞介素 (IL), 其中所述IL不是IL-15, 并且其中所述NK细胞包含一种或多种工程化受体。

2. 权利要求1的组合物, 其中所述IL选自IL-12、IL-21、IL-2、IL-18、IL-7、用接头人工连接在一起的IL-12的p35和p40亚基以及它们的组合。

3. 权利要求1或2的组合物, 其中所述IL是IL-12、IL-21或两者。

4. 权利要求1-3中任一项的组合物, 其中所述IL被分泌、栓系或膜结合在细胞中。

5. 权利要求1-4中任一项的组合物, 其中外源提供进一步被定义为从细胞中的载体表达和/或其中NK细胞在一种或多种IL的存在下培养。

6. 权利要求1-5中任一项的组合物, 其中所述工程化受体是工程化抗原受体。

7. 权利要求6的组合物, 其中所述工程化抗原受体是嵌合抗原受体 (CAR) 或T细胞受体 (TCR)。

8. 权利要求6或7的组合物, 其中所述抗原是癌抗原。

9. 权利要求6-8中任一项的组合物, 其中所述抗原是实体瘤抗原。

10. 权利要求6-9中任一项的组合物, 其中所述抗原选自5T4、8H9、 $\alpha_v\beta_6$ 整联蛋白、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CA9、CD5、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD123、CD138、CD171、CEA、CSPG4、CS1、CLL1、CD99、DLL3、EGFR、EGFR家族, 包括ErbB2 (HER2)、EGFRvIII、EGP2、EGP40、ERBB3、ERBB4、ErbB3/4、EPCAM、EphA2、EpCAM、FAP、FBP、胎儿AchR、FR α 、GD2、GD3、Glypican-3 (GPC3)、HLA-A1+MAGE1、HLA-A1+NY-ESO-1、IL-11R α 、IL-13R α 2、Lambda、Lewis-Y、L1CAM、Kappa、KDR、MCSP、间皮素、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2D配体、NY-ESO-1、PRAME、PSC1、PSCA、PSMA、ROR1、SP17、生存素、TAG72、TEM、HMW-MAA和VEGFR2。

11. 权利要求6的组合物, 其中所述工程化受体是细胞因子受体、趋化因子受体或归巢受体。

12. 权利要求1-11中任一项的组合物, 其中所述NK细胞包含自杀基因。

13. 权利要求1-12中任一项的组合物, 其中所述细胞的一种或多种内源基因的表达被降低或抑制, 所述内源基因选自TDAG8、NKG2A、SIGLEC-7、LAG3、TIM3、CISH、FOXO1、TGFB2、TIGIT、CD96、ADORA2、NR3C1、PD1、PDL-1、PDL-2、CD47、SIRPA、SHIP1、ADAM17、RPS6、4EBP1、CD25、CD40、IL21R、ICAM1、CD95、CD80、CD86、IL10R、CD5、CD7及其组合。

14. 包含权利要求1-13中任一项的组合物的细胞群, 其包含在合适的培养基中。

15. 一种治疗个体的癌症的方法, 包括向个体施用治疗有效量的权利要求1-13中任一项的组合物步骤。

16. 权利要求15的方法, 其中个体中的癌细胞具有增加的NK配体表达。

17. 权利要求15或16的方法, 其中个体中的癌细胞具有MICA/B、ULBP1、ULBP2/5、ULBP3、B7-H6、CD112、CD155、HLA-ABC、HLA-DR、HLA-3或其组合的增加的表达。

18. 权利要求15-17中任一项的方法, 其中所述癌症是实体瘤或不是实体瘤。

19. 权利要求15-18中任一项的方法, 其中所述癌症是肺癌、脑癌、乳腺癌、血液癌、皮肤癌、胰腺癌、肝癌、结肠癌、头颈癌、肾癌、甲状腺癌、胃癌、脾癌、胆囊癌、骨癌、卵巢癌、睾丸癌、子宫内膜癌、前列腺癌、直肠癌、肛门癌、子宫颈癌或是血液学的癌症。

20. 权利要求15-19中任一项的方法, 其中所述癌症是胶质母细胞瘤。

21. 权利要求15-20中任一项的方法, 其中所述个体是哺乳动物。

22. 权利要求15-21中任一项的方法,其中所述个体是人、狗、猫、马、牛、羊、猪或啮齿动物。

23. 权利要求15-22中任一项的方法,其中向所述个体施用一种或多种另外的癌症疗法。

24. 权利要求23的方法,其中所述另外的癌症疗法是手术、放射、化学疗法、激素疗法、免疫疗法或其组合。

25. 权利要求15-24中任一项的方法,还包括诊断个体的癌症的步骤。

26. 权利要求15-25中任一项的方法,还包括生成细胞的步骤。

27. 权利要求15-26中任一项的方法,其中所述细胞对于所述个体而言是自体的。

28. 权利要求15-26中任一项的方法,其中所述细胞对于所述个体而言是同种异体的。

29. 权利要求15-28中任一项的方法,其中将细胞群颅内、通过注射、静脉内、动脉内、腹膜内、气管内、瘤内、肌肉内、内窥镜下、病灶内、颅内、经皮、皮下、局部地、通过灌注、在肿瘤微环境中或其组合施用至个体。

用于治疗癌症的细胞免疫疗法

[0001] 本申请要求2020年3月28日提交的美国临时专利申请序列号63/001,275的优先权,该申请的全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0002] 本公开内容的实施方案至少涉及细胞生物学、分子生物学、免疫学和医学领域。

[0003] 背景

[0004] 胶质母细胞瘤 (GBM) 是一种具有不良预后的侵袭性恶性肿瘤。复发后,没有标准治疗,并且生存期不足9个月。靶向IL13R α 2 (Brown等人,2016)、Her2/CMV (Ahmed等人,2010) 和EGFRvIII (O'Rourke等人,2017) 的三个首次人体嵌合抗原受体 (CAR) T细胞试验的结果最近报道了令人失望的临床结果。

[0005] 目前迫切需要推进针对GBM以及其他实体瘤的细胞疗法,特别是它们在白血病和淋巴瘤中证明的巨大反应。本公开内容提供了对推进针对癌症(至少包括胶质母细胞瘤)的细胞疗法的长期需求的解决方案。

[0006] 概述

[0007] 本公开内容的实施方案包括与用于医学病况的细胞疗法有关的方法和组合物。细胞疗法包括用于施用至有需要的个体的免疫效应细胞或其他细胞。在具体实施方案中,与其他细胞疗法相比,细胞的活性增强,因为细胞包含一种或多种外源提供的白细胞介素 (IL) 并且任选地包含一种或多种其他异源基因产物,例如一种或多种工程化受体。细胞可以外部暴露于一种或多种细胞因子(例如在培养物中) 和/或它们可以被转染以表达异源细胞因子(与从细胞基因组表达的内源细胞因子相反),包括来自一种或多种载体。本公开内容包括使用与外源细胞因子(例如,IL-2、IL-12、IL-21、IL-18、IL-15、IL-7) 组合的离体扩增和活化的天然杀伤 (NK) 细胞或NK细胞经过工程化以分泌或在其表面表达膜结合或栓系的细胞因子(例如,IL-2、IL-12、IL-21、IL-18、IL-15、IL-7) 的免疫疗法,用于治疗胶质母细胞瘤 (GBM) 和其他癌症。在递送之前,细胞可能已经在合适的条件下暴露于培养物中的有效量的IL-2、IL-12、IL-21、IL-18、IL-15和/或IL-7。在特定实施方案中,细胞包含一种或多种不是IL-15的外源提供的白细胞介素,但在替代实施方案中,细胞包含外源提供的IL-15。

[0008] 在具体实施方案中,本公开内容包括使用包含NK细胞的过继细胞疗法治疗胶质母细胞瘤的方法。在特定方面,NK细胞特别有效对抗胶质母细胞瘤干细胞,并且本公开内容提供了用于增强对抗任何种类的胶质母细胞瘤细胞(包括胶质母细胞瘤细胞) 的NK细胞的方法和组合物。本公开内容包括杀死患有胶质母细胞瘤的个体中的胶质母细胞瘤干细胞的方法,包括向个体施用有效量的NK细胞,所述NK细胞经工程化以表达一种或多种外源提供的IL和/或已在一种或多种IL的存在下培养。在一些实施方案中,胶质母细胞瘤干细胞被表达一种或多种工程化受体的NK细胞杀死,并且工程化受体可以或不靶向在胶质母细胞瘤干细胞上表达的一种或多种抗原。在某些情况下,胶质母细胞瘤干细胞被NK细胞杀死,这些NK细胞已被工程化以表达一种或多种工程化受体,已被工程化以表达一种或多种外源细胞因子,和/或已在一种或多种IL的存在下培养。

[0009] 本公开内容的实施方案包括包含任何种类的免疫效应细胞(包括天然杀伤(NK)细胞)的组合物,所述细胞包含一种或多种外源提供的IL,任选地其中IL不是IL-15,并且其中所述细胞包含一种或更多工程化受体。在特定实施方案中,IL选自IL-12、IL-21、IL-2、IL-15、IL-18、IL-7及其组合。在特定情况下,IL是IL-12、IL-21或两者。在本公开内容的任何实施方案中,IL可以是分泌的、栓系或膜结合在细胞中。如本文所用,“外源提供的”可进一步定义为从细胞中的载体表达和/或其中细胞外部暴露于一种或多种IL。

[0010] 在特定实施方案中,本公开内容的细胞中使用的工程化受体是工程化抗原受体,例如嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)。抗原可以是癌症抗原,包括实体瘤抗原,或者它可以是与病原体相关的抗原。在抗原是癌抗原的情况下,具体实例包括选自以下的抗原: 5T4、8H9、 $\alpha_v\beta_6$ 整联蛋白、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CA9、CD5、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD123、CD138、CD171、CEA、CSPG4、CS1、CLL1、CD99、DLL3、EGFR、EGFR家族,包括ErbB2(HER2)、EGFRvIII、EGP2、EGP40、ERBB3、ERBB4、ErbB3/4、EPCAM、EphA2、EpCAM、FAP、FBP、胎儿AchR、FR α 、GD2、GD3、Glypican-3(GPC3)、HLA-A1+MAGE1、HLA-A1+NY-ESO-1、IL-11R α 、IL-13R α 2、Lambda、Lewis-Y、L1CAM、Kappa、KDR、MCSP、间皮素、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2D配体、NY-ESO-1、PRAME、PSC1、PSCA、PSMA、ROR1、SP17、生存素、TAG72、TEM、HMW-MAA、VEGFR2及其组合。在一些实施方案中,工程化受体是细胞因子受体、趋化因子受体或归巢受体,或者细胞可以具有这些的组合。

[0011] 在特定实施方案中,本公开内容的细胞是包含自杀基因的细胞,包括NK细胞。在一些情况下,细胞的一种或多种内源基因的表达被降低或抑制,所述内源基因选自TDAG8、NKG2A、SIGLEC-7、LAG3、TIM3、CISH、FOXO1、TGFB β 2、TIGIT、CD96、ADORA2、NR3C1、PD1、PDL-1、PDL-2、CD47、SIRPA、SHIP1、ADAM17、RPS6、4EBP1、CD25、CD40、IL21R、ICAM1、CD95、CD80、CD86、IL10R、CD5、CD7及其组合。

[0012] 本公开内容的实施方案包括本文涵盖的任何细胞群。

[0013] 在一个实施方案中,存在治疗个体的癌症的方法,包括施用治疗有效量的本文涵盖的任何组合物的步骤。在某些情况下,个体中的癌细胞具有增加的NK配体(例如MICA/B、ULBP1、ULBP2/5、ULBP3、B7-H6、CD112、CD155、HLA-ABC、HLA-DR、HLA-3,或其组合)表达。工程化的NK细胞可以表达一种或多种工程化的抗原受体,其靶向一种或多种这些NK配体,或者可以靶向其他靶标。可以通过颅内、通过注射、静脉内、动脉内、腹膜内、气管内、瘤内、肌肉内、内窥镜下、病灶内、颅内、经皮、皮下、局部地、通过灌注、在肿瘤微环境中或其组合来向个体提供组合物。

[0014] 对于癌症治疗,癌症可以是实体瘤或不是实体瘤。癌症可以是肺癌、脑癌、乳腺癌、血液癌、皮肤癌、胰腺癌、肝癌、结肠癌、头颈癌、肾癌、甲状腺癌、胃癌、脾癌、胆囊癌、骨癌、卵巢癌、睾丸癌、子宫内膜癌、前列腺癌、直肠癌、肛门癌、子宫颈癌或是血液学的癌症。在特定情况下,癌症是胶质母细胞瘤。

[0015] 在本公开内容的治疗方法实施方案中,个体可以是哺乳动物,例如人、狗、猫、马、牛、羊、猪或啮齿动物。可以向个体施用一种或多种另外的癌症疗法,包括手术、放射、化学疗法、激素疗法、免疫疗法或其组合。在一些实施方案中,本公开内容的任何方法还包括诊断个体的癌症的步骤。在一些实施例中,本发明的任何方法进一步包括产生细胞的步骤。本文使用的任何细胞对于个体而言可以是自体的或同种异体的。

[0016] 前面已经相当广泛地概述了本公开内容的特征和技术优点,以便可以更好地理解以下的详细描述。下文将描述形成本文权利要求的主题的附加特征和优点。本领域技术人员应当理解,所公开的概念和具体实施方案可以容易地用作修改或设计其他结构以实现本设计的相同目的的基础。本领域技术人员还应该认识到,这样的等效结构不背离所附权利要求中阐述的精神和范围。当结合附图考虑时,从以下描述中将更好地理解被认为是本文所公开的设计特征的新颖特征,包括关于操作的组织和方法以及进一步的优点和优点。然而,应明确理解,提供每幅图仅用于说明和描述的目的,并不旨在作为对本公开内容的限制的定义。

[0017] 附图的简要说明

[0018] 为了更完整地理解本发明,现结合附图参考以下描述,其中:

[0019] 图1A和1B。胶质母细胞瘤干细胞 (GSC) 而非星形胶质细胞对NK介导的裂解高度敏感。(图1A) NK细胞与Cr51标记的GSC以不同的比率共培养4小时并测量Cr51释放 (n=4)。(图1B) NK配体在GSC和星形胶质细胞上的表达。

[0020] 图2。掺入细胞因子基因的逆转录病毒载体的实例的示意图。hIL-12p40linkerp35是人IL-12,其中p35和p40亚基通过接头人工连接在一起。

[0021] 图3A和3B。患者来源的胶质母细胞瘤干细胞系 (GSC) 的球状培养物作为3-D肿瘤培养模型 (图3A) 和细胞因子转导的CB-NK细胞对GSC靶标的细胞毒性 (图3B)。与未转导的CB-NK (黑线 (底部)) 相比,IL-12、IL-21或IL-21转导的NK细胞 (红色 (顶部线)、绿色 (顶部第三个) 和蓝色 (顶部第二个) 线) 对GSC具有出色的细胞毒性,如**Incucyte®**实时成像所示。通过半胱天冬酶3/7绿色信号测量凋亡细胞。

[0022] 图4A-4C。在FFluc转导的GSC的患者来源的异种移植物 (PDX) 模型中,非转导的 (NT) 相对IL12和IL21转导的NK细胞的比较。如生物发光成像 (图4A-4B) 所示,以 1×10^5 个细胞的剂量输注IL-12或IL21转导的NK细胞根除了肿瘤,并导致动物的长期治愈 (图4C)。

[0023] 详细描述

[0024] I. 定义举例

[0025] 按照长期存在的专利法惯例,词语“一个”和“一种”与单词包含在本说明书 (包括权利要求) 中一起使用时,表示“一个或多个/一种或多种”。本公开内容的一些实施方案可以由或基本上由本公开内容的一个或多个元件、方法步骤和/或方法组成。预期本文描述的任何方法或组合物可以相对于本文描述的任何其他方法或组合物来实施,并且可以组合不同的实施方案。

[0026] 在整个本说明书中,除非上下文另有要求,否则词语“包括”、“包含”和“含有”将被理解为暗示包含陈述的步骤或元素或一组步骤或元素,但不排除任何其他步骤或元素或一组步骤或元素。“由...组成”是指包括并限于“由...组成”这一短语之后的任何内容。因此,短语“由...组成”表示列出的元素是必需的或强制性的,并且可能不存在其他元素。“基本上由...组成”是指包括在该短语之后列出的任何元素,并且限于不干扰或有助于在公开内容中为列出的元素指定的活动或作用的其他元素。因此,短语“基本上由...组成”表示所列元素是必需的或强制性的,但没有其他元素是任选的,并且可能存在或可能不存在,这取决于它们是否影响所列元素的活动或作用。

[0027] 在整个本说明书中,提及“一个实施方案”、“实施方案”、“特定实施方案”、“相关实

施方案”、“某个实施方案”、“额外的实施方案”或“另一个实施方案”或其组合意味着结合实施方案描述的特定特征、结构或特征包括在本发明的至少一个实施方案中。因此,前述短语在整个本说明书的各个地方的出现不一定都指相同的实施方案。此外,在一个或多个实施方案中,可以以任何合适的方式组合特定特征、结构或特征。

[0028] 如本文所用,术语“或”和“和/或”用于描述组合或相互排斥的多个组分。例如,“x、y和/或z”可以指单独的“x”、单独的“y”、单独的“z”、“x、y和z”、“(x和y)或z”、“x或(y和z)”或“x或y或z”。具体地设想,x、y或z可以被具体地从实施方案中排除。

[0029] 在整个本申请中,术语“约”根据其在细胞和分子生物学领域中的简单和普通含义使用以表示值包括用于确定该值的装置或方法的误差的标准偏差。

[0030] 如本文所用,术语“工程化”是指人工产生的实体,包括细胞、核酸、多肽、载体等。在至少一些情况下,工程化实体是合成的,并且包括不天然存在或不以其在本公开内容中使用的方式配置的元件。

[0031] 如本文所用,术语“外源的”是指在哺乳动物细胞例如免疫细胞中非内源存在或在哺乳动物细胞之外合成产生(例如通过重组技术)的多核苷酸(例如编码基因产物或基因产物的一部分的多核苷酸)。在特定情况下,可以将特定基因产物外源地提供给细胞,并且该细胞可以或可以不还在细胞中表达相应的内源基因产物。

[0032] 如本文所用,“预防”和诸如“预防”、“防止”等的类似词语表示用于预防、抑制或降低疾病或病况(例如,癌症)发生或复发的可能性的方法。它还指延迟疾病或病况的发作或复发或延迟疾病或病况的症状的发生或复发。如本文所用,“预防”和类似词语还包括在疾病或病况发作或复发之前降低疾病或病况的强度、效果、症状和/或负担。

[0033] 如本文所用的术语“受试者”或“个体”是可互换的并且通常是指需要治疗医学病况的个体。在特定情况下,个体患有或怀疑患有癌症。受试者可以是作为方法或材料的对象的任何有机体或动物受试者,包括哺乳动物,例如人、实验动物(例如灵长类动物、大鼠、小鼠、兔)、家畜(例如牛、绵羊、山羊、猪、火鸡和鸡)、家庭宠物(例如狗、猫和啮齿动物)、马和转基因非人动物。受试者可以是患者,例如患有或怀疑患有疾病(可称为医学病况),例如良性或恶性肿瘤形成或癌症。受试者可能正在接受或已经接受治疗。受试者可能是无症状的。受试者可以是健康个体,但希望预防癌症。如本文所用,“受试者”或“个体”可能或可能不被安置在医疗机构中,并且可以被视为医疗机构的门诊患者。个体可能正在通过互联网接收一种或多种医学组合物。个体可以包括任何年龄的人或非人动物,因此包括成人和青少年(即儿童)和婴儿,并且包括子宫内的个体。预期该术语并不意味着需要医学治疗,因此,个体可能自愿或非自愿地是实验的一部分,无论是临床实验或支持基础科学研究。在替代情况下,受试者或个体需要病原体治疗。

[0034] 如本文所用,“治疗”或“医治”包括对疾病或病理状况的症状或病理学的任何有益或期望的效果,并且可以包括对正在治疗的疾病或病况例如癌症的一种或多种可测量标志物的甚至最小程度的降低。治疗可以任选地包括减少或改善疾病或病况的一种或多种症状,或延迟疾病或病况的发作或进展。治疗不一定表示完全根除或治愈疾病或病况或其相关症状。治疗可包括减轻医学病况的一种或多种症状的严重程度。

[0035] 本公开内容的实施方案利用免疫效应细胞,例如NK细胞,用于任何种类的癌症(包括胶质母细胞瘤)的免疫疗法。在特定实施方案中,免疫效应细胞是NK细胞。NK细胞适合作

为针对高度异质性肿瘤(如GBM)的治疗效应物,因为与T和B淋巴细胞不同,它们不具有重排的V(D)J受体,并且不受主要组织相容性复合物(MHC)结合抗原呈递的限制。相反,它们的效应功能取决于通过种系编码受体接收的信号的综合,这些受体可以识别癌症靶标上的多个配体,而无需特定的抗原特异性或共刺激要求。

[0036] NK细胞包括浸润胶质母细胞瘤(GBM)的最丰富的淋巴亚群之一,支持NK细胞在该疾病的免疫监视中的作用。此外,本文显示,GBM干细胞(GSC),而非正常星形胶质细胞,表达许多被NK激活受体识别的配体,例如MHC链相关抗原(MICA/B)和UL16结合蛋白(ULBP)-被NKG2D和CD155(被DNAM识别)识别,GSC对体外同种异体健康NK细胞的裂解高度敏感(图1A)。因此,对于GBM,NK细胞免疫疗法相对于CAR T细胞的一个主要优势是它们通过其种系编码受体靶向GSC上的多种抗原的内在能力,而无需使用CAR靶向特定抗原。NK细胞的这种特性可能克服与在CAR T细胞治疗中观察到的抗原逃逸和肿瘤异质性相关的挑战,包括在GBM中。本公开内容允许通过将NK细胞暴露于一种或多种外源细胞因子例如IL-2、IL-12、IL-21、IL-7或IL-18和/或工程化它们以表达一种或多种细胞因子基因以帮助它们的效应功能、持久性和运输来进一步改善NK细胞针对GBM的活性。NK细胞可以被进一步修饰以特异性靶向胶质母细胞瘤细胞,包括通过利用靶向胶质母细胞瘤细胞上的抗原的工程化抗原受体。

[0037] 本公开内容的具体实施方案包括将同种异体NK细胞与一种或多种外源细胞因子和/或经遗传工程化以在其表面上分泌或表达一种或多种细胞因子的NK细胞组合使用。此类细胞可用于现成的疗法,其降低成本并将该疗法扩展到许多患者。

[0038] II. 细胞因子

[0039] 本公开内容的实施方案包括已在外部(例如包括在培养物中)暴露于一种或多种细胞因子的免疫效应细胞和/或已用表达一种或多种细胞因子的载体转染的细胞。尽管细胞因子可以是任何种类,但在具体实施方案中,细胞因子是IL-2、IL-12、IL-15、IL-21、IL-7或IL-18。然而,在特定实施方案中,细胞因子不是IL-15。

[0040] 在特定实施方案中,从细胞中的载体表达的一种或多种外源提供的细胞因子是膜结合的。任何细胞因子都可以是膜结合的并在NK细胞的表面上表达,因为细胞因子可以异源地附着于任何种类的膜附着分子的跨膜结构域,例如B7-1、CD40、CD28、CD8、GM-CSF受体、IgG1或IgG4。

[0041] 在一些情况下,一种或多种细胞因子存在于与另一种基因产物(例如工程化受体)相同的载体分子上,尽管在其他情况下它们在不同的分子上。在特定实施方案中,一种或多种细胞因子与一种或多种工程化受体从相同载体共表达。一种或多种细胞因子可以作为与抗原特异性受体分离的多肽产生。在特定情况下,细胞因子诱导NK细胞的发育和细胞增殖,通过减轻肿瘤驻留细胞的功能抑制来促进已建立的肿瘤的根除,和/或抑制活化诱导的细胞死亡。设想了其他细胞因子。这些包括但不限于有助于用于人应用的细胞的活化和增殖的趋化因子和其他分子。

[0042] 在具体实施方案中,NK细胞表达一种或多种外源提供的细胞因子。细胞因子可以外源地提供给细胞,因为它从饲养细胞内的表达载体表达的,或者可以直接添加到NK细胞培养物中。在另一种情况下,细胞中的内源性细胞因子在对内源性细胞因子的表达进行调控(例如在细胞因子的启动子位点进行基因重组)时被上调。在细胞因子在表达构建体上

提供给细胞的情况下,细胞因子可以由与表达另一种基因产物如自杀基因的载体相同的载体编码。细胞因子可以表达为与自杀基因分开的多肽分子和表达为与细胞的工程化受体分开的多肽。在一些实施方案中,本公开内容涉及CAR和/或TCR载体与不是IL-15的细胞因子的共同使用。

[0043] III. 免疫效应细胞

[0044] 本公开内容涵盖具有一种或多种外源提供的白细胞介素的任何类型的免疫效应细胞,其中白细胞介素不是IL-15,并且任选地其中所述细胞包含一种或多种工程化受体和/或其他异源基因产物。在具体实施方案中,外源提供给细胞的IL是人工故意操纵细胞的直接或间接结果。无论细胞是否外部暴露于一种或多种细胞因子(例如,在培养物中)和/或细胞是否已被转染以表达来自载体的一种或多种IL(其可能已整合或未整合到细胞基因组中),情况都是如此。以这种方式对免疫效应细胞的操作可以通过任何机制进行。免疫效应细胞可以是NK细胞、T细胞、T调节细胞、iNKT细胞、B细胞、MSC等。

[0045] 在其中免疫效应细胞具有一种或多种外源提供的白细胞介素的情况下,细胞可能已经通过在包含一种或多种细胞因子的培养基中培养的过程而外部暴露于一种或多种细胞因子。培养基中细胞因子的浓度范围可以是例如0.1ng至1000ng;0.1ng至750ng;0.1ng至500ng;0.1至250ng;0.1至100ng;0.1至75ng;0.1至50ng;0.1至25ng;0.1至10ng;等等。培养基中细胞因子的浓度范围可以是例如1个单位到5000个单位;1个单位至4000个单位;1个单位到3000个单位;1个单位至2000个单位;1个单位到1000个单位;1个单位至750个单位;1个单位至500个单位;1个单位至250个单位;1个单位至100个单位;1个单位至75个单位;1个单位至50个单位;1个单位至25个单位;等等。在一些情况下,细胞因子在培养细胞的整个时间内都在培养基中,而在其他情况下,细胞因子在培养的稍后时间点被添加到培养物中。细胞因子可以在第一次、第二次、第三次、第四次或以后的传代或它们的组合存在于培养基中。

[0046] 本公开内容涵盖任何种类的免疫效应细胞,包括常规T细胞、 γ - δ T细胞、NK细胞、NK T细胞、不变NK T细胞、调节性T细胞、巨噬细胞、B细胞、树突细胞、肿瘤-浸润性淋巴细胞或其混合物。对于个体,包括需要细胞的个体,例如患有癌症的个体,细胞可以是同种异体的、自体的或异种的。

[0047] 在特定的实施方案中,免疫效应细胞被人工修饰以表达或以其他方式产生一种或多种细胞因子,并且这些不是细胞中的内源性细胞因子,例如是重组的。可以以另外的方式修饰免疫效应细胞,例如通过表达另外的异源蛋白质,例如工程化受体、自杀基因、它们的组合等。还可以修饰细胞以具有一种或多种内源基因的降低或抑制的表达。

[0048] 当免疫效应细胞已经以多于一种方式被修饰时,免疫效应细胞被修饰的顺序可以是任何种类的。例如,表达外源提供的细胞因子(和/或在外部暴露于一种或多种细胞因子,例如在培养物中)的免疫效应细胞可以用一种或多种工程化受体转染。在其他情况下,表达一种或多种工程化受体的免疫效应细胞可以用外源提供的细胞因子转染和/或暴露于培养物中的一种或多种细胞因子。

[0049] 在特定实施方案中,包含一种或多种外源提供的不是IL-15的IL的免疫效应细胞是被修饰以表达工程化受体例如抗原受体的相同细胞。本公开内容涵盖的任何免疫效应细胞表达可以是任何种类的抗原受体,包括针对抗原的受体,该抗原是癌症抗原,其也可以是实体瘤抗原。例如,在特定实施方案中,受体是嵌合抗原受体或T细胞受体。免疫效应细胞可

以专门设计为包含一种或多种外源提供的IL,并且也可以专门设计为表达抗原受体,其靶向个体中癌细胞上的抗原。即,细胞可以被调整为包括一种或多种抗原受体,这些抗原受体靶向已知存在于个体癌细胞上的抗原。

[0050] 在特定实施方案中,生产本公开内容的细胞以用作现成的细胞。例如,包含一种或多种外源提供的IL的细胞可以存在于例如储存库中,并且它们可以从储存库中获得并被工程化以具有除了表达外源提供的细胞因子之外的进一步修饰。在其他情况下,具有除表达外源提供的细胞因子以外的修饰的细胞获自储存库并被工程化以表达一种或多种外源提供的细胞因子。在从储存库获得细胞后对细胞进行此类修饰后,可以储存细胞,或将有效量的细胞提供给需要的个体。

[0051] 任何免疫效应细胞可以从任何形式的储存库中获得,例如从低温保存的储存库中获得,并且可以被进一步修饰。可以将细胞储存为具有表达一种或多种细胞因子的表达构建体,然后获得和修饰其以表达特定的一种或多种工程化的感兴趣的抗原受体,例如被工程化以靶向对于有需要的个体针对特定癌症定制的抗原的受体。细胞可以储存为具有表达一种或多种工程化的感兴趣的抗原受体的表达构建体,例如靶向特定癌症的抗原的受体,然后对它们进行修饰以表达需要的一种或多种外源细胞因子。在储存之前或之后,可以修饰细胞以包含自杀基因,并且在某些情况下,自杀基因从与相应的细胞因子或工程化抗原受体相同的载体表达。

[0052] 在特定实施方案中,免疫效应细胞包含一种或多种外源提供的IL并且还表达一种或多种工程化抗原靶向受体和/或表达至少一种自杀基因。在某些情况下,对于包含一种或多种外源提供的IL的细胞,不同的载体编码抗原靶向受体相对编码自杀基因和/或外源细胞因子。在其他情况下,它们(或子集)在同一个载体上。免疫效应细胞,包括NK细胞,可以来源于任何合适的来源,例如脐带血、外周血、诱导多能干细胞(iPSC)、造血干细胞(HSC)、骨髓或其混合物。NK细胞可以来源于细胞系,例如但不限于NK-92细胞。NK细胞可以是脐带血单核细胞,例如CD56+NK细胞。

[0053] 在一些情况下,包含一种或多种外源提供的IL的免疫效应细胞(包括NK细胞)已经在有效量的通用抗原呈递细胞(UAPC)的存在下(包括以任何合适的比例)扩增。细胞可以与UAPC以10:1至1:10;9:1至1:9;8:1至1:8;7:1至1:7;6:1至1:6;5:1至1:5;4:1至1:4;3:1至1:3;2:1至1:2;或1:1,例如1:2的比例培养。在一些情况下,NK细胞在IL-2的存在下(例如浓度为10-500、10-400、10-300、10-200、10-100、10-50、100-500、100-400、100-300、100-200、200-500、200-400、200-300、300-500、300-400或400-500U/mL)扩增。

[0054] 在用任何载体进行基因修饰后,包含一种或多种外源提供的IL的免疫效应细胞可立即递送至个体或可被储存(或将一些细胞递送至个体,其余细胞被储存)。在某些方面,遗传修饰后,细胞可以在基因转移到细胞后约1、2、3、4、5天或更长时间内作为大量群体离体繁殖数天、数周或数月。在另一方面,克隆转染子并且离体扩增证明存在单个整合或附加体维持的表达盒或质粒的克隆。选择用于扩增的克隆表现出一种或多种外源提供的细胞因子的表达。重组免疫细胞可以通过用IL-2或结合共同 γ 链的其他细胞因子(例如IL-7、IL-12、IL-15、IL-21等)刺激来扩增。可以通过用人工抗原呈递细胞刺激来扩增重组免疫细胞。在另一方面,任何遗传修饰的细胞都可以被冷冻保存。

[0055] 本公开内容的实施方案涵盖免疫效应细胞,其包含一种或多种外源提供的IL和一

种或多种工程化受体,包括一种或多种抗原受体。一种或多种工程化抗原受体通过人工产生,例如使用重组技术,并且对于免疫效应细胞而言不是天然的。尽管工程化受体可以是任何种类,但在具体实施方案中,受体是嵌合抗原受体、T细胞受体、归巢受体、成簇的规则间隔短回文重复序列(CRISPR)/Cas9介导的基因突变、诱饵受体、细胞因子受体、嵌合细胞因子受体、它们的组合等。

[0056] 本公开内容的实施方案涵盖包含一种或多种外源提供的IL和一种或多种自杀基因的细胞。免疫效应细胞可以包含一种或多种外源提供的IL并且可以包含编码任何种类的自杀基因的重组核酸。自杀基因的实例包括工程化的不可分泌的(包括膜结合的)肿瘤坏死因子(TNF)- α 突变多肽(见PCT/US19/62009,其通过引用整体并入本文),并且它们可通过递送结合TNF- α 突变体的抗体而被影响。可以使用的自杀基因/前药组合的实例是单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-tk)和更昔洛韦、阿昔洛韦或FIAU;氧化还原酶和放线菌酮;胞嘧啶脱氨酶和5-氟胞嘧啶;胸苷激酶胸苷酸激酶(thymidine kinase thymidilate kinase)(Tdk::Tmk)和AZT;和脱氧胞苷激酶和胞嘧啶阿拉伯糖苷。可以使用大肠杆菌嘌呤核苷磷酸化酶,一种所谓的自杀基因,其将前药6-甲基嘌呤脱氧核糖核苷转化为毒性的嘌呤6-甲基嘌呤。另外的自杀基因包括例如CD20、CD52、诱导型半胱天冬酶9、嘌呤核苷磷酸化酶(PNP)、细胞色素p450酶(CYP)、羧肽酶(CP)、羧酸酯酶(CE)、硝基还原酶(NTR)、鸟嘌呤核糖基转移酶(XGRTF)、糖苷酶、蛋氨酸- α 、 γ -裂解酶(MET)和胸苷磷酸化酶(TP)。

[0057] 细胞可以直接从个体获得或者可以从储存库或其他储存设施获得。作为治疗的细胞对于接受细胞作为治疗的个体而言可以是自体的或同种异体的。

[0058] 细胞可以来自需要治疗医学病况的个体,并且在对其进行操作以包含一种或多种外源提供的IL、任选的自杀基因、任选的细胞因子和任选的受体(使用例如用于过继细胞疗法的转导和扩增的标准技术)后,它们可能被提供给它们最初来源于的个体。在某些情况下,这些细胞被储存起来用于个体或另一个体的以后使用。

[0059] 免疫细胞可以包含在细胞群中,并且该细胞群可以具有包含一种或多种外源提供的IL和/或一种或多种自杀基因和/或一种或多种细胞因子的大部分细胞。细胞群可包含51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%的包含一种或多种外源提供的IL和/或一种或多种自杀基因和/或一种或多种工程化受体的免疫细胞;这些基因产物中的每一种可以或可以不作为单独的多肽产生。

[0060] 可以产生免疫细胞以包含一种或多种外源提供的IL和/或一种或多种自杀基因和/或一种或多种细胞因子,以就特定目的而言是模块化的。例如,可以产生包含一种或多种外源提供的IL和/或一种或多种自杀基因(或与编码自杀基因的核酸一起用于随后转导)的细胞,包括用于商业分销,并且用户可以修饰它们以表达一种或多种其他感兴趣的基因(包括治疗基因),这取决于它们的预期目的。例如,对治疗癌细胞感兴趣的个体可以获得或产生自杀基因表达细胞(或异源细胞因子表达细胞)并将它们修饰为包含一种或多种外源提供的IL,反之亦然。

[0061] 在特定实施方案中,使用NK细胞,并且可以修饰包含一种或多种外源提供的IL和/或一种或多种自杀基因和/或一种或多种工程化受体的NK细胞的基因组。可以以任何方式修饰基因组,但在具体实施方案中,例如通过CRISPR基因编辑来修饰基因组。可以对细胞的

基因组进行修饰以增强细胞用于任何目的的有效性。在特定情况下,通过抑制一种或多种基因的表达来进一步修饰细胞。在某些情况下,经过编辑的基因允许细胞在肿瘤微环境中更有效地工作。具体情况下,基因为TDAG8、NKG2A、SIGLEC-7、LAG3、TIM3、CISH、FOXO1、TGFB2、TIGIT、CD96、ADORA2、NR3C1、PD1、PDL-1、PDL-2、CD47、SIRPA、SHIP1、ADAM17、RPS6、4EBP1、CD25、CD40、IL21R、ICAM1、CD95、CD80、CD86、IL10R、CD5和CD7中的一种或多种。在具体实施方案中,这些基因中的一种或多种在细胞中被敲除或敲低。

[0062] 在细胞被基因编辑以敲除或敲低一种或多种基因的表达的情况下,可以以任何合适的方式进行这种基因编辑。在一些实施方案中,细胞中的任何基因编辑使用一种或多种DNA结合核酸进行,例如通过RNA引导的核酸内切酶(RGEN)进行改变。例如,可以使用CRISPR和CRISPR相关(Cas)蛋白进行改变;在一些实施方案中,使用CpF1代替Cas9。通常,“CRISPR系统”总体地指CRISPR相关(“Cas”)基因的表达或指导CRISPR相关(“Cas”)基因的活性有关的转录物和其他元件,包括编码Cas基因的序列、tracr(反式激活CRISPR)序列(例如, tracrRNA或活性部分tracrRNA)、tracr配对序列(在内源CRISPR系统的背景下包含“直接重复序列”和tracrRNA处理的部分直接重复序列)、指导序列(在内源CRISPR系统的背景下也称为“间隔子”)和/或来自CRISPR基因座的其他序列和转录物。

[0063] CRISPR/Cas核酸酶或CRISPR/Cas核酸酶系统可包括非编码RNA分子(指导)RNA(其序列特异性结合DNA)和具有核酸酶功能(例如,两个核酸酶结构域)的Cas蛋白(例如, Cas9)。CRISPR系统的一个或多个元件可以来源于I型、II型或III型CRISPR系统,例如来源于包含内源性CRISPR系统的特定生物,例如化脓链球菌。

[0064] 在一些方面,将Cas核酸酶和gRNA(包括对靶序列特异的crRNA和固定的tracrRNA的融合体)引入细胞中。通常,使用互补碱基配对,在gRNA的5'末端的靶位点将Cas核酸酶靶向至靶位点,例如基因。靶位点可以基于其紧邻前间区序列邻近基序(PAM)序列的5'的位置(例如,通常为NGG或NAG)进行选择。在这方面,通过修饰指导RNA的前20、19、18、17、16、15、14、14、12、11或10个核苷酸来将gRNA靶向至所需序列以对应于靶DNA序列。通常,CRISPR系统的特征在于促进靶序列位点处的CRISPR复合物形成的元件。通常,“靶序列”通常是指指导序列被设计成与其具有互补性的序列,其中靶序列和指导序列之间的杂交促进CRISPR复合物的形成。如果存在足够的互补性以引起杂交并促进CRISPR复合物的形成,则不一定需要完全互补。

[0065] CRISPR系统可以在靶位点诱导双链断裂(DSB),随后引起如本文所讨论的破坏或改变。在其他实施方案中,被认为是“切口酶”的Cas9变体用于在靶位点处对单链切口。可以使用成对的切口酶,例如以改善特异性,其各自由不同gRNA靶向序列对指导,使得在同时引入切口时,引入5'突出端。在其他实施方案中,将无催化活性的Cas9融合至异源效应子结构域,例如转录阻遏物或激活子,以影响基因表达。

[0066] 靶序列可以包含任何多核苷酸,例如DNA或RNA多核苷酸。靶序列可以位于细胞的核或细胞质中,例如在细胞的细胞器内。通常,可用于重组为包含靶序列的靶基因座的序列或模板称为“编辑模板”或“编辑多核苷酸”或“编辑序列”。在一些方面,外源模板多核苷酸可以被称为编辑模板。在一些方面,重组是同源重组。

[0067] 通常,在内源性CRISPR系统的情况下,CRISPR复合物(包含与靶序列杂交并与一种或多种Cas蛋白复合的指导序列)的形成导致在靶序列中或其附近(例如,在距靶序列的1、

2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50个或更多个碱基对内)的一条或两条链的切割。tracr序列(其可以包含野生型tracr序列的全部或一部分或由其组成(例如,野生型tracr序列的约或大于约20、26、32、45、48、54、63、67、85个或更多个核苷酸)也可以形成CRISPR复合物的一部分,例如通过沿着tracr序列的至少一部分与可操作地连接至指导序列的tracr配对序列的全部或部分杂交。tracr序列与tracr配对序列具有足够的互补性,以杂交并参与CRISPR复合物的形成,例如当最佳匹配时沿tracr配对序列的长度至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%的序列互补性。

[0068] 可以将驱动CRISPR系统的一种或多种元件的表达的一种或多种载体引入细胞,使得CRISPR系统的元件的表达指导在一个或多个靶位点形成CRISPR复合物。组分也可以作为蛋白质和/或RNA递送到细胞。例如,Cas酶、连接至tracr-配对序列的指导序列和tracr序列可各自可操作地连接至单独载体上的单独调控元件。可替代地,可以将从相同或不同调控元件表达的两个或更多个元件组合在单个载体中,而一个或多个附加载体提供不包含在第一载体中的CRISPR系统的任何组分。载体可以包含一个或多个插入位点,例如限制性内切核酸酶识别序列(也称为“克隆位点”)。在一些实施方案中,一个或多个插入位点位于一个或多个载体的一个或多个序列元件的上游和/或下游。当使用多个不同的指导序列时,单个表达构建体可以用于将CRISPR活性靶向至细胞内的多个不同的相应靶序列。

[0069] 载体可以包含与编码CRISPR酶(例如Cas蛋白)的酶编码序列可操作地连接的调节元件。Cas蛋白的非限制性实例包括Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9(也称为Csn1和Csx12)、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4、其同源物或其修饰形式。这些酶是已知的;例如,化脓链球菌Cas9蛋白的氨基酸序列可以在SwissProt数据库中以登录号Q99ZW2找到。

[0070] CRISPR酶可以是Cas9(例如,来自化脓性链球菌或肺炎链球菌)。在某些情况下,CpF1可用作核酸内切酶而不是Cas9。CRISPR酶可以指导一条或两条链的在靶序列位置处的切割,例如在靶序列内和/或在靶序列的互补序列内。载体可以编码相对于相应的野生型酶被突变的CRISPR酶,使得突变的CRISPR酶缺乏切割含有靶序列的靶多核苷酸的一条或两条链的能力。例如,来自化脓链球菌的Cas9的RuvC I催化结构域中的天冬氨酸至丙氨酸置换(D10A)将Cas9从切割两条链的核酸酶转化成切口酶(切割单链)。在一些实施方案中,Cas9切口酶可以与一个或多个指导序列(例如两个指导序列(其分别靶向DNA靶标的有义链和反义链))组合使用。这种组合允许两条链都被切口并用于诱导NHEJ或HDR。

[0071] 在一些实施方案中,对编码CRISPR酶的酶编码序列进行密码子优化以在特定细胞(例如真核细胞)中表达。真核细胞可以是特定生物(例如哺乳动物,包括但不限于人,小鼠,大鼠,兔,狗或非人灵长类)的真核细胞或来源于该特定生物的真核细胞。一般而言,密码子优化是指通过用在宿主细胞的基因中更频繁或最频繁使用的密码子替换天然序列的至少一个密码子同时保持天然氨基酸序列来修饰核酸序列以在感兴趣的宿主细胞中增强表达的过程。各种物种对特定氨基酸的某些密码子表现出特定的偏倚。密码子偏倚(生物之间密码子使用的差异)通常与信使RNA(mRNA)的翻译效率相关,其进而被认为取决于(除其他以外)翻译的密码子的性质和特定转移RNA(tRNA)分子的可用性。所选tRNA在细胞中的优势通

常反映了肽合成中最常使用的密码子。因此,可以基于密码子优化针对在给定生物中的最佳基因表达定制基因。

[0072] 一般而言,指导序列是与靶多核苷酸序列具有足够互补性以与靶序列杂交并指导CRISPR复合物与靶序列的序列特异性结合的任何多核苷酸序列。在一些实施方案中,当使用合适的比对算法进行最佳比对时,指导序列与其相应的靶序列之间的互补程度为约或大于约50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%或更高。

[0073] 可以使用任何合适的用于比对序列的算法来确定最佳比对,算法的非限制性示例包括Smith-Waterman算法,Needleman-Wunsch算法,基于Burrows-Wheeler变换的算法(例如Burrows Wheeler Aligner),Clustal W,Clustal X,BLAT,Novoalign(Novocraft Technologies,ELAND(Illumina, San Diego, Calif.),SOAP(可在soap.genomics.org.cn上获得)和Maq(可在maq.sourceforge.net上获得)。

[0074] CRISPR酶可以是包含一个或多个异源蛋白质结构域的融合蛋白的一部分。CRISPR酶融合蛋白可包含任何其他蛋白序列,以及任选地任何两个结构域之间的接头序列。可以与CRISPR酶融合的蛋白质结构域的实例包括但不限于表位标签,报告基因序列和具有以下一种或多种活性的蛋白结构域:甲基化酶活性,脱甲基酶活性,转录激活活性,转录抑制活性,转录释放因子活性,组蛋白修饰活性,RNA切割活性和核酸结合活性。表位标签的非限制性实例包括组氨酸(His)标签,V5标签,FLAG标签,流感血凝素(HA)标签,Myc标签,VSV-G标签和硫氧还蛋白(Trx)标签。报告基因的实例包括但不限于谷胱甘肽-S-转移酶(GST),辣根过氧化物酶(HRP),氯霉素乙酰转移酶(CAT), β 半乳糖苷酶, β -葡萄糖醛酸苷酶,荧光素酶,绿色荧光蛋白(GFP),HcRed,DsRed,青色荧光蛋白(CFP),黄色荧光蛋白(YFP)和自发荧光蛋白包括蓝色荧光蛋白(BFP)。CRISPR酶可以与编码结合DNA分子或结合其他细胞分子的蛋白质或蛋白质片段的基因序列融合,包括但不限于麦芽糖结合蛋白(MBP),S-标签,Lex A DNA结合结构域(DBD)融合,GAL4A DNA结合结构域融合体和单纯疱疹病毒(HSV)BP16蛋白融合体。可以形成包含CRISPR酶的融合蛋白的一部分的其他结构域在US 20110059502中描述,其通过引用并入本文。

[0075] IV. 治疗方法

[0076] 本公开内容的实施方案包括例如与癌症免疫疗法、抗病原体免疫疗法、自身免疫或同种免疫相关的治疗方法。在特定情况下,癌症免疫疗法和抗病原体免疫疗法至少包括包含免疫效应细胞的组合物,所述免疫效应细胞包含一种或多种外源提供的白细胞介素。该方法包括向患有癌症和/或病原体的个体提供有效量的包含一种或多种外源提供的白细胞介素的免疫效应细胞。

[0077] 在特定情况下,向个体提供有效量的包含一种或多种外源提供的白细胞介素的细胞。在特定情况下,细胞还表达一种或多种工程化抗原受体。在特定情况下,还使用CRISPR/Cas9敲除细胞。基因工程化免疫效应细胞用于各种细胞疗法以提高其对抗实体瘤的有效性,并且这些细胞疗法被提供给个体。

[0078] 作为一个例子,包含一种或多种外源提供的白细胞介素的NK细胞表达一种或多种CAR,并且经过基因工程化以删除一种或多种内源基因,以提高它们在实体瘤的酸性TME中的有效性,其在具体实施方案中导致这种疗法扩展到实体瘤。此外,这种基因工程化策略用于各种其他形式的细胞疗法,例如CAR-NK细胞、T细胞受体(TCR)-T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞

(TIL),以增强它们对各种类型的实体瘤的抵抗。

[0079] 在某些实施方案中,将本公开内容的细胞提供给个体以用于改善医学病况,例如任何种类的癌症和/或任何种类的病原体感染。本文所考虑的细胞(包括包含其的药物组合物)的用途是用于预防、治疗或改善癌症疾病,例如肿瘤疾病或病原体感染。在特定实施方案中,本公开内容的药物组合物可特别用于预防、改善和/或治疗癌症,包括例如可能是或可能不是实体瘤的癌症。

[0080] 在特定实施方案中,本公开内容部分考虑使用本文涵盖的细胞,其可以单独施用或与一种或多种其他疗法任意组合施用,并且在至少一些方面,与药学上可接受的载体或赋形剂一起施用。在某些实施方案中,任何核酸分子或载体可以在将细胞递送至受试者之前稳定地整合到细胞的基因组中。

[0081] 本公开内容的任何细胞可以通过注射、静脉内、动脉内、腹膜内、气管内、瘤内、肌内、内窥镜下、病灶内、颅内、经皮、皮下、局部、通过灌注、在肿瘤微环境中或它们的组合施用至个体。

[0082] 此外,本公开内容涉及一种用于预防、治疗或改善肿瘤疾病的方法,包括向有需要的受试者施用有效量的包含一种或多种外源提供的白细胞介素的任何细胞的步骤,如在本文中考虑的。

[0083] 用于施用细胞的组合物的可能适应症是癌症疾病,包括肿瘤疾病,包括例如胶质母细胞瘤、B细胞恶性肿瘤、多发性骨髓瘤、肺癌、脑癌、乳腺癌、血液癌、皮肤癌、胰腺癌、肝癌、结肠癌、头颈癌、肾癌、甲状腺癌、胃癌、脾癌、胆囊癌、骨癌、卵巢癌、睾丸癌、子宫内膜癌、前列腺癌、直肠癌、肛门癌或子宫颈癌。用于施用细胞的组合物的示例性适应症是癌性疾病,包括表达一种或多种与个体的癌症相关的某些抗原的任何恶性肿瘤。本公开内容的组合物的施用可用于所有阶段和类型的癌症,包括例如最小残留疾病、早期癌症、晚期癌症和/或转移性癌症和/或难治性癌症。

[0084] 本公开内容进一步涵盖与通过免疫细胞起作用的其他化合物(例如双特异性抗体构建体、靶向毒素或其他化合物)的共同施用方案。本发明化合物共同施用的临床方案可以包括在施用其他组分的同时、之前或之后共同施用。特定的联合疗法包括化学疗法、放射、手术、激素疗法或其他类型的免疫疗法。

[0085] 本公开内容的实施方案包括将细胞免疫疗法靶向胶质母细胞瘤干细胞同时排除从相同细胞免疫疗法靶向星形胶质细胞的方法。细胞免疫疗法可以包括任何种类的免疫效应细胞,包括至少NK细胞。细胞免疫疗法可以包括免疫效应细胞,其包含一种或多种外源提供的细胞因子。

[0086] 实施方案涉及试剂盒,其包含产生细胞的构建体、本文定义的核酸序列、本文定义的载体和/或本文定义的宿主细胞(例如免疫效应细胞)。还预期本公开内容的试剂盒包含如上文所述的药物组合物,单独的或与待施用至需要医学治疗或干预的个体的其他药物组合的。

[0087] V. 基因工程化受体

[0088] 可以进一步修饰包含一种或多种外源提供的白细胞介素的本公开内容的免疫细胞以表达一种或多种非内源基因产物。基因产物可能是或可能不是基因工程化受体。受体可以是任何类型的,包括例如抗原、趋化因子或细胞因子的受体。在受体是针对抗原的情况

下,抗原可以是癌抗原,包括实体瘤抗原。

[0089] 可以对包含一种或多种外源提供的白细胞介素的免疫效应细胞进行基因工程化以表达靶向特定抗原的抗原受体,并且此类细胞可以被专门设计为靶向存在于个体癌细胞上的一种或多种抗原。

[0090] 在具体实施方案中,包含一种或多种外源提供的白细胞介素的免疫效应细胞可包含工程化抗原受体,例如工程化TCR或CAR。例如,免疫细胞可以是经过修饰以表达对一种或多种特异性抗原具有抗原特异性的一种或多种CAR和/或TCR的NK细胞。在一些方面,免疫细胞通过例如使用CRISPR的CAR或TCR敲入而被工程化以表达抗原特异性CAR或抗原特异性TCR。

[0091] 合适的修饰方法是本领域已知的。参见例如上文的Sambrook和Ausubel。例如,可以使用Heemskerk等人,2008和Johnson等人,2009中描述的转导技术转导细胞以表达对癌症抗原具有抗原特异性的TCR。

[0092] 在一些实施方案中,细胞包含通过遗传工程化引入的编码一种或多种抗原受体的一种或多种核酸,以及此类核酸的遗传工程化产物。在一些实施方案中,核酸是异源的,即,通常不存在于从该细胞获得的细胞或样品中,例如从另一种生物或细胞获得的核酸,其例如通常不在进行工程化的细胞和/或衍生出此类细胞的生物体中发现。在一些实施方案中,核酸不是天然存在的,例如自然界中不存在的核酸(例如,嵌合的)。

[0093] 示例性抗原受体(包括CAR和重组TCR)以及将所述受体工程化和引入细胞的方法包括例如描述于以下中的那些:国际专利申请公开号W0200014257、W02013126726、W02012/129514、W02014031687、W02013/166321、W02013/071154、W02013/123061美国专利申请公开号US2002131960、US2013287748、US20130149337、美国专利号6,451,995、7,446,190、8,252,592、8,339,645、8,398,282、7,446,179、6,410,319、7,070,995、7,265,209、7,354,762、7,446,191、8,324,353和8,479,118,和欧洲专利申请号EP2537416和/或Sadelaian等人,2013;Davila等人,2013;Turtle等人,2012;Wu等人,2012描述的那些。在一些方面,遗传工程化的抗原受体包括如美国专利号7,446,190中描述的CAR,以及国际专利申请公开号W0/2014055668A1中描述的那些。

[0094] 当工程化受体是抗原受体时,抗原可以选自5T4、8H9、 $\alpha_v\beta_6$ 整联蛋白、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CA9、CD5、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD123、CD138、CD171、CEA、CSPG4、CS1、CLL1、CD99、DLL3、EGFR、EGFR家族,包括ErbB2 (HER2)、EGFRvIII、EGP2、EGP40、ERBB3、ERBB4、ErbB3/4、EPCAM、EphA2、EpCAM、FAP、FBP、胎儿AchR、FR α 、GD2、GD3、Glypican-3 (GPC3)、HLA-A1+MAGE1、HLA-A1+NY-ESO-1、IL-11R α 、IL-13R α 2、Lambda、Lewis-Y、L1CAM、Kappa、KDR、MCSP、间皮素、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2D配体、NY-ESO-1、PRAME、PSC1、PSCA、PSMA、ROR1、SP17、生存素、TAG72、TEM、HMW-MAA和VEGFR2。

[0095] A. 嵌合抗原受体

[0096] 在一些实施方案中,CAR包含:a)一个或多个细胞内信号转导结构域,b)跨膜结构域,和c)包含一个或多个靶向(包括特异性结合)所需抗原的抗原结合区的细胞外结构域。

[0097] 在一些实施方案中,工程化的抗原受体包括CAR,包括活化或刺激性CAR、共刺激性CAR(参见W02014/055668)和/或抑制性CAR(iCAR,参见Fedorov等人,2013)。CAR通常包含与一种或多种细胞内信号转导组分连接(在一些方面通过接头和/或一个或多个跨膜结构域)

的细胞外抗原(或配体)结合结构域。这样的分子通常模拟或近似通过天然抗原受体引起的信号、通过与共刺激受体组合的这样的受体引起的信号和/或仅通过共刺激受体引起的信号。

[0098] 本公开内容的某些实施方案涉及使用核酸,包括编码抗原特异性CAR多肽(包括已被人源化以降低免疫原性的CAR(hCAR),其包含至少一个细胞内信号转导结构域、跨膜结构域以及包含一个或多个信号转导基序的细胞外结构域)的核酸。在某些实施方案中,抗原特异性CAR可以识别包含在一种或多种抗原之间的共享空间的表位。在某些实施方案中,结合区可包含单克隆抗体的互补决定区、单克隆抗体的可变区和/或其抗原结合片段。在另一个实施方案中,该特异性来源于与受体结合的肽(例如,细胞因子)。

[0099] 预期人抗原CAR核酸可以是用于增强人患者的细胞免疫疗法的人基因。在一个具体的实施方案中,本公开内容包括全长抗原特异性CAR cDNA或编码区。抗原结合区或结构域可以包含来源于特定人单克隆抗体的单链可变片段(scFv)的V_H和V_L链的片段,例如在美国专利号7,109,304中描述的那些,该文献以引用方式并入本文。该片段也可以是人抗原特异性抗体的任何数量的不同抗原结合结构域。在一个更具体的实施方案中,该片段是由针对用于在人细胞中表达的人密码子使用进行优化的序列编码的抗原特异性scFv。

[0100] 布置可以是多聚体,例如双抗体或多聚体。多聚体最可能通过将轻链和重链的可变部分交叉配对成双抗体而形成。构建体的铰链部分可以具有多种替代选择,从完全缺失到维持第一半胱氨酸,到脯氨酸而不是丝氨酸置换、被截短至第一半胱氨酸。Fc部分可以被删除。任何稳定和/或二聚化的蛋白质都可以达到这个目的。可以仅使用一个Fc结构域,例如人免疫球蛋白的CH2或CH3结构域。还可以使用经过修饰以改善二聚化的人免疫球蛋白的铰链区、CH2区和CH3区。也可以使用免疫球蛋白的铰链部分。也可以使用CD8α的一部分。

[0101] 在一些实施方案中,CAR核酸包含编码其他共刺激受体(例如,跨膜结构域和修饰的CD28细胞内信号转导结构域)的序列。其他共刺激受体包括但不限于CD28、CD27、OX-40(CD134)、DAP10、DAP12和4-1BB(CD137)中的一种或多种。除了由CD3ζ引发的主要信号外,由插入人CAR中的人共刺激受体提供的其他信号对于NK细胞的完全活化也很重要,并且可以帮助改善体内持久性和过继免疫疗法的治疗成功。

[0102] 在一些实施方案中,以对抗原例如在正常或未患病细胞类型或患病细胞类型上表达的抗原具有特异性的方式构建抗原特异性CAR。因此,CAR通常在其细胞外部分中包含一个或多个抗原结合分子,例如一个或多个抗原结合片段、结构域或部分,或一个或多个抗体可变结构域,和/或抗体分子。在一些实施方案中,抗原特异性CAR包含抗体分子的一个或多个抗原结合部分,例如来源于单克隆抗体(mAb)的可变重链(VH)和可变轻链(VL)的单链抗体片段(scFv)。

[0103] 编码嵌合受体的开放阅读框的序列可获自基因组DNA源、cDNA源或可被合成(例如,经由PCR)或其组合。取决于基因组DNA的大小和内含子的数目,可能期望使用cDNA或其组合,因为发现内含子使mRNA稳定。此外,使用内源或外源非编码区来稳定mRNA可能是进一步有利的。

[0104] 预期可以将嵌合构建体作为裸露的DNA或在合适的载体中引入免疫细胞。使用裸露的DNA通过电穿孔稳定转染细胞的方法是本领域已知的。参见,例如,美国专利号6,410,319。裸露的DNA通常是指以用于表达的合适取向包含在质粒表达载体中的编码嵌合受体的

DNA。

[0105] 或者,可以使用病毒载体(例如,逆转录病毒载体,腺病毒载体,腺相关病毒载体或慢病毒载体)将嵌合构建体引入免疫细胞。根据本公开内容的方法使用的合适的载体在免疫细胞中是非复制性的。已知许多基于病毒的载体,其中维持在细胞中的病毒的拷贝数足够低以维持细胞的存活力,例如基于HIV、SV40、EBV、HSV或BPV的载体。

[0106] 在一些方面,抗原特异性结合或识别组分连接至一个或多个跨膜和细胞内信号转导结构域。在一些实施方案中,CAR包括与CAR的细胞外结构域融合的跨膜结构域。在一个实施方案中,使用与CAR中的结构域之一天然缔合的跨膜结构域。在一些情况下,跨膜结构域通过氨基酸置换来选择或修饰,以避免此类结构域与相同或不同的表面膜蛋白的跨膜结构域结合,以使与受体复合物的其他成员的相互作用最小化。

[0107] 在一些实施方案中,跨膜结构域来源于天然来源或来源于合成来源。如果来源是天然的,则该结构域在某些方面来源于任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。跨膜区包括来源于以下(即至少包括其一个或多个跨膜区)的那些:T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链,CD28,CD3 ζ ,CD3 ϵ ,CD3 γ ,CD3 δ ,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD 16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD86,CD 134,CD137,CD154,ICOS/CD278,GITR/CD357,NKG2D和DAP分子。可替代地,在一些实施方案中,跨膜结构域是合成的。在一些方面,合成的跨膜结构域主要包含疏水性残基,例如亮氨酸和缬氨酸。在一些方面,在合成的跨膜结构域的每个末端将发现苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体。

[0108] 在某些实施方案中,本文公开的用于遗传修饰免疫细胞(例如,NK细胞)的平台技术包括(i)使用电穿孔装置(例如,nucleofector)的非病毒基因转移,(ii)通过内结构域(例如,CD28/CD3- ζ ,CD137/CD3- ζ 或其他组合)发送信号的CAR,(iii)具有可变长度的将CD70识别结构域连接到细胞表面的胞外结构域的CAR,和在某些情况下(iv)来源于K562以能够鲁棒地和大量扩增CAR⁺免疫细胞的人工抗原呈递细胞(aAPC)(Singh等人,2008;Singh等人,2011)。

[0109] B.T细胞受体(TCR)

[0110] 在一些实施方案中,遗传工程化的抗原受体包括重组TCR和/或从天然存在的T细胞克隆的TCR。“T细胞受体”或“TCR”是指包含可变的 α 和 β 链(分别称为TCR α 和TCR β)或可变的 γ 和 δ 链(分别称为TCR γ 和TCR δ),并且能够特异性结合与主要组织相容性复合物(MHC)受体结合的抗原肽的分子。在一些实施方案中,TCR为 $\alpha\beta$ 形式。

[0111] 通常,以 $\alpha\beta$ 和 $\gamma\delta$ 形式存在的TCR通常在结构上相似,但是表达它们的T细胞可能具有不同的解剖学位置或功能。TCR可以在细胞表面上或以可溶形式存在。通常,TCR在T细胞(或T淋巴细胞)的表面上发现,通常负责识别与MHC分子结合的抗原。在一些实施方案中,TCR还可以包含恒定结构域、跨膜结构域和/或短胞质尾(参见,例如,Janeway等人,1997)。例如,在一些方面,TCR的每条链可具有一个N末端免疫球蛋白可变结构域、一个免疫球蛋白恒定结构域、跨膜区和在C末端的短胞质尾。在一些实施方案中,TCR与参与介导信号转导的CD3复合物的不变蛋白相关。除非另有说明,否则术语“TCR”应理解为涵盖其功能性TCR片段。该术语还涵盖完整的或全长的TCR,包括 $\alpha\beta$ 形式或 $\gamma\delta$ 形式的TCR。

[0112] 因此,出于本文的目的,提及的TCR包括任何TCR或功能片段,例如与结合在MHC分子中的特定抗原肽(即MHC-肽复合物)结合的TCR的抗原结合部分。TCR的“抗原结合部分”或

“抗原结合片段”(其可以互换使用)是指包含TCR的结构性结构域的一部分但与全长TCR结合的抗原(例如,MHC-肽复合物)结合的分子。在某些情况下,抗原结合部分包含TCR的可变结构域,例如TCR的可变 α 链和可变 β 链,其足以形成与特定MHC-肽复合物结合的结合位点,例如通常每条链包含三个互补决定区。

[0113] 在一些实施方案中,TCR链的可变结构域缔合以形成类似于免疫球蛋白的环或互补决定区(CDR),其通过形成TCR分子的结合位点并确定肽特异性而赋予抗原识别并确定肽特异性。通常,像免疫球蛋白一样,CDR被框架区(FR)分开(参见,例如,Jores等人,1990; Chothia等人,1988;Lefranc等人,2003)。在一些实施方案中,CDR3是负责识别经加工的抗原的主要CDR,尽管也已显示 α 链的CDR1与抗原肽的N末端部分相互作用,而 β 链的CDR1与肽的C末端部分相互作用。CDR2被认为识别MHC分子。在一些实施方案中, β 链的可变区可以包含附加的高变(HV4)区。

[0114] 在一些实施方案中,TCR链包含恒定结构域。例如,像免疫球蛋白一样,TCR链的细胞外部分(例如, α 链、 β 链)可以包含两个免疫球蛋白结构域,分别是N末端处的可变结构域(例如, V_α 或 V_β ;通常是基于Kabat编号的氨基酸1至116,Kabat等人,"Sequences of Proteins of Immunological Interest,US Dept.Health and Human Services,Public Health Service National Institutes of Health,1991,5th ed.),和与细胞膜相邻的恒定结构域(例如, α 链恒定结构域或 C_α ,通常是基于Kabat的氨基酸117至259, β 链恒定结构域或 C_β ,通常是基于Kabat的氨基酸117至295)。例如,在某些情况下,由两条链形成的TCR的细胞外结构域包含两个膜近端恒定结构域和两个包含CDR的膜远端可变结构域。TCR结构域的恒定结构域包含短连接序列,其中半胱氨酸残基形成二硫键,从而在两条链之间形成连接。在一些实施方案中,TCR在 α 链和 β 链的每条链中可具有另外的半胱氨酸残基,使得TCR在恒定结构域中包含两个二硫键。

[0115] 在一些实施方案中,TCR链可包含跨膜结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域带正电。在一些情况下,TCR链包含细胞质尾部。在一些情况下,该结构允许TCR与其他分子(例如,CD3)缔合。例如,具有跨膜区的含有恒定结构域的TCR可以将蛋白质锚定在细胞膜中,并与CD3信号转导装置或复合物的不变亚基缔合。

[0116] 通常,CD3是一种多蛋白复合物,其在哺乳动物中可以具有三条不同的链(γ 、 δ 和 ϵ)以及 ζ 链。例如,在哺乳动物中,该复合物可含有CD3 γ 链、CD3 δ 链、两条CD3 ϵ 链和CD3 ζ 链的同二聚体。CD3 γ 、CD3 δ 和CD3 ϵ 链是包含单个免疫球蛋白结构域的免疫球蛋白超家族的高度相关的细胞表面蛋白。CD3 γ 、CD3 δ 和CD3 ϵ 链的跨膜区带负电荷,这是允许这些链与带正电荷的T细胞受体链缔合的特征。CD3 γ 、CD3 δ 和CD3 ϵ 链的细胞内尾部各自包含一个保守的基序,称为基于酪氨酸的免疫受体活化基序或ITAM,而每个CD3 ζ 链具有三个。通常,ITAM涉及TCR复合体的信号转导能力。这些辅助分子具有带负电的跨膜区,并在将信号从TCR传播到细胞中发挥作用。CD3-和 ζ -链与TCR一起形成所谓的T细胞受体复合物。

[0117] 在一些实施方案中,TCR可以是两条链 α 和 β (或任选地 γ 和 δ)的异二聚体,或者它可以是单链TCR构建体。在一些实施方案中,TCR是包含两条分开的链(α 和 β 链或 γ 和 δ 链)的异二聚体,其例如通过一个或多个二硫键连接。在一些实施方案中,鉴定针对靶抗原(例如,癌症抗原)的TCR并将其引入细胞。在一些实施方案中,编码TCR的核酸可以从多种来源获得,例如通过可公开获得的TCR DNA序列的聚合酶链反应(PCR)扩增。在一些实施方案中,

TCR获自生物学来源,诸如获自细胞,诸如获自T细胞(例如细胞毒性T细胞)、T细胞杂交瘤或其他可公开获得的来源。在一些实施方案中,T细胞可以获自体内分离的细胞。在一些实施方案中,可以从患者中分离出高亲和力的T细胞克隆,并分离出TCR。在一些实施方案中,T细胞可以是培养的T细胞杂交瘤或克隆。在一些实施方案中,已经在用人免疫系统基因(例如人白细胞抗原系统或HLA)工程化的转基因小鼠中产生了针对靶抗原的TCR克隆。参见,例如,肿瘤抗原(参见,例如,Parkhurst等人,2009和Cohen等人,2005)。在一些实施方案中,噬菌体展示用于分离针对靶抗原的TCR(参见,例如,Varela-Rohena等人,2008和Li,2005)。在一些实施方案中,TCR或其抗原结合部分可以根据TCR序列的知识合成产生。

[0118] VI. 载体

[0119] 在其中免疫效应细胞包含非内源工程化基因产物或外源提供的基因产物例如一种或多种外源提供的白细胞介素的情况下,可以通过任何合适的载体将基因产物递送至受体免疫效应细胞,包括通过病毒载体或通过非病毒载体。病毒载体的实例至少包括逆转录病毒、慢病毒、腺病毒或腺相关病毒载体。非病毒载体的例子至少包括质粒、转座子、脂质、纳米颗粒等。

[0120] 在免疫细胞用编码抗原靶向受体的载体转导并且还需要将另一种基因或多种基因(例如自杀基因和/或细胞因子和/或任选的治疗基因产物)转导到细胞中的情况下,抗原靶向受体、自杀基因、细胞因子和任选的治疗基因可以或可以不包含在相同的载体上或与相同的载体一起。在一些情况下,抗原靶向CAR、自杀基因、细胞因子和任选的治疗基因从相同的载体分子例如相同的病毒载体分子表达。在这种情况下,细胞因子、任选的抗原靶向受体、任选的自杀基因和任选的治疗基因的表达可能受或可能不受相同调节元件的调节。当细胞因子、任选的抗原靶向CAR、任选的自杀基因和任选的治疗基因位于同一载体上时,它们可以或可以不表达为单独的多肽。例如,在它们作为单独的多肽表达的情况下,它们可以在载体上通过2A元件或IRES元件分开(或者两种类型可以在同一载体上使用一次或多次)。

[0121] A. 一般实施方案

[0122] 本领域技术人员将有能力通过标准重组技术(参见,例如,Sambrook等人,2001和Ausubel等人,1996,均以引用的方式并入本文)构建载体以用于本公开内容的抗原受体的表达。

[0123] 1. 调控元件

[0124] 包括在本公开内容的载体中的表达盒特别地包含(沿5'至3'方向)可操作地连接至蛋白质编码序列的真核转录启动子、包括间插序列的剪接信号和转录终止/聚腺苷酸化序列。控制真核细胞中蛋白质编码基因的转录的启动子和增强子可以由多种遗传元件组成。细胞机构能够收集和整合每个元件传达的调控信息,从而允许不同的基因进化出独特的、通常是复杂的转录调控模式。例如,在本公开内容的上下文中使用的启动子包括组成型、诱导型和组织特异性启动子。在载体用于产生癌症治疗的情况下,启动子在缺氧条件下可能是有效的。

[0125] 2. 启动子/增强子

[0126] 本文提供的表达构建体包含驱动抗原受体和其他顺反子基因产物的表达的启动子。启动子通常包含用于定位RNA合成的起始位点的序列。最熟知的实例是TATA盒,但在一些缺少TATA盒的启动子中,诸如,例如,哺乳动物末端脱氧核苷酸转移酶基因的启动子和

SV40晚期基因的启动子,覆盖起始位点的离散元件本身帮助固定起始位置。另外的启动子元件调节转录起始的频率。通常,这些位于起始位点上游的区域,尽管已显示许多启动子在起始位点下游也含有功能元件。为了使编码序列“处于启动子的控制之下”,将转录阅读框的转录起始位点的5'末端定位在所选择的启动子的“下游”(即3')。“上游”的启动子刺激DNA的转录并促进编码的RNA的表达。

[0127] 启动子元件之间的间隔通常是柔性的,使得当元件相对于彼此反转或移动时,启动子功能得以保留。例如,在tk启动子中,启动子元件之间的间隔可以在活性开始下降之前增加到50bp。取决于启动子,似乎个体元件可以合作地或独立地起作用以激活转录。启动子可以或可以不与“增强子”结合使用,“增强子”是指与核酸序列的转录激活有关的顺式作用调节序列。

[0128] 启动子可以是与核酸序列天然缔合的启动子,如可以通过分离位于编码片段和/或外显子上游的5'非编码序列而获得。这样的启动子可以称为“内源的”。类似地,增强子可以是与核酸序列天然缔合的增强子,位于该序列的下游或上游。可替代地,通过将编码核酸片段置于重组或异源启动子的控制下将获得某些优势,所述重组或异源启动子是指在其天然环境中通常不与核酸序列缔合的启动子。重组或异源增强子也指在其天然环境中通常不与核酸序列缔合的增强子。此类启动子或增强子可以包括其他基因的启动子或增强子,以及从任何其他病毒、原核或真核细胞中分离的启动子或增强子,以及不是“天然存在”的启动子或增强子,即包含不同转录调控区的不同元件,和/或改变表达的突变。例如,最常用于重组DNA构建的启动子包括 β -内酰胺酶(青霉素酶)、乳糖和色氨酸(trp-)启动子系统。除了合成地产生启动子和增强子的核酸序列以外,还可以结合本文公开的组合物使用重组克隆和/或核酸扩增技术(包括PCRTM)来产生序列。此外,考虑还可以采用指导序列在非核细胞器(例如,线粒体、叶绿体等)内的转录和/或表达的控制序列。

[0129] 自然地,重要的是使用有效地指导DNA片段在选择用于表达的细胞器、细胞类型、组织、器官或生物体中的表达的启动子和/或增强子。分子生物学领域的技术人员通常知道用于蛋白质表达的启动子、增强子和细胞类型组合的使用(参见,例如Sambrook等人,1989,通过引用并入本文)。所使用的启动子可以是组成型的、组织特异性的、可诱导的和/或在适当的条件下可用于指导引入的DNA片段的高水平表达,例如在重组蛋白和/或肽的大规模生产中是有利的。启动子可以是异源的或内源的。

[0130] 另外,任何启动子/增强子组合(例如,根据真核启动子数据库EPDB,通过网址epd.isb-sib.ch/访问)也可以用于驱动表达。T3、T7或SP6细胞质表达系统的使用是另一个可能的实施方案。如果提供适当的细菌聚合酶(无论是作为递送复合物的一部分还是作为额外的基因表达构建体),则真核细胞可以支持某些细菌启动子的胞质转录。

[0131] 启动子的非限制性实例包括早期或晚期病毒启动子,例如SV40早期或晚期启动子,巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子,劳斯氏肉瘤病毒(RSV)早期启动子;真核细胞启动子,例如 β 肌动蛋白启动子,GADPH启动子,金属硫蛋白启动子;以及串联反应元件启动子,例如最小TATA盒附近的环AMP反应元件启动子(cre)、血清反应元件启动子(sre)、佛波酯启动子(TPA)和反应元件启动子(tre)。也可以使用人生长激素启动子序列(例如,Genbank登录号X05244,核苷酸283-341中描述的人生长激素最小启动子)或小鼠乳腺肿瘤启动子(可得自ATCC登录号ATCC 45007)。在某些实施方案中,启动子是CMV IE、dectin-1、dectin-2、人

CD11c、F4/80、SM22、RSV、SV40、Ad MLP、 β -肌动蛋白、I类MHC或II类MHC启动子,但是可用于驱动治疗性基因的表达式其他任何启动子适用于本公开内容的实践。

[0132] 在某些方面,本公开内容的方法还涉及增强子序列,即,增加启动子的活性并具有顺式作用(无论其取向,即使在相对长的距离(多至距离靶启动子数千碱基)也起作用)潜力的核酸序列。然而,增强子功能不一定限于这样长的距离,因为它们也可以在非常接近给定启动子的情况下起作用。

[0133] 3. 起始信号和连锁表达

[0134] 特异性起始信号也可以用于本公开内容中提供的表达构建体中以有效翻译编码序列。这些信号包括ATG起始密码子或相邻序列。可能需要提供外源翻译控制信号,包括ATG起始密码子。本领域普通技术人员将能够容易地确定这一点并提供必要的信号。众所周知,起始密码子必须与所需编码序列的阅读框“在读框内”,以确保整个插入片段的翻译。外源翻译控制信号和起始密码子可以是天然的或合成的。通过包含适当的转录增强子元件可以提高表达效率。

[0135] 在某些实施方案中,内部核糖体进入位点(IRES)元件的使用被用于产生多基因或多顺反子信息。IRES元件能够绕过5'甲基化的Cap依赖性翻译的核糖体扫描模型,并在内部位点开始翻译。已经描述了来自微小核糖核酸病毒家族的两个成员(脊髓灰质炎和脑心肌炎)的IRES元件,以及来自哺乳动物信息的IRES。IRES元件可以链接到异源开放阅读框。可以将多个开放阅读框一起转录,各自通过IRES隔开,从而产生多顺反子信息。借助于IRES元件,核糖体可接近每个开放阅读框以进行有效翻译。使用单个启动子/增强子来转录单个信息可以有效表达多个基因。

[0136] 如本文别处详述的,某些2A序列元件可用于在本公开内容提供的构建体中产生基因的连锁表达或共表达。例如,切割序列可用于通过连接开放阅读框形成单个顺反子来共表达基因。示例性的切割序列是马鼻A病毒(E2A)或F2A(口蹄疫病毒2A)或“2A样”序列(例如,Thosea asigna病毒2A;T2A)或猪捷申病毒-1(P2A)。在具体实施方案中,在单个载体中,多个2A序列是不相同的,尽管在替代实施方案中相同的载体利用两个或更多个相同的2A序列。2A序列的例子在US2011/0065779中提供,其通过引用整体并入本文。

[0137] 4. 复制的起点

[0138] 为了使载体在宿主细胞中繁殖,它可以包含一个或多个复制起始位点(通常称为“ori”),例如,对应于如上文所述的EBV的oriP或在编程中遗传工程化的具有相似或增强的功能的oriP(其是复制起始处的特定核酸序列)的核酸序列。可替代地,可以使用如上文所述的其他染色体外复制病毒的复制起点或自主复制序列(ARS)。

[0139] 5. 选择性和可筛选的标志物

[0140] 在一些实施方案中,可以通过在表达载体中包含标志物来在体外或体内鉴定含有本公开内容的靶向CD70的受体构建体的NK细胞。这样的标志物将赋予细胞可识别的改变,从而允许容易地鉴定含有表达载体的细胞。通常,选择标志物是赋予允许进行选择的属性的标志物。阳性选择标志物是其中标志物的存在允许其选择的标志物,而阴性选择标志物是其中其存在阻止其选择的标志物。阳性选择标志物的一个实例是抗药性标志物。

[0141] 通常药物选择标志物的包括有助于克隆和鉴定转化体,例如,赋予对新霉素、嘌呤霉素、潮霉素、DHFR、GPT、博来霉素(zeocin)和组氨酸的抗性的基因是有用的选择标志物。

除了赋予允许基于条件的实施来区分转化体的表型的标志物之外,还考虑了其他类型的标志物,包括可筛选的标志物,例如GFP,其基础是比色分析。可替代地,可以使用可筛选的酶作为阴性选择标志物,例如单纯疱疹病毒胸苷激酶(tk)或氯霉素乙酰转移酶(CAT)。本领域技术人员还将知道如何使用免疫学标志物,可能结合FACS分析使用。所使用的标志物据信是不重要的,只要其能够与编码基因产物的核酸同时表达。选择性和可筛选的标志物的其他实例是本领域技术人员众所周知的。

[0142] B. 多顺反子载体

[0143] 在特定的实施方案中,细胞因子、任选的抗原靶向受体、任选的自杀基因和/或任选的治疗基因从多顺反子载体表达(如本文所用的术语“顺反子”是指可从其产生基因产物的核酸序列)。在具体实施方案中,多顺反子载体编码至少一种细胞因子、自杀基因和/或工程化受体,例如T细胞受体和/或另外的非抗原靶向CAR。在一些情况下,多顺反子载体编码至少一种抗原靶向CAR、至少一种自杀基因和至少一种细胞因子。细胞因子可以是特定类型的细胞因子,例如人或小鼠或任何物种。在特定情况下,细胞因子是IL-7、IL-12、IL-2、IL-18和/或IL-21。

[0144] 在某些实施方案中,本公开内容提供了一种灵活的模块化系统(本文使用的术语“模块化”是指允许其互换性的顺反子或顺反子的组分,例如分别地通过移除和更换整个顺反子或顺反子的组分,例如通过使用标准重组技术),其利用具有以基本相同水平表达多个顺反子的能力的多顺反子载体。该系统可用于允许多个基因的组合表达(包括过表达)的细胞工程化。在具体实施方案中,由载体表达的一种或多种基因包括一种、两种或更多种抗原受体。多种基因可以包括但不限于CAR、TCR、细胞因子、趋化因子、归巢受体、CRISPR/Cas9介导的基因突变、诱饵受体、细胞因子受体、嵌合细胞因子受体等。载体可以进一步包含:(1)一种或多种报道分子,例如荧光或酶促报道分子,例如用于细胞测定和动物成像;(2)一种或多种细胞因子或其他信号传导分子;和/或(3)自杀基因。

[0145] 在特定情况下,载体可以包含至少4个由任何种类的切割位点(例如2A切割位点)隔开的顺反子。该载体可能是或可能不是基于莫洛尼鼠白血病病毒(MoMLV或MMLV)的,包括3'和5'LTR,其中在pUC19主链中具有psi包装序列。该载体可以包含4个或更多个具有三个或更多个2A切割位点的顺反子和多个用于基因交换的ORF。该系统允许其侧翼为用于通过亚克隆快速整合的限制性位点的多个基因(7个或更多)的组合过表达,并且在一些实施方案中,该系统还包括至少三个2A自切割位点。因此,该系统允许表达多种CAR、TCR、信号传导分子、细胞因子、细胞因子受体和/或归巢受体。该系统还可应用于其他病毒和非病毒载体,包括但不限于慢病毒、腺病毒AAV以及非病毒质粒。

[0146] 该系统的模块化特性使得还能够将基因有效地亚克隆到多顺反子表达载体中的4个顺反子中的每一个中以及基因的交换,例如用于快速测试。策略性地位于多顺反子表达载体中的限制性位点允许高效地交换基因。

[0147] 本公开内容的实施方案涵盖利用多顺反子载体的系统,其中该载体的至少一部分是模块化的,例如通过允许移除和替换一个或多个顺反子(或一个或多个顺反子的组分),例如通过利用一个或多个限制性酶位点,其特性和位置经过特别选择以促进载体的模块化使用。该载体还具有其中多个顺反子被翻译成单个多肽并加工成单独的多肽的实施方案,从而赋予载体以基本上等摩尔浓度表达单独的基因产物的优势。

[0148] 本公开内容的载体被配置用于模块化以能够改变载体的一个或多个顺反子和/或改变一个或多个特定顺反子的一个或多个组分。载体可以设计成利用位于一个或多个顺反子的末端的侧翼和/或位于特定顺反子的一个或多个组分的末端的侧翼的独特限制酶位点。

[0149] 本公开内容的实施方案包括多顺反子载体,其包含至少两个、至少三个或至少四个顺反子,每个顺反子侧接一个或多个限制酶位点,其中至少一个顺反子编码至少一种抗原受体。在一些情况下,两个、三个、四个或更多个顺反子被翻译成单个多肽并被切割成单独的多肽,而在其他情况下多个顺反子被翻译成单个多肽并被切割成单独的多肽。载体上的相邻顺反子可以被自切割位点(例如2A自切割位点)分开。在某些情况下,每个顺反子表达来自载体的单独多肽。在特定情况下,载体上的相邻顺反子由IRES元件分开。

[0150] 在某些实施方案中,本公开内容提供了一种用于细胞工程化的系统,该系统允许例如可以包括一个、两个或更多个抗原受体的多个顺反子的组合表达,包括过表达。在特定实施方案中,如本文所述的多顺反子载体的使用允许该载体从相同的mRNA产生等摩尔水平的多个基因产物。多个基因可以包括但不限于细胞因子、CAR、TCR、趋化因子、归巢受体、CRISPR/Cas9介导的基因突变、诱饵受体、细胞因子受体、嵌合细胞因子受体等。载体可以进一步包含一种或多种荧光或酶促报道分子,例如用于细胞测定和动物成像。载体还可以包含自杀基因产物,用于在不再需要含有载体的细胞或含有载体的细胞对已将它们提供至的宿主有害时终止含有载体的细胞。

[0151] 在本公开内容的具体实施方案中,载体上的至少一个顺反子包含两个或更多个模块化组分,其中顺反子内的每个模块化组分侧接一个或多个限制性酶位点。例如,顺反子可以包括三个、四个或五个模块化组分。在至少一些情况下,顺反子编码抗原受体,该抗原受体具有由相应模块化组分编码的受体的不同部分。顺反子的第一个模块化组分可以编码受体的抗原结合结构域。此外,顺反子的第二个模块化组分可以编码受体的铰链区。此外,顺反子的第三个模块化组分可以编码受体的跨膜结构域。此外,顺反子的第四模块化组分可以编码第一共刺激结构域。此外,顺反子的第五个模块化组分可以编码第二个共刺激结构域。此外,顺反子的第六个模块化组分可以编码信号传导结构域。

[0152] 在本公开内容的特定方面,载体上的两个不同的顺反子各自编码不同的抗原受体。两种抗原受体都可以由包含两个或更多个模块化组分的顺反子编码,包括包含两个或更多个模块化组分的单独的顺反子。例如,抗原受体可以是嵌合抗原受体(CAR)和/或T细胞受体(TCR)。

[0153] 在具体实施方案中,载体是病毒载体(例如,逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体或腺相关病毒载体)或非病毒载体。载体可包含莫洛尼鼠白血病病毒(MMLV) 5'LTR、3'LTR和/或psi包装元件。在特定情况下,psi包装被整合在5'LTR和抗原受体编码序列之间。载体可以包含或不包含pUC19序列。在载体的一些方面,至少一个顺反子编码细胞因子(例如,白细胞介素15(IL-15)、IL-7、IL-21或IL-2)、趋化因子、细胞因子受体和/或归巢受体。

[0154] 当在载体中使用2A切割位点时,2A切割位点可包含P2A、T2A、E2A和/或F2A位点。

[0155] 除了编码靶向CD70的CAR的一个顺反子之外,载体的任何顺反子可以包含自杀基因。载体的任何顺反子可以编码报道基因。在具体实施方案中,第一顺反子编码自杀基因,第二顺反子编码靶向CD70的CAR,第三顺反子编码报道基因,第四顺反子编码细胞因子。在

某些实施方案中,第一顺反子编码自杀基因,第二顺反子编码靶向CD70的CAR,第三顺反子编码第二CAR或另一种抗原受体,第四顺反子编码细胞因子。在具体实施方案中,靶向CD70的CAR和/或另一种受体的不同部分由相应的模块化组分编码,并且第二顺反子的第一组分编码抗原结合结构域,第二组分编码铰链和/或跨膜结构域,第三组分编码共刺激结构域,第四组分编码信号传导结构域。

[0156] 在具体实施方案中,顺反子中的至少一个编码自杀基因。在一些实施方案中,顺反子中的至少一个编码细胞因子。在某些实施方案中,顺反子中的至少一个编码抗原靶向CAR。顺反子可以编码或可以不编码报道基因。在某些实施方案中,至少两个顺反子编码两种不同的抗原受体(例如,CAR和/或TCR)。顺反子可以编码或可以不编码报道基因。

[0157] 在感兴趣的遗传货物的特定配置中,单个载体可以包含编码靶向抗原的CAR的顺反子和编码与抗原靶向受体不同的第二抗原受体的顺反子。在具体实施方案中,第一抗原受体编码抗原靶向CAR,第二抗原受体编码TCR,或反之亦然。在特定实施方案中,包含分别编码抗原靶向CAR和第二抗原受体的单独顺反子的载体还包含编码细胞因子或趋化因子的第三顺反子和编码自杀基因的第四顺反子。然而,自杀基因和/或细胞因子(或趋化因子)可能不存在于载体上。

[0158] 在特定实施方案中,至少一个顺反子包括模块化的多个组分本身。例如,一个顺反子可以编码多组分基因产物,例如具有多个部分的抗原受体;在特定情况下,抗原受体由单个顺反子编码,从而最终产生单个多肽。编码多个组分的顺反子可以具有由1、2、3、4、5或更多个限制性酶消化位点(包括1、2、3、4、5或更多个对包含顺反子的载体独特的限制性酶消化位点)分隔的多个组分。在具体实施方案中,具有多种组分的顺反子编码具有多个对应部分(各自赋予受体独特的功能)的抗原受体。在一个具体的实施方案中,多组分顺反子的每个或大部分组分被载体所特有的一个或多个限制性内切酶消化位点分开,从而在需要时允许分开的组分的互换性。

[0159] 在具体实施方案中,多组分顺反子的每个组分对应于编码的抗原受体的不同部分,例如抗原靶向CAR。在说明性实施方案中,组分1可以编码受体的抗原结合结构域;组分2可以编码受体的铰链结构域;组分3可以编码受体的跨膜结构域;组分4可以编码受体的共刺激结构域,组分5可以编码受体的信号传导结构域。在具体实施方案中,抗原靶向CAR可以包含一个或多个共刺激结构域,每个由独特的限制性酶消化位点隔开以用于受体内共刺激结构域的互换性。

[0160] 在具体实施方案中,存在具有四个单独的顺反子的多顺反子载体,其中相邻的顺反子由2A切割位点隔开,尽管在具体实施方案中,存在直接或间接导致分开的多肽从顺反子(例如IRES序列)产生的元件替代2A切割位点。例如,四个单独的顺反子可以被三个2A切割位点隔开,并且每个顺反子具有侧接顺反子的每一端的限制性位点(X_1 、 X_2 等),以允许特定顺反子的互换性,例如与另一个顺反子或其他类型的序列的互换性,以及在使用标准重组技术后。在具体的实施方案中,每个顺反子侧翼的限制性酶位点对于载体来说是独特的以允许容易进行重组,尽管在替代实施方案中限制性酶位点不是载体所特有的。

[0161] 在特定实施方案中,载体通过允许在特定顺反子内包括在特定顺反子的多个组件内的互换性提供独特的第二级模块化。特定顺反子的多个组分可以由一个或多个限制酶位点分隔,包括那些对载体独特的限制酶位点,以允许顺反子内的一种或多种组分的互换性。

作为示例,顺反子2可以包括五个单独的组分,尽管每个顺反子可以有2、3、4、5、6个或更多个组分。例如,载体可以包括顺反子2,其具有五个组分,每个组分由独特的限制性酶切位点 X_9 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{12} 、 X_{13} 和 X_{14} 隔开,以允许标准重组以交换不同的组分1、2、3、4和/或5。在某些情况下,不同组分之间可能有多个限制性酶切位点(它们是唯一的,虽然可替代地一个或多个不是唯一的)并且在多个限制性酶切位点之间可能存在序列(尽管可替代地可能没有)。在某些实施方案中,由顺反子编码的所有组件都是为了可互换的目的而设计的。在特定情况下,顺反子的一个或多个组分被设计为可互换的,而顺反子的一个或多个其他组分可能不被设计为可互换的。

[0162] 在具体实施方案中,顺反子编码具有多种组分的抗原靶向CAR分子。例如,顺反子2可以由编码抗原靶向CAR分子的序列组成,该分子具有由组分1、组分2、组分3等表示的单独组分。CAR分子可以包括2、3、4、5、6、7、8个或更多可互换组分。在一个具体的例子中,组分1编码scFv;组件2编码铰链;组分3编码跨膜结构域;组分4编码共刺激结构域(尽管也可能存在编码两侧是用于交换的限制性位点的第二个或更多共刺激结构域的组分4');组件5编码信号传导结构域。在一个特定的例子中,组分1编码scFv;组分2编码IgG1铰链和/或跨膜结构域;组分3编码CD28;和组分4编码CD3 ζ 。

[0163] 本领域技术人员认识到,在载体的设计中,各种顺反子和组分必须被配置成使得它们在必要时保持在框架中。

[0164] 在一个具体的例子中,顺反子1编码自杀基因;顺反子2编码抗原靶向CAR;顺反子3编码报告基因;顺反子4编码细胞因子;顺反子2的组分1编码scFv;顺反子2的组分2编码IgG1铰链;顺反子2的组分3编码CD28;和组分4编码CD3 ζ 。

[0165] 限制性酶切位点可以是任何种类的并且可以在其识别位点中包括任何数量的碱基,例如4-8个碱基;识别位点中的碱基数可以是至少4、5、6、7、8或更多。在切割时位点可能产生钝切或粘性末端。例如,限制酶可以是I型、II型、III型或IV型。限制酶位点可以从可用的数据库中获得,例如综合关系酶数据库(IntEnz)或BRENDA(综合酶信息系统)。

[0166] 示例性载体可以是圆形的,并且按照惯例,其中位置1(圆形顶部的12点钟位置,序列的其余部分沿顺时针方向)设置在5'LTR的开始处。

[0167] 在使用自切割2A肽的实施方案中,2A肽可以是18-22个氨基酸(aa)长的病毒寡肽,其在真核细胞中的翻译过程中介导多肽的“切割”。名称“2A”是指病毒基因组的特定区域,不同的病毒2A通常以它们来源于的病毒命名。最早发现的2A是F2A(口蹄疫病毒),之后还发现了E2A(马鼻A病毒)、P2A(猪捷申病毒-1 2A)和T2A(thosea asigna病毒2A)。发现2A介导的“自切割”的机制是核糖体在2A的C末端跳过甘氨酸-脯氨酸肽键的形成。

[0168] 在特定情况下,载体可以是 γ -逆转录病毒转移载体。逆转录病毒转移载体可以包含基于质粒的主链,例如pUC19质粒(HindIII和EcoRI限制酶位点之间的大片段(2.63kb))。主链可能携来自莫洛尼鼠白血病病毒(MoMLV)的病毒组分,包括5'LTR、psi包装序列和3'LTR。LTR是在逆转录病毒前病毒的任一侧发现的长末端重复序列,并且在转移载体的情况下,将感兴趣的遗传货物(例如抗原靶向CAR和相关成分)囊括起来。psi包装序列(其是用于通过核衣壳包装的靶位点)也顺式掺入,夹在5'LTR和CAR编码序列之间。因此,转移载体的实例的基本结构可以这样配置:pUC19序列-5'LTR-psi包装序列-感兴趣的遗传货物-3'LTR-pUC19序列。该系统还可应用于其他病毒和非病毒载体,包括但不限于慢病毒、腺病毒

AAV以及非病毒质粒。

[0169] VII. 药物组合物

[0170] 本文提供了药物组合物和制剂,其包含如本文所涵盖的免疫效应细胞和药学上可接受的载体。细胞可以包含在适合转移至个体的培养基和/或适合保存(例如冷冻保存,包括在转移至个体之前)的培养基中。

[0171] 本文所述的药物组合物和制剂可通过将具有所需纯度的活性成分(例如细胞)与一种或多种任选的药学上可接受的载体(Remington's Pharmaceutical Sciences第22版,2012)混合来以冻干制剂或水性溶液形式制备。药学上可接受的载体在所采用的剂量和浓度下通常对受体无毒,并且包括但不限于:缓冲剂,例如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯,例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,例如血清白蛋白,明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,例如甘氨酸,谷氨酰胺,天冬酰胺,组氨酸,精氨酸或赖氨酸;单糖,二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖,甘露糖或糊精;螯合剂,例如EDTA;糖,例如蔗糖,甘露醇,海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子,例如钠;金属配合物(例如Zn-蛋白配合物);和/或非离子表面活性剂,例如聚乙二醇(PEG)。本文的示例性药学上可接受的载体还包括间质药物分散剂,例如可溶性中性活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),例如人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白,例如rHuPH20 (**HYLENEX[®]**, Baxter International, Inc.)。在美国专利公开号2005/0260186和2006/0104968中描述了某些示例性的sHASEGP和使用方法,包括rHuPH20。在一个方面,将sHASEGP与一种或多种另外的糖胺葡聚糖酶(例如软骨素酶)组合。

[0172] VIII. 组合疗法

[0173] 在某些实施方案中,本实施方案的组合物和方法涉及与至少一种另外的疗法组合的免疫细胞群(包括NK细胞群)。另外的疗法可以是放射疗法,手术(例如,肿块切除术和乳房切除术),化学疗法,基因疗法,DNA疗法,病毒疗法,RNA疗法,免疫疗法,骨髓移植,纳米疗法,单克隆抗体疗法,激素疗法或前述的组合。另外的疗法可以是辅助疗法或新辅助疗法的形式。

[0174] 在一些实施方案中,另外的疗法是小分子酶抑制剂或抗转移剂的施用。在一些实施方案中,另外的疗法是副作用限制剂(例如,旨在减少治疗的副作用的发生和/或严重性的药剂,例如抗恶心剂等)的施用。在一些实施方案中,另外的疗法是放射疗法。在一些实施方案中,另外的疗法是手术。在一些实施方案中,另外的疗法是放射疗法和手术的组合。在一些实施方案中,另外的疗法是伽马辐照。在一些实施方案中,另外的疗法是靶向PI3K/AKT/mTOR途径疗法,HSP90抑制剂,微管蛋白抑制剂,细胞凋亡抑制剂和/或化学预防剂。另外的疗法可以是本领域已知的一种或多种化学治疗剂。

[0175] 可以相对于另外的癌症疗法(例如免疫检查点疗法)在之前、期间、之后或以各种组合施用免疫细胞疗法。施用间隔可以从同时至数分钟至数天至数周。在其中免疫细胞疗法与另外的治疗剂分开地提供给患者的实施方案中,通常将确保在每次递送的时间之间没有显著的时间段到期,使得两种化合物将仍然能够发挥对患者有利的联合作用。在这样的情况下,预期可以在彼此约12至24或72小时内,更具体地在彼此约6-12小时内为患者提供

抗体疗法和抗癌疗法。在某些情况下,可能期望将治疗时间显著延长,其中在各自施用之间流逝几天(2、3、4、5、6或7)至几周(1、2、3、4、5、6、7或8)。

[0176] 可以采用各种组合。对于下面的实例,免疫细胞疗法为“A”,和抗癌疗法为“B”:

[0177] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

[0178] B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

[0179] B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

[0180] 考虑到试剂的毒性(如果有的话),本实施方案的任何化合物或细胞疗法向患者的施用将遵循用于施用此类化合物的一般方案。因此,在一些实施方案中,存在监测归因于组合疗法的毒性的步骤。

[0181] A. 化学疗法

[0182] 根据本发明的实施方案,可以使用多种化学治疗剂。术语“化学疗法”是指使用药物来治疗癌症。“化学治疗剂”用于表示在癌症的治疗中施用的化合物或组合物。这些药剂或药物根据它们在细胞内的活动方式(例如,它们是否影响细胞周期以及在什么阶段影响细胞周期)进行分类。可替代地,药剂可以基于其直接交联DNA、插入DNA或通过影响核酸合成来诱导染色体和有丝分裂畸变的能力来进行表征。

[0183] 化疗剂的实例包括烷基化剂,例如噻替派(thiotepa)和环磷酰胺;烷基磺酸盐,诸如白消安,英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);氮丙啶,例如苯并多巴(benzodopa),卡波醌(carboquone),米特多巴(meturedopa)和尤利多巴(uredopa);乙烯亚胺和甲基氨基吡啶(methylamelamine),包括六甲蜜胺(altretamine),三亚乙基三聚氰胺(triethylenemelamine),三亚乙基磷酰胺(triethylenephosphoramidate),三亚乙基硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)和三甲基三聚氰胺(trimethylolomelamine);多聚乙酰(acetogenin)(特别是布拉他辛(bullatacin)和布拉他辛酮(bullatacinone));喜树碱(包括合成类似物拓扑替康(topotecan));苔藓抑素;callystatin;CC-1065(包括其阿多来新(adozelesin),卡折来新(carzelesin)和比折来新(bizelesin)合成类似物);念珠藻素(cryptophycin)(特别是念珠藻素1和念珠藻素8);海兔毒素(dolastatin);多卡霉素(duocarmycin)(包括合成类似物KW-2189和CB1-TM1);eleutherobin;水鬼蕉碱(pancratistatin);sarcodictyin;海绵抑素(spongistatin);氮芥,例如苯丁酸氮芥,氮芥(chlornaphazine),氯磷酰胺(cholophosphamide),雌氮芥(estramustine),异环磷酰胺(ifosfamide),甲氮芥(mechlorethamine),盐酸甲氧氮芥(mechlorethamine oxidehydrochloride),美法仑(melphalan),新恩比兴(novembichin),苯芥胆甾醇(phenesterine),泼尼氮芥(prednimustine),曲磷胺(trofosfamide),和尿嘧啶氮芥;亚硝基尿素,诸如卡莫司汀(carmustine),氯脲霉素(chlorozotocin),福莫司汀(fotemustine),洛莫司汀(lomustine),尼莫司汀(nimustine)和雷莫司汀(ranimustine);抗生素,诸如烯二炔抗生素(例如,卡奇霉素(calicheamicin),特别是卡奇霉素 γ II和卡奇霉素 ω II);达米辛(dynemicin),包括达米辛A;双膦酸盐,诸如氯膦酸盐;埃斯培拉霉素(esperamicin);以及新制癌菌素生色团和相关的色蛋白烯二炔类抗生素生色团,aclacinomycin,放线菌素(actinomycin),安曲霉素(authrarnycin),重氮丝氨酸,博来霉素(bleomycins),放线菌素C(cactinomycin),卡拉比辛(carabycin),洋红霉素(carminomycin),嗜癌菌素(carzinophilin),色霉素(chromomycinis),放线菌素D

(dactinomycin), 道诺霉素 (daunorubicin), 地托比星 (detorubicin), 6-重氮-5-氧-L-正亮氨酸, 多柔比星 (doxorubicin) (包括吗啉基-多柔比星, 氰基吗啉基-多柔比星, 2-吡咯啉基-多柔比星, 和 deoxydoxorubicin), 表柔比星 (epirubicin), 伊达比星 (esorubicin), 去甲氧正定霉素 (idarubicin), 麻西罗霉素 (marcellomycin), 丝裂霉素例如丝裂霉素C, 霉酚酸, 诺加霉素 (nogalarnycin), 橄榄霉素 (olivomycins), 培洛霉素 (peplomycin), 紫菜霉素 (potfiromycin), 嘌呤霉素, 三铁阿霉素 (quelamycin), 罗多比星 (rodorubicin), 链黑菌素 (streptonigrin), 链唑霉素 (streptozocin), 杀结核菌素 (tubercidin), 乌苯美司 (ubenimex), 净司他丁 (zinostatin), 和佐柔比星 (zorubicin); 抗代谢物例如甲氨蝶呤和 5-氟尿嘧啶 (5-FU); 叶酸类似物例如二甲叶酸, 蝶罗呤 (pteropterin), 和三甲曲沙 (trimetrexate); 嘌呤类似物例如氟达拉滨 (fludarabine), 6-巯嘌呤, 硫咪嘌呤, 和硫鸟嘌呤; 嘧啶类似物例如环胞苷, 阿扎胞苷, 6-氮尿苷, 卡莫氟 (carmofur), 阿糖胞苷, 二脱氧尿苷, 去氧氟尿苷, 依诺他滨 (enocitabine), 和氟尿苷; 雄激素, 例如卡普睾酮 (calusterone), 丙酸甲雄烷酮 (dromostanolone propionate), 表硫雄醇 (epitiostanol), 美雄烷 (mepitiostane), 和睾内脂 (testolactone); 抗肾上腺, 例如米托坦 (mitotane) 和曲洛司坦 (trilostane); 叶酸补充剂例如亚叶酸; 醋葡醛内酯 (aceglatone); 醛磷酰胺糖苷 (aldophosphamide glycoside); 氨基乙酰丙酸; 恩尿嘧啶 (eniluracil); 安吡啶 (amsacrine); bestabucil; 比山群 (bisantrene); 依达曲沙 (edatraxate); 得弗伐胺 (defofamine); 地美可辛 (demecolcine); 地吡醌 (diaziquone); elfornithine; 依利醋铵; 埃博霉素 (epothilone); 依托格鲁 (etoglucid); 硝酸镓; 羟基脲; 香菇多糖 (lentinan); 氯尼达明 (lonidainine); 美登醇 (maytansinoids), 例如美登素 (maytansine) 和安丝菌素 (ansamitocins); 米托胍脲 (mitoguazone); 米托蒽醌 (mitoxantrone); mopidanmol; nitraerine; 喷司他丁 (pentostatin); 蛋氨酸芥 (phenamet); 吡柔比星 (pirarubicin); 洛索蒽醌 (losoxantrone); 鬼臼酸 (podophyllinic acid); 2-乙基胍类; 甲基苄胍; PSK 多糖复合物; 丙亚胺 (razoxane); 根霉素 (rhizoxin); 西佐喃 (sizofiran); 螺旋锗 (spirogermanium); 细格孢氮杂酸 (tenuazonic acid); 三亚胺醌; 2,2',2''-三氯三乙胺; 单端孢霉烯族毒素类 (特别是 T-2 毒素, 黏液霉素 A, 杆孢菌素 A 和 anguidine); 乌拉坦 (urethan); 长春地辛 (vindesine); 氮烯唑胺 (dacarbazine); 甘露莫司汀 (mannomustine); 二溴甘露醇; 二溴卫矛醇; 哌血生 (pipobroman); gacytosine; 阿糖胞苷 ("Ara-C"); 环磷酰胺; 紫杉烷, 例如紫杉醇和多西他赛; 吉西他滨; 6-硫鸟嘌呤; 硫嘌呤; 铂配位复合物例如顺铂、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; 长春瑞滨; 能灭瘤 (novantrone); 鬼臼噻吩甙 (teniposide); 依达曲沙 (edatrexate); 柔红霉素; 氨基蝶呤; 希罗达 (xeloda); 伊班膦酸盐; 伊立替康 (irinotecan) (例如 CPT-11); 拓扑异构酶抑制剂 RFS 2000; 二氟甲基鸟氨酸 (DMFO); 类视黄醇, 例如视黄酸; 卡培他滨 (capecitabine); 卡铂, 甲基苄胍 (procarbazine), plicomycin, 吉西他滨, 那韦尔滨 (navelbine), 法呢基蛋白转移酶抑制剂, 跨铂 (transplatinum) 和上述任何一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0184] B. 放射疗法

[0185] 引起DNA损伤并已被广泛使用的其他因素包括通常已知的 γ 射线、X射线和/或放射性同位素向肿瘤细胞的定向递送。也可以考虑其他形式的DNA损伤因素, 例如微波、质子

束辐照(美国专利5,760,395和4,870,287)和UV辐照。最有可能的是所有这些因素影响对DNA、DNA的前体、DNA的复制和修复以及染色体的装配和维持的广泛损害。X射线的剂量范围从长时间(3-4周)的50至200伦琴的每日剂量到2000至6000伦琴的单剂量。放射性同位素的剂量范围广泛变化,并且取决于同位素的半衰期、所发射的辐照的强度和类型以及肿瘤细胞的吸收。

[0186] C. 免疫疗法

[0187] 本领域技术人员将理解,其他免疫疗法可以与实施方案的方法组合或结合使用。在癌症治疗的背景下,免疫疗法通常依靠使用免疫效应细胞和分子来靶向和破坏癌细胞。利妥昔单抗(**RITUXAN[®]**)是这样的实例。免疫效应子可以是例如对肿瘤细胞表面上的某些标志物具有特异性的抗体。单独的抗体可以充当疗法的效应子,或者它可以募集其他细胞来实际影响细胞杀伤。抗体也可以与药物或毒素(化疗剂,放射性核素,蓖麻毒蛋白A链,霍乱毒素,百日咳毒素等)缀合,并用作靶向剂。可替代地,效应子可以是携带直接或间接与肿瘤细胞靶相互作用的表面分子的淋巴细胞。各种效应细胞包括细胞毒性T细胞和NK细胞。

[0188] 抗体-药物缀合物已成为开发癌症疗法的突破性方法。癌症是世界上主要的死亡原因之一。抗体-药物缀合物(ADC)包含与杀细胞药物共价连接的单克隆抗体(MAb)。这种方法将MAb针对其抗原靶标的高特异性与高效的细胞毒性药物结合在一起,从而产生了“经武装的”MAb,其可将有效载荷(药物)递送至具有丰富抗原水平的肿瘤细胞。药物的靶向递送还将其在正常组织中的暴露降至最低,从而降低了毒性并改善了治疗指数。FDA批准的两种ADC药物(2011年的**ADCETRIS[®]**(本妥昔单抗(brentuximab vedotin))和2013年的**KADCYLA[®]**(恩美曲妥珠单抗(trastuzumabemtansine)或T-DM1))验证了该方法。目前有30多种ADC候选药物处于癌症治疗临床试验的各个阶段(Leal等人,2014)。随着抗体工程化和接头-有效负载优化变得越来越成熟,新ADC的发现和开发越来越依赖于适合这种方法的新靶标的识别和验证以及靶向MAb的产生。ADC靶标的两个标准是肿瘤细胞中上调/高水平的表达和稳健的内化。

[0189] 在免疫疗法的一方面,肿瘤细胞必须带有一些易于靶向的标志物,即其在大多数其他细胞上不存在。存在许多肿瘤标志物,并且在本发明的实施方案的背景下,这些肿瘤标志物中的任何一种都可能适于靶向。常见的肿瘤标志物包括CD20,癌胚抗原,酪氨酸酶(p97),gp68,TAG-72,HMFG,唾液酸化的路易斯抗原,MucA,MucB,PLAP,层粘连蛋白受体,erbB和p155。免疫疗法的可选择的方面是将抗癌作用与免疫刺激作用相结合。还存在免疫刺激分子,包括:细胞因子,例如IL-2,IL-4,IL-12,GM-CSF, γ -IFN,趋化因子,例如MIP-1,MCP-1,IL-8和生长因子,例如FLT3配体。

[0190] 目前正在研究或使用的免疫疗法的例子是免疫佐剂,例如牛分枝杆菌,恶性疟原虫,二硝基氯苯和芳香族化合物(美国专利号5,801,005和5,739,169;Hui and Hashimoto,1998;Christodoulides等人,1998);细胞因子疗法,例如干扰素 α 、 β 和 γ ,IL-1,GM-CSF和TNF(Bukowski等人,1998;Davidson等人,1998;Hellstrand等人,1998);基因疗法,例如TNF,IL-1,IL-2和p53(Qin等人,1998;Austin-Ward and Villaseca,1998;美国专利号5,830,880和5,846,945);和单克隆抗体,例如抗CD20,抗神经节苷脂GM2和抗p185

(Hollander, 2012; Hanibuchi 等人, 1998; 美国专利号 5,824,311)。预期可以将一种或多种抗癌疗法与本文所述的抗体疗法一起使用。

[0191] 在一些实施方案中,免疫疗法可以是免疫检查点抑制剂。免疫检查点调高信号(例如共刺激分子)或调低信号。可能被免疫检查点阻滞靶向的抑制性免疫检查点包括腺苷A2A受体(A2AR),B7-H3(也称为CD276),B和T淋巴细胞弱化剂(BTLA),细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4,也称为CD152),吡哆胺2,3-双加氧酶(IDO),杀伤细胞免疫球蛋白(KIR),淋巴细胞激活基因3(LAG3),程序性死亡1(PD-1),T细胞免疫球蛋白结构域和粘蛋白结构域3(TIM-3)和T细胞激活的V-结构域Ig抑制剂(VISTA)。特别地,免疫检查点抑制剂靶向PD-1轴和/或CTLA-4。

[0192] 免疫检查点抑制剂可以是药物,例如小分子,配体或受体的重组形式,或者特别是抗体,例如人抗体(例如,国际专利公开W02015/016718;Pardoll, Nat Rev Cancer, 12(4): 252-64, 2012; 两者均以引用方式并入本文)。可以使用免疫检查点蛋白或其类似物的已知抑制剂,特别是可以使用抗体的嵌合、人源化或人形式。如技术人员将知道的,替代和/或等效名称可以用于本公开内容中提及的某些抗体。在本公开内容的上下文中,这样的替代和/或等效名称是可互换的。例如,已知lambrolizumab也已知为替代和等效名称MK-3475和派姆单抗(pembrolizumab)。

[0193] 在一些实施方案中,PD-1结合拮抗剂是抑制PD-1与其配体结合伴侣结合的分子。在一个具体方面,PD-1配体结合伴侣是PDL1和/或PDL2。在另一个实施方案中,PDL1结合拮抗剂是抑制PDL1与其结合伴侣结合的分子。在特定方面,PDL1结合伴侣是PD-1和/或B7-1。在另一个实施方案中,PDL2结合拮抗剂是抑制PDL2与其结合伴侣结合的分子。在一个具体方面,PDL2结合伴侣是PD-1。拮抗剂可以是抗体,其抗原结合片段,免疫粘附素,融合蛋白或寡肽。示例性抗体在美国专利号8735553、8354509和8008449中有所描述,均以引用的方式并入本文。用于本文提供的方法中的其他PD-1轴拮抗剂是本领域已知的,例如描述于美国专利申请号US2014/0294898、US2014/022021和US2011/0008369,均通过引用并入本文。

[0194] 在一些实施方案中,PD-1结合拮抗剂是抗PD-1抗体(例如,人抗体、人源化抗体或嵌合抗体)。在一些实施方案中,抗PD-1抗体选自纳武单抗、派姆单抗和CT-011。在一些实施方案中,PD-1结合拮抗剂是免疫粘附素(例如,包含与恒定区(例如,免疫球蛋白序列的Fc区)融合的PDL1或PDL2的细胞外或PD-1结合部分的免疫粘附素)。在一些实施方案中,PD-1结合拮抗剂是AMP-224。纳武单抗(也称为MDX-1106-04, MDX-1106, ONO-4538, BMS-936558和**OPDIVO**[®])是描述于W02006/121168的抗PD-1抗体,派姆单抗(也称为MK-3475, Merck3475, lambrolizumab, **KEYTRUDA**[®]和SCH-900475)是描述于W02009/114335的抗PD-1抗体。CT-011(也称为hBAT或hBAT-1)是描述于W02009/101611的抗PD-1抗体。AMP-224(也称为B7-DCIg)是描述于W02010/027827和W02011/066342的PDL2-Fc融合可溶性受体。

[0195] 可以在本文提供的方法中靶向的另一个免疫检查点是细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4),也称为CD152。人CTLA-4的完整cDNA序列的Genbank登录号为L15006。CTLA-4发现于T细胞的表面,并当与抗原呈递细胞表面上的CD80或CD86结合时,充当“关闭”开关。CTLA4是免疫球蛋白超家族的成员,其在辅助T细胞的表面表达并向T细胞传递抑制信号。CTLA4与T细胞共刺激蛋白CD28相似,并且两种分子均与抗原呈递细胞上的CD80和CD86(分

别也称为B7-1和B7-2)结合。CTLA4将抑制信号传递给T细胞,而CD28传递刺激信号。细胞内CTLA4也存在于调节性T细胞中,并且可能对它们的功能很重要。通过T细胞受体和CD28的T细胞活化导致CTLA-4(B7分子的抑制受体)的表达增加。

[0196] 在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是抗CTLA-4抗体(例如,人抗体、人源化抗体或嵌合抗体)、其抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋白或寡肽。

[0197] 适用于本发明方法的抗人-CTLA-4抗体(或来源于其的VH和/或VL结构域)可以使用本领域众所周知的方法产生。或者,可以使用本领域公认的抗CTLA-4抗体。例如,公开于美国专利号8,119,129、W001/14424、W098/42752;W000/37504(CP675,206,也称为曲美木单抗;以前称为替西木单抗),美国专利号6,207,156;Hurwitz等人(1998)Proc Natl Acad Sci USA 95(17):10067-10071;Camacho等人(2004)J Clin Oncology 22(145):Abstract No.2505(抗体CP-675206);和Mokyr等人(1998)Cancer Res 58:5301-5304的抗CTLA-4抗体可用于本文公开的方法中。上述出版物中的每一个的教导通过引用并入本文。也可以使用与任何这些本领域公认的抗体竞争结合CTLA-4的抗体。例如,人源化CTLA-4抗体描述于国际专利公开号W02001/014424、W02000/037504和美国专利号8,017,114;全部通过引用并入本文。

[0198] 示例性的抗CTLA-4抗体是伊匹单抗(也称为10D1,MDX-010,MDX-101和**Yervoy®**)或其抗原结合片段和变体(参见,例如,W001/14424)。在其他实施方案中,抗体包含伊匹单抗的重链和轻链CDR或VR。因此,在一个实施方案中,抗体包含伊匹单抗的VH区的CDR1,CDR2和CDR3结构域,以及伊匹单抗的VL区的CDR1、CDR2和CDR3结构域。在另一个实施方案中,该抗体竞争与CTLA-4上与上述抗体相同的表位的结合和/或与CTLA-4上与上述抗体相同的表位结合。在另一个实施方案中,该抗体与上述抗体具有至少约90%的可变区氨基酸序列同一性(例如,与伊匹单抗具有至少约90%,95%或99%的可变区同一性)。

[0199] 用于调节CTLA-4的其他分子包括CTLA-4配体和受体,例如描述于美国专利号5844905、5885796和国际专利申请号W01995/001994和W01998/042752;全部通过引用并入本文,以及免疫粘附素,例如描述于美国专利号8329867,通过引用并入本文。

[0200] D. 手术

[0201] 大约60%的癌症患者将接受某种类型的手术,包括预防性、诊断或分期性、治愈性和姑息手术。治愈性手术包括切除(其中全部或部分癌组织被物理移除、切除和/或破坏),并且可以与其他疗法(例如本发明实施方案的治疗,化学疗法,放射疗法,激素疗法,基因疗法,免疫疗法和/或替代疗法)结合使用。肿瘤切除术是指肿瘤的至少一部分的物理切除。除肿瘤切除术外,手术治疗还包括激光手术、冷冻手术、电外科手术和显微控制手术(莫氏手术)。

[0202] 在切除部分或全部癌细胞、组织或肿瘤后,可在体内形成空腔。可以通过使用其他抗癌疗法对该区域进行灌注、直接注射或局部应用来完成治疗。例如,可以每1、2、3、4、5、6或7天,或者每1、2、3、4和5周或每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月重复这种治疗。这些治疗也可以具有不同的剂量。

[0203] E. 其他药剂

[0204] 预期可以将其他药剂与本实施方案的某些方面组合使用以改善治疗的疗效。这些另外的药剂包括影响细胞表面受体的上调和GAP连接的药剂,细胞生长抑制剂和分化剂,细

胞粘附抑制剂,增加过度增殖细胞对凋亡诱导剂的敏感性的药剂或其他生物药剂。通过增加GAP连接数增加细胞间信号转导将增加对邻近的过度增殖细胞群的抗过度增殖作用。在其他实施方案中,细胞生长抑制剂或分化剂可以与本发明实施方案的某些方面结合使用以改善治疗的抗过度增殖功效。预期细胞粘附的抑制剂可改善本发明实施方案的功效。细胞粘附抑制剂的实例是粘着斑激酶(FAK)抑制剂和洛伐他汀。进一步考虑了可以将增加过度增殖细胞对凋亡的敏感性的其他试剂(例如抗体c225)与发明本发明实施方案的某些方面组合使用以改善治疗功效。

[0205] IX. 公开内容的试剂盒

[0206] 本文所述的任何组合物可以包含在试剂盒中。在一个非限制性实例中,包含一种或多种外源提供的白细胞介素的细胞、用于产生细胞的试剂、载体和用于产生载体的试剂和/或其组分可以包含在试剂盒中。在某些实施方案中,NK细胞可以包含在试剂盒中,并且它们可以或尚未以任何方式修饰。这样的试剂盒可以具有或可以不具有用于操作细胞的一种或多种试剂。例如,此类试剂包括细胞因子、小分子、蛋白质、核酸、抗体、缓冲液、引物、核苷酸、盐和/或其组合。可以提供表达一种或多种细胞因子和/或一种或多种工程化抗原受体的载体,或用于制造它们的试剂,可以包括在试剂盒中。试剂盒中可以包括编码一种或多种细胞因子的核苷酸、编码CRISPR试剂以敲除一种或多种特定基因的核苷酸、自杀基因产物、受体等。试剂盒中可以包括蛋白质,例如细胞因子或抗体,包括单克隆抗体。试剂盒中可以包括编码工程化CAR受体或TCR受体的组分的核苷酸,包括用于产生它们的试剂。

[0207] 在特定方面,试剂盒包含本公开内容的NK细胞疗法以及另一种癌症疗法。在一些情况下,除了细胞疗法实施方案之外,试剂盒还包括第二癌症疗法,例如化学疗法、激素疗法和/或免疫疗法。试剂盒可以针对个体的特定癌症进行定制,并且包括针对个体的相应的第二癌症疗法。

[0208] 试剂盒可包含适当等分的本公开内容的组合物。试剂盒的组分可以包装在水性介质中或以冻干形式包装。试剂盒的容器装置通常将包括至少一个小瓶、试管、烧瓶、瓶子、注射器或其他容器装置,在其中可以放置组分,并且优选地适当地等分。在试剂盒中存在多于一种组分的情况下,该试剂盒通常还可以包含第二、第三或其他额外的容器,额外的组分可以单独放置在其中。然而,各种组分的组合可以包含在小瓶中。本发明的试剂盒通常还包括用于将组合物和任何其他试剂容器装在密闭范围内以供商业销售的装置。这样的容器可以包括注射或吹塑成型的塑料容器,所需的小瓶保持在其中。

实施例

[0209] 包括以下实施例以证明本公开内容的某些非限制性方面。本领域技术人员应当理解,在随后的实施例中公开的技术代表了发明人发现的在公开的主题的实践中发挥良好作用的技术。然而,本领域的技术人员根据本公开内容应该理解,可以在公开的具体实施方案中进行许多改变并且仍然获得相似或相似的结果而不背离所公开主题的精神和范围。

[0210] 实施例1

[0211] 用于治疗胶质母细胞瘤的NK细胞免疫疗法

[0212] 测试了NK细胞治疗胶质母细胞瘤的能力。NK细胞可以杀死患者来源的胶质母细胞瘤干细胞系(GCS),但不能杀死正常的星形胶质细胞(图1)。图1B显示了选择的NK配体的表

达在GCS和星形胶质细胞之间的差异。

[0213] NK细胞可以被工程化以表达特定的所需基因,例如一种或多种细胞因子基因(例如,IL-15、IL-12、IL-21)。具体构建体的例子在图2中呈现,其中2A元件将细胞因子的产生与IgG1的产生分开,尽管它们在相同的表达构建体上。在这些具体实例中,人IL-15、人IL-21或人IL-12被配置为其中p35和p40亚基通过接头人工连接在一起。这样的表达构建体可以存在于NK细胞内的任何类型的载体中。

[0214] 使用GSC的3-D肿瘤球体培养模型来测试细胞因子工程化NK细胞的活性(图3A)。肿瘤球体模型模拟实体瘤块。在**Incucyte®**装置中进行杀伤测定,其中进行了对肿瘤细胞生长和NK细胞杀伤的活细胞成像。与非转导的NK细胞(黑线)相比,所述脐带血来源的细胞因子工程化NK细胞(红、蓝和绿线)对患者来源的胶质母细胞瘤干细胞系发挥出色的杀伤作用(图3B)。

[0215] 表征了NK细胞对GBM的体内活性。NOD/SCID/IL2R γ c无效小鼠(每组n=5)将ffLuc+患者来源的胶质母细胞瘤干细胞系(5×10^5)立体定向植入NSG小鼠的右前脑。7天后和在通过BLI成像确认肿瘤已建立后,如每个实验所示,用 1.0×10^5 个NK细胞颅内处理小鼠。与用未转导(NT)的NK细胞治疗的动物相比,用IL-12转导或IL-21转导(分泌型)的脐带血NK细胞治疗的动物具有明显消退的肿瘤(通过BLI成像不再可检测到肿瘤),总体存活率显著提高(图4A、4B和4C)。

[0216] 尽管已经详细描述了本公开内容及其优点,但是应当理解,在不背离所附权利要求限定的设计的精神和范围的情况下,可以在本文中进行各种改变、替换和变更。此外,本申请的范围不旨在限于说明书中描述的过程、机器、制造、物质组成、装置、方法和步骤的特定实施方案。正如本领域普通技术人员从本公开内容中容易理解的那样,可以根据本公开内容利用与在此描述的相应实施方案执行基本相同的功能或实现基本相同的结果的现在已存在的或以后待开发的过程、机器、制造、物质组成、装置、方法或步骤。因此,所附权利要求旨在将这些过程、机器、制造、物质组成、装置、方法或步骤包括在它们的范围内。

[0217] 参考资料

[0218] 说明书中提及的所有专利和出版物都表明了本发明所属领域的技术人员的水平。所有专利和出版物都以引用的方式并入本文,其程度与每个单独的出版物被具体地和单独地指示以引用的方式并入的程度相同。

[0219] 出版物

[0220] Ahmed等人Clin Cancer Res 16(2):474-485(2010)。

[0221] Austin-Ward和Villasaca,Revista Medica de Chile,126(7):838-845,1998.

[0222] Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology,Green Publishing Associates and John Wiley&Sons,NY,1994.Brown等人,N.Engl J.Med.375(26):256-269.(2016)。

[0223] Bukowski等人,Clinical Cancer Res.,4(10):2337-2347,1998.

[0224] Camacho等人(2004)J Clin Oncology 22(145):Abstract No.2505(antibody CP-675206)

[0225] Cohen等人,J Immunol.175:5799-5808,2005.Chothia等人,1988

[0226] Christodoulides等人,Microbiology,144(Pt 11):3027-3037,1998.

- [0227] Davidson等人,J.Immunother.,21 (5) :389-398,1998.
- [0228] Davila等人PLoS ONE 8 (4) :e61338,2013.
- [0229] Heemskerk等人Hum Gene Ther.19:496-510,2008.
- [0230] Hellstrand等人,Acta Oncologica,37 (4) :347-353,1998.
- [0231] Hollander,Front.Immun.,3:3,2012.
- [0232] Hanibuchi等人,Int.J.Cancer,78 (4) :480-485,1998.
- [0233] Hui和Hashimoto,Infection Immun.,66 (11) :5329-5336,1998.
- [0234] Hurwitz等人(1998)Proc Natl Acad Sci USA 95 (17) :10067-10071
- [0235] Johnson等人Blood 114:535-46,2009.
- [0236] Jores等人,PNAS U.S.A.87:9138,1990.
- [0237] Kabat等人,"Sequences of Proteins of Immunological Interest,US Dept.Health and Human Services,Public Health Service National Institutes of Health,1991,5th ed.
- [0238] Leal,M.,Ann N Y Acad Sci 1321,41-54,2014.
- [0239] Lefranc等人,Dev.Comp.Immunol.27:55,2003.
- [0240] Li,Nat Biotechnol.23:349-354,2005.
- [0241] Mokyr等人(1998)Cancer Res 58:5301-5304
- [0242] O' Rourke等人Sci Transl Med 9 (399) .
- [0243] Parkhurst等人,Clin Cancer Res.15:169-180,2009.
- [0244] Pardoll,Nat Rev Cancer,12 (4) :252-64,2012
- [0245] Qin等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,95 (24) :14411-14416,1998.
- [0246] Sadelain等人,Nat.Rev.Cancer 2003;3:35-45.
- [0247] Sadelain等人,Cancer Discov.3 (4) :388-398,2013.
- [0248] Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,3rd ed.,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,N.Y.2001.
- [0249] Singh等人,Cancer Research,68:2961-2971,2008.
- [0250] Singh等人,Cancer Research,71:3516-3527,2011.
- [0251] Turtle等人,Curr.Opin.Immunol.,24 (5) :633-39,2012.
- [0252] Varela-Rohena等人Nat Med.14:1390-1395,2008.
- [0253] Wu等人,Cancer,18 (2) :160-75,2012.
- [0254] 专利和专利申请
- [0255] 欧洲专利申请号EP2537416
- [0256] 美国专利公开号2005/0260186
- [0257] 美国专利公开号2006/0104968
- [0258] 美国专利公开号2002131960
- [0259] 美国专利公开号2013287748
- [0260] 美国专利公开号20130149337
- [0261] 美国专利申请号2014/0294898
- [0262] 美国专利申请号2014/022021

- [0263] 美国专利申请号2011/0008369
- [0264] 美国专利号5,739,169
- [0265] 美国专利号5,801,005
- [0266] 美国专利号5,824,311
- [0267] 美国专利号5,830,880
- [0268] 美国专利号5,846,945
- [0269] 美国专利号5,844,905
- [0270] 美国专利号5,885,796
- [0271] 美国专利号6,207,156
- [0272] 美国专利号6,410,319
- [0273] 美国专利号6,451,995
- [0274] 美国专利号7,070,995
- [0275] 美国专利号7,109,304
- [0276] 美国专利号7,265,209
- [0277] 美国专利号7,354,762
- [0278] 美国专利号7,446,179
- [0279] 美国专利号7,446,190
- [0280] 美国专利号7,446,191
- [0281] 美国专利号8,008,449
- [0282] 美国专利号8,017,114
- [0283] 美国专利号8,119,129
- [0284] 美国专利号8,252,592
- [0285] 美国专利号8,324,353
- [0286] 美国专利号8,329,867
- [0287] 美国专利号8,339,645
- [0288] 美国专利号8,354,509
- [0289] 美国专利号8,398,282
- [0290] 美国专利号8,479,118
- [0291] 美国专利号8,735,553
- [0292] WO 1995/001994
- [0293] WO 1998/042752
- [0294] WO 2000/14257
- [0295] WO 2000/37504
- [0296] WO 2001/014424
- [0297] WO 2009/101611
- [0298] WO 2009/114335
- [0299] WO 2010/027827
- [0300] WO 2011/066342
- [0301] WO 2012/129514

- [0302] WO 2013/071154
- [0303] WO 2013/123061
- [0304] WO 2013/126726
- [0305] WO 2013/166321
- [0306] WO 2014/031687
- [0307] WO 2014/055668
- [0308] WO 2015/016718。

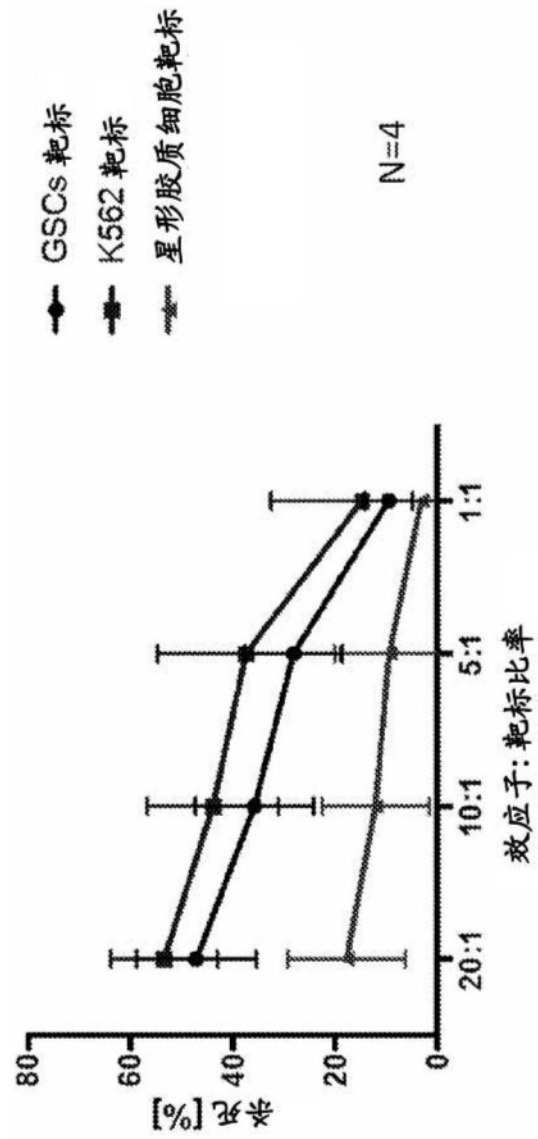


图1A

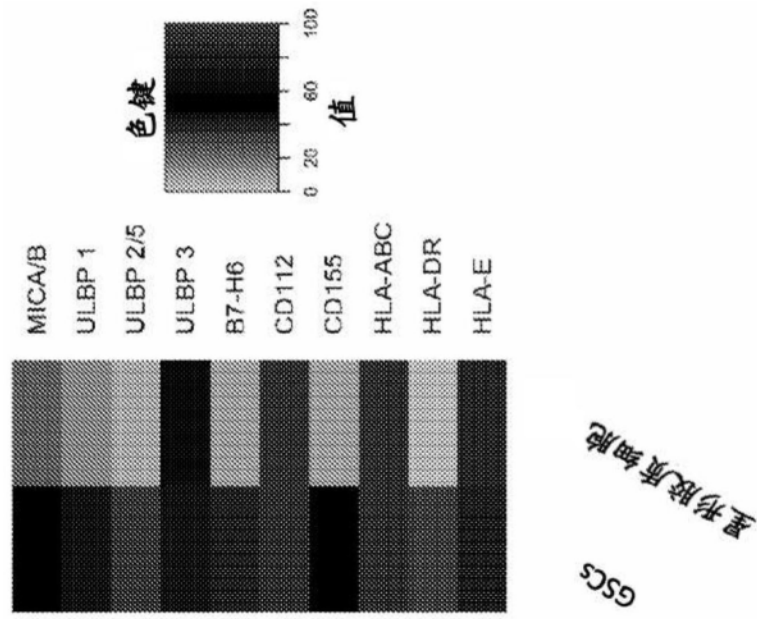


图1B

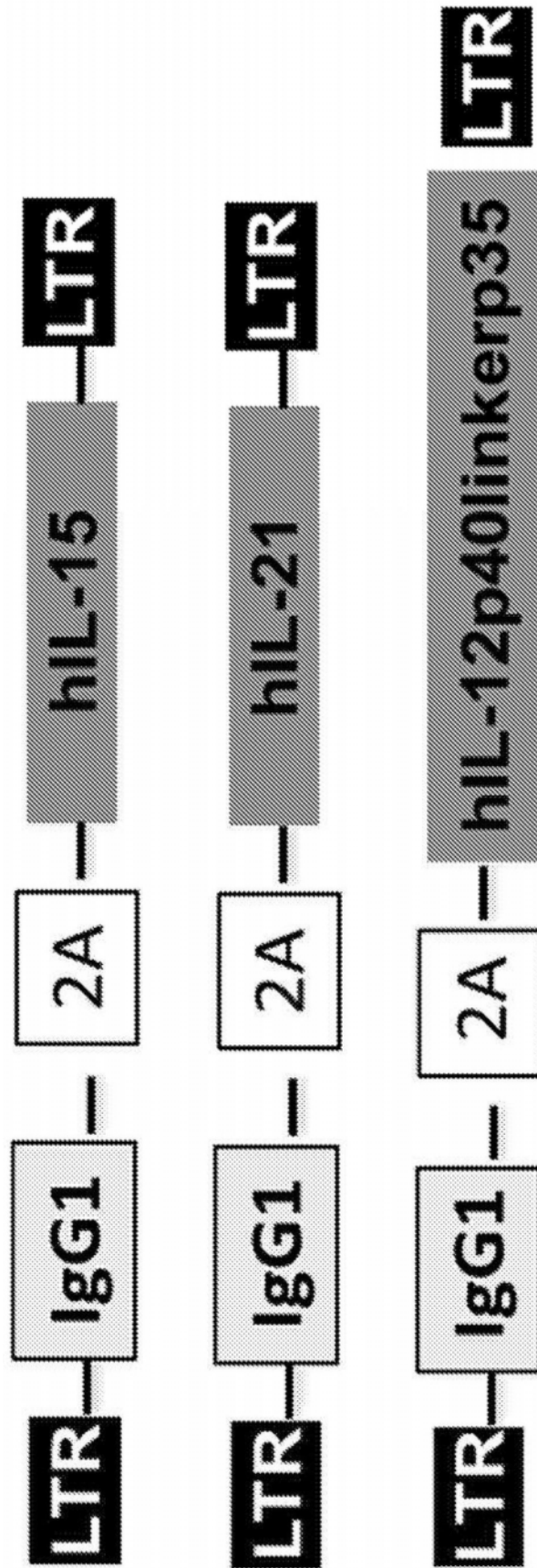


图2

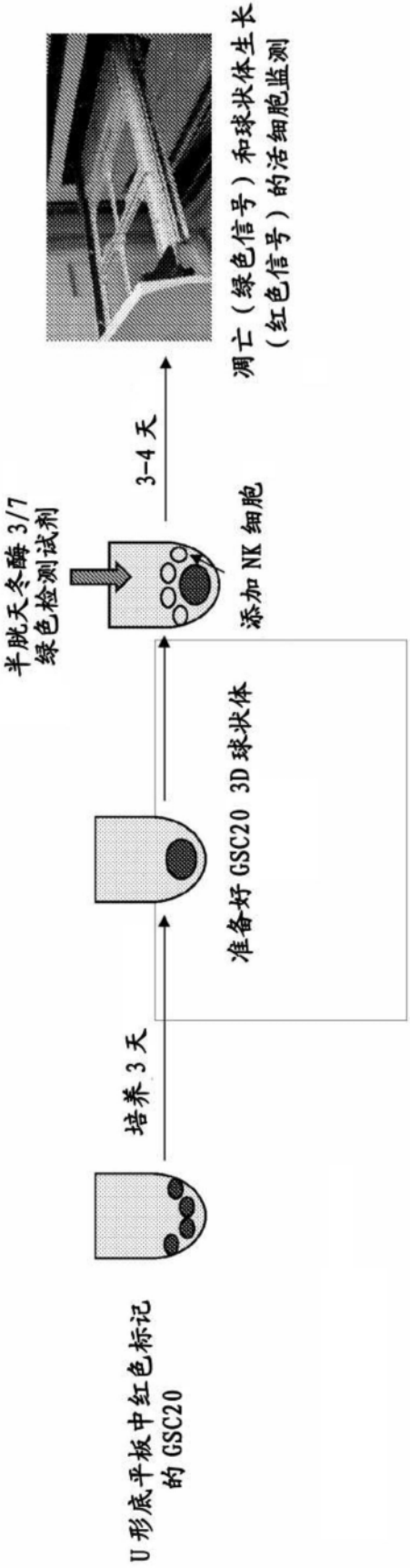


图3A

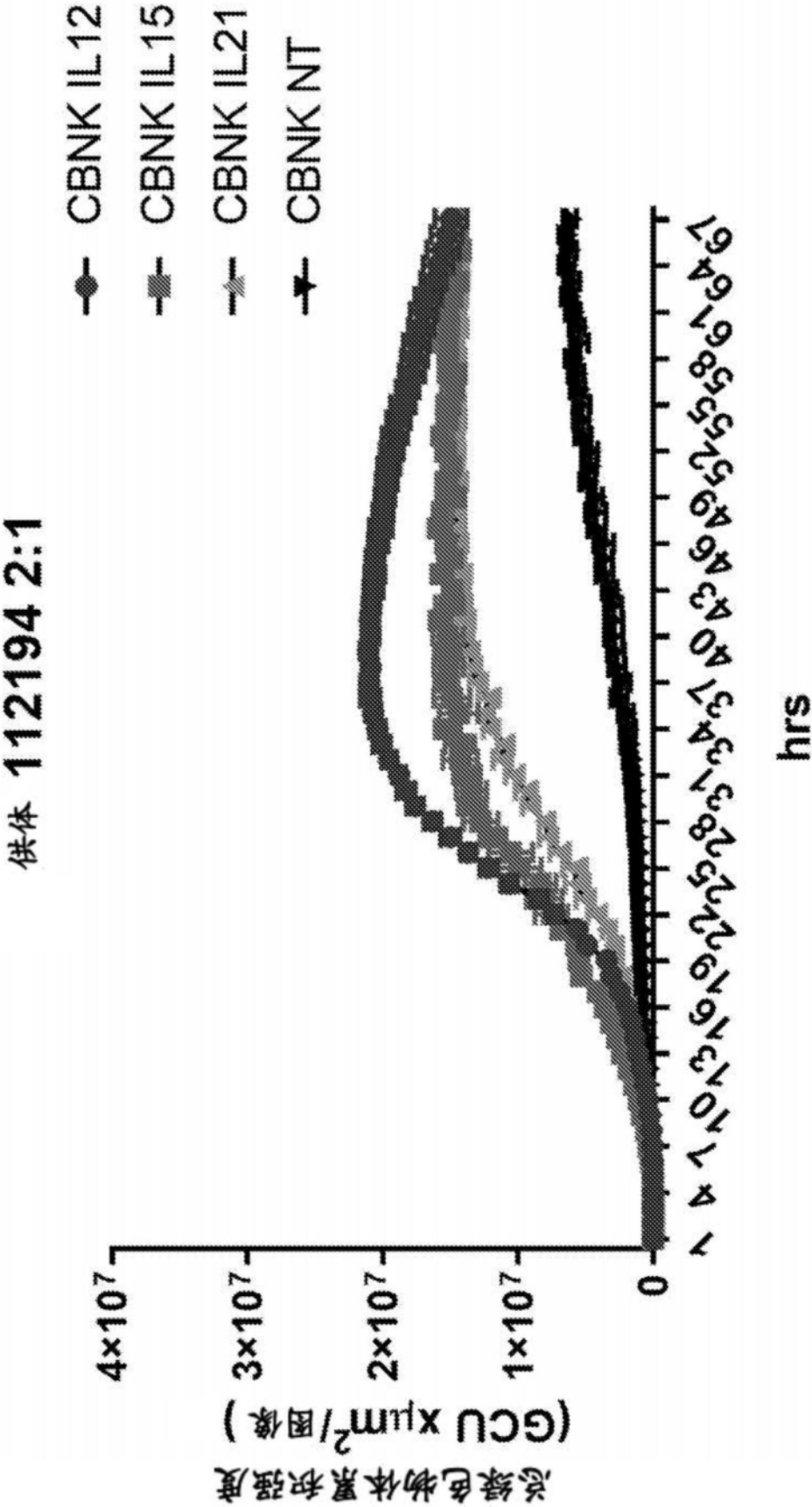


图3B

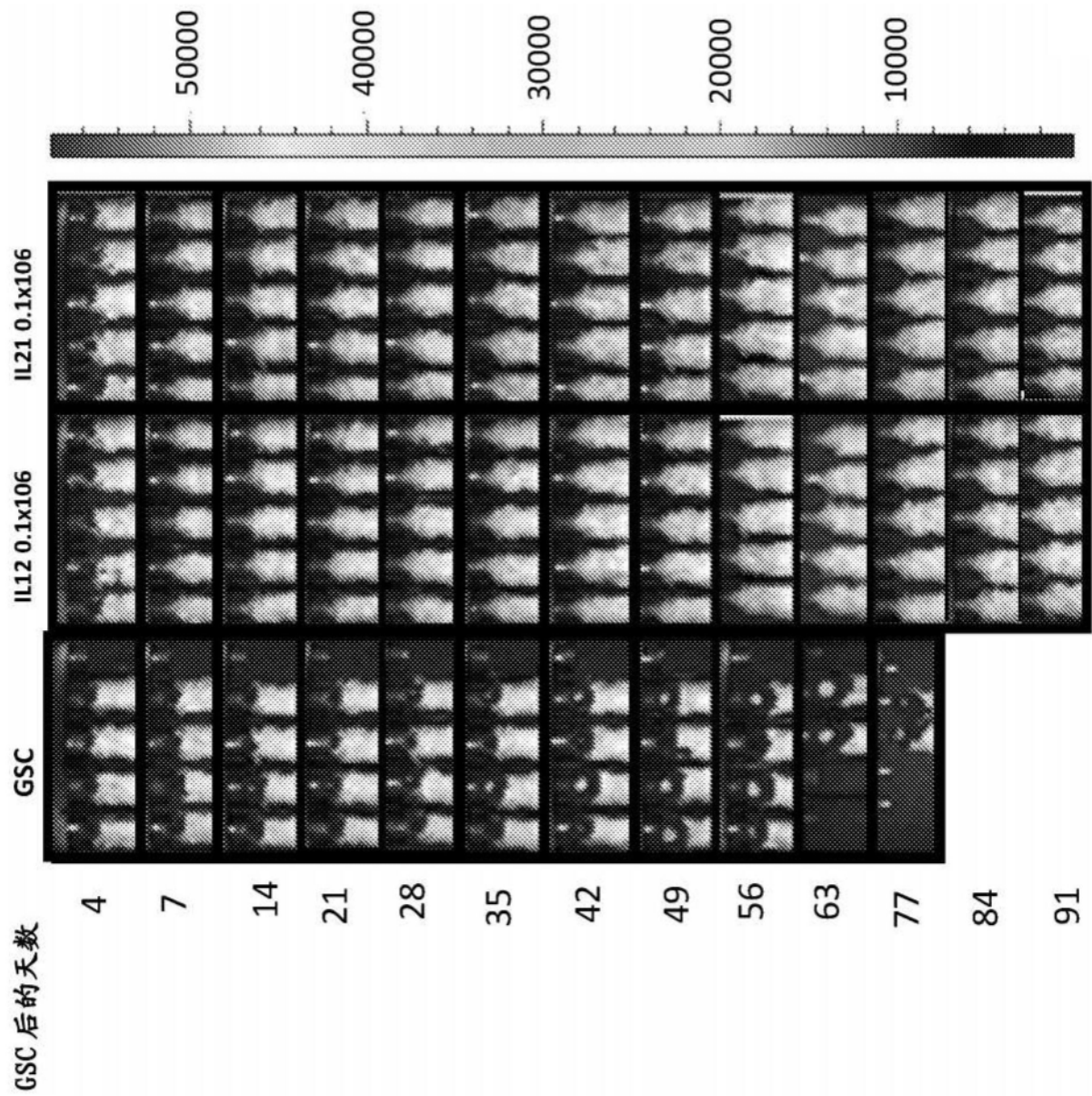


图4A

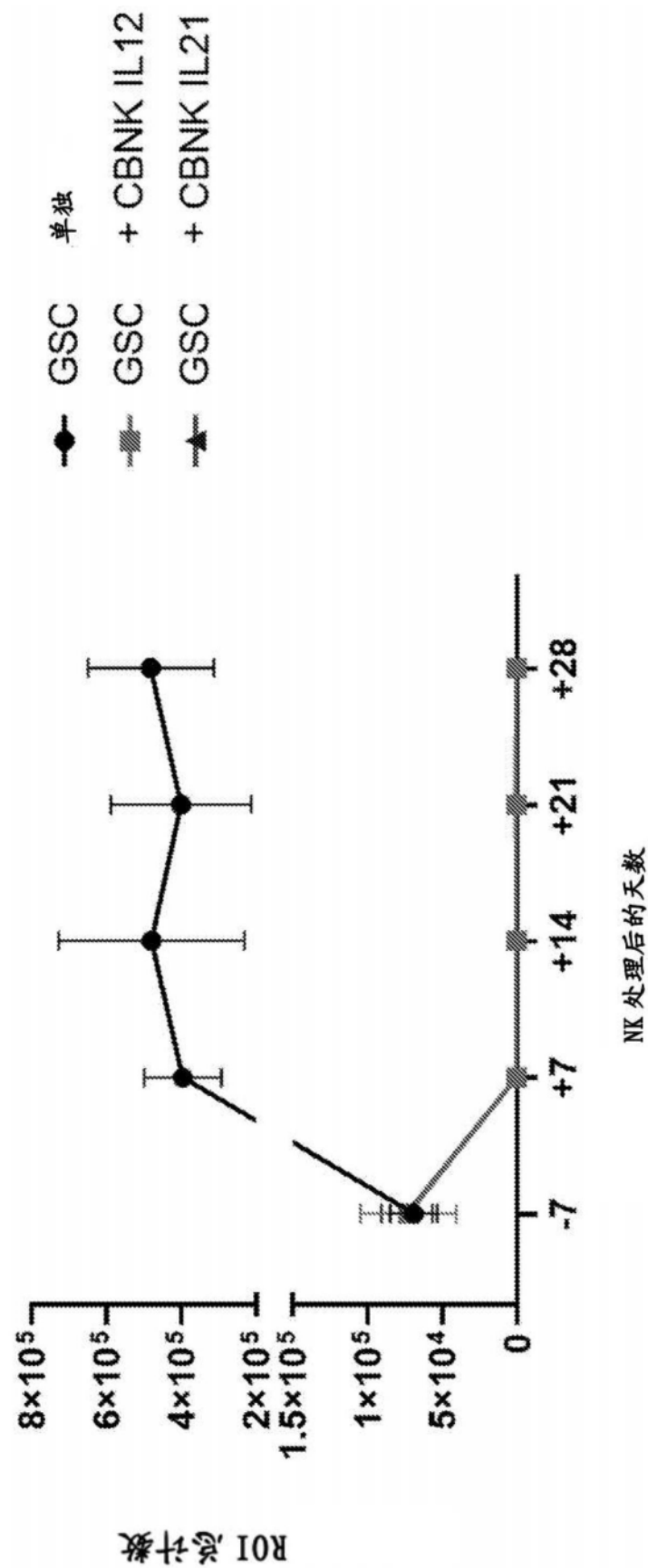


图4B

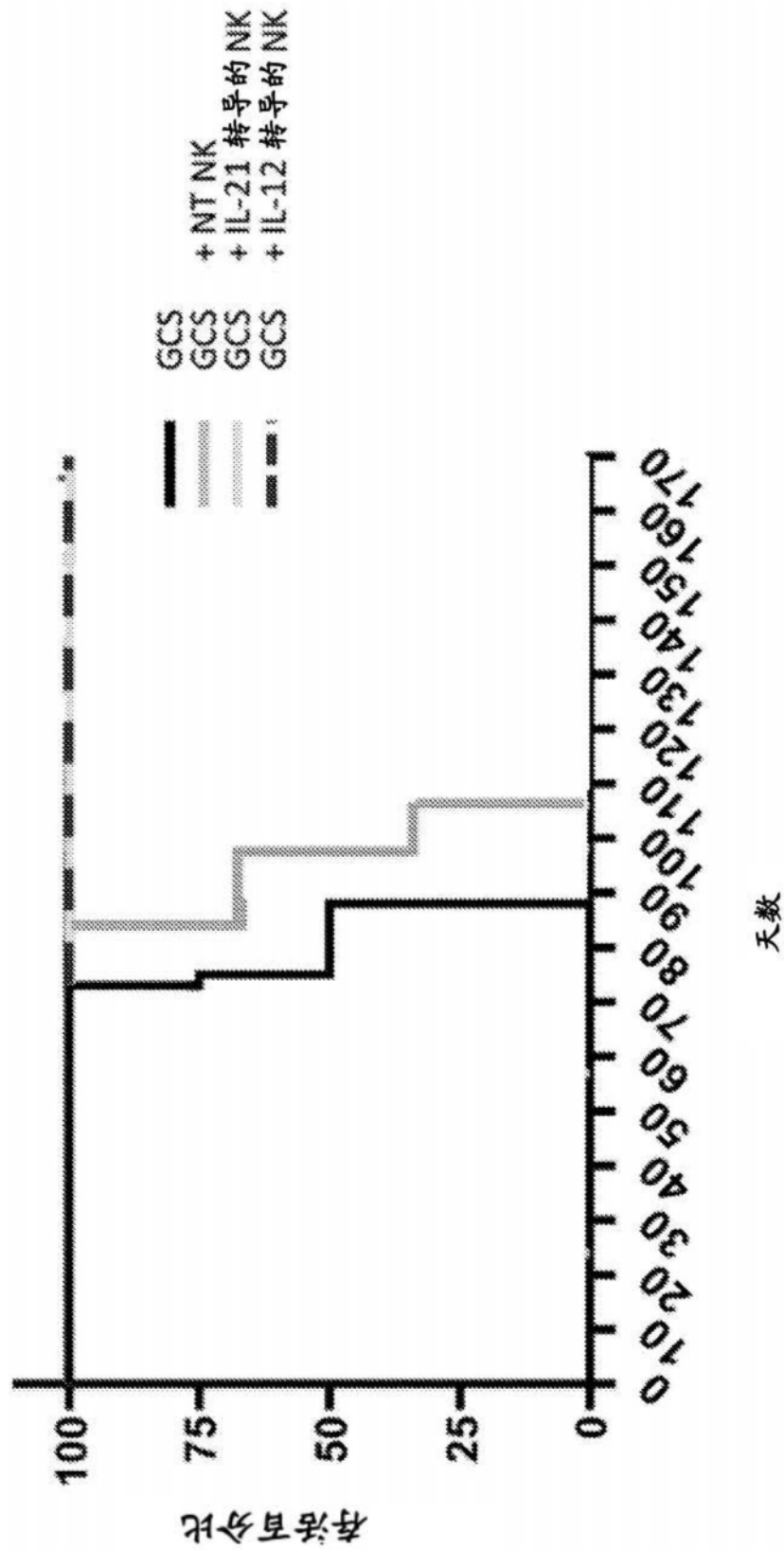


图4C