



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 111954714 A

(43) 申请公布日 2020.11.17

(21) 申请号 201980023038.1

朱莉·多纳西

(22) 申请日 2019.03.08

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

(30) 优先权数据

62/641,159 2018.03.09 US

代理人 武晶晶

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.09.28

(51) Int.Cl.

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/864 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/021315 2019.03.08

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 35/17 (2015.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2019/173693 EN 2019.09.12

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

(71) 申请人 T细胞受体治疗公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 帕特里克·亚历山大·博伊尔勒

罗伯特·霍夫梅斯特

丹尼尔·盖茨 菲利普·基弗-权

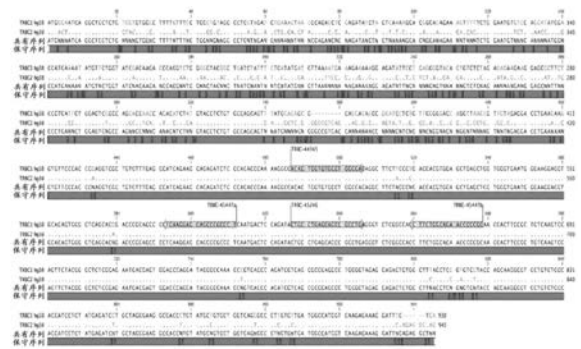
权利要求书7页 说明书62页 附图10页

(54) 发明名称

使用融合蛋白进行TCR重编程的组合物和方法

(57) 摘要

本文提供了编码T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 和TCR恒定结构域的重组核酸、表达编码的分子的经修饰的T细胞及其用于治疗包括癌症在内的疾病的方法。



1. 一种重组核酸,所述重组核酸包含
 - (a) 编码T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的序列,所述TFP包含
 - (i) TCR亚基,所述TCR亚基包含
 - (1) TCR胞外结构域的至少一部分,
 - (2) 跨膜结构域,和
 - (3) 胞内结构域,所述胞内结构域包含来自CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 或TCR β 的胞内信号传导结构域的刺激结构域,及
 - (ii) 包含抗原结合结构域的人抗体或人源化抗体;以及
 - (b) 编码TCR恒定结构域的序列,其中所述TCR恒定结构域是TCR α 恒定结构域、TCR β 恒定结构域或TCR α 恒定结构域和TCR β 恒定结构域;
其中所述TCR亚基与所述抗体可操作地连接,并且
其中当在包含内源TCR的功能性破坏的经修饰的T细胞中表达时,所述TFP功能性地掺入TCR复合物中。
 - (a) 编码T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的序列,所述TFP包含
 - (i) TCR亚基,所述TCR亚基包含
 - (1) TCR胞外结构域的至少一部分,
 - (2) 跨膜结构域,和
 - (3) 胞内结构域,所述胞内结构域包含来自CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 或TCR β 的胞内信号传导结构域的刺激结构域,及
 - (ii) 结合配体或其片段,所述结合配体或其片段能够与抗体或其片段结合;以及
 - (b) 编码TCR恒定结构域的序列,其中所述TCR恒定结构域是TCR α 恒定结构域、TCR β 恒定结构域或TCR α 恒定结构域和TCR β 恒定结构域;
其中所述TCR亚基和所述结合配体或其片段可操作地连接,并且
其中当在包含内源TCR的功能性破坏的经修饰的T细胞中表达时,所述TFP功能性地掺入TCR复合物中。
 3. 如权利要求2所述的重组核酸,其中所述结合配体能够结合所述抗体的Fc结构域。
 4. 如权利要求2所述的重组核酸,其中所述结合配体能够选择性地结合IgG1抗体。
 5. 如权利要求2所述的重组核酸,其中所述结合配体能够特异性结合IgG4抗体。
 6. 如权利要求2所述的重组核酸,其中所述抗体或其片段与细胞表面抗原结合。
 7. 如权利要求2所述的重组核酸,其中所述抗体或其片段与肿瘤细胞表面上的细胞表面抗原结合。
 8. 如权利要求2所述的重组核酸,其中所述结合配体包括单体、二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体或十聚体。
 9. 如权利要求2所述的重组核酸,其中所述结合配体不包括抗体或其片段。
 10. 如权利要求9所述的重组核酸,其中所述结合配体包括CD16多肽或其片段。
 11. 如权利要求10所述的重组核酸,其中所述结合配体包括CD16结合多肽。
 12. 如权利要求2所述的重组核酸,其中所述结合配体是人配体或人源化配体。
 13. 如权利要求2所述的重组核酸,所述重组核酸还包含编码能够被所述结合配体结合

的抗体或其片段的核酸序列。

14. 如权利要求13所述的重组核酸,其中所述抗体或其片段能够从细胞中分泌。

15. 一种重组核酸,所述重组核酸包含

(a) 编码T细胞受体 (TCR) 融合蛋白 (TFP) 的序列,所述TFP包含

(i) TCR亚基,所述TCR亚基包含

(1) TCR胞外结构域的至少一部分,

(2) 跨膜结构域,和

(3) 胞内结构域,所述胞内结构域包含来自CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 或TCR β 的胞内信号传导结构域的刺激结构域,及

(ii) 抗原结构域,所述抗原结构域包含与在细胞表面上表达的受体或多肽结合的配体或其片段;以及

(b) 编码TCR恒定结构域的序列,其中所述TCR恒定结构域是TCR α 恒定结构域、TCR β 恒定结构域或TCR α 恒定结构域和TCR β 恒定结构域;

其中所述TCR亚基与所述抗原结构域可操作地连接,并且

其中当在包含内源TCR的功能性破坏的经修饰的T细胞中表达时,所述TFP功能性地掺入TCR复合物中。

16. 如权利要求15所述的重组核酸,其中所述抗原结构域包括配体。

17. 如权利要求15所述的重组核酸,其中所述配体与细胞的所述受体结合。

18. 如权利要求15所述的重组核酸,其中所述配体与在细胞表面上表达的所述多肽结合。

19. 如权利要求15所述的重组核酸,其中在细胞表面上表达的所述受体或多肽包括应激反应受体或多肽。

20. 如权利要求15所述的重组核酸,其中在细胞表面上表达的所述受体或多肽是MHC I类相关糖蛋白。

21. 如权利要求20所述的重组核酸,其中所述MHC I类相关糖蛋白选自由以下组成的组: MICA、MICB、RAET1E、RAET1G、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4及其组合。

22. 如权利要求15所述的重组核酸,其中所述抗原结构域包括单体、二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体或十聚体。

23. 如权利要求22所述的重组核酸,其中所述抗原结构域包括配体或其片段的单体或二聚体。

24. 如权利要求15所述的重组核酸,其中所述配体或其片段是单体、二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体或十聚体。

25. 如权利要求24所述的重组核酸,其中所述配体或其片段是单体或二聚体。

26. 如权利要求15所述的重组核酸,其中所述抗原结构域不包括抗体或其片段。

27. 如权利要求15所述的重组核酸,其中所述抗原结构域不包括可变区。

28. 如权利要求15所述的重组核酸,其中所述抗原结构域不包括CDR。

29. 如权利要求15所述的重组核酸,其中所述配体或其片段是天然杀伤2D组 (NKG2D) 配体或其片段。

30. 如权利要求1-29中任一项所述的重组核酸,其中当在T细胞中表达时,所述TCR恒定

结构域掺入功能性TCR复合物中。

31. 如权利要求1-30中任一项所述的重组核酸,其中当在T细胞中表达时,所述TCR恒定结构域掺入到与掺入了TFP的功能性TCR复合物相同的功能性TCR复合物中。

32. 如权利要求1-31中任一项所述的重组核酸,其中编码所述TFP的所述序列和编码所述TCR恒定结构域的所述序列包含在同一核酸分子中。

33. 如权利要求1-31中任一项所述的重组核酸,其中编码所述TFP的所述序列和编码所述TCR恒定结构域的所述序列包含在不同的核酸分子中。

34. 如权利要求1-33所述的重组核酸,其中所述TCR亚基和所述抗体结构域、所述抗原结构域或所述结合配体或其片段通过接头序列可操作地连接。

35. 如权利要求34所述的重组核酸,其中所述接头序列包含 $(G_4S)_n$,其中 $n=1$ 至4。

36. 如权利要求1-35中任一项所述的重组核酸,其中所述跨膜结构域是来自CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 或TCR β 的TCR跨膜结构域。

37. 如权利要求1-36中任一项所述的重组核酸,其中所述胞内结构域仅源自CD3 ϵ 、仅源自CD3 γ 、仅源自CD3 δ 、仅源自TCR α 或仅源自TCR β 。

38. 如权利要求1-37中任一项所述的重组核酸,其中所述TCR亚基包含(i) TCR胞外结构域的至少一部分,(ii) TCR跨膜结构域,和(iii) TCR胞内结构域,其中(i)、(ii)和(iii)中的至少两个来自同一TCR亚基。

39. 如权利要求1-38中任一项所述的重组核酸,其中所述TCR胞外结构域包含选自由TCR α 链、TCR β 链、CD3 ϵ TCR亚基、CD3 γ TCR亚基、CD3 δ TCR亚基组成的组的蛋白质的胞外结构域或其部分、其功能性片段,以及其具有至少一个但不超过20个修饰的氨基酸序列。

40. 如权利要求1-39中任一项所述的重组核酸,其中所述TCR亚基包含跨膜结构域,所述跨膜结构域包含选自由TCR α 链、TCR β 链、TCR ζ 链、CD3 ϵ TCR亚基、CD3 γ TCR亚基、CD3 δ TCR亚基、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD28、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154组成的组的蛋白质的跨膜结构域、其功能性片段,以及其具有至少一个但不超过20个修饰的氨基酸序列。

41. 如权利要求1-40中任一项所述的重组核酸,其中所述TCR亚基包含TCR胞内结构域,所述TCR胞内结构域包含选自CD3 ϵ 、CD3 γ 或CD3 δ 的胞内信号传导结构域的蛋白质的刺激结构域,或对其具有至少一个修饰的氨基酸序列。

42. 如权利要求1-41中任一项所述的重组核酸,其中所述TCR亚基包含胞内结构域,所述胞内结构域包含选自4-1BB的功能性信号传导结构域和/或CD3 ζ 的功能性信号传导结构域的蛋白质的刺激结构域,或对其具有至少一个修饰的氨基酸序列。

43. 如权利要求1-42中任一项所述的重组核酸,所述重组核酸还包含编码共刺激结构域的序列。

44. 如权利要求43所述的重组核酸,其中所述共刺激结构域包含选自由OX40、CD2、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278) 和4-1BB (CD137) 组成的组的蛋白质的功能性信号传导结构域,以及对其具有至少一个但不超过20个修饰的氨基酸序列。

45. 如权利要求1-44中任一项所述的重组核酸,其中所述TCR亚基包含TCR亚基的基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM),所述ITAM包含选自由CD3 ζ TCR亚基、CD3 ϵ TCR亚基、CD3 γ TCR亚基、CD3 δ TCR亚基、TCR ζ 链、Fc ϵ 受体1链、Fc ϵ 受体2链、Fc γ 受体1链、Fc γ 受体2a链、

Fc γ 受体2b1链、Fc γ 受体2b2链、Fc γ 受体3a链、Fc γ 受体3b链、Fc β 受体1链、TYROBP (DAP12)、CD5、CD16a、CD16b、CD22、CD23、CD32、CD64、CD79a、CD79b、CD89、CD278、CD66d组成的组的蛋白质的ITAM或其部分、其功能性片段,以及对其具有至少一个但不超过20个修饰的氨基酸序列。

46. 如权利要求45所述的重组核酸,其中所述ITAM替代CD3 γ 、CD3 δ 或CD3 ϵ 的ITAM。

47. 如权利要求45所述的重组核酸,其中所述ITAM选自由CD3 ζ TCR亚基、CD3 ϵ TCR亚基、CD3 γ TCR亚基和CD3 δ TCR亚基组成的组,并替代选自由CD3 ζ TCR亚基、CD3 ϵ TCR亚基、CD3 γ TCR亚基和CD3 δ TCR亚基组成的组的不同的ITAM。

48. 如权利要求1-47中任一项所述的重组核酸,其中所述TFP、所述TCP α 恒定结构域、所述TCP β 恒定结构域及其任何组合能够与内源TCR复合物和/或至少一种内源TCR多肽功能性相互作用。

49. 如权利要求1-48中任一项所述的重组核酸,其中

(a) 所述TCR恒定结构域是TCR α 恒定结构域,并且所述TFP功能性整合到包含TCR β 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 或其组合的内源亚基的TCR复合物中;

(b) 所述TCR恒定结构域是TCR β 恒定结构域,并且所述TFP功能性整合到包含TCR α 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 或其组合的内源亚基的TCR复合物中;或者

(c) 所述TCR恒定结构域是TCR α 恒定结构域和TCR β 恒定结构域,并且所述TFP功能性整合到包含CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 或其组合的内源亚基的TCR复合物中。

50. 如权利要求1-49中任一项所述的重组核酸,其中所述对其的至少一个但不超过20个修饰包括介导细胞信号传导的氨基酸的修饰或响应于配体与所述TFP结合而被磷酸化的氨基酸的修饰。

51. 如权利要求1和34-50中任一项所述的重组核酸,其中所述人抗体或人源化抗体是抗体片段。

52. 如权利要求51所述的重组核酸,其中所述抗体片段是scFv、单结构域抗体结构域、V_H结构域或V_L结构域。

53. 如权利要求1和34-52中任一项所述的重组核酸,其中所述抗原结合结构域选自由以下组成的组:抗CD19结合结构域、抗B细胞成熟抗原(BCMA)结合结构域、抗间皮素(MSLN)结合结构域、抗IL13R α 2结合结构域、抗MUC16结合结构域、抗CD22结合结构域、抗PD-1结合结构域、抗BAFF或BAFF受体结合结构域和抗ROR-1结合结构域。

54. 如权利要求1-53中任一项所述的重组核酸,其中所述核酸选自由DNA和RNA组成的组。

55. 如权利要求1-54中任一项所述的重组核酸,其中所述核酸是mRNA。

56. 如权利要求1-55中任一项所述的重组核酸,其中所述重组核酸包含核酸类似物,其中所述核酸类似物不在所述重组核酸的编码序列中。

57. 如权利要求56所述的重组核酸,其中所述核酸类似物选自由以下组成的组:2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-氨基丙基、2'-脱氧、T-脱氧-2'-氟、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)、T-0-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)、2'-O-N-甲基乙酰氨基(2'-O-NMA)修饰的、锁核酸(LNA)、乙烯核酸(ENA)、肽核酸(PNA)、1',5'-脱水己糖醇核酸(HNA)、吗啉代、甲基膦酸酯

核苷酸、硫代磷酸酯核苷酸和2'-氟N3-P5'-亚磷酰胺。

58. 如权利要求1-57中任一项所述的重组核酸,所述重组核酸还包含前导序列。

59. 如权利要求1-58中任一项所述的重组核酸,所述重组核酸还包含启动子序列。

60. 如权利要求1-59中任一项所述的重组核酸,所述重组核酸还包含编码poly(A)尾的序列。

61. 如权利要求1-60中任一项所述的重组核酸,所述重组核酸还包含3' UTR序列。

62. 如权利要求1-61中任一项所述的重组核酸,其中所述核酸是分离的核酸或非天然存在的核酸。

63. 如权利要求1-62中任一项所述的重组核酸分子,其中所述核酸是体外转录的核酸。

64. 如权利要求1-63中任一项所述的重组核酸分子,所述重组核酸分子还包含编码TCR α 跨膜结构域的序列。

65. 如权利要求1-63中任一项所述的重组核酸分子,所述重组核酸分子还包含编码TCR β 跨膜结构域的序列。

66. 如权利要求1-63中任一项所述的重组核酸,所述重组核酸还包含编码TCR α 跨膜结构域的序列和编码TCR β 跨膜结构域的序列。

67. 一种载体,其包含权利要求1-66中任一项的重组核酸。

68. 如权利要求67所述的载体,其中所述载体选自由以下组成的组:DNA、RNA、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体(AAV)、劳斯肉瘤病毒(RSV)载体或逆转录病毒载体。

69. 如权利要求67或68所述的载体,其中所述载体是AAV6载体。

70. 如权利要求67-69中任一项所述的载体,所述载体还包含启动子。

71. 如权利要求67-70中任一项所述的载体,其中所述载体是体外转录的载体。

72. 一种经修饰的T细胞,其包含权利要求1-66中任一项所述的重组核酸或权利要求67-71中任一项所述的载体,其中所述经修饰的T细胞包含内源TCR的功能性破坏。

73. 一种经修饰的T细胞,其包含权利要求1-66中任一项所述的核酸的编码所述TFP的序列或由编码所述TFP的权利要求1-66中任一项所述的核酸的序列所编码的TFP,其中所述经修饰的T细胞包含内源TCR的功能性破坏。

74. 一种经修饰的同种异体T细胞,其包含权利要求1-66中任一项所述的编码所述TFP的序列或由编码所述TFP的权利要求1-66中任一项所述的核酸的序列所编码的TFP。

75. 如权利要求72-74中任一项所述的经修饰的T细胞,其中所述T细胞还包含编码TCR恒定结构域的异源序列,其中所述TCR恒定结构域是TCR α 恒定结构域、TCR β 恒定结构域或TCR α 恒定结构域和TCR β 恒定结构域。

76. 如权利要求72-75中任一项所述的经修饰的T细胞,其中被功能性破坏的所述内源TCR是内源TCR α 链、内源TCR β 链或内源TCR α 链和内源TCR β 链。

77. 如权利要求72-76中任一项所述的经修饰的T细胞,其中与未经修饰的对照T细胞相比,被功能性破坏的所述内源TCR与MHC-肽复合物的结合减少。

78. 如权利要求72-77中任一项所述的经修饰的T细胞,其中所述功能性破坏是编码所述内源TCR的基因的破坏。

79. 如权利要求78所述的经修饰的T细胞,其中编码所述内源TCR的基因的所述破坏是

从T细胞的所述基因组中去除编码所述内源TCR的基因序列。

80. 如权利要求72-79中任一项所述的经修饰的T细胞,其中所述T细胞是选自CD4细胞、CD8细胞、初始T细胞、记忆干T细胞、中枢记忆T细胞、双阴性T细胞、效应记忆T细胞、效应T细胞、Th0细胞、Tc0细胞、Th1细胞、Tc1细胞、Th2细胞、Tc2细胞、Th17细胞、Th22细胞、 γ/δ T细胞、天然杀伤(NK)细胞、天然杀伤T(NKT)细胞、造血干细胞和多能干细胞的人T细胞。

81. 如权利要求72-80中任一项所述的经修饰的T细胞,其中所述T细胞是CD8+T细胞或CD4+T细胞。

82. 如权利要求72-81中任一项所述的经修饰的T细胞,其中所述T细胞是同种异体T细胞。

83. 如权利要求72-82中任一项所述的经修饰的T细胞,所述经修饰的T细胞还包含编码抑制性分子的核酸,所述抑制性分子包含含有抑制性分子的至少一部分的第一多肽,所述第一多肽与包含来自胞内信号传导结构域的阳性信号的第二多肽缔合。

84. 如权利要求83所述的经修饰的T细胞,其中所述抑制性分子包含含有PD1的至少一部分的第一多肽和含有共刺激结构域和初级信号传导结构域的第二多肽。

85. 一种药物组合物,其包含:

- (a) 权利要求72-84中任一项所述的经修饰的T细胞;和
- (b) 药学上可接受的载体。

86. 一种产生权利要求72-84中任一项的经修饰的T细胞的方法,所述方法包括

(a) 破坏编码TCR α 链、TCR β 链或TCR α 链和TCR β 链的内源TCR基因;从而产生包含内源TCR基因的功能性破坏的T细胞;以及

(b) 用权利要求1-63中任一项所述的重组核酸或权利要求67-71中任一项所述的载体转导包含内源TCR基因的功能性破坏的所述T细胞。

87. 如权利要求86所述的方法,其中破坏包括用核酸酶蛋白或编码核酸酶蛋白的核酸序列转导所述T细胞,所述核酸酶蛋白靶向编码TCR α 链、TCR β 链或TCR α 链和TCR β 链的内源基因。

88. 一种产生权利要求72-84中任一项所述的经修饰的T细胞的方法,所述方法包括用权利要求1-63中任一项所述的重组核酸或权利要求67-71中任一项所述的载体转导包含内源TCR基因的功能性破坏的T细胞。

89. 如权利要求88所述的方法,其中包含内源TCR基因的功能性破坏的所述T细胞是包含编码TCR α 链、TCR β 链或TCR α 链和TCR β 链的内源TCR基因的功能性破坏的T细胞。

90. 如权利要求86-89中任一项所述的方法,其中所述T细胞是人T细胞。

91. 如权利要求86-90中任一项所述的方法,其中与未经修饰的对照T细胞相比,包含内源TCR基因的功能性破坏的所述T细胞与MHC肽复合物的结合减少。

92. 如权利要求86-91中任一项所述的方法,其中所述核酸酶是大范围核酸酶、锌指核酸酶(ZFN)、转录激活子样效应子核酸酶(TALEN)、CRISPR/Cas核酸酶或megaTAL核酸酶。

93. 如权利要求86-92中任一项所述的方法,其中将由所述重组核酸或所述载体所包含的所述序列在所述切割位点处插入所述内源TCR亚基基因中,并且其中所述将所述序列插入所述内源TCR亚基基因中功能性破坏了所述内源TCR亚基。

94. 如权利要求86-93中任一项所述的方法,其中所述核酸酶是大范围核酸酶。

95. 如权利要求94所述的方法,其中所述大范围核酸酶包含第一亚基和第二亚基,其中所述第一亚基与所述识别序列的第一识别半位点结合,并且其中所述第二亚基与所述识别序列的第二识别半位点结合。

96. 如权利要求95所述的方法,其中所述大范围核酸酶是包含接头的单链大范围核酸酶,其中所述接头共价连接所述第一亚基与所述第二亚基。

97. 一种治疗有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的权利要求85所述的药物组合物。

98. 一种治疗有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用药物组合物,所述药物组合物包含 (a) 根据权利要求86-96中任一项所述的方法产生的经修饰的T细胞;和 (b) 药学上可接受的载体。

99. 一种治疗有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用药物组合物,所述药物组合物包含 (a) 根据权利要求88-96中任一项所述的方法产生的经修饰的T细胞;和 (b) 药学上可接受的载体。

100. 如权利要求97-99中任一项所述的方法,其中所述经修饰的T细胞是同种异体T细胞。

101. 如权利要求97-100中任一项所述的方法,其中与施用了有效量的未经修饰的对照T细胞的受试者相比,所述受试者中释放的细胞因子较少。

102. 如权利要求97-101中任一项所述的方法,其中与施用了有效量的包含权利要求1-66中任一项的重组核酸或权利要求67-71中任一项所述的载体的经修饰的T细胞的受试者相比,所述受试者中释放的细胞因子较少。

103. 如权利要求97-102中任一项所述的方法,其中所述方法包括将所述药物组合物与增强所述药物组合物的功效的剂组合施用。

104. 如权利要求97-103中任一项所述的方法,其中所述方法包括将所述药物组合物与改善与所述药物组合物相关的一种或多种副作用的剂组合施用。

105. 如权利要求97-104中任一项所述的方法,其中所述癌症是实体癌、淋巴瘤或白血病。

106. 如权利要求97-105中任一项所述的方法,其中所述癌症选自由以下组成的组:肾细胞癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、结肠癌、宫颈癌、脑癌、肝癌、胰腺癌、肾癌和胃癌。

107. 如权利要求1-66中任一项所述的重组核酸、如权利要求67-71中任一项所述的载体、如权利要求72-84中任一项所述的经修饰的T细胞或如权利要求85所述的药物组合物,用作药剂或用于制备药剂。

使用融合蛋白进行TCR重编程的组合物和方法

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2018年3月9日提交的美国临时专利申请第62/641,159号的权益,该申请通过引用整体并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 大多数血液学恶性肿瘤或晚期实体瘤患者用标准疗法是无法治愈的。另外,常规治疗选项通常具有严重的副作用。已经进行了许多尝试来利用患者的免疫系统来排斥癌细胞,这种方法统称为癌症免疫疗法。然而,有几个障碍使其很难达到临床效果。虽然已经鉴定了数百种所谓的肿瘤抗原,但这些抗原通常来源于自身,因此可以针对健康组织实施癌症免疫治疗,或者免疫原性差。此外,癌细胞利用多种机制使其自身不可见或对癌症免疫疗法引发和传播的免疫攻击产生敌意。

[0005] 使用嵌合抗原受体(CAR)修饰的自体T细胞疗法(其依赖于将遗传工程化的T细胞重定向至癌细胞上的合适的细胞表面分子)的最新进展显示出在利用免疫系统的力量治疗B细胞恶性肿瘤方面的有希望的结果(参见,例如,Sadelain等人,Cancer Discovery 3:388-398(2013))。CD19特异性CAR T细胞(称为CTL019)的临床结果已显示患有慢性淋巴细胞性白血病(CLL)的患者以及患有急性淋巴母细胞白血病(ALL)的儿童完全缓解(参见,例如,Kalos等人,Sci Transl Med 3:95ra73(2011),Porter等人,NEJM 365:725-733(2011),Grupp等人,NEJM 368:1509-1518(2013))。替代方法是使用针对肿瘤相关肽抗原选择的T细胞受体(TCR)α链和β链对自体T细胞进行遗传工程。这些TCR链将形成完整的TCR复合物,并为T细胞提供具有第二确定特异性的TCR。对于在滑膜癌患者中表达NY-ESO-1-特异性TCRα链和β链的工程化的自体T细胞,获得了令人鼓舞的结果。

[0006] 除了表达CAR或第二TCR的遗传修饰的T细胞在体外/离体识别并破坏各自靶细胞的能力以外,利用工程化的T细胞进行的成功患者疗法还可能要求T细胞能够强烈活化、扩增和随时间推移的持续性,并且在疾病复发的情况下,使得能够产生“记忆”反应。CAR T细胞的高且可控制的临床疗效目前仅限于CD19阳性B细胞恶性肿瘤和表达HLA-A2的表达NY-ESO-1-肽的滑膜肉瘤患者。

发明内容

[0007] 显然有必要改进遗传工程化的T细胞,以更广泛地对抗各种人恶性肿瘤。

[0008] 本文描述了包含TCR亚基(包括CD3ε、CD3γ、CD3δ、TCRγ、TCRδ、TCRα和TCRβ链)的融合蛋白的经修饰的T细胞,所述TCR亚基具有对细胞表面抗原特异的结合结构域,所述经修饰的T细胞具有克服现有方法的局限性的潜力。另外,这些经修饰的T细胞可能破坏内源TCR(例如,TCRα、β或两者)的功能。这些经修饰的T细胞可具有比CAR更高效地杀死靶细胞,但释放相当或更低水平的促炎细胞因子的能力。这些经修饰的T细胞及其使用方法可代表这些细胞相对于CAR的有利方面,因为这些细胞因子水平的升高与过继性CAR-T疗法的剂量限制毒性相关。

[0009] 本文提供了包含T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)和TCR恒定结构域的经修饰的T细

胞,产生经修饰的T细胞的方法,及其用于治疗疾病的方法。

[0010] 在一些实施方案中,本文公开了重组核酸,所述重组核酸包含(a)编码T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)的序列,所述TFP包含(i)TCR亚基,所述TCR亚基包含(1)TCR胞外结构域的至少一部分,(2)跨膜结构域,和(3)胞内结构域,所述胞内结构域包含来自CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR γ 、TCR δ 、TCR α 或TCR β 的胞内信号传导结构域的刺激结构域,及(ii)包含抗原结合结构域的人抗体或人源化抗体;以及(b)编码TCR恒定结构域的序列,其中所述TCR恒定结构域是TCR α 恒定结构域、TCR β 恒定结构域、TCR α 恒定结构域和TCR β 恒定结构域、TCR γ 恒定结构域、TCR δ 恒定结构域或TCR γ 恒定结构域和TCR δ 恒定结构域;其中所述TCR亚基与所述抗体可操作地连接,并且其中当在T细胞中表达时,所述TFP功能性地掺入TCR复合物中。

[0011] 在一些实施方案中,本文公开了重组核酸,所述重组核酸包含(a)编码T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)的序列,所述TFP包含(i)TCR亚基,所述TCR亚基包含(1)TCR胞外结构域的至少一部分,(2)跨膜结构域,和(3)胞内结构域,所述胞内结构域包含来自CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 或TCR β 的胞内信号传导结构域的刺激结构域,及(ii)结合配体或其片段,所述结合配体或其片段能够与抗体或其片段结合;以及(b)编码TCR恒定结构域的序列,其中所述TCR恒定结构域是TCR α 恒定结构域、TCR β 恒定结构域或TCR α 恒定结构域和TCR β 恒定结构域;其中所述TCR亚基和所述结合配体或其片段可操作地连接,并且其中当在包含内源TCR的功能性破坏的T细胞中表达时,所述TFP功能性掺入TCR复合物中。在一些情况下,结合配体能够结合抗体的Fc结构域。在一些情况下,结合配体能够选择性地结合IgG1抗体。在一些情况下,结合配体能够特异性结合IgG1抗体。在一些情况下,抗体或其片段与细胞表面抗原结合。在一些情况下,抗体或其片段与肿瘤细胞表面的细胞表面抗原结合。在一些情况下,结合配体包括单体、二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体或十聚体。在一些情况下,结合配体不包括抗体或其片段。在一些情况下,结合配体包括CD16多肽或其片段。在一些情况下,结合配体包括CD16结合多肽。在一些情况下,结合配体是人结合配体或人源化结合配体。在一些情况下,重组核酸还包含编码能够被结合配体结合的抗体或其片段的核酸序列。在一些情况下,抗体或其片段能够从细胞分泌。

[0012] 在一些实施方案中,本文公开了重组核酸,所述重组核酸包含(a)编码T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)的序列,所述TFP包含(i)TCR亚基,所述TCR亚基包含(1)TCR胞外结构域的至少一部分,(2)跨膜结构域,和(3)胞内结构域,所述胞内结构域包含来自CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 或TCR β 的胞内信号传导结构域的刺激结构域,及(ii)抗原结构域,所述抗原结构域包含与在细胞表面上表达的受体或多肽结合的配体或其片段;以及(b)编码TCR恒定结构域的序列,其中TCR恒定结构域是TCR α 恒定结构域、TCR β 恒定结构域或TCR α 恒定结构域和TCR β 恒定结构域;其中TCR亚基与抗原结构域可操作地连接,并且其中当在包含内源TCR的功能性破坏的T细胞中表达时,TFP在功能性掺入TCR复合物中。在一些情况下,抗原结构域包括配体。在一些情况下,配体与细胞的受体结合。在一些情况下,配体与在细胞表面上表达的多肽结合。在一些情况下,在细胞表面上表达的受体或多肽包括应激反应受体或多肽。在一些情况下,在细胞表面上表达的受体或多肽是MHC I类相关糖蛋白。在一些情况下,MHC I类相关糖蛋白选自由以下组成的组:MICA、MICB、RAET1E、RAET1G、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4及其组合。在一些情况下,抗原结构域包括单体、二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体或十聚体。在一些情况下,抗原结构域包括配体或其片

段的单体或二聚体。在一些情况下,配体或其片段是单体、二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体或十聚体。在一些情况下,配体或其片段是单体或二聚体。在一些情况下,抗原结构域不包括抗体或其片段。在一些情况下,抗原结构域不包括可变区。在一些情况下,抗原结构域不包括CDR。在一些情况下,配体或其片段是天然杀伤2D组(NKG2D)配体或其片段。

[0013] 在一些实施方案中,对于上文公开的重组核酸,当在T细胞中表达时,TCR恒定结构域掺入功能性TCR复合物中。在一些情况下,当在T细胞中表达时,TCR恒定结构域掺入到与掺入了TFP的功能性TCR复合物相同的功能性TCR复合物中。在一些情况下,编码TFP的序列和编码TCR恒定结构域的序列包含在同一核酸分子中。在一些情况下,编码TFP的序列和编码TCR恒定结构域的序列包含在不同的核酸分子中。在一些情况下,TCR亚基和抗体结构域、抗原结构域或结合配体或其片段通过接头序列可操作地连接。在一些情况下,接头序列包含 $(G_4S)_n$,其中 $n=1$ 至 4 。在一些情况下,跨膜结构域是来自 $CD3\epsilon$ 、 $CD3\gamma$ 、 $CD3\delta$ 、 $TCR\alpha$ 或 $TCR\beta$ 的TCR跨膜结构域。在一些情况下,胞内结构域仅源自 $CD3\epsilon$ 、仅源自 $CD3\gamma$ 、仅源自 $CD3\delta$ 、仅源自 $TCR\alpha$ 或仅源自 $TCR\beta$ 。在一些情况下,TCR亚基包含(i) TCR胞外结构域的至少一部分,(ii) TCR跨膜结构域,和(iii) TCR胞内结构域,其中(i)、(ii)和(iii)中的至少两个来自同一TCR亚基。在一些情况下,TCR胞外结构域包含选自由 $TCR\alpha$ 链、 $TCR\beta$ 链、 $CD3\epsilon$ TCR亚基、 $CD3\gamma$ TCR亚基、 $CD3\delta$ TCR亚基组成的组的蛋白质的胞外结构域或其部分、其功能性片段,以及其具有至少一个但不超过20个修饰的氨基酸序列。在一些情况下,TCR亚基包含跨膜结构域,所述跨膜结构域包含选自由 $TCR\alpha$ 链、 $TCR\beta$ 链、 $TCR\gamma$ 链、 $TCR\delta$ 链、 $TCR\zeta$ 链、 $CD3\epsilon$ TCR亚基、 $CD3\gamma$ TCR亚基、 $CD3\delta$ TCR亚基、 $CD45$ 、 $CD4$ 、 $CD5$ 、 $CD8$ 、 $CD9$ 、 $CD16$ 、 $CD22$ 、 $CD33$ 、 $CD28$ 、 $CD37$ 、 $CD64$ 、 $CD80$ 、 $CD86$ 、 $CD134$ 、 $CD137$ 、 $CD154$ 组成的组的蛋白质的跨膜结构域、其功能性片段,以及其具有至少一个但不超过20个修饰的氨基酸序列。在一些情况下,TCR亚基包含TCR胞内结构域,其包含选自 $CD3\epsilon$ 、 $CD3\gamma$ 或 $CD3\delta$ 的胞内信号传导结构域的蛋白质的刺激结构域,或对其具有至少一个修饰的氨基酸序列。在一些情况下,TCR亚基包含胞内结构域,其包含选自4-1BB的功能性信号传导结构域和/或 $CD3\zeta$ 的功能性信号传导结构域的蛋白质的刺激结构域,或对其具有至少一个修饰的氨基酸序列。在一些情况下,重组核酸还包含编码共刺激结构域的序列。在一些情况下,共刺激结构域包含选自由OX40、 $CD2$ 、 $CD27$ 、 $CD28$ 、 CDS 、 $ICAM-1$ 、 $LFA-1$ ($CD11a/CD18$)、 $ICOS$ ($CD278$)和4-1BB ($CD137$)组成的组的蛋白质的功能性信号传导结构域,以及对其具有至少一个但不超过20个修饰的氨基酸序列。在一些情况下,TCR亚基包含TCR亚基的基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM),所述ITAM包含选自由 $CD3\zeta$ TCR亚基、 $CD3\epsilon$ TCR亚基、 $CD3\gamma$ TCR亚基、 $CD3\delta$ TCR亚基、 $TCR\zeta$ 链、 $Fc\epsilon$ 受体1链、 $Fc\epsilon$ 受体2链、 $Fc\gamma$ 受体1链、 $Fc\gamma$ 受体2a链、 $Fc\gamma$ 受体2b1链、 $Fc\gamma$ 受体2b2链、 $Fc\gamma$ 受体3a链、 $Fc\gamma$ 受体3b链、 $Fc\beta$ 受体1链、 $TYROBP$ ($DAP12$)、 $CD5$ 、 $CD16a$ 、 $CD16b$ 、 $CD22$ 、 $CD23$ 、 $CD32$ 、 $CD64$ 、 $CD79a$ 、 $CD79b$ 、 $CD89$ 、 $CD278$ 、 $CD66d$ 组成的组的蛋白质的ITAM或其部分、其功能性片段,以及对其具有至少一个但不超过20个修饰的氨基酸序列。在一些情况下,所述ITAM替代 $CD3\gamma$ 、 $CD3\delta$ 或 $CD3\epsilon$ 的ITAM。在一些情况下,ITAM选自由 $CD3\zeta$ TCR亚基、 $CD3\epsilon$ TCR亚基、 $CD3\gamma$ TCR亚基和 $CD3\delta$ TCR亚基组成的组,并替代选自由 $CD3\zeta$ TCR亚基、 $CD3\epsilon$ TCR亚基、 $CD3\gamma$ TCR亚基和 $CD3\delta$ TCR亚基组成的组的不同的ITAM。在一些情况下,TFP、 $TCR\alpha$ 恒定结构域、 $TCR\beta$ 恒定结构域及其任何组合都能够与内源TCR复合物和/或至少一种内源TCR多肽功能性相互作用。在一些情况下,(a) TCR恒定结构域是 $TCR\alpha$ 恒定结构域,并

且TFP功能性整合到包含TCRB、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 或其组合的内源亚基的TCR复合物中；(b) TCR恒定结构域是TCR β 恒定结构域，并且TFP功能性整合到包含TCR α 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 或其组合的内源亚基的TCR复合物中；或(c) TCR恒定结构域是TCR α 恒定结构域和TCR β 恒定结构域，并且TFP功能性整合到包含CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 或其组合的内源亚基的TCR复合物中。在一些情况下，对其的至少一个但不超过20个修饰包括介导细胞信号传导的氨基酸的修饰或响应于配体与TFP结合而被磷酸化的氨基酸的修饰。在一些情况下，人抗体或人源化抗体是抗体片段。在一些情况下，抗体片段是scFv、单结构域抗体结构域、V_H结构域或V_L结构域。在一些情况下，包含抗原结合结构域的人抗体或人源化抗体选自自由以下组成的组：抗CD19结合结构域、抗B细胞成熟抗原 (BCMA) 结合结构域、抗间皮素 (MSLN) 结合结构域、抗-IL13R α 2结合结构域、抗MUC16结合结构域、抗CD22结合结构域、抗PD-1结合结构域、抗BAFF或BAFF受体结合结构域和抗ROR-1结合结构域。在一些情况下，核酸选自自由DNA和RNA组成的组。在一些情况下，核酸是mRNA。在一些情况下，重组核酸包含核酸类似物，其中所述核酸类似物不在重组核酸的编码序列中。在一些情况下，核酸类似物选自自由以下组成的组：2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基 (2'-O-MOE)、2'-O-氨基丙基、2'-脱氧、T-脱氧-2'-氟、2'-O-氨基丙基 (2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基 (2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基 (2'-O-DMAP)、T-O-二甲基氨基乙氧基乙基 (2'-O-DMAEOE)、2'-O-N-甲基乙酰氨基 (2'-O-NMA) 修饰的、锁核酸 (LNA)、乙烯核酸 (ENA)、肽核酸 (PNA)、1',5'-脱水己糖醇核酸 (HNA)、吗啉代、甲基膦酸酯核苷酸、硫代膦酸酯核苷酸和2'-氟N3-P5'-亚磷酰胺。在一些情况下，重组核酸还包含前导序列。在一些情况下，重组核酸还包含启动子序列。在一些情况下，重组核酸还包含编码poly (A) 尾的序列。在一些情况下，重组核酸还包含3' UTR序列。在一些情况下，核酸是分离的核酸或非天然存在的核酸。在一些情况下，核酸是体外转录的核酸。在一些情况下，重组核酸还包含编码TCR α 跨膜结构域的序列。在一些情况下，重组核酸还包含编码TCR β 跨膜结构域的序列。在一些情况下，重组核酸还包含编码TCR α 跨膜结构域的序列和编码TCR β 跨膜结构域的序列。

[0014] 在一些实施方案中，本文公开了包含本文公开的重组核酸的载体。在一些情况下，载体选自自由以下组成的组：DNA、RNA、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体 (AAV)、劳斯肉瘤病毒 (RSV) 载体或逆转录病毒载体。在一些情况下，载体是AAV6载体。在一些情况下，载体还包含启动子。在一些情况下，载体是体外转录的载体。

[0015] 在一些实施方案中，本文公开了经修饰的T细胞，其包含上文公开的重组核酸或上文公开的载体；其中经修饰的T细胞包含内源TCR的功能性破坏。在一些实施方案中，本文还公开了经修饰的T细胞，其包含上文公开的核酸的编码TFP的序列或由编码TFP的上文公开的核酸的序列所编码的TFP，其中所述经修饰的T细胞包含内源TCR的功能性破坏。本文还公开了经修饰的同种异体T细胞，其包含编码上文公开的TFP的序列或由编码TFP的上文公开的核酸的序列所编码的TFP。在一些情况下，T细胞还包含编码TCR恒定结构域的异源序列，其中TCR恒定结构域是TCR α 恒定结构域、TCR β 恒定结构域或TCR α 恒定结构域和TCR β 恒定结构域。在一些情况下，被功能性破坏的内源TCR是内源TCR α 链、内源TCR β 链或内源TCR α 链和内源TCR β 链。在一些情况下，与未经修饰的对照T细胞相比，被功能性破坏的内源TCR与MHC-肽复合物的结合减少。在一些情况下，功能性破坏是编码内源TCR的基因的破坏。在一些情况下，编码内源TCR的基因的破坏是从T细胞的基因组中去除编码内源TCR的基因序列。在一

些情况下,T细胞是人T细胞。在一些情况下,T细胞是CD8+T细胞、CD4+T细胞、初始T细胞、记忆干T细胞、中枢记忆T细胞、双阴性T细胞、效应记忆T细胞、效应T细胞、Th0细胞、Tc0细胞、Th1细胞、Tc1细胞、Th2细胞、Tc2细胞、Th17细胞、Th22细胞、 γ δ T细胞、天然杀伤(NK)细胞、天然杀伤T(NKT)细胞、造血干细胞或多能干细胞。在一些情况下,T细胞是CD8+T细胞或CD4+T细胞。在一些情况下,T细胞是同种异体T细胞。在一些情况下,经修饰的T细胞还包含编码抑制性分子的核酸,所述抑制性分子包含含有抑制性分子的至少一部分的第一多肽,所述第一多肽与包含来自胞内信号传导结构域的阳性信号的第二多肽缔合。在一些情况下,抑制性分子包含含有PD1的至少一部分的第一多肽和含有共刺激结构域和初级信号传导结构域的第二多肽。

[0016] 在一些实施方案中,本文公开了药物组合物,其包含:(a)本公开的经修饰的T细胞;和(b)药学上可接受的载体。

[0017] 在一些实施方案中,本文公开了产生本公开的经修饰的T细胞的方法,该方法包括(a)破坏编码TCR α 链、TCR β 链或TCR α 链和TCR β 链的内源TCR基因;从而产生含有内源TCR基因的功能性破坏的T细胞;以及(b)用重组核酸或本文公开的载体转导含有内源TCR基因的功能性破坏的T细胞。在一些情况下,破坏包括用核酸酶蛋白或编码核酸酶蛋白的核酸序列转导T细胞,所述核酸酶蛋白靶向编码TCR α 链,TCR β 链或TCR α 链和TCR β 链的内源基因。在一些实施方案中,本文还公开了产生本公开的经修饰的T细胞的方法,所述方法包括用本文公开的重组核酸或载体转导含有内源TCR基因的功能性破坏的T细胞。在一些情况下,含有内源TCR基因的功能性破坏的T细胞是含有编码TCR α 链、TCR β 链或TCR α 链和TCR β 链的内源TCR基因的功能性破坏的T细胞。在一些情况下,T细胞是人T细胞。在一些情况下,与未经修饰的对照T细胞相比,包含内源TCR基因的功能性破坏的T细胞与MHC-肽复合物的结合减少。在一些情况下,核酸酶是大范围核酸酶、锌指核酸酶(ZFN)、转录激活子样效应子核酸酶(TALEN)、CRISPR/Cas核酸酶或megaTAL核酸酶。在一些情况下,将由重组核酸或载体所包含的序列在切割位点处插入内源TCR亚基基因,并且其中将序列插入内源TCR亚基基因功能性破坏内源TCR亚基。在一些情况下,核酸酶是大范围核酸酶。在一些情况下,大范围核酸酶包含第一亚基和第二亚基,其中第一亚基与识别序列的第一识别半位点结合,并且其中第二亚基与识别序列的第二识别半位点结合。在一些情况下,大范围核酸酶是包含接头的单链大范围核酸酶,其中接头共价连接第一亚基与第二亚基。

[0018] 在一些实施方案中,本文公开了治疗有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的本文公开的药物组合物。在一些实施方案中,本文还公开治疗有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向受试者施用药物组合物,所述药物组合物包含(a)根据本文公开的方法产生的经修饰的T细胞;和(b)药学上可接受的载体。在一些情况下,经修饰的T细胞是同种异型(allogeneic)T细胞。在一些情况下,与施用了有效量的未经修饰的对照T细胞的受试者相比,受试者中释放的细胞因子较少。在一些情况下,与施用了有效量的包含本文公开的重组核酸或本文公开的载体的经修饰的T细胞的受试者相比,受试者中释放的细胞因子较少。在一些情况下,所述方法包括将药物组合物与增强药物组合物功效的剂组合施用。在一些情况下,所述方法包括将药物组合物与改善与所述药物组合物相关的一种或多种副作用的剂组合施用。在一些情况下,癌症是实体癌、淋巴瘤或白血病。在一些情况下,所述癌症选自由以下组成的组:肾细胞癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列

腺癌、结肠癌、宫颈癌、脑癌、肝癌、胰腺癌、肾癌和胃癌。

[0019] 在一些实施方案中,本文公开了本文公开的重组核酸、载体、经修饰的T细胞或药物组合物,其用作药剂或用于制备药剂。

[0020] 通过引用并入

[0021] 本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请通过引用并入本文,就如每个单独的出版物、专利或专利申请被具体地和单独地指出通过引用并入本文的程度一样。其程度如同每个单独出版物、专利和专利申请具体地和单独地指出通过引用方并入。

[0022] 附图简述

[0023] 图1是TRBC1与TRBC2之间的序列比对,选择的crRNA由TRBC1序列上方的箭头表示。

[0024] 图2A-B描绘了显示在TRA编辑的(图2A)和TRB编辑的(图2B)细胞中CD3(SK7)对比TCR $\alpha\beta$ (IP26)的表面表达的图。在TRAC或TRBC基因处编辑野生型Jurkat细胞,以破坏TRA或TRB表面表达。使用磁激活细胞分选法纯化对CD3和TCR $\alpha\beta$ 呈阴性的细胞。绘制图上的门控以描绘CD3和TCR $\alpha\beta$ 阴性-阴性细胞群,每个象限中保留的细胞百分比显示于角落处。

[0025] 图3A-E描绘了显示纯化之前和之后野生型细胞对比编辑的(TRA/B被破坏的)细胞中的CD3对比TCR $\alpha\beta$ 的表面表达的图。在TRAC(图3B或图3D)或TRBC(图3C或图3E)基因处编辑野生型供体1T细胞(图3A)以破坏TRA或TRB的表面表达。图3B和图3C显示刚好在编辑后CD3对比TCR $\alpha\beta$ 表面标志物的状态,而图3D和图3E显示这些表面标志物在使用磁激活细胞分选(MACS)进行其阴性选择后的状态。绘制图上的门控以描绘CD3和TCR $\alpha\beta$ 阴性-阴性细胞群,每个象限中保留的细胞百分比显示于角落处。

[0026] 图4描绘了通过观察它们的增殖速率来测量TCR阴性T细胞的同种异体性(allogenicity)的示例图。用CSFE染料永久标记TCR阴性T细胞,所述染料的浓度会随着细胞分裂而减半。沿X轴的全灰色峰显示作为阴性对照的未标记细胞中的CSFE信号。灰线显示在没有任何刺激的情况下24小时后细胞中的CSFE量,而黑线表示在共培养5天(有刺激)后的CSFE量。Y轴表示细胞百分比。TRA阴性T细胞显示在最上面的四个图中,而TRB阴性T细胞显示在最下面的四个图上。同种异体反应表明将TRA KO供体2T细胞与来自不同单倍型供体(供体1)的PBMC混合,而自体反应表明将T细胞与相同供体的PBMC共培养。在PMA和离子霉素小组中指示了TCR独立刺激的阳性对照。

[0027] 图5描述了产生同种异体TFP T细胞的示例性策略。下面的数字对应于图5中的编号的附图。(1)显示T细胞上的内源TCR $\alpha\beta$ 与抗原呈递细胞上的MHC I和抗原相互作用。(2)显示TRBC与与TFP结合剂融合的TRAC在TRA $-/-$ 或TRB $-/-$ 细胞中的共表达。(3)显示小鼠TRBC与与TFP结合剂融合的小鼠TRAC在TRA $-/-$ 或TRB $-/-$ 细胞中的共表达。(4)显示鼠源化TRBC与与TFP结合剂融合的鼠源化TRAC在TRA $-/-$ 或TRB $-/-$ 细胞中的共表达。(5)显示TRA $-/-$ 细胞中的由增强型TRAC蛋白携带的TFP结合剂,其对TCR β 具有强亲和力。(6)显示一种策略,其中为了增强TRAC与TRBC之间的相互作用,将IgG恒定结构域在每个TCR恒定结构域的C末端与TCR恒定结构域融合。在TRA $-/-$ 或TRB $-/-$ 细胞中TFP结合剂与IgG恒定结构域的C末端融合。(7)显示一种策略,其中TRAC和TRBC的N-末端部分分别被它们在TCR γ 和TCR δ 中的同源部分替代。在TRA $-/-$ 或TRB $-/-$ 细胞中,TFP结合剂由TRAC和/或TRBC携带。

[0028] 图6描绘了显示使得能够产生同种异体TFP T细胞的T2A自我切割序列的敲入策略的示例性示意图。

[0029] 图7描绘了显示如通过实施例6中所述的Luc-Cyto测定法所测定的TCR $\alpha\beta$ 和CD3 ϵ (人)或小鼠TCR β 的表面表达的示例图。

[0030] 图8描绘了显示以3:1、1:1或1:3的比率与肿瘤靶细胞(顶图为Na1m 6细胞,底图为K562细胞)一起培养的T效应细胞的Luc-Cyto分析的示例图。靶(CD19阳性)细胞显示在左图中。x轴代表肿瘤细胞裂解的百分比。

[0031] 图9A-C描绘了显示野生型细胞(图9A)、无转导的TRB KO细胞(图9B)、具有TCR β 全长(FL)TFP的转导的TRB KO细胞(图9C)中的CD3对比TCR $\alpha\beta$ 的表面表达的示例图,绘制图上的门控以描绘CD3和TCR $\alpha\beta$ 阴性-阴性细胞群,每个象限中保留的细胞百分比显示于角落处。

[0032] 图10A-B描绘了显示用人TRBC基因(图10A)和用鼠TRAC-T2A-TRBC基因(图10B)转导的TRB敲除细胞中CD3对比TCR $\alpha\beta$ 的表面表达的示例图。绘制图上的门控以描绘CD3和TCR $\alpha\beta$ 阴性-阴性细胞群,每个象限中保留的细胞百分比显示于角落处。

具体实施方式

[0033] 在一些实施方案中,本文公开了重组核酸,所述重组核酸包含(a)编码T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)的序列,所述TFP包含(i)TCR亚基,所述TCR亚基包含(1)TCR胞外结构域的至少一部分,(2)跨膜结构域,和(3)胞内结构域,所述胞内结构域包含来自CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 、TCR β 、TCR γ 或TCR δ 的胞内信号传导结构域的刺激结构域,及(ii)包含抗原结合结构域的人抗体或人源化抗体;以及(b)编码TCR恒定结构域的序列,其中所述TCR恒定结构域是TCR α 恒定结构域、TCR β 恒定结构域、TCR α 恒定结构域和TCR β 恒定结构域;其中所述TCR亚基与所述抗体可操作地连接,并且其中当在T细胞中表达时,所述TFP功能性地掺入TCR复合物中。

[0034] 在一些实施方案中,本文公开了重组核酸,所述重组核酸包含(a)编码T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)的序列,所述TFP包含(i)TCR亚基,所述TCR亚基包含(1)TCR胞外结构域的至少一部分,(2)跨膜结构域,和(3)胞内结构域,所述胞内结构域包含来自CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 或TCR β 的胞内信号传导结构域的刺激结构域,及(ii)结合配体或其片段,所述结合配体或其片段能够与抗体或其片段结合;以及(b)编码TCR恒定结构域的序列,其中所述TCR恒定结构域是TCR α 恒定结构域、TCR β 恒定结构域或TCR α 恒定结构域和TCR β 恒定结构域;其中所述TCR亚基和所述结合配体或其片段可操作地连接,并且其中当在T细胞中表达时,所述TFP功能性地掺入TCR复合物中。

[0035] 在一些实施方案中,本文公开了重组核酸,所述重组核酸包含(a)编码T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)的序列,所述TFP包含(i)TCR亚基,所述TCR亚基包含(1)TCR胞外结构域的至少一部分,(2)跨膜结构域,和(3)胞内结构域,所述胞内结构域包含来自CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 或TCR β 的胞内信号传导结构域的刺激结构域,及(ii)抗原结构域,所述抗原结构域包含与在细胞表面上表达的受体或多肽结合的配体或其片段;以及(b)编码TCR恒定结构域的序列,其中TCR恒定结构域是TCR α 恒定结构域、TCR β 恒定结构域或TCR α 恒定结构域和TCR β 恒定结构域;其中TCR亚基与抗原结构域可操作地连接,并且其中当在T细胞中表达时,TFP功能性地掺入TCR复合物中。

[0036] 在一些实施方案中,本文公开了包含本文公开的重组核酸的载体。

[0037] 在一些实施方案中,本文公开了经修饰的T细胞,其包含本文公开的重组核酸或本

文公开的载体;其中经修饰的T细胞包含内源TCR的功能性破坏。

[0038] 在一些实施方案中,本文公开了经修饰的T细胞,其包含本文公开的核酸的编码TFP的序列或由本文公开的核酸的序列所编码的TFP,其中所述经修饰的T细胞包含内源TCR的功能性破坏。

[0039] 在一些实施方案中,本文公开了经修饰的同种异体T细胞,其包含本文公开的编码TFP的序列或由本文公开的核酸的序列所编码的TFP。

[0040] 在一些实施方案中,本文公开了药物组合物,其包含:(a)本公开的经修饰的T细胞;和(b)药学上可接受的载体。

[0041] 在一些实施方案中,本文公开了产生本公开的经修饰的T细胞的方法,该方法包括(a)破坏编码TCR α 链、TCR β 链或TCR α 链和TCR β 链的内源TCR基因;从而产生含有内源TCR基因的功能性破坏的T细胞;以及(b)用本公开的重组核酸或本文公开的载体转导含有内源TCR基因的功能性破坏的T细胞。

[0042] 在一些实施方案中,本文公开了产生本公开内容的修饰的T细胞的方法,该方法包括用本文公开的重组核酸或本文公开的载体转导含有内源TCR基因的功能性破坏的T细胞。

[0043] 在一些实施方案中,本文公开了治疗有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的本文公开的药物组合物。

[0044] 在一些实施方案中,本文公开治疗有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向受试者施用药物组合物,所述药物组合物包含(a)根据本文公开的方法产生的经修饰的T细胞;和(b)药学上可接受的载体。

[0045] 某些术语

[0046] 除非另有定义,否则本文中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含义相同的含义。

[0047] 术语“一个/种(a)”和“一个/种(an)”是指物品的语法对象中的一个或多个(即,至少一个)。举例来说,“一个/种(an)元件”是指一个/种元件或不止一个/种元件。

[0048] 如本文中所用,“约”可以表示加或减小于1%或1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%或大于30%,这取决于本领域技术人员已知或可知的情况。

[0049] 如本文中所用,“受试者(subject)”或“受试者(subjects)”或“个体”可以包括但不限于哺乳动物,诸如人或非人哺乳动物,例如驯养动物、农业动物或野生动物以及鸟类和水生动物。“患者”是患有疾病、病症或疾患或有发展所述疾病、病症或疾患的风险或另外地需要本文提供的组合物和方法的受试者。

[0050] 如本文中所用,“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”是指疾病或疾患的成功治疗或改善的任何征候。治疗可包括例如减轻、延迟或缓解疾病或疾患的一个或多个症状的严重度,或者其可包括降低由患者经历疾病、缺陷、病症或不利状况等的症状的频率。如本文中所用,“治疗或预防”有时在本文中用于指导致疾病或疾患的某种程度的治疗或改善的方法,并考虑了针对该目的的一系列结果,包括但不限于疾患的完全预防。

[0051] 如本文中所用,“预防”是指对患者中的疾病或疾患,例如肿瘤形成的预防。例如,如果用本公开的方法治疗了有发展肿瘤或其它形式的癌症的风险的个体,并且所述个体后来没有发展肿瘤或其它形式的癌症,则在该个体中在至少一段时间内该疾病已被预防。

[0052] 如本文中所示，“治疗有效量”是足以向施用组合物的个体提供有益效果或以其它方式减少有害的非有益事件的组合物或其活性成分的量。本文中的“治疗有效剂量”是指对于其施用产生一种或多种所需的或期望的（例如，有益的）作用的剂量，这种施用在给定的时间段内发生一次或多次。确切的剂量将取决于治疗的目的，并且将可由本领域技术人员使用已知技术来确定（参见，例如Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (第1-3卷, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); 以及Pickar, *Dosage Calculations* (1999))

[0053] 如本文中所示，“T细胞受体 (TCR) 融合蛋白”或“TFP”包括源自包括TCR在内的各种多肽的重组多肽，所述重组多肽通常能够i) 与靶细胞上的表面抗原结合并且ii) 通常在T细胞内或其表面上共同定位时，与完整TCR复合物的其它多肽组分相互作用。

[0054] 术语“刺激”是指通过刺激结构域或刺激性分子（例如，TCR/CD3复合物）与其相关配体的结合（从而介导信号传导事件，诸如但不限于通过TCR/CD3复合物的信号传导）诱导的初级反应。刺激可介导某些分子表达的改变，和/或细胞骨架结构的重组等。

[0055] 术语“刺激性分子”或“刺激结构域”是指由T细胞表达的分子或其部分，其提供一个或多个初级细胞质信号传导序列，所述序列对T细胞信号传导途径的至少某些方面以刺激性方式调节TCR复合物的初级激活。一方面，初级信号通过例如TCR/CD3复合物与载有肽的MHC分子的结合启动，并且所述结合导致T细胞反应（包括但不限于增殖、活化、分化等）的介导。以刺激性方式起作用的初级细胞质信号传导序列（也称为“初级信号传导结构域”）可包含被称为基于免疫受体酪氨酸的激活基序或“ITAM”的信号传导基序。在本发明中特别使用的包含ITAM的初级细胞质信号传导序列的实例包括但不限于源自TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278（也称为“ICOS”）和CD66d的那些。

[0056] 术语“抗原呈递细胞”或“APC”是指在其表面上展示与主要组织相容性复合物 (MHC) 复合的外来抗原的免疫系统细胞，诸如辅助细胞（例如，B细胞、树突细胞等）。T细胞可使用其T细胞受体 (TCR) 识别这些复合物。APC加工抗原并将其呈递给T细胞。

[0057] “主要组织相容性复合物 (MHC) 分子通常被TCR结合，作为肽:MHC复合物的一部分。MHC分子可以是MHC I类或II类分子。所述复合物可存在于抗原呈递细胞诸如树突细胞或B细胞或任何其它细胞（包括癌细胞）的表面上，或者其可通过例如包被在珠粒或平板上而被固定。

[0058] 人白细胞抗原系统 (HLA) 是编码人中的主要组织相容性复合物 (MHC) 的基因复合体的名称，包括HLA I类抗原 (A、B及C) 和HLA II类抗原 (DP、DQ及DR)。HLA等位基因A、B和C呈递主要源自细胞内蛋白质（例如，细胞内表达的蛋白质）的肽。

[0059] 在体内T细胞发育过程中，T细胞经历正向选择步骤以确保识别自身MHC，然后经历负向步骤以去除与呈现自身抗原的MHC结合太强的T细胞。因此，某些T细胞及其表达的TCR将仅识别由某些类型的MHC分子-即由特定HLA等位基因编码的那些MHC分子呈递的肽。这称为HLA限制。

[0060] 一个目标HLA等位基因是HLA-A*0201，其在绝大多数 (>50%) 高加索人群中表达。因此，结合由HLA-A*0201编码的（即为HLA-A*0201限制的）MHC呈递的WT1肽的TCR是有利的，因为使用此类TCR的免疫疗法将适合治疗大部分高加索人群。

[0061] 其它目标HLA-A等位基因是HLA-A*0101、HLA-A*2402，和HLA-A*0301。

[0070] 除非特别说明,否则如本文中所示,scFv可以以任一顺序(例如,相对于多肽的N-末端和C-末端)具有V_L和V_H可变区,scFv可包含V_L-接头-V_H或可包含V_H-接头-V_L。

[0071] 包含抗体或其抗体片段的本公开的TFP组合物的部分可以以多种形式存在,其中抗原结合结构域表达为连续多肽链(包括例如单结构域抗体片段(sdAb)、源自鼠抗体、人源化抗体或人抗体的单链抗体(scFv))的一部分(Harlow等人,1999,In:Using Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,N.Y.;Harlow等人,1989,In:Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor,N.Y.;Houston等人,1988,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883;Bird等人,1988,Science 242:423-426)。一方面,本公开的TFP组合物的抗原结合结构域包含抗体片段。在另外的方面,TFP包含含有scFv或sdAb的抗体片段。

[0072] 术语“重组抗体”是指使用重组DNA技术产生的抗体,例如由噬菌体或酵母表达系统表达的抗体。所述术语还应解释为意指通过合成编码抗体的DNA分子而产生的抗体,所述DNA分子表达抗体蛋白或指定该抗体的氨基酸序列,其中已使用本领域可用和公知的重组DNA或氨基酸序列技术获得所述DNA或氨基酸序列。

[0073] 术语“抗原”或“Ag”是指能够被抗体特异性结合或以其它方式激发免疫反应的分子。这种免疫反应可涉及抗体的产生或特定免疫活性细胞的活化,或者两者。

[0074] 技术人员将理解,任何大分子,包括实际上所有的蛋白质或肽,都可用作抗原。此外,抗原可源自重组DNA或基因组DNA。技术人员将理解,包含编码引发免疫反应的蛋白质的核苷酸序列或部分核苷酸序列的任何DNA因而编码“抗原”,正如该术语在本文使用的含义那样。此外,本领域技术人员将理解抗原不必仅由基因的全长核苷酸序列编码。显而易见的是,本公开包括但不限于不止一个基因的部分核苷酸序列的使用,并且这些核苷酸序列以各种组合排列以编码引发所需免疫反应的多肽。此外,技术人员将理解,抗原根本不需要由“基因”编码。显而易见的是,抗原可合成产生或可源自生物样品,或者可以是除了多肽以外的大分子。这样的生物样品可包括但不限于组织样品、肿瘤样品、细胞或具有其它生物组分的流体。

[0075] 如本文中所示,术语“CD19”是指分化簇19蛋白,其是在B细胞白血病前体细胞、其它恶性B细胞和正常B细胞谱系的大多数细胞上可检测的抗原决定簇。

[0076] 如本文中所示,术语“BCMA”是指B细胞成熟抗原(也称为肿瘤坏死因子受体超家族成员17(TNFRSF17)),分化簇269蛋白(CD269)是在人中由TNFRSF17编码的蛋白质。TNFRSF17是TNF受体超家族的细胞表面受体,其识别B细胞活化因子(BAFF)(参见,例如,Laabi等人,EMBO 11(11):3897-904(1992))。该受体在成熟的B淋巴细胞中表达,可能对B细胞发育和自身免疫反应很重要。

[0077] 如本文中所示,术语“CD16”(也称为Fc γ RIII)是指在天然杀伤细胞、嗜中性粒细胞多形核白细胞、单核细胞和巨噬细胞的表面上发现的分化簇分子。已将CD16鉴定为参与信号传导的Fc受体Fc γ RIIIa(CD16a)和Fc γ RIIIb(CD16b)。CD16是涉及抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的免疫球蛋白超家族(IgSF)的分子。

[0078] 如本文中所示,“NKG2D”是指属于C型凝集素样受体的CD94/NKG2家族的跨膜蛋白。在人中,NKG2D由NK细胞、 γ δ T细胞和CD8 α β T细胞表达。NKG2D识别来自MIC和RAET1/ULBP家族的自我诱导的蛋白质,其出现在受到应激、恶性转化和感染的细胞的表面上。

[0079] 间皮素 (MSLN) 是指通常存在于内衬胸膜、腹膜和心包膜的间皮细胞上的肿瘤分化抗原。间皮素在几种人肿瘤 (包括间皮瘤、卵巢癌和胰腺腺癌) 中过表达。

[0080] 酪氨酸蛋白激酶跨膜受体 ROR1 (也称为神经营养性酪氨酸激酶, 受体相关 1 (NTRKR1)) 是受体酪氨酸激酶样孤儿受体 (ROR) 家族的成员。其在癌症转移中起作用。

[0081] 术语“MUC16” (也称为“细胞表面缔合的粘蛋白 16”或“卵巢癌相关肿瘤标志物 CA125”) 是膜系接的粘蛋白, 在其氨基端包含胞外域 (一个大的串联重复域) 和具有短的胞质结构域的跨膜结构域。该基因的产物已被用作不同癌症的标志物, 其中较高的表达水平与较差的结果相关。

[0082] 术语“CD22” (也称为唾液酸结合 Ig 样凝集素 2、SIGLEC-2、T 细胞表面抗原 leu-14 和 B 细胞受体 CD22) 是介导 B 细胞/B 细胞相互作用的蛋白, 并被认为参与 B 细胞在淋巴组织中的定位, 并且与包括难治性血液学癌症和毛细胞白血病在内的疾病有关。例如, 在 Xiao 等人, MAbs. 2009 May-Jun; 1 (3) : 297-303 中描述了适合与本文公开的方法一起使用的完全人抗 CD22 单克隆抗体 (“M971”)。

[0083] “CD79 α ”和“CD79 β ”基因编码组成 B 淋巴细胞抗原受体的蛋白质, 所述 B 淋巴细胞抗原受体是包括抗原特异性组分、表面免疫球蛋白 (Ig) 的多聚体复合物。表面 Ig 与 B 细胞抗原受体的表达和功能所必需的两种其它蛋白质 Ig- α 和 Ig- β (分别由 CD79 α 及其旁系同源物 CD79 β 编码) 非共价结合。该复合物的功能性破坏可导致例如人 B 细胞慢性淋巴细胞性白血病。

[0084] B 细胞活化因子或“BAFF”是属于肿瘤坏死因子 (TNF) 配体家族的细胞因子。该细胞因子是受体 TNFRSF13B/TACI、TNFRSF17/BCMA 和 TNFRSF13C/BAFF-R 的配体。该细胞因子在 B 细胞谱系细胞中表达, 并充当强效 B 细胞活化剂。还已显示其在 B 细胞的增殖和分化中起重要作用。

[0085] 术语“抗肿瘤作用”是指可通过各种方式表现出来的生物作用, 包括但不限于例如肿瘤体积的减小、肿瘤细胞数量的减少、转移灶数量的减少、预期寿命的增加、肿瘤细胞增殖的减少、肿瘤细胞存活率的降低或与癌症状况相关的各种生理症状的改善。“抗肿瘤作用”还可通过本公开的肽、多核苷酸、细胞和抗体首先预防肿瘤发生的能力来表现。

[0086] 术语“自体的”是指源自同一个体的任何材料, 所述材料之后将被重新引入该个体。

[0087] 术语“同种型的”或者可选地“同种异体的”是指任何材料, 所述材料源自与引入该材料的个体相同的物种的不同动物或与所述个体不同的患者。当一个或多个基因座上的基因不完全相同时, 两个或多个个体被认为是彼此同种异体的。在一些方面, 来自同一物种的个体的同种异型材料可能在遗传上充分不同以在抗原性方面相互作用。

[0088] 术语“异种的”是指源自不同物种的动物的移植物。

[0089] 术语“癌症”是指以异常细胞的快速且不受控制的生长为特征性疾病。癌细胞可以局部扩散, 也可以通过血液和淋巴系统扩散到身体的其它部位。本文描述了各种癌症的实例, 其包括但不限于乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、胰腺癌、结直肠癌、肾癌、肝癌、脑癌、淋巴瘤、白血病、肺癌等。

[0090] 术语“编码”是指多核苷酸 (诸如基因、cDNA 或 mRNA) 中特定核苷酸序列在具有确定的核苷酸序列 (例如, rRNA、tRNA 和 mRNA) 或确定的氨基酸序列以及由此产生的生物性质的

生物过程中,用作合成其它聚合物和大分子的模板的固有性质因此,基因、cDNA或RNA编码蛋白质,如果对应于该基因的mRNA的转录和翻译在细胞或其它生物系统中产生蛋白质的话。其核苷酸序列与mRNA序列相同且通常在序列表中提供的编码链,以及用作基因或cDNA的转录模板的非编码链都可被称为编码该基因或cDNA的蛋白质或其它产物。

[0091] 除非另有说明,否则“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括为彼此的简并形式并且编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。短语编码蛋白质或RNA的核苷酸序列还可包括内含子,达到编码蛋白质的核苷酸序列在一些形式中可以包含一个或多个内含子的程度。

[0092] 术语“有效量”或“治疗有效量”在本文可互换使用,并且是指如本文所述的有效实现特定生物或治疗结果的化合物、制剂、材料或组合物的量。

[0093] 术语“内源的”是指来自生物体、细胞、组织或系统的或在生物体、细胞、组织或系统内部产生的任何材料。

[0094] 术语“外源的”是指从生物体、细胞、组织或系统外部引入的或在生物体、细胞、组织或系统外部产生的任何材料。

[0095] 术语“表达”是指由启动子驱动的特异性核苷酸序列的转录和/或翻译。

[0096] 术语“功能性破坏”是指特定(例如,靶)核酸(例如,基因、RNA转录物、由其编码的蛋白质)的物理或生物化学变化,所述变化阻止其在细胞中的正常表达和/或行为。在一个实施方案中,功能性破坏是指通过基因编辑方法对基因的修饰。在一个实施方案中,功能性破坏阻止了靶基因(例如,内源基因)的表达。

[0097] 术语“转移载体”是指包含分离的核酸并且可以用于将分离的核酸递送至细胞内部的物质的组合物。许多载体是本领域已知的,包括但不限于线性多核苷酸、与离子或两亲性化合物缔合的多核苷酸、质粒和病毒。因此,术语“转移载体”包括自主复制质粒或病毒。所述术语还应解释为进一步包括促进核酸转移到细胞中的非质粒和非病毒化合物,例如多聚赖氨酸化合物、脂质体等。病毒转移载体的实例包括但不限于腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体等。

[0098] 术语“表达载体”是指包含重组多核苷酸的载体,所述重组多核苷酸包含可操作地连接至待表达的核苷酸序列的表达控制序列。表达载体包含足够的顺式作用元件以用于表达;用于表达的其它元件可由宿主细胞提供或在体外表达系统中提供。表达载体包括本领域已知的所有载体,包括掺入重组多核苷酸的粘粒、质粒(例如,裸露的或包含在脂质体中的)和病毒(例如,慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0099] 术语“慢病毒”是指逆转录病毒科的一个属。慢病毒在逆转录病毒中是独特的,能够感染非分裂细胞;它们可将大量遗传信息传递到宿主细胞的DNA中,因此它们是最高效的基因递送载体方法之一。HIV、SIV和FIV都是慢病毒的实例。

[0100] 术语“慢病毒载体”是指源自慢病毒基因组的至少一部分的载体,尤其包括Milone等人,Mol. Ther. 17 (8) :1453-1464 (2009)中提供的自身灭活型慢病毒载体。可在临床中使用的慢病毒载体的其它实例包括但不限于,例如,来自Oxford BioMedica的LENTIVECTOR™基因递送技术、来自Lentigen的LENTIMAX™载体系统,等等。慢病毒载体的非临床类型也是可用的,并且是本领域技术人员已知的。

[0101] 术语“同源的”或“同一性”是指两个聚合物分子之间,例如,两个核酸分子,诸如两个DNA分子或两个RNA分子之间,或两个多肽分子之间的亚基序列同一性。当两个分子中的

亚基位置都被相同的单体亚基占据时；例如，如果两个DNA分子中的每一个中的位置都被腺嘌呤占据，那么它们在该位置处是同源或相同的。两个序列之间的同源性是匹配或同源位置数目的直接函数；例如，如果两个序列中一半（例如，长度为十个亚基的多聚体中的五个位置）的位置是同源的，则两个序列是50%同源的；如果90%的位置（例如10个中的9个）是匹配或同源的，则两个序列是90%同源的。

[0102] 非人（例如，鼠）抗体的“人源化”形式是嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段（诸如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗体的其它抗原结合子序列），其包含源自非人免疫球蛋白的最小序列。在很大程度上，人源化抗体及其抗体片段为人免疫球蛋白（受者抗体或抗体片段），其中来自所述受者的互补决定区（CDR）的残基被具有所需特异性、亲和力和能力的来自非人物种（诸如小鼠、大鼠或兔）（供体抗体）的CDR的残基替代。在一些情况下，所述人免疫球蛋白的Fv框架区（FR）残基由相应的非人残基替代。此外，人源化抗体/抗体片段可包含既不存在于受者抗体中也不存在于输入的CDR或框架序列中的残基。这些修饰还可精修和优化抗体或抗体片的性能。通常，人源化抗体或其抗体片段将包含基本上所有的至少一个，通常是两个可变结构域，其中所有或基本上所有的CDR区对应于非人免疫球蛋白的那些CDR区，并且所有或大部分的FR区是人免疫球蛋白序列的那些FR区。人源化抗体或抗体片段还可包含免疫球蛋白恒定区（Fc）的至少一部分，通常是人免疫球蛋白的恒定区。关于进一步的细节，参见Jones等人，*Nature*, 321:522-525, 1986; Reichmann等人，*Nature*, 332:323-329, 1988; Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596, 1992。

[0103] “人”或“完全人”是指免疫球蛋白，诸如抗体或抗体片段，其中整个分子是人来源的或由与抗体或免疫球蛋白的人形式相同的氨基酸序列组成。

[0104] 术语“分离的”意指从自然状态改变或去除的。例如，天然存在于活动物中的核酸或肽不是“分离的”，但从其天然状态的共存材料部分或完全分离的相同核酸或肽是“分离的”。分离的核酸或蛋白质可以基本上纯化的形式存在，或可以存在于非天然环境例如宿主细胞中。

[0105] 在本公开的说明书中，使用以下常见核酸碱基的缩写。“A”是指腺苷，“C”是指胞嘧啶，“G”是指鸟苷，“T”是指胸苷，“U”是尿苷。

[0106] 术语“保守序列修饰”是指不会显著影响或改变包含所述氨基酸序列的抗体或抗体片段的结合特性的氨基酸修饰。此类保守修饰包括氨基酸取代、添加和缺失。可通过本领域已知的标准技术（诸如定点诱变和PCR介导的诱变）将修饰引入本公开的抗体或抗体片段中。“保守氨基酸取代”是其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基替代的氨基酸取代。具有相似侧链的氨基酸残基的家族已经在本领域中进行了定义。这些家族包括具有碱性侧链（例如，赖氨酸、精氨酸、组氨酸）、酸性侧链（例如，天冬氨酸、谷氨酸）、不带电荷的极性侧链（例如，甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸）、非极性侧链（例如，丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸）、β支链侧链（例如，苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸）和芳香族侧链（例如，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸）的氨基酸。因此，本公开的TFP内的一个或多个氨基酸残基可被来自相同侧链家族的其他氨基酸残基替代，并且改变的TFP可使用本文所述的功能测定法进行测试。

[0107] 术语“可操作地连接”或“转录控制”是指调控序列与导致后者表达的异源核酸序列之间的功能性键联。例如，当第一核酸序列与第二核酸序列处于功能关系时，所述第一核

酸序列与所述第二核酸序列可操作地连接。例如,如果启动子实现编码序列的转录或表达,则启动子与所述编码序列可操作地连接。可操作地连接的DNA序列可以彼此连续,例如,在需要连接两个蛋白质编码区的情况下,它们处于同一阅读框中。

[0108] 术语免疫原性组合物的“肠胃外”施用包括例如皮下(s.c.)、静脉内(i.v.)、肌肉内(i.m.)或胸骨内注射、瘤内或输注技术。

[0109] 术语“核酸”或“多核苷酸”是指单链或双链形式的脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)及其聚合物。除非特别限制,否则该术语涵盖含有天然核苷酸的已知类似物的核酸,所述核酸具有与参考核酸相似的结合特性并且以与天然存在的核苷酸相似的方式被代谢。除非另有说明,否则特定的核酸序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体(例如,简并密码子取代)、等位基因、直向同源物、SNP和互补序列以及明确指示的序列。具体而言,简并密码子替代可通过产生序列来实现,在所述序列中一个或多个所选(或全部)密码子的第三位被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代(Batzer等人,Nucleic Acid Res.19:5081(1991);Ohtsuka等人,J.Biol.Chem.260:2605-2608(1985);和Rossolini等人,Mol.Cell.Probes 8:91-98(1994))。

[0110] 术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换使用,指由通过肽键共价连接的氨基酸残基组成的化合物。蛋白质或肽必须包含至少两个氨基酸,并且对可包含蛋白质或肽的序列的氨基酸的最大数量没有限制。多肽包括任何包含两个或更多个通过肽键相互连接的氨基酸的肽或蛋白质。如本文中所示,该术语指短链和长链,所述短链在本领域中通常也称为肽、寡肽和寡聚物,所述长链在本领域中通常称为蛋白质,所述蛋白质具有许多类型。“多肽”包括例如生物活性片段、基本上同源的多肽、寡肽、同二聚体、异二聚体、多肽的变体、经修饰的多肽、衍生物、类似物、融合蛋白等等。多肽包括天然肽、重组肽或其组合。

[0111] 术语“启动子”是指由细胞的转录机制识别的DNA序列,或启动多核苷酸序列的特异性转录所需的引入的合成机制。

[0112] 术语“启动子/调控序列”是指与启动子/调控序列可操作地连接的基因产物的表达所需的核酸序列。在一些情况下,该序列可以是核心启动子序列,在其它情况下,该序列还可包括增强子序列和基因产物的表达所需的其它调控元件。启动子/调控序列可以是例如以组织特异性方式表达基因产物的序列。

[0113] 术语“组成型”启动子是指当与编码或指定基因产物的多核苷酸可操作地连接时,在细胞的大多数或所有生理条件下导致基因产物在细胞中产生的核苷酸序列。

[0114] 术语“诱导型”启动子是指当与编码或指定基因产物的多核苷酸可操作地连接时,基本上仅当细胞中存在对应于该启动子的诱导物时,才在细胞中产生基因产物的核苷酸序列。

[0115] 术语“组织特异性”启动子是指这样的核苷酸序列,当其与编码基因或由基因指定的多核苷酸可操作地连接时,仅当细胞为对应于所述启动子的组织类型的细胞时,才基本上在细胞中产生基因产物。

[0116] 如在scFv的情况下所用,术语“接头”和“柔性多肽接头”是指被单独或组合使用以将可变重链与可变轻链区域连接在一起的肽接头,其由氨基酸诸如甘氨酸和/或丝氨酸残基组成。在一个实施方案中,柔性多肽接头是Gly/Ser接头,并包含氨基酸序列(Gly-Gly-Gly-Ser)_n,其中n为等于或大于1的正整数。例如,n=1,n=2,n=3,n=4,n=5,n=6,n=7,

$n=8$, $n=9$ 以及 $n=10$ 。在一个实施方案中,柔性多肽接头包括但不限于 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_4$ 或 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ 。在另一个实施方案中,接头包括 (Gly_2Ser) 、 (GlySer) 或 (Gly_3Ser) 的多个重复。在本公开的范围还包括在 W02012/138475 (通过引用并入本文) 中描述的接头。在一些情况下,接头序列包括长接头 (LL) 序列。在一些情况下,长接头序列包含 $(\text{G}_4\text{S})_n$, 其中 $n=2$ 至 4 。在一些情况下,接头序列包含短接头 (SL) 序列。在一些情况下,短接头序列包含 $(\text{G}_4\text{S})_n$, 其中 $n=1$ 至 3 。

[0117] 如本文中所示,5'帽(也称为RNA帽、RNA 7-甲基鸟苷帽或RNA m7G帽)是经修饰的鸟嘌呤核苷酸,其在转录开始后不久被添加到真核信使RNA的“前”或5'末端。5'帽由与第一个转录的核苷酸连接的末端基团组成。其存在对于被核糖体识别和免受RNA酶降解的保护至关重要。帽的添加与转录偶联,并且共转录地发生,使得彼此影响。转录开始后不久,所合成的mRNA的5'末端被与RNA聚合酶缔合的合成帽的复合物结合。这种酶复合物催化mRNA封端所需的化学反应。合成作为多步生化反应进行。可修饰封端部分以调节mRNA的功能性,诸如其稳定性或翻译效率。

[0118] 如本文中所示,“体外转录的RNA”是指已经在体外合成的RNA,优选mRNA。通常,体外转录的RNA由体外转录载体产生。体外转录载体包含用于产生体外转录的RNA的模板。

[0119] 如本文中所示,“poly (A)”是通过多腺苷酸化连接至mRNA的一系列腺苷。在用于瞬时表达的构建体的优选实施方案中,polyA为50至5000,优选大于64,更优选大于100,最优选大于300或400。可以化学或酶促修饰Poly (A) 序列,以调节mRNA功能性,诸如定位、稳定性或翻译效率。

[0120] 如本文中所示,“多腺苷酸化”是指聚腺苷酰基部分或其修饰变体与信使RNA分子的共价键联。在真核生物体中,大多数信使RNA (mRNA) 分子在3'端被多腺苷酸化。3' poly (A) 尾是通过酶多腺苷酸聚合酶的作用添加到前体mRNA中的腺嘌呤核苷酸的长序列(通常为数百个)。在高级真核生物中,将poly (A) 尾添加到包含特定序列即多腺苷酸化信号的转录物上。poly (A) 尾及与其结合的蛋白质有助于保护mRNA免受外切核酸酶的降解。多腺苷酸化对于转录终止、mRNA从细胞核的输出以及翻译也很重要。DNA转录为RNA后,多腺苷酸化立即在细胞核中发生,但另外地也可在细胞质中稍后发生。转录终止后,通过与RNA聚合酶相关的内切核酸酶复合物的作用切割mRNA链。切割位点的特征通常在于在切割位点附近存在碱基序列AAUAAA。切割mRNA后,将腺苷残基添加到切割位点的3'末端。

[0121] 如本文中所示,“瞬时”是指非整合的转基因表达数小时、数天或数周的时间,其中如果整合到基因组中或者包含在宿主细胞中的稳定的质粒复制子内,则表达的时间段短于基因表达的时间段。

[0122] 术语“信号转导途径”是指在信号从细胞的一部分传递到细胞的另一部分中起作用的多种信号传导分子之间的生化关系。短语“细胞表面受体”包括能够接收信号并跨细胞膜传递信号的分子和分子的复合物。

[0123] 术语“受试者”旨在包括其中可引发免疫反应的活生物体(例如,哺乳动物、人)。

[0124] 术语“基本上纯化的”细胞是指基本上不含其它细胞类型的细胞。基本上纯化的细胞也指已经与在其天然存在的状态下通常与其结合的其它细胞类型分离的细胞。在一些情况下,基本上纯化的细胞群是指同质的细胞群。在其它情况下,该术语仅指已与在它们的天然状态下与它们天然结合的细胞分离的细胞。在一些方面,体外培养细胞。在其它方面,不

在体外培养细胞。

[0125] 如本文中所示,术语“治疗的”意指治疗。通过减轻、抑制、缓解或根除疾病状态来获得治疗效果。

[0126] 如本文中所示,术语“预防”是意指疾病或疾病状态的预防或对疾病或疾病状态的保护性治疗。

[0127] 在本公开的说明书中,“肿瘤抗原”或“过度增殖性病征抗原”或“与过度增殖性病征相关的抗原”是指特定过度增殖性病征所共有的抗原。在某些方面,本发明的过度增殖性病征抗原源自癌症,包括但不限于原发性或转移性黑色素瘤、胸腺瘤、淋巴瘤、肉瘤、肺癌、肝癌、NHL、白血病、子宫癌、宫颈癌、膀胱癌、肾癌和腺癌诸如乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、胰腺癌等。

[0128] 术语“转染的”或“转化的”或“转导的”是指籍以将外源核酸转移或引入宿主细胞的过程。“转染的”或“转化的”或“转导的”细胞是已经用外源核酸转染、转化或转导的细胞。所述细胞包括原代受试者细胞及其后代。

[0129] 术语“特异性结合”是指这样的抗体、抗体片段或特异性配体,其识别并结合存在于样品中的同源结合配偶体(例如,CD19),但不一定和基本上不会识别或结合样品中的其它分子。

[0130] 如本文中所示,术语“大范围核酸酶”是指以大于12个碱基对的识别序列结合双链DNA的内切核酸酶。优选地,本公开的大范围核酸酶的识别序列是22个碱基对。大范围核酸酶可以是源自I-Cre1的内切核酸酶,并且可以指在例如DNA结合特异性、DNA裂解活性、DNA结合亲和力或二聚化性质方面相对于天然I-Cre1已被修饰的I-Cre1的工程化的变体。产生此类I-Cre1的修饰变体的方法是本领域已知的(例如,WO 2007/047859)。如本文所用的大范围核酸酶以异二聚体或“单链大范围核酸酶”(其中使用肽接头将一对DNA结合结构域连接成单个多肽)的形式与双链DNA结合。术语“归巢内切核酸酶”与术语“大范围核酸酶”同义。当在细胞中,特别是在人T细胞中表达时,本公开的大范围核酸酶基本上是无毒的,使得当使用本文所述的方法测量时,细胞可以被转染并保持在37°C,而没有观察到对细胞活力的有害作用或大范围核酸酶切割活性的显著降低。

[0131] 如本文中所示,术语“单链大范围核酸酶”是指包含由接头连接的一对核酸酶亚基的多肽。单链大范围核酸酶具有如下组织:N末端亚基-接头-C末端亚基。这两个大范围核酸酶亚基的氨基酸序列通常并不相同,并且将识别不相同的DNA序列。因此,单链大范围核酸酶通常切割伪回文或非回文识别序列。单链大范围核酸酶可被称为“单链异二聚体”或“单链异二聚体大范围核酸酶”,尽管事实上其不是二聚体。为了清楚起见,除非另有说明,否则术语“大范围核酸酶”可以指二聚或单链大范围核酸酶。

[0132] 如本文中所示,术语“TALEN”是指包含DNA结合结构域的内切核酸酶,所述DNA结合结构域包含与Fok1核酸酶结构域的任何部分融合的16-22个TAL结构域重复序列。

[0133] 如本文中所示,术语“紧凑型TALEN”是指包含DNA结合结构域的内切核酸酶,所述DNA结合结构域具有以任何方向与I-Tev1归巢内切核酸酶的核酸酶结构域的任何催化活性部分融合的16-22个TAL结构域重复序列。

[0134] 如本文中所示,术语“CRISPR”是指基于半胱天冬酶的内切核酸酶,其包含半胱天冬酶,诸如Cas9,和通过与基因组DNA中的识别位点杂交来指导半胱天冬酶的DNA切割的引

导RNA。

[0135] 如本文中所示,术语“megaTAL”是指包含转录激活子样效应因子(TALE)DNA结合结构域和工程化的序列特异性归巢内切核酸酶的单链核酸酶。

[0136] 范围:贯穿本公开,本公开的各个方面可以以范围格式呈现。应当理解,以范围格式进行的描述仅仅是为了方便和简洁,不应当被解释为对本公开范围的僵化限制。因此,范围的描述应该被认为已经具体地公开了所有可能的子范围以及该范围内的各个数值。例如,诸如1至6的范围的描述应该被认为已经具体地公开了子范围,诸如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等以及该范围内的单个数字,例如1、2、2.7、3、4、5、5.3和6。作为另一个实例,诸如95-99%同一性的范围包括具有95%、96%、97%、98%或99%同一性的东西,以及包括诸如96-99%、96-98%、96-97%、97-99%、97-98%和98-99%同一性的子范围。无论范围有多广,这都适用。

[0137] 描述

[0138] 本文提供了用于治疗疾病诸如癌症的物质组合物和使用方法,所述方法使用包含T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)和TCR恒定结构域的经修饰的T细胞,其中所述经修饰的T细胞还具有功能性破坏的内源TCR亚基。如本文中所示,“T细胞受体(TCR)融合蛋白”或“TFP”包括源自包括TCR在内的各种多肽的重组多肽,所述重组多肽通常能够i)与靶细胞上的表面抗原结合并且ii)通常在T细胞内或其表面上共同定位时,与完整TCR复合物的其它多肽组分相互作用。如本文中所述,与嵌合抗原受体相比,TFP提供了显著的益处。术语“嵌合抗原受体”或者可选地“CAR”是指包含呈scFv形式的胞外抗原结合结构域、跨膜域和胞质信号传导结构域(在本文中也称为“胞内信号传导结构域”)的重组多肽,所述胞质信号传导结构域包含源自如下定义的刺激性分子的功能性信号传导结构域。通常,CAR的中心胞内信号传导结构域源自通常被发现与TCR复合物缔合的CD3 ζ 链。CD3 ζ 信号传导结构域可以与源自至少一种共刺激分子诸如4-1BB(即,CD137)、CD27和/或CD28的一个或多个功能性信号传导结构域融合。

[0139] T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)

[0140] 本公开涵盖编码TFP的重组DNA构建体,其中所述TFP包含与CD19(例如,人CD19)特异性结合的抗体片段,其中所述抗体片段的序列与编码TCR亚基或其部分的核酸序列毗连并处于同一阅读框中。本公开涵盖编码TFP的重组DNA构建体,其中所述TFP包含与BCMA(例如,人BCMA)特异性结合的抗体片段,其中所述抗体片段的序列与编码TCR亚基或其部分的核酸序列毗连并处于同一阅读框中。本公开涵盖编码TFP的重组DNA构建体,其中所述TFP包含与ROR1(例如,人ROR1)特异性结合的抗体片段,其中所述抗体片段的序列与编码TCR亚基或其部分的核酸序列毗连并处于同一阅读框中。本公开涵盖编码TFP的重组DNA构建体,其中所述TFP包含与CD22(例如,人CD22)特异性结合的抗体片段,其中所述抗体片段的序列与编码TCR亚基或其部分的核酸序列毗连并处于同一阅读框中。本文提供的TFP能够与一个或多个内源(或可选地,一个或多个外源,或内源和外源的组合)TCR亚基缔合,以形成功能性TCR复合物。

[0141] 一方面,本公开的TFP包含原本称为抗原结合结构域的靶特异性结合元件。部分的选择取决于定义靶细胞表面的靶抗原的类型和数量。例如,可选择抗原结合结构域来识别靶抗原,所述靶抗原充当与特定疾病状态相关的靶细胞上的细胞表面标志物。因此,可充当

本公开的TFP中的抗原结合结构域的靶抗原的细胞表面标志物的实例包括与病毒、细菌和寄生虫感染、自身免疫性疾病和癌症疾病(例如,恶性疾病)相关的那些细胞表面标志物。

[0142] 一方面,可通过将抗原结合结构域工程化到特异性结合所需抗原的TFP中来将TFP介导的T细胞反应导向目标抗原。

[0143] 一方面,包含抗原结合结构域的TFP的部分包含靶向CD19的抗原结合结构域。一方面,抗原结合结构域靶向人CD19。一方面,包含抗原结合结构域的TFP的部分包含靶向BCMA的抗原结合结构域。一方面,抗原结合结构域靶向人BCMA。

[0144] 抗原结合结构域可以是与抗原结合的任何结构域,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、人抗体、人源化抗体及其功能性片段,包括但不限于单结构域抗体,诸如重链可变结构域(V_H)、轻链可变结构域(V_L)和骆驼科来源的纳米体的可变结构域(V_{HH}),以及本领域已知的用作抗原结合结构域的替代支架,诸如重组纤连蛋白结构域、抗运载蛋白(anticalin)、DARPIN等。同样地,可将特异性识别并结合靶抗原的天然或合成配体用作TFP的抗原结合结构域。在一些情况下,抗原结合结构域源自最终将在其中使用TFP的相同物种是有益的。例如,在人中使用,TFP的抗原结合结构域包含抗体或抗体片段的抗原结合结构域的人残基或人源化残基可以是有益的。

[0145] 因此,在一个方面,抗原结合结构域包括人源化抗体或人抗体或抗体片段,或鼠抗体或抗体片段。在一个实施方案中,人源化或人抗CD19或抗BCMA结合结构域包含本文所述的人源化或人抗CD19或抗BCMA结合结构域的重链互补决定区1(LC CDR1)、轻链互补决定区2(LC CDR2)和轻链互补决定区3(LC CDR3)中的一个或多个(例如,全部三个),和/或本文所述的人源化或人抗CD19结合结构域的重链互补决定区1(HC CDR1)、重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3)中的一个或多个(例如,全部三个),例如人源化或人抗CD19或抗BCMA结合结构域包含一个或多个(例如,全部三个)LC CDR和一个或多个(例如,全部三个)HC CDR。在一个实施方案中,人源化或人抗CD19结合结构域包含本文所述的人源化或人抗CD19或抗BCMA结合结构域的重链互补决定区1(HC CDR1)、重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3)中的一个或多个(例如,全部三个),例如,人源化或人抗CD19或抗BCMA结合结构域具有两个可变重链区域,每个可变重链区域均包含本文所述的HC CDR1、HC CDR2和HC CDR3。在一个实施方案中,人源化或人抗CD19或抗BCMA结合结构域包含本文所述的人源化轻链可变区或人轻链可变区和/或本文所述的人源化重链可变区或人重链可变区。在一个实施方案中,人源化或人源抗CD19或抗BCMA结合结构域包含本文所述的人源化重链可变区,例如,至少两个本文所述的人源化或人重链可变区。在一个实施方案中,抗CD19或抗BCMA结合结构域是包含具有本文提供的氨基酸序列的轻链和重链的scFv。在一个实施方案中,抗CD19或抗BCMA结合结构域(例如,scFv)包含:轻链可变区,所述轻链可变区包含本文提供的轻链可变区的氨基酸序列的具有至少一个、两个或三个修饰(例如,取代)但不超过30个、20个或10个修饰(例如,取代)的氨基酸序列,或与本文提供的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列;和/或重链可变区,所述重链可变区包含本文提供的重链可变区的氨基酸序列的具有至少一个、两个或三个修饰(例如,取代)但不超过30个、20个或10个修饰(例如,取代)的氨基酸序列,或与本文提供的氨基酸序列具有95-99%同一性的序列。在一个实施方案中,人源化或人抗CD19或抗BCMA结合结构域是scFv,并且包含本文所述氨基酸序列的轻链可变区通过接头(例如,本文所述的接头)与包含本文所述氨基酸

序列的重链可变区连接。在一个实施方案中,人源化抗CD19或抗BCMA结合结构域包括(Gly₄-Ser)_n接头,其中n为1、2、3、4、5或6,优选为3或4。scFv的轻链可变区和重链可变区可以例如处于以下取向中的任何取向:轻链可变区-接头-重链可变区或重链可变区-接头-轻链可变区。在一些情况下,接头序列包括长接头(LL)序列。在一些情况下,长接头序列包含(G₄S)_n,其中n=2至4。在一些情况下,接头序列包含短接头(SL)序列。在一些情况下,短接头序列包含(G₄S)_n,其中n=1至3。

[0146] 在一些方面,非人抗体是人源化的,其中抗体的特定序列或区域经修饰以增加与在人中天然产生的抗体或其片段的相似性。一方面,抗原结合结构域是人源化的。

[0147] 可使用本领域已知的多种技术(包括但不限于CDR移植(参见,例如,欧洲专利第EP 239,400号;国际公开第W0 91/09967号;和美国专利第5,225,539号、第5,530,101号和第5,585,089号,其每一个通过引用整体并入本文)、饰面(veneering)或重修表面(resurfacing)(参见,例如,欧洲专利第EP 592,106号和第EP 519,596号;Padlan,1991, *Molecular Immunology*, 28(4/5):489-498;Studnicka等人,1994, *Protein Engineering*, 7(6):805-814;和Roguska等人,1994, *PNAS*, 91:969-973,其每一个通过引用整体并入本文)、链改组(参见,例如美国专利第5,565,332号,其通过引用整体并入本文)以及在例如以下文献中描述的技术来产生人源化抗体:美国专利申请公开第US2005/0042664号、美国专利申请公开第US2005/0048617号、美国专利第6,407,213号、美国专利第5,766,886号、国际公开第W0 9317105号,Tan等人, *J. Immunol.*, 169:1119-25(2002), Caldas等人, *Protein Eng.*, 13(5):353-60(2000), Morea等人, *Methods*, 20(3):267-79(2000), Baca等人, *J. Biol. Chem.*, 272(16):10678-84(1997), Roguska等人, *Protein Eng.*, 9(10):895-904(1996), Couto等人, *Cancer Res.*, 55(23Supp):5973s-5977s(1995), Couto等人, *Cancer Res.*, 55(8):1717-22(1995), Sandhu J S, *Gene*, 150(2):409-10(1994)和Pedersen等人, *J. Mol. Biol.*, 235(3):959-73(1994),其每一个通过引用整体并入本文。通常,框架区中的框架残基将被来自CDR供体抗体的相应残基取代以改变例如改善抗原结合。这些框架取代通过本领域公知的方法鉴定,例如,通过对CDR和框架残基的相互作用建模以鉴定对抗原结合重要的框架残基,以及通过序列比较以鉴定特定位置处的罕见框架残基(参见,例如,Queen等人,美国专利第5,585,089号;和Riechmann等人,1988, *Nature*, 332:323,所述文献通过引用整体并入本文)。

[0148] 人源化抗体或抗体片段具有一个或多个保留在其中的来自非人来源的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常被称为“输入”残基,其通常取自“输入”可变结构域。如本文所提供的,人源化抗体或抗体片段包含一个或多个来自非人免疫球蛋白分子的CDR和其中构成框架的氨基酸残基完全或主要源自人种系的框架区。用于抗体或抗体片段的人源化的多种技术是本领域公知的,并且基本上可以按照Winter和同事的方法(Jones等人, *Nature*, 321:522-525(1986);Riechmann等人, *Nature*, 332:323-327(1988);Verhoeyen等人, *Science*, 239:1534-1536(1988)),通过用啮齿动物的CDR或CDR序列替代人抗体的相应序列(即,CDR移植)(EP 239,400;PCT公开第W0 91/09967号;和美国专利第4,816,567号、第6,331,415号、第5,225,539号、第5,530,101号、第5,585,089号、第6,548,640号,其内容通过引用整体并入本文)来进行。在此类人源化抗体和抗体片段中,基本上少于完整的人可变结构域已被来自非人物种的相应序列取代。人源化抗体通常是人抗体,其中一些CDR残基和可

能的一些框架 (FR) 残基被来自啮齿动物抗体中类似位点的残基取代。抗体和抗体片段的人源化还可通过饰面或重修表面 (EP 592,106; EP 519,596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology*, 28 (4/5): 489-498; Studnicka 等人, *Protein Engineering*, 7 (6): 805-814 (1994) 和 Roguska 等人, *PNAS*, 91: 969-973 (1994)) 或链改组 (美国专利第 5,565,332 号) 来实现, 所述文献的内容通过引用整体并入本文。

[0149] 选择人可变结构域 (轻和重可变结构域) 用于制备人源化抗体是为了降低抗原性。根据所谓的“最佳适配”方法, 针对已知的人可变结构域序列的整个文库, 筛选啮齿动物抗体可变结构域的序列。然后, 将最接近啮齿动物的人序列接受为人源化抗体的人框架 (FR) (Sims 等人, *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia 等人, *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987), 其内容通过引用整体并入本文)。另一种方法使用源自特定轻链或重链亚组的所有人抗体的共有序列的特定框架。相同的框架可用于几种不同的人源化抗体 (参见, 例如, Nicholson 等人 *Mol. Immun.* 34 (16-17): 1157-1165 (1997); Carter 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta 等人, *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993), 所述文献的内容通过引用整体并入本文)。在一些实施方案中, 重链可变区的框架区, 例如, 所有四个框架区, 源自 V_H4-4-59 种系序列。在一个实施方案中, 框架区可以包含一个、两个、三个、四个或五个修饰, 例如, 取代, 例如, 来自相应鼠序列的氨基酸。在一个实施方案中, 框架区, 例如, 轻链可变区的所有四个框架区源自 VK3-1.25 种系序列。在一个实施方案中, 框架区可以包含一个、两个、三个、四个或五个修饰, 例如, 取代, 例如, 来自相应鼠序列的氨基酸。

[0150] 在一些方面, 包含抗体片段的本公开的 TFP 组合物的部分被人源化, 保留了对靶抗原的高亲和力和其它有利的生物学特性。根据本公开的一个方面, 通过使用亲本序列和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念性人源化产物的方法来制备人源化抗体和抗体片段。三维免疫球蛋白模型通常是可获得的, 并且是本领域技术人员所熟悉的。说明和显示所选的候选免疫球蛋白序列的可能的三维构象结构的计算机程序是可获得的。对这些显示的检查允许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能发挥中的可能作用, 例如, 分析影响候选免疫球蛋白结合靶抗原的能力的残基。这样, 可从受者和输入序列中选择和结合 FR 残基, 从而获得所需抗体或抗体片段特征, 诸如对靶抗原的增加的亲和力。一般来说, CDR 残基直接且最实质性地参与影响抗原结合。

[0151] 人源化抗体或抗体片段可保持与原始抗体相似的抗原特异性 (例如, 在本公开中, 结合人 CD19 的能力)。在一些实施方案中, 人源化抗体或抗体片段可具有与人 CD19 或人 BCMA 结合的增强的亲和力和/或特异性。

[0152] 一方面, 抗 CD19 或抗 BCMA 结合结构域的特征在于抗体或抗体片段的特定功能特征或性质。例如, 一个方面, 本包含抗原结合结构域的公开的 TFP 组合物的部分特异性结合人 CD19 或人 BCMA。一方面, 抗原结合结构域具有与 Nicholson 等人 *Mol. Immun.* 34 (16-17): 1157-1165 (1997) 中描述的 FMC63 scFv 相同或相似的对人 CD19 的结合特异性。一方面, 本公开涉及包含抗体或抗体片段的抗原结合结构域, 其中所述抗体结合结构域与 CD19 或 BCMA 蛋白或其片段特异性结合, 其中所述抗体或抗体片段包含包括本文提供的氨基酸序列的可变轻链和/或可变重链。在某些方面, scFv 与前导序列毗连并处于同一阅读框中。

[0153] 一方面, 抗 CD19 或抗 BCMA 结合结构域是片段, 例如, 单链可变片段 (scFv)。一方面, 抗 CD19 结合结构域为 Fv、Fab、(Fab')₂ 或双功能 (例如双特异性) 杂交抗体 (例如,

Lanzavecchia等人, Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987))。一方面, 本公开的抗体及其片段以野生型或增强的亲和力结合CD19蛋白。

[0154] 本文还提供了获得对靶抗原(例如, CD19、BCMA或本文别处所述的融合部分结合结构域的靶标的任何靶抗原)特异的抗体抗原结合结构域的方法, 所述方法包括通过在本文所列出的V_H结构域的氨基酸序列中添加、删除、取代或插入一个或多个氨基酸来提供V_H结构域, 其为V_H结构域的氨基酸序列变体, 任选地将如此提供的V_H结构域与一个或多个V_L结构域组合, 并测试V_H结构域或一个或多个V_H/V_L组合, 以鉴定对目标靶抗原(例如, CD19或BCMA)特异并任选地具有一个或多个所需性质的特异性结合成员或抗体抗原结合结构域。

[0155] 在一些情况下, 可以根据本领域已知的方法(参见, 例如, Bird等人, (1988) Science 242:423-426和Huston等人, (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)制备V_H结构域和scFv。scFv分子可通过使用柔性多肽接头将V_H与V_L区域连接在一起而产生。scFv分子包含具有优化的长度和/或氨基酸组成的接头(例如, Ser-Gly接头)。接头长度可以极大地影响scFv的可变区折叠和相互作用的方式。事实上, 如果使用短多肽接头(例如, 5-10个氨基酸), 则链内折叠被阻止。链间折叠也是将两个可变区结合在一起形成功能性表位结合位点所必需的。在一些情况下, 接头序列包括长接头(LL)序列。在一些情况下, 长接头序列包含(G₄S)_n, 其中n=2至4。在一些情况下, 接头序列包含短接头(SL)序列。在一些情况下, 短接头序列包含(G₄S)_n, 其中n=1至3。关于接头取向和大小的实例, 参见, 例如, Hollinger等人1993 Proc Natl Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448、美国专利申请公开第2005/0100543号、第2005/0175606号、第2007/0014794号和PCT公开第W02006/020258号和第W02007/024715号(通过引用并入本文)。

[0156] scFv可在其V_L与V_H区之间包含约10个、11个、12个、13个、14个、15个或大于15个残基的接头。接头序列可包含任何天然存在的氨基酸。在一些实施方案中, 接头序列包含氨基酸甘氨酸和丝氨酸。在另一个实施方案中, 接头序列包含成组的甘氨酸和丝氨酸重复序列, 诸如(Gly₄Ser)_n, 其中n为等于或大于1的正整数。在一个实施方案中, 接头可以是(Gly₄Ser)₄或(Gly₄Ser)₃。接头长度的变化可以保持或增强活性, 从而在活性研究中产生了更高的功效。在一些情况下, 接头序列包括长接头(LL)序列。在一些情况下, 长接头序列包含(G₄S)_n, 其中n=2至4。在一些情况下, 接头序列包含短接头(SL)序列。在一些情况下, 短接头序列包含(G₄S)_n, 其中n=1至3。

[0157] 稳定性和突变

[0158] 抗CD19或抗BCMA结合结构域, 例如, scFv分子(例如, 可溶性scFv)的稳定性可参考常规对照scFv分子或全长抗体的生物物理性质(例如, 热稳定性)来评估。在一个实施方案中, 人源化scFv或人scFv在所描述的测定中具有比亲本scFv高约0.1、约0.25、约0.5、约0.75、约1、约1.25、约1.5、约1.75、约2、约2.5、约3、约3.5、约4、约4.5、约5、约5.5、约6、约6.5、约7、约7.5、约8、约8.5、约9、约9.5、约10摄氏度、约11摄氏度、约12摄氏度、约13摄氏度、约14摄氏度或约15摄氏度的热稳定性。

[0159] 随后将抗CD19或抗BCMA结合结构域(例如, scFv)的提高了的热稳定性赋予整个CD19-TFP构建体, 从而导致抗CD19或抗BCMA TFP构建体的改善的治疗性质。与常规抗体相比, 抗CD19或抗BCMA结合结构域(例如, scFv)的热稳定性可提高至少约2°C或3°C。在一个实施方案中, 与常规抗体相比, 抗CD19或抗BCMA结合结构域(例如, scFv)具有提高了1°C的热

稳定性。在另一个实施方案中,与常规抗体相比,抗CD19结合结构域(例如,scFv)具有提高了2°C的热稳定性。在另一个实施方案中,与常规抗体相比,scFv具有提高了4°C、5°C、6°C、7°C、8°C、9°C、10°C、11°C、12°C、13°C、14°C或15°C的热稳定性。例如,可在本文公开的scFv分子与scFv_{VH}和_{VL}所源自的抗体的scFv分子或Fab片段之间进行比较。可使用本领域已知的方法测量热稳定性。例如,在一个实施例中,可测量 T_M 。在下文中更详细地描述了测量 T_M 的方法和测定蛋白质稳定性的其它方法。

[0160] scFv中的突变(通过可溶性scFv的人源化或直接诱变产生的)改变了scFv的稳定性,并提高了scFv和抗CD19或抗BCMA TFP构建体的总体稳定性。使用诸如 T_M 、温度变性和温度聚集等的测量将人源化scFv的稳定性与鼠scFv进行比较。在一个实施方案中,抗CD19或抗BCMA结合结构域(例如,scFv)包含至少一个从人源化过程产生的突变,使得突变的scFv赋予抗CD19 TFP构建体提高的稳定性。在另一个实施方案中,抗CD19结合结构域(例如,scFv)包含至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个从人源化过程产生的突变,使得突变的scFv赋予CD19-TFP或BCMA-TFP构建体提高的稳定性。

[0161] 一方面,TFP的抗原结合结构域包含与本文所述的抗原结合结构域氨基酸序列同源的氨基酸序列,并且所述抗原结合结构域保留了本文所述的抗CD19或抗BCMA抗体片段的所需功能性质。在一个特定方面,本公开的TFP组合物包含抗体片段。另一方面,该抗体片段包括scFv。

[0162] 在各个方面,通过修饰一个或两个可变区(例如,_{VH}和/或_{VL})内,例如一个或多个CDR区内和/或一个或多个框架区内的一个或多个氨基酸来对TFP的抗原结合结构域进行工程化。在一个特定方面,本公开的TFP组合物包含抗体片段。另一方面,该抗体片段包括scFv。

[0163] 本领域普通技术人员将理解,本公开的抗体或抗体片段可被进一步修饰,使得它们的氨基酸序列(例如,来自野生型)发生改变,但是所需活性不改变。例如,可对蛋白质进行导致在“非必需”氨基酸残基处的氨基酸取代的另外的核苷酸取代。例如,分子中的非必需氨基酸残基可被来自相同侧链家族的另一种氨基酸残基替代。在另一个实施方案中,一串氨基酸可被相异在于侧链家族成员的顺序和/或组成的结构相似的串替代,例如,可进行其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基替代的保守取代。

[0164] 具有相似侧链的氨基酸残基的家族在本领域中已被定义,包括碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、 β -支链侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。

[0165] 在两个或更多个核酸或多肽序列的情况下的同一性百分比是指两个或更多个相同的序列。如果两个序列在比较窗口或指定区域上进行比较和对齐以获得最大一致性(如使用以下序列比较算法之一或通过手动比对和目视检查所测量的)时,具有指定百分比的相同的氨基酸残基或核苷酸(例如,在指定区域上,或者,当未指定时,在整个序列上,具有60%同一性,任选地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%或99%同一性),则两个序列是“基本上相同的”。任选地,同一性存在于长度至少

约50个核苷酸(或10个氨基酸)的区域上,或更优选地存在于长度为100个至500个或1000个或更多个核苷酸(或20个、50个、200个或更多个氨基酸)的区域上。

[0166] 为了进行序列比较,通常将一个序列用作参考序列,将其与测试序列进行比较。当使用序列比较算法时,将测试序列和参考序列输入计算机中,如果需要,指定子序列坐标,并且指定序列算法程序参数。可使用默认程序参数,也可以指定其可选的参数。然后序列比较算法基于所述程序参数计算测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。用于比较的序列比对方法是本领域公知的。用于比较的序列的最佳比对可以例如通过Smith和Waterman, (1970) *Adv. Appl. 2*:482c的局部同源性算法、通过Needleman和Wunsch, (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443的同源性比对算法、通过Pearson和Lipman, (1988) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 85:2444的相似性搜索方法、通过这些算法的计算机化实现 (Wisconsin Genetics软件包中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.) 或通过手工比对和目视检查(参见,例如, Brent等人, (2003) *Current Protocols in Molecular Biology*) 来进行。适用于确定百分比序列同一性和序列相似性的算法的两个实例是分别描述于Altschul等人, (1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402; 和Altschul等人, (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410中的BLAST和BLAST 2.0算法。可通过国家生物技术信息中心公开获得用于进行BLAST分析的软件。

[0167] 一方面,本公开设想了对起始抗体或片段(例如, scFv) 氨基酸序列的修饰,所述修饰产生功能上等价的分子。例如,可以修饰包含在TFP中的抗CD19或抗BCMA结合结构域的V_H或V_L(例如, scFv), 以保留至少约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%的与抗CD19结合结构域(例如, scFv) 的起始V_H或V_L框架区的同一性。本公开内容设想了整个TFP构建体的修饰,例如, TFP构建体的各个结构域的一个或多个氨基酸序列中的修饰,以产生功能上等价的分子。可以修饰TFP构建体以保留至少约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%的与起始TFP构建体的同一性。

[0168] 胞外结构域

[0169] 胞外结构域可源自天然或重组来源。在来源是天然的情况下,所述结构域可源自任何蛋白质,但尤其为膜结合蛋白或跨膜蛋白。一方面,胞外结构域能够与跨膜结构域缔合。在本公开中特别使用的胞外结构域可以至少包括例如T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链或CD3 ϵ 、CD3 γ 或CD3 δ 的胞外结构域,或在替代实施方案中,CD28、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154的胞外结构域。

[0170] 跨膜结构域

[0171] 一般来说,TFP序列包含由单个基因组序列编码的胞外结构域和跨膜结构域。在替代实施方案中,可将TFP设计为包含与TFP的胞外结构域异源的跨膜结构域。跨膜结构域可包含与跨膜区域相邻的一个或多个另外的氨基酸,例如,与跨膜结构域所源自的蛋白质的细胞外区域相关的一个或多个氨基酸(例如,细胞外区域的至少1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个或更多个氨基酸)和/或与跨膜蛋白所源

自的蛋白质的细胞内区域相关的一种或多种另外的氨基酸(例如,细胞内区域的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个或更多个氨基酸)。在一些情况下,跨膜结构域可包括细胞外区域的至少30个、35个、40个、45个、50个、55个、60个或更多个氨基酸。在一些情况下,跨膜结构域可包含细胞内区域的至少30个、35个、40个、45个、50个、55个、60个或更多个氨基酸。一方面,跨膜结构域是与所使用的TFP的另外的结构域之一相关的跨膜结构域。在一些情况下,可通过氨基酸取代选择或修饰跨膜结构域,以避免此类结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合,例如,以使与受体复合物的其它成员的相互作用最小化。一方面,跨膜结构域能够与TFP-T细胞表面上的另一TFP同源二聚化。在不同的方面,可修饰或取代跨膜结构域的氨基酸序列,以使与存在于同一TFP中的天然结合配偶体的结合结构域的相互作用最小化。

[0172] 跨膜结构域可源自天然或重组来源。如果来源是天然的,则所述结构域可源自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。一方面,每当TFP已与靶标结合时,跨膜结构域就能够向一个或多个胞内结构域发送信号。在本公开中特别使用的跨膜结构域可以至少包括例如T细胞受体的 α 链、 β 链、 γ 链、 δ 链或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154的一个或多个跨膜区。

[0173] 在一些情况下,跨膜结构域可通过铰链(例如,来自人蛋白质的铰链)与TFP的细胞外区域(例如,TFP的抗原结合结构域)连接。例如,在一个实施方案中,铰链可以是人免疫球蛋白(Ig)铰链,例如,IgG4铰链或CD8a铰链。

[0174] 接头

[0175] 任选地,长度为2至10个氨基酸的短寡肽接头或多肽接头可在TFP的跨膜结构域与细胞质区域之间形成键联。在一些情况下,接头的长度可以至少约为5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个或更多个。甘氨酸-丝氨酸双联体提供了特别合适的接头。例如,一方面,接头包含为GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:3)的氨基酸序列。在一些实施方案中,接头由为GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC (SEQ ID NO:4)的核苷酸序列编码。

[0176] 胞质结构域

[0177] 如果TFP包含CD3 γ 、 δ 或 ϵ 多肽,则TFP的胞质结构域可包括胞内信号传导结构域;TCR α 和TCR β 亚基通常不存在于信号传导结构域中。胞内信号传导结构域通常负责激活已向其中引入了TFP的免疫细胞的正常效应子功能中的至少一种。术语“效应子功能”是指细胞的专用功能。例如,T细胞的效应子功能可以是溶细胞活性或辅助活性,包括细胞因子的分泌。因此,术语“胞内信号传导结构域”是指转导效应子功能信号并指导细胞执行专用功能的蛋白质的部分。虽然通常可以使用整个胞内信号传导结构域,但在许多情况下,没有必要使用整条链。就使用胞内信号传导结构域的截短部分而言,这种截短的部分可用来代替完整链,只要其传导效应子功能信号。因此,术语胞内信号传导结构域意味着包括足以传导效应子功能信号的胞内信号传导结构域的任何截短部分。

[0178] 用于本公开的TFP的胞内信号传导结构域的实例包括T细胞受体(TCR)和共受体的细胞质序列以及这些序列的任何衍生物或变体和具有相同功能能力的任何重组序列,所述T细胞受体(TCR)和共受体协同作用以在抗原受体结合后启动信号传导。

[0179] 已知,仅通过TCR产生的信号不足以完全活化初始T细胞,并且需要次级和/或共刺激信号。因此,初始T细胞活化可以说是由两类不同的胞质信号传导序列(通过TCR启动抗原依赖性初级激活的那些序列(初级胞内信号传导结构域)和以不依赖于抗原的方式起作用以提供次级或共刺激信号的那些序列(次级胞质结构域,例如,共刺激结构域))介导的。

[0180] 初级信号传导结构域以刺激方式或抑制方式调节TCR复合物的初级激活。以刺激方式起作用的初级胞内信号传导结构域可包含信号传导基序,所述信号传导基序被称为基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)。

[0181] 在本公开中特别有用的含ITAM的初级胞内信号传导结构域的实例包括CD3 ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的那些初级胞内信号传导结构域。在一个实施方案中,本公开的TFP包含胞内信号传导结构域,例如,CD3- ϵ 的初级信号传导结构域。在一个实施方案中,初级信号传导结构域包含经修饰的ITAM结构域,例如,突变的ITAM结构域,其与天然ITAM结构域相比具有改变的(例如,增强的或减弱的)活性。在一个实施方案中,初级信号传导结构域包括经修饰的含ITAM的初级胞内信号传导结构域,例如,优化的和/或截短的含ITAM的初级胞内信号传导结构域。在实施方案中,初级信号传导结构域包含一个、两个、三个、四个或更多个ITAM基序。

[0182] TFP的胞内信号传导结构域可以自身包含CD3 ζ 信号传导结构域,或者其可以与在本公开的TFP的情况下有用的一个或多个任何其它所需胞内信号传导结构域组合。例如,TFP的胞内信号传导结构域可包含CD3 ϵ 链部分和共刺激信号传导结构域。共刺激信号传导结构域是指包含共刺激分子的胞内结构域的TFP的部分。共刺激分子是除抗原受体或其配体外的细胞表面分子,其是淋巴细胞对抗原的高效反应所必需的。此类分子的实例包括CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、PD1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3以及与CD83特异性结合的配体等。例如,CD27共刺激已被证明在体外增强人TFP-T细胞的扩增、效应子功能和存活,并在体内增强人T细胞的持久性和抗肿瘤活性(Song等人Blood.2012;119(3):696-706)。

[0183] 本公开的TFP的细胞质部分内的胞内信号传导序列可以以随机或指定的顺序相互连接。任选地,例如长度为2至10个氨基酸(例如,2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸)的短寡肽或多肽接头可在胞内信号传导序列之间形成键联。

[0184] 在一个实施方案中,甘氨酸-丝氨酸双联体可用作合适的接头。在一个实施方案中,单个氨基酸,例如,丙氨酸、甘氨酸可用作合适的接头。

[0185] 一方面,本文所述的表达TFP的细胞还可包含第二TFP,例如,包含例如针对相同靶标(CD19或BCMA)或不同靶标(例如,CD123)的不同抗原结合结构域的第二TFP。在一个实施方案中,当表达TFP的细胞包含两种或多种不同的TFP时,不同TFP的抗原结合结构域可以使得抗原结合结构域不会彼此相互作用。例如,表达第一TFP和第二TFP的细胞可具有第一TFP的抗原结合结构域,例如,如不会与第二TFP的抗原结合结构域形成缔合的片段(例如,scFv),例如,第二TFP的抗原结合结构域为V_{HH}。

[0186] 另一方面,本文所述的表达TFP的细胞还可表达另一种剂,例如,增强经修饰的T细胞的活性的剂。例如,在一个实施方案中,所述剂可以是抑制抑制性分子的剂。在一些实施方案中,抑制性分子,例如PD1,可降低经修饰的T细胞产生免疫效应物反应的能力。抑制性分子的实例包括PD1、PD-L1、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4和

TGFR β 。在一个实施方案中,抑制抑制性分子的剂包含第一多肽(例如,抑制性分子),所述第一多肽与向细胞提供阳性信号的第二多肽(例如,本文所述的胞内信号传导结构域)缔合。在一个实施方案中,所述剂包含例如抑制性分子诸如PD1、LAG3、CTLA4、CD160、BTLA、LAIR1、TIM3、2B4和TIGIT或任何这些多肽的片段(例如,任何这些多肽的胞外结构域的至少一部分)的第一多肽,和第二多肽,其为本文所述的胞内信号传导结构域(例如,包含共刺激结构域(例如,4-1BB、CD27或CD28,例如,如本文所述的))和/或初级信号传导结构域(例如,本文所述的CD3 ζ 信号传导结构域)。在一个实施方案中,所述剂包含PD1或其片段(例如,PD1的胞外结构域的至少一部分)的第一多肽,和本文所述的胞内信号传导结构域(例如,本文所述的CD28信号传导结构域和/或本文所述的CD3 ζ 信号传导结构域)的第二多肽。PD1是CD28受体家族的抑制性成员,所述家族还包括CD28、CTLA-4、ICOS和BTLA。PD-1在活化的B细胞、T细胞和髓样细胞上表达(Agata等人1996 *Int. Immunol* 8:765-75)。PD1的两个配体PD-L1和PD-L2,已被证明在与PD1结合时下调T细胞活化(Freeman等人2000 *J Exp Med* 192:1027-34;Latchman等人2001 *Nat Immunol* 2:261-8;Carter等人2002 *Eur J Immunol* 32:634-43)。PD-L1在人癌症中很丰富(Dong等人2003 *J Mol Med* 81:281-7;Blank等人2005 *Cancer Immunol. Immunother* 54:307-314;Konishi等人2004 *Clin Cancer Res* 10:5094)。免疫抑制可以通过抑制PD1与PD-L1的局部相互作用来逆转。

[0187] 在一个实施方案中,所述剂包含抑制性分子的胞外结构域(ECD),例如,程序性死亡1(PD1)可与跨膜结构域和任选的胞内信号传导结构域诸如41BB和CD3 ζ 融合(在本文也称为PD1 TFP)。在一个实施方案中,当与本文所述的抗CD19 TFP组合使用时,PD1 TFP延长了T细胞的持久性。在一个实施方案中,TFP是包含PD 1胞外结构域的PD1 TFP。或者,提供了含有与程序性死亡配体1(PD-L1)或程序性死亡配体2(PD-L2)特异性结合的抗体或抗体片段诸如scFv的TFP。

[0188] 另一方面,本公开提供了表达TFP的T细胞(例如,TFP-T细胞)群。在一些实施方案中,表达TFP的T细胞群包括表达不同TFP的细胞的混合物。例如,在一个实施方案中,TFP-T细胞群可包括第一细胞和第二细胞,所述第一细胞表达具有本文所述的抗CD19或抗BCMA结合结构域的TFP,所述第二细胞表达具有不同的抗CD19或抗BCMA结合结构域,例如,与由所述第一细胞表达的TFP中的抗CD19结合结构域相异的本文所述的抗CD19或抗BCMA结合结构域的TFP。作为另一个实例,表达TFP的细胞群可包括第一细胞和第二细胞,所述第一细胞表达包括例如,如本文所述的抗CD19或抗BCMA结合结构域的TFP,所述第二细胞表达包括针对除CD19或BCMA外的靶标(例如,另一种肿瘤相关抗原)的抗原结合结构域的TFP。

[0189] 另一方面,本公开提供了细胞群,其中所述群中的至少一个细胞表达具有本文所述的抗CD19或抗BCMA结构域的TFP,并且第二细胞表达另一种剂,例如,增强经修饰的T细胞的活性的剂。例如,在一个实施方案中,所述剂可以是抑制抑制性分子的剂。例如,在一些实施方案中,抑制性分子可以降低经修饰的T细胞产生免疫效应物反应的能力。抑制性分子的实例包括PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4和TGFR β 。在一个实施方案中,抑制抑制性分子的剂包含第一多肽,例如,抑制性分子,其与向细胞提供阳性信号的第二多肽(例如,本文所述的胞内信号传导结构域)缔合。

[0190] 本文公开了用于产生体外转录的编码TFP的RNA的方法。本公开还包括可被直接转染到细胞中的编码TFP的RNA构建体。用于产生用于转染的mRNA的方法可包括用特别设计的

引物体外转录 (IVT) 模板, 随后添加 polyA, 以产生含有 3' 和 5' 非翻译序列 (“UTR”)、5' 帽和/或内部核糖体进入位点 (IRES)、待表达的核酸和 polyA 尾 (通常长度为 50-2000 个碱基) 的构建体。如此产生的 RNA 可高效地转染不同种类的细胞。一方面, 模板包括 TFP 的序列。

[0191] 一方面, 抗 CD19 或抗 BCMA TFP 由信使 RNA (mRNA) 编码。一个方面, 将编码抗 CD19 或抗 BCMA TFP 的 mRNA 引入 T 细胞以产生 TFP-T 细胞。在一个实施方案中, 可将体外转录的 RNA TFP 作为瞬时转染的形式引入细胞。使用聚合酶链式反应 (PCR) 生成的模板, 通过体外转录产生 RNA。可使用合适的引物和 RNA 聚合酶, 通过 PCR 将来自任何来源的目标 DNA 直接转化为用于体外 mRNA 合成的模板。DNA 的来源可以是, 例如, 基因组 DNA、质粒 DNA、噬菌体 DNA、cDNA、合成 DNA 序列或任何其它合适的 DNA 来源。用于体外转录的所需模板是本公开 TFP。在一个实施方案中, 用于 PCR 的 DNA 包含开放阅读框。DNA 可来自生物体的基因组中天然存在的 DNA 序列。在一个实施方案中, 核酸可包括 5' 和/或 3' 非翻译区 (UTR) 的一些或全部。核酸可包含外显子和内含子。在一个实施方案中, 用于 PCR 的 DNA 是人核酸序列。在另一个实施方案中, 用于 PCR 的 DNA 是包括 5' 和 3' UTR 的人核酸序列。或者, DNA 可以是在天然存在的生物体中不正常表达的人工 DNA 序列。示例性人工 DNA 序列是含有基因的部分的人工序列, 所述基因的部分被连接在一起形成编码融合蛋白的开放阅读框。连接在一起的 DNA 的部分可以来自单个生物体, 也来自多个生物体。

[0192] 将 PCR 用于产生用于 mRNA 的体外转录的模板, 所述 mRNA 用于转染。进行 PCR 的方法在本领域是公知的。用于 PCR 的引物被设计成具有与被用作 PCR 的模板的 DNA 的区域基本上互补的区域。如本文中所示, “基本上互补的” 是指这样的核苷酸序列, 其中引物序列中的大部分或全部碱基是互补的, 或者一个或多个碱基是非互补的, 或者错配的。在用于 PCR 的退火条件下, 基本上互补的序列能够与预期的 DNA 靶标退火或杂交。引物可被设计成与 DNA 模板的任何部分基本上互补。例如, 引物可被设计成扩增通常在细胞中转录的核酸的部分 (开放阅读框) (包括 5' 和 3' UTR)。引物也可被设计成扩增编码特定的目标结构域的核酸的部分。在一个实施方案中, 引物被设计成扩增人 cDNA 的编码区, 包括 5' 和 3' UTR 的全部或部分。可用于 PCR 的引物可通过本领域公知的合成方法产生。“正向引物” 是指含有核苷酸区域的引物, 所述核苷酸区域与在待扩增的 DNA 序列上游的 DNA 模板上的核苷酸基本上互补。“上游” 在本文中用于指相对于编码链处于待扩增的 DNA 序列的 5' 的位置。“反向引物” 是含有核苷酸区域的引物, 所述核苷酸区域与在待扩增的 DNA 序列下游的双链 DNA 模板基本上互补。“下游” 在本文中用于指相对于编码链处于待扩增的 DNA 序列的 3' 的位置。

[0193] 可用于 PCR 的任何 DNA 聚合酶都可用于本文公开的方法。试剂和聚合酶可从多种来源商购获得。

[0194] 还可使用具有提高稳定性和/或翻译效率的能力的化学结构。所述 RNA 优选具有 5' 和 3' UTR。在一个实施方案中, 5' UTR 的长度为 1 至 3000 个核苷酸。待添加到编码区的 5' 和 3' UTR 序列的长度可通过不同的方法改变, 包括但不限于设计与 UTR 的不同区域退火的 PCR 引物。使用这种方法, 本领域普通技术人员可在转录的 RNA 的转录后, 修改达到最佳翻译效率所需的 5' 和 3' UTR 长度。

[0195] 5' 和 3' UTR 可以是目标核酸的天然存在的内源 5' 和 3' UTR。或者, 可通过将的 UTR 序列掺入正向和反向引物或通过模板的任何其它修饰来添加对于目标核酸不是内源的 UTR 序列。对于目标核酸不是内源的 UTR 序列的使用对于改变 RNA 的稳定性和/或翻译效率可以是

有用的。例如,已知3' UTR序列中富含AU的元件可降低mRNA的稳定性。因此,可基于本领域公知的UTR的特性,选择或设计3' UTR以增加转录的RNA的稳定性。

[0196] 在一个实施方案中,5' UTR可包含内源核酸的Kozak序列。或者,当通过如上所述的PCR添加对于目标核酸不是内源的5' UTR时,可通过添加5' UTR序列来重新设计共有Kozak序列。Kozak序列可以提高一些RNA转录物的翻译效率,但似乎不是所有RNA都需要它来实现高效翻译。本领域中已知许多mRNA的对Kozak序列的要求。在其它实施方案中,5' UTR可以是其RNA基因组在细胞中是稳定的RNA病毒的5' UTR。在其它实施方案中,各种核苷酸类似物可用于3' 或5' UTR以阻止mRNA的外切核酸降解。

[0197] 为了能够从DNA模板合成RNA而不需要基因克隆,应将转录启动子在待转录的序列上游连接至DNA模板。当将用作RNA聚合酶的启动子的序列添加到正向引物的5' 末端时,将RNA聚合酶启动子在待转录的开放阅读框上游掺入PCR产物中。在一个优选实施方案中,启动子是T7聚合酶启动子,如本文别处所述。其它有用的启动子包括但不限于T3和SP6RNA聚合酶启动子。T7、T3和SP6启动子的共有核苷酸序列是本领域已知的。

[0198] 在一些实施方案中,mRNA在5' 末端上具有帽并在3' 末端具有poly(A)尾,这决定了核糖体的结合、翻译的起始和mRNA在细胞中的稳定性。在环状DNA模板(例如质粒DNA)上,RNA聚合酶产生长串联产物,所述产物不适合在真核细胞中表达。在3' UTR末端线性化的质粒DNA的转录产生正常大小的mRNA,所述mRNA在真核细胞感染中是无效的,即使其在转录后被多聚腺苷酸化。

[0199] 在线性DNA模板上,噬菌体T7 RNA聚合酶可将转录物的3' 末端延伸到模板的最后一个碱基之外(Schenborn和Mierendorf,Nuc Acids Res.,13:6223-36(1985);Nacheva和Berzal-Herranz,Eur.J.Biochem.,270:1485-65(2003))。

[0200] 将polyA/T延伸部分整合到DNA模板中的常规方法是分子克隆。然而,整合到质粒DNA中的polyA/T序列可导致质粒不稳定,这就是为什么从细菌细胞中获得的质粒DNA模板经常受到缺失和其它畸变的高度污染。这使得克隆过程不仅费力费时,而且常常不可靠。这就是为什么无需克隆就能构建具有polyA/T 3' 延伸部分的DNA模板的方法是非常理想的。

[0201] 转录DNA模板的polyA/T区段可以在PCR过程中通过使用含有polyT尾(诸如100T的尾(大小可以是50-5000T))的反向引物产生,或者在PCR后通过任何其它方法产生,包括但不限于DNA连接或体外重组。Poly(A)尾也为RNA提供了稳定性,减少了它们的降解。通常,poly(A)尾的长度与转录的RNA的稳定性正相关。在一个实施方案中,poly(A)尾在100与5000个腺苷之间。

[0202] 可在体外转录后,使用polyA聚合酶诸如大肠杆菌(E.coli)polyA聚合酶(E-PAP)进一步延伸RNA的Poly(A)尾。在一个实施方案中,将poly(A)的长度从100个核苷酸增加到300至400个核苷酸,导致RNA的翻译效率增加约两倍。另外,将不同的化学基团附接至3' 末端可增加mRNA稳定性。这种附接可包含修饰的/人工的核苷酸、适体和其它化合物。例如,可使用poly(A)聚合酶将ATP类似物掺入poly(A)尾。ATP类似物可进一步增加RNA的稳定性。

[0203] 5' 帽也可对RNA分子提供稳定性。在一些实施方案中,通过本文公开的方法产生的RNA包含5' 帽。使用本领域已知的和本文所述的技术(Cougot,等人,Trends in Biochem.Sci.,29:436-444(2001);Stepinski,等人,RNA,7:1468-95(2001);Elango,等人,Biochim.Biophys.Res.Commun.,330:958-966(2005))提供5' 帽。

[0204] 通过本文公开的方法产生的RNA也可包含内部核糖体进入位点(IRES)序列。IRES序列可以是任何病毒序列、染色体序列或人工设计的序列,其启动不依赖于帽的核糖体与mRNA的结合并促进翻译的起始。可包括任何适于细胞电穿孔的溶质,所述溶质可包含促进细胞渗透性和活力的因子,诸如糖、肽、脂质、蛋白质、抗氧化剂和表面活性剂。

[0205] 可使用多种不同方法中的任何方法将RNA引入靶细胞,所述方法为例如商购可得的方法,包括但不限于电穿孔法(Amaxa **Nucleofector**[®]-II (Amaxa Biosystems, Cologne, Germany))、ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.) 或Gene **Pulser**[®] II (BioRad, Denver, Colo.)、**Multiporator**[®] (Eppendorf, Hamburg Germany)、使用脂转染的阳离子脂质体介导的转染、聚合物封装、肽介导的转染,或微粒轰击递送系统诸如“基因枪”(参见,例如,Nishikawa,等人Hum Gene Ther., 12(8):861-70 (2001))。

[0206] 编码TFP和TCR恒定结构域的重组核酸

[0207] 在一些实施方案中,本文公开了重组核酸,所述重组核酸包含(a) 编码T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)的序列,所述TFP包含(i) TCR亚基,所述TCR亚基包含(1) TCR胞外结构域的至少一部分,(2) 跨膜结构域,和(3) 胞内结构域,所述胞内结构域包含来自CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 或TCR β 的胞内信号传导结构域的刺激结构域,及(ii) 包含抗原结合结构域的人抗体或人源化抗体;以及(b) 编码TCR恒定结构域的序列,其中所述TCR恒定结构域是TCR α 恒定结构域、TCR β 恒定结构域、TCR α 恒定结构域和TCR β 恒定结构域;其中所述TCR亚基与所述抗体可操作地连接,并且其中当在T细胞中表达时,所述TFP功能性地掺入TCR复合物中。

[0208] 在一些情况下,当在T细胞中表达时,TCR恒定结构域掺入功能性TCR复合物中。在一些情况下,当在T细胞中表达时,TCR恒定结构域掺入到与掺入了TFP的功能性TCR复合物相同的功能性TCR复合物中。在一些情况下,编码TFP的序列和编码TCR恒定结构域的序列包含在同一核酸分子中。在一些情况下,编码TFP的序列和编码TCR恒定结构域的序列包含在不同的核酸分子中。

[0209] 在一些情况下,TCR亚基和抗体结构域、抗原结构域或结合配体或其片段通过接头序列可操作地连接。在一些情况下,接头序列包含(G4S) $_n$,其中 $n=1$ 至4。

[0210] 在一些情况下,跨膜结构域是来自CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 或TCR β 的TCR跨膜结构域。在一些情况下,胞内结构域仅源自CD3 ϵ 、仅源自CD3 γ 、仅源自CD3 δ 、仅源自TCR α 或仅源自TCR β 。

[0211] 在一些情况下,TCR亚基包含(i) TCR胞外结构域的至少一部分,(ii) TCR跨膜结构域,和(iii) TCR胞内结构域,其中(i)、(ii)和(iii)中的至少两个来自同一TCR亚基。

[0212] 在一些情况下,TCR胞外结构域包含选自由TCR α 链、TCR β 链、CD3 ϵ TCR亚基、CD3 γ TCR亚基、CD3 δ TCR亚基组成的组的蛋白质的胞外结构域或其部分、其功能性片段,以及其具有至少一个但不超过20个修饰的氨基酸序列。

[0213] 在一些情况下,TCR亚基包含跨膜结构域,所述跨膜结构域包含选自由TCR α 链、TCR β 链、TCR ζ 链、CD3 ϵ TCR亚基、CD3 γ TCR亚基、CD3 δ TCR亚基、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD28、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154组成的组的蛋白质的跨膜结构域、其功能性片段,以及其具有至少一个但不超过20个修饰的氨基酸序列。

[0214] 在一些情况下,TCR亚基包含TCR胞内结构域,所述TCR胞内结构域包含选自CD3 ϵ 、

CD3 γ 或CD3 δ 的胞内信号传导结构域的蛋白质的刺激结构域,或对其具有至少一个修饰的氨基酸序列。

[0215] 在一些情况下,TCR亚基包含胞内结构域,所述胞内结构域包含选自4-1BB的功能性信号传导结构域和/或CD3 ζ 的功能性信号传导结构域的蛋白质的刺激结构域,或对其具有至少一个修饰的氨基酸序列。

[0216] 在一些情况下,重组核酸还包含编码共刺激结构域的序列。在一些情况下,共刺激结构域包含选自由OX40、CD2、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278) 和4-1BB (CD137) 组成的组的蛋白质的功能性信号传导结构域,以及对其具有至少一个但不超过20个修饰的氨基酸序列。

[0217] 在一些情况下,TCR亚基包含TCR亚基的基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM),所述ITAM包含选自由CD3 ζ TCR亚基、CD3 ϵ TCR亚基、CD3 γ TCR亚基、CD3 δ TCR亚基、TCR ζ 链、Fc ϵ 受体1链、Fc ϵ 受体2链、Fc γ 受体1链、Fc γ 受体2a链、Fc γ 受体2b1链、Fc γ 受体2b2链、Fc γ 受体3a链、Fc γ 受体3b链、Fc β 受体1链、TYROBP (DAP12)、CD5、CD16a、CD16b、CD22、CD23、CD32、CD64、CD79a、CD79b、CD89、CD278、CD66d组成的组的蛋白质的ITAM或其部分、其功能性片段,以及对其具有至少一个但不超过20个修饰的氨基酸序列。在一些情况下,所述ITAM替代CD3 γ 、CD3 δ 或CD3 ϵ 的ITAM。在一些情况下,ITAM选自由CD3 ζ TCR亚基、CD3 ϵ TCR亚基、CD3 γ TCR亚基和CD3 δ TCR亚基组成的组,并替代选自由CD3 ζ TCR亚基、CD3 ϵ TCR亚基、CD3 γ TCR亚基和CD3 δ TCR亚基组成的组的不同的ITAM。

[0218] 在一些情况下,TFP、TCR α 恒定结构域、TCR β 恒定结构域及其任何组合都能够与内源TCR复合物和/或至少一种内源TCR多肽功能性相互作用。在一些情况下,(a) TCR恒定结构域是TCR α 恒定结构域,并且TFP功能性整合到包含TCR β 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 或其组合的内源亚基的TCR复合物中;(b) TCR恒定结构域是TCR β 恒定结构域,并且TFP功能性整合到包含TCR α 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 或其组合的内源亚基的TCR复合物中;或(c) TCR恒定结构域是TCR α 恒定结构域和TCR β 恒定结构域,并且TFP功能性整合到包含CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 或其组合的内源亚基的TCR复合物中。

[0219] 在一些情况下,对其的至少一个但不超过20个修饰包括介导细胞信号传导的氨基酸的修饰或响应于配体与TFP结合而被磷酸化的氨基酸的修饰。

[0220] 在一些情况下,人抗体或人源化抗体是抗体片段。在一些情况下,抗体片段是scFv、单结构域抗体结构域、VH结构域或VL结构域。在一些情况下,包含抗原结合结构域的人抗体或人源化抗体选自由以下组成的组:抗CD19结合结构域、抗B细胞成熟抗原(BCMA)结合结构域、抗间皮素(MSLN)结合结构域、抗CD22结合结构域、抗PD-1结合结构域、抗BAFF或BAFF受体结合结构域和抗ROR-1结合结构域。

[0221] 在一些情况下,核酸选自由DNA和RNA组成的组。在一些情况下,核酸是mRNA。在一些情况下,重组核酸包含核酸类似物,其中所述核酸类似物不在重组核酸的编码序列中。在一些情况下,核酸类似物选自由以下组成的组:2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-氨基丙基、2'-脱氧、T-脱氧-2'-氟、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)、T-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)、2'-O-N-甲基乙酰氨基(2'-O-NMA)修饰的、锁核酸(LNA)、乙烯核酸(ENA)、肽核酸(PNA)、1',5'-脱水己糖醇核酸(HNA)、吗啉代、甲基磷酸酯核苷酸、硫代磷酸酯核苷酸和2'-

氟N3-P5'-亚磷酰胺。

[0222] 在一些情况下,重组核酸还包含前导序列。在一些情况下,重组核酸还包含启动子序列。在一些情况下,重组核酸还包含编码poly(A)尾的序列。在一些情况下,重组核酸还包含3' UTR序列。在一些情况下,核酸是分离的核酸或非天然存在的核酸。在一些情况下,核酸是体外转录的核酸。

[0223] 在一些情况下,重组核酸还包含编码TCR α 跨膜结构域的序列。在一些情况下,重组核酸还包含编码TCR β 跨膜结构域的序列。在一些情况下,重组核酸还包含编码TCR α 跨膜结构域的序列和编码TCR β 跨膜结构域的序列。

[0224] 在一些实施方案中,本文公开了重组核酸,所述重组核酸包含(a)编码T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)的序列,所述TFP包含(i)TCR亚基,所述TCR亚基包含(1)TCR胞外结构域的至少一部分,(2)跨膜结构域,和(3)胞内结构域,所述胞内结构域包含来自CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 或TCR β 的胞内信号传导结构域的刺激结构域,及(ii)结合配体或其片段,所述结合配体或其片段能够与抗体或其片段结合;以及(b)编码TCR恒定结构域的序列,其中所述TCR恒定结构域是TCR α 恒定结构域、TCR β 恒定结构域或TCR α 恒定结构域和TCR β 恒定结构域;其中所述TCR亚基和所述结合配体或其片段可操作地连接,并且其中当在T细胞中表达时,所述TFP功能性掺入TCR复合物中。在一些情况下,结合配体能够结合抗体的Fc结构域。在一些情况下,结合配体能够选择性地结合IgG1抗体。在一些情况下,结合配体能够特异性结合IgG1抗体。在一些情况下,抗体或其片段与细胞表面抗原结合。在一些情况下,抗体或其片段与肿瘤细胞表面的细胞表面抗原结合。在一些情况下,结合配体包括单体、二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体或十聚体。在一些情况下,结合配体不包括抗体或其片段。在一些情况下,结合配体包括CD16多肽或其片段。在一些情况下,结合配体包括CD16结合多肽。在一些情况下,结合配体是人结合配体或人源化结合配体。在一些情况下,重组核酸还包含编码能够被结合配体结合的抗体或其片段的核酸序列。在一些情况下,抗体或其片段能够从细胞分泌。

[0225] 在一些情况下,当在T细胞中表达时,TCR恒定结构域掺入功能性TCR复合物中。在一些情况下,当在T细胞中表达时,TCR恒定结构域掺入到与掺入了TFP的功能性TCR复合物相同的功能性TCR复合物中。在一些情况下,编码TFP的序列和编码TCR恒定结构域的序列包含在同一核酸分子中。在一些情况下,编码TFP的序列和编码TCR恒定结构域的序列包含在不同的核酸分子中。

[0226] 在一些情况下,TCR亚基和抗体结构域、抗原结构域或结合配体或其片段通过接头序列可操作地连接。在一些情况下,接头序列包含(G₄S)_n,其中n=1至4。

[0227] 在一些情况下,跨膜结构域是来自CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 或TCR β 的TCR跨膜结构域。在一些情况下,胞内结构域仅源自CD3 ϵ 、仅源自CD3 γ 、仅源自CD3 δ 、仅源自TCR α 或仅源自TCR β 。

[0228] 在一些情况下,TCR亚基包含(i)TCR胞外结构域的至少一部分,(ii)TCR跨膜结构域,和(iii)TCR胞内结构域,其中(i)、(ii)和(iii)中的至少两个来自同一TCR亚基。

[0229] 在一些情况下,TCR胞外结构域包含选自由TCR α 链、TCR β 链、CD3 ϵ TCR亚基、CD3 γ TCR亚基、CD3 δ TCR亚基组成的组的蛋白质的胞外结构域或其部分、其功能性片段,以及其具有至少一个但不超过20个修饰的氨基酸序列。

[0230] 在一些情况下,TCR亚基包含跨膜结构域,所述跨膜结构域包含选自TCR α 链、TCR β 链、TCR ζ 链、CD3 ϵ TCR亚基、CD3 γ TCR亚基、CD3 δ TCR亚基、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD28、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154组成的组的蛋白质的跨膜结构域、其功能性片段,以及其具有至少一个但不超过20个修饰的氨基酸序列。

[0231] 在一些情况下,TCR亚基包含TCR胞内结构域,所述TCR胞内结构域包含选自CD3 ϵ 、CD3 γ 或CD3 δ 的胞内信号传导结构域的蛋白质的刺激结构域,或对其具有至少一个修饰的氨基酸序列。

[0232] 在一些情况下,TCR亚基包含胞内结构域,所述胞内结构域包含选自4-1BB的功能性信号传导结构域和/或CD3 ζ 的功能性信号传导结构域的蛋白质的刺激结构域,或对其具有至少一个修饰的氨基酸序列。

[0233] 在一些情况下,重组核酸还包含编码共刺激结构域的序列。在一些情况下,共刺激结构域包含选自OX40、CD2、CD27、CD28、CD28、CD5、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278) 和4-1BB (CD137) 组成的组的蛋白质的功能性信号传导结构域,以及对其具有至少一个但不超过20个修饰的氨基酸序列。

[0234] 在一些情况下,TCR亚基包含TCR亚基的基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM),所述ITAM包含选自CD3 ζ TCR亚基、CD3 ϵ TCR亚基、CD3 γ TCR亚基、CD3 δ TCR亚基、TCR ζ 链、Fc ϵ 受体1链、Fc ϵ 受体2链、Fc γ 受体1链、Fc γ 受体2a链、Fc γ 受体2b1链、Fc γ 受体2b2链、Fc γ 受体3a链、Fc γ 受体3b链、Fc β 受体1链、TYROBP (DAP12)、CD5、CD16a、CD16b、CD22、CD23、CD32、CD64、CD79a、CD79b、CD89、CD278、CD66d组成的组的蛋白质的ITAM或其部分、其功能性片段,以及对其具有至少一个但不超过20个修饰的氨基酸序列。在一些情况下,所述ITAM替代CD3 γ 、CD3 δ 或CD3 ϵ 的ITAM。在一些情况下,ITAM选自CD3 ζ TCR亚基、CD3 ϵ TCR亚基、CD3 γ TCR亚基和CD3 δ TCR亚基组成的组,并替代选自CD3 ζ TCR亚基、CD3 ϵ TCR亚基、CD3 γ TCR亚基和CD3 δ TCR亚基组成的组的不同的ITAM。

[0235] 在一些情况下,TFP、TCR α 恒定结构域、TCR β 恒定结构域及其任何组合都能够与内源TCR复合物和/或至少一种内源TCR多肽功能性相互作用。在一些情况下,(a) TCR恒定结构域是TCR α 恒定结构域,并且TFP功能性整合到包含TCR β 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 或其组合的内源亚基的TCR复合物中;(b) TCR恒定结构域是TCR β 恒定结构域,并且TFP功能性整合到包含TCR α 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 或其组合的内源亚基的TCR复合物中;或(c) TCR恒定结构域是TCR α 恒定结构域和TCR β 恒定结构域,并且TFP功能性整合到包含CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 或其组合的内源亚基的TCR复合物中。

[0236] 在一些情况下,对其的至少一个但不超过20个修饰包括介导细胞信号传导的氨基酸的修饰或响应于配体与TFP结合而被磷酸化的氨基酸的修饰。

[0237] 在一些情况下,人抗体或人源化抗体是抗体片段。在一些情况下,抗体片段是scFv、单结构域抗体结构域、VH结构域或VL结构域。在一些情况下,包含抗原结合结构域的人抗体或人源化抗体选自以下组成的组:抗CD19结合结构域、抗B细胞成熟抗原(BCMA)结合结构域、抗间皮素(MSLN)结合结构域、抗CD22结合结构域、抗PD-1结合结构域、抗BAFF结合结构域和抗ROR-1结合结构域。

[0238] 在一些情况下,核酸选自DNA和RNA组成的组。在一些情况下,核酸是mRNA。在一些情况下,重组核酸包含核酸类似物,其中所述核酸类似物不在重组核酸的编码序列中。在

一些情况下,核酸类似物选自由以下组成的组:2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-氨基丙基、2'-脱氧、T-脱氧-2'-氟、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)、T-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)、2'-O-N-甲基乙酰氨基(2'-O-NMA)修饰的、锁核酸(LNA)、乙烯核酸(ENA)、肽核酸(PNA)、1',5'-脱水己糖醇核酸(HNA)、吗啉代、甲基磷酸酯核苷酸、硫代磷酸酯核苷酸和2'-氟N3-P5'-亚磷酰胺。

[0239] 在一些情况下,重组核酸还包含前导序列。在一些情况下,重组核酸还包含启动子序列。在一些情况下,重组核酸还包含编码poly(A)尾的序列。在一些情况下,重组核酸还包含3' UTR序列。在一些情况下,核酸是分离的核酸或非天然存在的核酸。在一些情况下,核酸是体外转录的核酸。

[0240] 在一些情况下,重组核酸还包含编码TCR α 跨膜结构域的序列。在一些情况下,重组核酸还包含编码TCR β 跨膜结构域的序列。在一些情况下,重组核酸还包含编码TCR α 跨膜结构域的序列和编码TCR β 跨膜结构域的序列。或者,重组核酸包含编码TCR γ 或TCR δ 结构域,例如跨膜结构域的序列。

[0241] 在一些实施方案中,本文公开了重组核酸,所述重组核酸包含(a)编码T细胞受体(TCR)融合蛋白(TFP)的序列,所述TFP包含(i)TCR亚基,所述TCR亚基包含(1)TCR胞外结构域的至少一部分,(2)跨膜结构域,和(3)胞内结构域,所述胞内结构域包含来自CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 或TCR β 的胞内信号传导结构域的刺激结构域,及(ii)抗原结构域,所述抗原结构域包含与在细胞表面上表达的受体或多肽结合的配体或其片段;以及(b)编码TCR恒定结构域的序列,其中TCR恒定结构域是TCR α 恒定结构域、TCR β 恒定结构域或TCR α 恒定结构域和TCR β 恒定结构域;其中TCR亚基与抗原结构域可操作地连接,并且其中当在T细胞中表达时,TFP功能性掺入TCR复合物中。在一些情况下,抗原结构域包括配体。在一些情况下,配体与细胞的受体结合。在一些情况下,配体与在细胞表面上表达的多肽结合。在一些情况下,在细胞表面上表达的受体或多肽包括应激反应受体或多肽。在一些情况下,在细胞表面上表达的受体或多肽是MHC I类相关糖蛋白。在一些情况下,MHC I类相关糖蛋白选自由以下组成的组:MICA、MICB、RAET1E、RAET1G、ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4及其组合。在一些情况下,抗原结构域包括单体、二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体或十聚体。在一些情况下,抗原结构域包括配体或其片段的单体或二聚体。在一些情况下,配体或其片段是单体、二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体或十聚体。在一些情况下,配体或其片段是单体或二聚体。在一些情况下,抗原结构域不包括抗体或其片段。在一些情况下,抗原结构域不包括可变区。在一些情况下,抗原结构域不包括CDR。在一些情况下,配体或其片段是天然杀伤2D组(NKG2D)配体或其片段。

[0242] 在一些情况下,当在T细胞中表达时,TCR恒定结构域掺入功能性TCR复合物中。在一些情况下,当在T细胞中表达时,TCR恒定结构域掺入到与掺入了TFP的功能性TCR复合物相同的功能性TCR复合物中。在一些情况下,编码TFP的序列和编码TCR恒定结构域的序列包含在同一核酸分子中。在一些情况下,编码TFP的序列和编码TCR恒定结构域的序列包含在不同的核酸分子中。

[0243] 在一些情况下,TCR亚基和抗体结构域、抗原结构域或结合配体或其片段通过接头序列可操作地连接。在一些情况下,接头序列包含(G4S) $_n$,其中 $n=1$ 至4。

[0244] 在一些情况下,跨膜结构域是来自CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、TCR α 或TCR β 的TCR跨膜结构域。在一些情况下,胞内结构域仅源自CD3 ϵ 、仅源自CD3 γ 、仅源自CD3 δ 、仅源自TCR α 或仅源自TCR β 。

[0245] 在一些情况下,TCR亚基包含(i) TCR胞外结构域的至少一部分,(ii) TCR跨膜结构域,和(iii) TCR胞内结构域,其中(i)、(ii)和(iii)中的至少两个来自同一TCR亚基。

[0246] 在一些情况下,TCR胞外结构域包含选自由TCR α 链、TCR β 链、CD3 ϵ TCR亚基、CD3 γ TCR亚基、CD3 δ TCR亚基组成的组的蛋白质的胞外结构域或其部分、其功能性片段,以及其具有至少一个但不超过20个修饰的氨基酸序列。

[0247] 在一些情况下,TCR亚基包含跨膜结构域,所述跨膜结构域包含选自由TCR α 链、TCR β 链、TCR ζ 链、CD3 ϵ TCR亚基、CD3 γ TCR亚基、CD3 δ TCR亚基、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD28、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154组成的组的蛋白质的跨膜结构域、其功能性片段,以及其具有至少一个但不超过20个修饰的氨基酸序列。

[0248] 在一些情况下,TCR亚基包含TCR胞内结构域,所述TCR胞内结构域包含选自CD3 ϵ 、CD3 γ 或CD3 δ 的胞内信号传导结构域的蛋白质的刺激结构域,或对其具有至少一个修饰的氨基酸序列。

[0249] 在一些情况下,TCR亚基包含胞内结构域,所述胞内结构域包含选自4-1BB的功能性信号传导结构域和/或CD3 ζ 的功能性信号传导结构域的蛋白质的刺激结构域,或对其具有至少一个修饰的氨基酸序列。

[0250] 在一些情况下,重组核酸还包含编码共刺激结构域的序列。在一些情况下,共刺激结构域包含选自由OX40、CD2、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278)和4-1BB (CD137)组成的组的蛋白质的功能性信号传导结构域,以及对其具有至少一个但不超过20个修饰的氨基酸序列。

[0251] 在一些情况下,TCR亚基包含TCR亚基的基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM),所述ITAM包含选自由CD3 ζ TCR亚基、CD3 ϵ TCR亚基、CD3 γ TCR亚基、CD3 δ TCR亚基、TCR ζ 链、Fc ϵ 受体1链、Fc ϵ 受体2链、Fc γ 受体1链、Fc γ 受体2a链、Fc γ 受体2b1链、Fc γ 受体2b2链、Fc γ 受体3a链、Fc γ 受体3b链、Fc β 受体1链、TYROBP (DAP12)、CD5、CD16a、CD16b、CD22、CD23、CD32、CD64、CD79a、CD79b、CD89、CD278、CD66d组成的组的蛋白质的ITAM或其部分、其功能性片段,以及对其具有至少一个但不超过20个修饰的氨基酸序列。在一些情况下,所述ITAM替代CD3 γ 、CD3 δ 或CD3 ϵ 的ITAM。在一些情况下,ITAM选自由CD3 ζ TCR亚基、CD3 ϵ TCR亚基、CD3 γ TCR亚基和CD3 δ TCR亚基组成的组,并替代选自由CD3 ζ TCR亚基、CD3 ϵ TCR亚基、CD3 γ TCR亚基和CD3 δ TCR亚基组成的组的不同的ITAM。

[0252] 在一些情况下,TFP、TCR α 恒定结构域、TCR β 恒定结构域及其任何组合都能够与内源TCR复合物和/或至少一种内源TCR多肽功能性相互作用。在一些情况下,(a) TCR恒定结构域是TCR α 恒定结构域,并且TFP功能性整合到包含TCR β 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 或其组合的内源亚基的TCR复合物中;(b) TCR恒定结构域是TCR β 恒定结构域,并且TFP功能性整合到包含TCR α 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 或其组合的内源亚基的TCR复合物中;或(c) TCR恒定结构域是TCR α 恒定结构域和TCR β 恒定结构域,并且TFP功能性整合到包含CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 或其组合的内源亚基的TCR复合物中。

[0253] 在一些情况下,对其的至少一个但不超过20个修饰包括介导细胞信号传导的氨基

酸的修饰或响应于配体与TFP结合而被磷酸化的氨基酸的修饰。

[0254] 在一些情况下,人抗体或人源化抗体是抗体片段。在一些情况下,抗体片段是scFv、单结构域抗体结构域、VH结构域或VL结构域。在一些情况下,包含抗原结合结构域的人抗体或人源化抗体选自自由以下组成的组:抗CD19结合结构域、抗B细胞成熟抗原(BCMA)结合结构域、抗间皮素(MSLN)结合结构域、抗CD22结合结构域、抗BAFF结合结构域、抗PD-1结合结构域和抗ROR-1结合结构域。

[0255] 在一些情况下,核酸选自自由DNA和RNA组成的组。在一些情况下,核酸是mRNA。在一些情况下,重组核酸包含核酸类似物,其中所述核酸类似物不在重组核酸的编码序列中。在一些情况下,核酸类似物选自自由以下组成的组:2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-氨基丙基、2'-脱氧、T-脱氧-2'-氟、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)、T-0-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)、2'-O-N-甲基乙酰氨基(2'-O-NMA)修饰的、锁核酸(LNA)、乙烯核酸(ENA)、肽核酸(PNA)、1',5'-脱水己糖醇核酸(HNA)、吗啉代、甲基磷酸酯核苷酸、硫代磷酸酯核苷酸和2'-氟N3-P5'-亚磷酰胺。

[0256] 在一些情况下,重组核酸还包含前导序列。在一些情况下,重组核酸还包含启动子序列。在一些情况下,重组核酸还包含编码poly(A)尾的序列。在一些情况下,重组核酸还包含3' UTR序列。在一些情况下,核酸是分离的核酸或非天然存在的核酸。在一些情况下,核酸是体外转录的核酸。

[0257] 在一些情况下,重组核酸还包含编码TCR α 跨膜结构域的序列。在一些情况下,重组核酸还包含编码TCR β 跨膜结构域的序列。在一些情况下,重组核酸还包含编码TCR α 跨膜结构域的序列和编码TCR β 跨膜结构域的序列。

[0258] 在一些实施方案中,本文还公开了包含本文公开的重组核酸的载体。在一些情况下,载体选自自由以下组成的组:DNA、RNA、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体(AAV)、劳斯肉瘤病毒(RSV)载体或逆转录病毒载体。在一些情况下,载体是AAV6载体。在一些情况下,载体还包含启动子。在一些情况下,载体是体外转录的载体。

[0259] 编码所需分子的核酸序列可使用本领域已知的重组方法获得,例如,通过筛选来自表达该基因的细胞的文库,通过从已知包含该基因的载体中获得该基因,或者通过使用标准技术从含有该基因的细胞和组织中直接分离。或者,可通过合成而非克隆来产生目标基因。

[0260] 本公开还提供了其中插入了本公开的DNA的载体。源自逆转录病毒诸如慢病毒的载体是实现长期基因转移的合适工具,因为它们允许转基因的长期稳定整合及其在子细胞中的繁殖。慢病毒载体相对于源自肿瘤逆转录病毒诸如鼠白血病病毒的载体具有额外的优势,因为它们可以转导非增殖细胞,诸如肝细胞。它们还具有免疫原性低的额外优势。

[0261] 在另一个实施方案中,包含编码本公开的所需TFP的核酸的载体是腺病毒载体(A5/35)。在另一个实施方案中,编码TFP的核酸的表达可使用转座子诸如sleeping beauty、crisper、CAS9和锌指核酸酶来完成。参见以下June等人2009 Nature Reviews Immunology 9.10:704-716,通过引用并入本文。

[0262] 还可使用标准的基因递送方案将本公开的表达构建体用于核酸免疫和基因疗法。用于基因递送的方法是本领域已知的(参见,例如,美国专利第5,399,346号、第5,580,859

号、第5,589,466号,通过引用整体并入本文)。在另一个实施方案中,本公开提供了基因治疗载体。

[0263] 可将核酸克隆到许多类型的载体中。例如,可将核酸克隆到载体中,所述载体包括但不限于质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、动物病毒和粘粒。特别吸引人的载体包括表达载体、复制载体、探针生成载体和测序载体。

[0264] 另外,还可以以病毒载体的形式向细胞提供表达载体。病毒载体技术在本领域中是公知的,并且在例如Sambrook等人,2012,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第1-4卷,Cold Spring Harbor Press,NY)和其它病毒学和分子生物学手册中进行了描述。可用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒和慢病毒。一般而言,合适的载体包含在至少一种生物体中起作用的复制起始位点、启动子序列、方便的限制性内切酶位点以及一个或多个选择标记(例如,W001/96584;W001/29058;和美国专利第6,326,193号)。

[0265] 已经开发了许多基于病毒的系统用于将基因转移到哺乳动物细胞中。例如,逆转录病毒为基因递送系统提供了方便的平台。可使用本领域已知的技术将选定的基因插入载体中并包装在逆转录病毒颗粒中。然后可分离重组病毒并在体内或离体地将其递送至受试者的细胞。许多逆转录病毒系统是本领域已知的。在一些实施方案中,使用腺病毒载体。许多腺病毒载体是本领域已知的。在一个实施方案中,使用慢病毒载体。

[0266] 另外的启动子元件,例如,增强子,调控转录起始的频率。通常,这些启动子位于起始位点上游30-110bp的区域,尽管许多启动子也显示出在起始位点下游含有功能元件。启动子元件之间的间隔通常是灵活的,因此当元件相对于彼此倒置或移动时,启动子功能得以保留。在胸苷激酶(tk)启动子中,可将启动子元件之间的间隔增加至相隔50bp,然后活性开始下降。根据启动子的不同,似乎单个元件可以协同或独立地激活转录。

[0267] 能够在哺乳动物T细胞中表达TFP转基因的启动子的实例是EF1a启动子。天然EF1a启动子驱动延伸因子-1复合物的 α 亚基表达,所述亚基负责氨酰基tRNA向核糖体的酶促递送。EF1a启动子已被广泛用于哺乳动物表达质粒中,并已被证明能有效地驱动从克隆到慢病毒载体中的转基因表达TFP(参见,例如,Milone等人,Mol. Ther. 17 (8):1453-1464 (2009))。启动子的另一个实例是早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列。该启动子序列是强组成型启动子序列,其能够驱动与其可操作地连接的任何多核苷酸序列的高水平表达。然而,还可使用其它组成型启动子序列,包括但不限于猿猴病毒40(SV40)早期启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)、人免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复序列(LTR)启动子、MoMuLV启动子、禽白血病病毒启动子、爱泼斯坦-巴尔病毒立即早期启动子、劳斯肉瘤病毒启动子以及人基因启动子,诸如但不限于肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、延伸因子-1a启动子、血红蛋白启动子和肌酸激酶启动子。另外,本公开不应限于组成型启动子的使用。诱导型启动子也被认为是本公开的一部分。诱导型启动子的使用提供了分子开关,其在需要这种表达时,能够开启与其有可操作地连接的多核苷酸序列的表达,或者在不需要表达时,关闭该表达。诱导型启动子的实例包括但不限于金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素调节的启动子。

[0268] 为了评估TFP多肽或其部分的表达,待引入细胞的表达载体也可包含选择标记基因或报告基因或这两者,以便于从寻求通过病毒载体转染或感染的细胞群中鉴定和选择表

达细胞。在其它方面,可在单独的DNA片段上携带选择标记并将其用于共转染程序。选择标记基因和报告基因两侧都可具有适当的调控序列,以使其能够在宿主细胞中表达。有用的选择标记包括,例如,抗生素抗性基因,诸如neo等。

[0269] 报告基因用于鉴定潜在地转染的细胞和用于评估调控序列的功能性。一般而言,报告基因是受者生物体或组织中不存在或不由其表达的基因,其编码其表达表现为一些易于检测的性质(例如,酶促活性)的多肽。在将DNA引入受者细胞后的合适时间测定报告基因的表达。合适的报告基因可包括编码荧光素酶、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰基转移酶、分泌型碱性磷酸酶的基因或绿色荧光蛋白基因(例如,Ui-Tei等人,2000 FEBS Letters 479:79-82)。合适的表达系统是公知的,并且可使用已知技术制备或商购获得。一般而言,具有显示报告基因最高表达水平的最小5'侧翼区的构建体被鉴定为启动子。此类启动子区域可与报告基因连接,并用于评估剂的调节启动子驱动的转录的能力。

[0270] 将基因引入细胞并表达的方法在本领域中是已知的。在表达载体的情况下,载体可通过本领域中的任何方法容易地引入宿主细胞,例如哺乳动物、细菌、酵母或昆虫细胞。例如,可通过物理、化学或生物手段将表达载体转移到宿主细胞中。

[0271] 将多核苷酸引入宿主细胞的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂转染、微粒轰击、显微注射、电穿孔等。用于产生包含载体和/或外源核酸的细胞的方法在本领域中是公知的。参见,例如,Sambrook等人,2012, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第1-4卷, Cold Spring Harbor Press, NY)。将多核苷酸引入宿主细胞的优选方法是磷酸钙转染。

[0272] 将目标多核苷酸引入宿主细胞的生物学方法包括DNA和RNA载体的使用。病毒载体,尤其是逆转录病毒载体,已经成为将基因插入哺乳动物(例如,人细胞)的最广泛使用的方法。其它病毒载体可源自慢病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒I型、腺病毒和腺相关病毒等(参见,例如,美国专利第5,350,674号和第5,585,362号)。

[0273] 将多核苷酸引入宿主细胞的化学方法包括胶体分散系统,诸如大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠粒和基于脂质的系统,包括水包油乳液、胶束、混合胶束和脂质体。用作体外和体内递送媒介物的示例性胶体系统是脂质体(例如,人工膜囊泡)。现有技术水平的核酸靶向递送的其它方法也是可用的,诸如用靶向纳米颗粒或其它合适的亚微米大小的递送系统递送多核苷酸。

[0274] 在使用非病毒递送系统的情况下,示例性递送媒介物是脂质体。设想了使用脂质制剂将核酸引入宿主细胞(体外、离体或体内)。另一方面,可将核酸与脂质缔合。与脂质缔合的核酸可被包封在脂质体的含水内部,散布在脂质体的脂质双层内,通过与脂质体和寡核苷酸都缔合的连接分子衔接至脂质体上,被包封在脂质体中,与脂质体复合,分散在含有脂质的溶液中,与脂质混合,与脂质组合,作为悬浮液包含在脂质中,包含在胶束中或与胶束复合,或者以其它方式与脂质缔合。脂质、脂质/DNA或脂质/表达载体相关的组合物不限于溶液中的任何特定结构。例如,它们可以存在于双层结构中,如胶束,或具有“塌陷的”结构。它们也可以简单地分散在溶液中,可能形成大小或形状不均匀的聚集体。脂质是脂肪物质,其可以是天然存在的或合成的脂质。例如,脂质包括天然存在于细胞质中的脂肪滴,以及含有长链脂肪族烃及其衍生物诸如脂肪酸、醇、胺、氨基醇和醛的化合物类。

[0275] 适合使用的脂质可从商业来源获得。例如,二肉豆蔻基磷脂酰胆碱(“DMPC”)可从Sigma, St. Louis, Mo. 获得;磷酸联十六烷基酯(“DCP”)可从K&K Laboratories (Plainview,

N.Y.) 获得;胆固醇(“Choi”)可从Calbiochem-Behring获得;二肉豆蔻基磷脂酰甘油(“DMPG”)和其它脂质可以从Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, Ala.) 获得。脂质在氯仿或氯仿/甲醇中的原液可在约-20℃下储存。将氯仿用作唯一的溶剂,因为其比甲醇更容易蒸发。“脂质体”是通用术语,其涵盖通过生成封闭的脂质双层或聚集体形成的各种单层和多层脂质媒介物。脂质体可被表征为具有拥有磷脂双层膜和内部含水介质的囊泡结构。多层脂质体具有被含水介质分隔的多个脂质层。当磷脂悬浮在过量的水溶液中时,它们会自发形成。脂质组分在形成封闭结构之前经历自我重排,并在脂质双层之间截留水和溶解的溶质(Ghosh等人,1991Glycobiology 5:505-10)。然而,在溶液中具有与正常囊泡结构不同的结构的组合物也被涵盖在内。例如,脂质可能呈现胶束结构,或者仅仅作为脂质分子的不均匀聚集体而存在。还设想了lipofectamine-核酸复合物。

[0276] 无论用于将外源核酸引入宿主细胞或以其它方式将细胞暴露于本公开的抑制剂的方法如何,为了确认宿主细胞中重组DNA序列的存在,可进行多种测定。此类测定包括,例如,本领域技术人员公知的“分子生物学”测定,诸如DNA印迹和RNA印迹、RT-PCR和PCR;“生物化学”测定,诸如检测特定肽的存在或不存在,例如,通过免疫学手段(ELISA和蛋白质印迹法)或通过本文所述的鉴定属于本发明范围内的剂的测定。

[0277] 本公开还提供了包含编码TFP的核酸分子的载体。一方面,可将TFP载体直接转导到细胞(例如,T细胞)中。一方面,载体是克隆性载体或表达载体,例如包括但不限于一种或多种质粒(例如,表达质粒、克隆性载体、微环、微载体、双微体(double minute chromosomes))、逆转录病毒和慢病毒载体构建体的载体。一方面,载体能够在哺乳动物T细胞中表达TFP构建体。一方面,哺乳动物T细胞是人T细胞。

[0278] 经修饰的T细胞

[0279] 在一些实施方案中,本文公开了经修饰的T细胞,其包含本文公开的重组核酸或本文公开的载体;其中经修饰的T细胞包含内源TCR的功能性破坏。在一些实施方案中,本文还公开了经修饰的T细胞,其包含本文公开的核酸的编码TFP的序列或由本文公开的核酸的序列所编码的TFP,其中所述经修饰的T细胞包含内源TCR的功能性破坏。在一些实施方案中,本文还公开了经修饰的同种异体T细胞,其包含本文公开的编码TFP的序列或由本文公开的核酸的序列所编码的TFP。

[0280] 在一些情况下,T细胞还包含编码TCR恒定结构域的异源序列,其中TCR恒定结构域是TCR α 恒定结构域、TCR β 恒定结构域或TCR α 恒定结构域和TCR β 恒定结构域。在一些情况下,被功能性破坏的内源TCR是内源TCR α 链、内源TCR β 链或内源TCR α 链和内源TCR β 链。在一些情况下,与未经修饰的对照T细胞相比,被功能性破坏的内源TCR与MHC-肽复合物的结合减少。在一些情况下,功能性破坏是编码内源TCR的基因的破坏。在一些情况下,编码内源TCR的基因的破坏是从T细胞的基因组中去除编码内源TCR的基因序列。在一些情况下,T细胞是人T细胞。在一些情况下,T细胞是CD8⁺T细胞或CD4⁺T细胞。在一些情况下,T细胞是同种异体T细胞。在一些情况下,经修饰的T细胞还包含编码抑制性分子的核酸,所述抑制性分子包含含有抑制性分子的至少一部分的第一多肽,所述第一多肽与包含来自胞内信号传导结构域的阳性信号的第二多肽缔合。在一些情况下,抑制性分子包含含有PD1的至少一部分的第一多肽和含有共刺激结构域和初级信号传导结构域的第二多肽。

[0281] T细胞的来源

[0282] 在扩增和遗传修饰之前,从受试者获得T细胞来源。术语“受试者”旨在包括其中能够引发免疫反应的活生物体(例如,哺乳动物)。受试者的实例包括人、狗、猫、小鼠、大鼠及其转基因物种。T细胞可从多种来源获得,包括外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾组织和肿瘤。在本公开的某些方面,可使用本领域中可用的多种T细胞系。在本公开的某些方面,可使用本领域技术人员已知的多种技术,诸如Ficoll™分离,由从受试者收集的血液单位获得T细胞。在一个优选方面,通过单采获得来自个体循环血液的细胞。单采产物通常含有淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其它有核白细胞、红细胞和血小板。一方面,可洗涤通过单采收集的细胞以除去血浆级分,并将细胞置于适当的缓冲液或培养基中,用于随后的处理步骤。在本公开的一个方面,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤细胞。在另一方面,洗涤溶液缺乏钙,并且可以缺乏镁,或者可以缺乏许多(如果不是全部)二价阳离子。在钙不存在的情况下,初始活化步骤会导致更大的活化。如本领域普通技术人员将容易理解的,洗涤步骤可通过本领域技术人员已知的方法完成,诸如根据制造商的说明使用半自动“流通”离心机(例如, Cobe® 2991细胞处理器、Baxter OncologyCytoMate或 Haemonetics® Cell Saver® 5)来完成。洗涤后,可将细胞重悬于各种生物相容的缓冲液中,例如,不含钙、不含镁的PBS、PlasmaLyte A或其它含或不含缓冲剂的盐溶液。或者,可以除去单采样品中不需要的组分,并将细胞直接重悬于培养基中。

[0283] 一方面,通过裂解红细胞和耗竭单核细胞,例如经由通过PERCOLL®梯度的离心或通过逆流离心淘析,从外周血淋巴细胞中分离出T细胞。可通过阳性或阴性选择技术进一步分离特定的T细胞亚群,诸如CD3+T细胞、CD28+T细胞、CD4+T细胞、CD8+T细胞、CD45RA+T细胞和CD45RO+T细胞。例如,一方面,通过与缀合有抗CD3/抗CD28(例如,3×28)的珠粒,诸如DYNABEADS®M-450 CD3/CD28 T一起孵育足以阳性选择所需的T细胞的一段时间来分离T细胞。一方面,所述时间段约为30分钟。另一方面,所述时间段的范围为30分钟至36小时或更长,以及其间的所有整数值。另一方面,所述时间段为至少1小时、2小时、3小时、4小时、5小时或6小时。在另一个优选方面,所述时间段为10至24小时。一方面,孵育时间段为24小时。在与其它细胞类型相比T细胞较少的任何情况下,例如在从肿瘤组织或免疫受损个体中分离肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)中,可使用更长的孵育时间来分离T细胞。另外,使用更长的孵育时间可以提高CD8+T细胞的捕获效率。因此,仅通过缩短或延长允许T细胞与CD3/CD28珠粒结合的时间和/或通过增加或减少珠粒与T细胞的比率(如本文进一步描述的),可以在培养开始时或在培养过程中的其它时间点优先选择或选除T细胞亚群。此外,通过增加或减少珠粒或其它表面上的抗CD3和/或抗CD28抗体的比率,可以在培养开始时或其它期望的时间点优先选择或选除T细胞亚群。本领域技术人员将认识到,在本公开的说明书中也可使用多轮选择。在某些方面,可能希望执行选择程序并在活化和扩增过程中使用“未选中的”细胞。还可将“未选中”的细胞经历进一步轮次的选择。

[0284] 通过阴性选择富集T细胞群可通过针对阴性选择的细胞所特有的表面标志物的抗体的组合来实现。一种方法是通过阴性磁性免疫粘附或流式细胞术进行细胞分选和/或选择,所述方法使用针对存在于阴性选择的细胞上的细胞表面标志物的单克隆抗体的混合物。例如,为了通过阴性选择富集CD4+细胞,单克隆抗体混合物通常包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。在某些方面,可能需要富集或阳性选择调节T细胞,所述

调节T细胞通常表达CD4⁺、CD25⁺、CD62Lhi、GITR⁺和FoxP3⁺。或者,在某些方面,通过缀合有抗C25的珠粒或其它类似的选择方法来耗竭调节T细胞。

[0285] 在一个实施方案中,可以选择表达IFN- γ 、TNF- α 、IL-17A、IL-2、IL-3、IL-4、GM-CSF、IL-10、IL-13、粒酶B和穿孔素中的一种或多种或其它合适的分子(例如,其它细胞因子)的T细胞群。筛选细胞表达的方法可以例如通过PCT公开号:WO 2013/126712中描述的方法来确定。

[0286] 为了通过阳性或阴性选择来分离所需的细胞群,可改变细胞和表面(例如,颗粒诸如珠粒)的浓度。在某些方面,可能希望显著减小其中将珠粒和细胞混合在一起的体积(例如,增加细胞的浓度),以确保细胞和珠粒的最大接触。例如,一方面,使用20亿个细胞/mL的浓度。一方面,使用10亿个细胞/mL的浓度。在另一方面,使用超过1亿个细胞/mL。在另一方面,使用1000万、1500万、2000万、2500万、3000万、3500万、4000万、4500万或5000万个细胞/mL的细胞浓度。在又一方面,使用7500万、8000万、8500万、9000万、9500万或1亿个细胞/mL的细胞浓度。在另一方面,可使用1.25亿个或1.5亿个细胞/mL的浓度。使用高浓度可以增加细胞产率、细胞活化和细胞扩增。另外,高细胞浓度的使用允许更高效地捕获可能微弱表达目标靶抗原的细胞(诸如CD28阴性T细胞),或来自其中存在许多肿瘤细胞的样品(例如,白血病血液、肿瘤组织等)的细胞。此类细胞群可具有治疗价值,并且是所希望获得的。例如,使用高浓度的细胞允许更高效地选择通常具有较弱的CD28表达的CD8⁺T细胞。

[0287] 在相关方面,可能希望使用较低浓度的细胞。通过显著稀释T细胞和表面(例如,颗粒诸如珠粒)的混合物,使颗粒与细胞之间的相互作用降至最低。这就选择了与颗粒结合的表达大量所需抗原的细胞。例如,CD4⁺T细胞表达更高水平的CD28,并且在稀释浓度下比CD8⁺T细胞更高效地被捕获。一方面,所用细胞的浓度为 5×10^6 /mL。在其它方面,所使用的浓度可以是约 1×10^5 /mL至 1×10^6 /mL,以及介于两者之间的任何整数值。在其它方面,可将细胞在旋转器上以不同的速度在2-10°C或室温下孵育不同的时间长度。

[0288] 也可在洗涤步骤后冷冻用于刺激的T细胞。不希望受理论束缚,冷冻和随后的解冻步骤通过去除细胞群中的粒细胞和一定程度上的单核细胞来提供更均一的产物。在去除血浆和血小板的洗涤步骤之后,可将细胞悬浮在冷冻溶液中。虽然许多冷冻溶液和参数在本领域中是已知的,并且在这种情况下是有用的,但一种方法涉及使用含有20%DMSO和8%人血清白蛋白的PBS,或者含有10%葡聚糖40和5%葡萄糖、20%人血清白蛋白和7.5%DMSO或含有31.25%Plasmalyte-A、31.25%葡萄糖5%、0.45%NaCl、10%葡聚糖40和5%葡萄糖、20%人血清白蛋白和7.5%DMSO的培养基或者其它含有例如羟乙基淀粉溶液(Hespan)和PlasmaLyte A的合适的细胞冷冻培养基,然后将细胞以每分钟1的速度冷冻至-80°C,并储存在液氮储罐的汽相(vapor phase)中。可使用其它受控冷冻的方法,以及立即在-20°C或在液氮中进行非受控冷冻。在某些方面,如本文所述解冻和洗涤冷冻保存的细胞,并使其在室温下静置一小时,然后使用本公开的方法进行活化。

[0289] 在本公开的说明书中还设想了在可能需要本文所述的扩增的细胞之前的一段时间从受试者收集血液样品或单采产物。因此,可在任何必要的时间点收集待扩增的细胞的来源,分离所需的细胞(诸如T细胞)并将其冷冻,以待以后用于许多将受益于T细胞疗法的疾病或疾患(诸如本文所述的那些)的T细胞疗法。一个方面,血液样品或单采产物取自一般健康的受试者。在某些方面,从一般健康的受试者(所述受试者有发展疾病的风险,但尚未

发展成疾病)获取血液样品或单采产物,并分离目标细胞,将其冷冻以备后用。在某些方面,可将T细胞扩增、冷冻并在以后使用。在某些方面,在如本文所述的特定疾病诊断后不久,但在任何治疗之前,从患者收集样品。在另外的方面,在进行多种相关治疗模式之前,从受试者的血液样品或单采物中分离细胞,所述治疗模式包括但不限于利用诸如那他珠单抗、依法珠单抗、抗病毒剂、化学疗法等剂、放射、免疫抑制剂诸如环孢霉素、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤和霉酚酸酯、抗体或其它免疫消融剂诸如阿伦珠单抗、抗CD3抗体、环磷酰胺、氟达拉滨、环孢霉素、他克莫司、雷帕霉素、霉酚酸、类固醇、罗米地新和辐照等手段的治疗。

[0290] 在本公开的另外方面,在给受试者留下功能性T细胞的治疗后,直接从患者获取T细胞。在这方面,已经观察到,在某些癌症治疗之后,特别是用损害免疫系统的药物治疗之后,在治疗后不久在患者通常从治疗中恢复期间,所获得的T细胞的质量对于它们离体扩增的能力而言可能是最佳的或得到改善的。同样,在使用本文所述方法进行离体操作后,这些细胞可能处于增强的植入和体内扩增的优选状态。因此,在本公开的说明书中,设想了在该恢复阶段期间收集血细胞,包括T细胞、树突细胞或其它造血谱系的细胞。另外,在某些方面,动员(例如,利用GM-CSF的动员)和条件化方案可用于在受试者中创造条件,在所述条件下,尤其在治疗后的限定时间窗内,有利于特定细胞类型的再增殖、再循环、再生和/或扩增。说明性细胞类型包括T细胞、B细胞、树突细胞和免疫系统的其它细胞。

[0291] T细胞的活化和扩增

[0292] 通常可使用例如美国专利第6,352,694号、第6,534,055号、第6,905,680号、第6,692,964号、第5,858,358号、第6,887,466号、第6,905,681号、第7,144,575号、第7,067,318号、第7,172,869号、第7,232,566号、第7,175,843号、第5,883,223号、第6,905,874号、第6,797,514号、第6,867,041号和第7,572,631号中描述的方法来活化和扩增T细胞。

[0293] 通常,可通过与表面接触来扩增本公开的T细胞,所述表面附着有刺激CD3/TCR复合物相关信号的剂和刺激T细胞表面上的共刺激分子的配体。特别地,可如本文所述,诸如通过与抗CD3抗体或其抗原结合片段或固定在表面上的抗CD2抗体接触,或通过与蛋白激酶C激活剂(例如,苔藓抑素)结合钙离子载体接触来刺激T细胞群。对于辅助分子在T细胞表面的共刺激,使用结合辅助分子的配体。例如,可在适于刺激T细胞增殖的条件下,将T细胞群与抗CD3抗体和抗CD28抗体接触。刺激CD4+T细胞或CD8+T细胞的增殖,抗CD3抗体和抗CD28抗体。抗CD28抗体的实例包括9.3、B-T3、XR-CD28(Diaclone, Besancon, France),可如使用本领域公知的其它方法(Berg等人, Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen等人, J. Exp. Med. 190(9):1319-1328, 1999; Garland等人, J. Immunol. Meth. 227(1-2):53-63, 1999)那样使用。

[0294] 已暴露于不同刺激时间的T细胞可表现出不同的特征。例如,典型的血液或单采外周血单核细胞产物具有比细胞毒性或抑制性T细胞群(TC, CD8+)更大的辅助性T细胞群(TH, CD4+)。通过刺激CD3和CD28受体离体扩增T细胞产生了T细胞群,所述T细胞群在约8-9天之前主要由TH细胞组成,而在约8-9天之后, T细胞群体包含越来越大的TC细胞群。因此,根据治疗的目的,用主要由TH细胞组成的T细胞群输注受试者可以是有利的。类似地,如果已经分离出抗原特异性的TC细胞亚群,则将该亚群扩增至更大的程度可以是有益的。

[0295] 另外,除了CD4和CD8标志物以外,其它表型标志物也有显著变化,但在很大程度上,在细胞扩增过程中是可再现的。因此,这种再现性使得能够为特定目的定制活化的T细

胞产品。

[0296] 一旦构建了抗CD19抗BCMA、抗CD22、抗ROR1、抗PD-1或抗BAFF TFP,就可使用各种测定来评估该分子的活性,诸如但不限于在抗原刺激后扩增T细胞的能力,在再刺激不存在的情况下维持T细胞扩增的能力,以及在适当的体外和动物模型中的抗癌活性。评估抗CD19抗BCMA、抗CD22、抗ROR1、抗PD-1或抗BAFF TFP作用的测定将在下面进一步详细描述。

[0297] 原代T细胞中TFP表达的蛋白质印迹分析可用于检测单体和二聚体的存在(参见,例如,Milone等人,Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009))。简言之,将表达TFP的T细胞(CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞的1:1混合物)离体扩增超过10天,随后进行裂解并在还原条件下进行SDS-PAGE。通过蛋白质印迹法,使用针对TCR链的抗体来检测TFP。将相同的T细胞亚群用于在非还原条件下进行SDS-PAGE分析,以允许评估共价二聚体的形成。

[0298] 抗原刺激后的TFP⁺T细胞的离体扩增可通过流式细胞术来测量。例如,将CD4⁺和CD8⁺T细胞的混合物用 α CD3/ α CD28和APC刺激,然后在待分析的启动子的控制下用表达GFP的慢病毒载体进行转导。示例性启动子包括CMV IE基因、EF-1 α 、遍在蛋白C或磷酸甘油激酶(PGK)启动子。在培养的第6天,通过流式细胞术评估CD4⁺T细胞和/或CD8⁺T细胞亚群中的GFP荧光(参见,例如,Milone等人,Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009))。或者,在第0天用 α CD3/ α CD28包被的磁珠刺激CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞的混合物,并在第1天使用表达TFP的双顺反子慢病毒载体利用TFP,以及使用2A核糖体跳跃序列利用eGFP一起转导所述细胞混合物。洗涤后,在抗CD3抗体和抗CD28抗体(K562-BBL-3/28)存在的条件下,用CD19⁺K562细胞(K562-CD19)、野生型K562细胞(K562野生型)或表达hCD32和4-1BBL的K562细胞再刺激培养物。每隔一天向培养物中加入100IU/mL的外源IL-2。通过使用基于珠粒的计数的流式细胞术对GFP⁺T细胞进行计数(参见,例如,Milone等人,Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009))。

[0299] 还可测量再刺激不存在的情况下的持续的TFP⁺T细胞扩增(参见,例如,Milone等人,Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009))。简言之,在于第0天用 α CD3/ α CD28包被的磁珠刺激并于第1天用指示的TFP转导后,在培养的第8天使用Coulter Multisizer III颗粒计数器测量平均T细胞体积(f1)。

[0300] 还可使用动物模型来测量TFP-T的活性。例如,可使用异种移植模型,所述异种移植模型在免疫缺陷型小鼠中使用人CD19特异性TFP⁺T细胞治疗原代人前B ALL(参见,例如,Milone等人,Molecular Therapy 17(8):1453-1464(2009))。简言之,在建立ALL后,将小鼠随机分为治疗组。将不同数量的工程化的T细胞以1:1的比率共注射到携带B-ALL的NOD/SCID/ γ ^{-/-}小鼠中。在注射T细胞后的不同时间,评估小鼠的脾脏DNA中每个载体的拷贝数。以每周为间隔对动物进行白血病评估。在注射了 α CD19- ζ TFP⁺T细胞或模拟转导的T细胞的小鼠中,测量外周血CD19⁺B-ALL母维细胞计数。使用时序检验(log-rank test)比较各组的存活曲线。另外,还可分析NOD/SCID/ γ ^{-/-}小鼠在注射T细胞后4周的绝对外周血CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞计数。给小鼠注射白血病细胞,3周后给小鼠注射通过编码与eGFP连接的TFP的双顺反子慢病毒载体工程化以表达TFP的T细胞。通过在注射前与模拟转导的细胞混合,将T细胞针对45-50%的输入GFP⁺T细胞进行标准化,并通过流式细胞术进行确认。以1隔的间隔对动物进行白血病评估。用时序检验比较TFP⁺T细胞组的存活曲线。

[0301] 可以评估剂量依赖性TFP治疗反应(参见,例如,Milone等人,Molecular Therapy

17 (8) :1453-1464 (2009))。例如,在建立白血病后35-70天,在于第21天注射了TFP T细胞、等数量的模拟转导的T细胞或未注射T细胞的小鼠中获得外周血。对各组小鼠进行随机放血以测定外周血CD19+ALL细胞计数测定,然后在第35天和第49天处死小鼠。在第57天和第70天评估剩余的动物。

[0302] 先前已经例如在Milone等人, *Molecular Therapy* 17 (8) :1453-1464 (2009) 中描述了细胞增殖和细胞因子产生的评估。简言之,通过将洗涤过的T细胞与表达CD19 (K19) 或CD32和CD137 (KT32-BBL) 的K562细胞混合 (最终的T细胞:K562的比率为2:1), 在微量滴定板中进行TFP介导的增殖的评估。K562细胞在使用前用 γ 射线照射。将抗CD3 (克隆OKT3) 单克隆抗体和抗CD28 (克隆9.3) 单克隆抗体添加到含有KT32-BBL细胞的培养物中, 用作刺激T细胞增殖的阳性对照, 因为这些信号支持长期CD8+T细胞离体扩增。如制造商所描述的, 使用CountBright™荧光珠粒 (Invitrogen) 和流式细胞术对培养物中的T细胞进行计数。使用利用表达eGFP-2A连接的TFP的慢病毒载体工程化的T细胞, 通过GFP表达鉴定TFP+T细胞。对于不表达GFP的TFP+T细胞, 利用生物素化的重组CD19蛋白和第二抗生物素蛋白-PE缀合物检测TFP+T细胞。还可用特异性单克隆抗体 (BD Biosciences) 同时检测T细胞上的CD4+和CD8+表达。根据制造商的说明, 使用人TH1/TH2细胞因子细胞计数珠粒阵列试剂盒 (BD Biosciences) 对再刺激后24小时收集的上清液进行细胞因子测量。使用FACScalibur™流式细胞仪 (BD Biosciences) 评估荧光, 并根据制造商的说明分析数据。

[0303] 细胞毒性可通过标准⁵¹Cr释放测定进行评估 (参见, 例如, Milone等人, *Molecular Therapy* 17 (8) :1453-1464 (2009))。在频繁搅拌的条件下, 将靶细胞 (K562细胞系和原代前B-ALL细胞) 在37°C下用⁵¹Cr (如NaCrO₄, New England Nuclear) 加载2小时, 在完全RPMI中洗涤两次, 然后涂铺到微量滴定板中。在孔中, 将效应T细胞与靶细胞在完全RPMI中以不同的效应细胞:靶细胞比率 (E:T) 混合。还准备了仅含培养基 (自发释放, SR) 或1% Triton-X100去垢剂溶液 (总释放, TR) 的额外孔。在37°C孵育4小时后, 收获每个孔的上清液。然后使用 γ 粒子计数器 (Packard Instrument Co., Waltham, Mass.) 测量释放的⁵¹Cr。以至少一式三份执行每种条件, 裂解百分比使用以下公式计算: 裂解% = (ER-SR) / (TR-SR), 其中ER表示每种实验条件下释放的平均⁵¹Cr。

[0304] 可将成像技术用于在荷瘤动物模型中评估TFP的特定运输和增殖。此类测定已例如在Barrett等人, *Human Gene Therapy* 22:1575-1586 (2011) 中进行了描述。给NOD/SCID/ γ c-/- (NSG) 小鼠IV注射Na1m-6细胞 (ATCC® CRL-3273™), 7天后, 在用TFP构建体电穿孔后4小时给小鼠注射T细胞。用慢病毒构建体稳定转染T细胞以表达萤火虫萤光素酶, 并对小鼠的生物发光进行成像。或者, 可如下测量Na1m-6异种移植物模型中单次注射TFP+T细胞的治疗效果和特异性: 给NSG小鼠注射经转导以稳定表达萤火虫萤光素酶的Na1m-6, 随后在7天后单次尾静脉注射用CD19 TFP电穿孔的T细胞。在注射后的不同时间点对动物进行成像。例如, 可生成第5天 (治疗前2天) 和第8天 (TFP+PBL后24小时) 的代表性小鼠中萤火虫萤光素酶阳性白血病的光子密度热图。

[0305] 其它测定, 包括本文实施例部分所述的以及本领域已知的那些测定也可用于评估本文公开的抗CD19、抗BCMA、抗CD22、抗ROR1、抗PD-1或抗BAFF TFP构建体。

[0306] 药物组合物

[0307] 在一些实施方案中, 本文公开了药物组合物, 其包含: (a) 本公开的经修饰的T细

胞;和(b)药学上可接受的载体。此类组合物可包含缓冲液,诸如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等;碳水化合物,诸如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇;蛋白质;多肽或氨基酸,诸如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂,诸如EDTA或谷胱甘肽;佐剂(例如,氢氧化铝);和防腐剂。一方面,将本公开的组合物配制用于静脉内施用。

[0308] 可以以适合于待治疗(或预防)的疾病的方式施用本公开的药物组合物。施用的数量和频率将由诸如患者的状况以及患者的疾病类型和严重程度等因素决定,尽管适当的剂量可由临床试验决定。

[0309] 在一个实施方案中,药物组合物基本上不含污染物,例如,不存在可检测水平的污染物(例如,选自由以下组成的组:内毒素、支原体、有复制能力的慢病毒(RCL)、p24、VSV-G核酸、HIV gag、残留的抗CD3/抗CD28包被的珠粒、小鼠抗体、混合人血清、牛血清白蛋白、牛血清、培养基组分、载体包装细胞或质粒组分、细菌和真菌)。在一个实施方案中,所述细菌是选自由以下组成的组的至少一种细菌:粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitidis*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)和化脓性链球菌A组(*Streptococcus pyogenes* group A)。

[0310] 当指示“免疫有效量”、“抗肿瘤有效量”、“肿瘤抑制有效量”或“治疗量”时,医生可以在考虑患者(受试者)的年龄、体重、肿瘤尺寸、感染或转移的程度以及状况的个体差异的情况下,确定待施用的本公开的组合物的精确量。通常可以说,包含本文所述的T细胞的药物组合物可以以 10^4 至 10^9 个细胞/kg体重,在一些情况下为 10^5 至 10^6 个细胞/kg体重(包括这些范围内的所有整数值)的剂量施用。也可以以这些剂量多次施用T细胞组合物。所述细胞可通过使用免疫疗法中公知的输注技术施用(参见,例如,Rosenberg等人,*New Eng. J. of Med.* 319:1676,1988)。

[0311] 在某些方面,可能需要向受试者施用活化的T细胞,随后重新抽取血液(或进行单采),根据本公开从血液中活化T细胞,并用这些活化和扩增的T细胞再输注给患者。这个过程可以每隔几周进行多次。在某些方面,可从10cc至400cc的取血中活化T细胞。在某些方面,可从20cc、30cc、40cc、50cc、60cc、70cc、80cc、90cc或100cc的取血中活化T细胞。

[0312] 本发明组合物的施用可以以任何方便的方式进行,包括通过气雾剂吸入、注射、摄入、输注、植入或移植。可经动脉、皮下、皮内、瘤内、结节内、髓内、肌内、通过静脉内(i.v.)注射或腹膜内途径向患者施用本文所述的组合物。一方面,通过皮内或皮下注射向患者施用本公开的T细胞组合物。一方面,通过静脉内(i.v.)注射施用本公开的T细胞组合物。可将T细胞的组合物直接注射到肿瘤、淋巴结或感染部位。

[0313] 在一个特定的示例性方面,受试者可进行白细胞去除术,其中离体收集、富集或去除白细胞,以选择和/或分离目标细胞,例如T细胞。这些T细胞分离株可通过本领域已知的方法扩增,并进行处理,使得可以引入本公开的一种或多种TFP构建体,从而产生本公开的经修饰的T-T细胞。有需要的受试者可随后进行高剂量化学疗灶的标准治疗,然后进行外周血干细胞移植。在某些方面,在移植之后或移植的同时,受试者接受本公开的扩增的经修饰的T细胞的输注。另一方面,在手术之前或之后施用扩增的细胞。

[0314] 对患者进行的上述治疗的剂量将随着所治疗疾病的确切性质和治疗的接受者而

变化。用于人施用的剂量缩放 (scaling of dosages) 可以根据本领域公认的实践进行。例如,对于成年患者,阿仑珠单抗的剂量通常在1mg至约100mg的范围内,通常每天施用,持续1至30天的时期。优选日剂量为1至10mg/天,尽管在某些情况下可使用高达40mg/天的较大剂量(描述于美国专利第6,120,766号中)。

[0315] 在一个实施方案中,例如,使用体外转录将TFP引入T细胞,并且受试者(例如,人)接受本公开的TFP T细胞的初始施用,以及本公开的TFP T细胞的一次或多次后续施用,其中一次或多次后续施用在前一次施用后少于15天,例如,14天、13天、12天、11天、10天、9天、8天、7天、6天、5天、4天、3天或2天施用。在一个实施方案中,每周向受试者(例如,人)施用多于一次的本公开的TFP T细胞的施用,例如,每周施用2次、3次或4次本公开的TFP T细胞的施用。在一个实施方案中,受试者(例如,人受试者)每周接受多于一次的TFP T细胞的施用(例如,每周2次、3次或4次施用)(在本文中也称为一个周期),随后一周不进行TFP T细胞施用,然后向受试者施用一次或多次另外的TFP T细胞的施用(例如,每周超过一次的TFP T细胞施用)。在另一个实施方案中,受试者(例如,人受试者)接受超过一个周期的TFP T细胞,并且每个周期之间的时间少于10天、9天、8天、7天、6天、5天、4天或3天。在一个实施方案中,每隔一天施用TFP T细胞一次,每周施用3次。在一个实施方案中,施用本公开的TFP T细胞至少2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周或更多周。

[0316] 一方面,使用慢病毒载体诸如慢病毒产生CD19 TFP T细胞。以这种方式产生的TFP T细胞将具有稳定的TFP表达。

[0317] 一方面,TFP T细胞在转导后瞬时表达TFP载体4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天。TFP的瞬时表达可通过RNA TFP载体递送来实现。一方面,通过电穿孔将TFP RNA转导到T细胞中

[0318] 使用瞬时表达TFP的T细胞(尤其是携带鼠scFv的TFP T细胞)治疗的患者中可出现的潜在问题是多次治疗后的过敏反应。

[0319] 不受这一理论束缚,据信这种过敏反应可能是由患者产生体液性抗TFP反应引起的,即抗TFP抗体具有抗IgE同种型。据认为,患者的抗体产生细胞在对抗原的暴露中中断10至14天时经历从IgG同种型(其不引起过敏反应)至IgE同种型的类别转换。

[0320] 如果患者在短暂TFP疗法过程中有产生抗TFP抗体反应(诸如由RNA转导产生的那些)的风险,则TFP T细胞输注中断不应持续超过10至14天。

[0321] 产生经修饰的T细胞的方法

[0322] 在一些实施方案中,本文公开了产生本公开的经修饰的T细胞的方法,所述方法包括(a)破坏编码TCR α 链、TCR β 链、TCR γ 链、TCR δ 链或其任何组合的内源TCR基因;从而产生包含内源TCR基因的功能性破坏的T细胞;以及(b)用本公开的重组核酸或本文公开的载体转导含有内源TCR基因的功能性破坏的T细胞。在一些情况下,破坏包括用核酸酶蛋白或编码核酸酶蛋白的核酸序列转导T细胞,所述核酸酶蛋白靶向编码TCR α 链,TCR β 链或TCR α 链和TCR β 链的内源基因。

[0323] 在一些实施方案中,本文还公开了产生本公开的经修饰的T细胞的方法,所述方法包括用本文公开的重组核酸或本文公开的载体转导含有内源TCR基因的功能性破坏的T细胞。在一些情况下,含有内源TCR基因的功能性破坏的T细胞是含有编码TCR α 链、TCR β 链或TCR α 链和TCR β 链的内源TCR基因的功能性破坏的T细胞。

[0324] 在一些情况下，T细胞是人T细胞。在一些情况下，与未经修饰的对照T细胞相比，包含内源TCR基因的功能性破坏的T细胞与MHC-肽复合物的结合减少。

[0325] 在一些情况下，核酸酶是大范围核酸酶、锌指核酸酶 (ZFN)、转录激活子样效应子核酸酶 (TALEN)、CRISPR/Cas核酸酶、CRISPR/Cas切口酶或megaTAL核酸酶。在一些情况下，将由重组核酸或载体所包含的序列在切割位点处插入内源TCR亚基基因，并且其中将序列插入内源TCR亚基基因功能性破坏内源TCR亚基。在一些情况下，核酸酶是大范围核酸酶。在一些情况下，大范围核酸酶包含第一亚基和第二亚基，其中第一亚基与识别序列的第一识别半位点结合，并且其中第二亚基与识别序列的第二识别半位点结合。在一些情况下，大范围核酸酶是包含接头的单链大范围核酸酶，其中接头共价连接第一亚基与第二亚基。

[0326] 基因编辑技术

[0327] 在一些实施方案中，使用基因编辑技术，诸如成簇的规律间隔短回文重复序列 (CRISPR®，参见，例如美国专利第8,697,359号)、转录激活物样效应子 (TALE) 核酸酶 (TALEN，参见，例如美国专利第9,393,257号)、大范围核酸酶 (具有包含12至40个碱基对的双链DNA序列的大识别位点的内切脱氧核糖核酸酶)、锌指核酸酶 (ZFN，参见，例如，Urnov等人，*Nat.Rev.Genetics* (2010) 第11卷，第636-646页) 或megaTAL核酸酶 (大范围核酸酶与TAL重复序列的融合蛋白) 方法对本文公开的经修饰的T细胞进行工程化。这样，可对嵌合构建体进行工程化以组合每个亚基的所需特征，诸如构象或信号传递能力。另请参见Sander & Joung, *Nat.Biotech.* (2014) 第32卷，第347-55页；和June等人，2009 *Nature Reviews Immunol.* 9.10:704-716，每篇文献均通过引用并入本文。在一些实施方案中，对TFP亚基的胞外结构域、跨膜结构域或胞质结构域中的一种或多种进行工程化以具有超过一个天然TCR亚基结构域 (即，是嵌合的) 的方面。

[0328] 永久性改变人基因组以及在疾病相关基因中引入位点特异性基因组修饰的技术的最新发展为治疗应用奠定了基础。这些技术现在通常被称为“基因组编辑”。

[0329] 在一些实施方案中，基因编辑技术被用于破坏内源TCR基因。在一些实施方案中，所提及的内源TCR基因编码TCR α 链、TCR β 链或TCR α 链和TCR β 链。在一些实施方案中，基因编辑技术为多重基因组编辑铺平了道路，所述多重基因组编辑允许同时破坏内源TCR基因中的多个基因组基因座。在一些实施方案中，应用多重基因组编辑技术来产生在内源TCR和/或人白细胞抗原 (HLA)、和/或程序性细胞死亡蛋白1 (PD1) 和/或其它基因表达方面具有缺陷的基因被破坏的T细胞。

[0330] 目前的基因编辑技术包括大范围核酸酶、锌指核酸酶 (ZFN)、TAL效应子核酸酶 (TALEN) 和成簇的规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) /CRISPR相关 (Cas) 系统。这四大类基因编辑技术在结合用户定义的DNA序列和介导双链DNA断裂 (DSB) 方面具有共同的作用模式。然后，DSB可通过非同源末端连接 (NHEJ) 或者-当存在供体DNA时-同源重组 (HR) 来修复，同源重组是从供体DNA片段引入同源序列的事件。另外，切口酶产生单链DNA断裂 (SSB)。DSB可通过单链DNA掺入 (ssDI) 或单链模板修复 (ssTR) 来修复，单链模板修复是从供体DNA中引入同源序列的事件。

[0331] 基因组DNA的遗传修饰可使用位点特异性的、稀有切割的内切核酸酶来完成，所述内切核酸酶被工程化来识别目标基因座中的DNA序列。产生工程化的位点特异性内切核酸酶的方法在本领域中是已知的。例如，可对锌指核酸酶 (ZFN) 进行工程化以识别和切割基因

组中的预定位点。ZFN是嵌合蛋白,其包含与FokI限制性酶的核酸酶结构域融合的锌指DNA结合结构域。锌指结构域可通过合理的或实验性手段重新设计,以生产与预先确定的长度为18个碱基对的DNA序列结合的蛋白质。通过将这种工程化的蛋白质结构域与FokI核酸酶融合,就有可能以基因组水平特异性来靶向DNA断裂。ZFN已被广泛用于多种真核生物的靶基因添加、去除和取代(综述于Durai等人(2005),*Nucleic Acids Res* 33,5978中)。同样地,可以产生TAL-效应子核酸酶(TALEN)来切割基因组DNA中的特定位置。与ZFN一样,TALEN包含与FokI核酸酶结构域融合的工程化的、位点特异性的DNA结合结构域(综述于Mak等人(2013),*Curr Opin Struct Biol.*23:93-9)中。然而,在这种情况下,DNA结合结构域包括一个串联阵列的TAL效应子结构域,其每一个特异性识别单个DNA碱基对。紧凑型TALEN具有替代的内切核酸酶结构,避免了对二聚化的需要(Beurdeley等人(2013),*Nat Commun.*4:1762)。紧凑型TALEN包含与I-TevI归巢内切核酸酶的核酸酶结构域融合的工程化的、位点特异性TAL-效应子DNA结合结构域。与FokI不同,I-TevI不需要二聚化来产生双链DNA断裂,因此紧凑型TALEN作为单体是有功能的。

[0332] 基于CRISPR/Cas9系统的工程化的内切核酸酶在本领域也是已知的(Ran等人(2013),*Nat Protoc.*8:2281-2308;Mali等人(2013),*Nat Methods* 10:957-63)。CRISPR基因编辑技术由其DNA靶向特异性和切割活性可通过短的引导RNA或双链体crRNA/TracrRNA来编程的内切核酸酶蛋白组成。CRISPR内切核酸酶包含两个组分:(1)半胱天冬酶效应子核酸酶,通常为微生物Cas9;和(2)包含18至20个核苷酸靶向序列的短的“引导RNA”或RNA双链体,其将核酸酶导向基因组中的目标位置。通过在同一细胞中表达多种引导RNA,每种引导RNA具有不同的靶向序列,就可能将DNA断裂同时靶向基因组中的多个位点(多重基因组编辑)。

[0333] 本领域中已知两类CRISPR系统(Adli(2018)*Nat. Commun.*9:1911),每个种类都包含多个CRISPR类型。I类包括通常存在于古细菌的I型和III型CRISPR系统。而II类包括II型、IV型、V型和VI型CRISPR系统。尽管最广泛使用的CRISPR/Cas系统是II型CRISPR-Cas9系统,但CRISPR/Cas系统已被研究人员重新用于基因组编辑。在过去的几年里,已改造了10多种不同的CRISPR/Cas蛋白(Adli(2018)*Nat. Commun.*9:1911)。在这些蛋白中,诸如来自酸性氨基球菌属的某一种(*Acid-aminococcus* sp)(AsCpf1)和毛螺菌科细菌(*Lachnospiraceae bacterium*)(LbCpf1)的Cas12a(Cpf1)蛋白是特别令人感兴趣的。

[0334] 归巢内切核酸酶是一组天然存在的核酸酶,其能识别植物和真菌基因组中常见的15-40个碱基对的切割位点。它们通常与寄生物的DNA元件缔合,诸如组1自我剪接内含子和内含肽(intein)。它们通过在染色体上产生双链断裂(这募集细胞的DNA修复机制(Stoddard(2006),*Q. Rev. Biophys.*38:49-95))来自自然地促进同源重组或在宿主基因组的特定位置插入基因。特定的氨基酸取代可重新编程归巢核酸酶的DNA切割特异性(Niyonzima(2017),*Protein Eng Des Sel.*30(7):503-522)。大范围核酸酶(MN)是具有天然核酸酶活性的单体蛋白,其源自细菌归巢内切核酸酶,并针对独特的靶位点进行了工程化(Gersbach(2016),*Molecular Therapy.*24:430-446)。在一些实施方案中,大范围核酸酶是工程化的I-CreI归巢内切核酸酶。在其它实施方案中,大范围核酸酶是工程化的I-SceI归巢内切核酸酶。

[0335] 除了提及的四种主要的基因编辑技术以外,还已对包含大范围核酸酶、ZFN和

TALEN的融合体的嵌合蛋白进行工程化,以产生新型单体酶,该酶利用ZFN和TALEN的结合亲和力和大范围核酸酶的切割特异性(Gersbach(2016),Molecular Therapy.24:430-446)。例如,megaTAL是单一嵌合蛋白,其是来自TALEN的易于定制的DNA结合结构域与大范围核酸酶的高切割效率的组合。

[0336] 为了执行基因编辑技术,核酸酶,以及在CRISPR/Cas9系统的情况下,gRNA,必须被高效地递送到目标细胞。诸如物理、化学和病毒方法等的递送方法也是本领域已知的(Mali(2013).Indian J.Hum.Genet.19:3-8.)。在一些情况下,物理递送方法可选自但不限于电穿孔、显微注射或使用弹道粒子的方法。另一方面,化学递送方法需要使用复杂分子,诸如磷酸钙、脂质或蛋白质。在一些实施方案中,使用病毒(诸如但不限于腺病毒、慢病毒和逆转录病毒)将病毒递送方法应用于基因编辑技术。

[0337] 治疗方法

[0338] 在一些实施方案中,本文公开了治疗有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的本文公开的药物组合物。在一些实施方案中,本文进一步公开了在有需要的受试者中治疗癌症的方法,该方法包括给受试者施用药物组合物,该药物组合物包含(a)根据本文公开的方法产生的修饰的T细胞;和(b)药学上可接受的载体。

[0339] 在一些情况下,经修饰的T细胞是同种异体T细胞。在一些情况下,与施用了有效量的未经修饰的对照T细胞的受试者相比,受试者中释放的细胞因子较少。在一些情况下,与施用了有效量的包含本文公开的重组核酸或本文公开的载体的经修饰的T细胞的受试者相比,受试者中释放的细胞因子较少。

[0340] 在一些情况下,所述方法包括将药物组合物与增强药物组合物功效的剂组合施用。在一些情况下,所述方法包括将药物组合物与改善与所述药物组合物相关的一种或多种副作用的剂组合施用。

[0341] 在一些情况下,癌症是实体癌、淋巴瘤或白血病。在一些情况下,所述癌症选自以下组成的组:肾细胞癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、结肠癌、宫颈癌、脑癌、肝癌、胰腺癌、肾癌和胃癌。

[0342] 本公开包括一种类型的细胞疗法,其中对T细胞进行遗传修饰以表达TFP和TCR α 和/或 β 内含子结构域,并将经修饰的T细胞输注给有需要的受体。输注的细胞能够杀死受者体内的肿瘤细胞。与抗体疗法不同,经修饰的T细胞能够在体内复制,从而导致长期持久性,这可导致持续的肿瘤控制。在各个方面,向患者施用的T细胞或其后代在向患者施用T细胞后,在患者体内存留至少4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月、21个月、22个月、23个月、2年、3年、4年或5年。

[0343] 本公开还包括一种类型的细胞疗法,其中例如,通过体外转录的RNA修饰T细胞以瞬时表达TFP和TCR α 和/或 β 恒定结构域,并将经修饰的T细胞输注给有需要的受者。输注的细胞能够杀死受者体内的肿瘤细胞。因此,在各个方面,向患者施用的T细胞在向患者施用T细胞后存留少于一个月,例如,3周、2周或1周。

[0344] 不希望受任何特定理论束缚,由经修饰的T细胞引发的抗肿瘤免疫反应可以是主动或被动免疫反应,或者可选地,可以是由于直接对比间接免疫反应而导致的。

[0345] 一方面,本公开的人的经修饰的T细胞可以是用于哺乳动物的离体免疫和/或体内

疗法的疫苗类型。一方面,所述哺乳动物是人。

[0346] 关于离体免疫,在向哺乳动物施用细胞之前,在体外发生下列项中的至少一项:i) 扩增细胞,ii) 将编码TFP和TCR α 和/或 β 恒定结构域的核酸引入细胞,或iii) 冷冻保存细胞。

[0347] 离体程序在本领域是公知的,并且将在下面更全面地论述。简言之,从哺乳动物(例如,人)中分离细胞并用本文公开的载体对其进行遗传修饰(即,体外转导或转染)。可向哺乳动物受者施用经修饰的T细胞以提供治疗益处。所述哺乳动物受者可以是人,经修饰的细胞相对于受者可以是自体的。或者,相对于受者,细胞可以是同种异型的、同系的或异种的。

[0348] 在美国专利第5,199,942号(通过引用并入本文)中描述了用于造血干细胞和祖细胞离体外扩增的程序,其可应用于本公开的细胞。其它合适的方法在本领域中是已知的,因此本公开不限于任何特定的细胞离体扩增方法。简言之,T细胞的离体培养和扩增包括:(1) 从外周血收获物或骨髓外植体中收集哺乳动物的CD34⁺造血干细胞和祖细胞;以及(2) 离体扩增此类细胞。除了美国专利第5,199,942号中描述的细胞生长因子以外,还可将其它因子诸如flt3-L、IL-1、IL-3和c-kit配体用于培养和扩增细胞。

[0349] 除了在离体免疫方面使用基于细胞的疫苗以外,本公开还提供了用于离体免疫(以在患者体内引发针对抗原的免疫反应)的组合物和方法。

[0350] 通常,如本文所述活化和扩增的细胞可用于治疗和预防免疫受损的个体中出现的疾病。

[0351] 本公开的经修饰的T细胞可以单独施用,或者作为药物组合物与稀释剂和/或其它组分(诸如IL-2或其它细胞因子或细胞群)组合施用。

[0352] 联合治疗

[0353] 可将本文所述的经修饰的T细胞与其它已知的剂和疗法组合使用。如本文中所示,“组合”施用意指在受试者患有病症的过程中,向受试者递送两种(或更多种)不同的治疗,例如,在受试者被诊断患有病症后并且在疾病被治愈或消除或治疗因其它原因停止之前,递送两种或更多种治疗。在一些实施方案中,当第二治疗的递送开始时,一种治疗的递送仍在进行,因此在施用方面存在重叠。这在本文中有时被称为“同时”或“同时递送”。在其它实施方案中,一种治疗的递送在另一种治疗的递送开始之前结束。在任一情况的一些实施方案中,由于组合施用,治疗更有效。例如,第二治疗比在没有第一治疗的情况下施用第二治疗或在对于第一治疗看到类似情况的情况下施用第二治疗更有效,例如,用较少的第二治疗可看到等效效果,或者第二治疗可在更大程度上减轻症状。在一些实施方案中,递送使得症状或与病症相关的其它参数的减少大于在没有另一种治疗的情况下递送的一种治疗所观察到的所述减少。两种治疗的效果可以是部分累加、完全累加或大于累加。递送可使得当递送第二治疗时,递送的第一治疗的效果仍然是可检测的。

[0354] 在一些实施方案中,“至少一种另外的治疗剂”包括经修饰的T细胞。还提供了表达多种与相同或不同的靶抗原或相同靶抗原上相同或不同的表位结合的TFP的T细胞。还提供了T细胞群,其中T细胞的第一亚群表达第一TFP和TCR α 和/或 β 恒定结构域,而T细胞的第二亚群表达第二TFP和TCR α 和/或 β 恒定结构域。

[0355] 可将本文所述的经修饰的T细胞和所述至少一种另外的治疗剂在同一组合物中或在分开的组合物中施用,或顺序施用。对于顺序施用,可以首先施用本文所述的经修饰的T

细胞,然后再施用另外的剂,或者可以颠倒施用顺序。

[0356] 在另外的方面,可将本文所述的经修饰的T细胞与外科手术、化学疗法、放射、免疫抑制剂诸如环孢霉素、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤、霉酚酸酯和FK506、抗体或其它免疫消融剂诸如阿伦珠单抗、抗CD3抗体或其它抗体疗法、细胞毒素、氟达拉滨、环孢霉素、他克莫司、雷帕霉素、霉酚酸、类固醇、罗米地辛、细胞因子和辐照、肽疫苗(诸如Izumoto等人2008 J Neurosurg 108:963-971中描述的肽疫苗)结合用于治疗方案。

[0357] 在一个实施方案中,可向受试者施用减少或改善与施用经修饰的T细胞相关的副作用的剂。与施用经修饰的T细胞相关的副作用包括但不限于细胞因子释放综合征(CRS)和噬血细胞性淋巴组织细胞增多症(HLH),也称为巨噬细胞活化综合征(MAS)。CRS的症状包括高烧、恶心、短暂性低血压、缺氧等。因此,本文公开的方法可包括向受试者施用本文所述的经修饰的T细胞,并进一步施用剂以控制用经修饰的T细胞治疗所导致的升高的可溶性因子水平。在一个实施方案中,受试者中升高的可溶性因子是IFN- γ 、TNF α 、IL-2和IL-6中的一种或多种。因此,被施用来治疗这种副作用的剂可以是中和这些可溶性因子的一种或多种的剂。此类剂包括但不限于类固醇、TNF α 抑制剂和IL-6抑制剂。TNF α 抑制剂的实例为依那西普。IL-6抑制剂的实例为托珠单抗(toc)。

[0358] 在一个实施方案中,可向受试者施用增强经修饰的T细胞的活性的剂。例如,在一个实施方案中,所述剂可以是抑制抑制性分子的剂。在一些实施方案中,抑制性分子,例如,程序性死亡1(PD1),可以降低经修饰的T细胞产生免疫效应子反应的能力。抑制性分子的实例包括PD1、PD-L1、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4和TIGR β 。抑制性分子的抑制(例如,通过在DNA、RNA或蛋白质水平上的抑制)可以优化经修饰的T细胞性能。在实施方案中,抑制性核酸,例如抑制性核酸,例如dsRNA,例如siRNA或shRNA,可用于抑制抑制性分子在表达TFP的细胞中的表达。在实施方案中,抑制剂是shRNA。在实施方案中,抑制性分子在经修饰的T细胞中被抑制。在这些实施方案中,抑制抑制性分子表达的dsRNA分子与编码TFP的组分(例如,所有组分)的核酸连接。在一个实施方案中,抑制性信号的抑制剂可以是例如与抑制性分子结合的抗体或抗体片段。例如,所述剂可以是与PD1、PD-L1、PD-L2或CTLA4结合的抗体或抗体片段(例如,伊匹木单抗(也称为MDX-010和MDX-101,并作为Yervoy[®]来销售;Bristol-Myers Squibb;曲美木单抗(可从Pfizer获得的IgG2单克隆抗体,以前称为替西木单抗,CP-675,206))。在一个实施方案中,所述剂是与TIM3结合的抗体或抗体片段。在一个实施方案中,所述剂是与LAG3结合的抗体或抗体片段。

[0359] 在一些实施方案中,增强经修饰的T细胞活性的剂可以是例如包含第一结构域和第二结构域的融合蛋白,其中第一结构域是抑制性分子或其片段,第二结构域是与阳性信号相关的多肽,例如包含本文所述的胞内信号传导结构域的多肽。在一些实施方案中,与阳性信号相关的多肽可包括CD28、CD27、ICOS的共刺激结构域,例如CD28、CD27和/或ICOS的胞内信号传导结构域,和/或初级信号传导结构域,例如CD3 ζ ,例如,本文所述的。在一个实施方案中,融合蛋白由表达TFP的同一细胞表达。在另一个实施方案中,融合蛋白由不表达抗CD19 TFP的细胞(例如,T细胞)表达。

[0360] 实施例

[0361] 通过参考以下实验实施例进一步详细描述本发明。这些实施例仅是为了说明的目的而提供的,除非另有说明,否则并不旨在进行限制。因此,本发明决不应被解释为限于以

下实施例,而是应被解释为涵盖任何和所有的变型,所述变型由于本文提供的教导而变得明显。无需进一步描述,相信本领域普通技术人员可使用前面的描述和下面的说明性实施例,制造和利用本发明的化合物,并实施所要求的方法。以下工作实施例具体指出了本发明的各个方面,并且不应被解释为以任何方式限制本公开的其余部分。

[0362] 实施例1-5的背景

[0363] T细胞受体 (TCR) 识别已被加工成小肽并在抗原呈递细胞 (APC) 表面与主要组织相容性复合体 (MHC) 分子结合的外来抗原。T细胞受体 (TCR) 复合物由一组二聚体形成,所述二聚体包括:T细胞受体 α 和 β 亚基 (TCR α/β) 或 γ 和 δ 亚基 (TCR $\gamma \delta$); 和CD3二聚体CD3 γ/ϵ 、CD3 δ/ϵ 和CD3 ζ/ζ 。T细胞受体 α 恒定 (TRAC) 基因和T细胞受体 β 恒定 (TRBC) 基因分别编码TCR α 和TCR β 的恒定C末端区域。

[0364] 一个或多个TCR恒定区的破坏阻断了TCR α 或TCR β 向细胞表面的迁移,从而抑制了TCR受体复合物的组装。削弱TCR α 或TCR β 的迁移足以抑制整个TCR受体的组装。因此,TCR复合物的失活可通过用基因编辑方法靶向TRAC或TRBC基因来完成,所述基因编辑方法使用成簇的规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) 方法、转录激活子样效应子核酸酶 (TALEN)、锌指核酸酶或大范围核酸酶。然而,基于CD3 ϵ 或CD3 γ 或CD3 δ 融合蛋白的TFP T细胞需要TCR α/β 的表面表达以掺入功能性TCR复合物中。

[0365] 受体抗原对供体T细胞表面上的TCR复合物的激活(即,主要组织相容性复合物 (MHC) 在抗原呈递细胞上呈递的抗原的识别) 可引发不良效应,诸如移植物抗宿主病 (GvHD) 和细胞因子释放综合征 (CRS)。因此,以下实施例描述了将转基因引入TCR敲除细胞的方法,所述转基因编码TCR α 或TCR β 的截短形式,以及本身通过自我切割信号(例如,T2A) 分离的融合蛋白。在一个实施方案中,TCR α 或TCR β 的截短形式包括TCR α 或TCR β 的跨膜结构域和连接肽结构域 (CP)。在另一个实施方案中,TFP的抗原结合结构域在截短或全长TCR α 和/或TCR β 的N末端处融合。

[0366] 实施例1.crRNA (CRISPR RNA) 设计

[0367] 利用可在DeskGen™ CRISPR图书馆网站 (www.deskgen.com) 上获得的“Dunne 2017”算法设计TRA的crRNA。任何结合TRA基因座的crRNA都能够在TRA基因中高效地产生双链断裂。为了使CRISPR内切核酸酶的脱靶活性最小化,所用的crRNA的脱靶分数大于90%,包括与基因组参考联盟人基因组构建38 (Genome Reference Consortium Human genome build) (GRCh38/hg38) 基因组中最接近的同源序列的至少3个错配。在优选实施方案中,一个错配位于原间隔区邻近基序 (protospacer adjacent motif) (PAM) 上游的8bp中。表1-2显示了被选择用于使TRA基因失活的示例性crRNA序列(表1) 和预测的脱靶活性(表2)。

[0368] 表1:被选择来使TRA基因失活的crRNA:

ID	crRNA	PAM	靶标	基因组定位	脱靶得分 (%)
TRAC1-4894	TCTCTCAGCTGGTACACGC	AGG	TRAC1	chr14: 22547526 - 22547545	94
TRAC2-4598	CTCGACCAGCTTGACATCAC	AGG	TRAC2	chr14: 22549647 - 22549666	98
TRAC3-2998	GATTAAACCCGGCCACTTTC	AGG	TRAC3	chr14: 22550612 - 22550631	98

[0370] 表2: 预测的脱靶位点; 中靶与脱靶之间的错配以粗体显示

crRNA	脱靶	PAM	错配	外显子	基因组定位
TRAC1 - 4894	TCCCTCAGCTGGTACA AGGA	TGG	3,17,20	是	chr1: 186070730 - 186070753
	TCT G TCAACTGGTACATGGC	AAG	4,8,17	否	chrX: 83244396 - 83244419
	TCTCATAGCTGGTACATGGC	GGG	5,6,17	否	chr15: 100865579 - 100865602
	TTTCTCAGCTGGTACAT GGA	GGG	2,17,20	否	chr1: 247923608 - 247923631
	G CACTCAGCTGGTACCCGGC	AAG	1,3,16	否	chr16: 8713603 - 8713626
	TCACTCAGCTGGTACAT GGG	CAG	3,17,20	否	chr4: 130310607 - 130310630
	TCTCCAGCTGG G ACACGGT	GAG	5,13,20	否	chr1: 55167399 - 55167422
	TCA A TCAGCTGGTGCACGGC	TGG	3,4,14	否	chr1: 236924538 - 236924561
	TCTCACAGCTGATATACGGC	TGG	5,12,15	否	chr12: 49641344 - 49641367
TRAC2 - 4598	CTCCACCACCTTGACCTCAC	CGG	4,9,16	是	chr10: 102422239 - 102422262
	CTCAACCAG A ATGACATCAC	CAG	4,10,11	否	chr2: 55715822 - 55715845
	CTAGACCAGCTTGACCTCC	CAG	3,16,19	否	chr4: 89585943 - 89585966
	CTAGACCAGCTTG G CAACAC	AGG	3,14,17	否	chr5: 82123725 - 82123748
TRAC3 - 2998	GAATAAAACCGGCCACTT G	GGG	3,8,20	否	chr5: 128101267 - 128101290
	GATTATACCTGGCCAC A TTTC	AAG	6,10,17	否	chr2: 145719958 - 145719981

[0372] 利用上述获得的Dunne 2017算法设计使TRB失活的crRNA。由于TCRB的恒定区由两个基因TRBC1和TRBC2编码,因此crRNA针对的是在TRBC1和TRBC2中相同的序列。因此,由DeskGenTM产生的脱靶分数低于94%。然而,除了靶向TRBC1和TRBC2以外,crRNA与GRCh38/hg38基因组之间的其它同源序列至少携带3个错配。在优选实施方案中,这些错配之一位于原间隔区邻近基序(PAM)上游的8bp中。表3-4显示被选择用于使TRB基因失活的示例性crRNA序列(表3)和预测的脱靶活性(表4)。

[0373] 表3: 被选择来使TRB基因失活的crRNA

ID	crRNA	PAM	靶标	定位	脱靶得分 (%)
[0374] TRBC-44 345	ACACTGGTG TGCCTGGCC AC	AG G	TRBC1	chr7: 142801121 - 142801140	45
			TRBC2	chr7_KI270803v1_alt: 814747 - 814766	
[0375] TRBC-45 447a	AGGGCGGG CTGCTCCTT GAG	GG G	TRBC1	chr7: 142791879 - 142791898	47
			TRBC2	chr7: 142801226 - 142801245	
[0375] TRBC-45 246	CTGCCTGAG CAGCCGCTT GA	GG G	TRBC1	chr7: 142791914 - 142791933	46
			TRBC2	chr7: 142801261 - 142801280	
[0375] TRBC-45 447b	GCGGGGGTT CTGCCAGAA GG	TG G	TRBC1	chr7: 142791946 - 142791965	47
			TRBC2	chr7: 142801293 - 142801312	

[0376] 表4: 预测的脱靶, 中靶与脱靶之间的错配以粗体显示

[0377]

crRNA	脱靶	PAM	错配	外显子	基因座
TRBC-4434 5	<u>ACTCTGGGCTGCCTGGC</u> CAC	GG G	3,8,9	是	chr14: 105601630-10560 1653
	<u>ACTCTGTTGTGCCTGGA</u> CAC	CG G	3,7,17	是	chr20: 62963310-629633 33
	<u>TCACAGGTGAGCCTGGC</u> CAC	AG G	1,5,10	否	chr14: 98950719-989507 42
	<u>GCACGGGTGGGCCTGG</u> CCAC	TG G	1,5,10	否	chr12: 108839394-10883 9417
	<u>GCAGGGTGTGCCTGG</u> CCAC	TG G	1,4,5	否	chr16: 3010877-3010900
	<u>ATCCTGCTGTGCCTGGC</u> CAC	AG G	2,3,7	否	chr6: 37655368-376553 91
	<u>TCTCTGGTGTGCCTGGC</u> CAA	GA G	1,3,20	否	chrX: 138046658-13804 6681
	<u>ACACATGTGGCCTGGC</u> CAC	GG G	5,6,10	否	chr16: 2438272-2438295
	<u>AGCCTGGTGTGTCTGGC</u> CAC	TG G	2,3,12	否	chr2: 162055950-16205 5973
	<u>CCTCTGGTGTGCCTGGC</u> CCC	AG G	1,3,19	否	chr2: 239228091-23922 8114
	<u>CCACTTGTGTGCATGGC</u> CAC	TA G	1,6,13	否	chr1: 101657244-10165 7267
	<u>ATAATGGTGTGCCTGGC</u> AAC	TA G	2,4,18	否	chr1: 230924183-23092 4206
<u>ACACTGGCCTGCCTGGG</u> CAC	TA G	8,9,17	否	chr1: 155926881-15592 6904	
TRBC-4544 7a	AGCGCGGGCTCCTCCTT GAC	GG G	3,11,2 0	是	chr8: 143598506-14359 8529

[0378]

	AGGGCCTGCTGCTCCTT CAG	CA G	6,7,18	是	chr3: 45030894-450309 17
	AGGGCTGACAGCTCCTT GAG	TG G	6,8,10	否	chr20: 683139-683162
	GGGGTGGGCTGCTCCTG GAG	CA G	1,5,17	否	chr20: 63440195-634402 18
	AGAGCGGCCTGCTCCTC GAG	GG G	3,8,17	否	chr17: 50124057-501240 80
	GGGGTGGGCTGCACCTT GAG	GG G	1,5,13	否	chr12: 3189255-3189278
	AAGGCAGGCTCCTCCTT GAG	AG G	2,6,11	否	chr5: 176733401-17673 3424
	AGGAAGGGCTGCTCTTT GAG	GA G	4,5,15	否	chr10: 100783415-10078 3438
	AGGCTGGGCTGCTCTTT GAG	CA G	4,5,15	否	chr1: 226617392-22661 7415
	AGTGCCGGCTGCTCCTG GAG	TG G	3,6,17	否	chr15: 74624787-746248 10
	AGGGTGGGGTGCTCCTC GAG	GG G	5,9,17	否	chr7: 99165433-991654 56
	TGGGCTGGCTGCACCTT GAG	TA G	1,6,13	否	chr12: 92396203-923962 26
TGGGCGGGCTGTTCCTT GGG	GA G	1,12,1 9	否	chr5: 179287136-17928 7159	
TRBC-4524 6	CTTCCTGAGCAGCCGTC TGC	AG G	3,16,2 0	是	chr5: 177525051-17752 5074
	CTGCCTGAGCAGCTGCC ACA	AG G	14,18, 19	是	chr21: 42085445-420854 68
	CAGCGTTAGCAGCCGCC TGA	GG G	2,5,7	否	chr6: 24719514-247195 37
	CACCCAGAGCAGCCGCC TGA	CA G	2,3,6	否	chr8: 58226030-582260 53
	CTGCCTGGGAAGCCGCC TGC	CA G	8,10,2 0	否	chr1: 41873106-418731 29
	CTGCCTCCTCAGCCGCC TGA	GG G	7,8,9	否	chr15: 89663036-896630 59
	CTGTCTGACCAGCCGCC TGC	CG G	4,9,20	否	chr1: 9401937-9401960
	CAGCCTGAGCTGCCGCC TGC	GG G	2,11,2 0	否	chr17: 36923765-369237

					88
	CAACCTGAGCAGCCTCC TGA	GA G	2,3,15	否	chr8: 127075998-12707 6021
	CTCCCTGATCAGCCGCA TGA	GG G	3,9,17	否	chr20: 63598726-635987 49
	CGGCCGGAGCAGCCGC CTCA	GG G	2,6,19	否	chr1: 204685196-20468 5219
	CTGCCTCAACATCCGCC TGA	AA G	7,9,12	否	chrX: 58268037-582680 60
[0379]	GTTGGGATTCTGCCAGA AGG	CA G	2,3,7	否	chr17: 52505137-525051 60
	GAGGGGGGCCTGCCAG AAGG	AG G	2,8,9	否	chr8: 1547518-1547541
	GCGGAAGATCTGCCAGA AGG	GG G	5,6,8	否	chr16: 1946717-1946740
	GGTGGGGTTCTGCCAGG AGG	AG G	2,3,17	否	chr9: 135224974-13522 4997
	GCGGGGGATGTGCCAG GAGG	AG G	8,10,1 7	否	chr11: 62414927-624149 50
	GAGGGGATTCTGCCAGC AGG	CG G	2,7,17	否	chr5: 133192714-13319 2737
	GAGGGGGTCCTGCCAG CAGG	GA G	2,9,17	否	chr6: 13415078-134151 01
	GAGGGTGTCTGCCAGC AGG	CA G	2,6,17	否	chr8: 23039425-230394 48
	GCAGGGGTTCCAGCCAG GAGG	CA G	3,11,1 7	否	chr11: 60938213-609382 36
	GAGGGGGTTCAGACAG AAGG	CA G	2,11,1 3	否	chr18: 13654430-136544 53
	GCAGGGGTTCTCCAGT AGG	CA G	3,12,1 7	否	chr3: 18516713-185167 36
	GTGGGGTCTGCCAGC AGC	TG G	2,17,2 0	否	chr17: 68030673-680306 96

[0380] 实施例2: Jurkat细胞中内源TCR α 或 β 的编辑

[0381] Jurkat细胞中TRA或TRB基因的失活是通过针对TRA或TRB基因的SpCas9核糖核蛋白(RNP)的电穿孔完成的。在补充有10%胎牛血清(FBS)和300mg/L L-谷氨酰胺的RPMI 1640培养基中以 0.2×10^6 个细胞/mL保持细胞,直至电穿孔。通过将靶向TRAC (TRAC2-4598)或TRBC (TRBC-44345)的crRNA与tracrRNA以1:1的分子比率退火来制备靶向TRA或TRB基因的SpCas9核糖核蛋白。将退火的双链体以1.5:1的分子比率与SpCas9蛋白混合。将 $0.61 \mu\text{M}$ 的RNP与 2.5×10^6 个T细胞混合,并根据制造商的Neon转染系统(ThermoFisher)方案进行电穿孔。将电穿孔设定在1600V、10ms、3个脉冲。脉冲后,立即将细胞转移到温培养基中,并在37

℃下孵育三天。

[0382] 通过流式细胞术观察TCR $\alpha\beta$ 和CD3 ϵ 表面表达的损失来评估编辑效率。图2显示了TRA编辑的细胞(左图)和TRB编辑的细胞(右图)的结果。通过磁激活细胞分选(MACS, Miltenyi Biotec)细胞分离系统纯化编辑的Jurkat细胞。针对抗TCR $\alpha\beta$ IP27(eBioscience#17-9986-42)抗体和抗CD3 ϵ SK7抗体(eBioscience#25-0036-42)阴性选择编辑的Jurkat细胞。将在它们表面处表达TCR $\alpha\beta$ 或CD3 ϵ 的细胞固定在MACS MS(目录号130-041-301)或LS(目录号130-041-306)柱上,同时在柱流通中收集对TCR $\alpha\beta$ 和CD3 ϵ 均呈阴性的编辑的Jurkat细胞,并在上面指定的培养基中以 0.4×10^6 个细胞/mL在培养中维持编辑的Jurkat细胞。

[0383] 实施例3.人T细胞的编辑

[0384] 然后在人供体的原代T细胞中使TRA或TRB基因失活。电穿孔前2-4天,在补充有10%的人血清(hAB, Valley Biomedical HP1022)和 $300 \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ IL2(Petrotech#200-02)的CTS optimizer培养基(Gibco#A1022101)中,以1:1的比率用对CD3/CD28特异的Dynabeads®人T细胞激活剂珠粒(Gibco#11132D)活化T细胞。通过将靶向TRAC(TRAC2-4598)或TRBC(TRBC-44345)的crRNA以1:1的分子比率与tracrRNA退火来制备靶向TRA或TRB基因的SpCas9核糖核蛋白(RNP)。将退火的双链体以1.5:1的分子比率与SpCas9蛋白混合。将 $0.61 \mu\text{M}$ 的RNP与 2.5×10^6 个T细胞混合,并按照制造商的Neon转染系统的方案进行电穿孔,将电穿孔设定在1600V、10ms、3个脉冲。立即将细胞转移到含有10% hAB(Valley Biomedical#HP1022)、 $300 \text{u} \cdot \text{mL}^{-1}$ IL2(Petrotech#200-02)、 $25 \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ IL7(R&D System#207-IL-010)的温培养基(CTS Optimizer(Gibco#A1048501))中,并在37℃下孵育以允许编辑的T细胞扩增,其倍增时间约为3至5天。通过流式细胞术测量TCR $\alpha\beta$ 和CD3 ϵ 的表面表达的损失来评估编辑效率。使用根据制造商的磁激活细胞分选(MACS®, Miltenyi Biotec)细胞分离系统纯化编辑的T细胞,并将所述编辑的T细胞针对抗TCR $\alpha\beta$ IP27抗体(eBioscience#14-9986-82)和抗CD3 ϵ SK7抗体(eBioscience#16-0036-81)进行阴性选择。将在它们表面处表达TCR $\alpha\beta$ 或CD3 ϵ 的细胞固定在MACS MS(目录号130-041-301)或LS(目录号130-041-306)柱上,同时在柱流通中收集对TCR $\alpha\beta$ 和CD3 ϵ 均呈阴性的编辑的T细胞,并在上面指定的培养基中以 10^6 个细胞/mL在培养中维持编辑的T细胞。结果如图3所示。

[0385] 实施例4:TCR阴性T细胞的同种异体性(Allogenicity)

[0386] 通过使用混合的淋巴细胞反应(MLR)测定来评估TCR $\alpha\beta$ 敲除(KO)细胞的同种异体性。将羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CSFE)标记染料掺入TCR α 和TCR β KO T细胞,随后将细胞与来自匹配(自体反应)或错配(同种异体反应)的HLA供体(分别为供体1和供体2)的增殖抑制PBMC(Streck, Inc.)以1:1的比率共培养。将 $5 \text{ng}/\text{mL}$ 的佛波醇肉豆蔻酸乙酸酯(PMA)和 $500 \text{ng}/\text{mL}$ 的离子霉素用作独立TCR刺激的阳性对照。平板结合的抗CD3 ϵ 也被用作间接对照,以证实TCR α 和TCR β 敲除T细胞中缺乏TCR受体。通过CSFE耗竭法监测供体T细胞的增殖;在无刺激的24小时孵育后测量增殖的基础水平,并在5天孵育期后再次测量水平。CSFE染料在细胞分裂时稀释了一半,因此评估了在T细胞中发生的增殖量,并将其与匹配和错配的HLA供体对照进行了比较。结果如图4所示。

[0387] 如实施例2针对Jurkat T细胞(图9A-C)和供体T细胞(图10A-B)所述,分析了TCR $\alpha\beta$ 和CD3 ϵ 的表面表达。图9A-C显示CD3对比TCR $\alpha\beta$ 在野生型细胞(图9A)、未转导的TRB KO细胞(图9B)、转导了TCR β 全长(FL) TFP的TRB KO细胞(图9C)中的表面表达。绘制图上的门控以描

绘CD3和TCR $\alpha\beta$ 阴性-阴性细胞群,每个象限中保留的细胞百分比显示于角落处。

[0388] 图10A-B显示CD3对比TCR $\alpha\beta$ 在用截短的人TRBC基因(图10A)和鼠TRAC-T2A-TRBC基因(图10B)转导的TRB敲除细胞中的表面表达。绘制图上的门控以描绘CD3和TCR $\alpha\beta$ 阴性-阴性细胞群,每个象限中保留的细胞百分比显示于角落处。

[0389] 实施例5:TCR阴性细胞中的T细胞受体融合蛋白表达

[0390] TRA或TRB的失活阻断了所有TCR亚基向细胞表面的迁移。因此,外源TRA或TRB转基因分别在TRA^{-/-}或TRB^{-/-}细胞中表达,以获得功能性TFP T细胞。

[0391] Jurkat细胞的转导

[0392] 如例如在共同未决的美国专利公开第2017-0166622号中所述,使用慢病毒将TFP转基因引入Jurkat细胞。将Jurkat细胞与病毒一起孵育,感染复数(MOI)为5。孵育后24小时更换培养基。使用对目标TFP结合剂特异的配体和/或TCR $\alpha\beta$ 和CD3 ϵ 的表面表达,利用流式细胞术评估了转导效率和TFP表达。

[0393] T细胞的转导

[0394] 如例如在共同未决的美国专利公开第2017-0166622号中所述,使用慢病毒将TFP转基因引入T细胞。在感染复数(MOI)为5并且存在5 μ g/mL聚凝胺的条件下,在100分钟期间将T细胞与病毒一起以600g离心。离心后24小时更换培养基。使用对目标TFP结合剂特异的配体和/或TCR $\alpha\beta$ 和CD3 ϵ 的表面表达,利用流式细胞术评估了转导效率和TFP表达。

[0395] 人TCR α/β TFP的表达

[0396] 由于TCR α 阴性细胞仍然表达TCR β 并且,反过来,TCR α 在TCR β 阴性细胞中表达;因此,TCR α TFP在TRA^{-/-}细胞中表达,并且TCR β TFP在TRB^{-/-}细胞中表达。在TCR阴性细胞中测试多种形式的TCR α/β 和TCR α/β TFP,以确定恢复整个TCR复合物的迁移的最佳结构(图5)。通过组装来自TCR基因座的任何可变外显子(V)与任何连接外显子(J)以及随后所有恒定外显子来产生TCR α/β 全长(FL)TFP。在一个实施方案中,可将多样性外显子D置于V与J之间。可能地,可将突变或插入缺失(indel)添加在每个外显子的接合处以模拟重组激活基因(RAG)酶的活性。根据国际免疫遗传学信息系统(IMGT, imgt.org)对TRA α 残基进行编号。

[0397] 在TRA^{-/-}细胞中表达的TCR α (FL)FMC63 TFP

[0398] Nt-FMC63-TRA(V13-1₍₁₋₂₅₆₎;J13;C)-Ct

[0399] Nt-FMC63-TRA(V8-1;J20;C)-Ct

[0400] Nt-FMC63-TRA(V29DV5;J44;C)-Ct

[0401] 在TRA^{-/-}细胞中表达的截短的TCR α TFP,

[0402] Nt-FMC63-TRA(V13-1₍₃₃₋₂₅₆₎;J13;C)-Ct

[0403] Nt-FMC63-TRA(V13-1₍₁₀₅₋₂₅₆₎;J13;C)-Ct

[0404] 根据国际免疫遗传学信息系统(IMGT, www.imgt.org)对TRA^{-/-}细胞中表达的截短的TCR α , TRAC残基进行编号。

[0405] Nt-TRAC₇₋₁₇₄-Ct

[0406] Nt-TRAC₁₂₈₋₁₇₄-Ct

[0407] 在TRB^{-/-}细胞中表达的TCR β (FL)FMC63 TFP

[0408] Nt-FMC63-TRB(V9;J1-1;C1)-Ct

[0409] Nt-FMC63-TRB(V7-9;J1-5;C1)-Ct

[0410] Nt-FMC63-TRB (V5-1; J2-2; C1) -Ct

[0411] 根据如上所述的国际IMGT信息系统对TRB^{-/-}细胞中表达的截短的TCRβTFP, TRBC残基进行编号。

[0412] Nt-FMC63-TRBC1⁽⁻⁸⁾-173-Ct

[0413] Nt-FMC63-TRBC1₁₂₂₋₁₇₄-Ct

[0414] Nt-FMC63-TRBC1₁₂₇₋₁₇₄-Ct

[0415] 截短的人TCRα/βTFP的表达

[0416] TCRα和TCRβ的恒定结构域的过表达可足以驱动整个TCR复合物向细胞表面的移位。为了测试这一点,设计了TRP转基因,其编码由2A自我切割肽分离的TCRα和TCRβ的恒定结构域。在一个实施方案中,TFP结合剂在TRAC和/或TRBC的N末端处融合。在另一个实施方案中,TFP与CD3分子融合并独立于TR[A/B]C转基因表达。

[0417] 截短的鼠TCRα/βTFP的表达

[0418] 人TCR恒定区可与其鼠同源物互换。另外,当在人细胞中表达时,小鼠TCR恒定区增强CD3ζ/TCR复合物的稳定性。因此,设计了TFP转基因,其编码由2A自我切割肽分离的小鼠TCRα和TCRβ的恒定结构域。在一个实施方案中,TFP结合剂在mTRAC和/或mTRBC的N末端处融合。在另一个实施方案中,TFP结合剂由CD3分子携带,并独立于mTR[A/B]C基因表达。

[0419] 在TRA^{-/-}或TRB^{-/-}细胞中表达的mTR[A/B]C转基因

[0420] Nt-FMC65-mTRAC₁₁₄₋₁₆₉-T2A-mTRBC₁₂₃₋₁₇₃-Ct

[0421] Nt-mTRAC₁₁₄₋₁₆₉-T2A-mTRBC₁₂₃₋₁₇₃-Ct

[0422] 鼠源化人TCRα/βTFP的表达

[0423] 为了增加人TCRα与TCRβ的恒定区之间的亲和力,对一系列序列进行了工程化,其中人TCR残基被小鼠TCR替代。将取代引入TCRα的恒定区,包括残基P90S、E91D、S92V、S93P。被引入TCRβ的恒定区中的取代为E11K、S15A、F129I、E132A、Q135H。这些取代使得TRAC和TRBC足以将整个TCR复合物迁移到细胞表面。因此,TFP通过转基因Nt-FMC63-TRAC⁽⁻⁷⁾-174P90S、E91D、S92V、S93P-T2A-TRBC1⁽⁻⁸⁾-173E11K、S15A、F129I、E132A、Q135H-Ct在TRA^{-/-}或TRB^{-/-}细胞中表达。

[0424] 增强型TCRαTFP的表达

[0425] 可在蛋白质数据库(PDB)中获得几种人TCRαβ复合物的结构。这些结构突出显示了参与TCRα/TCRβ相互作用的残基和接近TRBC但不参与TCRα/TCRβ相互作用的TRAC的其它残基。因此,有可能通过TRAC中的一个或多个以下取代来增强TCRα对TCRβ的亲和力:V22W、F85.5E、T84D、S85.1D、V84.1W,

[0426] TRA^{-/-}细胞中增强型TRAC-TFP的表达恢复了整个TCR向细胞表面的迁移。WT细胞中的增强型TRAC-TFP高效地取代了TCR复合物中的内源TCRα分子。在无TFP结合剂的情况下,增强型TRAC表达高效地恢复了TCR复合物向细胞表面的迁移,在这种情况下,将TFP结合剂与CD3分子融合,并独立于增强型TRAC转基因表达,或者通过在两个编码序列(CDS)之间放置2A自我切割肽而在同一转基因上表达。

[0427] 类似地,TRBC中的取代增强了TCRα/TCRβ之间的相互作用。在TRBC中单独或组合引入的取代V22W足以恢复TRB^{-/-}细胞中整个TCR向细胞表面的迁移。增强型TRBC-TFP在TRB^{-/-}细胞中的表达恢复了整个TCR向细胞表面的迁移。增强型TRBC-TFP在野生型细胞中的表达

高效地取代了TCR复合体中的内源TCR β 分子。在无TFP结合剂的情况下增强型TRBC表达的情况下,TFP结合物与CD3分子融合,并独立于增强型TRBC转基因表达,或者通过在两个CDS之间放置2A自我切割肽而在同一转基因上表达。

[0428] 杂交IgG/TCR α / β TFP的表达

[0429] TCR α 与TCR β 之间的相互作用通过用IgG恒定结构域替代TCR α 和TCR β 的可变结构域而得以增强。因此,IgG重链恒定结构域CH1在TRBC的N末端处融合,而IgG轻链恒定结构域CL在TRAC的N末端处融合。最后,在CL的N末端处加入TFP。在一个实施方案中,通过如下所示在两个构建体之间放置2A自我切割肽,由同一个转基因编码所述两个构建体:Nt-FMC63-IgG_{CL}(-7)₋₁₂₅-TRAC(-6)₋₁₇₄-T2A-IgG_{CH1}(-7)₋₁₂₂-TRBC(-8)₋₁₇₃。在另一个实施方案中,将IgG_{CL}与IgG_{CH1}的位置互换。在另一个实施方案中,TFP结合剂在IgG_{CL}和/或IgG_{CH1}的N-末端处融合或与CD3分子融合并独立表达。在另一个实施方案中,引入残基取代以增强IgG_{CL}F7A、IgG_{CH1}A20L的CH1/CL相互作用。

[0430] 结构域交换的TCR-TFP的表达。

[0431] TCR α / β / γ / δ 分子采用类似的结构组织。在N末端处,它们的V(D)J区采用免疫球蛋白(IgV)样构象,而它们的C区由免疫球蛋白(IgC)样结构域、接着连接肽(CP)、跨膜结构域(TM)和位于C末端处的短的细胞内尾部(IC)构成。尽管这些分子之间存在很高的结构同源性,但TCR α 只与TCR β 配对,并且TCR γ 只与TCR δ 配对。因此,用TCR α 的一个或多个结构域与一个或多个TCR γ 结构域交换以及将TCR β 的一个或多个结构域与一个或多个TCR δ 结构域交换,将产生不与内源性TCR分子配对的TFP。例如,Nt-FMC63-IgC α -CP γ -TM γ -IC γ -2A-IgC β -CP δ -IC δ -Ct产生同种异型受体,其中IgC α CP γ TM γ IC γ 与IgCbCPdICd特异性相互作用,而不与TRA^{-/-}细胞中的内源TCR β 或TRB^{-/-}细胞中的内源TCR α 相互作用。在另一个实施方案中,TFP结合剂在IgC β 或/和IgC α 的N末端处融合或与CD3分子融合并独立表达。可将交换域(swapped domain)的不同组合与本文公开的方法一起使用。

[0432] 在TCR基因座中敲入(KI)2A自我切割肽

[0433] 在具有TRAC或TRBC基因的框中的CP结构域的上游引入自我切割信号产生TCR α 或TCR β 的内源截短形式。因此,包含CP和TM结构域的切割信号下游的序列易位到细胞表面;相反地,包含互补决定区(CDR)的切割信号的上游的部分未易位到细胞表面。在一个实施方案中,通过同源定向修复(HDR)或单链模板修复(ssTR),将自我切割信号框内插入TRAC或TRBC基因中。HDR是由DNA单链断裂(SSB)或DNA双链断裂(DSB)诱导的,而ssTR仅由SSB诱导。在一个实施方案中,使用定制的内切核酸酶在CP区域的上游产生DSB或使用切口酶在TRAC或TRBC的相同区域中产生SSB。包含自我切割信号的同源供体DNA必须与内源靶标具有至少40个碱基对(bp)的同源性,并且可以是单链或双链的、线性或环状的。另外,同源供体DNA包含多个碱基取代,以不被定制的内切核酸酶或切口酶切割。在一个实施方案中,在基因编辑之前或之后,将CD3-TFP转基因插入细胞。在另一个实施方案中,同源供体DNA编码位于具有TRAC或TRBC的框中的自我切割肽的下游的TFP序列。因此,TFP-TCR融合分子在内源TCR受体的控制之下而无在整个基因组中多次随机插入外源启动子的风险。示意图如图6所示。

[0434] 实施例6:表达TFP的人TCR阴性T细胞的细胞毒性

[0435] 基于萤光素酶的细胞毒性测定(“Luc-Cyto”测定)通过间接测量共培养后残留活靶细胞中的萤光素酶活性来评估TFP T细胞的细胞毒性。

[0436] 表达萤火虫萤光素酶 (Luc) 的肿瘤细胞的产生

[0437] 在Luc-Cyto测定中使用的靶细胞是Nalm6-Luc (CD19阳性) 和K562-Luc (CD19阴性), 是通过稳定转导Nalm6 (DSMZ目录号ACC128) 和K562 (ATCC® 目录号CCL-243™) 细胞以表达萤火虫萤光素酶而产生的。编码萤火虫萤光素酶的DNA由GeneArt® (ThermoFisher) 合成, 并被插入单启动子慢病毒载体pCDH527A-1 (System Biosciences) 的多克隆位点中。根据制造商的说明包装慢病毒。然后用慢病毒转导肿瘤细胞24小时, 然后用嘌呤霉素 (5μg/mL) 选择。通过使用Bright-Glo™萤光素酶测定系统 (Promega) 测量细胞中的萤光素酶酶促活性, 证实了Nalm6-Luc和K562-Luc细胞的成功产生。

[0438] 同种异体TFP T细胞的表型

[0439] 检测同种异体TFP T细胞的人TCRαβ (利用抗人TCR, Miltenyi Bio, 克隆BW242/412)、小鼠TCRαβ (利用抗小鼠TCRβ, BioLegend, 克隆H57-597)、人CD3ε (利用抗人CD3ε BioLegend, 克隆UCHT1)、人CD4 (利用抗人CD4, BioLegend, 克隆RPA-T4)、人CD8 (利用抗人CD8, BioLegend, 克隆SK-1) 和TFP (通过生物素化的CD19 (目录号CD9-H8259, AcroBio) 检测CD19结合剂FMC63) 的表达。来自同一供体的野生型T细胞 (未编辑的) 用同一小组作为对照进行检查。

[0440] 结果如图7所示。野生型T细胞显示人TCRαβ和CD3ε的表面表达, 但不显示小鼠TCRβ的表面表达。相反地, 同种异体TFP T细胞未显示人TCRαβ的表面表达, 表明编辑成功。小鼠TCRβ在同种异体TFP T细胞上的表面表达与在表面上检测到的人CD3ε一致, 表明完整TCR复合物的成功重新组装。人CD4和CD8的表达在野生型T细胞与TFP T细胞之间没有显著差异。仅对同种异体TFP T细胞观察到表面CD19结合剂 (FMC63, SEQ ID NO:X) 的检测。

[0441] 评估T细胞的细胞毒性的Luc-Cyto测定

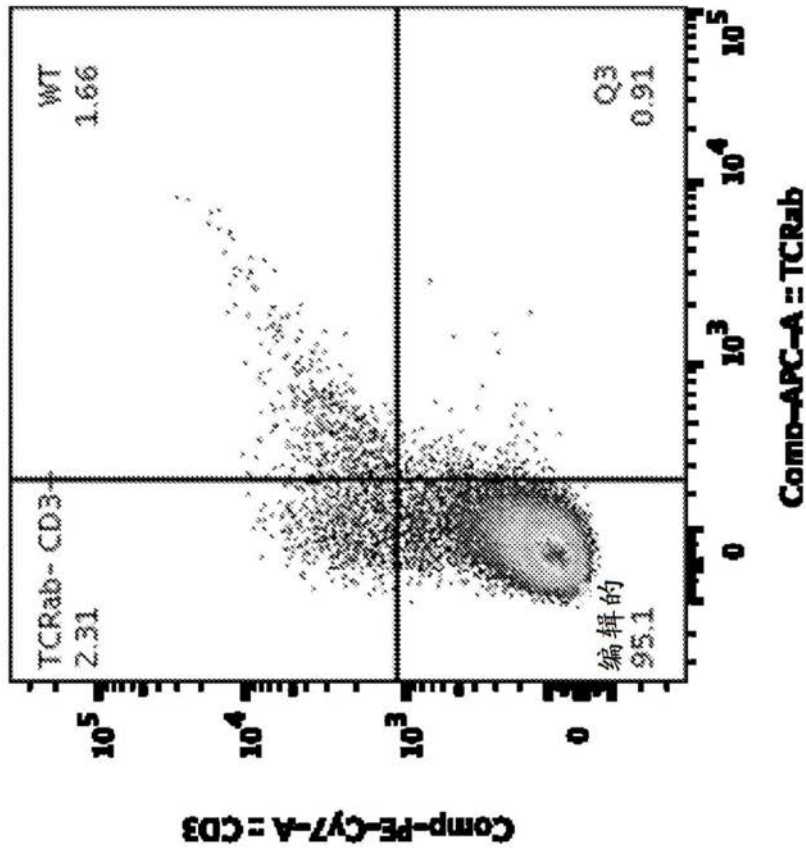
[0442] 通过将T细胞与肿瘤细胞以不同的效应子 (T细胞) 与靶标 (肿瘤细胞) 的比率 (E:T) 混合, 建立了Luc-Cyto测定。用补充有10%热灭活的 (HI) FBS的RPMI-1640培养基将靶细胞 (Nalm6-Luc或K562-Luc) 以10,000个细胞/孔涂铺在96孔板中。将同种异型TFP T细胞以每孔30000个、10000个或3333个细胞/孔添加到肿瘤细胞中, 以达到3:1、1:1或1:3的E:T比率。将细胞混合物在37℃和5%CO₂下孵育24小时。使用Bright-Glo™萤光素酶测定系统 (Promega) 测量萤光素酶的酶促活性, 所述萤光素酶测定系统测量T细胞和肿瘤细胞共培养物中残留活靶细胞的活性。

[0443] 结果如图8所示。同种异体TFP T细胞、同种异体CD3ε-TFP和同种异体mTCRαβ-TFP T细胞, 显示出针对CD19阳性肿瘤细胞Nalm6-Luc的强劲且特异的裂解作用, 但对CD19阴性肿瘤细胞K562-Luc则无所述裂解作用。

[0444] 表达TFP的人TCR阴性T细胞的MLR

[0445] 通过使用混合淋巴细胞反应 (MLR) 测定来评估表达TFP的人TCR阴性T细胞的同种异体性。错配的PBMC供体细胞首先通过CD19阴性细胞的磁激活细胞分选来耗竭B细胞。用亲脂性细胞标记染料PKH标记PBMC, 并用.4%多聚甲醛固定PBMC。同时, 将不同颜色的PKH染料掺入靶T细胞。随后以1:1的比率 (PBMC比T细胞) 共培养来自同一供体的表达TFP的人TCR阴性T细胞和野生型T细胞, 或者单独培养T细胞。通过在6天至12天的时间点跟踪PKH染料来监测供体T细胞的增殖。PKH染料在细胞分裂时稀释了一半, 因此评估了在T细胞中发生的增殖量, 并将其与野生型对照进行了比较。

TRB经编辑的细胞



TRA经编辑的细胞

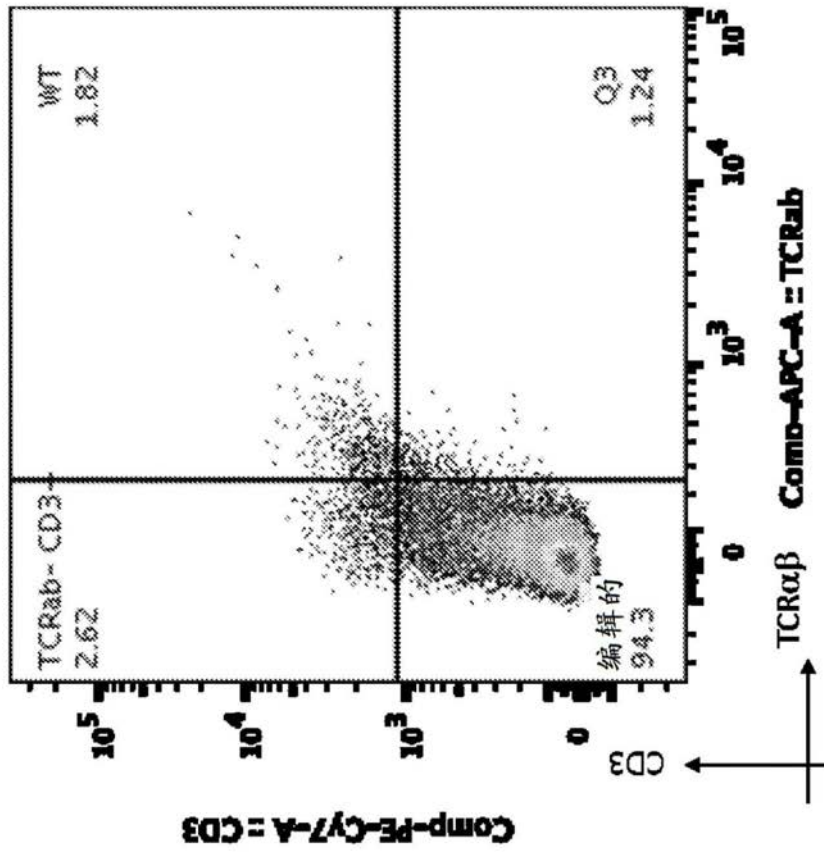


图 2B

图 2A

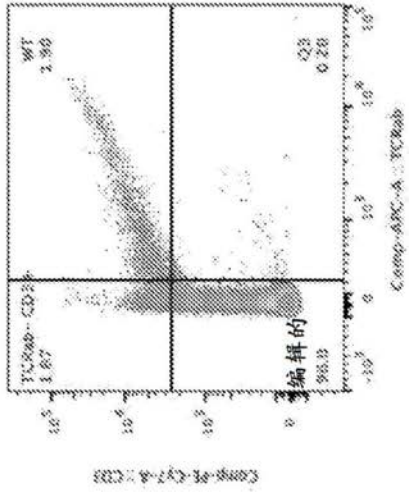


图 3D

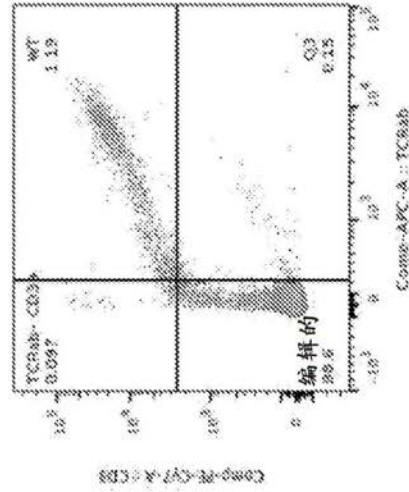


图 3E

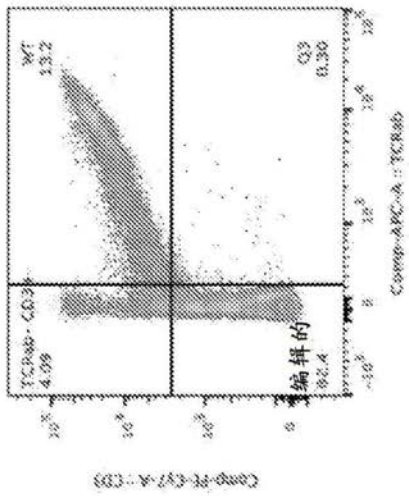


图 3B

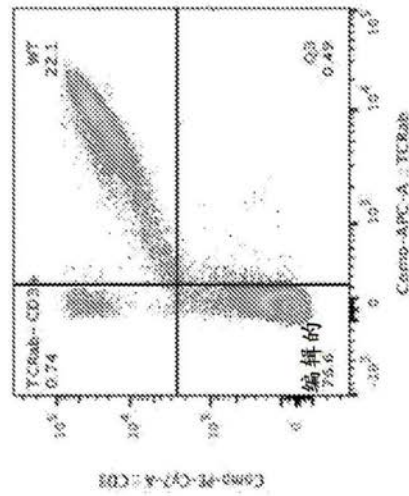


图 3C

野生型供体1

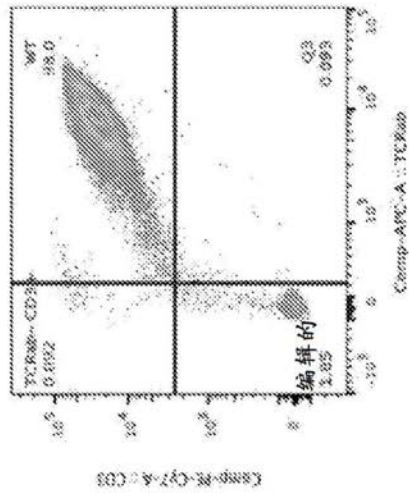
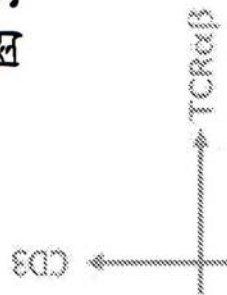


图 3A



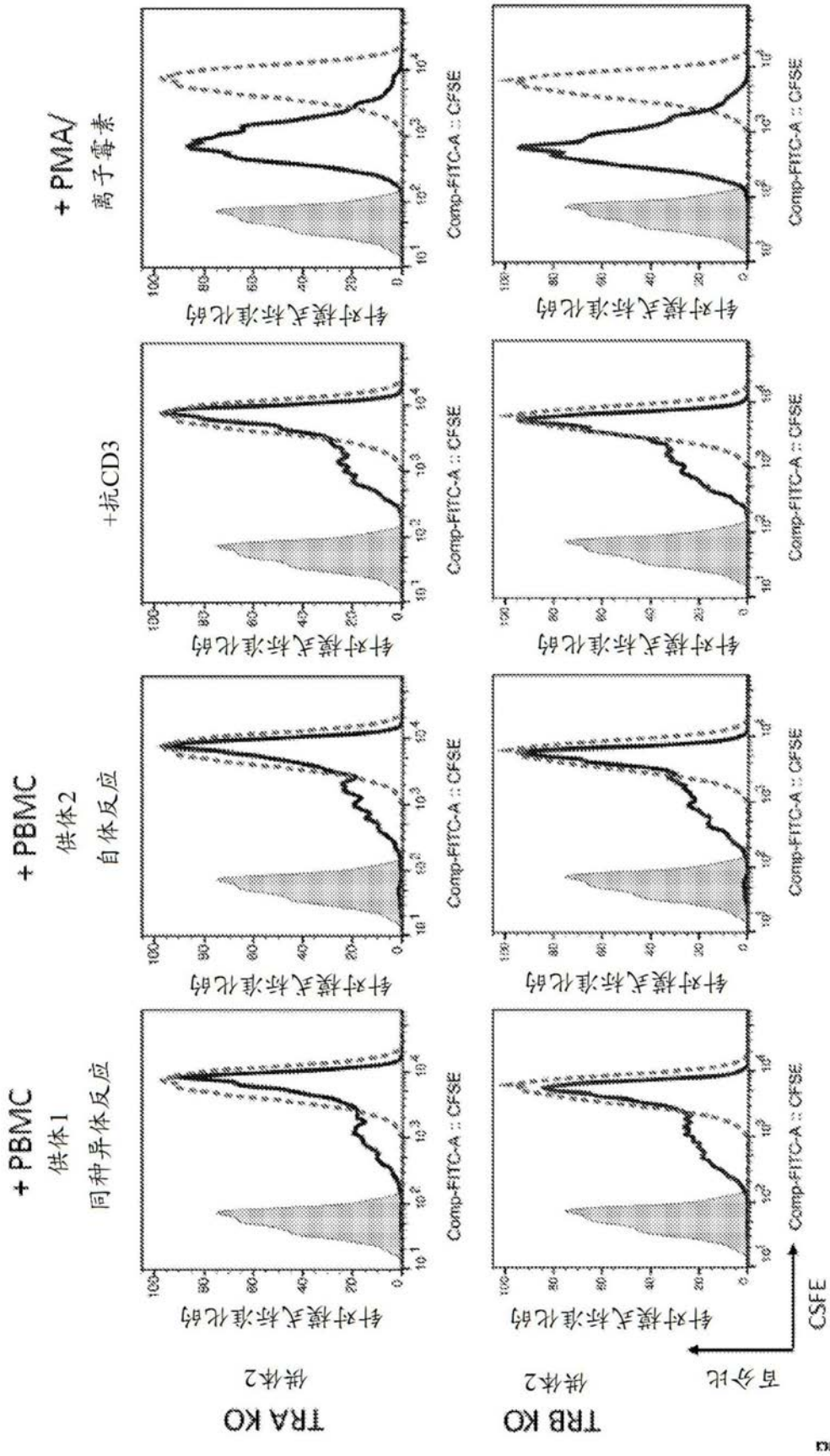


图4

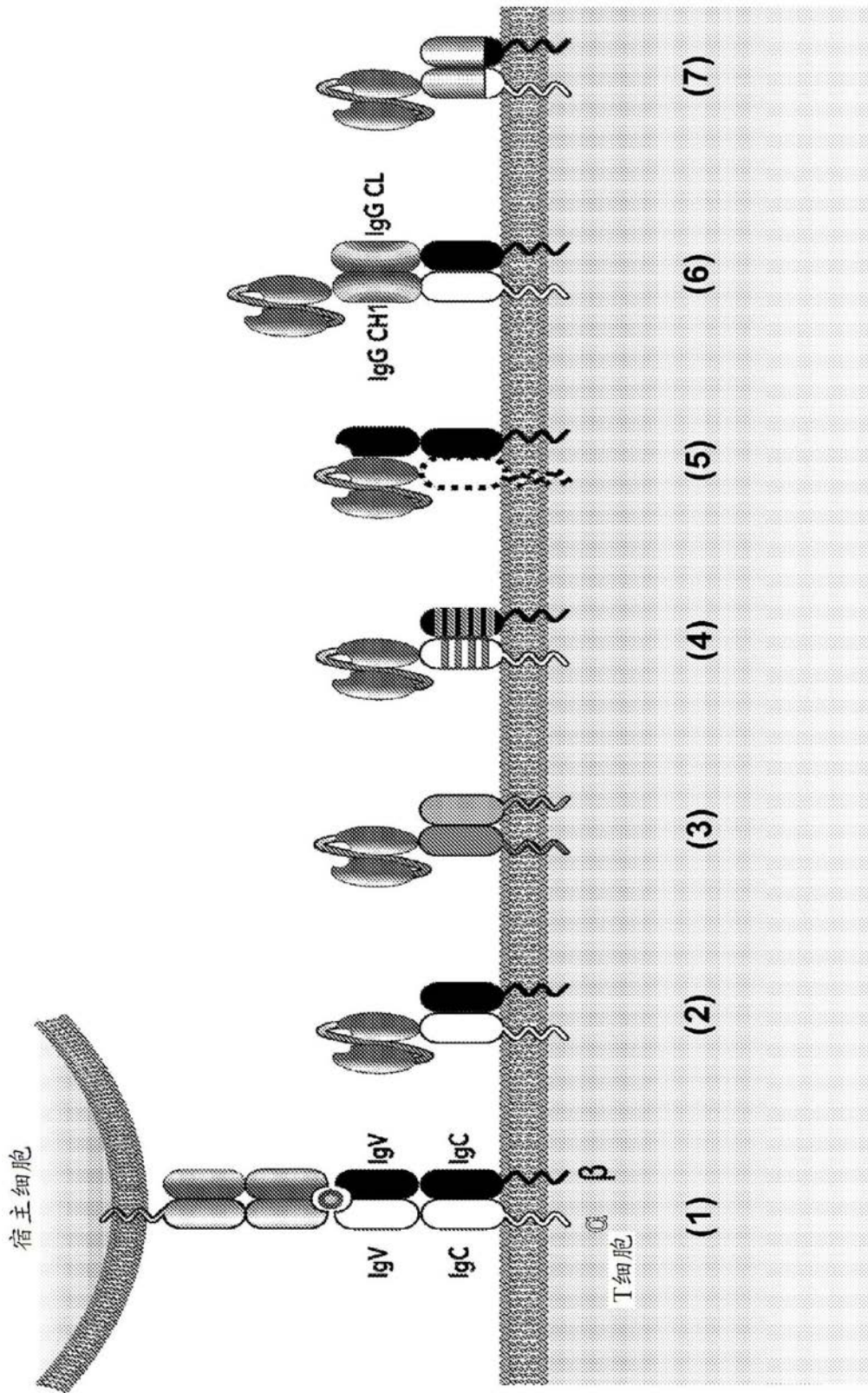


图5

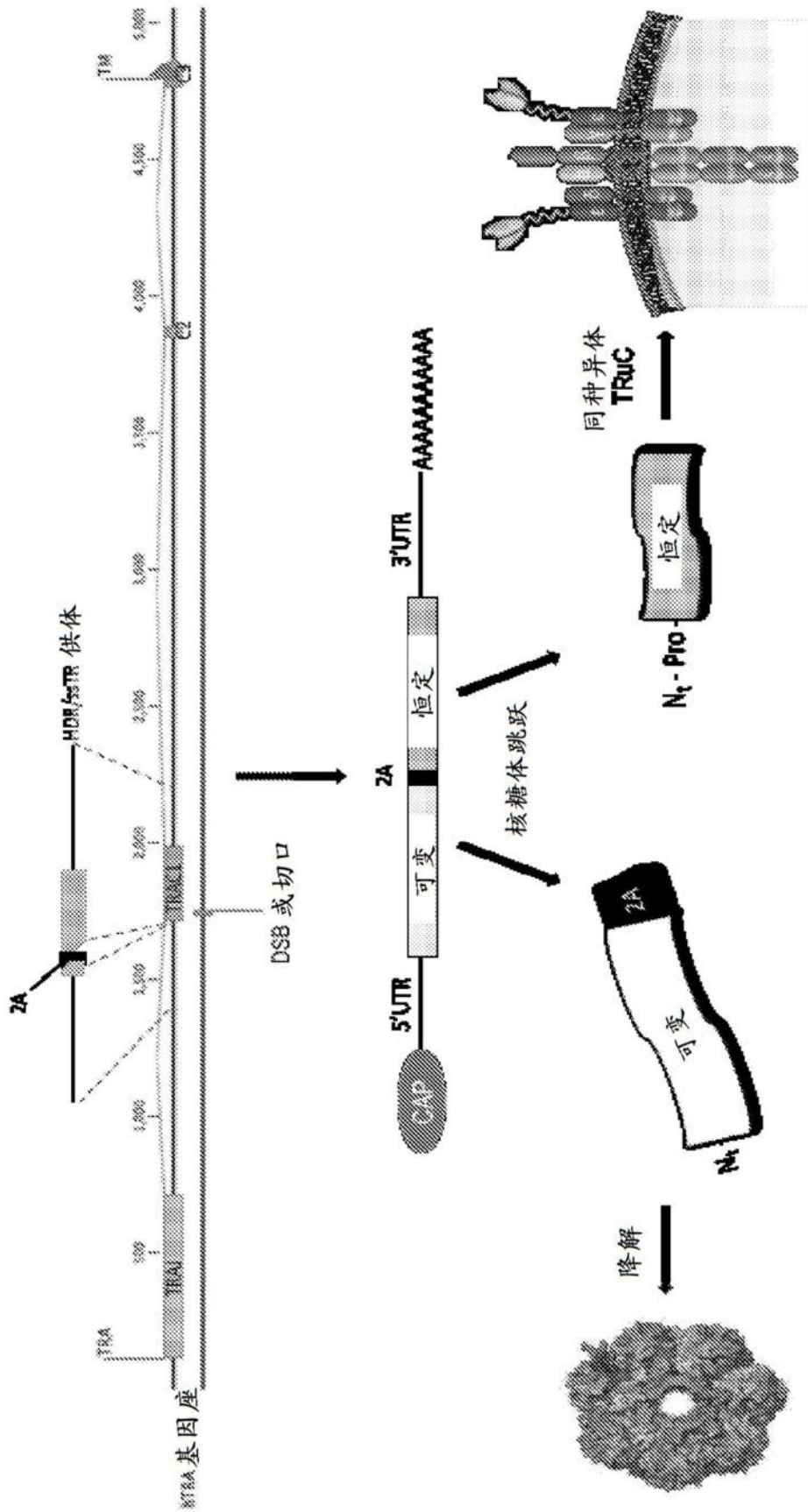


图6

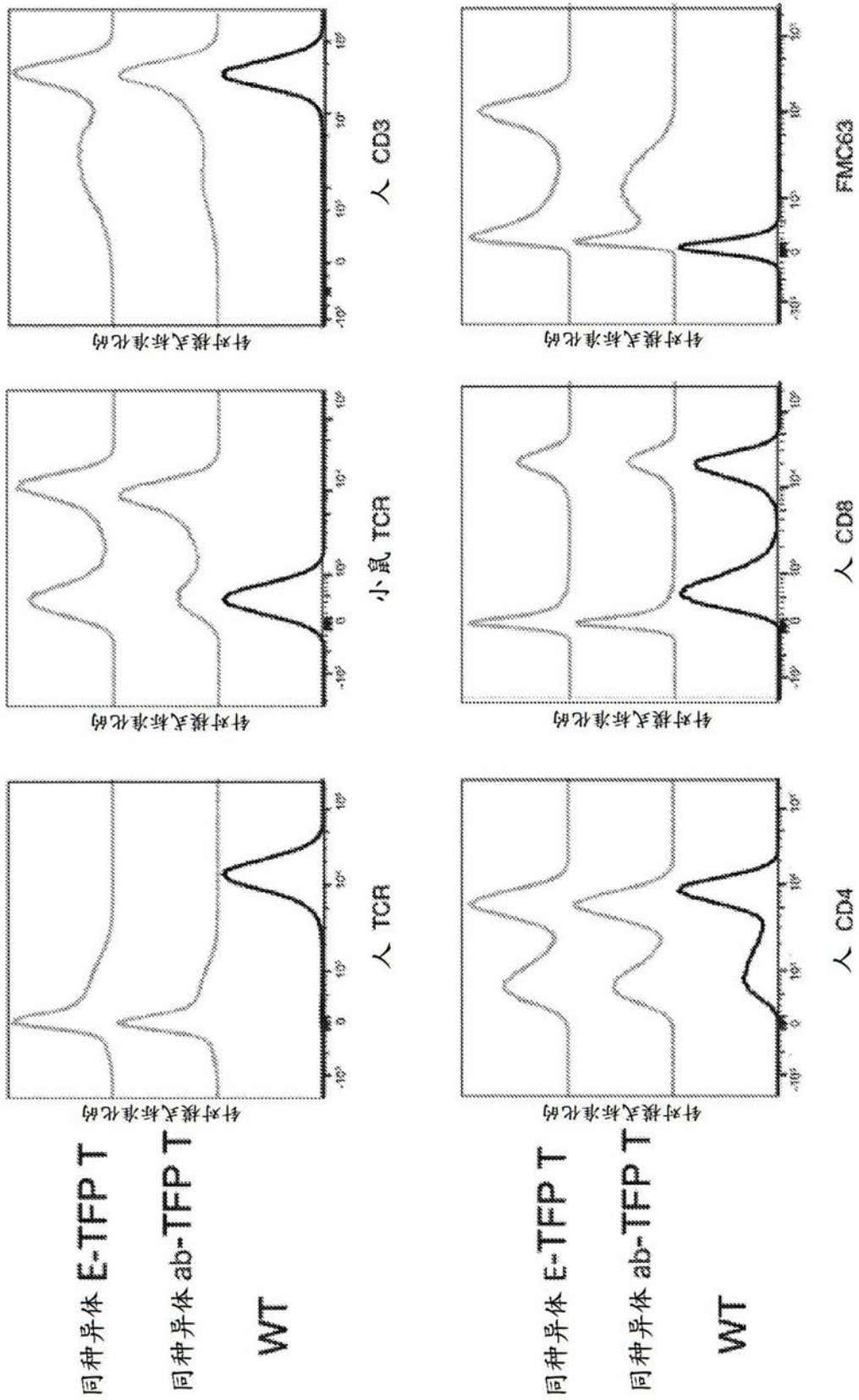


图7

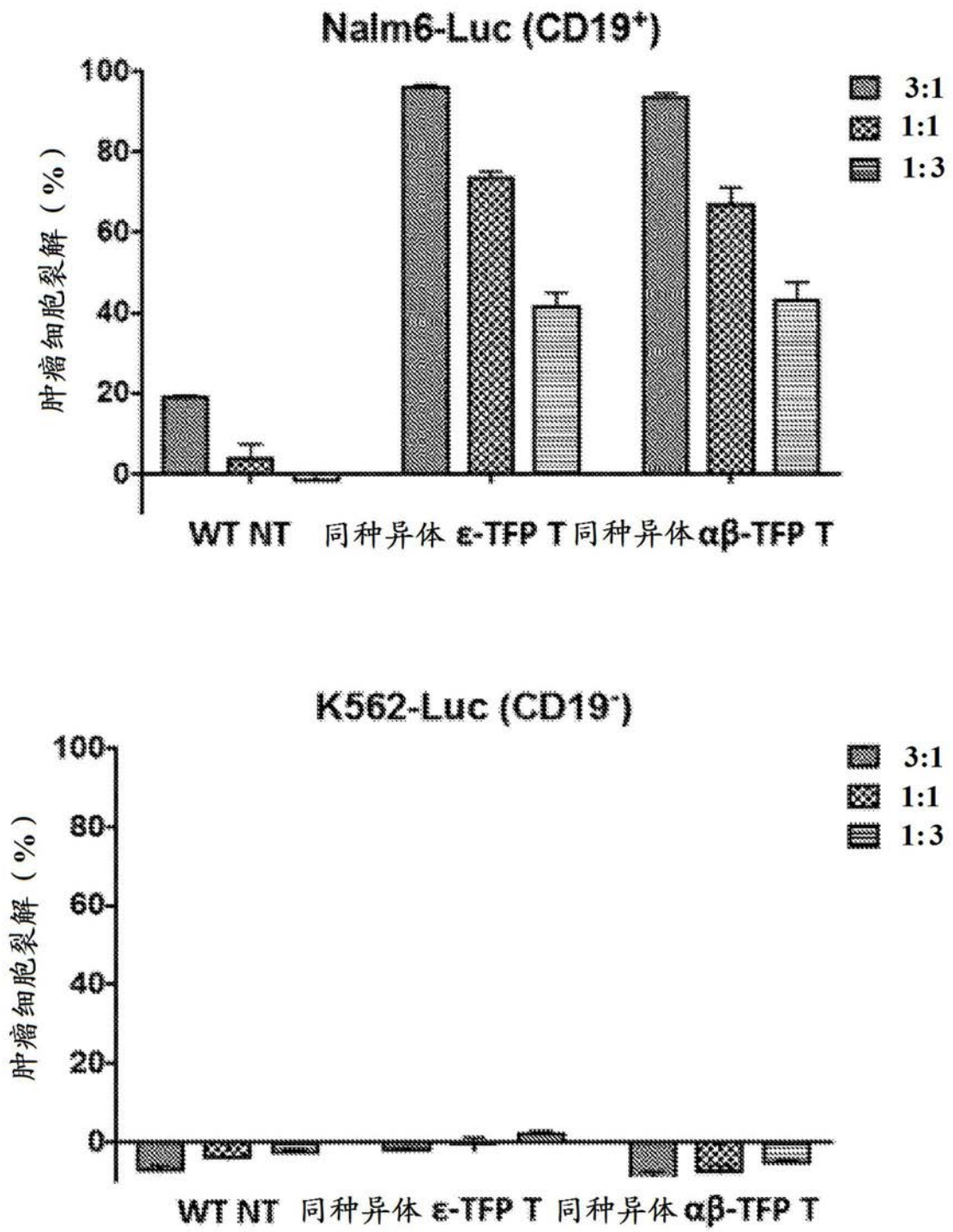


图8

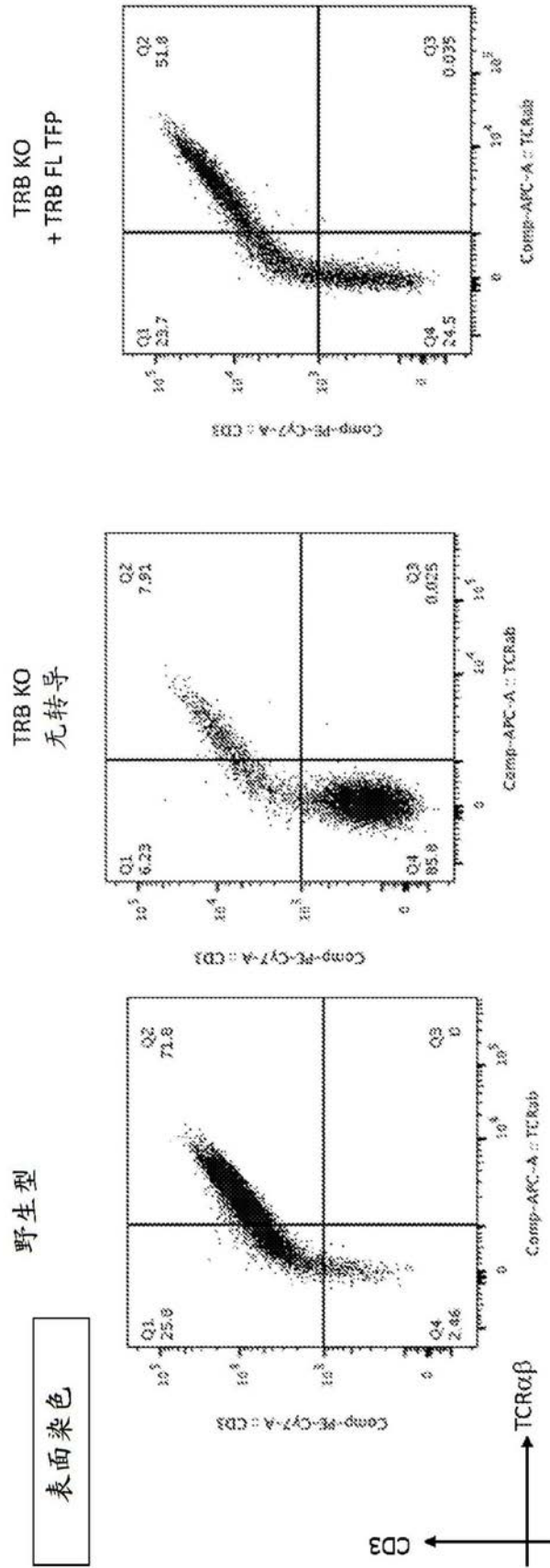


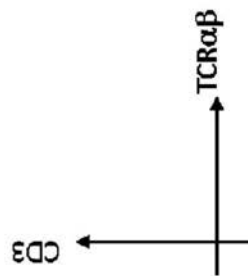
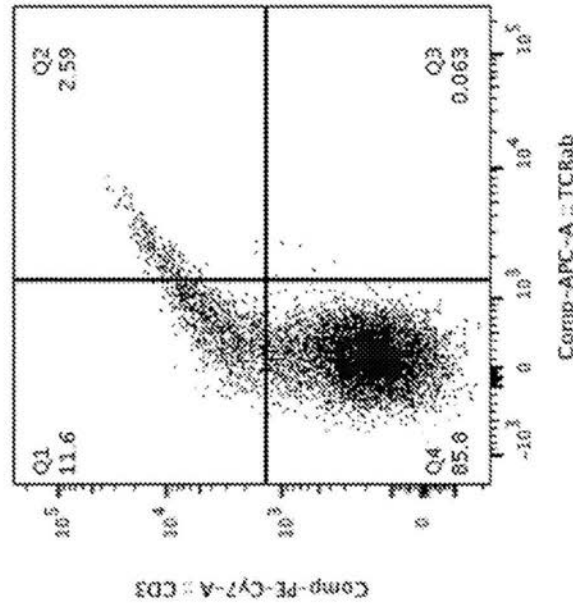
图 9C

图 9B

图 9A

表面染色

TRB KO
+ TRB截短的恒定hTFP



TRB KO
+ TRA/B截短的恒定mTFP

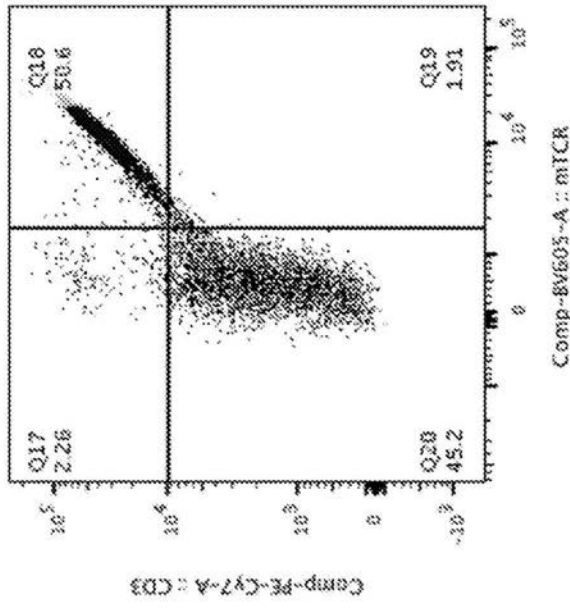


图 10A

图 10B