



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113748201 A

(43) 申请公布日 2021.12.03

(21) 申请号 202080031590.8

(22) 申请日 2020.04.24

(30) 优先权数据

62/839449 2019.04.26 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.10.26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/029722 2020.04.24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/219812 EN 2020.10.29

(71) 申请人 艾洛基治疗公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 D·A·瓦加斯-因丘斯特吉

T·C·珀特尔 B·J·萨苏

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 李进 李唐

(51) Int.Cl.

C12N 5/0783 (2006.01)

A61K 35/17 (2006.01)

权利要求书2页 说明书41页
序列表9页 附图4页

(54) 发明名称

制备同种异体CAR T细胞的方法

(57) 摘要

本文描述了用于培养免疫细胞的改进的培养基,以及其使用方法。确切地说,本文所述的细胞生长培养基特别适合于T细胞扩增,其可用于制造适用于过继细胞疗法,包括使用嵌合抗原受体的疗法(例如,CAR-T细胞疗法)的细胞。

1. 一种用于T细胞扩增的细胞生长培养基,其包含:
细胞增殖的第一刺激剂和第二刺激剂,其各自独立地选自由以下组成的群组:IL-4、IL-7、IL-10、IL-12和IL-15;以及
细胞代谢的细胞外调节剂,其是浓度为约4mM到约40mM的细胞外钾,
其中所述第一刺激剂和所述第二刺激剂以约1000:1到约4:1的浓度比存在。
2. 根据权利要求1所述的细胞生长培养基,其中所述细胞增殖的第一刺激剂是IL-7。
3. 根据权利要求1或2所述的细胞生长培养基,其中所述细胞增殖的第二刺激剂是IL-15。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的细胞生长培养基,其中所述第一刺激剂和所述第二刺激剂以约500:1到约10:1、约250:1到约10:1、约200:1到约10:1、约150:1到约10:1、约100:1到约10:1、约500:1到约50:1、约250:1到约50:1、约200:1到约50:1、约150:1到约50:1、约100:1到约50:1、约500:1到约75:1、约250:1到约75:1、约200:1到约75:1、约150:1到约75:1、约100:1到约75:1、约10:1到约4:1、约8:1到约4:1,或约7:1到约6:1的浓度比存在。
5. 根据权利要求1至3中任一项所述的细胞生长培养基,其中所述第一刺激剂和所述第二刺激剂以约150:1、约140:1、约130:1、约120:1、约110:1、约100:1、约90:1、约80:1,或约70:1的浓度比存在。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的细胞生长培养基,其中
第一刺激剂为IL-7,其以约100IU/mL到约5,000IU/mL的浓度存在;以及
第二刺激剂为IL-15,其以约1IU/mL到约100IU/mL的浓度存在。
7. 根据权利要求6所述的细胞生长培养基,其中IL-7以约300IU/mL到约5000IU/mL的浓度存在,并且IL-15以约25IU/mL到约50IU/mL的浓度存在。
8. 根据权利要求7所述的细胞生长培养基,其中IL-7以约5000IU/mL的浓度存在,并且IL-15以约50IU/mL的浓度存在。
9. 根据权利要求1至8中任一项所述的细胞生长培养基,其中细胞外钾以约20mM到约35mM或约20mM到约30mM的浓度存在。
10. 根据权利要求9所述的细胞生长培养基,其中细胞外钾以约20mM或约25mM的浓度存在。
11. 根据权利要求1至10中任一项所述的细胞生长培养基,其中细胞外钾以KCl形式存在。
12. 一种在体外获得T细胞群体的方法,所述方法包含用细胞生长培养基培养初始T细胞群体,所述细胞生长培养基包含
细胞增殖的第一刺激剂和第二刺激剂,其各自独立地选自由以下组成的群组:IL-4、IL-7、IL-10、IL-12和IL-15;以及
细胞代谢的细胞外调节剂,其是浓度为约4mM到约40mM的细胞外钾,
其中所述第一刺激剂和所述第二刺激剂以约1000:1到约4:1的浓度比存在。
13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述细胞生长培养基是根据权利要求1至11中任一项所述的细胞生长培养基。
14. 根据权利要求12或13所述的方法,其中所获得的所述T细胞群体富集 T_{CM} 和/或 T_{SCM} 细胞。

15. 根据权利要求12至14中任一项所述的方法,其中所获得的所述T细胞群体包含至少约30%、35%、40%或45%的 T_{SCM} 细胞。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中所获得的所述T细胞群体包含至少约40%的 T_{SCM} 细胞。

17. 根据权利要求12至16中任一项所述的方法,其中所获得的所述T细胞群体所富集的 T_{CM} 和/或 T_{SCM} 是所述初始T细胞群体的 T_{CM} 和/或 T_{SCM} 的约100到约1000倍,如在约7-16天的时段内所测量。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中所获得的所述T细胞群体所富集的 T_{CM} 和/或 T_{SCM} 是所述初始T细胞群体的 T_{CM} 和/或 T_{SCM} 的约100到约1000倍,如在约10-14天的时段内所测量。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中所获得的所述T细胞群体所富集的 T_{CM} 和/或 T_{SCM} 是所述初始T细胞群体的 T_{CM} 和/或 T_{SCM} 的至少约100或约200倍。

20. 根据权利要求12至19中任一项所述的方法,其中所述初始T细胞群体是工程改造的T细胞群体。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中所述初始T细胞群体是表达一种或多种嵌合抗原受体的T细胞群体。

22. 根据权利要求12至21中任一项所述的方法,其中所述T细胞是同种异体T细胞。

23. 根据权利要求12至21中任一项所述的方法,其中所述T细胞是自体T细胞。

24. 一种工程改造的免疫细胞群体,其中所述群体包含表达一种或多种嵌合抗原受体(CAR T细胞)的T细胞,并且其中所述CAR T细胞是使用根据权利要求1至11中任一项所述的细胞生长培养基获得的。

25. 一种工程改造的免疫细胞群体,其中所述群体包含表达一种或多种嵌合抗原受体(CAR T细胞)的T细胞,并且其中所述(CAR T细胞)是使用根据权利要求12至23中任一项所述的方法获得的。

26. 根据权利要求24或25所述的工程改造的免疫细胞群体,其中所述CAR T细胞包含至少约30%、35%、40%或45%的 T_{SCM} 细胞。

27. 根据权利要求26所述的工程改造的免疫细胞群体,其中所述CAR T细胞包含至少约40%的 T_{SCM} 细胞。

28. 一种药物组合物,其包含根据权利要求24至27中任一项所述的工程改造的免疫细胞群体。

29. 一种治疗有需要的受试者中的疾病或病症的方法,所述方法包含向所述受试者授予根据权利要求24至27中任一项所述的工程改造的免疫细胞或根据权利要求28所述的药物组合物。

30. 根据权利要求29所述的方法,其中所述疾病或病症是癌症。

31. 一种制品,其包含根据权利要求24至27中任一项所述的工程改造的免疫细胞,或根据权利要求28所述的药物组合物。

制备同种异体CAR T细胞的方法

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2019年4月26日提交的美国临时申请第62/839,449号的优先权权益,所述美国临时申请的内容以全文引用的方式并入本文中。

技术领域

[0003] 本公开涉及用于制造工程改造的免疫细胞(包括包含嵌合抗原受体(CAR)和工程改造的T细胞受体(TCR)的那些工程改造的免疫细胞)的细胞生长培养基和方法,以及使用所述工程改造的免疫细胞治疗患者中的癌症的方法。

[0004] 序列表

[0005] 本申请含有序列表,所述序列表已经以ASCII格式以电子方式提交且以全文引用的方式并入本文中。2020年4月17日创建的所述ASCII拷贝命名为AT-025_02W0_ST25.txt并且大小为15,405字节。

背景技术

[0006] 显示经遗传修饰以识别恶性肿瘤相关抗原的免疫细胞的过继转移有希望作为治疗癌症的新型方法(参见例如,Brenner等人,《免疫学新见(Current Opinion in Immunology)》,22(2):251-257(2010);Rosenberg等人,《自然综述:癌症(Nature Reviews Cancer)》,8(4):299-308(2008))。免疫细胞可以经遗传修饰以表达嵌合抗原受体(CAR)(参见例如Eshhar等人,《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》,90(2):720-724(1993),以及Sadelain等人,《免疫学新见》21(2):215-223(2009))。将含有CAR(例如CAR-T细胞(CAR-T))的免疫细胞工程改造以在保持或增强其识别和杀死靶细胞的能力的同时赋予其抗原特异性。有效的免疫细胞生长培养基和其使用方法可尤其适用于制造工程改造的免疫细胞,如CAR-T。本文提供细胞生长培养基和解决此需要的制造方法。

发明内容

[0007] 本文描述了用于培养免疫细胞的改进的培养基,以及使用方法。例如,本文所述的是特别适合于T细胞扩增的培养基,其可用于制造可用于过继细胞疗法,包括使用嵌合抗原受体的疗法(例如,CAR-T细胞疗法)的细胞。

[0008] 在一个方面,本公开提供用于T细胞扩增的细胞生长培养基,其包含:细胞增殖的第一刺激剂和第二刺激剂,其各自独立地选自由以下组成的群组:IL-4、IL-7、IL-10、IL-12和IL-15,并且其中第一刺激剂和第二刺激剂以约1000:1到约4:1的浓度比存在。

[0009] 在一个方面,本公开提供用于T细胞扩增的细胞生长培养基,其包含细胞代谢的细胞外调节剂,所述细胞代谢的细胞外调节剂是浓度为约4mM到约40mM的细胞外钾。

[0010] 在一个方面,本公开提供用于T细胞扩增的细胞生长培养基,其包含:细胞增殖的第一刺激剂和第二刺激剂,其各自独立地选自由以下组成的群组:IL-4、IL-7、IL-10、IL-12和IL-15;以及细胞代谢的细胞外调节剂,所述细胞代谢的细胞外调节剂是浓度为约4mM到

- 约40mM的细胞外钾;并且其中第一刺激剂和第二刺激剂以约1000:1到约4:1的浓度比存在。
- [0011] 在一些实施例中,细胞增殖的第一刺激剂为IL-7。
- [0012] 在一些实施例中,细胞增殖的第二刺激剂为IL-15。
- [0013] 在一些实施例中,第一刺激剂和第二刺激剂以约500:1到约10:1、约250:1到约10:1、约200:1到约10:1、约150:1到约10:1、约100:1到约10:1、约500:1到约50:1、约250:1到约50:1、约200:1到约50:1、约150:1到约50:1、约100:1到约50:1、约500:1到约75:1、约250:1到约75:1、约200:1到约75:1、约150:1到约75:1、约100:1到约75:1、约10:1到约4:1、约8:1到约4:1,或约7:1到约6:1的浓度比存在。
- [0014] 在一些实施例中,第一刺激剂和第二刺激剂以约150:1、约140:1、约130:1、约120:1、约110:1、约100:1、约90:1、约80:1或约70:1的浓度比存在。
- [0015] 在一些实施例中,第一刺激剂为IL-7,其以约100IU/mL到约5,000IU/mL的浓度存在;并且第二刺激剂为IL-15,其以约1IU/mL到约100IU/mL的浓度存在。
- [0016] 在一些实施例中,IL-7以约300IU/mL到约5000IU/mL的浓度存在,并且IL-15以约25IU/mL到约50IU/mL的浓度存在。
- [0017] 在一些实施例中,IL-7以约5000IU/mL的浓度存在,并且IL-15以约50IU/mL的浓度存在。
- [0018] 在一些实施例中,将第一刺激剂和第二刺激剂同时或依序添加到细胞培养物中。
- [0019] 在一些实施例中,细胞外钾以约4mM到约40mM;约10mM到约35mM;约10mM到约25mM;约20mM到约35mM;约20mM到约25mM;或约20mM到约30mM的浓度存在。
- [0020] 在一些实施例中,细胞外钾以约20mM或约25mM的浓度存在。
- [0021] 在一些实施例中,细胞外钾以小于40mM并且大于4mM;小于40mM并且大于10mM;小于40mM并且大于20mM;或小于40mM并且等于或大于25mM的浓度存在。
- [0022] 在一些实施例中,细胞外钾以KCl形式存在。
- [0023] 在一些实施例中,所获得的T细胞群体富集 T_{CM} 和/或 T_{SCM} 细胞。
- [0024] 另一方面,本公开提供一种在体外获得T细胞群体的方法,所述方法包含用细胞生长培养基培养初始T细胞群体,所述细胞生长培养基包含细胞增殖的第一刺激剂和第二刺激剂,其各自独立地选自由IL-4、IL-7、IL-10、IL-12和IL-15组成的群组;以及细胞代谢的细胞外调节剂,所述细胞代谢的细胞外调节剂是浓度为约4mM到约40mM的细胞外钾;并且其中第一刺激剂和第二刺激剂以约1000:1到约4:1的浓度比存在,并且其中所获得的T细胞群体富集 T_{CM} 和/或 T_{SCM} 细胞。
- [0025] 在一些实施例中,细胞生长培养基为如上文所述的细胞生长培养基。
- [0026] 在一些实施例中,所获得的T细胞群体包含至少约30%、35%、40%或45% T_{SCM} 细胞。
- [0027] 在一些实施例中,所获得的T细胞群体包含至少约40% T_{SCM} 细胞。
- [0028] 在一些实施例中,所获得的T细胞群体为如在约7-16天的时段内所测量的初始T细胞群体的约100到约1000倍。
- [0029] 在一些实施例中,所获得的T细胞群体为如在约10-14天的时段内所测量的初始T细胞群体的约100到约1000倍。
- [0030] 在一些实施例中,所获得的T细胞群体为初始T细胞群体的至少约100或约200倍。

[0031] 在一些实施例中,所获得的T细胞群体所富集的 T_{CM} 和/或 T_{SCM} 是初始T细胞群体的 T_{CM} 和/或 T_{SCM} 的约100到约1000倍,如在约7-16天的时段内所测量。

[0032] 在一些实施例中,所获得的T细胞群体所富集的 T_{CM} 和/或 T_{SCM} 是初始T细胞群体的 T_{CM} 和/或 T_{SCM} 的约100到约1000倍,如在约10-14天的时段内所测量。

[0033] 在一些实施例中,所获得的T细胞群体所富集的 T_{CM} 和/或 T_{SCM} 是初始T细胞群体的 T_{CM} 和/或 T_{SCM} 的至少约100倍或至少约200倍。

[0034] 在一些实施例中,初始T细胞群体为工程改造的T细胞群体。

[0035] 在一些实施例中,初始T细胞群体为表达一种或多种嵌合抗原受体的T细胞群体。

[0036] 在一些实施例中,T细胞为同种异体T细胞。

[0037] 在一些实施例中,T细胞为自体T细胞。

[0038] 在一个方面,本公开提供工程改造的免疫细胞群体,其中所述群体包含表达一种或多种嵌合抗原受体(CAR T细胞)的T细胞,并且其中所述CAR T细胞使用如上文所述的细胞生长培养基获得。

[0039] 在一个方面,本公开提供工程改造的免疫细胞群体,其中所述群体包含表达一种或多种嵌合抗原受体(CAR T细胞)的T细胞,并且其中所述(CAR T细胞)使用如上文所述的方法获得。

[0040] 在一些实施例中,CAR T细胞包含至少约30%、35%、40%或45% T_{SCM} 细胞。

[0041] 在一些实施例中,CAR T细胞包含至少约40% T_{SCM} 细胞。

[0042] 在一个方面,本公开提供一种药物组合物,其包含如上文所述的工程改造的免疫细胞群体。

[0043] 在一个方面,本公开提供一种治疗有需要的受试者的疾病或病症的方法,所述方法包含向受试者投予如上文所述的工程改造的免疫细胞或如上文所述的药物组合物。

[0044] 在一些实施例中,所述疾病或病症是癌症。

[0045] 在一个方面,本公开提供一种制品,其包含如上文所述的工程改造的免疫细胞或如上文所述的药物组合物。

[0046] 本文所呈现的所有实施例适用于贯穿本公开所公开的所有方面。

附图说明

[0047] 图1A描绘使用包含以下的方法的CAR⁺表现型的比较:依序IL-2刺激;IL-2刺激随后的IL-7+IL-15刺激;以及依序IL-7+IL-15刺激。基于IL-7+IL-15的方法增加了 T_{SCM} CAR T细胞的丰度。

[0048] 图1B描绘在靶细胞暴露后CD19特异性CAR T细胞的细胞因子释放能力,其中CAR T细胞使用包含依序IL-2刺激;IL-2刺激随后的IL-7+IL-15刺激;以及依序IL-7+IL-15刺激的制造方法制备。

[0049] 图2A描绘当与正常(4mM)钾浓度(实心条)相比时,在IL-2和IL-7+15方法中增加细胞外钾(40mM,空心条)的丰度以增加 T_{SCM} 细胞丰度的影响。

[0050] 图2B描绘当与正常钾浓度(4mM,实心条)相比时,在IL-2和IL-7+15方法中增加的细胞外钾(40mM,空心条)对同种异体CAR T细胞的扩增能力的影响。

[0051] 图3描绘浓度为25mM和10mM的细胞外钾的影响:与较高浓度相比,这些浓度在同种

异体CAR T细胞制造期间不会不利地影响人类T细胞的扩增。

[0052] 图4描绘在25mM细胞外钾中实现 T_{SCM} 细胞的最大程度保存。

[0053] 图5显示Flt3特异性CAR T细胞(Allo-819)的改进效力是使用基于IL-7+15的方法与25mM细胞外钾补充的组合所获得。

具体实施方式

[0054] 本文描述了特别适用于培养免疫细胞的细胞生长培养基和方法。

[0055] 使用工程改造的免疫细胞的过继细胞疗法是一种类型的免疫疗法,其已显现为用于癌症治疗的特别有前景的新方法。工程改造的免疫细胞的产生和制造包含从受试者收集免疫细胞(例如,T细胞),接着是细胞的体外细胞扩增。免疫细胞(例如,T细胞)的成功体外扩增都通过足够的细胞增殖以及获得所需细胞表现型来表征。

[0056] 例如,T细胞扩增可以产生T细胞的混合物,所述T细胞包括原生T细胞(T_N)、记忆T细胞(包括干细胞样记忆体(T_{SCM})、中央记忆(T_{CM})和效应记忆(T_{EM})T细胞),以及效应(T_{EFF})T细胞亚群。不同T细胞亚群的不同量可能影响所得工程改造的T细胞的治疗概况和功效。确切地说,在早期分化阶段中产生T细胞的富集量的T细胞扩增方法在治疗上是合乎需要的。

[0057] 因此,本文所述的细胞生长培养基可尤其有利于T细胞扩增,其中富集成比例的 T_{SCM} 和/或 T_{CM} 。 T_{SCM} 细胞为至少分化型的记忆T细胞,并且对于过继T细胞疗法,在向患者授予工程改造的细胞之后促进长期体内T细胞增殖可特别有利。因此,此类细胞培养基和使用此类培养基制备的免疫细胞(例如,T细胞)可产生更有效的过继细胞转移疗法,包括如本文所述的CAR-T疗法。

[0058] 确切地说,包含细胞增殖的不同刺激剂(例如,第一和第二T细胞生长因子)的组的细胞生长培养基与细胞代谢的细胞外调节剂的组合可产生合乎需要的细胞增殖和细胞表现型。

[0059] 在一个方面,本公开的特征在于细胞生长培养基(例如,适合于T细胞扩增的培养基),其包含:

[0060] 细胞增殖的第一刺激剂(例如,刺激T细胞增殖的第一细胞因子);

[0061] 细胞增殖的第二刺激剂(例如,刺激T细胞增殖的第二细胞因子);以及

[0062] 细胞代谢的细胞外调节剂(例如,T细胞代谢)。

[0063] 确切地说,如本文所述的细胞因子和代谢调节剂的组合和浓度提供新T细胞扩增培养基可引起免疫细胞疗法产品(包括遗传修饰的同种异体细胞疗法产品和自体细胞疗法产品)的效能增加。在一个实施例中,与经典的基于IL-2的扩增条件相比,IL-7和IL-15刺激剂的组合以及增加的细胞外钾可实现获得所需同种异体CAR T细胞(例如,增加的 T_{SCM} 细胞群体)的表现型和/或自体细胞疗法产品方面的改进。

[0064] 1. 免疫细胞

[0065] 适用于使用本文所述的培养基和方法培养的细胞包括免疫细胞。

[0066] 在体外操纵或遗传修饰(例如,如本文所述)之前,可从受试者获得本文所述的方法(例如,免疫细胞)中使用的细胞。细胞可从多个非限制性来源获得,包括外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐血、胸腺组织、干细胞或iPSC衍生的免疫细胞、来自感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾组织和肿瘤。在一些实施例中,可使用任何数目的所属领域的技术人

员可获得的并已知的T细胞系。在一些实施例中,细胞可以来源于健康供体、来源于诊断患有癌症的患者或来源于诊断患有感染的患者。在一些实施例中,细胞可为展现不同表现型特征的混合细胞群体的部分。

[0067] 在一些实施例中,免疫细胞获自将最终接收工程改造的免疫细胞的受试者。在一些实施例中,免疫细胞获自供体,所述供体为来自将接受工程改造的免疫细胞的受试者的不同个体。

[0068] 在一些实施例中,免疫细胞包含T细胞。T细胞可从多个来源获得,包括外周血单核细胞(PBMC)、骨髓、淋巴结组织、脐血、胸腺组织、干细胞或iPSC衍生的T细胞、来自感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾组织和肿瘤。在某些实施例中,可使用技术人员已知的任何数目的技术,如FICOLL™分离,从收集于受试者的血液体积获得T细胞。

[0069] 细胞可通过单采血液成分术获自个体的循环血液。单采血液成分术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。在某些实施例中,可洗涤通过单采血液成分术收集的细胞以去除血浆成分,并且将其置于适当的缓冲液或培养基中以用于后续处理。

[0070] PBMC可直接用于使用如本文所述的方法进行免疫细胞(如CAR或TCR)的遗传修饰。在某些实施例中,在分离PBMC之后,可进一步分离T淋巴细胞,并且在遗传修饰和/或扩增之前或之后,可将细胞毒性和辅助T淋巴细胞两者分选为原生、记忆和效应T细胞亚群。

[0071] 在某些实施例中,例如,使用通过PERCOLL™梯度的离心,通过裂解红细胞和消耗单核细胞,从PBMC中分离T细胞。T细胞的特定亚群,如CCR7+、CD95+、CD122、CD27+、CD69+、CD127+、CD28+、CD3+、CD4+、CD8+、CD25+、CD62L+、CD45RA+和CD45RO+T细胞可通过所属领域中已知的阳性或阴性选择技术进一步分离。例如,T细胞群体通过阴性选择的富集可用针对对于阴性选择的细胞独特的表面标记的抗体的组合实现。本文使用的方法之一是通过负磁免疫粘附或流式细胞术进行细胞分选和/或选择,所述负磁免疫粘附或流式细胞术使用针对在阴性选择的细胞上存在的细胞表面标记的单克隆抗体混合物。例如,为了通过阴性选择针对CD4+细胞富集,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。流式细胞术和细胞分选还可用于分离用于本公开中的所关注的细胞群体。

[0072] 在一些实施例中,T细胞群体针对C4+细胞富集。

[0073] 在一些实施例中,T细胞群体针对CD8+细胞富集。

[0074] 在一些实施例中,CD8+细胞通过鉴别与那些类型的CD8+细胞中的每一种缔合的细胞表面抗原而进一步分选成原生、中央记忆和效应细胞。在一些实施例中,中央记忆T细胞的表现型标记的表达包括CD45RO、CD62L、CCR7、CD28、CD3、和CD127并且对于颗粒酶B是阴性的。在一些实施例中,中央记忆T细胞为CD45RO+、CD62L+和/或CD8+T细胞。在一些实施例中,效应T细胞对于CD62L、CCR7、CD28和/或CD127是阴性的,并且对于颗粒酶B和穿孔素是阳性的。在某些实施例中,CD4+T细胞进一步分选成亚群。例如,CD4+T辅助细胞可通过鉴别具有细胞表面抗原的细胞群体而分选到原生、中央记忆和效应细胞中。

[0075] 应了解,PBMC还可包括其它细胞毒性淋巴细胞,如NK细胞或NKT细胞。可将携带如本文所公开的嵌合受体的编码序列的表达载体引入人类供体T细胞、NK细胞或NKT细胞的群体中。可使用流式细胞术将携带表达载体的成功转导的T细胞分选以分离CD3阳性T细胞,并且接着进一步增殖以增加除使用抗CD3抗体和IL-2或所属领域中已知的如本文中其它地方

所述的其它方法的细胞活化之外的这些CAR表达T细胞的数目。标准程序用于冷冻保存表达CAR的T细胞,以储存和/或制备用于人类受试者。在一个实施例中,在不存在非人类动物衍生产物,如胎牛血清(fetal calf serum/fetal bovine serum)的情况下进行T细胞的体外转导、培养和/或扩增。

[0076] 2. 工程改造的免疫细胞

[0077] 本文所述的细胞生长培养基和使用方法可尤其适用于免疫细胞(包括工程改造的免疫细胞(例如CAR-T细胞))的体外扩增。

[0078] 工程改造的免疫细胞可以是同种异体或自体的。

[0079] 在一些实施例中,工程改造的免疫细胞为T细胞(例如发炎性T淋巴细胞细胞毒性T淋巴细胞、调节T淋巴细胞、辅助T淋巴细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL))、NK细胞、NK-T细胞、TCR表达细胞、树突状细胞、杀手树突状细胞、肥大细胞或B细胞。在一些实施例中,细胞可衍生自由CD4+T淋巴细胞和CD8+T淋巴细胞组成的群组。在一些示例性实施例中,工程改造的免疫细胞为T细胞。

[0080] 在一些实施例中,工程改造的免疫细胞可衍生自例如(但不限于)干细胞。干细胞可以是成体干细胞、非人类胚胎干细胞、更确切地说,非人类干细胞、脐血干细胞、祖细胞、骨髓干细胞、诱导多能干细胞、全能干细胞或造血干细胞。

[0081] 在一些实施例中,细胞获自外周血或由其制备。在一些实施例中,细胞获自外周血单核细胞(PBMC)或由其制备。在一些实施例中,细胞获自骨髓或由其制备。在一些实施例中,细胞获自脐血或由其制备。在一些实施例中,细胞是人类细胞。在一些实施例中,使用选自以下组成的群组的方法通过核酸载体转染或转导细胞:电穿孔、声致穿孔、基因枪(例如基因枪(Gene Gun))、脂质转染、聚合物转染、纳米粒子或聚合复合物。

[0082] a. 结合剂(包括抗体)

[0083] 在一些实施例中,工程改造的免疫细胞包含抗原结合剂(例如,包含抗原结合结构域或包含抗体或其片段)。

[0084] 如本文所使用,术语“抗体”是指一种多肽,其包括足以赋予与特定靶抗原的特异性结合的典型免疫球蛋白序列元件。如所属领域中已知,如在自然界中产生的完整抗体是大约150kD四聚体试剂,由两条相同的重链多肽(各约50kD)和两条相同的轻链多肽(各约25kD)组成,这些多肽相互结合成通常被称为“Y形”结构的物质。每条重链由至少四个结构域(各长约110个氨基酸)组成:氨基端可变(VH)结构域(位于Y结构的顶端),接着是三个恒定结构域:CH1、CH2和羧基端CH3(位于Y主干的基底处)。称为“开关”的短区域连接重链可变区与恒定区。“铰链”将CH2和CH3结构域连接到抗体的其余部分上。此铰链区中的两个二硫键使完整抗体中的两个重链多肽彼此连接。每条轻链包含两个结构域-氨基端可变(VL)结构域,接着是羧基端恒定(CL)结构域,其由另一个“开关”而彼此分离。所属领域的技术人员对抗体结构和序列元件很熟悉,识别所提供的序列中的“可变”和“恒定”区,并且理解,在此类结构域之间的“边界”的定义中可存在一些灵活性,使得相同抗体链序列的不同呈现可例如指示在相对于相同抗体链序列的不同呈现移位一个或几个残基的位置处的此类边界。

[0085] 完整抗体四聚体包含两个重链-轻链二聚体,其中重链和轻链通过单个双硫键彼此连接;另外两个二硫键使重链铰链区彼此连接,使得二聚体彼此连接并且形成四聚体。天然产生的抗体也是糖基化的,通常是在CH2结构域上。天然抗体中的每个结构域都具有这样

一种结构,其特征在于由两个β片层(例如,3、4或5链片层)按压缩反向平行β桶形式针对彼此填充形成的“免疫球蛋白折叠”。每个可变结构域含有三个称为“互补决定区”的高变环(CDR1、CDR2和CDR3)以及四个在某种程度上恒定的“构架”区(FR1、FR2、FR3和FR4)。当天然抗体折叠时,FR区形成为结构域提供结构构架的β片层,而来自重链和轻链的CDR环区则在三维空间中聚在一起,使得其产生位于Y结构的顶端的单个高变抗原结合位点。天然存在的抗体的Fc区结合于补体系统的元件,并且还结合于效应细胞上的受体,包括例如介导细胞毒性的效应细胞。如所属领域中已知,可通过糖基化或其它修饰来调节Fc区对Fc受体的亲和力和/或其它结合属性。在一些实施例中,根据本公开产生和/或使用的抗体包括糖基化Fc结构域,包括具有此类糖基化修饰或工程改造的Fc结构域。

[0086] 出于本公开的目的,在某些实施例中,任何包括足够的如在天然抗体中发现的免疫球蛋白结构域序列的多肽或多肽复合物可称为和/或用作“抗体”,无论此类多肽是天然产生(例如通过生物体对抗原的反应产生),或通过重组型工程改造、化学合成或其它人工系统或方法产生。在一些实施例中,抗体是多克隆;在一些实施例中,抗体是单克隆。在一些实施例中,抗体具有恒定区序列,其具有小鼠、兔、灵长类动物或人类抗体的特征。在一些实施例中,如所属领域中已知,抗体序列元件是人源化、灵长类化、嵌合等。

[0087] 此外,如本文所使用,术语“抗体”在适当实施例中可指(除非另外陈述或从上下文显而易见,否则)所属领域已知或开发的在替代性呈现中利用抗体结构和功能特征的构建体或形式中的任一种。例如,在一些实施例中,根据本公开使用的抗体的格式选自(但不限于):完整IgA、IgG、IgE或IgM抗体;双特异性或多特异性抗体(例如,Zybodies®等);抗体片段,如Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、Fd'片段、Fd片段和分离的CDR或其集合;单链Fv;多肽-Fc融合体;单结构域抗体(例如,鲨鱼单结构域抗体(如IgNAR或其片段));骆驼样抗体;屏蔽抗体(例如,Probodies®);小模块免疫药物(“SMIPsTM”);单链或串联双功能抗体(TandAb®);VHH;Anticalins®;Nanobodies®微型抗体;BiTE®;锚蛋白重复蛋白或DARPINs®;Avimers®;DART;TCR样抗体;Adnectins®;Affilins®;Trans-bodies®;Affibodies®;TrimerX®;微量蛋白;Fynomers®、Centylins®;以及KALBITOR®。在一些实施例中,抗体可缺乏天然产生的情况下将具有的共价修饰(例如聚糖的连接)。在一些实施例中,抗体可含有共价修饰(例如聚糖、有效负载(例如可检测部分、治疗部分、催化部分等)的连接)或其它侧基(例如聚乙二醇等)。

[0088] 在一些实施例中,抗体或结合剂可以是“对称”的。“对称”意指抗体或结合剂具有相同种类的Fv区(例如抗体具有两个Fab区)。在一些实施例中,抗体或结合剂可以是“不对称”的。“不对称”意指抗体或结合剂具有至少两种不同种类的Fv区(例如抗体具有:Fab和scFv区、Fab和scFv₂区或Fab-VHH区)。所属领域中已知各种不对称抗体或结合剂架构(Brinkman和Kontermann等人,2017Mabs(9)(2):182-212)。

[0089] 如本文所使用,术语“抗体药剂”是指特异性结合于特定抗原的药剂。在一些实施例中,术语涵盖了包括足以赋予特异性结合的免疫球蛋白结构元件的任何多肽或多肽复合物。示例性抗体药剂包括但不限于单克隆抗体或多克隆抗体。在一些实施例中,抗体药剂可包括为小鼠、兔、灵长类或人类抗体的特征的一个或多个恒定区序列。在一些实施例中,如所属领域中已知,抗体药剂可包括一种或多种为人源化、灵长类、嵌合等的序列元件。在许

多实施例中,术语“抗体药剂”用于指用于所属领域已知或开发的在替代呈现中利用抗体结构和功能特征的构建体或格式中的一种或多种。例如,根据本公开使用的抗体药剂的格式选自(但不限于):完整IgA、IgG、IgE或IgM抗体;双特异性或多特异性抗体(例如,Zybodies[®]);抗体片段,如Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、Fd'片段、Fd片段和分离的CDR或其集合;单链Fv;多肽-Fc融合体;单结构域抗体(例如,鲨鱼单结构域抗体(如IgNAR或其片段));骆驼样抗体;屏蔽抗体(例如,Probodies[®]);小模块免疫药物(“SMIPs[™]”);单链或串联双功能抗体(TandAb[®]);VHH;Anticalins[®];Nanobodies[®]微型抗体;BiTE[®];锚蛋白重复蛋白或DARPINS[®];Avimers[®];DART;TCR样抗体;Adnectins[®];Affilins[®];Trans-bodies[®];Affibodies[®];TrimerX[®];微量蛋白;Fynomers[®]、Centylins[®];以及KALBITOR[®]。

[0090] 本公开编码的抗体或抗原结合分子可以是单链或双链的。在一些实施例中,抗体或抗原结合分子是单链的。在某些实施例中,抗原结合分子选自由以下组成的群组:scFv、Fab、Fab'、Fv、F(ab')₂、dAb和其任何组合。

[0091] 抗体包括抗体片段。抗体片段包含完整抗体的一部分,如完整抗体的抗原结合或可变区。抗体片段包括但不限于Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、双功能抗体、线性抗体、由抗体片段抗体和scFv片段形成的多特异性,以及下文所述的其它片段。抗体还包括但不限于多克隆单克隆、嵌合dAb(结构域抗体)、单链、F_{ab}、F_a、F_(ab)₂片段、scFv和F_{ab}表达库。抗体可以是全抗体,或免疫球蛋白,或抗体片段。在一些实施例中,抗体为全长抗体,例如完整IgG1抗体或如本文所述的其它抗体类别或同种型。(参见例如Hudson等人,Nat. Med., 9:129-134 (2003);Pluckthun,《单克隆抗体的药理学(The Pharmacology of Monoclonal Antibodies)》,第113卷,第269-315页(1994);Hollinger等人,《美国国家科学院院刊》,90:6444-6448(1993);W093/01161;和美国专利第5,571,894号、第5,869,046号、第6,248,516号和第5,587,458号)。全长抗体、完整抗体或全抗体为具有大体上类似于天然抗体结构或具有含有如本文所定义的Fc区的重链的结构抗体。抗体片段可由各种技术制备,包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化,以及由重组宿主细胞(例如大肠杆菌或噬菌体)产生,如所属领域中已知。

[0092] 在一些实施例中,抗体为或包含单克隆抗体,包括嵌合、人源化或人类抗体。

[0093] 在一些实施例中,本文所提供的抗原特异性抗体药剂可以是嵌合抗体(参见例如美国专利第4,816,567号;和Morrison等人,《美国国家科学院院刊》,81:6851-6855(1984))。嵌合抗体可以是其中重链和/或轻链的一部分衍生自特定来源或物种,而重链和/或轻链的其余部分衍生自不同来源或物种的一种抗体。在一个实例中,嵌合抗体可包含非人类可变区(例如,衍生自小鼠、大鼠、仓鼠、兔或非人类灵长类(如猴子)的可变区)和人类恒定区。在另一实例中,嵌合抗体可以是其中类别或子类别已从亲本抗体的类别或子类别改变的“类别转换”抗体。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0094] 在一些实施例中,嵌合抗体可以是人源化抗体(参见例如Almagro和Fransson,《生物科学前沿(Front. Biosci.)》,13:1619-1633(2008);Riechmann等人,《自然(Nature)》,332:323-329(1988);Queen等人,《美国国家科学院院刊》86:10029-10033(1989);美国专利第5,821,337号、第7,527,791号、第6,982,321号和第7,087,409号;Kashmiri等人,《方法》

36:25-34 (2005); Padlan,《分子免疫学 (Mol. Immunol)》, 28:489-498 (1991); Dall'Acqua 等人,《方法》, 36:43-60 (2005); Osbourn 等人,《方法》, 36:61-68 (2005); 和 Klimka 等人,《英国癌症杂志 (Br. J. Cancer)》, 83:252-260 (2000)。人源化抗体为包含来自非人类高变区的氨基酸残基和来自人类FR的氨基酸残基的嵌合抗体。在某些实施例中,人源化抗体将包含至少一个且通常两个可变结构域的大体上全部,其中全部或大体上全部的高变区(例如CDR)对应于非人类抗体的高变区,并且全部或大体上全部的FR对应于人类抗体的FR。人源化抗体可任选地包含衍生自人类抗体的抗体恒定区的至少一部分。

[0095] 可将非人类抗体人源化,以减少对人类的免疫原性,同时保留亲本非人类抗体的特异性和亲和力。人源化抗体可包含一个或多个可变结构域,所述可变结构域包含衍生自非人类抗体的一个或多个CDR或其部分。人源化抗体可包含一个或多个可变结构域,所述可变结构域包含衍生自人类抗体序列的一个或多个FR或其部分。人源化抗体可任选地包含人类恒定区的至少一部分。在一些实施例中,人源化抗体中的一个或多个FR残基被来自非人类抗体(例如CDR残基衍生自其的抗体)的对应残基取代,以恢复或改进抗体特异性或亲和力。

[0096] 可用于人源化的人类构架区包括但不限于:使用“最佳拟合”方法选择构架区;衍生自轻链或重链可变区的特定亚群的人类抗体的共有序列的构架区;人类成熟(体细胞突变)构架区或人类生殖系构架区;以及衍生自筛选FR库的构架区(参见例如,Sims 等人,《免疫学杂志 (J. Immunol)》, 151:2296 (1993); Carter 等人,《美国国家科学院院刊》89:4285 (1992); Presta 等人,《免疫学杂志》, 151:2623 (1993); Baca 等人,《生物化学杂志 (J. Biol. Chem.)》, 272:10678-10684 (1997); 和 Rosok 等人,《生物化学杂志》, 271:22611-22618 (1996))。

[0097] 在一些实施例中,本文所提供的抗体药剂为人类抗体。人类抗体可使用所属领域中已知的各种技术产生(参见例如 van Dijk 和 van de Winkel,《药理学现状 (Curr. Opin. Pharmacol)》5:368-74 (2001); 以及 Lonberg,《免疫学现状 (Curr. Opin. Immunol)》, 20:450-459 (2008))。人类抗体可以是氨基酸序列对应于由人类或人类细胞产生或衍生自利用人类抗体谱系或其它人类抗体编码序列的非人类来源的抗体的氨基酸序列的抗体。人类抗体的此定义尤其排除包含非人类抗原结合残基的人源化抗体。人抗体可通过将免疫原授予转基因动物来制备,所述转基因动物已进行修饰以响应于抗原攻击而产生完整人类抗体或具有人类可变区的完整抗体(参见例如 Lonberg,《自然·生物技术 (Nat. Biotech)》, 23:1117-1125 (2005); 美国专利第6,075,181号、第6,150,584号、第5,770,429号和第7,041,870号;和美国专利申请公开案第US 2007/0061900号)。来自此类动物产生的完整抗体的人类可变区可进一步修饰,例如,通过与不同的人类恒定区组合。

[0098] 人类抗体也可以通过基于杂交瘤的方法来制备。例如,人类抗体可使用人类B细胞杂交瘤技术和其它方法由人类骨髓瘤和小鼠-人类杂交骨髓瘤细胞系产生(参见例如 Kozbor,《免疫学杂志》, 133:3001 (1984); Brodeur 等人,《单克隆抗体生产技术和应用单 (Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications)》, 第51-63页 (1987); Boerner 等人,《免疫学杂志》, 147:86 (1991); Li 等人,《美国国家科学院院刊》, 103:3557-3562 (2006); 美国专利第7,189,826号; Ni, Xiandai Mianyixue, 26 (4):265-268

(2006); Vollmers 和 Brandlein, 《组织学和组织病理学 (Histology and Histoopathology)》, 20 (3): 927-937 (2005); 以及 Vollmers 和 Brandlein, 《方法和在实验和临床药理学中的发现 (Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology)》, 27 (3): 185-91 (2005)。人类抗体还可通过分离选自人源噬菌体展示库的 Fv 克隆可变结构域序列来产生。此类可变结构域序列可接着与所需的人类恒定区组合。

[0099] 可例如修饰抗体中的低聚糖以产生具有某些改进的特性的抗体变体。例如, 抗体糖基化变体可具有改进的 CDC 功能。在一些实施例中, 本公开可涵盖具有一些但非所有效应功能的抗体变体, 这使得其成为对于其中抗体体内的半衰期为重要的但某些效应功能 (如补体) 为不必要的或有害的应用的理想候选物。可进行体外和/或体内细胞毒性分析, 以证实 CDC 活性的减少/耗尽。

[0100] 在一些实施例中, 可进一步修饰本文所提供的抗体药剂, 以含有所属领域已知且容易获得的其它非蛋白质部分。适用于抗体的衍生作用的部分可包括但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性实例包括但不限于聚乙二醇 (PEG)、乙二醇/丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三恶烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸 (均聚物或无规共聚物), 以及葡聚糖或聚 (N-乙烯基吡咯烷酮) 聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚氧化丙烯/环氧乙烷共聚物、聚氧乙基化多元醇 (例如甘油)、聚乙烯醇和其混合物。聚乙二醇丙醛可由于其在水中的稳定性而在制造中具有优势。

[0101] 聚合物可具有任何分子量, 并且可以是支链或非分支链的。连接到抗体的聚合物的数目可变化, 并且如果连接两种或更多种聚合物, 那么其可以是相同或不同分子。

[0102] 在一些实施例中, 提供可通过暴露于辐射选择性地加热的抗体和非蛋白质部分的结合物。在一些实施例中, 非蛋白质部分可以是碳纳米管 (参见例如 Kam 等人, 《美国国家科学院院刊》, 102: 11600-11605 (2005))。辐射可具有任何波长, 并且可包括但不限于不伤害普通细胞, 但将非蛋白质部分加热到杀死抗体-非蛋白质部分附近的细胞的温度的波长。

[0103] b. 嵌合抗原受体

[0104] 在一些实施例中, 工程改造的免疫细胞包含 CAR 群体, 每个 CAR 包含细胞外抗原结合结构域。在一些实施例中, 免疫细胞包含 CAR 群体, 每个 CAR 包含相同的细胞外抗原结合结构域。

[0105] 如本文所使用, 嵌合抗原受体 (CAR) 是特异性识别靶抗原 (例如癌细胞上的靶抗原) 的蛋白质。当结合于靶抗原时, CAR 可活化免疫细胞以攻击和破坏携带所述抗原的细胞 (例如癌细胞)。CAR 还可并有共刺激或信号传导结构域以增加其效力。参见 Krause 等人, 《实验医学杂志》, 第 188 卷, 第 4 号, 1998 (619-626); Finney 等人, 《免疫学杂志 (Journal of Immunology)》, 1998, 161: 2791-2797; Song 等人, 《血液 (Blood)》119: 696-706 (2012); Kalos 等人, 《科学·转化医学 (Sci. Transl. Med.)》3: 95 (2011); Porter 等人, 《新英格兰医学杂志 (N. Engl. J. Med.)》365: 725-33 (2011), 以及 Gross 等人, 《药理学和毒理学年度综述 (Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.)》56: 59-83 (2016); 美国专利第 7,741,465 号和第 6,319,494 号。

[0106] 本文所述的嵌合抗原受体包含细胞外结构域、跨膜结构域和胞内结构域, 其中所述细胞外结构域包含特异性结合于所述靶标的抗原结合结构域。

[0107] 在一些实施例中, 抗原特异性 CAR 进一步包含安全开关和/或一个或多个单克隆抗

体特异性-表位。

[0108] i. 抗原结合结构域

[0109] 如上文所论述,本文所述的CAR包含抗原结合结构域。如本文所使用,“抗原结合结构域”意指结合指定靶抗原的任何多肽。在一些实施例中,抗原结合结构域结合于肿瘤细胞上的抗原。在一些实施例中,抗原结合结构域结合于涉及过度增殖性疾病的细胞上的抗原。

[0110] 在一些实施例中,抗原结合结构域包含本文所述的可变重链、可变轻链和/或一个或多个CDR。在一些实施例中,抗原结合结构域为单链可变片段(scFv),其包含轻链CDR CDR1、CDR2和CDR3,和重链CDR CDR1、CDR2和CDR3。

[0111] 抗原结合结构域的变体(例如CDR的变体、VH和/或VL)也在本公开的范围,例如各自具有与抗原结合结构域序列的氨基酸序列至少70-80%、80-85%、85-90%、90-95%、95-97%、97-99%或高于99%一致性的可变轻链和/或可变重链。在一些情况下,此类分子包括至少一个重链和一个轻链,而在其它情况下,变体形式含有两个可变轻链和两个可变重链(或其子部分)。所属领域的技术人员将能够使用众所周知的技术确定如本文所阐述的抗原结合结构域的合适的变体。在某些实施例中,所属领域的技术人员可以鉴别分子的合适区域,其可以在不破坏活性的情况下通过靶向未被认为对活性重要的区域而改变。

[0112] 在某些实施例中,抗原结合结构域的多肽结构基于抗体,分别包括但不限于单克隆抗体、双特异性抗体、微型抗体、结构域抗体、合成抗体(本文有时称为“抗体模拟物”)、嵌合抗体、人源化抗体、人类抗体、抗体融合体(本文有时称为“抗体结合物”)和其片段。在一些实施例中,抗原结合结构域包含高亲合性多聚体(avimer)或由其组成。

[0113] 当抗原结合结构域与其结合于第二靶标相比更紧密地结合于一个靶标时,称其为“选择性的”。

[0114] 在一些实施例中,抗原结合结构域为scFv。

[0115] 在一些实施例中,抗原-选择性CAR包含前导或信号肽。

[0116] 在其它实施例中,本公开涉及编码本文所述的抗原结合结构域中的任一者的分离的多核苷酸。在一些实施例中,本公开涉及编码CAR的分离的多核苷酸。本文还提供包含多核苷酸的载体和其制备方法。

[0117] ii. 安全开关和单克隆抗体特异性-表位

[0118] 应当理解,可以通过用自杀基因转导免疫细胞(含有一个或多个CAR)来将不良事件减到最少。还可能需要将诱导型“开启”或“加速器”开关并入免疫细胞中。合适的技术包括在用本公开的CAR构建体转导细胞之前、之后或同时使用诱导型半胱天冬酶-9(美国申请案2011/0286980)或胸苷激酶。用于引入自杀基因和/或“开启”开关的其它方法包括TALENs、锌指、RNAi、siRNA、shRNA、反义技术以及所属领域已知的其它技术。

[0119] 根据本公开,可将其它开/关型或其它类型的控制开关技术并入本文中。这些技术可使用二聚结构域和此类结构域二聚的任选的活化剂。这些技术包括例如由Wu等人,《科学(Science)》2014 350(6258)描述的在某些细胞中利用FKBP/Rapalog二聚系统的那些技术,其内容以全文引用的方式并入本文中。其它二聚技术描述于例如Fegan等人,《化学综述(Chem.Rev.)》2010,110,3315-3336以及美国专利第5,830,462号;第5,834,266号;第5,869,337号;和第6,165,787号,其内容也以全文引用的方式并入本文中。其它二聚对可包括环孢灵-A/亲环蛋白、受体、雌激素/雌激素受体(任选地使用他莫昔芬)、糖皮质激素/糖皮

质激素受体、四环素/四环素受体、维生素D/维生素D受体。二聚技术的其它实例可见于例如WO 2014/127261、WO 2015/090229、US 2014/0286987、US2015/0266973、US2016/0046700、美国专利第8,486,693号、第US 2014/0171649号和第US 2012/0130076号,其内容以全文引用的方式进一步并入本文中。

[0120] 在一些实施例中,本公开的CAR免疫细胞(例如CAR-T细胞)包含编码自杀多肽的多核苷酸,例如RQR8。参见例如WO2013153391A,其以全文引用的方式并入本文中。在包含多核苷酸的CAR免疫细胞(例如CAR-T细胞)细胞中,自杀多肽在CAR免疫细胞(例如CAR-T细胞)的表面处表达。在一些实施例中,自杀多肽包含SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列。

[0121] CPYSNP SLCSGGGGSELPTQGTF SNVSTNVSPAKPTTTAC PYSNP SLCSGGGGSP

[0122] APRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVV (SEQ ID NO:1)。

[0123] 自杀多肽还可包含氨基端处的信号肽,例如MGTSLLCWMALCLLGADHADA (SEQ ID NO:2)。在一些实施例中,自杀多肽包含SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列,其包括SEQ ID NO:2的信号序列。

[0124] MGTSLLCWMALCLLGADHADAC PYSNP SLCSGGGGSELPTQGTF SNVSTNVSPAKPTTTAC PYSNP SLCSGGGGSPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVV (SEQ ID NO:3)。

[0125] 当自杀多肽在CAR免疫细胞(例如CAR-T细胞)的表面处表达时,利妥昔单抗(rituximab)与多肽的R表位的结合引起细胞裂解。在细胞表面处表达的每个多肽可结合超过一个利妥昔单抗分子。多肽的每个R表位可结合利妥昔单抗的单独分子。抗原特异性CAR免疫细胞(例如CAR-T细胞)的缺失可在体内发生,例如通过向患者授予利妥昔单抗。删除转移细胞的决定可能由患者中检测到的可归因于转移细胞的不合需要的影响,如当检测到不可接受的毒性水平时而产生。

[0126] 在一些实施例中,自杀多肽在细胞表面上表达。在一些实施例中,CAR构建体中包括自杀多肽。在一些实施例中,自杀多肽不是CAR构建体的一部分。

[0127] 在一些实施例中,抗原特异性CAR的细胞外结构域可包含对(即,特异性地由其识别)单克隆抗体具有特异性的一个或多个表位。这些表位在本文中也被称为mAb特异性表位。示例性mAb特异性表位公开于国际专利公开案第WO 2016/120216中,其以全文引用的方式并入本文中。在这些实施例中,CAR的细胞外结构域包含特异性结合于抗原的抗原结合结构域和结合于一个或多个单克隆抗体(mAb)的一个或多个表位。包含mAb特异性表位的CAR可以是单链或多链。

[0128] 在本文所述的CAR的细胞外结构域中包括对单克隆抗体具有特异性的表位使得可分选和耗尽表达CAR的工程改造的免疫细胞。在一些实施例中,这一特征还促进通过授予表达CAR的工程改造的免疫细胞耗尽的内源性抗原表达细胞的恢复。在一些实施例中,在有害影响的情况下,例如在向受试者授予时,允许耗尽提供安全开关。

[0129] 因此,在一些实施例中,本公开涉及一种用于分选和/或耗尽具有包含mAb特异性表位的CAR的工程改造的免疫细胞的方法和用于促进内源性抗原表达细胞的恢复的方法。

[0130] 数种表位-单克隆抗体偶联可用于产生包含单克隆抗体特异性表位的CAR;确切地说,已批准用于医学用途的那些表位,如作为非限制性实例的CD20表位/利妥昔单抗。

[0131] 抗原还涵盖分选赋予表达一种或多种mAb特异性表位的抗原特异性CAR的工程改造的免疫细胞的方法和治疗方法,其中赋予这些CAR的工程改造的免疫细胞的活化通过使用靶向所述CAR的外配体结合结构域的抗体耗尽细胞来调节。表1提供了可插入本公开的CAR中的任一个的细胞外结构域中的示例性模拟表位序列。

[0132] 表1.示例性模拟表位序列

[0133]

利妥昔单抗		
模拟表位	SEQ ID NO: 4	CPYSNPSLC
帕利珠单抗 (Palivizumab)		
表位	SEQ ID NO: 5	NSELLSLINDMPITNDQKKLMSNN
西妥昔单抗 (Cetuximab)		
模拟表位 1	SEQ ID NO: 6	CQFDLSTRRLKC
模拟表位 2	SEQ ID NO: 7	CQYNLSSRALKC
模拟表位 3	SEQ ID NO: 8	CVWQRWQKSYVC
模拟表位 4	SEQ ID NO: 9	CMWDRFSRWYKC
纳武单抗 (Nivolumab)		
表位 1	SEQ ID NO: 10	SFVLNWyRMSPSNQTDKLAAPEDR
表位 2	SEQ ID NO: 11	SGTYLCGAISLAPKAQIKE
QBEND-10		
表位 1	SEQ ID NO: 12	ELPTQGTFNSVSTNVS
表位 2	SEQ ID NO: 25	ELPTQGTFNSVSTNVSPAKPTTTA
阿仑单抗 (Alemtuzumab)		
表位	SEQ ID NO: 13	GQNDTSQTSSPS

[0134] 在一些实施例中,CAR的细胞外结合结构域包含以下序列

[0135] $V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -表位1- $(L)_x$;

[0136] $V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -表位1- $(L)_x$ -表位2- $(L)_x$;

[0137] $V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -表位1- $(L)_x$ -表位2- $(L)_x$ -表位3- $(L)_x$;

[0138] $(L)_x$ -表位1- $(L)_x-V_1-L_1-V_2$;

[0139] $(L)_x$ -表位1- $(L)_x$ -表位2- $(L)_x-V_1-L_1-V_2$;

[0140] 表位1- $(L)_x$ -表位2- $(L)_x$ -表位3- $(L)_x-V_1-L_1-V_2$;

[0141] $(L)_x$ -表位1- $(L)_x-V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -表位2- $(L)_x$;

[0142] $(L)_x$ -表位1- $(L)_x-V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -表位2- $(L)_x$ -表位3- $(L)_x$;

[0143] $(L)_x$ -表位1- $(L)_x-V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -表位2- $(L)_x$ -表位3- $(L)_x$ -表位4- $(L)_x$;

[0144] $(L)_x$ -表位1- $(L)_x$ -表位2- $(L)_x-V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -表位3- $(L)_x$;

[0145] $(L)_x$ -表位1- $(L)_x$ -表位2- $(L)_x-V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -表位3- $(L)_x$ -表位4- $(L)_x$;

[0146] $V_1-(L)_x$ -表位1- $(L)_x-V_2$;

[0147] $V_1-(L)_x$ -表位1- $(L)_x-V_2-(L)_x$ -表位2- $(L)_x$;

[0148] $V_1-(L)_x$ -表位1- $(L)_x-V_2-(L)_x$ -表位2- $(L)_x$ -表位3- $(L)_x$;

[0149] $V_1 - (L)_x - \text{表位1} - (L)_x - V_2 - (L)_x - \text{表位2} - (L)_x - \text{表位3} - (L)_x - \text{表位4} - (L)_x$;

[0150] $(L)_x - \text{表位1} - (L)_x - V_1 - (L)_x - \text{表位2} - (L)_x - V_2$; 或,

[0151] $(L)_x - \text{表位1} - (L)_x - V_1 - (L)_x - \text{表位2} - (L)_x - V_2 - (L)_x - \text{表位3} - (L)_x$;

[0152] 其中,

[0153] V_1 是 V_L 并且 V_2 是 V_H 或 V_1 是 V_H 并且 V_2 是 V_L ;

[0154] L_1 是适合于将 V_H 链连接到 V_L 链的连接子;

[0155] 表位1、表位2、表位3和表位4是mAb特异性表位,并且可以相同或不同,并且其中 V_H 是重链可变片段并且 V_L 是轻链可变片段。

[0156] iii. 铰链结构域

[0157] 本公开的CAR的细胞外结构域可包含“铰链”结构域(或铰链区)。术语通常针对用以将CAR中的跨膜结构域连接到CAR中的细胞外抗原结合结构域的任何多肽。确切地说,铰链域可用于提供细胞外抗原结合结构域的更多灵活性和可接入性。

[0158] 铰链结构域可包含至多300个氨基酸-在一些实施例中10到100个氨基酸或在一些实施例中,25到50个氨基酸。铰链结构域可衍生自天然存在的分子的全部或部分,如衍生自CD8、CD4、CD28、4-1BB或IgG的细胞外区的全部或部分(确切地说,IgG的铰链区;应了解,铰链区可含有免疫球蛋白家族的成员中的一些或全部,如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgD、IgE、IgM或其片段),或衍生自抗体重链恒定区的全部或部分。或者,A结构域可以是对应于天然存在的A序列的合成序列,或者可以是完全合成的A序列。在一些实施例中,所述A结构域为人类CD8 α 链(例如,NP_001139345.1)的一部分。在另一特定实施例中,所述铰链和跨膜结构域包含人类CD8 α 链的一部分。在一些实施例中,本文所述的CAR的铰链结构域包含CD8 α 、IgG1、IgG4、PD-1或Fc γ RIII α 的子序列,确切地说,CD8 α 、IgG1、IgG4、PD-1或Fc γ RIII α 中的任一者的铰链区。在一些实施例中,铰链结构域包含人类CD8 α 铰链、人类IgG1铰链、人类IgG4、人类PD-1或人类Fc γ RIII α 铰链。在一些实施例中,本文所公开的CAR包含scFv、CD8 α 人类铰链和跨膜结构域、CD3 ζ 信号传导结构域和4-1BB信号传导结构域。表2提供了本文所提供的示例性铰链的氨基酸序列。

[0159] 表2. 示例性铰链

结构域	氨基酸序列	SEQ ID NO:
Fc γ RIII α 铰链	GLAVSTISSFFPPGYQ	14
CD8 α 铰链	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH TRGLDFACD	15
IgG1 铰链	EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLM IARTPEVTCV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPV LDSGDGFLLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK	16

[0160] iv. 跨膜结构域

[0162] 本公开的CAR设计为具有与CAR的细胞外结构域融合的跨膜结构域。其可类似地与

CAR的胞内结构域融合。在一些情况下,跨膜结构域可通过氨基酸取代来选择或修饰的,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,从而使与受体复合物的其它成员的相互作用最小化。在一些实施例中,短连接子可在CAR的细胞外、跨膜和胞内结构域中的任一者或一些之间形成键联。

[0163] 本文所公开的CAR的合适的跨膜结构域具有以下能力:(a)在表面上表达免疫细胞,例如但不限于淋巴细胞,如T辅助细胞(T_H)细胞、细胞毒性T(T_C)细胞、T调节(T_{reg})细胞或自然杀伤细胞(NK)细胞,和/或(b)与细胞外抗原结合结构域和胞内信号传导结构域相互作用,以引导免疫细胞针对靶细胞的细胞应答。

[0164] 跨膜结构域可衍生自天然或合成来源。当来源是天然的时,所述结构域可衍生自任何膜结合或跨膜蛋白。

[0165] 本公开中特定用途的跨膜区可衍生自(包含或对应于)CD28、OX-40、4-1BB/CD137、CD2、CD7、CD27、CD30、CD40、程序性死亡-1(PD-1)、诱导型T细胞共刺激分子(ICOS)、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1、CD1-1a/CD18)、CD3 γ 、CD3 δ 、D3 ϵ 、CD247、CD276(B7-H3)、LIGH、(TNFSF14)、NKG2C、Iga(CD79a)、DAP-10、Fc γ 受体、MHC I类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白蛋白、细胞因子受体、整合素、信号传导淋巴细胞活化分子(SLAM蛋白)、活化NK细胞受体、BTLA、Toll配体受体、ICAM-1、B7-H3、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL-2R β 、IL-2R γ 、IL-7R α 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a,与CD83特异性结合的配体,或其任何组合。

[0166] 作为非限制性实例,跨膜区可衍生自或为T细胞受体的一部分(如 α 、 β 、 γ 或 δ)、构成CD3复合物、IL-2受体p55(α 链)、p75(β 链)或 γ 链的多肽、Fc受体(确切地说,Fc γ 受体III)的亚单位链或CD蛋白质。或者,跨膜结构域可以是合成的并且可主要包含疏水性残基,如亮氨酸和缬氨酸。在一些实施例中,所述跨膜结构域衍生自人类CD8 α 链(例如NP_001139345.1)。

[0167] 在一些实施例中,本公开的CAR中的跨膜结构域为CD8 α 跨膜结构域。在一些实施例中,本公开的CAR中的跨膜结构域为包含氨基酸序列IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT(SEQ ID NO:[1])的CD8 α 跨膜结构域。在一些实施例中,CD8 α 跨膜结构域包含编码SEQ ID NO:17的跨膜氨基酸序列的核酸序列。在一些实施例中,本公开的CAR中的铰链和跨膜结构域是包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的CD8 α 铰链和跨膜结构域。

[0168] 在一些实施例中,本公开的CAR中的跨膜结构域是CD28跨膜结构域。在一些实施例中,本公开的CAR中的跨膜结构域是包含FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV(SEQ ID NO:[1])的氨基酸序列的CD28跨膜结构域。在一些实施例中,CD28跨膜结构域包含编码SEQ ID NO:18的跨膜氨基酸序列的核酸序列。

[0169] v. 胞内结构域

[0170] 本公开的CAR的胞内(细胞质)结构域可提供包含CAR的免疫细胞的正常效应功能的至少一者的活化。例如,T细胞的效应功能可指细胞裂解活性或辅助细胞活性,包括细胞因子的分泌。

[0171] 在一些实施例中,供用于CAR中的活化胞内信号传导结构域可为例如(但不限于)T细胞受体和在抗原受体结合后协调作用以发起信号转导的共受体的细胞质序列,以及这些序列和具有相同功能能力的任何合成序列的任何衍生物或变体。

[0172] 应了解,合适的(例如活化)胞内结构域包括(但不限于)衍生自(或对应于)以下的信号传导结构域:CD28、OX-40、4-1BB/CD137、CD2、CD7、CD27、CD30、CD40、程序性死亡-1(PD-1)、诱导型T细胞共刺激分子(ICOS)、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1、CD1-1a/CD18)、CD3 γ 、CD3 δ 、D3 ϵ 、CD247、CD276(B7-H3)、LIGHT、(TNFSF14)、NKG2C、Ig α (CD79a)、DAP-10、Fc γ 受体、MHC I类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白蛋白、细胞因子受体、整合素、信号传导淋巴细胞活化分子(SLAM蛋白)、活化NK细胞受体、BTLA、To11配体受体、ICAM-1、B7-H3、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL-2R β 、IL-2R γ 、IL-7R α 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD1-1d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD1-1a、LFA-1、ITGAM、CD1-1b、ITGAX、CD1-1c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRT AM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a,与CD83特异性结合的配体,或其任何组合。

[0173] 本公开的CAR的胞内结构域除了上述活化结构域之外,还可并入共刺激信号传导结构域(在本文中可互换地称为共刺激分子)以增加其效力。共刺激结构域可提供除如本文所述的活化分子所提供的初级信号之外的信号。

[0174] 应了解,本公开的范围内的合适的共刺激结构域可衍生自(或对应于)例如,CD28、OX40、4-1BB/CD137、CD2、CD3(α 、 β 、 δ 、 ϵ 、 γ 、 ζ)、CD4、CD5、CD7、CD9、CD16、CD22、CD27、CD30、CD33、CD37、CD40、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1(CD1-1a/CD18)、CD247、CD276(B7-H3)、LIGHT(肿瘤坏死因子超家族成员14;TNFSF14)、NKG2C、Ig α (CD79a)、DAP-10、Fc γ 受体、MHC I类分子、TNFR、整合素、信号传导淋巴细胞活化分子、BTLA、To11配体受体、ICAM-1、B7-H3、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL-2R β 、IL-2R γ 、IL-7R α 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD1-1d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD1-1a、LFA-1、ITGAM、CD1-1b、ITGAX、CD1-1c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRT AM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、CD83配体,或片段或其组合。应了解,上文未列出的额外共刺激分子或其片段在本公开的范围。

[0175] 在一些实施例中,CAR的胞内/细胞质结构域可设计成自身包含4-1BB/CD137结构域或与适用于本公开的CAR的情形的任何其它所需胞内结构域组合。4-1BB/CD137的完整天

然氨基酸序列描述于NCBI参考序列:NP_001552.2。完整的天然4-1BB/CD137核酸序列描述于NCBI参考序列:NM_001561.5。

[0176] 在一些实施例中,CAR的胞内/细胞质结构域可设计成自身包含CD28结构域或与适用于本公开的CAR的情形的任何其它所需胞内结构域组合。CD28的完整天然氨基酸序列描述于NCBI参考序列:NP_006130.1。完整的天然CD28核酸序列描述于NCBI参考序列:NM_006139.1。

[0177] 在一些实施例中,CAR的胞内/细胞质结构域可设计成自身包含CD3 ζ 结构域或与适用于本公开的CAR的情形的任何其它所需胞内结构域组合。在一些实施例中,CAR的胞内信号传导结构域可包含CD3 ζ 信号传导结构域,其具有与SEQ. ID NO:19或SEQ. ID NO:26中所示的氨基酸序列至少约70%,例如至少80%、至少90%、95%、97%或99%序列一致性的氨基酸序列。

[0178] LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM AEAYSEIGMKGERRRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR (SEQ ID NO:19)

[0179] LRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM AEAYSEIGMKGERRRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR (SEQ ID NO:26)

[0180] 例如,CAR的胞内结构域可包含CD3 ζ 链部分和共刺激信号传导分子的一部分。本公开的CAR的胞内信号传导部分内的胞内信号传导序列可随机或以指定顺序彼此连接。在一些实施例中,胞内结构域设计成包含CD3 ζ 的活化结构域和CD28的信号传导结构域。在一些实施例中,胞内结构域设计成包含CD3 ζ 的活化结构域和4-1BB的信号传导结构域。

[0181] 在一些实施例中,4-1BB(胞内结构域)包含氨基酸序列KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO:20)。在一些实施例中,4-1BB(胞内结构域)由核酸序列:

[0182] AAGCGCGCAGGAAGAAGCTCCTCTACATTTTTAAGCAGCCTTTTATGAGGCCCGTACAGACAACACA GGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCAGATTTCCCAGGAGGAGGAAGGTGGGTGCGAGCTG (SEQ ID NO:21) 编码。

[0183] 在一些实施例中,CAR中的胞内结构域设计成包含CD28和CD3 ζ 的一部分,其中胞内CD28包含SEQ ID NO:22

[0184] AGATCCAAAAGAAGCCGCTGCTCCATAGCGATTACATGAATATGACTCC

[0185] ACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACTACCAGCCTTACGCACCACCTAGAGATTTGCTGCCTATC GGAGC (SEQ ID NO:22) 中所示的核酸序列。

[0186] 在一些实施例中,CAR中的胞内结构域设计成包含氨基酸序列RSKRSRLHSDYMNMT PRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (EQ ID NO:23)。CD3 ζ 氨基酸序列可包含SEQ ID NO:23,并且核酸序列可包含SEQ ID NO:24:

[0187] AGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGA GCTCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTGGACAAGCGCAGAGGACGGGACCCTGAGATGGGTGGCAAA CCAAGACGAAAAAACCCCAGGAGGTCTCTATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAGCCTATTCTGAAA TAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGAAGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTTGTACCAGGGACTCAGCACTGCTACGAAGGA TACTTATGACGCTCTCCACATGCAAGCCCTGCCACCTAGG (SEQ ID NO:24)。

[0188] 在一些实施例中,本公开的CAR的胞内信号传导结构域包含共刺激分子的结构域。在一些实施例中,本公开的CAR的胞内信号传导结构域包含选自由4-1BB(基因库:

AAA53133.)和CD28(NP_006130.1)的片段组成的群组的共刺激分子的一部分。在一些实施例中,本公开的CAR的胞内信号传导结构域包含氨基酸序列,其包含与SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:22中所示的氨基酸序列的至少70%、至少80%、至少90%、95%、97%或99%序列一致性。在一些实施例中,本公开的CAR的胞内信号传导结构域包含氨基酸序列,其包含与SEQ ID NO:20中所示的氨基酸序列的至少70%、至少80%、至少90%、95%、97%或99%序列一致性和/或与SEQ ID NO:22中所示的氨基酸序列的至少70%、至少80%、至少90%、95%、97%或99%序列一致性。

[0189] c. 包含CAR的免疫细胞

[0190] 本文提供表达本公开的CAR的工程改造的免疫细胞(例如,CAR-T细胞)。

[0191] 在一些实施例中,工程改造的免疫细胞包含CAR群体,每个CAR包含细胞外抗原结合结构域。在一些实施例中,工程改造的免疫细胞包含CAR群体,每个CAR包含不同的细胞外抗原结合结构域。在一些实施例中,免疫细胞包含CAR群体,每个CAR包含相同的细胞外抗原结合结构域。

[0192] 工程改造的免疫细胞可以是同种异体或自体的。

[0193] 在一些实施例中,工程改造的免疫细胞为T细胞(例如发炎性T淋巴细胞细胞毒性T淋巴细胞、调节T淋巴细胞、辅助T淋巴细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL))、NK细胞、NK-T细胞、TCR表达细胞、树突状细胞、杀手树突状细胞、肥大细胞或B细胞。在一些实施例中,细胞可衍生自由CD4+T淋巴细胞和CD8+T淋巴细胞组成的群组。在一些示例性实施例中,工程改造的免疫细胞为T细胞。在一些示例性实施例中,工程改造的免疫细胞为 $\gamma\delta$ T细胞。在一些示例性实施例中,工程改造的免疫细胞为巨噬细胞。

[0194] 在一些实施例中,工程改造的免疫细胞可衍生自例如(但不限于)干细胞。干细胞可以是成体干细胞、非人类胚胎干细胞、更确切地说,非人类干细胞、脐血干细胞、祖细胞、骨髓干细胞、诱导多能干细胞、全能干细胞或造血干细胞。

[0195] 在一些实施例中,细胞获自外周血或由其制备。在一些实施例中,细胞获自外周血单核细胞(PBMC)或由其制备。在一些实施例中,细胞获自骨髓或由其制备。在一些实施例中,细胞获自脐血或由其制备。在一些实施例中,细胞是人类细胞。在一些实施例中,细胞由核酸载体使用选自由以下组成的群组的方法转染或转导:电穿孔、声致穿孔、基因枪(例如,基因枪(Gene Gun))、脂质转染、聚合物转染、纳米粒子、病毒转染(例如,逆转录病毒、慢病毒、AAV)或聚合复合物。

[0196] 在一些实施例中,在其细胞表面膜处表达本公开的抗原特异性CAR的工程改造的免疫细胞包含大于10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的干细胞记忆和中央记忆细胞的百分比。

[0197] 在一些实施例中,在其细胞表面膜处表达本公开的抗原特异性CAR的工程改造的免疫细胞包含约10%到约100%、约10%到约90%、约10%到约80%、约10%到约70%、约10%到约60%、约10%到约50%、约10%到约40%、约10%到约30%、约10%到约20%、约15%到约100%、约15%到约90%、约15%到约80%、约15%到约70%、约15%到约60%、约15%到约50%、约15%到约40%、约15%到约30%、约20%到约100%、约20%到约90%、约20%到约80%、约20%到约70%、约20%到约60%、约20%到约50%、约20%到约40%、约20%到约30%、约30%到约100%、约30%到约90%、约30%到约80%、约30%到约70%、约

30%到约60%、约30%到约50%、约30%到约40%、约40%到约100%、约40%到约90%、约40%到约80%、约40%到约70%、约40%到约60%、约40%到约50%、约50%到约100%、约50%到约90%、约50%到约80%、约50%到约70%、约50%到约60%、约60%到约100%、约60%到约90%、约60%到约80%、约60%到约70%、约70%到约90%、约70%到约80%、约80%到约100%、约80%到约90%、约90%到约100%、约25%到约50%、约75%到约100%，或约50%到约75%的干细胞记忆和中央记忆细胞的百分比。

[0198] 在一些实施例中，在其细胞表面膜处表达本公开的抗原特异性CAR的工程改造的免疫细胞包含大于10%、20%、30%、40%、50%、60%的干细胞记忆和中央记忆细胞的百分比。

[0199] 在一些实施例中，在其细胞表面膜处表达本公开的抗原特异性CAR的工程改造的免疫细胞包含约10%到约60%、约10%到约50%、约10%到约40%、约15%到约50%、约15%到约40%、约20%到约60%，或约20%到约70%的干细胞记忆和中央记忆细胞的百分比。

[0200] 在一些实施例中，在其细胞表面膜处表达本公开的抗原特异性CAR的工程改造的免疫细胞富集 T_{CM} 和/或 T_{SCM} 细胞，使得工程改造的免疫细胞包含至少约60%、65%、70%、75%或80%的组合 T_{CM} 和 T_{SCM} 细胞。在一些实施例中，在其细胞表面膜处表达本公开的抗原特异性CAR的工程改造的免疫细胞富集 T_{CM} 和/或 T_{SCM} 细胞，使得工程改造的免疫细胞包含至少约70%的组合 T_{CM} 和 T_{SCM} 细胞。在一些实施例中，在其细胞表面膜处表达本公开的抗原特异性CAR的工程改造的免疫细胞富集 T_{CM} 和/或 T_{SCM} 细胞，使得工程改造的免疫细胞包含至少约75%的组合 T_{CM} 和/或 T_{SCM} 细胞。

[0201] 在一些实施例中，在其细胞表面膜处表达本公开的抗原特异性CAR的工程改造的免疫细胞富集 T_{CM} 和/或 T_{SCM} 细胞，使得工程改造的免疫细胞包含至少约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%或60%的 T_{SCM} 细胞。在一些实施例中，在其细胞表面膜处表达本公开的抗原特异性CAR的工程改造的免疫细胞富集 T_{CM} 和/或 T_{SCM} 细胞，使得工程改造的免疫细胞包含至少约30%、35%、40%或45%的 TT_{SCM} 细胞。

[0202] 在一些实施例中，免疫细胞为表达本文所述的CAR中的任一种的炎性T淋巴细胞。在一些实施例中，免疫细胞为表达本文所述的CAR中的任一种的细胞毒性T淋巴细胞。在一些实施例中，免疫细胞为表达本文所述的CAR中的任一种的调节T淋巴细胞。在一些实施例中，免疫细胞为表达本文所述的CAR中的任一种的辅助T淋巴细胞。

[0203] 本文还提供根据上述方法中的任一种由转化的免疫细胞（例如，T细胞）获得的细胞系。本文还提供对免疫抑制治疗具有抗性的修饰细胞。在一些实施例中，根据本公开的分离细胞包含编码CAR的多核苷酸。

[0204] 在一些实施例中，根据本公开的工程改造的免疫细胞可包含一种或多种破坏或失活的基因。在一些实施例中，根据本公开的工程改造的免疫细胞包含一种破坏或失活的基因，其选自由以下组成的群组：CD52、DLL3、GR、PD-1、CTLA-4、LAG3、TIM3、BTLA、BY55、TIGIT、B7H5、LAIR1、SIGLEC10、2B4、HLA、TCR α 和TCR β ；和/或表达CAR、多链CAR和/或pTa转基因。在一些实施例中，分离细胞包含编码包含多链CAR的多肽的多核苷酸。在一些实施例中，根据本公开的分离细胞包含两个破坏或失活的基因，所述基因选自由以下组成的群组：CD52和GR、CD52和TCR α 、CD52和TCR β 、DLL3和CD52、DLL3和TCR α 、DLL3和TCR β 、GR和TCR α 、GR和TCR β 、TCR α 和TCR β 、PD-1和TCR α 、PD-1和TCR β 、CTLA-4和TCR α 、CTLA-4和TCR β 、LAG3和TCR α 、LAG3和

TCR β 、TIM3和TCR α 、Tim3和TCR β 、BTLA和TCR α 、BTLA和TCR β 、BY55和TCR α 、BY55和TCR β 、TIGIT和TCR α 、TIGIT和TCR β 、B7H5和TCR α 、B7H5和TCR β 、LAIR1和TCR α 、LAIR1和TCR β 、SIGLEC10和TCR α 、SIGLEC10和TCR β 、2B4和TCR α 、2B4和TCR β ；和/或表达CAR、多链CAR和pTa转基因。在一些实施例中，所述方法包含通过将能够通过选择性DNA裂解使基因选择性地失活的核酸内切酶引入细胞中而使一种或多种基因破坏或失活。在一些实施例中，核酸内切酶可以是例如锌指核酸酶 (ZFN)、megaTAL核酸酶、大范围核酸酶 (TALE-核酸酶) 转录活化剂样效应核酸酶 (TALE-核酸酶)，或CRIPR (例如，Cas9) 核酸内切酶。

[0205] 在一些实施例中，通过使TCR α 基因和/或TCR β 基因破坏或失活，使TCR在根据本公开的细胞中呈现为非功能性的。在一些实施例中，提供一种获得来源于个体的修饰细胞的方法，其中所述细胞可不依赖于主要组织相容性复合体 (MHC) 信号传导路径增殖。易于通过这一方法获得的可不依赖于MHC信号传导路径增殖的修饰细胞涵盖于本公开的范围中。本文所公开的修饰细胞可用于治疗需要对抗宿主抗移植物 (HvG) 排斥反应和移植物抗宿主疾病 (GvHD) 的患者；因此，在本公开的范围中，是一种治疗需要对抗宿主抗移植物 (HvG) 排斥反应和移植物抗宿主疾病 (GvHD) 的患者，其包含通过将有效量的修饰细胞投予所述患者来治疗所述患者，所述修饰细胞包含破坏或失活的TCR α 和/或TCR β 基因。

[0206] 在一些实施例中，免疫细胞被工程改造而对一种或多种化疗药物具有抗性。所述化疗药物可为例如，嘌呤核苷酸类似物 (PNA)，由此使得免疫细胞适用于进行结合过继免疫治疗和化疗的癌症治疗。示例性PNA包括例如氯法拉滨 (clofarabine)、氟达拉滨 (fludarabine) 和环磷酰胺及阿糖胞苷，其呈单独或组合形式。PNA是通过脱氧胞苷激酶 (dCK) 代谢成单、二和三磷酸酯PNA。其三磷酸酯形式与ATP竞争DNA合成，充当促细胞凋亡剂，并为参与三核苷酸生产的核糖核苷酸还原酶 (RNR) 的有效抑制剂。

[0207] 在一些实施例中，本公开的分离细胞或细胞系可包含pTa或其功能变体。在一些实施例中，分离细胞或细胞系可通过使TCR α 基因破坏或失活而进一步进行遗传修饰。

[0208] 本公开还提供包含本文所述的CAR多核苷酸中的任一种的工程改造的免疫细胞。在一些实施例中，可经由质粒载体将CAR引入免疫细胞中作为转基因。在一些实施例中，质粒载体也可含有例如选择标记，其提供对接受载体的细胞的鉴别和/或选择。

[0209] 在将编码CAR多肽的多核苷酸引入细胞中之后，可在细胞中原位合成CAR多肽。或者，CAR多肽可在细胞外产生，并随后将其引入细胞中。将多核苷酸构建体引入细胞中的方法为所属领域中已知的。在一些实施例中，稳定转化方法 (例如使用慢病毒载体) 可用于将多核苷酸构建体整合到细胞的基因组中。在其它实施例中，可使用瞬时转化方法来瞬时表达多核苷酸构建体和未整合到细胞的基因组中的多核苷酸构建体。在其它实施例中，可使用病毒介导方法。可通过任何合适的手段，例如重组病毒载体 (例如逆转录病毒、腺病毒)、脂质体等将多核苷酸引入细胞中。瞬时转化方法包括例如 (但不限于) 微注射、电穿孔或粒子轰击。多核苷酸可包括于载体中，如质粒载体或病毒载体中。

[0210] 在一些实施例中，提供分离核酸，其包含可操作地连接到编码抗原结合结构域的第一多核苷酸的启动子、至少一种共刺激分子和活化结构域。在一些实施例中，核酸构建体含于病毒载体内。在一些实施例中，病毒载体选自由以下组成的群组：逆转录病毒载体、鼠类白血病病毒载体、SFG载体、腺病毒载体、慢病毒载体、腺病毒相关病毒 (AAV) 载体、疱疹病毒载体和牛痘病毒载体。在一些实施例中，核酸含于质粒内。

[0211] 3. 用于免疫细胞的体外扩增的细胞生长培养基

[0212] 可使用包含以下的细胞生长培养基实现细胞的体外扩增(包括免疫细胞(如遗传修饰的T细胞)的扩增):

[0213] 细胞增殖的第一刺激剂(例如,刺激T细胞增殖的第一细胞因子);

[0214] 细胞增殖的第二刺激剂(例如,刺激T细胞增殖的第二细胞因子);以及

[0215] 细胞代谢的细胞外调节剂(例如,T细胞代谢)。

[0216] 本公开的免疫细胞可以在免疫细胞的遗传修饰之前或之后,使用如通常已知的且如本文所述的方法活化和扩增。在一些实施例中,免疫细胞(例如T细胞)在免疫细胞的遗传修饰之前活化和扩增。在一些实施例中,免疫细胞(例如T细胞)在免疫细胞(例如工程改造的免疫细胞,包括本文所述的那些免疫细胞)的遗传修饰之后活化和扩增。

[0217] 因此,适用于T细胞扩增的条件包括适当的培养基(例如,最小必需培养基或RPMI培养基1640,或X-vivo 15,(龙沙(Lonza))),其包含细胞增殖(例如,IL-7和IL-15)的第一和第二刺激剂以及细胞代谢的细胞外调节剂(例如,细胞外钾),并且其可含有增殖和存活力所需的其它因素,包括血清(例如,胎牛或人类血清)、IL-2、胰岛素、IFN- γ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-2、IL-15、TGF β 和TNF,或所属领域的技术人员已知的用于细胞生长的任何其它添加剂。在一些实施例中,用于T细胞培养物的培养基不包括外源性IL-2。用于细胞生长的其它添加剂包括(但不限于)表面活性剂、血浆蛋白剂(plasmanate)和还原剂,如N-乙酰基-半胱氨酸和2-巯基乙醇。培养基可包括RPMI 1640、A1M-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo15和X-Vivo 20、优化剂(Optimizer)以及添加的氨基酸、丙酮酸钠和维生素、无血清或补充有适当量的血清(或血浆)或限定组的激素,和/或足够用于T细胞生长和扩增的量的的一种或多种细胞因子(例如,IL-7和/或IL-15)。抗生素(例如青霉素和链霉素)仅包括于实验培养物中,不包括于待输注到受试者中的细胞培养物中。靶细胞维持在支持生长所需的条件下,例如适当温度(例如37 $^{\circ}$ C)和大气(例如空气加5%CO $_2$)。

[0218] 已暴露于不同刺激时间的T细胞可展现不同特征。

[0219] 本文所述的方法还可包括使细胞与刺激CD3TCR复合物和T细胞表面上的共刺激分子的药剂接触以产生T细胞的活化信号。例如,如钙离子载体A23187、佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯(PMA)或促有丝分裂凝集素样植物血凝素(PHA)的化学物质可用于产生T细胞的活化信号。

[0220] 在一些实施例中,可通过与例如固定于表面的抗CD3抗体或其抗原结合片段或抗CD2抗体接触,或通过与结合钙离子载体的蛋白激酶C活化剂(例如苔藓抑素)接触来体外刺激T细胞群体。为了共刺激T细胞表面上的辅助分子,使用与辅助分子结合的配体。例如,在适合刺激T细胞增殖的条件下,T细胞群体可与抗CD3抗体和抗CD28抗体接触。抗CD3抗体和抗CD28抗体可安置于珠粒或板或其它衬底上。

[0221] 在一些实施例中,本公开的细胞可通过与组织或细胞共培养来扩增。在将细胞投予受试者之后,细胞还可以在体内,例如在受试者的血液中扩增。

[0222] 确切地说,细胞生长培养基和其使用方法可尤其适用于制造T细胞,包括如同种异体CAR-T细胞的CAR-T细胞。

[0223] a. 细胞增殖刺激剂

[0224] 在一些实施例中,第一和第二刺激剂选自:刺激CD3TCR复合物的药剂;抗CD3抗体

或其抗原结合片段;抗CD2抗体或其抗原结合片段;蛋白激酶C活化剂;或生长因子(例如,T细胞生长因子)或其任何组合。

[0225] 在一些实施例中,免疫细胞(例如,T细胞或工程改造的免疫细胞)的刺激剂为刺激CD3TCR复合物和T细胞表面上的共刺激分子以产生T细胞的活化信号的药剂。例如,如钙离子载体A23187、佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯(PMA)或促有丝分裂凝集素样植物血凝素(PHA)的化学物质可用于产生T细胞的活化信号。

[0226] 在一些实施例中,免疫细胞(例如,T细胞或工程改造的免疫细胞)的刺激剂是固定于表面上的抗CD3抗体或其抗原结合片段,或抗CD2抗体,或与钙离子载体结合的蛋白激酶C活化剂(例如苔藓抑素)。为了共刺激T细胞表面上的辅助分子,使用与辅助分子结合的配体。例如,在适合刺激T细胞增殖的条件下,T细胞群体可与抗CD3抗体和抗CD28抗体接触。抗CD3抗体和抗CD28抗体可安置于珠粒或板或其它衬底上。

[0227] 在一些实施例中,细胞的刺激剂为生长因子。在一些实施例中,细胞的刺激剂为T细胞生长因子。在一些实施例中,T细胞生长因子为细胞因子。在一些实施例中,第一刺激剂为第一细胞因子,并且第二刺激剂为第二细胞因子。在一些实施例中,细胞因子为白介素(例如IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-12或IL-15)。在一些实施例中,第一刺激剂和第二刺激剂选自自由IL-4、IL-7、IL-10、IL-12和IL-15组成的群组。

[0228] 在一些实施例中,第一刺激剂为IL-7,并且第二刺激剂为IL-15。

[0229] 在一些实施例中,细胞生长培养基不包括IL-2(例如细胞生长培养基不包括外源性IL-2,并且IL-2不作为第一刺激剂和/或第二刺激剂存在于细胞生长培养基中)。

[0230] 在一些实施例中,第一刺激剂和第二刺激剂的使用量以浓度(例如使用IU/mL)描述。因此,“x:y的浓度比”可用于描述第一刺激剂(例如,x IU/mL的IL-7)的浓度与第二刺激剂(例如,y IU/mL的IL-15)的浓度的比。

[0231] 在一些实施例中,第一刺激剂(例如第一细胞因子,如IL-7)和第二刺激剂(例如第二细胞因子,如IL-15)以约10000:1到约1:10000、约1000:1到约1:1000、约100:1到约1:100,或约10:1到约1:10的浓度比存在。

[0232] 在一些实施例中,第一刺激剂(例如第一细胞因子,如IL-7)以大于第二刺激剂(例如第二细胞因子,如IL-15)的量存在。在一些实施例中,第一刺激剂(例如第一细胞因子,如IL-7)和第二刺激剂(例如第二细胞因子,如IL-15)以约1000:1到约10:1、约900:1到约10:1、约800:1到约10:1、约700:1到约10:1、约600:1到约10:1、约500:1到约10:1、约400:1到约10:1、约300:1到约10:1、约250:1到约10:1、约200:1到约10:1、约150:1到约10:1,或约100:1到约4:1的浓度比存在。在一些实施例中,第一刺激剂(例如第一细胞因子,如IL-7)和第二刺激剂(例如第二细胞因子,如IL-15)以约1000:1到约50:1、约900:1到约50:1、约800:1到约50:1、约700:1到约50:1、约600:1到约50:1、约500:1到约50:1、约400:1到约50:1、约300:1到约50:1、约250:1到约50:1、约200:1到约50:1、约150:1到约50:1,或约100:1到约50:1的浓度比存在。在一些实施例中,第一刺激剂(例如第一细胞因子,如IL-7)和第二刺激剂(例如第二细胞因子,如IL-15)以约200:1到约10:1、约150:1到约10:1、约125:1到约10:1,或约100:1到约4:1的浓度比存在。在一些实施例中,第一刺激剂(例如第一细胞因子,如IL-7)和第二刺激剂(例如第二细胞因子,如IL-15)以约100:1的浓度比存在。在一些实施例中,第一刺激剂(例如第一细胞因子,如IL-7)和第二刺激剂(例如第二细胞因子,如IL-15)以约5:1、

约6:1或约7:1的浓度比存在。在一些实施例中,第一刺激剂(例如第一细胞因子,如IL-7)和第二刺激剂(例如第二细胞因子,如IL-15)以6.25:1的浓度比存在。

[0233] 在一些实施例中,第一刺激剂(例如第一细胞因子,如IL-7)以约100IU/mL到约20,000IU/mL的浓度存在。在一些实施例中,第二刺激剂(例如第二细胞因子,如IL-15)以约1IU/mL到约200IU/mL的浓度存在。

[0234] 在一些实施例中,第一刺激剂(例如第一细胞因子,如IL-7)以约100IU/mL到约10,000IU/mL的浓度存在。在一些实施例中,第二刺激剂(例如第二细胞因子,如IL-15)以约1IU/mL到约100IU/mL的浓度存在。

[0235] 在一些实施例中,第一刺激剂(例如第一细胞因子,如IL-7)以约100IU/mL到约1,000IU/mL、约300IU/mL到约5,000IU/mL,或约3,000IU/mL的浓度存在。在一些实施例中,第一刺激剂(例如第一细胞因子,如IL-7)以约3,000IU/mL或约5,000IU/mL的浓度存在。

[0236] 在一些实施例中,第一刺激剂(例如第一细胞因子,如IL-7)以约2500IU/mL到约7500IU/mL的浓度存在。在一些实施例中,第二刺激剂(例如第二细胞因子,如IL-15)以约25IU/mL到约75IU/mL的浓度存在。

[0237] 在一些实施例中,第一刺激剂(例如第一细胞因子,如IL-7)以约4000IU/mL到约6000IU/mL的浓度存在。在一些实施例中,第二刺激剂(例如第二细胞因子,如IL-15)以约40IU/mL到约60IU/mL的浓度存在。在一些实施例中,第二刺激剂(例如第二细胞因子,如IL-15)以约25IU/mL到约100IU/mL或约50IU/mL的浓度存在。

[0238] 在一些实施例中,第一刺激剂(例如第一细胞因子,如IL-7)以约5000IU/mL的浓度存在。在一些实施例中,第二刺激剂(例如第二细胞因子,如IL-15)以约50IU/mL的浓度存在。

[0239] 在一些实施例中,免疫细胞(例如T细胞,如遗传修饰的T细胞)与第一刺激剂(例如第一细胞因子,如IL-7)和第二刺激剂(例如第二细胞因子,如IL-15)一起每约一天、两天、三天、四天、五天、六天、七天或八天接触一次。在一些实施例中,免疫细胞(例如T细胞,如遗传修饰的T细胞)与第一刺激剂(例如第一细胞因子,如IL-7)和第二刺激剂(例如第二细胞因子,如IL-15)每约一周接触一次。在一些实施例中,免疫细胞(例如T细胞,如遗传修饰的T细胞)与第一刺激剂(例如第一细胞因子,如IL-7)和第二刺激剂(例如第二细胞因子,如IL-15)在持续约一天、两天、三天、四天、五天、六天、七天(例如约一周)、约两周、约三周,或约四周的扩增过程期间接触一次、两次、三次、四次、五次、六次、七次或八次。在一些实施例中,免疫细胞(例如T细胞,如遗传修饰的T细胞)与第一刺激剂(例如第一细胞因子,如IL-7)和第二刺激剂(例如第二细胞因子,如IL-15)接触约两周。

[0240] b. 细胞代谢的细胞外调节剂

[0241] 在一些实施例中,细胞生长培养基除如本文所述的第一刺激剂(例如第一细胞因子,如IL-7)和第二刺激剂(例如第二细胞因子,如IL-15)之外还包含细胞代谢的细胞外调节剂。

[0242] 在一些实施例中,细胞外调节剂是细胞外钾(K^+)。在一些实施例中,细胞外钾以约4mM到约50mM、约4mM到约40mM、约4mM到约30mM、约10mM到约40mM、约10mM到约30mM、约15mM到约40mM、约15mM到约35mM、约15mM到约30mM,或约20mM到约30mM的浓度存在。在一些实施例中,细胞外钾以约10mM到约30mM或约20mM到约30mM的浓度存在。

[0243] 在一些实施例中,细胞外钾以约8mM、9mM、10mM、11mM、12mM、13mM、14mM、15mM、16mM、17mM、18mM、19mM、20mM、21mM、22mM、23mM、24mM、25mM、26mM、27mM、28mM、29mM或30mM的浓度存在。

[0244] 在一些实施例中,细胞外钾以大于约15mM的浓度存在。在一些实施例中,细胞外钾以大于或等于约20mM的浓度存在。在一些实施例中,细胞外钾以约20mM、21mM、22mM、23mM、24mM、25mM、26mM、27mM、28mM、29mM或30mM的浓度存在。

[0245] 在一些实施例中,细胞外钾以不小于约10mM的浓度存在。在一些实施例中,细胞外钾以不小于约20mM的浓度存在。在一些实施例中,细胞外钾以不超过约30mM的浓度存在。在一些实施例中,细胞外钾以约25mM的浓度存在。

[0246] 在一些实施例中,细胞外钾以KCl形式提供。

[0247] c. 细胞生长培养基的其它特征和组分

[0248] 如本文所述的细胞生长培养基(例如,包含为IL-7的第一刺激剂、为IL-15的第二刺激剂和为细胞外钾的细胞外调节剂的细胞生长培养基)可用于所属领域中已知并且描述于例如美国专利第6,905,874号;美国专利第6,867,041号;美国专利第6,797,514号;以及PCT W02012/079000中的用于活化和扩增的各种方法,所述专利的内容特此以全文引用的方式并入本文中。

[0249] 在一些实施例中,方法还包含使PBMC或分离T细胞与通常附接到珠粒或其它表面的其它刺激分子和共刺激分子(如抗CD3和抗CD28抗体)在培养基中在适当细胞因子(如IL-2)下接触。附接到同一珠粒的抗CD3和抗CD28抗体充当“替代”抗原呈现细胞(APC)。一个实施例为针对人类T细胞的生理活化的Dynabeads®系统、CD3/CD28活化剂/刺激剂系统。在其它实施例中,T细胞可活化并且使用如美国专利第6,040,177号;美国专利第5,827,642号;以及W02012129514中描述的那些方法用饲养细胞和适当抗体以及其它细胞因子(例如除IL-7和IL-15之外)刺激以增殖,所述专利的内容特此以全文引用的方式并入本文中。在一些实施例中,细胞生长培养基和其使用方法排除作为T细胞生长因子的外源性IL-2。

[0250] 适用于T细胞培养物的其它条件包括适当的培养基(例如,最小必需培养基或RPMI培养基1640或X-vivo™培养基(龙沙),其可含有例如细胞增殖、增殖和活力的第一和第二刺激剂的另外的因子,包括血清(例如,胎牛或人类血清)、胰岛素、IFN- γ 、GM-CSF、TGF \cdot 以及TNF,或所属领域的技术人员已知的用于细胞生长的任何其它添加剂。用于细胞生长的其它添加剂包括(但不限于)表面活性剂、血浆蛋白剂和还原剂,如N-乙酰基-半胱氨酸和2-巯基乙醇。培养基可包括RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo™10、X-Vivo™15和X-Vivo™20、OpTmizer™,可包含添加的氨基酸、丙酮酸钠和/或维生素,并且可以是无血清的或补充有适当量的血清(或血浆)和/或限定组的激素。抗生素(例如青霉素和链霉素)仅包括于实验培养物中,不包括于待输注到受试者中的细胞培养物中。靶细胞维持在支持生长所需的条件下,例如适当温度(例如37°C)和大气(例如空气加5%CO₂)。已暴露于不同刺激时间的T细胞可展现不同特征。

[0251] 在一些实施例中,本公开的细胞可通过与组织或细胞共培养来扩增。在将细胞授予受试者之后,细胞还可以在体内,例如在受试者的血液中扩增。

[0252] 在一些实施例中,细胞生长培养基是含血清的。在一些实施例中,细胞生长培养基是无血清的。在一些实施例中,细胞生长培养基是无异种性的。在一些实施例中,细胞生长

培养基是化学定义的。

[0253] d. 细胞增殖

[0254] 在一些实施例中,使用本文所述的细胞生长培养基(例如,包含为IL-7的第一刺激剂、为IL-15的第二刺激剂,并且为细胞外钾的细胞外调节剂的细胞生长培养基)培养细胞(包括免疫细胞,如T细胞)用于体外扩增或本文所述的任何方法的持续时间为约一天、两天、三天、四天、五天、六天、七天(例如约一周)、约两周、约三周,或约四周。在一些实施例中,持续时间为约一周到约三周或约一周到约两周(例如,约7-15天或约10-14天)。

[0255] 在一些实施例中,本文所述的细胞生长培养基(例如,包含为IL-7的第一刺激剂、为IL-15的第二刺激剂和为细胞外钾的细胞外调节剂的细胞生长培养基)或本文所述的任何方法引起细胞扩增,所述扩增为约10到约10000倍,如在约一周到约三周的约一时段内所测量。在一些实施例中,在约7-15天内(例如,约10-14天内或约2周内)观察到约100到约1000倍的细胞扩增。在一些实施例中,在约7-15天内(例如,在约10-14天内或在约2周内)观察到至少约100倍的细胞扩增。在一些实施例中,在约7-15天内(例如,在约10-14天内或在约2周内)观察到至少约200倍的细胞扩增。

[0256] 在一些实施例中,本文所述的细胞生长培养基(例如,包含为IL-7的第一刺激剂、为IL-15的第二刺激剂和为细胞外钾的细胞外调节剂的细胞生长培养基)或用于细胞扩增的任何方法在约8-16天的时段内引起至少约 50×10^6 到约 100×10^6 的细胞计数。在一些实施例中,细胞计数在约10-14天的时段内为至少约 100×10^6 (例如,在约10-14天的时段内为至少约 100×10^6 、约 125×10^6 、约 150×10^6 ,或约 100×10^6)。

[0257] e. 细胞表现型

[0258] 在一些实施例中,本文所述的细胞生长培养基(例如,包含为IL-7的第一刺激剂、为IL-15的第二刺激剂和为细胞外钾的细胞外调节剂的细胞生长培养基)或其任何使用方法产生用于产生工程改造的免疫细胞的所需表现型。

[0259] 在一些实施例中,本文所述的T细胞生长培养基(例如,包含为IL-7的第一刺激剂、为IL-15的第二刺激剂和为细胞外钾的细胞外调节剂的细胞生长培养基)或其任何使用方法产生富集 T_{CM} 和 T_{SCM} 细胞的T细胞群体(例如,遗传修饰的T细胞)。

[0260] 在一些实施例中,富集 T_{CM} 和/或 T_{SCM} 细胞的T细胞群体(例如,遗传修饰的T细胞)包含至少约60%、65%、70%、75%或80%的组合 T_{CM} 和 T_{SCM} 细胞。在一些实施例中,富集 T_{CM} 和/或 T_{SCM} 细胞的T细胞群体包含至少约70%的组合 T_{CM} 和 T_{SCM} 细胞。在一些实施例中,富集 T_{CM} 和 T_{SCM} 细胞的T细胞群体(例如,遗传修饰的T细胞)包含至少约75%的组合 T_{CM} 和/或 T_{SCM} 细胞。

[0261] 在一些实施例中,富集 T_{CM} 和/或 T_{SCM} 细胞的T细胞群体(例如,遗传修饰的T细胞)包含至少约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%或60%的 T_{SCM} 细胞。在一些实施例中,富集 T_{CM} 和/或 T_{SCM} 细胞的T细胞群体包含至少约30%、35%、40%或45%的 T_{SCM} 细胞。

[0262] 4. 工程改造的免疫细胞(包括CAR T细胞)的制造

[0263] 本文提供使用本文所述的细胞生长培养基来制造免疫细胞(包括工程改造的免疫细胞,如CAR T细胞)的方法。

[0264] 多种已知技术可用于制备根据本公开的多核苷酸、多肽、载体、抗原结合结构域、免疫细胞、组合物等。

[0265] 在对本文所述的免疫细胞进行体外操纵或遗传修饰之前,可从受试者获得细胞。

表达CAR的细胞可衍生自同种异体或自体过程。

[0266] a. 源材料

[0267] 本文所述的细胞生长培养基(例如,包含IL-7+IL-15和增加的细胞外钾)可用于培养各种细胞,包括用于各种免疫细胞(例如,遗传修饰的T细胞)的体外扩增。本文描述了示例性细胞。

[0268] 在一些实施例中,免疫细胞包含T细胞。T细胞可从多个来源获得,包括外周血单核细胞(PBMC)、骨髓、淋巴结组织、脐血、胸腺组织、来自感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾组织和肿瘤。在某些实施例中,可使用技术人员已知的任何数目的技术,如FICOLL™分离,从收集于受试者的血液体积获得T细胞。

[0269] 细胞可通过单采血液成分术获自个体的循环血液。单采血液成分术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。在某些实施例中,可洗涤通过单采血液成分术收集的细胞以去除血浆成分,并且随后将其置于适当的缓冲液或培养基中以用于后续处理。

[0270] 在某些实施例中,例如,使用通过PERCOLL™梯度的离心,通过裂解红细胞和消耗单核细胞,从PBMC中分离T细胞。T细胞的特定亚群,(例如CD28+、CD4+、CD45RA-和CD45RO+T细胞或CD28+、CD4+、CD45RA-、CD45RO+和CD62L+T细胞)可通过所属领域中已知的阳性或阴性选择技术进一步分离。例如,T细胞群体通过阴性选择的富集可用针对对于阴性选择的细胞独特的表面标记的抗体的组合实现。本文使用的方法之一是通过负磁免疫粘附或流式细胞术进行细胞分选和/或选择,所述负磁免疫粘附或流式细胞术使用针对在阴性选择的细胞上存在的细胞表面标记的单克隆抗体混合物。例如,为了通过阴性选择针对CD4+细胞富集,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。流式细胞术和细胞分选还可用于分离用于本公开中的所关注的细胞群体。

[0271] PBMC可直接用于使用如本文所述的方法进行免疫细胞(例如CAR或TCR)的遗传修饰。在某些实施例中,在分离PBMC之后,可进一步分离T淋巴细胞,并且在遗传修饰和/或扩增之前或之后,可将细胞毒性和辅助T淋巴细胞两者分选为原生、记忆和效应T细胞亚群。

[0272] 在一些实施例中,CD8+细胞通过鉴别与那些类型的CD8+细胞中的每一种缔合的细胞表面抗原而进一步分选成原生、干细胞记忆、中央记忆和效应细胞。在一些实施例中,中央记忆T细胞的表现型标记的表达包括CD27、CD45RA、CD45RO、CD62L、CCR7、CD28、CD3、和CD127并且对于粒酶B是阴性的。在一些实施例中,干细胞记忆T细胞为CD45RO-、CD62L+、CD8+T细胞。在一些实施例中,中央记忆T细胞是CD45RO+、CD62L+、CD8+T细胞。在一些实施例中,效应T细胞对于CD62L、CCR7、CD28和CD127是阴性的,并且对于颗粒酶B和穿孔素是阳性的。在某些实施例中,CD4+T细胞进一步分选成亚群。例如,CD4+T辅助细胞可通过鉴别具有细胞表面抗原的细胞群体而分选到原生、中央记忆和效应细胞中。

[0273] b. 干细胞衍生的免疫细胞

[0274] 在一些实施例中,免疫细胞可衍生自胚胎干(ES)细胞或诱导多能干(iPS)细胞。合适的HSC、间叶细胞、iPS细胞和其它类型的干细胞可培育成无限增殖细胞系或直接从患者分离。用于分离、产生和/或培育干细胞的各种方法为所属领域中已知的并且可用于实践本公开。

[0275] 在一些实施例中,免疫细胞为衍生自再程序化T细胞的诱导多能干细胞(iPSC)。在

一些实施例中,源材料可以是衍生自T细胞或非T细胞的诱导多能干细胞(iPSC)。源材料可以是胚胎干细胞。源材料可以是B细胞,或来自外周血单核细胞分离物、造血祖细胞、造血干细胞、间叶干细胞、脂肪干细胞或任何其它体细胞类型的任何其它细胞。

[0276] c. 分离细胞的遗传修饰

[0277] 免疫细胞,如T细胞可在分离之后使用已知方法进行遗传修饰,或免疫细胞可在经遗传修饰之前在体外被活化和扩增(或在祖细胞的情况下分化)。在一些实施例中,将分离免疫细胞进行遗传修饰以减少或消除内源性TCR α 和/或CD52的表达。在一些实施例中,细胞使用基因编辑技术(例如,CRISPR/Cas9、锌指核酸酶(ZFN)、TALEN、MegaTAL、大范围核酸酶)进行基因修饰以减少或消除内源性蛋白质(例如,TCR α 和/或CD52)的表达。在另一实施例中,免疫细胞(如T细胞)用本文所述的嵌合抗原受体(例如,用包含编码CAR的一个或多个核苷酸序列的病毒载体转导)进行遗传修饰,并且随后在体外活化和/或扩增。

[0278] 用于制备本公开的构建体和工程改造的免疫细胞的某些方法描述于PCT申请案PCT/US15/14520中,所述PCT申请案的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0279] 应了解,PBMC还可包括其它细胞毒性淋巴细胞,如NK细胞或NKT细胞。可将携带如本文所公开的嵌合受体的编码序列的表达载体引入人类供体T细胞、NK细胞或NKT细胞的群体中。可使用流式细胞术将携带表达载体的成功转导的T细胞分选以分离CD3阳性T细胞,并且接着进一步增殖以增加除使用抗CD3抗体和IL-2或所属领域中已知的如本文中其它地方所述的其它方法的细胞活化之外的这些CAR表达T细胞的数目。标准程序用于冷冻保存表达CAR的T细胞,以储存和/或制备用于人类受试者。在一个实施例中,在不存在非人类动物衍生产物,如胎牛血清(fetal calf serum/fetal bovine serum)的情况下进行T细胞的体外转导、培养和/或扩增。

[0280] 为了克隆多核苷酸,可将载体引入宿主细胞(分离宿主细胞)以允许载体本身的复制,并且由此扩增其中所含的多核苷酸的拷贝。克隆载体可含有序列组分,通常包括但不限于复制起点、启动子序列、转录起始序列、增强子序列和可选标记。这些元件可由所属领域的普通技术人员酌情选择。例如,可以选择复制起点以促进载体在宿主细胞中的自主复制。

[0281] 在某些实施例中,本公开提供含有本文所提供的载体的分离宿主细胞。含有载体的宿主细胞可用于载体中所含的多核苷酸的表达或克隆。合适的宿主细胞可包括但不限于原核细胞、真菌细胞、酵母细胞或较高真核细胞,如哺乳动物细胞,特别是人类细胞。

[0282] 载体可使用所属领域中已知的任何合适的方法引入到宿主细胞,包括(但不限于)DEAE-葡聚糖介导的递送、磷酸钙沉淀方法、阳离子脂质介导的递送、脂质体介导的转染、电穿孔、基因枪法、受体介导的基因递送、由聚赖氨酸、组蛋白、壳聚糖和肽介导的递送。用于转染和转化用于表达所关注的载体的细胞的标准方法在所属领域中是众所周知的。在另一实施例中,不同表达载体的混合物可用于遗传修饰免疫效应细胞的供体群体,其中每个载体编码如本文所公开的不同CAR。所得转导免疫效应细胞形成工程改造的细胞的混合群体,其中一定比例的工程改造的细胞表达超过一个不同CAR。

[0283] 在一个实施例中,本公开提供一种储存表达CAR或TCR的遗传工程改造的细胞的方法。这涉及冷冻保存免疫细胞,使得细胞在解冻后保持存活。可通过所属领域中已知的方法冷冻保存表达CAR的免疫细胞的一部分,以提供此类细胞的永久性来源,用于将来治疗患有恶性肿瘤的患者。需要时,冷冻保存的转化免疫细胞可解冻、生长和扩增以得到更多此类细

胞。

[0284] 在一些实施例中,细胞通过首先从其培养基收集细胞,并且随后洗涤并且浓缩适合于以治疗有效量投予的培养基和容器系统(“药学上可接受的”载剂)中的细胞来调配。合适的输注介质可以是任何等渗培养基调配物,通常是生理盐水Normosol™R(雅培(Abbott))或Plasma-Lyte™A(巴克斯特(Baxter)),但也可以使用5%的右旋糖水溶液或林格乳酸盐(Ringer's lactate)。输注介质可补充有人类血清白蛋白。

[0285] d. 同种异体CAR T (ALLOCAR T™) 细胞

[0286] 用于制造同种异体CAR T疗法或AlloCARs™的方法涉及从健康供体收集健康、选定、筛选和测试的T细胞。接着,对T细胞进行工程改造以表达CAR,所述CAR识别在血液或实体肿瘤中表达的某些细胞表面蛋白质。同种异体T细胞是基因编辑的,以降低移植物抗宿主病(GvHD)的风险并防止同种异体排斥。敲除T细胞受体基因(例如,TCR α 、TCR β)以避免GvHD。可敲除CD52基因以使得CAR T产品对抗CD52抗体治疗具有抗性。因此抗CD52抗体治疗可用于抑制宿主免疫系统,并且允许CAR T保持植入以实现完全治疗作用。工程改造的T细胞随后进行纯化步骤,并且最终在小瓶中冷冻保存以递送到患者。

[0287] e. 自体CAR T (AUTOCAR T™) 细胞

[0288] 自体嵌合抗原受体(CAR)T细胞疗法涉及收集患者自身的细胞(例如,白细胞,包括T细胞)和对T细胞进行遗传工程改造,以表达识别在一种或多种特定癌细胞的细胞表面上表达的靶的CAR并杀死癌细胞。然后冷冻保存工程改造的细胞,并且随后投予患者。

[0289] 5. 药物组合物和疗法

[0290] 在一些实施例中,细胞通过首先从其培养基收集细胞,并且随后洗涤并且浓缩适合于以治疗有效量投予的培养基和容器系统(“药学上可接受的”载剂)中的细胞来调配。合适的输注介质可以是任何等渗培养基调配物,通常是生理盐水Normosol™R(雅培)或Plasma-Lyte™A(巴克斯特),但也可以使用5%的右旋糖水溶液或林格乳酸盐(Ringer's lactate)。输注介质可补充有人类血清白蛋白。

[0291] 在实施例中,组合中细胞的期望治疗量通常为至少2个细胞(例如,至少1个CD8+中央或干细胞记忆T细胞和至少1个CD4+辅助T细胞子集;或两个或更多个CD8+中心或干细胞记忆T细胞;或两个或更多个CD4+辅助T细胞子集)或更通常地大于 10^2 个细胞,并且高达且包括 10^6 个细胞,高达且包括 10^7 、 10^8 或 10^9 个细胞,并且可以是超过 10^{10} 个细胞。细胞的数目将取决于组合物的预期用途和其中所包括的细胞的类型。所需细胞的密度通常大于 10^6 个细胞/ml,并且通常大于 10^7 个细胞/ml,通常为 10^8 个细胞/ml或更大。可以将临床相关数目的免疫细胞分摊成累积等于或超过 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} ,或 10^{12} 个细胞的多次输注。在本公开的一些方面,特别是由于所有输注的细胞将重定向到特定靶抗原,因此可投予在约 10^5 /千克或约 10^6 /千克(每个患者 10^6 - 10^{11})范围内的较低数目的细胞。CAR治疗可在这些范围内的剂量下多次投予。细胞对进行治疗的患者可以是自体、同种异体或异源的。

[0292] 本公开的CAR表达细胞群体可以单独或以与稀释剂和/或其它组分(如IL-2或其它细胞因子或细胞群体)组合的药物组合物形式一起投予。本公开的药物组合物可包含与一种或多种药学上或生理学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂组合的CAR表达或TCR表达细胞群体,如本文所述的T细胞。此类组合物可包含缓冲液,如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等;碳水化合物,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,如甘氨

酸;抗氧化剂;螯合剂,如EDTA或谷胱甘肽;佐剂(例如,氢氧化铝);以及防腐剂。本公开组合物优选调配用于静脉内授予。

[0293] 药物组合物(溶液、悬浮液等)可包括以下中的一种或多种:无菌稀释剂,如注射用水、盐水溶液(较佳生理盐水)、林格氏溶液(Ringer's solution)、等渗氯化钠;不挥发性油,如可以充当溶剂或悬浮介质的合成单或二甘油酯;聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它溶剂;抗菌剂,如苯醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,如乙二胺四乙酸;缓冲液,如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐和用于调节张力的试剂,如氯化钠或右旋糖。可以将肠胃外调配物密封在安瓿、一次性注射器或由玻璃或塑料制成的多剂量小瓶中。可注射药物组合物优选地是无菌的。

[0294] 6. 治疗方法

[0295] 本公开包含用于治疗或预防患者中的疾病(例如,癌症)的方法,其包含向有需要的患者授予有效量的至少一种CAR,或包含本文所公开的CAR的免疫细胞。

[0296] 提供用于治疗包括癌症的疾病或病症的方法。在一些实施例中,本公开涉及在受试者中产生T细胞介导的免疫反应,其包含向所述受试者授予有效量的本申请的工程改造的免疫细胞。在一些实施例中,T细胞介导的免疫反应针对靶细胞或细胞。在一些实施例中,工程改造的免疫细胞包含嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施例中,靶细胞是肿瘤细胞。在一些方面,本公开包含一种用于治疗或预防恶性肿瘤的方法,所述方法包含向有需要的受试者授予有效量的至少一种本文所述的分离抗原结合结构域。在一些方面,本公开包含一种用于治疗或预防恶性肿瘤的方法,所述方法包含向有需要的受试者授予有效量的至少一种免疫细胞,其中所述免疫细胞包含至少一种如本文所述的嵌合抗原受体、T细胞受体和/或分离抗原结合结构域。本公开的含有CAR的免疫细胞可用于治疗涉及生物标记异常表达的恶性肿瘤。在一些实施例中,本公开的含CAR的免疫细胞可用于治疗小细胞肺癌、黑素瘤、低级别神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、甲状腺髓样癌、类癌、胰腺中的分散性神经内分泌肿瘤、膀胱和前列腺、睾丸癌和具有神经内分泌特征的肺腺癌。在示例性实施例中,含CAR的免疫细胞(例如本公开的CAR-T细胞)用于治疗小细胞肺癌。

[0297] 还提供了用于减小受试者的肿瘤大小的方法,其包含向受试者授予本公开的工程改造的细胞,其中所述细胞包含嵌合抗原受体,所述嵌合抗原受体包含抗原结合结构域并且与肿瘤上的抗原结合。

[0298] 在一些实施例中,受试者患有实体肿瘤或血液恶性肿瘤,如淋巴瘤或白血病。在一些实施例中,将工程改造的细胞递送到肿瘤床。在一些实施例中,癌症存在于受试者的骨髓中。在一些实施例中,工程改造的细胞为自体免疫细胞,例如自体T细胞。在一些实施例中,工程改造的细胞为同种异体免疫细胞,例如同种异体T细胞。在一些实施例中,工程改造的细胞为异源免疫细胞,例如异源T细胞。在一些实施例中,本申请的工程改造的细胞在体内转染或转导。在其它实施例中,离体转染或转导工程改造的细胞。如本文所使用,术语“体外细胞”是指离体培养的任何细胞。

[0299] 治疗剂,例如,工程改造的CART细胞的“治疗有效量”、“有效剂量”、“有效量”,或“治疗有效剂量”,是任何量,当单独使用或与另一种治疗剂组合使用时,保护受试者免于疾病发作或促进疾病消退,所述疾病消退由疾病症状的严重程度降低来证明,无疾病症状的频率和持续时间增加,或预防疾病病痛导致的障碍或残疾。治疗剂促进疾病消退的能力

可使用熟练的从业者已知的多种方法来评价,例如在临床试验期间在人类受试者中、在预测人类中功效的动物模型系统中或通过体外分析中分析药剂的活性来评价。

[0300] 术语“患者”和“受试者”可互换使用,并且包括人类和非人类动物受试者以及患有正式诊断的病症的那些受试者、没有正式识别的病症的那些受试者、接受医学观察的那些受试者、处于发病风险的那些受试者等。

[0301] 术语“治疗(treat/treatment)”包括治疗性治疗、预防性治疗和其中一个降低受试者将出现病症或其它风险因素的风险的应用。治疗不需要完全治愈病症并且涵盖其中一个减少症状或潜在风险因素的实施例。术语“预防”不需要100%消除事件发生的可能性。确切地说,其表示在化合物或方法存在下事件的发生的可能性已降低。

[0302] 组合物中细胞的期望治疗量通常为至少2个细胞(例如,至少1个CD8+中央记忆T细胞和至少1个CD4+辅助T细胞子集),或更通常大于 10^2 个细胞,并且高达 10^6 ,高达并且包括 10^8 或 10^9 个细胞,并且可超过 10^{10} 个细胞。细胞的数目将取决于组合物的预期用途和其中所包括的细胞的类型。所需细胞的密度通常大于 10^6 个细胞/ml,并且通常大于 10^7 个细胞/ml,通常 10^8 个细胞/ml或更大。可以将临床相关数目的免疫细胞分摊成累积等于或超过 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 或 10^{12} 个细胞的多次输注。在本公开的一些方面中,确切地说,由于所有输注的细胞将被重定向到特定靶抗原,因此可以投予在 10^6 /千克(每个患者 10^6 - 10^{11})范围内的较低数目的细胞。CAR治疗可在这些范围内的剂量下多次投予。细胞对进行治疗的患者可以是自体、同种异体或异源的。

[0303] 在一些实施例中,所述治疗有效量的CAR T细胞为约 1×10^5 个细胞/kg、约 2×10^5 个细胞/kg、约 3×10^5 个细胞/kg、约 4×10^5 个细胞/kg、约 5×10^5 个细胞/kg、约 6×10^5 个细胞/kg、约 7×10^5 个细胞/kg、约 8×10^5 个细胞/kg、约 9×10^5 个细胞/kg、 2×10^6 细胞/kg、约 3×10^6 个细胞/kg、约 4×10^6 个细胞/kg、约 5×10^6 个细胞/kg、约 6×10^6 个细胞/kg、约 7×10^6 个细胞/kg、约 8×10^6 个细胞/kg、约 9×10^6 个细胞/kg、约 1×10^7 个细胞/kg、约 2×10^7 个细胞/kg、约 3×10^7 个细胞/kg、约 4×10^7 个细胞/kg、约 5×10^7 个细胞/kg、约 6×10^7 个细胞/kg、约 7×10^7 个细胞/kg、约 8×10^7 个细胞/kg,或约 9×10^7 个细胞/kg。

[0304] 在一些实施例中,CAR+/CAR-T+/TCR+细胞的目标剂量在 1×10^6 - 2×10^8 个细胞/kg,例如 2×10^6 个细胞/kg的范围内。应了解,高于和低于此范围的给药适合于某些受试者,并且可按需要由保健提供者确定适当的给药水平。另外,可根据本公开提供多个剂量的细胞。

[0305] 在一些方面,本公开包含药物组合物,其包含至少一种如本文所述的抗原结合结构域和药学上可接受的赋形剂。在一些实施例中,药物组合物还包含额外活性剂。

[0306] 本公开的CAR表达细胞群体可以单独或以与稀释剂和/或其它组分(如IL-2或其它细胞因子或细胞群体)组合的药物组合物形式一起投予。本公开的药物组合物可包含与一种或多种药学上或生理学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂组合的CAR表达或TCR表达细胞群体,如本文所述的T细胞。此类组合物可包含缓冲液,如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等;碳水化合物,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,如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂,如EDTA或谷胱甘肽;佐剂(例如,氢氧化铝);以及防腐剂。本公开组合物优选调配用于静脉内投予。

[0307] 药物组合物(溶液、悬浮液等)可包括以下中的一种或多种:无菌稀释剂,如注射用

水、盐水溶液(较佳生理盐水)、林格氏溶液、等渗氯化钠;不挥发性油,如可以充当溶剂或悬浮介质的合成单或二甘油酯;聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它溶剂;抗细菌剂,如苯醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,如乙二胺四乙酸;缓冲液,如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐和用于调节张力的试剂,如氯化钠或右旋糖。可以将肠胃外调配物密封在安瓿、一次性注射器或由玻璃或塑料制成的多剂量小瓶中。可注射药物组合物优选地是无菌的。

[0308] 在一些实施例中,在授予患者后,在细胞表面处表达本文所述的抗原特异性CAR中的任一种的工程改造的免疫细胞可减少、杀伤或裂解患者的内源性抗原表达细胞。在一个实施例中,通过表达本文所述的抗原特异性CAR中的任一个的工程改造的免疫细胞表达抗原的抗原表达内源性细胞或细胞系的细胞的减少或裂解百分比为至少约或大于10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。在一个实施例中,通过表达抗原特异性CAR的工程改造的免疫细胞表达抗原的抗原表达内源性细胞或细胞系的细胞的减少或裂解百分比为约5%到约95%、约10%到约95%、约10%到约90%、约10%到约80%、约10%到约70%、约10%到约60%、约10%到约50%、约10%到约40%、约20%到约90%、约20%到约80%、约20%到约70%、约20%到约60%、约20%到约50%、约25%到约75%,或约25%到约60%。在一个实施例中,内源性抗原表达细胞为内源性抗原表达骨髓细胞。

[0309] 在一个实施例中,可使用本文所公开的分析法测量通过在其细胞表面膜处表达本公开的抗原特异性CAR的工程改造的免疫细胞对靶细胞,例如表达抗原的细胞系的减少或裂解百分比。

[0310] 所述方法还可包含授予一种或多种化学治疗剂。在某些实施例中,化学治疗剂为淋巴细胞消耗(预处理)化学治疗剂。例如,调节需要T细胞疗法的患者的方法,其包含向患者授予指定有益剂量的环磷酰胺(在 $200\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 与 $2000\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 之间、约 $100\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 与约 $2000\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$;例如,约 $100\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $200\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $300\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $400\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $500\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $600\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $700\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $800\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $900\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $1000\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $1500\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 或约 $2000\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$)和指定剂量的氟达拉滨(在 $20\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 与 $900\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 之间、在约 $10\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 与约 $900\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 之间;例如,约 $10\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $20\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $30\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $40\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $40\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $50\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $60\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $70\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $80\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $90\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $100\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 、约 $500\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 或约 $900\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$)。优选给药方案涉及治疗患者,其包含在向患者授予治疗有效量的工程改造的T细胞之前,每日向患者投予约 $300\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 的环磷酰胺和约 $30\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 的氟达拉滨持续三天。

[0311] 在一些实施例中,淋巴细胞消耗还包含授予CD52抗体。在一些实施例中,CD52抗体以约 $13\text{mg}/\text{天}$ 的剂量IV投予。

[0312] 在其它实施例中,抗原结合结构域、转导(或以其它方式工程改造的)细胞和化学治疗剂各自以有效治疗受试者的疾病或病况的量投予。

[0313] 在某些实施例中,包含本文所公开的CAR表达免疫效应细胞的组合物可与可按任何顺序投予的任何数目的化学治疗剂一起投予。化学治疗剂的实例包括烷基化剂,如噻替派(thiotepa)和环磷酰胺(CYTOXANTM);烷基磺酸盐,如白消安、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);氮丙啶,如苯唑多巴、卡波醌(carboquone)、米特多巴

(meturedopa) 和尤利多巴 (uredopa); 乙烯亚胺和甲基三聚氰胺, 包括六甲蜜胺、三乙烯三聚氰胺、三乙烯磷酰胺、三乙烯硫代磷酰胺和三羟甲基三聚氰胺; 氮芥, 如氯芥苯丁酸、萘氮芥、氯磷酰胺、雌莫司汀 (estramustine)、异环磷酰胺、二氯甲二乙胺、二氯甲二乙胺氧化物盐酸盐、美法仑 (melphalan)、新恩比兴 (novembichin)、胆固醇对苯乙酸氮芥、泼尼氮芥、曲洛磷胺、尿嘧啶芥末; 亚硝基脲, 如卡莫司汀 (carmustine)、氯脲菌素、福莫司汀 (fotemustine)、洛莫司汀 (lomustine)、尼莫司汀 (nimustine)、雷诺莫司汀 (ranimustine); 抗生素, 例如阿克拉霉素、放射菌素、奥斯拉菌素、氮杂丝氨酸、博来霉素、放线菌素C、卡奇霉素、卡拉比星 (carabycin)、洋红霉素、嗜癌霉素、色霉素、更生霉素、道诺霉素、地托比星 (detorubicin)、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星 (doxorubicin)、表柔比星 (epirubicin)、依索比星 (esorubicin)、艾达霉素、麻西罗霉素、丝裂霉素、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、培洛霉素、泼非霉素、嘌呤霉素、奎那霉素、罗多比星 (rodorubicin)、链黑霉素、链脲霉素、杀结核菌素、乌苯美司 (ubenimex)、净司他丁 (zinostatin)、左柔比星 (zorubicin); 抗代谢物, 例如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶 (5-FU); 叶酸类似物, 如迪诺特宁、甲氨蝶呤、蝶罗呤、三甲曲沙; 嘌呤类似物, 如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、噻咪嘌呤、硫鸟嘌呤; 嘧啶类似物, 例如安西他滨 ()、阿扎胞苷、6-氮杂尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、双去氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷、5-FU; 雄激素, 如卡普睾酮、丙酸屈他雄酮、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯; 抗肾上腺, 例如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦; 叶酸补充剂, 如亚叶酸; 醋葡萄糖内酯; 醛磷酰胺糖苷; 氨基乙酰丙酸; 安吡啶; 倍思塔布; 比生群; 艾达曲克; 得弗伐胺; 秋水仙碱; 地吡醌; 艾福米辛; 乙酸依利铵; 依托格鲁; 硝酸镓; 羟基脲; 香菇多糖; 氯尼达明; 米托胍脞; 米托蒽醌; 莫哌达醇; 尼曲吡啶; 喷司他汀 (pentostatin); 苯来美特 (phenamet); 吡柔比星 (pirarubicin); 鬼臼酸; 2-乙酰肼; 丙卡巴肼; **PSK®**; 雷佐生; 西佐喃; 锗螺胺; 细交链孢菌酮酸; 三亚胺醌; 2,2',2''-三氯三乙胺; 乌拉坦; 长春地辛; 达卡巴嗪; 甘露氮芥; 二溴甘露醇; 二溴卫矛醇; 哌泊溴烷; 甲托辛; 阿拉伯糖苷 ("Ara-C"); 环磷酰胺; 噻替派; 类紫杉醇, 如太平洋紫杉醇 (TAXOL™, 布里斯托尔-迈尔斯·斯奎布肿瘤学 (Bristol-Myers Squibb Oncology), 新泽西州普林斯顿 (Princeton)) 和多西他赛 (doxorubicin) (**TAXOTERE®**, Rhne-Poulenc Rorer, 法国安东尼 (Antony)); 氯芥苯丁酸; 吉西他滨 (gemcitabine); 6-硫鸟嘌呤; 巯基嘌呤; 甲氨蝶呤; 铂类似物, 如顺铂和卡铂; 长春碱; 铂; 依托泊苷 (VP-16); 异环磷酰胺; 丝裂霉素C; 米托蒽醌; 长春新碱; 长春瑞滨 (vinorelbine); 诺维本 (navelbine); 米托蒽醌; 替尼泊苷; 道诺霉素; 氨基嘌呤; 希罗达 (xeloda); 伊班膦酸盐; CPT-11; 拓扑异构酶抑制剂RFS 2000; 二氟甲基鸟氨酸 (DMFO); 视黄酸衍生物, 如Targretin™ (贝瑟罗汀)、Panretin™ (亚利崔托宁); ONTAK™ (地尼白介素); 埃斯波霉素; 卡培他滨 (capecitabine); 以及以上各者中的任一者的药学上可接受的盐、酸或衍生物。此定义中还包括用以调节或抑制激素对肿瘤的作用的抗激素剂, 如抗雌激素, 包括例如他莫昔芬、雷洛昔芬、芳香酶抑制4(5)-咪唑、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、雷洛昔芬盐酸盐、LY117018、奥那司酮和托瑞米芬 (法乐通 (Fareston)); 和抗雄激素, 如氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮丙瑞林和戈舍瑞林; 以及以上各者中的任一者的药学上可接受的盐、酸或衍生物。化学治疗剂的组合也在适当时投予, 包括但不限于CHOP, 即环磷酰胺 (**Cytosan®**)、多柔比星 (Doxorubicin) (羟基多柔比星)、长春新碱 (**Oncovin®**) 和泼尼松 (Prednisone)。

[0314] 在一些实施例中,在授予工程改造的细胞、多肽或核酸之后同时或一周内授予化学治疗剂。在其它实施例中,在授予工程改造的细胞、多肽或核酸之后1到4周或1周到1个月、1周到2个月、1周到3个月、1周到6个月、1周到9个月或1周到12个月授予化学治疗剂。在其它实施例中,在授予细胞、多肽或核酸之前至少1个月授予化学治疗剂。在一些实施例中,所述方法还包含授予两种或更多种化学治疗剂。

[0315] 多种额外治疗剂可与本文所述的组合物结合使用。例如,潜在有用的额外治疗剂包括PD-1抑制剂,如纳武单抗(nivolumab) (**Opdivo®**)、帕博利珠单抗(pembrolizumab) (**Keytruda®**)、帕博利珠单抗、匹利珠单抗(pidilizumab)和阿特殊单抗(atezolizumab)。

[0316] 适合与本公开组合使用的额外治疗剂包括(但不限于):依鲁替尼(ibrutinib) (**Imbruvica®**)、奥法木单抗(ofatumumab) (**Arzerra®**)、利妥昔单抗(rituximab) (**Rituxan®**)、贝伐珠单抗(bevacizumab) (**Avastin®**)、曲妥珠单抗(trastuzumab) (**Herceptin®**)、曲妥珠单抗恩他新(trastuzumab emtansine) (**KADCYLA®**)、伊马替尼(imatinib) (**Gleevec®**)、西妥昔单抗(cetuximab) (**Erbitux®**)、帕尼单抗(panitumumab) (**Vectibix®**)、卡妥索单抗(catumaxomab)、替伊莫单抗(ibritumomab)、奥司木单抗、托西莫单抗(tositumomab)、本妥昔单抗(brentuximab)、阿仑单抗(alemtuzumab)、吉妥单抗(gemtuzumab)、埃罗替尼(erlotinib)、吉非替尼(gefitinib)、凡德他尼(vandetanib)、阿法替尼(afatinib)、拉帕替尼(lapatinib)、来那替尼(neratinib)、阿西替尼(axitinib)、马赛替尼(masitinib)、帕唑帕尼(pazopanib)、舒尼替尼(sunitinib)、索拉非尼(sorafenib)、托西尼布(toceranib)、来他替尼(lestaurtinib)、阿西替尼(axitinib)、西地尼布(cediranib)、乐伐替尼(lenvatinib)、尼达尼布(nintedanib)、帕唑帕尼、瑞格非尼(regorafenib)、司马沙尼(semaxanib)、索拉非尼、舒尼替尼、替沃扎尼(tivozanib)、托西尼布、凡德他尼、恩曲替尼(entrectinib)、卡博替尼(cabozantinib)、伊马替尼、达沙替尼、尼洛替尼、普纳替尼(ponatinib)、拉多替尼(radotinib)、伯舒替尼、来他替尼、卢佐替尼(ruxolitinib)、帕瑞替尼(pacritinib)、考比替尼(cobimetinib)、司美替尼(selumetinib)、曲美替尼(trametinib)、贝美替尼(binimetinib)、阿来替尼(alectinib)、色瑞替尼(ceritinib)、克卓替尼(crizotinib)、阿柏西普(aflibercept)、阿替泊(adipotide)、地尼白介素(denileukin diftitox);mTOR抑制剂,如依维莫司(Everolimus)和坦罗莫司(Temsirolimus);刺猬抑制剂,如索尼得吉(sonidegib)和维莫德吉(vismodegib);CDK抑制剂,如CDK抑制剂(帕博西尼(palbociclib))。

[0317] 在一些实施例中,包含含CAR的免疫细胞的组合物可与治疗方案一起投予以预防细胞因子释放综合征(CRS)或神经毒性。预防细胞因子释放综合征(CRS)或神经毒性的治疗方案可包括冷自鲁单抗(lenzilumab)、托西利单抗(tocilizumab)、心房利钠肽(atrial natriuretic peptide,ANP)、阿那白滞素(anakinra)、iNOS抑制剂(例如L-NIL或1400W)。在额外实施例中,包含含CAR的免疫细胞的组合物可与抗炎剂一起授予。抗炎剂或药物包括(但不限于)类固醇和糖皮质激素(包括倍他米松(betamethasone)、布地奈德

(budesonide)、地塞米松(dexamethasone)、乙酸氢皮质酮(hydrocortisone acetate)、氢皮质酮(hydrocortisone)、氢皮质酮、甲基泼尼松龙(methylprednisolone)、泼尼松龙(prednisolone)、泼尼松(prednisone)、曲安西龙(triamcinolone));非类固醇消炎药物(NSAIDs),包括阿司匹林(aspirin)、布洛芬(ibuprofen)、萘普生(naproxen)、甲氨蝶呤(methotrexate)、柳氮磺胺吡啶(sulfasalazine)、来氟米特(leflunomide)、抗TNF药剂、环磷酰胺和霉酚酸酯(mycophenolate)。示例性的NSAID包括布洛芬(ibuprofen)、萘普生(naproxen)、萘普生钠(naproxen sodium)、Cox-2抑制剂和唾液酸盐。示例性镇痛剂包括乙酰苯酚、羟考酮、盐酸丙氧吩的曲马多。示例性糖皮质激素包括可的松(cortisone)、地塞米松(dexamethasone)、氢化可的松、甲基泼尼松龙、泼尼松龙(prednisolone)或泼尼松(prednisone)。示例性生物应答修饰剂包括针对细胞表面标记(例如CD4、CD5等)的分子、细胞因子抑制剂(如TNF拮抗剂(例如依那西普(etanercept)(ENBREL®)、阿达木单抗(adalimumab)(HUMIRA®)和英利昔单抗(infliximab)(REMICADE®)))、趋化因子抑制剂和粘附分子抑制剂。生物应答修饰剂包括单克隆抗体以及重组形式的分子。示例性DMARD包括硫唑嘌呤、环磷酰胺、环孢灵、甲氨蝶呤、青霉胺、来氟米特、柳氮磺胺吡啶、羟化氯喹、戈尔德(Gold)(口服(金诺芬(auranofin))和肌内)和米诺环素(minocycline)。

[0318] 在某些实施例中,本文所述的组合物与细胞因子结合投予。细胞因子的实例是淋巴因子、单核因子和传统多肽激素。细胞因子之中包括生长激素,如人类生长激素、N-甲硫氨酰人类生长激素和牛生长激素;副甲状腺激素;甲状腺素;胰岛素;胰岛素原;松弛素;松弛素原;糖蛋白激素,例如促卵泡激素(FSH)、促甲状腺激素(TSH)和促黄体激素(LH);肝生长因子(HGF);成纤维细胞生长因子(FGF);催乳素;胎盘催乳素;苗勒氏(mullerian)抑制物质;小鼠促性腺激素相关肽;抑制素;活化素;血管内皮生长因子;整合素;血小板生成素(TPO);神经生长因子(NGF),如NGF- β ;血小板生长因子;转化生长因子(TGF),如TGF- α 和TGF- β ;胰岛素样生长因子-I和II;促红细胞生成素(EPO);骨诱导因子;干扰素,例如干扰素- α 、 β 和 γ ;集落刺激因子(CSF),如巨噬细胞-CSF(M-CSF)、粒细胞-巨噬细胞-CSF(GM-CSF)和粒细胞-CSF(G-CSF);白介素(IL),如IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-15、IL-21;肿瘤坏死因子,如TNF- α 或TNF- β ;和其它多肽因子,包括LIF和kit配体(KL)。如本文所使用,术语细胞因子包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质,和天然序列细胞因子的生物活性等效物。

[0319] 7. 分选和消耗方法

[0320] 在一些实施例中,提供了用于免疫细胞群体体外分选的方法,其中免疫细胞群体的子集包含表达抗原特异性CAR的工程改造的免疫细胞,所述抗原特异性CAR包含对单克隆抗体具有特异性的表位(例如,示例性模拟表位序列)。所述方法包含使免疫细胞群体与对表位具有特异性的单克隆抗体接触,并选择结合于单克隆抗体的免疫细胞以获得富集表达抗原特异性CAR的工程改造的免疫细胞的细胞群体。

[0321] 在一些实施例中,对所述表位具有特异性的所述单克隆抗体任选地结合于荧光团。在此实施例中,选择结合于单克隆抗体的细胞的步骤可通过荧光激活细胞分选术(FACS)进行。

[0322] 在一些实施例中,对所述表位具有特异性的所述单克隆抗体任选地结合于磁性粒

子。在此实施例中，选择结合于单克隆抗体的细胞的步骤可通过磁性激活细胞分选术 (MACS) 进行。

[0323] 在一些实施例中，对表达CAR的免疫细胞进行分选的方法中所使用的mAb选自阿仑单抗、替伊莫单抗、莫罗单抗-CD3 (muromonab-CD3)、托西莫单抗、阿昔单抗、巴利昔单抗 (basiliximab)、本妥昔单抗、西妥昔单抗、英利昔单抗、利妥昔单抗、贝伐单抗、聚乙二醇化赛妥珠单抗、达利珠单抗、艾库组单抗 (eculizumab)、依法利珠单抗 (efalizumab)、吉妥珠单抗 (gemtuzumab)、那他珠单抗、奥马珠单抗、帕利珠单抗 (palivizumab)、兰比珠单抗 (ranibizumab)、托西利单抗、曲妥珠单抗、维多珠单抗 (vedolizumab)、阿达木单抗、贝利单抗、卡那单抗、地诺单抗 (denosumab)、戈利木单抗 (golimumab)、伊匹单抗 (ipilimumab)、奥法木单抗、帕尼单抗、QBEND-10和/或优特克单抗 (ustekinumab)。在一些实施例中，所述mAb为利妥昔单抗。在另一实施例中，所述mAb为QBEND-10。在另一实施例中，mAb结合TCR • 或 TCR • 。

[0324] 在一些实施例中，当使用上文所述的用于对表达CAR的免疫细胞进行体外分选的方法时获得的表达CAR的免疫细胞群体包含至少70%、75%、80%、85%、90%、95%的表达CAR的免疫细胞。在一些实施例中，当使用所述用于对表达CAR的免疫细胞进行体外分选的方法时获得的表达CAR的免疫细胞的群体包含至少85%的表达CAR的免疫细胞。

[0325] 在一些实施例中，当使用上文所述的用于对表达CAR的免疫细胞进行体外分选的方法时获得的表达CAR的免疫细胞的群体与初始(未分选)细胞群体相比显示体外细胞毒性活性增加。在一些实施例中，所述细胞毒性活性体外增加10%、20%、30%或50%。在一些实施例中，免疫细胞是T细胞。

[0326] 在一些实施例中，mAb先前结合于支持物或表面上。固体支持物的非限制性实例可包括珠粒、琼脂糖珠粒、磁珠、塑料孔板、玻璃孔板、陶瓷孔板、柱或细胞培养袋。

[0327] 可从源群体中在体外富集待投予于受体的表达CAR的免疫细胞。扩增源群体的方法可包括使用密度离心、免疫磁珠纯化、亲和色谱和荧光活化细胞分选的组合来选择表达抗原(如CD34抗原)的细胞。

[0328] 流式细胞术可用于定量细胞群体中的特定细胞类型。一般来说，流式细胞术是一种主要通过光学手段对细胞的组分或结构特征进行定量的方法。由于不同细胞类型可通过对结构特征定量来区分，因此流式细胞术和细胞分选可用于对混合物中的不同表现型的细胞进行计数和分选。

[0329] 流式细胞术分析涉及两个基本步骤：1) 用一种或多种标记的标记对选定细胞类型进行标记，和2) 测定相对于群体中的细胞总数的标记细胞数。在一些实施例中，标记细胞类型的方法包括将标记抗体结合于由特定细胞类型表达的标记。抗体可直接标记有荧光化合物或使用例如，识别第一抗体的荧光标记的第二抗体间接标记。

[0330] 在一些实施例中，用于对表达CAR的T细胞进行分选的方法为磁性激活细胞分选 (MACS)。磁性激活细胞分选 (MACS) 是一种取决于细胞群体表面抗原 (CD分子)，通过使用超顺磁纳米粒子和柱分离多种细胞群体的方法。MACS可用于获得纯细胞群体。单细胞悬浮液中的细胞可用微珠磁性标记。将样品施加于由铁磁性球体构成的柱，其覆盖有允许快速和平缓分离细胞的细胞友好型涂层。未经标记的细胞会通过而磁标记的细胞保留在柱中。流过物可收集作为未标记的细胞部分。洗涤步骤之后，从分离器去除所述柱，并使磁标记的细

胞从柱洗脱。

[0331] 用于纯化特定细胞群体(如T细胞)的详细方案可见于Basu S等人(2010)。(Basu S、Campbell HM、Dittel BN、Ray A.《通过荧光激活细胞分选术(FACS)纯化特定细胞群(Purification of specific cell population by fluorescence activated cell sorting)》。《可视化实验杂志(JVis Exp)》。(41):1546)。

[0332] 在一些方面,本公开提供了一种用于通过体内消耗来消耗表达抗原特异性CAR的免疫细胞的方法。体内消耗可包括向哺乳动物生物体授予治疗(例如,结合CAR上的表位的分子),所述治疗旨在通过抑制或消除来阻止表达CAR的免疫细胞的增殖。

[0333] 本公开的一个方面涉及一种用于体内消耗表达包含mAb特异性表位的CAR的工程改造的免疫细胞的方法,其包含使所述工程改造的免疫细胞或所述表达CAR的免疫细胞与至少一个表位特异性mAb接触。本公开的另一方面涉及一种用于体内消耗表达CAR的免疫细胞的方法,所述方法包含通过使所述工程改造的免疫细胞与表位特异性抗体接触而形成的嵌合scFv(例如,通过插入mAb特异性表位而形成)。在一些实施例中,免疫细胞是T细胞和/或抗体是单克隆的。

[0334] 根据一个实施例,对先前使用本公开的体外方法分选的工程改造的免疫细胞进行免疫工程改造的细胞的体内消耗。在此情况下,可使用相同的输注的mAb。在一些实施例中,mAb特异性抗原是CD20抗原,并且表位特异性mAb是利妥昔单抗。在一些实施例中,本公开涉及一种用于在患者中体内消耗表达包含mAb特异性表位的CAR的工程改造的免疫细胞(CAR表达免疫细胞)的方法,所述方法包含使所述表达CAR的免疫细胞与至少一种表位特异性mAb接触。

[0335] 在一些实施例中,使所述工程改造的免疫细胞或所述表达CAR的免疫细胞与至少一种表位特异性mAb接触的步骤包含向患者输注表位特异性mAb(例如,利妥昔单抗)。在一些实施例中,向患者授予的表位特异性mAb的量足以在患者中消除至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%表达CAR的免疫细胞。

[0336] 在一些实施例中,使所述工程改造的免疫细胞或所述表达CAR的免疫细胞与至少一种表位特异性mAb接触的步骤包含向患者输注375mg/m²的利妥昔单抗一次或多次。在一些实施例中,mAb(例如利妥昔单抗)每周授予一次。

[0337] 在一些实施例中,当表达包含mAb特异性表位的CAR的免疫细胞(表达CAR的免疫细胞)在补体依赖性细胞毒性(CDC)分析中使用表位特异性mAb消耗时,表达存活CAR的免疫细胞的量减少。在一些实施例中,表达存活CAR的免疫细胞的量减少至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。在一些实施例中,所述mAb特异性表位是CD20表位或模拟表位,和/或表位特异性mAb是利妥昔单抗。

[0338] 在某些实施例中,CAR工程改造的免疫细胞的体内消耗通过输注双特异性抗体来进行。根据定义,双特异性单克隆抗体(BsAb)是由两种不同单克隆抗体的片段组成的人工蛋白质,并且因此结合于两种不同类型的抗原。这些BsAb和其在免疫疗法中的用途已在Muller D和Kontermann R.E. (2010)《用于癌症免疫治疗的双特异性抗体(Bispecific Antibodies for Cancer Immunotherapy)》,《生物制药(BioLugs)》24(2):89-98。

[0339] 根据另一特定实施例,所输注的双特异性mAb能够结合在表达嵌合scFv的工程改造的免疫细胞上携带的mAb特异性表位以及结合在效应和细胞毒性细胞(例如免疫细胞,如

淋巴细胞、巨噬细胞、树突状细胞、自然杀伤细胞(NK细胞)、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)上的表面抗原。通过这样做,由BsAb触发的工程改造的免疫细胞的消耗可通过抗体依赖性细胞毒性(ADCC)发生。(Deo Y M、Sundarapandiyam K、Keler T、Wallace PK和Graziano RF,(2000),《免疫学杂志(Journal of Immunology)》,165(10):5954-5961]。

[0340] 在一些实施例中,细胞毒性药物偶联于可用于消耗表达CAR的免疫细胞的表位特异性mAb。通过使单克隆抗体的靶向能力与细胞毒性药物的癌症杀伤能力组合,当相比于使用单独的药物时,抗体-药物结合物(ADC)提供健康和病变组织之间的敏感辨别。若干ADC已得到市场批准;其制造技术(尤其利用接头)描述于(Payne,G.(2003)《癌细胞(Cancer Cell)》3:207-212;Trail等人(2003)《癌症免疫与免疫疗法(Cancer Immunol.Immunother.》)52:328-337;Syrigos和Epenetos(1999)《抗癌研究(Anticancer Research)》19:605-614;Niculescu-Duvaz和Springer(1997)《先进药物递送评论(Adv Drug Del.Rev.》)26:151-172;美国专利第4,975,278号)。

[0341] 在一些实施例中,待输注的表位特异性mAb预先与能够促进补体依赖性细胞毒性(CDC)的分子结合。因此补体系统辅助或补充抗体从生物体清除病原体的能力。当刺激时,由于应答的大规模扩增和杀伤细胞的攻膜复合物的活化而触发活化级联。可使用不同分子结合mAb,如聚糖[Courtois,A、Gac-Breton,S.、Berthou,C、Guezennec,J.、Bordron,A.和Boisset,C.(2012),《治疗抗体片段的补体依赖细胞毒活性通过免疫原性聚糖偶联得到(Complement dependent cytotoxicity activity of therapeutic antibody fragments is acquired by immunogenic glycan coupling)》,《生物技术电子杂志ISSN(Electronic Journal of Biotechnology ISSN)》:0717-3458;http://www.ejbiotechnology.info DOI:10.2225/vol15-第5期)。

[0342] 8. 试剂盒和制品

[0343] 本公开提供了试剂盒,其包含本文所述的任何培养的免疫细胞或工程改造的免疫细胞,以及所述免疫细胞的药物组合物。在一些示例性实施例中,本公开的试剂盒包含用于授予受试者的含同种异体CAR的T细胞。

[0344] 本申请还提供包含本文所述的治疗性组合物或试剂盒中的任一者的制品。制品的实例包括小瓶(例如,密封小瓶)。

[0345] 此外,本公开提供了试剂盒,其包含一个或多个包含所需浓度的钾溶液的容器,以及任选地包含有包含一种或多种细胞因子(如IL-7或IL-15)的溶液的一个或多个容器。

[0346] 实例

[0347] 如以下实例中所示,细胞因子和代谢调节剂条件和浓度的组合在T细胞扩增培养基中可导致遗传修饰的同种异体细胞治疗产物的效力增加。例如,可以通过使用细胞增殖刺激剂例如IL-7、IL-15和增加的细胞外钾来获得所需同种异体CAR T细胞表现型。

[0348] 1. 用于CAR T细胞生产的示例性方案

[0349] 如本文所述,CAR T细胞可根据所属领域已知的各种方法产生。本文描述了示例性的标准方法。

[0350] 为了产生CAR-T细胞,可使用Ficoll梯度密度培养基(Ficoll Pque PLUS/GE医疗生命科学(GE Healthcare Life Sciences))从健康志愿者的血沉棕黄层样品中纯化PBMC。可使用可商购的T细胞分离试剂盒(美天旎生物技术公司(Miltenyi Biotec),目录号130-

096-535) 从PBMC纯化T细胞。或者,可从Leuko Paks (干细胞技术有限公司 (StemCell Technologies)) 直接纯化原代人类T细胞。

[0351] 为了制备编码CAR的慢病毒,在第0天时,可将HEK-293T细胞以40万个细胞/mL在补充有10%FBS (Hyclone或JR Scientific) 的6孔板的每孔的2mL DMEM (Gibco) 中铺板。在第1天,慢病毒可通过将慢病毒包装载体1.5ug psPAX2、0.5ug pMD2G与6孔板的每孔250uL Opti-MEM (Gibco) 中的0.5ug适当转移CAR载体 (“DNA混合物”) 混合在一起制备。250uL Opti-MEM中的10uL脂染胺2000 (英杰公司 (Invitrogen)) 可在室温下培育5分钟,并且接着添加到DNA混合物中。混合物可在室温下培育20分钟,并且将500uL的总体积缓慢添加到含有HEK-293T的孔的侧面。

[0352] 纯化的T细胞可在合适的培养基中活化。在第2天时,6孔板的每个孔的培养基可替换为每孔2mL的T细胞转导培养基,即补充有10%FBS的X-Vivo-15。在第3天时,T细胞可以以50万个细胞/mL在Grexx-24板的每孔1mL T细胞转导培养基 (Wilson Wolf, 目录号80192M) 中再悬浮。可收获来自HEK293T细胞的慢病毒上清液并通过0.45微米过滤器 (EMD Millipore) 以去除细胞碎片,并且随后连同100IU/mL人类IL-2一起添加到T细胞中。

[0353] 在第5天时,可将4.5mL的T细胞扩增培养基 (例如,包含IL-7+IL-15并且具有或不具有额外细胞外钾) 添加到Grexx-24板的每个孔中。在第9天和第13天时,可通过使用流式细胞术检测识别所需抗原 (例如重组抗原) 的T细胞的百分比来确定转导效率。使用如本文所述的T细胞扩增培养基按需要将细胞扩增到较大的烧瓶或G-Rex容器 (Wilson Wolf) 中。

[0354] 在第14天时,抗原特异性CAR-T细胞可冷冻保存,例如通过在如CryoStor[®]CS5、CryoStor[®]CS10或CryoStor[®]CS2 (BioLife Solutions) 的培养基中冷冻细胞。用重组抗原染色的细胞的百分比可在冷冻保存之前在克隆中归一化。

[0355] 2. IL-7+15补充剂

[0356] 以下实例中的数据表明例如第一刺激剂和第二刺激剂,例如使用IL-7 (5,000IU/ml) 和IL-15 (50IU/ml), 任选地加上增加的细胞外钾 (25mM), 与经典的基于IL-2的方法相比,可实现同种异体CAR T细胞的高度期望的表现型。

[0357] 我们首先在细胞培养基中测试IL-7和IL-15补充剂,其中钾保持在4mM基线水平。如图1A所示,当以基于IL-2的制造方法 (“遍及IL-2 • IL-2” -100IU/mL IL-2, 在第5天添加新鲜IL-2) 为基准时,基于L-7+IL-15的方法 (“IL-2 • IL-7+15” -100IU/mL IL-2直到第2天, 在第5天时,添加5000IU/mL IL-7和50IU/mL IL-15或在第5天时添加具有新鲜IL-7和IL-15的遍及“IL-7+15 • IL-7+15” -5000IU/mL IL-7和50IU/mL IL-15) 在最终产物中增加CD19特异性CAR T细胞的T_{SCM} (CD62L⁺CD45RO⁻)。如图1B所示,IL-7+15培养条件也在靶细胞暴露后增加CD19特异性CAR T细胞的细胞因子释放能力。

[0358] 3. 钾补充剂和滴定研究

[0359] 为了进一步提高我们同种异体CAR T细胞的效力,我们研究了将IL-7+15补充剂的益处以前实验相同的浓度与已知调节T细胞代谢的细胞外营养素组合。细胞外钾已显示为肿瘤微环境 (TME) 体内抑制效应T细胞的抑制机制。另一方面,在过继细胞疗法 (ACT) 的体外扩增期间,细胞外钾的增加导致具有较年轻的低分化表现型的T细胞的得以保存。

[0360] 如图2A所示,当与正常 (4mM) 钾浓度 (实心条) 相比时,增加的细胞外钾 (40mM, 空心

条)条件增加了同种异体抗CD19CAR T细胞在IL-2和IL-7+15方法中的T_{SCM}细胞的丰度。在图2B中,然而,出人意料地发现,当与正常钾浓度(4mM,实心条)相比时,增加的细胞外钾(40mM,空心条)条件在基于IL-2和IL-7+15的方法中对同种异体CAR T细胞的扩增能力产生负面影响。

[0361] 为了进一步增强在同种异体CAR T细胞生产期间高细胞外钾的益处,我们调整了对基于IL-7+15的同种异体CAR T细胞方法特别有效的细胞外钾的量。在同种异体CAR T细胞生产期间,25mM和10mM的细胞外钾浓度对人类T细胞的扩增没有负面影响(图3)。此外,在25mM细胞外钾中实现了T_{SCM}细胞的最大程度保存(图4)。

[0362] 4. 使用具有IL-7+15和钾的组合补充剂的效力研究

[0363] 连续杀伤分析涉及CAR-T细胞重复暴露于其靶,使得CAR-T细胞进行增殖,并且在某些情况下进行分化和耗竭。此分析用于研究在不同条件下扩增的同种异体CAR T细胞的效力。

[0364] 在确定了用于同种异体CAR T细胞制造的细胞外钾的有效浓度之后,我们继续评估IL-7+15与25mM浓度的钾的组合是否改进了我们的同种异体CAR T细胞的效力。当与具有正常(4mM)钾浓度的IL-2中制造的类似产物相比,基于IL-7+15的方法与25mM的细胞外钾补充剂的组合使得CAR T细胞产生最大效力(图5)。此外,与具有25mM钾的基于IL-2的方法相比,基于IL-7+15的方法与25mM的细胞外钾的组合显著改进了效力,并且还进一步改进了具有基线水平4mM钾的基于IL-7+15的方法。

[0365] 总之,我们已经鉴定了细胞因子(IL-7+IL-15)和代谢调节剂(细胞外钾)的高效组合,其可最大化同种异体CAR T细胞的效力。

[0366] 尽管已描述关于多种应用、方法、试剂盒和组合物的所公开的传授内容,但应了解,可在不脱离本文中的传授内容和以下所要求的发明的情况下做出多种变化和修改。提供上述实例以较好地阐明所公开的传授内容并且不打算限制本文中呈现的传授内容的范围。虽然已在这些示例性实施例方面描述本传授内容,但所属领域的技术人员将容易理解在不过度实验情况下这些示例性实施例的大量变化和修改是可能的。所有此类变化和修改都在现有传授内容的范围内。

[0367] SEQ ID NO. 概述图表

[0368]

SEQ ID NO.	描述	序列
1	自杀多肽	CPYSNPSLCSGGGGSELPTQGTFNSVSTNVSPAKPTTT ACPYSNPSLCSGGGGSPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSL VITLYCNHRNRRRVCKCPRPVV
2	自杀信号肽	MGTSLLCWMALCLLGADHADA
3	自杀信号肽 和自杀序列	MGTSLLCWMALCLLGADHADACPYSNPSLCSGGGG SELPTQGTFNSVSTNVSPAKPTTTACPYSNPSLCSGGG GSPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG LDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRV CKCPRPVV
4	利妥昔单抗 模拟表位	CPYSNPSLC
5	帕利珠单抗 表位	NSELLSLINDMPITNDQKKLMSNN
6	西妥昔单抗 模拟表位 1	CQFDLSTRRLKC
7	西妥昔单抗 模拟表位 2	CQYNLSSRALKC
8	西妥昔单抗 模拟表位 3	CVWQRWQKSYVC
9	西妥昔单抗 模拟表位 4	CMWDRFSRWYKC
10	纳武单抗表 位 1	SFVLNWyRMSPSNQTDKLAAPEDR
11	纳武单抗表 位 2	SGTYLCGAISLAPKAQIKE
12	QBEND-10 表位 1	ELPTQGTFNSVSTNV
25 表 1 p. 20	QBEND-10 表位 2	ELPTQGTFNSVSTNVSPAKPTTTA
13	阿仑单抗表 位	GQNDTSQTSSPS
14	FcγRIIIα 较 链	GLAVSTISSFFPPGYQ

[0369]

15	CD8 α 铰链	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACD
16	IgG1 铰链	EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIA RTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY TQKLSLSLSPGK
17	CD8 α 跨膜	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT
18	CD28 跨膜 结构域	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
19	CD3 ζ 结构 域 (1)	LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPR
26	CD3 ζ 结构 域 (2)	LRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPR
20	4-1BB	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCEL
21	4-1BB 核酸 序列	AAGCGCGGCAGGAAGAAGCTCCTCTACATTTTAA GCAGCCTTTTATGAGGCCCGTACAGACAACACAGG AGGAAGATGGCTGTAGCTGCAGATTTCCCGAGGAG GAGGAAGGTGGGTGCGAGCTG
22	胞内 CD28 包含核酸	AGATCCAAAAGAAGCCGCCTGCTCCATAGCGATTAC ATGAATATGACTCC ACGCCGCCCTGGCCCCACAAGGAAACACTACCAGC CTTACGCACCACCTAGAGATTCGCTGCCTATCGGA GC
23	CD3 ζ 胞内 结构域	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDF AAYRS
24	CD3 ζ 核酸 序列	AGGGTGAAGTTTTCCAGATCTGCAGATGCACCAGC GTATCAGCAGGGCCAGAACCAACTGTATAACGAGC TCAACCTGGGACGCAGGGAAGAGTATGACGTTTTG GACAAGCGCAGAGGACGGACCCTGAGATGGGTG GCAAACCAAGACGAAAAAACCCTCAGGAGGGTCT CTATAATGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCTGAAG CCTATTCTGAAATAGGCATGAAAGGAGAGCGGAGA AGGGGAAAAGGGCACGACGGTTTGTACCAGGGAC TCAGCACTGCTACGAAGGATACTTATGACGCTCTCC ACATGCAAGCCCTGCCACCTAGG

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注= “人工序列的描述: 合成肽”
 <400> 5
 Asn Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp
 1 5 10 15
 Gln Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn
 20

<210> 6
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注= “人工序列的描述: 合成肽”
 <400> 6
 Cys Gln Phe Asp Leu Ser Thr Arg Arg Leu Lys Cys
 1 5 10

[0003]

<210> 7
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注= “人工序列的描述: 合成肽”
 <400> 7
 Cys Gln Tyr Asn Leu Ser Ser Arg Ala Leu Lys Cys
 1 5 10

<210> 8
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注= “人工序列的描述: 合成肽”
 <400> 8
 Cys Val Trp Gln Arg Trp Gln Lys Ser Tyr Val Cys
 1 5 10

<210> 9
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0004]

<220>
 <221> 来源
 <223> /注= “人工序列的描述：合成肽”
 <400> 9
 Cys Met Trp Asp Arg Phe Ser Arg Trp Tyr Lys Cys
 1 5 10
 <210> 10
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注= “人工序列的描述：合成肽”
 <400> 10
 Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp
 1 5 10 15
 Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg
 20 25
 <210> 11
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注= “人工序列的描述：合成肽”
 <400> 11
 Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln
 1 5 10 15
 Ile Lys Glu
 <210> 12
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注= “人工序列的描述：合成肽”
 <400> 12
 Glu Leu Pro Thr Gln Gly Thr Phe Ser Asn Val Ser Thr Asn Val Ser
 1 5 10 15
 <210> 13
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 50 55 60
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 65 70 75 80
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 85 90 95
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 100 105 110
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 115 120 125
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 130 135 140
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 145 150 155 160
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 165 170 175
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 180 185 190
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 195 200 205
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 210 215 220

[0006]

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230
 <210> 17
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注= “人工序列的描述: 合成肽”
 <400> 17
 Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Ser Leu Val Ile Thr
 20
 <210> 18
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注= “人工序列的描述: 合成肽”
 <400> 18

[0008]

<212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注= “人工序列的描述: 合成多核苷酸”
 <400> 21
 aagcgcggca ggaagaagct cctctacatt ttaagcagc cttttatgag gcccgtagag 60
 acaacacagg aggaagatgg ctgtagctgc agatttcccg aggaggagga aggtgggtgc 120
 gagctg 126
 <210> 22
 <211> 123
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注= “人工序列的描述: 合成多核苷酸”
 <400> 22
 agatccaaaa gaagccgct gtcctatagc gattacatga atatgactcc acgccgcct 60
 ggccccacaa ggaacacta ccagccttac gcaccaccta gagatttcgc tgcctatcgg 120
 agc 123
 <210> 23
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注= “人工序列的描述: 合成多肽”
 <400> 23
 Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
 1 5 10 15
 Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
 20 25 30
 Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 35 40
 <210> 24
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注= “人工序列的描述: 合成多核苷酸”
 <400> 24
 aggggtgaagt tttccagatc tgcagatgca ccagcgtatc agcagggccca gaaccaactg 60
 tataacgagc tcaacctggg acgcagggaa gagtatgacg ttttgacaa gcgcagagga 120

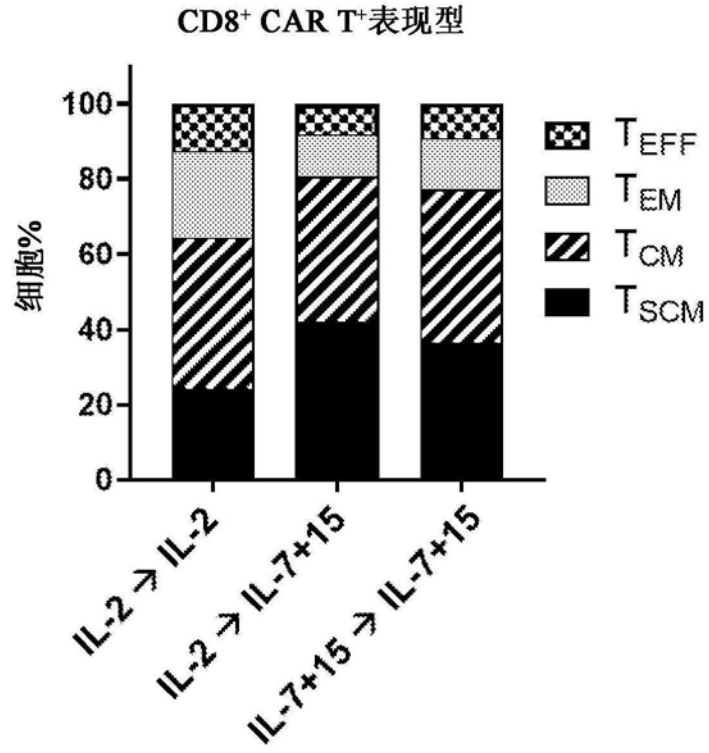


图1A

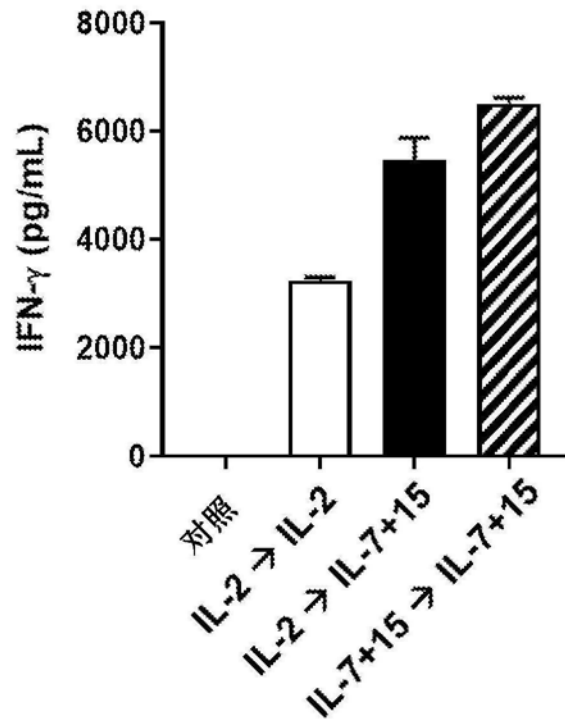


图1B

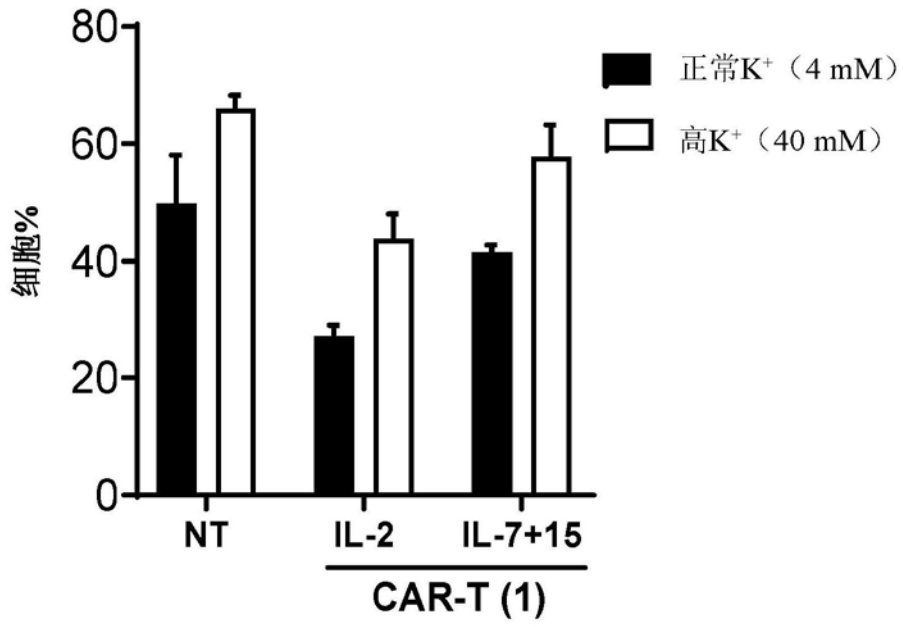


图2A

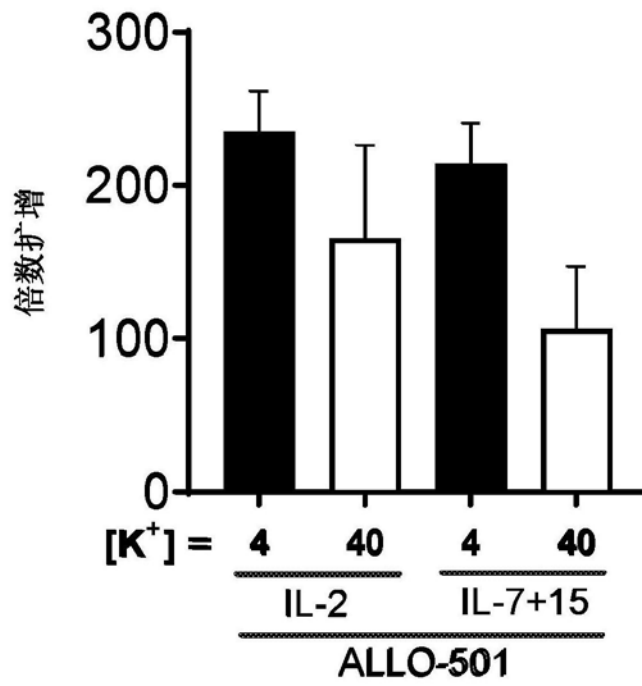


图2B

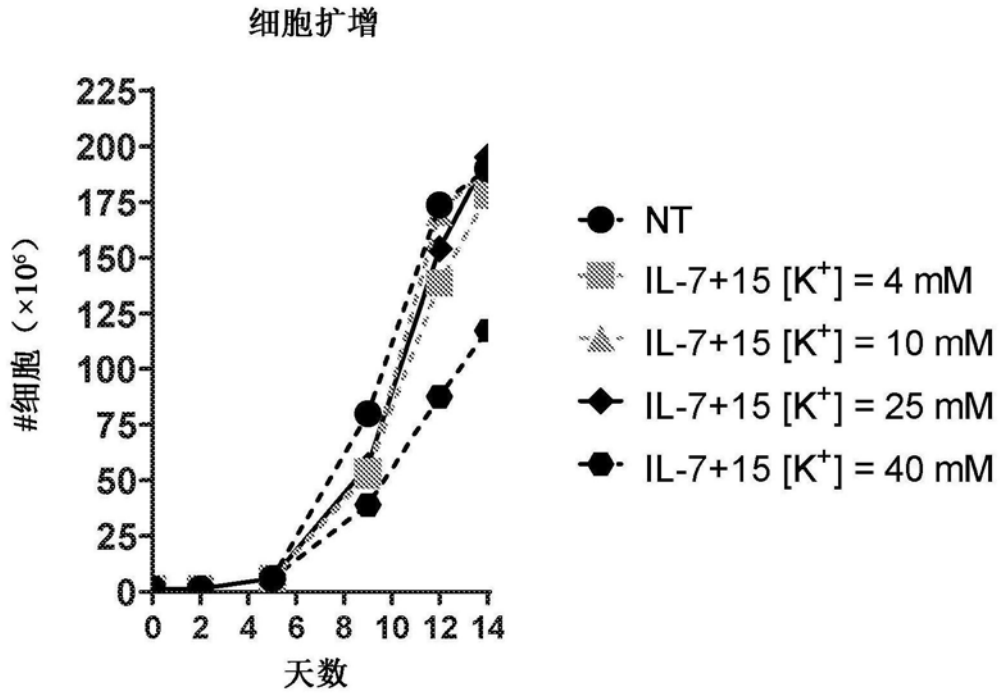


图3

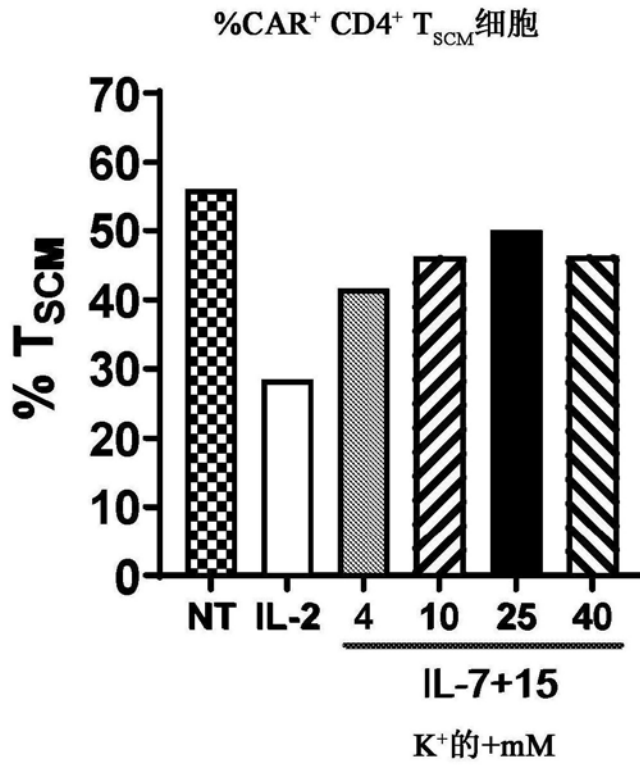


图4

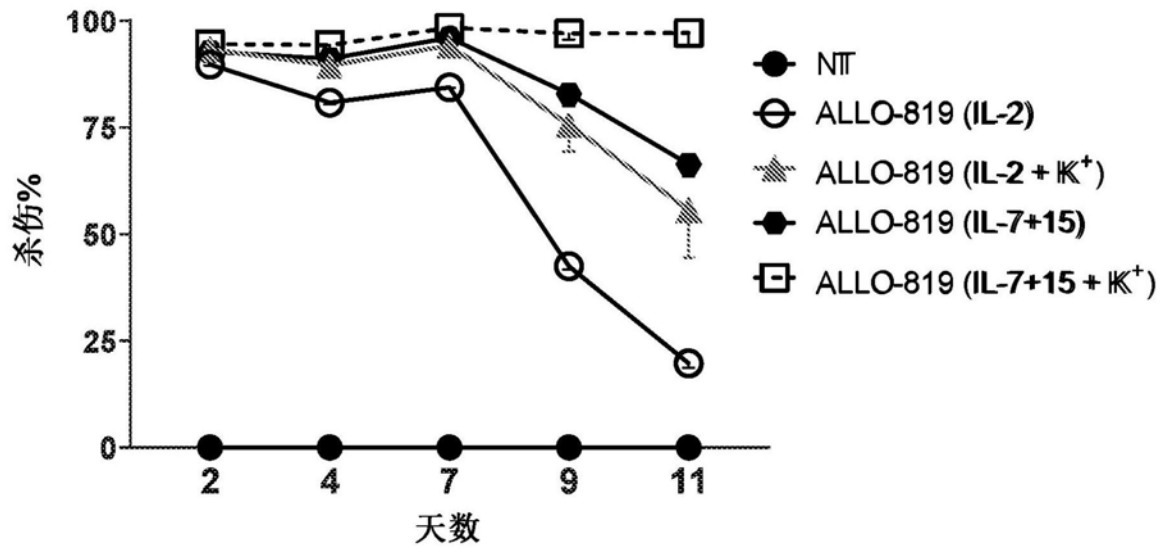


图5