



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107073138 B

(45)授权公告日 2018.06.29

(21)申请号 201680002926.1

C12N 5/0783(2006.01)

(22)申请日 2016.03.01

C12N 15/85(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107073138 A

(43)申请公布日 2017.08.18

(30)优先权数据

62/126,804 2015.03.02 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.03.27

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2016/075061 2016.03.01

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/138846 EN 2016.09.09

(73)专利权人 上海斯丹赛生物技术有限公司

地址 201203 上海市浦东新区哈雷路998号
4号楼201室

(72)发明人 吴昭

(74)专利代理机构 北京京万通知识产权代理有

限公司 11440

代理人 许天易 徐小琴

(51)Int.Cl.

A61K 48/00(2006.01)

C07K 14/705(2006.01)

(56)对比文件

WO 2013019615 A2,2013.02.07,

CN 103492406 A,2014.01.01,

WO 2014059173 A2,2014.04.17,

CN 104718284 A,2015.06.17,

WO 2014145252 A2,2014.09.18,

Victor D. Fedorov,等.PD-1- and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses.《Sci Transl Med.》.2013,第5卷(第215期),第1-25页.

Michael C. Milone,等.Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo.《Molecular Therapy》.2009,第17卷(第8期),参见第1453-1464页.

贺兰湘,等.sPD-1封闭PD-L促进抗瘤免疫的机制研究.《中华微生物学和免疫学杂志》.2006,第26卷(第5期),第463-467页.

审查员 宋智刚

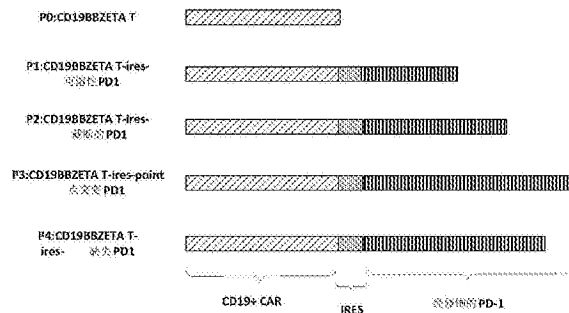
权利要求书1页 说明书25页 附图11页

(54)发明名称

降低由PD-L1诱导的免疫耐受性

(57)摘要

本公开涉及用于降低与CAR T细胞疗法相关的免疫耐受性的组合物和方法。本公开的实施例包括分离的核酸序列,所述分离的核酸序列包含编码经修饰的程序性细胞死亡蛋白质1(PD-1)的核酸序列和编码嵌合抗原受体(CAR)的核酸序列。



1. 一种包含人T细胞群的药物组合物,其中,所述人T细胞群包括包含核酸分子的人T细胞,所述核酸分子包含:编码经修饰的程序性细胞死亡蛋白质1 (PD-1) 的第一核酸序列,所述经修饰的程序性细胞死亡蛋白质1 (PD-1) 的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示;以及编码嵌合抗原受体 (CAR) 的第二核酸序列,所述嵌合抗原受体 (CAR) 包含:识别肿瘤抗原的胞外结构域;跨膜结构域;以及包含CD3- ζ 信号传导结构域和一个或多个共刺激分子的一个或多个信号传导结构域的胞内结构域;其中所述经修饰的PD-1和所述CAR被表达为基因产物,所述基因产物是单独的多肽。

2. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中,与表达所述CAR但是缺乏经修饰的PD-1的人T细胞相比,由靶细胞诱导的对所述人T细胞的细胞因子产生的抑制作用降低,并且所述靶细胞表达所述肿瘤抗原和程序性死亡配体1 (PD-L1)。

3. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中,所述肿瘤抗原是CD19。

4. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中,所述一个或多个共刺激分子包括4-1BB。

5. 权利要求1所述的药物组合物用于制备降低由靶细胞诱导的对表达嵌合抗原受体 (CAR) 的人T细胞的细胞因子产生的抑制作用的方法中使用的药物的用途,所述方法包含将核酸分子引入所述人T细胞中,其中:经修饰的程序性细胞死亡蛋白质1 (PD-1) 的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示,所述CAR包含:识别肿瘤抗原的胞外结构域;跨膜结构域;以及包含CD3- ζ 结构域和一个或多个共刺激分子的一个或多个信号传导结构域的胞内结构域,所述靶细胞表达所述肿瘤抗原和程序性死亡配体1 (PD-L1),并且所述经修饰的PD-1和所述CAR被表达为基因产物,所述基因产物是单独的多肽。

6. 根据权利要求5所述的用途,其中,所述肿瘤抗原是CD19。

7. 根据权利要求5所述的用途,其中,所述一个或多个共刺激分子包括4-1BB。

降低由PD-L1诱导的免疫耐受性

[0001] 相关专利申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年3月2日提交的题目为“经修饰的细胞及其用途”的美国临时专利申请号62/126,804的优先权,所述临时专利申请通过全文引用并入本文。

技术领域

[0003] 本公开涉及经修饰的细胞和使用者,尤其涉及用于降低与CAR T细胞疗法相关的免疫耐受性的组合物和方法。

背景技术

[0004] T细胞疗法已经证明了用于治疗癌症的疗效和治疗潜力。然而,它们的使用受到免疫抑制微环境的存在限制。免疫抑制微环境包括由程序性死亡-1 (PD-1) 与PD-L1配体 (PD-L1) 之间的相互作用所诱导的免疫耐受性。PD-1是在T细胞和抗原呈递细胞上的阴性共调节受体。PD-L1由几种细胞类型(例如,肿瘤细胞和其它组织细胞)表达,并且表现为由免疫微环境进行动态调节。因此,需要解决由PD-L1诱导的免疫耐受性,以改善T细胞疗法的疗效。

发明内容

[0005] 本公开的实施例涉及一种包含编码经修饰的程序性细胞死亡蛋白质1 (PD-1) 的核酸序列和编码嵌合抗原受体 (CAR) 的核酸序列的分离的核酸序列。在某些实施例中,经修饰的PD-1和CAR被表达为基因产物,所述基因产物为单独的多肽。

[0006] 在一些实施例中,CAR对存在于癌细胞上的肿瘤抗原是特异性的,并且其中所述癌细胞表达PD-L1。

[0007] 在一些实施例中,肿瘤抗原包含HER2、CD19、CD20、CD22、 κ 轻链、CD30、CD33、CD123、CD38、ROR1、ErbB3/4、EGFR、EGFRvIII、EphA2、FAP、癌胚抗原、EGP2、EGP40、间皮素、TAG72、PSMA、NKG2D配体、B7-H6、IL-13受体 α 2、IL-11受体 α 、MUC1、MUC16、CA9、GD2、GD3、HMW-MAA、CD171、Lewis Y、G250/CAIX、HLA-A1、MAGE A1、HLA-A2NY-ESO-1、PSC1、叶酸受体 α 、CD44v7/8、8H9、NCAM、VEGF受体、5T4、胎儿型乙酰胆碱受体、NKG2D配体、CD44v6、TEM1、TEM8,或者由肿瘤表达的病毒相关抗原。

[0008] 在一些实施例中,与编码野生型PD-1的胞内部分的核酸序列相比,编码经修饰的PD-1的核酸序列包含一个或多个核苷酸的取代或者缺失。

[0009] 在一些实施例中,与编码野生型PD-1的胞内部分的核酸序列相比,编码经修饰的PD-1的核酸序列包含多个核苷酸的缺失。在某些实施例中,经修饰的PD-1包含SEQ ID NO: 14的核酸序列。

[0010] 在一些实施例中,编码经修饰的PD-1的核酸序列包含编码截断的PD-1的核酸,所述截断的PD-1不包括胞内结构域。在某些实施例中,编码经修饰的PD-1的核酸序列包含SEQ ID NO: 12的核酸序列。

[0011] 在一些实施例中,与野生型PD-1相比,经修饰的PD-1包含一个或多个点突变。在某些实施例中,点突变包含野生型PD-1的磷酸化位点的一个或两个氨基酸点突变。

[0012] 实施例进一步涉及一种包含如上所述的核酸序列的表达载体。在一些实施例中,表达载体是选自自由以下组成的群组的病毒载体:逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体和腺相关病毒载体。

[0013] 实施例进一步涉及一种包含本公开的表达载体的细胞。在一些实施例中,所述细胞选自自由以下组成的群组:T细胞、NK细胞和NKT细胞。

[0014] 实施例进一步涉及一种包含抗肿瘤有效量的人T细胞群的药物组合物,其中所述人T细胞群包括包含如上所述的分离的核酸序列的人T细胞。在一些实施例中,PD-L1对所述人T细胞群的细胞因子产生的抑制作用小于PD-L1对不包含编码经修饰的PD-1的核酸序列的至少一部分的人T细胞的细胞因子产生的抑制作用。

[0015] 实施例进一步涉及一种治疗人患者的癌症的方法,该方法包含向人患者施用如本公开中所描述的药物组合物。

[0016] 实施例进一步涉及一种被工程化以表达经修饰的PD-1和嵌合抗原受体(CAR)的细胞,其中所述经修饰的PD-1不包括PD-1的跨膜部分或胞内部分,或其组合。在一些实施例中,细胞表达可溶性PD-1,例如以破坏PD-1与PD-L1的结合。例如,可溶性PD-1没有粘附到细胞的细胞膜。

[0017] 实施例进一步涉及一种治疗和/或抑制受试者的癌症的方法。该方法包括向受试者施用治疗有效量的可溶性受体,所述可溶性受体包括PD-1的胞外结构域。在一些实施例中,可溶性受体结合PD-L1蛋白质,并且可溶性受体破坏癌细胞的PD-1信号传导和/或破坏PD-1与PD-L1的结合。在某些实施例中,分离的可溶性受体多肽包括SEQ ID NO:9的氨基酸残基20-519。

[0018] 实施例进一步涉及一种包括受体多肽的经修饰的细胞,所述受体多肽的胞质结构域被截断,所述受体多肽是程序性细胞死亡蛋白质1(PD-1)受体多肽、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白质4(CTLA-4)受体多肽,或者B和T淋巴细胞衰减因子(BTLA)受体中的至少一种。

[0019] 实施例进一步涉及一种用于治疗患有疾病的受试者的方法。该方法包括向患有疾病的受试者施用细胞,其中所述细胞经遗传修饰以表达:受体多肽,所述受体多肽的胞质结构域被截断,所述受体多肽是程序性细胞死亡蛋白质1(PD-1)受体多肽、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白质4(CTLA-4)受体多肽,或者B和T淋巴细胞衰减因子(BTLA)受体中的至少一种;包括特异性抗体的抗原识别结构域和胞内结构域的嵌合抗原受体(CAR),或者经修饰的或野生型T细胞受体,所述特异性抗体与抗原结合。

[0020] 在一些实施例中,所述受体多肽是PD-1受体多肽,并且其中所述PD-1受体多肽的胞质结构域含有基于免疫受体酪氨酸的基序。

[0021] 实施例进一步涉及一种与相应的野生型细胞相比包括减少量的一种或多种受体的经修饰的细胞,所述一种或多种受体包括程序性细胞死亡蛋白质1(PD-1)、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白质4(CTLA-4),或者B和T淋巴细胞衰减因子(BTLA)中的至少一种。

[0022] 实施例进一步涉及一种用于治疗患有疾病的受试者的方法。该方法包括向患有疾病的受试者施用细胞,其中,与相应的野生型细胞相比,所述细胞经修饰以表达减少量的一种或多种受体,所述一种或多种受体包括程序性细胞死亡蛋白质1(PD-1)、细胞毒性T淋巴

细胞相关蛋白质4 (CTLA-4), 或者B和T淋巴细胞衰减因子 (BTLA) 中的至少一种。

[0023] 在一些实施例中, 经修饰的细胞进一步包括: 包括特异性抗体的抗原识别结构域和胞内结构域的嵌合抗原受体 (CAR), 或者经修饰的或野生型T细胞受体。在某些实施例中, 经修饰的细胞进一步包括: 包括特异性抗体的抗原识别结构域和胞内结构域的嵌合抗原受体 (CAR), 或者经修饰的或野生型T细胞受体, 所述特异性抗体与抗原结合。

[0024] 在一些实施例中, 与相应的野生型细胞相比, 经修饰的细胞具有一个或多个基因的降低的表达, 所述一个或多个基因的降低的表达与一种或多种受体的生物合成途径或输送途径相关。在某些实施例中, 经修饰的细胞包括一个或多个基因的破坏。在某些实施例中, 经修饰的细胞包括一个或多个基因的部分或完全缺失。在某些实施例中, 经遗传修饰的细胞在人患者体内复制。

[0025] 在一些实施例中, 经修饰的细胞形成人患者的记忆细胞。在这些情况下, 经修饰的细胞经静脉内施用给人患者。在某些实施例中, 经修饰的细胞持续存在于人患者内。例如, 经修饰的细胞是自体T细胞。对于另一个实例, 细胞可以包括B细胞、T细胞、NK细胞、胚胎细胞或树突细胞中的至少一种。

[0026] 在一些实施例中, 所述疾病可以包括癌症、免疫缺陷、自身免疫性疾病, 或肥胖症中的至少一种。

[0027] 提供该发明内容以用简化的形式介绍以下具体实施方式中进一步描述的精选概念。该发明内容并不旨在标识所要求保护的主题的关键特征或必要特征, 也不旨在用于限制所要求保护的主题的范围。

附图说明

[0028] 参照附图描述具体实施方式。在不同附图中使用相同的参考数字表示类似或相同的项目。

[0029] 图1是示出P0:CD19BBZETA、P1:CD19BBZETA-ires-可溶性PD1、P2:CD19BBZETA-ires-截断的PD1、P3:CD19BBZETA-ires-点突变PD1、P4:CD19BBZETA-ires-缺失PD1的DNA构建体的示意图。

[0030] 图2包括图2A和图2B, 是显示CAR和经修饰的PD-1在转导的293T和K562细胞上的表达的一系列图像。图2A显示CAR在转导的293T和K562细胞上的表达。图2B显示经修饰的PD-1在转导的293T和K562细胞上的表达。

[0031] 图3包括图3A至图3C, 是显示CAR和经修饰的PD-1在原代T细胞上的表达的一系列图像。图3A显示CAR在转导的原代T细胞上的表达。图3B和图3C显示经修饰的PD-1在转导的原代T细胞上的表达。

[0032] 图4包括图4A和图4B, 是显示用CAR和经修饰的PD-1转导的T细胞的细胞毒性的一系列图像。图4A显示每 10^4 个T细胞的IFN- γ 释放, 所述T细胞用CAR和经修饰的PD-1转导, 其中E:T比例是10:1并且用CD19⁺细胞培养24小时。图4B表明, 每 10^4 个T细胞杀死CD19⁺细胞, 损失T细胞用CAR和经修饰的PD-1转导, 其中E:T比例是10:1并且培养24小时。

[0033] 图5显示PD-L1在转导的Na1M6细胞上的表达。

[0034] 图6包括图6A和图6B, 是证明经修饰的PD-1降低了由PD-L1诱导的免疫耐受性的一系列图像。图6A显示每 10^4 个T细胞的IFN- γ 释放, 所述T细胞用CAR和经修饰的PD-1转导, 其

中E:T比例是10:1并且用CD19⁺细胞和CD19⁺/PD-L1⁺细胞培养24小时。这些结果表明,由PD-L1诱导的细胞毒性的抑制作用在用CAR和经修饰的PD-1转导的T细胞上降低。

[0035] 图6B示出与单独用CAR转导的T细胞相比,由PD-L1诱导的细胞毒性的损失在用CAR和经修饰的PD-1转导的T细胞上降低。

具体实施方式

[0036] 概述

[0037] 本公开涉及以下发现:关于基于CAR T细胞的疗法,由PD-L1诱导的免疫耐受性可以通过经遗传修饰的PD-1在这些T细胞上的表达而降低。在一些实施例中,这些T细胞包括编码CAR和经遗传修饰的PD-1的核酸序列,使得经修饰的PD-1和CAR被表达为基因产物,所述基因产物是这些T细胞上的单独的多肽。遗传修饰的实例包括与PD-1的胞内部分的表达或功能相关的一个或多个核苷酸的取代或缺失。

[0038] 在一些实施例中,本公开提供了一种T细胞,所述T细胞被工程化以表达抗CD19的CAR和经修饰的PD-1,使得PD-L1对T细胞的细胞因子产生的抑制作用显著小于PD-L1对不包括编码经修饰的PD-1的核酸序列的至少一部分的T细胞的细胞因子产生的抑制作用。在一些情况下,CAR对存在于肿瘤细胞上的肿瘤抗原是特异性的,并且所述肿瘤细胞表达PD-L1。因此,当本公开的工程化T细胞被输注到患者中时,所述工程化T细胞可以降低由肿瘤细胞的PD-L1诱导的免疫耐受性,并且进一步消除患者体内的这些肿瘤细胞。

[0039] 定义

[0040] 除非另有定义,本文所使用的所有技术和科学术语具有如本公开所属的领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。虽然在本公开的实践或测试中可以使用与本文描述的方法和材料类似或等同的任何方法和材料,但是描述了优选的方法和材料。对于本公开的目的,下列术语定义如下。

[0041] 本文使用冠词“一(a)”和“一个(an)”指的是一个或多于一个(即,指的是至少一个)该冠词的语法对象。举例来说,“元件”表示一个元件或多于一个元件。

[0042] “约”是指与参考量、水平、值、数量、频率、百分比、量纲、大小、用量、重量或长度相比,量、水平、值、数量、频率、百分比、量纲、大小、用量、重量或长度的变化高达30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1%。

[0043] 如本文所使用的,术语“活化”指的是已经被充分刺激以诱导可检测的细胞增殖的T细胞的状态。活化也可与诱导的细胞因子产生和可检测的效应子功能相关。术语“活化的T细胞”尤其指的是正经历细胞分裂的T细胞。

[0044] 术语“抗体”以最广泛的意义使用,并且具体包括单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多特异性抗体(例如,双特异性抗体),以及抗体片段,只要它们表现出期望的生物学活性或功能即可。本公开中的抗体可以以多种形式存在,包括例如多克隆抗体、单克隆抗体、Fv、Fab和F(ab)₂,以及单链抗体和人源化抗体(Harlow等人,1999年,载于:《使用抗体:实验室手册(Using Antibodies:A Laboratory Manual)》,冷泉港实验室出版社,纽约;Harlow等人,1989年,载于:《抗体:实验室手册(Antibodies:A Laboratory Manual)》,冷泉港,纽约;Houston等人,1988年,美国国家科学院院报85:5879-5883;Bird等人,1988年,《科学(Science)》242:423-426)。

[0045] “抗体片段”包含全长抗体的一部分,通常包含抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括:Fab、Fab’、F(ab’)2和Fv片段;双抗体;线性抗体;单链抗体分子;以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0046] “Fv”是包含完整抗原识别和结合位点的最小抗体片段。此片段由一个重链和一个轻链可变区结构域通过紧密的、非共价结合的二聚体组成。通过这两个结构域的折叠发出提供用于抗原结合的氨基酸残基并赋予抗体抗原结合特异性的六个高变环(3个环各自来自H和L链)。但是,甚至单个可变结构域(或者仅仅包括抗原特异的三个互补决定区(CDR)的Fv的一半)也具有识别和结合抗原的能力,尽管亲和力比完整结合位点低。如本文所使用的,“抗体重链”指的是以它们天然存在的构象存在于所有抗体分子中的两类多肽链中较大的一类。如本文所使用的,“抗体轻链”指的是以它们天然存在的构象存在于所有抗体分子中的两类多肽链中较小的一类。 κ 和 λ 轻链指的是两种主要的抗体轻链同种型。

[0047] 如本文所使用的,术语“合成抗体”是指利用重组DNA技术产生的抗体,例如,如本文所述的由噬菌体表达的抗体。该术语也应当被解释为指通过编码抗体的DNA分子的合成而产生的抗体,并且所述DNA分子表达抗体蛋白质,或表示抗体的氨基酸序列,其中DNA或氨基酸序列是利用本领域可用且公知的合成DNA或氨基酸序列技术获得的。

[0048] 如本文所使用的,术语“抗原”被定义为引起免疫应答的分子,所述免疫应答可涉及抗体产生,或特异性免疫活性细胞的活化,或这两者。抗原可以包括任何大分子,实际上包括所有蛋白质或肽,或者源自重组或基因组DNA的分子。例如,包括编码引发免疫应答的蛋白质的核苷酸序列或部分核苷酸序列的DNA因此编码如本文所使用的术语“抗原”。此外,抗原不一定仅由基因的全长核苷酸序列编码。进一步地,抗原可以通过生物学样本产生、合成或衍生,所述生物学样本包括组织样本、肿瘤样本、细胞或生物学流体。

[0049] 如本文所使用的,术语“抗肿瘤作用”指的是与肿瘤体积的减小、肿瘤细胞数量的减少、转移数量的减少、具有肿瘤细胞的受试者的预期寿命的增加,或者与癌性病征相关的各种生理症状的改善相关的生物学效应。“抗肿瘤作用”也可由本公开的肽、多核苷酸、细胞和抗体在预防肿瘤首次出现的能力表示。

[0050] 术语“自体抗原”指的是由免疫系统错误识别为外源的抗原。自体抗原包括细胞蛋白质、磷蛋白质、细胞表面蛋白质、细胞脂质、核酸、糖蛋白,包括细胞表面受体。

[0051] 术语“自体的”用于描述源自相同个体的物质,所述物质随后被再次引入到个体中。

[0052] “同种异体的”用于描述源自相同物种的不同动物的移植物。

[0053] “异种异体的”用于描述源自不同物种的动物的移植物。

[0054] 如本文所使用的,术语“癌症”被定义为以畸变细胞的快速和失控生长为特征的疾病。癌症细胞可局部蔓延或通过血流和淋巴系统蔓延至身体的其它部位。各种癌症的实例包括乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、子宫颈癌、皮肤癌、胰腺癌、结肠直肠癌、肾癌、肝癌、脑癌、淋巴瘤、白血病、肺癌等等。

[0055] 在整个本说明书中,除非上下文另有要求,词语“包含”和“包括”将被理解为指包括所陈述的步骤或元素或者步骤或元素的集合,但是不排除任何其它步骤或元素或者步骤或元素的集合。

[0056] “由……组成”是指包括并且限于短语“由……组成”之后所描述的内容。因此,短

语“由……组成”表示所列元素是必要的或强制性的,并且其它元素可以不存在。

[0057] “基本上由……组成”是指包括该短语后面列出的任何元素,并且限于对本公开中针对所列元素说明的活性或作用不干扰或无贡献的其它元素。因此,短语“基本上由……组成”表示所列元素是必要的或强制性的,但是其它元素是任选的,并且根据它们是否影响所列元素的活性或作用可以存在或不存在。

[0058] 术语“互补的”和“互补”指的是通过碱基配对原则相关的多核苷酸(即核苷酸的序列)。例如,序列“A-G-T”与序列“T-C-A”是互补的。互补可以是“部分的”,其中仅一些核酸的碱基根据碱基配对原则进行匹配。或者,核酸之间可存在“完全”或“总体”的互补。核酸链之间的互补程度对核酸链之间杂交的效率和强度具有显著影响。

[0059] “对应于”是指(a)具有与参考多核苷酸序列的全部或部分基本上相同或互补的核酸序列或编码与肽或蛋白质中的氨基酸序列相同的氨基酸序列的多核苷酸;或者(b)具有与参考肽或蛋白质中的氨基酸的序列基本上相同的氨基酸序列的肽或多肽。

[0060] “共刺激配体”包括特异性结合T细胞上的同源共刺激分子的抗原呈递细胞(例如,APC、树突细胞、B细胞等等)上的分子,由此除了通过例如将TCR/CD3复合物与负载有肽的MHC分子结合提供的初级信号之外,还提供介导T细胞应答的信号,所述T细胞应答包括增殖、活化、分化等等。共刺激配体可包括CD7、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、可诱导的共刺激配体(ICOS-L)、细胞间粘附分子(ICAM)、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB、HVEM、淋巴毒素β受体、3/TR6、ILT3、ILT4、HVEM、结合To11配体受体的激动剂或抗体和与B7-H3特异性结合的配体。共刺激配体也包括,特别是与存在于T细胞上的共刺激分子特异性结合的抗体,诸如CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、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。

[0061] “共刺激分子”指的是与共刺激配体特异性结合的T细胞上的同源结合配偶体,由此由T细胞介导共刺激应答,诸如增殖。共刺激分子包括MHC I类分子、BTLA和To11样受体。

[0062] “共刺激信号”指的是与初级信号(诸如TCR/CD3接合)结合导致T细胞增殖和/或关键分子的上调或下调的信号。

[0063] 如本文所使用的,术语“疾病”和“病症”可以互换使用,或者可以是不同的,因为特殊的疾病或病症可以不具有已知的致病因子(因此不能用病因学解决),因此其不被公认为疾病而是为不合适的病症或症状,其中临床医师已经鉴定出或多或少的特异系列症状。如本文所使用的,“疾病”是受试者的一种健康状态,其中受试者不能维持体内平衡,并且其中如果不改善该疾病,则受试者的健康继续恶化。与之相比,受试者中的“紊乱”是一种健康状态,其中动物能够维持体内平衡,但是其中动物的健康状态与它没有处于该紊乱相比不太有利。保持不治疗,紊乱不一定引起动物健康状态的进一步降低。

[0064] 如本文所使用的,术语“有效的”是指足以实现所期望的、预期的或意图的结果。例如,“有效量”可以是足以产生治疗性或预防性益处的化合物的量。

[0065] “编码”指的是多核苷酸(诸如基因、cDNA或mRNA)中核苷酸的特异性序列在生物学过程中用作合成其它聚合物和大分子的模板的固有性质,所述聚合物和大分子具有确定的核苷酸序列(即,rRNA、tRNA和mRNA)或确定的氨基酸序列和由其产生的生物学性质。因此,如果对应于基因的mRNA的转录和翻译在细胞或其它生物学系统中产生蛋白质,则该基因编

码蛋白质。核苷酸序列与mRNA序列相同并且通常在序列表中提供的编码链和用作基因或cDNA转录的模板的非编码链可被称为编码那个基因或cDNA的蛋白质或其它产物。

[0066] 关于多核苷酸,术语“外源的”指的是在野生型细胞或生物体中并非天然存在但是通常通过分子生物学技术将其引入到细胞中的多核苷酸序列。外源多核苷酸的实例包括载体、质粒,和/或编码所需蛋白质的人造核酸构建体。对于多核苷酸,术语“内源的”或“天然的”指的是可在给定的野生型细胞或生物体中找到的天然存在的多核苷酸序列。同样,从第一生物体分离并且通过分子生物学技术转移到第二生物体的特定多核苷酸序列通常被认为相对于所述第二生物体是“外源”多核苷酸。在具体的实施例中,多核苷酸序列可以通过分子生物学技术被“引入”到已包含这样的多核苷酸序列的微生物中,例如以创建另外的天然存在的多核苷酸序列的一个或多个附加拷贝,并且由此促进所编码的多肽的过表达。

[0067] 如本文所使用的,术语“表达”被定义为由它的启动子驱动的特定核苷酸序列的转录和/或翻译。

[0068] “表达载体”指的是包括重组多核苷酸的载体,所述重组多核苷酸包括可操作地连接至待表达的核苷酸序列的表达控制序列。表达载体包括用于表达的足够的顺式作用元件;用于表达的其它元件可由宿主细胞供应或在体外表达系统中供应。表达载体包括本领域已知的所有那些表达载体,诸如并入重组多核苷酸的粘粒、质粒(例如,裸露或包含在脂质体中)和病毒(例如,慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0069] “同源的”指的是两个多肽之间或两个核酸分子之间的序列相似性或序列同一性。当两个比较序列中的位置被相同的碱基或氨基酸单体亚单元占据时,例如,如果两个DNA分子的每一个中的位置被腺嘌呤占据,则所述分子在那个位置上是同源的。两个序列之间的同源性百分比为两个序列共有的匹配或同源位置数除以被比较的位置数再乘以100所得的函数。例如,如果两个序列中10个位置中的6个是匹配或同源的,则两个序列是60%同源的。举例来说,DNA序列ATTGCC和TATGGC共有50%的同源性。通常,当两个序列进行比对给出最大同源性时才进行比较。

[0070] 术语“免疫球蛋白”或“Ig”指的是起到抗体作用的一类蛋白质。包括在该类蛋白质中的五个成员为IgA、IgG、IgM、IgD和IgE。IgA为存在于身体分泌物(诸如唾液、泪液、母乳)、胃肠分泌物以及呼吸道和泌尿生殖道的粘液分泌物中的初级抗体。IgG是最常见的循环抗体。IgM是在多数受试者的初级免疫应答中产生的主要免疫球蛋白。它是在凝集、补体结合和其它抗体应答中最有效的免疫球蛋白,并且在抵御细菌和病毒方面是很重要的。IgD是不具有已知抗体功能但可用作抗原受体的免疫球蛋白。IgE是在暴露于过敏原后,通过引起从肥大细胞和嗜碱性粒细胞释放介体而介导速发型超敏反应的免疫球蛋白。

[0071] “分离的”是指基本上或实质上不含通常在其天然状态下附带着的成分的物质。例如,如本文所使用的,“分离的多核苷酸”指的是在天然存在的状态下被来自其两侧的序列所纯化的多核苷酸,例如从正常毗邻于所述片段的序列所移除的DNA片段。可选地,如本文所使用的,“分离的肽”或“分离的多肽”等指的是肽或多肽分子从其天然细胞环境中的体外分离和/或纯化,以及与细胞的其它成分关联。

[0072] 在本公开的上下文中,使用下列普遍存在的核酸碱基的缩写。“A”指的是腺苷,“C”指的是胞嘧啶,“G”指的是鸟苷,“T”指的是胸苷,以及“U”指的是尿苷。

[0073] 除非另有说明,“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括彼此互为简并版本并且编码

相同的氨基酸序列的所有核苷酸序列。短语编码蛋白质或RNA的核苷酸序列也可包括内含子,在一定程度上编码蛋白质的核苷酸序列可在某些版本中包含(一个或多个)内含子。

[0074] 如本文所使用的,“慢病毒”指的是逆转录病毒科的属。在逆转录病毒中,慢病毒是唯一能够感染非分裂细胞的;它们可以将显著量的遗传信息传递到宿主细胞的DNA中,所以它们是基因传递载体的最有效的方法之一。HIV、SIV和FIV是慢病毒的所有实例。源自慢病毒的载体提供了实现显著水平的基因体内转移的工具。

[0075] 如本文所使用的,术语“调节”是指与缺少治疗或化合物的受试者中的应答水平相比,和/或与在另外相同但未治疗的受试者中的应答水平相比,介导受试者中的应答水平的可检测的增加或减少。该术语包括扰乱和/或影响天然信号或应答,由此介导受试者、优选人中的有益的治疗性应答。

[0076] 当使一核酸与另一核酸序列处于功能性关系时,所述核酸即是“可操作地连接”。例如,如果前序列或分泌前导序列的DNA被表达为参与多肽的分泌的前蛋白,则其可操作地连接至所述多肽的DNA;如果启动子或增强子影响序列的转录,则其可操作地连接至编码序列;或者如果核糖体结合位点被定位成便于翻译,则其可操作地连接至编码序列。通常,“可操作地连接”是指被连接的DNA序列是连续的,并且在分泌前导序列的情况下是连续的并且处于阅读相。然而,增强子不一定是连续的。连接是通过在方便的限制性位点进行接合而实现的。如果不存在此类位点,则根据常规实践使用合成的寡核苷酸接头或连接器。

[0077] 术语“过表达的”肿瘤抗原或肿瘤抗原的“过表达”意在表示相对于在来自组织或器官的正常细胞中的表达水平,肿瘤抗原在来自患者的特异性组织或器官内的疾病区域(如实体肿瘤)的细胞中的异常表达水平。患有特征在于肿瘤抗原的过表达的实体肿瘤或恶性血液疾病的患者可以通过本领域中已知的标准测定法来确定。

[0078] 免疫原性组合物的“肠胃外”施用包括,例如,皮下注射(s.c.)、静脉内注射(i.v.)、肌肉注射(i.m.)、或胸骨内注射、或输液技术。

[0079] 术语“患者”、“受试者”、“个体”等等在本文中可互换使用,并且指的是不论是在体外或原位服从本文所描述的方法的任何动物或其细胞。在某些非限制性实施例中,患者、受试者或个体是人。在一些实施例中,术语“受试者”意在包括可引发免疫应答的活生物体(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。

[0080] 如本文所使用的,叙述“多核苷酸”或“核酸”是指mRNA、RNA、cRNA、rRNA、cDNA或DNA。该术语通常指的是长度为至少10个碱基的聚合体形式的核苷酸,所述核苷酸是核糖核苷酸或脱氧核苷酸或任一类型核苷酸的经修饰形式。该术语包括DNA和RNA的单链和双链形式。

[0081] 术语“多核苷酸变体”和“变体”等指的是显示与参考多核苷酸序列具有基本序列同一性的多核苷酸或在下文定义的低严谨性条件下与参考序列杂交的多核苷酸。这些术语还包括通过至少一个核苷酸的添加、缺失或取代而区别于参考多核苷酸的多核苷酸。因此,术语“多核苷酸变体”和“变体”包括其中一个或多个核苷酸被添加或缺失,或用不同的核苷酸置换的多核苷酸。在这方面,本领域技术人员很好理解的是,可以对参考多核苷酸进行某些改变,包括突变、添加、缺失和取代,由此所改变的多核苷酸保持参考多核苷酸的生物学功能或活性,或者相对于所述参考多核苷酸具有增加的活性(即,优化)。多核苷酸变体包括,例如,与本文中所描述的参考多核苷酸序列具有至少50%(和至少51%至至少99%,以

及在之间的所有整数百分比,例如,90%、95%或98%)序列同一性的多核苷酸。术语“多核苷酸变体”和“变体”还包括天然存在的等位基因变体和编码这些酶的直系同源物。

[0082] “多肽”、“多肽片段”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,用来指氨基酸残基的聚合物及其变体和合成类似物。因此,这些术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是合成的非天然存在的氨基酸的氨基酸聚合物(诸如相应的天然存在的氨基酸的化学类似物),以及适用于天然存在的氨基酸聚合物。在某些方面,多肽可以包括通常催化不同的化学反应(即,增加不同的化学反应的速率)的酶多肽,或“酶”。

[0083] 叙述多肽“变体”指的是通过至少一个氨基酸残基的添加、缺失或取代而区别于参考多肽序列的多肽。在某些实施例中,多肽变体通过一个或多个取代基而区别于参考多肽,所述取代基可以是保守的或非保守的。在某些实施例中,所述多肽变体包含保守性取代基,并且在这方面,本领域中很好理解的是,一些氨基酸可以被改变为具有广泛相似性质的其它氨基酸,而不改变多肽的活性性质。多肽变体还包括其中一个或多个氨基酸被添加或缺失,或用不同的氨基酸残基置换的多肽。

[0084] 如本文所使用的,术语“启动子”被定义为通过细胞的合成机制,或引入的合成机制识别的DNA序列,它是启动多核苷酸序列的特异性转录所必需的。表达“控制序列”指的是在特定宿主生物体中表达可操作连接的编码序列所必需的DNA序列。例如适于原核生物的控制序列包括启动子,任选地包括操纵子序列和核糖体结合位点。真核细胞已知利用启动子、多腺苷酸化信号,以及增强子。

[0085] 术语“结合”或“与……相互作用”是指一个分子识别并粘附到样本或生物体中的特定第二分子,但基本上不识别或粘附到样本中的其它结构上无关的分子。如本文关于抗体所使用的,术语“特异性结合”是指识别特异性抗原但基本上不识别或结合样本中的其它分子的抗体。例如,与来自一个物种的抗原特异性结合的抗体也可与来自一个或多个物种的抗原结合。但是,这种交叉物种反应性本身没有将抗体的类别改变为特异性的。在另一个实例中,与抗原特异性结合的抗体也可与不同等位基因形式的抗原结合。然而,这种交叉反应性本身没有将抗体的类别改变为特异性的。在一些情况下,术语“特异性结合”或“特异性地结合”可以在提及抗体、蛋白质或肽与第二化学物种的相互作用时使用,用于指所述相互作用依赖于化学物种上特定结构(例如,抗原决定簇或表位)的存在;例如,抗体通常识别和结合特异性蛋白质结构而不是蛋白质。如果抗体对表位“A”是特异性的,则在包含标记的“A”和抗体的反应中,包含表位A(或游离的、未标记的A)的分子的存在将降低与抗体结合的标记的A的量。

[0086] “可溶性受体”是不与细胞膜结合的受体多肽。可溶性受体是缺乏跨膜结构域和胞质结构域的最常见的配体结合受体多肽。可溶性受体可包括附加的氨基酸残基,诸如用于多肽的纯化或为多肽与底物粘附提供位点的亲和标签,或免疫球蛋白恒定区序列。许多细胞表面受体具有天然存在的由蛋白水解产生的可溶性对应物。当可溶性受体多肽缺乏分别提供膜锚定或信号转导的足够的跨膜和胞内多肽区段的部分时,它们被认为是基本上不含跨膜和胞内多肽区段。

[0087] “统计学上显著的”是指结果不太可能是偶然发生的。统计显著性可通过本领域已知的任何方法来确定。通常使用的显著性测量值包括P值,它是在无效假设是真的情况下所观察到的事件将发生的频率或概率。如果获得的p值小于显著性水平,则无效假设被拒绝。

在简单的情况下,显著性水平被限定在0.05或更小的p值。“下降的”或“减少的”或“更少的”量通常是“统计学上显著的”或生理学上显著的量,并且可以包括是本文中描述的量或水平的约1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40或50倍或更多倍(例如,100、500、1000倍)(包括在之间和在1以上的所有整数和小数点,例如,1.5、1.6、1.7、1.8等)的下降。

[0088] 术语“刺激”是指通过将刺激分子(例如,TCR/CD3复合物)与其同源配体结合而诱导的初级应答,由此介导信号转导事件,诸如经TCR/CD3复合物的信号转导。刺激可介导某些分子的改变的表达,诸如TGF- β 的下调和/或细胞骨架结构的再组织等等。

[0089] “刺激分子”指的是与存在于抗原呈递细胞上的同源刺激配体特异性结合的T细胞上的分子。

[0090] “刺激配体”指的是当存在于抗原呈递细胞(例如,APC、树突细胞、B-细胞等等)上时,可与T细胞上的同源结合配偶体(在本文中被称为“刺激分子”)特异性结合的配体,由此介导T细胞的初级应答,包括活化、免疫应答的开始、增殖等等。刺激配体在本领域中是公知的,并且尤其包括负载有肽的MHC I类分子、抗-CD3抗体、超激动剂抗-CD28抗体,以及超激动剂抗-CD2抗体。

[0091] 如本文所使用的,“基本上纯化的”细胞为基本上不含其它细胞类型的细胞。基本上纯化的细胞也指的是已经与在其天然存在状态下与其正常相关联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指的是均质细胞群。在其它情况下,该术语仅仅指的是已经与在其天然状态下与其自然相关联的细胞分离的细胞。在一些实施例中,细胞在体外培养。在其它实施例中,细胞不在体外培养。

[0092] 如本文所使用的,术语“治疗的”表示治疗和/或预防。治疗作用通过疾病状态的抑制、缓和或根除而获得。

[0093] 术语“治疗有效量”指的是将引发由研究者、兽医、医生或其它临床医师所寻求的组织、系统或受试者的生物学或医学应答的受试者化合物的量。术语“治疗有效量”包括当施用化合物时足以预防被治疗的紊乱或疾病的迹象或症状中的一个或多个的发展,或在一定程度上减轻被治疗的紊乱或疾病的迹象或症状中的一个或多个的化合物的量。治疗有效量将根据化合物、疾病和其严重性、以及待治疗的受试者的年龄、重量等而变化。

[0094] 如本文所使用的术语,“治疗”疾病是指降低受试者经历的疾病或紊乱的至少一种迹象或症状的频率或严重性。

[0095] 如本文所使用的,术语“转染的”或“转化的”或“转导的”指的是外源核酸被转移或引入到宿主细胞中的过程。“转染的”或“转化的”或“转导的”细胞是已经由外源核酸转染、转化或转导的细胞。所述细胞包括原代受试者细胞及其子代。

[0096] 如本文所使用的,短语“在转录控制下”或“可操作地连接”是指启动子在相对于多核苷酸的正确位置和朝向上,以控制通过RNA聚合酶进行的转录的开始和多核苷酸的表达。

[0097] “载体”为包括分离的核酸,并且可用于将分离的核酸传递至细胞内部的物质组合物。很多载体在本领域中是已知的,包括线性多核苷酸、与离子或两性分子化合物相关的多核苷酸、质粒和病毒。因此,术语“载体”包括自主复制的质粒或病毒。该术语也应当被解释为包括便于将核酸转移到细胞中的非质粒和非病毒化合物,例如聚赖氨酸化合物、脂质体等等。病毒载体的实例包括但不限于,腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体等等。

例如,慢病毒是复杂的逆转录病毒,其中,除了常见的逆转录病毒基因gag、pol和env之外,其还包含具有调节或结构功能的其它基因。慢病毒载体在本领域中是公知的。慢病毒的一些实例包括人类免疫缺陷病毒:HIV-1、HIV-2和猿猴免疫缺陷病毒:SIV。慢病毒载体通过将大多数的HIV的致病基因剔除而产生,例如基因env、vif、vpr、vpu和nef被删除使得载体具有生物安全性。

[0098] 范围:在整个本公开中,本公开的各个方面可以以范围格式给出。应当理解,范围格式的描述仅是为了方便和简洁,并且不应当被解释为对本公开的范围的硬性限制。因此,范围的描述应被认为具有具体公开的所有可能的子范围以及处于那个范围内的单个数值。例如,范围的描述诸如从1至6应被认为具有具体公开的子范围诸如从1至3、从1至4、从1至5、从2至4、从2至6、从3至6等,以及那个范围内的单个数值,例如,1、2、2.7、3、4、5、5.3和6。不管范围的宽度如何,这一点都是适用的。

[0099] 本公开涉及分离的核酸序列、包括分离的核酸序列的载体、包括分离的核酸序列的细胞和使用这些细胞治疗癌症的方法。

[0100] 组合物和治疗应用

[0101] 本文的实施例涉及一种包括编码经修饰的程序性细胞死亡蛋白质1 (PD-1) 的核酸序列和编码嵌合抗原受体 (CAR) 的核酸序列的分离的核酸序列。在一些实施例中,经修饰的PD-1和CAR被表达为基因产物,所述基因产物是单独的多肽。在这些情况下,CAR对存在于癌细胞上的肿瘤抗原是特异性的,并且所述癌细胞表达PD-L1。

[0102] CAR是通常包括胞外结构域和胞内结构域分子。胞外结构域包括靶特异性结合元件。胞内结构域(例如胞质结构域)包括共刺激信号传导区和 ζ 链部分。共刺激信号传导区指的是包括共刺激分子的胞内结构域的CAR的一部分。共刺激分子为淋巴细胞针对抗原的有效应答所需要的细胞表面分子,而不是抗原受体或它们的配体。

[0103] 在CAR的胞外结构域与跨膜结构域之间,可并入间隔结构域。如本文所使用的,术语“间隔结构域”通常指起到将跨膜结构域连接至多肽链的胞外结构域或胞质结构域的作用的任何寡肽或多肽。间隔结构域可包括高达300个氨基酸,优选地10至100个氨基酸并且最优选地25至50个氨基酸。

[0104] 在一些实施例中,在本公开中的CAR的靶特异性结合元件可以识别肿瘤抗原。肿瘤抗原是由引发免疫应答,特别是T-细胞介导的免疫应答的肿瘤细胞产生的蛋白质。肿瘤抗原在本领域中是公知的,并且包括例如神经胶质瘤相关抗原、癌胚抗原 (CEA)、 β -人绒毛膜促性腺激素、 α -胎蛋白 (AFP)、凝集素-反应性AFP、甲状腺球蛋白、RAGE-1、MN-CA IX、人端粒酶逆转录酶、RU1、RU2 (AS)、肠道羧酸酯酶、mut hsp70-2、M-CSF、前列腺酶、前列腺特异性抗原 (PSA)、PAP、NY-ESO-1、LAGE-1a、p53、prostein、PSMA、Her2/neu、存活素和端粒酶、前列腺癌肿瘤抗原-1 (PCTA-1)、MAGE、ELF2M、中性白细胞弹性蛋白酶、埃甫蛋白B2、CD22、胰岛素生长因子 (IGF)-I、IGF-II、IGF-I受体和间皮素。

[0105] 在一些实施例中,肿瘤抗原包括HER2、CD19、CD20、CD22、 κ 轻链、CD30、CD33、CD123、CD38、ROR1、ErbB3/4、EGFR、EGFRvIII、EphA2、FAP、癌胚抗原、EGP2、EGP40、间皮素、TAG72、PSMA、NKG2D配体、B7-H6、IL-13受体 α 2、IL-11受体 α 、MUC1、MUC16、CA9、GD2、GD3、HMW-MAA、CD171、Lewis Y、G250/CAIX、HLA-AI MAGE A1、HLA-A2NY-ESO-1、PSC1、叶酸受体- α 、CD44v7/8、8H9、NCAM、VEGF受体、5T4、胎儿型乙酰胆碱受体、NKG2D配体、CD44v6、TEM1、TEM8,或者由

肿瘤表达的病毒相关抗原。

[0106] 在一些实施例中,本公开的CAR的抗原结合元件以CD19为靶点。在一些情况下,本公开的CAR的抗原结合元件包括抗CD19scFv,所述抗CD19scFv包括在SEQ ID NO:1中列出的氨基酸序列。

[0107] 在一些实施例中,本公开的CAR的跨膜结构域包括CD8或CD9跨膜结构域。在一些实施例中,本公开的CAR的胞内结构域包括4-1BB (CD137) 或CD28的胞内结构域。PD-1, CD28家族的一个成员,是具有包含单个免疫球蛋白 (Ig) 样的可变结构域的胞外结构域和包含基于免疫受体酪氨酸的抑制基序的胞内结构域的I型跨膜蛋白质。PD-1在活化的T细胞、B淋巴细胞、自然杀伤细胞、树突细胞和活化的单核细胞上表达。PD-1与其配体PD-L1和PD-L2之间的相互作用导致T细胞耗尽、失活和细胞凋亡。

[0108] 耗尽的T淋巴细胞丧失产生促炎细胞因子(包括IL-2、肿瘤坏死因子 α 和干扰素- γ)的能力。由不同组织进行的PD-L1的表达介导外周免疫耐受性,并且PD-1/PD-L1的活化限制持续的免疫/炎症应答后的组织损伤。PD-1表达的肿瘤浸润淋巴细胞与受损的抗肿瘤作用和PD-1的上调相关,而PD-L1与几个肿瘤类型的结果相关。

[0109] 实施例涉及一种包括编码经修饰的PD-1的核酸序列和编码嵌合抗原受体(CAR)的核酸序列的分离的核酸序列。在一些实施例中,与编码野生型PD-1的胞内部分的核酸序列相比,编码经修饰的PD-1的核酸序列可以包括一个或多个核苷酸的取代或缺失。在某些实施例中,与编码野生型PD-1的胞内部分的核酸序列相比,编码经修饰的PD-1的核酸序列包括一个或多个核苷酸的缺失。例如,经修饰的PD-1是包括SEQ ID NO:14的核酸序列的人PD-1。

[0110] 在一些实施例中,编码经修饰的PD-1的核酸序列包括编码截断的PD-1的核酸,所述截断的PD-1不包括胞内结构域。例如,编码经修饰的PD-1的核酸序列包括SEQ ID NO:12的核酸序列。

[0111] 在一些实施例中,与野生型PD-1相比,经修饰的PD-1包括一个或多个点突变。在某些实施例中,点突变可以包括野生型PD-1的磷酸化位点的一个或两个氨基酸点突变。例如,氨基酸点突变包括酪氨酸残基223和/或酪氨酸残基248的点突变。

[0112] 本公开的实施例进一步涉及一种包括编码CAR和经修饰的PD-1的序列的DNA构建体。在一些实施例中,CAR可以包括CD3- ζ 、CD28、4-1BB等的任意组合。例如,本公开的CAR包括抗CD19scFv、人CD8铰链和跨膜结构域,以及人4-1BB和CD3 ζ 信号传导结构域。在一个实施例中,本公开的CAR包括在SEQ ID NO:1中列出的核酸序列。

[0113] 在一些实施例中,内部核糖体进入位点(IRES)元件用于产生多基因或多顺反子信息。例如,IRES元件可以将编码CAR的核酸序列和编码各种经修饰的PD-1(见表1)中的一种的核酸序列连接起来。

[0114] 编码所需分子的核酸序列可以使用本领域中已知的重组方法获得,例如使用标准技术通过从表达基因的细胞筛选文库、通过从已知包括基因的载体衍生该基因,或者通过直接从含有基因的细胞或组织中分离该基因而获得。可选地,也可以合成而非克隆生产感兴趣的基因。

[0115] 本公开的实施例进一步涉及将本发明的DNA插入其中的载体。从逆转录病毒(例如慢病毒)衍生的载体是实现长期的基因转移的合适的工具,因为它们允许转基因的长期、稳

定的整合及其在子细胞中的繁殖。与从致癌性逆转录病毒(例如鼠白血病病毒)衍生的载体相比,慢病毒载体具有附加优点,在于因为它们能转导非增殖细胞,例如肝细胞。它们也具有低免疫原性的附加优点。

[0116] 编码CAR和经修饰的PD-1的天然或合成的核酸的表达通常通过将编码CAR多肽或其部分的核酸可操作地连接至一个或多个启动子,以及将所述构建体整合到表达载体中来实现。所述载体可适合于复制和整合真核生物。典型的克隆载体包含转录和翻译终止子、起始序列和用于调节所需的核酸序列的表达的启动子。

[0117] 在美国专利号US8,906,682中提供了与编码CAR和经修饰的PD-1并且将基因转移到哺乳动物细胞中的表达合成核酸有关的附加信息,所述专利全文引入作为参考。

[0118] 实施例进一步涉及表达CAR和经修饰的PD-1的经遗传修饰的细胞(例如,T细胞)。在一些实施例中,将显性阴性PD-1引入T细胞中,使得显性阴性PD-1抑制由肿瘤细胞的PD-L1诱导的野生型PD-1活性。在某些实施例中,经遗传修饰的T细胞表达非功能性PD-1。例如,经遗传修饰的T细胞表达不包括胞内结构域、不包括胞内结构域和跨膜结构域,或包括如在本公开中所描述的点突变的PD-1分子。

[0119] 在一些实施例中,肿瘤细胞的PD-L1对本公开的经遗传修饰的T细胞的细胞因子产生的抑制作用小于PD-L1对不包括编码经修饰的PD-1的核酸序列的至少一部分的T细胞的细胞因子产生的抑制作用。例如,PD-L1对本公开的经遗传修饰的T细胞的细胞因子产生的抑制作用足以减少PD-L1对不包括编码经修饰的PD-1的核酸序列的至少一部分的T细胞的细胞因子产生的抑制作用的至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%。

[0120] 在一些实施例中,经遗传修饰的T细胞包括编码与野生型PD-1相比具有一个或多个点突变的经修饰的PD-1的核酸序列。例如,所述点突变包含野生型PD-1的磷酸化位点的一个或两个氨基酸点突变。在某些实施例中,经遗传修饰的T细胞包括编码经修饰的PD-1且与编码野生型PD-1的胞内部分的核酸序列相比包括一个或多个核苷酸的缺失的核酸序列。例如,编码经修饰的PD-1的核酸序列包含SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:14的核酸序列。

[0121] 实施例进一步涉及用于治疗患者的疾病的方法,所述方法包括向患者施用有效量的本公开的工程化细胞。各种疾病可以根据本发明的方法加以治疗,所述疾病包括癌症,诸如卵巢癌、乳腺癌、结肠癌、胶质母细胞瘤、前列腺癌和白血病。在一些实施例中,所述方法包括向人患者施用药物组合物,所述药物组合物包括抗肿瘤有效量的人T细胞群,其中所述人T细胞群包括包含如在本公开中所描述的核酸序列的人T细胞。

[0122] 可治疗的癌症包括没有被血管化或基本上还没有被血管化的肿瘤,以及血管化的肿瘤。癌症可包括非实体肿瘤(诸如血液性肿瘤,例如白血病和淋巴瘤)或可包括实体肿瘤。利用本公开的CAR治疗的癌症的类型包括但不限于癌、胚细胞瘤和肉瘤,以及某些白血病或淋巴恶性肿瘤、良性和恶性肿瘤、以及恶性肿瘤,例如肉瘤、癌和黑素瘤。也包括成人肿瘤/癌症和小儿肿瘤/癌症。

[0123] 血液性癌症为血液或骨髓的癌症。血液性(或血源性)癌症的实例包括白血病,包括急性白血病(诸如急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性骨髓性白血病和成髓细胞性白血病、前髓细胞性白血病、骨髓单核单核细胞性白血病、单核细胞性白血病和红白血病)、慢性白血病(诸如慢性髓细胞(粒细胞性)白血病、慢性骨髓性白血病和慢性淋巴细胞

白血病)、真性红细胞增多症、淋巴瘤、霍奇金氏疾病、非霍奇金氏淋巴瘤(不活跃形式和高等级形式)、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症、重链疾病、骨髓增生异常综合征、多毛细胞白血病和脊髓发育不良。

[0124] 实体肿瘤为通常不包含囊肿或液体区的组织的异常肿块。实体肿瘤可为良性或恶性的。不同类型的实体肿瘤以形成它们的细胞类型命名(诸如肉瘤、癌和淋巴瘤)。实体肿瘤(诸如肉瘤和癌)的实例包括纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨肉瘤和其它肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏肿瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、淋巴类恶性肿瘤、胰腺癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝细胞癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、甲状腺髓样癌、乳头状甲状腺癌、嗜铬细胞瘤、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞瘤、胆管癌、绒膜癌、维尔姆斯氏肿瘤、子宫颈癌、睾丸肿瘤、精原细胞瘤、膀胱癌、黑素瘤和CNS肿瘤(诸如神经胶质瘤(诸如脑干神经胶质瘤和混合性神经胶质瘤)、成胶质细胞瘤(也称为多形性成胶质细胞瘤)、星形细胞瘤、CNS淋巴瘤、生殖细胞瘤、成神经管细胞瘤、神经鞘瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤和脑转移瘤)。

[0125] 通常,如本文所述的活化和扩增的细胞可以用于治疗和预防免疫受损的个体出现的疾病。特别地,本公开的工程化细胞用于治疗癌症。在某些实施例中,本公开的细胞用于治疗处于发展成癌症的风险中的患者。因此,本公开提供用于治疗或预防癌症的方法,所述方法包含向需要其的受试者施用治疗有效量的本公开的工程化T细胞。

[0126] 本公开的工程化T细胞可被单独施用或作为药物组合物与稀释剂和/或与其它成分(诸如IL-2或其它细胞因子或细胞群)结合施用。简单地说,本公开的药物组合物可包括如本文所述的靶细胞群,与一种或多种药学或生理学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂结合。这样的组合物可包括:缓冲液,诸如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等等;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);以及防腐剂。本公开的组合物优选配制成用于静脉内施用。

[0127] 本公开的药物组合物可以以适于待治疗(或预防)的疾病的方式施用。施用的量和频率将由以下因素确定,诸如患者的病症、以及患者疾病的类型和严重程度,尽管适当的剂量可由临床试验确定。

[0128] 当指出“免疫学有效量”、“抗肿瘤有效量”、“肿瘤抑制有效量”或“治疗量”时,待施用的本公开的组合物的精确量可由医师通过考虑个体的年龄、体重、肿瘤大小、感染或转移的程度,以及患者(受试者)的状态的差异而确定。可以概括地说:包含本文所描述的T细胞的药物组合物可以以 10^4 至 10^9 个细胞/kg体重的剂量,优选 10^5 至 10^6 个细胞/kg体重的剂量施用,包括那些范围内的所有整数值。T细胞组合物也可以以这些剂量多次施用。所述细胞可以通过使用免疫疗法中通常已知的输液技术施用(参见例如Rosenberg等人,新英格兰医学杂志319:1676,1988年)。对于特殊患者的最佳剂量和治疗方案可由医学领域技术人员通过监测患者的疾病迹象并相应地调节治疗容易地确定。

[0129] 在某些实施例中,可能期望向受试者施用活化的T细胞,并且随后重新抽取血液(或进行单采血液成分术),根据本公开活化来自其中的T细胞,并且将这些活化和扩增的T细胞再输给患者。该过程可每几周进行多次。在某些实施例中,T细胞可通过10cc至400cc的

血液抽取来进行活化。在某些实施例中，T细胞通过20cc、30cc、40cc、50cc、60cc、70cc、80cc、90cc或100cc的血液抽取来进行活化。不受理论所束缚，利用这种多次血液抽取/多次再输液方案可选出某些T细胞群。

[0130] 受试者组合物的施用可以以任何方便的方式进行，包括通过雾化吸入、注射、吞咽、输液、植入或移植。本文描述的组合物可经皮下、皮内、瘤内、结内、脊髓内、肌肉内、通过静脉内(i.v.)注射或腹膜内施用给患者。在一个实施例中，本公开的T细胞组合物通过皮内或皮下注射施用给患者。在另一个实施例中，本公开的T细胞组合物优选地通过i.v.注射施用。T细胞的组合物可被直接注射到肿瘤、淋巴结或感染部位中。

[0131] 在本公开的某些实施例中，利用本文所描述的方法或本领域已知的其它方法活化和扩增的细胞(其中T细胞被扩增至治疗水平)与任何数量的相关治疗方式结合(例如，在其之前、同时或之后)施用给患者，所述相关治疗方式包括但不限于用试剂进行治疗，诸如抗病毒疗法、西多福韦和白细胞介素-2、阿糖胞苷(也称为ARA-C)或对MS患者的那他珠单抗治疗或对牛皮癣患者的依法利珠单抗治疗或对PML患者的其它治疗。在进一步的实施例中，本公开的T细胞可与以下各项结合使用：化疗、辐射、免疫抑制剂(诸如环孢菌素、硫唑嘌呤、甲氨喋呤、麦考酚酯和FK506)、抗体，或其它免疫烧蚀剂(诸如CAM PATH、抗-CD3抗体或其它抗体疗法、细胞毒素、氟达拉滨、环孢菌素、FK506、雷帕霉素、麦考酚酸、类固醇类、FR901228、细胞因子和辐射。这些药物抑制钙依赖性的磷酸酶钙调磷酸酶(环孢菌素和FK506)或抑制对生长因子诱导的信号传导重要的P70S6激酶(雷帕霉素)。(Liu等人,《细胞(Cell)》66:807-815,1991;Henderson等人,《免疫(Immun.)》73:316-321,1991年;Bierer等人,《免疫学新观点(Curr.Opin,Immun.)》5:763-773,1993年;Isoniemi(同上))。在进一步的实施例中，本公开的细胞组合物与骨髓移植、利用化疗剂(诸如氟达拉滨)的T细胞烧蚀疗法、外部光束放射疗法(XRT)、环磷酰胺，或抗体(诸如OKT3或CAMPATH)结合(例如，在其之前、同时或之后)施用给患者。在另一个实施例中，本公开的细胞组合物在B-细胞烧蚀疗法(诸如与CD20反应的试剂，例如Rituxan)之后进行施用。例如，在一个实施例中，受试者可经历高剂量化疗的标准治疗，之后进行外周血液干细胞移植。在某些实施例中，在移植后，受试者接受本公开的扩增的免疫细胞的输注。在一个附加的实施例中，扩增的细胞在外科手术之前或之后施用。

[0132] 施用给患者的以上治疗的剂量将随着治疗病症的精确属性和治疗的接受者而变化。人施用的剂量比例可根据本领域接受的实践实施。例如，CAMPATH的剂量对于成人患者通常将在1至约100mg的范围中，通常每天施用，持续1至30天。尽管在一些情况下可以使用高达40mg/天的较大剂量，但优选的日剂量为1至10mg/天(在美国专利号6,120,766中描述，所述专利全文引入作为参考)。

[0133] 在美国专利号US8,906,682中提供了关于使用工程化T细胞治疗癌症的方法的其它信息，所述专利全文引入作为参考。

[0134] 实施例进一步涉及治疗和/或抑制受试者的癌症的方法。该方法包括向受试者施用治疗有效量的可溶性受体，所述可溶性受体包括PD-1的胞外结构域。在一些实施例中，所述可溶性受体结合PD-L1蛋白质，并且可溶性受体破坏癌细胞的PD-1信号传导和/或破坏PD-1与PD-L1的结合。在某些实施例中，分离的可溶性受体多肽包括SEQ ID NO:9的氨基酸残基20-519。

[0135] “可溶性受体”是不与细胞膜结合的受体多肽。可溶性受体是缺乏跨膜结构域和胞质结构域的最常见的配体结合受体多肽。可溶性受体可包括附加的氨基酸残基,诸如用于多肽的纯化或为多肽与底物粘附提供位点的亲和标签,或免疫球蛋白恒定区序列。许多细胞表面受体具有天然存在的由蛋白水解产生的可溶性对应物。当可溶性受体多肽缺乏分别提供膜锚定或信号转导的足够的跨膜和胞内多肽区段的部分时,它们被认为是基本上不含跨膜和胞内多肽区段。

[0136] 实施例进一步涉及包括受体多肽的经修饰的细胞,所述受体多肽的胞质结构域被截断,所述受体多肽是程序性细胞死亡蛋白质1 (PD-1) 受体多肽、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白质4 (CTLA-4) 受体多肽,或者B和T淋巴细胞衰减因子 (BTLA) 受体的至少一种。

[0137] 实施例进一步涉及一种用于治疗患有疾病的受试者的方法。该方法包括向患有疾病的受试者施用细胞,其中所述细胞经遗传修饰以表达:受体多肽,所述受体多肽的胞质结构域被截断,所述受体多肽是程序性细胞死亡蛋白质1 (PD-1) 受体多肽、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白质4 (CTLA-4) 受体多肽,或者B和T淋巴细胞衰减因子 (BTLA) 受体的至少一种;以及包括特异性抗体的抗原识别结构域和胞内结构域的嵌合抗原受体 (CAR) 或者经修饰的或野生型T细胞受体,所述特异性抗体与抗原结合。

[0138] 在一些实施例中,所述受体多肽是PD-1受体多肽,并且其中所述PD-1受体多肽的胞质结构域含有基于免疫受体酪氨酸的基序。

[0139] 实施例进一步涉及相比于相应的野生型细胞包括减少量的一种或多种受体的经修饰的细胞,所述一种或多种受体包括程序性细胞死亡蛋白质1 (PD-1)、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白质4 (CTLA-4),或者B和T淋巴细胞衰减因子 (BTLA) 中的至少一种。

[0140] 实施例进一步涉及一种用于治疗患有疾病的受试者的方法。该方法包括向患有疾病的受试者施用细胞,其中,与相应的野生型细胞相比,所述细胞经修饰以表达减少量的一种或多种受体,所述一种或多种受体包括程序性细胞死亡蛋白质1 (PD-1)、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白质4 (CTLA-4),或者B和T淋巴细胞衰减因子 (BTLA) 中的至少一种。

[0141] 在一些实施例中,经修饰的细胞进一步包括:包括特异性抗体的抗原识别结构域和胞内结构域的嵌合抗原受体 (CAR),或者经修饰的或野生型T细胞受体。在某些实施例中,经修饰的细胞进一步包括:包括特异性抗体的抗原识别结构域和胞内结构域的嵌合抗原受体 (CAR),或者经修饰的或野生型T细胞受体,所述特异性抗体与抗原结合。

[0142] 在一些实施例中,与相应的野生型细胞相比,经修饰的细胞具有一个或多个基因的降低的表达,所述一个或多个基因的降低的表达与一种或多种受体的生物合成途径或输送途径或其组合相关联。在某些实施例中,经修饰的细胞包括一个或多个基因的破坏。在某些实施例中,经修饰的细胞包括一个或多个基因的部分或完全缺失。在某些实施例中,经遗传修饰的细胞在人患者体内复制。

[0143] 在一些实施例中,经修饰的细胞形成人患者的记忆细胞。在这些情况下,经修饰的细胞经静脉内施用给人患者。在某些实施例中,经修饰的细胞持续存在人患者中。例如,经修饰的细胞是自体T细胞。对于另一个实例,细胞可以包括B细胞、T细胞、NK细胞、胚胎细胞或树突细胞中的至少一种。

[0144] 在一些实施例中,所述疾病可以包括癌症、免疫缺陷、自身免疫性疾病,或肥胖症中的至少一种。

[0145] 实例

[0146] 通过参考以下实例进一步描述本公开。提供这些实例仅用于说明的目的，且并非旨在限制，除非另有说明。因此，本公开不应当以任何方式被解释为限于以下实例，而是应当被解释为包括由于本文所提供的教导而变得明显的任何和所有变化。

[0147] 实例1

[0148] CAR和PD-1在HEK293T和K562细胞上的表达

[0149] 生成编码由脑心肌炎病毒内部核糖体进入序列分离的CD19CAR和经修饰的PD-1的慢病毒载体(参见通过引用并入本文中的《T细胞的包含CD137信号转导结构域介导增强的存活率的嵌合受体和增加的抗白血病疗效的体内分子疗法(Chimeric Receptors Containing CD137Signal Transduction Domains Mediate Enhanced Survival of T Cells and Increased Antileukemic Efficacy In Vivo Molecular Therapy)》，第17卷，第8期，1453-1464，2009年8月)。图1和表1中提供了编码CAR和经修饰的PD-1的DNA构建体的信息。在表1-3中列出了这些构建体和模块的总结。

[0150] 表1 DNA构建体和编码模块

[0151]

参 考	构建体名称	PD-1 信号肽	PD-1 胞外结构域	PD-1 跨膜结构域	PD-1 胞内结构域或残基
P0	P0:CD19BBZETA T	没有	没有	没有	没有
P1	P1:CD19BBZETA T-ires-可溶性 PD1	有	有	没有	没有
P2	P2:CD19BBZETA T-ires-截断的 PD1	有	有	有	残基
P3	P3:CD19BBZETA T-ires-点突变 PD1	有	有	有	有: aa223, Y 至 A; aa248, Y 至 A
P4	P4:CD19BBZETA T-ires-缺失 PD1	有	有	有	残基

[0152] HEK293T和K562细胞用慢病毒载体转导。进行流式细胞获取并分析以确定CAR和PD-1在这些细胞中的表达。如图2A和图2B所示，KECK293T和K562细胞表达CAR(参见图2A中的方框)和PD-1(参见图2B中的方框)。

[0153] 从美国典型培养物保藏中心(ATCC;弗吉尼亚州马纳萨斯)获得HEK293T和K562细胞。与细胞培养物、慢病毒载体的构建，以及流式细胞术有关的技术可以在通过引用并入本文中的以下文献中找到:《T细胞的包含CD137信号转导结构域介导增强的存活率的嵌合受体和增加的抗白血病疗效的体内分子疗法》，第17卷，第8期，1453-1464，2009年8月，所述文献通过引用并入本文。

[0154] 表2各种构建体的序列标识符

[0155]

SEQ ID NO:#	标识符
-------------	-----

SEQ ID NO:1	P0 (核酸序列)
SEQ ID NO:2	P1 (核酸序列)
SEQ ID NO:3	P2 (核酸序列)
SEQ ID NO:4	P3 (核酸序列)
SEQ ID NO:5	P4 (核酸序列)
SEQ ID NO:6	IRES元件 (核酸序列)
SEQ ID NO:7	PDL1-IRES-EGFP (核酸序列)
SEQ ID NO:8	PD-1信号肽 (氨基酸序列)
SEQ ID NO:9	PD-1胞外结构域 (氨基酸序列)
SEQ ID NO:10	PD-1跨膜结构域 (氨基酸序列)
SEQ ID NO:11	P1:添加的亲水性链段
SEQ ID NO:12	P2:PD-1胞内结构域残基 (氨基酸序列)
SEQ ID NO:13	P3:PD-1胞内结构域残基 (氨基酸序列)
SEQ ID NO:14	P4:PD-1胞内结构域残基 (氨基酸序列)
SEQ ID NO:15	P2:PD-1胞内结构域的移除部分 (氨基酸序列)
SEQ ID NO:16	P4:PD-1胞内结构域的移除部分 (氨基酸序列)

[0156] 实例2

[0157] CAR和PD-1在原代T细胞上的表达

[0158] 从患者获得原代T细胞。所获得的原代T细胞用慢病毒载体转导。进行流式细胞获取并分析以确定CAR和PD-1在原代T细胞中的表达。如图3A、图3B和图3C所示,原代T细胞表达CAR (参见图3A中的方框) 和PD-1 (参见图3B和图3C中的方框)。

[0159] 与细胞培养物、慢病毒载体的构建,以及流式细胞术有关的技术可以在以下文献中找到:《利用包含CD28和CD137结构域的经遗传重新靶向的人T细胞控制大的、所建立的肿瘤异种移植物 (Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains)》,3360-3365PNAS,2009年3月3日,第106卷,第9期,所述文献通过引用并入本文。

[0160] 表3序列

[0161]

SEQ ID NO: #	序列
SEQ ID NO: 1	atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgc cgccaggccggacatccagatgacaca gactacatcctccctgtctgcctctctgggagacagagtcaccatcagttgca gggcaagtcaggacattagtaaataatttaattggtatcagcagaaaccagat ggaactgttaaactcctgatctaccatacatcaagattacactcaggagtc atcaagggttcagtggcagtggtctggaacagattattctctcaccattagca acctggagcaagaagatattgccacttacttttgccaacagggtataacgctt ccgtacacgttcggaggggggaccaagctggagatcaca ggtggcgggtggctcgggcgggtggtgggtcgggtggcggcggtatct gagggtgaaactgcaggagtcaggacctggcctggtggcgccctcacagagcct gtccgtcacatgcactgtctcaggggtctcattaccgcactatggtgtaagct ggattcggcagcctccacgaaagggtctggagtggtgggagtaatatggggt agtgaaccacatactataattcagctctcaaataccagactgaccatcatcaa ggacaactccaagagccaagttttcttaaaaatgaacagctctgcaaactgatg acacagccatttactactgtgccaaacattattactacggtggtagctatgct atggactactggggccaaggaacctcagtcaccgtctctctca accacgacgccagcgccgcgaccaccaaacaccggcgccaccatcgcgctcgca gcccctgtccctgcgccagaggcgtgccggccagcgcgggggggcgcagtgcc acacgagggggctggacttcgcctgtgatattctacatctgggcgcccttgcc gggacttgtggggctccttctcctgtcactggttatcaccccttactgc aaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaacaaccatttatgagacc agtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaag aagaaggaggatgtgaactg agagtgaagttcagcaggagcgagacgccccgcgtacaagcagggccagaa ccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttg acaagagacgtggccgggacctgagatggggggaaagccgagaaggaagaac cctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggccta cagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcc tttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatg

[0162]

	caggccctgccccctcgctaa
SEQ ID NO:2	cctctccctccccccccctaacgttactggccgaagccgcttggaataaggc cgggtgtgcgtttgtctatatgttatttccaccatattgccgtcttttggcaa tgtgagggcccgaaacctggccctgtcttcttgacgagcattcctaggggtc tttccctctcgcgaaggaatgcaagggtctgttgatgtcgtgaaggaagca gttcctctggaagcttcttgaagacaaacaacgtctgtagcgaccctttgcag gcagcgggaacccccacctggcgacagggtgcctctgcggccaaaagccacgtg tataagatacacctgcaaaggcggcacaaccccagtgccacgttgtgagttgg atagttgtggaagagtcaaattggctctcctcaagcgtattcaacaaggggt gaaggatgccagaaggatccccattgtatgggatctgatctggggcctcggt acacatgctttacatgtgttttagtcgaggttaaaaaacgtctagggcccccg aaccacggggacgtggttttccttgaaaaacacgatgataatatggccacaa cc atgcagatcccacaggcgccttgccagtcgtctggcggtgctacaactggg ctggcgg ccaggatggttcttagactccccagacaggccctggaacccccccaccttctc cccagccctgctcgtggtgaccgaaggggacaacgccaccttcacctgcagct tctccaacacatcggagagcttcgtgctaaactggtaccgcatgagccccagc aaccagacggacaagctggccgccttccccgaggaccgcagccagccggcca ggactgccgcttccgtgtcacacaactgccaacgggcgtgacttcacatga gcgtggtcagggcccggcgaatgacagcggcacctacctctgtggggccatc tccctggcccccaaggcgcagatcaaagagagcctgcgggcagagctcagggt gacagagagaagggcagaagtgccacagcccaccccagccctcaccaggc cagccggccagttccaaacctggtg ggtaatatctgaatgtgtccattaaaatatgtctaacactgtcccctagcac ctaa
SEQ ID NO:3	cctctccctccccccccctaacgttactggccgaagccgcttggaataaggc cgggtgtgcgtttgtctatatgttatttccaccatattgccgtcttttggcaa tgtgagggcccgaaacctggccctgtcttcttgacgagcattcctaggggtc tttccctctcgcgaaggaatgcaagggtctgttgatgtcgtgaaggaagca gttcctctggaagcttcttgaagacaaacaacgtctgtagcgaccctttgcag gcagcgggaacccccacctggcgacagggtgcctctgcggccaaaagccacgtg tataagatacacctgcaaaggcggcacaaccccagtgccacgttgtgagttgg atagttgtggaagagtcaaattggctctcctcaagcgtattcaacaaggggt gaaggatgccagaaggatccccattgtatgggatctgatctggggcctcggt acacatgctttacatgtgttttagtcgaggttaaaaaacgtctagggcccccg

[0163]

	aaccacggggacgtgggttttctttgaaaaacacgatgataatatggccacaa cc atgcagatcccacaggcgccctggccagtcgtctgggcggtgctacaactggg ctggcgg ccaggatggttcttagactcccagacaggccctggaacccccccaccttctc cccagccctgctcgtggtgaccgaaggggacaacgccaccttcacctgcagct tctccaacacatcggagagcttcgtgctaaactggtaccgcatgagccccagc aaccagacggacaagctggccgccttccccgaggaccgcagccagcccgcca ggactgccgcttccgtgtcacacaactgccaacgggctgacttccacatga gcgtggtcaggggcccgcgcaatgacagcggcacctacctctgtggggccatc tccctggcccccaaggcgagatcaaagagagcctgcgggcagagctcagggt gacagagagaagggcagaagtgccacagcccacccagcccctcaccaggc cagccggccagttccaaacctggtg gttgggtgctggtggcgccctgctgggcagcctggtgctgctagtctgggtcct ggcgtcctc tgctcccgggcccgcacgaggggacaataa
SEQ ID NO:4	cctctccctccccccccctaacgttactggccgaagccgcttggaataaggc cgggtgtcggtttgtctatatgttatttccaccatattgccgtcttttgcaa tgtgaggggcccggaacctggccctgtcttcttgacgagcattcctaggggct tttccctctcgcacaaaggaatgcaaggctctgttgatgtcgtgaaggaagca gttctcttggaagcttcttgagacaaacaacgtctgtagcgacctttgcag gcagcgggaacccccacctggcgacagggtgcctctgcggccaaaagccacgtg tataagatacacctgcaaaggcggcacaccccagtgccacgttgtagttgg atagttgtggaagagtcaaattggctctcctcaagcgtattcaacaaggggt gaaggatgccagaaggtaacccattgtatgggatctgatctggggcctoggt acacatgctttacatgtgttttagtcgagggttaaaaaaacgtctaggcccccg aaccacggggacgtgggttttctttgaaaaacacgatgataatatggccacaa cc atgcagatcccacaggcgccctggccagtcgtctgggcggtgctacaactggg ctggcgg ccaggatggttcttagactcccagacaggccctggaacccccccaccttctc cccagccctgctcgtggtgaccgaaggggacaacgccaccttcacctgcagct tctccaacacatcggagagcttcgtgctaaactggtaccgcatgagccccagc aaccagacggacaagctggccgccttccccgaggaccgcagccagcccgcca ggactgccgcttccgtgtcacacaactgccaacgggctgacttccacatga gcgtggtcaggggcccgcgcaatgacagcggcacctacctctgtggggccatc

[0164]

	tccctggccccaaggcgcagatcaaagagagcctgcgggcagagctcagggt gacagagagaagggcagaagtgccacagcccacccagcccctcaccaggc cagccggccagttccaaaccctgggtg gttggtgtcgtgggcggcctgctgggcagcctgggtgctgctagctctgggtcct ggccgtcatc tgotcccgggcccgcacgagggaacaataggagccaggcgcaccggccagcccct gaaggaggaccccctcagccgtgcctgtgttctctgtggacgccggggagctgg atttccagtggcgagagaagaccccgagcccccggtgcctgtgtccctgag cagacggaggccgccaccattgtctttcttagcggaatgggcacctcatcccc cgcccgccaggggctcagctgacggccctcggagtgccagccactgaggcctg aggatggacactgctcttggccctctga
SEQ ID NO:5	cctctccctccccccccctaacgttactggccgaagccgcttgaataaggc cgggtgtgcgtttgtctatatgttatttccaccatattgccgtcttttggcaa tgtgagggcccgaaacctggccctgtcttcttgacgagcattcctaggggtc tttccctctcgcctaaaggaatgcaaggctctgttgaatgtcgtgaaggaagca gttctcttggaagcttcttgaagacaaacaacgtctgtagcgaccctttgcag gcagcggaaacccccacctggcgacagggtgcctctgcggccaaaaggccacgtg tataagatacacctgcaaaggcggcacaaccccagtgccacgttgtgagttgg atagttgtggaagagtcaaattggctctcctcaagcgtattcaacaaggggct gaaggatgccagaaggtaacccattgtatgggatctgatctggggcctcggt acacatgctttacatgtgttttagtcgaggttaaaaaaacgtctaggccccccg aaccacggggacgtgggttttcttgaaaaacacgatgataatatggccacaa cc atgcagatcccacaggcgccttgccagtcgtctgggcgggtgtacaactggg ctggcgg ccaggatggttcttagactccccagacaggccctggaacccccccaccttctc cccagccctgctcgtgggtgaccgaaggggacaacgccaccttcacctgcagct tctccaacacatcggagagcttctgtctaaactggtaacgcctgagccccagc aaccagacggacaagctggccgccttccccgaggacgcagccagccggcca ggactgccgcttccgtgtcacacaactgccaacggcggtgacttccacatga gcgtgggtcagggcccggaatgacagcggcacctacctctgtggggccatc tccctggccccaaggcgcagatcaaagagagcctgcgggcagagctcagggt gacagagagaagggcagaagtgccacagcccacccagcccctcaccaggc cagccggccagttccaaaccctgggtg gttggtgtcgtgggcggcctgctgggcagcctgggtgctgctagctctgggtcct ggccgtcatc

[0165]

	tgctcccgggccgcacgagggaacaatagatggacactgctcttggccctcta a
SEQ ID NO:6	cctctccctccccccccctaacgttactggccgaagccgcttgaataaggc cgggtgtgcgtttgtctatatgttattttccaccatattgccgtcttttggcaa tgtgagggcccgaaacctggccctgtcttcttgacgagcattcctaggggtc tttccctctcgccaaaggaatgcaaggtctgttgaatgtcgtgaaggaagca gttctcttggaagcttcttgaagacaaacaacgtctgtagcgacctttgcag gcagcggaacccccacctggcgacaggtgcctctcgggccaaaagccacgtg tataagatacacctgcaaaggcggcacaccccagtgccacgttgtgagttgg atagttgtgaaagagtcaaattggctctcctcaagcgtattcaacaaggggt gaaggatgccagaaggtacccattgtatgggatctgatctggggcctcggt acacatgctttacatgtgttttagtcgaggttaaaaaacgtctaggcccccg aaccacggggacgtggttttcctttgaaaaacacgatgataatatggccacaa cc
SEQ ID NO:7	atgaggatatttgcgtcttttatattcatgacctactggcatttgcgtgaacgc atttactgtcacggttcccaaggacctatatgtggtagagtatggtagcaata tgacaattgaatgcaaattcccagtagaaaaacaattagacctggctgacta attgtctattgggaaatggaggataagaacattattcaatttgtgcatggaga ggaagacctgaagggtcagcatagtagctacagacagagggcccgctgttga aggaccagctctccctgggaaatgctgcacttcagatcacagatgtgaaattg caggatgcaggggtgtaccgctgcatgatcagctatgggtggcgactacaa gcgaattactgtgaaagtcaatgccccatacaacaaaatcaaccaaagaattt tggttgtggatccagtcacctctgaacatgaactgacatgtcaggctgagggc taccocaaggccgaagtcactctggacaagcagtgaccatcaagtcctgagtgg taagaccaccaccaccaattccaagagagaggagaagcttttcaatgtgacca gcacactgagaatcaacacaacaactaatgagattttctactgcacttttagg agattagatcctgaggaaaaccatacagctgaattgggtcatccagaactacc tctggcacatcctccaaatgaaaggactcacttggttaattctgggagccatct tattatgccttgggtgtagcactgacattcatcttccgtttaagaaaagggaga atgatggatgtgaaaaatgtggcatccaagatacaaaactcaaagaagcaaag tgatacacatttggaggagacgtaa cctctccctccccccccctaacgttactggccgaagccgcttgaataaggc cgggtgtgcgtttgtctatatgttattttccaccatattgccgtcttttggcaa tgtgagggcccgaaacctggccctgtcttcttgacgagcattcctaggggtc tttccctctcgccaaaggaatgcaaggtctgttgaatgtcgtgaaggaagca gttctcttggaagcttcttgaagacaaacaacgtctgtagcgacctttgcag

[0166]

	gcagcgggaacccccacctggcgacaggtgcctctgoggccaaaagccacgtg tataagatacacctgcaaaggcggcacaaccccagtgccacgttgtagttgg atagttgtgaaagagtcaaattggctctcctcaagcgtattcaacaaggggct gaaggatgcccagaaggtaccccatgtatgggatctgatctggggcctcggt acacatgctttacatgtgttttagtcgaggttaaaaaacgtctagggcccccg aaccacggggacgtgggttttcccttgaaaaacacgatgataatatggccacaa cc atgggtgagcaagggcgaggagctgttcaccggggtgggtgcccatcctggtcga gctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgaggcgagg gcgatgccacctacggcaagctgacctgaagttcatctgcaccacgggcaag ctgcccgtgccctggcccaccctcgtgaccacctgacctacggcgtgcagtg cttcagccgctaccccgaccacatgaagcagcacgacttcttcaagtccgcca tgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcttcaaggacgacggcaac tacaagacccgcgcgaggtgaagttcgagggcgacaccctggtgaaccgcat cgagctgaagggcacgcacttcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagc tggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaag aacggcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgt gcagctcgccgaccactaccagcagaacacccccatcggcgacggccccgtgc tgctgcccgacaaccactacctgagcaccacagtcggccctgagcaaagacccc aacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggagtctgtgaccgccgcccgggat cactctcggcatggacgagctgtacaagtaa
SEQ ID NO:8	mqipqapwpvvav qlgwr
SEQ ID NO:9	pgwfl dspdrpwnp ptfspal vvtegdnatftcsfsntsesfv nwyrmsps nqtdklaafpedrsqpgqdcfrvtqlpngrdfhmsvvrarrndsgtyl cgai slapkaqikes raelrvterraevptahpspsprpagqfqlv
SEQ ID NO:10	vgvvggl lgs v lvwv lavi
SEQ ID NO:11	gnilnvsikictlspst
SEQ ID NO:12	csraargti
SEQ ID NO:13	csraargtigarrtgqplkedpsavpvfsvdage dfqwrektpeppvpcvpe qteaativf psgmgtssparrgsadgprsaqplrpedghcswpl
SEQ ID NO:14	csraargtidghcswpl
SEQ ID NO:15	garrtgqplkedpsavpvfsvdygel dfqwrektpeppvpcvpeqteyativf psgmtssparrgsadgprsaqplrpedghcswpl
SEQ ID NO:16	garrtgqplkedpsavpvfsvdygel dfqwrektpeppvpcvpeqteyativf psgmtssparrgsadgprsaqplrpe

[0167] 实例3

[0168] 细胞毒性T淋巴细胞测定

[0169] 在该测定中,通过将用效应子细胞培养的靶细胞(即,转导的T细胞)的存活率与用

阴性对照细胞培养的靶细胞(即,非转导的T细胞)的存活率进行比较来测定对靶细胞(即,K562-CD19)的细胞毒性。将靶细胞和效应子细胞或阴性对照细胞培养约24小时,其中靶细胞与效应子细胞或阴性对照细胞之间的数量比为约10:1。测定靶细胞的存活率和转导的T细胞和非转导的T细胞的IFN- γ 的产生。如图4A和图4B所示,含有编码CAR和各种PD-1的核酸序列的转导的T细胞能够释放IFN- γ 并且杀死CD19细胞。所有的误差条代表标准偏差。

[0170] 与细胞培养物、细胞毒性T淋巴细胞测定的构建有关的技术可以在以下文献中找到:《利用包含CD28和CD137结构域的经遗传重新靶向的人T细胞控制大的、所建立的肿瘤异种移植(Control of large,established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28and CD137domains)》,3360-3365PNAS,2009年3月3日,第106卷,第9期,所述文献通过引用并入本文。

[0171] 实例4

[0172] PD-L1-ires-EGFP Nalm-6细胞系的构建

[0173] 生成编码PD-L1-ires-EGFP (SEQ I D NO:7)的慢病毒载体。Nalm-6细胞用慢病毒载体转导为MOI为30或MOI为100的T细胞。进行流式细胞获取并分析以确定CAR和PD-1在这些细胞中的表达。如图5所示,Nalm-6PD-L1表达PD-L1。

[0174] 从美国典型培养物保藏中心(ATCC;弗吉尼亚州马纳萨斯)获得Nalm-6细胞。与细胞培养物、慢病毒载体的构建,以及流式细胞术有关的技术可以在以下文献中找到:《利用mRNA工程T细胞治疗小鼠的晚期白血病。人类基因疗法(Treatment of Advanced Leukemia in Mice with mRNA Engineered T Cells.HUMAN GENE THERAPY)》,22:1575-1586(2011年12月),所述文献通过引用并入本文。

[0175] 实例5

[0176] 由PD-L1诱导的细胞毒性的抑制作用在用CAR和经修饰的PD-1转导的T细胞上降低

[0177] 将靶细胞(即,表达PD-L1的Nalm-6或Nalm-6)和各种效应子细胞(即,转导的T细胞)或阴性对照细胞(即,非转导的T细胞)培养约24小时,其中靶细胞与效应子细胞或阴性对照细胞的数量比为约10:1。测定转导的T细胞的IFN- γ 产生。如图6A和图6B所示,CAR T细胞的IFN- γ 产生降低,这表明PD-L1在Nalm-6细胞上的表达造成细胞毒性损失。进一步地,与不包括经修饰的PD-1的CAR T细胞相比,由PD-L1诱导的细胞毒性的损失在用经修饰的PD-1转导的CAR T细胞上下降。例如,用CAR和具有点突变的PD-1(即,P3)转导的T细胞的细胞毒性的损失为约22%,其比不包括经修饰的PD-1(即,P0)的CAR T细胞低43%。这表明,由PD-L1诱导的细胞毒性的抑制作用在用CAR和经修饰的PD-1转导的T细胞上降低。所有的误差条代表标准偏差。

[0178] 与细胞培养物、细胞毒性T淋巴细胞测定的构建有关的技术可以在以下文献中找到:《T细胞的包含CD137信号转导结构域介导增强的存活率的嵌合受体和增加的抗白血病疗效的体内分子疗法》,第17卷,第8期,1453-1464,2009年8月,所述文献通过引用并入本文。

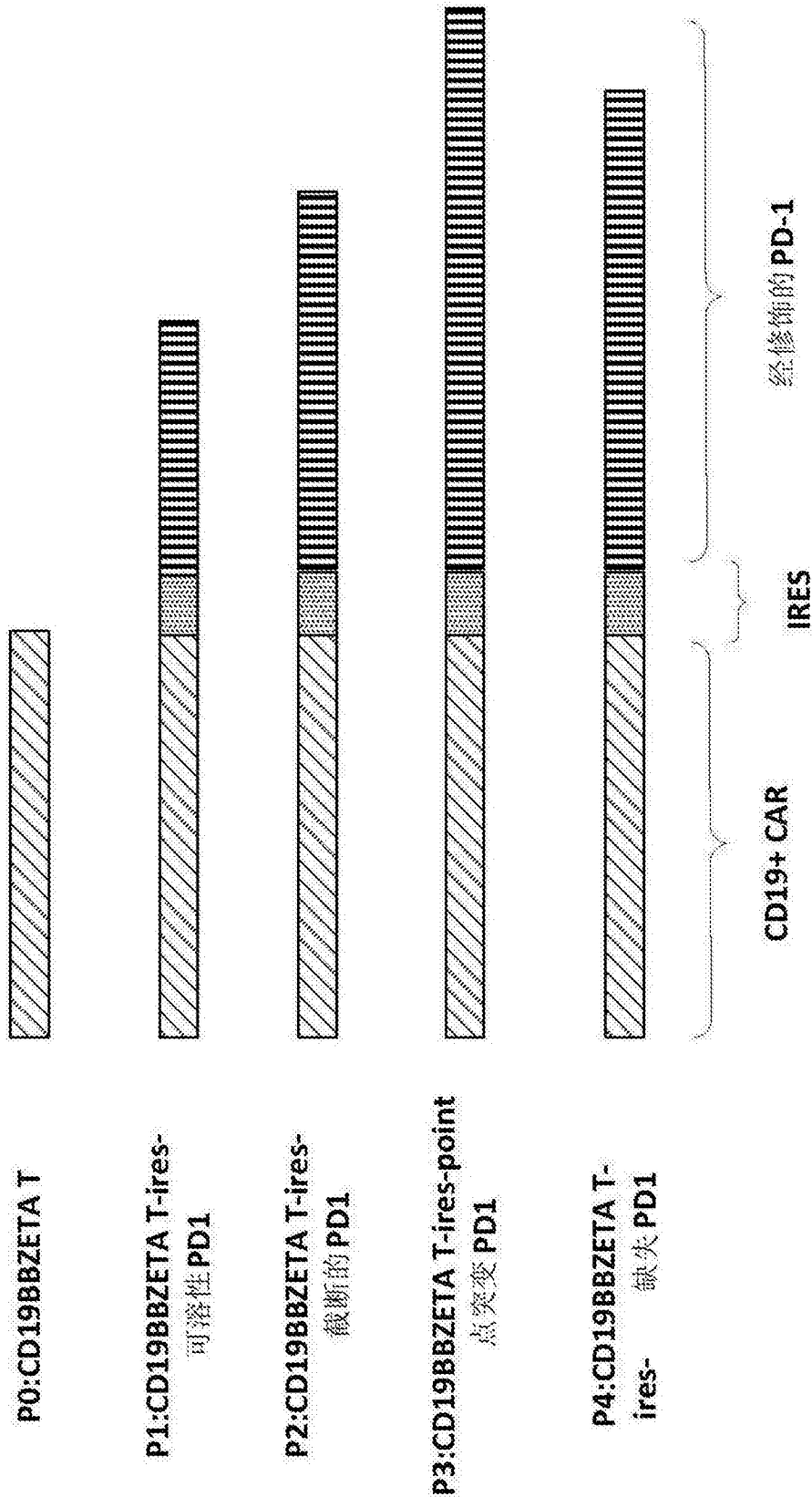


图1

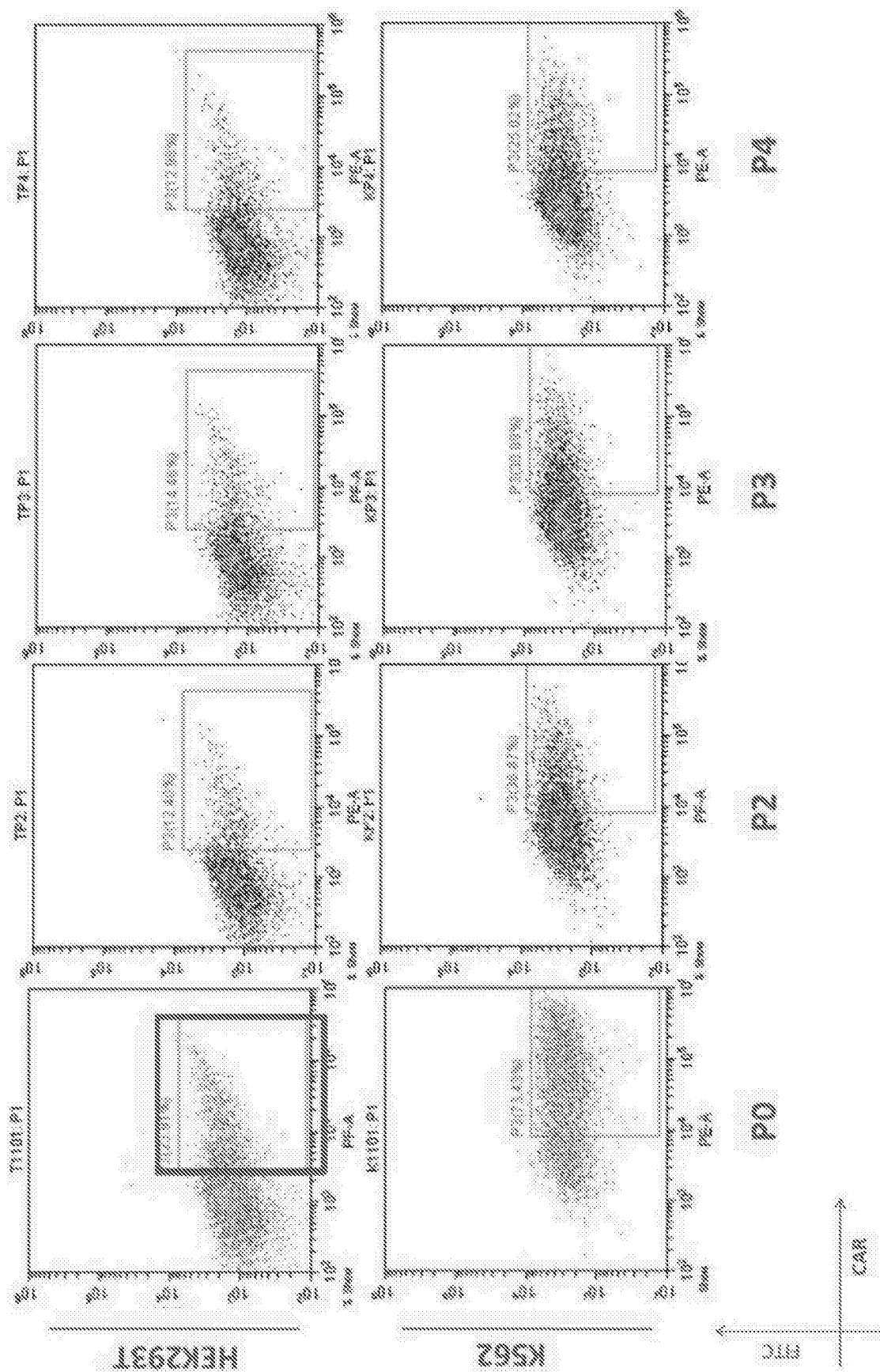


图2A

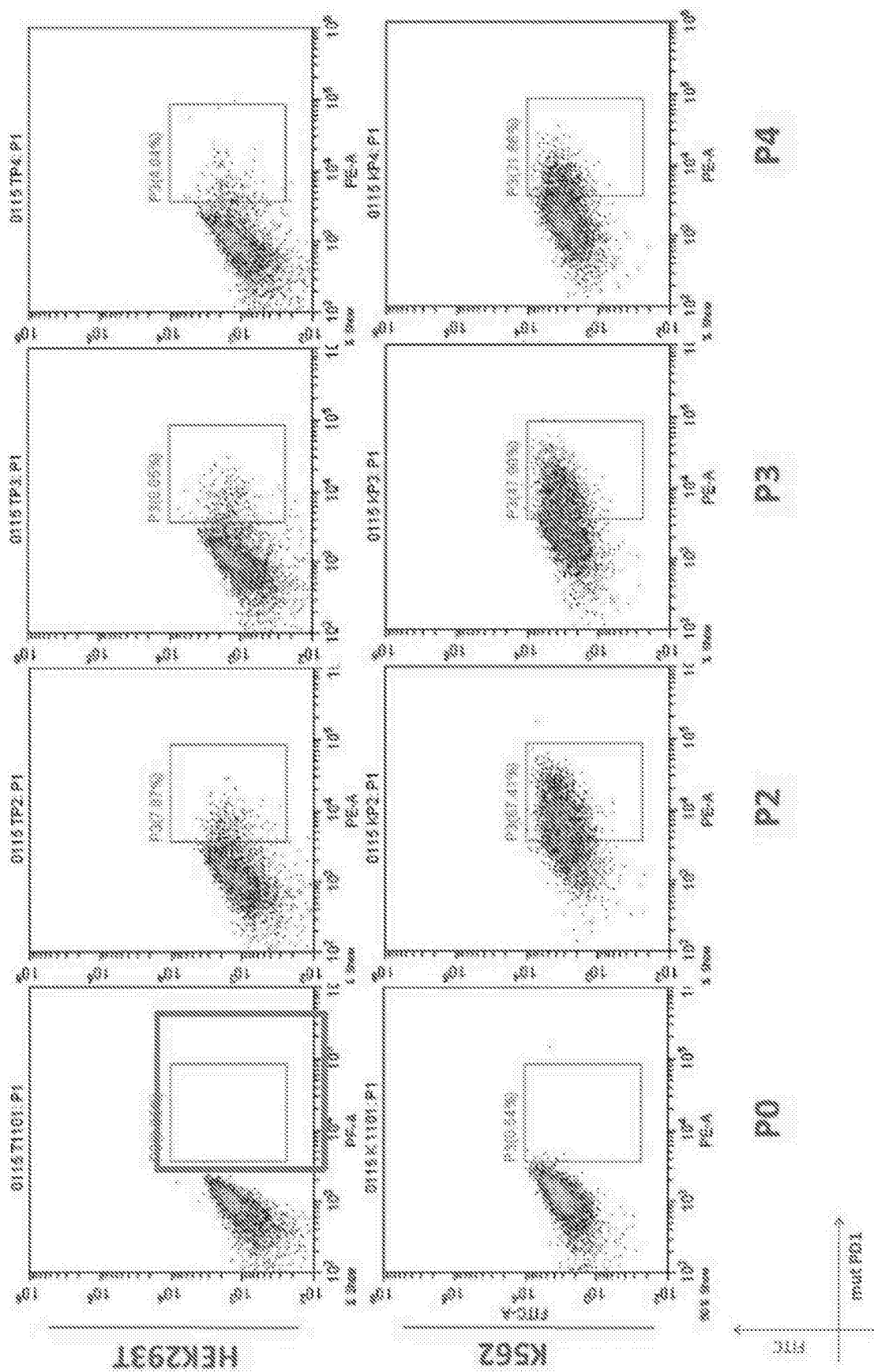


图2B

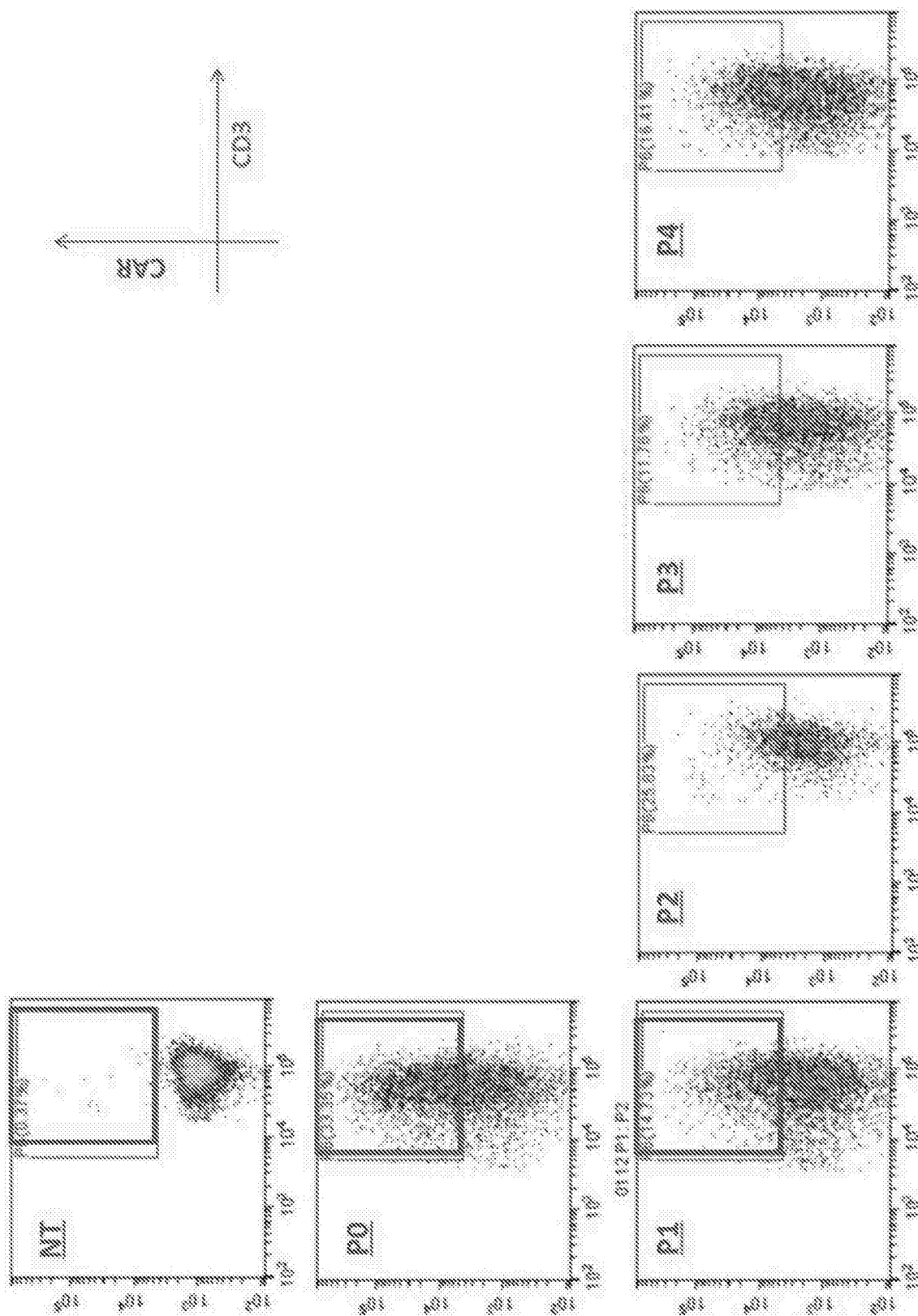


图3A

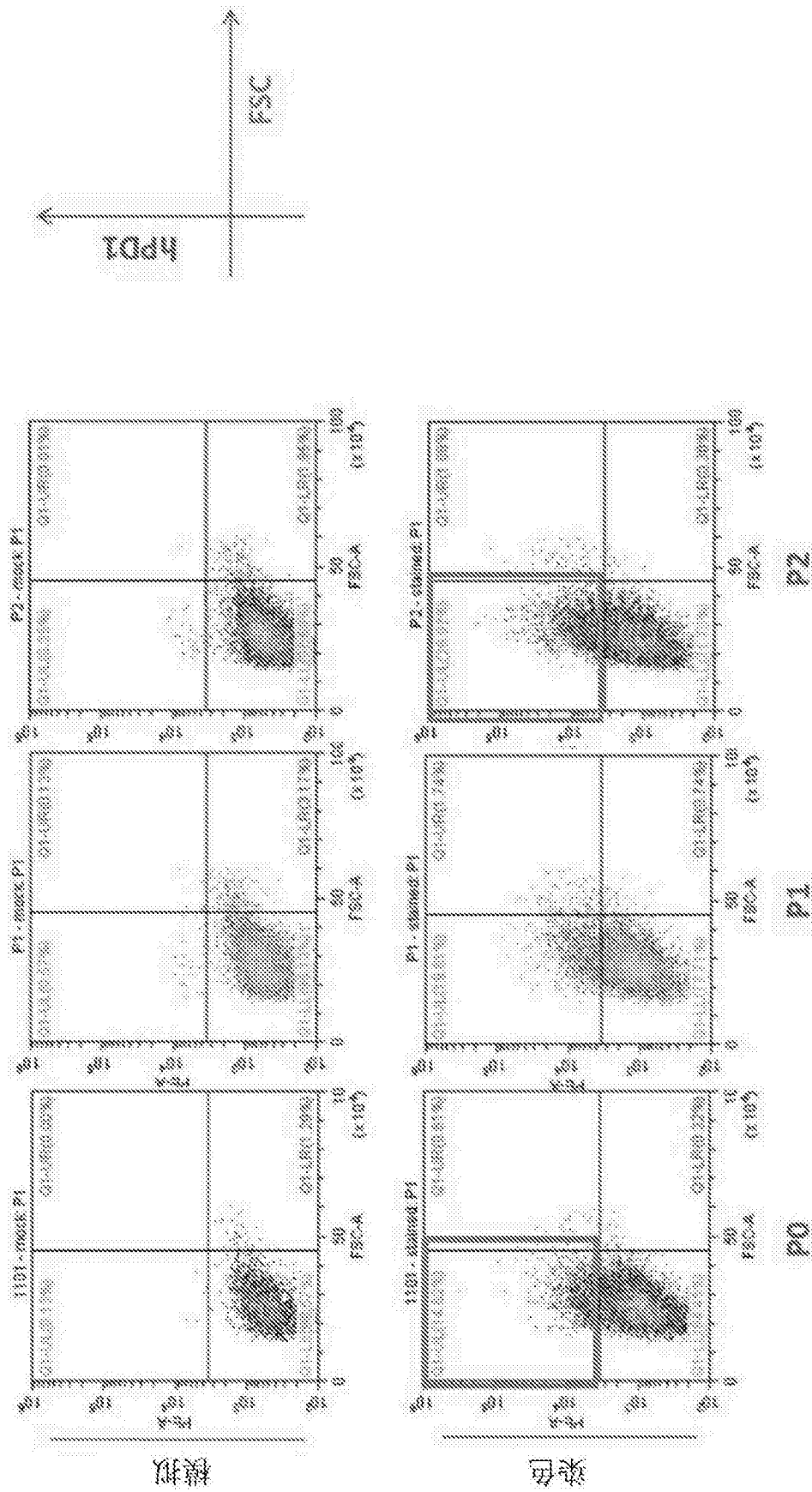


图3B

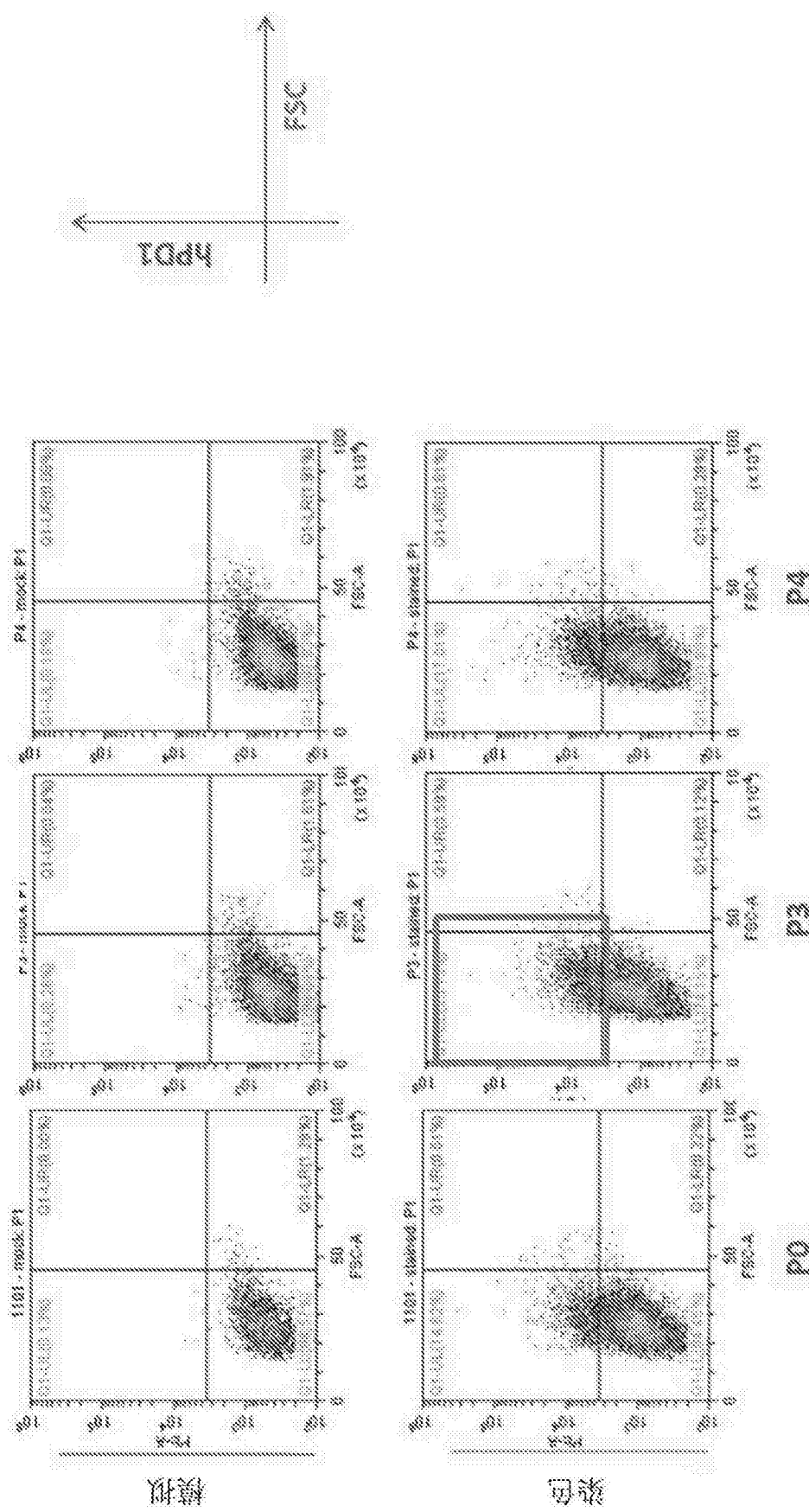


图3C

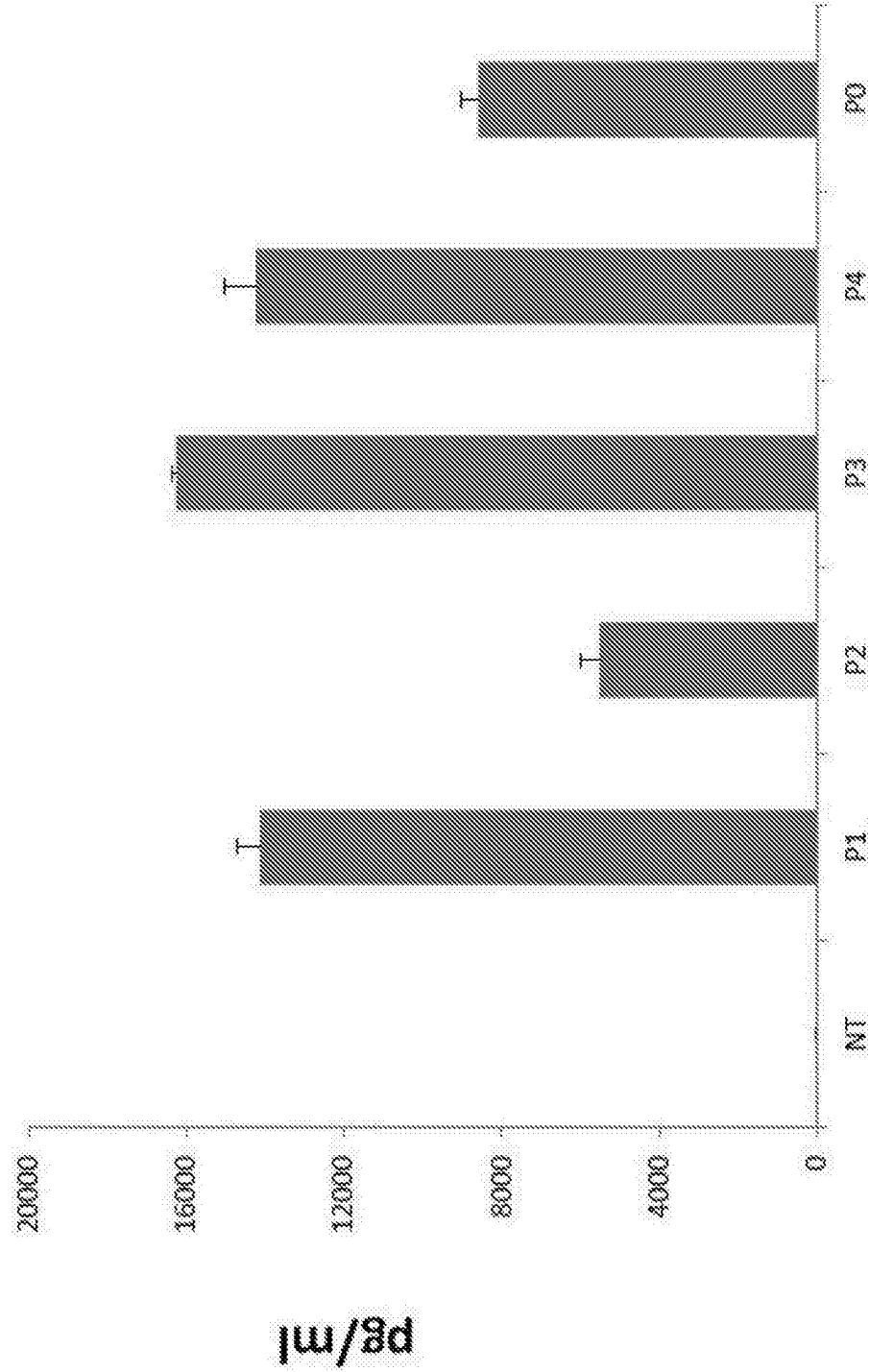


图4A

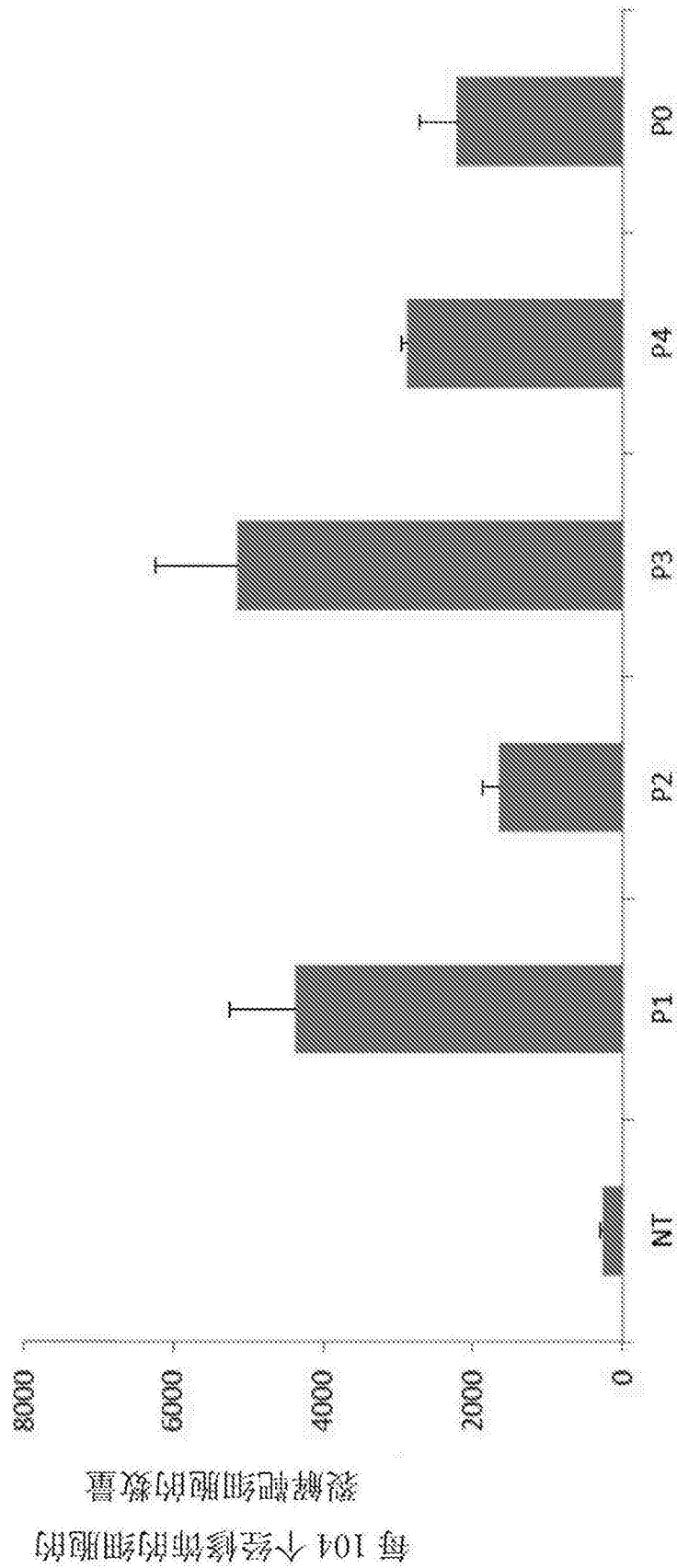


图4B

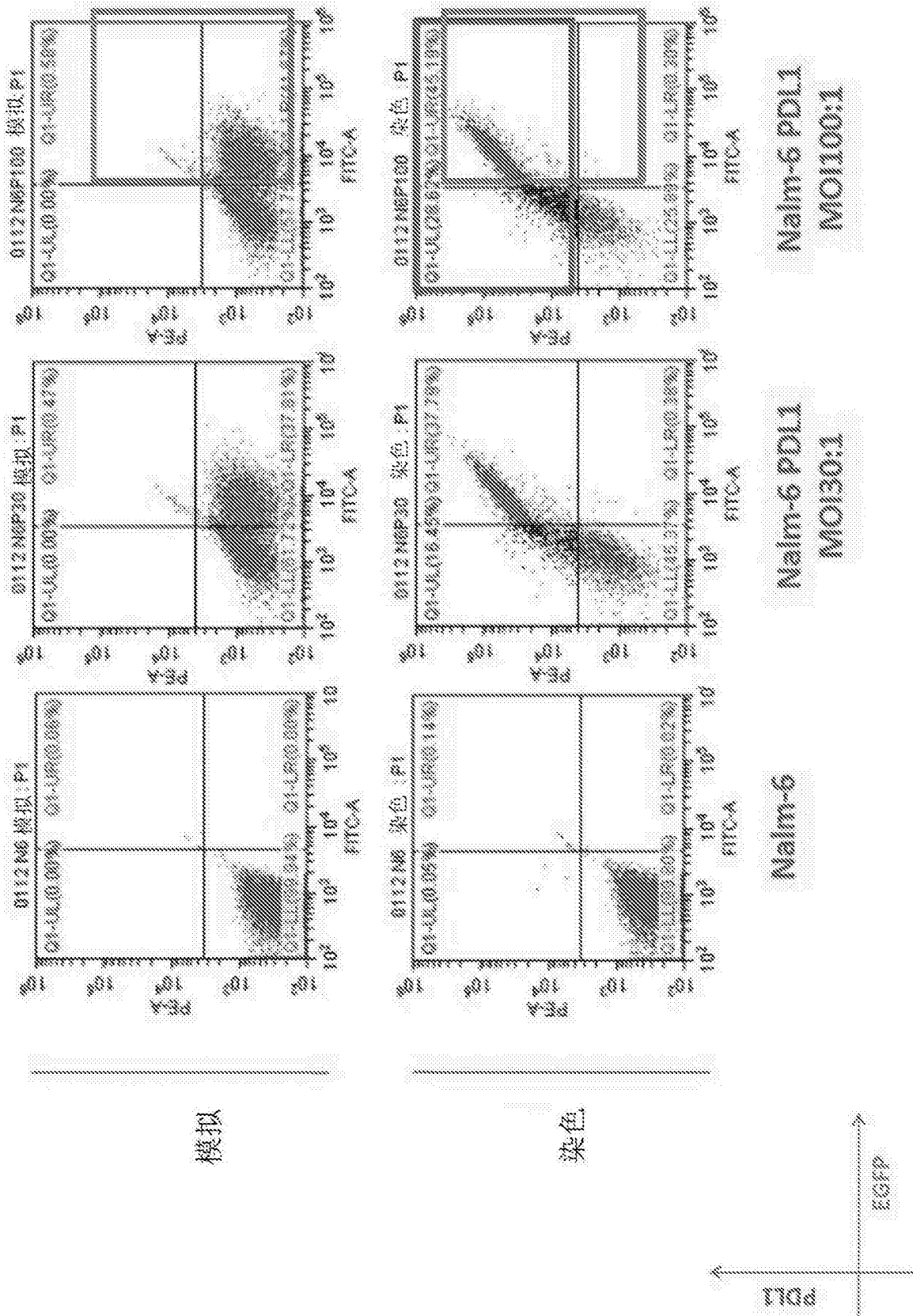


图5

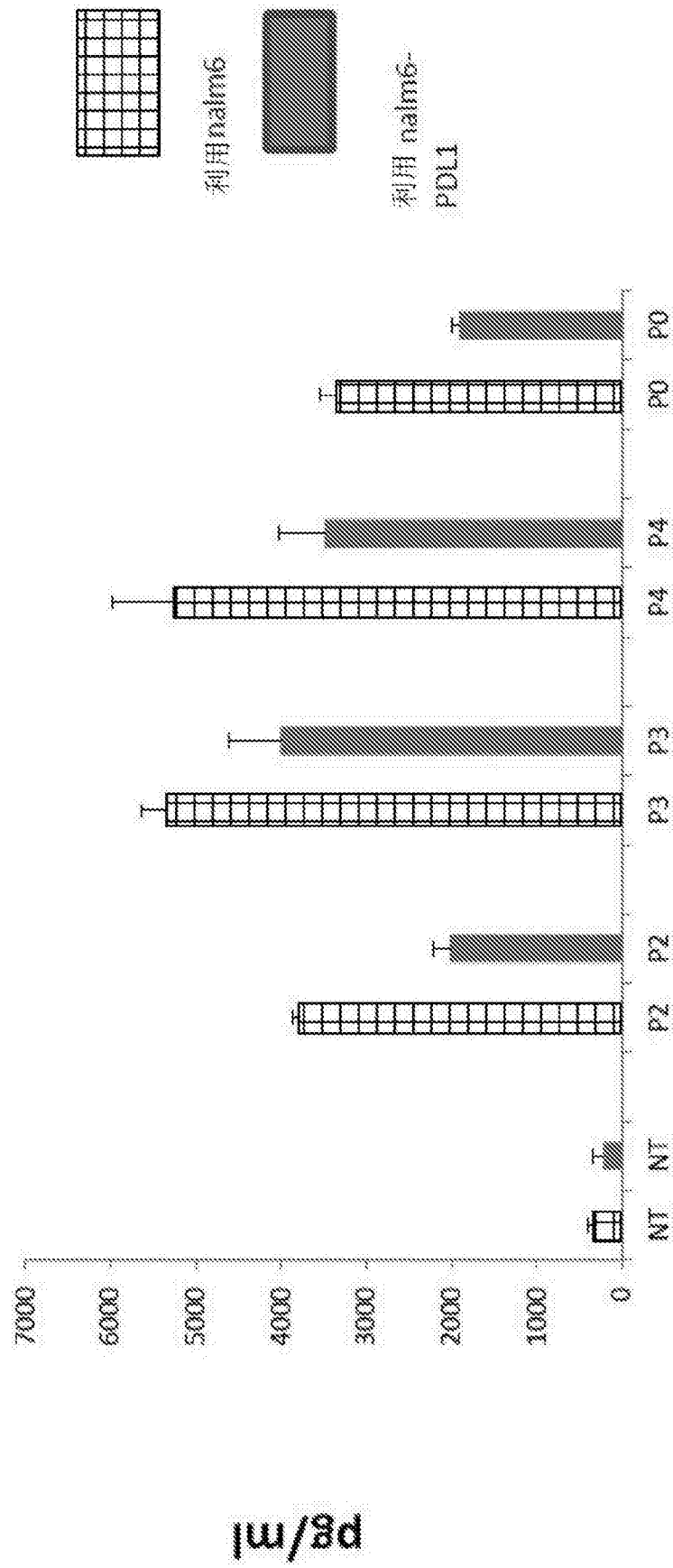


图6A

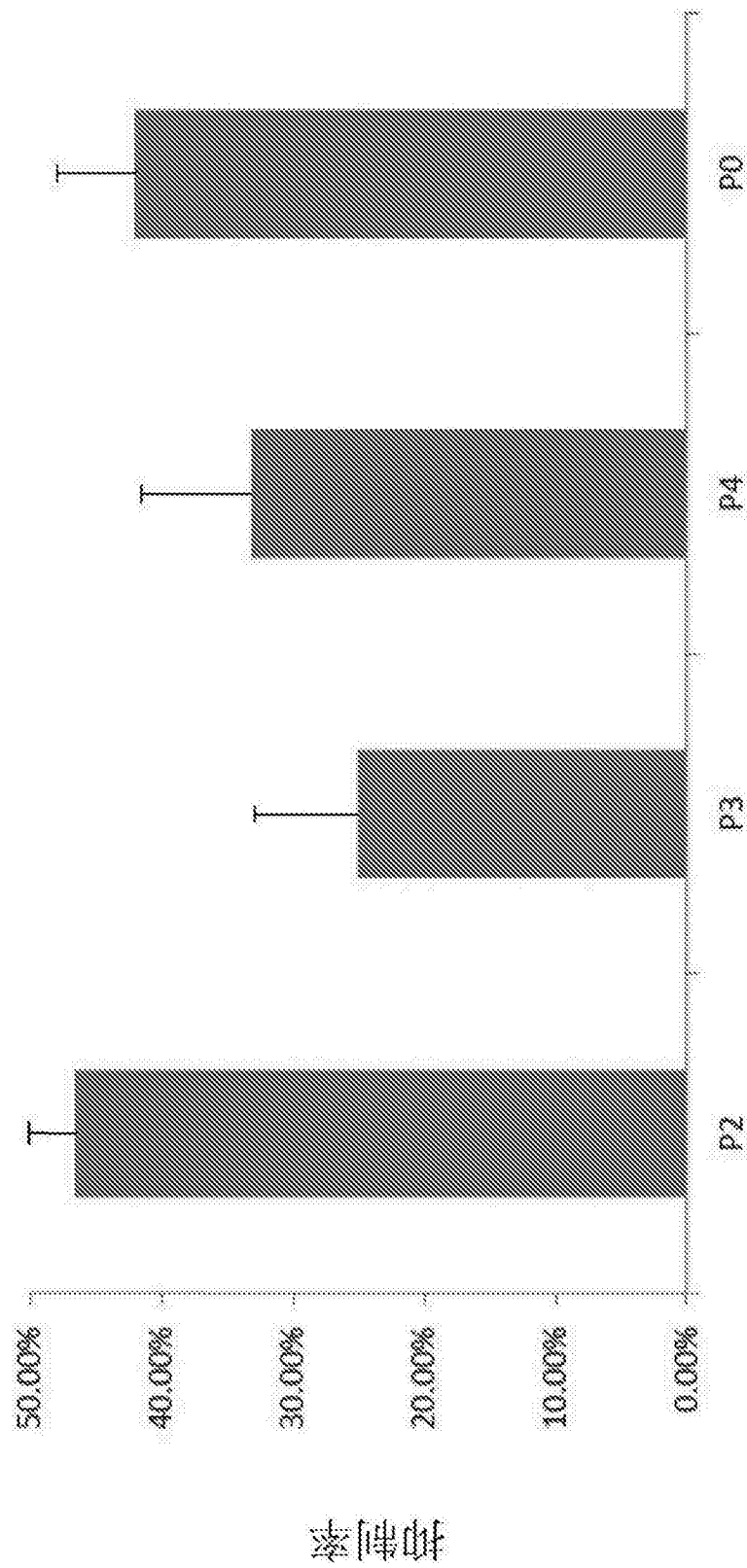


图6B