



(21)申請案號：108141962

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 11 月 19 日

(51)Int. Cl.：

*C07K14/54 (2006.01)**A61K35/17 (2015.01)**A61K39/00 (2006.01)**C07K14/705 (2006.01)**C07K14/725 (2006.01)**C07K14/71 (2006.01)**C07K16/28 (2006.01)**C12N15/867 (2006.01)*

(30)優先權：2018/11/19 美國

62/769,414

2018/11/30 美國

62/773,394

2019/01/11 美國

62/791,491

(71)申請人：美國德州系統大學評議委員會(美國) BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM (US)

美國

(72)發明人：瑞分尼 凱蒂 REZVANI, KATY (US)；須帕爾 依麗莎白 J SHPALL, ELIZABETH J. (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：64 項 圖式數：3 共 92 頁

(54)名稱

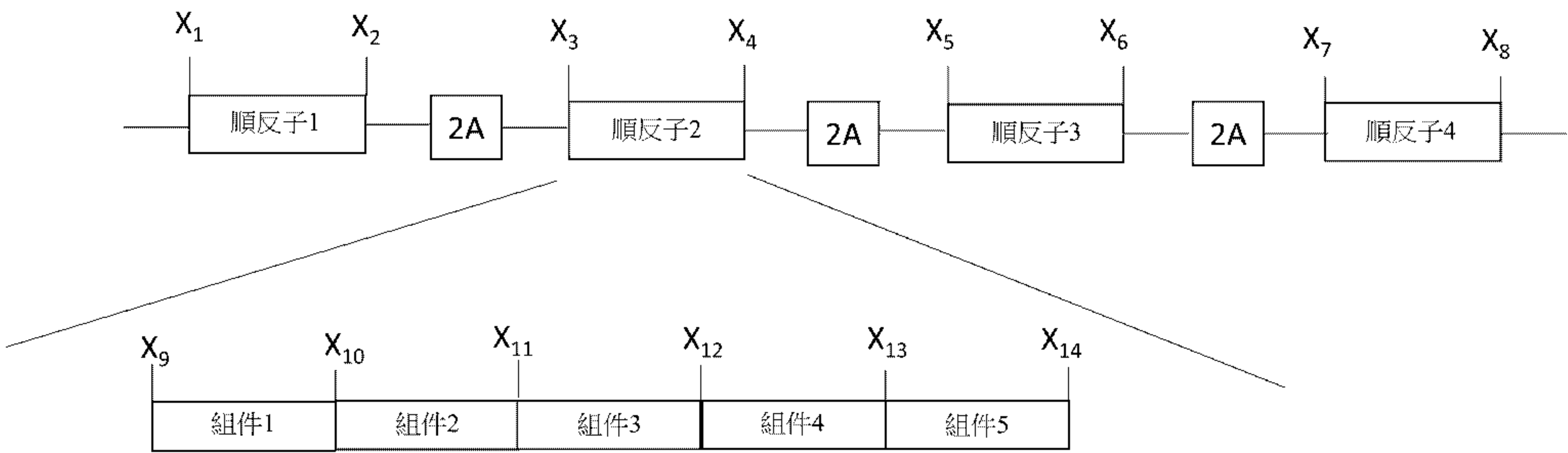
用於 C A R 及 T C R 轉導之模組化多順反子載體

(57)摘要

本文提供一種模組化多順反子載體系統，諸如用於細胞之基因再程式化以表現一或多種抗原受體。系統之模組化特徵允許在除了特定順反子內之一或多個組件之外的一或多個順反子之交換。在特定實施例中，系統之模組化允許嵌合抗原受體之組件之交換，諸如協同刺激域、scFv、鉸鏈、信號傳導域等之交換。

Provided herein is a modular polycistronic vector system, such as for the genetic reprogramming of cells to express one or more antigen receptors. The modular characteristic of the system allows for exchange of one or more cistrons in addition to one or more components within particular cistrons. In specific embodiments, the modularity of the system allows exchange of components of a chimeric antigen receptor, such as exchange of costimulatory domains, scFvs, hinges, signaling domains, and so forth.

指定代表圖：



【圖1A】



202033542

【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於CAR及TCR轉導之模組化多順反子載體

【英文發明名稱】

A MODULAR, POLYCISTRONIC VECTOR FOR CAR AND TCR
TRANSDUCTION

【中文】

本文提供一種模組化多順反子載體系統，諸如用於細胞之基因再程式化以表現一或多種抗原受體。系統之模組化特徵允許在除了特定順反子內之一或多個組件之外的一或多個順反子之交換。在特定實施例中，系統之模組化允許嵌合抗原受體之組件之交換，諸如協同刺激域、scFv、鉸鏈、信號傳導域等之交換。

【英文】

Provided herein is a modular polycistronic vector system, such as for the genetic reprogramming of cells to express one or more antigen receptors. The modular characteristic of the system allows for exchange of one or more cistrons in addition to one or more components within particular cistrons. In specific embodiments, the modularity of the system allows exchange of components of a chimeric antigen receptor, such as exchange of costimulatory domains, scFvs, hinges, signaling domains, and so forth.

【指定代表圖】

圖1A

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於CAR及TCR轉導之模組化多順反子載體

【英文發明名稱】

A MODULAR, POLYCISTRONIC VECTOR FOR CAR AND TCR
TRANSDUCTION

【技術領域】

【0001】 本發明大體上至少關於免疫學、細胞生物學、分子生物學、重組技術及醫學之領域。更特定言之，其係關於多順反子載體，諸如用於表現一或多種抗原受體。

【先前技術】

【0002】 儘管診斷及診斷患有癌症之患者可獲得之治療選項中存在顯著技術進步，但預後仍通常保持不良且許多患者無法治癒。免疫療法有希望向診斷患有各種腫瘤之患者提供強效但具有靶向性之治療，其具有根除惡性腫瘤細胞而不破壞正常組織之潛力。理論上，免疫系統之T細胞能夠識別對腫瘤細胞具有特異性之蛋白質模式且經由多種效應機制介導其破壞。

【0003】 用於過繼癌症免疫療法之免疫細胞(諸如自然殺手(NK)細胞)之基因再程式化具有臨床上相關之應用及益處，諸如內在抗腫瘤監測，而無先前對敏化同種異體功效之需求，無移植物抗宿主反應性，及目標腫瘤之直接細胞介導之細胞毒性及細胞溶解。投與表現嵌合抗原受體(CAR)之免疫細胞(諸如過繼T細胞療法或NK細胞療法)為嘗試利用及擴增患者自身免疫細胞之腫瘤根除能力，且接著在效應子實際上消除殘餘腫

瘤，然而不損害健康組織之狀態下使此等效應子返回至患者。通常，CAR 包含對腫瘤相關抗原(TAA)具有特異性之抗體之單鏈可變片段(scFv)，該腫瘤相關抗原經由鉸鏈及跨膜區偶合至T細胞信號傳導分子之細胞質域。

【0004】 多個基因在所要比率下之共表現對廣泛基礎研究及生物醫學應用(包括基因再程式化)具有高度吸引力。用於多基因共表現之策略包括引入多種載體、在單一載體中使用多種啟動子、融合蛋白、在基因之間的蛋白水解裂解位點、內部核糖體入口位點及「自行裂解」2A肽。然而，存在對用於包括CAR、T細胞受體(TCR)、細胞介素、細胞介素受體、趨化因子受體及歸巢受體(homing receptor)(僅舉幾例)之多個基因之組合表現的方法之未滿足的需求。本發明滿足彼需要。

【發明內容】

【0005】 本發明之實施例包括涉及多順反子載體之方法及組合物，該等多順反子載體包含各自由一或多個限制酶位點側接之至少兩個、至少三個或至少四個順反子，其中至少一個順反子編碼至少一種抗原受體。在一些情況下，順反子中之兩者、三者、四者或更多者被轉譯為單一多肽且裂解為分開的多肽。載體上之相鄰順反子可藉由提供經編碼多肽為分開的分子之能力的位點分開。舉例而言，載體上之相鄰順反子可藉由自行裂解位點(諸如2A自行裂解位點)分開。在一些情況下，順反子中之每一者表現與載體分開之多肽。在特定情況下，載體上之相鄰順反子藉由IRES元件分離。

【0006】 在本發明之特定實施例中，載體上之順反子中之至少一者包含兩個或更多個模組化組件，其中順反子內的模組化組件中之每一者由一或多個限制酶位點側接。舉例而言，順反子可包含三個、四個或五個模

組化組件。在至少一些情況下，順反子編碼具有由相應模組化組件編碼之受體之不同部分的抗原受體。順反子之第一模組化組件可編碼受體之抗原結合域。另外，順反子之第二模組化組件可編碼受體之鉸鏈區。另外，順反子之第三模組化組件可編碼受體之跨膜域。另外，順反子之第四模組化組件可編碼第一協同刺激域。另外，順反子之第五模組化組件可編碼第二協同刺激域。另外，順反子之第六模組化組件可編碼信號傳導域。

【0007】 在本發明之特定態樣中，載體上之兩個不同順反子各自編碼非一致抗原受體。兩種抗原受體均可由包含兩個或更多個模組化組件之順反子，包括包含兩個或更多個模組化組件的分開的順反子編碼。抗原受體可為例如嵌合抗原受體(CAR)及/或T細胞受體(TCR)。

【0008】 在特定實施例中，載體為病毒載體(例如反轉錄病毒載體、豆狀病毒載體、腺病毒載體或腺相關病毒載體)或非病毒載體。載體可包含莫洛尼鼠類白血病毒(Moloney Murine Leukemia Virus, MMLV) 5' LTR, 3' LTR及/或psi封裝元件。在特定情況下，psi封裝併入於5' LTR與抗原受體編碼序列之間。載體可或可不包含pUC19序列。在載體之一些態樣中，至少一個順反子編碼分泌或膜結合細胞介素(例如介白素15 (IL-15)、IL-7、IL-21、IL-12、IL-18或IL-2)、趨化因子、細胞介素受體及/或歸巢受體。

【0009】 當2A裂解位點用於載體中時，2A裂解位點可包含P2A、T2A、E2A及/或F2A位點。

【0010】 載體之任何順反子可包含自殺基因。載體之任何順反子可編碼報導基因。在特定實施例中，第一順反子編碼自殺基因，第二順反子編碼抗原受體，第三順反子編碼報導基因，且第四順反子編碼細胞介素。

在某些實施例中，第一順反子編碼自殺基因，第二順反子編碼第一抗原受體，第三順反子編碼第二抗原受體，且第四順反子編碼細胞介素。在特定實施例中，抗原受體之不同部分由相應模組化組件編碼，且第二順反子之第一組件編碼抗原結合域，第二組件編碼鉸鏈及/或跨膜域，第三組件編碼協同刺激域，且第四組件編碼信號傳導域。

【0011】 本發明之方法及組合物涵蓋在單一載體上之順反子之任何適合次序。

【0012】 本發明之實施例包括攜帶本文所涵蓋之載體中之任一者的任何種類之細胞。在特定實施例中，存在包含本發明之載體的免疫細胞，且免疫細胞可為T細胞、末梢血液淋巴細胞、B細胞、NK細胞、不變NK細胞、NKT細胞、iNKT、巨噬細胞或幹細胞(諸如間葉幹細胞(MSC)或誘導多能幹(iPS)細胞)。T細胞可為CD8+ T細胞、CD4+ T細胞或 γ - δ T細胞。在特定實施例中，T細胞為細胞毒性T淋巴細胞(CTL)。任何細胞相對於個體可為同種異體或自體的。免疫細胞可為人類細胞。免疫細胞可衍生自臍帶血、末梢血液、骨髓、CD34+細胞或iPSC。可包含複數個免疫細胞作為細胞群體。在特定情況下，免疫細胞包含於醫藥學上可接受之載劑中。

【0013】 在本發明之一個實施例中，存在用於產生免疫細胞之方法，其包含(a)獲得免疫細胞之起始群體；(b)在人工呈現細胞(APC)存在下培養免疫細胞之起始群體；(c)將本發明中涵蓋之載體引入免疫細胞中；及(d)在APC存在下擴增免疫細胞，由此獲得擴增之免疫細胞。免疫細胞之起始群體可藉由使用菲科爾-帕克密度梯度(ficoll-paque density gradient)分離單核細胞來獲得。APC可為經 γ 輻射之APC。在方法之一些

情況下，方法進一步包含冷凍保存擴增之免疫細胞之群體。

【0014】 本發明之實施例包括包含如本文所涵蓋之任何免疫細胞群體及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物。

【0015】 在特定實施例中，提供包含有效量之如本文所涵蓋之免疫細胞的組合物，其用於治療個體之疾病或病症，諸如癌症或免疫相關病症。在特定實施例中，存在包含有效量之本發明所涵蓋之免疫細胞的組合物用於治療個體之癌症或免疫相關病症之用途。

【0016】 在一個實施例中，存在治療個體之疾病或病症之方法，其包含向個體投與有效量之本發明所涵蓋之免疫細胞。在特定實施例中，疾病或病症為癌症(實體癌症或血液惡性病)、自體免疫病症、移植物抗宿主疾病、同種異體移植排斥反應或發炎性病狀。自體免疫病症可為發炎性病狀且免疫細胞可基本上不表現糖皮質激素受體。個體已投與或可正投與類固醇療法。免疫細胞相對於個體可為自體或同種異體的。該方法可進一步包含向個體投與至少第二治療劑，諸如化學療法、免疫療法、手術、放射療法或生物療法。在特定實施例中，免疫細胞係靜脈內、腹膜內、氣管內、瘤內、肌肉內、內視鏡、病灶內、經皮、皮下、局部、藉由輸液或藉由直接注射向個體投與。在特定實施例中，第二治療劑係靜脈內、腹膜內、氣管內、瘤內、肌肉內、內視鏡、病灶內、經皮、皮下、局部、藉由輸液或藉由直接注射向個體投與。

【0017】 在一些實施例中，多順反子載體包含各自由一或多個限制酶位點側接之至少兩個、至少三個或至少四個順反子，其中載體上之順反子中之至少一者包含兩個或更多個模組化組件，其中順反子內的模組化組件中之每一者由一或多個限制酶位點側接。

【0018】 本發明之其他目標、特徵及優勢將自以下實施方式而變得顯而易見。然而，應理解，由於在本發明之精神及範疇內的各種改變及修改將自此實施方式對熟習此項技術者變得顯而易見，所以實施方式及特定實例儘管指示本發明之特定實施例，但僅以說明方式給出。

【圖式簡單說明】

【0019】 以下圖式形成本說明書之一部分且包括以進一步展現本發明之某些態樣。結合本文中呈現之特定實施例之詳細描述參考此等圖式中之一或多者可更好地理解本發明。

【0020】 **圖1A**：包含具有至少一個具有多個模組化組件之順反子的多個模組化順反子的多順反子載體之一個實施例。X表示至少一個限制酶位點。

【0021】 **圖1B**：包含具有至少一個具有多個模組化組件之順反子的多個模組化順反子的多順反子載體之另一實施例。X表示至少一個限制酶位點。

【0022】 **圖2**：描繪具有經由三個2A自行裂解位點表現7個開放閱讀框架(ORF) (包括抗原受體順反子內之組件)之四個順反子之多順反子反轉錄病毒載體之一個實例之線性表示之示意圖。

【0023】 **圖3**：具有多個順反子及三個2A裂解位點之多順反子質體的一個實例。

【實施方式】

【0024】 本申請案主張2018年11月19日申請之美國臨時專利申請案第62/769,414號；2018年11月30日申請之美國臨時專利申請案第62/773,394號；及2019年1月11日申請之美國臨時專利申請案第

62/791,491號之優先權，該等申請案全部以全文引用之方式併入本文中。

序列表

【0025】 本申請案含有序列表，該序列表已以ASCII格式以電子方式提交且其全文以引用的方式併入本文中。該ASCII複本於2019年11月13日創建，命名為UTFC_P1152WO_SL.txt且大小為2,502個位元組。

【0026】 在某些實施例中，本發明提供一種利用能夠在實質上一致水準下表現多個順反子的多順反子載體之靈活模組化系統。該系統可用於細胞工程改造，從而允許多個基因之組合表現(包括過度表現)。在特定實施例中，由載體表現之基因中之一或多者包括在特定實施例中為非天然受體之一種、兩種或更多種抗原受體。多個基因可包含但不限於：CAR、TCR、細胞介素、趨化因子、歸巢受體、CRISPR/Cas9介導之基因突變、誘餌受體、細胞介素受體、嵌合細胞介素受體等。載體可進一步包含：(1)一或多個報導子，例如螢光或酶報導子，諸如用於細胞分析法及動物成像；(2)一或多種細胞介素或其他信號傳導分子；及/或(3)自殺基因。

【0027】 特定言之，載體可包含藉由任何種類之裂解位點(諸如2A裂解位點)分離的至少4個順反子。載體可或可不基於莫洛尼鼠類白血病毒(MoMLV或MMLV)，包括具有pUC19主鏈中之psi封裝序列的3'及5'LTR。載體可包含具有三個或更多個2A裂解位點及多個ORF之4個或更多個順反子以用於基因調換。在一些實施例中，系統允許由一或多個限制位點側接之多個基因(7個或更多)之組合過度表現以便經由次選殖快速整合，且系統亦包括至少三個2A自行裂解位點。因此，系統允許表現多種CAR、TCR、信號傳導分子、細胞介素、細胞介素受體及/或歸巢受體。此系統亦可應用於其他病毒及非病毒載體，包括但不限於豆狀病毒、腺病

毒AAV以及非病毒質體。

【0028】 系統之模組化性質亦允許將基因有效次選殖至多順反子表現載體中之4個順反子中之每一者及調換基因，諸如用於快速測試。位於多順反子表現載體中關鍵位置之限制位點允許高效調換基因。限制酶位點之實例至少包括以下：Bln I、BstE II、EcoR V、Acc I、Alu I、Apa I、BamH I、Bcl I、Bgl II、Bsm I、Cfo I、Cla I、Dde I、Dpn I、Dra I、EclX I、EcoR I、Hae III、Hind III、Hpa I、Kpn I、Ksp I、Mva I、Nco I、Nde I、Nhe I、Not I、Nsi I、Pst I、Pvu I、Pvu II、Rsa I、Sac I、Sal I、Sau3A I、Sca I、Sfi I、Sma I、Spe I、Sph I、Taq I、Xba I及/或Xho I。

【0029】 本文進一步提供用於用本文中涵蓋之模組化載體基因工程改造免疫細胞之方法。免疫細胞可為任何種類，包括例如T細胞、B細胞、NK細胞、NKT細胞或間葉基質細胞(MSC)。本文亦提供免疫療法之方法，其包含投與載體工程改造之免疫細胞，諸如用於治療例如癌症、感染或自體免疫疾病。

I.定義

【0030】 如本文所用，關於指定組分「基本上游離」在本文中用於意謂指定組分中無一者有目的地調配入組合物中及/或僅作為污染物或以痕量存在。因此，由組合物之任何非預期污染引起之指定組分之總量遠低於0.05%，較佳低於0.01%。最佳為其中任何量之指定組分均不可用標準分析方法偵測到之組合物。

【0031】 與長期以來的專利法慣例一致，當在本說明書中與字組包含共同使用時，包括申請專利範圍，字組「一(a)」及「一(an)」指代「一

或多種」。本發明之一些實施例可由以下組成或基本上由以下組成：一或多個本發明之元件、方法步驟及/或方法。預期本文所述之任何方法或組合物可根據本文所述之任何其他方法或組合物，所揭示的實施例實施，且在不脫離本發明之精神及範疇的情況下仍獲得相同或類似結果。儘管本發明支持僅指替代方案及「及/或」之定義，但除非明確地指示為僅指替代方案或替代方案相互排斥，否則術語「或」之使用在申請專利範圍中用於意謂「及/或」。如本文所用，「另一」可意謂至少第二個或更多個。

【0032】 如本文所用，術語「順反子」係指可產生基因產物之核酸序列。

【0033】 如本文所用，術語「模組化」係指允許其互換性的順反子或順反子組件，在一些情況下互換性諸如藉由分別移除及置換整個順反子或順反子組件，例如藉由使用標準重組技術，包括利用一或多個限制酶位點，包括獨特限制酶位點。

【0034】 貫穿本申請案，術語「約」用於指示值包括用於裝置、用以測定值之方法之誤差之固有偏差，或研究個體當中存在之偏差。

【0035】 「免疫病症」、「免疫相關病症」或「免疫調節病症」係指其中免疫反應在疾病之發展及/或進展中起關鍵作用之病症。免疫調節病症例如包括自身免疫病症、同種異體移植排斥反應、移植物抗宿主疾病及發炎性及過敏性病狀。

【0036】 「免疫反應」為諸如B細胞或T細胞或先天性免疫細胞之免疫系統之細胞對刺激之反應。在一個實施例中，反應對特定抗原具有特異性(「抗原特異性反應」)。

【0037】 「自體免疫疾病」係指其中免疫系統針對為正常宿主之一

部分之抗原(亦即自體抗原)產生免疫反應(例如B細胞或T細胞反應)及隨之而來的對組織的損傷之疾病。自體抗原可衍生自宿主細胞，或可衍生自諸如通常定殖黏膜表面之微生物體(稱為共生生物體)之共生生物體。

【0038】 「治療(treating)」或治療(treatment)疾病或病狀係指執行方案，其可包括向患者投與一或多種藥物或療法(包括細胞)以致力於減輕疾病之至少一種徵象或症狀。所要治療效果包括降低疾病進展之速率、改善或緩和疾病狀態、延遲至少一種症狀之發作及緩解或改良預後。緩解可在疾病或病狀之徵象或症狀出現之前以及在其出現之後或兩種情況下出現。因此，「治療(treating)」或「治療(treatment)」可包括「預防(preventing)」或「預防(prevention)」疾病或非所要病狀。此外，「治療(treating)」或「治療(treatment)」不需要完全緩解一或多種徵象或症狀，不需要治癒，且尤其包括對患者僅具有微小作用之方案。

【0039】 如本申請案通篇使用，術語「治療益處」或「治療有效」係指關於病狀之醫療，促進或增強個體之健康的任何事物。此包括但不限於疾病之一或多種徵象或症狀之頻率或嚴重程度降低。舉例而言，癌症之治療可涉及例如減小腫瘤尺寸、減小腫瘤侵襲性、減小癌症之生長速率及/或預防癌轉移。癌症之治療亦可指延長患有癌症之個體之存活期。

【0040】 「個體(subject)」及「患者」及「個體(individual)」係指人類或非人類，諸如靈長類、哺乳動物及脊椎動物。在特定實施例中，個體為人類、狗、貓、馬、牛等。

【0041】 片語「醫藥學上可接受或藥理學上可接受」係指分子實體及組合物在按需要投與諸如人類之動物時不產生不利、過敏性或其他不良反應。根據本發明，包含抗體或額外活性成分之醫藥組合物之製備將為熟

習此項技術者已知。此外，對於動物(例如人類)投藥，應理解，製劑應滿足如FDA生物標準辦公室(FDA Office of Biological Standards)所要求之無菌性、發熱性、一般安全性及純度標準。

【0042】如本文所用，「醫藥學上可接受之載劑」包括任何及所有水性溶劑(例如水、醇性/水性溶液、鹽水溶液、非經腸媒劑，諸如氯化鈉、林格氏右旋糖(Ringer's dextrose)等)、非水性溶劑(例如丙二醇、聚乙二醇、植物油及可注射有機酯，諸如油酸乙酯)、分散介質、包衣、界面活性劑、抗氧化劑、防腐劑(例如抗菌或抗真菌劑、抗氧化劑、螯合劑及惰性氣體)、等張劑、吸收延遲劑、鹽、藥物、藥物穩定劑、凝膠、黏合劑、賦形劑、崩解劑、潤滑劑、甜味劑、調味劑、染料、流體及養分補充劑，諸如材料及其組合，如一般熟習此項技術者應已知。根據熟知參數調節醫藥組合物中各種組分之pH值及精確濃度。

【0043】術語「抗原呈現細胞(APC)」係指能夠呈現一或多種呈可藉由免疫系統之特異性效應細胞識別之肽-MHC複合體形式之抗原，且由此誘導針對所呈現的一或多種抗原的有效細胞免疫反應的一類細胞。術語「APC」涵蓋諸如巨噬細胞、B細胞、內皮細胞、活化T細胞及樹突狀細胞之完整全細胞，或諸如與 $\beta 2$ -微球蛋白複合之純化MHC I類分子之能夠呈現抗原之天然存在或合成分子。

II.多順反子模組化載體系統

【0044】本發明之實施例涵蓋利用多順反子載體之系統，其中載體之至少一部分為模組化的，例如藉由允許移除及置換一或多個順反子(或一或多個順反子之一或多個組件)，諸如藉由利用一或多個特異性選擇其身分及位置以促進載體之模組化使用的限制酶位點。載體亦具有其中多個

順反子被轉譯為單一多肽且加工成分開的多肽，由此賦予載體以實質上等莫耳濃度表現分開的基因產物的優勢之實施例。

【0045】 本發明之載體之組態可以模組化以便能夠改變載體之一或多個順反子及/或改變一或多個特定順反子之一或多個組件。載體可經設計以利用側接一或多個順反子之末端及/或側接特定順反子之一或多個組件之末端的獨特限制酶位點。

【0046】 在某些實施例中，本發明提供一種用於細胞工程改造之系統，其允許可包括例如一種、兩種或更多種抗原受體之多個順反子的組合表現，包括過度表現。在特定實施例中，使用如本文所描述之多順反子載體允許載體自相同mRNA產生等莫耳量之多種基因產物。多個基因可包含但不限於：CAR、TCR、細胞介素、趨化因子、歸巢受體、CRISPR/Cas9介導之基因突變、誘餌受體、細胞介素受體、嵌合細胞介素受體等。載體可進一步包含一或多個螢光或酶報導子，諸如用於細胞分析法及動物成像。載體亦可包含自殺基因產物，以用於在提供有攜帶載體之細胞之宿主不再需要其或其對宿主變得有害時除去攜帶載體之細胞。

【0047】 在特定情況下，載體可為 γ -反轉錄病毒轉移載體。反轉錄病毒轉移載體可包含基於質體，諸如pUC19質體(在HindIII與EcoRI限制酶位點之間的大片段(2.63 kb))之主鏈。主鏈可攜帶來自莫洛尼鼠類白血病病毒(MoMLV)之病毒組件，包括5' LTR、psi封裝序列及3' LTR。LTR為發現於反轉錄病毒原病毒之任一側上之長末端重複序列，且在轉移載體之情況下，囊括相關基因負荷，諸如CAR及相關組件。psi封裝序列(其為藉由核衣殼封裝之目標位點)亦以順式併入，包夾於5' LTR與CAR編碼序列之間。因此，轉移載體之實例之基本結構可如此組態：pUC19序列-5'

LTR-psi封裝序列-相關基因負荷-3' LTR-pUC19序列。此系統亦可應用於其他病毒及非病毒載體，包括但不限於豆狀病毒、腺病毒AAV以及非病毒質體。

【0048】 在特定實施例中，載體之多個順反子藉由一或多個提供基因自相應多個順反子至單一轉錄物之表現的元件分開。隨後轉譯單一轉錄物以產生多蛋白質多肽，其經加工(例如藉由裂解)以使得蛋白質變成分開的蛋白質分子。例示性元件為編碼自行裂解肽，諸如2A肽裂解序列之位點。其他裂解位點包括弗林蛋白酶裂解位點(furin cleavage site)或菸草蝕刻病毒(Tobacco Etch Virus，TEV)裂解位點。在其他情況下，載體之順反子藉由一或多個提供分開的順反子(諸如IRES序列)之不同轉譯的元件分開。在一些情況下，載體利用兩種類型之元件之組合。

【0049】 相關基因負荷可包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個或更多個包含可自載體表現之至少一個ORF的順反子。本發明之實施例包括處於其中相關基因負荷可能當前未容納於載體中，但載體仍保留其存在時表現及/或進一步加工順反子所需的一或多個結構或管家元件(諸如一或多個啟動子、多個2A序列等)之狀態中的載體。載體可具有多個順反子，其能夠轉譯成單一多肽且加工成分開的多肽(諸如藉由使用在相鄰順反子之間的2A自行裂解位點)。在替代實施例中，多個順反子均表現為分開的多肽(諸如藉由使用在相鄰順反子之間的IRES元件)。

【0050】 在特定情況下，載體中相關基因負荷之結構可如下：

順反子1-2A-順反子2-2A-順反子3-2A-順反子4，

其中在特定實施例中，順反子1、順反子2、順反子3及順反子4為不同基因。在至少一些情況下，載體內之2A序列可或可不一致。

【0051】在特定實施例中，順反子中之至少一者編碼自殺基因。在一些實施例中，順反子中之至少一者編碼細胞介素。在某些實施例中，至少一個順反子編碼抗原受體。順反子可或可不編碼報導基因。在某些實施例中，至少兩個順反子編碼兩種不同抗原受體(例如CAR及/或TCR)。順反子可或可不編碼報導基因。在特定情況下，相關基因負荷如下：

自殺基因-2A-抗原受體-2A-報導基因-2A-細胞介素；或
 自殺基因-2A-抗原受體-2A-細胞介素-2A報導基因；或
 自殺基因-2A-細胞介素-2A報導基因-2A-抗原受體；或
 自殺基因-2A-細胞介素-2A抗原受體-2A-報導基因；或
 自殺基因-2A-報導基因-2A-細胞介素-2A抗原受體；或
 自殺基因-2A-報導基因-2A-抗原受體-2A-細胞介素；或
 抗原受體-2A-細胞介素-2A-報導基因-2A-自殺基因；或
 抗原受體-2A-細胞介素-2A-自殺基因-2A-報導基因；或
 抗原受體-2A-報導基因-2A-細胞介素-2A-自殺基因；或
 抗原受體-2A-報導基因-2A-自殺基因-2A-細胞介素；或
 抗原受體-2A-自殺基因-2A-報導基因-2A-細胞介素；或
 抗原受體-2A-自殺基因-2A-細胞介素-2A-報導基因；或
 報導基因-2A-抗原受體-2A-自殺基因-2A-細胞介素；或
 報導基因-2A-抗原受體-2A-細胞介素-2A-自殺基因；或
 報導基因-2A-細胞介素-2A-自殺基因-2A-抗原受體；或
 報導基因-2A-細胞介素-2A-抗原受體-2A-自殺基因；或
 報導基因-2A-自殺基因-2A-抗原受體-2A-細胞介素；或
 報導基因-2A-自殺基因-2A-細胞介素-2A-抗原受體；或

細胞介素-2A-報導基因-2A-自殺基因-2A-抗原受體；或
 細胞介素-2A-報導基因-2A-抗原受體-2A-自殺基因；或
 細胞介素-2A-自殺基因-2A-抗原受體-2A-報導基因；或
 細胞介素-2A-自殺基因-2A-報導基因-2A-抗原受體；或
 細胞介素-2A-抗原受體-2A-自殺基因-2A-自殺基因；或
 細胞介素-2A-抗原受體-2A-報導基因-2A-報導基因。

【0052】 在相關基因負荷之特定組態中，單一載體可包含編碼第一抗原受體之順反子及編碼與第一抗原受體不一致之第二抗原受體之順反子。在特定實施例中，第一抗原受體編碼CAR且第二抗原受體編碼TCR，或反過來。在特定實施例中，包含分別編碼第一抗原受體及第二抗原受體之分開的順反子的載體亦包含編碼細胞介素或趨化因子之第三順反子及編碼自殺基因之第四順反子。然而，自殺基因及/或細胞介素(或趨化因子)可不存在於載體上。

【0053】 在特定情況下，相關基因負荷如下：

自殺基因-2A-第一抗原受體-2A-細胞介素-2A-第二抗原受體；或
 自殺基因-2A-第一抗原受體-2A-第二抗原受體-2A-細胞介素；或
 自殺基因-2A-細胞介素-2A-第一抗原受體-2A-第二抗原受體；或
 自殺基因-2A-細胞介素-2A-第二抗原受體-2A-第一抗原受體；或
 自殺基因-2A-第二抗原受體-2A-第一抗原受體-2A-細胞介素；或
 自殺基因-2A-第二抗原受體-2A-細胞介素-2A-第一抗原受體；或
 第一抗原受體-2A-細胞介素-2A-第二抗原受體-2A-自殺基因；或
 第一抗原受體-2A-細胞介素-2A-自殺基因-2A-第二抗原受體；或
 第一抗原受體-2A-自殺基因-2A-第二抗原受體-2A-細胞介素；或

第一抗原受體-2A-自殺基因-2A-細胞介素-2A-第二抗原受體；或
 第一抗原受體-2A-第二抗原受體-2A-細胞介素-2A-自殺基因；或
 第一抗原受體-2A-第二抗原受體-2A-自殺基因-2A-細胞介素；或
 細胞介素-2A-第一抗原受體-2A-自殺基因-2A-第二抗原受體；或
 細胞介素-2A-第一抗原受體-2A-第二抗原受體-2A-自殺基因；或
 細胞介素-2A-自殺基因-2A-第一抗原受體-2A-第二抗原受體；或
 細胞介素-2A-自殺基因-2A-第二抗原受體-2A-第一抗原受體；或
 細胞介素-2A-第二抗原受體-2A-第一抗原受體-2A-自殺基因；或
 細胞介素-2A-第二抗原受體-2A-自殺基因-2A-第一抗原受體。

【0054】 在一些情況下，載體中之順反子中之一者不為報導基因或不為細胞介素。在上文所提供之順反子之組態的替代實施例中，替代2A肽序列，可存在允許不同順反子之共表現的替代元件，諸如IRES序列。在單一載體中，可存在所使用之2A肽裂解序列及IRES元件之組合。

【0055】 在特定實施例中，至少一個順反子包含為模組化的多個組件本身。舉例而言，一個順反子可編碼多組件基因產物，諸如具有多個部分之抗原受體；在特定情況下，抗原受體由單一順反子編碼，從而最終產生單一多肽。編碼多個組件之順反子可具有由1、2、3、4、5個或更多個限制酶消化位點(包括對於包含順反子之載體獨特的1、2、3、4、5個或更多個限制酶消化位點)分離的多個組件(圖1A及圖1B)。在特定實施例中，具有多個組件之順反子編碼具有多個相應部分(各自為受體提供獨特功能)之抗原受體。在特定實施例中，多組件順反子之組件之每一者或大部分藉由一或多個對於載體獨特的限制酶消化位點分開，從而在需要時允許分開的組件之互換性。

【0056】 作為說明，多組件順反子之一個實例之模組化如下經組態，其中存在一或多個獨特限制酶位點，如各X表示：

組件1--X₁-組件2---X₂-組件3---X₃-組件4---X₄-組件5---X₅-等。

【0057】 在特定實施例中，多組件順反子之各組件對應於經編碼抗原受體，諸如嵌合抗原受體(CAR)之不同部分。在說明性實施例中，組件1可編碼受體之抗原結合域；組件2可編碼受體之鉸鏈域；組件3可編碼受體之跨膜域；組件4可編碼受體之協同刺激域，且組件5可編碼受體之信號傳導域。在特定實施例中，抗原受體可包含一或多個協同刺激域，其各自藉由獨特限制酶消化位點分開以得到受體內一或多個協同刺激域之互換性。

【0058】 轉而參看圖1A及圖1B，此等說明提供本發明之一個載體之至少部分的實施例之實例且展示載體之模組化性質。圖1A說明具有四個分開的順反子的多順反子載體，其中相鄰順反子藉由2A裂解位點分離，但在特定實施例中，替代2A裂解位點，存在直接或間接引起分開的多肽由順反子(諸如IRES序列)產生的元件。在圖1A中，四個分開的順反子藉由三個2A肽裂解位點分開，且各順反子具有側接順反子之各末端的限制位點(X₁、X₂等)以允許特定順反子諸如與另一順反子或其他類型之序列的互換性，且在使用標準重組技術時。在特定實施例中，側接順反子中之每一者的一或多個限制酶位點對於載體為獨特的，以允許易於重組，但在替代性實施例中，限制酶位點對於載體並不獨特。

【0059】 在特定實施例中，載體藉由允許特定順反子內(包括在特定順反子之多個組件內)之互換性提供獨特，第二層級模組化。特定順反子之多個組件可藉由一或多個限制酶位點(包括對於載體獨特的彼等限制酶

位點)分離，以允許順反子內之一或多個組件的互換性。在圖1A中，作為實例，順反子2包含五個分開的組件，但每個順反子可存在2、3、4、5、6個或更多個組件。圖1A中之實例包括具有各自獨特酶限制位點 X_9 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{12} 、 X_{13} 及 X_{14} 分離，以允許標準重組以交換不同組件1、2、3、4及/或5之五個組件的順反子2。圖1B與圖1A之不同之處在於說明在不同組件之間可存在多個限制酶位點(其為獨特的，但替代地，一或多個不獨特)且在多個限制酶位點之間可存在序列(但替代地可不存在)。在某些實施例中，出於可互換之目的設計由順反子編碼之所有組件。在特定情況下，順反子之一或多個組件設計成可互換，而順反子之一或多個其他組件可不設計成可互換的。

【0060】 在特定實施例中，在圖1A及圖1B之實例中，順反子編碼具有多個組件之CAR分子或其他抗原受體。舉例而言，順反子2可包含編碼具有由組件1、組件2、組件3等表示之分開的組件之CAR分子的序列。CAR分子可包含2、3、4、5、6、7、8個或更多個可互換組件。在特定實施例中，圖1A或圖1B中之組件1編碼用於相關抗原之scFv；組件2編碼鉸鏈；組件3編碼跨膜域；組件4編碼協同刺激域(但亦可存在編碼由用於交換之限制位點側接之第二或更多個協同刺激域的組件4')；且組件5編碼信號傳導域。在特定實施例中，組件1編碼CD19 scFv；組件2編碼IgG1鉸鏈及/或跨膜域；組件3編碼CD28；且組件4編碼CD3 ζ 。

【0061】 熟習此項技術者在設計載體方面認識到，各種順反子及組件必須經組態使得其在必要時保持在框架中。

【0062】 在圖1A或圖1B之特定實施例中，順反子1編碼自殺基因；順反子2編碼CAR；順反子3編碼報導基因；順反子4編碼細胞介素；順反子

2之組件1編碼scFv；順反子2之組件2編碼IgG1鉸鏈；順反子2之組件3編碼CD28；且組件4編碼CD3 ζ 。在替代性實施例中，無順反子編碼抗原受體。

【0063】 限制酶位點可為任何種類且在其識別位點中可包括任何數目之基座(base)，諸如在4個與8個基座之間；識別位點中之基座數目可為至少4個、5個、6個、7個、8個或更多個。切割時位點可產生鈍切口或黏性末端。限制酶可屬於例如I型、II型、III型或IV型。限制酶位點可獲自可用資料庫，諸如整合關係酶資料庫(Integrated relational Enzyme database，IntEnz)或BRENDA (全面酶資訊系統(The Comprehensive Enzyme Information System))。

【0064】 例示性載體描繪於圖2及圖3中。在圖2中，載體DNA為環狀且依據慣例，位置1 (環頂部12點鐘位置處，其中序列之其餘部分在順時針方向上)設定在5' LTR開始處。

【0065】 在其中利用自行裂解2A肽之實施例中，2A肽可為在真核細胞中轉譯期間介導多肽之「裂解」的長為18-22個胺基酸(aa)之病毒寡肽。名稱「2A」係指病毒基因組之特定區域且不同病毒2A一般以其衍生自之病毒命名。第一個發現之2A為F2A (口蹄疫病毒)，其後亦鑑別出E2A (馬鼻炎A病毒)、P2A (豬鐵士古病毒-1 2A (porcine teschovirus-1 2A))及T2A (明脈扁刺蛾病毒2A (thosea asigna virus 2A))。發現2A-介導之「自行裂解」之機制為核糖體跳過2A之C端處的甘胺鹽基-脯胺鹽基肽鍵之形成。高度保守序列GDVEXNPGP (SEQ ID NO: 5)由不同2A在C端共用，且適用於產生位阻及核糖體跳躍。成功跳過及再開始轉譯產生兩種「裂解」蛋白質。2A序列之實例如下：

T2A : (GSG) E G R G S L L T C G D V E E N P G P (SEQ ID NO:

1)

P2A : (GSG) A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P (SEQ ID

NO: 2)

E2A : (GSG) Q C T N Y A L L K L A G D V E S N P G P (SEQ ID

NO: 3)

F2A : (GSG) V K Q T L N F D L L K L A G D V E S N P G P (SEQ

ID NO: 4)

A.產生方法

【0066】 熟習此項技術者將充分配備以經由用於表現本發明之抗原受體之標準重組技術構築載體(參見例如Sambrook等人，2001及Ausubel等人，1996，兩者均以引用的方式併入本文中)。

1.調節元件

【0067】 包括於適用於本發明之載體中的表現卡匣尤其含有(以5'至3'方向)可操作地連接於蛋白質編碼序列之真核轉錄啟動子、包括介入序列之剪接信號及轉錄終止/聚腺苷酸化序列。控制在真核細胞中編碼基因之蛋白質之轉錄的啟動子及強化子可由多個基因元件構成。細胞機構能夠聚集及整合由各元件輸送之調節資訊，從而允許不同基因演進出不同的、常常複合的轉錄調節模式。舉例而言，在本發明之上下文中所使用之啟動子包括組成性、誘導性及組織特異性啟動子。在其中載體用於產生癌症療法之情況下，啟動子可在低氧之條件下有效。

a.啟動子/強化子

【0068】 本文所提供之表現構築體包含驅動抗原受體及其他順反子

基因產物之表現的啟動子。啟動子一般包含用於定位RNA合成之起始位點之序列。此之最佳已知實例為TATA盒，但在不具有TATA盒之一些啟動子(諸如哺乳動物末端去氧核苷酸轉移酶基因之啟動子及SV40晚期基因之啟動子)中，上覆於起始位點本身之離散元件有助於固定起始之位置。額外啟動子元件調節轉錄起始頻率。通常，此等位於起始位點上游之區域中，但已展示多個啟動子亦含有起始位點下游之功能元件。為「在啟動子控制下」引入編碼序列，將轉錄閱讀框架之轉錄起始位點之5'端置於所選擇的啟動子之「下游」(亦即之3')。「上游」啟動子刺激DNA之轉錄且促進經編碼RNA之表現。

【0069】 啟動子元件之間的間距通常為靈活的，使得當元件倒置或相對於彼此移動時保留啟動子功能。在tk啟動子中，例如啟動子元件之間的間距可在活性開始下降之前增加至相隔50 bp。視啟動子而定，似乎個別元件可合作地或獨立地起作用以活化轉錄。啟動子可或可不與「強化子」(其係指涉及核酸序列之轉錄活化的順式作用調節序列)結合使用。

【0070】 啟動子可為天然地與核酸序列相關之一種啟動子，如可藉由分離位於編碼區段及/或外顯子上游之5'非編碼序列獲得。此類啟動子可稱為「內源」的。類似地，強化子可為天然地與核酸序列相關，位於彼序列下游或上游之一種強化子。或者，某些優勢將藉由將編碼核酸區段置於重組或異源啟動子(其係指在其天然環境中通常不與核酸序列相關之啟動子)控制下來獲得。重組或異源強化子亦指在其天然環境中通常不與核酸序列相關之強化子。此類啟動子或強化子可包括其他基因之啟動子或強化子，及自任何其他病毒或原核或真核細胞分離之啟動子或強化子，及不「天然存在」之啟動子或強化子，亦即含有不同轉錄調節區之不同元件，

及/或改變表現之突變。舉例而言，最常用於重組DNA構築之啟動子包括 β -內鹼胺酶(青黴素酶)、乳糖及色胺酸(trp-)啟動子系統。除合成地產生啟動子及強化子之核酸序列以外，可結合本文所揭示之組合物使用重組選殖及/或核酸擴增技術(包括PCR™)產生序列。此外，預期亦可採用引導非核細胞器(諸如粒線體、葉綠體及其類似物)內之序列之轉錄及/或表現之控制序列。

【0071】 自然地，使用有效主導DNA區段在選擇用於表現之細胞器、細胞型態、組織、器官或生物體中之表現的啟動子及/或強化子很重要。熟習分子生物學技術者一般已知使用啟動子、強化子及細胞型態組合來進行蛋白質表現(參見例如Sambrook等人1989，其以引用的方式併入本文中)。所用啟動子可為組成性、組織特異性、誘導性及/或適用於在適當條件下主導所引入之DNA區段的高度表現，諸如有利於大規模產生重組蛋白質及/或肽。啟動子可為異源或內源性。

【0072】 另外，任何啟動子/強化子組合(按照例如真核啟動子資料庫(Eukaryotic Promoter Data Base) EPDB，經由全球資訊網epd.isb-sib.ch/)亦可用於驅動表現。另一可能實施例為使用T3、T7或SP6細胞質表現系統。若提供適當細菌聚合酶，則真核細胞可支持自某些細菌啟動子之細胞質轉錄，作為遞送複合物之一部分或作為額外基因表現構築體。

【0073】 啟動子之非限制性實例包括早期或晚期病毒啟動子，諸如SV40早期或晚期啟動子、細胞巨大病毒(CMV)即刻早期啟動子、勞斯肉瘤病毒(Rous Sarcoma Virus，RSV)早期啟動子；真核細胞啟動子，諸如 β 肌動蛋白啟動子、GADPH啟動子、金屬硫蛋白啟動子；及串聯反應元件啟動子，諸如環狀AMP反應元件啟動子(cre)、血清反應元件啟動子

(sre)、佛波醇酯(phorbol)啟動子(TPA)及靠近最小TATA盒之反應元件啟動子(tre)。亦有可能使用人類生長激素啟動子序列(例如GenBank®, 寄存編號X05244, 核苷酸283-341處所描述之人類生長激素最小啟動子)或小鼠乳房腫瘤啟動子(可購自ATCC, 目錄號ATCC 45007)。在某些實施例中, 啟動子為CMV IE、C型凝集素-1 (dectin-1)、C型凝集素-2、人類CD11c、F4/80、SM22、RSV、SV40、Ad MLP、 β -肌動蛋白、MHC I類或MHC II類啟動子, 然而適用於驅動治療性基因表現之任何其他啟動子均可適用於實施本發明。

【0074】 在某些態樣中, 本發明之方法亦關於強化子序列, 亦即, 提高啟動子活性且具有順式作用潛力之核酸序列, 且即使在相當長距離(遠離目標啟動子多達幾千個鹼基)下也不受方向影響。然而, 強化子功能不一定受限於此類長距離, 因為其等在非常接近特定啟動子下仍有功能。

b. 起始信號及連接表現

【0075】 特定起始信號亦可用於本發明中所提供之表現構築體中以便有效轉譯編碼序列。此等信號包括ATG起始密碼子或相鄰序列。可能需要提供包括ATG起始密碼子之外源性轉譯控制信號。一般熟習此項技術者將容易地能夠判定此且提供必需信號。熟知起始密碼子必須在所編碼序列之閱讀框架「框內」, 以確保整個插入物之轉譯。外源性轉譯控制信號及起始密碼子可為天然或合成的。表現效率可藉由包括適當轉錄強化子元件來增強。

【0076】 在某些實施例中, 使用內部核糖體入口位點(IRES)元件之用途產生多基因或多順反子訊息。IRES元件能夠繞過5'甲基化封端依賴性轉譯之核糖體掃描模型且在固有位點開始轉譯。已描述來自小核糖核酸病

毒家族(脊髓灰質炎及腦心肌炎)之兩個成員的IRES元件以及來自哺乳動物訊息之IRES。IRES元件可連接至異源開放閱讀框架。多個開放閱讀框架可轉錄在一起，各自藉由IRES分離，產生多順反子訊息。藉助於IRES元件，各開放閱讀框架可接近核糖體以便有效轉譯。多個基因可使用單一啟動子/強化子以轉錄單一訊息來有效表現。

【0077】如本文中其他地方所詳述，某些2A序列元件可用於在本發明中所提供之構築體中產生基因之連接表現或共表現。舉例而言，裂解序列可用於藉由連接開放閱讀框架以形成單一順反子來共表現基因。例示性裂解序列為馬鼻炎A病毒(E2A)或F2A (口蹄疫病毒2A)或「2A樣」序列(例如明脈扁刺蛾病毒2A；T2A)或豬鐵士古病毒-1 (P2A)。在特定實施例中，在單一載體中，多個2A序列不一致，但在替代實施例中，相同載體利用相同2A序列中之兩者或更多者。2A序列之實例提供於US 2011/0065779中，其以全文引用之方式併入本文中。

c.複製起點

為了在宿主細胞中傳播載體，其可含有一或多個複製位點起點(常常稱為「ori」)，例如，對應於如上文所描述之EBV之oriP，或在程式化中具有類似或較高功能的經基因工程改造之oriP的核酸序列，其為複製起始之特定核酸序列。或者，可採用如上文所述之其他超染色體複製病毒或自主複製序列(ARS)之複製起點。

d.選擇及可篩選標記物

【0078】在一些實施例中，含有本發明之構築體之細胞可藉由在表現載體中包括標記物活體外或活體內鑑別。此類標記物將賦予細胞可鑑別之變化，允許容易地鑑別含有表現載體之細胞。一般而言，選擇標記物為

賦予允許選擇之特性的一種標記物。陽性選擇標記物為其中標記物之存在允許其選擇之一種標記物，而陰性選擇標記物為其中其存在阻止其選擇之一種標記物。陽性選擇標記物之實例為抗藥性標記物。

【0079】通常，包括藥物選擇標記物有助於選殖及鑑別轉化子，例如賦予新黴素、嘌呤黴素、潮黴素、DHFR、GPT、吉歐黴素及組胺醇抗性之基因為適用選擇標記物。除了賦予允許基於條件之實施區分轉化子之表型的標記物之外，亦涵蓋其他類型之標記物，包括基於比色分析之可篩選標記物，諸如GFP。或者，可利用可篩選酶作為陰性選擇標記物，諸如單純疱疹病毒胸苷激酶(*tk*)或氯黴素乙醯基轉移酶(CAT)。熟習此項技術者亦將知道如何使用免疫標記物，可能結合FACS分析。所用標記物不被認為是重要的，只要其能夠與編碼基因產物之核酸同時表現即可。選擇及可篩選標記物之其他實例為熟習此項技術者所熟知的。

B.經基因工程改造之抗原受體

【0080】載體可編碼一或多種抗原受體，諸如經工程改造之TCR、CAR、誘餌受體、細胞介素受體、嵌合細胞介素受體等。諸如對於不同抗原的多種CAR及/或TCR可與本發明載體系統一起使用。單一載體可編碼兩個分開的CAR分子，或單一載體可編碼一或多個CAR分子，其中至少一個對兩種非一致抗原具有特異性，諸如雙特異性CAR、雙特異性TCR或雙特異性CAR/TCR。由本發明之載體編碼之抗原受體、載體本身及攜帶載體之細胞由人工產生且不存在於自然界中。

【0081】在一些實施例中，CAR包含特異性結合於抗原之細胞外抗原識別域。CAR可經特定設計以靶向特定組織或細胞類型之抗原。在一些實施例中，抗原為在細胞表面上表現之蛋白質。在一些實施例中，CAR係

TCR樣CAR且抗原係經加工之肽抗原，諸如細胞內蛋白質之肽抗原，其類似TCR，在主要組織相容複合體(MHC)分子之情形下在細胞表面上識別。

【0082】 例示性抗原受體，包括CAR及重組TCR，以及用於工程改造受體及將其引入細胞中之方法，包括例如以下中所述者：國際專利申請公開案第WO200014257號、第WO2013126726號、第WO2012/129514號、第WO2014031687號、第WO2013/166321號、第WO2013/071154號、第WO2013/123061美國專利申請公開案第US2002131960號、第US2013287748號、第US20130149337號，美國專利第6,451,995號、第7,446,190號、第8,252,592號、第8,339,645號、第8,398,282號、第7,446,179號、第6,410,319號、第7,070,995號、第7,265,209號、第7,354,762號、第7,446,191號、第8,324,353號及第8,479,118號，及歐洲專利申請案第EP2537416號，及/或由Sadelain等人，2013；Davila等人，2013；Turtle等人，2012；Wu等人，2012所述者。在一些態樣中，經基因工程改造之抗原受體包括如美國專利第7,446,190號所描述之CAR，及國際專利申請公開案第WO/2014055668 A1號中所描述之彼等。

1.嵌合抗原受體

【0083】 在一些實施例中，CAR由載體編碼且包含至少：a)細胞內信號傳導域、b)跨膜域及c)包含至少一個抗原結合區之細胞外域。

【0084】 在一些實施例中，經工程改造之抗原受體包括CAR，其包括活化或刺激CAR、協同刺激CAR（參見WO2014/055668）及/或抑制CAR(iCAR，參見Fedorov等人，2013)。CAR一般包括連接至一或多個細胞內信號傳導組件之細胞外抗原(或配位體)結合域，在一些態樣中經由

一或多個連接子及/或一或多個跨膜域。此類分子通常模仿或接近經由天然抗原受體之信號、經由此類受體與協同刺激受體組合之信號及/或單獨經由協同刺激受體之信號。**CAR**可為第一代、第二代或第三代或後續世代。

【0085】 本發明之某些實施例係關於核酸之用途，包括編碼抗原特異性**CAR**多肽之核酸，包括已經人類化以降低免疫原性之**CAR** (**hCAR**)，包含具有一或多個信號傳導基序之細胞內信號傳導域、跨膜域及細胞外域。在某些實施例中，**CAR**可識別包含一或多個抗原之間的共用空間之抗原決定基。在某些實施例中，結合區可包含單株抗體之互補決定區、單株抗體之可變區及/或其抗原結合片段。在另一實施例中，該特異性來源於結合至受體之肽(例如細胞介素)。

【0086】 預期人類**CAR**核酸可衍生自用於增強人類患者之細胞免疫療法之人類基因。在特定實施例中，本發明包括由載體編碼之全長**CAR** cDNA或編碼區。抗原結合區或域可包含衍生自特定人類單株抗體之單鏈可變片段(scFv)之V_H及V_L鏈之片段，諸如以引用的方式併入本文中之美國專利7,109,304中所描述之彼等。片段亦可為人類抗原特異性抗體之任何數目之不同抗原結合域。在更特定實施例中，片段為由序列編碼之抗原特異性scFv，該序列針對用於在人類細胞中表現之人類密碼子使用最佳化。

【0087】 配置可為多聚的，諸如雙功能抗體或多聚體。多聚體最可能藉由將輕鏈及重鏈之可變部分交叉配對成雙功能抗體來形成。構築體之鉸鏈部分可具有自完全缺失至維持第一半胱胺酸、至取代脯胺酸而非絲胺酸、至截斷至第一半胱胺酸之多個替代物。**Fc**部分可或可不缺失。穩定及

/或二聚化之任何蛋白質均可供用於此目的。可僅使用Fc域中之一者，例如來自人類免疫球蛋白之CH2或CH3域。亦可使用已經修飾以改良二聚化之人類免疫球蛋白之鉸鏈、CH2及CH3區。亦可僅使用免疫球蛋白之鉸鏈部分。亦可使用CD8 α 之部分。

【0088】 在一些實施例中，CAR核酸包含編碼其他協同刺激受體(諸如跨膜域)及一或多個細胞內信號傳導域(諸如CD28細胞內信號傳導域)之序列。其他協同刺激受體包括但不限於CD28、CD27、OX-40(CD134)、DAP10、DAP12及4-1BB(CD137)中之一或多者。除由CD3 ζ 起始之初級信號以外，由插入於人類CAR中之人類協同刺激受體提供之額外信號可用於NK細胞之完全活化且可有助於提高過繼免疫療法之活體內持久性及治療成效。

【0089】 在一些實施例中，CAR經構築具有針對特定抗原(或標記物或配位體)之特異性，該特定抗原諸如在待由過繼療法靶向之特定細胞類型中表現之抗原，例如癌症標記物，及/或意欲誘導抑制反應之抗原，諸如在正常或非病變細胞類型上表現之抗原。因此，CAR在其細胞外部分中通常包括一或多個抗原結合分子，諸如一或多個抗原結合片段、域或部分，或一或多個抗體可變域及/或抗體分子。在一些實施例中，CAR包括抗原結合部分或抗體分子部分，諸如衍生自單株抗體(mAb)之可變重(VH)及可變輕(VL)鏈的單鏈抗體片段(scFv)。

【0090】 在嵌合抗原受體之某些實施例中，受體之抗原特異性部分(其可稱為包含抗原結合區之細胞外域)包含腫瘤相關抗原結合域或病原體特異性抗原結合域。抗原包括藉由模式識別受體，諸如C型凝集素-1識別之碳水化合物抗原。腫瘤相關抗原可為任何種類，只要其表現於腫瘤細胞

之細胞表面上即可。腫瘤相關抗原之例示性實施例包括CD19、CD20、癌胚抗原、 α 胎蛋白、CA-125、MUC-1、CD56、EGFR、c-Met、AKT、Her2、Her3、上皮腫瘤抗原、黑素瘤相關抗原、突變p53、突變ras等。在某些實施例中，當存在少量腫瘤相關抗原時，CAR可與細胞介素共表現以提高持久性。舉例而言，CAR可與IL-2、IL-21、IL-12、IL-18或IL-15共表現。

【0091】 編碼嵌合受體之開放閱讀框架之序列可獲自基因體DNA來源、cDNA來源，或可合成(例如經由PCR)，或其組合。視基因體DNA之尺寸及內含子之數目而定，可能需要使用cDNA或其組合，因為發現內含子使mRNA穩定。另外，使用內源性或外源性非編碼區以使mRNA穩定可進一步有利。

【0092】 預期嵌合構築體可以裸DNA形式或在適合載體中引入免疫細胞中。藉由電穿孔使用裸DNA穩定轉染細胞之方法為此項技術中已知的。參見例如美國專利第6,410,319號。裸DNA一般係指編碼嵌合受體之DNA，該嵌合受體以對於表現適當之定向含於表現載體中。本發明之多順反子模組化載體可為病毒載體或可不為病毒載體，諸如質體。儘管對於說明性實施例，本文詳述之載體為反轉錄病毒載體，但在其他情況下，載體亦為病毒載體，但替代地為例如腺病毒載體、腺相關病毒載體或豆狀病毒載體。

【0093】 可使用任何載體將嵌合構築體引入免疫細胞中。根據本發明方法使用之適合載體可在免疫細胞中非複製。已知大量載體係基於病毒，其中維持在細胞中之病毒的複本數足夠低以維持細胞活力，諸如基於HIV、SV40、EBV、HSV或BPV之載體。在特定情況下，載體係基於莫

洛尼鼠類白血病毒。

【0094】 在一些態樣中，抗原特異性結合或識別組件連接至一或多個跨膜及細胞內信號傳導域。在一些實施例中，CAR包括融合至CAR之細胞外域之跨膜域。在一個實施例中，使用與CAR中之域中之一者天然相關之跨膜域。在一些情況下，跨膜域經選擇或由胺基酸取代修飾以避免此類域結合至相同或不同表面膜蛋白質之跨膜域，以使與受體複合物之其他成員的相互作用降至最低。

【0095】 在一些實施例中，跨膜域來源於天然或合成來源。在來源為天然的情況下，在一些態樣中，域來源於任何膜結合或跨膜蛋白。跨膜區包括來源於以下(亦即至少包含以下之一或多個跨膜區)之彼等：T細胞受體之 α 、 β 或 ζ 鏈、CD28、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD 16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD 134、CD137、CD154、ICOS/CD278、GITR/CD357、NKG2D及DAP分子。或者，在一些實施例中，跨膜域為合成的。在一些態樣中，合成跨膜域主要包含疏水性殘基，諸如白胺酸及纈胺酸。在一些態樣中，將在合成跨膜域之各端發現苯丙胺酸、色胺酸及纈胺酸之三聯體。

【0096】 在某些實施例中，本文所揭示之基因修飾免疫細胞(諸如T、NK、iNKT、B或MSC細胞)之平台技術包含(i)使用電穿孔裝置之非病毒基因轉移(例如核轉染)，(ii)經由胞內域(endodomain)信號傳導之CAR(例如CD28/CD3- ζ 、CD137/CD3- ζ 或其他組合)，(iii)具有將抗原識別域連接至細胞表面之可變長度之細胞外域之CAR，及在一些情況下，(iv)衍生自K562之人工抗原呈現細胞(aAPC)能夠穩固地及數值上擴增

CAR⁺免疫細胞(Singh等人，2008；Singh等人，2011)。

2.T細胞受體(TCR)

【0097】 在一些實施例中，經基因工程改造之抗原受體包括重組TCR及/或選殖自天然產生之T細胞之TCR。「T細胞受體」或「TCR」係指含有可變 α 及 β 鏈(亦分別稱為TCR α 及TCR β)或可變 γ 及 δ 鏈(亦分別稱為TCR γ 及TCR δ)且能夠特異性結合於與MHC受體結合之抗原肽的分子。在一些實施例中，TCR呈 $\alpha\beta$ 形式。

【0098】 通常，呈 $\alpha\beta$ 及 $\gamma\delta$ 形式存在之TCR一般結構上類似，但表現其之T細胞可具有不同解剖學部位或功能。TCR可發現於細胞表面上或呈可溶形式。一般而言，TCR發現於一般負責識別結合於主要組織相容複合體(MHC)分子之抗原之T細胞(或T淋巴細胞)的表面上。在一些實施例中，TCR亦可含有恆定域、跨膜域及/或短胞質尾區(參見例如Janeway等人，1997)。舉例而言，在一些態樣中，TCR之各鏈可具有一個N端免疫球蛋白可變域、一個免疫球蛋白恆定域、跨膜區及C末端處之短胞質尾區。在一些實施例中，TCR與涉及介導信號轉導之CD3複合物之不變蛋白質相關。除非另外說明，否則術語「TCR」應理解為涵蓋其功能TCR片段。術語亦涵蓋完整或全長TCR，包括呈 $\alpha\beta$ 形式或 $\gamma\delta$ 形式之TCR。

【0099】 因此，出於本文之目的，TCR之指代包括任何TCR或功能片段，諸如結合於在MHC分子中結合之特定抗原肽，亦即MHC-肽複合物之TCR的抗原結合部分。可互換使用之TCR之「抗原結合部分」或「抗原結合片段」係指含有TCR之域之部分，但結合完全TCR所結合之抗原(例如MHC-肽複合物)的分子。在一些情況下，抗原結合部分含有TCR之可變域，諸如TCR之可變 α 鏈及可變 β 鏈，足以形成用於結合於特定MHC-肽複

合物之結合位點，諸如一般其中各鏈含有三個互補決定區。

【0100】 在一些實施例中，TCR鏈之可變域結合以形成環，或類似於免疫球蛋白之互補決定區(CDR)，其藉由形成TCR分子之結合位點賦予抗原識別且確定肽特異性且確定肽特異性。通常，如免疫球蛋白，CDR由框架區(FR)分離(參見例如Jores等人 1990；Chothia等人，1988；Lefranc等人，2003)。在一些實施例中，CDR3係負責識別經加工抗原之主要CDR，儘管 α 鏈之CDR1亦已展示與抗原肽之N端部分相互作用，同時 β 鏈之CDR1與肽之C端部分相互作用。認為CDR2識別MHC分子。在一些實施例中， β 鏈之可變區可含有另一高變(HV4)區。

【0101】 在一些實施例中，TCR鏈包含恆定域。舉例而言，如免疫球蛋白，TCR鏈之細胞外部分(例如 α 鏈、 β 鏈)可含有兩個免疫球蛋白域，在N端之可變域(例如V_a或V_p；通常為基於Kabat編號之胺基酸1至116，Kabat等人，「免疫學相關之蛋白質序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)」，美國衛生及公共服務部(US Dept. Health and Human Services)，國立衛生研究院公共衛生處(Public Health Service National Institutes of Health)，1991，第5版)，及鄰近細胞膜之一個恆定域(例如， α 鏈恆定域或C_a，通常為基於Kabat之胺基酸117至259、 β 鏈恆定域或C_p，通常為基於Kabat之胺基酸117至295)。舉例而言，在一些情況下，藉由兩個鏈形成之TCR之細胞外部分含有兩個近膜恆定域及兩個含有CDR之遠膜可變域。TCR域之恆定域含有短連接序列，其中半胱胺酸殘基形成二硫鍵，在兩個鏈之間產生連接。在一些實施例中，TCR在 α 及 β 鏈中之每一者中可具有額外半胱胺酸殘基，使得TCR在恆定域中含有兩個二硫鍵。

【0102】 在一些實施例中，TCR鏈可包含跨膜域。在一些實施例中，跨膜域帶正電。在一些情況下，TCR鏈含有胞質尾區。在一些情況下，結構允許TCR與如CD3之其他分子結合。舉例而言，含有具有跨膜區之恆定域之TCR可將蛋白質錨定於細胞膜中且與CD3信號傳導設備或複合物之不變次單元結合。

【0103】 一般而言，CD3係可具有哺乳動物中之三個不同鏈(γ 、 δ 及 ϵ)及 ζ 鏈之多蛋白質複合物。舉例而言，在哺乳動物中，複合物可含有CD3 γ 鏈、CD3 δ 鏈、兩個CD3 ϵ 鏈及CD3 ζ 鏈之均二聚體。CD3 γ 、CD3 δ 及CD3 ϵ 鏈係含有單一免疫球蛋白域之免疫球蛋白超家族之高度相關細胞表面蛋白質。CD3 γ 、CD3 δ 及CD3 ϵ 鏈之跨膜區帶負電，其為允許此等鏈與帶正電T細胞受體鏈結合之特徵。CD3 γ 、CD3 δ 及CD3 ϵ 鏈之細胞內尾區各自含有稱為基於免疫受體酪胺酸之活化基序或ITAM之單一保守基序，而各CD3 ζ 鏈具有三個。一般而言，ITAM涉及TCR複合物之信號傳導能力。此等輔助分子具有帶負電跨膜區且在將信號自TCR傳播至細胞中起作用。CD3鏈及 ζ 鏈與TCR一起形成被稱為T細胞受體複合物之物體。

【0104】 在一些實施例中，TCR可為兩個鏈 α 及 β (或視情況 γ 及 δ)之雜二聚體或其可為單鏈TCR構築體。在一些實施例中，TCR係含有諸如藉由一或多個二硫鍵連接之兩個分開的鏈(α 及 β 鏈或 γ 及 δ 鏈)之雜二聚體。在一些實施例中，鑑別且將目標抗原(例如癌症抗原)之TCR引入細胞中。在一些實施例中，編碼TCR之核酸可獲自多種來源，諸如藉由公開可用之TCR DNA序列之聚合酶鏈反應(PCR)擴增。在一些實施例中，TCR係獲自生物來源，諸如獲自細胞，諸如獲自T細胞(例如，細胞毒性T細胞)、T細胞融合瘤或其他公開可用的來源。在一些實施例中，T細胞可獲自活體

內分離之細胞。在一些實施例中，可自患者分離高親和力T細胞純系，且分離TCR。在一些實施例中，T細胞可為經培養之T細胞融合瘤或純系。在一些實施例中，目標抗原之TCR純系已在用人類免疫系統基因(例如人類白細胞抗原系統或HLA)工程改造之轉基因小鼠中產生。參見例如腫瘤抗原(參見例如Parkhurst等人，2009及Cohen等人，2005)。在一些實施例中，噬菌體呈現用於針對目標抗原分離TCR (參見例如Varela-Rohena等人，2008及Li等人，2005)。在一些實施例中，TCR或其抗原結合部分可由TCR之序列之知識合成產生。

C.細胞介素之共表現

【0105】 一或多種細胞介素可自載體共表現為與抗原受體分開之多肽。舉例而言，介白素-15 (IL-15)為組織限制性的，且僅在病理性條件下觀測到其血清中或全身性的任何含量。IL-15具有過繼療法所要之若干屬性。IL-15為誘導自然殺手細胞之發展及細胞增殖、經由緩解腫瘤駐留細胞之功能性抑制來促進已建立腫瘤之根除及抑制AICD的恆穩細胞介素。

【0106】 在一些實施例中，本發明係關於CAR及/或TCR載體與IL-15之共同利用。除IL-15之外，預想其他細胞介素。此等包括但不限於促進用於人類應用之細胞之活化及增殖的細胞介素、趨化因子及其他分子。表現IL-15之NK或T細胞能夠繼續支持細胞介素信號傳導，其對其在輸注後之存活至關重要。

【0107】 在基因修飾之後，可立即輸注細胞或可儲存細胞。在某些態樣中，在基因修飾之後，細胞可在基因轉移至細胞中後約1、2、3、4、5天或更多天內以散裝群體形式離體傳播數天、數週或數月。在另一態樣中，選殖轉染物且純系證明存在單一整合或游離維持之表現卡匣或質

體，及嵌合受體之表現離體已經擴增。經選擇用於擴增之純系證明特異性識別及溶解表現CD19之目標細胞的能力。重組免疫細胞可藉由用IL-2或結合共同 γ 鏈之其他細胞介素(例如，IL-7、IL-12、IL-15、IL-21及其他)刺激來擴增。重組免疫細胞可藉由用人工抗原呈現細胞刺激來擴增。在另一態樣中，經基因修飾之細胞可冷凍保存。

D. 抗原

【0108】 在由經基因工程改造之抗原受體靶向之抗原中的為在待經由過繼細胞療法靶向之疾病、病狀或細胞類型之情形下表現的彼等抗原。在疾病及病狀中的為增生性、贅生性及惡性疾病及病症，包括癌症及腫瘤，包括血液癌、免疫系統癌症，諸如淋巴瘤、白血病及/或骨髓瘤，諸如B、T及骨髓白血病、淋巴瘤及多發性骨髓瘤以及自體免疫或同種免疫病狀。在一些實施例中，相比於正常或非靶向細胞或組織，抗原選擇性地表現或過度表現於疾病或病狀之細胞，例如腫瘤或病原性細胞上。在其他實施例中，抗原表現於正常細胞上及/或表現於經工程改造之細胞上。在一些情況下，抗原與免疫相關病症相關。

【0109】 任何適合之抗原可用於本發明方法中。例示性抗原包括但不限於來自感染物之抗原分子、自體/自身抗原、腫瘤/癌症相關抗原及腫瘤新抗原(Linnemann等人，2015)。在特定態樣中，抗原包括NY-ESO、EGFRvIII、Muc-1、Her2、CA-125、WT-1、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A10、TRAIL/DR4及CEA。在特定態樣中，兩種或更多種抗原受體之抗原包括但不限於CD19、EBNA、WT1、CD123、NY-ESO、EGFRvIII、MUC1、HER2、CA-125、WT1、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A10、TRAIL/DR4及/或CEA。此等抗原之序列在此項技術中已

知，例如 CD19（寄存編號 NG_007275.1）、EBNA（寄存編號 NG_002392.2）、WT1（寄存編號 NG_009272.1）、CD123（寄存編號 NC_000023.11）、NY-ESO（寄存編號 NC_000023.11）、EGFRvIII（寄存編號 NG_007726.3）、MUC1（寄存編號 NG_029383.1）、HER2（寄存編號 NG_007503.1）、CA-125（寄存編號 NG_055257.1）、WT1（寄存編號 NG_009272.1）、Mage-A3（寄存編號 NG_013244.1）、Mage-A4（寄存編號 NG_013245.1）、Mage-A10（寄存編號 NC_000023.11）、TRAIL/DR4（寄存編號 NC_000003.12）及/或CEA（寄存編號 NC_000019.10）。

【0110】 腫瘤相關抗原可衍生自前列腺癌、乳癌、結腸直腸癌、肺癌、胰臟癌、腎癌、間皮瘤、卵巢癌或黑素瘤。例示性腫瘤相關抗原或腫瘤細胞衍生抗原包括MAGE 1、3及MAGE 4（或其他MAGE抗原，諸如國際專利公開案第WO99/40188號中所揭示之彼等MAGE抗原）；PRAME；BAGE；RAGE，Lage（亦稱為NY ESO 1）；SAGE；及HAGE或GAGE。腫瘤抗原之此等非限制性實例表現於廣泛範圍之腫瘤類型，諸如黑素瘤、肺癌、肉瘤及膀胱癌中。參見例如美國專利第6,544,518號。前列腺癌腫瘤相關抗原包括例如前列腺特異性膜抗原(PSMA)、前列腺特異性抗原(PSA)、前列腺酸磷酸鹽、NKX3.1及前列腺之六跨膜上皮抗原(STEAP)。

【0111】 其他腫瘤相關抗原包括Plu-1、HASH-1、HasH-2、Cripto及Criptin。另外，腫瘤抗原可為自身肽激素，諸如全長促性腺激素釋放激素(GnRH)，一種適用於治療許多癌症之長度為10個胺基酸的短肽。

【0112】 腫瘤抗原包括衍生自特徵在於腫瘤相關抗原表現，諸如HER-2/neu表現之癌症的腫瘤抗原。相關腫瘤相關抗原包括譜系特異性腫

瘤抗原，諸如黑素細胞-黑素瘤譜系抗原MART-1/Melan-A、gp100、gp75、mda-7、酪胺酸酶及酪胺酸酶相關蛋白質。說明性腫瘤相關抗原包括但不限於衍生自或包含以下中之任何一或多者之腫瘤抗原：p53、Ras、c-Myc、細胞質絲胺酸/蘇胺酸激酶(例如A-Raf、B-Raf及C-Raf、細胞週期素依賴性激酶)、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A10、MAGE-A12、MART-1、BAGE、DAM-6、-10、GAGE-1、-2、-8、GAGE-3、-4、-5、-6、-7B、NA88-A、MART-1、MC1R、Gp100、PSA、PSM、酪胺酸酶、TRP-1、TRP-2、ART-4、CAMEL、CEA、Cyp-B、hTERT、hTRT、iCE、MUC1、MUC2、磷酸肌醇3-激酶(PI3K)、TRK受體、PRAME、P15、RU1、RU2、SART-1、SART-3、威耳姆士腫瘤抗原(Wilms' tumor antigen；WT1)、AFP、-連環蛋白/m、凋亡蛋白酶-8/m、CEA、CDK-4/m、ELF2M、GnT-V、G250、HSP70-2M、HST-2、KIAA0205、MUM-1、MUM-2、MUM-3、肌凝蛋白/m、RAGE、SART-2、TRP-2/INT2、707-AP、磷脂結合蛋白II、CDC27/m、TPI/m bcr-abl、BCR-ABL、干擾素調節因子4 (IRF4)、ETV6/AML、LDLR/FUT、Pml/RAR、腫瘤相關鈣信號轉導蛋白1 (TACSTD1) TACSTD2、受體酪胺酸激酶(例如表皮成長因子受體(EGFR) (特定言之，EGFRvIII)、血小板衍生生長因子受體(PDGFR)、血管內皮生長因子受體(VEGFR)、細胞質酪胺酸激酶(例如src-家族、syk-ZAP70家族)、整合素連接激酶(ILK)、轉錄STAT3之信號轉導蛋白及活化因子、STATS及STATE、低氧誘導因子(例如HIF-1及HIF-2)、核因子- κ B(NF-B)、Notch受體(例如Notch1-4)、c-Met、雷帕黴素之哺乳動物目標(mTOR)、WNT、細胞外信號調節激酶(ERK)及其調節

次單位、PMSA、PR-3、MDM2、間皮素、腎細胞癌-5T4、Sm22- α 、碳酸酐酶I (CAI)及IX (CAIX) (亦稱為G250)、STEAD、TEL/AML1、GD2、蛋白酶3、hTERT、肉瘤移位斷點、EphA2、ML-IAP、EpCAM、ERG (TMPRSS2 ETS融合基因)、NA17、PAX3、ALK、雄激素受體、細胞週期素B1、聚唾液酸、MYCN、RhoC、GD3、岩藻糖基GM1、間皮素(mesothelium)、PSCA、sLe、PLAC1、GM3、BORIS、Tn、GLobH、NY-BR-1、RGsS、SART3、STn、PAX5、OY-TES1、精子蛋白17、LCK、HMWMAA、AKAP-4、SSX2、XAGE 1、B7H3、豆莢蛋白、TIE2、Page4、MAD-CT-1、FAP、MAD-CT-2、fos相關抗原1、CBX2、CLDN6、SPANX、TPTE、ACTL8、ANKRD30A、CDKN2A、MAD2L1、CTAG1B、SUNC1、LRRN1及個體基因型。

【0113】 抗原可包括抗原決定基區或抗原決定基肽，其衍生自腫瘤細胞中突變之基因或衍生自相比於正常細胞在腫瘤細胞中以不同層級轉錄之基因，諸如端粒酶、存活素、間皮素、突變ras、bcr/abl重排、Her2/neu、突變或野生型p53、細胞色素P450 1B1，及異常表現之內含子序列，諸如N-乙醯胺基葡萄糖轉移酶-V；在骨髓瘤及B細胞淋巴瘤中產生獨特個體基因型之免疫球蛋白基因之純系重排；包括衍生自癌病毒過程之抗原決定基區或抗原決定基肽之腫瘤抗原，諸如人類乳頭狀瘤病毒蛋白E6及E7；艾巴二氏病毒蛋白(Epstein bar virus protein) LMP2；具有腫瘤選擇性表現之非變異癌胚蛋白，諸如癌胚抗原及 α -胎蛋白。

【0114】 在其他實施例中，抗原獲自或衍生自病原性微生物或機會性病原性微生物(在本文中亦稱作傳染病微生物)，諸如病毒、真菌、寄生蟲及細菌。在某些實施例中，衍生自此類微生物之抗原包括全長蛋白質。

【0115】其抗原預期用於本文所述之方法的說明性病原性生物體包括人類免疫不全病毒(HIV)、單純疱疹病毒(HSV)、呼吸道融合病毒(RSV)、巨細胞病毒(CMV)、埃-巴二氏病毒(EBV)、A型、B型及C型流感、水泡性口炎病毒(VSV)、水泡性口炎病毒(VSV)、多瘤病毒(例如BK病毒及JC病毒)、腺病毒、包括抗甲氧西林金黃色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ; MRSA)之葡萄球菌屬(*Staphylococcus species*)及包括肺炎鏈球菌(*Streptococcus pneumoniae*)之鏈球菌屬(*Streptococcus species*)。如熟習此項技術者將理解，衍生自此等及其他病原性微生物、用作如本文所描述之抗原的蛋白質及編碼蛋白質之核苷酸序列可在公開案及公開資料庫，諸如GENBANK®、SWISS-PROT®及TREMBL®中鑑別。

【0116】衍生自人類免疫不全病毒(HIV)之抗原包括以下中之任一者：HIV病毒粒子結構蛋白(例如gp120、gp41、p17、p24)、蛋白酶、逆轉錄酶或由tat、rev、nef、vif、vpr及vpu編碼之HIV蛋白。

【0117】衍生自單純疱疹病毒(例如HSV 1及HSV2)之抗原包括但不限於表現自HSV晚期基因之蛋白質。晚期基因組主要編碼形成病毒粒子之蛋白質。此類蛋白質包括形成病毒衣殼之來自(UL)之五種蛋白質：UL6、UL18、UL35、UL38及主要衣殼蛋白UL19、UL45及UL27，其中每一者可用作如本文所述之抗原。預期用作本文中之抗原的其他說明性HSV蛋白包括ICP27 (H1、H2)、醣蛋白B (gB)及醣蛋白D (gD)蛋白。HSV基因組包含至少74個基因，各自編碼可潛在地用作抗原之蛋白質。

【0118】衍生自巨細胞病毒(CMV)之抗原包括CMV結構蛋白、在病毒複製之即刻早期及早期期間表現之病毒抗原、醣蛋白I及III、衣殼蛋

白、鞘蛋白、低基質蛋白pp65 (ppUL83)、p52 (ppUL44)、IE1及1E2 (UL123及UL122)、來自UL128-UL150基因集群之蛋白質產物(Rykman等人，2006)、包膜醣蛋白B (gB)、gH、gN及pp150。如熟習此項技術者將理解，用作本文所述之抗原的CMV蛋白質可在公開資料庫，諸如GENBANK®、SWISS-PROT®及TREMBL®中鑑別(參見例如Bennekov等人，2004；Loewendorf等人，2010；Marschall等人，2009)。

【0119】 預期用於某些實施例之衍生自艾巴二氏病毒(EBV)之抗原包括EBV溶解蛋白gp350及gp110、在潛伏週期感染期間產生之EBV蛋白，包括艾巴二氏核抗原(EBNA)-1、EBNA-2、EBNA-3A、EBNA-3B、EBNA-3C、EBNA-前導蛋白(EBNA-LP)及潛伏膜蛋白(LMP)-1、LMP-2A及LMP-2B(參見例如Lockey等人，2008)。

【0120】 預期用於本文中之衍生自呼吸道融合病毒(RSV)之抗原包括由RSV基因組編碼之十一種蛋白質，或其抗原性片段中之任一者：NS1、NS2、N (核衣殼蛋白)、M (基質蛋白)SH、G及F (病毒鞘蛋白)、M2 (第二基質蛋白)、M2-1 (延長因子)、M2-2 (轉錄調節)、RNA聚合酶及磷蛋白P。

【0121】 預期使用之衍生自水泡性口炎病毒(VSV)之抗原包括由VSV基因組編碼之五種主要蛋白，及其抗原性片段中之任一者：大蛋白(L)、醣蛋白(G)、核蛋白(N)、磷蛋白(P)及基質蛋白(M) (參見例如Rieder等人，1999)。

【0122】 預期用於某些實施例之衍生自流感病毒之抗原包括血球凝集素(HA)、神經胺糖酸苷酶(NA)、核蛋白(NP)、基質蛋白M1及M2、NS1、NS2 (NEP)、PA、PB1、PB1-F2及PB2。

【0123】 例示性病毒抗原亦包括但不限於腺病毒多肽、 α 病毒多肽、杯狀病毒多肽(例如杯狀病毒衣殼抗原)、冠狀病毒多肽、犬瘟熱病毒多肽、伊波拉病毒多肽、腸病毒多肽、黃病毒多肽、肝炎病毒(AE)多肽(B型肝炎核或表面抗原、C型肝炎病毒E1或E2醣蛋白、核或非結構蛋白)、疱疹病毒多肽(包括單純疱疹病毒或水痘帶狀胞狀病毒醣蛋白)、感染性腹膜炎病毒多肽、白血病毒多肽、馬堡病毒(Marburg virus)多肽、正黏液病毒多肽、乳頭瘤病毒多肽、副流感病毒多肽(例如血球凝集素及神經胺糖酸苷酶多肽)、副黏病毒多肽、小病毒多肽、瘟病毒多肽、病毒科病毒多肽(例如脊髓灰白質炎病毒衣殼多肽)、痘病毒多肽(例如痘瘡病毒多肽)、狂犬病病毒多肽(例如狂犬病病毒醣蛋白G)、里奧病毒(reovirus)多肽、反轉錄病毒多肽及輪狀病毒多肽。

【0124】 在某些實施例中，抗原可為細菌抗原。在某些實施例中，相關細菌抗原可為分泌多肽。在其他某些實施例中，細菌抗原包括具有暴露於細菌之外細胞表面上之多肽之一或多個部分的抗原。

【0125】 預期使用之衍生自包括抗甲氧西林金黃色葡萄球菌(MRSA)之葡萄球菌屬之抗原包括毒性調節子，諸如Agr系統、Sar及Sae、Arl系統、Sar同系物(Rot、MgrA、SarS、SarR、SarT、SarU、SarV、SarX、SarZ及TcaR)、Srr系統及TRAP。可充當抗原之其他葡萄球菌蛋白質包括Clp蛋白質、HtrA、MsrR、烏頭酸酶、CcpA、SvrA、Msa、CfvA及CfvB(參見例如*Staphylococcus: Molecular Genetics*, 2008 Caister Academic Press, Jodi Lindsay編)。金黃色葡萄球菌之兩個物種(N315及Mu50)之基因組已定序且公開可用，例如在PATRIC (PATRIC: The VBI PathoSystems Resource Integration Center, Snyder等人，

2007)。如熟習此項技術者將理解，用作抗原之葡萄球菌蛋白質亦可在其他公開資料庫，諸如GenBank®、Swiss-Prot®及TrEMBL®中鑑別。

【0126】 預期用於本文所述之某些實施例的衍生自肺炎鏈球菌之抗原包括肺炎鏈球菌溶血素、PspA、膽鹼-結合蛋白A (CbpA)、NanA、NanB、SpnHL、PavA、LytA、Pht及菌毛蛋白(RrgA；RrgB；RrgC)。肺炎鏈球菌之抗原性蛋白質亦為此項技術中已知的且可在一些實施例中用作抗原(參見例如Zysk等人，2000)。肺炎鏈球菌之毒性菌株之完整基因組序列已定序且如熟習此項技術者應理解，本文中所用之肺炎鏈球菌蛋白質亦可在其他公開資料庫，諸如GENBANK®、SWISS-PROT®及TREMBL®中鑑別。用於根據本發明之抗原的尤其相關之蛋白質包括預測暴露於肺炎球菌(pneumococci)表面之毒性因子及蛋白質(參見例如Frolet等人，2010)。

【0127】 可用作抗原之細菌抗原之實例包括但不限於放線菌(*Actinomyces*)多肽、芽孢桿菌(*Bacillus*)多肽、擬桿菌(*Bacteroides*)多肽、鮑特氏菌(*Bordetella*)多肽、巴爾通體(*Bartonella*)多肽、疏螺旋體(*Borrelia*)多肽(例如伯氏疏螺旋體(*B. burgdorferi*) OspA)、布氏桿菌(*Brucella*)多肽、曲狀桿菌(*Campylobacter*)多肽、二氧化碳嗜纖維菌(*Capnocytophaga*)多肽、披衣菌(*Chlamydia*)多肽、棒狀桿菌(*Corynebacterium*)多肽、考克斯氏體(*Coxiella*)多肽、潛蚤(*Dermatophilus*)多肽、腸球菌(*Enterococcus*)多肽、艾利希體(*Ehrlichia*)多肽、艾氏菌(*Escherichia*)多肽、弗朗西斯氏菌(*Francisella*)多肽、梭桿菌(*Fusobacterium*)多肽、血巴爾通氏體(*Haemobartonella*)多肽、嗜血桿菌(*Haemophilus*)多肽(例如流感嗜血桿菌b型外膜蛋白質)、螺旋桿菌

(*Helicobacter*)多肽、克雷伯氏菌(*Klebsiella*)多肽、L-形式細菌多肽、鉤端螺旋體(*Leptospira*)多肽、李斯特菌(*Listeria*)多肽、分枝桿菌(*Mycobacteria*)多肽、黴漿菌(*Mycoplasma*)多肽、奈瑟氏菌(*Neisseria*)多肽、新立克次體(*Neorickettsia*)多肽、諾卡菌(*Nocardia*)多肽、巴氏桿菌(*Pasteurella*)多肽、消化球菌(*Peptococcus*)多肽、消化鏈球菌(*Peptostreptococcus*)多肽、肺炎球菌(*Pneumococcus*)多肽(亦即肺炎鏈球菌(*S. pneumoniae*)多肽)(參見本文描述)、變形桿菌(*Proteus*)多肽、假單胞菌(*Pseudomonas*)多肽、立克次體(*Rickettsia*)多肽、羅克利馬體(*Rochalimaea*)多肽、沙門氏菌(*Salmonella*)多肽、志賀桿菌(*Shigella*)多肽、葡萄球菌(*Staphylococcus*)多肽、A組鏈球菌(*Streptococcus*)多肽(例如化膿性鏈球菌(*S. pyogenes*) M蛋白)、B組鏈球菌(無乳鏈球菌(*S. agalactiae*))多肽、密螺旋體(*Treponema*)多肽及耶爾森菌(*Yersinia*)多肽(例如鼠疫耶爾森菌(*Y. pestis*)F1及V抗原)。

【0128】 真菌抗原之實例包括但不限於犁頭黴(*Absidia*)多肽、枝頂孢(*Acremonium*)多肽、交鏈孢(*Alternaria*)多肽、麴菌(*Aspergillus*)多肽、蛙糞黴菌(*Basidiobolus*)多肽、平臍蠕孢(*Bipolaris*)多肽、芽生菌(*Blastomyces*)多肽、念珠菌(*Candida*)多肽、粗球菌(*Coccidioides*)多肽、耳黴(*Conidiobolus*)多肽、隱球菌(*Cryptococcus*)多肽、彎孢黴(*Curvalaria*)多肽、表皮癬菌(*Epidermophyton*)多肽、外瓶黴(*Exophiala*)多肽、地絲菌(*Geotrichum*)多肽、組織漿菌(*Histoplasma*)多肽、馬杜拉分支菌(*Madurella*)多肽、馬拉色菌(*Malassezia*)多肽、小芽孢菌(*Microsporum*)多肽、小叢梗孢(*Moniliella*)多肽、被孢黴(*Mortierella*)多肽、白黴菌(*Mucor*)多肽、擬青黴菌(*Paecilomyces*)多肽、青黴菌

(*Penicillium*)多肽、單胞瓶黴(*Phialemonium*)多肽、瓶黴(*Phialophora*)多肽、原壁菌(*Prototheca*)多肽、假埃希氏菌(*Pseudallescheria*)多肽、假小托菌(*Pseudomicrodochium*)多肽、腐黴菌(*Pythium*)多肽、鼻孢子蟲(*Rhinosporidium*)多肽、根黴菌(*Rhizopus*)多肽、線狀擔子菌(*Scolecobasidium*)多肽、孢子絲菌(*Sporothrix*)多肽、匍柄黴(*Stemphylium*)多肽、發癬菌(*Trichophyton*)多肽、毛芽胞菌(*Trichosporon*)多肽及木絲黴(*Xylohypha*)多肽。

【0129】原蟲寄生蟲抗原之實例包括但不限於巴倍蟲(*Babesia*)多肽、腸袋蟲(*Balantidium*)多肽、貝諾孢子蟲(*Besnoitia*)多肽、隱孢子蟲(*Cryptosporidium*)多肽、艾美球蟲(*Eimeria*)多肽、腦胞內原蟲(*Encephalitozoon*)多肽、內阿米巴(*Entamoeba*)多肽、梨形鞭毛蟲(*Giardia*)多肽、哈蒙德蟲(*Hammondia*)多肽、肝簇蟲(*Hepatozoon*)多肽、等孢子球蟲(*Isospora*)多肽、利什曼原蟲(*Leishmania*)多肽、微孢子蟲(*Microsporidia*)多肽、新孢子蟲(*Neospora*)多肽、小孢子蟲(*Nosema*)多肽、五鞭毛蟲(*Pentatrichomonas*)多肽、瘧原蟲(*Plasmodium*)多肽。蠕蟲寄生蟲抗原之實例包括但不限於棘唇(*Acanthocheilonema*)多肽、貓圓線蟲(*Aelurostrongylus*)多肽、鉤蟲(*Ancylostoma*)多肽、血管圓線蟲(*Angiostrongylus*)多肽、蛔蟲(*Ascaris*)多肽、布魯線蟲(*Brugia*)多肽、仰口線蟲(*Bunostomum*)多肽、毛細線蟲(*Capillaria*)多肽、夏氏線蟲(*Chabertia*)多肽、古柏線蟲(*Cooperia*)多肽、環體線蟲(*Crenosoma*)多肽、網尾線蟲(*Dictyocaulus*)多肽、膨結線蟲(*Dioctophyme*)多肽、雙板線蟲(*Dipetalonema*)多肽、裂頭條蟲(*Diphyllbothrium*)多肽、複孔條蟲(*Diplydium*)多肽、絲蟲(*Dirofilaria*)多肽、龍線(*Dracunculus*)多肽、蟯

蟲 (*Enterobius*) 多肽、類絲蟲 (*Filaroides*) 多肽、撚轉血茅線蟲 (*Haemonchus*) 多肽、兔唇蛔 (*Lagochilascaris*) 多肽、羅阿線蟲 (*Loa*) 多肽、曼森線蟲 (*Mansonella*) 多肽、繆勒線蟲 (*Muellerius*) 多肽、侏形吸蟲 (*Nanophyetus*) 多肽、鉤蟲 (*Necator*) 多肽、細頸線蟲 (*Nematodirus*) 多肽、結節線蟲 (*Oesophagostomum*) 多肽、盤尾絲蟲 (*Onchocerca*) 多肽、後睪吸蟲 (*Opisthorchis*) 多肽、奧斯特線蟲 (*Ostertagia*) 多肽、副絲蟲 (*Parafilaria*) 多肽、並殖吸蟲 (*Paragonimus*) 多肽、副蛔蟲 (*Parascaris*) 多肽、泡翼線蟲 (*Physaloptera*) 多肽、原圓線蟲 (*Protostrongylus*) 多肽、狗尾草 (*Setaria*) 多肽、旋尾線蟲 (*Spirocerca*) 多肽、迭宮絛蟲 (*Spirometra*) 多肽、冠絲蟲 (*Stephanofilaria*) 多肽、類圓線蟲 (*Strongyloides*) 多肽、圓蟲 (*Strongylus*) 多肽、吸吮線蟲 (*Thelazia*) 多肽、蛔線蟲 (*Toxascaris*) 多肽、弓蛔蟲 (*Toxocara*) 多肽、旋毛蟲 (*Trichinella*) 多肽、毛樣圓蟲 (*Trichostrongylus*) 多肽、鞭蟲 (*Trichuris*) 多肽、鉤蟲 (*Uncinaria*) 多肽及吳策線蟲 (*Wuchereria*) 多肽。(例如惡性瘧原蟲 (*P. falciparum*) 環子孢子 (PfCSP))、子孢子表面蛋白 2 (PfSSP2)、肝狀態抗原 1 之羧基末端 (PfLSA1 c-term) 及輸出蛋白 1 (PfExp-1)、肺囊蟲 (*Pneumocystis*) 多肽、肉孢子蟲 (*Sarcocystis*) 多肽、住血吸蟲 (*Schistosoma*) 多肽、泰累爾犁漿蟲 (*Theileria*) 多肽、弓蟲 (*Toxoplasma*) 多肽及錐蟲 (*Trypanosoma*) 多肽。

【0130】 外部寄生蟲抗原之實例包括但不限於來自以下之多肽(包括抗原以及過敏原)：跳蚤；蜱，包括硬蜱及軟蜱；蒼蠅，諸如蠓、蚊子、白蛉、黑蠅、馬蠅、角蠅、鹿蠅、舌蠅、廢螫蠅、引起蠅蛆病之蒼蠅及庫蠓；螞蟥；蜘蛛、虱；蟎；以及蝨，諸如床虱及接吻蟲。

E. 自殺基因

【0131】 本發明之已經修飾以攜帶本發明所涵蓋之載體的細胞可包含一或多種自殺基因。如本文所用，術語「自殺基因」定義為在投與前藥或其他試劑時實現基因產物向殺滅其宿主細胞之化合物之轉變的基因。可使用之自殺基因/前藥組合之實例為單純疱疹病毒-胸苷激酶(HSV-tk)及更昔洛韋(ganciclovir)、阿昔洛韋(acyclovir)或FIAU；氧化還原酶及環己醯亞胺；胞嘧啶脫胺酶及5-氟胞嘧啶；胸苷激酶胸苷酸激酶(Tdk::Tmk)及AZT；及去氧胞苷激酶及胞嘧啶阿拉伯糖苷。

【0132】 可使用大腸桿菌(*E. coli*)嘌呤核苷磷酸化酶，所謂的自殺基因，其將前藥6-甲基嘌呤去氧核糖苷轉化為有毒嘌呤6-甲基嘌呤。與前藥療法一起使用之自殺基因之其他實例為大腸桿菌胞嘧啶脫胺酶基因及HSV胸苷激酶基因。

【0133】 例示性自殺基因包括CD20、CD52、EGFRv3或誘導性凋亡蛋白酶9。在一個實施例中，EGFR變異體III (EGFRv3)之截短型式可用作可藉由西妥昔單抗(Cetuximab)切除之自殺抗原。可用於本發明中之此項技術中已知之其他自殺基因包括：嘌呤核苷磷酸化酶(PNP)、細胞色素p450酶(CYP)、羧肽酶(CP)、羧酸酯酶(CE)、硝基還原酶(NTR)、鳥嘌呤核糖基轉移酶(XGRTP)、糖苷酶、甲硫胺酸- α,γ -解離酶(MET)及胸苷磷酸化酶(TP)。在特定實施例中，利用突變體TNF- α 自殺基因，其編碼在細胞膜上表現，允許其由抑制劑靶向之不可分泌TNF α 蛋白質，諸如抗體，如描述於2018年11月19日申請之美國臨時專利申請案62/769,405，及2018年11月30日申請之美國臨時專利申請案62/773,372，及2019年1月11日申請之美國臨時專利申請案62/791,464中，其所有皆以全文引用之方式併入本文中。

III.免疫細胞

【0134】 本發明之某些實施例涉及表現一或多種抗原受體，諸如嵌合抗原受體(CAR)及/或T細胞受體(TCR)之免疫細胞。免疫細胞可為任何種類，諸如T細胞(例如調節T細胞、CD4+ T細胞、CD8+ T細胞或 γ - δ T細胞)、NK細胞、不變NK細胞、NKT細胞、B細胞、幹細胞(例如間葉幹細胞(MSC)或誘導多能幹(iPSC)細胞)。在一些實施例中，細胞為單核球或粒細胞，例如骨髓細胞、巨噬細胞、嗜中性白血球、樹突狀細胞、肥大細胞、嗜伊紅血球及/或嗜鹼性球。本文亦提供產生及工程改造免疫細胞之方法以及使用及投與細胞(諸如用於過繼細胞療法)之方法，在此情況下細胞相對於接受者可為自體或同種異體的。因此，免疫細胞可用作免疫療法，諸如以靶向癌細胞。

【0135】 免疫細胞可自個體，特定言之人類個體，包括需要療法之個體分離。免疫細胞可獲自相關個體，諸如疑似罹患特定疾病或病狀之個體、疑似易患特定疾病或病狀之個體、或正針對特定疾病或病狀接受治療的個體。免疫細胞可從其存在於個體中之任何位置收集，包括但不限於血液、臍帶血、脾、胸腺、淋巴結及骨髓。經分離之免疫細胞可直接使用，或其可儲存一段時間，諸如藉由冷凍。

【0136】 免疫細胞可從其存在之任何組織富集/純化，包括但不限於血液(包括由血庫或臍帶血庫收集之血液)、脾、骨髓、在手術程序期間移除及/或暴露之組織及經由活檢程序獲得之組織。富集、分離及/或純化免疫細胞之組織/器官可分離自活個體及非活個體，其中非活個體為器官供體。在特定實施例中，免疫細胞分離自血液，諸如末梢血液或臍帶血。在一些態樣中，免疫細胞分離自具有增強之免疫調節能力(諸如藉由CD4陽

性或CD8陽性T細胞抑制性來量測)之臍帶血。在特定態樣中，免疫細胞分離自混合血液，特定言之混合臍帶血，以增強免疫調節能力。混合血液可來自2個或更多個來源，諸如3、4、5、6、7、8、9、10個或更多個來源(例如，供體個體)。

【0137】 免疫細胞群體可獲自需要療法或罹患與降低之免疫細胞活性相關之疾病的個體。因此，細胞可為該需要療法之個體之自體細胞。或者，免疫細胞群體可獲自供體，較佳為組織相容性匹配供體。免疫細胞群體可收穫自末梢血液、臍帶血、骨髓、脾、或該個體或供體中有免疫細胞存在之任何其他器官/組織。免疫細胞可分離自一群個體及/或供體，諸如來自混合臍帶血。

【0138】 當免疫細胞群體獲自不同於個體之供體時，供體較佳為同種異體，其限制條件為獲得之細胞為個體相容性，使其等可引入至個體中。同種異體供體細胞可為或可不為人類白血球抗原(HLA)相容性。為了與個體相容，可處理同種異體細胞，以降低免疫原性(Fast等人，2004)。

IV.治療方法

【0139】 在一些實施例中，本發明提供用於療法，包括免疫療法之方法，其包含投與有效量之本發明所涵蓋之免疫細胞，該等免疫細胞經工程改造以表現本文所提供之模組化載體系統。在一些實施例中，醫學疾病或病症藉由在接受個體中轉移引發免疫反應的免疫細胞群體來治療。在本發明之某些實施例中，癌症或感染藉由轉移引發免疫反應的免疫細胞群體來治療。本文提供用於治療個體之癌症或延緩其進展之方法，其包含向個體投與有效量之抗原特異性細胞療法(對一或多種抗原具有特異性)。本發明方法可應用於治療免疫病症、實體癌症、血液癌症及病毒感染。

【0140】 在需要療法之個體患有癌症之情況下，癌症可為血液癌症或可包含實體腫瘤，本發明治療方法適用之腫瘤包括任何惡性細胞類型，諸如在實體腫瘤或血液惡性病中發現之彼等腫瘤。例示性實體腫瘤可包括但不限於選自由以下組成之群的器官或組織之腫瘤：胰臟、結腸、盲腸、胃、腦、頭、頸、卵巢、腎臟、喉、肉瘤、肺、膀胱、黑素瘤、前列腺、皮膚、甲狀腺、膽囊、脾、肝、骨、子宮內膜、睪丸、子宮頸、食道、前列腺及乳房。例示性血液腫瘤包括骨髓腫瘤、T細胞或B細胞惡性腫瘤、白血病、淋巴瘤、母細胞瘤、骨髓瘤及其類似物。可使用本文所提供之方法治療之癌症之另外實例包括但不限於肺癌(包括小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌及肺鱗狀癌)、腹膜癌、胃癌(gastric/stomach cancer)(包括胃腸癌及胃腸基質癌)、胰腺癌、子宮頸癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜癌或子宮癌、唾液腺癌、腎癌(kidney/renal cancer)、前列腺癌、外陰癌、甲狀腺癌、各種類型之頭頸癌及黑素瘤。

【0141】 癌症可特定為以下組織學類型，儘管其不限於此等：惡性贅瘤；癌瘤；未分化癌瘤；巨細胞及梭狀細胞癌；小細胞癌；乳頭狀癌；鱗狀細胞癌；淋巴上皮癌；基底細胞癌；毛母質癌；移行細胞癌；乳頭狀移行細胞癌；腺癌；惡性胃泌素瘤；膽管癌；肝細胞癌；組合之肝細胞癌及膽管癌；小梁腺癌；腺樣囊性癌症；腺瘤息肉中之腺癌；家族性結腸息肉腺癌；實體癌瘤；惡性類癌；細支氣管肺泡腺癌；乳頭狀腺癌；嫌色細胞癌；嗜酸性癌；嗜氧性腺癌；嗜鹼性癌瘤；透明細胞腺癌；粒狀細胞癌；濾泡腺癌；乳頭狀及濾泡腺癌；無包膜硬化性癌瘤；腎上腺皮質癌；子宮內膜樣癌；皮膚附屬器癌；頂泌腺癌；皮脂腺癌；耵聍腺癌；黏液表

皮樣癌瘤；囊腺癌；乳頭狀囊腺癌；乳頭狀漿液性囊腺癌；黏液性囊腺癌；黏液性腺癌；戒環細胞癌；浸潤性導管癌；髓樣癌；小葉癌；炎性癌；乳房佩吉特氏病(paget's disease, mammary)；腺泡細胞癌；腺鱗癌；腺癌伴鱗狀化生；惡性胸腺瘤；惡性卵巢基質腫瘤；惡性泡膜細胞瘤；惡性粒層細胞瘤；惡性睪丸母細胞瘤；塞特利細胞癌(sertoli cell carcinoma)；惡性雷迪格細胞瘤(leydig cell tumor, malignant)；惡性脂質細胞瘤；惡性副神經節瘤；惡性乳房外副神經節瘤；嗜鉻細胞瘤；血管球肉瘤；惡性黑素瘤；無黑色素性黑素瘤；淺表擴散性黑素瘤；雀斑惡性黑素瘤；肢端雀斑狀黑素瘤；結節性黑素瘤；巨大色素痣內惡性黑素瘤；上皮狀細胞黑素瘤；惡性藍痣；肉瘤；纖維肉瘤；惡性纖維性組織細胞瘤；黏液肉瘤；脂肉瘤；平滑肌肉瘤；橫紋肌肉瘤；胚胎性橫紋肌肉瘤；肺泡橫紋肌肉瘤；基質肉瘤；惡性混合瘤；苗勒混合瘤(mullerian mixed tumor)；腎母細胞瘤；肝母細胞瘤；癌肉瘤；惡性間質瘤；惡性布倫納瘤(brenner tumor, malignant)；惡性葉狀腫瘤；滑膜肉瘤；惡性間皮瘤；無性細胞瘤；胚胎性癌；惡性畸胎瘤；惡性卵巢甲狀腺瘤；絨毛膜癌；惡性中腎瘤；血管肉瘤；惡性血管內皮瘤；卡波西氏肉瘤(kaposi's sarcoma)；惡性血管外皮瘤；淋巴管肉瘤；骨肉瘤；皮質旁骨肉瘤；軟骨肉瘤；惡性軟骨母細胞瘤；間葉軟骨肉瘤；骨巨細胞瘤；尤文氏肉瘤(ewing's sarcoma)；惡性牙源性腫瘤；成釉細胞牙肉瘤；惡性成釉細胞瘤；成釉細胞纖維肉瘤；惡性松果體瘤；脊索瘤；惡性神經膠質瘤；室管膜瘤；星形細胞瘤；原生質星形細胞瘤；纖維型星形細胞瘤；星形母細胞瘤；神經膠母細胞瘤；少突神經膠質瘤；成少突神經膠質細胞瘤；原始神經外胚層；小腦肉瘤；成神經節細胞瘤；成神經細胞瘤；視網膜母細胞

瘤；嗅覺神經性腫瘤；惡性腦膜瘤；神經纖維肉瘤；惡性神經鞘瘤；惡性粒狀細胞瘤；惡性淋巴瘤；霍奇金氏病(hodgkin's disease)；霍奇金氏；類肉芽腫；小淋巴細胞性惡性淋巴瘤；大細胞彌漫性惡性淋巴瘤；濾泡性惡性淋巴瘤；蕁樣黴菌病；其他指定非霍奇金氏淋巴瘤；B細胞淋巴瘤；低級/濾泡性非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)；小淋巴細胞性(SL) NHL；中級/濾泡性NHL；中級彌漫性NHL；高級免疫母細胞性NHL；高級淋巴母細胞性NHL；高級小非裂解細胞NHL；腫塊疾病NHL；套細胞淋巴瘤；AIDS相關淋巴瘤；瓦爾登斯特倫氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)；惡性組織細胞增多病；多發性骨髓瘤；肥大細胞肉瘤；免疫增殖性小腸疾病；白血病；淋巴白血病；漿細胞白血病；紅白血病；淋巴肉瘤細胞白血病；骨髓白血病；嗜鹼性白血病；嗜伊紅血球白血病；單核球性白血病；肥大細胞白血病；巨核母細胞白血病；骨髓肉瘤；毛細胞白血病；慢性淋巴細胞性白血病(CLL)；急性淋巴母細胞白血病(ALL)；急性骨髓性白血病(AML)；及慢性骨髓母細胞白血病。

【0142】 特定實施例係關於白血病之治療方法。白血病為血液癌症或骨髓癌症且特徵在於血球(通常白血球(white blood cell/leukocyte))之異常增殖(倍增產生)。其為稱為血液贅瘤之廣泛群組之疾病的一部分。白血病為廣義術語，涵蓋一系列疾病。白血病在臨床上及病理上分成其急性及慢性形式。

【0143】 在本發明之某些實施例中，免疫細胞遞送至有需要之個體，諸如患有癌症或感染之個體。隨後，細胞增強個體之免疫系統以攻擊各別癌細胞或病原性細胞。在一些情況下，向個體提供一或多次劑量之免疫細胞。在向個體提供兩次或更多次劑量之免疫細胞的情況下，投藥之間

的持續時間應足以允許在個體中傳播之時間，且在特定實施例中，劑量之間的持續時間為1、2、3、4、5、6、7天或更多天。

【0144】 本發明之某些實施例提供治療或預防免疫調節病症之方法。在一個實施例中，個體患有自體免疫疾病。自體免疫疾病之非限制性實例包括：斑禿、僵直性脊椎炎、抗磷脂症候群、自體免疫性艾迪森氏病(autoimmune Addison's disease)、腎上腺之自體免疫疾病、自體免疫性溶血性貧血、自體免疫性肝炎、自體免疫性卵巢炎及睪丸炎、自體免疫性血小板減少症、白塞氏病(Behcet's disease)、大皰性類天庖瘡、心肌病、口炎性腹瀉-皮炎(celiac spate-dermatitis)、慢性疲勞免疫功能障礙症候群(CFIDS)、慢性發炎性脫髓鞘性多發性神經病、徹奇-斯全司症候群(Churg-Strauss syndrome)、癍痕性類天庖瘡、CREST症候群、冷凝集素病、克隆氏病(Crohn's disease)、盤狀狼瘡、自發性混合型冷凝球蛋白血症、纖維肌痛-纖維肌炎、絲球體腎炎、格雷夫氏病(Graves' disease)、格林-巴利(Guillain-Barre)、橋本氏甲狀腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、特發性肺部纖維化、特發性血小板減少性紫癍(ITP)、IgA神經病變、幼年期關節炎、扁平苔癬、紅斑狼瘡(lupus erthematosus)、梅尼爾氏病(Meniere's disease)、混合性結締組織病、多發性硬化症、1型或免疫介導糖尿病、重症肌無力、腎病症候群(諸如微小病變疾病、局灶性腎小球硬化或膜性腎病)、尋常天庖瘡、惡性貧血、結節性多動脈炎、多軟骨炎、多腺症候群、風濕性多肌痛、多發性肌炎及皮肌炎、原發性無 γ 球蛋白血症、原發性膽汁性肝硬化、牛皮癬、牛皮癬性關節炎、雷諾氏現象(Raynaud's phenomenon)、萊特氏症候群(Reiter's syndrome)、類風濕性關節炎、類肉瘤病、硬皮病、休格連氏症候群(Sjogren's syndrome)、僵

人症候群、全身性紅斑性狼瘡症、紅斑狼瘡(lupus erythematosus)、潰瘍性結腸炎、葡萄膜炎、血管炎(諸如結節性多動脈炎、高安氏動脈炎(takayasu arteritis)、顱動脈炎/巨細胞動脈炎或疱疹樣皮炎血管炎)、白斑病及韋格納氏肉芽腫病(Wegener's granulomatosis)。因此，可使用本文所揭示之方法治療之自體免疫疾病之一些實例包括但不限於多發性硬化症、類風濕性關節炎、全身性紅斑狼瘡、I型糖尿病、克隆氏病；潰瘍性結腸炎、重症肌無力、絲球體腎炎、僵直性脊椎炎、血管炎或牛皮癬。個體亦可患有過敏性病症，諸如哮喘。

【0145】 在另一實施例中，個體為移植器官或幹細胞之接受者且免疫細胞用於預防及/或治療排斥反應。在特定實施例中，個體患有移植物抗宿主疾病或處於發展移植物抗宿主疾病之風險下。**GVHD**為使用或含有來自相關或無關供體之幹細胞之任何移植體的可能併發症。存在兩種類型之**GVHD**，急性及慢性**GVHD**。急性**GVHD**在移植後前三個月內出現。急性**GVHD**之徵象包括手部及足部上之微紅皮疹，其可擴散且變得更嚴重，伴以脫皮或皮膚起泡。急性**GVHD**亦可影響胃及腸，在此情況下存在痙攣、噁心及腹瀉。皮膚及眼睛發黃(黃疸)指示急性**GVHD**已影響肝臟。慢性**GVHD**係基於其嚴重程度分級：階段/級別1為輕度；階段/級別4為嚴重。慢性**GVHD**在移植之後三個月或更晚產生。慢性**GVHD**之症狀與急性**GVHD**之症狀類似，但此外慢性**GVHD**亦可影響眼睛中之黏液腺、口腔中之唾液腺及潤滑胃黏膜及腸之腺體。可利用本文揭示之免疫細胞群體中之任一者。移植器官之實例包括實體器官移植體，諸如腎、肝、皮膚、胰臟、肺及/或心，或細胞移植體，諸如胰島、肝細胞、肌母細胞、骨髓或造血或其他幹細胞。移植體可為複合移植體，諸如面部組織。免疫細胞可

在移植之前、與移植同時或在移植之後投與。在一些實施例中，免疫細胞在移植之前，諸如在移植之前至少1小時、至少12小時、至少1天、至少2天、至少3天、至少4天、至少5天、至少6天、至少1週、至少2週、至少3週、至少4週或至少1個月投與。在一個特定非限制性實例中，治療有效量之免疫細胞之投與在移植之前3至5天發生。

【0146】 在一些實施例中，可在免疫細胞療法之前向個體投與非清髓性淋巴細胞耗盡化學療法。非清髓性淋巴細胞耗盡化學療法可為任何適合之此類療法，其可藉由任何適合之途徑投與。非清髓性淋巴細胞耗盡化學療法可包含例如投與環磷醯胺及氟達拉賓(fludarabine)，尤其若癌症係可為轉移性之黑素瘤時。投與環磷醯胺及氟達拉賓之例示性途徑係靜脈內。同樣地，可投與任何適合劑量之環磷醯胺及氟達拉賓。在特定態樣中，持續兩天投與約60 mg/kg環磷醯胺，其後持續五天投與約25 mg/m² 氟達拉賓。

【0147】 在某些實施例中，與免疫細胞同時或在免疫細胞之後向個體投與促進免疫細胞生長及活化之生長因子。免疫細胞生長因子可為促進免疫細胞生長及活化之任何適合之生長因子。適合之免疫細胞生長因子之實例包括介白素(IL)-2、IL-7、IL-15及IL-12，其可單獨或以各種組合使用，該等組合諸如IL-2及IL-7，IL-2及IL-15，IL-7及IL-15，IL-2、IL-7及IL-15，IL-12及IL-7，IL-12及IL-15，或IL-12及IL2。

【0148】 治療有效量之免疫細胞可藉由多種途徑投與，該等多種途徑包括非經腸投藥，例如靜脈內、腹膜內、肌肉內、胸骨內或關節內注射或輸注。

【0149】 用於過繼細胞療法之免疫細胞之治療有效量為在所治療之

個體中實現所要作用之該量。舉例而言，此可為抑制自體免疫或同種免疫疾病進展，或使其消退必需之免疫細胞之量，或其能夠緩解由自體免疫疾病引起之症狀，諸如疼痛及發炎。其可為緩解與發炎相關之症狀，諸如疼痛、水腫及體溫升高必需之量。其亦可為減輕或預防移植器官之排斥反應必需之量。

【0150】 免疫細胞群體可以符合疾病之治療方案投與，例如經一天至若干天之單一劑量或若干劑量以改善疾病狀態，或經延長時間之週期性劑量以抑制疾病進展及預防疾病復發。待用於調配物中之精確劑量亦將視投藥途徑及疾病或病症之嚴重性而定，且應根據醫師之判斷及各患者之情況來決定。免疫細胞之治療有效量將視所治療之個體、病痛之嚴重程度及類型以及投與方式而定。在一些實施例中，可用於治療人類個體之劑量在以下範圍內：至少 3.8×10^4 ，至少 3.8×10^5 ，至少 3.8×10^6 ，至少 3.8×10^7 ，至少 3.8×10^8 ，至少 3.8×10^9 或至少 3.8×10^{10} 個免疫細胞/ m^2 。在某一實施例中，用於治療人類個體之劑量在約 3.8×10^9 至約 3.8×10^{10} 個免疫細胞/ m^2 範圍內。在額外實施例中，免疫細胞之治療有效量可在每公斤體重約 5×10^6 個細胞至每公斤體重約 7.5×10^8 個細胞之範圍內變化，諸如每公斤體重約 2×10^7 個細胞至約 5×10^8 個細胞，或每公斤體重約 5×10^7 個細胞至約 2×10^8 個細胞。熟習此項技術者基於個體之年齡、重量、性別及生理條件容易地確定免疫細胞之精確量。有效劑量可自來源於活體外或動物模型測試系統之劑量反應曲線外推得到。

【0151】 免疫細胞可與一或多種其他治療劑組合投與以治療免疫調節病症。組合療法可包括但不限於一或多種抗微生物劑(例如抗生素、抗病毒劑及抗真菌劑)、抗腫瘤劑(例如氟尿嘧啶、甲胺喋呤、太平洋紫杉醇

(paclitaxel)、氟達拉賓、依託泊苷(etoposide)、小紅莓(doxorubicin)或長春新鹼(vincristine))、免疫耗乏劑(例如氟達拉賓、依託泊苷、小紅莓或長春新鹼)、免疫抑制劑(例如硫唑嘌呤或糖皮質激素，諸如地塞米松(dexamethasone)或潑尼松(prednisone))、消炎劑(例如糖皮質激素，諸如氫皮質酮、地塞米松或潑尼松，或非類固醇消炎劑，諸如乙醯水楊酸、布洛芬(ibuprofen)或萘普生鈉(naproxen sodium))、細胞介素(例如介白素-10或轉化生長因子- β)、激素(例如雌激素)或疫苗。另外，可投與免疫抑制劑或耐受劑，包括但不限於鈣調神經磷酸酶抑制劑(例如環孢素及他克莫司(tacrolimus))；mTOR抑制劑(例如雷帕黴素(Rapamycin))；黴酚酸嗎啉乙酯，抗體(例如識別CD3、CD4、CD40、CD154、CD45、IVIG或B細胞)；化學治療劑(例如甲胺喋呤、曲奧舒凡(Treosulfan)、白消安(Busulfan))；照射；或趨化因子、介白素或其抑制劑(例如BAFF、IL-2、抗IL-2R、IL-4、JAK激酶抑制劑)。此類額外醫藥試劑可取決於所要作用而在投與免疫細胞之前、期間或之後投與。細胞及試劑之此投與可藉由相同途徑或藉由不同途徑，且在相同位點或在不同位點。

A.醫藥組合物

【0152】 本文亦提供包含免疫細胞(例如，T細胞或NK細胞)及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物及調配物。

【0153】 如本文所述之醫藥組合物及調配物可以凍乾調配物或水性溶液形式藉由混合具有所要純度之活性成分(諸如細胞)與一或多種視情況選用之醫藥學上可接受之載劑(雷明頓氏醫藥科學(Remington's Pharmaceutical Sciences)第22版，2012)來製備。醫藥學上可接受之載劑在採用之劑量及濃度下一般對接受者無毒性，且包括但不限於：緩衝劑，

諸如磷酸酯、檸檬酸酯及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(諸如十八烷基二甲基苯甲基氯化銨；氯化六羥季銨；苯紮氯銨；苄索氯銨；丁基苯酚或苄醇；對羥基苯甲酸烷基酯，諸如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；及間甲酚)；低分子量(小於約10個殘基)多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，諸如聚乙烯吡咯啶酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單醣、雙醣及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，諸如EDTA；糖，諸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；成鹽抗衡離子，諸如鈉；金屬錯合物(例如Zn-蛋白質錯合物)；及/或非離子界面活性劑，諸如聚乙二醇(PEG)。本文中之例示性醫藥學上可接受之載劑進一步包括間質藥物分散劑，諸如可溶性中性活性玻尿酸酶醣蛋白(sHASEGP)，例如人類可溶性PH-20 玻尿酸酶醣蛋白，諸如 rHuPH20 (HYLENEX[®]，Baxter International, Inc.)。某些例示性sHASEGP (包括rHuPH20)及使用方法描述於美國專利公開案第2005/0260186號及第2006/0104968號中。在一個態樣中，sHASEGP與一或多種額外葡萄糖胺聚糖酶(諸如軟骨素酶)組合。

B.組合療法

【0154】 在某些實施例中，本發明實施例之組合物及方法涉及與至少一種額外療法組合之免疫細胞群體。額外療法可為放射療法、手術(例如乳房腫瘤切除術及乳房切除術)、化學療法、基因療法、DNA療法、病毒療法、RNA療法、免疫療法、骨髓移植、奈米療法、單株抗體療法或前述各者之組合。額外療法可呈佐劑或新輔助療法形式。

【0155】 在一些實施例中，額外療法為投與小分子酶抑制劑或抗轉移劑。在一些實施例中，額外療法為投與副作用限制劑(例如意欲減少治療副作用之出現及/或嚴重程度的試劑，諸如抗噁心劑等)。在一些實施例中，額外療法為放射療法。在一些實施例中，額外療法為手術。在一些實施例中，額外療法為放射療法與手術之組合。在一些實施例中，額外療法為γ照射。在一些實施例中，額外療法為靶向PBK/AKT/mTOR路徑之療法、HSP90抑制劑、微管蛋白抑制劑、細胞凋亡抑制劑及/或化學預防劑。額外療法可為此項技術中已知之化學治療劑中之一或多者。

【0156】 免疫細胞療法可在相對於額外癌症療法，諸如免疫檢查點療法之前、期間、之後或以各種組合投與。投藥可以在同時至數分鐘至數天至數週範圍內之時間間隔進行。在其中免疫細胞療法與額外治療劑分開地提供給患者之實施例中，一般將確保在各遞送時間之間不經歷很長時間，使得兩種化合物將仍能夠對患者發揮有利的組合作用。在此類情況下，預期可在距彼此約12小時至24小時或72小時內(且更特定言之，在距彼此約6小時至12小時內)向患者提供抗體療法及抗癌療法。在一些情況下，可能需要顯著地延長治療時間段，其中在各別投藥之間會流逝若干天(2、3、4、5、6或7)至若干週(1、2、3、4、5、6、7或8)。

【0157】 可使用各種組合。在下文實例中，免疫細胞療法為「A」且抗癌療法為「B」：

- A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B
- B/A/B/B
- B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A
- B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

【0158】考慮到試劑之毒性(若存在)，向患者投與本發明實施例之任何化合物或療法將遵循用於投與此類化合物之一般方案。因此，在一些實施例中，存在監測可歸因於組合療法之毒性的步驟。

1.化學療法

【0159】可根據本發明實施例使用廣泛多種化學治療劑。術語「化學療法」係指使用藥物治療癌症。「化學治療劑」用於意味在癌症治療中投與之化合物或組合物。此等試劑或藥物藉由其在細胞內之活性模式分類，例如其是否且在哪一階段影響細胞週期。或者，試劑可基於其直接交聯DNA、插入DNA中或藉由影響核酸合成來誘導染色體及有絲分裂失常之能力表徵。

【0160】化學治療劑之實例包括烷基化劑，諸如噻替派及環磷醯胺；磺酸烷基酯，諸如白消安、英丙舒凡(improsulfan)及哌泊舒凡(piposulfan)；氮丙啶，諸如苯唑多巴(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、米特多巴(meturedopa)及尤利多巴(uredopa)；乙烯亞胺及甲基蜜胺，包括六甲蜜胺、三伸乙基蜜胺、三伸乙基磷醯胺、三伸乙基硫代磷醯胺及三甲密胺；多聚乙醯(尤其布拉他辛(bullatacin)及布拉他辛酮(bullatacinone))；喜樹鹼(camptothecin)（包括合成類似物拓朴替康(topotecan)）；苔蘚抑素；卡利他汀(callystatin)；CC-1065（包括其阿多來新(adozelesin)、卡折來新(carzelesin)及比折來新(bizelesin)合成類似物)；念珠藻環肽(特定言之念珠藻環肽1及念珠藻環肽8)；海兔毒素(dolastatin)；倍癌黴素(duocarmycin)（包括合成類似物KW-2189及CB1-TM1)；軟珊瑚醇(eleutherobin)；水鬼蕉鹼(pancratistatin)；匍枝珊瑚醇(sarcodictyin)；海綿抑制素(spongistatin)；氮芥，諸如苯丁酸氮芥、蔡

氮芥、氯磷醯胺、雌氮芥、異環磷醯胺、二氯甲基二乙胺、氧化二氯甲基二乙胺鹽酸鹽、美法侖、新氮芥、膽甾醇對苯乙酸氮芥(phenesterine)、潑尼氮芥(prednimustine)、曲洛磷胺(trofosfamide)及尿嘧啶氮芥(uracil mustard)；亞硝基脲，諸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)及雷莫司汀(ranimustine)；抗生素，諸如烯二炔抗生素(例如卡奇黴素(calicheamicin)，尤其卡奇黴素 γ II及卡奇黴素 ω II)；達內黴素(dynemicin)，包括達內黴素A；雙膦酸鹽，諸如氯屈膦酸鹽(clodronate)；埃斯培拉黴素(esperamicin)；以及新抑癌蛋白發色團(neocarzinostatin chromophore)及相關色蛋白烯二炔抗生素發色團)、阿克拉黴素(aclacinomycin)、放線菌素(actinomycin)、奧納黴素(authramycin)、偶氮絲胺酸、博來黴素(bleomycin)、放線菌素C、卡柔比星(carubicin)、洋紅黴素(carminomycin)、嗜癌素(carzinophilin)、色黴素(chromomycinis)、更生黴素(dactinomycin)、道諾黴素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮基-5-側氧基-L-正白胺酸、小紅莓(包括N-嗎啉基-小紅莓、氰基-N-嗎啉基-小紅莓、2-吡咯啉基-小紅莓及去氧小紅莓)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、艾達黴素(idarubicin)、麻西羅黴素(marcellomycin)、絲裂黴素(諸如絲裂黴素C)、黴酚酸(mycophenolic acid)、諾加黴素(nogalamycin)、橄欖黴素(olivomycins)、培洛黴素(peplomycin)、潑非黴素(potfiromycin)、嘌呤黴素、奎那黴素(quelamycin)、羅多比星(rodorubicin)、鏈黑菌素、鏈脲菌素、殺結核菌素、烏苯美司(ubenimex)、淨司他丁(zinostatin)及左柔比星(zorubicin)；抗代謝物，諸如甲胺喋呤及5-氟尿嘧啶(5-FU)；葉酸類似

物，諸如迪諾特寧(denopterin)、蝶羅呤(pteropterin)及曲美沙特(trimetrexate)；嘌呤類似物，諸如氟達拉賓、6-巰基嘌呤、硫咪嘌呤(thiamiprine)及硫鳥嘌呤；嘧啶類似物，諸如安西他濱(ancitabine)、阿紮胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷、雙去氧尿苷、去氧氟尿苷、依諾他濱(enocitabine)及氟尿苷；雄激素(androgen)，諸如卡魯甾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、環硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiothane)及甾內酯(testolactone)；抗腎上腺藥，諸如米托坦(mitotane)及曲洛司坦(trilostane)；葉酸補充劑，諸如亞葉酸；乙醯葡醛酯；醛磷醯胺糖苷；胺基乙醯丙酸；恩尿嘧啶(eniluracil)；安吡啶(amsacrine)；貝斯布西(bestrabucil)；比生群(bisantrene)；艾達曲克(edatraxate)；地磷醯胺(defofamine)；秋水仙胺(demecolcine)；地吡醯(diaziquone)；艾福米辛(elformithine)；依利醋鉍(elliptinium acetate)；埃坡黴素(epothilone)；依託格魯(etoglucid)；硝酸鎂；羥脲；磨菇多糖(lentinan)；氯尼達明(lonidainine)；類美登素(maytansinoid)，諸如美登素(maytansine)及安絲菌素(ansamitocins)；丙脒脞；米托蒽醯(mitoxantrone)；莫比達摩(mopidanmol)；二胺硝吡啶；噴司他丁(pentostatin)；苯來美特(phenamet)；吡柔比星(pirarubicin)；洛索蒽醯(losoxantrone)；鬼臼酸；2-乙基醯肼；甲基苄肼；PSK多醣複合物；雷佐生(razoxane)；根黴素(rhizoxin)；西佐喃(sizofuran)；鍺螺胺(spirogermanium)；細交鏈孢菌酮酸(tenuazonic acid)；三亞胺醯(triaziquone)；2,2',2''-三氯三乙胺；單端孢黴烯(trichothecene) (尤其T-2毒素、黏液黴素A (verracurin A)、桿孢菌素A (roridin A)及蛇形菌素(anguidine))；尿烷(urethan)；長春地辛(vindesine)；達卡巴嗪

(dacarbazine)；甘露醇氮芥(mannomustine)；二溴甘露醇；二溴衛矛醇(mitolactol)；哌泊溴烷(pipobroman)；加西托星(gacytosine)；阿拉伯糖苷(「Ara-C」)；環磷醯胺；類紫杉醇(taxoid)，例如太平洋紫杉醇及多烯紫杉醇吉西他濱(docetaxel gemcitabine)；6-硫代鳥嘌呤；巯基嘌呤；鉑配位錯合物，諸如順鉑、奧沙利鉑(oxaliplatin)及卡鉑；長春鹼；鉑；依託泊苷(VP-16)；異環磷醯胺；米托蒽醌(mitoxantrone)；長春新鹼；長春瑞賓(vinorelbine)；米托蒽醌(novantrone)；替尼泊甙(teniposide)；依達曲沙(edatrexate)；柔紅黴素(daunomycin)；胺基喋呤(aminopterin)；截瘤達(xeloda)；伊班膦酸鹽(ibandronate)；伊立替康(irinotecan) (例如CPT-11)；拓撲異構酶抑制劑RFS 2000；二氟甲基鳥胺酸(DMFO)；類視黃素，諸如視黃酸；卡培他濱(capecitabine)；卡鉑、丙卡巴肼(procarbazine)、普爾黴素(plicomycin)、吉西他濱(gemcitabien)、溫諾平(navelbine)、法呢基-蛋白質轉移酶抑制劑(farnesyl-protein transferase inhibitor)、反鉑，及以上任一者之醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物。

2.放射療法

【0161】引起DNA損壞且已廣泛使用之其他因素包括通常稱為 γ 射線、X射線及/或將放射性同位素定向遞送至腫瘤細胞之因素。DNA損壞因素之其他形式亦涵蓋諸如微波、質子束輻射(美國專利5,760,395及4,870,287)及UV照射。最可能的是，所有此等因素對DNA、DNA之前驅體、DNA之複製及修復及染色體之組裝及維持造成大範圍的損壞。X射線之劑量範圍在50至200倫琴之日劑量持續較長時段(3至4週)到2000至6000倫琴之單次劑量範圍內。放射性同位素之劑量範圍變化極大，且視同位素之半衰期、所發射輻射之強度及類型及贅生性細胞之攝取而定。

3.免疫療法

【0162】 熟習此項技術者應瞭解，額外免疫療法可與實施例之方法組合或結合使用。在癌症治療之情形下，免疫治療劑一般依賴於使用免疫效應細胞及分子靶向及除滅癌細胞。利妥昔單抗(Rituximab)(RITUXAN®)係此類實例。免疫效應子可例如為對腫瘤細胞表面上之一些標記物具有特異性之抗體。單獨抗體可充當療法之效應子或其可募集其他細胞以實際上影響細胞殺滅。抗體亦可結合於藥物或毒素(化學治療劑、放射性核種、蓖麻毒素A鏈、霍亂毒素、百日咳毒素等)且充當靶向劑。或者，效應子可為攜帶直接或間接與腫瘤細胞目標相互作用之表面分子的淋巴細胞。各種效應細胞包括細胞毒性T細胞及NK細胞

【0163】 抗體-藥物結合物已作為癌症療法之研發之突破性方法出現。癌症係世界上死亡主要原因中之一者。抗體-藥物結合物(ADC)包含共價連接至細胞殺滅藥物之單株抗體(MAb)。此方法組合MAb針對其抗原目標之高特異性與高度有效之細胞毒性藥物，產生將有效負載物(藥物)遞送至具有富集含量之抗原之腫瘤細胞的「武裝」MAb。藥物之靶向遞送亦使其在正常組織中之暴露降到最低，產生降低之毒性及提高之治療指數。FDA對兩種ADC藥物，2011年之ADCETRIS® (貝倫妥單抗維多汀(brentuximab vedotin))及2013年之KADCYLA® (曲妥珠單抗恩他新(trastuzumab emtansine)或T-DM1)的批准證實方法。當前在癌症治療之臨床試驗之各種階段存在超過30種ADC候選藥物(Leal等人，2014)。隨著抗體工程改造及連接子有效負載最佳化變得愈來愈成熟，新穎ADC之發現及發展愈來愈取決於適合於此方法之新穎目標之鑑別及驗證及靶向MAb之產生。ADC目標之兩個標準係腫瘤細胞中之上調/高水準表現及穩

固內化。

【0164】 在免疫療法之一個態樣中，腫瘤細胞必須帶有一些適合於靶向，亦即不存在於大部分其他細胞上之標記物。存在許多腫瘤標記物且此等標記物中之任一者可適用於在本發明實施例之情形下靶向。常見腫瘤標記物包括CD20、癌胚抗原、酪胺酸酶(p97)、gp68、TAG-72、HMFG、唾液酸基Lewis抗原、MucA、MucB、PLAP、層黏連蛋白受體、erb B及p155。免疫療法之替代態樣為組合抗癌作用與免疫刺激作用。亦存在免疫刺激分子，包括：細胞介素，諸如IL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、 γ -IFN；趨化因子，諸如MIP-1、MCP-1、IL-8及生長因子，諸如FLT3配位體。

【0165】 當前在研究中或在使用中之免疫療法之實例為免疫佐劑，例如牛分支桿菌、惡性瘧原蟲、二硝基氯苯及芳族化合物(美國專利5,801,005及5,739,169；Hui及Hashimoto, 1998；Christodoulides等人，1998)；細胞介素療法，例如干擾素 α 、 β 及 γ 、IL-1、GM-CSF及TNF(Bukowski等人，1998；Davidson等人，1998；Hellstrand等人，1998)；基因療法，例如TNF、IL-1、IL-2及p53(Qin等人，1998；Austin-Ward及Villaseca, 1998；美國專利5,830,880及5,846,945)；及單株抗體，例如抗CD20、抗神經節苷脂GM2及抗p185(Hollander, 2012；Hanibuchi等人，1998；美國專利5,824,311)。預期一或多種抗癌療法可與本文所述之抗體療法一起使用。

【0166】 在一些實施例中，免疫療法可為免疫檢查點抑制劑。免疫檢查點增強信號(例如協同刺激分子)或減弱信號。可由免疫檢查點阻斷靶向之抑制性免疫檢查點包括腺苷A2A受體(A2AR)、B7-H3(亦稱為

CD276)、B及T淋巴細胞弱化子(BTLA)、細胞毒性T淋巴細胞相關蛋白4(CTLA-4, 亦稱為CD152)、吡啶胺2,3-二加氧酶(IDO)、殺手細胞免疫球蛋白(KIR)、淋巴細胞活化基因-3 (LAG3)、計劃性死亡1 (PD-1)、T細胞免疫球蛋白域及黏蛋白域3 (TIM-3)及T細胞活化之V域Ig抑制因子(VISTA)。詳言之, 免疫檢查點抑制劑靶向PD-1軸及/或CTLA-4。

【0167】 免疫檢查點抑制劑可為諸如小分子之藥物、配位體或受體之重組形式, 或特定言之為抗體, 諸如人類抗體(例如國際專利公開案WO2015016718; Pardoll, *Nat Rev Cancer*, 12(4): 252-64, 2012; 兩者以引用之方式併入本文中)。可使用免疫檢查點蛋白或其類似物之已知抑制劑, 特定言之可使用抗體之嵌合、人類化或人類形式。如熟習此項技術者將知曉, 替代及/或等效名稱可用於本發明中提及之某些抗體。此類替代及/或等效名稱在本發明之上下文中為可互換的。舉例而言, 已知拉立珠單抗(lambrolizumab)亦以替代及等效名稱MK-3475及派立珠單抗(pembrolizumab)已知。

【0168】 在一些實施例中, PD-1結合拮抗劑為抑制PD-1與其配位體結合搭配物結合之分子。在一特定態樣中, PD-1配位體結合搭配物為PDL1及/或PDL2。在另一實施例中, PDL1結合拮抗劑為抑制PDL1與其結合搭配物結合之分子。在一具體態樣中, PDL1結合搭配物為PD-1及/或B7-1。在另一實施例中, PDL2結合拮抗劑為抑制PDL2與其結合搭配物結合之分子。在一特定態樣中, PDL2結合搭配物為PD-1。拮抗劑可為抗體、其抗原結合片段、免疫黏附素、融合蛋白或寡肽。例示性抗體描述於美國專利第US8735553號、第US8354509號及第US8008449號中, 其皆以引用之方式併入本文中。用於本文所提供之方法之其他PD-1軸拮抗劑

為此項技術中已知的，諸如描述於美國專利申請案第US20140294898號、第US2014022021號及第US20110008369號中，所有文獻皆以引用之方式併入本文中。

【0169】 在一些實施例中，PD-1結合拮抗劑為抗PD-1抗體(例如人類抗體、人類化抗體或嵌合抗體)。在一些實施例中，抗PD-1抗體選自由納武單抗(nivolumab)、派立珠單抗及CT-011組成之群。在一些實施例中，PD-1結合拮抗劑為免疫黏附素(例如包含融合至恆定區(例如免疫球蛋白序列之Fc區)的PDL1或PDL2之細胞外或PD-1結合部分的免疫黏附素)。在一些實施例中，PD-1結合拮抗劑為AMP-224。納武單抗，亦稱為MDX-1106-04、MDX-1106、ONO-4538、BMS-936558及OPDIVO[®]，為WO2006/121168中所描述之抗PD-1抗體。派立珠單抗，亦稱為MK-3475、Merck 3475、拉立珠單抗、KEYTRUDA[®]及SCH-900475，為WO2009/114335中所描述之抗PD-1抗體。CT-011，亦稱為hBAT或hBAT-1，為WO2009/101611中所描述之抗PD-1抗體。AMP-224，亦稱為B7-DCIg，為WO2010/027827及WO2011/066342中所描述之PDL2-Fc融合可溶受體。

【0170】 在本文中提供之方法中可靶向之另一免疫檢查點為細胞毒性T淋巴細胞相關蛋白4 (CTLA-4)，亦稱為CD152。人類CTLA-4之完整cDNA序列具有GenBank寄存編號L15006。CTLA-4發現於T細胞之表面上且在結合於抗原呈現細胞之表面上之CD80或CD86時充當「關閉」開關。CTLA4係表現於輔助T細胞之表面上之免疫球蛋白超家族的成員且將抑制信號傳輸至T細胞。CTLA4類似於T細胞協同刺激蛋白質CD28，且兩種分子均結合於抗原呈現細胞上之亦分別稱為B7-1及B7-2的CD80及

CD86。CTLA4將抑制信號傳輸至T細胞，而CD28傳輸刺激信號。細胞內CTLA4亦發現於調節T細胞中且對其功能可為重要的。經由T細胞受體及CD28之T細胞活化引起B7分子之抑制性受體CTLA-4之表現增加。

【0171】 在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑係抗CTLA-4抗體(例如人類抗體、人類化抗體或嵌合抗體)、其抗原結合片段、免疫黏附素、融合蛋白或寡肽。

【0172】 適用於本發明方法之抗人類-CTLA-4抗體(或自其衍生之VH及/或VL域)可使用此項技術中熟知之方法產生。或者，可使用此項技術中公認之抗CTLA-4抗體。舉例而言，以下中所揭示之抗CTLA-4抗體可用於本文所揭示之方法：US 8,119,129、WO 01/14424、WO 98/42752；WO 00/37504 (CP675,206，亦稱為曲美單抗(tremelimumab)；以前稱替西單抗(ticilimumab))、美國專利第6,207,156號；Hurwitz等人(1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95(17): 10067-10071；Camacho等人(2004) *J Clin Oncology* 22(145): 摘要編號2505 (抗體CP-675206)；以及Mokyr等人(1998) *Cancer Res* 58:5301-5304。前述公開案中之每一者之教示內容以引用之方式併入本文中。亦可使用與此等此項技術中公認的抗體中之任一者競爭結合至CTLA-4之抗體。舉例而言，人類化CTLA-4抗體描述於國際專利申請案第WO2001014424號、第WO2000037504號及美國專利第8,017,114號中；所有文獻皆以引用之方式併入本文中。

【0173】 例示性抗CTLA-4抗體係伊派利單抗(ipilimumab)(亦稱為10D1、MDX-010、MDX-101及Yervoy®)或其抗原結合片段及變異體(參見例如WO 01/14424)。在其他實施例中，抗體包含伊派利單抗之重鏈及

輕鏈CDR或VR。因此，在一個實施例中，抗體包含伊派利單抗之VH區之CDR1、CDR2及CDR3域，及伊派利單抗之VL區之CDR1、CDR2及CDR3域。在另一實施例中，抗體競爭與與上文所提及之抗體相同之CTLA-4上的抗原決定基結合及/或結合於與上文所提及之抗體相同之CTLA-4上的抗原決定基。在另一實施例中，抗體與上文所提及之抗體具有至少約90%可變區胺基酸序列一致性(例如與伊派利單抗之至少約90%、95%或99%可變區一致性)。

【0174】 用於調節CTLA-4之其他分子包括諸如描述於美國專利第US5844905號、第US5885796號及國際專利申請案第WO1995001994號及第WO1998042752號中之CTLA-4配位體及受體；所有文獻皆以引用之方式併入本文中，及諸如描述於美國專利第US8329867號中之免疫黏附素，其以引用之方式併入本文中。

4.手術

【0175】 約60%患有癌症的人將經歷一些類型之手術，其包括預防性、診斷或分期、治癒性及姑息性手術。治癒性手術包括切除，其中癌組織的所有或一部分經物理移除、切除及/或破壞，且可與其他療法結合使用，該等其他療法諸如本發明實施例之治療、化學療法、放射療法、激素療法、基因療法、免疫療法及/或替代療法。腫瘤切除係指物理移除腫瘤之至少一部分。除腫瘤切除以外，手術治療包括雷射手術、冷凍手術、電手術及顯微鏡控制手術(microscopically-controlled surgery) (莫氏手術(Mohs' surgery))。

【0176】 在切除癌細胞、組織或腫瘤的一部分或所有時，可在體內形成空腔。治療可藉由用額外抗癌療法對區域進行輸液、直接注射或局部

施用而實現。可例如每1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天，或每1週、2週、3週、4週及5週或每1個月、2個月、3個月、4個月、5個月、6個月、7個月、8個月、9個月、10個月、11個月、或12個月重複此類治療。此等治療亦可具有不同劑量。

5.其他試劑

【0177】 預期其他試劑可與本發明實施例之某些態樣組合使用以改善治療之治療功效。此等額外試劑包括影響細胞表面受體及GAP連接之上調之試劑、細胞生長抑制劑及分化劑、細胞黏附抑制劑、提高過度增殖細胞對細胞凋亡誘導物之敏感性之試劑或其他生物試劑。藉由升高GAP連接之數目增加細胞間信號傳導將增加對相鄰過度增殖細胞群體之抗過度增殖作用。在其他實施例中，細胞生長抑制劑或分化劑可與本發明實施例之某些態樣組合使用以改善治療之抗過度增殖功效。預期細胞黏附抑制劑改善本發明實施例之功效。細胞黏附抑制劑之實例為局部黏著斑激酶(FAK)抑制劑及洛伐他汀(Lovastatin)。進一步預期增加過度增殖細胞對細胞凋亡之敏感性的其他試劑，諸如抗體c225，可與本發明實施例之某些態樣組合使用以改善治療功效。

V.製品或套組

【0178】 本文亦提供包含免疫細胞之製品或套組。製品或套組可進一步包含藥品說明書，其包含使用免疫細胞治療個體中之癌症或延遲其進展或增強患有癌症之個體之免疫功能的說明。本文所述之抗原特異性免疫細胞中之任一者可包括於製品或套組中。適合容器包括例如瓶、小瓶、袋及注射器。容器可由多種材料形成，該等材料諸如玻璃、塑膠(諸如聚氯乙烯或聚烯烴)或金屬合金(諸如不鏽鋼或赫史特合金(hastelloy))。在一些

實施例中，容器容納調配物，且在容器上或與容器結合之標籤可指示使用說明。製品或套組可進一步包括自商業及使用者角度來看需要之其他材料，包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針、注射器及具有使用說明之藥品說明書。在一些實施例中，製品進一步包括一或多種另一試劑(例如化學治療劑及抗贅生劑)。用於一或多種試劑之適合容器包括例如瓶、小瓶、袋及注射器。

VI. 實例

【0179】 包括以下實例以展示本發明之特定實施例。熟習此項技術者應瞭解，以下實例中所揭示之技術表示由本發明人發現之在本發明之方法之實踐中起良好作用的技術，且因此可被視為構成用於其實踐之特定模式。然而，熟習此項技術者應理解，根據本發明，在不脫離本發明之精神及範疇的情況下可對所揭示之特定實施例作出許多改變且仍獲得相同或相似結果。

實例1-模組化載體系統

【0180】 載體以 γ -反轉錄病毒轉移載體形式產生。反轉錄病毒轉移載體pSFG4具有基於pUC19質體之主鏈(HindIII與EcoRI限制酶位點之間的大片段[2.63kb])，其攜載來自莫洛尼鼠類白血病毒(MoMLV)之病毒組分，包括5' LTR、psi封裝序列及3' LTR。LTR為發現於反轉錄病毒原病毒之任一側上之長末端重複序列，且在轉移載體之情況下，囊括相關基因負荷，諸如CAR及相關基因組件。psi封裝序列(其為藉由核衣殼封裝之目標位點)亦以順式併入，包夾於5' LTR與CAR編碼序列之間。因此，pSFG4轉移載體之基本結構可如此概述：pUC19序列-5' LTR-psi封裝序列-相關基因負荷-3' LTR-pUC19序列。

【0181】 例示性載體描繪於圖2及圖3中。在圖3中，載體DNA為環狀且依據慣例，位置1（環頂部12點鐘位置處，其中序列之其餘部分在順時針方向上）設定在5' LTR開始處。

* * *

【0182】 本文中所揭示及主張之所有方法均可根據本發明製造及執行，無需過度實驗。雖然已根據較佳實施例描述本發明之組合物及方法，但熟習此項技術者應清楚變化可在不脫離本發明之概念、精神及範疇的情況下應用於本文所述之方法及步驟中或方法步驟之順序中。更特定言之，顯而易見在化學上及生理上相關之某些試劑可取代本文所描述之試劑，同時將實現相同或類似結果。對熟習此項技術者顯而易見的所有此類類似取代及修改視為在由隨附申請專利範圍所定義之本發明之精神、範疇及概念內。

參考文獻

以下參考文獻特定地以引用之方式併入本文中，以便其對本文所闡述之內容提供例示性程序或其他細節補充。

U.S. Patent 5,844,905

U.S. Patent 5,885,796

U.S. Patent 6,207,156

U.S. Patent 6,410,319

U.S. Patent 6,451,995

U.S. Patent 7,070,995

U.S. Patent 7,109,304

U.S. Patent 7,265,209

U.S. Patent 7,354,762

U.S. Patent 7,446,179

U.S. Patent 7,446,190

U.S. Patent 7,446,191

U.S. Patent 8,324,353

U.S. Patent 8,329,867

U.S. Patent 8,354,509

U.S. Patent 8,479,118

U.S. Patent 8,735,553

U.S. Patent 8,008,449

U.S. Patent 8,017,114

U.S. Patent 8,119,129

U.S. Patent 8,252,592

U.S. Patent 8,339,645

U.S. Patent 8,398,282

U.S. Patent Application US2002131960

U.S. Patent Application US20110008369

U.S. Patent Application US2013287748

U.S. Patent Application US20130149337

U.S. Patent Application US20140294898

U.S. Patent Application US2014022021

WO1995001994
WO1998042752
WO199842752
WO2001014424
WO2000037504
WO200014257
WO200037504
WO200114424
WO2012129514
WO2013126726
WO2013166321
WO2013071154
WO2013123061
WO2014055668
WO2014031687

EP Patent Application EP2537416

Ausubel *et al.*, 1996, (eds.) Current Protocols in Molecular
Biology, John Wiley & Sons Inc
Camacho *et al.* (2004) *J Clin Oncology* 22(145): Abstract No. 2505
Cohen *et al.* (2005) *J Immunol.* 175(9): 5799-5808
Chothia *et al.* (1988) *EMBO J.* 7(12):3745-55

Davila *et al.* (2013) *Hematol Oncol Clin North Am.* 27(2):341-53

Fedorov *et al.* (2013) *Science Translational Medicine*, Vol. 5, Issue 215, pp. 215ra172

Hurwitz *et al.* (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95(17): 10067-10071

Jores *et al.* (1990) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(23):9138-42

Lefranc *et al.* (2003) *Dev Comp Immunol.* 27(1):55-77

Li *et al.* (2005) *Nature Biotechnology* volume 23, pages 349-354

Lockey *et al.* (2008) *Front Biosci.* 1;13:5916-27

Mokyr *et al.* (1998) *Cancer Res* 58:5301-5304

Parkhurst *et al.* (2009) *Clin Cancer Res.* 15(1):169-80

Sadelain *et al.* (2013) *Cancer Discov.* 3(4):388-98

Sambrook *et al.* (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 1st ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press

Singh *et al.* (2008) *Cancer Res.*;68(8):2961-71

Singh *et al.* (2011) *Cancer Res.* 15;71(10):3516-27

Turtle *et al.* (2012) *Curr Opin Immunol.* 24(5):633-9.

Varela-Rohena *et al.* (2008) *Immunol Res.* 42(1-3):166-81.

Wu *et al.* (2012) *Cancer J.* 18(2):160-75

【序列表】

<110> 美國德州系統大學評議委員會(THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM)

<120> 用於CAR及TCR轉導之模組化多順反子載體

<130> UTFC.P1152TW

<140>

<141>

<150> 62/791,491

<151> 2019-01-11

<150> 62/773,394

<151> 2018-11-30

<150> 62/769,414

<151> 2018-11-19

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(3)

<223> 此區可能存在或可能不存在

<400> 1

Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu
1 5 10 15

Glu Asn Pro Gly Pro
 20

<210> 2

<211> 22

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(3)
<223> 此區可能存在或可能不存在

<400> 2
Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro
 20

<210> 3
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(3)
<223> 此區可能存在或可能不存在

<400> 3
Gly Ser Gly Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp
1 5 10 15

Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
 20

<210> 4
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(3)

<223> 此區可能存在或可能不存在

<400> 4

Gly	Ser	Gly	Val	Lys	Gln	Thr	Leu	Asn	Phe	Asp	Leu	Leu	Lys	Leu	Ala
1				5					10					15	

Gly	Asp	Val	Glu	Ser	Asn	Pro	Gly	Pro
			20					25

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 未知之描述：2A保守序列

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> 任何胺基酸

<400> 5

Gly	Asp	Val	Glu	Xaa	Asn	Pro	Gly	Pro
1				5				

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種多順反子載體，其包含各自由一或多個限制酶位點側接之至少三個順反子，其中至少一個順反子編碼至少一種抗原受體。

【第2項】

如請求項1之載體，其中該等順反子中之兩者、三者、四者或更多者可轉譯為單一多肽且該多肽可裂解為分開的多肽。

【第3項】

如請求項2之載體，其中該等順反子中之四者可轉譯為單一多肽且可裂解為分開的多肽。

【第4項】

如請求項1至3中任一項之載體，其中該載體上之相鄰順反子藉由2A自行裂解位點分開。

【第5項】

如請求項1之載體，其中該等順反子中之每一者之組態可以表現與該載體分開的多肽。

【第6項】

如請求項5之載體，其中該載體上之相鄰順反子藉由IRES元件分開。

【第7項】

如請求項1至6中任一項之載體，其中該載體上至少一個順反子包含兩個或更多個模組化組件，其中順反子內的該等模組化組件中之每一者由一或多個限制酶位點側接。

【第8項】

如請求項7之載體，其中順反子包含三個、四個或五個模組化組件。

【第9項】

如請求項7或8之載體，其中順反子編碼具有由相應模組化組件編碼之受體之不同部分的抗原受體。

【第10項】

如請求項9之載體，其中順反子之第一模組化組件編碼該受體之抗原結合域。

【第11項】

如請求項9或10之載體，其中順反子之第二模組化組件編碼該受體之鉸鏈區。

【第12項】

如請求項9、10或11之載體，其中順反子之第三模組化組件編碼該受體之跨膜域。

【第13項】

如請求項9至12中任一項之載體，其中順反子之第四模組化組件編碼第一協同刺激域。

【第14項】

如請求項9至13中任一項之載體，其中順反子之第五模組化組件編碼第二協同刺激域。

【第15項】

如請求項9至14中任一項之載體，其中順反子之第六模組化組件編碼信號傳導域。

【第16項】

如請求項1至15中任一項之載體，其中該載體上之兩個不同順反子各自編碼抗原受體。

【第17項】

如請求項16之載體，其中兩種抗原受體均由包含兩個或更多個模組化組件之順反子編碼。

【第18項】

如請求項1至17中任一項之載體，其中該抗原受體為嵌合抗原受體(CAR)及/或T細胞受體(TCR)。

【第19項】

如請求項1至17中任一項之載體，其中該載體為病毒載體或非病毒載體。

【第20項】

如請求項19之載體，其中該病毒載體為反轉錄病毒載體、豆狀病毒載體、腺病毒載體或腺相關病毒載體。

【第21項】

如請求項1至20中任一項之載體，其中該載體包含莫洛尼鼠類白血病毒(Moloney Murine Leukemia Virus，MMLV) 5' LTR，3' LTR及psi封裝元件。

【第22項】

如請求項21之載體，其中該psi封裝併入於該5' LTR與抗原受體編碼序列之間。

【第23項】

如請求項1至22中任一項之載體，其中該載體包含pUC19序列。

【第24項】

如請求項1至23中任一項之載體，其中至少一個順反子編碼細胞介素、趨化因子、細胞介素受體及/或歸巢受體(homing receptor)。

【第25項】

如請求項24之載體，其中該細胞介素為介白素15 (IL-15)、IL-7、IL-12、IL-21、IL-18或IL-2。

【第26項】

如請求項4之載體，其中2A裂解位點包含P2A、T2A、E2A及/或F2A位點。

【第27項】

如請求項1至26中任一項之載體，其中順反子包含自殺基因。

【第28項】

如請求項1至27中任一項之載體，其中順反子編碼報導基因產物。

【第29項】

如請求項1至28中任一項之載體，其中第一順反子編碼自殺基因，第二順反子編碼抗原受體，第三順反子編碼報導基因產物，且第四順反子編碼細胞介素。

【第30項】

如請求項29之載體，其中該抗原受體之不同部分由相應模組化組件編碼，且其中該第二順反子之第一組件編碼抗原結合域，第二組件編碼鉸鏈及/或跨膜域，第三組件編碼協同刺激域，且第四組件編碼信號傳導域。

【第31項】

一種免疫細胞，其包含如請求項1至30中任一項之載體。

【第32項】

如請求項31之免疫細胞，其中該免疫細胞為T細胞、末梢血液淋巴細胞、B細胞、NK細胞、不變NK細胞、NKT細胞、iNKT細胞、巨噬細胞、幹細胞或其混合物。

【第33項】

如請求項32之免疫細胞，其中該幹細胞為間葉幹細胞(MSC)或誘導多能幹(iPS)細胞。

【第34項】

如請求項31之免疫細胞，其中該免疫細胞衍生自iPS細胞。

【第35項】

如請求項31之免疫細胞，其中該T細胞為CD8+ T細胞、CD4+ T細胞或 γ - δ T細胞。

【第36項】

如請求項32或35之免疫細胞，其中該T細胞為細胞毒性T淋巴細胞(CTL)。

【第37項】

如請求項31至36中任一項之免疫細胞，其中該免疫細胞相對於個體為同種異體細胞。

【第38項】

如請求項31至36中任一項之免疫細胞，其中該免疫細胞相對於個體為自體細胞。

【第39項】

如請求項31至38中任一項之免疫細胞，其中該免疫細胞為人類細胞。

【第40項】

如請求項31至39中任一項之免疫細胞，其中該免疫細胞衍生自臍帶血、末梢血液、骨髓、CD34+細胞或iPSC。

【第41項】

如請求項40之免疫細胞，其中該免疫細胞衍生自臍帶血。

【第42項】

如請求項31至41中任一項之免疫細胞，其中該免疫細胞包含於細胞群體中。

【第43項】

如請求項31至42中任一項之免疫細胞，其中該免疫細胞包含於醫藥學上可接受之載劑中。

【第44項】

一種產生擴增免疫細胞之方法，其包含：

- (a)獲得免疫細胞之起始群體；
- (b)在人工呈現細胞(APC)存在下培養該免疫細胞之起始群體；
- (c)將如請求項1至30中任一項之載體引入該等免疫細胞中；及
- (d)在APC存在下擴增該等免疫細胞，由此獲得擴增之免疫細胞。

【第45項】

如請求項44之方法，其中該免疫細胞之起始群體係藉由使用菲科爾-帕克密度梯度(ficoll-paque density gradient)分離單核細胞來獲得。

【第46項】

如請求項44或45之方法，其中該等APC為經 γ 輻射之APC。

【第47項】

如請求項44之方法，其進一步包含冷凍保存該等擴增之免疫細胞之群體。

【第48項】

一種醫藥組合物，其包含如請求項31至43中任一項之免疫細胞群體及醫藥學上可接受之載劑。

【第49項】

一種包含有效量之如請求項31至43中任一項之免疫細胞之組合物，其用於治療個體之疾病或病症。

【第50項】

如請求項49之組合物，其中該疾病為癌症或該病症為免疫相關病症。

【第51項】

一種包含有效量之如請求項31至43中任一項之免疫細胞之組合物的用途，其用於治療個體之癌症或免疫相關病症。

【第52項】

一種治療個體之疾病或病症之方法，其包含向該個體投與有效量之如請求項31至43中任一項之免疫細胞。

【第53項】

如請求項52之方法，其中該疾病或病症為癌症、自體免疫病症、移植植物抗宿主疾病、同種異體移植排斥反應或發炎性病狀。

【第54項】

如請求項53之方法，其中該自體免疫病症為發炎性病狀且該等免疫細胞基本上不表現糖皮質激素受體。

【第55項】

如請求項54之方法，其中該個體已投與或正投與類固醇療法。

【第56項】

如請求項52至55中任一項之方法，其中該等免疫細胞相對於該個體為自體的。

【第57項】

如請求項52至55中任一項之方法，其中該等免疫細胞相對於該個體為同種異體細胞。

【第58項】

如請求項52、53、56或57中任一項之方法，其中該疾病為癌症。

【第59項】

如請求項58之方法，其中該癌症為實體癌症或血液惡性病。

【第60項】

如請求項59之方法，其進一步包含向該個體投與至少第二治療劑。

【第61項】

如請求項60之方法，其中該第二治療劑包含化學療法、免疫療法、手術、放射療法或生物療法。

【第62項】

如請求項52至61中任一項之方法，其中該等免疫細胞係經靜脈內、腹膜內、氣管內、瘤內、肌肉內、內視鏡、病灶內、經皮、皮下、局部、藉由輸液或藉由直接注射向該個體投與。

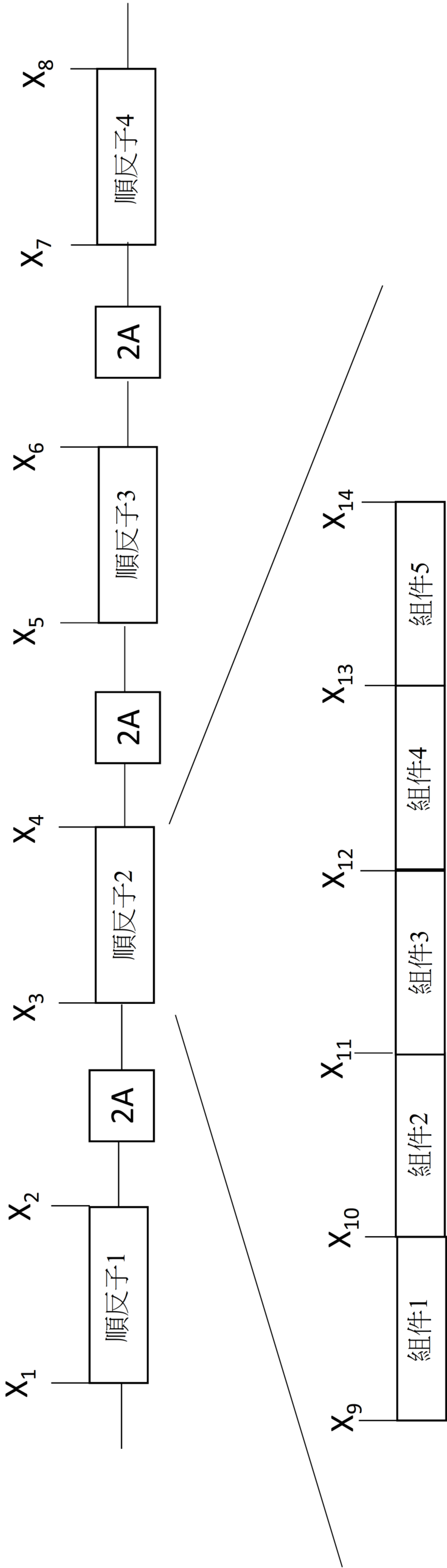
【第63項】

如請求項61或62之方法，其中該第二治療劑係經靜脈內、腹膜內、氣管內、瘤內、肌肉內、內視鏡、病灶內、經皮、皮下、局部、藉由輸液或藉由直接注射向該個體投與。

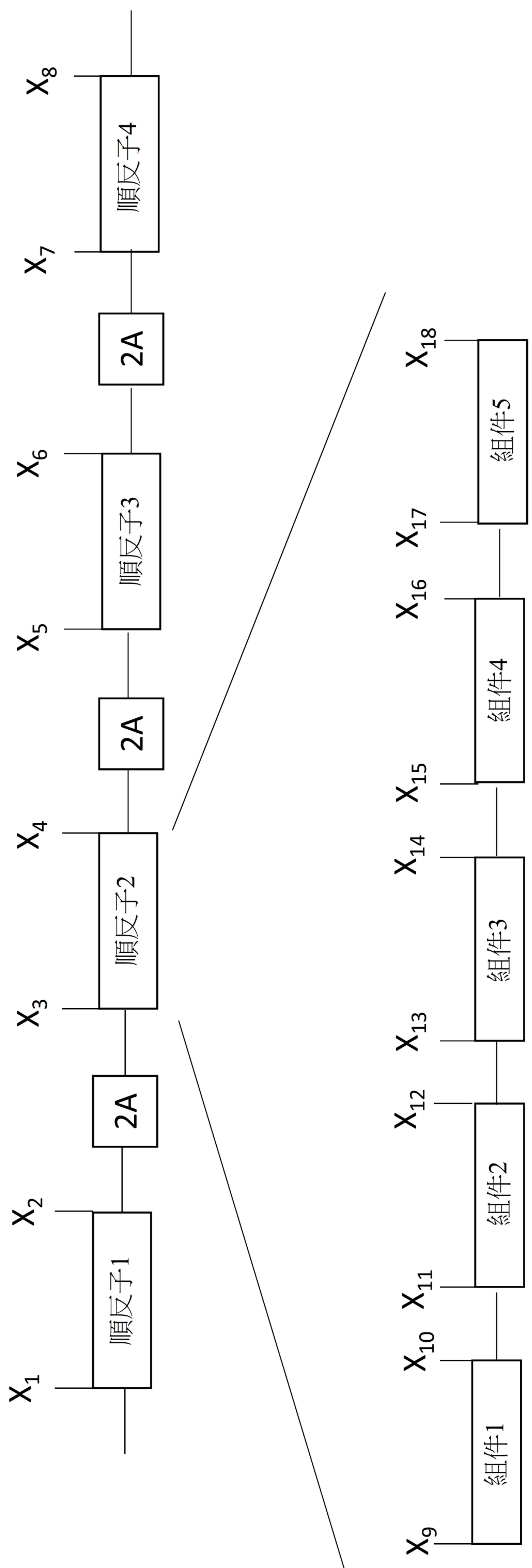
【第64項】

一種多順反子載體，其包含各自由一或多個限制酶位點側接之至少四個順反子，其中該載體上至少一個順反子包含兩個或更多個模組化組件，其中順反子內的該等模組化組件中之每一者由一或多個限制酶位點側接。

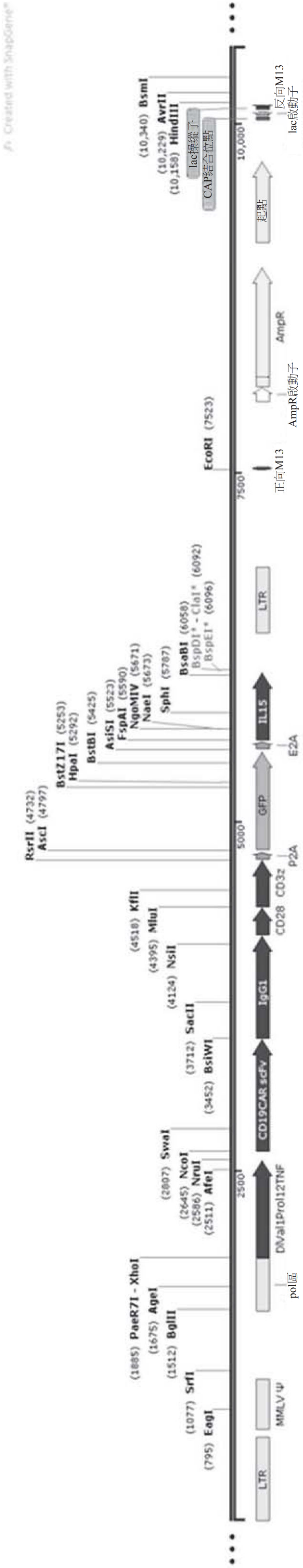
【發明圖式】



【圖1A】

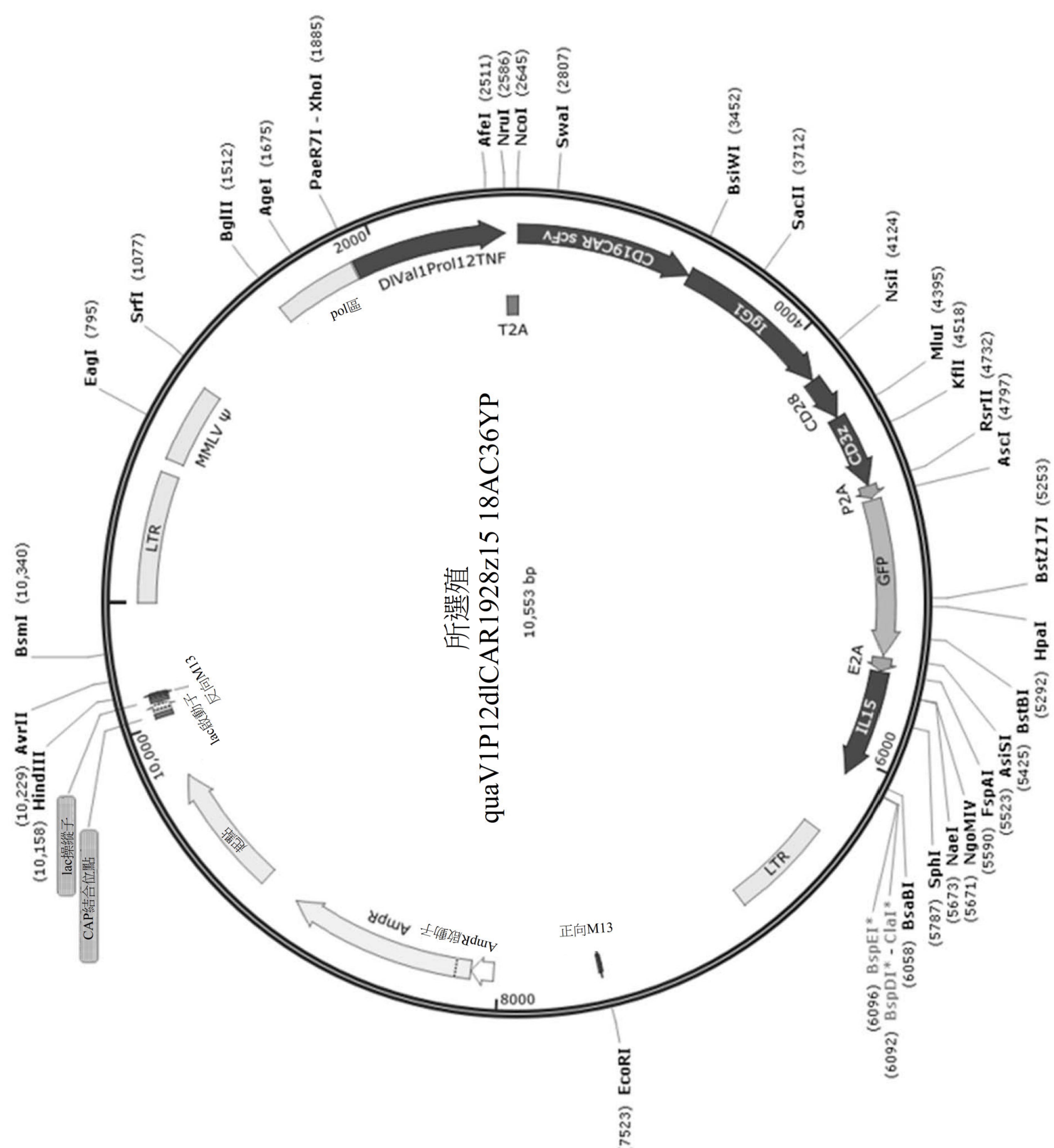


【圖1B】



所選殖
quaV1P12dICAR1928z15 18AC36YP

【圖2】



【圖3】