



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113056558 A

(43) 申请公布日 2021.06.29

(21) 申请号 201980074148.0

(22) 申请日 2019.11.15

(30) 优先权数据

62/768,579 2018.11.16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.05.11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/061723 2019.11.15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/102676 EN 2020.05.22

(71) 申请人 细胞基因公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 托马斯·A·布列瓦 大卫·熊

塞斯·琼斯 希夫·米斯特里

纳耶雷赫·拉贾伊

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 贺淑东

(51) Int.Cl.

*C12N 5/0783* (2006.01)

*C07K 14/705* (2006.01)

*C12N 15/87* (2006.01)

权利要求书1页 说明书20页

(54) 发明名称

改进的T细胞制造工艺

(57) 摘要

本文提供了改进的制造细胞的方法,所述细胞包括T细胞和CAR T细胞。本文还提供了使用结合膜过滤和氯化铵-钾(ACK)缓冲液来使能够从血液获得的细胞如T细胞和CAR T细胞与其他血液组分分离的方法来制造所述细胞的方法。

1. 一种由来自受试者的外周血单核细胞 (PBMC) 制造表达嵌合抗原受体 (CAR) 的T细胞 (CAR T细胞) 的方法, 其中从所述受试者获得血液样品, 所述方法包括以下步骤:

- a. 从所述血液样品获得PBMC;
- b. 使用膜过滤系统和氯化铵-钾 (ACK) 缓冲液分离已从所述血液样品获得的所述PBMC;
- c. 通过离心洗涤所述PBMC;
- d. 任选地冷冻保存所述PBMC;
- e. 任选地使在步骤 (d) 中冷冻保存的PBMC解冻;
- f. 使用膜过滤系统洗涤所述PBMC;
- g. 由来自步骤 (f) 的PBMC制造所述CAR T细胞; 以及
- h. 使用膜过滤系统洗涤来自步骤 (g) 的所述CAR T细胞。

2. 一种由来自受试者的去除白细胞的血液样品中的外周血单核细胞 (PBMC) 制造表达嵌合抗原受体 (CAR) 的T细胞 (CAR T细胞) 的方法, 所述方法包括以下步骤:

a. 使用膜过滤系统和氯化铵-钾 (ACK) 缓冲液从所述去除白细胞的血液样品中分离所述PBMC;

- b. 冷冻保存来自步骤 (a) 的所述PBMC;
- c. 使来自步骤 (b) 的PBMC解冻;
- d. 使用旋转过滤系统洗涤来自步骤 (c) 的解冻的PBMC;
- e. 由来自步骤 (d) 的PBMC制造所述CAR T细胞; 以及
- f. 使用膜过滤系统洗涤来自步骤 (e) 的所述CAR T细胞。

3. 一种由来自受试者的血液样品中的外周血单核细胞 (PBMC) 制造表达嵌合抗原受体 (CAR) 的T细胞 (CAR T细胞) 的方法, 所述方法包括以下步骤:

- a. 使用膜过滤系统和氯化铵-钾 (ACK) 缓冲液从所述血液样品中分离所述PBMC;
- b. 将来自步骤 (a) 的所述PBMC冷冻保存并解冻;
- c. 使用膜过滤系统洗涤来自步骤 (b) 的解冻的PBMC;
- d. 由所述PBMC制造所述CAR T细胞; 以及
- e. 使用旋转膜过滤系统洗涤所述CAR T细胞。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的方法, 其中所述膜过滤系统中的任一个或所有膜过滤系统是旋转膜过滤系统。

5. 如权利要求4所述的方法, 其中所述旋转膜过滤系统是LOVO自动化细胞加工系统。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的方法, 其中所述ACK缓冲液包含50-300mM氯化铵、5-25mM碳酸钾和0.05-0.25mM EDTA钠。

7. 如权利要求6所述的方法, 其中所述ACK缓冲液包含150mM氯化铵、10mM碳酸钾和0.1mM EDTA钠。

8. 如权利要求1-7中任一项所述的方法, 其中与使用密度梯度离心代替每次使用膜过滤的相同方法相比, 所述方法使来自所述PBMC的血小板和红细胞的减少程度提高了18%-36%。

9. 如权利要求1至8中任一项所述的方法, 其中与使用密度梯度离心代替每次使用膜过滤的相同方法相比, 所述方法使在CAR T细胞制造后CAR T细胞的回收率提高了17%-36%。

## 改进的T细胞制造工艺

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年11月16日提交的美国临时专利申请号62/768,579的权益,所述临时专利申请的全部内容以引用的方式整体并入本文。

### 1. 技术领域

[0003] 本发明涉及医学领域,特别是用于治疗癌症的细胞疗法的生产。

### 2. 背景技术

[0004] 基于表达人工受体(例如,嵌合抗原受体或T细胞受体(TCR))、多肽(所述多肽使所述T细胞靶向特定肿瘤相关抗原并提供初级信号传导且通常共刺激信号传导来活化并增加T细胞增殖)的T细胞的免疫疗法已成为越来越有前景的治疗方式,特别是对于已经用尽了其他线治疗的患者而言。然而,对于自体CAR T细胞疗法,细胞的制造仍然是费力且耗时的。因此,在本领域中需要改进的制造CAR T细胞的方法,所述方法将减少产生此类细胞的时间和费用。本文提供了这种改进的方法。

### 3. 发明内容

[0005] 在第一方面,本文提供了使用结合膜过滤和氯化铵-钾(ACK)缓冲液来使可从血液获得的细胞与其他血液组分分离的方法来制造所述细胞的方法。在第一实施方案中,本文提供了一种由来自受试者的外周血单核细胞(PBMC)制造细胞的方法,其中从所述受试者获得血液样品,所述方法包括以下步骤:(a)从所述血液样品获得血细胞,例如使用白细胞去除术或抽血以获得外周血单核细胞(PBMC);(b)任选地冷冻所述血细胞并在解冻后获得所述PBMC,或者任选地获得并冷冻所述PBMC,然后在后续步骤之前解冻;(c)使用膜过滤系统和氯化铵-钾(ACK)缓冲液分离所述PBMC;(d)通过离心洗涤所述PBMC;(e)任选地冷冻保存所述PBMC;(f)如果在步骤(e)中冷冻保存所述PBMC,则任选地使所述PBMC解冻;(g)使用膜过滤系统洗涤所述PBMC;(h)由所述PBMC制造所述细胞;以及(i)使用膜过滤系统洗涤所述细胞。在具体实施方案中,所述方法中的步骤(a)-(h)按顺序进行。在具体实施方案中,所述细胞是表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞(CAR T细胞)。

[0006] 在另一个实施方案中,本文提供了一种由来自受试者的外周血单核细胞(PBMC)制造表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞(CAR T细胞)的方法,其中从所述受试者获得血液样品,所述方法包括以下步骤:(a)从所述血液样品获得PBMC;(b)使用膜过滤系统和氯化铵-钾(ACK)缓冲液分离已从所述血液样品获得的PBMC;(c)通过离心洗涤所述PBMC;(d)任选地冷冻保存所述PBMC;(e)任选地使在步骤(d)中冷冻保存的PBMC解冻;(f)使用膜过滤系统洗涤所述PBMC;(g)由来自步骤(f)的PBMC制造所述CAR T细胞;以及(h)使用膜过滤系统洗涤来自步骤(g)的所述CAR T细胞。在具体实施方案中,所述方法中的步骤(a)-(h)按顺序进行。

[0007] 在另一个实施方案中,本文提供了一种由来自受试者的外周血单核细胞(PBMC)制造表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞(CAR T细胞)的方法,其中从所述受试者获得血液样品,

所述方法包括以下步骤：(a) 分离已从来自所述受试者的血液样品获得的PBMC，其中所述分离使用膜过滤系统和氯化铵-钾(ACK)缓冲液；(b) 通过离心洗涤所述PBMC；(c) 任选地冷冻保存所述PBMC；(d) 任选地使在步骤(c)中冷冻保存的PBMC解冻；(e) 使用膜过滤系统洗涤所述PBMC；(f) 由来自步骤(f)的PBMC制造所述CAR T细胞；以及(g) 使用膜过滤系统洗涤来自步骤(f)的CAR T细胞。在具体实施方案中，所述方法中的步骤(a) - (g) 按顺序进行。

[0008] 在另一个实施方案中，本文提供了一种由来自受试者的血液样品中的外周血单核细胞(PBMC)制造细胞的方法，所述方法包括以下步骤：(a) 使用膜过滤系统和氯化铵-钾(ACK)缓冲液从来自所述受试者的血液样品中分离PBMC，其中所述血液样品是除去白细胞的血液样品或是来自抽血；(b) 任选地冷冻保存来自步骤(a)的PBMC；(c) 任选地使来自步骤(b)的PBMC解冻；(d) 使用膜过滤系统洗涤来自步骤(c)的解冻的PBMC；(e) 由来自步骤(d)的PBMC制造所述细胞；以及(f) 使用膜过滤系统洗涤来自步骤(e)的所述细胞。在具体实施方案中，所述方法中的步骤(a) - (f) 按顺序进行。在具体实施方案中，所述细胞是表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞(CAR T细胞)。

[0009] 在另一个实施方案中，本文提供了一种由来自受试者的血液样品中的外周血单核细胞(PBMC)制造细胞的方法，所述方法包括以下步骤：(a) 使用膜过滤系统和氯化铵-钾(ACK)缓冲液从来自所述受试者的血液样品中分离PBMC，其中所述血液样品是除去白细胞的血液样品或是来自抽血；(b) 冷冻保存来自步骤(a)的PBMC；(c) 使来自步骤(b)的PBMC解冻；(d) 使用膜过滤系统洗涤来自步骤(c)的解冻的PBMC；(e) 由来自步骤(d)的PBMC制造所述细胞；以及(f) 使用膜过滤系统洗涤来自步骤(e)的所述细胞。在具体实施方案中，所述方法中的步骤(a) - (f) 按顺序进行。在具体实施方案中，所述细胞是表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞(CAR T细胞)。

[0010] 在另一个实施方案中，本文提供了一种由来自受试者的血液样品中的外周血单核细胞(PBMC)制造细胞的方法，所述方法包括以下步骤：(a) 使用膜过滤系统和氯化铵-钾(ACK)缓冲液从来自所述受试者的血液样品中分离PBMC；(b) 任选地将来自步骤(a)的PBMC冷冻保存并解冻；(c) 任选地使用膜过滤系统洗涤来自步骤(b)的解冻的PBMC；(d) 由所述PBMC制造所述细胞；以及(e) 使用膜过滤系统洗涤所述细胞。在具体实施方案中，所述方法中的步骤(a) - (e) 按顺序进行。在具体实施方案中，所述血液样品是除去白细胞的血液样品。在具体实施方案中，所述细胞是表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞(CAR T细胞)。

[0011] 在另一个实施方案中，本文提供了一种由来自受试者的血液样品中的外周血单核细胞(PBMC)制造细胞的方法，所述方法包括以下步骤：(a) 使用膜过滤系统和氯化铵-钾(ACK)缓冲液从来自所述受试者的血液样品中分离PBMC；(b) 将来自步骤(a)的PBMC冷冻保存并解冻；(c) 使用膜过滤系统洗涤来自步骤(b)的解冻的PBMC；(d) 由所述PBMC制造所述细胞；以及(e) 使用膜过滤系统洗涤所述细胞。在具体实施方案中，所述方法中的步骤(a) - (e) 按顺序进行。在具体实施方案中，所述血液样品是除去白细胞的血液样品。在具体实施方案中，所述细胞是表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞(CAR T细胞)。

[0012] 在任何上述实施方案的具体实施方案中，所述细胞是T细胞(T淋巴细胞)、自然杀伤细胞(NK细胞)或树突细胞。在具体实施方案中，所述T细胞是细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、CD4+T细胞、CD8+T细胞或T中心记忆( $T_{cm}$ )细胞。在具体实施方案中，所述细胞(例如T细胞)已进行遗传修饰以表达多肽，例如嵌合受体。在更具体的实施方案中，所述嵌合受体是T细胞

受体 (TCR) 或嵌合抗原受体。在更具体的实施方案中,任何上述方法的细胞是表达嵌合抗原受体的T细胞 (CAR T细胞)。

[0013] 在任何上述实施方案的具体实施方案中,所述一个或多个膜过滤系统中的至少一个或所有膜过滤系统是切向流过滤系统。在任何上述实施方案的具体实施方案中,所述一个或多个膜过滤系统中的至少一个或所有膜过滤系统可以是旋转膜过滤系统。在任何上述实施方案的具体实施方案中,所述膜过滤系统是旋转膜过滤系统,如LOVO自动化细胞加工系统。在任何上述实施方案的另一个具体实施方案中,其中所述ACK缓冲液包含50-300mM氯化铵、5-25mM碳酸钾和0.05-0.25mM EDTA钠。在更具体的实施方案中,所述ACK缓冲液包含150mM氯化铵、10mM碳酸钾和0.1mM EDTA钠。在任何上述实施方案的另一个具体实施方案中,与使用密度梯度离心代替每次使用旋转膜过滤的相同方法相比,所述方法使来自所述PBMC的血小板和红细胞的减少程度提高了18%-36%。在任何上述实施方案的另一个具体实施方案中,与使用密度梯度离心代替每次使用旋转膜过滤的相同方法相比,所述方法使来自所述PBMC的血小板和红细胞的减少程度提高了10%-50%、15%-45%、20%-40%、20%-35%、20%-30%、25%-35%、25%-30%、25%-40%或30-35%。在任何上述实施方案的另一个具体实施方案中,与使用密度梯度离心代替每次使用旋转膜过滤的相同方法相比,所述方法使在T细胞制造后所述细胞 (例如CAR T细胞) 的回收率提高了17%-36%。在任何上述实施方案的另一个具体实施方案中,与使用密度梯度离心代替每次使用旋转膜过滤的相同方法相比,所述方法使在T细胞制造后所述细胞 (例如CAR T细胞) 的回收率提高了约10%-50%、15%-45%、20%-40%、20%-35%、20%-30%、25%-35%、25%-30%、25%-40%或30-35%。

#### 4. 具体实施方式

[0014] 4.1. 改进的生产细胞的工艺-概述

[0015] 本文提供了用于制造细胞的工艺,所述工艺结合了改进的生产所述细胞的工艺。所述制造工艺开始于从患者的白细胞去除术或从抽血分离自体外周血单核细胞 (PBMC)。

[0016] 所述制造工艺开始于从患者的白细胞去除术或从抽血分离PBMC。通过膜过滤系统 (例如,例如孔径为3.6 $\mu$ m的旋转膜过滤系统) 从白细胞去除术或从抽血分离自体PBMC,以例如除去血小板和细胞碎片。在除去血小板和细胞碎片后,使用氯化铵-钾 (ACK) 缓冲液来裂解红细胞。然后从ACK缓冲溶液中分离出PBMC,并通过离心进行洗涤。旋转膜过滤、随后RBC的ACK裂解的这种组合代表了相对于先前工艺的第一改进,所述先前工艺使用密度梯度离心 (细胞回收器 (Cell-Saver) 5+ (CS5+; Haemonetics, Braintree, Massachusetts))。

[0017] 洗涤后,将分离的PBMC重新悬浮,然后配制在合适的溶液,例如Cryostor中。或者,在配制在这种溶液中之前,可从PBMC中分离出T细胞 (或NK细胞或树突细胞)。对于T细胞,可将用抗CD3、抗CD4或抗CD8抗体包被的磁珠 (如Dynabeads) 用于T细胞分离。然后可使用控制速率的冷冻机将配制的PBMC或分离的细胞冷冻,储存并释放。此步骤之后可以是细胞培养步骤。例如,可在定义为第0天的那天使用37 $^{\circ}$ C水浴来解冻冷冻保存的PBMC或分离的细胞,然后洗涤所述细胞并重新悬浮于适合此类细胞生长的生长培养基中,使用膜过滤系统 (例如,旋转膜过滤系统) 或离心。优选的T细胞生长培养基 (TCGM) 包含93% (v/v) 细胞培养基X-VIVO-15 (Lonza)、10mM HEPES、2mM GlutaMAX<sup>TM</sup>、5% (v/v) 人AB血清和100IU/mL重组人白介

素-2 (rhIL-2) (参见Hollyman等人, J Immunother 2009, 32:169-180)。

[0018] 可通过将分离的PBMC以于培养基(例如TCGM)中 $1 \times 10^6$ 个PBMC/mL的浓度接种到透气性细胞分化袋中,所述培养基补充有活化试剂(例如,对于T细胞,用抗CD3和抗CD28包被的Dynabeads)。然后可将细胞在37°C,优选在具有5%CO<sub>2</sub>的空气中孵育。在CAR T细胞的情况下,这种孵育可持续直到用表达CAR的载体转导T细胞。T细胞活化可通过细胞大小的增加(细胞爆破)和细胞簇集来测量。可在培养开始后使用例如库尔特方法(Coulter method)监测细胞大小(活化的指标)。

[0019] 为了制造CAR T细胞,可通过将指定体积的载体稀释于培养基(例如TCGM)中来进行用表达CAR的载体转导,然后将其添加至细胞培养物中。可基于在第0天接种的PBMC的数量、所使用的载体批次的病毒滴度和目标感染复数(MOI)来选择载体的体积。在某些实施方案中,目标MOI特定于载体的批次,并且选择目标MOI以实现批次间可比较的结果。然后将细胞在37°C与5%CO<sub>2</sub>下孵育。

[0020] 用载体转导后,将培养物孵育并使其在目标接种密度下扩增一段时间。然后可将培养物重新接种到例如透气性细胞扩增袋或其他培养袋(如WAVE™生物反应器)中,并孵育。

[0021] 此后,例如在第10天,收获细胞并使用膜过滤系统(例如旋转膜过滤系统)洗涤,然后使用密闭系统将培养物无菌转移到加工袋中用于配制成最终药物产品。这代表相对于先前基线工艺的第三改进,所述基线工艺使用CS5+装置来进行这一最后洗涤。

[0022] 对于使用旋转膜过滤器的任何上述步骤,优选的装置是LOVO自动化细胞加工系统(Fresenius Kabi)。

[0023] 在具体实施方案中,本文提供了一种由来自受试者的外周血单核细胞(PBMC)制造CAR T细胞的方法,其中从所述受试者获得血液样品,所述方法包括以下步骤:(a)从所述血液样品获得血细胞,例如使用白细胞去除术或抽血以获得外周血单核细胞(PBMC);(b)任选地冷冻所述血细胞并在解冻后获得所述PBMC,或者任选地获得并冷冻所述PBMC,随后在后续步骤之前解冻;(c)使用膜过滤系统(例如旋转膜过滤系统)和氯化铵-钾(ACK)缓冲液分离所述PBMC;(d)通过离心洗涤所述PBMC;(e)任选地冷冻保存所述PBMC;(f)如果在步骤(e)中冷冻保存所述PBMC,则任选地使所述PBMC解冻;(g)使用膜过滤系统(例如旋转膜过滤系统)洗涤所述PBMC;(h)由所述PBMC制造所述细胞;以及(i)使用膜过滤系统(例如旋转膜过滤系统)洗涤所述细胞。在具体实施方案中,步骤(a)-(d)和(g)-(i)按顺序进行。在具体实施方案中,所述方法中的步骤(a)-(i)按顺序进行。

[0024] 在另一个实施方案中,本文提供了一种由来自受试者的外周血单核细胞(PBMC)制造表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞(CAR T细胞)的方法,其中从所述受试者获得血液样品,所述方法包括以下步骤:(a)从所述血液样品获得PBMC;(b)使用膜过滤系统和氯化铵-钾(ACK)缓冲液分离已从所述血液样品获得的PBMC;(c)通过离心洗涤所述PBMC;(d)任选地冷冻保存所述PBMC;(e)任选地使在步骤(d)中冷冻保存的PBMC解冻;(f)使用膜过滤系统洗涤所述PBMC;(g)由来自步骤(f)的PBMC制造所述CAR T细胞;以及(h)使用膜过滤系统洗涤来自步骤(g)的CAR T细胞。在具体实施方案中,所述方法中的步骤(a)-(h)按顺序进行。

[0025] 在另一个实施方案中,本文提供了一种由来自受试者的外周血单核细胞(PBMC)制造表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞(CAR T细胞)的方法,其中从所述受试者获得血液样品,所述方法包括以下步骤:(a)分离已从来自所述受试者的血液样品获得的PBMC,其中所述分

离使用膜过滤系统和氯化铵-钾 (ACK) 缓冲液; (b) 通过离心洗涤所述PBMC; (c) 任选地冷冻保存所述PBMC; (d) 任选地使在步骤 (c) 中冷冻保存的PBMC解冻; (e) 使用膜过滤系统洗涤所述PBMC; (f) 由来自步骤 (f) 的PBMC制造所述CAR T细胞; 以及 (g) 使用膜过滤系统洗涤来自步骤 (f) 的CAR T细胞。在具体实施方案中, 所述方法中的步骤 (a) - (g) 按顺序进行。

[0026] 在另一个实施方案中, 本文提供了一种由来自受试者的血液样品中的外周血单核细胞 (PBMC) 制造细胞的方法, 所述方法包括以下步骤: (a) 使用膜过滤系统和氯化铵-钾 (ACK) 缓冲液从来自所述受试者的血液样品中分离PBMC, 其中所述血液样品是除去白细胞的血液样品或是来自抽血; (b) 任选地冷冻保存来自步骤 (a) 的PBMC; (c) 任选地使来自步骤 (b) 的PBMC解冻; (d) 使用膜过滤系统洗涤来自步骤 (c) 的解冻的PBMC; (e) 由来自步骤 (d) 的PBMC制造所述细胞; 以及 (f) 使用膜过滤系统洗涤来自步骤 (e) 的所述细胞。在具体实施方案中, 所述方法中的步骤 (a) - (f) 按顺序进行。在具体实施方案中, 所述细胞是表达嵌合抗原受体 (CAR) 的T细胞 (CAR T细胞)。

[0027] 在另一个实施方案中, 本文提供了一种由来自受试者的血液样品中的外周血单核细胞 (PBMC) 制造细胞的方法, 所述方法包括以下步骤: (a) 使用膜过滤系统和氯化铵-钾 (ACK) 缓冲液从来自所述受试者的血液样品中分离PBMC, 其中所述血液样品是除去白细胞的血液样品或是来自抽血; (b) 冷冻保存来自步骤 (a) 的PBMC; (c) 使来自步骤 (b) 的PBMC解冻; (d) 使用膜过滤系统洗涤来自步骤 (c) 的解冻的PBMC; (e) 由来自步骤 (d) 的PBMC制造所述细胞; 以及 (f) 使用膜过滤系统洗涤来自步骤 (e) 的所述细胞。在具体实施方案中, 所述方法中的步骤 (a) - (f) 按顺序进行。在具体实施方案中, 所述细胞是表达嵌合抗原受体 (CAR) 的T细胞 (CAR T细胞)。

[0028] 在另一个实施方案中, 本文提供了一种由来自受试者的血液样品中的外周血单核细胞 (PBMC) 制造细胞的方法, 所述方法包括以下步骤: (a) 使用膜过滤系统和氯化铵-钾 (ACK) 缓冲液从来自所述受试者的血液样品中分离PBMC; (b) 任选地将来自步骤 (a) 的PBMC冷冻保存并解冻; (c) 任选地使用膜过滤系统洗涤来自步骤 (b) 的解冻的PBMC; (d) 由所述PBMC制造所述细胞; 以及 (e) 使用膜过滤系统洗涤所述细胞。在具体实施方案中, 所述血液样品是除去白细胞的血液样品。在具体实施方案中, 所述方法中的步骤 (a) - (e) 按顺序进行。

[0029] 在另一个实施方案中, 本文提供了一种由来自受试者的血液样品中的外周血单核细胞 (PBMC) 制造细胞的方法, 所述方法包括以下步骤: (a) 使用膜过滤系统和氯化铵-钾 (ACK) 缓冲液从来自所述受试者的血液样品中分离PBMC; (b) 将来自步骤 (a) 的PBMC冷冻保存并解冻; (c) 使用膜过滤系统洗涤来自步骤 (b) 的解冻的PBMC; (d) 由所述PBMC制造所述细胞; 以及 (e) 使用膜过滤系统洗涤所述细胞。在具体实施方案中, 所述血液样品是除去白细胞的血液样品。在具体实施方案中, 所述方法中的步骤 (a) - (e) 按顺序进行。

[0030] 在具体实施方案中, 本文提供了一种制备来自受试者的外周血单核细胞 (PBMC) 的方法, 其中从所述受试者获得血液样品以用于制造表达嵌合抗原受体 (CAR) 的T细胞 (CAR T细胞), 所述方法包括以下步骤: (a) 从所述血液样品获得血细胞, 例如使用白细胞去除术或抽血以获得外周血单核细胞 (PBMC); (b) 任选地冷冻所述血细胞并在解冻后获得所述PBMC, 或者任选地获得并冷冻所述PBMC, 随后在后续步骤之前解冻; (c) 使用膜过滤系统 (例如旋转膜过滤系统) 和氯化铵-钾 (ACK) 缓冲液分离所述PBMC; (d) 通过离心洗涤所述PBMC; (e) 任

选地冷冻保存所述PBMC；(f) 如果在步骤(e)中冷冻保存所述PBMC，则任选地使所述PBMC解冻；以及(g) 使用膜过滤系统(例如旋转膜过滤系统)洗涤所述PBMC。在具体实施方案中，步骤(a) - (d)按顺序进行。在具体实施方案中，所述方法中的步骤(a) - (g)按顺序进行。

[0031] 在另一个实施方案中，本文提供了一种制备来自受试者的外周血单核细胞(PBMC)的方法，其中从所述受试者获得血液样品以用于制造表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞(CAR T细胞)，所述方法包括以下步骤：(a) 从所述血液样品获得PBMC；(b) 使用膜过滤系统和氯化铵-钾(ACK)缓冲液分离已从所述血液样品获得的PBMC；(c) 通过离心洗涤所述PBMC；(d) 任选地冷冻保存所述PBMC；(e) 任选地使在步骤(d)中冷冻保存的PBMC解冻；以及(f) 使用膜过滤系统洗涤所述PBMC。在具体实施方案中，所述方法中的步骤(a) - (f)按顺序进行。

[0032] 在另一个实施方案中，本文提供了一种制备来自受试者的外周血单核细胞(PBMC)的方法，其中从所述受试者获得血液样品以用于制造表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞(CAR T细胞)，所述方法包括以下步骤：(a) 分离已从来自所述受试者的血液样品获得的PBMC，其中所述分离使用膜过滤系统和氯化铵-钾(ACK)缓冲液；(b) 通过离心洗涤所述PBMC；(c) 任选地冷冻保存所述PBMC；(d) 任选地使在步骤(c)中冷冻保存的PBMC解冻；以及(e) 使用膜过滤系统洗涤所述PBMC。在具体实施方案中，所述方法中的步骤(a) - (e)按顺序进行。

[0033] 在另一个实施方案中，本文提供了一种制备来自受试者的外周血单核细胞(PBMC)的方法，其中从所述受试者获得血液样品以用于制造表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞(CAR T细胞)，所述方法包括以下步骤：(a) 使用膜过滤系统和氯化铵-钾(ACK)缓冲液从来自所述受试者的血液样品中分离PBMC，其中所述血液样品是除去白细胞的血液样品或是来自抽血；(b) 任选地冷冻保存来自步骤(a)的PBMC；(c) 任选地使来自步骤(b)的PBMC解冻；以及(d) 使用膜过滤系统洗涤来自步骤(c)的解冻的PBMC。在具体实施方案中，所述方法中的步骤(a) - (d)按顺序进行。

[0034] 在另一个实施方案中，本文提供了一种制备来自受试者的外周血单核细胞(PBMC)的方法，其中从所述受试者获得血液样品以用于制造表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞(CAR T细胞)，所述方法包括以下步骤：(a) 使用膜过滤系统和氯化铵-钾(ACK)缓冲液从来自所述受试者的血液样品中分离PBMC，其中所述血液样品是除去白细胞的血液样品或是来自抽血；(b) 冷冻保存来自步骤(a)的PBMC；(c) 使来自步骤(b)的PBMC解冻；以及(d) 使用膜过滤系统洗涤来自步骤(c)的解冻的PBMC。在具体实施方案中，所述方法中的步骤(a) - (d)按顺序进行。

[0035] 在另一个实施方案中，本文提供了一种制备来自受试者的外周血单核细胞(PBMC)的方法，其中从所述受试者获得血液样品以用于制造表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞(CAR T细胞)，所述方法包括以下步骤：(a) 使用膜过滤系统和氯化铵-钾(ACK)缓冲液从来自所述受试者的血液样品中分离外周血单核细胞(PBMC)；(b) 任选地将来自步骤(a)的PBMC冷冻保存并解冻；以及(c) 任选地使用膜过滤系统洗涤来自步骤(b)的解冻的PBMC。在具体实施方案中，所述血液样品是除去白细胞的血液样品。在具体实施方案中，所述方法中的步骤(a) - (c)按顺序进行。

[0036] 在另一个实施方案中，本文提供了一种制备来自受试者的外周血单核细胞(PBMC)的方法，其中从所述受试者获得血液样品以用于制造表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞(CAR T细胞)，所述方法包括以下步骤：(a) 使用膜过滤系统和氯化铵-钾(ACK)缓冲液从来自所述

受试者的血液样品中分离外周血单核细胞 (PBMC) ; (b) 将来自步骤 (a) 的 PBMC 冷冻保存并解冻; 以及 (c) 使用膜过滤系统洗涤来自步骤 (b) 的解冻的 PBMC。在具体实施方案中, 所述血液样品是除去白细胞的血液样品。在具体实施方案中, 所述方法中的步骤 (a) - (c) 按顺序进行。

[0037] 对于任何上述实施方案, 在配制于溶液之前, 可从 PBMC 中分离出 T 细胞、NK 细胞或树突细胞。在更具体的实施方案中, 任何上述方法的细胞是表达嵌合抗原受体的 T 细胞 (CAR T 细胞)。对于 T 细胞, 可将用抗 CD3、抗 CD4 或抗 CD8 抗体包被的磁珠 (如 Dynabeads) 用于 T 细胞分离。

[0038] 下文更详细地讨论制造工艺的各个方面。

[0039] 4.2. 冷冻保存

[0040] 可冷冻保存本文所述的经历细胞制造工艺 (例如 CAR T 细胞制造工艺) 的 PBMC 或细胞 (例如 T 细胞)。如本文所用, “冷冻保存” 是指通过冷却至低于零温度, 例如至大约或恰好低于液氮的沸点或  $-196^{\circ}\text{C}$  的温度来保存细胞。冷冻保护剂优选地在低于零的温度下使用, 以防止所保存的细胞由于在低温下冷冻或升温至室温而受到损害。可使用的冷冻保护剂包括但不限于二甲基亚砜 (DMSO) (Lovelock 和 Bishop, *Nature*, 1959; 183: 1394-1395; Ashwood-Smith, *Nature*, 1961; 190: 1204-1205)、甘油、聚乙烯吡咯烷 (Rinfret, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1960; 85: 576) 和聚乙二醇 (Sloviter and Ravdin, *Nature*, 1962; 196: 48)。优选的冷却速率是每分钟约  $1^{\circ}\text{C}$  至  $3^{\circ}\text{C}$ 。至少两个小时后, T 细胞达到了  $-80^{\circ}\text{C}$  的温度, 并且可直接置于液氮 ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) 中用于永久储存, 如储存于长期低温储存容器中。

[0041] 4.3. 培养开始和刺激

[0042] T 细胞 (例如未修饰的 T 细胞或表达 CD3 和 CD28 的 T 细胞或包含含有 CD3 $\zeta$  信号传导结构域和 CD28 共刺激结构域的多肽的 T 细胞) 可使用针对 CD3 和 CD28 的抗体, 例如附着于珠粒的抗体进行扩增; 参见例如美国专利号 5, 948, 893; 6, 534, 055; 6, 352, 694; 6, 692, 964; 6, 887, 466; 和 6, 905, 681。用抗 CD3 和抗 CD28 抗体包被的磁珠 (如 Dynabeads) 可用于 T 细胞扩增。

[0043] 4.4. 嵌合抗原受体

[0044] 在某些实施方案中, 在执行本文描述的方法期间产生的 PBMC (例如免疫细胞, 更具体地, T 细胞) 在其表面上表达一种或多种嵌合抗原受体 (CAR)。通常, CAR 包含来自第一蛋白 (例如, 抗原结合蛋白) 的细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域 (例如, 初级信号传导结构域和任选的一个或多个共刺激结构域)。在优选的实施方案中, 一旦细胞外结构域结合至靶蛋白如肿瘤相关抗原 (TAA) 或肿瘤特异性抗原 (TSA), 则经由细胞内信号传导结构域产生信号, 所述信号活化免疫细胞, 例如靶向并杀死表达靶蛋白的细胞。

[0045] 细胞外结构域: CAR 的细胞外结构域结合至目标抗原。在某些实施方案中, CAR 的细胞外结构域包含结合至所述抗原的受体或受体的一部分。在某些实施方案中, 细胞外结构域包含或是抗体或其抗原结合部分。在具体实施方案中, 细胞外结构域包含或是单链 Fv (scFv) 结构域。单链 Fv 结构域可包含例如, 通过柔性接头连接至  $V_L$  的  $V_H$ , 其中所述  $V_L$  和  $V_H$  来自结合所述抗原的抗体。

[0046] 在某些实施方案中, 由本文所述的多肽的细胞外结构域识别的抗原是肿瘤相关抗原 (TAA) 或肿瘤特异性抗原 (TSA)。在各种具体实施方案中, 肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗

原是但不限于Her2、前列腺干细胞抗原 (PSCA)、甲胎蛋白 (AFP)、癌胚抗原 (CEA)、癌抗原125 (CA-125)、CA19-9、钙网膜蛋白、MUC-1、B细胞成熟抗原 (BCMA)、上皮膜蛋白 (EMA)、上皮肿瘤抗原 (ETA)、酪氨酸酶、黑素瘤24相关抗原 (MAGE)、CD19、CD22、CD27、CD30、CD34、CD45、CD70、CD99、CD117、EGFRvIII (表皮生长因子变体III)、间皮素、PAP (前列腺酸磷酸酶)、前列腺素、TARP (T细胞受体  $\gamma$  交替阅读框蛋白)、Trp-p8、STEAPI (前列腺六跨膜上皮抗原1)、嗜铬粒蛋白、细胞角蛋白、结蛋白、胶质原纤维酸性蛋白 (GFAP)、总胆囊疾病液蛋白 (GCDFP-15)、HMB-45抗原、蛋白质melan-A (由T淋巴细胞识别的黑素瘤抗原; MART-I)、myo-D1、肌肉特异性肌动蛋白 (MSA)、神经丝、神经元特异性烯醇化酶 (NSE)、胎盘碱性磷酸酶、突触素、甲状腺球蛋白、甲状腺转录因子-1、丙酮酸激酶同工酶M2型 (肿瘤M2-PK) 的二聚体形式、异常ras蛋白或异常p53蛋白。在某些其他实施方案中,由CAR的细胞外结构域识别的TAA或TSA是整联蛋白 $\alpha$ v $\beta$ 3 (CD61)、泌乳激素或Ral-B。

[0047] 在某些实施方案中,由CAR的细胞外结构域识别的TAA或TSA是癌症/睾丸 (CT) 抗原,例如, BAGE、CAGE、CTAGE、FATE、GAGE、HCA661、HOM- TES- 85、MAGEA、MAGEB、MAGEC、NA88、NY-ES0-1、NY-SAR-35、OY- TES-1、SPANXBI、SPA17、SSX、SYCPI或TPTE。

[0048] 在某些其他实施方案中,由CAR的细胞外结构域识别的TAA或TSA是碳水化合物或神经节苷脂,例如fuc-GMI、GM2 (癌胚抗原-免疫原性-1; OFA-I-1); GD2 (OFA-I-2)、GM3、GD3等。

[0049] 在某些其他实施方案中,由CAR的细胞外结构域识别的TAA或TSA是 $\alpha$ -肌动蛋白-4、Bage-1、BCR-ABL、Bcr-Ab1融合蛋白、 $\beta$ -连环蛋白、CA 125、CA 15-3 (CA 27.29\BCAA)、CA 195、CA 242、CA-50、CAM43、Casp-8、cdc27、cdk4、cdkn2a、CEA、coa-1、dek-can融合蛋白、EBNA、EF2、爱泼斯坦巴尔病毒抗原、ETV6-AML1融合蛋白、HLA-A2、HLA-A11、hsp70-2、KIAA0205、Mart2、Mum-1、2和3、neo-PAP、I类肌球蛋白、OS-9、pml-RAR $\alpha$ 融合蛋白、PTPRK、K-ras、N-ras、磷酸丙糖异构酶、Gage 3、4、5、6、7、GnTV、Herv-K-mel、Lage-1、NA-88、NY-Eso-1/Lage-2、SP17、SSX-2、TRP2-Int2、gp100 (Pmel17)、酪氨酸酶、TRP-1、TRP-2、MAGE-1、MAGE-3、RAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15 (58)、RAGE、SCP-1、Hom/Mel-40、PRAME、p53、HRas、HER-2/neu、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、人乳头瘤病毒 (HPV) 抗原E6和E7、TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、PSA、TAG-72-4、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、13-连环蛋白、Mum-1、p16、TAGE、PSMA、CT7、端粒酶、43-9F、5T4、791Tgp72、13HCG、BCA225、BTAA、CD68\KP1、C0-029、FGF-5、G250、Ga733、(EpCAM)、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB\70K、NY-C0-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90、TAAL6、TAG72、TLP或TPS。

[0050] 在具体实施方案中,肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原是AML相关肿瘤抗原,如S. Anguille等人, Leukemia (2012), 26, 2186-2196中所述。

[0051] 其他肿瘤相关抗原和肿瘤特异性抗原是本领域技术人员已知的。

[0052] 在抗原为BCMA的具体实施方案中,嵌合抗原受体是BCMA02 (参见Chekmasova等人, Blood 126:3094 (2015))。在更具体的实施方案中,表达BCMA02的CAR T细胞是bb2121或bb21217。

[0053] 可用于构建嵌合抗原受体的结合至TSA和TAA的受体、抗体和scFv是本领域中已知的,编码它们的核苷酸序列也是本领域中已知的。

[0054] 在某些具体实施方案中,由嵌合抗原受体的细胞外结构域识别的抗原是通常不被认为是TSA或TAA的抗原,但其仍然与肿瘤细胞或由肿瘤引起的损伤相关。在某些实施方案中,例如,抗原是例如生长因子、细胞因子或白细胞介素,例如与血管生成或血管发生相关的生长因子、细胞因子或白细胞介素。此类生长因子、细胞因子或白细胞介素可包括例如血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、血小板源性生长因子(PDGF)、肝细胞生长因子(HGF)、胰岛素样生长因子(IGF)或白细胞介素8(IL-8)。肿瘤还可产生肿瘤局部的低氧环境。如此,在其他具体实施方案中,抗原是缺氧相关因子,例如,HIF-1 $\alpha$ 、HIF-1 $\beta$ 、HIF-2 $\alpha$ 、HIF-2 $\beta$ 、HIF-3 $\alpha$ 或HIF-3 $\beta$ 。肿瘤还可对正常组织造成局部损伤,从而导致称为损伤相关分子模式分子(DAMP;也称为警报素)的分子的释放。因此,在某些其他具体实施方案中,抗原是DAMP,例如热休克蛋白、染色质相关蛋白高迁移率族盒1(HMGB 1)、S100A8(MRP8,钙粒蛋白A)、S100A9(MRP14,钙粒蛋白B)、血清淀粉样蛋白A(SAA),或者可以是脱氧核糖核酸、三磷酸腺苷、尿酸或硫酸肝素。

[0055] 跨膜结构域:在某些实施方案中,CAR的细胞外结构域通过接头、间隔区或铰链多肽序列(例如,来自CD28的序列或来自CTLA4的序列)连接至多肽的跨膜结构域。跨膜结构域可获自或源自任何跨膜蛋白的跨膜结构域,并且可包括这种跨膜结构域的全部或部分。在具体实施方案中,跨膜结构域可获自或源自例如CD8、CD16、细胞因子受体和白细胞介素受体或生长因子受体等。

[0056] 细胞内信号传导域:在某些实施方案中,CAR的细胞内结构域是或包含在T细胞表面上或邻近T细胞表面表达并触发所述T细胞的活化和/或增殖的蛋白质的细胞内结构域或基序。这种结构域或基序能够响应于抗原与CAR细胞外部分的结合而传递活化T淋巴细胞所必需的初级抗原结合信号。通常,此结构域或基序包含或为ITAM(基于免疫受体酪氨酸的活化基序)。适合于CAR的含ITAM多肽包括例如 $\zeta$ -CD3链(CD3 $\zeta$ )或其含ITAM部分。在具体实施方案中,细胞内结构域是或包含CD3 $\zeta$ 细胞内信号传导结构域;CD3 $\zeta$ 细胞内信号传导结构域可被称为初级信号传导结构域。在其他具体实施方案中,细胞内结构域(初级信号传导结构域)来自淋巴细胞受体链、TCR/CD3复合蛋白、Fc受体亚基或IL-2受体亚基。

[0057] 在某些实施方案中,CAR另外包含一个或多个共刺激结构域或基序,例如作为多肽的细胞内结构域的一部分。一个或多个共刺激结构域或基序可以是或可包含共刺激CD27多肽序列或结构域、共刺激CD28多肽序列或结构域、共刺激OX40(CD134)多肽序列或结构域、共刺激4-1BB(CD137)多肽序列或结构域或共刺激诱导型T细胞共刺激(ICOS)多肽序列或结构域或其他共刺激结构域或基序或它们的任何组合中的一者或多者。

[0058] CAR也可包含T细胞存活基序。T细胞存活基序可以是在由抗原刺激后促进T淋巴细胞存活的任何多肽序列或基序。在某些实施方案中,T细胞存活基序是或源自CD3、CD28、IL-7受体(IL-7R)的细胞内信号传导结构域、IL-12受体的细胞内信号传导结构域、IL-15受体的细胞内信号传导结构域、IL-21受体的细胞内信号传导结构域或转化生长因子 $\beta$ (TGF $\beta$ )受体的细胞内信号传导结构域。

[0059] 4.5. T细胞(T淋巴细胞)

[0060] 通过本文提供的方法产生的T细胞可以是初始T淋巴细胞或MHC限制性T淋巴细胞。在某些实施方案中,T淋巴细胞是肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)。在某些实施方案中,T细胞是细胞毒性T细胞(细胞毒性T淋巴细胞或CTL)、CD4+T细胞、CD8+T细胞、T效应(T<sub>EFF</sub>)细胞或T中

心记忆( $T_{CM}$ )细胞。

[0061] T细胞可以是NKT细胞(自然杀伤T细胞),其是指CD1d限制性T细胞,其表达T细胞受体(TCR)。与检测由常规主要组织相容性(MHC)分子呈递的肽抗原的常规T细胞不同,NKT细胞识别由非经典MHC分子CD1d呈递的脂质抗原。当前识别出两种类型的NKT细胞。不变或I型NKT细胞表达的TCR谱非常有限-与有限范围的 $\beta$ 链(人中的V $\beta$ 11)相关的典型 $\alpha$ 链(人中的V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18)。第二NKT细胞群体(称为非经典或非不变II型NKT细胞)展示更异质的TCR $\alpha\beta$ 用法。可通过以下标志物中的至少一者或多者的表达来鉴定适应性或不变(I型)NKT细胞:TCR V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18、V $\beta$ 11、CD1d、CD3、CD4、CD8、 $\alpha$ GalCer、CD161和/或CD56。

[0062] 通过本文描述的方法产生的T细胞可以是遗传修饰的T细胞,例如可进行修饰以表达多肽,如T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR),例如,上文第4.4节中描述的CAR中的一种。经修饰的免疫细胞(例如T细胞)优选对于待向其施用经修饰的免疫细胞的个体是自体的。在某些其他实施方案中,经修饰的免疫细胞对于待向其施用经修饰的免疫细胞的个体是同种异体的。当使用同种异体T细胞来制备经修饰的T细胞时,优选选择将降低个体中移植抗宿主病(GVHD)的可能性的T细胞。例如,在某些实施方案中,选择病毒特异性T细胞用于制备经修饰的T细胞;将预期此类T细胞结合至任何受体抗原并且因此被任何受体抗原活化的天然能力大大降低。在某些实施方案中,可通过向宿主共同施用一种或多种免疫抑制剂,例如环孢霉素、他克莫司、西罗莫司、环磷酰胺等来减少同种异体T细胞的受体介导的排斥。

[0063] 经修饰的免疫细胞,例如经修饰的T细胞可任选地包含在需要时能够杀死基本上所有经修饰的免疫细胞的“自杀基因”或“安全开关”。例如,在某些实施方案中,经修饰的T细胞可包含HSV胸苷激酶基因(HSV-TK),其在与更昔洛韦接触后引起经修饰的T细胞死亡。在另一个实施方案中,经修饰的T细胞包含诱导型半胱天冬酶,例如诱导型半胱天冬酶9(iCaspase9),例如半胱天冬酶9与人FK506结合蛋白之间的融合蛋白,从而允许使用特定的小分子药物进行二聚化。参见Straathof等人,Blood 105(11):4247-4254(2005)。

[0064] 4.6. CAR T细胞的制造

[0065] 在某些实施方案中,可使用本文描述的任何方法将任何CAR引入本文所描述的任何细胞中。在具体实施方案中,所述方法包括:活化所述细胞(例如T细胞),扩增所述细胞,使用编码CAR的载体(例如慢病毒载体)转导所述细胞。在具体实施方案中,使用抗CD3和抗CD28抗体活化所述细胞(例如T细胞)。在具体实施方案中,抗CD3和抗CD28抗体通过与内源性抗原呈递细胞(如单核细胞和树突细胞)上的Fc受体结合而被固定。在具体实施方案中,使用静电袋扩增所述细胞(例如T细胞),和/或使用WAVE生物反应器(GE Healthcare Life Sciences)扩增。

[0066] 4.7. 树突细胞

[0067] 通过本文公开的方法产生的树突细胞(DC)可如下鉴定。在其未成熟状态下,DC的特征可在于低水平的MHC蛋白和B7共刺激分子和进行吞噬作用和胞饮作用的能力以及不存在表面分子CD83和CD25。在成熟状态下,它们的特征可在于细胞表面蛋白的模式改变,其中一些或所有以下分子的表面表达增加:CD25、CD40、CD70、CD80、CD83、CD86和MHC蛋白。“成熟”DC与“未成熟”DC的不同之处在于,前者在免疫刺激方面更具活性,通常保留在体内迁移到引流淋巴结中的能力,并且在MHC背景下呈递越来越多的内源性表达和外源性抗原。在生

理条件下,只有“成熟”的DC才能活化初始T细胞。

#### [0068] 4.8. 自然杀伤细胞

[0069] 通过本文提供的方法产生的自然杀伤(NK)细胞可通过CD56或CD16的表达和不存在T细胞受体(CD3)来定义。NK细胞可以是“适应性NK细胞”或“记忆NK细胞”,所述术语是可互换的,并且是指在表型上为CD3<sup>-</sup>和CD56<sup>+</sup>、表达NKG2C和CD57并且任选地表达CD16但缺乏以下中的一者或多者的表达的NK细胞亚群:PLZF、SYK、FceR $\gamma$ 和EAT-2。通过本文提供的方法产生的分离的CD56<sup>+</sup>NK细胞亚群可包含CD16、NKG2C、CD57、NKG2D、NCR配体、NKp30、NKp40、NKp46、活化和/或抑制性KIR、NKG2A和DNAM-1的表达。CD56<sup>+</sup>可以是暗或亮的表达。通过本文描述的方法产生的NK细胞可以是遗传修饰的NK细胞,例如可进行修饰以表达多肽,如T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)。

#### [0070] 4.9. 表达载体和细胞转导

[0071] 通常,将表达嵌合抗原受体的多核苷酸序列携带到多核苷酸载体中的细胞(例如,T细胞或NK细胞)中。来源于逆转录病毒(诸如慢病毒)的载体是适于实现长期基因转移的工具,因为它们允许转基因及其子代长期稳定地整合在子细胞中。编码CAR的天然或合成核酸的表达可通过将编码CAR多肽或其部分的核酸可操作地连接至启动子并将构建体并入适合在真核细胞(例如T细胞)中表达的表达载体中来实现。

[0072] 表达载体通常可以病毒载体的形式提供给细胞。病毒载体技术在本领域中是熟知的,并且描述于例如Sambrook等人(2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)和其他病毒学和分子生物学手册中。可用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒、慢病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒I等。参见例如,美国专利号5,350,674和5,585,362。

[0073] 一般来讲,合适的载体含有在至少一种生物体中发挥功能的复制起点、启动子序列、便利的限制核酸内切酶位点以及一种或多种选择性标记物(例如WO 01/96584; WO 01/29058; 以及美国专利号6,326,193)。

[0074] 多种基于病毒的系统已经被开发用于将基因转移到哺乳动物细胞中。例如,可使用本领域已知的技术将选择的基因插入载体中并包装在逆转录病毒颗粒中。然后可分离重组病毒并离体递送至受试者的细胞。或者,可使用腺病毒载体。

[0075] 载体可包含启动子和任选的一个或多个启动子元件(例如增强子),调控转录起始的频率。通常,这些启动子位于起始位点上游30-110bp区域中,不过许多启动子最近已被证明也含有起始位点下游的功能元件。启动子元件之间的间隔经常是灵活的,使得当元件相对于彼此反转或移动时保留启动子功能。在胸苷激酶(tk)启动子中,例如,在活性开始下降之前,启动子元件之间的间隔可增加到相隔50bp。立即早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列可用于驱动CAR的表达。这种启动子序列是强大的组成型启动子序列,其能够驱动任何与其可操作地连接的多核苷酸序列的高水平表达。合适的启动子的另一个实例是伸长生长因子-1 $\alpha$ (EF-1 $\alpha$ )。然而,也可使用其他组成型启动子序列,包括但不限于猿猴病毒40(SV40)早期启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)、人类免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复序列(LTR)启动子、MoMuLV启动子、禽白血病病毒启动子、爱泼斯坦-巴尔(Epstein-Barr)病毒立即早期启动子、劳氏(Rous)肉瘤病毒启动子以及人类基因启动子,诸如但不限于肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、血红蛋白启动子以及肌酸激酶启动子。此外,本发明不应该被局限于使用组成

型启动子。还可使用诱导型启动子,包括但不限于金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、黄体酮启动子以及四环素启动子。

[0076] 为了评估CAR T细胞上CAR多肽的表达,待引入到细胞中的表达载体也可含有选择性标记物基因或报告基因或两者,以便有助于从试图通过病毒载体转染或感染的细胞群体中鉴定和选择表达细胞。选择性标记物可携带在单独多核苷酸上,并且与编码CAR的载体一起共转染到T细胞中。选择性标记和报告基因可侧接适当的调控序列,以使得在宿主细胞中能够表达。有用的选择性标记物包括例如抗生素抗性基因,诸如neo等。

[0077] 报告基因可用于鉴定潜在被转染的细胞并用于评价调控序列的功能性。一般来说,报告基因是不存在于接受体生物体或组织中或不由所述接受体生物体或组织表达并且编码通过一些易于检测的性质(例如,酶活性)显现表达的多肽的基因。在编码报告基因的多核苷酸已被引入到接受体细胞中后合适的时间,测定所述报告基因的表达。合适的报告基因可包括编码荧光素酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、分泌型碱性磷酸酶的基因或绿色荧光蛋白基因(例如,Ui-Tei等人,2000FEBS Letters 479:79-82)。合适的表达系统是熟知的,并且可使用已知的技术来制备或商购获得。一般来说,具有显示报告基因的最高水平表达的最小5'侧翼区的构建体被鉴定为启动子。这样的启动子区域可连接至报告基因,并用于评估剂调节启动子驱动的转录的能力。

[0078] 在真核细胞(例如T细胞)中引入和表达基因的方法是本领域已知的。在表达载体的情况下,可通过本领域中已知的任何方法将载体容易地引入T细胞中。用于将多核苷酸(例如编码CAR的载体)引入到宿主细胞中的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂质转染、粒子轰击、显微注射、电穿孔等。用于产生包含载体和/或外源核酸的细胞的方法是本领域众所周知的。参见例如,Sambrook等人(2001,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,New York)。用于将多核苷酸引入到宿主细胞中的优选的方法是磷酸钙转染。

[0079] 5. 实施例

[0080] 5.1. 实施例1:改进的制造CAR-T细胞的工艺

[0081] 5.1.1. 基线工艺

[0082] 针对表达BCMA定向嵌合抗原受体(CAR)的T细胞,开发了基线CAR T细胞制造工艺(参见Hollyman等人,J. Immunother. 2009,32:169-180)。最初使用小规模、基于T烧瓶的工艺开发并优化制造工艺参数,如PBMC分离、T细胞活化、转导和扩增。一旦建立并优化了工艺参数,就可扩大工艺规模以用于临床制造。所述工艺始于白细胞去除术,然后通过使用细胞回收器5+(CS5+;Haemonetics,Braintree,Massachusetts)进行密度梯度离心分离外周血单核细胞(PBMC);使用所得PBMC在TCGM-HABS培养基(T细胞生长培养基,其包含X-VIVO-15™化学成分确定的造血细胞培养基(Lonza,Basel,Switzerland)而无酚红,补充有5%v/v人AB血清2mM GlutaMAX™(Gibco)、10mM HEPES(4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸(Thermo Fisher Scientific)和300IU/mL重组人白细胞介素-2(rhIL2))中的分批离心培养进行培养前洗涤。还测试了进一步补充有1%丙酮酸钠和1%最低必需维生素的相同培养基,并且发现在八天内导致相同数量的群体倍增。为简单起见,选择了TCGM-HABS用于所述工艺。与另外的培养基比较后,使rhIL2的浓度从300IU/mL降低至100IU/mL。

[0083] 然后,使用可溶性抗CD3和抗CD28抗体活化PBMC中的T细胞,所述抗体通过与内源

性抗原呈递细胞(如单核细胞和树突细胞)上的Fc受体结合而被固定。通过确定细胞的大小来证实T细胞的活化;静息T细胞的体积为约180-200fL,而强烈活化的T细胞的大小则增加至>500fL。活化步骤之后是在静电袋中扩增,然后在WAVE生物反应器(GE Healthcare Life Sciences)中扩增。扩增之后是用编码靶向BCMA的CAR的慢病毒载体转导扩增的T细胞。基于利用0.625至40的感染复数范围并监测群体倍增、细胞大小和抗BCMA CAR的表达的研究,将10-30MOI的范围用于基础临床制造工艺。收获所得细胞,并在收获后使用CD5+装置洗涤。

[0084] 然而,从白细胞去除术至T细胞活化的基线工艺中的初始步骤需要一些劳动密集型步骤,尤其是对初始PBMC分离和密度梯度离心依赖性洗涤进行了改进,以提高效率。

[0085] 5.1.2.改进的工艺

[0086] T细胞制造工艺的一致性生产CAR T细胞药物产品一致性的关键。为此,通过用LOVO-ACK分离步骤、LOVO培养开始前洗涤和最终LOVO洗涤步骤代替基线工艺的CS5+装置依赖性步骤来寻求改进基线工艺。

[0087] LOVO-ACK PBMC分离过程包括依次执行的两个步骤:使用LOVO自动化细胞加工系统(Fresenius Kabi, Lake Zurich, Illinois;在本文中称为“LOVO”)进行洗涤,然后进行ACK(氯化铵-钾)裂解缓冲液孵育。ACK缓冲液是在水中(例如去离子水)中的150mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、10mM  $\text{KHCO}_3$ 和0.1mM EDTA钠。LOVO洗涤步骤使用LOVO自动化细胞加工系统,所述系统的特征是旋转膜过滤系统,所述旋转膜过滤系统被设计为有效除去血小板和细胞碎片、同时将PBMC群体保留在起始白细胞去除术材料中。洗涤步骤在密闭的预先灭菌的单个使用LOVO一次性使用试剂盒内进行,所述试剂盒的特征是细胞分离装置(旋转膜过滤系统)以帮助除去血小板、细胞碎片和血浆。

[0088] LOVO洗涤步骤后,将ACK缓冲液添加至剩余的细胞悬浮液中以裂解红细胞。这一步骤在具有由聚氯乙烯组成的细胞接触表面的转移袋中进行。然后从ACK缓冲溶液中分离出RBC耗竭的PBMC,并通过离心进行洗涤。

[0089] 然后任选地使用标准冷冻保存技术和控制速率冷冻将分离且洗涤过的PBMC冷冻保存(如果要在使用前运输)。在随后使用之前,立即将细胞在37°浴中解冻。在三个测试批次中,冷冻保存的细胞产生了足够数量的T细胞,并且在CAR T制造之后,产生了足够数量CAR+T细胞。

	<b>PBMC 批次</b>	<b>所制造的T细胞总数</b>	<b>CAR+ %</b>	<b>CAR + T 细胞总数</b>
[0090]	3101	$1.32 \times 10^{10}$	29.4%	$3.88 \times 10^9$
	3167	$6.05 \times 10^9$	22.5%	$1.36 \times 10^9$
	3219	$5.76 \times 10^9$	23.8%	$1.37 \times 10^9$

[0091] 解冻后,PBMC经历细胞培养过程,所述过程包括培养开始和用抗CD3和抗CD28抗体刺激(第0天);用携带抗BCMA嵌合抗原受体的编码序列的慢病毒载体转导T细胞(第1天);在透气性细胞培养袋中进行细胞计数和重新接种(第2-5天);在WAVE™生物反应器中进行细胞计数和重新接种(第6-9天);然后收获细胞,并使用LOVO装置进行最终洗涤(第10天)。

[0092] 因此,改进的LOVO-ACK工艺的最终步骤如下:

[0093] a. 白细胞去除术;

[0094] b. LOVO-ACK PBMC分离;

- [0095] c.通过离心洗涤PBMC;
- [0096] d.PBMC冷冻保存(如果要运输);
- [0097] e.PBMC解冻(如果已运输);
- [0098] f.使用LOVO进行PBMC洗涤
- [0099] g.T细胞活化、扩增和细胞收获;
- [0100] h.使用LOVO洗涤。
- [0101] 改进的工艺具有以下优于基线工艺的优点:封闭的工艺步骤(降低污染的可能性);增强PBMC制备稳健性和可重复性;减少药物产品加工时间;以及降低总体工艺复杂性。
- [0102] 5.2.实施例2:改进的工艺优异性研究
- [0103] 基线分离工艺和LOVO-ACK分离工艺的比较
- [0104] 此实施例表明,对于一些参数,改进的工艺优于基线工艺。
- [0105] 对来自3位健康供体和2位多发性骨髓瘤(MM)受试者的白细胞除去术单元进行了将基线CS5+PBMC分离工艺与LOVO-ACK PBMC分离工艺进行比较的可行性研究。在使用基线工艺和LOVO ACK工艺进行并行PBMC分离后,将分离的PBMC冷冻保存,并使用相同的细胞培养、DP制剂和冷冻保存方法进行加工。如下文所概述,PBMC活力和表型组成、PBMC CD4+和CD8+T细胞亚群、细胞培养表征以及药物产品释放测试结果证明,LOVO-ACK分离工艺是CS5+PBMC分离程序的可行替代。
- [0106] PBMC分离和回收
- [0107] PBMC分离步骤旨在从白细胞去除术起始材料中除去红细胞(RBC)和血小板(PLT)。如表1所示,更新的PBMC分离方法产生更广泛且一致的红细胞(RBC)减少和血小板(PLT)耗竭,从而提高了用于细胞培养起始的PBMC的质量。
- [0108] 表1-变化前与变化后PBMC RBC/WBC和PLT/WBC的比较

供体批次	PBMC RBC 除去			PBMC PLT 除去		
	基线工 艺 (RBC/ WBC)	更新的工艺 (RBC/WBC)	变化前 至变化 后差异	基线 工艺 (PLT/ WBC)	更新的工艺 (PLT/WBC)	变化前至 变化后差 异
[0109] 1	4	1	-3	18	1	-17
2	5	2	-3	28	1	-27
3	4	2	-2	19	1	-18
4	4	2	-2	36	0	-36
5	2	1	-1	13	0	-13
平均值	4	2	-2	23	1	-22

- [0110] 值=总细胞的百分比
- [0111] 由于两种PBMC工艺使用不同的装置进行PBMC分离,因此已经评估并比较了从PBMC分离步骤获得的细胞产率。如表2所示,基线工艺和更新的工艺产量的PBMC回收率非常相

似,平均变化前至变化后差异为-2个百分点。

[0112] 表2-PBMC分离回收率的比较

供体批次	PBMC 分离回收率		
	基线工艺(%)	更新的工艺(%)	变化前至变化后差异
1	82	86	4
2	70	73	2
3	87	78	-9
4	61	59	-2
5	73	69	-4
平均值	75	73	-2

[0114] 因此,改进的工艺显示了PBMC分离和回收以及RBC除去;以及与基线工艺相比,优异的血小板除去。

[0115] 工艺中细胞培养表征-T细胞生长和峰值T细胞活化比较

[0116] 细胞培养表征结果呈现于表3种。从基线工艺和更新的工艺制造的T细胞展示可比的生长动力学,如由T细胞生长(T细胞生长的平均变化前至变化后差异为-1群体倍增)和活化谱(在细胞培养中平均变化前和变化后峰值活化日是相同的)的相似程度所证明。

[0117] 表3-细胞培养中的T细胞生长和峰值T细胞活化日

BCMA CAR T 细胞 批次	T 细胞生长 (收获时的 T 细胞 PDL)			峰值活化时间 (细胞培养中的日期)		
	基线工 艺	更新的工 艺	变化前 至变化 后差异	基线工 艺	更新的工 艺	变化前至 变化后差 异
1	8	7	-1	第3天	第3天	第0天
2	11	11	0	第4天	第4天	第0天
3	7	7	0	第5天	第4天	第-1天
4	9	8	-1	第4天	第4天	第0天
5	9	8	-1	第3天	第4天	第1天
平均值	9	8	-1	第4天	第4天	第0天

[0120] 工艺中药物产品表征结果-收获后洗涤回收率

[0121] 在第10天收获后,由于两种药物产品工艺对于洗涤步骤使用了不同的装置,因此已评估并比较了从收获后洗涤步骤获得的细胞产率。如表4所示,从更新的工艺产生的药物产品(CAR T细胞)的收获后洗涤回收率相对于基线工艺显著提高,观察到平均增加30个百

分点。

[0122] 表4-收获后洗涤回收率

PBMC 批次 ID	收获后洗涤回收率		
	基线工艺(%)	更新的工艺(%)	变化前至变化后差异
1	63	93	30
2	77	94	17
3	63	101*	38
4	71	97	26
5	52	88	36
平均值	65	95	30

[0124] \*由于测量误差,值超过100。

[0125] 因此,与基线工艺相比,改进的工艺显示出CAR T细胞的明显优异的回收率。

[0126] 5.3. 实施例3:改进的工艺可比性研究

[0127] 此实施例证明,关于其他参数,改进的工艺与基线工艺相当。

[0128] 对基线工艺和改进的PBMC分离工艺进行比较并确定产生等效的结果,如下所示。表5中概述了工艺变化条件。对于每个健康供体,将白细胞去除术单元均匀分给基线CS5+装置和更新的“LOVO-ACK”PBMC分离方法。PBMC分离步骤后,将PBMC批次冷冻保存或用于在不冷冻保存的情况下开始细胞培养。在开始细胞培养之前,通过分批离心或LOVO细胞加工装置洗涤PBMC。在整个细胞培养持续过程中都使用了透气性细胞培养袋。在第10天,用CS5+装置或LOVO细胞加工装置洗涤收获后的药物物质。将配制的药物产品冷冻保存在袋中进行非临床体内可比性评估和解冻后使用中稳定性测定,或冷冻保存在小瓶中进行体外可比性评估。

[0129] 表5-用于可比性评估的工艺变化条件

条件 ID	描述	工艺条件
[0130]		

		<b>工艺步骤： PBMC 制备</b>		<b>工艺步骤： 药物产品配制和 冷冻保存</b>	
		<b>操作： PBMC 分离：</b>	<b>操作： 细胞培养开始前洗涤</b>	<b>操作： 收获后洗涤</b>	
[0131]	<b>1</b>	<b>基线工艺</b>	使用 CS5+装置 的 Ficoll 密度离 心	分批离心	CS5+装置
	<b>2</b>	<b>更新的工艺</b>	LOVO-ACK 方 法	如果没有 PBMC 保 持步骤，则不适用 (LOVO-ACK 方法的一部 分) LOVO 细胞加工装置 ，如果有 PBMC 冷冻保 持步骤	LOVO 细胞加工 装置

[0132] 用五个健康供体白细胞除去术单元进行了可比性研究，从中产生了十个抗BCMA CAR T细胞批次(各自的方法前后变化)。

[0133] 将每个起始白细胞除去术单元分开并进行加工用于PBMC分离，其中基线工艺和更新的工艺并行进行。将五个PBMC批次中的三个冷冻保存，然后解冻并开始细胞培养，而剩余两个PBMC批次立即加工用于细胞培养而不冷冻。先前确立了在抗BCMA CAR T细胞制造过程中冷冻保存(PBMC保持步骤)和新鲜(无PBMC保持步骤)PBMC的可比性。细胞培养结束时，基线工艺和更新的工艺继续进行收获和药物产品加工步骤，从而并入了它们各自的细胞洗涤方法。根据如下所述的比较分析测试计划，对使用基线工艺和更新的工艺产生的工艺中(In-process)和冷冻保存的药物产品测试样品进行了评估。

[0134] 比较分析测试

[0135] PBMC活力比较的结果在表6中提供。没有活力的一致差异，平均变化前至变化后差异为+2个百分点。

[0136] 表6-变化前与变化后PBMC活力的比较

PBMC 批次	PBMC 活力		
	基线工艺(%)	改进的工艺(%)	变化前至变化 后差异
1	95	97	2
2	95	97	2

[0138] 表6-变化前与变化后PBMC活力的比较

PBMC 批次	PBMC 活力		
	基线工艺(%)	改进的工艺(%)	变化前至变化后差异
[0139] 3	97	97	0
4	95	96	1
5	95	96	1
平均值	95	97	2

[0140] PBMC组成比较

[0141] PBMC组成比较的结果分别在表7中针对CD45+白细胞、CD3+CD56-T细胞、CD14+单核细胞和在表8中针对CD19+B细胞、CD3-CD56+NK细胞和CD56-CD16+粒细胞提供。PBMC组成是可比的,因为CD45+白细胞、CD3+CD56-T细胞、CD14+单核细胞、CD19+B细胞和CD3-CD56+NK细胞的平均变化前至变化后差异分别为+1、+2、+1、-1和-1个百分点。任一工艺均未显著存在CD56-CD16+粒细胞(未检测到)。总之,PBMC组成在基线工艺和更新的工艺中是一致的。

[0142] 表7-PBMC组成:CD45+白细胞、CD3+CD56-T细胞、CD14+单核细胞

PBMC 批次	CD45+白细胞			CD3+CD56-T 细胞			CD14+单核细胞		
	在活细胞上门控			在 CD45+白细胞上门控			在 CD45+白细胞上门控		
	基线工艺 (%)	更新的工艺 (%)	变化前至变化后差异	基线工艺 (%)	更新的工艺 (%)	变化前至变化后差异	基线工艺 (%)	更新的工艺 (%)	变化前至变化后差异
[0143] 1	95	97	2	57	61	4	20	17	-3
2	98	97	-1	41	48	7	28	24	-4
3	96	96	0	41	36	-5	31	40	9
4	94	96	2	20	20	0	42	45	3
5	95	97	2	43	45	2	30	31	1
平均值	96	97	1	40	42	2	30	31	1

[0144] 表8-PBMC组成:CD19+B细胞、CD3-CD56+NK细胞、CD56-CD16+粒细胞

[0145]

PBMC 批次	CD19+ B 细胞			CD3-CD56+ NK 细胞			CD56-CD16+粒细胞		
	在活细胞上门控			在 CD45+白细胞上门控			在 CD45+白细胞上门控		
	基线工艺 (%)	更新的工艺 (%)	变化前至变化后差异	基线工艺 (%)	更新的工艺 (%)	变化前至变化后差异	基线工艺 (%)	更新的工艺 (%)	变化前至变化后差异
1	7	9	2	10	9	-1	0	0	0
2	16	15	-1	8	7	-1	0	0	0
3	11	6	-5	9	10	1	0	0	0
4	8	7	-1	21	21	0	0	0	0
5	7	6	-1	11	11	0	1	0	-1
平均值	10	9	-1	12	11	-1	0	0	0

[0146] PBMC CD4+和CD8+T细胞表达的比较

[0147] 进一步表征PBMC T细胞群体的CD4+和CD8+表达。如表9所示，PBMC T细胞的CD4+/CD8+亚群分布在两种工艺之间是可比的，T细胞群体中CD4+和CD8+细胞的平均变化前至变化后差异为-3和+3个百分点。

[0148] 表9-PBMC CD4+和CD8+T细胞亚群

[0149]

PBMC 批次	CD4+ T 细胞			CD8+ T 细胞		
	在 CD3+CD56- T 细胞上门控			在 CD3+CD56- T 细胞上门控		
	基线工艺 (%)	更新的工艺 (%)	变化前至变化后差异	基线工艺 (%)	更新的工艺 (%)	变化前至变化后差异
1	63	60	-3	29	34	5
2	69	68	-1	27	28	1
3	68	66	-2	24	24	0
4	68	65	-3	26	28	2
5	50	45	-5	41	47	6
平均值	64	61	-3	29	32	3

[0150] 在针对这种工艺变化可比性评估而生成的正常供体PBMC白细胞组成数据与来自先前研究的多发性骨髓瘤 (MM) 患者PBMC数据之间观察到差异。与健康供体相比，MM患者的

PBMC包含较少数量的B细胞和T细胞以及增加数量的单核细胞。

[0151] 此外,T细胞群体中的CD4+/CD8+比率也不同。使用基线工艺,健康供体PBMC批次中B细胞、T细胞和单核细胞的平均(N=5)百分比分别为9.7%±4.2%、40.6%±13.1%、30.0%±7.8%。健康供体PBMC批次的平均(N=5) CD4+/CD8+T细胞比率为T细胞的58.8%/32.7%。使用相同的基线PBMC工艺,CRB-401PBMC批次中B细胞、T细胞和单核细胞的平均百分比(N=24)分别为1.9%±1.5%、29.9%±15.7%、56.4%±19.4%。CRB-401PBMC批次的平均(N=24) CD4+/CD8+T细胞比率为T细胞的40.8%/54.4%。在两个数据集中这类观察到的差异与工艺变化无关,并且与科学文献中报告的那些一致。

[0152] 因此,通过以上参数,改进的工艺与基线工艺是可比的。