202321436

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202321436 A

(43)公開日： 中華民國 112 (2023) 年 06 月 01 日

(21)申請案號：111134138 (22)申請日： 中華民國 111 (2022) 年 09 月 08 日

(51)Int. Cl.： *C12N5/071 (2010.01)* *C12N15/13 (2006.01)*
*C12N15/113 (2010.01)* *A61K39/395 (2006.01)*
*C12N15/63 (2006.01)* *C12N15/64 (2006.01)*
*C12N15/86 (2006.01)* *A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2021/09/10 美國 63/242,909

(71)申請人：美商蒂慕尼堤治療公司 (美國) TMUNITY THERAPEUTICS INC. (US)
美國

(72)發明人：比朵雅 飛利浦 BEDOYA, FELIPE (US)；貝瑞特 大衛 BARRETT, DAVID (US)；佩達雷迪加里 維傑 葛博 瑞迪 PEDDAREDDIGARI, VIJAY GOPAL REDDY (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：36 項 圖式數：8 共 219 頁

(54)名稱

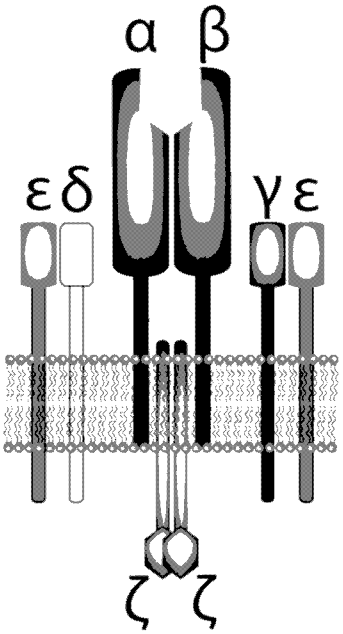
同種異體人類 T 細胞之替代生產

(57)摘要

本發明提供適用於授受性 T 細胞療法之經基因編輯修飾之免疫細胞，該等細胞包含能夠下調 CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP 及恆定鏈之核酸；且進一步包含編碼嵌合抗原受體(chimeric antigen receptor；CAR)、經工程改造 T 細胞受體(engineered T cell receptor；TCR)、殺手細胞免疫球蛋白樣受體(Killer cell immunoglobulin-like receptor；KIR)、顯性負受體及/或開關受體的外源性核酸。本發明亦提供用於生產該等經修飾免疫細胞之組合物及方法，以及使用該等經修飾免疫細胞進行授受性療法及治療疾病或病況之方法。

The present invention provides gene edited modified immune cells suitable for adoptive T cell therapy comprising a nucleic acid capable of downregulating CD3δ, CD3ε, CD3γ, B2M, CIITA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, and invariant chain; and further comprising an exogenous nucleic acid encoding a chimeric antigen receptor (CAR), an engineered T cell receptor (TCR), a Killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR), dominant negative receptor and/or a switch receptor. Also provided are compositions and methods for generating the modified immune cell, and methods of using the modified immune cells for adoptive therapy and treating a disease or condition.

指定代表圖：




【圖1】

專利案號：111134138
202327436
202521456

# 【發明摘要】

【中文發明名稱】

同種異體人類T細胞之替代生產

【英文發明名稱】

ALTERNATIVE GENERATION OF ALLOGENEIC HUMAN T CELLS

【中文】

本發明提供適用於授受性T細胞療法之經基因編輯修飾之免疫細胞，該等細胞包含能夠下調CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP及恆定鏈之核酸；且進一步包含編碼嵌合抗原受體(chimeric antigen receptor；CAR)、經工程改造T細胞受體(engineered T cell receptor；TCR)、殺手細胞免疫球蛋白樣受體(Killer cell immunoglobulin-like receptor；KIR)、顯性負受體及/或開關受體的外源性核酸。本發明亦提供用於生產該等經修飾免疫細胞之組合物及方法，以及使用該等經修飾免疫細胞進行授受性療法及治療疾病或病況之方法。

【英文】

The present invention provides gene edited modified immune cells suitable for adoptive T cell therapy comprising a nucleic acid capable of downregulating CD3δ, CD3ε, CD3γ, B2M, CIITA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, and invariant chain; and further comprising an exogenous nucleic acid encoding a chimeric antigen receptor (CAR), an engineered T cell receptor (TCR), a Killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR), dominant negative receptor and/or a

switch receptor. Also provided are compositions and methods for generating the modified immune cell, and methods of using the modified immune cells for adoptive therapy and treating a disease or condition.

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

# 【發明說明書】

【中文發明名稱】

同種異體人類T細胞之替代生產

【英文發明名稱】

ALTERNATIVE GENERATION OF ALLOGENEIC HUMAN T CELLS

【技術領域】

【先前技術】

【0001】 授受性免疫療法涉及將離體產生之自體抗原特異性T細胞轉移回患者中，且已被證明為一種用於治療癌症、感染及自體免疫疾病之有前景的策略。用於授受性免疫療法之T細胞為初級細胞，該等初級細胞經工程改造以表現嵌合抗原受體(CAR)或重組T細胞受體(TCR)，且離體擴增以再導引初級免疫細胞針對病理性細胞，諸如癌細胞。CAR係由與單一融合分子中之一或多個信號傳導域相關之靶向部分組成的合成抗體樣分子，且經設計以將抗原特異性傳遞至T細胞。CAR成功使T細胞經再導引而針對在各種惡性病，包括淋巴瘤及實體腫瘤的腫瘤細胞表面處表現的抗原。表現CAR之T細胞亦展現治療某些類型之癌症之長期功效。

【0002】 然而，授受性免疫療法當前係基於自體細胞轉移。在自體免疫療法中，患者接受基於患者自身淋巴細胞之個人化治療，該等淋巴細胞自該患者分離、經遺傳修飾或離體選擇、活體外培養且輸注回患者中。儘管自體授受性免疫療法治療獲批且大體上係成功的，但此類療法之可擴展性及可行性存在顯著挑戰。自體授受性免疫療法治療仍極其複雜，需要專門知識及臨床管理以及昂貴的專用設備。許多患者由於在CAR製造期間

疾病進展快速，或在此類治療之前患者免疫功能降低，亦無法接受授受性免疫療法。因此，癌症免疫療法之廣泛臨床應用受限於相當大的經濟約束以及自體CART細胞之個人化製備。因此，需要標準化授受性免疫療法，在該療法中，同種異體治療性細胞經預先製造，詳細表徵且可供用於立即向大量患者投與。

【0003】 同種異體免疫療法仍然係一種危險程序，具有許多可能併發症，諸如同種異體T細胞反應，其臨床上體現為移植物抗宿主病(GVHD)及/或宿主抗移植物病(HvGD，移植排斥)。GvHD起因於藉由供體CAR細胞上之同種異體反應性TCR介導的所輸注之同種異體CAR-T細胞攻擊接受者組織。尤其，所輸注之T細胞上之內源性T細胞受體α(TCRα；TRAC)及β (TCRβ；TRBC)鏈可識別接受者中之主要及次要組織相容抗原，從而引起(GvHD)。相反地，所輸注之同種異體CART細胞可被接受者T淋巴細胞排斥，從而引起HvGD。因此，若確定了控制固有同種異體免疫反應之標準化解決方案，則使用同種異體CAR T細胞將改良授受性免疫療法之適用性及通用性。特異性抑制GvHD將使得能夠安全且有效使用同種異體CART細胞。

【0004】 因此，需要改良之CAR-T細胞方法以不引起宿主免疫反應。特定言之，需要新穎及替代組合物及方法生產具有更好的適應性之同種異體T細胞。

【0005】 本發明提供滿足此等需求之方法及組合物。

【發明內容】

【0006】 在一個態樣中，本發明提供一種經修飾免疫細胞，其包含：(a)一或多個基因座中之插入及/或缺失，該一或多個基因座各自編碼

選自由以下組成之群的內源性免疫蛋白：CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP及恆定鏈(Ii鏈)。插入及/或缺失能夠下調一或多種內源性免疫基因之基因表現。另外，經修飾免疫細胞包含(b)編碼嵌合抗原受體(CAR)、經工程改造T細胞受體(TCR)、殺手細胞免疫球蛋白樣受體(KIR)、抗原結合多肽、細胞表面受體配位體或腫瘤抗原之外源性核酸。在一些實施例中，經修飾免疫細胞進一步包含顯性負受體、開關受體、趨化介素、趨化介素受體、細胞介素、細胞介素受體、IL-7、IL-7R、IL-15、IL-15R、IL-21、IL-18、CCL21、CCL19或其任何組合。

【0007】 在一些實施例中，插入及/或缺失能夠下調以下之基因表現：(a)選自CD3δ、CD3ε及/或CD3γ之T細胞受體次單元；(b)選自B2M、TAP1、TAP2、TAPBP及/或NLRC5之HLA I類分子；及(c)選自HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP及/或恆定鏈(Ii鏈)之HLA II類分子。

【0008】 在一些實施例中，插入及/或缺失能夠下調(a) CD3δ之基因表現，及(b)選自由以下組成之群的HLA分子之基因表現：B2M、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恆定鏈(Ii鏈)及其任何組合。

【0009】 在一些實施例中，插入及/或缺失能夠下調：(a) CD3ε之基因表現，及(b)選自由以下組成之群的HLA分子之基因表現：B2M、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、CIITA、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恆定鏈(Ii鏈)或其任何組合。

【0010】 在一些實施例中，插入及/或缺失能夠下調：(a) CD3γ之基因表現，及(b)選自由以下組成之群的HLA分子之基因表現：B2M、

TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、CIITA、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恆定鏈(Ii鏈)或其任何組合。

【0011】在一些實施例中，插入及/或缺失能夠下調以下之基因表現：(a) CD3ε、B2M及CIITA；(b) CD3ε、B2M及RFX5；(c) CD3ε、B2M及RFXAP；(d) CD3ε、B2M及RFXANK；(e) CD3ε、B2M及HLA-DM；(f) CD3ε、B2M及Ii鏈；(g) CD3ε、TAP1及CIITA；(h) CD3ε、TAP1及RFX5；(i) CD3ε、TAP1及RFXAP；(j) CD3ε、TAP1及RFXANK；(k) CD3ε、TAP1及HLA-DM；(l) CD3ε、TAP1及Ii鏈；(m) CD3ε、TAP2及CIITA；(n) CD3ε、TAP2及RFX5；(o) CD3ε、TAP2及RFXAP；(p) CD3ε、TAP2及RFXANK；(q) CD3ε、TAP2及HLA-DM；(r) CD3ε、TAP2及Ii鏈；(s) CD3ε、NLRC5及CIITA；(t) CD3ε、NLRC5及RFX5；(u) CD3ε、NLRC5及RFXAP；(v) CD3ε、NLRC5及RFXANK；(w) CD3ε、NLRC5及HLA-DM；(x) CD3ε、NLRC5及Ii鏈；(y) CD3ε、TAPBP及CIITA；(z) CD3ε、TAPBP及RFX5；(aa) CD3ε、TAPBP及RFXAP；(bb) CD3ε、TAPBP及RFXANK；(cc) CD3ε、TAPBP及HLA-DM；或(dd) CD3ε、TAPBP及Ii鏈。

【0012】在一些實施例中，插入及/或缺失能夠下調以下之基因表現：(a) CD3δ、B2M及CIITA；(b) CD3δ、B2M及RFX5；(c) CD3δ、B2M及RFXAP；(d) CD3δ、B2M及RFXANK；(e) CD3δ、B2M及HLA-DM；(f) CD3δ、B2M及Ii鏈；(g) CD3δ、TAP1及CIITA；(h) CD3δ、TAP1及RFX5；(i) CD3δ、TAP1及RFXAP；(j) CD3δ、TAP1及RFXANK；(k) CD3δ、TAP1及HLA-DM；(l) CD3δ、TAP1及Ii鏈；(m) CD3δ、TAP2及CIITA；(n) CD3δ、TAP2及RFX5；(o) CD3δ、TAP2及

RFXAP；CD3δ、TAP2及RFXANK；CD3δ、TAP2及HLA-DM；(r) CD3δ、TAP2及Ii鏈；(s) CD3δ、NLRC5及CIITA；(t) CD3δ、NLRC5及RFX5；(u) CD3δ、NLRC5及RFXAP；(v) CD3δ、NLRC5及RFXANK；(w) CD3δ、NLRC5及HLA-DM；(x) CD3δ、NLRC5及Ii鏈；(y) CD3δ、TAPBP及CIITA；(z) CD3δ、TAPBP及RFX5；(aa) CD3δ、TAPBP及RFXAP；(bb) CD3δ、TAPBP及RFXANK；(cc) CD3δ、TAPBP及HLA-DM；或(dd) CD3δ、TAPBP及Ii鏈。

【0013】在一些實施例中，插入及/或缺失能夠下調以下之基因表現：(a) CD3γ、B2M及CIITA；(b) CD3γ、B2M及RFX5；(c) CD3γ、B2M及RFXAP；(d) CD3γ、B2M及RFXANK；(e) CD3γ、B2M及HLA-DM；(f) CD3γ、B2M及Ii鏈；(g) CD3γ、TAP1及CIITA；(h) CD3γ、TAP1及RFX5；(i) CD3γ、TAP1及RFXAP；(j) CD3γ、TAP1及RFXANK；(k) CD3γ、TAP1及HLA-DM；(l) CD3γ、TAP1及Ii鏈；(m) CD3γ、TAP2及CIITA；(n) CD3γ、TAP2及RFX5；(o) CD3γ、TAP2及RFXAP；(p) CD3γ、TAP2及RFXANK；(q) CD3γ、TAP2及HLA-DM；(r) CD3γ、TAP2及Ii鏈；(s) CD3γ、NLRC5及CIITA；(t) CD3γ、NLRC5及RFX5；(u) CD3γ、NLRC5及RFXAP；(v) CD3γ、NLRC5及RFXANK；(w) CD3γ、NLRC5及HLA-DM；(x) CD3γ、NLRC5及Ii鏈；(y) CD3γ、TAPBP及CIITA；(z) CD3γ、TAPBP及RFX5；(aa) CD3γ、TAPBP及RFXAP；(bb) CD3γ、TAPBP及RFXANK；(cc) CD3γ、TAPBP及HLA-DM；或(dd) CD3γ、TAPBP及Ii鏈。

【0014】在一些實施例中，經修飾免疫細胞係選自由以下組成之群：T細胞、自然殺手細胞(NK細胞)、自然殺手T細胞、淋巴祖細胞、造

血幹細胞、幹細胞、巨噬細胞、樹突狀細胞或其任何組合。在一些實施例中，經修飾免疫細胞為CD4+ T細胞或CD8+ T細胞。在一些實施例中，經修飾免疫細胞為同種異體T細胞或自體人類T細胞。

【0015】 在一些實施例中，插入及/或缺失為選自由以下組成之群的基因編輯之結果：(a)與CRISPR相關(Cas) (CRISPR-Cas)之核酸內切酶系統及引導RNA；(b) TALEN基因編輯系統、鋅指核酸酶(ZFN)基因編輯系統、巨核酸酶基因編輯系統或mega-TALEN基因編輯系統；及(c)選自反義RNA、抗寡聚物RNA (antigomer RNA)、RNAi、siRNA或shRNA之基因緘默系統。在一些實施例中，CRISPR-Cas系統包含pAd5/F35-CRISPR載體。在一些實施例中，Cas核酸內切酶包含Cas3、Cas4、Cas8a、Cas8b、Cas9、Cas10、Cas10d、Cas12a、Cas12b、Cas12d、Cas12e、Cas12f、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas13、Cas14、CasX、Cse1、Csy1、Csn2、Cpf1、C2c1、Csm2、Cmr5、Fok1、釀膿鏈球菌(*S. pyogenes*) Cas9、金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) Cas9、MAD7核酸酶(V型CRISPR核酸酶)或其任何組合。

【0016】 在一些實施例中，CRISPR-Cas核酸內切酶系統包含引導RNA。在一些實施例中，引導RNA包含與一或多個基因座內之序列互補之引導序列，該一或多個基因座各自編碼選自由以下組成之群的免疫蛋白：CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP及恆定鏈(Ii鏈)。在一些實施例中，引導RNA與CD3δ、CD3ε或CD3γ之一或多個外顯子內的序列互補。在一些實施例中，引導RNA與CD3δ、CD3ε或CD3γ之外顯子1內之序列互補。

【0017】在一些實施例中，引導RNA之互補序列在CD3δ基因座內且引導RNA包含由SEQ ID NO: 53編碼之核酸序列。在一些實施例中，引導RNA之互補序列在CD3ε基因座內且引導RNA包含由SEQ ID NO: 52編碼之核酸序列。在一些實施例中，引導RNA之互補序列在CD3γ基因座內且引導RNA包含由SEQ ID NO: 54編碼之核酸序列。在一些實施例中，引導RNA之互補序列在B2M基因座內且引導RNA包含由SEQ ID NO: 55編碼之核酸序列。在一些實施例中，引導RNA之互補序列在CIITA基因座內且引導RNA包含由SEQ ID NO: 61編碼之核酸序列。在一些實施例中，引導RNA之互補序列在TAP1基因座內且引導RNA包含由SEQ ID NO: 56編碼之核酸序列。在一些實施例中，引導RNA之互補序列在TAP2基因座內且引導RNA包含由SEQ ID NO: 57編碼之核酸序列。在一些實施例中，引導RNA之互補序列在TAPBP基因座內且引導RNA包含由SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 59或其組合編碼之核酸序列。在一些實施例中，引導RNA之互補序列在NLRC5基因座內且引導RNA包含由SEQ ID NO: 60編碼之核酸序列。在一些實施例中，引導RNA之互補序列在HLA-DM基因座內且引導RNA包含由SEQ ID NO: 62編碼之核酸序列。在一些實施例中，引導RNA之互補序列在RFX5基因座內且引導RNA包含由SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 64或其組合編碼之核酸序列。在一些實施例中，引導RNA之互補序列在RFXANK基因座內且引導RNA包含由SEQ ID NO: 65編碼之核酸序列。在一些實施例中，引導RNA之互補序列在RFXAP基因座內且引導RNA包含由SEQ ID NO: 66編碼之核酸序列。在一些實施例中，引導RNA之互補序列在Ii鏈基因座內且引導RNA包含由SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 68或其任何組合編碼之核酸序列。

【0018】在本發明之一個態樣中，相比於由向個體投與之未經修飾之免疫細胞產生的免疫反應，當向同一個體投與經修飾免疫細胞時，該經修飾免疫細胞在該個體中產生減少的免疫反應。

【0019】在一些實施例中，相比於由包含能夠下調TRAC、TRBC、B2M及CIITA之基因表現之插入及/或缺失的免疫細胞產生的免疫反應，當向個體投與經修飾免疫細胞時，該經修飾免疫細胞在該個體中產生減少的免疫反應。在一些實施例中，免疫反應為移植物抗宿主病(GvHD)反應。在一些實施例中，將由該經修飾免疫細胞減少之該GvHD反應與在一或多個基因座中無缺失及/或插入之等效免疫細胞或在TRAC、TRBC、B2M及CIITA中包含缺失及/或插入之免疫細胞進行比較。在一些實施例中，針對HLA-I錯配細胞或針對HLA-II錯配細胞引發減少的GvHD反應。

【0020】在一些實施例中，該GvHD反應減少約10%或更多、約20%或更多、約30%或更多、約40%或更多、約50%或更多、約60%或更多、約70%或更多、約80%或更多、約90%或更多或約95%或更多。在一些實施例中，該GvHD反應減少約1倍或更多倍、約2倍或更多倍、約3倍或更多倍、約4倍或更多倍、約5倍或更多倍、約6倍或更多倍、約7倍或更多倍、約8倍或更多倍、約9倍或更多倍、約10倍或更多倍、約20倍或更多倍、約30倍或更多倍、約50倍或更多倍、約100倍或更多倍、約150倍或更多倍或約200倍或更多倍。

【0021】在本發明之一個態樣中，外源性核酸編碼嵌合抗原受體(CAR)。在一些實施例中，CAR包含抗原結合域、鉸鏈域、跨膜域、協同刺激信號傳導域及胞內信號傳導域。在一些實施例中，抗原結合域包含全

長抗體或其抗原結合片段、Fab、$F(ab)_2$、單特異性$Fab_2$、雙特異性$Fab_2$、三特異性$Fab_2$、單鏈可變片段(scFv)、雙功能抗體、三功能抗體、微型抗體、V-NAR或V hH。

【0022】在經修飾免疫細胞之一些實施例中，該跨膜域係選自人工疏水性序列、I型跨膜蛋白之跨膜域、T細胞受體之α、β或ζ鏈、CD28、CD3ε、CD45、CD4、CD2、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、OX40 (CD134)、4-1BB (CD137)、ICOS (CD278)、CD154、CD357 (GITR)、鐸樣受體1 (TLR1)、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9及來源於殺手免疫球蛋白樣受體(KIR)之跨膜域。

【0023】在經修飾免疫細胞之一些實施例中，該協同刺激域包含選自由以下組成之群的蛋白質之協同刺激域中之一或多者：TNFR超家族中之蛋白質、CD28、4-1BB (CD137)、OX40 (CD134)、PD-1、CD7、LIGHT、CD83L、DAP10、DAP12、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、ICOS (CD278)、NKG2C、B7-H3 (CD276)及來源於殺手免疫球蛋白樣受體(KIR)之胞內域或其變異體。

【0024】在經修飾免疫細胞之一些實施例中，胞內信號傳導域包含選自由以下組成之群的胞內域：人類CD2之細胞質信號傳導域、CD3ζ鏈(CD3ζ)、FcγRIII、FcsRI、Fc受體之胞質尾區、帶有細胞質受體之基於免疫受體酪胺酸之活化模體(ITAM)、TCRζ、FcRγ、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD5、CD22、CD79a、CD79b及CD66d或其變異體。在一些實施例中，胞內信號傳導域包含人類CD3ζ鏈(CD3ζ)。

【0025】 在經修飾免疫細胞之一些實施例中，抗原結合域靶向與血液惡性腫瘤相關及/或與實體腫瘤相關之腫瘤抗原。在一些實施例中，抗原結合域靶向選自由以下組成之群的腫瘤抗原：ROR1、間皮素、c-Met、PSMA、PSCA、葉酸受體α、葉酸受體β、EGFR、EGFRvIII、GPC2、GPC2、黏蛋白1(MUC1)、Tn抗原((Tn Ag)或(GalNAca-Ser/Thr))、TnMUC1、GDNF家族受體α-4 (GFRa4)、纖維母細胞活化蛋白(FAP)及介白素-13受體次單元α-2 (IL-13Ra2或CD213A2)。

【0026】 在一些實施例中，CAR包含(a) PSMA抗原結合域、CD2協同刺激域及CD3ζ胞內信號傳導域；或(b)間皮素抗原結合域、4-1BB協同刺激域及CD3ζ信號傳導域；或(c) TnMUC1抗原結合域、CD2協同刺激域及CD3ζ信號傳導域。

【0027】 在本發明之一個態樣中，經修飾免疫細胞進一步包含開關受體。在一些實施例中，開關受體包含與負信號相關之信號傳導蛋白的胞外域、跨膜域及與正信號相關之信號傳導蛋白的胞內域。

【0028】 在一些實施例中，經修飾免疫細胞進一步包含顯性負受體。在一些實施例中，顯性負受體包含(a)與負信號相關之野生型蛋白質的截短變異體；或(b)與負信號相關的包含胞外域、跨膜域及實質上缺乏胞內信號傳導域之野生型蛋白質之變異體；或(c)與負信號相關之信號傳導蛋白之胞外域，以及跨膜域。在一些實施例中，顯性負受體為PD1、VSIG3、VISG8或TGFβR顯性負受體。

【0029】 在一些實施例中，與負信號相關之蛋白質係選自由以下組成之群：CTLA4、PD-1、TGFβRII、BTLA、VSIG3、VSIG8及TIM-3。在一些實施例中，與正信號相關之蛋白質係選自由以下組成之群：

CD28、4-1BB、IL12Rβ1、IL12Rβ2、CD2、ICOS及CD27。

【0030】在一些實施例中，開關受體係選自由以下組成之群：PD-1-CD28、PD-$1^{A132L}$-CD28、PD-1-CD27、PD-$1^{A132L}$-CD27、PD-1-4-1BB、PD-$1^{A132L}$-4-1BB、PD-1-ICOS、PD-$1^{A132L}$-ICOS、PD-1-IL12Rβ1、PD-$1^{A132L}$-IL12Rβ1、PD-1-IL12Rβ2、PD-$1^{A132L}$-IL12Rβ2、VSIG3-CD28、VSIG8-CD28、VSIG3-CD27、VSIG8-CD27、VSIG3-4-1BB、VSIG8-4-1BB、VSIG3-ICOS、VSIG8-ICOS、VSIG3-IL12Rβ1、VSIG8-IL12Rβ1、VSIG3-IL12Rβ2、VSIG8-IL12Rβ2、TGFβRII-CD27、TGFβRII-CD28、TGFβRII-4-1BB、TGFβRII-ICOS、TGFβRII-IL12Rβ1及TGFβRII-IL12Rβ2。

【0031】在經修飾免疫細胞之一些實施例中，開關受體之跨膜域係選自蛋白質之跨膜域，該蛋白質係選自由以下組成之群：CTLA4、PD-1、VSIG3、VSIG8、TGFβRII、BTLA、TIM-3、CD28、4-1BB、IL12Rβ1、IL12Rβ2、CD2、ICOS及CD27。在一些實施例中，開關受體之跨膜域係選自與負信號相關之蛋白質之跨膜或與該負信號相關之蛋白質之跨膜域。

【0032】在一個態樣中，本發明提供經分離之經修飾T細胞，其包含至少一種選自由以下組成之群的功能受損之多肽：CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP及恆定鏈(Ii鏈)。在一些實施例中，包含功能受損之多肽之經修飾T細胞展現以下中之至少一者：(i)相比於未經修飾之T細胞，降低的T細胞受體表現；(ii)降低的該受損多肽之表現；(iii)完全不存在T細胞受體複合體表面表現；及/或(iv)減少或不足的T細胞受體交聯。在一些實施例中，相比於由向個體投與之未經修飾之T細胞產生的免疫反應，

當向同一個體投與該經修飾T細胞時，該T細胞在該個體中產生減少的免疫反應。

【0033】在一些實施例中，T細胞包含兩種或更多種功能受損之多肽，且其中第二受損多肽為T細胞受體α鏈(TRAC)及/或T細胞受體β鏈(TRBC)。

【0034】在一些實施例中，經修飾T細胞包含：(a)三種或更多種功能受損之多肽，其係選自TRAC、CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii鏈；或(b)兩種功能受損之多肽，其係選自CD3α、CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii鏈；或(c)三種功能受損之多肽，其係選自CD3α、CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii鏈；或(d)選自由CD3δ、CD3ε及CD3γ組成之群的功能受損之多肽，及至少一種選自TRAC、TRBC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii鏈之功能受損之多肽；或(e)選自由CD3δ、CD3ε及CD3γ組成之群的功能受損之多肽，及選自TRAC、TRBC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii鏈之功能受損之多肽。

【0035】在一些實施例中，經修飾T細胞包含：(a)功能受損之CD3δ及至少一種選自TRAC、TRBC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii鏈之功能受損之多肽；(b)功能受損之CD3ε及至少一種選自TRAC、TRBC、

B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii鏈之功能受損之多肽；或(c)功能受損之CD3γ及至少一種選自TRAC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii鏈之功能受損之多肽。

【0036】在一些實施例中，經修飾T細胞包含兩種或更多種選自TRAC、TRBC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii鏈之功能受損之多肽。在一些實施例中，經修飾T細胞具有降低的TRAC、TRBC、CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、Ii鏈或其任何組合之表現。在一些實施例中，經修飾T細胞不表現CD3δ、CD3ε、CD3γ、TRAC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、Ii鏈或其任何組合。

【0037】在一些實施例中，經修飾T細胞進一步包含選自TRAC、TRBC、B2M及C2TA之功能受損之多肽。在一些實施例中，經修飾T細胞具有降低的TRAC、TRBC、B2M或C2TA表現或不表現TRAC、TRBC、B2M或C2TA。在一些實施例中，CD3δ、CD3ε及/或CD3γ之修飾引起TCR/CD3複合體功能受損。在一些實施例中，CD3δ、CD3ε或CD3γ中之至少一者藉由靶向CD3δ、CD3ε或CD3γ之一或多個外顯子，視情況CD3δ、CD3ε或CD3γ之外顯子1來修飾。

【0038】本發明之一個態樣提供一種用於生產經修飾免疫細胞之方法，其包含：(a)將一或多種核酸引入至該免疫細胞中，該一或多種核酸能夠下調編碼內源性免疫蛋白之一或多種內源性免疫基因之基因表現，該

內源性免疫蛋白係選自由以下組成之群：CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP及恆定鏈(Ii鏈)；(b)將編碼嵌合抗原受體(CAR)、經工程改造T細胞受體(TCR)、殺手細胞免疫球蛋白樣受體(KIR)、抗原結合多肽、細胞表面受體配位體或腫瘤抗原之外源性核酸引入至該免疫細胞中；(c)擴增該經修飾免疫細胞以產生T細胞群。在一些實施例中，用於生產經修飾免疫細胞之方法進一步包含將編碼顯性負受體、開關受體或其組合之外源性核酸引入至免疫細胞中。

【0039】 在一些實施例中，引入至經修飾免疫細胞中之一或多種核酸能夠下調以下之基因表現：(a)選自CD3δ、CD3ε或CD3γ之T細胞受體次單元；及/或(b)選自B2M、TAP1、TAP2、TAPBP或NLRC5之HLA I類分子；及/或(c)選自HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或恆定鏈(Ii鏈)之HLA II類分子。

【0040】 在一些實施例中，引入至經修飾免疫細胞中之一或多種核酸能夠下調CD3δ之基因表現及選自由以下組成之群的HLA分子之基因表現：B2M、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恆定鏈(Ii鏈)及其組合。在一些實施例中，引入至經修飾免疫細胞中之一或多種核酸能夠下調CD3ε及選自由以下組成之群的HLA分子之基因表現：B2M、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、CIITA、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恆定鏈(Ii鏈)及其組合。在一些實施例中，引入至經修飾免疫細胞中之一或多種核酸能夠下調CD3γ及選自由以下組成之群的HLA分子之基因表現：B2M、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、CIITA、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、

恆定鏈(Ii鏈)及其組合。

【0041】 在一些實施例中，引入至經修飾免疫細胞中之一或多種核酸能夠下調以下之基因表現：(a) CD3ε、B2M及CIITA；(b) CD3ε、B2M及RFX5；(c) CD3ε、B2M及RFXAP；(d) CD3ε、B2M及RFXANK；(e) CD3ε、B2M及HLA-DM；(f) CD3ε、B2M及Ii鏈；(g) CD3ε、TAP1及CIITA；(h) CD3ε、TAP1及RFX5；(i) CD3ε、TAP1及RFXAP；(j) CD3ε、TAP1及RFXANK；(k) CD3ε、TAP1及HLA-DM；(l) CD3ε、TAP1及Ii鏈；(m) CD3ε、TAP2及CIITA；(n) CD3ε、TAP2及RFX5；(o) CD3ε、TAP2及RFXAP；(p) CD3ε、TAP2及RFXANK；(q) CD3ε、TAP2及HLA-DM；(r) CD3ε、TAP2及Ii鏈；(s) CD3ε、NLRC5及CIITA；(t) CD3ε、NLRC5及RFX5；(u) CD3ε、NLRC5及RFXAP；(v) CD3ε、NLRC5及RFXANK；(w) CD3ε、NLRC5及HLA-DM；(x) CD3ε、NLRC5及Ii鏈；(y) CD3ε、TAPBP及CIITA；(z) CD3ε、TAPBP及RFX5；(aa) CD3ε、TAPBP及RFXAP；(bb) CD3ε、TAPBP及RFXANK；(cc) CD3ε、TAPBP及HLA-DM；或(dd) CD3ε、TAPBP及Ii鏈。

【0042】 在一些實施例中，引入至經修飾免疫細胞中之一或多種核酸能夠下調以下之基因表現：(a) CD3δ、B2M及CIITA；(b) CD3δ、B2M及RFX5；(c) CD3δ、B2M及RFXAP；(d) CD3δ、B2M及RFXANK；(e) CD3δ、B2M及HLA-DM；(f) CD3δ、B2M及Ii鏈；(g) CD3δ、TAP1及CIITA；(h) CD3δ、TAP1及RFX5；(i) CD3δ、TAP1及RFXAP；(j) CD3δ、TAP1及RFXANK；(k) CD3δ、TAP1及HLA-DM；(l) CD3δ、TAP1及Ii鏈；(m) CD3δ、TAP2及CIITA；(n) CD3δ、TAP2及RFX5；(o)

CD3δ、TAP2及RFXAP；(p) CD3δ、TAP2及RFXANK；(q) CD3δ、TAP2及HLA-DM；(r) CD3δ、TAP2及Ii鏈；(s) CD3δ、NLRC5及CIITA；(t) CD3δ、NLRC5及RFX5；(u) CD3δ、NLRC5及RFXAP；(v) CD3δ、NLRC5及RFXANK；(w) CD3δ、NLRC5及HLA-DM；(x) CD3δ、NLRC5及Ii鏈；(y) CD3δ、TAPBP及CIITA；(z) CD3δ、TAPBP及RFX5；(aa) CD3δ、TAPBP及RFXAP；(bb) CD3δ、TAPBP及RFXANK；(cc) CD3δ、TAPBP及HLA-DM；或(dd) CD3δ、TAPBP及Ii鏈。

【0043】在一些實施例中，引入至經修飾免疫細胞中之一或多種核酸能夠下調以下之基因表現：(a) CD3γ、B2M及CIITA；(b) CD3γ、B2M及RFX5；(c) CD3γ、B2M及RFXAP；(d) CD3γ、B2M及RFXANK；(e) CD3γ、B2M及HLA-DM；(f) CD3γ、B2M及Ii鏈；(g) CD3γ、TAP1及CIITA；(h) CD3γ、TAP1及RFX5；(i) CD3γ、TAP1及RFXAP；(j) CD3γ、TAP1及RFXANK；(k) CD3γ、TAP1及HLA-DM；(l) CD3γ、TAP1及Ii鏈；(m) CD3γ、TAP2及CIITA；(n) CD3γ、TAP2及RFX5；(o) CD3γ、TAP2及RFXAP；(p) CD3γ、TAP2及RFXANK；(q) CD3γ、TAP2及HLA-DM；(r) CD3γ、TAP2及Ii鏈；(s) CD3γ、NLRC5及CIITA；(t) CD3γ、NLRC5及RFX5；(u) CD3γ、NLRC5及RFXAP；(v) CD3γ、NLRC5及RFXANK；(w) CD3γ、NLRC5及HLA-DM；(x) CD3γ、NLRC5及Ii鏈；(y) CD3γ、TAPBP及CIITA；(z) CD3γ、TAPBP及RFX5；(aa) CD3γ、TAPBP及RFXAP；(bb) CD3γ、TAPBP及RFXANK；(cc) CD3γ、TAPBP及HLA-DM；或(dd) CD3γ、TAPBP及Ii鏈。

【0044】在一些實施例中，待修飾免疫細胞係選自由以下組成之群：T細胞、自然殺手細胞(NK細胞)、自然殺手T細胞、淋巴祖細胞、造血幹細胞、幹細胞、巨噬細胞及樹突狀細胞。在一些實施例中，待修飾免疫細胞為CD4+ T細胞或CD8+ T細胞之免疫細胞。在一些實施例中，待修飾免疫細胞為同種異體T細胞或自體T細胞。

【0045】在一些實施例中，藉由病毒轉導將核酸引入至免疫細胞中。在一些實施例中，病毒轉導包含使免疫細胞與包含一或多種核酸之病毒載體接觸。在一些實施例中，病毒載體係選自由以下組成之群：反轉錄病毒載體、仙台病毒載體(sendai viral vector)、腺病毒載體、腺相關病毒載體及慢病毒載體。

【0046】在一些實施例中，能夠下調一或多種內源性免疫基因之表現的一或多種核酸中之各者包含選自由以下組成之群的基因編輯系統：(a)與CRISPR相關(Cas) (CRISPR-Cas)之核酸內切酶系統及引導RNA；(b) TALEN基因編輯系統、鋅指核酸酶(ZFN)基因編輯系統、巨核酸酶基因編輯系統或mega-TALEN基因編輯系統；及(c)選自反義RNA、抗寡聚物RNA、RNAi、siRNA或shRNA之基因緘默系統。

【0047】在一些實施例中，Cas核酸內切酶包含Cas3、Cas4、Cas8a、Cas8b、Cas9、Cas10、Cas10d、Cas12a、Cas12b、Cas12d、Cas12e、Cas12f、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas13、Cas14、CasX、Cse1、Csy1、Csn2、Cpf1、C2c1、Csm2、Cmr5、Fok1、釀膿鏈球菌Cas9、金黃色葡萄球菌Cas9、MAD7核酸酶(V型CRISPR核酸酶)或其任何組合。在一些實施例中，CRISPR-Cas系統包含pAd5/F35-CRISPR載體。

【0048】 在一些實施例中，CRISPR-Cas系統之引導RNA包含與一或多個基因座內之序列互補之引導序列，該一或多個基因座各自編碼選自由以下組成之群的免疫蛋白：CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP及恆定鏈(Ii鏈)。

【0049】 在一些實施例中，引入至經修飾免疫細胞中之引導RNA與CD3δ、CD3ε或CD3γ之一或多個外顯子內的序列互補。在一些實施例中，引導RNA與CD3δ、CD3ε或CD3γ之外顯子1內之序列互補。

【0050】 在一些實施例中，引入至經修飾免疫細胞中之引導RNA與CD3δ基因座內之序列互補且引導RNA包含由SEQ ID NO: 53編碼之核酸序列。在一些實施例中，引入至經修飾免疫細胞中之引導RNA與CD3ε基因座內之序列互補且引導RNA包含由SEQ ID NO: 52編碼之核酸序列。在一些實施例中，引入至經修飾免疫細胞中之引導RNA與CD3γ基因座內之序列互補且引導RNA包含由SEQ ID NO: 54編碼之核酸序列。在一些實施例中，引入至經修飾免疫細胞中之引導RNA與B2M基因座內之序列互補且引導RNA包含由SEQ ID NO: 55編碼之核酸序列。在一些實施例中，引入至經修飾免疫細胞中之引導RNA與CIITA基因座內之序列互補且引導RNA包含由SEQ ID NO: 61編碼之核酸序列。在一些實施例中，引入至經修飾免疫細胞中之引導RNA與TAP1基因座內之序列互補且引導RNA包含由SEQ ID NO: 56編碼之核酸序列。在一些實施例中，引入至經修飾免疫細胞中之引導RNA與TAP2基因座內之序列互補且引導RNA包含由SEQ ID NO: 57編碼之核酸序列。在一些實施例中，引入至經修飾免疫細胞中之引導RNA與TAPBP基因座內之序列互補且引導RNA包含由SEQ ID NO:

58、SEQ ID NO: 59或其任何組合編碼之核酸序列。在一些實施例中，引入至經修飾免疫細胞中之引導RNA與NLRC5基因座內之序列互補且引導RNA包含由SEQ ID NO: 60編碼之核酸序列。在一些實施例中，引入至經修飾免疫細胞中之引導RNA與HLA-DM基因座內之序列互補且引導RNA包含由SEQ ID NO: 62編碼之核酸序列。在一些實施例中，引入至經修飾免疫細胞中之引導RNA與RFX5基因座內之序列互補且引導RNA包含由SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 64或其任何組合編碼之核酸序列。在一些實施例中，引入至經修飾免疫細胞中之引導RNA與RFXANK基因座內之序列互補且引導RNA包含由SEQ ID NO: 65編碼之核酸序列。在一些實施例中，引入至經修飾免疫細胞中之引導RNA與RFXAP基因座內之序列互補且引導RNA包含由SEQ ID NO: 66編碼之核酸序列。在一些實施例中，引入至經修飾免疫細胞中之引導RNA與Ii鏈基因座內之序列互補且引導RNA包含由SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 68或其任何組合編碼之核酸序列。

【0051】在一些實施例中，相比於由向個體投與之未經修飾之免疫細胞產生的免疫反應，當向同一個體投與藉由所揭示之方法生產的經修飾免疫細胞時，該經修飾免疫細胞在該個體中產生減少的免疫反應。

【0052】在一些實施例中，相比於由包含一或多種能夠下調TRAC、TRBC、B2M及CIITA之基因表現之核酸的免疫細胞產生的免疫反應，當向個體投與藉由所揭示之方法生產之經修飾免疫細胞時，該免疫細胞產生減少之免疫反應。在一些實施例中，將由藉由所揭示之方法生產之經修飾免疫細胞減少之該GvHD反應與在一或多個基因座中無缺失及/或插入之等效免疫細胞或在TRAC、TRBC、B2M及CIITA中包含缺失及/或

插入之免疫細胞進行比較。

【0053】 在一些實施例中，免疫反應為移植物抗宿主病(GvHD)反應。在一些實施例中，針對HLA-I錯配細胞或針對HLA-II錯配細胞引發減少的GvHD反應。在一些實施例中，由藉由所揭示之方法生產之經修飾免疫細胞引發之GvHD反應減少約10%或更多、約20%或更多、約30%或更多、約40%或更多、約50%或更多、約60%或更多、約70%或更多、約80%或更多、約90%或更多或約95%或更多。在一些實施例中，藉由所揭示之方法生產之經修飾免疫細胞引發的GvHD反應減少約1倍或更多倍、約2倍或更多倍、約3倍或更多倍、約4倍或更多倍、約5倍或更多倍、約6倍或更多倍、約7倍或更多倍、約8倍或更多倍、約9倍或更多倍、約10倍或更多倍、約20倍或更多倍、約30倍或更多倍、約50倍或更多倍、約100倍或更多倍、約150倍或更多倍或約200倍或更多倍。

【0054】 在一些實施例中，引入至免疫細胞中之外源性核酸編碼嵌合抗原受體(CAR)。在一些實施例中，CAR包含抗原結合域、鉸鏈域、跨膜域、協同刺激信號傳導域及胞內信號傳導域。

【0055】 在一些實施例中，抗原結合域靶向與血液惡性腫瘤相關及/或與實體腫瘤相關之腫瘤抗原。在一些實施例中，抗原結合域靶向選自由以下組成之群的腫瘤抗原：ROR1、間皮素、c-Met、PSMA、PSCA、葉酸受體α、葉酸受體β、EGFR、EGFRvIII、GPC2、GPC2、黏蛋白1(MUC1)、Tn抗原((Tn Ag)或(GalNAca-Ser/Thr))、TnMUC1、GDNF家族受體α-4 (GFRa4)、纖維母細胞活化蛋白(FAP)及介白素-13受體次單元α-2 (IL-13Ra2或CD213A2)。

【0056】 在一些實施例中，引入至經修飾免疫細胞中之CAR包含：

(a) PSMA抗原結合域(例如SEQ ID NO: 73或74)、CD2協同刺激域及CD3ζ胞內信號傳導域；或(b)間皮素抗原結合域(例如SEQ ID NO: 75)、4-1BB協同刺激域及CD3ζ信號傳導域；或(c) TnMUC1抗原結合域、CD2協同刺激域及CD3ζ信號傳導域。在一些實施例中，TnMUC1 CAR包含SEQ ID NO: 70中所闡述之胺基酸序列，且間皮素CAR包含SEQ ID NO: 71或SEQ ID NO: 72中所闡述之胺基酸序列。在一些實施例中，TnMUC1 CAR由SEQ ID NO: 69中所闡述之核酸序列編碼。

【0057】 在本發明之一個態樣中，引入至經修飾免疫細胞中之開關受體包含：(a)與負信號相關之選自由以下組成之群之信號傳導蛋白的胞外域：CTLA4、PD-1、VISG3、VSIG8、TGFβRII、BTLA及TIM-3；(b)跨膜域；及(c)與選自由CD28、4-1BB、IL12Rβ1、IL12Rβ2、CD2、ICOS及CD27組成之群的正信號相關的信號傳導蛋白之胞內域。

【0058】 在一些實施例中，開關受體係選自由以下組成之群：PD-1-CD28、PD-$1^{A132L}$-CD28、PD-1-CD27、PD-$1^{A132L}$-CD27、PD-1-4-1BB、PD-$1^{A132L}$-4-1BB、PD-1-ICOS、PD-$1^{A132L}$-ICOS、PD-1-IL12Rβ1、PD-$1^{A132L}$-IL12Rβ1、PD-1-IL12Rβ2、PD-$1^{A132L}$-IL12Rβ2、VSIG3-CD28、VSIG8-CD28、VSIG3-CD27、VSIG8-CD27、VSIG3-4-1BB、VSIG8-4-1BB、VSIG3-ICOS、VSIG8-ICOS、VSIG3-IL12Rβ1、VSIG8-IL12Rβ1、VSIG3-IL12Rβ2、VSIG8-IL12Rβ2、TGFβRII-CD27、TGFβRII-CD28、TGFβRII-4-1BB、TGFβRII-ICOS、TGFβRII-IL12Rβ1及TGFβRII-IL12Rβ2。

【0059】 在一些實施例中，引入至經修飾免疫細胞中之顯性負受體包含：(a)與負信號相關之野生型蛋白質之截短變異體，或(b)與負信號相

關的包含胞外域、跨膜域及實質上缺乏胞內信號傳導域之野生型蛋白質之變異體；或(c)與負信號相關之信號傳導蛋白之胞外域，以及跨膜域。在一些實施例中，顯性負受體為PD1、VSIG3、VSIG8或TGFβR顯性負受體。

【0060】 在一些實施例中，開關受體之跨膜域係選自選自由以下組成之群的蛋白質之跨膜域：CTLA4、PD-1、BTLA、TGFβRII、BTLA、TIM-3、CD28、4-1BB、IL12Rβ1、IL12Rβ2、CD2、ICOS及CD27。在一些實施例中，開關受體之跨膜域係選自與負信號相關之蛋白質之跨膜或與該負信號相關之蛋白質之跨膜域。

【0061】 本發明之一個態樣提供擴增經修飾免疫細胞。在一些實施例中，擴增經修飾免疫細胞包含用選自由以下組成之群的因子培養T細胞：flt3-L、IL-1、IL-3、IL-2、IL-7、IL-15、IL-18、IL-21、TGFβ、IL-10及c-kit配位體。本發明之一個態樣提供進一步將多肽Klf4、Oct3/4及Sox2及/或編碼Klf4、Oct3/4及Sox2之核酸引入該免疫細胞中以誘導免疫細胞之多能性。

【0062】 在一些實施例中，免疫細胞係獲自血液樣品、全血樣品、周邊血液單核細胞(PBMC)樣品或血球分離術樣品。在一些實施例中，血球分離術樣品為冷凍保存之樣品。在一些實施例中，血球分離術樣品為新製樣品。在一些實施例中，免疫細胞係獲自人類個體。

【0063】 本發明之一個態樣提供藉由如前述實施例中任一項之方法獲得之經修飾免疫細胞群。在一些實施例中，組合物包含如前述實施例中之任一者之經修飾免疫細胞。在一些實施例中，組合物包含藉由前述實施例中之任一者中所揭示之方法生產的經修飾免疫細胞群及醫藥學上可接受

之載劑或賦形劑。

【0064】 本發明之一個態樣提供一種治療個體之與增強的免疫相關的疾病或病況之方法，其包含向有需要之個體投與有效量之前述實施例中之任一者中所揭示之組合物。在一些實施例中，病況係癌症。在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群：乳癌、前列腺癌、卵巢癌、子宮頸癌、皮膚癌、胰臟癌、大腸直腸癌、腎癌、肝癌、腦癌、淋巴瘤、白血病、肺癌及其任何組合。在一些實施例中，癌症為實體腫瘤或血液惡性腫瘤。在一些實施例中，治療癌症之方法包含向個體投與如前述實施例中任一項之經修飾免疫細胞、如前述實施例中任一項之經修飾T細胞群或如前述實施例中任一項之組合物。

【0065】 本發明之一個態樣提供一種用於刺激個體之針對目標細胞或組織的T細胞介導之免疫反應的方法，其包含向個體投與有效量之醫藥組合物，其包含如前述實施例中任一項之經修飾免疫細胞、如前述實施例中任一項之經修飾免疫細胞群或如前述實施例中任一項之組合物。

【0066】 本發明之一個態樣提供一種套組，其包含如前述實施例中任一項之經修飾免疫細胞、如前述實施例中任一項之經修飾T細胞群或如前述實施例中任一項之組合物，視情況包含使用說明書。

【0067】 前文概述及以下圖式描述及詳細描述為例示性及解釋性的。其意欲提供本發明之其他細節，但不應被解釋為限制。熟習此項技術者根據本發明之以下詳細描述將對其他目的、優勢及新穎特徵顯而易見。

【圖式簡單說明】

【0068】 **圖1**展示人類T細胞受體(TCR)-CD3複合體之示意性圖示，其包含與三個二聚模組CD3δ/CD3ε、CD3γ/CD3ε及CD3ζ/CD3ζ偶合之可

變TCR-α鏈(TCR-α、TRAC)及TCR-β鏈(TCR-β、TRBC)。CD3δ/CD3ε及CD3γ/CD3ε模組為本發明之主題。

【0069】 **圖2A-2C**展示說明使用CRISPR/Cas系統之基因，在靶向破壞CD3δ (**圖2A**)、CD3ε (**圖2B**)及CD3γ (**圖2C**)之後藉由流動式細胞測量術所量測的人類T細胞上之TCR-α及TCR-β鏈破裂效率的條形圖。

【0070】 **圖3**展示的圖式說明使用圖1之策略生產之同種異體CART細胞之擴增，且說明在十天的時段內群體倍增數。所測試之同種異體CART細胞為包含TRAC基因剔除(TRAC KO)、CD3δ基因剔除(D1 KO)、CD3γ基因剔除(G4 KO)及CD3ε基因剔除(E4 KO)之經工程改造T細胞。

【0071】 **圖4A及圖4B**展示流動式細胞測量術結果，其比較TCR-α鏈(TRAC)基因剔除、CD3δ基因剔除(D1 KO)、CD3γ基因剔除(G4 KO)及CD3ε基因剔除(E4 KO)之CRISPR介導之下調。**圖4A**展示藉由TCR-α/β鏈之表面表現所量測，CD3ε基因剔除(E4 KO)係T細胞受體基因剔除之較佳目標。**圖4B**展示包含CD3ε基因剔除(E4 KO)之同種異體CART細胞具有較高轉導效率且功能上優於包含例如CD3γ或CD3δ基因剔除之CART細胞；說明PSMA CART細胞實施例。

【0072】 **圖5**展示的圖式展現包含TCR-α鏈(TRAC)基因剔除、CD3δ基因剔除(D1)、CD3ε基因剔除(E4)及CD3γ基因剔除(G4)之同種異體PSMA CART細胞之腫瘤殺死能力；且說明PSMA E4同種異體CART細胞具有最佳殺死能力。目標細胞為PC3細胞。

【0073】 **圖6A-6D**展示用T7核酸內切酶錯配偵測分析法(T7E1)說明之CRISPR-Cas活性。**圖6A**展示使用三個不同gRNA自三個不同CRISPR-Cas C2TA (CIITA)基因之位點擴增的經T7E1處理之PCR產物之代表性凝

膠電泳影像。**圖6B-6D**展示由T7E1核酸內切酶分析之Agilent生物分析儀電泳圖產生的電泳圖，展現CRISPR-Cas編輯效率。

【0074】 **圖7A-D**展示對照及經T7E1處理之PCR的Agilent生物分析儀電泳圖及凝膠電泳，說明C2TA (CIITA) CRISPR編輯效率結果。尤其，**圖7A**展示樣品C2TA-1-PCR之總體結果，**圖7B**展示樣品C2TA-1-T7E1之總體結果，**圖7C**展示樣品C2TA-2-PCR之總體結果，且**圖7D**展示樣品C2TA-2-T7E1之總體結果。

【0075】 **圖8**展示的圖式說明混合淋巴細胞反應(MLR)分析之結果；且展現單獨或共培養的對照T細胞(第2供體)、同種異體PSMA CART細胞之存活力；且說明儘管存在HLA錯配，來自第2 (不相關)供體之T細胞不回應於共培養之同種異體PSMA CART細胞而增殖。同種異體CART細胞包含PSMA CAR及CRISPR編輯之TRAC/B2M/C2TA gRNA。

【實施方式】

**相關申請案之交叉參考**

【0076】 本申請案主張2021年9月10日申請的美國臨時申請案第63/242,909號的優先權，該申請案的內容以引用之方式特定地併入。

**I. 概述**

【0077】 T細胞受體(TCR)複合體為由至少八個多肽次單元(TCRαβ、CD3εγ、CD3εδ及CD3ζζ)構成之大型多個次單元複合體。TCRαβ雜二聚體為負責識別結合於主要組織相容複合體I類及II類分子之抗原的配位體結合次單元。將CD3ε、CD3γ、CD3δ及CD3ζ組織成二聚體以形成轉導由TCRαβ雜二聚體產生之信號的三個二聚模組CD3δ/CD3ε、CD3γ/CD3ε及CD3ζ/CD3ζ。迄今為止，GvHD及/或HvHD避免策略為產生同種異體T細胞的方法，其包含經由*TRAC*基因座之靶向破壞來下調

TCRα鏈。在本發明之前，未研究過CD3ε、CD3γ、CD3δ及CD3ζ促進GvHD及HvHD之調節作用，因為咸信破壞CD3α/β對於成功產生同種異體T細胞而言具有決定性。本發明詳述以下驚人發現：CD3ε、CD3γ、CD3δ及CD3ζ基因座之靶向破壞產生同種異體CAR T細胞，與包含TRAC基因座之靶向破壞的CAR T細胞一樣高效及/或更佳。在本發明中，較佳破壞CD3ε、CD3γ、CD3δ基因中之至少一者。

【0078】 本發明包括用於藉由以下產生經修飾T細胞之方法及組合物：減弱一或多個內源性T細胞受體複合體基因表現，且表現嵌合抗原受體(CAR)、經工程改造T細胞受體(TCR)、殺手細胞免疫球蛋白樣受體(KIR)、抗原結合多肽、細胞表面受體配位體、腫瘤抗原、顯性負受體、開關受體、趨化介素、趨化介素受體、細胞介素或細胞介素受體。

【0079】 因此，本發明係基於以下觀測結果：包含T細胞受體複合體之基因編輯之CD3δ基因、CD3ε基因、CD3ζ基因及/或CD3γ基因中之至少一者以及嵌合抗原受體(CAR)及/或開關受體及/或免疫增強因子的經修飾免疫細胞為具有增強的適應性之經改良同種異體T細胞，其展現活體外針對各種癌細胞株之有效胞溶質活性，以及與此領域中已知之標準同種異體T細胞相比的活體內顯著腫瘤根除率。

【0080】 授受性免疫療法為癌症患者提供令人興奮的前景。然而，當前存在若干與CAR-T及TCR細胞之製造相關的挑戰。此等挑戰影響授受性免疫療法之潛在成功率。

【0081】 儘管自體授受性免疫療法獲批且大體上成功，但此類療法之可擴展性及可行性存在顯著挑戰。尤其，授受性免疫療法之廣泛臨床應用受限於相當大的經濟約束以及自體CART細胞之個人化製備。然而，其中同種異體治療性細胞經預先製造，詳細表徵且可供用於立即向大量患者

投與的標準化授受性免疫療法仍然係一種危險程序，具有許多可能併發症，諸如同種異體T細胞反應。同種異體T細胞反應臨床上體現為移植物抗宿主病(GVHD)及/或宿主抗移植物病(HvGD，移植排斥)。GvHD起因於藉由供體CAR細胞上之同種異體反應性TCR介導的所輸注之同種異體CAR-T細胞攻擊接受者組織。尤其，所輸注之T細胞上之內源性T細胞受體α (TCRα；TRAC)及β (TCRβ；TRBC)鏈識別接受者中之主要及次要組織相容抗原，從而引起(GvHD)。相反地，所輸注之同種異體CART細胞可被接受者T淋巴細胞排斥，從而引起HvGD。

【0082】 在本發明之前，解決同種異體T細胞反應之一種方法為使用基因體編輯技術工程改造同種異體T細胞以消除同種異體供體T細胞中之TCRα、TCRβ及/或一或多種主要組織相容(MHC) I類(MHC I)及/或MHC II類複合體之表現。因為TCRαβ雜二聚體為整個TCR複合體之組裝及活性所必需，所以基因剔除TCRα或β鏈之表現防止供體CAR T細胞識別出宿主同種異體抗原且因此引起GVHD。此外，在供體T細胞中編輯出MHC I相反地防止接受者之T細胞識別此等同種異體T細胞且因此排斥移植物。迄今為止，經由*TRAC*基因座之靶向破壞使α鏈缺失已用作GVHD避免策略，主要因為β鏈由兩個*TRBC*基因(*TRBC1*及*TRBC2*)編碼。因此，基因剔除TRBC基因可能更複雜。

【0083】 將Cas9/sgRNA有效引入至具有最小毒性之T細胞中之最佳方案仍有待建立。此外，當前技術不引起100% CART細胞中之TCR基因剔除。此為顯著的，因為成功生產可用於CART療法之同種異體細胞將得益於100% TCR基因剔除。

【0084】 為了解決此問題，本發明詳述單獨地以及與至少一個其他基因基因剔除組合破壞CD3ε基因、CD3γ基因及/或CD3δ基因(參見**圖1**)，

如下表1中詳述。(CD3ζ其因亦可遭破壞。)本發明亦涵蓋其中CD3ε、CD3γ及/或CD3δ (及視情況CD3ζ其因)中之至少一者遭破壞的構築體及其用途。CD3ε、CD3γ及/或CD3δ (及視情況CD3ζ其因)中之至少一者之破壞亦可與CD3α及CD3β中之一或多者之破壞組合(例如，CD3ε其因及CD3γ其因之其因剔除；CD3ε其因及CD3α其因之其因剔除；CD3γ其因及CD3δ其因之其因剔除等)。參見例如實例2及表1，該表說明本發明之新穎同種異體CART策略，其涉及在抗原處理及呈現路徑中替代性T細胞受體次單元(CD3δ、CD3γ及CD3ε)及額外關鍵其因之其因剔除(KO)。

表1

| | | T細胞受體 | | | | HLA-I | | | | | HLA-II | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | TRAC | CD3δ | CD3ε | CD3γ | B2M | TAP1 | TAP2 | TAPBP | NLRC5 | CIITA | RFX5 | RFXANK | RFXAP | RUNX1 | 其他 |
| 敲除基因 | TRAC | | | | | 1 | | | | | 1 | | | | | |
| | CD3δ | | | | | | | | | | | | | | | |
| | CD3ε | | | | | | | | | | | | | | | |
| | CD3γ | | | | | | | | | | | | | | | |
| | B2M | 1 | | | | | | | | | 1 | | | | | |
| | TAP1 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | TAP2 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | TAPBP | | | | | | | | | | | | | | | |
| | NLRC5 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | CIITA | 1 | | | | 1 | | | | | | | | | | |
| | HLA-DM | | | | | | | | | | | | | | | |
| | RFX5 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | RFXANK | | | | | | | | | | | | | | | |
| | RFXAP | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 其他 | | | | | | | | | | | | | | | |

【0085】 令人驚訝地發現，兩種或三種(或更多種)破壞干擾T細胞受體表現，且成功引起具有最小毒性之TCR下調。

【0086】 另外，證實TRAC陰性T細胞在腫瘤中存留較長時間(Stadtmauer等人, *Science, 367*(6481): eaba7365 (2020))，因此出人意料地，聚焦於CD3ε基因、CD3γ基因、CD3ζ基因及/或CD3δ基因之破壞亦產生在授受性免疫療法中有效之T細胞(儘管如上文所指出，本發明亦涵蓋CD3ε、CD3γ、CD3ζ及/或CD3δ基因中之一或多者之破壞以及CD3α及/或CD3β基因之破壞)。

【0087】 本發明提供用於藉由替代性調整及調節與同種異體T細胞反應相關之TCR信號傳導來調節T細胞之功能特性的新穎及替代方法。尤其，本發明證實單獨或與一或多種額外TCR複合體組分組合之CD3ε基因、CD3γ基因、CD3ζ及/或CD3δ基因中之至少一者之下調顯著減少同種異體T細胞反應，同時保留CART細胞有益抗腫瘤特性，由此產生安全且有效的CART細胞。下文更詳細地描述此等新穎及替代方法之優點。

## II. 實驗結果

【0088】 人類T細胞上之TCR-α及TCR-β鏈破壞效率百分比係使用CRISPR/Cas系統，在靶向破壞CD3δ (**圖2A**)、CD3ε (**圖2B**)及CD3γ (**圖2C**)基因之後藉由流動式細胞測量術來量測(亦參見以下實例3)。**圖2A**展示在使用以下四種不同引導RNA破壞CD3δ之後的結果：gRNA1、gRNA2、gRNA3及gRNA4。在CRISPR/Cas系統中使用gRNA1及gRNA3引導RNA靶向破壞CD3δ產生100% TCR α/β KO效率，而在CRISPR/Cas系統中使用gRNA2及gRNA4產生大於約90% TCR α/β KO效率。因此，gRNA1及gRNA3之用途較佳為在CRISPR/Cas系統中破壞CD3δ。

【0089】 **圖2B**展示在使用以下五種不同引導RNA靶向破壞CD3ε之後的結果：gRNA1、gRNA2、gRNA3、gRNA4及gRNA5。在CRISPR/Cas系統中使用gRNA4及gRNA5引導RNA破壞CD3ε產生100% TCR α/β KO效率，而使用gRNA1僅產生約50% KO TCR α/β KO效率，且最後在CRISPR/Cas系統中使用引導gRNA2及gRNA3產生大於約90% TCR α/β KO效率。因此，gRNA4及gRNA5引導RNA之用途較佳為在CRISPR/Cas系統中破壞CD3ε。

【0090】 **圖2C**展示在使用以下五種不同引導RNA靶向破壞CD3γ之後的結果：gRNA1、gRNA2、gRNA3、gRNA4及gRNA5。在CRISPR/Cas系統中使用gRNA4及引導RNA破壞CD3ε產生100% TCR α/β KO效率，而使用gRNA5產生大於約95% TCR α/β KO效率，且最後在CRISPR/Cas系統中使用gRNA1、gRNA2及gRNA3引導RNA產生較差TCR α/β KO效率。因此，gRNA4引導RNA之用途較佳為在CRISPR/Cas系統中破壞CD3γ。

【0091】 在具有以下實例4中提供之細節的另一個實驗中，評估同種異體CART細胞之不同構築體在10天時段內之擴增。此資料為重要的，因為若經修飾免疫細胞不擴增，則將不產生用於成功療法的足夠數目之細胞。所測試之不同構築體包括同種異體CART細胞，該等細胞包含：(1) TRAC基因剔除(**圖3**上之ALLO (TRAC KO)) (例如，在本發明之前使用之基因剔除)；(2) CD3δ基因剔除(**圖3**上之ALLO (D1 KO))；(3)圖之CD3γ基因剔除(**圖3**上之ALLO (G4 KO))；及(4) CD3ε基因剔除(**圖3**上之ALLO (E4 KO))。細胞群倍增百分比展示在Y軸上，而天數展示在X軸上。詳述於**圖3**中之結果展示所有經修飾細胞在9天時段內加倍約4×或更多倍產

量，由此展現經修飾細胞產生適用於免疫療法之適用量的材料。

【0092】 實例5評估若干種不同基因剔除構築體以評估TCR-α/β鏈之表面表現。尤其，**圖4A及圖4B**展示流動式細胞測量術結果，其比較載體TCR-α鏈(TRAC)基因剔除(例如在本發明之前使用之構築體)、CD3δ基因剔除(D1 KO)、CD3γ基因剔除(G4 KO)及CD3ε基因剔除(E4 KO)之CRISPR介導之下調。**圖4A**展示藉由TCR-α/β鏈之表面表現所量測，CD3ε基因剔除(E4 KO)係T細胞受體基因剔除之較佳目標。**圖4B**展示包含CD3ε基因剔除(E4 KO)之同種異體CART細胞具有較高轉導效率且功能上優於包含例如CD3γ或CD3δ基因剔除之CART細胞；說明PSMA CART細胞實施例。此外，圖4B展示大部分CART細胞為同種異體的(CD3及TCR陰性)，此意謂被投與本發明之CART細胞之患者將被輸注較高數目之同種異體CART細胞。

【0093】 在詳述於下文實例6中之另一實驗中，評估不同PSMA CART細胞構築體之腫瘤殺死能力，如**圖5**中所示。尤其，**圖5**展示的圖式展現包含TCR-α鏈(TRAC)基因剔除(例如，在本發明之前使用之構築體)、CD3δ基因剔除(D1)、CD3ε基因剔除(E4)及CD3γ基因剔除(G4)之同種異體PSMA CART細胞之腫瘤殺死能力。結果說明PSMA E4同種異體CART細胞具有最佳殺死能力。目標細胞為PC3細胞，其為人類前列腺癌細胞株。出乎意料地發現E4比D1及G4更有效。當相比於所評估之其他同種異體CART細胞時，藉由靶向CD3ε分子製得之同種異體CART細胞更有效(例如殺死腫瘤細胞快得多)。CD3ε基因剔除(E4) CART細胞之較高效力意謂在與TCR-α鏈(TRAC)基因剔除CART細胞、CD3δ基因剔除(D1) CART細胞及/或CD3γ基因剔除(G4) CART細胞相比時，被此等CART細

胞靶向之腫瘤細胞被更快得根除。且時間對於吾等同種異體策略在患者中取得成功至關重要。

【0094】 實例7描述對CRISPR-Cas方法在實現目標基因之基因剔除上之有效性的評估。尤其，**圖6A-6D**展示用T7核酸內切酶錯配偵測分析法(T7E1)說明之CRISPR-Cas活性。**圖6A**展示使用三個不同gRNA自三個不同CRISPR-Cas C2TA (CIITA)基因之位點擴增的經T7E1處理之PCR產物之代表性凝膠電泳影像。**圖6B-6D**展示由T7E1核酸內切酶分析之Agilent生物分析儀電泳圖產生的電泳圖，展現CRISPR-Cas編輯效率。

【0095】 另外，**圖7A-D**展示對照及經T7E1處理之PCR的Agilent生物分析儀電泳圖及凝膠電泳，說明C2TA (CIITA) CRISPR編輯效率結果。**圖7A**展示樣品C2TA-1-PCR之總體結果，**圖7B**展示樣品C2TA-1-T7E1之總體結果，**圖7C**展示樣品C2TA-2-PCR之總體結果，且**圖7D**展示樣品C2TA-2-T7E1之總體結果。

【0096】 最後，進行混合淋巴細胞分析(MLA)。**圖8**展示的圖式說明用單獨的同種異體細胞、單獨的T細胞(第2供體；來自不同供體之T細胞)、共培養的同種異體細胞及共培養的T細胞(第2供體)之混合淋巴細胞反應(MLR)分析之結果。尤其，接受者之T細胞(來自不同供體之T細胞)與同種異體CART細胞共培養14天，且分析T細胞之增殖。結果展現對照T細胞(第2供體)、單獨或共培養的同種異體PSMA CART細胞之存活力，且展示「接受者之」T細胞對存在之同種異體細胞不反應(無增殖)。因此，圖8展示，儘管存在HLA錯配，但來自第2 (不相關)供體之T細胞不回應於共培養之同種異體PSMA CART細胞而增殖。同種異體CART包含PSMA CART及CRISPR編輯之TRAC/B2M/C2TA gRNA。因此，本發明之同種

異體CART細胞將具有殺死腫瘤細胞而不被接受者之免疫系統(亦即T細胞)偵測到之機會窗。

## III. 同種異體T細胞

### A. 內源性免疫蛋白之下調

【0097】本發明之一個態樣提供一種經修飾免疫細胞，其包含(1)一或多個基因座中之插入及/或缺失，該一或多個基因座各自編碼內源性免疫蛋白；(2)外源性核酸，其編碼嵌合抗原受體(CAR)、經工程改造T細胞受體(TCR)、殺手細胞免疫球蛋白樣受體(KIR)、抗原結合多肽、細胞表面受體配位體或腫瘤抗原。因此，本發明之經修飾細胞經基因編輯以破壞本文中所描述之內源性基因中之任一者的表現。在一些實施例中，包含本發明之經工程改造TCR或CAR表現系統之經修飾細胞經基因編輯以破壞本文所描述之內源性基因中之一或多者的表現。在其中CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP及恆定鏈(Ii鏈)中之一或多者遭破壞的一些實施例中，產生同種異體T細胞(亦即通用免疫細胞)。如本文所用，術語「通用免疫細胞」或「通用T細胞」係指預修飾/預製造以投與任何患者之同種異體免疫細胞或T細胞。在一些實施例中，本發明之經修飾免疫細胞為具有減少或抑制之同種異體T細胞反應的同種異體T細胞產物。在一些實施例中，內源性免疫蛋白之一或多個基因座之下調減少及/或消除GvHD及/或HvHD。

【0098】在一些實施例中，相比於由向個體投與之未經修飾之免疫細胞產生的免疫反應，當向同一個體投與該經修飾免疫細胞時，該免疫細胞在該個體中產生減少的免疫反應。在一些實施例中，相比於由包含能夠

下調TRAC、TRBC、B2M及CIITA之基因表現之插入及/或缺失的免疫細胞產生之免疫反應，當向個體投與本發明之免疫細胞時，該經修飾免疫細胞在個體中產生減少的免疫反應。在一些實施例中，免疫反應為移植物抗宿主病(GvHD)或宿主抗移植物病(HvHD；移植排斥)反應。在一些實施例中，針對HLA-I錯配細胞或針對HLA-II錯配細胞引發減少的GvHD反應。在一些實施例中，該GvHD反應減少約10%或更多、約20%或更多、約30%或更多、約40%或更多、約50%或更多、約60%或更多、約70%或更多、約80%或更多、約90%或更多或約95%或更多。在一些實施例中，該GvHD反應減少約1倍或更多倍、約2倍或更多倍、約3倍或更多倍、約4倍或更多倍、約5倍或更多倍、約6倍或更多倍、約7倍或更多倍、約8倍或更多倍、約9倍或更多倍、約10倍或更多倍、約20倍或更多倍、約30倍或更多倍、約50倍或更多倍、約100倍或更多倍、約150倍或更多倍或約200倍或更多倍。在一些實施例中，將由該經修飾免疫細胞減少之該GvHD反應與在一或多個基因座中無缺失及/或插入之等效免疫細胞或在TRAC、TCRβ、B2M及CIITA中包含缺失及/或插入之免疫細胞進行比較。

【0099】 在一些實施例中，一或多個基因座中之插入及/或缺失能夠下調一或多個內源性免疫蛋白基因座之基因表現。在一些實施例中，內源性免疫蛋白為TCR複合體之組分中之一者。在一些實施例中，內源性免疫蛋白為CD3ε CD3γ、CD3δ及CD3ζ中之一或多者，其組織成雜二聚體且形成轉導由配位體結合於TCRαβ雜二聚體產生之信號的三個二聚模組CD3δ/CD3ε、CD3γ/CD3ε及CD3ζ/CD3ζ。在一些實施例中，配位體為由TCRαβ雜二聚體識別的與主要組織相容複合體I類及II類(MHC-I；MHC-II)分子結合之抗原。

【0100】 在一些實施例中，內源性免疫蛋白為MHC I類(MHC-I)及/或MHC II類(MHC-II)分子。在一些實施例中，內源性免疫蛋白係β-2-微球蛋白(B2M)、II類反式活化因子(CIITA)、抗原處理相關ABC轉運體1(TAP1；ATP結合卡匣子族B成員轉運體1)、抗原處理相關ABC轉運體2(TAP2；ATP結合卡匣子族B成員轉運體2)、TAP結合蛋白(TAPBP；Tapasin；TAP相關蛋白)、NLR家族含CARD域5 (NLRC5)、HLA-DM、RFX5 (調節因子X5)、調節因子X相關含錨蛋白之蛋白(RFXANK)、調節因子X相關蛋白(RFXAP)及恆定鏈(Ii鏈)。

【0101】 如同TCR，MHC-I及MHC-II藉由向T淋巴細胞呈現抗原而在適應性免疫反應之活化中起重要作用。人類具有三個主要MHC-I基因座(HLA-A、HLA-B及HLA-C)，其對於偵測及消除病毒、癌細胞及移植細胞至關重要。此外，存在三種非經典MHC-I分子(HLA-E、HLA-F及HLA-G)，其具有免疫調節功能。人類MHC-II分子亦包含三個基因座(HLA-DP、HLA-DQ及HLA-DR)。MHC I類及II類中之各者亦包含若干種調節蛋白。MHC-I調節蛋白包括β-2-微球蛋白(B2M)，諸如TAP1、TAP2、TAPBP之抗原處理分子及諸如NLRC5之轉錄調節因子。Tap1、Tap2及TAPBP為將肽抗原裝載至HLA I類複合體上所必需的TAP轉運體複合體之部分。B2M、NLRC5、Tap1、Tap2及TAPBP中之任一者之表現下調引起MHC I類蛋白質之細胞表面表現降低及免疫反應受損。在一些實施例中，本發明涵蓋之內源性免疫蛋白為選自由B2M、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5及其組合組成之群的MHC-I基因。

【0102】 MHC-II調節蛋白包括轉錄調節因子CIITA、RFX5、RFXANK、RFXAP；及伴隨蛋白，其參與形成及轉運MHC II類肽、恆定

鏈(Ii鏈)及人類白血球抗原DM (HLA-DM；HLA-DMA)、HLA-DOA及HLA-DOB。RFX5、RFXANK、RFXAP為特異性結合於所有MHC II類基因啟動子以調節其轉錄的三聚RFX DNA結合複合體之次單元。恆定鏈(Ii)充當MHC II類伴隨蛋白，防止肽負載於ER中，刺激離開ER且調節抗原肽負載。類似於TAPBP，HLA-DM (例如HLA-DMA)有助於胞內運輸期間MHC-II分子之肽負載。HLA-DM藉由引導針對抗原之「免疫顯性」區的T細胞反應而消除/防止弱結合肽對MHC-II蛋白之呈現。在一些實施例中，HLA-DM (例如HLA-DMA)在處理自身蛋白質中促進潛在自體反應性T細胞的消除。在一些實施例中，本發明涵蓋之內源性免疫蛋白係選自由以下組成之群的MHC-II基因：CIITA、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恆定鏈(Ii鏈)及其組合。

【0103】 因此，高效移除HLA障壁以減少HvHD或GvHD可藉由下調以下中之一或多者實現：(1)靶向多態MHC-I基因(HLA-A、HLA-B、HLA-C)及/或MHC-II基因(HLA-DP、HLA-DQ、HLA-DR)；(2)靶向調節所有MHC-I分子至細胞表面之運輸的分子，諸如B2M，或MHC-I抗原處理分子，諸如TAP1、TAP2或TAPBP；(3)靶向調節MHC-II分子運輸的分子，諸如恆定鏈(Ii；或CD74))或HLA-DM；及/或(4)靶向MHC-I (NLRC5)或MHC-II表現(CIITA、RFX-5、RFXANK、RFX-AP)之轉錄調節子。

【0104】 在一些實施例中，基因表現藉由插入及/或缺失下調之內源性免疫蛋白係選自由以下組成之群：CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恆定鏈(Ii鏈；CD74)或其任何組合。在一些實施例

中，具有選自CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恆定鏈(Ii鏈；CD74)之內源性免疫蛋白之下調基因表現的經修飾免疫細胞(亦即T細胞)及其組合在同種異體環境中具有降低之免疫原性。在一些實施例中，下調CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恆定鏈(Ii鏈；CD74)或其任何組合之基因表現移除可引起HvHD及/或GvHD之T細胞上之同種異體抗原的表面呈現及/或阻止T細胞受體之膜表現。

【0105】 在一些實施例中，用於生產同種異體T細胞產物之經修飾免疫細胞包含三基因剔除，該三基因剔除包含下調一種T細胞受體次單元、一種HLA I類分子及一種HLA II類分子。在一些實施例中，T細胞受體次單元係選自CD3δ、CD3ε或CD3γ；HLA I類分子係選自B2M、TAP1、TAP2、TAPBP或NLRC5；及HLA II類分子係選自HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或恆定鏈(Ii鏈)。在一些實施例中，同種異體T細胞產物包含超過三個內源性免疫蛋白基因剔除。在此類實施例中，T細胞受體次單元係選自CD3δ、CD3ε及/或CD3γ；HLA I類分子係選自B2M、TAP1、TAP2、TAPBP及/或NLRC5；且HLA II類分子係選自HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP及/或恆定鏈(Ii鏈)。在一些實施例中，用於產生同種異體T細胞產物之經修飾免疫細胞包含一或多個內源性免疫蛋白基因剔除，該一或多個內源性免疫蛋白基因剔除包含下調至少兩種T細胞受體次單元、至少兩種HLA I類分子及至少兩種HLA II類分子。在一些實施例中，T細胞受體次單元係選自CD3δ、CD3ε及CD3γ中之至少兩者；HLA I類分子係選自B2M、TAP1、TAP2、TAPBP及NLRC5中之

至少兩者；且HLA II類分子係選自至少兩種HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP及恆定鏈(Ii鏈)。

【0106】在一些實施例中，經修飾免疫細胞包含下調CD3δ基因表現及選自由以下組成之群的HLA分子之基因表現的插入及/或缺失：B2M、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恆定鏈(Ii鏈)及其組合。在一些實施例中，經修飾免疫細胞包含下調CD3ε基因表現及選自由以下組成之群的HLA分子之基因表現的插入及/或缺失：B2M、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恆定鏈(Ii鏈)及其組合。在一些實施例中，經修飾免疫細胞包含下調CD3γ基因表現及選自由以下組成之群的HLA分子之基因表現的插入及/或缺失：B2M、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恆定鏈(Ii鏈)及其組合。

【0107】在一些實施例中，當CD3δ、CD3ε及/或CD3γ之基因表現下調時，T細胞受體α及β之表面表現下調至少約50%、至少約60%、至少約70%、至少約80%、至少約90%、至少約95%、至少約99%或至少約100%。在一些實施例中，當與CD3γ及/或CD3δ之下調相比時，CD3ε之下調產生較高T細胞受體基因剔除效率。在一些實施例中，由CD3ε下調誘導之T細胞受體基因剔除效率高於或等於由TRAC下調誘導的效率。

【0108】在一些實施例中，用於產生同種異體T細胞產物之經修飾免疫細胞包含三基因剔除。在一些實施例中，經修飾免疫包含降低或消除以下之基因表現：(1) CD3ε、B2M及CIITA；(2) CD3ε、B2M及RFX5；(3) CD3ε、B2M及RFXAP；(4) CD3ε、B2M及RFXANK；(5) CD3ε、

B2M及HLA-DM；(6) CD3ε、B2M及Ii鏈；(7) CD3ε、TAP1及CIITA；(8) CD3ε、TAP1及RFX5；(9) CD3ε、TAP1及RFXAP；(10) CD3ε、TAP1及RFXANK；(11) CD3ε、TAP1及HLA-DM；(12) CD3ε、TAP1及Ii鏈；(13) CD3ε、TAP2及CIITA；(14) CD3ε、TAP2及RFX5；(15) CD3ε、TAP2及RFXAP；(16) CD3ε、TAP2及RFXANK；(17) CD3ε、TAP2及HLA-DM；(18) CD3ε、TAP2及Ii鏈；(19) CD3ε、NLRC5及CIITA；(20) CD3ε、NLRC5及RFX5；(21) CD3ε、NLRC5及RFXAP；(22) CD3ε、NLRC5及RFXANK；(23) CD3ε、NLRC5及HLA-DM；(24) CD3ε、NLRC5及Ii鏈；(25) CD3ε、TAPBP及CIITA；(26) CD3ε、TAPBP及RFX5；(27) CD3ε、TAPBP及RFXAP；(28) CD3ε、TAPBP及RFXANK；(29) CD3ε、TAPBP及HLA-DM；或(30) CD3ε、TAPBP及Ii鏈。

【0109】在一些實施例中，經修飾免疫包含降低或消除以下之基因表現：(1) CD3δ、B2M及CIITA；(2) CD3δ、B2M及RFX5；(3) CD3δ、B2M及RFXAP；(4) CD3δ、B2M及RFXANK；(5) CD3δ、B2M及HLA-DM；(6) CD3δ、B2M及Ii鏈；(7) CD3δ、TAP1及CIITA；(8) CD3δ、TAP1及RFX5；(9) CD3δ、TAP1及RFXAP；(10) CD3δ、TAP1及RFXANK；(11) CD3δ、TAP1及HLA-DM；(12) CD3δ、TAP1及Ii鏈；(13) CD3δ、TAP2及CIITA；(14) CD3δ、TAP2及RFX5；(15) CD3δ、TAP2及RFXAP；(16) CD3δ、TAP2及RFXANK；(17) CD3δ、TAP2及HLA-DM；(18) CD3δ、TAP2及Ii鏈；(19) CD3δ、NLRC5及CIITA；(20) CD3δ、NLRC5及RFX5；(21) CD3δ、NLRC5及RFXAP；(22) CD3δ、NLRC5及RFXANK；(23) CD3δ、NLRC5及HLA-DM；(24)

CD3δ、NLRC5及Ii鏈；(25) CD3δ、TAPBP及CIITA；(26) CD3δ、TAPBP及RFX5；(27) CD3δ、TAPBP及RFXAP；(28) CD3δ、TAPBP及RFXANK；(29) CD3δ、TAPBP及HLA-DM；或(30) CD3δ、TAPBP及Ii鏈。

【0110】在一些實施例中，經修飾免疫包含降低或消除以下之基因表現：(1) CD3γ、B2M及CIITA；(2) CD3γ、B2M及RFX5；(3) CD3γ、B2M及RFXAP；(4) CD3γ、B2M及RFXANK；(5) CD3γ、B2M及HLA-DM；(6) CD3γ、B2M及Ii鏈；(7) CD3γ、TAP1及CIITA；(8) CD3γ、TAP1及RFX5；(9) CD3γ、TAP1及RFXAP；(10) CD3γ、TAP1及RFXANK；(11) CD3γ、TAP1及HLA-DM；(12) CD3γ、TAP1及Ii鏈；(13) CD3γ、TAP2及CIITA；(14) CD3γ、TAP2及RFX5；(15) CD3γ、TAP2及RFXAP；(16) CD3γ、TAP2及RFXANK；(17) CD3γ、TAP2及HLA-DM；(18) CD3γ、TAP2及Ii鏈；(19) CD3γ、NLRC5及CIITA；(20) CD3γ、NLRC5及RFX5；(21) CD3γ、NLRC5及RFXAP；(22) CD3γ、NLRC5及RFXANK；(23) CD3γ、NLRC5及HLA-DM；(24) CD3γ、NLRC5及Ii鏈；(25) CD3γ、TAPBP及CIITA；(26) CD3γ、TAPBP及RFX5；(27) CD3γ、TAPBP及RFXAP；(28) CD3γ、TAPBP及RFXANK；(29) CD3γ、TAPBP及HLA-DM；或(30) CD3γ、TAPBP及Ii鏈。

【0111】在一些實施例中，本發明之經修飾免疫細胞為T細胞、自然殺手細胞(NK細胞)、自然殺手T細胞(NKT)、淋巴祖細胞、造血幹細胞、幹細胞、巨噬細胞或樹突狀細胞。在一些實施例中，經修飾免疫細胞為經修飾未經刺激免疫細胞或其前驅細胞。在一些實施例中，經修飾免疫

細胞為經修飾未經刺激T細胞、經修飾未經刺激NK細胞或經修飾未經刺激NKT細胞。在一些實施例中，經修飾免疫細胞為CD4+ T細胞或CD8+ T細胞。在一些實施例中，經修飾免疫細胞為同種異體T細胞或自體人類T細胞。在一些實施例中，經修飾免疫細胞為人類細胞或哺乳動物細胞。

**B. 經修飾免疫細胞**

【0112】 本發明之一個態樣提供經分離之經修飾T細胞，其包含至少一種選自由以下組成之群的功能受損之多肽：CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP及恆定鏈(Ii鏈)。如本文所用，術語「功能受損之多肽」意謂多肽發生突變(例如包含缺失、插入或為截短變異體)，使得其無法容易地結合於TCR複合體之其他組分，或其不併入TRC複合體中。在一些實施例中，功能受損之多肽引起TCR功能受損或抑制功能TCR在細胞表面上之表現。在一些實施例中，受損多肽可為實質上抑制TCR複合體之活性的顯性負多肽。包含所述功能受損之多肽的經修飾T細胞為不產生功能性TCR或在細胞表面處表現極少功能性TCR之TCR缺乏型T細胞。在一些實施例中，受損多肽為TCR信號傳導複合體之組分。在一些實施例中，受損多肽調節功能性TCR之形成。在一些實施例中，受損多肽包含影響功能蛋白之功能或表現的突變。在一些實施例中，突變為缺失、插入、取代或其組合。在一些實施例中，受損多肽係由缺陷基因產物之表現或不存在所需基因或基因產物之表現引起。

【0113】 TCR之正常功能需要適當化學計量比率之構成TCR複合體之蛋白質。如**圖1**中所示，TCR複合體包含可變TCR-α鏈(TCR-α、TRAC)及TCR-β鏈(TCR-β、TRBC)，該等鏈偶合至三個二聚模組CD3δ/CD3ε、

CD3γ/CD3ε及CD3ζ/CD3ζ。三個二聚模組為TCR信號傳導之整體部分。各CD3受體包含信號傳導模體，該等模體在TCR-α/β雜二聚體與MHC-肽配位體接合時傳播及擴增TCR受體活化。在配位體結合於TCRαβ後，CD3次單元經歷構形變化且CD3胞質尾區內之信號傳導模體(例如ITAM)由胞內蛋白質酪胺酸激酶磷酸化。隨後，含SH2域之胞內信號傳導及銜接分子被募集至質膜，在該質膜中其藉由與CD3信號傳導模體直接相互作用而擴增TCR活化信號。因此，雖然TCRαβ雜二聚體負責抗原結合，但CD3次單元充當信號轉導元件。因此，若必需的CD3受體中之一者缺失或受損，則TCR複合體在功能上變得不穩定，或至少TCR之信號傳導功能減弱。不希望受理論所束縛，所有六種蛋白質之座標表現為TCR複合體及/或功能之表面表現所需的。

【0114】 TCR複合體之各組分為TCR複合體在細胞表面處之組裝所需。TCR複合體之一種組分之損失會導致細胞表面處之TCR表現損失。在一些實施例中，損失一種組分可不消除TCR複合體之表面表現。在此類實施例中，雖然可保留一些或甚至所有TCR表現，但其為TCR受體功能，其確定TCR受體是否誘導免疫反應。本發明涵蓋功能缺陷，而非在細胞表面處不存在完整TCR複合體。在不希望受理論束縛的情況下，TCR表現愈低，可進行的TCR交聯愈不可能足以經由TCR複合體引起T細胞活化。

【0115】 在一些實施例中，經分離之經修飾T細胞包含兩個或更多個功能受損之多肽。在此類實施例中，一種受損多肽可為T細胞受體α鏈(TRAC)。TCR複合體將保留在細胞內，且將不在TRAC不存在下易位至質膜。此外，缺乏TRAC之TCR受體將不穩定且可能快速降解。在一些實施例中，經修飾T細胞包含三種或更多種選自TRAC、TRBC、CD3δ、

CD3ε、CD3γ、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或恆定(Ii)鏈之功能受損之多肽。在一些實施例中，經修飾T細胞包含兩種功能受損之多肽，其係選自CD3α、CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii鏈。在一些實施例中，經修飾T細胞包含三種功能受損之多肽，其係選自CD3α、CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii鏈。在一些實施例中，經修飾T細胞包含選自由CD3δ、CD3ε及CD3γ組成之群的功能受損之多肽，及至少一種選自TRAC、TRBC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii鏈之功能受損之多肽。在一些實施例中，經修飾T細胞包含至少一種選自由以下組成之群的功能受損之多肽：CD3δ、CD3ε及CD3γ，及至少一種選自TRAC、TRBC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii鏈之功能受損之多肽。

【0116】在一些實施例中，經修飾T細胞包含(a)功能受損之CD3δ、CD3ε及/或CD3γ中之至少一者，及(b)至少一種選自TRAC、TRBC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii鏈的功能受損之多肽。在一些實施例中，經修飾T細胞包含兩種或更多種選自TRAC、TRBC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii鏈之功能受損之多肽。

【0117】在一些實施例中，功能受損之多肽降低蛋白質表現。在此

類實施例中，經修飾T細胞具有降低的TRAC、TRBC、CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、Ii鏈或其任何組合之表現。在一些實施例中，功能受損之多肽不存在經編碼基因表現。在此類實施例中，經修飾T細胞不表現CD3δ、CD3ε、CD3γ、TRAC、TRBC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、Ii鏈或其任何組合。

【0118】在一些實施例中，包含降低的表現及或缺乏選自由以下組成之群的多肽之表現的經修飾T細胞進一步包含選自TRAC、TRBC、B2M及C2TA之功能受損之多肽：CD3δ、CD3ε、CD3γ、TRAC、TRBC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、Ii鏈。在此類實施例中，經修飾T細胞具有TRAC、TRBC、B2M或C2TA之降低的表現及/或不表現TRAC、TRBC、B2M或C2TA。

【0119】在一些實施例中，CD3δ、CD3ε及/或CD3γ之修飾引起TCR/CD3受體複合體功能受損。在一些實施例中，本發明涵蓋之功能受損之多肽係使用基因編輯技術產生。在一些實施例中，基因編輯係選自由以下組成之群：CRISPR相關(Cas) (CRISPR-Cas)核酸內切酶系統、TALEN基因編輯系統、鋅指核酸酶(ZFN)基因編輯系統、巨核酸酶基因編輯系統或mega-TALEN基因編輯系統、反義RNA、抗寡聚物RNA、RNAi、siRNA及shRNA。在一些實施例中，CD3δ、CD3ε或CD3γ藉由靶向CD3δ、CD3ε或CD3γ之一或多個外顯子，視情況CD3δ、CD3ε或CD3γ之外顯子1來修飾。

【0120】 T細胞是否表現功能性TCR可使用此項技術中已知或本文所述之已知分析方法確定。在一些實施例中，TCR αβ及CD3之表現可藉由流動式細胞測量術及定量即時PCR (QRT-PCR)評估。TCR-α、TCR-β、CD3ε、CD3δ、CD3γ及CD3-ζ mRNA之表現可藉由QRT-PCR，使用ABI7300即時PCR儀及基因特異性TAQMAN®引子，使用類似於Sentman等人, *J. Immunol.* 173:6760-6766 (2004)的方法來分析。細胞表面表現之變化可使用對TCR-α、TCR-β、CD3ε、CD8、CD4、CD5及CD45具有特異性之抗體測定。為使用流動式細胞測量術測試TCR/CD3表現，使用針對TCR複合體之特異性次單元的螢光染料標記之抗體。在一些實施例中，活細胞用例如針對CD5、CD8及CD4之抗體與針對CD3ε、CD3δ、CD3γ、TCRα、TCRβ、TCRγ或TCRδ之抗體組合染色。若使用CD3或TCR基因之表現，則在與未經修飾之T細胞或表現對照載體之T細胞相比時，經修飾T細胞中之TCR蛋白及CD3蛋白兩者之表現應大幅降低。同型對照抗體用於控制背景螢光。

【0121】 為確定功能受損之多肽在經修飾T細胞中之表現是否足以改變TCR功能及/或經修飾T細胞功能，針對以下各者測試經修飾T細胞：(1)活體外細胞存活；(2)在經絲裂黴素處理之同種異體PBMC存在下之增殖；及/或(3)回應於同種異體PBMC、抗CD3mAb或抗TCR mAb之細胞介素產生。

【0122】 為了測試TCR複合體之功能缺陷，可確定驅動T細胞擴增之關鍵效應細胞介素之生產缺乏。舉例而言，抗CD3刺激對經修飾T細胞之作用可用於確定介白素-2 (IL-2)之產生及/或干擾素(IFN)-γ產生。

【0123】 在一些實施例中，包含功能受損之多肽之經修飾T細胞展

現相比於未經修飾之T細胞，降低的T細胞受體表現。在一些實施例中，包含功能受損之多肽之經修飾T細胞展現降低的該受損多肽之表現。在一些實施例中，包含功能受損之多肽之經修飾T細胞展現完全不存在T細胞受體複合體表面表現。在一些實施例中，包含功能受損之多肽之經修飾T細胞展現減少或不足的T細胞受體交聯。在一些實施例中，經修飾T細胞可在細胞表面上表現一些或所有TCR次單元。經修飾T細胞在其表面上無功能性TCR之情況下不能完全活化。因此，本發明涵蓋之經修飾T細胞當被引入宿主中時，無法產生不合需要之反應。因此，經修飾T細胞不能引起GvHD或HvHD，因為經修飾T細胞無法轉導來自宿主MHC分子之信號。

【0124】在一些實施例中，相比於由向個體投與之未經修飾之T細胞產生的免疫反應，當向同一個體投與該經修飾T細胞時，該經修飾T細胞在該個體中產生減少的免疫反應。本發明之經修飾T細胞可用於T細胞療法之所有應用中。在一些實施例中，經修飾T細胞用於需要T細胞療法之任何方法或組合物中。在一些實施例中，本發明之經修飾T細胞可用於減少或改善或預防或治療癌症、GVHD、移植排斥反應、感染、一或多種自體免疫病症、輻射病或其他疾病或病況。

## IV. 基因編輯系統

### A. CRISPR

【0125】在一些實施例中，本發明之經修飾免疫細胞為經基因編輯修飾之免疫細胞。在一些實施例中，一或多個各自編碼本發明之內源性免疫蛋白之基因座中的插入及/或缺失為基因編輯之結果。在某些實施例中，編碼CD3δ、CD3ε、CD3γ、TRAC、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、

TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii鏈之基因由基因編輯系統修飾。在一些情況下，基因編輯系統包含經RNA引導之核酸酶，諸如成簇規律間隔短回文核酸(CRISPR)-Cas系統。CRISPR系統(在本文中亦稱為CRISPR-Cas系統系統、Cas系統或CRISPR/Cas系統)包含Cas核酸內切酶及對目標基因具有特異性之引導核酸序列，該引導核酸序列在引入至細胞中之後形成使得Cas核酸內切酶能夠在目標基因處引入斷裂(例如，雙股斷裂)之複合體。在一些實施例中，經修飾免疫細胞使用CRISPR/Cas9編輯以破壞一或多種內源性免疫蛋白。

【0126】在一些實施例中，CRISPR-Cas系統用於破壞內源性CD3δ、CD3ε、CD3γ、TRAC、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii鏈中之一或多者，由此引起CD3δ、CD3ε、CD3γ、TRAC、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii鏈之基因表現下調。在一些實施例中，能夠下調一或多種內源性免疫蛋白之基因表現之插入及/或缺失下調一或多種選自由以下組成之群之內源性蛋白的表現：CD3δ、CD3ε、CD3γ、TRAC、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii鏈。在一些實施例中，能夠下調基因表現之插入及/或缺失中之各者包含CRISPR相關系統。在一些實施例中，CRISPR相關系統為CRISPR相關Cas核酸內切酶及引導RNA。

【0127】在一些實施例中，Cas核酸內切酶包含Cas9核酸內切酶。在一些情況下，Cas9核酸內切酶來源於或基於例如以下之Cas9分子：釀膿鏈球菌(例如，SpCas9)、嗜熱鏈球菌(*S. thermophiles*)、金黃色葡萄球

菌(例如，SaCas9)或腦膜炎雙球菌(*Neisseria meningitides*)。在一些情況下，Cas9核酸內切酶來源於或基於例如以下之Cas9分子：燕麥嗜酸菌(*Acidovorax avenae*)、胸膜肺炎放線桿菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*)、產琥珀酸放線桿菌(*Actinobacillus succinogenes*)、豬放線桿菌(*Actinobacillus suis*)、放線菌(*Actinomyces sp.*)、反硝化嗜脂環菌(*cycliphilus denitrificans*)、少食胺基單胞菌(*Aminomonas paucivorans*)、蠟樣芽胞桿菌(*Bacillus cereus*)、史氏芽孢桿菌(*Bacillus smithii*)、蘇力菌(*Bacillus thuringiensis*)、擬桿菌(*Bacteroides sp.*)、海洋芽殖小梨形菌(*Blastopirellula marina*)、根瘤菌(*Bradyrhiz obium sp.*)、側孢短小芽孢桿菌(*Brevibacillus latemsporus*)、大腸彎曲桿菌(*Campylobacter coli*)、空腸彎曲桿菌(*Campylobacter jejuni*)、男孩兒彎曲桿菌(*Campylobacter lad*)、普尼側螺旋菌候選種(*Candidatus Puniceispirillum*)、解纖維素梭菌(*Clostridiu cellulolyticum*)、產氣莢膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、擁擠棒狀桿菌(*Corynebacterium accolens*)、白喉棒狀桿菌(*Corynebacterium diphtheria*)、馬氏棒狀桿菌(*Corynebacterium matruchotii*)、絲貝玫瑰桿菌(*Dinoroseobacter sliibae*)、直腸真桿菌(*Eubacterium rectale*)、細長真桿菌(*Eubacterium dolichum*)、γ變形桿菌(*gamma proteobacterium*)、重氮營養葡糖酸醋桿菌(*Gluconacetobacler diazotrophicus*)、副流感嗜血桿菌(*Haemophilus parainfluenzae*)、生痰嗜血桿菌(*Haemophilus sputorum*)、加拿大螺旋桿菌(*Helicobacter canadensis*)、同性戀螺旋桿菌(*Helicobacter cinaedi*)、鼬鼠螺旋桿菌(*Helicobacter mustelae*)、營養泥桿菌(*Ilyobacler polytropus*)、金氏金氏菌(*Kingella kingae*)、捲曲乳桿菌(*Lactobacillus*

*crispatus*)、伊氏李斯特氏菌(*Listeria ivanovii*)、產單核細胞李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)、李斯特氏菌(*Listeriaceae bacterium*)、甲基孢囊菌屬(*Methylocystis sp.*)、甲烷氧化菌(*Methylosinus trichosporium*)、羞怯動彎桿菌(*Mobiluncus mulieris*)、桿狀奈瑟氏菌(*Neisseria bacilliformis*)、灰色奈瑟球菌(*Neisseria cinerea*)、淺黃奈瑟氏菌(*Neisseria flavescens*)、奈瑟氏菌屬乳糖奈瑟氏菌(*Neisseria lactamica. Neisseria sp.*)、瓦茨瓦爾西奈瑟氏菌(*Neisseria wadsworthii*)、亞硝化單胞菌(*Nitrosomonas sp.*)、食清潔劑細小棒菌(*Parvibaculum lavamentivorans*)、多殺性巴氏桿菌(*Pasteurella multocida*)、琥珀酸考拉桿菌(*Phascolarctobacterium succinatutens*)、丁香羅爾斯頓菌(*Ralstonia syzygii*)、沼澤紅假單胞菌(*Rhodopseudomonas palustris*)、小紅卵菌(*Rhodovulum sp.*)、米氏西蒙斯氏菌(*Simonsiella muelleri*)、鞘脂單胞菌(*Sphingomonas sp.*)、威尼亞芽孢乳桿菌(*Sporolactobacillus vineae*)、路鄧葡萄球菌(*Staphylococcus lugdunensis*)、鏈球菌(*Streptococcus sp.*)、罕見小球菌(*Subdoligranulum sp.*)、運動替斯崔納菌(*Tislrella mobilis*)、密螺旋體菌(*Treponema sp.*)或艾森氏蚯蚓狀腎桿菌(*Verminephrobacter eiseniae*)。

【0128】在一些實施例中，Cas9核酸內切酶來源於以下之Cas9分子：釀膿鏈球菌(例如菌株SF370、MGAS 10270、MGAS 10750、MGAS2096、MGAS315、MGAS5005、MGAS6180、MGAS9429、NZ131及SSI- 1)、嗜熱鏈球菌(*S. thermophilus*) (例如菌株LMD-9)、假豕鏈球菌(*S. pseudoporcinus*) (例如菌株SPIN 20026)、變異鏈球菌(*S. mutans*) (例如菌株UA 159、NN2025)、獼猴鏈球菌(*S. macacae*) (例如菌

株NCTC1 1558)、解沒食子酸鏈球菌(*S. gallolylicus*) (例如菌株UCN34、ATCC BAA-2069)、馬鏈球菌(*S. equines*) (例如菌株ATCC 9812、MGCS 124)、停乳鏈球菌(*S. dysdalactiae*) (例如菌株GGS 124)、牛鏈球菌(*S. bovis*) (例如菌株ATCC 700338)、克米諾蘇鏈球菌(*S. cmginosus*) (例如F021 1)、無乳鏈球菌(*S. agalactia*) (例如菌株NEM316、A909)、單核球增多性李氏菌(*Listeria monocytogenes*) (例如菌株F6854)、無害李斯特氏菌(*Listeria innocua*/*L. innocua*，例如菌株Clip 11262)、意大利腸球菌(*Enterococcus italicus*) (例如菌株DSM 15952)或屎腸球菌(*Enterococcus faecium*) (例如菌株1,23,408)。

【0129】在一些情況下，核酸內切酶包含Cas3、Cas4、Cas8a、Cas8b、Cas9、Cas10、Cas10d、Cas12a、Cas12b、Cas12d、Cas12e、Cas12f、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas13、Cas14、CasX、Cse1、Csy1、Csn2、Cpf1、C2c1、Csm2、Cmr5、Fok1、釀膿鏈球菌Cas9、金黃色葡萄球菌Cas9、MAD7核酸酶(V型CRISPR核酸酶)或其任何組合。

**B. 引導RNA**

【0130】在一些實施例中，引導核酸為引導RNA (gRNA)分子，其將Cas-RNA複合體導引至目標序列。在一些情況下，導引係經由雜交gRNA之一部分與DNA (例如經由gRNA靶向域)及藉由結合gRNA分子之一部分與RNA引導之核酸酶或其他效應分子(例如經由至少gRNA tracr)來實現。在一些實施例中，gRNA分子由在本文中稱為「單引導RNA」(「sgRNA」)之單一連續聚核苷酸分子組成。在其他實施例中，gRNA分子係由複數個，通常兩個聚核苷酸分子組成，該等聚核苷酸分子本身能夠締合，通常經由雜交締合，在本文中稱為「雙引導RNA」

(「dgRNA」)。

【0131】 在一些情況下，gRNA分子包含crRNA及tracr，其可視情況在單一聚核苷酸上或在各別聚核苷酸上。在一些情況下，crRNA包含靶向域及與tracr相互作用以形成旗桿區(flagpole region)之區域。tracr包含結合於核酸酶或其他效應分子之gRNA分子之部分。在一些實施例中，tracr包含特異性結合於Cas核酸內切酶(例如Cas9)之核酸序列。在一些實施例中，tracr包含形成旗桿之一部分之核酸序列。在一些實施例中，靶向域為識別，例如與目標DNA內之原間隔序列互補的gRNA分子之部分。

【0132】 原間隔序列相鄰模體(PAM)係2-6個鹼基對DNA序列，其鄰近於原間隔序列之3'端定位且由Cas核酸內切酶識別。在一些情況下，各Cas核酸內切酶識別特定PAM序列。例示性PAM序列包括由釀膿鏈球菌Cas9核酸內切酶識別之NGG序列；或由嗜熱鏈球菌Cas9核酸內切酶識別之NGGNG或NNAGAAW序列，其中N為任何核苷酸。熟習此項技術者應瞭解如何基於連同其中之Cas核酸內切酶將被識別之PAM序列一起使用的特定Cas核酸內切酶設計gRNA分子。

【0133】 在一些實施例中，引導RNA包含與選自由以下組成之群之內源性免疫蛋白基因座之目標序列充分互補的引導序列：CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP及恆定鏈(Ii鏈)。在一些實施例中，引導RNA包含與一或多個基因座內之序列互補之引導序列，該一或多個基因座各自編碼選自由以下組成之群的免疫蛋白：CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP及恆定鏈(Ii鏈)。在一些實施例中，引導RNA與

CD3δ、CD3ε或CD3γ之一或多個外顯子內的序列互補。在一些實施例中，引導RNA與CD3δ、CD3ε或CD3γ之外顯子1內之序列互補。在一些實施例中，CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或恆定鏈(Ii鏈)之gRNA核酸序列具有表4中所揭示之核酸序列。

【0134】在一些實施例中，引導RNA包含與CD3δ基因座內之序列互補之引導序列且引導RNA包含SEQ ID NO: 53中所闡述之核酸序列。在一些實施例中，引導RNA包含與CD3ε基因座內之序列互補之引導序列且引導RNA包含SEQ ID NO: 52中所闡述之核酸序列。在一些實施例中，引導RNA包含與CD3γ基因座內之序列互補之引導序列且引導RNA包含SEQ ID NO: 54中所闡述之核酸序列。在一些實施例中，引導RNA包含與B2M基因座內之序列互補之引導序列且引導RNA包含SEQ ID NO: 55中所闡述之核酸序列。在一些實施例中，引導RNA包含與CIITA (C2TA)基因座內之序列互補之引導序列且引導RNA包含SEQ ID NO: 61中所闡述之核酸序列。在一些實施例中，引導RNA包含與TAP1基因座內之序列互補之引導序列且引導RNA包含SEQ ID NO: 56中所闡述之核酸序列。在一些實施例中，引導RNA包含與TAP2基因座內之序列互補之引導序列且引導RNA包含SEQ ID NO: 57中所闡述之核酸序列。在一些實施例中，引導RNA包含與TAPBP基因座內之序列互補之引導序列且引導RNA包含SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 59或其任何組合中所闡述之核酸序列。在一些實施例中，引導RNA包含與NLRC5基因座內之序列互補之引導序列且引導RNA包含SEQ ID NO: 60中所闡述之核酸序列。在一些實施例中，引導RNA包含與HLA-DM基因座內之序列互補之引導序列且引導RNA包含SEQ ID

NO: 62中所闡述之核酸序列。在一些實施例中，引導RNA包含與RFX5基因座內之序列互補之引導序列且引導RNA包含SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 64或其任何組合中所闡述之核酸序列。在一些實施例中，引導RNA包含與RFXANK基因座內之序列互補之引導序列且引導RNA包含SEQ ID NO: 65中所闡述之核酸序列。在一些實施例中，引導RNA包含與RFXAP基因座內之序列互補之引導序列且引導RNA包含SEQ ID NO: 66中所闡述之核酸序列。在一些實施例中，引導RNA包含與Ii鏈基因座內之序列互補之引導序列且引導RNA包含SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 68或其任何組合中所闡述之核酸序列。

【0135】 在一些實施例中，一或多個、兩個或更多個、三個或更多個或四個或更多個引導核酸(例如，引導RNA分子)經Cas核酸內切酶轉染至免疫細胞中。在一些情況下，約一個、兩個或三個引導核酸(例如引導RNA分子)經Cas核酸內切酶轉染至免疫細胞中。在一些情況下，約三個引導核酸(例如引導RNA分子)經Cas核酸內切酶轉染至免疫細胞中。在一些情況下，約兩個引導核酸(例如引導RNA分子)經Cas核酸內切酶轉染至免疫細胞中。在一些情況下，約一個引導核酸(例如引導RNA分子)經Cas核酸內切酶轉染至免疫細胞中。

【0136】 在一些實施例中，載體驅動CRISPR系統之表現。此項技術充滿適用於本發明之適合的載體。待使用之載體適合於在真核細胞中複製且視情況整合。典型載體含有轉錄及轉譯終止子、起始序列及適用於調節所需核酸序列之表現的啟動子。本發明之載體亦可用於核酸標準基因遞送方案。基因遞送方法為此項技術中已知的。此外，載體可以病毒載體形式提供至細胞。病毒載體技術為此項技術中熟知且描述於例如Sambrook

等人，第4版，Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 2012；及其他病毒學及分子生物學手冊中。適用作載體之病毒包括但不限於反轉錄病毒、腺病毒、腺相關病毒、疱疹病毒、辛德比病毒(Sindbis virus)、γ反轉錄病毒及慢病毒。不希望受理論所束縛，適合的載體含有在至少一個生物體中起作用之複製起點、啟動子序列、便利限制性核酸內切酶位點及一或多個可選標記物。在一些實施例中，CRISPR/Cas系統包含表現載體。在一些實施例中，CRISPR/Cas系統包含pAd5/F35-CRISPR載體。

**C. TALEN**

【0137】 在一些實施例中，基因編輯系統為TALEN基因編輯系統。藉由使TAL效應子DNA結合域融合至DNA裂解域來人工產生TALEN。轉錄活化因子樣效應(TALE)可經工程改造以結合於目標DNA。藉由將經工程改造之TALE與DNA裂解域組合，可產生對任何目標DNA序列具有特異性之限制酶。

【0138】 TALE為黃單胞菌屬(Xanthomonas)細菌分泌之蛋白質。DNA結合域含有高度保存之重複33-34個胺基酸序列，第12及第13胺基酸除外。此等兩個位置高度可變，展示與特異性核苷酸識別之較強相關性，且因此可經工程改造以結合於目標DNA序列。

【0139】 為了製造TALEN，TALE蛋白質融合至包含例如野生型或突變Fok1核酸內切酶之核酸酶(N)。Fok1域用作二聚體，需要兩個具有獨特DNA結合域之構築體，該等結合域針對目標基因體中之位點且具有適當方向及間距。特異性及脫靶效應可藉由改變TALE DNA結合域與Fok1裂解域之間的胺基酸殘基數目及兩個個別TALEN結合位點之間的鹼基數

目來調節。

**D. 鋅指核酸酶**

【0140】 在一些實施例中，基因編輯系統為鋅指核酸酶(ZFN)基因編輯系統。鋅指核酸酶為人工核酸酶，其可用於修飾目標核酸序列之一或多個核酸位點。類似於TALEN編輯系統，ZFN包含融合至DNA結合域之Fok1核酸酶域(或其衍生物)。在ZFN之情況中，DNA結合域包含一或多個鋅指。鋅指為藉由一或多個鋅離子穩定之小蛋白質結構模體。鋅指可包含例如Cys2His2，且可識別大致3 -bp序列。具有已知特異性之多個鋅指可組合產生多指多肽，其識別約6、9、12、15或18-bp序列。

【0141】 ZFN識別非回文DNA位點。為了裂解目標位點，一對ZFN二聚且組裝至目標位點之相對股。多種選擇及模組組裝技術可用於產生識別特異性序列(包括噬菌體顯示)、酵母單雜交系統、細菌單雜交及雙雜交系統及哺乳動物細胞之鋅指(及其組合)。

**E. 巨核酸酶**

【0142】 在一些實施例中，基因編輯系統為巨核酸酶基因編輯系統。巨核酸酶為識別15-40個鹼基對裂解位點的人工核酸酶。在一些情況下，巨核酸酶基於其影響核酸酶活性及/或DNA識別之結構模體分組成家族。LAGLIDADG家族之成員之特徵為具有保守LAGLIDADG模體之一個或兩個複本。在一些情況下，LAGLIDADG巨核酸酶與LAGLIDADG模體之單一複本形成均二聚體，而具有兩個LAGLIDADG模體複本之成員以單體形式存在。GIY-YIG家族成員具有GP-YIG模組，該模組為70-100個殘基長且包括四個或五個保守序列模體，該等模體具有四個不變殘基，其中兩個殘基為活性所需。His-Cys盒巨核酸酶之特徵為在涵蓋數百胺基

酸殘基之區域內的高度保守組胺酸及半胱胺酸系列。NHN家族成員由含有兩對由天冬醯胺殘基包圍之保守組胺酸的模體定義。用於工程改造具有改變之DNA結合特異性(例如與預定核酸序列結合)的巨核酸酶的策略為此項技術中已知的。

【0143】 在一些情況下，巨核酸酶為包含融合至巨核酸酶N端之TALE域的稱為megaTAL之雜交核酸酶。在一些情況下，巨核酸酶為LAGLIDADG家族之成員。

【0144】 在一些實施例中，基因編輯系統為基因緘默系統。例示性基因緘默系統包含RNAi、siRNA或shRNA介導之基因緘默系統。

**V. 外源性核酸**

【0145】 本發明提供經修飾免疫細胞或其前驅體細胞，其包含編碼內源性免疫蛋白之一或多個基因座中的能夠下調內源性免疫蛋白之基因表現的插入及/或缺失及外源性核酸。在一些實施例中，外源性核酸編碼嵌合抗原受體(CAR)、經工程改造T細胞受體(TCR)、殺手細胞免疫球蛋白樣受體(KIR)、抗原結合多肽、細胞表面受體配位體或腫瘤抗原。在一些實施例中，本文揭示一種表現外源性多肽之經修飾免疫細胞。在一些情況下，外源性核酸編碼嵌合抗原受體(CAR)。在一些情況下，外源性核酸編碼抗原結合多肽。在一些情況下，外源性核酸編碼殺手細胞免疫球蛋白樣受體(KIR)。在其他情況下，外源性核酸編碼細胞表面受體配位體或腫瘤抗原。

**A. 嵌合抗原受體**

【0146】 本發明亦包括具有如本文所描述之下調的基因表現之經修飾T細胞及嵌合抗原受體(CAR)。在一些實施例中，本發明涵蓋包含CAR

或編碼CAR之核酸的經修飾T細胞，其中CAR包含抗原結合域、鉸鏈域、跨膜域、協同刺激域及胞內信號傳導域。設想本文所述之包含有包含任何抗原結合域、任何鉸鏈、任何跨膜域、任何協同刺激域及任何胞內信號傳導域之CAR的任何經修飾細胞，且熟習此項技術者鑒於本文中之揭示內容可容易地理解且製得。

【0147】 抗原結合域可操作地連接至CAR之另一域，諸如皆在本文中有描述之跨膜域或胞內域，用於在免疫細胞中表現。在一個實施例中，編碼抗原結合域之第一核酸序列與編碼跨膜域之第二核酸可操作地連接，且進一步與編碼胞內域之第三核酸序列可操作地連接。

【0148】 本文所描述之抗原結合域可與本文所描述之任何跨膜域、本文所描述之任何胞內域或細胞質域或本文所描述之任何可包括於本發明之CAR中的其他域組合。本發明之個體CAR亦可包括如本文所描述之間隔域。在一些實施例中，抗原結合域、跨膜域及胞內域中之各者由連接子分隔開。

**1. 抗原結合域**

【0149】 CAR之抗原結合域為CAR之胞外區，用於與包括蛋白質、碳水化合物及糖脂之特異性目標抗原結合。在一些實施例中，CAR包含對目標細胞(例如癌細胞)上之目標抗原(例如腫瘤相關抗原)之親和力。目標抗原可包括與目標細胞相關之任何類型之蛋白質或其抗原決定基。舉例而言，CAR可包含對目標細胞上之目標抗原之親和力，其指示目標細胞之特定狀態。

【0150】 如本文所述，對目標細胞上之特異性目標抗原具有親和力之本發明CAR可包含目標特異性結合域。在一些實施例中，目標特異性結

合域為鼠類目標特異性結合域，例如目標特異性結合域來源於鼠類。在一些實施例中，目標特異性結合域為人類目標特異性結合域，例如目標特異性結合域來源於人類。

【0151】 抗原結合域可包括結合於抗原之任何域且可包括但不限於單株抗體、多株抗體、合成抗體、人類抗體、人類化抗體、非人類抗體及其任何片段。因此，在一個實施例中，抗原結合域部分包含哺乳動物抗體或其片段。在一些實施例中，抗原結合域包含全長抗體。在一些實施例中，抗原結合域包含抗原結合片段(Fab)，例如Fab、Fab'、$F(ab')_2$、單特異性$Fab_2$、雙特異性$Fab_2$、三特異性$Fab_2$、單鏈可變片段(scFv)、dAb、串聯scFv、VhH、V-NAR、駱駝科抗體(camelid)、雙功能抗體、微型抗體、三功能抗體或四功能抗體。

【0152】 在一些實施例中，本發明之CAR可對一或多種目標細胞上之一或多種目標抗原具有親和力。在一些實施例中，CAR可對單一目標細胞上之一或多種目標抗原具有親和力。在此類實施例中，CAR為雙特異性CAR或多特異性CAR。在一些實施例中，CAR包含一或多個賦予一或多種目標抗原親和力的目標特異性結合域。在一些實施例中，CAR包含一或多個賦予相同目標抗原親和力之目標特異性結合域。舉例而言，包含一或多個對相同目標抗原具有親和力之目標特異性結合域的CAR可結合目標抗原之不同抗原決定基。當複數個目標特異性結合域存在於CAR中時，結合域可以串聯方式排列且可藉由連接肽分隔開。舉例而言，在包含兩個目標特異性結合域之CAR中，結合域經由多肽連接子、Fc鉸鏈區或膜鉸鏈區彼此共價連接在單一多肽鏈上。

【0153】 如本文所用，術語「單鏈可變片段」或「scFv」為共價連

接形成VH::VL雜二聚體的免疫球蛋白(例如，小鼠或人類)之重鏈(VH)及輕鏈(VL)之可變區的融合蛋白。重鏈(VH)及輕鏈(VL)直接接合或藉由編碼肽之連接子或間隔子接合，該連接子或間隔子連接VH之N端與VL之C端或VH之C端與VL之N端。術語「連接子」及「間隔子」在本文中可互換地使用。在一些實施例中，抗原結合域(例如Tn-MUC1結合域、PSMA結合域或間皮素結合域)包含具有自N端至C端VH-連接子-VL之組態的scFv。在一些實施例中，抗原結合域(例如Tn-MUC1結合域、PSMA結合域或間皮素結合域)包含具有自N端至C端VL-連接子-VH之組態的scFv。熟習此項技術者將能夠選擇適用於本發明之組態。

【0154】該連接子通常富含甘胺酸以具有可撓性，且富含絲胺酸或蘇胺酸以具有溶解度。連接子可連接胞外抗原結合域之重鏈可變區及輕鏈可變區。連接子之非限制性實例揭示於Shen等人, Anal. Chem. 80(6):1910-1917 (2008)及WO 2014/087010中。此項技術中已知各種連接序列，包括但不限於甘胺酸絲胺酸(GS)連接子，諸如(GS)n、(GSGGS)n (SEQ ID NO: 47)、(GGGS)n (SEQ ID NO: 48)及(GGGGS)n (SEQ ID NO: 49)，其中n表示至少1之整數。例示性連接序列可包含胺基酸序列，包括但不限於GGSG (SEQ ID NO: 29)、GGSGG (SEQ ID NO: 30)、GSGSG (SEQ ID NO: 31)、GSGGG (SEQ ID NO: 32)、GGGSG (SEQ ID NO: 33)、GSSSG (SEQ ID NO: 34)、GGGGS (SEQ ID NO: 49)或GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 50)及其類似者。熟習此項技術者將能夠選擇適用於本發明之連接序列。在一個實施例中，本發明之抗原結合域(例如Tn-MUC1結合域、PSMA結合域或間皮素結合域)包含重鏈可變區(VH)及輕鏈可變區(VL)，其中VH及VL藉由具有胺基酸序列

GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 50)之連接序列分隔開。在一些實施例中，連接核酸序列包含核苷酸序列GGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTCGGGTGGCGGCGGATCT (SEQ ID NO: 51)。

【0155】 儘管移除恆定區且引入連接子，但scFv蛋白質保持原始免疫球蛋白之專一性。單鏈Fv多肽抗體可自包含VH及VL編碼序列之核酸表現，如Huston等人, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988)所述。具有抑制活性之拮抗scFv業已描述。參見例如Zhao等人, *Hybridoma* (Larchmt), *27*(6):455-51 (2008)。具有刺激活性之促效scFv業已描述。參見例如Peter等人, *J. Biol. Chem.*, *25278*(38):36740-7 (2003)。

【0156】 如本文所用，「Fab」係指結合於抗原、但係單價且不具有Fc部分的抗體結構之片段，例如藉由番木瓜蛋白酶消化的抗體產生兩個Fab片段及Fc片段(例如重(H)鏈恆定區；不結合於抗原的Fc區)。

【0157】 在一些情況下，抗原結合域可能來源於最終使用CAR之相同物種。舉例而言，對於用於人類，CAR之抗原結合域可包含如本文中其他段落所描述之人類抗體或其片段。

【0158】 因此，例如藉由本文所述方法獲得之免疫細胞可經工程改造以表現靶向以下癌症相關抗原(腫瘤抗原)中之一者的CAR：CD19；CD20；CD22 (Siglec 2)；CD37；CD 123；CD22；CD30；CD 171；CS-1 (亦稱為CD2子集1、CRACC、SLAMF7、CD319及19A24)；C型凝集素樣分子-1 (CLL-1或CLECL1)；CD33；CD133；表皮成長因子受體(EGFR)；表皮成長因子受體變異體III (EGFRvIII)；人類表皮成長因子受體(HER1)；神經節苷脂G2 (GD2)；神經節苷脂GD3 (aNeu5Ac(2-

8)aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1 -4)bDGlcp(1- 1)Cer)；TNF受體家族成員B細胞成熟抗原(BCMA)；Tn抗原((Tn Ag)或(GalNAca-Ser/Thr))；前列腺特異性膜抗原(PSMA)；受體酪胺酸激酶樣孤兒受體1 (ROR1)；Fms樣酪胺酸激酶3 (FLT3)；腫瘤相關糖蛋白72 (TAG72)；CD38；CD44v6；癌胚抗原(CEA)；上皮細胞黏附分子(EPCAM)；B7H3 (CD276)；KIT (CD117)；介白素-13受體次單元α-2 (IL- 13Ra2或CD213A2)；間皮素；介白素11受體α (IL- 1 1Ra)；前列腺幹細胞抗原(PSCA)；蛋白酶絲胺酸21 (Testisin或PRSS21)；血管內皮生長因子受體2 (VEGFR2)；Lewis(Y)抗原；CD24；血小板衍生生長因子受體β (PDGFR-β)；階段特異性胚抗原-4 (SSEA-4)；葉酸受體α；受體酪胺酸蛋白激酶ERBB2 (Her2/neu)；細胞表面相關黏蛋白1 (MUC 1)；GalNAca1-O-Ser/Thr (Tn) MUC 1 (TnMUC1)；神經細胞黏附分子(NCAM)；前列腺酶；前列腺酸性磷酸酶(PAP)；突變延長因子2 (ELF2M)；蝶素(Ephrin) B2；纖維母細胞活化蛋白α (FAP)；類胰島素生長因子1受體(IGF-I受體)、碳酸酐酶IX (CAIX)；蛋白酶體(前體，巨蛋白因子)次單元β型9 (LMP2)；糖蛋白100 (gp100)；由斷點叢集區(BCR)及阿貝爾森鼠(Abelson murine)白血病病毒致癌基因同源物1 (Abl) (bcr-abl)組成的致癌基因融合蛋白質；酪胺酸酶；蝶素A型受體2 (EphA2)；海藻糖基GM1；唾液酸基Lewis黏附分子(sLe)；神經節苷脂GM3 (aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlcp(1-1)Cer)；轉麩醯胺酸酶5 (TGS5)；高分子量黑色素瘤相關抗原(HMWMAA)；o-乙醯基-GD2神經節苷脂(OAcGD2)；葉酸受體β；腫瘤內皮標記物1 (TEM1/CD248)；腫瘤內皮相關標記物7 (TEM7R)；緊密連接蛋白6 (CLDN6)；促甲狀腺激素受體(TSHR)；G蛋白偶合受體C類第5族成員D (GPRC5D)；X染色體開放閱

讀框架61 (CXORF61)；CD97；CD179a；多形性淋巴瘤激酶(ALK)；聚唾液酸；胎盤特異性蛋白1 (PLAC1)；globoH糖基神經醯胺之六醣部分(GloboH)；乳腺分化抗原(NY-BR-1)；尿溶蛋白2 (UPK2)；酪胺酸蛋白激酶Met (c-Met)；A型肝炎病毒細胞受體1 (HAVCR1)；腎上腺素受體β3 (ADRB3)；泛連接蛋白3 (PANX3)；G蛋白偶合受體20 (GPR20)；淋巴細胞抗原6複合體基因座K 9 (LY6K)；嗅覺受體51E2 (OR51E2)；TCRγ候補閱讀框架蛋白質(TARP)；威爾姆斯氏腫瘤蛋白質(Wilms tumor protein) (WT1)；癌症/睪丸抗原1 (NY-ESO-1)；癌症/睪丸抗原2 (LAGE-la)；黑色素瘤相關抗原1 (MAGE-A1)；定位於染色體12p上的ETS易位變異體基因6 (ETV6-AML)；精子蛋白質17 (SPA17)；X抗原家族成員1A (XAGEl)；血管生成素結合細胞表面受體2 (Tie 2)；黑色素瘤癌症睪丸抗原-1 (MAD-CT-1)；黑色素瘤癌症睪丸抗原-2 (MAD-CT-2)；Fos相關抗原1；腫瘤蛋白p53 (p53)；p53突變；前列腺蛋白；存活蛋白；端粒酶；前列腺癌腫瘤抗原-1 (PCTA-1或半乳糖凝集素8)、由T細胞1識別之黑色素瘤抗原(MelanA或MARTI)；大鼠肉瘤(Ras)突變；人類端粒酶反轉錄酶(hTERT)；肉瘤易位斷點；細胞凋亡之黑色素瘤抑制劑(ML-IAP)；ERG(跨膜蛋白酶，絲胺酸2 (TMPRSS2)ETS融合基因)；N-乙醯基葡糖胺基轉移酶V (NA17)；配對框蛋白Pax-3 (PAX3)；雄激素受體；細胞週期素B 1；v-myc禽類髓細胞瘤病病毒致癌基因神經母細胞瘤衍生同源物(MYCN)；Ras同源物家族成員C (RhoC)；酪胺酸酶相關蛋白質2 (TRP-2)；細胞色素P450 1B 1 (CYP1B 1)；由T細胞3識別之CCCTC結合因子(鋅指蛋白)樣(BORIS或印跡位點調節子兄弟)鱗狀細胞癌抗原(SART3)；配對框蛋白Pax-5 (PAX5)；前頂體素結合蛋白sp32 (OY-TES 1)；淋巴細

胞特異性蛋白質酪胺酸激酶(LCK)；A激酶錨定蛋白4 (AKAP-4)；滑膜肉瘤X斷點2 (SSX2)蛋白；晚期糖基化終產物受體(RAGE-1)；腎遍在蛋白(renal ubiquitous) 1 (RU1)；腎遍在蛋白2 (RU2)；豆莢蛋白；人類乳頭狀瘤病毒E6 (HPV E6)；人類乳頭狀瘤病毒E7 (HPV E7)；腸羧基酯酶；突變熱休克蛋白70-2 (mut hsp70-2)；CD79a；CD79b；CD72；白血球相關免疫球蛋白樣受體1 (LAIR1)；IgA受體之Fc片段(FCAR或CD89)；白血球免疫球蛋白樣受體子族A成員2 (LILRA2)；CD300分子樣家族成員f (CD300LF)；C型凝集素域家族12成員A (CLEC12A)；骨髓基質細胞抗原2 (BST2)；含EGF樣模組黏蛋白樣激素受體樣2 (EMR2)；淋巴細胞抗原75 (LY75)；磷脂肌醇蛋白聚糖(Glypican)-2 (GPC2)；磷脂肌醇蛋白聚糖-3 (GPC3)；NKG2D；KRAS；GDNF家族受體α-4 (GFRa4)；IL13Ra2；Fc受體樣5 (FCRL5)；及免疫球蛋白λ樣多肽1 (IGLL1)。

【0159】在一些實施例中，免疫細胞經工程改造以表現靶向CD19、CD20、CD22、BCMA、CD37、間皮素、PSMA、PSCA、Tn-MUC1、EGFR、EGFRvIII、c-Met、HER1、HER2、CD33、CD133、GD2、GPC2、GPC3、NKG2D、KRAS或WT1之CAR。

**2. 跨膜域**

【0160】關於跨膜域，CAR可經設計以包含將CAR之抗原結合域連接至胞內域的跨膜域。個體CAR之跨膜域為能夠跨越細胞(例如免疫細胞或其前驅體)之質膜的區域。跨膜域用於插入至細胞膜，例如真核細胞膜中。在一些實施例中，跨膜域插入CAR之抗原結合域與胞內域之間。

【0161】在一個實施例中，跨膜域天然地與CAR中之一或多個域締合。在一些情況下，可以藉由胺基酸取代來選擇或修飾跨膜域，以避免此

類域結合於相同或不同表面膜蛋白之跨膜域，從而使與受體複合體中之其他元件的相互作用降至最低。

【0162】在一些實施例中，跨膜域可以來源於天然或合成來源。當來源為天然來源時，該域可來源於任何膜結合蛋白或跨膜蛋白，例如I型跨膜蛋白。在來源為合成的情況下，跨膜域可為促進CAR插入至細胞膜中之任何人工序列，例如人工疏水性序列。在一些實施例中，本發明中特定使用之跨膜域包括但不限於來源於以下之跨膜域：(T細胞受體之α、β或ζ鏈、CD28、CD2、CD3ε、CD45、CD4、CD5、CD7、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134 (OX-40)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、CD278 (ICOS)、CD357 (GITR)、鐸樣受體1 (TLR1)、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9及殺手免疫球蛋白樣受體(KIR)。在一些實施例中，跨膜域包含選自由以下組成之群的蛋白質之至少一個跨膜區：T細胞受體之α、β或ζ鏈、CD28、CD2、CD3ε、CD45、CD4、CD5、CD7、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134 (OX-40)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、CD278 (ICOS)、CD357 (GITR)、鐸樣受體1 (TLR1)、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9及殺手免疫球蛋白樣受體(KIR)。在一些實施例中，跨膜域可為合成的。在一些實施例中，合成性跨膜域主要包含疏水性殘基，諸如白胺酸及纈胺酸。在某些例示性實施例中，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。

【0163】本文所描述之跨膜域可與本文所描述之任何抗原結合域、本文所描述之任何協同刺激信號傳導域、本文所描述之任何胞內信號傳導

域或本文所描述之任何可包括於個體CAR中之其他域組合。

【0164】 在一個實施例中，跨膜域包含CD8α跨膜域。在一些實施例中，跨膜域包含有包含SEQ ID NO: 23中所闡述之胺基酸序列的CD8α跨膜域。在一些實施例中，跨膜域包含SEQ ID NO: 24中所闡述之核苷酸序列。

【0165】 在一些實施例中，跨膜域包含CD28跨膜域。在一些實施例中，CAR包含有包含SEQ ID NO: 27中所闡述之胺基酸序列的CD28跨膜域。在一些實施例中，CD28跨膜域包含SEQ ID NO: 28中所闡述之核苷酸序列。

【0166】 跨膜及/或鉸鏈域之可容許變化將為熟習此項技術者已知，同時維持其預期功能。在一些實施例中，跨膜域包含與SEQ ID NO: 23及/或27中所闡述之胺基酸序列中之任一者具有至少約80%、至少約81%、至少約82%、至少約83%、至少約84%、至少約85%、至少約86%、至少約87%、至少約88%、至少約89%、至少約90%、至少約91%、至少約92%、至少約93%、至少約94%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%序列一致性的胺基酸序列。在一些實施例中，跨膜域由一核酸序列編碼，該核酸序列包含與SEQ ID NO: 24及/或28中所闡述之核苷酸序列中之任一者具有至少約80%、至少約81%、至少約82%、至少約83%、至少約84%、至少約85%、至少約86%、至少約87%、至少約88%、至少約89%、至少約90%、至少約91%、至少約92%、至少約93%、至少約94%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%序列一致性的核苷酸序列。跨膜域可以與任何鉸鏈域組合及/或可以包含本文所述之一或多個跨膜域。

【0167】在一些實施例中，CAR包含：任何抗原結合域；跨膜域，其選自由以下組成之群的跨膜域：T細胞受體之α、β或ζ鏈、CD28、CD2、CD3ε、CD45、CD4、CD5、CD7、CD8、CD9、CD 16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134 (OX-40)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、CD278 (ICOS)、CD357 (GITR)、鐸樣受體1 (TLR1)、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9及殺手免疫球蛋白樣受體(KIR)；本文所述之任何協同刺激信號傳導域及任何胞內域或細胞質域，或本文所述之任何可包括於CAR中之其他域及視情況存在之鉸鏈域。

【0168】在一些實施例中，CAR在CAR之胞外域與跨膜域之間或在CAR之胞內域與跨膜域之間進一步包含間隔域。如本文所用，術語「間隔域」通常意謂用於使跨膜域連接至多肽鏈中之胞外域或胞內域的任何寡肽或多肽。間隔域可包含至多約300個胺基酸，例如約10至約100個胺基酸，或約25至約50個胺基酸。在一些實施例中，間隔域可為短寡肽或多肽連接子，例如長度在約2與約10個胺基酸之間。舉例而言，甘胺酸-絲胺酸二聯體提供個體CAR之跨膜域與胞內信號傳導域之間的尤其適合之連接子。

【0169】因此，本發明之CAR可包含本文所述之跨膜域、鉸鏈域或間隔域中之任一者。

**3. 鉸鏈域**

【0170】在一些實施例中，本發明之個體CAR包含鉸鏈區。CAR之鉸鏈區為位於抗原結合域與跨膜域之間的親水性區。在一些實施例中，鉸鏈域促進CAR之適當蛋白質摺疊。在一些實施例中，鉸鏈域為CAR之視

情況存在之組分。在一些實施例中，鉸鏈域包含選自以下之域：抗體之Fc片段、抗體之鉸鏈區、抗體之CH2區、抗體之CH3區、人工鉸鏈序列或其組合。在一些實施例中，鉸鏈域係選自(但不限於) CD8a鉸鏈、由可小至三個甘胺酸(Gly)之多肽製成的人工鉸鏈。在一些實施例中，鉸鏈區為來源於受體之鉸鏈區多肽。在一些實施例中，鉸鏈區為CD8衍生之鉸鏈區)。在一個實施例中，鉸鏈域包含來源於人類CD8之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，個體CAR包含CD8α鉸鏈域及CD8α跨膜域。在一些實施例中，CD8α鉸鏈域包含SEQ ID NO: 25中所闡述之胺基酸序列。在一些實施例中，CD8α鉸鏈域包含SEQ ID NO: 26中所闡述之核苷酸序列。

【0171】 在一些實施例中，鉸鏈域包含與SEQ ID NO 25中所闡述之胺基酸序列中之任一者具有至少約80%、至少約81%、至少約82%、至少約83%、至少約84%、至少約85%、至少約86%、至少約87%、至少約88%、至少約89%、至少約90%、至少約91%、至少約92%、至少約93%、至少約94%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%序列一致性的胺基酸序列。在一些實施例中，鉸鏈域由一核酸序列編碼，該核酸序列包含與SEQ ID NO: 26中所闡述之核苷酸序列中之任一者具有至少約80%、至少約81%、至少約82%、至少約83%、至少約84%、至少約85%、至少約86%、至少約87%、至少約88%、至少約89%、至少約90%、至少約91%、至少約92%、至少約93%、至少約94%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%序列一致性的核苷酸序列。

【0172】 在一些實施例中，鉸鏈域將抗原結合域連接至跨膜域，該

跨膜域連接至胞內域。在例示性實施例中，鉸鏈區能夠支持抗原結合域識別目標細胞上之目標抗原且與其結合。參見例如Hudecek等人，*Cancer Immunol. Res.*, *3*(2): 125-135 (2015)。在一些實施例中，鉸鏈區為可撓性域，因此允許抗原結合域具有最佳識別細胞(諸如腫瘤細胞)上之目標抗原之特異性結構及密度的結構。鉸鏈區的可撓性准許鉸鏈區採用許多不同構形。

【0173】 在一些實施例中，鉸鏈域之長度選自約4至約50個、約4至約10個、約10至約15個、約15至約20個、約20至約25個、約25至約30個、約30至約40個或約40至約50個胺基酸。

【0174】 適合的鉸鏈區可以容易地選擇且可以具有多種適合長度中之任一者，諸如約1個胺基酸(例如甘胺酸(Gly)至約20個胺基酸、約2至約15、約3至約12個胺基酸，包括約4至約10、約5至約9、約6至約8或約7至約8個胺基酸，且可為約1、約2、約3、約4、約5、約6或約7個胺基酸。

【0175】 在一些實施例中，胺基酸係甘胺酸(Gly)。可以使用甘胺酸及甘胺酸-絲胺酸聚合物；Gly及Ser均相對非結構化，且因此可以充當各組分之間的中性繫鏈。可以使用甘胺酸聚合物；甘胺酸甚至比丙胺酸進入顯著更多的phi-psi空間，且受限比具有較長側鏈之殘基小得多(參見例如Scheraga, Rev. Computational. Chem. (1992) 2: 73-142)。在一些實施例中，鉸鏈區包含甘胺酸聚合物(G)n、甘胺酸-絲胺酸聚合物。在一些實施例中，鉸鏈區包含選自由(GS)n、(GSGGS)n (SEQ ID NO: 47)及(GGGS)n (SEQ ID NO: 48)組成之群的甘胺酸-絲胺酸聚合物，其中n為至少一之整數)。在一些實施例中，鉸鏈域包含胺基酸序列，包括但不限於GGSG (SEQ ID NO: 29)、GGSGG (SEQ ID NO: 30)、GSGSG (SEQ ID NO:

31)、GSGGG (SEQ ID NO: 32)、GGGSG (SEQ ID NO: 33)、GSSSG (SEQ ID NO: 34)。在一些實施例中，鉸鏈區包含甘胺酸-丙胺酸聚合物、丙胺酸-絲胺酸聚合物或此項技術中已知之其他可撓性連接子。

【0176】 在一些實施例中，鉸鏈區為免疫球蛋白重鏈鉸鏈區。免疫球蛋白鉸鏈區胺基酸序列為此項技術中已知的。在一些實施例中，免疫球蛋白鉸鏈域包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：DKTHT (SEQ ID NO: 35)；CPPC (SEQ ID NO: 36)；CPEPKSCDTPPPCPR (SEQ ID NO: 37) (參見例如Glaser等人, J. Biol. Chem. (2005) 280:41494-41503)；ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO: 38)；KSCDKTHTCP (SEQ ID NO: 39)；KCCVDCP (SEQ ID NO: 40)；KYGPPCP (SEQ ID NO: 41)；EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 42) (人類IgG1鉸鏈)；ERKCCVECPPCP (SEQ ID NO: 43) (人類IgG2鉸鏈)；ELKTPLGDTTHTCPRCP (SEQ ID NO: 44) (人類IgG3鉸鏈)；SPNMVPHAHHAQ (SEQ ID NO: 45) (人類IgG4鉸鏈)；及類似者。

【0177】 在一些實施例中，鉸鏈區為免疫球蛋白重鏈鉸鏈區。在一些實施例中，鉸鏈選自IgG (諸如人類IgG4)之CH1及CH3域。在一些實施例中，鉸鏈域包含人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4鉸鏈域之胺基酸序列。在一些實施例中，該鉸鏈區相比於野生型(天然存在之)鉸鏈區，可包括一或多個胺基酸取代及/或插入及/或缺失。在一些實施例中，人類IgG1鉸鏈之位置229處之組胺酸(His229)經酪胺酸(Tyr)取代。在一些實施例中，鉸鏈域包含胺基酸序列EPKSCDKTYTCPPCP (SEQ ID NO: 46)。

**4. 協同刺激域**

【0178】 本發明之CAR亦包含胞內域。CAR之胞內域或者細胞質域

負責表現CAR之細胞的活化。因此，術語「胞內域」意欲包括足以轉導活化信號之胞內域之任何部分。在一個實施例中，胞內域包括負責效應功能之域。術語「效應功能」係指細胞之特化功能。T細胞之效應功能例如可為溶胞活性或輔助活性，包括分泌細胞介素。在一個實施例中，CAR之胞內域包括負責信號活化及/或轉導之域。胞內域可經由蛋白質-蛋白質相互作用、生物化學改變或其他反應傳輸信號活化以改變細胞代謝、形狀、基因表現或對嵌合胞內信號傳導分子活化之其他細胞反應。

【0179】 用於本發明之胞內域之實例包括但不限於T細胞受體(TCR)之細胞質部分，及任何協同刺激分子，或在抗原受體接合之後與TCR協同作用以在T細胞中引發信號轉導的任何分子，以及此等元件之任何衍生物或變異體及具有相同功能性能力之任何合成序列。

【0180】 在一些實施例中，胞內域包含協同刺激信號傳導域及胞內信號傳導。在某些實施例中，胞內域包含協同刺激信號傳導域。在一個實施例中，CAR之胞內域包含選自由以下組成之群的協同刺激信號傳導域：來自TNFR超家族中之蛋白質之信號傳導域的一部分、CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40 (CD134)、PD-1、CD7、LIGHT、CD83L、DAP10、DAP12、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、ICOS (CD278)、NKG2C、B7-H3 (CD276)，以及來源於殺手免疫球蛋白樣受體(KIR)之胞內域、其任何衍生物或變異體、其任何具有相同功能性能力之合成序列及其任何組合。

【0181】 在一些實施例中，協同刺激域包含選自由以下組成之群的蛋白質之協同刺激域中之一或多者：TNFR超家族中之蛋白質、CD28、4-1BB (CD137)、OX40 (CD134)、PD-1、CD7、LIGHT、CD83L、

DAP10、DAP12、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、ICOS (CD278)、NKG2C、B7-H3 (CD276)及來源於殺手免疫球蛋白樣受體(KIR)之胞內域或其變異體。在一些實施例中，協同刺激域包含選自由CD28、4-1BB (CD137)、OX40 (CD134)、CD27、CD2或其組合中之蛋白質組成之群的蛋白質之協同刺激域中之一或多者。在一些實施例中，協同刺激信號傳導域包含4-1BB協同刺激域。在一些實施例中，協同刺激信號傳導域包含CD2協同刺激域。在一些實施例中，協同刺激信號傳導域包含CD28協同刺激域。

【0182】 在一個實施例中，CAR之協同刺激域包含有包含SEQ ID NO: 1中所闡述之胺基酸序列的4-1BB協同刺激域。在一些實施例中，4-1BB協同刺激域由包含SEQ ID NO: 2或3中所闡述之核苷酸序列的核酸序列編碼。在一些實施例中，CAR之協同刺激域包含有包含SEQ ID NO: 4中所闡述之胺基酸序列的CD28協同刺激域。在一些實施例中，CD28協同刺激域由包含SEQ ID NO: 5中所闡述之核苷酸序列的核酸序列編碼。在一些實施例中，CAR之協同刺激域包含有包含SEQ ID NO: 6中所闡述之胺基酸序列的CD28(YMFM)協同刺激域。在一些實施例中，CD28(YMFM)協同刺激域由包含SEQ ID NO: 7中所闡述之核苷酸序列的核酸序列編碼。在一個實施例中，CAR之胞內域包含有包含SEQ ID NO: 8中所闡述之胺基酸序列的ICOS協同刺激域。在一些實施例中，ICOS協同刺激域由包含SEQ ID NO: 9或SEQ ID NO: 10中闡述之核苷酸序列之核酸序列編碼。在一些實施例中，CAR之胞內域包含有包含SEQ ID NO: 11中所闡述之胺基酸序列的ICOS(YMNM)協同刺激域。在一些實施例中，ICOS(YMNM)協同刺激域由包含SEQ ID NO: 12中所闡述之核苷酸序列的核酸序列編碼。

在一些實施例中，個體CAR之胞內域包含有包含SEQ ID NO: 13中所闡述之胺基酸序列的CD2協同刺激域。在一些實施例中，CD2協同刺激域由包含SEQ ID NO: 14中所闡述之核苷酸序列的核酸序列編碼。在一個實施例中，CAR之胞內域包含有包含SEQ ID NO: 15中所闡述之胺基酸序列的CD27協同刺激域。在一些實施例中，CD27協同刺激域由包含SEQ ID NO: 16中所示之核苷酸序列的核酸序列編碼。在一個實施例中，CAR之胞內域包含有包含SEQ ID NO: 17中所闡述之胺基酸序列的OX40協同刺激域。在一些實施例中，OX40協同刺激域由包含SEQ ID NO: 18中所闡述之核苷酸序列的核酸序列編碼。

**5. 胞內域**

【0183】 在某些實施例中，胞內域包含胞內信號傳導域。胞內域之實例包括一或多個分子或受體之片段或域，包括但不限於TCR、CD3ζ、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD86、常見FcRγ、FcRβ (Fcε Rib)、CD79a、CD79b、FcγR11a、DAP10、DAP12、T細胞受體(TCR)、CD2、CD8、CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX9、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、KIR家族蛋白、淋巴細胞功能相關之抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、特異性結合CD83之配位體、CD5、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM (LIGHTR)、SLAMF7、NKp80 (KLRF1)、CD127、CD160、CD19、CD4、CD8α、CD8β、IL2Rβ、IL2Rγ、IL7Rα、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD1Id、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD lib、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、

SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD 162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、鐸樣受體1 (TLR1)、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、syk家族酪胺酸激酶(Syk、ZAP 70等)、src家族酪胺酸激酶(Lck、Fyn、Lyn等)、本文所述之其他協同刺激分子、其任何衍生物、變異體或片段、具有相同功能性能力之協同刺激分子之任何合成序列及其任何組合。

【0184】在一些實施例中，胞內信號傳導域包含選自由以下組成之群的胞內域：人類CD2之細胞質信號傳導域、CD3ζ鏈(CD3ζ)、FcγRIII、FcsRI、Fc受體之胞質尾區、帶有細胞質受體之基於免疫受體酪胺酸之活化模體(ITAM)、TCRζ、FcRγ、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD5、CD22、CD79a、CD79b及CD66d或其變異體。在一些實施例中，胞內信號傳導域包含CD3ζ胞內信號傳導域。

【0185】胞內域之額外實例包括但不限於若干類型之各種其他免疫信號傳導受體的胞內信號傳導域，包括但不限於：第一代、第二代及第三代T細胞信號傳導蛋白，包括CD3、B7家族協同刺激及腫瘤壞死因子受體(TNFR)超家族受體。另外，胞內信號傳導域可包括NK及NKT細胞使用之信號傳導域，諸如NKp30 (B7-H6)及DAP 12、NKG2D、NKp44、NKp46、DAP10及CD3z之信號傳導域。

【0186】適用於本發明之CAR的胞內信號傳導域包括轉導回應於CAR活化(亦即藉由抗原及二聚合劑活化)之信號的任何所需信號傳導域。

在一些實施例中，獨特且可偵測之信號例如包含細胞增產一或多種細胞介素；目標基因轉錄變化；蛋白質活性變化；細胞行為變化(例如細胞死亡)；細胞增殖；細胞分化；細胞存活；及/或調節細胞信號傳導反應。例如在一些實施例中，胞內信號傳導域包括DAP10/CD28型信號傳導鏈。在一些實施例中，胞內信號傳導域不共價連接至膜結合CAR，而是在細胞質中擴散。

【0187】 適用於本發明之CAR的胞內信號傳導域包括含基於免疫受體酪胺酸之活化模體(ITAM)的胞內信號傳導多肽。在一些實施例中，胞內信號傳導域包括至少一個至少兩個、至少三個、至少四個、至少五個或至少六個如下文所描述之ITAM模體。在一些實施例中，ITAM模體在胞內信號傳導域中重複兩次，其中ITAM模體之第一及第二實例經6至8個胺基酸彼此分隔開。在一個實施例中，個體CAR之胞內信號傳導域包含3個ITAM模體。在一些實施例中，胞內信號傳導域包括含有基於免疫受體酪胺酸之活化模體(ITAM)的人類免疫球蛋白受體之信號傳導域，諸如(但不限於) FcγRI、FcγRIIA、FcγRIIC、FcγRIIIA、FcRL5。

【0188】 適合的胞內信號傳導域可為來源於含有ITAM模體之多肽的含ITAM模體之部分。舉例而言，適合的胞內信號傳導域可為來自任何含ITAM模體之蛋白質的含ITAM之模體域。因此，適合之胞內信號傳導域無需含有衍生其之整個蛋白質之完整序列。適合的含ITAM模體之多肽之實例包括但不限於：DAP12、FCER1G (Fcε受體I γ鏈)、CD3D (CD3δ)、CD3E (CD3ε)、CD3G (CD3γ)、CD3Z (CD3ζ)及CD79A (抗原受體複合體相關蛋白α鏈)。

【0189】 在一個實施例中，胞內信號傳導域來源於DAP12 (亦稱為

TYROBP；TYRO蛋白質酪胺酸激酶結合蛋白；KARAP；PLOSL；DNAX活化蛋白12；KAR相關蛋白；TYRO蛋白質酪胺酸激酶結合蛋白；殺手活化受體相關蛋白；殺傷活化受體相關蛋白；等)。在一個實施例中，胞內信號傳導域來源於FCER1G (亦稱為FCRG；Fcε受體I γ鏈；Fc受體γ鏈；fc-ε RI-γ；fcRγ；fceR1γ；高親和力免疫球蛋白ε受體次單元γ；免疫球蛋白E受體、高親和力γ鏈等)。在一個實施例中，胞內信號傳導域來源於T細胞表面糖蛋白CD3δ鏈(亦稱為CD3D；CD3-δ；T3D；CD3抗原、δ次單元；CD3δ；CD3d抗原、δ多肽(TiT3複合體)；OKT3、δ鏈；T細胞受體T3δ鏈；T細胞表面糖蛋白CD3δ鏈等)。在一個實施例中，胞內信號傳導域來源於T細胞表面糖蛋白CD3ε鏈(亦稱為CD3e、T細胞表面抗原T3/Leu-4ε鏈、T細胞表面糖蛋白CD3ε鏈、AI504783、CD3、CD3ε、T3e等)。在一個實施例中，胞內信號傳導域來源於T細胞表面糖蛋白CD3γ鏈(亦稱為CD3G、T細胞受體T3γ鏈、CD3-γ、T3G、γ多肽(TiT3複合體)等)。在一個實施例中，胞內信號傳導域來源於T細胞表面糖蛋白CD3ζ鏈(亦稱為CD3Z、T細胞受體T3ζ鏈、CD247、CD3-ζ、CD3H、CD3Q、T3Z、TCRZ等)。在一個實施例中，胞內信號傳導域來源於CD79A (亦稱為B細胞抗原受體複合體相關蛋白α鏈；CD79a抗原(免疫球蛋白相關α)；MB-1膜醣蛋白；Ig-α；膜結合免疫球蛋白相關蛋白；表面IgM相關蛋白；等)。在一個實施例中，適用於本發明之CAR之胞內信號傳導域包括DAP10/CD28型信號傳導鏈。在一個實施例中，適用於本發明之個體CAR的胞內信號傳導域包括ZAP70多肽。在一些實施例中，胞內信號傳導域包括TCRζ、FcRγ、FcRβ、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD5、CD22、CD79a、CD79b或CD66d之細胞質信號傳導域。在一個實施例中，CAR中之胞內

信號傳導域包括人類CD3ζ之細胞質信號傳導域。

【0190】 雖然通常可使用整個胞內信號傳導域，但在許多情況下，無需使用整條鏈。至於使用胞內信號傳導域之截短部分的程度，此類截短部分只要轉導效應功能信號即可用於替代完整鏈。胞內信號傳導域包括足以轉導效應功能信號之胞內信號傳導域之任何截短部分。

【0191】 本文所述之胞內信號傳導域可與本文所述之任何協同刺激信號傳導域、本文所述之任何抗原結合域、本文所述之任何跨膜域或本文所述之任何可包括於CAR中之其他域組合。在一些實施例中，CAR之胞內域包含雙信號傳導域。雙信號傳導域可包括來自本文所述之任何分子的片段或域。在一些實施例中，胞內域包含4-1BB協同刺激域及CD3ζ信號傳導域；CD28協同刺激域及CD3ζ信號傳導域；CD2協同刺激域及CD3ζ信號傳導域。在一些實施例中，CAR之胞內域包括協同刺激分子之任何部分，諸如至少一個來自CD3、CD27、CD28、ICOS、4-1BB、PD-1、T細胞受體(TCR)、其任何衍生物或變異體、其任何具有相同功能性能力之合成序列及其任何組合的信號傳導域。

【0192】 此外，適用於個體CAR之變異胞內信號傳導域為此項技術中已知的。YMFM模體見於ICOS中且為募集PI3K之p85α及p50α次單元兩者之SH2結合模體，從而引起AKT信號傳導增強。在一個實施例中，可產生CD28胞內域變異體以包含YMFM模體。

【0193】 在一個實施例中，個體CAR之胞內域包含CD3ζ胞內信號傳導域，該胞內信號傳導域包含可由核酸序列編碼的SEQ ID NO: 19或SEQ ID NO: 21中所闡述之胺基酸序列，該核酸序列包含分別在SEQ ID NO: 20或SEQ ID NO: 22中所闡述之核苷酸序列。

【0194】 胞內域之可容許變化將為熟習此項技術者已知，同時維持比活性。在一些實施例中，胞內域包含與SEQ ID NO: 19或21中所闡述之胺基酸序列中之任一者至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%序列一致性之胺基酸序列。在一些實施例中，胞內域由核酸序列編碼，該核酸序列包含與SEQ ID NO: 20或22序列中所闡述之核苷酸序列中之任一者至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%序列一致性之核苷酸序列。

【0195】 在一個實施例中，個體CAR之胞內域包含ICOS協同刺激域及CD3ζ胞內信號傳導域。在一個實施例中，個體CAR之胞內域包含CD28協同刺激域及CD3ζ胞內信號傳導域。在一個實施例中，個體CAR之胞內域包含CD28 YMFM變異協同刺激域及CD3ζ胞內信號傳導域。在一個實施例中，個體CAR之胞內域包含CD27協同刺激域及CD3ζ胞內信號傳導域。在一個實施例中，個體CAR之胞內域包含OX40協同刺激域及CD3ζ胞內信號傳導域。在一個例示性實施例中，個體CAR之胞內域包含4-1BB協同刺激域及CD3ζ胞內信號傳導域。在一個例示性實施例中，個體CAR之胞內域包含CD2協同刺激域及CD3ζ胞內信號傳導域。

【0196】 **表2**說明本文所述之CAR之域的例示性序列。

| 表2 | | |
|---|---|---|
| **SEQ ID NO:** | **描述** | **序列** |
| 1 | 4-1BB協同刺激域胺基酸序列 | KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL |
| 2 | 4-1BB協同刺激域核酸序列#1 | AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACC ATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGACGGCT GTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAA CTG |
| 3 | 4-1BB協同刺激域核酸序列#2 | AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACC ATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCT GTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAA CTG |
| 4 | CD28協同刺激域胺基酸序列 | RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS |
| 5 | CD28協同刺激域核酸序列 | AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAA CATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACC AGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC |
| 6 | CD28(YMFM) 協同刺激域胺基酸序列 | RSKRSRLLHSDYMFMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS |
| 7 | CD28(YMFM) 協同刺激域核酸序列 | AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGTT CATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACC AGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC |
| 8 | ICOS協同刺激域胺基酸序列 | TKKKYSSSVHDPNGEYMFMRAVNTAKKSRLTDVTL |
| 9 | ICOS協同刺激域核酸序列#1 | ACAAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGG TGAATACATGTTCATGAGAGCAGTGAACACAGCCAAAAAAT CCAGACTCACAGATGTGACCCTA |
| 10 | ICOS協同刺激域核酸序列#2 | ACAAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGG TGAATACATGTTCATGAGAGCAGTGAACACAGCCAAAAAAT CTAGACTCACAGATGTGACCCTA |
| 11 | ICOS(YMNM) 協同刺激域胺基酸序列 | TKKKYSSSVHDPNGEYMNMRAVNTAKKSRLTDVTL |
| 12 | ICOS(YMNM) 協同刺激域核酸序列 | ACAAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGG TGAATACATGAACATGAGAGCAGTGAACACAGCCAAAAAAT CCAGACTCACAGATGTGACCCTA |
| 13 | CD2協同刺激域胺基酸序列 | TKRKKQRSRRNDEELETRAHRVATEERGRKPHQIPASTPQNPA TSQHPPPPPGHRSQAPSHRPPPPGHRVQHQPQKRPPAPSGTQVH QQKGPPLPRPRVQPKPPHGAAENSLSPSSN |
| 14 | CD2協同刺激域核酸序列 | ACCAAAAGGAAAAAACAGAGGAGTCGGAGAAATGATGAGG AGCTGGAGACAAGAGCCCACAGAGTAGCTACTGAAGAAAG GGGCCGGAAGCCCCACCAAATTCCAGCTTCAACCCCTCAGA ATCCAGCAACTTCCCAACATCCTCCTCCACCACCTGGTCATC GTTCCCAGGCACCTAGTCATCGTCCCCCGCCTCCTGGACACC GTGTTCAGCACCAGCCTCAGAAGAGGCCTCCTGCTCCGTCG GGCACACAAGTTCACCAGCAGAAAGGCCCGCCCCTCCCCAG ACCTCGAGTTCAGCCAAAACCTCCCCATGGGGCAGCAGAAA ACTCATTGTCCCCTTCCTCTAAT |
| 15 | CD27協同刺激域胺基酸序列 | QRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPA CSP |
| 16 | CD27協同刺激域核酸序列 | CAACGAAGGAAATATAGATCAAACAAAGGAGAAAGTCCTG TGGAGCCTGCAGAGCCTTGTCGTTACAGCTGCCCCAGGGAG GAGGAGGGCAGCACCATCCCCATCCAGGAGGATTACCGAAA ACCGGAGCCTGCCTGCTCCCCC |
| 17 | OX40協同刺激域胺 | ALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI |

| 表2 | | |
|---|---|---|
| **SEQ ID NO:** | **描述** | **序列** |
| | 基酸序列 | |
| 18 | OX40協同刺激域核酸序列 | GCCCTGTACCTGCTCCGCAGGGACCAGAGGCTGCCCCCCGA TGCCCACAAGCCCCCTGGGGGAGGCAGTTTCAGGACCCCCA TCCAAGAGGAGCAGGCCGACGCCCACTCCACCCTGGCCAAG ATC |
| 19 | CD3ζ胞內信號傳導域胺基酸序列 | RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR |
| 20 | CD3ζ胞內信號傳導域核酸序列 | AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCA GCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGAC GAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGG GACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTC AGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGC GGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGG AGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTAC AGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCC TGCCCCCTCGC |
| 21 | CD3ζ (Q14K)胞內信號傳導域胺基酸序列 | RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR |
| 22 | CD3ζ (Q14K)胞內信號傳導域核酸序列 | AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAA GCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGAC GAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGG GACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTC AGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGC GGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGG AGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTAC AGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCC TGCCCCCTCGC |
| 23 | CD8α (CD8a)跨膜域胺基酸序列 | IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC |
| 24 | CD8α (CD8a)跨膜域核酸序列 | ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTT CTCCTGTCACTGGTTATCACCCTTTACTGC |
| 25 | CD8α (CD8a)鉸鏈域胺基酸序列 | TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC D |
| 26 | CD8α (CD8a)鉸鏈域核酸序列 | ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCAC CATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCC GGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGA CTTCGCCTGTGAT |
| 27 | CD28跨膜域胺基酸序列 | FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV |
| 28 | CD28跨膜域核酸序列 | TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTAT AGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTG |
| 29 | 鉸鏈/連接子 | GGSG |
| 30 | 鉸鏈/連接子 | GGSGG |
| 31 | 鉸鏈/連接子 | GSGSG |
| 32 | 鉸鏈/連接子 | GSGGG |
| 33 | 鉸鏈/連接子 | GSSSG |
| 34 | 鉸鏈/連接子 | GGGSG |
| 35 | Ig鉸鏈區 | DKTHT |

| 表2 | | |
|---|---|---|
| **SEQ ID NO:** | **描述** | **序列** |
| 36 | Ig鉸鏈區 | CPPC |
| 37 | Ig鉸鏈區 | CPEPKSCDTPPPCPR |
| 38 | Ig鉸鏈區 | ELKTPLGDTTHT |
| 39 | Ig鉸鏈區 | KSCDKTHTCP |
| 40 | Ig鉸鏈區 | KCCVDCP |
| 41 | Ig鉸鏈區 | KYGPPCP |
| 42 | 人類IgG1鉸鏈 | EPKSCDKTHTCPPCP |
| 43 | 人類IgG2鉸鏈 | ERKCCVECPPCP |
| 44 | 人類IgG3鉸鏈 | ELKTPLGDTTHTCPRCP |
| 45 | 人類IgG4鉸鏈 | SPNMVPHAHHAQ |
| 46 | 人類IgG1$^{H229Y}$鉸鏈 | EPKSCDKT**Y**TCPPCP |
| 47 | 鉸鏈/連接子 | (GSGGS)n |
| 48 | 鉸鏈/連接子 | (GGGS)n |
| 49 | 鉸鏈/連接子 | (GGGGS)n |
| 50 | 鉸鏈/連接子 | GGGGSGGGGSGGGGS |
| 51 | 鉸鏈/連接子 | GGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTCGGGTGGCGGCGGATCT |
| 52 | CD3ε | AGATCCAGGATACTGAGGGCA |
| 53 | CD3δ | TCTCTGGCCTGGTACTGGCTA |
| 54 | CD3γ | GCTTCTGCATCACAAGTCAGA |
| 55 | B2M | TATCTCTTGTACTACACTGA |
| 56 | TAP1 | GCTCTTGGAGCCAACCGTTG |
| 57 | TAP2 | CTTCCTCAAGGGCTGCCAGGA |
| 58 | TAPBP_gRNA1 | CCTACATGCCCCCCACCTCC |
| 59 | TAPBP_gRNA2 | CGCTCGCATCCTCCACGAAC |
| 60 | NLRC5 | GTGAGCAGCCTCACAAGACAG |
| 61 | C2TA | CCTTGGGGCTCTGACAGGTA |
| 62 | HLA-DMA | CCAGAACACTCGGGTGCCTCG |
| 63 | RFX5_gRNA1 | CAAGGCCGTGCAGAACAAAGT |
| 64 | RFX5_gRNA2 | TTCTGCACGGCCTTGGAAATG |
| 65 | RFXANK | CCTGCACCCCTGAGCCTGTGA |
| 66 | RFXAP | GAGGATCTAGAGGACGAGGAG |
| 67 | Ii鏈_gRNA1 | CATCCTGGTGACTCTGCTCCT |
| 68 | Ii鏈_gRNA2 | TCCAGCCGGCCCTGCTGCTGG |
| 69 | Tn-MUC1 CAR 核酸序列 | ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTG<br>CTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGGATCCCAGGTGCAGCTGCA<br>GCAGTCTGATGCCGAGCTCGTGAAGCCTGGCAGCAGCGTGA<br>AGATCAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCGACCAC<br>GCCATCCACTGGGTCAAGCAGAAGCCTGAGCAGGGCCTGGA<br>GTGGATCGGCCACTTCAGCCCCGGCAACACCGACATCAAGT<br>ACAACGACAAGTTCAAGGGCAAGGCCACCCTGACCGTGGAC<br>AGAAGCAGCAGCACCGCCTACATGCAGCTGAACAGCCTGAC<br>CAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTTCTGCAAGACCAGCACCT<br>TCTTTTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCCTGACAGTGT<br>CTAGCGGAGGCGGAGGATCTGGCGGCGGAGGAAGTGGCGG<br>AGGGGGATCTGAACTCGTGATGACCCAGAGCCCCAGCTCTC<br>TGACAGTGACAGCCGGCGAGAAAGTGACCATGATCTGCAAG |

| 表2 | | |
|---|---|---|
| **SEQ ID NO:** | **描述** | **序列** |
| | | TCCTCCCAGAGCCTGCTGAACTCCGGCGACCAGAAGAACTA<br>CCTGACCTGGTATCAGCAGAAACCCGGCCAGCCCCCCAAGC<br>TGCTGATCTTTTGGGCCAGCACCCGGGAAAGCGGCGTGCCC<br>GATAGATTCACAGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTTACCCT<br>GACCATCAGCTCCGTGCAGGCCGAGGACCTGGCCGTGTATT<br>ACTGCCAGAACGACTACAGCTACCCCCTGACCTTCGGAGCC<br>GGCACCAAGCTGGAACTGAAGTCCGGAACCACGACGCCAGC<br>GCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGC<br>CCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGG<br>GGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATAT<br>CTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCT<br>CCTGTCACTGGTTATCACCCTTTACTGCACCAAAAGGAAAAA<br>ACAGAGGAGTCGGAGAAATGATGAGGAGCTGGAGACAAGA<br>GCCCACAGAGTAGCTACTGAAGAAAGGGGCCGGAAGCCCC<br>ACCAAATTCCAGCTTCAACCCCTCAGAATCCAGCAACTTCCC<br>AACATCCTCCTCCACCACCTGGTCATCGTTCCCAGGCACCTA<br>GTCATCGTCCCCCGCCTCCTGGACACCGTGTTCAGCACCAGC<br>CTCAGAAGAGGCCTCCTGCTCCGTCGGGCACACAAGTTCAC<br>CAGCAGAAAGGCCCGCCCCTCCCCAGACCTCGAGTTCAGCC<br>AAAACCTCCCCATGGGGCAGCAGAAAACTCATTGTCCCCTT<br>CCTCTAATATCGATAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGAC<br>GCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGA<br>GCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACA<br>AGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAG<br>AAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGA<br>AAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAA<br>AGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACC<br>AGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTT<br>CACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC |
| 70 | Tn-MUC1 CAR<br>胺基酸序列 | MALPVTALLLPLALLLHAARPGSQVQLQQSDAELVKPGSSVKI<br>SCKASGYTFTDHAIHWVKQKPEQGLEWIGHFSPGNTDIKYNDK<br>FKGKATLTVDRSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCKTSTFFFDYW<br>GQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSELVMTOSPSSLTVTAGEK<br>VTMICKSSQSLLNSGDQKNYLTWYOQKPGQPPKLLIFWASTRE<br>SGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCONDYSYPLTFG<br>AGTKLELKSGTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV<br>HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCTKRKKQRSRR<br>NDEELETRAHRVATEERGRKPHQIPASTPONPATSQHPPPPPGH<br>RSQAPSHRPPPPGHRVQHQPQKRPPAPSGTQVHQQKGPPLPRPR<br>VQPKPPHGAAENSLSPSSNIDRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYN<br>ELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK<br>DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALH<br>MQALPPR |
| 71 | 間皮素CAR<br>胺基酸序列(M5) | MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVEKPGASVKVSCKASG<br>YTFTDYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVT<br>MTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCASGWDFDYWGQGTLVTV<br>SSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCR<br>ASQSIRYYLSWYQQKPGKAPKLLIYTASILQNGVPSRFSGSGSGTDF<br>TLTISSLQPEDFATYYCLQTYTTPDFGPGTKVEIKTTTPAPRPPTPAP<br>TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVL<br>LLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE<br>GGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR<br>GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG<br>KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR |
| 72 | 間皮素CAR<br>胺基酸序列(M11) | MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQQSGAEVKKPGASVKVS<br>CKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYA<br>QNFQGRVTMTRDTSISTAYMELRRLRSDDTAVYYCASGWDFD<br>YWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIRMTQSPSS |

| 表2 | | |
|---|---|---|
| **SEQ ID NO:** | **描述** | **序列** |
| | | LSASVGDRVTITCRASQSIRYYLSWYQQKPGKAPKLLIYTASIL QNGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQTYTTPDFGP GTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYK QGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQALPPR |
| 73 | 人類PSMA特異性結合域胺基酸序列 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAPG KGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDRVTITVDKSTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSS GGGSDIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVDWYQQ KPGQAPKLLIYWASTRHTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLQPED FAVYYCQQYNSYPLTFGQGTKVDIK |
| 74 | 人類PSMA特異性結合域核酸序列 | GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACA CATTCACTGAATACACCATCCACTGGGTGAGGCAGGCCCCT GGAAAGGGCCTTGAGTGGATTGGAAACATTAATCCTAACAA TGGTGGTACTACCTACAACCAGAAGTTCGAGGACAGAGTCA CAATCACTGTAGACAAGTCCACCAGCACAGCCTACATGGAG CTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGATACTGCAGTCTATTACTGT GCAGCTGGTTGGAACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCAC GGTCACCGTCTCCTCAGGAGGCGGAGGATCTGGCGGCGGAG GAAGTTCTGGCGGAGGCAGCGACATTCAGATGACCCAGTCT CCCAGCACCCTGTCCGCATCAGTAGGAGACAGGGTCACCAT CACTTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTGCTGTAGACT GGTATCAACAGAAACCAGGGCAAGCTCCTAAACTACTGATT TACTGGGCATCCACCCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGCTTC AGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG CAGACTGCAGCCTGAAGACTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCA ATATAACAGCTATCCTCTCACGTTCGGCCAGGGGACCAAGG TGGATATCAAA |
| 75 | 間皮素特異性結合域胺基酸序列 | QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQ APGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQNFQGRVTMTRDTSISTAY MELRRLRSDDTAVYYCASGWDFDYWGQGTLVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSDIRMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIR YYLSWYQQKPGKAPKLLIYTASILQNGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCLQTYTTPDFGPGTKVEIK |
| 76 | TGFPRII顯性負受體胺基酸序列 (TGFbRII-DN) | MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNG AVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAV WRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPG ETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLVIFQVTGISLLPPL GVAISVIIIFYCYRVNRQQKLSSSG |
| 77 | TGFPRII顯性負受體核酸序列 (TGFbRII-DN) | ATGGGTCGGGGGCTGCTCAGGGGCCTGTGGCCGCTGCACAT CGTCCTGTGGACGCGTATCGCCAGCACGATCCCACCGCACG TTCAGAAGTCGGTTAATAACGACATGATAGTCACTGACAAC AACGGTGCAGTCAAGTTTCCACAACTGTGTAAATTTTGTGAT GTGAGATTTTCCACCTGTGACAACCAGAAATCCTGCATGAG CAACTGCAGCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCACAGGAAG TCTGTGTGGCTGTATGGAGAAAGAATGACGAGAACATAACA CTAGAGACAGTTTGCCATGACCCCAAGCTCCCCTACCATGAC TTTATTCTGGAAGATGCTGCTTCTCCAAAGTGCATTATGAAG GAAAAAAAAAAGCCTGGTGAGACTTTCTTCATGTGTTCCTGT AGCTCTGATGAGTGCAATGACAACATCATCTTCTCAGAAGA ATATAACACCAGCAATCCTGACTTGTTGCTAGTCATATTTCA AGTGACAGGCATCAGCCTCCTGCCACCACTGGGAGTTGCCA TATCTGTCATCATCATCTTCTACTGCTACCGCGTTAACCGGC AGCAGAAGCTGAGTTCATCCGGA |

| 表2 | | |
|---|---|---|
| **SEQ ID NO:** | **描述** | **序列** |
| 78 | PD1-CTM-CD28 受體胺基酸序列 | MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALL<br>VVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPED<br>RSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISL<br>APKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVFW<br>VLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNM<br>TPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS |
| 79 | PD1-CTM-CD28 受體核酸序列 | ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGT<br>GCTACAACTGGGCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCC<br>CAGACAGGCCCTGGAACCCCCCCACCTTCTCCCCAGCCCTGC<br>TCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCACCTGCAGC<br>TTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCG<br>CATGAGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCC<br>CCGAGGACCGCAGCCAGCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGT<br>GTCACACAACTGCCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGT<br>GGTCAGGGCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTCTGTG<br>GGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGC<br>CTGCGGGCAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAG<br>TGCCCACAGCCCACCCCAGCCCCTCACCCAGGCCAGCCGGC<br>CAGTTCCAAACCCTGGTGTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGT<br>GGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTT<br>ATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCA<br>CAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCCA<br>CCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCG<br>CAGCCTATCGCTCC |
| 80 | PD1-PTM-CD28受體胺基酸序列 | MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALL<br>VVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPED<br>RSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTVLCGAISL<br>APKLQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVVG<br>VVGGLLGSLVLLVWVLAVIRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPT<br>RKHYQPYAPPRDFAAVRS |
| 81 | PD1-PTM-CD28受體核酸序列 | ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGT<br>GCTACAACTGGGCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCC<br>CAGACAGGCCCTGGAACCCCCCCACCTTCTCCCCAGCCCTGC<br>TCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCACCTGCAGC<br>TTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGC<br>ATGAGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCC<br>CGAGGACCGCAGCCAGCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGTG<br>TCACACAACTGCCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGTG<br>GTCAGGGCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTCTGTGG<br>GGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCC<br>TGCGGGCAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGT<br>GCCCACAGCCCACCCCAGCCCCTCACCCAGGCCAGCCGGCC<br>AGTTCCAAACCCTGGTGGTTGGTGTCGTGGGCGGCCTGCTGG<br>GCAGCCTGGTGCTGCTAGTCTGGGTCCTGGCCGTCATCAGGA<br>GTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATG<br>ACTCCCCGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCC<br>CTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC |
| 82 | PD1A$^{132L}$_PTM-CD28受體胺基酸序列 | MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALL<br>VVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPED<br>RSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTVLCGAISL<br>APKLQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVVG<br>VVGGLLGSLVLLVWVLAVIRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPT<br>RKHYQPYAPPRDFAAVRS |
| 83 | PD1$^{A132L}$_PTM-CD28受體核酸序列 | ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGT<br>GCTACAACTGGGCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCC<br>CAGACAGGCCCTGGAACCCCCCCACCTTCTCCCCAGCCCTGC<br>TCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCACCTGCAGC<br>TTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGC |

| 表2 | | |
|---|---|---|
| **SEQ ID NO:** | **描述** | **序列** |
| | | ATGAGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCC<br>CGAGGACCGCAGCCAGCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGTG<br>TCACACAACTGCCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGTG<br>GTCAGGGCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTCTGTGG<br>GGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGCTGCAGATCAAAGAGAGCC<br>TGCGGGCAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGT<br>GCCCACAGCCCACCCCAGCCCCTCACCCAGGCCAGCCGGCC<br>AGTTCCAAACCCTGGTGGTTGGTGTCGTGGGCGGCCTGCTGG<br>GCAGCCTGGTGCTGCTAGTCTGGGTCCTGGCCGTCATCAGGA<br>GTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATG<br>ACTCCCCGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCC<br>CTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGC |
| 84 | PD-1-4-1BB 受體胺基酸序列<br>(PD1-BB) | MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALL<br>VVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPED<br>RSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISL<br>APKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVIYI<br>WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT<br>TQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL |
| 85 | PD-1-4-1BB 受體核酸序列<br>(PD1-BB) | ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGT<br>GCTACAACTGGGCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCC<br>CAGACAGGCCCTGGAACCCCCCCACCTTCTCCCCAGCCCTGC<br>TCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCACCTGCAGC<br>TTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGC<br>ATGAGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCC<br>CGAGGACCGCAGCCAGCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGTG<br>TCACACAACTGCCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGTG<br>GTCAGGGCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTCTGTGG<br>GGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCC<br>TGCGGGCAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGT<br>GCCCACAGCCCACCCCAGCCCCTCACCCAGGCCAGCCGGCC<br>AGTTCCAAACCCTGGTTATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCG<br>GGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCTTT<br>ACTGCAAAAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTC<br>AAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGA<br>AGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAG<br>GATGTGAACTG |
| 86 | $PD1^{A132L}$_4-1BB受體胺基酸序列<br>(PDl*BB) | MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALL<br>VVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPED<br>RSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTVLCGAISL<br>APKLQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVIYI<br>WAPLAGTCGVLLLSLVITLVCKKRGRKKLLYIFKQPFMRPV<br>QTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL |
| 87 | $PD1^{A132L}$_4-1BB受體核酸序列<br>(PDl*BB) | ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGT<br>GCTACAACTGGGCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGACTCCC<br>CAGACAGGCCCTGGAACCCCCCCACCTTCTCCCCAGCCCTGC<br>TCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCACCTTCACCTGCAGC<br>TTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGC<br>ATGAGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCC<br>CGAGGACCGCAGCCAGCCCGGCCAGGACTGCCGCTTCCGTG<br>TCACACAACTGCCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGTG<br>GTCAGGGCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTCTGTGG<br>GGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGCTGCAGATCAAAGAGAGCC<br>TGCGGGCAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGT<br>GCCCACAGCCCACCCCAGCCCCTCACCCAGGCCAGCCGGCC<br>AGTTCCAAACCCTGGTTATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCG<br>GGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCTTT<br>ACTGCAAAAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTC<br>AAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGA |

| 表2 | | |
|---|---|---|
| **SEQ ID NO:** | **描述** | **序列** |
| | | AGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAG GATGTGAACTG |
| 88 | TGFβR-IL12Rβ1 受體胺基酸序列 | MEAAVAAPRPRLLLLVLAAAAAAAAALLPGATALQCFCHLCT KDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPRDRPFVC APSSKTGSVTTTYCCNQDHCNKIELPTTVKSSPGLGPVELAAVI AGPVCFVCISLMLMVYIRAARHLCPPLPTPCASSAIEFPGGKET WOWINPVDFQEEASLQEALVVEMSWDKGERTEPLEKTELPEG APELALDTELSLEDGDRCKAKM |
| 89 | TGFβR-IL12Rβ1 受體核酸序列 | ATGGAGGCGGCGGTCGCTGCTCCGCGTCCCCGGCTGCTCCTC CTCGTGCTGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGCTGCT CCCGGGGGCGACGGCGTTACAGTGTTTCTGCCACCTCTGTAC AAAAGACAATTTTACTTGTGTGACAGATGGGCTCTGCTTTGT CTCTGTCACAGAGACCACAGACAAAGTTATACACAACAGCA TGTGTATAGCTGAAATTGACTTAATTCCTCGAGATAGGCCGT TTGTATGTGCACCCTCTTCAAAAACTGGGTCTGTGACTACAA CATATTGCTGCAATCAGGACCATTGCAATAAAATAGAACTT CCAACTACTGTAAAGTCATCACCTGGCCTTGGTCCTGTGGAA CTGGCAGCTGTCATTGCTGGACCAGTGTGCTTCGTCTGCATC TCACTCATGTTGATGGTCTATATCAGGGCCGCACGGCACCTG TGCCCGCCGCTGCCCACACCCTGTGCCAGCTCCGCCATTGAG TTCCCTGGAGGGAAGGAGACTTGGCAGTGGATCAACCCAGT GGACTTCCAGGAAGAGGCATCCCTGCAGGAGGCCCTGGTGG TAGAGATGTCCTGGGACAAAGGCGAGAGGACTGAGCCTCTC GAGAAGACAGAGCTACCTGAGGGTGCCCCTGAGCTGGCCCT GGATACAGAGTTGTCCTTGGAGGATGGAGACAGGTGCAAGG CCAAGATG |
| 90 | TGFβR-IL12Rβ2 受體胺基酸序列 | MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVOKSVNNDMIVTDNNG AVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAV WRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPG ETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLVIFQVTGISLLPPL GVAISVIIIFYQQKVFVLLAALRPOWCSREIPDPANSTCAKKYPI AEEKTOLPLDRLLIDWPTPEDPEPLVISEVLHQVTPVFRHPPCSN WPQREKGIQGHQASEKDMMHSASSPPPPRALQAESRQLVDLY KVLESRGSDPKPENPACPWTVLPAGDLPTHDGYLPSNIDDLPSH EAPLADSLEELEPQHISLSVFPSSSLHPLTFSCGDKLTLDQLKMR CDSLML |
| 91 | TGFβR-IL12Rβ2 受體核酸序列 | ATGGGTCGGGGGCTGCTCAGGGGCCTGTGGCCGCTGCACAT CGTCCTGTGGACGCGTATCGCCAGCACGATCCCACCGCACG TTCAGAAGTCGGTTAATAACGACATGATAGTCACTGACAAC AACGGTGCAGTCAAGTTTCCACAACTGTGTAAATTTTGTGAT GTGAGATTTTCCACCTGTGACAACCAGAAATCCTGCATGAG CAACTGCAGCATCACCTCCATCTGTGAGAAGCCACAGGAAG TCTGTGTGGCTGTATGGAGAAAGAATGACGAGAACATAACA CTAGAGACAGTTTGCCATGACCCCAAGCTCCCCTACCATGAC TTTATTCTGGAAGATGCTGCTTCTCCAAAGTGCATTATGAAG GAAAAAAAAAAGCCTGGTGAGACTTTCTTCATGTGTTCCTGT AGCTCTGATGAGTGCAATGACAACATCATCTTCTCAGAAGA ATATAACACCAGCAATCCTGACTTGTTGCTAGTCATATTTCA AGTGACAGGCATCAGCCTCCTGCCACCACTGGGAGTTGCCA TATCTGTCATCATCATCTTCTACCAGCAAAAGGTGTTTGTTC TCCTAGCAGCCCTCAGACCTCAGTGGTGTAGCAGAGAAATT CCAGATCCAGCAAATAGCACTTGCGCTAAGAAATATCCCAT TGCAGAGGAGAAGACACAGCTGCCCTTGGACAGGCTCCTGA TAGACTGGCCCACGCCTGAAGATCCTGAACCGCTGGTCATC AGTGAAGTCCTTCATCAAGTGACCCCAGTTTTCAGACATCCC CCCTGCTCCAACTGGCCACAAAGGGAAAAAGGAATCCAAGG TCATCAGGCCTCTGAGAAAGACATGATGCACAGTGCCTCAA GCCCACCACCTCCAAGAGCTCTCCAAGCTGAGAGCAGACAA |

| 表2 | | |
|---|---|---|
| SEQ ID NO: | 描述 | 序列 |
| | | CTGGTGGATCTGTACAAGGTGCTGGAGAGCAGGGGCTCCGA CCCAAAGCCAGAAAACCCAGCCTGTCCCTGGACGGTGCTCC CAGCAGGTGACCTTCCCACCCATGATGGCTACTTACCCTCCA ACATAGATGACCTCCCCTCACATGAGGCACCTCTCGCTGACT CTCTGGAAGAACTGGAGCCTCAGCACATCTCCCTTTCTGTTT TCCCCTCAAGTTCTCTTCACCCACTCACCTTCTCCTGTGGTGA TAAGCTGACTCTGGATCAGTTAAAGATGAGGTGTGACTCCCT CATGCTC |

**B．額外抗原結合多肽**

【0197】在一些實施例中，經修飾T細胞表現抗原結合多肽、細胞表面受體配位體或結合於腫瘤抗原之多肽。在一些情況下，抗原結合域包含識別腫瘤細胞上表現之細胞表面蛋白質或受體的抗體。在一些情況下，抗原結合域包含識別腫瘤抗原之抗體。在一些情況下，抗原結合域包含全長抗體或其抗原結合片段、Fab、$F(ab)_2$、單特異性$Fab_2$、雙特異性$Fab_2$、三特異性$Fab_2$、單鏈可變片段(scFv)、雙功能抗體、三功能抗體、微型抗體、V-NAR或V hH。

**C．細胞表面受體配位體**

【0198】在一些實施例中，經修飾T細胞表現細胞表面受體配位體。在一些情況下，配位體結合於腫瘤細胞上表現之細胞表面受體。在一些情況下，配位體包含結合於細胞表面受體之野生型蛋白質或其變異體。在一些情況下，配位體包含結合於細胞表面受體之全長蛋白質或其功能片段。在一些情況下，與蛋白質之全長型式相比，功能片段長度之長度佔約90%、約80%、約70%、約60%、約50%或約40%，但保持與細胞表面受體結合。在一些情況下，配位體為與細胞表面受體結合之重新經工程改造之蛋白質。例示性配位體包括但不限於表皮生長因子(EGF)、血小板衍生生長因子(PDGF)或Wnt3A。

**D．腫瘤抗原**

【0199】在一些實施例中，經修飾T細胞表現結合於腫瘤抗原之多肽。在一些情況下，腫瘤抗原與血液惡性腫瘤相關。例示性腫瘤抗原包括但不限於CD19、CD20、CD22、CD33/IL3Ra、ROR1、間皮素、c-Met、PSMA、PSCA、葉酸受體α、葉酸受體β、EGFRvIII、GPC2、Tn-MUC1、GDNF家族受體α-4 (GFRa4)、纖維母細胞活化蛋白(FAP)及IL13Ra2。在一些情況下，腫瘤抗原包含CD19、CD20、CD22、BCMA、CD37、間皮素、PSMA、PSCA、Tn-MUC1、EGFR、EGFRvIII、c-Met、HER1、HER2、CD33、CD133、GD2、GPC2、GPC3、NKG2D、KRAS或WT1。在一些情況下，多肽為腫瘤抗原之配位體(例如與腫瘤抗原結合之全長蛋白質)、其功能片段或與腫瘤抗原結合之重新經工程改造之配位體。在一些情況下，多肽為結合於腫瘤抗原之抗體。

**E. 開關受體及顯性負受體**

【0200】在一個態樣中，本發明亦包括如本文所描述之具有下調基因表現之經修飾免疫細胞，該細胞進一步包含編碼顯性負受體、開關受體或其組合之外源性核酸。在一些實施例中，如本文所描述之具有下調基因表現之經修飾免疫細胞進一步包含嵌合抗原受體(CAR)及/或顯性負受體。在一些實施例中，如本文所描述之具有下調基因表現之經修飾免疫細胞進一步包含CAR及開關受體。在一些實施例中，如本文所描述之具有下調基因表現之經修飾免疫細胞進一步包含經工程改造TCR及開關受體。在一些實施例中，如本文中所描述之具有下調基因表現之經修飾免疫細胞進一步包含經工程改造TCR及顯性負受體。在一些實施例中，如本文所描述之具有下調基因表現之經修飾免疫細胞進一步包含KIR及開關受體。在一些實施例中，如本文所述之具有下調基因表現之經修飾免疫細胞進一步包

含KIR及顯性負受體。

**1. 開關受體**

【0201】 本發明提供用於包含CAR及開關受體的具有下調基因表現之經修飾免疫細胞或其前驅物的組合物及方法。腫瘤細胞產生用以保護其免受免疫識別及消除之免疫抑制微環境。此免疫抑制微環境可限制免疫抑制療法，諸如CAR-T或TCR-T細胞療法之有效性。舉例而言，分泌之細胞介素轉型生長因子β (TGFβ)直接抑制細胞毒性T細胞之功能且另外誘導調節T細胞形成以進一步抑制免疫反應。在前列腺癌之情形下，由TGFβ引起之T細胞免疫抑制先前已由Donkor等人(2011)及Shalapour等人(2015)證實。為了減少TGF對免疫細胞之免疫抑制作用，免疫細胞可經修飾以表現包含融合至例如介白素-12受體(IL12R；TGFβR-IL12R)之胞內信號傳導域的TGFβR之胞外配位體結合域的經工程改造TGFβR。因此，包含開關受體之經修飾免疫細胞可在經修飾免疫細胞之微環境中結合負信號轉導分子，且將可在經修飾免疫細胞上之抑制性分子之負信號轉導信號轉化為正信號，刺激經修飾免疫細胞。本發明之開關受體可經設計以減少負信號轉導分子之作用，或藉助於包含與正信號相關聯之胞內域將負信號轉化為正信號。

【0202】 因此，在一些實施例中，包含編碼內源性免疫蛋白之一或多個基因座中之插入及/或缺失的經修飾免疫細胞已經進一步基因修飾以表現開關受體。如本文所用，術語「開關受體」係指經設計以減少負信號轉導分子對本發明之經修飾免疫細胞之作用的分子。開關受體包含：來源於與負信號相關之第一多肽的第一域(遏制或抑制細胞或T細胞活化之信號轉導)；及來源於與正信號相關之第二多肽的第二域(刺激細胞或T細胞之

信號轉導信號)。在一些實施例中，與負信號相關之蛋白質係選自由以下組成之群：CTLA4、PD-1、TGFβRII、BTLA、VSIG3、VSIG8及TIM-3。在一些實施例中，與正信號相關之蛋白質係選自由以下組成之群：CD28、4-1BB、IL12Rβ1、IL12Rβ2、CD2、ICOS及CD27。

【0203】 在一個實施例中，第一域包含與負信號相關之第一多肽之胞外域的至少一部分，且第二域包含與正信號相關之第二多肽之胞內域的至少一部分。因此，開關受體包含與負信號相關之胞外域，該負信號融合至與正信號相關之胞內域。在一些實施例中，開關受體包含與負信號相關之信號傳導蛋白的胞外域、跨膜域及與正信號相關之信號傳導蛋白的胞內域。在一些實施例中，開關受體之跨膜域係選自與負信號相關之蛋白質之跨膜或與該負信號相關之蛋白質之跨膜域。在一些實施例中，開關受體之跨膜域係選自選自由以下組成之群的蛋白質之跨膜域：CTLA4、PD-1、VSIG3、VSIG8、TGFβRII、BTLA、TIM-3、CD28、4-1BB、IL12Rβ1、IL12Rβ2、CD2、ICOS及CD27。

【0204】 在一些實施例中，開關受體係選自由以下組成之群：PD-1-CD28、PD-1$^{A132L}$-CD28、PD-1-CD27、PD-1$^{A132L}$-CD27、PD-1-4-1BB、PD-1$^{A132L}$-4-1BB、PD-1-ICOS、PD-1$^{A132L}$-ICOS、PD-1-IL12Rβ1、PD-1$^{A132L}$-IL12Rβ1、PD-1-IL12Rβ2、PD-1$^{A132L}$-IL12Rβ2、VSIG3-CD28、VSIG8-CD28、VSIG3-CD27、VSIG8-CD27、VSIG3-4-1BB、VSIG8-4-1BB、VSIG3-ICOS、VSIG8-ICOS、VSIG3-IL12Rβ1、VSIG8-IL12Rβ1、VSIG3-IL12Rβ2、VSIG8-IL12Rβ2、TGFβRII-CD27、TGFβRII-CD28、TGFβRII-4-1BB、TGFβRII-ICOS、TGFβRII-IL12Rβ1及TGFβRII-IL12Rβ2。

【0205】 在一些實施例中，開關受體為PD-1-CD28且包含SEQ ID NO: 78中所闡述之胺基酸序列。在一個實施例中，開關受體為PD-1$^{A132L}$-CD28且包含SEQ ID NO: 82中所闡述之胺基酸序列。在一個實施例中，開關受體為PD-1-4-1BB且包含SEQ ID NO: 84中所闡述之胺基酸序列。在一個實施例中，開關受體為PD-1$^{A132L}$-4-1BB且包含SEQ ID NO: 86中所闡述之胺基酸序列。在一個實施例中，開關受體為TGFβRII-IL12Rβ1且包含SEQ ID NO: 88中所闡述之胺基酸序列。在一個實施例中，開關受體為TGFβRII-IL12Rβ2且包含SEQ ID NO: 90中所闡述之胺基酸序列。在一個實施例中，開關受體係以SEQ ID NO: 79、81、83、85、87、89或91中所闡述之核酸序列編碼。

【0206】 開關受體之可容許變化將為熟習此項技術者已知，同時維持其預期生物活性(例如當在細胞中表現時將負信號轉化為正信號)。因此，在一些實施例中，本發明之開關受體可由與SEQ ID NO: 79、81、83、85、87、89或91中所闡述之核酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%序列一致性的核酸序列編碼。在一些實施例中，本發明之開關受體可包含與SEQ ID NO: 78、80、82、84、86、88或90具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%序列一致性的胺基酸序列。

【0207】在一些實施例中，經修飾免疫細胞包含能夠下調CD3、B2M及CIITA之插入及/或缺失，CAR及開關受體係選自由以下組成之群：PD-1-CD28、PD-1$^{A132L}$-CD28、PD-1-CD27、PD-1$^{A132L}$-CD27、PD-1-4-1BB、PD-1$^{A132L}$-4-1BB、PD-1-ICOS、PD-1$^{A132L}$-ICOS、PD-1-IL12Rβ1、PD-1$^{A132L}$-IL12Rβ1、PD-1-IL12Rβ2、PD-1$^{A132L}$-IL12Rβ2、VSIG3-CD28、VSIG8-CD28、VSIG3-CD27、VSIG8-CD27、VSIG3-4-1BB、VSIG8-4-1BB、VSIG3-ICOS、VSIG8-ICOS、VSIG3-IL12Rβ1、VSIG8-IL12Rβ1、VSIG3-IL12Rβ2、VSIG8-IL12Rβ2、TGFβRII-CD27、TGFβRII-CD28、TGFβRII-4-1BB、TGFβRII-ICOS、TGFβRII-IL12Rβ1及TGFβRII-IL12Rβ2。在一些實施例中，經修飾免疫細胞包含一或多個基因座中之插入及/或缺失，該一或多個基因座各自編碼選自由以下組成之群的內源性免疫蛋白：CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恆定鏈(Ii鏈)及其組合，CAR及開關受體係選自由以下組成之群：PD-1-CD28、PD-1$^{A132L}$-CD28、PD-1-CD27、PD-1$^{A132L}$-CD27、PD-1-4-1BB、PD-1$^{A132L}$-4-1BB、PD-1-ICOS、PD-1$^{A132L}$-ICOS、PD-1-IL12Rβ1、PD-1$^{A132L}$-IL12Rβ1、PD-1-IL12Rβ2、PD-1$^{A132L}$-IL12Rβ2、VSIG3-CD28、VSIG8-CD28、VSIG3-CD27、VSIG8-CD27、VSIG3-4-1BB、VSIG8-4-1BB、VSIG3-ICOS、VSIG8-ICOS、VSIG3-IL12Rβ1、VSIG8-IL12Rβ1、VSIG3-IL12Rβ2、VSIG8-IL12Rβ2、TGFβRII-CD27、TGFβRII-CD28、TGFβRII-4-1BB、TGFβRII-ICOS、TGFβRII-IL12Rβ1及TGFβRII-IL12Rβ2。

**2. 顯性負受體**

【0208】本發明提供用於包含CAR及顯性負受體的具有下調基因表現之經修飾免疫細胞或其前驅物的組合物及方法。因此，在一些實施例中，包含編碼內源性免疫蛋白之一或多個基因座中之插入及/或缺失的經修飾免疫細胞已經進一步基因修飾以表現顯性負受體。如本文所用，術語「顯性負受體」係指經設計以減少負信號轉導分子之作用(例如負信號轉導分子對本發明之經修飾免疫細胞的作用)的分子。顯性負受體與負信號相關之野生型蛋白質之截短變異體。在一些實施例中，與負信號相關之蛋白質係選自由以下組成之群：CTLA4、PD-1、BTLA、TGFβRII、VSIG3、VSIG8及TIM-3。

【0209】本發明之顯性負受體可藉助於與負信號相關之胞外域結合負信號轉導分子(例如，CTLA4、PD-1、BTLA、TGFβRII、VSIG3、VSIG8及TIM-3)，可減少負信號轉導分子之作用。舉例而言，包含顯性負受體之經修飾免疫細胞可在經修飾免疫細胞之微環境中結合負信號轉導分子，但此結合將不轉導細胞內部之此信號以改變經修飾T細胞之活性。實際上，結合螯合負信號轉導分子且防止其與內源性受體/配位體之結合，由此減少負信號轉導分子對經修飾免疫細胞之作用。因此，為了減少某些分子之免疫抑制作用，免疫細胞可經修飾以表現顯性負受體，其為顯性負受體。

【0210】在一些實施例中，顯性負受體包含與負信號相關之野生型蛋白質之截短變異體。在一些實施例中，顯性負受體包含與負信號相關的包含胞外域、跨膜域及實質上缺乏胞內信號傳導域之野生型蛋白質之變異體。在一些實施例中，顯性負受體包含與負信號相關之信號傳導蛋白之胞外域，以及跨膜域。在一些實施例中，顯性負受體為PD-1、CTLA4、

BTLA、TGFβRII、VSIG3、VSIG8或TIM-3顯性負受體。在一些實施例中，顯性負受體為PD-1或TGFβRII。在一些實施例中，TGFβRII包含SEQ ID NO: 76中所闡述之胺基酸序列。在一些實施例中，TGFβRII由SEQ ID NO: 77中所闡述之核酸序列編碼。

【0211】 顯性負受體之可容許變化將為熟習此項技術者已知，同時維持其預期生物活性(例如當在細胞中表現時阻斷負信號及/或螯合具有負信號之分子)。因此，在一些實施例中，本發明之顯性負受體可由與SEQ ID NO: 77中所闡述之核酸序列至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%序列一致性之核酸序列編碼。在一些實施例中，本發明之顯性負受體可包含與SEQ ID NO: 76至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%序列一致性的胺基酸序列。

**F. 趨化介素及細胞介素作為免疫增強因子改善適應性**

【0212】 本發明提供用於具有下調免疫基因表現之經修飾免疫細胞之組合物及方法，該等細胞包含CAR，且進一步包含顯性負受體、開關受體、趨化介素、趨化介素受體、細胞介素、細胞介素受體、介白素-7 (IL-7)、介白素-7受體(IL-7R)、介白素-15 (IL-15)、介白素-15受體(IL-15R)、介白素-21 (IL-21)、介白素-18 (IL-18)、CCL21、CCL19或其組合。在一些實施例中，趨化介素、趨化介素受體、細胞介素、細胞介素受

體、IL-7、IL-7R、IL-15、IL-15R、IL-21、IL-18、C-C模體趨化介素配位體21 (CCL21)或C-C模體趨化介素配位體19 (CCL19)為免疫功能增強因子，改善所主張之經修飾免疫細胞之適應性。不希望受理論束縛，添加趨化介素、趨化介素受體、細胞介素、細胞介素受體、IL-7、IL-7R、IL-15、IL-15R、IL-21、IL-18、CCL21或CCL19至經修飾免疫細胞增強經修飾免疫細胞之免疫誘導作用及抗腫瘤活性。

【0213】 不希望受理論所束縛，介白素及趨化介素可促進實體腫瘤中之T細胞激活及/或T細胞浸潤增加。舉例而言，在具有較低T細胞浸潤之小形隨體穩定大腸直腸癌(CRC)中，IL-15促進T細胞激活。在一些實施例中，CAR與趨化介素/介白素受體複合體之組合促進T細胞激活。此外，IL-15可誘導NK細胞浸潤。在一些實施例中，對IL-15/IL-15RA複合體之反應可引起NK細胞浸潤。在某些實施例中，本文所述之經修飾免疫細胞進一步包含IL-15/IL-15Ra複合體。在一些實施例中，IL-15/IL-15Ra複合體係選自NIZ985 (Novartis)、ATL-803 (Altor)或CYP0150 (Cytune)。在一些實施例中，IL-15/IL-15RA複合體為NIZ985。在一些實施例中，IL-15刺激自然殺手細胞以消除(例如殺死)胰臟癌細胞。在一些實施例中，對本文所描述的進一步包含IL-15/IL-15Ra之經修飾免疫細胞之治療反應與大腸直腸癌動物模型中之自然殺手細胞浸潤相關。在一些實施例中，IL-15/IL-15Ra複合體包含與可溶形式之人類IL-15Ra複合之人類IL-15。複合體可包含與可溶形式之IL-15Ra共價或非共價結合的IL-15。在一特定實施例中，人類IL-15與IL-15Ra之可溶形式非共價結合。

【0214】 CAR T細胞療法對實體腫瘤無效部分起因於實體腫瘤中免疫細胞及CAR T細胞之有限募集及積累。一種解決此問題之方法為工程改

造模擬T區纖維母細胞網狀細胞(FRC)功能之CAR T細胞。淋巴結負責偵測病原體及免疫原。T區含有三種類型之細胞：(1)先天性免疫細胞，諸如樹突狀細胞、單核球、巨噬細胞及粒細胞；(2)適應性免疫細胞，諸如CD4及CD8淋巴細胞，及(3)基質細胞(FRC)。此等細胞協作以藉由促進CD4 T細胞之活化、分化及成熟產生對病原體之有效免疫反應。FRC尤其重要，此係因為其形成允許樹突狀細胞及T細胞在整個淋巴結中行進且吸引B細胞之網路。尤其，FRC提供以下網路：(i)藉由釋放兩種趨化介素(CCL21及CCL19)將未處理T細胞、B細胞及樹突狀細胞募集至淋巴結；(ii)藉由分泌作為尤其針對未處理T細胞之存活因子的IL-7使T細胞存活；及(iii) CD4 T細胞朝向生發中心(GC；淋巴結之不同部分)運輸。因此，具有外源性CCL21或CCL19及IL-7之CAR將提供T細胞、B細胞及樹突狀細胞至實體腫瘤之募集。在一些實施例中，經修飾T細胞包含編碼免疫功能增強因子之核酸，其中編碼免疫功能增強因子之核酸為編碼介白素-7之核酸及編碼CCL19或CCL21之核酸。

【0215】 在一些實施例中，免疫功能增強因子(亦即趨化介素、趨化介素受體、細胞介素、細胞介素受體、IL-7、IL-7R、IL-15、IL-15R、IL-21、IL-18、CCL21或CCL19)之核酸融合至CAR。在一些實施例中，趨化介素、趨化介素受體、細胞介素、細胞介素受體、IL-7、IL-7R、IL-15、IL-15R、IL-21、IL-18、CCL21或CCL19經由自裂解肽，諸如P2A、T2A、E2A或F2A融合至CAR。

**VI. 生產經修飾T細胞之方法**

【0216】 本發明之一個態樣提供生產經修飾免疫細胞(例如同種異體T細胞、NK細胞或NKT細胞)之方法。本發明之經修飾免疫細胞一般藉由

以下方式進行工程改造：(1)將一或多種能夠下調編碼內源性免疫蛋白之一或多種內源性免疫基因之基因表現的核酸引入至免疫細胞中；(2)將編碼經工程改造受體之外源性核酸引入至免疫細胞中；及(3)擴增經修飾免疫細胞以產生經修飾免疫T細胞。此類經修飾免疫細胞可包括於治療性組合物中且向有需要之患者投與。

【0217】 在一些實施例中，生產本發明之經修飾免疫細胞的方法包含將一或多種能夠下調一或多種內源性免疫基因之基因表現的核酸引入至免疫細胞中。一或多種免疫基因編碼選自由以下組成之群的內源性免疫蛋白：CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP及恆定鏈(Ii鏈)。另外，亦將編碼嵌合抗原受體(CAR)、經工程改造T細胞受體(TCR)、殺手細胞免疫球蛋白樣受體(KIR)、抗原結合多肽、細胞表面受體配位體或腫瘤抗原之外源性核酸引入至該免疫細胞中。在一些實施例中，該方法進一步包含將編碼顯性負受體、開關受體或其組合之外源性核酸引入至免疫細胞中。

**A. 將核酸引入至細胞中之方法**

【0218】 將核酸引入至細胞中之方法包括物理、生物及化學方法。將諸如RNA之聚核苷酸引入至宿主細胞中之物理方法包括磷酸鈣沈澱、脂質體轉染、粒子轟擊、顯微注射、電穿孔及其類似方法。可使用可商購的方法將RNA引入至目標細胞中，該等方法包括電穿孔(Amaxa Nucleofector-II (Amaxa Biosystems, Cologne, Germany))、(ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, MA)或Gene Pulser II (BioRad, Denver, CO)、Multiporator (Eppendorf, Hamburg Germany)。亦可使用陽離子脂質體介導之轉染、使用脂質體轉染、使用聚合物囊封、使用肽介

導之轉染或使用基因槍粒子遞送系統(諸如「基因槍」)將RNA引入至細胞中。

**1. 生物方法**

【0219】 用於將相關聚核苷酸引入至宿主細胞(例如免疫細胞)中之生物方法包括使用DNA及RNA載體。病毒載體及尤其反轉錄病毒載體已成為最廣泛用於將基因插入至哺乳動物(例如人類細胞)中之方法。其他病毒載體可來源於慢病毒、痘病毒、I型單純疱疹病毒、腺病毒及腺相關病毒及其類似病毒。參見例如美國專利第5,350,674號及第5,585,362號。

【0220】 在一些實施例中，藉由表現載體將編碼本發明之個體CAR、個體經工程改造TCR、個體KIR、個體抗原結合多肽、個體細胞表面受體配位體、個體腫瘤抗原、個體開關受體及/或個體顯性負受體之核酸引入細胞中。本文提供包含編碼個體CAR之核酸、個體經工程改造TCR、個體KIR、個體抗原結合多肽、個體細胞表面受體配位體、個體腫瘤抗原、個體開關受體及/或個體顯性負受體的表現載體。適合的表現載體包括慢病毒載體、γ反轉錄病毒載體、多泡病毒載體、腺相關病毒(AAV)載體、腺病毒載體、經工程改造之混雜病毒、裸DNA，包括但不限於轉座子介導之載體，諸如Sleeping Beauty、Piggyback及Integrases，諸如Phi31。一些其他適合的表現載體包括單純疱疹病毒(HSV)及反轉錄病毒表現載體。

【0221】 腺病毒表現載體係基於腺病毒，其具有整合至基因體DNA中之低容量，但轉染宿主細胞之高效率。腺病毒表現載體含有足夠的腺病毒序列來：(a)支持表現載體之封裝，及(b)在宿主細胞中最終表現個體CAR、個體經工程改造TCR、個體KIR、個體抗原結合多肽、個體細胞表

面受體配位體、個體腫瘤抗原、個體開關受體及/或個體顯性負受體。在一些實施例中，腺病毒基因體為36 kb線性雙股DNA，其中為外來DNA序列。舉例而言，可插入編碼個體CAR、個體經工程改造TCR、個體KIR、個體抗原結合多肽、個體細胞表面受體配位體、個體腫瘤抗原、個體開關受體及/或個體顯性負受體之核酸以取代大片段之腺病毒DNA，以便製備本發明之表現載體。

【0222】 其他表現載體係基於腺相關病毒，其利用腺病毒偶合系統。此AAV表現載體具有高頻率整合至宿主基因體中。其可感染非分裂細胞，因此使得適用於將基因遞送至哺乳動物細胞中，例如在組織培養物中或活體內。AAV載體具有廣泛宿主感染性。關於產生及使用AAV載體之細節描述於美國專利第5,139,941號及第4,797,368號中。

【0223】 反轉錄病毒表現載體能夠整合至宿主基因體中，遞送大量外來遺傳物質，感染廣泛範圍之物種及細胞類型且封裝在特定細胞株中。反轉錄病毒載體係藉由在某些位置將核酸(例如編碼個體CAR、個體經工程改造TCR、個體KIR、個體抗原結合多肽、個體細胞表面受體配位體、個體腫瘤抗原、個體開關受體及/或個體顯性負受體之核酸)插入至病毒基因體中以產生複製缺陷型病毒來構築。儘管反轉錄病毒載體能夠感染廣泛多種細胞類型，個體CAR、個體經工程改造TCR、個體KIR、個體抗原結合多肽、個體細胞表面受體配位體、個體腫瘤抗原、個體開關受體及/或個體顯性負受體之整合及穩定表現需要宿主細胞分裂。

【0224】 慢病毒載體來源於慢病毒，慢病毒為複雜反轉錄病毒，除共同反轉錄病毒基因gag、pol及env以外，亦含有具有調節功能或結構功能之其他基因。參見例如美國專利第6,013,516號及第5,994,136號。慢病

毒之一些實例包括人類免疫缺乏病毒(HTV-1，HTV-2)及猿猴免疫缺乏病毒(SIV)。慢病毒載體已藉由多次緩解HIV毒性基因產生，例如基因env、vif、vpr、vpu及nef缺失使得載體生物安全。慢病毒載體能夠感染非分裂細胞且可用於編碼個體CAR、個體經工程改造TCR、個體KIR、個體抗原結合多肽、個體細胞表面受體配位體、個體腫瘤抗原、個體開關受體及/或個體顯性負受體之核酸的活體內及離體基因轉移及表現。參見例如美國專利第5,994,136號。

【0225】 包括本發明之核酸的表現載體可藉由熟習此項技術者已知的任何方式引入至宿主細胞中。表現載體必要時可包括用於轉染之病毒序列。替代地，表現載體可藉由融合、電穿孔、基因槍、轉染、脂質體轉染或其類似者引入。宿主細胞(例如免疫細胞)可在培養物中生長及擴增，之後引入表現載體，繼而用於引入及整合載體之適當的處理。宿主細胞(例如免疫細胞)隨後經擴增且可藉助於存在於載體中之標記物篩選。在一些實施例中，編碼個體CAR、個體經工程改造TCR、個體KIR、個體抗原結合多肽、個體細胞表面受體配位體、個體腫瘤抗原、個體開關受體及/或個體顯性負受體之核酸藉由病毒轉導引入至免疫細胞中。在一些實施例中，病毒轉導包含使免疫細胞與包含一或多種核酸之病毒載體接觸。在一些實施例中，病毒載體係選自由以下組成之群：反轉錄病毒載體、仙台病毒載體、腺病毒載體、腺相關病毒載體及慢病毒載體。可使用之各種標記物為此項技術中已知的，且可包括hprt、新黴素抗性、胸苷激酶、潮黴素抗性等。如本文所用，術語「細胞」、「細胞株」及「細胞培養物」可互換使用。在一些實施例中，宿主細胞為免疫細胞或其前驅體。在一些實施例中，經基因工程改造之細胞為經基因工程改造之T淋巴細胞(T細胞)、未

處理T細胞(TN)、記憶T細胞(例如中樞記憶T細胞(TCM)、效應記憶細胞(TEM))、自然殺手細胞(NK細胞)及能夠產生治療學上相關之後代的巨噬細胞。在一些實施例中，宿主細胞為T細胞、NK細胞或NKT細胞。在一些實施例中，免疫細胞係選自由以下組成之群：T細胞、自然殺手細胞(NK細胞)、自然殺手T細胞、淋巴祖細胞、造血幹細胞、幹細胞、巨噬細胞及樹突狀細胞。在一些實施例中，免疫細胞為CD4+ T細胞或CD8+ T細胞。在一些實施例中，免疫細胞為同種異體T細胞或自體T細胞。在一些實施例中，同種異體T細胞或自體T細胞為人類。

【0226】本發明之經修飾免疫細胞(例如，包含能夠下調基因、CAR、KIR、TCR、顯性負受體及/或開關受體之核酸)可藉由用包括本發明之核酸之表現載體穩定轉染宿主細胞(例如免疫細胞)而產生。產生本發明之經修飾細胞之額外方法包括但不限於化學轉變法(例如，使用磷酸鈣、樹枝狀聚合物、脂質體及/或陽離子聚合物)、非化學轉變方法(例如，電穿孔、光學轉型、基因電轉移及/或流體動力學遞送)及/或基於粒子之方法(例如，刺穿感染、使用基因槍及/或磁轉染)。表現能夠下調本發明之基因、CAR、KIR、TCR、顯性負受體及/或開關受體之核酸的經轉染細胞(亦即免疫細胞)可離體擴散。

**2. 物理方法**

【0227】用於將表現載體引入至宿主細胞中之物理方法包括磷酸鈣沈澱、脂質體轉染、粒子轟擊、顯微注射、電穿孔及其類似者。用於生產包括載體及/或外源性核酸之細胞之方法為此項技術中熟知的。參見例如Sambrook等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001)。

### 3. 化學方法

【0228】 將表現載體引入至宿主細胞中之化學方式包括膠態分散系統，諸如大分子複合體、奈米膠囊、微球、珠粒及基於脂質之系統，包括水包油乳液、微胞、混合微胞及脂質體。將聚核苷酸引入至宿主細胞中之化學方式包括膠態分散系統，諸如大分子複合體、奈米膠囊、微球、珠粒及基於脂質之系統，包括水包油乳液、微胞、混合微胞及脂質體。用作活體外及活體內遞送媒劑之例示性膠態系統為脂質體(例如，人工膜泡)。

【0229】 不管用於將外源性核酸引入至宿主細胞中或以其他方式使細胞暴露於本發明之抑制劑的方法，為確認核酸存在於宿主細胞中，可進行多種分析。此類分析包括例如熟習此項技術者熟知之分子生物分析，諸如南方及北方墨點法、RT-PCR及PCR；生物化學分析，諸如偵測特定肽之存在或不存在(例如免疫方式(ELISA及西方墨點法)或藉由本文所述之分析以鑑別屬於本發明之範疇內的藥劑。

【0230】 此外，核酸可藉由任何方式引入，諸如轉導經擴增之宿主細胞(例如免疫細胞)、轉染經擴增之宿主細胞(例如免疫細胞)及電穿孔經擴增之宿主細胞(例如免疫細胞)。一種核酸可藉由一種方法引入且另一種核酸可藉由不同方法引入宿主細胞(例如免疫細胞)中。

### 4. RNA

【0231】 在一個實施例中，引入宿主細胞(例如免疫細胞)中之核酸為RNA。在另一實施例中，RNA為包含活體外轉錄RNA或合成RNA之mRNA。藉由使用聚合酶鏈反應(PCR)產生之模板活體外轉錄產生RNA。來自任何來源之相關DNA可藉由PCR使用適當引子及RNA聚合酶直接轉化成用於活體外mRNA合成之模板。DNA來源可為基因體DNA、質體

DNA、噬菌體DNA、cDNA、合成DNA序列或任何其他適當DNA來源。

【0232】PCR可用於產生用於活體外轉錄mRNA之模板，隨後mRNA被引入至細胞中。進行PCR之方法為此項技術中熟知。用於PCR之引子經設計以具有與待用作PCR模板之DNA區實質上互補的區域。如本文所用，「實質上互補」係指引子序列中之大部分或所有鹼基互補或一或多個鹼基不互補或錯配的核苷酸序列。實質上互補序列能夠與預期DNA目標在用於PCR之黏接條件下黏接或雜交。引子可經設計以與DNA模板之任何部分實質上互補。舉例而言，引子可經設計以擴增在細胞(開放閱讀框架)中正常轉錄之基因之部分，包括5'及3' UTR。引子亦可經設計以擴增編碼相關特定域的基因之一部分。在一個實施例中，引子經設計以擴增人類cDNA之編碼區，包括全部或部分5'及3' UTR。適用於PCR之引子係藉由此項技術中熟知之合成方法產生。「正向引子」為含有與DNA模板上在待擴增DNA序列之上游的核苷酸實質上互補之核苷酸區的引子。「上游」在本文中用於指待擴增之DNA序列相對於編碼股之位置5。「反向引子」為含有與在待擴增DNA序列之下游的雙股DNA模板實質上互補之核苷酸區的引子。「下游」在本文中用於指待擴增之DNA序列相對於編碼股之位置3'。

【0233】亦可使用能夠促進RNA之穩定性及/或轉譯效率的化學結構。RNA較佳具有5'及3' UTR。在一個實施例中，5' UTR之長度在零與3000個核苷酸之間。待添加至編碼區的5'及3' UTR序列之長度可藉由不同方法改變，包括但不限於設計黏接至UTR之不同區域的PCR之引子。使用此方法，一般技術者可以修改5'及3' UTR長度，此為所轉錄之RNA轉染後達成最佳轉譯效率所必需的。

【0234】 5'及3' UTR可為相關基因之天然存在的內源性5'及3' UTR。或者，可藉由將UTR序列併入正向及反向引子中或藉由模板之任何其他修飾來添加對相關基因非內源的UTR序列。對相關基因非內源的UTR序列之用途可適用於改變RNA之穩定性及/或轉譯效率。舉例而言，已知3' UTR序列中之富AU元件可以降低mRNA之穩定性。因此，可選擇或設計3' UTR以基於此項技術中熟知之UTR特性提高經轉錄之RNA的穩定性。

【0235】 在一個實施例中，5' UTR可含有內源性基因之Kozak序列。替代地，如上所述，當藉由PCR添加對相關基因非內源的5' UTR時，可藉由添加5' UTR序列來重新設計共同Kozak序列。克紮克序列可提高一些RNA轉錄物之轉譯效率，但似乎並非為所有RNA所需能夠實現有效轉譯。此項技術中已知許多mRNA需要Kozak序列。在其他實施例中，5' UTR可來源於RNA基因體在細胞中穩定的RNA病毒。在其他實施例中，多種核苷酸類似物可用於3'或5' UTR以阻礙mRNA之核酸外切酶降解。

【0236】 為能夠在不需要基因選殖之情況下自DNA模板合成RNA，轉錄啟動子應附接至待轉錄序列上游之DNA模板。當充當RNA聚合酶之啟動子的序列添加至正向引子之5'端時，RNA聚合酶啟動子併入待轉錄之開放閱讀框架上游的PCR產物中。在一個實施例中，啟動子為如本文別處所描述之T7聚合酶啟動子。其他有用啟動子包括但不限於T3及SP6 RNA聚合酶啟動子。T7、T3及SP6啟動子的共同核苷酸序列為此項技術中已知。

【0237】 在一個實施例中，mRNA具有5'端上之封端及3'聚(A)兩者，其確定mRNA在細胞中之核糖體結合、轉譯起始及穩定性。在圓形

DNA模板上，例如質體DNA，RNA聚合酶產生不適於在真核細胞中表現的長連體產物。在3' UTR之末端經線性化之質體DNA的轉錄產生正常尺寸之mRNA，即使在轉錄後經聚腺苷酸化，其在真核轉染中仍無效。在線性DNA模板上，噬菌體T7 RNA聚合酶可使轉錄之3'端延伸超過模板之最後一個鹼基(Schenborn及Mierendorf, Nuc Acids Res., 13:6223-36 (1985)；Nacheva及Berzal-Herranz, Eur. J. Biochem, 270: 1485-65 (2003)。

【0238】將聚A/T伸長部整合至DNA模板中的習知方法為分子選殖。然而，整合至質體DNA中之聚A/T序列可使質體不穩定，此為獲自細菌細胞之質體DNA模板通常高度混雜有缺失及其他畸變之原因。此使選殖程序不僅費力費時且通常不可靠。此為能夠用聚A/T 3'伸長部構築DNA模板而無需選殖的方法高度符合需要的原因。轉錄DNA模板之聚A/T區段可在PCR期間藉由使用含有聚T尾，諸如100T尾(尺寸可為50-5000 T)之反向引子產生，或在PCR之後藉由任何其他方法產生，包括但不限於DNA連接或活體外重組。聚(A)尾亦向RNA提供穩定性且減少其降解。一般而言，聚(A)尾之長度與經轉錄之RNA的穩定性正相關。在一個實施例中，聚(A)尾在100與5000個腺苷之間。

【0239】RNA之聚(A)尾在使用聚(A)聚合酶(諸如大腸桿菌聚A聚合酶(E-PAP))活體外轉錄之後可進一步延伸。在一個實施例中，將聚(A)尾之長度自100個核苷酸增加至300與400個核苷酸之間使得RNA轉譯效率增加約兩倍。此外，不同化學基團與3'端之連接可提高mRNA穩定性。此類連接可含有經修飾/人工核苷酸、適體及其他化合物。舉例而言，ATP類似物可以使用聚(A)聚合酶併入聚(A)尾中。ATP類似物可進一步提高RNA

穩定性。5'封端亦提供RNA分子穩定性。在一較佳實施例中，本文揭示之方法產生的RNA包括5'封端。使用此項技術中已知且本文中所描述之技術提供5'封端。Cougot等人, *Trends in Biochem. Sci.* 29:436-444 (2001); Stepinski等人, *RNA* 7: 1468-95 (2001); Elango等人, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 330:958-966 (2005)。

【0240】 藉由本文所揭示之方法產生之RNA亦可含有內部核糖體入口位點(IRES)序列。IRES序列可為起始封端非依賴性核糖體結合於mRNA且促進轉譯起始的任何病毒、染色體或人工設計序列。可包括適合於細胞電穿孔之任何溶解物，其可含有促進細胞滲透性及存活力之因素，諸如糖、肽、脂質、蛋白質、抗氧化劑及界面活性劑。在一些實施例中，RNA電穿孔至細胞中，諸如活體外轉錄RNA。

【0241】 所揭示之方法可應用於在癌症、幹細胞、急性及慢性感染及自體免疫疾病領域的基礎研究及療法中調節宿主細胞活性，包括評定經遺傳修飾之宿主細胞殺死目標癌細胞之能力。

【0242】 該等方法亦提供藉由改變例如啟動子或輸入RNA之量來控制在廣泛範圍內之表現量的能力，從而使得有可能單獨地調節表現量。此外，基於PCR之mRNA生產技術大大促進具有不同結構之mRNA及其域組合的設計。本發明RNA轉染方法之一個優點為RNA轉染基本上短暫且無載體。RNA轉殖基因可以在短暫活體外細胞活化之後遞送至淋巴細胞且在其中表現為最小表現卡匣，而無需任何額外病毒序列。在此等條件下，不大可能將轉殖基因整合至宿主細胞基因體中。因為RNA轉染效率及其均勻修飾整個淋巴細胞群之能力，所以細胞選殖並非必需的。

【0243】 因此，本發明提供一種用於生產經修飾免疫細胞或其前驅

體細胞之方法，其包含使用本文所述或熟習此項技術者已知之基因編輯技術中之任一者，將一或多種能夠下調一或多種如本文所述之內源性免疫基因之基因表現的核酸引入至免疫細胞中。下調涉及對細胞產生免疫反應之內源性基因，諸如TCR α鏈、TCR β鏈、CD3δ、CD3ε、CD3γ、HLA-I分子(例如β-2微球蛋白、TAP1、TAP2、TAPBP或NLRC5)或經HLA-II分子(例如CIITA、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或恆定鏈)之表現減少經修飾T細胞之免疫介導之排斥。舉例而言，內源性TCR受體組分，MHC-I或MHC-II、β-2微球蛋白、CIITA基因之下調表現移除可能引起宿主免疫系統排斥的同種異體抗原在T細胞上之表面呈現。在一些實施例中，諸如藉由電穿孔、轉染或慢病毒或其他病毒轉導將能夠下調內源性基因表現之核酸引入至T細胞中。在一些實施例中，本發明包括經修飾T細胞，該細胞包含能夠下調內源性基因表現之電穿孔核酸。在一些實施例中，藉由病毒轉導將核酸引入至免疫細胞中。在一些實施例中，病毒轉導包含使免疫細胞與包含一或多種核酸之病毒載體接觸。在一個實施例中，病毒載體係選自由以下組成之群：反轉錄病毒載體、仙台病毒載體、腺病毒載體、腺相關病毒載體及慢病毒載體。

**B. 基因編輯免疫細胞之方法**

【0244】在一個態樣中，本發明提供一種基因編輯免疫細胞之方法，其包含將一或多種核酸引入至該免疫細胞中，該一或多種核酸能夠下調編碼內源性免疫蛋白之一或多種內源性免疫基因之基因表現，該內源性免疫蛋白係選自由以下組成之群：CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP及恆定鏈(Ii鏈)。在一個實施例中，一種基因編輯經修飾免疫細胞之方法

包含將能夠下調T細胞受體次單元之基因表現的核酸引入至免疫細胞中，該T細胞受體次單元係選自CD3δ、CD3ε或CD3γ。在一個實施例中，一種基因編輯經修飾免疫細胞之方法包含將能夠下調選自B2M、TAP1、TAP2、TAPBP或NLRC5之HLA I類分子之基因表現的核酸引入至免疫細胞中。在一個實施例中，基因編輯經修飾免疫細胞之方法包含將能夠下調選自HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或恆定鏈(Ii鏈)之HLA II類分子之基因表現的核酸引入至免疫細胞中。

【0245】 在一些實施例中，基因編輯免疫細胞之方法包含將能夠下調CD3δ基因表現及選自由以下組成之群的HLA分子之基因表現之核酸引入至免疫細胞中：B2M、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恆定鏈(Ii鏈)及其組合。在一些實施例中，基因編輯免疫細胞之方法包含將能夠下調CD3ε基因表現及選自由以下組成之群的HLA分子之基因表現的核酸引入至免疫細胞中：B2M、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恆定鏈(Ii鏈)及其組合。在一些實施例中，基因編輯免疫細胞之方法包含將能夠下調CD3γ之基因表現及選自由以下組成之群的HLA分子之基因表現的核酸引入至免疫細胞中：B2M、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恆定鏈(Ii鏈)及其組合。在一些實施例中，基因編輯免疫細胞之方法包含將能夠下調CD3γ之基因表現及CD3ε、B2M及CIITA之基因表現的核酸引入至免疫細胞中。

【0246】 在一些實施例中，基因編輯免疫細胞之方法包含將能夠下調以下之基因表現之核酸引入至免疫細胞中：(1) CD3ε、B2M及RFX5；(2) CD3ε、B2M及RFXAP；(3) CD3ε、B2M及RFXANK；(4) CD3ε、

B2M及HLA-DM；(5) CD3ε、B2M及Ii鏈；(6) CD3ε、TAP1及CIITA；(7) CD3ε、TAP1及RFX5；(8) CD3ε、TAP1及RFXAP；(9) CD3ε、TAP1及RFXANK；(10) CD3ε、TAP1及HLA-DM；(11) CD3ε、TAP1及Ii鏈；(12) CD3ε、TAP2及CIITA；(13) CD3ε、TAP2及RFX5；(14) CD3ε、TAP2及RFXAP；(15) CD3ε、TAP2及RFXANK；(16) CD3ε、TAP2及HLA-DM；(17) CD3ε、TAP2及Ii鏈；(18) CD3ε、NLRC5及CIITA；(19) CD3ε、NLRC5及RFX5；(20) CD3ε、NLRC5及RFXAP；(21) CD3ε、NLRC5及RFXANK；(22) CD3ε、NLRC5及HLA-DM；(23) CD3ε、NLRC5及Ii鏈；(24) CD3ε、TAPBP及CIITA；(25) CD3ε、TAPBP及RFX5；(26) CD3ε、TAPBP及RFXAP；(27) CD3ε、TAPBP及RFXANK；(28) CD3ε、TAPBP及HLA-DM；或(29) CD3ε、TAPBP及Ii鏈。

【0247】在一些實施例中，基因編輯免疫細胞之方法包含將能夠下調以下之基因表現之核酸引入至免疫細胞中：(1) CD3δ、B2M及RFX5；(2) CD3δ、B2M及RFXAP；(3) CD3δ、B2M及RFXANK；(4) CD3δ、B2M及HLA-DM；(5) CD3δ、B2M及Ii鏈；(6) CD3δ、TAP1及CIITA；(7) CD3δ、TAP1及RFX5；(8) CD3δ、TAP1及RFXAP；(9) CD3δ、TAP1及RFXANK；(10) CD3δ、TAP1及HLA-DM；(11) CD3δ、TAP1及Ii鏈；(12) CD3δ、TAP2及CIITA；(13) CD3δ、TAP2及RFX5；(14) CD3δ、TAP2及RFXAP；(15) CD3δ、TAP2及RFXANK；(16) CD3δ、TAP2及HLA-DM；(17) CD3δ、TAP2及Ii鏈；(18) CD3δ、NLRC5及CIITA；(19) CD3δ、NLRC5及RFX5；(20) CD3δ、NLRC5及RFXAP；(21) CD3δ、NLRC5及RFXANK；(22) CD3δ、NLRC5及HLA-DM；(23)

CD3δ、NLRC5及Ii鏈；(24) CD3δ、TAPBP及CIITA；(25) CD3δ、TAPBP及RFX5；(26) CD3δ、TAPBP及RFXAP；(27) CD3δ、TAPBP及RFXANK；(28) CD3δ、TAPBP及HLA-DM；或(29) CD3δ、TAPBP及Ii鏈。

【0248】在一些實施例中，基因編輯免疫細胞之方法包含將能夠下調以下之基因表現之核酸引入至免疫細胞中：(1) CD3γ、B2M及RFX5；(2) CD3γ、B2M及RFXAP；(3) CD3γ、B2M及RFXANK；(4) CD3γ、B2M及HLA-DM；(5) CD3γ、B2M及Ii鏈；(6) CD3γ、TAP1及CIITA；(7) CD3γ、TAP1及RFX5；(8) CD3γ、TAP1及RFXAP；(9) CD3γ、TAP1及RFXANK；(10) CD3γ、TAP1及HLA-DM；(11) CD3γ、TAP1及Ii鏈；(12) CD3γ、TAP2及CIITA；(13) CD3γ、TAP2及RFX5；(14) CD3γ、TAP2及RFXAP；(15) CD3γ、TAP2及RFXANK；(16) CD3γ、TAP2及HLA-DM；(17) CD3γ、TAP2及Ii鏈；(18) CD3γ、NLRC5及CIITA；(19) CD3γ、NLRC5及RFX5；(20) CD3γ、NLRC5及RFXAP；(21) CD3γ、NLRC5及RFXANK；(22) CD3γ、NLRC5及HLA-DM；(23) CD3γ、NLRC5及Ii鏈；(24) CD3γ、TAPBP及CIITA；(25) CD3γ、TAPBP及RFX5；(26) CD3γ、TAPBP及RFXAP；(27) CD3γ、TAPBP及RFXANK；(28) CD3γ、TAPBP及HLA-DM或(29) CD3γ、TAPBP及Ii鏈。

【0249】在一些實施例中，基因編輯免疫細胞之方法包含將能夠下調基因表現之核酸引入至免疫細胞中，該核酸包含選自由反義RNA、抗寡聚物RNA、siRNA、shRNA及CRISPR系統組成之群的基因編輯系統。可藉由例如反義RNA、抗寡聚物RNA、siRNA、shRNA、CRISPR系統等

下調、減弱、降低及/或抑制內源性免疫基因表現。在一個實施例中，基因編輯免疫細胞之方法包含將能夠下調基因表現之核酸引入至免疫細胞中，該核酸包含CRISPR相關(Cas) (CRISPR-Cas)核酸內切酶系統及引導RNA。在一些實施例中，能夠下調基因表現之核酸包含選自由以下組成之群的Cas核酸內切酶：Cas3、Cas4、Cas8a、Cas8b、Cas9、Cas10、Cas10d、Cas12a、Cas12b、Cas12d、Cas12e、Cas12f、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas13、Cas14、CasX、Cse1、Csy1、Csn2、Cpf1、C2c1、Csm2、Cmr5、Fok1、釀膿鏈球菌Cas9 (spCas9)、金黃色葡萄球菌Cas9 (saCas9)、MAD7核酸酶(V型CRISPR核酸酶)及其任何組合。基因編輯細胞之方法為此項技術中熟知的且描述於本文中。

【0250】在一些實施例中，基因編輯免疫細胞之方法包含將CRISPR/Cas引入至免疫細胞中以破壞經修飾細胞(例如經修飾T細胞)中之一或多個內源性免疫基因。在一些實施例中，使用CRISPR/Cas9破壞內源性免疫蛋白中之一或多者，該內源性免疫蛋白係選自由以下組成之群：CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP及恆定鏈(Ii鏈)。在某些例示性實施例中，CRISPR/Cas9用於破壞內源性CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP及恆定鏈(Ii鏈)中之一或多者，由此引起CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP及恆定鏈(Ii鏈)之下調。用於破壞內源性TRAC、TRBC、B2M、CIITA及/或PD1中之一或多者的適合之gRNA闡述於圖26及圖27。在一些實施例中，基因編輯免疫細胞之方法包含將

CRISPR/Cas及引導RNA引入至免疫細胞中以破壞經修飾細胞(例如經修飾T細胞)中之一或多個內源性免疫基因。在一個實施例中，基因編輯免疫細胞之方法包含將CRISPR/Cas及引導RNA引入至免疫細胞中，且該引導RNA包含與選自由以下組成之群的一或多個基因座內之序列互補的引導序列：CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP及恆定鏈(Ii鏈)。適用於破壞內源性CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP及恆定鏈(Ii鏈)中之一或多者的引導RNA (gRNA)闡述於表4中。

【0251】 在一個實施例中，一種基因編輯免疫細胞之方法，其包含將能夠下調基因表現之核酸引入至免疫細胞中，該核酸包含TALEN基因編輯系統。在一個實施例中，一種基因編輯免疫細胞之方法，其包含將能夠下調基因表現之核酸引入至免疫細胞中，該核酸包含鋅指核酸酶(ZFN)基因編輯系統。在一個實施例中，一種基因編輯免疫細胞之方法，其包含將能夠下調基因表現之核酸引入至免疫細胞中，該核酸包含巨核酸酶基因編輯系統。在一個實施例中，一種基因編輯免疫細胞之方法，其包含將能夠下調基因表現之核酸引入至免疫細胞中，該核酸包含mega-TALEN基因編輯系統。在一個實施例中，一種基因編輯經修飾免疫細胞之方法，其包含將能夠下調基因表現之核酸引入至免疫細胞中，該核酸包含選自反義RNA、抗寡聚物RNA、RNAi、siRNA或shRNA之基因緘默系統。

**C. 經修飾免疫細胞之擴增**

【0252】 在又一實施例中，生產如本文所述之經修飾T細胞之方法進一步包含擴增經修飾免疫細胞以產生經修飾T細胞群。無論在修飾免疫

細胞以表現CAR、TCR、顯性負受體及/或開關受體之前或之後，經修飾細胞可使用此項技術中已知之方法活化及數目擴增。舉例而言，本發明之免疫細胞可藉由與表面接觸來擴增，該表面連接有刺激CD3/TCR複合體相關信號的試劑及刺激經修飾免疫細胞表面上之協同刺激分子的配位體。尤其，經修飾免疫細胞群可藉由與固定於表面上之抗CD3抗體或其抗原結合片段，或抗CD2抗體接觸，或藉由與蛋白激酶C活化因子(例如苔蘚蟲素)以及鈣離子載體接觸而受刺激。為了協同刺激經修飾免疫細胞表面上輔助分子，使用結合輔助分子之配位體。舉例而言，經修飾免疫細胞可與抗CD3抗體及抗CD28抗體在適合於刺激免疫細胞增殖之條件下接觸。抗CD28抗體之實例包括9.3、B-T3、XR-CD28 (Diaclone, Besancon, France)，且此等可用於本發明中，如此項技術中已知之其他方法及試劑一般。

【0253】藉由本文所揭示之方法擴增經修飾免疫細胞可乘以約10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、2000倍、3000倍、4000倍、5000倍、6000倍、7000倍、8000倍、9000倍、10,000倍、100,000倍、1,000,000倍、10,000,000倍或更多倍，及兩者之間的任何及所有整數或部分整數。在一個實施例中，經修飾免疫細胞在約20倍至約50倍範圍內擴增。

【0254】在培養之後，經修飾免疫細胞可在培養設備中在細胞培養基中培育一段時間，或直至細胞達成匯合或高細胞密度以便最佳繼代，隨後將細胞傳遞至另一培養設備。培養設備可為通常用於活體外培養細胞之任何培養設備。較佳地，在使細胞傳遞至另一培養設備之前，匯合率為

70%或更大。更佳地，匯合率為90%或更大。一段時間可為適用於活體外培養細胞之任何時間。免疫細胞培養基可在免疫細胞培養期間的任何時間更換。較佳地，免疫細胞培養基約每2至3天更換。接著自培養設備收集免疫細胞，接著可立即使用經修飾免疫細胞或將其冷凍保存以儲存供稍後使用。在一個實施例中，本發明包括冷凍保存擴增之經修飾免疫細胞。將冷凍保存之免疫細胞解凍，隨後將核酸引入至免疫細胞中。

【0255】 在另一實施例中，該方法包含分離免疫細胞及擴增免疫細胞。在另一個實施例中，本發明進一步包含在擴增之前低溫保存免疫細胞。在另一實施例中，將冷凍保存之免疫細胞解凍以便用編碼嵌合膜蛋白之RNA電穿孔。

【0256】 在另一實施例中，如本文所述產生經修飾T細胞之方法進一步包含離體擴增經修飾免疫細胞。在一些實施例中，經修飾免疫細胞之離體培養及擴增包含添加細胞生長因子。然而，亦可添加其他因子，諸如flt3-L、IL-1、IL-3及c-kit配位體。在一些實施例中，擴增經修飾T細胞包含用選自由以下組成之群的因子培養經修飾T細胞：flt3-L、IL-1、IL-3、IL-2、IL-7、IL-15、IL-18、IL-21、TGFβ、IL-10及c-kit配位體。如本文所述之培養步驟(與如本文所述之試劑接觸或在電穿孔之後)可極短，例如小於24小時，諸如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小時。培養步驟可用更長時間，例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14天或更多天。

【0257】 使用各種術語描述培養中之細胞。細胞培養通常係指獲自活生物體且在控制條件下生長之細胞。原代細胞培養物為直接獲自生物體

且在第一次繼代培養之前取得之細胞、組織或器官的培養物。當將細胞置於生長培養基中在促進細胞生長及/或分裂之條件下時，使其在培養物中擴增，產生較大細胞群。當細胞在培養物中擴增時，細胞增殖速率通常藉由細胞數加倍所需的時間量，或者稱為倍增時間來量測。

【0258】 適合於免疫細胞培養之條件包括適當培養基(例如最低必需培養基或RPMI培養基1640或X-vivo 15, (Lonza))，該等培養基可含有增殖及存活所需之因子，包括血清(例如胎牛或人類血清)、介白素-2 (IL-2)、胰島素、IFN-γ、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF-β及TNF-a，或用於使熟習此項技術者已知之細胞生長的任何其他添加物。用於細胞生長之其他添加物包括但不限於界面活性劑、人血漿蛋白粉(plasmanate)，及還原劑，諸如N-乙醯基-半胱胺酸及2-巰基乙醇。

【0259】 培養基可以包括RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、a-MEM、F-12、X-Vivo 15及X-Vivo 20、Optimizer，其中添加有胺基酸、丙酮酸鈉及維生素，無血清或補充有適量血清(或血漿)或確定的一組激素，及/或足以供免疫細胞生長及擴增之量的細胞介素。抗生素，例如青黴素及鏈黴素，僅包括在實驗培養物中，而不包括在待輸注至個體之細胞培養物中。目標細胞保持於支持生長所必需之條件下，例如適當溫度(例如，37℃)及氛圍(例如，空氣加5% CO2)。

【0260】 用於培養免疫細胞之培養基可包括可協同刺激免疫細胞之試劑。舉例而言，可刺激CD3之試劑為針對CD3之抗體，且可刺激CD28之試劑為針對CD28之抗體。此係因為如本文所揭示之資料所證實，藉由本文所揭示之方法分離之細胞可擴增大致10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500

倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、2000倍、3000倍、4000倍、5000倍、6000倍、7000倍、8000倍、9000倍、10,000倍、100,000倍、1,000,000倍、10,000,000倍或更多倍。在一個實施例中，免疫細胞藉由培養電穿孔群體而在約20倍至約50倍或更大範圍內擴增。在一個實施例中，人類T調節細胞經由抗CD3抗體塗佈之KT64.86人工抗原呈現細胞(aAPC)擴增。用於擴增及活化免疫細胞之方法可見於美國專利：第7,754,482號、第8,722,400號及第9,555,105號中，其內容以全文併入本文中。

**D. 免疫細胞源**

【0261】 在擴增之前，自個體獲得免疫細胞源以進行離體操作。用於離體操作之目標細胞源亦可包括例如自體或異源供體血液、臍帶血或骨髓。舉例而言，免疫細胞源可來自待用本發明之經修飾免疫細胞治療之個體，例如個體之血液、個體之臍帶血或個體之骨髓。個體之非限制性實例包括人類、狗、貓、小鼠、大鼠及其轉殖基因物種。個體較佳為人類。

【0262】 可從多種來源獲得免疫細胞，包括血液、周邊血液單核細胞、骨髓、淋巴結組織、脾臟組織、臍帶、淋巴或淋巴器官。免疫細胞為免疫系統之細胞，諸如先天性或適應性免疫細胞，例如骨髓或淋巴細胞，包括淋巴細胞，通常為T細胞及/或NK細胞。其他例示性細胞包括幹細胞，諸如多潛能(multipotent)及多能(pluripotent)幹細胞，包括經誘導多能幹細胞(iPSC)。在一些態樣中，細胞為人類細胞。當提及待治療之個體時，細胞可為同種異體細胞及/或自體細胞。細胞通常為初代細胞，諸如直接自個體分離及/或自個體分離且冷凍之細胞。

【0263】 在某些實施例中，免疫細胞為T細胞，例如CD8+ T細胞

(例如，CD 8+未處理T細胞、中樞記憶T細胞或效應記憶T細胞)、CD4+ T細胞、自然殺手T細胞(NKT細胞)、調節T細胞(Treg)、幹細胞記憶T細胞、淋巴祖細胞、造血幹細胞、自然殺手細胞(NK細胞)或樹突狀細胞。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、嗜中性球、樹突狀細胞、肥大細胞、嗜伊紅血球及/或嗜鹼性血球。在一實施例中，目標細胞為經誘導多能幹細胞(iPS)或衍生自iPS細胞之細胞，例如一種iPS細胞，其由個體產生，經操縱以改變(例如誘導突變)或操縱一或多種目標基因之表現，且分化成例如T細胞，例如CD8+ T細胞(例如CD8+未處理T細胞、中樞記憶T細胞或效應記憶T細胞)、CD4+ T細胞、幹細胞記憶T細胞、淋巴祖細胞或造血幹細胞。

【0264】 在一些實施例中，細胞包括T細胞或其他細胞類型之一或多個子集，諸如全T細胞群、CD4+細胞、$CD8^+$細胞及其亞群，諸如根據以下定義之彼等細胞：功能、活化狀態、成熟度、分化潛能、擴增、再循環、位置及/或持久能力、抗原特異性、抗原受體類型、特定器官或區室中之存在、標記物或細胞介素分泌概況及/或分化程度。

【0265】 T細胞及/或CD4+ T細胞及/或CD8+ T細胞的亞型及亞群為未處理T細胞(TN)、效應子T細胞(TEFF)、記憶T細胞及其亞型，諸如幹細胞記憶T細胞 (TSCM)、中樞記憶T細胞 (TCM)、效應子記憶T細胞(TEM)或末期分化效應子記憶T細胞；腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)、不成熟T細胞、成熟T細胞、輔助T細胞、細胞毒性T細胞、黏膜相關不變T細胞(MAIT)、天然存在及適應性調節T細胞 (Treg)、輔助T細胞，諸如TH1細胞、TH2細胞、TH3細胞、TH17細胞、TH9細胞、TH22細胞、濾泡性輔助T細胞；α/β T細胞及δ/γ T細胞。在某些實施例中，可使用此項技術中可

獲得之任何數目之T細胞株。

【0266】 在一些實施例中，該等方法包括自個體分離免疫細胞、對其進行製備、處理、培養及/或工程改造。在一些實施例中，經工程改造之細胞的製備包括一或多個培養及/或製備步驟。如所描述之用於工程改造之細胞可自樣品分離，諸如生物樣品，例如獲自或源自個體之樣品。在一些實施例中，經分離細胞所來自之個體為患有疾病或病況、或需要細胞療法、或細胞療法將投與之個體。在一些實施例中，個體為需要特定治療性干預(諸如對細胞進行分離、處理及/或工程改造的授受性細胞療法)的人類。因此，在一些實施例中，細胞為初代細胞，例如初代人類細胞。樣品包括組織、流體及直接獲自個體的其他樣品，以及經由一或多個處理步驟(諸如分離、離心、基因工程改造(例如經病毒載體轉導)、洗滌及/或培育)產生的樣品。生物樣品可為直接獲自生物學來源之樣品或經處理之樣品。生物樣品包括但不限於體液，諸如血液、血漿、血清、腦脊髓液、滑液、尿液及汗液；組織及器官樣品，包括來源於其之經處理樣品。

【0267】 在某些態樣中，所得或經分離之免疫細胞所來自的樣品為血液或血液源性樣品，或為或來源於血球分離術或白血球分離術產物。例示性樣品包括全血、周邊血液單核細胞(PBMC)、白血球、骨髓、胸腺、組織活檢體、腫瘤、白血病、淋巴瘤、淋巴結、腸道相關淋巴組織、黏膜相關淋巴組織、脾臟、其他淋巴組織、肝臟、肺、胃、腸、大腸、腎臟、胰臟、乳房、骨骼、前列腺、子宮頸、睪丸、卵巢、扁桃體或其他器官，及/或來源於其之細胞。在細胞療法(例如授受性細胞療法)之情形下，樣品包括來自自體及同種異體來源之樣品。

【0268】 在一些實施例中，細胞源自細胞株，例如T細胞株。在一

些實施例中，細胞係自異種來源，例如小鼠、大鼠、非人類靈長類動物及豬獲得。在一些實施例中，細胞之分離包括一或多個製備步驟及/或基於非親和力之細胞分離步驟。在一些實例中，對細胞進行洗滌、離心及/或在一或多種試劑存在下培育，以例如移除不合需要之組分、增濃所需組分、溶解或移除對特定試劑敏感之細胞。在一些實例中，基於一或多種特性(諸如密度、黏附特性、尺寸、敏感性及/或對特定組分之耐藥性)分離細胞。

【0269】 在一些實例中，自個體之循環血液中獲得細胞，例如藉由血球分離術或白血球分離術獲得。在某些態樣中，樣品含有淋巴細胞，包括T細胞、單核細胞、粒細胞、B細胞、其他成核白血球、紅血球及/或血小板，且在某些態樣中含有除紅血球及血小板之外的細胞。在一些實施例中，自個體收集之血細胞經洗滌，例如以移除血漿部分及將細胞置於適當緩衝液或培養基中用於後續處理步驟。在一些實施例中，細胞用磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)進行洗滌。在某一特定實施例中，洗滌步驟根據製造商說明書藉由切向流過濾(TFF)實現。在某些實施例中，在洗滌之後將細胞再懸浮於多種生物相容緩衝液中。在某些實施例中，移除血細胞樣品之組分，且將細胞直接再懸浮於培養基中。在一些實施例中，該等方法包括基於密度之細胞分離方法，諸如藉由使紅血球溶解而自周邊血液製備白血球及經由Percoll或Ficoll梯度離心。

【0270】 在一個實施例中，免疫細胞獲自個體之循環血液，藉由血球分離術或白血球分離術來獲得。血球分離術產物通常含有淋巴細胞，包括T細胞、單核球、粒細胞、B細胞、其他成核白血球、紅血球及血小板。藉由血球分離術收集之細胞可經洗滌以移除血漿部分且將細胞置放於

適當緩衝液或培養基中，諸如磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)，或洗滌溶液缺乏鈣且可能缺乏鎂或可能缺乏許多(若並非全部)二價陽離子用於後續處理步驟。如一般熟習此項技術者將容易瞭解，洗滌步驟可藉由熟習此項技術者已知的方法實現，諸如藉由根據製造商說明書使用半自動「流通」離心(例如Cobe 2991細胞處理器、Baxter CytoMate或Haemonetics細胞保存器5)。洗滌後，可將細胞再懸浮於多種生物相容性緩衝劑中，諸如不含$Ca^{2+}$、不含$Mg^{2+}$之PBS、PlasmaLyte A或其他具有或不具有生理食鹽水溶液之緩衝液。在一些實施例中，可移除血球分離術樣品之非所要組分且將細胞直接再懸浮於培養基中。

【0271】在一些實施例中，分離方法包括基於一或多種特定分子，諸如表面標記物(例如表面蛋白質)、細胞內標記物或核酸在細胞中之表現或存在，分離不同細胞類型。在一些實施例中，可使用用於基於此類標記物分離之任何已知方法。在一些實施例中，分離為基於親和力或免疫親和力之分離。舉例而言，某些態樣中之分離包括基於細胞表現或一或多種標記物，通常細胞表面標記物之表現量來分離細胞及細胞群，例如藉由與特異性結合於此類標記物之抗體或結合搭配物一起培育，隨後一般為洗滌步驟及分離已結合抗體或結合搭配物之細胞與尚未結合於抗體或結合搭配物之彼等細胞來進行。此類分離步驟可基於陽性選擇，其中保留已結合試劑之細胞供進一步使用；及/或陰性選擇，其中保留尚未結合於抗體或結合搭配物之細胞。在一些實例中，兩個部分均保留以供進一步使用。在某些態樣中，在無法獲得特異性鑑別非均質群體中之細胞類型的抗體時，陰性選擇可為特別適用的，從而分離最佳基於除所需群體以外之細胞所表現的標記物來進行。分離無需引起特定細胞群或表現特定標記物之細胞之

100%增濃或移除。舉例而言，特定類型之細胞(諸如表現標記物之彼等細胞)的陽性選擇或增濃係指增加此類細胞之數目或百分比，但無需使得不表現該標記物之細胞完全不存在。同樣，特定類型之細胞(諸如表現標記物之彼等細胞)的陰性選擇、移除或耗乏係指減少此類細胞之數目或百分比，但無需使得全部此類細胞完全移除。在某些例示性實施例中，進行多輪分離步驟，其中對來自一個步驟的經陽性或陰性選擇之部分進行另一分離步驟，諸如後續陽性或陰性選擇。在某些例示性實施例中，單個分離步驟可耗乏同時表現多種標記物之細胞，諸如藉由使細胞與各自對陰性選擇所靶向之標記物具特異性的複數種抗體或結合搭配物一起培育。同樣，多種細胞類型可藉由使細胞與各種細胞類型上所表現之複數種抗體或結合搭配物一起培育而同時進行陽性選擇。

【0272】 在一些實施例中，tire T細胞群中之一或多者對於以下細胞增濃或耗乏：對(標記物-)或表現高水準(標記物$^{高}$)之一或多種特定標記物，諸如表面標記物呈陽性，或對(標記-)或表現相對較低水準(標記物$^{低}$)之一或多種標記物呈陰性的細胞。舉例而言，在某些態樣中，特定T細胞亞群，諸如對一或多種表面標記物呈陽性或表現高水準的細胞，例如CD28+、CD62L+、CCR7+、CD27+、CD127+、CD4+、CD8+、CD45RA+及/或CD45RO+ T細胞係藉由陽性或陰性選擇技術分離。在一些情況下，此類標記物為在T細胞(諸如非記憶細胞)之某些群體上不存在或以相對較低水準表現但在T細胞(諸如記憶細胞)之某些其他群體上存在或以相對較高水準表現之彼等物。在一個實施例中，細胞(諸如CD8+細胞或T細胞，例如CD3+細胞)對於陽性或表現高表面水準的CD45RO、CCR7、CD28、CD27、CD44、CD127及/或CD62L的細胞增濃(亦即，針

對其進行陽性選擇)，及/或對於陽性或表現高表面水準的CD45RA的細胞耗乏(例如，針對其進行陰性選擇)。在一些實施例中，細胞對於陽性或表現高表面水準的CD122、CD95、CD25、CD27及/或IL7-Ra (CD127)的細胞增濃或耗乏。在某些例示性實施例中，CD8+ T細胞對於陽性CD45RO(或對CD45RA呈陰性)且陽性CD62L的細胞增濃。舉例而言，CD3+、CD28+ T細胞可使用CD3/CD28結合之磁性珠粒(例如DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T細胞擴增器)進行陽性選擇。

【0273】 在一些實施例中，藉由在非T細胞(諸如B細胞、單核球或其他白血球)上表現之標記物(諸如CD14)之陰性選擇來自PBMC樣品分離T細胞。在某些態樣中，使用CD4+或CD8+選擇步驟分離CD4+輔助細胞及CD8+細胞毒性T細胞。此類$CD4^+$及$CD8^+$群體可藉由對一或多種未處理、記憶及/或效應子T細胞亞群上所表現或表現至相對較高程度的標記物進行正向或負向選擇而進一步分選成亞群。在一些實施例中，CD8+細胞藉由諸如基於與各別亞群相關之表面抗原的陽性或陰性選擇而進一步增濃或耗乏原初、中心記憶型、效應記憶型及/或中心記憶型幹細胞。在一些實施例中，進行中樞記憶T 細胞(TCM)之增濃以增加功效，以便改善投藥後之長期存活、擴增及/或移植，在某些態樣中，其在此類亞群中尤其穩健。

【0274】 在一些實施例中，將TCM增濃之CD8+ T細胞與CD4+ T細胞組合可進一步增強功效。在一些實施例中，記憶T細胞存在於CD8+周邊血液淋巴細胞之CD62L+及CD62L-子集中。PBMC可諸如使用抗CD8及抗CD62L抗體增濃或耗乏CD62L-CD8+及/或CD62L+CD8+部分。在一些實施例中，CD4+ T細胞群及/或CD8+ T群體對於中樞記憶細胞(TCM)增濃。在一些實施例中，中心記憶T 細胞(TCM)之增濃係基於陽性或較高表

面表現之CD45RO、CD62L、CCR7、CD28、CDS及/或CD 127；在某些態樣中，其係基於對表現或高度表現CD45RA及/或顆粒酶B之細胞的陰性選擇。在某些態樣中，藉由耗乏表現CD4、CD14、CD45RA之細胞及對於表現CD62L之細胞進行陽性選擇或增濃來分離TCM細胞增濃之CD8+群體。在一個態樣中，中心記憶型T 細胞(TCM)之增濃係自基於CD4表現所選擇之陰性細胞部分開始進行，該等細胞係基於CD14及CD45RA之表現進行陰性選擇，且基於CD62L進行陽性選擇。此類選擇在某些態樣中同時進行且在其他態樣中按任一次序依序進行。在某些中，用於製備CD8+細胞群或亞群之基於CD4表現之相同選擇步驟亦用於產生CD4+細胞群或子群，使得基於CD4分離之陽性及陰性部分均在該等方法之後續步驟中保留且用於該等後續步驟中，視情況在一或多個其他陽性或陰性選擇步驟之後。

【0275】 藉由辨識具有細胞表面抗原的細胞群將CD4+ T輔助細胞分選為初始、中樞記憶及效應細胞。CD4+淋巴細胞可藉由標準方法獲得。在一些實施例中，原初CD4+ T淋巴細胞係CD45RO-、CD45RA+、CD62L+、CD4+ T細胞。在一些實施例中，中樞記憶CD4+細胞為CD62L+及CD45RO+。在一些實施例中，效應子CD4+細胞為CD62L-及CD45RO。在一個實例中，為了藉由陰性選擇增濃CD4+細胞，單株抗體混合液通常包括針對CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR及CDS之抗體。在一些實施例中，抗體或結合搭配物結合於固體支撐物或基質，諸如磁性珠粒或順磁珠粒，以便分離用於陽性及/或陰性選擇之細胞。

【0276】 在一些實施例中，細胞在基因工程改造之前或與基因工程改造結合進行培育及/或培養。培育(incubation)步驟可包括培養、培育

(cultivation)、刺激、活化及/或繁殖。在一些實施例中，組合物或細胞在刺激條件或刺激劑存在下進行培育。此類條件包括經設計以誘導群體中之細胞增殖、擴增、活化及/或存活、模擬抗原暴露及/或使用於基因工程改造(諸如用於引入重組抗原受體)之細胞預致敏的彼等條件。該等條件可包括以下中之一或多者：特定培養基、溫度、氧含量、二氧化碳含量、時間、試劑，例如養分、胺基酸、抗生素、離子及/或刺激因子，諸如細胞介素、趨化介素、抗原、結合搭配物、融合蛋白、重組可溶受體及任何其他經設計以活化細胞之試劑。在一些實施例中，刺激條件或刺激劑包括能夠活化TCR複合體之胞內信號傳導域的一或多種試劑，例如配位體。在某些態樣中，藥劑開啟或起始T細胞中之TCR/CD3胞內信號傳導級聯。此類試劑可包括抗體，諸如對TCR組分及/或協同刺激受體具有特異性之抗體，例如抗CD3、抗CD28，例如結合於諸如珠粒之固體支撐物，及/或一或多種細胞介素。視情況，擴增方法可進一步包含向培養基中添加抗CD3及/或抗CD28抗體(例如以至少約0.5 ng/ml之濃度)的步驟。在一些實施例中，刺激劑包括IL-2及/或IL-15，例如至少約10個單位/毫升濃度的IL-2。

【0277】在另一實施例中，藉由溶解紅血球及例如經由PERCOLL™梯度離心耗乏單核球而自周邊血液分離T細胞。替代地，T細胞可自臍帶分離。在任何情況下，特定T細胞亞群可藉由陽性或陰性選擇技術進一步分離。

【0278】如此分離之臍帶血單核細胞可耗乏表現某些抗原，包括但不限於CD34、CDS、CD14、CD19及CD56之細胞。此等細胞之耗乏可使用分離抗體、包含抗體之生物樣品(諸如腹水)、結合於實體支撐物之抗體及細胞結合抗體實現。

【0279】 藉由負向選擇增濃T細胞群可使用針對負向選擇細胞獨特之表面標記物的抗體組合來實現。一種方法為經由負向磁性免疫黏附或流動式細胞測量術進行的細胞分選及/或選擇，其使用導引至存在於經負向選擇之細胞上之細胞表面標記物的單株抗體混合物。舉例而言，為了藉由陰性選擇增濃CD4+細胞，單株抗體混合液通常包括針對CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR及CDS之抗體。

【0280】 為了藉由陽性選擇或陰性選擇分離所需細胞群，細胞濃度及表面(例如粒子，諸如珠粒)可變化。在某些實施例中，可能需要顯著減小珠粒與細胞混合在一起的體積(亦即增加細胞濃度)以確保細胞與珠粒最大程度接觸。舉例而言，在一個實施例中，使用20億個細胞/毫升之濃度。在一個實施例中，使用10億個細胞/毫升之濃度。在另一實施例中，使用大於1億個細胞/毫升。在另一實施例中，使用約1000萬、1500萬、2000萬、2500萬、3000萬、3500萬、4000萬、4500萬或5000萬個細胞/毫升的細胞濃度。在另一實施例中，使用7500萬、8000萬、8500萬、9000萬、9500萬或1億個細胞/毫升之細胞濃度。在其他實施例中，可使用1.25億或1.5億個細胞/毫升之濃度。使用高濃度可以引起細胞產量、細胞活化及細胞擴增增加。

【0281】 T細胞亦可在洗滌步驟之後冷凍，不需要單核球移除步驟。雖然不希望受理論束縛，但冷凍及隨後解凍步驟藉由在細胞群中移除粒細胞及一定程度上移除單核細胞來提供更均勻產物。在移除血漿及血小板之洗滌步驟後，細胞可懸浮於冷凍溶液中。雖然此項技術中已知許多冷凍方法及參數且其將適用於此情形，但在非限制性實例中，一種方法涉及使用含有20% DMSO及8%人類血清白蛋白之PBS或其他適合之細胞冷凍

培養基。接著以每分鐘1℃之速率將細胞冷凍至-80℃，且儲存於氣相液氮儲槽中。可使用受控冷凍以及立即在-20℃下或液氮中不受控冷凍之其他方法。

【0282】 在一個實施例中，T細胞群包含在細胞內，諸如周邊血液單核細胞、臍帶血細胞、純化T細胞群及T細胞株。在另一個實施例中，周邊血液單核細胞包含T細胞群。在又一實施例中，經純化T細胞包含T細胞群。

【0283】 在一些實施例中，免疫細胞係獲自血液樣品、全血樣品、周邊血液單核細胞(PBMC)樣品或血球分離術樣品。在一些實例中，自個體之循環血液中獲得細胞，例如藉由血球分離術或白血球分離術獲得。在一個實施例中，免疫細胞獲自個體之循環血液，藉由血球分離術或白血球分離術來獲得。血球分離術產物通常含有淋巴細胞，包括T細胞、單核球、粒細胞、B細胞、其他成核白血球、紅血球及血小板。在一些實施例中，血球分離術樣品為冷凍保存之樣品。在一些實施例中，血球分離術樣品為新製樣品。在一些實施例中，免疫細胞係獲自人類個體。

## VII. 組合物

【0284】 在一個態樣中，本發明提供一種組合物，其包含本文所述之經修飾免疫細胞或獲自本文所述方法中之任一者之經修飾免疫細胞群。在一些實施例中，本發明之組合物可包含如本文所述之經修飾未經刺激T細胞或經修飾刺激T細胞。在一些實施例中，組合物可包括醫藥組合物。在一些實施例中，組合物可包括醫藥組合物且另外包含一或多種醫藥學上或生理學上可接受之載劑、稀釋劑、佐劑或賦形劑。此類組合物可包含緩衝液，諸如中性緩衝鹽水、磷酸鹽緩衝鹽水及其類似物；碳水化合物，諸

如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露糖醇；蛋白質；多肽或胺基酸，諸如甘胺酸；抗氧化劑；螯合劑，諸如EDTA或麩胱甘肽；佐劑(例如氫氧化鋁)；及防腐劑。本發明之組合物較佳經調配用於非經腸投與(例如靜脈內投與)。在一些實施例中，治療有效量之包含經修飾T細胞之醫藥組合物可投與有需要之個體。

## VIII. 治療方法

【0285】在一個態樣中，本發明提供一種用於授受性細胞轉移療法之方法，其包含向有需要之個體投與本發明之經修飾免疫細胞。在一些實施例中，本文揭示一種治療個體之疾病或病況的方法，其包含向個體投與本文所述之經修飾T細胞群，例如本文所述之經修飾未經刺激T細胞群或經修飾刺激T細胞群。在一些實施例中，本發明包括一種治療個體之疾病或病況的方法，其包含向有需要之個體投與包含本文所述之經修飾免疫細胞的組合物。在一些實施例中，治療個體之疾病或病況之方法包含向有需要之個體投與包含：一或多個基因座中之插入及/或缺失的經修飾免疫細胞(例如T細胞)，該一或多個基因座各自編碼選自由以下組成之群的內源性免疫蛋白：CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP及恆定鏈(Ii鏈)；及外源性核酸，其編碼嵌合抗原受體(CAR)、經工程改造T細胞受體(TCR)、殺手細胞免疫球蛋白樣受體(KIR)、抗原結合多肽、細胞表面受體配位體或腫瘤抗原。在一些實施例中，插入及/或缺失能夠下調一或多種內源性免疫基因之基因表現。

【0286】在一些實施例中，經修飾免疫細胞進一步包含顯性負受體、開關受體、趨化介素、趨化介素受體、細胞介素、細胞介素受體、

IL-7、IL-7R、IL-15、IL-15R、IL-21、IL-18、CCL21、CCL19或其組合。在一些情況下，疾病為癌症，視情況實體腫瘤或血液惡性腫瘤。在一些情況下，經修飾未經刺激T細胞或經修飾刺激T細胞各自表現對由癌症表現之抗原具有特異性之抗原結合域。在一些實施例中，該方法包含向有需要之個體投與經修飾免疫細胞(例如，T細胞)，該經修飾免疫細胞包含能夠下調基因表現之核酸、TCR、KIR、CAR、顯性負受體及/或如本文中其他地方所述之開關受體。在一些實施例中，經修飾免疫細胞為通用TCR再導引T細胞(例如同種異體T細胞)。

【0287】 在一些實施例中，癌症為實體腫瘤。例示性實體腫瘤包括但不限於膀胱癌、骨癌、腦癌(例如神經膠質瘤、神經膠母細胞瘤、神經母細胞瘤)、乳癌、大腸直腸癌、食道癌、眼癌、頭頸癌、腎癌、肺癌、黑色素瘤、間皮瘤、卵巢癌、胰臟癌、前列腺癌或胃癌。在一些情況下，實體腫瘤係腦癌(例如神經膠質瘤、神經膠母細胞瘤、神經母細胞瘤)、乳癌、肺癌、黑色素瘤、間皮瘤、卵巢癌、胰臟癌或前列腺癌。在一些情況下，實體腫瘤係轉移癌。在一些情況下，實體腫瘤係復發性或難治性實體腫瘤。

【0288】 在一些實施例中，癌症為血液惡性腫瘤。在一些實施例中，血液惡性腫瘤為B細胞惡性病或T細胞惡性病。在一些實施例中，血液惡性腫瘤為淋巴瘤、白血病或骨髓瘤。在一些實施例中，血液惡性腫瘤係霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)或非霍奇金氏淋巴瘤。例示性血液惡性腫瘤包括但不限於慢性淋巴球性白血病(CLL)、小淋巴球性淋巴瘤(SLL)、濾泡性淋巴瘤(FL)、彌漫性大B細胞淋巴瘤(DLBCL)、套細胞淋巴瘤(MCL)、瓦爾登斯特倫氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's

macroglobulinemia)、多發性骨髓瘤、結外邊緣區B細胞淋巴瘤、結邊緣區B細胞淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、非伯基特高級B細胞淋巴瘤、原發性縱隔B細胞淋巴瘤(PMBL)、免疫胚細胞大細胞淋巴瘤、前驅體B淋巴母細胞性淋巴瘤、B細胞前淋巴球性白血病、淋巴漿細胞淋巴瘤、脾邊緣區淋巴瘤、漿細胞骨髓瘤、漿細胞瘤、縱隔(胸腺)大B細胞淋巴瘤、血管內大B細胞淋巴瘤、原發性滲出性淋巴瘤或淋巴瘤樣肉芽腫。在一些情況下，血液惡性腫瘤為轉移性血液惡性腫瘤。在一些情況下，血液惡性腫瘤係復發性或難治性血液惡性腫瘤。

【0289】 在一些實施例中，治療疾病之方法進一步包含向個體投與額外治療劑或額外療法。在一些情況下，本文所揭示之額外治療劑包含化學治療劑、免疫治療劑、靶向療法、放射線療法或其組合。說明性額外治療劑包括但不限於烷基化劑，諸如六甲蜜胺(altretamine)、白消安(busulfan)、卡鉑(carboplatin)、卡莫司汀(carmustine)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、順鉑(cisplatin)、環磷醯胺(cyclophosphamide)、達卡巴啡(dacarbazine)、洛莫司汀(lomustine)、美法侖(melphalan)、奧沙利鉑(oxalaplatin)、替莫唑胺(temozolomide)或噻替派(thiotepa)；抗代謝物，諸如5-氟尿嘧啶(5-FU)、6-巰基嘌呤(6-MP)、卡培他濱(capecitabine)、阿糖胞苷(cytarabine)、氟尿苷(floxuridine)、氟達拉賓(fludarabine)、吉西他濱(gemcitabine)、羥基脲(hydroxyurea)、甲胺喋呤(methotrexate)或培美曲塞(pemetrexed)；蒽環黴素(anthracycline)，諸如道諾黴素(daunorubicin)、小紅莓(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)或伊達比星(idarubicin)；拓樸異構酶I抑制劑，諸如拓樸替康(topotecan)或伊立替康(irinotecan) (CPT-11)；拓樸異構酶II抑制劑，諸如依託泊苷(etoposide)

(VP-16)、替尼泊苷(teniposide)或米托蒽醌(mitoxantrone)；有絲分裂抑制劑，諸如多烯紫杉醇(docetaxel)、雌莫司汀(estramustine)、伊沙匹隆(ixabepilone)、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、長春鹼(vinblastine)、長春新鹼(vincristine)或長春瑞賓(vinorelbine)；或皮質類固醇，諸如普賴松(prednisone)、甲基潑尼龍(methylprednisolone)或地塞米松(dexamethasone)。在一些情況下，額外治療劑包含一線療法。如本文所用，「一線療法」包含用於具有癌症之個體之初級治療。在一些情況下，癌症為原發癌。在其他情況下，癌症為轉移性或復發性癌症。在一些情況下，一線療法包含化學療法。在其他情況下，一線治療包含放射線療法。熟習此項技術者將容易理解，不同的一線治療可適用於不同類型的癌症。在一些情況下，額外治療劑包含免疫檢查點抑制劑。在一些情況下，免疫檢查點抑制劑包含如下抑制劑，諸如針對PD-1、PD-L1、CTLA4、PD-L2、LAG3、B7-H3、KIR、CD137、PS、TFM3、CD52、CD30、CD20、CD33、CD27、OX40、GITR、ICOS、BTLA (CD272)、CD160、2B4、LAIR1、TIGHT、LIGHT、DR3、CD226、CD2或SLAM的抗體或其片段(例如單株抗體、人類、人類化或嵌合抗體)、RNAi分子或小分子。例示性檢查點抑制劑包括帕博利珠單抗(pembrolizumab)、納武利尤單抗(nivolumab)、曲美單抗(tremelimumab)或伊匹單抗(ipilimumab)。在一些實施例中，額外療法包含放射線療法。

【0290】 在一些實施例中，另外的療法包含手術。

## IX. 套組及製品

【0291】 在一些實施例中，本文所描述之套組或製品包括一或多個經修飾T細胞(例如，經修飾未經刺激T細胞或經修飾刺激T細胞)群。在一

些情況下，本文所述之套組或製品進一步包括載劑、封裝或容器，其經分隔以容納一或多個容器，諸如小瓶、管及其類似物，各容器包含待用於本文所述方法中之各別元件中之一者。適合的容器包括(例如)瓶子、小瓶、注射器及試管。在一個實施例中，容器係由多種材料(諸如玻璃或塑膠)形成。

【0292】 本文所提供之製品含有封裝材料。醫藥封裝材料之實例包括但不限於泡殼封裝、瓶子、管、袋、容器、瓶子及適於所選調配物及預期投與及處理模式的任何封裝材料。

【0293】 套組通常包括列出含量之標籤及/或使用說明書，及藥品說明書與使用說明書。通常亦包括一組說明書。

**IX. 定義**

【0294】 除非另外定義，否則本文所用之所有技術及科學術語均具有與一般熟習本發明所屬領域者通常所理解相同的含義。儘管類似或等效於本文所述者之方法及材料可用於本發明的實施或測試，但本文描述適合之方法及材料。

【0295】 亦應瞭解，本文所用之術語僅出於描述特定實施例之目的，且不意欲作為限制性的。

【0296】 除非另外指明，否則本發明之實踐將採用組織培養、免疫學、分子生物學、微生物學、細胞生物學及重組DNA之習知技術，其屬於此項技術之範圍內。參見例如Green及Sambrook編(2012) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第4版; Ausubel等人編系列(2015) Current Protocols in Molecular Biology; Methods in Enzymology系列(Academic Press, Inc., N.Y.); MacPherson等人(2015) PCR 1 : A Practical Approach

(IRL Press at Oxford University Press); MacPherson等人(1995) PCR 2: A Practical Approach; McPherson等人(2006) PCR: The Basics (Garland Science); Harlow及Lane編(1999) Antibodies, A Laboratory Manual; Greenfield編(2014) Antibodies, A Laboratory Manual; Freshney (2010) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 第6版; Gait編(1984) Oligonucleotide Synthesis; Hames及Higgins編(1984) Nucleic Acid Hybridization; Anderson (1999) Nucleic Acid Hybridization; Herdewijn 編 (2005) Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications; Hames及Higgins編(1984) Transcription and Translation; Buzdin 及 Lukyanov 編 (2007) Nucleic Acids Hybridization: Modern Applications; Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press (1986)); Grandi編(2007) In Vitro Transcription and Translation Protocols, 第2版; Guisan編(2006) Immobilization of Enzymes and Cells; Perbal (1988) A Practical Guide to Molecular Cloning, 第2版; Miller及Calos編, (1987) Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides編(2003) Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells; Mayer及Walker編(1987) Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Academic Press, London); Lundblad 及 Macdonald 編 (2010) Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, 第4版; 及Herzenberg等人編(1996) Weir's Handbook of Experimental Immunology, 第5版。

【0297】 如本文所用，除非上下文另外明確指示，否則單數形式「一(a/an)」及「該」包括複數個指示物。舉例而言，術語「一細胞」包括複數個細胞，包括其混合物，且意謂一個細胞或多於一個細胞。

【0298】 如本文所用，術語「約」用於指示值，其包括用於測定該值之裝置或方法之誤差的標準差。當在數值名稱(例如溫度、時間、量及濃度，包括範圍)之前使用時，術語「約」表示近似值，其可變化(+)或(-)(±) 20%、15%、10%、5%、3%、2%或1%。較佳指定值之±5%，更佳±1%，且再更佳±0.1%，因為此類變化適合於執行所揭示之方法。

【0299】 如本文所用，術語「活化」係指T細胞經刺激足以誘導可偵測細胞增殖的狀態。活化亦可與誘導之細胞介素產生及可偵測效應功能相關聯。術語「活化T細胞」尤其係指經歷細胞分裂之T細胞。

【0300】 「同種異體」係指來源於與引入材料之個體相同物種之不同動物的任何材料。當一或多個基因座處之基因不相同時，據稱兩個或更多個個體為彼此同種異體。在一些態樣中，來自相同物種之個體的同種異體材料基因上可足夠不同從而以抗原方式相互作用。

【0301】 如本文所用，術語「同種異體T細胞目標」或「同種異體T細胞」係指介導或促成宿主抗移植物反應、介導或促成移植物抗宿主反應或為免疫抑制劑之目標的蛋白質；及編碼該分子之基因及其相關調節元件(例如啟動子)。應理解，術語同種異體T細胞目標係指當與目標序列或gRNA分子結合使用時編碼同種異體T細胞目標蛋白之基因(及其相關調節元件)。不受理論束縛，一或多個同種異體T細胞目標之抑制或消除(例如藉由本文所揭示之方法及組合物)可提高同種異體細胞之功效、存活、功能及/或存活力。在一些實施例中，同種異體細胞之功效、存活、功能及/或存活力藉由降低或消除非所需免疫原性(諸如宿主抗移植物反應或移植物抗宿主反應)來提高。在一些實施例中，介導或促進移植物抗宿主反應或宿主抗移植物反應的蛋白質為T細胞受體複合體的一或多種組分。在一

些實施例中，T細胞受體複合體之組分為T細胞受體α、TCRα (TRAC；TCRa)之恆定域。在一些實施例中，T細胞受體之組分為T細胞受體β鏈(TRBC；TCR-β)，例如TCRβ之恆定域1 (TRBC1)或恆定域2 (TRBC2)。在一些實施例中，T細胞受體之組分為T細胞受體δ鏈(CD3δ)、T細胞受體ε鏈(CD3ε)、T細胞受體ζ鏈(CD3ζ；CD247)及/或T細胞受體γ鏈(CD3γ)。在其中由同種異體T細胞目標編碼之蛋白質為TCR信號傳導複合體之組分的一些實施例中，編碼同種異體T細胞目標之基因可為例如TRAC、TRBC1、TRBC2、CD3δ、CD3ε、CD3γ或CD3ζ (CD247)，或其任何組合。

【0302】 如本文所用，術語「抗體」係指特異性結合抗原之免疫球蛋白分子。抗體可為源自天然來源或源自重組來源之完整免疫球蛋白且可為完整免疫球蛋白之免疫反應性部分。抗體通常為免疫球蛋白分子之四聚體。本發明中之抗體可以多種形式存在，包括例如多株抗體、單株抗體、Fv、Fab及F(ab)2以及單鏈抗體(scFv)及人類化抗體。在一些實施例中，抗體係指對相關抗原(例如腫瘤相關抗原)具有顯著已知特異性免疫反應活性的此類組裝(例如完整抗體分子、免疫黏附素或其變異體)。抗體及免疫球蛋白包含輕鏈及重鏈，其間具有或不具有鏈間共價鍵。脊椎動物系統中之基本免疫球蛋白結構為相對充分理解的。

【0303】 術語「抗體片段」係指完整抗體之一部分且係指完整抗體之抗原決定可變區。抗體片段之實例包括但不限於Fab、Fab'、F(ab')2及Fv片段、線性抗體、scFv抗體及由抗體片段形成之多特異性抗體。

【0304】 如本文所用，本文所使用之術語「抗體重鏈」係指以天然存在之構形存在於所有抗體分子中之兩種類型多肽鏈中之較大者。

【0305】 如本文所用，術語「抗體輕鏈」係指以其天然存在之構形存在於所有抗體分子中之兩種類型多肽鏈中之較小者。α及β輕鏈係指兩種主要抗體輕鏈同型。

【0306】 如本文所用，術語「合成抗體」意謂使用重組DNA技術產生之抗體，諸如藉由如本文所描述之噬菌體表現之抗體。術語亦應理解為意謂已藉由合成編碼抗體之DNA分子(且所述DNA分子表現抗體蛋白質)或指定抗體之胺基酸序列產生之抗體，其中所述DNA或胺基酸序列已使用在此項技術中可獲得且熟知之合成DNA或胺基酸序列技術獲得。

【0307】 (例如嵌合抗原受體)之抗原結合域包括抗體變異體。如本文所用，術語「抗體變異體」包括合成及工程改造形式之抗體，該等抗體經改變，因此其不天然存在，例如包含至少兩個重鏈部分但不包含兩個完整重鏈之抗體(諸如域缺失之抗體或微型抗體)；經改變以結合於兩個或更多個不同抗原或結合於單一抗原上之不同抗原決定基的多特異性形式之抗體(例如雙特異性、三特異性等)；接合scFV分子的重鏈分子及其類似抗體。另外，術語「抗體變異體」包括多價形式之抗體(例如三價、四價等)抗體，結合於同一抗原之三個、四個或更多個複本的抗體。

【0308】 如本文所用，術語「抗原」或「Ag」定義為引起免疫反應的分子。此免疫反應可涉及抗體產生或特異性免疫勝任細胞之活化或兩者。熟習此項技術者應理解包括幾乎所有蛋白或肽之任何大分子可充當抗原。此外，抗原可來源於重組或基因體DNA。所屬技術領域中具有通常技術者應理解，包含編碼引發免疫反應之蛋白之核苷酸序列或部分核苷酸序列的任何DNA因此編碼如本文所用之術語「抗原」。此外，熟習此項技術者應瞭解抗原不必僅由基因之全長核苷酸序列編碼。顯而易見，本發

明包括但不限於多於一個基因之部分核苷酸序列之用途且此等核苷酸序列以各種組合排列以編碼引發所需免疫反應之多肽。此外，熟習此項技術者應理解，抗原根本無需由「基因」編碼。顯而易見的是，抗原可由生物樣品產生、合成或自其衍生。此類生物樣品可包括但不限於組織樣品、腫瘤樣品、細胞或生物流體。

【0309】 如本文所用，術語「抗腫瘤作用」係指可體現為腫瘤體積減小、腫瘤細胞數減小、癌轉移數目減小、預期壽命增加或與癌病況相關之各種生理症狀改善的生物作用。在一些實施例中，「抗腫瘤作用」亦可首先體現為本發明之肽、聚核苷酸、細胞及抗體預防腫瘤出現之能力。

【0310】 如本文所用，根據本發明之術語「自體抗原」意謂由免疫系統識別為外來的任何自體抗原。在一些實施例中，自體抗原包含(但不限於)細胞蛋白、磷蛋白、細胞表面蛋白、細胞脂質、核酸、醣蛋白，包括細胞表面受體。

【0311】 如本文所用，本文所使用之術語「自體免疫疾病」定義為由自體免疫反應產生之病症。自體免疫疾病為對自體抗原不當且過度反應之結果。自體免疫疾病之實例尤其包括但不限於愛迪生氏病(Addision's disease)、斑禿、僵直性脊椎炎、自體免疫性肝炎、自體免疫性腮腺炎、癌症、克羅恩氏病(Crohn's disease)、糖尿病(I型)、營養不良性大皰性表皮鬆懈、附睾炎、絲球體腎炎、格雷夫氏病(Graves' disease)、格-巴二氏症候群(Guillain-Barr syndrome)、橋本氏病(Hashimoto's disease)、溶血性貧血、全身性紅斑性狼瘡症、多發性硬化症、重症肌無力、尋常天疱瘡、牛皮癬、風濕熱、類風濕性關節炎、類肉瘤病、硬皮病、休格連氏症候群(Sjogren's syndrome)、脊椎關節病、甲狀腺炎、血管炎、白斑病、

黏液腺瘤、惡性貧血、潰瘍性結腸炎。

【0312】 如本文所用，術語「自體」意指來源於同一個體的任何材料可稍後將材料再引入至其中。

【0313】 如本文所用，術語「癌症」係指特徵為異常細胞之快速且不受控的生長的疾病。癌細胞可局部擴散或經由血流及淋巴系統擴散至身體的其他部分。各種癌症之實例包括但不限於乳癌、前列腺癌、卵巢癌、子宮頸癌、皮膚癌、胰臟癌、大腸直腸癌、腎癌、肝癌、腦癌、淋巴瘤、白血病、肺癌、轉移性去勢抗性前列腺癌、黑色素瘤、滑膜肉瘤、晚期TnMuc1陽性實體腫瘤、神經母細胞瘤、神經內分泌腫瘤及其類似癌症。在某些實施例中，癌症為髓質性甲狀腺癌。在某些實施例中，該癌症係前列腺癌。在某些實施例中，癌症為間皮瘤或間皮素表現癌。在一些實施例中，癌症為轉移性去勢抗性前列腺癌。術語「癌症」及「腫瘤」在本文中可互換使用，且兩種術語涵蓋實體腫瘤及液體腫瘤、彌漫性或循環性腫瘤。在一些實施例中，癌症或腫瘤包括癌前以及惡性癌症及腫瘤。

【0314】 如本文所用，術語「癌症相關抗原」或「腫瘤抗原」可互換地指完全或以片段(例如MHC/肽)形式表現於癌細胞表面上且適用於使藥理學藥劑優先靶向癌細胞的分子(通常為蛋白質、碳水化合物或脂質)。在一些實施例中，腫瘤抗原為正常細胞及癌細胞表現之標記物(例如譜系標記物，諸如B細胞上之CD19)。在一些實施例中，腫瘤抗原為相比於正常細胞在癌細胞中過度表現之細胞表面分子，例如相比於正常細胞1倍過度表現、2倍過度表現、3倍或更多倍過度表現。在一些實施例中，腫瘤抗原為相比於在正常細胞上表現之分子而言在癌細胞中不適當合成之細胞表面分子，例如含有刪除、添加或突變之分子。在一些實施例中，腫瘤抗原

將全部或以片段形式(例如，MHC/肽)專門表現於癌細胞之細胞表面上，且在正常細胞表面上不合成或表現。在一些實施例中，本發明之CAR包括包含結合於MHC呈現肽之抗原結合域(例如抗體或抗體片段)的CAR。通常，來源於內源性蛋白質之肽填充主要組織相容複合體(MHC) I類分子之凹穴，且由CD8+ T淋巴細胞上之T細胞受體(TCR)識別。MHC I級複合體由所有成核細胞構成性表現。在癌症中，病毒特異性及/或腫瘤特異性肽/MHC複合體表示免疫療法之獨特類別之細胞表面目標。已描述在人類白血球抗原(HLA)-A1或HLA-A2之情形下靶向來源於病毒或腫瘤抗原之肽的TCR樣抗體。舉例而言，TCR樣抗體可自篩選庫(諸如人類scFv噬菌體顯示庫)識別。

【0315】 如本文所用，術語「癌症支持抗原」或「腫瘤支持抗原」可互換地指細胞表面上表現之分子(通常為蛋白質、碳水化合物或脂質)，其本身不為癌性的，但藉由促進癌細胞生長或存活(例如對免疫細胞之抗性)而支持癌細胞。例示性此類型之細胞包括基質細胞及骨髓源性抑制細胞(MDSC)。腫瘤支持抗原本身無需在支持腫瘤細胞中起作用，只要抗原存在於支持癌細胞之細胞上即可。

【0316】 如本文所用，術語「Cas」、「Cas分子」或「Cas分子」係指負責DNA裂解之細菌II型CRISPR/Cas系統之酶。Cas包括野生型蛋白質以及其功能性及非功能性突變體。

【0317】 如本文所用，術語「嵌合抗原受體」或「CAR」係指經工程改造以在免疫效應細胞或其前驅細胞上表現且特異性結合抗原之人工T細胞受體。在授受性細胞轉移下，CAR可用於授受性細胞療法中。在一些實施例中，授受性細胞轉移(或療法)包含自患者移除T細胞，及修飾T細胞

以表現對特定抗原具有特異性之受體。在一些實施例中，CAR對所選目標具有特異性，例如ROR1、間皮素、c-Met、PSMA、PSCA、葉酸受體α、葉酸受體β、EGFR、EGFRvIII、GPC2、GPC2、黏蛋白1(MUC1)、Tn抗原((Tn Ag)或(GalNAca-Ser/Thr))、TnMUC1、GDNF家族受體α-4(GFRa4)、纖維母細胞活化蛋白(FAP)或介白素-13受體次單元α-2 (IL-13Ra2或CD213A2)。在一些實施例中，CAR亦可包含胞內活化域、跨膜域及包含腫瘤相關抗原結合區之胞外域。在一些態樣中，CAR包含與CD3-ζ跨膜及胞內域融合的單鏈可變片段(scFv)衍生之單株抗體的融合物。CAR設計之特異性可來源於受體(例如，肽)之配位體。在一些實施例中，CAR可藉由再引導表現對腫瘤相關抗原具有特異性之CAR的T細胞的特異性來靶向癌症。

【0318】 如本文所用，術語「裂解」係指共價鍵斷裂，諸如核酸分子之主鏈中之共價鍵斷裂。裂解可藉由多種方法，包括但不限於磷酸二酯鍵之酶或化學水解引發。單股裂解及雙股裂解兩者皆可能。雙股裂解可由於兩個不同單股裂解事件而發生。DNA裂解可致使產生鈍端或交錯末端。在某些實施例中，融合多肽可用於靶向裂解雙股DNA。

【0319】 如本文所用，如與核酸結合使用之術語「互補」係指鹼基A與T或U及G與C之配對。術語互補係指完全互補(亦即，在整個參考序列中形成A至T或U對及G至C對)之核酸分子以及至少80%、85%、90%、95%、99%互補之分子。

【0320】 如本文所用，術語「保守序列修飾」意欲指不顯著影響或改變含有胺基酸序列之抗體的結合特徵的胺基酸修飾。此類保守修飾包括胺基酸取代、添加及缺失。可藉由此項技術中已知之標準技術將修飾引入

至本發明之抗體中，諸如定點突變誘發及PCR介導之突變誘發。保守胺基酸取代係胺基酸殘基經具有類似側鏈之胺基酸殘基置換之取代。此項技術中已定義具有類似側鏈之胺基酸殘基家族。此等家族包括具有鹼性側鏈(例如離胺酸、精胺酸、組胺酸)、酸性側鏈(例如天冬胺酸、麩胺酸)、不帶電極性側鏈(例如甘胺酸、天冬醯胺、麩醯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、半胱胺酸、色胺酸)、非極性側鏈(例如丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸)、β分支鏈側鏈(例如蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸)及芳族側鏈(例如酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、組胺酸)之胺基酸。因此，抗體之CDR區內之一或多個胺基酸殘基可經來自相同側鏈家族之其他胺基酸殘基置換，且經改變之抗體可使用本文所述之功能分析法來測試結合抗原之能力。

【0321】 如本文所用，術語「協同刺激配位體」包括抗原呈現細胞(例如aAPC、樹突狀細胞、B細胞及其類似物)上之分子，其特異性結合T細胞上之同源協同刺激分子，由此提供除藉由例如TCR/CD3複合體與負載有肽之MHC分子之結合所提供之初級信號以外的信號，該信號亦介導T細胞反應，包括但不限於增殖、活化、分化及其類似者。協同刺激配位體可包括但不限於CD2、CD7、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、誘導性協同刺激配位體(ICOS-L)、細胞間黏附分子(ICAM)、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB、HVEM、淋巴毒素β受體、3/TR6、ILT3、ILT4、HVEM、結合於鐸配位體受體之促效劑或抗體及特異性結合B7-H3之配位體。協同刺激配位體尤其亦涵蓋特異性結合T細胞上存在之協同刺激分子的抗體，諸如但不限於CD27、CD28、4- 1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴細

胞功能相關抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3及特異性結合CD83之配位體。

【0322】 如本文所用，「協同刺激分子」係指特異性結合協同刺激配位體，由此介導T細胞之協同刺激反應，諸如(但不限於)增殖的T細胞上之同源結合搭配物。協同刺激分子為除抗原受體或其配位體之外之促成有效免疫反應的細胞表面分子。協同刺激分子包括但不限於MHC I類分子、BTLA、鐸配位體受體、CD28、4-1BB (CD137)、OX40 (CD134)、PD-1、CD7、LIGHT、CD83L、DAP10、DAP12、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、ICOS (CD278)、NKG2C、B7-H3 (CD276)及來源於殺手免疫球蛋白樣受體(KIR)之胞內域。在一些實施例中，協同刺激分子包括OX40、CD27、CD2、CD28、ICOS (CD278)及4-1BB (CD137)。此類協同刺激分子之其他實例包括CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM (LIGHTR)、SLAMF7、NKp80 (KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD160、CD19、CD4、CD8α、CD8β、IL2R β、IL2R γ、IL7R α、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、

LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a，及特異性結合CD83之配位體。

【0323】 如本文所用，術語「協同刺激信號」係指與初級信號(諸如TCR/CD3連接)組合引起T細胞增殖及/或關鍵分子之上調或下調的信號。協同刺激胞內信號傳導域可為協同刺激分子之胞內部分。協同刺激分子可存在於以下蛋白質家族中：TNF受體蛋白、免疫球蛋白樣蛋白質、細胞介素受體、整合素、信號傳導淋巴球性活化分子(SLAM蛋白)及活化NK細胞受體。該等分子之實例包括CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、GITR、CD30、CD40、ICOS、BAFFR、HVEM、ICAM-1、淋巴細胞功能相關抗原-1 (LFA-1)、CD2、CDS、CD7、CD287、LIGHT、NKG2C、NKG2D、SLAMF7、NKp80、NKp30、NKp44、NKp46、CD160、B7-H3及特異性結合CD83之配位體以及其類似物。

【0324】 如本文所用，術語「CRISPR」係指成簇規律間隔短回文重複序列系統。術語「CRISPR系統」、「CRISPR/Cas」、「CRISPR/Cas系統」或「CRISPR」係指含有較短重複鹼基序列的DNA基因座。各次重複之後為來自先前暴露於病毒之間隔DNA之短區段。細菌及古菌已進化被稱為CRISPR-CRISPR相關(Cas)系統的適應性免疫防禦，該等系統使用短RNA來導引外源性核酸降解。在細菌中，CRISPR系統經由RNA引導之DNA裂解提供對入侵外來DNA之後天性免疫性。在II型CRISPR/Cas系統中，外來DNA之短區段(稱為「間隔子」)被整合於CRISPR基因體基因座內且轉錄並處理成短CRISPR RNA (crRNA)。此等crRNA黏接成反式活化crRNA (tracrRNA)，且藉由Cas蛋白導引病原性DNA之序列特異性裂解及緘默。近期研究已展示，Cas9蛋白進行之目標

識別需要crRNA內之「種子」序列及crRNA結合區上游之含有二核苷酸的保守原間隔序列相鄰模體(PAM)序列。

【0325】在一些實施例中，術語「CRISPR系統」、「CRISPR/Cas」、「CRISPR/Cas系統」或「CRISPR」係指包含RNA引導之核酸酶或其他效應分子及gRNA分子的一組分子，其共同為必需的且足以藉由RNA引導之核酸酶或其他效應分子導引並實現目標序列處核酸之修飾。在一些實施例中，CRISPR系統包含gRNA及Cas蛋白質，例如Cas3、Cas4、Cas8a、Cas8b、Cas9、Cas10、Cas10d、Cas12a、Cas12b、Cas12d、Cas12e、Cas12f、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas13、Cas14、CasX、Cse1、Csy1、Csn2、Cpf1、C2c1、Csm2、Cmr5、Fok1、釀膿鏈球菌Cas9 (spCas9)或金黃色葡萄球菌Cas9 (saCas9)蛋白質。包含Cas或經修飾Cas分子之此類系統在本文中稱為「Cas系統」或「CRISPR/Cas系統」。在一些實施例中，gRNA分子及Cas分子可複合形成核糖核蛋白(RNP)複合體。

【0326】為導引Cas9裂解相關序列，可設計來自人類U6聚合酶III啟動子之crRNA-tracrRNA融合轉錄物，下文稱為「引導RNA」或「gRNA」。CRISPR/CAS介導之基因體編輯及調節突出顯示其對於基本科學、細胞工程改造及治療學之變革潛力。

【0327】如本文所用，術語「crRNA」作為術語與gRNA分子結合使用，為gRNA分子之一部分，該分子包含靶向域及與tracr相互作用以形成旗桿區之區域。

【0328】如本文所用，術語「CRISPRi」係指用於諸如在轉錄水準下，進行序列特異性基因壓製或抑制基因表現之CRISPR系統。

【0329】 如本文所用，術語「來源於」係指第一與第二分子之間的關係。其定義第一分子與第二分子之間的結構相似性，且不涵蓋或包括對來源於第二分子之第一分子的過程或來源限制。舉例而言，在來源於CD3ζ分子之胞內信號傳導域之情況下，胞內信號傳導域保留足夠滿足以下之CD3ζ結構：具有所需功能，亦即在適當條件下產生信號之能力。其不涵蓋或包括對產生胞內信號傳導域之特定過程之限制，其並不意謂，為提供胞內信號傳導域，必須以CD3ζ序列開始且刪除不必要序列，或施加突變以達成胞內信號傳導域。

【0330】 如本文所用，術語「疾病」係指動物無法維持體內恆定，且其中若不改善疾病，則動物健康狀況繼續惡化的動物健康狀態。相比之下，在動物中術語「病症」係指動物能夠維持體內恆定，但動物健康狀態不如其在無病症存在下之健康狀態有利的健康狀態。如果不進行治療，病症未必造成動物之健康狀態進一步惡化。

【0331】 如本文所用，「與腫瘤抗原之表現相關之疾病」包括但不限於與腫瘤抗原之表現相關的疾病或與表現腫瘤抗原之細胞相關之病況，包括但不限於增生性疾病，諸如癌症或惡性病或癌變前病況，諸如骨髓發育不良、骨髓發育不良症候群或白血病前驅症；或與表現腫瘤抗原之細胞相關之非癌症相關適應症。在一些實施例中，與腫瘤抗原之表現相關之癌症為血液癌。在一些實施例中，與腫瘤抗原之表現相關之癌症為實體癌症。與腫瘤抗原之表現相關之其他疾病包括但不限於與腫瘤抗原之表現相關之非典型及/或非經典癌症、惡性病、癌變前病況或增生性疾病。與腫瘤抗原之表現相關之非癌症相關適應症包括但不限於自體免疫疾病(例如狼瘡)、發炎性病症(過敏及哮喘)及移植。在一些實施例中，表現腫瘤抗

原之細胞表現或在任何時間表現編碼腫瘤抗原之mRNA。在一些實施例中，表現腫瘤抗原之細胞產生腫瘤抗原蛋白質(例如野生型或突變型)，且腫瘤抗原蛋白質可以正常水準或降低之水準存在。在一些實施例中，表現腫瘤抗原之細胞在某一時刻產生可偵測含量之腫瘤抗原蛋白質，且隨後產生實質上不可偵測之腫瘤抗原蛋白質。

【0332】 如本文所用，術語「下調」係指降低或消除一或多個基因之基因表現。

【0333】 如本文所用，術語「編碼」係指聚核苷酸(諸如基因、cDNA或mRNA)中之特定核苷酸序列充當用於在具有核苷酸(例如，rRNA、tRNA及mRNA)之確定序列或胺基酸之確定序列的生物過程中合成其他聚合物及大分子的模板的固有特性及由其產生之生物特性。因此，若與基因相對應之mRNA之轉錄及轉譯在細胞或其他生物系統中產生蛋白，則基因、cDNA或RNA編碼該蛋白。核苷酸序列與mRNA序列一致且通常提供於序列表中的編碼股與用作基因或cDNA轉錄之模板的非編碼股均可稱為編碼基因或cDNA之蛋白質或其他產物。除非另外指定，否則「編碼胺基酸序列之核苷酸序列」包括為彼此之簡併型式且編碼相同胺基酸序列之所有核苷酸序列。片語編碼蛋白質或RNA之核苷酸序列亦可包括內含子，其達到編碼蛋白質之核苷酸序列可在一些形式中含有內含子之程度。

【0334】 如本文中可互換使用之「有效量」或「治療有效量」係指如本文所述之化合物、調配物、材料、醫藥劑或組合物有效地在有需要之個體中實現所需生理、治療或預防結果的量。此類結果可包括但不限於如下量：當投與哺乳動物時，與在不存在本發明之組合物時偵測到的免疫反

應相比，引起可偵測之免疫反應水準。免疫反應可容易地藉由許多此項技術中公認的方法評定。熟習此項技術者應理解，本文所投與之組合物之量變化且可容易地基於多種因素確定，諸如所治療之疾病或病況、所治療之哺乳動物之年齡及健康狀況及身體狀況、疾病之嚴重程度、所投與之特定化合物及其類似因素。有效量可視待治療個體之健康狀況及身體狀況、待治療個體之分類群、組合物之調配、個體醫療病況之評估及其他相關因素而在個體當中變化。

【0335】 如本文所用，術語「內源性」係指來自或在生物體、細胞、組織或系統內部產生之任何物質。

【0336】 如本文所用，本文中所使用之術語「擴增」係指數目增加，如免疫細胞(例如T細胞)之數目增加。在一些實施例中，相對於培養物中最初存在之數目，離體擴增之免疫細胞(例如T細胞)數目增加。在另一實施例中，相對於培養物中之其他細胞類型，離體擴增之免疫細胞(例如T細胞)數目增加。

【0337】 如本文所用，術語「表現」係指由啟動子驅動之特定核苷酸序列的轉錄及/或轉譯。

【0338】 如本文所用，術語「外源性」係指自生物體、細胞、組織或系統外部引入或產生之任何物質。

【0339】 如本文所用，術語「表現載體」係指包含重組性聚核苷酸之載體，該重組性聚核苷酸包含可操作地連接於待表現核苷酸序列之表現控制序列。表現載體包含足夠順式作用元件用於表現；用於表現之其他元件可由宿主細胞供應或在活體外表現系統中。表現載體包括此項技術中已知之所有表現載體，諸如併入重組性聚核苷酸之黏質體、質體(例如裸露

或含於脂質體中)及病毒(例如仙台病毒、慢病毒、反轉錄病毒、腺病毒及腺相關病毒)。

【0340】 如本文所用，術語「活體外」係指已自活生物體(例如人類)移除且在生物體外(例如在培養皿、試管或生物反應器中)繁殖之細胞。

【0341】 如本文所用，與gRNA分子結合使用之術語「旗桿」係指其中crRNA與tracr彼此結合或雜交之gRNA之一部分。

【0342】 如本文所用，術語「引導RNA」、「引導RNA分子」、「gRNA分子」或「gRNA」可互換地使用，且指促進將RNA引導之核酸酶或其他效應分子(通常與gRNA分子複合)特異性導引至目標序列的一組核酸分子。在一些實施例中，該導引經由gRNA之一部分與DNA雜交(例如經由gRNA靶向域)及藉由gRNA分子之一部分與RNA引導之核酸酶或其他效應分子結合(例如經由至少gRNA tracr)來實現。在一些實施例中，gRNA分子由在本文中稱為「單引導RNA」或「sgRNA」及其類似者之單一連續聚核苷酸分子組成。在一些實施例中，gRNA分子由複數個(通常兩個)聚核苷酸分子組成，該等聚核苷酸分子本身能夠締合，通常經由雜交，在本文中稱為「雙引導RNA」或「dgRNA」及其類似者。gRNA分子更詳細地描述於下文中，但一般包括靶向域及tracr。在一些實施例中，靶向域及tracr安置在單一聚核苷酸上。在其他實施例中，靶向域及tracr安置於單獨聚核苷酸上。

【0343】 如本文所用，術語「同源」係指兩個聚合分子之間(例如兩個核酸分子之間，諸如兩個DNA分子或兩個RNA分子)或兩個多肽分子之間的次單元序列一致性。當兩個分子中之次單元位置由相同單體次單元佔

據時，則其在該位置處同源。舉例而言，若兩個DNA分子中之各者中的位置由腺嘌呤佔據，則兩個DNA分子為同源的。兩個序列之間之同源性與匹配或同源位置之數目直接相關。舉例而言，若兩個序列中一半(例如，長度為聚合物十個次單元中之五個位置)位置同源，則兩個序列為50%同源；若90%之位置(例如，9/10)匹配或同源，則兩個序列為90%同源。

【0344】 如本文所用，術語「人類化抗體」係指人類形式之非人類(例如鼠類)抗體，且為嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白鏈或其片段(諸如Fv、Fab、Fab'、F(ab')2或抗體之其他抗原結合子序列)，其含有來源於非人類免疫球蛋白之最小序列。在很大程度上，人類化抗體為人類免疫球蛋白(接受者抗體)，其中來自接受者之互補決定區(CDR)的殘基由具有所需特異性、親和力及能力的來自諸如小鼠、大鼠或兔之非人類物種(供體抗體)之CDR的殘基置換。在一些情況下，人類免疫球蛋白之Fv構架區(FR)殘基經相應非人類殘基置換。此外，人類化抗體可包含在接受者抗體中及在所引入的CDR或構架序列中均不存在之殘基。進行此等修飾以進一步優化且最佳化抗體效能。一般而言，人類化抗體將包含實質上所有至少一個及典型地兩個可變域，其中所有或實質上所有CDR區域與非人類免疫球蛋白之彼等區域相對應且所有或實質上所有FR區域為人類免疫球蛋白序列之彼等區域。人類化抗體最佳亦將包含至少一部分免疫球蛋白恆定區(Fc)，通常係人類免疫球蛋白恆定區。關於其他細節，參見Jones等人，Nature 321: 522-525 (1986); Reichmann等人，Nature 332: 323-329 (1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992)。

【0345】 如本文所用，術語「完全人類」係指免疫球蛋白，如抗

體，其中整個分子具有人類來源或由與人類形式之抗體一致的胺基酸序列組成。

【0346】 如本文所用，術語「一致性」係指兩個聚合物分子之間，尤其兩個胺基酸分子之間，諸如兩個多肽分子之間的次單元序列一致性。當兩個胺基酸序列在同一位置處具有相同殘基時，則其在該位置處一致。舉例而言，若兩個多肽分子中之各者中之位置由精胺酸佔據，則兩個多肽一致。兩個胺基酸序列在比對中在相同位置具有相同殘基之一致性或程度通常表示為百分比。兩個胺基酸序列之間的一致性為匹配或一致位置之數目的直接函數。舉例而言，若兩個序列中之一半位置(例如，長度為聚合物十個胺基酸中之五個位置)一致，則兩個序列具有50%一致性；若90%之位置(例如，9/10)匹配或一致，則兩個胺基酸序列具有90%一致性。

【0347】 如本文所用，術語「免疫球蛋白」或「Ig」定義一類充當抗體之蛋白質。由B細胞表現之抗體有時稱為BCR (B細胞受體)或抗原受體。此類蛋白質中包括之五個成員為IgA、IgG、IgM、IgD及IgE。IgA係存在於諸如唾液、淚液、母乳、胃腸道分泌物及呼吸道及泌尿生殖道之黏液分泌物之身體分泌物中的初級抗體。IgG係最常見之循環抗體。IgM為在大部分個體中主要免疫反應中產生之主要免疫球蛋白。其係凝集、補體結合及其他抗體反應中最有效之免疫球蛋白，且對於防禦細菌及病毒具有重要意義。IgD係無已知之抗體功能的免疫球蛋白，但可充當抗原受體。IgE係藉由在暴露於過敏原時引起介體自肥大細胞及嗜鹼細胞釋放來介導速發超敏反應的免疫球蛋白。

【0348】 如本文所用，本文所使用之術語「免疫反應」定義為當淋巴細胞將抗原分子鑑別為外來物且誘導抗體形成及/或活化淋巴細胞以移

除抗原時發生的細胞對抗原之反應。

【0349】 如本文所用，術語「免疫效應細胞」係指參與免疫反應，例如促進免疫效應反應之細胞。免疫效應細胞之實例包括T細胞(例如α/δ T細胞及γ/δ T細胞)、B細胞、自然殺手細胞(NK)、自然殺手T 細胞(NKT)、肥大細胞及骨髓衍生之吞噬細胞。

【0350】 如本文所用，術語「免疫效應功能或免疫效應反應」係指增強或促進免疫攻擊目標細胞的功能或反應。在一些實施例中，免疫效應功能或反應係指T或NK細胞促進目標細胞之殺死或生長或增殖抑制之特性。在T細胞之情況下，主要刺激及協同刺激為免疫效應功能或反應之實例。

【0351】 如本文所用，術語「抑制性分子」係指如下分子，其在活化時引起或有助於抑制細胞存活、活化、增殖及/或功能；及編碼該分子之基因及其相關調節元件(例如啟動子)。在一些實施例中，抑制性分子為在免疫效應細胞上(例如，在T細胞上)表現之分子。抑制性分子之非限制性實例為PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、LAG3、CEACAM (例如CEACAM-1、CEACAM-3及/或CEACAM-5)、VISTA、TGFβIIR、VSIG3、VSIG 8、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3 (CD276)、B7- H4 (VTCN1)、HVEM (TNFRSF14或CD107)、KIR、A2aR、I類MHC、II類MHC、GAL9、腺苷及TGFβ。應理解，術語抑制性分子係指當與目標序列或gRNA分子結合使用時編碼抑制性分子蛋白質之基因(及其相關調節元件)。在一些實施例中，編碼抑制性分子之基因為BTLA、PD-1、TIM-3、VSIG3、VSIG8、CTLA4或TGFβIIR。在一些實施例中，編碼抑制性分子之基因為VSIG3。在一些實

施例中，編碼抑制性分子之基因為PD-1。在一些實施例中，編碼抑制性分子之基因為TGFβIIR。

【0352】 如本文所用，術語「經誘導之多能幹細胞」或「iPS細胞」係指由成體細胞，諸如免疫細胞(亦即T細胞)產生之多能幹細胞。成體細胞中之再程式化因子(諸如Klf4、Oct3/4及Sox2)之表現將細胞轉化為能夠繁殖及分化成多種細胞類型之多能細胞。

【0353】 如本文所用，術語「說明材料」包括公開案、記錄、圖式或可用於傳達本發明之組合物及方法之有用性的任何其他表達介質。本發明之套組之說明材料可例如貼附至含有本發明之核酸、肽及/或組合物的容器上，或與含有核酸、肽及/或組合物的容器一起運送。替代地，說明材料可與容器分開運送，意圖由接受者將說明材料與化合物協作使用。

【0354】 如本文所用，術語「經分離」意謂自天然狀態改變或移除。舉例而言，天然存在於活動物中之核酸或肽並非「經分離」，但自其天然狀態之共存材料部分或完全分離之相同核酸或肽為「經分離」。經分離之核酸或蛋白質可以實質上純化形式存在，或可存在於諸如宿主細胞之非原生環境中。

【0355】 如本文所用，術語「基因剔除」係指一或多個基因之基因表現的消融。

【0356】 如本文所用，術語「慢病毒」係指反轉錄病毒家族之屬。慢病毒在反轉錄病毒中為獨特的，因為其能夠感染未分化細胞；其可將大量遺傳資訊遞送至宿主細胞之DNA中，因此其為基因遞送載體之最有效方法中之一者。HIV、SIV及FIV均為慢病毒之實例。來源於慢病毒之載體提供實現顯著水準之活體內基因轉移的手段。

【0357】 如本文所用，如在scFv之情形下所用之術語「可撓性多肽連接子」或「連接子」係指由單獨或組合使用以將可變重鏈及可變輕鏈區連接在一起的胺基酸(諸如甘胺酸及/或絲胺酸殘基)組成的肽連接子。在一個實施例中，可撓性多肽連接子為Gly/Ser連接子，且包含胺基酸序列$(Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_n$，其中n為等於或大於1之正整數。舉例而言，n=1，n=2，n=3。n=4，n=5且n=6，n=7，n=8，n=9且n=10 (SEQ ID NO: 6592)。在一個實施例中，可撓性多肽連接子包括但不限於(Gly4 Ser)4或(Gly4 Ser)3。在另一實施例中，連接子包括$(Gly_2Ser)$、(GlySer)或$(Gly_3Ser)$之多個重複。

【0358】 如本文所用，術語「經修飾」意謂本發明之分子或細胞的經改變之狀態或結構。分子可以許多方式經修飾，包括在化學上、結構上及功能上進行修飾。細胞可經由引入核酸而經修飾。

【0359】 如本文所用，術語「調節」意謂與不存在治療或化合物之個體中之反應水準相比及/或與其他相同但未治療之個體中之反應水準相比，調節個體中之反應水準之可偵測增加或降低。該術語涵蓋擾動及/或影響天然信號或反應，由此介導個體、較佳人類中之有益治療反應。

【0360】 在本發明之上下文中，使用以下通常出現之核酸鹼基之縮寫。「A」係指腺苷，「C」係指胞嘧啶，「G」係指鳥苷，「T」係指胸苷，且「U」係指尿苷。

【0361】 除非另外指定，否則「編碼胺基酸序列之核苷酸序列」包括為彼此之簡併型式且編碼相同胺基酸序列之所有核苷酸序列。就編碼蛋白質之核苷酸序列可以在一些形式中含有內含子而言，片語編碼該蛋白質或RNA之核苷酸序列亦可包括內含子。

【0362】 如本文所用，術語「可操作地連接」係指調節序列與異源性核酸序列之間的功能鍵聯，引起異源性核酸序列表現。舉例而言，當第一核酸序列與第二核酸序列處於官能性關係時，第一核酸序列可操作地連接第二核酸序列。舉例而言，若啟動子影響編碼序列之轉錄或表現，則啟動子可操作地連接至編碼序列。一般而言，可操作地連接之DNA序列為連續的，且必要時使兩個蛋白質編碼區在同一個閱讀框架中連接。

【0363】 如本文所用，術語「過度表現(overexpressed)」腫瘤抗原或腫瘤抗原之「過度表現(overexpression)」意欲指示來自如患者之特定組織或器官內之實體腫瘤的疾病區域的細胞中腫瘤抗原之表現量相對於來自該組織或器官之正常細胞中之表現量而言異常。患有實體腫瘤或由腫瘤抗原過度表現表徵之血液惡性病的患者可藉由此項技術中已知之標準分析確定。

【0364】 如本文所用，術語「非經腸」投與免疫原性組合物包括例如皮下(s.c.)、靜脈內(i.v.)、肌肉內(i.m.)或胸骨內注射或輸注技術。

【0365】 如本文所用，本文中所使用之術語「聚核苷酸」定義為核苷酸鏈。此外，核酸為核苷酸之聚合物。因此，如本文中所使用之核酸及聚核苷酸為可互換的。熟習此項技術者具有核酸為聚核苷酸之常識，聚核苷酸其可水解成單體「核苷酸」。單體核苷酸可水解成核苷。如本文中所使用之聚核苷酸包括但不限於藉由此項技術中可使用之任何方式(包括但不限於重組方式，亦即使用一般選殖技術自重組文庫或細胞基因體選殖核酸序列，及PCR™以及其類似者)及藉由合成方式獲得的所有核酸序列。

【0366】 如本文所用，術語「肽」、「多肽」及「蛋白質」可互換使用，且係指包含藉由肽鍵共價連接之胺基酸殘基的化合物。蛋白質或肽

必須含有至少兩個胺基酸，且對可構成蛋白質或肽序列之胺基酸的最大數目無限制。多肽包括任何包含藉由肽鍵彼此接合之兩個或大於兩個胺基酸的肽或蛋白質。如本文所用，該術語係指短鏈(其在此項技術中通常亦稱為例如肽、寡肽及寡聚物)及長鏈(其在此項技術中一般稱為蛋白質，其存在多種類型)。「多肽」尤其包括例如生物活性片段、實質上同源多肽、寡肽、均二聚體、雜二聚體、多肽變異體、經修飾之多肽、衍生物、類似物、融合蛋白。多肽包括天然肽、重組肽、合成肽或其組合。

【0367】 如本文所用，術語「啟動子」定義為起始聚核苷酸序列之特異性轉錄所需的由細胞之合成機制識別或引入合成機制之DNA序列。

【0368】 如本文所用，術語「啟動子/調節序列」意謂表現可操作地連接於啟動子/調節序列之基因產物所需的核酸序列。在一些情況下，此序列可為核心啟動子序列，且在其他情況下，此序列亦可包括強化子序列及表現基因產物所必需的其他調節元件。啟動子/調節序列可例如為以組織特異性方式表現基因產物之各者。

【0369】 如本文所用，術語「構成性啟動子」為當與編碼或指定基因產物之聚核苷酸可操作地連接時，引起在細胞中在細胞之大部分或所有生理學條件下產生基因產物的核苷酸序列。

【0370】 如本文所用，術語「誘導性啟動子」為當與編碼或指定基因產物之聚核苷酸可操作地連接時，引起實質上僅在細胞中存在對應於啟動子之誘導因子時於細胞中產生基因產物的核苷酸序列。

【0371】 如本文所用，術語「組織特異性啟動子」為當可與編碼基因或由基因指定的聚核苷酸可操作地連接時，引起實質上僅在細胞為對應於啟動子的組織類型之細胞時於細胞中產生基因產物的核苷酸序列。

【0372】 如本文所用，術語「仙台病毒」係指副黏液病毒家族之屬。仙台病毒為陰性單股RNA病毒，其不整合至宿主基因體中或改變宿主細胞之遺傳資訊。仙台病毒具有格外廣泛的宿主範圍且對人類不具有致病性。仙台病毒用作重組病毒載體能夠進行短暫但較強基因表現。

【0373】 如本文所用，術語「信號轉導路徑」係指在將信號自細胞之一個部分傳輸至細胞之另一部分中起作用的多種信號轉導分子之間的生物化學關係。片語「細胞表面受體」包括能夠跨越細胞質膜接收信號及傳輸信號之分子及分子複合體。

【0374】 如本文所用，術語「單鏈抗體」係指藉由重組DNA技術形成之抗體，其中免疫球蛋白重鏈及輕鏈片段經由經工程改造之胺基酸跨度連接至Fv區。已知多種產生單鏈抗體之方法，包括美國專利第4,694,778號; Bird, Science 242:423-442 (1988); Huston等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879- 5883 (1988); Ward等人, Nature 334:54454 (1989); Skerra等人, Science 242:1038-1041 (1988)中所描述之方法。

【0375】 如本文所用，術語「特異性」係指特異性結合給定目標抗原(例如人類目標抗原) (例如與之發生免疫反應)的能力。嵌合抗原受體可為單特異性的且含有一或多個特異性結合目標，或嵌合抗原受體之結合位點可為多特異性的且含有兩個或更多個特異性結合相同或不同目標之結合位點。在某些實施例中，嵌合抗原受體對同一目標之兩個不同(例如非重疊)部分具有特異性。在某些實施例中，嵌合抗原受體對超過一種目標具有特異性。

【0376】 如本文所用，術語「特異性結合」就抗體而言意謂抗體或其結合片段(例如scFv)識別特異性抗原，但實質上不識別或結合樣品中之

其他分子。舉例而言，與來自一種物種之抗原特異性結合之抗體亦可與來自一或多種物種之抗原結合。然而，此類跨物種反應性自身並不改變抗體特異性分類。在另一個實例中，與抗原特異性結合之抗體亦可與抗原之不同等位基因形式結合。然而，此類交叉反應性自身並不改變抗體特異性分類。在一些情況下，術語「特異性結合」或「特異性地結合」可參考抗體、蛋白質、嵌合抗原受體或肽與第二化學物種之相互作用使用，意謂相互作用視化學物種上特定結構(例如抗原決定子或抗原決定基)之存在而定；舉例而言，嵌合抗原受體識別且結合於特定蛋白質結構而非一般蛋白質。若抗體對抗原決定基「A」具有特異性，則在含經標記「A」及該抗體之反應中，含抗原決定基A (或未經標記之游離A)之分子的存在將減少結合於該抗體之經標記A的量。

【0377】 如本文所用，術語「刺激」意謂藉由刺激分子(例如TCR/CD3複合體)與其同源配位體之結合，由此介導信號轉導事件，諸如(但不限於)經由TCR/CD3複合體之信號轉導而誘導之初級反應。刺激可介導某些分子之經改變之表現，諸如下調TGF-β，及/或重組細胞骨架結構、純系擴增及分化成不同子集。

【0378】 如本文所用，術語「刺激分子」意謂與存在於抗原呈遞細胞上之同源刺激配位體特異性結合之T細胞上的分子。

【0379】 如本文所用，術語「刺激配位體」意謂當存在於抗原呈現細胞(例如aAPC、樹突狀細胞、B細胞及其類似物)上時可與T細胞上之同源結合搭配物(在本文中稱為「刺激分子」)特異性結合，由此藉由T細胞介導初級反應，包括但不限於活化、免疫反應起始、增殖及其類似者的配位體。刺激配位體為此項技術中熟知的且尤其涵蓋裝載有肽、抗CD3抗

體、超促效劑CD28抗體及超促效劑抗CD2抗體之MHC I類分子。

【0380】 如本文所用，術語「個體」及「患者」可互換地使用。如本文所用，個體係哺乳動物，諸如非靈長類動物(例如牛、豬、馬、貓、犬、大鼠等)或靈長類動物(例如猴及人類)。在某些實施例中，如本文所用，術語「個體」係指脊椎動物，諸如哺乳動物。哺乳動物包括但不限於人類、非人類靈長類動物、野生型動物、野生家畜、農畜、運動型動物及寵物。可誘發免疫反應之任何活生物體可為個體或患者。在某些例示性實施例中，個體為人類。

【0381】 如本文所用，術語「實質上純化」細胞為基本上不含其他細胞類型的細胞。實質上純化細胞亦指已與在其天然存在之狀態中通常與其締合之其他細胞類型分離之細胞。在一些情況下，實質上純化細胞群係指同源細胞群。在其他情況下，此術語僅指已與在其天然狀態下與其天然締合之細胞分離之細胞。在一些實施例中，在活體外培養細胞。在其他實施例中，不在活體外培養細胞。

【0382】 如本文所用，術語「目標位點」或「目標序列」係指在足以發生結合之條件下界定可與結合分子特異性結合之核酸之一部分的基因體核酸序列。

【0383】 如本文所用，與gRNA結合使用之術語「靶向域」係指識別目標序列或與其互補之gRNA分子之一部分。舉例而言，細胞核酸內(例如基因內)之目標序列。

【0384】 如本文所用，術語「目標序列」係指與gRNA靶向域互補，例如完全互補的核酸序列。在一些實施例中，目標序列安置於基因體DNA上。在一些實施例中，目標序列鄰近(在同一股上或在DNA之互補股

上)由具有核酸酶或其他效應子活性之蛋白質識別之前間隔序列鄰近模體(PAM)序列，例如由Cas9識別之PAM序列。在一些實施例中，目標序列為同種異體T細胞目標之目標序列。在一些實施例中，目標序列為抑制分子之目標序列。在一些實施例中，目標序列為抑制分子之下游效應子之目標序列。

【0385】 如本文所用，術語「T細胞受體」或「TCR」係指參與回應於抗原之呈現的T細胞活化的膜蛋白複合體。TCR負責識別結合於主要組織相容複合體分子之抗原。TCR由阿爾法(α)及貝塔(β)鏈之雜二聚體偶合至三個二聚模組CD3δ/CD3ε、CD3γ/CD3ε及CD3ζ/CD3ζ構成。在一些細胞中，TCR由γ及δ (γ/δ)鏈(CD3γ/CD3ε)組成。在一些實施例中，TCR可以α/β及γ/δ形式存在，其在結構上類似但具有不同的解剖位置及功能。各鏈由兩個胞外域(可變域及恆定域)構成。在一些實施例中，TCR可在包含TCR之任何細胞上經修飾，包括例如輔助T細胞、細胞毒性T細胞、記憶T細胞、調節T細胞、自然殺手T細胞及γδ T細胞。

【0386】 如本文所用，術語「治療」意謂治療及/或預防。藉由抑制、緩解或根除疾病病況來獲得治療作用。

【0387】 如本文所用，術語「療法」係指可用於預防、管理、治療及/或改善疾病或與其相關之症狀的任何方案、方法及/或藥劑(例如CAR-T)。在一些實施例中，術語「療法(therapies)」及「療法(therapy)」係指生物療法(例如授受性細胞療法)、支持性療法(例如淋巴細胞耗乏療法)及/或適用於預防、管理、治療及/或改善熟習此項技術者，諸如醫療人員已知之疾病或與其相關之症狀的其他療法。

【0388】 如本文所用，與gRNA分子結合使用之術語「tracr」係指

與核酸酶或其他效應分子結合之gRNA之一部分。在一些實施例中，tracr包含特異性結合於Cas9之核酸序列。在一些實施例中，tracr包含形成旗桿之一部分之核酸序列。如本文所用，術語「經轉染」或「經轉型」或「經轉導」係指外源性核酸被轉移或引入宿主細胞中之過程。「經轉染」或「經轉型」或「經轉導」細胞為經外源性核酸轉染、轉化或轉導之細胞。該細胞包括原代個體細胞及其後代。

【0389】 如本文所用，術語「治療(treat)」、「治療(treatment)」及「治療(treating)」係指藉由投與一或多種療法(包括但不限於針對實體腫瘤治療之CAR-T療法)降低或改善疾病或與其相關之症狀的進展、嚴重程度、頻率及/或持續時間。如本文所用，術語「治療」亦可指改變所治療個體之疾病病程。治療之治療作用包括但不限於預防疾病之發生或復發、緩解症狀、減輕疾病之直接或間接病理性結果、降低疾病進展速率、改善或緩和疾病況態，及緩解或改善預後。

【0390】 如本文所用，本文中所使用之術語「在轉錄控制下」或「可操作地連接」意謂啟動子相對於聚核苷酸處於正確位置及方向以控制RNA聚合酶轉錄之起始及聚核苷酸之表現。

【0391】 如本文所用，術語「載體」為包含經分離核酸且可用於將經分離核酸遞送至細胞內部之物質組合物。此項技術中已知多種載體，包括但不限於線性聚核苷酸、與離子或兩親媒性化合物相關之聚核苷酸、質體及病毒。因此，術語「載體」包括自主複製質體或病毒。該術語亦應視為包括非質體及非病毒化合物，其促進核酸轉移至細胞中，諸如聚離胺酸化合物、脂質體及其類似物。病毒載體之實例包括但不限於仙台病毒載體、腺病毒載體、腺相關病毒載體、反轉錄病毒載體、慢病毒載體及其類

似物。

【0392】 如本文所用，術語「異種」係指來源於不同物種動物之移植物。

【0393】 如本文所用，術語「完全培養基(complete media)」及「完全培養基(complete medium)」係指經最佳化以用於免疫細胞生長(例如，T細胞生長)之細胞培養基。在一些情況下，完全培養基包含蛋白質、無機鹽、微量元素、維生素、胺基酸、脂質、碳水化合物、細胞介素及/或生長因子，其中各組分之比率已經最佳化以用於細胞生長。例示性蛋白質包括白蛋白、轉鐵蛋白、纖維結合蛋白及胰島素。例示性碳水化合物包括葡萄糖。例示性無機鹽不包括鈉、鉀及鈣離子。例示性痕量元素包括鋅、銅、硒及三羧酸。例示性胺基酸包括必需胺基酸，諸如L-麩醯胺酸(例如，丙胺醯基-l-麩醯胺酸或甘胺醯基-l-麩醯胺酸)；或非必需胺基酸(NEAA)，諸如甘胺酸、L-丙胺酸、L-天冬醯胺、L-天冬胺酸、L-麩胺酸、L-脯胺酸及/或L-絲胺酸。在一些實施例中，完全培養基亦包含碳酸氫鈉(NaHCO3)、HEPES (4-(2-羥乙基)-1-哌啡乙磺酸)、酚紅、抗生素及/或β-巰基乙醇中之一或多者。在一些情況下，完全培養基係無血清培養基。在一些情況下，完全培養基係無外源物質培養基。

【0394】 如本文所用，術語「化學成分確定之培養基」係指所有組分之組成及濃度為已知的細胞培養基。其不同於完全培養基，因為完全培養基可含有組合物及/或濃度為未知的組分，例如生物衍生組分。

【0395】 在一些情況下，「無外源物質」培養基不含任何生物衍生(非人類)組分。在一些情況下，無外源物質培養基含有一或多種人類衍生組分，諸如人類血清、生長因子及胰島素。

【0396】 在一些實施例中，「無血清」培養基不含血清或血漿但可含有來源於血清或血漿之組分。在一些情況下，「無血清」培養基含有動物衍生組分，諸如牛血清白蛋白(BSA)。

【0397】 在一些實施例中，「基本」培養基包含目標細胞生長之最少必需成分。在一些情況下，基本培養基含有無機鹽、碳源及水。在一些情況下，將補充劑、細胞介素及/或蛋白質，諸如白蛋白(例如HSA)添加至基本培養基中。如本文所用，補充劑包含微量元素、維生素、胺基酸、脂質、碳水化合物、細胞介素、生長因子或其組合。

【0398】 範圍：在本發明通篇中，本發明之各種態樣可以範圍格式呈現。應理解，範圍格式中之描述僅為了方便及簡潔起見且不應解釋為對本發明範疇之固定限制。因此，範圍之描述應被視為已特定揭示所有可能的子範圍以及彼範圍內之個別數值。舉例而言，對諸如1至6之範圍的描述應被視為已特定揭示子範圍，諸如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等，以及彼範圍內之個別數值，例如1、2、2.7、3、4、5、5.3及6。不管範圍之廣度如何，此均適用。

**實例**

【0399】 此等實例僅為了說明目的而提供且不限制本文所提供之申請專利範圍之範疇。

**實例1**

【0400】 此實例提供用於製成本發明之新穎同種異體CART細胞之物質及方法。

【0401】 *初級人類T細胞擴增及細胞冷凍保存.* 將T細胞以$1\times10^6$個細胞/毫升在培養基中培育且在培養開始時使用Dynabeads® (ThermoFisher)

活化。每隔一天使用NC200™自動細胞計數器(Chemometec)計數細胞。另外，每隔一天測定細胞存活力及細胞尺寸。細胞饋入新製T細胞培養基且以$5\times10^5$個細胞/毫升再懸浮。在第9-11天，收集細胞且在含有5% DMSO之冷凍培養基中冷凍保存。

【0402】 *多色流動式細胞測量術分析.* 洗滌細胞且再懸浮於FACS緩衝液(含有5%胎牛血清之磷酸鹽緩衝鹽水)中。將與特定螢光團結合之抗體的反應混合物添加至細胞中。細胞經洗滌且再懸浮於FACS緩衝液中，且使用MACSQuant®細胞計數器(Miltenyi)分析。所用抗體組包括抗CD3-VioBlue、抗TCRab-APC、抗B2M-PE-Vio770、抗HLA-DR-VioGreen、抗HLAI-ABC-FITC、抗CAR-PE及7AAD以用於存活力評定。FlowJo®軟體(BD Biosciences)用於資料分析。

【0403】 *初級人類T細胞之基因編輯.* 將呈與各目標之相應引導RNA結合之核酸酶形式的核糖核蛋白(RNP)轉染至人類T細胞中。細胞在含有5%人類血清、IL-7、IL-15及麩醯胺酸之特殊T細胞培養基中培養5-8天。在培養結束時，執行多色流動式細胞測量術以同時測定基因目標中之各者的基因編輯效率之水準。

【0404】 *即時腫瘤細胞毒性分析.* CAR T細胞之細胞毒性能力使用xCelligence™即時細胞分析儀器(Agilent)評定。簡言之，CAR T細胞與腫瘤目標細胞以不同效應子與目標比率(例如1:10、1:5、1:2.5、1:1)在微量滴定盤中共培養若干天。腫瘤細胞死亡連續測定為針對各病況所量測之細胞阻抗之變化。使用RTCA®軟體(Agilent)捕獲資料。

【0405】 *T7E1核酸內切酶分析之基因編輯效率.* 為確定分子水準下之基因編輯效率，吾等使用針對各特定基因目標定製之T7E1核酸內切酶

分析。自T細胞分離總基因體DNA且儲存在負80℃下或直接用於分析。使用跨越各目標之剪切位點之引子進行PCR反應。藉由凝膠電泳分析PCR產物以驗證擴增子尺寸及數量。隨後使用T7E1核酸酶消化PCR擴增子且使用2100 High-Resolution Automated Electrophoresis BioAnalyzer®儀器(Agilent)分析。2100 Expert®軟體用於測定基因編輯效率。

【0406】 *混合白血球反應.* 將同種異體CAR T細胞與來自不相關供體之T細胞(標記為「第2供體」)之共培養物設置為不同比率且追蹤16天。細胞死亡藉由流動式細胞測量術，使用特異性標記物來確定以區別及跟蹤各特定細胞類型(亦即同種異體CART細胞與「第2供體」T細胞)。在流動式細胞測量術之前添加123count™ eBeads以測定細胞之絕對數目，且使用7AAD染料評定細胞存活力。

**實例2**

【0407】 此實例之目的為詳述三基因剔除策略。

【0408】 下表3說明包含本發明之三基因剔除策略(3-基因剔除組合)之新穎同種異體CART細胞平台。獨特方法涉及靶向TCR模組(CD3δ、CD3ε及CD3γ)之一或多個基因、HLA-I之一或多個基因及HLA-II之一或多個基因。

**表3：CRISPR組合**

| | **TCR** | **HLA-I** | **HLA-II** |
|---|---|---|---|
| 1 | TRAC | B2M | C2TA |
| 2 | CD3ε | B2M | C2TA |
| 3 | CD3ε | B2M | RFX5 |
| 4 | CD3ε | B2M | RFXAP |
| 5 | CD3ε | B2M | RFXANK |
| 6 | CD3ε | B2M | HLA-DM |
| 7 | CD3ε | TAP1 | RFX5 |
| 8 | CD3ε | TAP1 | RFXANK |
| 9 | CD3ε | TAP1 | RFXAP |
| 10 | CD3ε | TAP1 | HLA-DM |
| 11 | CD3ε | NLRC5 | RFX5 |

| 表3：CRISPR組合 | | | |
|---|---|---|---|
| | **TCR** | **HLA-I** | **HLA-II** |
| 12 | CD3ε | NLRC5 | RFXANK |
| 13 | CD3ε | NLRC5 | RFXAP |
| 14 | CD3ε | NLRC5 | HLA-DM |
| 15 | CD3ε | TAP2 | RFX5 |
| 16 | CD3ε | TAP2 | RFXANK |
| 17 | CD3ε | TAP2 | RFXAP |
| 18 | CD3ε | TAP2 | HLA-DM |
| 19 | CD3δ | B2M | C2TA |
| 20 | CD3δ | B2M | RFX5 |
| 21 | CD3δ | B2M | RFXAP |
| 22 | CD3δ | B2M | RFXANK |
| 23 | CD3δ | B2M | HLA-DM |
| 24 | CD3δ | TAP1 | RFX5 |
| 25 | CD3δ | TAP1 | RFXANK |
| 26 | CD3δ | TAP1 | RFXAP |
| 27 | CD3δ | TAP1 | HLA-DM |
| 28 | CD3δ | NLRC5 | RFX5 |
| 29 | CD3δ | NLRC5 | RFXANK |
| 30 | CD3δ | NLRC5 | RFXAP |
| 31 | CD3δ | NLRC5 | HLA-DM |
| 32 | CD3δ | TAP2 | RFX5 |
| 33 | CD3δ | TAP2 | RFXANK |
| 34 | CD3δ | TAP2 | RFXAP |
| 35 | CD3δ | TAP2 | HLA-DM |
| 36 | CD3γ | B2M | C2TA |
| 37 | CD3γ | B2M | RFX5 |
| 38 | CD3γ | B2M | RFXAP |
| 39 | CD3γ | B2M | RFXANK |
| 40 | CD3γ | B2M | HLA-DM |
| 41 | CD3γ | TAP1 | RFX5 |
| 42 | CD3γ | TAP1 | RFXANK |
| 43 | CD3γ | TAP1 | RFXAP |
| 44 | CD3γ | TAP1 | HLA-DM |
| 45 | CD3γ | NLRC5 | RFX5 |
| 46 | CD3γ | NLRC5 | RFXANK |
| 47 | CD3γ | NLRC5 | RFXAP |
| 48 | CD3γ | NLRC5 | HLA-DM |
| 49 | CD3γ | TAP2 | RFX5 |
| 50 | CD3γ | TAP2 | RFXANK |
| 51 | CD3γ | TAP2 | RFXAP |
| 52 | CD3γ | TAP2 | HLA-DM |

【0409】 預期基因剔除多個基因之策略產生改良的同種異體T細胞產物。

**實例3**

【0410】 此實例之目的為使用至少一個基因剔除基因製備如本文所述之各種構築體。

【0411】 **表1**說明本發明之新穎同種異體CART策略，其涉及替代T細胞受體次單元(CD3δ、CD3γ及CD3ε)及額外關鍵基因在抗原處理及呈遞路徑中之基因剔除(KO)。尤其，選擇15種基因目標且使用CRISPR相關(Cas) (CRISPR-Cas)核酸內切酶系統用多個引導RNA (gRNA)測試各者。用於靶向15種基因之例示性gRNA揭示於**表4**中。

**表4：例示性gRNA**

| SEQ ID NO | 基因目標 | gRNA序列(間隔子) |
|---|---|---|
| 52 | CD3ε | AGATCCAGGATACTGAGGGCA |
| 53 | CD3δ | TCTCTGGCCTGGTACTGGCTA |
| 54 | CD3γ | GCTTCTGCATCACAAGTCAGA |
| 55 | B2M | TATCTCTTGTACTACACTGA |
| 56 | TAP1 | GCTCTTGGAGCCAACCGTTG |
| 57 | TAP2 | CTTCCTCAAGGGCTGCCAGGA |
| 58 | TAPBP_gRNA1 | CCTACATGCCCCCCACCTCC |
| 59 | TAPBP_gRNA2 | CGCTCGCATCCTCCACGAAC |
| 60 | NLRC5 | GTGAGCAGCCTCACAAGACAG |
| 61 | C2TA | CCTTGGGGCTCTGACAGGTA |
| 62 | HLA-DMA | CCAGAACACTCGGGTGCCTCG |
| 63 | RFX5_gRNA1 | CAAGGCCGTGCAGAACAAAGT |
| 64 | RFX5_gRNA2 | TTCTGCACGGCCTTGGAAATG |
| 65 | RFXANK | CCTGCACCCCTGAGCCTGTGA |
| 66 | RFXAP | GAGGATCTAGAGGACGAGGAG |
| 67 | Ii鏈_gRNA1 | CATCCTGGTGACTCTGCTCCT |
| 68 | Ii鏈_gRNA2 | TCCAGCCGGCCCTGCTGCTGG |

**實例4**

【0412】 此實例之目的為使用集中於靶向破壞CD3δ (**圖2A**)、CD3ε (**圖2B**)及CD3γ (**圖2C**)之不同構築體評估TCR α/β之基因剔除效率。

【0413】 人類T細胞上之TCR-α及TCR-β鏈破壞效率百分比係使用CRISPR/Cas系統，在靶向破壞CD3δ (**圖2A**)、CD3ε (**圖2B**)及CD3γ (**圖2C**)基因之後藉由流動式細胞測量術來量測。**圖2A**展示在使用以下四種不

同引導RNA破壞CD3δ之後的結果：gRNA1、gRNA2、gRNA3及gRNA4。在CRISPR/Cas系統中使用gRNA1及gRNA3引導RNA破壞CD3δ產生100% TCR α/β KO效率，而在CRISPR/Cas系統中使用gRNA2及gRNA4產生大於約90% TCR α/β KO效率。因此，gRNA1及gRNA3之用途較佳為在CRISPR/Cas系統中破壞CD3δ。

【0414】 **圖2B**展示在使用以下五種不同引導RNA靶向破壞CD3ε之後的結果：gRNA1、gRNA2、gRNA3、gRNA4及gRNA5。在CRISPR/Cas系統中使用gRNA4及gRNA5引導RNA破壞CD3ε產生100% TCR α/β KO效率，而使用gRNA1僅產生約50% KO TCR α/β KO效率，且最後在CRISPR/Cas系統中使用引導gRNA2及gRNA3產生大於約90% TCR α/β KO效率。因此，gRNA4及gRNA5引導RNA之用途較佳為在CRISPR/Cas系統中破壞CD3ε。

【0415】 **圖2C**展示在使用以下五種不同引導RNA靶向破壞CD3γ之後的結果：gRNA1、gRNA2、gRNA3、gRNA4及gRNA5。在CRISPR/Cas系統中使用gRNA4及引導RNA破壞CD3ε產生100% TCR α/β KO效率，而使用gRNA5產生大於約95% TCR α/β KO效率，且最後在CRISPR/Cas系統中使用gRNA1、gRNA2及gRNA3引導RNA產生較差TCR α/β KO效率。因此，gRNA4引導RNA之用途較佳為在CRISPR/Cas系統中破壞CD3γ。

**實例5**

【0416】 此實例之目的為評估同種異體CART細胞之不同構築體在10天時段內之擴增。

【0417】 所測試之不同構築體包括同種異體CART細胞，該等細胞

包含：(1) TRAC基因剔除(**圖3**上之ALLO (TRAC KO)) (例如，在本發明之前使用之基因剔除)；(2) CD3δ基因剔除(**圖3**上之ALLO (D1 KO))；(3) 圖之CD3γ基因剔除(**圖3**上之ALLO (G4 KO))；及(4) CD3ε基因剔除(**圖3**上之ALLO (E4 KO))。細胞群倍增百分比展示在Y軸上，而天數展示在X軸上。結果詳述於**圖3**中。

【0418】 **圖3**展示的圖式說明使用圖1之策略生產之同種異體CART細胞之擴增，且說明在十天的時段內群體倍增數。所測試之同種異體CART細胞為包含TRAC基因剔除(TRAC KO)、CD3δ基因剔除(D1 KO)、CD3γ基因剔除(G4 KO)及CD3ε基因剔除(E4 KO)之經工程改造T細胞。

**實例6**

【0419】 此實例評估若干不同基因剔除構築體以比較TCR-α/β鏈之表面表現。

【0420】 **圖4A及圖4B**展示流動式細胞測量術結果，其比較載體TCR-α鏈(TRAC)基因剔除(例如在本發明之前使用之構築體)、CD3δ基因剔除(D1 KO)、CD3γ基因剔除(G4 KO)及CD3ε基因剔除(E4 KO)之CRISPR介導之下調。**圖4A**展示藉由TCR-α/β鏈之表面表現所量測，CD3ε基因剔除(E4 KO)係T細胞受體基因剔除之較佳目標。**圖4B**展示包含CD3ε基因剔除(E4 KO)之同種異體CART細胞具有較高轉導效率且功能上優於包含例如CD3γ或CD3δ基因剔除之CART細胞；說明PSMA CART細胞實施例。

**實例7**

【0421】 此實例之目的為評估不同PSMA CART細胞構築體之腫瘤殺死能力。

【0422】 **圖5**展示的圖式展現包含TCR-α鏈(TRAC)基因剔除(例如，在本發明之前使用之構築體)、CD3δ基因剔除(D1)、CD3ε基因剔除(E4)及CD3γ基因剔除(G4)之同種異體PSMA CART細胞之腫瘤殺死能力。結果說明PSMA E4同種異體CART細胞具有最佳殺死能力。目標細胞為PC3細胞，其為人類前列腺癌細胞株。

【0423】 此等結果為出人意料且意外的，因為當與另一CD3次單元之靶向破壞相比時，預期靶向破壞一個CD3次單元不會產生更有效同種異體CART細胞。圖5展現出人意料之發現，當與同種異體TCR-α鏈(TRAC)基因剔除CART細胞、同種異體CD3δ基因剔除(D1) CART細胞或同種異體CD3γ基因剔除(G4) CART細胞相比時，靶向CD3ε (例如CD3ε基因剔除(E4))之同種異體CART細胞更有效(亦即殺死腫瘤細胞快得多)。

**實例8**

【0424】 此實例之目的為評估CRISPR-Cas方法實現目標基因之基因剔除之有效性。尤其，

【0425】 **圖6A-6D**展示用T7核酸內切酶錯配偵測分析法(T7E1)說明之CRISPR-Cas活性。**圖6A**展示使用三個不同gRNA自三個不同CRISPR-Cas C2TA (CIITA)基因之位點擴增的經T7E1處理之PCR產物之代表性凝膠電泳影像。**圖6B-7D**展示由展現CRISPR-Cas編輯效率之T7E1核酸內切酶分析之Agilent生物分析儀電泳圖產生的電泳圖。

【0426】 另外，**圖7A-D**展示對照及經T7E1處理之PCR的Agilent生物分析儀電泳圖及凝膠電泳，說明C2TA (CIITA) CRISPR編輯效率結果。

**實例9**

【0427】 此實例之目的為測定不同細胞類型之存活力。

【0428】 進行混合淋巴細胞分析(MLA)。**圖8**展示的圖式說明使用單獨同種異體細胞、單獨T細胞(第二供體)、共培養之同種異體細胞及共培養之T細胞(第二供體)之混合淋巴細胞反應(MLR)分析之結果。尤其，接受者之T細胞(來自不同供體之T細胞)與同種異體CART細胞共培養14天，且分析T細胞之增殖。

【0429】 結果展現對照T細胞(第2供體)、單獨或共培養的同種異體PSMA CART細胞之存活力，且展示「接受者之」T細胞對存在之同種異體細胞不反應(無增殖)。因此，圖8展示，儘管存在HLA錯配，但來自第2(不相關)供體之T細胞不回應於共培養之同種異體PSMA CART細胞而增殖。同種異體CART包含PSMA CART及CRISPR編輯之TRAC/B2M/C2TA gRNA。因此，本發明之同種異體CART細胞將具有殺死腫瘤細胞而不被接受者之免疫系統(亦即T細胞)偵測到之機會窗。

* * * *

【0430】 雖然已說明且描述某些實施例，但應瞭解，可根據一般技術者在不脫離較廣態樣如以下申請專利範圍中所定義之技術的情況下在其中進行改變及修改。

【0431】 本文示例性描述之實施例可在無本文未具體揭示之任一個或多個要素、任一個或多個限制之情況下適當地實踐。因此，例如，術語「包含」、「包括」、「含有」等應解讀為廣泛性且非限制性的。另外，片語「主要由……組成」應理解為包括彼等特定列舉之要素及彼等並未顯著影響所主張之技術之基本及新穎特徵之額外要素。片語「由……組成」不包括任何未指定之要素。

【0432】 另外，在根據Markush組描述本發明之特徵或態樣時，熟習此項技術者應認識到，本發明亦從而根據Markush組成員之任何個別成員或子組進行描述。

【0433】 如熟習此項技術者將理解，出於任何及所有目的，尤其就提供書面說明而言，本文中所揭示之所有範圍亦涵蓋其任何及所有可能的子範圍及子範圍組合，包括端點。任何列出範圍可因足夠描述且能夠將同一範圍分解為至少相同的兩份、三份、四份、五份、十份等而容易地識別。作為非限制性實例，本文所論述的各範圍可容易地分解為下部三分之一、中間三分之一及上部三分之一等。熟習此項技術者亦應理解，所有語言，諸如「至多」、「至少」、「大於」、「小於」及其類似者均包括所列舉之數字且指代可隨後按上文所論述分解為子範圍之範圍。最終，熟習此項技術者將理解，範圍包括各個別成員。

【0434】 本說明書中所提及之所有公開案、專利申請案、頒佈之專利及其他公開可用文獻均以引用之方式併入本文中，其引用程度就如同已特定地且個別地將各個公開案、專利申請案、頒佈之專利或其他文獻以全文引用的方式併入本文中一般。在以引用的方式併入之文本中所含之定義若與本發明中之定義矛盾，則將其排除在外。

【0435】 其他實施例闡述於以下申請專利範圍中。

# 【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種經修飾免疫細胞，其包含：

(a) 一或多個基因座中之插入及/或缺失，該一或多個基因座各自編碼選自由以下組成之群的內源性免疫蛋白：CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP及恆定鏈(Ii鏈)，其中該插入及/或缺失能夠下調該一或多種內源性免疫基因之基因表現；及

(b) 編碼以下之外源性核酸：嵌合抗原受體(chimeric antigen receptor；CAR)、經工程改造T細胞受體(engineered T cell receptor；TCR)、殺手細胞免疫球蛋白樣受體(Killer cell immunoglobulin-like receptor；KIR)、抗原結合多肽、細胞表面受體配位體或腫瘤抗原，且視情況

(c) 進一步包含顯性負受體、開關受體、趨化介素、趨化介素受體、細胞介素、細胞介素受體、IL-7、IL-7R、IL-15、IL-15R、IL-21、IL-18、CCL21、CCL19或其組合。

【請求項2】

如請求項1之經修飾免疫細胞，其中該插入及/或缺失能夠下調以下之基因表現：

(a) 選自CD3δ、CD3ε及/或CD3γ之T細胞受體次單元；

(b) 選自B2M、TAP1、TAP2、TAPBP及/或NLRC5之HLA I類分子；及

(c) 選自HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP及/或恆定鏈(Ii鏈)

之HLA II類分子。

【請求項3】

如請求項2之經修飾免疫細胞，其中：

(a) 該插入及/或缺失能夠下調：

(i) CD3δ之基因表現，及

(ii) 選自由以下組成之群的HLA分子之基因表現：B2M、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恆定鏈(Ii鏈)及其組合；或

(b) 該插入及/或缺失能夠下調：

(i) CD3ε之基因表現，及

(ii) 選自由以下組成之群的HLA分子之基因表現：B2M、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、CIITA、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恆定鏈(Ii鏈)及其組合；或

(c) 該插入及/或缺失能夠下調：

(i) CD3γ之基因表現，及

(ii) 選自由以下組成之群的HLA分子之基因表現：B2M、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、CIITA、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恆定鏈(Ii鏈)及其組合。

【請求項4】

如請求項1之經修飾免疫細胞，其中該插入及/或缺失能夠下調以下之基因表現：

(I) 以下中之任一者：

(a) CD3ε、B2M及CIITA；

(b) CD3ε、B2M及RFX5；

(c) CD3ε、B2M及RFXAP；

(d) CD3ε、B2M及RFXANK；

(e) CD3ε、B2M及HLA-DM；

(f) CD3ε、B2M及Ii鏈；

(g) CD3ε、TAP1及CIITA；

(h) CD3ε、TAP1及RFX5；

(i) CD3ε、TAP1及RFXAP；

(j) CD3ε、TAP1及RFXANK；

(k) CD3ε、TAP1及HLA-DM；

(l) CD3ε、TAP1及Ii鏈；

(m) CD3ε、TAP2及CIITA；

(n) CD3ε、TAP2及RFX5；

(o) CD3ε、TAP2及RFXAP；

(p) CD3ε、TAP2及RFXANK；

(q) CD3ε、TAP2及HLA-DM；

(r) CD3ε、TAP2及Ii鏈；

(s) CD3ε、NLRC5及CIITA；

(t) CD3ε、NLRC5及RFX5；

(u) CD3ε、NLRC5及RFXAP；

(v) CD3ε、NLRC5及RFXANK；

(w) CD3ε、NLRC5及HLA-DM；

(x) CD3ε、NLRC5及Ii鏈；

(y) CD3ε、TAPBP及CIITA；

(z) CD3ε、TAPBP及RFX5；

(aa) CD3ε、TAPBP及RFXAP；

(bb) CD3ε、TAPBP及RFXANK；

(cc) CD3ε、TAPBP及HLA-DM；或

(dd) CD3ε、TAPBP及Ii鏈；或

(II) 以下中之任一者：

(a) CD3δ、B2M及CIITA；

(b) CD3δ、B2M及RFX5；

(c) CD3δ、B2M及RFXAP；

(d) CD3δ、B2M及RFXANK；

(e) CD3δ、B2M及HLA-DM；

(f) CD3δ、B2M及Ii鏈；

(g) CD3δ、TAP1及CIITA；

(h) CD3δ、TAP1及RFX5；

(i) CD3δ、TAP1及RFXAP；

(j) CD3δ、TAP1及RFXANK；

(k) CD3δ、TAP1及HLA-DM；

(l) CD3δ、TAP1及Ii鏈；

(m) CD3δ、TAP2及CIITA；

(n) CD3δ、TAP2及RFX5；

(o) CD3δ、TAP2及RFXAP；

(p) CD3δ、TAP2及RFXANK；

(q) CD3δ、TAP2及HLA-DM；

(r) CD3δ、TAP2及Ii鏈；

(s) CD3δ、NLRC5及CIITA；

(t) CD3δ、NLRC5及RFX5；

(u) CD3δ、NLRC5及RFXAP；

(v) CD3δ、NLRC5及RFXANK；

(w) CD3δ、NLRC5及HLA-DM；

(x) CD3δ、NLRC5及Ii鏈；

(y) CD3δ、TAPBP及CIITA；

(z) CD3δ、TAPBP及RFX5；

(aa) CD3δ、TAPBP及RFXAP；

(bb) CD3δ、TAPBP及RFXANK；

(cc) CD3δ、TAPBP及HLA-DM；或

(dd) CD3δ、TAPBP及Ii鏈；或

(III) 以下中之任一者：

(a) CD3γ、B2M及CIITA；

(b) CD3γ、B2M及RFX5；

(c) CD3γ、B2M及RFXAP；

(d) CD3γ、B2M及RFXANK；

(e) CD3γ、B2M及HLA-DM；

(f) CD3γ、B2M及Ii鏈；

(g) CD3γ、TAP1及CIITA；

(h) CD3γ、TAP1及RFX5；

(i) CD3γ、TAP1及RFXAP；

(j) CD3γ、TAP1及RFXANK；

(k) CD3γ、TAP1及HLA-DM；

(l) CD3γ、TAP1及Ii鏈；

(m) CD3γ、TAP2及CIITA；

(n) CD3γ、TAP2及RFX5；

(o) CD3γ、TAP2及RFXAP；

(p) CD3γ、TAP2及RFXANK；

(q) CD3γ、TAP2及HLA-DM；

(r) CD3γ、TAP2及Ii鏈；

(s) CD3γ、NLRC5及CIITA；

(t) CD3γ、NLRC5及RFX5；

(u) CD3γ、NLRC5及RFXAP；

(v) CD3γ、NLRC5及RFXANK；

(w) CD3γ、NLRC5及HLA-DM；

(x) CD3γ、NLRC5及Ii鏈；

(y) CD3γ、TAPBP及CIITA；

(z) CD3γ、TAPBP及RFX5；

(aa) CD3γ、TAPBP及RFXAP；

(bb) CD3γ、TAPBP及RFXANK；

(cc) CD3γ、TAPBP及HLA-DM；或

(dd) CD3γ、TAPBP及Ii鏈。

【請求項5】

如請求項1之經修飾免疫細胞，其中：

(a) 該經修飾免疫細胞係選自由以下組成之群：T細胞、自然殺手細胞(NK細胞)、自然殺手T細胞、淋巴祖細胞、造血幹細胞、幹細胞、巨噬細胞及樹突狀細胞；及/或

(b) 該經修飾免疫細胞為CD4+ T細胞或CD8+ T細胞；及/或

(c) 該經修飾免疫細胞為同種異體T細胞或自體人類T細胞。

【請求項6】

如請求項1之經修飾免疫細胞，其中該插入及/或缺失為選自由以下組成之群的基因編輯之結果：

(a) 與CRISPR相關(Cas) (CRISPR-CAs)之核酸內切酶系統及引導RNA；

(b) TALEN基因編輯系統、鋅指核酸酶(ZFN)基因編輯系統、巨核酸酶基因編輯系統或mega-TALEN基因編輯系統；及

(c) 選自反義RNA、抗寡聚物RNA (antigomer RNA)、RNAi、siRNA或shRNA之基因緘默系統。

【請求項7】

如請求項6之經修飾免疫細胞，其中：

(a) 該Cas核酸內切酶包含Cas3、Cas4、Cas8a、Cas8b、Cas9、Cas10、Cas10d、Cas12a、Cas12b、Cas12d、Cas12e、Cas12f、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas13、Cas14、CasX、Cse1、Csy1、Csn2、Cpf1、C2c1、Csm2、Cmr5、Fok1、釀膿鏈球菌(*S. pyogenes*) Cas9、金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) Cas9、MAD7或其任何組合；或

(b) 該CRISPR-Cas系統包含pAd5/F35-CRISPR載體；或

(c) 該引導RNA包含與該一或多個基因座內之序列互補的引導序列，該一或多個基因座各自編碼選自由以下組成之群的免疫蛋白：CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP及恆定鏈(Ii鏈)。

【請求項8】

如請求項7之經修飾免疫細胞，其中：

(a) 該引導RNA與以下範圍內之序列互補：(1) CD3δ、CD3ε或CD3γ之一或多個外顯子，或(2) CD3δ、CD3ε或CD3γ之外顯子1；或

(b) 該序列在該CD3δ基因座內且該引導RNA包含由SEQ ID NO: 53編碼之核酸序列；或

(c) 該序列在該CD3ε基因座內且該引導RNA包含由SEQ ID NO: 52編碼之核酸序列；或

(d) 該序列在該CD3γ基因座內且該引導RNA包含由SEQ ID NO: 54編碼之核酸序列；或

(e) 該序列在該B2M基因座內且該引導RNA包含由SEQ ID NO: 55編碼之核酸序列；或

(f) 該序列在該CIITA基因座內且該引導RNA包含由SEQ ID NO: 61編碼之核酸序列；或

(g) 該序列在該TAP1基因座內且該引導RNA包含由SEQ ID NO: 56編碼之核酸序列；或

(h) 該序列在該TAP2基因座內且該引導RNA包含由SEQ ID NO: 57編碼之核酸序列；或

(i) 該序列在該TAPBP基因座內且該引導RNA包含由SEQ ID NO:

58、SEQ ID NO: 59或其組合編碼之核酸序列；或

(j) 該序列在該NLRC5基因座內且該引導RNA包含由SEQ ID NO: 60編碼之核酸序列；或

(k) 該序列在該HLA-DM基因座內且該引導RNA包含由SEQ ID NO: 62編碼之核酸序列；或

(l) 該序列在該RFX5基因座內且該引導RNA包含由SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 64或其組合編碼之核酸序列；或

(m) 該序列在該RFXANK基因座內且該引導RNA包含由SEQ ID NO: 65編碼之核酸序列；或

(n) 該序列在該RFXAP基因座內且該引導RNA包含由SEQ ID NO: 66編碼之核酸序列；或

(o) 該序列在該Ii鏈基因座內且該引導RNA包含由SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 68或組合編碼之核酸序列。

【請求項9】

如請求項1之經修飾免疫細胞，其中：

(a) 相比於向個體投與之未經修飾之免疫細胞發揮的免疫反應，當向同一個體投與該經修飾免疫細胞時，該免疫細胞在該個體中發揮降低的免疫反應；

(b) 相比於由包含能夠下調TRAC、B2M及CIITA之基因表現的插入及/或缺失之免疫細胞發揮的免疫反應，當向個體投與該經修飾免疫細胞時，該免疫細胞在該個體中發揮降低的免疫反應，且視情況地，其中該免疫反應為移植物抗宿主病(graft-versus-host disease；GvHD)反應，且另外視情況地，其中該降低的GvHD反應係針對HLA-I錯配細胞或針對

HLA-II錯配細胞引發的。

【請求項10】

如請求項9之經修飾免疫細胞，其中：

(a) 該GvHD反應降低約10%或更多、約20%或更多、約30%或更多、約40%或更多、約50%或更多、約60%或更多、約70%或更多、約80%或更多、約90%或更多或約95%或更多；或

(b) 該GvHD反應降低約1倍或更多倍、約2倍或更多倍、約3倍或更多倍、約4倍或更多倍、約5倍或更多倍、約6倍或更多倍、約7倍或更多倍、約8倍或更多倍、約9倍或更多倍、約10倍或更多倍、約20倍或更多倍、約30倍或更多倍、約50倍或更多倍、約100倍或更多倍、約150倍或更多倍或約200倍或更多倍；及/或

(c) 將該經修飾免疫細胞所降低之GvHD反應與在一或多個基因座中無該缺失及/或插入之等效免疫細胞或在TRAC、B2M及CIITA中包含該缺失及/或插入之免疫細胞進行比較。

【請求項11】

如請求項1之經修飾細胞，其中該外源性核酸編碼嵌合抗原受體(CAR)，且其中該CAR包含抗原結合域、鉸鏈域、跨膜域、協同刺激信號傳導域及胞內信號傳導域。

【請求項12】

如請求項11之經修飾免疫細胞，其中：

(a) 該抗原結合域包含全長抗體或其抗原結合片段、Fab、$F(ab)_2$、單特異性$Fab_2$、雙特異性$Fab_2$、三特異性$Fab_2$、單鏈可變片段(scFv)、雙功能抗體、三功能抗體、微型抗體、V-NAR或VhH；及/或

(b) 該跨膜域係選自人工疏水性序列、I型跨膜蛋白之跨膜域、T細胞受體之α、β或ζ鏈、CD28、CD3ε、CD45、CD4、CD2、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、OX40 (CD134)、4-1BB (CD137)、ICOS (CD278)、CD154、CD357 (GITR)、鐸樣受體1 (TLR1)、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9及來源於殺手免疫球蛋白樣受體(KIR)之跨膜域；及/或

(c) 該協同刺激域包含選自由以下組成之群的蛋白質之協同刺激域中之一或多者：TNFR超家族中之蛋白質、CD28、4-1BB (CD137)、OX40 (CD134)、PD-1、CD7、LIGHT、CD83L、DAP10、DAP12、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、ICOS (CD278)、NKG2C、B7-H3 (CD276)及來源於殺手免疫球蛋白樣受體(KIR)之胞內域或其變異體；及/或

(d) 該胞內信號傳導域包含選自由以下組成之群的胞內域：人類CD2之細胞質信號傳導域、CD3ζ鏈(CD3ζ)、FcγRIII、FcsRI、Fc受體之胞質尾區、帶有細胞質受體之基於免疫受體酪胺酸之活化模體(ITAM)、TCRζ、FcRγ、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD5、CD22、CD79a、CD79b及CD66d或其變異體；及/或

(e) 該抗原結合域靶向腫瘤抗原，該腫瘤抗原係：

(i) 與血液惡性腫瘤相關；

(ii) 與實體腫瘤相關；及/或

(iii) 選自由以下組成之群：ROR1、間皮素、c-Met、PSMA、PSCA、葉酸受體α、葉酸受體β、EGFR、EGFRvIII、GPC2、GPC2、黏蛋白1(MUC1)、Tn抗原((Tn Ag)或(GalNAca-Ser/Thr))、

TnMUC1、GDNF家族受體α-4 (GFRa4)、纖維母細胞活化蛋白(FAP)及介白素-13受體次單元α-2 (IL-13Ra2或CD213A2)；及/或

(f) 該胞內信號傳導域包含人類CD3ζ鏈(CD3ζ)；及/或

(g) 該CAR包含：

(i) PSMA抗原結合域、CD2協同刺激域及CD3ζ胞內信號傳導域；

(ii) 間皮素抗原結合域、4-1BB協同刺激域及CD3ζ信號傳導域；或

(iii) TnMUC1抗原結合域、CD2協同刺激域及CD3ζ信號傳導域。

【請求項13】

如請求項1之經修飾免疫細胞，其中：

(a) 該開關受體包含與負信號相關之信號傳導蛋白之胞外域、跨膜域及與正信號相關之信號傳導蛋白之胞內域；及/或

(b) 該顯性負受體包含：

(i) 與負信號相關之野生型蛋白質之截短變異體；

(ii) 與負信號相關的包含胞外域、跨膜域及實質上缺乏胞內信號傳導域之野生型蛋白質之變異體；或

(iii) 與負信號相關之信號傳導蛋白之胞外域，以及跨膜域。

【請求項14】

如請求項13之經修飾免疫細胞，其中：

(a) 與該負信號相關之該蛋白質係選自由以下組成之群：CTLA4、PD-1、TGFβRII、BTLA、VSIG3、VSIG8及TIM-3；及/或

(b) 與該正信號相關之該蛋白質係選自由以下組成之群：CD28、4-1BB、IL12Rβ1、IL12Rβ2、CD2、ICOS及CD27；及/或

(c) 該開關受體係選自由以下組成之群：PD-1-CD28、PD-1$^{A132L}$-CD28、PD-1-CD27、PD-1$^{A132L}$-CD27、PD-1-4-1BB、PD-1$^{A132L}$-4-1BB、PD-1-ICOS、PD-1$^{A132L}$-ICOS、PD-1-IL12Rβ1、PD-1$^{A132L}$-IL12Rβ1、PD-1-IL12Rβ2、PD-1$^{A132L}$-IL12Rβ2、VSIG3-CD28、VSIG8-CD28、VSIG3-CD27、VSIG8-CD27、VSIG3-4-1BB、VSIG8-4-1BB、VSIG3-ICOS、VSIG8-ICOS、VSIG3-IL12Rβ1、VSIG8-IL12Rβ1、VSIG3-IL12Rβ2、VSIG8-IL12Rβ2、TGFβRII-CD27、TGFβRII-CD28、TGFβRII-4-1BB、TGFβRII-ICOS、TGFβRII-IL12Rβ1及TGFβRII-IL12Rβ2；及/或

(d) 該顯性負受體為PD1、VSIG3、VISG8或TGFβR顯性負受體；及/或

(e) 該跨膜域係：

(i) 選自選自由以下組成之群的蛋白質之跨膜域：CTLA4、PD-1、VSIG3、VSIG8、TGFβRII、BTLA、TIM-3、CD28、4-1BB、IL12Rβ1、IL12Rβ2、CD2、ICOS及CD27；或

(ii) 選自與負信號相關之蛋白質之跨膜或與該負信號相關之蛋白質之跨膜域。

【請求項15】

一種經分離之經修飾T細胞，其包含至少一種選自由以下組成之群的功能受損之多肽：CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP及恆定鏈(Ii鏈)；

其中包含該功能受損之多肽之該經修飾T細胞展現以下中之至少一者：

(i) 相比於未經修飾之T細胞，降低的T細胞受體表現；

(ii) 降低的該受損多肽之表現；

(iii) 完全不存在T細胞受體複合體表面表現；及

(iv) 減少或不足的T細胞受體交聯。

【請求項16】

如請求項15之經分離之經修飾T細胞，其中：

(a) 相比於向個體投與之未經修飾T細胞發揮的免疫反應，當向同一個體投與該經修飾T細胞時，該經修飾T細胞在該個體中發揮降低的免疫反應；及/或

(b) 該經修飾T細胞包含兩種或更多種功能受損之多肽，且其中該第二受損多肽為T細胞受體α鏈(TRAC)；及/或

(c) 該經修飾T細胞包含：

(i) 三種或更多種功能受損之多肽，其係選自TRAC、CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii鏈；

(ii) 兩種功能受損之多肽，其係選自CD3α、CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii鏈；

(iii) 三種功能受損之多肽，其係選自CD3α、CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii鏈；

(iv) 選自由CD3δ、CD3ε及CD3γ組成之群的功能受損之多肽，及至少一種選自TRAC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii鏈之功能受損之多肽；或

(v) 選自由CD3δ、CD3ε及CD3γ組成之群的功能受損之多肽，及選自TRAC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii鏈之功能受損之多肽；及/或

(d) 該經修飾T細胞包含：

(i) 功能受損之CD3δ及至少一種選自TRAC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii鏈之功能受損之多肽；

(ii) 功能受損之CD3ε及至少一種選自TRAC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii鏈之功能受損之多肽；或

(iii) 功能受損之CD3γ及至少一種選自TRAC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii鏈之功能受損之多肽；及/或

(e) 該經修飾T細胞包含兩種或更多種選自TRAC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或Ii鏈之功能受損之多肽；及/或

(f) 該經修飾T細胞：

(i) 具有降低的TRAC、CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、C2TA、

TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、Ii鏈或其任何組合之表現，或

(ii) 不表現CD3δ、CD3ε、CD3γ、TRAC、B2M、C2TA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、Ii鏈或其任何組合；及/或

(g) 該經修飾T細胞進一步包含選自TRAC、B2M及C2TA之功能受損之多肽；及/或

(h) 該經修飾T細胞具有降低的TRAC、B2M或C2TA之表現或不表現TRAC、B2M或C2TA；及/或

(i) CD3δ、CD3ε及/或CD3γ之修飾引起TCR/CD3複合體功能受損；及/或

(j) CD3δ、CD3ε或CD3γ藉由靶向CD3δ、CD3ε或CD3γ之一或多個外顯子，視情況CD3δ、CD3ε或CD3γ之外顯子1來修飾。

【請求項17】

一種用於生產經修飾免疫細胞之方法，其包含：

(a) 將一或多種核酸引入至該免疫細胞中，該一或多種核酸能夠下調編碼內源性免疫蛋白之一或多種內源性免疫基因之基因表現，該內源性免疫蛋白係選自由以下組成之群：CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP及恆定鏈(Ii鏈)；

(b) 將編碼嵌合抗原受體(CAR)、經工程改造T細胞受體(TCR)、殺手細胞免疫球蛋白樣受體(KIR)、抗原結合多肽、細胞表面受體配位體或腫瘤抗原之外源性核酸引入至該免疫細胞中；及

(c) 擴增該經修飾免疫細胞以產生T細胞群；且視情況

(d) 該方法進一步包含將編碼顯性負受體、開關受體或其組合之外源性核酸引入至該免疫細胞中。

【請求項18】

如請求項17之方法，其中：

(a) 其中該一或多種核酸能夠下調以下之基因表現：

(i) 選自CD3δ、CD3ε或CD3γ之T細胞受體次單元；

(ii) 選自B2M、TAP1、TAP2、TAPBP或NLRC5之HLA I類分子；及

(iii) 選自HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP或恆定鏈(Ii鏈)之HLA II類分子；及/或

(b) 其中該一或多種核酸能夠下調CD3δ之基因表現及選自由以下組成之群的HLA分子之基因表現：B2M、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恆定鏈(Ii鏈)及其組合；及/或

(c) 其中該一或多種核酸能夠下調CD3ε及選自由以下組成之群的HLA分子之基因表現：B2M、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、CIITA、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恆定鏈(Ii鏈)及其組合；及/或

(d) 其中該一或多種核酸能夠下調CD3γ及選自由以下組成之群的HLA分子之基因表現：B2M、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、CIITA、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP、恆定鏈(Ii鏈)及其組合。

【請求項19】

如請求項18之方法，其中該一或多種核酸能夠下調以下之基因表現：

(I) 以下中之任一者：

(a) CD3ε、B2M及CIITA；

(b) CD3ε、B2M及RFX5；

(c) CD3ε、B2M及RFXAP；

(d) CD3ε、B2M及RFXANK；

(e) CD3ε、B2M及HLA-DM；

(f) CD3ε、B2M及Ii鏈；

(g) CD3ε、TAP1及CIITA；

(h) CD3ε、TAP1及RFX5；

(i) CD3ε、TAP1及RFXAP；

(j) CD3ε、TAP1及RFXANK；

(k) CD3ε、TAP1及HLA-DM；

(l) CD3ε、TAP1及Ii鏈；

(m) CD3ε、TAP2及CIITA；

(n) CD3ε、TAP2及RFX5；

(o) CD3ε、TAP2及RFXAP；

(p) CD3ε、TAP2及RFXANK；

(q) CD3ε、TAP2及HLA-DM；

(r) CD3ε、TAP2及Ii鏈；

(s) CD3ε、NLRC5及CIITA；

(t) CD3ε、NLRC5及RFX5；

(u) CD3ε、NLRC5及RFXAP；

(v) CD3ε、NLRC5及RFXANK；

(w) CD3ε、NLRC5及HLA-DM；

(x) CD3ε、NLRC5及Ii鏈；

(y) CD3ε、TAPBP及CIITA；

(z) CD3ε、TAPBP及RFX5；

(aa) CD3ε、TAPBP及RFXAP；

(bb) CD3ε、TAPBP及RFXANK；

(cc) CD3ε、TAPBP及HLA-DM；或

(dd) CD3ε、TAPBP及Ii鏈；或

(II) 以下中之任一者：

(a) CD3δ、B2M及CIITA；

(b) CD3δ、B2M及RFX5；

(c) CD3δ、B2M及RFXAP；

(d) CD3δ、B2M及RFXANK；

(e) CD3δ、B2M及HLA-DM；

(f) CD3δ、B2M及Ii鏈；

(g) CD3δ、TAP1及CIITA；

(h) CD3δ、TAP1及RFX5；

(i) CD3δ、TAP1及RFXAP；

(j) CD3δ、TAP1及RFXANK；

(k) CD3δ、TAP1及HLA-DM；

(l) CD3δ、TAP1及Ii鏈；

(m) CD3δ、TAP2及CIITA；

(n) CD3δ、TAP2及RFX5；

(o) CD3δ、TAP2及RFXAP；

(p) CD3δ、TAP2及RFXANK；

(q) CD3δ、TAP2及HLA-DM；

(r) CD3δ、TAP2及Ii鏈；

(s) CD3δ、NLRC5及CIITA；

(t) CD3δ、NLRC5及RFX5；

(u) CD3δ、NLRC5及RFXAP；

(v) CD3δ、NLRC5及RFXANK；

(w) CD3δ、NLRC5及HLA-DM；

(x) CD3δ、NLRC5及Ii鏈；

(y) CD3δ、TAPBP及CIITA；

(z) CD3δ、TAPBP及RFX5；

(aa) CD3δ、TAPBP及RFXAP；

(bb) CD3δ、TAPBP及RFXANK；

(cc) CD3δ、TAPBP及HLA-DM；或

(dd) CD3δ、TAPBP及Ii鏈；或

(III) 以下中之任一者：

(a) CD3γ、B2M及CIITA；

(b) CD3γ、B2M及RFX5；

(c) CD3γ、B2M及RFXAP；

(d) CD3γ、B2M及RFXANK；

(e) CD3γ、B2M及HLA-DM；

(f) CD3γ、B2M及Ii鏈；

(g) CD3γ、TAP1及CIITA；

(h) CD3γ、TAP1及RFX5；

(i) CD3γ、TAP1及RFXAP；

(j) CD3γ、TAP1及RFXANK；

(k) CD3γ、TAP1及HLA-DM；

(l) CD3γ、TAP1及Ii鏈；

(m) CD3γ、TAP2及CIITA；

(n) CD3γ、TAP2及RFX5；

(o) CD3γ、TAP2及RFXAP；

(p) CD3γ、TAP2及RFXANK；

(q) CD3γ、TAP2及HLA-DM；

(r) CD3γ、TAP2及Ii鏈；

(s) CD3γ、NLRC5及CIITA；

(t) CD3γ、NLRC5及RFX5；

(u) CD3γ、NLRC5及RFXAP；

(v) CD3γ、NLRC5及RFXANK；

(w) CD3γ、NLRC5及HLA-DM；

(x) CD3γ、NLRC5及Ii鏈；

(y) CD3γ、TAPBP及CIITA；

(z) CD3γ、TAPBP及RFX5；

(aa) CD3γ、TAPBP及RFXAP；

(bb) CD3γ、TAPBP及RFXANK；

(cc) CD3γ、TAPBP及HLA-DM；或

(dd) CD3γ、TAPBP及Ii鏈。

【請求項20】

如請求項17之方法，其中：

(a) 該免疫細胞係選自由以下組成之群：T細胞、自然殺手細胞(NK細胞)、自然殺手T細胞、淋巴祖細胞、造血幹細胞、幹細胞、巨噬細胞及樹突狀細胞；及/或

(b) 該免疫細胞為CD4+ T細胞或CD8+ T細胞；及/或

(c) 該免疫細胞為同種異體T細胞或自體T細胞。

【請求項21】

如請求項17之方法，其中：

(a) 藉由病毒轉導將該等核酸引入至該免疫細胞中，其中該病毒轉導包含使該免疫細胞與包含該一或多種核酸之病毒載體接觸；及/或

(b) 藉由病毒轉導將該等核酸引入至該免疫細胞中，其中該病毒轉導包含使該免疫細胞與包含該一或多種核酸之病毒載體接觸，且另外其中該病毒載體係選自由以下組成之群：反轉錄病毒載體、仙台病毒載體(sendai viral vector)、腺病毒載體、腺相關病毒載體及慢病毒載體；及/或

(c) 該一或多種能夠下調表現之核酸中之各者包含選自由以下組成之群的基因編輯系統：

(i) 與CRISPR相關(Cas) (CRISPR-CAs)之核酸內切酶系統及引導RNA；

(ii) TALEN基因編輯系統、鋅指核酸酶(ZFN)基因編輯系統、巨核酸酶基因編輯系統或mega-TALEN基因編輯系統；及

(iii) 選自反義RNA、抗寡聚物RNA、RNAi、siRNA或shRNA之基因緘默系統。

【請求項22】

如請求項21之方法，其中：

(a) 該Cas核酸內切酶包含Cas3、Cas4、Cas8a、Cas8b、Cas9、Cas10、Cas10d、Cas12a、Cas12b、Cas12d、Cas12e、Cas12f、Cas12g、Cas12h、Cas12i、Cas13、Cas14、CasX、Cse1、Csy1、Csn2、Cpf1、C2c1、Csm2、Cmr5、Fok1、釀膿鏈球菌Cas9、金黃色葡萄球菌Cas9、MAD7或其任何組合；及/或

(b) 該CRISPR-Cas系統包含pAd5/F35-CRISPR載體；及/或

(c) 該引導RNA包含與該一或多個基因座內之序列互補的引導序列，該一或多個基因座各自編碼選自由以下組成之群的免疫蛋白：CD3δ、CD3ε、CD3γ、B2M、CIITA、TAP1、TAP2、TAPBP、NLRC5、HLA-DM、RFX5、RFXANK、RFXAP及恆定鏈(Ii鏈)；及/或

(d) 該引導RNA與以下範圍內之序列互補：(1) CD3δ、CD3ε或CD3γ之一或多個外顯子，或(2) CD3δ、CD3ε或CD3γ之外顯子1；及/或

(e) 該序列在該CD3δ基因座內且該引導RNA包含由SEQ ID NO: 53編碼之核酸序列；

(f) 該序列在該CD3ε基因座內且該引導RNA包含由SEQ ID NO: 52編碼之核酸序列；

(g) 該序列在該CD3γ基因座內且該引導RNA包含由SEQ ID NO: 54

編碼之核酸序列；

(h) 該序列在該B2M基因座內且該引導RNA包含由SEQ ID NO: 55編碼之核酸序列；

(i) 該序列在該CIITA基因座內且該引導RNA包含由SEQ ID NO: 61編碼之核酸序列；

(j) 該序列在該TAP1基因座內且該引導RNA包含由SEQ ID NO: 56編碼之核酸序列；

(k) 該序列在該TAP2基因座內且該引導RNA包含由SEQ ID NO: 57編碼之核酸序列；

(l) 該序列在該TAPBP基因座內且該引導RNA包含由SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 59或其組合編碼之核酸序列；

(m) 該序列在該NLRC5基因座內且該引導RNA包含由SEQ ID NO: 60編碼之核酸序列；

(n) 該序列在該HLA-DM基因座內且該引導RNA包含由SEQ ID NO: 62編碼之核酸序列；

(o) 該序列在該RFX5基因座內且該引導RNA包含由SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 64或其組合編碼之核酸序列；

(p) 該序列在該RFXANK基因座內且該引導RNA包含由SEQ ID NO: 65編碼之核酸序列；

(q) 該序列在該RFXAP基因座內且該引導RNA包含由SEQ ID NO: 66編碼之核酸序列；或

(r) 該序列在該Ii鏈基因座內且該引導RNA包含由SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 68或其組合編碼之核酸序列。

【請求項23】

如請求項17之方法，其中：

(a)　相比於由向個體投與之未經修飾之免疫細胞產生的免疫反應，當向同一個體投與該免疫細胞時，該免疫細胞在該個體中產生減少的免疫反應；及/或

(b)　相比於由包含一或多種能夠下調TRAC、B2M及CIITA之基因表現之核酸的免疫細胞產生的免疫反應，當向個體投與該免疫細胞時，該免疫細胞在該個體中產生減少的免疫反應；及/或

(c)　當向個體投與該免疫細胞時，該免疫細胞在該個體中產生減少的免疫反應，其中該免疫反應為移植物抗宿主病(GvHD)反應；及/或

(d)　當向個體投與該免疫細胞時，該免疫細胞在該個體中產生減少的免疫反應，其中該免疫反應為移植物抗宿主病(GvHD)反應，且另外其中針對HLA-I錯配細胞或針對HLA-II錯配細胞引發減少的GvHD反應；及/或

(e)　當向個體投與該免疫細胞時，該免疫細胞在該個體中產生減少的免疫反應，其中該免疫反應為移植物抗宿主病(GvHD)反應，其中該GvHD反應：

(i)　減少約10%或更多、約20%或更多、約30%或更多、約40%或更多、約50%或更多、約60%或更多、約70%或更多、約80%或更多、約90%或更多或約95%或更多；或

(ii)　減少約1倍或更多倍、約2倍或更多倍、約3倍或更多倍、約4倍或更多倍、約5倍或更多倍、約6倍或更多倍、約7倍或更多倍、約8倍或更多倍、約9倍或更多倍、約10倍或更多倍、約20倍或更多

倍、約30倍或更多倍、約50倍或更多倍、約100倍或更多倍、約150倍或更多倍或約200倍或更多倍；及/或

(f) 當向個體投與該免疫細胞時，該免疫細胞在該個體中產生減少的免疫反應，其中該免疫反應為移植物抗宿主病(GvHD)反應，且另外其中將由該經修飾免疫細胞減少之該GvHD反應與在一或多個基因座中無該缺失及/或插入之等效免疫細胞或在TRAC、B2M及CIITA中包含該缺失及/或插入之免疫細胞進行比較。

【請求項24】

如請求項17之方法，其中：

(a) 該外源性核酸編碼嵌合抗原受體(CAR)，且其中該CAR包含抗原結合域、鉸鏈域、跨膜域、協同刺激信號傳導域及胞內信號傳導域；及/或

(b) 該外源性核酸編碼嵌合抗原受體(CAR)，且其中該CAR包含抗原結合域、鉸鏈域、跨膜域、協同刺激信號傳導域及胞內信號傳導域，且另外其中該抗原結合域靶向腫瘤抗原：

(i) 與血液惡性腫瘤相關；

(ii) 與實體腫瘤相關；及/或

(iii) 選自由以下組成之群：ROR1、間皮素、c-Met、PSMA、PSCA、葉酸受體α、葉酸受體β、EGFR、EGFRvIII、GPC2、GPC2、黏蛋白1(MUC1)、Tn抗原((Tn Ag)或(GalNAca-Ser/Thr))、TnMUC1、GDNF家族受體α-4 (GFRa4)、纖維母細胞活化蛋白(FAP)及介白素-13受體次單元α-2 (IL-13Ra2或CD213A2)；及/或

(c) 該外源性核酸編碼嵌合抗原受體(CAR)，且其中該CAR包含抗

原結合域、鉸鏈域、跨膜域、協同刺激信號傳導域及胞內信號傳導域，且另外其中該CAR包含：

(i) PSMA抗原結合域、CD2協同刺激域及CD3ζ胞內信號傳導域；

(ii) 間皮素抗原結合域、4-1BB協同刺激域及CD3ζ信號傳導域；或

(iii) TnMUC1抗原結合域、CD2協同刺激域及CD3ζ信號傳導域；及/或

(d) 該開關受體包含：

(i) 與負信號相關之選自由以下組成之群之信號傳導蛋白的胞外域：CTLA4、PD-1、VISG3、VSIG8、TGFβRII、BTLA及TIM-3，

(ii) 跨膜域，及

(iii) 與選自由CD28、4-1BB、IL12Rβ1、IL12Rβ2、CD2、ICOS及CD27組成之群的正信號相關的信號傳導蛋白之胞內域；及/或

(e) 該顯性負受體包含：

(i) 與負信號相關之野生型蛋白質之截短變異體，

(ii) 與負信號相關的包含胞外域、跨膜域及實質上缺乏胞內信號傳導域之野生型蛋白質之變異體；或

(iii) 與負信號相關之信號傳導蛋白的胞外域及跨膜域；及/或

(f) 該開關受體係選自由以下組成之群：PD-1-CD28、PD-1$^{A132L}$-CD28、PD-1-CD27、PD-1$^{A132L}$-CD27、PD-1-4-1BB、PD-1$^{A132L}$-4-1BB、

PD-1-ICOS、PD-$1^{A132L}$-ICOS、PD-1-IL12Rβ1、PD-$1^{A132L}$-IL12Rβ1、PD-1-IL12Rβ2、PD-$1^{A132L}$-IL12Rβ2、VSIG3-CD28、VSIG8-CD28、VSIG3-CD27、VSIG8-CD27、VSIG3-4-1BB、VSIG8-4-1BB、VSIG3-ICOS、VSIG8-ICOS、VSIG3-IL12Rβ1、VSIG8-IL12Rβ1、VSIG3-IL12Rβ2、VSIG8-IL12Rβ2、TGFβRII-CD27、TGFβRII-CD28、TGFβRII-4-1BB、TGFβRII-ICOS、TGFβRII-IL12Rβ1及TGFβRII-IL12Rβ2；及/或

(g) 該顯性負受體為PD1、VSIG3、VSIG8或TGFβR顯性負受體；及/或

(h) 該跨膜域係：

(i) 選自選自由以下組成之群的蛋白質之跨膜域：CTLA4、PD-1、BTLA、TGFβRII、BTLA、TIM-3、CD28、4-1BB、IL12Rβ1、IL12Rβ2、CD2、ICOS及CD27；或

(ii) 選自與負信號相關之蛋白質之跨膜或與該負信號相關之蛋白質之跨膜域。

【請求項25】

如請求項17之方法：

(a) 其中擴增該經修飾免疫細胞包含用選自由以下組成之群的因子培養該T細胞：flt3-L、IL-1、IL-3、IL-2、IL-7、IL-15、IL-18、IL-21、TGFβ、IL-10及c-kit配位體；及/或

(b) 其進一步包含將多肽Klf4、Oct3/4及Sox2及/或編碼Klf4、Oct3/4及Sox2之核酸引入該免疫細胞中以誘導該免疫細胞之多能性；及/或

(c)　其中該免疫細胞係獲自血液樣品、全血樣品、周邊血液單核細胞(peripheral blood mononuclear cell；PBMC)樣品或血球分離術樣品；及/或

(d)　其中該免疫細胞係獲自血球分離術樣品且另外其中該血球分離術樣品為冷凍保存之樣品；及/或

(e)　其中該免疫細胞係獲自血球分離術樣品且另外其中該血球分離術樣品為新製樣品；及/或

(f)　其中該免疫細胞係獲自人類個體。

【請求項26】

一種經修飾免疫細胞群，其係獲自如請求項17至25中任一項之方法。

【請求項27】

一種組合物，其包含如請求項1至16中任一項之經修飾免疫細胞或經修飾T細胞及醫藥學上可接受之載劑或賦形劑。

【請求項28】

一種組合物，其包含如請求項26之經修飾免疫細胞群及醫藥學上可接受之載劑或賦形劑。

【請求項29】

一種治療個體中與增強的免疫相關之疾病或病況的方法，其包含向有需要之個體投與有效量之如請求項27之組合物。

【請求項30】

如請求項29之方法，其中：

(a)　該病況為癌症；及/或

(b)　該病況為癌症且另外其中該癌症係選自由以下組成之群：乳癌、前列腺癌、卵巢癌、子宮頸癌、皮膚癌、胰臟癌、大腸直腸癌、腎癌、肝癌、腦癌、淋巴瘤、白血病、肺癌及其任何組合；及/或

(c)　該病況為癌症且另外其中該癌症為實體腫瘤或血液惡性腫瘤。

【請求項31】

一種治療個體中與增強的免疫相關之疾病或病況的方法，其包含向有需要之個體投與有效量之如請求項28之組合物。

【請求項32】

如請求項31之方法，其中：

(a)　該病況為癌症；及/或

(b)　該病況為癌症且另外其中該癌症係選自由以下組成之群：乳癌、前列腺癌、卵巢癌、子宮頸癌、皮膚癌、胰臟癌、大腸直腸癌、腎癌、肝癌、腦癌、淋巴瘤、白血病、肺癌及其任何組合；及/或

(c)　該病況為癌症且另外其中該癌症為實體腫瘤或血液惡性腫瘤。

【請求項33】

一種用於刺激個體中針對目標細胞或組織的T細胞介導之免疫反應的方法，其包含向個體投與有效量之如請求項27之組合物。

【請求項34】

一種用於刺激個體中針對目標細胞或組織的T細胞介導之免疫反應的方法，其包含向個體投與有效量之如請求項28之組合物。

【請求項35】

一種套組，其包含如請求項27之組合物，視情況該套組包含使用說明書。

【請求項36】

一種套組，其包含如請求項28之組合物，視情況該套組包含使用說明書。

# [發明圖式]


圖1
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

TCR α/β
KO效率%
(実施例2A)

S1
S2
S3
S4
S5
G1
G2
G3
G4
G5
(第23圖)

TCR/P
KO※※%

TCR4B
KO效率%
(pg/mL)

OM-EA
OM-CA
OM-DA
OM-FA
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1.0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
32
34
36
38
40
42
44
46
48
50
52
54
56
58
60
62
64
66
68
70
72
74
76
78
80
82
84
86
88
90
92
94
96
98
100
102
104
106
108
110
112
114
116
118
120
122
124
126
128
130
132
134
136
138
140
142
144
146
148
150
152
154
156
158
160
162
164
166
168
170
172
174
176
178
180
182
184
186
188
190
192
194
196
198
200
202
204
206
208
210
212
214
216
218
220
222
224
226
228
230
232
234
236
238
240
242
244
246
248
250
252
254
256
258
260
262
264
266
268
270
272
274
276
278
280
282
284
286
288
290
292
294
296
298
300
302
304
306
308
310
312
314
316
318
320
322
324
326
328
330
332
334
336
338
340
342
344
346
348
350
352
354
356
358
360
362
364
366
368
370
372
374
376
378
380
382
384
386
388
390
392
394
396
398
400
402
404
406
408
410
412
414
416
418
420
422
424
426
428
430
432
434
436
438
440
442
444
446
448
450
452
454
456
458
460
462
464
466
468
470
472
474
476
478
480
482
484
486
488
490
492
494
496
498
500
502
504
506
508
510
512
514
516
518
520
522
524
526
528
530
532
534
536
538
540
542
544
546
548
550
552
554
556
558
560
562
564
566
568
570
572
574
576
578
580
582
584
586
588
590
592
594
596
598
600
602
604
606
608
610
612
614
616
618
620
622
624
626
628
630
632
634
636
638
640
642
644
646
648
650
652
654
656
658
660
662
664
666
668
670
672
674
676
678
680
682
684
686
688
690
692
694
696
698
700
702
704
706
708
710
712
714
716
718
720
722
724
726
728
730
732
734
736
738
740
742
744
746
748
750
752
754
756
758
760
762
764
766
768
770
772
774
776
778
780
782
784
786
788
790
792
794
796
798
800
802
804
806
808
810
812
814
816
818
820
822
824
826
828
830
832
834
836
838
840
842
844
846
848
850
852
854
856
858
860
862
864
866
868
870
872
874
876
878
880
882
884
886
888
890
892
894
896
898
900
902
904
906
908
910
912
914
916
918
920
922
924
926
928
930
932
934
936
938
940
942
944
946
948
950
952
954
956
958
960
962
964
966
968
970
972
974
976
978
980
982
984
986
988
990
992
994
996
998
1000

CDS
CDS

CD3
CD3
SVIA CAR
SVIA CAR
EVACRO
EVACRO
EVACRO
EVACRO

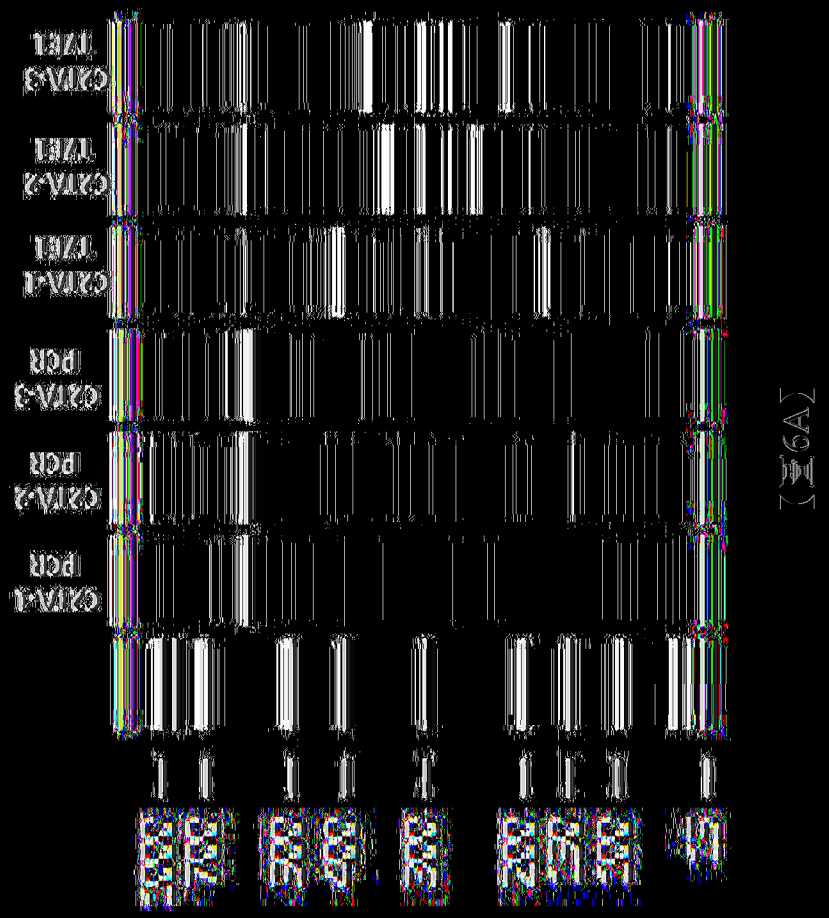

C21A-1 PCR
C21A-2 PCR
C21A-3 PCR
C21A-1 TZE1
C21A-2 TZE1
C21A-3 TZE1

圖 6A

(圖1)

C1
C2
C3
C4
C5
C6
C7
C8
C9
C10
C11
C12
C13
C14
C15
C16
C17
C18
C19
C20
C21
C22
C23
C24
C25
C26
C27
C28
C29
C30
C31
C32
C33
C34
C35
C36
C37
C38
C39
C40
C41

(C圖)

[圖1]

Cycaseas
[Bi]与(第2层)
第2层
第1层
第2层
第1层
0
5
10
0.2
0.4
0.6
0.8