



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110753555 A

(43)申请公布日 2020.02.04

(21)申请号 201880038694.4

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限

(22)申请日 2018.04.19

公司 11227

(30)优先权数据

代理人 顾晋伟 刘振佳

62/487,248 2017.04.19 US

(51)Int.Cl.

A61K 38/20(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

C07K 14/54(2006.01)

2019.12.11

C07K 14/705(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

C07K 16/30(2006.01)

PCT/US2018/028418 2018.04.19

C12N 5/0783(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/195339 EN 2018.10.25

(71)申请人 得克萨斯州大学系统董事会

权利要求书4页 说明书50页

地址 美国得克萨斯州

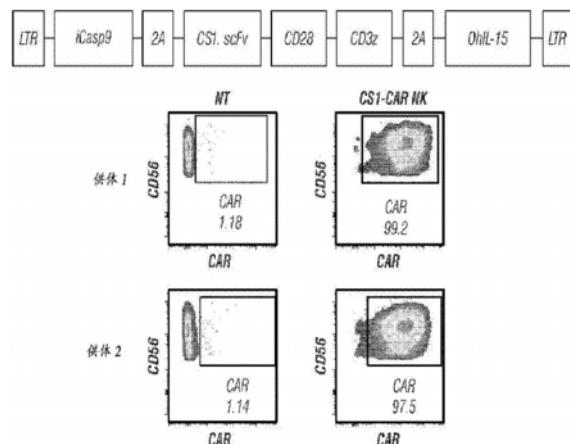
序列表2页 附图21页

(54)发明名称

表达工程化抗原受体的免疫细胞

(57)摘要

本文提供了表达抗原受体(诸如嵌合抗原受体和T细胞受体)的免疫细胞。本文还提供了通过施用抗原特异性免疫细胞来治疗免疫相关疾病的方法。



1. 一种经工程化以表达人IL-15 (hIL-15) 和至少两种抗原受体的免疫细胞, 其中所述至少两种抗原受体包含嵌合抗原受体 (CAR) 和/或T细胞受体 (TCR)。
2. 根据权利要求1所述的免疫细胞, 其中所述免疫细胞经工程化以表达hIL-15、所述CAR和所述TCR。
3. 根据权利要求1所述的免疫细胞, 其中所述免疫细胞经工程化以表达hIL-15和两种CAR。
4. 根据权利要求1所述的免疫细胞, 其中所述免疫细胞经工程化以表达hIL-15和两种TCR。
5. 根据权利要求1所述的免疫细胞, 其中所述免疫细胞经工程化以表达3种、4种或5种抗原受体。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的免疫细胞, 其中所述免疫细胞进一步限定为T细胞、外周血淋巴细胞、NK细胞、不变NK细胞、NKT细胞或干细胞。
7. 根据权利要求1至5中任一项所述的免疫细胞, 其中所述免疫细胞是T细胞。
8. 根据权利要求1至5中任一项所述的免疫细胞, 其中所述免疫细胞是NK细胞。
9. 根据权利要求6所述的免疫细胞, 其中所述干细胞是间充质干细胞 (MSC) 或诱导性多能干 (iPS) 细胞。
10. 根据权利要求1所述的免疫细胞, 其中所述免疫细胞源自iPS细胞。
11. 根据权利要求7所述的免疫细胞, 其中所述T细胞是CD8<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>T细胞或 $\gamma$ - $\delta$ T细胞。
12. 根据权利要求7所述的免疫细胞, 其中所述T细胞是细胞毒性T淋巴细胞 (CTL)。
13. 根据权利要求6所述的免疫细胞, 其中所述免疫细胞是同种异体的。
14. 根据权利要求6所述的免疫细胞, 其中所述免疫细胞是自体同源的。
15. 根据权利要求1至13中任一项所述的免疫细胞, 其中所述免疫细胞经工程化以表达一种或多种另外的细胞因子。
16. 根据权利要求15所述的免疫细胞, 其中所述一种或多种另外的细胞因子是IL-21和/或IL-2。
17. 根据权利要求1至13中任一项所述的免疫细胞, 其中所述免疫细胞经工程化以基本上不表达糖皮质激素受体、TGF $\beta$ 受体和/或CISH。
18. 根据权利要求17所述的免疫细胞, 其中使用一种或多种指导RNA和Cas9酶来对所述免疫细胞进行工程化。
19. 根据权利要求18所述的免疫细胞, 其中所述一种或多种指导RNA包含SEQ ID NO.1至SEQ ID NO.2。
20. 根据权利要求18所述的免疫细胞, 其中所述一种或多种指导RNA包含SEQ ID NO.3-4。
21. 根据权利要求17所述的免疫细胞, 其中所述TGF $\beta$ 受体进一步限定为TGF $\beta$ -RII。
22. 根据权利要求1至13中任一项所述的免疫细胞, 其中所述免疫细胞是从外周血、脐带血或骨髓分离的。
23. 根据权利要求1至13中任一项所述的免疫细胞, 其中所述免疫细胞是从脐带血分离的。

24. 根据权利要求23所述的免疫细胞,其中所述脐带血是从2个或更多个单独脐带血单元合并的。

25. 根据权利要求1至13中任一项所述的免疫细胞,其中所述免疫细胞还表达自杀基因。

26. 根据权利要求25所述的免疫细胞,其中所述自杀基因是CD20、CD52、EGFRv3或诱导型胱天蛋白酶9。

27. 根据权利要求25所述的免疫细胞,其中所述自杀基因是诱导型胱天蛋白酶9。

28. 根据权利要求1所述的免疫细胞,其中编码所述至少两种抗原受体的DNA被整合到所述细胞的基因组中。

29. 根据权利要求1所述的免疫细胞,其中编码所述CAR和/或TCR的DNA被整合到所述细胞的所述基因组中。

30. 根据权利要求1所述的免疫细胞,其中所述至少两种抗原受体包含选自由以下项组成的组的抗原结合区:F(ab')2、Fab'、Fab、Fv和scFv。

31. 根据权利要求30所述的免疫细胞,其中所述至少两种抗原受体的所述抗原结合区与一种或多种肿瘤相关抗原结合。

32. 根据权利要求31所述的免疫细胞,其中所述肿瘤相关抗原是CD19、CD319/CS1、ROR1、CD20、癌胚抗原、甲胎蛋白、CA-125、MUC-1、上皮肿瘤抗原、黑素瘤相关抗原、突变的p53、突变的ras、HER2/Neu、ERBB2、叶酸结合蛋白、HIV-1包膜糖蛋白gp120、HIV-1包膜糖蛋白gp41、GD2、CD123、CD23、CD30、CD56、c-Met、间皮素、GD3、HERV-K、IL-11Ra、 $\kappa$ 链、 $\lambda$ 链、CSPG4、ERBB2、WT-1、EGFRvIII、TRAIL/DR4和/或VEGFR2。

33. 根据权利要求30所述的免疫细胞,其中第一抗原受体的所述抗原结合区与第二抗原受体的所述抗原结合区不同。

34. 根据权利要求32所述的免疫细胞,其中所述第一抗原受体的所述抗原结合区与第一抗原结合,而所述第二抗原受体的所述抗原结合区与第二抗原结合。

35. 根据权利要求34所述的免疫细胞,其中所述第一抗原是EGFRvIII,而所述第二抗原是NY-ESO。

36. 根据权利要求34所述的免疫细胞,其中所述第一抗原是HER2/Neu,而所述第二抗原是MUC-1。

37. 根据权利要求34所述的免疫细胞,其中所述第一抗原是CA-125,而所述第二抗原是MUC-1。

38. 根据权利要求34所述的免疫细胞,其中所述第一抗原是CA-125,而所述第二抗原是WT-1。

39. 根据权利要求34所述的免疫细胞,其中所述第一抗原是EGFRvIII,而所述第二抗原是Mage-A3、Mage-A4或Mage-A10。

40. 根据权利要求34所述的免疫细胞,其中所述第一抗原是EGFRvIII,而所述第二抗原是TRAIL/DR4。

41. 根据权利要求34所述的免疫细胞,其中所述第一抗原是CEA-CAR,而所述第二抗原是Mage-A3-TCR、Mage-A4-TCR或Mage-A10。

42. 根据权利要求34所述的免疫细胞,其中所述第一抗原是HER2/Neu、CEA-CAR和/或

CA-125、EGFR $\text{vIII}$ ，而所述第二抗原是MUC-1、WT-1、TRAIL/DR4Mage-A3-TCR、Mage-A4-TCR和/或Mage-A10。

43. 根据权利要求1至13中任一项所述的免疫细胞，其中所述至少两种抗原受体包含一个或多个细胞内信号传导结构域。

44. 根据权利要求42所述的免疫细胞，其中所述一个或多个细胞内信号传导结构域是T淋巴细胞活化结构域。

45. 根据权利要求42所述的免疫细胞，其中所述一个或多个细胞内信号传导结构域包括CD3 $\xi$ 、CD28、OX40/CD134、4-1BB/CD137、Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ 、ICOS/CD278、ILRB/CD122、IL-2RG/CD132、DAP12、CD70、CD40或它们的组合。

46. 根据权利要求42所述的免疫细胞，其中所述一个或多个细胞内信号传导结构域包括CD3 $\xi$ 、CD28、4-1BB-L和/或DAP12。

47. 根据权利要求1所述的免疫细胞，其中所述至少两种抗原受体包含一个或多个跨膜结构域。

48. 根据权利要求47所述的免疫细胞，其中所述一个或多个跨膜结构域包括CD28跨膜结构域、IgG4Fc铰链、Fc区、CD4跨膜结构域、CD3 $\xi$ 跨膜结构域、半胱氨酸突变的人CD3 $\xi$ 结构域、CD16跨膜结构域、CD8跨膜结构域和/或促红细胞生成素受体跨膜结构域。

49. 一种药物组合物，所述药物组合物包含有效量的根据权利要求1至48中任一项所述的免疫细胞。

50. 一种组合物，所述组合物包含有效量的用于治疗受试者的免疫相关疾病的根据权利要求1至48中任一项所述的免疫细胞。

51. 组合物的用途，所述组合物包含有效量的用于治疗受试者的免疫相关疾病的根据权利要求1至48中任一项所述的免疫细胞。

52. 一种治疗受试者的免疫相关疾病的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求1至48中任一项所述的免疫细胞。

53. 根据权利要求52所述的方法，其中所述免疫相关疾病是癌症、自身免疫疾病、移植物抗宿主病、同种异体移植排斥或炎性病症。

54. 根据权利要求52所述的方法，其中所述免疫相关疾病是炎性病症，并且所述免疫细胞基本上不表达糖皮质激素受体。

55. 根据权利要求54所述的方法，其中所述受试者已经或正在接受类固醇疗法。

56. 根据权利要求52所述的方法，其中所述免疫细胞是自体同源的。

57. 根据权利要求52所述的方法，其中所述免疫细胞是同种异体的。

58. 根据权利要求52所述的方法，其中所述免疫相关疾病是癌症。

59. 根据权利要求58所述的方法，其中所述癌症是实体瘤或血液恶性肿瘤。

60. 根据权利要求58所述的方法，其中所述癌症是卵巢癌，并且所述免疫细胞对MUC-1、CA-125和/或WT-1具有抗原特异性。

61. 根据权利要求58所述的方法，其中所述癌症是肺癌，并且所述免疫细胞对NY-ESO、EGFR-vIII、Mage-A3、Mage-A4、Mage-A10和/或TRAIL/DR4具有抗原特异性。

62. 根据权利要求58所述的方法，其中所述癌症是胰腺癌或结肠癌，并且所述免疫细胞对Mage-A3、Mage-A4、Mage-A10和/或CEA具有抗原特异性。

63. 根据权利要求58所述的方法,其中所述癌症是乳腺癌,并且所述免疫细胞对MUC-1和HER2/Neu具有抗原特异性。

64. 根据权利要求58所述的方法,其中所述癌症是胶质母细胞瘤,并且所述免疫细胞对Mage-A3、Mage-A4、Mage-A10v和/或EGFRvIII具有抗原特异性。

65. 根据权利要求58所述的方法,其中所述癌症是肉瘤,并且所述免疫细胞对NY-ESO和EGFR-vIII具有抗原特异性。

66. 根据权利要求52所述的方法,所述方法进一步包括施用至少第二治疗剂。

67. 根据权利要求66所述的方法,其中所述至少第二治疗剂包括化学疗法、免疫疗法、手术、放射疗法或生物疗法。

68. 根据权利要求66所述的方法,其中所述免疫细胞和/或所述至少第二治疗剂是静脉内地、腹膜内地、气管内地、瘤内地、肌内地、经内窥镜地、病灶内地、经皮地、皮下地、区域性地或通过直接注射或灌注而施用的。

## 表达工程化抗原受体的免疫细胞

[0001] 本申请要求2017年4月19日提交的美国临时申请号62/487,248的优先权,两份申请的全部内容通过引用并入本申请。

[0002] 序列表的并入

[0003] 名为“UTFCP1321W0\_ST25.txt”的文件中包含序列表,此序列表为2Kb(在Microsoft Windows中测量),是在2018年4月18日创建的,通过电子提交方式提交,并通过引用并入本文。

### 技术领域

[0004] 本发明总的来说涉及免疫学和医学领域。更具体地说,它涉及在同一细胞类型中表达诸如嵌合抗原受体和T细胞受体的抗原受体的免疫细胞。

[0005] 相关技术说明

[0006] 尽管在诊断为癌症的患者中可用的诊断和治疗方法上有了技术进步,但预后仍然常常很差,许多患者无法治愈。免疫疗法有望为被诊断为各种肿瘤的患者提供一种有效但有针对性的治疗方法,有可能在不损害正常组织的情况下根除恶性肿瘤细胞。理论上,免疫系统的T细胞能够识别肿瘤细胞特有的蛋白图谱,并通过多种效应机制介导其破坏。过继性T细胞治疗是一种试图利用和增强患者自身T细胞的肿瘤根除能力,然后将这些效应器返回给患者,使其在不损害健康组织的情况下有效地消除残留肿瘤。虽然这一方法在肿瘤免疫学领域并不新鲜,但在临幊上应用过继性T细胞治疗的许多缺点妨碍了该方法在肿瘤治疗中的充分应用。

[0007] 利用自体或人类白细胞抗原(HLA)相合的异体供体细胞进行细胞治疗是一种很有前途的治疗包括癌症等多种疾病的方法和再生医学疗法。许多小组已经探索了通过将T细胞工程化以表达高亲和力人工TCR来重新定向T细胞抗原特异性的策略。然而,在T细胞中引入额外的TCR链可导致内源性TCR链和引入的TCR链之间形成混合二聚体,这有可能导致特异性和毒性未知的T细胞的产生。这大大限制了这一策略在临幊上的应用。因此,有必要开发改进的用于过继细胞治疗的工程免疫细胞方法,该方法具有增强的特异性以及肿瘤的双重靶向性。

### 发明内容

[0008] 在第一实施方案中,本公开提供了一种经工程化以表达人IL-15(hIL-15)的免疫细胞和至少两种抗原受体,其中所述至少两种抗原受体包括嵌合抗原受体(CAR)和/或T细胞受体(TCR)。在一个实施方案中,提供了一种免疫细胞,其被工程化以表达CAR、TCR和hIL-15。在另一实施方案中,提供了一种免疫细胞,其被工程化以表达hIL-15和两个CAR。在又一实施方案中,提供了一种免疫细胞,其被工程化以表达hIL-15和两个TCR。在再一实施方案中,提供了一种免疫细胞,其被工程化以表达3、4、5或更多抗原受体。在一些方面,所述免疫细胞是异体的。在某些方面,所述免疫细胞是自体的。

[0009] 在一些方面,所述免疫细胞进一步定义为T细胞、外周血淋巴细胞、NK细胞、非变异

NK细胞、NKT细胞或干细胞。在某些方面,所述干细胞是间充质干细胞(MSC)或诱导的多能干(iPS)细胞。在一些方面,所述免疫细胞源自多能干细胞。在特定方面,所述T细胞是CD8<sup>+</sup> T细胞、CD4<sup>+</sup> T细胞或 $\gamma$ - $\delta$ T细胞。在一个特定方面,所述T细胞是细胞毒性T淋巴细胞(CTL)。在特定方面,所述免疫细胞是T细胞或NK细胞。

[0010] 在某些方面,所述免疫细胞被工程化以表达一种或多种额外的细胞因子。在特定方面,所述一种或多种额外的细胞因子是IL-21和/或IL-2。

[0011] 在其他方面,所述免疫细胞被工程化成基本上不表达糖皮质激素受体、TGF $\beta$ 受体和/或CISH。在一些方面,所述免疫细胞是使用一种或多种向导RNA和Cas9酶来工程化的。在特定方面,所述一种或多种向导RNA包括SEQ ID N0s:1-2,以便沉默GR。在特定方面,所述一种或多种向导RNA包括SEQ ID N0s:3-4,以便沉默TGF $\beta$ 。在一些方面,所述一种或多种向导RNA包括SEQ ID N0s:1-4,以便靶向GR和TGF $\beta$ 。在特定方面,所述TGF $\beta$ 受体被进一步定义为TGF $\beta$ -RII。

[0012] 在一些方面,所述免疫细胞是从外周血、脐带血或骨髓中分离出来的。在特定方面,所述免疫细胞是从诸如从两个或两个以上的脐带血单位中汇集而成的脐带血中分离出来的。

[0013] 在进一步的方面,所述免疫细胞进一步表达自杀基因。在某些方面,所述自杀基因是CD20、CD52、EGFRv3或诱导型caspase 9。在特定方面,所述自杀基因是诱导型caspase 9。

[0014] 在一些方面,诸如CAR和/或TCR的所述至少两种抗原受体包含选自F(ab')2、Fab'、Fab、Fv和scFv的抗原结合区。在某些方面,诸如CAR和/或TCR的所述至少两种抗原受体的所述抗原结合区结合一种或多种肿瘤相关抗原。在特定方面,所述肿瘤相关抗原为CD19、CD319/CS1、ROR1、CD20、癌胚抗原、甲胎蛋白、CA-125、MUC-1、上皮性肿瘤抗原、黑色素瘤相关抗原、突变的p53、突变的ras、HER2/Neu、ERBB2、叶酸结合蛋白、HIV-1包膜糖蛋白gp120、HIV-1包膜糖蛋白gp41、GD2、CD123、CD23、CD30、CD56、c-Met、间皮素、GD3、HERV-K、IL-11Ra、 $\kappa$ 链、 $\lambda$ 链、CSPG4、ERBB2、WT-1、EGFRvIII、TRAIL/DR4和/或VEGFR2。在某些方面,诸如CAR的第一抗原受体的抗原结合区不同于诸如TCR的第二抗原受体的抗原结合区。在一些方面,诸如CAR的第一抗原受体的抗原结合区与第一抗原结合,而诸如TCR的第二抗原受体的抗原结合区与第二抗原结合。在特定方面,所述第一抗原为EGFRvIII,而所述第二抗原为NY-ESO。在其他方面,所述第一抗原为HER2/Neu,而所述第二抗原为MUC-1。在一些方面,所述第一抗原为CA-125,而所述第二抗原为MUC-1。在某些方面,所述第一抗原为CA-125,所述第二抗原为WT-1。在一些方面,所述第一抗原为EGFRvIII,而所述第二抗原为Mage-A3、Mage-A4或Mage-A10。在特定方面,所述第一抗原为EGFRvIII,而所述第二抗原为TRAIL/DR4。在某些方面,所述第一抗原为CEA-CAR,而所述第二抗原为Mage-A3-TCR、Mage-A4-TCR或Mage-A10。在一些方面,所述第一抗原为HER2/Neu、CEA-CAR和/或CA-125、EGFRvIII,而所述第二抗原为MUC-1、WT-1、TRAIL/DR4 Mage-A3-TCR、Mage-A4-TCR和/或Mage-A10。

[0015] 在一些方面,诸如CAR和/或TCR的所述至少两种抗原受体包含一种或多种细胞内信号结构域。在特定方面,所述一种或多种细胞内信号结构域是T淋巴细胞活化结构域。在一些方面,所述一种或多种细胞内信号结构域包括CD3 $\xi$ 、CD28、OX40/CD134、4-1BB/CD137、Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ 、ICOS/CD278、ILRB/CD122、IL-2RG/CD132、DAP12、CD70、CD40或其组合。在一些方面,所述一种或多种细胞内信号结构域包括CD3 $\xi$ 、CD28、4-1BB-L和/或DAP12。在特定方面,

诸如CAR和/或TCR的所述至少两种抗原受体包含一种或多种跨膜结构域。在一些方面,所述一种或多种跨膜结构域包括CD28跨膜结构域、IgG4Fc铰链、Fc区、CD4跨膜结构域、CD3ξ跨膜结构域、半胱氨酸突变人CD3ξ结构域、CD16跨膜结构域、CD8跨膜结构域和/或促红细胞生成素受体跨膜结构域。在一些方面,编码诸如CAR和/或TCR的所述至少两种抗原受体的DNA被整合到细胞基因组中。

[0016] 另一实施方案提供包含所述实施方案的有效量的免疫细胞(例如,表达诸如CAR和/或TCR的至少两种抗原受体)的药物组合物。在另一实施方案中,提供了一种成分,其包含用于治疗受试者中的免疫相关疾病的实施方案的有效量的免疫细胞(例如,表达诸如CAR和/或TCR的至少两种抗原受体)。在另一实施方案中,提供了一种治疗受试者中的免疫相关疾病的方法,所述方法包括向受试者给予实施方案的有效量的免疫细胞(例如,表达诸如CAR和/或TCR的至少两种抗原受体)。

[0017] 在一些方面,所述免疫相关疾病是癌症、自身免疫性疾病、移植物抗宿主病、移植物排斥反应或炎症性疾病。在某些方面,所述免疫相关疾病是一种炎症状态,所述免疫细胞基本上没有糖皮质激素受体的表达。在一些方面,所述受试者已经或正在接受类固醇治疗。在一些方面,所述免疫细胞是自体的。在某些方面,所述免疫细胞是异体的。

[0018] 在某些方面,所述免疫相关疾病是癌症。在特定方面,所述癌症是实体癌或血液恶性肿瘤。在一些方面,所述癌症是卵巢癌,且所述免疫细胞对MUC-1、CA-125和/或WT-1具有抗原特异性。在某些方面,所述癌症是肺癌,且所述免疫细胞对NY-ESO、EGFR-vIII、Mage-A3、Mage-A4、Mage-A10和/或TRAIL/DR4具有抗原特异性。在特定方面,所述癌症是胰腺癌或结肠癌,且所述免疫细胞对Mage-A3、Mage-A4、Mage-A10和/或CEA具有抗原特异性。在一些方面,所述癌症是乳腺癌,且所述免疫细胞对MUC-1和HER2/Neu具有抗原特异性。在某些方面,所述癌症是胶质母细胞瘤,且所述免疫细胞对Mage-A3、Mage-A4、Mage-A10v和/或EGFRvIII具有抗原特异性。在一些方面,所述癌症是肉瘤,且所述免疫细胞对NY-ESO和EGFR-vIII具有抗原特异性。

[0019] 在其他方面,所述方法还包括给予至少第二治疗剂。在一些方面,所述至少第二治疗剂包括化学疗法、免疫疗法、手术、放射疗法或生物疗法。在某些方面,所述免疫细胞和/或至少第二治疗剂是静脉内地、腹膜内地、气管内地、瘤内地、肌内地、经内窥镜地、病灶内地、经皮地、皮下地、区域性地或通过直接注射或灌注而施用的。

[0020] 通过下面详细的描述,本发明的其他目的、特点和优点将会变得显而易见。然而应当理解,这些详细说明和特定的实施例在指示本发明的优选实施方案时,只是用于示范,因为根据此详细说明,在本发明的精神和范围内的各种变化和改进对于本领域技术人员将显而易见。

[0021] 附图简要说明

[0022] 以下附图构成本说明书的一部分并被包括,以进一步说明本发明的某些方面。通过参考一个或多个附图,并结合此处给出的具体实施方式的描述,可以更好地理解本发明。

[0023] 图1A-1C:CS1 CAR在脐带血NK细胞中的转导效率。(图1A)流式细胞术检测来自两个不同供体的NK细胞的CAR的表达。(图1B) iC9/CAR.CS1/IL-15转导的NK细胞对表达CS1的骨髓瘤细胞系有较好的杀伤作用。(图1C) iC9/CAR.CS1/IL-15转导的NK细胞对表达CS1的骨髓瘤细胞系产生更多的效应细胞因子。

- [0024] 图2A-2B: IL-15增强NK-CAR介导的肿瘤杀伤作用(图2A)并延长存活时间(图2B)。
- [0025] 图3:造血细胞中基于PCR的糖皮质激素受体(GR)敲除的筛选。
- [0026] 图4A-4B:NK细胞对地塞米松的杀伤反应敏感。图4A)地塞米松处理4小时后,来自3个不同供体的NK细胞显示膜联蛋白V的表达。(图4B)地塞米松处理24小时后,来自3个不同供体的NK细胞显示膜联蛋白V的表达。500μM地塞米松处理24小时后,所有细胞死亡。
- [0027] 图5:CAR NK细胞中GR敲除对地塞米松的杀伤有保护作用。用200μM地塞米松处理12小时后,CAR NK的膜联蛋白V染色控制细胞或GR敲除的细胞。
- [0028] 图6A-6C:TFGβCRISPR介导的敲除使CAR NK细胞对外源性TGFβ的免疫抑制作用产生抗性。(图6A)利用CRISPR/CAS9技术成功敲除TGFβ-RII (Cas9加TGFβ-RII的外显子3的gRNA靶向)。(图6B)用10ng/ml重组TGF-β处理野生型和TGF-β-RII敲除NK细胞48小时,评估它们对K562靶点的反应。TGF-β-RII敲除NK细胞对外源性TGF-β的免疫抑制作用产生抗性。(图6C)与单独用CAS9处理的NK细胞相比,通过CRISPR/CAS9技术敲除TGFβ-RII可消除响应于10ng/ml重组TGF-β的下游Smad-2/3磷酸化反应。
- [0029] 图7A-7D: (图7A)描述具有两个CAR和hIL-15表达的诸如NK细胞的免疫细胞的示意图。(图7B)描述具有CAR、TCR和hIL-15表达的诸如NK细胞的免疫细胞的示意图。(图7C)描述具有两个TCR和hIL-15表达的诸如NK细胞的免疫细胞的示意图。(图7D)表达CAR-CAR、TCR-CAR或TCR-TCR和hIL-15的构建体的示意图。

## 具体实施方式

- [0030] 本公开通过提供抗原特异性免疫细胞(例如T细胞和NK细胞)用于免疫治疗,例如用于治疗包括癌症和自身免疫性疾病的免疫相关疾病以及包括但不限于诸如CMV、EBV和HIV的病毒感染,克服了与当前技术相关的问题。在一个实施方案中,本公开提供了表达一种或多种T细胞受体(TCR)的NK细胞。与传统的抗体导向靶抗原相比,所述TCR识别的抗原可以包括整个潜在的细胞内蛋白质阵列,这些蛋白质作为肽/MHC复合物被加工并传递到细胞表面。由于NK细胞不表达内源性TCR,在NK细胞中引入高亲和力TCR可导致其抗原特异性的重新定向,而不具有产生与表达外源性和内源性TCR的T细胞一样的混合二聚体的风险。为了在NK细胞中产生功能最佳的更有效的受体,所述受体可能具有共刺激结构域(包括但不限于CD28、41BB配体、DAP12、DAP10或其任何组合)以及载体中的Cd3ζ信号结构域(图7D)。因此,本公开还提供了将NK细胞免疫疗法应用于源自通常仅由T细胞识别的肿瘤和病原体的靶抗原的方法。此外,与T细胞不同,来自异体的NK细胞不会增加诱发移植物抗宿主病的风险;因此,将异体的NK细胞与TCR结合使用为过继治疗提供了TCR工程化NK细胞的潜在来源。
- [0031] 此外,本公开还提供诸如NK细胞和T细胞的免疫细胞,所述免疫细胞包含诸如CAR和TCR的组合、两个CAR或两个TCR的至少两个抗原受体,用于肿瘤的双重靶向。这种将多个抗原受体(如TCR和CAR)同时放入单个细胞类型的方法允许使用两种完全不同的抗原识别机制(包括通过CAR的表面抗原识别和通过TCR的肽/MHC复合物识别)来靶向两种或更多种抗原。为了增强NK细胞在体内的持久性,这些细胞可能被工程化以表达IL-15。因此,所述细胞可以表达两个CAR,一个CAR+一个TCR,两个TCR,或者CAR和TCR的任何组合,它们可以进一步表达IL-15或其他细胞因子。这种方法还可以减少抗原阴性肿瘤逃逸的风险。所述免疫细胞可以源自多种来源,包括外周血、脐带血、骨髓、干细胞、诱导多能干细胞(iPSC细胞)和诸

如但不限于NK-92细胞系的NK细胞系。

[0032] 进一步的实施方案涉及通过基因编辑来靶向糖皮质激素受体 (GR)、TGF $\beta$ 受体2 (TGF $\beta$ RII) 和/或免疫检查点基因CISH, 以增强诸如CAR和/或TCR工程化免疫细胞的效力。特别是靶向GR使免疫细胞对皮质类固醇的淋巴细胞毒性产生抵抗, 靶向TGF $\beta$ RII使免疫细胞对免疫抑制肿瘤微环境产生抵抗。例如, 利用CRISPR-CAS系统或其他诸如TALEN或锌指核酸酶的基因编辑系统可以将免疫细胞工程化成抗类固醇和/或抗TGF $\beta$ 。

[0033] 此外, 本公开中使用的抗原受体可包含IL15, 例如人IL-15, 或包括但不限于IL-21或IL-2的其他支持性细胞因子。抗原受体构建体 (TCR或CAR) 可进一步包括诸如CD3 $\zeta$ 、4-1BB-L、DAP12、DAP10或其他共刺激分子的共刺激分子。虽然本公开的免疫细胞可针对任何抗原组合, 但针对CAR和/或TCR的示例性抗原包括但不限于CS1、BCMA、CD38、CD19、CD123、CD33、CD99、CLL1、CD5、CD7、间皮素和ROR1。在特定方面, 所述免疫细胞双重靶向于抗原组合, 所述抗原组合包括针对EBNA肽的CD19-CAR和TCR (例如, 针对EBV淋巴瘤); WT1和CD123 (例如, 针对髓系恶性肿瘤 (例如, AML、MDS、CML)) 的治疗; NY-ESOTCR加上EGFRvIII-NK-CAR (例如, 针对肉瘤和肺癌); Muc-1-TCR和Her-2-neu-NK-CAR (例如, 针对乳腺癌); Muc-1-TCR和CA-125-NK-CAR (例如, 针对卵巢癌); WT1-TCR和CA-125-NK-CAR (例如, 针对卵巢癌); Mage-A3-TCR、Mage-A4-TCR或Mage-A10-TCR加上EGFRVII-NK-CAR (例如, 针对肺癌和胶质母细胞瘤); TRAIL/DR4-TCR加上EGFRv3-CAR (例如, 针对肺癌); 以及Mage-A3-TCR、Mage-A4-TCR或Mage-A10-TCR加上CEA-CAR (例如, 针对结肠癌和胰腺癌)。

[0034] 在进一步的实施方案中, 免疫细胞, 特别是NK细胞, 通过携带两个CAR (例如CD99和CD33, 或CD123和CD33, 或CD19和ROR1, 或CD38和BCMA或CS1或其他组合) 提供对免疫细胞和IL-15或其他细胞因子的双重特异性, 以增强它们在体内的持久性。这种方法通过限制非靶向毒性提高了NK-CAR的特异性, 使得只有当两种抗原都在肿瘤上表达时, 才会给NK细胞一个杀死的信号, 同时增强了体内的增殖和持久性。因此, 只表达一种抗原的正常细胞将不会成为靶标。此策略适用于任何免疫细胞子集, 包括但不限于NK细胞、T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞和iNKT细胞。

[0035] 过继性癌症免疫治疗中诸如NK细胞和T细胞的免疫细胞的基因重编程具有临床相关的应用和益处, 例如, 1) 先天性抗肿瘤监测, 无需事先致敏, 2) NK细胞无移植物抗宿主反应的异体疗效, 以及3) 靶肿瘤细胞直接介导的细胞毒性和细胞溶解。因此, 本公开还提供治疗诸如癌症等免疫相关疾病的方法, 包括使用本文提供的任何工程化免疫细胞进行过继细胞免疫治疗。

[0036] I. 定义

[0037] 如本文中所使用的, 就特定组分而言, “基本上不含”在本文中被用于表示未将任何特定组分故意配制成组合物和/或仅作为污染物或微量存在。因此, 由组合物的任何意外污染而产生的特定组分的总量远低于0.05%, 优选低于0.01%。最优选的是使用标准分析方法无法检测特定组分的组合物。

[0038] 如本说明书所使用的, “a”或“an”可指一个或多个。如在一个或多个权利要求中所使用的, 当与“包含”一词一起使用时, “a”或“an”可指一个或多个。

[0039] 尽管本公开支持仅提及替代品和“和/或”的定义, 在权利要求书中使用的术语“或”是指“和/或”, 除非明确指出仅提及替代品或替代品相互排斥。如本文中所使用的“另

一个”可表示至少第二个或更多。

[0040] 在整个应用中,术语“关于”用于指示包括装置的固有误差变化、用于确定值的方法或研究对象之间存在的变化的值。

[0041] 当用于细胞或有机体中的蛋白质、基因、核酸或多核苷酸时,术语“外源性”指通过人工或自然手段引入细胞或生物体的蛋白质、基因、核酸或多核苷酸;或用于细胞时,该术语指通过人工或自然手段分离并随后引入其他细胞或生物体的细胞。外源核酸可以来自不同的生物体或细胞,也可以是生物体或细胞内自然产生的核酸的一个或多个额外的拷贝。外源细胞可能来自不同的生物体,也可能来自同一生物体。作为一个非限制性的例子,外源核酸是一种位于不同于它在自然细胞中的染色体位置的核酸,或者以其他方式侧接不同于在自然中发现的核酸序列。

[0042] “表达构建体”或“表达盒”是指能够指导转录的核酸分子。一种表达构建体至少包括一个或多个转录控制元件(例如启动子、增强子或其功能等同的结构),其在一个或多个期望的细胞类型、组织或器官中指导基因表达。还可以包括诸如转录终止信号之类的额外元件。

[0043] “载体”或“构建物”(有时称为基因传递系统或基因转移“载体”)是指包括在体外或体内被传递给宿主细胞的多核苷酸的大分子或分子复合物。

[0044] “质粒”是一种常见的载体类型,是从染色体DNA中分离出来的能够独立于染色体DNA进行复制的染色体外的DNA分子。在某些情况下,它是环状双链。

[0045] “复制起点”(“ori”或“origin of replication”或“replication origin”)是诸如在淋巴疱疹病毒中的DNA序列,当存在于细胞中的质粒中时,该DNA序列能够维持质粒和/或DNA合成开始处或附近的位点中的连接序列。例如,EBV(Ebstein-Barr病毒)的ori包括FR序列(30bp重复序列的20个不完全拷贝),以及优选DS序列;然而,EBV中的其他位点结合EBNA-1,例如Rep\*序列可以代替DS作为复制起点(Kirshmaier和Sugden,1998)。因此,EBV的复制起点包括FR、DS或Rep\*序列或通过核酸修饰或由此衍生的合成组合的任何功能等同的序列。例如,本公开的方法还可以使用EBV的诸如通过插入或突变单个元件的基因工程化复制起点。

[0046] “编码”特定蛋白质的“基因”、“多核苷酸”、“编码区”、“序列”、“区段”、“片段”或“转基因”是一种核酸分子,当置于适当的调节序列的控制下时,该核酸分子在体外或体内转录并选择性地翻译成基因产物,例如多肽。所述编码区可能以cDNA、基因组DNA或RNA形式存在。当以DNA形式存在时,所述核酸分子可以是单链(即有义链)或双链。编码区的边界由5'(氨基)末端的起始密码子和3'(羧基)末端的翻译终止密码子决定。基因可以包括但不限于来自原核或真核mRNA的cDNA、来自原核或真核DNA的基因组DNA序列以及合成DNA序列。转录终止序列通常位于基因序列的3'处。

[0047] 术语“控制元件”统称为启动子区域、多聚腺苷酸化信号、转录终止序列、上游调节域、复制起点、内部核糖体进入位点(IRES)、增强子、剪接点等,它们共同提供编码序列在受体细胞中的复制、转录、转录后处理和翻译。只要选定的编码序列能够在适当的宿主细胞中被复制、转录和翻译,就不需要存在所有这些控制元件。

[0048] 术语“启动子”在本文中的一般意义是指包含DNA调节序列的核苷酸区域,其中,所述调节序列源自能够结合RNA聚合酶并启动下游(3'方向)编码序列转录的基因。它可能包

含调节蛋白和分子可以在其中结合的基因元件,例如RNA聚合酶和其他转录因子,以启动核酸序列的特异转录。术语“操作定位”、“操作连接”、“受控”和“转录控制”意味着启动子相对于核酸序列处于正确的功能定位和/或定向,以控制转录起始和/或那个序列的表达。

[0049] “增强子”是指一个核酸序列,当它靠近启动子时,在没有增强子结构域的情况下,相对于由启动子产生的转录活性,其赋予了增加的转录活性。

[0050] 关于核酸分子“可操作地连接”或“共表达”是指两个或多个核酸分子(例如,要转录的核酸分子、启动子和增强子元件)以允许所述核酸分子转录的方式连接。关于肽和/或多肽分子“可操作地连接”或“共表达”是指两个或多个肽和/或多肽分子以产生单个多肽链的方式连接,即具有每个肽的至少一种性质的融合多肽和/或融合的多肽组分。所述融合多肽优选是嵌合的,即由异源分子组成。

[0051] “同源性”是指两个多核苷酸或两个多肽之间的同源性百分比。一个序列和另一个序列之间的对应关系可以由本领域已知的技术来确定。例如,同源性可以通过比较序列信息并使用现成的计算机程序来直接比较两个多肽分子之间的序列信息来确定。或者,可以通过在促进同源区域之间形成稳定双链体的条件下杂交多核苷酸来确定同源性,然后用单链特异核酸酶进行消化,并确定消化片段的大小。如用上述方法所测定的,当至少约80%、优选至少约90%、最优选至少约95%的核苷酸或氨基酸分别在分子的限定长度上匹配时,两个DNA或两个多肽序列彼此“基本上同源”。

[0052] 在此,术语“细胞”在本领域最广泛的意义上使用,是指作为多细胞生物体组织的结构单元并被将其与外界隔离的膜结构包围的活体,所述细胞具有自我复制能力,有遗传信息和表达该遗传信息的机制。此处使用的细胞可以是天然存在的细胞或人工修饰的细胞(例如,融合细胞、基因修饰的细胞等)。

[0053] 术语“干细胞”在此指的是在适当条件下能够分化成各种分化细胞类型的细胞,而在其他适当条件下能够自我更新并保持基本上未分化的多能状态的细胞。术语“干细胞”还包括多能(pluripotent或multipotent)细胞、前体细胞和祖细胞。可从自骨髓组织获得的造血干细胞或间充质干细胞、自胚胎组织获得的胚胎干细胞或自胎儿生殖组织获得的胚胎生殖细胞中获得示例性人干细胞。通过表达与多能性相关的某些转录因子,将体细胞重编程到多能状态,也可以从体细胞中产生示例性多能干细胞;这些细胞被称为“诱导多能干细胞”或“iPSCs或iPS细胞”。

[0054] “胚胎干细胞”是指从早期胚胎中获得的诸如囊胚期的内细胞团的未分化多能干细胞,或通过人工手段(例如,核移植)产生,并能在胚胎或成人中产生的包括生殖细胞(例如,精子和卵子)的任何分化的细胞类型。

[0055] “诱导多能干细胞(iPSCs或iPS细胞)”是通过表达或诱导表达多种因子(以下称为重编程因子)对体细胞进行重编程而产生的细胞。iPS细胞可以由胎儿、产后、新生儿、幼年或成年体细胞产生。在某些实施方案中,可用于将体细胞重新编程为多能干细胞的因子包括,例如,Oct4(有时称为Oct 3/4)、Sox2、c-Myc、Klf4、Nanog和Lin28。在一些实施方案中,通过表达至少两个重编程因子、至少三个重编程因子、至少四个重编程因子、至少五个重编程因子、至少六个重编程因子或至少七个重编程因子来重编程体细胞,以将体细胞重编程为多能干细胞。

[0056] “造血祖细胞”或“造血前体细胞”是指致力于造血谱系但能进一步造血分化的细

胞,并且包括造血干细胞、多能造血干细胞、普通骨髓祖细胞、巨核祖细胞、红细胞祖细胞和淋巴祖细胞。造血干细胞(HSC)是一种多能干细胞,能产生所有类型的血细胞,包括髓细胞(单核细胞和巨噬细胞、粒细胞(中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞和肥大细胞)、红细胞、巨核细胞/血小板、树突状细胞),以及淋巴系(T细胞、B细胞、NK细胞)(参见例如Doulatov等人,2012;Notta等人,2015)。“多淋巴祖细胞”(MLP)被定义为产生所有淋巴系(B、T和NK细胞)但可能具有或不具有其他(髓系)潜能的任何祖细胞(Doulatov等人,2010),并且是CD45RA<sup>+</sup>、/CD10<sup>+</sup>/CD7<sup>-</sup>。任何B、T和NK祖细胞都可以被称为MLP。“普通骨髓祖细胞”(CMP)是指CD45RA<sup>-</sup>/CD135<sup>+</sup>/CD10<sup>-</sup>/CD7<sup>-</sup>细胞,可产生粒细胞、单核细胞、巨核细胞和红细胞。

[0057] “多能干细胞”是指具有分化为构成一个或多个组织或器官或优选内胚层(胃内层、胃肠道、肺)、中胚层(肌肉、骨、血液、泌尿生殖系统)或外胚层(表皮组织和神经系统)等三个胚层中的任何一个的所有细胞的潜能的干细胞。

[0058] 如本文所使用的,术语“体细胞”是指除诸如卵子、精子等生殖细胞以外的任何细胞,其不直接将其DNA转移到下一代。通常,体细胞具有有限的或没有多能性。本文中使用的体细胞可以是天然存在的,也可以是基因修饰的。

[0059] “程序化”是改变细胞所能产生的子代类型的过程。例如,当一个细胞被改变时,它已经被程序化,这样它就可以在培养物或体内形成至少一种新细胞类型的子代,而在相同的条件下,它不需要程序化就可以形成。这意味着,在充分增殖后,如果在程序化之前基本上不能形成这样的子代,则观察到具有新细胞类型的表型特征的子代的可测量比例;或者,具有新细胞类型特征的可测量比例大于程序化之前。这一过程包括分化、去分化和转分化。

[0060] “分化”是一个分化少的细胞变成更分化细胞类型的过程。“去分化”是一个细胞过程,在这个过程中,一个部分或最终分化的细胞恢复到早期的诸如多能性(pluripotency或multipotency)的发育阶段。“转分化”是将一种分化细胞类型转化为另一种分化细胞类型的过程。典型地,通过程序化的转分化发生时,细胞没有经过一个中间多能期,即细胞直接从一种分化细胞类型程序化到另一种分化细胞类型。在某些条件下,具有新细胞类型特征的子代比例可能至少为约1%、5%、25%或更多,以增加偏好。

[0061] 如本文所使用的,术语“受试者”或“有需要的受试者”是指在任何年龄需要细胞或组织移植的哺乳动物,优选人、男性或女性。通常,受试者由于疾病或病理或不希望的情况、状态或综合征,或可通过细胞或组织移植治疗的身体、形态或生理上的异常,需要进行细胞或组织移植(这里也称为受体)。

[0062] 如本文所使用的,基因的“破坏”或“改变”是指与没有改变的基因产物的表达水平相比,受试者基因在细胞中编码的一个或多个基因产物的表达被消除或减少。示例性基因产物包括由该基因编码的mRNA和蛋白质产物。改变在某些情况下是暂时的或可逆的,在其他情况下是永久的。在某些情况下,尽管可能产生截短或非功能性产物,改变是功能性的或全长蛋白质或mRNA。在这里的一些实施方案中,与表达相反的基因活性或功能被破坏。基因改变通常由人工方法在诸如DNA水平上引起,即通过添加或引入化合物、分子、复合物或组合物,和/或通过改变基因的核酸或与之相关联的核酸。基因改变的示例性方法包括诸如基因编辑的基因沉默、敲低、敲除和/或基因改变技术。例子包括诸如RNAi、siRNA、shRNA和/或核酸酶的通常导致瞬时表达减少的反义技术,以及通过例如诱导断裂和/或同源重组导致靶向基因失活或改变的基因编辑技术。例子包括插入、突变和删除。这些改变通常导致基因

编码的正常或“野生型”产品的表达抑制和/或完全不表达。这些基因改变的示例是插入、移码和错义突变、缺失、敲入和基因或部分基因的敲除，包括整个基因的缺失。这些改变可以发生在诸如一个或多个外显子的编码区域中，通过诸如插入终止密码子，导致无法产生全长产物、功能产物或任何产物。这些改变也可以通过启动子、增强子或其他影响转录激活的区域的改变来发生，从而阻止基因的转录。基因改变包括包含同源重组的靶向基因失活的基因靶向。

[0063] “免疫疾病”、“免疫相关疾病”或“免疫介导的疾病”是指免疫应答在疾病发展或进展中起关键作用的疾病。免疫介导的疾病包括自身免疫性疾病、移植排斥反应、移植抗宿主病以及炎症和过敏性疾病。

[0064] “免疫反应”是指免疫系统的诸如B细胞、T细胞或先天免疫细胞的细胞对刺激的反应。在一个实施方案中，所述反应针对特定抗原是特定的（“抗原特定反应”）。

[0065] 如本文所用，术语“抗原”是能够被抗体或T细胞受体结合的分子。抗原通常可用于诱导体液免疫反应和/或细胞免疫反应，从而产生B和/或T淋巴细胞。

[0066] 术语“肿瘤相关抗原”、“肿瘤抗原”和“癌细胞抗原”在此互换使用。在每种情况下，这些术语都指由癌细胞特异或优先表达的蛋白质、糖蛋白或碳水化合物。

[0067] “表位”是由氨基酸序列的特异性决定的抗体识别的抗原上的位点。如在竞争性结合试验中所测定的，如果两种抗体竞争性地抑制（阻断）另一种抗体与抗原的结合，则称它们与相同的表位结合。或者，如果抗原中减少或消除一种抗体结合的大多数氨基酸突变减少或消除另一种抗体结合，则两种抗体具有相同的表位。如果两种抗体各自部分抑制另一种抗体与抗原的结合，和/或如果一些减少或消除一种抗体结合的氨基酸突变减少或消除另一种抗体的结合，则称两种抗体具有重叠的表位。

[0068] “自身免疫性疾病”是指免疫系统对作为正常宿主一部分的抗原（即自身抗原）产生免疫反应（例如，B细胞或T细胞反应），从而对组织造成损伤的疾病。自体抗原可源自宿主细胞，也可源自通常定殖于粘膜表面的诸如微生物（称为共生生物体）的共生生物体。

[0069] 术语“移植抗宿主病（GVHD）”是指骨髓或其他组织移植的常见和严重并发症，其中捐赠的免疫感受态淋巴细胞对移植受体自身组织有反应。（GVHD）是使用或含有来自相关或无关供体的干细胞的任何移植的可能并发症。在一些实施方案中，所述GVHD是慢性GVHD（cGVHD）。

[0070] “免疫反应参数”是免疫反应的任何特定的可测量方面，包括但不限于细胞因子分泌（IL-6、IL-10、IFN- $\gamma$ 等）、趋化因子分泌、迁移或细胞聚集改变、免疫球蛋白产生、树突状细胞成熟、调节活性、免疫细胞数量和免疫系统任何细胞的增殖。免疫反应的另一个参数是由免疫攻击引起的任何器官的结构损伤或功能退化。本领域技术人员可以使用已知的实验室试验来容易地确定这些参数中任何一个的增加。在一个特定的非限制性例子中，为了评估细胞增殖，可以评估<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷的掺入。与对照组相比，所述免疫反应参数的“实质性”增加是该参数的显著增加。具体的、非限制性的实质性增加的例子是至少50%左右的增加、至少75%左右的增加、至少90%左右的增加、至少100%左右的增加、至少200%左右的增加、至少300%左右的增加和至少500%左右的增加。同样，与对照组相比，所述免疫反应参数的抑制或降低是该参数的显著降低。具体的、非限制性的显著性降低的例子是至少约50%的降低、至少约75%的降低、至少约90%的降低、至少约100%的降低、至少约200%的降低。

降低、至少约300%的降低、以及至少约500%降低。统计检验,如非参数ANOVA或T检验,可用于比较一种药剂引起的反应幅度与使用第二种药剂引起的反应的样本百分比之间的差异。在一些例子中,p≤0.05是显著的,并且表明由随机变化引起的任何观测参数的增加或降低的几率小于5%。本领域技术人员能够容易地识别其他使用的统计测定。

[0071] “治疗(treating或treatment)”或对疾病或病症指执行一项方案,该方案可包括向患者给予一种或多种药物,以减轻疾病的症状或体征。治疗的理想效果包括降低疾病进展率、改善或缓解疾病状态、缓解或改善预后。在疾病或病症出现的症状或体征之前可以发生缓解,也可在它们之后发生。因此,“治疗(treating或treatment)”可包括疾病或不良病症的“预防(preventing或prevention)”。此外,“治疗(treating或treatment)”不需要完全缓解症状或体征,不需要治愈,特别是包括对患者只有边际效果的方案。

[0072] 在本申请中使用的术语“治疗益处”或“治疗有效的”是指促进或增强受试者在本条件的医疗方面的福祉的任何东西。这包括但不限于疾病症状或体征的频率或严重程度的降低。例如,癌症的治疗可以包括,例如,缩小肿瘤的大小、降低肿瘤的侵袭性、降低肿瘤的生长速度或防止转移。癌症的治疗也可指延长癌症患者的生存。

[0073] 本文的术语“抗体”在最广泛意义上使用并且涵盖各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、单特异性和多特异性抗体(例如,双特异性抗体),以及抗体片段,只要它们表现出所需的抗原结合活性即可。

[0074] 本文所使用的术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群中获得的抗体,例如,除了可能存在的突变,诸如可能存在的少量天然存在的突变,所述抗体群包含的单个抗体是相同的。因此,修饰语“单克隆”表示抗体的特征不是离散抗体的混合物。在某些实施方案中,这种单克隆抗体通常包括包含结合靶点的多肽序列的抗体,其中,所述靶点结合多肽序列通过包括从多个多肽序列中选择单个靶点结合多肽序列的过程获得。例如,所述选择过程可以是从诸如杂交瘤克隆、噬菌体克隆或重组DNA克隆库等多个克隆中选择唯一的克隆。应理解,可进一步改变选定的靶点结合序列,例如,提高对靶点的亲和力、使靶点结合序列人性化、提高其在细胞培养中的产生、降低其在体内的免疫原性、产生多特异性抗体等,并且包含改变的靶点结合序列的抗体也是本发明的单克隆抗体。与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反,单克隆抗体制剂中的每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。除了它们的特异性外,单克隆抗体制剂的优势在于它们通常不受其他免疫球蛋白的污染。

[0075] 术语“药学上或药理学上可接受的”是指分子实体和组合物在所采用的剂量和浓度下通常对接受者无毒,即当视情况而定施用于动物(例如人)时不产生不利的、过敏的或其他不良反应。根据本公开,包含抗体或额外活性成分的药物组合物的制备对于本领域普通技术人员而言是已知的。此外,对于动物(如人)给药,应理解制剂应符合FDA生物标准办公室要求的无菌性、热原性、一般安全性和纯度标准。

[0076] 如本文所用,如本领域普通技术人员已知的,“药学上可接受的载体”包括任何和所有水溶剂(例如水、酒精/水溶液、盐水溶液、诸如氯化钠、林格氏葡萄糖等的非肠道载体)、非水溶剂(例如丙二醇、聚乙二醇、植物油和诸如油酸乙酯的可注射有机酯)、分散介质、涂料、表面活性剂、抗氧化剂、防腐剂(例如抗菌剂或抗真菌剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体)、等渗剂、吸收延迟剂、盐、药物、药物稳定剂、凝胶、粘合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、

甜味剂、调味剂、染料、液体和营养补充剂等材料及其组合。根据已知参数调整药物组合物中各成分的pH值和准确浓度。

[0077] 术语“T细胞”指T淋巴细胞,包括但不限于 $\gamma:\delta^+$  T细胞、NK T细胞、CD4<sup>+</sup> T细胞和CD8<sup>+</sup> T细胞。CD4<sup>+</sup> T细胞包括T<sub>H</sub>0、T<sub>H</sub>1和T<sub>H</sub>2细胞以及调节性T细胞(T<sub>reg</sub>)。至少有三种类型的调节性T细胞:CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>、CD25<sup>+</sup> T<sub>H</sub>3 T<sub>reg</sub>和CD25<sup>+</sup> T<sub>R</sub>1 T<sub>reg</sub>。“细胞毒性T细胞”指能杀死另一个细胞的T细胞。大多数细胞毒性T细胞是CD8<sup>+</sup> MHC I类限制性T细胞,但也有部分细胞毒性T细胞是CD4<sup>+</sup>。在优选实施方案中,本公开的T细胞为CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>。

[0078] T细胞的激活状态定义了T细胞是“静止”(即处于细胞周期的G<sub>0</sub>期)还是“激活”以在适当的刺激(如识别其特定抗原)后增殖,或通过OKT3抗体、PHA或PMA刺激增殖等。T细胞的“表型”(例如,初始、中枢记忆、效应器记忆、溶解效应器、帮助效应器(T<sub>H</sub>1和T<sub>H</sub>2细胞)和调节效应器)描述了细胞激活时发挥的功能。一个健康的供体有每一种表型的T细胞,它们主要处于静止状态。一个初始T细胞在激活后会增殖,然后分化成记忆T细胞或效应器T细胞。然后,它可以再次假设静止状态,直到下一次被激活,发挥其新功能,并可能再次改变其表型。效应器T细胞会在激活和抗原特异性效应器功能上分裂。

[0079] 如本文所使用的术语“嵌合抗原受体(CAR)”可指人工T细胞受体、嵌合T细胞受体或嵌合免疫受体,并包括将人工特异性嫁接到特定免疫效应器细胞上的工程化受体。CAR可用于将单克隆抗体的特异性赋予T细胞,从而允许产生大量特异性T细胞,例如,用于过继细胞治疗。在特定实施方案中,例如,CAR直接将细胞特异性用于肿瘤相关抗原。在一些实施方案中,CAR包括细胞内激活结构域、跨膜结构域和包含肿瘤相关抗原结合区的胞外结构域。在特定方面,CAR包括由单克隆抗体衍生的单链可变片段(scFv)的融合,融合到CD3 $\zeta$ a跨膜结构域和胞内结构域。其他CAR设计的特异性可从受体的配体(如肽)或模式识别受体(如Dectin)中获得。在某些情况下,可以改变抗原识别结构域的间距以减少活化诱导的细胞死亡。在某些情况下,CAR包含额外的共刺激信号的结构域,如CD3 $\zeta$ 、FcR、CD27、CD28、CD137、DAP10和/或OX40。在某些情况下,分子可以与CAR共表达,包括共刺激分子、用于成像的报告基因(例如,正电子发射断层扫描)、在添加前药、归巢受体、趋化因子、趋化因子受体、细胞因子和细胞因子受体时条件性地消融T细胞的基因产物。

[0080] 术语“抗原呈递细胞(APC)”是指能够以免疫系统的特异性效应器细胞识别的肽-MHC复合体的形式呈现一种或多种抗原的一类细胞,从而诱导对所呈递的一种或多种抗原的有效细胞免疫应答。APC可以是完整的细胞,如巨噬细胞、B细胞、内皮细胞、活化的T细胞和树突状细胞;或其他天然存在或合成的分子,如与 $\beta 2$ -微球蛋白复合的纯化的MHC I类分子。虽然许多类型的细胞可能能够在其细胞表面上呈递抗原以用于T细胞识别,但只有树突状细胞具有以有效量呈递抗原以激活初始T细胞的细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的应答。

[0081] 术语“培养”是指细胞在合适的培养基中的体外维持、分化和/或增殖。“浓缩”是指含有细胞的组合物在总细胞中所占的比例比在生物体中存在的组织中所占的比例要高。

[0082] “抗癌剂”能够对受试者中的癌细胞/肿瘤产生负面影响,例如通过促进癌细胞的杀伤、诱导癌细胞的凋亡、降低癌细胞的生长率、减少转移的发生率或数量、减少肿瘤大小、抑制肿瘤生长、减少对肿瘤或癌细胞的血液供应、促进对癌细胞或肿瘤的免疫应答、预防或抑制癌症的进展或增加癌症患者的寿命。

[0083] II. 免疫细胞

[0084] 本公开的某些实施方案涉及表达嵌合抗原受体 (CAR) 和/或T细胞受体 (TCR) 的免疫细胞。所述免疫细胞可以是T细胞 (例如调节性T细胞、CD4<sup>+</sup> T细胞、CD8<sup>+</sup> T细胞或  $\gamma\delta$ T细胞)、NK细胞、非变异NK细胞、NKT细胞、干细胞 (例如间充质干细胞 (MSC) 或诱导多能干细胞 (iPSC))。在一些实施方案中,所述细胞为单核细胞或粒细胞,例如骨髓细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞和/或嗜碱性粒细胞。本文还提供了生产和工程化免疫细胞的方法,以及使用和管理细胞用于过继细胞治疗的方法,在这种情况下,所述细胞可以是自体的或异体的。因此,所述免疫细胞可以用作免疫治疗,例如靶向癌细胞。

[0085] 所述免疫细胞可以从受试者,特别是人类受试者中分离出来。所述免疫细胞可从感兴趣的受试者获得,例如从怀疑患有某种疾病或病症的受试者、怀疑患有某种疾病或病症的易感者、或正在接受某种疾病或病症的治疗的受试者。可以从它们所在的受试者的任何部位收集免疫细胞,包括但不限于血液、脐带血、脾脏、胸腺、淋巴结和骨髓。分离的免疫细胞可以直接使用,或者它们可以储存一段时间,例如通过冷冻。

[0086] 所述免疫细胞可以从它们所在的任何组织中富集/纯化,包括但不限于血液 (包括血库或脐带血库采集的血液)、脾脏、骨髓、手术过程中移除和/或暴露的组织以及通过活检程序获得的组织。从中富集、分离和/或纯化所述免疫细胞的组织/器官可从活体和非活体受试者中分离,其中所述非活体受试者为器官供体。在特定实施方案中,所述免疫细胞从如外周血或脐带血等血液中分离。如通过CD4-或CD8-阳性T细胞抑制所测定的,在某些方面,从脐血中分离的免疫细胞具有增强的免疫调节能力。在特定方面,为了增强免疫调节能力,从采集的血,特别是采集的脐带血中分离免疫细胞。所述采集的血液可以来自2个或更多来源,例如3、4、5、6、7、8、9、10个或更多来源 (例如供体受试者)。

[0087] 免疫细胞群可以从需要治疗或患有与免疫细胞活性降低相关疾病的受试者身上获得。因此,这些细胞将自体移植到需要治疗的受试者身上。或者,可以从供体获得免疫细胞群,优选组织相容性匹配的供体。免疫细胞群可从外周血、脐带血、骨髓、脾脏或免疫细胞所在的所述受试者或供体中的任何其他器官/组织中收获。所述免疫细胞可以从受试者和/或供体中分离出来,例如从脐血中分离出来。

[0088] 当从不同于受试者的供体获得免疫细胞群时,供体最好是异体的,前提是获得的细胞与受试者相容,使得它们可以被引入受试者。异体供体细胞可能与人类白细胞抗原 (HLA) 相容,也可能不相容。为了使异体细胞与受试者相容,可以对其进行处理以降低免疫原性。

[0089] A.T细胞

[0090] 在一些方面,所述免疫细胞是T细胞。在过去的二十年中,人们已经描述了几种诱导、激活和扩增功能性抗肿瘤效应器细胞的基本方法。这些细胞包括:自体细胞,如肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL);用自体DC、淋巴细胞、人工抗原提呈细胞 (APC) 或包覆有T细胞配体和活化抗体的珠子在体外激活的T细胞,或通过捕获靶细胞膜分离的细胞;天然表达抗宿主肿瘤 TCR 的异体细胞;以及非肿瘤特异性自体或异体细胞,它们通过基因重编程或“重定向”来表达肿瘤反应性TCR或显示抗体样肿瘤识别能力的嵌合TCR分子,称为“T体”。这些方法产生了大量的T细胞制备和免疫方案,可用于本文所述的方法。

[0091] 在一些实施方案中,所述T细胞源自血液、骨髓、淋巴、脐带或淋巴器官。在一些方面,所述细胞是人类细胞。这些细胞通常是原代细胞,例如直接从受试者和/或从受试者分

离并冷冻的细胞。在一些实施方案中,所述细胞包括一个或多个T细胞亚群或其他细胞类型,例如整个T细胞群、CD4<sup>+</sup>细胞、CD8<sup>+</sup>细胞及其亚群,例如由功能、激活状态、成熟度、分化潜能、扩张、再循环、定位和/或持久性能力、抗原特异性、抗原受体类型、存在于特定器官或隔间、标记物或细胞因子分泌谱和/或分化程度所定义的亚群。对于待治疗的受试者,所述细胞可以是异体和/或自体的。在一些方面,例如对于现成技术,所述细胞是多能的,例如干细胞,例如诱导多能干细胞(iPSC)。在一些实施方案中,所述方法包括从受试者分离细胞,如本文所述制备、处理、培养和/或工程化细胞,以及在冷冻保存之前或之后将其重新引入同一患者。

[0092] 在T细胞的亚型和亚群(例如CD4<sup>+</sup>和/或CD8<sup>+</sup> T细胞)中,有初始T(T<sub>N</sub>)细胞、效应器T细胞(T<sub>EFF</sub>)、记忆T细胞及其亚型,如干细胞记忆T(TSC<sub>M</sub>)、中枢记忆T(TC<sub>M</sub>)、效应器记忆T(T<sub>EM</sub>)或终末分化效应器记忆T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、未成熟T细胞、成熟T细胞、辅助T细胞、细胞毒性T细胞、粘膜相关非变异T(MAIT)细胞、天然存在和适应性调节T(Treg)细胞、辅助T细胞,如TH1细胞、TH2细胞、TH3细胞、TH17细胞、TH9细胞,TH22细胞、滤泡辅助T细胞、 $\alpha/\beta$ T细胞和 $\delta/\gamma$ T细胞。

[0093] 在一些实施方案中,一个或多个所述T细胞群富集或耗尽对特定标记(例如表面标记)呈阳性或对特定标记呈阴性的细胞。在一些情况下,这些标记是在某些T细胞群(例如非记忆细胞)上缺失或以相对较低水平表达,但在某些其他T细胞群(例如记忆细胞)上存在或以相对较高水平表达的标记。

[0094] 在一些实施方案中,通过阴性选择在非T细胞(例如B细胞、单核细胞或其他白细胞(例如CD14))上表达的标记,从PBMC样品中分离T细胞。在一些方面,CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>选择步骤用于分离CD4<sup>+</sup>辅助细胞和CD8<sup>+</sup>细胞毒性T细胞。这种CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>群可以通过对在一个或多个初始、记忆和/或效应器T细胞亚群上表达或表达达到相对较高程度的标记的阳性或阴性选择进一步分类为亚群。

[0095] 在一些实施方案中,CD8<sup>+</sup> T细胞例如通过基于与相应亚群相关联的表面抗原的阳性或阴性选择进一步富集或耗尽初始、中枢记忆、效应器记忆和/或中枢记忆干细胞。

[0096] 在一些实施方案中,所述T细胞是自体T细胞。在这种方法中,从患者身上获取肿瘤样本并获得单细胞悬液。所述单细胞悬浮液可以以任何合适的方式获得,例如,机械(使用例如gentleMACS<sup>TM</sup>解离剂、Miltenyi Biotec、Auburn、Calif.分解肿瘤)或酶法(例如胶原酶或DNA酶)。在白细胞介素-2(IL-2)中培养肿瘤酶消化液的单细胞悬液。

[0097] 培养的T细胞可以聚集并迅速扩增。快速扩增可使抗原特异性T细胞的数量在大约10到14天的时间内增加至少50倍(例如,50、60、70、80、90或100倍或更大)。更优选地,快速扩增在约10至约14天期间具有至少200倍的增长(例如,200、300、400、500、600、700、800、900或更大)。

[0098] 可以通过本领域中已知的许多方法中的任何一种来实现扩增。例如,在饲养淋巴细胞和白细胞介素-2(IL-2)或白细胞介素-15(IL-15)存在(其中IL-2为首选)的情况下,利用非特异性T细胞受体刺激可快速扩增T细胞。所述非特异性T细胞受体刺激物可包括约30ng/ml的OKT3,一种小鼠单克隆抗CD3抗体(可从Ortho-McNeil<sup>®</sup>、Raritan、N.J.获得)。或者,在T细胞生长因子(如300IU/ml IL-2或IL-15)存在下(以IL-2为首选),T细胞可以通过在体外用一种或多种抗原(包括其抗原部分,例如肿瘤的表位或细胞)刺激外周血单个核

细胞 (PBMC) 来快速扩增, 这些抗原可以任选地从载体表达, 如人类白细胞抗原A2 (HLA-A2) 结合肽。所述体外诱导的T细胞通过HLA-A2抗原递呈细胞上的肿瘤的相同抗原的再刺激而迅速扩增。或者, 例如所述T细胞可以用照射过的自体淋巴细胞或照射过的HLA-A2+异体淋巴细胞和IL-2重新刺激。

[0099] 所述自体T细胞可以被修饰以表达促进所述自体T细胞生长和活化的T细胞生长因子。合适的T细胞生长因子包括, 例如, 白细胞介素 (IL) -2、IL-7、IL-15和IL-12。合适的修饰方法是本领域已知的。参见, 例如Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001; 和Ausubel等人, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates和John Wiley&Sons, NY, 1994。特别是在特定方面, 修饰后的自体T细胞高水平表达T细胞生长因子。T细胞生长因子编码序列, 例如IL-12的序列, 在本领域中是现成的, 启动子也是如此, 其与T细胞生长因子编码序列的可操作连接促进高水平表达。

[0100] B.NK细胞

[0101] 在一些方面, 所述免疫细胞是NK细胞。NK细胞是对多种肿瘤细胞、病毒感染细胞以及骨髓和胸腺中的一些正常细胞具有自发的细胞毒性的淋巴细胞亚群。NK细胞是转化细胞和病毒感染细胞早期固有免疫反应的关键效应器。NK细胞约占人外周血淋巴细胞的10%。当淋巴细胞在IL-2存在下培养时, 会产生强烈的细胞毒性反应。因为体积较大, 并且在细胞质中存在典型的嗜天青颗粒, NK细胞是被称为大颗粒淋巴细胞的效应细胞。NK细胞在骨髓、淋巴结、脾脏、扁桃体和胸腺中分化成熟。NK细胞可以通过诸如人CD16、CD56和CD8的特定表面标记物检测。NK细胞不表达T细胞抗原受体、pan T标记CD3或表面免疫球蛋白B细胞受体。

[0102] NK细胞的刺激是通过细胞表面激活和抑制受体信号的串扰实现的。NK细胞的激活状态由一系列生殖系编码的激活和抑制受体接收到的细胞内信号的平衡来调节 (Campbell, 2006)。当NK细胞遇到异常细胞 (如肿瘤或病毒感染细胞) 并以激活信号为主时, 所述NK细胞可通过定向分泌含有穿孔素和颗粒酶的溶细胞颗粒或结合有死亡结构域的受体迅速诱导靶细胞凋亡。活化的NK细胞也能分泌I型细胞因子, 如干扰素- $\gamma$ 、肿瘤坏死因子- $\alpha$ 和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF), 这些细胞因子既能激活先天性和适应性免疫细胞, 也能激活其他细胞因子和趋化因子 (Wu等人, 2003)。NK细胞在早期先天性免疫反应中产生的这些可溶性因子对其他造血细胞的募集和功能有显著影响。此外, 通过物理接触和细胞因子的产生, NK细胞是树突状细胞和中性粒细胞调节串扰网络中促进或抑制免疫反应的核心参与者。

[0103] 在某些实施方案中, NK细胞通过本领域众所周知的方法从人类外周血单个核细胞 (PBMC)、非刺激性白细胞去除产物 (PBSC)、人类胚胎干细胞 (hESC)、诱导多能干细胞 (iPSC)、骨髓或脐带血中衍生。尤其是脐带血CB被用来获得NK细胞。在某些方面, 通过先前描述的NK细胞体外扩增方法分离和扩增所述NK细胞 (Shah等人, 2013)。在该方法中, 采用ficol1密度梯度离心法分离CB单核细胞, 并与IL-2和人工抗原提呈细胞 (aAPC) 在生物反应器中培养。7天后, 细胞培养物中的任何表达CD3的细胞被耗尽, 再培养7天。这些细胞再次被CD3耗尽, 其特征是确定CD56 $^{+}$ /CD3 $^{-}$ 细胞或NK细胞的百分比。在其他方法中, 脐带血CB通过分离CD34 $^{+}$ 细胞获得NK细胞, 并在含有SCF、IL-7、IL-15和IL-2的培养基中分化为CD56 $^{+}$ /CD3 $^{-}$ 细胞。

[0104] C. 干细胞

[0105] 在一些实施方案中,本公开的免疫细胞可以是干细胞,例如诱导多能干细胞(PSC)、间充质干细胞(MSC)或造血干细胞(HSC)。

[0106] 本文中使用的多能干细胞可以是诱导多能干细胞(iPS),通常缩写为iPS细胞或iPSC。多能性的诱导最初是在2006年用小鼠细胞(Yamanaka等人,2006)和2007年使用人类细胞(Yu等人,2007;Takahashi等人,2007)通过引入与多能性相关的转录因子对体细胞进行重新编程实现的。iPSC的使用回避了ES细胞大规模临床应用的大部分伦理和实际问题,iPSC来源的自体移植患者可能不需要终生免疫抑制治疗来预防移植排斥反应。

[0107] 除生殖细胞外,任何细胞都可以作为iPSC的起点。例如,细胞类型可以是角质形成细胞、成纤维细胞、造血细胞、间充质细胞、肝细胞或胃细胞。细胞分化程度或收集细胞的动物的年龄没有限制;在本文公开的方法中,甚至未分化的祖细胞(包括体细胞干细胞)和最终分化的成熟细胞也可以用作体细胞的来源。

[0108] 可以使用本领域技术人员已知的方法重新编程体细胞以产生iPS细胞。本领域技术人员能够容易地生产iPS细胞,例如,参见公开的美国专利申请号2009/0246875、公开的美国专利申请号2010/0210014、公开的美国专利申请号2012/0276636、美国专利号8,058,065、美国专利号8,129,187、PCT公开号W0 2007/069666 A1、美国专利号8,268,620、美国专利号8,546,140、美国专利号9,175,268、美国专利号8,741,648、美国专利申请号2011/0104125和美国专利号8,691,574,它们通过引用并入本文。通常,核重编程因子用于从体细胞产生多能干细胞。在一些实施方案中,使用Klf4、c-Myc、Oct3/4、Sox2、Nanog和Lin28中的至少三或至少四种。在其他实施方案中,使用Oct3/4、Sox2、c-Myc和Klf4或Oct3/4、Sox2、Nanog和Lin28。

[0109] 这些核重编程物质的小鼠和人类cDNA序列可参考W0 2007/069666和美国专利号8,183,038中提到的NCBI编号,它们通过引用结合在本文中。引入一种或多种重编程物质或编码这些重编程物质的核酸的方法在本领域中是已知的,例如在美国专利Nos. 8268620、8691574、8741648、8546140中,在已公布的美国专利号8900871和美国专利号8071369中所公开的,两者均以引用方式并入本文。

[0110] 一旦衍生出来,iPSC可以在足以维持多能性的培养基中培养。所述iPSC可以与各种培养基和技术一起使用,以培养多能干细胞,更具体地说,胚胎干细胞,如美国专利号7,442,548和美国专利号2003/0211603所述。在小鼠细胞的情况下,将白血病抑制因子(LIF)作为分化抑制因子加入到普通培养基中进行培养。就人类细胞而言,添加碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)代替LIF是可取的。本领域技术人员已知的用于iPSC的培养和维持的其他方法可以与本文公开的方法一起使用。

[0111] 在某些实施方案中,可以使用未定义的条件;例如,多能干细胞可以培养在成纤维细胞饲养细胞上,或者培养在暴露于成纤维细胞饲养细胞的培养基上,以保持干细胞处于未分化状态。在一些实施方案中,作为饲养细胞,将所述细胞在与辐射或抗生素处理的小鼠胚胎成纤维细胞共同存在下培养,以终止细胞分裂。另外,可以使用一种定义的、与饲养无关的培养系统,如TESR<sup>TM</sup>培养基或E8<sup>TM</sup>/必需8<sup>TM</sup>培养基,在基本上未分化状态下培养和维持多能细胞。

[0112] 质粒已经被设计成具有多个目标,例如获得调节的高拷贝数和避免细菌中质粒不

稳定性的潜在原因，并且提供与哺乳动物细胞（包括人细胞）兼容的质粒选择的手段。在人类细胞中使用的质粒的双重要求已经得到了特别的关注。首先，它们适合于大肠杆菌的维持和发酵，从而可以产生和纯化大量DNA。第二，它们是安全的，适用于人类患者和动物。第一个要求是在细菌发酵过程中可以相对容易地被选择和稳定地维持的高拷贝数质粒。第二个要求是注意诸如可选标记和其他编码序列之类的元素。在一些实施方案中，编码标记的质粒由以下组成：(1) 高拷贝数复制起点，(2) 可选择的标记，例如但不限于用于卡那霉素选择的抗生素新基因，(3) 转录终止序列，包括酪氨酸酶增强子和(4) 用于并入各种核酸盒的多克隆位点；和(5) 编码可操作地连接到酪氨酸酶启动子的标记的核酸序列。在特定方面，所述质粒不包含酪氨酸酶增强子或启动子。本领域中已知有许多质粒载体用于诱导编码蛋白质的核酸。这些包括但不限于通过引用并入本文的在美国专利号6,103,470、美国专利号7,598,364、美国专利号7,989,425、美国专利号6,416,998和美国申请12/478,154中公开的载体。

[0113] 游离型基因传递系统可以是质粒、基于Epstein-Barr病毒的游离型载体、基于酵母的载体、基于腺病毒的载体、基于猿猴病毒40 (SV40) 的游离型载体、基于牛乳头状瘤病毒 (BPV) 的载体或慢病毒载体。病毒基因传递系统可以是基于RNA或DNA的病毒载体。

[0114] D. 基因工程化抗原受体

[0115] 免疫细胞（例如自体或异体T细胞（例如调节性T细胞、CD4<sup>+</sup> T细胞、CD8<sup>+</sup> T细胞或 $\gamma$ δT细胞）、NK细胞、非变异NK细胞、NKT细胞、干细胞（如，MSC或iPS细胞）可以通过基因工程化来表达诸如工程化TCR和/或CAR的抗原受体。例如，宿主细胞（例如自体或异体T细胞）被修饰以表达对癌症抗原具有抗原特异性的TCR。在特定实施方案中，NK细胞被工程化以表达TCR。所述NK细胞可能被进一步工程化来表达CAR。多个CAR和/或TCR，例如不同的抗原，可以添加到诸如T细胞或NK细胞的单个细胞类型。

[0116] 合适的修饰方法是本领域已知的。例如，参见上文Sambrook和Ausubel。例如，可以使用Heemskerk等人，2008和Johnson等人，2009中描述的转导技术，将细胞转导以表达对癌症抗原具有抗原特异性的TCR。

[0117] 编码全长TCR $\alpha$ 和 $\beta$ （或 $\gamma$ 和 $\delta$ ）链的RNA电穿孔可作为替代方法，以克服逆转录病毒转导链和内源性TCR链配对引起的具有自反应性的长期问题。即使这种选择性配对发生在瞬时转染策略中，可能产生的自反应性T细胞在一段时间后也会失去这种自反应性，因为引入的TCR $\alpha$ 和 $\beta$ 链只在瞬时表达。当引入的TCR $\alpha$ 和 $\beta$ 链表达减弱时，只剩下正常的自体T细胞。当稳定的逆转录病毒转导途径引入全长TCR链时，情况并非如此，它永远不会丢失引入的TCR链，从而导致患者不断出现自反应。

[0118] 在一些实施方案中，细胞包括通过编码一个或多个抗原受体的基因工程引入的一个或多个核酸以及此类核酸的基因工程化产品。在一些实施方案中，所述核酸是异体的，即通常不存在于例如从另一个生物体或细胞获得的细胞或从所述细胞获得的样品中，例如，通常不在被工程化的细胞中和/或从这样的细胞中获得的生物体中发现。在一些实施方案中，所述核酸不是天然存在的，例如自然界中没有发现的核酸（例如嵌合的）。

[0119] 在一些实施方案中，所述CAR包含特异性结合抗原的胞外抗原识别结构域。在一些实施方案中，所述抗原是在细胞表面表达的蛋白质。在一些实施方案中，所述CAR是TCR样CAR，所述抗原是经过处理的肽抗原，如细胞内蛋白的肽抗原（如TCR），并在主要组织相容性

复合体(MHC)分子的背景下在细胞表面上被识别。

[0120] 示例性抗原受体,包括CAR和重组TCR,以及用于将受体工程化和引入细胞的方法,包括在国际专利申请公开号W0200014257、W02013126726、W02012/129514、W02014031687、W02013/166321、W02013/071154、W02013/123061,美国专利申请公开号US2002131960、US2013287748、US20130149337,美国专利号6,451,995、7,446,190、8,252,592、8,339,645、8,398,282、7,446,179、6,410,319、7,070,995、7,265,209、7,354,762、7,446,191、8,324,353、8,479,118和欧洲专利申请号EP2537416中,和/或Salestin等人,2013;Davila等人,2013;Tuttle等人,2012;Wu等人,2012所描述的那些。在一些方面,所述基因工程化抗原受体包括如美国专利号:7,446,190所述的CAR和国际专利申请公开号:W0/2014055668 A1中所述的。

[0121] 1. 嵌合抗原受体

[0122] 在一些实施方案中,所述CAR包括:a) 细胞内信号结构域、b) 跨膜结构域和c) 包含抗原结合区的胞外结构域。

[0123] 在一些实施方案中,所述工程化抗原受体包括包含激活或刺激性CAR、共刺激CAR(参见W02014/055668)和/或抑制性CAR(iCAR,参见Fedorov等人,2013)的CAR。所述CAR通常包括细胞外抗原(或配体)结合结构域,其在某些方面通过接头和/或跨膜结构域结合到一个或多个细胞内信号组分。这种分子通常通过天然抗原受体模拟或逼近信号,或通过这种受体与共刺激受体结合模拟或逼近信号,和/或单独通过共刺激受体模拟或逼近信号。

[0124] 本公开的某些实施方案涉及核酸的使用,所述核酸包括编码抗原特异性的CAR多肽的核酸,所述CAR包括已经被源化以降低免疫原性(hCAR)的CAR,并包含细胞内信号结构域、跨膜结构域和包含一个或多个信号基序的胞外结构域。在某些实施方案中,所述CAR可识别包含一个或多个抗原之间共享空间的表位。在某些实施方案中,所述结合区可包括单克隆抗体的互补确定区、单克隆抗体的可变区和/或其抗原结合片段。在另一实施方案中,所述特异性来自与受体结合的肽(例如细胞因子)。

[0125] 设想人类CAR核酸可能是用于增强人类患者细胞免疫治疗的人类基因。在特定实施方案中,本发明包括全长CAR cDNA或编码区。所述抗原结合区或结构域可包含源自特定人类单克隆抗体的单链可变片段(scFv)的V<sub>H</sub>链和V<sub>L</sub>链片段,如通过引用并入本文中的美国专利7,109,304中所述。该片段也可以是人类抗原特异性抗体的任何数量的不同抗原结合结构域。在更具体的实施方案中,所述片段是由为在人类细胞中表达使用人类密码子而优化的序列编码的抗原特异性scFv。

[0126] 这种排列可以是多聚体,例如双抗体或多聚体。所述多聚体最有可能由轻链和重链的可变部分交叉配对成双抗体而形成。该结构的铰链部分可以有多个替代品,从完全删除、使第一半胱氨酸维持、以脯氨酸代替丝氨酸到被截断到第一半胱氨酸。可以删除Fc部分。任何稳定和/或二聚体的蛋白质都可以达到这个目的。一个可以使用所述Fc结构中的一个,例如,来自人免疫球蛋白的CH2或CH3结构域。一个还可以使用修饰的人免疫球蛋白的铰链、CH2和CH3区域以改善二聚反应。一个也可以只用免疫球蛋白的铰链部分。一个也可以使用部分CD8 $\alpha$ 。

[0127] 在一些实施方案中,CAR核酸包括编码其他共刺激受体的序列,如跨膜结构域和修饰的CD28细胞内信号结构域。其他共刺激受体包括但不限于CD28、CD27、OX-40(CD134)、

DAP10和4-1BB (CD137) 中的一个或多个。除了由CD3启动的主信号之外,由人类共刺激受体提供的附加信号在人CAR中对于完全激活NK细胞是重要的,并且可以有助于提高体内持久性和过继免疫治疗的成功治疗。

[0128] 在一些实施方案中,CAR以诸如以过继治疗靶向的特定细胞类型表达的特定抗原(或标记或配体)的特异性构建,例如诸如在正常或非病变细胞类型上表达的癌症标记和/或旨在诱导衰减反应的抗原。因此,所述CAR通常在其胞外部分包括一个或多个抗原结合分子,例如一个或多个抗原结合片段、结构或部分,或一个或多个抗体可变结构域和/或抗体分子。在一些实施方案中,所述CAR包括抗原结合部分或抗体分子的部分,例如从单克隆抗体(mAb)的可变重链(VH)和可变轻链(VL)衍生的单链抗体片段(scFv)。

[0129] 在嵌合抗原受体的某些实施方案中,受体的抗原特异性部分(可称为包含抗原结合区的胞外结构域)包含肿瘤相关抗原或病原体特异性抗原结合结构域。抗原包括模式识别受体识别的碳水化合物抗原,如Dectin-1。肿瘤相关抗原可以是只要在肿瘤细胞表面表达的任何一种。肿瘤相关抗原的示例性实施方案包括CD19、CD20、癌胚抗原、甲胎蛋白、CA-125、MUC-1、CD56、EGFR、c-Met、AKT、Her2、Her3、上皮肿瘤抗原、黑色素瘤相关抗原、突变的p53、突变的ras等。在某些实施方案中,当存在少量肿瘤相关抗原时,所述CAR可与细胞因子共同表达以改善持久性。例如,CAR可以与IL-15共同表达。

[0130] 编码嵌合体受体的开放阅读框的序列可以从基因组DNA源、cDNA源获得,或者可以合成(例如,通过PCR)或其组合。根据基因组DNA的大小和内含子的数量,可能需要使用cDNA或其组合,因为发现内含子稳定了mRNA。此外,使用内源性或外源性非编码区来稳定所述mRNA可能更为有利。

[0131] 所述嵌合构建体可以作为裸DNA或合适的载体导入免疫细胞。本领域已知利用裸DNA电穿孔稳定转染细胞的方法。例如,参见美国专利号6,410,319。裸DNA通常是指编码嵌合受体的DNA,该DNA包含在质粒表达载体中,并具有适当的表达方向。

[0132] 或者,可使用病毒载体(例如,逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体或慢病毒载体)将嵌合构建体引入免疫细胞。根据本公开的方法使用的合适载体在免疫细胞中是非复制的。已知有大量基于病毒的载体,其中维持在细胞中的病毒的拷贝数低到足以维持细胞的生存能力,例如,基于HIV、SV40、EBV、HSV或BPV的载体。

[0133] 在一些方面,抗原特异性结合或识别成分与一个或多个跨膜和细胞内信号结构域相连。在一些实施方案中,所述CAR包括与所述CAR的胞外结构域融合的跨膜结构域。在一个实施方案中,使用与所述CAR中的一个结构域自然相关联的跨膜结构域。在一些情况下,通过氨基酸替代选择或修饰跨膜结构域,以避免此类结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合,以最小化与受体复合体其他成员的相互作用。

[0134] 一些实施方案中的跨膜结构域来自天然或合成来源。如果来源是天然的,则在一些方面该结构域源自任何膜结合或跨膜蛋白质。跨膜区包括(即至少包括如下的跨膜区)来源于T细胞受体的 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\zeta$ 链、CD28、CD3 $\zeta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、ICOS/CD278、GITR/CD357、NKG2D和DAP分子的跨膜区。或者,在一些实施方案中跨膜结构域是合成的。在一些方面,合成的跨膜结构域主要包含疏水残基,例如亮氨酸和缬氨酸。在一些方面,在合成的跨膜结构域的两端会发现苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三重态。

[0135] 在某些实施方案中,本文公开的用于基因修饰免疫细胞(例如NK细胞)的平台技术包括(i)使用电穿孔装置(例如,核受体)的非病毒性基因转移,(ii)通过胞内结构域(例如,CD28/CD3- $\zeta$ 、CD137/CD3- $\zeta$ 或其他组合)进行信号传导的CAR,(iii)将抗原识别结构域连接到细胞表面的胞外结构域长度可变的CAR,在某些情况下,(iv)衍生自K562的人工抗原提呈细胞(aAPC)能够在数量上强有力地扩增CAR<sup>+</sup>免疫细胞(Singh等人,2008;Singh等人,2011)。

[0136] 2.T细胞受体(TCR)

[0137] 在一些实施方案中,基因工程化抗原受体包括从天然存在的T细胞克隆的重组TCR和/或TCR。“T细胞受体”或“TCR”是指含有可变 $\alpha$ 和 $\beta$ 链(分别称为TCR $\alpha$ 和TCR $\beta$ )或可变 $\gamma$ 和 $\delta$ 链(也称为TCR $\gamma$ 和TCR $\delta$ ),以及能够特异性地结合到结合MHC受体的抗原肽上的分子。在一些实施方案中,所述TCR为 $\alpha\beta$ 形式。

[0138] 通常,以 $\alpha\beta$ 和 $\gamma\delta$ 形式存在的TCR在结构上大体相似,但表达它们的T细胞可能具有不同的解剖位置或功能。TCR可以在细胞表面或以可溶性形式存在。通常,TCR出现在T细胞(或T淋巴细胞)表面,在那里它通常负责识别与主要组织相容性复合物(MHC)分子结合的抗原。在一些实施方案中,TCR还可以包含恒定结构域、跨膜结构域和/或短胞质尾(参见,例如,Janeway等人,1997)。例如,在一些方面,所述TCR的每条链可具有一个N末端免疫球蛋白可变结构域、一个免疫球蛋白恒定结构域、一个跨膜区和一个C末端短胞质尾。在一些实施方案中,TCR与参与介导信号转导的CD3复合物的未突变蛋白相关。除非另有说明,术语“TCR”应理解为包含其功能性TCR片段。该术语还包括完整或全长TCR,包括 $\alpha\beta$ 形式或 $\gamma\delta$ 形式的TCR。

[0139] 因此,为了本文的目的,对TCR的引用包括任何TCR或功能片段,例如结合MHC分子中结合的特定抗原肽(即MHC-肽复合物)的TCR的抗原结合部分。TCR的“抗原结合部分”或抗原结合片段(可互换使用)是指包含TCR结构域的一部分,但与完整TCR结合的抗原(例如MHC-肽复合物)结合的分子。在一些情况下,抗原结合部分包含诸如TCR的可变 $\alpha$ 链和可变 $\beta$ 链的TCR的可变结构域,足以形成结合位点以结合特定MHC-肽复合物,例如通常每个链包含三个互补决定区。

[0140] 在一些实施方案中,所述TCR链的可变结构域与形成环或类似于免疫球蛋白的互补性决定区(CDR)相关,它通过形成TCR分子的结合位点来进行抗原识别和确定肽的特异性,并确定肽的特异性。通常,与免疫球蛋白一样,CDR由框架区(FR)分离(参见,例如,Jones等人,1990;Chothia等人,1988;Lefranc等人,2003)。在一些实施方案中,CDR3是负责识别处理过的抗原的主要CDR,尽管 $\alpha$ 链的CDR1也被证明与抗原肽的N末端部分相互作用,而 $\beta$ 链的CDR1与肽的C末端部分相互作用.CDR2被认为可以识别MHC分子。在一些实施方案中, $\beta$ 链的可变区可包含进一步的高度可变(HV4)区。

[0141] 在一些实施方案中,TCR链包含恒定结构域。例如,与免疫球蛋白类似,TCR链的胞外部分(例如, $\alpha$ 链、 $\beta$ 链)可以包含在N末端的两个免疫球蛋白结构域、一个可变结构域(例如,V <sub>$\alpha$</sub> 或V <sub>$\beta$</sub> ;通常是基于Kabat编号的氨基酸1-116,Kabat等人,"Sequences of Proteins of Immunological Interest,US Dept.Health and Human Services,Public Health Service National Institutes of Health,1991,5<sup>th</sup> ed)和一个靠近细胞膜的恒定结构域(例如, $\alpha$ 链恒定结构域或C <sub>$\alpha$</sub> ,通常是基于Kabat的氨基酸117-259、 $\beta$ 链恒定结构域或C <sub>$\beta$</sub> ,通常

是基于Kabat的氨基酸117-295)。例如,在一些情况下,由这两个链形成的TCR的胞外部分包含两个膜近端恒定结构域和两个膜远端可变结构域(包含CDR)。所述TCR结构域的恒定结构域包含短连接序列,其中半胱氨酸残基形成二硫键,在两个链之间形成连接。在一些实施方案中,TCR可在 $\alpha$ 链和 $\beta$ 链中的每一个中具有额外的半胱氨酸残基,使得所述TCR在恒定结构域中包含两个二硫键。

[0142] 在一些实施方案中,所述TCR链可包含跨膜结构域。在一些实施方案中,所述跨膜结构域带正电荷。在一些情况下,所述TCR链包含一个细胞质尾。在一些情况下,这种结构允许所述TCR与CD3等其他分子结合。例如,含有具有跨膜区的恒定结构域的TCR可将蛋白质锚定在细胞膜中,并与CD3信号装置或复合物的未突变亚单位相关联。

[0143] 一般来说,CD3是一种在哺乳动物中具有三条不同的链( $\gamma$ 、 $\delta$ 和 $\epsilon$ )和 $\zeta$ 链的多蛋白复合物。例如,在哺乳动物中,所述复合物可以包含一个CD3 $\gamma$ 链、一个CD3 $\delta$ 链、两个CD3 $\epsilon$ 链和一个CD3 $\zeta$ 链的同二聚体。所述CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 和CD3 $\epsilon$ 链是包含单一的免疫球蛋白结构域的免疫球蛋白超家族中高度相关的细胞表面蛋白。所述CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 和CD3 $\epsilon$ 链的跨膜区带负电荷,这是使这些链与带正电荷的T细胞受体链相关联的特征。所述CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 和CD3 $\epsilon$ 链的胞内尾部各含有一个保守的基序,称为免疫受体酪氨酸基激活基序或ITAM,而每个CD3 $\zeta$ 链有三个基序。通常,ITAM参与所述TCR复合物的信号传导能力。这些辅助分子具有带负电荷的跨膜区,并在将信号从TCR传送到细胞中发挥作用。CD3和 $\zeta$ 链与TCR一起形成了T细胞受体复合物。

[0144] 在一些实施方案中,所述TCR可以是双链 $\alpha$ 和 $\beta$ (或任选 $\gamma$ 和 $\delta$ )的异二聚体,也可以是单链TCR构建体。在一些实施方案中,所述TCR是包含两个独立链( $\alpha$ 和 $\beta$ 链或 $\gamma$ 和 $\delta$ 链)的异二聚体,这两个链通过一个或多个二硫键连接。在一些实施方案中,用于靶点抗原(例如,癌抗原)的TCR被识别并引入到细胞中。在一些实施方案中,可从多种来源获得编码TCR的核酸,例如通过对公开可用的TCR DNA序列的聚合酶链式反应(PCR)扩增。在一些实施方案中,从诸如T细胞(例如细胞毒性T细胞)、T细胞杂交瘤或其他公共可用来源的细胞的生物源获得所述TCR。在一些实施方案中,可从体内分离的细胞获得所述T细胞。在一些实施方案中,可从患者分离高亲和力T细胞克隆,且分离所述TCR。在一些实施方案中,所述T细胞可以是培养的T细胞杂交瘤或克隆。在一些实施方案中,已在用人类免疫系统基因(例如,人类白细胞抗原系统,或HLA)工程化的转基因小鼠中生成靶抗原的TCR克隆。参见,例如,肿瘤抗原(参见,例如, Parkhurst等人,2009和Cohen等人,2005)。在一些实施方案中,噬菌体展示用于分离针对靶抗原的TCR(参见,例如, Varela-Rohena等人,2008和Li,2005)。在一些实施方案中,TCR或其抗原结合部分可根据TCR序列的知识合成来生成。

[0145] 3. 抗原提呈细胞

[0146] 抗原提呈细胞包括巨噬细胞、B淋巴细胞和树突状细胞,它们的区别在于它们表达特定的MHC分子。APC将抗原内化并与MHC分子一起在其外细胞膜上重新表达该抗原的一部分。所述MHC是一个具有多个位点的大型基因复合物。MHC位点编码两大类MHC膜分子,称为I类和II类MHC。T辅助淋巴细胞通常识别与MHC II类分子相关的抗原,T细胞毒性淋巴细胞识别与MHC I类分子相关的抗原。在人类中,MHC被称为HLA复合物,而在小鼠中被称为H-2复合物。

[0147] 在一些情况下,aAPC可用于制备实施方案的治疗组合物和细胞治疗产品。有关抗

原提呈系统的制备和使用的一般指南,请参见,例如,美国专利号6,225,042、6,355,479、6,362,001和6,790,662;美国专利申请公开号2009/0017000和2009/0004142;以及国际公开号W02007/103009。

[0148] aAPC系统可包括至少一种外源性辅助分子。可以使用任何合适数量和组合的辅助分子。所述辅助分子可以选自如共刺激分子和粘附分子中的辅助分子。典型的共刺激分子包括CD86、CD64 (Fc  $\gamma$  RI)、41BB配体和IL-21。粘附分子可包括诸如选择素的碳水化合物结合糖蛋白、诸如整合素的跨膜结合糖蛋白、诸如钙黏蛋白的钙依赖性蛋白和诸如细胞间粘附分子(ICAM)的单程跨膜免疫球蛋白(Ig)超家族蛋白,其促进例如细胞间的相互作用,或细胞与基质的接触。示例性粘附分子包括诸如ICAM-1的LFA-3和ICAM。用于选择、克隆、制备和表达包括辅助刺激分子和粘附分子在内的示例性辅助分子的技术、方法和试剂在例如美国专利号6,225,042、6,355,479和6,362,001中举例说明。

[0149] 4. 白介素-15

[0150] 白细胞介素-15 (IL-15) 是组织限制性的,只有在病理条件下,才能在血清中的任何水平或系统中观察到。IL-15具有过继性治疗所需的多种属性。IL-15是一种诱导自然杀伤细胞的发育和细胞增殖的稳态细胞因子,它通过减轻肿瘤驻留细胞的功能抑制,促进对已形成的肿瘤的根除,并抑制AICD。

[0151] 在一个实施方案中,本公开涉及用IL-15共同修饰CAR和/或TCR免疫细胞。除了IL-15,可以预见其他细胞因子。这些包括但不限于细胞因子、趋化因子和其他用于人类应用的细胞的活化和增殖的分子。表达IL-15的NK细胞或T细胞能够持续支持细胞因子信号传导,这对它们输注后的生存至关重要。

[0152] 在某些实施方案中,开发了K562 aAPC,表达期望的抗原(例如,CD19)以及诸如CD28、IL-15和CD3 $\zeta$ 的共刺激分子,以选择能够持续CAR介导的增殖的体外免疫细胞(例如,NK细胞)。这种强大的技术允许制造临床适用数量(高达10<sup>10</sup>)的CAR<sup>+</sup> NK细胞适合人类应用。根据需要,可以进行额外的刺激周期,以产生更多数量的基因修饰的NK细胞。一般情况下,至少90%的NK细胞表达CAR,并且可以冷冻保存以供输注。此外,该方法可以通过将引入的CAR的特异性与aAPC上的CAR所识别的肿瘤相关抗原(TAA)的表达来产生不同肿瘤类型的NK细胞。

[0153] 基因修饰后,所述细胞可以立即输注或储存。在某些方面,在基因修饰之后,所述细胞可以在基因转移到细胞之后的大约1、2、3、4、5天或更长时间内作为一个整体离体培养几天、几周或几个月。在另一个方面,克隆了转染子,并展示了存在一个单一的整合或游离地维持的表达盒或质粒的克隆,并且在离体扩增了嵌合受体的表达。选择用于扩增的克隆展示了特异性识别和裂解表达CD19的靶细胞的能力。可通过刺激IL-2或结合共同 $\gamma$ 链(例如IL-7、IL-12、IL-15、IL-21和其他等)的其他细胞因子来扩增重组免疫细胞。可通过人工抗原提呈细胞的刺激来扩增重组免疫细胞。在另一方面,所述基因修饰细胞可以被冷冻保存。

[0154] 5. 抗原

[0155] 在基因工程化抗原受体靶向的抗原中,有那些在通过过继细胞疗法靶向的疾病、病症或细胞类型的背景下表达的抗原。在这些增殖性、肿瘤性的疾病和病症,和包括癌症和肿瘤的恶性疾病和病症,所述癌症和肿瘤包括血液系统癌症、免疫系统癌症,所述血液系统

癌症、免疫系统癌症诸如淋巴瘤、白血病和/或骨髓瘤,如B、T和髓样白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤。在一些实施方案中,与正常或非靶向细胞或组织相比,所述抗原在疾病或病症的细胞(例如肿瘤或致病细胞)上选择性地表达或过表达。在其他实施方案中,在正常细胞上和/或在工程细胞上表达所述抗原。

[0156] 任何合适的抗原都可以在本方法中找到用途。示例性抗原包括但不限于来自传染源的抗原分子、自身(auto-/self-)抗原、肿瘤/癌症相关抗原和肿瘤新抗原(Linnemann等人,2015)。具体而言,所述抗原包括NY-ESO、EGFRvIII、Muc-1、Her2、CA-125、WT-1、Mage-A3、Mage-A4、Mage-A10、TRAIL/DR4和CEA。具体而言,两个或更多抗原受体的抗原包括但不限于CD19、EBNA、WT1、CD123、NY-ESO、EGFRvIII、MUC1、HER2、CA-125、WT1、Mage-A3、Mage-A4、Mage-A10、TRAIL/DR4和/或CEA。这些抗原的序列在本领域中是已知的,例如CD19(编号NG\_007275.1)、EBNA(编号NG\_002392.2)、WT1(编号NG\_009272.1)、CD123(编号NC\_000023.11)、NY-ESO(编号NC\_000023.11)、EGFRvIII(编号NG\_007726.3)、MUC1(编号NG\_029383.1)、HER2(编号NG\_007503.1)、CA-125(编号NG\_055257.1)、WT1(编号NG\_009272.1)、Mage-A3(编号NG\_013244.1)、Mage-A4(编号NG\_013245.1)、Mage-A10(编号NC\_000023.11)、TRAIL/DR4(编号NC\_000003.12)和/或CEA(编号NC\_000019.10)。

[0157] 肿瘤相关抗原可能来源于前列腺癌、乳腺癌、结直肠癌、肺癌、胰腺癌、肾癌、间皮瘤、卵巢癌或黑色素瘤。示例性肿瘤相关抗原或肿瘤细胞衍生抗原包括MAGE 1、3和MAGE 4(或其他例如在国际专利申请号W099/40188中公开的那些MAGE抗原);PRAME;BAGE;RAGE, Lage(也称为NY ESO 1);SAGE;以及HAGE或GAGE。这些肿瘤抗原的非限制性例子表达于诸如黑色素瘤、肺癌、肉瘤和膀胱癌等多种肿瘤类型。参见,例如,美国专利号6,544,518。前列腺癌肿瘤相关抗原包括例如前列腺特异膜抗原(PSMA)、前列腺特异抗原(PSA)、前列腺酸性磷酸酯、NKX3.1和六种前列腺跨膜上皮抗原(STEAP)。

[0158] 其他肿瘤相关抗原包括Plu-1、HASH-1、HasH-2、Cripto和Criptin。此外,肿瘤抗原可能是一种自身肽激素,如全长促性腺激素释放激素(GnRH),一种短的10个氨基酸的长肽,可用于治疗许多癌症。

[0159] 肿瘤抗原包括以诸如HER-2/neu的肿瘤相关抗原表达为特征的肿瘤抗原。感兴趣的肿瘤相关抗原包括诸如黑色素细胞黑色素瘤家族抗原MART-1/Melan-A、gp100、gp75、mda-7、酪氨酸酶和酪氨酸酶相关蛋白的家族特异性肿瘤抗原。示例性肿瘤相关抗原包括但不限于来源于或包含p53、Ras、c-Myc、细胞质丝氨酸/苏氨酸激酶(例如A-Raf、B-Raf和C-Raf、细胞周期蛋白依赖性激酶)、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A10、MAGE-A12、MART-1、BAGE、DAM-6、-10、GAGE-1、-2、-8、GAGE-3、-4、-5、-6、-7B、NA88-A、MART-1、MC1R、Gp100、PSA、PSM、酪氨酸酶、TRP-1、TRP-2、ART-4、CAMEL、CEA、Cyp-B、hTERT、hTRT、iCE、MUC1、MUC2、磷酸肌醇3-激酶(PI3K)、TRK受体、PRAME、P15、RU1、RU2、SART-1、SART-3、Wilms肿瘤抗原(WT1)、AFP、-catenin/m、Caspase-8/m、CEA、CDK-4/m、ELF2M、GnT-V、G250、HSP70-2M、HST-2、KIAA0205、MUM-1、MUM-2、MUM-3、肌球蛋白/m、RAGE、SART-2、TRP-2/INT2、707-AP、Annexin II、CDC27/m、TPI/m、bcr-abl、BCR-ABL、干扰素调节因子4(IRF4)、ETV6/AML、LDLR/FUT、Pml/RAR、肿瘤相关钙信号转导子1(TACSTD1)、TACSTD2、受体酪氨酸激酶(例如表皮生长因子受体(EGFR)(特别是EGFRvIII)、血小板衍生生长因子受体(PDGFR)、血管内皮生长因子受体(VEGFR))、细胞质酪氨酸激酶(例如src家族、svk-ZAP70家族)、整合素连接

激酶 (ILK)、信号转导和转录激活因子STAT3、STAT5和STAT6、缺氧诱导因子 (例如HIF-1和HIF-2)、核因子κB (NF-Β)、Notch受体 (例如Notch1-4)、c-Met、雷帕霉素的哺乳动物靶点 (mTOR)、WNT、细胞外信号调节激酶 (ERK) 及其调控亚基、PMSA、PR-3、MDM2、间皮素、肾细胞癌-5T4、SM22α、碳酸酐酶I (CAI) 和IX (CAIX) (又称G250)、STEAD、TEL/AML1、GD2、蛋白酶3、hTERT、肉瘤易位断点、Epha2、ML-IAP、EpCAM、ERG (TMPRSS2 ETS融合基因)、NA17、PAX3、ALK、雄激素受体、细胞周期蛋白B1、聚唾液酸、MYCN、RhoC、GD3、岩藻糖基GM1、间皮细胞、PSCA、sLe、PLAC1、GM3、BORIS、Tn、GLoboH、NY-BR-1、RGsS、SART3、STn、PAX5、OY-TES1、精子蛋白17、LCK、HMWMAA、AKAP-4、SSX2、XAGE 1、B7H3、legumain、TIE2、Page4、MAD-CT-1、FAP、MAD-CT-2、fos相关抗原1、CBX2、CLDN6、SPANX、TPTE、ACTL8、ANKRD30A、CDKN2A、MAD2L1、CTAG1B、SUNC1、LRRN1和独特型中的任何一种或多种的肿瘤抗原。

[0160] 抗原可能包括来源于肿瘤细胞中突变的基因或与正常细胞相比在不同水平转录的基因的表位区或表位肽,例如端粒酶、生存素、间皮素、突变的ras、bcr/abl重排、Her2/neu、突变的或野生型p53、细胞色素P4501B1和如N-乙酰氨基葡萄糖转移酶-V的异常表达的内含子序列;骨髓瘤和B细胞淋巴瘤中产生独特型的免疫球蛋白基因的克隆性重排;包括来自肿瘤病毒过程的表位区或表位肽的肿瘤抗原,如人乳头状瘤病毒蛋白E6和E7;Epstein bar病毒蛋白LMP2;具有肿瘤选择性表达的非突变的肿瘤胎儿蛋白,如癌胚抗原和甲胎蛋白。

[0161] 在其他实施方案中,从诸如病毒、真菌、寄生虫和细菌的致病微生物或机会性致病微生物(这里也称为传染病微生物)获得或衍生抗原。在某些实施方案中,从微生物衍生的抗原包括全长蛋白质。

[0162] 其抗原预期用于本文所述方法中的示例性病原体包括人类免疫缺陷病毒 (HIV)、单纯疱疹病毒 (HSV)、呼吸道合胞病毒 (RSV)、巨细胞病毒 (CMV)、Epstein-Barr 病毒 (EBV)、甲型流感、乙型流感、丙型流感、水泡性口炎病毒 (VSV)、多瘤病毒 (例如BK病毒和JC病毒)、腺病毒、葡萄球菌 (包括耐甲氧西林金黄色酿脓葡萄球菌 (MRSA)) 和链球菌 (包括肺炎链球菌)。如本领域技术人员所理解的,可在出版物和诸如GENBANK®、SWISS-PROT®和TREMBL®等公共数据库中识别从这些和其他致病微生物中衍生的用作本文所述抗原的蛋白质和编码所述蛋白质的核苷酸序列。

[0163] 源自人类免疫缺陷病毒 (HIV) 的抗原包括任何HIV病毒粒子结构蛋白 (例如gp120、gp41、p17、p24)、蛋白酶、逆转录酶或由tat、rev、nef、vif、vpr和vpu编码的HIV蛋白。

[0164] 源自单纯疱疹病毒的抗原 (例如HSV 1和HSV2) 包括但不限于HSV晚期基因表达的蛋白质。晚期基因主要编码形成病毒粒子的蛋白质。这些蛋白质包括形成病毒衣壳的五种蛋白质 (UL) :UL6、UL18、UL35、UL38和主要衣壳蛋白UL19、UL45和UL27,每一种都可以用作本文所述的抗原。本文中预期用作抗原的其它示例性HSV蛋白质包括ICP27 (H1、H2)、糖蛋白B (gB) 和糖蛋白D (gD) 蛋白质。所述HSV基因组至少包含74个基因,每个基因编码一种可能用作抗原的蛋白质。

[0165] 源于巨细胞病毒 (CMV) 的抗原包括CMV结构蛋白、病毒复制即时早期和早期表达的病毒抗原、糖蛋白I和III、衣壳蛋白、外壳蛋白、低基质蛋白pp65 (ppUL83)、p52 (ppUL44)、IE1和1E2 (UL123和UL122)、来自UL128-UL150基因簇的蛋白质产物 (Rykman等人,2006)、包膜糖蛋白B (gB)、gH、gN和pp150。如技术人员所理解的,本文所述用作抗原的CMV蛋白质可在

诸如GENBANK®、SWISS-PROT®和TREMBL®等公共数据库中识别(参见例如Bennekov等人,2004;Loewendorf等人,2010;Marschall等人,2009)。

[0166] 在某些实施方案中预期使用的从Epstein-Ban病毒(EBV)衍生的抗原包括EBV裂解蛋白gp350和gp110,在潜伏周期感染期间产生的EBV蛋白包括Epstein-Ban核抗原(EBNA)-1、EBNA-2、EBNA-3A、EBNA-3B、EBNA-3C、EBNA先导蛋白(EBNA-LP)和潜伏膜蛋白(LMP)-1、LMP-2A和LMP-2B(参见,例如,Lockey等人,2008)。

[0167] 预期用于本文中的源于呼吸道合胞病毒(RSV)的抗原包括由RSV基因组编码的11种蛋白质或其抗原片段中的任何一种:NS 1、NS2、N(核衣壳蛋白)、M(基质蛋白)SH、G和F(病毒外壳蛋白)、M2(第二基质蛋白)、M2-1(延伸因子)、M2-2(转录调控)、RNA聚合酶和磷蛋白P。

[0168] 来自水泡性口炎病毒(VSV)的预期使用的抗原包括VSV基因组编码的五种主要蛋白中的任何一种及其抗原片段:大蛋白(L)、糖蛋白(G)、核蛋白(N)、磷酸蛋白(P)和基质蛋白(M)(参见,例如,Rieder等人,1999)。

[0169] 在某些实施方案中预期使用的来自流感病毒的抗原包括血凝素(HA)、神经氨酸酶(NA)、核蛋白(NP)、基质蛋白M1和M2、NS1、NS2(NEP)、PA、PB1、PB1-F2和PB2。

[0170] 示例病毒抗原也包括,但不限于腺病毒多肽、 $\alpha$ 病毒多肽、杯状病毒多肽(例如杯状病毒壳抗原)、冠状病毒多肽、瘟热病毒多肽、埃博拉病毒多肽、肠病毒多肽、黄病毒多肽、肝炎病毒(AE)多肽(乙型肝炎核心或表面抗原,丙型肝炎病毒E1或E2糖蛋白、核心或非结构蛋白)、疱疹病毒多肽(包括单纯疱疹病毒或水痘带状疱疹病毒糖蛋白)、传染性腹膜炎病毒多肽、白血病病毒多肽、马尔堡病毒多肽、正粘病毒多肽、乳头状瘤病毒多肽、副流感病毒多肽(例如血凝素和神经氨酸酶多肽)、副粘病毒多肽、细小病毒多肽、瘟病毒多肽、细小核糖核酸病毒(例如脊髓灰质炎病毒衣壳多肽)、痘病毒多肽(例如牛痘病毒多肽)、狂犬病病毒多肽(例如狂犬病病毒糖蛋白G)、呼肠孤病毒多肽、逆转录病毒多肽和轮状病毒多肽。

[0171] 在某些实施方案中,所示抗原可能是细菌抗原。在某些实施方案中,感兴趣的细菌抗原可能是分泌多肽。在其他某些实施方案中,细菌抗原包括在细菌外细胞表面暴露的部分或部分多肽的抗原。

[0172] 抗原源于包括耐甲氧西林金黄色酿脓葡萄球菌(“MRSA”)的葡萄球菌种类。它被考虑用于包括Agr系统、Sar和Sae、Arl系统、Sar同源物(Rot、MgrA、SarS、SarR、SarT、SarU、SarV、SarX、SarZ和TcaR)、Srr系统与TRAP的毒性调节器。其他可作为抗原的葡萄球菌蛋白包括C1p蛋白、HtrA、Msrr、顺乌头酸酶、CcpA、SvrA、Msa、CfvA和CfvB(参见,例如,Staphylococcus: Molecular Genetics, 2008 Caister Academic Press, Ed. Jodi Lindsay)。两种金黄色酿脓葡萄球菌(N315和Mu50)的基因组已经测序,并公开提供,例如在PATRIC(PATRIC:The VBI PathoSystems Resource Integration Center,Snyder等人,2007)。如技术人员所理解,作为抗原使用的葡萄球菌蛋白质也可在诸如GenBank®、Swiss-Prot®和TrEMBL®等其他公共数据库中识别。

[0173] 被考虑用于本文所述的某些实施方案的抗原源于肺炎链球菌,包括肺炎链球菌溶血素、PspA、胆碱结合蛋白A(CbpA)、NanA、NanB、SpnHL、PavA、LytA、Pht和菌毛蛋白(RrgA;RrgB;RrgC)。肺炎链球菌的抗原蛋白在本领域中也是已知的,并且可以在一些实施方案中用作抗原(参见,例如,Zysk等人,2000)。已对肺炎链球菌毒株的全基因组序列进行了测序,

如本领域技术人员所理解的,本文中使用的肺炎链球菌蛋白质也可在诸如 GENBANK®、SWISS-PROT® 和 TREMBL® 等其他公共数据库中识别。根据本公开,对抗原特别感兴趣的蛋白质包括毒力因子和预计暴露在肺炎球菌表面的蛋白质(参见,例如,Frolet等人,2010)。

[0174] 可用作抗原的细菌抗原的例子包括但不限于放线菌多肽、芽孢杆菌多肽、拟杆菌多肽、博德特氏菌多肽、巴尔通体多肽、包柔氏螺旋体多肽(例如,莱姆病螺旋体)、布鲁氏菌多肽,弯曲杆菌多肽、噬菌体多肽、衣原体多肽、棒状杆菌多肽、柯克斯氏体多肽、嗜皮菌多肽、肠球菌多肽、埃立克体多肽、大肠杆菌多肽、弗朗西斯菌多肽、梭杆菌多肽、巴尔通氏体多肽、嗜血杆菌多肽(如B型流感病毒外膜蛋白)、螺旋杆菌多肽、克雷伯菌多肽、L型细菌多肽、钩端螺旋体多肽、李斯特菌多肽、分枝杆菌多肽、支原体多肽、奈瑟菌多肽、新立克次体多肽、诺卡氏菌多肽、巴氏杆菌多肽、消化球菌多肽、消化链球菌多肽、肺炎球菌多肽(即肺炎链球菌多肽)(见本文描述)、变形杆菌多肽、假单胞菌多肽、立克次体多肽、罗氏菌多肽、沙门氏菌多肽、志贺氏菌多肽、葡萄球菌多肽、A组链球菌多肽(例如化脓性链球菌M蛋白)、B组链球菌(无乳链球菌)多肽、螺旋体多肽,和耶尔森菌多肽(如鼠疫F1和V抗原)。

[0175] 真菌抗原的例子包括但不限于:犁头霉菌多肽、顶孢菌多肽、链格孢霉多肽、曲霉多肽、蛙粪霉菌多肽、平脐蠕孢多肽、芽生菌多肽、念珠菌多肽、球虫多肽、耳霉多肽、隐球菌多肽、弯孢菌多肽、表皮癣菌多肽、外瓶霉多肽、地霉多肽、组织胞浆菌多肽、马杜拉分枝菌多肽、马拉色菌多肽、小孢子菌多肽、小丛梗孢多肽、被孢霉多肽、毛霉多肽、拟青霉多肽、青霉多肽、单胞瓶霉多肽、瓶霉菌多肽、原壁菌多肽、假霉样真菌多肽、假单胞菌多肽、腐霉多肽、鼻孢子菌多肽、根霉多肽、丝状担子菌多肽、孢子丝菌多肽、柄霉多肽、毛霉菌多肽、毛孢子菌多肽和木霉多肽。

[0176] 原生动物寄生虫抗原的例子包括但不限于巴贝虫多肽、结肠小袋虫多肽、贝诺孢子虫多肽、隐孢子虫多肽、艾美球虫多肽、脑炎微孢子虫多肽、内阿米巴多肽、贾第鞭毛虫多肽、哈蒙德虫多肽、肝簇虫多肽、等孢子虫多肽、利什曼原虫多肽、小孢子虫多肽、新孢子虫多肽、微粒子虫多肽、五滴虫多肽、疟原虫多肽。蠕虫寄生虫抗原的例子包括但不限于棘唇线虫多肽、猫圆线虫多肽、钩虫多肽、管圆线虫多肽、蛔虫多肽、马来丝虫多肽、仰口线虫多肽、毛细线虫多肽、夏柏特线虫多肽、古柏线虫多肽、环体线虫多肽、网尾线虫多肽、球孢子虫多肽、棘唇线虫多肽、裂头绦虫多肽、*Diplydium*多肽、恶丝虫多肽、龙线虫多肽、蛲虫多肽、类丝虫多肽、血矛线虫多肽、兔唇蛔虫多肽、*Loa*多肽、曼森氏线虫多肽、缪勒线虫多肽、侏体吸虫多肽、板口线虫多肽、细颈线虫多肽、结节线虫多肽、盘尾丝虫多肽、后睾吸虫多肽、奥斯特线虫多肽、副鞭毛虫多肽、并殖吸虫多肽、副蛔虫多肽、肺孢子虫多肽、原圆线虫多肽、狗尾草多肽、尾旋线虫多肽、迭宫绦虫多肽、冠丝虫多肽、类圆线虫多肽、圆线虫多肽、吸吮线虫多肽、弓形虫多肽、弓蛔虫多肽、旋毛虫多肽、毛圆线虫多肽、鞭虫多肽、钩虫多肽和血丝虫多肽。(例如恶性疟原虫环子孢子(PfCSP)、子孢子虫表面蛋白2(PfSSP2)、肝状态抗原1羧基末端(PfLSA1 c-末端)和出口蛋白1(PfExp-1)、肺孢子虫多肽、肉孢子虫多肽、裂殖多肽、泰勒虫多肽、弓形虫多肽和锥虫多肽。

[0177] 外寄生虫抗原的例子包括但不限于跳蚤的多肽(包括抗原和过敏原);蜱,包括硬蜱和软蜱;蝇,例如蠔、蚊子、沙蝇、黑蝇、马蝇、角蝇、鹿蝇、采采蝇、螯蝇、引起蝇蛆病的苍蝇和咬人的蚊虫;蚂蚁;蜘蛛,虱子;螨虫;真虫,如臭虫和接吻虫。

[0178] 6. 自杀基因

[0179] 本公开的免疫细胞的CAR和/或TCR可包含一个或多个自杀基因。本文中使用的术语“自杀基因”被定义为一种基因，其在前体药物给药前，影响从基因产物到杀死其宿主细胞的化合物的转变。可使用自杀基因/前体药物组合的例子有：单纯疱疹病毒胸昔激酶(HSV-tk)和更昔洛韦、阿昔洛韦或FIAU；氧脱氧还原酶和环己酰亚胺；胞嘧啶脱氨酶和5-氟胞嘧啶；胸昔激酶胸昔酸激酶(Tdk::Tmk)和AZT；脱氧胞昔激酶和阿糖胞昔。

[0180] 大肠杆菌嘌呤核昔磷酸化酶，一种所谓的自杀基因，能将前体药物6-甲基嘌呤脱氧核糖转化为有毒的嘌呤6-甲基嘌呤。与前体药物一起使用的自杀基因的其他例子是大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶基因和HSV胸腺嘧啶激酶基因。

[0181] 示例性自杀基因包括CD20、CD52、EGFRv3或诱导型caspase 9。在一个实施方案中，截短版的EGFR变体III (EGFRv3) 可用作可被西妥昔单抗清除的自杀抗原。本领域已知的可用于本公开的其他基因包括嘌呤核昔磷酸化酶 (PNP)、细胞色素p450酶 (CYP)、羧肽酶 (CP)、羧酸酯酶 (CE)、硝基还原酶 (NTR)、鸟嘌呤核糖基转移酶 (XGRTP)、糖昔酶、甲硫氨酸- $\alpha$ 、 $\gamma$ -裂解酶 (MET) 和胸昔磷酸化酶 (TP)。

[0182] 7. 递送方法

[0183] 本领域技术人员将装备精良以通过标准重组技术来构建载体(参见例如Sambrook等人, 2001和Ausubel等人, 1996,这两篇文献均以引用方式并入本文),以用于表达本公开的抗原受体。载体包括但不限于质粒、粘粒、病毒(噬菌体、动物病毒,以及植物病毒),以及人工染色体(例如YAC),诸如逆转录病毒载体(例如,源自莫洛尼氏鼠白血病病毒载体(MoMLV)、MSCV、SFFV、MPSV、SNV等);慢病毒载体(例如源自HIV-1、HIV-2、SIV、BIV、FIV等);腺病毒(Ad)载体,包括其复制型形式、复制缺陷型形式和无病毒基因(gutless)形式;腺相关病毒(AAV)载体;猿猴病毒40(SV-40)载体;牛乳头瘤病毒载体;艾普斯登-巴尔病毒载体;疱疹病毒载体;牛痘病毒载体;哈维鼠肉瘤病毒载体;鼠乳腺肿瘤病毒载体;劳斯氏肉瘤病毒载体;微小病毒载体;脊髓灰质炎病毒载体;水疱性口炎病毒载体;马拉巴病毒载体;以及B组腺病毒enadenotucirev载体。

[0184] a. 病毒载体

[0185] 在本公开的某些方面中可提供编码抗原受体的病毒载体。在产生重组病毒载体时,通常用异源(或非天然)蛋白的基因或编码序列来替换非必需基因。病毒载体是一种表达构建体,其利用病毒序列来将核酸和可能的蛋白质引入细胞中。某些病毒经由受体介导的-内吞作用感染细胞或进入细胞的能力,以及整合入宿主细胞基因组并稳定且有效地表达病毒基因的能力已经使它们成为用于将外来核酸转移到细胞(例如,哺乳动物细胞)中的吸引人的候选物。下文描述了可用于递送本发明某些方面的核酸的病毒载体的非限制性示例。

[0186] 慢病毒是复杂的逆转录病毒,除常见的逆转录病毒基因gag、pol和env外,其还含有其他具有调节或结构功能的基因。慢病毒载体是本领域中众所周知的(参见例如,美国专利6,013,516和5,994,136)。

[0187] 重组慢病毒载体能够感染非分裂细胞,并且可用于体内和离体基因转移和核酸序列表达。例如,在美国专利5,994,136中描述了能够感染非分裂细胞的重组慢病毒,其中合适的宿主细胞是用两种或更多种携带包装功能的载体(即gag、pol和env,以及rev和tat)转

染的,该美国专利以引用方式并入本文。

[0188] b. 调节元件

[0189] 可用于本公开中的载体中所包含的表达盒具体地含有(在5'至3'方向上)可操作地连接至蛋白质编码序列的真核转录启动子,包含间插序列的剪接信号,以及转录终止/聚腺苷酸化序列。控制真核细胞中蛋白质编码基因转录的启动子和增强子由多种遗传元件组成。所述细胞机制能够收集和整合每个元件所传达的调节信息,从而允许不同基因进化出独特的,通常是复杂的转录调节模式。在本公开的上下文中使用的启动子包括组成型启动子、诱导型启动子,以及组织特异性启动子。

[0190] (i) 启动子/增强剂

[0191] 本文提供的表达构建体包含驱动抗原受体表达的启动子。启动子通常包含作用以定位RNA合成起始位点的序列。此序列的最众所周知的示例是TATA盒,但在一些缺乏TATA盒的启动子(例如,用于哺乳动物末端脱氧核苷酸转移酶基因的启动子和用于SV40晚期基因的启动子)中,覆盖起始位点的分立元件本身有助于固定起始位置。其他启动子元件调节转录起始的频率。通常,这些启动子元件位于起始位点上游30110bp-的区域中,尽管许多启动子已显示为还含有起始位点下游的功能元件。为了使编码序列“处于启动子的控制下”,将转录阅读框的转录起始位点的5'末端定位在所选启动子“下游”(即,3'端)。“上游”启动子刺激DNA的转录并促进所编码的RNA的表达。

[0192] 启动子元件之间的间距通常是灵活的,因此当元件相对于彼此反转或移动时,启动子功能得以保留。在tk启动子中,在活性开始下降之前,启动子元件之间的间距可以增大到50bp。取决于启动子,似乎单独元件可协同或独立地作用以激活转录。启动子可以或可以不与“增强子”结合使用,“增强子”是指参与核酸序列的转录激活的顺式作用调节序列。

[0193] 启动子可以是与核酸序列天然结合的启动子,如可通过分离位于编码区段和/或外显子上游的5'非编码序列获得。此类启动子可以称为“内源的”。类似地,增强子可以是与核酸序列天然结合的增强子,位于该核酸序列的下游或上游。或者,通过将编码核酸区段置于重组或异源启动子的控制下将获得某些优点,重组或异源启动子是指在其天然环境中通常不与核酸序列结合的启动子。重组或异源增强子还指在其天然环境中通常不与核酸序列结合的增强子。此类启动子或增强子可包括其他基因的启动子或增强子,以及从任何其他病毒或原核或真核细胞中分离的启动子或增强子,以及不是“天然存在的”(即,含有不同转录调节区的不同元件和/或改变表达的突变)的启动子或增强子。例如,在重组DNA构建体中最常用的启动子包括β内酰胺酶(青霉素酶)、乳糖和色氨酸(*trp*-)启动子系统。除了合成地产生启动子和增强子的核酸序列外,还可以结合本文公开的组合物,使用重组克隆和/或核酸扩增技术(包括PCR<sup>TM</sup>)来产生序列。此外,可以预期的是,也可以采用指导序列在非核细胞器内的转录和/或表达的控制序列,所述细胞器为诸如线粒体、叶绿体等。

[0194] 自然地,将重要的是采用这样的启动子和/或增强子,所述启动子和/或增强子有效指导DNA区段在被选择进行表达的细胞器、细胞类型、组织、器官或生物体中的表达。分子生物学领域的技术人员通常知道用于蛋白质表达的启动子、增强子和细胞类型组合的使用(参见,例如Sambrook等人,1989,该文献以引用方式并入本文)。所采用的启动子可以是组成型的、组织特异性的、诱导型的,和/或可在适当条件下使用以指导导入的DNA区段的高水平表达,这诸如在重组蛋白和/或肽的大规模生产中是有利的。启动子可以是异源的或内源

的。

[0195] 此外,任何启动子/增强子组合(根据例如通过万维网在网址epd.isb-sib.ch/处的真核启动子数据库EPDB)也可以用于驱动表达。T3、T7或SP6细胞质表达系统的使用是另一个可能的实施方案。如果适当的细菌聚合酶被提供作为递送复合体的一部分或作为另外的基因表达构建体,则真核细胞可以支持某些细菌启动子的细胞质转录。

[0196] 启动子的非限制性示例包括早期或晚期病毒启动子,诸如SV40早期或晚期启动子、巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子、劳氏肉瘤病毒(RSV)早期启动子;真核细胞启动子,诸如β肌动蛋白启动子、GADPH启动子、金属硫蛋白启动子;以及连锁反应元件启动子,诸如最小TATA盒附近的环状AMP反应元件启动子(cre)、血清反应元件启动子(sre)、佛波酯启动子(TPA)和响应元件启动子(tre)。也可以使用人类生长激素启动子序列(例如,在Genbank处描述的人类生长激素最小启动子,登录号X05244,核苷酸283-341)或小鼠乳腺瘤启动子(可从ATCC,产品目录号ATCC 45007获得)。在某些实施方案中,启动子是CMV IE、dectin-1、dectin-2、人CD11c、F4/80、SM22、RSV、SV40、Ad MLP、β-肌动蛋白、MHC I类或MHC II类启动子,然而可用于驱动治疗性基因表达的任何其他启动子也适用于本公开的实践。

[0197] 在某些方面中,本公开的方法还涉及增强子序列,即这样的核酸序列,所述核酸序列增强启动子活性并且具有顺式作用的潜力,而不管它们的定向如何,即使在相对较长的距离(距靶启动子至多几千个碱基)下。然而,增强子功能不一定限于如此长的距离,因为它们也可以在给定启动子的紧邻处起作用。

[0198] (ii) 起始信号和连锁表达

[0199] 特异性起始信号也可以用于本公开提供的表达构建体中以有效翻译编码序列。这些信号包括ATG起始密码子或相邻序列。可能需要提供外源翻译控制信号,包括ATG起始密码子。本领域普通技术人员将能够容易地确定此并提供必要的信号。众所周知的是,起始密码子必须是与所需编码序列的阅读框“符合读框”的,以确保整个插入物的翻译。外源翻译控制信号和起始密码子可以是天然的或合成的。通过包含适当的转录增强子元件可以使表达效率增强。

[0200] 在某些实施方案中,使用内部核糖体进入位点(IRES)元件来产生多基因信息,或多顺反子信息。IRES元件能够绕过5甲基化Cap依赖性翻译的核糖体扫描模型,并在内部位点处开始翻译。已经描述了来自小核糖核酸病毒家族的两个成员(脊髓灰质炎和脑心肌炎)的IRES元件,以及来自哺乳动物信息的IRES。IRES元件可以链接到异源开放阅读框。可以将多个开放阅读框一起转录,各个阅读框由IRES分隔开,从而创建多顺反子信息。借助于IRES元件,核糖体可接近每个开放阅读框以进行有效翻译。使用单个启动子/增强子来转录单个信息,可以有效表达多个基因。

[0201] 另外,某些2A序列元件可用于在本公开提供的构建体中创建基因的连锁表达或共表达。例如,通过连接开放阅读框以形成单个顺反子,切割序列可用于共表达基因。示例性的切割序列是F2A(口蹄疫病毒2A)或“2A样”序列(例如,明脉扁刺蛾(Thosea asigna)病毒2A;T2A)。

[0202] (iii) 复制起点

[0203] 为了使载体在宿主细胞中增殖,所述载体可以含有一个或多个复制起始位点(通常称为“ori”),例如,与如上所述的EBV的oriP或在编程中具有相似或增强的功能的基因工

程化oriP对应的核酸序列,所述核酸序列是复制起始的特定核酸序列。或者,可以采用如上所述的其他染色体外复制病毒的复制起点或自主复制序列(ARS)。

[0204] c. 选择标记和可筛选标记

[0205] 在一些实施方案中,含有本公开的构建体的细胞可以通过在表达载体中包含标记而被体外或体内地鉴定。此类标记应赋予细胞可鉴定的改变,从而允许容易地鉴定含有表达载体的细胞。通常,选择标记是赋予允许选择的属性的标记。阳性选择标记是这样的选择标记,其中所述标记的存在允许其选择,而阴性选择标记是这样的选择标记,其中所述标记的存在阻止其选择。阳性选择标记的一示例是抗药性标记。

[0206] 通常,包含药物选择标记有助于克隆和鉴定转化体,例如赋予对新霉素、嘌呤霉素、潮霉素、DHFR、GPT、吉欧霉素(zeocin)和组氨醇的抗性的基因是有用的选择标记。除了赋予允许基于条件的实施来区分转化体的表型的标记之外,还考虑了其他类型的标记,包括可筛选标记,诸如GFP,所述GFP的基础是比色分析。或者,可以利用可筛选的酶作为阴性选择标记,诸如单纯疱疹病毒胸苷激酶(tk)或氯霉素乙酰基转移酶(CAT)。本领域技术人员也将知道如何采用免疫学标记,所述免疫学标记的采用可能与FACS分析结合。据信所使用的标记是不重要的,只要所述标记能够与编码基因产物的核酸同时表达即可。选择标记和可筛选标记的其他示例是本领域技术人员所熟知的。

[0207] d. 其他核酸递送方法

[0208] 除了病毒递送编码抗原受体的核酸外,以下是将重组基因递送至给定宿主细胞的另外方法,因此所述另外方法也被视为在本公开中。

[0209] 如本文所述或如本领域普通技术人员已知的,将诸如DNA或RNA等核酸引入本公开的免疫细胞中可使用用于核酸递送以转化细胞的任何合适方法。此类方法包括但不限于直接DNA递送,诸如通过离体转染、通过注射,包括显微注射;通过电穿孔;通过磷酸钙沉淀;通过使用DEAE-葡聚糖之后是聚乙二醇;通过直接声波负载;通过脂质体介导的转染和受体介导的转染;通过微粒轰击;通过与碳化硅纤维一起搅拌;通过农杆菌(*Agrobacterium*-)介导的转化;通过干燥/抑制-介导的DNA吸收,以及此类方法的任意组合。通过应用诸如这些的技术,可以稳定地或瞬时地转化细胞器、细胞、组织或生物体。

[0210] E. 对基因表达的修饰

[0211] 在一些实施方案中,对本公开的免疫细胞进行修饰以改变某些基因的表达,所述基因为诸如糖皮质激素受体、TGF $\beta$ 受体(例如,TGF $\beta$ -RII)和/或CISH。在一个实施方案中,可以对免疫细胞进行修饰以表达显性阴性TGF $\beta$ 受体II(TGF $\beta$ RIIDN),所述显性阴性TGF $\beta$ 受体II可以充当细胞因子槽(cytokine sink)以消耗内源性TGF $\beta$ 。

[0212] 细胞因子信号传导对于造血细胞的正常功能至关重要。SOCS蛋白质家族在细胞因子信号传导的负调节中起重要的作用,起到内在制动的作用。CIS是由CISH基因编码的SOCS蛋白质家族的成员,其已被鉴定为小鼠NK细胞中的重要检查点分子。因此,在一些实施方案中,本公开涉及敲除免疫细胞中(诸如在NK细胞和CD8 $^+$  T细胞中)的CISH以改善细胞毒性。该方法可以单独使用或与其他检查点抑制剂联合使用以改善抗肿瘤活性。

[0213] 在一些实施方案中,改变的基因表达是通过实行所述基因的破坏来进行的,诸如敲除、插入、错义或移码突变(诸如双等位基因移码突变),全部或部分基因(例如一个或多个外显子或部分)的缺失,和/或敲入。例如,改变的基因表达可以通过序列特异性或靶向核

酸酶来实现,所述序列特异性或靶向核酸酶包括结合DNA的靶向核酸酶,诸如锌指核酸酶(ZFN)和转录激活因子样效应核酸酶(TALEN),以及RNA指导的核酸酶(诸如CRISPR相关的核酸酶(Cas)),所述序列特异性或靶向核酸酶专门设计用于靶向所述基因的序列或其部分。

[0214] 在一些实施方案中,基因的表达、活性和/或功能的改变是通过破坏所述基因来进行的。在一些方面中,所述基因经修饰,使得与在缺乏基因修饰的情况下或在没有被引入以实行修饰的组分的情况下相比,所述基因的表达降低至少或约20%、30%或40%,通常至少或约50%、60%、70%、80%、90%或95%。

[0215] 在一些实施方案中,所述改变是瞬时的或可逆的,使得所述基因的表达在稍后的时间恢复。在其他实施方案中,该改变是不可逆的或短暂的,例如是永久的。

[0216] 在一些实施方案中,通过通常以靶向方式诱导基因中的一个或多个双链断裂和/或一个或多个单链断裂来进行基因改变。在一些实施方案中,双链或单链断裂是通过核酸酶(例如内切核酸酶,诸如基因靶向核酸酶)产生的。在一些方面中,在基因的编码区(例如在外显子中)诱导断裂。例如,在一些实施方案中,所述诱导发生在编码区的N末端部分附近,例如在第一外显子中、在第二外显子中,或在后续外显子中。

[0217] 在一些方面中,双链或单链断裂通过细胞修复过程来进行修复,诸如通过非同源末端连接(NHEJ)或同源性定向修复(HDR)。在一些方面中,修复过程是易出错的并且导致对所述基因的破坏,诸如移码突变,例如双等位基因移码突变,所述双等位基因移码突变可以导致所述基因的完全敲除。例如,在一些方面中,所述破坏包括诱导缺失、突变和/或插入。在一些实施方案中,所述破坏导致早期终止密码子的存在。在一些方面中,插入、缺失、易位、移码突变和/或提前终止密码子的存在导致对所述基因的表达、活性和/或功能的破坏。

[0218] 在一些实施方案中,使用反义技术来实现基因改变,诸如通过RNA干扰(RNAi)、短干扰RNA(siRNA)、短发夹(shRNA),和/或使用核酶来选择性地抑制或压制所述基因的表达。siRNA技术是一种RNAi,其采用双链RNA分子,所述双链RNA分子具有与从所述基因转录的mRNA的核苷酸序列同源的序列,以及与所述核苷酸序列互补的序列。siRNA通常与从所述基因转录的mRNA的一个区域同源/互补,或者可以是包含多个与不同区域同源/互补的RNA分子的siRNA。在一些方面中,siRNA包含在多顺反子构建体中。

[0219] 1. ZFP和ZFN

[0220] 在一些实施方案中,靶向DNA的分子包括与诸如核酸内切酶等效应蛋白融合的DNA结合蛋白,诸如一种或多种锌指蛋白(ZFP)或转录激活因子样蛋白(TAL)。示例包括ZFN、TALE和TALEN。

[0221] 在一些实施方案中,靶向DNA的分子包含以序列特异性方式与DNA结合的一种或多种锌指蛋白(ZFP)或其结构域。ZFP或其结构域是通过一个或多个锌指以序列特异性方式与DNA结合的蛋白质或较大蛋白质内的结构域,所述锌指是具有这样的结合结构域内的氨基酸序列的区域,所述结合结构域的结构通过锌离子配位而稳定化。术语锌指DNA结合蛋白通常缩写为锌指蛋白或ZFP。ZFP中有这样的人工ZFP结构域,所述人工ZFP结构域靶向通过单独指的装配而产生的通常为9-18个核苷酸长的特定DNA序列。

[0222] ZFP包括这样的ZFP,在所述ZFP中单指结构域长度为约30个氨基酸并且含有 $\alpha$ 螺旋,所述 $\alpha$ 螺旋含有两个不变的组氨酸残基通过锌与单一 $\beta$ 转角的两个半胱氨酸配位,并且具有两个、三个、四个、五个或六个指。通常,ZFP的序列特异性可以通过对锌指识别螺旋上

的四个螺旋位置(-1、2、3和6)进行氨基酸取代来改变。因此,在一些实施方案中,ZFP或含ZFP的分子是非天然存在的,例如经工程化以与选定的靶位点结合。

[0223] 在一些实施方案中,靶向DNA的分子是或包含这样的锌指DNA结合结构域,所述锌指DNA结合结构域与DNA切割结构域融合以形成锌指核酸酶(ZFN)。在一些实施方案中,融合蛋白包含来自至少一种1iS型限制酶的切割结构域(或切割半结构域),以及一个或多个锌指结合结构域,所述一个或多个锌指结合结构域可以或可以不经工程化。在一些实施方案中,切割结构域来自1iS型限制性内切核酸酶Fok I。Fok I通常催化在一条链上距其识别位点9个核苷酸处和在另一条链上距其识别位点13个核苷酸处的DNA双链切割。

[0224] 许多基因特异性工程化的锌指可商购获得。例如,Sangamo Biosciences(Richmond,CA,USA)已经与Sigma-Aldrich(St.Louis,MO,USA)合作开发了用于锌指构建的平台(CompoZr),从而允许研究人员完全绕过锌指构建和验证,并且提供了针对数千种蛋白质的特异性靶向锌指(Gaj等人,Trends in Biotechnology,2013,31(7),397-405)。在一些实施方案中,使用或定制设计市售的锌指。(参见例如,Sigma-Aldrich目录号CSTZFND、CSTZFN、CTi1-1KT,以及PZD0020)。

#### [0225] 2.TAL、TALE和TALEN

[0226] 在一些实施方案中,靶向DNA的分子包含天然存在的或经工程化的(非天然存在的)转录激活因子样蛋白(TAL)DNA结合结构域,诸如在转录激活因子样蛋白效应物(TALE)蛋白中,参见例如美国专利公开号2011/0301073,该美国专利公开的全部内容以引用方式并入本文。

[0227] TALE DNA结合结构域或TALE是包含一个或多个TALE重复结构域/单元的多肽。所述重复结构域参与TALE与其同源靶DNA序列的结合。单一“重复单元”(也称为“重复序列”)的长度通常为33-35个氨基酸,并且表现出与天然存在的TALE蛋白内的其他TALE重复序列的至少一些序列同源性。每个TALE重复单元都包含1个或2个DNA结合残基,从而通常在重复序列的12位和/或13位处组成重复可变双残基(RVD)。已经确定了用于这些TALE的DNA识别的天然(规范)编码,使得12位和13位处的HD序列导致与胞嘧啶(C)结合,NG与T结合,NI与A结合,NN与G或A结合,并且N0与T结合,并且非规范(非典型的)RVD也是已知的。在一些实施方案中,可以通过设计对靶DNA序列具有特异性的TAL阵列来将TALE靶向任何基因。靶序列通常以胸苷开始。

[0228] 在一些实施方案中,所述分子是DNA结合核酸内切酶,诸如TALE核酸酶(TALEN)。在一些方面中,TALEN是融合蛋白,所述融合蛋白包含来源于TALE的DNA结合结构域以及用于切割核酸靶序列的核酸酶催化结构域。

[0229] 在一些实施方案中,TALEN识别并切割基因中的靶序列。在一些方面中,DNA的切割导致双链断裂。在一些方面中,所述断裂刺激同源重组或非同源末端连接(NHEJ)的速率。通常,NHEJ是不完善的修复过程,其通常导致切割位点处的DNA序列的变化。在一些方面中,修复机制涉及通过直接重新连接或经由所谓的微同源性介导的末端连接来重新连接两个DNA末端的残留部分。在一些实施方案中,经由NHEJ进行修复导致小的插入或缺失,并且可用于破坏并由此抑制所述基因。在一些实施方案中,修饰可以是至少一个核苷酸的取代、缺失或添加。在一些方面中,已经发生了切割诱导的诱变事件(即,相继于NHEJ事件发生的诱变事件)的细胞可以通过本领域中众所周知的方法来鉴定和/或选择。

[0230] 在一些实施方案中,将TALE重复序列装配以特异性地靶向基因。(Gaj等人,2013)。已经构建了靶向18,740种人类蛋白质编码基因的TALEN文库(Kim等人,2013)。定制设计的TALE阵列可通过Celllectis Bioresearch(Paris,France)、Transposagen Biopharmaceuticals(Lexington,KY,USA)和Life Technologies(Grand Island,NY,USA)商购获得。具体地,靶向CD38的TALEN是可商购获得的(参见Gencopoeia,产品目录号HTN222870-1、HTN222870-2和HTN222870-3)。示例性分子描述于美国专利公开号US 2014/0120622和2013/0315884中。

[0231] 在一些实施方案中,TALEN作为由一种或多种质粒载体编码的转基因引入。在一些方面中,质粒载体可以含有选择标记,所述选择标记提供用于鉴定和/或选择接受所述载体的细胞。

[0232] 3.RGEN(CRISPR/Cas系统)

[0233] 在一些实施方案中,使用一种或多种DNA结合核酸来进行改变,诸如经由RNA指导的核酸内切酶(RGEN)来进行改变。例如,可以使用成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)和CRISPR相关的(Cas)蛋白来进行改变。通常,“CRISPR系统”统指参与CRISPR相关(“Cas”)基因的表达或指导其活性的转录物和其他元件,所述转录物和其他元件包括编码Cas基因的序列、tracr(反式激活CRISPR)序列(例如,tracrRNA或有活性的部分tracrRNA)、tracr配偶序列(在内源性CRISPR系统的背景下包含“直接重复序列”和经tracrRNA处理的部分直接重复序列)、指导序列(在内源性CRISPR系统的背景下也称为“间隔区”),和/或来自CRISPR基因座的其他序列和转录物。

[0234] CRISPR/Cas核酸酶或CRISPR/Cas核酸酶系统可包括非编码RNA分子(指导)RNA,所述非编码RNA分子(指导)RNA与DNA序列特异性地结合;以及具有核酸酶功能性(例如,两个核酸酶结构域)的Cas蛋白质(例如,Cas9)。CRISPR系统的一个或多个元件可源自I型、II型或III型CRISPR系统,例如源自包含内源性CRISPR系统的特定生物体,诸如酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)。

[0235] 在一些方面中,将Cas核酸酶和gRNA(包括对靶序列特异的crRNA与固定的tracrRNA的融合体)引入细胞中。通常,在gRNA的5'端的靶位点使用互补碱基配对来将Cas核酸酶靶向靶位点(例如,所述基因)。靶位点可以基于其位置紧邻前间区序列临近基序(PAM)序列(诸如通常为NGG或NAG)的5'端而被选择。就此而言,通过将指导RNA的前20个、19个、18个、17个、16个、15个、14个、13个、12个、11个、或10个核苷酸修饰成对应于靶DNA序列,而将gRNA靶向所需序列。通常,CRISPR系统的特征在于促进靶序列的位点处CRISPR复合物形成的元件。通常,“靶序列”通常是指这样的序列,指导序列被设计为与所述序列具有互补性,其中靶序列与指导序列之间的杂交促进CRISPR复合物的形成。不一定需要完全互补,前提条件是存在足够的互补性以引起杂交并促进CRISPR复合物的形成。

[0236] CRISPR系统可以在靶位点处诱导双链断裂(DSB),之后进行如本文所述的破坏或改变。在其他实施方案中,使用被认为是“切口酶”的Cas9变体来使单链在靶位点处产生切口。可以使用成对的切口酶,例如以提高特异性,每一对切口酶均由一对不同的gRNA靶向序列指导,使得在同时引入切口时,引入5'突出端。在其他实施方案中,将无催化活性的Cas9融合至异源效应结构域(诸如转录阻遏物或激活因子),以影响基因表达。

[0237] 靶序列可以包含任何多核苷酸,诸如DNA或RNA多核苷酸。靶序列可以位于细胞的

核或细胞质中,诸如在细胞的细胞器内。通常,可用于重组到包含靶序列的靶基因座中的序列或模板被称为“编辑模板”或“编辑多核苷酸”或“编辑序列”。在一些方面中,外源模板多核苷酸可以被称为编辑模板。在一些方面中,重组是同源重组。

[0238] 通常,在内源性CRISPR系统的背景下,CRISPR复合物(包含与靶序列杂交并与一种或多种Cas蛋白复合的指导序列)的形成导致靶序列中或附近(例如,在距所述靶序列1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、20个、50个或更多个碱基对内)的一条链或两条链的切割。tracr序列可包含或由野生型tracr序列的全部或一部分或由野生型tracr序列的全部或一部分组成(例如,野生型tracr序列的约或大于约20个、26个、32个、45个、48个、54个、63个、67个、85个或更多个核苷酸),其也可以从CRISPR复合物的一部分形成,诸如通过沿着tracr序列的至少一部分与tracr配偶序列的全部或一部分进行杂交,所述tracr配偶序列可操作地连接至指导序列。tracr序列与tracr配偶序列具有足够的互补性以杂交并参与CRISPR复合物的形成,诸如当最佳比对时沿着tracr配偶序列的长度至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%的序列互补性。

[0239] 可以将驱动CRISPR系统的一种或多种元件的表达的一种或多种载体引入细胞中,以使CRISPR系统的元件的表达直接在一个或多个靶位点处形成CRISPR复合物。部件也可以作为蛋白质和/或RNA递送到细胞。例如,Cas酶、连接至tracr配偶序列的指导序列,以及tracr序列可各自可操作地连接至单独载体上的单独调节元件。或者,可以将由相同或不同调节元件表达的元件中的两个或更多个元件组合在单个载体中,并且一个或多个附加载体提供不包含在第一载体中的CRISPR系统的任何部件。载体可包含一个或多个插入位点,诸如限制性核酸内切酶识别序列(也称为“克隆位点”)。在一些实施方案中,一个或多个插入位点位于一个或多个载体的一个或多个序列元件的上游和/或下游。当使用多个不同的指导序列时,单个表达构建体可用于将CRISPR活性靶向至细胞内的多个不同的对应靶序列。

[0240] 载体可包含调节元件,所述调节元件可操作地连接至编码CRISPR酶(诸如Cas蛋白)的酶编码序列。Cas蛋白的非限制性示例包括Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9(也称为Csn1和Csx12)、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4,它们的同源物,或它们的经修饰形式。这些酶是已知的;例如,酿脓链球菌Cas9蛋白的氨基酸序列可以在SwissProt数据库中以登录号Q99ZW2找到。

[0241] CRISPR酶可以是Cas9(例如,来自酿脓链球菌或肺炎链球菌(*S. pneumonia*))。CRISPR酶可以指导对一条或两条链的靶序列位置处的切割,诸如在靶序列内和/或在靶序列的互补序列内的切割。载体可以编码这样的CRISPR酶,所述CRISPR酶相对于对应的野生型酶突变,使得突变的CRISPR酶缺乏切割含有靶序列的靶多核苷酸的一条或两条链的能力。例如,来自酿脓链球菌的Cas9的RuvC I催化结构域中的天冬氨酸至丙氨酸取代(D10A)将Cas9从切割两条链的核酸酶转化成切口酶(切割单条链)。在一些实施方案中,Cas9切口酶可以与指导序列(例如,两个指导序列,所述两个指导序列分别靶向DNA靶的有义链和反义链)组合使用。该组合允许两条链都被切开切口并用于诱导NHEJ或HDR。

[0242] 在一些实施方案中,对编码CRISPR酶的酶编码序列进行密码子优化,以在诸如真核细胞等特定细胞中表达。真核细胞可以是特定生物体(诸如哺乳动物,包括但不限于人、

小鼠、大鼠、兔子、狗或非人灵长类)的那些真核细胞或来源于所述特定生物体的那些真核细胞。一般而言,密码子优化是指通过以下方式来修饰核酸序列以增强在感兴趣的宿主细胞中的表达的过程:用在所述宿主细胞的基因中更频繁或最频繁使用的密码子替换天然序列的至少一个密码子,同时保持天然氨基酸序列。各种物种表现出对特定氨基酸的某些密码子的特别偏倚。密码子偏倚(生物体之间密码子使用的差异)通常与信使RNA(mRNA)的翻译效率相关,而信使RNA(mRNA)的翻译效率又被认为尤其取决于被翻译的密码子的性质和特定转移RNA(tRNA)分子的可用性。所选tRNA在细胞中的优势通常反映了肽合成中最常使用的密码子。因此,可以基于密码子优化来定制基因以实现在给定生物体中的最佳基因表达。

[0243] 通常,指导序列是这样的任何多核苷酸序列,其与靶多核苷酸序列具有足够互补性以与靶序列杂交并将CRISPR复合物直接序列特异性结合至靶序列。在一些实施方案中,当使用合适的比对算法进行最佳比对时,指导序列与其对应的靶序列之间的互补程度为约或大于约50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%,或更高。

[0244] NR3CS(糖皮质激素受体)的示例性gRNA序列包括Ex3 NR3C1 sG1 5-TGC TGT TGA GGA GCT GGA-3 (SEQ ID NO:1) 和Ex3 NR3C1 sG2 5-AGC ACA CCA GGC AGA GTT-3 (SEQ ID NO:2)。TGF-β受体2的示例性gRNA序列包括EX3 TGFBR2 sG1 5-CGG CTG AGG AGC GGA AGA-3 (SEQ ID NO:3) 和EX3 TGFBR2 sG2 5-TGG-AGG-TGA-GCA-ATC-CCC-3 (SEQ ID NO:4)。T7启动子、靶序列和重叠序列可以具有序列TTAATACGACTCACTATAGG (SEQ ID NO:5)+靶序列+gttttagagctagaaatagc (SEQ ID NO:6)。

[0245] 可以使用用于比对序列的任何合适比对算法来确定最佳比对,所述比对算法的非限制性示例包括Smith-Waterman算法、Needleman-Wunsch算法、基于Burrows-Wheeler变换的算法(例如,Burrows Wheeler Aligner)、Clustal W、Clustal X、BLAT、Novoalign (Novocraft Technologies)、ELAND (Illumina, San Diego, Calif.)、SOAP(可在soap.genomics.org.cn处获得)和Maq(可在maq.sourceforge.net处获得)。

[0246] CRISPR酶可以是包含一个或多个异源蛋白结构域的融合蛋白的一部分。CRISPR酶融合蛋白可包含任何其他蛋白序列,以及任选地在任何两个结构域之间的接头序列。可以与CRISPR酶融合的蛋白结构域的示例包括但不限于表位标签、报告基因序列,以及具有以下活性中的一种或多种活性的蛋白结构域:甲基化酶活性、脱甲基酶活性、转录激活活性、转录抑制活性、转录释放因子活性、组蛋白修饰活性、RNA切割活性和核酸结合活性。表位标签的非限制性示例包括组氨酸(His)标签、V5标签、FLAG标签、流感血凝素(HA)标签、Myc标签、VSV-G标签,以及硫氧还蛋白(Trx)标签。报告基因的示例包括但不限于谷胱甘肽-5-转移酶(GST)、辣根过氧化物酶(HRP)、氯霉素乙酰转移酶(CAT)β半乳糖苷酶、β葡萄糖醛酸酶、荧光素酶、绿色荧光蛋白(GFP)、HcRed、DsRed、青色荧光蛋白(CFP)、黄色荧光蛋白(YFP),以及自发荧光蛋白,包括蓝色荧光蛋白(BFP)。CRISPR酶可与这样的基因序列融合,所述基因序列编码与DNA分子结合或与其他细胞分子结合的蛋白质或蛋白质片段,所述蛋白质或蛋白质片段包括但不限于麦芽糖结合蛋白(MBP)、S标签、Lex A DNA结合结构域(DBD)融合体、GAL4A DNA结合结构域融合体,以及单纯疱疹病毒(HSV)BP16蛋白融合体。可以形成包含CRISPR酶的融合蛋白的一部分的另外结构域描述于US 20110059502中,该专利以引用方式并入本文。

## [0247] III. 使用方法

[0248] 在一些实施方案中,本公开提供了用于免疫疗法的方法,所述方法包括施用有效量的本公开的免疫细胞。在一个实施方案中,通过转移引起免疫应答的免疫细胞群来治疗医学疾病或疾患。在本公开的某些实施方案中,通过转移引发免疫应答的免疫细胞群来治疗癌症或感染。本文提供了用于治疗或延迟个体的癌症进展的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的抗原特异性细胞疗法。本发明方法可应用于治疗免疫疾患、实体癌、血液癌症,以及病毒感染。

[0249] 本治疗方法可用于的肿瘤包括任何恶性细胞类型,诸如在实体瘤或血液肿瘤中发现的那些恶性细胞类型。示例性实体瘤可包括但不限于选自由以下项组成的组的器官的肿瘤:胰腺、结肠、盲肠、胃、脑、头、颈、卵巢、肾、喉、肉瘤、肺、膀胱、黑素瘤、前列腺,以及乳房。血液肿瘤的示例包括骨髓瘤、T或B细胞恶性肿瘤、白血病、淋巴瘤、胚细胞瘤、骨髓瘤等。可以使用本文提供的方法治疗的癌症的其他示例包括但不限于肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌,以及肺鳞癌)、腹膜癌、胃癌(包括胃肠道癌和胃肠道间质癌)、胰腺癌、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌,各种类型的头颈癌,以及黑素瘤。

[0250] 癌症可以具体地是以下组织学类型,尽管所述癌症不限于这些组织学类型:恶性肿瘤;癌;未分化的癌;巨细胞和梭形细胞癌;小细胞癌;乳头状癌;鳞状细胞癌;淋巴上皮癌;基底细胞癌;毛基质癌;移行细胞癌;乳头状移行细胞癌;腺癌;恶性胃泌素瘤;胆管癌;肝细胞癌;混合型肝细胞癌和胆管癌;小梁腺癌;腺样囊性癌;腺瘤性息肉中的腺癌;家族性息肉中的腺癌;实体癌;恶性类癌瘤;支气管-肺泡腺癌;乳头状腺癌;嫌色细胞癌;嗜酸癌;嗜氧腺癌;嗜碱细胞癌;透明细胞腺癌;颗粒细胞癌;滤泡腺癌;乳头状和滤泡状腺癌;非包裹硬化性癌;肾上腺皮质癌;子宫内膜样癌;皮肤附属器癌;大汗腺腺癌;皮脂腺癌;耵聍腺癌(ceruminous adenocarcinoma);黏液表皮样癌;囊腺癌;乳头状囊腺癌;乳头状浆液性囊腺癌(papillary serous cystadenocarcinoma);黏液性囊腺癌;黏液性腺癌;印戒细胞癌;浸润性导管癌;髓样癌;小叶癌;炎性癌;乳腺佩吉特氏病;腺泡细胞癌;腺鳞癌;腺癌伴鳞状化生(adenocarcinoma with squamous metaplasia);恶性胸腺瘤;恶性卵巢间质肿瘤;恶性卵泡膜细胞瘤(thecoma);恶性颗粒细胞瘤;恶性睾丸母细胞瘤;塞尔托利氏细胞癌(sertoli cell carcinoma);恶性莱迪希细胞瘤(leydig cell tumor);恶性脂质细胞瘤;恶性副神经节瘤;恶性乳腺外副神经节瘤;嗜铬细胞瘤;肾小球肉瘤(glomangiosarcoma);恶性黑素瘤;无色素性黑素瘤;浅表扩散性黑素瘤;恶性雀斑痣样黑素瘤(lentigo maligna melanoma);肢端雀斑样痣黑素瘤(acral lentiginous melanoma);结节性黑素瘤;巨型色素痣中的恶性黑素瘤;上皮样细胞黑素瘤;恶性蓝色痣;肉瘤;纤维肉瘤;恶性纤维组织细胞瘤;黏液肉瘤;脂肪肉瘤;平滑肌肉瘤;横纹肌肉瘤;胚胎性横纹肌肉瘤;肺泡横纹肌肉瘤;间质肉瘤;恶性混合瘤;苗勒氏混合瘤(mullerian mixed tumor);肾胚细胞瘤;肝胚细胞瘤;癌肉瘤;恶性间质瘤;恶性布伦纳瘤;恶性叶状瘤(phyllodes tumor);滑膜肉瘤;恶性间皮瘤;无性细胞瘤;胚胎癌;恶性畸胎瘤;恶性卵巢甲状腺瘤(struma ovarii);绒毛膜癌;恶性中肾瘤;血管肉瘤;恶性血管内皮细胞瘤;卡波西肉瘤;恶性血管外皮细胞瘤;淋巴管肉瘤;骨肉瘤;皮质旁成骨肉瘤(juxtacortical osteosarcoma);软骨肉瘤;恶性软骨母细胞瘤;间质性软骨肉瘤(mesenchymal chondrosarcoma);骨巨细胞瘤;尤因肉瘤;恶性牙源性肿瘤

(odontosarcoma)；成釉细胞牙肉瘤；恶性成釉细胞瘤；成釉细胞纤维肉瘤；恶性松果体瘤；脊索瘤；恶性胶质瘤；室管膜瘤；星形细胞瘤；原浆型星形细胞瘤；纤维型星形细胞瘤；星形母细胞瘤；胶质母细胞瘤；少突神经胶质肿瘤；成少突神经胶质细胞瘤；原始神经外胚层瘤；小脑肉瘤；神经节神经母细胞瘤；神经母细胞瘤；视网膜母细胞瘤；嗅神经源性肿瘤；恶性脑脊膜瘤；神经纤维肉瘤；恶性神经鞘瘤；恶性颗粒细胞瘤；恶性淋巴瘤；霍奇金氏病；霍奇金病；副肉芽肿；小淋巴细胞恶性淋巴瘤；大细胞弥漫性恶性淋巴瘤；滤泡性恶性淋巴瘤；蕈样肉芽肿(mycosis fungoides)；其他特定的非霍奇金淋巴瘤；B细胞淋巴瘤；低度/滤泡性非霍奇金淋巴瘤(NHL)；小淋巴细胞(SL)NHL；中度/滤泡性NHL；中度弥漫性NHL；高度免疫原性NHL；高度淋巴母细胞NHL；高度小非裂解细胞NHL；巨块病变NHL；套细胞淋巴瘤；AIDS相关淋巴瘤；沃尔丹斯特伦巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)；恶性组织细胞增生症；多发性骨髓瘤；肥大细胞肉瘤；免疫增生性小肠疾病；白血病；淋巴性白血病；浆细胞白血病；红白血病；淋巴肉瘤细胞白血病；髓样白血病；嗜碱性白血病；嗜酸性粒细胞白血病；单核细胞白血病；肥大细胞白血病；巨核细胞白血病；髓样肉瘤；毛细胞白血病；慢性淋巴细胞白血病(CLL)；急性淋巴细胞白血病(ALL)；急性髓细胞性白血病(AML)；以及慢性粒细胞性白血病。

[0251] 具体的实施方案涉及治疗白血病的方法。白血病是血液或骨髓的癌症，并且其特征在于血细胞，通常是白血细胞(白细胞)的异常增殖(通过增殖来进行生产)。白血病是被称为血液肿瘤的广泛疾病的一部分。白血病是一个涵盖广泛疾病的广义术语。白血病在临床和病理上分为其急性形式和慢性形式。

[0252] 在本公开的某些实施方案中，将免疫细胞递送至有需要的个体，诸如患有癌症或感染的个体。然后，细胞增强个体的免疫系统，以攻击相应的癌症或致病细胞。在一些情况下，向个体提供一个或多个剂量的免疫细胞。在向个体提供两个或更多个剂量的免疫细胞的情况下，施用之间的持续时间应足以允许用于在个体中增殖的时间，并且在特定的实施方案中，各剂量之间的持续时间为1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或更多天。

[0253] 本公开的某些实施方案提供了用于治疗或预防免疫介导的疾患的方法。在一个实施方案中，受试者患有自体免疫疾病。自体免疫疾病的非限制性示例包括：斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、自体免疫性爱迪生氏病、肾上腺自体免疫性疾病，自体免疫性溶血性贫血、自体免疫性肝炎，自身免疫性卵泡炎和睾丸炎、自身免疫性血小板减少症、白塞氏病、大疱性类天疱疮、心肌病、乳糜泻性皮炎(celiac spate-dermatitis)、慢性疲劳症候群(CFIDS)、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病、查格-施特劳斯综合征(Churg-Strauss syndrome)、瘢痕性类天疱疮、CREST综合征、冷凝集素病、克罗恩氏病、盘状狼疮、混合性冷凝球蛋白血症(essential mixed cryoglobulinemia)、纤维肌痛-纤维肌炎、肾小球性肾炎、格雷夫斯氏病、吉兰-巴雷综合征、桥本甲状腺炎、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、IgA神经病、幼年型关节炎、扁平苔藓、红斑狼疮、美尼尔氏病、混合性结缔组织病、多发性硬化、1型或免疫介导的糖尿病、重症肌无力、肾病综合征(诸如微小病变性肾病、局灶性肾小球硬化或膜性肾病)、寻常天疱疮、恶性贫血、结节性多动脉炎、多发性软骨炎、多腺性综合征、风湿性多肌痛、多发性肌炎和皮肌炎、原发性无丙种球蛋白血症、原发性胆汁性肝硬化、牛皮癣、牛皮癣关节炎、雷诺氏征候群(Raynaud's phenomenon)、莱特尔氏综合征(Reiter's syndrome)、类风湿性关节炎、肉状瘤病、硬皮病、干燥综合征(Sjogren's

syndrome)、僵人综合征、系统性红斑狼疮、红斑狼疮、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、血管炎(诸如结节性多发动脉炎、大动脉炎、颞动脉炎/巨细胞性动脉炎,或疱疹样皮炎性血管炎(*dermatitis herpetiformis vasculitis*)),白癜风,以及韦格纳肉芽肿病。因此,可以使用本文公开的方法治疗的自体免疫疾病的一些示例包括但不限于多发性硬化症、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、I型糖尿病、克罗恩氏病;溃疡性结肠炎,重症肌无力、肾小球肾炎,强直性脊柱炎,血管炎,或牛皮癣。受试者还可患有过敏性疾患,诸如哮喘。

[0254] 在另一个实施方案中,受试者是移植的器官或干细胞的接受者,并且使用免疫细胞来预防和/或治疗排斥。在特定实施方案中,受试者患有移植植物抗宿主疾病或有发展成移植植物抗宿主疾病的风。GVHD是使用或含有来自相关或无关供体的干细胞的任何移植的可能并发症。有两种GVHD,即急性的和慢性的GVHD。急性GVHD出现在移植后的前三个月内。急性GVHD的迹象包括手和脚上的红色皮疹,所述皮疹可扩散并变得更严重;以及皮肤剥落或起泡。急性GVHD也会影响胃和肠道,在这种情况下会出现痉挛、恶心和痢疾。皮肤和眼睛黄化(黄疸)表明急性GVHD已经影响肝脏。慢性GVHD根据其严重程度进行分级:1级/度是轻微的;4级/度是严重的。慢性GVHD在移植后三个月或之后发展出。慢性GVHD的症状与急性GVHD的症状相似,但此外,慢性GVHD还可能影响眼睛中的粘液腺、口腔中的唾液腺以及润滑胃粘膜和肠道的腺体。可以利用本文所公开的免疫细胞群体中的任何免疫细胞群体。移植器官的示例包括实体器官移植植物,诸如肾脏、肝脏、皮肤、胰腺、肺和/或心脏;或细胞移植植物,诸如胰岛、肝细胞、成肌细胞、骨髓,或造血或其他干细胞。移植植物可以是复合移植植物,诸如面部的组织。免疫细胞可以在移植前、移植的同时或移植后施用。在一些实施方案中,免疫细胞在移植前施用,诸如在移植前至少1小时、至少12小时、至少1天、至少2天、至少3天、至少4天、至少5天、至少6天、至少1周、至少2周、至少3周、至少4周,或至少1个月。在一个特定的非限制性示例中,治疗有效量的免疫细胞的施用在移植前3-5天发生。

[0255] 在一些实施方案中,可以在免疫细胞治疗之前向受试者施用非清髓性淋巴细胞清除性化疗(*nonmyeloablative lymphodepleting chemotherapy*)。非清髓性淋巴细胞清除性化疗可以是任何合适的此类疗法,所述疗法可以通过任何合适的途径进行施用。非清髓性淋巴细胞清除性化疗可包括例如施用环磷酰胺和氟达拉滨,特别是如果癌症是能够转移的黑色素瘤。施用环磷酰胺和氟达拉滨的示例性途径是静脉内。同样,可以施用任何合适剂量的环磷酰胺和氟达拉滨。在特定方面中,施用约60mg/kg的环磷酰胺两天,在此之后施用约25mg/m<sup>2</sup>的氟达拉滨五天。

[0256] 在某些实施方案中,将促进免疫细胞生长和活化的生长因子与所述免疫细胞同时或在所述免疫细胞之后向受试者施用。免疫细胞生长因子可以是促进免疫细胞的生长和活化的任何合适的生长因子。合适的免疫细胞生长因子的示例包括白介素(IL)-2、IL-7、IL-15,以及IL-12,它们可以单独使用或以多种组合使用,诸如IL-2和IL-7,IL-2和IL-15,IL-7和IL-15,IL-2、IL-7和IL-15,IL-12和IL-7,IL-12和IL-15,或IL-12和IL2。

[0257] 治疗有效量的免疫细胞可以通过多种途径施用,包括肠胃外施用,例如静脉内、腹膜内、肌内、胸骨内或关节内注射,或输注。

[0258] 用于过继细胞疗法的免疫细胞的治疗有效量是在被治疗的受试者中实现所需效应的量。例如,这可以是这样的免疫细胞量,所述量是抑制进展或引起自体免疫或同种免疫疾病消退所必需的量,或所述量能够缓解由自体免疫疾病(诸如疼痛和炎症)引起的症状。

它可以是缓解与炎症相关的症状(诸如疼痛、水肿和体温升高)所必需的量。它也可以是减少或防止移植器官排斥所必需的量。

[0259] 免疫细胞群体可以按照与疾病一致的治疗方案施用,例如在一天至几天内施用单一剂量或几个剂量以改善疾病状态,或者在延长时间施用周期性剂量以抑制疾病进展和预防疾病复发。要在制剂中采用的精确剂量还将取决于使用途径和疾病或疾患的严重性,并且应根据从业者的判断和每个患者的情况来决定。免疫细胞的治疗有效量取决于所治疗的受试者、患病的严重程度和类型,以及施用方式。在一些实施方案中,可用于治疗人类受试者的剂量范围为至少 $3.8 \times 10^4$ 个、至少 $3.8 \times 10^5$ 个、至少 $3.8 \times 10^6$ 个、至少 $3.8 \times 10^7$ 个、至少 $3.8 \times 10^8$ 个、至少 $3.8 \times 10^9$ 个,或至少 $3.8 \times 10^{10}$ 个免疫细胞/ $m^2$ 。在某个实施方案中,在人受试者的治疗中使用的剂量的范围为约 $3.8 \times 10^9$ 个至约 $3.8 \times 10^{10}$ 个免疫细胞/ $m^2$ 。在另外的实施方案中,免疫细胞的治疗有效量的范围可以为约 $5 \times 10^6$ 个细胞/千克体重至约 $7.5 \times 10^8$ 个细胞/千克体重,诸如约 $2 \times 10^7$ 个细胞/千克体重至约 $5 \times 10^8$ 个细胞/千克体重,或约 $5 \times 10^7$ 个细胞/千克体重至约 $2 \times 10^8$ 个细胞/千克体重。免疫细胞的确切量由本领域技术人员基于受试者的年龄、体重、性别和生理状况而容易地确定。有效剂量可以根据从体外测试系统或动物模型测试系统导出的剂量反应曲线来外推。

[0260] 可以将免疫细胞与一种或多种其他治疗剂联合施用以治疗免疫介导的疾患。联合疗法可包括但不限于一种或多种抗微生物剂(例如,抗生素、抗病毒剂和抗真菌剂)、抗肿瘤剂(例如氟尿嘧啶、甲氨蝶呤、紫杉醇,氟达拉滨、依托泊昔、阿霉素,或长春新碱)、免疫耗竭剂(例如,氟达拉滨、依托泊昔、阿霉素,或长春新碱)、免疫抑制剂(例如,硫唑嘌呤,或糖皮质激素,诸如地塞米松或泼尼松)、抗炎剂(例如,糖皮质激素,诸如氢化可的松、地塞米松或泼尼松;或非甾体抗炎药剂,诸如乙酰水杨酸、布洛芬或萘普生钠)、细胞因子(例如,白介素-10或转化生长因子- $\beta$ )、激素(例如,雌激素),或疫苗。另外,可以施用免疫抑制剂或致耐受剂,所述免疫抑制剂或致耐受剂包括但不限于钙调神经磷酸酶抑制剂(例如,环孢菌素和他克莫司);mTOR抑制剂(例如,雷帕霉素);霉酚酸酯抗体(例如,识别CD3、CD4、CD40、CD154、CD45、IVIG或B细胞);化疗剂(例如,甲氨蝶呤、曲奥舒凡,白消安);辐照;或趋化因子、白介素或它们的抑制剂(例如,BAFF、IL-2、抗IL-2R、IL-4、JAK激酶抑制剂)。取决于所需的效果,可以在施用免疫细胞之前、期间或之后施用此类另外的药物。细胞和药剂的这种施用可以通过相同的途径或通过不同的途径,并且可以在相同的位点或在不同的位点。

[0261] A. 药物组合物

[0262] 本文还提供了包含免疫细胞(例如,T细胞或NK细胞)和药学上可接受的载体的药物组合物和制剂。

[0263] 如本文所述的药物组合物和制剂可通过将具有所需纯度的活性成分(诸如抗体或多肽)与一种或多种任选的药学上可接受的载体(Remington's Pharmaceutical Sciences,第22版,2012)混合来制备,为冻干制剂或水溶液形式。药学上可接受的载体通常在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒,并且包括但不限于:合适的药学上可接受的赋形剂包括但不限于:缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和蛋氨酸;防腐剂(诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血

清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物，诸如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸；单糖、二糖和其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂，诸如EDTA；糖，诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇；成盐抗衡离子，诸如钠；金属络合物（例如锌蛋白络合物）；和/或非离子表面活性剂，诸如聚乙二醇（PEG）。本文的示例性药学上可接受的载体还包括间质药物分散剂，诸如可溶中性活性透明质酸酶糖蛋白（sHASEGP），例如人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白，诸如rHuPH20（HYLENEX<sup>®</sup>,Baxter International, Inc.）。某些示例性sHASEGP和使用方法，包括rHuPH20，描述于美国专利公开号2005/0260186和2006/0104968中。在一个方面中，将sHASEGP与一种或多种另外的糖胺聚糖酶（诸如软骨素酶）组合。

[0264] B. 联合疗法

[0265] 在某些实施方案中，本发明实施方案的组合物和方法涉及免疫细胞群体与至少一种附加疗法的组合。所述附加疗法可以是放射疗法、手术（例如，乳房肿瘤切除术和乳房切除术）、化学疗法、基因疗法、DNA疗法、病毒疗法、RNA疗法、免疫疗法、骨髓移植、纳米疗法、单克隆抗体疗法，或前述的组合。附加疗法可以为辅助疗法或新辅助疗法的形式。

[0266] 在一些实施方案中，附加疗法是施用小分子酶抑制剂或抗转移剂。在一些实施方案中，附加疗法是施用副作用限制剂（例如，旨在减少治疗副作用的发生和/或严重性的药剂，诸如抗恶心剂等）。在一些实施方案中，附加疗法是放射疗法。在一些实施方案中，附加疗法是手术。在一些实施方案中，附加疗法是放射疗法和手术的组合。在一些实施方案中，附加疗法是伽马辐照。在一些实施方案中，附加疗法是靶向PBK/AKT/mTOR途径、HSP90抑制剂、微管蛋白抑制剂、细胞凋亡抑制剂，和/或化学预防剂的疗法。附加疗法可以是本领域已知的化学治疗剂中的一种或多种。

[0267] 免疫细胞疗法可以相对于诸如免疫检查点疗法等附加癌症疗法在之前、期间、之后或以各种组合施用。施用间隔的范围可以从同时发生至数分钟至数天至数周。在将免疫细胞疗法与附加治疗剂分开提供给患者的实施方案中，通常应确保在每次递送的时间之间不达到显著时间段，以便两种化合物仍然能够发挥对患者有利的联合效应。在此类情况下，预期可以在彼此相距约12h至24h或72h内，以及更特别地在彼此相距约6-12h内向患者提供抗体疗法和抗癌疗法。在一些情况下，可能期望将治疗时间段显著延长，其中在相应施用之间间隔几天（2天、3天、4天、5天、6天或7天）至几周（1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周或8周）。

[0268] 可以采用各种组合。对于下面的示例，免疫细胞疗法为“A”，并且抗癌疗法为“B”：

[0269] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

[0270] B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

[0271] B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

[0272] 考虑到药剂的毒性（如果有的话），将本发明实施方案的任何化合物或疗法施用于患者应遵循用于施用此类化合物的一般方案。因此，在一些实施方案中，存在监测归因于联合疗法的毒性的步骤。

[0273] 1. 化学疗法

[0274] 根据本发明的实施方案可以使用多种化学治疗剂。术语“化学疗法”是指使用药物来治疗癌症。“化学治疗剂”用于表示在癌症的治疗中施用的化合物或组合物。这些药剂或药物按其在细胞内的活性模式进行分类，例如它们是否影响细胞周期以及影响细胞周期的

什么阶段。或者,药剂可以基于其直接与DNA交联、嵌入DNA或通过影响核酸合成来诱导染色体和有丝分裂畸变的能力来进行表征。

[0275] 化疗剂的示例包括烷化剂,诸如噻替哌和环磷酰胺;烷基磺酸盐,诸如白消安、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);氮丙啶,诸如苯佐替哌(benzodopa)、卡波醌、美妥替哌(meturedopa)和乌瑞替哌(uredopa);乙撑亚胺和甲基蜜胺类(methylalamines),包括六甲蜜胺、三乙撑蜜胺、三乙撑磷酰胺、三乙撑硫代磷酰胺,以及三羟甲基蜜胺(trimethylololomelamine);番荔枝内酯类(尤其是布拉它辛和布拉它辛酮);喜树碱(包括合成类似物拓扑替康);苔藓抑素;卡利士他汀(callystatin);CC-1065(包括其阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)和比折来新(bizelesin)合成类似物);隐藻霉素(尤其是隐藻霉素1和隐藻霉素8);多拉司他汀(dolastatin);多卡霉素(duocarmycin)(包括合成类似物KW-2189和CB1-TM1);艾榴塞洛素(eleutherobin);水鬼蕉碱(pancratistatin);sarcodictyin;海绵抑素(spongistatin);氮芥,诸如苯丁酸氮芥、芥氮芥、氯磷酰胺(cholophosphamide)、雌氮芥、异环磷酰胺、二氯甲基二乙胺、盐酸甲氧氮芥、美法仑、新氮芥(novembichin)、苯芥胆甾醇、泼尼氮芥、氯乙环磷酰胺,以及尿嘧啶氮芥(uracil mustard);亚硝基脲类,诸如卡莫司汀、氯脲霉素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀和雷莫司汀(ranimustine);抗生素类,诸如烯二炔类抗生素(例如,加利车霉素,尤其是加利车霉素 $\gamma$ I和加利车霉素 $\omega$ I);达内霉素(dynemicin),包括达内霉素A;双膦酸盐,诸如氯膦酸盐;埃斯培拉霉素(esperamicin);以及新制癌菌素生色团和相关色蛋白烯二炔抗生素生色团、阿克拉霉素(aclacinomycin)、放线菌素、氨茴霉素(authrarnycin)、氮丝氨酸、博来霉素类、放线菌素C(cactinomycin)、卡柔比星(carabacin)、洋红霉素、嗜癌菌素、色霉素(chromomycinis)、更生霉素、柔红霉素、地托比星、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸、阿霉素(包括吗啉代-阿霉素、氰基吗啉代-阿霉素、2-吡咯啉基-阿霉素和脱氧阿霉素)、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素(诸如丝裂霉素C)、霉酚酸、诺加霉素(nogalarnycin)、橄榄霉素类、培洛霉素、泊非霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑菌素、链脲菌素、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司、净司他丁,以及佐柔比星;代谢物类,诸如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,诸如二甲叶酸、蝶罗呤,以及三甲曲沙;嘌呤类似物,诸如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤,以及硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,例如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、二脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨,以及氟尿苷;雄激素类,诸如卡普睾酮、屈他雄酮丙酸酯、环硫雄醇、美雄烷,以及睾酮内酯;抗肾上腺类,诸如米托坦和曲洛司坦;叶酸补充剂,诸如亚叶酸;醋葡萄糖内酯(aceglatone);醛磷酰胺糖苷;氨基乙酰丙酸;恩尿嘧啶;安吖啶;bestrabucil;比生群;依达曲沙(edatraxate);磷胺氮芥(defosfamide);地美可辛(demecolcine);地吖啶;依弗米星(elformithine);依利醋铵;埃博霉素;依托格鲁;硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;氯尼达明(lonidainine);美登木素生物碱类(maytansinoids),诸如美登素(maytansine)和安丝菌素(ansamitocin);米托胍腙;米托蒽醌;莫匹达谋(mopidanmol);硝嗪(nitroaerine);喷司他丁;苯来美特;吡柔比星;洛索蒽醌;鬼臼酸(podophyllinic acid);2-乙基肼;甲基苄肼;PSK多糖复合物;雷佐生(razoxane);根霉素;西佐喃;锗螺胺(spirogermanium);细交链孢菌酮酸;三亚胺醌;2,2',2"-三氯三乙胺;单端孢霉烯族毒素类(尤其是T-2毒素、疣孢菌素A(verracurin A)、杆孢菌素A和蛇形菌素);乌拉坦(urethan);长春地辛;达卡巴嗪;甘露醇。

氮芥;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌泊溴烷;加西托辛(gacytosine);阿糖胞昔("Ara-C");环磷酰胺;紫杉烷类(taxoids),例如紫杉醇和多西他赛吉西他滨;6-硫鸟嘌呤;巯基嘌呤;铂配位复合物,诸如顺铂、奥沙利铂,以及卡铂;长春花碱;铂;依托泊昔(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌;长春新碱;长春瑞滨(vinorelbine);诺消灵(novantrone);替尼泊昔;依达曲沙;道诺霉素;氨基蝶呤;希罗达;伊班膦酸盐;伊立替康(例如,CPT-11);拓扑异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);维甲酸,诸如视黄酸;卡培他滨;卡铂、甲基苄肼、普卡霉素(plicomycin)、吉西他滨(gemcitabine)、诺维苯(navelbine)、法尼基蛋白转移酶抑制剂、反式铂,以及上述任一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0276] 2. 放射疗法

[0277] 引起DNA损伤并已被广泛使用的其他因素包括众所周知的 $\gamma$ 射线、X射线,和/或将放射性同位素直接递送到肿瘤细胞。也可以考虑其他形式的DNA破坏因子,诸如微波、质子束辐照(美国专利5,760,395和4,870,287)和紫外辐照。最有可能的是所有这些因素影响对DNA、对DNA前体、对DNA的复制和修复以及对染色体的装配和维持的广泛损伤。X射线的剂量范围从长时间(3至4周)50至200伦琴的日剂量,到2000至6000伦琴的单次剂量。放射性同位素的剂量范围差异很大,并且取决于同位素的半衰期、所发出辐照的强度和类型,以及贅生性细胞的摄入。

[0278] 3. 免疫疗法

[0279] 本领域技术人员应理解,可以将附加免疫疗法与实施方案的方法组合或结合使用。在癌症治疗的背景下,免疫疗法通常依赖于使用免疫效应细胞和分子来靶向和破坏癌细胞。利妥昔单抗(RITUXAN®)就是此类示例。免疫效应物可以是例如对肿瘤细胞表面上的某些标记具有特异性的抗体。单独的抗体可以充当治疗的效应物,或者其可以募集其他细胞来实际影响细胞杀伤。抗体也可以与药物或毒素(化疗药物、放射性核素、蓖麻毒蛋白A链、霍乱毒素、百日咳毒素等)缀合,并用作靶向剂。或者,效应物可以是携带表面分子的淋巴细胞,所述表面分子与肿瘤细胞靶标直接或间接地相互作用。各种效应细胞包括细胞毒性T细胞和NK细胞。

[0280] 抗体-药物缀合物已作为用于癌症治疗剂开发的突破性方法而出现。癌症是世界上的主要死亡原因之一。抗体-药物缀合物(ADC)包含与细胞杀伤药物共价连接的单克隆抗体(MAb)。这种方法将Mab对它们的抗原靶标的高特异性与高效的细胞毒性药物组合,从而产生了“武装的”MAb,所述“武装的”MAb将有效载荷(药物)递送到具有丰富抗原水平的肿瘤细胞。药物的靶向递送还使其在正常组织中的暴露最小化,从而导致了毒性降低和治疗指数改善。由FDA批准的两种ADC药物,即在2011年的ADCETRIS®(本妥昔单抗)和在2013年的KADCYLA®(曲妥珠单抗-美坦新缀合物或T-DM1)验证了该方法。目前,在针对癌症治疗的临床试验的不同阶段中,存在多于30种ADC药物候选物(Leal et al., 2014)。随着抗体工程化和接头有效载荷优化变得越来越成熟,新ADC的探索和开发越来越依赖于对适用于该方法的新靶标的鉴定和验证以及靶向MAb的产生。针对ADC靶标的两个标准是在肿瘤细胞中上调/高水平的表达和稳健的内化。

[0281] 在免疫疗法的一个方面中,肿瘤细胞必须带有一些易于靶向(即,不存在于大多数其他细胞上)的标记。存在许多肿瘤标记,并且在本发明实施方案的背景下,这些肿瘤标记中的任何一种可适用于靶向。常见的肿瘤标记包括CD20、癌胚抗原、酪氨酸酶(p97)、gp68、

TAG-72、HMFG、唾液酸化的路易斯抗原、MucA、MucB、PLAP、层粘连蛋白受体、erb B以及p155。免疫疗法的替代方面是将抗癌效应与免疫刺激效应组合。还存在免疫刺激分子,所述免疫刺激分子包括:细胞因子,诸如IL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、 $\gamma$ -IFN;趋化因子,诸如MIP-1、MCP-1、IL-8;以及生长因子,诸如FLT3配体。

[0282] 当前正在研究或使用的免疫疗法的示例是免疫佐剂,例如牛分枝杆菌(Mycobacterium bovis)、恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)、二硝基氯苯和芳香族化合物(美国专利5,801,005和5,739,169;Hui和Hashimoto,1998;Christodoulides等人,1998);细胞因子疗法,例如干扰素- $\alpha$ 、IL-1、GM-CSF,以及TNF(Bukowski等人,1998;Davidson等人,1998;Hellstrand等人,1998);基因疗法,例如TNF、IL-1、IL-2,以及p53(Qin等人,1998;Austin-Ward和Villaseca,1998;美国专利5,830,880和5,846,945);以及单克隆抗体,例如抗CD20、抗神经节苷脂GM2,以及抗p185(Hollander,2012;Hanibuchi等人,1998;美国专利5,824,311)。预期可将一种或多种抗癌疗法与本文所述的抗体疗法一起采用。

[0283] 在一些实施方案中,免疫疗法可以是免疫检查点抑制剂。免疫检查点使信号升高(例如,共刺激分子)或使信号降低。可被免疫检查点阻断靶向的抑制性免疫检查点包括腺苷A2A受体(A2AR)、B7-H3(也称为CD276)、B和T淋巴细胞衰减因子(BTLA)、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4,也称为CD152)、吲哚胺2,3-双加氧酶(IDO)、杀伤细胞免疫球蛋白(KIR)、淋巴细胞激活基因-3(LAG3)、程序性死亡1(PD-1)、T细胞免疫球蛋白结构域和粘蛋白结构域3(TIM-3),以及T细胞活化的V结构域Ig抑制剂(VISTA)。具体地,免疫检查点抑制剂靶向PD-1轴和/或CTLA-4。

[0284] 免疫检查点抑制剂可以是药物,诸如小分子、配体或受体的重组形式,或者特别是抗体,诸如人抗体(例如,国际专利公开W02015016718;Pardoll,Nat Rev Cancer,12(4):252-64,2012;这两者均以引用方式并入本文)。可以使用免疫检查点蛋白或其类似物的已知抑制剂,特别是可以使用抗体的嵌合、人源化或人形式。如技术人员将知道的,替代和/或等效名称可用于本公开中提及的某些抗体。在本公开的上下文中,此类替代和/或等效名称是可互换的。例如,已知lambrolizumab也称为替代和等效名称MK-3475和派姆单抗(pembrolizumab)。

[0285] 在一些实施方案中,PD-1结合拮抗剂是抑制PD-1与其配体结合配偶体结合的分子。在一个特定方面中,PD-1配体结合配偶体是PDL1和/或PDL2。在另一个实施方案中,PDL1结合拮抗剂是抑制PDL1与其结合配偶体结合的分子。在一个特定方面,PDL1结合配偶体是PD-1和/或B7-1。在另一个实施方案中,PDL2结合拮抗剂是抑制PDL2与其结合配偶体结合的分子。在一个特定方面,PDL2结合配偶体是PD-1。拮抗剂可以是抗体、其抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋白,或寡肽。示例性抗体描述于美国专利号US8735553、US8354509和US8008449中,该等美国专利全部以引用方式并入本文。用于本文提供的方法中的其他PD-1轴拮抗剂是本领域已知的,诸如描述于美国专利申请号US20140294898、US2014022021和US20110008369中,这些美国专利全部以引用方式并入本文。

[0286] 在一些实施方案中,PD-1结合拮抗剂是抗PD-1抗体(例如,人抗体、人源化抗体,或嵌合抗体)。在一些实施方案中,抗PD-1抗体选自由以下项组成的组:纳武单抗(Nivolumab)、派姆单抗,以及CT-011。在一些实施方案中,PD-1结合拮抗剂是免疫粘附素

(例如,包含与恒定区(例如,免疫球蛋白序列的Fc区)融合的PDL1或PDL2的细胞外或PD-1结合部分的免疫粘附素)。在一些实施方案中,PD-1结合拮抗剂是AMP-224。纳武单抗,也称为MDX-1106-04、MDX-1106、ONO-4538、BMS-936558,以及OPDIVO<sup>®</sup>,是在W02006/121168中描述的一种抗PD-1抗体。派姆单抗,也称为MK-3475、Merck 3475、lambrolizumab、KEYTRUDA<sup>®</sup>,以及SCH-900475,是在W02009/114335中描述的一种抗PD-1抗体。CT-011,也称为hBAT或hBAT-1,是W02009/101611中所述的一种抗PD-1抗体。AMP-224,也称为B7-DCIg,是W02010/027827和W02011/066342中所述的一种PDL2-Fc融合可溶性受体。

[0287] 在本文提供的方法中可以靶向的另一个免疫检查点是细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4),也称为CD152。人CTLA-4的完整cDNA序列的Genbank登录号为L15006。CTLA-4发现于T细胞的表面上,并且当与抗原呈递细胞表面上的CD80或CD86结合时,充当“关闭”开关。CTLA4是免疫球蛋白超家族的成员,所述免疫球蛋白超家族在辅助T细胞的表面上表达并向T细胞传递抑制信号。CTLA4与T细胞共刺激蛋白CD28相似,两种分子均与抗原呈递细胞上的CD80和CD86(也分别称为B7-1和B7-2)结合。CTLA4向T细胞传递抑制信号,而CD28则传递刺激信号。细胞内CTLA4也存在于调节性T细胞中,并切可能对调节性T细胞的功能很重要。通过T细胞受体和CD28进行的T细胞活化导致CTLA-4(B7分子的抑制受体)的表达增加。

[0288] 在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是抗CTLA-4抗体(例如,人抗体、人源化抗体,或嵌合抗体)、其抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋白,或寡肽。

[0289] 可以使用本领域熟知的方法来产生适用于本发明方法的抗人CTLA-4抗体(或来源于其的VH和/或VL结构域)。或者,可以使用本领域公认的抗CTLA-4抗体。例如,在:US 8,119,129、W0 01/14424、W0 98/42752;W0 00/37504(CP675,206,也称为tremelimumab;以前称为ticilimumab)、美国专利号6,207,156;Hurwitz等人,(1998) Proc Natl Acad Sci USA 95 (17) :10067-10071;Camacho等人,(2004) J Clin Oncology 22 (145) :摘要号2505(抗体CP-675206);以及Mokyr等人,(1998) Cancer Res 58:5301-5304中公开的抗CTLA-4抗体可用于本文公开的方法。前述出版物中的每一者的教导以引用方式并入本文。也可以使用与这些本领域公认的抗体中的任一者竞争与CTLA-4结合的抗体。例如,人源化CTLA-4抗体描述于国际专利申请号W02001014424、W02000037504和美国专利号8,017,114中,这些专利全部以引用方式并入本文。

[0290] 示例性抗CTLA-4抗体是易普利姆玛(ipilimumab)(也称为10D1、MDX-010、MDX-101,以及Yervoy<sup>®</sup>),或其抗原结合片段及变体(参见例如,W0 01/14424)。在其他实施方案中,抗体包含易普利姆玛的重链和轻链CDR或VR。因此,在一个实施方案中,该抗体包含易普利姆玛的VH区的CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及易普利姆玛的VL区的CDR1、CDR2和CDR3结构域。在另一个实施方案中,抗体与上述抗体竞争结合CTLA-4上的相同表位和/或同上述抗体一样与CTLA-4上的相同表位结合。在另一个实施方案中,该抗体与上述抗体具有至少约90%的可变区氨基酸序列同一性(例如,与易普利姆玛具有至少约90%、95%或99%的可变区氨基酸同一性)。

[0291] 用于调控CTLA-4的其他分子包括CTLA-4配体和受体,诸如在美国专利号US5844905、US5885796和国际专利申请号W01995001994和W01998042752中描述的;这些专利都以引用方式并入本文;以及免疫粘附素,诸如美国专利号US8329867中描述的,该美国专利以引用方式并入本文。

## [0292] 4. 手术

[0293] 约60%的癌症患者将接受某种类型的手术,所述手术包括预防手术、诊断手术或分期手术、治愈手术以及姑息手术。根治性手术包括切除,在切除中将癌组织的全部或部分物理去除、切除和/或破坏,并且可以与其他疗法结合使用,所述其他疗法为诸如本发明实施方案的治疗、化学疗法、放射疗法、激素疗法、基因疗法、免疫疗法和/或替代疗法。肿瘤切除是指物理去除肿瘤的至少部分。除肿瘤切除外,通过手术治疗还包括激光手术、冷冻手术、电外科手术,以及显微控制手术(莫氏手术)。

[0294] 在切除癌细胞、组织或肿瘤的部分或全部后,可能在体内形成空腔。可以通过使用附加抗癌疗法对该区域进行灌注、直接注射或局部应用来完成治疗。可以例如每1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天,或者每1周、2周、3周、4周和5周,或每1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月或12个月重复此类治疗。这些治疗也可以具有不同的剂量。

## [0295] 5. 其他药剂

[0296] 预期可以将其他药剂与本发明实施方案的某些方面组合使用以改善治疗的疗效。这些附加药剂包括影响细胞表面受体和GAP接合的上调的试剂、细胞生长抑制和分化药剂、细胞粘附抑制剂、增加过度增殖性细胞对凋亡诱导剂的敏感性的药剂,或其他生物药剂。通过增加GAP接合的数量而增加细胞间信号传导,将增加对邻近的过度增殖性细胞群体的抗过度增殖效应。在其他实施方案中,细胞生长抑制或分化药剂可以与本发明实施方案的某些方面组合使用以改善治疗的抗过度增殖功效。细胞粘附抑制剂被预期为改善本发明实施方案的功效。细胞粘附抑制剂的示例是黏着斑激酶(FAK)抑制剂和洛伐他汀。进一步设想的是,可以将增加过度增殖性细胞对凋亡的敏感性的其他药剂,例如抗体c225,与本发明实施方案的某些方面组合使用以改善治疗功效。

## [0297] IV. 制品或试剂盒

[0298] 本文还提供了包含免疫细胞的制品或试剂盒。所述制品或试剂盒还可包括包装插页,所述包装插页包括对使用免疫细胞治疗或延迟个体的癌症进展或增强患有癌症的个体的免疫功能的说明。本文所述的任何抗原特异性免疫细胞可包括在所述制品或试剂盒中。合适的容器包括例如瓶、小瓶、袋子和注射器。容器可以由多种材料形成,所述多种材料为诸如玻璃、塑料(诸如聚氯乙烯或聚烯烃)或金属合金(诸如不锈钢或哈氏合金)。在一些实施方案中,容器保持制剂,并且在所述容器上或与所述容器相关的标签可以指示使用说明。制品或试剂盒还可以包括从商业和用户角度出发期望的其他材料,包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针头、注射器,以及带有使用说明的包装插页。在一些实施方案中,该制品还包括一种或多种其他药剂(例如,化学治疗剂和抗肿瘤剂)。用于所述一种或多种药剂的合适容器包括例如瓶、小瓶、袋子和注射器。

## [0299] V. 实施例:

[0300] 包括以下实施例以说明本发明的优选实施方案。本领域技术人员应该理解,以下实施例中公开的技术代表本发明人发现的在本发明的实践中发挥良好作用的技术,因此可以被视为构成本发明实践的优选模式。然而,根据本公开,本领域技术人员应当理解,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以对所公开的特定实施方案进行许多改变并且仍可获得相同或相似的结果。

[0301] 实施例1表达IL-15的CAR-NK细胞

[0302] NK细胞来源于脐带血,并且通过对所述NK细胞进行基因工程化而将所述NK细胞的特异性重定向为表达肿瘤特异性嵌合抗原受体(CAR),所述CAR能够增强所述NK细胞的抗肿瘤活性,而不增加移植物抗宿主病(GVHD)的风险,从而提供了“现成的”细胞来源用于治疗,诸如对表达靶标的任何癌症的免疫治疗。为了进行基因修饰,用逆转录病毒构建体(iC9/CAR.CS1/IL-15)转导CB-NK细胞,以将所述CB-NK细胞的特异性重定向为识别肿瘤抗原CS1和靶向骨髓瘤。监测用逆转录病毒载体转导的CB-NK细胞的转导效率,发现转基因表达是稳定的。来自2个不同供体的NK细胞中CAR表达的转导效率在图1A中示出。观察到转导的NK细胞发挥出对表达CS1的骨髓瘤细胞系的优异杀伤(图1A),并响应于表达CS1的骨髓瘤细胞系而产生更多的效应细胞因子(图1C)。

[0303] 为了确定CAR转导的NK细胞的抗白血病效应,将CAR转导的NK细胞注入到成淋巴细胞性白血病的“人源化”小鼠模型、表达荧光素酶的Raji NSG小鼠模型中。为了监测CAR-CD191+ CB-NK细胞到肿瘤部位的体内运输,将细胞用FFLuc载体标记,从而使得能够通过生物发光成像来进行监测。经移植的小鼠接受CS1<sup>+</sup> Raji白血病B细胞(2×10<sup>6</sup>个),所述CS1<sup>+</sup> Raji白血病B细胞经静脉内注射且用RLuc载体标记以监测肿瘤生长。在肿瘤移植后6至10天,向小鼠静脉内注入2×10<sup>7</sup>个未修饰的扩增CB-NK细胞,或用FFLuc标记的CD19-CD28-ζ-2A-IL15 CB-NK细胞。所有成像每周进行一次,持续3周。研究四组动物(每组n=10),对小鼠进行安乐死后收集所述小鼠的脾脏、血液和淋巴结。如通过体内生物发光成像所证明的,CAR转导的细胞导致了强抗肿瘤反应。观察到IL-15增强NK-CAR介导的肿瘤杀伤并延长存活期(图2A-2B)。

[0304] 由于担心由于IL-15的自分泌产生而导致自主、不受控制的NK细胞生长,因此将基于可诱导性胱天蛋白酶-9(IC9)基因的自杀基因结合到构建体中。为了测试整合到逆转录病毒载体中的可诱导性胱天蛋白酶-9自杀基因,将10nM的CID AP20187加入到iC9/CS1/IL15+ NK细胞的培养物中。如通过膜联蛋白-V-7AAD染色所评定,AP20187在4小时内诱导了转基因细胞的凋亡/坏死。

[0305] 实施例2糖皮质激素受体的敲除

[0306] 为了产生抗类固醇的免疫细胞,使用CRISPR-CAS9系统以使用gRNA SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:2来敲除造血细胞中的糖皮质激素受体。对所述糖皮质激素受体敲除的基于PCR的筛选显示了T细胞和NK细胞中的有效敲除(图3)。

[0307] 从3个不同供体获得CAR转导的NK细胞,并评定所述CAR转导的NK细胞对地塞米松杀伤的敏感性。在以不同剂量的地塞米松处理4小时和24小时后,进行膜联蛋白V染色以评定细胞死亡。发现来自所有3个供体的NK细胞对地塞米松敏感,并且在用500μM地塞米松处理24小时时,所有细胞均死亡(图4A-4B)。CAR NK细胞中的GR敲除据发现用以保护抗地塞米松杀伤。对CAR NK对照细胞或用200μM地塞米松处理了12小时的具有GR敲除的细胞的膜联蛋白V染色示出于图5。据发现与对照NK细胞相比,具有GR敲除的NK细胞显著抗地塞米松杀伤(图5)。因此,使用CRISPR-CAS9系统进行GR敲除能够产生抗类固醇的NK细胞。

[0308] 实施例3敲除免疫细胞中的TGFβ-RII

[0309] 接下来,使用CRISPR-CAS9来敲除CAR NK细胞中的TGFβ,以使CAR NK细胞抗外源性TGFβ的免疫抑制效应。(图6A) 使用CRISPR/CAS9技术(Cas9加上使用gRNA SEQ ID NO:3至

SEQ ID NO:4对TGF $\beta$ -RII的外显子3进行gRNA靶向)实现了TGF $\beta$ -RII的成功敲除(图6A)。用10ng/ml的重组TGF- $\beta$ 处理野生型和TGF- $\beta$ -RII敲除NK细胞48小时,并评定它们对K562靶标的反应。发现TGF- $\beta$ -RII敲除NK细胞抗外源性TGF- $\beta$ 的免疫抑制效应(图6B)。还发现与用仅CAS9处理的NK细胞相比,通过CRISPR/CAS9技术进行的TGF $\beta$ -RII敲除用于消除响应于10ng/ml重组TGF- $\beta$ 的下游Smad-2/3磷酸化(图6C)。因此,CRISPR-CAS9介导的TGF $\beta$ -RII敲除使NK细胞抗TGF $\beta$ 。

[0310] 实施例4经工程化以表达多种抗原受体的免疫细胞

[0311] 免疫细胞,诸如T细胞或NK细胞,来源于血液(诸如脐带血),并经基因工程化以表达肿瘤特异性抗原受体,诸如CAR和/或TCR(图7A-7D)。为了进行基因修饰,使用逆转录病毒构建体来转导细胞(图7D),以将所述细胞的特异性重定向为识别两种或更多种肿瘤抗原。监测转导效率和转基因表达。另外,通过细胞毒性测定来测量免疫细胞在杀伤抗原特异性靶细胞方面的功效。

[0312] 为了确定受体转导的免疫细胞的抗癌效应,将所述受体转导的免疫细胞注入癌症小鼠模型中。将细胞用可检测部分标记,以诸如通过生物发光成像来进行体内监测。经移植的小鼠接受抗原特异性靶细胞(例如,2×10<sup>6</sup>个),所述抗原特异性靶细胞经静脉内注射并用载体(诸如RLuc载体)标记以监测肿瘤生长。在肿瘤移植后,向小鼠静脉内注入扩增的转导免疫细胞,所述扩增的转导免疫细胞是未修饰的或表达抗原受体。监测动物,诸如通过每周成像一次,持续3周来监测动物。在将小鼠安乐死后,收集小鼠的脾脏、血液和淋巴结。

[0313] \*\*\*

[0314] 鉴于本公开,可以在不进行过度实验的情况下进行和执行本文所公开和要求保护的所有方法。尽管已经根据优选实施方案描述了本发明的组合物和方法,但是对于本领域技术人员而言将显而易见的是,在不脱离本发明的概念、精神和范围的情况下,可以对本文所述的方法和对本文所述方法的步骤或对本文所述方法的步骤顺序应用改变。更具体地,将显而易见的是,在化学和生理上均相关的某些药剂可以代替本文所述的药剂,同时将获得相同或相似的结果。对于本领域技术人员显而易见的所有此类类似替代和修改都被认为落入由所附权利要求所限定的本发明的精神、范围和概念内。

[0315] 参考文献

[0316] 以下参考文献在一定程度上提供了示例性的过程或其他细节,所述示例性的过程或其他细节是对本文所述的那些过程或细节的补充,所述参考文献以引用方式明确地并入本文。

[0317] Austin-Ward and Villaseca,Revista Medica de Chile,126 (7) :838-845,1998。

[0318] Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology,Greene Publishing Associates和John Wiley&Sons, NY,1994。

[0319] Bennekov等人,Mt.Sinai J.Med.71 (2) :86-93,2004。

[0320] Bukowski等人,Clinical Cancer Res,4 (10) :2337-2347,1998。

[0321] Camacho等人,J Clin Oncology 22 (145) :摘要号2505(抗体CP-675206),2004。

[0322] Campbell,Curr.Top.Microbiol.Immunol.,298:23-57,2006。

[0323] Chothia等人,EMBO J.7:3745,1988。

- [0324] Christodoulides等人, *Microbiology*, 144 (Pt 11) :3027-3037, 1998。
- [0325] Cohen等人, *J Immunol*. 175:5799-5808, 2005。
- [0326] Davidson等人, *J. Immunother.*, 21 (5) :389-398, 1998。
- [0327] Davila等人, *PLoS ONE* 8 (4) :e61338, 2013。
- [0328] Doulatov等人, *Cell Stem Cell*. 10:120-36, 2012。
- [0329] 欧洲专利申请号EP2537416
- [0330] Fedorov等人, *Sci. Transl. Medicine*, 5 (215) , 2013.
- [0331] Frolet et al., *BMC Microbiol*. 10:190 (2010)。
- [0332] Gaj等人, *Trends in Biotechnology* 31 (7) , 397-405, 2013。
- [0333] Hanibuchi等人, *Int. J. Cancer*, 78 (4) :480-485, 1998。
- [0334] Heemskerk等人, *Hum Gene Ther*. 19:496-510, 2008。
- [0335] Hellstrand等人, *Acta Oncologica*, 37 (4) :347-353, 1998。
- [0336] Hollander, *Front. Immun*., 3:3, 2012。
- [0337] Hubert等人 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 14523-28, 1999。
- [0338] Hui and Hashimoto, *Infection Immun*., 66 (11) :5329-5336, 1998。
- [0339] Hurwitz等人, *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (17) :10067-10071, 1998。
- [0340] 国际专利公开号W0 00/37504
- [0341] 国际专利公开号W0 01/14424
- [0342] 国际专利公开号W0 2007/069666
- [0343] 国际专利公开号W0 2007/069666
- [0344] 国际专利公开号W0 98/42752
- [0345] 国际专利公开号W0/2014055668
- [0346] 国际专利公开号W01995001994
- [0347] 国际专利公开号W01998042752
- [0348] 国际专利公开号W02000037504
- [0349] 国际专利公开号W0200014257
- [0350] 国际专利公开号W02001014424
- [0351] 国际专利公开号W02006/121168
- [0352] 国际专利公开号W02007/103009
- [0353] 国际专利公开号W02009/101611
- [0354] 国际专利公开号W02009/114335
- [0355] 国际专利公开号W02010/027827
- [0356] 国际专利公开号W02011/066342
- [0357] 国际专利公开号W02012/129514
- [0358] 国际专利公开号W02013/071154
- [0359] 国际专利公开号W02013/123061
- [0360] 国际专利公开号W02013/166321
- [0361] 国际专利公开号W02013126726
- [0362] 国际专利公开号W02014/055668

- [0363] 国际专利公开号W02014031687
- [0364] 国际专利公开号W02015016718
- [0365] 国际专利公开号W099/40188
- [0366] Janeway等人, *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 3<sup>rd</sup> Ed., Current Biology Publications, 第433页, 1997。
- [0367] Johnson等人 *Blood* 114:535-46, 2009。
- [0368] Jores等人, *PNAS U.S.A.* 87:9138, 1990。
- [0369] Kim等人, *Nature Biotechnology* 31, 251-258, 2013。
- [0370] Kirchmaier and Sugden, *J. Virol.*, 72 (6) : 4657-4666, 1998。
- [0371] Leal, M., *Ann N Y Acad Sci* 1321, 41-54, 2014。
- [0372] Lefranc等人, *Dev. Comp. Immunol.* 27:55, 2003。
- [0373] Li等人, *Nat Biotechnol.* 23:349-354, 2005。
- [0374] Li等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4275-4279, 1992。
- [0375] Linnemann, C. 等人, *Nat Med* 21, 81-85, 2015。
- [0376] Lockey等人, *Front. Biosci.* 13:5916-27, 2008。
- [0377] Loewendorf等人, *J. Intern. Med.* 267 (5) : 483-501, 2010。
- [0378] Ludwig等人, *Nature Biotech.*, (2) : 185-187, 2006a。
- [0379] Ludwig等人, *Nature Methods*, 3 (8) : 637-646, 2006b。
- [0380] Marschall等人, *Future Microbiol.* 4:731-42, 2009。
- [0381] Mokyr等人, *Cancer Res* 58:5301-5304, 1998。
- [0382] Notta等人, *Science*, 218-221, 2011。
- [0383] Pardoll, *Nat Rev Cancer*, 12 (4) : 252-64, 2012
- [0384] Parkhurst等人, *Clin Cancer Res*. 15:169-180, 2009。
- [0385] Qin等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 (24) : 14411-14416, 1998。
- [0386] Rieder等人, *J. Interferon Cytokine Res.* (9) : 499-509, 2009。
- [0387] Rykman等人, *J. Virol.* 80 (2) : 710-22, 2006。
- [0388] Sadelain等人, *Cancer Discov.* 3 (4) : 388-398, 2013。
- [0389] Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001。
- [0390] Shah等人, *PLoS One*, 8:e776781, 2013。
- [0391] Singh等人, *Cancer Research*, 68:2961-2971, 2008。
- [0392] Singh等人, *Cancer Research*, 71:3516-3527, 2011。
- [0393] Takahashi等人, *Cell*, 126 (4) : 663-76, 2007。
- [0394] Terakura等人, *Blood*. 1:72-82, 2012。
- [0395] Turtle等人, *Curr. Opin. Immunol.*, 24 (5) : 633-39, 2012。
- [0396] 美国专利号4,870,287
- [0397] 美国专利号5,739,169
- [0398] 美国专利号5,760,395
- [0399] 美国专利号5,801,005

- [0400] 美国专利号5,824,311
- [0401] 美国专利号5,830,880
- [0402] 美国专利号5,844,905
- [0403] 美国专利号5,846,945
- [0404] 美国专利号5,885,796
- [0405] 美国专利号5,994,136
- [0406] 美国专利号6,013,516
- [0407] 美国专利号6,103,470
- [0408] 美国专利号6,207,156
- [0409] 美国专利号6,225,042
- [0410] 美国专利号6,355,479
- [0411] 美国专利号6,362,001
- [0412] 美国专利号6,410,319
- [0413] 美国专利号6,416,998
- [0414] 美国专利号6,544,518
- [0415] 美国专利号6,790,662
- [0416] 美国专利号7,109,304
- [0417] 美国专利号7,442,548
- [0418] 美国专利号7,446,190
- [0419] 美国专利号7,598,364
- [0420] 美国专利号7,989,425
- [0421] 美国专利号8,008,449
- [0422] 美国专利号8,017,114
- [0423] 美国专利号8,058,065
- [0424] 美国专利号8,071,369
- [0425] 美国专利号8,119,129
- [0426] 美国专利号8,129,187
- [0427] 美国专利号8,183,038
- [0428] 美国专利号8,268,620
- [0429] 美国专利号8,329,867
- [0430] 美国专利号8,354,509
- [0431] 美国专利号8,546,140
- [0432] 美国专利号8,691,574
- [0433] 美国专利号8,735,553
- [0434] 美国专利号8,741,648
- [0435] 美国专利号8,900,871
- [0436] 美国专利号9,175,268
- [0437] 美国专利公开号2010/0210014
- [0438] 美国专利公开号12/478,154

- [0439] 美国专利公开号2002131960
- [0440] 美国专利公开号2003/0211603
- [0441] 美国专利公开号2005/0260186
- [0442] 美国专利公开号2006/0104968
- [0443] 美国专利公开号2009/0004142
- [0444] 美国专利公开号2009/0017000
- [0445] 美国专利公开号2009/0246875
- [0446] 美国专利公开号2011/0104125
- [0447] 美国专利公开号2011/0301073
- [0448] 美国专利公开号20110008369
- [0449] 美国专利公开号2012/0276636
- [0450] 美国专利公开号2013/0315884
- [0451] 美国专利公开号20130149337
- [0452] 美国专利公开号2013287748
- [0453] 美国专利公开号2014/0120622
- [0454] 美国专利公开号2014022021
- [0455] 美国专利公开号20140294898
- [0456] Varela-Rohena等人, *Nat Med.* 14:1390-1395, 2008。
- [0457] Wang等人, *J Immunother.* 35 (9) :689-701, 2012。
- [0458] Wu等人, *Adv. Cancer Res.* , 90:127-56, 2003。
- [0459] Wu等人, *Cancer*, 18 (2) :160-75, 2012。
- [0460] Yamanaka等人, *Cell*, 131 (5) :861-72, 2007。
- [0461] Yu等人, *Science*, 318:1917-1920, 2007。
- [0462] Zysk等人, *Infect. Immun.* 68 (6) :3740-43, 2000。

## 序列表

<110>	得克萨斯大学系统董事会 (Board of Regents, The University of Texas System)	
	REZVANI, KATY	
	SHPALL, ELIZABETH J	
<120>	表达工程化抗原受体的免疫细胞	
<130>	UTF.C.P1321W0	
<150>	62487248	
<151>	2017/4/19	
<160>	6	
<170>	PatentIn 版本 3.5	
<210>	1	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Ex3 NR3C1 sG1	
<400>	1	
	tgctgttgag gagctgga	18
<210>	2	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Ex3 NR3C1 sG2	
<400>	2	
	agcacaccag gcagagtt	18
<210>	3	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	EX3 TGFBR2 sG1	
<400>	3	
	cggctgagga gcggaaga	18
<210>	4	
<211>	18	
<212>	DNA	

---

<213>	人工序列	
<220>		
<223>	EX3 TGFBR2 sG2	
<400>	4	
	tggaggtaga caatcccc	18
<210>	5	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	重叠序列	
<400>	5	
	ttaatacgac tcactatagg	20
<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	重叠序列	
<400>	6	
	gttttagagc tagaaatagc	20

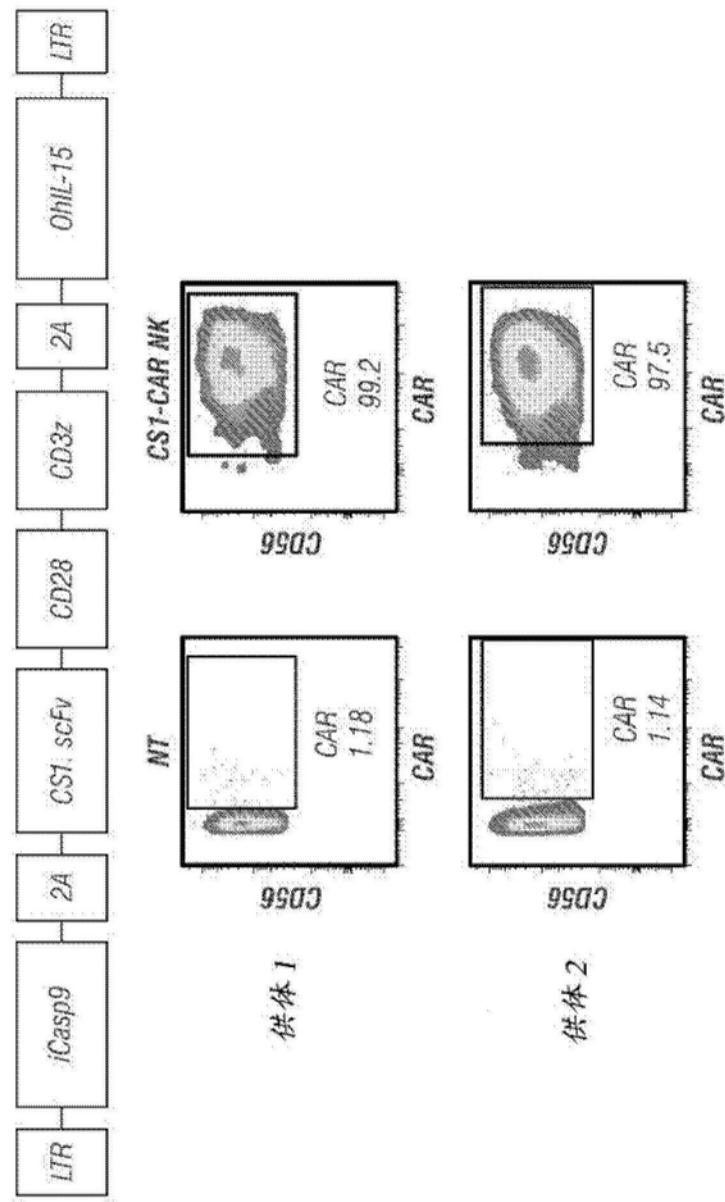


图1A

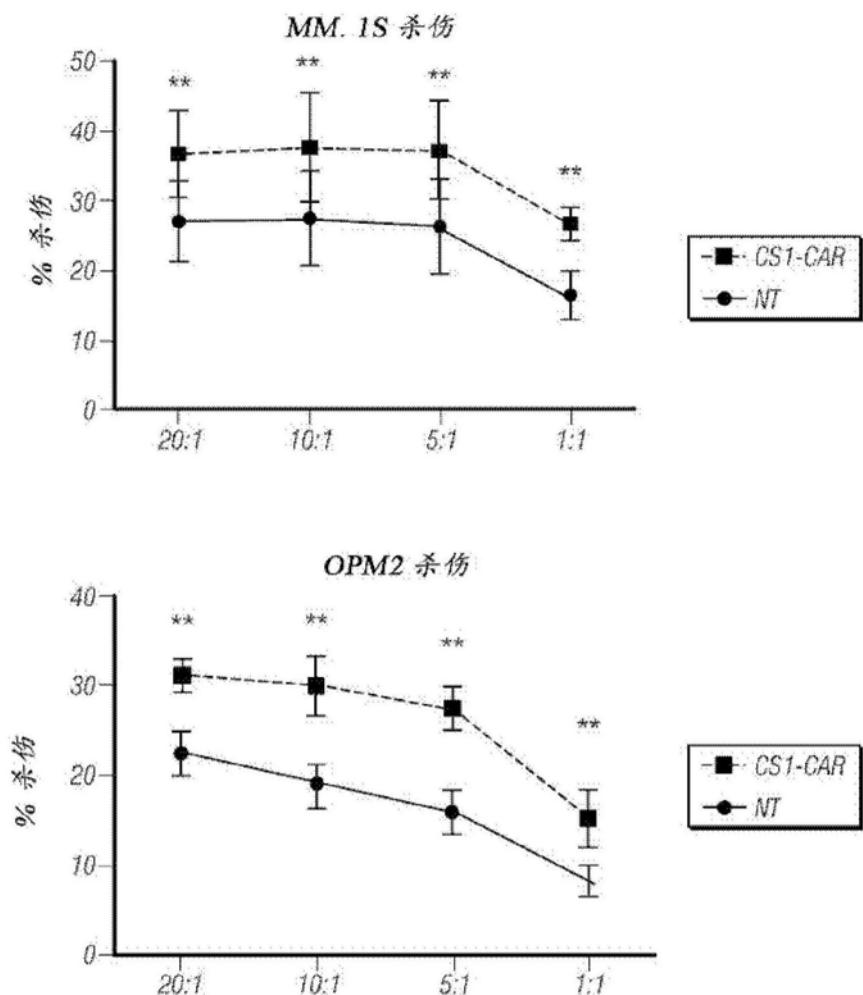


图1B

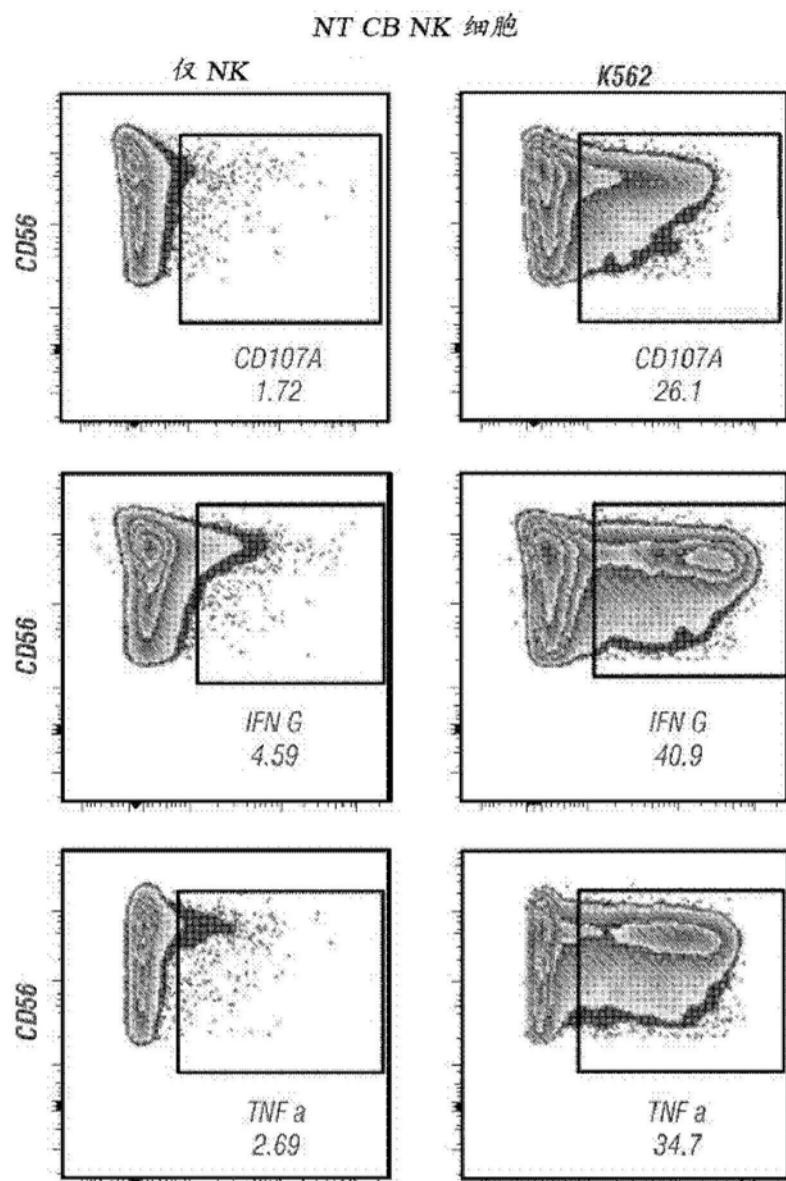


图1C

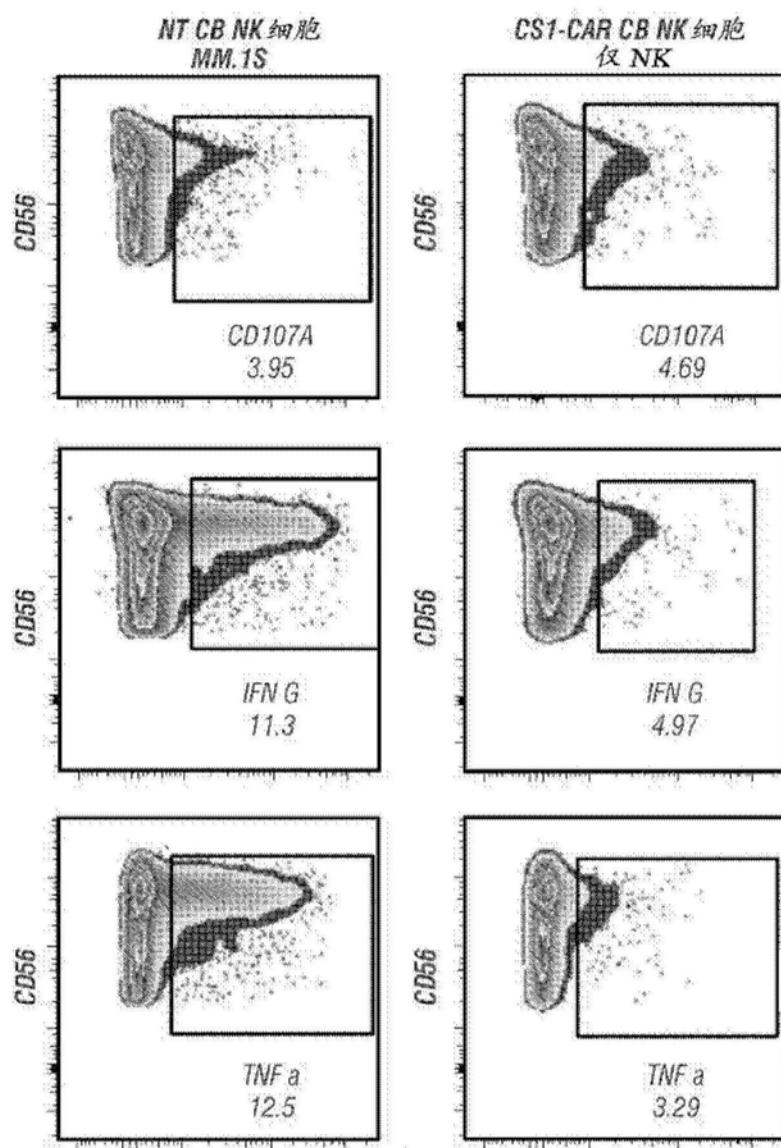


图1C(续)

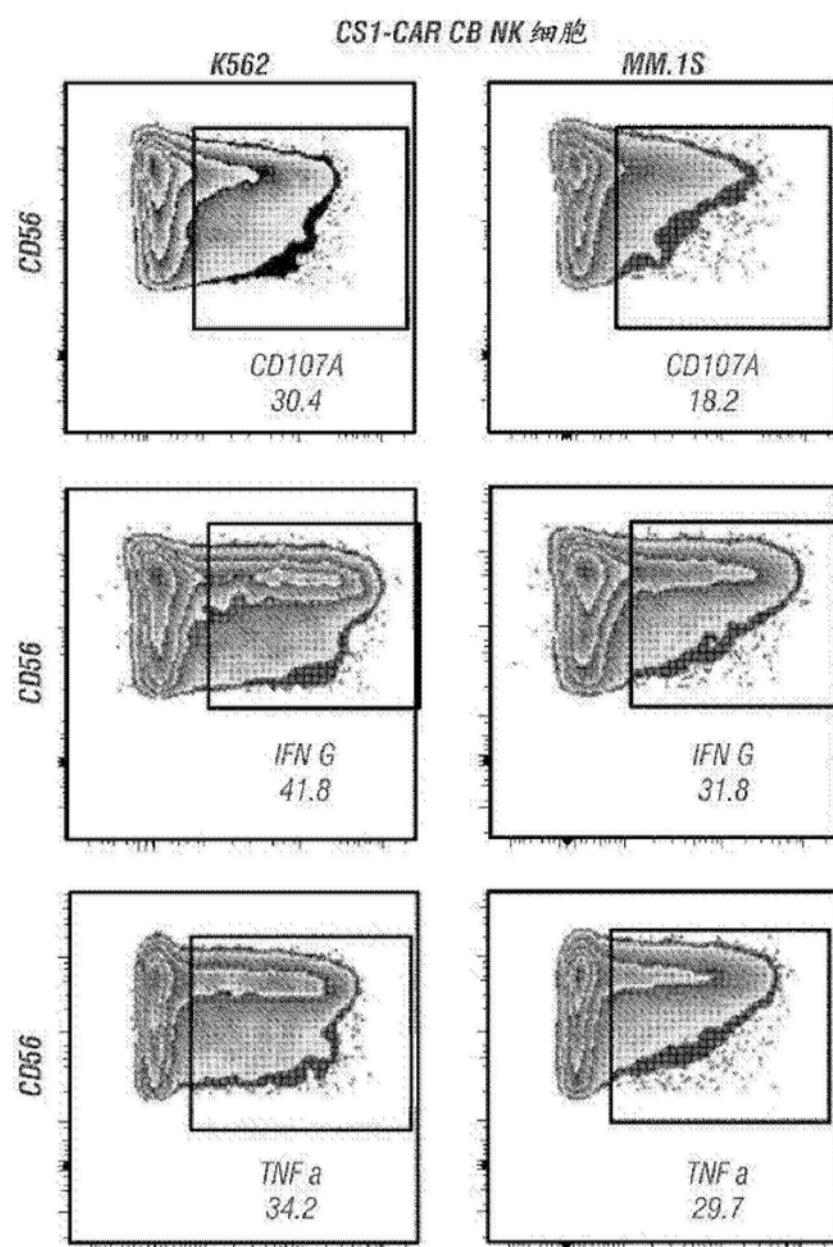


图1C (续)

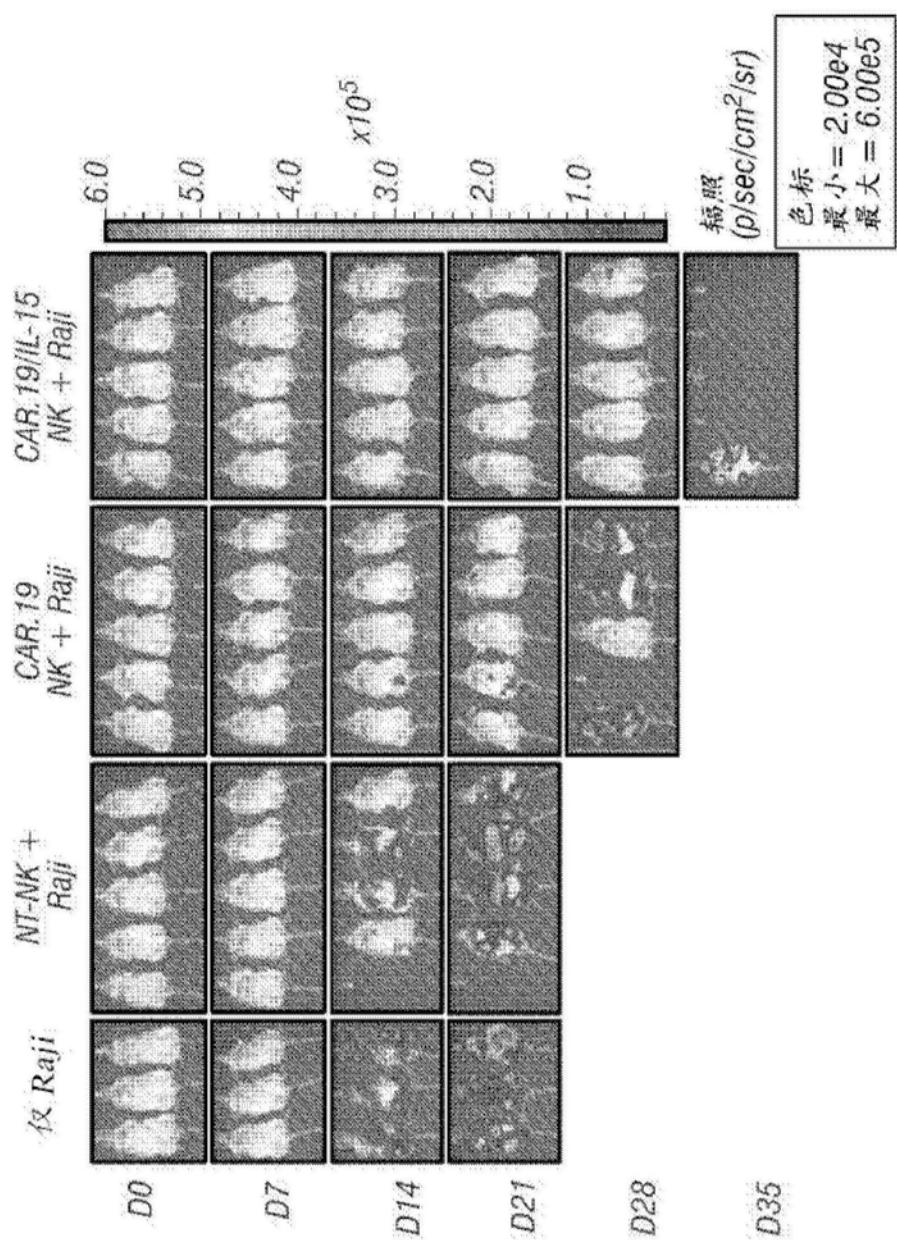


图2A

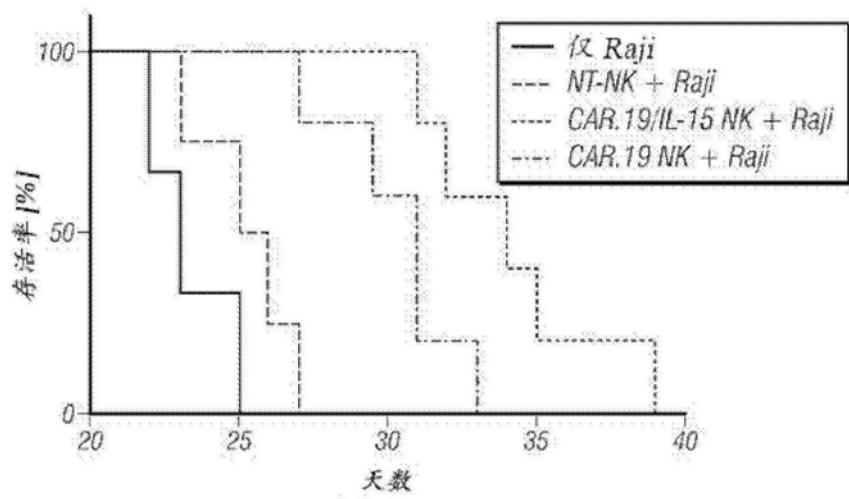


图2B

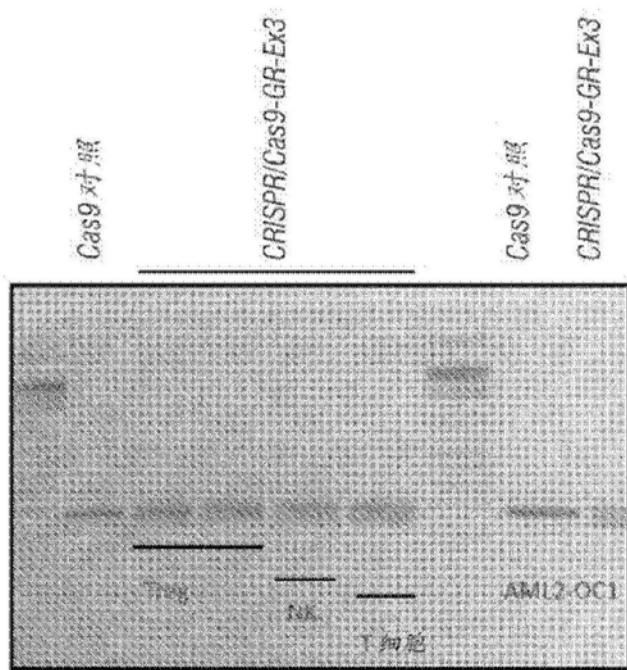


图3

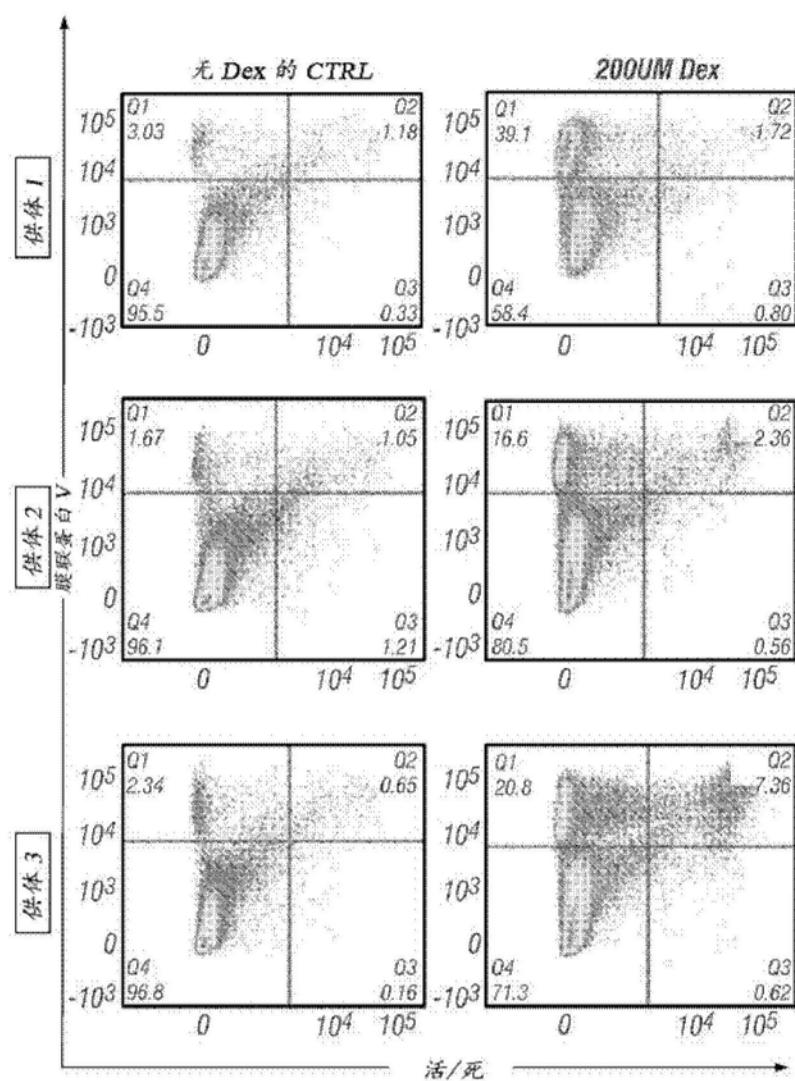


图4A

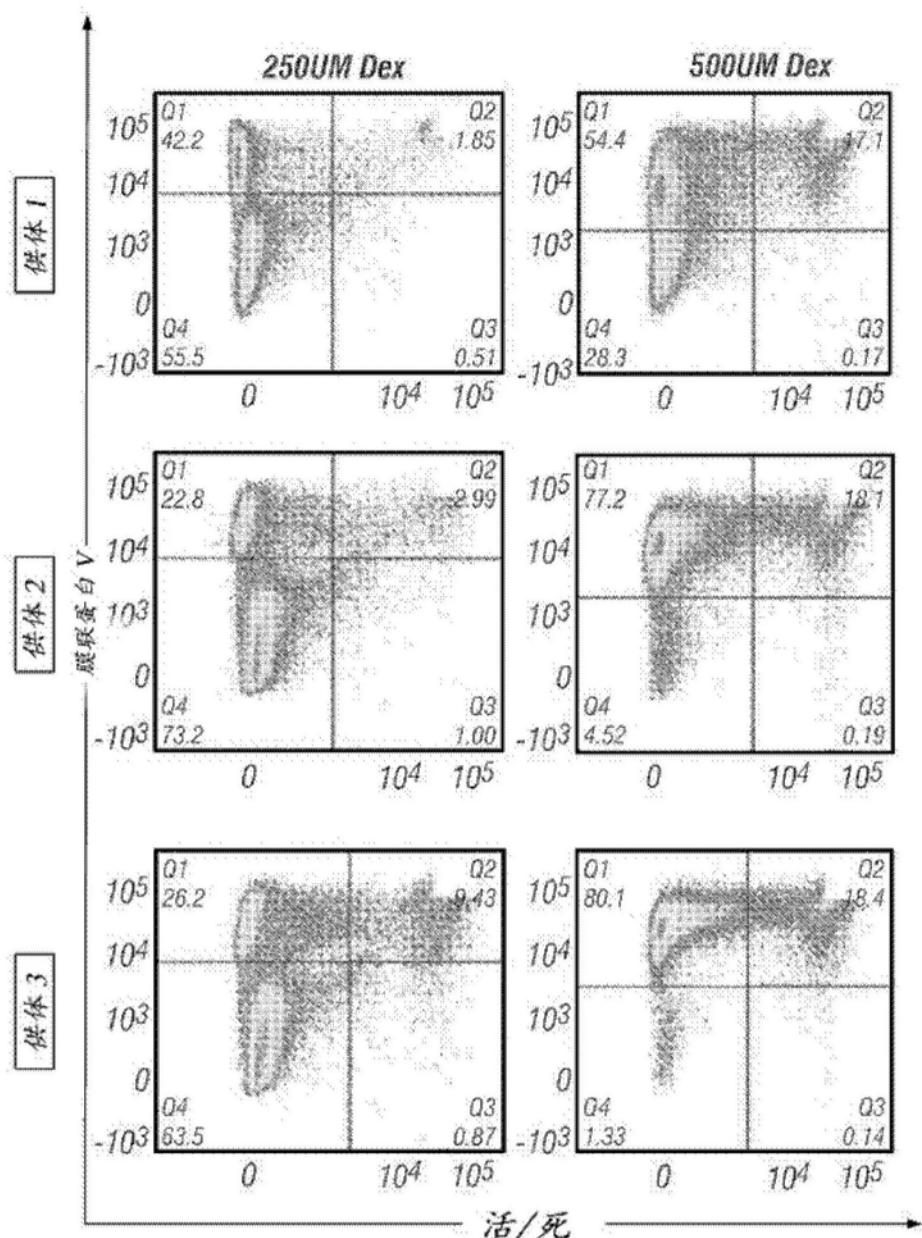


图4A (续)

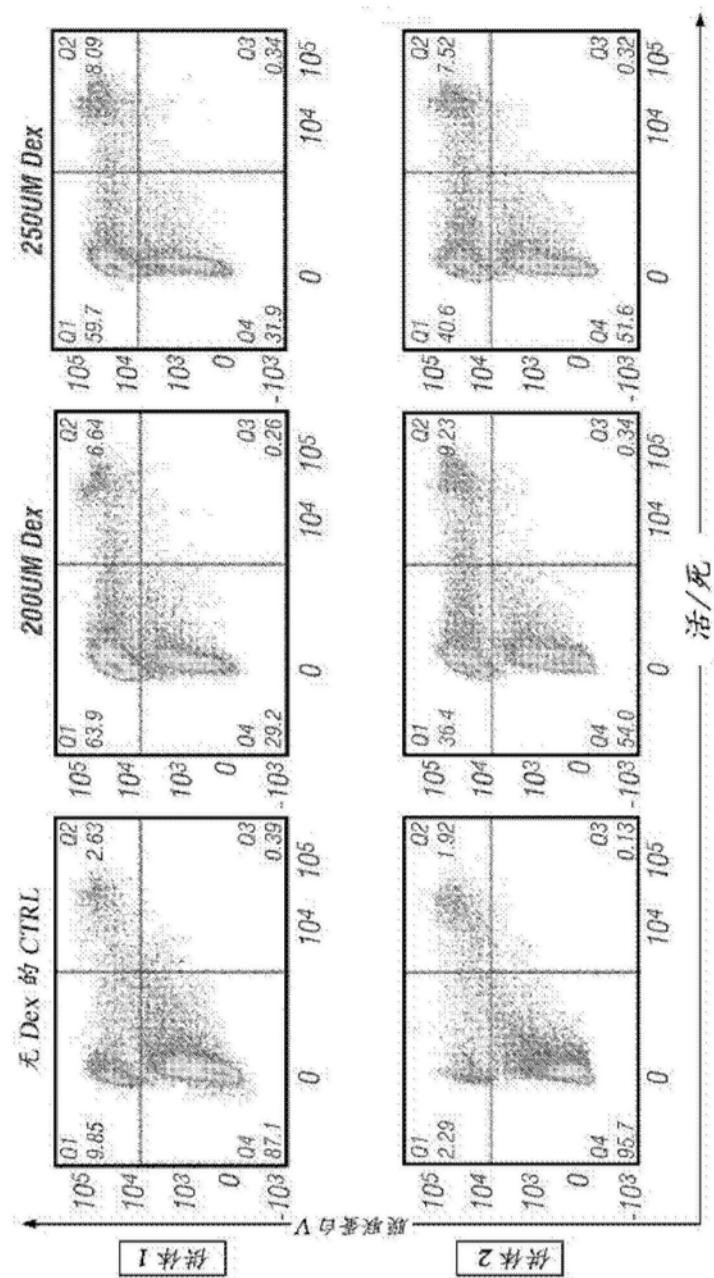


图4B

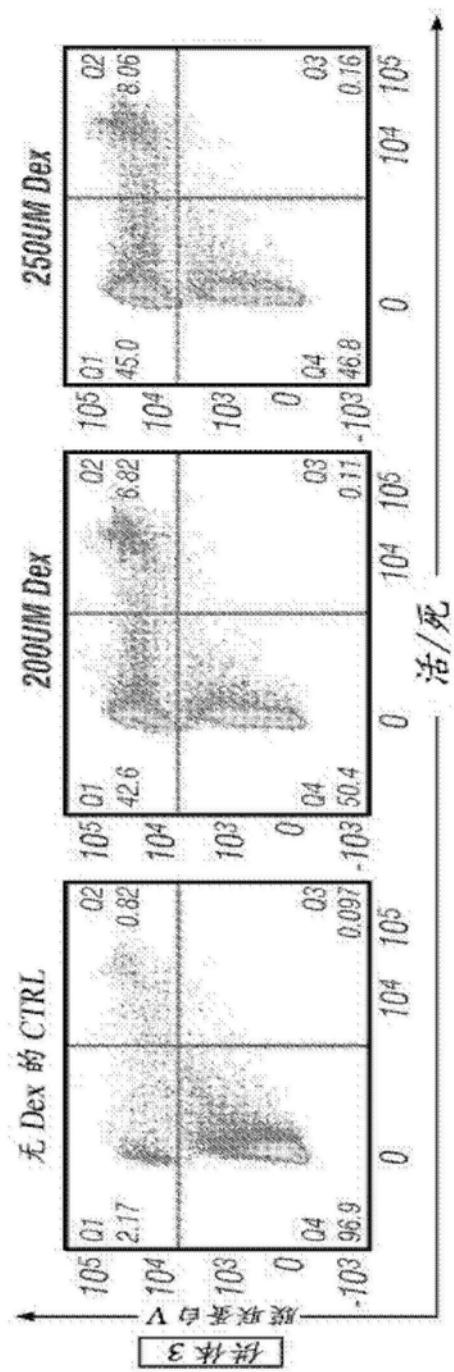


图4B(续)

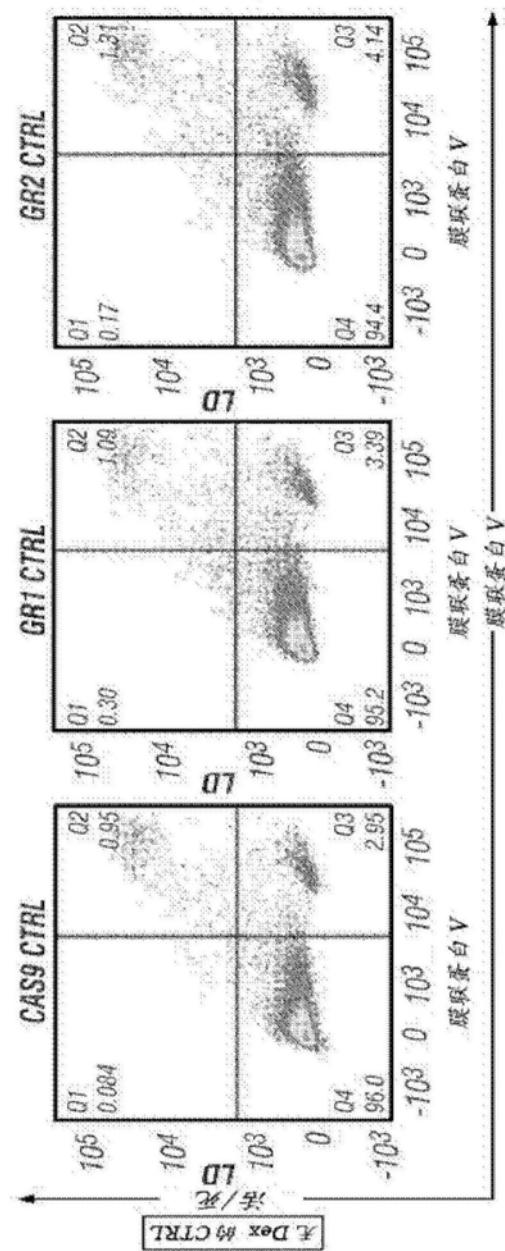


图5

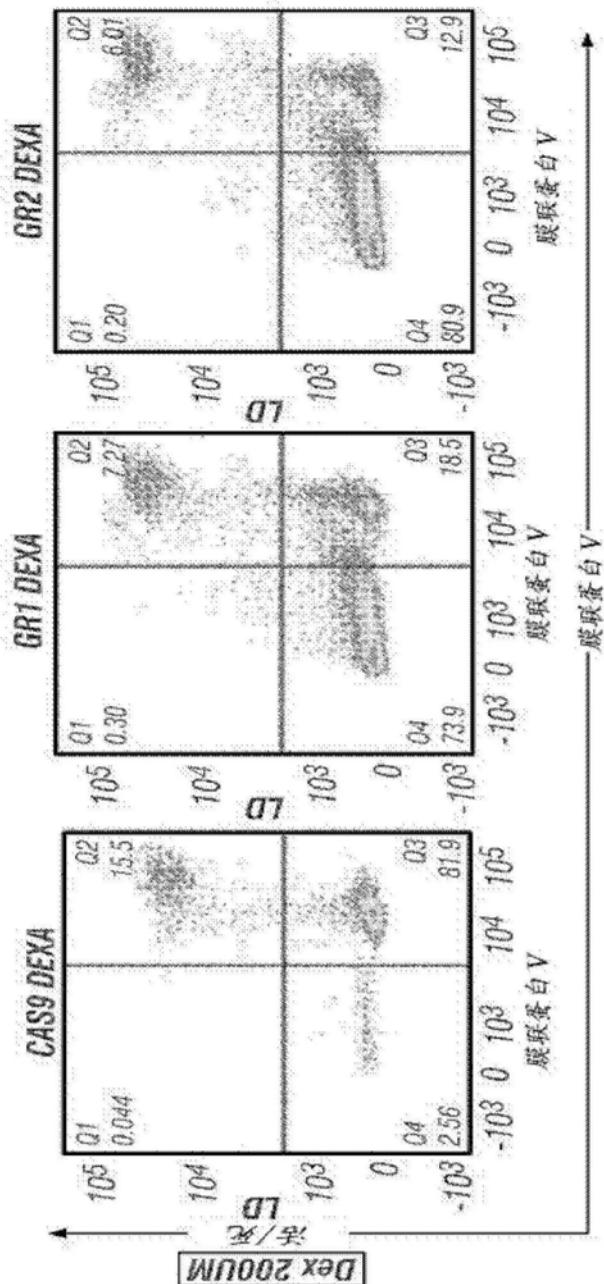


图5 (续)

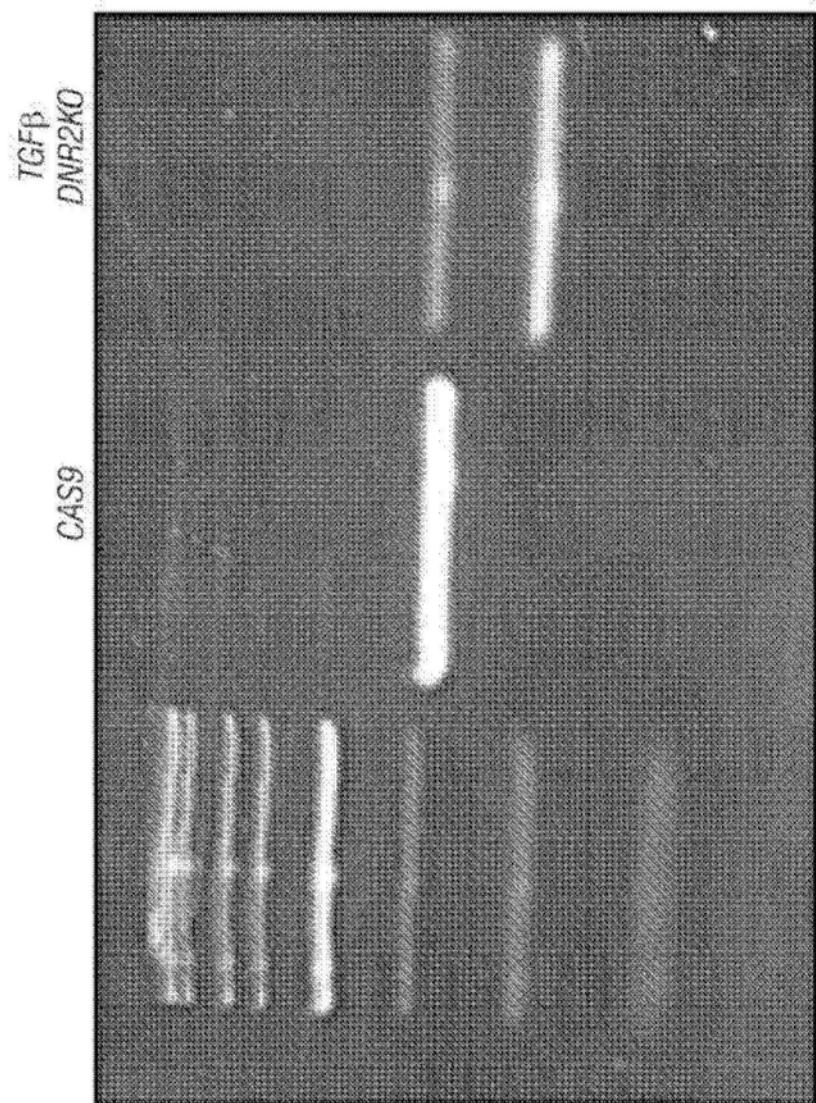


图6A

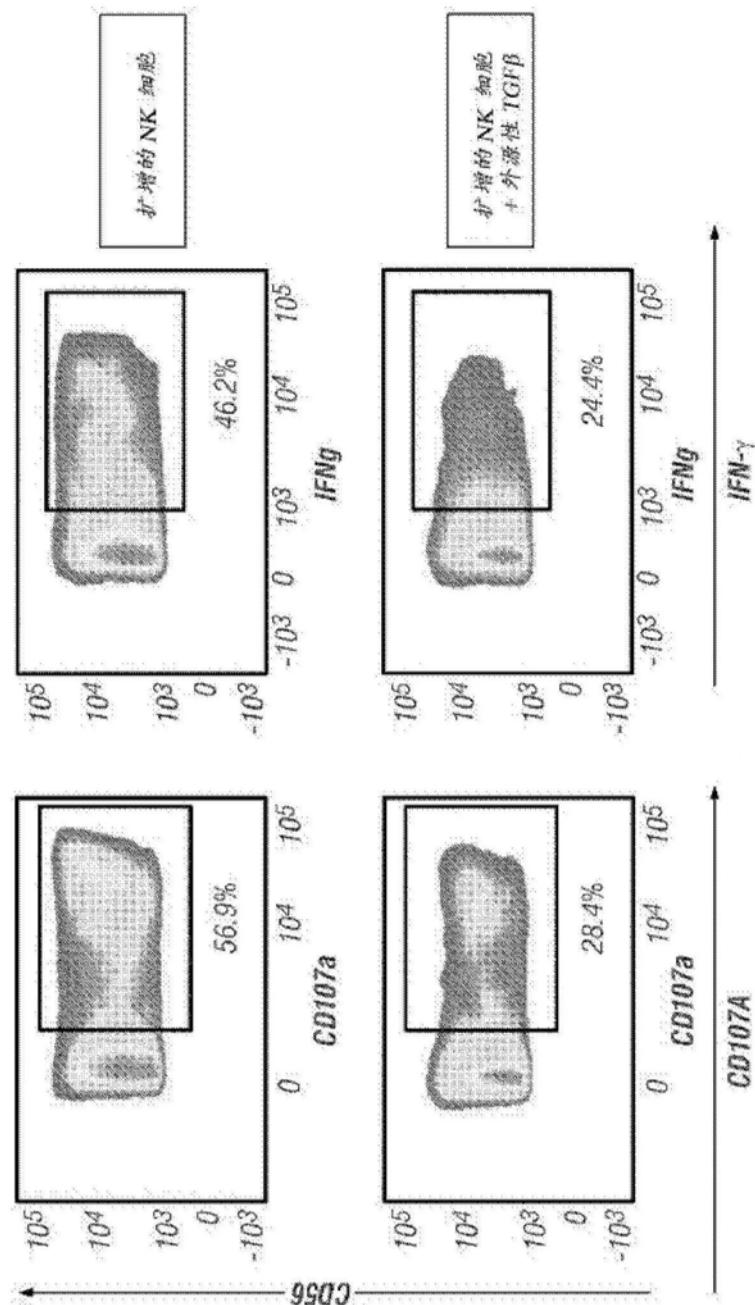


图6B

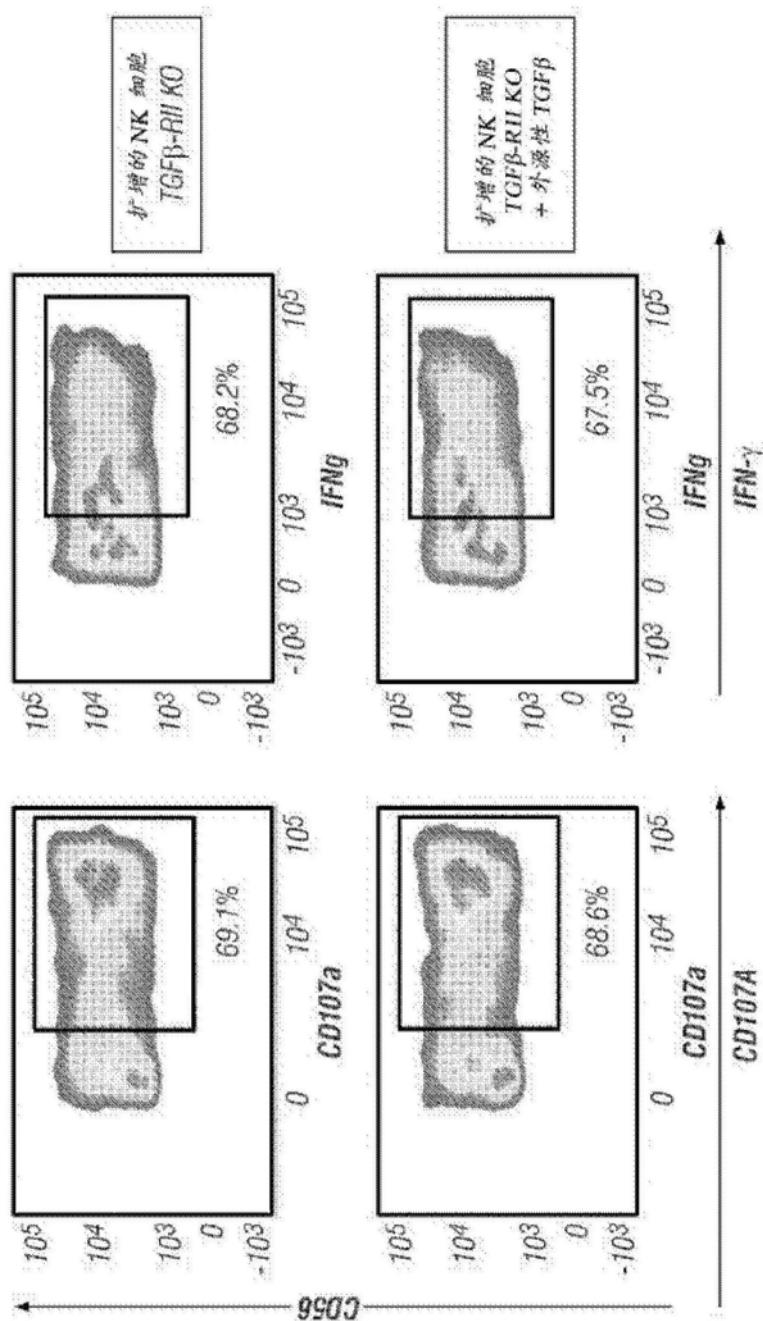


图6B(续)

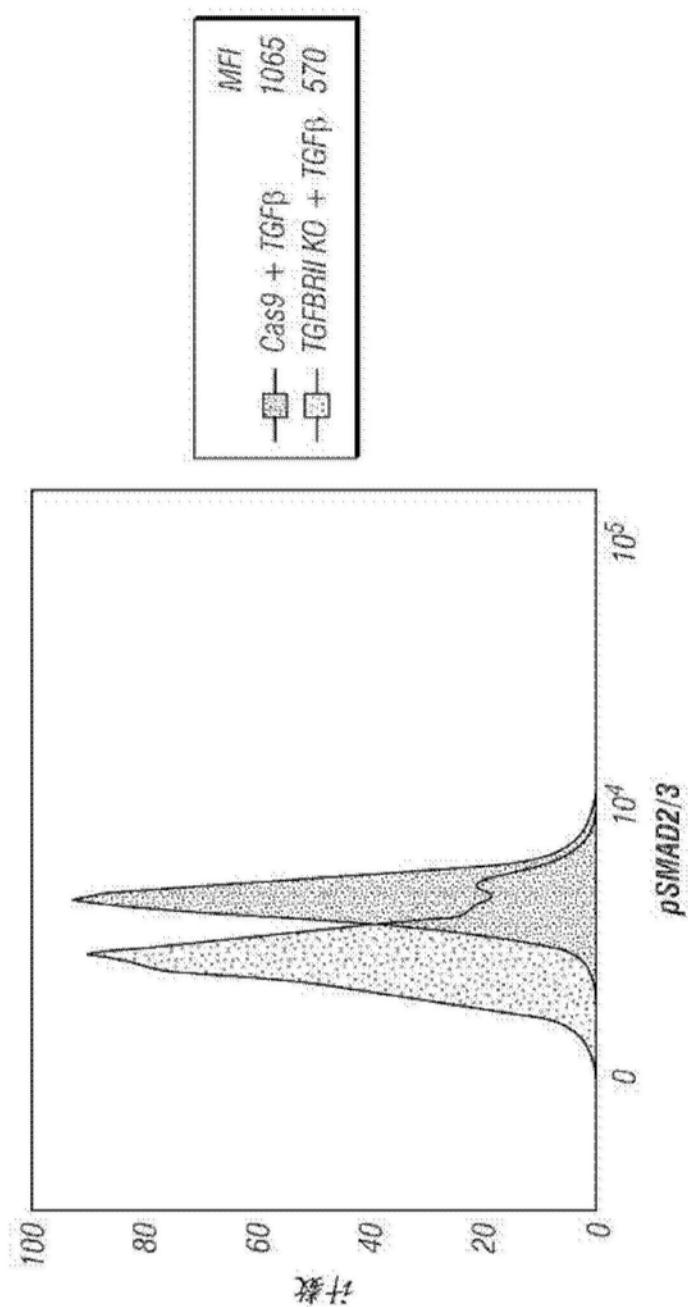


图6C

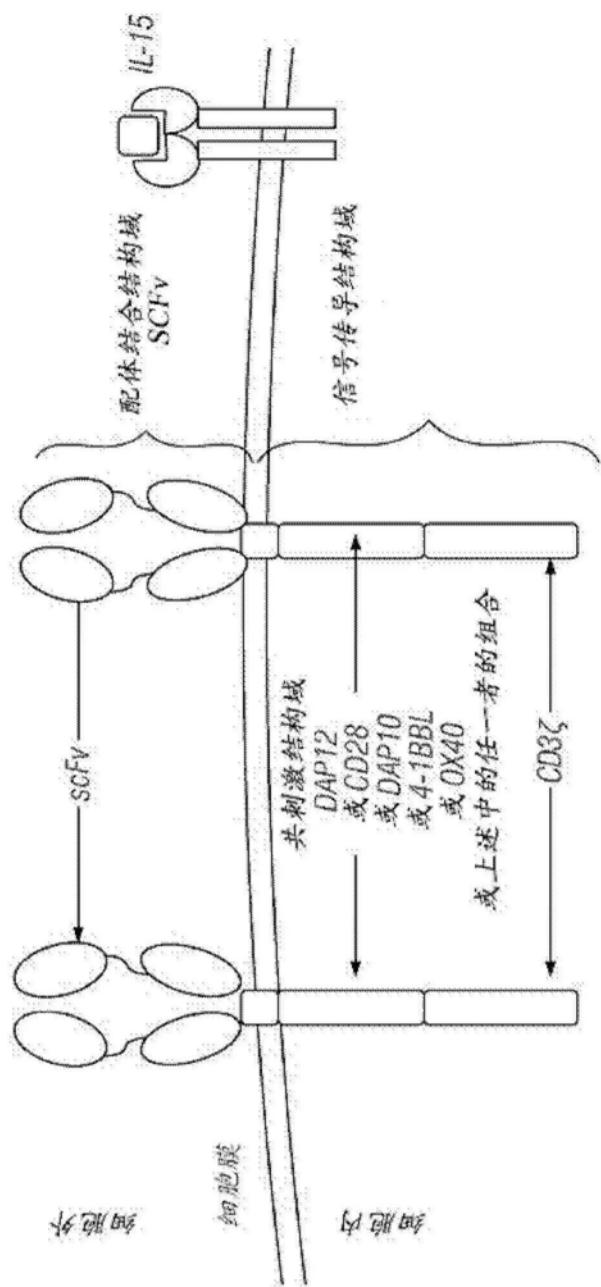


图7A

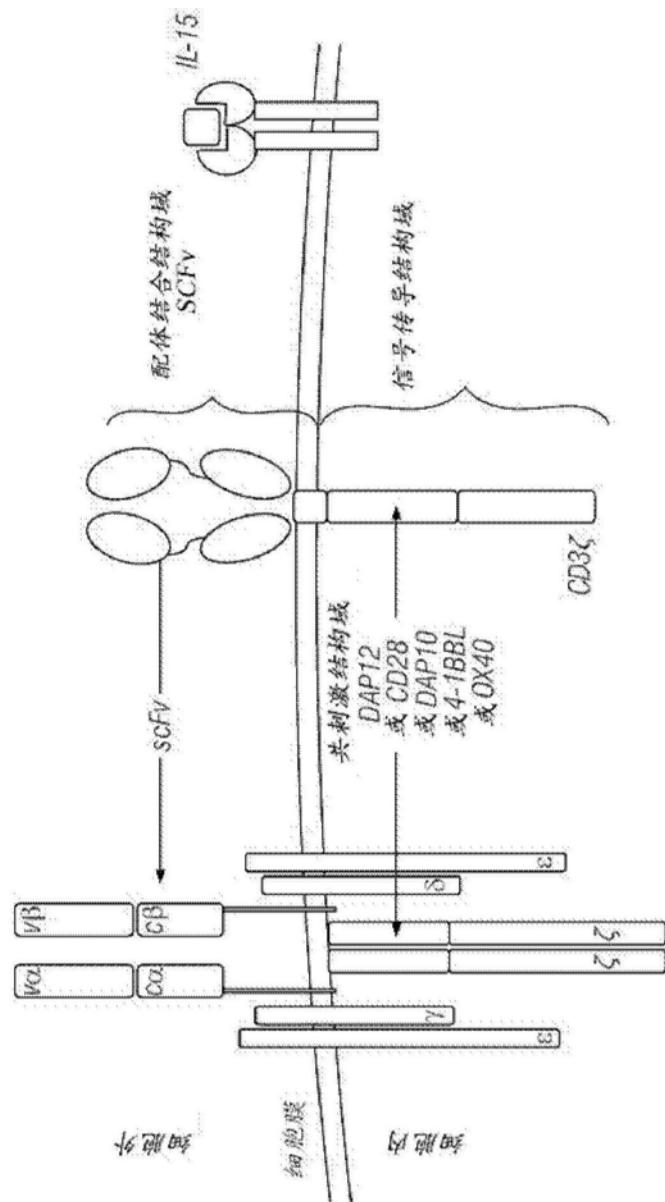


图7B

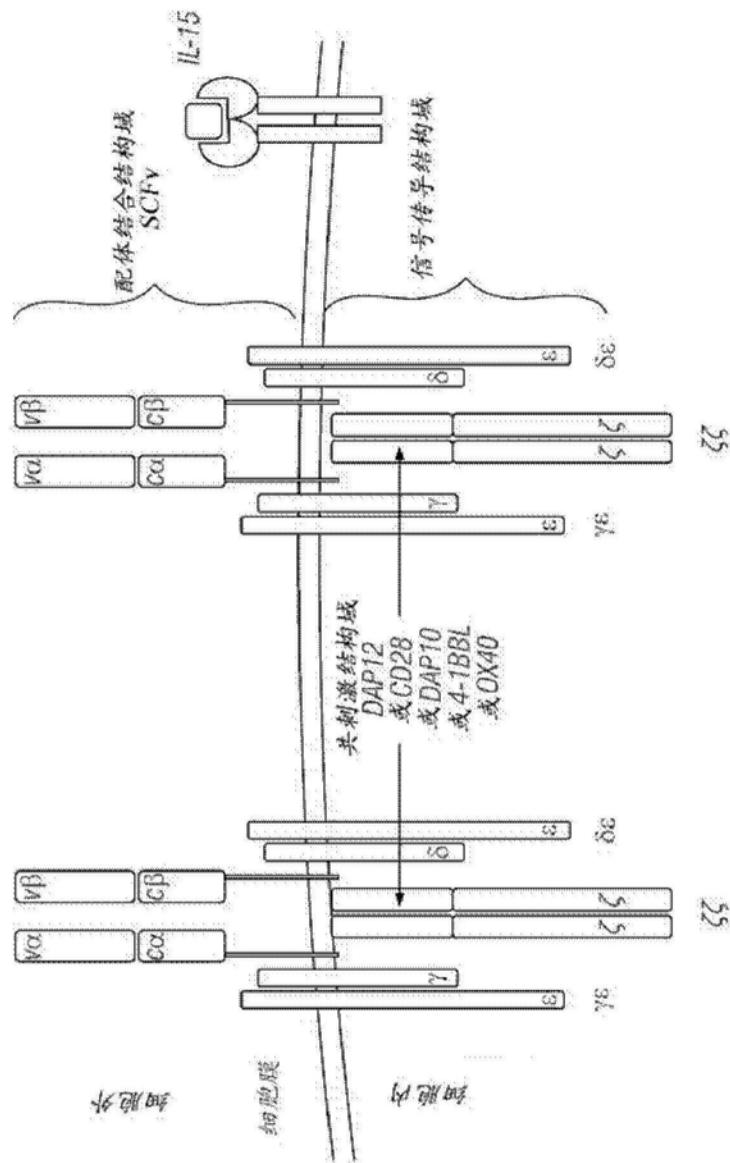


图7C

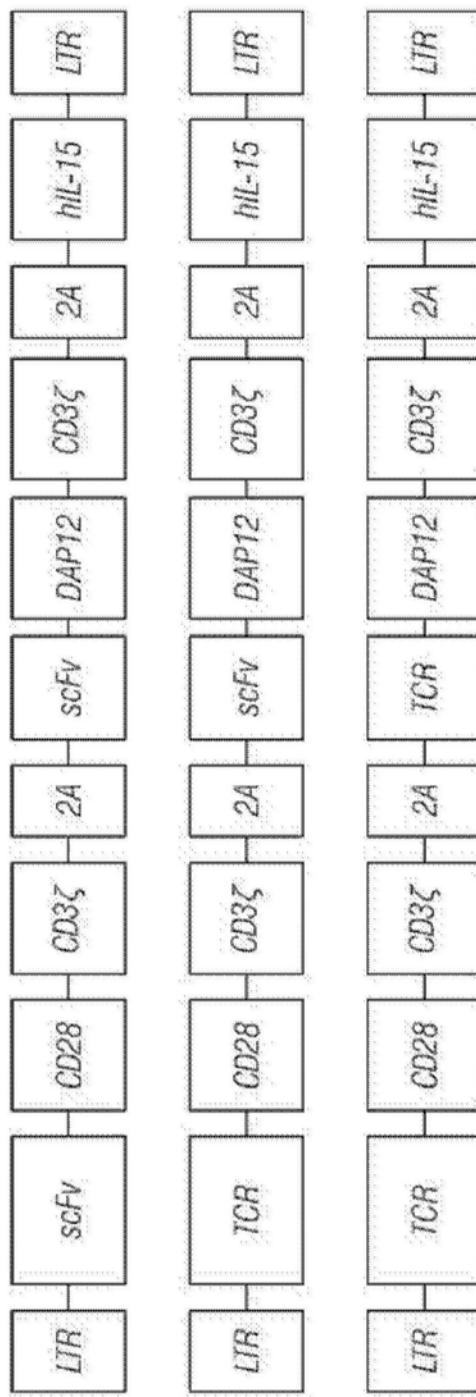


图7D