(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115427550 A
(43)申请公布日 2022.12.02

(21)申请号 202180023558.X

(22)申请日 2021.01.27

(30)优先权数据
62/967,005 2020.01.28 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.09.22

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/015333 2021.01.27

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/154887 EN 2021.08.05

(71)申请人 朱诺治疗学股份有限公司
地址 美国华盛顿州

(72)发明人 N·海格 J·泰奥

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴

(51)Int.Cl.
C12N 5/00(2006.01)
C12N 5/0783(2006.01)

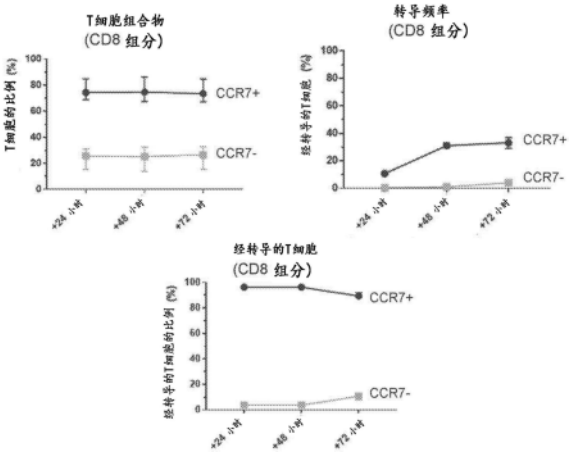
权利要求书6页 说明书105页
序列表35页 附图6页

(54)发明名称

T细胞转导方法

(57)摘要

本文提供了用于转导T细胞的方法。在一些实施方案中,所提供的方法包括通过与逆转录病毒载体颗粒、例如慢病毒载体一起孵育来转导T细胞,其中已经针对CCR7+表达对所述细胞进行选择。所提供的方法通过提高转导频率和/或通过降低生物样品之间转导频率的可变性来改善基因工程化T细胞的过程。还提供了被重组或异源基因转导的所得细胞及其组合物。在一些实施方案中,所提供的细胞和组合物能够用于过继免疫疗法的方法中。



CN 115427550 A

1.一种用于提高原代T细胞的转导频率的方法,所述方法包括:

(a)从包含原代T细胞群的生物样品中选择对CCR7的表面表达呈阳性的原代T细胞,从而产生富含CCR7+原代T细胞的输入群体;

(b)在刺激条件下孵育所述输入群体,从而产生经刺激的组合物,其中所述刺激条件包括刺激试剂的存在,所述刺激试剂能够激活TCR复合物的一种或多种组分的一个或多个细胞内信号传导结构域和/或一种或多种共刺激分子的一个或多个细胞内信号传导结构域;以及

(c)将包含编码重组蛋白的异源多核苷酸的病毒载体颗粒与所述经刺激的组合物的T细胞一起孵育,从而产生经转导的细胞群。

2.一种用于提高原代T细胞的转导频率的方法,所述方法包括:

(a)从包含原代T细胞群的生物样品中选择对CCR7的表面表达呈阳性的原代T细胞,从而产生富含CCR7+原代T细胞的输入群体;以及

(b)将包含编码重组蛋白的异源多核苷酸的病毒载体颗粒与所述输入细胞群的T细胞一起孵育,从而产生经转导的细胞群。

3.一种用于提高原代T细胞的转导频率的方法,所述方法包括:

(a)在刺激条件下孵育富含CCR7+T细胞的原代T细胞的输入群体,从而产生经刺激的组合物,其中所述刺激条件包括刺激试剂的存在,所述刺激试剂能够激活TCR复合物的一种或多种组分的一个或多个细胞内信号传导结构域和/或一种或多种共刺激分子的一个或多个细胞内信号传导结构域;以及

(b)将包含编码重组蛋白的异源多核苷酸的病毒载体颗粒与所述经刺激的组合物的T细胞一起孵育,从而产生经转导的细胞群。

4.一种用于提高原代T细胞的转导频率的方法,所述方法包括将包含编码重组蛋白的异源多核苷酸的病毒载体颗粒与富含CCR7+T细胞的原代T细胞的输入群体的T细胞一起孵育,从而产生经转导的细胞群。

5.根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述输入群体的至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%是CCR7+原代T细胞。

6.根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述输入群体的至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%是CCR7+原代T细胞。

7.根据权利要求1-6中任一项所述的方法,其中所述输入群体的至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%是CCR7+原代T细胞。

8.根据权利要求1、2和5-7中任一项所述的方法,其中所述生物样品是血液样品。

9.根据权利要求1、2和5-7中任一项所述的方法,其中所述生物样品是白细胞单采术样品。

10.根据权利要求1-9中任一项所述的方法,其中所述T细胞是未经分级的T细胞,是经富集或分离的CD3+T细胞,是经富集或分离的CD4+T细胞,或者是经富集或分离的CD8+T细胞。

11.根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中所述输入群体包含至少80%、至少

85％、至少90％或至少95％的作为CD4+T细胞或CD8+T细胞的细胞。

12.根据权利要求1-11中任一项所述的方法，其中所述输入群体包含至少80％、至少85％、至少90％或至少95％的作为CD4+T细胞的细胞。

13.根据权利要求1-11中任一项所述的方法，其中所述输入群体包含至少80％、至少85％、至少90％或至少95％的作为CD8+T细胞的细胞。

14.根据权利要求1-11中任一项所述的方法，其中所述输入群体包含至少80％、至少85％、至少90％或至少95％的作为CD4+T细胞和CD8+T细胞的细胞。

15.根据权利要求14所述的方法，其中所述CD4+T细胞与所述CD8+T细胞的比率为或为约1:1、1:2、2:1、1:3或3:1。

16.根据权利要求1-10中任一项所述的方法，其中所述输入群体包含至少80％、至少85％、至少90％或至少95％的作为CD3+T细胞的细胞。

17.根据权利要求1-16中任一项所述的方法，其中所述输入群体包含在$100x10^6$个与$500x10^6$个之间的总T细胞。

18.根据权利要求1-17中任一项所述的方法，其中所述输入群体包含在$200x10^6$个与$400x10^6$个之间的总T细胞，任选地为或约$300x10^6$个总T细胞。

19.根据权利要求17或权利要求18所述的方法，其中所述总T细胞是活T细胞。

20.根据权利要求1、3和519中任一项所述的方法，其中所述经刺激的组合物的至少10％、至少20％、至少30％、至少40％、至少50％或至少60％的细胞：

(i)表达选自HLA-DR、CD25、CD69、CD71、CD40L和4-1BB的表面标记；

(ii)包括选自IL-2、IFN-γ和TNF-α的细胞因子的细胞内表达；

(iii)处于细胞周期的G1期或较后期;和/或

(iv)能够增殖。

21.根据权利要求1、3和5-20中任一项所述的方法，其中所述刺激试剂包括与TCR复合物的成员特异性结合、任选地与CD3特异性结合的一级药剂。

22.根据权利要求21所述的方法，其中所述刺激试剂进一步包括与T细胞共刺激分子特异性结合的二级药剂，任选地其中所述共刺激分子选自CD28、CD137(4-1-BB)、OX40或ICOS。

23.根据权利要求21或权利要求22所述的方法，其中所述一级药剂和/或二级药剂包括抗体，任选地其中所述刺激试剂包括与抗CD3抗体和抗CD28抗体或其抗原结合片段一起孵育。

24.根据权利要求21-23中任一项所述的方法，其中所述一级药剂和/或二级药剂存在于固体支持物的表面上。

25.根据权利要求24所述的方法，其中所述固体支持物是或包括珠。

26.根据权利要求21-23中任一项所述的方法，其中所述一级药剂和二级药剂可逆地结合在包含多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子的寡聚颗粒试剂的表面上。

27.根据权利要求26所述的方法，其中参考在SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列中的在链霉亲和素中的位置，在对应于位置44至47的序列位置处，所述多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子各自包含氨基酸序列Val^{44}-Thr^{45}-Ala^{46}-Arg^{47}或Ile^{44}-Gly^{45}-Ala^{46}-Arg^{47}。

28.根据权利要求26所述的方法，其中所述多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分

子各自是链霉亲和素突变蛋白分子，并且其中所述多个链霉亲和素突变蛋白分子各自是或包含：

a)SEQ ID NO:36、41、48-50或53-55中任一个所示的氨基酸序列；

b)如下氨基酸序列，其与SEQ ID NO:36、41、48-50或53-55中的任一个展现出至少85％、86％、87％、88％、89％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％或更高的序列同一性，并且含有对应于Va144-Thr45-Ala46-Arg47或lle44-Gly45-Ala46-Arg47的氨基酸序列，和/或与生物素、生物素类似物或链霉亲和素结合肽可逆地结合；或

c)a)或b)的与生物素、生物素类似物或链霉亲和素结合肽可逆地结合的功能片段，任选地其中所述多个链霉亲和素突变蛋白分子各自是或包含SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列。

29.根据权利要求1-28中任一项所述的方法，其中所述经转导的细胞群包含至少20％、至少25％、至少30％、至少35％、至少40％、至少45％、至少50％、至少55％、至少60％、至少65％、至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％或至少95％的表达所述重组蛋白的细胞。

30.根据权利要求1-29中任一项所述的方法，其中所述经转导的细胞群包含至少55％、至少60％、至少65％、至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％或至少95％的表达所述重组蛋白的细胞。

31.根据权利要求1-30中任一项所述的方法，其中与未通过选择步骤针对CCR7+原代T细胞富集的细胞组合物相比，在所述经转导的细胞群中表达所述重组蛋白的细胞的百分比大至少0.5倍、至少1倍、至少1.5倍或至少2倍。

32.根据权利要求1-31中任一项所述的方法，其中孵育所述病毒载体颗粒包括将所述病毒载体颗粒与所述输入群体或所述经刺激的组合物一起旋转接种的步骤。

33.根据权利要求32所述的方法，其中旋转接种包括在离心室的内部腔室中旋转所述病毒载体颗粒和所述输入群体或经刺激的组合物，其中所述旋转是在所述腔室侧壁的内表面处在如下相对离心力下进行，所述相对离心力是：

在或在约500g与2500g之间、500g与2000g之间、500g与1600g之间、500g与1000g之间、600g与1600g之间、600g与1000g之间、1000g与2000g之间或1000g与1600g之间，每个都包含端值；或

至少或至少约600g、800g、1000g、1200g、1600g或2000g。

34.根据权利要求32或权利要求33所述的方法，其中旋转接种进行如下时间，所述时间是：

大于或约5分钟、大于或约10分钟、大于或约15分钟、大于或约20分钟、大于或约30分钟、大于或约45分钟、大于或约60分钟、大于或约90分钟或者大于或约120分钟；或

在或在约5分钟与60分钟之间、10分钟与60分钟之间、15分钟与60分钟之间、15分钟与45分钟之间、30分钟与60分钟之间或45分钟与60分钟之间，每个都包含端值。

35.根据权利要求1、3和5-34中任一项所述的方法，所述方法进一步包括在所述孵育的至少一部分期间，使所述经刺激的组合物和/或病毒载体颗粒与转导佐剂接触。

36.根据权利要求2、4-34中任一项所述的方法，所述方法进一步包括，在所述孵育的至

少一部分期间，使所述输入群体和/或病毒载体颗粒与转导佐剂接触。

37.根据权利要求35或权利要求36所述的方法，其中所述接触是在将所述病毒载体颗粒与所述输入群体或所述经刺激的组合物一起旋转接种之前、同时或之后进行。

38.根据权利要求1-37中任一项所述的方法，其中所述病毒载体颗粒的孵育的至少一部分是在或在约37℃±2℃下进行。

39.根据权利要求1-38中任一项所述的方法，其中所述病毒载体颗粒的孵育的至少一部分是在所述旋转接种之后进行。

40.根据权利要求38或权利要求39所述的方法，其中所述病毒载体颗粒的孵育的所述至少一部分进行不超过或不超过约2小时、4小时、12小时、18小时、24小时、30小时、36小时、48小时、60小时或72小时。

41.根据权利要求38-40中任一项所述的方法，其中所述病毒载体颗粒的孵育的所述至少一部分进行或进行约24小时。

42.根据权利要求1-41中任一项所述的方法，其中所述病毒载体颗粒的孵育的总持续时间不超过12小时、24小时、36小时、48小时或72小时。

43.根据权利要求1-42中任一项所述的方法，其中所述病毒载体颗粒是慢病毒载体颗粒。

44.根据权利要求43所述的方法，其中所述慢病毒载体颗粒是复制缺陷型的。

45.根据权利要求1-44中任一项所述的方法，其中所述病毒载体颗粒被病毒包膜糖蛋白假型化。

46.根据权利要求45所述的方法，其中所述病毒包膜糖蛋白是VSV-G。

47.根据权利要求1-46中任一项所述的方法，其中将所述病毒载体颗粒在小于或小于约20.0或者小于或小于约10.0的感染复数下孵育。

48.根据权利要求1-47中任一项所述的方法，其中：

将所述病毒载体颗粒在从或从约1.0IU/细胞至10IU/细胞或2.0IU/细胞至5.0IU/细胞的感染复数下孵育；或者

将所述病毒载体颗粒在至少或至少约1.6IU/细胞、1.8IU/细胞、2.0IU/细胞、2.4IU/细胞、2.8IU/细胞、3.2IU/细胞、3.6IU/细胞、4.0IU/细胞、5.0IU/细胞、6.0IU/细胞、7.0IU/细胞、8.0IU/细胞、9.0IU/细胞或10.0IU/细胞的感染复数下孵育。

49.根据权利要求1、3和5-48中任一项所述的方法，其中所述经刺激的组合物包含至少为或约至少或约$50x10^6$个细胞、$100x10^6$个细胞或$200x10^6$个细胞。

50.根据权利要求1、3和5-49中任一项所述的方法，其中所述经刺激的组合物包含在为或约$50x10^6$个与为或约$300x10^6$个之间的细胞，包含端值，任选地在为或约$100x10^6$个与为或约$200x10^6$个之间的细胞，包含端值。

51.根据权利要求2和4-48中任一项所述的方法，其中所述输入群体包含至少为或约至少或约$50x10^6$个细胞、$100x10^6$个细胞或$200x10^6$个细胞。

52.根据权利要求2和4-49中任一项所述的方法，其中所述输入群体包含在为或约$50x10^6$个与为或约$300x10^6$个之间的细胞，包含端值，任选地在为或约$100x10^6$个与为或约$200x10^6$个之间的细胞，包含端值。

53.根据权利要求1-52中任一项所述的方法，其中与所述病毒颗粒一起孵育的所述T细

胞包括至少为或约至少或约$50x10^6$个细胞、$100x10^6$个细胞或$200x10^6$个细胞。

54.根据权利要求1-53中任一项所述的方法，其中与所述病毒颗粒一起孵育的所述T细胞包括在为或约$50x10^6$个与为或约$300x10^6$个之间的细胞，包含端值，任选地在为或约$100x10^6$个与为或约$200x10^6$个之间的细胞，包含端值。

55.根据权利要求1-54中任一项所述的方法，其中所述重组蛋白是抗原受体。

56.根据权利要求55所述的方法，其中所述抗原受体是转基因T细胞受体(TCR)。

57.根据权利要求55所述的方法，其中所述抗原受体是嵌合抗原受体(CAR)。

58.根据权利要求57所述的方法，其中所述CAR包含与靶抗原特异性结合的细胞外抗原识别结构域、包含ITAM的细胞内信号传导结构域以及连接所述细胞外结构域和所述细胞内信号传导结构域的跨膜结构域。

59.根据权利要求58所述的方法，其中所述细胞内信号传导结构域包括CD3-zeta(CD3ζ)链的细胞内结构域。

60.根据权利要求58或权利要求59所述的方法，其中所述跨膜结构域包含CD28的跨膜部分。

61.根据权利要求58-60中任一项所述的方法，其中所述细胞内信号传导结构域进一步包括T细胞共刺激分子的细胞内信号传导结构域。

62.根据权利要求61所述的方法，其中所述T细胞共刺激分子选自CD28和41BB。

63.根据权利要求55-62中任一项所述的方法，其中所述抗原受体与和疾病或病症相关的抗原特异性结合或者与通用标签特异性结合。

64.根据权利要求63所述的方法，其中所述疾病或病症是癌症、自身免疫性疾病或障碍或者感染性疾病。

65.根据权利要求1-64中任一项所述的方法，其中所述经转导的细胞群包含被所述异源多核苷酸转导的T细胞。

66.根据权利要求65所述的方法，其中所述经转导的细胞群中至少20％、至少25％、至少30％、至少35％、至少40％、至少45％、至少50％、至少55％、至少60％、至少65％、至少70％、至少75％、至少80％或至少85％的T细胞被所述异源多核苷酸转导。

67.根据权利要求65或权利要求66所述的方法，其中所述经转导的细胞群中至少55％、至少60％、至少65％、至少70％、至少75％、至少80％或至少85％的T细胞被所述异源多核苷酸转导。

68.根据权利要求65-67中任一项所述的方法，其中至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％的被所述异源多核苷酸转导的T细胞呈CCR7+。

69.根据权利要求65或权利要求66所述的方法，所述方法进一步包括从所述经转导的细胞群中回收或分离通过所述方法产生的经转导的T细胞。

70.根据权利要求1-69中任一项所述的方法，其中，在多个经转导的细胞群中，在所述经转导的细胞群中被所述异源多核苷酸转导的T细胞的百分比变化30％或更少、25％或更少、20％或更少、15％或更少或者10％或更少。

71.根据权利要求1-70中任一项所述的方法，所述方法是在体外或离体进行。

72.一种组合物，所述组合物包含通过根据权利要求1-71中任一项所述的方法产生的经转导的细胞群。

73.根据权利要求72所述的组合物,所述组合物进一步包含冷冻保存剂。

T细胞转导方法

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2020年1月28日提交的标题为“T细胞转导方法(METHODS FOR T CELL TRANSDUCTION)”的美国临时申请62/967,005的优先权,出于所有目的将其内容通过引用以其整体并入。

通过引用并入序列表

[0002] 将ASCII文本文件的以下提交的内容通过引用以其整体并入本文:将计算机可读形式(CRF)的序列表作为创建于2021年1月27日的标题为73504_2023140_SEQLIST.txt的文件提供,其大小为53,345字节。

技术领域

[0003] 本公开文本提供了用于转导T细胞的方法。在一些实施方案中,所提供的方法包括通过与逆转录病毒载体颗粒(例如,慢病毒载体)一起孵育来转导T细胞,其中已经针对CCR7+表达对所述细胞进行选择。在一些实施方案中,此类方法导致通过提高转导频率和/或通过降低生物样品之间转导频率的可变性来改善基因工程化T细胞的过程。还提供了被重组或异源基因转导的所得细胞及其组合物,所述重组或异源基因如编码嵌合受体(如嵌合抗原受体)或其他重组抗原受体(如转基因T细胞受体)的基因。在一些实施方案中,所提供的细胞和组合物能够用于过继免疫疗法的方法中。

背景技术

[0004] 多种策略可用于在体外转导T细胞群,包括用于在体外转导用于在过继细胞免疫疗法或癌症疗法中使用的T细胞。需要改进的策略用于在体外转导细胞群,包括用于研究、诊断和治疗目的,使得转导频率得以提高并且在生物样品之间更一致。提供了满足此类需要的方法。

发明内容

[0005] 本文提供了一种用于提高原代T细胞的转导频率的方法,所述方法包括:(a)从包含原代T细胞群的生物样品中选择对CCR7的表面表达呈阳性的原代T细胞,从而产生富含CCR7+原代T细胞的输入群体;(b)任选地,在刺激条件下孵育所述输入群体,从而产生经刺激的组合物,其中所述刺激条件包括刺激试剂的存在,所述刺激试剂能够激活TCR复合物的一种或多种组分的一个或多个细胞内信号传导结构域和/或一种或多种共刺激分子的一个或多个细胞内信号传导结构域;以及(c)将包含编码重组蛋白的异源多核苷酸的病毒载体颗粒与所述输入细胞群或任选地所述经刺激的组合物的T细胞一起孵育,从而产生经转导的细胞群。

[0006] 本文还提供了一种用于提高原代T细胞的转导频率的方法,所述方法包括:(a)从包含原代T细胞群的生物样品中选择对CCR7的表面表达呈阳性的原代T细胞,从而产生富含CCR7+原代T细胞的输入群体;(b)在刺激条件下孵育所述输入群体,从而产生经刺激的组合

物,其中所述刺激条件包括刺激试剂的存在,所述刺激试剂能够激活TCR复合物的一种或多种组分的一个或多个细胞内信号传导结构域和/或一种或多种共刺激分子的一个或多个细胞内信号传导结构域;以及(c)将包含编码重组蛋白的异源多核苷酸的病毒载体颗粒与所述经刺激的组合物的T细胞一起孵育,从而产生经转导的细胞群。

[0007] 本文还提供了一种用于提高原代T细胞的转导频率的方法,所述方法包括:(a)从包含原代T细胞群的生物样品中选择对CCR7的表面表达呈阳性的原代T细胞,从而产生富含CCR7+原代T细胞的输入群体;以及(b)将包含编码重组蛋白的异源多核苷酸的病毒载体颗粒与所述输入细胞群的T细胞一起孵育,从而产生经转导的细胞群。

[0008] 本文还提供了一种用于提高原代T细胞的转导频率的方法,所述方法包括:(a)在刺激条件下孵育富含CCR7+T细胞的原代T细胞的输入群体,从而产生经刺激的组合物,其中所述刺激条件包括刺激试剂的存在,所述刺激试剂能够激活TCR复合物的一种或多种组分的一个或多个细胞内信号传导结构域和/或一种或多种共刺激分子的一个或多个细胞内信号传导结构域;以及(b)将包含编码重组蛋白的异源多核苷酸的病毒载体颗粒与所述经刺激的组合物的T细胞一起孵育,从而产生经转导的细胞群。

[0009] 本文还提供了一种用于提高原代T细胞的转导频率的方法,所述方法包括将包含编码重组蛋白的异源多核苷酸的病毒载体颗粒与富含CCR7+T细胞的原代T细胞的输入群体的T细胞一起孵育,从而产生经转导的细胞群。

[0010] 在一些任何此类实施方案中,所述输入群体的至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%是CCR7+原代T细胞。在一些任何此类实施方案中,所述输入群体的至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%是CCR7+原代T细胞。在一些任何此类实施方案中,所述输入群体的至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%是CCR7+原代T细胞。

[0011] 在一些任何此类实施方案中,所述选择不包括选择呈(a)CCR7+且CD45RO+;或(b)CCR7+且CD27+;或(c)CCR7+且CD45RA-;或(d)CCR7+且CD62L+;或(e)CCR7+且CD45RA+;或(f)CCR7+且CD62L-的细胞。在一些任何此类实施方案中,所述输入群体不富含呈(a)CCR7+且CD45RO+;或(b)CCR7+且CD27+;或(c)CCR7+且CD45RA-;或(d)CCR7+且CD62L+;或(e)CCR7+且CD45RA+;或(f)CCR7+且CD62L-的T细胞。在一些任何此类实施方案中,所述输入群体不富含CCR7+且CD45RO+的T细胞,任选地其中所述输入群体的少于85%的总细胞是CCR7+且CD45RO+的T细胞。在一些任何此类实施方案中,所述输入群体不富含CCR7+且CD27+的T细胞,任选地其中所述输入群体的少于85%的总细胞是CCR7+且CD27+的T细胞。在一些任何此类实施方案中,所述输入群体不富含CCR7+且CD45RA-的T细胞,任选地其中所述输入群体的少于85%的总细胞是CCR7+且CD45RA-的T细胞。在一些任何此类实施方案中,所述输入群体不富含CCR7+且CD62L+的T细胞,任选地其中所述输入群体的少于85%的总细胞是CCR7+且CD62L+的T细胞。在一些任何此类实施方案中,所述输入群体不富含CCR7+且CD45RA+的T细胞,任选地其中所述输入群体的少于85%的总细胞是CCR7+且CD45RA+的T细胞。在一些任何此类实施方案中,所述输入群体不富含CCR7+且CD62L-的T细胞,任选地其中所述输入群体的少于85%的总细胞是CCR7+且CD62L-的T细胞。

[0012] 在一些任何此类实施方案中，所述生物样品是血液样品。在一些任何此类实施方案中，所述生物样品是白细胞单采术样品。

[0013] 在一些任何此类实施方案中，所述T细胞是未经分级的T细胞，是经富集或分离的CD3+T细胞，是经富集或分离的CD4+T细胞，或者是经富集或分离的CD8+T细胞。

[0014] 在一些任何此类实施方案中，所述输入群体包含至少80％、至少85％、至少90％或至少95％的作为CD4+T细胞或CD8+T细胞的细胞。在一些任何此类实施方案中，所述输入群体包含至少80％、至少85％、至少90％或至少95％的作为CD4+T细胞的细胞。在一些任何此类实施方案中，所述输入群体包含至少80％、至少85％、至少90％或至少95％的作为CD8+T细胞的细胞。在一些任何此类实施方案中，所述输入群体包含至少80％、至少85％、至少90％或至少95％的作为CD4+T细胞和CD8+T细胞的细胞。在一些任何此类实施方案中，所述CD4+T细胞与所述CD8+T细胞的比率为或为约1:1、1:2、2:1、1:3或3:1。在一些任何此类实施方案中，所述输入群体包含至少80％、至少85％、至少90％或至少95％的作为CD3+T细胞的细胞。

[0015] 在一些任何此类实施方案中，所述输入群体包含在$100x10^6$个与$500x10^6$个之间的总T细胞。在一些任何此类实施方案中，所述输入群体包含在$200x10^6$个与$400x10^6$个之间的总T细胞，任选地为或约$300x10^6$个总T细胞。在一些任何此类实施方案中，所述总T细胞是活T细胞。

[0016] 在一些任何此类实施方案中，所述经刺激的组合物的至少10％、至少20％、至少30％、至少40％、至少50％或至少60％的细胞：(i)表达选自HLA-DR、CD25、CD69、CD71、CD40L和4-1BB的表面标记；(ii)包括选自IL-2、IFN-γ、TNF-α的细胞因子的细胞内表达；(iii)处于细胞周期的G1期或较后期；和/或(iv)能够增殖。

[0017] 在一些任何此类实施方案中，所述刺激试剂包括与TCR复合物的成员特异性结合、任选地与CD3特异性结合的一级药剂。在一些任何此类实施方案中，所述刺激试剂进一步包括与T细胞共刺激分子特异性结合的二级药剂，任选地其中所述共刺激分子选自CD28、CD137(4-1-BB)、OX40或ICOS。在一些任何此类实施方案中，所述一级药剂和/或二级药剂包括抗体，任选地其中所述刺激试剂包括与抗CD3抗体和抗CD28抗体或其抗原结合片段一起孵育。

[0018] 在一些任何此类实施方案中，所述一级药剂和/或二级药剂存在于固体支持物的表面上。在一些任何此类实施方案中，所述固体支持物是或包括珠。在一些任何此类实施方案中，所述一级药剂和二级药剂可逆地结合在包含多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子的寡聚颗粒试剂的表面上。在一些任何此类实施方案中，参考在SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列中的在链霉亲和素中的位置，在对应于位置44至47的序列位置处，所述多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子各自包含氨基酸序列Val^{44}-Thr^{45}-Ala^{46}-Arg^{47}或Ile^{44}-Gly^{45}-Ala^{46}-Arg^{47}。在一些任何此类实施方案中，所述多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子各自是或包含：a)SEQ ID NO:35或56所示的氨基酸序列；或b)与SEQ ID NO:35或56所示的氨基酸序列展现出至少85％、86％、87％、88％、89％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％或更高序列同一性的氨基酸序列；或c)a)或b)的与生物素、生物素类似物或链霉亲和素结合肽可逆地结合的功能片段。在一些任何此类实施方案中，所述多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子各自是链霉亲和素突变蛋白分

子，并且其中所述多个链霉亲和素突变蛋白分子各自是或包含：a)SEQ ID NO:36、41、48-50或53-55中任一个所示的氨基酸序列；b)如下氨基酸序列，其与SEQ ID NO:36、41、48-50或53-55中的任一个展现出至少85％、86％、87％、88％、89％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％或更高的序列同一性，并且含有对应于Val44-Thr45-Ala46-Arg47或lle44-Gly45-Ala46-Arg47的氨基酸序列，和/或与生物素、生物素类似物或链霉亲和素结合肽可逆地结合；或c)a)或b)的与生物素、生物素类似物或链霉亲和素结合肽可逆地结合的功能片段，任选地其中所述多个链霉亲和素突变蛋白分子各自是或包含SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列。

[0019] 在一些任何此类实施方案中，所述经转导的细胞群包含至少20％、至少25％、至少30％、至少35％、至少40％、至少45％、至少50％、至少55％、至少60％、至少65％、至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％或至少95％的表达所述重组蛋白的细胞。在一些任何此类实施方案中，所述经转导的细胞群包含至少55％、至少60％、至少65％、至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％或至少95％的表达所述重组蛋白的细胞。

[0020] 在一些任何此类实施方案中，与未通过选择步骤针对CCR7+原代T细胞富集的细胞组合物相比，在所述经转导的细胞群中表达所述重组蛋白的细胞的百分比大至少0.5倍、至少1倍、至少1.5倍或至少2倍。

[0021] 在一些任何此类实施方案中，孵育所述病毒载体颗粒包括将所述病毒载体颗粒与所述输入群体一起旋转接种的步骤。在一些任何此类实施方案中，孵育所述病毒载体颗粒包括将所述病毒载体颗粒与所述经刺激的组合物一起旋转接种的步骤。

[0022] 在一些任何此类实施方案中，旋转接种包括在离心室的内部腔室中旋转所述病毒载体颗粒和所述输入群体，其中所述旋转是在所述腔室侧壁的内表面处在如下相对离心力下进行，所述相对离心力是：在或在约500g与2500g之间、500g与2000g之间、500g与1600g之间、500g与1000g之间、600g与1600g之间、600g与1000g之间、1000g与2000g之间或1000g与1600g之间，每个都包含端值；或者至少或至少约600g、800g、1000g、1200g、1600g或2000g。在一些任何此类实施方案中，旋转接种包括在离心室的内部腔室中旋转所述病毒载体颗粒和所述经刺激的组合物，其中所述旋转是在所述腔室侧壁的内表面处在如下相对离心力下进行，所述相对离心力是：在或在约500g与2500g之间、500g与2000g之间、500g与1600g之间、500g与1000g之间、600g与1600g之间、600g与1000g之间、1000g与2000g之间或1000g与1600g之间，每个都包含端值；或者至少或至少约600g、800g、1000g、1200g、1600g或2000g。

[0023] 在一些任何此类实施方案中，旋转接种进行如下时间，所述时间是：大于或约5分钟、大于或约10分钟、大于或约15分钟、大于或约20分钟、大于或约30分钟、大于或约45分钟、大于或约60分钟、大于或约90分钟或者大于或约120分钟；或者在或在约5分钟与60分钟之间、10分钟与60分钟之间、15分钟与60分钟之间、15分钟与45分钟之间、30分钟与60分钟之间或45分钟与60分钟之间，每个都包含端值。

[0024] 在一些任何此类实施方案中，所述方法进一步包括在所述孵育的至少一部分期间，使所述输入群体和/或病毒载体颗粒与转导佐剂接触。在一些任何此类实施方案中，所述方法进一步包括在所述孵育的至少一部分期间，使所述经刺激的组合物和/或病毒载体颗粒与转导佐剂接触。在一些任何此类实施方案中，所述方法进一步包括在所述孵育的至少一部分期间，使所述经刺激的组合物和/或病毒载体颗粒与转导佐剂接触。

[0025] 在一些任何此类实施方案中，所述方法进一步包括在所述孵育的至少一部分期间，使所述输入群体和/或病毒载体颗粒与转导佐剂接触。

[0026] 在一些任何此类实施方案中，所述接触是在将所述病毒载体颗粒与所述输入群体一起旋转接种之前、同时或之后进行。在一些任何此类实施方案中，所述接触是在将所述病毒载体颗粒与所述经刺激的组合物一起旋转接种之前、同时或之后进行。

[0027] 在一些任何此类实施方案中，所述病毒载体颗粒的孵育的至少一部分是在或在约37℃±2℃下进行。在一些任何此类实施方案中，所述病毒载体颗粒的孵育的至少一部分是在所述旋转接种之后进行。在一些任何此类实施方案中，所述病毒载体颗粒的孵育的所述至少一部分进行不超过或不超过约2小时、4小时、12小时、18小时、24小时、30小时、36小时、48小时、60小时或72小时。在一些任何此类实施方案中，所述病毒载体颗粒的孵育的所述至少一部分进行或进行约24小时。在一些任何此类实施方案中，所述病毒载体颗粒的孵育的总持续时间不超过12小时、24小时、36小时、48小时或72小时。

[0028] 在一些任何此类实施方案中，所述病毒载体颗粒是慢病毒载体颗粒。在一些任何此类实施方案中，所述慢病毒载体颗粒是复制缺陷型的。在一些任何此类实施方案中，所述病毒载体颗粒被病毒包膜糖蛋白假型化。在一些任何此类实施方案中，所述病毒包膜糖蛋白是VSV-G。

[0029] 在一些任何此类实施方案中，将所述病毒载体颗粒在小于或小于约20.0或者小于或小于约10.0的感染复数下孵育。在一些任何此类实施方案中，将所述病毒载体颗粒在从或从约1.0IU/细胞至10IU/细胞或2.0IU/细胞至5.0IU/细胞的感染复数下孵育；或者将所述病毒载体颗粒在至少或至少约1.6IU/细胞、1.8IU/细胞、2.0IU/细胞、2.4IU/细胞、2.8IU/细胞、3.2IU/细胞、3.6IU/细胞、4.0IU/细胞、5.0IU/细胞、6.0IU/细胞、7.0IU/细胞、8.0IU/细胞、9.0IU/细胞或10.0IU/细胞的感染复数下孵育。

[0030] 在一些任何此类实施方案中，所述经刺激的组合物包含至少为或约至少或约$50x10^6$个细胞、$100x10^6$个细胞或$200x10^6$个细胞。在一些任何此类实施方案中，所述经刺激的组合物包含在为或约$50x10^6$个与为或约$300x10^6$个之间的细胞，包含端值。在一些任何此类实施方案中，所述经刺激的组合物包含在为或约$100x10^6$个与为或约$200x10^6$个之间的细胞，包含端值。

[0031] 在一些任何此类实施方案中，所述输入群体包含至少为或约至少或约$50x10^6$个细胞、$100x10^6$个细胞或$200x10^6$个细胞。在一些任何此类实施方案中，所述输入群体包含在为或约$50x10^6$个与为或约$300x10^6$个之间的细胞，包含端值。在一些任何此类实施方案中，所述输入群体包含在为或约$100x10^6$个与为或约$200x10^6$个之间的细胞，包含端值。

[0032] 在一些任何此类实施方案中，与所述病毒颗粒一起孵育的所述T细胞包括至少为或约至少或约$50x10^6$个细胞、$100x10^6$个细胞或$200x10^6$个细胞。在一些任何此类实施方案中，与所述病毒颗粒一起孵育的所述T细胞包括在为或约$50x10^6$个与为或约$300x10^6$个之间的细胞，包含端值。在一些任何此类实施方案中，与所述病毒颗粒一起孵育的所述T细胞包括在为或约$100x10^6$个与为或约$200x10^6$个之间的细胞，包含端值。

[0033] 在一些任何此类实施方案中，所述重组蛋白是抗原受体。在一些任何此类实施方案中，所述抗原受体是转基因T细胞受体(TCR)。在一些任何此类实施方案中，所述抗原受体是嵌合抗原受体(CAR)。在一些任何此类实施方案中，所述CAR包含与靶抗原特异性结合的

细胞外抗原识别结构域和包含ITAM的细胞内信号传导结构域。在一些任何此类实施方案中，所述CAR包含与靶抗原特异性结合的细胞外抗原识别结构域、包含ITAM的细胞内信号传导结构域以及连接所述细胞外结构域和所述细胞内信号传导结构域的跨膜结构域。在一些任何此类实施方案中，所述细胞内信号传导结构域包括CD3-zeta(CD3ζ)链的细胞内结构域。在一些任何此类实施方案中，所述CAR进一步包含连接所述细胞外结构域和所述细胞内信号传导结构域的跨膜结构域。在一些任何此类实施方案中，所述跨膜结构域包含CD28的跨膜部分。在一些任何此类实施方案中，所述细胞内信号传导结构域进一步包括T细胞共刺激分子的细胞内信号传导结构域。在一些任何此类实施方案中，所述T细胞共刺激分子选自CD28和41BB。

[0034] 在一些任何此类实施方案中，所述抗原受体与和疾病或病症相关的抗原特异性结合或者与通用标签特异性结合。在一些任何此类实施方案中，所述疾病或病症是癌症、自身免疫性疾病或障碍或者感染性疾病。

[0035] 在一些任何此类实施方案中，所述经转导的细胞群包含被所述异源多核苷酸转导的T细胞。

[0036] 在一些任何此类实施方案中，所述经转导的细胞群中至少20％、至少25％、至少30％、至少35％、至少40％、至少45％、至少50％、至少55％、至少60％、至少65％、至少70％、至少75％、至少80％或至少85％的T细胞被所述异源多核苷酸转导。在一些任何此类实施方案中，所述经转导的细胞群中至少55％、至少60％、至少65％、至少70％、至少75％、至少80％或至少85％的T细胞被所述异源多核苷酸转导。在一些任何此类实施方案中，至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％的被所述异源多核苷酸转导的T细胞呈CCR7+。

[0037] 在一些任何此类实施方案中，所述方法进一步包括从所述经转导的细胞群中回收或分离通过所述方法产生的经转导的T细胞。

[0038] 在一些任何此类实施方案中，在多个经转导的细胞群中，在所述经转导的细胞群中被所述异源多核苷酸转导的T细胞的百分比变化30％或更少、25％或更少、20％或更少、15％或更少或者10％或更少。

[0039] 在一些任何此类实施方案中，所述方法是在体外或离体进行。

[0040] 本文还提供了一种组合物，所述组合物包含通过本文提供的任一个实施方案的方法产生的经转导的细胞群。在一些任何此类实施方案中，所述组合物进一步包含冷冻保存剂。

附图说明

[0041] 图1描绘了示出来自载体滴定实验的结果的图，所述载体滴定实验展示了六名供体之间T细胞的最大可转导频率的变化。

[0042] 图2A和图2B描绘了来自如下研究的结果，所述研究评估了来自从三名健康供体获得的样品的T细胞子集之间的转导频率。在图2A和图2B中的每一个中，左上图示出了激活和转导之前的T细胞组合物(输入或经选择的组合物或群体)，右上图示出了这些T细胞子集中的所得转导频率，并且下图示出了每个群体代表的经转导的T细胞的比例。

[0043] 图3A和图3B描绘了来自更大规模的研究的结果，所述研究评估了来自从六名健康

供体获得的样品的T细胞子集之间的转导频率。在图3A和图3B中的每一个中，左上图示出了激活和转导之前的T细胞组合物(输入或经选择的组合物或群体)，右上图示出了这些T细胞子集中的所得转导频率，并且下图示出了每个群体代表的经转导的T细胞的比例。

[0044] 图4描绘了来自如下研究的结果，所述研究通过流式细胞术评估了从患有复发性/难治性大B细胞淋巴瘤的患者获得的样品中呈CCR7+相比于CCR7-的经选择的CD4和CD8 T细胞亚群的频率(n＝145)。如图4所示的箱指示四分位距，而线指示整体范围。

具体实施方式

[0045] 提供了通过在进行转导之前或与其结合选择或以其他方式获得富含CCR7表面表达的原代T细胞群来提高原代T细胞的转导频率的方法。

[0046] 通常，基于逆转录病毒的载体(如慢病毒载体)可以用于将目的基因稳定整合到细胞中。在原代细胞中，T细胞特别难以被基于逆转录病毒的载体转导。在一些情况下，通过首先用刺激剂(例如，抗CD3/抗CD28)激活细胞来提高转导效率。已显示激活在一些情况下增加LDL受体表达，从而增强慢病毒载体的摄取。通常，在转导之前将T细胞激活至少一天(有时长达3天或更长时间)以用于在过继T细胞疗法中使用。例如，T细胞的慢病毒转导方案通常需要在转导前至少24小时激活(Amirache等人(2014)Blood,123:1422-1424)。在一些情形中，可用于制备用于过继免疫疗法的基因工程化T细胞的程序可能需要选择、激活、转导和扩增的依次离体步骤。

[0047] 在一些情况下，目前的转导方法并不完全令人满意，特别是与过继细胞疗法结合。例如，如本文所示，来自不同受试者的细胞群之间的转导频率可以是高度可变的，并且这种效应与供体相关。转导频率的可变性同样可能导致治疗性细胞组合物给药的可变性，如由于可能需要在不同受试者之间给药以达到对异源基因(例如，重组受体，如嵌合抗原受体)呈阳性的细胞的阈值数量的总细胞数量高度可变，或者由于当给药策略基于总细胞的阈值数量时对异源基因呈阳性的细胞的频率的可变性。另外，转导频率的可变性也可能影响药物产品的制备和制造过程(例如，收获细胞的时间)，诸如如果转导频率是用于在方法的一个或多个步骤期间监测工程化过程成功的标准的话。

[0048] 本文的观察结果证明，有某些T细胞亚群比其他T细胞亚群更可转导。由于不同受试者之间此类亚群的可变性，这可以解释转导频率的可变性导致一些细胞群中的转导频率降低以及来自不同受试者的多个细胞群之间的转导频率不一致。具体而言，所提供的方法基于如下观察结果，即CCR7表达在来自不同受试者的细胞群中高度可变，并且CCR7+T细胞展现出比CCR7-T细胞更高的转导频率。因此，所提供的方法是有利的，因为它们通过包括如下步骤提高了细胞群的转导频率，同时降低了来自不同患者的细胞群之间转导频率的可变性，借以所述步骤选择对CCR7的表面表达呈阳性的原代T细胞，或以其他方式获得富含CCR7+T细胞的原代T细胞，用于在转导中使用。

[0049] 所提供的方法包括转导针对对CCR7呈阳性的细胞进行富集和/或选择的细胞的输入群体(在下文中也称为输入组合物)。在一些实施方案中，所提供的方法涉及从如例如章节I-A中所述的原代T细胞群中选择对CCR7的表面表达呈阳性的原代T细胞，即富含CCR7+原代T细胞的输入群体。在一些实施方案中，在转导群体中的细胞的条件下将富含CCR7+原代T细胞的输入群体与含有异源基因(编码异源或重组蛋白)的病毒载体颗粒一起孵育。在一些

情况下,首先将富含CCR7+原代T细胞的输入群体在刺激条件下刺激,如通过在能够激活TCR复合物的一种或多种组分的一个或多个细胞内信号传导结构域和/或一种或多种共刺激分子的一个或多个细胞内信号传导结构域的刺激试剂(例如,抗CD3/抗CD28)的存在下进行孵育,然后在转导群体中的细胞的条件下与病毒载体颗粒一起孵育。

[0050] 在一些实施方案中,所提供的方法涉及从先前在如本文例如在章节I-B中所述的刺激条件下孵育的细胞组合物中选择对CCR7的表面表达呈阳性的原代T细胞,从而产生富含CCR7+原代T细胞的经刺激的群体,随后对其进行转导。

[0051] 因此,本文提供了用于提高原代T细胞的转导频率的方法,所述方法包括:(a)从包含原代T细胞群的生物样品中选择对CCR7的表面表达呈阳性的原代T细胞,从而产生富含CCR7+原代T细胞的输入群体;(b)在刺激条件下孵育输入群体,从而产生经刺激的组合物,其中所述刺激条件包括刺激试剂的存在,所述刺激试剂能够激活TCR复合物的一种或多种组分的一个或多个细胞内信号传导结构域和/或一种或多种共刺激分子的一个或多个细胞内信号传导结构域;以及(c)将包含编码重组蛋白的异源多核苷酸的病毒载体颗粒与经刺激的组合物的T细胞一起孵育,从而产生经转导的细胞群。

[0052] 本文还提供了用于提高原代T细胞的转导频率的方法,所述方法包括:(a)在刺激条件下孵育富含CCR7+T细胞的原代T细胞的输入群体,从而产生经刺激的组合物,其中所述刺激条件包括刺激试剂的存在,所述刺激试剂能够激活TCR复合物的一种或多种组分的一个或多个细胞内信号传导结构域和/或一种或多种共刺激分子的一个或多个细胞内信号传导结构域;以及(b)将包含编码重组蛋白的异源多核苷酸的病毒载体颗粒与经刺激的组合物的T细胞一起孵育,从而产生经转导的细胞群。

[0053] 本申请中提及的所有出版物(包括专利文献、科学文章和数据库)出于所有目的通过引用以其整体并入,在程度上如同每个单独的出版物通过引用单独并入。如果本文所述的定义与通过引用并入本文的专利、申请、公开的申请和其他出版物中所述的定义相反或在其他方面不一致,则本文所述的定义优先于通过引用并入本文的定义。

[0054] 本文使用的章节标题仅用于组织目的,而不应解释为限制所描述的主题。

I.T细胞转导方法

[0055] 本文提供了提高细胞(例如,原代T细胞)的转导频率的方法,所述方法包括从细胞组合物中选择对CCR7的表面表达呈阳性的细胞(例如,原代T细胞),以及将经选择的细胞与逆转录病毒载体颗粒(例如,慢病毒载体颗粒)一起孵育或使经选择的细胞与逆转录病毒载体颗粒(例如,慢病毒载体颗粒)接触。在一些实施方案中,所述方法进一步包括在如本文例如在章节I-B中所述的刺激条件下孵育原代T细胞。在一些实施方案中,在选择对CCR7的表面表达呈阳性的细胞之后,在刺激条件下孵育原代T细胞。在一些实施方案中,在选择对CCR7的表面表达呈阳性的细胞之前,在刺激条件下孵育原代T细胞。在一些方面,细胞组合物是从受试者(例如,生物样品)获得的原代细胞的组合物,其中,在一些情况下,细胞的亚群或子集已经被选择和/或富集。提供了组合物的特征。

[0056] 本文还提供了用于提高原代T细胞的转导频率的方法,所述方法包括:(a)从包含原代T细胞群的生物样品中选择对CCR7的表面表达呈阳性的原代T细胞,从而产生富含CCR7+原代T细胞的输入群体;(b)在刺激条件下孵育输入群体,从而产生经刺激的组合物;以及(c)将包含编码重组蛋白的异源多核苷酸的病毒载体颗粒与经刺激的组合物的T细胞一起

孵育,从而产生经转导的细胞群。在一些实施方案中,所述刺激条件包括刺激试剂的存在,所述刺激试剂能够激活TCR复合物的一种或多种组分的一个或多个细胞内信号传导结构域和/或一种或多种共刺激分子的一个或多个细胞内信号传导结构域。

[0057] 本文还提供了用于提高原代T细胞的转导频率的方法,所述方法包括将包含编码重组蛋白的异源多核苷酸的病毒载体颗粒与富含CCR7+原代T细胞的输入细胞群的T细胞一起孵育,从而产生经转导的细胞群。在一些实施方案中,在孵育之前,已经在刺激条件下孵育输入细胞群的细胞。

[0058] 本文还提供了用于提高原代T细胞的转导频率的方法,所述方法包括:(a)在刺激条件下孵育富含CCR7+T细胞的原代T细胞的输入群体,从而产生经刺激的组合物;以及(b)将包含编码重组蛋白的异源多核苷酸的病毒载体颗粒与经刺激的组合物的T细胞一起孵育,从而产生经转导的细胞群。在一些实施方案中,所述刺激条件包括刺激试剂的存在,所述刺激试剂能够激活TCR复合物的一种或多种组分的一个或多个细胞内信号传导结构域和/或一种或多种共刺激分子的一个或多个细胞内信号传导结构域。

[0059] 在一些任何所提供的实施方案中,在刺激条件下孵育导致或引起激活或刺激细胞群中的细胞,和/或能够激活或刺激细胞群中的细胞(例如,CD4+T细胞)中的信号,如从TCR和/或共受体产生的信号。

[0060] 在一些实施方案中,细胞包括根据例如如章节I-D中所述的所提供的方法经由基因工程化引入的一种或多种核酸(例如,多核苷酸),从而表达此类核酸(例如,多核苷酸)的重组或基因工程化产物。在一些实施方案中,核酸(例如,多核苷酸)是异源的,即通常不存在于细胞或从细胞获得的样品中,如从另一种生物或细胞获得的核酸,例如,所述核酸通常不在被工程化的细胞和/或衍生出这种细胞的生物中发现。在一些实施方案中,核酸(例如,多核苷酸)不是天然存在的,如自然界中未发现的核酸,包括包含编码来自多种不同细胞类型的各种结构域的核酸的嵌合组合的核酸。

[0061] 所述方法的处理步骤可包括多个细胞处理步骤中单独的或组合的任何一个或多个步骤。在特定实施方案中,处理步骤包括用含有逆转录病毒载体的病毒载体颗粒转导细胞,如编码用于在细胞中表达的重组产物的载体。所述方法可以进一步和/或可替代地包括其他处理步骤,如细胞的分离、分开、选择、洗涤、悬浮、稀释、浓缩和/或配制的步骤。在一些情况下,所述方法还可以包括离体培育步骤(例如,刺激细胞以例如诱导其增殖和/或激活)。在其他情况下,刺激或激活细胞的步骤是在将细胞施用至受试者后在体内进行,通过抗原识别进行和/或在施用一种或多种药剂以加强或扩大细胞在受试者体内的扩增、激活和/或增殖后进行。在一些实施方案中,所述方法包括从受试者分离细胞、制备、加工、培养和/或将它们工程化,并在冷冻保存之前或之后将它们重新引入同一受试者中。

[0062] 在一些实施方案中,所述方法包括按如下顺序进行的处理步骤,其中:首先从生物样品中分离(如选择或分开)原代细胞;将经选择的细胞与病毒载体颗粒一起孵育以供转导;以及将经转导的细胞配制于组合物中。在一些情况下,离体激活、扩增或增殖经转导的细胞,如通过在刺激试剂(例如,抗CD3/抗CD28)和/或一种或多种重组T细胞刺激性细胞因子(如IL-2、IL-7和/或IL-25)的存在下进行刺激。在一些实施方案中,激活或刺激步骤可以在原代细胞经历一个或多个选择步骤(例如,选择对CCR7的表面表达呈阳性的细胞)之前或之后发生。在一些实施方案中,所述方法可以包括来自洗涤、悬浮、稀释和/或浓缩细胞中的

一个或多个处理步骤,其可以在分离(如分开或选择)、转导、刺激和/或配制步骤之前、期间或同时或之后进行。

[0063] 在一些实施方案中,一个或多个或所有处理步骤(例如,隔离、选择和/或富集、处理、与转导和工程化结合的孵育)和配制步骤是使用集成或自含式系统中的系统、装置或设备进行和/或以自动化或可编程方式进行。在一些方面,系统或设备包括与系统或设备通信的计算机和/或计算机程序,其允许用户对加工、分离、工程化和配制步骤的各个方面进行编程、控制、评估其结局和/或调整。在一个例子中,系统是如国际专利申请公开号WO 2009/072003或US 20110003380 A1中所述的系统。在一个例子中,系统是如国际公开号WO 2016/073602中所述的系统。

[0064] 在一些实施方案中,与结合所提供的转导方法的制备、处理和/或孵育细胞结合的一个或多个细胞处理步骤可以在离心室的内部腔室中进行,所述离心室如基本上刚性的室,其通常为圆柱形并且可围绕旋转轴旋转,这与其他可用的方法相比可以提供某些优点。在一些实施方案中,所有处理步骤都在同一个离心室中进行。在一些实施方案中,一个或多个处理步骤在不同的离心室(如相同类型的多个离心室)中进行。此类方法包括如国际公开号WO 2016/073602中所述的那些中的任一种。

[0065] 示例性离心室包括由Biosafe SA生产和销售的那些,包括用于Sepax®和Sepax®2系统的那些,包括A-200/F和A-200离心室以及用于此类系统的各种试剂盒。示例性室、系统以及处理仪器和机柜描述于例如以下文献中:美国专利号6,123,655、美国专利号6,733,433和公开的美国专利申请公开号US 2008/0171951,以及公开的国际专利申请公开号WO 00/38762,将其各自的内容通过引用以其整体并入本文。根据具体的工艺(例如,稀释、洗涤、转导、配制),技术人员可熟练选择适合于所述工艺的特定试剂盒。用于此类系统的示例性试剂盒包括但不限于由BioSafe SA以产品名CS-430.1、CS-490.1、CS-600.1或CS-900.2销售的一次性试剂盒。使用离心室进行转导的示例性方法描述于国际专利公开号WO 2016/073602中。

[0066] 在一些实施方案中,系统与其他仪器一起被包括和/或被放置与其他仪器联合,所述其他仪器包括用于操作、自动化、控制和/或监控系统中进行的各个处理步骤的各个方面的仪器。在一些实施方案中,这种仪器容纳于机柜中。在一些实施方案中,仪器包括机柜,所述机柜包括外壳,所述外壳含有控制电路、离心机、罩、电机、泵、传感器、显示器和用户界面。示例性装置描述于美国专利号6,123,655、美国专利号6,733,433和US2008/0171951中。

[0067] 在一些实施方案中,系统包含一系列容器,例如袋、管路、旋塞、夹子、连接器和离心室。在一些实施方案中,容器(如袋)包括一个或多个容器(如袋),其在同一容器或单独容器(如同一袋或单独袋)中含有待转导的细胞和病毒载体颗粒。在一些实施方案中,系统进一步包括一个或多个容器(如袋),所述容器含有介质,如稀释剂和/或洗涤溶液,在所述方法期间将所述介质抽入室和/或其他部件中以稀释、重悬和/或洗涤组分和/或组合物。容器可以连接在系统中的一个或多个位置,如连接在对应于输入管线、稀释剂管线、洗涤管线、废液管线和/或输出管线的位置。

[0068] 在一些实施方案中,系统(如封闭系统)是无菌的。在一些实施方案中,使系统部件的所有连接(如管路管线与容器通过连接器的连接)都处于无菌条件下。在一些实施方案中,使连接处于层流下。在一些实施方案中,在管路与容器之间使用产生无菌连接的无菌连

接装置(如无菌焊接)进行连接。在一些实施方案中,无菌连接装置在足够高以维持无菌的热学条件下,如在至少200℃、如至少260℃或300℃的温度下实现连接。

[0069] 在一些实施方案中,系统可以是一次性的,如单用式试剂盒。在一些实施方案中,单用式试剂盒可以用于一个或多个过程的多个循环中,如至少2、3、4、5或更多次,例如在以连续或半连续方式进行的过程中。在一些实施方案中,系统(如单用式试剂盒)用于处理来自单一患者的细胞。

[0070] 离心室通常可围绕旋转轴旋转,并且腔室通常与室同轴。在一些实施方案中,离心室进一步包括可移动构件(如活塞),其通常能够在室内移动(例如,轴向移动),以改变腔室的体积。因此,在特定实施方案中,内部腔室以室的侧壁和端壁以及可移动构件为边界,并且具有可通过移动可移动构件来调节的可变容积。可移动构件可由刚性、基本上或大体上刚性、柔性材料或其组合制成。

[0071] 室通常还包括一个或多个开口,如一个或多个入口、一个或多个出口和/或一个或多个入口/出口,其可以允许将液体和/或气体摄入腔室中或从腔室压出。在一些情况下,开口可以是入口/出口,其中发生液体和/或气体的摄入和压出。在一些情况下,所述一个或多个入口可以与所述一个或多个出口分开或不同。一个或多个开口可以位于一个端壁中。在一些实施方案中,通过移动可移动构件来增加和/或减小腔室的容积,以将液体和/或气体摄入腔室中和/或从腔室压出。在其他实施方案中,可以通过管路管线或其他通道将液体和/或气体摄入腔室中和/或从腔室压出,所述管路管线或其他通道与开口连接或被放置与开口连接,例如,通过放置管线或通道连接或控制泵、注射器或其他可以自动化方式控制的机构。

[0072] 在一些实施方案中,室是封闭系统(如无菌系统)的一部分,所述室具有多种另外的部件,如管路管线和连接器和盖,在所述室内进行处理步骤。因此,在一些实施方案中,所提供的方法和/或其步骤是在完全封闭或半封闭的环境中进行,如封闭或半封闭的无菌系统,从而促进用于治疗性施用至受试者的细胞的产生,无需单独的无菌环境,如生物安全柜或房间。在一些实施方案中,所述方法以自动化或部分自动化方式进行。

[0073] 在一些实施方案中,室与离心机相关联,离心机能够实现室的旋转,如围绕其旋转轴旋转。在一个或多个处理步骤中,旋转可发生在孵育之前、期间和/或之后。因此,在一些实施方案中,各个处理步骤中的一个或多个在旋转下(例如,在特定的力下)进行。室通常能够竖直或大致竖直地旋转,使得室在离心期间竖直放置,并且侧壁和轴是竖直或大致竖直的,且一个或多个端壁是水平或大致水平的。

[0074] 在所述方法的各方面,所述过程不需要在同一封闭系统中(如在同一离心室中)进行,而是可以在不同的封闭系统下(如在不同的离心室中)进行;在一些实施方案中,此类不同的离心室位于方法中的各个点处,所述点被放置与同一系统相关联,如被放置与同一离心机相关联。在一些实施方案中,所有处理步骤都是在封闭系统中进行,其中每一个或多个处理步骤的全部或一部分在相同或不同的离心室中进行。

A.样品和细胞制剂

[0075] 细胞通常是真核细胞,如哺乳动物细胞,并且通常是人细胞。在一些实施方案中,细胞源自血液、骨髓、淋巴或淋巴器官,是免疫系统的细胞,如先天或适应性免疫的细胞,例如骨髓或淋巴细胞,包括淋巴细胞,通常为T细胞和/或NK细胞。其他示例性细胞包括干细

胞，如多潜能干细胞和多能干细胞，包括诱导多能干细胞(iPSC)。在一些实施方案中，细胞源自生物样品。在一些实施方案中，生物样品是血液样品。在一些实施方案中，生物样品是白细胞单采术样品。在一些实施方案中，细胞是T细胞。

[0076] 细胞通常是原代细胞，如直接从受试者分离和/或从受试者分离并冷冻的那些。在一些实施方案中，细胞包括T细胞或其他细胞类型的一个或多个子集，如整个T细胞群、CD4+细胞、CD8+细胞及其亚群，如由以下项所定义的那些：功能、激活状态、成熟度、分化的可能性、扩增、再循环、定位和/或持久能力、抗原特异性、抗原受体类型、在特定器官或区室中的存在、标记或细胞因子分泌特征和/或分化程度。关于待治疗的受试者，细胞可以是同种异体的和/或自体的。所述方法包括现成的方法。在一些方面，如对于现有技术，细胞是多能的和/或多潜能的，如干细胞，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、制备、加工、培养和/或将它们工程化，并在冷冻保存之前或之后将它们重新引入同一受试者中。

[0077] T细胞和/或CD4+和/或CD8+T细胞的亚型和亚群包括幼稚T(T_N)细胞、效应T细胞(T_{EFF})、记忆T细胞及其亚型(如干细胞记忆T(T_{SCM})、中枢记忆T(T_{CM})、效应记忆T(T_{EM})或终末分化效应记忆T细胞)、肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)、未成熟T细胞、成熟T细胞、辅助T细胞、细胞毒性T细胞、粘膜相关恒定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)、α/βT细胞和δ/γT细胞。

[0078] 在一些实施方案中，细胞是自然杀伤(NK)细胞。在一些实施方案中，细胞是单核细胞或粒细胞，例如骨髓细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞和/或嗜碱性粒细胞。

[0079] 在一些实施方案中，细胞源自细胞系，例如T细胞系。在一些实施方案中，细胞获得自异种来源，例如获得自小鼠、大鼠、非人灵长类动物和猪。

[0080] 在一些实施方案中，细胞可以分离自样品，如生物样品，例如从受试者获得或源自受试者的样品。在一些实施方案中，分离出细胞的受试者是患有疾病或病症或需要细胞疗法或将对其施用细胞疗法的受试者。在一些实施方案中，受试者是需要特定治疗性干预(如过继细胞疗法，其中细胞被分离、加工和/或工程化)的人。

[0081] 因此，在一些实施方案中，细胞是原代细胞，例如原代人细胞。样品包括直接取自受试者的组织、流体和其他样品、以及来源于一个或多个加工步骤(如分离、离心、基因工程化(例如，用病毒载体转导)、洗涤和/或孵育)的样品。生物样品可以是直接从生物来源获得的样品或经过加工的样品。生物样品包括但不限于体液(如血液、血浆、血清、脑脊液、滑液、尿液和汗液)、组织和器官样品，包括由其衍生的加工样品。

[0082] 在一些方面，衍生或分离出细胞的样品是血液或血液衍生的样品，或者是或源自单采术或白细胞单采术产物。示例性样品包括全血、外周血单核细胞(PBMC)、白细胞、骨髓、胸腺、组织活检、肿瘤、白血病、淋巴瘤、淋巴结、肠相关淋巴组织、粘膜相关淋巴组织、脾、其他淋巴组织、肝、肺、胃、肠、结肠、肾、胰腺、乳房、骨、前列腺、子宫颈、睾丸、卵巢、扁桃体或其他器官和/或由其衍生的细胞。在细胞疗法(例如，过继细胞疗法)的背景下，样品包括来自自体和同种异体来源的样品。

[0083] 在一些例子中，例如通过单采术或白细胞单采术获得来自受试者的循环血液的细

胞。在一些方面，样品含有淋巴细胞(包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞)、其他有核白细胞、红细胞和/或血小板，并且在一些方面含有除红细胞和血小板之外的细胞。

[0084] 在一些实施方案中，洗涤从受试者收集的血细胞以例如去除血浆级分，并将细胞置于适当缓冲液或介质中以用于后续的处理步骤。在一些实施方案中，用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤细胞。在一些实施方案中，洗涤溶液缺乏钙和/或镁和/或许多或所有二价阳离子。在一些方面，根据制造商的说明书，通过半自动“流通式”离心机(例如，Cobe 2991细胞处理器，Baxter)完成洗涤步骤。在一些方面中，根据制造商的说明书，通过切向流过滤(TFF)完成洗涤步骤。在一些实施方案中，洗涤后将细胞重悬于多种生物相容性缓冲液(例如，像不含Ca^{++}/Mg^{++}的PBS)中。在某些实施方案中，去除血细胞样品的组分，并且将细胞直接重悬于培养基中。

[0085] 在一些实施方案中，在富集和/或选择细胞之前，使样品与血清或血浆(如人血清或血浆)接触和/或所述样品含有所述血清或血浆。在一些实施方案中，血清或血浆对于从其获得细胞的受试者是自体的。在一些实施方案中，血清或血浆在样品中按如下浓度存在：至少或至少约10％(v/v)、至少或至少约15％(v/v)、至少或至少约20％(v/v)、至少或至少约25％(v/v)、至少或至少约30％(v/v)、至少或至少约35％(v/v)或者至少或至少约40％(v/v)。在一些实施方案中，在细胞的选择和/或转导之前，使含有原代细胞的样品与抗凝血剂接触或者所述样品含有抗凝血剂。在一些实施方案中，抗凝血剂是或含有游离柠檬酸根离子，例如，抗凝血剂柠檬酸盐右旋糖溶液，溶液A(ACD-A)。

[0086] 在一些实施方案中，输入组合物不含和/或基本上不含血清。在特定实施方案中，在无血清培养基中孵育和/或接触输入组合物。在一些实施方案中，无血清培养基是定义的和/或明确定义的细胞培养基。在某些实施方案中，无血清培养基是受控培养基，其已经过处理，例如被过滤以去除抑制剂和/或生长因子。在一些实施方案中，无血清培养基含有蛋白质。在某些实施方案中，无血清培养基可含有血清白蛋白、水解产物、生长因子、激素、载体蛋白和/或附着因子。在一些实施方案中，无血清培养基含有蛋白质，例如白蛋白，如牛血清白蛋白、人血清白蛋白和/或重组白蛋白。在一些实施方案中，无血清培养基含有基础培养基，例如DMEM或RPMI 1640，其含有氨基酸、维生素、无机盐、缓冲剂、抗氧化剂和能量来源。在一些实施方案中，无血清培养基补充有如但不限于白蛋白、化学上定义的脂质、生长因子、胰岛素、细胞因子和/或抗氧化剂。在一些实施方案中，配制无血清培养基以支持某种细胞类型(如免疫细胞、T细胞和/或CD4+和CD8+T细胞)的细胞的生长、增殖、健康、稳态。

[0087] 在一些实施方案中，在选择和/或富集细胞之前，在进一步处理步骤之前，可以静息或保持样品或样品中的细胞。在一些实施方案中，将样品维持在或保持在从或从约2℃至8℃的温度下长达48小时，如长达12小时、24小时或36小时。

[0088] 在一些实施方案中，制备方法在分离、选择和/或富集和/或刺激和/或激活和/或孵育以用于转导和工程化之前或之后包括冷冻(例如，冷冻保存)细胞的步骤。在一些实施方案中，冷冻和后续解冻步骤去除细胞群中的粒细胞，并且在一定程度上去除单核细胞。在一些实施方案中，例如在洗涤步骤后将细胞悬浮在冷冻溶液中以去除血浆和血小板。在一些方面中，可以使用多种已知的冷冻溶液和参数中的任何一种。一个例子包括使用含有20％DMSO和8％人血清白蛋白(HSA)的PBS，或其他合适的细胞冷冻培养基。然后用培养基将其1:1稀释，使得DMSO和HSA的最终浓度分别为10％和4％。然后通常将细胞以1°/分钟的速

率冷冻至-80℃并储存在液氮储罐的气相中。

[0089] 在一些实施方案中，细胞的分离包括一个或多个制备和/或基于非亲和力的细胞分离步骤。在一些例子中，将细胞在存在一种或多种试剂的情况下洗涤、离心和/或孵育，例如以去除不需要的组分、针对所需组分进行富集、裂解或去除对特定试剂敏感的细胞。在一些例子中，基于一种或多种特性(如密度、粘附特性、尺寸、对特定组分的敏感性和/或抗性)分离细胞。

[0090] 在一些实施方案中，所述方法包括基于密度的细胞分离方法，如通过裂解红细胞并通过Percoll或Ficoll梯度离心而从外周血制备白细胞。

[0091] 在一些实施方案中，分离方法包括基于一种或多种特定分子(如表面标记(例如，表面蛋白)、细胞内标记或核酸)在细胞中的表达或存在来分离不同的细胞类型。在一些实施方案中，可以使用任何已知的基于此类标记的用于分离的方法。在一些实施方案中，分开是基于亲和力或基于免疫亲和力的分开。例如，在一些方面，分离包括基于细胞的一种或多种标记(通常为细胞表面标记)的表达或表达水平来分离细胞和细胞群，例如通过和与此类标记特异性结合的抗体或结合配偶体一起孵育，然后通常是洗涤步骤和从那些未与所述抗体或结合配偶体结合的细胞中分离已结合所述抗体或结合配偶体的细胞。

[0092] 此类分离步骤可以基于阳性选择(其中保留已经结合试剂的细胞以供进一步使用)和/或阴性选择(其中保留未与抗体或结合配偶体结合的细胞)。在一些例子中，保留两种级分以供进一步使用。在一些方面，在没有可用于特异性鉴定异质群体中的细胞类型的抗体的情况下，阴性选择可能特别有用，使得最好基于由除所需群体之外的细胞表达的标记进行分离。

[0093] 分离无需导致特定细胞群或表达特定标记的细胞的100％富集或去除。例如，针对特定类型的细胞(如表达标记的那些)的阳性选择或富集是指增加此类细胞的数量或百分比，但不需要导致不表达该标记的细胞的完全不存在。同样地，特定类型的细胞(如表达标记的那些)的阴性选择、去除或耗尽是指减少此类细胞的数量或百分比，但不需要导致所有此类细胞的完全去除。

[0094] 在一些例子中，进行多轮分离步骤，其中来自一个步骤的阳性或阴性选择的级分经受另一个分离步骤，如随后的阳性或阴性选择。在一些例子中，单个分离步骤可以同时耗尽表达多种标记的细胞，如通过将细胞与多种抗体或结合配偶体(每种抗体或结合配偶体对被靶向用于阴性选择的标记具特异性)一起孵育。同样地，通过将细胞与在各种细胞类型上表达的多种抗体或结合配偶体一起孵育，可以同时阳性选择多种细胞类型。

[0095] 例如，在一些方面，通过阳性或阴性选择技术来分离T细胞的特定亚群，如对一种或多种表面标记呈阳性或表达高水平的所述表面标记的细胞，例如$CD4^+$、$CD8^+$、CD3+、CD28+和/或CCR7+T细胞。

[0096] 例如，可以使用抗CD3/抗CD28缀合的磁珠(例如，DYNABEADS®M-450CD3/CD28 T Cell Expander)阳性选择$CD3^+$、$CD28^+$T细胞。

[0097] 在一些实施方案中，T细胞(例如，原代T细胞群)是未经分级的T细胞，是经富集或分离的CD3+T细胞，是经富集或分离的CD4+T细胞，或者是经富集或分离的CD8+T细胞。

[0098] 在一些实施方案中，通过经由阳性选择富集特定细胞群，或经由阴性选择耗尽特定细胞群来进行分离。在一些实施方案中，通过将细胞与一种或多种抗体或其他结合剂一

起孵育来完成阳性或阴性选择，所述一种或多种抗体或其他结合剂与分别在阳性或阴性选择的细胞上表达或以相对较高水平(标记^{高})(标记$^{+}$)的一种或多种表面标记特异性结合。

[0099] 在一些实施方案中，通过阴性选择在非T细胞(如B细胞、单核细胞或其他白细胞，如CD14)上表达的标记，将T细胞与PBMC样品分离。在一些方面，$CD4^+$或$CD8^+$选择步骤用于分离$CD4^+$辅助T细胞和$CD8^+$细胞毒性T细胞。通过对在一种或多种幼稚、记忆和/或效应T细胞亚群上表达或以相对较高程度表达的标记的阳性或阴性选择，可以将此类$CD4^+$和$CD8^+$群体进一步分类成亚群。

[0100] 在一些实施方案中，如通过基于与相应亚群相关的表面抗原进行阳性或阴性选择，将$CD8^+$细胞针对幼稚、中枢记忆、效应子记忆和/或中枢记忆干细胞进一步富集或耗尽。在一些实施方案中，针对中枢记忆T(T_{CM})细胞进行富集以增加功效，如以改善施用后的长期存活、扩增和/或植入，这在一些方面在此类亚群中特别稳健。参见Terakura等人(2012)Blood.1:72-82;Wang等人(2012)J Immunother.35(9):689-701。在一些实施方案中，组合富含T_{CM}的$CD8^+$T细胞与$CD4^+$T细胞进一步增强功效。

[0101] 在一些实施方案中，幼稚T(T_N)或中枢记忆T(T_{CM})细胞的富集基于CCR7、CD4、CD8和CD3中的一种或多种的阳性或高表面表达。在一些方面这种选择是同时进行的，而在其他方面以任何顺序依序进行。在一些方面，用于制备$CD8^+$细胞群或亚群的相同的基于CD4表达的选择步骤也用于生成$CD4^+$细胞群或亚群，使得来自基于CD4的分离的阳性和阴性级分两者被保留并用于所述方法的后续步骤中，任选地在一个或多个其他阳性或阴性选择步骤之后。

[0102] 在一个特定例子中，使PBMC样品或其他白细胞样品经受$CD4^+$细胞、或CD8+细胞、或CD3+细胞、或CD4+和CD8+细胞的选择，其中保留了阴性和阳性级分两者。

[0103] 在一个例子中，为了通过阴性选择富集$CD4^+$细胞，单克隆抗体混合剂通常包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。在一些实施方案中，抗体或结合配偶体结合至固体支持物或基质(如磁珠或顺磁珠)，以允许细胞分离以用于阳性和/或阴性选择。例如，在一些实施方案中，使用免疫磁性(或亲和磁性)分离技术来分开或分离细胞和细胞群(综述于以下文献中:Methods in Molecular Medicine,第58卷:Metastasis Research Protocols,第2卷:Cell Behavior In Vitro and In Vivo,第17-25页S.A.Brooks和U.Schumacher编辑©Humana Press Inc.,Totowa,NJ)。

[0104] 在一些实施方案中，组合物(例如，输入群体)包含至少80％、至少85％、至少90％或至少95％的作为CD4+T细胞或CD8+T细胞的细胞。在一些实施方案中，组合物(例如，输入群体)包含至少80％、至少85％、至少90％或至少95％的作为CD4+T细胞的细胞。在一些实施方案中，组合物(例如，输入群体)包含至少80％、至少85％、至少90％或至少95％的作为CD8+T细胞的细胞。在一些实施方案中，组合物(例如，输入群体)包含至少80％、至少85％、至少90％或至少95％的作为CD4+T细胞和CD8+T细胞的细胞。在一些实施方案中，CD4+T细胞与CD8+T细胞的比率为或为约1:1、1:2、2:1、1:3或3:1。在一些实施方案中，组合物(例如，输入群体)包含至少80％、至少85％、至少90％或至少95％的作为CD3+T细胞的细胞。

[0105] 在一些实施方案中，所述方法包括使用富含CCR7+T细胞的原代T细胞的细胞群，如富含CCR7+原代T细胞的输入群体。

在一些实施方案中，从生物样品中选择或获得富含对CCR7的表面表达呈阳性的细

胞的群体。在一些实施方案中，选择步骤包括从包含原代T细胞群的生物样品中选择对CCR7的表面表达呈阳性的原代T细胞，从而产生富含CCR7+原代T细胞的细胞群。在一些方面，富含CCR7+原代T细胞的细胞群被称为“富含CCR7+原代T细胞的输入群体”。在一些实施方案中，选择是通过从生物样品中选择或分离对CCR7呈阳性的细胞的阳性选择。在一些实施方案中，选择是通过从生物样品中去除或耗尽对CCR7呈阴性的细胞的阴性选择。选择可以在将细胞在如本文例如在章节I-B中所述的刺激条件下孵育之前或之后发生。

[0106] 在某些实施方案中，例如特定蛋白质的阴性表达(如CCR7的阴性表达或CCR7-)是等于或低于背景表达水平的表达，例如如使用标准技术(如涉及用对蛋白质不具有特异性的对照抗体(例如，同种型抗体)进行抗体染色的技术)所检测。在某些实施方案中，阴性表达等于或低于背景表达水平，如通过用于评估蛋白质或基因表达的合适技术所检测，所述技术如但不限于基于免疫组织化学、免疫荧光或流式细胞术的技术。在一些实施方案中，例如特定蛋白质的阳性表达(如CCR7的阳性表达或CCR7+)是或包括高于背景的量、水平或浓度下的蛋白质的表面表达，例如如使用标准技术(如涉及用对蛋白质不具有特异性的对照抗体(例如，同种型抗体)进行抗体染色的技术)所检测。在某些实施方案中，阳性表达大于背景表达水平，如通过用于评估蛋白质或基因表达的合适技术所检测，所述技术如但不限于基于免疫组织化学、免疫荧光或流式细胞术的技术。在特定实施方案中，样品、组合物或群体中对蛋白质表达(例如，表面表达)呈阴性或阳性的细胞的量、频率或百分比是通过流式细胞术来确定。

[0107] 在某些实施方案中，在从生物样品中选择、分离或富集CCR7+T细胞之前，从生物样品中选择、分离或富集T细胞(例如，CD3+)或T细胞子集(例如，CD4+或CD8+T细胞)。在一些实施方案中，从经富集的CCR7+T细胞群中选择、分离或富集T细胞(例如，CD3+)或T细胞子集(例如，CD4+或CD8+T细胞)。在特定实施方案中，选择、分离或富集T细胞(例如，CD3+)或T细胞子集(例如，CD4+或CD8+T细胞)涉及从样品中阳性选择对CD3、CD4或CD8呈阳性的细胞。

[0108] 在特定实施方案中，(1)从生物样品中富集、选择或分离CD4+T细胞，从而产生经富集的CD4+T细胞群和富含CD4-细胞的未经选择的群体；(2)从经富集的CD4-细胞的未经选择的群体中富集、选择或分离CD8+T细胞，从而产生经富集的CD8+T细胞群；并且(3)从经富集的CD4+和CD8+T细胞群中选择或分离CCR7+T细胞，从而产生经富集的CCR7+CD4+和CCR7+CD8+T细胞群。在特定实施方案中，(1)从生物样品中富集、选择或分离CD8+T细胞，从而产生经富集的CD8+T细胞群和富含CD8-细胞的未经选择的群体；(2)从经富集的CD4-细胞的未经选择的群体中富集、选择或分离CD4+T细胞，从而产生经富集的CD4+T细胞群；并且(3)从经富集的CD4+和CD8+T细胞群中选择或分离CCR7+T细胞，从而产生经富集的CCR7+CD4+和CCR7+CD8+T细胞群。

[0109] 在特定实施方案中，从生物样品中富集、选择或分离CD4+T细胞，从而产生CD4+T细胞的经富集的群体，然后从CD4+T细胞的经富集的群体中选择或分离CCR7+细胞，从而产生经富集的CCR7+CD4+T细胞群。在特定实施方案中，从生物样品中富集、选择或分离CD8+T细胞，从而产生CD8+T细胞的经富集的群体，然后从CD8+T细胞的经富集的群体中鉴定或选择CCR7+细胞，从而产生经富集的CD57-CD8+T细胞群。

[0110] 在特定实施方案中，从生物样品中富集、选择或分离CD3+T细胞，从而产生CD3+T细胞的经富集的群体，然后从CD3+T细胞的经富集的群体中鉴定或选择CCR7+细胞，从而产生

经富集的CCR7+CD8+T细胞群。

[0111] 在一些实施方案中，富含CCR7+原代T细胞的输入群体的至少40％、至少45％、至少50％、至少55％、至少60％、至少65％、至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％是CCR7+原代T细胞。在一些实施方案中，富含CCR7+原代T细胞的输入群体的至少60％、至少65％、至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％是CCR7+原代T细胞。在一些实施方案中，富含CCR7+原代T细胞的输入群体的至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％是CCR7+原代T细胞。在一些实施方案中，富含CCR7+原代T细胞的输入群体的至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％是CCR7+原代T细胞。在一些实施方案中，富含CCR7+原代T细胞的输入群体的至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％是CCR7+原代T细胞。

[0112] 在一些实施方案中，选择步骤不包括选择呈(a)CCR7+且CD45RO+；或(b)CCR7+且CD27+；或(c)CCR7+且CD45RA-；或(d)CCR7+且CD62L+；或(e)CCR7+且CD45RA+；或(f)CCR7+且CD62L-的细胞。

[0113] 在一些实施方案中，输入群体不富含呈(a)CCR7+且CD45RO+；或(b)CCR7+且CD27+；或(c)CCR7+且CD45RA-；或(d)CCR7+且CD62L+；或(e)CCR7+且CD45RA+；或(f)CCR7+且CD62L-的T细胞。在一些实施方案中，输入群体的少于50％、少于55％、少于60％、少于65％、少于70％、少于75％、少于80％、少于85％或少于90％是(a)CCR7+且CD45RO+；或(b)CCR7+且CD27+；或(c)CCR7+且CD45RA-；或(d)CCR7+且CD62L+；或(e)CCR7+且CD45RA+；或(f)CCR7+且CD62L-的T细胞。在一些实施方案中，输入群体不富含CCR7+且CD45RO+的T细胞，任选地其中输入群体的少于85％的总细胞是CCR7+且CD45RO+的T细胞。在一些实施方案中，输入群体不富含CCR7+且CD27+的T细胞，任选地其中输入群体的少于85％的总细胞是CCR7+且CD27+的T细胞。在一些实施方案中，输入群体不富含CCR7+且CD45RA-的T细胞，任选地其中输入群体的少于85％的总细胞是CCR7+且CD45RA-的T细胞。在一些实施方案中，输入群体不富含CCR7+且CD62L+的T细胞，任选地其中输入群体的少于85％的总细胞是CCR7+且CD62L+的T细胞。在一些实施方案中，输入群体不富含CCR7+且CD45RA+的T细胞，任选地其中输入群体的少于85％的总细胞是CCR7+且CD45RA+的T细胞。在一些实施方案中，输入群体不富含CCR7+且CD62L-的T细胞，任选地其中输入群体的少于85％的总细胞是CCR7+且CD62L-的T细胞。

[0114] 在一些方面，将待分离的细胞的样品或组合物与小的可磁化或磁响应材料(如磁响应颗粒或微粒，如顺磁珠(例如，如Dynabeads®或MACS®珠))一起孵育。磁响应材料(例如，颗粒)通常直接或间接地附着于结合配偶体(例如，抗体)，所述结合配偶体与希望分离(例如，希望阴性地或阳性地选择)的一个细胞、多个细胞或细胞群上存在的分子(例如，表面标记)特异性结合。

[0115] 在一些实施方案中，磁性颗粒或珠包含与特异性结合成员(如抗体或其他结合配偶体)结合的磁响应材料。有许多在磁分离方法中使用的熟知的磁响应材料。合适的磁性颗粒包括在Molday，美国专利号4,452,773和欧洲专利说明书EP 452342B中所述的那些，将所

述专利通过引用特此并入。胶体大小的颗粒(如在Owen美国专利号4,795,698;和Liberti等人的美国专利号5,200,084中所述的那些)是其他的例子。

[0116] 孵育通常在这样的条件下进行,由此抗体或结合配偶体或者与附着于磁性颗粒或珠的此类抗体或结合配偶体特异性结合的分子(如二抗或其他试剂)与细胞表面分子(如果存在于样品内的细胞上的话)特异性结合。

[0117] 在一些方面,将样品置于磁场中,并且具有附着于其上的磁响应或可磁化颗粒的那些细胞将被吸引到磁体并与未标记的细胞分离。对于阳性选择,保留被磁铁吸引的细胞;对于阴性选择,保留未被吸引的细胞(未标记的细胞)。在一些方面,在同一选择步骤期间进行阳性和阴性选择的组合,其中保留阳性和阴性级分并进一步处理或经受另外的分离步骤。

[0118] 在某些实施方案中,磁响应颗粒被包被在一抗或其他结合配偶体、二抗、凝集素、酶或链霉亲和素中。在某些实施方案中,磁性颗粒通过对一种或多种标记具特异性的一抗的包被而附着于细胞。在某些实施方案中,用一抗或结合配偶体标记细胞而不是珠,然后添加细胞类型特异性二抗或其他结合配偶体(例如,链霉亲和素)包被的磁粒。在某些实施方案中,将链霉亲和素包被的磁性颗粒与生物素化的一抗或二抗结合使用。

[0119] 在一些实施方案中,磁响应颗粒保持附着于细胞,所述细胞随后被孵育,培养和/或工程化;在一些方面,颗粒保持附着于细胞以用于施用于患者。在一些实施方案中,从细胞中去除可磁化或磁响应颗粒。从细胞中去除可磁化颗粒的方法是已知的,并且包括例如使用竞争性非标记抗体和与可切割接头缀合的可磁化颗粒或抗体。在一些实施方案中,可磁化颗粒是可生物降解的。

[0120] 在一些实施方案中,基于亲和力的选择是经由磁激活细胞分选(MACS)(Miltenyi Biotech,加利福尼亚州奥本)进行的。磁激活细胞分选(MACS)系统能够高纯度选择附着有磁化颗粒的细胞。在某些实施方案中,MACS以这样的模式操作,其中在施加外部磁场之后依序洗脱非靶标和靶标种类。也就是说,附着于磁化颗粒的细胞保持在适当的位置,而未附着的种类被洗脱。然后,在完成第一次洗脱步骤之后,以某种方式释放被捕获在磁场中并被阻止洗脱的种类,使得它们可以被洗脱和回收。在某些实施方案中,非靶细胞被标记并从异质细胞群中耗尽。

[0121] 在某些实施方案中,使用这样的系统、装置或设备进行分离或分开,所述系统、装置或设备进行所述方法的分离、细胞制备、分开、加工、孵育、培养和/或制备步骤中的一种或多种。在一些方面,系统用于在封闭或无菌环境中进行这些步骤中的每一个,例如以最小化错误、用户操作和/或污染。在一个例子中,系统是如国际专利申请公开号WO 2009/072003或US 20110003380 A1中所述的系统。在一个例子中,系统是如国际公开号WO 2016/073602中所述的系统。

[0122] 在一些实施方案中,所述方法包括选择细胞,其中全部或部分选择是在离心室的内部腔室中进行,例如在离心旋转下进行。在一些实施方案中,细胞与选择试剂(如基于免疫亲和力的选择试剂)的孵育是在离心室中进行。

[0123] 例如,基于免疫亲和力的选择可取决于所分离细胞与和细胞上的标记特异性结合的分子(例如,固体(例如,颗粒)上的抗体或其他结合配偶体)之间的有利的能量相互作用。在某些用于使用颗粒(如珠)的基于亲和力的分离的可用方法中,将颗粒和细胞在容器(如

管或袋)中孵育,同时振荡或混合,且细胞密度与颗粒(例如,珠)的比率是恒定的,以帮助促进能量上有利的相互作用。此类途径对于用于大规模生产可能不是理想的,例如,因为其可能需要使用大体积以维持最佳或所需的细胞与颗粒的比率,同时维持所需的细胞数量。因此,此类途径可能需要以分批模式或形式进行处理,这可能需要增加时间、步骤数和操作,从而增加成本和用户错误的风险。

[0124] 在一些实施方案中,通过在离心室的腔室中实施此类选择步骤或其部分(例如,与抗体涂覆的颗粒(例如,磁珠)一起孵育),用户能够控制某些参数,如各种溶液的体积、在处理期间溶液的添加及其定时,与其他可用方法相比,这可以提供多种优势。例如,在孵育期间减少腔室中液体体积的能力可以增加选择中使用的颗粒(例如,珠试剂)的浓度,从而增加溶液的化学势,而不影响腔室中的细胞总数。这又可以增强正在处理的细胞与用于选择的颗粒之间的成对相互作用。在一些实施方案中,例如,在与如本文所述的系统、电路和控制相关联时,在室中进行孵育步骤,允许用户在孵育期间的一个或多个所需时间实现对溶液的搅动,这也可以改善相互作用。

[0125] 在一些实施方案中,选择步骤的至少一部分是在离心室中进行,其包括将细胞与选择试剂一起孵育。在此类过程的一些方面,将一定体积的细胞与一定量的基于亲和力的所需选择试剂混合,所述量远少于根据制造商的说明书在管或容器中进行类似选择以用于选择相同数量的细胞和/或相同体积的细胞时通常采用的量。在一些实施方案中,所采用的一种或多种选择试剂的量为根据制造商的说明书针对相同数量的细胞和/或相同体积的细胞在基于管或容器的孵育中用于选择细胞的相同的一种或多种选择试剂的量的不超过5%、不超过10%、不超过15%、不超过20%、不超过25%、不超过50%、不超过60%、不超过70%或不超过80%。

[0126] 例如作为可以在室的腔室中进行的选择方法的部分的与一种或多种选择试剂一起孵育包括使用一种或多种选择试剂,基于一种或多种特定分子(如表面标记(例如,表面蛋白)、细胞内标记或核酸)在细胞中或细胞上的表达或存在,选择一种或多种不同的细胞类型。在一些实施方案中,可以使用任何已知的利用一种或多种选择试剂基于此类标记进行分离的方法。在一些实施方案中,一种或多种选择试剂导致分离,所述分离是基于亲和力或免疫亲和力的分离。例如,在一些方面,选择包括与一种或多种试剂一起孵育,用于基于一种或多种标记(通常是细胞表面标记)的细胞表达或表达水平来分离细胞和细胞群,例如通过与和此类标记特异性结合的抗体或结合配偶体一起孵育,之后通常进行洗涤步骤并分离已结合抗体或结合配偶体的细胞与未结合至抗体或结合配偶体的那些细胞。

[0127] 在一些实施方案中,对于细胞的选择,例如基于免疫亲和力的选择,将细胞在室的腔室中在组合物中孵育,所述组合物还含有具有选择试剂的选择缓冲液,所述选择试剂如与希望富集和/或耗尽的细胞上(而不是组合物中其他细胞上)的表面标记特异性结合的分子,如抗体,其任选地偶联到支架(如聚合物或表面,例如珠,例如磁珠,如与对CD4和CD8具有特异性的单克隆抗体偶联的磁珠)。在一些实施方案中,如所描述的,将选择试剂添加至室的腔室中的细胞,所添加的量与在振荡或旋转的管中进行选择时对相同数量的细胞或相同体积的细胞实现大致相同或类似的选择效率通常使用或将需要的选择试剂的量相比显著较小(例如,不大于所述量的5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%或80%)。在一些实施方案中,在向细胞和选择试剂添加选择缓冲液的情况下进行孵育,以达到例如10mL

至200mL(如至少或约至少或约或为10mL、20mL、30mL、40mL、50mL、60mL、70mL、80mL、90mL、100mL、150mL或200mL)试剂的孵育的目标体积。在一些实施方案中,将选择缓冲液和选择试剂在添加至细胞之前预先混合。在一些实施方案中,将选择缓冲液和选择试剂分开添加至细胞。在一些实施方案中,选择孵育是在周期性温和混合条件下进行的,这可有助于促进能量上有利的相互作用,从而允许在实现高选择效率的同时使用较少的总选择试剂。

[0128] 在一些实施方案中,与选择试剂一起孵育的总持续时间从或从约5分钟至6小时,如30分钟至3小时,例如至少或约至少30分钟、60分钟、120分钟或180分钟。

[0129] 在一些实施方案中,孵育通常在混合条件下进行,如在旋转的存在下,通常以相对较低的力或速度旋转,如速度低于用于使细胞沉淀的速度,如从或从约600rpm至1700rpm(例如,为或约或至少600rpm、1000rpm或1500rpm或1700rpm),如在样品或室壁或其他容器壁处的一定RCF下,所述RCF从或从约80g至100g(例如,为或约或至少80g、85g、90g、95g或100g)。在一些实施方案中,旋转是使用以这种低速旋转和之后的休息时间段的重复间隔来进行,如旋转和/或休息1、2、3、4、5、6、7、8、9或10秒,如旋转大约1或2秒,然后休息大约5、6、7或8秒。

[0130] 在一些实施方案中,这种过程是在与室为整体的完全封闭的系统内进行的。在一些实施方案中,这个过程(并且在一些方面还有一个或多个另外的步骤,如预先洗涤步骤洗涤含有细胞的样品,如单采术样品)以自动化方式进行,使得将细胞、试剂和其他组分在适当时间吸入和推出室并进行离心,以便使用自动化程序在单一封闭系统中完成洗涤和结合步骤。

[0131] 在一些实施方案中,在孵育和/或混合细胞和一种和/或多种选择试剂后,使经孵育的细胞经受分离,以基于一种或多种特定试剂的存在或不存在来选择细胞。在一些实施方案中,在离心室外部进行进一步选择。在一些实施方案中,在同一封闭系统中进行分离,其中存在离心室并且其中将细胞与选择试剂一起进行孵育。在一些实施方案中,在与选择试剂一起孵育后,将经孵育的细胞(包括其中已经结合选择试剂的细胞)从离心室压出,如从离心室转移到系统中,用于基于免疫亲和力来分离细胞。在一些实施方案中,用于基于免疫亲和力的分离的系统是或含有磁分离柱。在一些实施方案中,在分离之前,可以在室中进行一个或多个其他处理步骤,如洗涤。

[0132] 在一些方面,使用CliniMACS系统(Miltenyi Biotic)进行分离和/或其他步骤,例如用于在封闭和无菌系统中在临床规模水平上进行细胞的自动化分离。部件可以包括集成微计算机、磁分离单元、蠕动泵和各种夹管阀。在一些方面,集成计算机控制仪器的所有部件并指示系统以标准化顺序执行重复程序。在一些方面,磁分离单元包括可移动的永磁体和用于选择柱的支架。蠕动泵控制整个管组的流速,并与夹管阀一起确保缓冲液通过系统的受控流动和细胞的连续悬浮。

[0133] 在一些方面,CliniMACS系统使用抗体偶联的可磁化颗粒,其在无菌,无热原的溶液中提供。在一些实施方案中,在用磁性颗粒标记细胞后,洗涤细胞以去除过量的颗粒。然后将细胞制备袋连接到管组,所述管组又连接到含有缓冲液的袋和细胞收集袋。管组由预装配的无菌管(包括预柱和分离柱)组成,并且仅供一次性使用。在启动分离程序后,系统自动将细胞样品施加到分离柱。标记的细胞保留在柱内,而未标记的细胞通过一系列洗涤步骤去除。在一些实施方案中,用于与本文描述的方法一起使用的细胞群是未标记的并且不

保留在柱中。在一些实施方案中，用于与本文描述的方法一起使用的细胞群被标记并保留在柱中。在一些实施方案中，用于与本文描述的方法一起使用的细胞群在去除磁场后从柱中洗脱，并且收集在细胞收集袋内。

[0134] 在某些实施方案中，使用CliniMACS Prodigy系统(Miltenyi Biotec)进行分离和/或其他步骤。在一些方面，CliniMACS Prodigy系统配备有细胞加工联合体，其允许通过离心自动化洗涤和分级分离细胞。CliniMACS Prodigy系统还可以包括机载相机和图像识别软件，其通过辨别源细胞产物的宏观层来确定最佳的细胞分级分离终点。例如，外周血自动分离成红细胞、白细胞和血浆层。CliniMACS Prodigy系统还可以包括集成细胞培育室，其实现细胞培养方案，例如像细胞分化和扩增、抗原负载和长期细胞培养。输入端口可允许无菌移除和补充培养基，并且可以使用集成显微镜监测细胞。参见例如，Klebanoff等人(2012)J Immunother.35(9):651-660，Terakura等人(2012)Blood.1:72-82，和Wang等人(2012)J Immunother.35(9):689-701。

[0135] 在一些实施方案中，通过流式细胞术收集和富集(或耗尽)本文描述的细胞群，其中针对多种细胞表面标记染色的细胞在流体流中载携。在一些实施方案中，通过制备规模(FACS)分类收集和富集(或耗尽)本文描述的细胞群。在某些实施方案中，通过使用微机电系统(MEMS)芯片结合基于FACS的检测系统来收集和富集(或耗尽)本文所述的细胞群(参见例如，WO 2010/033140；Cho等人(2010)Lab Chip 10,1567-1573；和Godin等人(2008)J Biophoton.1(5):355-376)。在两种情况下，细胞可以用多种标记来标记，允许以高纯度分离明确定义的T细胞子集。

[0136] 在一些实施方案中，用一种或多种可检测标记来标记抗体或结合配偶体，以促进分离供阳性和/或阴性选择。例如，分离可以基于与荧光标记的抗体的结合。在一些例子中，基于对一种或多种细胞表面标记具有特异性的抗体或其他结合配偶体的结合来分离细胞携载于流体流中，如通过荧光激活细胞分选(FACS)(包括制备规模(FACS))和/或微机电系统(MEMS)芯片，例如与流式细胞检测系统组合。此类方法允许基于多种标记同时进行阳性和阴性选择。

[0137] 在一些实施方案中，所提供的逆转录病毒颗粒可以转导经刺激和/或激活的T细胞。在特定实施方案中，所提供的逆转录病毒颗粒可以转导静息T细胞。在一些实施方案中，输入组合物包含多个细胞，如免疫细胞，例如T细胞，所述细胞是非循环的和/或静止的和/或静息的，和/或其中如此转导的群体中大多数细胞(例如，大于50％、60％、70％、80％、80％或更多的细胞)是非循环和/或静止和/或静息的。在一些实施方案中，输入组合物包含T细胞群，其中群体中至少40％、50％、60％、70％、80％、90％或更多的T细胞是静息T细胞，如缺乏T细胞激活标记(如表面标记或细胞内细胞因子或其他标记)的T细胞和/或处于细胞周期的G_0或G_0G_{1a}期的T细胞。在一些实施方案中，细胞处于细胞周期的G_0、G_0/G_{1a}或G1期。

[0138] 在一些实施方案中，在转导之前，在刺激条件下孵育被转导的细胞。在一些实施方案中，至少10％、至少20％、至少30％、至少40％、至少50％或至少60％的被转导的细胞(i)表达选自HLA-DR、CD25、CD69、CD71、CD40L和4-1BB的表面标记；(ii)包括选自IL-2、IFN-γ、TNF-α的细胞因子的细胞内表达；(iii)处于细胞周期的G1期或较后期；和/或(iv)能够增殖。

B.激活和刺激

[0139] 在一些实施方案中，将所提供的方法与在刺激条件下孵育细胞结合使用。在一些实施方案中，刺激条件包括激活或刺激和/或能够激活或刺激细胞(例如，CD4+T细胞)中的信号(如从TCR和/或共受体产生的信号)的条件。在一些实施方案中，刺激条件包括用刺激试剂(例如，激活或刺激和/或能够激活或刺激细胞中的信号的试剂)和/或在所述刺激试剂的存在下培养、培育、孵育、激活、繁殖细胞的一个或多个步骤。在一些实施方案中，刺激试剂刺激和/或激活TCR和/或共受体。在特定实施方案中，刺激试剂是本文提供的试剂，例如，如在章节I-B-1中所述。

[0140] 在某些实施方案中，在诸如通过本文提供的方法或技术(例如，在章节I-C和I-D中所述的方法或技术)基因工程化细胞(例如，转染和/或转导细胞)之前在刺激条件下孵育一种或多种经富集的T细胞的组合物。在特定实施方案中，在刺激条件下孵育的经富集的T细胞的组合物是输入组合物。在某些实施方案中，输入组合物的细胞先前已从生物样品中分离、选择、富集或获得。在特定实施方案中，来自输入组合物的细胞先前已经被冷冻并储存，并在孵育之前解冻。

[0141] 在一些实施方案中，将所提供的方法与一个或多个处理步骤结合使用，所述一个或多个处理步骤包括刺激细胞(如来自输入组合物的细胞)的步骤。在某些实施方案中，孵育可以是在基因工程化之前或与其结合，所述基因工程化如由本文所述的转导的实施方案(例如，章节I-D中所述的方法)引起的基因工程化。在一些实施方案中，刺激导致细胞的激活和/或增殖，例如在工程化(例如，转导)之前。

[0142] 在一些实施方案中，处理步骤包括细胞(如输入细胞和/或输入组合物的细胞)的孵育，其中孵育步骤可以包括细胞的培养、培育、刺激、激活和/或繁殖。在一些实施方案中，在存在刺激条件或刺激剂的情况下孵育组合物或细胞。此类条件包括设计为诱导群体中细胞的增殖、扩增、激活和/或存活，模拟抗原暴露和/或引发细胞用于基因工程化(如用于引入重组抗原受体)的那些。

[0143] 在某些实施方案中，例如在刺激条件下(如在刺激试剂的存在下)，以小于或小于约$5x10^7$个细胞/mL、$4x10^7$个细胞/mL、$3x10^7$个细胞/mL、$2x10^7$个细胞/mL、$1x10^7$个细胞/mL、$9x10^6$个细胞/mL、$8x10^6$个细胞/mL、$7x10^6$个细胞/mL、$6x10^6$个细胞/mL、$5x10^6$个细胞/mL、$4x10^6$个细胞/mL或$3x10^6$个细胞/mL的密度孵育细胞(例如，输入组合物的细胞)。在特定实施方案中，以小于$5x10^6$个细胞/mL的密度孵育细胞。在一些实施方案中，以在$1x10^3$个细胞/mL与$1x10^9$个细胞/mL之间、$1x10^4$个细胞/mL与$1x10^8$个细胞/mL之间、$1x10^5$个细胞/mL与$1x10^7$个细胞/mL之间、$5x10^5$个细胞/mL与$1x10^7$个细胞/mL之间、$1x10^6$个细胞/mL与$5x10^6$个细胞/mL之间或$3x10^6$个细胞/mL与$5x10^6$个细胞/mL之间的密度孵育细胞。在特定实施方案中，以为或约$1x10^6$个细胞/mL、$1.5x10^6$个细胞/mL、$2x10^6$个细胞/mL、$2.5x10^6$个细胞/mL、$3x10^6$个细胞/mL、$3.5x10^6$个细胞/mL、$4x10^6$个细胞/mL、$4.5x10^6$个细胞/mL或$5x10^6$个细胞/mL的密度孵育细胞。在特定实施方案中，以为或约$3x10^6$个细胞/mL的密度孵育细胞。在一些实施方案中，细胞是活细胞。在某些实施方案中，细胞对凋亡标记(例如，膜联蛋白V或活性半胱天冬酶3)呈阴性。在特定实施方案中，细胞是或包括CD4+T细胞和CD8+T细胞。

[0144] 在特定实施方案中，活力的指标包括但不限于细胞复制、线粒体功能、能量平衡、膜完整性和细胞死亡率的指标。在某些实施方案中，活力的指标进一步包括氧化应激、代谢激活、代谢稳定性、酶诱导、酶抑制以及与细胞膜转运蛋白的相互作用的指标。在一些实施

方案中，活细胞包括经历正常功能性细胞过程的细胞和/或未经历坏死或程序性细胞死亡或不处于经历坏死或程序性细胞死亡的过程下的细胞。在一些实施方案中，可以通过细胞的氧化还原电位、细胞膜的完整性或线粒体的活性或功能来评估活力。在一些实施方案中，活力是在测定中不存在与细胞死亡相关的特定分子，或不存在细胞死亡的指征。在某些实施方案中，可以通过许多常规手段来检测、测量和/或评估细胞的活力。此类活力测定的非限制性例子包括但不限于染料摄取测定(例如，钙黄绿素AM测定)、XTT细胞活力测定和染料排除测定(例如，台盼蓝、伊红或丙啶染料排除测定)。活力测定可用于确定细胞剂量、细胞组合物和/或细胞样品中的活细胞的数量或百分比(例如，频率)。

[0145] 在特定实施方案中，凋亡标记可以包括与凋亡相关的任何已知标记，并且可以包括基因、蛋白质或蛋白质的活性形式的表达或与凋亡(如起泡和/或核破坏)相关的特征的出现。在某些实施方案中，凋亡标记是与凋亡相关的标记，其包括但不限于已知启动凋亡的促凋亡因子、死亡受体途径的成员、线粒体(内在)途径的激活成员、Bcl-2家庭成员(如Bax、Bad、和Bid、Fas、FADD)、核收缩的存在(例如，通过显微镜监测的)、染色体DNA片段化的存在(例如，染色体DNA阶梯的存在)或与凋亡测定(例如，TUNEL染色和膜联蛋白V染色)相关的标记。在一些实施方案中，凋亡标记是半胱天冬酶的表达，例如，半胱天冬酶-1、半胱天冬酶-2、半胱天冬酶-3、半胱天冬酶-7、半胱天冬酶-8、半胱天冬酶9、半胱天冬酶10和/或半胱天冬酶-13的活性形式的表达。在一些实施方案中，凋亡标记是膜联蛋白V。在某些实施方案中，凋亡标记是活性半胱天冬酶3。

[0146] 在一些实施方案中，例如在刺激条件下(如在刺激试剂的存在下)孵育在为或约$1x10^5$个与为或约$500,000x10^6$个之间的细胞、在为或约$1x10^6$个与为或约$50,000x10^6$个之间的细胞、在为或约$10x10^6$个与为或约$5,000x10^6$个之间的细胞、在为或约$1x10^6$个与为或约$1,000x10^6$个之间的细胞、在为或约$50x10^6$个与为或约$5,000x10^6$个之间的细胞、在为或约$10x10^6$个与为或约$1,000x10^6$个之间的细胞、在为或约$100x10^6$个与为或约$2,500x10^6$个之间的细胞、在为或约$100x10^6$个与为或约$500x10^6$个之间的细胞、在为或约$200x10^6$个与为或约$400x10^6$个之间的细胞(例如，输入组合物的细胞)。在特定实施方案中，例如在刺激条件下孵育至少、为或约$50x10^6$个细胞、$100x10^6$个细胞、$150x10^6$个细胞、$200x10^6$个细胞、$250x10^6$个细胞、$300x10^6$个细胞、$350x10^6$个细胞、$400x10^6$个细胞、$450x10^6$个细胞或$500x10^6$个细胞。在一些实施方案中，细胞是活细胞。在某些实施方案中，细胞对凋亡标记(例如，膜联蛋白V或活性半胱天冬酶3)呈阴性。在特定实施方案中，细胞是或包括CD4+T细胞和CD8+T细胞。

[0147] 在一些实施方案中，例如在刺激条件下(如在刺激试剂的存在下)孵育在为或约$1x10^5$个与为或约$25,000x10^6$个之间、在为或约$1x10^6$个与为或约$25,000x10^6$个之间、在为或约$10x10^6$个与为或约$2,500x10^6$个之间、在为或约$1x10^6$个与为或约$500x10^6$个之间、在为或约$50x10^6$个与为或约$2,500x10^6$个之间、在为或约$10x10^6$个与为或约$500x10^6$个之间、在为或约$100x10^6$个与为或约$500x10^6$个之间、在为或约$200x10^6$个与为或约$400x10^6$个之间、在为或约$50x10^6$个与为或约$300x10^6$个之间的CD4+T细胞(例如，输入组合物的CD4+T细胞)。在特定实施方案中，在例如刺激条件下孵育至少、为或约$25x10^6$、$50x10^6$、$75x10^6$、$100x10^6$、$125x10^6$、$150x10^6$、$175x10^6$、$200x10^6$、$225x10^6$或$250x10^6$个CD4+T细胞。在一些实施方案中，CD4+T细胞是活CD4+T细胞。在某些实施方案中，CD4+T细胞对凋亡标记(例如，膜联蛋白V或活性半胱天冬酶3)呈阴性。

[0148] 在某些实施方案中，例如在刺激条件下(如在刺激试剂的存在下)孵育在为或约$1x10^5$个与为或约$25,000x10^6$个之间、在为或约$1x10^6$个与为或约$25,000x10^6$个之间、在为或约$10x10^6$个与为或约$2,500x10^6$个之间、在为或约$1x10^6$个与为或约$500x10^6$个之间、在为或约$50x10^6$个与为或约$2,500x10^6$个之间、在为或约$10x10^6$个与为或约$500x10^6$个之间、在为或约$100x10^6$个与为或约$500x10^6$个之间、在为或约$200x10^6$个与为或约$400x10^6$个之间、在为或约$50x10^6$个与为或约$300x10^6$个之间的CD8+T细胞(例如，输入组合物的CD8+T细胞)。在一些实施方案中，例如在刺激条件下孵育至少、为或约$25x10^6$、$50x10^6$、$75x10^6$、$100x10^6$、$125x10^6$、$150x10^6$、$175x10^6$、$200x10^6$、$225x10^6$或$250x10^6$个CD8+T细胞。在一些实施方案中，CD8+T细胞是活CD8+T细胞。在某些实施方案中，CD8+T细胞对凋亡标记(例如，膜联蛋白V或活性半胱天冬酶3)呈阴性。

[0149] 在一些实施方案中，用于刺激和/或激活的条件可以包括以下中的一种或多种：特定介质、温度、氧含量、二氧化碳含量、时间、药剂(例如，营养素、氨基酸、抗生素、离子和/或刺激因子(如细胞因子、趋化因子、抗原、结合配偶体、融合蛋白、重组可溶性受体和任何其他被设计用于激活细胞的药剂))。

[0150] 在一些实施方案中，刺激试剂包括一级药剂，其可以是本文所述的任何刺激试剂。在一些实施方案中，刺激试剂包括一级药剂和二级药剂。在一些实施方案中，二级药剂可以是本文所述的任何刺激试剂。在一些实施方案中，一级药剂与TCR复合物的成员特异性结合，任选地与CD3特异性结合。在一些实施方案中，二级药剂与T细胞共刺激分子特异性结合，任选地其中共刺激分子选自CD28、CD137(4-1-BB)、OX40或ICOS。

[0151] 在一些实施方案中，刺激条件或刺激试剂包括能够与TCR复合物的成员结合(例如，特异性结合)的一种或多种试剂(例如，配体)。在一些实施方案中，TCR复合物的成员是CD3。在一些实施方案中，刺激条件或刺激试剂包括能够刺激或激活TCR复合物的细胞内信号传导结构域的一种或多种试剂(例如，配体)。在一些方面，药剂开启或启动T细胞中的TCR/CD3细胞内信号传导级联，如适于递送初级信号以例如启动ITAM诱导的信号(如对TCR组分(例如，抗CD3)具有特异性的那些)的激活的药剂，和/或促进共刺激信号(如对T细胞共刺激受体具有特异性的共刺激信号)的药剂，例如抗CD28或抗4-1BB(例如，其结合至固体支持物(如珠))和/或一种或多种细胞因子。在一些实施方案中，与T细胞共刺激分子特异性结合的药剂是与CD28、CD137(4-1BB)、OX40或ICOS特异性结合的药剂。刺激试剂包括抗CD3/抗CD28珠(例如，DYNABEADS®M-450CD3/CD28 T细胞扩增剂和/或ExpACT®珠)。任选地，扩增方法可以进一步包括向培养基中添加抗CD3和/或抗CD28抗体的步骤。在一些实施方案中，刺激剂包括细胞因子。

[0152] 在特定实施方案中，刺激条件包括将细胞与刺激试剂一起孵育、培养和/或培育。在特定实施方案中，刺激试剂是本文提供的试剂，例如，如在章节I-B-1中所述的试剂。在某些实施方案中，刺激试剂含有或包括珠。在某些实施方案中，当使细胞与刺激试剂接触和/或将细胞与刺激试剂一起孵育时，在刺激条件下起始和或开始孵育、培养和/或培育细胞。在特定实施方案中，在基因工程化细胞(例如，如通过转染或转导将重组多核苷酸引入细胞中)之前、期间和/或之后，孵育细胞。

[0153] 在一些实施方案中，以为或为约3:1、2.5:1、2:1、1.5:1、1.25:1、1.2:1、1.1:1、1:1、0.9:1、0.8:1、0.75:1、0.67:1、0.5:1、0.3:1或0.2:1的刺激试剂和/或珠与细胞的比率孵

育经富集的T细胞的组合物。在特定实施方案中，刺激试剂和/或珠与细胞的比率在2.5:1与0.2:1之间、在2:1与0.5:1之间、在1.5:1与0.75:1之间、在1.25:1与0.8:1之间或在1.1:1与0.9:1之间。在特定实施方案中，刺激试剂与细胞的比率为约1:1或为1:1。

[0154] 在特定实施方案中，刺激条件包括在使用一种或多种细胞因子的情况下和/或在一种或多种细胞因子的存在下孵育、培养和/或培育细胞(例如，来自输入组合物的细胞)。在特定实施方案中，所述一种或多种细胞因子是重组细胞因子。在一些实施方案中，所述一种或多种细胞因子是人重组细胞因子。在某些实施方案中，所述一种或多种细胞因子结合和/或能够结合由T细胞表达的和/或对T细胞而言内源的受体。在特定实施方案中，所述一种或多种细胞因子是或包括细胞因子的4-α-螺旋束家族的成员。在一些实施方案中，细胞因子的4-α-螺旋束家族的成员包括但不限于白介素2(IL-2)、白介素4(IL-4)、白介素7(IL-7)、白介素9(IL-9)、白介素12(IL-12)、白介素15(IL-15)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)。在一些实施方案中，所述一种或多种细胞因子是或包括IL-15。在特定实施方案中，所述一种或多种细胞因子是或包括IL-7。在特定实施方案中，所述一种或多种细胞因子是或包括IL-2。

[0155] 在某些实施方案中，所述一种或多种细胞因子的量或浓度是用国际单位(IU)测量和/或定量的。国际单位可以用于定量维生素、激素、细胞因子、疫苗、血液制品和类似的生物活性物质。在一些实施方案中，IU是或包括通过与具有特定重量和强度的国际参考标准(例如，针对IL-2的WHO第一国际标准(WHO 1st International Standard for Human IL-2)，86/504)相比的生物制剂效力的度量单位。国际单位是报告生物活性单位的唯一公认且标准化的方法，所述生物活性单位公开和源自国际合作研究工作。在特定实施方案中，可以通过与类似的WHO标准产品的产品比较测试获得细胞因子的组合物、样品或来源的IU。例如，在一些实施方案中，将人重组IL-2、IL-7或IL-15的组合物、样品或来源的IU/mg分别与WHO标准IL-2产品(NIBSC代码:86/500)、WHO标准IL-17产品(NIBSC代码:90/530)和WHO标准IL-15产品(NIBSC代码:95/554)进行比较。

[0156] 在一些实施方案中，以IU/mg计的生物活性等同于(ED_{50}，以ng/mL计)$^{-1}$x10^6。在特定实施方案中，重组人IL-2或IL-15的ED_{50}等同于使用CTLL-2细胞的细胞增殖的半最大刺激(XTT切割)所需的浓度。在某些实施方案中，重组人IL-7的ED_{50}等同于PHA激活的人外周血淋巴细胞增殖的半最大刺激所需的浓度。与IL-2的IU的测定和计算相关的细节论述于Wadhwa等人，Journal of Immunological Methods(2013)，379(1-2):1-7；以及Gearing和Thorpe，Journal of Immunological Methods(1988)，114(1-2):3-9中；与IL-15的IU的测定和计算相关的细节论述于Soman等人Journal of Immunological Methods(2009)348(1-2):83-94中。

[0157] 在一些实施方案中，将细胞(例如，输入细胞)与细胞因子例如重组人细胞因子以在为或约1IU/mL与为或约1,000IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约50IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约250IU/mL与为或约500IU/mL之间或在为或约500IU/mL与为或约1,000IU/mL之间的浓度一起孵育。

[0158] 在一些实施方案中，将细胞(例如，输入细胞)与IL-2(例如，人重组IL-2)以在为或约1IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约250IU/mL之间、在为或约

50IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约150IU/mL之间、在为或约75IU/mL与为或约125IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约200IU/mL之间或在为或约10IU/mL与为或约100IU/mL之间的浓度例如在无血清培养基中一起孵育。在特定实施方案中，将细胞(例如，输入组合物的细胞)与重组IL-2以为或约50IU/mL、60IU/mL、70IU/mL、80IU/mL、90IU/mL、100IU/mL、110IU/mL、120IU/mL、130IU/mL、140IU/mL、150IU/mL、160IU/mL、170IU/mL、180IU/mL、190IU/mL或100IU/mL的浓度一起孵育。在一些实施方案中，在例如为或约100IU/mL的重组IL-2(例如，人重组IL-2)的存在下孵育细胞(例如，输入细胞)。

[0159] 在一些实施方案中，将细胞(例如，输入细胞)与重组IL-7(例如，人重组IL-7)以在为或约100IU/mL与为或约2,000IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约1,000IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约750IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约1,000IU/mL之间或在为或约550IU/mL与为或约650IU/mL之间的浓度例如在无血清培养基中一起孵育。在特定实施方案中，将细胞(例如，输入细胞)与IL-7以为或约50IU/mL、100IU/mL、150IU/mL、200IU/mL、250IU/mL、300IU/mL、350IU/mL、400IU/mL、450IU/mL、500IU/mL、550IU/mL、600IU/mL、650IU/mL、700IU/mL、750IU/mL、800IU/mL、750IU/mL、750IU/mL、750IU/mL或1,000IU/mL的浓度一起孵育。在特定实施方案中，在为或约600IU/mL的IL-7(例如，人重组IL-7)的存在下孵育细胞(例如，输入细胞)。

[0160] 在一些实施方案中，将细胞(例如，输入细胞)与重组IL-15(例如，人重组IL-15)以在为或约1IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约250IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约150IU/mL之间、在为或约75IU/mL与为或约125IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约200IU/mL之间或在为或约10IU/mL与为或约100IU/mL之间的浓度例如在无血清培养基中一起孵育。在特定实施方案中，将细胞(例如，输入组合物的细胞)与重组IL-15以为或约50IU/mL、60IU/mL、70IU/mL、80IU/mL、90IU/mL、100IU/mL、110IU/mL、120IU/mL、130IU/mL、140IU/mL、150IU/mL、160IU/mL、170IU/mL、180IU/mL、190IU/mL或200IU/mL的浓度一起孵育。在一些实施方案中，在例如为或约100IU/mL的重组IL-15(例如，人重组IL-15)的存在下孵育细胞(例如，输入细胞)。

[0161] 在特定实施方案中，在刺激条件下在IL-2、IL-7和/或IL-15的存在下例如在无血清培养基中孵育细胞(例如，来自输入组合物的细胞)。在一些实施方案中，IL-2、IL-7和/或IL-15是重组的。在某些实施方案中，IL-2、IL-7和/或IL-15是人的。在特定实施方案中，所述一种或多种细胞因子是或包括人重组IL-2、IL-7和/或IL-15。在某些实施方案中，在重组IL-2、IL-7和IL-15的存在下在刺激条件下例如在无血清培养基中孵育细胞。

[0162] 条件可以包括以下中的一种或多种：特定培养基、温度、氧含量、二氧化碳含量、时间、药剂(例如，营养素、氨基酸、抗生素、离子和/或刺激因子(如细胞因子、趋化因子、抗原、结合配偶体、融合蛋白、重组可溶性受体和旨在激活细胞的任何其他药剂))。

[0163] 在一些方面，孵育是根据多种技术来进行，所述技术如以下文献中所述的那些：Riddell等人的美国专利号6,040,1 77;Klebanoff等人(2012)J Immunother.35(9):651-660,Terakura等人(2012)Blood.1:72-82,和/或Wang等人(2012)J Immunother.35(9):689-701。

[0164] 在一些实施方案中，在无血清培养基中进行孵育。在一些实施方案中，无血清培养基是定义的和/或明确定义的细胞培养基。在某些实施方案中，无血清培养基是受控培养

基,其已经过处理,例如被过滤以去除抑制剂和/或生长因子。在一些实施方案中,无血清培养基含有蛋白质。在某些实施方案中,无血清培养基可含有血清白蛋白、水解产物、生长因子、激素、载体蛋白和/或附着因子。

[0165] 在一些实施方案中,在一种或多种刺激条件或刺激试剂的存在下的孵育的至少一部分在离心室的内部腔室中例如在离心旋转下进行,如在国际公开号WO 2016/073602中所述。在一些实施方案中,在离心室中进行的孵育的至少一部分包括与一种或多种试剂混合以诱导刺激和/或激活。在一些实施方案中,将细胞(如经选择的细胞)与刺激条件或刺激剂在离心室中混合。在此类过程的一些方面,将一定体积的细胞与一定量的一种或多种刺激条件或刺激剂混合,所述刺激条件或刺激剂远小于在细胞培养板或其他系统中进行类似刺激时通常使用的刺激条件或刺激剂。

[0166] 在一些实施方案中,将刺激剂添加至室的腔室中的细胞,所添加的量与例如在周期性振荡或旋转的管或袋中进行选择而不在离心室中混合时对相同数量的细胞或相同体积的细胞实现大致相同或类似的选择效率通常使用或将需要的刺激剂的量相比显著较小(例如,不大于所述量的5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%或80%)。在一些实施方案中,在向细胞和刺激剂添加孵育缓冲液的情况下进行孵育,以实现例如10mL至200mL(如至少或至少约或约或10mL、20mL、30mL、40mL、50mL、60mL、70mL、80mL、90mL、100mL、150mL或200mL)试剂的孵育的目标体积。在一些实施方案中,在添加细胞之前预先混合孵育缓冲液和刺激剂。在一些实施方案中,将孵育缓冲液和刺激剂分开添加至细胞中。在一些实施方案中,在周期性温和混合条件下进行刺激孵育,这可能有助于促进能量上有利的相互作用,并且从而允许在实现细胞的刺激和激活的同时使用较少的总体刺激剂。

[0167] 在一些实施方案中,孵育通常在混合条件下进行,如在旋转的存在下,通常以相对较低的力或速度旋转,如速度低于用于使细胞沉淀的速度,如从或从约600rpm至或至约1700rpm(例如,为或约或至少600rpm、1000rpm或1500rpm或1700rpm),如在样品或室壁或其他容器壁处的一定RCF下,所述RCF从或从约80g至100g(例如,为或约或至少80g、85g、90g、95g或100g)。在一些实施方案中,旋转是使用以这种低速旋转和之后的休息时间段的重复间隔来进行,如旋转和/或休息1、2、3、4、5、6、7、8、9或10秒,如旋转大约1或2秒,然后休息大约5、6、7或8秒。

[0168] 在一些实施方案中,在刺激条件下(例如,与刺激试剂一起)的孵育的总持续时间在或在约1小时与96小时之间、1小时与72小时之间、1小时与48小时之间、4小时与36小时之间、8小时与30小时之间、12小时与24小时之间、18小时与30小时之间,如至少或至少约6小时、12小时、18小时、24小时、36小时或72小时。在一些实施方案中,例如与刺激试剂一起孵育的总持续时间在或在约18小时与约30小时之间。

[0169] 在一些实施方案中,在将多核苷酸(例如,编码重组受体的多核苷酸)引入细胞(例如,通过转导和/或转染,如由章节I-C所述)中的步骤之前和/或期间,在刺激条件下培养、培育和/或孵育细胞。在某些实施方案中,在基因工程化之前将细胞在刺激条件下培养、培育和/或孵育如下时间量:在30分钟与2小时之间、在1小时与8小时之间、在6小时与12小时之间、在12小时与18小时之间、在16小时与24小时之间、在18小时与30小时之间、在24小时与48小时之间、在24小时与72小时之间、在42小时与54小时之间、在60小时与120小时之间、在96小时与120小时之间、在90小时和在1天与7天之间、在3天与8天之间、在1天与3天之间、

在4天与6天之间或在4天与5天之间。在一些实施方案中，将细胞在刺激条件下孵育为或约在18小时与30小时之间。在特定实施方案中，将细胞在刺激条件下孵育为或约24小时。

[0170] 在一些实施方案中，在刺激条件下孵育细胞包括将细胞与在章节I-B-1中所述的刺激试剂一起孵育。在一些实施方案中，刺激试剂含有或包括珠，如顺磁珠，并且将细胞与刺激试剂以小于3:1(珠:细胞)的比率，如1:1的比率一起孵育。在特定实施方案中，在一种或多种细胞因子的存在下将细胞与刺激试剂一起孵育。在一些实施方案中，在重组IL-2、IL-7和IL-15的存在下，将细胞与刺激试剂以1:1(珠:细胞)的比率孵育。

[0171] 在特定实施方案中，将含有CD4+和CD8+T细胞的细胞的输入组合物在刺激条件下孵育。在某些实施方案中，在无血清培养基中孵育细胞。在特定实施方案中，输入组合物含有为或约1:1的比率的CD4+T细胞与CD8+T细胞。在一些实施方案中，输入组合物含有为或约1:1、1:2、2:1、1:3或3:1的比率的CD4+T细胞与CD8+T细胞。在某些实施方案中，在刺激条件下如以小于或小于约$5x10^6$个细胞/mL的密度孵育至少或至少约$100x10^6$个细胞(例如，来自输入组合物的细胞)。在特定实施方案中，在刺激条件下孵育至少或至少约$50x10^6$个CD4+T细胞和至少或至少约$50x10^6$个CD8+T细胞。在一些实施方案中，将细胞孵育在18小时与30小时之间。在特定实施方案中，在刺激条件下孵育细胞包括在IL-2、IL-7和/或IL-15的存在下将细胞与刺激试剂一起孵育。在某些实施方案中，以小于3:1的刺激试剂与细胞的比率将细胞与刺激试剂一起孵育。在一些实施方案中，将细胞与在为或约50IU/mL与为或约200IU/mL之间的IL-2、在为或约400与为或约1,000IU/mL之间的IL-7和/或在为或约50IU/mL与为或约200IU/mL之间的IL-15一起孵育。

[0172] 在某些实施方案中，在刺激条件下孵育输入组合物的在$100x10^6$个与$500x10^6$个之间的细胞，所述输入组合物含有为或约1:1的比率的CD4+和CD8+T细胞。在某些实施方案中，在刺激条件下孵育输入组合物的在$200x10^6$个与$400x10^6$个之间的细胞，所述输入组合物含有为或约1:1的比率的CD4+和CD8+T细胞。在某些实施方案中，细胞是活细胞和/或对凋亡标记呈阴性。在一些实施方案中，孵育输入组合物的为或约$300x10^6$个细胞。在特定实施方案中，在无血清培养基中孵育细胞。在特定实施方案中，以为或约$3x10^6$个细胞/mL的密度孵育细胞。在一些实施方案中，孵育为或约$150x10^6$个CD4+T细胞和为或约$150x10^6$个CD8+T细胞。在特定实施方案中，以为或约1:1的比率的刺激试剂与细胞将细胞与刺激试剂一起孵育。在某些实施方案中，在为或约100IU/mL IL-2、为或约600IU/mL IL-7和在50IU/mL和/或为或约200IU/mL之间的IL-15的存在下孵育细胞。

1.刺激试剂

[0173] 在一些实施方案中，在刺激条件下孵育经富集的细胞的组合物是或包括使经富集的细胞的组合物与能够激活和/或扩增T细胞的刺激试剂孵育和/或接触。在一些实施方案中，刺激试剂能够刺激和/或激活细胞中的一个或多个信号。在一些实施方案中，所述一个或多个信号由受体介导。在特定实施方案中，所述一个或多个信号是信号转导和/或第二信使(例如，cAMP和/或细胞内钙)的水平或量的变化，一种或多种细胞蛋白的量、细胞定位、构象、磷酸化、泛素化和/或截短的变化，和/或细胞活性(例如，转录、翻译、蛋白降解、细胞形态、激活状态和/或细胞分裂)的变化，或与所述变化相关。在特定实施方案中，刺激条件包括将细胞与刺激试剂一起孵育、培养和/或培育。在某些实施方案中，刺激试剂含有或包括珠。在某些实施方案中，当将细胞与刺激试剂一起孵育或接触时，发生刺激的开始。在特定

实施方案中，刺激试剂含有或包括寡聚试剂，例如链霉亲和素突变蛋白寡聚物。在特定实施方案中，刺激试剂激活和/或能够激活TCR复合物的一种或多种组分的一个或多个细胞内信号传导结构域和/或一种或多种共刺激分子的一个或多个细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中，任何刺激试剂也被称为一级药剂，和/或任何刺激试剂也被称为二级药剂。在一些实施方案中，刺激试剂包括一级药剂，例如与TCR复合物的成员特异性结合的一级药剂。在一些实施方案中，一级药剂与CD3特异性结合。在一些实施方案中，刺激试剂包括二级药剂，例如与T细胞共刺激分子特异性结合的二级药剂。在一些实施方案中，二级药剂与CD28、CD137(4-1-BB)、OX40或ICOS特异性结合。

[0174] 在一些实施方案中，刺激条件或刺激试剂包括能够激活TCR复合物的细胞内信号传导结构域的一种或多种药剂(例如，配体)。在一些实施方案中，如本文设想的药剂可以包括但不限于RNA、DNA、蛋白质(例如，酶)、抗原、多克隆抗体、单克隆抗体、抗体片段、碳水化合物、脂质凝集素或对所需靶标具有亲和力的任何其他生物分子。在一些实施方案中，所需靶标是T细胞受体和/或T细胞受体的组分。在某些实施方案中，所需靶标是CD3。在某些实施方案中，所需靶标是T细胞共刺激分子，例如CD28、CD137(4-1-BB)、OX40或ICOS。所述一种或多种药剂可以通过在本领域中已知和可用的各种方法直接或间接附着于珠。附着可以是共价的、非共价的、静电的或疏水的，并且可以通过各种附着手段(包括例如化学手段、机械手段或酶促手段)来实现。在一些实施方案中，药剂是抗体或其抗原结合片段，如Fab。在一些实施方案中，生物分子(例如，生物素化的抗CD3抗体)可以经由直接附着于珠的另一种生物分子(例如，抗生物素抗体)间接附着于珠。

[0175] 在一些实施方案中，刺激试剂含有与细胞(例如，T细胞)上的一种或多种以下大分子特异性结合的一种或多种药剂(例如，抗体或其抗原结合片段，如Fab)：CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD25、CD27、CD28、CD29、CD31、CD44、CD45RA、CD45RO、CD54(ICAM-1)、CD127、MHCI、MHCII、CTLA-4、ICOS、PD-1、OX40、CD27L(CD70)、4-1BB(CD137)、4-1BBL、CD30L、LIGHT、IL-2R、IL-12R、IL-1R、IL-15R；IFN-γR、TNF-αR、IL-4R、IL-10R、CD18/CD11a(LFA-1)、CD62L(L-选择素)、CD29/CD49d(VLA-4)、Notch配体(例如，Delta样配体1/4、Jagged 1/2等)、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7和CXCR3或其片段，包括这些大分子的对应配体或其片段。在一些实施方案中，刺激试剂含有与细胞(例如，T细胞)上的一种或多种以下大分子特异性结合的一种或多种药剂(例如，抗体或其抗原结合片段，如Fab)：CD28、CD62L、CCR7、CD27、CD127、CD3、CD4、CD8、CD45RA和/或CD45RO。在一些实施方案中，所述一种或多种药剂是或能够附着于珠(例如，顺磁珠)。在一些实施方案中，所述一种或多种药剂是或能够附着(例如，可逆地附着)于寡聚试剂(例如，链霉亲和素突变蛋白寡聚物)。

[0176] 在一些实施方案中，所述一种或多种药剂包括抗体或其抗原结合片段，如Fab。抗体可以包括多克隆抗体、单克隆抗体(包括具有免疫球蛋白Fc区的全长抗体)、具有多表位特异性的抗体组合物、多特异性抗体(例如，双特异性抗体、双抗体和单链分子)、以及抗体片段(例如，Fab、F(ab')2和Fv)。在一些实施方案中，刺激试剂是或包括抗体片段(包括抗原结合片段)，例如Fab、Fab′-SH、Fv、scFv或(Fab′)2片段。应当理解，任何同种型的恒定区都可以用于本文设想的抗体，包括IgG、IgM、IgA、IgD和IgE恒定区，并且此类恒定区可以从任何人或动物物种(例如，鼠物种)获得。在一些实施方案中，药剂是或包括结合和/或识别T细胞受体的一种或多种组分的抗体。在特定实施方案中，药剂是或包括抗CD3抗体。在某些实

施方案中，药剂是或包括结合和/或识别共受体的抗体。在一些实施方案中，刺激试剂是或包括抗CD28抗体。在一些实施方案中，刺激试剂包括一级药剂，所述一级药剂是或包括抗CD3抗体或其抗原结合片段；并且包括二级药剂，所述二级药剂是或包括抗CD28抗体或其抗原结合片段。

[0177] 在一些实施方案中，在为或为约3:1、2.5:1、2:1、1.5:1、1.25:1、1.2:1、1.1:1、1:1、0.9:1、0.8:1、0.75:1、0.67:1、0.5:1、0.3:1或0.2:1的比率的刺激试剂与细胞的存在下刺激细胞(例如，输入群体的细胞)。在特定实施方案中，刺激试剂与细胞的比率为在2.5:1与0.2:1之间、在2:1与0.5:1之间、在1.5:1与0.75:1之间、在1.25:1与0.8:1之间或在1.1:1与0.9:1之间。在特定实施方案中，刺激试剂与细胞的比率为约1:1或为1:1。

[0178] 在一些实施方案中，在每10^6个细胞为、约或至少0.01μg、0.02μg、0.03μg、0.04μg、0.05μg、0.1μg、0.2μg、0.3μg、0.4μg、0.5μg、0.75μg、1μg、2μg、3μg、4μg、5μg、6μg、7μg、8μg、9μg或10μg刺激试剂的存在下刺激细胞。在一些实施方案中，在每10^6个细胞为或约4μg的存在下刺激细胞。在特定实施方案中，在每10^6个细胞为或约0.8μg的存在下刺激细胞。在各种实施方案中，在每10^6个细胞为或约0.8μg的存在下刺激细胞。

a.珠试剂

[0179] 在某些实施方案中，刺激试剂含有与能够激活和/或扩增细胞(例如，T细胞)的一种或多种药剂(例如，生物分子)缀合或连接的颗粒(例如，珠)。在一些实施方案中，所述一种或多种药剂结合至固体支持物。在一些实施方案中，固体支持物是或包括珠。在一些实施方案中，所述一种或多种药剂结合至珠。在一些实施方案中，珠是生物相容的，即由适合于生物学用途的材料构成。在一些实施方案中，珠对培养的细胞(例如，培养的T细胞)是无毒的。在一些实施方案中，珠可以是能够以允许药剂与细胞之间相互作用的方式附着药剂的任何颗粒。

[0180] 在一些实施方案中，刺激试剂含有能够激活和/或扩增细胞(例如，T细胞)的一种或多种药剂，所述一种或多种药剂结合至或以其他方式附着于珠，例如结合至或附着于珠的表面。在某些实施方案中，珠是非细胞颗粒。在特定实施方案中，珠可以包括胶体颗粒、微球体、纳米颗粒、磁珠等。在一些实施方案中，珠是琼脂糖珠。在某些实施方案中，珠是琼脂糖凝胶珠。

[0181] 在特定实施方案中，刺激试剂含有单分散的珠。在某些实施方案中，是单分散的珠包含彼此的直径标准偏差小于5％的尺寸分散体。

[0182] 在一些实施方案中，珠含有一种或多种药剂，如与珠的表面偶联、缀合或连接(直接或间接)的药剂。在一些实施方案中，如本文设想的药剂可以包括但不限于RNA、DNA、蛋白质(例如，酶)、抗原、多克隆抗体、单克隆抗体、抗体片段、碳水化合物、脂质凝集素或对所需靶标具有亲和力的任何其他生物分子。在一些实施方案中，所需靶标是T细胞受体和/或T细胞受体的组分。在某些实施方案中，所需靶标是CD3。在某些实施方案中，所需靶标是T细胞共刺激分子，例如CD28、CD137(4-1-BB)、OX40或ICOS。所述一种或多种药剂可以通过在本领域中已知和可用的各种方法直接或间接附着于珠。附着可以是共价的、非共价的、静电的或疏水的，并且可以通过各种附着手段(包括例如化学手段、机械手段或酶促手段)来实现。在一些实施方案中，生物分子(例如，生物素化的抗CD3抗体)可以经由直接附着于珠的另一种生物分子(例如，抗生物素抗体)间接附着于珠。

[0183] 在一些实施方案中，刺激试剂含有珠和直接与细胞表面上的大分子相互作用的一种或多种药剂。在某些实施方案中，珠(例如，顺磁珠)经由对细胞上的一种或多种大分子(例如，一种或多种细胞表面蛋白)具有特异性的一种或多种药剂(例如，抗体)与细胞相互作用。在某些实施方案中，将珠(例如，顺磁珠)用本文所述的第一药剂(如一抗(例如，抗生物素抗体)或其他生物分子)标记，然后添加第二药剂(如二抗(例如，生物素化的抗CD3抗体)或其他第二生物分子(例如，链霉亲和素)，由此二抗或其他第二生物分子与颗粒上的此类一抗或其他生物分子特异性结合。

[0184] 在一些实施方案中，刺激试剂含有附着于珠(例如，顺磁珠)并且与细胞(例如，T细胞)上的一种或多种以下大分子特异性结合的一种或多种药剂(例如，抗体)：CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD25、CD27、CD28、CD29、CD31、CD44、CD45RA、CD45RO、CD54(ICAM-1)、CD127、MHCI、MHCII、CTLA-4、ICOS、PD-1、OX40、CD27L(CD70)、4-1BB(CD137)、4-1BBL、CD30L、LIGHT、IL-2R、IL-12R、IL-1R、IL-15R；IFN-γR、TNF-αR、IL-4R、IL-10R、CD18/CD11a(LFA-1、$\alpha_L\beta 2$)、CD62L(L-选择素)、CD29/CD49d(VLA-4)、Notch配体(例如，Delta样配体1/4、Jagged 1/2等)、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7和CXCR3或其片段，包括这些大分子的对应配体或其片段。在一些实施方案中，附着于珠的药剂(例如，抗体)与细胞(例如，T细胞)上的一种或多种以下大分子特异性结合：CD28、CD62L、CCR7、CD27、CD127、CD3、CD4、CD8、CD45RA和/或CD45RO。

[0185] 在一些实施方案中，附着于珠的一种或多种药剂是抗体。抗体可以包括多克隆抗体、单克隆抗体(包括具有免疫球蛋白Fc区的全长抗体)、具有多表位特异性的抗体组合物、多特异性抗体(例如，双特异性抗体、双抗体和单链分子)、以及抗体片段(例如，Fab、F(ab')2和Fv)。在一些实施方案中，刺激试剂是抗体片段(包括抗原结合片段)，例如Fab、Fab′-SH、Fv、scFv或(Fab′)2片段。应当理解，任何同种型的恒定区都可以用于本文设想的抗体，包括IgG、IgM、IgA、IgD和IgE恒定区，并且此类恒定区可以从任何人或动物物种(例如，鼠物种)获得。在一些实施方案中，药剂是结合和/或识别T细胞受体的一种或多种组分的抗体。在特定实施方案中，药剂是抗CD3抗体。在某些实施方案中，药剂是结合和/或识别共受体的抗体。在一些实施方案中，刺激试剂包括抗CD28抗体。在一些实施方案中，珠具有大于或大于约0.001μm、大于或大于约0.01μm、大于或大于约0.1μm、大于或大于约1.0μm、大于或大于约10μm、大于或大于约50μm、大于或大于约100μm或大于或大于约1000μm且不超过或不超过约1500μm的直径。在一些实施方案中，珠具有为或约1.0μm至为或约500μm、为或约1.0μm至为或约150μm、为或约1.0μm至为或约30μm、为或约1.0μm至为或约10μm、为或约1.0μm至为或约5.0μm、为或约2.0μm至为或约5.0μm或者为或约3.0μm至为或约5.0μm的直径。在一些实施方案中，珠具有为或约3μm至为或约5μm的直径。在一些实施方案中，珠具有至少或至少约或约0.001μm、0.01μm、0.1μm、0.5μm、1.0μm、1.5μm、2.0μm、2.5μm、3.0μm、3.5μm、4.0μm、4.5μm、5.0μm、5.5μm、6.0μm、6.5μm、7.0μm、7.5μm、8.0μm、8.5μm、9.0μm、9.5μm、10μm、12μm、14μm、16μm、18μm或20μm的直径。在某些实施方案中，珠具有为或约4.5μm的直径。在某些实施方案中，珠具有为或约2.8μm的直径。

[0186] 在一些实施方案中，珠具有大于或大于约0.001g/cm^3、大于或大于约0.01g/cm^3、大于或大于约0.05g/cm^3、大于或大于约0.1g/cm^3、大于或大于约0.5g/cm^3、大于或大于约0.6g/cm^3、大于或大于约0.7g/cm^3、大于或大于约0.8g/cm^3、大于或大于约0.9g/cm^3、大于或

大于约1g/cm^3、大于或大于约1.1g/cm^3、大于或大于约1.2g/cm^3、大于或大于约1.3g/cm^3、大于或大于约1.4g/cm^3、大于或大于约1.5g/cm^3、大于或大于约2g/cm^3、大于或大于约3g/cm^3、大于或大于约4g/cm^{3}或者大于或大于约5g/cm^{3}的密度。在一些实施方案中，珠具有在为或约0.001g/cm^{3}与为或约100g/cm^{3}之间、为或约0.01g/cm^{3}与为或约50g/cm^{3}之间、为或约0.1g/cm^{3}与为或约10g/cm^{3}之间、为或约0.1g/cm^{3}与为或约5g/cm^{3}之间、为或约0.5g/cm^{3}与为或约1g/cm^{3}之间、为或约0.5g/cm^{3}与为或约1.5g/cm^{3}之间、为或约1g/cm^{3}与为或约1.5g/cm^{3}之间、为或约1g/cm^{3}与为或约2g/cm^{3}之间或者为或约1g/cm^{3}与为或约5g/cm^{3}之间的密度。在一些实施方案中，珠具有为或约0.5g/cm^3、为或约0.5g/cm^3、为或约0.6g/cm^3、为或约0.7g/cm^3、为或约0.8g/cm^3、为或约0.9g/cm^3、为或约1.0g/cm^3、为或约1.1g/cm^3、为或约1.2g/cm^3、为或约1.3g/cm^3、为或约1.4g/cm^3、为或约1.5g/cm^3、为或约1.6g/cm^3、为或约1.7g/cm^3、为或约1.8g/cm^3、为或约1.9g/cm^{3}或者为或约2.0g/cm^{3}的密度。在某些实施方案中，珠具有为或约1.6g/cm^{3}的密度。在特定实施方案中，珠或颗粒具有为或约1.5g/cm^{3}的密度。在某些实施方案中，颗粒具有为或约1.3g/cm^{3}的密度。

[0187] 在某些实施方案中，多个珠具有均匀的密度。在某些实施方案中，均匀的密度包含平均珠密度的小于或小于约10％、小于或小于约5％或小于或小于约1％的密度标准偏差。

[0188] 在一些实施方案中，珠具有在为或约0.001m^2/克颗粒(m^2/g)至为或约1,000m^2/g、为或约010m^2/g至为或约100m^2/g、为或约0.1m^2/g至为或约10m^2/g、为或约0.1m^2/g至为或约1m^2/g、为或约1m^2/g至为或约10m^2/g、为或约10m^2/g至为或约100m^2/g、为或约0.5m^2/g至为或约20m^2/g、为或约0.5m^2/g至为或约5m^2/g或者为或约1m^2/g至为或约4m^2/g之间的表面积。在一些实施方案中，颗粒或珠具有为或约1m^2/g至为或约4m^2/g的表面积。

[0189] 在一些实施方案中，珠在珠的表面处或附近含有可以与药剂偶联、连接或缀合的至少一种材料。在一些实施方案中，珠是表面官能化的，即包含能够与结合分子(例如，多核苷酸或多肽)形成共价键的官能团。在特定实施方案中，珠包含表面暴露的羧基、氨基、羟基、甲苯磺酰基、环氧基和/或氯甲基。在特定实施方案中，珠包含表面暴露的琼脂糖和/或琼脂糖凝胶。在某些实施方案中，珠表面包含附着的刺激试剂，所述刺激试剂可以结合或附着结合分子。在特定实施方案中，生物分子是多肽。在一些实施方案中，珠包含表面暴露的蛋白质A、蛋白质G或生物素。

[0190] 在一些实施方案中，珠在磁场中反应。在一些实施方案中，珠是磁珠。在一些实施方案中，磁珠是顺磁性的。在特定实施方案中，磁珠是超顺磁性的。在某些实施方案中，珠不展示任何磁性特性，除非它们暴露于磁场。

[0191] 在特定实施方案中，珠包含磁核、顺磁核或超顺磁核。在一些实施方案中，磁核含有金属。在一些实施方案中，金属可以是但不限于铁、镍、铜、钴、钆、锰、钽、锌、锆或其任何组合。在某些实施方案中，磁核包含金属氧化物(例如，氧化铁)、铁氧体(例如，锰铁氧体、钴铁氧体、镍铁氧体等)、赤铁矿和金属合金(例如，CoTaZn)。在一些实施方案中，磁核包含铁氧体、金属、金属合金、氧化铁或二氧化铬中的一种或多种。在一些实施方案中，磁核包含元素铁或其化合物。在一些实施方案中，磁核包含磁铁矿(Fe_3O_4)、磁赤铁矿(γFe_2O_3)或硫复铁矿(Fe_3S_4)中的一种或多种。在一些实施方案中，内核包含氧化铁(例如，Fe_3O_4)。

[0192] 在某些实施方案中，珠含有被表面官能化涂层(coat或coating)覆盖的磁核、顺磁核和/或超顺磁核。在一些实施方案中，涂层可以含有这样的材料，其可以包括但不限于聚

合物、多糖、二氧化硅、脂肪酸、蛋白质、碳、琼脂糖、琼脂糖凝胶或其组合。在一些实施方案中，聚合物可以是聚乙二醇、聚(乳酸-共-乙醇酸)、聚戊二醛、聚氨酯、聚苯乙烯或聚乙烯醇。在某些实施方案中，外包衣(coat或coating)包含聚苯乙烯。在特定实施方案中，外包衣是表面官能化的。

[0193] 在一些实施方案中，刺激试剂包含珠，其含有金属氧化物核(例如，氧化铁核)和涂层，其中金属氧化物核包含至少一种多糖(例如，葡聚糖)，并且其中涂层包含至少一种多糖(例如，氨基葡聚糖)、至少一种聚合物(例如，聚氨酯)和二氧化硅。在一些实施方案中，金属氧化物核是胶体氧化铁核。在某些实施方案中，所述一种或多种药剂包括抗体或其抗原结合片段。在特定实施方案中，所述一种或多种药剂包括抗CD3抗体和抗CD28抗体。在一些实施方案中，刺激试剂包含抗CD3抗体、抗CD28抗体和抗生物素抗体。在一些实施方案中，刺激试剂包括抗生物素抗体。在一些实施方案中，珠具有约3μm至约10μm的直径。在一些实施方案中，珠具有约3μm至约5μm的直径。在某些实施方案中，珠的直径为约3.5μm。

[0194] 在一些实施方案中，刺激试剂包含附着于珠的一种或多种药剂，所述珠包含金属氧化物核(例如，氧化铁内核)和涂层(例如，保护涂层)，其中涂层包含聚苯乙烯。在某些实施方案中，珠是单分散的顺磁(例如，超顺磁)珠，其包含顺磁(例如，超顺磁)铁核(例如，包含磁铁矿(Fe_3O_4)和/或磁赤铁矿(γFe_2O_3)的核)和聚苯乙烯涂层(coat或coating)。在一些实施方案中，珠是无孔的。在一些实施方案中，珠含有所述一种或多种药剂附着的官能化表面。在某些实施方案中，所述一种或多种药剂在表面上共价地结合至珠。在一些实施方案中，所述一种或多种药剂包括抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中，所述一种或多种药剂包括抗CD3抗体和抗CD28抗体。在一些实施方案中，所述一种或多种药剂包括抗CD3抗体和/或抗CD28抗体，以及能够与标记的抗体(例如，生物素化的抗体)(如标记的抗CD3或抗CD28抗体)结合的抗体或其片段。在某些实施方案中，珠具有约1.5g/cm^3的密度和约1m^2/g至约4m^2/g的表面积。在特定实施方案中，珠是具有约4.5μm的直径和约1.5g/cm^3的密度的单分散的超顺磁珠。在一些实施方案中，珠是具有约2.8μm的平均直径和约1.3g/cm^3的密度的单分散的超顺磁珠。

[0195] 在一些实施方案中，以为或为约3:1、2.5:1、2:1、1.5:1、1.25:1、1.2:1、1.1:1、1:1、0.9:1、0.8:1、0.75:1、0.67:1、0.5:1、0.3:1或0.2:1的珠与细胞的比率将经富集的T细胞的组合物与刺激试剂一起孵育。在特定实施方案中，珠与细胞的比率为在2.5:1与0.2:1之间、在2:1与0.5:1之间、在1.5:1与0.75:1之间、在1.25:1与0.8:1之间或在1.1:1与0.9:1之间。在特定实施方案中，珠与细胞的比率为约1:1或为1:1。

b.寡聚试剂

[0196] 在特定实施方案中，刺激试剂含有寡聚试剂(例如，链霉亲和素突变蛋白试剂)，其被缀合、连接或附着于一种或多种能够激活TCR复合物的细胞内信号传导结构域的药剂(例如，配体)。在一些实施方案中，所述一种或多种药剂具有能够在特定的结合位点(例如，结合位点Z)上结合寡聚试剂的附着的结合结构域或结合配偶体(例如，结合配偶体C)。在一些实施方案中，多种药剂可逆地结合至寡聚试剂。在各种实施方案中，寡聚试剂具有多个特定结合位点，所述多个特定结合位点在某些实施方案中在结合结构域(例如，结合配偶体C)处可逆地结合至多种药剂。在一些实施方案中，在竞争试剂(例如，还能够结合特定结合位点(例如，结合位点Z)的试剂)的存在下结合药剂的量被降低或减少。寡聚刺激试剂(包括抗

CD3/抗CD28寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂)描述于国际PCT公开号WO 2018/197949中。

[0197] 在一些实施方案中,刺激试剂是或包括可逆系统,其中至少一种药剂(例如,能够在细胞(如T细胞)中产生信号的药剂)与寡聚试剂缔合(例如,可逆地缔合)。在一些实施方案中,试剂含有能够与试剂结合(例如,可逆地结合)的多个结合位点。在一些实施方案中,刺激试剂可逆地结合在包含多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子的寡聚颗粒试剂的表面上。在一些实施方案中,刺激试剂(例如,一级药剂和二级药剂)可逆地结合在包含多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子的寡聚颗粒试剂的表面上。在一些情况下,试剂是具有能够在细胞(如T细胞)中产生信号的至少一种附着的药剂的寡聚颗粒试剂。在一些实施方案中,药剂含有可以特异性结合分子的表位或区域的至少一个结合位点(例如,结合位点B)并且还含有与试剂的至少一个结合位点(例如,试剂的结合位点Z)结合的结合配偶体(在本文中也称为结合配偶体C)。在一些实施方案中,结合配偶体C与至少一个结合位点Z之间的结合相互作用是非共价相互作用。在一些情况下,结合配偶体C与至少一个结合位点Z之间的结合相互作用是共价相互作用。在一些实施方案中,结合配偶体C与至少一个结合位点Z之间的结合相互作用(如非共价相互作用)是可逆的。

[0198] 可以在此类可逆系统中用作寡聚试剂的物质是已知的,参见例如,美国专利号5,168,049;5,506,121;6,103,493;7,776,562;7,981,632;8,298,782;8,735,540;9,023,604;以及国际公开PCT申请号WO 2013/124474和WO 2014/076277。下文描述了能够形成可逆相互作用的试剂和结合配偶体以及能够逆转这种结合的物质(例如,竞争试剂)的非限制性例子。

[0199] 在一些实施方案中,寡聚试剂是链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白或类似物、抗生物素蛋白、抗生物素蛋白突变蛋白或类似物(如中性抗生物素蛋白)或其混合物的寡聚物,其中这种寡聚试剂含有用于与药剂的结合结构域(例如,结合配偶体C)可逆地缔合的一个或多个结合位点。在一些实施方案中,药剂的结合结构域可以是生物素、生物素衍生物或类似物、或链霉亲和素结合肽、或能够特异性结合链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白或类似物、抗生物素蛋白或抗生物素蛋白突变蛋白或类似物的其他分子。

[0200] 在某些实施方案中,一种或多种药剂(例如,能够在细胞如T细胞中产生信号的药剂)如经由寡聚试剂上存在的多个特定结合位点(例如,结合位点Z)与寡聚试剂缔合(如可逆地结合)。在一些情况下,这导致药剂彼此紧密地排列,使得如果使具有由药剂结合或识别的(至少两个拷贝的)细胞表面分子的靶细胞与药剂接触,则可以发生亲合力效应。

[0201] 在一些实施方案中,寡聚试剂是链霉亲和素寡聚物、链霉亲和素突变蛋白寡聚物、链霉亲和素类似物寡聚物、抗生物素蛋白寡聚物、由抗生物素蛋白突变蛋白或抗生物素蛋白类似物(如中性抗生物素蛋白)构成的寡聚物或其混合物。在特定实施方案中,寡聚试剂含有能够与药剂的结合结构域(例如,结合配偶体C)结合的特定结合位点。在一些实施方案中,结合结构域可以是生物素、生物素衍生物或类似物、或链霉亲和素结合肽、或能够与链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白或类似物、抗生物素蛋白或抗生物素蛋白突变蛋白或类似物特异性结合的其他分子。

[0202] 在一些实施方案中,链霉亲和素可以是野生型链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白或类似物(如链霉亲和素样多肽)。同样地,在一些方面,抗生物素蛋白包括野生型抗生物素蛋白或者抗生物素蛋白的突变蛋白或类似物(如中性抗生物素蛋白,它是具有修饰的精氨

酸的去糖基化抗生物素蛋白,其通常展现更中性的pi并且可用作天然抗生物素蛋白的替代物)。通常,去糖基化的中性形式的抗生物素蛋白包括诸如可通过Sigma Aldrich获得的"Extravidin"或可获自Thermo Scientific或Invitrogen的"NeutrAvidin"等的那些可商购获得的形式。

[0203] 在一些实施方案中,试剂是链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白或类似物。在一些实施方案中,野生型链霉亲和素(wt-链霉亲和素)具有由Argarana等人,Nucleic Acids Res.14(1986)1871-1882所披露的氨基酸序列(SEQ ID NO:34)。通常,链霉亲和素自然地作为四个相同亚基的四聚体存在,即它是同源四聚体,其中每个亚基含有针对生物素、生物素衍生物或类似物或生物素模拟物的单一结合位点。链霉亲和素亚基的示例性序列是SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列,但是这个序列还可以包括在来自其他链霉菌属(Streptomyces)物种的同源物中存在的序列。特别地,链霉亲和素的每个亚基可以展现出对生物素的强结合亲和力,平衡解离常数(K_D)近似于为或约10^{-14}M。在一些情况下,链霉亲和素可以作为其中四个结合位点中仅有一个有功能的单价四聚体存在(Howarth等人(2006)Nat.Methods,3:267-73;Zhang等人(2015)Biochem.Biophys.Res.Commun.,463:1059-63)、作为其中四个结合位点中的两个有功能的二价四聚体存在(Fairhead等人(2013)J.Mol.Biol.,426:199-214),或者可以以单体或二聚体形式存在(Wu等人(2005)J.Biol.Chem.,280:23225-31;Lim等人(2010)Biochemistry,50:8682-91)。

[0204] 在一些实施方案中,链霉亲和素可以是任何形式,如野生型或未经修饰的链霉亲和素,如来自链霉菌属物种的链霉亲和素或其功能活性片段,所述功能活性片段包括含有针对生物素、生物素衍生物或类似物或生物素模拟物的结合位点的至少一个功能性亚基,如通常含有SEQ ID NO:34所示的来自阿维丁链霉菌(Streptomyces avidinii)的野生型链霉亲和素的至少一个功能性亚基或其功能活性片段。例如,在一些实施方案中,链霉亲和素可以包括野生型链霉亲和素的片段,所述片段在N末端和/或C末端被缩短。这种最小链霉亲和素包括在SEQ ID NO:34的氨基酸位置10至16的区域中的N末端开始并且在SEQ ID NO:34的氨基酸位置133至142的区域中的C末端终止的任何链霉亲和素。在一些实施方案中,链霉亲和素的功能活性片段含有SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,如SEQ ID NO:35所示的链霉亲和素可以在对应于Ala13(其编号如SEQ ID NO:34所示)的位置处进一步含有N末端甲硫氨酸。关于链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白中残基的位置是参考在SEQ ID NO:34中残基的编号。

[0205] 链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白的例子在例如WO 86/02077、DE 19641876Al、US 6,022,951、WO 98/40396或WO 96/24606中有提及。链霉亲和素突变蛋白的例子是本领域已知的,参见例如,美国专利号5,168,049;5,506,121;6,022,951;6,156,493;6,165,750;6,103,493;或6,368,813;或者国际公开PCT申请号WO 2014/076277。

[0206] 在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白可以含有不是未经修饰的或野生型链霉亲和素的一部分的氨基酸,或者可以仅包括野生型或未经修饰的链霉亲和素的一部分。在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白含有至少一个亚基,所述至少一个亚基与未经修饰的或野生型链霉亲和素的亚基相比(如与SEQ ID NO:34所示的野生型链霉亲和素亚基或例如SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:56所示的其功能活性片段相比)可以具有一个或多个氨基酸取代(置换)。

[0207] 在一些实施方案中，链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白对结合结构域的结合亲和力(如解离常数(K_d))小于或小于约$1x10^{-4}$M、$5x10^{-4}$M、$1x10^{-5}$M、$5x10^{-5}$M、$1x10^{-6}$M、$5x10^{-6}$M或$1x10^{-7}$M，但通常大于$1x10^{-13}$M、$1x10^{-12}$M或$1x10^{-11}$M。例如，如美国专利号5,506,121中披露的肽序列(Strep-tag)可以用作生物素模拟物，并且展示出对链霉亲和素的结合亲和力，例如，K_D大约在10^{-4}与10^{-5}M之间。在一些情况下，可以通过在链霉亲和素分子内进行突变来进一步改善结合亲和力，参见例如美国专利号6,103,493或国际公开PCT申请号WO 2014/076277。在一些实施方案中，结合亲和力可以通过本领域已知的方法(如本文所述的任何方法)来确定。

[0208] 在一些实施方案中，试剂(如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白)展现出对肽配体结合配偶体的结合亲和力，所述肽配体结合配偶体可以是药剂(例如，受体结合剂或选择剂)中存在的结合配偶体C。在一些实施方案中，肽序列含有具有通式His-Pro-Xaa的序列，其中Xaa是谷氨酰胺、天冬酰胺或甲硫氨酸，如SEQ ID NO:51所示的序列。在一些实施方案中，肽序列具有SEQ ID NO:52所示的通式，如SEQ ID NO:42所示。在一个例子中，肽序列是Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly(也称为Strep-tag®，如SEQ ID NO:43所示)。在一个例子中，肽序列是Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys(也称为Strep-tag®II，如SEQ ID NO:37所示)。在一些实施方案中，肽配体含有至少两个链霉亲和素结合模块的顺序排列，其中在这两个模块之间的距离为至少0个且不大于50个氨基酸，其中一个结合模块具有3个至8个氨基酸并且含有至少序列His-Pro-Xaa，其中Xaa是谷氨酰胺、天冬酰胺或甲硫氨酸，并且其中另一个结合模块具有相同或不同的链霉亲和素肽配体，如SEQ ID NO:52所示(参见例如，国际公开PCT申请号WO 02/077018;美国专利号7,981,632)。在一些实施方案中，肽配体含有具有SEQ ID NO:44或45中任一个所示的式的序列。在一些实施方案中，肽配体具有SEQ ID NO:38-40、46和47中任一个所示的氨基酸序列。在大多数情况下，所有这些链霉亲和素结合肽结合相同的结合位点，即链霉亲和素的生物素结合位点。如果将一种或多种此类链霉亲和素结合肽用作结合配偶体C(例如，C1和C2)，经由结合配偶体C结合至所述一种或多种药剂的多聚化试剂和/或寡聚颗粒试剂通常由一种或多种链霉亲和素突变蛋白构成。

[0209] 在一些实施方案中，链霉亲和素突变蛋白是如美国专利号6,103,493中所述的突变体。在一些实施方案中，基于野生型链霉亲和素的氨基酸序列(如SEQ ID NO:34所示)，链霉亲和素突变蛋白在氨基酸位置44至53的区域内含有至少一个突变。在一些实施方案中，链霉亲和素突变蛋白在一个或多个残基44、45、46和/或47处含有突变。在一些实施方案中，链霉亲和素突变蛋白含有疏水性脂肪族氨基酸(例如，Val、Ala、Ile或Leu)对野生型链霉亲和素的位置44处的Glu的替代，位置45处的任何氨基酸，位置46处的脂肪族氨基酸(如疏水性脂肪族氨基酸)，和/或碱性氨基酸(例如，Arg或Lys，如通常Arg)对位置47处的Val的替代。在一些实施方案中，Ala位于位置46和/或Arg位于位置47和/或Val或Ile位于位置44。在一些实施方案中，链霉亲和素突变体含有残基Val44-Thr45-Ala46-Arg47，如含有SEQ ID NO:48或SEQ ID NO:49或50所示氨基酸序列的示例性链霉亲和素突变蛋白中所示(也称为链霉亲和素突变体1，SAM1)。在一些实施方案中，链霉亲和素突变蛋白含有残基Ile44-Gly45-Ala46-Arg47，如含有SEQ ID NO:53、36或41所示氨基酸序列的示例性链霉亲和素突变蛋白中所示(也称为SAM2)。在一些情况下，这种链霉亲和素突变蛋白描述于例如美国专利6,103,493中，并且可以在商标Strep-Tactin®下商业购得。在一些实施方案中，突变蛋白

链霉亲和素含有SEQ ID NO:54或SEQ ID NO:55所示的氨基酸序列。在特定实施方案中，分子是链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白的四聚体，其包含SEQ ID NO:35、49、36、54、56、50或41中任一个所示的序列，作为四聚体，其是含有20个伯胺(每个单体包含1个N末端胺和4个赖氨酸)的分子。

[0210] 在一些实施方案中，链霉亲和素突变蛋白展现出特征在于如下的平衡解离常数(K_D)的结合亲和力，所述K_D对于肽配体(Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly；也称为Strep-tag®，如SEQ ID NO:43所示)而言等于或小于或小于约$3.7x10^{-5}$M，和/或对于肽配体(Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys；也称为Strep-tag®II，如SEQ ID NO:37所示)而言等于或小于或小于约$7.1x10^{-5}$M，和/或对于SEQ ID NO:37、44-47、38-40、42、43、51和52中任一个所示的任何肽配体而言等于或小于或小于约$7.0x10^{-5}$M、$5.0x10^{-5}$M、$1.0x0^{-5}$M、$5.0x0^{-6}$M、$1.0x0^{-6}$M、$5.0x0^{-7}$M或$1.0x10^{-7}$M，但通常大于或大于约$1x10^{-13}$M、$1x10^{-12}$M或$1x10^{-11}$M。

[0211] 在一些实施方案中，所得链霉亲和素突变蛋白展现出特征在于如下的平衡缔合常数(K_A)的结合亲和力，所述K_A对于肽配体(Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly；也称为Strep-tag®，如SEQ ID NO:43所示)而言等于或大于或大于约$2.7x10^{4}M^{-1}$，和/或对于肽配体(Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys；也称为Strep-tag®II，如SEQ ID NO:37所示)而言等于或大于或大于约$1.4x10^{4}M^{-1}$，和/或对于SEQ ID NO:37、44-47、38-40、42、43、51和52中任一个所示的任何肽配体而言等于或大于或大于约$1.43x10^{4}M^{-1}$、$1.67x10^{4}M^{-1}$、$2x10^{4}M^{-1}$、$3.33x10^{4}M^{-1}$、$5x10^{4}M^{-1}$、$1x10^{5}M^{-1}$、$1.11x10^{5}M^{-1}$、$1.25x10^{5}M^{-1}$、$1.43x10^{5}M^{-1}$、$1.67x10^{5}M^{-1}$、$2x10^{5}M^{-1}$、$3.33x10^{5}M^{-1}$、$5x10^{5}M^{-1}$、$1x10^{6}M^{-1}$、$1.11x10^{6}M^{-1}$、$1.25x10^{6}M^{-1}$、$1.43x10^{6}M^{-1}$、$1.67x10^{6}M^{-1}$、$2x10^{6}M^{-1}$、$3.33x10^{6}M^{-1}$、$5x10^{6}M^{-1}$、$1x10^{7}M^{-1}$，但通常小于$1x10^{13}M^{-1}$、$1x10^{12}M^{-1}$或$1x10^{11}M^{-1}$。

[0212] 在特定实施方案中，本文提供了由多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体构成和/或含有多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体的寡聚颗粒试剂。在某些实施方案中，本文提供的寡聚颗粒试剂含有可逆地结合或能够可逆地结合一种或多种药剂(例如，刺激剂和/或选择剂)的多个结合位点。在一些实施方案中，寡聚颗粒具有在为或约70nm与为或约125nm之间(包含端值)的半径(例如，平均(average或mean)半径)；在为或约$1x10^{7}$g/mol与为或约$1x10^{9}$g/mol之间(包含端值)的分子量；和/或在为或约1,000与为或约5,000之间的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体，包含端值。在一些实施方案中，寡聚颗粒试剂与一种或多种药剂结合(例如，可逆地结合)，所述一种或多种药剂如与细胞表面上的分子(例如，受体)结合的药剂。在某些实施方案中，所述一种或多种药剂是或包括抗体或其抗原结合片段，如Fab。在一些实施方案中，所述一种或多种药剂与细胞(例如，T细胞)上的一种或多种以下大分子特异性结合：CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD25、CD27、CD28、CD29、CD31、CD44、CD45RA、CD45RO、CD54(ICAM-1)、CD127、MHCI、MHCII、CTLA-4、ICOS、PD-1、OX40、CD27L(CD70)、4-1BB(CD137)、4-1BBL、CD30L、LIGHT、IL-2R、IL-12R、IL-1R、IL-15R；IFN-γR、TNF-αR、IL-4R、IL-10R、CD18/CD11a(LFA-1)、CD62L(L-选择素)、CD29/CD49d(VLA-4)、Notch配体(例如，Delta样配体1/4、Jagged 1/2等)、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7和CXCR3或其片段，包括这些大分子的对应配体或其片段。在一些实施方案中，所述一种或多种药剂与细胞(例如，T细胞)上的一种或多种以下大分子特异性结合：CD28、CD62L、CCR7、CD27、CD127、CD3、CD4、CD8、CD45RA和/或CD45RO。在一些实施方案中，所述一种或多种药剂包括抗体或其抗原结合片段，如Fab，并且抗体可以包括多克隆抗体、单克隆抗体(包括具有

免疫球蛋白Fc区的全长抗体)、具有多表位特异性的抗体组合物、多特异性抗体(例如,双特异性抗体、双抗体和单链分子)以及抗体片段(例如,Fab、F(ab')2和Fv)。在一些实施方案中,所述一种或多种试剂是或包括抗体片段(包括抗原结合片段),例如Fab、Fab′-SH、Fv、scFv或(Fab′)2片段。应当理解,任何同种型的恒定区都可以用于本文设想的抗体,包括IgG、IgM、IgA、IgD和IgE恒定区,并且此类恒定区可以从任何人或动物物种(例如,鼠物种)获得。在一些实施方案中,所述一种或多种试剂是或包括结合和/或识别T细胞受体的一种或多种组分的抗体。在特定实施方案中,所述一种或多种试剂是或包括抗CD3抗体。在某些实施方案中,所述一种或多种试剂是或包括结合和/或识别共受体的抗体。在一些实施方案中,所述一种或多种试剂是或包括抗CD28抗体。在一些实施方案中,所述一种或多种试剂是或包括抗CD3和/或抗CD28抗体或其抗原结合片段,如含有结合配偶体(例如,链霉亲和素结合肽,例如Strep-tag®II)的抗体或其抗原片段。在特定实施方案中,所述一种或多种药剂是或包括含有结合配偶体(例如,链霉亲和素结合肽,例如Strep-tag®II)的抗CD3和/或抗CD28 Fab。

[0213] 在一些实施方案中,本文提供了由多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体构成和/或含有多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体的寡聚颗粒试剂。在某些实施方案中,本文提供的寡聚颗粒试剂含有可逆地结合或能够可逆地结合一种或多种药剂(例如,刺激剂和/或选择剂)的多个结合位点。在一些实施方案中,寡聚颗粒具有在为或约80nm与为或约120nm之间(包含端值)的半径(例如,平均半径);在为或约$7.5x10^6$g/mol与为或约$2x10^8$g/mol之间(包含端值)的分子量(例如,平均分子量);和/或在为或约500与为或约10,000之间的量(例如,平均量)的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体,包含端值。在一些实施方案中,寡聚颗粒试剂与一种或多种药剂结合(例如,可逆地结合),所述一种或多种药剂如与细胞表面上的分子(例如,受体)结合的药剂。在一些实施方案中,药剂是抗CD3和/或抗CD28 Fab,如含有结合配偶体(例如,链霉亲和素结合肽,例如Strep-tag®II)的Fab。在特定实施方案中,所述一种或多种药剂是含有结合配偶体(例如,链霉亲和素结合肽,例如Streptag®II)的抗CD3和/或抗CD28Fab。

[0214] 在一些实施方案中,在每10^6个细胞为、约、或至少或至少约0.01μg、0.02μg、0.03μg、0.04μg、0.05μg、0.1μg、0.2μg、0.3μg、0.4μg、0.5μg、0.75μg、1μg、2μg、3μg、4μg、5μg、6μg、7μg、8μg、9μg或10μg寡聚刺激试剂的存在下刺激细胞。在一些实施方案中,在每10^6个细胞为或约4μg的存在下刺激细胞。在特定实施方案中,在每10^6个细胞为或为约0.8μg的存在下刺激细胞。在某些方面,4μg寡聚刺激试剂是或包括为或约3μg的寡聚颗粒和为或约1μg的附着的药剂,例如为或约0.5μg的抗CD3 Fab和为或约0.5μg的抗CD28 Fab。

2.从细胞中去除刺激试剂

[0215] 在一些实施方案中,在收集、收获或配制细胞之前,将刺激试剂从细胞或细胞群中去除或分离。在一些实施方案中,在孵育(例如,在本文(如在章节I-D中)所述的孵育)之后或期间,将刺激试剂从细胞或细胞群中去除或分离。在某些实施方案中,细胞或细胞群在孵育之后但在收集、收获或配制细胞的步骤之前经历去除刺激试剂的过程、程序、步骤或技术。在特定实施方案中,细胞或细胞群在孵育之后经历去除刺激试剂的过程、程序、步骤或技术。在一些方面,当在孵育期间从细胞分离或去除刺激试剂时,对于孵育的剩余持续时间,将细胞返回到与分离或去除之前相同的孵育条件。

[0216] 在某些实施方案中，从细胞去除和/或分离刺激试剂。在特定实施方案中，在一些情况下，在孵育期间，刺激试剂与细胞之间的结合和/或缔合可能随时间降低。在某些实施方案中，可以添加一种或多种药剂以减少刺激试剂与细胞之间的结合和/或缔合。在特定实施方案中，细胞培养条件的变化(例如，药剂的添加和/或培养基温度和/或pH的变化)可能降低刺激试剂与细胞之间的结合和/或缔合。因此，在一些实施方案中，可以将刺激试剂与细胞分开地从孵育、细胞培养系统和/或溶液中去除，例如不会将细胞也从孵育、细胞培养系统和/或溶液中去除。

[0217] 在某些实施方案中，在一定时间量后将刺激试剂从细胞分离和/或去除。在特定实施方案中，时间量是从开始刺激起的时间量。在特定实施方案中，孵育的起始被认为是在或约在细胞与刺激试剂和/或含有刺激试剂的培养基或溶液接触的时候。在特定实施方案中，在刺激开始的为或约120小时、108小时、96小时、84小时、72小时、60小时、48小时、36小时、24小时或12小时(包含端值)内，将刺激试剂从细胞中去除或分离。在特定实施方案中，在开始刺激后或在刺激后约48小时将刺激试剂从细胞中去除或分离。在某些实施方案中，在开始刺激后或在刺激后约72小时将刺激试剂从细胞中去除或分离。在一些实施方案中，在开始刺激后或在刺激后约96小时将刺激试剂从细胞中去除或分离。

[0218] 从细胞中去除刺激试剂(例如，为或含有颗粒如珠颗粒或可磁化颗粒的刺激试剂)的方法是已知的。在某些实施方案中，从细胞或细胞群中分离或去除珠刺激试剂，例如抗CD3/抗CD28抗体缀合的顺磁珠。在一些实施方案中，可以使用竞争性抗体(如未标记的抗体)的使用，其例如与刺激试剂的一抗结合，并改变所述一抗对细胞上其抗原的亲和力，从而允许温和脱附。在一些情况下，在脱附之后，竞争性抗体可以保持与颗粒(例如，珠颗粒)缔合，而未反应的抗体被洗掉或可以被洗掉，并且细胞不含分离、选择、富集和/或激活抗体。这种试剂的例子是DETACaBEAD(Friedl等人1995;Entschladen等人1997)。在一些实施方案中，可以在可切割接头(例如，DNA接头)的存在下除去颗粒(例如，珠颗粒)，由此使颗粒结合的抗体缀合至接头(例如，CELLection、Dynal)。在一些情况下，接头区提供了可切割位点，以在分离之后例如通过添加DNase或其他释放缓冲液从细胞中除去颗粒(例如，珠颗粒)。在一些实施方案中，还可以采用其他酶促方法从细胞中释放颗粒(例如，珠颗粒)。在一些实施方案中，颗粒(例如，珠颗粒或可磁化颗粒)是可生物降解的。

[0219] 在一些实施方案中，刺激试剂是磁性的、顺磁性的和/或超顺磁性的，和/或含有是磁性的、顺磁性的和/或超顺磁性的珠，并且可以通过将细胞暴露于磁场来从细胞中去除刺激试剂。含有用于产生磁场的磁体的合适设备的例子包括DynaMag CTS(Thermo Fisher)、磁分离器(Takara)和EasySep磁体(Stem Cell Technologies)。

[0220] 在特定实施方案中，在完成所提供的方法之前，例如在收获、收集和/或配制通过本文提供的方法产生的工程化细胞之前，将刺激试剂从细胞中去除或分离。在一些实施方案中，在工程化(例如，转导或转染)细胞之后，从细胞中去除和/或分离刺激试剂。在某些实施方案中，在培育细胞之后，例如在促进增殖和/或扩增的条件下培育工程化(例如，经转染的或经转导的)细胞之前，去除刺激试剂。在特定实施方案中，在培育细胞期间细胞实现阈值数量、密度和/或扩增之后，去除刺激试剂。在一些实施方案中，在配制细胞之前，例如在形成培育的细胞，如已经实现阈值数量、浓度或扩增的培育细胞之前，去除刺激试剂。

[0221] 在一些实施方案中，在收集、收获或配制细胞之前，将刺激性珠试剂(例如，刺激性

磁珠试剂)从细胞或细胞群中去除或分离。在一些实施方案中,通过在孵育(例如,本文如章节I-D中所述的孵育)期间或之后暴露于磁场,将刺激性珠试剂(例如,刺激性磁珠试剂)从细胞或细胞群中去除或分离。在某些实施方案中,在孵育之后但在收集、收获或配制细胞的步骤之前,将细胞或细胞群暴露于磁场以去除刺激性珠试剂,例如刺激性磁珠试剂。在特定实施方案中,在孵育之后,将细胞或细胞群经历暴露于磁场以去除刺激性珠试剂,例如刺激性磁珠试剂。在一些方面,当在孵育期间将刺激性珠试剂从细胞或细胞群分离或去除时,使细胞或细胞群返回到与暴露于磁场之前相同的孵育条件,持续孵育的剩余持续时间。

[0222] 在特定实施方案中,在刺激开始的为或约120小时、108小时、96小时、84小时、72小时、60小时、48小时、36小时、24小时或12小时内(包含端值),例如通过暴露于磁场,将刺激性珠试剂(例如,刺激性磁珠试剂)从细胞去除或分离。在某些实施方案中,在刺激开始后的为或约72小时时,例如通过暴露于磁场,从细胞中去除或分离刺激性珠试剂(例如,刺激性磁珠试剂)。在一些实施方案中,在刺激开始后的为或约96小时时,例如通过暴露于磁场,将刺激性珠试剂(例如,刺激性磁珠试剂)从细胞中去除或分离。

[0223] 在某些实施方案中,在一定时间量后将刺激试剂从细胞分离和/或去除。在特定实施方案中,所述时间量是从在刺激条件下起始和/或开始孵育起的时间量。在特定实施方案中,孵育的起始被认为是在或约在细胞与刺激试剂和/或含有刺激试剂的培养基或溶液接触的时候。在特定实施方案中,在孵育起始或开始后的为或约28天、21天、20天、19天、18天、17天、16天、15天、14天、13天、12天、11天、10天或9天内,将刺激试剂从细胞中去除或分离。在一些实施方案中,在将CD4+T细胞和CD8+T细胞合并、组合和/或混合成输入组合物后的为或约28天、21天、20天、19天、18天、17天、16天、15天、14天、13天、12天、11天、10天或9天内,将刺激试剂从细胞中去除或分离。在某些实施方案中,在从生物样品中获得、分离、富集和/或选择CD4+T细胞和CD8+T细胞后的为或约28天、21天、20天、19天、18天、17天、16天、15天、14天、13天、12天、11天、10天或9天内,将刺激试剂从细胞中去除或分离。

[0224] 在一些实施方案中,去除刺激试剂(如所描述的寡聚刺激试剂)包括向经孵育的T细胞群中添加物质(如竞争剂),以破坏(如减少和/或终止)一种或多种刺激剂的信号传导。在一些实施方案中,经孵育的T细胞群含有物质(如竞争剂,例如生物素或生物素类似物,例如D-生物素)的存在。在一些实施方案中,物质(如竞争剂,例如生物素或生物素类似物,例如D-生物素)以如下量存在,所述量是在孵育期间没有外源性添加所述物质的经培养的T细胞的参考群体或制剂中所述物质的量的至少1.5倍、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少10倍、至少100倍或至少1000倍或更多倍。在一些实施方案中,在经培养的T细胞群中物质(如竞争剂,例如生物素或生物素类似物,例如D-生物素)的量为从为或约10μM至为或约100μM、为或约100μM至为或约1mM、为或约100μM至为或约500μM或者为或约10μM至为或约100μM。在一些实施方案中,将10μM或约10μM的生物素或生物素类似物(例如,D-生物素)添加至细胞或细胞群,以从细胞或细胞群中分离或去除寡聚刺激试剂。

[0225] 在某些实施方案中,所述一种或多种药剂(例如,刺激或激活TCR和/或共受体的药剂)如经由寡聚试剂上存在的多个特定结合位点(例如,结合位点Z)与寡聚试剂缔合(如可逆地结合)。在一些情况下,这导致药剂彼此紧密地排列,使得如果使具有由药剂结合或识别的(至少两个拷贝的)细胞表面分子的靶细胞与药剂接触,则可以发生亲合力效应。在一些方面,受体结合试剂在结合位点B处对细胞的受体分子具有低亲和力,使得受体结合试剂

在竞争试剂的存在下从细胞解离。因此，在一些实施方案中，在竞争试剂的存在下从细胞去除药剂。

[0226] 在一些实施方案中，寡聚刺激试剂是具有可逆地附着的抗CD3和抗CD28 Fab的链霉亲和素突变蛋白寡聚物。在一些实施方案中，所附着的Fab含有链霉亲和素结合结构域，例如，其允许可逆地附着于链霉亲和素突变蛋白寡聚物。在一些情况下，抗CD3和抗CD28 Fab相互紧密布置，使得如果使表达CD3和/或CD28的T细胞与具有可逆地附着的Fab的寡聚刺激试剂接触，则可能发生亲合力作用。在一些方面，Fab对CD3和CD28具有低亲和力，使得Fab在竞争试剂(例如，生物素或生物素变体或类似物)的存在下从细胞中解离。因此，在一些实施方案中，在竞争试剂(例如，D-生物素)的存在下将Fab从细胞去除或解离。

[0227] 在一些实施方案中，在收集、收获或配制细胞之前，将刺激性寡聚试剂(例如，刺激性寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂)从细胞或细胞群中去除或分离。在一些实施方案中，在孵育(例如，本文如在章节I-D中所述的孵育)之后或期间，通过接触或暴露于竞争试剂(例如，生物素或生物素类似物，如D-生物素)从细胞或细胞群中去除或分离刺激性寡聚试剂(例如，刺激性寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂)。在某些实施方案中，在孵育之后但在用于收集、收获或配制细胞的步骤之前，使细胞或细胞群接触或暴露于竞争试剂(例如，生物素或生物素类似物，如D-生物素)，以去除刺激性寡聚试剂(例如，刺激性寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂)。在特定实施方案中，在孵育之后，使细胞或细胞群接触或暴露于竞争试剂(例如，生物素或生物素类似物，如D-生物素)，以去除刺激性寡聚试剂(例如，刺激性寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂)。在一些方面，当在孵育期间，例如通过接触或暴露于竞争试剂(例如，生物素或生物素类似物，如D-生物素)，从细胞分离或去除刺激性寡聚试剂(例如，刺激性寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂)时，将细胞返回到与分离或去除之前相同的孵育条件，持续孵育的剩余持续时间。

[0228] 在一些实施方案中，使细胞与为、约或者至少或至少约0.01μM、0.05μM、0.1μM、0.5μM、1μM、2μM、3μM、4μM、5μM、10μM、100μM、500μM、0.01mM、1mM或10mM的竞争试剂接触，以从细胞中去除或分离寡聚刺激试剂。在各种实施方案中，使细胞与为、约或者至少或至少约0.01μM、0.05μM、0.1μM、0.5μM、1μM、2μM、3μM、4μM、5μM、10μM、100μM、500μM、0.01mM、1mM或10mM的生物素或生物素类似物(如D-生物素)接触，以从细胞中去除或分离具有可逆地附着的抗CD3和抗CD28 Fab的刺激性链霉亲和素突变蛋白寡聚物。

[0229] 在特定实施方案中，在刺激开始的为或约120小时、108小时、96小时、84小时、72小时、60小时、48小时、36小时、24小时或12小时(包含端值)内，从细胞中去除或分离刺激性寡聚试剂(例如，刺激性寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂)。在特定实施方案中，在刺激开始后或在刺激后约48小时从细胞中去除或分离刺激性寡聚试剂(例如，刺激性寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂)。在某些实施方案中，在刺激开始后的为或约72小时时，从细胞中去除或分离刺激性寡聚试剂(例如，刺激性寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂)。在一些实施方案中，在刺激开始后的为或约96小时时，从细胞中去除或分离刺激性寡聚试剂(例如，刺激性寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂)。

C.病毒载体颗粒

[0230] 在一些实施方案中，病毒载体颗粒是逆转录病毒载体颗粒(如慢病毒颗粒)，其在病毒载体的基因组中含有编码重组和/或异源分子(例如，重组或异源蛋白，如重组和/或异

源受体,如嵌合抗原受体(CAR)或其他抗原受体)的核酸。病毒载体颗粒的基因组通常包括除了编码重组分子的核酸(例如,多核苷酸)以外的序列。此类序列可包括允许将基因组包装到病毒颗粒中的序列和/或促进编码重组受体(如CAR)的核酸表达的序列。

1.病毒载体

[0231] 在一些实施方案中,病毒载体颗粒含有源自基于逆转录病毒基因组的载体(如源自基于慢病毒基因组的载体)的基因组。在一些实施方案中,病毒载体颗粒是慢病毒载体颗粒。在所提供的病毒载体的一些方面,编码重组受体(如抗原受体,如嵌合抗原受体(CAR)或转基因T细胞受体(TCR))的异源核酸(例如,多核苷酸)被包含在和/或位于载体基因组的5′LTR与3′LTR序列之间。在一些实施方案中,重组蛋白是抗原受体。在一些实施方案中,重组蛋白是T细胞受体(TCR)。在一些实施方案中,重组蛋白是嵌合抗原受体(CAR)。

[0232] 在一些实施方案中,病毒载体基因组是慢病毒基因组,如HIV-1基因组或SIV基因组。在一些实施方案中,慢病毒载体颗粒是复制缺陷型的。例如,已经通过多次减弱毒力基因生成慢病毒载体,例如,可以使基因env、vif、vpu和nef缺失,使得载体对于治疗目的更安全。慢病毒载体是已知的。参见Naldini等人,(1996和1998);Zufferey等人,(1997);Dull等人,1998,美国专利号6,013,516;以及5,994,136。在一些实施方案中,这些病毒载体是基于质粒的或基于病毒的,并且被配置为携带用于掺入外来核酸的基本序列,用于选择和用于将核酸(例如,多核苷酸)转移到宿主细胞中。已知的慢病毒可以容易地从保管机构或保藏中心(如美国典型培养物保藏中心(“ATCC”;弗吉尼亚州马纳萨斯大学大道(University Blvd.)10801号20110-2209))获得,或者使用常用技术从已知来源分离。

[0233] 慢病毒载体的非限制性例子包括源自慢病毒的那些,如人免疫缺陷病毒1(HIV-1)、HIV-2、猿猴免疫缺陷病毒(SIV)、人嗜T淋巴细胞病毒1(HTLV-1)、HTLV-2或马感染贫血病毒(E1AV)。例如,已经通过多次减弱HIV毒力基因生成慢病毒载体,例如,使基因env、vif、vpr、vpu和nef缺失,使得载体对于治疗目的更安全。慢病毒载体是本领域已知的,参见Naldini等人,(1996和1998);Zufferey等人,(1997);Dull等人,1998,美国专利号6,013,516;以及5,994,136。在一些实施方案中,这些病毒载体是基于质粒的或基于病毒的,并且被配置为携带用于掺入外来核酸的基本序列,用于选择和用于将核酸(例如,多核苷酸)转移到宿主细胞中。已知的慢病毒可以容易地从保管机构或保藏中心(如美国典型培养物保藏中心(“ATCC”;弗吉尼亚州马纳萨斯大学大道(University Blvd.)10801号20110-2209))获得,或者使用常用技术从已知来源分离。

[0234] 在一些实施方案中,病毒基因组载体可以含有逆转录病毒(如慢病毒)的5’和3’LTR的序列。在一些方面,病毒基因组构建体可含有来自慢病毒的5’和3’LTR的序列,并且具体而言可以含有来自慢病毒的5’LTR的R和U5序列以及来自慢病毒的失活或自失活3’LTR。LTR序列可以是来自任何物种的任何慢病毒的LTR序列。例如,它们可以是来自HIV、SIV、FIV或BIV的LTR序列。通常,LTR序列是HIV LTR序列。

[0235] 在一些实施方案中,病毒载体(如HIV病毒载体)的核酸(例如,多核苷酸)缺乏另外的转录单元。载体基因组可以含有失活或自失活的3’LTR(Zufferey等人J Virol72:9873,1998;Miyoshi等人,J Virol 72:8150,1998)。例如,用于产生病毒载体RNA的核酸(例如,多核苷酸)的3’LTR的U3区中的缺失可以用于产生自失活(SIN)载体。然后可以在逆转录期间将此缺失转移到原病毒DNA的5’LTR。自失活载体通常具有自3’长末端重复序列(LTR)的增

强子和启动子序列缺失,所述缺失在载体整合期间被拷贝到5'LTR中。在一些实施方案中,可以消除足够的序列,包括去除TATA盒,以消除LTR的转录活性。这可以防止在经转导细胞中产生全长载体RNA。在一些方面,3'LTR的U3元件含有其增强子序列、TATA盒、Sp1和NF-κB位点的缺失。由于自失活3'LTR,在进入和逆转录之后产生的原病毒含有失活的5'LTR。这可以通过降低动员载体基因组的风险和LTR对附近细胞启动子的影响来提高安全性。可以通过本领域已知的任何方法来构建自失活3'LTR。在一些实施方案中,这不会影响载体滴度或载体的体外或体内特性。

[0236] 任选地,来自慢病毒5'LTR的U3序列可以在病毒构建体中用启动子序列(如异源启动子序列)替代。这可以增加从包装细胞系中回收的病毒的滴度。还可以包括增强子序列。可以使用增加病毒RNA基因组在包装细胞系中的表达的任何增强子/启动子组合。在一个例子中,使用CMV增强子/启动子序列(美国专利号5,385,839和美国专利号5,168,062)。

[0237] 在某些实施方案中,可以通过将逆转录病毒载体基因组(如慢病毒载体基因组)构建为整合缺陷性来使插入诱变的风险降至最低。可以采用多种途径来产生非整合型载体基因组。在一些实施方案中,可以将一种或多种突变工程化至pol基因的整合酶组分中,使得其编码具有无活性整合酶的蛋白质。在一些实施方案中,可以修饰载体基因组本身以通过例如使一个或两个附着位点突变或缺失来防止整合,或者通过缺失或修饰使3'LTR近端多嘌呤束(PPT)没有功能。在一些实施方案中,可以使用非遗传途径;这些途径包括抑制整合酶的一种或多种功能的药理学药剂。这些方法并不相互排斥;也就是说,可以一次使用多于一种所述方法。例如,整合酶和附着位点两者可以都没有功能,或者整合酶和PPT位点可以没有功能,或者附着位点和PPT位点可以没有功能,或者它们全部都可以没有功能。此类方法和病毒载体基因组是已知的并且是可获得的(参见Philpott和Thrasher,Human Gene Therapy 18:483,2007;Engelman等人J Virol 69:2729,1995;Brown等人J Virol 73:9011(1999);WO 2009/076524;McWilliams等人,J Virol 77:11150,2003;Powell和Levin J Virol 70:5288,1996)。

[0238] 在一些实施方案中,载体含有用于在宿主细胞(如原核宿主细胞)中繁殖的序列。在一些实施方案中,病毒载体的核酸(例如,多核苷酸)含有用于在原核细胞(如细菌细胞)中繁殖的一个或多个复制起点。在一些实施方案中,包括原核复制起点的载体还可以含有这样的基因,其表达赋予可检测或可选择标记,如抗药性。

2.编码异源蛋白的核酸

[0239] 在一些实施方案中,病毒载体含有编码异源重组蛋白的核酸(例如,多核苷酸)。在一些实施方案中,异源重组蛋白或分子是或包括重组受体(例如,抗原受体)、SB转座子(例如,用于基因沉默)、衣壳包封的转座子、同源双链核酸(例如,用于基因组重组)或报告基因(例如,荧光蛋白,如GFP)或萤光素酶。

[0240] 在一些实施方案中,病毒载体含有编码重组受体和/或嵌合受体(如异源受体蛋白)的核酸(例如,多核苷酸)。重组受体(如异源受体)可以包括抗原受体,如功能性非TCR抗原受体,包括嵌合抗原受体(CAR)和其他抗原结合受体,如转基因T细胞受体(TCR)。受体还可以包括其他受体,如其他嵌合受体,如与特定配体结合并且具有与CAR中存在的那些类似的跨膜和/或细胞内信号传导结构域的受体。

[0241] 在任何此类例子中,将核酸(例如,多核苷酸)插入或定位在病毒载体的区域中,如

通常在病毒基因组的非必需区域中。在一些实施方案中，将核酸(例如，多核苷酸)插入病毒基因组的某些病毒序列的位置中以产生具有复制缺陷的病毒。

[0242] 在一些实施方案中，所编码的重组抗原受体(例如，CAR)是能够与要靶向的细胞或疾病上的一种或多种配体特异性结合的受体，所述疾病如癌症、感染性疾病、炎性或自身免疫性疾病或其他疾病或病症，包括本文所述用于以所提供的方法和组合物靶向的那些。

[0243] 在某些实施方案中，示例性抗原是或包括αvβ6整合素(avb6整合素)、B细胞成熟抗原(BCMA)、B7-H3、B7-H6、碳酸酐酶9(CA9，也称为CAIX或G250)、癌症-睾丸抗原、癌症/睾丸抗原1B(CTAG，也称为NY-ESO-1和LAGE-2)、癌胚抗原(CEA)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、C-C基序趋化因子配体1(CCL-1)、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD123、CD138、CD171、表皮生长因子蛋白(EGFR)、截短的表皮生长因子蛋白(tEGFR)、表皮生长因子受体III型突变体(EGFR vIII)、上皮糖蛋白2(EPG-2)、上皮糖蛋白40(EPG-40)、肝配蛋白B2、肝配蛋白受体A2(EPHa2)、雌激素受体、Fc受体样蛋白5(FCRL5；也称为Fc受体同源物5或FCRH5)、胎儿乙酰胆碱受体(胎儿AchR)、叶酸结合蛋白(FBP)、叶酸受体α、神经节苷脂GD2、O-乙酰化GD2(OGD2)、神经节苷脂GD3、糖蛋白100(gp100)、G蛋白偶联受体5D(GPCR5D)、Her2/neu(受体酪氨酸激酶erb-B2)、Her3(erb-B3)、Her4(erb-B4)、erbB二聚体、人高分子量黑色素瘤相关抗原(HMW-MAA)、乙型肝炎表面抗原、人白细胞抗原A1(HLA-A1)、人白细胞抗原A2(HLA-A2)、IL-22受体α(IL-22Ra)、IL-13受体α2(IL-13Ra2)、激酶插入结构域受体(kdr)、κ轻链、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、L1-CAM的CE7表位、含有富亮氨酸重复序列的蛋白8家族成员A(LRRC8A)、Lewis Y、黑色素瘤相关抗原(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、间皮素、c-Met、鼠类巨细胞病毒(CMV)、粘蛋白1(MUC1)、MUC16、自然杀伤细胞2族成员D(NKG2D)配体、黑色素A(MART-1)、神经细胞粘附分子(NCAM)、癌胚胎抗原、黑色素瘤优先表达抗原(PRAME)、孕酮受体、前列腺特异性抗原、前列腺干细胞抗原(PSCA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)、存活蛋白、滋养层糖蛋白(TPBG，也称作5T4)、肿瘤相关糖蛋白72(TAG72)、血管内皮生长因子受体(VEGFR)、血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)、肾母细胞瘤1(WT-1)、病原体特异性抗原、或与通用标签相关的抗原、和/或生物素化的分子、和/或由HIV、HCV、HBV或其他病原体表达的分子。在一些实施方案中，受体靶向的抗原包括与B细胞恶性肿瘤相关的抗原，如许多已知B细胞标记中的任何一种。在一些实施方案中，抗原是或包括CD20、CD19、CD22、ROR1、CD45、CD21、CD5、CD33、Igκ、Igλ、CD79a、CD79b或CD30。

[0244] 在一些实施方案中，示例性抗原是孤儿酪氨酸激酶受体ROR1、tEGFR、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、间皮素、CEA和乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、OEPHa2、ErbB2、3或4、FBP、胎儿乙酰胆碱受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R-α、IL-13R-α2、kdr、κ轻链、Lewis Y、L1细胞粘附分子、MAGE-A1、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、癌胚胎抗原、ROR1、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、Her2/neu、雌激素受体、孕酮受体、肝配蛋白B2、CD123、CS-1、c-Met、GD-2和MAGE A3、CE7、肾母细胞瘤1(WT-1)、细胞周期蛋白(如细胞周期蛋白A1(CCNA1))，和/或生物素化的分子，和/或由HIV、HCV、HBV、HPV和/或其他病原体表达的分子和/或具有HIV、HCV、HBV、HPV和/或其他病原体的特征的分子或对HIV、HCV、HBV、HPV和/或其他病原体具有特异性的分子，和/或其致癌形式。

[0245] 在一些实施方案中，抗原是或包括病原体特异性抗原或病原体表达的抗原。在一些实施方案中，抗原是病毒抗原(如来自HIV、HCV、HBV等的病毒抗原)、细菌抗原和/或寄生虫抗原。

[0246] 在一些实施方案中，抗原受体(包括CAR和重组TCR)及其产生和引入包括例如以下文献中所述的那些：国际专利申请公开号WO 200014257、WO 2013126726、WO 2012/129514、WO 2014031687、WO 2013/166321、WO 2013/071154、WO 2013/123061，美国专利申请公开号US 2002131960、US 2013287748、US 20130149337，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和8,479,118，以及欧洲专利申请号EP 2537416，和/或以下文献中所述的那些：Sadelain等人，Cancer Discov.2013年4月；3(4)：388-398；Davila等人(2013)PLoS ONE 8(4)：e61338；Turtle等人，Curr.Opin.Immunol.，2012年10月；24(5)：633-39；Wu等人，Cancer，2012年3月18(2)：160-75。

a.嵌合抗原受体

[0247] 在一些实施方案中，病毒载体基因组中所含的核酸(例如，多核苷酸)编码嵌合抗原受体(CAR)。CAR通常是基因工程化受体，其具有细胞外配体结合结构域，如含有抗体或其片段的细胞外部分，所述细胞外配体结合结构域与一种或多种细胞内信号传导组分连接。在一些实施方案中，嵌合抗原受体包括将细胞外结构域与细胞内信号传导结构域连接的跨膜结构域和/或细胞内结构域。此类分子通常模拟或接近通过天然抗原受体发出的信号和/或通过这样的受体与共刺激受体的组合发出的信号。

[0248] 在一些实施方案中，CAR被构建具有对特定标记的特异性，如在过继疗法所靶向的特定细胞类型中表达的标记，例如癌症标记和/或任何所述抗原。因此，CAR通常包括抗体的一个或多个抗原结合片段、结构域或部分、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，CAR包括抗体分子的一个或多个抗原结合部分，如可变重链(VH)或其抗原结合部分、或源自单克隆抗体(mAb)的可变重链(VH)和可变轻链(VL)的单链抗体片段(scFv)。

[0249] 在一些实施方案中，提供了工程化细胞(如T细胞)，其表达对特定抗原(或标记或配体)具有特异性的CAR，所述特定抗原如在特定细胞类型的表面上表达的抗原。在一些实施方案中，抗原是多肽。在一些实施方案中，它是碳水化合物或其他分子。在一些实施方案中，与正常或非靶标细胞或组织相比，抗原在疾病或病症的细胞(例如，肿瘤或病原细胞)上选择性表达或过表达。在其他实施方案中，抗原在正常细胞上表达和/或在工程化细胞上表达。

[0250] 在特定实施方案中，重组受体(如嵌合受体)含有细胞内信号传导区域，所述细胞内信号传导区域包括胞质信号传导结构域或区域(也可互换地称为细胞内信号传导结构域或区域)，如能够在T细胞中诱导初级激活信号的胞质(细胞内)区域，例如，T细胞受体(TCR)组分的胞质信号传导结构域或区域(例如，CD3-zeta(CD3ζ)链的ζ链的胞质信号传导结构域或区域或其功能变体或信号传导部分)；和/或所述细胞内信号传导区域包含基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)。在一些实施方案中，CAR包含与靶抗原特异性结合的细胞外抗原识别结构域和包含ITAM的细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中，细胞内信号传导结构域包含CD3-zeta(CD3ζ)链的细胞内结构域。

[0251] 在一些实施方案中，嵌合受体进一步含有与配体(例如，抗原)抗原特异性结合的细胞外配体结合结构域。在一些实施方案中，嵌合受体是CAR，其含有与抗原特异性结合的细胞外抗原识别结构域。在一些实施方案中，配体(如抗原)是在细胞表面上表达的蛋白质。在一些实施方案中，CAR是TCR样CAR，并且抗原是加工过的肽抗原，如细胞内蛋白的肽抗原，其与TCR一样在主要组织相容性复合物(MHC)分子的背景下在细胞表面上被识别。

[0252] 示例性抗原受体(包括CAR)以及将此类抗原受体工程化并引入细胞中的方法包括例如以下文献中所述的那些：国际专利申请公开号WO 200014257、WO 2013126726、WO 2012/129514、WO 2014031687、WO 2013/166321、WO 2013/071154、WO 2013/123061，美国专利申请公开号US 2002131960、US 2013287748、US 20130149337、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和8,479,118，以及欧洲专利申请号EP2537416；和/或以下文献中所述的那些：Sadelain等人，Cancer Discov.2013年4月；3(4)：388-398；Davila等人(2013)PLoS ONE 8(4)：e61338；Turtle等人，Curr.Opin.Immunol.，2012年10月；24(5)：633-39；Wu等人，Cancer，2012年3月18(2)：160-75。在一些方面，抗原受体包括如美国专利号7,446,190中所述的CAR，和国际专利申请公开号WO/2014055668A1中所述的那些。CAR的例子包括如前述出版物中任一项中披露的CAR，所述出版物如WO 2014031687、US 8,339,645、US 7,446,179、US 2013/0149337、美国专利号7,446,190、美国专利号8,389,282；Kochenderfer等人，2013，Nature Reviews Clinical Oncology，10，267-276(2013)；Wang等人(2012)J.Immunother.35(9)：689-701；和Brentjens等人，Sci Transl Med.2013 5(177)。还参见WO 2014031687、US 8,339,645、US 7,446,179、US 2013/0149337、美国专利号7,446,190和美国专利号8,389,282。

[0253] 在一些实施方案中，CAR被构建为具有对特定抗原(或标记或配体)的特异性，所述特定抗原如在过继疗法靶向的特定细胞类型中表达的抗原(例如，癌症标记)和/或旨在诱导衰减反应的抗原(如在正常或未患病细胞类型上表达的抗原)。因此，CAR典型地在其胞外部分中包含一种或多种抗原结合分子，如一种或多种抗原结合片段、结构域或部分，或一种或多种抗体可变结构域，和/或抗体分子。在一些实施方案中，CAR包含抗体分子的一个或多个抗原结合部分，如源自单克隆抗体(mAb)的可变重链(VH)和可变轻链(VL)的单链抗体片段(scFv)。

[0254] 在一些实施方案中，抗体或其抗原结合部分作为重组受体(如抗原受体)的一部分在细胞上表达。抗原受体包括功能性非TCR抗原受体，如嵌合抗原受体(CAR)。通常，含有针对肽-MHC复合物表现出TCR样特异性的抗体或抗原结合片段的CAR也可以称为TCR样CAR。在一些实施方案中，在一些方面，对TCR样CAR的MHC-肽复合物具有特异性的细胞外抗原结合结构域经由接头和/或一个或多个跨膜结构域与一种或多种细胞内信号传导组分连接。在一些实施方案中，此类分子通常可以模拟或接近通过天然抗原受体(如TCR)的信号，并且任选地模拟或接近通过这种受体与共刺激受体的组合的信号。

[0255] 在一些实施方案中，重组受体(如嵌合受体(例如，CAR))包括与抗原(或配体)结合(如特异性结合)的配体结合结构域。嵌合受体靶向的抗原包括在经由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那些。疾病和病症包括增殖性、肿瘤性和恶性疾病和障碍，包括癌症和肿瘤，包括血液癌症、免疫系统癌症，如淋巴瘤、白血病和/或骨髓瘤，如B

型白血病、T型白血病和髓性白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤。

[0256] 在一些实施方案中，抗原(或配体)是多肽。在一些实施方案中，它是碳水化合物或其他分子。在一些实施方案中，与正常或非靶向细胞或组织相比，抗原(或配体)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，抗原在正常细胞上表达和/或在工程化细胞上表达。在一些实施方案中，抗原与疾病或病症相关，所述疾病或病症如癌症、自身免疫性疾病或障碍或者感染性疾病。在一些实施方案中，抗原受体(例如，CAR)与通用标签特异性结合。

[0257] 在一些实施方案中，CAR含有特异性识别在细胞表面上表达的抗原(如完整抗原)的抗体或抗原结合片段(例如，scFv)。

[0258] 在一些实施方案中，抗原(或配体)是肿瘤抗原或癌症标记。在一些实施方案中，抗原(或配体)是或包括αvβ6整合素(avb6整合素)、B细胞成熟抗原(BCMA)、B7-H3、B7-H6、碳酸酐酶9(CA9，也称为CAIX或G250)、癌症-睾丸抗原、癌症/睾丸抗原1B(CTAG，也称为NY-ESO-1和LAGE-2)、癌胚抗原(CEA)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、C-C基序趋化因子配体1(CCL-1)、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD123、CD138、CD171、表皮生长因子蛋白(EGFR)、截短的表皮生长因子蛋白(tEGFR)、表皮生长因子受体III型突变体(EGFR vIII)、上皮糖蛋白2(EPG-2)、上皮糖蛋白40(EPG-40)、肝配蛋白B2、肝配蛋白受体A2(EPHa2)、雌激素受体、Fc受体样5(FCRL5；也称为Fc受体同源物5或FCRH5)、胎儿乙酰胆碱受体(胎儿AchR)、叶酸结合蛋白(FBP)、叶酸受体α、神经节苷脂GD2、O-乙酰化GD2(OGD2)、神经节苷脂GD3、糖蛋白100(gp100)、G蛋白偶联受体5D(GPCR5D)、Her2/neu(受体酪氨酸激酶erb-B2)、Her3(erb-B3)、Her4(erb-B4)、erbB二聚体、人高分子量黑色素瘤相关抗原(HMW-MAA)、乙型肝炎表面抗原、人白细胞抗原A1(HLA-A1)、人白细胞抗原A2(HLA-A2)、IL-22受体α(IL-22Ra)、IL-13受体α2(IL-13Ra2)、激酶插入结构域受体(kdr)、κ轻链、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、L1-CAM的CE7表位、含有富亮氨酸重复序列的蛋白8家族成员A(LRRC8A)、Lewis Y、黑色素瘤相关抗原(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、间皮素、c-Met、鼠类巨细胞病毒(CMV)、粘蛋白1(MUC1)、MUC16、自然杀伤细胞2族成员D(NKG2D)配体、黑色素A(MART-1)、神经细胞粘附分子(NCAM)、癌胚胎抗原、黑色素瘤优先表达抗原(PRAME)、孕酮受体、前列腺特异性抗原、前列腺干细胞抗原(PSCA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)、存活蛋白、滋养层糖蛋白(TPBG也称为5T4)、肿瘤相关糖蛋白72(TAG72)、血管内皮生长因子受体(VEGFR)、血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)、肾母细胞瘤1(WT-1)、病原体特异性抗原、或与通用标签相关的抗原、和/或生物素化分子、和/或由HIV、HCV、HBV或其他病原体表达的分子。在一些实施方案中，受体靶向的抗原包括与B细胞恶性肿瘤相关的抗原，如许多已知B细胞标记中的任何一种。在一些实施方案中，抗原是或包括CD20、CD19、CD22、ROR1、CD45、CD21、CD5、CD33、Igκ、Igλ、CD79a、CD79b或CD30。

[0259] 在一些实施方案中，抗原或抗原结合结构域是CD19。在一些实施方案中，scFv含有源自对CD19具特异性的抗体或抗体片段的VH和VL。在一些实施方案中，结合CD19的抗体或抗体片段是小鼠来源的抗体，如FMC63和SJ25C1。在一些实施方案中，抗体或抗体片段是人抗体，例如如美国专利公开号US 2016/0152723中所述。

[0260] 在一些实施方案中，scFv源自FMC63。FMC63通常是指针对人来源的表达CD19的Nalm-1和Nalm-16细胞产生的小鼠单克隆IgG1抗体(Ling，N.R.等人(1987).Leucocyte

typing III.302)。在一些实施方案中,FMC63抗体包含SEQ ID NO:60所示的CDRH1、SEQ ID NO:61所示的CDRH2和SEQ ID NO:62或SEQ ID NO:76所述的CDRH3,以及SEQ ID NO:57所示的CDRL1和SEQ ID NO:58或77所示的CDR L2和SEQ ID NO:59或78所示的CDR L3。在一些实施方案中,FMC63抗体包含含有SEQ ID NO:63的氨基酸序列的重链可变区(V_H)和含有SEQ ID NO:64的氨基酸序列的轻链可变区(V_L)。

[0261] 在一些实施方案中,scFv包含含有SEQ ID NO:57的CDRL1序列、SEQ ID NO:58的CDRL2序列和SEQ ID NO:59的CDRL3序列的可变轻链以及含有SEQ ID NO:60的CDRH1序列、SEQ ID NO:61的CDRH2序列和SEQ ID NO:62的CDRH3序列的可变重链。在一些实施方案中,scFv包含含有SEQ ID NO:57的CDRL1序列、SEQ ID NO:77的CDRL2序列和SEQ ID NO:78的CDRL3序列的可变轻链以及含有SEQ ID NO:60的CDRH1序列、SEQ ID NO:61的CDRH2序列和SEQ ID NO:76的CDRH3序列的可变重链。

[0262] 在一些实施方案中,scFv包含SEQ ID NO:63所示的可变重链区和SEQ ID NO:64所示的可变轻链区。在一些实施方案中,可变重链和可变轻链通过接头连接。在一些实施方案中,接头如SEQ ID NO:80所示。在一些实施方案中,scFv依次包含V_H、接头和V_L。在一些实施方案中,scFv依次包含V_L、接头和V_H。在一些实施方案中,scFv由SEQ ID NO:65所示的核苷酸序列或展现出与SEQ ID NO:65至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列编码。在一些实施方案中,scFv包含SEQ ID NO:65所示的氨基酸序列或展现出与SEQ ID NO:65至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[0263] 在一些实施方案中,scFv源自SJ25C1。SJ25C1是针对人来源的表达CD19的Nalm-1和Nalm-16细胞产生的小鼠单克隆IgG1抗体(Ling,N.R.等人(1987).Leucocyte typing III.302)。在一些实施方案中,SJ25C1抗体包含SEQ ID NO:69-71中分别所示的CDRH1、H2和H3,以及SEQ ID NO:66-68中分别所示的CDRL1、L2和L3序列。在一些实施方案中,SJ25C1抗体包含含有SEQ ID NO:72的氨基酸序列的重链可变区(V_H)和含有SEQ ID NO:73的氨基酸序列的轻链可变区(V_L)。

[0264] 在一些实施方案中,scFv包含含有SEQ ID NO:66的CDRL1序列、SEQ ID NO:67的CDRL2序列和SEQ ID NO:68的CDRL3序列的可变轻链以及含有SEQ ID NO:69的CDRH1序列、SEQ ID NO:70的CDRH2序列和SEQ ID NO:71的CDRH3序列的可变重链。在一些实施方案中,scFv包含SEQ ID NO:72所示的可变重链区和SEQ ID NO:73所示的可变轻链区。在一些实施方案中,可变重链和可变轻链通过接头连接。在一些实施方案中,接头如SEQ ID NO:74所示。在一些实施方案中,scFv依次包含V_H、接头和V_L。在一些实施方案中,scFv依次包含V_L、接头和V_H。在一些实施方案中,scFv包含SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列或展现出与SEQ ID NO:75至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[0265] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段(例如,scFv或V_H结构域)特异性识别抗原(如BCMA)。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段源自与BCMA特异性结合的抗体或抗原结合片段,或者是所述抗体或抗原结合片段的变体。

[0266] 在一些实施方案中,CAR是对BCMA(例如,人BCMA)具有特异性的抗BCMA CAR。先前已经描述了含有抗BCMA抗体(包括小鼠抗人BCMA抗体和人抗人抗体)的嵌合抗原受体以及

表达此类嵌合受体的细胞。参见Carpenter等人,Clin Cancer Res.,2013,19(8):2048-2060,WO 2016/090320,WO 2016090327,WO 2010104949A2和WO 2017173256。在一些实施方案中,抗原或抗原结合结构域是BCMA。在一些实施方案中,scFv含有源自对BCMA具有特异性的抗体或抗体片段的VH和VL。在一些实施方案中,结合BCMA的抗体或抗体片段是或含有来自国际专利申请公开号WO 2016/090327和WO 2016/090320中所述的抗体或抗体片段的VH和VL。

[0267] 在一些实施方案中,抗原或抗原结合结构域是GPRC5D。在一些实施方案中,scFv含有源自对GPRC5D具特异性的抗体或抗体片段的VH和VL。在一些实施方案中,结合GPRC5D的抗体或抗体片段是或含有来自国际专利申请公开号WO 2016/090329和WO 2016/090312中所述的抗体或抗体片段的VH和VL。

[0268] 在一些方面,CAR含有结合或识别(例如,特异性结合)通用标签或通用表位的配体(例如,抗原)结合结构域。在一些方面,结合结构域可以结合分子、标签、多肽和/或表位,所述分子、标签、多肽和/或表位可以连接至识别与疾病或障碍相关的抗原的不同结合分子(例如,抗体或抗原结合片段)。示例性标签或表位包括染料(例如,异硫氰酸荧光素)或生物素。在一些方面,结合分子(例如,抗体或抗原结合片段)与标签连接,所述标签识别与疾病或障碍相关的抗原(例如,肿瘤抗原),且工程化细胞表达对所述标签具有特异性的CAR,以实现工程化细胞的细胞毒性或其他效应子功能。在一些方面,CAR对与疾病或障碍相关的抗原的特异性由带标签的结合分子(例如,抗体)提供,并且不同的带标签的结合分子可以用于靶向不同抗原。对通用标签或通用表位具有特异性的示例性CAR包括例如以下文献中所述的那些:U.S.9,233,125;WO 2016/030414;Urbanska等人,(2012)Cancer Res 72:1844-1852;和Tamada等人,(2012).Clin Cancer Res 18:6436-6445。

[0269] 在一些实施方案中,抗原是或包括病原体特异性抗原或病原体表达的抗原。在一些实施方案中,抗原是病毒抗原(如来自HIV、HCV、HBV等的病毒抗原)、细菌抗原和/或寄生虫抗原。在一些实施方案中,CAR含有TCR样抗体,如特异性识别作为MHC-肽复合物于细胞表面上呈递的细胞内抗原(如肿瘤相关抗原)的抗体或抗原结合片段(例如,scFv)。在一些实施方案中,识别MHC-肽复合物的抗体或其抗原结合部分可以作为重组受体(如抗原受体)的部分在细胞上表达。抗原受体包括功能性非TCR抗原受体,如嵌合抗原受体(CAR)。通常,含有针对肽-MHC复合物表现出TCR样特异性的抗体或抗原结合片段的CAR也可以称为TCR样CAR。

[0270] 提及“主要组织相容性复合物”(MHC)是指含有多态性肽结合位点或结合沟的蛋白质,通常是糖蛋白,在一些情况下,所述蛋白质可以与多肽的肽抗原(包括由细胞机构加工的肽抗原)复合。在一些情况下,MHC分子可以在细胞表面上展示或表达,包括作为与肽的复合物,即MHC-肽复合物,用于呈递具有T细胞上的抗原受体(如TCR或TCR样抗体)可识别的构象的抗原。通常,MHC I类分子是具有跨膜α链(在一些情况下具有三个α结构域)和非共价缔合的β2微球蛋白的异二聚体。通常,MHC II类分子由两种跨膜糖蛋白α和β构成,两者通常都跨越膜。MHC分子可以包括MHC的有效部分,其含有抗原结合位点或用于结合肽的位点以及由适当抗原受体识别所需的序列。在一些实施方案中,MHC I类分子将源自胞质溶胶的肽递送至细胞表面,其中MHC-肽复合物由T细胞(如通常是$CD8^+$T细胞,但是在一些情况下是CD4+T细胞)识别。在一些实施方案中,MHC II类分子将源自囊泡系统的肽递送至细胞表面,其中

肽通常被$CD4^+$T细胞识别。通常，MHC分子由一组连锁基因座编码，它们在小鼠中统称为H-2，并且在人中统称为人白细胞抗原(HLA)。因此，通常人MHC也可以称为人白细胞抗原(HLA)。

[0271] 术语“MHC-肽复合物”或“肽-MHC复合物”或其变体是指肽抗原与MHC分子的复合物或缔合物，例如通常通过所述肽在MHC分子的结合沟或裂缝中的非共价相互作用来形成。在一些实施方案中，MHC-肽复合物存在或展示于细胞表面上。在一些实施方案中，MHC-肽复合物可以由抗原受体(如TCR、TCR样CAR或其抗原结合部分)特异性识别。

[0272] 在一些实施方案中，多肽的肽(如肽抗原或表位)可以与MHC分子缔合，如用于由抗原受体识别。通常，肽源自或基于较长生物分子(如多肽或蛋白质)的片段。在一些实施方案中，肽通常具有约8至约24个氨基酸的长度。在一些实施方案中，对于MHC II类复合物中的识别，肽的长度为从或从约9至22个氨基酸。在一些实施方案中，对于MHC I类复合物中的识别，肽的长度为从或从约8至13个氨基酸。在一些实施方案中，在识别MHC分子(如MHC-肽复合物)背景下的肽后，抗原受体(如TCR或TCR样CAR)产生或触发激活信号至T细胞，诱导T细胞反应，如T细胞增殖、细胞因子产生、细胞毒性T细胞反应或其他反应。

[0273] 在一些实施方案中，TCR样抗体或抗原结合部分是已知的或可通过已知方法产生(参见例如，美国公开申请号US 2002/0150914;US 2003/0223994;US 2004/0191260;US 2006/0034850;US 2007/00992530;US20090226474;US20090304679;和国际PCT公开号WO 03/068201)。

[0274] 在一些实施方案中，与MHC-肽复合物特异性结合的抗体或其抗原结合部分可以通过用有效量的含有特定MHC-肽复合物的免疫原对宿主进行免疫来产生。在一些情况下，MHC-肽复合物的肽是能够与MHC结合的抗原的表位，所述抗原如肿瘤抗原，例如通用肿瘤抗原、骨髓瘤抗原或如下文所述的其他抗原。在一些实施方案中，然后向宿主施用有效量的免疫原以用于引发免疫反应，其中免疫原保持其三维形式持续一段足以引发针对所述肽在MHC分子的结合沟中的三维呈递的免疫反应的时间。然后测定从宿主中收集的血清以确定是否产生了识别MHC分子结合沟中的肽的三维呈递的所需抗体。在一些实施方案中，可以评估所产生的抗体以确认所述抗体可以区分MHC-肽复合物与单独的MHC分子、单独的目的肽以及MHC与无关肽的复合物。然后可以分离所需抗体。

[0275] 在一些实施方案中，与MHC-肽复合物特异性结合的抗体或其抗原结合部分可以通过采用抗体文库展示方法(如噬菌体抗体文库)来产生。在一些实施方案中，可以产生突变体Fab、scFv或其他抗体形式的噬菌体展示文库，例如，其中文库的成员在一个或多个CDR的一个或多个残基处发生突变。参见例如，美国公开申请号US 20020150914、US 2014/0294841;和Cohen CJ.等人(2003)J Mol.Recogn.16:324-332。

[0276] 本文中的术语“抗体”在最广泛的意义上使用，并且包括多克隆和单克隆抗体，包括完整抗体和功能性(抗原结合)抗体片段，包括抗原结合的片段(Fab)片段、$F(ab')_2$片段、Fab'片段、Fv片段、重组IgG(rIgG)片段、能够特异性结合抗原的可变重链(V_H)区、单链抗体片段(包括单链可变片段(scFv))以及单结构域抗体(例如，sdAb、sdFv、纳米抗体)片段。所述术语涵盖免疫球蛋白的基因工程化的和/或以其他方式修饰的形式，如胞内抗体、肽体、嵌合抗体、完全人抗体、人源化抗体和异缀合抗体、多特异性(例如，双特异性)抗体、双抗体、三抗体和四抗体、串联二-scFv、串联三-scFv。除非另有说明，否则术语“抗体”应当理解为涵盖其功能性抗体片段。所述术语还涵盖完整或全长抗体，包括任何类别或亚类(包括

IgG及其亚类、IgM、IgE、IgA和IgD)的抗体。

[0277] 在一些实施方案中,抗原结合蛋白、抗体及其抗原结合片段特异性地识别全长抗体的抗原。在一些实施方案中,抗体的重链和轻链可以是全长的或者可以是抗原结合部分(Fab、F(ab')2、Fv或单链Fv片段(scFv))。在其他实施方案中,抗体重链恒定区选自例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD和IgE,特别是选自例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4,更特别是IgG1(例如,人IgG1)。在另一个实施方案中,抗体轻链恒定区选自例如κ或λ,特别是κ。

[0278] 所提供的抗体包括抗体片段。"抗体片段"是指不同于完整抗体的分子,其包含完整抗体中结合完整抗体所结合抗原的一部分。抗体片段的例子包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')$_2$;双抗体;线性抗体;可变重链(V_H)区、单链抗体分子(如scFv)和单结构域V_H单一抗体;和由抗体片段形成的多特异性抗体。在特定实施方案中,抗体是包含可变重链区和/或可变轻链区的单链抗体片段,如scFv。

[0279] 术语"可变区"或"可变结构域"是指抗体重链或轻链中参与抗体与抗原的结合的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域(分别为V_H和V_L)通常具有相似的结构,每个结构域包含四个保守的框架区(FR)和三个CDR。(参见例如,Kindt等人Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman and Co.,第91页(2007))。单一V_H或V_L结构域可能足以赋予抗原结合特异性。此外,可以使用来自结合抗原的抗体的V_H或V_L结构域分离结合所述特定抗原的抗体,以分别筛选互补的V_L或V_H结构域的文库。参见例如,Portolano等人,J.Immunol.150:880-887(1993);Clarkson等人,Nature 352:624-628(1991)。

[0280] 单结构域抗体是包含抗体的全部或部分重链可变结构域或者全部或部分轻链可变结构域的抗体片段。在某些实施方案中,单结构域抗体是人单结构域抗体。在一些实施方案中,CAR包含特异性结合抗原的抗体重链结构域,所述抗原如癌症标记或待靶向的细胞或疾病(如肿瘤细胞或癌细胞)的细胞表面抗原,如本文所述或已知的任何靶抗原。

[0281] 抗体片段可以通过各种技术制备,包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及通过重组宿主细胞产生。在一些实施方案中,抗体是重组产生的片段,如包含天然不存在的排列的片段(如具有通过合成接头(例如,肽接头)连接的两个或更多个抗体区或链的那些),和/或可不通过酶消化天然存在的完整抗体产生的片段。在一些实施方案中,抗体片段是scFv。

[0282] "人源化"抗体是这样的抗体,其中所有或基本上所有CDR氨基酸残基都源自非人CDR并且所有或基本上所有FR氨基酸残基都源自人FR。人源化抗体任选地可以包括源自人抗体的抗体恒定区的至少一部分。非人抗体的"人源化形式"是指非人抗体的变体,其已经经历人源化以通常降低对人的免疫原性,同时保留亲代非人抗体的特异性和亲和力。在一些实施方案中,人源化抗体中的一些FR残基被来自非人抗体(例如,CDR残基所来源的抗体)的相应残基取代,例如以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0283] 因此,在一些实施方案中,嵌合抗原受体(包括TCR样CAR)包括含有抗体或抗体片段的细胞外部分。在一些实施方案中,抗体或片段包括scFv。在一些方面,嵌合抗原受体包括含有抗体或片段的细胞外部分和细胞内信号传导区。在一些实施方案中,细胞内信号传导区包含细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域是或包括初级信号传导结构域、能够在T细胞中诱导初级激活信号的信号传导结构域、T细胞受体(TCR)

组分的信号传导结构域和/或包含基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)的信号传导结构域。

[0284] 在一些实施方案中,CAR的细胞外部分(如其抗体部分)进一步包括间隔子,如抗原识别组分(例如,scFv)与跨膜结构域之间的间隔子区域。间隔子可以是或包括免疫球蛋白恒定区或其变体或经修饰形式的至少一部分,如铰链区(例如,IgG4铰链区)和/或CH1/CL和/或Fc区。在一些实施方案中,重组受体进一步包含间隔子和/或铰链区。在一些实施方案中,恒定区或部分是人IgG如IgG4或IgG1的。在一些方面,恒定区的所述部分用作抗原识别组分(例如,scFv)与跨膜结构域之间的间隔子区。在一些实施方案中,间隔子具有SEQ ID NO:8所示的序列,并且由SEQ ID NO:9所示的序列编码。在一些实施方案中,间隔子具有SEQ ID NO:10所示的序列。在一些实施方案中,间隔子具有SEQ ID NO:11所示的序列。

[0285] 在一些实施方案中,恒定区或部分是IgD的。在一些实施方案中,间隔子具有SEQ ID NO:12所示的序列。在一些实施方案中,间隔子具有与SEQ ID NO:8、10、11和12中的任何一个展现出至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0286] 在一些实施方案中,间隔子可以是或包括免疫球蛋白恒定区或其变体或经修饰形式的至少一部分,如铰链区(例如,IgG4铰链区)和/或C_H1/C_L和/或Fc区。在一些实施方案中,重组受体进一步包含间隔子和/或铰链区。在一些实施方案中,恒定区或部分是人IgG如IgG4或IgG1的。在一些方面,恒定区的所述部分用作抗原识别组分(例如,scFv)与跨膜结构域之间的间隔子区。与不存在间隔子的情况下相比,间隔子的长度可以提供抗原结合后增强的细胞反应性。在一些例子中,间隔子具有为或约12个氨基酸的长度或者具有不超过12个氨基酸的长度。示例性间隔子包括具有至少约10至229个氨基酸、约10至200个氨基酸、约10至175个氨基酸、约10至150个氨基酸、约10至125个氨基酸、约10至100个氨基酸、约10至75个氨基酸、约10至50个氨基酸,约10至40个氨基酸、约10至30个氨基酸、约10至20个氨基酸或约10至15个氨基酸(并且包括任何列出的范围的端点之间的任何整数)的那些。在一些实施方案中,间隔子区具有约12个或更少的氨基酸、约119个或更少的氨基酸或者约229个或更少的氨基酸。示例性间隔子包括仅IgG4铰链、与CH2和CH3结构域连接的IgG4铰链或与CH3结构域连接的IgG4铰链。示例性间隔子包括但不限于Hudecek等人(2013)Clin.Cancer Res.,19:3153或国际专利申请公开号WO 2014/031687中描述的那些。在一些实施方案中,间隔子具有SEQ ID NO:8所示的序列,并且由SEQ ID NO:9所示的序列编码。在一些实施方案中,间隔子具有SEQ ID NO:10所示的序列。在一些实施方案中,间隔子具有SEQ ID NO:11所示的序列。

[0287] 在一些实施方案中,恒定区或部分是IgD的。在一些实施方案中,间隔子具有SEQ ID NO:12所示的序列。在一些实施方案中,间隔子具有与SEQ ID NO:8、10、11和12中的任何一个展现出至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0288] 细胞外配体结合结构域(如抗原识别结构域)通常与一个或多个细胞内信号传导组分连接,所述一个或多个细胞内信号传导组分如在CAR的情况下模拟通过抗原受体复合物(如TCR复合物)进行激活和/或通过另一细胞表面受体传导信号的信号传导组分。在一些实施方案中,跨膜结构域连接细胞外配体结合结构域与细胞内信号传导结构域。

在一些实施方案中，抗原结合组分(例如，抗体)与一个或多个跨膜和细胞内信号传导区域连接。在一些实施方案中，CAR包含与胞外结构域融合的跨膜结构域。在一个实施方案中，使用天然地与受体(例如，CAR)中的结构域之一相关的跨膜结构域。在一些情形中，通过氨基酸取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物的其他成员的相互作用。

[0289] 在一些实施方案中，跨膜结构域源自天然或合成来源。当来源是天然的时，在一些方面，结构域可以源自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。跨膜区包括源自以下的那些(即，包含以下的至少一个或多个跨膜区)：T细胞受体的α、β或ζ链，CD28，CD3ε，CD45，CD4，CD5，CD8，CD9，CD16，CD22，CD33，CD37，CD64，CD80，CD86，CD134，CD137或CD154。可替代地，在一些实施方案中，跨膜结构域是合成的。在一些方面，合成跨膜结构域主要包含疏水性残基，如亮氨酸和缬氨酸。在一些方面，将在合成跨膜结构域的每个末端发现苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体。在一些实施方案中，连接是通过接头、间隔子和/或一个或多个跨膜结构域来实现。

[0290] 在一些实施方案中，存在短的寡肽或多肽接头，例如长度在2与10个氨基酸之间的接头(如含有甘氨酸和丝氨酸的接头，例如甘氨酸-丝氨酸双联体)，并且在CAR的跨膜结构域与胞质信号传导结构域之间形成连接。

[0291] 重组受体(例如，CAR)通常包括至少一种或多种细胞内信号传导组分。在一些实施方案中，受体包括TCR复合物的细胞内组分，如介导T细胞激活和细胞毒性的TCR CD3链，例如CD3ζ链。因此，在一些方面，抗原结合部分连接至一个或多个细胞信号传导模块。在一些实施方案中，细胞信号传导模块包括CD3跨膜结构域、CD3细胞内信号传导结构域和/或其他CD跨膜结构域。在一些实施方案中，受体(例如，CAR)进一步包括一种或多种另外的分子(如Fc受体γ、CD8、CD4、CD25或CD16)的一部分。例如，在一些方面，CAR或其他嵌合受体包括CD3-zeta(CD3-ζ)或Fc受体γ与CD8、CD4、CD25或CD16之间的嵌合分子。

[0292] 在一些实施方案中，在连接CAR或其他嵌合受体后，受体的胞质结构域和/或区域或细胞内信号传导结构域和/或区域激活免疫细胞(例如，工程化以表达CAR的T细胞)的正常效应子功能或反应中的至少一种。例如，在一些情境下，CAR诱导T细胞的功能，如细胞溶解活性或T辅助活性，如细胞因子或其他因子的分泌。在一些实施方案中，使用抗原受体组分或共刺激分子的细胞内信号传导结构域的截短部分(例如，如果其转导效应子功能信号的话)代替完整的免疫刺激链。在一些实施方案中，细胞内信号传导区域(例如，包含一种或多种细胞内信号传导结构域)包括T细胞受体(TCR)的胞质序列，并且在一些方面还包括共受体(其在天然情境下与这种受体并行起作用以在抗原受体接合后启动信号转导)和/或此类分子的任何衍生物或变体的那些，和/或具有相同功能能力的任何合成序列。

[0293] 在天然TCR的背景下，完全激活通常不仅需要通过TCR进行信号传导，还需要共刺激信号。因此，在一些实施方案中，为了促进完全激活，用于生成次级或共刺激信号的组分也被包括在CAR中。在其他实施方案中，CAR不包括用于生成共刺激信号的组分。在一些方面，另外的CAR在同一细胞中表达，并且提供用于生成次级或共刺激信号的组分。

[0294] T细胞激活在一些方面被描述为由至少如下两类胞质信号传导序列介导：通过TCR启动抗原依赖性初级激活的那些(初级胞质信号传导序列)，以及以非抗原依赖性方式起作用以提供次级或共刺激信号的那些(次级胞质信号传导序列)。在一些方面，CAR包括此类信

号传导组分中的一种或两种。

[0295] 在一些方面,CAR包括调节TCR复合物的初级激活的初级胞质信号传导序列。以刺激方式起作用的初级胞质信号传导序列可以含有信号传导基序(其称为免疫受体酪氨酸激活基序或ITAM)。含有ITAM的初级胞质信号传导序列的例子包括源自以下的那些:TCR或CD3ζ、FcRγ、FcRβ、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD8、CD22、CD79a、CD79b和CD66d。在某些实施方案中,含有ITAM的初级胞质信号传导序列包括源自TCR或CD3ζ、FcRγ或FcRβ的那些。在一些实施方案中,CAR中的一种或多种胞质信号传导分子含有源自CD3ζ的胞质信号传导结构域、其部分或序列。

[0296] 在一些实施方案中,CAR包括共刺激受体(如CD28、4-1BB、OX40、CD27、DAP10和/或ICOS)的信号传导结构域和/或跨膜部分。在一些方面,同一CAR包括激活或信号传导区域和共刺激组分两者。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包括T细胞共刺激分子的细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,T细胞共刺激分子选自CD28和41BB。

[0297] 在一些实施方案中,激活结构域包括于一个CAR内,而共刺激组分是由识别另一种抗原的另一种CAR提供。在一些实施方案中,CAR包括在同一细胞上表达的激活或刺激CAR和共刺激CAR(参见WO 2014/055668)。在一些方面,CAR是刺激或激活CAR;在其他方面,它是共刺激CAR。在一些实施方案中,细胞进一步包括抑制性CAR(iCAR,参见Fedorov等人,Sci.Transl.Medicine,5(215)(2013年12月),如识别不同抗原的CAR,其中通过识别第一抗原的CAR递送的激活信号通过抑制性CAR与其配体的结合而被减少或抑制,例如以减少脱靶效应。

[0298] 在某些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含与CD3细胞内结构域连接的CD28跨膜和信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包括与CD3细胞内结构域连接的嵌合CD28和CD137共刺激结构域。

[0299] 在一些实施方案中,$CD8^+$细胞毒性T细胞的细胞内信号传导结构域与$CD4^+$辅助T细胞的细胞内信号传导结构域相同。在一些实施方案中,$CD8^+$细胞毒性T细胞的细胞内信号传导结构域与$CD4^+$辅助T细胞的细胞内信号传导结构域不同。

[0300] 在一些实施方案中,CAR涵盖在胞质部分中的一个或多个(例如,两个或更多个)共刺激结构域和激活结构域(例如,初级激活结构域)。示例性CAR包括CD3ζ、CD28和4-1BB的细胞内组分。

[0301] 在一些实施方案中,由所提供的病毒载体内的一种或多种核酸(例如,一种或多种多核苷酸)编码的一种或多种重组受体(例如,CAR)进一步包括一种或多种标记,例如用于确认要表达受体的细胞的转导或工程化和/或对表达由多核苷酸编码的一种或多种分子的细胞的选择和/或靶向的目的。在一些方面,这种标记可以由不同的核酸或多核苷酸编码,所述核酸或多核苷酸也可以在基因工程化过程期间被引入,通常通过相同的方法(例如,通过本文所提供的任何方法转导,例如通过相同的载体或相同类型的载体转导)被引入。

[0302] 在一些方面,标记(例如,转导标记)是蛋白质和/或是细胞表面分子。示例性标记是天然存在的(例如,内源性)标记(如天然存在的细胞表面分子)的截短的变体。在一些方面,与天然或内源细胞表面分子相比,变体具有降低的免疫原性、降低的运输功能和/或降低的信号传导功能。在一些实施方案中,标记是细胞表面受体的截短形式,如截短的EGFR(tEGFR)。在一些方面,标记包括CD34、NGFR或表皮生长因子受体的全部或部分(例如,截短

形式)(例如,tEGFR)。在一些实施方案中,编码标记的核酸与编码接头序列(如可切割的接头序列,例如T2A、P2A、E2A和/或F2A)的多核苷酸可操作地连接。参见例如,WO 2014/031687。

[0303] 在一些实施方案中,标记是并非在T细胞上天然发现或并非在T细胞表面上天然发现的分子(例如,细胞表面蛋白)或其部分。

[0304] 在一些实施方案中,分子是非自身分子,例如非自身蛋白质,即并非被将细胞过继转移至其中的宿主的免疫系统识别为"自身"的分子。

[0305] 在一些实施方案中,标记不提供治疗功能和/或不产生除了用作基因工程化标记(例如,用于选择成功工程化的细胞)以外的作用。在其他实施方案中,标记可以是治疗性分子或原本发挥一定所需作用的分子,如在体内所遇到的细胞的配体,如共刺激或免疫检查点分子,以增强和/或减弱细胞在过继转移和遇到配体后的反应。

[0306] 在一些情况下,CAR被称为第一代、第二代和/或第三代CAR。在一些方面,第一代CAR是在抗原结合后仅提供CD3链诱导的信号的CAR;在一些方面,第二代CAR是提供这种信号和共刺激信号的CAR,如包括来自共刺激受体(如CD28或CD137)的细胞内信号传导结构域的CAR;在一些方面,第三代CAR是在一些方面包括不同共刺激受体的多个共刺激结构域的CAR。

[0307] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体包括细胞外配体结合部分(如抗原结合部分,如抗体或其片段)和细胞内结构域。在一些实施方案中,抗体或片段包括scFv或单结构域VH抗体,并且细胞内结构域含有ITAM。在一些方面中,细胞内信号传导结构域包括CD3-zeta(CD3ζ)链的ζ链的信号传导结构域。在一些实施方案中,嵌合抗原受体包括连接和/或设置在细胞外结构域与细胞内信号传导区域或结构域之间的跨膜结构域。

[0308] 在一些方面,跨膜结构域含有CD28的跨膜部分。细胞外结构域和跨膜可以直接或间接连接。在一些实施方案中,细胞外结构域和跨膜通过间隔子(如本文描述的任何间隔子)连接。在一些实施方案中,嵌合抗原受体含有T细胞共刺激分子的细胞内结构域,如在跨膜结构域与细胞内信号传导结构域之间。在一些方面,T细胞共刺激分子是CD28或4-1BB。

[0309] 在一些实施方案中,CAR含有抗体(例如,抗体片段)、跨膜结构域(其是或含有CD28的跨膜部分或其功能变体)以及细胞内信号传导结构域(含有CD28的信号传导部分或其功能变体和CD3ζ的信号传导部分或其功能变体)。在一些实施方案中,CAR含有抗体(例如,抗体片段)、跨膜结构域(其是或含有CD28的跨膜部分或其功能变体)以及细胞内信号传导结构域(含有4-1BB的信号传导部分或其功能变体和CD3ζ的信号传导部分或其功能变体)。在一些此类实施方案中,受体进一步包括含有Ig分子(如人Ig分子)的一部分(如Ig铰链,例如IgG4铰链)的间隔子,如仅铰链间隔子。

[0310] 在一些实施方案中,受体(例如,CAR)的跨膜结构域是人CD28的跨膜结构域或其变体,例如人CD28(登录号:P10747.1)的27个氨基酸的跨膜结构域,或者是包含SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:15展现出至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或更高序列同一性的氨基酸序列的跨膜结构域;在一些实施方案中,含有重组受体的一部分的跨膜结构域包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列或与其具有至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0311] 在一些实施方案中，嵌合抗原受体含有T细胞共刺激分子的细胞内结构域。在一些方面，T细胞共刺激分子是CD28或4-1BB。

[0312] 在一些实施方案中，细胞内结构域包含人CD28的胞内共刺激信号传导结构域或其功能变体或部分，如其41个氨基酸的结构域，和/或在天然CD28蛋白的位置186-187处具有LL至GG取代的这种结构域。在一些实施方案中，细胞内信号传导区域和/或结构域可以包含SEQ ID NO:17或18所示的氨基酸序列，或与SEQ ID NO:17或18展现出至少或至少约85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％或更高序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，细胞内区域和/或结构域包含4-1BB的细胞内共刺激信号传导结构域或其功能变体，如人4-1BB(登录号Q07011.1)的42氨基酸胞质结构域或其功能变体或部分，如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:19展现出至少或至少约85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0313] 在一些实施方案中，细胞内信号传导区域和/或结构域包含人CD3链、任选地CD3ζ刺激信号传导结构域或其功能变体，如人CD3ζ(登录号:P20963.2)的亚型3的112个AA的胞质结构域或如美国专利号7,446,190或美国专利号8,911,993中所述的CD3ζ信号传导结构域。在一些实施方案中，细胞内信号传导区域包含SEQ ID NO:20、21或22所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:20、21或22展现出至少或至少约85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0314] 在一些方面，间隔子仅含有IgG的铰链区，如仅IgG4或IgG1的铰链，如SEQ ID NO:8所示的仅铰链的间隔子。在其他实施方案中，间隔子是与CH2和/或CH3结构域连接的Ig铰链，例如IgG4铰链。在一些实施方案中，间隔子是与C_H2和C_H3结构域连接的Ig铰链，例如IgG4铰链，如SEQ ID NO:10所示。在一些实施方案中，间隔子是仅与C_H3结构域连接的Ig铰链，例如IgG4铰链，如SEQ ID NO:11所示。在一些实施方案中，间隔子是或包括富甘氨酸-丝氨酸的序列或其他柔性接头，如已知的柔性接头。

[0315] 例如，在一些实施方案中，CAR包括:细胞外配体结合部分(如抗原结合部分，如抗体或其片段，包括sdAb和scFv)，其特异性结合抗原，例如本文所述的抗原;间隔子，如任何含有Ig铰链的间隔子;跨膜结构域，其是CD28的一部分或其变体;细胞内信号传导结构域，其含有CD28的信号传导部分或其功能变体;以及CD3ζ信号传导结构域的信号传导部分或其功能变体。在一些实施方案中，CAR包括:细胞外配体结合部分(如抗原结合部分，如抗体或其片段，包括sdAb和scFv)，其特异性结合抗原，例如本文所述的抗原;间隔子，如任何含有Ig铰链的间隔子;跨膜结构域，其是CD28的一部分或其变体;细胞内信号传导结构域，其含有4-1BB的信号传导部分或其功能变体;以及CD3ζ信号传导结构域的信号传导部分或其功能变体。

[0316] 在一些实施方案中，此类CAR构建体例如在CAR的下游进一步包括T2A核糖体跳跃元件和/或tEGFR序列。在一些实施方案中，编码此类CAR构建体的核酸分子例如在编码CAR的序列的下游进一步包括编码核糖体跳跃元件(例如，T2A)的序列，然后是编码tEGFR序列的序列。在一些实施方案中，还可以产生表达抗原受体(例如，CAR)的T细胞以表达截短的EGFR(EGFRt)作为非免疫原性选择表位(例如，通过引入编码由T2A核糖体开关隔开的CAR和EGFRt的构建体以从相同构建体表达两种蛋白质)，然后可以使用所述截短的EGFR作为标记

来检测此类细胞(参见例如,美国专利号8,802,374)。在一些情况下,肽(如T2A)可以引起核糖体跳过(核糖体跳跃)2A元件C末端处的肽键的合成,从而导致2A序列末端与下游的下一个肽之间的分离(参见例如,de Felipe.Genetic Vaccines and Ther.2:13(2004)和deFelipe等人Traffic 5:616-626(2004))。已知许多2A元件。可以用于本文公开的方法和核酸中的2A序列的例子包括但不限于来自口蹄疫病毒的2A序列(F2A)、来自马甲型鼻炎病毒的2A序列(E2A)、来自明脉扁刺蛾β四体病毒(Thosea asigna virus)的2A序列(T2A)和来自猪捷申病毒-1的2A序列(P2A),如美国专利公开号20070116690中所述。

[0317] 由施用于受试者的细胞表达的重组受体(如CAR)通常识别或特异性结合至在所治疗的疾病或病症或其细胞中表达、与所治疗的疾病或病症或其细胞相关和/或为所治疗的疾病或病症或其细胞所特有的分子。在与分子(例如,抗原)特异性结合后,受体通常将免疫刺激信号(如ITAM转导的信号)递送到细胞中,从而促进靶向疾病或病症的免疫反应。例如,在一些实施方案中,细胞表达CAR,其与由疾病或病症的细胞或组织表达的或和疾病或病症相关的抗原特异性结合。

b.T细胞受体(TCR)

[0318] 在一些实施方案中,由一种或多种核酸(例如,多核苷酸)编码的一种或多种重组分子是或包括重组T细胞受体(TCR)。在一些实施方案中,重组TCR对抗原具特异性,所述抗原通常是存在于靶细胞上的抗原(如肿瘤特异性抗原)、在与自身免疫性或炎性疾病关联的特定细胞类型上表达的抗原或源自病毒病原体或细菌病原体的抗原。在一些实施方案中,提供了工程化细胞(如T细胞),其表达识别靶多肽(如肿瘤、病毒或自身免疫蛋白的抗原)的肽表位或T细胞表位的TCR或其抗原结合部分。在一些实施方案中,TCR与和疾病或病症相关的抗原特异性结合或者与通用标签特异性结合。在一些实施方案中,抗原与疾病或病症相关,所述疾病或病症如癌症、自身免疫性疾病或障碍或者感染性疾病。

[0319] 在一些实施方案中,“T细胞受体”或“TCR”是含有可变α和β链(也分别称为TCRα和TCRβ)或可变γ和δ链(也分别称为TCRα和TCRβ)的分子或其抗原结合部分,并且其能够与结合至MHC分子的肽特异性结合。在一些实施方案中,TCR呈αβ形式。通常,以αβ和γδ形式存在的TCR一般在结构上相似,但是表达它们的T细胞可以具有不同的解剖位置或功能。TCR可以在细胞的表面上发现或以可溶形式发现。通常,发现TCR在T细胞(或T淋巴细胞)的表面上,在此处它通常负责识别结合至主要组织相容性复合物(MHC)分子的抗原。

[0320] 除非另有说明,否则术语“TCR”应理解为涵盖完整的TCR以及其抗原结合部分或其抗原结合片段。在一些实施方案中,TCR是完整或全长TCR,包括呈αβ形式或γδ形式的TCR。在一些实施方案中,TCR是这样的抗原结合部分,其少于全长TCR但与在MHC分子中结合的特定肽结合(如与MHC-肽复合物结合)。在一些情况下,TCR的抗原结合部分或片段可以仅含有全长或完整TCR的结构性结构域的一部分,但是仍能够结合与完整TCR结合的肽表位(如MHC-肽复合物)。在一些情况下,抗原结合部分含有TCR的可变结构域(如TCR的可变α链和可变β链),足以形成用于与特定MHC-肽复合物结合的结合位点。通常,TCR的可变链含有参与肽、MHC和/或MHC-肽复合物的识别的互补决定区。

[0321] 在一些实施方案中,TCR的可变结构域含有超变环或互补决定区(CDR),其通常是抗原识别和结合能力和特异性的主要贡献者。在一些实施方案中,TCR的CDR或其组合形成给定TCR分子的全部或基本上全部的抗原结合位点。TCR链的可变区内的各个CDR通常由框

架区(FR)隔开,与CDR相比,所述框架区通常在TCR分子之间展示较低可变性(参见例如,Jores等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.U.S.A.87:9138,1990;Chothia等人,EMBO J.7:3745,1988;还参见Lefranc等人,Dev.Comp.Immunol.27:55,2003)。在一些实施方案中,CDR3是负责抗原结合或特异性的主要CDR,或者是在给定TCR可变区的用于肽-MHC复合物的加工肽部分的抗原识别和/或用于与其相互作用的三个CDR中最重要的CDR。在一些情境下,α链的CDR1可以与某些抗原肽的N末端部分相互作用。在一些情境下,β链的CDR1可以与肽的C末端部分相互作用。在一些情境下,CDR2对与MHC-肽复合物的MHC部分的相互作用或识别具有最强的作用或者是主要的负责CDR。在一些实施方案中,β链的可变区可以含有另外的高变区(CDR4或HVR4),其通常参与超抗原结合而非抗原识别(Kotb(1995)Clinical Microbiology Reviews,8:411-426)。

[0322] 在一些实施方案中,TCR还可以含有恒定结构域、跨膜结构域和/或短胞质尾(参见例如,Janeway等人,Immunobiology:The Immune System in Health and Disease,第3版,Current Biology Publications,第4页:33,1997)。在一些方面,TCR的每条链可以具有一个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、跨膜区和位于C末端的短胞质尾。在一些实施方案中,TCR与参与介导信号转导的CD3复合物的不变蛋白质缔合。

[0323] 在一些实施方案中,TCR链含有一个或多个恒定结构域。例如,给定TCR链(例如,α链或β链)的细胞外部分可以含有与细胞膜相邻的两个免疫球蛋白样结构域,如可变结构域(例如,Vα或Vβ;通常为基于Kabat编号的氨基酸1至116,Kabat等人,"Sequences of Proteins of Immunological Interest",US Dept.Health and Human Services,Public Health Service National Institutes of Health,1991,第5版)和恒定结构域(例如,α链恒定结构域或Cα,通常为基于Kabat编号的链的位置117至259;或β链恒定结构域或C_{β},通常为基于Kabat的链的位置117至295)。例如,在一些情况下,由两条链形成的TCR的细胞外部分含有两个膜近端恒定结构域和两个膜远端可变结构域,其中可变结构域各自含有CDR。TCR的恒定结构域可含有短连接序列,其中半胱氨酸残基形成二硫键,由此连接TCR的两条链。在一些实施方案中,TCR可在每条α和β链中具有另外的半胱氨酸残基,使得TCR在恒定结构域中含有两个二硫键。

[0324] 在一些实施方案中,TCR链含有跨膜结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域带正电荷。在一些情况下,TCR链含有胞质尾。在一些情况下,结构允许TCR与其他分子(如CD3和其亚基)缔合。例如,含有恒定结构域与跨膜区的TCR可以将蛋白质锚定在细胞膜中并与CD3信号传导设备或复合物的不变亚基缔合。CD3信号传导亚基(例如,CD3γ、CD3δ、CD3ε和CD3ζ链)的细胞内尾含有TCR复合物的信号传导能力中所涉及的一个或多个基于免疫受体酪氨酸的激活基序或ITAM。

[0325] 在一些实施方案中,TCR可以是两条链α和β(或者任选地γ和δ)的异二聚体,或者其可以是单链TCR构建体。在一些实施方案中,TCR是含有两条单独链(α和β链或γ和δ链)的异二聚体,所述链是通过如一个或多个二硫键连接。

[0326] 在一些实施方案中,TCR可以从一个或多个已知的TCR序列(如Vα,β链的序列)产生,所述一个或多个已知的TCR序列的基本上全长的编码序列是易于获得的。用于从细胞来源获得全长TCR序列(包括V链序列)的方法是熟知的。在一些实施方案中,编码TCR的核酸(例如,多核苷酸)可以从多种来源获得,如通过一种或多种给定细胞内的或从所述一种或

多种给定细胞分离的编码TCR的核酸(例如,多核苷酸)的聚合酶链式反应(PCR)扩增获得,或者通过公众可获得的TCR DNA序列的合成获得。

[0327] 在一些实施方案中,TCR是从生物来源获得,如来自细胞(如来自T细胞(例如,细胞毒性T细胞))、T细胞杂交瘤或其他公众可获得的来源。在一些实施方案中,T细胞可以从体内分离的细胞获得。在一些实施方案中,TCR是胸腺选择的TCR。在一些实施方案中,TCR是新表位限制性TCR。在一些实施方案中,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,TCR或其抗原结合部分或其抗原结合片段可以根据对TCR序列的知识以合成方式产生。

[0328] 在一些实施方案中,TCR是从通过针对靶多肽抗原或其靶T细胞表位筛选候选TCR文库而鉴定或选择的TCR产生的。TCR文库可以通过扩增来自T细胞的Vα和Vβ库来产生,所述T细胞是从受试者分离,包括存在于PBMC、脾或其他淋巴器官中的细胞。在一些情况下,T细胞可以从肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)扩增。在一些实施方案中,TCR文库可以从CD4+或CD8+细胞产生。在一些实施方案中,TCR可以从正常或健康受试者的T细胞来源(即,正常TCR文库)扩增。在一些实施方案中,TCR可以从患病受试者的T细胞来源扩增,即患病TCR文库。在一些实施方案中,使用简并引物扩增Vα和Vβ的基因库,如通过在从人获得的样品(如T细胞)中进行RT-PCR。在一些实施方案中,scTv文库可以从天然Vα和Vβ文库组装,其中扩增的产物被克隆或组装以由接头隔开。取决于受试者和细胞的来源,文库可以是HLA等位基因特异性的。可替代地,在一些实施方案中,TCR文库可以通过亲本或支架TCR分子的诱变或多样化产生。在一些方面,使TCR经受例如α或β链的定向进化,如通过诱变来进行。在一些方面,TCR的CDR内的特定残基被改变。在一些实施方案中,可以通过亲和力成熟来修饰经选择的TCR。在一些实施方案中,可以选择抗原特异性T细胞,如通过筛选以评估针对肽的CTL活性。在一些方面,可以选择例如存在于抗原特异性T细胞上的TCR,如通过对抗原的结合活性(例如,特定亲和力或亲合力)来选择。

[0329] 在一些实施方案中,基因工程化抗原受体包括重组T细胞受体(TCR)和/或从天然存在的T细胞克隆的TCR。在一些实施方案中,TCR是已经从天然存在的T细胞克隆的TCR。在一些实施方案中,从患者鉴定并分离靶抗原(例如,癌抗原)的高亲和力T细胞克隆,并将其引入细胞中。在一些实施方案中,已经在用人免疫系统基因(例如,人白细胞抗原系统或HLA)工程化的转基因小鼠中产生针对靶抗原的TCR克隆。参见例如,肿瘤抗原(参见例如,Parkhurst等人(2009)Clin Cancer Res.15:169-180和Cohen等人(2005)J Immunol.175:5799-5808)。在一些实施方案中,使用噬菌体展示来分离针对靶抗原的TCR(参见例如,Varela-Rohena等人(2008)Nat Med.14:1390-1395和Li(2005)Nat Biotechnol.23:349-354)。在一些实施方案中,TCR或其抗原结合部分是已经修饰或工程化的。在一些实施方案中,使用定向进化方法来产生具有改变的特性如具有较高的对特定MHC-肽复合物的亲和力的TCR。在一些实施方案中,通过展示方法实现定向进化,所述展示方法包括但不限于酵母展示(Holler等人(2003)Nat Immunol,4,55-62;Holler等人(2000)Proc Natl Acad Sci U S A,97,5387-92);噬菌体展示(Li等人(2005)Nat Biotechnol,23,349-54)或T细胞展示(Chervin等人(2008)J Immunol Methods,339,175-84)。在一些实施方案中,展示途径涉及工程化或修饰已知的亲本或参考TCR。例如,在一些情况下,野生型TCR可以用作模板以用于产生诱变的TCR,其中CDR的一个或多个残基被突变,并且选择具有所需改变的特性(如对所

需靶抗原具有更高的亲和力)的突变体。

[0330] 在一些实施方案中,用于在产生或生成目的TCR中使用的靶多肽的肽是已知的或可以由熟练技术人员容易地鉴定。在一些实施方案中,适用于在产生TCR或抗原结合部分中使用的肽可以基于目的靶多肽(如下文所述的靶多肽)中HLA限制性基序的存在来确定。在一些实施方案中,使用可用的计算机预测模型来鉴定肽。在一些实施方案中,对于预测MHC I类结合位点,此类模型包括但不限于ProPred1(Singh和Raghava(2001)Bioinformatics 17(12):1236-1237)和SYFPEITHI(参见Schuler等人(2007)Immunoinformatics Methods in Molecular Biology,409(1):75-93 2007)。在一些实施方案中,MHC限制性表位是HLA-A0201,其在所有高加索人的大约39%-46%中表达,并且因此代表用于制备TCR或其他MHC-肽结合分子的MHC抗原的合适选择。

[0331] 使用计算机预测模型的蛋白酶体和免疫蛋白酶体的HLA-A0201结合基序和切割位点是已知的。用于预测MHC I类结合位点的此类模型包括但不限于ProPred1(更详细地描述于Singh和Raghava,ProPred:prediction of HLA-DR binding sites.BIOINFORMATICS 17(12):1236-1237 2001)和SYFPEITHI(参见Schuler等人SYFPEITHI Database for Searching and T-Cell Epitope Prediction.,Immunoinformatics Methods in Molecular Biology,第409卷(1):75-93 2007)。

[0332] 在一些实施方案中,TCR或其抗原结合部分可以是重组产生的天然蛋白质或其突变形式(其中一种或多种特性(如结合特征)已经被改变)。在一些实施方案中,TCR可以源自各种动物物种之一,如人、小鼠、大鼠或其他哺乳动物。TCR可以是细胞结合的或呈可溶形式。在一些实施方案中,出于所提供的方法的目的,TCR呈在细胞的表面上表达的细胞结合形式。

[0333] 在一些实施方案中,TCR是全长TCR。在一些实施方案中,TCR是抗原结合部分。在一些实施方案中,TCR是二聚TCR(dTCR)。在一些实施方案中,TCR是单链TCR(sc-TCR)。在一些实施方案中,dTCR或scTCR具有如WO 03/020763、WO 04/033685和WO 2011/044186中所述的结构。

[0334] 在一些实施方案中,TCR含有对应于跨膜序列的序列。在一些实施方案中,TCR确实含有对应于胞质序列的序列。在一些实施方案中,TCR能够与CD3形成TCR复合物。在一些实施方案中,任何TCR(包括dTCR或scTCR)可以与在T细胞的表面上产生活性TCR的信号传导结构域连接。在一些实施方案中,TCR在细胞的表面上表达。

[0335] 在一些实施方案中,dTCR含有第一多肽(其中对应于TCRα链可变区序列的序列与对应于TCRα链恒定区细胞外序列的序列的N末端融合)和第二多肽(其中对应于TCRβ链可变区序列的序列与对应于TCRβ链恒定区细胞外序列的序列的N末端融合),第一和第二多肽通过二硫键连接。在一些实施方案中,键可以对应于天然二聚αβTCR中存在的天然链间二硫键。在一些实施方案中,链间二硫键不存在于天然TCR中。例如,在一些实施方案中,可以将一个或多个半胱氨酸掺入dTCR多肽对的恒定区细胞外序列中。在一些情况下,可能需要天然和非天然二硫键两者。在一些实施方案中,TCR含有跨膜序列以锚定至膜。

[0336] 在一些实施方案中,dTCR含有TCRα链(含有可变α结构域、恒定α结构域和附着于恒定α结构域C末端的第一二聚化基序)和TCRβ链(包含可变β结构域、恒定β结构域和附着于恒定β结构域C末端的第一二聚化基序),其中第一和第二二聚化基序易于相互作用以在第一

二聚化基序的氨基酸与第二二聚化基序的氨基酸之间形成共价键，从而将TCRα链与TCRβ链连接在一起。

[0337] 在一些实施方案中，TCR是scTCR。通常，可以使用已知的方法产生scTCR。参见例如，Soo Hoo,W.F.等人PNAS(USA)89,4759(1992)；Wülfing,C.和Plückthun,A.,J.Mol.Biol.242,655(1994)；Kurucz,I.等人PNAS(USA)90 3830(1993)；国际公开PCT号WO 96/13593、WO 96/18105、WO 99/60120、WO 99/18129、WO 03/020763、WO 2011/044186；和Schlueter,C.J.等人J.Mol.Biol.256,859(1996)。在一些实施方案中，scTCR含有引入的非天然链间二硫键以促进TCR链的缔合(参见例如，国际公开PCT号WO 03/020763)。在一些实施方案中，scTCR是非二硫键连接的截短的TCR，其中与其C末端融合的异源亮氨酸拉链促进链缔合(参见例如，国际公开PCT号WO 99/60120)。在一些实施方案中，scTCR含有经由肽接头与TCRβ可变结构域共价连接的TCRα可变结构域(参见例如，国际公开PCT号WO 99/18129)。

[0338] 在一些实施方案中，scTCR含有由对应于TCRα链可变区的氨基酸序列构成的第一区段、由对应于TCRβ链可变区序列的氨基酸序列构成的第二区段(融合至对应于TCRβ链恒定结构域细胞外序列的氨基酸序列的N末端)和将第一区段的C末端连接至第二区段的N末端的接头序列。

[0339] 在一些实施方案中，scTCR含有第一区段(其由与α链细胞外恒定结构域序列的N末端融合的α链可变区序列构成)和第二区段(其由与序列β链细胞外恒定和跨膜序列的N末端融合的β链可变区序列构成)以及任选地接头序列(其将第一区段的C末端连接至第二区段的N末端)。

[0340] 在一些实施方案中，scTCR含有第一区段(其由与β链细胞外恒定结构域序列的N末端融合的TCRβ链可变区序列构成)和第二区段(其由与序列α链细胞外恒定和跨膜序列的N末端融合的α链可变区序列构成)以及任选地接头序列(其将第一区段的C末端连接至第二区段的N末端)。

[0341] 在一些实施方案中，scTCR的连接第一和第二TCR区段的接头可以是能够形成单多肽链同时保留TCR结合特异性的任何接头。在一些实施方案中，接头序列可例如具有式-P-AA-P-，其中P是脯氨酸并且AA代表氨基酸序列，其中氨基酸是甘氨酸和丝氨酸。在一些实施方案中，第一和第二区段配对，使得其可变区序列定向用于这种结合。因此，在一些情况下，接头具有足够的长度以跨越第一区段的C末端与第二区段的N末端之间的距离，或反之亦然，但是不能太长以阻断或减少scTCR与靶配体的结合。在一些实施方案中，接头可以含有从或从约10至45个氨基酸，如10至30个氨基酸或26至41个氨基酸残基，例如29、30、31或32个氨基酸。在一些实施方案中，接头具有式-PGGG-$(SGGGG)_5$-P-，其中P是脯氨酸，G是甘氨酸，并且S是丝氨酸(SEQ ID NO:29)。在一些实施方案中，接头具有序列GSADDAKKDAAKKDGKS(SEQ ID NO:30)

[0342] 在一些实施方案中，scTCR含有共价二硫键，其将α链的恒定结构域的免疫球蛋白区域的残基连接至β链的恒定结构域的免疫球蛋白区域的残基。在一些实施方案中，天然TCR中不存在链间二硫键。例如，在一些实施方案中，可以将一个或多个半胱氨酸掺入scTCR多肽的第一和第二区段的恒定区细胞外序列中。在一些情况下，可能需要天然和非天然二硫键两者。

[0343] 在含有引入的链间二硫键的dTCR或scTCR的一些实施方案中，不存在天然二硫键。在一些实施方案中，用形成天然链间二硫键的一个或多个天然半胱氨酸取代另一残基，如取代丝氨酸或丙氨酸。在一些实施方案中，可以通过使第一和第二区段上的非半胱氨酸残基突变为半胱氨酸来形成引入的二硫键。TCR的示例性非天然二硫键描述于公开的国际PCT号WO 2006/000830中。

[0344] 在一些实施方案中，TCR或其抗原结合片段对靶抗原以平衡结合常数展现出亲和力，所述平衡结合常数在或在约10-5与10-12M之间以及其中的所有单独值和范围。在一些实施方案中，靶抗原是MHC-肽复合物或配体。

[0345] 在一些实施方案中，编码TCR(如α和β链)的一种或多种核酸(例如，一种或多种多核苷酸)可以通过PCR、克隆或其他合适的方法扩增，并且克隆到一种或多种合适的表达载体中。表达载体可以是任何合适的重组表达载体，并且可以用于转化或转染任何合适的宿主。合适的载体包括设计用于繁殖和扩增或用于表达或用于两者的那些，如质粒和病毒。

[0346] 在一些实施方案中，载体可以是如下系列的载体：pUC系列(Fermentas Life Sciences)、pBluescript系列(Stratagene，加利福尼亚州拉霍亚)、pET系列(Novagen，威斯康星州麦迪逊)、pGEX系列(Pharmacia Biotech，瑞典乌普萨拉)或pEX系列(Clontech，加利福尼亚州帕罗奥图)。在一些情况下，也可以使用噬菌体载体，如λG10、λGT11、λZapII(Stratagene)、λEMBL4和λNM1149。在一些实施方案中，可以使用植物表达载体，并且包括pBI01、pBI101.2、pBI101.3、pBI121和pBIN19(Clontech)。在一些实施方案中，动物表达载体包括pEUK-C1、pMAM和pMAMneo(Clontech)。在一些实施方案中，使用病毒载体，如逆转录病毒载体。

[0347] 在一些实施方案中，可以使用标准重组DNA技术来制备重组表达载体。在一些实施方案中，载体可以含有调节序列，如转录和翻译起始和终止密码子，其对引入载体的宿主(例如，细菌、真菌、植物或动物)的类型具特异性，酌情并考虑载体是基于DNA还是基于RNA。在一些实施方案中，载体可以含有非天然启动子，其与编码TCR或抗原结合部分(或其他MHC-肽结合分子)的核苷酸序列可操作地连接。在一些实施方案中，启动子可以是非病毒启动子或病毒启动子，如巨细胞病毒(CMV)启动子、SV40启动子、RSV启动子或在鼠干细胞病毒的长末端重复序列中发现的启动子。还设想其他已知的启动子。

[0348] 在一些实施方案中，在获得T细胞克隆之后，将TCRα和β链分离并克隆到基因表达载体中。在一些实施方案中，TCRα和β基因经由小核糖核酸病毒2A核糖体跳跃肽连接，使得两条链共表达。在一些实施方案中，编码TCR的核酸(例如，多核苷酸)进一步包括标记以确认细胞经转导或工程化而表达受体。在一些实施方案中，TCR的遗传转移是通过逆转录病毒或慢病毒载体或通过转座子完成(参见例如，Baum等人(2006)Molecular Therapy:The Journal of the American Society of Gene Therapy.13:1050-1063;Frecha等人(2010)Molecular Therapy:The Journal of the American Society of Gene Therapy.18:1748-1757;和Hackett等人(2010)Molecular Therapy:The Journal of the American Society of Gene Therapy.18:674-683)。

[0349] 在一些实施方案中，为了产生编码TCR的载体，将α和β链从表达目的TCR的T细胞克隆分离的总cDNA进行PCR扩增，并将其克隆到表达载体中。在一些实施方案中，将α和β链克隆到同一载体中。在一些实施方案中，将α和β链克隆到不同的载体中。在一些实施方案中，

将所产生的α和β链掺入逆转录病毒(例如,慢病毒)载体中。

c.嵌合自身抗体受体(CAAR)

[0350] 在一些实施方案中,重组受体是嵌合自身抗体受体(CAAR)。在一些实施方案中,CAAR对自身抗体具有特异性。在一些实施方案中,表达CAAR的细胞(如工程化以表达CAAR的T细胞)可以用于特异性结合并杀伤表达自身抗体的细胞,但不杀伤表达正常抗体的细胞。在一些实施方案中,表达CAAR的细胞可以用于治疗与自身抗原的表达相关的自身免疫性疾病,如自身免疫性疾病。在一些实施方案中,表达CAAR的细胞可以靶向最终产生自身抗体并在其细胞表面上展示自身抗体的B细胞,将这些B细胞标记为用于治疗性干预的疾病特异性靶标。在一些实施方案中,CAAR表达细胞可以用于通过使用抗原特异性嵌合自身抗体受体靶向引起疾病的B细胞,有效靶向和杀伤自身免疫性疾病中的致病性B细胞。在一些实施方案中,重组受体是CAAR,如美国专利申请公开号US 2017/0051035中所述的任何一种。

[0351] 在一些实施方案中,CAAR包含自身抗体结合结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导区。在一些实施方案中,细胞内信号传导区包含细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域是或包括初级信号传导结构域、能够在T细胞中诱导初级激活信号的信号传导结构域、T细胞受体(TCR)组分的信号传导结构域和/或包含基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)的信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞内信号传导区包含次级或共刺激信号传导区(次级细胞内信号传导区)。

[0352] 在一些实施方案中,自身抗体结合结构域包含自身抗原或其片段。自身抗原的选择可以取决于所靶向的自身抗体的类型。例如,自身抗原的选择可能是由于其识别与特定疾病状态(例如,自身免疫性疾病,如自身抗体介导的自身免疫性疾病)相关的靶细胞(如B细胞)上的自身抗体。在一些实施方案中,自身免疫性疾病包括寻常型天疱疮(PV)。示例性自身抗原包括桥粒芯糖蛋白1(Dsg1)和Dsg3。

d.多靶向

[0353] 在一些实施方案中,细胞和方法包括多靶向策略,如在细胞上表达两种或更多种基因工程化受体,每种受体识别相同或不同的抗原,并且通常各自包括不同的细胞内信号传导组分。此类多靶向策略描述于例如以下文献中:国际专利申请公开号WO2014055668A1(描述激活和共刺激CAR的组合,例如,靶向单独存在于脱靶(例如,正常细胞)上,但仅一起存在于待治疗疾病或病症的细胞上的两种不同抗原)和Fedorov等人,Sci.Transl.Medicine,5(215)(2013年12月)(描述表达激活和抑制性CAR的细胞,如这样的细胞,其中激活CAR与同时在正常或非患病细胞和待治疗疾病或病症的细胞上表达的一种抗原结合,并且抑制性CAR与仅在正常细胞或不希望治疗的细胞上表达的另一种抗原结合)。

[0354] 例如,在一些实施方案中,细胞包括表达第一基因工程化抗原受体(例如,CAR或TCR)的受体,其通常在与由第一受体识别的抗原(例如,第一抗原)特异性结合后能够诱导激活或刺激信号至细胞。在一些实施方案中,细胞进一步包括第二基因工程化抗原受体(例如,CAR或TCR),例如嵌合共刺激受体,所述受体通常在与由第二受体识别的第二抗原特异性结合后,能够将共刺激信号诱导至免疫细胞。在一些实施方案中,第一抗原与第二抗原是相同的。在一些实施方案中,第一抗原与第二抗原是不同的。

[0355] 在一些实施方案中,第一和/或第二基因工程化抗原受体(例如,CAR或TCR)能够诱

导激活或刺激信号至细胞。在一些实施方案中，受体包括含有ITAM或ITAM样基序的细胞内信号传导组分。在一些实施方案中，由第一受体诱导的激活涉及信号转导或细胞中蛋白质表达的变化，导致启动免疫反应(如ITAM磷酸化)和/或启动ITAM介导的信号转导级联、形成免疫突触和/或所结合受体(例如，CD4或CD8等)附近的分子的聚簇、激活一种或多种转录因子(如NF-κB和/或AP-1)和/或诱导因子(如细胞因子)的基因表达、增殖和/或存活。

[0356] 在一些实施方案中，第一和/或第二受体包括共刺激受体的细胞内信号传导结构域，所述共刺激受体如CD28、CD137(4-1BB)、OX40和/或ICOS。在一些实施方案中，第一受体和第二受体包括不同的共刺激受体的细胞内信号传导结构域。在一个实施方案中，第一受体含有CD28共刺激信号传导区，并且第二受体含有4-1BB共刺激信号传导区，或反之亦然。

[0357] 在一些实施方案中，第一和/或第二受体包括含有ITAM或ITAM样基序的细胞内信号传导结构域和共刺激受体的细胞内信号传导结构域两者。

[0358] 在一些实施方案中，第一受体含有包含ITAM或ITAM样基序的细胞内信号传导结构域，并且第二受体含有共刺激受体的细胞内信号传导结构域。与在同一细胞中诱导的激活或刺激信号组合的共刺激信号是导致免疫反应的共刺激信号，所述免疫反应如稳健且持续的免疫反应，如增加的基因表达，细胞因子和其他因子的分泌，以及T细胞介导的效应子功能(如细胞杀伤)。

[0359] 在一些实施方案中，单独的第一受体的连接和单独的第二受体的连接都不会诱导稳健的免疫反应。在一些方面，如果仅连接一个受体，则细胞变得耐受抗原或对抗原无反应，或被抑制，和/或不被诱导增殖或分泌因子或实现效应子功能。然而，在一些此类实施方案中，在连接多个受体时，如在遇到表达第一和第二抗原的细胞时，实现所需反应，如完全免疫激活或刺激，例如如通过一种或多种细胞因子的分泌、增殖、持久性和/或执行免疫效应子功能(如靶细胞的细胞毒性杀伤)所指示的。

[0360] 在一些实施方案中，两种受体分别将激活和抑制信号诱导至细胞，使得一种受体与其抗原的结合激活细胞或诱导反应，但是第二抑制性受体与其抗原的结合诱导了抑制或减弱该反应的信号。例子是激活性CAR与抑制性CAR或iCAR的组合。例如，可以使用这种策略，其中激活性CAR结合在疾病或病症中表达但也在正常细胞上表达的抗原，并且抑制性受体与在正常细胞上表达但不在疾病或病症的细胞上表达的单独抗原结合。

[0361] 在一些实施方案中，多靶向策略用于如下情况，其中与特定疾病或病症相关的抗原在未患病细胞上表达和/或在工程化细胞本身上表达，所述表达为瞬时表达(例如，在与基因工程化相关的刺激后)或永久表达。在此类情况下，通过需要连接两个分开的和单独特异性抗原受体，可以改善特异性、选择性和/或功效。

[0362] 在一些实施方案中，多种抗原(例如，第一和第二抗原)在所靶向的细胞、组织或疾病或病症上(如在癌细胞上)表达。在一些方面，细胞、组织、疾病或病症是多发性骨髓瘤或多发性骨髓瘤细胞。在一些实施方案中，多种抗原中的一种或多种通常也在不需要用细胞疗法靶向的细胞(如正常或未患病细胞或组织，和/或工程化细胞本身)上表达。在此类实施方案中，通过需要连接多个受体以实现细胞的反应，实现特异性和/或功效。

e.其他调节元件

[0363] 在本文提供的方法和组合物的一些实施方案中，包含在病毒载体基因组中的编码重组受体(如抗原受体，例如CAR)的核酸(例如，多核苷酸)序列与其他遗传元件(例如，包括

启动子或增强子在内的转录调节序列)以功能关系可操作地连接,以便以特定方式调节目的序列的表达。在某些情形中,此类转录调节序列是关于活性在时间和/或空间上受调节的那些。可以用于调节组分表达的表达控制元件是已知的,并且包括但不限于诱导型启动子、组成型启动子、分泌信号、增强子和其他调节元件。在一些实施方案中,病毒载体基因组中所含的核酸(例如,多核苷酸)序列含有多个表达控制元件,其控制所编码的不同组分,例如不同的受体组分和/或信号传导组分,使得重组受体和/或工程化细胞(例如,表达工程化受体的细胞)的表达、功能和/或活性可以被调节,例如是可诱导的、可抑制的、可调节的和/或用户控制的。在一些实施方案中,一种或多种载体可以含有一种或多种核酸(例如,多核苷酸)序列,所述(例如,多核苷酸)核酸序列含有一种或多种表达控制元件和/或一种或多种所编码组分,使得核酸序列一起可以调节所编码组分(例如,重组受体)或工程化细胞的表达、活性和/或功能。

[0364] 在一些实施方案中,编码重组受体(如抗原受体,例如CAR)的核酸(例如,多核苷酸)序列与内部启动子/增强子调节序列可操作地连接。所采用的启动子在用于指导所引入DNA区段的高水平表达的适当条件下可以是组成型的、组织特异性的、诱导型的和/或有用的。启动子可以是异源的或内源的。在一些实施方案中,合成地产生启动子和/或增强子。在一些实施方案中,使用重组克隆和/或核酸扩增技术产生启动子和/或增强子。

[0365] 在一些情况下,编码重组受体的核酸(例如,多核苷酸)序列含有编码信号肽的信号序列。在一些方面,信号序列可以编码源自天然多肽的信号肽。在其他方面,信号序列可以编码异源或非天然信号肽,如SEQ ID NO:32所示并且由SEQ ID NO:31所示核苷酸序列编码的GMCSFRα链的示例性信号肽。在一些情况下,编码重组受体(例如,嵌合抗原受体(CAR))的核酸(例如,多核苷酸)序列含有编码信号肽的信号序列。信号肽的非限制性示例性例子包括例如SEQ ID NO:32所示并且由SEQ ID NO:31所示核苷酸序列编码的GMCSFRα链信号肽,或SEQ ID NO:33所示的CD8α信号肽。

[0366] 在一些实施方案中,编码重组受体的多核苷酸含有至少一个启动子,所述启动子可操作连接以控制重组受体的表达。在一些例子中,多核苷酸含有两个、三个或更多个启动子,所述启动子可操作地连接以控制重组受体的表达。

[0367] 在核酸分子编码两种或更多种不同多肽链(例如,重组受体和标记)的某些情况下,每条多肽链可以由单独的核酸分子编码。例如,提供了两种单独的核酸,并且每一种可以单独转移到或引入细胞中以在细胞中表达。在一些实施方案中,编码重组受体的核酸和编码标记的核酸与相同的启动子可操作地连接,并且任选地由内部核糖体进入位点(IRES)或编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽(其任选地是T2A、P2A、E2A或F2A)的核酸隔开。在一些实施方案中,编码标记的核酸和编码重组受体的核酸与两个不同的启动子可操作地连接。在一些实施方案中,编码标记的核酸和编码重组受体的核酸存在或插入于细胞基因组内的不同位置。在一些实施方案中,诸如通过逆转录病毒转导、转染或转化将编码重组受体的多核苷酸引入含有培养细胞的组合物中。

[0368] 在一些实施方案中,如多核苷酸含有第一和第二核酸序列的那些实施方案中,编码不同多肽链中的每一种的编码序列可以与相同或不同的启动子可操作地连接。在一些实施方案中,核酸分子可以含有驱动两条或更多条不同多肽链表达的启动子。在一些实施方案中,此类核酸分子可以是多顺反子的(双顺反子的或三顺反子的,参见例如美国专利号6,

060,273)。在一些实施方案中,可以将转录单位工程化为含有IRES(内部核糖体进入位点)的双顺反子单元,其允许通过来自单一启动子的信息共表达基因产物(例如,编码标记和编码重组受体)。可替代地,在一些情况下,单一启动子可以引导RNA的表达,所述RNA在单一开放阅读框(ORF)中含有两个或三个基因(例如,编码标记和编码重组受体),所述基因通过编码自切割肽(例如,2A序列)的序列或蛋白酶识别位点(例如,弗林蛋白酶(furin))彼此分开。因此,ORF编码单个多肽,其在翻译期间(在2A的情况下)或翻译后被加工成单个蛋白质。在一些情况下,肽(如T2A)可引起核糖体跳过2A元件C末端处肽键的合成(核糖体跳跃),导致2A序列末端与下游的下一个肽之间分开(参见例如,de Felipe,Genetic Vaccines and Ther.2:13(2004)和de Felipe等人Traffic 5:616-626(2004))。各种2A元件是已知的。可以用于本文公开的方法和系统中的2A序列的例子包括但不限于来自如下病毒的2A序列:口蹄疫病毒(F2A,例如SEQ ID NO:28)、马鼻炎A病毒(E2A,例如SEQ ID NO:27)、明脉扁刺蛾β四体病毒(T2A,例如SEQ ID NO:13或24)和猪捷申病毒-1(P2A,例如SEQ ID NO:25或26),如美国专利公开号20070116690中所述。

[0369] 本文所述的任何重组受体可以由呈任何组合或排列的含有编码重组受体的一种或多种核酸序列的多核苷酸编码。例如,一种、两种、三种或更多种多核苷酸可以编码一种、两种、三种或更多种不同的多肽,例如重组受体。在一些实施方案中,一种载体或构建体含有编码标记的核酸序列,并且单独的载体或构建体含有编码重组受体(例如,CAR)的核酸序列。在一些实施方案中,编码标记的核酸和编码重组受体的核酸与两种不同的启动子可操作地连接。在一些实施方案中,编码重组受体的核酸存在于编码标记的核酸的下游。

[0370] 在一些实施方案中,载体骨架含有编码一种或多种标记的核酸序列。在一些实施方案中,所述一种或多种标记是转导标记、替代标记和/或选择标记。

[0371] 在一些实施方案中,标记是转导标记或替代标记。转导标记或替代标记可用于检测已经引入多核苷酸(例如,编码重组受体的多核苷酸)的细胞。在一些实施方案中,转导标记可以指示或确认对细胞的修饰。在一些实施方案中,替代标记是制备以在细胞表面上与重组受体(例如,CAR)共表达的蛋白质。在特定实施方案中,这种替代标记是已经修饰以具有极少或无活性的表面蛋白。在某些实施方案中,替代标记是由编码重组受体的相同多核苷酸编码。在一些实施方案中,编码重组受体的核酸序列与编码标记的核酸序列可操作地连接,任选地由内部核糖体进入位点(IRES)或编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽(如2A序列,如T2A、P2A、E2A或F2A)的核酸隔开。在一些情况下,外在标记基因可以结合工程化细胞用于允许检测或选择细胞,并且在一些情况下还可以用于促进细胞自杀。

[0372] 示例性替代标记可以包括截短的细胞表面多肽,如截短的人表皮生长因子受体2(tHER2)、截短的表皮生长因子受体(EGFRt,SEQ ID NO:14或23所示的示例性EGFRt序列)或前列腺特异性膜抗原(PSMA)或其经修饰形式。EGFRt可含有由抗体西妥昔单抗(Erbitux®)或其他治疗性抗EGFR抗体或结合分子识别的表位,其可以用于鉴定或选择已经用EGFRt构建体和重组受体(如嵌合抗原受体(CAR))工程化的细胞,和/或用于消除或分离表达受体的细胞。参见美国专利号8,802,374和Liu等人,Nature Biotech.2016年4月;34(4):430-434。在一些方面,标记(例如,替代标记)包括全部或部分(例如,截短形式的)CD34、NGFR或表皮生长因子受体(例如,tEGFR)。在一些实施方案中,编码标记的核酸与编码接头序列(如可切割接头序列,例如T2A)的多核苷酸可操作地连接。例如,标记和任选地接头序列可以是如

PCT公开号WO 2014031687中披露的任一种。例如，标记可以是截短的EGFR(tEGFR)，其任选地连接至接头序列，如T2A可切割接头序列。截短的EGFR(例如，tEGFR)的示例性多肽包含SEQ ID NO:14或23所示的氨基酸序列或者与SEQ ID NO:14或23展现出至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0373] 在一些实施方案中，标记是或包括荧光蛋白，如绿色荧光蛋白(GFP)、增强型绿色荧光蛋白(EGFP)(如超折叠GFP)、红色荧光蛋白(RFP)(如tdTomato、mCherry、mStrawberry、AsRed2、DsRed或DsRed2)、青色荧光蛋白(CFP)、蓝绿色荧光蛋白(BFP)、增强型蓝色荧光蛋白(EBFP)和/或黄色荧光蛋白(YFP)和/或其变体，包括荧光蛋白的物种变体、单体变体和密码子优化的和/或增强的变体。在一些实施方案中，标记是或包括酶(如萤光素酶)、来自大肠杆菌的lacZ基因、碱性磷酸酶、分泌型胚胎碱性磷酸酶(SEAP)和/或氯霉素乙酰转移酶(CAT)。示例性发光报告基因包括萤光素酶(luc)、β-半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、β-葡萄糖醛酸酶(GUS)或其变体。

[0374] 在一些实施方案中，标记是选择标记。在一些实施方案中，选择标记是或包括赋予对外源药剂或药物的抗性的多肽。在一些实施方案中，选择标记是抗生素抗性基因。在一些实施方案中，选择标记是向哺乳动物细胞赋予抗生素抗性的抗生素抗性基因。在一些实施方案中，选择标记是或包括嘌呤霉素抗性基因、潮霉素抗性基因、杀稻瘟菌素抗性基因、新霉素抗性基因、遗传霉素抗性基因或博莱霉素抗性基因或其修饰形式。

[0375] 另外的核酸(例如，用于引入的基因)包括用于改善治疗功效的那些，如通过促进转移细胞的活力和/或功能；用于提供选择和/或评估细胞(如用于评估体内存活或定位)的遗传标记的基因；改善安全性的基因，例如通过使细胞在体内对阴性选择易感，如Lupton S.D.等人，Mol.and Cell Biol.，11:6(1991)；和Riddell等人，Human Gene Therapy 3:319-338(1992)所述；还参见Lupton等人的PCT/US91/08442和PCT/US94/05601的出版物，其描述了通过将显性阳性选择性标记与阴性选择性标记融合而得到的双功能选择性融合基因的使用。参见例如，Riddell等人，美国专利号6,040,177，第14-17栏。

[0376] 在一些实施方案中，启动子和/或增强子可以是与核酸序列天然缔合的启动子和/或增强子，如可以通过分离位于编码区段和/或外显子上游的5'非编码序列获得的。可替代地，在一些实施方案中，可以将编码核酸区段定位在重组和/或异源启动子和/或增强子的控制下，所述重组和/或异源启动子和/或增强子在自然环境中通常不与编码核酸序列缔合。例如，用于重组DNA构建的示例性启动子包括但不限于β-内酰胺酶(青霉素酶)、乳糖、色氨酸(trp)、RNA聚合酶(pol)III启动子(包括人和鼠U6 pol III启动子以及人和鼠H1 RNA pol III启动子)、RNA聚合酶(pol)II启动子、巨细胞病毒立即早期启动子(pCMV)、延伸因子-1α(EF-1α)和劳斯肉瘤病毒长末端重复启动子(pRSV)启动子系统。在一些实施方案中，启动子可以例如从病毒的基因组获得，所述病毒如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒、牛乳头瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙型肝炎病毒和/或猿猴病毒40(SV40)。启动子也可以是，例如，异源哺乳动物启动子，例如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子、热激启动子或通常与天然序列相关的启动子，条件是此类启动子与靶细胞相容。在一个实施方案中，启动子是病毒表达系统中的天然存在的病毒启动子。

[0377] 在一些实施方案中，启动子可以具有组成性活性。可以使用的组成型启动子的非

限制性例子包括以下的启动子:泛素(美国专利号5,510,474;WO 98/32869)、CMV(Thomsen等人,PNAS 81:659,1984;美国专利号5,168,062)、β-肌动蛋白(Gunning等人1989Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:4831-4835)和pgk(参见例如,Adra等人1987Gene 60:65-74;Singer-Sam等人1984Gene 32:409-417;和Dobson等人1982Nucleic Acids Res.10:2635-2637)。

[0378] 在一些实施方案中,启动子可以是组织特异性启动子和/或靶细胞特异性启动子。在一些实施方案中,可以选择启动子以允许可诱导地表达目的序列。已知许多用于可诱导表达的系统,包括四环素反应系统、lac操纵子-阻遏物系统、以及对多种环境或生理变化有响应的启动子,包括热休克、金属离子(如金属硫蛋白启动子)、干扰素、低氧、类固醇(如孕酮或糖皮质激素受体启动子)、辐射(如VEGF启动子)。在一些实施方案中,基于大肠杆菌(Escherichia coli)的tet抑制(tetr)对tet操纵基因序列(TECO)的抑制作用的四环素-(tet)可调节系统可以被修饰用于在哺乳动物系统中使用并用作表达盒的可调节元件。这些系统是熟知的。(参见Goshen和Badgered,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:5547-51(1992);Shockett等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:6522-26(1996);Lindemann等人,Mol.Med.3:466-76(1997))。

[0379] 启动子的组合也可以用于获得目的基因的所需表达。普通技术人员将能够基于基因在目的生物或靶细胞中的所需表达模式来选择启动子。

[0380] 在一些实施方案中,增强子也可以存在于病毒构建物中以增加目的基因的表达。增强子通常是顺式作用核酸元件,长度通常为约10至300by,其作用于启动子以增加其转录。病毒基因组中的许多增强子(如HIV或CMV)是已知的。例如,可以使用CMV增强子(Boshart等人Cell,41:521,1985)。其他例子包括例如复制起点晚期侧(bp 100-270)的SV40增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、复制起点晚期侧的多瘤病毒增强子和腺病毒增强子。在一些情况下,增强子来自哺乳动物基因,如来自球蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、甲胎蛋白或胰岛素的增强子。增强子可以与异源启动子组合使用。可以将增强子剪接到载体中,在编码目的基因的多核苷酸序列的5'或3'位置,但通常位于启动子的5'位点。本领域普通技术人员将能够基于所需表达模式来选择适当的增强子。

[0381] 病毒载体基因组还可以含有另外的遗传元件。可以被包括在构建体中的元件的类型不以任何方式受到限制,并且可以由本领域技术人员选择。

[0382] 例如,可以包括促进病毒基因组核进入靶细胞的信号。这种信号的例子是HIV-1拍动信号(flap signal)(在一些情况下称为拍动序列)。另外,载体基因组可含有一种或多种设计用于增强目的基因表达的遗传元件。在一些实施方案中,基因组含有转录后调节元件(PRE)或其展现转录后活性的经修饰形式。例如,在一些实施方案中,可以将土拨鼠肝炎病毒转录后响应元件(WPRE)置入构建体中(Zufferey等人1999.J.Virol.74:3668-3681;Deglon等人2000.Hum.Gene Ther.11:179-190)。在一些实施方案中,载体基因组缺乏拍动序列和/或缺乏WPRE。在一些实施方案中,载体基因组含有突变或缺陷的拍动序列和/或WPRE。

[0383] 在一些情形中,可以包括超过一个的编码单独的异源蛋白的开放阅读框。例如,在一些实施方案中,如果报告基因和/或可检测和/或可选择基因被包括在表达构建体中,则可以包括内部核糖体进入位点(IRES)序列。通常,另外的遗传元件与独立的启动子/增强子

可操作地连接并受其控制。另外的遗传元件可以是报告基因、可选择标记或其他所需基因。

[0384] 在一些实施方案中，其他各种调节元件可以包括转录起始区和/或终止区。表达载体还可以含有用于终止转录和用于稳定mRNA的序列。此类序列是已知的并且通常天然存在于真核或病毒DNA或cDNA的5'和偶尔3'非翻译区中。转录终止区的例子包括但不限于多腺苷酸化信号序列。多腺苷酸化信号序列的例子包括但不限于牛生长激素(BGH)聚(A)、SV40晚期聚(A)、兔β-球蛋白(RBG)聚(A)、胸苷激酶(TK)聚(A)序列及其任何变体。

[0385] 在一些实施方案中，调节元件可以包括允许重组受体(例如，CAR)的可调节表达和/或活性的调节元件和/或系统。在一些实施方案中，可调节的表达和/或活性是通过将重组受体配置成含有特定调节元件和/或系统或受所述调节元件和/或系统控制来实现。在一些实施方案中，一种或多种另外的受体可以用于表达调节系统中。在一些实施方案中，表达调节系统可以包括需要暴露于特定配体或结合特定配体的系统，所述配体可以调节重组受体的表达和/或活性。在一些实施方案中，重组受体(例如，CAR)的受调节表达是通过可调节的转录因子释放系统(例如，经修饰的Notch信号传导系统)来实现(参见例如，Roybal等人，Cell(2016)164:770-779;Morsut等人，Cell(2016)164:780-791)。在一些实施方案中，对重组受体活性的调节是通过施用另外的药剂来实现，所述另外的药剂可以诱导多肽(例如，重组受体)的构象变化和/或多聚化。在一些实施方案中，另外的药剂是化学诱导剂(参见例如，美国专利公开号2016/0046700;Clackson等人(1998)Proc Natl Acad Sci U S A.95(18):10437-42;Spencer等人(1993)Science 262(5136):1019-24;Farrar等人(1996)Nature 383(6596):178-81;Miyamoto等人(2012)Nature Chemical Biology 8(5):465-70;Erhart等人(2013)Chemistry and Biology 20(4):549-57)。

3.病毒载体颗粒的制备

[0386] 病毒载体基因组通常以质粒形式构建，其可以转染到包装细胞系或生产细胞系中。可以使用多种已知方法中的任何一种来产生逆转录病毒颗粒，其基因组含有病毒载体基因组的RNA拷贝。在一些实施方案中，至少两种组分参与制备基于病毒的基因递送系统：第一，包装质粒，包括结构蛋白以及产生病毒载体颗粒所必需的酶，第二，病毒载体本身，即，要转移的遗传物质。可以在设计这些组分之一或两者时引入生物安全保护措施。

[0387] 在一些实施方案中，包装质粒可以含有除了包膜蛋白以外的所有逆转录病毒(如HIV-1)蛋白(Naldini等人，1998)。在其他实施方案中，病毒载体可能缺乏另外的病毒基因(如与毒力有关的那些，例如vpr、vif、vpu和nef和/或Tat(HIV的主要反式激活因子))。在一些实施方案中，慢病毒载体(如基于HIV的慢病毒载体)仅包含三种亲本病毒的基因：gag、pol和rev，这减少或消除了野生型病毒通过重组而重构的可能性。

[0388] 在一些实施方案中，将病毒载体基因组引入包装细胞系中，所述细胞系含有将从病毒载体基因组转录的病毒基因组RNA包装至病毒颗粒中所需的所有组分。可替代地，除了所述一种或多种目的序列(例如，重组核酸)以外，病毒载体基因组可以包含一种或多种编码病毒组分的基因。然而，在一些方面，为了防止基因组在靶细胞中复制，将复制所需的内源病毒基因去除，并且在包装细胞系中分开提供。

[0389] 在一些实施方案中，用含有产生颗粒所必需的组分的一种或多种质粒载体转染包装细胞系。在一些实施方案中，用含有病毒载体基因组(包括LTR、顺式作用包装序列和目的序列，即编码抗原受体(如CAR)的核酸)的质粒；以及编码病毒酶和/或结构组分(如Gag、pol

和/或rev)的一种或多种辅助质粒转染包装细胞系。在一些实施方案中,利用多个载体分离产生逆转录病毒载体颗粒的各种遗传组分。在一些此类实施方案中,向包装细胞提供单独的载体减少了重组事件的可能性,否则可能产生有复制能力的病毒。在一些实施方案中,可以使用具有所有逆转录病毒组分的单个质粒载体。

[0390] 在一些实施方案中,将逆转录病毒载体颗粒(如慢病毒载体颗粒)假型化以增加宿主细胞的转导效率。在一些实施方案中,病毒载体颗粒(例如,慢病毒载体颗粒)被病毒包膜糖蛋白假型化。例如,在一些实施方案中,将逆转录病毒载体颗粒(如慢病毒载体颗粒)用VSV-G糖蛋白假型化,其提供宽细胞宿主范围,从而扩增可以转导的细胞类型。在一些实施方案中,用编码非天然包膜糖蛋白的质粒或多核苷酸转染包装细胞系,诸如以包括嗜异性、多嗜性或双嗜性包膜,如辛德比斯病毒包膜、GALV或VSV-G。

[0391] 在一些实施方案中,包装细胞系提供将病毒基因组RNA包装至慢病毒载体颗粒中反式作用所需的组分,包括病毒调节蛋白和结构蛋白。在一些实施方案中,包装细胞系可以是能够表达慢病毒蛋白并产生功能性慢病毒载体颗粒的任何细胞系。在一些方面,合适的包装细胞系包括293(ATCC CCL X)、293T、HeLA(ATCC CCL 2)、D17(ATCC CCL 183)、MDCK(ATCC CCL 34)、BHK(ATCC CCL-10)和Cf2Th(ATCC CRL 1430)细胞。

[0392] 在一些实施方案中,包装细胞系稳定地表达一种或多种病毒蛋白质。例如,在一些方面,可以构建含有gag、pol、rev和/或其他结构基因但没有LTR和包装组分的包装细胞系。在一些实施方案中,可以用编码一种或多种病毒蛋白的核酸分子以及含有编码异源蛋白的核酸分子的病毒载体基因组和/或编码包膜糖蛋白的核酸对包装细胞系进行瞬时转染。

[0393] 在一些实施方案中,将病毒载体和包装质粒和/或辅助质粒通过转染或感染引入包装细胞系中。包装细胞系产生含有病毒载体基因组的病毒载体颗粒。用于转染或感染的方法是熟知的。非限制性例子包括磷酸钙、DEAE-葡聚糖和脂质转染方法、电穿孔和显微注射。

[0394] 在将重组质粒和逆转录病毒LTR和包装序列引入特殊细胞系(例如,通过磷酸钙沉淀)中时,包装序列可以允许待包装至病毒颗粒中的重组质粒的RNA转录,然后所述病毒颗粒可能会被分泌到培养基中。在一些实施方案中,随后收集含有重组逆转录病毒的培养基,任选地将其浓缩,并用于基因转移。例如,在一些方面,在将包装质粒和转移载体共转染至包装细胞系后,从培养基回收病毒载体颗粒,并通过本领域技术人员使用的标准方法进行滴定。

[0395] 在一些实施方案中,可以通过引入质粒以允许产生慢病毒颗粒,而在包装细胞系(如示例性HEK 293T细胞系)中产生逆转录病毒载体,如慢病毒载体。在一些实施方案中,包装细胞被转染和/或含有编码gag和pol的多核苷酸,以及编码重组受体(如抗原受体,例如CAR)的多核苷酸。在一些实施方案中,包装细胞系被任选地和/或另外用编码rev蛋白的多核苷酸转染和/或含有所述多核苷酸。在一些实施方案中,包装细胞系被任选地和/或另外用编码非天然包膜糖蛋白(如VSV-G)的多核苷酸转染和/或含有所述多核苷酸。在一些此类实施方案中,在转染细胞(例如,HEK 293T细胞)后大约两天,细胞上清液含有可以回收并滴定的重组慢病毒载体。

[0396] 所回收和/或产生的逆转录病毒载体颗粒可以用于使用如所述的方法转导靶细胞。一旦进入靶细胞中,病毒RNA就被逆转录,进入细胞核中并稳定整合到宿主基因组中。在

病毒RNA整合后一天或两天,可以检测到重组蛋白(例如,抗原受体,如CAR)的表达。

D.转导

[0397] 在任何所提供的实施方案中,所提供的方法涉及通过使病毒载体颗粒与包含多个细胞的细胞组合物接触(例如,一起孵育)来转导细胞的方法。在一些实施方案中,输入组合物是或包含从受试者获得的原代细胞,如从受试者中富集和/或选择的细胞和/或在刺激条件下孵育的细胞。在一些实施方案中,包含多个细胞的细胞组合物是或包含针对标记(如CCR7)的阳性表面表达选择和/或富集的细胞。在一些实施方案中,包含多个细胞的细胞组合物是或包含针对CCR7的阳性表面表达选择和/或富集,并且在刺激条件下孵育的细胞(在下文中也称为"经刺激的组合物")。在一些实施方案中,细胞组合物是或包括经刺激的组合物。

[0398] 在一些实施方案中,细胞组合物包含从受试者获得的原代细胞。在一些方面,样品是全血样品、血沉棕黄层样品、外周血单核细胞(PBMC)样品、未分级T细胞样品、淋巴细胞样品、白细胞样品、单采术产物或白细胞单采术产物。在一些实施方案中,在细胞的选择、刺激和/或转导之前,使含有原代细胞的样品与如下浓度的血清或血浆离体接触或者所述样品含有如下浓度的血清或血浆:至少或至少约10%(v/v)、至少或至少约15%(v/v)、至少或至少约20%(v/v)、至少或至少约25%(v/v)、至少或至少约30%(v/v)、至少或至少约35%(v/v)、至少或至少约40%(v/v)或者至少或至少约50%。在一些实施方案中,样品含有血清或血浆,所述血清或血浆的浓度为或大致为约或至少约25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%或35%(v/v)。在一些实施方案中,血清或血浆是人的。在一些实施方案中,血清或血浆对于受试者是自体的。在一些实施方案中,在细胞的选择、刺激和/或转导之前,使含有原代细胞的样品与抗凝血剂接触或者所述样品含有抗凝血剂。在一些实施方案中,抗凝血剂是或含有游离柠檬酸根离子,例如抗凝血剂柠檬酸盐右旋糖溶液,溶液A(ACD-A)。在一些实施方案中,在细胞的选择、刺激和/或转导之前,将样品维持在从或从约2℃至8℃的温度下长达48小时,如长达12小时、24小时或36小时。

[0399] 在一些实施方案中,细胞组合物包含和/或富含CCR7+细胞,如CCR7+T细胞。在一些实施方案中,细胞组合物包含和/或富含T细胞,包括CD4+和/或CD8+T细胞。在一些实施方案中,细胞组合物包含和/或富含CCR7+CD4+T细胞、CCR7+CD8+T细胞、CCR7+CD3+T细胞或CCR7+CD4+CD8+T细胞。在一些方面,富集可以通过基于亲和力的选择,通过将原代细胞与一种或多种选择或亲和试剂一起孵育来进行,所述选择或亲和试剂与原代细胞亚群上表达的细胞表面分子特异性结合,从而基于与选择试剂的结合来富集原代细胞。在一些实施方案中,富集可以通过将细胞与抗体包被的颗粒(例如,磁珠)一起孵育来进行。

[0400] 在一些实施方案中,细胞组合物包含大于或大于约75%、80%、85%、90%或95%或更多的从受试者的样品获得的T细胞。在一些实施方案中,在通过将细胞与病毒载体颗粒一起孵育来转导它们之前,未在刺激条件下孵育细胞组合物。在一些方面,在孵育之前,细胞组合物的不超过5%、10%、20%、30%或40%的T细胞是经激活的细胞,例如表达选自HLA-DR、CD25、CD69、CD71、CD40L和4-1BB的表面标记;包括选自IL-2、IFN-γ和TNF-α的细胞因子的细胞内表达;处于细胞周期的G1期或较后期;和/或能够增殖。在一些实施方案中,含有此类细胞(例如,在孵育和/或接触之前未经受用一种或多种刺激剂离体刺激的细胞)的细胞组合物是大于20%、30%、40%、50%、60%或70%或更多的细胞表达低密度脂质受体

(LDL-R)的细胞组合物。在一些实施方案中,针对T细胞(如也呈CD4+和/或CD8+的CCR7+T细胞)富集和/或选择细胞组合物,并且在所述孵育之前,大于20%、30%、40%、50%、60%或70%或更多的T细胞表达低密度脂质受体(LDL-R)。

[0401] 在一些实施方案中,在通过将细胞与病毒载体颗粒一起孵育来转导它们之前,在刺激条件下孵育细胞组合物(例如,经刺激的组合物)。在一些方面,在孵育之前,细胞组合物的至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%的T细胞是经激活的细胞,例如表达选自HLA-DR、CD25、CD69、CD71、CD40L和4-1BB的表面标记;包括选自IL-2、IFN-γ和TNF-α的细胞因子的细胞内表达;处于细胞周期的G1期或较后期;和/或能够增殖。在一些方面,在孵育之前,细胞组合物的至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%或至少60%的T细胞是经激活的细胞,例如表达选自HLA-DR、CD25、CD69、CD71、CD40L和4-1BB的表面标记;包括选自IL-2、IFN-γ和TNF-α的细胞因子的细胞内表达;处于细胞周期的G1期或较后期;和/或能够增殖。

[0402] 在一些实施方案中,在孵育和/或接触期间或在孵育和/或接触的至少一部分期间,细胞组合物可以包含一种或多种细胞因子。在一些实施方案中,细胞因子选自IL-2、IL-7或IL-15。在一些实施方案中,细胞因子是重组细胞因子。在一些实施方案中,细胞组合物中细胞因子的浓度独立地从或从约1IU/mL至1500IU/mL,如从或从约1IU/mL至100IU/mL、2IU/mL至50IU/mL、5IU/mL至10IU/mL、10IU/mL至500IU/mL、50IU/mL至250IU/mL、100IU/mL至200IU/mL、50IU/mL至1500IU/mL、100IU/mL至1000IU/mL或200IU/mL至600IU/mL。在一些实施方案中,细胞组合物中细胞因子的浓度独立地为至少或至少约1IU/mL、5IU/mL、10IU/mL、50IU/mL、100IU/mL、200IU/mL、500IU/mL、1000IU/mL或1500IU/mL。在一些方面,也可以在孵育期间或在孵育的至少一部分期间或在孵育之后,包括能够激活TCR复合物的细胞内信号传导结构域的药剂(如抗CD3和/或抗CD28抗体)。

[0403] 在一些实施方案中,在孵育和/或接触期间或在孵育和/或接触的至少一部分期间,细胞组合物可以包含血清。在一些实施方案中,血清是胎牛血清。在一些实施方案中,血清是人血清。在一些实施方案中,血清以从或从约0.5%至25%(v/v)、1.0%至10%(v/v)或2.5%至5.0%(v/v)的浓度存于细胞组合物中,每个都包含端值。在一些实施方案中,血清以至少或至少约0.5%(v/v)、1.0%(v/v)、2.5%(v/v)、5%(v/v)或10%(v/v)的浓度存于细胞组合物中。

[0404] 在一些实施方案中,在孵育和/或接触期间或在孵育和/或接触的至少一部分期间,细胞组合物不含和/或基本上不含血清。在一些实施方案中,在孵育和/或接触期间或在孵育和/或接触的至少一部分期间,在不存在血清的情况下孵育和/或接触细胞组合物。在特定实施方案中,在孵育和/或接触期间或在孵育和/或接触的至少一部分期间,在无血清培养基中孵育和/或接触细胞组合物。在一些实施方案中,无血清培养基是定义的和/或明确定义的细胞培养基。在一些实施方案中,配制无血清培养基以支持某种细胞类型(如免疫细胞、T细胞和/或CD4+和CD8+T细胞)的细胞的生长、增殖、健康、稳态。

[0405] 在一些实施方案中,在孵育和/或接触期间或在孵育和/或接触的至少一部分期间,细胞组合物包含N-乙酰半胱氨酸。在一些实施方案中,细胞组合物中N-乙酰半胱氨酸的浓度为从或从约0.4mg/mL至4mg/mL、0.8mg/mL至3.6mg/mL或1.6mg/mL至2.4mg/mL,每个都包含端值。在一些实施方案中,细胞组合物中N-乙酰半胱氨酸的浓度为至少或至少约或约

0.4mg/mL、0.8mg/mL、1.2mg/mL、1.6mg/mL、2.0mg/mL、2.4mg/mL、2.8mg/mL、3.2mg/mL、3.6mg/mL或4.0mg/mL。

[0406] 在一些实施方案中，细胞组合物的细胞浓度为从或从约$1.0x10^5$个细胞/mL至$1.0x10^8$个细胞/mL，如至少或约至少或约$1.0x10^5$个细胞/mL、$5x10^5$个细胞/mL、$1x10^6$个细胞/mL、$5x10^6$个细胞/mL、$1x10^7$个细胞/mL、$5x10^7$个细胞/mL或$1x10^8$个细胞/mL。

[0407] 在一些实施方案中，细胞组合物(例如，经刺激的组合物)包含至少为或约至少或约$25x10^6$个细胞、$50x10^6$个细胞、$75x10^6$个细胞、$100x10^6$个细胞、$125x10^6$个细胞、$150x10^6$个细胞、$175x10^6$个细胞、$200x10^6$个细胞、$225x10^6$个细胞、$250x10^6$个细胞、$275x10^6$个细胞或$300x10^6$个细胞。例如，在一些实施方案中，细胞组合物(例如，经刺激的组合物)包含至少为或约至少或约$50x10^6$个细胞、$100x10^6$个细胞或$200x10^6$个细胞。

[0408] 在一些实施方案中，以病毒载体颗粒拷贝或其感染单位(IU)与细胞组合物中的细胞总数或待转导的细胞总数的某一比率(IU/细胞)来提供病毒载体颗粒。例如，在一些实施方案中，病毒载体颗粒在接触期间以为或约或至少或至少约每个细胞0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、30、40、50或60IU的病毒载体颗粒存在。

[0409] 在一些实施方案中，病毒载体颗粒的滴度在或在约$1x10^6$IU/mL与$1x10^8$IU/mL之间，如在或在约$5x10^6$IU/mL与$5x10^7$IU/mL之间，如至少$6x10^6$IU/mL、$7x10^6$IU/mL、$8x10^6$IU/mL、$9x10^6$IU/mL、$1x10^7$IU/mL、$2x10^7$IU/mL、$3x10^7$IU/mL、$4x10^7$IU/mL或$5x10^7$IU/mL。

[0410] 在一些实施方案中，可以按小于100(如通常小于60、50、40、30、20、10或5或更小)的感染复数(MOI)来实现转导。在一些实施方案中，将病毒载体颗粒在小于约20.0或者小于或小于约10.0的感染复数下孵育。在一些实施方案中，将病毒载体颗粒在从或从约1.0IU/细胞至10IU/细胞的感染复数下孵育；或者将病毒载体颗粒在至少或至少约1.6IU/细胞、1.8IU/细胞、2.0IU/细胞、2.4IU/细胞、2.8IU/细胞、3.2IU/细胞、3.6IU/细胞、4.0IU/细胞、5.0IU/细胞、6.0IU/细胞、7.0IU/细胞、8.0IU/细胞、9.0IU/细胞或10.0IU/细胞的感染复数下孵育。

[0411] 在一些实施方案中，所述方法涉及使细胞与病毒载体颗粒接触或一起孵育，如混合。在一些实施方案中，接触或孵育进行30分钟至72小时，如30分钟至48小时、30分钟至24小时或1小时至24小时，如至少或约至少30分钟、1小时、2小时、6小时、12小时、24小时或36小时或更长时间。

[0412] 在一些实施方案中，接触或孵育是在溶液中进行。在一些实施方案中，使细胞和病毒颗粒以如下体积接触：从或从约0.5mL至500mL，如从或从约0.5mL至200mL、0.5mL至100mL、0.5mL至50mL、0.5mL至10mL、0.5mL至5mL、5mL至500mL、5mL至200mL、5mL至100mL、5mL至50mL、5mL至10mL、10mL至500mL、10mL至200mL、10mL至100mL、10mL至50mL、50mL至500mL、50mL至200mL、50mL至100mL、100mL至500mL、100mL至200mL或200mL至500mL。

[0413] 在一些实施方案中，接触或孵育可以通过离心如旋转接种(例如，离心接种)来实现。在一些实施方案中，孵育病毒载体颗粒包括将病毒载体颗粒与组合物(例如，经刺激的组合物)一起旋转接种的步骤。在一些实施方案中，可以使含有细胞、病毒载体颗粒和试剂的组合物旋转，通常以相对较低的力或速度旋转，如速度低于用于使细胞沉淀的速度，如从或从约600rpm至1700rpm(例如，为或约或至少600rpm、1000rpm、1500rpm或1700rpm)。在一些实施方案中，旋转是以从或从约100g至3200g(例如，为或约或至少或至少约100g、200g、

300g、400g、500g、1000g、1500g、2000g、2500g、3000g或3200g)的力(例如,相对离心力)来进行,如例如在室或腔室的内壁或外壁处所测量。在包括将病毒载体颗粒与经刺激的组合物一起旋转接种的步骤的一些实施方案中,旋转接种步骤包括在离心室的内部腔室中旋转病毒载体颗粒和经刺激的组合物,其中旋转是在腔室侧壁的内表面处在如下相对离心力下进行,所述相对离心力是:(a)在或在约500g与2500g之间、500g与2000g之间、500g与1600g之间、500g与1000g之间、600g与1600g之间、600g与1000g之间、1000g与2000g之间或1000g与1600g之间,每个都包含端值;或者(b)至少或至少约600g、800g、1000g、1200g、1600g或2000g。术语"相对离心力"或RCF通常被理解为在如与旋转轴相比在空间的特定点处,相对于地球的重力,施加在物体或物质(如细胞、样品或团粒和/或所旋转的室或其他容器中的点)上的有效力。所述值可以使用熟知的公式来确定,所述公式考虑到重力、旋转速度和旋转半径(与旋转轴的距离以及测量RCF的物体、物质或颗粒)。

[0414] 在某些实施方案中,工程化、转导和/或转染的至少一部分在旋转,例如旋转接种和/或离心下进行。在一些实施方案中,将旋转进行、进行约、或进行至少或约5分钟、10分钟、15分钟、30分钟、60分钟、90分钟、1形式、2小时、3小时、4小时、6小时、8小时、12小时、24小时、48小时、72小时、2天、3天、4天、5天、6天,或进行至少7天。在一些实施方案中,将旋转进行或进行约60分钟。在一些实施方案中,旋转接种进行如下时间,所述时间是:(a)大于或约5分钟、大于或约10分钟、大于或约15分钟、大于或约20分钟、大于或约30分钟、大于或约45分钟、大于或约60分钟、大于或约90分钟或者大于或约120分钟;或者(b)在或在约5分钟与60分钟之间、10分钟与60分钟之间、15分钟与60分钟之间、15分钟与45分钟之间、30分钟与60分钟之间或45分钟与60分钟之间,每个都包含端值。在某些实施方案中,将旋转进行约30分钟。在一些实施方案中,将旋转在600g至700g之间,例如在或在约693g下进行约30分钟。

[0415] 在某些实施例中,工程化、转导和/或转染的至少一部分在如下体积(例如,旋转接种体积)下进行:从约5mL至约100mL,如从约10mL至约50mL、从约15mL至约45mL、从约20mL至约40mL、从约25mL至约35mL,或为或为约30mL。在某些实施方案中,旋转接种后的细胞团粒体积的范围为从约1mL至约25mL,如从约5mL至约20mL、从约5mL至约15mL、从约5mL至约10mL,或为或为约10mL。

[0416] 在一些实施方案中,细胞与病毒载体颗粒的孵育通过使组合物的一个或多个细胞与编码重组蛋白(例如,重组受体)的核酸分子接触来进行。在一些实施方案中,接触可以通过离心如旋转接种(例如,离心接种)来实现。此类方法包括如国际公开号WO2016/073602中所述的那些中的任一种。示例性离心室包括由Biosafe SA生产和销售的那些,包括用于Sepax®和Sepax®2系统的那些,包括A-200/F和A-200离心室以及用于此类系统的各种试剂盒。示例性室、系统以及处理仪器和机柜描述于例如以下文献中:美国专利号6,123,655、美国专利号6,733,433和公开的美国专利申请公开号US 2008/0171951,以及公开的国际专利申请公开号WO 00/38762,将其各自的内容通过引用以其整体并入本文。用于此类系统的示例性试剂盒包括但不限于由BioSafe SA以产品名CS-430.1、CS-490.1、CS-600.1或CS-900.2销售的一次性试剂盒。

[0417] 在一些实施方案中,细胞与病毒载体颗粒的孵育进一步包括使组合物(例如,经刺激的组合物)和/或病毒载体颗粒与转导佐剂接触。在一些实施方案中,组合物(例如,经刺

激的组合物)和/或病毒载体颗粒与转导佐剂的接触是在将病毒载体颗粒与组合物(例如,经刺激的组合物)一起旋转接种之前、同时或之后进行。

[0418] 在一些实施方案中,病毒载体颗粒的孵育的至少一部分是在或在约37℃±2℃下进行。例如,在一些实施方案中,病毒颗粒的孵育的至少一部分是在或在约35℃-39℃下进行。在一些实施方案中,在或在约37℃±2℃下进行的病毒载体颗粒的孵育的至少一部分进行不超过或不超过约2小时、4小时、12小时、18小时、24小时、30小时、36小时、48小时、60小时或72小时。在一些实施方案中,在或在约37℃±2℃下进行的病毒载体颗粒的孵育的至少一部分进行或进行约24小时。

[0419] 在一些实施方案中,病毒载体颗粒的孵育的至少一部分是在旋转接种之后进行。在一些实施方案中,在旋转接种之后进行的病毒载体颗粒的孵育的至少一部分进行不超过或不超过约2小时、4小时、12小时、18小时、24小时、30小时、36小时、48小时、60小时或72小时。在一些实施方案中,在旋转接种之后进行的病毒载体颗粒的孵育的至少一部分进行或进行约24小时。

[0420] 在一些实施方案中,病毒载体颗粒的孵育的总持续时间不超过12小时、24小时、36小时、48小时或72小时。

[0421] 在一些实施方案中,细胞与病毒载体颗粒的孵育导致或产生包含被病毒载体颗粒转导的细胞的输出组合物,其在本文中也被称为经转导的细胞群。因此,在一些实施方案中,经转导的细胞群包含被异源多核苷酸转导的T细胞。在一些实施方案中,经转导的细胞群中至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%或至少85%的T细胞被异源多核苷酸转导。在一些实施方案中,经转导的细胞群中至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%或至少85%的T细胞被异源多核苷酸转导。在一些实施方案中,至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的被异源多核苷酸转导的T细胞呈CCR7+。

[0422] 在一些实施方案中,经转导的细胞群包含至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的表达重组蛋白的细胞。在一些实施方案中,经转导的细胞群包含至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的表达重组蛋白的细胞。

[0423] 可以将通过如本文所述的方法(其包括针对CCR7+T细胞选择,或以其他方式转导富含CCR7+T细胞的T细胞群,例如如章节I-A中所述)产生的经转导的细胞群中细胞的百分比与通过除了缺少针对CCR7+T富集的步骤外相同的方法产生的经转导的细胞群中细胞的百分比进行比较。在一些实施方案中,与未通过选择步骤针对CCR7+原代T细胞富集的细胞组合物相比,在经转导的细胞群中细胞的百分比大至少0.5倍、至少1倍、至少1.5倍或至少2倍。在一些实施方案中,与未通过选择步骤针对CCR7+原代T细胞富集的细胞组合物相比,在经转导的细胞群中细胞的百分比大至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少100%、至少110%、至少120%、至少130%、至少140%、至少150%、至少160%、至少170%、至少180%、至少190%或至少200%。例如,如果经转导的细胞群中细胞的百分比为80%并且未针对CCR7+原代T细胞富集的细胞群中细胞的百分比为40%,则与未针对CCR7+原代T细胞富集的细胞群相比,经转导的细胞群中细胞的百分比

大100％。在一些实施方案中，与未通过选择步骤针对CCR7+原代T细胞富集的细胞组合物相比，在经转导的细胞群中表达重组蛋白的细胞的百分比大至少0.5倍、至少1倍、至少1.5倍或至少2倍。在一些实施方案中，与未通过选择步骤针对CCR7+原代T细胞富集的细胞组合物相比，在经转导的细胞群中表达重组蛋白的细胞的百分比大至少20％、至少30％、至少40％、至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少100％、至少110％、至少120％、至少130％、至少140％、至少150％、至少160％、至少170％、至少180％、至少190％或至少200％。

[0424] 在一些实施方案中，所述方法进一步包括一个或多个另外的步骤。在一些实施方案中，所述方法进一步包括从经转导的细胞群中回收或分离通过所述方法产生的经转导的细胞。在一些实施方案中，回收或分离包括针对重组蛋白(例如，CAR或TCR)的表达进行选择。

[0425] 可以将经转导的细胞群中被异源多核苷酸转导的T细胞的百分比与其他经转导的细胞群中经转导的T细胞的百分比进行比较，例如，可以比较多个经转导的细胞群中被异源多核苷酸转导的T细胞的百分比。在一些实施方案中，相对于多个群体之间的平均转导百分比，多个群体中经转导的T细胞的百分比之间的最大可变性小于50％、小于40％、小于30％、小于25％、小于20％、小于15％、小于10％或小于5％。例如，包括70％、80％和90％的转导百分比的多个经转导的细胞群具有12.5％的最大可变性。在一些实施方案中，多个经转导的细胞群包括至少5个、至少10个、至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个或至少100个经转导的细胞群。

E.进一步培育和扩增

[0426] 在一些实施方案中，所提供的方法包括用于培育工程化细胞(例如，在促进增殖和/或扩增的条件下培育细胞)的一个或多个步骤。在某些实施方案中，所提供的方法不包括用于培育工程化细胞的步骤。在某些实施方案中，与产生细胞的初始源细胞相比，在完成所述过程后存在更多数量的工程化细胞。在各种实施方案中，与产生细胞的初始源细胞相比，在完成所述过程后存在更少数量的工程化细胞。在一些实施方案中，在基因工程化(例如，通过转导或转染将重组多肽引入细胞)的步骤之后在促进增殖和/或扩增的条件下培育工程化细胞。在特定实施方案中，已经在刺激条件下孵育细胞并用多核苷酸(例如，编码重组蛋白的异源多核苷酸)转导或转染细胞之后培育细胞。在一些实施方案中，被培育的细胞是经转导的细胞群的细胞，例如如章节I-D中所述。在一些实施方案中，被培育的细胞是通过本文提供的任何方法产生的经转导的细胞群的细胞。在一些实施方案中，培育产生含有表达重组受体(例如，CAR)的经富集的T细胞的组合物的输出组合物。

[0427] 在一些实施方案中，将工程化细胞在容器中培养，所述容器可以例如经由补料端口填充细胞培养基和/或细胞以用于培养所添加细胞。细胞可以来自需要细胞培养(例如，以用于扩增和/或增殖细胞)的任何细胞来源。

[0428] 在一些方面，培养基是支持细胞(如T细胞)的生长、培育、扩增或增殖的适应性培养基。在一些方面，培养基可以是含有盐、氨基酸、维生素、糖或其任何组合的混合物的液体。在一些实施方案中，培养基进一步含有一种或多种刺激条件或刺激剂，如在孵育期间刺激细胞的培育、扩增或增殖。在一些实施方案中，刺激条件是或包括选自IL-2、IL-7或IL-15的一种或多种细胞因子。在一些实施方案中，细胞因子是重组细胞因子。在一些实施方案

中，在培养或孵育期间在培养基中的所述一种或多种细胞因子的浓度独立地为从或从约1IU/mL至1500IU/mL，如从或从约1IU/mL至100IU/mL、2IU/mL至50IU/mL、5IU/mL至10IU/mL、10IU/mL至500IU/mL、50IU/mL至250IU/mL或100IU/mL至200IU/mL、50IU/mL至1500IU/mL、100IU/mL至1000IU/mL或200IU/mL至600IU/mL。在一些实施方案中，所述一种或多种细胞因子的浓度独立地为至少或至少约1IU/mL、5IU/mL、10IU/mL、50IU/mL、100IU/mL、200IU/mL、500IU/mL、1000IU/mL或1500IU/mL。

[0429] 在一些方面，在转移工程化细胞和培养基之后，将细胞孵育至少一部分时间。在一些实施方案中，刺激条件通常包括适合于初级免疫细胞如人T淋巴细胞生长的温度，例如至少约25摄氏度，通常至少约30摄氏度，并且通常为或约37摄氏度。在一些实施方案中，在25至38摄氏度(如30至37摄氏度，例如为或约37摄氏度±2摄氏度)的温度下孵育细胞。在一些实施方案中，将孵育进行一段时间，直至培养(例如，培育或扩增)产生所需或阈值密度、数量或剂量的细胞。在一些实施方案中，孵育是大于或大于约或持续约或24小时、48小时、72小时、96小时、5天、6天、7天、8天或9天或更长时间。

[0430] 在一些实施方案中，在维持细胞培养中目标量的二氧化碳的条件下孵育细胞。在一些方面，这确保了细胞在生长期间的最佳培育、扩增和增殖。在一些方面，二氧化碳(CO_2)的量在所述气体的10％与0％(v/v)之间，如在所述气体的8％与2％(v/v)之间，例如为或约5％(v/v)CO_2的量。

[0431] 在一些实施方案中，通过如下方式来扩增T细胞：向培养起始组合物中添加饲养细胞(如非分裂外周血单核细胞(PBMC))(例如，使得针对待扩增的初始群体中每个T淋巴细胞，所得细胞群含有至少约5、10、20或40个或更多的PBMC饲养细胞)；以及孵育培养物(例如，持续足以扩增T细胞数量的时间)。在一些方面，非分裂饲养细胞可以包含γ辐照的PBMC饲养细胞。在一些实施方案中，用约3000至3600拉德范围内的γ射线辐照PBMC以防止细胞分裂。在一些方面，在添加T细胞群之前将饲养细胞添加到培养基中。

[0432] 在一些实施方案中，刺激条件包括适合于人T淋巴细胞生长的温度，例如至少约25摄氏度，通常为至少约30摄氏度，并且通常在或在约37摄氏度。任选地，孵育可以进一步包括加入非分裂的EBV转化的类淋巴母细胞(LCL)作为饲养细胞。可以用约6000至10,000拉德范围内的γ射线辐照LCL。在一些方面，LCL饲养细胞以任何合适的量(如LCL饲养细胞与初始T淋巴细胞的比率为至少约10:1)提供。

[0433] 在一些实施方案中，使用与生物反应器结合使用的容器(例如，袋)孵育细胞。在一些情况下，生物反应器可以经受运动或摇摆，其在一些方面可以增加氧气传递。使生物反应器运动可以包括但不限于沿着水平轴线旋转、沿着竖直轴线旋转、沿着生物反应器的倾斜(tilted或inclined)的水平轴线的摇摆运动或其任何组合。在一些实施方案中，在摇摆的情况下进行孵育的至少一部分。可以调节摇摆速度和摇摆角度以实现所需搅动。在一些实施方案中，摇摆角度为或为约20°、19°、18°、17°、16°、15°、14°、13°、12°、11°、10°、9°、8°、7°、6°、5°、4°、3°、2°或1°。在某些实施方案中，摇摆角度在6-16°之间。在其他实施方案中，摇摆角度在7-16°之间。在其他实施方案中，摇摆角度在8-12°之间。在一些实施方案中，摇摆速率为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39或40rpm。在一些实施方案中，摇摆速率在4rpm与12rpm之间，如在4rpm与6rpm之间并包含端值。在摇摆运动下进行细胞培养扩增的至少一

部分，如以在5°与10°之间(如6°)的角度，以恒定摇摆速度(如在5RPM与15RPM之间，如6RMP或10RPM的速度)摇摆。CD4+和CD8+细胞各自分开扩增，直至它们各自达到阈值量或细胞密度。

[0434] 在一些实施方案中，在静态条件下进行至少一部分的孵育。在一些实施方案中，在灌注(如在培养期间灌注出用过的培养基并灌注入新鲜培养基)的情况下进行孵育的至少一部分。在一些实施方案中，方法包括将新鲜培养基灌注到细胞培养物中(如通过补料端口)的步骤。在一些实施方案中，在灌注期间添加的培养基含有所述一种或多种刺激剂，例如一种或多种重组细胞因子，如IL-2、IL-7和/或IL-15。在一些实施方案中，在灌注期间添加的培养基是在静态孵育期间使用的相同培养基。

[0435] 在一些实施方案中，在一种或多种抗独特型抗体(如结合或识别由工程化细胞表达的重组受体的抗独特型抗体)的存在下扩增或培育细胞。

[0436] 在一些实施方案中，在孵育之后，将容器(例如，袋)与进行用于制造、生成或产生细胞疗法的一个或多个其他处理步骤的系统重新连接，如与含有离心室的系统重新连接。在一些方面，将培养的细胞从袋转移到室的内部腔室中用于配制培养的细胞。

II.组合物

[0437] 本文还提供了组合物，所述组合物包含通过本文提供的任何方法产生的经转导的细胞群。

[0438] 在一些实施方案中，本文提供了通过包括本文公开的转导方法(如章节I-D或章节I-E中公开的那些)在内的方法产生的治疗性组合物(例如，治疗性T细胞组合物)，例如输出组合物。在一些实施方案中，治疗性组合物包括经转导的细胞群，如例如章节I-D中所述。在一些实施方案中，本文提供了具有本文公开的任何一种或多种特征的治疗性组合物(例如，治疗性T细胞组合物)。在一些实施方案中，提供包含用重组抗原受体(例如，CAR或TCR)工程化的细胞的所述剂量的细胞作为组合物或配制品，如药物组合物或配制品。此类组合物可以根据所提供的方法来使用和/或与所提供的组合物一起使用，如用于预防或治疗疾病、病症和障碍，或者用于检测、诊断和预后方法中。

[0439] 术语“药物配制品”是指这样的制剂，其处于使得其中所含活性成分的生物活性有效的形式，并且不含对施用配制品的受试者具有不可接受的毒性的另外的组分。

[0440] “药学上可接受的载体”是指药物配制品中除了活性成分之外对受试者无毒的成分。药学上可接受的载体包括但不限于缓冲液、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0441] 在一些方面，载体的选择部分地由特定细胞或药剂和/或通过施用方法确定。因此，存在多种合适的配制品。例如，药物组合物可以含有防腐剂。合适的防腐剂可以包括例如对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸钠和苯扎氯铵。在一些方面，使用两种或更多种防腐剂的混合物。该防腐剂或其混合物通常以按总组合物的重量计约0.0001％至约2％的量存在。载体描述于例如Remington's Pharmaceutical Sciences第16版，Osol，A.编辑(1980)。药学上可接受的载体在所用剂量和浓度下通常对接受者无毒，并且包括但不限于：缓冲液，如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸；抗氧化剂，包括抗坏血酸和甲硫氨酸；防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵；六甲氯铵；苯扎氯铵；苄索氯铵；苯酚、丁醇或苄醇；烷基对羟基苯甲酸酯，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；和间甲酚)；低分子量(少于约10个残基)多肽；蛋白质，如血清白蛋白、明胶或免疫球

蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,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,如EDTA;糖类,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐抗衡离子,如钠;金属络合物(例如,锌-蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂,如聚乙二醇(PEG)。

[0442] 在一些方面,在组合物中包括缓冲剂。合适的缓冲剂包括例如柠檬酸、柠檬酸钠、磷酸、磷酸钾和各种其他酸和盐。在一些方面,使用两种或更多种缓冲剂的混合物。该缓冲剂或其混合物通常以按总组合物的重量计约0.001%至约4%的量存在。用于制备可施用的药物组合物的方法是已知的。示例性方法更详细地描述于例如Remington:The Science and Practice of Pharmacy,Lippincott Williams&Wilkins;第21版(2005年5月1日)中。

[0443] 配制品或组合物还可含有多于一种活性成分,其可用于用细胞或药剂预防或治疗的特定适应症、疾病或病症,其中各自的活性不会相互产生不利影响。此类活性成分以有效用于既定目的的量以合适的方式组合存在。因此,在一些实施方案中,药物组合物进一步包含其他药物活性剂或药物如化学治疗剂,例如天冬酰胺酶、白消安、卡铂、顺铂、柔红霉素、多柔比星、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、甲氨蝶呤、紫杉醇、利妥昔单抗、长春碱、长春新碱等。在一些实施方案中,药剂或细胞以盐(例如,药学上可接受的盐)的形式施用。合适的药学上可接受的酸加成盐包括源自无机酸(如盐酸、氢溴酸、磷酸、偏磷酸,硝酸和硫酸)和有机酸(如酒石酸、乙酸、柠檬酸、苹果酸、乳酸、富马酸、苯甲酸、乙醇酸、葡萄糖酸、琥珀酸和芳基磺酸,例如对甲苯磺酸)的那些。

[0444] 在一些实施方案中,药物组合物含有有效治疗或预防疾病或病症的量(如治疗有效量或预防有效量)的药剂或细胞。在一些实施方案中,通过定期评估所治疗的受试者来监测治疗或预防功效。对于数天或更长时间的重复施用,取决于病症,重复治疗直至出现所需疾病症状的抑制。然而,其他剂量方案可能是有用的并且可以被确定。所需剂量可以通过单次推注施用组合物、通过多次推注施用组合物或通过连续输注施用组合物来递送。

[0445] 药剂或细胞可以通过任何合适的方式施用,例如通过推注输注,通过注射例如静脉内或皮下注射、眼内注射、眼周注射、视网膜下注射、玻璃体内注射、经中隔注射、巩膜下注射、脉络膜内注射、前房注射、结膜下(subconjectval)注射、结膜下(subconjuntival)注射、眼球筋膜囊下(sub-Tenon)注射、眼球后注射、眼球周注射或后近巩膜(posterior juxtascleral)递送。在一些实施方案中,将它们通过肠胃外、肺内和鼻内以及(如果需要用于局部治疗的话)病灶内施用来施用。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。在一些实施方案中,给定剂量通过细胞或药剂的单次推注给药来施用。在一些实施方案中,其是通过例如在不超过3天的时间段内对细胞或药剂的多次推注施用或通过细胞或药剂的连续输注施用来施用。

[0446] 对于疾病的预防或治疗,适当的剂量可以取决于待治疗的疾病类型、一种或多种药剂的类型、细胞或重组受体的类型、疾病的严重程度和病程、施用药剂或细胞是用于预防目的还是治疗目的、先前疗法、受试者的临床病史和对药剂或细胞的反应以及主治医师的决断。在一些实施方案中,组合物适合一次或在一系列治疗中施用于受试者。

[0447] 可以使用标准施用技术、配制品和/或设备施用细胞或药剂。提供了用于储存和施用组合物的配制品和装置(如注射器和小瓶)。关于细胞,施用可以是自体的或异源的。例如,免疫反应细胞或祖细胞可以获得自一名受试者,并且施用于同一受试者或不同的相容

受试者。外周血衍生的免疫反应细胞或其后代(例如,体内、离体或体外衍生的)可以经由局部注射施用,包括导管施用、全身注射、局部注射、静脉内注射或肠胃外施用。当施用治疗性组合物(例如,含有基因修饰的免疫反应性细胞或治疗或改善神经毒性症状的药剂的药物组合物)时,通常将其配制成单位剂量可注射形式(溶液、悬浮液、乳液)。

[0448] 配制品包括用于口服、静脉内、腹膜内、皮下、经肺、透皮、肌内、鼻内、经颊、舌下或栓剂施用的那些。在一些实施方案中,肠胃外施用药剂或细胞群。如本文所用术语"肠胃外"包括静脉内、肌内、皮下、直肠、阴道和腹膜内施用。在一些实施方案中,使用通过静脉内、腹膜内或皮下注射的外周全身递送向受试者施用药剂或细胞群。

[0449] 在一些实施方案中,组合物作为无菌液体制剂提供,例如等渗水溶液、悬浮液、乳液、分散体或粘性组合物,其在一些方面可以缓冲至选择的pH。液体制剂一般比凝胶、其他粘性组合物和固体组合物制备起来更容易。另外地,液体组合物稍微更方便施用,特别是通过注射。在另一方面,粘性组合物可以配制在适当的粘度范围内,以提供与特定组织的更长的接触时间。液体或粘性组合物可以包含载体,其可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、多元醇(例如,甘油、丙二醇、液体聚乙二醇)及其合适的混合物。

[0450] 可以添加各种增强组合物的稳定性和无菌性的添加剂,包括抗微生物防腐剂、抗氧化剂、螯合剂和缓冲液。可以通过各种抗细菌和抗真菌剂(例如,对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚和山梨酸)来确保防止微生物的作用。通过使用延迟吸收的药剂(例如,单硬脂酸铝和明胶)可以实现可注射药物形式的延长吸收。

[0451] 在一些实施方案中,配制缓冲液含有冷冻保存剂。在一些实施方案中,用冷冻保存剂溶液配制细胞,所述冷冻保存剂溶液含有1.0%至30%的DMSO溶液,如5%至20%的DMSO溶液或5%至10%的DMSO溶液。在一些实施方案中,冷冻保存溶液是或含有例如含有20%DMSO和8%人血清白蛋白(HSA)的PBS或者其他合适的细胞冷冻介质。在一些实施方案中,冷冻保存剂溶液是或含有例如至少或约7.5%DMSO。在一些实施方案中,加工步骤可以涉及洗涤经转导的和/或扩增的细胞以交换在冷冻保存剂溶液中的细胞。在一些实施方案中,将细胞在介质和/或溶液中冷冻(例如,冷冻保护或冷冻保存),所述介质和/或溶液具有终浓度为或为约12.5%、12.0%、11.5%、11.0%、10.5%、10.0%、9.5%、9.0%、8.5%、8.0%、7.5%、7.0%、6.5%、6.0%、5.5%或5.0%的DMSO,或者在1%与15%之间、在6%与12%之间、在5%与10%之间或在6%与8%之间的DMSO。在特定实施方案中,将细胞在介质和/或溶液中冷冻(例如,冷冻保护或冷冻保存),所述介质和/或溶液具有终浓度为或为约5.0%、4.5%、4.0%、3.5%、3.0%、2.5%、2.0%、1.5%、1.25%、1.0%、0.75%、0.5%或0.25%的HSA,或者在0.1%与-5%之间、在0.25%与4%之间、在0.5%与2%之间或在1%与2%之间的HSA。

[0452] 在特定实施方案中,将经富集的T细胞(例如,已经进行选择、刺激、工程化和/或培育的T细胞)的组合物配制,冷冻保护,然后储存一定时间量。在某些实施方案中,将配制的冷冻保护的细胞储存直至释放细胞用于输注。在特定实施方案中,将配制的冷冻保护的细胞储存1天与6个月之间、1个月与3个月之间、1天与14天之间、1天与7天之间、3天与6天之间、6个月与12个月之间或长于12个月。在一些实施方案中,将细胞冷冻保护并储存为、为约或为小于1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天。在某些实施方案中,在储存之后,将细胞解冻并施用至受试者。在某些实施方案中,将细胞储存或储存约5天。在一些实施方案中,配制的细

胞并未冷冻保存。

[0453] 无菌可注射溶液可以通过如下方式来制备:将药剂或细胞掺入溶剂中,如掺入与合适的载体、稀释剂或赋形剂(如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等)的混合物中。

[0454] 用于体内施用的配制品通常是无菌的。可以例如通过经无菌滤膜过滤容易地实现无菌。

[0455] 还提供了制品或试剂盒,所述制品或试剂盒包括(i)本文所述的任何组合物;以及(ii)用于将组合物施用至受试者的说明书。

[0456] 在一些实施方案中,制品或试剂盒包括一个或多个容器(通常多个容器)、包装材料以及在所述一个或多个容器和/或包装上或与一个或多个容器和/或包装相关的标签或包装说明书(通常包括使用说明书)。在一些实施方案中,制品和试剂盒含有表达重组受体的工程化细胞或其组合物,如使用本文提供的方法产生的那些,以及任选地使用说明书,例如施用说明书。在一些实施方案中,说明书为评估受试者在接受细胞疗法之前是否可能或被怀疑可能反应和/或在施用用于治疗疾病或障碍的表达重组受体的工程化细胞后的反应程度或水平提供指导或指定方法。在一些方面,制品可以含有工程化细胞的剂量或组合物。

[0457] 本文提供的制品含有包装材料。用于在包装所提供的材料中使用的包装材料是本领域技术人员所熟知的。参见例如,美国专利号5,323,907、5,052,558和5,033,252,将其中的每一个以其整体并入本文。包装材料的例子包括但不限于泡罩包装、瓶子、管、吸入器、泵、袋、小瓶、容器、注射器、一次性实验室用品(例如,移液管尖端和/或塑料板)或瓶子。制品或试剂盒可以包括装置,以便有助于分配材料或有助于以高通量或大规模方式使用,例如以有助于在机器人设备中使用。通常,包装不与其中所含的组合物反应。

[0458] 在一些实施方案中,试剂和/或细胞组合物是分开包装的。在一些实施方案中,每个容器可以具有单一区室。在一些实施方案中,制品或试剂盒的其他组分是分开包装的,或者一起包装于单一区室中。

III.治疗方法和用途

[0459] 本文提供了治疗方法,例如包括施用本文所述的任何工程化细胞或含有工程化细胞的组合物。在一些方面,还提供了将本文所述的任何工程化细胞或含有工程化细胞的组合物施用至受试者(如患有疾病或障碍的受试者)的方法。在一些方面,还提供了本文所述的任何工程化细胞或含有工程化细胞的组合物用于治疗疾病或障碍的用途。在一些方面,还提供了本文所述的任何工程化细胞或含有工程化细胞的组合物用于制造用以治疗疾病或障碍的药物的用途。在一些方面,还提供了本文所述的任何工程化细胞或含有工程化细胞的组合物,用于在治疗疾病或障碍中使用,或者用于施用至患有疾病或障碍的受试者。

[0460] 用于过继细胞疗法的细胞的施用方法是已知的,并且可以与所提供的方法和组合物结合使用。例如,过继T细胞治疗方法描述于例如以下文献中:授予Gruenberg等人的美国专利申请公开号2003/0170238;授予Rosenberg的美国专利号4,690,915;Rosenberg(2011)Nat Rev Clin Oncol.8(10):577-85。参见例如,Themeli等人(2013)Nat Biotechnol.31(10):928-933;Tsukahara等人(2013)Biochem Biophys Res Commun 438(1):84-9;Davila等人(2013)PLoS ONE 8(4):e61338。

[0461] 所治疗的疾病或病症可以是任何疾病或病症,其中抗原的表达与疾病、病症或障碍的病因相关和/或参与所述病因,例如引起、加重或以其他方式参与这种疾病、病症或障

碍。示例性疾病和病症可以包括与恶性肿瘤或细胞转化(例如,癌症)、自身免疫性疾病或炎性疾病或者例如由细菌、病毒或其他病原体引起的感染性疾病相关的疾病或病症。示例性抗原(其包括与可以治疗的各种疾病和病症相关的抗原)描述于上文中。在特定实施方案中,嵌合抗原受体或转基因TCR与和疾病或病症相关的抗原特异性结合。

[0462] 疾病、病症和障碍包括肿瘤,包括实体瘤、血液恶性肿瘤和黑色素瘤,并且包括局部和转移性肿瘤;感染性疾病,如病毒或其他病原体的感染,例如HIV、HCV、HBV、CMV、HPV和寄生虫病;以及自身免疫性和炎性疾病。在一些实施方案中,疾病、障碍或病症是肿瘤、癌症、恶性肿瘤、肿疡或其他增殖性疾病或障碍。此类疾病包括但不限于白血病、淋巴瘤,例如,急性髓样(或髓性)白血病(AML)、慢性髓样(或髓性)白血病(CML)、急性淋巴细胞(或成淋巴细胞)白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、毛细胞白血病(HCL)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、边缘区淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤(HL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)、滤泡性淋巴瘤、难治性滤泡性淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)和多发性骨髓瘤(MM)。在一些实施方案中,疾病或病症是选自以下的B细胞恶性肿瘤:急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、成人ALL、慢性成淋巴细胞性白血病(CLL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)和弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)。在一些实施方案中,疾病或病症是NHL,并且NHL选自侵袭性NHL、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)NOS型(从头的和从惰性转化的)、原发性纵隔大B细胞淋巴瘤(PMBCL)、富含T细胞/组织细胞的大B细胞淋巴瘤(TCHRBCL)、伯基特淋巴瘤、套细胞淋巴瘤(MCL)和/或滤泡性淋巴瘤(FL)(任选地,3B级滤泡性淋巴瘤(FL3B))。

[0463] 在一些实施方案中,疾病或病症是感染性疾病或病症,例如但不限于病毒、逆转录病毒、细菌和原生动物感染、免疫缺陷、巨细胞病毒(CMV)、埃-巴二氏病毒(Epstein-Barr virus,EBV)、腺病毒、BK多瘤病毒。在一些实施方案中,疾病或病症是自身免疫性或炎性疾病或病症,如关节炎(例如,类风湿性关节炎(RA))、I型糖尿病、系统性红斑狼疮(SLE)、炎性肠病、银屑病、硬皮病、自身免疫性甲状腺疾病、格雷夫斯病、克罗恩病、多发性硬化症、哮喘和/或与移植相关的疾病或病症。

[0464] 在一些实施方案中,与疾病或障碍相关的抗原是或包括αvβ6整合素(avb6整合素)、B细胞成熟抗原(BCMA)、B7-H3、B7-H6、碳酸酐酶9(CA9,也称为CAIX或G250)、癌症-睾丸抗原、癌症/睾丸抗原$_{1B}$(CTAG,也称为NY-ESO-1和LAGE-2)、癌胚抗原(CEA)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、C-C基序趋化因子配体1(CCL-1)、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD123、CD133、CD138、CD171、表皮生长因子蛋白(EGFR)、截短的表皮生长因子蛋白(tEGFR)、表皮生长因子受体III型突变体(EGFR vIII)、上皮糖蛋白2(EPG-2)、上皮糖蛋白40(EPG-40)、肝配蛋白B2、肝配蛋白受体A2(EPHa2)、雌激素受体、Fc受体样蛋白5(FCRL5;也称为Fc受体同源物5或FCRH5)、胎儿乙酰胆碱受体(胎儿AchR)、叶酸结合蛋白(FBP)、叶酸受体α、神经节苷脂GD2、O-乙酰化GD2(OGD2)、神经节苷脂GD3、糖蛋白100(gp100)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3)、G蛋白偶联受体5D(GPCR5D)、Her2/neu(受体酪氨酸激酶erb-B2)、Her3(erb-B3)、Her4(erb-B4)、erbB二聚体、人高分子量黑色素瘤相关抗原(HMW-MAA)、乙型肝炎表面抗原、人白细胞抗原A1(HLA-A1)、人白细胞抗原A2(HLA-A2)、IL-22受体α(IL-22Rα)、IL-13受体α2(IL-13Rα2)、激酶插入结构域受体(kdr)、κ轻链、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、L1-CAM的CE7表位、含有富亮氨酸重复序列的蛋白8家族成

员A(LRRC8A)、Lewis Y、黑色素瘤相关抗原(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、MAGE-A10、间皮素(MSLN)、c-Met、鼠类巨细胞病毒(CMV)、粘蛋白1(MUC1)、MUC16、自然杀伤细胞2族成员D(NKG2D)配体、黑色素A(MART-1)、神经细胞粘附分子(NCAM)、癌胚胎抗原、黑色素瘤优先表达抗原(PRAME)、孕酮受体、前列腺特异性抗原、前列腺干细胞抗原(PSCA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)、存活蛋白、滋养层糖蛋白(TPBG,也称为5T4)、肿瘤相关糖蛋白72(TAG72)、酪氨酸酶相关蛋白1(TRP1,也称为TYRP1或gp75)、酪氨酸酶相关蛋白2(TRP2,也称为多巴色素互变异构酶、多巴色素δ异构酶或DCT)、血管内皮生长因子受体(VEGFR)、血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)、肾母细胞瘤1(WT-1)、病原体特有的或病原体表达的抗原、或与通用标签相关的抗原、和/或生物素化分子、和/或由HIV、HCV、HBV或其他病原体表达的分子。在一些实施方案中,受体靶向的抗原包括与B细胞恶性肿瘤相关的抗原,如许多已知B细胞标记中的任何一种。在一些实施方案中,抗原是或包括CD20、CD19、CD22、ROR1、CD45、CD21、CD5、CD33、Igκ、Igλ、CD79a、CD79b或CD30。在一些实施方案中,抗原是或包括病原体特异性或病原体表达的抗原,如病毒抗原(例如,来自HIV、HCV、HBV的病毒抗原)、细菌抗原和/或寄生虫抗原。

[0465] 在一些实施方案中,CAR的抗体或抗原结合片段(例如,scFv或V_H结构域)特异性识别抗原,如CD19。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段源自与CD19特异性结合的抗体或抗原结合片段,或者是与CD19特异性结合的抗体或抗原结合片段的变体。在一些实施方案中,细胞疗法(例如,过继T细胞疗法)通过自体转移进行,其中从接受细胞疗法的受试者或从源自这种受试者的样品中分离和/或以其他方式制备细胞。因此,在一些方面,细胞源自需要治疗的受试者(例如,患者),并且在分离和处理后将细胞施用于同一受试者。

[0466] 在一些实施方案中,细胞疗法(例如,过继T细胞疗法)通过同种异体转移进行,其中从将要接受或最终接受细胞疗法的受试者以外的受试者(例如,第一受试者)分离和/或以其他方式制备细胞。在此类实施方案中,然后将细胞施用于相同物种的不同受试者,例如第二受试者。在一些实施方案中,第一和第二受试者在遗传上是相同的。在一些实施方案中,第一和第二受试者在遗传上是相似的。在一些实施方案中,第二受试者与第一受试者表达相同的HLA类别或超类型。

[0467] 细胞可以通过任何合适的方式施用,例如通过推注输注,通过注射例如静脉内或皮下注射、眼内注射、眼周注射、视网膜下注射、玻璃体内注射、经中隔注射、巩膜下注射、脉络膜内注射、前房注射、结膜下(subconjectval)注射、结膜下(subconjuntival)注射、眼球筋膜囊下注射、眼球后注射、眼球周注射或后近巩膜递送。在一些实施方案中,将它们通过肠胃外、肺内和鼻内以及(如果需要用于局部治疗的话)病灶内施用来施用。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。在一些实施方案中,给定剂量是通过细胞的单次推注施用来施用。在一些实施方案中,给定剂量通过例如在不超过3天的时间段内细胞的多次推注施用,或通过细胞的连续输注施用来施用。在一些实施方案中,细胞剂量或任何另外的疗法(例如,淋巴细胞清除疗法、干预疗法和/或组合疗法)的施用是经由门诊递送进行的。

[0468] 对于疾病的预防或治疗,适当的剂量可取决于待治疗的疾病类型、细胞或重组受体的类型、疾病的严重程度和病程、是针对预防目的还是针对治疗目的而施用细胞、先前治疗、受试者的临床病史和对细胞的反应以及主治医师的决断。在一些实施方案中,适合将组

合物和细胞一次或在一系列治疗中施用于受试者。

[0469] 在一些实施方案中，根据所提供方法和/或用所提供制品或组合物将一定剂量的细胞施用于受试者。在一些实施方案中，剂量的大小或时间安排根据受试者的特定疾病或病症确定。在一些情况下，可以根据所提供的描述凭经验确定用于特定疾病的剂量的大小或时间安排。

[0470] 在一些实施方案中，细胞的剂量包含在为或约$2x10^5$个细胞/kg与为或约$2x10^6$个细胞/kg之间，如在为或约$4x10^5$个细胞/kg与为或约$1x10^6$个细胞/kg之间或在为或约$6x10^5$个细胞/kg与为或约$8x10^5$个细胞/kg之间。在一些实施方案中，细胞的剂量包含不超过$2x10^5$个细胞(例如，抗原表达细胞，如CAR表达细胞)/公斤受试者体重(细胞/kg)，如不超过或不超过约$3x10^5$个细胞/kg、不超过或不超过约$4x10^5$个细胞/kg、不超过或不超过约$5x10^5$个细胞/kg、不超过或不超过约$6x10^5$个细胞/kg、不超过或不超过约$7x10^5$个细胞/kg、不超过或不超过约$8x10^5$个细胞/kg、不超过或不超过约$9x10^5$个细胞/kg、不超过或不超过约$1x10^6$个细胞/kg或者不超过或不超过约$2x10^6$个细胞/kg。在一些实施方案中，细胞的剂量包含至少或至少约或为或约$2x10^5$个细胞(例如，抗原表达细胞，如CAR表达细胞)/公斤受试者体重(细胞/kg)，如至少或至少约或为或约$3x10^5$个细胞/kg、至少或至少约或为或约$4x10^5$个细胞/kg、至少或至少约或为或约$5x10^5$个细胞/kg、至少或至少约或为或约$6x10^5$个细胞/kg、至少或至少约或为或约$7x10^5$个细胞/kg、至少或至少约或为或约$8x10^5$个细胞/kg、至少或至少约或为或约$9x10^5$个细胞/kg、至少或至少约或为或约$1x10^6$个细胞/kg或者至少或至少约或为或约$2x10^6$个细胞/kg。

[0471] 在某些实施方案中，细胞或细胞的亚型的单独群体是以约100万至约1000亿个细胞和/或按每公斤体重该细胞量的范围施用至受试者，如例如100万至约500亿个细胞(例如，约500万个细胞、1000万个细胞、约1500万个细胞、约2000万个细胞、约2500万个细胞、约5亿个细胞、约10亿个细胞、约50亿个细胞、约200亿个细胞、约300亿个细胞、约400亿个细胞或由任两个前述值定义的范围)，如约1000万至约1000亿个细胞(例如，约2000万个细胞、约3000万个细胞、约4000万个细胞、约6000万个细胞、约7000万个细胞、约8000万个细胞、约9000万个细胞、约100亿个细胞、约250亿个细胞、约500亿个细胞、约750亿个细胞、约900亿个细胞或由任两个前述值定义的范围)，并且在一些情况下约1亿个细胞至约500亿个细胞(例如，约1.2亿个细胞、约2.5亿个细胞、约3.5亿个细胞、约4.5亿个细胞、约6.5亿个细胞、约8亿个细胞、约9亿个细胞、约30亿个细胞、约300亿个细胞、约450亿个细胞)或在这些范围和/或每公斤体重的这些范围之间的任何值。剂量可以根据疾病或障碍和/或患者和/或其他治疗特有的属性而变化。

[0472] 在一些实施方案中，细胞剂量是细胞的平剂量或细胞的固定剂量，使得细胞剂量不依赖于或基于受试者的体表面积或体重。

[0473] 例如，在一些实施方案中，如果受试者是人，那么剂量包括少于约$5x10^8$个总重组受体(例如，CAR)表达细胞、T细胞或外周血单核细胞(PBMC)，例如在约$1x10^6$到$5x10^8$个此类细胞的范围内，如$2x10^6$、$5x10^6$、$1x10^7$、$5x10^7$、$1x10^8$或$5x10^8$个总此类细胞，或任两个前述值之间的范围。

[0474] 在一些实施方案中，基因工程化细胞的所述剂量包含从或从约$1x10^5$至$5x10^8$个表达CAR的总T细胞、$1x10^5$至$2.5x10^8$个表达CAR的总T细胞、$1x10^5$至$1x10^8$个表达CAR的总T细

胞、$1x10^5$至$5x10^7$个表达CAR的总T细胞、$1x10^5$至$2.5x10^7$个表达CAR的总T细胞、$1x10^5$至$1x10^7$个表达CAR的总T细胞、$1x10^5$至$5x10^6$个表达CAR的总T细胞、$1x10^5$至$2.5x10^6$个表达CAR的总T细胞、$1x10^5$至$1x10^6$个表达CAR的总T细胞、$1x10^6$至$5x10^8$个表达CAR的总T细胞、$1x10^6$至$2.5x10^8$个表达CAR的总T细胞、$1x10^6$至$1x10^8$个表达CAR的总T细胞、$1x10^6$至$5x10^7$个表达CAR的总T细胞、$1x10^6$至$2.5x10^7$个表达CAR的总T细胞、$1x10^6$至$1x10^7$个表达CAR的总T细胞、$1x10^6$至$5x10^6$个表达CAR的总T细胞、$1x10^6$至$2.5x10^6$个表达CAR的总T细胞、$2.5x10^6$至$5x10^8$个表达CAR的总T细胞、$2.5x10^6$至$2.5x10^8$个表达CAR的总T细胞、$2.5x10^6$至$1x10^8$个表达CAR的总T细胞、$2.5x10^6$至$5x10^7$个表达CAR的总T细胞、$2.5x10^6$至$2.5x10^7$个表达CAR的总T细胞、$2.5x10^6$至$1x10^7$个表达CAR的总T细胞、$2.5x10^6$至$5x10^6$个表达CAR的总T细胞、$5x10^6$至$5x10^8$个表达CAR的总T细胞、$5x10^6$至$2.5x10^8$个表达CAR的总T细胞、$5x10^6$至$1x10^8$个表达CAR的总T细胞、$5x10^6$至$5x10^7$个表达CAR的总T细胞、$5x10^6$至$2.5x10^7$个表达CAR的总T细胞、$5x10^6$至$1x10^7$个表达CAR的总T细胞、$1x10^7$至$5x10^8$个表达CAR的总T细胞、$1x10^7$至$2.5x10^8$个表达CAR的总T细胞、$1x10^7$至$1x10^8$个表达CAR的总T细胞、$1x10^7$至$5x10^7$个表达CAR的总T细胞、$1x10^7$至$2.5x10^7$个表达CAR的总T细胞、$2.5x10^7$至$5x10^8$个表达CAR的总T细胞、$2.5x10^7$至$2.5x10^8$个表达CAR的总T细胞、$2.5x10^7$至$1x10^8$个表达CAR的总T细胞、$2.5x10^7$至$5x10^7$个表达CAR的总T细胞、$5x10^7$至$5x10^8$个表达CAR的总T细胞、$5x10^7$至$2.5x10^8$个表达CAR的总T细胞、$5x10^7$至$1x10^8$个表达CAR的总T细胞、$1x10^8$至$5x10^8$个表达CAR的总T细胞、$1x10^8$至$2.5x10^8$个表达CAR的总T细胞或$2.5x10^8$至$5x10^8$个表达CAR的总T细胞。

[0475] 在一些实施方案中，基因工程化细胞的剂量包含至少或至少约$1x10^5$个表达CAR的细胞、至少或至少约$2.5x10^5$个表达CAR的细胞、至少或至少约$5x10^5$个表达CAR的细胞、至少或至少约$1x10^6$个表达CAR的细胞、至少或至少约$2.5x10^6$个表达CAR的细胞、至少或至少约$5x10^6$个表达CAR的细胞、至少或至少约$1x10^7$个表达CAR的细胞、至少或至少约$2.5x10^7$个表达CAR的细胞、至少或至少约$5x10^7$个表达CAR的细胞、至少或至少约$1x10^8$个表达CAR的细胞、至少或至少约$2.5x10^8$个表达CAR的细胞或者至少或至少约$5x10^8$个表达CAR的细胞。

[0476] 在一些实施方案中，细胞疗法包括施用包含如下细胞数量的剂量：从或从约$1x10^5$至$5x10^8$个总重组受体表达细胞、总T细胞或总外周血单核细胞(PBMC)，从或从约$5x10^5$至$1x10^7$个总重组受体表达细胞、总T细胞或总外周血单核细胞(PBMC)，或从或从约$1x10^6$至$1x10^7$个总重组受体表达细胞、总T细胞或总外周血单核细胞(PBMC)，每个都包含端值。在一些实施方案中，细胞疗法包括施用一定剂量的细胞，所述剂量包含如下细胞数量：至少或至少约$1x10^5$个总重组受体表达细胞、总T细胞或总外周血单个核细胞(PBMC)，如至少或至少$1x10^6$、至少或至少约$1x10^7$、至少或至少约$1x10^8$个此类细胞。在一些实施方案中，所述数量是关于CD3+或CD8+的总数，在一些情况下也是关于重组受体表达(例如，CAR+)细胞。在一些实施方案中，细胞疗法包括施用包含如下细胞数量的剂量：从或从约$1x10^5$至$5x10^8$个CD3+或CD8+总T细胞或CD3+或CD8+重组受体表达细胞、从或从约$5x10^5$至$1x10^7$个CD3+或CD8+总T细胞或CD3+或CD8+重组受体表达细胞或者从或从约$1x10^6$至$1x10^7$个CD3+或CD8+总T细胞或CD3+或CD8+重组受体表达细胞，每个都包含端值。在一些实施方案中，细胞疗法包括施用包含如下细胞数量的剂量：从或从约$1x10^5$至$5x10^8$个总CD3+/CAR+或CD8+/CAR+细胞、从或从约$5x10^5$至$1x10^7$个总CD3+/CAR+或CD8+/CAR+细胞或者从或从约$1x10^6$至$1x10^7$个总CD3+/CAR+或CD8+/CAR+细胞，每个都包含端值。

[0477] 在一些实施方案中，所述剂量的T细胞包括CD4+T细胞、CD8+T细胞或CD4+和CD8+T细胞。

[0478] 在一些实施方案中，例如，如果受试者是人，那么所述剂量的CD8+T细胞(包括在剂量中包括CD4+和CD8+T细胞)包括在约$1x10^6$与$5x10^8$个之间的总重组受体(例如，CAR)表达CD8+细胞，例如，在约$5x10^6$至$1x10^8$个此类细胞的范围内，例如$1x10^7$、$2.5x10^7$、$5x10^7$、$7.5x10^7$、$1x10^8$或$5x10^8$个总此类细胞，或在任两个前述值之间的范围。在一些实施方案中，向患者施用多个剂量，并且每个剂量或总剂量可以在任何前述值内。在一些实施方案中，细胞的剂量包括施用从或从约$1x10^7$至$0.75x10^8$个总重组受体表达CD8+T细胞、$1x10^7$至$2.5x10^7$个总重组受体表达CD8+T细胞、从或从约$1x10^7$至$0.75x10^8$个总重组受体表达CD8+T细胞，每个都包含端值。在一些实施方案中，细胞的剂量包含施用或施用约$1x10^7$、$2.5x10^7$、$5x10^7$、$7.5x10^7$、$1x10^8$或$5x10^8$个总重组受体表达CD8+T细胞。

[0479] 在一些实施方案中，细胞(例如，重组受体表达T细胞)的剂量作为单一剂量施用于受试者，或者在两周、一个月、三个月、六个月、1年或更长的时间段内仅施用一次。

[0480] 在过继细胞疗法的背景下，施用给定“剂量”涵盖施用作为单一组合物和/或单次不间断施用(例如，作为单次注射或连续输注)的给定量或数量的细胞，并且还涵盖在指定时间段中(如在不超过3天中)施用在多种单独组合物或输注中提供的作为分割剂量或作为多种组合物的给定量或数量的细胞。因此，在一些情境下，剂量是指定数量的细胞的单次或连续施用，在单个时间点施用或开始。然而，在一些情境下，剂量在不超过三天的时间段内以多次注射或输注的方式施用，如每天一次持续三天或两天或者通过在一天的时间内多次输注。

[0481] 因此，在一些方面，所述剂量的细胞以单一药物组合物施用。在一些实施方案中，所述剂量的细胞以共同含有所述剂量的细胞的多种组合物施用。

[0482] 在一些实施方案中，术语“分割剂量”是指这样分割的剂量，使其在超过一天的时间内施用。这种类型的给药包括在本方法中并且被认为是单一剂量。

[0483] 因此，所述细胞剂量可以作为分割剂量施用，例如随时间施用的分割剂量。例如，在一些实施方案中，剂量可以在2天或3天内施用受试者。用于分割给药的示例性方法包括在第一天施用25％的剂量并在第二天施用剩余的75％的剂量。在其他实施方案中，可以在第一天施用33％的剂量，并且在第二天施用剩余的67％。在一些方面，在第一天施用10％的剂量，在第二天施用30％的剂量，并且在第三天施用60％的剂量。在一些实施方案中，分割剂量不超过3天。

[0484] 在一些实施方案中，所述剂量的细胞可以通过施用多种组合物或溶液(如第一和第二，任选地更多)来施用，每种组合物或溶液含有所述剂量的一些细胞。在一些方面，任选地在某一时间段内，分开地或独立地施用各自含有不同细胞群和/或细胞亚型的多种组合物。例如，细胞群或细胞亚型可以分别包括$CD8^+$和$CD4^+$T细胞，和/或分别包括富集$CD8^+$和$CD4^+$的群体，例如CD4+和/或CD8+T细胞，其各自单独地包括基因工程化以表达重组受体的细胞。在一些实施方案中，所述剂量的施用包括施用第一组合物，其包含一定剂量的CD8+T细胞或一定剂量的CD4+T细胞；以及施用第二组合物，其包含另一剂量的CD4+T细胞和CD8+T细胞。

[0485] 在一些实施方案中，组合物或剂量的施用(例如，多种细胞组合物的施用)涉及分

开施用细胞组合物。在一些方面，分开施用同时或按任何顺序依序进行。在一些实施方案中，所述剂量包括第一组合物和第二组合物，并且第一组合物和第二组合物的施用相隔0至12小时，相隔0至6小时或相隔0至2小时。在一些实施方案中，第一组合物的施用的开始和第二组合物的施用的开始相隔不超过2小时、不超过1小时或不超过30分钟，相隔不超过15分钟、不超过10分钟或不超过5分钟进行。在一些实施方案中，第一组合物的施用的开始和/或完成和第二组合物的施用的完成和/或开始相隔不超过2小时、不超过1小时或不超过30分钟，相隔不超过15分钟、不超过10分钟或不超过5分钟进行。

[0486] 在一些组合物中，第一组合物(例如，所述剂量的第一组合物)包含CD4+T细胞。在一些组合物中，第一组合物(例如，所述剂量的第一组合物)包含CD8+T细胞。在一些实施方案中，第一组合物是在第二组合物之前施用。

[0487] 在一些实施方案中，细胞的剂量或组合物包括表达重组受体的CD4+细胞与表达重组受体的CD8+细胞和/或CD4+细胞与CD8+细胞的定义的或目标比率，所述比率任选地为约1:1，或者在大约1:3与大约3:1之间，如大约1:1。在一些方面，具有目标或所需比率的不同细胞群(如CD4+:CD8+比率或CAR+CD4+:CAR+CD8+比率，例如1:1)的组合物或剂量的施用涉及施用含有一种群体的细胞组合物，然后施用包含另一种群体的单独细胞组合物，其中施用是以或大致以目标或所需比率来进行。在一些方面，定义比率的细胞的剂量或组合物的施用导致改善T细胞疗法的扩增、持久性和/或抗肿瘤活性。

[0488] 在一些实施方案中，受试者接受细胞的多个剂量，例如，两个或更多个剂量或多个连续剂量。在一些实施方案中，向受试者施用两个剂量。在一些实施方案中，受试者接受连续剂量，例如，第二剂量是在第一剂量后约4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天或21天施用。在一些实施方案中，在第一剂量后施用多个连续剂量，使得在施用连续剂量后施用另外一个或多个剂量。在一些方面，在另外的剂量中施用至受试者的细胞数量与第一剂量和/或连续剂量相同或相似。在一些实施方案中，另外一个或多个剂量大于先前剂量。

[0489] 在一些方面，第一和/或连续剂量的大小基于一个或多个标准来确定，如受试者对先前治疗(例如，化学疗法)的反应、受试者的疾病负荷(如肿瘤负担、体积、大小或程度)、转移的范围或类型、分期和/或受试者发生毒性结局(例如，CRS、巨噬细胞激活综合征、肿瘤溶解综合征、神经毒性和/或针对所施用的细胞和/或重组受体的宿主免疫反应)的可能性或发生率。

[0490] 在一些方面，第一剂量的施用与连续剂量的施用之间的时间为约9至约35天、约14至约28天或15至27天。在一些实施方案中，施用连续剂量是在施用第一剂量后大于约14天且在施用第一剂量后小于约28天的某个时间点进行。在一些方面，第一剂量与连续剂量之间的时间为约21天。在一些实施方案中，在施用连续剂量后施用另外一个或多个剂量(例如，连续剂量)。在一些方面，在施用先前剂量后至少约14天且小于约28天施用另外一个或多个连续剂量。在一些实施方案中，在先前剂量后小于约14天(例如，在先前剂量后4、5、6、7、8、9、10、11、12或13天)施用另外的剂量。在一些实施方案中，在先前剂量后小于约14天不施用剂量，和/或在先前剂量后超过约28天不施用剂量。

[0491] 在一些实施方案中，细胞(例如，重组受体表达细胞)的剂量包含两个剂量(例如，双剂量)，包含第一剂量的T细胞和连续剂量的T细胞，其中第一剂量和第二剂量中之一或两

者包括施用分割剂量的T细胞。

[0492] 在一些实施方案中，细胞的所述剂量通常足够大以有效减少疾病负荷。

[0493] 在一些实施方案中，细胞以所需剂量施用，所述所需剂量在一些方面包括所需剂量或数量的细胞或一种或多种细胞类型和/或所需比率的细胞类型。因此，在一些实施方案中，细胞剂量基于细胞总数(或每kg体重的细胞数量)和所需的单独群体或亚型的比率，如CD4+与CD8+的比率。在一些实施方案中，细胞剂量基于所需的单独群体中的细胞或单独细胞类型的总数(或每kg体重的细胞数量)。在一些实施方案中，剂量基于这种特征的组合，如所需的细胞总数、所需比率和所需的单独群体中的细胞总数。

[0494] 在一些实施方案中，以所需剂量的总细胞(如所需剂量的T细胞)的耐受差异或在所述耐受差异之内施用细胞的群体或亚型如$CD8^+$和$CD4^+$T细胞。在一些方面，所需剂量是所需细胞数量或被施用细胞的受试者的每单位体重的所需细胞数量，例如细胞/kg。在一些方面，所需剂量等于或高于最小细胞数量或每单位体重的最小细胞数量。在一些方面，在以所需剂量施用的总细胞中，单独群体或亚型以等于或接近所需输出比率(如$CD4^+$与$CD8^+$比率)存在，例如在这种比率的一定容忍差异或误差内。

[0495] 在一些实施方案中，细胞以所需剂量的一种或多种单独细胞群或亚型的耐受差异或在所述耐受差异之内施用，如所需剂量的CD4+细胞和/或所需剂量的CD8+细胞。在一些方面，所需剂量是亚型或群体的细胞的所需数量或被施用细胞的受试者的每单位体重的此类细胞的所需数量，例如细胞/kg。在一些方面，所需剂量等于或高于最小的群体或亚型的细胞数量或每单位体重的最小的群体或亚型的细胞数量。

[0496] 因此，在一些实施方案中，剂量基于所需的总细胞的固定剂量和所需比率，和/或基于所需的一种或多种单独亚型或亚群(例如，各自)的固定剂量。因此，在一些实施方案中，剂量基于所需的T细胞的固定或最小剂量和所需的$CD4^+$与$CD8^+$细胞的比率，和/或基于所需的$CD4^+$和/或$CD8^+$细胞的固定或最小剂量。

[0497] 在一些实施方案中，细胞在多种细胞群或亚型(如CD4+和CD8+细胞或亚型)的所需输出比率的耐受范围下或耐受范围内施用。在一些方面，所需比率可以是特定比率或可以是一系列比率。例如，在一些实施方案中，所需比率(例如，$CD4^+$与$CD8^+$细胞的比率)是在为或约1:5与为或约5:1之间(或大于约1:5且小于约5:1)或在为或约1:3与为或约3:1之间(或大于约1:3且小于约3:1)，如在为或约2:1与为或约1:5之间(或大于约1:5且小于约2:1，如为或约5:1、4.5:1、4:1、3.5:1、3:1、2.5:1、2:1、1.9:1、1.8:1、1.7:1、1.6:1、1.5:1、1.4:1、1.3:1、1.2:1、1.1:1、1:1、1:1.1、1:1.2、1:1.3、1:1.4、1:1.5、1:1.6、1:1.7、1:1.8、1:1.9、1:2、1:2.5、1:3、1:3.5、1:4、1:4.5或1:5。在一些方面，耐受差异在所需比率的约1％、约2％、约3％、约4％、约5％、约10％、约15％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％内，包括这些范围之间的任何值。

[0498] 在特定实施方案中，细胞的数量和/或浓度是指重组受体(例如，CAR)表达细胞的数量。在其他实施方案中，细胞的数量和/或浓度是指施用的所有细胞、T细胞或外周血单个核细胞(PBMC)的数量或浓度。

[0499] 在一些方面，剂量的大小基于一个或多个标准来确定，如受试者对先前治疗(例如，化学疗法)的反应、受试者的疾病负荷(如肿瘤负担、体积、尺寸或程度)、转移的程度或类型、分期和/或受试者发生毒性结局(例如，CRS、巨噬细胞激活综合征、肿瘤溶解综合征、

神经毒性和/或针对所施用的细胞和/或重组受体的宿主免疫反应)的可能性或发生率。

[0500] 在一些实施方案中,所述方法还包括施用一个或多个另外的剂量的表达嵌合抗原受体(CAR)的细胞和/或淋巴细胞清除疗法,和/或重复所述方法的一个或多个步骤。在一些实施方案中,所述一个或多个另外的剂量与初始剂量相同。在一些实施方案中,所述一个或多个另外的剂量不同于初始剂量,例如更高,如比初始剂量高2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍或更多倍,或者更低,如比初始剂量低2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍或更多倍。在一些实施方案中,基于以下确定一个或多个另外的剂量的施用:受试者对初试治疗或任何先前治疗的反应、受试者的疾病负荷(如肿瘤负担、体积、尺寸或程度)、转移的程度或类型、分期和/或受试者发生毒性结局(例如,CRS、巨噬细胞激活综合征、肿瘤溶解综合征、神经毒性和/或针对所施用的细胞和/或重组受体的宿主免疫反应)的可能性或发生率。

[0501] 在一些实施方案中,将细胞作为组合治疗的一部分施用,如与另一种治疗性干预如抗体或工程化细胞或受体或药剂(如细胞毒性剂或治疗剂)同时施用或以任何顺序依序施用。在一些实施方案中,将细胞与一种或多种另外的治疗剂共同施用或与另一种治疗性干预联合施用(同时或以任何顺序依序施用)。在一些情境下,将细胞与另一种疗法在时间上足够接近地共同施用,使得细胞群增强一种或多种另外的治疗剂的效果,或反之亦然。在一些实施方案中,在所述一种或多种另外的治疗剂之前施用细胞。在一些实施方案中,在所述一种或多种另外的治疗剂之后施用细胞。在一些实施方案中,所述一种或多种另外的药剂包括细胞因子如IL-2,以例如增强持久性。在一些实施方案中,所述方法包括施用化学治疗剂。

[0502] 在一些实施方案中,所述方法包括在施用之前施用化学治疗剂(例如,调理性化学治疗剂),例如以减小肿瘤负荷。

[0503] 在一些方面,用免疫清除(例如,淋巴细胞清除)疗法预调理受试者可以改善过继细胞疗法(ACT)的效果。

[0504] 因此,在一些实施方案中,所述方法包括在开始细胞疗法之前将预调理剂施用于受试者,所述预调理剂如淋巴细胞清除剂或化学治疗剂,如环磷酰胺、氟达拉滨或其组合。例如,可以在开始细胞疗法之前至少2天(如之前至少3、4、5、6或7天),向受试者施用预调理剂。在一些实施方案中,在开始细胞疗法之前不超过7天(如之前不超过6、5、4、3或2天),向受试者施用预调理剂。

[0505] 在一些实施方案中,用环磷酰胺以在或在约20mg/kg与100mg/kg之间,如在或在约40mg/kg与80mg/kg之间的剂量对受试者进行预调理。在一些方面,用或用约60mg/kg的环磷酰胺对受试者进行预调理。在一些实施方案中,可以将环磷酰胺按单剂量施用或者可以按多个剂量施用,如每日施用、每隔一天施用或每三天施用。在一些实施方案中,将环磷酰胺每日施用一次,持续一天或两天。在一些实施方案中,在淋巴细胞清除剂包含环磷酰胺的情况下,按如下剂量向受试者施用环磷酰胺:在或在约100mg/m^2与500mg/m^2之间,如在或在约200mg/m^2与400mg/m^2之间或者250mg/m^2与350mg/m^2之间,包含端值。在一些情形中,向受试者施用约300mg/m^2的环磷酰胺。在一些实施方案中,可以将环磷酰胺按单剂量施用或者可以按多个剂量施用,如每日施用、每隔一天施用或每三天施用。在一些实施方案中,每天施用环磷酰胺,如持续1-5天,例如持续3至5天。在一些情形中,在开始细胞疗法之前每天向受

试者施用约300mg/m^2的环磷酰胺，持续3天。

[0506] 在一些实施方案中，当淋巴细胞清除剂包含氟达拉滨时，向受试者施用剂量在或在约1mg/m^2与100mg/m^2之间、如在或在约10mg/m^2与75mg/m^2之间、15mg/m^2与50mg/m^2之间、20mg/m^2与40mg/m^2之间或24mg/m^2与35mg/m^2之间的氟达拉滨(包含端值)。在一些情形中，向受试者施用约30mg/m^2的氟达拉滨。在一些实施方案中，可以将氟达拉滨按单一剂量施用或者可以按多个剂量施用，如每日施用、每隔一天施用或每三天施用。在一些实施方案中，每天施用氟达拉滨，如持续1-5天，例如持续3至5天。在一些情形中，在开始细胞疗法之前每天向受试者施用约30mg/m^2的氟达拉滨，持续3天。

[0507] 在一些实施方案中，淋巴细胞清除剂包含药剂的组合，如环磷酰胺和氟达拉滨的组合。因此，药剂的组合可包括任何剂量或施用时间表(如上述那些)下的环磷酰胺以及任何剂量或施用时间表(如上述那些)下的氟达拉滨。例如，在一些方面，在第一剂量或后续剂量之前，向受试者施用60mg/kg(约2g/m^2)的环磷酰胺和3至5次剂量的25mg/m^2氟达拉滨。

[0508] 在一些实施方案中，在施用细胞后，例如通过许多已知方法中的任一种测量工程化细胞群的生物学活性。待评估的参数包括工程化或天然T细胞或其他免疫细胞与抗原的特异性结合，其在体内例如通过成像进行评估，或离体例如通过ELISA或流式细胞术进行评估。在某些实施方案中，工程化细胞破坏靶细胞的能力可以使用任何合适的已知方法来测量，所述方法如描述于例如以下文献中的细胞毒性测定：Kochenderfer等人，J.Immunotherapy,32(7):689-702(2009)，和Herman等人J.Immunological Methods,285(1):25-40(2004)。在某些实施方案中，通过测定一种或多种细胞因子(如CD107a、IFNγ、IL-2和TNF)的表达和/或分泌来测量细胞的生物学活性。在一些方面，通过评估临床结果(如肿瘤负荷或负担的减少)来测量生物活性。

[0509] 在某些实施方案中，将工程化细胞以任何数量的方式进一步修饰，使得其治疗或预防功效增加。例如，可以将群体表达的工程化CAR或TCR直接或通过接头间接缀合至靶向部分。将化合物(例如，CAR或TCR)与靶向部分缀合的实践在本领域是已知的。参见例如，Wadwa等人，J.Drug Targeting 3:1 1 1(1995)和美国专利5,087,616。

[0510] 在一些实施方案中，将细胞作为组合治疗的一部分施用，如与另一种治疗性干预如抗体或工程化细胞或受体或药剂(如细胞毒性剂或治疗剂)同时施用或以任何顺序依序施用。在一些实施方案中，将细胞与一种或多种另外的治疗剂共同施用或与另一种治疗性干预联合施用(同时或以任何顺序依序施用)。在一些情境下，将细胞与另一种疗法在时间上足够接近地共同施用，使得细胞群增强一种或多种另外的治疗剂的效果，或反之亦然。在一些实施方案中，在所述一种或多种另外的治疗剂之前施用细胞。在一些实施方案中，在所述一种或多种另外的治疗剂之后施用细胞。在一些实施方案中，所述一种或多种另外的药剂包括细胞因子(如IL-2)例如以增强持久性。

IV.定义

[0511] 除非另外定义，否则本文使用的所有领域术语、符号和其他技术和科学术语或命名旨在具有与所要求保护的主题所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。在一些情况下，为了清楚和/或为了便于参考而在本文中定义具有通常理解的含义的术语，并且本文中包含的此类定义不应被解释为表示与本领域通常理解的实质性差异。

[0512] 除非上下文明确指示其他含义，否则如本文所用的单数形式“一个”、“一种”和“所

述”包括复数指示物。例如，“一种/个(a或an)”意指“至少一种/个”或“一种/个或多种/个”。

[0513] 贯穿本公开文本，所要求保护的主题的各个方面以范围形式呈现。应当理解，范围形式的描述仅仅是为了方便和简洁，并且不应被解释为对所要求保护的主题的范围的僵硬限制。因此，应该认为范围的描述具体公开了所有可能的子范围以及该范围内的单个数值。例如，在提供了值的范围的情况下，应理解，在该范围的上限和下限之间的每个中间值以及在所陈述范围内的任何其他所述或中间值涵盖在所要求保护的主题内。这些较小范围的上限和下限可以独立地被包括在所述较小范围内，并且也涵盖在所要求保护的主题内，受制于在所陈述范围内任何确切排除的限制。在所陈述范围包括限制中的一者或两者的情况下，排除了那些包括的限制中的任一者或两者的范围也包括在所要求保护的主题内。无论范围的广度如何，这都适用。

[0514] 如本文所用的术语“约”是指本技术领域的技术人员容易知道的相应值的常用误差范围。在本文中提及“约”某一值或参数时包括(并描述)涉及该值或参数本身的实施方案。

[0515] 如本文所用，受试者包括任何活的生物体，如人和其他哺乳动物。哺乳动物包括但不限于人和非人动物，包括农场动物、运动动物、啮齿动物和宠物。在特定实施方案中，受试者是人类受试者。

[0516] 如本文所用，当提及一种或多种特定细胞类型或细胞群时，“耗尽”是指例如与组合物中的细胞总数或组合物体积相比或者相对于其他细胞类型，如通过基于所述群体或细胞表达的标记的阴性选择，或通过基于不存在于待耗尽的所述细胞群或细胞上的标记的阳性选择来降低所述细胞类型或群体的数量或百分比。所述术语不要求从组合物完全去除细胞、细胞类型或群体。

[0517] 如本文所用，当提及一种或多种特定细胞类型或细胞群时，“富集”是指例如与组合物中的细胞总数或组合物体积相比，或者相对于其他细胞类型，如通过基于所述群体或细胞表达的标记的阳性选择，或通过基于在要耗尽的所述细胞群或细胞上不存在的标记的阴性选择，增加所述细胞类型或群体(例如，CCR7+细胞)的数量或百分比。所述术语不需要从组合物完全去除其他细胞、细胞类型或群体，并且不需要如此富集的细胞在经富集的组合物中以等于或甚至接近100％存在。

[0518] 如本文所用，细胞或细胞群针对特定标记是“阳性”或“+”的陈述是指，特定标记(通常是表面标记)在细胞上或细胞中的可检测存在。当提及表面标记时，所述术语是指如在一些实施方案中通过流式细胞术检测到的，表面表达的存在，例如通过用与所述标记特异性结合的抗体进行染色并检测所述抗体，其中染色通过流式细胞术以如下水平是可检测的，所述水平基本上高于在其他方面相同的条件下用同种型匹配对照进行相同程序检测到的染色，和/或所述水平基本上与已知对所述标记呈阳性的细胞的水平相似，和/或所述水平基本上高于已知对所述标记呈阴性的细胞的水平。

[0519] 如本文所用，细胞或细胞群对特定标记呈“阴性”的陈述是指特定标记(通常为表面标记)在细胞上或细胞中不存在实质上可检测的存在。当提及表面标记时，所述术语是指在一些实施方案中如通过流式细胞术检测到的，表面表达的不存在，例如通过用与标记特异性结合的抗体进行染色并且检测所述抗体，其中染色通过流式细胞术以如下水平没有检测到，所述水平基本上高于在其他方面相同的条件下用同种型匹配对照进行相同程序检测

到的染色，和/或所述水平基本上低于已知对所述标记呈阳性的细胞的水平，和/或所述水平与已知对所述标记呈阴性的细胞的水平相比是基本上相似的。

[0520] 如本文所用，在关于氨基酸序列(参考多肽序列)使用时，“氨基酸序列同一性百分比(%)”和“同一性百分比”定义为，在比对序列并在必要时引入空位以实现最大序列同一性百分比并且不将任何保守取代视作序列同一性的一部分之后，候选序列中与参考多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。用于确定氨基酸序列同一性百分比的比对可以以本领域熟知的多种方式来实现，例如使用公众可获得的计算机软件，如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适当参数，包括为了在所比较的序列的全长上实现最大比对所需要的任何算法。

[0521] 氨基酸取代可以包括用另一种氨基酸替代多肽中的一个氨基酸。通常可以根据以下常见的侧链特性将氨基酸进行分组：

(1)疏水性：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

(2)中性亲水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

(3)酸性：Asp、Glu；

(4)碱性：His、Lys、Arg；

(5)影响链取向的残基：Gly、Pro；

(6)芳族：Trp、Tyr、Phe。

[0522] 非保守氨基酸取代将涉及将这些类别之一的成员与另一个类别交换。

[0523] 如本文所用，“在对应于……的位置”或叙述核苷酸或氨基酸位置“对应于”所公开序列中的核苷酸或氨基酸位置(如序列表中所述)是指，在使用标准比对算法(如GAP算法)与所公开序列比对以使同一性最大化之后，所鉴定的核苷酸或氨基酸位置。通过比对序列，本领域技术人员可以例如使用保守和相同的氨基酸残基作为指导，鉴定相应的残基。通常，为了鉴定对应位置，比对氨基酸序列，使得获得最高阶匹配(参见例如：Computational Molecular Biology,Lesk,A.M.编辑,Oxford University Press,New York,1988；Biocomputing:Informatics and Genome Projects,Smith,D.W.编辑,Academic Press,New York,1993;Computer Analysis of Sequence Data,Part I,Griffin,A.M.和Griffin,H.G.编辑,Humana Press,New Jersey,1994;Sequence Analysis in Molecular Biology,von Heinje,G.,Academic Press,1987;以及Sequence Analysis Primer,Gribskov,M.和Devereux,J.编辑,M Stockton Press,New York,1991;Carrillo等人(1988)SIAM J Applied Math 48:1073)。

[0524] 如本文所用，术语“载体”是指能传播其所连接的另一核酸分子的核酸分子。所述术语包括作为自我复制核酸结构的载体以及掺入已引入其的宿主细胞基因组中的载体。某些载体能够指导它们可操作地连接的核酸的表达。此类载体在本文中称为“表达载体”。载体包括病毒载体，如逆转录病毒载体(例如慢病毒或γ逆转录病毒载体)，其具有携带另一种核酸并且能够插入宿主基因组中以供其繁殖的基因组。

[0525] 如本文所用，组合物是指两种或更多种产物、物质或化合物(包括细胞)的任何混合物。其可以是溶液、悬浮液、液体、粉末、糊剂、水性、非水性或其任何组合。

[0526] 如本文所用，术语“治疗(treatment、treat和treating)”是指疾病或病症或障碍，或与其相关的症状、不良反应或结果或者表型的完全或部分减轻或减少。在某些实施方案

中，效果是治疗性的，使得其部分或完全治愈疾病或病症或归因于其的不良症状。

[0527] 如本文所用，化合物或组合物或组合的“治疗有效量”是指在必要的剂量下和必要的时间段内有效实现所需治疗结果(如针对治疗疾病、病症或障碍)和/或治疗的药代动力学或药效动力学作用的量。治疗有效量可以根据诸如疾病状态、受试者的年龄、性别和体重和所施用的细胞群等因素而变化。

V.示例性实施方案

[0528] 所提供的实施方案包括：

1.一种用于提高原代T细胞的转导频率的方法，所述方法包括：(a)从包含原代T细胞群的生物样品中选择对CCR7的表面表达呈阳性的原代T细胞，从而产生富含CCR7+原代T细胞的输入群体；(b)在刺激条件下孵育所述输入群体，从而产生经刺激的组合物，其中所述刺激条件包括刺激试剂的存在，所述刺激试剂能够激活TCR复合物的一种或多种组分的一个或多个细胞内信号传导结构域和/或一种或多种共刺激分子的一个或多个细胞内信号传导结构域；以及

(c)将包含编码重组蛋白的异源多核苷酸的病毒载体颗粒与所述经刺激的组合物的T细胞一起孵育，从而产生经转导的细胞群。

2.一种用于提高原代T细胞的转导频率的方法，所述方法包括：(a)从包含原代T细胞群的生物样品中选择对CCR7的表面表达呈阳性的原代T细胞，从而产生富含CCR7+原代T细胞的输入群体；以及(b)将包含编码重组蛋白的异源多核苷酸的病毒载体颗粒与所述输入细胞群的T细胞一起孵育，从而产生经转导的细胞群。

3.一种用于提高原代T细胞的转导频率的方法，所述方法包括：(a)从包含原代T细胞群的生物样品中选择对CCR7的表面表达呈阳性的原代T细胞，从而产生富含CCR7+原代T细胞的输入群体；(b)任选地，在刺激条件下孵育所述输入群体，从而产生经刺激的组合物，其中所述刺激条件包括刺激试剂的存在，所述刺激试剂能够激活TCR复合物的一种或多种组分的一个或多个细胞内信号传导结构域和/或一种或多种共刺激分子的一个或多个细胞内信号传导结构域；以及(c)将包含编码重组蛋白的异源多核苷酸的病毒载体颗粒与所述输入细胞群或任选地所述经刺激的组合物的T细胞一起孵育，从而产生经转导的细胞群。

4.一种用于提高原代T细胞的转导频率的方法，所述方法包括：(a)在刺激条件下孵育富含CCR7+T细胞的原代T细胞的输入群体，从而产生经刺激的组合物，其中所述刺激条件包括刺激试剂的存在，所述刺激试剂能够激活TCR复合物的一种或多种组分的一个或多个细胞内信号传导结构域和/或一种或多种共刺激分子的一个或多个细胞内信号传导结构域；以及(b)将包含编码重组蛋白的异源多核苷酸的病毒载体颗粒与所述经刺激的组合物的T细胞一起孵育，从而产生经转导的细胞群。

5.一种用于提高原代T细胞的转导频率的方法，所述方法包括将包含编码重组蛋白的异源多核苷酸的病毒载体颗粒与富含CCR7+T细胞的原代T细胞的输入群体的T细胞一起孵育，从而产生经转导的细胞群。

6.根据实施方案1-5中任一项所述的方法，其中所述输入群体的至少60％、至少65％、至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％是CCR7+原代T细胞。

7.根据实施方案1-6中任一项所述的方法，其中所述输入群体的至少90％、至少

91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％是CCR7+原代T细胞。

8.根据实施方案1-7中任一项所述的方法，其中所述输入群体的至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％是CCR7+原代T细胞。

9.根据实施方案1-3和6中任一项所述的方法，其中所述选择不包括选择呈(a)CCR7+且CD45RO+；或(b)CCR7+且CD27+；或(c)CCR7+且CD45RA-；或(d)CCR7+且CD62L+；或(e)CCR7+且CD45RA+；或(f)CCR7+且CD62L-的细胞。

10.根据实施方案1-9中任一项所述的方法，其中所述输入群体不富含呈(a)CCR7+且CD45RO+；或(b)CCR7+且CD27+；或(c)CCR7+且CD45RA-；或(d)CCR7+且CD62L+；或(e)CCR7+且CD45RA+；或(f)CCR7+且CD62L-的T细胞。

11.根据实施方案1-10中任一项所述的方法，其中所述输入群体不富含CCR7+且CD45RO+的T细胞，任选地其中所述输入群体的少于85％的总细胞是CCR7+且CD45RO+的T细胞。

12.根据实施方案1-11中任一项所述的方法，其中所述输入群体不富含CCR7+且CD27+的T细胞，任选地其中所述输入群体的少于85％的总细胞是CCR7+且CD27+的T细胞。

13.根据实施方案1-12中任一项所述的方法，其中所述输入群体不富含CCR7+且CD45RA-的T细胞，任选地其中所述输入群体的少于85％的总细胞是CCR7+且CD45RA-的T细胞。

14.根据实施方案1-13中任一项所述的方法，其中所述输入群体不富含CCR7+且CD62L+的T细胞，任选地其中所述输入群体的少于85％的总细胞是CCR7+且CD62L+的T细胞。

15.根据实施方案1-14中任一项所述的方法，其中所述输入群体不富含CCR7+且CD45RA+的T细胞，任选地其中所述输入群体的少于85％的总细胞是CCR7+且CD45RA+的T细胞。

16.根据实施方案1-15中任一项所述的方法，其中所述输入群体不富含CCR7+且CD62L-的T细胞，任选地其中所述输入群体的少于85％的总细胞是CCR7+且CD62L-的T细胞。

17.根据实施方案1-3和6-16中任一项所述的方法，其中所述生物样品是血液样品。

18.根据实施方案1-3和6-16中任一项所述的方法，其中所述生物样品是白细胞单采术样品。

19.根据实施方案1-18中任一项所述的方法，其中所述T细胞是未经分级的T细胞，是经富集或分离的CD3+T细胞，是经富集或分离的CD4+T细胞，或者是经富集或分离的CD8+T细胞。

20.根据实施方案1-19中任一项所述的方法，其中所述输入群体包含至少80％、至少85％、至少90％或至少95％的作为CD4+T细胞或CD8+T细胞的细胞。

21.根据实施方案1-20中任一项所述的方法，其中所述输入群体包含至少80％、至少85％、至少90％或至少95％的作为CD4+T细胞的细胞。

22.根据实施方案1-20中任一项所述的方法，其中所述输入群体包含至少80％、至少85％、至少90％或至少95％的作为CD8+T细胞的细胞。

23.根据实施方案1-20中任一项所述的方法，其中所述输入群体包含至少80％、至

少85％、至少90％或至少95％的作为CD4+T细胞和CD8+T细胞的细胞。

24.根据实施方案23所述的方法，其中所述CD4+T细胞与所述CD8+T细胞的比率为或为约1:1、1:2、2:1、1:3或3:1。

25.根据实施方案1-19中任一项所述的方法，其中所述输入群体包含至少80％、至少85％、至少90％或至少95％的作为CD3+T细胞的细胞。

26.根据实施方案1-25中任一项所述的方法，其中所述输入群体包含在100x10^6个与500x10^6个之间的总T细胞。

27.根据实施方案1-26中任一项所述的方法，其中所述输入群体包含在200x10^6个与400x10^6个之间的总T细胞，任选地为或约300x10^6个总T细胞。

28.根据实施方案26或实施方案27所述的方法，其中所述总T细胞是活T细胞。

29.根据实施方案1-28中任一项所述的方法，其中所述经刺激的组合物的至少10％、至少20％、至少30％、至少40％、至少50％或至少60％的细胞：(i)表达选自HLA-DR、CD25、CD69、CD71、CD40L和4-1BB的表面标记；(ii)包括选自IL-2、IFN-γ和TNF-α的细胞因子的细胞内表达；(iii)处于细胞周期的G1期或较后期；和/或(iv)能够增殖。

30.根据实施方案1-29中任一项所述的方法，其中所述刺激试剂包括与TCR复合物的成员特异性结合、任选地与CD3特异性结合的一级药剂。

31.根据实施方案30所述的方法，其中所述刺激试剂进一步包括与T细胞共刺激分子特异性结合的二级药剂，任选地其中所述共刺激分子选自CD28、CD137(4-1-BB)、OX40或ICOS。

32.根据实施方案30或实施方案31所述的方法，其中所述一级药剂和/或二级药剂包括抗体，任选地其中所述刺激试剂包括与抗CD3抗体和抗CD28抗体或其抗原结合片段一起孵育。

33.根据实施方案30-32中任一项所述的方法，其中所述一级药剂和/或二级药剂存在于固体支持物的表面上。

34.根据实施方案33所述的方法，其中所述固体支持物是或包括珠。

35.根据实施方案30-34中任一项所述的方法，其中所述一级药剂和二级药剂可逆地结合在包含多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子的寡聚颗粒试剂的表面上。

36.根据实施方案35所述的方法，其中参考在SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列中的在链霉亲和素中的位置，在对应于位置44至47的序列位置处，所述多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子各自包含氨基酸序列Val^{44}-Thr^{45}-Ala^{46}-Arg^{47}或lle^{44}-Gly^{45}-Ala^{46}-Arg^{47}。

37.根据实施方案35所述的方法，其中所述多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子各自是链霉亲和素突变蛋白分子，并且其中所述多个链霉亲和素突变蛋白分子各自是或包含：a)SEQ ID NO:36、41、48-50或53-55中任一个所示的氨基酸序列；b)如下氨基酸序列，其与SEQ ID NO:36、41、48-50或53-55中的任一个展现出至少85％、86％、87％、88％、89％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％或更高的序列同一性，并且含有对应于Va144-Thr45-Ala46-Arg47或lle44-Gly45-Ala46-Arg47的氨基酸序列，和/或与生物素、生物素类似物或链霉亲和素结合肽可逆地结合；或c)a)或b)的与生物素、生物素类似物或链霉亲和素结合肽可逆地结合的功能片段，任选地其中所述多个链霉

亲和素突变蛋白分子各自是或包含SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列。

38.根据实施方案1-37中任一项所述的方法,其中所述经转导的细胞群包含至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的表达所述重组蛋白的细胞。

39.根据实施方案1-38中任一项所述的方法,其中所述经转导的细胞群包含至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的表达所述重组蛋白的细胞。

40.根据实施方案1-39中任一项所述的方法,其中与未通过选择步骤针对CCR7+原代T细胞富集的细胞组合物相比,在所述经转导的细胞群中表达所述重组蛋白的细胞的百分比大至少0.5倍、至少1倍、至少1.5倍或至少2倍。

41.根据实施方案1-40中任一项所述的方法,其中孵育所述病毒载体颗粒包括将所述病毒载体颗粒与所述输入群体或所述经刺激的组合物一起旋转接种的步骤。

42.根据实施方案41所述的方法,其中旋转接种包括在离心室的内部腔室中旋转所述病毒载体颗粒和所述输入群体或经刺激的组合物,其中所述旋转是在所述腔室侧壁的内表面处在如下相对离心力下进行,所述相对离心力是:在或在约500g与2500g之间、500g与2000g之间、500g与1600g之间、500g与1000g之间、600g与1600g之间、600g与1000g之间、1000g与2000g之间或1000g与1600g之间,每个都包含端值;或者至少或至少约600g、800g、1000g、1200g、1600g或2000g。

43.根据实施方案41或实施方案42所述的方法,其中旋转接种进行如下时间,所述时间是:大于或约5分钟、大于或约10分钟、大于或约15分钟、大于或约20分钟、大于或约30分钟、大于或约45分钟、大于或约60分钟、大于或约90分钟或者大于或约120分钟;或者在或在约5分钟与60分钟之间、10分钟与60分钟之间、15分钟与60分钟之间、15分钟与45分钟之间、30分钟与60分钟之间或45分钟与60分钟之间,每个都包含端值。

44.根据实施方案1-43中任一项所述的方法,所述方法进一步包括在所述孵育的至少一部分期间,使所述经刺激的组合物和/或病毒载体颗粒与转导佐剂接触。

45.根据实施方案2、3和5-44中任一项所述的方法,所述方法进一步包括,在所述孵育的至少一部分期间,使所述输入群体和/或病毒载体颗粒与转导佐剂接触。

46.根据实施方案44所述的方法,其中所述接触是在将所述病毒载体颗粒与所述输入群体或所述经刺激的组合物一起旋转接种之前、同时或之后进行。

47.根据实施方案1-46中任一项所述的方法,其中所述病毒载体颗粒的孵育的至少一部分是在或在约37℃±2℃下进行。

48.根据实施方案1-47中任一项所述的方法,其中所述病毒载体颗粒的孵育的至少一部分是在所述旋转接种之后进行。

49.根据实施方案47或实施方案48所述的方法,其中所述病毒载体颗粒的孵育的所述至少一部分进行不超过或不超过约2小时、4小时、12小时、18小时、24小时、30小时、36小时、48小时、60小时或72小时。

50.根据实施方案47-49中任一项所述的方法,其中所述病毒载体颗粒的孵育的所述至少一部分进行或进行约24小时。

51.根据实施方案1-50中任一项所述的方法，其中所述病毒载体颗粒的孵育的总持续时间不超过12小时、24小时、36小时、48小时或72小时。

52.根据实施方案1-51中任一项所述的方法，其中所述病毒载体颗粒是慢病毒载体颗粒。

53.根据实施方案52所述的方法，其中所述慢病毒载体颗粒是复制缺陷型的。

54.根据实施方案1-53中任一项所述的方法，其中所述病毒载体颗粒被病毒包膜糖蛋白假型化。

55.根据实施方案54所述的方法，其中所述病毒包膜糖蛋白是VSV-G。

56.根据实施方案1-55中任一项所述的方法，其中将所述病毒载体颗粒在小于或小于约20.0或者小于或小于约10.0的感染复数下孵育。

57.根据实施方案1-56中任一项所述的方法，其中：将所述病毒载体颗粒在从或从约1.0IU/细胞至10IU/细胞或2.0IU/细胞至5.0IU/细胞的感染复数下孵育；或者将所述病毒载体颗粒在至少或至少约1.6IU/细胞、1.8IU/细胞、2.0IU/细胞、2.4IU/细胞、2.8IU/细胞、3.2IU/细胞、3.6IU/细胞、4.0IU/细胞、5.0IU/细胞、6.0IU/细胞、7.0IU/细胞、8.0IU/细胞、9.0IU/细胞或10.0IU/细胞的感染复数下孵育。

58.根据实施方案1-57中任一项所述的方法，其中所述经刺激的组合物包含至少为或约至少或约$50x10^6$个细胞、$100x10^6$个细胞或$200x10^6$个细胞。

59.根据实施方案1、3、4和6-58中任一项所述的方法，其中所述经刺激的组合物包含在为或约$50x10^6$个与为或约$300x10^6$个之间的细胞，包含端值，任选地在为或约$100x10^6$个与为或约$200x10^6$个之间的细胞，包含端值。

60.根据实施方案2和6-59中任一项所述的方法，其中所述输入群体包含至少为或约至少或约$50x10^6$个细胞、$100x10^6$个细胞或$200x10^6$个细胞。

61.根据实施方案2和6-59中任一项所述的方法，其中所述输入群体包含在为或约$50x10^6$个与为或约$300x10^6$个之间的细胞，包含端值，任选地在为或约$100x10^6$个与为或约$200x10^6$个之间的细胞，包含端值。

62.根据实施方案1-61中任一项所述的方法，其中与所述病毒颗粒一起孵育的所述T细胞包括至少为或约至少或约$50x10^6$个细胞、$100x10^6$个细胞或$200x10^6$个细胞。

63.根据实施方案1-61中任一项所述的方法，其中与所述病毒颗粒一起孵育的所述T细胞包括在为或约$50x10^6$个与为或约$300x10^6$个之间的细胞，包含端值，任选地在为或约$100x10^6$个与为或约$200x10^6$个之间的细胞，包含端值。

64.根据实施方案1-63中任一项所述的方法，其中所述重组蛋白是抗原受体。

65.根据实施方案64所述的方法，其中所述抗原受体是转基因T细胞受体(TCR)。

66.根据实施方案64所述的方法，其中所述抗原受体是嵌合抗原受体(CAR)。

67.根据实施方案66所述的方法，其中所述CAR包含与靶抗原特异性结合的细胞外抗原识别结构域、包含ITAM的细胞内信号传导结构域以及连接所述细胞外结构域和所述细胞内信号传导结构域的跨膜结构域。

68.根据实施方案67所述的方法，其中所述细胞内信号传导结构域包括CD3-zeta(CD3ζ)链的细胞内结构域。

69.根据实施方案67或实施方案68所述的方法，其进一步包含连接所述细胞外结

构域和所述细胞内信号传导结构域的跨膜结构域。

70.根据实施方案69所述的方法,其中所述跨膜结构域包含CD28的跨膜部分。

71.根据实施方案67-70中任一项所述的方法,其中所述细胞内信号传导结构域进一步包括T细胞共刺激分子的细胞内信号传导结构域。

72.根据实施方案71所述的方法,其中所述T细胞共刺激分子选自CD28和41BB。

73.根据实施方案64-72中任一项所述的方法,其中所述抗原受体与和疾病或病症相关的抗原特异性结合或者与通用标签特异性结合。

74.根据实施方案73所述的方法,其中所述疾病或病症是癌症、自身免疫性疾病或障碍或者感染性疾病。

75.根据实施方案1-74中任一项所述的方法,其中所述经转导的细胞群包含被所述异源多核苷酸转导的T细胞。

76.根据实施方案75所述的方法,其中所述经转导的细胞群中至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%或至少85%的T细胞被所述异源多核苷酸转导。

77.根据实施方案75或实施方案76所述的方法,其中所述经转导的细胞群中至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%或至少85%的T细胞被所述异源多核苷酸转导。

78.根据实施方案75-77中任一项所述的方法,其中至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的被所述异源多核苷酸转导的T细胞呈CCR7+。

79.根据实施方案75或实施方案76所述的方法,所述方法进一步包括从所述经转导的细胞群中回收或分离通过所述方法产生的经转导的T细胞。

80.根据实施方案1-79中任一项所述的方法,其中,在多个经转导的细胞群中,在所述经转导的细胞群中被所述异源多核苷酸转导的T细胞的百分比变化30%或更少、25%或更少、20%或更少、15%或更少或者10%或更少。

81.根据实施方案1-80中任一项所述的方法,所述方法是在体外或离体进行。

82.一种组合物,所述组合物包含通过根据实施方案1-81中任一项所述的方法产生的经转导的细胞群。

83.根据实施方案82所述的组合物,所述组合物进一步包含冷冻保存剂。

VI.实施例

[0529] 以下实施例被包括在内仅用于说明目的,并不旨在限制本发明的范围。

实施例1:供体T细胞之间转导频率的评估

[0530] 从来自多名患有复发性/难治性大B细胞淋巴瘤的人类受试者的白细胞单采术样品的经分离的PBMC中选择原代CD4+和CD8+T细胞。在重组IL-2、IL-7和IL-15的存在下,在与抗CD3和抗CD28抗体缀合的顺磁珠的存在下分开刺激CD4+和CD8+T细胞(各自约300x10^6个细胞),珠与细胞比率为约1:1。通过孵育将刺激进行18至30小时之间。然后将经刺激的细胞与目标体积的编码异源核酸(在此实施例中编码针对特定抗原(例如,CD19)的嵌合抗原受体(CAR))的慢病毒载体一起孵育,并且经由旋转接种进行转导。在10μg/ml硫酸鱼精蛋白的存在下转导细胞。在旋转接种后,将细胞在37℃±6℃下孵育长达72小时。评估经转导的CD4或CD8 T细胞的转导频率,如使用荧光标记的对CAR的细胞外抗原结合结构域具有特异性的

抗独特型抗体通过流式细胞术所测量。转导频率计算为经转导的供体细胞群(CD4或CD8细胞)中CD3+CAR+细胞的百分比。

[0531] 如表E1所示,针对CD4和CD8细胞群都观察到转导频率的高度变化。CD4细胞的转导频率的范围从35%-93%,取决于供体;并且CD8细胞的转导频率的范围从16%-92%,取决于供体。

表E1

细胞群	供体样品(n)	分布拟合	转导频率(% CD3+CAR+)				
			范围				
			最小值	最大值	平均值	中值	标准偏差
CD4	277	Johnson SI	35	93	67	67	10.8
CD8	267	Johnson SI	16	92	63	65	15.4

[0532] 进行研究以确定可能影响T细胞转导频率差异的因素。基本上如上所述,从来自多个人类供体白细胞单采术样品的经分离的PBMC中选择原代CD4+和CD8+T细胞,用抗CD3/抗CD28顺磁珠进行刺激,并且用含有编码异源蛋白的核酸的慢病毒载体进行转导。对如上所述的单独的CD4+和CD8+T细胞群以及CD4+和CD8+T细胞群进行实验。评估诸如供体、载体批数、CD4和/或CD8 T细胞亚型、用于转导的过程和分析可变性等因素与转导频率差异的关联。如表E2所示,这些研究证明,T细胞转导频率总差异的主要来源(约70%)可归因于供体T细胞群的异质性。

表E2

T细胞组分	健康人类供体	载体批数	所制造的T细胞组分批数	统计检验	与供体异质性相关的差异(%)
CD4和CD8	6	8	70	混合模型约束最大似然法	67*
CD4	7	7	21	随机效应约束最大似然法	87**
CD8	7	7	21	随机效应约束最大似然法	83**

*研究考虑了供体、组分、过程和分析可变性的影响

**研究考虑了供体、过程和分析可变性的影响

[0533] 为了进一步评估供体相比于病毒载体对转导频率差异的贡献,进行载体滴定实验,其中载体的量通过体积滴定增加。基本上如上所述,分离、刺激和转导来自六名人类供体的CD4和CD8 T细胞。如图1所示,观察到供体之间T细胞的最大可转导频率的变化,并且这种变化不能通过增加载体的滴定来克服。这证明,来自不同供体的T细胞群之间存在似乎影响转导频率的差异。

实施例2:T细胞子集之间转导频率的评估

[0534] 基本上如实施例1所述,用编码嵌合抗原受体(CAR)的慢病毒载体转导包括CD4细胞或CD8细胞的T细胞组合物。

[0535] 在一项研究中,从来自3名健康供体的白细胞单采术样品的经分离的PBMC中分开选择CD4+和CD8+T细胞。使用如实施例1所述的抗独特型抗体,在用病毒载体接种后24、48和72小时监测转导频率。还通过流式细胞术分析细胞以基于分化标记CCR7进行表型表征。分

化程度较低的幼稚T细胞(T_n)和中枢记忆T细胞(T_{cm})的特征在于CCR7表达(CCR7+)，并且分化程度较高的效应T细胞(T_e)和效应记忆T细胞(T_{em})的特征在于不存在CCR7表达(CCR7-)。

[0536] 结果描绘于图2A(CD4)和图2B(CD8)中。在图2A和图2B中的每一个中，左上图示出了激活和转导之前的T细胞组合物(输入或经选择的组合物)，右上图示出了这些T细胞子集中的所得转导频率，并且下图示出了每个群体代表的经转导的T细胞的比例。线代表观察到的数据的范围。如图2A和图2B的右上图所示，通过流式细胞术进行的表型表征都证明，特征在于CCR7+表达的分化程度较低的T_n和T_{cm}细胞的转导频率高于特征在于不存在CCR7表达的分化程度较高的T_e和T_{em}细胞。如图2A和图2B的下图所示，相当大比例的经转导的CD4和CD8 T细胞是被表征为CCR7+的那些。这些结果证明，CCR7+T细胞对转导的敏感性较高，而CCR7-T细胞对转导的敏感性较低，从而证明在CD4和CD8T细胞中在CCR7表达与被编码异源蛋白的病毒载体转导之间都存在关联。

[0537] 通过如下方式以更大规模进行进一步研究：从两名健康人类供体中选择CD4+和CD8+T细胞，然后分别各自用抗CD3/抗CD28顺磁珠刺激约$300x10^6$个细胞，并且经由用目标体积的编码CAR的慢病毒载体旋转接种进行转导。如上所述，除了在用病毒载体接种后0、24、48、72和120小时外，针对CCR7表达评估转导频率和表型表征。结果描绘于图3A(CD4+)和图3B(CD8+)中。在每个图中，左上图示出了激活和转导之前的T细胞组合物，右上图示出了这些T细胞子集中的所得转导频率，并且下图示出了每个群体代表的经转导的T细胞的比例。线代表观察到的数据的范围。与上述较小规模的研究类似，相当大比例的经转导的CD4和CD8 T细胞是被表征为CCR7+的那些(图3A和图3B，下图)，并且如图3A和图3B的右上图所示，也在CD4和CD8 T细胞中在CCR7表达与被病毒载体转导之间都观察到相关性，尽管在CD8 T细胞组合物中展示出更强的相关性。

[0538] 在实施例1的研究中描述的患有复发性/难治性大B细胞淋巴瘤的受试者中，通过流式细胞术评估经选择的呈CCR7+相比于CCR7-的CD4和CD8 T细胞亚群的频率(n＝145)。结果描绘于图4中，其证明，CCR7表达在CD4和CD8 T细胞群中都是高度可变的。如图4所示的箱指示四分位距，而线指示整体范围。由于在从患者样品中选择CD4+和CD8+T细胞后发生转导，因此该数据揭示到，CCR7+相比于CCR7-T细胞的相对比例在转导时在患者材料之间高度可变。例如，发现在这项研究中患有复发性/难治性大B细胞淋巴瘤的一组受试者(n＝133)中CD8 T细胞的T细胞转导频率与紧接转导步骤之前CCR7+T细胞的百分比高度相关(n＝133;Spearman秩相关系数，p值<0.0006，Rho 0.302)。

[0539] 综上所述，来自这些研究的结果表明，患者样品之间转导频率的可变性主要是由于患者的T细胞亚群组成的差异，如CCR7+相比于CCR7-亚群的比例。这些结果与如下方法一致，其中通过在转导之前首先从患者样品中选择CCR7+T细胞，可以最小化或降低转导频率的可变性。

[0540] 本发明并不旨在限于具体公开的实施方案的范围，所提供的实施例例如是为了说明本发明的各个方面。根据本文的描述和传授，对组合物和方法的各种修改将变得清楚。可以在不脱离本公开文本的真实范围和精神的情况下实践这些变化，并且这些变化旨在落入本公开文本的范围内。

序列

SEQ ID NO:	序列	描述
1	LQSRPEPTAPPEESFRFGVETTTPPQKQEPIDKELYPLTSLRSLFGN DPSSQ	HIV-1 p6
2	PMAQVHQGLMPTAPPEDPAVDLLKNYMQLGKQQREKQRESRE KPYKEVTEDLLHLNSLFGGDQ	P6 Gag
3	DXAXXLL	P6 Gag包装基序
4	DPAVDLL	P6包装基序
5	DPAVDLLKNY	P6包装基序
6	LQSRPEPTAPPEESDPAVDLLTTPPQKQEPIDKELYPLTSLRSLFG NDPSSQ	杂合或嵌合p6结构域
7	WXXXXXXXXXXXAXXH	Wx4Φx2Φx3AΦxH基序
8	ESKYGPPCPPCP	间隔子(IgG4铰链)(aa)
9	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCCTTGCCCT	间隔子(IgG4铰链)(nt)
10	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	铰链-CH3间隔子
11	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGK	铰链-CH2-CH3间隔子
12	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEK KKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKA TFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQS QHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAQAPV KLSLNLLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTS GFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSR TLLNASRSLEVSYVTDH	IgD-铰链-Fc
13	LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR	T2A
14	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKH FKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFL LIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLR SLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGEN SCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCN LLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYI DGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGC TGPGLEGCPTNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM	tEGFR
15	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28(登录号P10747的氨基酸153-179)
16	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28(登录号P10747的氨基酸114-179)
17	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	CD28(P10747的氨基酸180-220)

18	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	CD28（LL至GG）
19	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	4-1BB（Q07011.1的氨基酸214-255）
20	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3ζ
21	RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3ζ
22	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3ζ
23	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM	tEGFR
24	EGRGSLLTCGDVEENPGP	T2A
25	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
26	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
27	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
28	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
29	-PGGG-(SGGGG)5-P-，其中P是脯氨酸，G是甘氨酸并且S是丝氨酸	接头
30	GSADDAKKDAAKKDGKS	接头
31	atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacacccagcattcctcctgatccca	GMCSFR α链信号序列
32	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP	GMCSFR α链信号序列
33	MALPVTALLLPLALLLHA	CD8 α信号肽
34	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAVGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAASIDAAKKAGVNNGNPLDAVQQ	链霉亲和素物种：阿维丁链霉菌 UniProt编号P22629
35	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAVGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	最小链霉亲和素物种：阿维丁链霉菌
36	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTY**IGAR**GNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	突变蛋白链霉亲和素 Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47 物种：阿维丁链霉菌
37	WSHPQFEK	Strep-tag® II
38	WSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHPQFEK	Twin-Strep-tag

39	WSHPQFEKGGGSGGGSWSHPQFEK	Twin-Strep-tag
40	WSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK	Twin-Strep-tag
41	MEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTY**IGAR**GNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	突变蛋白链霉亲和素 Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47 物种：阿维丁链霉菌
42	-Trp-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa-	链霉亲和素结合肽 Xaa是任何氨基酸； Yaa是Gly或Glu Zaa是Gly、Lys或Arg
43	Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly	链霉亲和素结合肽，Strep-tag®
44	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Xaa)n-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-	链霉亲和素结合肽的顺序模块 Xaa是任何氨基酸； n是8或12
45	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)n-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys	链霉亲和素结合肽的顺序模块 n是2或3
46	SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHPQFEK	Twin-Strep-tag
47	SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK	Twin-Strep-tag
48	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTY**VTAR**GNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAASIDAAKKAGVNNGNPLDAVQQ	突变蛋白链霉亲和素 Val44-Thr45-Ala46-Arg47 物种：阿维丁链霉菌
49	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTY**VTAR**GNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	突变蛋白链霉亲和素 Val44-Thr45-Ala46-Arg47 物种：阿维丁链霉菌
50	MEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTY**VTAR**GNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	突变蛋白链霉亲和素 Val44-Thr45-Ala46-Arg47 物种：阿维丁链霉菌

51	His-Pro-Gln-Phe	链霉亲和素结合肽
52	Oaa-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa	链霉亲和素结合肽 Oaa是Trp、Lys或Arg；Xaa是任何氨基酸；Yaa是Gly或Glu；Zaa是Gly、Lys或Arg
53	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTY**I GAR**GNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNA HSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDT FTKVKPSAASIDAAKKAGVNNGNPLDAVQQ	突变蛋白链霉亲和素 Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47 物种：阿维丁链霉菌
54	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTY**VTAR**GNAESRYVLT GRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVG GAEARINTQWLLTSGTTEENAGYSTLVGHDTFTKVKPSAAS	突变蛋白链霉亲和素 Val44-Thr45-Ala46-Arg47和Glu117、Gly120、Try121（突变蛋白m1-9）物种：阿维丁链霉菌
55	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFI**VTAG**ADGALTGTY VTARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRN AHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEENAGYSTLVGHD TFTKVKPSAAS	突变蛋白链霉亲和素 Val44-Thr45-Ala46-Arg47和Glu117、Gly120、Try121（突变蛋白m1-9）物种：阿维丁链霉菌
56	MEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAVGNAESRYV LTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYV GGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	最小链霉亲和素 物种：阿维丁链霉菌
57	RASQDISKYLN	CDR L1
58	SRLHSGV	CDR L2
59	GNTLPYTFG	CDR L3
60	DYGVS	CDR H1
61	VIWGSETTYYNSALKS	CDR H2
62	YAMDYWG	CDR H3
63	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGL EWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDD TAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS	VH
64	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTV KLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQ GNTLPYTFGGGTKLEIT	VL

65	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTV KLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQ GNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPG LVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGS ETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS	scFv
66	KASQNVGTNVA	CDR L1
67	SATYRNS	CDR L2
68	QQYNRYPYT	CDR L3
69	SYWMN	CDR H1
70	QIYPGDGDTNYNGKFKG	CDR H2
71	KTISSVVDFYFDY	CDR H3
72	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQ GLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLT SEDSAVYFCARKTISSVVDFYFDYWGQGTTVTVSS	VH
73	DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQS PKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFC QQYNRYPYTSGGGTKLEIKR	VL
74	GGGGSGGGGSGGGGS	接头
75	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQ GLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLT SEDSAVYFCARKTISSVVDFYFDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQ QKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKD LADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKR	scFv
76	HYYYGGSYAMDY	HC-CDR3
77	HTSRLHS	LC-CDR2
78	QQGNTLPYT	LC-CDR3
79	gacatccagatgacccagaccacctccagcctgagcgccagcctgggcgaccgggtgaccatcagc tgccgggccagccaggacatcagcaagtacctgaactggtatcagcagaagcccgacggcaccgtc aagctgctgatctaccacaccagccggctgcacagcggcgtgcccagccggtttagcggcagcggct ccggcaccgactacagcctgaccatctccaacctggaacaggaagatatcgccacctacttttgccag cagggcaacacactgccctacacctttggcggcggaacaaagctggaaatcaccggcagcacctcc ggcagcggcaagcctggcagcggcgagggcagcaccaagggcgaggtgaagctgcaggaaagc ggccctggcctggtggcccccagccagagcctgagcgtgacctgcaccgtgagcggcgtgagcctg cccgactacggcgtgagctggatccggcagccccccaggaagggcctggaatggctgggcgtgatc tggggcagcgagaccacctactacaacagcgccctgaagagccggctgaccatcatcaaggacaac agcaagagccaggtgttcctgaagatgaacagcctgcagaccgacgacaccgccatctactactgcg ccaagcactactactacggcggcagctacgccatggactactggggccagggcaccagcgtgaccg tgagcagc	编码scFv的序列
80	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	接头

序列表

<110> 朱诺治疗学股份有限公司

<120> T细胞转导方法

<130> 735042023140

<140> 尚未分配

<141> 同时随同提交

<150> US 62/967,005

<151> 2020-01-28

<160> 80

<170> 用于Windows的FastSEQ 4.0版

<210> 1

<211> 52

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 1

Leu Gln Ser Arg Pro Glu Pro Thr Ala Pro Pro Glu Glu Ser Phe Arg
1 5 10 15

Phe Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Pro Gln Lys Gln Glu Pro Ile Asp
20 25 30

Lys Glu Leu Tyr Pro Leu Thr Ser Leu Arg Ser Leu Phe Gly Asn Asp
35 40 45

Pro Ser Ser Gln
50

<210> 2

<211> 63

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 2

Pro Met Ala Gln Val His Gln Gly Leu Met Pro Thr Ala Pro Pro Glu
1 5 10 15

Asp Pro Ala Val Asp Leu Leu Lys Asn Tyr Met Gln Leu Gly Lys Gln
20 25 30

Gln Arg Glu Lys Gln Arg Glu Ser Arg Glu Lys Pro Tyr Lys Glu Val
35 40 45

Thr Glu Asp Leu Leu His Leu Asn Ser Leu Phe Gly Gly Asp Gln
50 55 60

<210> 3
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> 2, 4, 5
<223> Xaa可以是任何氨基酸
<220>
<221> 变体
<222> (4)...(5)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
<400> 3
Asp Xaa Ala Xaa Xaa Leu Leu
1 5
<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 4
Asp Pro Ala Val Asp Leu Leu
1 5
<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 5
Asp Pro Ala Val Asp Leu Leu Lys Asn Tyr
1 5 10
<210> 6
<211> 52

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 6

Leu Gln Ser Arg Pro Glu Pro Thr Ala Pro Pro Glu Glu Ser Asp Pro
1 5 10 15
Ala Val Asp Leu Leu Thr Thr Pro Pro Gln Lys Gln Glu Pro Ile Asp
20 25 30
Lys Glu Leu Tyr Pro Leu Thr Ser Leu Arg Ser Leu Phe Gly Asn Asp
35 40 45
Pro Ser Ser Gln
50

<210> 7
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> 6, 9, 14
<223> Xaa可以是Val, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr或Met
<220>
<221> 变体
<222> 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 12, 15
<223> Xaa可以是任何氨基酸
<400> 7

Trp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Xaa His
1 5 10 15

<210> 8
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 8

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 9
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 9
gaatctaagt acggaccgcc ctgccccccct tgccct 36
<210> 10
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 10
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Gly Gln Pro Arg
1 5 10 15
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
20 25 30
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
35 40 45
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
50 55 60
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
65 70 75 80
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
85 90 95
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
100 105 110
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
115
<210> 11
<211> 229
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 11
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe

1 5 10 15
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
20 25 30
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
35 40 45
Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
50 55 60
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
65 70 75 80
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
85 90 95
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
100 105 110
Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
115 120 125
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
130 135 140
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
145 150 155 160
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
165 170 175
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
180 185 190
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
195 200 205
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
210 215 220
Leu Ser Leu Gly Lys
225

<210> 12
<211> 282
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 12

Arg Trp Pro Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro Thr Ala
1 5 10 15
Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala

20 25 30

Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys

35 40 45

Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro

50 55 60

Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Tyr Leu Leu Thr Pro Ala Val Gln

65 70 75 80

Asp Leu Trp Leu Arg Asp Lys Ala Thr Phe Thr Cys Phe Val Val Gly

85 90 95

Ser Asp Leu Lys Asp Ala His Leu Thr Trp Glu Val Ala Gly Lys Val

100 105 110

Pro Thr Gly Gly Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Arg His Ser Asn Gly

115 120 125

Ser Gln Ser Gln His Ser Arg Leu Thr Leu Pro Arg Ser Leu Trp Asn

130 135 140

Ala Gly Thr Ser Val Thr Cys Thr Leu Asn His Pro Ser Leu Pro Pro

145 150 155 160

Gln Arg Leu Met Ala Leu Arg Glu Pro Ala Ala Gln Ala Pro Val Lys

165 170 175

Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser Asp Pro Pro Glu Ala Ala Ser

180 185 190

Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe Ser Pro Pro Asn Ile Leu Leu

195 200 205

Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu Val Asn Thr Ser Gly Phe Ala Pro

210 215 220

Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro Gly Ser Thr Thr Phe Trp Ala Trp Ser

225 230 235 240

Val Leu Arg Val Pro Ala Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Thr Tyr Thr

245 250 255

Cys Val Val Ser His Glu Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn Ala Ser Arg

260 265 270

Ser Leu Glu Val Ser Tyr Val Thr Asp His

275 280

<210> 13

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 13

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

Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg
20

<210> 14

<211> 357

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 14

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly
20 25 30

Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe
35 40 45

Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala
50 55 60

Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu
65 70 75 80

Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile
85 90 95

Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu
100 105 110

Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala
115 120 125

Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu
130 135 140

Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr
145 150 155 160

Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys
165 170 175

Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly
180 185 190

Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu
195 200 205

Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys

210 215 220
Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu
225 230 235 240
Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met
245 250 255
Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala
260 265 270
His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val
275 280 285
Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His
290 295 300
Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro
305 310 315 320
Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala
325 330 335
Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly
340 345 350
Ile Gly Leu Phe Met
355

<210> 15
<211> 27
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 15
Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
1 5 10 15
Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
20 25

<210> 16
<211> 66
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 16
Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn
1 5 10 15

Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu
20 25 30
Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly
35 40 45
Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe
50 55 60
Trp Val
65

<210> 17
<211> 41
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 17

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
1 5 10 15
Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
20 25 30
Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
35 40

<210> 18
<211> 41
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 18

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
1 5 10 15
Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
20 25 30
Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
35 40

<210> 19
<211> 42
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<220>

<223> 合成构建体
<400> 19
Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
1 5 10 15
Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
20 25 30
Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
35 40
<210> 20
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 20
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
1 5 10 15
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
50 55 60
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65 70 75 80
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110
<210> 21
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 21
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Glu Pro Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
1 5 10 15
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr

20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

<210> 22

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 22

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly
1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

<210> 23

<211> 335

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 23

Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu
1 5 10 15
Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile
20 25 30
Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe
35 40 45
Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr
50 55 60
Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn
65 70 75 80
Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg
85 90 95
Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile
100 105 110
Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val
115 120 125
Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp
130 135 140
Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn
145 150 155 160
Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu
165 170 175
Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser
180 185 190
Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu
195 200 205
Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln
210 215 220
Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly
225 230 235 240
Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro
245 250 255
His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr
260 265 270
Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His
275 280 285
Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro
290 295 300
Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala

305 310 315 320
Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met
325 330 335

<210> 24
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 24
Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro
1 5 10 15
Gly Pro

<210> 25
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 25
Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
1 5 10 15
Glu Glu Asn Pro Gly Pro
20

<210> 26
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 26
Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn
1 5 10 15
Pro Gly Pro

<210> 27
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成构建体
<400> 27
Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser
1 5 10 15
Asn Pro Gly Pro
20
<210> 28
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 28
Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val
1 5 10 15
Glu Ser Asn Pro Gly Pro
20
<210> 29
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 29
Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Pro
20 25 30
<210> 30
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 30
Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Gly Lys
1 5 10 15
Ser
<210> 31

<211> 66
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 31
atgcttctcc tggtgacaag ccttctgctc tgtgagttac cacacccagc attcctcctg 60
atccca 66
<210> 32
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 32
Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15
Ala Phe Leu Leu Ile Pro
20
<210> 33
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 33
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala
<210> 34
<211> 159
<212> PRT
<213> 阿维丁链霉菌(Streptomyces avidinii)
<220>
<223> UniProt编号P22629
<400> 34
Asp Pro Ser Lys Asp Ser Lys Ala Gln Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly
1 5 10 15
Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr

20 25 30

Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Glu Ser Ala Val Gly
35 40 45

Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro
50 55 60

Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys
65 70 75 80

Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr
85 90 95

Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser
100 105 110

Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp
115 120 125

Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser Ile Asp Ala Ala Lys
130 135 140

Lys Ala Gly Val Asn Asn Gly Asn Pro Leu Asp Ala Val Gln Gln
145 150 155

<210> 35

<211> 126

<212> PRT

<213> 阿维丁链霉菌(Streptomyces avidinii)

<220>

<223> 合成构建体

<400> 35

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe
1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Glu Ser
20 25 30

Ala Val Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val
50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser
65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu
85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val
100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser

115 120 125

<210> 36
<211> 126
<212> PRT
<213> 阿维丁链霉菌(Streptomyces avidinii)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 36

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe
1 5 10 15
Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ile Gly
20 25 30
Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp
35 40 45
Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val
50 55 60
Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser
65 70 75 80
Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu
85 90 95
Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val
100 105 110
Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser
115 120 125

<210> 37
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 37

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
1 5

<210> 38
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体

<400> 38
Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15
Gly Gly Gly Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
20 25
<210> 39
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 39
Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15
Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
20
<210> 40
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 40
Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15
Gly Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
20 25
<210> 41
<211> 127
<212> PRT
<213> 阿维丁链霉菌(Streptomyces avidinii)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 41
Met Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr
1 5 10 15
Phe Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ile
20 25 30
Gly Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr

35 40 45

Asp Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr
50 55 60

Val Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp
65 70 75 80

Ser Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp
85 90 95

Leu Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu
100 105 110

Val Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser
115 120 125

<210> 42
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> 2
<223> Xaa是任何氨基酸
<220>
<221> 变体
<222> 7
<223> Xaa是Gly或Glu
<220>
<221> 变体
<222> 8
<223> Xaa是Gly, Lys或Arg
<400> 42
Trp Xaa His Pro Gln Phe Xaa Xaa
1 5
<210> 43
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 43

Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly
1 5
<210> 44
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> 9
<223> Xaa是任何氨基酸
<220>
<221> 重复
<222> 9
<223> 重复8或12次
<400> 44
Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Xaa Trp Ser His Pro Gln Phe Glu
1 5 10 15
Lys
<210> 45
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 重复
<222> (9)...(12)
<223> 重复2或3次
<400> 45
Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Trp Ser His Pro
1 5 10 15
Gln Phe Glu Lys
20
<210> 46
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体
<400> 46
Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15
Gly Ser Gly Gly Gly Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
20 25 30
<210> 47
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 47
Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15
Gly Ser Gly Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
20 25 30
<210> 48
<211> 159
<212> PRT
<213> 阿维丁链霉菌(Streptomyces avidinii)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 48
Asp Pro Ser Lys Asp Ser Lys Ala Gln Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly
1 5 10 15
Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr
20 25 30
Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr Ala Arg Gly
35 40 45
Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro
50 55 60
Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys
65 70 75 80
Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr
85 90 95
Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser
100 105 110

Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp
115 120 125
Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser Ile Asp Ala Ala Lys
130 135 140
Lys Ala Gly Val Asn Asn Gly Asn Pro Leu Asp Ala Val Gln Gln
145 150 155

<210> 49
<211> 126
<212> PRT
<213> 阿维丁链霉菌(Streptomyces avidinii)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 49

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe
1 5 10 15
Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr
20 25 30
Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp
35 40 45
Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val
50 55 60
Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser
65 70 75 80
Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu
85 90 95
Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val
100 105 110
Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser
115 120 125

<210> 50
<211> 127
<212> PRT
<213> 阿维丁链霉菌(Streptomyces avidinii)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 50

Met Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr
1 5 10 15
Phe Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val

20 25 30

Thr Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr

35 40 45

Asp Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr

50 55 60

Val Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp

65 70 75 80

Ser Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp

85 90 95

Leu Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu

100 105 110

Val Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser

115 120 125

<210> 51

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 51

His Pro Gln Phe

1

<210> 52

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 1

<223> Xaa是Trp, Lys或Arg

<220>

<221> 变体

<222> 2

<223> Xaa是任何氨基酸

<220>

<221> 变体

<222> 7

<223> Xaa是Gly或Glu
<220>
<221> 变体
<222> 8
<223> Xaa是Gly, Lys或Arg
<400> 52
Xaa Xaa His Pro Gln Phe Xaa Xaa
1 5
<210> 53
<211> 159
<212> PRT
<213> 阿维丁链霉菌(Streptomyces avidinii)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 53
Asp Pro Ser Lys Asp Ser Lys Ala Gln Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly
1 5 10 15
Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr
20 25 30
Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ile Gly Ala Arg Gly
35 40 45
Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro
50 55 60
Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys
65 70 75 80
Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr
85 90 95
Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser
100 105 110
Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp
115 120 125
Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser Ile Asp Ala Ala Lys
130 135 140
Lys Ala Gly Val Asn Asn Gly Asn Pro Leu Asp Ala Val Gln Gln
145 150 155
<210> 54
<211> 126
<212> PRT
<213> 阿维丁链霉菌(Streptomyces avidinii)

<220>
<223> 合成构建体
<400> 54

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe
1 5 10 15
Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr
20 25 30
Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp
35 40 45
Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val
50 55 60
Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser
65 70 75 80
Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu
85 90 95
Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Glu Asn Ala Gly Tyr Ser Thr Leu Val
100 105 110
Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser
115 120 125

<210> 55
<211> 139
<212> PRT
<213> 阿维丁链霉菌(Streptomyces avidinii)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 55

Asp Pro Ser Lys Asp Ser Lys Ala Gln Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly
1 5 10 15
Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr
20 25 30
Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr Ala Arg Gly
35 40 45
Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro
50 55 60
Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys
65 70 75 80
Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr
85 90 95
Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser

100 105 110
Gly Thr Thr Glu Glu Asn Ala Gly Tyr Ser Thr Leu Val Gly His Asp
115 120 125
Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser
130 135
<210> 56
<211> 127
<212> PRT
<213> 阿维丁链霉菌(Streptomyces avidinii)
<220>
<223> 合成构建体
<400> 56
Met Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr
1 5 10 15
Phe Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Glu
20 25 30
Ser Ala Val Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr
35 40 45
Asp Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr
50 55 60
Val Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp
65 70 75 80
Ser Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp
85 90 95
Leu Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu
100 105 110
Val Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser
115 120 125
<210> 57
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR L1
<400> 57
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn
1 5 10
<210> 58
<211> 7

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR L2
<400> 58
Ser Arg Leu His Ser Gly Val
1 5
<210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR L3
<400> 59
Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly
1 5
<210> 60
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR H1
<400> 60
Asp Tyr Gly Val Ser
1 5
<210> 61
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR H2
<400> 61
Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15
<210> 62
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> CDR H3
<400> 62
Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
1 5
<210> 63
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> VH
<400> 63
Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15
Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30
Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80
Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 64
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> VL
<400> 64
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr
100 105

<210> 65

<211> 245

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> scFv

<400> 65

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Ser Thr Ser Gly
100 105 110

Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Glu Val Lys
115 120 125

Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser
130 135 140

Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser
145 150 155 160

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile
165 170 175

Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu

180 185 190
Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn
195 200 205
Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr
210 215 220
Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
225 230 235 240
Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 66
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR L1
<400> 66
Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala
1 5 10

<210> 67
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR L2
<400> 67
Ser Ala Thr Tyr Arg Asn Ser
1 5

<210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR L3
<400> 68
Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 69
<211> 5
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> CDR H1
<400> 69
Ser Tyr Trp Met Asn
1 5
<210> 70
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR H2
<400> 70
Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly
<210> 71
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR H3
<400> 71
Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10
<210> 72
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> VH
<400> 72
Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Gln Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 73
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> VL
<400> 73

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Thr Tyr Arg Asn Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser
65 70 75 80
Lys Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr
85 90 95
Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 74
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 74

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 75
<211> 245
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> scFv
<400> 75

Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Gln Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser
130 135 140
Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys
145 150 155 160
Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
165 170 175
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Ser Ala Thr Tyr Arg Asn
180 185 190
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
195 200 205
Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser Lys Asp Leu Ala Asp Tyr Phe
210 215 220
Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240
Leu Glu Ile Lys Arg
245

<210> 76
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> HC-CDR3
<400> 76
His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10
<210> 77
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> LC-CDR2
<400> 77
His Thr Ser Arg Leu His Ser
1 5
<210> 78
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> LC-CDR3
<400> 78
Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr
1 5
<210> 79
<211> 735
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> scFv
<400> 79
gacatccaga tgacccagac cacctccagc ctgagcgcca gcctgggcga ccgggtgacc 60
atcagctgcc gggccagcca ggacatcagc aagtacctga actggtatca gcagaagccc 120
gacggcaccg tcaagctgct gatctaccac accagccggc tgcacagcgg cgtgcccagc 180
cggtttagcg gcagcggctc cggcaccgac tacagcctga ccatctccaa cctggaacag 240
gaagatatcg ccacctactt ttgccagcag ggcaacacac tgccctacac ctttggcggc 300

ggaacaaagc tggaaatcac cggcagcacc tccggcagcg gcaagcctgg cagcggcgag 360
ggcagcacca agggcgaggt gaagctgcag gaaagcggcc ctggcctggt ggcccccagc 420
cagagcctga gcgtgacctg caccgtgagc ggcgtgagcc tgcccgacta cggcgtgagc 480
tggatccggc agcccccccag gaagggcctg gaatggctgg gcgtgatctg gggcagcgag 540
accacctact acaacagcgc cctgaagagc cggctgacca tcatcaagga caacagcaag 600
agccaggtgt tcctgaagat gaacagcctg cagaccgacg acaccgccat ctactactgc 660
gccaagcact actactacgg cggcagctac gccatggact actggggcca gggcaccagc 720
gtgaccgtga gcagc 735

<210> 80
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 接头
<400> 80

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
1 5 10 15
Lys Gly

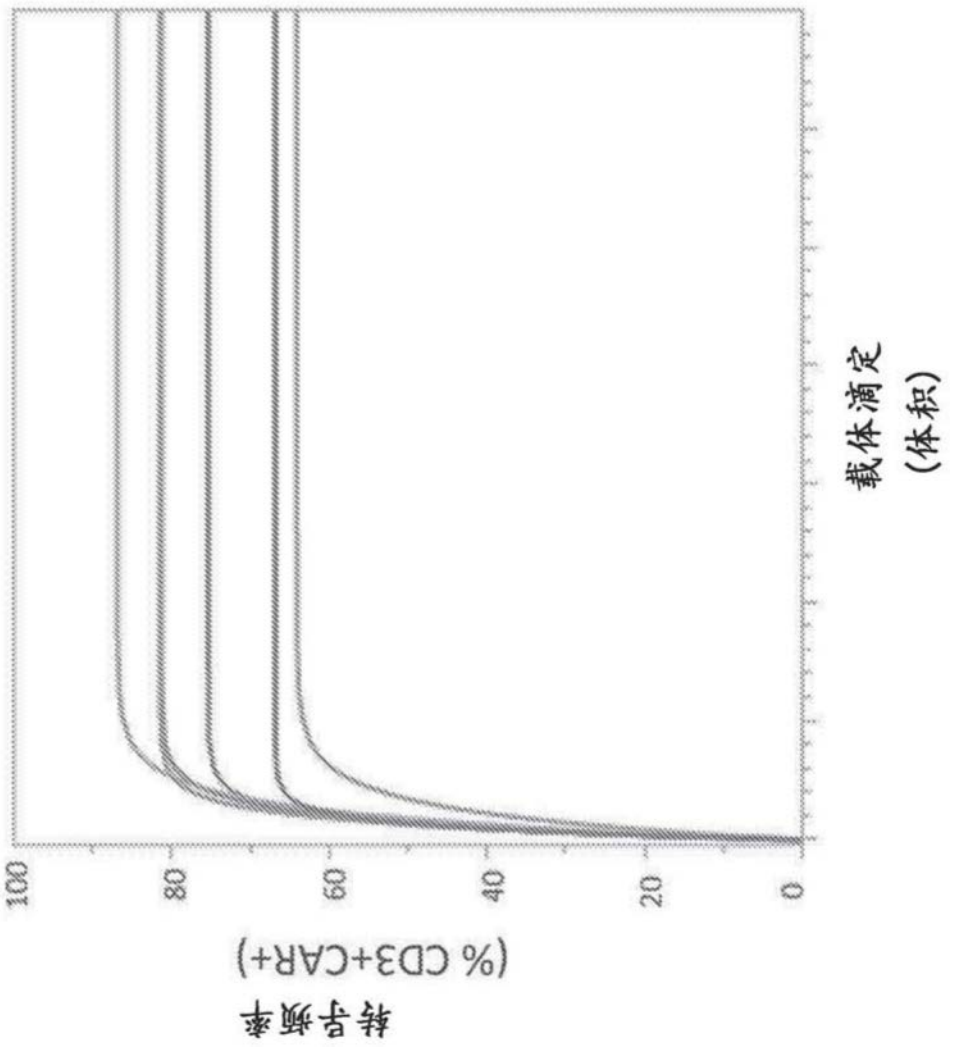


FIG.1

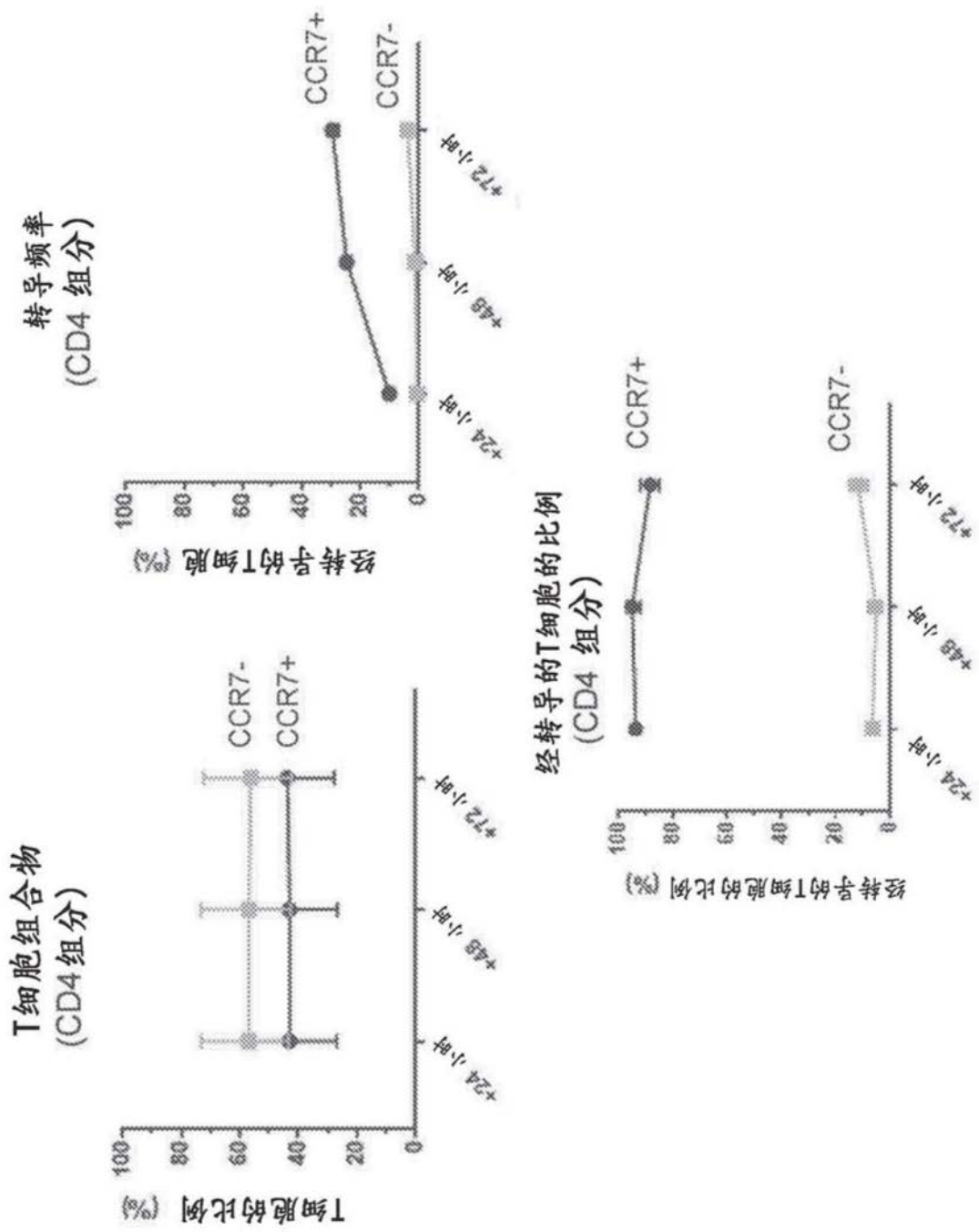

转导频率
(CD4 组分)
CCR7+
CCR7-
经转导的T细胞 (%)
100
80
60
40
20
0
*24 小时
*48 小时
*72 小时
T细胞组合物
(CD4组分)
CCR7-
CCR7+
T细胞的比例 (%)
经转导的T细胞的比例
(CD4 组分)
CCR7+
CCR7-
经转导的T细胞的比例 (%)

FIG.2A

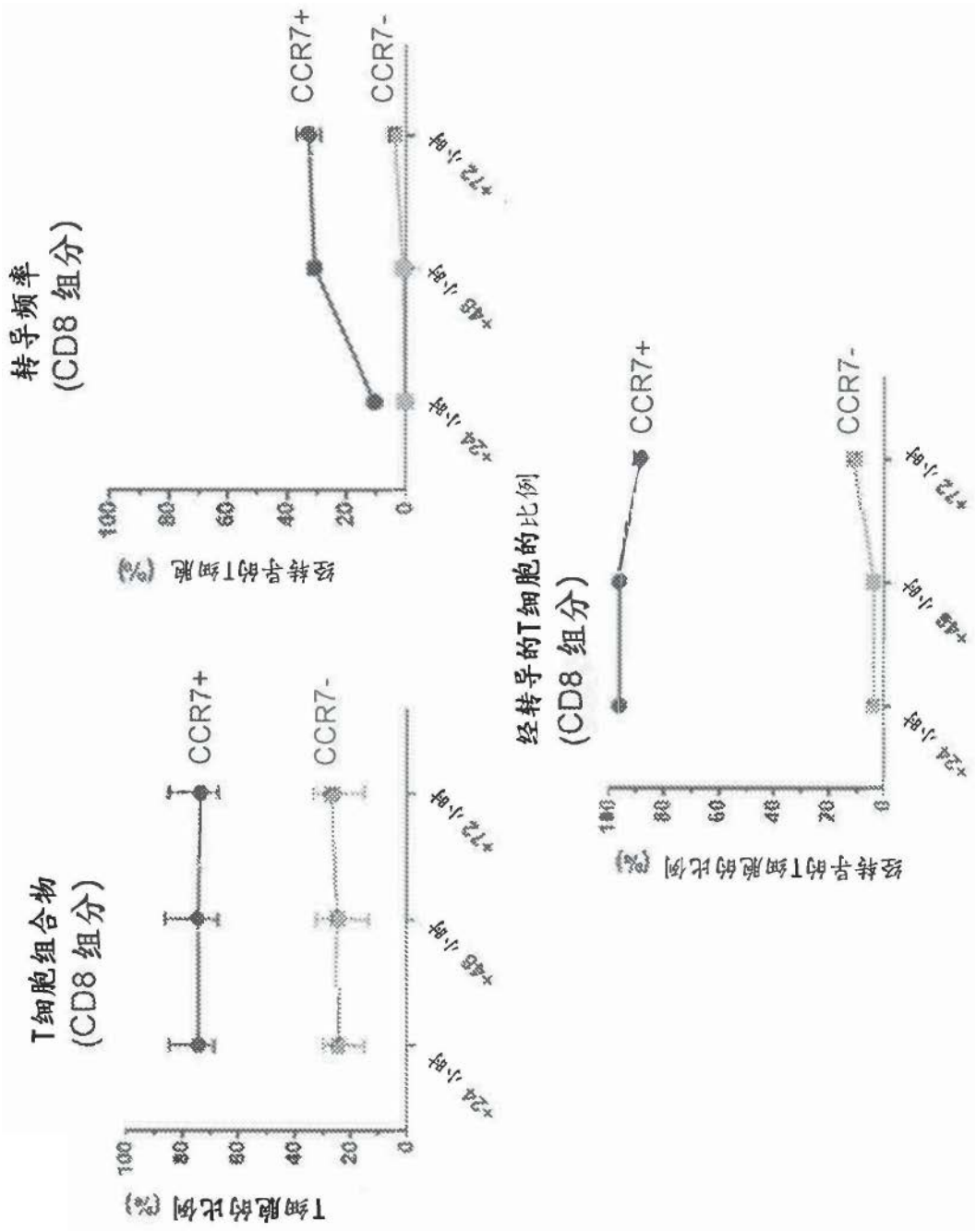

转导频率
(CD8 组分)
CCR7+
CCR7-
经转导的T细胞 (%)
100
80
60
40
20
0
24 小时
48 小时
72 小时
T细胞组合物
(CD8 组分)
T细胞的比例 (%)
经转导的T细胞的比例
(CD8 组分)

FIG.2B

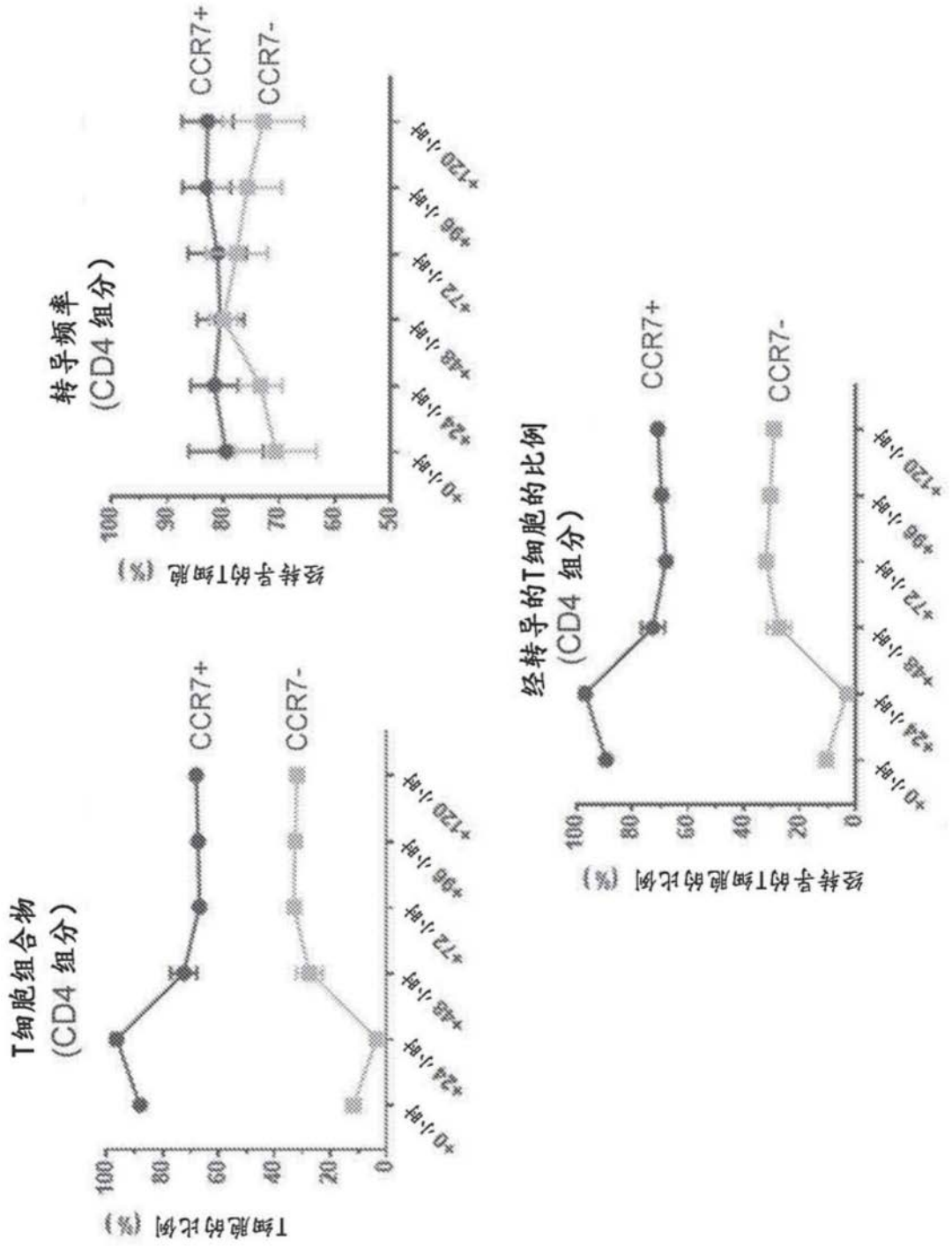

T细胞组合物
(CD4 组分)
T细胞的比例 (%)
100
80
60
40
20
0
CCR7+
CCR7-
+0 小时
+24 小时
+48 小时
+72 小时
+96 小时
+120 小时
转导频率
(CD4 组分)
经转导的T细胞 (%)
100
90
80
70
60
50
CCR7+
CCR7-
+0 小时
+24 小时
+48 小时
+72 小时
+96 小时
+120 小时
经转导的T细胞的比例
(CD4 组分)
经转导的T细胞的比例 (%)
100
80
60
40
20
0
CCR7+
CCR7-
+0 小时
+24 小时
+48 小时
+72 小时
+96 小时
+120 小时

FIG.3A

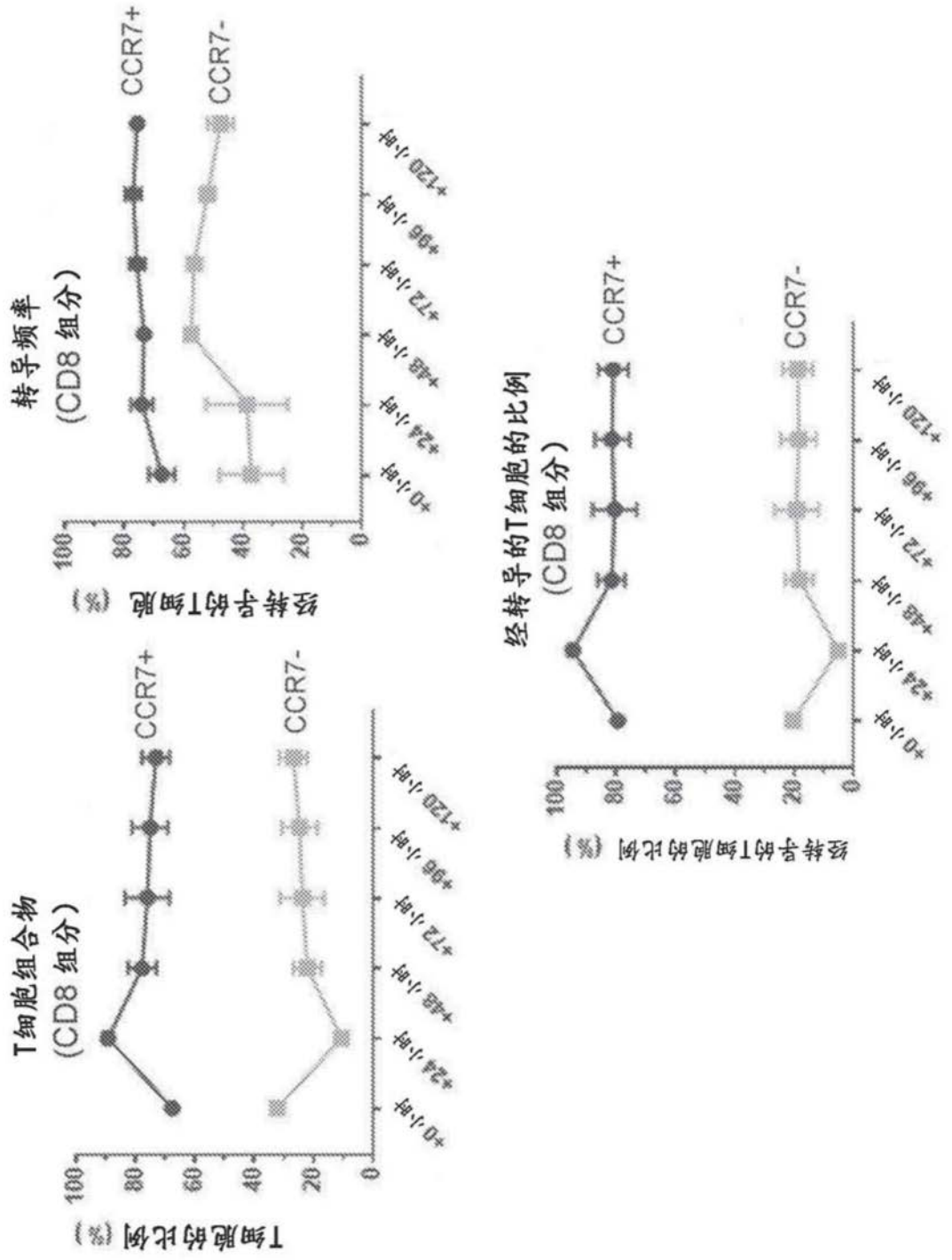

转导频率
(CD8 组分)
CCR7+
CCR7-
经转导的T细胞 (%)
100
80
60
40
20
0
+0 小时
+24 小时
+48 小时
+72 小时
+96 小时
+120 小时
T细胞组合物
(CD8 组分)
T细胞的比例 (%)
经转导的T细胞的比例
(CD8 组分)
经转导的T细胞的比例 (%)

FIG.3B

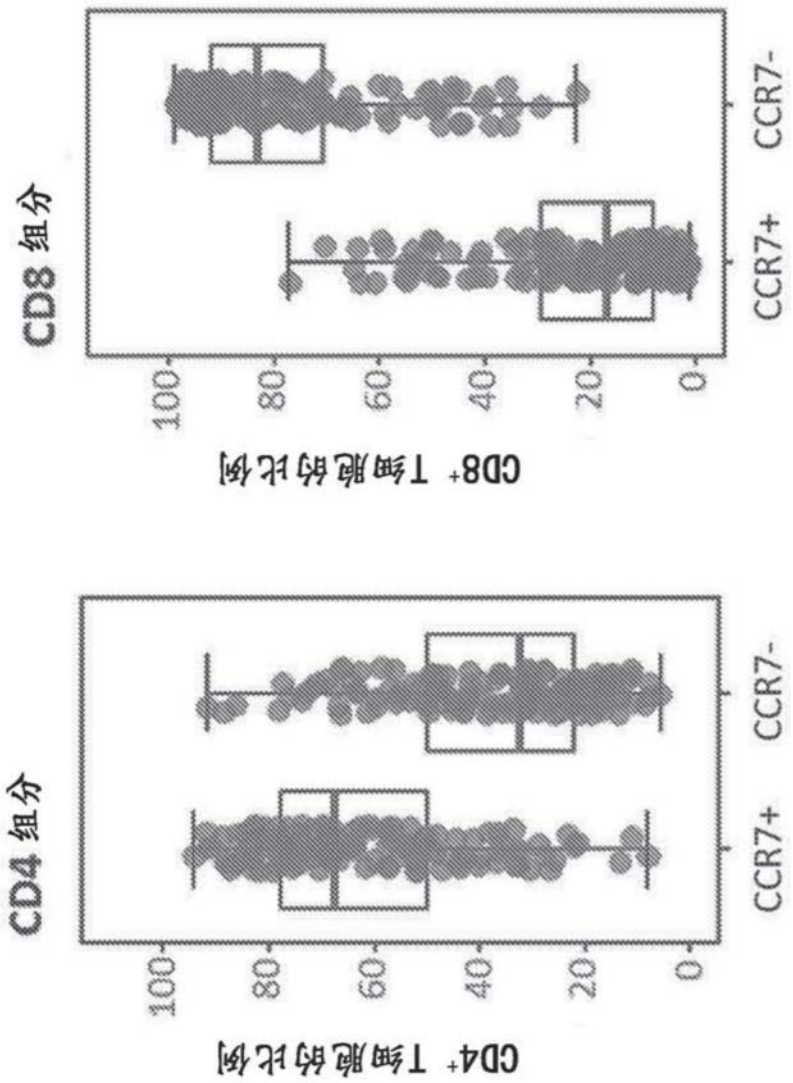

CD8 组分
CCR7+
CCR7-
0
20
40
60
80
100
CD8+ T细胞的比例
CD4 组分
CCR7+
CCR7-
0
20
40
60
80
100
CD4+ T细胞的比例

FIG.4