



(21)申請案號：111139574 (22)申請日：中華民國 111 (2022) 年 10 月 19 日

(51)Int. Cl. : C07K14/705 (2006.01) C07K16/30 (2006.01)  
 C12N5/0783 (2010.01) A61K38/17 (2006.01)  
 A61K35/17 (2015.01) A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2021/10/20 美國 63/257,608

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

(72)發明人：瑞分尼 凱蒂 REZVANI, KATY (US)；戴爾 梅 DAHER, MAY (LB)；巴薩 拉斐特 BASAR, RAFET (TR)；阿查里亞 桑尼爾 ACHARYA, SUNIL (US)；烏普雷蒂 納迪瑪 UPRETY, NADIMA (US)；努內茲 寇特司 安娜 凱倫 NUNEZ CORTES, ANA KAREN (MX)；恩斯里 艾蜜莉 ENSLEY, EMILY (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：48 項 圖式數：14 共 128 頁

## (54)名稱

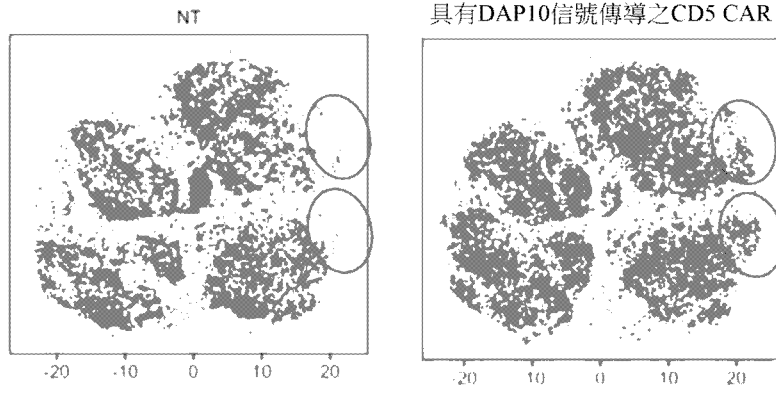
具最佳信號之 CAR 構築體之工程化 NK 細胞

## (57)摘要

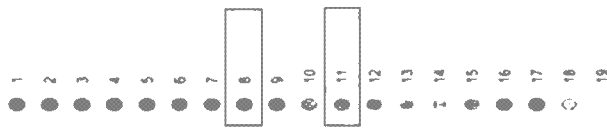
本發明之實施例涵蓋特定嵌合抗原受體構築體，其包含視情況存在的鉸鏈；CD28 跨膜域或 DAP10 跨膜域中之一者；DAP10 共刺激域及 CD3 $\zeta$ 。在特定實施例中，嵌合抗原受體由自然殺手(NK)細胞表現，且在一些情況下，NK 細胞進一步經修飾，諸如以便表現一或多種細胞介素及視情況存在之自殺基因。

Embodiments of the disclosure encompass particular chimeric antigen receptor constructs that comprise optionally a hinge, one of the CD28 transmembrane domain or the DAP10 transmembrane domain, DAP10 costimulatory domain, and CD3zeta. In particular embodiments, the chimeric antigen receptor is expressed by natural killer (NK) cells, and in some cases the NK cells are further modified, such as to express one or more cytokines and optionally a suicide gene.

指定代表圖：



Phenograph聚類



【圖1A】

## 【發明摘要】

### 【中文發明名稱】

具最佳信號之CAR構築體之工程化NK細胞

### 【英文發明名稱】

ENGINEERING NK CELLS WITH A CAR CONSTRUCT WITH OPTIMAL SIGNALING

### 【中文】

本發明之實施例涵蓋特定嵌合抗原受體構築體，其包含視情況存在的鉸鏈；CD28跨膜域或DAP10跨膜域中之一者；DAP10共刺激域及CD3 $\zeta$ 。在特定實施例中，嵌合抗原受體由自然殺手(NK)細胞表現，且在一些情況下，NK細胞進一步經修飾，諸如以便表現一或多種細胞介素及視情況存在之自殺基因。

### 【英文】

Embodiments of the disclosure encompass particular chimeric antigen receptor constructs that comprise optionally a hinge, one of the CD28 transmembrane domain or the DAP10 transmembrane domain, DAP10 costimulatory domain, and CD3zeta. In particular embodiments, the chimeric antigen receptor is expressed by natural killer (NK) cells, and in some cases the NK cells are further modified, such as to express one or more cytokines and optionally a suicide gene.

### 【指定代表圖】

圖1A

### 【代表圖之符號簡單說明】

無

## 【發明說明書】

### 【中文發明名稱】

具最佳信號之CAR構築體之工程化NK細胞

### 【英文發明名稱】

ENGINEERING NK CELLS WITH A CAR CONSTRUCT WITH OPTIMAL SIGNALING

### 【技術領域】

【0001】 本發明之實施例至少包括細胞生物學、分子生物學、免疫學及醫學(包括癌症醫學)之領域。

### 【先前技術】

【0002】 近年來，使用經嵌合抗原受體(CAR)轉導之自體T細胞進行授受性細胞療法已證實為用於治療癌症的極有效方法，從而獲得FDA批准用於B細胞白血病/淋巴瘤。<sup>1-3</sup>然而，挑戰仍然存在，其包括：使針對腫瘤細胞之細胞毒性與全身毒性解除關聯，發現靶抗原陰性復發之解決方案，以及開發通用的現成細胞療法產品以便在管控同種異體T細胞產品出現之問題時避免產生自體產物的邏輯障礙。<sup>4</sup>自然殺手(NK)細胞為用於CAR工程化之有吸引力的競爭者，因為其介導針對腫瘤細胞之有效細胞毒性且不同於T細胞，自然殺手(NK)細胞不具有在同種異體環境中引起移植抗宿主疾病(graft-versus-host-disease；GVHD)的可能性。<sup>5</sup>因此，NK細胞可作為現成細胞療法產品獲得而直接在臨床上使用。CAR-NK細胞亦保留其經由其原生受體識別且靶向腫瘤細胞之固有能力，因此原則上使疾病經由CAR標靶抗原之下調而逃逸之可能性低於使用CAR-T細胞所觀測到的可能性。<sup>6</sup>臍帶血(Cord blood；CB)為容易獲得的同種異體NK細胞

「現成」來源，其(作為一個實例)可使用符合GMP之通用抗原呈現細胞(universal antigen presenting cells；uAPC)擴增至高度功能性大劑量，該等抗原呈現細胞為經工程改造以表現CD48、4-1BBL及膜結合IL-21(mbIL21)的K562細胞。<sup>7</sup>

**【0003】** 本發明滿足授受性細胞療法技術中之長期需要，以提供能夠經由特定CAR組態靶向所需抗原之高效NK細胞。

**【發明內容】**

**【0004】** 本發明之實施例包括與有需要之個體之授受性細胞療法有關的方法及組合物，包括其中細胞為經修飾之NK細胞的細胞療法。經修飾之NK細胞表現特定合成蛋白質，使得其對治療特定醫學病狀尤其有效，諸如藉由允許NK細胞對合成蛋白質所靶向之細胞具有增強的功效。

**【0005】** 在特定實施例中，本發明係關於嵌合抗原受體構築體，其包含DAP10共刺激域(其與NK細胞生物學相關性較高，諸如與T細胞生物學相比)與DAP10跨膜域或CD28跨膜域的組合，及/或視情況與CD28鉸鏈的組合。與其他共刺激域(諸如對T細胞生物學更具特異性之CD28共刺激域)相比，此類包含DAP10之CAR構築體使得CAR-NK細胞抗腫瘤活性增強。在特定實施例中，此類構築體係用於改良授受性CAR-NK細胞療法，且藉由增強效力，由此能夠對有需要之個體使用更低數目之CAR-NK (或在替代情況下，CAR-T細胞)以降低毒性風險。

**【0006】** 本發明之特定實施例涵蓋使用CAR-NK細胞(或其他替代CAR媒劑)之授受性細胞療法，以治療患有任何類型之血液科惡性疾病、實體癌症及/或傳染病的患者。

**【0007】** 本發明之實施例包括編碼融合蛋白之聚核苷酸，該融合蛋

白包含：(a)視情況存在之CD28鉸鏈；及(b1) CD28跨膜域，或(b2) DAP10跨膜域；及(c) DAP10共刺激域。在特定實施例中，融合蛋白進一步定義為嵌合抗原受體(CAR)。在一些情況下，CAR進一步包含一或多個抗原結合域，包括其中抗原結合域靶向癌症抗原(實體腫瘤或血液科惡性疾病)或傳染原。在特定情況下，CAR進一步包含CD3 $\zeta$ ，諸如包含SEQ ID NO: 3之CD3 $\zeta$ 。聚核苷酸可編碼包含於SEQ ID NO: 1中之CD28跨膜域。在某些實施例中，CAR進一步包含一或多個額外共刺激域，諸如一或多個選自由CD28、DAP12、4-1BB、NKG2D、2B4及其組合組成之群的額外共刺激域。CAR可或可不另外包含信號肽，作為實例，諸如來自CD8、CD27、顆粒球-巨噬細胞群落刺激因子受體(GMSCF-R)、Ig重鏈(IgH)、CD3或CD4之信號肽。

**【0008】** 在特定實施例中，本發明之聚核苷酸包括進一步編碼一或多種所關注之額外多肽之聚核苷酸。編碼一或多種所關注之額外多肽之序列及編碼CAR之序列可藉由2A元件或IRES在聚核苷酸上分隔。在某些情況下，所關注之額外多肽為一或多種治療性蛋白質及/或增強細胞活性、擴增、細胞毒性及/或持久性之蛋白質。在一些情況下，所關注之額外多肽為自殺基因產物、一或多種細胞介素(例如，IL-15、IL-2、IL-12、IL-18、IL-21、IL-23及/或IL-7)及/或增強增殖、擴增及/或代謝適能的一或多種人類或病毒蛋白質。在細胞介素為IL-15之情況下，IL-15序列可包含SEQ ID NO: 8。

**【0009】** 在特定實施例中，任何種類之載體包含本發明之任何聚核苷酸，包括病毒載體，諸如腺病毒載體、腺相關病毒載體、慢病毒載體或反轉錄病毒載體，或非病毒載體，諸如質體。本發明亦涵蓋包含本文所涵

蓋之任何聚核苷酸及/或本文所涵蓋之任何載體的任何種類之細胞。細胞可為幹細胞或免疫細胞或其混合物。特異性免疫細胞包括以下：自然殺手(NK)細胞、T細胞、 $\gamma \delta$  T細胞、 $\alpha \beta$  T細胞、無變異NKT (iNKT)細胞、B細胞、巨噬細胞、間葉基質細胞、樹突狀細胞或其混合物。當免疫細胞為NK細胞時，NK細胞可來源於臍帶血、末梢血液、誘導性多能幹細胞、造血幹細胞、骨髓或來自細胞株，諸如來源於NK-92細胞株之NK細胞。NK細胞可來源於臍帶血單核細胞。NK細胞可為CD56+ NK細胞。在特定實施例中，NK細胞表現重組細胞介素，諸如IL-15、IL-2、IL-12、IL-18、IL-21、IL-7及/或IL-23。本文亦包括表現一或多種本發明之CAR分子的免疫細胞或幹細胞群體。當超過一種類型之CAR分子由細胞表現時，CAR可靶向不同抗原，諸如增強特異性結合預定細胞之能力。群體可包含或不包含任何種類之細胞之混合。

**【0010】** 本發明之實施例包括殺滅個體之癌細胞之方法，其包含向個體投與有效量之含有本文所涵蓋之任何聚核苷酸的任何細胞及/或含有本文所涵蓋之任何載體的任何細胞。在特定實施例中，含有聚核苷酸之細胞為免疫細胞，諸如NK細胞、T細胞、 $\gamma \delta$  T細胞、 $\alpha \beta$  T細胞、iNKT細胞、B細胞、巨噬細胞、樹突狀細胞或其混合物。免疫細胞可包含NK細胞，其中NK細胞來源於臍帶血(包括CB單核細胞)、末梢血液、誘導性多能幹細胞、造血幹細胞、骨髓、來自細胞株或其混合物。免疫細胞相對於個體可為自體或同種異體的。在方法之特定實施例中，一次性或超過一次向個體投與含有聚核苷酸之細胞及/或含有載體之細胞，且向個體投與含有聚核苷酸之細胞之間的持續時間可為1至24小時、1至7天、1至4週、1至12個月或一或多年。方法可進一步包含向個體提供有效量之額外療法的

步驟，諸如手術、輻射、基因療法、免疫療法或激素療法。可藉由輸注、注射、靜脈內、動脈內、腹膜內、氣管內、瘤內、肌肉內、用內視鏡、病灶內、顱內、經皮、皮下、局部、藉由灌注、在腫瘤微環境中或其組合向個體投與含有聚核苷酸之細胞及/或含有載體之細胞。

**【0011】** 前述內容已相當概括地概述本發明之特徵及技術優勢，以便可更好地理解以下實施方式。下文將描述額外特徵及優勢，其形成本文中之申請專利範圍之標的。熟習此項技術者應瞭解，所揭示之概念及特定實施例可容易用作修改或設計用於實現本發明設計之相同目的之其他結構的基礎。熟習此項技術者亦應意識到，此類等效構造並不脫離如在所附申請專利範圍中所闡述之精神及範疇。結合附圖考慮時，自以下描述將更好地理解新穎特徵，以及其他目標及優勢，咸信該等新穎特徵為本文中關於組織與操作方法所揭示之設計的特徵。然而，應明確地理解，各圖僅出於說明及描述之目的而提供，且不希望成為本發明之限制定義。

#### **【圖式簡單說明】**

**【0012】** 為了更完整理解本發明，現在結合附圖對以下描述進行參考。

**【0013】** 圖1A至圖1B. 使用質譜流式細胞技術面板進行表型分型。1A. TSNE phenograph圖，其展示未轉導之NT (左)及CD5CAR-NK CD28TMDAP10CD3z轉導之NK細胞之不同聚類。聚類用如phenograph圖下所指示之色碼圖例編號。CARCD5NK細胞中表現之2個新聚類(#8及#11)藉由圓形及矩形突出顯示。1B. 熱圖，其展示各聚類(Y軸上指示)中各種標記物(X軸上指示)之標準化表現。聚類#8及#11中之活性、細胞毒性及具有高表現之成熟標記物用矩形突出顯示。

【0014】 圖2A至圖2C. Isoplexis單細胞分泌蛋白質組資料，其展示具有DAP10共刺激域之CD5 CAR-NK細胞的多功能性。2A. 條形圖，其展示與未轉導之(NT) NK細胞相比，不同CD5 CAR-NK細胞之多功能性百分比。2B. 條形圖，其展示與未轉導之(NT) NK細胞相比，不同CD5 CAR-NK細胞之多功能性強度指數。2C. 多功能熱圖，其展示哪些構築體具有在單細胞水平分泌各種細胞介素排列之最高能力。

【0015】 圖3A至圖3C. 利用多重腫瘤再攻擊之Incucyte殺滅分析實驗。3A. 示意圖，其展示Incucyte殺滅分析再攻擊實驗之實驗設計及方法之一個實施例。3B. 展示各種CD5 CAR-NK細胞條件下在各腫瘤再攻擊(由箭頭指示)之後的紅血球計數圖(y軸；活腫瘤計數之量測)。3C. 展示各腫瘤再攻擊(由箭頭指示)之後的匯合百分比圖(腫瘤豐度之量測)。

【0016】 圖4A至圖4B. Seahorse代謝分析，其量測各種CD5 CAR-NK細胞之耗氧速率(OCR)及細胞外酸化速率(ECAR)。4A. 展示與未轉導之(NT) NK細胞相比，各種CD5 CAR-NK細胞設計之OCR的圖。4B. 展示與未轉導之(NT) NK細胞相比，各種CD5 CAR-NK細胞設計之ECAR的圖。

【0017】 圖5A至圖5C. 具有DAP10共刺激域之CD5 CAR-NK細胞在PDX小鼠套細胞淋巴瘤模型中展示良好活性。5A. 條形圖，其展示僅接受腫瘤之小鼠(左)相對於接受腫瘤加CD5CAR-NK之小鼠(右)的皮下腫瘤中之CD45+CD5+細胞之絕對數。5B. 條形圖，其展示脾中僅接受腫瘤之小鼠(左)相對於接受腫瘤加CD5CAR-NK之小鼠(右)的皮下腫瘤中之CD45+CD5+細胞之絕對數。5C. 條形圖，其展示骨髓中僅接受腫瘤之小鼠(左)相對於接受腫瘤加CD5CAR-NK之小鼠(右)的皮下腫瘤中之

CD45+CD5+細胞之絕對數。

**【0018】** 圖6A至圖6B. 在急性骨髓性白血病(用螢火蟲螢光素酶(FFLuc)轉導的THP-1)之NSG小鼠模型中，具有DAP10共刺激域之CD27 CAR-NK細胞改善腫瘤控制及存活。6A. 一系列生物發光影像(BLI)，其以THP-1 FFLuc的發光展示各組小鼠中之腫瘤負荷。6B. 存活率曲線，其展示各組小鼠隨時間之存活率。

**【0019】** 圖7A至圖7B. 圖7A繪示各種構築體標識及相應轉導效率(圖7B)。用各種CD5 CAR構築體轉導CB-NK細胞，如圖7A中所示，且轉導效率藉由流式細胞分析技術量測。轉導效率係基於陽性細胞百分比(圖7B)。在圖7B中，條形圖中自左至右之長條對應於如圖例中自頂部至底部讀取之長條。

**【0020】** 圖8提供用各種CD5構築體注射小鼠之實驗計劃及對應時間軸之一個實例。示意圖顯示各種CD5 CAR NK細胞針對作為標靶之T類淋巴母細胞細胞株CCRF-CEM之活體內抗腫瘤活性的測試。

**【0021】** 圖9A至圖9B. 圖9A及圖9B展示用具有IgG1鉸鏈之抗CD5 CAR NK細胞處理之小鼠存活期顯著長於用NT NK細胞及僅腫瘤處理的小鼠。展示各組小鼠之生物發光影像(圖9A)，且螢光素酶信號之定量展示於圖9B中。

**【0022】** 圖10A至圖10B. 圖10A及圖10B表明與用僅腫瘤、NT NK細胞及具有IgG1鉸鏈的CD5 CAR NK細胞處理之小鼠相比，用具有CD28鉸鏈的抗CD5 CAR NK處理之小鼠的腫瘤負荷顯著降低。各組小鼠之生物發光影像提供於圖10A中，且螢光素酶信號之定量展示於圖10B中。

**【0023】** 圖11. 具有DAP10信號傳導之CD5 CAR-NK細胞展示在單

細胞轉錄體水平之高增殖性及代謝優勢之證據。熱圖展示比較CD5CAR-DAP10-CD3z、CD5CAR-CD3z及NT NK細胞之scRNAseq資料之路徑富集分析。N=2。

【0024】 圖12. 具有DAP10信號傳導之CD5 CAR-NK細胞在單細胞表觀遺傳水平展示與AP1複合物及BATF家族相關之TF富集。火山圖展示比較CD5CAR-DAP10-CD3z及CD5CAR-CD3z之scATACseq資料的TF富集分析。N=2。

【0025】 圖13A至圖13B. 具有DAP10信號傳導之CD5 CAR-NK細胞展示RPPA的活化作用在蛋白質體水平增強。13A. RPPA分析之熱圖，其展示相對於NT NK細胞標準化之CD5CAR-DAP10-CD3z及CD5CAR-CD3z在刺激之前(未刺激)及在用CD5靶抗原刺激2分鐘及15分鐘之後的Log2蛋白質表現資料。13B. 路徑網路分析，其展示與增殖、幹細胞特性、代謝活性、免疫突觸形成及記憶特徵相關之各種蛋白質路徑之間的相互作用。N=2。

【0026】 圖14A至圖14B. 具有DAP10信號傳導之CD5 CAR-NK細胞持續存在且在活體內具有腫瘤再攻擊之後建立回憶反應的能力。14A. 示意圖，其展示活體內小鼠模型之實驗計劃細節，其展示照射時序、CD5+CCRF腫瘤注射時序、CD5 CAR-NK細胞輸注時序及CD5+CCRF腫瘤(用FFLuc-GFP轉導)再攻擊時序。14B. FACS圖，其展示再攻擊前(左側面板)及再攻擊後(右側面板)之流式細胞分析技術資料，該圖展示人類CD45+閘，繼之為NK細胞閘(CD56+及GFP-)。此展示CD5 CAR-NK細胞在腫瘤再攻擊之後擴增且可建立針對CD5+CCRF腫瘤之回憶反應。

#### 【實施方式】

【0027】 本申請案主張2021年10月20日申請的美國臨時專利申請案第63/257,608號之優先權。

【0028】 本申請案含有序列表，該序列表已以XML格式提交且以全文引用之方式併入本文中。2022年10月11日創建之該XML複本命名為MDAC\_1299WO\_Sequence\_Listing\_ST26.xml且位元組大小為13,926。

【0029】 與長期以來的專利法慣例一致，當在本說明書中與字詞包含共同使用時，包括申請專利範圍，字詞「一(a)」及「一(an)」指代「一或多種」。本發明之一些實施例可由以下組成或基本上由以下組成：一或多個本發明之元件、方法步驟及/或方法。在此考慮了本文中所描述之任何方法或組合物可相對於本文中所描述之任何其他方法或組合物來實施且可組合不同的實施例。

【0030】 在通篇本說明書中，除非上下文另有要求，否則字詞「包含(comprise/comprises/comprising)」應理解為意味著包括所述步驟或元件或步驟或元件之群組，但不排除任何其他步驟或元件或其他步驟或元件群組。「由……組成」意欲包括且限於片語「由……組成」中所列的任何事物。因此，片語「由……組成」指示所列元件為所需或必選的，且不可存在其他元件。「基本上由……組成」意謂包括該片語中所列之任何元件，且限於不干擾或促進所列元件在本發明中所指定之活性或作用的其他元件。因此，片語「基本上由…組成」指示所列元件為所需或必選的，但沒有其他元件為視情況存在的且視其是否影響所列元件的活性或作用而定，可存在或可不存在。

【0031】 在通篇本說明書中，提及「一個實施例」、「實施例」、「特定實施例」、「相關實施例」、「某一實施例」、「額外實施例」或「另一實施

例」或其組合意謂結合實施例描述的特定特徵、結構或特性包含於本發明的至少一個實施例中。因此，在通篇本說明書各處出現上述片語未必皆指代相同實施例。另外，在一或多個實施例中，具體特徵、結構或特性可以任何適合的方式組合。

**【0032】** 如本文所用，術語「或」及「及/或」用於描述呈組合形式或彼此排斥之多個組分。舉例而言，「x、y及/或z」可指單獨的「x」、單獨的「y」、單獨的「z」、「x、y及z」、「(x及y)或z」、「x或(y及z)」或「x或y或z」。在此特別考慮了可自實施例中特定地排除x、y或z。

**【0033】** 在通篇本申請案中，術語「約」係根據其在細胞及分子生物學領域中之簡單及一般含義使用，表示某一值包括用於測定該值之裝置或方法之誤差之標準差。

**【0034】** 如本文所用，術語「工程化」係指由人工產生之實體，包括細胞、核酸、多肽、載體等。在至少一些情況下，工程化實體為合成的且包含非天然存在或以利用於本發明之方式組態之元件。

**【0035】** 如本文所用，術語「分離」係指基本上不含其他材料之分子或生物或細胞材料。在一個態樣中，術語「分離」係指核酸(諸如DNA或RNA)，或蛋白質或多肽，或細胞或細胞器，或組織或器官分別與諸如天然來源中存在之其他DNA或RNA，或蛋白質或多肽，或細胞或細胞器，或組織或器官分開。術語「分離」亦指一種核酸或肽當藉由重組DNA技術產生時，基本上不含細胞材料、病毒材料或培養基，或當化學合成時基本上不含化學前驅體或其他化學物質。此外，「經分離之核酸」意欲包括天然不作為片段存在且不會以天然狀態發現的核酸片段。術語「分離」在本文中亦用於指多肽與其他細胞蛋白分離，且意欲涵蓋純化及

重組的多肽。術語「分離」在本文中亦用於指細胞或組織與其他細胞或組織分離，且意欲涵蓋經培養及工程化細胞或組織。

**【0036】** 如本文所用，「預防(prevent)」及類似詞(諸如「預防(prevented/preventing)」等)指示一種用於預防、抑制或降低疾病或病狀(例如癌症)發生或復發之可能性的方法。其亦指延遲疾病或病狀發作或復發，或延遲疾病或病狀之症狀發生或復發。如本文所用，「預防」及類似詞亦包括在疾病或病狀發作或復發之前降低疾病或病狀之強度、作用、症狀及/或負荷。

**【0037】** 如本文所用，術語「樣品」一般係指生物樣品。樣品可獲自個體之組織或細胞。在一些實例中，樣品可包含或來源於組織切片、血液(例如全血)、血漿、細胞外液、乾燥血斑、經培養細胞、丟棄組織。樣品在採集之前可已自來源分離。非限制性實例包括採集之前自主要來源分離之血液、腦脊髓液、胸膜液、羊膜液、淋巴液、唾液、尿液、大便、淚液、汗液或黏膜排泄物及其他體液。在一些實例中，在樣品製備期間，樣品自其主要來源(細胞、組織、體液(諸如血液)、環境樣品等)分離。樣品可以或可以不自其主要來源純化或以其他方式富集。在一些情況下，在進一步處理之前使主要來源均質化。可過濾或離心樣品以移除白血球層、脂質或顆粒物質。樣品亦可經純化或富集核酸，或可用核糖核酸酶處理。樣品可含有完整、片段化或部分降解之組織或細胞。

**【0038】** 如本文所用，術語「個體」一般係指具有正在進行處理或分析之生物樣品且在特定情況下患有或疑似患有癌症的個體。個體可為作為方法或材料之對象的任何生物體或動物個體，包括哺乳動物(例如人類)、實驗室動物(例如，靈長類動物、大鼠、小鼠、兔)、家畜(例如，母

牛、綿羊、山羊、豬、火雞及雞)、家養寵物(例如,狗、貓及嚙齒動物)、馬及轉殖基因非人類動物。個體可為患者,例如患有或疑似患有疾病(可稱為醫學病狀)(諸如良性或惡性贅瘤或癌症)的患者。個體可正在經受或已經受治療。個體可無症狀。個體可為健康,但希望預防癌症的個體。在至少一些情況下,術語「個體」可互換使用。如本文所用,「個體(subject)」或「個體(individual)」可或可不安置於醫療機構中且可作為醫療機構之門診患者進行治療。個體可經由網際網路接受一或多種醫療組合物。個體可包含任何年齡之人類或非人類動物且因此包括成人及青少年(即兒童)及嬰兒且包括未出生的個體。不希望該術語暗示對醫學治療之需求,因此,個體可自願地或非自願地參與實驗,無論為臨床或支持基礎科學研究。

**【0039】** 如本文中所使用,「治療(treatment)」或「治療(treating)」包括對疾病或病理性病狀之症狀或病變的任何有益或所需作用,且可包括所治療之疾病或病狀(例如癌症)之一或多種可量測標記物出現甚至最小的減少。治療可涉及視情況減少或改善疾病或病狀之症狀,或延緩疾病或病狀之惡化。「治療」不一定表示完全根除或治癒疾病或病狀或其相關症狀。

**【0040】** 在治療性、診斷性或生理學目的或作用之情形下的任何方法亦可描述於「用途」申請專利範圍語言中,諸如本文所論述之任何化合物、組合物或藥劑用於達成或實施所描述之治療性、診斷性或生理學目的或作用「之用途」。

\*\*\*\*\*

**【0041】** 本發明係關於方法及組合物,其中嵌合抗原受體構築體至

少在一些情況下更適用於NK細胞，因為與適合於其他免疫細胞(包括T細胞)之生物學對比，嵌合抗原受體構築體具有一或多種與NK細胞更相關之組分。在一個實例中，鑒於CD28為與T細胞生物學有關且不存在於NK細胞中的共刺激分子，本發明人開發具有與NK細胞生物學更相關之替代性共刺激分子的其他CAR載體，諸如DAP10、DAP12、NKG2D及/或4-1BB作為實例。如本文所涵蓋，具有各種共刺激分子之不同CAR設計之特徵為CD5 scFv或CD27細胞外域作為抗原結合域，但其僅為實例。DAP10共刺激域賦予CAR-NK細胞更活化表型，其中藉由質譜流式細胞技術鑑別之特定聚類展示活化標記物(諸如DNAM、NKG2D、CD3z及ZAP70)；細胞毒性標記物(諸如TRAIL、顆粒酶B及穿孔蛋白)；及成熟標記物(諸如Eomes及T-bet)之表現增加(圖1)。此外，具有DAP10共刺激域及DAP10或CD28跨膜域之CAR-NK細胞展示的多功能性高於具有其他共刺激域之CAR-NK細胞(圖2)。重要地，具有DAP10共刺激域之針對CD5的CAR-NK細胞能夠在多次腫瘤再攻擊之後殺滅CCRF T-ALL細胞株，而具有其他共刺激分子之CAR-NK細胞可能歸因於功能性耗竭而喪失殺滅CCRF的能力(圖3)。自代謝視角來看，具有DAP10共刺激域之CAR-NK細胞展示具有較高氧化磷酸化之較高代謝適能，如藉由較高耗氧速率(OCR)及較高糖分解能力證明且如藉由較高細胞外酸化速率(ECAR)證明(圖4)。在特定實施例中，此可與其增強之效力相關。此轉變為DAP10構築體在測試CD5 CAR-NK細胞功效之PDX小鼠套細胞淋巴瘤模型中(圖5)及測試CD70CAR-NK細胞功效之NSG小鼠急性骨髓白血病(THP-1)模型中(圖6)之抗腫瘤活性增強。如本文所示，作為NK活化受體NKG2D下游之重要轉接分子的DAP10可充當CAR-NK細胞之有效共刺激域，且在試管內及活體內可增強其代謝適能及

其抗腫瘤活性。

## I. 基因工程化受體

【0042】本發明係關於基因工程化受體，相較於缺乏特定組分之其他基因工程化受體，其利用特定組分增強功效。在特定實施例中，受體視情況包含鉸鏈。在受體包含scFv作為細胞外域之至少一部分的情況下，受體可在scFv與跨膜域之間包含鉸鏈。在特定實例中，當受體之細胞外域不具有scFv (諸如包含內源性或其他受體之細胞外域之至少一部分)時，受體可或不包含鉸鏈。在特定情況下，受體包含至少一CD28鉸鏈。在一些情況下，受體包含至少一CD28跨膜域。在某些情況下，受體包含至少一DAP10跨膜域。在特定情況下，受體包含至少一DAP10共刺激域。

【0043】在特定實施例中，經增強之受體包含(包括呈融合蛋白形式)以下各者：

【0044】(a)視情況存在之鉸鏈；及

【0045】(b1) CD28跨膜域，或

【0046】(b2) DAP10跨膜域；

【0047】(c) DAP10共刺激域；及

【0048】(d) CD3 $\zeta$ 。

【0049】因此，在特定情況下，受體包含CD28鉸鏈(或CD8 $\alpha$ 鉸鏈或IgG1鉸鏈，作為實例)、CD28跨膜域及DAP10共刺激域。在其他情況下，受體包含CD28鉸鏈、DAP10跨膜域及DAP10共刺激域。在特定實施例中，(a) (視情況)、(b1)或(b2)、(c)及(d)之組分呈融合蛋白形式，且在N端至C端方向上處於(a) (視情況)、(b1)或(b2)、(c)及(d)之次序。在特定情況下，融合蛋白不具有(a)。

**【0050】** 在特定實施例中，呈融合蛋白形式之(a) (視情況)、(b1)或(b2)、(c)及(d)之組分進一步包含一或多個抗原結合域，包括作為CAR組態。在特定實施例中，N端至C端方向上的一或多個抗原結合域位於(a) (視情況)、(b1)或(b2)、(c)及(d) (按彼次序)之N端側。在特定實施例中，作為基因工程化受體之融合蛋白基本上由以下組成或由以下組成：一或多個抗原結合域、(a) (視情況)、(b1)或(b2)、(c)及(d)。亦即，在特定情況下，基因工程化受體不具有除DAP10外之任何其他共刺激域，但在替代情況下，基因工程化受體包含除DAP10外之一或多個共刺激域。在基因工程化受體包含除DAP10外之一或多個其他共刺激域的此類替代情況下，其他共刺激域可為或可不為存在於天然發現於NK細胞而非T細胞中之蛋白質中的共刺激域。特定實例包括CD28、DAP12、4-1BB、NKG2D、2B4、其組合等。

**【0051】** (a) (視情況)、(b1)或(b2)、(c)及(d)之組分可在單一聚核苷酸上表現為融合蛋白，且在特定實施例中，融合蛋白包含一或多個抗原結合域。聚核苷酸可經分離或可包含於任何種類之載體中，包括病毒或非病毒載體。在特定實施例中，載體存在於任何類型之細胞中，包括免疫細胞，諸如NK細胞、T細胞、 $\gamma \delta$  T細胞、 $\alpha \beta$  T細胞、iNKT細胞、B細胞、巨噬細胞、樹突狀細胞或其混合物。適合的修飾細胞之方法為此項技術中已知的。參見例如Sambrook及Ausubel，見上文。舉例而言，細胞可使用Heemskerk等人，2008及Johnson等人，2009中所描述之轉導技術轉導以表現對於癌症抗原或傳染原之抗原具有抗原性特異性之基因工程化受體。

**【0052】** 在一些實施例中，細胞包含編碼一或多種基因工程化受體之一或多種經由基因工程化引入的核酸，且表現此類核酸之基因工程化產

物。在特定實施例中，核酸為異源核酸，亦即通常不存在於細胞或獲自細胞之樣品中的核酸，諸如獲自另一生物體或細胞之核酸，舉例而言，此類核酸在工程化細胞及/或此類細胞所來源之生物體中通常未發現。在一些實施例中，核酸並非天然存在的，諸如未在自然界中發現之核酸(例如，嵌合)。其可為人手工產物。

**【0053】** 包括CAR之例示性抗原受體以及用於工程化且將受體引入細胞內之方法包括描述於例如以下中之彼等者：國際專利申請公開案第WO200014257號、第WO2013126726號、第WO2012/129514號、第WO2014031687號、第WO2013/166321號、第WO2013/071154號、第WO2013/123061號、美國專利申請公開案第US2002131960號、第US2013287748號、第US20130149337號、美國專利第6,451,995號、第7,446,190號、第8,252,592號、第8,339,645號、第8,398,282號、第7,446,179號、第6,410,319號、第7,070,995號、第7,265,209號、第7,354,762號、第7,446,191號、第8,324,353號及第8,479,118號以及歐洲專利申請案第EP2537416號，及/或Sadelain等人，2013；Davila等人，2013；Turtle等人，2012；Wu等人，2012所描述之彼等者。在一些態樣中，基因工程化抗原受體包括如美國專利第7,446,190號所描述之CAR，及國際專利申請公開案第WO/2014055668 A1號中所描述之彼等者。

**【0054】** 在特定實施例中，基因工程化受體包含一或多個抗原結合域及(a)、(b1)或(b2)及(c)之組分。在特定實施例中，基因工程化受體為CAR，且在一些實施例中，抗原結合域為抗體或其功能片段。在其他情況下，CAR之抗原結合域不為抗體或其功能性片段，而實際上為受體之天然配位體。CAR可為藉由包含兩個或兩個以上抗原結合域而具有雙特異性的

單一多肽，其中一個抗原結合域結合所需抗原且另一個抗原結合域結合另一個不相同抗原。

**【0055】** 在一些實施例中，工程化抗原受體包括CAR，包括活化或刺激CAR，或共刺激CAR (參見WO2014/055668)。CAR一般包括連接至一或多種細胞內信號傳導組分之細胞外抗原(或配位體)結合域，在一些態樣中經由(a)、(b1)或(b2)及(c)之組分連接。此類分子通常模仿或接近經由天然抗原受體之信號、經由此類受體與共刺激受體組合之信號及/或單獨經由共刺激受體之信號。

**【0056】** 經考慮，嵌合構築體可以裸DNA形式或在適合載體中引入至免疫細胞中。藉由電穿孔使用裸DNA穩定轉染細胞之方法為此項技術中已知的。參見例如美國專利第6,410,319號。裸DNA一般係指編碼嵌合受體之DNA，該DNA以適於表現之定向包含於質體表現載體中。

**【0057】** 可替代地，病毒載體(例如反轉錄病毒載體、腺病毒載體、腺相關病毒載體或慢病毒載體)可用於將嵌合CAR構築體引入免疫細胞中。根據本發明之方法使用之適合載體在免疫細胞中為非複製的。已知大量載體係基於病毒，其中在細胞中維持之病毒的複本數低足以維持細胞活力，諸如基於HIV、SV40、EBV、HSV或BPV之載體。

**【0058】** 本發明之某些實施例係關於核酸之用途，包括編碼包含(a) (視情況)、(b1)或(b2)、(c)及(d)之組分之特異性CAR多肽的核酸，在一些情況下包括已經人類化以降低免疫原性之CAR (hCAR)。在某些實施例中，CAR可識別包含一或多個抗原之間的共用空間之抗原決定基。在某些實施例中，結合區可包含單株抗體之互補決定區、單株抗體之可變區及/或其抗原結合片段。在另一實施例中，該特異性來源於結合至受體之肽

(例如細胞介素)。

**【0059】** 經考慮，人類CAR核酸可為用於增強人類患者之細胞免疫療法之人類基因。在一特定實施例中，本發明包括抗原特異性全長CAR cDNA或編碼區。抗原結合區或抗原結合域可包含來源於特定人類單株抗體之單鏈可變片段(scFv)之V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>鏈之片段，諸如美國專利7,109,304中所描述之彼等者，該專利以引用之方式併入本文中。片段亦可為人類抗原特異性抗體之任何數目之不同抗原結合域。在一更特定實施例中，片段為抗原特異性scFv，其由人類密碼子使用針對人類細胞中之表現優化的序列編碼。

**【0060】** 在一些實施例中，抗原特異性CAR經構築而對抗原具有特異性，諸如在病變細胞類型(癌細胞或感染傳染原之細胞)上表現之抗原。因此，CAR在其細胞外部分中通常包括一或多種抗原結合分子，諸如一或多種抗原結合片段、域、抗體可變域、配位體、受體及/或任何種類之抗體分子。熟習此項技術者能夠基於至少對多肽及常規操作之瞭解來產生抗體，包括針對抗原之scFv，但許多抗抗原scFv及單株抗體可能已存在於此項技術中。在一些實施例中，抗原特異性scFv為來自一或多種抗體純系的scFv。

**【0061】** 在一些實施例中，抗原特異性CAR包括抗體分子之一或多個抗原結合部分，諸如來源於單株抗體(mAb)之可變重鏈(VH)及可變輕鏈(VL)之單鏈抗體片段(scFv)。在特定實施例中，抗體或其功能片段係或來源於已知抗體。抗體亦可為針對抗原重新產生之抗體，且scFv序列可獲自或來源於此類新生抗體。

**【0062】** 在某些實施例中，CAR包含細胞外域，該細胞外域為或包

含標靶抗原或受體之天然配位體或天然受體。在一些實施例中，CAR包含細胞外域，該細胞外域為或包含來自靶向抗原之抗體之VH及/或VL。

**【0063】** 編碼嵌合受體之開放閱讀框架之序列可獲自基因體DNA來源、cDNA來源，或可合成(例如經由PCR)，或其組合。視基因體DNA之尺寸及內含子之數目而定，可能需要使用cDNA或其組合，因為發現內含子使mRNA穩定。另外，使用內源性或外源性非編碼區以使mRNA穩定可進一步有利。

**【0064】** 在一些態樣中，抗原特異性結合域連接至CD28或DAP10跨膜域，且在特定情況下亦連接至DAP10共刺激域。在一些情況下，CD28或DAP10跨膜域經胺基酸取代修飾以避免此類域結合至相同或不同表面膜蛋白之跨膜域，從而使與受體複合物之其他成員的相互作用降至最低。在一些實施例中，跨膜域係來源於天然或合成來源。或者，在一些實施例中，跨膜域為合成的。在一些態樣中，合成跨膜域主要包含疏水性殘基，諸如白胺酸及纈胺酸。在一些態樣中，在合成性CD28或DAP10跨膜域之各端可發現苯丙胺酸、色胺酸及纈胺酸之三聯體。

**【0065】** 在一些實施例中，CAR核酸包含編碼除DAP10外之序列及編碼視情況存在之CD3 $\zeta$ 的序列。除初始T細胞活化信號(諸如除DAP10之外，可由CD3 $\zeta$ 及/或Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ 起始)之外，亦可利用另一刺激信號以便在嵌合受體與標靶抗原接合後實現免疫效應細胞增殖及效應功能。舉例而言，可利用用於增強細胞活化的人類共刺激受體之一部分或全部，其可有助於改善活體內持久性且改善授受性免疫療法之治療成效。實例包括來自諸如下列分子之共刺激域：DAP12、NKG2D、2B4、CD2、CD28、CD27、4-1BB、OX40、ICOS、(CD278)、CD30、HVEM、CD40、LFA-1

(CD11a/CD18)及/或ICAM-1，但在特定替代實施例中，此等所列者中之任一者可不用於CAR中。

## II. 特定CAR實施例之實例

**【0066】** 在特定實施例中，本文涵蓋特異性CAR分子，其包含(a)視情況存在的鉸鏈；及(b1) CD28跨膜域，或(b2) DAP10跨膜域；(c) DAP10共刺激域；及(d) CD3 $\zeta$ 。在一些情況下，CAR進一步包含任何種類之抗原結合域且可為任何種類之scFv。在CAR之細胞外域中利用scFv之情況下，特定scFv之可變重鏈及可變輕鏈在N端至C端方向上可呈任何次序。舉例而言，可變重鏈可位於可變輕鏈之N端側，或反之亦然。結合CAR中之抗原的scFv可經或可不經密碼子最佳化。在特定實施例中，載體編碼包含(a) (視情況)、(b1)或(b2)、(c)及(d)之抗原特異性CAR且亦編碼一或多種其他分子。舉例而言，載體可編碼此類CAR且亦可編碼所關注之另一種蛋白質，諸如一或多種其他工程化抗原受體、自殺基因及/或一或多種特定細胞介素。

**【0067】** 在同一分子上，CAR可包含一或多個抗原特異性細胞外域，諸如靶向兩種不同抗原，且在兩種抗原特異性細胞外域之間可存在連接子。

**【0068】** 在特定CAR分子之特定實施例中，CAR不僅利用DAP10，而且利用CD28、DAP12、4-1BB、NKG2D或其他共刺激域，包括本文所涵蓋之彼等(其在本文中可稱為細胞質內域)。

**【0069】** 下文以特定順序提供CAR之特定序列實施例之實例：

**【0070】** CD28跨膜域胺基酸序列：

FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO:1)

【0071】 本發明涵蓋之任何多肽可包含SEQ ID NO: 1或與SEQ ID NO: 1至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高一致之序列。

【0072】 一或多個細胞內域(其在本文中、在適當情況下亦可稱為信號活化域或共刺激域)可或可不用於本發明之特定CAR中。特定實例包括來自DAP10之細胞內域，且特定言之，CD3 $\zeta$ 。

【0073】 可用於本發明之CAR中之特定細胞內域之實例如下：

【0074】 DAP10細胞內域胺基酸序列之實例：

LCARPRRSPAQEDGKVYINMPGRG (SEQ ID NO:2)

本發明涵蓋之任何多肽可包含SEQ ID NO: 2或與SEQ ID NO: 2至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高一致之序列。

【0075】 CD3 $\zeta$ 細胞內域胺基酸序列之實例：

【0076】 RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD  
KRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR  
RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRG (SEQ ID NO:3)

【0077】 本發明涵蓋之任何多肽可包含SEQ ID NO: 3或與SEQ ID NO: 3至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高一致之序列。

【0078】 在一些情況下，CAR進一步包含除DAP10 (且在一些情況下，CD3 $\zeta$ )外之細胞內域，諸如以下：

【0079】 4-1BB細胞內域胺基酸序列：

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEGGCEL

(SEQ ID NO:4)

本發明涵蓋之任何多肽可包含SEQ ID NO: 4或與SEQ ID NO: 4至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高一致之序列。

**【0080】** DAP12細胞內域胺基酸序列：

YFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDL  
NTQRPYK (SEQ ID NO:5)

本發明涵蓋之任何多肽可包含SEQ ID NO: 5或與SEQ ID NO: 5至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高一致之序列。

**【0081】** NKG2D細胞內域胺基酸序列：

SANERCKSKVVPCRQKQWRTSFDSKKLDLNYNHFESMEWSHR  
SRRGRIWGM (SEQ ID NO:6)

**【0082】** CD28細胞內域胺基酸序列：

RSKRSLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAAYRS

(SEQ ID NO:14)

**【0083】** 本發明涵蓋之任何多肽可包含SEQ ID NO: 6或與SEQ ID NO: 6至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高一致之序列。

**【0084】** 在CAR之一些實施例中，一或多個細胞外抗原結合域與跨膜域之間存在鉸鏈區，且在特定情況下，此在CAR中使用scFv而非CAR中缺乏scFv時發生。在特定實施例中，鉸鏈具有特定長度，諸如10至20、10至15、11至20、11至15、12至20、12至15或15至20個胺基酸的長

度。在特定實施例中，鉸鏈為CD28鉸鏈。在特定情況下，可改變CD28鉸鏈之一致性或長度以增強CAR之效率。參見例如Hudecek等人(2014)及 Jonnalagadda等人(2015)。在特定實施例中，鉸鏈來自CD28、CD8 $\alpha$ 或 IgG1。

**【0085】** CD28鉸鏈胺基酸序列之實例包括：

IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKP (SEQ ID NO:7)

**【0086】** 本發明涵蓋之任何多肽可包含SEQ ID NO: 7或與SEQ ID NO: 7至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高一致之序列。

**【0087】** 在特定實施例中，可利用CAR之表現構築體之以下實例。儘管此等CAR靶向CD5，但可靶向其他抗原。

**【0088】** CD5#1包含具有DAP12跨膜域、DAP12共刺激域及CD3 $\zeta$ 之IgG鉸鏈。

**【0089】** CD5#2包含具有CD28跨膜域、DAP12共刺激域及CD3 $\zeta$ 之IgG鉸鏈。

**【0090】** CD5#3包含具有CD28跨膜域、4-1BB共刺激域及CD3 $\zeta$ 之IgG鉸鏈。

**【0091】** CD5#4包含具有DAP10跨膜域、DAP10共刺激域及CD3 $\zeta$ 之IgG鉸鏈。

**【0092】** CD5#5包含具有CD28跨膜域、DAP10共刺激域及CD3 $\zeta$ 之IgG鉸鏈。

**【0093】** CD5#7包含具有CD28跨膜域、NKG2D共刺激域及CD3 $\zeta$ 之IgG鉸鏈。

【0094】 CD5#8包含具有CD28跨膜域及CD3 $\zeta$ 之IgG鉸鏈。

【0095】 CD5#9包含IgG1鉸鏈、CD28跨膜域、CD28共刺激域及CD3 $\zeta$ 。

【0096】 CD5#10包含CD28鉸鏈、CD28跨膜域、DAP10共刺激域及CD3 $\zeta$ 。

【0097】 CD5#11包含CD28鉸鏈、DAP10跨膜域、DAP10共刺激域及CD3 $\zeta$ 。

【0098】 CD5#12包含CD28鉸鏈、CD28跨膜域、DAP12共刺激域及CD3 $\zeta$ 。

【0099】 CD5#13包含CD28鉸鏈、CD28跨膜域、CD28共刺激域及CD3 $\zeta$ 。

【0100】 本發明方法中可靶向任何適合之抗原。在一些情況下，抗原可與某些癌細胞締合但不與非癌細胞締合。例示性抗原包括(但不限於)來自傳染原之抗原分子、自體/自身抗原、腫瘤/癌症相關抗原及腫瘤新抗原(Linnemann等人, 2015)。

【0101】 在特定態樣，抗原與癌症締合且包括CD19、EBNA、CD123、HER2、CA-125、TRAIL/DR4、CD20、CD70、CD38、CD123、CLL1、癌胚抗原、 $\alpha$ 胎蛋白、CD56、AKT、Her3、上皮腫瘤抗原、CD319 (CS1)、ROR1、葉酸結合蛋白、HIV-1包膜醣蛋白gp120、HIV-1包膜醣蛋白gp41、CD5、CD23、CD30、HERV-K、IL-11R $\alpha$ 、 $\kappa$ 鏈、 $\lambda$ 鏈、CSPG4、CD33、CD47、CLL-1、U5snRNP200、CD200、BAFF-R、BCMA、CD70、TROP-2、CD99、p53、突變的p53、Ras、突變的ras、c-Myc、細胞質絲胺酸/蘇胺酸激酶(例如，A-Raf、B-Raf及C-

Raf、細胞週期素依賴性激酶)、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A10、MAGE-A12、MART-1、黑色素瘤相關抗原、BAGE、DAM-6、DAM-10、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-8、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7B、NA88-A、MC1R、mda-7、gp75、Gp100、PSA、PSM、酪胺酸酶、酪胺酸酶相關蛋白質、TRP-1、TRP-2、ART-4、CAMEL、CEA、Cyp-B、hTERT、hTRT、iCE、MUC1、MUC2、磷酸肌醇3-激酶(PI3Ks)、TRK受體、PRAME、P15、RU1、RU2、SART-1、SART-3、威爾姆斯氏腫瘤抗原(Wilms'tumor antigen; WT1)、AFP、-鏈蛋白/m、凋亡蛋白酶-8/m、CDK-4/m、ELF2M、GnT-V、G250、HAGE、HSP70-2M、HST-2、KIAA0205、MUM-1、MUM-2、MUM-3、肌凝蛋白/m、RAGE、SART-2、TRP-2/INT2、707-AP、磷脂結合蛋白II、CDC27/m、TPI/mbr-abl、BCR-ABL、干擾素調控因子4 (IRF4)、ETV6/AML、LDLR/FUT、Pml/RAR、腫瘤相關鈣信號轉導因子1 (TACSTD1)、TACSTD2、受體酪胺酸激酶(例如，表皮生長因子受體(EGFR) (特定言之，EGFRvIII))、血小板衍生生長因子受體(PDGFR)、血管內皮生長因子受體(VEGFR)、VEGFR2、細胞質酪胺酸激酶(例如，src家族、syk-ZAP70家族)、整合素相關激酶(ILK)、信號轉導及轉錄活化因子(STAT3、STAT5及STAT6)、低氧誘導因子(例如，HIF-1及HIF-2)、核因子- $\kappa$  B (NF- $\kappa$ B)、Notch受體(例如，Notch1-4)、NY ESO 1、c-Met、哺乳動物雷帕黴素標靶(mTOR)、WNT、細胞外信號調節激酶(ERK)及其調節次單元、PMSA、PR-3、MDM2、間皮素、腎細胞癌-5T4、SM22- $\alpha$ 、碳酸酐酶I (CAI)及IX (CAIX) (亦稱為G250)、STEAD、TEL/AML1、GD2、蛋白酶3、

hTERT、肉瘤易位斷點、EphA2、ML-IAP、EpCAM、ERG (TMPRSS2 ETS融合基因)、NA17、PAX3、ALK、雄激素受體、細胞週期素B1、聚唾液酸、MYCN、RhoC、GD3、岩藻糖基GM1、間皮細胞、PSCA、sLe、PLAC1、GM3、BORIS、Tn、GLoboH、NY-BR-1、RGsS、SAGE、SART3、STn、PAX5、OY-TES1、精子蛋白質17、LCK、HMWMAA、AKAP-4、SSX2、XAGE1、B7H3、豆莢蛋白、TIE2、Page4、MAD-CT-1、FAP、MAD-CT-2、fos相關抗原1、CBX2、CLDN6、SPANX、TPTE、ACTL8、ANKRD30A、CDKN2A、MAD2L1、CTAG1B、SUNC1及LRRN1。抗原序列之實例為此項技術(例如GenBank®資料庫)中已知的：CD19 (登錄號NG\_007275.1)、EBNA (登錄號NG\_002392.2)、WT1 (登錄號NG\_009272.1)、CD123 (登錄號NC\_000023.11)、NY-ESO (登錄號NC\_000023.11)、EGFRvIII (登錄號NG\_007726.3)、MUC1 (登錄號NG\_029383.1)、HER2 (登錄號NG\_007503.1)、CA-125 (登錄號NG\_055257.1)、WT1 (登錄號NG\_009272.1)、Mage-A3 (登錄號NG\_013244.1)、Mage-A4 (登錄號NG\_013245.1)、Mage-A10 (登錄號NC\_000023.11)、TRAIL/DR4 (登錄號NC\_000003.12)及/或CEA (登錄號NC\_000019.10)。

**【0102】** 作為實例，腫瘤相關抗原可來源於前列腺癌、乳癌、大腸直腸癌、肺癌、胰臟癌、腎癌、間皮瘤、卵巢癌、肝癌、腦癌、骨癌、胃癌、脾癌、睪丸癌、子宮頸癌、肛門癌、膽囊癌、甲狀腺癌或黑色素瘤癌。例示性腫瘤相關抗原或腫瘤細胞衍生抗原包括MAGE 1、MAGE 3及MAGE 4 (或其他MAGE抗原，諸如國際專利公開案第WO99/40188號中所揭示之彼等MAGE抗原)；PRAME；BAGE；RAGE，Lage (亦稱為NY

ESO 1)；SAGE；及HAGE或GAGE。腫瘤抗原之此等非限制性實例表現於廣泛範圍之腫瘤類型(諸如黑色素瘤、肺癌、肉瘤及膀胱癌)中。參見例如美國專利第6,544,518號。前列腺癌腫瘤相關抗原包括例如前列腺特異性膜抗原(PSMA)、前列腺特異性抗原(PSA)、前列腺酸磷酸鹽、NKX3.1及前列腺之六跨膜上皮抗原(STEAP)。

**【0103】** 其他腫瘤相關抗原包括Plu-1、HASH-1、HasH-2、Cripto及Criptin。另外，腫瘤抗原可為自身肽激素，諸如全長促性腺激素釋放激素(GnRH)，一種可用於治療許多癌症之10個胺基酸長的短肽。

**【0104】** 抗原可包括抗原決定基區或抗原決定基肽，其衍生自腫瘤細胞中突變之基因或衍生自腫瘤細胞中之轉錄位準與正常細胞不同的基因，諸如端粒酶、存活素、間皮素、突變ras、bcr/abl重排、Her2/neu、突變或野生型p53、細胞色素P450 1B1，及異常表現之內含子序列，諸如N-乙醯胺基葡萄糖轉移酶-V；骨髓瘤及B細胞淋巴瘤中產生獨特個體基因型之免疫球蛋白基因之純系重排；包括衍生自致癌病毒過程之抗原決定基區或抗原決定基肽之腫瘤抗原，諸如人類乳頭狀瘤病毒蛋白E6及E7；艾巴二氏病毒蛋白(Epstein bar virus protein) LMP2；具有腫瘤選擇性表現之非突變癌胚蛋白，諸如癌胚抗原及 $\alpha$ -胎蛋白。

**【0105】** 在其他實施例中，抗原獲自或衍生自包括病原微生物之傳染原或來自機會性病原微生物(在本文中亦稱為傳染病微生物)，諸如病毒、真菌、寄生蟲、原蟲及細菌。在某些實施例中，衍生自此類微生物之抗原包括全長蛋白質。

**【0106】** 其抗原預期用於本文所描述之方法的說明性病原性生物體包括人類免疫缺乏病毒(HIV)、單純疱疹病毒(HSV)、呼吸道融合病毒

(RSV)、細胞巨大病毒(CMV)、艾-巴二氏病毒(EBV)、A型、B型及C型流感、水泡性口炎病毒(VSV)、水泡性口炎病毒(VSV)、多瘤病毒(例如BK病毒及JC病毒)、腺病毒、包括二甲氧苯青黴素抗性金黃色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA)之葡萄球菌(*Staphylococcus*)種及包括肺炎鏈球菌(*Streptococcus pneumoniae*)之鏈球菌(*Streptococcus*)種。如熟習此項技術者將理解，衍生自此等及其他病原性微生物、用作如本文所描述之抗原的蛋白質及編碼蛋白質之核苷酸序列可在公開案及公開資料庫(諸如GENBANK®、SWISS-PROT®及TREMBL®)中鑑別。

**【0107】** 衍生自人類免疫缺乏病毒(HIV)之抗原包括以下中之任一者：HIV病毒粒子結構蛋白(例如gp120、gp41、p17、p24)、蛋白酶、反轉錄酶或由tat、rev、nef、vif、vpr及vpu編碼之HIV蛋白。

**【0108】** 衍生自單純疱疹病毒(例如HSV 1及HSV2)之抗原包括(但不限於)由HSV晚期基因表現之蛋白質。晚期基因群主要編碼形成病毒粒子之蛋白質。此類蛋白質包括形成病毒衣殼之(UL)之五種蛋白質：UL6、UL18、UL35、UL38及主要衣殼蛋白UL19、UL45及UL27，其各自可用作如本文中所描述之抗原。預期用作本文中之抗原的其他說明性HSV蛋白包括ICP27 (HI、H2)、醣蛋白B (gB)及醣蛋白D (gD)蛋白。HSV基因體包含至少74個基因，各自編碼可潛在地用作抗原之蛋白質。

**【0109】** 衍生自巨細胞病毒(CMV)之抗原包括CMV結構蛋白、在病毒複製之即刻早期及早期期間表現之病毒抗原、醣蛋白I及III、衣殼蛋白、外殼蛋白、低基質蛋白pp65 (ppUL83)、p52 (ppUL44)、IE1及IE2 (UL123及UL122)、來自UL128-UL150基因聚類之蛋白質產物(Rykman等

人, 2006)、包膜醣蛋白B (gB)、gH、gN及pp150。如熟習此項技術者將理解, 用作本文所描述之抗原的CMV蛋白質可在公開資料庫(諸如GENBANK®、SWISS-PROT®及TREMBL®)中鑑別(參見例如Bennekov等人, 2004; Loewendorf等人, 2010; Marschall等人, 2009)。

**【0110】** 預期用於某些實施例中之衍生自艾巴二氏病毒(EBV)之抗原包括EBV裂解蛋白gp350及gp110; 在潛伏週期感染期間產生之EBV蛋白, 包括艾巴二氏核抗原(Epstein-Ban nuclear antigen; EBNA)-1、EBNA-2、EBNA-3A、EBNA-3B、EBNA-3C、EBNA-前導蛋白(EBNA-LP); 及潛伏膜蛋白(LMP)-1、LMP-2A及LMP-2B (參見例如Lockey等人, 2008)。

**【0111】** 預期用於本文中之衍生自呼吸道融合病毒(RSV)之抗原包括由RSV基因體編碼之十一種蛋白質或其抗原片段中之任一者: NS 1、NS2、N (核衣殼蛋白)、M (基質蛋白) SH、G及F (病毒外殼蛋白)、M2 (第二基質蛋白)、M2-1 (延長因子)、M2-2 (轉錄調節)、RNA聚合酶及磷蛋白P。

**【0112】** 預期使用之衍生自水泡性口炎病毒(VSV)之抗原包括由VSV基因體編碼之五種主要蛋白及其抗原片段中之任一者: 大蛋白(L)、醣蛋白(G)、核蛋白(N)、磷蛋白(P)及基質蛋白(M) (參見例如Rieder等人, 1999)。

**【0113】** 預期用於某些實施例之衍生自流感病毒之抗原包括血球凝集素(HA)、神經胺酸酶(NA)、核蛋白(NP)、基質蛋白M1及M2、NS 1、NS2 (NEP)、PA、PB 1、PB 1-F2及PB2。

**【0114】** 例示性病毒抗原亦包括(但不限於)腺病毒多肽、 $\alpha$ 病毒多

肽、杯狀病毒多肽(例如，杯狀病毒衣殼抗原)、冠狀病毒多肽、犬瘟熱病毒多肽、伊波拉病毒(Ebola virus)多肽、腸病毒多肽、黃病毒多肽、肝炎病毒(AE)多肽(B型肝炎核心或表面抗原、C型肝炎病毒E1或E2醣蛋白、核心、或非結構蛋白)、疱疹病毒多肽(包括單純疱疹病毒或水痘帶狀疱疹病毒醣蛋白)、感染性腹膜炎病毒多肽、白血病毒多肽、馬堡病毒(Marburg vims)多肽、正黏病毒多肽、乳頭瘤病毒多肽、副流感病毒多肽(例如，血球凝集素及神經胺酸酶多肽)、副黏病毒多肽、小病毒多肽、瘟病毒多肽、小核糖核酸病毒多肽(例如，脊髓灰質炎病毒衣殼多肽)、痘病毒多肽(例如，牛痘病毒多肽)、狂犬病病毒多肽(例如，狂犬病病毒醣蛋白G)、呼腸孤病毒多肽、反轉錄病毒多肽及輪狀病毒多肽。

**【0115】** 在某些實施例中，抗原可為細菌抗原。在某些實施例中，所關注的細菌抗原可為分泌多肽。在其他某些實施例中，細菌抗原包括其中多肽之一或多個部分暴露於細菌之細胞表面外的抗原。

**【0116】** 預期使用之衍生自葡萄球菌種(包括二甲氧苯青黴素抗性金黃色葡萄球菌(MRSA))之抗原包括毒性調節劑，諸如Agr系統、Sar及Sae、Arl系統、Sar同源物(Rot、MgrA、SarS、SarR、SarT、SarU、SarV、SarX、SarZ及TcaR)、Srr系統及TRAP。可充當抗原之其他葡萄球菌屬蛋白包括Clp蛋白、HtrA、MsrR、烏頭酸酶、CcpA、SvrA、Msa、CfvA及CfvB (參見例如Staphylococcus: Molecular Genetics, 2008 Caister Academic Press, Jodi Lindsay編)。金黃色葡萄球菌之兩個菌種(N315及Mu50)之基因體已定序且公開可用，例如在PATRIC (PATRIC: The VBI PathoSystems Resource Integration Center, Snyder等人, 2007)。如熟習此項技術者將理解，用作抗原之葡萄球菌蛋白質亦可在其他公開資料庫(諸

如GenBank®、Swiss-Prot®及TrEMBL®)中鑑別。

**【0117】** 預期用於本文所描述之某些實施例的衍生自肺炎鏈球菌之抗原包括肺炎鏈球菌溶血素、PspA、膽鹼結合蛋白A (CbpA)、NanA、NanB、SpnHL、PavA、LytA、Pht及菌毛蛋白(RrgA；RrgB；RrgC)。肺炎鏈球菌之抗原性蛋白質亦為此項技術中已知的且可在一些實施例中用作抗原(參見例如Zysk等人，2000)。肺炎鏈球菌之毒性菌株之完整基因體序列已定序且如熟習此項技術者應理解，本文中所使用之肺炎鏈球菌蛋白亦可在其他公共資料庫(諸如GENBANK®、SWISS-PROT®及TREMBL®)中鑑別。

**【0118】** 用於根據本發明之抗原的備受關注之蛋白質包括預測暴露於肺炎球菌(pneumococci)表面之毒性因子及蛋白質(參見例如Frolet等人，2010)。

**【0119】** 可用作抗原之細菌抗原之實例包括但不限於放線菌(Actinomyces)多肽、芽孢桿菌(Bacillus)多肽、擬桿菌(Bacteroides)多肽、鮑特氏菌(Bordetella)多肽、巴爾通體(Bartonella)多肽、疏螺旋體(Borrelia)多肽(例如伯氏疏螺旋體(B. burgdorferi) OspA)、布氏桿菌(Brucella)多肽、曲狀桿菌(Campylobacter)多肽、嗜二氧化碳噬纖細菌屬(Capnocytophaga)多肽、披衣菌(Chlamydia)多肽、棒狀桿菌(Corynebacterium)多肽、柯克斯氏體(Coxiella)多肽、嗜皮菌屬(Dermatophilus)多肽、腸球菌(Enterococcus)多肽、艾利希體(Ehrlichia)多肽、艾氏菌屬(Escherichia)多肽、弗朗西斯氏菌(Francisella)多肽、梭桿菌(Fusobacterium)多肽、血巴東蟲屬(Haemobartonella)多肽、嗜血桿菌(Haemophilus)多肽(例如流感嗜血桿菌b型外膜蛋白質)、螺旋桿菌

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

【0120】 真菌抗原之實例包括(但不限於)犁頭黴屬(*Absidia*)多肽、枝頂孢屬(*Acremonium*)多肽、交鏈孢屬(*Alternaria*)多肽、麴菌屬(*Aspergillus*)多肽、蛙糞黴菌屬(*Basidiobolus*)多肽、平臍蠕孢屬(*Bipolaris*)多肽、芽生菌屬(*Blastomyces*)多肽、念珠菌屬(*Candida*)多肽、粗球菌(*Coccidioides*)多肽、耳黴屬(*Conidiobolus*)多肽、隱球菌屬(*Cryptococcus*)多肽、彎孢黴屬(*Curvalaria*)多肽、表皮癬菌(*Epidermophyton*)多肽、外瓶黴屬(*Exophiala*)多肽、地絲菌(*Geotrichum*)多肽、組織漿菌(*Histoplasma*)多肽、馬杜拉分支菌屬(*Madurella*)多肽、馬拉色氏黴菌屬(*Malassezia*)多肽、小芽孢菌(*Microsporum*)多肽、小叢梗孢屬(*Moniliella*)多肽、被孢黴屬(*Mortierella*)多肽、白黴菌屬(*Mucor*)

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

【0121】原蟲寄生蟲抗原之實例包括(但不限於)巴倍蟲(*Babesia*)多肽、腸袋蟲(*Balantidium*)多肽、貝諾孢子蟲(*Besnoitia*)多肽、隱孢子蟲(*Cryptosporidium*)多肽、艾美球蟲(*Eimeria*)多肽、腦胞內原蟲(*Encephalitozoon*)多肽、內阿米巴(*Entamoeba*)多肽、梨形鞭毛蟲(*Giardia*)多肽、哈蒙德蟲(*Hammondia*)多肽、肝簇蟲(*Hepatozoon*)多肽、等孢子球蟲(*Isospora*)多肽、利什曼原蟲(*Leishmania*)多肽、微孢子蟲(*Microsporidia*)多肽、新孢子蟲(*Neospora*)多肽、小孢子蟲(*Nosema*)多肽、五鞭毛蟲(*Pentatrichomonas*)多肽、瘧原蟲(*Plasmodium*)多肽。蠕蟲寄生蟲抗原之實例包括但不限於棘唇線蟲(*Acanthocheilonema*)多肽、貓圓線蟲(*Aelurostrongylus*)多肽、鉤蟲(*Ancylostoma*)多肽、血管圓線蟲(*Angiostrongylus*)多肽、蛔蟲(*Ascaris*)多肽、布魯線蟲(*Brugia*)多肽、仰口線蟲(*Bunostomum*)多肽、毛細線蟲(*Capillaria*)多肽、夏氏線蟲(*Chabertia*)多肽、古柏線蟲(*Cooperia*)多肽、環體線蟲(*Crenosoma*)多肽、網尾線蟲(*Dictyocaulus*)多肽、膨結線蟲(*Diectophyme*)多肽、雙板線蟲(*Dipetalonema*)多肽、裂頭條蟲(*Diphyllobothrium*)多肽、複孔條蟲

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

**【0122】** 外部寄生蟲抗原之實例包括(但不限於)來自以下之多肽(包括抗原以及過敏原)：跳蚤；壁虱，包括硬壁虱及軟壁虱；蒼蠅，諸如蠓、蚊子、白蛉、黑蠅、馬蠅、角蠅、鹿蠅、舌蠅、底螯蠅、引起蠅蛆病之蒼蠅及庫蠓；螞蟻；蜘蛛、虱；蟎；及蝨，諸如床虱及接吻蟲。

### III. 視情況存在之蛋白質

【0123】 在一些實施例中，本發明之特定CAR利用一或多種其他蛋白質。一或多種其他蛋白質可出於任何原因利用，包括促進CAR自身之功效及/或促進任何種類之表現CAR之細胞的功效。在一些情況下，其他蛋白質有助於治療接受表現CAR之細胞作為療法的個體，無論其他蛋白質是否直接或間接地影響CAR或細胞之活性。在一些情況下，其他蛋白質為自殺基因、一或多種細胞介素或兩者。在特定實施例中，一或多種其他蛋白質由載體產生且最終以兩種各別多肽形式產生。舉例而言，CAR及其他蛋白質可藉由例如2A序列或IRES分隔。

【0124】 在特定實施例中，一或多種細胞介素(諸如IL-15)聯合CAR利用。

【0125】 IL-15胺基酸序列：

ISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFI LGCF SAGLPKTEA  
 NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCF LLELQ  
 VISLESGDASIHD TVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIK  
 EFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:8)

本發明涵蓋之任何多肽可包含SEQ ID NO: 8或與SEQ ID NO: 8至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高一致之序列。

【0126】 在特定實施例中，自殺基因產物(諸如凋亡蛋白酶9 (例如誘導性凋亡蛋白酶9))聯合CAR利用。

【0127】 例示性凋亡蛋白酶9胺基酸序列：

MLEGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTG MLEDGKKVDSSR

DRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATG  
 HPGIIPPHATLVFDVELLKLESGGGSGVDGFGDVGALSLRGNADLAY  
 ILSMEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSSLHFMVE  
 VKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPG  
 AVYGTGDCPVSVVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGF  
 EVASTPEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTRFDQLDAISSLPTPSDIFVSY  
 TFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSV  
 KGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTSAS (SEQ ID NO:9)

本發明涵蓋之任何多肽可包含SEQ ID NO: 9或與SEQ ID NO: 9至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高一致之序列。

**【0128】** 在相同載體中之CAR及另一蛋白質意欲產生兩種不同多肽之情況下，可利用特定2A序列。

**【0129】** 可利用如下E2A胺基酸序列：

QCTNYALLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:10)

**【0130】** 可利用其他2A實例且該等實例如下：

**【0131】** T2A: EGRGSLTTCGDVEENPGP (SEQ ID NO:11)

**【0132】** P2A: ATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO:12)

**【0133】** F2A: VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:13)

**【0134】** 本發明亦涵蓋特定CAR分子，包括用於在任何類型之免疫效應細胞中表現的特定CAR分子。

**【0135】** 在載體中，CAR可用IL-15表現，諸如可藉由2A序列與CAR分隔。

## A. 細胞介素

【0136】 一或多種細胞介素可與一或多種所揭示之基因工程化受體(諸如包含以下之CAR)一起利用：(a)視情況存在之鉸鏈；及(b1) CD28跨膜域，或(b2) DAP10跨膜域；及(c) DAP10共刺激域。在一些情況下，一或多種細胞介素與工程化受體存在於同一載體分子上，但在其他情況下，其位於各別載體分子上。在特定實施例中，一或多種細胞介素與工程化受體自相同的載體共表現。一或多種細胞介素可與抗原特異性受體作為各別多肽產生。作為一個實例，利用介白素-15 (IL-15)。採用IL-15的原因在於，舉例而言，其為組織限制性的，且其僅在病理性條件下，才在血清中、在任何含量下或全身性地觀測到。IL-15具有授受性療法所要之若干屬性。IL-15為恆穩細胞介素，其誘導自然殺手細胞之發育及細胞增殖、經由緩解腫瘤駐留細胞之功能性抑制來促進已形成之腫瘤根除且抑制活化誘導之細胞死亡。除IL-15之外，亦預想其他細胞介素。此等細胞介素包括但不限於促進用於人類應用之細胞活化及增殖的細胞介素、趨化因子及其他分子。作為一個實例，一或多種細胞介素為IL-15、IL-12、IL-2、IL-18、IL-21、IL-23、IL-7或其組合。可利用表現IL-15之NK細胞且其能夠維持支持性細胞介素信號傳導，此適用於該等細胞在輸注後存活。

【0137】 在特定實施例中，NK細胞表現外源提供之一或多種細胞介素。細胞介素可外源地提供至NK細胞，因為其自細胞內之表現載體表現及/或因為其提供於細胞之培養基中。在替代情況下，在操縱內源性細胞介素之表現調節(諸如細胞介素之啟動子位點處之基因重組)後，細胞中之內源性細胞介素立即上調。在細胞介素於表現構築體上提供至細胞的情況下，細胞介素可由與自殺基因相同之載體編碼。細胞介素可作為來自自

殺基因之各別多肽分子且作為來自細胞之工程化受體之各別多肽表現。在一些實施例中，本發明係關於CAR及/或TCR載體與IL-15的共利用，尤其用於NK細胞。

## B. 自殺基因

**【0138】** 在特定實施例中，自殺基因聯合任何種類之細胞療法利用以控制其使用，且允許在所要事件及/或時間時終止細胞療法。出於在需要時起始經轉導細胞死亡之目的，在經轉導細胞中採用自殺基因。已經修飾以具有本發明所涵蓋之載體的本發明之靶向抗原的細胞可包含一或多個自殺基因。在一些實施例中，如本文所用之術語「自殺基因」定義為在投與前驅藥或其他藥劑後實現基因產物轉變成殺滅其宿主細胞之化合物的基因。在其他實施例中，自殺基因編碼基因產物，即當需要時，被靶向自殺基因產物之藥劑(諸如抗體)靶向的基因產物。「自殺基因產物」描述由自殺基因編碼之蛋白質或多肽。

**【0139】** 可使用之自殺基因/前驅藥組合之實例為單純疱疹病毒-胸苷激酶(HSV-tk)及更昔洛韋(ganciclovir)、阿昔洛韋(acyclovir)或FIAU；氧化還原酶及環己醯亞胺；胞嘧啶脫胺酶及5-氟胞嘧啶；胸苷激酶胸苷酸激酶(Tdk::Tmk)及AZT；及去氧胞苷激酶及胞嘧啶阿拉伯糖苷。可使用大腸桿菌(*E. coli*)嘌呤核苷磷酸化酶，即所謂的自殺基因，其將前驅藥6-甲基嘌呤去氧核糖苷轉化為有毒嘌呤6-甲基嘌呤。與前驅藥療法一起使用之自殺基因之其他實例為大腸桿菌胞嘧啶脫胺酶基因及HSV胸苷激酶基因。

**【0140】** 例示性自殺基因亦包括CD20、CD52、EGFRv3或誘導性凋亡蛋白酶9。在一個實施例中，EGFR變異體III (EGFRv3)之截斷型式可用作可藉由西妥昔單抗(Cetuximab)消融之自殺抗原。可用於本發明中之

此項技術中已知之其他自殺基因包括：嘌呤核苷磷酸化酶(PNP)、細胞色素p450酶(CYP)、羧肽酶(CP)、羧酸酯酶(CE)、硝基還原酶(NTR)、鳥嘌呤核糖基轉移酶(XGRTP)、糖苷酶、甲硫胺酸- $\alpha,\gamma$ -解離酶(MET)及胸苷磷酸化酶(TP)。在一些實施例中，使用誘導性凋亡蛋白酶9 (iC9)。例示性iC9描述於例如Yagy S等人 Mol Ther. 2015年9月;23(9):1475-85中，該文獻以全文引用的方式併入本文中。

**【0141】** 在特定實施例中，編碼CAR之載體或本文所涵蓋之NK細胞中之任何載體包括一或多種自殺基因。自殺基因可或可不存在於與CAR相同之載體上。在自殺基因與CAR存在於相同載體上的情況下，自殺基因及CAR可例如藉由IRES或2A元件分隔。

### C. 其他受體

**【0142】** 在一些實施例中，包含CAR之細胞可表現一或多種其他受體，包括可包含或可不包含本文所涵蓋之任何一或多種組分之其他CAR分子、一或多種細胞介素受體、一或多種趨化因子受體(例如，增強向腫瘤位點遷移及歸巢的變型，諸如增強向產生CXCL8之腫瘤遷移的CXCR1及CXCR2)及/或一或多種合成TCR。在其他受體靶向抗原(諸如癌症抗原)之情況下，其他受體可或可不靶向與本發明之CAR相同的抗原。

### IV. 載體

**【0143】** 包含(a) CD28鉸鏈；及(b1) CD28跨膜域，或(b2) DAP10跨膜域；及(c) DAP10共刺激域之CAR可藉由任何適合載體(包括病毒載體或非病毒載體)遞送至受者免疫細胞。病毒載體之實例至少包括反轉錄病毒、慢病毒、腺病毒或腺相關病毒載體。非病毒載體之實例至少包括質體、轉座子、脂質、奈米粒子等。

**【0144】** 在免疫細胞用編碼基因工程化受體之載體轉導且亦需要將另一或多個基因(諸如自殺基因及/或細胞介素及/或視情況存在之治療性基因產物)轉導至細胞中之情況下，靶向抗原之受體、自殺基因、細胞介素及視情況存在之治療性基因可包含或可不包含於相同載體上或與相同載體一起被包含在內。在一些情況下，CAR、自殺基因、細胞介素及視情況存在之治療性基因自相同載體分子(諸如相同病毒載體分子)表現。在此類情況下，CAR、自殺基因、細胞介素及視情況存在之治療性基因之表現可藉由或可不藉由相同調節元件調節。當CAR、自殺基因、細胞介素及視情況存在之治療性基因位於相同載體上時，其可或可不作為各別多肽表現。在其作為各別多肽表現之情況下，其在載體上可藉由例如2A元件或IRES元件分隔(或兩種元件可在相同載體上使用一次或超過一次)。

#### **A. 一般實施例**

**【0145】** 熟習此項技術者會利用精良的裝備、經由標準重組技術構築用於表現本發明之抗原受體的載體(參見例如Sambrook等人, 2001及Ausubel等人, 1996，兩者均以引用的方式併入本文中)。

##### **1. 調節元件**

**【0146】** 適用於本發明之載體中所包括的表現卡匣尤其含有(5'至3'方向)可操作地連接於蛋白質編碼序列之真核轉錄啟動子、包括介入序列之剪接信號及轉錄終止/聚腺苷酸化序列。控制真核細胞中之蛋白質編碼基因轉錄的啟動子及強化子可由多個基因元件構成。細胞機制能夠聚集且整合由各元件輸送之調節資訊，從而允許不同基因演進出不同的、通常複雜的轉錄調節模式。舉例而言，在本發明之上下文中所使用之啟動子包括組成性、誘導性及組織特異性啟動子。在其中載體用於產生癌症療法之情

況下，啟動子可在低氧之條件下有效。

## 2. 啟動子/強化子

**【0147】** 本文所提供之表現構築體包含驅動抗原受體及其他順反子基因產物之表現的啟動子。啟動子通常包含用於定位RNA合成之起始位點的序列。此之最佳已知實例為TATA盒，但在缺乏TATA盒之一些啟動子(諸如哺乳動物末端去氧核苷酸轉移酶基因之啟動子及SV40晚期基因之啟動子)中，上覆於起始位點本身之離散元件有助於固定起始的位置。額外啟動子元件調節轉錄起始之頻率。通常，此等元件位於起始位點上游之區域中，但已展示多個啟動子亦含有起始位點下游之功能元件。為在啟動子「控制下」引入編碼序列，將轉錄閱讀框架之轉錄起始位點之5'端置於所選啟動子之「下游」(亦即，3')。「上游」啟動子刺激DNA之轉錄且促進所編碼RNA之表現。

**【0148】** 啟動子元件之間間距通常為靈活的，使得當元件相對於彼此倒置或移動時保留啟動子功能。在tk啟動子中，例如啟動子元件之間間距可在活性開始下降之前增加至相隔50 bp。視啟動子而定，個別元件似乎可合作地或獨立地起活化轉錄的功能。啟動子可或可不聯合「強化子」使用，該強化子係指涉及核酸序列之轉錄活化的順式作用調節序列。

**【0149】** 啟動子可為與核酸序列天然相關之一種啟動子，如可藉由分離位於編碼區段及/或外顯子上游之5'端非編碼序列而獲得。此類啟動子可稱為「內源性」的。類似地，強化子可為與核酸序列天然相關，位於彼序列下游或上游之一種強化子。替代地，藉由將編碼核酸區段置放於重組或異源啟動子控制下將獲得某些優勢，該重組或異源啟動子係指在其天然

環境中通常不與核酸序列相關之啟動子。重組或異源強化子亦係指在其天然環境中通常不與核酸序列相關之強化子。此類啟動子或強化子可包括其他基因之啟動子或強化子，及自任何其他病毒或原核或真核細胞分離之啟動子或強化子，及非「天然存在」之啟動子或強化子，亦即含有不同轉錄調節區之不同元件，及/或改變表現之突變。舉例而言，最常用於重組DNA構築之啟動子包括 $\beta$ -內醯胺酶(青黴素酶)、乳糖及色胺酸(trp-)啟動子系統。除以合成方式產生啟動子及強化子之核酸序列以外，可結合本文所揭示之組合物使用重組選殖及/或核酸擴增技術(包括PCR™)產生序列。此外，經考慮，亦可採用控制序列來引導非核細胞器(諸如粒線體、葉綠體及其類似物)內之序列轉錄及/或表現。

**【0150】** 自然地，使用有效引導DNA區段在選用於表現之細胞器、細胞類型、組織、器官或生物體中之表現的啟動子及/或強化子很重要。熟習分子生物學技術者一般知道使用啟動子、強化子及細胞型組合進行蛋白質表現(參見例如Sambrook等人1989，其以引用的方式併入本文中)。所用啟動子可為組成性、組織特異性、誘導性及/或適用於在適當條件下引導所引入之DNA區段的高度表現，諸如有利於大規模產生重組蛋白質及/或肽。啟動子可為異源的或內源的。

**【0151】** 此外，任何啟動子/強化子組合(根據例如真核啟動子資料庫EPDB，經由全球資訊網epd.isb-sib.ch/)亦可用於驅動表現。另一可能實施例為使用T3、T7或SP6細胞質表現系統。若提供適當細菌聚合酶，則真核細胞可支援自某些細菌啟動子之細胞質轉錄，作為遞送複合物之一部分或作為另一種基因表現構築體。

**【0152】** 啟動子之非限制性實例包括早期或晚期病毒啟動子，諸如

SV40早期或晚期啟動子、細胞巨大病毒(CMV)即刻早期啟動子、勞斯肉瘤病毒(RSV)早期啟動子；真核細胞啟動子，諸如 $\beta$ 肌動蛋白啟動子、GADPH啟動子、金屬硫蛋白啟動子；及串聯反應元件啟動子，諸如環狀AMP反應元件啟動子(cre)、血清反應元件啟動子(sre)、佛波醇(phorbol)酯啟動子(TPA)及靠近最小TATA盒之反應元件啟動子(tre)。亦有可能使用人類生長激素啟動子序列(例如GenBank®所描述之人類生長激素最小啟動子，登錄號X05244，核苷酸283-341)或小鼠乳房腫瘤啟動子(可購自ATCC，目錄號ATCC 45007)。在某些實施例中，啟動子為CMV IE、凝集素-1、凝集素-2、人類CD11c、F4/80、SM22、RSV、SV40、Ad MLP、 $\beta$ -肌動蛋白、MHC I類或MHC II類啟動子，然而適用於驅動治療性基因之表現的任何其他啟動子可適用於本發明之實施。

**【0153】** 在某些態樣中，本發明之方法亦係關於強化子序列，亦即增加啟動子活性且具有起順式作用之潛能的核酸序列，且不考慮其定向，甚至跨越相對較長距離(與目標啟動子相距多達幾千鹼基)。然而，強化子功能不一定受限於此類長距離，因為其在緊密接近指定啟動子時亦可具有功能。

### 3. 起始信號及連接表現

**【0154】** 特定起始信號亦可用於本發明中所提供之表現構築體中以便有效轉譯編碼序列。此等信號包括ATG起始密碼子或相鄰序列。可能需要提供外源轉譯控制信號，包括ATG起始密碼子。一般熟習此項技術者能夠容易判定此情形且提供必需信號。已熟知起始密碼子必須與所需編碼序列之閱讀框架「同框」，以確保整個插入序列之轉譯。外源轉譯控制信號及起始密碼子可為天然或合成的。表現效率可藉由包括適當轉錄強化子元

件來提高。

**【0155】** 在某些實施例中，使用內部核糖體入口位點(IRES)元件之用途產生多基因或多順反子訊息。IRES元件能夠繞過5'甲基化帽依賴性轉譯之核糖體掃描模型且在內部位點開始轉譯。已描述來自小核糖核酸病毒家族之兩個成員(脊髓灰質炎及腦心肌炎)的IRES元件以及來自哺乳動物訊息之IRES。IRES元件可連接至異源開放閱讀框架。多個開放閱讀框架可一起轉錄，各自由IRES分隔，產生多順反子訊息。藉助於IRES元件，各開放閱讀框架可接近核糖體以進行高效轉譯。可使用單一啟動子/強化子轉錄單一訊息來有效表現多個基因。

**【0156】** 如本文中其他地方所詳述，某些2A序列元件可用於在本發明中所提供之構築體中產生基因之連接表現或共表現。舉例而言，裂解序列可用於藉由連接開放閱讀框架以形成單一順反子來共表現基因。例示性裂解序列為馬鼻炎A病毒(E2A)或F2A(口蹄疫病毒2A)或「2A樣」序列(例如明脈扁刺蛾(*Thosea asigna*)病毒2A；T2A)或豬鐵士古病毒-1 (porcine teschovirus-1；P2A)。在特定實施例中，在單一載體中，多個2A序列不一致，但在替代實施例中，相同載體利用相同2A序列中之兩者或更多者。2A序列之實例提供於US 2011/0065779中，該文獻以全文引用之方式併入本文中。

#### 4. 複製起點

**【0157】** 為了在宿主細胞中繁殖載體，其可含有一或多個複製起點(通常稱為「ori」)，例如對應於如上文所描述之EBV之oriP或經基因工程化之oriP、在程式化中具有類似或升高功能的核酸序列，其為起始複製之特定核酸序列。或者，可使用如上文所描述之其他染色體外複製病毒或自

主複製序列(ARS)之複製起點。

## 5. 選擇及可篩選標記物

【0158】 在一些實施例中，包含本發明之受體構築體之NK細胞可藉由將標記物包括於表現載體中來試管內或活體內鑑別。此類標記物將賦予細胞可鑑別之變化，允許容易鑑別含有表現載體之細胞。一般而言，選擇標記物為賦予允許選擇之特性的標記物。正向選擇標記物為標記物之存在允許其選擇的標記物，而負向選擇標記物為其存在阻止其選擇的標記物。正向選擇標記物之實例為耐藥性標記物。

【0159】 通常，包括藥物選擇標記物有助於選殖及鑑別轉化體，例如賦予新黴素、嘌呤黴素、潮黴素、DHFR、GPT、吉歐黴素(zeocin)及組胺醇抗性之基因為適用選擇標記物。除了賦予允許基於條件之實施區分轉化體之表型的標記物之外，亦考慮其他類型之標記物，包括基於比色分析之可篩選標記物，諸如GFP。替代地，可利用可篩選酶作為負向選擇標記物，諸如單純疱疹病毒胸苷激酶(*tk*)或氯黴素乙醯基轉移酶(CAT)。熟習此項技術者亦可結合FACS分析知曉如何使用免疫標記物。威信所用標記物不重要，只要其能夠與編碼基因產物之核酸同時表現即可。選擇及可篩選標記物之其他實例為熟習此項技術者所熟知的。

### B. 多順反子載體

【0160】 在特定實施例中，編碼基因工程化受體(包含(a) CD28鉸鏈、(b1) CD28跨膜域或(b2) DAP10跨膜域及(c) DAP10共刺激域)的載體亦包含編碼視情況存在之自殺基因、視情況存在之細胞介素及/或視情況存在之治療性基因的序列，包括由多順反子載體表現(如本文所用，術語「順反子」係指可產生基因產物的核酸序列)。在特定實施例中，多順反

子載體編碼受體、自殺基因及至少一種細胞介素及/或工程化受體，諸如T細胞受體及/或另一種CAR。在一些情況下，多順反子載體編碼至少一種CAR、至少一種不可分泌的TNF- $\alpha$ 突變體及至少一種細胞介素。細胞介素可為特定類型之細胞介素，諸如人類或小鼠或任何物種。在特定情況下，細胞介素為IL15、IL12、IL2、IL18及/或IL21。

**【0161】** 在某些實施例中，本發明利用能夠在基本上一致水平下表現多個順反子的多順反子載體來提供柔性模組化系統(如本文所使用之術語「模組」係指順反子或順反子之組分，其實現其可互換性，諸如使用例如標準重組技術分別移除及替換整個順反子或順反子之組分來達成)。該系統可用於細胞工程化，從而允許多個基因之組合表現(包括過度表現)。在特定實施例中，由載體表現之一或多種基因包括一種、兩種或更多種抗原受體。多種基因可包含但不限於CAR、TCR、細胞介素、趨化因子、歸巢受體、CRISPR/Cas9介導之基因突變、誘餌受體、細胞介素受體、嵌合細胞介素受體等。載體可進一步包含：(1)一或多個報導子，例如螢光或酶報導子，諸如用於細胞分析及動物成像；(2)一或多種細胞介素或其他信號傳導分子；及/或(3)自殺基因。

**【0162】** 在特定情況下，載體可包含藉由任何種類之裂解位點(諸如2A裂解位點)分隔的至少4個順反子。載體可為或可不為基於莫洛尼鼠類白血病病毒(MoMLV或MMLV)的載體，包括pUC19主鏈中具有psi封裝序列的3'及5' LTR。載體可包含具有三個或更多個2A裂解位點及多個ORF之4個或更多個順反子以用於基因調換。在一些實施例中，系統允許多個基因(7個或更多)之組合過度表現，該等基因側接限制位點以便經由次選殖快速整合，且系統亦包括至少三個2A自裂解位點。因此，系統允許表現

多種CAR、TCR、信號傳導分子、細胞介素、細胞介素受體及/或歸巢受體。此系統亦可應用於其他病毒及非病毒載體，包括但不限於慢病毒、腺病毒AAV以及非病毒質體。

**【0163】** 系統之模組化性質亦能夠將基因有效次選殖至多順反子表現載體中之4個順反子中之每一者及調換基因，諸如用於快速測試。策略性定位於多順反子表現載體中之限制位點允許基因高效調換。

**【0164】** 本發明之實施例涵蓋利用多順反子載體之系統，其中載體之至少一部分為模組化的，例如允許移除及置換一或多個順反子(或一或多個順反子之組分)，諸如利用限制酶位點，該等限制酶位點的身分及位置經特異性選擇以促進載體之模組化使用。載體之實施例亦為其中多個順反子被轉譯為單一多肽且加工成各別多肽，由此賦予載體以基本上等莫耳濃度表現各別基因產物的優勢。

**【0165】** 本發明之載體經組態以達成模組化，從而能夠改變載體之一或多個順反子及/或改變一或多個特定順反子之一或多個組分。載體可設計成利用側接一或多個順反子之末端及/或側接特定順反子之一或多個組分之末端的獨特限制酶位點。

**【0166】** 本發明之實施例包括包含至少兩個、至少三個或至少四個順反子的多順反子載體，該等順反子各自側接一或多個限制酶位點，其中至少一個順反子編碼至少一種抗原受體。在一些情況下，兩個、三個、四個或更多個順反子被轉譯成單一多肽且裂解成各別多肽，而在其他情況下，多個順反子被轉譯成單一多肽且裂解成各別多肽。載體上之相鄰順反子可藉由自裂解位點(諸如2A自裂解位點)分隔。在一些情況下，順反子中之每一者表現載體中之各別多肽。在特定情況下，載體上之相鄰順反子藉

由IRES元件分隔。

**【0167】** 在某些實施例中，本發明提供一種用於細胞工程化之系統，其允許多個順反子(可包括例如一種、兩種或更多種抗原受體)的組合表現，包括過度表現。在特定實施例中，使用如本文所描述之多順反子載體允許載體自相同mRNA產生等莫耳量之多種基因產物。多個基因可包含但不限於：CAR、TCR、細胞介素、趨化因子、歸巢受體、CRISPR/Cas9介導之基因突變、誘餌受體、細胞介素受體、嵌合細胞介素受體等。載體可進一步包含一或多個螢光或酶報導子，諸如用於細胞分析及動物成像。載體亦可包含自殺基因產物，以便在含有載體之細胞對其所供給之宿主而言不再需要或變得有害時終結該等細胞。

**【0168】** 在特定實施例中，載體為病毒載體(例如反轉錄病毒載體、慢病毒載體、腺病毒載體或腺相關病毒載體)或非病毒載體。載體可包含莫洛尼鼠類白血病毒(Moloney Murine Leukemia Virus, MMLV) 5' LTR、3' LTR及/或psi封裝元件。在特定情況下，psi封裝併入於5' LTR與抗原受體編碼序列之間。載體可或可不包含pUC19序列。在載體之一些態樣中，至少一個順反子編碼細胞介素(例如IL-15、IL-7、IL-21、IL-23、IL-18、IL-12或IL-2)、趨化因子、細胞介素受體及/或歸巢受體。

**【0169】** 當2A裂解位點用於載體中時，2A裂解位點可包含P2A、T2A、E2A及/或F2A位點。

**【0170】** 限制酶位點可為任何種類且在其識別位點中可包括任何數目之鹼基，諸如在4個與8個鹼基之間；識別位點中之鹼基數目可為至少4個、5個、6個、7個、8個或更多個。切割時位點可產生鈍切口或黏性末端。限制酶可屬於例如I型、II型、III型或IV型。限制酶位點可獲自可用

資料庫，諸如整合關係酶資料庫(Integrated relational Enzyme database，IntEnz)或BRENDA (全面酶資訊系統(The Comprehensive Enzyme Information System))。

【0171】 例示性載體可為圓形且依據慣例，其中將位置1 (圓圈頂部之12點鐘位置，其餘序列沿順時針方向)設定在5' LTR之起點。

【0172】 在其中利用自裂解2A肽之實施例中，2A肽可為在真核細胞中轉譯期間介導多肽「裂解」的長為18-22個胺基酸(aa)之病毒寡肽。名稱「2A」係指病毒基因體之特定區域且不同病毒2A一般以衍生其之病毒命名。首次發現之2A為F2A (口蹄疫病毒)，其後亦鑑別出E2A (馬鼻炎A病毒)、P2A (豬鐵土古病毒-1 2A)及T2A (明脈扁刺蛾病毒2A)。發現2A介導之「自裂解」機制為核糖體跳過在2A之C端處形成甘胺醯基-脯胺醯基肽鍵。

【0173】 在特定情況下，載體可為 $\gamma$ -反轉錄病毒轉移載體。反轉錄病毒轉移載體可包含基於質體(諸如HindIII與EcoRI限制酶位點之間的pUC19質體(大片段(2.63 kb))之主鏈。主鏈可攜帶來自莫洛尼鼠類白血病毒(MoMLV)之病毒組分，包括5' LTR、psi封裝序列及3' LTR。LTR為在反轉錄病毒原病毒之任一側上發現的長末端重複序列，且在轉移載體之情況下，將所關注之基因負荷括起來，諸如包含(a) CD28鉸鏈、(b1) CD28跨膜域或(b2) DAP10跨膜域及(c) DAP10共刺激域及視情況存在之相關組分的CAR。psi封裝序列(其為藉由核衣殼封裝之目標位點)亦以順式併入，包夾於5' LTR與CAR編碼序列之間。因此，轉移載體之實例之基本結構可如此組態：pUC19序列 - 5' LTR - psi封裝序列 - 所關注之基因負荷 - 3' LTR - pUC19序列。此系統亦可應用於其他病毒及非病毒載體，包

括但不限於慢病毒、腺病毒AAV以及非病毒質體。

## V. 細胞

**【0174】** 本發明涵蓋具有至少一種編碼基因工程化受體之載體的任何種類之免疫細胞或幹細胞，該基因工程化受體包含(a) CD28鉸鏈、(b1) CD28跨膜域或(b2) DAP10跨膜域及(c) DAP10共刺激域，且該載體亦可編碼至少一種細胞介素及/或至少一種自殺基因。在一些情況下，相對於編碼自殺基因及/或細胞介素，不同載體編碼CAR。免疫細胞(包括NK細胞)可來源於臍帶血(包括來自多種來源之彙集臍帶血)、末梢血液、誘導性多能幹細胞(iPSC)、造血幹細胞(HSC)、骨髓或其混合物。NK細胞可來源於細胞株，諸如但不限於例如NK-92細胞。NK細胞可為臍帶血單核細胞，諸如CD56<sup>+</sup> NK細胞。

**【0175】** 本發明涵蓋任何種類之免疫或其他細胞，包括習知T細胞、 $\gamma$ - $\delta$  T細胞、NKT及無變異NK T細胞、調節T細胞、巨噬細胞、B細胞、樹突狀細胞、間葉基質細胞(MSC)或其混合物。

**【0176】** 在一些情況下，細胞已在有效量之通用抗原呈現細胞(UAPC)存在下擴增，包括以任何適合比率。細胞可與UAPC一起以10:1至1:10；9:1至1:9；8:1至1:8；7:1至1:7；6:1至1:6；5:1至1:5；4:1至1:4；3:1至1:3；2:1至1:2；或1:1之比率(包括1:2之比率)培養。在一些情況下，NK細胞在IL-2 (諸如10-500、10-400、10-300、10-200、10-100、10-50、100-500、100-400、100-300、100-200、200-500、200-400、200-300、300-500、300-400或400-500 U/mL之濃度) 存在下擴增。

**【0177】** 在用載體進行基因修飾之後，可立即輸注NK細胞或可儲

存NK細胞。在某些態樣中，在基因修飾之後，細胞可作為基因轉移至細胞後約1、2、3、4、5天或更多天內的混合群體離體繁殖數天、數週或數月。在另一態樣中，選殖轉染物且對證明存在單一整合或以游離方式維持之表現卡匣或質體及CAR表現的純系進行離體擴增。選用於擴增之純系證明特異性識別及溶解表現抗原之標靶細胞的能力。重組免疫細胞可藉由用IL2或結合共同 $\gamma$ 鏈之其他細胞介素(例如，IL-7、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-23及其他)刺激而擴增。重組免疫細胞可藉由用人工抗原呈現細胞刺激來擴增。在另一態樣中，經基因修飾之細胞可冷凍保存。

**【0178】** 本發明之實施例涵蓋表現一或多種CAR及一或多種如本文所涵蓋之自殺基因的細胞。在特定實施例中，NK細胞包含重組核酸，其編碼一或多種CAR及一或多種工程化之不可分泌、膜結合TNF- $\alpha$ 突變體多肽。在特定實施例中，除表現一或多種CAR及TNF- $\alpha$ 突變體多肽之外，細胞亦包含編碼一或多種治療性基因產物之核酸。

**【0179】** 細胞可直接獲自個體或可獲自保藏機構或其他儲存機構。作為療法之細胞相對於細胞作為療法所供給之個體可為自體或同種異體的。

**【0180】** 細胞可來自需要治療醫學病狀之個體，且在其操縱以表現CAR、視情況存在之自殺基因、視情況存在之細胞介素及視情況存在之治療性基因產物之後(例如使用轉導及擴增標準技術用於授受性細胞療法)，可將其提供回至其最初來源之個體。在一些情況下，儲存細胞以便隨後用於個體或另一個體。

**【0181】** 免疫細胞可包含於細胞群體中，且該群體之大部分可經一或多種受體及/或一或多種自殺基因及/或一或多種細胞介素轉導。細胞群

體可包含51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%之免疫細胞，該等免疫細胞經一或多種CAR及/或一或多種自殺基因及/或一或多種細胞介素轉導。一或多種CAR及/或一或多種自殺基因及/或一或多中細胞介素可為各別多肽。

**【0182】** 免疫細胞可用一或多種CAR及/或一或多種自殺基因及/或一或多種細胞介素產生，其意圖為根據特定目的進行模組化。舉例而言，可產生的細胞(包括用於商業分配)表現CAR及/或一或多種自殺基因及/或一或多種細胞介素(或分佈有編碼突變體之核酸用於後續轉導)，且使用者可視其預期目的而定，將其修飾以表現一或多種其他所關注基因(包括治療性基因)。舉例而言，對治療抗原陽性細胞(包括抗原陽性癌症或傳染原感染細胞)感興趣的個體可獲得或產生表現自殺基因之細胞(或表現異源細胞介素之細胞)且將其修飾以表現包含抗原特異性scFv之受體，或反之亦然。

**【0183】** 在特定實施例中，利用NK細胞，且表現一或多種CAR及/或一或多種自殺基因及/或一或多種細胞介素之經轉導之NK細胞的基因體可經修飾。基因體可以任何方式修飾，但在特定實施例中，基因體例如藉由CRISPR基因編輯修飾。細胞之基因體可經修飾以增強細胞用於任何目的之有效性。

## VI. 治療方法

【0184】 在各種實施例中，靶向表面上表現所需者的病變細胞或其他細胞以達成改善患有醫學病狀之個體之醫學病狀的目的；或達成降低個體之醫學病狀之風險或延緩其嚴重程度及/或發作的目的。在特定情況下，出於殺滅癌細胞之目的，靶向表現內源性抗原之癌細胞。在其他情況下，出於殺滅感染細胞之目的，靶向感染傳染原之細胞。

【0185】 在特定實施例中，如本文所考慮之CAR構築體、核酸序列、載體、免疫細胞等及/或包含其之醫藥組合物用於預防、治療或改善疾病，諸如癌性疾病。在特定實施例中，本發明之醫藥組合物可尤其適用於預防、改善及/或治療癌症，包括表現特定抗原且可為或可不為實體腫瘤之癌症。

【0186】 在特定實施例中，利用受體之免疫細胞可為工程化以用於哺乳動物之細胞療法的NK細胞、T細胞、 $\gamma$   $\delta$  T細胞、 $\alpha$   $\beta$  T細胞或NKT或無變異NKT (iNKT)或無變異NKT細胞。在細胞為NK細胞之此類情況下，NK細胞療法可為任何種類且NK細胞可為任何種類。在特定實施例中，細胞為已經工程化以表現一或多種CAR及/或一或多種自殺基因及/或一或多種細胞介素之NK細胞。在特定實施例中，細胞為經CAR轉導之NK細胞。

【0187】 在特定實施例中，本發明部分地考慮了表現CAR之細胞、CAR構築體、CAR核酸分子及CAR載體，其可單獨或以任何組合、使用標準載體及/或基因遞送系統投與，且在至少一些態樣中與醫藥學上可接受之載劑或賦形劑一起投與。在某些實施例中，在投與之後，核酸分子或載體可穩定整合至個體之基因體中。

【0188】 在特定實施例中，可使用對某些細胞或組織具有特異性且久存於NK細胞中之病毒載體。適合之醫藥載劑及賦形劑為此項技術中所

熟知。根據本發明製備之組合物可用於預防或治療或延遲上文所鑑別之疾病。

**【0189】** 此外，本發明係關於一種用於預防、治療或改善腫瘤性疾病之方法，其包含向有需要之個體投與有效量之表現CAR、核酸序列、載體之細胞(如本文所考慮及/或藉由如本文所考慮之方法產生)的步驟。

**【0190】** 投與例示性CAR細胞之組合物之可能適應症為癌性疾病，包括腫瘤疾病，包括例如B細胞惡性疾病、多發性骨髓瘤、乳癌、神經膠母細胞瘤、腎癌、胰臟癌或肺癌。投與靶向抗原之CAR細胞之組合物的例示性適應症為癌性疾病，包括表現抗原之任何惡性疾病。投與本發明之組合物適用於所有階段(I、II、III或IV)及癌症類型，包括例如微小殘留疾病、早期癌症、晚期癌症及/或轉移性癌症及/或難治性癌症。

**【0191】** 本發明進一步涵蓋與經由免疫細胞起作用之其他化合物(例如雙特異性抗體構築體、靶向毒素或其他化合物)之共投與方案。共投與本發明化合物之臨床療法可涵蓋同時共投與、在投與其他組分之前或之後共投與。特定組合療法包括化學療法、輻射、手術、激素療法或其他類型之免疫療法。

**【0192】** 實施例係關於一種套組，其包含如本文所定義之CAR構築體或本文所涵蓋之組分、如本文所定義之核酸序列、如本文所定義之載體及/或如本文所定義之宿主細胞(諸如免疫細胞)。在特定實施例中，套組包含編碼(a) CD28鉸鏈、(b1) CD28跨膜域或(b2) DAP10跨膜域及/或(c) DAP10共刺激域的核酸，或適於擴增其的引子。亦經考慮，本發明之套組包含單獨的或與待向需要醫學治療或干預之個體投與之其他藥劑組合的如上文所描述之醫藥組合物。

## VII. 醫藥組合物

【0193】 本發明之醫藥組合物包含有效量的組合物，該等組合物包含分散於醫藥學上可接受之載劑中之NK細胞。片語「醫藥學或藥理學上可接受」係指分子實體及組合物在適當時投與動物(諸如人類)時不產生不利、過敏或其他不良反應。熟習此項技術者根據本發明將知曉包含組合物之醫藥組合物之製備，如Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第21版 Lippincott Williams及Wilkins, 2005所例示，該文獻以引用之方式併入本文中。此外，對於動物(例如人類)投與而言，應理解製備應滿足如FDA生物標準辦公室(FDA Office of Biological Standards)所要求之無菌性、發熱性、一般安全性及純度標準。

【0194】 如本文所用，「醫藥學上可接受之載劑」包括任何及所有溶劑、分散介質、塗料、界面活性劑、抗氧化劑、防腐劑(例如抗細菌劑、抗真菌劑)、等張劑、吸收延遲劑、鹽、防腐劑、藥物、藥物穩定劑、凝膠、黏合劑、賦形劑、崩解劑、潤滑劑、甜味劑、調味劑、染料、此類類似材料及其組合，如一般熟習此項技術者所知(參見例如Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版, Mack Printing Company, 1990, 第1289-1329頁，該文獻以引用之方式併入本文中)。除非任何習知載劑與活性成分不相容，否則考慮將其用於醫藥組合物中。

【0195】 醫藥組合物可包含不同類型的載劑，此視其是否以固體、液體或氣溶膠形式投與及其是否需無菌以用於諸如注射之投與途徑而定。本發明所揭示之組合物可靜脈內、皮內、經皮、鞘內、動脈內、腹膜內、鼻內、陰道內、直腸內、外用、肌肉內、皮下、黏膜、經口、外用、局部、吸入(例如，氣溶膠吸入)、注射、輸注、連續輸注、直接洗浴標靶細

胞之局域灌注、經由導管、經由灌洗、以乳膏、以脂質組合物(例如，脂質體)或藉由其他方法或前述者之任何組合投與，如一般熟習此項技術者所知(參見例如Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版, Mack Printing Company, 1990，該文獻以引用之方式併入本文中)。

**【0196】** 包含NK細胞之組合物可調配成呈游離鹼、中性或鹽形式之組合物。適當時，醫藥學上可接受之鹽包括酸加成鹽，例如與蛋白質組合物之游離胺基形成的鹽，或與無機酸(諸如鹽酸或磷酸)或有機酸(諸如乙酸、乙二酸、酒石酸或杏仁酸)形成的鹽。與游離羧基形成之鹽亦可衍生自無機鹼，諸如氫氧化鈉、氫氧化鉀、氫氧化銨、氫氧化鈣或氫氧化鐵；或有機鹼，諸如異丙胺、三甲胺、組胺酸或普魯卡因(procaine)。在調配後，溶液將以與劑量調配物相容之方式且以諸如治療有效之量投與。該等調配物易於以各種劑型投與，諸如經調配以用於非經腸投與，諸如可注射溶液或氣溶膠以用於遞送至肺中，或經調配以用於消化道投與，諸如藥物釋放膠囊及其類似物。

**【0197】** 進一步根據本發明，適於投與之本發明組合物提供於具有或不具有惰性稀釋劑之醫藥學上可接受之載劑中。載劑應為可同化的且包括液體、半固體，亦即糊劑，或固體載劑。除非任何習知介質、試劑、稀釋劑或載劑對受者或對其中所含之組合物之治療有效性有害，否則其適用於可投與的組合物中以用於實施本發明之方法。載劑或稀釋劑之實例包括脂肪、油、水、生理鹽水溶液、脂質、脂質體、樹脂、黏合劑、填充劑及其類似者或其組合。該組合物亦可包含各種抗氧化劑以阻止一或多種組分氧化。另外，預防微生物作用可藉由防腐劑實現，該等防腐劑諸如各種抗細菌劑及抗真菌劑，包括(但不限於)對羥基苯甲酸酯(例如對羥基苯甲酸

甲酯、對羥基苯甲酸丙酯)、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞或其組合。

**【0198】** 根據本發明，組合物係以任何方便且實用的方式(亦即藉由溶解、懸浮、乳化、混合、囊封、吸收及其類似方式)與載劑合併。此類程序對於熟習此項技術者為常規的。

**【0199】** 在本發明之一特定實施例中，組合物與半固體或固體載劑合併或充分混合。混合可以任何方便的方式進行，諸如研磨。亦可在混合過程中添加穩定劑以保護組合物以防治療活性損失，亦即在胃中變性。用於組合物中之穩定劑之實例包括緩衝劑、胺基酸(諸如甘胺酸及離胺酸)、碳水化合物(諸如右旋糖、甘露糖、半乳糖、果糖、乳糖、蔗糖、麥芽糖、山梨糖醇、甘露糖醇等)。

**【0200】** 在其他實施例中，本發明可關於醫藥脂質媒劑組合物之用途，該醫藥脂質媒劑組合物包括包含NK細胞及視情況存在之水溶劑的組合物。如本文所使用之術語「脂質」應定義為包括寬範圍中之任一種物質，其特徵為不溶於水且可用有機溶劑萃取。此廣泛類別之化合物為熟習此項技術者所熟知，且在本文中使用的術語「脂質」時，其不限於任何特定結構。實例包括含有長鏈脂族烴之化合物及其衍生物。脂質可為天然產生的或合成的(亦即，由人設計或生產)。然而，脂質通常為生物物質。生物脂質為此項技術中所熟知，且包括例如中性脂肪、磷脂、磷酸甘油酯、類固醇、萜類、溶血脂素、鞘醯脂、醯脂、硫脂、具有醚及酯連接之脂肪酸之脂質及可聚合脂質及其組合。當然，本發明之組合物及方法亦涵蓋除本文所專門描述之彼等化合物以外之由熟習此項技術者理解為脂質之化合物。

**【0201】** 一般熟習此項技術者將熟悉可用於將組合物分散於脂質媒

劑中之一系列技術。舉例而言，包含NK細胞及抗體之組合物可分散於含有脂質、溶解有脂質、經脂質乳化、與脂質混合、與脂質合併、共價鍵結至脂質、以懸浮液形式含於脂質中、含有微胞或脂質體或與微胞或脂質體複合、或藉由一般熟習此項技術者已知之任何方法以其他方式與脂質或脂質結構締合的溶液。分散液可或可不引起脂質體形成。

**【0202】** 向動物患者投與之本發明組合物之實際劑量可根據身體及生理因素判定，諸如體重、病狀嚴重程度、所治療疾病之類型、先前或並行治療性干預、患者之特發病及投與途徑。視投與劑量及途徑而定，較佳劑量及/或有效量之投與次數可根據個體之反應而變化。負責投與的從業者將在任何情況下確定組合物中活性成分之濃度及適用於單獨個體的劑量。

**【0203】** 在某些實施例中，醫藥組合物可包含例如至少約0.1%之活性化合物。在其他實施例中，活性化合物可例如占單元重量之約2%至約75%之間，或占單元重量之約25%至約60%之間，及其中可導出之任何範圍。自然可以由含該量之活性化合物製備治療上有用之各組合物，依此方式得到呈任何指定單位劑量之化合物之合適劑量。熟習製備此類醫藥調配物之技術者應考慮諸如以下因素：溶解性、生物可用性、生物半衰期、投與途徑、產品存放期、及其他藥理學考慮因素，且因此，可能需要各種不同劑量及治療方案。

**【0204】** 在其他非限制性實例中，劑量亦可包含每次投與每公斤體重約1微克、每公斤體重約5微克、每公斤體重約10微克、每公斤體重約50微克、每公斤體重約100微克、每公斤體重約200微克、每公斤體重約350微克、每公斤體重約500微克、每公斤體重約1毫克、每公斤體重約5

毫克、每公斤體重約10毫克、每公斤體重約50毫克、每公斤體重約100毫克、每公斤體重約200毫克、每公斤體重約350毫克、每公斤體重約500毫克至約1000毫克或更高，及其中可導出之任何範圍。在本文所列數值之可推導範圍之非限制性實例中，基於上述數值，可投與的範圍為每公斤體重約5毫克至約每公斤體重約100毫克、每公斤體重約5微克至約每公斤體重約500毫克，等。

**【0205】** 包含本發明之NK細胞之治療組合物可藉由輸注、靜脈內、肌肉內、皮下、體表、經口、經皮、腹膜內、眶內、藉由植入、藉由吸入、鞘內、腦室內或鼻內投與。可基於待治療之疾病類型、疾病之嚴重程度及病程、個體之臨床病狀、個體之臨床病史及治療反應以及主治醫師之判斷來判定適合的劑量。

**【0206】** 治療可包括各種「單位劑量」。單位劑量定義為含有預定量之治療組合物。待投與之量及特定途徑及調配物屬於熟習臨床技術者之判定技能範圍內。單位劑量無需以單次注射形式投與，而是可包含設定時間段內的連續輸注。在一些實施例中，單位劑量包含可單次投與之劑量。

**【0207】** 在特定實施例中，遞送至有需要之個體的劑量(包括至少藉由輸注)為105至1010個細胞/公斤/劑/週及其中可導出之任何範圍。

**【0208】** 根據治療次數及單位劑量投與之數量視所需治療作用而定。應理解，有效劑量係指實現特定作用所需之量。在實務中，在某些實施例中，經考慮在10 mg/kg至200 mg/kg範圍內之劑量可影響此等藥劑之保護能力。因此，經考慮，劑量包括約0.1、0.5、1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、

165、170、175、180、185、190、195、及200、300、400、500、1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $\text{mg}/\text{kg}$ 、 $\mu\text{g}/\text{天}$ 或 $\text{mg}/\text{日}$ 或其中可導出之任何範圍的劑量。此外，此類劑量可在一天內及/或在數天、數週或數月內投與多次。

【0209】 在某些實施例中，醫藥組合物之有效劑量為可提供約1  $\mu\text{M}$  至150  $\mu\text{M}$ 之血液含量之劑量。在另一實施例中，有效劑量提供以下血液含量：約4  $\mu\text{M}$ 至100  $\mu\text{M}$ ；或約1  $\mu\text{M}$ 至100  $\mu\text{M}$ ；或約1  $\mu\text{M}$ 至50  $\mu\text{M}$ ；或約1  $\mu\text{M}$ 至40  $\mu\text{M}$ ；或約1  $\mu\text{M}$ 至30  $\mu\text{M}$ ；或約1  $\mu\text{M}$ 至20  $\mu\text{M}$ ；或約1  $\mu\text{M}$ 至10  $\mu\text{M}$ ；或約10  $\mu\text{M}$ 至150  $\mu\text{M}$ ；或約10  $\mu\text{M}$ 至100  $\mu\text{M}$ ；或約10  $\mu\text{M}$ 至50  $\mu\text{M}$ ；或約25  $\mu\text{M}$ 至150  $\mu\text{M}$ ；或約25  $\mu\text{M}$ 至100  $\mu\text{M}$ ；或約25  $\mu\text{M}$ 至50  $\mu\text{M}$ ；或約50  $\mu\text{M}$ 至150  $\mu\text{M}$ ；或約50  $\mu\text{M}$ 至100  $\mu\text{M}$  (或其中可導出之任何範圍)。在其他實施例中，劑量可提供由治療劑投與個體引起之以下血液藥劑含量：約、至少約或至多約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100  $\mu\text{M}$ 或其中可導出之任何範圍。在某些實施例中，投與個體之治療劑在體內代謝成經代謝之治療劑，在此情況下，血液含量可指該藥劑之量。或者，在治療劑未被個體代謝之情況下，本文中所論述之血液含量可指未代謝之治療劑。

#### A. 消化道組合物及調配物

【0210】 在本發明之特定實施例中，包含NK細胞及抗體之組合物經調配以經由消化途徑投與。消化途徑包括其中組合物與消化道直接接觸的所有可能投與途徑。特定言之，本文所揭示之醫藥組合物可經口、口頰、直腸或舌下投與。因此，此等組合物可用惰性稀釋劑或用可吸收的可食用載劑調配，或其可封閉於硬殼或軟殼明膠膠囊中，或其可壓縮成錠劑，或其可直接併入飲食食物。

【0211】 在某些實施例中，可將活性化合物併入賦形劑且以可攝取之錠劑、口頰錠、糖衣錠、膠囊、酏劑、懸浮液、糖漿、粉片及其類似形式使用(Mathiowitz等人, 1997；Hwang等人, 1998；美國專利第5,641,515號；第5,580,579號及第5,792,451號，各文獻以全文引用的方式特別併入本文中)。錠劑、糖衣錠、丸劑、膠囊及其類似者亦可含有以下：黏合劑，諸如黃耆膠、阿拉伯膠、玉米澱粉、明膠或其組合；賦形劑，諸如磷酸二鈣、甘露糖醇、乳糖、澱粉、硬脂酸鎂、糖精鈉、纖維素、碳酸鎂或其組合；崩解劑，諸如玉米澱粉、馬鈴薯澱粉、褐藻酸或其組合；潤滑劑，諸如硬脂酸鎂；甜味劑，諸如蔗糖、乳糖、糖精或其組合；調味劑，諸如胡椒薄荷、冬青油、櫻桃調味劑、橙調味劑等。當單位劑型為膠囊時，除以上類型之材料以外，其亦可含有液體載劑。各種其他材料可以包衣形式存在或以其他方式改變劑量單元之實體形式。舉例而言，錠劑、丸劑或膠囊可用蟲膠、糖或二者包覆。當劑型為膠囊時，除以上類型之材料之外，其亦可含有載劑，諸如液體載劑。明膠膠囊、錠劑或丸劑可包覆腸溶包衣。腸溶包衣防止組合物在pH呈酸性的胃或腸上部中變性。參見例如美國專利第5,629,001號。在到達小腸後，其中之鹼性pH溶解包衣且允許組合物釋放且被特化細胞吸附，例如腸上皮細胞及派氏結M細胞

(Peyer's patch M cell)。糖漿或醃劑可含有活性化合物、作為甜味劑之蔗糖、作為防腐劑之對羥基苯甲酸甲酯及對羥基苯甲酸丙酯、染料及調味劑，諸如櫻桃或橙調味劑。當然，用於製備任何單位劑型之任何物質應為醫藥學上純的且在所用量下基本上無毒性。另外，活性化合物可併入持續釋放製劑及調配物中。

**【0212】** 對於經口投與而言，本發明之組合物可替代地與一或多種賦形劑一起併成漱口水、牙粉、口頰錠、經口噴霧劑或舌下經口投與調配物形式。舉例而言，可製備將所需量之活性成分併入適當溶劑中之漱口水，諸如硼酸鈉溶液(多貝爾氏溶液(Dobell's Solution))。可替代地，活性成份可併入口服溶液，諸如含有硼酸鈉、甘油及碳酸氫鉀之口服溶液，或分散於牙粉中，或以治療有效量添加至可包括水、黏合劑、研磨劑、調味劑、發泡劑及保濕劑之組合物中。可替代地，組合物可以塑造成可置放於舌下或以其他方式溶解於口腔中之錠劑或溶液形式。

**【0213】** 適合於其他消化道投與模式之其他調配物包括栓劑。栓劑為各種重量及形狀之固體劑型，通常插入直腸中用藥。在插入之後，栓劑軟化、熔融或溶解於腔液中。一般而言，對於栓劑，傳統載劑可包括例如聚伸烷基二醇、三酸甘油酯或其組合。在某些實施例中，栓劑可由含有例如約0.5%至約10%且較佳約1%至約2%範圍內之活性成分的混合物形成。

## **B. 非經腸組合物及調配物**

**【0214】** 在其他實施例中，組合物可經由非經腸途徑投與。如本文中所示，術語「非經腸」包括繞過消化道之途徑。特定而言，本文所揭示之醫藥組合物可投與的方式例如但不限於靜脈內、皮內、肌肉內、動脈內、鞘內、皮下或腹膜內，美國專利第6,613,308號；第5,466,468號；第

5,543,158號；第5,641,515號；及第5,399,363號(各以全文引用的方式特別併入本文中)。

**【0215】** 可在水中藉由與界面活性劑(諸如羥丙基纖維素)適當混合來製備呈游離鹼或藥理學上可接受之鹽形式之活性化合物的溶液。亦可在甘油、液態聚乙二醇及其混合物中及在油中製備分散液。在一般儲存及使用條件下，此等製劑含有防腐劑以防止微生物生長。適合於注射使用之醫藥形式包括無菌水溶液或分散液以及臨時製備無菌可注射溶液或分散液的無菌粉末(美國專利第5,466,468號，該專利以全文引用之方式特別併入本文中)。在所有情況下，形式必須為無菌的且必須為流體，達到易於注射之程度。其在製造及儲存條件下必須穩定，且必須保護其免遭諸如細菌及真菌之微生物之污染作用。載劑可為溶劑或分散介質，其含有例如水、乙醇、多元醇(亦即甘油、丙二醇及液體聚乙二醇及其類似物)、其適合混合物及/或植物油。適當流動性可例如藉由使用諸如卵磷脂之包衣、藉由在分散液之情況下維持所要粒度及藉由使用界面活性劑來維持。微生物作用之預防可藉由各種抗細菌劑及抗真菌劑來實現，例如對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞及其類似物。在許多情況下，較佳包括等張劑，例如糖或氯化鈉。可藉由在組合物中使用延緩吸收劑(例如，單硬脂酸鋁及明膠)來延長可注射組合物之吸收。

**【0216】** 對於以水溶液形式非經腸投與而言，例如，該溶液必要時應經適當緩衝且先用足夠生理食鹽水或葡萄糖使液體稀釋劑具有等張性。此等特定水溶液尤其適用於靜脈內、肌內、皮下及腹膜內投與。在此方面，熟習此項技術者根據本發明將知曉可採用之無菌水性介質。舉例而言，單次劑量可溶解於等張NaCl溶液中，且添加至皮下灌注液中，或在

建議之輸注位點注射(參見例如「Remington's Pharmaceutical Sciences」, 第15版, 第1035-1038及1570-1580頁)。視所治療個體之病狀而定, 劑量必然將存在一些變化。在任何情況下, 負責投與之人員將判定個別個體之適當劑量。此外, 對於人類投與而言, 製劑應符合FDA生物製品標準辦公室(FDA Office of Biologics standards)所要求之無菌性、發熱性、大體安全及純度標準。

**【0217】** 無菌可注射溶液係如下製備: 將所要量之活性化合物視需要與上文列舉之各種其他成分一起併入適當溶劑中, 隨後過濾滅菌。一般而言, 藉由將各種滅菌活性成分併入含有鹼性分散介質及來自上文列舉之彼等成分之所需其他成分的無菌媒劑中來製備分散液。在無菌粉末用於製備無菌可注射溶液之情況下, 較佳製備方法為真空乾燥及冷凍乾燥技術, 由其先前無菌過濾溶液產生活性成分加任何額外所需成分之粉末。在存在或不存在穩定劑之情況下, 將粉末狀組合物與諸如水或生理鹽水溶液之液體載劑合併。

### C. 其他醫藥組合物及調配物

**【0218】** 在本發明之其他特定實施例中, 包含NK細胞及抗體之活性化合物組合物可經調配以經由各種其他途徑投與, 例如外用(亦即經皮)投與、黏膜投與(鼻內、陰道等)及/或吸入。

**【0219】** 外用投與之醫藥組合物可包括經調配用於藥用之活性化合物, 諸如軟膏、糊劑、乳膏或散劑。軟膏包括外用之所有基於油性、吸收性、乳液狀及水溶性之組合物, 而乳膏及乳劑僅為包括乳液基質的彼等組合物。外用投與之藥物可含有促進活性成分經由皮膚被吸收之滲透增強劑。適合之滲透增強劑包括甘油、醇、烷基甲基亞砷、吡咯啉酮及月桂氮

酮(luarocapram)。用於外用組合物的可能基質包括聚乙二醇、羊毛蠟、冷霜及凡士林(petrolatum)以及任何其他適合之吸收性、乳液狀或水溶性軟膏基質。外用製劑亦可視需要包括乳化劑、膠凝劑及抗微生物防腐劑以保存活性成分且提供均質混合物。本發明之經皮投與亦可包含使用「貼劑」。舉例而言，貼片可以預定速率且以連續方式在固定時間段供應一或多種活性物質。

**【0220】** 在某些實施例中，醫藥組合物可藉由滴眼劑、鼻內噴霧劑、吸入劑及/或其他氣溶膠遞送媒劑遞送。經由鼻氣溶膠噴霧將組合物直接遞送至肺部的方法已描述於例如美國專利第5,756,353號及第5,804,212號(各自以全文引用的方式特別併入本文中)中。同樣，使用鼻內微米顆粒樹脂(Takenaga等人, 1998)及溶血磷脂醯基-甘油化合物(美國專利第5,725,871號，該專利以全文引用之方式特別併入本文中)遞送藥物亦為醫藥技術中熟知的。同樣，以聚四氟乙烯支撐基質形式經黏膜遞送藥物描述於美國專利第5,780,045號(以全文引用之方式特別併入本文中)。

**【0221】** 術語氣溶膠係指液體顆粒分散於液化或加壓氣體推進劑中之細粉狀固體的膠態系統。用於吸入之本發明之典型氣溶膠將由活性成分於液體推進劑中之懸浮液或液體推進劑與適合溶劑之混合物組成。適合推進劑包括烴及烴醚。適合容器將根據推進劑之壓力要求而變化。氣溶膠之投與將根據個體之年齡、體重以及症狀之嚴重程度及反應而變化。

## VIII. 組合療法

**【0222】** 在某些實施例中，本發明實施例之組合物及方法涉及免疫細胞群體(包括NK細胞群體)與至少一種額外療法之組合。額外療法可為放射療法、手術(例如乳房腫瘤切除術及乳房切除術)、化學療法、基因療

法、DNA療法、病毒療法、RNA療法、免疫療法、骨髓移植、奈米療法、單株抗體療法、激素療法、溶瘤病毒或前述者之組合。額外療法可呈輔助或新輔助療法形式。

**【0223】** 在一些實施例中，額外療法為投與小分子酶抑制劑或抗轉移藥劑。在一些實施例中，額外療法為投與副作用限制劑(例如意欲減少治療之副作用出現及/或嚴重程度的藥劑，諸如抗噁心劑等)。在一些實施例中，額外療法為放射療法。在一些實施例中，額外療法為手術。在一些實施例中，額外療法為輻射療法與手術之組合。在一些實施例中，額外療法為 $\gamma$ 照射。在一些實施例中，額外療法係靶向PBK/AKT/mTOR路徑之療法、HSP90抑制劑、微管蛋白抑制劑、細胞凋亡抑制劑及/或化學預防劑。額外療法可為此項技術中已知之一或多種化學治療劑。

**【0224】** 在特定實施例中，除所揭示之本發明細胞療法以外，可已向個體提供、可向個體提供且/或可將向個體提供用於癌症之特定額外療法，包括手術、放射、免疫療法(除本發明之細胞療法以外)、激素療法、基因療法、化學療法等中之一或多者。

**【0225】** 免疫細胞療法可在額外癌症療法之前、期間、之後或以各種組合投與。投與可以同時至數分鐘至數天至數週範圍內之時間間隔進行。在其中免疫細胞療法與額外治療劑分別提供於患者之實施例中，通常確保各次遞送時間之間的長時間段未到期，使得兩種化合物將仍能夠對患者發揮有利的組合效果。在此類情況下，經考慮，抗體療法及抗癌療法可在彼此約12小時至24小時或72小時內(且更特定言之，在彼此約6小時至12小時內)提供給患者。在一些情況下，可能需要顯著地延長治療時間段，其中在各別投與之間會流逝若干天(2、3、4、5、6或7)至若干週(1、

2、3、4、5、6、7或8)。

【0226】 可使用各種組合。在下文實例中，免疫細胞療法為「A」且抗癌療法為「B」：

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B  
 B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A  
 B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

【0227】 考慮到藥劑之毒性(若存在)，向患者投與本發明實施例之任何化合物或細胞療法將遵循用於投與此類化合物之一般方案。因此，在一些實施例中，存在監測由於組合療法而引起之毒性的步驟。

#### A. 化學療法

【0228】 可根據本發明實施例使用各種化學治療劑。術語「化學療法」係指使用藥物治療癌症。「化學治療劑」用於表示在癌症治療中投與之化合物或組合物。此等藥劑或藥物藉由其在細胞內之活性模式分類，例如其是否且在哪一階段影響細胞週期。或者，藥劑可基於其與DNA直接交聯、插入DNA中或藉由影響核酸合成來誘導染色體及有絲分裂失常之能力表徵。

【0229】 化學治療劑之實例包括烷基化劑，諸如噻替派(thiotepa)及環磷醯胺；磺酸烷基酯，諸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)及哌泊舒凡(piposulfan)；氮丙啶(aziridine)，諸如苯佐替派(benzodopa)、卡波醯(carboquone)、美妥替派(meturedopa)及烏瑞替派(uredopa)；乙烯亞胺及甲基蜜胺(methylamelamine)，包括六甲蜜胺(altretamine)、三伸乙基蜜胺(triethylenemelamine)、三伸乙基磷醯胺、三伸乙基硫代磷醯胺及三甲蜜胺(trimethylolomelamine)；多聚乙醯

(acetogenin) (尤其布拉他辛(bullatacin)及布拉他辛酮(bullatacinone))；喜樹鹼(包括合成類似物拓樸替康(topotecan))；苔蘚抑素(bryostatin)；卡利他汀(callystatin)；CC-1065 (包括其合成類似物阿多來新(adozelesin)、卡折來新(carzelesin)及比折來新(bizelesin))；念珠藻環肽(cryptophycin) (特定言之，念珠藻環肽1及念珠藻環肽8)；海兔毒素(dolastatin)；倍癌黴素(duocarmycin) (包括合成類似物KW-2189及CB1-TM1)；軟珊瑚醇(eleutherobin)；水鬼蕉鹼(pancratistatin)；匍枝珊瑚醇(sarcodictyin)；海綿抑制素(spongistatin)；氮芥，諸如氮芥苯丁酸(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、氮磷醯胺、雌氮芥(estramustine)、異環磷醯胺、二氯甲基二乙胺、氧化二氯甲基二乙胺鹽酸鹽、美法侖(melphalan)、新氮芥(novembichin)、苯芥膽甾醇(phenesterine)、潑尼氮芥(prednimustine)、曲洛磷胺(trofosfamide)及尿嘧啶氮芥(uracil mustard)；亞硝基脲，諸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)及雷莫司汀(ranimustine)；抗生素，諸如烯二炔抗生素(例如卡奇黴素(calicheamicin)，尤其卡奇黴素 $\gamma$ II及卡奇黴素 $\omega$ II)；達內黴素(dynemicin)，包括達內黴素A；雙膦酸鹽，諸如氯屈膦酸鹽(clodronate)；埃斯培拉黴素(esperamicin)；以及新抑癌蛋白(neocarzinostatin)發色團及相關色蛋白烯二炔抗生素發色團、阿克拉黴素(aclacinomysin)、放射菌素(actinomycin)、胺茴黴素(authrarnycin)、偶氮絲胺酸、博來黴素(bleomycins)、放線菌素C (cactinomycin)、卡拉比辛(carabycin)、洋紅黴素(carminomycin)、嗜癌菌素(carzinophilin)、色黴素(chromomycinis)、放線菌素d、道諾黴素(daunorubicin)、地托比星

(detorubicin)、6-重氮-5-側氧基-L-正白胺酸、阿黴素(doxorubicin)(包括嗎啉基-阿黴素、氰基嗎啉基-阿黴素、2-吡咯啉基-阿黴素及去氧阿黴素)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、艾達黴素(idarubicin)、麻西羅黴素(marcellomycin)、絲裂黴素(mitomycins) (諸如絲裂黴素C)、黴酚酸(mycophenolic acid)、諾拉黴素(nogalarnycin)、橄欖黴素(olivomycins)、培洛黴素(peplomycin)、潑非黴素(potfiromycin)、嘌呤黴素(puromycin)、奎那黴素(quelamycin)、羅多比星(rodorubicin)、鏈黑黴素(streptonigrin)、鏈脲菌素(streptozocin)、殺結核菌素(tubercidin)、烏苯美司(ubenimex)、淨司他丁(zinostatin)及左柔比星(zorubicin)；抗代謝物，諸如甲胺喋呤(methotrexate)及5-氟尿嘧啶(5-FU)；葉酸類似物，諸如迪諾特寧(denopterin)、蝶羅呤(pteropterin)及曲美沙特(trimetrexate)；嘌呤類似物，諸如氟達拉賓、6-巰基嘌呤、硫咪嘌呤(thiamiprine)及硫鳥嘌呤(thioguanine)；嘧啶類似物，諸如安西他濱(ancitabine)、氮胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、雙去氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依諾他濱(enocitabine)及氟尿苷(floxuridine)；雄激素，諸如卡普翠酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、環硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)及翠內酯(testolactone)；抗腎上腺藥物，諸如米托坦(mitotane)及曲洛司坦(trilostane)；葉酸補充劑，諸如亞葉酸；乙醯葡醛酯(aceglatone)；醛磷醯胺醣苷(aldophosphamide glycoside)；胺基乙醯丙酸；恩尿嘧啶(eniluracil)；安吡啶(amsacrine)；貝斯布西(bestrabucil)；比生群(bisantrene)；依達曲沙(edatraxate)；地磷醯胺(defofamine)；地美可辛

(demecolcine)；地吡醌(diaziquone)；艾福米辛(elformthine)；依利醋鉍(elliptinium acetate)；埃博黴素(epothilone)；依託格魯(etoglucid)；硝酸鎂；羥基脲；磨菇多糖(lentinan)；氯尼達明(lonidainine)；類美登素(maytansinoid)，諸如美登素(maytansine)及安絲菌素(ansamitocin)；丙脒脞(mitoguazone)；米托蒽醌(mitoxantrone)；莫哌達醇(mopidamol)；尼曲吡啶(nitracrine)；噴司他丁(pentostatin)；苯來美特(phenamet)；吡柔比星(pirarubicin)；洛索蒽醌(losoxantrone)；鬼臼酸(podophyllinic acid)；2-乙基醯肼；丙卡巴肼(procarbazine)；PSK多醣複合物；雷佐生(razoxane)；根黴素(rhizoxin)；西索菲蘭(sizofiran)；螺旋鍺；細交鏈孢菌酮酸(tenuazonic acid)；三亞胺醌(triaziquone)；2,2',2"-三氯三乙胺；單端孢黴烯(trichothecene) (尤其T-2毒素、黏液黴素A (verracurin A)、桿孢菌素A (roridin A)及蛇形菌素(anguidine))；尿烷(urethan)；長春地辛(vindesine)；達卡巴嗪(dacarbazine)；甘露醇氮芥(mannomustine)；二溴甘露醇(mitobronitol)；二溴衛矛醇(mitolactol)；哌泊溴烷(pipobroman)；加西托星(gacytosine)；阿拉伯糖苷(「Ara-C」)；環磷醯胺；類紫杉醇(taxoid)，例如太平洋紫杉醇(paclitaxel)及多烯紫杉醇(docetaxel)；吉西他濱(gemcitabine)；6-硫鳥嘌呤；巯基嘌呤；鉑配位錯合物，諸如順鉑(cisplatin)、奧沙利鉑(oxaliplatin)及卡鉑(carboplatin)；長春鹼(vinblastine)；鉑；依託泊苷(etoposide) (VP-16)；異環磷醯胺；米托蒽醌(mitoxantrone)；長春新鹼；長春瑞濱(vinorelbine)；諾安托(novantrone)；替尼泊甙(teniposide)；依達曲沙(edatrexate)；柔紅黴素(daunomycin)；胺基喋呤(aminopterin)；希羅達(xeloda)；伊班膦酸鹽(ibandronate)；伊立替康(irinotecan) (例如，CPT-11)；拓樸異構酶抑制

劑RFS 2000；二氟甲基鳥胺酸(DMFO)；類視黃素，諸如視黃酸；卡培他濱(capecitabine)；卡鉑、丙卡巴肼(procarbazine)、光輝黴素(plicomycin)、吉西他濱(gemcitabien)、溫諾平(navelbine)、法呢基蛋白轉移酶抑制劑、反鉑(transplatinum)及以上任一者之醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物。

## B. 放射療法

【0230】造成DNA損傷且已廣泛使用之其他因素包括通常稱為 $\gamma$ 射線、X射線之因素及/或將放射性同位素定向遞送至腫瘤細胞。亦考慮DNA損壞因素之其他形式，諸如微波、質子束照射(美國專利5,760,395及4,870,287)及UV照射。最可能之情形為，所有此等因素對DNA、DNA之前驅物、DNA之複製及修復，及染色體之組裝及維持造成多種破壞。X射線之劑量範圍在延長之時間段(3至4週)期間為50至200倫琴(roentgen)日劑量至2000至6000倫琴之單次劑量範圍。放射性同位素之劑量範圍變化極大，且視同位素之半衰期、所發出之輻射之強度及類型，及贅生性細胞之吸收情況而定。

## C. 免疫療法

【0231】熟習此項技術者應瞭解，額外免疫療法可與實施例之方法組合或聯合使用。在癌症治療之情形下，免疫治療劑通常依賴於使用免疫效應細胞及分子靶向且摧毀癌細胞。利妥昔單抗(Rituximab；RITUXAN®)係此類實例。免疫效應子可為例如對腫瘤細胞表面上之一些標記物具有特異性的抗體。單獨的抗體可充當療法之效應子，或其可募集其他細胞來實際上影響細胞殺滅。抗體亦可與藥物或毒素(化學治療劑、放射性核種、蓖麻毒素A鏈、霍亂毒素、百日咳毒素等)結合且用作靶向

劑。或者，效應子可為攜帶直接或間接與腫瘤細胞目標相互作用之表面分子的淋巴球。各種效應細胞包括細胞毒性T細胞及NK細胞

**【0232】** 抗體-藥物結合物已作為癌症治療劑之突破性開發方法出現。癌症為世界上主要死亡原因之一。抗體-藥物結合物(ADC)包含共價連接至細胞殺滅藥物之單株抗體(MAb)。此方法係將MAb針對其抗原目標之高特異性與高度有效之細胞毒性藥物組合，從而產生將有效負載(藥物)遞送至抗原含量富集之腫瘤細胞的「武裝」MAb。藥物之靶向遞送亦使其在正常組織中之暴露降至最低，從而降低毒性且提高治療指數。FDA對以下兩種ADC藥物的批准證實此方法：2011年之ADCETRIS® (貝倫妥單抗維多汀(brentuximab vedotin))及2013年之KADCYLA® (曲妥珠單抗美坦新(trastuzumab emtansine)或T-DM1)。當前在癌症治療之臨床試驗之各種階段存在超過30種ADC候選藥物(Leal等人，2014)。隨著抗體工程化及連接子-有效負載最佳化變得愈來愈成熟，新穎ADC之發現及開發愈來愈取決於適合於此方法之新穎目標之鑑別及驗證及靶向MAb之產生。ADC目標之兩個標準為腫瘤細胞中之表現上調/表現量高及穩固內化。

**【0233】** 在免疫療法之一個態樣中，腫瘤細胞必須帶有一些適合於靶向(亦即不存在於大部分其他細胞上)之標記物。存在許多腫瘤標記物且此等標記物中之任一者可適於在本發明實施例之情形下靶向。常見腫瘤標記物包括CD20、癌胚抗原、酪胺酸酶(p97)、gp68、TAG-72、HMFG、唾液酸路易斯抗原(Sialyl Lewis Antigen)、MucA、MucB、PLAP、層黏連蛋白受體、erb B及p155。免疫療法之一替代態樣為將抗癌作用與免疫刺激作用組合。亦存在免疫刺激分子，包括：細胞介素，諸如IL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、 $\gamma$ -IFN；趨化因子，諸如MIP-1、MCP-1、IL-8；

及生長因子，諸如FLT3配位體。

【0234】目前正處於研究或使用中之免疫療法之實例係免疫佐劑，例如牛分支桿菌(*Mycobacterium bovis*)、惡性瘧原蟲(*Plasmodium falciparum*)、二硝基氯苯及芳族化合物(美國專利5,801,005及5,739,169；Hui及Hashimoto, 1998；Christodoulides等人, 1998)；細胞介素療法，例如干擾素 $\alpha$ 、 $\beta$ 及 $\gamma$ 、IL-1、GM-CSF及TNF (Bukowski等人, 1998；Davidson等人, 1998；Hellstrand等人, 1998)；基因療法，例如TNF、IL-1、IL-2及p53 (Qin等人, 1998；Austin-Ward及Villaseca, 1998；美國專利5,830,880及5,846,945)；以及單株抗體，例如抗CD20、抗神經節苷脂GM2及抗p185 (Hollander, 2012；Hanibuchi等人, 1998；美國專利5,824,311)。經考慮，一或多種抗癌療法可與本文所描述之抗體療法一起使用。

【0235】在一些實施例中，免疫療法可為免疫檢查點抑制劑。免疫檢查點調高信號(例如共刺激分子)或調低信號。可藉由免疫檢查點阻斷靶向之抑制性免疫檢查點包括腺苷A2A受體(A2AR)、B7-H3 (亦稱為CD276)、B及T淋巴球弱化因子(BTLA)、細胞毒性T淋巴球相關蛋白4 (CTLA-4，亦稱為CD152)、吲哚胺2,3-二加氧酶(IDO)、殺手細胞免疫球蛋白(KIR)、淋巴球活化基因-3 (LAG3)、計劃性死亡1 (PD-1)、T細胞免疫球蛋白域及黏蛋白域3 (TIM-3)及T細胞活化之V域Ig抑制因子(VISTA)。特定而言，免疫檢查點抑制劑靶向PD-1軸及/或CTLA-4。

【0236】免疫檢查點抑制劑可為藥物，諸如小分子、配位體或受體之重組形式，或尤其為抗體，諸如人類抗體(例如國際專利公開案WO2015016718；Pardoll, *Nat Rev Cancer*, 12(4): 252-64, 2012；兩者均

以引用之方式併入本文中)。可使用免疫檢查點蛋白之已知抑制劑或其類似物，尤其可使用抗體之嵌合、人類化或人類形式。如熟習此項技術者將知曉，替代及/或等效名稱可用於本發明中所提及之某些抗體。此類替代及/或等效名稱在本發明之上下文中可互換。舉例而言，已知藍利珠單抗(lambrolizumab)亦以替代及等效名稱MK-3475及派立珠單抗(pembrolizumab)已知。

**【0237】** 在一些實施例中，PD-1結合拮抗劑為抑制PD-1與其配位體結合搭配物結合之分子。在一特定態樣中，PD-1配位體結合搭配物為PDL1及/或PDL2。在另一實施例中，PDL1結合拮抗劑為抑制PDL1與其結合搭配物結合之分子。在一特定態樣中，PDL1結合搭配物為PD-1及/或B7-1。在另一實施例中，PDL2結合拮抗劑為抑制PDL2與其結合搭配物結合之分子。在一特定態樣中，PDL2結合搭配物為PD-1。拮抗劑可為抗體、其抗原結合片段、免疫黏附素、融合蛋白質或寡肽。例示性抗體描述於美國專利第US8735553號、第US8354509號及第US8008449號中，其皆以引用之方式併入本文中。用於本文所提供之方法之其他PD-1軸拮抗劑為此項技術中已知，諸如描述於美國專利申請案第US20140294898號、第US2014022021號及第US20110008369號中，該等申請案皆以引用之方式併入本文中。

**【0238】** 在一些實施例中，PD-1結合拮抗劑為抗PD-1抗體(例如人類抗體、人類化抗體或嵌合抗體)。在一些實施例中，抗PD-1抗體選自由尼沃單抗(nivolumab)、派立珠單抗及CT-011組成之群。在一些實施例中，PD-1結合拮抗劑為免疫黏附素(例如包含與恆定區(例如免疫球蛋白序列之Fc區)融合之PDL1或PDL2之細胞外部分或PD-1結合部分的免疫黏附

素)。在一些實施例中，PD-1結合拮抗劑為AMP-224。尼沃單抗，亦稱為MDX-1106-04、MDX-1106、ONO-4538、BMS-936558及OPDIVO<sup>®</sup>，為WO2006/121168中所描述之抗PD-1抗體。派立珠單抗(亦稱為MK-3475、Merck 3475、藍利珠單抗、KEYTRUDA<sup>®</sup>及SCH-900475)為WO2009/114335中所描述之抗PD-1抗體。CT-011，亦稱為hBAT或hBAT-1，為WO2009/101611中所描述之抗PD-1抗體。AMP-224，亦稱為B7-DCIg，為WO2010/027827及WO2011/066342中所描述之PDL2-Fc融合可溶受體。

**【0239】** 可在本文中提供之方法中靶向之其他免疫檢查點為細胞毒性T淋巴球相關蛋白4 (CTLA-4)，亦稱為CD152。人類CTLA-4之完整cDNA序列具有GenBank登錄號L15006。CTLA-4發現於T細胞表面上且在結合至抗原呈遞細胞表面上之CD80或CD86時充當「關閉」開關。CTLA4為表現於輔助T細胞表面上之免疫球蛋白超家族成員且將抑制信號傳輸至T細胞。CTLA4類似於T細胞共刺激蛋白CD28，且兩種分子均結合至抗原呈遞細胞上之CD80及CD86，分別亦稱為B7-1及B7-2。CTLA4將抑制信號傳輸至T細胞，而CD28傳輸刺激信號。細胞內CTLA4亦發現於調節T細胞中且對其功能可為重要的。經由T細胞受體及CD28發生之T細胞活化使得B7分子之抑制性受體CTLA-4之表現增加。

**【0240】** 在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑為抗CTLA-4抗體(例如人類抗體、人類化抗體或嵌合抗體)、其抗原結合片段、免疫黏附素、融合蛋白質或寡肽。

**【0241】** 適用於本發明方法之抗人類CTLA-4抗體(或自其衍生之VH及/或VL域)可使用此項技術中熟知之方法產生。替代地，可使用此項

技術公認之抗CTLA-4抗體。舉例而言，以下文獻中所揭示之抗CTLA-4抗體可用於本文所揭示之方法：US 8,119,129、WO 01/14424、WO 98/42752；WO 00/37504 (CP675,206，亦稱為曲美木單抗(tremelimumab)；以前稱替西單抗(ticilimumab))、美國專利第6,207,156號；Hurwitz等人(1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95(17): 10067-10071；Camacho等人(2004) *J Clin Oncology* 22(145): 摘要編號2505 (抗體CP-675206)；以及Mokyr等人(1998) *Cancer Res* 58:5301-5304。前述公開案中之每一者之教示內容特此以引用之方式併入。亦可使用與此項技術中公認的此等抗體中之任一者競爭以結合於CTLA-4之抗體。舉例而言，人類化CTLA-4抗體描述於國際專利申請案第WO2001014424號、第WO2000037504號及美國專利第8,017,114號中；該等申請案皆以引用之方式併入本文中。

**【0242】** 例示性抗CTLA-4抗體係伊匹單抗(ipilimumab)(亦稱為10D1、MDX-010、MDX-101及Yervoy®)或其抗原結合片段及變異體(參見例如WO 01/14424)。在其他實施例中，抗體包含伊匹單抗之重鏈及輕鏈CDR或VR。因此，在一個實施例中，抗體包含伊匹單抗之VH區之CDR1、CDR2及CDR3域，及伊匹單抗之VL區之CDR1、CDR2及CDR3域。在另一實施例中，抗體與上文所提及之抗體競爭結合及/或結合至CTLA-4上的相同抗原決定基。在另一實施例中，抗體與上文所提及之抗體具有至少約90%可變區胺基酸序列一致性(例如與伊匹單抗具有至少約90%、95%或99%可變區一致性)。

**【0243】** 用於調節CTLA-4之其他分子包括諸如描述於美國專利第US5844905號、第US5885796號及國際專利申請案第WO1995001994號

及第WO1998042752號中之CTLA-4配位體及受體，所有文獻皆以引用之方式併入本文中；及諸如描述於美國專利第US8329867號中之免疫黏附素，該文獻以引用之方式併入本文中。

#### D. 手術

【0244】 約60%患有癌症的人將經歷一些類型之手術，其包括預防性、診斷或分期、治癒性及姑息性手術。治癒性手術包括切除，其中癌組織之全部或一部分經物理移除、切除且/或破壞，且可聯合其他療法使用，諸如本發明實施例之療法、化學療法、輻射療法、激素療法、基因療法、免疫療法及/或替代療法。腫瘤切除係指物理移除腫瘤之至少一部分。除腫瘤切除以外，手術治療包括雷射手術、冷凍手術、電手術及顯微鏡控制手術(莫氏手術(Mohs' surgery))。

【0245】 在癌細胞、組織或腫瘤之一部分或全部被切除後，可在體內形成空腔。可藉由用另一種抗癌療法對區域灌注、直接注射或局部施用而實現治療。可重複進行此類療法，例如每1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天、或每1週、2週、3週、4週及5週或每1個月、2個月、3個月、4個月、5個月、6個月、7個月、8個月、9個月、10個月、11個月或12個月重複此類療法。此等療法亦可具有不同劑量。

#### E. 其他藥劑

【0246】 經考慮，其他藥劑可與本發明實施例之某些態樣組合使用以改善療法之治療功效。此等其他藥劑包括影響細胞表面受體上調及間隙連接之藥劑、細胞生長抑制劑及分化劑、細胞黏附抑制劑、提高過度增殖細胞對細胞凋亡誘導物之敏感性的藥劑或其他生物藥劑。藉由升高間隙連接之數目增加細胞間信號傳導將增加對相鄰過度增殖細胞群體之抗過度增

殖作用。在其他實施例中，細胞生長抑制劑或分化劑可與本發明實施例之某些態樣組合使用以改善治療之抗過度增殖功效。考慮細胞黏附抑制劑以改善本發明實施例之功效。細胞黏附抑制劑之實例為局部黏著斑激酶(focal adhesion kinase ; FAK)抑制劑及洛伐他汀(Lovastatin)。經進一步考慮，增加過度增殖性細胞對細胞凋亡之敏感度的其他藥劑(諸如抗體c225)可與本發明實施例之某些態樣組合使用以改善治療功效。

## IX. 本發明之套組

**【0247】** 本文中所描述之任一種組合物可包含於套組中。在一非限制性實例中，細胞、產生細胞之試劑、載體及/或產生載體之試劑及其組分可包含於套組中。在某些實施例中，NK細胞可包含於套組中，且其又可或可不表現CAR，該CAR包含(a) CD28鉸鏈、(b1) CD28跨膜域或(b2) DAP10跨膜域及(c) DAP10共刺激域、視情況存在之細胞介素或視情況存在之自殺基因。此類套組可或可不具有用於操縱細胞之一或多種試劑。此類試劑包括例如小分子、蛋白質、核酸、抗體、緩衝劑、引子、核苷酸、鹽及/或其組合。編碼一或多種CAR、自殺基因產物及/或細胞介素之核苷酸可包括於套組中。諸如細胞介素或抗體(包括單株抗體)之蛋白質可包括於套組中。編碼工程化CAR受體之組分或全部的核苷酸可包括於套組中，包括產生其之試劑。

**【0248】** 在特定態樣中，套組包含本發明之NK細胞療法以及另一癌症療法。例如在一些情況下，除細胞療法實施例外，套組亦包括第二癌症療法，諸如化學療法、激素療法及/或免疫療法。套組可針對個體之特定癌症定製且包含用於個體之各別第二癌症療法。

**【0249】** 套組可包含本發明之適當等分組合物。套組之組分可封裝

於水性介質中或以凍乾形式封裝。套組之容器構件一般將包括至少一個小瓶、試管、燒瓶、瓶、注射器或其他容器構件，該等容器構件中可置放組分且較佳將組分適當地等分。在套組中存在多於一種組分之情況下，套組亦可一般含有第二、第三或其他額外容器，其中可分開置放額外組分。然而，組分之各種組合可包含於小瓶中。本發明之套組通常亦將緊密封閉地包括用於容納組合物之構件及任何其他試劑容器以用於商業銷售。此類容器可包括注射或吹塑成型的塑膠容器，其中保留所需小瓶。

## X. 實例

**【0250】** 包括以下實例以展現本發明之某些實施例。熟習此項技術者應瞭解，以下實例中所揭示之技術代表本發明人所發現之在本發明實施中起良好作用之技術，且因此可視為構成其某些實施方式。然而，熟習此項技術者依據本發明應瞭解，在不脫離本發明之精神及範疇之情況下可在所揭示之具體實施例中作出許多改變且仍獲得相同或類似結果。

### 實例1

改善信號傳導之CAR構築體組分

**【0251】** 圖1A至圖1B表明DAP10信號傳導域賦予CD5 CAR-NK細胞活化表型，且使用質譜流式細胞技術面板顯示表型分型。使用t-分佈隨機鄰域嵌入(t-distributed stochastic neighbor embedding；TSNE)(藉由向各資料點賦予二維或三維圖中之位置而使高維資料可視化的一種統計方法)，藉由與未轉導之NT細胞(左)及表現包含IgG鉸鏈、CD28跨膜域、DAP10及CD3 $\zeta$  (CD5CAR-NK CD28TMDAP10CD3z)之CD5 CAR之NK細胞比較來產生不同聚類(圖1A)。聚類8及11 (CARCD5 NK細胞所表現之2個新聚類)藉由圓形及矩形突出顯示。圖1B中之熱圖指示各聚類(Y軸上指

示)中之各種標記物的標準化表現(X軸上指示)。聚類#8及#11中具有高表現之活化、細胞毒性及成熟標記物用藍色矩形突出顯示。此展示經DAP10轉導之NK細胞具有兩個不存在於未轉導之NK細胞中之群體或聚類。此等聚類含有表現較高活性標記物(諸如顆粒酶B、穿孔蛋白等)之NK細胞。

**【0252】** 圖2A至圖2C表明具有DAP10共刺激域之CD5 CAR-NK細胞能夠產生多種效應細胞介素及趨化因子且展示增強的多功能性。圖2A展現isoplexis的單一細胞分泌蛋白質體資料，其藉由比較不同CD5 CAR-NK細胞與未轉導之(NT) NK細胞來展示具有DAP10共刺激域之CD5 CAR-NK細胞的多功能性。CD5 CAR#5 (包含IgG鉸鏈、CD28跨膜域、DAP10及CD3z)展示最高多功能性，其中每次分泌2、3、4或5+種蛋白質之單一細胞的百分比最高。圖2B提供條形圖，其展示與未轉導之(NT) NK細胞相比，不同CD5 CAR-NK細胞之多功能性強度指數。此處，CD5 CAR#5亦展示最高多功能性，其中效應子與趨化細胞介素之比例最高。多功能性熱圖繪示具有DAP10共刺激域之CD5 CAR-NK細胞具有在單一細胞水平下分泌各種細胞介素排列之最高能力(圖2C)。

**【0253】** 在Incucyte殺滅分析中，在多次再攻擊之後，具有DAP10<sup>TM</sup>及DAP10共刺激域兩者之CD5 CAR-NK細胞繼續殺滅CD5<sup>+</sup> T-ALL細胞株(CCRF) (圖3A-3C)。Incucyte殺滅分析再攻擊研究之一個示意圖提供於圖3A中。在各種CD5 CAR-NK細胞條件下進行各腫瘤再攻擊(由粉紅箭頭指示)之後量測的紅血球計數(活腫瘤計數之量測)提供於圖3B中。在各腫瘤再攻擊(由粉紅箭頭指示之時序)之後的匯合百分比(腫瘤豐度之量測)提供於圖3C中。此等資料展示，相比於其他CD5 CAR-NK細胞設計且相

比於NT NK細胞且相比於不相關CD19 CAR-NK細胞，具有DAP10<sup>TM</sup>及DAP10共刺激域之CD5 CAR-NK細胞(由具有方塊之紅線表示)在多次再攻擊後繼續殺滅CD5<sup>+</sup> T-ALL細胞株(CCRF)。

**【0254】** 基於量測各種CD5 CAR-NK細胞中之耗氧速率(OCR)及細胞外酸化速率(ECAR)之seahorse代謝分析，與其他構築體設計相比，具有DAP10<sup>TM</sup>及DAP10共刺激域之CD5 CAR-NK細胞展現較高代謝適能(圖4A至圖4C)。圖4A中，各種CD5 CAR-NK細胞設計之OCR與未轉導之(NT) NK細胞之OCR相比較。各種CD5 CAR-NK細胞設計之ECAR亦與未轉導之(NT) NK細胞之ECAR相比較(圖4B)。此等資料表明，具有DAP10<sup>TM</sup>及DAP10共刺激域之CD5CAR-NK細胞的OCR顯著高於其他設計且顯著高於NT NK細胞，此外，相同構築體具有賦予其較高代謝適能之最高ECAR。

**【0255】** 圖5A至圖5C展示在CD5<sup>+</sup>套細胞淋巴瘤之PDX小鼠模型中，具有DAP10共刺激域之CD5 CAR-NK細胞改善腫瘤控制。展示在皮下腫瘤中僅接受腫瘤之小鼠(左)相對於接受腫瘤加CD5CAR-NK之小鼠(右)的皮下腫瘤中之CD45<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>細胞的絕對數(圖5A)。圖5B提供條形圖，其展示在脾中僅接受腫瘤之小鼠(左)相對於接受腫瘤加CD5CAR-NK之小鼠(右)的皮下腫瘤中之CD45<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>細胞的絕對數。展示在骨髓中僅接受腫瘤之小鼠(左)相對於接受腫瘤加CD5CAR-NK之小鼠(右)的皮下腫瘤中之CD45<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>細胞的絕對數(圖5C)。

**【0256】** 圖6A至圖6B表明在急性骨髓性白血病(用螢火蟲螢光素酶(FFLuc)轉導THP-1)之NSG小鼠模型中，具有DAP10共刺激域之CD27 CAR-NK細胞改善腫瘤控制及存活。在圖6A中，一系列生物發光成像

(BLI)以THP-1 FFLuc發光展示各組小鼠中之腫瘤負荷。展示各組小鼠隨時間之存活率的存活率曲線提供於圖6B中，表明DAP10共刺激域改良CD27 CAR-NK細胞之活體內效力。

## 實例2

### CD28鉸鏈-CD28跨膜域-DAP10共刺激域CAR之優越性

**【0257】** 本實例關於用於表徵之特定CAR構築體，包括包含CD28鉸鏈之各種構築體，其中一些包含CD28跨膜域，且一些包含DAP10共刺激域。在一個特定實施例中，包含CD28鉸鏈、CD28跨膜域及DAP10共刺激域之CAR構築體具有活性。

**【0258】** 圖7A繪示各種構築體標識及相應轉導效率(圖7B)。如圖7A中所示，CB-NK細胞經各種CD5 CAR構築體轉導，且轉導效率藉由流式細胞分析技術量測。轉導效率係基於陽性細胞百分比(圖7B)。

**【0259】** 圖8提供用各種CD5構築體注射小鼠之實驗計劃及對應時間軸之一個實例。示意圖顯示各種CD5 CAR NK細胞針對作為標靶之T類淋巴母細胞細胞株CCRF-CEM之活體內抗腫瘤活性的測試。

**【0260】** 圖9A及圖9B展示用具有IgG1鉸鏈之抗CD5 CAR NK處理之小鼠存活期顯著長於NT NK細胞及僅腫瘤處理的小鼠。CD5 CAR NK細胞減少T-急性淋巴球性白血病小鼠模型中之腫瘤負荷。經螢火蟲螢光素酶(FFLuc)轉導之CCRF-CEM細胞以每隻小鼠 $1 \times 10^5$ 注射至小鼠中，且用各組的生物發光成像監測。在腫瘤注射後2天，向治療組中之小鼠注射3M各別NK CAR細胞。各組小鼠的生物發光影像(圖9A)及螢光素酶信號定量(圖9B)顯示，當相比於單獨腫瘤、NT NK細胞時，接受具有IgG1鉸鏈之各種CD5 NK CAR的小鼠呈現增強之CCRF-CEM腫瘤控制，但由於NK細

胞並非持久存在，小鼠會隨著時間的推移死於腫瘤。

【0261】 圖10A及圖10B表明與僅腫瘤、NT NK細胞及具有IgG1鉸鏈的CD5 CAR NK細胞處理之小鼠相比，經具有CD28鉸鏈的抗CD5 CAR NK處理之小鼠的腫瘤負荷顯著降低。CD5 CAR NK細胞減少T-急性淋巴球性白血病小鼠模型中之腫瘤負荷。經螢火蟲螢光素酶(FFLuc)轉導之CCRF-CEM細胞以每隻小鼠 $1 \times 10^5$ 注射至小鼠中，且用各組的生物發光成像監測。在腫瘤注射後的第2天，向治療組中之小鼠注射3M各別NK CAR細胞。各組小鼠的生物發光影像(圖10A)及螢光素酶信號定量(圖10B)顯示，當相比於單獨腫瘤、NT NK細胞及具有IgG1鉸鏈之CD5 NK CAR時，接受具有CD28鉸鏈之各種CD5 NK CAR的小鼠呈現增強之CCRF-CEM腫瘤控制。此外，當與其他共刺激域相比時，DAP10共刺激域CD5 NK CAR顯著改善腫瘤控制。

### 實例3

具DAP10信號傳導的CD5 CAR-NK細胞在轉錄體、表觀遺傳及蛋白質體水平上展示高增殖能力、代謝活性及記憶特徵之標誌

【0262】 包括CD28跨膜(TM)域及DAP10共刺激域與CD3 $\zeta$ 信號傳導域的CD5 CAR構築體(CD28TMDAP10CD3 $\zeta$ )之效能比併有其他共刺激分子之CD5 CAR-NK細胞構築體之其他實例高，表明優良的試管內及活體內抗腫瘤活性、增強的多功能性及代謝適能，以及在活體外多個腫瘤再攻擊之後的功能耗竭較小。為進一步鑑定出DAP10信號傳導向CAR-NK細胞提供此顯著優勢的原因，本發明人進行單細胞RNA定序(scRNAseq)、單細胞ATAC定序(scATACseq)及反相蛋白質陣列(RPPA)，比較具DAP10-CD3 $\zeta$ 信號傳導之CD5 CAR-NK細胞與設計為無共刺激域(僅CD3 $\zeta$ 信號傳

導)之CD5 CAR-NK細胞以及同一供者產生之未轉導(NT) NK細胞。在單細胞轉錄體水平下，scRNAseq資料之路徑富集分析顯示，DAP10信號傳導賦予CAR-NK細胞優良增殖能力(如E2F標靶及G2M檢查點路徑富集所證明)，以及IL-2/STAT5信號傳導及增強之代謝活性(如諸如Myc、mTORC1及氧化磷酸化之代謝路徑富集所證明) (圖11)。在表觀遺傳水平上，scATACseq資料顯示具有DAP10-CD3z信號傳導域之CD5 CAR-NK細胞顯示與記憶形成及抗耗竭分別有關之AP-1複合物及BATF轉錄因子富集(圖12)。在蛋白質體水平上，RPPA資料之路徑富集分析證實轉錄體結果，顯示在用CD5標靶抗原刺激後，DAP10信號傳導增強CAR-NK細胞增殖及產生細胞介素之能力(ITGA及INSR蛋白質路徑)，為其提供幹細胞特性潛能(COPS5路徑)，增強其在糖酵解及粒線體水平(PDH及PARK7路徑)下之代謝活性，加強其膜極化及與靶細胞形成免疫突觸的能力(Cav1路徑)及賦予其記憶潛能(FOXO1路徑) (圖13A及圖13B)。

#### 實例4

具DAP10信號傳導的CD5 CAR-NK細胞持久存在且在腫瘤再攻擊後顯示活體內記憶反應之證據

**【0263】** 評估CAR-NK細胞在腫瘤再攻擊之後在活體內建立記憶反應之能力。良好確立的NSG小鼠模型使用CCRF-CEM (CD5+ T-ALL細胞株)。CCRF-CEM腫瘤細胞株經螢火蟲螢光素酶及GFP轉導(CCRF-Fluc-GFP)以能夠分別藉由生物發光成像(BLI)及流式監測腫瘤生長。在第-1天輻照小鼠(225cGy)，且隨後在第0天以每隻小鼠100,000個細胞靜脈內注射CCRF-Fluc腫瘤。在第2天，治療組接受 $5 \times 10^6$ 個具有DAP10信號傳導之CD5 CAR-NK細胞的靜脈內注射。在CCRF-CEM腫瘤注射後第93天，

收集血液以評估人類NK細胞(hCD45+CD56+GFP-)百分比。在第100天，用50,000個CCRF-CEM腫瘤細胞再攻擊經治癒且根據BLI或流式未顯示腫瘤證據的小鼠。1週後(第107天)，再次收集血液以檢驗人類NK細胞百分比。如圖14A及圖14B中所見，在腫瘤再攻擊之後，血液中人類NK細胞(hCD45+CD56+GFP-)之百分比自13%增加至91%，指示CAR-NK細胞能夠對活體內腫瘤再攻擊建立記憶反應。

#### 參考文獻

**【0264】** 以下參考文獻就其提供例示性程序細節或補充本文所述內容的其他細節而言，以引用之方式特別併入本文中。

**【0265】** 1. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med.* 2018;378(5):439-448.

**【0266】** 2. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med.* 2017;377(26):2531-2544.

**【0267】** 3. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, et al. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med.* 2019;380(1):45-56.

**【0268】** 4. Hartmann J, Schussler-Lenz M, Bondanza A, Buchholz CJ. Clinical development of CAR T cells-challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts. *EMBO Mol Med.* 2017;9(9):1183-1197.

**【0269】** 5. Daher M, Rezvani K. Next generation natural killer cells

for cancer immunotherapy: the promise of genetic engineering. *Curr Opin Immunol.* 2018;51:146-153.

【0270】 6. Mehta RS, Rezvani K. Chimeric Antigen Receptor Expressing Natural Killer Cells for the Immunotherapy of Cancer. *Front Immunol.* 2018;9:283.

【0271】 7. Liu E AS, Kerbauy L et al. GMP-compliant universal antigen presenting cells (uAPC) promote the metabolic fitness and antitumor activity of armored cord blood CAR-NK cell. *Front Immunol* doi: 103389/fimmu2021626098. 2021.

\* \* \*

【0272】 本文所揭示及主張之所有方法可依據本發明、在無需不當實驗之情況下進行及執行。雖然已根據較佳實施例描述本發明之組合物及方法，但熟習此項技術者應顯而易知，在不脫離本發明之概念、精神及範疇之情況下可對該等方法及本文所描述之方法之步驟或步驟順序施加變化。更確切而言，在化學上及生理學上均相關之某些藥劑顯然可取代本文所描述之藥劑，同時達成相同或類似結果。對熟習此項技術者顯而易見之所有此類類似取代及修改均視為在如隨附申請專利範圍所定義之本發明之精神、範疇及概念內。

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing nonEnglishFreeTextLanguageCode="zh" dtdVersion="V1_3"
fileName="C250604SEQA.xml" softwareName="WIPO Sequence" softwareVersion="2.2.0"
productionDate="2023-01-10">
  <ApplicantFileReference>MDAC.P1299WO-1001226493</ApplicantFileReference>
  <EarliestPriorityApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>US</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>63/257,608</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2021-10-20</FilingDate>
  </EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <ApplicantName languageCode="zh">美國德州系統大學評議委員會(BOARD OF REGENTS,
THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM)</ApplicantName>
  <ApplicantNameLatin>BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS
SYSTEM</ApplicantNameLatin>
  <InventionTitle languageCode="zh">具最佳信號之CAR構築體之工程化NK細胞
</InventionTitle>
  <SequenceTotalQuantity>14</SequenceTotalQuantity>
  <SequenceData sequenceIDNumber="1">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>27</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
          <INSDFeature_location>1..27</INSDFeature_location>
          <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier>
              <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
            <INSDQualifier id="q2">
              <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
              <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
            </INSDQualifier>
          </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
      </INSDSeq_feature-table>
    </INSDSeq>
  </SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```

```

    </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 2" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>24</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..24</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id=" q3" >
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>LCARPRRSPAQEDGKVIINMPGRG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 3" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>113</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..113</INSDFeature_location>

```

```

<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q4">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNEL
QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRG</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="4">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>42</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..42</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q5">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

<INSDSeq_sequence>KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 5" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>52</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..52</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q6">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>YFLGRLVPRGRGAAEAATRKRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYK</INSDSeq_
sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 6" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>51</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..51</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>

```

```

<INSDQualifier>
  <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q7">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>SANERCKSKVPCRQKQWRFSFDSKLLDLYNHFESEMEWSHRSRRGRIGM</INSDSeq_s
equence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="7">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>39</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..39</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q8">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>IEVMYPPPYLDNEKSNGTI IHVKGKHLCPSPFLPGPSKP</INSDSeq_sequence>

```

```

</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 8" >
<INSDSeq>
  <INSDSeq_length>160</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..160</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>
          <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="q9" >
          <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>ISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLI
  QSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNI
  KEFLQSFVHIVQMFINTS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 9" >
<INSDSeq>
  <INSDSeq_length>402</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..402</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>

```

```

<INSDQualifier>
  <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q10">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MLEGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFKFM LGKQEVIRGW
EEGVAQMSV GQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELL KLESGGGSGVDGFGDVGAL ESLRGNADLAYILSME
PCGHCL I INNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHG
CQASHLQFP GAVYGTGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGF EVASTSPEDESPGSNPEPDATP
FQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYK
QMPGCFNFLRKKLFFKTSAS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="10">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q11">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QCTNYALLKLAGDVESNPGP</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="11">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>18</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..18</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q12">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>EGRGSLTTCGDVEENPGP</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="12">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>19</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

```

```
<INSDFeature_location>1..19</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q13">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ATNFSLLKQAGDVEENPGP</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="13">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q14">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
```

```
<INSDSeq_sequence>VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="14">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>41</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..41</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q15">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```

## 【發明申請專利範圍】

### 【請求項1】

一種編碼融合蛋白之聚核苷酸，該融合蛋白包含：

(a) 視情況存在的鉸鏈；及

(b1) CD28跨膜域，或

(b2) DAP10跨膜域；

(c) DAP10共刺激域；及

(d) CD3 $\zeta$ 。

### 【請求項2】

如請求項1之聚核苷酸，其中該融合蛋白進一步定義為嵌合抗原受體(CAR)。

### 【請求項3】

如請求項2之聚核苷酸，其中當該CAR之細胞外域包含scFv時，該CAR包含鉸鏈。

### 【請求項4】

如請求項2之聚核苷酸，其中當該CAR之細胞外域包含受體之部分或全部細胞外域時，該CAR不具有鉸鏈。

### 【請求項5】

如請求項2之聚核苷酸，其中當該CAR之細胞外域包含受體之部分或全部細胞外域時，該CAR包含鉸鏈。

### 【請求項6】

如請求項2之聚核苷酸，其中該CAR進一步包含一或多個抗原結合域。

**【請求項7】**

如請求項6之聚核苷酸，其中抗原結合域靶向腫瘤抗原或傳染原。

**【請求項8】**

如請求項1至7中任一項之聚核苷酸，其中該CD3 $\zeta$ 包含SEQ ID NO: 3。

**【請求項9】**

如請求項1至8中任一項之聚核苷酸，其中該CD28跨膜域包含SEQ ID NO: 1。

**【請求項10】**

如請求項2至9中任一項之聚核苷酸，其中該CAR進一步包含一或多種額外共刺激域。

**【請求項11】**

如請求項10之聚核苷酸，其中該一或多種額外共刺激域係選自由CD28、DAP12、4-1BB、NKG2D、2B4及其組合組成之群。

**【請求項12】**

如請求項2至11中任一項之聚核苷酸，其中該CAR進一步包含信號肽。

**【請求項13】**

如請求項12之聚核苷酸，其中該信號肽為CD8、CD27、顆粒球-巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF-R)、Ig重鏈(IgH)、CD3或CD4之信號肽。

**【請求項14】**

如請求項2至13中任一項之聚核苷酸，其中該聚核苷酸進一步編碼所關注之額外多肽。

**【請求項15】**

如請求項14之聚核苷酸，其中編碼所關注之該額外多肽的序列及編碼該CAR的序列在該聚核苷酸上係藉由2A元件分隔。

**【請求項16】**

如請求項14或15之聚核苷酸，其中所關注之該額外多肽為治療性蛋白質及/或增強細胞活性、擴增及/或持久性之蛋白質。

**【請求項17】**

如請求項14至16中任一項之聚核苷酸，其中所關注之該額外多肽為自殺基因產物、一或多種細胞介素或增強增殖、擴增及/或代謝適能之一或多種人類或病毒蛋白質。

**【請求項18】**

如請求項17之聚核苷酸，其中該細胞介素為IL-15、IL-2、IL-12、IL-18、IL-21、IL-23或IL-7。

**【請求項19】**

如請求項17或18之聚核苷酸，其中該細胞介素為IL-15。

**【請求項20】**

如請求項18或19之聚核苷酸，其中該IL-15序列包含SEQ ID NO: 8。

**【請求項21】**

一種載體，其包含如請求項1至20中任一項之聚核苷酸。

**【請求項22】**

如請求項21之載體，其中該載體為病毒載體。

**【請求項23】**

如請求項22之載體，其中該病毒載體為腺病毒載體、腺相關病毒載體、慢病毒載體或反轉錄病毒載體。

**【請求項24】**

如請求項21之載體，其中該載體為非病毒載體。

**【請求項25】**

如請求項24之載體，其中該非病毒載體為質體。

**【請求項26】**

一種細胞，其包含如請求項1至20中任一項之聚核苷酸或如請求項21至25中任一項之載體。

**【請求項27】**

如請求項26之細胞，其中該細胞為免疫細胞。

**【請求項28】**

如請求項27之免疫細胞，其中該免疫細胞為自然殺手(NK)細胞、T細胞、 $\gamma$   $\delta$  T細胞、 $\alpha$   $\beta$  T細胞、恆定NKT (iNKT)細胞、B細胞、巨噬細胞、間葉基質細胞或樹突狀細胞。

**【請求項29】**

如請求項27之免疫細胞，其中該免疫細胞為NK細胞。

**【請求項30】**

如請求項29之免疫細胞，其中該NK細胞係來源於臍帶血、末梢血液、誘導性多能幹細胞、造血幹細胞、骨髓或來自細胞株。

**【請求項31】**

如請求項30之免疫細胞，其中該NK細胞來源於細胞株，其中該NK細胞株為NK-92。

**【請求項32】**

如請求項30之免疫細胞，其中該NK細胞來源於臍帶血單核細胞。

**【請求項33】**

如請求項28至32中任一項之免疫細胞，其中該NK細胞為CD56+ NK細胞。

**【請求項34】**

如請求項28至33中任一項之免疫細胞，其中該NK細胞表現重組細胞介素。

**【請求項35】**

如請求項34之免疫細胞，其中該細胞介素為IL-15、IL-2、IL-12、IL-18、IL-21、IL-7或IL-23。

**【請求項36】**

一種免疫細胞群體，其包含如請求項27至35中任一項之免疫細胞。

**【請求項37】**

一種殺滅個體中之癌細胞的方法，其包含向該個體投與有效量之含有如請求項1至20中任一項之聚核苷酸的細胞或含有如請求項21至25中任一項之載體的細胞。

**【請求項38】**

如請求項37之方法，其中含有該聚核苷酸之該等細胞為免疫細胞。

**【請求項39】**

如請求項38之方法，其中該等免疫細胞為NK細胞、T細胞、 $\gamma$   $\delta$  T細胞、 $\alpha$   $\beta$  T細胞、iNKT細胞、B細胞、巨噬細胞、樹突狀細胞、或其混合物。

**【請求項40】**

如請求項38或39之方法，其中該等免疫細胞包含NK細胞，其中該等

NK細胞來源於臍帶血、末梢血液、誘導性多能幹細胞、造血幹細胞、骨髓、來自細胞株、或其混合物。

**【請求項41】**

如請求項39或40之方法，其中該等NK細胞來源於臍帶血單核細胞。

**【請求項42】**

如請求項38至41中任一項之方法，其中該等免疫細胞相對於該個體為同種異體。

**【請求項43】**

如請求項38至41中任一項之方法，其中該等免疫細胞相對於該個體為自體。

**【請求項44】**

如請求項37至43中任一項之方法，其中含有該聚核苷酸之該等細胞或含有該載體之細胞係投與該個體一次或超過一次。

**【請求項45】**

如請求項44之方法，其中向該個體投與含有該聚核苷酸之該等細胞之間的持續時間為1至24小時、1至7天、1至4週、1至12個月或一或多年。

**【請求項46】**

如請求項37至45中任一項之方法，其進一步包含向該個體提供有效量之額外療法的步驟。

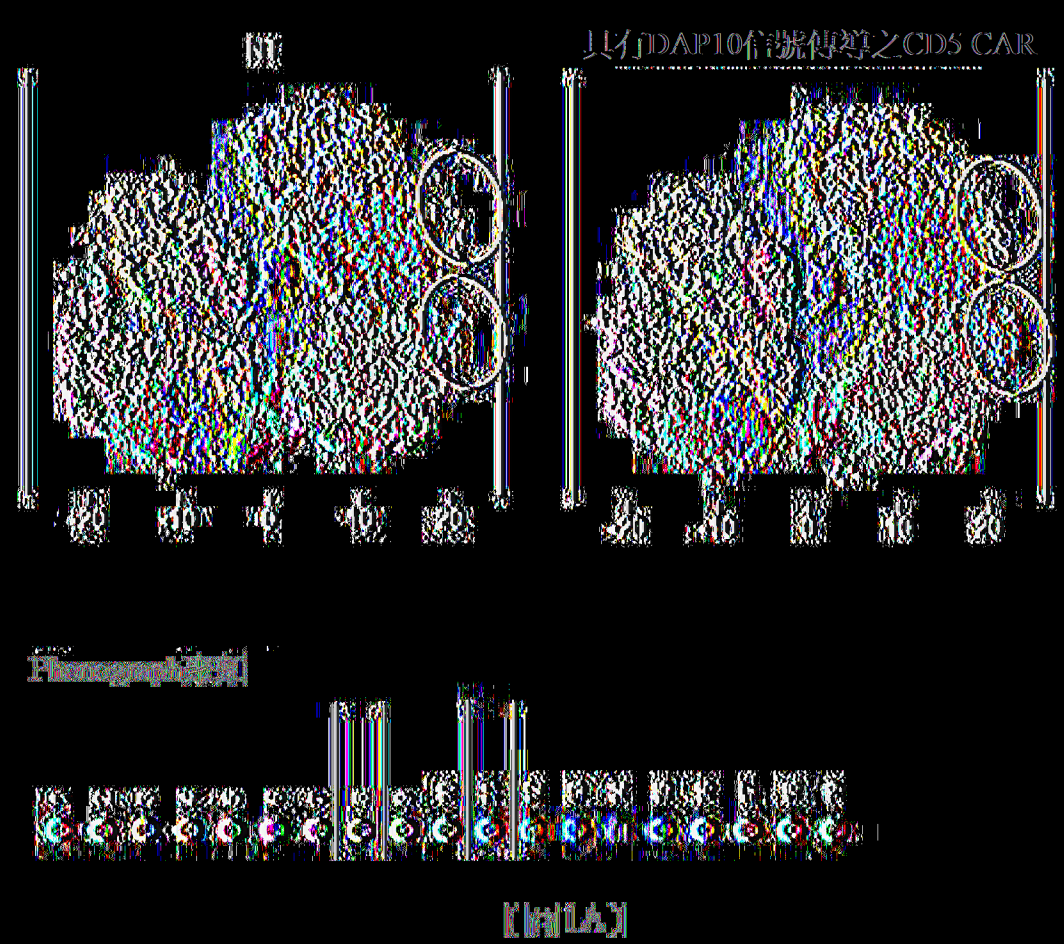
**【請求項47】**

如請求項46之方法，其中該額外療法包含手術、輻射、基因療法、免疫療法或激素療法。

**【請求項48】**

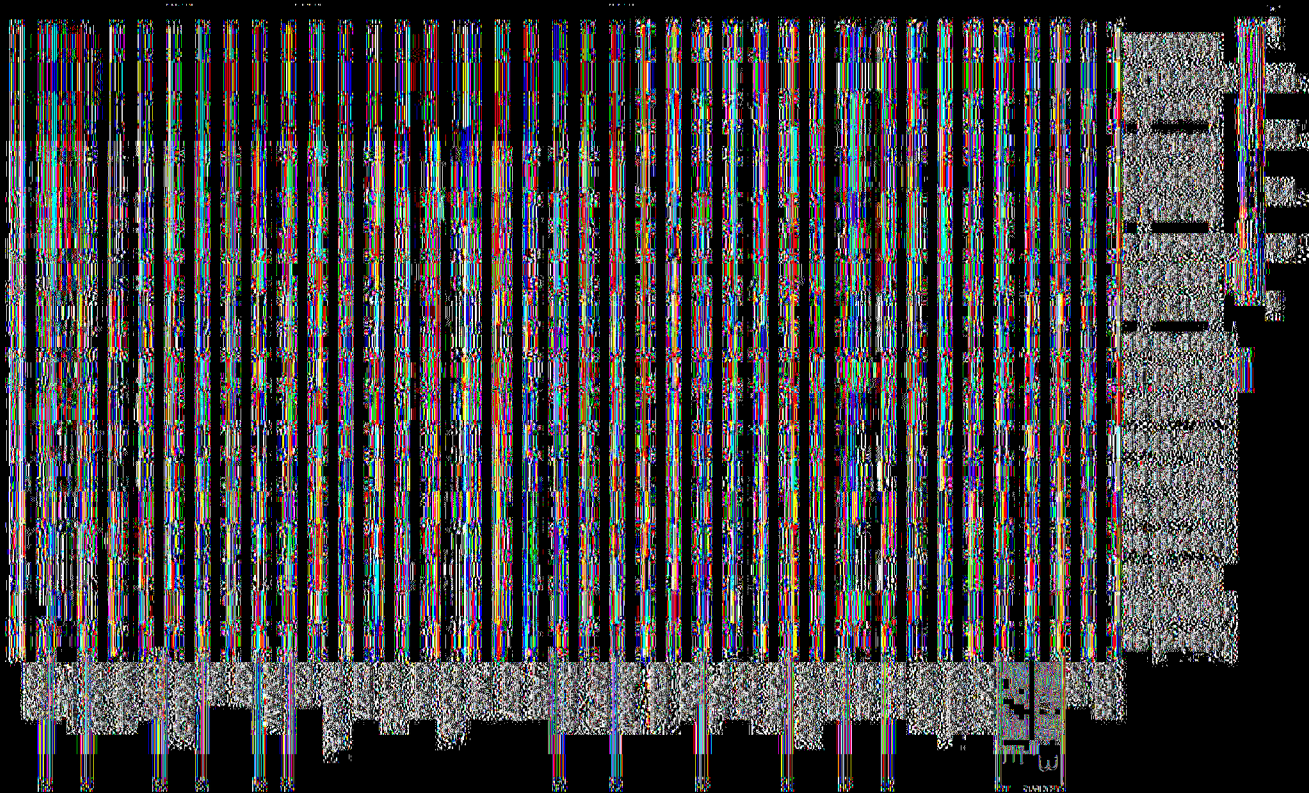
如請求項37至47中任一項之方法，其中含有該聚核苷酸之該等細胞或含有該載體之該等細胞係藉由輸注、注射、靜脈內、動脈內、腹膜內、氣管內、瘤內、肌肉內、內視鏡、病灶內、顱內、經皮、皮下、局部、藉由灌注、在腫瘤微環境中或其組合投與該個體。

(發明圖式)



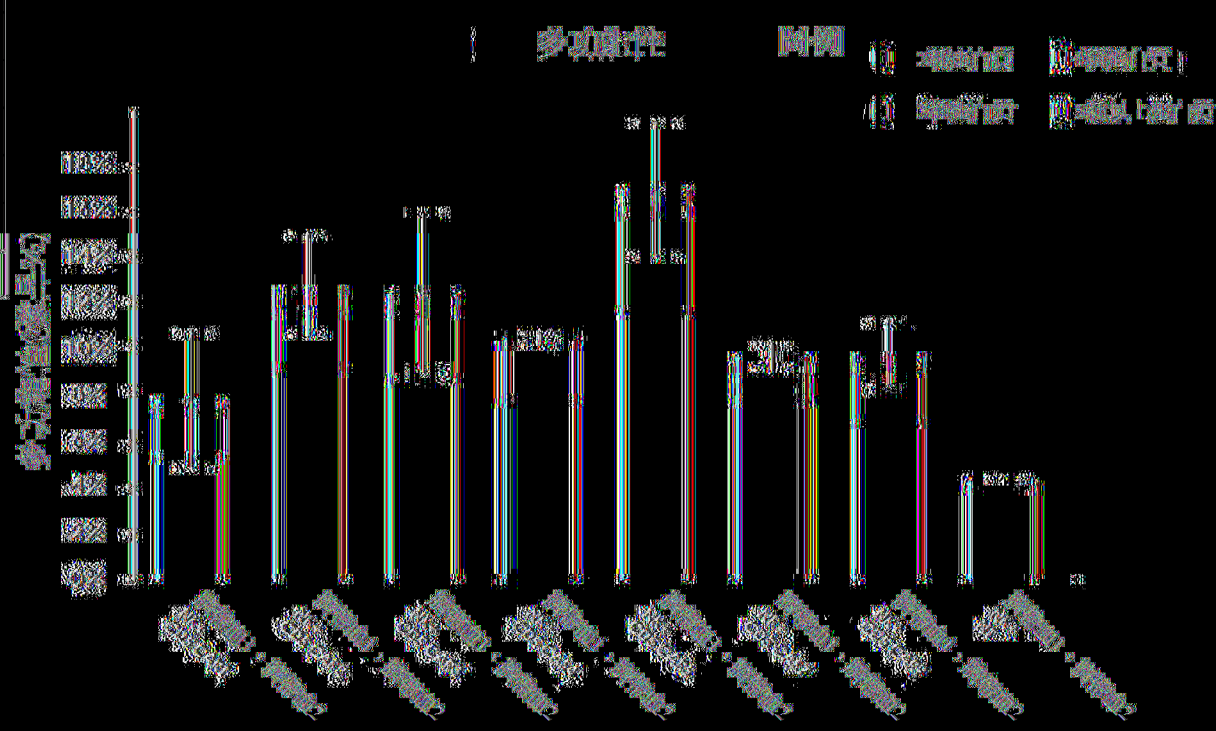
(圖1A)

展示各聚類之標準化標記物表現的熱圖



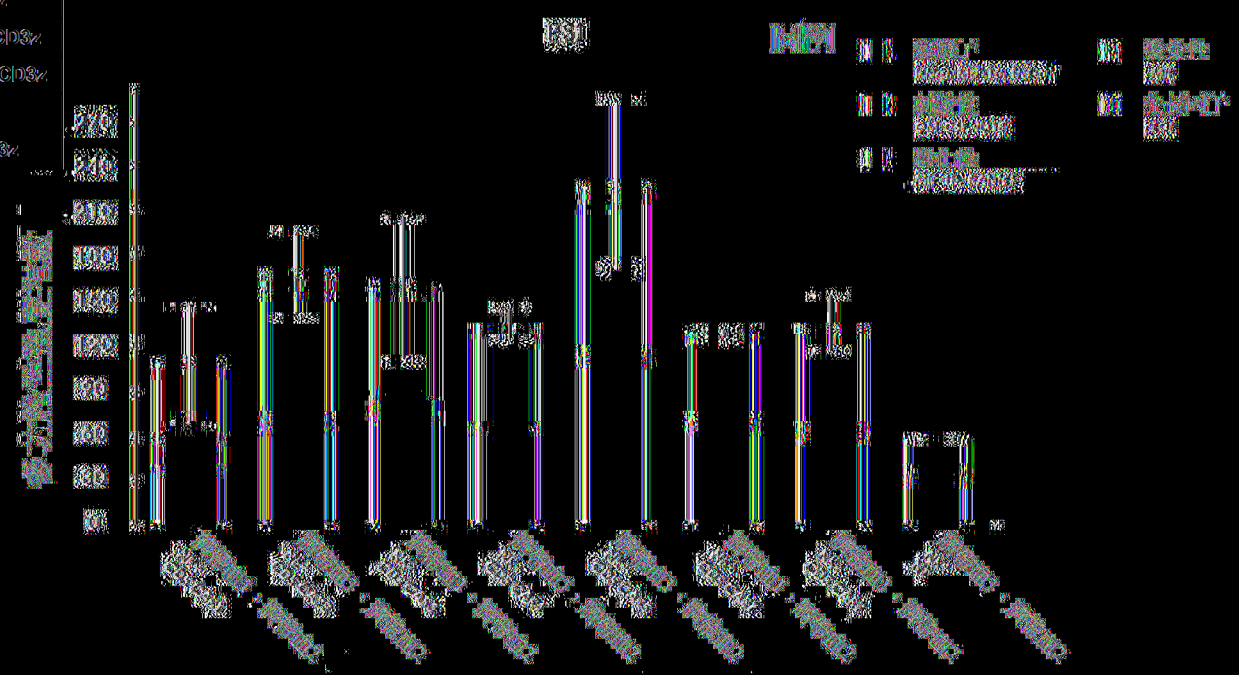
[(圖)1B]

CD5 #1	DAP1211M1cCD3 $\alpha$
CD5 #2	CD2811M1DAP12CD3 $\alpha$
CD5 #3	CD2811M1D41B13CD3 $\alpha$
CD5 #4	DAP1011M1cCD3 $\alpha$
CD5 #5	CD2811M1DAP10CD3 $\alpha$
CD5 #7	CD2811M1NK62pCD3 $\alpha$
CD5 #8	CD2811M1CD3 $\alpha$
	CD3 $\alpha$ (control)



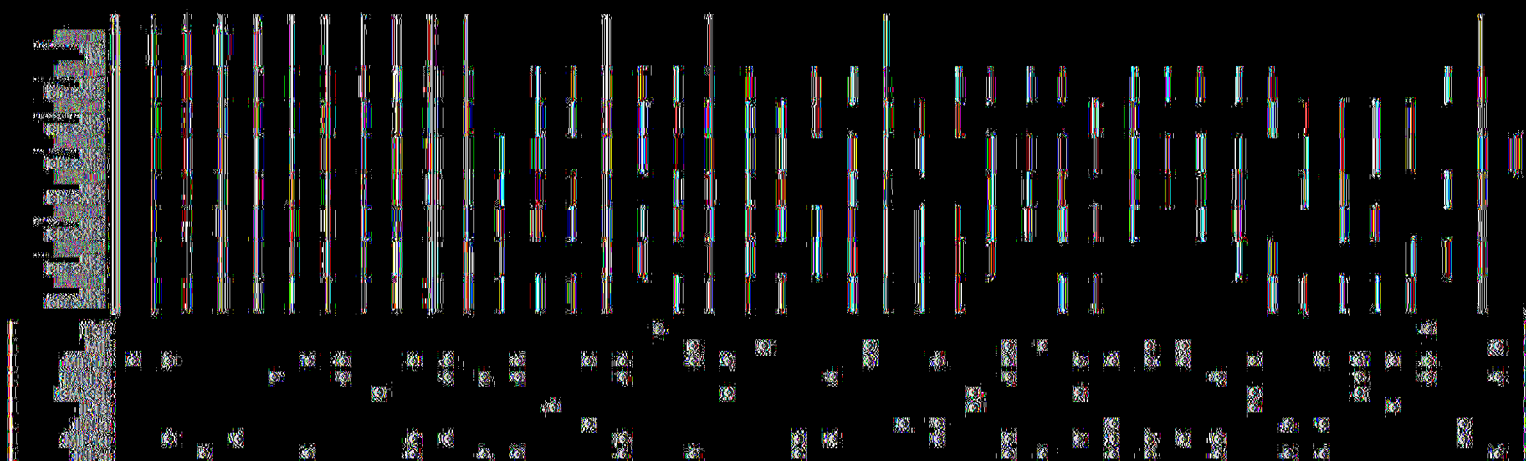
(图2A)

CDs #1	hAP1211MDCDs <sub>z</sub>
CDs #2	Ch2811MhDAP12CDs <sub>z</sub>
CDs #3	Ch2811MhD4113CDs <sub>z</sub>
CDs #4	hAP1011MDCDs <sub>z</sub>
CDs #5	Ch2811MhDAP10CDs <sub>z</sub>
CDs #7	Ch2811MhNKC2DChs <sub>z</sub>
CDs #8	Ch2811MhCDs <sub>z</sub>
CDs #9	Ch51gC1Ch28CDs <sub>z</sub>



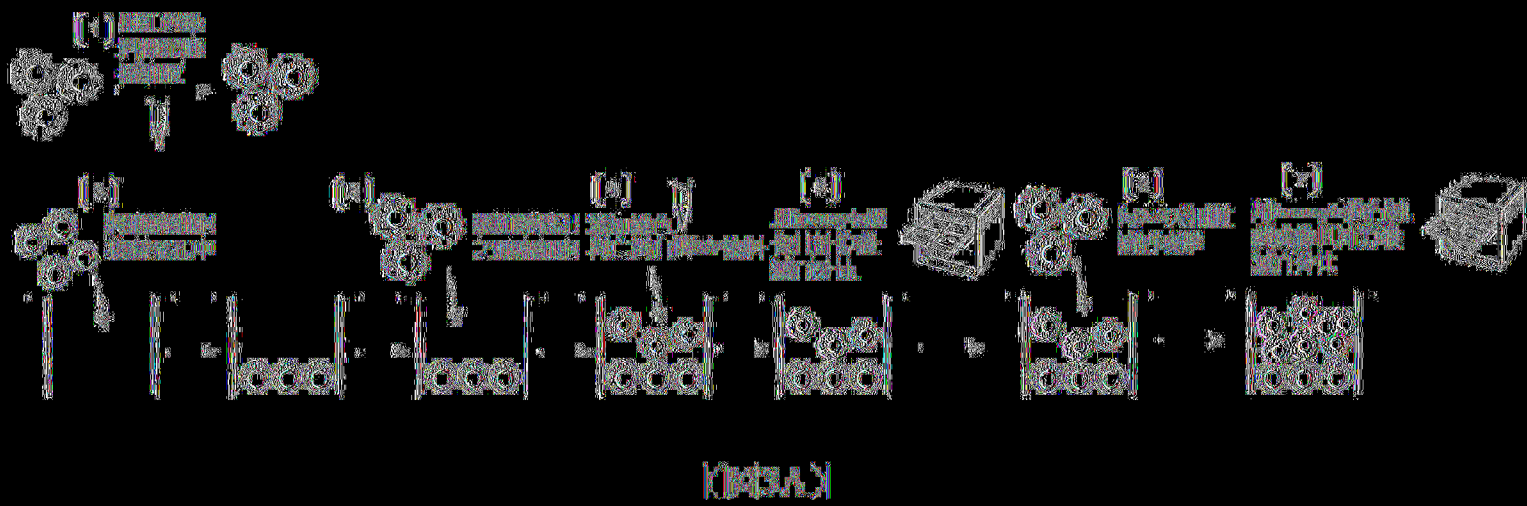
(圖2B)

### 多功能性熱圖

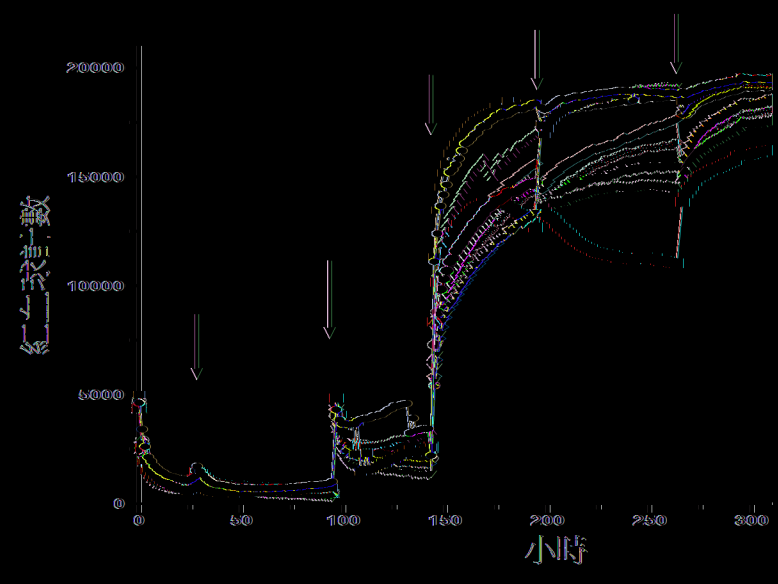


CDs #1	15AP121M1eCD3z
CDs #2	CD281M1DAP12CD3z
CDs #3	CD281M1D41F3CD3z
CDs #4	DAP101M1eCD3z
CDs #5	CD281M1DAP10CD3z
CDs #7	CD281M1DKC2DCD3z
CDs #8	CD281M1CD3z
CDs #9	CD51gC1CD28CD3z

(H2C)



- NT
- CD19
- △ CD19/IL-15
- ▽ CD5#1
- ◇ CD5#2
- CD5#3
- CD5#4
- △ CD5#5
- ▽ CD5#7
- ◇ CD5#8
- CD5#9



CD5 #1	DAP12+M1cCD3 $\alpha$
CD5 #2	CD28+M1DAP12CD3 $\alpha$
CD5 #3	CD28+M141E3CD3 $\alpha$
CD5 #4	DAP10+M1cCD3 $\alpha$
CD5 #5	CD28+M1DAP10CD3 $\alpha$
CD5 #7	CD28+M1NKG2pCD3 $\alpha$
CD5 #8	CD28+M1CD3 $\alpha$
CD5 #9	CD45c+CD28CD3 $\alpha$

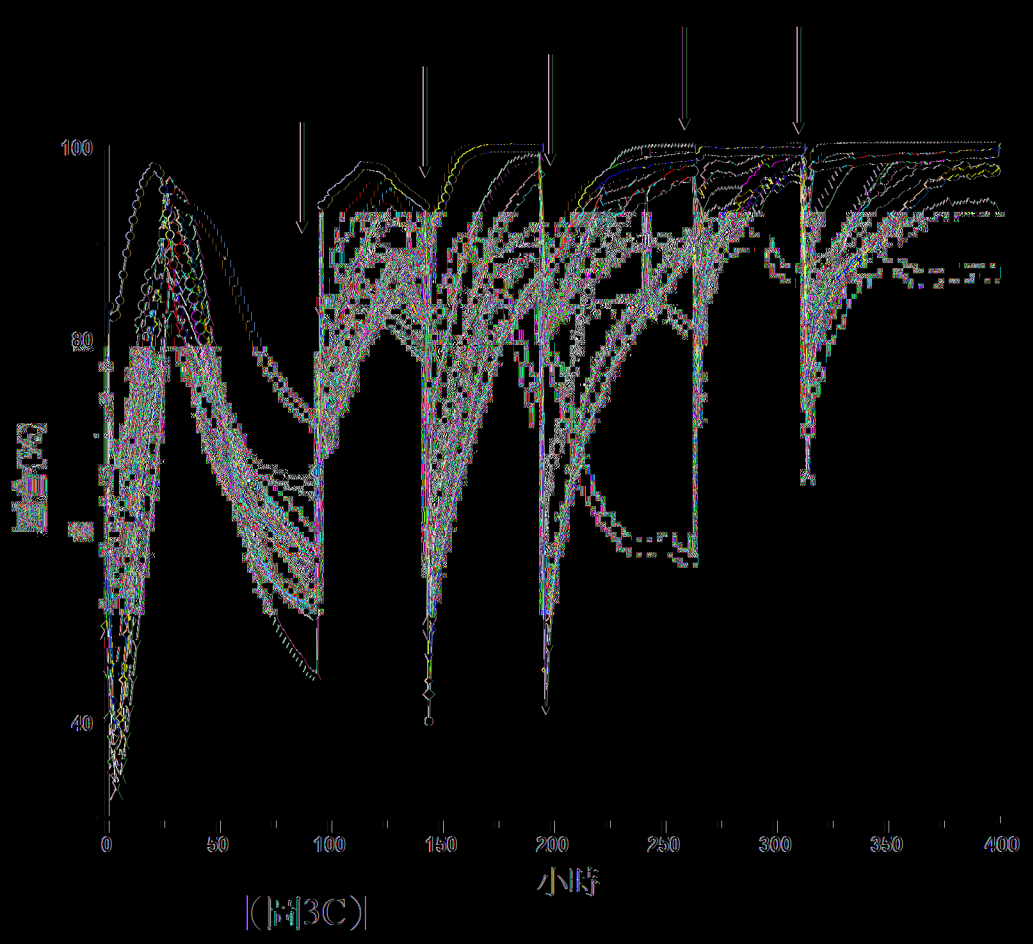
腫瘍母  
攻擊 ↓

(圖3B)

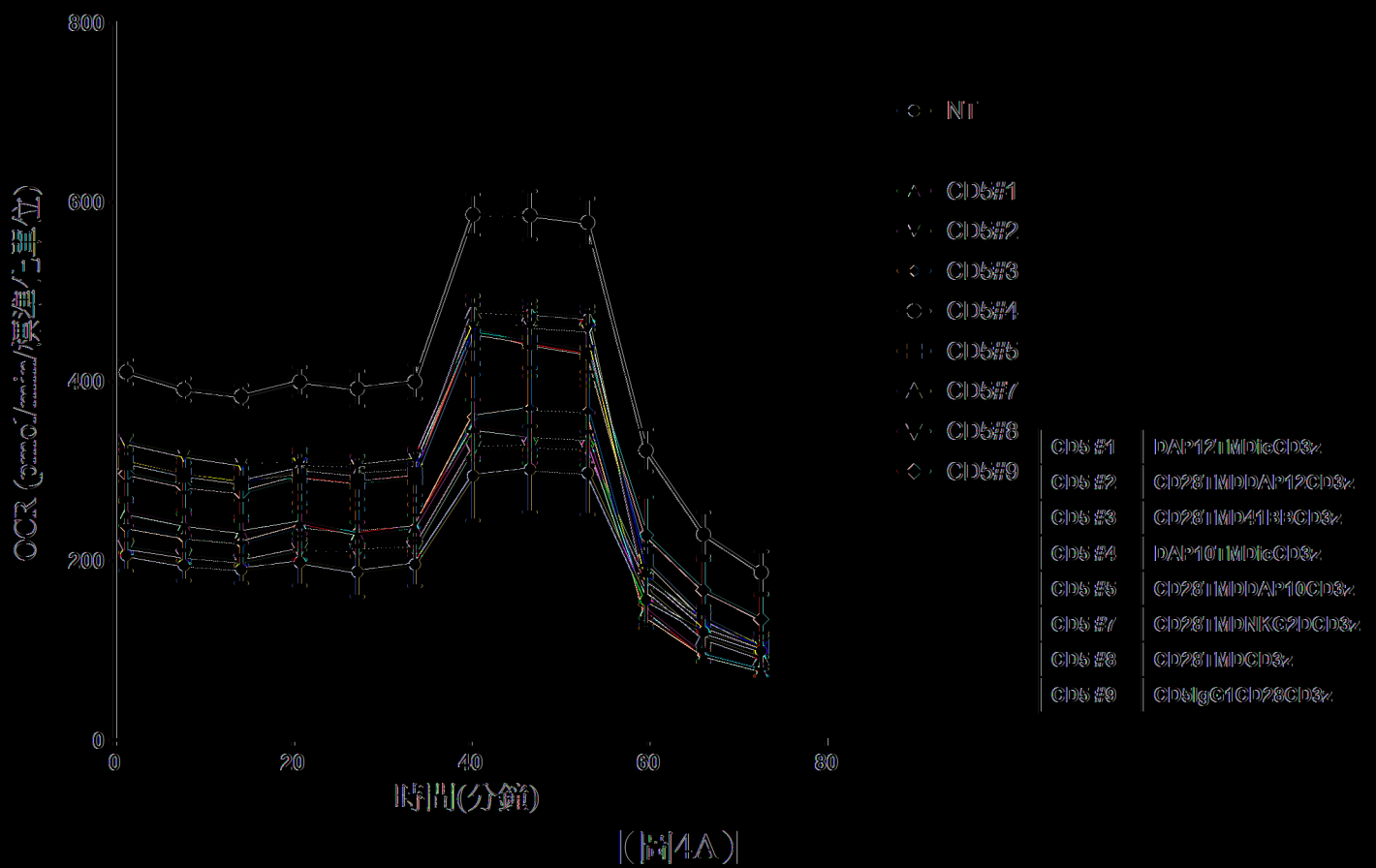
- NI
- CD19
- △ CD19A1-15
- ▽ CD8#1
- ◇ CD8#2
- CD8#3
- CD8#4
- △ CD8#5
- ▽ CD8#6
- ◇ CD8#7
- CD8#8
- CD8#9

細胞株

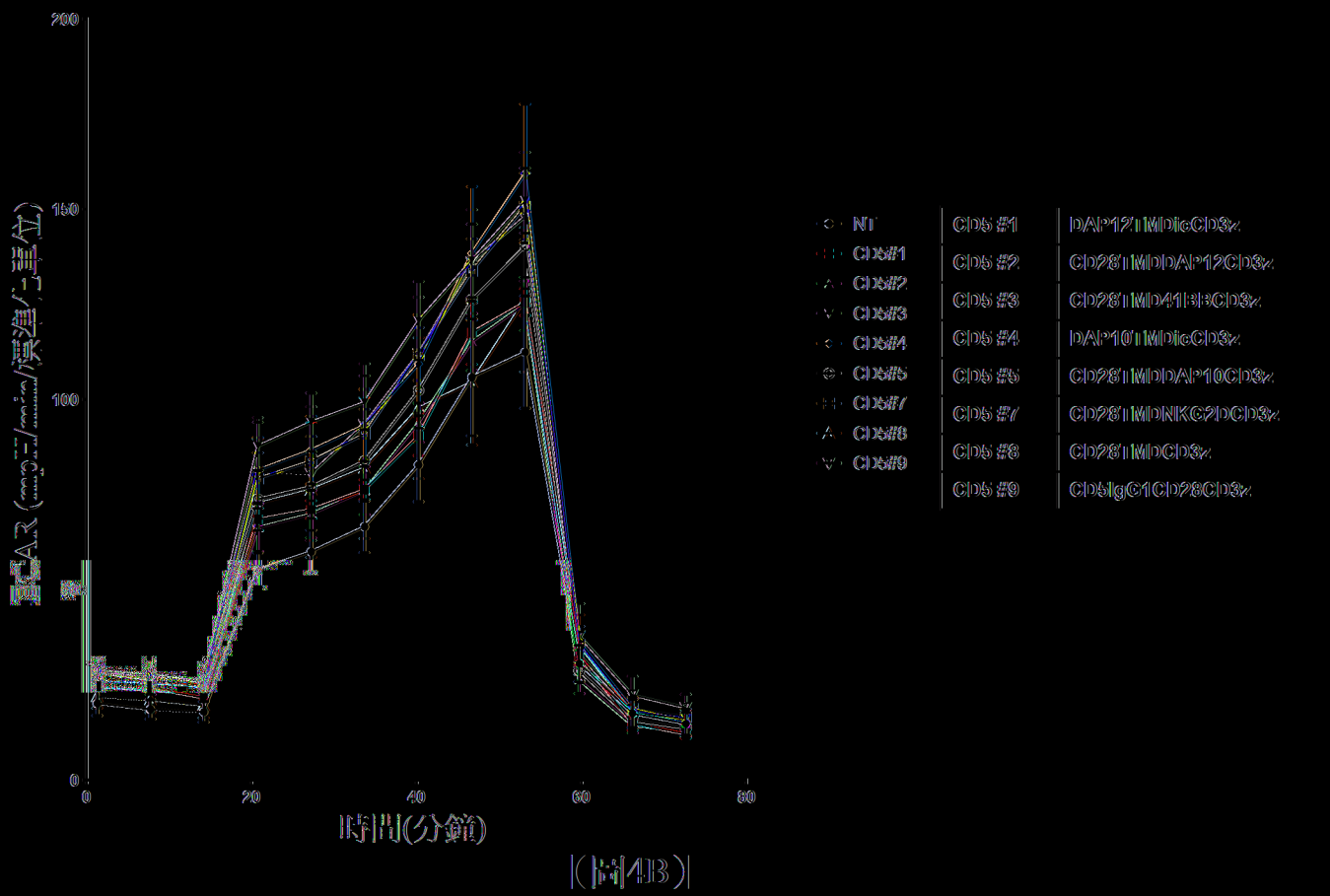
CD8#1	CD8#10
CD8#2	CD8#11
CD8#3	CD8#12
CD8#4	CD8#13
CD8#5	CD8#14
CD8#6	CD8#15
CD8#7	CD8#16
CD8#8	CD8#17
CD8#9	CD8#18

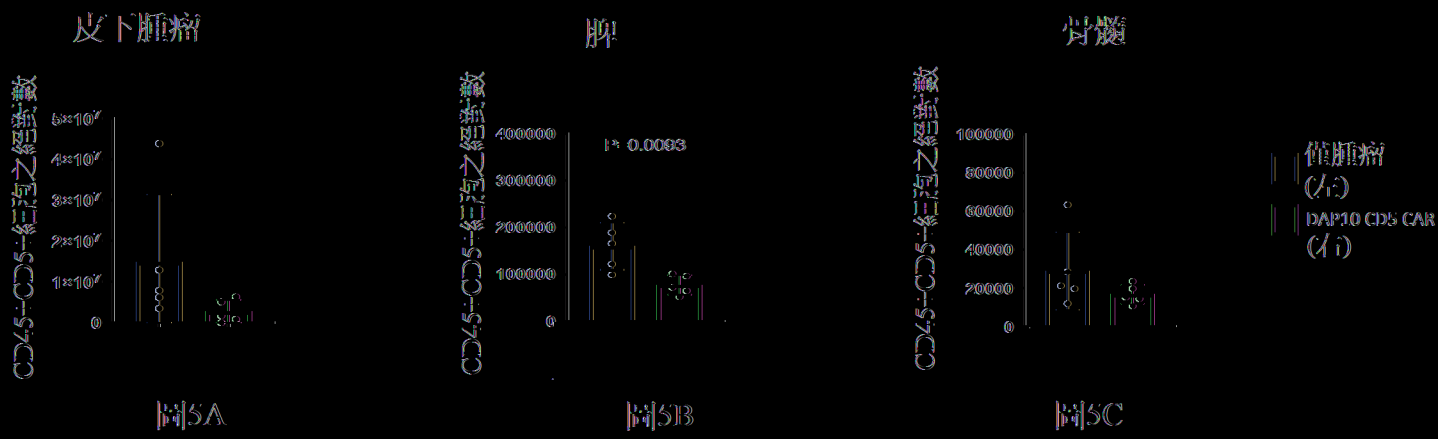


合併CB4及5之標準化;OCR資料



合併CB4及5之標準化EMCAR資料





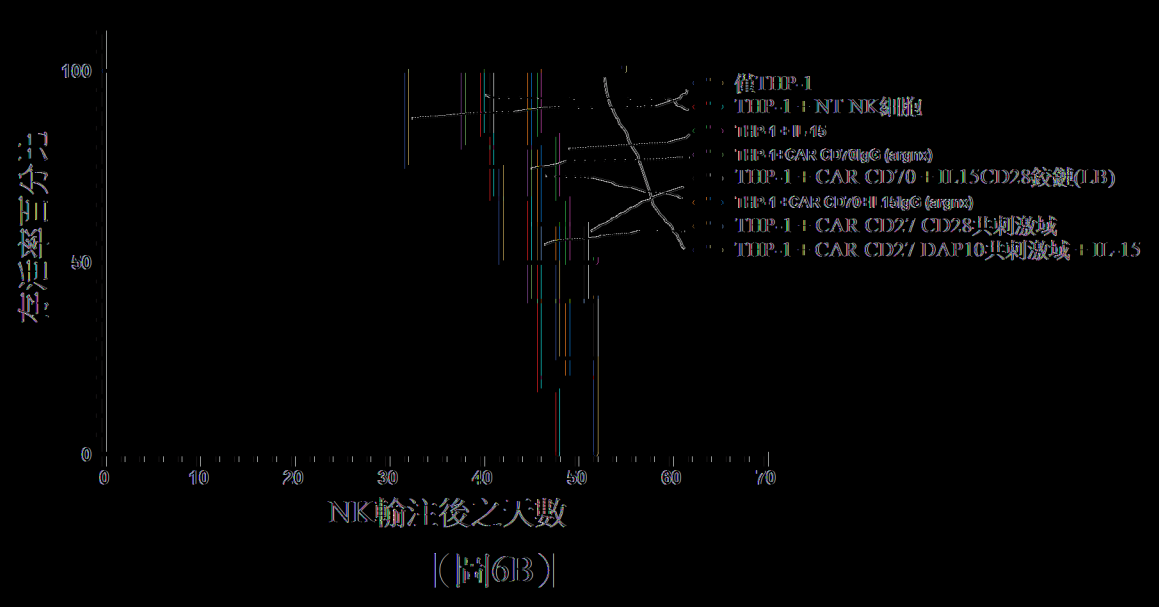
|(圖5A-5C)|

(發明)

(發明)

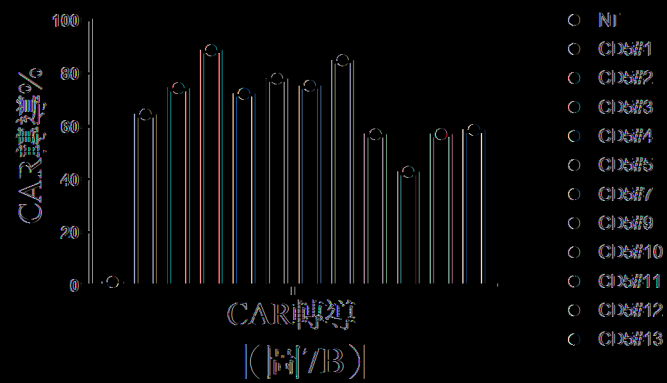
序號	名稱	數量	單位	備註
1	...	...	...	...
2	...	...	...	...
3	...	...	...	...
4	...	...	...	...
5	...	...	...	...
6	...	...	...	...
7	...	...	...	...
8	...	...	...	...
9	...	...	...	...
10	...	...	...	...
11	...	...	...	...
12	...	...	...	...
13	...	...	...	...
14	...	...	...	...
15	...	...	...	...
16	...	...	...	...
17	...	...	...	...
18	...	...	...	...
19	...	...	...	...
20	...	...	...	...
21	...	...	...	...
22	...	...	...	...
23	...	...	...	...
24	...	...	...	...
25	...	...	...	...
26	...	...	...	...
27	...	...	...	...
28	...	...	...	...
29	...	...	...	...
30	...	...	...	...
31	...	...	...	...
32	...	...	...	...
33	...	...	...	...
34	...	...	...	...
35	...	...	...	...
36	...	...	...	...
37	...	...	...	...
38	...	...	...	...
39	...	...	...	...
40	...	...	...	...
41	...	...	...	...
42	...	...	...	...
43	...	...	...	...
44	...	...	...	...
45	...	...	...	...
46	...	...	...	...
47	...	...	...	...
48	...	...	...	...
49	...	...	...	...
50	...	...	...	...
51	...	...	...	...
52	...	...	...	...
53	...	...	...	...
54	...	...	...	...
55	...	...	...	...
56	...	...	...	...
57	...	...	...	...
58	...	...	...	...
59	...	...	...	...
60	...	...	...	...
61	...	...	...	...
62	...	...	...	...
63	...	...	...	...
64	...	...	...	...
65	...	...	...	...
66	...	...	...	...
67	...	...	...	...
68	...	...	...	...
69	...	...	...	...
70	...	...	...	...
71	...	...	...	...
72	...	...	...	...
73	...	...	...	...
74	...	...	...	...
75	...	...	...	...
76	...	...	...	...
77	...	...	...	...
78	...	...	...	...
79	...	...	...	...
80	...	...	...	...
81	...	...	...	...
82	...	...	...	...
83	...	...	...	...
84	...	...	...	...
85	...	...	...	...
86	...	...	...	...
87	...	...	...	...
88	...	...	...	...
89	...	...	...	...
90	...	...	...	...
91	...	...	...	...
92	...	...	...	...
93	...	...	...	...
94	...	...	...	...
95	...	...	...	...
96	...	...	...	...
97	...	...	...	...
98	...	...	...	...
99	...	...	...	...
100	...	...	...	...

(發明)

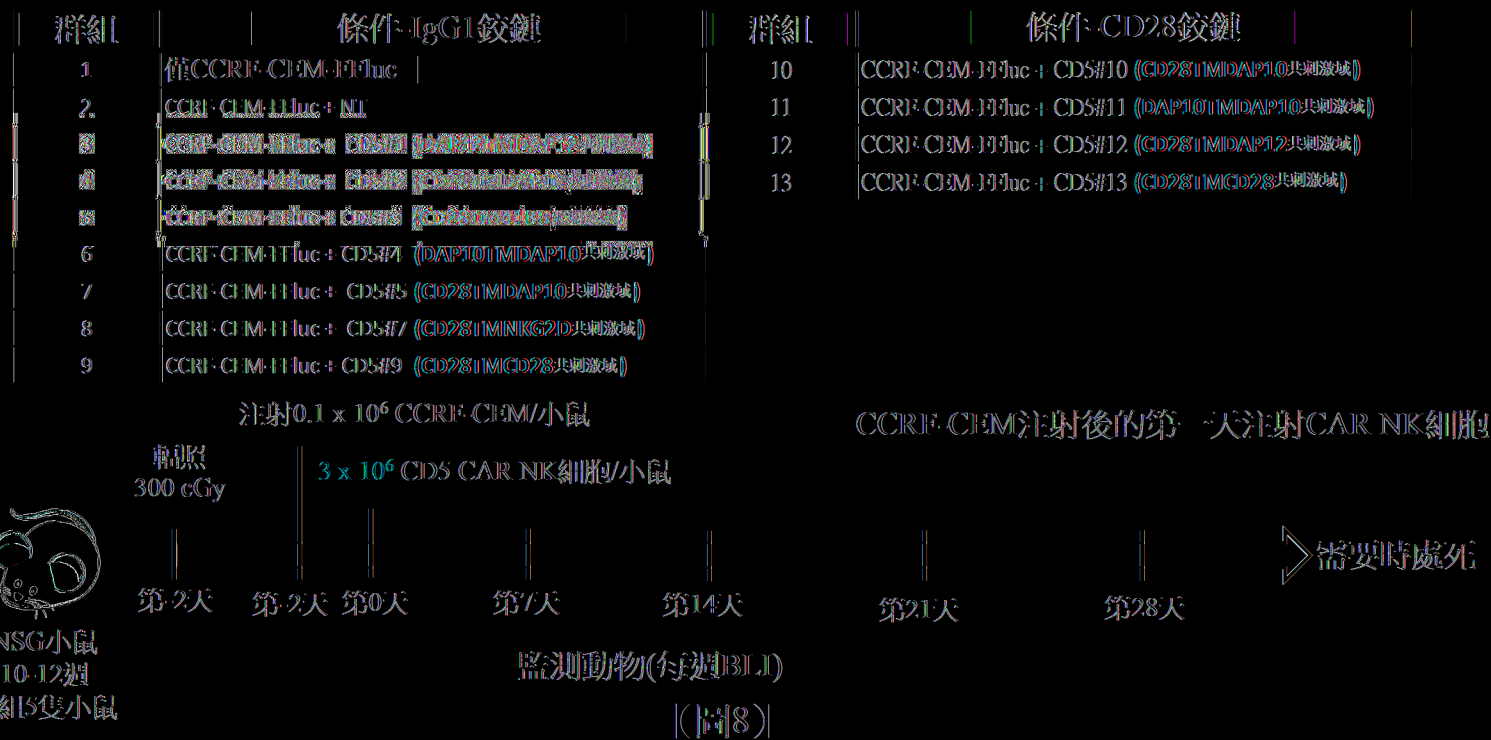


		ID	銜鏈	TM	共刺激域				
UHR	SP IgG	C05#1	IgG1	bAP12	bAP12	CD37	2A	II-15	UHR
UHR	SP IgG	C05#2	IgG1	CD28	bAP12	CD37	2A	II-15	UHR
UHR	SP IgG	C05#3	IgG1	CD28	41Bb	CD37	2A	II-15	UHR
UHR	SP IgG	C05#4	IgG1	bAP10	bAP10	CD37	2A	II-15	UHR
UHR	SP IgG	C05#5	IgG1	CD28	bAP10	CD37	2A	II-15	UHR
UHR	SP IgG	C05#7	IgG1	CD28	NKG2D	CD37	2A	II-15	UHR
UHR	SP IgG	C05#8	IgG1	CD28		CD37	2A	II-15	UHR
UHR	SP IgG	C05#9	IgG1	CD28	CD28	CD37	2A	II-15	UHR
UHR	SP IgG	C05#10	CD28	CD28	bAP10	CD37	2A	II-15	UHR
UHR	SP IgG	C05#11	CD28	bAP10	bAP10	CD37	2A	II-15	UHR
UHR	SP IgG	C05#12	CD28	CD28	bAP12	CD37	2A	II-15	UHR
UHR	SP IgG	C05#13	CD28	CD28	CD28	CD37	2A	II-15	UHR

(B1/A)



實驗#1: CCR1<sup>+</sup>CEM



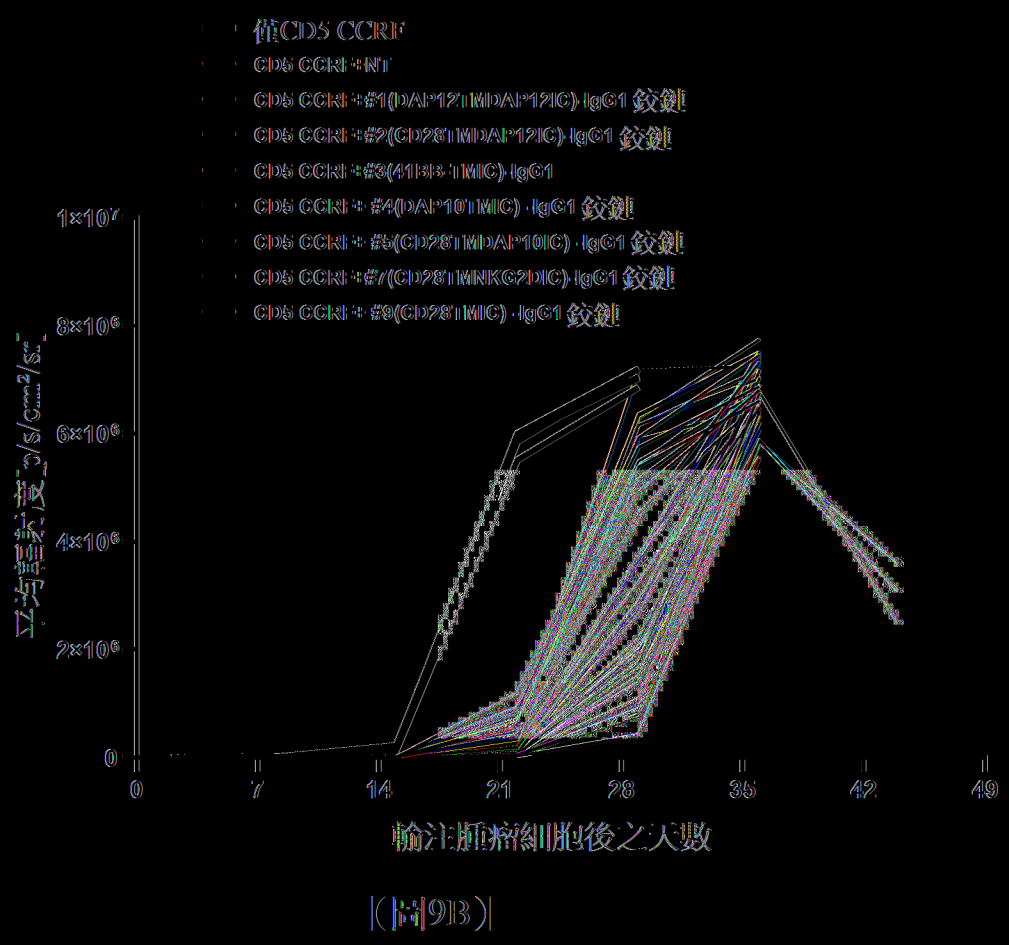
CCRI - CERN/COMINF

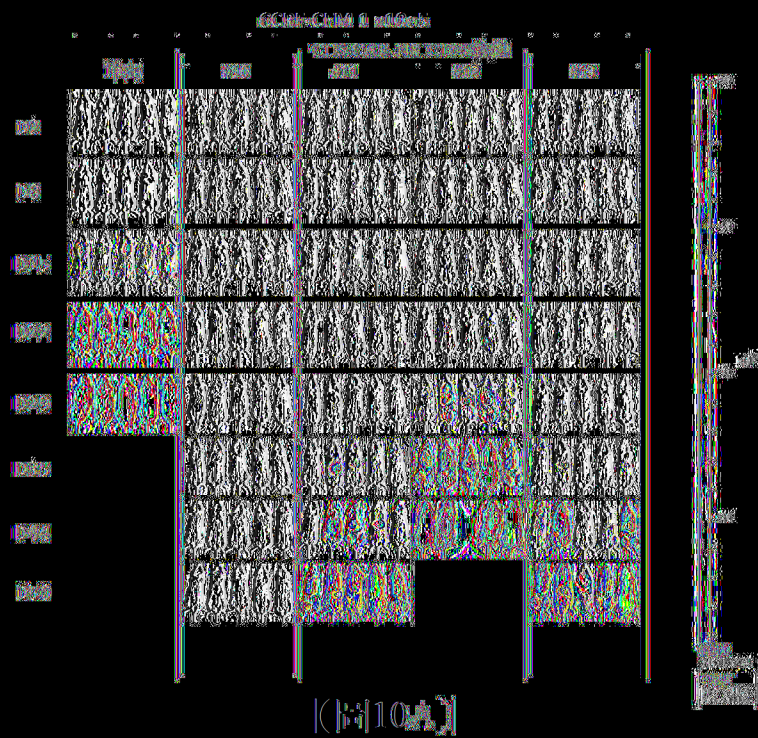
CODE - CERN/COMINF

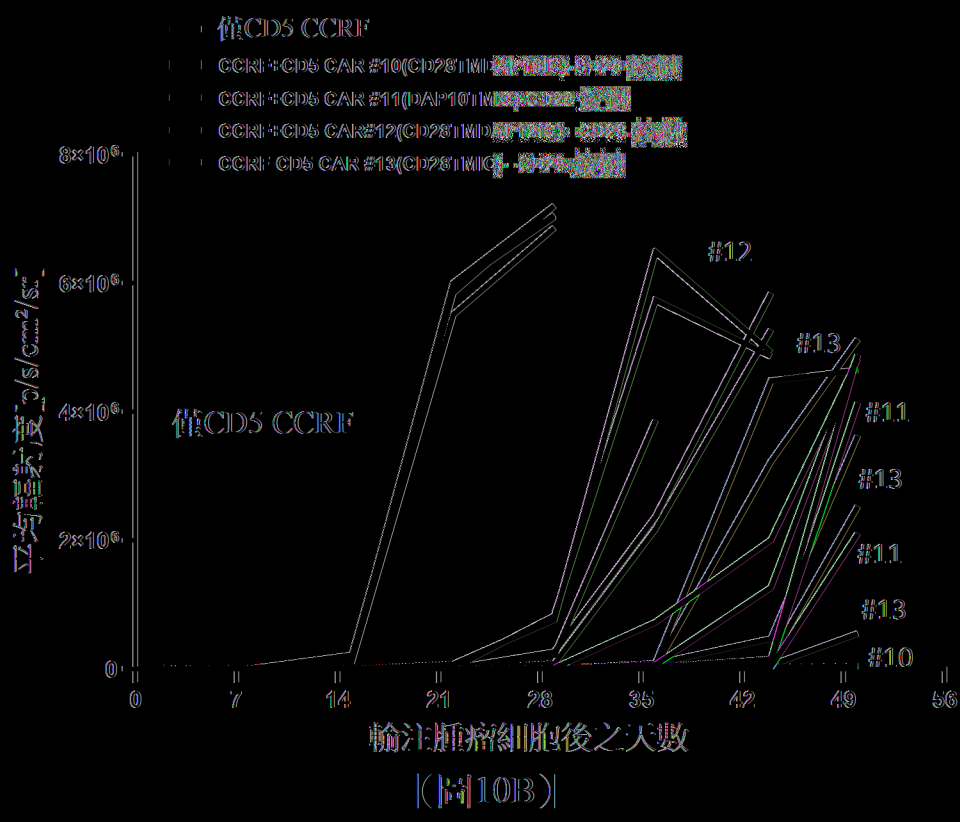
	CCRI	CODE	NAME	CODE	CODE	CODE	CODE	CODE	CODE
01									
02									
03									
04									
05									
06									
07									
08									
09									
10									

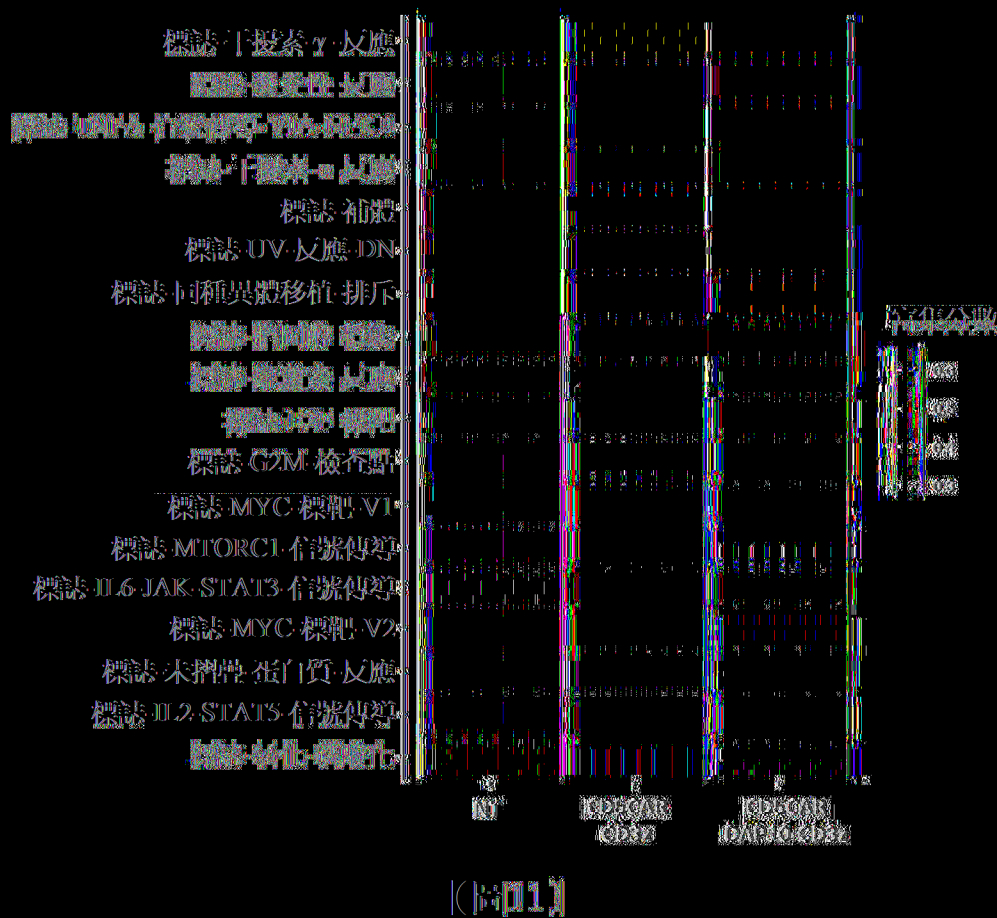


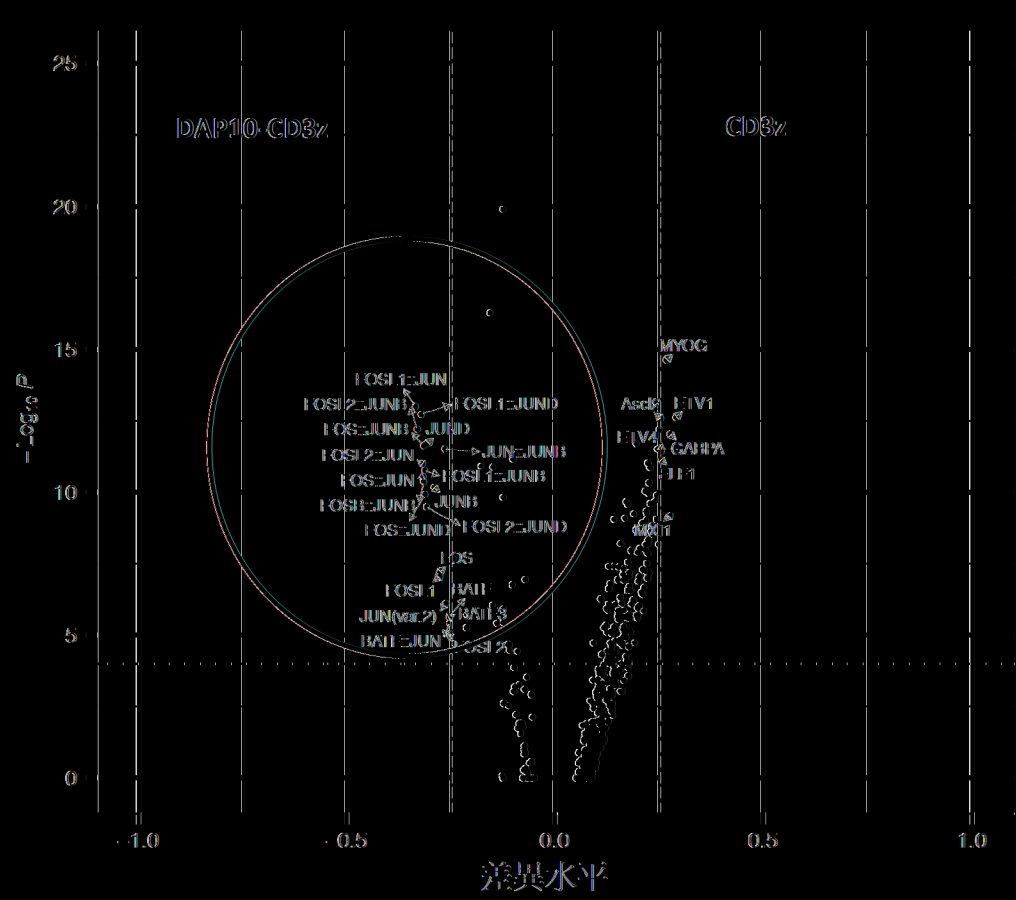
(附錄A)











(圖12)

