



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112805378 A

(43) 申请公布日 2021.05.14

(21) 申请号 201980064962.4

(22) 申请日 2019.08.09

(30) 优先权数据

62/716,972 2018.08.09 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.03.31

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/046048 2019.08.09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/033916 EN 2020.02.13

(71) 申请人 朱诺治疗学股份有限公司

地址 美国华盛顿州

(72) 发明人 A·W·布里格斯

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 封新琴

(51) Int.Cl.

C12N 15/10 (2006.01)

C12Q 1/6806 (2006.01)

权利要求书6页 说明书108页

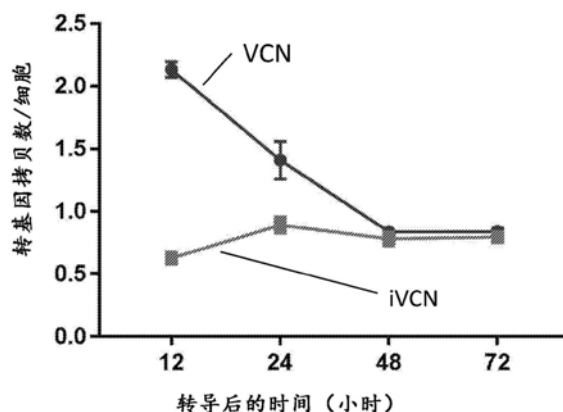
序列表34页 附图13页

(54) 发明名称

用于评估整合核酸的方法

(57) 摘要

本发明提供了用于评估整合到基因工程化细胞的基因组中的核酸序列的方法,所述基因工程化细胞例如用于细胞疗法的基因工程化细胞。细胞通常经由引入多核苷酸并将所述多核苷酸中的特定序列如重组序列整合到所述细胞的基因组中而被基因工程化为表达重组蛋白,如重组受体。在一些方面,所提供的方法可以用于区分整合核酸和非整合残留核酸。



1. 一种用于评估转基因序列的基因组整合的方法,所述方法包括:

(a) 从分离自一个或多个细胞的DNA分离大于或大于约10千碱基(kb)的脱氧核糖核酸(DNA)高分子量级分,所述一个或多个细胞包含或被怀疑包含至少一个含有编码重组蛋白的转基因序列的工程化细胞;

(b) 从所述高分子量级分确定整合到所述一个或多个细胞的基因组中的转基因序列的存在、不存在或量。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中在(a)中所述分离之前,从所述一个或多个细胞分离脱氧核糖核酸(DNA)。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中(b)中所述的确定所述转基因序列的存在、不存在或量包括确定所述一个或多个细胞中的每个二倍体基因组或每个细胞中所述转基因序列的质量、重量或拷贝数。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述一个或多个细胞包含细胞群体,其中所述群体的多个细胞包含编码所述重组蛋白的转基因序列。

5. 根据权利要求3或权利要求4所述的方法,其中所述拷贝数是所述细胞群体中的每个二倍体基因组或每个细胞中的平均或均值拷贝数。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中在(a)中所述分离之前,已将包含编码所述重组蛋白的转基因序列的多核苷酸引入所述一个或多个细胞的至少一个工程化细胞中。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中在引入包含所述转基因序列的所述多核苷酸后,所述至少一个工程化细胞尚未在高于25℃、任选地为或约37℃±2℃的温度下孵育超过96小时。

8. 根据权利要求6所述的方法,其中在引入包含所述转基因序列的所述多核苷酸后,所述至少一个工程化细胞尚未在高于25℃、任选地为或约37℃±2℃的温度下孵育超过72小时。

9. 根据权利要求6所述的方法,其中在引入包含所述转基因序列的所述多核苷酸后,所述至少一个工程化细胞尚未在高于25℃、任选地为或约37℃±2℃的温度下孵育超过48小时。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的方法,其中所述一个或多个细胞在(a)中分离所述DNA高分子量级分之前一直冷冻保存。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中所述一个或多个细胞是细胞系。

12. 根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中所述一个或多个细胞是从来自受试者的样品获得的原代细胞。

13. 根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述一个或多个细胞是免疫细胞。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述免疫细胞是T细胞或NK细胞。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述T细胞是CD3+、CD4+和/或CD8+T细胞。

16. 一种用于评估来自受试者的生物样品中转基因序列的方法,所述方法包括:

(a) 从分离自存在于来自受试者的生物样品中的一个或多个细胞的DNA分离大于或大于约10千碱基(kb)的脱氧核糖核酸(DNA)高分子量级分,其中所述生物样品包含或被怀疑包含至少一个含有编码重组蛋白的转基因序列的工程化细胞;和

(b) 从所述高分子量级分确定所述生物样品的全部或部分中转基因序列的存在、不存在或量。

17. 根据权利要求16所述的方法, 其中 (b) 中所述的确定转基因序列的存在、不存在或量包括确定所述生物样品的全部或部分中所述转基因序列的质量、重量或拷贝数。

18. 根据权利要求16或权利要求17所述的方法, 其中在所述分离之前, 从存在于所述生物样品中的一个或多个细胞分离所述DNA。

19. 根据权利要求16-18中任一项所述的方法, 其中所述生物样品是从受试者获得的, 所述受试者已被施用包含所述至少一个含有所述转基因序列的工程化细胞的组合物。

20. 根据权利要求16-19中任一项所述的方法, 其中所述生物样品是组织样品或体液样品。

21. 根据权利要求20所述的方法, 其中所述生物样品是组织样品并且所述组织是肿瘤。

22. 根据权利要求20或权利要求21所述的方法, 其中所述组织样品是肿瘤活检。

23. 根据权利要求20所述的方法, 其中所述生物样品是体液样品, 并且所述体液样品是血液或血清样品。

24. 根据权利要求16-23中任一项所述的方法, 其中在 (a) 中所述分离之前, 已将包含编码所述重组蛋白的转基因序列的多核苷酸引入所述一个或多个细胞的至少一个工程化细胞中。

25. 根据权利要求16-24中任一项所述的方法, 其中所述生物样品中的一个或多个细胞包含免疫细胞。

26. 根据权利要求25所述的方法, 其中所述免疫细胞是T细胞或NK细胞。

27. 根据权利要求26所述的方法, 其中所述T细胞是CD3⁺、CD4⁺和/或CD8⁺T细胞。

28. 根据权利要求1-27中任一项所述的方法, 其中所述分离是通过脉冲场凝胶电泳或尺寸排阻色谱法进行的。

29. 根据权利要求1-28中任一项所述的方法, 其中所述分离是通过脉冲场凝胶电泳进行的。

30. 一种用于评估转基因序列的基因组整合的方法, 所述方法包括:

(a) 通过脉冲场凝胶电泳从分离自细胞群体的DNA分离大于或大于约10千碱基 (kb) 的脱氧核糖核酸 (DNA) 高分子量级分, 所述细胞群体包含多个工程化细胞, 所述多个工程化细胞各自包含或被怀疑包含编码重组蛋白的转基因序列; 和

(b) 从所述高分子量级分确定整合到所述细胞群体的所述多个工程化细胞的基因组中的所述转基因序列在每个二倍体基因组或每个细胞中的平均或均值拷贝数。

31. 根据权利要求30所述的方法, 其中在 (a) 中所述分离之前, 已将包含编码所述重组蛋白的转基因序列的多核苷酸引入所述细胞群体的所述多个工程化细胞中的至少一个中。

32. 根据权利要求31所述的方法, 其中在向所述至少一个工程化细胞中引入包含所述转基因序列的所述多核苷酸后, 所述细胞群体尚未在高于25°C、任选地为或约37°C ± 2°C 的温度下孵育超过96小时。

33. 根据权利要求31所述的方法, 其中在向所述至少一个工程化细胞中引入包含所述转基因序列的所述多核苷酸后, 所述细胞群体尚未在高于25°C、任选地为或约37°C ± 2°C 的温度下孵育超过72小时。

34. 根据权利要求31所述的方法,其中在向所述至少一个工程化细胞中引入包含所述转基因序列的所述多核苷酸后,所述细胞群体尚未在高于25℃、任选地为或约37℃±2℃的温度下孵育超过48小时。

35. 根据权利要求30-34中任一项所述的方法,其中所述细胞群体在(a)中所述的分离所述DNA高分子量级分之前一直冷冻保存。

36. 根据权利要求1-35中任一项所述的方法,其中所述高分子量级分具有大于或大于约15千碱基(kb)。

37. 根据权利要求1-35中任一项所述的方法,其中所述高分子量级分具有大于或大于约17.5千碱基(kb)。

38. 根据权利要求1-35中任一项所述的方法,其中所述高分子量级分具有大于或大于约20千碱基(kb)。

39. 根据权利要求1-38中任一项所述的方法,所述转基因序列包含与编码所述重组蛋白的核酸序列可操作地连接的调节元件。

40. 根据权利要求1-39中任一项所述的方法,其中确定所述转基因序列的存在、不存在或量是通过聚合酶链反应(PCR)进行的。

41. 根据权利要求40所述的方法,其中所述PCR是定量聚合酶链反应(qPCR)、数字PCR或微滴式数字PCR。

42. 根据权利要求40或权利要求41所述的方法,其中所述PCR是微滴式数字PCR。

43. 根据权利要求40-42中任一项所述的方法,其中所述PCR是使用一种或多种引物进行的,所述一种或多种引物与所述转基因序列的至少一部分互补或能够将其特异性地扩增。

44. 根据权利要求43所述的方法,其中所述一种或多种引物与所述调节元件的序列互补或能够将其特异性地扩增。

45. 根据权利要求1-44中任一项所述的方法,其中确定所述转基因序列的量包括评估分离自所述一个或多个细胞的每一质量或重量的DNA中、任选分离自所述一个或多个细胞的每微克的DNA中所述转基因序列的质量、重量或拷贝数。

46. 根据权利要求45所述的方法,其中确定所述转基因序列的量包括评估分离自一个或多个细胞的每微克的DNA中转基因序列的质量或重量,以微克计。

47. 根据权利要求1-44中任一项所述的方法,其中确定所述转基因序列的量包括评估每个所述一个或多个细胞中、任选每个CD3⁺、CD4⁺和/或CD8⁺细胞中和/或每个表达所述重组蛋白的细胞中所述转基因序列的质量、重量或拷贝数。

48. 根据权利要求16-44中任一项所述的方法,其中确定所述转基因序列的存在、不存在或量包括评估生物样品中的每个二倍体基因组或每个细胞中所述转基因序列的质量、重量或拷贝数。

49. 根据权利要求48所述的方法,其中所述拷贝数是所述生物样品中的所述一个或多个细胞中每个二倍体基因组或每个细胞中的平均或均值拷贝数。

50. 根据权利要求16-44中任一项所述的方法,其中确定所述转基因序列的量包括评估每一体积的所述生物样品、任选每一微升或每一毫升的所述生物样品中所述转基因序列的质量、重量或拷贝数。

51. 根据权利要求16-44中任一项所述的方法, 其中确定所述转基因序列的量包括评估每一受试者体重或体表面积中所述转基因序列的质量、重量或拷贝数。

52. 根据权利要求1-48中任一项所述的方法, 其中确定所述转基因序列的量包括评估高分子量级分中所述转基因序列的质量、重量或拷贝数, 并将所述质量、重量或拷贝数针对所述高分子量级分中的参考基因的质量、重量或拷贝数或针对标准曲线归一化。

53. 根据权利要求52所述的方法, 其中所述参考基因是管家基因。

54. 根据权利要求52或权利要求53所述的方法, 其中所述参考基因是编码白蛋白 (ALB) 的基因。

55. 根据权利要求52或权利要求53所述的方法, 其中所述参考基因是编码核糖核酸酶P蛋白亚基p30 (RPP30) 的基因。

56. 根据权利要求52-55所述的方法, 其中所分离的DNA中参考基因的拷贝数是通过PCR使用一种或多种引物进行的一种或多种引物与所述参考基因的至少一部分互补或能够将其特异性地扩增。

57. 根据权利要求1-6中任一项所述的方法, 其中所述转基因序列不编码完整的病毒gag蛋白。

58. 根据权利要求1-57中任一项所述的方法, 其中所述转基因序列不包含完整的HIV基因组、有复制能力的病毒基因组和/或附属基因, 所述附属基因任选地是Nef、Vpu、Vif、Vpr和/或Vpx。

59. 根据权利要求6-15、24-29和31-57中任一项所述的方法, 其中所述多核苷酸的引入是通过用包含所述多核苷酸的病毒载体转导进行的。

60. 根据权利要求59所述的方法, 其中所述病毒载体是逆转录病毒载体或 γ 逆转录病毒载体。

61. 根据权利要求59或权利要求60所述的方法, 其中所述病毒载体是慢病毒载体。

62. 根据权利要求59所述的方法, 其中所述病毒载体是AAV载体, 其任选地选自AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7或AAV8载体。

63. 根据权利要求6-15、24-29和31-57中任一项所述的方法, 其中所述多核苷酸的引入是通过物理递送方法、任选地通过电穿孔进行的。

64. 根据权利要求1-63中任一项所述的方法, 其中所述重组蛋白是重组受体。

65. 根据权利要求64所述的方法, 其中所述重组受体特异性地结合至与疾病或病症相关的抗原或在与疾病或病症相关的病灶环境的细胞中表达的抗原。

66. 根据权利要求65所述的方法, 其中所述疾病或病症是癌症。

67. 根据权利要求65或权利要求66所述的方法, 其中所述抗原选自 $\alpha v \beta 6$ 整合素 ($\alpha v \beta 6$ 整合素)、B细胞成熟抗原 (BCMA)、B7-H3、B7-H6、碳酸酐酶9 (CA9, 也称为CAIX或G250)、癌症-睾丸抗原、癌症/睾丸抗原1B (CTAG, 也称为NY-ESO-1和LAGE-2)、癌胚抗原 (CEA)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、C-C基序趋化因子配体1 (CCL-1)、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD123、CD133、CD138、CD171、硫酸软骨素蛋白聚糖4 (CSPG4)、表皮生长因子蛋白 (EGFR)、表皮生长因子受体III型突变体 (EGFRvIII)、上皮糖蛋白2 (EPG-2)、上皮糖蛋白40 (EPG-40)、肝配蛋白B2、肝配蛋白受体A2 (EPHA2)、雌激素受体、Fc受体样蛋白5 (FCRL5; 也称为Fc受体同源物5或FCRH5)、胎儿乙酰胆碱受体 (胎儿AChR)、叶

酸结合蛋白 (FBP)、叶酸受体 α 、神经节苷脂GD2、O-乙酰化GD2 (OGD2)、神经节苷脂GD3、糖蛋白100 (gp100)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 (GPC3)、G蛋白偶联受体C5家族成员D (GPC5D)、Her2/neu (受体酪氨酸激酶erb-B2)、Her3 (erb-B3)、Her4 (erb-B4)、erbB二聚体、人高分子量黑色素瘤相关抗原 (HMW-MAA)、乙型肝炎表面抗原、人白细胞抗原A1 (HLA-A1)、人白细胞抗原A2 (HLA-A2)、IL-22受体 α (IL-22R α)、IL-13受体 α 2 (IL-13R α 2)、激酶插入结构域受体 (kdr)、 κ 轻链、L1细胞粘附分子 (L1-CAM)、L1-CAM的CE7表位、含有富亮氨酸重复序列的蛋白8家族成员A (LRRC8A)、路易斯Y、黑色素瘤相关抗原 (MAGE) -A1、MAGE-A3、MAGE-A6、MAGE-A10、间皮素 (MSLN)、c-Met、鼠类巨细胞病毒 (CMV)、粘蛋白1 (MUC1)、MUC16、自然杀伤细胞2族成员D (NKG2D) 配体、黑色素A (MART-1)、神经细胞粘附分子 (NCAM)、癌胚胎抗原、黑色素瘤优先表达抗原 (PRAME)、孕酮受体、前列腺特异性抗原、前列腺干细胞抗原 (PSCA)、前列腺特异性膜抗原 (PSMA)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR1)、存活蛋白、滋养层糖蛋白 (TPBG, 也称为5T4)、肿瘤相关糖蛋白72 (TAG72)、酪氨酸酶相关蛋白1 (TRP1, 也称为TYRP1或gp75)、酪氨酸酶相关蛋白2 (TRP2, 也称为多巴色素互变异构酶、多巴色素 δ 异构酶或DCT)、血管内皮生长因子受体 (VEGFR)、血管内皮生长因子受体2 (VEGFR2)、Wilms肿瘤1 (WT-1)、病原体特有的或病原体表达的抗原、或与通用标签相关的抗原、和/或生物素化分子、和/或由HIV、HCV、HBV或其他病原体表达的分子。

68. 根据权利要求64-67中任一项所述的方法, 其中所述重组受体是重组T细胞受体 (TCR) 或功能性非T细胞受体。

69. 根据权利要求64-68中任一项所述的方法, 其中所述重组受体是嵌合抗原受体 (CAR)。

70. 根据权利要求69所述的方法, 其中所述CAR包含特异性地结合至所述抗原的细胞外抗原识别结构域和包含ITAM的细胞内信号传导结构域。

71. 根据权利要求70所述的方法, 其中包含ITAM的细胞内信号传导结构域包含CD3- ζ (CD3 ζ) 链、任选人CD3- ζ 链的细胞内结构域。

72. 根据权利要求70或权利要求71所述的方法, 其中所述细胞内信号传导结构域进一步包含共刺激信号传导区。

73. 根据权利要求72所述的方法, 其中所述共刺激信号传导区包含CD28或4-1BB、任选人CD28或人4-1BB的信号传导结构域。

74. 一种评估残留的非整合转基因序列的方法, 所述方法包括:

(1) 进行根据权利要求1-15和28-73中任一项所述的方法, 以确定所述DNA高分子量级分中所述转基因序列的存在、不存在或量, 从而评估转基因序列的基因组整合;

(2) 确定在不分离所述高分子量级分的情况下在所分离的DNA中所述转基因序列的存在、不存在或量; 和

(3) 比较(1)中确定的量与(2)中确定的量, 从而确定残留的非整合重组序列的量。

75. 根据权利要求74所述的方法, 其中确定所述转基因序列的存在、不存在或量包括确定所述一个或多个细胞中的每个二倍体基因组或每个细胞中所述转基因序列的质量、重量或拷贝数。

76. 根据权利要求74或权利要求75所述的方法, 其中所述一个或多个细胞包含细胞群体, 其中所述群体的多个细胞包含或被怀疑包含编码所述重组蛋白的转基因序列。

77. 根据权利要求75或权利要求76所述的方法, 其中所述拷贝数是所述细胞群体中的每个二倍体基因组或每个细胞中的平均或均值拷贝数。

78. 根据权利要求75-77中任一项所述的方法, 其中比较所述量包括从(2)中确定的拷贝数减去(1)中确定的拷贝数。

79. 根据权利要求75-77中任一项所述的方法, 其中比较所述量包括确定在(1)中确定的拷贝数与在(2)中确定的拷贝数的比率。

80. 根据权利要求74-79中任一项所述的方法, 其中(2)中所述确定所述存在、不存在或量是通过聚合酶链反应(PCR)进行的。

81. 根据权利要求80所述的方法, 其中所述PCR是定量聚合酶链反应(qPCR)、数字PCR或微滴式数字PCR。

82. 根据权利要求80或权利要求81所述的方法, 其中所述PCR是微滴式数字PCR。

83. 根据权利要求80-82中任一项所述的方法, 其中所述PCR是使用一种或多种引物进行的, 所述一种或多种引物与所述转基因序列的至少一部分互补或能够将其特异性地扩增。

84. 根据权利要求74-83中任一项所述的方法, 其中(2)中所述确定所述存在、不存在或量包括评估在不分离所述高分子量级分的情况下在所分离的DNA中所述转基因序列的质量、重量或拷贝数, 并将所述质量、重量或拷贝数针对在不分离所述高分子量级分的情况下在所分离的DNA中的参考基因的质量、重量或拷贝数或针对标准曲线归一化。

85. 根据权利要求84所述的方法, 其中所述参考基因是管家基因。

86. 根据权利要求84或权利要求85所述的方法, 其中所述参考基因是编码白蛋白(ALB)的基因。

87. 根据权利要求84或权利要求85所述的方法, 其中所述参考基因是编码核糖核酸酶P蛋白亚基p30(RPP30)的基因。

88. 根据权利要求84-87所述的方法, 其中确定所分离的DNA中参考基因的质量、重量或拷贝数是通过PCR使用一种或多种引物进行的, 所述一种或多种引物与所述参考基因的至少一部分互补或能够将其特异性地扩增。

89. 根据权利要求74-88中任一项所述的方法, 其中(1)中所述确定所述存在、不存在或量和(2)中所述确定所述存在、不存在或量是通过聚合酶链反应(PCR)使用相同引物或相同引物组进行的。

90. 根据权利要求74-89中任一项所述的方法, 其中所述残留的非整合重组序列包含载体质粒、线性互补DNA(cDNA)、自我整合序列或长末端重复序列(LTR)环中的一种或多种。

用于评估整合核酸的方法

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2018年8月9日提交的标题为“用于评估整合核酸的方法 (METHODS FOR ASSESSING INTEGRATED NUCLEIC ACIDS)”的美国临时申请号62/716,972的优先权,将其内容通过引用以其整体并入。

通过引用序列表并入

[0002] 本申请是与电子格式的序列表一起提交的。序列表以2019年8月3日创建、大小为53.2千字节的名为735042016840SeqList.txt的文件提供。将在电子格式的序列表中的信息通过引用以其整体并入。

技术领域

[0003] 在一些方面,本公开文本涉及用于评估整合到基因工程化细胞(如用于细胞疗法的基因工程化细胞)的基因组中的核酸序列的方法。细胞通常被基因工程化为经由引入多核苷酸并将所述多核苷酸中的特定序列(如编码重组蛋白的转基因序列)整合到所述细胞的基因组中以表达重组蛋白(如重组受体)。在一些方面,所提供的方法可以用于区分整合核酸和非整合残留核酸。

背景技术

[0004] 方法可用于确定被引入以将细胞(如用于治疗疾病和病症的过继细胞疗法)基因工程化的核酸的拷贝数。对于过继细胞疗法(包括涉及施用表达对于目的疾病或病症具有特异性的重组受体(如嵌合抗原受体(CAR)和/或其他重组抗原受体)的细胞的那些)在向受试者施用细胞之前可能需要及时和准确地评估整合核酸,并且在一些情况下评估非整合残留核酸。需要改进的方法。提供了满足此类需求的方法和试剂盒。

发明内容

[0005] 本文提供了用于评估转基因序列的基因组整合的方法。在一些任何实施方案中,所述方法涉及:(a)从分离自一个或多个细胞的DNA分离大于或大于约10千碱基(kb)的脱氧核糖核酸(DNA)高分子量级分,所述一个或多个细胞包含或被怀疑包含至少一个含有转基因序列的工程化细胞,所述转基因序列包含编码重组蛋白的核酸序列;和(b)从所述高分子量级分确定整合到所述一个或多个细胞的基因组中的所述转基因序列的存在、不存在或量。

[0006] 本文提供了用于评估转基因序列的基因组整合的方法,所述方法包括:(a)从分离自一个或多个细胞的DNA分离大于或大于约10千碱基(kb)的脱氧核糖核酸(DNA)高分子量级分,所述一个或多个细胞包含或被怀疑包含至少一个含有编码重组蛋白的转基因序列的工程化细胞;和(b)确定整合到所述一个或多个细胞的基因组中的所述转基因序列的存在、不存在或量。

[0007] 本文还提供了用于评估转基因序列的基因组整合的方法,所述方法涉及:(a)从分

离自一个或多个细胞的DNA分离大于或大于约10千碱基(kb)的脱氧核糖核酸(DNA)高分子量级分,所述一个或多个细胞包含或被怀疑包含至少一个含有转基因序列的工程化细胞,所述转基因序列包含编码重组蛋白的核酸序列;和(b)确定所述高分子量级分中所述转基因序列的存在、不存在或量。

[0008] 在一些任何实施方案中,确定所述高分子量级分中所述转基因序列的存在、不存在或量,从而评估整合到所述一个或多个细胞的基因组中的所述转基因序列。

[0009] 本文还提供了用于评估转基因序列的基因组整合的方法,所述方法涉及:(a)从分离自一个或多个细胞的DNA分离大于或大于约10千碱基(kb)的脱氧核糖核酸(DNA)高分子量级分,所述一个或多个细胞包含或被怀疑包含至少一个含有转基因序列的工程化细胞,所述转基因序列包含编码重组蛋白的核酸序列;和(b)确定所述高分子量级分中所述转基因序列的存在、不存在或量,其中所述高分子量级分中的转基因序列表示已整合到所述一个或多个细胞的基因组中的所述转基因序列。

[0010] 在一些任何所提供的实施方案中,所述高分子量级分中的转基因序列表示已整合到所述一个或多个细胞的基因组中的所述转基因序列。在一些任何所提供的实施方案中,(b)中所述的确定整合到所述一个或多个细胞的基因组中的所述转基因序列的存在、不存在或量包括确定所述高分子量级分中所述转基因序列的质量、重量或拷贝数。

[0011] 在一些任何所提供的实施方案中,在所述分离之前,所述方法包括从所述一个或多个细胞分离脱氧核糖核酸(DNA)。在一些任何所提供的实施方案中,确定所述转基因序列的存在、不存在或量包括确定所述一个或多个细胞中的每个二倍体基因组或每个细胞中所述转基因序列的质量、重量或拷贝数。

[0012] 在一些任何所提供的实施方案中,所述一个或多个细胞包含细胞群体,其中所述群体的多个细胞包含编码所述重组蛋白的转基因序列。在一些任何所提供的实施方案中,所述一个或多个细胞包含细胞群体,其中所述群体的多个细胞被怀疑包含编码所述重组蛋白的转基因序列。

[0013] 在一些任何所提供的实施方案中,所述拷贝数是所述细胞群体中的每个二倍体基因组或每个细胞中的平均或均值拷贝数。

[0014] 在一些任何所提供的实施方案中,在所述分离之前,已将包含编码所述重组蛋白的转基因序列的多核苷酸引入细胞(例如细胞群体的细胞)中以产生所述一个或多个细胞的所述至少一个工程化细胞。在一些任何所提供的实施方案中,在引入包含所述转基因序列的所述多核苷酸后,所述至少一个工程化细胞尚未在高于25℃、任选地为或约37℃±2℃的温度下孵育超过96小时。在一些任何所提供的实施方案中,在引入包含所述转基因序列的所述多核苷酸后,所述至少一个工程化细胞尚未在高于25℃、任选地为或约37℃±2℃的温度下孵育超过72小时。在一些任何所提供的实施方案中,在引入包含所述转基因序列的所述多核苷酸后,所述至少一个工程化细胞尚未在高于25℃、任选地为或约37℃±2℃的温度下孵育超过48小时。

[0015] 在一些任何所提供的实施方案中,所述一个或多个细胞在分离所述DNA高分子量级分之前一直冷冻保存。在一些任何所提供的实施方案中,所述一个或多个细胞是细胞系。在一些任何所提供的实施方案中,所述一个或多个细胞是从来自受试者的样品获得的原代细胞。在一些任何所提供的实施方案中,所述一个或多个细胞是免疫细胞。在一些任何所提

供的实施方案中,所述免疫细胞是T细胞或NK细胞。在一些任何所提供的实施方案中,所述T细胞是CD3⁺、CD4⁺和/或CD8⁺T细胞。

[0016] 本文提供了用于评估来自受试者的生物样品中的转基因序列的方法。在一些任何实施方案中,所提供的方法涉及:(a)从分离自存在于来自受试者的生物样品中的一个或多个细胞的DNA分离大于或大于约10千碱基(kb)的脱氧核糖核酸(DNA)高分子量级分,其中所述生物样品包含或被怀疑包含至少一个含有编码重组蛋白的转基因序列的工程化细胞;和(b)确定所述高分子量级分中转基因序列的存在、不存在或量,从而评估存在于所述生物样品的全部或一部分中的转基因序列。

[0017] 本文提供了用于评估来自受试者的生物样品中转基因序列的方法,所述方法包括:(a)从分离自存在于来自受试者的生物样品中的一个或多个细胞的DNA分离大于或大于约10千碱基(kb)的脱氧核糖核酸(DNA)高分子量级分,其中所述生物样品包含或被怀疑包含至少一个含有编码重组蛋白的转基因序列的工程化细胞;和(b)确定所述高分子量级分中转基因序列的存在、不存在或量,从而评估存在于所述生物样品的全部或一部分中的转基因序列。

[0018] 本文提供了用于评估来自受试者的生物样品中转基因序列的方法,所述方法包括:(a)从分离自存在于来自受试者的生物样品中的一个或多个细胞的DNA分离大于或大于约10千碱基(kb)的脱氧核糖核酸(DNA)高分子量级分,其中所述生物样品包含或被怀疑包含至少一个含有编码重组蛋白的转基因序列的工程化细胞;和(b)确定所述生物样品的全部或一部分中转基因序列的存在、不存在或量。

[0019] 在一些任何所提供的实施方案中,(b)中所述的确定转基因序列的存在、不存在或量包括确定所述生物样品的全部或一部分中所述转基因序列的质量、重量或拷贝数。

[0020] 在一些任何所提供的实施方案中,在所述分离之前,从存在于所述生物样品中的一个或多个细胞分离所述DNA。在一些任何所提供的实施方案中,所述生物样品是从受试者获得的,所述受试者已被施用包含所述至少一个含有所述转基因序列的工程化细胞的组合物。在一些任何所提供的实施方案中,所述生物样品是组织样品或体液样品。在一些任何所提供的实施方案中,所述生物样品是组织样品并且所述组织是肿瘤。在一些实施方案中,所述组织样品是肿瘤活检。在一些任何所提供的实施方案中,所述生物样品是体液样品,并且所述体液样品是血液或血清样品。

[0021] 在所提供的任何实施方案中的一些实施方案中,在所述分离之前,将包含编码所述重组蛋白的转基因序列的多核苷酸引入细胞(例如细胞群的细胞)中以产生所述一个或多个细胞中的所述至少一个工程化细胞。

[0022] 在一些任何所提供的实施方案中,所述生物样品中的一个或多个细胞包含免疫细胞。在一些实施方案中,所述免疫细胞是T细胞或NK细胞。在一些实施方案中,所述T细胞是CD3⁺、CD4⁺和/或CD8⁺T细胞。

[0023] 在一些任何所提供的实施方案中,所述分离是通过脉冲场凝胶电泳或尺寸排阻色谱法进行的。在一些实施方案中,所述分离是通过脉冲场凝胶电泳进行的。

[0024] 本文还提供了用于评估转基因序列的基因组整合的方法。在一些任何实施方案中,所述方法涉及:(a)通过脉冲场凝胶电泳从分离自细胞群体的DNA分离大于或大于约10千碱基(kb)的脱氧核糖核酸(DNA)高分子量级分,所述细胞群体包含多个工程化细胞,所述

多个工程化细胞各自包含或被怀疑包含转基因序列,所述转基因序列包含编码重组蛋白的核酸序列;和(b)确定所述高分子量级分中所述转基因序列在每个二倍体基因组或每个细胞中的平均或均值拷贝数,从而评估整合到所述细胞群体的所述多个工程化细胞的基因组中的转基因序列。

[0025] 本文还提供了用于评估转基因序列的基因组整合的方法。在一些任何实施方案中,所述方法涉及:(a)通过脉冲场凝胶电泳从分离自细胞群体的DNA分离大于或大于约10千碱基(kb)的脱氧核糖核酸(DNA)高分子量级分,所述细胞群体包含多个工程化细胞,所述多个工程化细胞各自包含或被怀疑包含转基因序列,所述转基因序列包含编码重组蛋白的核酸序列;和(b)从所述高分子量级分确定整合到所述细胞群体的所述多个工程化细胞的基因组中的所述转基因序列在每个二倍体基因组或每个细胞中的平均或均值拷贝数。

[0026] 本文提供了一种用于评估转基因序列的基因组整合的方法,所述方法包括:(a)通过脉冲场凝胶电泳从分离自细胞群体的DNA分离大于或大于约10千碱基(kb)的脱氧核糖核酸(DNA)高分子量级分,所述细胞群体包含多个工程化细胞,所述多个工程化细胞各自包含或被怀疑包含编码重组蛋白的转基因序列;和(b)确定整合到所述细胞群体的所述多个工程化细胞的基因组中的所述转基因序列在每个二倍体基因组或每个细胞中的平均或均值拷贝数。

[0027] 在一些任何所提供的实施方案中,在所述分离之前,已将包含编码所述重组蛋白的转基因序列的多核苷酸引入细胞(例如细胞群体的细胞)中以产生所述细胞群体的所述多个工程化细胞中的至少一个。在一些任何所提供的实施方案中,在向所述至少一个工程化细胞中引入包含所述转基因序列的所述多核苷酸后,所述细胞群体尚未在高于25℃、任选地为或约37℃±2℃的温度下孵育超过96小时。在一些任何所提供的实施方案中,在向所述至少一个工程化细胞中引入包含所述转基因序列的所述多核苷酸后,所述细胞群体尚未在高于25℃、任选地为或约37℃±2℃的温度下孵育超过72小时。在一些任何所提供的实施方案中,在向所述至少一个工程化细胞中引入包含所述转基因序列的所述多核苷酸后,所述细胞群体尚未在高于25℃、任选地为或约37℃±2℃的温度下孵育超过48小时。在一些任何所提供的实施方案中,所述细胞群体在分离所述DNA高分子量级分之前一直冷冻保存。

[0028] 在一些任何所提供的实施方案中,所述高分子量级分具有大于或大于约15千碱基(kb)。在一些任何所提供的实施方案中,所述高分子量级分具有大于或大于约17.5千碱基(kb)。在一些任何所提供的实施方案中,所述高分子量级分具有大于或大于约20千碱基(kb)。

[0029] 在一些任何实施方案中,所述转基因序列包含与编码重组蛋白的核酸序列连接的调节元件。

[0030] 在一些任何所提供的实施方案中,确定所述转基因序列的存在、不存在或量是通过聚合酶链反应(PCR)进行的。在一些任何所提供的实施方案中,所述PCR是定量聚合酶链反应(qPCR)、数字PCR或微滴式数字PCR。在一些任何所提供的实施方案中,所述PCR是微滴式数字PCR。在一些任何所提供的实施方案中,所述PCR是使用一种或多种引物进行的,所述一种或多种引物与所述转基因序列的至少一部分互补或能够将其特异性地扩增。在一些任何实施方案中,所述一种或多种引物与所述调节元件的序列互补或能够将其特异性地扩增。

[0031] 在一些任何所提供的实施方案中,确定所述转基因序列的量包括评估分离自所述一个或多个细胞的每一质量或重量的DNA中、任选分离自所述一个或多个细胞的每微克的DNA中所述转基因序列的质量、重量或拷贝数。在一些任何所提供的实施方案中,确定所述转基因序列的量包括评估分离自一个或多个细胞的每微克的DNA中转基因序列的质量或重量,以微克计。在一些任何所提供的实施方案中,确定所述转基因序列的量包括评估每个所述一个或多个细胞中、任选每个CD3⁺、CD4⁺和/或CD8⁺细胞中和/或每个表达所述重组蛋白的细胞中所述转基因序列的质量、重量或拷贝数。

[0032] 在一些任何所提供的实施方案中,确定所述转基因序列的存在、不存在或量包括评估所述生物样品中的每个二倍体基因组或每个细胞中所述转基因序列的质量、重量或拷贝数。在一些任何所提供的实施方案中,所述拷贝数是所述生物样品中的所述一个或多个细胞中每个二倍体基因组或每个细胞中的平均或均值拷贝数。

[0033] 在一些任何所提供的实施方案中,确定所述转基因序列的量包括评估每一体积的所述生物样品、任选每一微升或每一毫升的所述生物样品中所述转基因序列的质量、重量或拷贝数。在一些任何所提供的实施方案中,确定所述转基因序列的量包括评估每一受试者体重或体表面积中所述转基因序列的质量、重量或拷贝数。在一些任何所提供的实施方案中,确定所述转基因序列的量包括评估高分子量级分中所述转基因序列的质量、重量或拷贝数,并将所述质量、重量或拷贝数针对所述高分子量级分中的参考基因的质量、重量或拷贝数或针对标准曲线归一化。在一些任何所提供的实施方案中,所述参考基因是管家基因。在一些任何所提供的实施方案中,所述参考基因是编码白蛋白 (ALB) 的基因。在一些任何所提供的实施方案中,所述参考基因是编码核糖核酸酶P蛋白亚基p30 (RPP30) 的基因。在一些任何所提供的实施方案中,所分离的DNA中参考基因的拷贝数是通过PCR使用一种或多种引物进行的,所述一种或多种引物与所述参考基因的至少一部分互补或能够将其特异性地扩增。

[0034] 在一些任何所提供的实施方案中,所述转基因序列不编码完整的病毒gag蛋白。在一些任何所提供的实施方案中,所述转基因序列不包含完整的HIV基因组、有复制能力的病毒基因组和/或附属基因,所述附属基因任选地是Nef、Vpu、Vif、Vpr和/或Vpx。

[0035] 在一些任何所提供的实施方案中,所述多核苷酸的引入是通过用包含所述多核苷酸的病毒载体转导进行的。在一些任何所提供的实施方案中,所述病毒载体是逆转录病毒载体或 γ 逆转录病毒载体。在一些任何所提供的实施方案中,所述病毒载体是慢病毒载体。在一些实施方案中,所述病毒载体是AAV载体,其任选地选自AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7或AAV8载体。

[0036] 在一些任何所提供的实施方案中,所述多核苷酸的引入是通过物理递送方法、任选地通过电穿孔进行的。

[0037] 在一些任何所提供的实施方案中,所述重组蛋白是重组受体。在一些任何所提供的实施方案中,所述重组受体特异性地结合至与疾病或病症相关的抗原或在与疾病或病症相关的病灶环境的细胞中表达的抗原。在一些任何所提供的实施方案中,所述疾病或病症是癌症。在一些任何所提供的实施方案中,所述抗原选自 α v β 6整合素 (α v β 6整合素)、B细胞成熟抗原 (BCMA)、B7-H3、B7-H6、碳酸酐酶9 (CA9,也称为CAIX或G250)、癌症-睾丸抗原、癌症/睾丸抗原1B (CTAG,也称为NY-ESO-1和LAGE-2)、癌胚抗原 (CEA)、细胞周期蛋白、细胞周

期蛋白A2、C-C基序趋化因子配体1 (CCL-1)、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD123、CD133、CD138、CD171、硫酸软骨素蛋白聚糖4 (CSPG4)、表皮生长因子蛋白 (EGFR)、表皮生长因子受体III型突变体 (EGFR vIII)、上皮糖蛋白2 (EPG-2)、上皮糖蛋白40 (EPG-40)、肝配蛋白B2、肝配蛋白受体A2 (EPHa2)、雌激素受体、Fc受体样蛋白5 (FCRL5; 也称为Fc受体同源物5或FCRH5)、胎儿乙酰胆碱受体 (胎儿AChR)、叶酸结合蛋白 (FBP)、叶酸受体 α 、神经节苷脂GD2、O-乙酰化GD2 (OGD2)、神经节苷脂GD3、糖蛋白100 (gp100)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 (GPC3)、G蛋白偶联受体C5家族成员D (GPRC5D)、Her2/neu (受体酪氨酸激酶erb-B2)、Her3 (erb-B3)、Her4 (erb-B4)、erbB二聚体、人高分子量黑色素瘤相关抗原 (HMW-MAA)、乙型肝炎表面抗原、人白细胞抗原A1 (HLA-A1)、人白细胞抗原A2 (HLA-A2)、IL-22受体 α (IL-22R α)、IL-13受体 α 2 (IL-13R α 2)、激酶插入结构域受体 (kdr)、 κ 轻链、L1细胞粘附分子 (L1-CAM)、L1-CAM的CE7表位、含有富亮氨酸重复序列的蛋白8家族成员A (LRRC8A)、路易斯Y、黑色素瘤相关抗原 (MAGE) -A1、MAGE-A3、MAGE-A6、MAGE-A10、间皮素 (MSLN)、c-Met、鼠类巨细胞病毒 (CMV)、粘蛋白1 (MUC1)、MUC16、自然杀伤细胞2族成员D (NKG2D) 配体、黑色素A (MART-1)、神经细胞粘附分子 (NCAM)、癌胚胎抗原、黑色素瘤优先表达抗原 (PRAME)、孕酮受体、前列腺特异性抗原、前列腺干细胞抗原 (PSCA)、前列腺特异性膜抗原 (PSMA)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR1)、存活蛋白、滋养层糖蛋白 (TPBG, 也称为5T4)、肿瘤相关糖蛋白72 (TAG72)、酪氨酸酶相关蛋白1 (TRP1, 也称为TYRP1或gp75)、酪氨酸酶相关蛋白2 (TRP2, 也称为多巴色素互变异构酶、多巴色素 δ 异构酶或DCT)、血管内皮生长因子受体 (VEGFR)、血管内皮生长因子受体2 (VEGFR2)、Wilms肿瘤1 (WT-1)、病原体特有的或病原体表达的抗原、或与通用标签相关的抗原、和/或生物素化分子、和/或由HIV、HCV、HBV或其他病原体表达的分子。在一些任何所提供的实施方案中,所述重组受体是重组T细胞受体 (TCR) 或功能性非T细胞受体。

[0038] 在一些任何所提供的实施方案中,所述重组受体是嵌合抗原受体 (CAR)。在一些任何所提供的实施方案中,所述CAR包含与所述抗原特异性结合的细胞外抗原识别结构域和包含ITAM的细胞内信号传导结构域。在一些任何所提供的实施方案中,包含ITAM的细胞内信号传导结构域包含CD3- ζ (CD3 ζ) 链、任选人CD3- ζ 链的细胞内结构域。在一些任何所提供的实施方案中,所述细胞内信号传导结构域进一步包含共刺激信号传导区。在一些实施方案中,所述共刺激信号传导区包含CD28或4-1BB、任选人CD28或人4-1BB的信号传导结构域。

[0039] 本文提供了一种用于评估残留的非整合转基因序列的方法,所述方法包括:(a) 进行根据所提供的实施方案中任一项所述的方法,以确定所述DNA高分子量级分中所述转基因序列的存在、不存在或量,从而评估转基因序列的基因组整合;(b) 确定在不分离所述高分子量级分的情况下在所分离的DNA中所述转基因序列的存在、不存在或量;和(c) 比较(a) 中确定的量与(b) 中确定的量,从而确定残留的非整合重组序列的量。

[0040] 在一些任何所提供的实施方案中,确定所述转基因序列的存在、不存在或量包括确定所述一个或多个细胞中的每个二倍体基因组或每个细胞中所述转基因序列的质量、重量或拷贝数。在一些任何所提供的实施方案中,所述一个或多个细胞包含细胞群体,其中所述群体的多个细胞包含编码所述重组蛋白的转基因序列。在一些任何所提供的实施方案中,所述一个或多个细胞包含细胞群体,其中所述群体的多个细胞被怀疑包含编码所述重组蛋白的转基因序列。在一些任何所提供的实施方案中,所述拷贝数是所述细胞群体中的

每个二倍体基因组或每个细胞中的平均或均值拷贝数。

[0041] 在一些任何所提供的实施方案中,比较所述量包括从(b)中确定的拷贝数减去(a)中确定的拷贝数。在一些任何所提供的实施方案中,比较所述量包括确定在(a)中确定的拷贝数与在(b)中确定的拷贝数的比率。

[0042] 在一些任何所提供的实施方案中,(b)中所述的确定所述存在、不存在或量是通过聚合酶链反应(PCR)进行的。在一些任何所提供的实施方案中,所述PCR是定量聚合酶链反应(qPCR)、数字PCR或微滴式数字PCR。在一些任何所提供的实施方案中,所述PCR是微滴式数字PCR。在一些任何所提供的实施方案中,所述PCR是使用一种或多种引物进行的,所述一种或多种引物与所述转基因序列的至少一部分互补或能够将其特异性地扩增。

[0043] 在一些任何所提供的实施方案中,(b)中所述的确定所述存在、不存在或量包括评估在不分离所述高分子量级分的情况下在所分离的DNA中所述转基因序列的质量、重量或拷贝数,并将所述质量、重量或拷贝数针对在不分离所述高分子量级分的情况下在所分离的DNA中的参考基因的质量、重量或拷贝数或针对标准曲线归一化。在一些任何所提供的实施方案中,所述参考基因是管家基因。在一些任何所提供的实施方案中,所述参考基因是编码白蛋白(ALB)的基因。在一些任何所提供的实施方案中,所述参考基因是编码核糖核酸酶P蛋白亚基p30(RPP30)的基因。

[0044] 在一些任何所提供的实施方案中,确定所分离的DNA中参考基因的质量、重量或拷贝数是通过PCR使用一种或多种引物进行的,所述一种或多种引物与所述参考基因的至少一部分互补或能够将其特异性地扩增。

[0045] 在一些任何所提供的实施方案中,(a)中所述的确定所述存在、不存在或量和(b)中所述的确定所述存在、不存在或量是通过聚合酶链反应(PCR)使用相同引物或相同引物组进行的。

[0046] 在一些任何所提供的实施方案中,所述残留的非整合重组序列包含载体质粒、线性互补DNA(cDNA)、自我整合序列(autointegrant)或长末端重复序列(LTR)环中的一种或多种。

附图说明

[0047] 图1显示了在通过脉冲场凝胶电泳(PFGE)分离高于15kb、17.5kb或20kb的阈值的高分子量DNA级分之前(凝胶前;标准载体拷贝数(VCN)测定)或之后(整合载体拷贝数(iVCN)测定)如通过微滴式数字PCR(ddPCR)评估的拷贝数。使用特异性扩增一部分整合转基因序列(“转基因”)、包装质粒(编码水疱性口炎印第安纳病毒G蛋白(“VSVg”)的病毒包装质粒)或基因组对照(编码核糖核酸酶P蛋白亚基p30(“RPP30”)的基因)的引物评估拷贝数。在来自转导细胞的样品中或在未转导的对照、加标CAR质粒和VSVg质粒中进行评估。将每个基因的拷贝数针对二倍体基因组数量(cp/二倍体基因组;使用对于白蛋白基因具有特异性的引物作为参考)或每50ng的基因组DNA进行归一化。

[0048] 图2A-图2B描绘了对于用含有编码CAR的转基因序列的慢病毒制剂转导的Jurkat T细胞(图2A)或分离自人受试者的原代T细胞(图2B),如通过标准载体拷贝数(VCN)测定(未经受PFGE的基因组DNA样品,含有高分子量和低分子量DNA二者)和整合载体拷贝数(iVCN)测定(在PFGE后的高分子量DNA样品中)评估的在不同时间点(在转导前(“之前”),在转导后

5分钟、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时和96小时,或在工程化过程完成时即“完成”)的转基因序列拷贝数。将每个基因的拷贝数针对二倍体基因组数量进行归一化(cp/二倍体基因组;使用对于白蛋白基因具有特异性的引物作为参考)。

[0049] 图3A显示了在使用来自两个不同的人受试者(供体A和供体B)的原代T细胞的示例性非扩增T细胞组合物制造过程的第3、4或5天评估的整合拷贝数,所述原代T细胞是在转导后通过与以下的孵育在无血清或生长因子的基础培养基(“基础”)或含有IL-2、IL-5和IL-15的无血清培养基(“完全”)中孵育而被刺激的:(1)抗CD3/抗CD28抗体缀合顺磁珠(“珠”)、(2)浓度为 $4.0\mu\text{g}/10^6$ 个细胞的抗CD3/抗CD28 Fab缀合寡聚体链霉亲和素突变蛋白质试剂、或(3)浓度为 $0.8\mu\text{g}/10^6$ 个细胞的抗CD3/抗CD28 Fab缀合寡聚体链霉亲和素突变蛋白质试剂。图3B描绘了如通过iVCN确定的拷贝数与CAR表达细胞的百分比(如通过流式细胞术所得的CD3+细胞中CD3+/激活的Cas3-/CAR+细胞的百分比所确定)之间的相关性。

[0050] 图4A-图4E描绘了在使用如表E1所示的不同刺激试剂和收集时间的不同示例性扩增或非扩增T细胞组合物制造过程中,如通过标准VCN(未使用PFGE)和iVCN(使用PFGE)所评估的每个二倍体基因组中的拷贝数(图4A)、整合转基因的分数(图4B)、非整合转基因的分数(图4C)、每个二倍体基因组中的非整合转基因拷贝数(图4D)和每个CAR+细胞中的整合拷贝数(图4E)。

[0051] 图5描绘了在用于将来自不同供体的原代T细胞工程化为表达嵌合抗原受体(CAR)的示例性工程化过程中的各个时间点期间,如通过标准VCN(未使用PFGE)和iVCN(使用PFGE)所评估的每个二倍体基因组中的拷贝数、非整合转基因拷贝数、非整合转基因的分数和整合转基因的分数。评估的时间点包括扩增过程的第0天至第8天,包括在解冻材料时(TMAT;第0天)、在激活时(AMAT;第1天)、在转导时(XMAT;第2天)或在开始培育后的不同时间(inoc+1至inoc+6;表示过程的第3-8天)。

[0052] 图6显示了在转导后12、24、48或72小时,在HT1080人成纤维细胞细胞系中,如通过标准VCN(未使用PFGE)和iVCN(使用PFGE)所评估的每个细胞的每个二倍体基因组中的拷贝数。

[0053] 图7A显示了在使用扩增过程(○)或非扩增过程(●)由已被工程化为表达CAR的来自不同人供体的原代T细胞产生的细胞组合物中,如通过标准VCN(未使用PFGE)和iVCN(使用PFGE)所评估的总细胞中每个细胞中的拷贝数之间的关系。图7B-图7C显示了如通过标准VCN(图7B)或iVCN(图7C)所评估的细胞组合物中每个细胞中的拷贝数之间的关系以及如通过流式细胞术评估的活CD45+细胞中表达CAR的CD3+细胞(CD3+CAR+%)的百分比所指示的CAR表面表达。

具体实施方式

[0054] 本文提供了用于评估整合到基因工程化细胞的基因组中的核酸序列的整合的方法。在一些方面,所述方法用于确定核酸序列(如用于细胞的基因工程化的转基因序列)的存在、不存在和/或量。在一些方面,所述方法可以用于评估在细胞(如用于细胞疗法的基因工程化细胞)的基因组中的转基因序列整合。在一些方面,通过引入含有待整合到细胞的基因组中的核酸序列(如编码重组蛋白的转基因序列)的多核苷酸,将所述细胞进行基因工程化以表达重组蛋白,如重组受体。在一些方面,所提供的方法可以用于评估整合,以及区分

和/或确定整合核酸和非整合残留核酸的存在、不存在或量。

[0055] 在一些方面,将含有编码重组蛋白的转基因序列的多核苷酸使用各种递送方法(如病毒转导或物理递送方法(如电穿孔))引入细胞中。在一些实施方案中,需要监测或评估所述工程化细胞(如用于过继细胞疗法的工程化细胞)的各种特征和特点,如确定由转基因序列编码的重组蛋白的表达水平,和/或确定整合到细胞的基因组中(如稳定地整合到细胞的基因组中)的转基因序列的拷贝数。在一些实施方案中,需要监测所述工程化细胞的非整合残留核酸的存在、不存在和/或量。在一些方面,这种评估可以在所述工程化或制造过程期间的一个或多个时间点进行。特别是对于用于细胞疗法(如过继细胞疗法)的工程化细胞和细胞组合物,高效且准确地确定转基因序列的存在、不存在、量、拷贝数和/或表达对于以下是关键的:确保所述工程化细胞的适当和准确的表征和定义、准确地确定给药以及确保当施用于受试者时所述细胞组合物的功效和安全性。需要改善的方法来满足对于高效且准确地评估整合核酸和非整合残留核酸的存在、不存在、量、拷贝数和/或表达的此类要求。

[0056] 在一些情况下,所述评估可能需要在工程化或制造过程的早期阶段期间和/或在缩短或简略的制造过程期间以及时和可靠的方式进行。示例性的缩短或简略的制造过程包括非扩增制造过程,例如不包括用于转导后扩增细胞的孵育或包括转导后扩增细胞的更短或更简略的孵育的过程。在一些方面,某些缩短或简略的过程可以涉及在基本上不扩增细胞或仅最小限度地扩增细胞的条件下孵育细胞。在一些情况下,此类过程可以包括在引入重组或异源多核苷酸(如通过转导)后,将细胞在高于25℃、任选地为或约37℃±2℃的温度下孵育不超过96、72或48小时。

[0057] 在一些情况下,确定整合到细胞基因组中的转基因序列的存在、不存在和/或量可能是困难的,特别是在早期时间点或使用非扩增过程时这是困难的,所述非扩增过程例如以下过程,其具有在引入用于整合的核酸序列后的较短的孵育、培育或扩增时间段,或在评估工程化细胞的特征或特点之前或在冷冻保存之前的较短的孵育、培育或扩增时间段。在一些方面,在工程化或制造过程的早期阶段期间或在非扩增过程中从分离自细胞的DNA确定的存在、不存在或量可能由于存在于反应物或细胞中的核酸的非整合种类的存在而导致过高估计。在一些方面,所提供的实施方案允许在向受试者施用细胞之前明确地确定整合核酸的存在、不存在或量,以及在一些情况下明确地确定非整合残留核酸的存在、不存在或量。

[0058] 所提供的实施方案提供了对于高效且准确地评估所述工程化细胞或细胞组合物的要求的改善的解决方案。特别地,对于使用简略或非扩增过程工程化的细胞或在工程化过程的早期时间点需要改善的方法。在一些方面,所提供的实施方案是基于在本文中(例如在实施例3-5中)描述的观察结果,即包括从细胞分离所述DNA高分子量级分(例如大于约10千碱基(kb))和评估所述高分子量级分中转基因序列的存在、不存在或量的测定方法可以可靠地检测样品中的整合转基因序列。发现,含有与非整合残留序列分离的整合转基因序列的所提供的方法提供了优点,特别是在简略的非扩增过程中提供了优点。

[0059] 在一些方面,所提供的实施方案是基于以下方法,所述方法将可含有基因组DNA的大分子量或高分子量核酸分子与可含有非整合或残留的分子(如附加体质粒、自我整合序列或其他片段)的较小分子量或低分子量核酸分子分开或分离。在一些方面,所述高分子量核酸分子还包括已整合到基因组中的转基因序列。所提供的实施方案提供了以下优点,所

述优点可以用于区分整合序列(例如,整合到细胞的基因组中)与非整合残留序列,因此即使在早期制造阶段或在非扩增过程中,也允许准确且可靠地确定整合序列。

[0060] 在一些方面,所提供的方法允许高效且可靠地确定整合核酸的拷贝数,特别是在工程化或制造过程期间的早期时间点或者是对于非扩增的、缩短的或加快的工程化或制造过程高效且可靠地确定整合核酸的拷贝数,从而改善用于在细胞疗法中使用或施用的细胞的表征的准确性和可靠性。在一些方面,所提供的实施方案提供了以下优点,即在特定时间点(如在非扩增的、缩短的或加快的工程化或制造过程期间或结束时)准确确定整合拷贝数,而不包括非整合或残留的分子(如附加体质粒、自我整合序列或其他片段)的拷贝数。

[0061] 在一些方面,所提供的实施方案是基于以下观察结果,即分离级分后的高分子量级分中的拷贝数评估可以导致准确地确定稳定整合的转基因序列的拷贝数,特别是对于使用可能保留转基因序列的游离的非整合拷贝的非扩增过程产生的细胞。相比之下,在未区分整合转基因序列与非整合转基因序列的没有先前分离高分子量的情况下的拷贝数确定在准确地确定稳定整合的转基因序列的数量方面受到限制,尤其是在较短的非扩增过程期间和之后。如本文中(例如在实施例3-5中)所述,在简略的非扩增过程期间,未采用分离高分子量片段的方法(例如,称为载体拷贝数(VCN)测定)可能导致假阳性或整合转基因序列的过高估计,因为非整合残留种类(例如,附加体质粒、自我整合序列或其他片段)也可能被检测到并计数。本文提供的实施方案提供了多种优点,因为它们允许高效且准确的测定,而没有可由现有VCN测定导致的假阳性或过高估计。

[0062] 还提供了可用于执行所提供的方法的试剂盒和制品。

[0063] 本申请中提及的所有出版物(包括专利文献、科学文章和数据库)出于所有目的通过引用以其整体并入,其并入程度如同将每个单独出版物通过引用单独并入一般。如果本文所述的定义与通过引用并入本文的专利、申请、公开的申请和其他出版物中所述的定义相反或在其他方面不一致,则本文所述的定义优先于通过引用并入本文的定义。

[0064] 本文使用的章节标题仅用于组织目的,而不应解释为限制所描述的主题。

I. 用于评估整合核酸的方法

[0065] 本文提供了用于评估在细胞的基因工程化中使用的转基因序列(例如编码重组蛋白的转基因序列)的基因组整合(在一些情况下,可以称为整合载体拷贝数(iVCN)测定)的方法。在一些实施方案中,所述方法用于确定核酸序列(如编码重组蛋白(如重组受体)的转基因序列)的存在、不存在和/或量。在一些实施方案中,所述方法涉及确定整合到一个或多个细胞(例如,包含或被怀疑包含至少一个含有转基因序列的工程化细胞的一个或多个基因工程化细胞,所述转基因序列包含编码重组蛋白的核酸序列)的基因组中的转基因序列的存在、不存在或量。在一些方面,所提供的方法可以用于评估在细胞工程化过程之前、期间或之后的各个时间点的整合,所述细胞工程化过程例如用于引入含有可整合到细胞基因组中的转基因序列的多核苷酸的过程。在一些方面,所提供的方法还可以用于评估从已施用工程化细胞的受试者获得的生物样品,以检测或确定生物样品中转基因序列的存在、不存在和/或量。

[0066] 在一些方面,所提供的方法可以用于评估整合以及区分和/或确定整合核酸和/或非整合残留核酸(如载体质粒、线性互补DNA(cDNA)、自我整合序列或长末端重复序列(LTR)环中的一种或多种)的存在、不存在和/或量。在一些方面,所提供的实施方案包括用于评估

来自受试者的生物样品中转基因序列的存在、不存在、拷贝数的方法,所述方法涉及从来自受试者(如已施用工程化细胞的受试者)的生物样品分离脱氧核糖核酸(DNA)。

[0067] 在一些实施方案中,提供了用于评估转基因序列的基因组整合的方法,所述方法涉及从分离自一个或多个细胞的DNA分离脱氧核糖核酸(DNA)的高分子量级分,如大于或大于约10千碱基(kb)的DNA种类。在一些方面,这种分离可以通过诸如脉冲场凝胶电泳(PFGE)的方法进行。在一些方面,所述一个或多个细胞含有或被怀疑含有至少一个工程化细胞,所述至少一个工程化细胞包含编码重组蛋白的转基因序列。在一些方面,所述转基因序列整合到或将要整合到细胞的基因组中。在一些实施方案中,所述转基因序列包含编码所述重组蛋白的核酸序列和其他组分或元件,包括调节元件(例如启动子、转录和/或转录后调节元件或反应元件)或标记(例如替代标记)。在一些方面,所述方法涉及确定整合到所述一个或多个细胞的基因组中的转基因序列的存在、不存在或量,例如通过定量方法(如定量聚合酶链反应(qPCR)、数字PCR(dPCR)或微滴式数字PCR(ddPCR))来确定。

[0068] 在一些实施方案中,提供了用于评估转基因序列的基因组整合的方法,所述方法涉及:通过脉冲场凝胶电泳从分离自细胞群体的DNA分离大于或大于约10千碱基(kb)的脱氧核糖核酸(DNA)高分子量级分,所述细胞群体包含多个工程化细胞,所述多个工程化细胞各自包含或被怀疑包含编码重组蛋白的转基因序列;和确定整合到所述细胞群体的所述多个工程化细胞的基因组中的所述转基因序列在每个二倍体基因组中的平均或均值拷贝数。

[0069] 在一些实施方案中,在所述分离之前,已将包含编码所述重组蛋白的转基因序列的多核苷酸引入所述细胞群体的所述多个工程化细胞中的至少一个中。

[0070] 在一些方面,所提供的方法涉及将特定级分(如高分子量级分)与存在于来自工程化细胞的分离的总DNA中的其他DNA分子或种类分离。在一些方面,所述方法涉及分离高分子量级分,如含有大小为约10千碱基(kb)或更大的DNA。在一些方面,所述分离步骤是使用基于大小或分子量分离核酸的方法(如基于电泳的方法)来进行的。在一些方面,所述方法还涉及从所述一个或多个细胞分离DNA,然后将所述高分子量级分从所分离的DNA分离。

[0071] 在一些方面,所述方法涉及确定整合到所述一个或多个细胞的基因组中的转基因序列的存在、不存在或量。在一些方面,所述方法涉及确定一个或多个所分离的级分中(如在所述高分子量级分中)转基因序列的存在、不存在和/或量。在一些方面,所述方法涉及确定所述高分子量级分中转基因序列的存在、不存在和/或量。在一些方面,所述方法涉及从所述高分子量级分确定整合到所述一个或多个细胞的基因组中的转基因序列的存在、不存在或量。在一些方面,所述确定可以是基于检测和/或定量核酸序列的方法,如定量聚合酶链反应(qPCR)或相关方法。在一些方面,所提供的方法允许区分整合转基因序列与可能存在于细胞中或附近和/或分析样品中的非整合转基因序列。

[0072] 在一些实施方案中,所述方法涉及从细胞分离脱氧核糖核酸(DNA),所述细胞已在用于整合到细胞基因组中的条件下引入了包含转基因序列的多核苷酸;以及从所分离的DNA分离大于或大于约10千碱基(kb)的高分子量级分。在一些实施方案中,所述方法涉及从分离自细胞的脱氧核糖核酸(DNA)分离大于或大于约10千碱基(kb)的高分子量级分,其中在所述分离之前,所述细胞已在用于将转基因序列整合到细胞基因组中的条件下引入了包含所述转基因序列的多核苷酸。在一些方面,所提供的方法涉及确定所分离的高分子量级分中转基因序列的存在、不存在或量。

[0073] 在一些方面,还提供了用于确定来自受试者的生物样品中转基因序列的存在、不存在或量的方法,所述方法涉及从来自受试者的生物样品分离脱氧核糖核酸(DNA);从所分离的DNA分离大于或大于约10千碱基(kb)的高分子量级分;以及确定所述高分子量级分中转基因序列的存在、不存在或量。在一些方面,所述生物样品是从受试者获得的,所述受试者已被施用包含所述转基因序列的工程化细胞。

[0074] 在一些方面,还提供了用于评估残留的非整合转基因序列的方法。在一些实施方案中,所述方法涉及进行所述方法中任一种的步骤,包括从细胞分离脱氧核糖核酸(DNA),所述细胞已在用于整合到细胞基因组中的条件下引入了包含转基因序列的多核苷酸;以及从所分离的DNA分离大于或大于约10千碱基(kb)的高分子量级分;确定所述高分子量级分中转基因序列的拷贝数,从而评估转基因序列的基因组整合。

[0075] 在一些方面,所述方法还涉及确定在不分离所述高分子量级分的情况下在所分离的DNA中的转基因序列的拷贝数,从而确定转基因序列的总拷贝数。在一些方面,所述方法涉及通过以下方法来确定残留的非整合转基因序列的拷贝数:从通过评估总分离的DNA(如未分离级分)确定的拷贝数减去通过评估所述高分子量级分确定的拷贝数。在一些方面,所述方法涉及通过以下方法来确定残留的非整合转基因序列的比例:通过评估所述高分子量级分确定的拷贝数除以通过评估总分离的DNA(如未分离级分)确定的拷贝数。在一些实施方案中,所述残留的非整合转基因序列包含载体质粒、线性互补DNA(cDNA)、自我整合序列或长末端重复序列(LTR)环中的一种或多种。

A. 分离高分子量级分

[0076] 在一些方面,所提供的实施方案涉及基于核酸的分子量或大小来分离核酸,如从工程化细胞获得的脱氧核糖核酸(DNA)。在一些方面,所述方法还包括分开或分离落入一定大小或分子量范围内的DNA分子。在一些方面,特定类型的整合转基因序列或非整合转基因序列可以具有典型的大小或分子量范围。在一些方面,特定的大小或分子量范围可以用于分开或分离具有此范围内的大小或分子量的DNA分子。在一些方面,所述转基因序列的存在、不存在或量在特定的大小或分子量范围内。

[0077] 在一些实施方案中,分开或分离例如含有大于阈值或在一定大小或分子量范围内的DNA分子的高分子量级分。在一些实施方案中,所述高分子量级分主要含有大DNA分子(如染色体或基因组DNA)并且含有少量或几乎没有小于大小阈值的分子,如质粒、非整合DNA片段、线性互补DNA(cDNA)、自我整合序列、长末端重复序列(LTR)环或尚未整合到基因组中的其他残留种类或分子。在一些实施方案中,所述高分子量级分主要含有大DNA分子(如染色体或基因组DNA)并且不含小于大小阈值的分子,如质粒、非整合DNA片段、线性互补DNA(cDNA)、自我整合序列、长末端重复序列(LTR)环或尚未整合到基因组中的其他残留种类或分子。在一些实施方案中,通过确定所述高分子量级分中转基因序列的存在、不存在或量,所检测到的转基因序列表示已整合到工程化细胞的基因组中的那些,并且最小限度地检测到非整合转基因序列。

[0078] 在一些实施方案中,所述高分子量级分包含大小大于或大于约10千碱基(kb)的DNA分子。在一些实施方案中,所述高分子量级分包含大小大于或大于约10、11、12、12.5、13、14、15、16、17、17.5、18、19、20、25或30千碱基(kb)或更大的DNA分子。在一些实施方案中,所述高分子量级分包含大小大于或大于约10、12.5、15、17.5或20千碱基(kb)或更大的

DNA分子。在一些方面,所述高分子量级分含有基因组DNA或基因组DNA片段,并且排除或分离可能存在于DNA样品中的非整合或残留的核酸种类。在一些方面,所述高分子量级分例如高于阈值(如约10、11、12、12.5、13、14、15、16、17、17.5、18、19、20、25或30千碱基(kb)或更大)的DNA样品。在一些实施方案中,所述阈值大于或大于约10、12.5、15、17.5或20千碱基(kb)或更大。在一些实施方案中,所述高分子量级分具有大于或大于约15千碱基(kb)。在一些实施方案中,所述高分子量级分具有大于或大于约17.5千碱基(kb)。在一些实施方案中,所述高分子量级分具有大于或大于约20千碱基(kb)。

[0079] 在一些方面,所述阈值是所引入的多核苷酸大小的约或为或高于1、1.5、2、2.5、3、3.5或4倍。例如,在一些方面,如果含有所述转基因序列的所引入的多核苷酸是为或约10kb,则所述阈值可以是为或高于20kb,即所引入的多核苷酸大小的约两倍。在一些方面,使用所述阈值来分离高分子量级分、可与所述高分子量种类分离的非整合序列(如线性互补DNA(cDNA)、自我整合序列、长末端重复序列(LTR)环或尚未整合到基因组中的其他残留的低分子量种类或分子)。

[0080] 在一些方面,所述高分子量级分主要含有如下DNA分子,所述DNA分子大于在完成所述转基因序列的整合之前或之后可存在于所述制造过程中和/或所述工程化细胞中的非整合和/或残留的DNA分子。在一些方面,通过确定所述高分子量级分中转基因序列的存在、不存在和/或量可以准确地确定整合序列的拷贝数,而不将含有所述转基因序列的非整合或残留的核酸分子的拷贝数包括在计数中。在一些情况下,将含有所述转基因序列的非整合或残留的核酸分子的拷贝数包含在内可能导致拷贝数的过高估计或不准确的确定。在一些方面,特别是在工程化或制造过程的早期阶段期间或在作为非扩增过程或缩短过程的过程中,非整合或残留的分子的存在可能影响所确定的拷贝数。

[0081] 在一些实施方案中,所述方法包括分开或分离例如含有小于阈值的DNA分子的低分子量级分。在一些实施方案中,所述低分子量级分可以含有小于大小阈值的DNA分子,如质粒、非整合DNA片段、线性互补DNA(cDNA)、自我整合序列、长末端重复序列(LTR)环或尚未整合到基因组中的其他残留种类或分子。在一些方面,可以确定所述低分子量级分中转基因序列的存在、不存在或量。在一些情况下,可能需要在制造或工程化的多个阶段确定未整合或残留的DNA分子的存在、不存在和/或量,如从而确定工程化的进展和/或评估残留的核酸(如用于将所述转基因序列引入细胞中的残留载体)的拷贝数。

[0082] 在一些实施方案中,所述低分子量级分包含大小小于或小于约20千碱基(kb)的DNA分子。在一些实施方案中,所述高分子量级分包含大小小于或小于约20、19、18、17.5、17、16、15、14、13、12.5、12、11或10千碱基(kb)或更小的DNA分子。

[0083] 在一些实施方案中,所述高分子量或低分子量级分可以使用基于电泳、微流体或色谱的方法来分开或分离。在一些实施方案中,所述高分子量级分可以使用脉冲场凝胶电泳(PFGE)或尺寸排阻色谱法来分开或分离。

[0084] 在一些实施方案中,使用脉冲场凝胶电泳(PFGE)分开或分离所述高分子量级分。在一些方面,PFGE涉及在电泳系统中引入交流电压梯度以提高较大核酸分子(如染色体或基因组DNA)的分辨率。在一些方面,所述电泳系统的电压在三个方向之间周期性地切换:一个通过凝胶的中心轴跑胶,并且两个以60度的角度在两侧跑胶。在一些方面,用于通过PFGE分开或分离核酸分子的示例性系统和方法包括在例如US 9599590、US 2017/0240882或US

2017/0254774中描述的那些。

[0085] 在一些实施方案中,使用基于电泳的方法分开或分离所述高分子量级分。在一些方面,电泳依据电荷和/或大小经由在存在电场的情况下通过分离基质的迁移率分离生物分子。在一些实施方案中,电泳系统可以用于基于大小或分子量来分级分馏、分析和收集特定分析物,包括核酸分子。在一些方面,级分是或包括所述多个分子的子集。在一些方面,可以通过大小或分子量来定义或确定级分,或者在一些方面通过任何如下物理特性来定义或确定级分,当由电场力驱动其迁移通过本发明的缓冲液组合物时,所述物理特性使其以比多个其他分子或级分更快或更慢的速率(即,电泳迁移率)迁移。

[0086] 在一些方面,所述电泳(如PFGE)可以使用设备或系统来进行。在一些方面,所述设备或系统是自动化系统或高通量系统。用于进行PFGE的示例性系统包括例如US 9599590、US 2017/0240882或US 2017/0254774中所述的那些,或可商购的设备或系统,如Pippin Prep、Blue Pippin或Pippin HT (Sage Science);CHEF Mapper® XA系统、CHEF-DR® III变角度系统、CHEF-DR II系统 (Bio-Rad);和Biometra Rotaphor 8系统 (Analytik Jena AG)。

[0087] 在一些方面,用于评估的示例性样品包括核酸、寡核苷酸、DNA分子、RNA分子或其任何组合。在一些方面,所述样品可以包括氨基酸、肽、蛋白质或其任何组合。在一些方面,所述样品可以是全细胞裂解物或细胞裂解物(如工程化用于过继细胞疗法的细胞的裂解物)的DNA或蛋白质级分。

[0088] 在一些方面,所提供的实施方案涉及从细胞(如工程化用于过继细胞疗法的细胞)分离、分开和分析核酸分子。在一些方面,所提供的实施方案涉及从正在经历基因工程化或制造过程的各个阶段或步骤的细胞分离、分开和分析核酸分子。在一些方面,核酸分子包括呈单链形式或双链螺旋的核糖核苷(腺苷、鸟苷、尿苷或胞苷;“RNA”)或脱氧核糖核苷(脱氧腺苷、脱氧鸟苷、脱氧胸苷或脱氧胞苷;“DNA”)的磷酸酯聚合体形式或其任何磷酸酯类似物,如硫代磷酸酯和硫代酸酯。在一些方面,核酸分子、并且特别是DNA或RNA分子仅指分子的一级和二级结构,而不将其限制为任何特定的三级形式。在一些方面,所述核酸分子可以包括以线性或环状DNA分子(例如限制性片段)发现的双链DNA、质粒和染色体。

[0089] 在一些实施方案中,来自样品的核酸可以包括基因组DNA、双链DNA(dsDNA)、单链DNA(ssDNA)、编码DNA(或互补DNA、cDNA)、信使RNA(mRNA)、短干扰RNA(siRNA)、短发夹RNA(shRNA)、微小RNA(miRNA)、单链RNA、双链RNA(dsRNA)、吗啉代、RNA干扰(RNAi)分子、线粒体核酸、叶绿体核酸、病毒DNA、病毒RNA和其他具有单独遗传物质的细胞器。在一些方面,来自样品的核酸还可以包括含有经修饰的、合成的或非天然存在的核苷酸或结构元件的核酸类似物或者其他替代/经修饰的核酸化学物质(如碱基类似物(如肌苷)、嵌入剂(美国专利号4,835,263)和小沟结合剂(美国专利号5,801,115))。

[0090] 在一些实施方案中,在分离或分开高分子量或低分子量级分之前,可以将样品与如下试剂组合,所述试剂在电泳系统中评估之前赋予净负电荷、使肽或蛋白质变性或消化DNA或RNA分子。在一些方面,出于检测的目的,可以将样品与赋予样品或其级分荧光、磁性或放射性特性的药剂组合。在一些例子中,将dsDNA样品与溴化乙锭混合,施加至电泳盒,并且使用超亮绿色LED检测样品的级分。

[0091] 在一些方面,用于分开或分离核酸样品的系统(如电泳系统)可以是自动化的和/

或高通量的。在一些方面,所述电泳系统可以利用一次性消耗品或试剂,如电泳盒。

B. 确定核酸的存在、不存在或量

[0092] 在一些方面,所述方法涉及确定样品(如含有来自一个或多个细胞(如包含工程化细胞的细胞群体)的脱氧核糖核酸(DNA)的样品)中转基因序列的存在、不存在或量。在一些方面,所述方法涉及确定样品(如含有来自正在经历基因工程化或制造的一个或多个阶段或步骤的一个或多个细胞的DNA的样品)中转基因序列的存在、不存在或量。在一些方面,确定所述转基因序列的存在、不存在或量可以使用用于确定核酸序列(例如,特定DNA序列)的存在、不存在或量的方法来进行。特别地,用于定量核酸序列的方法(如定量聚合酶链反应(qPCR)或相关方法)可以用于确定含有DNA的样品中或从含有DNA的样品分开或分离的特定级分(如高分子量级分)中的转基因序列的拷贝数。在一些实施方案中,确定所述转基因序列的存在、不存在或量包括例如使用以下描述的用于定量核酸分子的任何一种示例性测定来确定拷贝数。

[0093] 在一些方面,可以使用探针或引物检测特定序列的存在、不存在和/或量,所述探针或引物可以特异性地结合或识别所述转基因序列的全部或一部分。在一些实施方案中,可以使用探针或引物序列来确定拷贝数,所述探针可以特异性地检测所述转基因序列的一部分,所述引物序列可以特异性地扩增所述转基因序列的一部分。在一些方面,所述探针或引物序列可以特异性地检测、结合或识别所述转基因序列的一部分,如所述转基因序列中对细胞而言为异源的、外源的或转基因的部分。在一些方面,所述探针或引物序列可以特异性地检测、结合或识别所述转基因序列的一部分,如所述转基因序列中将要整合到或整合到细胞的基因组中的部分。在一些实施方案中,用于qPCR或其他基于核酸的方法的引物或探针结合、识别和/或扩增编码重组蛋白的核酸和/或所述质粒和/或载体的其他组分或元件具有特异性,所述其他组分或元件包括调节元件(例如启动子、转录和/或转录后调节元件或反应元件)或标记(例如替代标记)。在一些实施方案中,引物或探针可以与编码重组蛋白的核酸序列和/或其他组分或元件(如调节元件,包括转录后调节元件)结合。在一些任何实施方案中,所述一种或多种引物与调节元件的序列互补或能够将其特异性地扩增,所述调节元件例如与编码重组蛋白的核酸序列可操作地连接的调节元件。在一些方面,所述探针或引物可以用于确定转基因序列的存在、不存在和/或量(如定量PCR(qPCR)、数字PCR(dPCR)或微滴式数字PCR(ddPCR))的示例性方法。

[0094] 在一些方面,确定所述存在、不存在或量包括确定所述转基因序列的量,如确定在一个或多个细胞中或在含有一个或多个细胞的生物样品中所述转基因序列的质量、重量、浓度或拷贝数。在一些方面,确定核酸序列的存在、不存在或量或评估所述转基因序列的质量、重量、浓度或拷贝数可以在细胞群体的一部分或生物样品的一部分中进行,并且可以进行归一化、平均、和/或外推以确定整个样品或整个细胞群体中的存在、不存在或量。在一些方面,所述转基因序列的量可以包括所述转基因序列的质量、重量、浓度或拷贝数。在一些方面,所述质量、重量、浓度或拷贝数是平均质量、重量、浓度或拷贝数。在一些方面,所述质量、重量、浓度或拷贝数是每单位的(如每个细胞、每个二倍体基因组、每一体积、每一质量或其等同物,或以其他方式归一化、外推或平均为每单位的)平均质量、重量、浓度或拷贝数。

[0095] 在一些实施方案中,确定所述转基因序列的存在、不存在或量包括确定所述一个

或多个细胞中的每个二倍体基因组或每个细胞中所述转基因序列的质量、重量、浓度或拷贝数。在一些实施方案中,所述一个或多个细胞包含细胞群体,其中所述群体的多个细胞包含编码所述重组蛋白的转基因序列。在一些任何所提供的实施方案中,所述一个或多个细胞包含细胞群体,其中所述群体的多个细胞被怀疑包含所述转基因序列,所述转基因序列包含编码所述重组蛋白(例如,重组受体)的核酸序列。在一些实施方案中,所述拷贝数是所述细胞群体中的每个二倍体基因组或每个细胞中的平均或均值拷贝数。

[0096] 在一些方面,确定所述拷贝数包括确定存在于一个或多个细胞或生物样品中的转基因序列的拷贝数。在一些方面,所述拷贝数可以表示为平均或均值拷贝数。在一些方面,特定整合转基因的拷贝数包括每个细胞中的整合序列(含有转基因序列)的数量。在一些方面,特定整合转基因的拷贝数包括每个二倍体基因组中的整合序列(含有转基因序列)的数量。在一些方面,转基因序列的拷贝数表示为每个细胞中的整合转基因序列的数量。在一些方面,转基因序列的拷贝数表示为每个特定类型的细胞中(例如,每个表达特定表型标记的细胞中或每个表达由所引入的转基因编码的重组蛋白的细胞中)的整合转基因序列的数量。在一些方面,转基因序列的拷贝数表示为每个二倍体基因组中的整合转基因序列的数量。在一些方面,所述一个或多个细胞包含细胞群体,其中所述群体的多个细胞包含编码所述重组蛋白的转基因序列。在一些实施方案中,所述拷贝数是所述细胞群体中的每个二倍体基因组或每个细胞中的平均或均值拷贝数。

[0097] 在一些实施方案中,确定所述转基因序列的量包括评估分离自所述一个或多个细胞的每一质量或重量的DNA中的转基因序列的质量、重量、浓度或拷贝数。在一些方面,所述转基因序列的质量、重量、浓度或拷贝数以在分离自所述一个或多个细胞(例如,从受试者获得的生物样品中的一个或多个细胞或正在经历工程化过程的一个或多个细胞中)的每微克DNA中表示。在一些实施方案中,确定所述转基因序列的量包括评估分离自一个或多个细胞的每微克的DNA中转基因序列的质量或重量,以微克计。

[0098] 在一些实施方案中,确定所述转基因序列的量包括评估每个所述一个或多个细胞中、任选每个CD3⁺、CD4⁺和/或CD8⁺细胞中和/或每个表达所述重组蛋白的细胞中所述转基因序列的质量、重量、浓度或拷贝数。在一些实施方案中,确定所述转基因序列的量包括评估每个所述一个或多个细胞中、任选每个表达特定表型标记的细胞中(例如,任选每个CD3⁺、CD4⁺和/或CD8⁺细胞中)、每个活细胞、激活的半胱天冬酶阴性细胞(例如,aCas3⁻)或CD45⁺细胞中和/或每个表达重组蛋白的细胞中的转基因序列的质量、重量、浓度或拷贝数。在一些方面,可以使用基于细胞的方法(如通过流式细胞术或免疫染色)来确定在细胞上表达的表面标记或表型。在一些方面,可以使用基于细胞的方法(如通过流式细胞术或免疫染色)来确定表达重组蛋白的细胞。在一些方面,转基因序列的量可以针对特定细胞(如CD3⁺、CD4⁺和/或CD8⁺细胞)的数量来归一化,和/或按照表达重组蛋白的细胞或按照总细胞数(如按照样品中的总细胞数或按照正在经历工程化过程的总细胞数)来归一化。在一些方面,转基因序列的量可以针对特定细胞(如表达特定表型标记的细胞(例如CD3⁺、CD4⁺和/或CD8⁺细胞)、活细胞、激活的半胱天冬酶阴性细胞(例如,aCas3⁻)或CD45⁺细胞)的数量来归一化,和/或按照表达重组蛋白的细胞(例如,按照CAR表达细胞)或按照总细胞数(如按照样品中的总细胞数或按照正在经历工程化过程的总细胞数)来归一化。

[0099] 在一些实施方案中,确定所述转基因序列的存在、不存在或量包括评估生物样品

中的每个二倍体基因组或每个细胞中所述转基因序列的质量、重量、浓度或拷贝数。在一些实施方案中,所述拷贝数是所述生物样品中的所述一个或多个细胞中每个二倍体基因组或每个细胞中的平均或均值拷贝数。

[0100] 在一些实施方案中,确定所述转基因序列的量包括评估每一体积的所述生物样品、任选每一微升或每一毫升的所述生物样品中所述转基因序列的质量、重量、浓度或拷贝数。

[0101] 在一些实施方案中,确定所述转基因序列的量包括评估每一受试者体重或体表面积中所述转基因序列的质量、重量、浓度或拷贝数。

[0102] 在一些实施方案中,确定所述转基因序列的量包括评估所述高分子量级分中转基因序列的质量、重量、浓度或拷贝数,并将所述质量、重量、浓度或拷贝数针对所述高分子量级分中参考基因的质量、重量、浓度或拷贝数或者针对标准曲线(如基于含有已知量、浓度、质量、重量、浓度或拷贝数的转基因序列的样品的标准曲线)进行归一化。

[0103] 在一些实施方案中,所确定的拷贝数表示为归一化值。在一些实施方案中,将所确定的拷贝数量化为每个基因组或每个细胞中的转基因序列的拷贝数。在一些方面,每个基因组的值表示为每个二倍体基因组中的转基因序列的拷贝,因为典型的体细胞(如T细胞)含有二倍体基因组。在一些方面,所确定的拷贝数可以针对细胞的基因组中已知参考基因的拷贝数归一化。在一些方面,所述参考基因是RRP30(编码核糖核酸酶P蛋白亚基p30)、18S rRNA(18S核糖体RNA)、28S rRNA(28S核糖体RNA)、TUBA(α -微管蛋白)、ACTB(β -肌动蛋白)、 β 2M(β 2-微球蛋白)、ALB(白蛋白)、RPL32(核糖体蛋白L32)、TBP(TATA序列结合蛋白)、CYCC(亲环蛋白C)、EF1A(延长因子1 α)、GAPDH(甘油醛-3-磷酸脱氢酶)、HPRT(次黄嘌呤磷酸核糖转移酶)或RPII(RNA聚合酶II)。在一些实施方案中,将所确定的拷贝数量化为每微克DNA中的转基因序列的拷贝。

[0104] 在一些方面,所述拷贝数是来自多个细胞或细胞群体(如多个工程化细胞或工程化细胞群体)的平均、均值或中值拷贝数。在一些方面,所述拷贝数是来自多个细胞或细胞群体(如多个工程化细胞或工程化细胞群体)的平均或均值拷贝数。在一些方面,从多个细胞或细胞群体(如正在经历工程化或制造过程的一个或多个步骤的多个细胞或细胞群体)或在细胞组合物(如用于施用于受试者的细胞组合物)中确定平均或均值拷贝数。在一些方面,归一化的平均拷贝数被确定为例如针对参考基因(如在二倍体基因组中以两个拷贝存在的已知基因)归一化的转基因序列的平均或均值拷贝数。在一些方面,针对通常在每个二倍体基因组中以两个拷贝存在的参考基因的归一化可以对应于细胞(如二倍体细胞)中的拷贝数。因此,在一些方面,归一化的平均或均值拷贝数可以对应于多个细胞(例如,通常具有二倍体基因组的T细胞)或细胞群体中检测到的转基因序列的平均或均值拷贝数。

[0105] 在一些实施方案中,确定所述转基因序列的存在、不存在或量是通过聚合酶链反应(PCR)进行的。在一些实施方案中,所述PCR是定量聚合酶链反应(qPCR)、数字PCR或微滴式数字PCR,如下文中描述的任一种。在一些实施方案中,所述转基因序列的存在、不存在或量通过微滴式数字PCR来确定。在一些实施方案中,所述PCR是使用与所述转基因序列的至少一部分互补或能够将其特异性扩增的一种或多种引物进行的,并且在一些情况下是使用与参考基因的至少一部分互补或能够将其特异性扩增的一种或多种引物进行的。

[0106] 在一些方面,在一个或多个所述级分中和/或在特定样品(如从多个工程化细胞或

工程化细胞群体分离的总DNA)中确定的转基因序列的存在、不存在和/或量可以用作计算目的比率或比例(如非整合或残留分子的比例或数量)的基础,例如如下文第I.C节中所述。

1. 定量PCR (qPCR)

[0107] 在一些实施方案中,通过定量聚合酶链反应(qPCR;在一些情况下,也称为实时PCR)确定用于整合到工程化细胞的基因组中的转基因序列(如编码重组蛋白的转基因序列)的存在、不存在或量。

[0108] 在一些方面,qPCR可以用于实时检测随着反应进展而测量的扩增产物的积累,并在每个循环后进行产物量化。因此,在一些方面,qPCR可以用于确定样品中特定核酸序列(如转基因序列)的拷贝数。在一些方面,qPCR在每个反应孔中使用荧光报告分子,所述荧光报告分子随着产物DNA的量增加而产生增加的荧光。在一些方面,使用的荧光化学物质包括DNA结合染料和荧光标记的序列特异性引物或探针。在一些方面,qPCR使用专门的热循环仪,所述热循环仪具有以指定波长照射每个样品并检测由激发的荧光团发射的荧光的能力。在一些方面,所测量的荧光与扩增子的总量成比例;荧光随时间的变化用于计算每个循环中产生的扩增子的量。

[0109] 在一些方面,qPCR允许在宽动态范围内以准确性和高灵敏度确定特定DNA(扩增靶序列,例如编码重组蛋白的转基因序列)的初始拷贝数。在一些方面,qPCR可以产生定性(序列的存在或不存在)或定量(拷贝数)的结果。

2. 数字PCR (dPCR)

[0110] 在一些实施方案中,使用数字聚合酶链反应(dPCR)确定用于整合到工程化细胞的基因组中的转基因序列(如编码重组蛋白的转基因序列)的存在、不存在或量。在一些方面,dPCR允许以高准确度和灵敏度确定特定序列(如所述转基因序列)的存在、不存在或量。

[0111] 在一些实施方案中,dPCR是用于检测和定量核酸的方法,并且允许对靶核酸分子进行准确的定量分析和高度灵敏的检测。在一些方面,dPCR涉及将DNA有限稀释成一系列单独PCR反应物(或分区)。在一些方面,有限稀释可以使用基于待评估的模板核酸(例如,转基因序列)的随机分布用纳米流体学和乳液化学物质划分的原理以及泊松统计来测量对于给定比例的正分区存在的DNA的量。在一些方面,dPCR通常是线性的并且是灵敏的,能够检测或量化非常少量的DNA。在一些方面,dPCR允许使用无需标准曲线的单分子计数方法对DNA样品进行绝对量化,并且可以从对于每个孔中的单个分区的PCR获得绝对量化(参见Pohl等人,(2004)Expert Rev.Mol.Diagn.4(1),41-47)。

[0112] 在一些方面,dPCR方法可以用于产生多个分区(如数千个分区)以并行地进行多个单独PCR反应。在一些方面,划分样品使得样品内的单独核酸分子被定位并集中在许多分开的区域内。微孔板、毛细管、微流体或纳米流体、油性乳液、乳液化学物质和/或具有核酸结合表面的微型腔室阵列可以用于划分样品。用于进行dPCR的示例性组合物可以包含模板核酸(例如,从工程化细胞分离的DNA)、荧光猝灭剂探针、引物和PCR主混合物,所述PCR主混合物含有DNA聚合酶、dNTP、MgCl₂和最佳浓度的反应缓冲液。将PCR溶液分成较小的反应物,然后单独地运行PCR。样品的分区允许人们通过假设分子群体遵循泊松分布来估计不同分子的数量,从而说明多个靶标分子占据单个分区的可能性。

[0113] 在一些方面,dPCR涉及通过数字方法分析结果(因为所得信号具有二进制值:“0”或“1”)。在一些方面,dPCR可以用于分析大体积,同时分析不同的样品,并且可以同时进

多个评估。在一些方面,对于数字PCR,包含样品序列模板(例如,潜在地含有编码重组蛋白的转基因序列)的每个分区被制备以便被稀释至所述序列的平均拷贝数为0.5-1。稀释对于获得可靠的量化结果、出现在泊松分布中的信号是重要的。在每个孔内,分配对测试序列(例如,转基因序列的一部分)具有特异性的扩增引物和荧光探针,并进行乳液PCR。在一些方面,展现荧光信号的孔被计为值“1”,因为具有序列拷贝数为1的样品被分配到孔中并显示扩增后的信号;并且显示无信号的孔被计为“0”,因为不含序列拷贝的样品被分配到孔中,并且由于没有扩增而显示无信号。使用泊松小数定律可以准确地粗略估计样品内靶分子的分布,从而允许绝对量化PCR产物中的靶序列。

[0114] 用于dPCR的示例性可商购设备或系统包括RaindropTM数字PCR系统(RaindanceTMTechnologies);QX200TMDroplet DigitalTMPCR系统(Bio-Rad);BioMarkTMHD系统和qdPCR 37KTMIFC(Fluidigm Corporation)和QuantStudioTM3D数字PCR系统(Life TechnologiesTM) (参见例如,Huggett等人(2013)Clinical Chemistry 59:1691-1693;Shuga等人(2013)Nucleic Acids Research 41(16):e159;Whale等人(2013)PLoS One 3:e58177)。

3. 微滴式数字PCR (ddPCR)

[0115] 在一些实施方案中,使用微滴式数字聚合酶链反应(ddPCR)确定用于整合到工程化细胞的基因组中的转基因序列(如编码重组蛋白的转基因序列)的存在、不存在或量。ddPCR是一种类型的数字PCR,其中将所述PCR溶液通过水油乳液化学物质分成或划分为较小的反应物,以产生大量微滴。在一些方面,特定的表面活性剂可以用于产生油包水微滴。(参见例如,Hindson等人,(2011)Anal Chem 83(22):8604-8610;Pinheiro等人,(2012)Anal Chem 84,1003-1011)。在一些方面,每个单独微滴随后作为单独反应物运行。在一些方面,将PCR样品划分为纳升大小的样品并封装进油性微滴中。在一些方面,所述油性微滴是使用微滴生成器制备的,所述微滴生成器向每个孔施加真空。在示例性的情况下,可以由20 μ L样品体积制备用于单独反应物的约20,000个油性微滴。

[0116] 在一些方面,在PCR后,分析或读取每个微滴以确定原始样品中PCR正微滴(例如,基于荧光信号在每个微滴中分配的二进制“0”或“1”)的分数。然后使用泊松统计分析数据,以确定原始样品中的靶DNA序列浓度。可以基于荧光微滴的分数(p)来确定每个微滴中的靶分子拷贝(CPD)的泊松分布,由函数 $CPD = -\ln(1-p)$ 表示。该模型可以预测,随着含有至少一个靶分子的样品的数量的增加,含有多于一个靶分子的样品的可能性增加。

C. 示例性应用

[0117] 在一些方面,所提供的方法可以用于评估工程化细胞和含有工程化细胞的细胞组合物,以供各种用于评估核酸序列的整合和/或工程化细胞的表征的应用。例如,可以在工程化后、在配制之前、在施用之前和/或在施用时和/或在工程化或制造过程的各个阶段和/或时间点使用所述方法来表征核酸(如转基因序列)的整合和/或工程化细胞。在一些实施方案中,所述方法可以用于含有一个或多个工程化细胞的细胞组合物中。

[0118] 在一些实施方案中,所提供的方法可以在制造过程期间的一个或多个阶段或时间点进行,包括在工程化细胞或含有工程化细胞的细胞组合物被释放以供输注、准备好被施用于受试者和/或被施用于受试者之前进行。在一些实施方案中,在已对一种或多种所提供的方法例如关于工程化细胞或细胞组合物的一部分、级分和/或样品进行评估后,工程化细

胞或细胞组合物被释放以供输注、准备好被施用于受试者和/或被施用于受试者。在特定实施方案中,在完成所述一种或多种方法后所述细胞被确定为安全的(例如,无菌的和/或游离的)和/或具有期望的生物特征(如含有少于或多于所需的整合转基因序列阈值拷贝数)后,所述工程化细胞或细胞组合物被释放以供输注、准备好被施用于受试者和/或被施用于受试者。

[0119] 在一些方面,使用各种递送方法(如病毒转导)将含有转基因序列的多核苷酸引入细胞中。在一些实施方案中,需要监测或评估所述工程化细胞(如用于过继细胞疗法的工程化细胞)的各种特征和特点,如确定由转基因序列编码的重组蛋白的表达水平,和/或确定整合到细胞的基因组中(如稳定地整合到细胞的基因组中)的转基因序列的拷贝数。在一些方面,这种评估可以在所述工程化或制造过程期间的一个或多个时间点进行。

[0120] 在一些实施方案中,所提供的方法可以用于在向受试者(如患有疾病或病症的受试者)施用用于疗法的工程化细胞或细胞组合物后评估或确定工程化细胞的药代动力学参数和/或生物利用度。在一些方面,所提供的方法可以用作表征工程化细胞(如引入了编码重组蛋白(如重组受体)的转基因序列的工程化细胞)的持久性、扩增和/或数量的替代方法。

[0121] 在一些方面,以下描述的是所提供的方法的示例性应用。在一些方面,所述方法的变体和/或与评估或表征工程化细胞或工程化细胞组合物的其他方法的组合也可以用于确定用于细胞疗法的工程化细胞的特点和特征。

1. 评估转基因序列的整合

[0122] 在一些方面,提供了用于评估转基因序列(如编码重组蛋白(如重组受体)的转基因序列)的基因组整合的方法。在一些方面,在用于整合到细胞中(例如,用于基因工程化)的条件下引入包含转基因序列的多核苷酸后,可以使用所提供的方法来评估转基因序列整合到细胞的基因组中的时间安排、程度或进展。在一些实施方案中,在一些方面,在用于整合到细胞中的条件下引入包含转基因序列的多核苷酸后、在工程化或制造过程的一个或多个步骤或阶段期间或之后,可以使用所提供的方法来评估转基因序列整合到细胞的基因组中的时间安排、程度或进展。在一些方面,所评估的整合转基因序列的拷贝数是在多个细胞或细胞群体中的整合转基因序列的平均拷贝数。

[0123] 在一些实施方案中,所述方法涉及:(a)从分离自一个或多个细胞的DNA分离大于或大于约10千碱基(kb)的脱氧核糖核酸(DNA)高分子量级分,所述一个或多个细胞包含或被怀疑包含至少一个含有转基因序列的工程化细胞,所述转基因序列包含编码重组蛋白的核酸序列;(b)从所述高分子量级分确定整合到所述一个或多个细胞的基因组中的所述转基因序列的存在、不存在或量。在一些实施方案中,所述高分子量级分中的转基因序列表示已整合到所述一个或多个细胞的基因组中的所述转基因序列。

[0124] 在一些实施方案中,所述方法涉及(a)从分离自一个或多个细胞的DNA分离大于或大于约10千碱基(kb)的脱氧核糖核酸(DNA)高分子量级分,所述一个或多个细胞包含或被怀疑包含至少一个含有转基因序列的工程化细胞,所述转基因序列包含编码重组蛋白的核酸序列;和(b)确定所述高分子量级分中转基因序列的存在、不存在或量,从而评估整合到所述一个或多个细胞的基因组中的转基因序列。

[0125] 在一些任何实施方案中,所述高分子量级分中的转基因序列表示已整合到所述一

个或多个细胞的基因组中的所述转基因序列。在一些任何所提供的实施方案中, (b) 中所述的确定整合到所述一个或多个细胞的基因组中的所述转基因序列的存在、不存在或量包括确定所述高分子量级分中所述转基因序列的质量、重量或拷贝数。

[0126] 本文还提供了用于评估转基因序列的基因组整合的方法。在一些任何实施方案中, 所述方法涉及: (a) 通过脉冲场凝胶电泳从分离自细胞群体的DNA分离大于或大于约10千碱基(kb)的脱氧核糖核酸(DNA)高分子量级分, 所述细胞群体包含多个工程化细胞, 所述多个工程化细胞各自包含或被怀疑包含转基因序列, 所述转基因序列包含编码重组蛋白的核酸序列; 和(b) 确定所述高分子量级分中所述转基因序列在每个二倍体基因组或每个细胞中的平均或均值拷贝数, 从而评估整合到所述细胞群体的所述多个工程化细胞的基因组中的转基因序列。

[0127] 本文还提供了用于评估转基因序列的基因组整合的方法。在一些任何实施方案中, 所述方法涉及: (a) 通过脉冲场凝胶电泳从分离自细胞群体的DNA分离大于或大于约10千碱基(kb)的脱氧核糖核酸(DNA)高分子量级分, 所述细胞群体包含多个工程化细胞, 所述多个工程化细胞各自包含或被怀疑包含转基因序列, 所述转基因序列包含编码重组蛋白的核酸序列; 和(b) 从所述高分子量级分确定整合到所述细胞群体的所述多个工程化细胞的基因组中的所述转基因序列在每个二倍体基因组或每个细胞中的平均或均值拷贝数。

[0128] 在一些方面, 整合核酸序列的拷贝数可以通过评估存在于从一个细胞或多个细胞或细胞群体获得的脱氧核糖核酸(DNA)样品的高分子量级分中的特定核酸序列(如转基因序列的全部或一部分)的拷贝数来确定。在一些方面, 所述高分子量级分含有基因组DNA或基因组DNA片段, 并且排除或分离可能存在于DNA样品中的非整合或残留的核酸种类。在一些方面, 所述高分子量级分例如高于阈值(如约10、11、12、12.5、13、14、15、16、17、17.5、18、19、20、25或30千碱基(kb)或更大)的DNA样品。在一些实施方案中, 所述阈值大于或大于约10、12.5、15、17.5或20千碱基(kb)或更大。在一些实施方案中, 所述高分子量级分具有大于或大于约15千碱基(kb)。在一些实施方案中, 所述高分子量级分具有大于或大于约17.5千碱基(kb)。在一些实施方案中, 所述高分子量级分具有大于或大于约20千碱基(kb)。

[0129] 在一些实施方案中, 所述方法涉及从细胞分离脱氧核糖核酸(DNA), 所述细胞已在用于整合到细胞基因组中的条件下引入了包含转基因序列的多核苷酸; 以及从所分离的DNA分离大于或大于约10千碱基(kb)的高分子量级分。在一些实施方案中, 所述方法涉及从分离自细胞的脱氧核糖核酸(DNA)分离大于或大于约10千碱基(kb)的高分子量级分, 其中在所述分离之前, 所述细胞已在用于将转基因序列整合到细胞基因组中的条件下引入了包含所述转基因序列的多核苷酸。在一些方面, 所提供的方法涉及确定所分离的高分子量级分中转基因序列的存在、不存在或量。

[0130] 在一些实施方案中, 所述方法涉及从细胞分离脱氧核糖核酸(DNA), 所述细胞已在用于整合到细胞基因组中的条件下引入了包含转基因序列的多核苷酸; 从所分离的DNA分离大于或大于约10千碱基(kb)的高分子量级分; 以及确定所述高分子量级分中转基因序列的存在、不存在或拷贝数。

[0131] 在一些方面, 整合转基因序列的分数通过整合拷贝数(如在PFGE后通过ddPCR确定, 例如本文所述的整合载体拷贝数(iVCN)测定)除以总拷贝数(如在使用PFGE的情况下通过ddPCR确定, 例如通过标准载体拷贝数(VCN)测定确定)来确定。在一些方面, 其他测量

可以用于比较或归一化,例如针对参考基因的拷贝数进行归一化,或与通过检测蛋白质表达的方法检测到的重组受体表达进行比较,如与通过流式细胞术评估的群体中的CAR+细胞的数量进行比较。

[0132] 在一些方面,提供了用于评估转基因序列(如编码重组蛋白(如重组受体)的转基因序列)的基因组整合的方法。在一些方面,提供了用于评估含有编码重组蛋白(如重组受体)的核酸序列的转基因序列的基因组整合的方法。在一些方面,提供了用于评估转基因序列的基因组整合的方法,所述转基因序列例如包含调节元件(例如启动子、转录和/或转录后调节元件或反应元件)或标记(例如,与编码重组蛋白的核酸序列连接的替代标记)的转基因序列。在一些任何实施方案中,所述转基因序列包含与编码重组蛋白的核酸序列连接的调节元件。在一些方面,在用于整合到细胞中(例如,用于基因工程化)的条件下引入包含转基因序列的多核苷酸后,可以使用所提供的方法来评估基因工程化(例如,通过将转基因序列整合到细胞基因组中)的时间安排、程度或进展。在一些方面,所评估的整合转基因序列的拷贝数是在多个细胞或细胞群体中的整合转基因序列的平均拷贝数。在一些实施方案中,所述细胞存在于已引入了编码所述转基因序列的多核苷酸的细胞群体中,其中所述方法在所述群体中的多个细胞上进行。

[0133] 在一些方面,所提供的方法可以在各个时间点、步骤或阶段或使用各种不同的样品来进行,以确定和比较基因工程化(如将所引入的转基因序列整合到其中引入了所述转基因序列的细胞的基因组中)的时间安排、程度或进展。在一些方面,所提供的方法可以用于评估(例如,经由时程实验,其中在引入编码所述转基因序列的多核苷酸后的各个时间点获得DNA样品)转基因序列整合的时间安排和程度。在一些方面,所述方法可以在对于工程化细胞组合物的工程化或制造过程的各个阶段进行。例如,所提供的方法可以在扩增工程化过程或非扩增工程化过程的各个阶段进行。

[0134] 在一些方面,所述多核苷酸的引入是通过本文所述的任何方法(如本文第II.C节和第II.D节所述的那些)进行的。在一些方面,所述多核苷酸的引入是通过病毒转导进行的。在一些方面,所述多核苷酸的引入是通过物理递送方法、任选地通过电穿孔进行的。

[0135] 在一些方面,所述方法可以用于确定大部分或基本上全部整合完成的时间点。在一些方面,该时间点可以用于(例如,根据本文提供的方法)评估工程化细胞组合物(如用于过继细胞疗法的工程化细胞组合物)中的整合拷贝数。在一些方面,所述方法可以用于确定大部分或基本上全部整合尚未完成和/或细胞或细胞组合物中存在残留的非整合序列的时间点。

[0136] 在一些方面,所述方法可以用于确定在引入包含所述转基因序列的多核苷酸后合适的细胞孵育时间长度,在所述合适的细胞孵育时间长度下完成大部分或基本上全部整合。在一些方面,所述方法允许确定合适的孵育时间长度,所述合适的孵育时间长度可以最大化整合而减少工程化细胞的耗尽。在一些方面,在将包含所述转基因序列的多核苷酸引入细胞中后,所述细胞或细胞群体或多个细胞未在高于25℃的温度下孵育超过48、54、60、66或72小时。在一些方面,在将包含所述转基因序列的多核苷酸引入细胞中后,所述细胞未在高于25℃的温度下孵育超过72小时。在一些方面,在将包含所述转基因序列的多核苷酸引入细胞中后,所述细胞未在高于约30℃且小于约40℃的温度下孵育超过72小时。

[0137] 在一些实施方案中,在引入所述多核苷酸并确定所述转基因序列的存在、不存在

和/或量后,不冷冻保存所述细胞。

[0138] 在一些方面,提供了用于评估转基因序列的基因组整合的方法,所述方法涉及从分离自细胞的脱氧核糖核酸(DNA)分离大于或大于约10千碱基(kb)的高分子量级分,其中在所述分离之前,所述细胞已在用于通过病毒转导将所述转基因序列整合到细胞基因组中的条件下引入了包含转基因序列的多核苷酸,并且在将包含所述转基因序列的多核苷酸引入细胞中后,所述细胞未在高于25℃的温度下孵育超过48、54、60、66、72小时;以及确定所述高分子量级分中转基因序列的存在、不存在或量。

[0139] 在一些方面,提供了用于评估转基因序列的基因组整合的方法,所述方法涉及从细胞分离脱氧核糖核酸(DNA),所述细胞在用于通过病毒转导整合到细胞基因组中的条件下引入了包含转基因序列的多核苷酸,并且在将包含转基因序列的多核苷酸引入细胞中后,所述细胞未在高于25℃的温度下孵育超过48、54、60、66或72小时;从所分离的DNA分离大于或大于约10千碱基(kb)的高分子量级分;以及确定所述高分子量级分中转基因序列的存在、不存在或量。

2. 评估残留的非整合DNA的数量

[0140] 在一些方面,还提供了用于评估残留的非整合转基因序列的方法。在一些实施方案中,所述方法涉及进行所述方法中任一种的步骤,包括从细胞分离脱氧核糖核酸(DNA),所述细胞已在用于整合到细胞基因组中的条件下引入了包含转基因序列的多核苷酸;以及从所分离的DNA分离高分子量级分,如大于本文所述阈值(如大于或大于约10千碱基(kb))的DNA样品;确定所述高分子量级分中转基因序列的质量、重量、浓度或拷贝数,从而评估转基因序列的基因组整合。

[0141] 在一些方面,提供了用于评估残留的非整合转基因序列的方法。在一些实施方案中,所述方法涉及进行如本文所述的用于确定转基因序列的存在、不存在或量的步骤,从而确定在所述DNA高分子量级分中转基因序列的质量、重量、浓度或拷贝数。在一些实施方案中,所述方法还涉及确定在不分离所述高分子量级分的情况下在所分离的DNA中转基因序列的质量、重量、浓度或拷贝数,从而确定所述转基因序列的总拷贝数;在一些实施方案中,所述方法涉及比较所述高分子量级分中确定的质量、重量、浓度或拷贝数与在不分离所述高分子量级分的情况下在所分离的总DNA中确定的质量、重量、浓度或拷贝数,从而确定残留的非整合重组序列的质量、重量、浓度或拷贝数。

[0142] 在一些实施方案中,所述比较涉及从在不分离所述高分子量级分的情况下确定的质量、重量、浓度或拷贝数减去对于所述高分子量级分确定的质量、重量、浓度或拷贝数。在一些实施方案中,所述比较涉及确定对于所述高分子量级分确定的质量、重量、浓度或拷贝数与在不分离所述高分子量级分的情况下确定的质量、重量、浓度或拷贝数的比率。

[0143] 在一些实施方案中,确定在不分离所述高分子量DNA的情况下的拷贝数是通过聚合酶链反应(PCR)(如本文(例如,在第I.B节中)所述的任一种)进行的。在一些实施方案中,确定在不分离所述高分子量DNA的情况下的拷贝数是使用例如以下文献中描述的方法进行的:Charrier等人, *Gene Therapy* (2011) 18, 479-487; Christodoulou等人, *Gene Therapy* (2016) 23, 113-118; Zhao等人, *Human Gene Therapy Methods* (2017) 28 (4): 205-214; 以及 Milone等人, *Molecular Therapy: Methods & Clinical Development* (2018) 8: 210-221。在一些方面,在不分离高分子量DNA的情况下的拷贝数包括标准载体拷贝数(VCN)测定。

[0144] 在一些实施方案中,所述PCR是定量聚合酶链反应(qPCR)、数字PCR或微滴式数字PCR。在一些实施方案中,所述PCR是微滴式数字PCR。在一些实施方案中,所述PCR是使用与所述转基因序列的至少一部分互补或能够将其特异性扩增的一种或多种引物进行的。在一些任何实施方案中,所述一种或多种引物与整合到或待整合到基因组中的转基因中序列的全部或部分互补或能够将其特异性地扩增。在一些实施方案中,所述一种或多种引物与编码重组蛋白的核酸序列的一部分互补或能够将其特异性地扩增。在一些实施方案中,所述一种或多种引物与调节元件的序列互补或能够将其特异性地扩增,所述调节元件的序列与编码重组蛋白的核酸序列可操作地连接。在一些实施方案中,所述一种或多种引物与调节元件的序列互补或能够将其特异性地扩增,所述调节元件的序列与编码重组蛋白的核酸序列可操作地连接。在一些实施方案中,所述一种或多种引物与转录后调节元件的序列互补或能够将其特异性地扩增,所述转录后调节元件的序列与编码重组蛋白的核酸序列可操作地连接。在一些实施方案中,所述一种或多种引物与土拨鼠肝炎病毒调节元件(WPRE)的序列互补或能够将其特异性地扩增,所述土拨鼠肝炎病毒调节元件的序列与编码重组蛋白的核酸序列可操作地连接。

[0145] 在一些实施方案中,确定在不分离高分子量级分的情况下的拷贝数包括评估在不分离所述高分子量级分的情况下在所分离的DNA中转基因序列的拷贝数,并将所述量和所述浓度针对在不分离所述高分子量级分的情况下在所分离的DNA中的参考基因或针对标准曲线(例如,具有已知拷贝数的标准曲线)归一化。在一些实施方案中,所述参考基因是管家基因。在一些实施方案中,所述参考基因是编码白蛋白(ALB)的基因。在一些实施方案中,所述参考基因是编码核糖核酸酶P蛋白亚基p30(RPP30)的基因。

[0146] 在一些实施方案中,所分离的DNA中参考基因的拷贝数是通过PCR使用一种或多种引物进行的,所述一种或多种引物与所述参考基因的至少一部分互补或能够将其特异性地扩增。

[0147] 在一些实施方案中,确定所述高分子量级分中的拷贝数和确定在不分离所述高分子量级分的情况下的拷贝数是通过聚合酶链反应(PCR)使用相同引物或相同引物组进行的。

[0148] 在一些方面,所述方法还涉及确定在不分离所述高分子量级分的情况下在所分离的DNA中的转基因序列的拷贝数,从而确定转基因序列的总拷贝数。在一些方面,所述方法涉及通过以下方法来确定残留的非整合转基因序列的拷贝数:从通过评估总分离的DNA(如未分离级分)确定的拷贝数减去通过评估所述高分子量级分确定的拷贝数。在一些方面,所述方法涉及通过以下方法来确定残留的非整合转基因序列的比例:通过评估所述高分子量级分确定的拷贝数除以通过评估总分离的DNA(如未分离级分)确定的拷贝数。在一些实施方案中,所述残留的非整合转基因序列包含载体质粒、线性互补DNA(cDNA)、自我整合序列或长末端重复序列(LTR)环中的一种或多种。

[0149] 在一些方面,整合转基因序列的分数可以通过整合拷贝数(如在PFGE后通过ddPCR确定,例如本文所述的整合载体拷贝数(iVCN)测定)除以总拷贝数(如在使用PFGE的情况下通过ddPCR确定,例如通过标准载体拷贝数(VCN)测定确定)来确定。在一些实施方案中,非整合转基因序列的分数可以确定为 $1 - (\text{整合转基因序列的分数})$ 。在一些方面,所述非整合转基因序列拷贝数可以通过从总拷贝数减去整合拷贝数来确定。

3. 评估来自施用了工程化细胞的受试者的样品中转基因序列的量

[0150] 在一些方面,还提供了用于评估来自受试者的生物样品中转基因序列的存在、不存在或量的方法。在一些方面,所述受试者已被施用工程化细胞,例如,通过将含有转基因序列的多核苷酸引入细胞中而工程化的例如用于过继细胞疗法的免疫细胞。在一些方面,所述方法涉及从来自受试者的生物样品分离脱氧核糖核酸(DNA);从所分离的DNA分离大于或大于约10千碱基(kb)的高分子量级分;以及确定所述高分子量级分中转基因序列的存在、不存在或量。在一些方面,所述生物样品是从受试者获得的,所述受试者已被施用包含所述转基因序列的工程化细胞。在一些方面,确定所述转基因序列的存在、不存在或量包括确定拷贝数,如确定从所述受试者获得的生物样品中的拷贝数。

[0151] 本文提供了用于评估来自受试者的生物样品中的转基因序列的方法。在一些任何实施方案中,所提供的方法涉及:(a)从分离自存在于来自受试者的生物样品中的一个或多个细胞的DNA分离大于或大于约10千碱基(kb)的脱氧核糖核酸(DNA)高分子量级分,其中所述生物样品包含或被怀疑包含至少一个含有转基因序列的工程化细胞,所述转基因序列包含编码重组蛋白的核酸序列;和(b)确定所述高分子量级分中转基因序列的存在、不存在或量,从而评估存在于所述生物样品的全部或部分中的转基因序列。

[0152] 本文提供了用于评估来自受试者的生物样品中转基因序列的方法,所述方法包括:(a)从分离自存在于来自受试者的生物样品中的一个或多个细胞的DNA分离大于或大于约10千碱基(kb)的脱氧核糖核酸(DNA)高分子量级分,其中所述生物样品包含或被怀疑包含至少一个含有转基因序列的工程化细胞,所述转基因序列包含编码重组蛋白的核酸序列;和(b)确定所述高分子量级分中转基因序列的存在、不存在或量,从而评估存在于所述生物样品的全部或部分中的转基因序列。

[0153] 在一些实施方案中,用于评估来自受试者的生物样品中转基因序列的所提供的方法涉及从分离自存在于来自受试者的生物样品中的一个或多个细胞的DNA分离大于或大于约10千碱基(kb)的脱氧核糖核酸(DNA)高分子量级分,其中所述生物样品包含或被怀疑包含至少一个含有编码重组蛋白的转基因序列的工程化细胞;和确定所述生物样品的全部或部分中转基因序列的存在、不存在或量。在一些实施方案中,在所述分离之前,已将包含编码所述重组蛋白的转基因序列的多核苷酸引入所述一个或多个细胞的至少一个工程化细胞中。在一些实施方案中,确定转基因序列的存在、不存在或量包括确定所述生物样品的全部或部分中所述转基因序列的质量、重量、浓度或拷贝数。

[0154] 在一些实施方案中,所述方法可以用作用于确定所施用的细胞的药代动力学(PK)或药效动力学(PD)参数的基础。在一些方面,所述PK或PD参数可以以基于核酸的方法(例如,如根据本文提供的方法评估转基因序列的存在、不存在或量)为基础来测量。在一些方面,所述PK和PD参数可以基于测量细胞特性或表型来测量,例如,通过检测细胞表面的重组蛋白表达或细胞表面表型或活性来测量。在一些方面,可以使用多种方法,包括基于核酸的方法和基于细胞的方法的组合。在一些实施方案中,所述方法涉及从存在于生物样品中的一个或多个细胞分离DNA,然后分离所述高分子量级分。

[0155] 在一些实施方案中,所述生物样品是从受试者获得的,所述受试者已被施用包含所述至少一个含有所述转基因序列的工程化细胞的组合物。在一些实施方案中,所述生物样品是组织样品或体液样品或本文所述的从受试者获得的任何其他样品。在一些实施方案

中,所述生物样品是组织样品并且所述组织是肿瘤。在一些实施方案中,所述组织样品是肿瘤活检。在一些实施方案中,所述生物样品是体液样品,并且所述体液样品是血液或血清样品。

[0156] 在一些实施方案中,所述生物样品中的一个或多个细胞包含免疫细胞,包括本文所述的任何免疫细胞或其群体。在一些实施方案中,所述免疫细胞是T细胞或NK细胞。在一些实施方案中,所述T细胞是CD3⁺、CD4⁺和/或CD8⁺细胞或包含特定表型的任何此类细胞。

[0157] 在一些方面,可以使用用于确定所述转基因序列的存在、不存在或量的任何方法和用于确定本文所述序列的质量、重量、浓度或拷贝数的任何归一化或定量方法。

[0158] 在一些方面,所提供的方法可以用于评估T细胞(例如,用于基于T细胞的治疗而施用的T细胞)的暴露、数量、浓度、持久性和增殖的基础。在一些实施方案中,在本文所提供的方法中,可以通过在体外或离体评估T细胞的特征来测量细胞(例如用于免疫疗法(例如T细胞疗法)而施用的细胞)的暴露、或延长的扩增和/或持久性,和/或所述细胞的细胞表型或功能活性的变化。在一些实施方案中,在施用所述细胞疗法(如使用表达重组受体的工程化T细胞)之前或后,可以使用此类测定来确定或确认用于免疫疗法(例如T细胞疗法)的T细胞的功能。

[0159] 在一些方面,暴露、数量、浓度、持久性和增殖与药代动力学参数有关。在一些情况下,药代动力学可以通过测量诸如以下等参数来评估:最大(峰值)血浆浓度($C_{\max}$)、峰值时间(即出现最大血浆浓度($C_{\max}$)的时间; $T_{\max}$)、最小血浆浓度(即治疗剂(例如,CAR+T细胞)的剂量之间的最小血浆浓度; $C_{\min}$)、施用后的消除半衰期($T_{1/2}$)和曲线下面积(即通过绘制时间与治疗剂工程化细胞的血浆浓度的关系生成的曲线下面积;AUC)。可以使用所提供的方法测量施用后血浆中特定治疗剂(例如,工程化细胞)的浓度。例如,在一些方面,可以在样品(如来自受试者的血液样品)中评估整合转基因序列的拷贝数。在一些方面,用于确定PK的其他方法(如基于流式细胞术的方法)或其他测定(如免疫测定、ELISA或基于色谱/质谱的测定)可以组合或并行使用以确定一个或多个药代动力学参数。检测和/或外推至总细胞数的其他方法包括以下文献中描述的那些:Brentjens等人,Sci Transl Med.2013 5(177);Park等人,Molecular Therapy 15(4):825-833(2007);Savoldo等人,JCI 121(5):1822-1826(2011)、Davila等人,(2013) PLoS ONE 8(4):e61338;Davila等人,Oncoimmunology 1(9):1577-1583(2012),Lamers,Blood 2011 117:72-82;Jensen等人,Biol Blood Marrow Transplant 2010年9月;16(9):1245-1256;Brentjens等人,Blood 2011 118(18):4817-4828。

[0160] 在一些实施方案中,确定所施用细胞(例如工程化细胞组合物)的药代动力学(PK)以评估所施用细胞的可用性,例如生物利用度。在一些实施方案中,“暴露”可以指在施用所述治疗剂后的某一段时间期间,治疗剂(例如,工程化细胞)在血浆(血液或血清)中的身体暴露。在一些实施方案中,暴露可以陈述为在施用一定剂量的治疗剂(例如,工程化细胞)后的治疗剂浓度-时间曲线下面积(AUC),如通过药代动力学分析所确定。在一些情况下,对于细胞疗法中施用的细胞,AUC是以细胞*天/ μ L或以其相应单位来表示。在一些实施方案中,AUC被测量为患者群体(例如样品患者群体)中的平均AUC,例如一个或多个患者的平均AUC。在一些实施方案中,全身暴露是指在某一段时间内的曲线下面积(AUC),例如,第0天到第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、21、28天或更长时间,或第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、

12、13、14、15周或更长时间,或第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18、24、48个月或更长时间。在一些实施方案中,AUC被测量为施用所述治疗剂(例如,工程化细胞)后第0天到第28天的AUC (AUC_{0-28}),包括所有测量数据和从所测量的药代动力学(PK)参数外推的数据,例如来自患者群体(例如样品患者群体)的平均AUC。在一些实施方案中,为了确定随时间的暴露,例如某一时间段的AUC,例如 AUC_{0-28} ,使用参数(例如,细胞浓度)随时间的多次测量或评估(例如,每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、21或28天或更长时间进行的测量)生成治疗剂浓度-时间曲线。

[0161] 在一些实施方案中,检测在施用所述T细胞后以及在施用所述疗法之前、期间和/或之后受试者中转基因序列的存在、不存在和/或量。在一些实施方案中,检测在施用T细胞后且在施用所述疗法之前、期间和/或之后,受试者中表达重组受体的细胞(例如,用于基于T细胞的疗法而施用的CAR表达细胞)的存在、不存在和/或量。在一些方面,本文所述的评估所述转基因序列整合的任何方法可以用于评估在受试者的血液或血清或器官或组织样品(例如,疾病部位,例如,肿瘤样品)中表达重组蛋白的细胞(例如,用于基于T细胞的疗法而施用的表达重组受体的工程化细胞)的数量。在一些方面,持久性被量化为每个二倍体基因组中、每体积或面积的样品(例如,血液或血清)中、每微克的总DNA中整合转基因序列的拷贝或被量化为每微升的样品(例如,血液或血清)中工程化细胞(例如,表达重组受体的细胞)的数量或每微升的样品中外周血单核细胞(PBMC)或白细胞或T细胞的总数。

[0162] 在一些实施方案中,用于任何所提供的方法的引物或探针对结合、识别和/或扩增编码重组受体的核酸和/或所述质粒和/或载体的其他组分或元件具有特异性,所述其他组分或元件包括调节元件(例如启动子、转录和/或转录后调节元件或反应元件)或标记(例如替代标记)。在一些实施方案中,所述引物可以对调节元件具有特异性。在一些实施方案中,所述引物对与编码重组蛋白的核酸序列可操作地连接的调节元件具有特异性。在一些实施方案中,所述引物对扩增土拨鼠肝炎病毒调节元件(WPRE)的全部或一部分具有特异性,所述土拨鼠肝炎病毒调节元件与编码重组蛋白(例如,重组受体)的核酸序列可操作地连接。

[0163] 在一些实施方案中,在施用所述工程化细胞后为或至少4、14、15、27或28天,在受试者中检测所述转基因序列细胞。在一些方面,在施用所述工程化细胞后为或至少2、4或6周,或在施用所述工程化细胞后3、6或12、18或24或30或36个月,或1、2、3、4、5年或更长时间,检测所述细胞。

[0164] 在一些实施方案中,在开始施用基因工程化细胞后至少8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天或21天的时间,评估峰值水平和/或AUC和/或从受试者获得样品。在一些实施方案中,在开始施用所述基因工程化细胞后在或在约11天至22天、12天至18天或14天至16天之间(每个都包含端值)的时间,评估峰值水平和/或AUC和/或从受试者获得样品。

[0165] 可以在以下方面陈述可指示扩增和/或持久性的用于过继细胞疗法而施用的工程化细胞的暴露(例如,数量或浓度):所述转基因序列的最大拷贝数或暴露于受试者中的细胞的最大数量或浓度、可检测的细胞或高于特定数量或百分比的细胞的持续时间、对于所述转基因序列的拷贝数的曲线下面积(AUC)、随时间变化的细胞数量或浓度和/或其组合及其指示物。此类结果可以使用以下方法来评估:所提供的方法,其用于检测与特定样品(例如,血液、血清、血浆或组织,如肿瘤样品)中的核酸或DNA的总量相比,编码重组蛋白的转基

因序列的拷贝数;和/或流式细胞术测定,其通常使用对所述重组蛋白具有特异性的抗体来检测表达所述受体的细胞。还可以使用基于细胞的测定来检测功能细胞的数量或百分比或浓度,所述功能细胞例如以下细胞,其能够结合至和/或中和患有所述疾病或病症或表达由所述重组蛋白(其作为重组受体)识别的抗原的细胞,和/或能够诱导针对所述细胞的反应(例如,细胞毒性反应)。

[0166] 在一些方面,增加的受试者对细胞的暴露包括增加的细胞扩增。在一些实施方案中,在施用T细胞(例如,表达CAR的T细胞)后,表达受体的细胞(例如,表达CAR的细胞)在受试者中扩增。

[0167] 在一些实施方案中,在施用所述工程化细胞后至少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或60天或更长时间,在施用所述工程化细胞后至少或至少约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24周或更长时间中,表达所述受体的细胞可在受试者的血清、血浆、血液或组织(例如,肿瘤样品)中检测到,例如通过所提供的方法或基于流式细胞术的检测方法检测到。

[0168] 在一些方面,在施用所述工程化细胞后约1周、约2周、约3周、约4周、约5周或至少约6周或至少约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月或至少2或3年,如通过任何所述方法测量的每100个细胞中(例如在外周血或骨髓或其他隔室中)整合转基因序列的质量、重量、浓度或拷贝数可以是至少0.01、至少0.1、至少1或至少10。在一些实施方案中,在施用所述工程化细胞后约1周、约2周、约3周或至少约4周的时间,或在这种施用后至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月或至少2或3年的时间,每微克的基因组DNA中转基因序列的拷贝数是至少100、至少1000、至少5000、或至少10,000、或至少15,000、或至少20,000。

[0169] 在一些方面,在施用所述细胞后(例如,在开始施用所述T细胞后)至少约3个月、至少约6个月、至少约12个月、至少约1年、至少约2年、至少约3年、或超过3年的时间,所述工程化细胞中引入的转基因序列可通过所描述的方法在受试者、其血浆、血清、血液、组织和/或疾病部位(例如,肿瘤部位)中检测到。在一些实施方案中,测量在施用所述工程化细胞后,受试者的体液、血浆、血清、血液、组织、器官和/或疾病部位(例如肿瘤部位)中重组蛋白细胞的浓度随时间的曲线下面积(AUC)。

II. 引入包含转基因序列的多核苷酸的方法

[0170] 在一些实施方案中,所提供的用于评估整合核酸的方法与基因工程化细胞结合并且在用于产生基因工程化细胞的工程化或制造过程期间一次或多次使用或进行。在一些方面,被实施或进行所提供的方法的细胞或多个细胞包括已被基因工程化或处于基因工程化过程中并且可以用于细胞疗法(如过继细胞疗法)的细胞。在一些实施方案中,被实施或进行所提供的方法的细胞或多个细胞包括处于工程化的各个步骤或阶段的细胞。在一些方面,所述细胞包括免疫细胞(如T细胞),所述免疫细胞已被工程化(如通过引入含有转基因序列的多核苷酸,所述转基因序列包含编码重组蛋白的序列)为表达重组蛋白。在一些方面,所提供的方法用于评估此类转基因序列在工程化细胞的基因组中的整合。

[0171] 在一些方面,所述工程化或制造过程包括一个或多个步骤,包括细胞(包括免疫细胞,如T细胞)的刺激、激活、转导、扩增、培育或增殖。在一些实施方案中,所提供的用于评估整合核酸的方法可以作为用于生成或产生基因工程化细胞(如基因工程化T细胞)的过程的

一部分来进行。

[0172] 在一些方面,所提供的实施方案用于被缩短、简略或不包括扩增步骤的工程化或制造过程(如使用非扩增制造过程)中。在一些方面,在引入编码重组受体的核酸后,所述缩短或简略的制造过程包括缩短或简略的扩增步骤或不包括扩增步骤。在一些方面,所述缩短或简略的制造过程包括如下过程,其中在向所述至少一个工程化细胞中引入包含所述转基因序列的多核苷酸后,所述细胞尚未在高于25℃、任选地为或约37℃±2℃的温度下孵育超过96小时。

[0173] 在一些实施方案中,所提供的方法与正在经历一个或多个步骤或过程的细胞结合使用,所述一个或多个步骤或过程涉及制造、生成或产生用于细胞疗法的细胞或细胞组合物。在一些方面,所提供的方法可以用于评估核酸(如用于将细胞工程化的转基因序列)的整合。在一些实施方案中,所述细胞疗法包括施用工程化为表达重组蛋白(如重组受体,例如嵌合抗原受体(CAR))的细胞(如T细胞)。在一些实施方案中,所述一个或多个步骤包括细胞的分离、分开、选择、激活或刺激、转导、培育、扩增、洗涤、悬浮、稀释、浓缩和/或配制。

[0174] 在一些实施方案中,生成或产生细胞疗法的方法包括从受试者分离细胞,在一种或多种刺激条件下制备、加工、培养细胞。在一些实施方案中,所述方法包括按以下顺序进行的加工步骤,其中:首先将细胞(例如原代细胞)从生物样品分离(如选择或分开);将选择的细胞与用于转导的病毒制剂(例如,含有多核苷酸的病毒制剂,所述多核苷酸包含用于整合的转基因序列)一起孵育,任选地在存在刺激试剂的情况下刺激所分离的细胞的步骤后;培养所转导的细胞,例如以扩增所述细胞;将所转导的细胞配制在组合物中并将所述组合物引入生物医学材料容器中。

[0175] 在一些实施方案中,用于制造或工程化的方法可以包括以下中的一个或多个:(a) 洗涤含有细胞的生物样品(例如,全血样品、血沉棕黄层样品、外周血单核细胞(PBMC)样品、未分级T细胞样品、淋巴细胞样品、白细胞样品、单采术产物或白细胞单采术产物);(b) 从所述样品分离(例如选择)所需的细胞子集或群体(例如,CD4+和/或CD8+T细胞),例如通过将细胞与用于基于免疫亲和力的分离的选择或免疫亲和试剂一起孵育来进行;(c) 将编码重组受体(例如,CAR)的药剂引入所分离或所选择的细胞中,如通过将所分离(如所选择)的细胞与编码重组受体的病毒载体粒子一起孵育来进行;(d) 使用如所描述的方法培养、培育或扩增细胞;以及(e) 将所转导的细胞配制在如药学上可接受的缓冲液、冷冻保存剂或其他合适的培养基中。在一些实施方案中,所述方法还可以包括(f) 通过使细胞暴露于刺激条件来刺激细胞,这可以在将细胞与病毒载体粒子一起孵育之前、期间和/或之后进行。在一些实施方案中,在任何上述步骤之前或之后也可以进行洗涤或悬浮步骤的一个或多个另外的步骤,如用于细胞的稀释、浓缩和/或缓冲液交换。在一些方面,将所得的工程化细胞组合物引入一个或多个生物医学培养器皿中。

[0176] 在一些实施方案中,进行所提供的用于制备或产生基因工程化细胞的方法,使得在用于临床用途(例如在过继细胞疗法中)的细胞制备中的一个、多个或所有步骤是在未将所述细胞暴露于非无菌条件下且在无需使用无菌室或无菌柜的情况下进行的。在这种方法的一些实施方案中,细胞被分离、分开或选择、转导、洗涤、任选地激活或刺激和配制,都在封闭系统内进行。在这个过程的一些方面,使细胞从封闭系统中压出并引入一个或多个生物材料容器中。在一些实施方案中,所述方法是以自动方式进行的。在一些实施方案中,一

个或多个步骤是在封闭系统或装置之外进行的。

[0177] 在一些实施方案中,将封闭系统用于进行用于制造、生成或产生细胞疗法的方法的一个或多个其他处理步骤。在一些实施方案中,一个或多个或所有处理步骤(例如隔离、选择和/或富集、处理、与转导和工程化结合的繁育)和配制步骤是使用集成或自含式系统中的系统、装置或设备进行和/或以自动化或可编程方式进行。在一些方面,所述系统或设备包括与所述系统或设备通信的计算机和/或计算机程序,其允许用户对加工、分离、工程化和配制步骤的各个方面进行编程、控制、评估其结果和/或调整。在一个例子中,所述系统是如WO 2009/072003、US 20110003380或WO 2016/073602中所述的系统。

A. 细胞的分离或选择

[0178] 在一些实施方案中,经工程化的细胞(如通过所提供的方法评估或分析的细胞或细胞组合物)是原代细胞。在一些实施方案中,所述细胞是免疫细胞或富集的免疫细胞。在一些实施方案中,所述细胞是T细胞或富含T细胞。在一些实施方案中,有待使用所提供的方法评估或分析的细胞是T细胞或富含T细胞。在一些实施方案中,所述细胞是CD4+T细胞或富集的CD4+T细胞。在一些实施方案中,所述细胞是CD8+T细胞或富集的CD8+T细胞。在一些实施方案中,用于制造、生成或产生细胞疗法的过程包括以下步骤:其中在进行所述过程的后续步骤之前从获得自人受试者的样品分离或选择总T细胞,例如CD3+或CD4+/CD8+T细胞。

[0179] 在一些实施方案中,工程化或制造的方法包括从生物样品分离细胞或其组合物的步骤,所述生物样品例如获得自或源自受试者(如患有特定疾病或病症或需要细胞疗法或将被施用细胞疗法的受试者)的那些。在一些方面,所述受试者是人,如作为需要特定治疗性干预(如过继细胞疗法,其中分离、加工和/或工程化细胞以用于所述过继细胞疗法)的患者的受试者。因此,在一些实施方案中,所述细胞是原代细胞,例如原代人细胞。在一些实施方案中,所述细胞包括CD4+和CD8+T细胞。在一些实施方案中,所述细胞包括CD4+或CD8+T细胞。所述样品包括组织、流体和直接取自受试者的其他样品。所述生物样品可以是直接从生物来源获得的样品或经过加工的样品。所述生物样品包括但不限于体液(如血液、血浆、血清、脑脊液、滑液、尿液和汗液)、组织和器官样品,包括由其衍生的加工样品。

[0180] 在一些方面,所述样品是血液或血液来源的样品,或者是或源自单采术或白细胞单采术产物。示例性样品包括全血、外周血单核细胞(PBMC)、白细胞、骨髓、胸腺、组织活检、肿瘤、白血病、淋巴瘤、淋巴结、肠相关淋巴组织、粘膜相关淋巴组织、脾、其他淋巴组织、肝、肺、胃、肠、结肠、肾、胰腺、乳房、骨、前列腺、子宫颈、睾丸、卵巢、扁桃体或其他器官和/或源自它们的细胞。在细胞疗法(例如,过继细胞疗法)的背景下,样品包括来自自体 and 同种异体来源的样品。

[0181] 在一些例子中,例如通过单采术或白细胞单采术获得来自受试者的循环血液的细胞。在一些方面,所述样品含有淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其他有核白细胞、红细胞和/或血小板,并且在一些方面含有除了红细胞和血小板以外的细胞。

[0182] 在一些实施方案中,洗涤从受试者收集的血细胞,例如以去除血浆级分并将细胞置于适当的缓冲液或介质中以用于后续的加工步骤。在一些实施方案中,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤细胞。在一些实施方案中,所述洗涤溶液缺乏钙和/或镁和/或多种或全部二价阳离子。在一些方面,根据制造商的说明书,通过半自动“流通”离心机(例如,Cobe 2991细胞加工器,Baxter)完成洗涤步骤。在一些方面,洗涤步骤是通过切向流过滤(TFF)根据制造

商的说明书完成的。在一些实施方案中,洗涤后将所述细胞重悬于多种生物相容性缓冲液(例如像不含Ca⁺⁺/Mg⁺⁺的PBS)中。在某些实施方案中,去除血细胞样品的组分并将细胞直接重悬于培养基中。

[0183] 在一些实施方案中,所述制备方法在分离、选择和/或富集和/或用于转导和工程化的孵育之前或之后包括冷冻(例如冷冻保存)细胞的步骤。在一些实施方案中,所述冷冻和后续解冻步骤去除所述细胞群中的粒细胞,并且在一定程度上去除单核细胞。在一些实施方案中,例如在洗涤步骤后将细胞悬浮在冷冻溶液中以去除血浆和血小板。在一些方面,可以使用多种已知的冷冻溶液和参数中的任何一种。然后用培养基将其1:1稀释,使得DMSO和HSA的最终浓度分别为10%和4%。然后通常将所述细胞以1°/分钟的速率冷冻至-80℃并储存在液氮储罐的气相中。

[0184] 在一些实施方案中,所述细胞或群体的分离包括一个或多个制备和/或基于非亲和力的细胞分离步骤。在一些例子中,将细胞在存在一种或多种试剂的情况下进行洗涤、离心和/或孵育,例如以去除不需要的组分,针对所需组分进行富集,裂解或去除对特定试剂敏感的细胞。在一些例子中,基于一种或多种特性(如密度、粘附特性、尺寸、对特定组分的敏感性和/或抗性)分离细胞。在一些实施方案中,所述方法包括基于密度的细胞分离方法,如通过裂解红细胞并通过Percoll或Ficoll梯度离心而从外周血制备白细胞。

[0185] 在一些实施方案中,至少一部分选择步骤包括将细胞与选择试剂一起孵育。与一种或多种选择试剂一起孵育,例如作为选择方法的一部分可以使用一种或多种选择试剂来进行,以用于基于一种或多种特定分子(如表面标记(例如表面蛋白)、细胞内标记或核酸)在细胞中或细胞上的表达或存在来选择一种或多种不同的细胞类型。在一些实施方案中,可以使用任何已知的利用一种或多种选择试剂基于此类标记进行分离的方法。在一些实施方案中,所述一种或多种选择试剂导致分离,所述分离是基于亲和力或免疫亲和力的分离。例如,在一些方面,选择包括与一种或多种试剂一起孵育,用于基于一种或多种标记(通常是细胞表面标记)的细胞表达或表达水平来分离细胞和细胞群,例如通过与特异性地结合至此类标记的抗体或结合配偶体一起孵育,之后通常进行洗涤步骤并分离已结合抗体或结合配偶体的细胞与未结合至抗体或结合配偶体的那些细胞。在一些实施方案中,所述选择和/或所述过程的其他方面如W0 2015/164675中所述。

[0186] 在此类过程的一些方面,将一定体积的细胞与一定量的基于亲和力的所需选择试剂混合。基于免疫亲和力的选择可以使用任何系统或方法进行,所述系统或方法使得在分离的细胞与特异性地结合至细胞上的标记的分子(例如,固体表面(例如粒子)上的抗体或其他结合配偶体)之间产生有利的能量相互作用。在一些实施方案中,方法是使用粒子诸如珠,例如磁珠进行,所述粒子包被有对细胞的标记具有特异性的选择剂(例如抗体)。可以将粒子(例如珠)与细胞在容器(如管或袋)中一起孵育或混合,同时振荡或混合,其中细胞密度与粒子(例如,珠)的比率是恒定的,以帮助促进能量上有利的相互作用。在其他情况下,所述方法包括选择细胞,其中所述选择的全部或一部分是在离心室的内部空腔中进行,例如在离心旋转下进行。在一些实施方案中,将细胞与选择试剂(例如基于免疫亲和力的选择试剂)一起孵育是在离心室中进行。在某些实施方案中,使用在W0 2009/072003、US 20110003380或W0 2016/073602中所述的系统、装置或设备进行所述分离或分开。

[0187] 在一些实施方案中,通过在离心室的空腔中实施此类选择步骤或其部分(例如,与

抗体涂覆的粒子(例如磁珠)一起孵育),用户能够控制某些参数,例如各种溶液的体积、在处理期间溶液的添加及其时间安排,与其他可用方法相比,这可以提供多种优势。例如,在孵育期间减少空腔中液体体积的能力可以增加选择中使用的粒子(例如珠试剂)的浓度,并由此增加溶液的化学势,而不影响空腔中的总细胞数。这又可以增强正在处理的细胞与用于选择的粒子之间的成对相互作用。在一些实施方案中,例如,在与如本文所述的系统、电路和控制相关联时,在室中进行孵育步骤,允许用户在孵育期间的一个或多个所需时间实现对溶液的搅动,这也可以改善相互作用。

[0188] 在一些实施方案中,所述选择步骤的至少一部分是在离心室中进行的,其包括将细胞与选择试剂一起孵育。在此类过程的一些方面,将一定体积的细胞与一定量所需的基于亲和力的选择试剂混合,所述量远少于根据制造商的说明书在用于相同细胞数量和/或细胞体积的选择的管或容器中进行类似选择时通常所用的量。在一些实施方案中,所采用的一种或多种选择试剂的量是根据制造商的说明书在用于相同细胞数量和/或相同细胞体积的基于管或容器的孵育中进行细胞选择时所采用的一种或多种相同选择试剂的量的不超过5%、不超过10%、不超过15%、不超过20%、不超过25%、不超过50%、不超过60%、不超过70%或不超过80%。

[0189] 在一些实施方案中,对于细胞的选择,例如基于免疫亲和力的选择,将细胞在室空腔中在组合物中孵育,所述组合物还含有选择缓冲液,所述选择缓冲液含有选择试剂,所述选择试剂例如特异性地结合至希望富集和/或耗尽的细胞上而不是组合物中其他细胞上的表面标记的分子,例如抗体,所述分子任选地偶联到支架,例如聚合物或表面,例如珠,例如磁珠,例如与对CD4和CD8具有特异性的单克隆抗体偶联的磁珠。在一些实施方案中,如所描述的,将选择试剂添加至室空腔中的细胞,所添加的量与在振荡或旋转的管中进行选择时,对相同细胞数量或相同细胞体积实现大致相同或类似的选择效率通常使用或将需要的选择试剂的量相比显著较小(例如不大于所述量的5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%或80%)。在一些实施方案中,在向细胞和选择试剂添加选择缓冲液的情况下进行孵育,以实现例如10mL至200mL试剂的孵育的目标体积,例如至少或约至少或约10mL、20mL、30mL、40mL、50mL、60mL、70mL、80mL、90mL、100mL、150mL或200mL。在一些实施方案中,将选择缓冲液和选择试剂在添加至细胞之前预先混合。在一些实施方案中,将选择缓冲液和选择试剂单独添加至细胞。在一些实施方案中,选择孵育是在周期性温和混合条件下进行的,这可有助于促进能量上有利的相互作用,从而允许在实现高选择效率的同时使用较少的总选择试剂。

[0190] 在一些实施方案中,与选择试剂一起孵育的总持续时间为或为约5分钟至6小时,例如30分钟至3小时,例如至少或约至少30分钟、60分钟、120分钟或180分钟。

[0191] 在一些实施方案中,孵育通常在混合条件下进行,例如在旋转的存在下,通常以相对低的力或速度旋转,例如速度低于用于使细胞沉淀的速度,例如为或为约600rpm至1700rpm(例如,为或为约或至少600rpm、1000rpm或1500rpm或1700rpm),例如在样品或室壁或其他容器壁处的一定RCF下,所述RCF为或为约80g至100g(例如,为或为约或至少80g、85g、90g、95g或100g)。在一些实施方案中,旋转是使用以这种低速旋转和之后的休息时间段的重复间隔来进行,例如旋转和/或休息1、2、3、4、5、6、7、8、9或10秒,例如旋转大约1或2秒,然后休息大约5、6、7或8秒。

[0192] 在一些实施方案中,这个过程是在与所述室为整体的完全封闭的系统内进行的。在一些实施方案中,这个过程(并且在一些方面还有一个或多个另外的步骤,例如洗涤含有细胞的样品如单采术样品的预先洗涤步骤)以自动化方式进行,使得将细胞、试剂和其他组分在适当时间吸入所述室中和推出所述室并实现离心,以便使用自动化程序在单一封闭系统中完成洗涤和结合步骤。

[0193] 在一些实施方案中,在孵育和/或混合细胞和一种和/或多种选择试剂后,使所孵育的细胞经受分离,以基于一种或多种特定试剂的存在或不存在来选择细胞。在一些实施方案中,在同一封闭系统中进行分离,其中将细胞与选择试剂一起进行孵育。在一些实施方案中,在与选择试剂一起孵育后,将所孵育的细胞(包括其中已经结合选择试剂的细胞)转移到系统中用于基于免疫亲和力来分离细胞。在一些实施方案中,用于基于免疫亲和力的分离的系统是或含有磁分离柱。

[0194] 此类分离步骤可以基于阳性选择(其中保留已结合试剂(例如抗体或结合配偶体)的细胞以供进一步使用)和/或阴性选择(其中保留尚未结合试剂例如抗体或结合配偶体的细胞)。在一些例子中,保留两种级分以供进一步使用。在一些方面,在无法获得专门鉴定异质性群体中的细胞类型的抗体,使得最好基于除了所需群体以外的细胞表达的标记来进行分离的情况下,阴性选择可以特别有用。

[0195] 在一些实施方案中,加工步骤进一步包括如使用可进行基于亲和力的选择的系统或设备对孵育的细胞进行阴性和/或阳性选择。在一些实施方案中,通过以下方式进行分离:通过阳性选择富集特定细胞群,或通过阴性选择耗尽特定细胞群。在一些实施方案中,阳性或阴性选择是通过将细胞与一种或多种抗体或其他结合剂一起孵育完成的,所述一种或多种抗体或其他结合剂与分别在阳性或阴性选择的细胞上表达(标记⁺)或以相对较高水平表达(标记^高)的一种或多种表面标记特异性结合。

[0196] 分离无需导致特定细胞群或表达特定标记的细胞的100%富集或去除。例如,针对特定类型的细胞(如表达标记的那些)的阳性选择或富集是指增加此类细胞的数量或百分比,但不需要导致不表达所述标记的细胞的完全不存在。同样,特定类型的细胞(如表达标记的那些)的阴性选择、去除或耗尽是指减少此类细胞的数量或百分比,但不需要导致全部此类细胞的完全去除。

[0197] 在一些例子中,进行多轮分离步骤,其中使来自一个步骤的阳性或阴性选择的级分经受另一个分离步骤,如之后的阳性或阴性选择。在一些例子中,单一分离步骤可以同时耗尽表达多种标记的细胞,如通过将细胞与多种抗体或结合配偶体(每种抗体或结合配偶体对被靶向用于阴性选择的标记具有特异性)一起孵育。同样,通过将细胞与在各种细胞类型上表达的各种抗体或结合配偶体一起孵育,可以同时阳性选择各种细胞类型。

[0198] 例如,在一些方面,T细胞的特定亚群(如对一种或多种表面标记呈阳性或高水平表达的细胞(例如,CD28⁺、CD62L⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺和/或CD45RO⁺T细胞))通过阳性或阴性选择技术来分离。在一些实施方案中,通过与特异性结合此类标记的一种或多种抗体或结合配偶体一起孵育来选择此类细胞。在一些实施方案中,抗体或结合配偶体可以与固体支持物或基质(如磁珠或顺磁珠)缀合(如直接或间接地)以实现选择。例如,可以使用抗CD3/抗CD28缀合的磁珠(例如,DYNABEADS® M-450CD3/CD28T细胞扩增器和/或ExpACT®珠)阳性选择CD3⁺、CD28⁺T细胞。

[0199] 在一些实施方案中,通过阴性选择在非T细胞(如B细胞、单核细胞或其他白细胞)上表达的标记(如CD14),将T细胞与PBMC样品分离。在一些方面,CD4⁺或CD8⁺选择步骤用于分离CD4⁺辅助T细胞和CD8⁺细胞毒性T细胞。可以通过对在一种或多种幼稚、记忆和/或效应T细胞亚群上表达或以相对较高的程度表达的标记进行阳性或阴性选择,将此类CD4⁺和CD8⁺群体进一步分选为亚群。

[0200] 在一些实施方案中,如通过基于与相应亚群相关的表面抗原进行阳性或阴性选择,将CD8⁺细胞针对幼稚、中枢记忆、效应记忆和/或中枢记忆干细胞进一步富集或耗尽。在一些实施方案中,针对中枢记忆T(T_{CM})细胞进行富集以增加功效,如以改善施用后的长期存活、扩增和/或移植,这在一些方面在此类亚群中特别稳健。参见Terakura等人,(2012) Blood.1:72-82;Wang等人(2012) J Immunother.35(9):689-701。在一些实施方案中,组合富含TCM的CD8⁺T细胞与CD4⁺T细胞进一步增强功效。

[0201] 在实施方案中,记忆T细胞存在于CD8⁺外周血淋巴细胞的CD62L⁺和CD62L⁻两个子集中。可以将PBMC针对CD62L-CD8⁺和/或CD62L⁺CD8⁺级分进行富集或耗尽,如使用抗CD8和抗CD62L抗体。

[0202] 在一些实施方案中,中枢记忆T(TCM)细胞的富集是基于CD45RO、CD62L、CCR7、CD28、CD3和/或CD 127的阳性或高表面表达;在一些方面,它是基于对表达或高度表达CD45RA和/或颗粒酶B的细胞的阴性选择。在一些方面,通过表达CD4、CD14、CD45RA的细胞的耗尽和表达CD62L的细胞的阳性选择或富集来进行富含TCM细胞的CD8⁺群体的分离。在一方面,中枢记忆T(TCM)细胞的富集从基于CD4表达所选择阴性细胞级分开始进行,所述阴性细胞级分经受基于CD14和CD45RA的表达的阴性选择以及基于CD62L的阳性选择。在一些方面,此类选择是同时进行的,并且在其他方面,是以任何顺序依序进行的。在一些方面,用于制备CD8⁺细胞群或亚群的相同的基于CD4表达的选择步骤也用于产生CD4⁺细胞群或亚群,使得来自基于CD4的分离的阳性和阴性级分被保留并用于所述方法的后续步骤中,任选地在在一个或多个其他阳性或阴性选择步骤后。在一些实施方案中,对CD4⁺细胞群体的选择和对CD8⁺细胞群体的选择同时进行。在一些实施方案中,CD4⁺细胞群体和对CD8⁺细胞群体的选择以任一顺序依序进行。在一些实施方案中,用于选择细胞的方法可以包括公开的美国申请号US20170037369中所述的那些。在一些实施方案中,所选择的CD4⁺细胞群体和所选择的CD8⁺细胞群体可以在选择后进行组合。在一些方面,所选择的CD4⁺细胞群体与所选择的CD8⁺细胞群体可以在容器(如袋)中组合。

[0203] 在一个特定例子中,PBMC样品或其他白细胞样品经受CD4⁺细胞的选择,其中保留了阴性和阳性两种级分。然后使阴性级分经受基于CD14和CD45RA或CD19的表达的阴性选择和基于中枢记忆T细胞所特有的标记(如CD62L或CCR7)的阳性选择,其中阳性和阴性选择是以任一顺序进行的。

[0204] 可以通过鉴定具有细胞表面抗原的细胞群将CD4⁺T辅助细胞分选为幼稚、中枢记忆和效应细胞。CD4⁺淋巴细胞可以通过标准方法来获得。在一些实施方案中,幼稚CD4⁺T淋巴细胞是CD45RO⁻、CD45RA⁺、CD62L⁺或CD4⁺T细胞。在一些实施方案中,中枢记忆CD4⁺细胞是CD62L⁺且CD45RO⁺。在一些实施方案中,效应子CD4⁺细胞是CD62L⁻和CD45RO⁻。

[0205] 在一个例子中,为了通过阴性选择富集CD4⁺细胞,单克隆抗体混合剂通常包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。在一些实施方案中,所述抗体或结合配偶

体结合至固体支持物或基质(如磁珠或顺磁珠),以允许分离细胞用于阳性和/或阴性选择。例如,在一些实施方案中,使用免疫磁性(或亲和磁性)分离技术来分开或分离细胞和细胞群(综述于以下文献中:Methods in Molecular Medicine,第58卷:Metastasis Research Protocols,第2卷:Cell Behavior In Vitro and In Vivo,第17-25页S.A.Brooks和U.Schumacher编辑©Humana Press Inc.,新泽西州托托瓦)。

[0206] 在一些方面,将待分离的所孵育的细胞样品或组合物与含有小的可磁化或磁响应材料(如磁响应粒子或微粒,如顺磁珠(例如Dynabeads或MACS®珠))的选择试剂一起孵育。磁响应材料(例如,粒子)通常直接或间接地附着于结合配偶体(例如,抗体),所述结合配偶体与希望分离(例如,希望阴性地或阳性地选择)的一个细胞、多个细胞或细胞群上存在的分子(例如,表面标记)特异性结合。

[0207] 在一些实施方案中,磁粒或磁珠包含与特异性结合成员(如抗体或其他结合配偶体)结合的磁响应材料。用于磁分离方法的许多熟知的磁响应材料是已知的,例如在Molday的美国专利号4,452,773和欧洲专利说明书EP 452342B中描述的那些,将所述专利通过引用特此并入。胶体大小的粒子(例如在Owen美国专利号4,795,698;和Liberti等人的美国专利号5,200,084中所述的那些)。

[0208] 通常在如下条件下进行孵育,借此附着至磁粒或磁珠的抗体或结合配偶体或者与此类抗体或结合配偶体特异性结合的分子(如二抗或其他试剂)与样品内细胞上的细胞表面分子(如果存在)特异性结合。

[0209] 在某些实施方案中,磁响应粒子被包被在一抗或其他结合配偶体、二抗、凝集素、酶或链霉亲和素中。在某些实施方案中,磁粒经由对一种或多种标记具有特异性的一抗的包被而附着至细胞。在某些实施方案中,用一抗或结合配偶体标记细胞而不是珠,然后添加细胞类型特异性二抗或其他结合配偶体(例如,链霉亲和素)包被的磁粒。在某些实施方案中,链霉亲和素包被的磁粒是与生物素化的一抗或二抗结合使用。

[0210] 在一些方面,在其中将样品置于磁场中的过程中实现分离,并且具有附接于其上的磁响应或可磁化粒子的那些细胞将被吸引至磁体并与未标记的细胞分离。对于阳性选择,保留被吸引至磁体的细胞;对于阴性选择,保留未被吸引的细胞(未标记的细胞)。在一些方面,在同一选择步骤期间进行阳性与阴性选择的组合,其中保留阳性和阴性级分并进一步加工或使其经历进一步的分离步骤。

[0211] 在一些实施方案中,基于亲和力的选择是经由磁激活细胞分选(MACS)(Miltenyi Biotec,加利福尼亚州奥本)来进行。磁激活细胞分选(MACS),例如CliniMACS系统能够对附接有磁化粒子的细胞进行高纯度选择。在某些实施方案中,MACS以如下模式操作,其中在施加外部磁场后依序洗脱非靶种类和靶种类。也就是说,附着至磁化粒子的细胞被保持在适当的位置,而未附着的种类被洗脱。然后,在完成这个第一洗脱步骤后,以某种方式释放被捕获在磁场中并被阻止洗脱的种类,使得它们可以被洗脱和回收。在某些实施方案中,标记非靶细胞并将其从异质性细胞群中耗尽。

[0212] 在一些实施方案中,磁响应粒子保持附着至细胞,所述细胞随后被孵育、培养和/或工程化;在一些方面,粒子保持附着至用于施用于患者的细胞。在一些实施方案中,从细胞中去除可磁化或磁响应粒子。用于从细胞中去除可磁化粒子的方法是已知的,并且包括例如使用竞争性非标记抗体、与可切割接头缀合的可磁化粒子或抗体等。在一些实施方案

中,可磁化粒子是可生物降解的。

[0213] 在一些实施方案中,用于制造、生成或产生细胞疗法的过程包括以下步骤:其中单独分离CD4⁺细胞与CD8⁺细胞,然后在将重组受体(例如CAR)引入细胞中的步骤之前将这些细胞混合在一起。在一些实施方案中,在将编码重组受体的药剂引入之前和/或用于产生基因工程化细胞的一个或多个后续步骤之前,将CD4⁺细胞与CD8⁺细胞以如下比率混合:1:5至5:1的CD4⁺与CD8⁺T细胞,如1:3至3:1、1:2至2:1或为或约1:1的CD4⁺与CD8⁺细胞的比率。

[0214] 在一些实施方案中,用于制造、生成或产生细胞疗法的过程包括以下步骤:单独分离CD4⁺T细胞与CD8⁺T细胞,和对所选择或所分离的CD4⁺T细胞单独进行所述一个或多个后续步骤及对所选择或所分离的CD8⁺T细胞单独进行所述一个或多个后续步骤。在这种实施方案的方面,所转导的细胞(如用重组受体(例如CAR)基因工程化的CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞的单独组合物)可以在配制细胞的步骤之前组合在一起作为单一组合物。在这种实施方案的其他方面,所转导的细胞(如所转导的细胞,如用重组受体(例如CAR)基因工程化的CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞的单独组合物)是单独配制的,如用于向受试者单独施用。

B. 细胞的激活和刺激

[0215] 在一些实施方案中,用于制造细胞(如通过所提供的方法评估或分析的细胞)或将细胞工程化的方法包括刺激所分离的细胞(如选择的细胞群体)的步骤。所述孵育可以在所述多核苷酸的引入(如引入含有用于整合的转基因序列的多核苷酸,例如通过转导)之前或与所述多核苷酸的引入结合。在一些实施方案中,刺激导致例如在转导之前细胞的激活和/或增殖。

[0216] 在一些实施方案中,所述制造或工程化包括孵育细胞(如选择的细胞)的步骤,其中所述孵育步骤可以包括细胞的培养、培育、刺激、激活和/或繁殖。在一些实施方案中,在刺激条件或刺激剂的存在下孵育所述组合物或细胞。此类条件包括针对以下而设计的那些条件:在群体中诱导细胞的增殖、扩增、激活和/或存活以模拟抗原暴露和/或引发细胞用于遗传工程化(如用于引入重组抗原受体)。

[0217] 在一些实施方案中,用于刺激和/或激活的条件可以包括以下中的一种或多种:特定介质、温度、氧含量、二氧化碳含量、时间、药剂(例如,营养素、氨基酸、抗生素、离子和/或刺激因子(如细胞因子、趋化因子、抗原、结合配偶体、融合蛋白、重组可溶性受体和任何其他被设计用于激活细胞的药剂))。

[0218] 在一些实施方案中,刺激条件或刺激剂包括能够刺激或激活TCR复合物的细胞内信号传导结构域的一种或多种药剂(例如,配体)。在一些方面,所述药剂开启或启动T细胞中的TCR/CD3细胞内信号级联放大,所述药剂例如适合于递送初级信号(例如,以启动ITAM诱导的信号的激活)的药剂,如对TCR组分特异性的那些(例如,抗CD3)。在一些实施方案中,所述刺激条件包括促进共刺激信号的一种或多种药剂,如对T细胞共刺激受体具有特异性的药剂(例如,抗CD28或抗4-1BB)。在一些实施方案中此类药剂和/或配体可以与固体支持物(如珠)和/或一种或多种细胞因子结合。所述刺激剂包括抗CD3/抗CD28珠(例如, **DYNABEADS® M-450CD3/CD28**T细胞扩增剂和/或**ExpACT®**珠)。任选地,扩增方法可以还包括向培养基中添加抗CD3和/或抗CD28抗体(例如,以至少约0.5ng/mL的浓度)的步骤。在一些实施方案中,所述刺激剂包括IL-2、IL-7和/或IL-15。在一些方面,IL-2浓度是至少约10单位/mL、至少约50单位/mL、至少约100单位/mL或至少约200单位/mL。

[0219] 所述条件可以包括以下中的一种或多种：特定培养基、温度、氧含量、二氧化碳含量、时间、药剂（例如，营养素、氨基酸、抗生素、离子和/或刺激因子（如细胞因子、趋化因子、抗原、结合配偶体、融合蛋白、重组可溶性受体和任何其他旨在激活细胞的药剂））。

[0220] 在一些方面，根据多种技术进行孵育，所述多种技术例如以下文献中所述的那些：Riddell等人的美国专利号6,040,177；Klebanoff等人(2012) J Immunother. 35 (9) :651-660；Terakura等人(2012) Blood. 1:72-82；和/或Wang等人(2012) J Immunother. 35 (9) :689-701。

[0221] 在一些实施方案中，在一种或多种刺激条件或刺激剂存在下进行的孵育的至少一部分是在离心室的内部空腔中进行，例如在离心旋转下进行，如WO 2016/073602中所述的。在一些实施方案中，在离心室中进行的孵育的至少一部分包括与一种或多种试剂混合以诱导刺激和/或激活。在一些实施方案中，将细胞（如选择的细胞）与刺激条件或刺激剂在离心室中混合。在此类过程的一些方面，将一定体积的细胞与一定量的一种或多种刺激条件或刺激剂混合，所述刺激条件或刺激剂远小于在细胞培养板或其他系统中进行类似刺激时通常使用的刺激条件或刺激剂。

[0222] 在一些实施方案中，将刺激剂以一定的量添加至室空腔中的细胞，所述一定的量与例如在周期性振荡或旋转的管或袋中进行选择而不在离心室中混合时，对相同细胞数量或相同细胞体积实现大致相同或类似的选择效率通常使用或将需要的刺激剂的量相比显著较小（例如不大于所述量的5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%或80%）。在一些实施方案中，在向细胞和刺激剂中添加孵育缓冲液的情况下进行孵育，以实现例如10mL至200mL（例如至少或约至少或约10mL、20mL、30mL、40mL、50mL、60mL、70mL、80mL、90mL、100mL、150mL或200mL）试剂的孵育的目标体积。在一些实施方案中，在添加细胞之前预先混合孵育缓冲液和刺激剂。在一些实施方案中，将孵育缓冲液和刺激剂单独添加至细胞中。在一些实施方案中，在周期性温和混合条件下进行刺激孵育，这可能有助于促进能量上有利的相互作用，并且从而允许在实现细胞的刺激和激活的同时使用较少的总体刺激剂。

[0223] 在一些实施方案中，孵育通常在混合条件下进行，例如在旋转的存在下，通常以相对低的力或速度旋转，例如速度低于用于使细胞沉淀的速度，例如为或为约600rpm至1700rpm（例如，为或为约或至少600rpm、1000rpm或1500rpm或1700rpm），例如在样品或室壁或其他容器壁处的一定RCF下，所述RCF为或为约80g至100g（例如，为或为约或至少80g、85g、90g、95g或100g）。在一些实施方案中，旋转是使用以这种低速旋转和之后的休息时间段的重复间隔来进行，例如旋转和/或休息1、2、3、4、5、6、7、8、9或10秒，例如旋转大约1或2秒，然后休息大约5、6、7或8秒。

[0224] 在一些实施方案中，例如与刺激剂一起孵育的总持续时间在或在约1小时与96小时之间、1小时与72小时之间、1小时与48小时之间、4小时与36小时之间、8小时与30小时之间或12小时与24小时之间，例如至少或约至少6小时、12小时、18小时、24小时、36小时或72小时。在一些实施方案中，进一步孵育进行在或约在1小时与48小时之间、4小时与36小时之间、8小时与30小时之间或12小时与24小时之间（包含端值）。

C. 含有转基因序列的多核苷酸的引入

[0225] 在一些实施方案中，可以进行所提供的方法来评估通过引入编码所述转基因序列的多核苷酸而工程化的细胞。在一些实施方案中，用于制造细胞（如通过所提供的方法评估

或分析的细胞)或将细胞工程化的方法包括用于引入含有编码重组蛋白(例如,重组受体)的转基因序列的多核苷酸的步骤。在一些实施方案中,在用于将所述转基因序列整合到细胞基因组中的条件下,所述工程化细胞已引入了包含转基因序列的多核苷酸。在细胞中引入含有转基因序列(如编码重组蛋白的转基因序列)的多核苷酸可以使用多种不同的递送方法中的任一种进行。在一些方面,用于整合所述转基因序列的条件包括本文所述的任一种,例如使用用于将所述转基因序列整合到细胞(例如,免疫细胞)的基因组中的病毒转导系统。

[0226] 在一些方面,含有编码重组蛋白(如重组受体)的转基因序列的多核苷酸可以包含在载体中。在一些方面,此类载体包括病毒和非病毒系统,包括慢病毒和 γ 逆转录病毒系统,以及基于转座子的系统,如基于PiggyBac或Sleeping Beauty的基因转移系统。示例性方法包括用于将核酸引入或递送至细胞中的那些,包括经由病毒(例如,逆转录病毒或慢病毒)转导、转座子和电穿孔。

[0227] 在一些实施方案中,所述多核苷酸的引入是通过以下方法完成的:首先如通过将细胞与诱导反应(如增殖、存活和/或激活,例如如通过细胞因子或激活标记的表达所测量)的刺激物组合来刺激细胞,然后转导激活的细胞,并且在培养中扩增至足以用于临床应用的量。

[0228] 在一些实施方案中,所述多核苷酸是线性或环状核酸分子(如线性或环状DNA或线性RNA)并且可以使用用于将核酸分子递送至细胞中的任何方法来递送。在特定实施方案中,将所述多核苷酸以核苷酸形式(例如,作为非病毒载体或在非病毒载体内)引入细胞中。在一些实施方案中,非病毒载体是或包括多核苷酸,例如DNA或RNA多核苷酸,其适合于通过用于基因递送的任何合适的和/或已知的非病毒方法进行转导和/或转染,所述非病毒方法例如但不限于显微注射、电穿孔、瞬时细胞压缩或挤压(如Lee等人(2012) *Nano Lett* 12: 6322-27所述)、脂质介导的转染、肽介导的递送(例如细胞穿透肽)、或其组合。

[0229] 在一些实施方案中,经由电穿孔将重组核酸转移到T细胞中(参见例如,Chicaybam等人,(2013) *PLoS ONE* 8(3):e60298和Van Tedeloo等人(2000) *Gene Therapy* 7(16): 1431-1437)。在一些实施方案中,经由转座将重组核酸转移到T细胞中(参见例如,Manuri等人(2010) *Hum Gene Ther* 21(4):427-437;Sharma等人(2013) *Molec Ther Nucl Acids* 2, e74;和Huang等人(2009) *Methods Mol Biol* 506:115-126)。在免疫细胞中引入和表达遗传物质的其他方法包括磷酸钙转染(例如,如在Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons,纽约州纽约市中所述)、原生质体融合、阳离子脂质体介导的转染;钨粒子促进的微粒轰击(Johnston,Nature,346:776-777(1990));以及磷酸锆DNA共沉淀(Brash等人,*Mol.Cell Biol.*,7:2031-2034(1987))。

[0230] 用于转移编码所述重组产物的核酸的其他方法和载体是例如在国际专利申请公开号WO 2014055668和美国专利号7,446,190中所述的那些。

[0231] 在一些实施方案中,所述细胞(例如,T细胞)可以在扩增过程中或扩增后进行转导,例如用含有多核苷酸的病毒制剂转导,所述多核苷酸含有编码重组蛋白(如T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR))的转基因序列。例如,用于引入所需受体的多核苷酸的这种转导可以用任何合适的逆转录病毒载体来进行。然后可以使遗传修饰的细胞群摆脱初始刺激物(例如,抗CD3/抗CD28刺激物),随后用第二类型的刺激物例如通过从头引入的受体进行

刺激。该第二类型的刺激物可以包括呈肽/MHC分子形式的抗原刺激物、遗传引入的受体的同源(交联)配体(例如CAR的天然配体)或在新受体的框架内直接结合(例如通过识别受体内的恒定区)的任何配体(如抗体)。参见例如,Cheadle等人,“Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy”Methods Mol Biol.2012;907:645--66或Barrett等人,Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine第65卷:333-347(2014)。

[0232] 在一些情况下,可以使用不需要激活细胞(例如,T细胞)的载体。在一些这样的情况下,可以在激活之前选择和/或转导细胞。因此,可以在培养细胞之前或之后将细胞工程化,并且在一些情况下在培养的至少一部分的同时或期间将细胞工程化。

[0233] 在一些方面,对细胞进一步工程化以促进细胞因子或其他因子的表达。另外的核酸(例如,用于引入的基因)包括:用于改善治疗功效的那些,如通过促进所转移细胞的活力和/或功能;用来提供用于选择和/或评价细胞(如用于评估体内存活或定位)的遗传标记的基因;用于改善安全性的基因,例如通过使细胞对体内阴性选择易感,如以下文献中所述:Lupton S.D.等人,Mol.and Cell Biol.,11:6(1991);和Riddell等人,Human Gene Therapy 3:319-338(1992);还参见WO 1992/008796和WO 1994/028143,其描述了使用通过将显性的阳性选择标记与阴性选择标记融合而获得的双功能选择融合基因。参见例如,Riddell等人,美国专利号6,040,177,第14-17栏。

[0234] 在一些实施方案中,引入是通过使组合物的一个或多个细胞与编码重组蛋白(例如,重组受体)的核酸分子接触来进行。在一些实施方案中,接触可以通过离心如旋转接种(例如离心接种)来实现。此类方法包括如WO 2016/073602中所述的任何方法。示例性离心室包括由Biosafe SA生产和销售的那些,包括用于Sepax®和Sepax® 2系统的那些,包括A-200/F和A-200离心室以及用于此类系统的各种试剂盒。示例性室、系统和加工仪器和机柜描述于例如以下文献中:美国专利号6,123,655、美国专利号6,733,433以及US 2008/0171951和WO 00/38762,将其每一个的内容通过引用以其整体并入本文。用于此类系统的示例性试剂盒包括但不限于由BioSafe SA以产品名CS-430.1、CS-490.1、CS-600.1或CS-900.2销售的一次性试剂盒。

[0235] 在一些实施方案中,将系统与其他仪器一起包括和/或置于与其他仪器相关联,所述其他仪器包括用于操作、自动化、控制和/或监测转导步骤以及在系统中执行的一个或多个各种其他处理步骤(例如,可以使用或结合如本文或在WO 2016/073602中描述的离心室系统进行的一个或多个处理步骤)的方面的仪器。在一些实施方案中,这种仪器容纳于机柜中。在一些实施方案中,仪器包括机柜,所述机柜包括外壳,所述外壳含有控制电路、离心机、罩、电机、泵、传感器、显示器和用户界面。示例性装置描述于美国专利号6,123,655、美国专利号6,733,433和US 2008/0171951中。

[0236] 在一些实施方案中,系统包含一系列容器,例如袋、管路、旋塞、夹子、连接器和离心室。在一些实施方案中,容器(例如袋子)包括一个或多个容器(例如袋子),其在一容器或单独容器(例如同一个袋子或单独袋子)中含有待转导的细胞和病毒载体粒子。在一些实施方案中,所述系统还包括一个或多个容器(例如袋子),所述容器含有介质,例如稀释剂和/或洗涤溶液,在所述方法期间将所述介质抽入室和/或其他部件中以稀释、重悬和/或洗涤组分和/或组合物。容器可以连接在系统中的一个或多个位置,例如连接在对应于输入管

线、稀释剂管线、洗涤管线、废液管线和/或输出管线的位置。

[0237] 在一些实施方案中,室与离心机相关联,离心机能够实现所述室的旋转,例如围绕其旋转轴旋转。结合细胞的转导和/或在一个或多个其他处理步骤中,旋转可以发生在孵育之前、期间和/或之后。因此,在一些实施方案中,各个处理步骤中的一个或多个在旋转下(例如在特定的力下)进行。所述室通常能够竖直或大致竖直地旋转,使得所述室在离心期间竖直放置,并且侧壁和轴是竖直或大致竖直的,且一个或多个端壁是水平或大致水平的。

[0238] 在一些实施方案中,可以使含有细胞、病毒粒子和试剂的组合物旋转,通常以相对较低的力或速度旋转,例如速度低于用于沉淀细胞的速度,例如为或为约600rpm至1700rpm(例如,为或为约或至少600rpm、1000rpm或1500rpm或1700rpm)。在一些实施方案中,旋转是以从或从约100g至3200g(例如,为或约或至少或至少约100g、200g、300g、400g、500g、1000g、1500g、2000g、2500g、3000g或3200g)的力(例如,相对离心力)来进行,如例如在室或空腔的内壁或外壁处所测量。术语“相对离心力”或RCF通常被理解为在如与旋转轴相比在空间的特定点处,相对于地球的重力,施加在物体或物质(例如细胞、样品或团粒和/或所旋转的室或其他容器中的点)上的有效力。所述值可以使用熟知的公式来确定,所述公式考虑到重力、旋转速度和旋转半径(与旋转轴的距离以及测量RCF的物体、物质或粒子)。

D. 核酸和载体

[0239] 在一些实施方案中,使用所提供的方法评估或分析的细胞包括已被基因工程化的免疫细胞。在一些实施方案中,所述细胞(例如,T细胞)被基因工程化为表达重组蛋白,如重组受体。在一些实施方案中,所述工程化是通过引入含有编码重组蛋白或其部分或组分的转基因序列的一种或多种多核苷酸来进行的。在一些方面,引入多核苷酸(例如,含有所述转基因序列)的一部分以将所述序列整合到细胞(例如,正在工程化的细胞)的基因组中。在一些方面,所述多核苷酸包含在载体(如病毒载体)中以将所述多核苷酸引入所述工程化细胞中。

[0240] 在一些实施方案中,含有所述转基因序列的多核苷酸可以包含在载体分子中。在一些实施方案中,所述病毒是DNA病毒(例如,dsDNA或ssDNA病毒)。在一些实施方案中,所述病毒是RNA病毒(例如,ssRNA病毒)。示例性病毒载体/病毒包括例如逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺相关病毒(AAV)、痘苗病毒、痘病毒和单纯疱疹病毒、或本文其他地方所述的任何病毒。可以将多核苷酸作为载体分子的部分引入细胞中,所述载体分子具有另外的序列,如例如复制起点、启动子和编码抗生素抗性的基因。此外,多核苷酸可以作为裸核酸来引入,作为与诸如脂质体、纳米粒子或泊洛沙姆的材料复合的核酸来引入,或者可以通过病毒(例如,腺病毒、AAV、疱疹病毒、逆转录病毒、慢病毒和整合酶缺陷慢病毒(IDLV))来递送。

[0241] 在一些实施方案中,使用重组感染性病毒粒子(例如像源自猿猴病毒40(SV40)、腺病毒、腺相关病毒(AAV)和人免疫缺陷病毒(HIV)的载体)将包含所述转基因序列(如编码重组蛋白的转基因序列)的多核苷酸转移到细胞中。在一些实施方案中,使用诸如以下的重组慢病毒载体或逆转录病毒载体将重组核酸转移到T细胞中:γ-逆转录病毒载体(参见例如,Koste等人(2014)Gene Therapy 2014年4月3日.doi:10.1038/gt.2014.25;Carlens等人(2000)Exp Hematol 28(10):1137-46;Alonso-Camino等人(2013)Mol Ther Nucl Acids 2,e93;Park等人,Trends Biotechnol.2011年11月29(11):550-557)或HIV-1来源的慢病毒载体。

[0242] 在一些实施方案中,所述逆转录病毒载体具有长末端重复序列(LTR),例如,源自莫洛尼鼠白血病病毒(MoMLV)、骨髓增生性肉瘤病毒(MPSV)、鼠胚胎干细胞病毒(MESV)、鼠干细胞病毒(MSCV)、脾病灶形成病毒(SFFV)或人免疫缺陷病毒(HIV)的逆转录病毒载体。在一些实施方案中,所述逆转录病毒包括源自任何禽类或哺乳动物细胞来源的那些。逆转录病毒通常是双嗜性的,这意味着它们能够感染包括人在内的若干种物种的宿主细胞。在一些实施方案中,待表达的基因替代逆转录病毒gag、pol和/或env序列。已经描述了许多例示性逆转录病毒系统(例如,美国专利号5,219,740、6,207,453、5,219,740;Miller和Rosman (1989) *BioTechniques* 7:980-990;Miller, A.D. (1990) *Human Gene Therapy* 1:5-14; Scarpa等人(1991) *Virology* 180:849-852;Burns等人(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8033-8037;以及Boris-Lawrie和Temin(1993) *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3:102-109)。

[0243] 慢病毒转导的方法是已知的。示例性方法描述于例如以下文献中:Wang等人(2012) *J. Immunother.* 35 (9):689-701;Cooper等人(2003) *Blood*. 101:1637-1644;Verhoeyen等人(2009) *Methods Mol Biol.* 506:97-114;以及Cavalieri等人(2003) *Blood*. 102 (2):497-505。

[0244] 在其他方面,通过病毒和/或非病毒基因转移方法递送所述多核苷酸。在一些实施方案中,将所述多核苷酸经由腺相关病毒(AAV)递送至细胞。可以使用任何AAV载体,包括但不限于AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8及其组合。在一些情况下,与衣壳血清型(例如,具有AAV5、AAV6或AAV8衣壳的AAV2 ITR)相比,AAV包括异源血清型的LTR。在一些实施方案中,通过重组AAV来递送含有所述一种或多种药剂的多核苷酸和/或多核苷酸。在一些实施方案中,AAV可以将其基因组掺入宿主细胞(例如,如本文所述的靶细胞)的基因组中。在另一个实施方案中,AAV是自身互补的腺相关病毒(scAAV),例如包装一起退火以形成双链DNA的两条链的scAAV。可以用于所公开的方法中的AAV血清型包括AAV1、AAV2、修饰的AAV2(例如,在Y444F、Y500F、Y730F和/或S662V处的修饰)、AAV3、修饰的AAV3(例如,在Y705F、Y731F和/或T492V处的修饰)、AAV4、AAV5、AAV6、修饰的AAV6(例如,在S663V和/或T492V处的修饰)、AAV7、AAV8、AAV 8.2、AAV9、AAV.rh10、修饰的AAV.rh10、AAV.rh32/33、修饰的AAV.rh32/33、AAV.rh43、修饰的AAV.rh43、AAV.rh64R1、修饰的AAV.rh64R1,并且假型化AAV(如AAV2/8、AAV2/5和AAV2/6)也可以用于所公开的方法中。

[0245] 在一些实施方案中,所述转基因序列包含在载体中或可以被克隆到一个或多个载体中。在一些实施方案中,所述一个或多个载体可以用于转化或转染宿主细胞,例如用于工程化的细胞。示例性载体包括设计用于引入、增殖和扩增或用于表达或用于两者的载体,如质粒和病毒载体。在一些方面,载体是表达载体,例如,重组表达载体。在一些实施方案中,可以使用标准重组DNA技术来制备所述重组表达载体。

[0246] 在一些实施方案中,载体可以是以下系列的载体:pUC系列(Fermentas Life Sciences)、pBluescript系列(Stratagene,加利福尼亚州拉霍亚)、pET系列(Novagen,威斯康星州麦迪逊)、pGEX系列(Pharmacia Biotech,瑞典乌普萨拉)或pEX系列(Clontech,加利福尼亚州帕罗奥图)。在一些情况下,也可以使用噬菌体载体,如 λ G10、 λ GT11、 λ ZapII(Stratagene)、 λ EMBL4和 λ NM1149。在一些实施方案中,可以使用植物表达载体,并且包括pBI01、pBI101.2、pBI101.3、pBI121和pBIN19(Clontech)。在一些实施方案中,动物表达载体包括pEUK-C1、pMAM和pMAMneo(Clontech)。

[0247] 在一些实施方案中,载体是病毒载体,如逆转录病毒载体。在一些实施方案中,将所述转基因序列和/或一种或多种另外的多肽经由逆转录病毒或慢病毒载体或经由转座子引入细胞中(参见例如,Baum等人(2006) *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*.13:1050-1063;Frecha等人(2010) *Molecular Therapy* 18:1748-1757;和Hackett等人(2010) *Molecular Therapy* 18:674-683)。

[0248] 在一些实施方案中,可以将编码重组蛋白(例如,重组受体)的一种或多种转基因序列或一种或多种载体和/或一种或多种另外的多肽在扩增期间或扩增之后引入细胞(例如,T细胞)中。例如,所述一种或多种转基因序列或一种或多种载体的这种引入可以用任何合适的逆转录病毒载体进行。然后可以使所得的基因工程化细胞摆脱初始刺激物(例如,抗CD3/抗CD28刺激物),并且随后用第二种类型的刺激物(例如,经由从头引入的重组蛋白,例如重组受体)进行刺激。该第二种类型的刺激物可以包括呈肽/MHC分子形式的抗原刺激物、遗传引入的受体的同源(交联)配体(例如CAR的天然抗原和/或配体)或在新受体的框架内直接结合(例如通过识别受体内的恒定区)的任何配体(如抗体)。参见例如,Cheadle等人,“Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy” *Methods Mol Biol.*2012; 907:645-66或Barrett等人,Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine第65卷:333-347(2014)。

[0249] 在一些情况下,可以使用不需要激活细胞(例如,T细胞)的载体。在一些此类情形中,可以在激活或刺激之前选择和/或转导细胞。因此,可以在培养细胞之前或之后将细胞工程化,并且在一些情况下在培养的至少一部分的同时或期间将细胞工程化。

1. 用于转导的病毒载体粒子的制备

[0250] 在一些实施方案中,使用重组感染性病毒粒子将包含所述转基因序列(如编码重组蛋白的转基因序列)的多核苷酸转移到细胞中。在一些方面,所述多核苷酸是经由病毒转导引入的。在一些方面,所述转基因序列包含在病毒载体中。所述病毒载体基因组通常以质粒形式构建,其可以转染到包装细胞系或生产细胞系中。在任何此类例子中,将编码重组蛋白(如重组受体)的转基因序列插入或定位在病毒载体的区域中,例如通常在病毒基因组的非必需区域中。在一些实施方案中,将所述转基因序列插入病毒基因组的某些病毒序列的位置中以产生具有复制缺陷的病毒。

[0251] 可以使用多种已知方法中的任何一种来产生逆转录病毒粒子,其基因组含有病毒载体基因组的RNA拷贝。在一些实施方案中,至少两种组分参与制备基于病毒的基因递送系统:第一,包装质粒,包括结构蛋白以及产生病毒载体粒子所必需的酶,第二,病毒载体本身,即,要转移的遗传物质。可以在设计这些组分之一或两者时引入生物安全保护措施。

[0252] 在一些实施方案中,包装质粒可以含有除了包膜蛋白以外的所有逆转录病毒(如HIV-1)蛋白(Naldini等人,1998)。在其他实施方案中,病毒载体可能缺乏另外的病毒基因(例如与毒力有关的那些,例如vpr、vif、vpu和nef和/或Tat(HIV的主要反式激活因子))。在一些实施方案中,慢病毒载体(例如基于HIV的慢病毒载体)仅包含三种亲本病毒的基因:gag、pol和rev,这减少或消除了野生型病毒通过重组而重构的可能性。

[0253] 在一些实施方案中,将病毒载体基因组引入包装细胞系中,所述细胞系含有将从病毒载体基因组转录的病毒基因组RNA包装至病毒粒子中所需的所有组分。可替代地,除所述一个或多个目的转基因序列(例如,编码重组核酸的)以外,所述病毒载体基因组还可以

包含编码病毒组分的一种或多种基因。然而,在一些方面,为了防止基因组在靶细胞中复制,将复制所需的内源病毒基因去除,并且在包装细胞系中单独提供。

[0254] 在一些实施方案中,用含有产生粒子所必需的组分的一种或多种质粒载体转染包装细胞系。在一些实施方案中,用含有病毒载体基因组(包括LTR、顺式作用包装序列和目的序列,即编码抗原受体(例如CAR)的核酸)的质粒;以及编码病毒酶和/或结构组分(例如Gag、pol和/或rev)的一种或多种辅助质粒转染包装细胞系。在一些实施方案中,利用多个载体分离产生逆转录病毒载体粒子的各种遗传组分。在一些此类实施方案中,向包装细胞提供单独的载体减少了原本可能产生有复制能力的病毒的重组事件的机会。在一些实施方案中,可以使用具有所有逆转录病毒组分的单一质粒载体。

[0255] 在一些实施方案中,将逆转录病毒载体粒子(例如慢病毒载体粒子)假型化以增加宿主细胞的转导效率。例如,在一些实施方案中,将逆转录病毒载体粒子(例如慢病毒载体粒子)用VSV-G糖蛋白假型化,其提供宽细胞宿主范围,从而扩展可以转导的细胞类型。在一些实施方案中,用编码非天然包膜糖蛋白的质粒或多核苷酸转染包装细胞系,以例如包括嗜异性、多嗜性或双嗜性包膜,如辛德比斯病毒包膜、GALV或VSV-G。

[0256] 在一些实施方案中,所述包装细胞系提供将病毒基因组RNA包装到慢病毒载体粒子中反式作用所需的组分,包括病毒调节蛋白和结构蛋白。在一些实施方案中,所述包装细胞系可以是能够表达慢病毒蛋白并产生功能性慢病毒载体粒子的任何细胞系。在一些方面,合适的包装细胞系包括293(ATCC CCL X)、293T、HeLA(ATCC CCL 2)、D17(ATCC CCL 183)、MDCK(ATCC CCL 34)、BHK(ATCC CCL-10)和Cf2Th(ATCC CRL 1430)细胞。

[0257] 在一些实施方案中,所述包装细胞系稳定地表达所述一种或多种病毒蛋白。例如,在一些方面,可以构建含有gag、pol、rev和/或其他结构基因但没有LTR和包装组分的包装细胞系。在一些实施方案中,可以用编码一种或多种病毒蛋白的核酸分子以及含有编码异源蛋白的核酸分子的病毒载体基因组和/或编码包膜糖蛋白的核酸对包装细胞系进行瞬时转染。

[0258] 在一些实施方案中,将病毒载体和包装质粒和/或辅助质粒经由转染或感染引入包装细胞系中。包装细胞系产生含有病毒载体基因组的病毒载体粒子。用于转染或感染的方法是熟知的。非限制性例子包括磷酸钙、DEAE-葡聚糖和脂质转染方法、电穿孔和显微注射。

[0259] 在将重组质粒和逆转录病毒LTR和包装序列引入特殊细胞系(例如,通过磷酸钙沉淀)中时,包装序列可以允许待包装至病毒粒子中的重组质粒的RNA转录,然后所述病毒粒子可能会被分泌到培养基中。在一些实施方案中,随后收集含有重组逆转录病毒的培养基,任选地将其浓缩,并用于基因转移。例如,在一些方面,在将包装质粒和转移载体共转染到包装细胞系后,从培养基中回收病毒载体粒子,并且由本领域技术人员使用标准方法进行滴定。

[0260] 在一些实施方案中,可以通过引入质粒以允许产生慢病毒粒子,而在包装细胞系(例如示例性HEK 293T细胞系)中产生逆转录病毒载体,例如慢病毒载体。在一些实施方案中,包装细胞被转染和/或含有编码gag和pol的多核苷酸,以及编码重组受体(例如抗原受体,例如CAR)的多核苷酸。在一些实施方案中,所述包装细胞系被任选地和/或另外用编码rev蛋白的多核苷酸转染和/或含有所述多核苷酸。在一些实施方案中,所述包装细胞系被

任选地和/或另外用编码非天然包膜糖蛋白(例如VSV-G)的多核苷酸转染和/或含有所述多核苷酸。在一些此类实施方案中,在转染细胞(例如HEK 293T细胞)后大约两天,细胞上清液含有可以回收并滴定的重组慢病毒载体。

[0261] 所回收和/或产生的逆转录病毒载体粒子可以用于使用如所述的方法转导靶细胞。一旦进入靶细胞中,病毒RNA就被逆转录,进入细胞核中并稳定整合到宿主基因组中。在病毒RNA整合后一天或两天,可以检测到重组蛋白(例如抗原受体,例如CAR)的表达。

E. 细胞的培育和/或扩增

[0262] 在一些实施方案中,使用所提供的方法评估或分析的细胞(例如,工程化细胞)是使用工程化或制造的方法产生的,所述工程化或制造的方法不包括在引入所述多核苷酸后培育和/或扩增细胞的步骤;或使用缩短或简略的工程化或制造过程,如使用非扩增制造过程产生的。在一些方面,在引入编码重组受体的核酸后,所述缩短或简略的制造过程包括缩短或简略的扩增步骤或不包括扩增步骤。在一些方面,在将包含转基因序列的多核苷酸引入细胞中后,使所述细胞经受缩短或简略的用于扩增的孵育步骤,或者不经受扩增步骤,例如经受非扩增制造过程。在一些方面,所提供的方法在非扩增、缩短或简略的制造过程期间的一个或多个时间点进行。

[0263] 在一些实施方案中,使用所提供的方法评估或分析的细胞(例如,工程化细胞)是使用工程化或制造的方法产生的,所述工程化或制造的方法可以包括用于培育工程化细胞(例如在促进增殖和/或扩增的条件下培育细胞)的一个或多个步骤。在一些实施方案中,所提供的方法包括用于培育工程化细胞(例如在促进增殖和/或扩增的条件下培育细胞)的一个或多个步骤。在一些实施方案中,在用于引入所述多核苷酸的过程的至少一部分(例如,经由病毒转导)期间,和/或在引入所述多核苷酸后,培养所述细胞,例如以用于培育或扩增所述细胞。在一些方面,所提供的方法可以在引入所述多核苷酸(例如经由病毒转导)后进行一次或多次,如在细胞培养或扩增期间的一个或多个时间点进行。

[0264] 在一些方面,在将包含转基因序列的多核苷酸引入细胞中后,随后将所述细胞转移到容器(如用于培养的袋)中。在一些实施方案中,用于培育或扩增细胞的容器是生物反应器袋,如灌注袋。在一些实施方案中,在密闭的、连接的生物反应器中和/或在生物反应器的控制下培育的细胞在培育期间比没有生物反应器的情况下培育的细胞(例如在静态条件下(例如在没有混合、摇摆、运动和/或灌注的情况下)培育的细胞)经历更快的扩增。

[0265] 在一些实施方案中,在基因工程化(例如通过转导或转染将重组多肽引入细胞)的步骤后在促进增殖和/或扩增的条件下培育工程化细胞。在特定实施方案中,在刺激条件下孵育细胞并用重组多核苷酸(例如编码重组受体的多核苷酸)转导或转染细胞后培育细胞。在一些实施方案中,所述培育产生富集T细胞的一种或多种培育组合物。

[0266] 在一些实施方案中,将工程化细胞在容器中培养,所述容器可以例如经由补料端口填充细胞培养基和/或细胞以用于培养所添加细胞。所述细胞可以来自需要培养细胞(例如,用于扩增和/或增殖细胞)的任何细胞来源。

[0267] 在一些方面,所述培养基是支持细胞(如T细胞)的生长、培育、扩增或增殖的适应性培养基。在一些方面,所述培养基可以是含有盐、氨基酸、维生素、糖或其任何组合的混合物的液体。在一些实施方案中,所述培养基进一步含有一种或多种刺激条件或刺激剂,例如在培养期间刺激细胞的培育、扩增或增殖。在一些实施方案中,所述刺激条件是或包括选自

IL-2、IL-7或IL-15的一种或多种细胞因子。在一些实施方案中,所述细胞因子是重组细胞因子。在一些实施方案中,在培养或孵育期间在培养基中的一种或多种细胞因子的浓度独立地是从或从约1IU/mL至1500IU/mL,例如为或为约1IU/mL至100IU/mL、2IU/mL至50IU/mL、5IU/mL至10IU/mL、10IU/mL至500IU/mL、50IU/mL至250IU/mL或100IU/mL至200IU/mL、50IU/mL至1500IU/mL、100IU/mL至1000IU/mL或200IU/mL至600IU/mL。在一些实施方案中,所述一种或多种细胞因子的浓度独立地为至少或至少约1IU/mL、5IU/mL、10IU/mL、50IU/mL、100IU/mL、200IU/mL、500IU/mL、1000IU/mL或1500IU/mL。

[0268] 在一些方面,在转移工程化细胞和培养基后,将细胞培养(如孵育)至少一部分时间。在一些实施方案中,所述刺激条件通常包括适合于原代免疫细胞(如人T淋巴细胞)生长的温度,例如,至少约25摄氏度(°C),通常至少约30°C并且通常为或约37°C。在一些实施方案中,将所述细胞在25°C至38°C(如30°C至37°C,例如为或约37°C±2°C)的温度下孵育。在一些实施方案中,所述孵育进行一段时间,直到所述培养(例如培育或扩增)产生所需或阈值细胞密度、数量或剂量。在一些实施方案中,所述孵育进行如下时间:大于或大于约或为约或为24小时、48小时、72小时、96小时、5天、6天、7天、8天、9天或更长时间。

[0269] 在一些实施方案中,在维持细胞培养中目标量的二氧化碳的条件下孵育细胞。在一些方面,这确保了细胞在生长期间的最佳培育、扩增和增殖。在一些方面,二氧化碳(CO₂)的量在所述气体的10%与0%(v/v)之间,如在所述气体的8%与2%(v/v)之间,例如,为或约5%(v/v)CO₂的量。

[0270] 在一些实施方案中,使用与生物反应器结合使用的容器(例如袋)孵育细胞。在一些情况下,所述生物反应器可以经受运动或摇摆,其在一些方面可以增加氧气传递。使生物反应器运动可以包括但不限于沿着水平轴线旋转、沿着竖直轴线旋转、沿着生物反应器的倾斜(tilted或inclined)的水平轴线的摇摆运动、或其任何组合。在一些实施方案中,在摇摆的情况下进行孵育的至少一部分。可以调整摇摆速度和摇摆角度以实现所需的搅动。在一些实施例中,摇摆角度是或是约20°、19°、18°、17°、16°、15°、14°、13°、12°、11°、10°、9°、8°、7°、6°、5°、4°、3°、2°或1°。在某些实施方案中,摇摆角度在6-16°之间。在其他实施方案中,摇摆角度在7-16°之间。在其他实施方案中,摇摆角度在8-12°之间。在一些实施方案中,摇摆速率为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39或40rpm。在一些实施方案中,摇摆速率在4rpm与12rpm之间,例如在4rpm与6rpm之间(包含端值)。在摇摆运动下进行细胞培养扩增的至少一部分,如以在5°与10°之间(如6°)的角度,以恒定摇摆速度(如在5RPM与15RPM之间,如6RPM或10RPM的速度)摇摆。CD4⁺和CD8⁺细胞各自单独扩增,直至它们各自达到阈值量或细胞密度。

[0271] 在一些实施方案中,在静态条件下进行至少一部分的孵育。在一些实施方案中,在灌注(例如在培养期间灌注出用过的培养基并灌注入新鲜培养基)的情况下进行至少一部分的孵育。在一些实施方案中,方法包括将新鲜培养基灌注到细胞培养物中(如通过补料端口)的步骤。在一些实施方案中,在灌注期间添加的培养基含有所述一种或多种刺激剂,例如,一种或多种重组细胞因子,如IL-2、IL-7和/或IL-15。在一些实施方案中,在灌注期间添加的培养基与在静态孵育期间使用的培养基相同。

[0272] 在一些实施方案中,在孵育后,将容器(例如袋)重新连接到进行用于制造、生成或

产生细胞疗法的一个或多个其他处理步骤的系统上,例如重新连接到含有离心室的系统上。在一些方面,将培养的细胞从袋转移到室的内部空腔中用于配制培养的细胞。

[0273] 在一些实施方案中,将孵育进行一段时间直至培养(例如培育或扩增)产生所希望的或阈值密度、数量或剂量的细胞。在一些实施方案中,在封闭、连接的生物反应器中和/或在生物反应器的控制下培育的细胞在21天、14天、10天、8天、7天、6天、5天、4天、3天、2天、60小时、48小时、36小时、24小时或12小时内达到或实现阈值扩增、细胞计数和/或密度。在一些实施方案中,所述孵育是进行大于或大于约或持续约或持续12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、5天、6天、7天、8天、9天或更长时间。在一些方面,在引入所述核酸后,所述孵育被缩短或简略为例如小于或小于约12小时、24小时、48小时、72小时或96小时,或者所述孵育持续或持续约12小时、24小时、48小时、72小时或96小时。在一些方面,所述孵育足以允许将所述转基因序列递送和整合到细胞的基因组中。

[0274] 在一些实施方案中,将细胞培养一定的缩短或简略的时间,或者使其经受非扩增制造过程。在一些方面,在引入所述核酸(例如,经由转导或电穿孔)后,将所述细胞培养少于或少于约1、2、3、4、5、6或7天。在一些实施方案中,将细胞培养约2-3天、3-4天、4-5天、5-6天或6-7天或更短的时间(每个都包含端值)。

[0275] 在一些方面,所述方法可以用于确定在引入包含所述转基因序列的多核苷酸后合适的细胞孵育时间长度,在所述合适的细胞孵育时间长度下完成大部分或基本上全部整合。在一些方面,所述方法允许确定合适的孵育时间长度,所述合适的孵育时间长度可以最大化整合而减少工程化细胞的耗尽。在一些方面,在将包含所述转基因序列的多核苷酸引入细胞中后,所述细胞或细胞群体或多个细胞未在高于25℃的温度下孵育超过48、54、60、66或72小时。在一些方面,在将包含所述转基因序列的多核苷酸引入细胞中后,所述细胞未在高于25℃的温度下孵育超过72小时。在一些方面,在将包含所述转基因序列的多核苷酸引入细胞中后,所述细胞未在高于约30℃且小于约40℃的温度下孵育超过72小时。

F. 用于评估的示例性细胞

[0276] 在一些方面,所提供的方法可以在多个细胞或单个分离的细胞上进行或执行,所述多个细胞或单个分离的细胞已经经受过细胞工程化过程的一些或全部步骤,包括扩增或非扩增制造过程。在一些实施方案中,所提供的方法在一个或多个时间点期间进行,如在细胞工程化过程的一个或多个时间点期间或之后进行。在一些实施方案中,所提供的方法在完成细胞工程化或细胞制造过程后进行,所述过程包括含有扩增步骤的工程化或制造过程,或者不包括扩增步骤或者是缩短或简略的过程。在一些实施方案中,所提供的方法可以在来自施用细胞疗法的受试者的样品中进行。在一些方面,所述样品可以包括在施用所述细胞疗法后获得的所述受试者的血液或血清或器官或组织样品(例如,疾病部位,如肿瘤样品)。

[0277] 在一些实施方案中,根据所提供的方法工程化和评估的细胞是原代细胞。在一些实施方案中,所述细胞是免疫细胞或富集的免疫细胞。在一些实施方案中,所述细胞是T细胞或富含T细胞。在一些实施方案中,所述细胞是CD4+T细胞或富集的CD4+T细胞。在一些实施方案中,所述细胞是CD8+T细胞或富集的CD8+T细胞。在一些实施方案中,所述细胞包含基因工程化细胞或富集的基因工程化细胞群体。在一些实施方案中,所述细胞包含待基因工程化或已基因工程化的细胞,如在一个或多个步骤或制造或工程化过程的步骤中的细胞。

在一些实施方案中,所述细胞包含有待基因工程化或正在被基因工程化的富集的细胞群体。在一些实施方案中,所述细胞包含基因工程化的T细胞或富集的基因工程化的T细胞群体。在一些实施方案中,将所述细胞工程化为表达重组蛋白,如重组受体或其一部分。在一些实施方案中,所述重组受体是或包含嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,所述细胞先前已被冷冻保存。在一些实施方案中,所述细胞先前一直未被冷冻保存。在一些实施方案中,可以在冷冻保存之前对细胞进行所述方法。在一些实施方案中,可以在向受试者施用所述细胞或细胞组合物之前对细胞进行所述方法。在一些实施方案中,所述细胞特异性地靶向肿瘤细胞。

[0278] 在一些实施方案中,将细胞培养一定的缩短或简略的时间,或者使其经受非扩增制造过程。在一些方面,在引入编码重组蛋白的核酸(例如,经由转导或电穿孔)后,将所述细胞培养少于或少于约1、2、3、4、5、6或7天。在一些实施方案中,将细胞培养约2-3天、3-4天、4-5天、5-6天或6-7天或更短的时间(每个都包含端值)。在一些方面,在引入所述核酸(例如,经由转导或电穿孔)后,在选自第0、1、2、3、4、5、6或7天的一个或多个时间点评估细胞。

[0279] 在一些方面,所提供的方法可以在引入所述多核苷酸后但没有扩增的情况下进行一次或多次,例如所述工程化细胞在引入包含所述转基因序列的多核苷酸后尚未在高于25℃、任选地为或约37℃±2℃的温度下孵育超过96、72或48小时。

[0280] 在特定实施方案中,所述一种或多种评估(如根据本文所提供的方法的整合和/或非整合转基因序列的评估)是在所述工程化细胞被释放以供输注、准备好被施用于受试者和/或被施用于受试者(如以用于细胞疗法)之前进行的。在特定实施方案中,在例如已经对工程化细胞的一部分、级分和/或样品进行一种或多种评估后,工程化细胞被释放以供输注、准备好被施用于受试者和/或被施用于受试者。在特定实施方案中,在完成所述一种或多种评估后,在工程化细胞确定是安全的(例如无菌的和/或游离的)和/或具有所需的生物学特性后,工程化细胞被释放以供输注、准备好被施用于受试者和/或被施用于受试者。

[0281] 在一些方面,使用各种递送方法(如病毒转导)将含有转基因序列的多核苷酸引入细胞中。在一些实施方案中,需要监测或评估所述工程化细胞(如用于过继细胞疗法的工程化细胞)的各种特征和特点,如确定由转基因序列编码的重组蛋白的表达水平,和/或确定整合到细胞的基因组中(如稳定地整合到细胞的基因组中)的转基因序列的拷贝数。在一些方面,这种评估可以在所述工程化或制造过程期间的一个或多个时间点进行。

III. 转基因序列

[0282] 在一些方面,所提供的实施方案与评估转基因序列的整合结合使用。在一些方面,引入用于工程化的细胞中的多核苷酸(例如,使用上文第II节中描述的用于引入多核苷酸序列的任何方法)含有待整合到细胞基因组中的转基因序列。在一些方面,所述多核苷酸的转基因序列部分被设计为待整合到细胞的基因组中。在一些情况下,所述转基因序列可以指整合到细胞基因组中的多核苷酸的一部分。

[0283] 在一些方面,转基因序列(也称为嵌合序列、嵌合DNA或重组DNA)包括通过组合来自不同来源(如不同的生物、不同的基因或不同的变体)的成分而人工形成的核酸序列。在一些方面,所述转基因序列已经经历分子生物学操作,例如通过人工组合来自不同来源的不同核酸分子或片段的分子生物学操作。在一些实施方案中,所述转基因序列含有如下序

列的至少某个部分,所述序列与其中引入了含有所述转基因序列的多核苷酸的细胞的基因组序列相比来自不同的起源。例如,所述转基因序列的至少一部分对所述细胞而言是异源的、外源的或转基因的,所述细胞在一些情况下是从受试者分离的原代细胞,所述受试者是施用所述工程化细胞的候选者。

[0284] 在一些方面,整合到细胞中的转基因序列包括插入或整合到细胞基因组中的其编码和/或非编码序列和/或部分编码序列。在一些方面,所述整合可以是随机的、半随机的或靶向的。在一些方面,所述转基因序列可以包含含有不自然发生的排列的核酸序列片段,如接合在一起的来自不同起源的片段。在一些方面,所述转基因序列不是天然存在的序列。在一些实施方案中,所述转基因序列不编码完整的病毒gag蛋白。在一些实施方案中,所述转基因序列不包含完整的HIV基因组、有复制能力的病毒基因组和/或附属基因,所述附属基因任选地是Nef、Vpu、Vpx、Vif和/或Vpr。在一些方面,所述转基因序列包含在被引入细胞中(例如,根据本文所述的用于引入所述多核苷酸的方法)的多核苷酸中。在一些方面,所述转基因序列编码一种或多种重组蛋白的全部或一部分。在一些方面,由所述转基因序列编码的重组蛋白是重组受体,如嵌合抗原受体(CAR)或重组T细胞受体(TCR)。在一些实施方案中,所述转基因序列编码一种或多种另外的重组蛋白。

[0285] 在一些方面,所述转基因序列还含有一个或多个非编码、调节或控制元件,如启动子、增强子、转录后调节元件(PRE)、内含子、绝缘子、聚腺苷酸化信号、转录终止序列、Kozak共有序列、多顺反子元件(例如,内部核糖体进入位点(IRES)、2A序列)、与信使RNA(mRNA)的非翻译区(UTR)对应的序列以及剪接受体或供体序列。

[0286] 在一些方面,可以在本文所提供的任何方法中检测待整合的转基因序列的任何部分以确定所述转基因序列的存在、不存在或量。在一些方面,检测的转基因序列的部分可以是如下的一部分,所述部分是在对细胞而言是异源的、外源的或转基因的序列内,使得整合的异源的、外源的或转基因的序列可以被特异性地检测到并与细胞的任何类似的内源基因组序列区分开。在一些方面,用于确定存在、不存在或量的方法(如本文中(例如上文第I节中)所述的任一种)可以使用能够特异性地检测所述转基因序列的一部分的探针或能够特异性地扩增所述转基因序列的一部分的引物序列来进行。在一些方面,所述探针或引物序列可以特异性地检测、结合或识别所述转基因序列的一部分,如所述转基因序列中对细胞而言为异源的、外源的或转基因的部分。在一些方面,所述探针或引物序列可以特异性地检测、结合或识别所述转基因序列的一部分,如所述转基因序列中整合到基因组中的部分。在一些实施方案中,所述转基因序列不编码病毒gag蛋白。

[0287] 在一些实施方案中,所述转基因序列含有操作性地连接以控制所编码的重组蛋白(例如,重组受体)的表达的一个或多个启动子。在一些例子中,所述转基因序列含有操作性地连接以控制所编码的重组蛋白的表达的两个、三个或更多个启动子。在一些实施方案中,转基因序列可以含有调节序列(如转录和翻译起始和终止密码子),所述调节序列对其中待引入所述转基因序列的宿主(例如,细菌、真菌、植物或动物)的类型具有特异性,视情况来确定并考虑所述转基因序列是基于DNA的还是基于RNA的。在一些实施方案中,所述转基因序列可以含有调节/控制元件,如启动子、增强子、转录后调节元件(PRE)、内含子、聚腺苷酸化信号、Kozak共有序列、内部核糖体进入位点(IRES)、2A序列和剪接受体或供体。在一些实施方案中,所述转基因序列可以含有与编码重组蛋白和/或一种或多种另外的多肽的核苷

酸序列可操作连接的非天然启动子。在一些实施方案中,所述启动子选自RNA pol I、pol II或pol III启动子。在一些实施方案中,所述启动子由RNA聚合酶II识别(例如CMV、SV40早期区域或腺病毒主要晚期启动子)。在另一个实施方案中,所述启动子由RNA聚合酶III识别(例如U6或H1启动子)。在一些实施方案中,所述启动子可以是非病毒启动子或病毒启动子,如巨细胞病毒(CMV)启动子、SV40启动子、RSV启动子和在鼠干细胞病毒的长末端重复序列中发现的启动子。还设想其他已知的启动子。

[0288] 在一些实施方案中,所述启动子是或包含组成型启动子。示例性组成型启动子包括例如猿病毒40早期启动子(SV40)、巨细胞病毒立即早期启动子(CMV)、人泛素C启动子(UBC)、人延伸因子1 α 启动子(EF1 α)、小鼠磷酸甘油酸激酶1启动子(PGK)、和与CMV早期增强子偶联的鸡 β -肌动蛋白启动子(CAGG)。在一些实施方案中,所述组成型启动子是合成的或修饰的启动子。在一些实施方案中,所述启动子是或包含MND启动子,它是一种合成启动子,含有修饰的MoMuLV LTR的U3区和骨髓增生性肉瘤病毒增强子(参见Challita等人(1995) *J. Virol.* 69(2):748-755)。在一些实施方案中,所述启动子是组织特异性启动子。在另一个实施方案中,所述启动子是病毒启动子。在另一个实施方案中,所述启动子是非病毒启动子。在一些实施方案中,示例性启动子可以包括但不限于人延伸因子1 α (EF1 α)启动子或其修饰形式或MND启动子。

[0289] 在一些实施方案中,所述启动子是受调节的启动子(例如,诱导型启动子)。在一些实施方案中,所述启动子是诱导型启动子或阻抑型启动子。在一些实施方案中,所述启动子包含Lac操纵子序列、四环素操纵子序列、半乳糖操纵子序列或多西环素操纵子序列,或者是其类似物或能够由Lac阻遏因子或四环素阻遏因子或其类似物结合或识别。在一些实施方案中,所述转基因序列不包含调节元件,例如启动子。

[0290] 在一些方面,所述转基因序列含有可增强所编码的重组蛋白的表达的调节元件,如转录后调节元件(PRE),如顺式作用转录后调节元件。在一些方面,所述转基因序列含有可增强所编码的重组蛋白的表达的调节元件,如与编码所述重组蛋白的核苷酸序列可操作连接的转录后调节元件(PRE)。在一些实施方案中,所述调节元件是病毒转录后调节元件或其修饰形式,如源自肝炎病毒(如土拨鼠肝炎病毒(WHV)或乙型肝炎病毒(HBV))的PRE,例如肝炎转录后调节元件(HPREs)(如土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件(WPRE)、乙型肝炎病毒转录后调节元件(HBVPRE))。源自肝炎病毒的PRE(包括WPRE和HBVPRE)通常可以通过帮助从细胞核的转录后RNA输出来促进(例如,增强)与其可操作连接的编码序列的表达。由PRE内含有的顺式作用序列或元件形成的二级和三级结构可以促进此类功能。例如,源自野生型肝炎病毒的PRE通常包含 α 亚元件和 β 亚元件,它们各自独立地形成影响和/或参与完全PRE转录后活性的茎环结构(Smith等人(1998) *Nucleic Acids Research*, 26:4818-4827)。一些野生型非人肝炎病毒PRE(如WPRE)还包含可进一步增强转录后活性的 γ 亚元件。此类亚元件可以含有或编码具有如下结构的RNA,所述结构促进RNA从细胞核输出(例如,经由与CRM1依赖性和/或独立性的输出机制相互作用);提供对于细胞蛋白的结合位点;增加RNA(例如重组和/或异源RNA)、转录物的总量;增加RNA稳定性;增加聚腺苷酸化转录物的数量和/或扩大此类转录物中聚腺苷酸化尾的大小。在一些实施方案中,所述转录后调节元件是土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件(WPRE)。

[0291] 在一些情况下,编码所述重组蛋白(例如,重组受体)的核酸序列含有编码信号肽

的信号序列。在一些方面,所述信号序列可以编码源自天然多肽的信号肽。在其他方面,信号序列可以编码异源或非天然信号肽,例如SEQ ID NO:25所示的并且由SEQ ID NO:24所示的核苷酸序列编码的GMCSFR α 链的示例性信号肽。在一些情况下,编码所述重组蛋白(例如,重组受体,如嵌合抗原受体(CAR))的核酸序列含有编码信号肽的信号序列。非限制性示例性的信号肽包括例如SEQ ID NO:25所示的并且由SEQ ID NO:24所示的核苷酸序列编码的GMCSFR α 链信号肽,或SEQ ID NO:26所示的CD8 α 信号肽。

[0292] 在一些实施方案中,所述转基因序列含有编码一种或多种另外的多肽(例如一种或多种标记和/或一种或多种效应分子)的核酸序列。在一些实施方案中,所述一种或多种标记包括转导标记、替代标记和/或选择标记。例如编码一种或多种另外的多肽的引入的另外的核酸序列包括可以例如通过促进存活力和/或转移细胞的功能改善疗法的功效的核酸序列;提供用于选择和/或评价细胞的遗传标记如以便在体内评估存活或定位的核酸序列;例如通过使细胞对体内阴性选择易感来提高安全性的核酸序列,如以下文献中所述:Lupton S.D.等人,Mol. and Cell Biol., 11:6(1991);和Riddell等人,Human Gene Therapy 3:319-338(1992);还参见WO 1992008796和WO 1994028143(描述了使用将显性的阳性选择标记与阴性选择标记融合而获得的双功能选择融合基因)和美国专利号6,040,177。

[0293] 在一些实施方案中,所述标记是转导标记或替代标记。转导标记或替代标记可以用于检测已引入了编码重组蛋白(例如,重组受体)的核酸序列的细胞。在一些实施方案中,所述转导标记可以指示或确认对细胞的修饰。在一些实施方案中,所述替代标记是制备以在细胞表面上与重组蛋白(例如,重组受体,如CAR)共表达的蛋白质。在特定实施方案中,这种替代标记是已经被修饰以具有极小活性或不具有活性的表面蛋白。在某些实施方案中,所述替代标记在编码所述重组蛋白(例如,重组受体)的相同转基因序列上编码。在一些实施方案中,编码所述重组蛋白(例如,重组受体)的核酸序列与编码标记的核酸序列可操作地连接,任选地由内部核糖体进入位点(IRES)或编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽(如2A序列)的核酸隔开。在一些情况下,外在标记基因可以与工程化细胞结合用于允许检测或选择细胞,并且在一些情况下还用于促进细胞消除和/或细胞自杀。

[0294] 示例性替代标记可以包括细胞表面多肽的截短的形式,如以下截短的形式,其是非功能性的,并且不转导或不能转导信号或通常由细胞表面多肽的全长形式转导的信号,和/或不内化或不能内化。示例性截短的细胞表面多肽包括生长因子或其他受体的截短形式,如截短的人表皮生长因子受体2(tHER2)、截短的表皮生长因子受体(tEGFR, SEQ ID NO:7或16所示的示例性tEGFR序列)或前列腺特异性膜抗原(PSMA)或其修饰形式(如截短的PSMA(tPSMA))。在一些方面,tEGFR可以含有抗体西妥昔单抗(Erbix[®])或其他治疗性抗EGFR抗体或结合分子识别的表位,其可以用于鉴定或选择已经用tEGFR构建体和编码的外源蛋白质工程化的细胞,和/或用于消除或分离表达所编码的外源蛋白质的细胞。参见美国专利号8,802,374和Liu等人,Nature Biotech. 2016年4月;34(4):430-434。在一些方面,所述标记(例如替代标记)包括全部或部分(例如,截短形式)的CD34、NGFR、CD19或截短的CD19(例如,截短的非人CD19)。截短的EGFR(例如tEGFR)的示例性多肽包含SEQ ID NO:7或16所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:7或16展现出至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0295] 在一些实施方案中,所述标记是或包括可检测蛋白,如荧光蛋白,如绿色荧光蛋白(GFP)、增强型绿色荧光蛋白(EGFP)(如超折叠GFP(sfGFP))、红色荧光蛋白(RFP)(如tdTomato、mCherry、mStrawberry、AsRed2、DsRed或DsRed2)、青色荧光蛋白(CFP)、蓝绿色荧光蛋白(BFP)、增强型蓝色荧光蛋白(EBFP)和黄色荧光蛋白(YFP)及其变体,包括荧光蛋白的物种变体、单体变体、密码子优化的、稳定的和/或增强的变体。在一些实施方案中,所述标记是或包含酶(如萤光素酶)、来自大肠杆菌(*E. coli*)的lacZ基因、碱性磷酸酶、分泌型胚胎碱性磷酸酶(SEAP)、氯霉素乙酰转移酶(CAT)。示例性发光报告基因包括萤光素酶(luc)、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、 β -葡萄糖醛酸糖苷酶(GUS)或其变体。在一些方面,所述酶的表达可以通过添加底物来检测,所述底物可以根据所述酶的表达和功能活性来检测。

[0296] 在一些实施方案中,所述标记是选择标记。在一些实施方案中,所述选择标记是或包含赋予对外源药剂或药物的抗性的多肽。在一些实施方案中,所述选择标记是抗生素抗性基因。在一些实施方案中,所述选择标记是向哺乳动物细胞赋予抗生素抗性的抗生素抗性基因。在一些实施方案中,所述选择标记是或包含嘌呤霉素抗性基因、潮霉素抗性基因、杀稻瘟菌素抗性基因、新霉素抗性基因、遗传霉素抗性基因或博来霉素抗性基因或其修饰形式。

[0297] 任何重组蛋白(例如,重组受体)和/或本文所述的一种或多种另外的多肽可以由一个或多个转基因序列编码,所述一个或多个转基因序列含有以任何组合、取向或排列的编码重组蛋白(例如,重组受体)的一个或多个核酸序列。例如,一个、两个、三个或更多个转基因序列可以编码一种、两种、三种或更多种不同的多肽(例如,重组受体或其部分或组分)和/或一种或多种另外的多肽(例如,标记和/或效应分子)。在一些实施方案中,一个转基因序列含有编码重组蛋白(例如,重组受体,如CAR)或其部分或组分的核酸序列,以及编码一种或多种另外的多肽的核酸序列。在一些实施方案中,一个载体或构建体含有编码重组蛋白(例如,重组受体,如CAR)或其部分或组分的核酸序列,并且单独的载体或构建体含有编码一种或多种另外的多肽的核酸序列。在一些实施方案中,编码所述重组蛋白(例如,重组受体)的核酸序列和编码所述一种或多种另外的多肽的核酸序列与两种不同的启动子可操作地连接。在一些实施方案中,编码所述重组蛋白(例如,重组受体)的核酸存在于编码所述一种或多种另外的多肽的核酸的上游。在一些实施方案中,编码所述重组蛋白(例如,重组受体)的核酸存在于编码一种或多种另外的多肽的核酸的下游。

[0298] 在某些情况下,一个转基因序列含有编码两种或更多种不同的多肽链(例如,重组蛋白,例如,重组受体)和一种或多种另外的多肽(例如,标记和/或效应分子)的核酸序列。在一些实施方案中,编码两种或更多种不同的多肽链(例如,重组蛋白,例如,重组受体)和一种或多种另外的多肽的核酸序列存在于两个单独的转基因序列中。例如,提供了两个单独的转基因序列,并且每一个可以单独转移到或引入细胞中以在细胞中表达。在一些实施方案中,编码所述标记的核酸序列和编码所述重组蛋白(例如,重组受体)的核酸序列存在于或被插入细胞基因组内的不同位置。在一些实施方案中,编码所述标记的核酸序列和编码所述重组蛋白(例如,重组受体)的核酸序列与两种不同的启动子可操作地连接。

[0299] 在一些实施方案中,如所述转基因序列含有第一和第二核酸序列的实施方案中,编码不同多肽链中的每一种的编码序列可以与相同或不同的启动子操作性地连接。在一些

实施方案中,所述核酸分子可以含有驱动两条或更多条不同多肽链表达的启动子。在一些实施方案中,此类核酸分子可以是多顺反子的(双顺反子的或三顺反子的,参见例如,美国专利号6,060,273)。在一些实施方案中,编码所述重组蛋白(例如,重组受体)的核酸序列和编码所述一种或多种另外的多肽的核酸序列与相同的启动子可操作地连接,并且任选地由内部核糖体进入位点(IRES)或编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽(如2A元件)的核酸隔开。例如,示例性标记和任选的核糖体跳跃序列可以是PCT公开号WO 2014031687中披露的任一种。

[0300] 在一些实施方案中,可以将转录单元工程化为含有IRES的双顺反子单元,其允许通过来自单一启动子的信息共表达基因产物(例如编码所述重组蛋白(例如,重组受体)和所述另外的多肽的基因产物)。可替代地,在一些情况下,单一启动子可引导RNA的表达,所述RNA在单一开放阅读框(ORF)中含有两个或三个基因(例如编码所述标记和编码所述重组蛋白(例如,重组受体)),所述基因通过编码自切割肽(例如,2A序列)或蛋白酶识别位点(例如,弗林蛋白酶(furin))的序列彼此隔开。ORF由此编码单一多肽,所述多肽在翻译期间(在2A的情况下)或在翻译后被加工为单独蛋白质。在一些情况下,肽(如T2A)可以引起核糖体跳过2A元件C末端处肽键的合成(核糖体跳跃),从而导致2A序列末端与下游的下一个肽之间隔开(参见例如,de Felipe, *Genetic Vaccines and Ther.* 2:13 (2004) 和 de Felipe等人 *Traffic* 5:616-626 (2004))。多种2A元件是已知的。可以用于本文所公开的方法和系统中的2A序列的例子包括但不限于来自以下病毒的2A序列:口蹄疫病毒(F2A,例如,SEQ ID NO: 21)、马鼻肺炎病毒(E2A,例如,SEQ ID NO: 20)、明脉扁刺蛾β四体病毒(T2A,例如,SEQ ID NO: 6或17)和猪捷申病毒-1(P2A,例如,SEQ ID NO: 18或19),如美国专利公开号20070116690中所述。

A. 重组受体

[0301] 在一些实施方案中,被评估转基因序列的整合的细胞或细胞组合物含有编码重组蛋白的转基因序列。在一些实施方案中,所述转基因序列包含编码重组受体的核酸序列和如上所述的其他元件。在一些实施方案中,由整合转基因序列编码的重组蛋白是重组受体。在一些方面,所述转基因序列编码重组受体或其一部分。在一些实施方案中,如本文中(例如第I节中)所述处理、加工、工程化和/或产生的细胞含有或表达或被工程化为含有或表达重组蛋白,如重组受体,例如嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)。在某些实施方案中,所述的制造或工程化方法通过整合所述转基因序列产生和/或能够产生细胞或者含有和/或富含细胞的群体或组合物,所述细胞被工程化为表达或含有重组蛋白(如重组受体)。在一些实施方案中,处理、加工、工程化和/或生产T细胞、或T细胞群体或组合物。

[0302] 在一些方面,所编码的重组受体是嵌合抗原受体(CAR)或重组T细胞受体(TCR)。所述重组受体包括嵌合受体、抗原受体和含有嵌合受体或抗原受体的一种或多种组分的受体。所述重组受体可以包括含有配体结合结构域或其结合片段和细胞内信号传导结构域或区域的那些。在一些实施方案中,由所述工程化细胞编码的重组受体包括功能性非TCR抗原受体、嵌合抗原受体(CAR)、嵌合自身抗体受体(CAAR)、重组T细胞受体(TCR)和前述任一种的区域、结构域或组分,包括多链重组受体的一个或多个多肽链。所述重组受体(如CAR)通常包括(在一些方面经由接头和/或一个或多个跨膜结构域)与一种或多种细胞内信号传导组分连接的细胞外抗原(或配体)结合结构域。在一些实施方案中,由所述工程化细胞表达

的示例性重组受体包括含有两个或更多个受体多肽的多链受体,所述两个或更多个受体多肽在一些情况下含有不同的组分、结构域或区域。在一些方面,所述重组受体含有两个或更多个多肽,所述两个或更多个多肽共同构成功能性重组受体。在一些方面,所述多链受体是双链受体,其包含共同构成功能性重组受体的两个多肽。在一些实施方案中,所述重组受体是包含两个不同受体多肽(例如,TCR alpha (TCR α)和TCR beta (TCR β)链;或TCR gamma (TCR γ)和TCR delta (TCR δ)链)的TCR。在一些实施方案中,所述重组受体是多链受体,其中所述多肽中的一个或多个调节、修饰或控制另一个受体多肽的表达、活性或功能。在一些方面,多链受体允许在空间或时间上调节或控制所述受体的特异性、活性、抗原(或配体)结合、功能和/或表达。

1. 嵌合抗原受体 (CAR)

[0303] 在一些实施方案中,所编码的重组受体是对特定抗原(或标记或配体)(如在特定细胞类型的表面上表达的抗原)具有特异性的嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,所述抗原是多肽。在一些实施方案中,它是碳水化合物或其他分子。在一些实施方案中,与正常或非靶向细胞或组织相比,抗原在所述疾病或病症的细胞(例如,肿瘤或致病细胞)上选择性表达或过表达。在其他实施方案中,所述抗原在正常细胞上表达和/或在工程化的细胞上表达。

[0304] 在特定实施方案中,重组受体(如嵌合受体)含有细胞内信号传导区域,所述细胞内信号传导区域包括细胞质信号传导结构域或区域(也可互换地称为细胞内信号传导结构域或区域),例如能够在T细胞中诱导初级激活信号的细胞质(细胞内)区域,例如,T细胞受体(TCR)组分的细胞质信号传导结构域或区域(例如,CD3- ζ (CD3 ζ)链的 ζ 链或其功能变体或信号传导部分的细胞质信号传导结构域或区域);和/或所述细胞内信号传导区域包含基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)。

[0305] 在一些实施方案中,所述嵌合受体还含有特异性结合至配体(例如抗原)抗原的细胞外配体结合结构域。在一些实施方案中,所述嵌合受体是CAR,其含有与抗原特异性结合的细胞外抗原识别结构域。在一些实施方案中,所述配体(如抗原)是在细胞表面上表达的蛋白质。在一些实施方案中,CAR是TCR样CAR,并且抗原是加工的肽抗原,如细胞内蛋白的肽抗原,其与TCR一样在主要组织相容性复合物(MHC)分子的背景中在细胞表面上被识别。

[0306] 示例性抗原受体(包括CAR)以及将此类受体工程化并引入细胞的方法包括例如以下文献中所述的那些:国际专利申请公开号WO 200014257、WO 2013126726、WO 2012/129514、WO 2014031687、WO 2013/166321、WO 2013/071154、WO 2013/123061;美国专利申请公开号US 2002131960、US 2013287748、US 20130149337;美国专利号6,451,995、7,446,190、8,252,592、8,339,645、8,398,282、7,446,179、6,410,319、7,070,995、7,265,209、7,354,762、7,446,191、8,324,353和8,479,118;以及欧洲专利申请号EP2537416;和/或以下文献中所述的那些:Sadelain等人,Cancer Discov.2013年4月;3(4):388-398;Davila等人(2013)PLoS ONE 8(4):e61338;Turt le等人,Curr.Opin.Immunol.,2012年10月;24(5):633-39;Wu等人,Cancer,2012年3月18(2):160-75。在一些方面,抗原受体包括如美国专利号7,446,190中描述的CAR,以及国际专利申请公开号WO/2014055668A1中描述的那些。CAR的例子包括如在任何上述出版物中披露的CAR,所述出版物例如WO 2014031687、US 8,339,645、US 7,446,179、US 2013/0149337、美国专利号7,446,190、美国专利号8,389,282、

Kochenderfer等人,2013,Nature Reviews Clinical Oncology,10,267-276(2013);Wang等人(2012) J.Immunotherapy.35(9):689-701;和Brentjens等人,Sci Transl Med.2013 5(177)。还参见WO 2014031687、US 8,339,645、US 7,446,179、US 2013/0149337、美国专利号7,446,190和美国专利号8,389,282。

[0307] 在一些实施方案中,CAR被构建为具有对特定抗原(或标记或配体)的特异性,所述特定抗原是例如在过继疗法靶向的特定细胞类型中表达的抗原(例如,癌症标记)和/或旨在诱导衰减反应的抗原(如在正常或未患病细胞类型上表达的抗原)。因此,CAR通常在其细胞外部分中包括一种或多种抗原结合分子,如一种或多种抗原结合片段、结构域或部分,或者一种或多种抗体可变结构域,和/或抗体分子。在一些实施方案中,CAR包括抗体分子的一个或多个抗原结合部分,如源自单克隆抗体(mAb)的可变重链(V_H)和可变轻链(V_L)的单链抗体片段(scFv)。

[0308] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合部分作为重组受体(如抗原受体)的一部分在细胞上表达。抗原受体包括功能性非TCR抗原受体,如嵌合抗原受体(CAR)。通常,含有展现针对肽-MHC复合物的TCR样特异性的抗体或抗原结合片段的CAR也可以称为TCR样CAR。在一些实施方案中,在一些方面,对TCR样CAR的MHC-肽复合物具有特异性的细胞外抗原结合结构域经由接头和/或一个或多个跨膜结构域与一种或多种细胞内信号传导组分连接。在一些实施方案中,此类分子通常可以通过天然抗原受体(如TCR)模拟或接近信号,并且任选地通过这种受体与共刺激受体组合模拟或接近信号。

[0309] 在一些实施方案中,所述重组受体(如嵌合受体(例如CAR))包括与抗原(或配体)结合(如特异性结合)的配体结合结构域。嵌合受体靶向的抗原包括在经由过继细胞疗法靶向的疾病、病症或细胞类型的背景中表达的那些抗原。所述疾病和病症包括增殖性、肿瘤性和恶性疾病和障碍,包括癌症和肿瘤,包括血液癌、免疫系统癌症,如淋巴瘤、白血病和/或骨髓瘤,如B型白血病、T型白血病和髓系白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤。

[0310] 在一些实施方案中,所述抗原(或配体)是多肽。在一些实施方案中,它是碳水化合物或其他分子。在一些实施方案中,与正常或非靶向细胞或组织相比,抗原(或配体)在疾病或病症的细胞(例如,肿瘤或致病细胞)上选择性地表达或过表达。在其他实施方案中,所述抗原在正常细胞上表达和/或在工程化的细胞上表达。

[0311] 在一些实施方案中,CAR含有特异性识别在细胞表面上表达的抗原(如完整抗原)的抗体或抗原结合片段(例如scFv)。

[0312] 在一些实施方案中,所述抗原(或配体)是肿瘤抗原或癌症标记。在一些实施方案中,所述抗原(或配体)是或包括 $\alpha_v\beta_6$ 整合素($\alpha_v\beta_6$ 整合素)、B细胞成熟抗原(BCMA)、B7-H3、B7-H6、碳酸酐酶9(CA9,也称为CAIX或G250)、癌症-睾丸抗原、癌症/睾丸抗原1B(CTAG,也称为NY-ESO-1和LAGE-2)、癌胚抗原(CEA)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、C-C基序趋化因子配体1(CCL-1)、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD123、CD133、CD138、CD171、硫酸软骨素蛋白聚糖4(CSPG4)、表皮生长因子蛋白(EGFR)、表皮生长因子受体III型突变体(EGFR ν III)、上皮糖蛋白2(EPG-2)、上皮糖蛋白40(EPG-40)、肝配蛋白B2、肝配蛋白受体A2(EPHa2)、雌激素受体、Fc受体样蛋白5(FCRL5;也称为Fc受体同源物5或FCRH5)、胎儿乙酰胆碱受体(胎儿AChR)、叶酸结合蛋白(FBP)、叶酸受体 α 、神经节苷脂GD2、O-乙酰化GD2(OGD2)、神经节苷脂GD3、糖蛋白100(gp100)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3

(GPC3)、G蛋白偶联受体C5家族成员D(GPRC5D)、Her2/neu(受体酪氨酸激酶erb-B2)、Her3(erb-B3)、Her4(erb-B4)、erbB二聚体、人高分子量黑色素瘤相关抗原(HMW-MAA)、乙型肝炎表面抗原、人白细胞抗原A1(HLA-A1)、人白细胞抗原A2(HLA-A2)、IL-22受体 α (IL-22R α)、IL-13受体 α 2(IL-13R α 2)、激酶插入结构域受体(kdr)、 κ 轻链、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、L1-CAM的CE7表位、含有富亮氨酸重复序列的蛋白8家族成员A(LRRC8A)、路易斯Y、黑色素瘤相关抗原(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、MAGE-A10、间皮素(MSLN)、c-Met、鼠类巨细胞病毒(CMV)、粘蛋白1(MUC1)、MUC16、自然杀伤细胞2族成员D(NKG2D)配体、黑色素A(MART-1)、神经细胞粘附分子(NCAM)、癌胚胎抗原、黑色素瘤优先表达抗原(PRAME)、孕酮受体、前列腺特异性抗原、前列腺干细胞抗原(PSCA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)、存活蛋白、滋养层糖蛋白(TPBG,也称为5T4)、肿瘤相关糖蛋白72(TAG72)、酪氨酸酶相关蛋白1(TRP1,也称为TYRP1或gp75)、酪氨酸酶相关蛋白2(TRP2,也称为多巴色素互变异构酶、多巴色素 δ 异构酶或DCT)、血管内皮生长因子受体(VEGFR)、血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)、Wilms肿瘤1(WT-1)、病原体特有的或病原体表达的抗原、或与通用标签相关的抗原、和/或生物素化分子、和/或由HIV、HCV、HBV或其他病原体表达的分子。在一些实施方案中,所述受体靶向的抗原包括与B细胞恶性肿瘤相关的抗原,如许多已知B细胞标记中的任一种。在一些实施方案中,所述抗原是或包括CD20、CD19、CD22、ROR1、CD45、CD21、CD5、CD33、Ig κ 、Ig λ 、CD79a、CD79b或CD30。

[0313] 在一些实施方案中,CAR是对BCMA(例如人BCMA)具有特异性的抗BCMA CAR。先前已经描述了含有抗BCMA抗体(包括小鼠抗人BCMA抗体和人抗人抗体)的嵌合抗原受体,以及表达此类嵌合受体的细胞。参见Carpenter等人,Clin Cancer Res.,2013,19(8):2048-2060,WO 2016/090320、WO 2016090327、WO 2010104949A2和WO 2017173256。在一些实施方案中,抗BCMA CAR包含抗原结合结构域(如scFv),所述抗原结合结构域含有源自WO 2016/090320或WO 2016090327中所述的抗体的可变重链(V_H)区和/或可变轻链(V_L)区。在一些实施方案中,所述抗原结合结构域(如scFv)含有SEQ ID NO:30所示的 V_H 和SEQ ID NO:31所示的 V_L 。在一些实施方案中,所述抗原结合结构域(如scFv)含有SEQ ID NO:32所示的 V_H 和SEQ ID NO:33所示的 V_L 。在一些实施方案中,所述抗原结合结构域(如scFv)含有SEQ ID NO:34所示的 V_H 和SEQ ID NO:35所示的 V_L 。在一些实施方案中,所述抗原结合结构域(如scFv)含有SEQ ID NO:27所示的 V_H 和SEQ ID NO:28所示的 V_L 。在一些实施方案中,所述抗原结合结构域(如scFv)含有SEQ ID NO:41所示的 V_H 和SEQ ID NO:42所示的 V_L 。在一些实施方案中,所述抗原结合结构域(如scFv)含有SEQ ID NO:43所示的 V_H 和SEQ ID NO:44所示的 V_L 。在一些实施方案中,所述抗原结合结构域(如scFv)含有SEQ ID NO:45所示的 V_H 和SEQ ID NO:46所示的 V_L 。在一些实施方案中, V_H 或 V_L 具有展现出与任何前述 V_H 或 V_L 序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性并且保留与BCMA结合的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_H 区位于 V_L 区的氨基末端。在一些实施方案中, V_H 区位于 V_L 区的羧基末端。

[0314] 在一些实施方案中,CAR是对CD19(例如人CD19)具有特异性的抗CD19 CAR。在一些实施方案中,scFv和/或 V_H 结构域源自FMC63。FMC63通常是指针对人来源的表达CD19的Nalm-1和Nalm-16细胞产生的小鼠单克隆IgG1抗体(Ling,N.R.,等人(1987).Leucocyte typing III.302)。在一些实施方案中,FMC63抗体包含分别在SEQ ID NO:50和51所示的

CDR-H1和CDR-H2,和SEQ ID NO:52或66所示的CDR-H3;以及SEQ ID NO:47所示的CDR-L1和SEQ ID NO:48或67所示的CDR-L2和SEQ ID NO:49或68所示的CDR-L3序列。在一些实施方案中,FMC63抗体包含含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的重链可变区(V_H)和含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的轻链可变区(V_L)。

[0315] 在一些实施方案中,scFv包含含有SEQ ID NO:47的CDR-L1序列、SEQ ID NO:48的CDR-L2序列和SEQ ID NO:49的CDR-L3序列的可变轻链和/或含有SEQ ID NO:50的CDR-H1序列、SEQ ID NO:51的CDR-H2序列和SEQ ID NO:52的CDR-H3序列的可变重链。在一些实施方案中,scFv包含SEQ ID NO:53所示的可变重链区和SEQ ID NO:54所示的可变轻链区。在一些实施方案中,所述可变重链和可变轻链通过接头连接。在一些实施方案中,所述接头如SEQ ID NO:29所示。在一些实施方案中,scFv依次包含 V_H 、接头和 V_L 。在一些实施方案中,scFv依次包含 V_L 、接头和 V_H 。在一些实施方案中,scFv由SEQ ID NO:69所示的核苷酸序列或展现出与SEQ ID NO:69至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列编码。在一些实施方案中,scFv包含SEQ ID NO:55所示的氨基酸序列或展现出与SEQ ID NO:55至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[0316] 在一些实施方案中,scFv源自SJ25C1。SJ25C1是针对人来源的表达CD19的Nalm-1和Nalm-16细胞产生的小鼠单克隆IgG1抗体(Ling,N.R.,等人(1987).Leucocyte typing III.302)。在一些实施方案中,SJ25C1抗体包含分别如SEQ ID NO:59-61所示的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列,以及分别如SEQ ID NO:56-58所示的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列。在一些实施方案中,SJ25C1抗体包含含有SEQ ID NO:62的氨基酸序列的重链可变区(V_H)和含有SEQ ID NO:63的氨基酸序列的轻链可变区(V_L)。在一些实施方案中,svFv包含含有SEQ ID NO:56的CDR-L1序列、SEQ ID NO:57的CDR-L2序列和SEQ ID NO:58的CDR-L3序列的可变轻链,和/或含有SEQ ID NO:59的CDR-H1序列、SEQ ID NO:60的CDR-H2序列和SEQ ID NO:61的CDR-H3序列的可变重链。在一些实施方案中,scFv包含如SEQ ID NO:62所示的可变重链区和如SEQ ID NO:63所示的可变轻链区。在一些实施方案中,所述可变重链和可变轻链通过接头连接。在一些实施方案中,接头如SEQ ID NO:64所示。在一些实施方案中,scFv依次包含 V_H 、接头和 V_L 。在一些实施方案中,scFv依次包含 V_L 、接头和 V_H 。在一些实施方案中,scFv包含SEQ ID NO:65所示的氨基酸序列或展现出与SEQ ID NO:65至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[0317] 在一些实施方案中,CAR是对CD20具有特异性的抗CD20CAR。在一些实施方案中,scFv含有源自对CD20具有特异性的抗体或抗体片段的 V_H 和 V_L 。在一些实施方案中,结合CD20的抗体或抗体片段是或源自利妥昔单抗的抗体,例如是利妥昔单抗scFv。

[0318] 在一些实施方案中,CAR是对CD22具有特异性的抗CD22CAR。在一些实施方案中,scFv含有源自对CD22具有特异性的抗体或抗体片段的 V_H 和 V_L 。在一些实施方案中,结合CD22的抗体或抗体片段是或源自m971的抗体,例如是m971 scFv。

[0319] 在一些实施方案中,CAR是对GPCR5D具有特异性的抗GPCR5D CAR。在一些实施方案中,scFv含有源自对GPCR5D具特异性的抗体或抗体片段的 V_H 和 V_L 。在一些实施方案中,结合GPCR5D的抗体或抗体片段是或含有来自国际专利申请公开号WO 2016/090329和WO 2016/090312中阐述的抗体或抗体片段的 V_H 和 V_L 。

[0320] 在一些实施方案中,所述抗体是包括一个或多个接头的抗原结合片段(如scFv),所述一个或多个接头连接两个抗体结构域或区域(如重链可变(V_H)区和轻链可变(V_L)区)。所述接头通常是肽接头,例如,柔性和/或可溶性肽接头。所述接头包括富含甘氨酸和丝氨酸的那些和/或在一些情况下富含苏氨酸的那些。在一些实施方案中,所述接头还包括带电荷的残基(如赖氨酸和/或谷氨酸),其可以改善溶解性。在一些实施方案中,所述接头还包括一个或多个脯氨酸。在一些方面,富含甘氨酸和丝氨酸(和/或苏氨酸)的接头包括至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的此类氨基酸。在一些实施方案中,它们包括至少或至少约50%、55%、60%、70%或75%的甘氨酸、丝氨酸和/或苏氨酸。在一些实施方案中,所述接头基本上完全由甘氨酸、丝氨酸和/或苏氨酸组成。所述接头的长度通常在约5个与约50个氨基酸之间,通常在为或约10个与为或约30个之间,例如10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个或30个,并且在一些例子中长度在10个与25个氨基酸之间。示例性接头包括具有各种数量的序列GGGGS (4GS; SEQ ID NO:36) 或GGGS (3GS; SEQ ID NO:37) 的重复的接头,例如在这样的序列的2个、3个、4个和5个重复之间。示例性接头包括具有SEQ ID NO:38 (GGGGS GGGGS GGGGS S)、SEQ ID NO:39 (GSTSGSGKPGSGEGSTKG) 或SEQ ID NO:40 (SRGGGSGGGGS GGGGSLEMA) 所示的序列或由其组成的那些。

[0321] 在一些实施方案中,所述抗原是或包括病原体特异性抗原或病原体表达的抗原。在一些实施方案中,所述抗原是病毒抗原(如来自HIV、HCV、HBV等的病毒抗原)、细菌抗原和/或寄生虫抗原。在一些实施方案中,CAR含有TCR样抗体,如特异性识别作为MHC-肽复合物于细胞表面上呈递的细胞内抗原(如肿瘤相关抗原)的抗体或抗原结合片段(例如scFv)。在一些实施方案中,识别MHC-肽复合物的抗体或其抗原结合部分可以作为重组受体(如抗原受体)的部分在细胞上表达。所述抗原受体包括功能性非TCR抗原受体,如嵌合抗原受体(CAR)。通常,含有展现针对肽-MHC复合物的TCR样特异性的抗体或抗原结合片段的CAR也可以称为TCR样CAR。

[0322] 提及“主要组织相容性复合物”(MHC)是指含有多态性肽结合位点或结合沟的蛋白质,通常是糖蛋白,在一些情况下,所述蛋白质可以与多肽的肽抗原(包括由细胞机器处理的肽抗原)复合。在一些情况下,MHC分子可以在细胞表面上展示或表达,包括作为与肽的复合物,即MHC-肽复合物,用于呈递具有T细胞上的抗原受体(如TCR或TCR样抗体)可识别的构象的抗原。通常,MHC I类分子是异二聚体,其具有跨越 α 链的膜,在一些情况下具有三个 α 结构域和非共价缔合的 $\beta 2$ 微球蛋白。通常,MHC II类分子由两种跨膜糖蛋白 α 和 β 组成,两者通常都跨越膜。MHC分子可以包括MHC的有效部分,其含有抗原结合位点或用于结合肽的位点以及由适当抗原受体识别所必需的序列。在一些实施方案中,MHC I类分子将源自胞质溶胶的肽递送至细胞表面,其中MHC-肽复合物由T细胞(如通常是 $CD8^+$ T细胞,但是在一些情况下是 $CD4^+$ T细胞)识别。在一些实施方案中,MHC II类分子将源自囊泡系统的肽递送至细胞表面,其中所述肽通常被 $CD4^+$ T细胞识别。通常,MHC分子由一组连锁基因座编码,其在小鼠中统称为H-2并且在人中统称为人白细胞抗原(HLA)。因此,通常人MHC也可以称为人白细胞抗原(HLA)。

[0323] 术语“MHC-肽复合物”或“肽-MHC复合物”或其变体是指肽抗原与MHC分子的复合物或缔合物,例如通常通过所述肽在MHC分子的结合沟或裂缝中的非共价相互作用来形成。在

一些实施方案中,MHC-肽复合物在细胞表面上存在或展示。在一些实施方案中,MHC-肽复合物可以由抗原受体(如TCR、TCR样CAR或其抗原结合部分)特异性地识别。

[0324] 在一些实施方案中,多肽的肽(如肽抗原或表位)可以与MHC分子缔合,例如用于由抗原受体识别。通常,肽源自或基于较长生物分子(如多肽或蛋白质)的片段。在一些实施方案中,所述肽的长度通常为约8至约24个氨基酸。在一些实施方案中,对于MHC II类复合物中的识别,肽的长度为从或从约9至22个氨基酸。在一些实施方案中,对于MHC I类复合物中的识别,肽的长度为从或从约8至13个氨基酸。在一些实施方案中,在识别MHC分子(如MHC-肽复合物)的背景中的肽后,抗原受体(如TCR或TCR样CAR)产生或触发激活信号至T细胞,从而诱导T细胞反应,如T细胞增殖、细胞因子产生、细胞毒性T细胞反应或其他反应。

[0325] 在一些实施方案中,TCR样抗体或抗原结合部分是已知的或可通过已知方法产生(参见例如,美国公开申请号US 2002/0150914;US 2003/0223994;US 2004/0191260;US 2006/0034850;US 2007/00992530;US20090226474;US 20090304679;和国际PCT公开号WO 03/068201)。

[0326] 在一些实施方案中,与MHC-肽复合物特异性结合的抗体或其抗原结合部分可以通过用有效量的含有特定MHC-肽复合物的免疫原对宿主进行免疫来产生。在一些情况下,MHC-肽复合物的肽是能够与MHC结合的抗原的表位,所述抗原是例如肿瘤抗原,例如通用肿瘤抗原、骨髓瘤抗原或下文所述的其他抗原。在一些实施方案中,然后向宿主施用有效量的免疫原以用于引发免疫应答,其中免疫原保持其三维形式持续足以引发针对所述肽在MHC分子的结合沟中的三维呈递的免疫应答的时间段。然后测定从宿主中收集的血清以确定是否产生了识别MHC分子结合沟中的肽的三维呈递的所需抗体。在一些实施方案中,可以评估所产生的抗体以确认所述抗体可以区分MHC-肽复合物与单独的MHC分子、单独的肽以及MHC与无关肽的复合物。然后可以分离所需抗体。

[0327] 在一些实施方案中,与MHC-肽复合物特异性结合的抗体或其抗原结合部分可以通过采用抗体文库展示方法(如噬菌体抗体文库)来产生。在一些实施方案中,可以产生突变体Fab、scFv或其他抗体形式的噬菌体展示文库,例如,其中所述文库的成员在一个或多个CDR的一个或多个残基处发生突变。参见例如,美国公开申请号US 20020150914、US 2014/0294841;和Cohen CJ.等人(2003) J Mol. Recogn. 16:324-332。

[0328] 本文中的术语“抗体”在最广泛的意义上使用,并且包括多克隆和单克隆抗体,包括完整抗体和功能性(抗原结合)抗体片段,包括片段抗原结合(Fab)片段、F(ab')₂片段、Fab'片段、Fv片段、重组IgG(rIgG)片段、能够特异性结合抗原的可变重链(V_H)区、单链抗体片段(包括单链可变片段(scFv))以及单结构域抗体(例如,sdAb、sdFv、纳米抗体)片段。所述术语涵盖免疫球蛋白的基因工程化的和/或以其他方式修饰的形式,如胞内抗体、肽体、嵌合抗体、全人抗体、人源化抗体和异缀合抗体、多特异性(例如,双特异性)抗体、双抗体、三抗体和四抗体、串联二-scFv、串联三-scFv。除非另有说明,否则术语“抗体”应当理解为涵盖其功能性抗体片段。所述术语还涵盖完整或全长抗体,包括任何类别或亚类(包括IgG及其亚类、IgM、IgE、IgA和IgD)的抗体。

[0329] 术语“互补决定区”和“CDR”与“高变区”或“HVR”同义,在一些情况下是已知的,是指抗体可变区内的非连续氨基酸序列,其赋予抗原特异性和/或结合亲和力。通常,在每个重链可变区中有三个CDR(CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3),并且在每个轻链可变区中有三个CDR

(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3)。“框架区”和“FR”是已知的,在一些情况下是指重链和轻链的可变区的非CDR部分。通常,在每个全长重链可变区中有四个FR (FR-H1、FR-H2、FR-H3和FR-H4),并且在每个全长轻链可变区中有四个FR (FR-L1、FR-L2、FR-L3和FR-L4)。

[0330] 给定CDR或FR的精确氨基酸序列边界可以使用许多熟知的方案中的任一种容易地确定,所述方案包括以下文献中所述的那些:Kabat等人(1991),“Sequences of Proteins of Immunological Interest,”第5版Public Health Service,National Institutes of Health,马里兰州贝塞斯达(“Kabat”编号方案);Al-Lazikani等人,(1997) JMB 273,927-948(“Chothia”编号方案);MacCallum等人,J.Mol.Biol.262:732-745(1996),“Antibody-antigen interactions:Contact analysis and binding site topography,”J.Mol.Biol.262,732-745.”(“Contact”编号方案);Lefranc MP等人,“IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains,”Dev Comp Immunol,2003年1月;27(1):55-77(“IMGT”编号方案);Honegger A和Plückthun A,“Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains:an automatic modeling and analysis tool,”J Mol Biol,2001年6月8日;309(3):657-70(“Aho”编号方案);和Martin等人,“Modeling antibody hypervariable loops:a combined algorithm,”PNAS,1989,86(23):9268-9272(“AbM”编号方案)。

[0331] 给定CDR或FR的边界可能根据用于鉴定的方案而变化。例如,Kabat方案是基于结构比对,而Chothia方案是基于结构信息。Kabat和Chothia方案的编号都是基于最常见的抗体区域序列长度,其中通过插入字母(例如“30a”)提供插入,并且在一些抗体中出现缺失。这两种方案将某些插入和缺失(“插入缺失(indel)”)放置在不同的位置,从而产生不同的编号。Contact方案是基于对复杂晶体结构的分析,并且在许多方面与Chothia编号方案相似。AbM方案是Kabat与Chothia定义之间的折衷,是基于Oxford Molecular's AbM抗体建模软件使用的方案。

[0332] 下表1列出了分别通过Kabat、Chothia、AbM和Contact方案鉴定的CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3以及CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3的示例性位置边界。对于CDR-H1,使用Kabat和Chothia两种编号方案列出残基编号。FR位于CDR之间,例如,FR-L1位于CDR-L1之前,FR-L2位于CDR-L1与CDR-L2之间,FR-L3位于CDR-L2与CDR-L3之间,等等。应注意,因为所示的Kabat编号方案在H35A和H35B处放置插入,所以当使用所示的Kabat编号惯例进行编号时,Chothia CDR-H1环的末端根据环的长度在H32与H34之间变化。

表1. 根据各种编号方案的CDR边界。

CDR	Kabat	Chothia	AbM	Contact
CDR-L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
CDR-L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
CDR-L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
CDR-H1 (Kabat编号 ¹)	H31--H35B	H26--H32..34	H26--H35B	H30--H35B
CDR-H1 (Chothia编号 ²)	H31--H35	H26--H32	H26--H35	H30--H35
CDR-H2	H50--H65	H52--H56	H50--H58	H47--H58
CDR-H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

1-Kabat等人(1991),“Sequences of Proteins of Immunological Interest,”第5版Public Health Service,National Institutes of Health,贝塞斯达,马里兰州

2-Al-Lazikani等人,(1997) JMB 273,927-948

[0333] 因此,除非另有规定,否则应当理解给定抗体或其区域(如其可变区)的“CDR”或“互补决定区”或单独指定的CDR(例如,CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3)涵盖如由任何前述方案或其他已知方案所定义的一个(或特定的)互补决定区。例如,在声明特定的CDR(例如,CDR-H3)含有给定 V_H 或 V_L 区氨基酸序列中的相应CDR的氨基酸序列的情况下,应理解,这种CDR具有在可变区内的相应CDR(例如,CDR-H3)的序列,如由任何前述方案或其他已知方案所定义的。在一些实施方案中,指定了特定的CDR序列。使用各种编号方案描述所提供抗体的示例性CDR序列,但应当理解,所提供抗体可以包括如根据任何其他上述编号方案或熟练技术人员已知的其他编号方案所描述的CDR。

[0334] 同样,除非另有规定,否则给定抗体或其区域如其可变区的FR或单独指定的一个或多个FR(例如,FR-H1、FR-H2、FR-H3、FR-H4)应理解为涵盖如任何已知方案所定义的一个(或特定)框架区。在一些情形中,规定用于鉴定特定CDR、FR或多个特定FR或CDR的鉴定方案,如通过Kabat、Chothia、AbM或Contact方法或其他已知方案定义的CDR。在其他情况下,给出了CDR或FR的具体氨基酸序列。

[0335] 在一些实施方案中,所述抗原结合蛋白、抗体及其抗原结合片段特异性识别全长抗体的抗原。在一些实施方案中,抗体的重链和轻链可以是全长的或者可以是抗原结合部分(Fab、F(ab')₂、Fv或单链Fv片段(scFv))。在其他实施方案中,所述抗体重链恒定区选自例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD和IgE,特别是选自例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4,更特别是IgG1(例如,人IgG1)。在另一个实施方案中,所述抗体轻链恒定区选自例如 κ 或 λ ,特别是 κ 。

[0336] 所提供的抗体包括抗体片段。“抗体片段”是指不同于完整抗体的分子,其包含完整抗体的结合完整抗体所结合的抗原的一部分。抗体片段的例子包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;双抗体;线性抗体;可变重链(V_H)区、单链抗体分子(如scFv)和单结构域 V_H 单一抗体;和由抗体片段形成的多特异性抗体。在特定实施方案中,抗体是包含可变

重链区和/或可变轻链区的单链抗体片段,如scFv。

[0337] 术语“可变区”或“可变结构域”是指抗体重链或轻链的参与抗体与抗原的结合的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域(分别为 V_H 和 V_L)通常具有相似的结构,每个结构域包含四个保守的框架区(FR)和三个CDR。(参见例如Kindt等人Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman and Co.,第91页(2007)。单一 V_H 或 V_L 结构域可能足以赋予抗原结合特异性。此外,可以使用来自结合抗原的抗体的 V_H 或 V_L 结构域分离结合所述特定抗原的抗体,以分别筛选互补的 V_L 或 V_H 结构域的文库。参见例如,Portolano等人,J.Immunol.150:880-887(1993);Clarkson等人,Nature 352:624-628(1991)。

[0338] 包括在所提供的CAR中的抗体包括抗体片段。“抗体片段”或“抗原结合片段”是指除了完整抗体以外的分子,其包含完整抗体的结合完整抗体所结合的抗原的一部分。抗体片段的例子包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;双抗体;线性抗体;重链可变(V_H)区、单链抗体分子(如scFv)和仅含有 V_H 区的单结构域抗体;和由抗体片段形成的多特异性抗体。在一些实施方案中,所提供的CAR中的抗原结合结构域是或包括含有可变重链(V_H)区和可变轻链(V_L)区的抗体片段。在特定实施方案中,抗体是包含重链可变(V_H)区和/或轻链可变(V_L)区的单链抗体片段(例如scFv)。

[0339] 术语“可变区”或“可变结构域”是指抗体重链或轻链的参与抗体与抗原的结合的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域(分别为 V_H 和 V_L)通常具有相似的结构,每个结构域包含四个保守的框架区(FR)和三个CDR。(参见例如Kindt等人Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman and Co.,第91页(2007)。单一 V_H 或 V_L 结构域可能足以赋予抗原结合特异性。此外,可以使用来自结合抗原的抗体的 V_H 或 V_L 结构域分离结合所述特定抗原的抗体,以分别筛选互补的 V_L 或 V_H 结构域的文库。参见例如,Portolano等人,J.Immunol.150:880-887(1993);Clarkson等人,Nature 352:624-628(1991)。

[0340] 单结构域抗体是包含抗体的全部或部分重链可变结构域或者全部或部分轻链可变结构域的抗体片段。在某些实施方案中,单结构域抗体是人单结构域抗体。在一些实施方案中,CAR包含特异性结合抗原的抗体重链结构域,所述抗原例如癌症标记或待靶向的细胞或疾病(例如肿瘤细胞或癌细胞)的细胞表面抗原,例如本文所述或已知的任何靶抗原。

[0341] 抗体片段可以通过各种技术制备,包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及通过重组宿主细胞产生。在一些实施方案中,抗体是重组产生的片段,如包含天然不存在的排列的片段(如具有通过合成接头(例如,肽接头)连接的两个或更多个抗体区域或链的那些),和/或可能并非通过天然存在的完整抗体的酶消化产生的片段。在一些实施方案中,所述抗体片段是scFv。

[0342] “人源化”抗体是如下抗体,其中所有或基本上所有CDR氨基酸残基源自非人CDR,并且所有或基本上所有FR氨基酸残基源自人FR。人源化抗体任选地可以包括源自人抗体的抗体恒定区的至少一部分。非人抗体的“人源化形式”是指非人抗体的变体,其已经历人源化以通常降低对人的免疫原性,同时保留亲代非人抗体的特异性和亲和力。在一些实施方案中,人源化抗体中的一些FR残基被来自非人抗体(例如,CDR残基所来源的抗体)的相应残基取代,例如以恢复或改进抗体特异性或亲和力。

[0343] 因此,在一些实施方案中,嵌合抗原受体(包括TCR样CAR)包括含有抗体或抗体片段的细胞外部分。在一些实施方案中,所述抗体或片段包括scFv。在一些方面,所述嵌合抗

原受体包括含有抗体或片段的细胞外部分和细胞内信号传导区。在一些实施方案中,所述细胞内信号传导区包含细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,所述细胞内信号传导结构域是或包含初级信号传导结构域、能够在T细胞中诱导初级激活信号的信号传导结构域、T细胞受体(TCR)组分的信号传导结构域和/或包含基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)的信号传导结构域。

[0344] 在一些实施方案中,所述重组受体(如CAR,如其抗体部分)进一步包括间隔子,所述间隔子可以是或包括免疫球蛋白恒定区的至少一部分或其变体或经修饰形式,如铰链区(例如,IgG4铰链区)和/或 C_H1/C_L 和/或Fc区。在一些实施方案中,所述重组受体还包含间隔子和/或铰链区。在一些实施方案中,所述恒定区或部分是人IgG(如IgG4或IgG1)的。在一些方面,恒定区的所述部分用作抗原识别组分(例如,scFv)与跨膜结构域之间的间隔子区。与不存在间隔子的情况相比,所述间隔子的长度可以提供在抗原结合后增加的细胞反应性。

[0345] 在一些例子中,所述间隔子具有为或约12个氨基酸的长度或者具有不超过12个氨基酸的长度。示例性间隔子包括具有至少约10至229个氨基酸、约10至200个氨基酸、约10至175个氨基酸、约10至150个氨基酸、约10至125个氨基酸、约10至100个氨基酸、约10至75个氨基酸、约10至50个氨基酸,约10至40个氨基酸、约10至30个氨基酸、约10至20个氨基酸或约10至15个氨基酸(并且包括任何列出的范围的端点之间的任何整数)的那些。在一些实施方案中,间隔子区具有约12个或更少的氨基酸、约119个或更少的氨基酸或约229个或更少的氨基酸。示例性间隔子包括单独的IgG4铰链、与 C_H2 和 C_H3 结构域连接的IgG4铰链或与 C_H3 结构域连接的IgG4铰链。示例性间隔子包括但不限于以下文献中所述的那些:Hudecek等人(2013)Clin.Cancer Res.,19:3153;Hudecek等人(2015)Cancer Immunol Res.3(2):125-135或国际专利申请公开号W0 2014031687,美国专利号8,822,647或US 2014/0271635。在一些实施方案中,所述间隔子包括免疫球蛋白铰链区、 C_H2 区和 C_H3 区的序列。在一些实施方案中,所述铰链、 C_H2 和 C_H3 中的一个或多个全部或部分地源自IgG4或IgG2。在一些情况下,所述铰链、 C_H2 和 C_H3 源自IgG4。在一些方面,所述铰链、 C_H2 和 C_H3 中的一个或多个是嵌合的并且含有源自IgG4和IgG2的序列。在一些例子中,所述间隔子含有IgG4/2嵌合铰链、IgG2/4 C_H2 区、和IgG4 C_H3 区。

[0346] 在一些实施方案中,所述间隔子可以全部或部分地源自IgG4和/或IgG2。在一些实施方案中,所述间隔子可以是含有源自IgG4、IgG2和/或IgG2和IgG4的铰链、 C_H2 和/或 C_H3 序列中的一个或多个的嵌合多肽。在一些实施方案中,所述间隔子可以含有突变,如一个或多个结构域中的一个或多个单氨基酸突变。在一些例子中,所述氨基酸修饰是在IgG4的铰链区中脯氨酸(P)对丝氨酸(S)的取代。在一些实施方案中,所述氨基酸修饰是天冬酰胺(N)被谷氨酰胺(Q)取代以降低糖基化异质性,如在对应于SEQ ID NO:70所示的IgG4重链恒定区序列的 C_H2 区中的位置177的位置(Uniprot登录号P01861;对应于依据EU编号的位置297和SEQ ID NO:4所示的铰链- C_H2 - C_H3 间隔子序列的位置79的位置)处的N至Q取代,或在对应于SEQ ID NO:71所示的IgG2重链恒定区序列的 C_H2 区中的位置176的位置(Uniprot登录号P01859;对应于依据EU编号的位置297的位置)处的N至Q取代。

[0347] 在一些方面,所述间隔子仅含有IgG的铰链区,如仅IgG4或IgG1的铰链,如SEQ ID NO:1所示且由SEQ ID NO:2所示的序列编码的仅铰链间隔子。在其他实施方案中,所述间隔子是与 C_H2 和/或 C_H3 结构域连接的Ig铰链,例如IgG4铰链。在一些实施方案中,所述间隔子是

与C_H2和C_H3结构域连接的Ig铰链,例如IgG4铰链,如SEQ ID NO:3所示。在一些实施方案中,所述间隔子是仅与C_H3结构域连接的Ig铰链,例如IgG4铰链,如SEQ ID NO:4所示。在一些实施方案中,所述间隔子是或包含富含甘氨酸-丝氨酸的序列或其他柔性接头,如已知的柔性接头。在一些实施方案中,所述恒定区或部分IgD的。在一些实施方案中,所述间隔子具有SEQ ID NO:5所示的序列。在一些实施方案中,所述间隔子具有与SEQ ID NO:1、3、4和5中的任何一个展现出至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0348] 抗原识别结构域通常连接至一种或多种细胞内信号传导组分,如模拟通过抗原受体复合物(如TCR复合物)(在CAR的情况下)进行刺激或激活和/或经由另一种细胞表面受体传导信号的信号传导组分。因此,在一些实施方案中,抗原结合组分(例如,抗体)与一个或多个跨膜和细胞内信号传导区连接。在一些实施方案中,所述跨膜结构域与细胞外结构域融合。在一个实施方案中,使用与受体(例如,CAR)中的一个结构域天然地缔合的跨膜结构域。在一些情形下,通过氨基酸取代选择或修饰跨膜结构域,以避免此类结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合,以使与受体复合物的其他成员的相互作用最小化。

[0349] 在一些实施方案中,所述跨膜结构域源自天然来源或源自合成来源。在来源是天然的情况下,所述结构域在一些方面源自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。跨膜区包括源自以下(即包含其至少一个或多个跨膜区)的那些:T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154。可替代地,在一些实施方案中,所述跨膜结构域是合成的。在一些方面,所述合成跨膜结构域主要包含疏水性残基,如亮氨酸和缬氨酸。在一些方面,将在合成跨膜结构域的每个末端发现苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体。在一些实施方案中,所述连接是通过接头、间隔子和/或一个或多个跨膜结构域来实现。

[0350] 细胞内信号传导区域包括模拟或接近以下的那些:经由天然抗原受体的信号、经由这种受体与共刺激受体的组合的信号和/或仅经由共刺激受体的信号。在一些实施方案中,存在短的寡肽或多肽接头,例如长度在2与10个氨基酸之间的接头(如含有甘氨酸和丝氨酸的接头,例如甘氨酸-丝氨酸双联体),并且在CAR的跨膜结构域与胞质信号传导结构域之间形成连接。

[0351] 所述受体(例如,CAR)通常包括至少一种或多种细胞内信号传导组分。在一些实施方案中,所述受体包括TCR复合物的细胞内组分,如介导T细胞激活和细胞毒性的TCR CD3链,例如CD3 ζ 链。因此,在一些方面,所述ROR1结合抗体与一个或多个细胞信号传导模块连接。在一些实施方案中,细胞信号传导模块包括CD3跨膜结构域、CD3细胞内信号传导结构域和/或其他CD跨膜结构域。在一些实施方案中,受体(例如,CAR)还包括一种或多种另外的分子(如Fc受体 γ 、CD8、CD4、CD25或CD16)的一部分。例如,在一些方面,CAR包括CD3-zeta(CD3- ζ)或Fc受体 γ 与CD8、CD4、CD25或CD16之间的嵌合分子。

[0352] 在一些实施方案中,在连接CAR后,CAR的胞质结构域或细胞内信号传导区域激活免疫细胞(例如,工程化以表达CAR的T细胞)的正常效应子功能或反应中的至少一种。例如,在一些背景下,CAR诱导T细胞的功能,如细胞溶解活性或T辅助活性,如细胞因子或其他因子的分泌。在一些实施方案中,使用抗原受体组分或共刺激分子的细胞内信号传导区域的截短部分(例如,如果其转导效应子功能信号)代替完整的免疫刺激链。在一些实施方案中,

细胞内信号传导区域(例如包含一个或多个细胞内信号传导结构域)包括T细胞受体(TCR)的胞质序列,并且在一些方面还包括共受体(其在天然背景下与这种受体并行起作用以在抗原受体接合后启动信号转导)和/或此类分子的任何衍生物或变体的那些,和/或具有相同功能能力的任何合成序列。

[0353] 在天然TCR的情况下,完全激活通常不仅需要经由TCR进行信号传导,还需要共刺激信号。因此,在一些实施方案中,为了促进完全激活,用于产生次级或共刺激信号的组分也被包括在CAR中。在其他实施方案中,CAR不包括用于产生共刺激信号的组分。在一些方面,另外的CAR在相同细胞中表达,并且提供用于产生次级或共刺激信号的组分。

[0354] 在一些方面,将T细胞激活描述为由两个类别的胞质信号传导序列来介导:通过TCR起始抗原依赖性初级激活的那些(初级胞质信号传导序列),以及以非抗原依赖性方式作用以提供次级或共刺激信号的那些(次级胞质信号传导序列)。在一些方面,CAR包括此类信号传导组分中之一或两者。

[0355] 在一些方面,CAR包括调节TCR复合物的初级激活的初级胞质信号传导序列。以刺激方式起作用的初级胞质信号传导序列可以含有信号传导基序(其被称为基于免疫受体酪氨酸的激活基序或ITAM)。含有ITAM的初级胞质信号传导序列的例子包括源自TCR或CD3 ζ 、FcR γ 或FcR β 的那些。在一些实施方案中,CAR中的一种或多种胞质信号传导分子含有源自CD3 ζ 的胞质信号传导结构域、其部分或序列。

[0356] 在一些实施方案中,CAR包括共刺激受体(如CD28、4-1BB、OX40、DAP10和ICOS)的信号传导区和/或跨膜部分。在一些方面,同一CAR包括信号传导区和共刺激组分两者。

[0357] 在一些实施方案中,信号传导区包括于一种CAR内,而共刺激组分是由识别另一种抗原的另一种CAR提供。在一些实施方案中,CAR包括在同一细胞上表达的激活或刺激CAR和共刺激CAR(参见W02014/055668)。

[0358] 在某些实施方案中,细胞内信号传导区包含连接至CD3(例如,CD3- ζ)细胞内结构域的CD28跨膜和信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞内信号传导区包含与CD3 ζ 细胞内结构域连接的嵌合CD28和CD137(4-1BB,TNFRSF9)共刺激结构域。

[0359] 在一些实施方案中,CAR涵盖在胞质部分中的一个或多个(例如,两个或更多个)共刺激结构域和激活结构域(例如,初级激活结构域)。示例性CAR包括CD3- ζ 、CD28和4-1BB的细胞内组分。

[0360] 在一些情况下,CAR被称为第一代、第二代和/或第三代CAR。在一些方面,第一代CAR是在抗原结合后仅提供CD3链诱导的信号信号的CAR;在一些方面,第二代CAR是提供这种信号和共刺激信号的CAR,如包括来自共刺激受体(如CD28或CD137)的细胞内信号传导结构域的CAR;在一些方面,第三代CAR是在一些方面包括不同共刺激受体的多个共刺激结构域的CAR。

[0361] 在一些实施方案中,所述嵌合抗原受体包括含有本文所述的抗体或片段的细胞外部分。在一些方面,所述嵌合抗原受体包括含有本文所述的抗体或片段的细胞外部分和细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,所述抗体或片段包括scFv或单结构域V_H抗体,并且细胞内结构域含有ITAM。在一些方面,所述细胞内信号传导结构域包括CD3- ζ (CD3 ζ)链的 ζ 链的信号传导结构域。在一些实施方案中,所述嵌合抗原受体包括设置在细胞外结构域与细胞内信号传导区域之间的跨膜结构域。

[0362] 在一些方面,所述跨膜结构域含有CD28的跨膜部分。细胞外结构域和跨膜可以直接或间接连接。在一些实施方案中,所述细胞外结构域和跨膜通过间隔子(如本文所述的任何间隔子)连接。在一些实施方案中,嵌合抗原受体含有T细胞共刺激分子的细胞内结构域,如在跨膜结构域与细胞内信号传导结构域之间。在一些方面,所述T细胞共刺激分子是CD28或4-1BB。

[0363] 在一些实施方案中,CAR含有抗体(例如,抗体片段)、跨膜结构域(其是或含有CD28的跨膜部分或其功能变体)以及含有CD28的信号传导部分或其功能变体和CD3 ζ 的信号传导部分或其功能变体的细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,CAR含有抗体(例如,抗体片段)、跨膜结构域(其是或含有CD28的跨膜部分或其功能变体)以及含有4-1BB的信号传导部分或其功能变体和CD3 ζ 的信号传导部分或其功能变体的细胞内信号传导结构域。在一些此类实施方案中,受体还包括含有Ig分子(如人Ig分子)的一部分(如Ig铰链,例如IgG4铰链)的间隔子,如仅铰链间隔子。

[0364] 在一些实施方案中,所述受体(例如,CAR)的跨膜结构域是人CD28的跨膜结构域或其变体,例如人CD28(登录号:P10747.1)的27个氨基酸的跨膜结构域,或者是包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列或展现与SEQ ID NO:8至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列的跨膜结构域;在一些实施方案中,含有重组受体的部分的跨膜结构域包含SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列或与其具有至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0365] 在一些实施方案中,所述嵌合抗原受体含有T细胞共刺激分子的细胞内结构域。在一些方面,所述T细胞共刺激分子是CD28或4-1BB。

[0366] 在一些实施方案中,细胞内信号传导区域包含人CD28的细胞内共刺激信号传导结构域或其功能变体或部分,如其41个氨基酸的结构域,和/或在天然CD28蛋白的位置186-187处具有LL至GG取代的这种结构域。在一些实施方案中,所述细胞内信号传导结构域可以包含SEQ ID NO:10或11所示的氨基酸序列或展现出与SEQ ID NO:10或11至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述细胞内区域包含4-1BB的细胞内共刺激信号传导结构域或其功能变体或部分,如人4-1BB(登录号Q07011.1)的42个氨基酸的胞质结构域或其功能变体或部分,如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:12展现出至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0367] 在一些实施方案中,细胞内信号传导区包含人CD3 ζ 链、任选地CD3 ζ 刺激信号传导结构域或其功能变体,如人CD3 ζ (登录号:P20963.2)的亚型3的112个AA的胞质结构域或如美国专利号7,446,190或美国专利号8,911,993中所述的CD3 ζ 信号传导结构域。在一些实施方案中,所述细胞内信号传导区域包含SEQ ID NO:13、14或15所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:13、14或15展现出至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0368] 在一些方面,所述间隔子仅含有IgG的铰链区,如仅IgG4或IgG1的铰链,如SEQ ID NO:1所示的仅铰链间隔子。在其他实施方案中,所述间隔子是与C_H2和/或C_H3结构域连接的

Ig铰链,例如IgG4铰链。在一些实施方案中,所述间隔子是与C_H2和C_H3结构域连接的Ig铰链,例如IgG4铰链,如SEQ ID NO:3所示。在一些实施方案中,所述间隔子是仅与C_H3结构域连接的Ig铰链,例如IgG4铰链,如SEQ ID NO:4所示。在一些实施方案中,所述间隔子是或包含富含甘氨酸-丝氨酸的序列或其他柔性接头,如已知的柔性接头。

2. T细胞受体 (TCR)

[0369] 在一些实施方案中,所编码的重组受体是识别靶多肽(如肿瘤、病毒或自身免疫蛋白的抗原)的肽表位或T细胞表位的T细胞受体(TCR)或其抗原结合部分。

[0370] 在一些实施方案中,“T细胞受体”或“TCR”是如下分子,该分子含有可变 α 和 β 链(也分别称为TCR α 和TCR β)或可变 γ 和 δ 链(也分别称为TCR α 和TCR β)或其抗原结合部分,并且能够特异性结合与MHC分子结合的肽。在一些实施方案中,TCR呈 $\alpha\beta$ 形式。通常,以 $\alpha\beta$ 和 $\gamma\delta$ 形式存在的TCR在结构上总体上相似,但是表达它们的T细胞可以具有不同的解剖学位置或功能。TCR可以在细胞的表面上发现或以可溶形式发现。通常,在T细胞(或T淋巴细胞)的表面上发现TCR,在此处它通常负责识别与主要组织相容性复合物(MHC)分子结合的抗原。

[0371] 除非另有说明,否则术语“TCR”应当理解为涵盖完整的TCR以及其抗原结合部分或抗原结合片段。在一些实施方案中,TCR是完整或全长TCR,包括呈 $\alpha\beta$ 形式或 $\gamma\delta$ 形式的TCR。在一些实施方案中,TCR是小于全长TCR但结合至MHC分子中所结合的特定肽(如结合至MHC-肽复合物)的抗原结合部分。在一些情况下,TCR的抗原结合部分或片段可以仅含有全长或完整TCR的结构性结构域的一部分,但是仍能够结合与完整TCR结合的肽表位(如MHC-肽复合物)。在一些情况下,抗原结合部分含有TCR的可变结构域(如TCR的可变 α 链和可变 β 链),足以形成用于与特定MHC-肽复合物结合的结合位点。通常,TCR的可变链含有参与对肽、MHC和/或MHC-肽复合物的识别的互补决定区。

[0372] 在一些实施方案中,TCR的可变结构域含有超变环或互补决定区(CDR),其通常是抗原识别和结合能力和特异性的主要贡献者。在一些实施方案中,TCR的CDR或其组合形成给定TCR分子的全部或基本上全部的抗原结合位点。TCR链的可变区内的各个CDR通常由框架区(FR)隔开,与CDR相比,所述框架区通常在TCR分子之间展示较低可变性(参见,例如, Jores等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.U.S.A.87:9138,1990;Chothia等人,EMBO J.7:3745,1988;还参见Lefranc等人,Dev.Comp.Immunol.27:55,2003)。在一些实施方案中,CDR3是负责抗原结合或特异性的主要CDR,或者在给定TCR可变区上在三个CDR中对于抗原识别和/或对于与肽-MHC复合物的经加工肽部分的相互作用最重要。在一些背景下, α 链的CDR1可以与某些抗原肽的N末端部分相互作用。在一些背景下, β 链的CDR1可以与肽的C末端部分相互作用。在一些情境下,CDR2对与MHC-肽复合物的MHC部分的相互作用或识别具有最强的作用或者是主要的负责CDR。在一些实施方案中, β 链的可变区可以含有其他高变区(CDR4或HVR4),所述高变区通常参与超抗原结合而非抗原识别(Kotb(1995)Clinical Microbiology Reviews,8:411-426)。

[0373] 在一些实施方案中,TCR还可以含有恒定结构域、跨膜结构域和/或短胞质尾(参见例如,Janeway等人,Immunobiology:The Immune System in Health and Disease,第3版,Current Biology Publications,第4:33页,1997)。在一些方面,TCR的每条链可以具有一个N末端免疫球蛋白可变结构域、一个免疫球蛋白恒定结构域、跨膜区和位于C末端的短胞质尾。在一些实施方案中,TCR与参与介导信号转导的CD3复合物的不变蛋白质缔合。

[0374] 在一些实施方案中,TCR链含有一个或多个恒定结构域。例如,给定TCR链(例如, α 链或 β 链)的细胞外部分可以含有与细胞膜相邻的两个免疫球蛋白样结构域,如可变结构域(例如, $V\alpha$ 或 $V\beta$;通常为基于Kabat编号的氨基酸1至116,Kabat等人,“Sequences of Proteins of Immunological Interest”,US Dept.Health and Human Services,Public Health Service National Institutes of Health,1991,第5版)和恒定结构域(例如, α 链恒定结构域或 $C\alpha$,通常为基于Kabat编号的链的位置117至259;或 β 链恒定结构域或 $C\beta$,通常为基于Kabat的链的位置117至295)。例如,在一些情况下,由两条链形成的TCR的细胞外部分含有两个膜近端恒定结构域和两个膜远端可变结构域,所述可变结构域各自含有CDR。TCR的恒定结构域可以含有短连接序列,其中半胱氨酸残基形成二硫键,从而连接TCR的两条链。在一些实施方案中,TCR可以在 α 链和 β 链中的每一个中具有另外的半胱氨酸残基,使得TCR在恒定结构域中含有两个二硫键。

[0375] 在一些实施方案中,所述TCR链含有跨膜结构域。在一些实施方案中,所述跨膜结构域带正电荷。在一些情况下,TCR链含有胞质尾。在一些情况下,所述结构允许TCR与其他分子(像CD3)及其亚基缔合。例如,含有恒定结构域与跨膜区的TCR可以将蛋白质锚定在细胞膜中并与CD3信号传导设备或复合物的不变亚基缔合。CD3信号传导亚基(例如,CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 和CD3 ζ 链)的细胞内尾含有TCR复合物的信号传导能力中所涉及的一个或多个基于免疫受体酪氨酸的激活基序或ITAM。

[0376] 在一些实施方案中,TCR可以是两条链 α 和 β (或者任选 γ 和 δ)的异二聚体,或者TCR可以是单链TCR构建体。在一些实施方案中,TCR是含有如通过一个或多个二硫键连接的两条单独链(α 和 β 链或 γ 和 δ 链)的异二聚体。

[0377] 在一些实施方案中,TCR可以从一个或多个已知的TCR序列(如 $V\alpha$ 、 $V\beta$ 链的序列)产生,所述一个或多个已知的TCR序列的基本上全长的编码序列是可容易获得的。用于从细胞来源获得全长TCR序列(包括V链序列)的方法是熟知的。在一些实施方案中,编码TCR的核酸可以从多种来源获得,如通过一种或多种给定细胞内的或从所述一种或多种给定细胞中分离的编码TCR的核酸的聚合酶链反应(PCR)扩增获得,或者通过公众可获得的TCR DNA序列的合成获得。

[0378] 在一些实施方案中,TCR是从生物来源获得,如来自细胞(如来自T细胞(例如细胞毒性T细胞))、T细胞杂交瘤或其他公众可获得的来源。在一些实施方案中,T细胞可以从体内分离的细胞获得。在一些实施方案中,TCR是胸腺选择的TCR。在一些实施方案中,TCR是新表位限制性TCR。在一些实施方案中,T细胞可以是经培养的T细胞杂交瘤或克隆。在一些实施方案中,TCR或其抗原结合部分或其抗原结合片段可以根据对所述TCR序列的知识以合成方式产生。

[0379] 在一些实施方案中,TCR是从通过针对靶多肽抗原或其靶T细胞表位筛选候选TCR文库而鉴定或选择的TCR产生的。TCR文库可以通过扩增来自T细胞的 $V\alpha$ 和 $V\beta$ 库来产生,所述T细胞是从受试者中分离的,包括存在于PBMC、脾或其他淋巴器官中的细胞。在一些情况下,T细胞可以从肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)扩增。在一些实施方案中,TCR文库可以从CD4+或CD8+细胞产生。在一些实施方案中,TCR可以从正常或健康受试者的T细胞来源扩增,即正常TCR文库。在一些实施方案中,TCR可以从患病受试者的T细胞来源扩增,即患病TCR文库。在一些实施方案中,使用简并引物扩增 $V\alpha$ 和 $V\beta$ 的基因库,如在从人获得的样品(如T细胞)中通

过RT-PCR扩增。在一些实施方案中,scTv文库可以从天然V α 和V β 文库组装,其中经扩增的产物被克隆或组装以通过接头隔开。根据受试者和细胞的来源,所述文库可以是HLA等位基因特异性的。可替代地,在一些实施方案中,TCR文库可以通过亲本或支架TCR分子的诱变或多样化产生。在一些方面,使TCR经受例如 α 或 β 链的定向进化,如通过诱变来进行。在一些方面,TCR的CDR内的特定残基被改变。在一些实施方案中,可以通过亲和力成熟来修饰经选择的TCR。在一些实施方案中,可以如通过筛选以评估针对肽的CTL活性来选择抗原特异性T细胞。在一些方面,可以选择例如存在于抗原特异性T细胞上的TCR,如通过结合活性,例如对抗原的特定亲和力或亲合力来选择。

[0380] 在一些实施方案中,所述基因工程化抗原受体包括重组T细胞受体(TCR)和/或从天然存在的T细胞克隆的TCR。在一些实施方案中,从患者鉴定、分离针对靶抗原(例如,癌症抗原)的高亲和力T细胞克隆,并将其引入细胞中。在一些实施方案中,已经在用人免疫系统基因(例如,人白细胞抗原系统或HLA)工程化的转基因小鼠中产生针对靶抗原的TCR克隆。参见例如,肿瘤抗原(参见例如,Parkhurst等人(2009) Clin Cancer Res.15:169-180和Cohen等人(2005) J Immunol.175:5799-5808)。在一些实施方案中,使用噬菌体展示来分离针对靶抗原的TCR(参见例如,Varela-Ro hena等人(2008) Nat Med.14:1390-1395和Li (2005) Nat Biotechnol.23:349-354)。

[0381] 在一些实施方案中,TCR或其抗原结合部分是已经被修饰或工程化的。在一些实施方案中,使用定向进化方法来产生具有改变的特性(如对特定MHC-肽复合物具有较高亲和力的)的TCR。在一些实施方案中,通过展示方法实现定向进化,所述展示方法包括但不限于酵母展示(Holler等人(2003) Nat Immunol,4,55-62;Holler等人(2000) Proc Natl Acad Sci U S A,97,5387-92);噬菌体展示(Li等人(2005) Nat Biotechnol,23,349-54)或T细胞展示(Chervin等人(2008) J Immunol Methods,339,175-84)。在一些实施方案中,展示途径涉及工程化或修饰已知的亲本或参考TCR。例如,在一些情况下,野生型TCR可以用作模板以用于产生经诱变的TCR,其中CDR的一个或多个残基被突变,并且选择具有所需改变的特性(如对所需靶抗原具有更高的亲和力)的突变体。

[0382] 在一些实施方案中,用于产生或生成目的TCR的靶多肽的肽是已知的或可以由熟练技术人员容易地鉴定。在一些实施方案中,适用于产生TCR或抗原结合部分的肽可以基于目的靶多肽(如下文所述的靶多肽)中HLA限制性基序的存在来确定。在一些实施方案中,使用可用的计算机预测模型来鉴定肽。在一些实施方案中,对于预测MHC I类结合位点,此类模型包括但不限于ProPred1 (Singh和Raghava (2001) Bioinformatics17(12):1236-1237)和SYFPEITHI(参见Schuler等人(2007) Immunoinformatics Methods in Molecular Biology,409(1):75-93 2007)。在一些实施方案中,MHC限制性表位是HLA-A0201,其在所有高加索人的大约39%-46%中表达,并且因此代表用于制备TCR或其他MHC-肽结合分子的MHC抗原的合适选择。

[0383] 已知使用计算机预测模型的HLA-A0201结合基序和蛋白酶体和免疫蛋白酶体的切割位点。用于预测MHC I类结合位点的此类模型包括但不限于ProPred1(更详细地描述于Singh和Raghava,ProPred:prediction of HLA-DR binding sites.BIOINFORMATICS 17(12):1236-1237 2001中)和SYFPEITHI(参见Schuler等人SYFPEITHI Database for Searching and T-Cell Epitope Prediction.,Immunoinformatics Methods in

Molecular Biology, 第409卷(1):75-93 2007)。

[0384] 在一些实施方案中,TCR或其抗原结合部分可以是重组产生的天然蛋白或其突变形式,其中一种或多种特性(如结合特征)已发生改变。在一些实施方案中,TCR可以源自多个动物物种之一,如人、小鼠、大鼠或其他哺乳动物。TCR可以是细胞结合的或呈可溶形式。在一些实施方案中,出于所提供的方法的目的,TCR呈在细胞表面上表达的细胞结合形式。

[0385] 在一些实施方案中,所述TCR是全长TCR。在一些实施方案中,所述TCR是抗原结合部分。在一些实施方案中,所述TCR是二聚体TCR(dTCR)。在一些实施方案中,所述TCR是单链TCR(sc-TCR)。在一些实施方案中,dTCR或scTCR具有如WO 03/020763、WO 04/033685、WO2011/044186中所述的结构。

[0386] 在一些实施方案中,TCR含有对应于跨膜序列的序列。在一些实施方案中,TCR确实含有对应于胞质序列的序列。在一些实施方案中,TCR能够与CD3形成TCR复合物。在一些实施方案中,任何TCR(包括dTCR或scTCR)可以与信号传导结构域连接,从而在T细胞表面上产生活性TCR。在一些实施方案中,TCR在细胞表面上表达。

[0387] 在一些实施方案中,dTCR含有第一多肽(其中对应于TCR α 链可变区序列的序列与对应于TCR α 链恒定区细胞外序列的序列的N末端融合)和第二多肽(其中对应于TCR β 链可变区序列的序列与对应于TCR β 链恒定区细胞外序列的序列的N末端融合),所述第一和第二多肽通过二硫键连接。在一些实施方案中,所述键可以对应于天然二聚体 $\alpha\beta$ TCR中存在的天然链间二硫键。在一些实施方案中,链间二硫键不存在于天然TCR中。例如,在一些实施方案中,可以将一个或多个半胱氨酸掺入dTCR多肽对的恒定区细胞外序列中。在一些情况下,可能需要天然和非天然二硫键。在一些实施方案中,所述TCR含有跨膜序列以锚定至膜。

[0388] 在一些实施方案中,dTCR含有TCR α 链,所述TCR α 链含有可变 α 结构域、恒定 α 结构域和附接至恒定 α 结构域C末端的第一二聚化基序;以及TCR β 链,所述TCR β 链包含可变 β 结构域、恒定 β 结构域和附接至恒定 β 结构域C末端的第一二聚化基序,其中所述第一和第二二聚化基序易于相互作用以在第一二聚化基序的氨基酸与第二二聚化基序的氨基酸之间形成共价键,从而将TCR α 链与TCR β 链连接在一起。

[0389] 在一些实施方案中,TCR是scTCR。通常,可以使用已知的方法产生scTCR,参见例如,Soo Hoo, W.F.等人PNAS (USA) 89, 4759 (1992); Wülfing, C.和Plückthun, A., J.Mol.Biol.242, 655 (1994); Kurucz, I.等人PNAS (USA) 90 3830 (1993); 国际公开PCT号WO 96/13593、WO 96/18105、WO 99/60120、WO 99/18129、WO 03/020763、WO 2011/044186;以及 Schlueter, C.J.等人J.Mol.Biol.256, 859 (1996)。在一些实施方案中,scTCR含有引入的非天然链间二硫键以促进TCR链的缔合(参见例如,国际公开PCT号WO03/020763)。在一些实施方案中,scTCR是非二硫键连接的截短的TCR,其中与其C末端融合的异源亮氨酸拉链促进链缔合(参见例如国际公开PCT号WO 99/60120)。在一些实施方案中,scTCR含有经由肽接头与TCR β 可变结构域共价连接的TCR α 可变结构域(参见例如,国际公开的PCT号WO99/18129)。

[0390] 在一些实施方案中,scTCR含有第一区段(由对应于TCR α 链可变区的氨基酸序列构成)、第二区段(由与对应于TCR β 链恒定结构域细胞外序列的氨基酸序列的N末端融合的对对应于TCR β 链可变区序列的氨基酸序列构成)和接头序列(将第一区段的C末端连接至第二区段的N末端)。

[0391] 在一些实施方案中,scTCR含有第一区段(由与 α 链细胞外恒定结构域序列的N末端

融合的 α 链可变区序列构成)和第二区段(由与序列 β 链细胞外恒定和跨膜序列的N末端融合的 β 链可变区序列构成)以及任选接头序列(将第一区段的C末端连接至第二区段的N末端)。

[0392] 在一些实施方案中,scTCR含有第一区段(由与 β 链细胞外恒定结构域序列的N末端融合的TCR β 链可变区序列构成)和第二区段(由与序列 α 链细胞外恒定和跨膜序列的N末端融合的 α 链可变区序列构成)以及任选接头序列(将第一区段的C末端连接至第二区段的N末端)。

[0393] 在一些实施方案中,scTCR的连接第一和第二TCR区段的接头可以是能够形成单一多肽链同时保留TCR结合特异性的任何接头。在一些实施方案中,接头序列可以例如具有式-P-AA-P-,其中P是脯氨酸并且AA代表氨基酸序列,其中氨基酸是甘氨酸和丝氨酸。在一些实施方案中,所述第一和第二区段配对,使得其可变区序列定向用于这种结合。因此,在一些情况下,所述接头具有足够的长度以跨越所述第一区段的C末端与所述第二区段的N末端之间的距离,或反之亦然,但是不能太长以阻断或减少所述scTCR与所述靶配体的结合。在一些实施方案中,所述接头可以含有为或为约10至45个氨基酸,如10至30个氨基酸或26至41个氨基酸残基,例如29、30、31或32个氨基酸。在一些实施方案中,所述接头具有式-PGGG-(SGGGG)₅-P-,其中P是脯氨酸,G是甘氨酸,并且S是丝氨酸(SEQ ID NO:22)。在一些实施方案中,所述接头具有序列GSADDAKKDAAKKDGKS(SEQ ID NO:23)

[0394] 在一些实施方案中,scTCR含有共价二硫键,其将 α 链的恒定结构域的免疫球蛋白区域的残基连接至 β 链的恒定结构域的免疫球蛋白区域的残基。在一些实施方案中,天然TCR中不存在链间二硫键。例如,在一些实施方案中,可以将一个或多个半胱氨酸掺入scTCR多肽的第一和第二区段的恒定区细胞外序列中。在一些情况下,可能需要天然和非天然二硫键。

[0395] 在含有引入的链间二硫键的dTCR或scTCR的一些实施方案中,不存在天然二硫键。在一些实施方案中,形成天然链间二硫键的一个或多个天然半胱氨酸被取代为另一种残基,如丝氨酸或丙氨酸。在一些实施方案中,引入的二硫键可以通过使第一和第二区段上的非半胱氨酸残基突变为半胱氨酸来形成。TCR的示例性非天然二硫键描述于已公开的国际PCT号W02006/000830中。

[0396] 在一些实施方案中,TCR或其抗原结合片段对靶抗原以平衡结合常数展现出亲和力,所述平衡结合常数在或在约 10^{-5} 与 10^{-12} M之间以及其中的所有单独值和范围。在一些实施方案中,靶抗原是MHC-肽复合物或配体。

[0397] 在一些实施方案中,编码TCR(如 α 和 β 链)的一种或多种核酸可以通过PCR、克隆或其他合适的方法扩增,并且克隆到一种或多种合适的表达载体中。表达载体可以是任何合适的重组表达载体,并且可以用于转化或转染任何合适的宿主。合适的载体包括设计用于繁殖和扩增或用于表达或用于两者的那些,如质粒和病毒。

[0398] 在一些实施方案中,可以使用标准重组DNA技术来制备所述重组表达载体。在一些实施方案中,所述载体可以含有调节序列,如转录和翻译起始和终止密码子,其对引入载体的宿主(例如,细菌、真菌,植物或动物)的类型具特异性,酌情并考虑所述载体是基于DNA还是基于RNA。在一些实施方案中,所述载体可以含有非天然启动子,其与编码TCR或抗原结合部分(或其他MHC-肽结合分子)的核苷酸序列可操作地连接。在一些实施方案中,所述启动子可以是非病毒启动子或病毒启动子,如巨细胞病毒(CMV)启动子、SV40启动子、RSV启动子

和在鼠干细胞病毒的长末端重复序列中发现的启动子。还设想其他已知的启动子。

[0399] 在一些实施方案中,在获得T细胞克隆后,将TCR α 和 β 链分离并克隆到基因表达载体中。在一些实施方案中,TCR α 和 β 基因通过小核糖核酸病毒2A核糖体跳跃肽连接,使得两条链共表达。在一些实施方案中,TCR的遗传转移是通过逆转录病毒或慢病毒载体或通过转座子完成(参见例如,Baum等人(2006)Molecular Therapy:The Journal of the American Society of Gene Therapy.13:1050-1063;Frecha等人(2010)Molecular Therapy:The Journal of the American Society of Gene Therapy.18:1748-1757;和Hackett等人(2010)Molecular Therapy:The Journal of the American Society of Gene Therapy.18:674-683)。

[0400] 在一些实施方案中,为了产生编码TCR的载体,将 α 和 β 链从表达目的TCR的T细胞克隆分离的总cDNA进行PCR扩增,并将其克隆到表达载体中。在一些实施方案中,将 α 和 β 链克隆到同一载体中。在一些实施方案中,将 α 和 β 链克隆到不同的载体中。在一些实施方案中,将所产生的 α 和 β 链掺入逆转录病毒(例如,慢病毒)载体中。

3. 嵌合自身抗体受体 (CAAR)

[0401] 在一些实施方案中,所编码的重组受体是嵌合自身抗体受体 (CAAR)。在一些实施方案中,CAAR对自身抗体具有特异性。在一些实施方案中,表达CAAR的细胞(如工程化以表达CAAR的T细胞)可以用于特异性地结合并杀伤表达自身抗体的细胞,但不杀伤表达正常抗体的细胞。在一些实施方案中,表达CAAR的细胞可以用于治疗与自身抗原的表达相关的自身免疫性疾病,例如自身免疫性疾病。在一些实施方案中,表达CAAR的细胞可以靶向最终产生自身抗体并在其细胞表面上展示自身抗体的B细胞,将这些B细胞标记为用于治疗干预的疾病特异性靶标。在一些实施方案中,表达CAAR的细胞可以用于通过使用抗原特异性嵌合自身抗体受体靶向引起疾病的B细胞,有效靶向和杀伤自身免疫性疾病中的致病性B细胞。在一些实施方案中,所述重组受体是CAAR,如美国专利申请公开号US 2017/0051035中所述的任何一种。

[0402] 在一些实施方案中,CAAR包含自身抗体结合结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导区。在一些实施方案中,所述细胞内信号传导区包含细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,所述细胞内信号传导结构域是或包含初级信号传导结构域、能够在T细胞中诱导初级激活信号的信号传导结构域、T细胞受体 (TCR) 组分的信号传导结构域和/或包含基于免疫受体酪氨酸的激活基序 (ITAM) 的信号传导结构域。在一些实施方案中,所述细胞内信号传导区包含次级或共刺激信号传导区(次级细胞内信号传导区)。

[0403] 在一些实施方案中,所述自身抗体结合结构域包含自身抗原或其片段。自身抗原的选择可以取决于所靶向的自身抗体的类型。例如,可以因为自身抗原识别与特定疾病状态(例如自身免疫性疾病,如自身抗体介导的自身免疫性疾病)相关的靶细胞(如B细胞)上的自身抗体而选择所述自身抗原。在一些实施方案中,自身免疫性疾病包括寻常型天疱疮 (PV)。示例性自身抗原包括桥粒芯糖蛋白1 (Dsg1) 和Dsg3。

4. 多靶向

[0404] 在一些实施方案中,所述细胞和方法包括多靶向策略,例如在细胞上表达两种或更多种基因工程化受体,每种受体识别相同或不同的抗原,并且通常各自包括不同的细胞内信号传导组分。此类多靶向策略描述于例如以下文献中:WO 2014055668(描述激活和共

刺激CAR的组合,例如,靶向在脱靶(例如正常细胞)上单独呈现,而仅在待治疗疾病或病症的细胞上一起呈现的两种不同抗原)和Fedorov等人,Sci.Transl.Medicine,5(215)(2013年12月)(描述表达激活和抑制性CAR的细胞,如这样的细胞,其中激活CAR与同时在正常或非患病细胞和待治疗疾病或病症的细胞上表达的一种抗原结合,并且抑制性CAR与仅在正常细胞或不需要治疗的细胞上表达的另一种抗原结合)。

[0405] 例如,在一些实施方案中,所述细胞包括表达第一基因工程化抗原受体(例如,CAR或TCR)的受体,其通常在与由第一受体识别的抗原(例如,第一抗原)特异性地结合后能够诱导激活或刺激信号至所述细胞。在一些实施方案中,所述细胞进一步包括第二基因工程化抗原受体(例如,CAR或TCR),例如嵌合共刺激受体,所述受体通常在特异性结合至由第二受体识别的第二抗原后,能够将共刺激信号诱导至免疫细胞。在一些实施方案中,第一抗原与第二抗原是相同的。在一些实施方案中,第一抗原与第二抗原是不同的。

[0406] 在一些实施方案中,第一和/或第二基因工程化抗原受体(例如CAR或TCR)能够诱导激活或刺激信号至所述细胞。在一些实施方案中,受体包括含有ITAM或ITAM样基序的细胞内信号传导组分。在一些实施方案中,由第一受体诱导的激活涉及信号转导或细胞中蛋白质表达的变化,导致启动免疫应答(例如ITAM磷酸化)和/或启动ITAM介导的信号转导级联、形成免疫突触和/或所结合受体(例如CD4或CD8等)附近的分子的聚簇、激活一种或多种转录因子(例如NF- κ B和/或AP-1)、和/或诱导因子(如细胞因子)的基因表达、增殖和/或存活。

[0407] 在一些实施方案中,第一和/或第二受体包括共刺激受体的细胞内信号传导结构域,所述共刺激受体例如CD28、CD137(4-1BB)、OX40和/或ICOS。在一些实施方案中,第一和第二受体包括不同的共刺激受体的细胞内信号传导结构域。在一个实施方案中,第一受体含有CD28共刺激信号传导区域,并且第二受体含有4-1BB共刺激信号传导区域,或反之亦然。

[0408] 在一些实施方案中,第一和/或第二受体包括含有ITAM或ITAM样基序的细胞内信号传导结构域和共刺激受体的细胞内信号传导结构域。

[0409] 在一些实施方案中,第一受体含有包含ITAM或ITAM样基序的细胞内信号传导结构域,并且第二受体含有共刺激受体的细胞内信号传导结构域。与在相同细胞中诱导的激活或刺激信号组合的共刺激信号是导致免疫应答的共刺激信号,所述免疫应答例如为稳健且持续的免疫应答,例如增加的基因表达,细胞因子和其他因子的分泌,以及T细胞介导的效应子功能(如细胞杀伤)。

[0410] 在一些实施方案中,单独的第一受体的连接和单独的第二受体的连接都不会诱导稳健的免疫应答。在一些方面,如果仅连接一种受体,则细胞变得耐受抗原或对抗原无反应,或被抑制,和/或不被诱导增殖或分泌因子或实现效应子功能。然而,在一些此类实施方案中,在连接多个受体时,如在遇到表达第一和第二抗原的细胞时,实现所需反应,如完全免疫激活或刺激,例如通过一种或多种细胞因子的分泌、增殖、持久性和/或执行免疫效应子功能(如靶细胞的细胞毒性杀伤)所指示的。

[0411] 在一些实施方案中,两种受体分别将激活和抑制信号诱导至细胞,使得一种受体与其抗原的结合激活细胞或诱导反应,但是第二抑制性受体与其抗原的结合诱导了抑制或减弱所述反应的信号。例子是激活CAR与抑制性CAR或iCAR的组合。例如,可以使用这种策

略,其中激活CAR结合在疾病或病症中表达但也在正常细胞上表达的抗原,并且抑制性受体结合至在正常细胞上表达但不在疾病或病症的细胞上表达的单独抗原。

[0412] 在一些实施方案中,多靶向策略用于以下情况:其中与特定疾病或病症相关的抗原在未患病细胞上表达和/或在工程化细胞本身上表达,所述表达为瞬时表达(例如,在与基因工程化相关的刺激后)或永久表达。在此类情况下,通过需要连接两个分开的和单独特异性抗原受体,可以改善特异性、选择性和/或功效。

[0413] 在一些实施方案中,所述多种抗原(例如,第一和第二抗原)在所靶向的细胞、组织或者疾病或病症上(如在癌细胞上)表达。在一些方面,细胞、组织、疾病或病症是多发性骨髓瘤或多发性骨髓瘤细胞。在一些实施方案中,多种抗原中的一种或多种通常也在不需要用细胞疗法靶向的细胞(例如正常或未患病细胞或组织,和/或工程化细胞本身)上表达。在此类实施方案中,因为需要连接多种受体以实现细胞的反应,实现特异性和/或功效。

IV. 施用方法

[0414] 在一些方面,所述工程化细胞(例如,其中整合了所述转基因序列的细胞)可以与治疗方法(例如,包括施用已使用本文提供的方法评估的工程化细胞或含有所述工程化细胞的组合物中的任一种)结合使用。在一些方面,所提供的方法可以用于在施用之前测试、评价、表征和/或评估所述工程化细胞或细胞组合物,例如用于在所述工程化或制造过程的一个或多个步骤期间测试所述整合核酸(例如,转基因序列)的存在、不存在和/或量和/或用于配制后测试、评估用于施用和/或准备好施用于受试者的释放。

[0415] 在一些实施方案中,使用本文所述的实施方案评估或评价的表达重组受体或包含重组受体的组合物的工程化细胞可用于多种治疗性、诊断性和预防性适应症。例如,所述工程化细胞或包含所述工程化细胞的组合物可用于治疗受试者中的多种疾病和障碍。方法和用途包括治疗方法和用途,例如,涉及将工程化细胞或含有工程化细胞的组合物施用于患有疾病、病症或障碍(如肿瘤或癌症)的受试者。在一些实施方案中,将使用本文提供的实施方案评估或评价的工程化细胞或组合物以有效量施用以实现所述疾病或障碍的治疗。用途包括工程化细胞或组合物在此类方法和治疗中以及在制备药物以实施此类治疗方法中的用途。在一些实施方案中,通过向患有或怀疑患有所述疾病或病症的受试者施用所评估或评价的工程化细胞或包含其的组合物来进行所述方法(例如,治疗性方法)。在一些实施方案中,这些方法从而治疗所述受试者的所述疾病或病症或障碍。

[0416] 在一些方面,可以将所述工程化细胞或工程化细胞组合物施用于受试者,如患有疾病或病症的受试者。用于过继细胞疗法的细胞的施用方法是已知的,并且可以与所提供的方法和组合物一起使用。例如,过继T细胞疗法描述于例如以下文献中:Gruenberg等人的美国专利申请公开号2003/0170238;Rosenberg的美国专利号4,690,915;Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol.8(10):577-85。参见例如,Themeli等人(2013) Nat Biotechnol.31(10):928-933;Tsukahara等人(2013) Biochem Biophys Res Commun 438(1):84-9;Davila等人(2013) PLoS ONE 8(4):e61338。

[0417] 所治疗的疾病或病症可以是任何疾病或病症,其中抗原的表达与疾病、病症或障碍的病因相关和/或参与所述病因,例如引起、加重或以其他方式参与这种疾病、病症或障碍。示例性疾病和病症可以包括与恶性肿瘤或细胞转化(例如癌症)、自身免疫性疾病或炎症性疾病或例如由细菌、病毒或其他病原体引起的感染性疾病相关的疾病或病症。上文描述

了示例性抗原,其包括与可以治疗的各种疾病和病症相关的抗原。在特定实施方案中,嵌合抗原受体或转基因TCR特异性地结合至与所述疾病或病症相关的抗原。

[0418] 疾病、病症和障碍包括肿瘤,包括实体瘤、血液恶性肿瘤和黑色素瘤,并且包括局部和转移性肿瘤;感染性疾病,如病毒或其他病原体的感染,例如HIV、HCV、HBV、CMV、HPV和寄生虫病;以及自身免疫性和炎性疾病。在一些实施方案中,疾病、障碍或病症是肿瘤、癌症、恶性肿瘤、肿瘤或其他增殖性疾病或障碍。此类疾病包括但不限于白血病、淋巴瘤,例如,急性髓样(或髓性)白血病(AML)、慢性髓样(或髓性)白血病(CML)、急性淋巴细胞(或成淋巴细胞)白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、毛细胞白血病(HCL)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、边缘区淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤(HL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)、滤泡性淋巴瘤、难治性滤泡性淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)和多发性骨髓瘤(MM)。在一些实施方案中,疾病或病症是选自以下的B细胞恶性肿瘤:急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、成人ALL、慢性成淋巴细胞性白血病(CLL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)和弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)。在一些实施方案中,所述疾病或病症是NHL,并且NHL选自侵袭性NHL、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL) NOS型(从头的和从惰性转化的)、原发性纵隔大B细胞淋巴瘤(PMBCL)、富含T细胞/组织细胞的大B细胞淋巴瘤(TCHRBCL)、伯基特淋巴瘤、套细胞淋巴瘤(MCL)和/或滤泡性淋巴瘤(FL)(任选地滤泡性淋巴瘤3B级(FL3B))。

[0419] 在一些实施方案中,疾病或病症是感染性疾病或病症,例如但不限于病毒、逆转录病毒、细菌和原生动物感染、免疫缺陷、巨细胞病毒(CMV)、埃-巴二氏病毒(Epstein-Barr virus,EBV)、腺病毒、BK多瘤病毒。在一些实施方案中,所述疾病或病症是自身免疫性或炎性疾病或病症,如关节炎(例如类风湿性关节炎(RA))、I型糖尿病、系统性红斑狼疮(SLE)、炎性肠病、银屑病、硬皮病、自身免疫性甲状腺疾病、格雷夫斯病、克罗恩病、多发性硬化症、哮喘和/或与移植相关的疾病或病症。

[0420] 在一些实施方案中,与疾病或障碍相关的抗原是或包括 $\alpha\text{v}\beta 6$ 整合素($\alpha\text{v}\beta 6$ 整合素)、B细胞成熟抗原(BCMA)、B7-H3、B7-H6、碳酸酐酶9(CA9,也称为CAIX或G250)、癌症-睾丸抗原、癌症/睾丸抗原_{1B}(CTAG,也称为NY-ESO-1和LAGE-2)、癌胚抗原(CEA)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、C-C基序趋化因子配体1(CCL-1)、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD123、CD133、CD138、CD171、表皮生长因子蛋白(EGFR)、截短的表皮生长因子蛋白(tEGFR)、表皮生长因子受体III型突变体(EGFR vIII)、上皮糖蛋白2(EPG-2)、上皮糖蛋白40(EPG-40)、肝配蛋白B2、肝配蛋白受体A2(EPHa2)、雌激素受体、Fc受体样蛋白5(FCRL5;也称为Fc受体同源物5或FCRH5)、胎儿乙酰胆碱受体(胎儿AChR)、叶酸结合蛋白(FBP)、叶酸受体 α 、神经节苷脂GD2、O-乙酰化GD2(OGD2)、神经节苷脂GD3、糖蛋白100(gp100)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3)、G蛋白偶联受体C型家族5D(GPRC5D)、Her2/neu(受体酪氨酸激酶erb-B2)、Her3(erb-B3)、Her4(erb-B4)、erbB二聚体、人高分子量黑色素瘤相关抗原(HMW-MAA)、乙型肝炎表面抗原、人白细胞抗原A1(HLA-A1)、人白细胞抗原A2(HLA-A2)、IL-22受体 α (IL-22R α)、IL-13受体 $\alpha 2$ (IL-13R $\alpha 2$)、激酶插入结构域受体(kdr)、 κ 轻链、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、L1-CAM的CE7表位、含有富亮氨酸重复序列的蛋白8家族成员A(LRRC8A)、路易斯Y、黑色素瘤相关抗原(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、MAGE-A10、间皮素(MSLN)、c-Met、鼠类巨细胞病毒(CMV)、粘蛋白1(MUC1)、MUC16、自然杀伤

细胞2族成员D (NKG2D) 配体、黑色素A (MART-1)、神经细胞粘附分子 (NCAM)、癌胚胎抗原、黑色素瘤优先表达抗原 (PRAME)、孕酮受体、前列腺特异性抗原、前列腺干细胞抗原 (PSCA)、前列腺特异性膜抗原 (PSMA)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR1)、存活蛋白、滋养层糖蛋白 (TPBG, 也称为5T4)、肿瘤相关糖蛋白72 (TAG72)、酪氨酸酶相关蛋白1 (TRP1, 也称为TYRP1或gp75)、酪氨酸酶相关蛋白2 (TRP2, 也称为多巴色素互变异构酶、多巴色素 δ 异构酶或DCT)、血管内皮生长因子受体 (VEGFR)、血管内皮生长因子受体2 (VEGFR2)、Wilms肿瘤1 (WT-1)、病原体特异性或病原体表达的抗原、或与通用标签相关的抗原、和/或生物素化分子、和/或由HIV、HCV、HBV或其他病原体表达的分子。在一些实施方案中,所述受体靶向的抗原包括与B细胞恶性肿瘤相关的抗原,如许多已知B细胞标记中的任一种。在一些实施方案中,所述抗原是或包括CD20、CD19、CD22、ROR1、CD45、CD21、CD5、CD33、Ig κ 、Ig λ 、CD79a、CD79b或CD30。在一些实施方案中,所述抗原是或包括病原体特异性或病原体表达的抗原,如病毒抗原(例如,来自HIV、HCV、HBV的病毒抗原)、细菌抗原和/或寄生虫抗原。

[0421] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段(例如scFv或V_H结构域)特异性地识别抗原,如CD19。在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段源自特异性地结合CD19的抗体或抗原结合片段,或者是特异性地结合CD19的抗体或抗原结合片段的变体。在一些实施方案中,所述细胞疗法(例如,过继T细胞疗法)通过自体转移进行,其中从接受细胞疗法的受试者或从源自这种受试者的样品中分离和/或以其他方式制备细胞。因此,在一些方面,所述细胞源自需要治疗的受试者(例如,患者),并且在分离和加工后将所述细胞施用于同一受试者。

[0422] 在一些实施方案中,所述疾病或病症是B细胞恶性肿瘤。在一些实施方案中,B细胞恶性肿瘤是白血病或淋巴瘤。在一些方面,所述疾病或病症是急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、成人ALL、慢性成淋巴细胞性白血病(CLL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)或弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)。在一些情况下,所述疾病或病症是NHL(例如或包括作为侵袭性NHL的NHL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL) NOS型(从头的和从惰性转化的)、原发性纵隔大B细胞淋巴瘤(PMBCL)、富含T细胞/组织细胞的大B细胞淋巴瘤(TCHRBCL)、伯基特淋巴瘤、套细胞淋巴瘤(MCL)和/或滤泡性淋巴瘤(FL),任选地3B级滤泡性淋巴瘤(FL3B)。在一些方面,所述重组受体(如CAR)特异性地结合至与疾病或病症相关的抗原或在与B细胞恶性肿瘤相关的病灶环境的细胞中表达的抗原。在一些实施方案中,所述受体靶向的抗原包括与B细胞恶性肿瘤相关的抗原,如许多已知B细胞标记中的任一种。在一些实施方案中,所述受体靶向的抗原是CD20、CD19、CD22、ROR1、CD45、CD21、CD5、CD33、Ig κ 、Ig λ 、CD79a、CD79b或CD30、或其组合。

[0423] 在一些实施方案中,所述疾病或病症是骨髓瘤,如多发性骨髓瘤。在一些方面,所述重组受体(如CAR)特异性地结合至与疾病或病症相关的抗原或在与多发性骨髓瘤相关的病灶环境的细胞中表达的抗原。在一些实施方案中,所述受体靶向的抗原包括与多发性骨髓瘤相关的抗原。在一些方面,在多发性骨髓瘤上表达抗原,例如第二或另外抗原,如疾病特有抗原和/或相关抗原,如B细胞成熟抗原(BCMA)、G蛋白偶联受体C类5族成员D(GPRC5D)、CD38(环状ADP核糖水解酶)、CD138(多配体聚糖-1、多配体聚糖、SYN-1)、CS-1(CS1、CD2子集1、CRACC、SLAMF7、CD319和19A24)、BAFF-R、TACI和/或FcRH5。其他示例性多发性骨髓瘤抗原包括CD56、TIM-3、CD33、CD123、CD44、CD20、CD40、CD74、CD200、EGFR、 β 2-微球蛋白、HM1.24、IGF-1R、IL-6R、TRAIL-R1和IIA型激活素受体(ActRIIA)。参见Benson和Byrd,

J.Clin.Oncol. (2012) 30 (16) :2013-15; Tao和Anderson, Bone Marrow Research (2011) : 924058; Chu等人, Leukemia (2013) 28 (4) :917--27; Garfall等人, Discov Med. (2014) 17 (91) :37-46。在一些实施方案中, 抗原包括存在于淋巴瘤、骨髓瘤、AIDS相关的淋巴瘤和/或移植后淋巴组织增生上的那些抗原, 如CD38。针对此类抗原的抗体或抗原结合片段是已知的并且包括例如以下文献中所述的那些: 美国专利号8,153,765、8,603,477、8,008,450; 美国公开号US 20120189622或US 20100260748; 和/或国际PCT公开号WO 2006099875、WO 2009080829或WO 2012092612或WO 2014210064。在一些实施方案中, 此类抗体或其抗原结合片段(例如scFv) 包含在多特异性抗体、多特异性嵌合受体(如多特异性CAR) 和/或多特异性细胞中。

[0424] 在一些实施方案中, 所述疾病或障碍与G蛋白偶联受体C类5族成员D (GPCR5D) 的表达和/或B细胞成熟抗原 (BCMA) 的表达相关。

[0425] 在一些实施方案中, 所述疾病或障碍是B细胞相关障碍。在所提供方法的任何所提供实施方案的一些实施方案中, 与BCMA相关的疾病或障碍是自身免疫性疾病或障碍。在所提供方法的任何所提供实施方案的一些实施方案中, 所述自身免疫性疾病或障碍是系统性红斑狼疮 (SLE)、狼疮性肾炎、炎性肠病、类风湿性关节炎、ANCA相关性血管炎、特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、血栓性血小板减少性紫癜 (TTP)、自身免疫性血小板减少症、查加斯病 (Chagas' disease)、格雷夫斯病 (Grave's disease)、韦格纳氏肉芽肿病 (Wegener's granulomatosis)、结节性多动脉炎、舍格伦综合征 (Sjogren's syndrome)、寻常型天疱疮、硬皮病、多发性硬化症、银屑病、IgA肾病、IgM多发性神经病、血管炎、糖尿病、雷诺综合征 (Reynaud's syndrome)、抗磷脂综合征、古德帕斯丘病 (Goodpasture's disease)、川崎病、自身免疫性溶血性贫血、重症肌无力或进行性肾小球肾炎。

[0426] 在一些实施方案中, 所述疾病或障碍是癌症。在一些实施方案中, 所述癌症是表达GPCR5D的癌症。在一些实施方案中, 所述癌症是浆细胞恶性肿瘤, 并且所述浆细胞恶性肿瘤是多发性骨髓瘤 (MM) 或浆细胞瘤。在一些实施方案中, 所述癌症是多发性骨髓瘤 (MM)。在一些实施方案中, 所述癌症是复发性/难治性多发性骨髓瘤。

[0427] 在一些实施方案中, 所述细胞疗法(例如, 过继T细胞疗法) 通过同种异体转移进行, 其中从将要接受或最终接受细胞疗法的受试者以外的受试者(例如, 第一受试者) 分离和/或以其他方式制备细胞。在此类实施方案中, 然后将细胞施用于相同物种的不同受试者, 例如第二受试者。在一些实施方案中, 第一和第二受试者在遗传上是相同的。在一些实施方案中, 第一和第二受试者在遗传上是相似的。在一些实施方案中, 第二受试者表达与第一受试者相同的HLA类别或超型。

[0428] 可以将所述细胞通过任何合适的方式施用, 例如通过推注输注, 通过注射例如静脉内或皮下注射、眼内注射、眼周注射、视网膜下注射、玻璃体内注射、经中隔注射、巩膜下注射、脉络膜内注射、前房注射、结膜下 (subconjunctival) 注射、结膜下 (subconjunctival) 注射、眼球筋膜囊下 (sub-Tenon) 注射、眼球后注射、眼球周注射或后近巩膜 (posterior juxtасcleral) 递送。在一些实施方案中, 将它们通过肠胃外、肺内和鼻内以及(如果局部治疗需要) 病灶内施用来施用。肠胃外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。在一些实施方案中, 给定剂量是通过所述细胞的单次推注施用来施用。在一些实施方案中, 给定剂量通过细胞的多次推注给药例如在不超过3天的时间段内来施用, 或通过细胞的连

续输注给药。在一些实施方案中,所述细胞剂量或任何另外的疗法(例如,淋巴细胞清除疗法、干预疗法和/或组合疗法)的施用是通过门诊递送进行的。

[0429] 对于疾病的预防或治疗,适当的剂量可取决于要治疗的疾病类型、细胞或重组受体的类型、疾病的严重程度和病程、是针对预防目的还是针对治疗目的而施用细胞、先前治疗、受试者的临床病史和对细胞的反应以及主治医师的决断。在一些实施方案中,将所述组合物和细胞以合适的方式一次或经一系列治疗施用于所述受试者。

[0430] 在一些实施方案中,将细胞作为组合治疗的一部分施用,如与另一种治疗性干预(如抗体或工程化细胞或受体或药剂(如细胞毒性剂或治疗剂))同时施用或以任何顺序依序施用。在一些实施方案中,所述细胞与一种或多种另外的治疗剂共同施用或与另一种治疗性干预联合施用(同时或以任何顺序依次施用)。在一些情境下,将所述细胞与另一种疗法在时间上足够接近地共同施用,使得所述细胞群增强一种或多种另外的治疗剂的效果,或反之亦然。在一些实施方案中,在所述一种或多种另外的治疗剂之前施用细胞。在一些实施方案中,所述细胞在所述一种或多种另外的治疗剂后施用。在一些实施方案中,所述一种或多种另外的药剂包括细胞因子(例如IL-2)以例如增强持久性。在一些实施方案中,所述方法包括施用化学治疗剂。

[0431] 在一些实施方案中,在所述施用之前向所述受试者施用化学治疗剂(例如,调理性化学治疗剂)例如以减小肿瘤负荷。

[0432] 在一些方面,用免疫清除(例如,淋巴细胞清除)疗法预调理受试者可以改善过继细胞疗法(ACT)的效果。

[0433] 因此,在一些实施方案中,在开始所述细胞疗法之前将预调理剂施用于受试者,所述预调理剂如淋巴细胞清除剂或化学治疗剂,如环磷酰胺、氟达拉滨或其组合。例如,可以在开始所述细胞疗法之前至少2天(如之前至少3、4、5、6或7天),向所述受试者施用预调理剂。在一些实施方案中,在开始所述细胞疗法之前不超过7天(如之前不超过6、5、4、3或2天),向所述受试者施用预调理剂。

[0434] 在一些实施方案中,用环磷酰胺以在或在约20mg/kg与100mg/kg之间,如在或在约40mg/kg与80mg/kg之间的剂量对所述受试者进行预调理。在一些方面,用或用约60mg/kg的环磷酰胺对所述受试者进行预调理。在一些实施方案中,可以将环磷酰胺按单剂量施用或者可以按多个剂量施用,如每天给予、每隔一天给予或每三天给予。在一些实施方案中,每天一次施用环磷酰胺,持续一天或两天。在一些实施方案中,在淋巴细胞清除剂包含环磷酰胺的情况下,以在或在约100mg/m²与500mg/m²之间,如在或在约200mg/m²与400mg/m²之间或250mg/m²与350mg/m²之间(包含端值)的剂量向受试者施用环磷酰胺。在一些情形中,向所述受试者施用约300mg/m²的环磷酰胺。在一些实施方案中,可以将环磷酰胺按单剂量施用或者可以按多个剂量施用,如每天给予、每隔一天给予或每三天给予。在一些实施方案中,每天施用环磷酰胺,如持续1-5天,例如持续3至5天。在一些情形中,在开始所述细胞疗法之前,每天向所述受试者施用约300mg/m²的环磷酰胺,持续3天。

[0435] 在一些实施方案中,当淋巴细胞清除剂包含氟达拉滨时,向受试者施用剂量在或在约1mg/m²与100mg/m²之间、如在或在约10mg/m²与75mg/m²之间、15mg/m²与50mg/m²之间、20mg/m²与40mg/m²之间、或24mg/m²与35mg/m²之间的氟达拉滨(包含端值)。在一些情形中,向所述受试者施用约30mg/m²的氟达拉滨。在一些实施方案中,氟达拉滨可以按单一剂量施

用或者可以按多个剂量施用,如每天给予、每隔一天给予或每三天给予。在一些实施方案中,每天施用氟达拉滨,如持续1-5天,例如持续3至5天。在一些情形中,在开始所述细胞疗法之前,每天向所述受试者施用约30mg/m²的氟达拉滨,持续3天。

[0436] 在一些实施方案中,淋巴细胞清除剂包含药剂组合,如环磷酰胺与氟达拉滨的组合。因此,药剂组合可以包括任何剂量或施用时间表(如上文所述的那些)的环磷酰胺,以及任何剂量或施用时间表(如上文所述的那些)的氟达拉滨。例如,在一些方面,在第一剂量或后续剂量之前,向受试者施用60mg/kg(约2g/m²)的环磷酰胺和3至5个剂量的25mg/m²氟达拉滨。

[0437] 在一些实施方案中,在施用细胞后,例如通过许多已知方法中的任一种测量工程化细胞群的生物学活性。待评估的参数包括工程化或天然T细胞或其他免疫细胞与抗原的特异性结合,其在体内例如通过成像进行评估,或离体例如通过ELISA或流式细胞术进行评估。在某些实施方案中,工程化细胞破坏靶细胞的能力可以使用任何合适的已知方法来测量,所述方法例如描述于例如以下文献中的细胞毒性测定:Kochenderfer等人,J.Immunotherapy,32(7):689-702(2009),和Herman等人J.Immunological Methods,285(1):25-40(2004)。在某些实施方案中,通过测定一种或多种细胞因子(如CD107a、IFN γ 、IL-2和TNF)的表达和/或分泌来测量细胞的生物学活性。在一些方面,生物学活性是通过评估临床结果(如肿瘤负荷或负担的减少)来测量。

[0438] 在某些实施方案中,将工程化的细胞以任何数量的方式进一步修饰,使得其治疗或预防功效增加。例如,可以将所述群体表达的工程化CAR或TCR直接或通过接头间接缀合至靶向部分。将化合物(例如,CAR或TCR)与靶向部分缀合的实践是已知的。参见例如,Wadwa等人,J.Drug Targeting 3:1 1 1(1995)和美国专利5,087,616。

[0439] 在一些实施方案中,将细胞作为组合治疗的一部分施用,如与另一种治疗性干预(如抗体或工程化细胞或受体或药剂(如细胞毒性剂或治疗剂))同时施用或以任何顺序依序施用。在一些实施方案中,所述细胞与一种或多种另外的治疗剂共同施用或与另一种治疗性干预联合施用(同时或以任何顺序依次施用)。在一些情境下,将所述细胞与另一种疗法在时间上足够接近地共同施用,使得所述细胞群增强一种或多种另外的治疗剂的效果,或反之亦然。在一些实施方案中,在所述一种或多种另外的治疗剂之前施用细胞。在一些实施方案中,所述细胞在所述一种或多种另外的治疗剂后施用。在一些实施方案中,所述一种或多种另外的药剂包括细胞因子(如IL-2)例如以增强持久性。

A. 给药

[0440] 在一些实施方案中,根据所提供方法和/或用所提供制品或组合物将一定剂量的细胞施用于受试者。在一些实施方案中,所述剂量的大小或时间安排是根据所述受试者的特定疾病或病症来确定。在一些情况下,可以根据所提供的描述凭经验确定用于特定疾病的剂量的大小或时间安排。

[0441] 在一些实施方案中,所述剂量的细胞包含在为或约 2×10^5 个细胞/kg与为或约 2×10^6 个细胞/kg之间,如在为或约 4×10^5 个细胞/kg与为或约 1×10^6 个细胞/kg之间或为或约 6×10^5 个细胞/kg与为或约 8×10^5 个细胞/kg之间。在一些实施方案中,所述剂量的细胞包含不超过 2×10^5 个细胞(例如抗原表达细胞,如CAR表达细胞)/公斤受试者体重(细胞/kg),如不超过或不超过约 3×10^5 个细胞/kg、不超过或不超过约 4×10^5 个细胞/kg、不超过或不超过约

5×10^5 个细胞/kg、不超过或不超过约 6×10^5 个细胞/kg、不超过或不超过约 7×10^5 个细胞/kg、不超过或不超过约 8×10^5 个细胞/kg、不超过或不超过约 9×10^5 个细胞/kg、不超过或不超过约 1×10^6 个细胞/kg、或不超过约或不超过约 2×10^6 个细胞/kg。在一些实施方案中,所述剂量的细胞包含至少或至少约或为或约 2×10^5 个细胞(例如抗原表达细胞,如CAR表达细胞)/公斤受试者体重(细胞/kg),如至少或至少约或为或约 3×10^5 个细胞/kg、至少或至少约或为或约 4×10^5 个细胞/kg、至少或至少约或为或约 5×10^5 个细胞/kg、至少或至少约或为或约 6×10^5 个细胞/kg、至少或至少约或为或约 7×10^5 个细胞/kg、至少或至少约或为或约 8×10^5 个细胞/kg、至少或至少约或为或约 9×10^5 个细胞/kg、至少或至少约或为或约 1×10^6 个细胞/kg、或至少或至少约或为或约 2×10^6 个细胞/kg。

[0442] 在某些实施方案中,向受试者施用为或约10万至为或约1000亿个细胞和/或每公斤受试者体重的该细胞量的范围的细胞或细胞亚型的单独群体,例如像为或约10万至为或约500亿个细胞(例如,为或约500万个细胞、为或约2500万个细胞、为或约5亿个细胞、为或约10亿个细胞、为或约50亿个细胞、为或约200亿个细胞、为或约300亿个细胞、为或约400亿个细胞或由任两个前述值限定的范围)、为或约100万至为或约500亿个细胞(例如,为或约500万个细胞、为或约2500万个细胞、为或约5亿个细胞、为或约10亿个细胞、为或约50亿个细胞、为或约200亿个细胞、为或约300亿个细胞、为或约400亿个细胞或由任两个前述值限定的范围),如为或约1000万至为或约1000亿个细胞(例如,为或约2000万个细胞、为或约3000万个细胞、为或约4000万个细胞、为或约6000万个细胞、为或约7000万个细胞、为或约8000万个细胞、为或约9000万个细胞、为或约100亿个细胞、为或约250亿个细胞、为或约500亿个细胞、为或约750亿个细胞、为或约900亿个细胞或由前述任何两个值限定的范围),并且在一些情况下,为或约1亿个细胞至为或约500亿个细胞(例如,为或约1.2亿个细胞、为或约2.5亿个细胞、为或约3.5亿个细胞、约4.5亿个细胞、为或约6.5亿个细胞、为或约8亿个细胞、为或约9亿个细胞、为或约30亿个细胞、为或约300亿个细胞、为或约450亿个细胞)或在这些范围和/或每公斤受试者体重的这些范围之间的任何值。剂量可以根据所述疾病或障碍和/或患者和/或其他治疗所特有的属性而变化。

[0443] 在一些实施方案中,细胞的所述剂量是细胞的平坦剂量或细胞的固定剂量,使得细胞的所述剂量与受试者的体表面积或体重无关或不基于受试者的体表面积或体重。在一些实施方案中,这些值是指表达重组受体的细胞的数量;在其他实施方案中,它们是指施用的T细胞或PBMC或总细胞的数量。

[0444] 在一些实施方案中,例如,在受试者是人的情况下,所述剂量包括少于约 5×10^8 个总重组受体(例如,CAR)表达细胞、T细胞或外周血单核细胞(PBMC),例如,在约 1×10^6 至 5×10^8 个此类细胞的范围内,如 2×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 或 5×10^8 ,为或约 1×10^6 至为或约 5×10^8 个此类细胞,如为或约 2×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 1.5×10^8 或 5×10^8 个总此类细胞,或任两个前述值之间的范围。例如,在一些实施方案中,在受试者是人的情况下,剂量包括多于是或约 1×10^6 个总重组受体(例如CAR)表达细胞、T细胞或外周血单核细胞(PBMC)且少于为或约 2×10^9 个总重组受体(例如CAR)表达细胞、T细胞或外周血单核细胞(PBMC),例如,在为或约 2.5×10^7 至为或约 1.2×10^9 个此类细胞的范围内,如为或约 2.5×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 1.5×10^8 、 8×10^8 、或 1.2×10^9 个总此类细胞、或任两个前述值之间的范围。

[0445] 在一些实施方案中,所述剂量的基因工程化细胞包含从为或约 1×10^5 至为或约

5x10⁸个总CAR表达 (CAR+) T细胞、从为或约1x10⁵至为或约2.5x10⁸个总CAR表达T细胞、从为或约1x10⁵至为或约1x10⁸个总CAR表达T细胞、从为或约1x10⁵至为或约5x10⁷个总CAR表达T细胞、从为或约1x10⁵至为或约2.5x10⁷个总CAR表达T细胞、从为或约1x10⁵至为或约1x10⁷个总CAR表达T细胞、从为或约1x10⁵至为或约5x10⁶个总CAR表达T细胞、从为或约1x10⁵至为或约2.5x10⁶个总CAR表达T细胞、从为或约1x10⁵至为或约1x10⁶个总CAR表达T细胞、从为或约1x10⁶至为或约5x10⁸个总CAR表达T细胞、从为或约1x10⁶至为或约2.5x10⁸个总CAR表达T细胞、从为或约1x10⁶至为或约1x10⁸个总CAR表达T细胞、从为或约1x10⁶至为或约5x10⁷个总CAR表达T细胞、从为或约1x10⁶至为或约2.5x10⁷个总CAR表达T细胞、从为或约1x10⁶至为或约1x10⁷个总CAR表达T细胞、从为或约1x10⁶至为或约5x10⁶个总CAR表达T细胞、从为或约1x10⁶至为或约2.5x10⁶个总CAR表达T细胞、从为或约2.5x10⁶至为或约5x10⁸个总CAR表达T细胞、从为或约2.5x10⁶至为或约2.5x10⁸个总CAR表达T细胞、从为或约2.5x10⁶至为或约1x10⁸个总CAR表达T细胞、从为或约2.5x10⁶至为或约5x10⁷个总CAR表达T细胞、从为或约2.5x10⁶至为或约2.5x10⁷个总CAR表达T细胞、从为或约2.5x10⁶至为或约1x10⁷个总CAR表达T细胞、从为或约2.5x10⁶至为或约5x10⁶个总CAR表达T细胞、从为或约5x10⁶至为或约5x10⁸个总CAR表达T细胞、从为或约5x10⁶至为或约2.5x10⁸个总CAR表达T细胞、从为或约5x10⁶至为或约1x10⁸个总CAR表达T细胞、从为或约5x10⁶至为或约5x10⁷个总CAR表达T细胞、从为或约5x10⁶至为或约2.5x10⁷个总CAR表达T细胞、从为或约5x10⁶至为或约1x10⁷个总CAR表达T细胞、从为或约1x10⁷至为或约5x10⁸个总CAR表达T细胞、从为或约1x10⁷至为或约2.5x10⁸个总CAR表达T细胞、从为或约1x10⁷至为或约1x10⁸个总CAR表达T细胞、从为或约1x10⁷至为或约5x10⁷个总CAR表达T细胞、从为或约1x10⁷至为或约2.5x10⁷个总CAR表达T细胞、从为或约2.5x10⁷至为或约5x10⁸个总CAR表达T细胞、从为或约2.5x10⁷至为或约2.5x10⁸个总CAR表达T细胞、从为或约2.5x10⁷至为或约1x10⁸个总CAR表达T细胞、从为或约2.5x10⁷至为或约5x10⁷个总CAR表达T细胞、从为或约5x10⁷至为或约5x10⁸个总CAR表达T细胞、从为或约5x10⁷至为或约2.5x10⁸个总CAR表达T细胞、从为或约5x10⁷至为或约1x10⁸个总CAR表达T细胞、从为或约1x10⁸至为或约5x10⁸个总CAR表达T细胞、从为或约1x10⁸至为或约2.5x10⁸个总CAR表达T细胞、从为或约2.5x10⁸至为或约5x10⁸个总CAR表达T细胞。在一些实施方案中,基因工程化细胞的所述剂量包含从或从约2.5x10⁷至为或约1.5x10⁸个总CAR表达T细胞,如从或从约5x10⁷至或至约1x10⁸个总CAR表达T细胞。

[0446] 在一些实施方案中,基因工程化细胞的剂量包含至少或至少约1x10⁵个CAR表达细胞、至少或至少约2.5x10⁵个CAR表达细胞、至少或至少约5x10⁵个CAR表达细胞、至少或至少约1x10⁶个CAR表达细胞、至少或至少约2.5x10⁶个CAR表达细胞、至少或至少约5x10⁶个CAR表达细胞、至少或至少约1x10⁷个CAR表达细胞、至少或至少约2.5x10⁷个CAR表达细胞、至少或至少约5x10⁷个CAR表达细胞、至少或至少约1x10⁸个CAR表达细胞、至少或至少约1.5x10⁸个CAR表达细胞、至少或至少约5x10⁶个CAR表达细胞、至少或至少约1x10⁷个CAR表达细胞、至少或至少约2.5x10⁷个CAR表达细胞、至少或至少约5x10⁷个CAR表达细胞、至少或至少约1x10⁸个CAR表达细胞、至少或至少约2.5x10⁸个CAR表达细胞、或至少或至少约5x10⁸个CAR表达细胞。

[0447] 在一些实施方案中,细胞疗法包括施用一定剂量,所述剂量包含如下数量的细胞:从或从约1x10⁵至或至约5x10⁸个总重组受体表达细胞、总T细胞或总外周血单核细胞(PBMC),从或从约5x10⁵至或至约1x10⁷个总重组受体表达细胞、总T细胞或总外周血单核细

胞 (PBMC) 或者从或从约 1×10^6 至或至约 1×10^7 个总重组受体表达细胞、总T细胞或总外周血单核细胞 (PBMC) (每个都包含端值)。在一些实施方案中,细胞疗法包括施用一定剂量的细胞,所述剂量包含如下细胞数量:至少或至少约 1×10^5 个总重组受体表达细胞、总T细胞或总外周血单核细胞 (PBMC),如至少或至少 1×10^6 、至少或至少约 1×10^7 、至少或至少约 1×10^8 个此类细胞。在一些实施方案中,所述数量是关于CD3表达细胞或CD8表达细胞的总数,在一些情况下也是关于重组受体表达(例如CAR表达)细胞的总数。在一些实施方案中,所述细胞疗法包括施用一定剂量,所述剂量包含如下数量的细胞:从或从约 1×10^5 至或至约 5×10^8 个表达CD3或表达CD8的总T细胞或表达CD3或表达CD8的重组受体表达细胞、从或从约 5×10^5 至或至约 1×10^7 个表达CD3或表达CD8的总T细胞或表达CD3或表达CD8的重组受体表达细胞、或从或从约 1×10^6 至或至约 1×10^7 个表达CD3或表达CD8的总T细胞或表达CD3或表达CD8的重组受体表达细胞(每个都包含端值)。在一些实施方案中,所述细胞疗法包括施用一定剂量,所述剂量包含如下数量的细胞:从或从约 1×10^5 至或至约 5×10^8 个总CD3表达/CAR表达或CD8表达/CAR表达细胞、从或从约 5×10^5 至或至约 1×10^7 个总CD3表达/CAR表达或CD8表达/CAR表达细胞、或从或从约 1×10^6 至或至约 1×10^7 个总CD3表达/CAR表达或CD8表达/CAR表达细胞(每个都包含端值)。

[0448] 在一些实施方案中,所述剂量的T细胞包括CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞或CD4⁺和CD8⁺T细胞。

[0449] 例如,在一些实施方案中,如果受试者是人,则所述剂量的CD8⁺T细胞(包括在包括CD4⁺和CD8⁺T细胞的剂量中)包括在为或约 1×10^6 与为或约 5×10^8 个之间的总重组受体(例如CAR)表达CD8⁺细胞,例如在以下范围内:从为或约 5×10^6 至为或约 1×10^8 个此类细胞,如 1×10^7 、 2.5×10^7 、 5×10^7 、 7.5×10^7 、 1×10^8 、 1.5×10^8 或 5×10^8 个总此类细胞,或任两个前述值之间的范围。在一些实施方案中,向患者施用多个剂量,并且每个剂量或总剂量可以在任何前述值内。在一些实施方案中,细胞的所述剂量包括施用从或从约 1×10^7 至或至约 0.75×10^8 个总重组受体表达CD8⁺T细胞、从或从约 1×10^7 至或至约 5×10^7 个总重组受体表达CD8⁺T细胞、从或从约 1×10^7 至或至约 0.25×10^8 个总重组受体表达CD8⁺T细胞(每个都包含端值)。在一些实施方案中,细胞的所述剂量包括施用为或约 1×10^7 、 2.5×10^7 、 5×10^7 、 7.5×10^7 、 1×10^8 、 1.5×10^8 、 2.5×10^8 或 5×10^8 个总重组受体表达CD8⁺T细胞。

[0450] 在一些实施方案中,细胞(例如,重组受体表达T细胞)的剂量是作为单一剂量施用于受试者,或者在两周、一个月、三个月、六个月、1年或更长的时间段内仅施用一次。

[0451] 在过继细胞疗法的情况下,给予给定“剂量”涵盖给予作为单一组合物和/或单次不间断给予(例如,作为单次注射或连续输注)的给定量或数量的细胞,并且还涵盖在指定时间段中(如在不超过3天中)给予在多种单独组合物或输注中提供的作为分割剂量或作为多种组合物的给定量或数量的细胞。因此,在一些情况下,所述剂量是在单一时间点给予或起始的指定数量的细胞的单次或连续施用。然而,在一些情况下,所述剂量是在不超过三天的时间段内以多次注射或输注来施用,如每天一次持续三天或持续两天,或者在单日时间段中多次输注。

[0452] 因此,在一些方面,所述剂量的细胞以单一药物组合物施用。在一些实施方案中,所述剂量的细胞以共同含有所述剂量的细胞的多种组合物施用。

[0453] 在一些实施方案中,术语“分割剂量”是指这样分割的剂量,使其在超过一天的时

间内施用。这种类型的给药包括在本发明方法中并且被认为是单一剂量。

[0454] 因此,所述细胞剂量可以作为分割剂量施用,例如随时间施用的分割剂量。例如,在一些实施方案中,剂量可以在2天或3天内施用于受试者。用于分割给药的示例性方法包括在第一天施用25%的剂量并在第二天施用剩余的75%的剂量。在其他实施方案中,可以在第一天施用33%的剂量,并且在第二天施用剩余的67%。在一些方面,在第一天施用10%的剂量,在第二天施用30%的剂量,并且在第三天施用60%的剂量。在一些实施方案中,所述分割剂量的分布不超过3天。

[0455] 在一些实施方案中,所述剂量的细胞可以通过施用多个组合物或溶液(如第一和第二,任选地更多)来施用,每个组合物或溶液含有所述剂量的一些细胞。在一些方面,任选地在某一段时间内,分开地或独立地施用各自含有不同细胞群和/或细胞亚型的多个组合物。例如,细胞的群体或亚型可以分别包括CD8⁺和CD4⁺T细胞,和/或分别富含CD8⁺和富含CD4⁺的群体,例如,各自单独地包括基因工程化以表达重组受体的细胞的CD4⁺和/或CD8⁺T细胞。在一些实施方案中,所述剂量的施用包括施用第一组合物,所述第一组合物包含一定剂量的CD8⁺T细胞或一定剂量的CD4⁺T细胞,以及施用第二组合物,所述第二组合物包含所述剂量的CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞中的另一种。

[0456] 在一些实施方案中,所述组合物或剂量的施用(例如,所述多种细胞组合物的施用)涉及分开施用所述细胞组合物。在一些方面,所述分开施用是同时或按任何顺序依序进行的。在一些实施方案中,所述剂量包含第一组合物和第二组合物,并且将所述第一组合物和第二组合物相隔为或约0至为或约12小时、相隔为或约0至为或约6小时或相隔为或约0至为或约2小时施用。在一些实施方案中,开始施用第一组合物和开始施用第二组合物相隔不超过为或约2小时、不超过为或约1小时或不超过为或约30分钟,相隔不超过为或约15分钟、不超过为或约10分钟或不超过为或约5分钟进行。在一些实施方案中,开始和/或完成施用第一组合物和完成和/或开始施用第二组合物相隔不超过为或约2小时、不超过为或约1小时或不超过为或约30分钟,相隔不超过为或约15分钟、不超过为或约10分钟或不超过为或约5分钟进行。

[0457] 在一些组合物中,所述第一组合物(例如,所述剂量的第一组合物)包含CD4⁺T细胞。在一些组合物中,所述第一组合物(例如,所述剂量的第一组合物)包含CD8⁺T细胞。在一些实施方案中,将所述第一组合物在所述第二组合物之前施用。

[0458] 在一些实施方案中,细胞的所述剂量或组合物包括限定或目标比率的表达重组受体的CD4⁺细胞与表达重组受体的CD8⁺细胞和/或限定或目标比率的CD4⁺细胞与CD8⁺细胞,所述比率任选地为大约1:1或者在大约1:3与大约3:1之间,如大约1:1。在一些方面,具有不同细胞群的目标或所需比率(如CD4⁺:CD8⁺比率或CAR⁺CD4⁺:CAR⁺CD8⁺比率,例如,1:1)的组合物或剂量的施用涉及施用含有所述群体中的一种的细胞组合物,然后施用包含所述群体中的另一种的单独细胞组合物,其中所述施用是以或大约以所述目标或所需比率来进行。在一些方面,定义比率的细胞的剂量或组合物的施用导致改善T细胞疗法的扩增、持久性和/或抗肿瘤活性。

[0459] 在一些实施方案中,受试者接受细胞的多个剂量,例如,两个或更多个剂量或多个连续剂量。在一些实施方案中,向受试者施用两个剂量。在一些实施方案中,受试者接受连续剂量,例如,第二剂量是在第一剂量后约4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13

天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天或21天施用。在一些实施方案中,在第一剂量后施用多个连续剂量,使得在施用所述连续剂量后施用另外一个或多个剂量。在一些方面,以另外的剂量施用于所述受试者的细胞数量与第一剂量和/或连续剂量相同或相似。在一些实施方案中,所述另外一个或多个剂量大于先前剂量。

[0460] 在一些方面,所述第一和/或连续剂量的大小基于一个或多个标准来确定,如所述受试者对先前治疗(例如化学疗法)的反应、所述受试者的疾病负荷(如肿瘤负担、体积、大小或程度)、转移的范围或类型、分期和/或所述受试者发生毒性结果(例如CRS、巨噬细胞激活综合征、肿瘤溶解综合征、神经毒性和/或针对所施用的细胞和/或重组受体的宿主免疫应答)的可能性或发生率。

[0461] 在一些方面,所述第一剂量的施用与所述连续剂量的施用之间的时间为约9至约35天、约14至约28天或15至27天。在一些实施方案中,施用所述连续剂量是在施用所述第一剂量后大于约14天且在施用所述第一剂量后小于约28天的某个时间点进行。在一些方面,所述第一剂量与所述连续剂量之间的时间为约21天。在一些实施方案中,在施用连续剂量后施用另外一个或多个剂量(例如连续剂量)。在一些方面,在施用先前剂量后至少约14天且小于约28天施用另外一个或多个连续剂量。在一些实施方案中,在先前剂量后小于约14天(例如,在先前剂量后4、5、6、7、8、9、10、11、12或13天)施用所述另外的剂量。在一些实施方案中,在先前剂量后小于约14天不施用剂量,和/或在先前剂量后超过约28天不施用剂量。

[0462] 在一些实施方案中,所述剂量的细胞(例如,重组受体表达细胞)包含两个剂量(例如,双剂量),包含第一剂量的T细胞和连续剂量的T细胞,其中第一剂量和第二剂量中之一或两者包括施用分割剂量的T细胞。

[0463] 在一些实施方案中,所述剂量的细胞通常足够大以有效减轻疾病负荷。

[0464] 在一些实施方案中,将所述细胞以所需剂量施用,所述所需剂量在一些方面包括细胞或一种或多种细胞类型的所需剂量或数量和/或细胞类型的所需比率。因此,细胞的所述剂量在一些实施方案中是基于细胞的总数量(或每kg体重的数量)以及单独群体或亚型的所需比率,如CD4⁺与CD8⁺的比率。在一些实施方案中,细胞剂量基于所需的单独群体中的细胞或单独细胞类型的总数(或每kg体重的细胞数量)。在一些实施方案中,所述剂量是基于此类特征的组合,如总细胞的所需数量、所需比率和单独群体中细胞的所需总数。

[0465] 在一些实施方案中,以总细胞的所需剂量(如T细胞的所需剂量)的耐受差异或在所述耐受差异内施用细胞的群体或亚型(如CD8⁺和CD4⁺T细胞)。在一些方面,所需剂量是所需细胞数量或被施用所述细胞的受试者的每单位体重的所需细胞数量,例如细胞/kg。在一些方面,所需剂量等于或高于最小细胞数量或每单位体重的最小细胞数量。在一些方面,在以所需剂量施用的总细胞中,单独群体或亚型以等于或接近所需输出比率(如CD4⁺与CD8⁺的比率)存在,例如在这种比率的一定耐受差异或误差内。

[0466] 在一些实施方案中,所述细胞是以细胞的一种或多种单独群体或亚型的所需剂量(如CD4⁺细胞的所需剂量和/或CD8⁺细胞的所需剂量)来施用,或在所述所需剂量的容忍差异内施用。在一些方面,所需剂量是亚型或群体的细胞的所需数量或被施用所述细胞的受试者的每单位体重的此类细胞的所需数量,例如细胞/kg。在一些方面,所述所需剂量等于或高于群体或亚型的最小细胞数量或每单位体重的所述群体或亚型的最小细胞数量。

[0467] 因此,在一些实施方案中,所述剂量基于所需的总细胞的固定剂量和所需比率,和/或基于所需的一种或多种单独亚型或亚群(例如,各自)的固定剂量。因此,在一些实施方案中,剂量是基于T细胞的所需固定或最小剂量和CD4⁺与CD8⁺细胞的所需比率,和/或是基于CD4⁺和/或CD8⁺细胞的所需固定或最小剂量。

[0468] 在一些实施方案中,所述细胞是以多种细胞群或亚型(如CD4⁺和CD8⁺细胞或亚型)的所需输出比率来施用,或在所述所需输出比率的容忍范围内施用。在一些方面,所需比率可以是特定比率或可以是一系列比率。例如,在一些实施方案中,所需比率(例如,CD4⁺与CD8⁺细胞的比率)是在为或约1:5与为或约5:1之间(或大于约1:5且小于约5:1)、或在为或约1:3与为或约3:1之间(或大于约1:3且小于约3:1),如在为或约2:1与为或约1:5之间(或大于约1:5且小于约2:1,如为或约5:1、4.5:1、4:1、3.5:1、3:1、2.5:1、2:1、1.9:1、1.8:1、1.7:1、1.6:1、1.5:1、1.4:1、1.3:1、1.2:1、1.1:1、1:1.1、1:1.2、1:1.3、1:1.4、1:1.5、1:1.6、1:1.7、1:1.8、1:1.9、1:2、1:2.5、1:3、1:3.5、1:4、1:4.5或1:5。在一些方面,耐受差异在所需比率的约1%、约2%、约3%、约4%、约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%内,包括这些范围之间的任何值。

[0469] 在特定实施方案中,细胞的数量和/或浓度是指重组受体(例如,CAR)表达细胞的数量。在其他实施方案中,细胞的数量和/或浓度是指施用的所有细胞、T细胞或外周血单核细胞(PBMC)的数量或浓度。

[0470] 在一些方面,剂量的大小基于一个或多个标准来确定,如受试者对先前治疗(例如化学疗法)的反应、受试者的疾病负荷(如肿瘤负担、体积、尺寸或程度)、转移的程度或类型、分期和/或受试者发生毒性结果(例如,CRS、巨噬细胞激活综合征、肿瘤溶解综合征、神经毒性和/或针对所施用的细胞和/或重组受体的宿主免疫应答)的可能性或发生率。

[0471] 在一些实施方案中,所述方法还包括施用一个或多个另外的剂量的表达嵌合抗原受体(CAR)的细胞和/或淋巴细胞清除疗法,和/或重复所述方法的一个或多个步骤。在一些实施方案中,所述一个或多个另外的剂量与初始剂量相同。在一些实施方案中,所述一个或多个另外的剂量不同于初始剂量,例如更高,如是初始剂量的2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍高或更高;或者更低,如是初始剂量的2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍低或更低。在一些实施方案中,基于以下确定一个或多个另外的剂量的施用:受试者对初试治疗或任何先前治疗的反应、受试者的疾病负荷(如肿瘤负担、体积、尺寸或程度)、转移的程度或类型、分期和/或受试者发生毒性结果(例如,CRS、巨噬细胞激活综合征、肿瘤溶解综合征、神经毒性和/或针对所施用的细胞和/或重组受体的宿主免疫应答)的可能性或发生率。

B. 所施用的细胞的评估

[0472] 在一些情况下,所提供的方法可以用于在施用所述工程化细胞或细胞组合物(例如,含有其中整合了转基因序列的细胞)后,确定来自受试者的样品中工程化细胞的存在、不存在或数量。在一些方面,所提供的方法可以用于评估从已施用所述工程化细胞或细胞组合物(如使用本文(例如上文第II节中)所述的方法产生的那些)的受试者获得的特定样品中转基因序列的存在、不存在或量。在一些方面,所提供的方法可以用于评估所施用的工程化细胞的药代动力学(PK)或药效动力学(PD)参数。在一些实施方案中,药代动力学参数包括最大(峰值)血浆浓度($C_{\max}$)、峰值时间(即,出现最大血浆浓度($C_{\max}$)的时间; $T_{\max}$)、最小

血浆浓度(即治疗剂(例如CAR+T细胞)的剂量之间的最小血浆浓度; $C_{\min}$)、施用后的消除半衰期($T_{1/2}$)和曲线下面积(即通过标绘时间与治疗剂CAR+T细胞的血浆浓度产生的曲线下面积;AUC)。

[0473] 在一些方面,示例性实施方案涉及评估和/或监测药代动力学参数,例如从受试者获得的样品中(例如,血液中)CAR⁺T细胞的数量或浓度,所述受试者已被施用所述工程化细胞或含有所述工程化细胞的组合物;和/或存在于来自所述受试者的样品中的转基因序列的量或浓度。在一些方面,示例性实施方案涉及评估和/或监测药代动力学参数,例如血液中CAR⁺T细胞的数量或浓度。在一些实施方案中,所述方法涉及监测血液中的CAR⁺T细胞数量和/或浓度,例如通过确定血液中转基因序列的存在、不存在和/或量(如上文第I.C.3节所述)来监测。

V. 试剂盒和制品

[0474] 还提供了试剂盒和制品,如含有用于进行本文提供的方法的试剂(例如用于评估整合转基因序列的存在、不存在和/或量的试剂)的那些。在一些方面,所述试剂盒或制品还可以含有用于在产生工程化细胞的工程化或制造过程中使用的试剂和/或核酸。

[0475] 在一些实施方案中,所述试剂盒可以含有对于从样品分离核酸和/或基于大小或分子量分开或分离所述核酸和/或确定整合转基因序列的存在、不存在和/或量所需的试剂和/或消耗品。在一些实施方案中,所述试剂盒含有用于分开或分离DNA高分子量或低分子量级分的试剂和/或消耗品,如用于脉冲场凝胶电泳(PFGE)的试剂和消耗品。在一些实施方案中,所述试剂盒含有基质或凝胶或者包含基质或凝胶以进行分开或分离DNA高分子量或低分子量级分的步骤的盒。在一些实施方案中,提供了试剂盒,其包含对转基因序列的全部或一部分具有特异性的一种或多种探针和/或一种或多种引物,如一对引物。在一些方面,所述探针和/或引物可以特异性地结合至或识别或检测所述转基因序列的全部或一部分。在一些方面,所述试剂盒可以含有聚合酶链反应(PCR)(如用于定量PCR(qPCR)、数字PCR(dPCR)或微滴式数字PCR(ddPCR))所需的试剂和消耗品。

[0476] 在一些实施方案中,所述试剂盒任选地含有其他组分,例如:PCR引物、PCR试剂(如聚合酶、缓冲液、核苷酸)、用于另外的测定(例如,细胞内细胞因子染色、流式细胞术、染色质免疫沉淀和/或另外的分析)的试剂。在一些实施方案中,用于另外的测定的试剂包括用于进行体外测定以测量特定分子的表达或水平的组分。在一些情况下,体外测定是免疫测定、基于适体的测定、组织学或细胞学测定或mRNA表达水平测定。在一些实施方案中,体外测定选自酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫印迹、免疫沉淀、放射免疫测定(RIA)、免疫染色、流式细胞术测定、表面等离子体共振(SPR)、化学发光测定、侧向流免疫测定、抑制测定和亲和力测定。在一些方面,所述试剂是特异性地结合所述分子的结合试剂。在一些情况下,结合试剂是抗体或其抗原结合片段、适体或核酸探针。试剂盒的各种组分可以存在于分开的容器中,或者某些相容的组分可以预组合到单个容器中。在一些实施方案中,所述试剂盒进一步含有使用所述试剂盒的组分来实践所提供的方法的说明书。

VI. 定义

[0477] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术术语、符号和其他技术和科学术语或用辞旨在具有与所要求保护的主体所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。在一些情况下,为了清楚和/或为了便于引用而在本文中定义具有通常理解的含义的术语,并

且本文中包含此类定义不一定应当被解释为代表与本领域通常所理解的含义有实质性差异。

[0478] 如本文所用,术语“转基因”或“转基因序列”(在一些情况下,也称为嵌合、重组、异源、外源序列或嵌合、重组、异源、外源DNA)是指通过组合来自不同来源(如不同的生物、不同的基因或不同的变体)的成分而人工形成的核酸序列。在一些方面,所述转基因序列已经经历分子生物学操作,例如通过人工组合来自不同来源的不同核酸分子或片段的分子生物学操作。在一些实施方案中,所述转基因序列含有如下序列的至少某个部分,所述序列与其中引入了含有所述转基因序列的多核苷酸的细胞的基因组序列相比来自不同的起源。在一些情况下,所述转基因序列的至少一部分对于引入了所述转基因序列的细胞而言是异源的、外源的或转基因的,并且可以包括编码和/或非编码序列。在一些方面,所述转基因序列可以指整合到引入了所述转基因序列的细胞的基因组中的序列。

[0479] 除非上下文另有明确规定,否则如本文所用,单数形式“一种/一个(a)”、“一种/一个(an)”和“所述(the)”包括复数指示物。例如,“一种/一个(a)”或“一种/一个(an)”意指“至少一种/至少一个”或“一种或多种/一个或多个”。应理解,本文所述的方面和变化包括“由方面和变化组成”和/或“基本上由方面和变化组成”。

[0480] 如本文所用的术语“约”是指本技术领域的技术人员容易知道的相应值的常用误差范围。本文中提及“约”某一值或参数时包括(并描述)涉及该值或参数本身的实施方案。例如,提及“约X”的描述包括“X”的描述。

[0481] 在整个本公开文本中,所要求保护的主题的各个方面以范围形式呈现。应当理解,范围形式的描述仅仅是为了方便和简洁,并且不应当被解释为对所要求保护的主题的范围的僵硬限制。因此,应当将范围的描述视为已明确公开所有可能的子范围以及该范围内的单独数值。例如,在提供值的范围的情况下,应理解,该范围的上限与下限之间的每个中间值以及该所陈述范围中的任何其他所陈述值或中间值涵盖在所要求保护的主题内。这些较小范围的上限和下限可以独立地被包括在所述较小范围内,并且也涵盖在所要求保护的主题内,受制于在所陈述范围内任何明确排除的限值。在所陈述范围包括所述限值中之一或两者的情况下,排除那些所包括限值中之一或两者的范围也被包括在所要求保护的主题内。无论范围的广度如何,这都适用。

[0482] 如本文所用,组合物是指两种或更多种产物、物质或化合物(包括细胞)的任何混合物。其可以是溶液、悬浮液、液体、粉末、糊剂、水性、非水性或其任何组合。

[0483] 如本文所用,细胞或细胞群对于特定标记呈“阳性”的陈述是指特定标记(通常是表面标记)在细胞上或在细胞中的可检测存在。当提及表面标记时,所述术语是指如通过流式细胞术所检测的表面表达的存在,例如通过用与所述标记特异性结合的抗体进行染色并检测所述抗体,其中所述染色在如下水平下可通过流式细胞术检测,所述水平基本上高于在其他方面相同的条件下用同种型匹配对照进行相同程序检测到的染色,和/或所述水平与已知对所述标记呈阳性的细胞的水平基本上相似,和/或所述水平基本上高于已知对所述标记呈阴性的细胞的水平。

[0484] 如本文所用,细胞或细胞群对于特定标记呈“阴性”的陈述是指特定标记(通常是表面标记)在细胞上或在细胞中不存在实质可检测的存在。当提及表面标记时,所述术语是指如通过流式细胞术所检测的表面表达的不存在,例如通过用与所述标记特异性结合的抗

体进行染色并检测所述抗体,其中所述染色在如下水平下通过流式细胞术没有被检测到,所述水平基本上高于在其他方面相同的条件下用同种型匹配对照进行相同程序检测到的染色,和/或所述水平基本上低于已知对所述标记呈阳性的细胞的水平,和/或所述水平与已知对所述标记呈阴性的细胞的水平相比基本上相似。

[0485] 如本文所用,术语“载体”是指能够传播与其连接的另一核酸的核酸分子。所述术语包括作为自我复制核酸结构的载体以及掺入已引入其的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够指导它们操作性地连接的核酸的表达。此类载体在本文中称为“表达载体”。

[0486] 如本文所用,在关于氨基酸序列(参考多肽序列)使用时,“氨基酸序列同一性百分比(%)”和“同一性百分比”定义为,在比对序列并在必要时引入空位以实现最大序列同一性百分比并且不将任何保守取代视作序列同一性的一部分后,候选序列(例如,主题抗体或片段)中与参考多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。用于确定氨基酸序列同一性百分比的目的的比对可以以各种已知方式来实现,例如使用公众可获得的计算机软件,如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。可以确定用于比对序列的适当参数,包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。

[0487] 在一些实施方案中,“可操作地连接”可以包括组分(如DNA序列,例如异源核酸)与一个或多个调节序列的缔合,所述缔合的方式允许在适当分子(例如转录激活蛋白)与所述调节序列结合时进行基因表达。因此,它意味着,所述组分所处的关系允许它们以其预期方式起作用。

[0488] 氨基酸取代可以包括用一个氨基酸替代多肽中的另一个氨基酸。所述取代可以是保守氨基酸取代或非保守氨基酸取代。可以将氨基酸取代引入目的结合分子(例如,抗体)和针对所需活性(例如保留/改进的抗原结合、降低的免疫原性或改进的ADCC或CDC)筛选的产物中。

[0489] 通常可以根据以下常见的侧链特性将氨基酸进行分组:

- (1) 疏水性的:正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;
- (2) 中性亲水性的:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;
- (3) 酸性的:Asp、Glu;
- (4) 碱性的:His、Lys、Arg;
- (5) 影响链取向的残基:Gly、Pro;
- (6) 芳香族的:Trp、Tyr、Phe。

[0490] 在一些实施方案中,保守取代可能涉及将这些类别之一的成员交换为同一类别的另一个成员。在一些实施方案中,非保守氨基酸取代可能涉及将这些类别之一的成员交换为另一个类别。

[0491] 如本文所用,“受试者”是哺乳动物,如人或其他动物,并且通常是人。

VII. 示例性实施方案

[0492] 所提供的实施方案包括:

1. 一种用于评估转基因序列的基因组整合的方法,所述方法包括:

(a) 从分离自一个或多个细胞的DNA分离大于或大于约10千碱基(kb)的脱氧核糖核酸(DNA)高分子量级分,所述一个或多个细胞包含或被怀疑包含至少一个含有编码重组蛋白的转基因序列的工程化细胞;

(b) 确定整合到所述一个或多个细胞的基因组中的转基因序列的存在、不存在或量。

2. 根据实施方案1所述的方法,其中在所述分离之前,从所述一个或多个细胞分离脱氧核糖核酸(DNA)。

3. 根据实施方案1或实施方案2所述的方法,其中确定所述转基因序列的存在、不存在或量包括确定所述一个或多个细胞中的每个二倍体基因组或每个细胞中所述转基因序列的质量、重量或拷贝数。

4. 根据实施方案1-3中任一项所述的方法,其中所述一个或多个细胞包含细胞群体,其中所述群体的多个细胞包含编码所述重组蛋白的转基因序列。

5. 根据实施方案4所述的方法,其中所述拷贝数是所述细胞群体中的每个二倍体基因组或每个细胞中的平均或均值拷贝数。

6. 根据实施方案1-5中任一项所述的方法,其中在所述分离之前,已将包含编码所述重组蛋白的转基因序列的多核苷酸引入所述一个或多个细胞的至少一个工程化细胞中。

7. 根据实施方案6所述的方法,其中在引入包含所述转基因序列的所述多核苷酸后,所述至少一个工程化细胞尚未在高于25℃、任选地为或约37℃±2℃的温度下孵育超过96小时。

8. 根据实施方案6所述的方法,其中在引入包含所述转基因序列的所述多核苷酸后,所述至少一个工程化细胞尚未在高于25℃、任选地为或约37℃±2℃的温度下孵育超过72小时。

9. 根据实施方案6所述的方法,其中在引入包含所述转基因序列的所述多核苷酸后,所述至少一个工程化细胞尚未在高于25℃、任选地为或约37℃±2℃的温度下孵育超过48小时。

10. 根据实施方案1-9中任一项所述的方法,其中所述一个或多个细胞在分离所述DNA高分子量级分之前一直冷冻保存。

11. 根据实施方案1-10中任一项所述的方法,其中所述一个或多个细胞是细胞系。

12. 根据实施方案1-11中任一项所述的方法,其中所述一个或多个细胞是从来自受试者的样品获得的原代细胞。

13. 根据实施方案12中任一项所述的方法,其中所述一个或多个细胞是免疫细胞。

14. 根据实施方案13所述的方法,其中所述免疫细胞是T细胞或NK细胞。

15. 根据实施方案14所述的方法,其中所述T细胞是CD3+、CD4+和/或CD8+T细胞。

16. 一种用于评估来自受试者的生物样品中转基因序列的方法,所述方法包括:

(a) 从分离自存在于来自受试者的生物样品中的一个或多个细胞的DNA分离大于或大于约10千碱基(kb)的脱氧核糖核酸(DNA)高分子量级分,其中所述生物样品包含或被怀疑包含至少一个含有编码重组蛋白的转基因序列的工程化细胞;和

(b) 确定所述生物样品的全部或一部分中转基因序列的存在、不存在或量。

17. 根据实施方案16所述的方法,其中(b)中所述的确定转基因序列的存在、不存在或量包括确定所述生物样品的全部或一部分中所述转基因序列的质量、重量或拷贝数。

18. 根据实施方案16所述的方法,其中在所述分离之前,从存在于所述生物样品中的一个或多个细胞分离所述DNA。

19. 根据实施方案16-18中任一项所述的方法,其中所述生物样品是从受试者获得的,所述受试者已被施用包含所述至少一个含有所述转基因序列的工程化细胞的组合物。

20. 根据实施方案16-19中任一项所述的方法,其中所述生物样品是组织或体液样品。

21. 根据实施方案20所述的方法,其中所述生物样品是组织样品并且所述组织是肿瘤。

22. 根据实施方案21所述的方法,其中所述组织样品是肿瘤活检。

23. 根据实施方案20所述的方法,其中所述生物样品是体液样品,并且所述体液样品是血液或血清样品。

24. 根据实施方案16-23中任一项所述的方法,其中在所述分离之前,已将包含编码所述重组蛋白的转基因序列的多核苷酸引入所述一个或多个细胞的至少一个工程化细胞中。

25. 根据实施方案16-24中任一项所述的方法,其中所述生物样品中的一个或多个细胞包含免疫细胞。

26. 根据实施方案25所述的方法,其中所述免疫细胞是T细胞或NK细胞。

27. 根据实施方案26所述的方法,其中所述T细胞是CD3+、CD4+和/或CD8+T细胞。

28. 根据实施方案1-27中任一项所述的方法,其中所述分离是通过脉冲场凝胶电泳或尺寸排阻色谱法进行的。

29. 根据实施方案1-28中任一项所述的方法,其中所述分离通过脉冲场凝胶电泳进行。

30. 一种用于评估转基因序列的基因组整合的方法,所述方法包括:

(a) 通过脉冲场凝胶电泳从分离自细胞群体的DNA分离大于或大于约10千碱基(kb)的脱氧核糖核酸(DNA)高分子量级分,所述细胞群体包含多个工程化细胞,所述多个工程化细胞各自包含或被怀疑包含编码重组蛋白的转基因序列;和

(b) 确定整合到所述细胞群体的所述多个工程化细胞的基因组中的所述转基因序列在每个二倍体基因组或每个细胞中的平均或均值拷贝数。

31. 根据实施方案30所述的方法,其中在所述分离之前,已将包含编码所述重组蛋白的转基因序列的多核苷酸引入所述细胞群体的所述多个工程化细胞中的至少一个中。

32. 根据实施方案31所述的方法,其中在向所述至少一个工程化细胞中引入包含所述转基因序列的所述多核苷酸后,所述细胞群体尚未在高于25℃、任选地为或约37℃±2℃的温度下孵育超过96小时。

33. 根据实施方案31所述的方法,其中在向所述至少一个工程化细胞中引入包含所述转基因序列的所述多核苷酸后,所述细胞群体尚未在高于25℃、任选地为或约37℃±2℃的温度下孵育超过72小时。

34. 根据实施方案31所述的方法,其中在向所述至少一个工程化细胞中引入包含所述转基因序列的所述多核苷酸后,所述细胞群体尚未在高于25℃、任选地为或约37℃±2℃的温度下孵育超过48小时。

35. 根据实施方案30-34中任一项所述的方法,其中所述细胞群体在分离所述DNA高分子量级分之前一直冷冻保存。

36. 根据实施方案1-35中任一项所述的方法,其中所述高分子量级分具有大于或大于约15千碱基(kb)。

37. 根据实施方案1-35中任一项所述的方法,其中所述高分子量级分具有大于或大于约17.5千碱基(kb)。

38. 根据实施方案1-35中任一项所述的方法,其中所述高分子量级分具有大于或大于约20千碱基(kb)。

39. 根据实施方案1-38中任一项所述的方法,其中确定所述转基因序列的存在、不存在或量是通过聚合酶链反应(PCR)进行的。

40. 根据实施方案39所述的方法,其中所述PCR是定量聚合酶链反应(qPCR)、数字PCR或微滴式数字PCR。

41. 根据实施方案39或实施方案40所述的方法,其中所述PCR是微滴式数字PCR。

42. 根据实施方案39-41中任一项所述的方法,其中所述PCR是使用一种或多种引物进行的,所述一种或多种引物与所述转基因序列的至少一部分互补或能够将其特异性地扩增。

43. 根据实施方案1-42中任一项所述的方法,其中确定所述转基因序列的量包括评估分离自所述一个或多个细胞的每一质量或重量的DNA中、任选分离自所述一个或多个细胞的每微克的DNA中所述转基因序列的质量、重量或拷贝数。

44. 根据实施方案43所述的方法,其中确定所述转基因序列的量包括评估分离自一个或多个细胞的每微克的DNA中转基因序列的质量或重量,以微克计。

45. 根据实施方案1-42中任一项所述的方法,其中确定所述转基因序列的量包括评估每个所述一个或多个细胞中、任选每个CD3⁺、CD4⁺和/或CD8⁺细胞中和/或每个表达所述重组蛋白的细胞中所述转基因序列的质量、重量或拷贝数。

46. 根据实施方案16-42中任一项所述的方法,其中确定所述转基因序列的存在、不存在或量包括评估所述生物样品中的每个二倍体基因组或每个细胞中所述转基因序列的质量、重量或拷贝数。

47. 根据实施方案46所述的方法,其中所述拷贝数是所述生物样品中的所述一个或多个细胞中每个二倍体基因组或每个细胞中的平均或均值拷贝数。

48. 根据实施方案16-42中任一项所述的方法,其中确定所述转基因序列的量包括评估每一体积的所述生物样品、任选每一微升或每一毫升的所述生物样品中所述转基因序列的质量、重量或拷贝数。

49. 根据实施方案16-42中任一项所述的方法,其中确定所述转基因序列的量包括评估每一受试者体重或体表面积中所述转基因序列的质量、重量或拷贝数。

50. 根据实施方案1-42中任一项所述的方法,其中确定所述转基因序列的量包括评估高分子量级分中所述转基因序列的质量、重量或拷贝数,并将所述质量、重量或拷贝数针对所述高分子量级分中的参考基因的质量、重量或拷贝数或针对标准曲线归一化。

51. 根据实施方案50所述的方法,其中所述参考基因是管家基因。

52. 根据实施方案50或实施方案51所述的方法,其中所述参考基因是编码白蛋白(ALB)的基因。

53. 根据实施方案50或实施方案51所述的方法,其中所述参考基因是编码核糖核

酸酶P蛋白亚基p30 (RPP30) 的基因。

54. 根据实施方案50-53所述的方法, 其中所分离的DNA中参考基因的拷贝数是通过PCR使用一种或多种引物进行的, 所述一种或多种引物与所述参考基因的至少一部分互补或能够将其特异性地扩增。

55. 根据实施方案1-54中任一项所述的方法, 其中所述转基因序列不编码完整的病毒gag蛋白。

56. 根据实施方案1-55中任一项所述的方法, 其中所述转基因序列不包含完整的HIV基因组、有复制能力的病毒基因组和/或附属基因, 所述附属基因任选地是Nef、Vpu、Vif、Vpr和/或Vpx。

57. 根据实施方案6-15、24-29和31-55中任一项所述的方法, 其中所述多核苷酸的引入是通过用包含所述多核苷酸的病毒载体转导进行的。

58. 根据实施方案57所述的方法, 其中所述病毒载体是逆转录病毒载体或 γ 逆转录病毒载体。

59. 根据实施方案57或实施方案58所述的方法, 其中所述病毒载体是慢病毒载体。

60. 根据实施方案57所述的方法, 其中所述病毒载体是AAV载体, 其任选地选自AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7或AAV8载体。

61. 根据实施方案6-15、24-29和31-55中任一项所述的方法, 其中所述多核苷酸的引入是通过物理递送方法、任选地通过电穿孔进行的。

62. 根据实施方案1-61中任一项所述的方法, 其中所述重组蛋白是重组受体。

63. 根据实施方案62所述的方法, 其中所述重组受体特异性地结合至与疾病或病症相关的抗原或在与疾病或病症相关的病灶环境的细胞中表达的抗原。

64. 根据实施方案63所述的方法, 其中所述疾病或病症是癌症。

65. 根据实施方案63或实施方案64所述的方法, 其中所述抗原选自 α v β 6整合素(avb6整合素)、B细胞成熟抗原(BCMA)、B7-H3、B7-H6、碳酸酐酶9(CA9, 也称为CAIX或G250)、癌症-睾丸抗原、癌症/睾丸抗原1B(CTAG, 也称为NY-ESO-1和LAGE-2)、癌胚抗原(CEA)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、C-C基序趋化因子配体1(CCL-1)、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD123、CD133、CD138、CD171、硫酸软骨素蛋白聚糖4(CSPG4)、表皮生长因子蛋白(EGFR)、表皮生长因子受体III型突变体(EGFR vIII)、上皮糖蛋白2(EPG-2)、上皮糖蛋白40(EPG-40)、肝配蛋白B2、肝配蛋白受体A2(EPha2)、雌激素受体、Fc受体样蛋白5(FCRL5; 也称为Fc受体同源物5或FCRH5)、胎儿乙酰胆碱受体(胎儿AChR)、叶酸结合蛋白(FBP)、叶酸受体 α 、神经节苷脂GD2、O-乙酰化GD2(OGD2)、神经节苷脂GD3、糖蛋白100(gp100)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3)、G蛋白偶联受体C5家族成员D(GPRC5D)、Her2/neu(受体酪氨酸激酶erb-B2)、Her3(erb-B3)、Her4(erb-B4)、erbB二聚体、人高分子量黑色素瘤相关抗原(HMW-MAA)、乙型肝炎表面抗原、人白细胞抗原A1(HLA-A1)、人白细胞抗原A2(HLA-A2)、IL-22受体 α (IL-22R α)、IL-13受体 α 2(IL-13R α 2)、激酶插入结构域受体(kdr)、 κ 轻链、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、L1-CAM的CE7表位、含有富亮氨酸重复序列的蛋白8家族成员A(LRRC8A)、路易斯Y、黑色素瘤相关抗原(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、MAGE-A10、间皮素(MSLN)、c-Met、鼠类巨细胞病毒(CMV)、粘蛋白1(MUC1)、MUC16、自然杀伤细胞2族成员D(NKG2D)配体、黑色素A(MART-1)、神经细胞粘附分子(NCAM)、癌胚胎抗原、黑

色素瘤优先表达抗原 (PRAME)、孕酮受体、前列腺特异性抗原、前列腺干细胞抗原 (PSCA)、前列腺特异性膜抗原 (PSMA)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR1)、存活蛋白、滋养层糖蛋白 (TPBG, 也称为5T4)、肿瘤相关糖蛋白72 (TAG72)、酪氨酸酶相关蛋白1 (TRP1, 也称为TYRP1或gp75)、酪氨酸酶相关蛋白2 (TRP2, 也称为多巴色素互变异构酶、多巴色素 δ 异构酶或DCT)、血管内皮生长因子受体 (VEGFR)、血管内皮生长因子受体2 (VEGFR2)、Wilms肿瘤1 (WT-1)、病原体特有的或病原体表达的抗原、或与通用标签相关的抗原、和/或生物素化分子、和/或由HIV、HCV、HBV或其他病原体表达的分子。

66. 根据实施方案62-65中任一项所述的方法, 其中所述重组受体是T细胞受体 (TCR) 或功能性非T细胞受体。

67. 根据实施方案62-66中任一项所述的方法, 其中所述重组受体是嵌合抗原受体 (CAR)。

68. 根据实施方案67所述的方法, 其中所述CAR包含与所述抗原特异性地结合的细胞外抗原识别结构域和包含ITAM的细胞内信号传导结构域。

69. 根据实施方案68所述的方法, 其中包含ITAM的细胞内信号传导结构域包含CD3- ζ (CD3 ζ) 链、任选人CD3- ζ 链的细胞内结构域。

70. 根据实施方案68或实施方案69所述的方法, 其中所述细胞内信号传导结构域进一步包括共刺激信号传导区。

71. 根据实施方案70所述的方法, 其中所述共刺激信号传导区域包含CD28或4-1BB、任选人CD28或人4-1BB的信号传导结构域。

72. 一种评估残留的非整合转基因序列的方法, 所述方法包括:

(a) 进行根据实施方案1-15和28-71中任一项所述的方法, 以确定所述DNA高分子量级分中所述转基因序列的存在、不存在或量, 从而评估转基因序列的基因组整合;

(b) 确定在不分离所述高分子量级分的情况下在所分离的DNA中所述转基因序列的存在、不存在或量; 和

(c) 比较 (a) 中确定的量与 (b) 中确定的量, 从而确定残留的非整合重组序列的量。

73. 根据实施方案72所述的方法, 其中确定所述转基因序列的存在、不存在或量包括确定所述一个或多个细胞中的每个二倍体基因组或每个细胞中所述转基因序列的质量、重量或拷贝数。

74. 根据实施方案72或实施方案73所述的方法, 其中所述一个或多个细胞包含细胞群体, 其中所述群体的多个细胞包含编码所述重组蛋白的转基因序列。

75. 根据实施方案74所述的方法, 其中所述拷贝数是所述细胞群体中的每个二倍体基因组或每个细胞中的平均或均值拷贝数。

76. 根据实施方案72-75中任一项所述的方法, 其中比较所述拷贝数包括从 (b) 中确定的拷贝数减去 (a) 中确定的拷贝数。

77. 根据实施方案72-75中任一项所述的方法, 其中比较所述拷贝数包括确定在 (a) 中确定的拷贝数与在 (b) 中确定的拷贝数的比率。

78. 根据实施方案72-77中任一项所述的方法, 其中 (b) 中所述的存在、不存在或量是通过聚合酶链反应 (PCR) 进行的。

79. 根据实施方案78所述的方法, 其中所述PCR是定量聚合酶链反应 (qPCR)、数字

PCR或微滴式数字PCR。

80. 根据实施方案78或实施方案79所述的方法,其中所述PCR是微滴式数字PCR。

81. 根据实施方案78-80中任一项所述的方法,其中所述PCR是使用一种或多种引物进行的,所述一种或多种引物与所述转基因序列的至少一部分互补或能够将其特异性地扩增。

82. 根据实施方案72-81中任一项所述的方法,其中(b)中所述的确定所述存在、不存在或量包括评估在不分离所述高分子量级分的情况下在所分离的DNA中所述转基因序列的质量、重量或拷贝数,并将所述质量、重量或拷贝数针对在不分离所述高分子量级分的情况下所分离的DNA中的参考基因的质量、重量或拷贝数或针对标准曲线归一化。

83. 根据实施方案72所述的方法,其中所述参考基因是管家基因。

84. 根据实施方案82或实施方案83所述的方法,其中所述参考基因是编码白蛋白(ALB)的基因。

85. 根据实施方案82或实施方案83所述的方法,其中所述参考基因是编码核糖核酶P蛋白亚基p30(RPP30)的基因。

86. 根据实施方案82-85所述的方法,其中确定所分离的DNA中参考基因的质量、重量或拷贝数是通过PCR使用一种或多种引物进行的,所述一种或多种引物与所述参考基因的至少一部分互补或能够将其特异性地扩增。

87. 根据实施方案72-86中任一项所述的方法,其中(a)中所述的确定所述存在、不存在或量和(b)中所述的确定所述存在、不存在或量是通过聚合酶链反应(PCR)使用相同引物或相同引物组进行的。

88. 根据实施方案72-87中任一项所述的方法,其中所述残留的非整合重组序列包含载体质粒、线性互补DNA(cDNA)、自我整合序列或长末端重复序列(LTR)环中的一种或多种。

VIII. 实施例

[0493] 以下实施例被包括在内仅用于说明目的,并不旨在限制本发明的范围。

实施例1:用脉冲场凝胶电泳评估工程化为表达重组蛋白的细胞中整合转基因拷贝数的方法

[0494] 研究了在用于评估用含有编码重组蛋白的转基因序列的病毒载体转导的细胞中的载体拷贝数的方法中使用脉冲场凝胶电泳(PFGE)作为分离高分子量DNA的策略。

[0495] 用含有编码重组蛋白(在这种情况下为嵌合抗原受体(CAR))的转基因序列的慢病毒制剂转导Jurkat T细胞系。将细胞培养3天,然后从细胞分离基因组DNA。作为对照,从未用编码转基因序列的慢病毒转导的细胞分离基因组DNA,并向所分离的基因组DNA加标已知量的编码重组蛋白的质粒和编码水疱性口炎印第安纳病毒G蛋白(VSVg)的非整合病毒包装质粒。

[0496] 使用BluePippin(Sage Science,马萨诸塞州贝弗利)设备使DNA样品经受自动化脉冲场凝胶电泳(PFGE),以将高分子量DNA种类与低于15kb、17.5kb或20kb阈值的低分子量、非染色体DNA种类分离。

[0497] 使用对转基因序列特有的序列(“转基因”)具有特异性的引物对高分子量DNA样品进行示例性的定量聚合酶链反应(qPCR)方法,如微滴式数字PCR(ddPCR)。为了进行比较,还

使用对VSVg编码序列(“包装质粒”)具有特异性的引物进行ddPCR,以检测预期不会整合到细胞染色体中的加标DNA或转导细胞中的残留包装质粒,并使用对管家基因具有特异性的引物(例如,编码核糖核酸酶P蛋白亚基p30的基因(RRP30;“基因组对照”)的引物)进行ddPCR,以检测所有样品中的基因组DNA。对白蛋白(ALB)基因具有特异性的引物用作归一化的参考。还对未经受PFGE(凝胶前)的DNA样品进行了反应。对于ddPCR,将样品添加到含有每种引物组和探针的混合物中,使用微滴生成器产生微滴,将产生的微滴转移到PCR板,并在以下PCR条件下进行扩增:95℃ 10min;[94℃ 30秒;60℃ 1min]x39个循环,以2℃/秒的速率升温;98℃ 10min;以及4℃,不限时间。放大后,在微滴读取器上测量来自微滴的信号。将每个基因的拷贝数针对二倍体基因组数量(cp/二倍体基因组,使用对于作为参考的白蛋白(ALB)基因具有特异性的引物来扩增)或每50ng的基因组DNA进行归一化。

[0498] 如图1所示,在含有加标CAR编码质粒和VSVg包装质粒的未转导样品中,仅在未经受PFGE(凝胶前)的样品中检测到转基因序列和VSVg序列。相比之下,在所有经受针对15kb、17.5kb或20kb或更高的较高分子量DNA的PFGE的样品中检测到基因组对照序列。该结果证明,在所分离的DNA的PCR扩增之前进行PFGE实现了非整合低分子量质粒的分离。

[0499] 在转导样品中,在PFGE之前(凝胶前)的样品和在经受高于15kb、17.5kb或20kb的PFGE的样品中均检测到转基因序列(图1,底部图)。VSVg包装质粒序列发现于凝胶前样品中,并且在较高分子量DNA中几乎未检测到。可能源自病毒产生的残留质粒序列的这些序列预计不会整合到细胞的基因组中。在所有样品中也检测到包括染色体DNA在内的基因组DNA:观察到在所有样品中RRP30管家基因的拷贝数为每个二倍体基因组中约2个拷贝。

[0500] 包括PFGE在内的测定允许检测整合或基因组序列,同时去除非整合的、低分子量核酸种类。因此,结果显示,使用PFGE分离高分子量DNA然后从所分离的DNA进行转基因序列的PCR扩增可以用作整合载体拷贝数(iVCN)测定以帮助特异性确定已整合到基因组中的转基因序列的拷贝数。

实施例2:在细胞制造过程中不同时间点通过进行或未进行脉冲场凝胶电泳(PFGE)的情况下的微滴式数字PCR(ddPCR)评估的转基因拷贝数的比较

[0501] 在实施例1中描述的涉及在通过qPCR进行载体拷贝数分析之前通过PFGE分离高分子量种类的iVCN方法用于在细胞工程化过程期间的不同时间点评估在Jurkat T细胞系和原代T细胞二者中编码嵌合抗原受体(CAR)的示例性转基因序列的整合拷贝数。将所述方法与标准载体拷贝数(VCN)测定进行比较,所述标准载体拷贝数测定不包括通过脉冲场凝胶电泳(PFGE)分离高分子量和低分子量DNA种类。

[0502] 对于研究,基因组DNA是从细胞制备的并经受通过以下方法的转基因序列拷贝数评估:(1)通常如上文实施例1中所述的iVCN方法,其使用>15kb的分离阈值(“iVCN”)和PippinHT(Sage Science,马萨诸塞州贝弗利)设备,或(2)标准VCN方法,其中基因组DNA首先不通过PFGE分离(“VCN”)。在两种测定中,转基因拷贝数通过ddPCR使用对转基因特有的序列具有特异性的引物来确定,并针对如使用对参考基因(例如,白蛋白(ALB)基因)具有特异性的引物确定的二倍体基因组进行归一化。

A. Jurkat细胞系

[0503] 将Jurkat T细胞用含有编码CAR的转基因序列的慢病毒制剂转导,通常如上文实施例1中所述。在转导之前(“pre”)、在转导后5分钟、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时

和96小时获得细胞样品,并用于分析转基因拷贝数。

[0504] 如图2A所示,在将Jurkat细胞工程化过程中的不同时间点期间在使用PFGE的情况下的转基因拷贝数评估以检测在基因组中的整合拷贝数(iVCN)显示,在这些细胞中转基因整合直到大约6小时才可检测到,并且直到约48小时才增加,此时检测到的拷贝数通常趋于稳定。相比之下,通过标准VCN方法检测细胞中转基因拷贝数的在未使用PFGE的情况下的转基因拷贝数评估证明了从早得多的时间点开始大量检测到转基因序列。该观察结果与在细胞工程化后的这些早期时间点通过标准VCN方法检测到非整合转基因序列(如产生质粒、线性或环状互补DNA(cDNA)或自我整合序列)是一致的。在未使用PFGE的情况下确定的转基因拷贝数后来在大约96小时降低至与通过iVCN整合拷贝数评估(在使用PFGE的情况下)检测到的水平相似的水平,这表明尽管转基因整合在约48小时完成,但在未使用PFGE的情况下的标准VCN方法直到大约96小时或在这些细胞中转导后才准确。

B. 原代细胞工程化

[0505] 使用示例性工程化过程,将来自人受试者的原代T细胞工程化为表达CAR。从白细胞单采术样品的分离的PBMC选择CD4⁺和CD8⁺细胞的单独组合物,然后将选择的细胞组合物冷冻保存。随后将CD4⁺和CD8⁺T细胞的单独组合物解冻,并且以1:1的活CD4⁺T细胞与活CD8⁺T细胞的比率混合。在存在以1:1珠与细胞比率的顺磁性聚苯乙烯包被珠与附着的抗CD3和抗CD28抗体的情况下在含有重组IL-2、IL-7和IL-15的无血清培养基中刺激混合组合物的约 300×10^6 个T细胞(150×10^6 个CD4⁺T细胞和 150×10^6 个CD8⁺T细胞),持续18与30个小时之间。

[0506] 在孵育后,洗涤来自刺激的细胞组合物的大约 100×10^6 个活细胞,并将其重悬于含有重组IL-2、IL-7和IL-15的无血清培养基中。通过以约1600g旋转接种60分钟用编码抗BCMA CAR的慢病毒制剂转导细胞。旋转接种后,将细胞洗涤并重悬于含有重组IL-2、IL-7和IL-15的无血清培养基中,并且在约37℃下孵育约18至30小时。所述抗BCMA CAR含有对BCMA具有特异性的scFv抗原结合结构域、CD28跨膜区域、4-1BB共刺激信号传导区域和CD3-ζ来源的细胞内信号传导结构域。

[0507] 然后,通过转移到生物反应器(例如摇摆运动生物反应器)中的约500mL培养基中来培育细胞以进行扩增,所述培养基含有两倍于在孵育和转导步骤期间所用的浓度的细胞因子。当达到设定的活细胞密度时,开始灌注,其中在持续混合下通过半连续灌注更换培养基。将细胞在生物反应器中培育,直到达到约 3×10^9 个细胞的阈值细胞数量(TNC),这通常发生在涉及6-7天扩增的过程中。通过暴露于磁场将抗CD3和抗CD28抗体缀合的顺磁珠从细胞组合物中去除。然后收集细胞并将其用冷冻保护剂配制。

[0508] 对于通过如上所述的iVCN和标准VCN方法分析DNA,在转导之前(“pre”)、转导后24小时、48小时、72小时、96小时、120小时和在工程化过程完成时(“完成”)获得细胞样品。

[0509] 如图2B所示,如在PFGE后确定的转基因拷贝数(iVCN)直到转导后约24小时才被检测到,并直到约48至72小时才增加。在未使用PFGE的情况下的测定(VCN)中,转基因拷贝数在早期时间点(24和48小时)要高得多,但后来下降到与大约96小时通过整合拷贝数评估(iVCN)检测到的水平相似的水平。在两种测定中,在转导后96小时或更长时间处获得的样品中,评估的拷贝数是相似的。

[0510] 结果证实,在使用PFGE的情况下的载体拷贝数评估(iVCN)揭示转基因整合在转导后的各时间点处的时间安排是一致的。观察结果进一步表明,通过不涉及PFGE的标准VCN方

法进行的评估可以在发生整合到基因组中之前的时间检测细胞中的转基因序列,因此证明标准VCN方法可能不完全适合对转导后少于4天的样品评估载体拷贝数。

实施例3:在各种非扩增制造过程期间在进行脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 的情况下评估整合转基因拷贝数

[0511] 在用于产生基因工程化T细胞组合物的示例性过程期间的不同时间点,使用通常如实施例1和2中所述的iVCN和VCN方法评估编码嵌合抗原受体 (CAR) 的转基因的拷贝数。示例性过程不涉及转导后的扩增步骤,并且在刺激试剂、培养基和收获时间方面是不同的。

[0512] 对于每个过程,从两个不同的人受试者 (供体A和供体B) 的来自人白细胞单采术样品的分离的PBMC选择CD4⁺和CD8⁺原代人T细胞的单独组合物。将选择的细胞冷冻保存,随后解冻并以1:1的活CD4⁺T细胞与活CD8⁺T细胞的比率混合。通过与如下刺激试剂孵育来刺激混合细胞组合物: (1) 抗CD3/抗CD28抗体缀合的顺磁珠 (“珠”); (2) 抗CD3/抗CD28 Fab缀合的寡聚体链霉亲和素突变蛋白试剂,其浓度为4.0 μ g/10⁶个细胞;或 (3) 抗CD3/抗CD28 Fab缀合的寡聚体链霉亲和素突变蛋白试剂,其浓度为0.8 μ g/10⁶个细胞。在具有重组细胞因子的无血清培养基中进行孵育约18至30小时。

[0513] 然后将细胞洗涤并通过旋转接种用含有编码CAR的转基因序列的慢病毒制剂转导细胞。然后将细胞与不含血清、生长因子或重组细胞因子的基础培养基 (“基础”) 或含有重组IL-2、IL-5和IL-15细胞因子的无血清培养基 (“完全”) 一起孵育。在开始与珠试剂孵育后96小时后,将细胞暴露于磁场以去除顺磁珠。在开始与寡聚体刺激试剂孵育后24小时、48小时或96小时后,将细胞暴露于生物素10分钟以解离并去除寡聚体链霉亲和素试剂。将细胞洗涤并用冷冻保护剂配制。

[0514] 解冻细胞并从收获的细胞制备基因组DNA。对于转基因拷贝数的评估,如上文实施例1和2中所述,使用对转基因序列具有特异性的引物对DNA进行ddPCR,所述DNA已经受>15kb的高分子量级分的PFGE。还通过流式细胞术、针对CAR、CD3和激活的半胱天冬酶3 (aCas3) 的表达的染色来评估细胞样品。

[0515] 结果显示于图3A-图3E中。如图3A所示,对于使用寡聚体试剂刺激的细胞,在开始刺激后进行孵育24小时或48小时的样品中,通过iVCN测量的整合转基因拷贝数增加,但不进一步增加。直到开始刺激后约96小时,如通过标准VCN (在未使用PFGE的情况下) 测量的转基因拷贝数仍大大高于如通过iVCN测量的整合转基因拷贝数。该结果与以下观察结果是一致的:标准VCN方法 (在未使用PFGE的情况下) 直到该过程中96小时的时间点才是准确的。对于使用珠试剂刺激的细胞,在96小时,与用完全培养基孵育的细胞相比,对于用基础培养基孵育的细胞观察到更高的整合拷贝数。如图3B所示,整合转基因拷贝数与CAR表达细胞的百分比 (如通过流式细胞术所得的CD3⁺细胞中CD3⁺/激活的Cas3⁻/CAR⁺细胞的百分比所确定) 是相关的。该结果进一步支持iVCN测定用于评估整合拷贝数的实用性,特别是当评估不同参数 (包括孵育时间、培养基或试剂) 在用于将细胞工程化的过程中的影响时的实用性。

实施例4:在不同的细胞制造过程期间通过进行或未进行脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 的情况下的微滴式数字PCR (ddPCR) 评估的整合和非整合转基因拷贝数的比较

[0516] 编码嵌合抗原受体 (CAR) 的整合和非整合转基因的数量通过在进行或未进行脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 的情况下对DNA样品的ddPCR来评估,所述DNA样品是在用于产生基因工程化T细胞组合物的各种示例性过程期间获得的。

A. 将T细胞工程化的示例性过程

[0517] 所述示例性过程包括使工程化细胞经受细胞扩增的过程(扩增过程)和未扩增细胞的过程(非扩增过程)。

1) 扩增过程-抗CD3/抗CD28珠

[0518] 进行了如实施例2.B中通常描述的扩增方法。

2) 非扩增过程-抗CD3/抗CD28珠

[0519] 与实施例3中所述类似地进行了使用抗CD3/抗CD28抗体缀合珠的非扩增过程。选择CD4⁺和CD8⁺T细胞并将其以1:1的比率混合,以产生含有约600x10⁶个T细胞(300x10⁶个CD4⁺T细胞和300x10⁶个CD8⁺T细胞)的输入组合物。通过以下方法刺激混合输入细胞组合物:在含有重组IL-2、IL-7和IL-15的无血清培养基中,在存在抗CD3/抗CD28抗体缀合珠的情况下以1:1的珠与细胞比率将细胞孵育18-30小时。刺激后,将细胞洗涤并重悬于含有重组IL-2、IL-7和IL-15的无血清培养基中。然后通过以约693g旋转接种30分钟用慢病毒载体转导细胞,所述慢病毒载体编码在扩增过程中使用的相同的抗BCMA CAR。

[0520] 在一个组中,将细胞重悬于不含血清且不含添加的生长因子或重组细胞因子的基础培养基(基础培养基)中,并在开始用抗CD3/抗CD28珠刺激后,在约37.0℃下在培养箱中孵育约96小时。在另一组中,进行了类似的过程,不同之处在于,在旋转接种后,将细胞重悬于不含添加的生长因子或重组细胞因子的基础培养基(基础培养基)中,并在开始用抗CD3/抗CD28珠刺激后在约37.0℃下在培养箱中孵育约72小时。

3) 非扩增过程-抗CD3/抗CD28 Fab寡聚体试剂

[0521] 与实施例3中所述类似地进行了使用抗CD3/抗CD28 Fab寡聚体试剂的非扩增过程。选择CD4⁺和CD8⁺T细胞并将其以1:1的比率混合,以产生含有约600x10⁶个T细胞(300x10⁶个CD4⁺T细胞和300x10⁶个CD8⁺T细胞)的输入组合物。通过以下方法刺激来自混合输入细胞组合物的细胞:与如实施例2中所述产生的480μg(或0.8μg/1x10⁶个细胞)的抗CD3/抗CD28Fab缀合的寡聚体链霉亲和素突变蛋白试剂一起孵育,所述孵育在含有重组IL-2、IL-7和IL-15的无血清培养基中进行了18-30小时。刺激后,通过以约693g旋转接种30分钟用慢病毒载体转导细胞,所述慢病毒载体编码在扩增过程中使用的相同的抗BCMA CAR。

[0522] 在所述过程的一个组中,在旋转接种后,将细胞洗涤并重悬于不含血清、添加的生长因子或重组细胞因子的基础培养基(基础培养基)中,并在约37.0℃下在培养箱中孵育。在开始转导后约24小时(开始刺激后约48小时),在孵育期间添加1.0mM D-生物素,并将其与细胞混合以从寡聚体链霉亲和素试剂解离抗CD3和抗CD28 Fab试剂。将细胞进一步孵育约48小时(开始刺激后96小时),然后洗涤并用冷冻保护剂配制。

[0523] 在所述过程的另一组中,在旋转接种后,将细胞洗涤并重悬于无血清、添加的生长因子或重组细胞因子的基础培养基(基础培养基)中,并在约37.0℃下在培养箱中孵育。在开始转导后24小时后,在孵育期间添加1.0mM D-生物素,并将其与细胞混合以从寡聚体链霉亲和素试剂解离抗CD3和抗CD28 Fab试剂。将细胞进一步孵育另外24小时(开始刺激后72小时),然后洗涤并用冷冻保护剂配制。

4) 过程的总结

[0524] 表E1总结了上述过程的特征以及使用模拟空载体的过程。

表E1:过程的总结

组	刺激试剂	细胞数量	转导	扩增	去除刺激试剂	收获
1	珠	1.5 x 10 ⁶ 个CD4和1.5 x 10 ⁶ 个CD8	旋转接种和孵育18-30小时	直到TNC为约3 x 10 ⁹ 个细胞, 约6-7天	洗涤和去珠 阈值数后的第二天	在去珠后
2	珠	3.0 x 10 ⁶ 个CD4和3.0 x 10 ⁶ 个CD8	旋转接种和在基础培养基中孵育约72小时	无	洗涤和去珠 开始刺激后约96小时	在去珠后
3	珠	3.0 x 10 ⁶ 个CD4和3.0 x 10 ⁶ 个CD8	旋转接种和在基础培养基中孵育约48小时	无	洗涤和去珠 开始刺激后约72小时	在去珠后
4	寡聚体 0.2X	3.0 x 10 ⁶ 个CD4和3.0 x 10 ⁶ 个CD8	旋转接种和在基础培养基中孵育72小时	无	刺激后约24小时在孵育期间添加生物素	开始刺激后96小时
5	寡聚体 0.2X	3.0 x 10 ⁶ 个CD4和3.0 x 10 ⁶ 个CD8	旋转接种和在基础培养基中孵育48小时	无	在开始刺激后约24小时在孵育期间添加生物素	开始刺激后72小时
6	(模拟) 寡聚体 0.2X	1.5 x 10 ⁶ 个CD4和1.5x 10 ⁶ 个CD8	模拟转导和在完全培养基中静态孵育24小时	无	开始刺激后约24小时添加生物素	开始刺激后96小时

B. 转基因拷贝数的评估

[0525] 解冻细胞并从收获的细胞制备基因组DNA。对于整合转基因拷贝数的评估,通常如上文实施例1和2中所述,使用对转基因序列具有特异性的引物对DNA进行ddPCR,所述DNA已经受>10kb的高分子量级分的PFGE (“iVCN”)。为了进行比较,也对在未经受PFGE的DNA进行了使用对转基因序列具有特异性的引物的ddPCR (“VCN”, 高分子量和低分子量DNA二者)。还通过流式细胞术评估了细胞样品。

[0526] 结果显示于图4A-图4E中。如图4A所示,每个较短的非扩增过程产生了如下细胞,所述细胞展现出由VCN (未使用PFGE) 测定的拷贝数高于由iVCN (使用PFGE) 测定的拷贝数,

这表明在通过这些较短过程工程化的样品中存在非整合转基因序列。通过使用iVCN的拷贝数除以使用VCN的拷贝数来确定的整合转基因的分数在使用非扩增过程产生的细胞中明显较低(图4B)。类似地,在使用非扩增过程产生的细胞中,被确定为1-整合转基因的分数的非整合转基因的分数明显较高(图4C)。如图4D所示,在使用较短过程产生的细胞中,通过从VCN减去iVCN确定的非整合转基因拷贝数在平均约0.8与1.3之间。使用未使用PFGE的标准VCN,每个CAR+细胞的转基因拷贝数如图4E所示。该结果进一步支持iVCN方法对于在将细胞工程化的过程中评估整合和非整合转基因拷贝数的实用性。

实施例5:各种扩增细胞制造过程期间整合和非整合转基因拷贝数的比较

[0527] 在进行或未进行脉冲场凝胶电泳(PFGE)的情况下在DNA中的转基因拷贝数是通过在用于将T细胞基因工程化的过程中的不同时间点进行ddPCR来评估的,所述过程包括在转导后扩增细胞的步骤。

[0528] 如实施例2.B中所述,将来自不同人供体的原代T细胞工程化为表达CAR。从扩增过程的第0天开始至第8天每天获得样品,包括在解冻材料时(TMAT;第0天)、在激活时(AMAT;第1天)、在转导时(XMAT;第2天)或在开始培育后的不同时间(inoc+1至inoc+6;表示过程的第3-8天)获得样品。从细胞样品制备基因组DNA。对于整合转基因拷贝数的评估,如上文实施例1和2中所述,使用对转基因序列具有特异性的引物对DNA进行ddPCR,所述DNA已经受高分子量级分的PFGE(“iVCN”)。为了进行比较,也对在未经受PFGE的DNA进行了使用对转基因序列具有特异性的引物的ddPCR(“VCN”,高分子量和低分子量DNA二者)。通常如上文实施例4所述,还测定了非整合转基因拷贝数、整合转基因的分数和非整合转基因的分数。

[0529] 代表性结果显示于图5中。如图所示,在转导当天或转导后的早期时间点(例如,inoc+1,inoc+2),如通过标准VCN方法确定的由未经受PFGE的基因组DNA样品确定的拷贝数包括很大分数的非整合转基因。在转导后的稍晚时间点,如通过iVCN(使用PFGE)和标准VCN(未使用PFGE)确定的拷贝数大致相同,这表明在这些时间点,细胞中不再存在转基因的非整合拷贝。

实施例6:成纤维细胞中转基因整合的评估

[0530] 通过分析依据对已经受脉冲场凝胶电泳(PFGE)的基因组DNA进行ddPCR得到的转基因拷贝数来评估经由慢病毒转导引入成纤维细胞系中的转基因的整合。

[0531] 用含有编码重组蛋白(在这种情况下为嵌合抗原受体(CAR))的转基因序列的慢病毒制剂转导HT1080人纤维肉瘤细胞系(ATCC® CCL-121™)。转导后,培养细胞,并在转导后12、24、48或72小时收获细胞。从收获的细胞制备基因组DNA。通常如上文实施例1和2中所述,在PFGE后的高分子量DNA样品(“iVCN”)中和未经受PFGE的DNA样品(“VCN”,高分子量和低分子量DNA二者)中,使用对转基因具有特异性的引物的ddPCR确定转基因拷贝数。

[0532] 如图6所示,转基因整合到HT1080成纤维细胞系中是在转导后24小时完成的。在成纤维细胞系中完全整合的时间安排比在T细胞(包括Jurkat细胞和原代人T细胞)中观察到的(如上文实施例中所示)更快。该结果揭示,某些细胞类型经历更快的慢病毒整合到细胞的基因组中。

实施例7:评估重组受体表达T细胞以确定施用的工程化T细胞的转基因序列的量和药代动力学参数

[0533] 使用ddPCR和PFGE的示例性方法用于评估已施用工程化T细胞的受试者中编码重

组蛋白(如嵌合抗原受体(CAR))的转基因序列的量。

[0534] 向患有疾病或障碍(如增殖性疾病或障碍(例如癌症))的受试者施用表达重组蛋白(如可以靶向由与疾病或障碍相关的细胞(如癌细胞)表达的特定抗原的重组受体)的工程化细胞(如T细胞)。在一些例子中,所述重组受体是对癌症抗原(如由癌细胞表达或与癌细胞相关的抗原)具有特异性的嵌合抗原受体(CAR)。在一些方面,治疗性T细胞组合物通过以下方法产生:将编码重组受体的转基因序列引入所分离的原代人T细胞(如所分离的原代CD4⁺和/或CD8⁺人T细胞)中,如通过使用如上文实施例1-6中所述的扩增或非扩增过程产生。向受试者施用包含工程化细胞的治疗性T细胞组合物。

[0535] 在施用所述细胞组合物后的各个时间点,使用如本文所述的用于评估整合转基因拷贝数的方法来确定存在于已被施用所述工程化细胞的受试者的生物样品中的转基因序列的量。在一些方面,在施用所述治疗性T细胞组合物之前、期间和/或之后,获得受试者的血液或血清或器官或组织样品(例如,疾病部位,例如,肿瘤样品)中的细胞。从样品制备基因组DNA。在一些方面,通常如上文实施例1和2中所述,生物样品中存在的转基因序列的量是通过ddPCR使用可特异性地扩增转基因的一部分的引物从PFGE后的高分子量DNA样品确定的(“iVCN”)。在一些方面,还通过ddPCR使用相同的引物从未经受PFGE的DNA样品来评估拷贝数(“VCN”,高分子量和低分子量DNA二者)。在一些方面,在一些情况下还可以通过流式细胞术、针对重组蛋白(例如,CAR)的表达的染色来评估细胞样品,以确定样品中表达重组蛋白(例如,CAR)的细胞的比例。

[0536] 在一些实施方案中,生物样品中转基因序列的量被量化为每份量的DNA(如每微克的DNA)或每体积的样品(如每微升的样品,例如血液或血清)或按照总细胞数(如按照总外周血单核细胞(PBMC)或白血细胞或T细胞)、任选每体积(例如每微升)的样品或每个细胞(如每个二倍体T细胞基因组或每个CAR表达细胞)、任选每体积(例如每微升)的样品中编码重组蛋白(例如,CAR)的整合转基因的拷贝。可以基于iVCN方法或通过其他方法(如流式细胞术)确定的示例性药代动力学(PK)参数包括表达重组蛋白的转基因序列或特定细胞的最大(峰值)血浆浓度(C_{max}),如CD3⁺CAR⁺细胞、CD4⁺CAR⁺细胞和或CD8⁺CAR⁺T细胞的 C_{max} ;达到 C_{max} 的时间点(T_{max}),如转基因序列、CD3⁺CAR⁺细胞、CD4⁺CAR⁺细胞和或CD8⁺CAR⁺T细胞的 T_{max} ;和或对于施用后特定时间的曲线下面积(AUC),如转基因序列、CD3⁺CAR⁺细胞、CD4⁺CAR⁺细胞和或CD8⁺CAR⁺T细胞的AUC₀₋₂₈。

实施例8:细胞制造过程期间标准VCN测定和iVCN测定与重组受体的表面表达的相关性

[0537] 上述载体拷贝数(VCN)和iVCN测定用于确定通过慢病毒转导引入T细胞中的编码重组受体(例如,嵌合抗原受体(CAR))的转基因的拷贝数,并且结果与CAR的表面表达相关。在该研究中,对由来自不同人供体的原代T细胞产生的细胞组合物进行测定,所述原代T细胞已使用通常如实施例2.B中所述的扩增过程或通常如实施例4.A.3中所述的非扩增过程被工程化为表达CAR,所述过程具有如下修改,其中将细胞用抗CD3/抗CD28 Fab缀合的寡聚体链霉亲和素突变蛋白试剂激活,接着进行转导并在基础培养基(不包括添加重组细胞因子,无细胞因子培养基)中短孵育。

[0538] 在用于在缩短的、非扩增过程或在扩增过程中工程化的过程结束时从细胞样品制备基因组DNA。如实施例1中所述进行VCN和iVCN测定,其使用>15kb的分离阈值(“iVCN”)和

PippinHT (Sage Science, 马萨诸塞州贝弗利) 设备, 或 (2) 标准VCN方法, 其中基因组DNA首先不通过PFGE分离 (“VCN”)。

[0539] 结果表明, 使用VCN测定评估的转基因拷贝数通常与通过iVCN评估的转基因拷贝数相关 (图7A)。然而, 对于使用非扩增过程制造的细胞, 通过VCN获得的值高于通过iVCN获得的值, 这与检测可能存在于含有使用非扩增过程产生的细胞的样品中的非整合转基因序列的VCN测定是一致的。相比之下, 对于使用扩增过程制造的细胞, 通过VCN和iVCN获得的值几乎相同 (在VCN=iVCN线附近)。这些差异可能是由于与扩增过程相比, 在较短的非扩增过程中样品中存在更大量的游离的、非整合转基因序列拷贝所致。这些结果与以下观察结果一致: 与iVCN测定相比, 能够检测高分子量和低分子量DNA二者的标准VCN测定具有局限性, 特别是当用于在转基因引入后的早期评估细胞时, 如在将T细胞工程化的缩短过程 (其中游离的、非整合转基因序列拷贝可能仍存在于样品中) 中。

[0540] 为了评估iVCN或VCN测定与CAR的表面表达的相关性程度, 通过流式细胞术评估来自非扩增或扩增过程的细胞样品的CD3、CD45和CAR的表达, 以确定在活CD45+细胞中CD3+CAR+细胞的百分比。如图7B所示, 与通过非扩增过程工程化相比, VCN测定展现出与通过扩增过程工程化的样品的CAR+细胞的百分比更好的相关性, 这可能是由于存在未促进表面CAR表达的非整合CAR DNA序列。如图7C所示, iVCN显示出与在已通过非扩增或扩增过程工程化的细胞中的CAR表达的相似相关性。对于所有样品, 与通过VCN测定 ($R^2=0.5903$) 确定的每个细胞中的拷贝数相比, CAR表达与通过iVCN测定 ($R^2=0.8952$) 确定的每个细胞中的拷贝数的相关性更高。

[0541] 所述结果支持iVCN测定对于准确地确定特别是使用可保留游离、非整合转基因序列拷贝的非扩增过程产生的细胞的稳定整合的转基因序列的拷贝数的实用性。相比之下, 未区分整合转基因序列与非整合转基因序列的VCN测定在准确地确定稳定整合的转基因序列的数量方面受到限制, 尤其是在较短的非扩增过程期间和之后。

[0542] 本发明在范围上并不旨在受限于具体公开的实施方案, 所提供的实施方案例如是为了说明本发明的各个方面。根据本文的描述和传授, 对所述组合物和方法的各种修改将变得清楚。此类变化可以在不背离本公开文本的真实范围和精神的情况下实践, 并且旨在落入本公开文本的范围内。

序列

#	序列	注释
1	ESKYGPPCPPCP	间隔子 (IgG4 铰链) (aa) 智人
2	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCCCT	间隔子 (IgG4 铰链) (nt) 智人
3	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	铰链-CH3 间隔子 智人
4	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVQLHQLDNL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	铰链-CH2-CH3 间隔子 智人
5	RWPESPKAQASSVPTAQPAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEK EKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVG SDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWN AGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAPVKLSLNLLASSDPPEAAS WLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAW VLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYVTDH	IgD-铰链-Fc 智人
6	LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR	T2A 人工
7	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHF KNCTSIGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLI QAWPENRTDLHAFENLEIIRGRKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKE ISDGDVVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATG QVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGECVDKCNLLEGEPREFVE NSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGV MGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNGPKIPSIA TGMVGALLLLLVVALGIGLFM	tEGFR 人工

#	序列	注释
8	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (登录号 P10747的氨基酸 153-179) 智人
9	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKP FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (登录号 P10747的氨基酸 114-179) 智人
10	RSKR SRL LHS DY MNMT PRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAYRS	CD28 (P10747的 氨基酸180-220) 智人
11	RSKR SRGGHSDY MNMT PRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAYRS	CD28 (LL至GG) 智人
12	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCEL	4-1BB (Q07011.1 的氨基酸 214-255) 智人
13	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQALPPR	CD3ζ 智人
14	RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQALPPR	CD3ζ 智人
15	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQALPPR	CD3ζ 智人
16	RKVCNGIGIGEFKDSL SINATNIKHFNCTSI SGDLHILPVAFRGDSF THTPPLDPQELDILKT VKEITGFL LIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGR TKQH GQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINW KKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVS CRNVSRGRECVDKCNLLEGEPRFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTG RGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTC PAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCH PNCTYGCTGPGLEGCP TNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM	tEGFR 人工

#	序列	注释
17	EGRGSLLTCDGVEENPGP	T2A 人工
18	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
19	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
20	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
21	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
22	-PGGG- (SGGG) 5'-P-, 其中P是脯氨酸, G是甘氨酸并且S是丝氨酸	接头
23	GSADDAKKDAAKKDGKS	接头
24	atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacacca gcattcctcctgatccca	GMCSFRα链信号序列
25	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP	GMCSFRα链信号序列
26	MALPVTALLPLALLHA	CD8α信号肽
27	EVQLVQSGAEMKKPGASLKLCKASGYTFIDYYVYWMRQAPGQGLESM GWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLSDDTAMYYC ARSQRDGYMDYWGQGTLLTVSS	可变重链 (VH) 抗BCMA
28	QSALTQPASVSASPGQSIASCTGTSSDVGWYQQHPGKAPKLMIEDS KRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSNTRSSTLVFG GGTKLTVLG	可变轻链 (VL) 抗BCMA
29	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	接头
30	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFDYSINWVKRAPGKGLKWM GWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAYLQINNLYEDTATYFC ALDYSYAMDYWGQGTSTVTVSS	可变重链 (VH) 抗BCMA
31	DIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQPP TLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSR TIPRTFGGGTKLEIK	可变轻链 (VL) 抗BCMA
32	QIQLVQSGPDLKKPGETVKLSCKASGYTFNFGMNWVKQAPGKGFKWM AWINTYTGESYFADDFKGRFAFSVETSATTAYLQINNLTEDTATYFC ARGEIYYGYDGGFAYWGQGTLLTVSA	可变重链 (VH) 抗BCMA
33	DVVMTQSHRFMSTSVGDRVSITCRASQDVNTAVSWYQQKPGQSPKLLI	可变轻链 (VL)

#	序列	注释
	FSASYRYTGVPDRFTGSGSGADFTLTISVQAEDLAVYYCQQHYSTPW TFGGGTKLDIK	抗BCMA
34	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWM GIIYPGDS DTRYSPSFQGHVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYIC ARYSGSFDNWGQGT LVTVSS	可变重链 (VH) 抗BCMA
35	SYELTQPPSASGTPGQRVTMSCSGTSSNIGSHSVN WYQQLPGTAPKLL IYTNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDGSL NGLVFGGGTKLTVLG	可变轻链 (VL) 抗BCMA
36	GGGGS	接头
37	GGGS	接头
38	GGGSGGGSGGGGS	接头
39	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	接头
40	SRGGGSGGGSGGGGSLEMA	接头
41	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWM GRIIPILGIANYAQKFQGRVTMTEDTSTD TAYMELSSLRSED TAVYYC ARSGYSKSI VSYMDYWGQGT LVTVSS	可变重链 (VH) 抗BCMA
42	LPVLTQPPSTSGTPGQRVTVSCSGSSNIGSNVFWYQQLPGTAPKLV IYRNNQRPSGVPDRFSVSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSL SGYVFGTGTKVTVLG	可变轻链 (VL) 抗BCMA
43	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWM GRIIPILGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYC ARSGYGSYRWEDSWGQGT LVTVSS	可变重链 (VH) 抗BCMA
44	QAVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGSNYVFWYQQLPGTAPKLL IYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSL SASYVFGTGTKVTVLG	可变轻链 (VL) 抗BCMA
45	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYMHVVRQAPGQRLEWM GWINPNSGGTNYAQKFQDRITVTRDTSSNTGYMELTRLRSDD TAVYYC ARSPYSGVLDKKGQGT LVTVSS	可变重链 (VH) 抗BCMA
46	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGFDVHWYQQLPGTAPKL LIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSS	可变轻链 (VL) 抗BCMA

#	序列	注释
	LSGYVFGTGTKVTVLG	
47	RASQDISKYLN	CDR L1
48	SRLHSGV	CDR L2
49	GNTLPYTFG	CDR L3
50	DYGVS	CDR H1
51	VIWGSETTYNSALKS	CDR H2
52	YAMDYWG	CDR H3
53	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWL GVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCA KHHYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS	VH
54	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLI YHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPY TFGGGTKLEIT	VL
55	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLI YHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPY TFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLS VTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRL TIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHHYYGGSYAMDYWGQGTS VTVSS	scFv
56	KASQNVGTNVA	CDR L1
57	SATYRNS	CDR L2
58	QQYNRYPYT	CDR L3
59	SYWMN	CDR H1
60	QIYPGDGDTNYNGKFKG	CDR H2
61	KTISSVVDYFDY	CDR H3
62	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWI GQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFC ARKTISSVVDYFDYWGQGTITVTVSS	VH
63	DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLI YSATYRNSGVDPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPY	VL

#	序列	注释
	TSGGGTKLEIKR	
64	GGGSGGGSGGGGS	接头
65	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPQGLEWI GQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFC ARKTISSVVDYFDYWGQGTTVTVSSGGGSGGGSGGGSDIELTQS PKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRN SGVPDRFTGSGSGTDFLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTK LEIKR	scFv
66	HYYYGGSYAMDY	HC-CDR3
67	HTSRLHS	LC-CDR2
68	QQGNTLPYT	LC-CDR3
69	gacatccagatgacccagaccacctccagcctgagcgccagcctgggc gaccgggtgaccatcagctgccgggccagccaggacatcagcaagtac ctgaactggtatcagcagaagcccgacggcaccgtcaagctgctgac taccacaccagccggctgcacagcggcgtgccagccggttagcggc agcggctccggcaccgactacagcctgaccatctccaacctggaacag gaagatatcgccacctacttttgccagcagggcaacacactgccctac acctttggcggcggaacaaagctggaaatcacggcagcacctccggc agcggcaagcctggcagcggcgagggcagcaccaagggcgaggtgaag ctgcaggaaagcgccctggcctggtggccccagccagagcctgagc gtgacctgcaccgtgagcggcgtgagcctgcccgactacggcgtgagc tggatccggcagccccccaggaagggcctggaatggctgggcgtgac tggggcagcgagaccacctactacaacagcgcctgaagagccggctg accatcatcaaggacaacagcaagagccaggtgttcctgaagatgaac agcctgcagaccgacgacaccgccatctactactgcgccaagcactac tactacggcggcagctacgccatggactactggggccagggcaccagc gtgaccgtgagcagc	编码scFv的序列
70	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQKTYTCNVDPHKPSNTKVDK RVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV	人IgG4 Fc (Uniprot P01861)

#	序列	注释
	DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK	
71	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDK TVERKCCVECPGPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD VSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	人IgG2 Fc (Uniprot P01859)

序列表

<110> 朱诺治疗学股份有限公司

<120> 用于评估整合核酸的方法

<130> 735042016840

<140> 尚未分配

<141> 同时随同提交

<150> 62/716,972

<151> 2018-08-09

<160> 71

<170> 用于Windows 4.0版的FastSEQ

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<223> 间隔子 (IgG4铰链) (aa)

<400> 1

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 2

<211> 36

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<223> 间隔子 (IgG4铰链) (nt)

<400> 2

gaatctaagt acggaccgcc ctgccccct tgccct 36

<210> 3

<211> 119

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<223> 铰链-CH3间隔子

<400> 3

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Gly Gln Pro Arg

1 5 10 15

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys

20 25 30

Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
35				40				45							
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
50				55				60							
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
65				70				75				80			
Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
85				90				95							
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
100				105				110							
Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys									
115															
<210> 4															
<211> 229															
<212> PRT															
<213> 智人(Homo sapiens)															
<220>															
<223> 铰链-CH2-CH3间隔子															
<400> 4															
Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe
1				5				10				15			
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
20				25				30							
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
35				40				45							
Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val
50				55				60							
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser
65				70				75				80			
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu
85				90				95							
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser
100				105				110							
Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro
115				120				125							
Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln
130				135				140							
Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala
145				150				155				160			

Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr			
																165	170	175
Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu			
																180	185	190
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser			
																195	200	205
Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser			
																210	215	220
Leu	Ser	Leu	Gly	Lys														
																225		
<210>	5																	
<211>	282																	
<212>	PRT																	
<213>	智人 (Homo sapiens)																	
<220>																		
<223>	IgD-铰链-Fc																	
<400>	5																	
Arg	Trp	Pro	Glu	Ser	Pro	Lys	Ala	Gln	Ala	Ser	Ser	Val	Pro	Thr	Ala			
1																5	10	15
Gln	Pro	Gln	Ala	Glu	Gly	Ser	Leu	Ala	Lys	Ala	Thr	Thr	Ala	Pro	Ala			
																20	25	30
Thr	Thr	Arg	Asn	Thr	Gly	Arg	Gly	Gly	Glu	Glu	Lys	Lys	Lys	Glu	Lys			
																35	40	45
Glu	Lys	Glu	Glu	Gln	Glu	Glu	Arg	Glu	Thr	Lys	Thr	Pro	Glu	Cys	Pro			
																50	55	60
Ser	His	Thr	Gln	Pro	Leu	Gly	Val	Tyr	Leu	Leu	Thr	Pro	Ala	Val	Gln			
65																70	75	80
Asp	Leu	Trp	Leu	Arg	Asp	Lys	Ala	Thr	Phe	Thr	Cys	Phe	Val	Val	Gly			
																85	90	95
Ser	Asp	Leu	Lys	Asp	Ala	His	Leu	Thr	Trp	Glu	Val	Ala	Gly	Lys	Val			
																100	105	110
Pro	Thr	Gly	Gly	Val	Glu	Glu	Gly	Leu	Leu	Glu	Arg	His	Ser	Asn	Gly			
																115	120	125
Ser	Gln	Ser	Gln	His	Ser	Arg	Leu	Thr	Leu	Pro	Arg	Ser	Leu	Trp	Asn			
																130	135	140
Ala	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Cys	Thr	Leu	Asn	His	Pro	Ser	Leu	Pro	Pro			
145																150	155	160
Gln	Arg	Leu	Met	Ala	Leu	Arg	Glu	Pro	Ala	Ala	Gln	Ala	Pro	Val	Lys			
																165	170	175

Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser Asp Pro Pro Glu Ala Ala Ser
 180 185 190
 Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe Ser Pro Pro Asn Ile Leu Leu
 195 200 205
 Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu Val Asn Thr Ser Gly Phe Ala Pro
 210 215 220
 Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro Gly Ser Thr Thr Phe Trp Ala Trp Ser
 225 230 235 240
 Val Leu Arg Val Pro Ala Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Thr Tyr Thr
 245 250 255
 Cys Val Val Ser His Glu Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn Ala Ser Arg
 260 265 270
 Ser Leu Glu Val Ser Tyr Val Thr Asp His
 275 280

<210> 6

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> T2A

<400> 6

Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp
 1 5 10 15
 Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg
 20

<210> 7

<211> 357

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> tEGFR

<400> 7

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

50	55	60
Phe Arg Gly Asp Ser	Phe Thr His Thr Pro Pro	Leu Asp Pro Gln Glu
65	70	75
Leu Asp Ile Leu Lys Thr	Val Lys Glu Ile Thr Gly	Phe Leu Leu Ile
85	90	95
Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg	Thr Asp Leu His Ala Phe	Glu Asn Leu
100	105	110
Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr	Lys Gln His Gly Gln Phe	Ser Leu Ala
115	120	125
Val Val Ser Leu Asn Ile Thr	Ser Leu Gly Leu Arg Ser	Leu Lys Glu
130	135	140
Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile	Ile Ser Gly Asn Lys Asn	Leu Cys Tyr
145	150	155
Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys	Lys Leu Phe Gly Thr Ser	Gly Gln Lys
165	170	175
Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg	Gly Glu Asn Ser Cys Lys	Ala Thr Gly
180	185	190
Gln Val Cys His Ala Leu Cys	Ser Pro Glu Gly Cys Trp	Gly Pro Glu
195	200	205
Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys	Arg Asn Val Ser Arg Gly	Arg Glu Cys
210	215	220
Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu	Glu Gly Glu Pro Arg Glu	Phe Val Glu
225	230	235
Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys	His Pro Glu Cys Leu Pro	Gln Ala Met
245	250	255
Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg	Gly Pro Asp Asn Cys Ile	Gln Cys Ala
260	265	270
His Tyr Ile Asp Gly Pro His	Cys Val Lys Thr Cys Pro	Ala Gly Val
275	280	285
Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu	Val Trp Lys Tyr Ala Asp	Ala Gly His
290	295	300
Val Cys His Leu Cys His Pro	Asn Cys Thr Tyr Gly Cys	Thr Gly Pro
305	310	315
Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr	Asn Gly Pro Lys Ile Pro	Ser Ile Ala
325	330	335
Thr Gly Met Val Gly Ala Leu	Leu Leu Leu Val Val Ala	Leu Gly
340	345	350
Ile Gly Leu Phe Met		
355		

<210> 8
<211> 27
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<220>
<223> CD28
<300>
<308> UniProt P10747
<309> 1989-07-01
<400> 8
Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
1 5 10 15
Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
 20 25

<210> 9
<211> 66
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<220>
<223> CD28
<300>
<308> UniProt P10747
<309> 1989-07-01
<400> 9
Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn
1 5 10 15
Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu
 20 25 30
Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly
 35 40 45
Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe
 50 55 60
Trp Val

65
<210> 10
<211> 41
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
<220>

<223> CD28

<300>

<308> UniProt P10747

<309> 1989-07-01

<400> 10

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
1 5 10 15
Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
 20 25 30
Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 35 40

<210> 11

<211> 41

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> CD28

<400> 11

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
1 5 10 15
Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
 20 25 30
Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 35 40

<210> 12

<211> 42

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> 4-1BB

<300>

<308> UniProt Q07011.1

<309> 1995-02-01

<400> 12

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
1 5 10 15
Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
 20 25 30
Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

35	40
<210> 13	
<211> 112	
<212> PRT	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<220>	
<223> CD3ζ	
<400> 13	
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly	
1 5 10 15	
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr	
20 25 30	
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys	
35 40 45	
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys	
50 55 60	
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg	
65 70 75 80	
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala	
85 90 95	
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg	
100 105 110	
<210> 14	
<211> 112	
<212> PRT	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<220>	
<223> CD3ζ	
<400> 14	
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Glu Pro Pro Ala Tyr Gln Gln Gly	
1 5 10 15	
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr	
20 25 30	
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys	
35 40 45	
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys	
50 55 60	
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg	
65 70 75 80	

Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala
				85					90					95	
Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg
				100				105					110		

<210> 15

<211> 112

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<223> CD3ζ

<400> 15

Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Lys	Gln	Gly
1				5					10					15	
Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr
			20					25					30		
Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys
			35				40					45			
Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys
			50			55					60				
Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg
65				70				75						80	
Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala
				85				90						95	
Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg
				100				105					110		

<210> 16

<211> 335

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> tEGFR

<400> 16

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

50	55	60
Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn		
65	70	75
Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg		
85	90	95
Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile		
100	105	110
Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val		
115	120	125
Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp		
130	135	140
Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn		
145	150	155
Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu		
165	170	175
Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser		
180	185	190
Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu		
195	200	205
Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln		
210	215	220
Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly		
225	230	235
Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro		
245	250	255
His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr		
260	265	270
Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His		
275	280	285
Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro		
290	295	300
Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala		
305	310	315
Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met		
325	330	335

<210> 17

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> T2A

<400> 17

Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro

1 5 10 15

Gly Pro

<210> 18

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> P2A

<400> 18

Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val

1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 19

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> P2A

<400> 19

Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn

1 5 10 15

Pro Gly Pro

<210> 20

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> E2A

<400> 20

Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser

1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro

20

<210> 21

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F2A

<400> 21

Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val

1 5 10 15

Glu Ser Asn Pro Gly Pro

20

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<220>

<221> 重复序列

<222> (5) ... (9)

<223> SGGGG重复5次

<400> 22

Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Pro

1 5 10

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 23

Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Gly Lys

1 5 10 15

Ser

<210> 24

<211> 66

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> GMCSFR α 链信号序列

<400> 24

atgcttctcc tgggtgacaag ccttctgctc tgtgagttac cacacccagc attcctcctg 60
atccca 66

<210> 25

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GMCSFR α 链信号序列

<400> 25

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15
Ala Phe Leu Leu Ile Pro
20

<210> 26

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD8 α 信号肽

<400> 26

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala

<210> 27

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 可变重链 (VH) 抗BCMA

<400> 27

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Met Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Asp Tyr
20 25 30
Tyr Val Tyr Trp Met Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Ser Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Gln Arg Asp Gly Tyr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 28

<211> 105

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 可变轻链 (VL) 抗BCMA

<400> 28

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Ala Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Ser Ile Ala Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Trp Tyr
 20 25 30
 Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Glu Asp Ser
 35 40 45
 Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly
 50 55 60
 Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala
 65 70 75 80
 Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Asn Thr Arg Ser Ser Thr Leu Val Phe Gly
 85 90 95
 Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105

<210> 29

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 29

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
 1 5 10 15
 Lys Gly

<210> 30

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 可变重链 (VH) 抗BCMA

<400> 30

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Ser Ile Asn Trp Val Lys Arg Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe
 50 55 60
 Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Tyr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 31

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 可变轻链 (VL) 抗BCMA

<400> 31

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu Ala Met Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Thr Ile Leu
 20 25 30
 Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Thr Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp

65	70	75	80
Pro Val Glu Glu Asp Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg			
	85	90	95
Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
100	105	110	

<210> 32

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 可变重链 (VH) 抗BCMA

<400> 32

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Asp Leu Lys Lys Pro Gly Glu			
1	5	10	15
Thr Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Phe			
20	25	30	
Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Phe Lys Trp Met			
35	40	45	
Ala Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Tyr Phe Ala Asp Asp Phe			
50	55	60	
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Val Glu Thr Ser Ala Thr Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys			
85	90	95	
Ala Arg Gly Glu Ile Tyr Tyr Gly Tyr Asp Gly Gly Phe Ala Tyr Trp			
100	105	110	
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala			
115	120		

<210> 33

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 可变轻链 (VL) 抗BCMA

<400> 33

Asp Val Val Met Thr Gln Ser His Arg Phe Met Ser Thr Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala			
20	25	30	

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Phe Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys
 100 105

<210> 34

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 可变重链 (VH) 抗BCMA

<400> 34

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Ser Gly Ser Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115

<210> 35

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 可变轻链 (VL) 抗BCMA

<400> 35

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Met Ser Cys Ser Gly Thr Ser Ser Asn Ile Gly Ser His
20 25 30

Ser Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Thr Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Gly Ser Leu
85 90 95

Asn Gly Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 36

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 36

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 37

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 37

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 38

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 39

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 39

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 40

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 40

Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Glu Met Ala
20

<210> 41

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 可变重链 (VH) 抗BCMA

<400> 41

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

20	25	30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln	Ala Pro Gly Gln Gly	Leu Glu Trp Met
35	40	45
Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu	Gly Thr Ala Asn Tyr	Ala Gln Lys Phe
50	55	60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr	Ala Asp Glu Ser Thr	Ser Thr Ala Tyr
65	70	75
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg	Ser Glu Asp Thr	Ala Val Tyr Tyr Cys
85	90	95
Ala Arg Ser Gly Tyr Gly Ser	Tyr Arg Trp Glu Asp	Ser Trp Gly Gln
100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser	Ser	
115	120	

<210> 44

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 可变轻链 (VL) 抗BCMA

<400> 44

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro	Pro Ser Ala Ser Gly Thr	Pro Gly Gln
1	5	10
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser	Gly Ser Ser Ser Asn Ile	Gly Ser Asn
20	25	30
Tyr Val Phe Trp Tyr Gln Gln	Leu Pro Gly Thr Ala Pro	Lys Leu Leu
35	40	45
Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg	Pro Ser Gly Val Pro Asp	Arg Phe Ser
50	55	60
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser	Ala Ser Leu Ala Ile Ser	Gly Leu Arg
65	70	75
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr	Tyr Cys Ala Ala Trp Asp	Asp Ser Leu
85	90	95
Ser Ala Ser Tyr Val Phe Gly	Thr Gly Thr Lys Val Thr	Val Leu Gly
100	105	110

<210> 45

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 可变重链 (VH) 抗BCMA

<400> 45

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr
			20					25						30	
Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Arg	Leu	Glu	Trp	Met
			35				40						45		
Gly	Trp	Ile	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
			50				55				60				
Gln	Asp	Arg	Ile	Thr	Val	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ser	Asn	Thr	Gly	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Thr	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85				90						95
Ala	Arg	Ser	Pro	Tyr	Ser	Gly	Val	Leu	Asp	Lys	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
			100					105						110	
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
															115

<210> 46

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 可变轻链 (VL) 抗BCMA

<400> 46

Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Gly	Ala	Pro	Gly	Gln
1					5				10					15	
Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Ala	Gly
			20					25						30	
Phe	Asp	Val	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu
			35				40						45		
Leu	Ile	Tyr	Gly	Asn	Ser	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe
			50				55				60				
Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Thr	Gly	Leu
65					70					75					80
Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ser	Tyr	Asp	Ser	Ser
					85				90						95
Leu	Ser	Gly	Tyr	Val	Phe	Gly	Thr	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Leu	Gly
					100				105					110	

<210> 47
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR L1
<400> 47
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn
1 5 10
<210> 48
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR L2
<400> 48
Ser Arg Leu His Ser Gly Val
1 5
<210> 49
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR L3
<400> 49
Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly
1 5
<210> 50
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR H1
<400> 50
Asp Tyr Gly Val Ser
1 5
<210> 51
<211> 16
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR H2

<400> 51

Val	Ile	Trp	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys	Ser
1				5				10					15		

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR H3

<400> 52

Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly
1				5		

<210> 53

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VH

<400> 53

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

Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Val	Ser	Leu	Pro	Asp	Tyr
			20					25					30		

Gly	Val	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Arg	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu
		35					40					45			

Gly	Val	Ile	Trp	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys
		50				55					60				

Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ile	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu
65					70					75					80

Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Thr	Asp	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala
				85					90					95	

Lys	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		

Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser
		115				120	

<210> 54

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VL

<400> 54

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Thr	Thr	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly
1				5				10					15		
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser	Lys	Tyr
			20					25					30		
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr	Val	Lys	Leu	Leu	Ile
			35				40					45			
Tyr	His	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Asn	Leu	Glu	Gln
65					70					75				80	
Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Tyr
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Thr					
				100					105						

<210> 55

<211> 245

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> scFv

<400> 55

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Thr	Thr	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly
1				5				10					15		
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser	Lys	Tyr
			20					25					30		
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr	Val	Lys	Leu	Leu	Ile
			35				40					45			
Tyr	His	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Asn	Leu	Glu	Gln
65					70					75				80	
Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Tyr
				85					90					95	

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Ser Thr Ser Gly		
100	105	110
Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Glu Val Lys		
115	120	125
Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser		
130	135	140
Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser		
145	150	155
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile		
165	170	175
Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu		
180	185	190
Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn		
195	200	205
Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr		
210	215	220
Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser		
225	230	235
Val Thr Val Ser Ser		240
245		

<210> 56

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR L1

<400> 56

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala

1 5 10

<210> 57

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR L2

<400> 57

Ser Ala Thr Tyr Arg Asn Ser

1 5

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR L3

<400> 58

Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 59

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR H1

<400> 59

Ser Tyr Trp Met Asn

1 5

<210> 60

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR H2

<400> 60

Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 61

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR H3

<400> 61

Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 62

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VH

<400> 62

Glu	Val	Lys	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Arg	Pro	Gly	Ser
1				5				10						15	
Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20				25					30			
Trp	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35				40					45				
Gly	Gln	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gly	Lys	Phe
	50				55				60						
Lys	Gly	Gln	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
65				70					75					80	
Met	Gln	Leu	Ser	Gly	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys
			85					90					95		
Ala	Arg	Lys	Thr	Ile	Ser	Ser	Val	Val	Asp	Phe	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp
		100					105					110			
Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
		115					120								

<210> 63

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VL

<400> 63

Asp	Ile	Glu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Lys	Phe	Met	Ser	Thr	Ser	Val	Gly
1				5				10						15	
Asp	Arg	Val	Ser	Val	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asn	Val	Gly	Thr	Asn
			20				25					30			
Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Pro	Leu	Ile
		35				40					45				
Tyr	Ser	Ala	Thr	Tyr	Arg	Asn	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly
	50				55				60						
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Thr	Asn	Val	Gln	Ser
65				70					75					80	
Lys	Asp	Leu	Ala	Asp	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Arg	Tyr	Pro	Tyr
			85					90					95		

Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 64

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 64

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 65

<211> 245

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> scFv

<400> 65

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Gln Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser
130 135 140

Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys
145 150 155 160

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys

<210> 69

<211> 735

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>编码scFv的序列

<400> 69

```

gacatccaga tgacccagac cacctccagc ctgagcgcca gcctgggcca ccgggtgacc 60
atcagctgcc gggccagcca ggacatcagc aagtacctga actggtatca gcagaagccc 120
gacggcaccg tcaagctgct gatctaccac accagccggc tgcacagcgg cgtgcccagc 180
cggttttagcg gcagcggctc cggcaccgac tacagcctga ccatctccaa cctggaacag 240
gaagatatcg ccacctactt ttgccagcag ggcaacacac tgccctacac ctttggcggc 300
ggaacaaagc tggaaatcac cggcagcacc tccggcagcg gcaagcctgg cagcggcgag 360
ggcagcacca agggcgaggt gaagctgcag gaaagcgccc ctggcctggg ggccccccagc 420
cagagcctga gcgtgacctg caccgtgagc ggctgagcc tgcccgacta cggcgtgagc 480
tggtatccggc agccccccag gaagggcctg gaatggctgg gcgtgatctg gggcagcgag 540
accacctact acaacagcgc cctgaagagc cggctgacca tcatcaagga caacagcaag 600
agccaggtgt tcctgaagat gaacagcctg cagaccgacg acaccgccat ctactactgc 660
gccaagcact actactacgg cggcagctac gccatggact actggggcca gggcaccagc 720
gtgaccgtga gcagc 735

```

<210> 70

<211> 327

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> IgG4 Fc

<300>

<308> Uniprot P01861

<309> 1986-07-21

<400> 70

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1           5           10           15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
          20          25          30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
          35          40          45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
          50          55          60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65          70          75          80

```

Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
				85					90					95	
Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro
				100				105					110		
Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys
				115				120					125		
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
				130				135					140		
Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
145					150					155					160
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe
				165						170				175	
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
				180					185					190	
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu
				195				200					205		
Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
				210				215				220			
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys
225					230					235					240
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
				245						250				255	
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
				260					265					270	
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
				275				280					285		
Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
				290				295				300			
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
305					310					315					320
Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys									
				325											

<210> 71

<211> 326

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<223> IgG2 Fc

<300>

<308> Uniprot P01859

<309> 1986-07-21

<400> 71

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70				75					80	
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85					90					95		
Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
			100					105					110		
Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
		115					120					125			
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
	130					135					140				
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
145				150					155					160	
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn
			165					170					175		
Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp
		180						185					190		
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro
	195					200					205				
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
	210					215					220				
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
225				230					235					240	
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
			245					250					255		
Ser	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
		260					265						270		
Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
		275					280					285			

Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
290						295					300				
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
305						310				315					320
Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
						325									

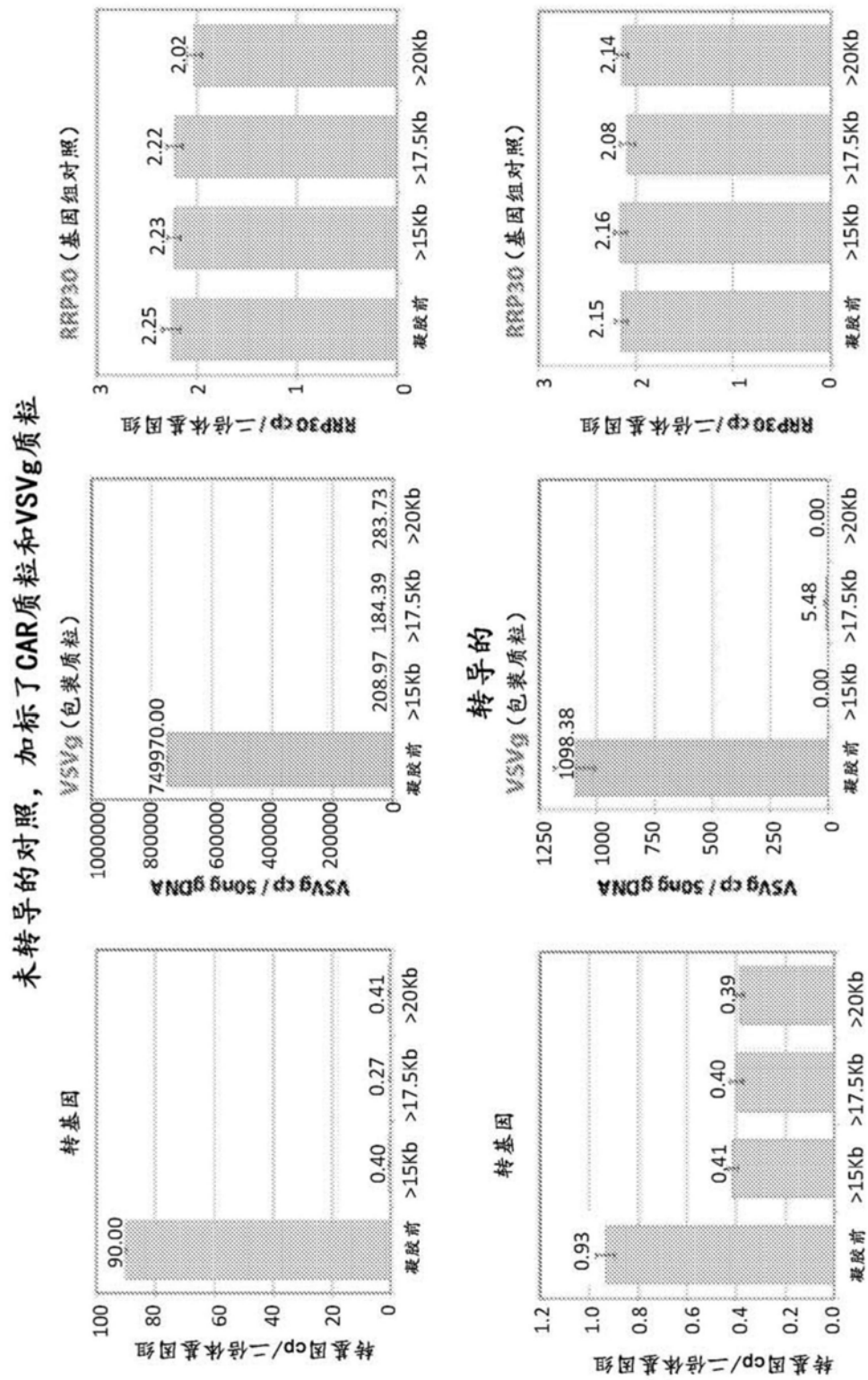


FIG.1

FIG. 2B

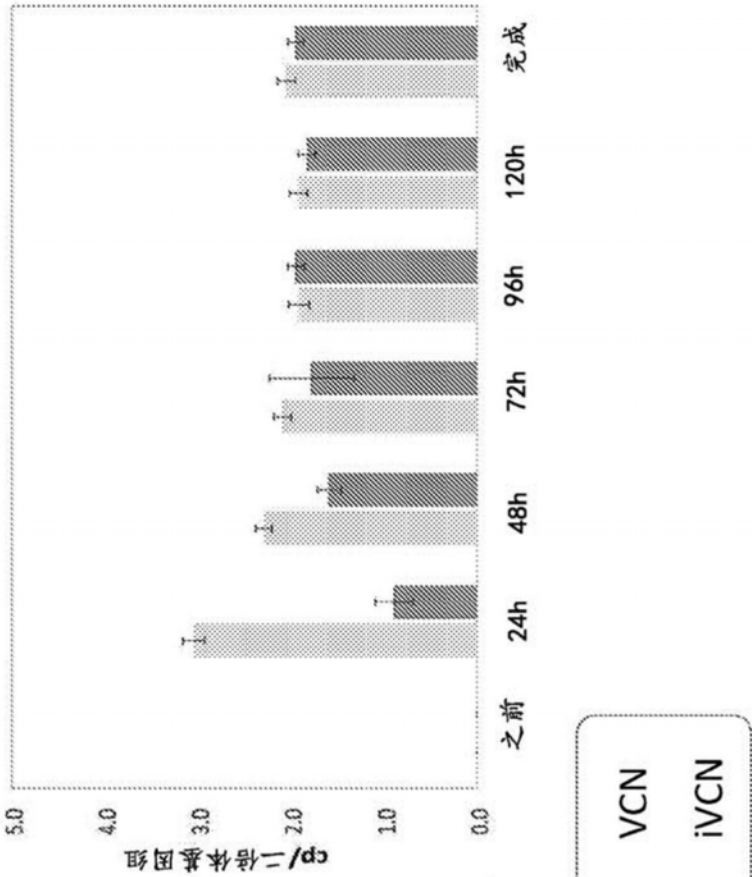
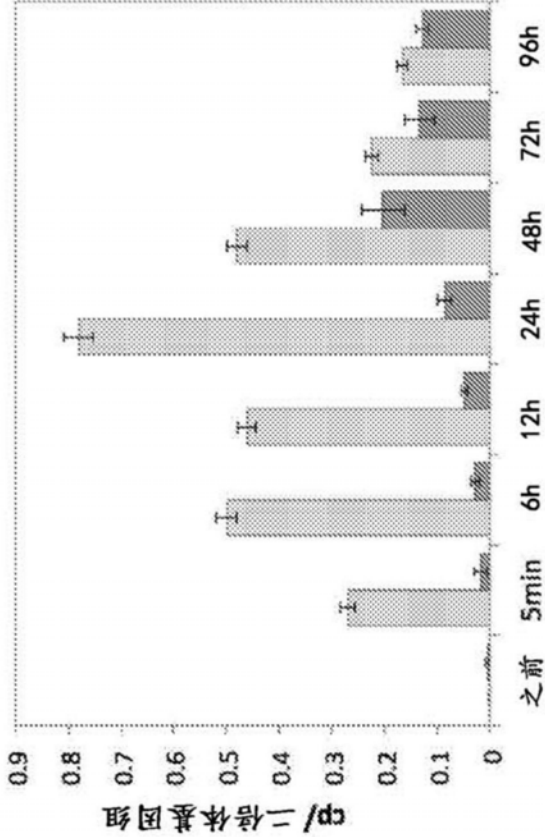


FIG. 2A



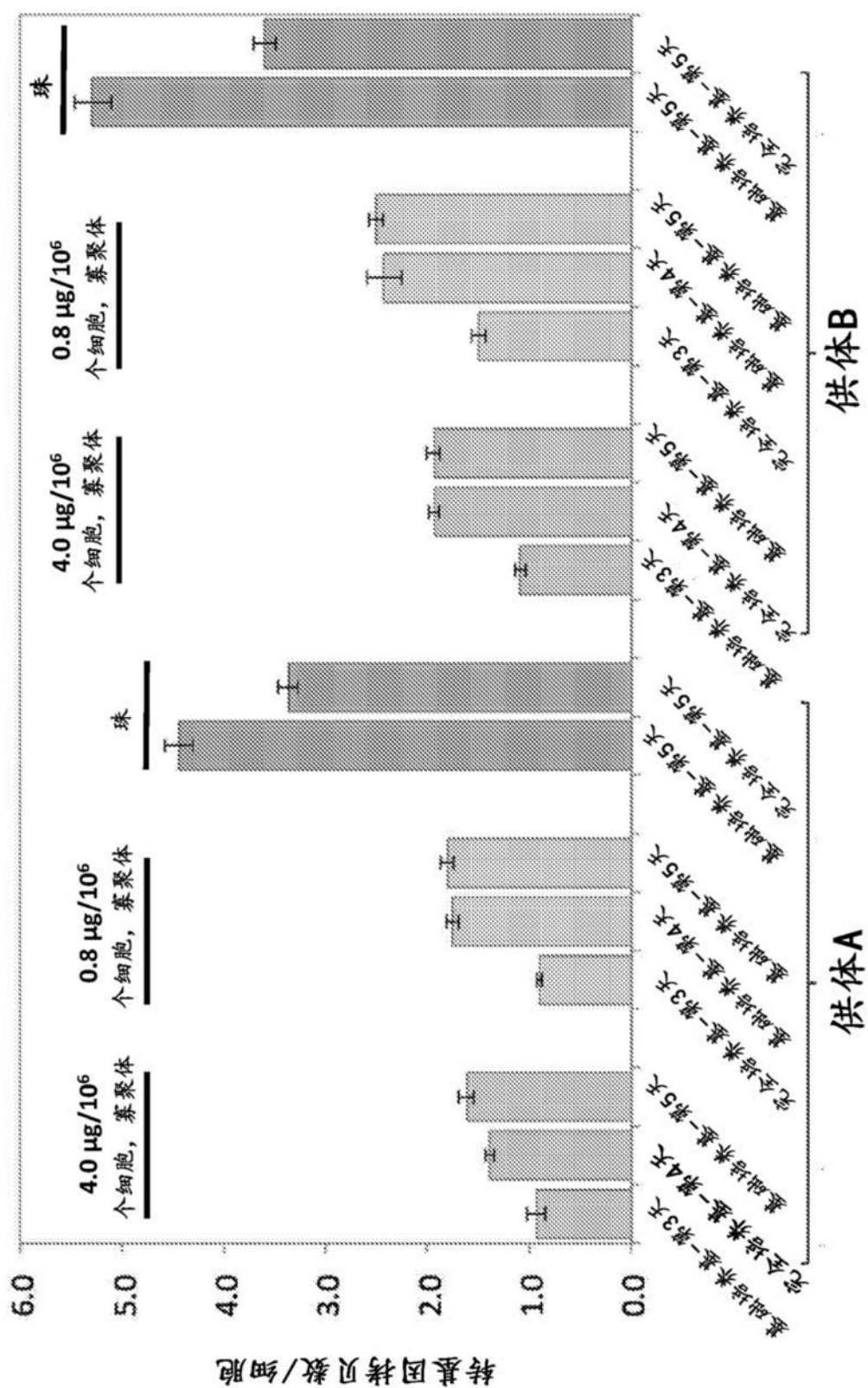


FIG. 3A

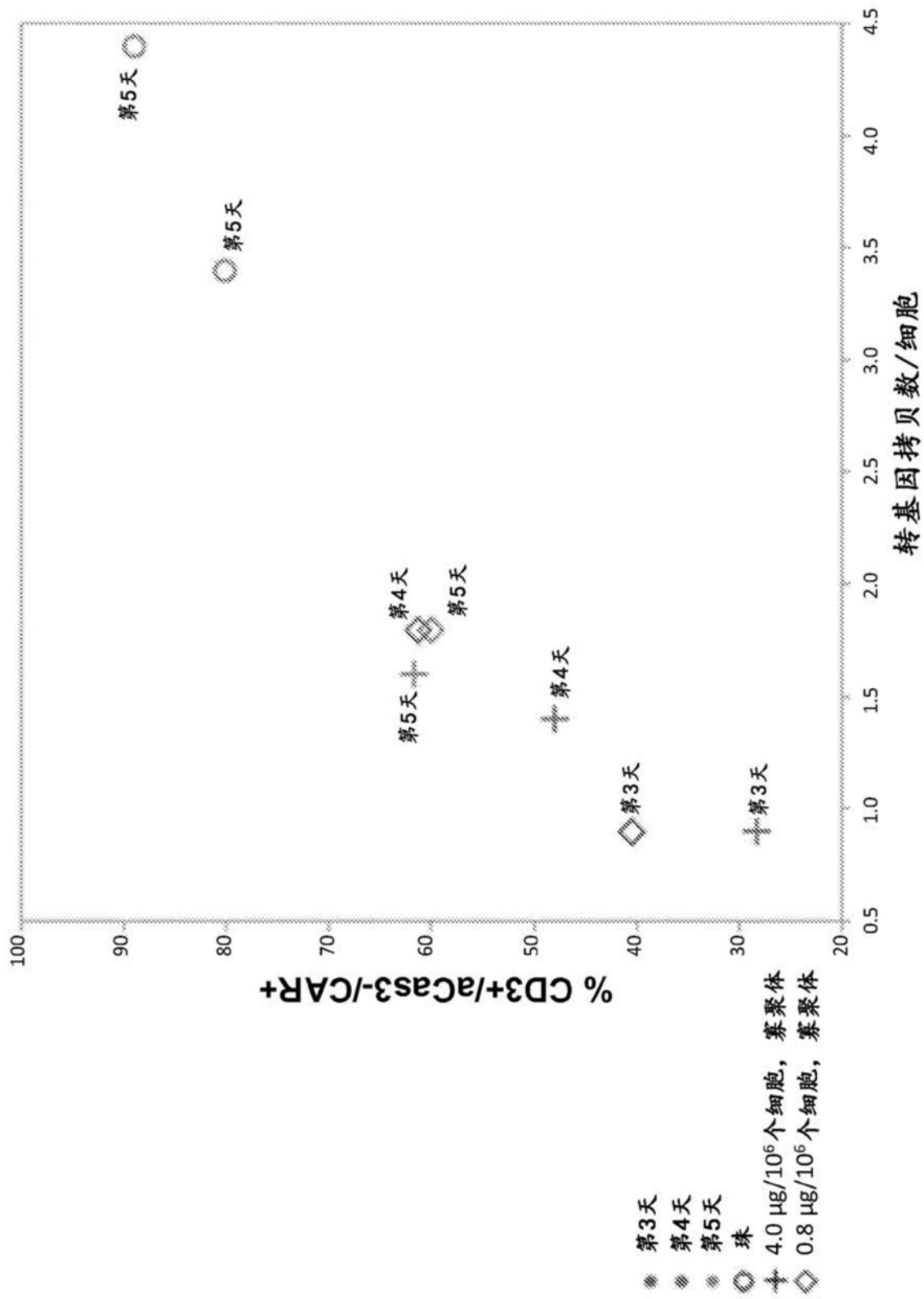


FIG. 3B

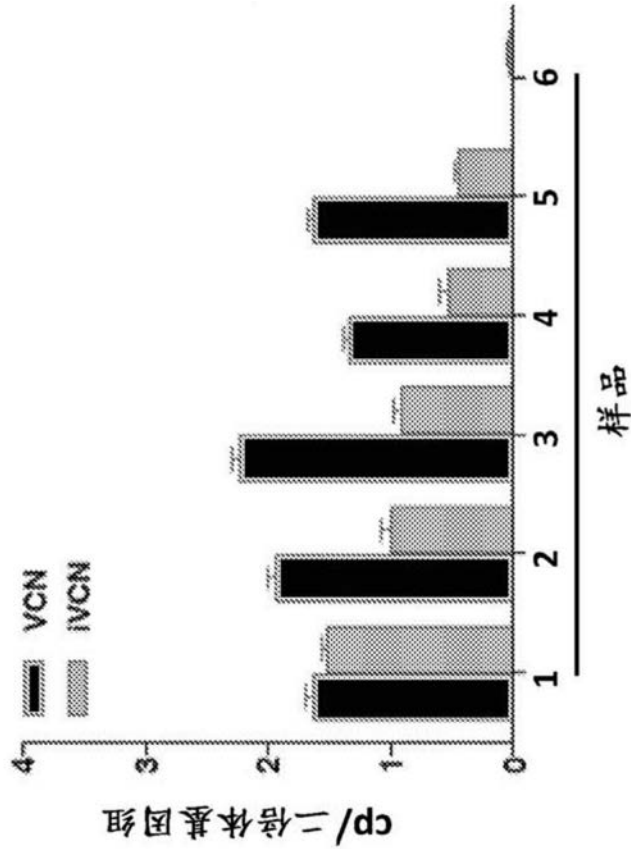


FIG. 4A

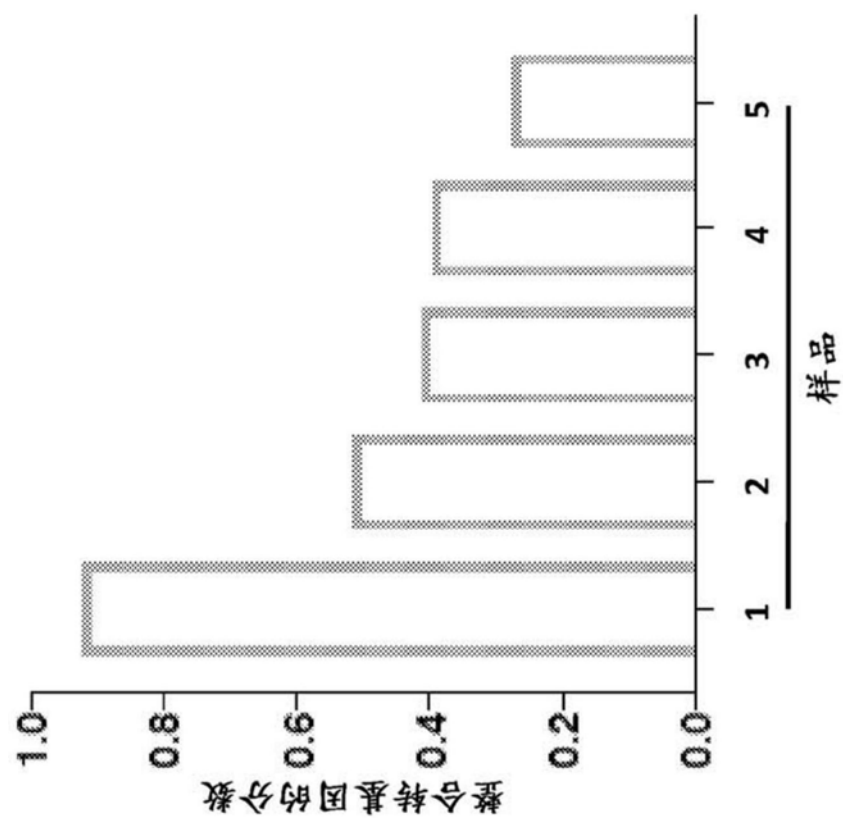


FIG.4B

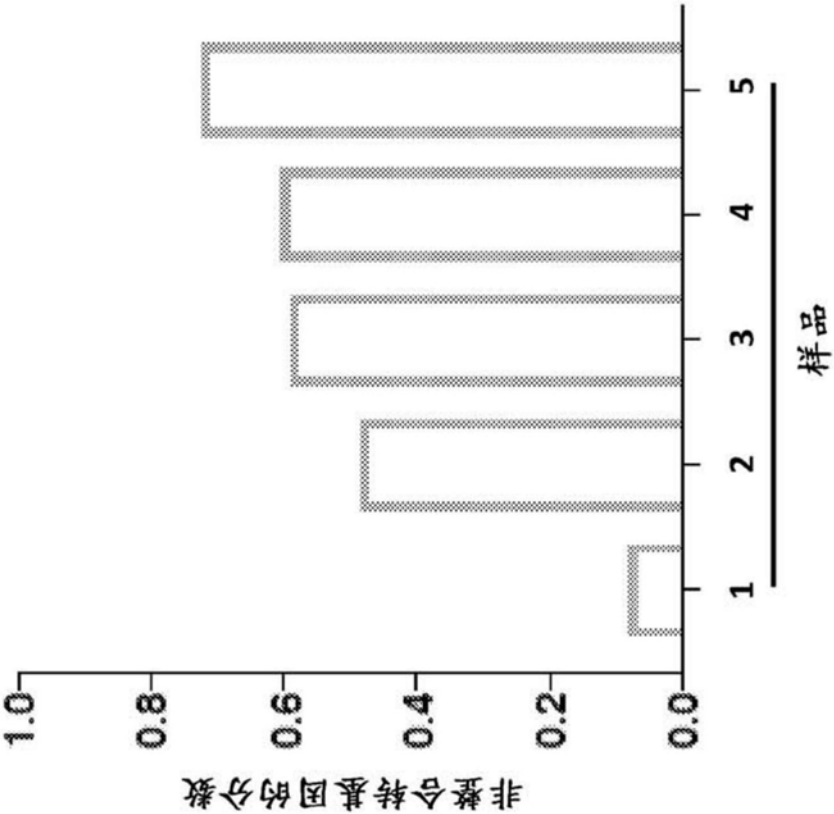


FIG.4C

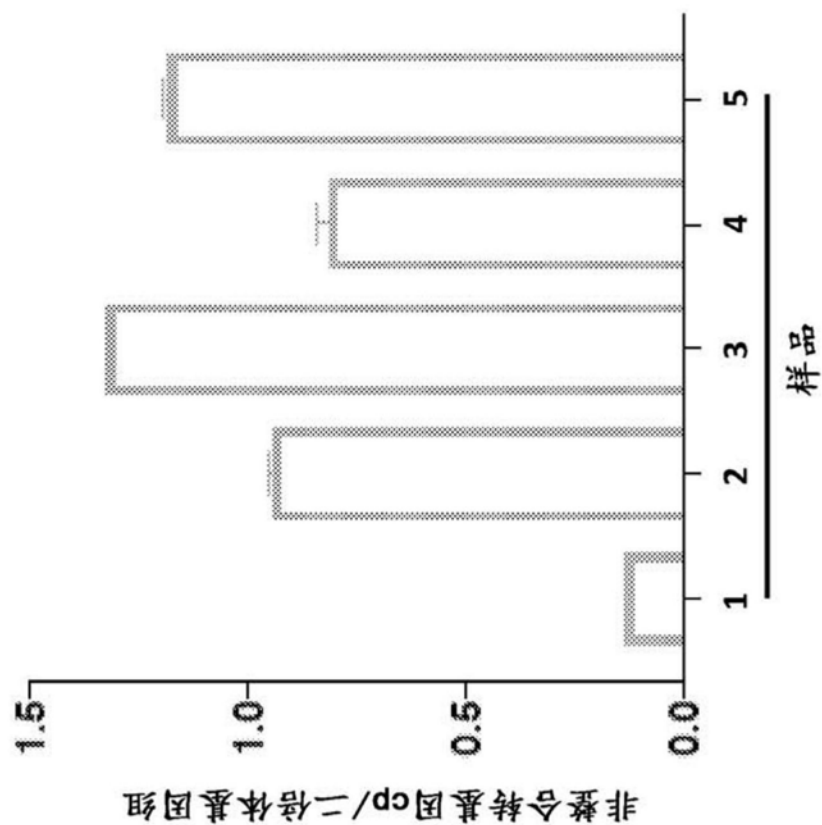


FIG.4D

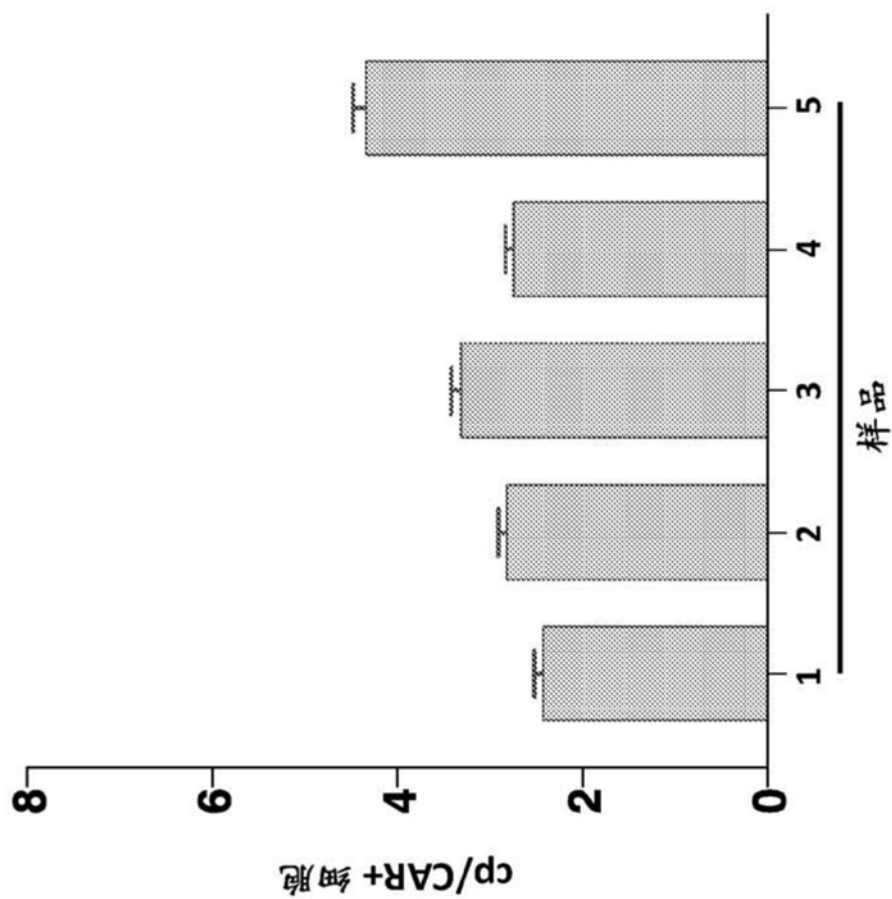


FIG. 4E

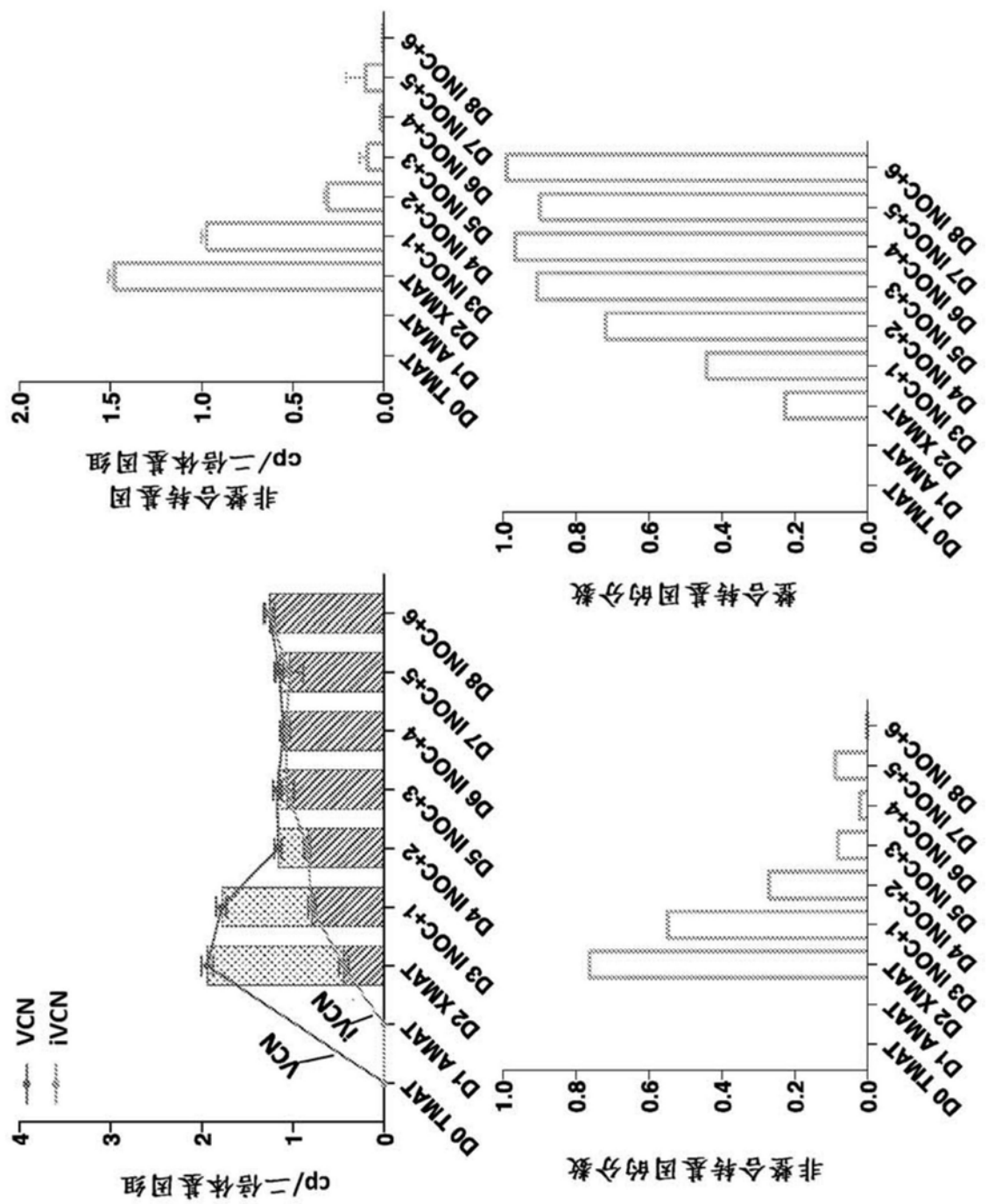


FIG.5

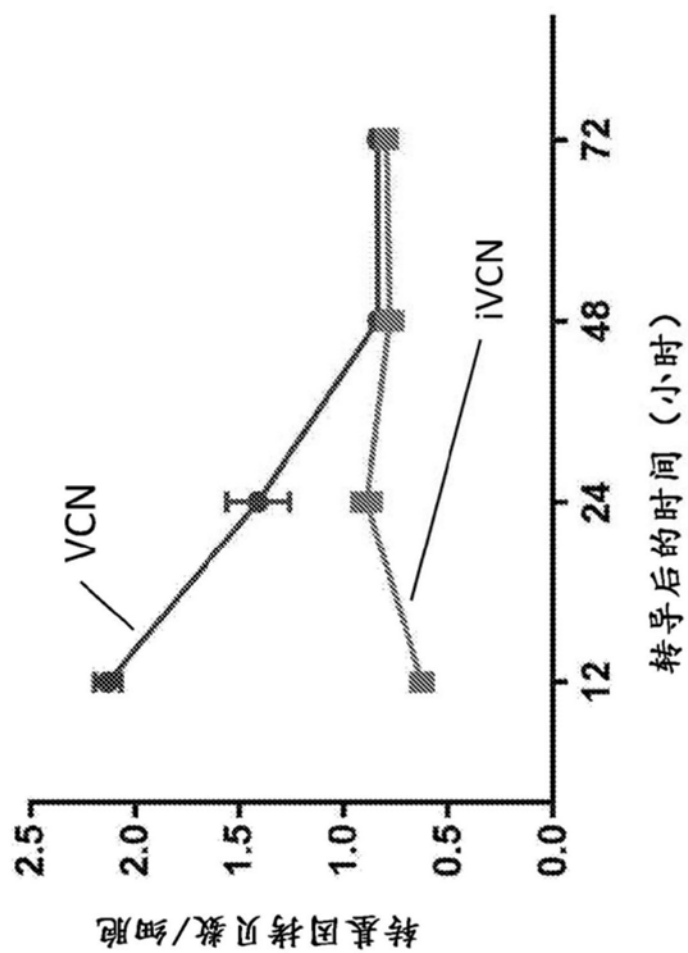


FIG.6

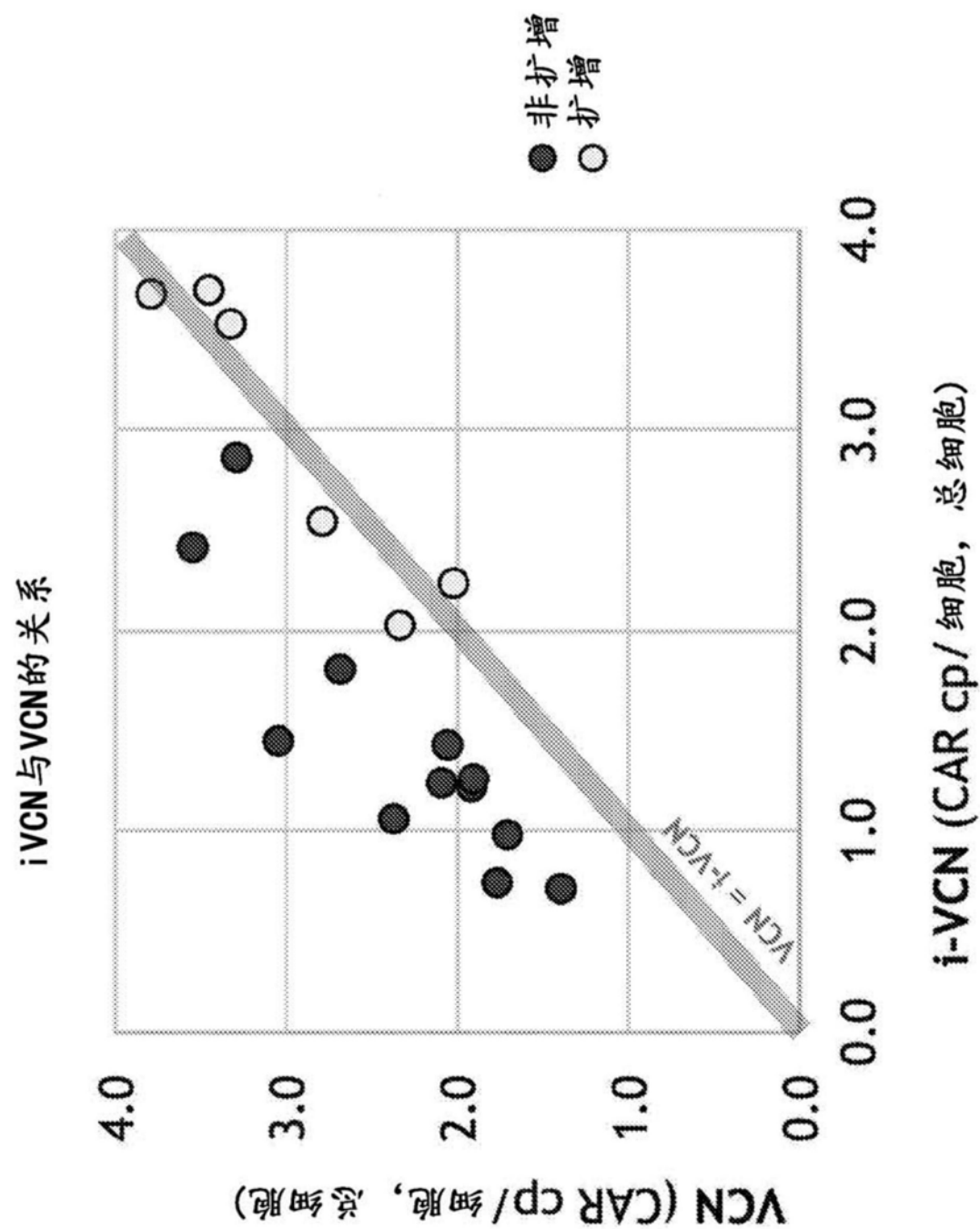


FIG. 7A

FIG. 7B

VCN与CD3+CAR+%的关系

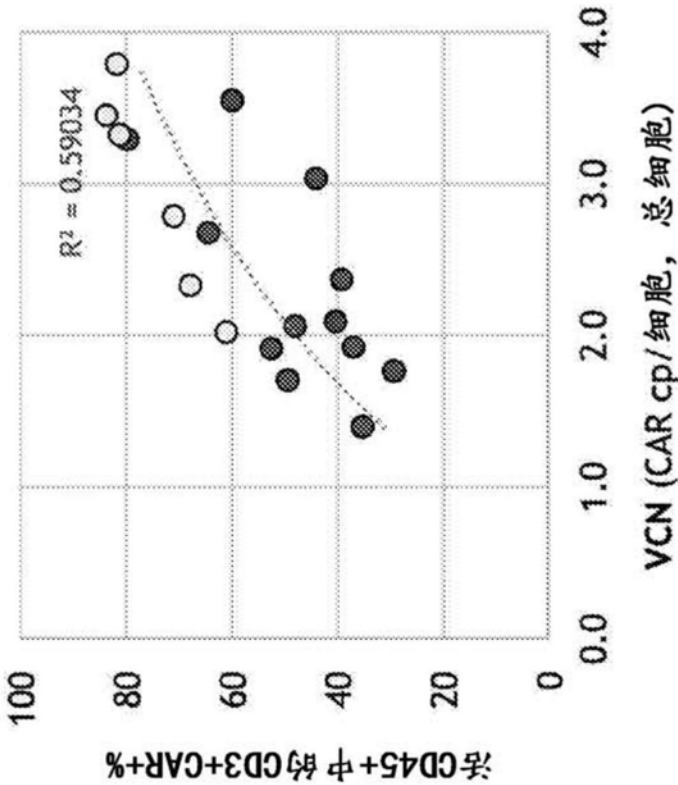


FIG. 7C

iVCN与CD3+CAR+%的关系

