

用于治疗与 CD20 相关的疾病的融合蛋白

相关申请的交叉引用

本申请基于申请号为 PCT/CN2023/109110 的国际专利申请提出，并要求所述国际专利申
5 请的优先权，所述国际专利申请的全部内容在此引入本申请作为参考。

技术领域

本公开总体上涉及融合蛋白，例如特异性靶向 CD20 的 CAR。进一步提供了包含这种
CAR 的免疫反应细胞，和使用这种 CAR 和细胞治疗肿瘤和自身免疫病的方法。

10

背景技术

嵌合抗原受体（CAR）是重定向 T 细胞对抗原或其表位特异性的人工分子，这些抗原或
表位在不同疾病中是不同的。CAR 构建体通常包括胞外抗原结合结构域，间隔区，跨膜结构
域和胞内信号传导结构域。由于 CAR 结构的复杂性，需要根据抗原对其进行优化。因此，有
15 必要针对特定抗原开发最佳 CAR。

发明内容

本公开提供了对于细胞治疗具有最佳性质的新型融合蛋白。具体地，本公开涉及具有特
定结构的 CAR，其允许所述 CAR 将抗原结合结构域定位在距靶表位的一定距离处，该距离
20 使所述 CAR 能有效地与靶细胞相互作用。

在一个方面，本公开提供了一种融合蛋白，其包含胞外抗原结合结构域、跨膜结构域、
位于胞外抗原结合结构域和跨膜结构域之间的间隔区、和胞内结构域，其中：a) 所述胞外抗
原结合结构域能够特异性地与包含 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 3 的氨基酸
25 序列的参比抗体结合 CD20 上的相同表位；b) 所述间隔区由来自 CD28 的铰链结构域或来自
免疫球蛋白的铰链结构域组成，其中由来自免疫球蛋白的铰链结构域组成的间隔区的长度为
12、13、14 或 15 个氨基酸；和 c) 所述跨膜结构域包含来自 CD28 的跨膜结构域。

在一个方面，本公开提供了一种融合蛋白，其包含胞外抗原结合结构域、跨膜结构域、
位于胞外抗原结合结构域和跨膜结构域之间的间隔区、和胞内信号传导结构域，其中：a) 所
述胞外抗原结合结构域能够特异性地与包含 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 3
30 的氨基酸序列的参比抗体结合 CD20 上的相同表位；b) 所述间隔区由来自 CD28 的铰链结构

域或来自免疫球蛋白的铰链结构域组成，其中由来自免疫球蛋白的铰链结构域组成的间隔区的长度为 12、13、14 或 15 个氨基酸；c) 所述跨膜结构域包含来自 CD28 的跨膜结构域；以及 d) 所述胞内信号传导结构域包含初级胞内信号传导结构域和位于所述跨膜结构域和所述初级胞内信号传导结构域之间的共刺激信号传导结构域，其中所述共刺激信号传导结构域包含
5 CD137 的信号传导结构域，所述初级胞内信号传导结构域包含 CD3 ζ 的胞质信号传导结构域。

在一个方面，胞外抗原结合结构域包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL)。在一个方面，VH 包含分别含有 SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7 和 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，VL 包含分别含有 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10 和 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。在一个方面，VH 包含分别含有 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 16 的氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，VL 包含分别含有 SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19 的氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。在一个方面，VH 包含分别含有 SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23 和 SEQ ID NO: 24 的氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，VL 包含分别含有 SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26 和 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。在一个方面，
10 VH 包含与 SEQ ID NO: 4 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列，VL 包含与 SEQ ID NO: 5 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列。在一个方面，VH 包含与 SEQ ID NO: 12 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列，VL 包含与 SEQ ID NO: 13 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列。在一个方面，VH 包含与 SEQ ID NO: 20 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列，VL 包含与 SEQ ID NO: 21 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列。在一个方面，VH 包含 SEQ
20 ID NO: 4 的氨基酸序列，VL 包含 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列。在一个方面，VH 包含 SEQ ID NO: 12 的氨基酸序列，VL 包含 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列。在一个方面，VH 包含 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列，VL 包含 SEQ ID NO: 21 的氨基酸序列。

在一个方面，胞外抗原结合结构域是 scFv。在一个方面，VH 通过其 C 末端经由柔性多肽接头与 VL 的 N 末端融合。在一个方面，胞外抗原结合结构域包含 SEQ ID NO: 1、SEQ ID
25 NO: 2 或 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列。

在一个方面，间隔区由来自 CD28 的铰链结构域组成。在一个方面，间隔区由与 SEQ ID NO: 30 具有 90% 序列同一性的氨基酸序列组成。在一个方面，间隔区由 SEQ ID NO: 30 的氨基酸序列组成。

在一个方面，间隔区由来自 IgG4 的铰链结构域组成，其中由来自 IgG4 的铰链结构域组成的间隔区的长度为 12 个氨基酸。在一个方面，间隔区由与 SEQ ID NO: 31 具有 90% 序列同一性的氨基酸序列组成。在一个方面，间隔区由 SEQ ID NO: 31 的氨基酸序列组成。
30

在一个方面，跨膜结构域包含与 SEQ ID NO: 33 具有 90% 序列同一性的氨基酸序列。在一个方面，跨膜结构域包含 SEQ ID NO: 33 的氨基酸序列。

在一个方面，胞内信号传导结构域包含初级胞内信号传导结构域。在一个方面，初级胞内信号传导结构域包含 CD3 ζ 的胞质信号传导结构域。在一个方面，初级胞内信号传导结构域包含与 SEQ ID NO: 35 具有 90%序列同一性的氨基酸序列。在一个方面，初级胞内信号传导结构域包含 SEQ ID NO: 35 的氨基酸序列。

5 在一个方面，胞内信号传导结构域包含位于跨膜结构域和初级胞内信号传导结构域之间的共刺激信号传导结构域。在一个方面，共刺激信号传导结构域包含选自 CD27、CD28、CD137、OX40、CD30、CD40、CD3、HVEM、ICOS、Myd88、LFA-1、ICOS、CD2、CD7、NKG2C、B7-H3、CD83 的配体及其组合的蛋白的信号传导结构域。在一个方面，共刺激信号传导结构域包含 CD137 的信号传导结构域。在一个方面，共刺激信号传导结构域包含与 SEQ ID NO: 10 34 具有 90%序列同一性的氨基酸序列。在一个方面，共刺激信号传导结构域包含 SEQ ID NO: 34 的氨基酸序列。

在一个方面，a) 胞外抗原结合结构域能够特异性地与包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列的参比抗体结合 CD20 上的相同表位；b) 间隔区由来自 CD28 的铰链结构域组成；c) 跨膜结构域包含来自 CD28 的跨膜结构域；d) 胞内信号传导结构域包含 CD137 的信号传导结构域和 CD3 ζ 的胞质信号传导结构域。在一个方面，a) 胞外抗原结合结构域包含 VH 和 VL，其中 VH 包含分别含有 SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7 和 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，且 VL 包含分别含有 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10 和 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；b) 间隔区由 SEQ ID NO: 30 的氨基酸序列组成；c) 跨膜结构域包含 SEQ ID NO: 33 的氨基酸序列；d) 胞内信号传导结构域包含 SEQ ID NO: 20 34 和 SEQ ID NO: 35 的氨基酸序列。在一个方面，融合蛋白包含 SEQ ID NO: 36 的氨基酸序列。

在一个方面，a) 胞外抗原结合结构域能够特异性地与包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列的参比抗体结合 CD20 上的相同表位；b) 间隔区由来自 IgG4 的铰链结构域组成，其中由来自 IgG4 的铰链结构域组成的间隔区的长度为 12 个氨基酸；c) 跨膜结构域包含来自 CD28 的跨膜结构域；d) 胞内信号传导结构域包含 CD137 的信号传导结构域和 CD3 ζ 的胞质信号传导结构域。在一个方面，a) 胞外抗原结合结构域包含 VH 和 VL，其中 VH 包含分别含有 SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7 和 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，，且 VL 包含分别含有 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10 和 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；b) 间隔区由 SEQ ID NO: 31 的氨基酸序列组成；c) 跨膜结构域包含 SEQ ID NO: 33 的氨基酸序列；d) 胞内信号传导结构域包含 SEQ ID NO: 34 和 SEQ ID NO: 35 的氨基酸序列。在一个方面，融合蛋白包含 SEQ ID NO: 38 的氨基酸序列。

在一个方面，a) 胞外抗原结合结构域能够特异性地与包含 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的参比抗体结合 CD20 上的相同表位；b) 间隔区由来自 IgG4 的铰链结构域组成，其中由来自 IgG4 的铰链结构域组成的间隔区的长度为 12 个氨基酸；c) 跨膜结构域包含来自 CD28 的

跨膜结构域；d) 胞内信号传导结构域包含 CD137 的信号传导结构域和 CD3 ζ 的胞质信号传导结构域。在一个方面，a) 胞外抗原结合结构域包含 VH 和 VL，其中 VH 包含分别含有 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 16 的氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，且 VL 包含分别含有 SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19 的氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；b) 间隔区由 SEQ ID NO: 31 的氨基酸序列组成；c) 跨膜结构域包含 SEQ ID NO: 33 的氨基酸序列；d) 胞内信号传导结构域包含 SEQ ID NO: 34 和 SEQ ID NO: 35 的氨基酸序列。在一个方面，融合蛋白包含 SEQ ID NO: 37 的氨基酸序列。

本公开还提供了编码如本文所述的融合蛋白的分离的核酸。

本公开还提供了包含如本文所述的核酸的载体。在一个方面，载体是病毒载体。在一个方面，病毒载体是逆转录病毒、慢病毒、腺病毒或腺相关病毒载体。

本公开还提供了包含如本文所述的融合蛋白、分离的核酸或载体的细胞。在一个方面，细胞是淋巴细胞。在一个方面，细胞是 NK 细胞或 T 细胞。

本公开还提供了药物制剂，其包含如本文所述的融合蛋白或细胞以及药学上可接受的载体。

本公开还提供了一种治疗个体中的与 CD20 相关的疾病或病症的方法，其包括向个体施用如本文所述的融合蛋白、分离的核酸、载体、细胞或药物制剂。在一个方面，所述个体患有复发性的或难治性的与 CD20 相关的疾病或病症，或之前接受过至少一个包含针对 CD20 的药物的方案的治疗。还提供了如本文所述的融合蛋白、分离的核酸、载体、细胞或药物制剂在制备用于治疗与 CD20 相关的疾病或病症的药物中的用途。本公开还提供了如本文所述的融合蛋白、分离的核酸、载体、细胞或药物制剂，其用作药物。在一个方面，所述疾病或病症是癌症或自身免疫病。在一个方面，癌症选自白血病、淋巴瘤、肺癌、肝癌、黑素瘤、乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、肾细胞癌、卵巢癌、成神经细胞瘤和横纹肌肉瘤。在一个方面，癌症是白血病或淋巴瘤。在一个方面，自身免疫性疾病选自类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、多发性硬化、韦格纳病 (Wegener's disease)、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、特发性血小板减少性紫癜、血栓性血小板减少性紫癜、自身免疫性血小板减少症、银屑病、IgA 肾病、IgM 多发性神经病、重症肌无力、ANCA 相关血管炎、糖尿病、雷诺综合征 (Reynaud's syndrome)、干燥综合征 (Sjogren's syndrome)、视神经脊髓炎和肾小球肾炎。

附图说明

图 1A 显示不同靶细胞的 CD20 表达程度。图 1B 描述了 Jurkat 细胞中激活测定的结果。

图 2A 至 2C 显示了以 CD20^{KO}、CD20^{lo} 或 CD20^{WT} Raji 细胞刺激 48 小时后，原代 T 细胞中 CD25、CD69 和 Ki67 阳性群体的百分比。

图 3A 至 3B 显示了不同靶细胞系刺激下，转导了 CAR 的 T 细胞分泌的 IFN- γ 和 IL-2。

图 4 显示了 T 细胞对不同靶细胞系的 24 小时杀伤指数。

具体实施方式

5 I. 定义

除非另有限定，本文所用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的那些普通技术人员通常理解的相同的含义。

术语单数形式（“a”和“an”）是指一个或多个（即，至少一个）该冠词的语法对象。举例来说，“组件”意指一个组件或多个组件。

10 如本文所用，术语“包含”的各种词性形式（comprising、comprises）与“包括”的各种词性形式（including、includes）”或“含有”的各种词性形式（containing、contains）同义，并且是包含性的或开放式的，并且不排除另外的、未列举的成员、要素或方法步骤。术语“包含”的各种词性形式（comprising、comprises）也涵盖了“由...组成（consisting of）”的方案。

15 术语“抗体”在本文中以最广泛的含义使用并且涵盖各种抗体结构，包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体（例如双特异性抗体）、完整抗体和抗体片段，只要它们表现出所需的抗原结合活性。

20 术语“全长抗体”、“完整抗体”和“全抗体”在本文中可互换使用，是指具有与天然抗体结构基本相似的结构抗体。例如，IgG 类完整抗体包含二硫键连接的两条轻链和两条重链。从 N 末端到 C 末端，每条重链具有可变结构域（VH），随后是三个恒定结构域（CH1、CH2 和 CH3），也称为重链恒定区。类似地，从 N 末端到 C 末端，每条轻链具有可变结构域（VL），随后是恒定轻链（CL）结构域，也称为轻链恒定区。抗体的重链可分为 5 种类型之一，称为 IgA、IgD、IgE、IgG 或 IgM，其中一些可进一步分为亚型，例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2。基于抗体的恒定结构域的氨基酸序列，抗体的轻链可分为两种类型之一，称为 kappa（ κ ）和 lambda（ λ ）。

25 “抗体片段”是指，包含结合抗原的完整抗体的一部分的非完整抗体的分子。抗体片段的实例包括但不限于 Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、diabody、线性抗体、单链抗体分子（例如 scFv 和 scFab）、单结构域抗体和由抗体片段形成的多特异性抗体。

30 “单链 Fv”或“scFv”是轻链（VL）和重链（VH）可变区的融合蛋白，其中 VL 和 VH 用约 10-25 个氨基酸的短接头肽连接。接头通常是柔性的，并且可以将 VH 的 N 末端与 VL 的 C 末端连接，反之亦然。尽管除去了恒定区并引入了接头，但这种蛋白保留了原始抗体的特异性。

术语“抗原结合结构域”是指包含与部分或全部抗原结合并互补的区域的抗体部分。抗原结合结构域可以由例如一个或多个抗体可变结构域（也称为抗体可变区）提供。在优选的方面，抗原结合结构域包含抗体轻链可变结构域（VL）和抗体重链可变结构域（VH）。

术语“可变区”或“可变结构域”是指参与抗体与抗原结合的抗体重链或轻链的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变区（分别为 VH 和 VL）通常具有相似的结构，每个结构域包含 4 个保守框架区（FR）和 3 个互补决定区（CDR）。在一些情况下，单个 VH 或 VL 结构域可足以赋予抗原结合特异性。此外，可使用来自结合抗原的抗体的 VH 或 VL 结构域分别筛选互补 VL 或 VH 结构域文库，分离结合该特定抗原的抗体。如本文所用，与可变区序列有关的“Kabat 编号”是指 Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)提出的编号系统。

术语“互补决定区”和“CDR”已知是指抗体可变区内的氨基酸的非连续序列，其赋予抗原结合特异性和/或结合亲和力。通常，在每个重链可变区中存在三个 CDR（HCDR1、HCDR2、HCDR3）并且在每个轻链可变区中存在三个 CDR（LCDR1、LCDR2、LCDR3）。“框架区”和“FR”指重链和轻链可变区的非 CDR 部分。下表 1 列出了分别由 Kabat、Chothia、AbM、IMGT 和 Contact 方案确定的 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的示例性位置边界。除非另有说明，本公开中所示的 CDR 的氨基酸序列根据 Kabat 确定。

表 1. 根据各种编号系统的 CDR 区

CDR	Kabat	AbM	Chothia	IMGT	Contact
HCDR1	31-35B	26-35	26-32	27-38	30-35
HCDR2	50-65	50-58	52-56	56-65	47-58
HCDR3	95-102	95-102	95-102	105-117	93-101
LCDR1	24-34	24-34	24-34	27-38	30-36
LCDR2	50-56	50-56	50-56	56-65	46-55
LCDR3	89-97	89-97	89-97	105-117	89-96

如本文所用，可互换使用的术语“特异性结合”或“结合”意指蛋白质在特异性结合条件下结合靶蛋白质的能力，使得其亲和力或亲合力至少为相同蛋白质对足够统计学大小的随机肽或多肽集合的平均亲和力或亲合力的 5 倍，但任选地至少 10、20、30、40、50、100、250 或 500 倍，或甚至至少 1000 倍。特异性结合蛋白不需要仅结合单个靶分子，而是也可以特异性结合非靶分子，如果在该靶分子和该非靶分子（例如，旁系同源物或直向同源物）之间存在构象结构的相似性。本领域技术人员明了，与在不同动物物种中具有相同功能的分子或与具有与靶分子基本上相似的表位的非靶分子的特异性结合是可能的，并且这不会损害相对于统计学上有效的独特非靶集合确定的结合特异性。因此，由于交叉反应性，多肽可以特异性结合多于一种的不同靶分子。

术语“表位”是指与抗体特异性相互作用的抗原部分 (moiety)。这样的部分 (在本文中称为表位决定簇) 通常包含或为诸如氨基酸侧链或糖侧链的元件的一部分。表位决定簇可以通过本领域已知的方法, 例如通过结晶学或通过氢-氘交换来定义。抗体分子上与表位决定簇特异性相互作用的部分的至少一个或一些通常位于 CDR 中。通常, 表位具有特定的三维结构特征和/或特定的电荷特征。一些表位是线性表位, 而另一些是构象表位。

术语“铰链”在本文中是指柔性多肽连接区, 其为所连接的侧翼多肽区提供结构柔性和间距, 并且可以由天然或合成的多肽组成。

相对于肽、多肽或抗体序列的“氨基酸序列同一性百分比 (%)”和“同源性”被定义为, 在比对序列并引入空位 (如果需要) 以获得最大百分比序列同一性后, 并且不考虑任何保守取代作为序列同一性的一部分时, 候选序列中与特定肽或多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。为了确定氨基酸序列同一性百分比, 可以用本领域技术人员已知的各种方法进行比对, 例如使用公众可获得的计算机软件, 例如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 MEGALIGN™ (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可以确定用于测量比对的适当参数, 包括在被比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。

术语“融合蛋白”是指包含来自至少两种不同蛋白质的蛋白质结构域的杂合 (例如嵌合、重组) 多肽。

术语“嵌合抗原受体”或“CAR”是指这样的融合蛋白, 其被工程化以包含两个或更多个天然存在的或工程化的氨基酸序列, 该氨基酸序列以在宿主细胞中天然不存在的方式连接在一起, 当存在于细胞表面上时, 所述融合蛋白可充当受体。本公开的 CAR 包括包含与间隔区序列连接的抗原结合结构域 (例如 scFv) 的胞外部分、跨膜结构域和一个或多个胞内信号传导结构域 (任选地含有共刺激结构域)。

如本文所用, 可互换使用的术语“胞外结构域”或“胞外域 (ectodomain)”是指位于囊泡膜外部的膜蛋白 (例如跨膜蛋白) 的区域。胞外域常包含特异性结合配体或细胞表面受体的结合结构域。术语“胞外抗原结合结构域”是指能够特异性结合抗原的胞外结构域或胞外结构域的一部分。

如本文所用, 可互换使用的术语“胞内域 (endodomain)”或“胞内结构域”或“胞质结构域”是指在一些膜蛋白 (例如跨膜蛋白) 中发现的区域, 其延伸到由细胞表面膜限定的内部空间中。在一些细胞中, 胞内域与细胞内成分相互作用且可在信号转导中起作用, 且因此在一些情况下可为胞内信号传导结构域。

本文所用的术语“跨膜结构域”是指在膜蛋白中发现的结构域, 其基本上或完全跨越脂质双分子层, 例如在生物膜 (例如哺乳动物细胞) 中或在人工构建体 (例如脂质体) 中的那些脂质双分子层。跨膜蛋白可以一次或多次穿过脂质双分子层的两层。

如本文所用, 术语“间隔区”是指能够将以下两个间隔开的部分共价连接在一起的多肽序

列（例如铰链）：融合蛋白（例如 CAR）的抗原结合结构域和跨膜结构域。

本文所用的术语“柔性多肽接头”是指连接其他肽以形成功能性蛋白质的肽。在 scFv 的上下文中，柔性多肽接头是指连接 VH 和 VL 以形成与抗原特异性结合的 scFv 的肽接头。

术语“表达”是指基于核酸分子如基因的编码序列产生多肽的过程。该过程可包括转录、
5 转录后控制、转录后修饰、翻译、翻译后控制、翻译后修饰或其任何组合。

术语“编码”是指多核苷酸（例如基因、cDNA 或 mRNA）中的特定核苷酸序列的固有特性，该特性使其可以在生物过程中充当合成其他聚合物和大分子的模板，所述聚合物和大分子具有确定的核苷酸序列（例如 rRNA、tRNA 和 mRNA）或确定的氨基酸序列以及由此产生的生物特性。因此，如果对应于基因的 mRNA 在细胞或其他生物系统中的转录和翻译可以产生蛋白质，则该基因、cDNA 或 RNA 编码该蛋白质。
10

术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”可互换使用，并且是指由通过肽键共价连接的氨基酸残基组成的化合物。多肽必须包含至少两个氨基酸，并且对可以包含在肽序列中的氨基酸的最大数目没有限制。术语“多肽”还意指多肽的表达后修饰的产物，包括但不限于糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、通过已知保护/封闭基团的衍生化、蛋白水解切割、或通过非天然存在的氨基酸的修饰。本公开的多肽的大小可以为约 3 个或更多个、5 个或更多个、10 个或更多个、20
15 个或更多个、25 个或更多个、50 个或更多个、75 个或更多个、100 个或更多个、200 个或更多个、500 个或更多个、1,000 个或更多个、或 2,000 个或更多个氨基酸。多肽可以但无需一定具有确定的三维结构。

“分离的”核酸分子是指已经从其天然环境的组分中分离的核酸分子。分离的核酸分子包括包含在通常含有该核酸分子的细胞中、但存在于染色体外或存在于与其天然染色体位置不同的染色体位置处的核酸分子。“编码融合蛋白的分离的多核苷酸（或核酸）”是指编码融合蛋白的一个或多个多核苷酸分子，包括在单个载体或不同载体中的此（一个或多个）多核苷酸分子，以及存在于宿主细胞中一个或多个位置处的此（一个或多个）多核苷酸分子。
20

如本文所用，术语“载体”是指能够使与其连接的另一种核酸扩增的核酸分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体以及整合到其已引入的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够指导与其可操作连接的核酸的表达。
25

术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用，并且是指已经引入了外源核酸的细胞，包括这些细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“转化细胞”，其包括原代转化细胞和由其衍生的后代，而不考虑传代次数。

术语“个体（subject or individual）”旨在包括其中可引发免疫应答的活的生物体（例如哺乳动物，人）。
30

如本文所用，“治疗（treatment）”（及其语法变化形式，诸如“治疗（treat 或 treating）”）

是指试图改变所治疗个体中疾病的自然过程的临床干预，并且可用于预防或在临床病理学过程期间进行。治疗的期望效果包括但不限于预防疾病的发生或复发、缓解症状、减轻疾病的任何直接或间接病理后果、预防转移、降低疾病进展的速率、改善或缓和疾病状态、以及缓解或改善预后。

- 5 术语“药物组合物”是指这样的制品，其形式使得包含在其中的活性成分的生物活性是有效的，并且其不包含对将施用制品的个体具有不可接受的毒性的另外的组分。药物组合物通常包含一种或多种药学上可接受的载体。“药学上可接受的载体”是指药物组合物中除活性成分以外的对个体无毒的成分。药学上可接受的载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。
- 10 活性剂（例如药物组合物）的“有效量”是指在必要的剂量和时间段内有效实现所需治疗或预防结果的量。

II. 融合蛋白

- 本公开提供了一种新的融合蛋白，其具有有利的特性，例如可生产性、稳定性、结合亲和力和生物活性、靶向效率、降低的毒性、可给予患者的扩展的剂量范围以及由此可能增强的功效。本文提供了一种融合蛋白，其包含 a) 胞外抗原结合结构域；b) 间隔区；c) 跨膜结构域；和 d) 胞内信号传导结构域。在一些实施方案中，融合蛋白是 CAR。
- 15

2.1 胞外抗原结合结构域

- 在一个方面，提供了如本文所定义的融合蛋白，其中胞外抗原结合结构域包含一种或多种抗体。在一个方面，抗体是 Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、diabody、线性抗体、单链抗体分子（例如 scFv 和 scFab）、单结构域抗体或由抗体片段形成的多特异性抗体。在具体的实施方案中，胞外抗原结合结构域包含 scFv。
- 20

- 在一个方面，胞外抗原结合结构域能够结合 CD20。在一个方面，融合蛋白能够与本领域中的任何抗 CD20 抗体（例如奥法木单抗（Ofatumumab）、奥妥珠单抗（Ofatumumab）、利妥昔单抗（Rituximab）、奥瑞利珠单抗（Ocrelizumab）、维妥珠单抗（Veltuzumab）、替伊莫单抗（Ibritumomab）、托西莫单抗（Tositumumab）、奥尼妥单抗（Odronextamab）、乌妥昔单抗（Ublituximab）、Leu16、IF5、1.5.3）结合 CD20 上的相同表位。在一个方面，胞外抗原结合结构域能够与包含 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列的参比抗体结合 CD20 上的相同表位。
- 25

- 在一个方面，胞外抗原结合结构域包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL）。在一个方面，VH 包含 SEQ ID NO: 4 中所含有的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，VL 包含 SEQ ID NO: 5 中所含有的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。在一个方面，VH 包含 SEQ ID NO: 12 中所含有的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，VL 包含 SEQ ID NO: 13 中所含有的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。在一个方面，VH 包含 SEQ ID NO: 20 中所含有的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，VL 包含 SEQ
- 30

ID NO: 21 中所含有的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一个方面，VH 包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，其分别含有 SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7 和 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列或分别由其组成；VL 包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其分别含有 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10 和 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列或分别由其组成。

5 在一个方面，VH 包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，其分别含有 EQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 16 的氨基酸序列或分别由其组成；VL 包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其分别含有 SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19 的氨基酸序列或分别由其组成。在一个方面，VH 包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，其分别含有 SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23 和 SEQ ID NO: 24 的氨基酸序列或分别由其组成；VL 包含 LCDR1、LCDR2 和
10 LCDR3，其分别含有 SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26 和 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列或分别由其组成。

在一个方面，VH 包含与 SEQ ID NO: 4 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或 98%序列同一性的氨基酸序列或由其组成，VL 包含与 SEQ ID NO: 5 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或 98%序列同一性的氨基酸序列或由其组成。

15 在一个方面，VH 包含与 SEQ ID NO: 12 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或 98%序列同一性的氨基酸序列或由其组成，VL 包含与 SEQ ID NO: 13 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或 98%序列同一性的氨基酸序列或由其组成。在一个方面，VH 包含与 SEQ ID NO: 20 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或 98%序列同一性的氨基酸序列或由其组成，VL 包含与 SEQ ID NO: 21 具有至少 90%、
20 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或 98%序列同一性的氨基酸序列或由其组成。在一个方面，VH 包含 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列或由其组成，VL 包含 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列或由其组成。在一个方面，VH 包含 SEQ ID NO: 12 的氨基酸序列或由其组成，VL 包含 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列或由其组成。在一个方面，VH 包含 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列或由其组成，VL 包含 SEQ ID NO: 21 的氨基酸序列或由其组成。

25 在一个方面，VH 和 VL 经由柔性多肽接头连接。在一个方面，VH 通过其 N 末端经由柔性多肽接头与 VL 的 C 末端融合（L-H）。在一个方面，VL 通过其 N 末端经由柔性多肽接头与 VH 的 C 末端融合（H-L）。在一个方面，柔性多肽接头是(G₄S)_n(SEQ ID NO: 41)、(SG₄)_n(SEQ ID NO: 42)或 G₄(SG₄)_n(SEQ ID NO: 43)，其中“n”是 1、2、3、4、5、6、7 或 8，特别是 3。在一个方面，柔性多肽接头包含 SEQ ID NO: 28 的氨基酸序列或由其组成。在一个方面，
30 scFv 包含与 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 3 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的氨基酸序列或由其组成。在一个方面，ScFv 包含 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列或由其组成。表 2 提供了示例性 scFv 的 SEQ ID NO。

表 2. 示例性 scFv 的 SEQ ID NO

编号	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3	VH	VL	接头
Ofa-scFv	6	7	8	9	10	11	4	5	28
Obin-scFv	14	15	16	17	18	19	12	13	28
RTX-scFv	22	23	24	25	26	27	20	21	28

2.2 间隔区

间隔区或铰链是指使胞外抗原结合结构域离开细胞表面以允许细胞接触、抗原结合和激活的区域。CAR 中的间隔区位于跨膜结构域和胞外抗原结合结构域之间。用于 CAR 中的示例性铰链区包括衍生自 I 型膜蛋白如 CD8 α 、CD4、CD28 和 CD7 的胞外区的铰链区，其可以是来自这些蛋白的野生型铰链区或可以是被修饰的。在一个方面，间隔区由来自 CD28 的铰链结构域组成。在一个方面，间隔区由来自野生型 CD28 的铰链结构域（或茎区）组成。在一个方面，间隔区由与 SEQ ID NO: 30 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列组成。在一个方面，间隔区由 SEQ ID NO: 30 的氨基酸序列组成。

在一个方面，融合蛋白中的间隔区包括免疫球蛋白恒定区的至少一部分或其变体或修饰形式，如铰链区。在一个方面，间隔区包括 IgG 铰链的至少一部分。在一个方面，间隔区可以是含有一个或多个来源于 IgG1、IgG2、IgG3 和/或 IgG4 的铰链片段的嵌合多肽。在一个方面，间隔区可以是含有一个或多个衍生自 IgG4 的铰链片段的嵌合多肽。在一个方面，间隔区由长度为 11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个氨基酸残基的氨基酸序列组成。在一些实施方案中，间隔区由长度为 12-15 个氨基酸残基的氨基酸序列组成。在一个优选的实施方案中，间隔区由长度为 12 个氨基酸残基的氨基酸序列组成。在一个方面，间隔区由与 SEQ ID NO: 31 的氨基酸序列至少约 90% 同一的氨基酸序列组成。在一个具体的实施方案中，间隔区由 SEQ ID NO: 31 的氨基酸序列组成。

2.3 跨膜结构域

在一个方面，提供了如本文所定义的融合蛋白，其中跨膜结构域可以从天然存在的蛋白质或合成的、非天然存在的蛋白质区段获得，例如在细胞膜中热力学稳定的疏水性蛋白质区段。在一个方面，蛋白质区段为至少约 20 个氨基酸，例如至少 18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 或更多个氨基酸。

在一个方面，本文提供的跨膜结构域来源于 I 型单次跨膜蛋白。在一个方面，来自多次跨膜蛋白的跨膜结构域也可适用于本文所述的融合蛋白。多次跨膜蛋白可包含复杂的（至少 2、3、4、5、6、7 或更多个） α 螺旋或 β 片层结构。在一个方面，多次跨膜蛋白的 N 末端和 C 末端存在于脂质双分子层的相对侧，例如，蛋白质的 N 末端存在于脂质双分子层的细胞质侧，且蛋白质的 C 末端存在于细胞外侧。

在一个方面，本文提供的跨膜结构域可以包含跨膜区和位于跨膜结构域的 C 末端侧的胞

质区。跨膜结构域的胞质区可包含三个或更多个氨基酸，并且在一些实施方案中，有助于跨膜结构域在脂质双分子层中的定向。在一个方面，一个或多个半胱氨酸残基存在于跨膜结构域的跨膜区。在一个方面，一个或多个半胱氨酸残基存在于跨膜结构域的胞质区。在一个方面，跨膜结构域的胞质区包含带正电荷的氨基酸。在一个方面，跨膜结构域的胞质区包含氨基酸精氨酸、丝氨酸和赖氨酸。

在一个方面，跨膜结构域的跨膜区包含疏水性氨基酸残基。在一个方面，本文提供的 CAR 的跨膜结构域包含人工疏水序列。例如，苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体可以存在于跨膜结构域的 C 末端。在一个方面，跨膜区主要包含疏水性氨基酸残基，如丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸或缬氨酸。在一个方面，跨膜区是疏水性的。在一些实施方案中，跨膜区包含聚亮氨酸-丙氨酸序列。

在一个方面，跨膜结构域包含选自以下的蛋白的跨膜结构域：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、KIRDS2、OX40、CD2、CD27、LFA-1 (CD11a、CD18)、ICOS (CD278)、GITR、CD40、BAFFR、HVEM (LIGHTR)、SLAMF7、NKp80 (KLR1)、CD160、GPC3、IL-2R β 、IL-2R γ 、IL-7Ra、ITGA1、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、SLAMF6 (NTB-A、Lyl08)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D 和/或 NKG2C。在一个方面，跨膜结构域来源于或包含 CD8 α 、CD4、CD28、CD137、CD80、CD86、CD152 或 PD1 的跨膜结构域。在一些具体实施方案中，跨膜结构域包含与 SEQ ID NO: 32 具有至少 88%、92%、96% 序列同一性的氨基酸序列。在一个具体的实施方案中，跨膜结构域包含 SEQ ID NO: 32 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。在一些具体实施方案中，跨膜结构域包含与 SEQ ID NO: 33 具有至少 88%、92%、96% 序列同一性的氨基酸序列。在一个具体的实施方案中，跨膜结构域包含 SEQ ID NO: 33 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

2.4 信号传导结构域

在一个方面，提供了如本文所定义的融合蛋白，其中胞内信号传导结构域通常负责激活至少一种正常效应子功能。在一个方面，胞内信号传导结构域包含两种不同类型的胞质信号传导序列：通过 TCR 起始抗原依赖性初级激活的那些（初级胞内信号传导结构域）和以抗原非依赖性方式起作用以提供次级或共刺激信号的那些（次级胞质结构域，例如共刺激结构域）。

在一个方面，初级信号传导结构域以刺激方式或以抑制方式调节 TCR 复合物的初级激

活。以刺激方式起作用的初级胞内信号传导结构域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（ITAM）。在本发明中特别有用的含有 ITAM 的初级胞内信号传导结构域的实例包括 TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278（也已知为“ICOS”）、Fc ϵ RI、DAP10、DAP12 和 CD66d 的那些。在一个方面，CAR 包含胞内信号传导结构域，例如 CD3- ζ 的初级信号传导结构域。在一个方面，初级信号传导结构域包含修饰的 ITAM 结构域，例如，与天然 ITAM 结构域相比，其活性已改变（例如增加或降低）的突变的 ITAM 结构域。在一个方面，初级信号传导结构域包含修饰的含 ITAM 的初级胞内信号传导结构域，例如优化的和/或截短的含 ITAM 的初级胞内信号传导结构域。在一个方面，CD3- ζ 的信号传导结构域是突变型 CD3 ζ 或野生型人 CD3 ζ 。在一个方面，初级信号传导结构域包含一个、两个、三个、四个或更多个 ITAM 基序。在一个方面，初级胞内信号传导结构域是含有一个或多个突变（例如 Q65K）的 CD3 ζ 的胞质信号传导结构域的功能性突变体。

在一个方面，胞质部分内的胞内信号传导序列可以以随机或指定的顺序彼此连接。在一个方面，共刺激分子是淋巴细胞对抗原的有效应答所需的除抗原受体或其配体之外的细胞表面分子。此类分子的实例包括 MHC I 类分子、TNF 受体蛋白、免疫球蛋白样蛋白、细胞因子受体、信号传导淋巴细胞激活分子（SEAM 蛋白）、激活 NK 细胞受体、BTFA、Toll 配体受体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、FFA-1(CD11a/CD18)、4-1BB(CD137)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS(CD278)、GITR、BAFFR、FIGHT、HVEM、KIRDS2、SFAMF7、NKp80(KFRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IF2R β 、IF2R γ 、IF7R α 、ITGA4、VFA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VFA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAF、FFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、FFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKF、DNAM1 (CD226)、SFAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Fy9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGF1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SFAMF6 (NTB-A、Fyl08)、SEAM (SFAMF1、CD150、IPO-3)、BFAME (SFAMF8)、SEFPFG (CD162)、FTBR、FAT、GADS、SFP-76、PAG/Cbp、CD19a 以及特异性结合 CD83 的配体等。

在一个方面，与野生型对应物相比，共刺激信号传导结构域包含至多 10 个氨基酸残基变异（例如，1、2、3、4、5 或 8 个）。这种包含一个或多个氨基酸变异的共刺激信号传导结构域可称为变体。相对于不包含突变的共刺激信号传导结构域，共刺激信号传导结构域的氨基酸残基的突变可导致信号传导的增加和免疫应答的刺激增强。相对于不包含突变的共刺激信号传导结构域，共刺激信号传导结构域的氨基酸残基的突变可导致信号传导的减少和免疫应答的刺激降低。

在一个方面，一个或多个共刺激信号传导结构域选自 CD27、CD28、CD137、OX40、CD30、CD40、CD3、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、NKG2C、B7-H3 和特异性结

合 CD83 的配体的传导结构域。在一个方面，本公开的 CAR 中的胞内信号传导结构域包含来源于 CD137(4-1BB)的共刺激信号传导结构域。在一个方面，胞内信号传导结构域包含 CD3 ζ 的胞质信号传导结构域和 CD28 或 CD137 的共刺激信号传导结构域。在一个具体的实施方案中，胞内信号传导结构域包含 CD3 ζ 的胞质信号传导结构域和 CD137 的共刺激信号传导结构域。

2.5 CAR

在一个方面，提供了如本文所定义的融合蛋白，其中融合蛋白是 CAR，该 CAR 从其 N 末端至 C 末端依次包含：胞外抗原结合结构域、间隔区、跨膜结构域和胞内信号传导结构域。在一个方面，胞外抗原结合结构域是 scFv，该 scFv 从其 N 末端到 C 末端依次包含：VH、接头和 VL。在一个方面，胞内信号传导结构域从其 N 末端至 C 末端依次包含：CD137 的信号传导结构域和 CD3 ζ 的胞质信号传导结构域。

在一个方面，胞外抗原结合结构域能够特异性地与包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列的参比抗体结合 CD20 上的相同表位，并且间隔区由来自 CD28 的铰链结构域组成。在一个方面，胞外抗原结合结构域包含 VH 和 VL，其中 VH 包含分别含有 SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7 和 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，且 VL 包含分别含有 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10 和 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；间隔区由 SEQ ID NO: 30 的氨基酸序列组成。在一个优选的实施方式中，胞外抗原结合结构域是包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列的 scFv，和间隔区由 SEQ ID NO: 30 的氨基酸序列组成。

在一个方面，胞外抗原结合结构域能够特异性地与包含 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的参比抗体结合 CD20 上的相同表位并且间隔区由来自 IgG4 的铰链结构域组成，其中由来自 IgG4 的铰链结构域组成的间隔区的长度为 12 个氨基酸。在一个方面，胞外抗原结合结构域包含 VH 和 VL，其中 VH 包含分别含有 SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7 和 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和 VL 包含分别含有 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10 和 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；间隔区由 SEQ ID NO: 31 的氨基酸序列组成。在一个方面，胞外抗原结合结构域包含 VH 和 VL，其中 VH 包含分别含有 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 16 的氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和 VL 包含分别含有 SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19 的氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；间隔区由 SEQ ID NO: 31 的氨基酸序列组成。在一个优选的实施方式中，胞外抗原结合结构域是包含 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的 scFv，和间隔区由 SEQ ID NO: 30 的氨基酸序列组成。

在一个具体的实施方式中，CAR 包含 SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 37 或 SEQ ID NO: 38 的氨基酸序列。

III. 工程化细胞及其制备

3.1 细胞

在一个方面，本公开提供了包含上述融合蛋白的工程化细胞，例如工程化免疫细胞。本公开的工程化免疫细胞的来源可以是待治疗的患者（即，自体细胞）或来自不是待治疗的患者供体的供体（例如，同种异体细胞）。

5 在一个方面，细胞是免疫应答细胞。在一个方面，细胞是淋巴谱系细胞。在一个方面，工程化免疫细胞是工程化 T 细胞。在一个方面，T 细胞来自哺乳动物个体。在一个方面，T 细胞来自灵长类个体，如人个体。T 细胞和/或 CD4⁺和/或 CD8⁺ T 细胞的亚型和亚群涵盖幼稚 T (TN) 细胞、效应 T 细胞 (TEFF)、记忆 T 细胞及其亚型如干细胞记忆 T 细胞 (TSCM)、中央记忆 T 细胞 (TCM)、效应记忆 T 细胞 (TEM) 或终末分化的效应记忆 T 细胞、肿瘤浸
10 润淋巴细胞 (TIL)、未成熟 T 细胞、成熟 T 细胞、辅助 T 细胞、细胞毒性 T 细胞、粘膜相关不变 T 细胞 (MAIT)、自然调节 T (Treg) 细胞和适应性调节 T (Treg) 细胞、辅助 T 细胞如 TH1 细胞、TH2 细胞、TH3 细胞、TH17 细胞、TH9 细胞、TH22 细胞、滤泡辅助 T 细胞、 α/β T 细胞和 δ/γ T 细胞。市售 T 细胞系的非限制性实例包括细胞系 BCL2 (AAA) Jurkat (ATCC[®] CRL-2902[™])、BCL2 (S70A) Jurkat (ATCC[®] CRL-2900[™])、BCL2 (S87A) Jurkat (ATCC[®]
15 CRL-2901[™])、BCL2 Jurkat (ATCC[®] CRL-2899[™])、Neo Jurkat (ATCC[®] CRL-2898[™])、TALL-104 细胞毒性人类 T 细胞系 (ATCC # CRL-11386)。其他实例包括但不限于成熟 T 细胞系，例如 Deglis、EBT-8、HPB-MLp-W、HUT 78、HUT 102、Karpas 384、Ki 225、My-La、Se-Ax、SKW-3、SMZ-1 和 T34；和未成熟 T 细胞系，例如，ALL-SIL、Be13、CCRF-CEM、CML-T1、DND-41、DU.528、EU-9、HD-Mar、HPB-ALL、H-SB2、HT-1、JK-T1、Jurkat、Karpas
20 45、KE-37、KOPT-K1、K-T1、L-KAW、Loucy、MAT、MOLT-1、MOLT 3、MOLT-4、MOLT 13、MOLT-16、MT-1、MT-ALL、P12/Ichikawa、Peer、PER0117、PER-255、PF-382、PFI-285、RPMI-8402、ST-4、SUP-T1 至 T14、TALL-1、TALL-101、TALL-103/2、TALL-104、TALL-105、TALL-106、TALL-107、TALL-197、TK-6、TLBR-1、TLBR-2、TLBR-3 和 TLBR-4、CCRF-HSB-2 (CCL-120.1)、J.RT3-T3.5 (ATCC TIB-153)、J45.01 (ATCC CRL-1990)、J.CaM1.6
25 (ATCC CRL-2063)、RS4; 11 (ATCC CRL-1873)、CCRF-CEM (ATCC CRM-CCL-119)；以及皮肤 T 细胞淋巴瘤系，例如，HuT78 (ATCC CRM-TIB-161)、MJ[G11] (ATCC CRL-8294)、HuT102 (ATCC TIB-162)。这种市售细胞系的非限制性示例性来源包括美国典型培养物保藏中心 (ATCC) (维吉尼亚州马纳萨斯) 和德国微生物和细胞培养物保藏中心。

30 在某些方面，细胞是细胞毒性 T 细胞（也称为 TC、细胞毒性 T 淋巴细胞、CTL、T 杀伤细胞、裂解性 T 细胞、CD8⁺ T 细胞或杀伤 T 细胞）。在某些方面，T 细胞是 CD4⁺ T 细胞。在某些方面，T 细胞可以是 CD4⁺ T 细胞或 CD8⁺ T 细胞。在某些方面，细胞是肿瘤特异性 T 细胞。

在一个方面，细胞是自然杀伤 (NK) 细胞、自然杀伤 T (NKT) 细胞、细胞因子诱导的杀伤 (CIK) 细胞、肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL)、淋巴因子激活的杀伤 (LAK) 细胞等。NK 细

胞可以分离或从市售来源获得。市售 NK 细胞系的非限制性实例包括 NK-92 (ATCC® CRL-2407™)、NK-92MI (ATCC® CRL-2408™)。其他实例包括但不限于 NK 系 HANK1、KHYG-1、NKL、NK-YS、NOI-90 和 YT。这种市售细胞系的非限制性示例性来源包括美国典型培养物保藏中心 (ATCC) (American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA)) 和德国微生物和细胞培养物保藏中心 (the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)。

在一个方面, 细胞是 B 细胞、单核细胞或粒细胞、例如髓细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞和/或嗜碱性粒细胞。

在某些方面, 细胞是髓系的细胞。髓系细胞的非限制性实例包括单核细胞、巨噬细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、红细胞、巨核细胞、血小板和可以分化出髓细胞的干细胞。在某些实施方案中, 干细胞是多能干细胞 (例如胚胎干细胞或诱导性多能干细胞)。

3.2. 基因工程方法

在一个方面, 工程化细胞通过转移编码融合蛋白 (例如抗原受体, 例如 CAR) 的多核苷酸的各种方法来制备。物理方法包括磷酸钙沉淀、脂质转染、粒子轰击、显微注射、电穿孔等。生物方法包括使用 DNA 和 RNA 载体, 例如病毒载体, 例如慢病毒载体。化学方法包括胶体分散系统, 例如大分子复合物、纳米胶囊、微球、微珠和基于脂质的系统, 包括水包油乳剂、胶束、混合胶束和脂质体。示例性方法示于表 3 中。在一些方面, 那些熟知的方法包括通过病毒 (例如逆转录病毒或慢病毒)、转座子和电穿孔的转导。

表 3. 用于基因组编辑系统的递送方法

递送模式		表达持续时间	基因组整合	递送的分子类型
物理 (例如电穿孔)		瞬时	否	核酸和蛋白质
病毒载体	逆转录病毒	稳定	是	RNA
	慢病毒	稳定	是	RNA
	腺病毒	瞬时	否	DNA
	AAV	稳定	否	DNA
	痘苗病毒	瞬时	否	DNA
	单纯疱疹病毒	稳定	否	DNA
非病毒载体	阳离子脂质体	瞬时		核酸和蛋白质
	聚合物纳米颗粒	瞬时		核酸和蛋白质
	转座子	稳定	是	DNA
生物非病毒递送载体	减毒细菌	瞬时	否	核酸

20

在一个方面, 使用重组感染性病毒颗粒 (例如腺病毒载体、AAV 载体、慢病毒载体、逆转录病毒载体如 γ -逆转录病毒载体) 将重组多核苷酸转移到细胞中。在一个方面, 逆转录病

毒载体或慢病毒载体具有长末端重复序列 (LTR)。在一个方面, 载体是自我失活的 (SIN)。在一个方面, 载体是条件复制型 (可移动) 载体。在一个方面, 慢病毒载体来源于人、猫或猿慢病毒。在一个方面, 逆转录病毒载体来源于鼠逆转录病毒。在一个方面, 慢病毒或逆转录病毒包括来自任何禽类或哺乳动物细胞来源的慢病毒或逆转录病毒。在一个方面, 慢病毒或逆转录病毒是兼嗜性的, 这意味着它们能够感染几种物种 (包括人) 的宿主细胞。在一个方面, 待表达的基因取代逆转录病毒 gag、pol 和/或 env 序列。

在一个方面, 包含编码融合蛋白 (例如 CAR) 的多核苷酸的载体可包含启动子和/或增强子或调节元件以调节所编码的重组受体的表达。在一个方面, 启动子和/或增强子或调节元件可以是条件依赖性启动子、增强子和/或调节元件。在一个方面, 编码融合蛋白的多核苷酸可以可操作地连接到组成型启动子。在一个方面, 启动子选自巨细胞病毒 (CMV) 启动子、延伸因子-1 α (EF1 α) 启动子、泛素 C (UbiC) 启动子、磷酸甘油激酶 (PGK) 启动子、猿猴病毒 40 (SV40) 早期启动子和与 CMV 早期增强子偶联的鸡 β -肌动蛋白启动子 (CAGG)。

在一个方面, 多核苷酸与诱导型启动子可操作地连接。诱导型启动子可以由一种或多种条件诱导, 例如物理条件、工程化免疫效应细胞的微环境, 或工程化免疫效应细胞的生理状态、诱导物 (即诱导剂) 或其组合。在一个方面, 诱导条件不诱导工程化哺乳动物细胞中和/或接受药物组合物的个体中内源基因的表达。在一个方面, 诱导条件选自: 诱导物、辐射 (如电离辐射、光)、温度 (如热)、氧化还原状态、肿瘤环境和工程化哺乳动物细胞的激活状态。

在一个方面, 多核苷酸可操作地连接到位于多核苷酸下游的土拨鼠肝炎病毒 (WHP) 转录后调控元件 (WPRE)。

在一个方面, 载体可以含有驱动一种或多种核酸分子表达的单个启动子。在一个方面, 这类核酸分子可以是多顺反子的。例如, 在一个方面, 转录单元可以被工程化为包含 IRES (内部核糖体进入位点) 的双顺反子单元, 其允许通过来自单个启动子的信使 RNA 共表达基因产物 (例如, 编码第一 CAR 和第二 CAR)。在一个方面, 单个启动子可以指导 RNA 的表达, 该 RNA 在单个开放阅读框 (ORF) 中含有通过编码自身切割肽或蛋白酶识别位点的序列彼此分开的两个或三个基因 (例如编码第一 CAR 和第二 CAR)。在一个方面, 自身切割肽选自口蹄疫病毒 (F2A)、马甲型鼻炎病毒 (E2A)、Thosea asigna 病毒 (T2A) 和猪捷申病毒-1 (P2A) 的自身切割肽。

在一个方面, 通过电穿孔将多核苷酸转移到 T 细胞中。在一个方面, 通过转座将多核苷酸转移到 T 细胞中。在一个方面, 通过转座子 (包括睡美人转座子系统 (SB) 和/或 piggyBac (PB) 转座子系统) 递送多核苷酸。

编码融合蛋白的多核苷酸可以与编码分泌肽或信号肽的其他编码区结合, 该分泌肽或信号肽指导融合蛋白的分泌。例如, 如果需要分泌融合蛋白, 可将编码信号序列的 DNA 置于融

合蛋白的上游。本领域普通技术人员知晓，脊椎动物细胞分泌的多肽通常具有与多肽的 N 末端融合的信号肽，该信号肽从翻译的多肽上切割以产生分泌或“成熟”形式的多肽。在一个方面，信号肽包含人 CD2、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 ζ 、CD4、CD8 α 、CD19、CD28、CD37、CD45、4-1BB、GM-CSFR、IL-2、CD33、人 IgKVIII、人 IgG2 H、胰凝乳蛋白酶原、胰蛋白酶原-2、HSA、胰岛素或 tPA 信号肽的序列。

在一个方面，编码融合蛋白的多核苷酸含有编码一种或多种标志物的核酸序列。在一个方面，一种或多种标志物是转导标志物、替代标志物(surrogate marker)和/或选择标志物。在一个方面，编码融合蛋白的多核苷酸含有编码一种或多种另外的融合蛋白的核酸序列，所述另外的融合蛋白增强和/或减弱细胞在过继转移和遇到配体时的应答。

10 在一个方面，多核苷酸还可以编码一种或多种替代标志物。在一个方面，替代标志物可包括细胞表面多肽的截短形式，例如非功能性的且不转导或不能转导信号或通常由全长形式的细胞表面多肽转导的信号和/或不内化或不能内化的截短形式。在一个方面，截短的细胞表面多肽包括截短形式的生长因子或其他受体，如截短的人表皮生长因子受体 2 (tHER2)、截短的表皮生长因子受体 (EGFRt)、截短的前列腺特异性膜抗原 (PSMA)，或其修饰形式。

15 EGFRt 可用于鉴定或选择已经用 EGFRt 融合蛋白和编码的外源蛋白工程化的细胞，和/或用于去除或分离表达编码的外源蛋白的细胞。

在一个方面，标志物是荧光蛋白，例如绿色荧光蛋白 (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

20 (EBFP) 和黄色荧光蛋白 (YFP) 及其变体，包括荧光蛋白的物种变体、单体变体和密码子优化和/或增强型变体。在一个方面，标志物是或包含酶，例如萤光素酶、来自大肠杆菌的 lacZ 基因、碱性磷酸酶、分泌型胚胎碱性磷酸酶 (SEAP)、氯霉素乙酰转移酶 (CAT)。示例性的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。

25 在一个方面，标志物是选择标志物。在一个方面，选择标志物是赋予对外源活性剂或药物的抗性的多肽。在一个方面，选择标志物是抗生素抗性基因。在一个方面，选择标志物是赋予对哺乳动物细胞抗生素抗性的抗生素抗性基因。在一个方面，选择标志物选自嘌呤霉素抗性基因、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 (Zeocin) 抗性基因或其修饰形式。

30 或者，可以使用各种测定法来确认工程化细胞中重组 DNA 序列的存在，例如 Southern 和 Northern 印迹、RT-PCR 和 PCR。在一个方面，可以通过识别靶细胞的能力或细胞因子 (例如，干扰素- γ 、粒细胞/单核细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 或白介素 2 (IL-2)) 的释放来检测融合蛋白。此外，融合蛋白的功能可以通过测量细胞的细胞毒

性来评价。

3.3 工程化细胞的制备

在一个方面，本公开提供了工程化细胞的制造方法。在一个方面，可以使用任何已知的制备方法。在一个具体的方面，该方法包括用编码融合蛋白的多核苷酸转导分离的细胞，并选择已经被多核苷酸成功转导的所述分离的细胞的亚群，从而产生如上所述遗传修饰的细胞。

在一个方面，该方法包括采集、分离、转导、扩增步骤。在一个具体方面，该方法包括以下步骤：(i) 采集免疫细胞群（例如血细胞）；(ii) 分离特定细胞群（例如 T 细胞和/或 NK 细胞）；(iii) 用编码融合蛋白的多核苷酸转导分离的细胞群；和 (iv) 扩增已经用步骤 (iii) 的所述核酸序列成功转导的所述分离的细胞的亚群，从而产生遗传修饰的细胞。下面更具体地描述这些不同的步骤。

3.3.1 细胞采集

在一个方面，用于获取细胞以引入融合蛋白（例如，CAR）的个体是患有疾病或病症或需要细胞疗法或将向其施用细胞疗法的个体。在一个方面，细胞可来自健康供体。

在一个方面，细胞可以获自样品，例如生物样品。在一个方面，样品选自全血、外周血单核细胞（PBMC）、白细胞、骨髓、胸腺、组织活检物、肿瘤组织、白血病组织、淋巴瘤组织、淋巴结、肠相关淋巴样组织、粘膜相关淋巴样组织、脾、其他淋巴样组织、肝、肺、胃、肠、结肠、肾、胰腺、乳腺、骨、前列腺、子宫颈、睾丸、卵巢、扁桃体或其他器官和/或源自其的细胞。在一个方面，细胞是原代细胞。在一个方面，例如通过单采术（apheresis）或血细胞去除术（leukapheresis）获得来自个体循环血液的细胞。所得样品包含淋巴细胞，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，并且在一些方面包含除红细胞和血小板之外的细胞。

3.3.2 细胞分离

有各种方法可方便地从样品中分离免疫细胞，例如使用 Life Technologies Dynabeads® 系统；STEMcell Technologies EasySep™、RoboSep™、RosetteSep™、SepMate™；Miltenyi Biotec MACS™ 细胞分离试剂盒；细胞表面标志物表达和其他市售细胞分离试剂盒（例如，来自 Pierce, Rockford, IL 的 ISOCELL）。可以通过使用此类试剂盒中可用的针对独特细胞表面标志物的微珠或其他结合剂来分离特定的免疫细胞亚群。例如，MACS™ CD4+ 和 CD8+ 微珠可用于分离 CD4+ 和 CD8+ T 细胞。

在一个方面，细胞的分离包括一个或多个基于非亲和性的细胞分离步骤。在一个方面，在一种或多种试剂的存在下洗涤、离心和/或孵育细胞，例如以除去不需要的组分、富集期望的组分、裂解或除去对特定试剂敏感的细胞。在一个方面，细胞基于一种或多种特性进行分离，例如密度、粘附特性、大小、敏感性和/或对特定组分的抗性。

在一个方面，将从个体收集的血细胞洗涤，例如以除去血浆部分并将细胞置于合适的缓冲液或介质中用于随后的处理步骤。在一个方面，用磷酸盐缓冲盐水（PBS）洗涤细胞。在一个方面，洗涤溶液缺乏钙，并且可缺乏镁，或者可缺乏许多（如果不是全部）二价阳离子。在不存在钙的情况下的初始激活步骤可导致放大的激活。在一个方面，根据制造商的说明书通过半自动“流通式（flow-through）”离心机（例如，Cobe 2991 细胞处理器，Baxter）完成洗涤步骤。在一个方面，根据制造商的说明书通过切向流过滤（TFF）完成洗涤步骤。在一个方面，洗涤后可以将细胞重悬于各种生物相容性缓冲液（例如不含 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 的 PBS）中。在某些实施方案中，除去血细胞样品的组分并将细胞直接重悬于培养基中。在一个方面，分离包括基于密度的细胞分离方法，例如通过裂解红细胞并通过 Percoll 或 Ficoll 梯度离心从外周血制备白细胞。

在一个方面，分离方法包括基于细胞中一种或多种特定分子的表达或存在来分离不同的细胞类型，所述特定分子例如表面标志物，例如表面蛋白、细胞内标志物或核酸。在一个方面，分离是基于亲和力或免疫亲和力的分离。分离可基于阳性选择和/或阴性选择，在阳性选择中，保留已结合试剂的细胞以供进一步使用，在阴性选择中，保留未结合抗体或结合配偶体的细胞。分离不需要 100% 富集或去除特定细胞群或表达特定标志物的细胞。

在一个方面，一个分离步骤可以去除同时表达多种标志物的细胞，例如通过将细胞与多种抗体或结合配偶体一起孵育，每种抗体或结合配偶体都对被靶向用于阴性选择的标志物具有特异性。同样地，可通过将细胞与在各种细胞类型上表达的多种抗体或结合配偶体一起孵育来同时阳性选择多种细胞类型。在一个方面，进行多轮分离步骤，其中将来自一个步骤的阳性或阴性选择的部分进行另一个分离步骤，如随后的阳性或阴性选择。

在一些方面，通过阳性或阴性选择技术分离特定的 T 细胞亚群，如一种或多种表面标志物呈阳性或高水平表达的细胞，例如 CD3+、CD28+、CD62L+、CCR7+、CD27+、CD127+、CD4+、CD8+、CD45RA+ 和/或 CD45RO+ T 细胞。在一个方面，通过与抗-CD3/抗-CD28 缀合的颗粒或微珠（例如 DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T Cell Expander、MACSiBeads™ 等）一起孵育来分离 T 细胞。在一个方面，阳性选择的时间段为约 30 分钟。在另一个实施方案中，该时间段为至少 1、2、3、4、5 或 6 小时。在一个方面，该时间段为 10 至 24 小时。在一个方面，孵育时间为 24 小时。为了通过阳性或阴性选择分离所需细胞群，可改变细胞和颗粒的浓度。在某些实施方案中，可能需要显著减少微珠和细胞混合在一起的体积（即，增加细胞的浓度），以确保细胞和微珠的最大接触。在一个方面，使用大于 1 亿个细胞/mL。

在一些方面，通过阴性选择非 T 细胞如 B 细胞、单核细胞或其他白细胞上表达的标志物如 CD14，从样品中分离 T 细胞。在一些方面，CD4 或 CD8 选择步骤用于分离 CD4+ 辅助 T 细胞和 CD8+ 细胞毒性 T 细胞。通过对在一种或多种幼稚、记忆和/或效应 T 细胞亚群上表达或以相对较高程度表达的标志物的阳性或阴性选择，可以将这类 CD4+ 和 CD8+ 群体进一步分选为亚群。

在一些方面，例如通过基于与相应亚群相关的表面抗原的阳性或阴性选择，进一步富集或去除 CD8⁺细胞中的幼稚、中央记忆、效应记忆和/或中央记忆干细胞。在一些方面，进行中央记忆 T (TCM) 细胞的富集以提高功效，例如改善施用后的长期存活、扩增和/或植入。在一些方面，组合 TCM 富集的 CD8⁺ T 细胞和 CD4⁺ T 细胞进一步增强功效。

- 5 在一些方面，记忆 T 细胞存在于 CD8⁺外周血淋巴细胞的 CD62L⁺和 CD62L⁻亚群中。例如使用抗 CD8 和抗 CD62L 抗体，可以富集或去除 PBMC 中的 CD62L⁻ CD8⁺和/或 CD62L⁺CD8⁺级分。

- 10 在一些方面，中央记忆 T (TCM) 细胞的富集基于 CD45RO、CD62L、CCR7、CD28、CD3 和/或 CD127 的阳性或高度表面表达。在一些方面，所述富集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，通过去除表达 CD4、CD14、CD45RA 的细胞和阳性选择或富集表达 CD62L 的细胞，来进行富集 TCM 细胞的 CD8⁺群体的分离。在一个方面，中央记忆 T (TCM) 细胞的富集从基于 CD4 表达选择的细胞的阴性部分开始进行，之后对其进行基于 CD14 和 CD45RA 的表达的阴性选择和基于 CD62L 的阳性选择。

- 15 在一个方面，NK 细胞的富集基于 CD56 和 CD16 的阳性或高度表面表达以及基于 CD3 的阴性表达和/或任选地基于 NKp46 或 NKp30 受体的存在。

- 20 在一个方面，将待分离的细胞的样品或组合物与小的、可磁化的或磁响应材料孵育，例如磁响应颗粒或微粒，例如顺磁珠（例如 Dynabeads[®]或 MACS[®]微珠）。磁响应材料（例如颗粒）通常直接或间接附着于结合配偶体（例如抗体），该结合配偶体特异性结合于存在于需要分离（例如需要阴性选择或阳性选择）的细胞、多个细胞或细胞群体上的分子（例如表面标志物）。在一个方面，将样品置于磁场中，那些附着有磁响应或可磁化颗粒的细胞将被吸引到磁性物体上并与未标记的细胞分离。对于阳性选择，被吸引到磁性物体上的细胞被保留；对于阴性选择，未被吸引的细胞（未标记的细胞）被保留。在一些方面，在相同的选择步骤期间进行组合的阳性和阴性选择，其中阳性和阴性部分被保留并进一步处理或经受进一步的分离步骤。

- 25 在一个方面，使磁响应颗粒附着于随后要孵育、培养和/或工程化的细胞；在一些方面，使颗粒附着于施用于患者的细胞。在一个方面，从细胞中除去磁响应颗粒。从细胞中除去磁响应颗粒的方法是已知的，包括例如使用竞争性非标记抗体、磁响应颗粒或与可切割接头偶联的抗体等。在一个方面，磁响应颗粒是可生物降解的。

- 30 在一个方面，基于亲和力的选择是通过磁激活的细胞分选 (MACS[®])（加利福尼亚州奥本本的 Miltenyi Biotec）进行的。磁激活的细胞分选 (MACS[®]) 系统能够高纯度地选择其上附着有磁化颗粒的细胞。在某些实施方案中，MACS[®]以施加外部磁场后依次洗脱非靶标和靶标物质的模式操作。即，附着于磁化颗粒的细胞被保持，而未附着的细胞被洗脱。然后，在该第一洗脱步骤完成之后，对于被磁场捕获而未被洗脱的物质，以某种方式进行释放，使得它

们可以被洗脱和回收。在某些实施方案中,非靶标细胞被标记并从异质细胞群中去除。

在一个方面,通过流式细胞术收集和富集(或去除)本文所述的细胞群体,其中在射流系统中针对多种细胞表面标志物进行细胞染色。在一个方面,通过制备级规模(FACS)分选,收集和富集(或去除)本文所述的细胞群体。在某些实施方案中,通过使用微机电系统(MEMS)芯片结合基于FACS的检测系统来收集和富集(或去除)本文所述的细胞群体。在这两种情况下,可以用多种标志物标记细胞,从而允许以高纯度分离明确规定的T细胞亚群。

在一个方面,制备方法包括在分离、孵育和/或工程化之前或之后冷冻(例如,冷冻保存)细胞的步骤。在一个方面,冷冻和随后的解冻步骤可以除去细胞群中的粒细胞和在一定程度上去除单核细胞。在一个方面,例如在洗涤步骤以除去血浆和血小板之后,将细胞悬浮在冷冻溶液中。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。一个实例涉及使用含有20% DMSO和8%人血清白蛋白(HSA)的PBS或其他合适的细胞冷冻培养基。然后将其用培养基以1:1稀释,使得DMSO和HSA的最终浓度分别为10%和4%。然后将细胞以1°C/分钟的速率冷冻至-80°C并储存在液氮储存罐的气相中。在一个方面,冷冻保存的细胞如本文所述解冻和洗涤,并在激活前在室温下静置1小时。

3.3.3 细胞扩增

在一个方面,所提供的方法包括培育、孵育、培养和/或基因工程步骤。在一个方面,在基因工程之前或与基因工程相关时孵育和/或培养细胞。孵育步骤可包括培养、培育、刺激、激活和/或增殖。在一个方面,在刺激条件或刺激剂存在下孵育细胞。所述条件可包括特定培养基、温度、氧含量、二氧化碳含量、时间、活性剂(例如营养物、氨基酸、抗生素、离子)和/或刺激因子(例如细胞因子、趋化因子、抗原、结合配偶体、融合蛋白、重组可溶性受体)和设计用于激活细胞的任何其他活性剂中的一种或多种。

在一个方面,刺激条件或刺激剂包括一种或多种活性剂,例如配体,其能够刺激或激活TCR复合物的胞内信号传导结构域。在一些方面,所述活性剂开启或启动T细胞中的TCR/CD3细胞内信号级联。此类活性剂可包括抗体,诸如对TCR组分和/或共刺激受体具有特异性的那些抗体(例如抗CD3、抗CD28,例如结合至固体支持物诸如微珠(例如Dynabeads®)上),和/或一种或多种细胞因子。在一个方面,使用1000万、1500万、2000万、2500万、3000万、3500万、4000万、4500万、5000万、7500万、8000万、8500万、9000万、9500万、1亿、1.25亿或1.5亿个细胞/mL的细胞浓度。

在一个方面,混合物可培养数小时(约3小时)至约14天或其间的任何小时整数值。在另一个实施方案中,混合物可以培养21天。在一个实施方案中,微珠和T细胞一起培养约8天。在另一个实施方案中,微珠和细胞一起培养2-3天。还可能几个刺激周期,由此T细胞的培养时间可以是60天或更长。适于T细胞培养的条件包括可含有增殖和活力所必需的因素或任何其他添加剂的适当培养基,所述因子包括白介素-2(IL-2)、胰岛素、IFN- γ 、IL-

4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF β 和 TNF- α 。用于细胞生长的其他添加剂包括但不限于表面活性剂、Plasmanate 和还原剂如 N-乙酰基-半胱氨酸和 2-巯基乙醇。培养基可包括 RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo 15 和 X-Vivo 20、optimizer，添加氨基酸、丙酮酸钠和维生素、无血清或补充适当量的血清（或血浆）或一组确定的激素，
5 和/或一些足以生长和扩增 T 细胞的细胞因子。抗生素（例如青霉素和链霉素）仅包含在实验培养物中，而不包含在待输注到个体中的细胞培养物中。将靶细胞维持在支持生长所必需的条件，例如，适当的温度（例如，37°C）和气氛（例如，空气加 5% CO₂）。

在一个方面，使用白介素-2（IL-2）、IL-15、IL-15/IL-15RA 复合物、IL-18 和 IL-12 在体外扩增 NK 细胞群。在一个方面，NK 细胞在施用于患者之前离体扩增至少约 5 天，例如不少
10 于约 10 天、不少于约 15 天或不少于约 20 天。

IV. 药物组合物

本公开的药物组合物可包含与一种或多种药学上或生理学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂组合的工程化细胞。这类组合物可包含：缓冲液如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等；碳水化合物如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇；蛋白质；多肽或氨基酸如甘氨酸；
15 抗氧化剂；螯合剂如 EDTA 或谷胱甘肽；佐剂（例如氢氧化铝）；和防腐剂。在一个方面，本公开的组合物被配制用于静脉内施用。

在一个方面，药物组合物基本上不含污染物，例如没有可检测水平的污染物，该污染物例如选自内毒素、支原体、可复制型慢病毒（RCL）、p24、VSV-G 核酸、HIV gag、残留的抗-CD3/抗-CD28 包被的微珠、小鼠抗体、混合的人血清、牛血清白蛋白、牛血清、培养基
20 成分、载体包装细胞或质粒成分、细菌和真菌组成的组。在一个方面，细菌是选自粪产碱菌（*Alcaligenes faecalis*）、白色念珠菌（*Candida albicans*）、大肠杆菌（*Escherichia coli*）、流感嗜血杆菌（*Haemophilus influenza*）、脑膜炎奈瑟氏球菌（*Neisseria meningitidis*）、铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）、金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）、肺炎链球菌（*Streptococcus pneumonia*）和 A 族酿脓链球菌（*Streptococcus pyogenes group A*）组成的组
25 中的至少一种。

当提及“免疫有效量”、“抗肿瘤有效量”、“肿瘤抑制有效量”或“治疗量”时，待施用的本公开的组合物的精确量可由医师考虑患者（个体）的年龄、体重、肿瘤大小、感染或转移的程度和状况的个体差异来确定。一般而言，包含本文所述的 T 细胞的药物组合物可以以 10⁴ 至 10⁹ 个细胞/kg 体重、在一些情况下 10⁵ 至 10⁶ 个细胞/kg 体重的剂量（包括这些范围内的所有
30 整数值）施用。T 细胞组合物也可以这些剂量施用一次或多次。可以通过使用免疫疗法中通常已知的输注技术来施用细胞。

V. 治疗方法

本公开的工程化细胞或药物组合物可以以适于待治疗（或预防）的疾病的方式施用。所

- 述疾病可包括实体瘤、例如肉瘤和癌，包括纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨肉瘤和其他肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、淋巴恶性肿瘤、胰腺癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝细胞癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、甲状腺髓样癌、甲状腺乳头状癌、嗜铬细胞瘤、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞瘤 (hepatoma)、胆管癌、绒毛膜癌、维尔姆斯氏瘤 (Wilms' tumor)、子宫颈癌、睾丸肿瘤、精原细胞瘤、膀胱癌、黑色素瘤和 CNS 肿瘤 (例如胶质瘤 (例如脑干胶质瘤和混合性胶质瘤)、胶质母细胞瘤 (也称为多形性成胶质细胞瘤)、星形细胞瘤、CNS 淋巴瘤、生殖细胞瘤、成神经管细胞瘤、雪旺瘤 (Schwannoma)、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突胶质瘤、脑膜瘤、成神经细胞瘤、成视网膜细胞瘤和脑转移瘤)；非实体肿瘤，例如白血病，包括急性白血病 (如急性淋巴细胞性白血病、急性髓细胞性白血病、急性髓性白血病和成髓细胞性白血病、早幼粒细胞性白血病、髓单核细胞性白血病、单核细胞白血病和红白血病)、慢性白血病 (例如慢性髓细胞性 (粒细胞性) 白血病、慢性髓性白血病和慢性淋巴细胞性白血病)、真性红细胞增多症、淋巴瘤、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤 (惰性和高级别)、多发性骨髓瘤、华氏巨球蛋白血症、重链病、骨髓增生异常综合征、毛细胞白血病和脊髓发育不良 (myelodysplasia)。

- 在一个方面，个体患有与 CD20 相关的复发性或难治性疾病或病症。在一个方面，个体之前接受过至少一个包含针对 CD20 的药物的方案的治疗。在一个方面，个体对于包含抗 CD20 单抗的治疗是复发或难治的。在一些实施方案中，抗 CD20 单抗是奥法木单抗、奥妥珠单抗或利妥昔单抗。在一个方面，个体在先前治疗开始后 6、12、18、24、30 或 36 个月内疾病进展。在一个方面，在给予有效量的本公开的工程化细胞或药物组合物之前，个体至少 4 周 (例如，4 周、6 周、8 周、10 周、12 周、24 周、36 周、48 周、60 周或更长时间) 未接受抗 CD20 单抗的治疗。

- 疾病还可包含自身免疫病，其选自炎症反应，如炎症性皮肤病，包括银屑病和皮炎 (如特应性皮炎)；系统性硬皮病和硬化症；与炎症性肠病 (如克罗恩病和溃疡性结肠炎) 相关的反应；呼吸窘迫综合征 (包括成人呼吸窘迫综合征；ARDS)；脑膜炎；脑炎；葡萄膜炎；结肠炎；肾小球肾炎；变应性疾病，如湿疹和哮喘，以及涉及 T 细胞浸润和慢性炎症反应的其他疾病；动脉粥样硬化；白细胞粘附缺陷；类风湿性关节炎；系统性红斑狼疮 (SLE)；韦格纳病；糖尿病 (例如 I 型糖尿病或胰岛素依赖性糖尿病)；多发性硬化症；雷诺综合征；自身免疫性甲状腺炎；变态反应性脑脊髓炎；干燥综合征；青少年糖尿病；以及与细胞因子和 T 淋巴细胞介导的急性和迟发性超敏反应相关的免疫反应，通常出现在结核病、结节病、多发性肌炎、肉芽肿病和血管炎中；恶性贫血 (阿狄森氏病)；涉及白细胞渗出 (leukocyte diapedesis) 的疾病；中枢神经系统 (CNS) 炎症性疾病；多器官损伤综合征；溶血性贫血；重症肌无力；抗原抗体复合物介导的疾病；抗肾小球基底膜疾病；抗磷脂综合征；过敏性神经炎；格雷夫斯病；兰伯特-伊顿肌无力综合征；大疱性类天疱疮；天疱疮；自身免疫性多内皮细胞增多症；

莱特氏病；僵人综合征；贝切特病；巨细胞动脉炎；免疫复合性肾炎；IgA 肾病；IgM 多发性神经病；免疫性血小板减少性紫癜（ITP）或自身免疫性血小板减少症。在一个实施方案中，所述药物用于治疗多发性硬化症。在一个优选实施方案中，该药物用于治疗继发性进行性多发性硬化症。

- 5 施用的量和频率将由患者的状况和患者疾病的类型和严重程度决定，尽管合适的剂量可由临床试验确定。组合物的施用可以以任何方便的方式进行，包括通过气溶胶注射、摄取、输液、植入或移植。本文所述的组合物可经动脉、皮下、皮内、瘤内、淋巴结内、髓内、肌内、通过静脉内（i.v.）注射或腹膜内施用于患者。在一个方面，本发明的 T 细胞组合物通过皮内或皮下注射施用于患者。在一个方面，将组合物直接注射到目的器官（例如受肿瘤影响的器官）中。可替代地，例如通过施用于循环系统（例如，肿瘤脉管系统）将组合物间接提
- 10 供给目的器官。扩增和分化剂可以在施用细胞或组合物之前、期间或之后提供，以在体外或体内增加 T 细胞或 NK 细胞的产生。

- 在一个方面，例如在施用本文所述的一种或多种细胞之前，对个体进行淋巴细胞清除（lymphodepletion）。在一个方面，淋巴细胞清除包括施用美法仑、环磷氮芥（cytoxan）、环
- 15 磷酰胺（cyclophosphamide）和氟达拉滨中的一种或多种。

- 在一个方面，工程化细胞作为组合治疗的一部分施用，例如与另一种治疗干预剂（例如抗体或工程化细胞或受体或活性剂，如细胞毒性剂或治疗剂）同时或以任何顺序依次施用。在一些实施方案中，以同时施用的方式或以任何顺序依次施用的方式，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干预联合施用。在一个方面，细胞与另一种疗法在足够
- 20 接近的时间共同施用，所述时间使得细胞群增强一种或多种另外的治疗剂的效果，或反之亦然。在一个方面，细胞在一种或多种另外的治疗剂之前施用。在一个方面，细胞在一种或多种另外的治疗剂如抗癌剂之后施用。在本公开的上下文中，预期细胞疗法可以类似地与化学治疗剂、放射治疗剂或免疫治疗干预以及促凋亡或细胞周期调节剂（如免疫检查点抑制剂）结合使用。

- 25 可替代地，本疗法可在其他活性剂治疗之前或之后间隔(范围从数分钟至数周)进行。在一些实施方案中，当将其他活性剂和本公开的细胞分别施用于个体时，通常应确保在每次递送的时间之间没有显著过长的时间段，以便活性剂和疗法仍然能够对细胞发挥有利的组合效果。在这种情况下，可以考虑，两种治疗方式与细胞的接触发生在彼此相隔约 12-24 小时的时间内、更优选在彼此相隔约 6-12 小时的时间内。然而，在一些情况下，可能需要显著延长治疗
- 30 的时间段，其中在各次施用之间间隔数天（2、3、4、5、6 或 7 天）至数周（1、2、3、4、5、6、7 或 8 周）。如果需要，可以考虑重复治疗周期。还可以考虑将各种标准疗法以及手术干预与细胞疗法组合应用。

VI. 序列

表 4. 本公开的序列

SEQ ID No:	名称	序列
1	Ofa-scFv	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNACKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYYGMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFLT TISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKRTV
2	Obin-scFv	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYAFSYSWINWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWQGQTLTVTSSGGGGSGGGGGSGGGGSDIVMTQTPLSLPVT PGEPA SISRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCAQNLELPYTFGGG TKVEIKRTV
3	RTX-scFv	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSGGGGSGGGGGSGGGGSIQVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSVSYIHWFFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKR
4	Ofa-VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNACKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYYGMDVWGQGTTVTVSS
5	Ofa-VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFLT TISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKRTV
6	Ofa HCDR1	DYAMH
7	Ofa HCDR2	TISWNSGSIGYADSVKG
8	Ofa HCDR3	DIQYGNYYYYGMDV
9	Ofa LCDR1	RASQSVSSYLA
10	Ofa LCDR2	DASNRA T
11	Ofa LCDR3	QQRSNWPIT
12	Obin-VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYAFSYSWINWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWQGQTLTVTSS
13	Obin-VL	DIVMTQTPLSLPVT PGEPA SISRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCAQNLELPYTFGGG TKVEIKRTV
14	Obin HCDR1	YSWIN
15	Obin HCDR2	RIFPGDGD TDYNGKFKG
16	Obin HCDR3	NVFDGYWLVY
17	Obin LCDR1	RSSKSLLSNGITYLY
18	Obin LCDR2	QMSNLVS
19	Obin LCDR3	AQNLELPYT
20	RTX-VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYM

		QLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVS
21	RTX-VL	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSP KPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYY CQQWTSNPPTFGGGTKLEIKR
22	RTX HCDR1	SYNMH
23	RTX HCDR2	AIYPGNGDTSYNQKFKG
24	RTX HCDR3	STYYGGDWYFNV
25	RTX LCDR1	RASSSVSYIH
26	RTX LCDR2	ATSNLAS
27	RTX LCDR3	QQWTSNPPT
28	接头	GGGSGGGSGGGSGGGS
29	CD8 铰链	PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD
30	CD28 铰链	KIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKP
31	IgG4 铰链	ESKYGPCPPCP
32	CD8 跨膜结构域	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
33	CD28 跨膜结构域	MFWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV
34	4-1BB	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
35	CD3 ζ	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
36	CAR-8	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAP GKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNACKSLYLQM NSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTITVTVSSG GGSGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSV SSYLAWYQQKPGQAPRLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTREIKRTVKIEV MYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPMFWVLV VVGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQ TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQL YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTY DALHMQUALPPR
37	CAR-4	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWINWVRQAP GQGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTITVTVSSGGG GSGGGSGGGGSDIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLH SNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGS TDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGTKEIKRTV ESKYGPCPPCPMFVVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVKR GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRV

		KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
38	CAR-7	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAP GKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQM NSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSV SSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKRTVESKY GPPCPPCPMFVWL VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRK KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSR SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
39	信号肽	METDTLLLWVLLLVPGSTG
40	EGFRt	MLLLVTSLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNI KHFKNCTSIISGDLHLIPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVE ITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIRGRTKQHGQFSLAVVSL NITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQ KTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRN VSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITC TGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCAPAGVMGENNTLVWKYA DAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNTPKIPSIATGMVGA LLLLLVVALGIGLFM
41	接头-1	(G ₄ S) _n , 其中“n”是 1、2、3、4、5、6、7 或 8, 特别是 3。
42	接头-2	(SG ₄) _n , 其中“n”是 1、2、3、4、5、6、7 或 8, 特别是 3。
43	接头-3	G ₄ (SG ₄) _n , 其中“n”是 1、2、3、4、5、6、7 或 8, 特别是 3。

VIII. 实施例

所包括的以下实施例仅用于举例说明目的，并不旨在限制本发明的范围。

重组 DNA 技术

- 5
- 使用标准方法操作 DNA，如 Sambrook 等人，Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 冷泉港, 纽约, 1989 中所述。根据制造商的说明书使用分子生物学试剂。关于人免疫球蛋白轻链和重链的核苷酸序列的一般信息参见：Kabat, E.A. 等人，(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版，NIH Publication No 91-3242。

DNA 测序

- 10
- 通过双链测序确定 DNA 序列。

基因合成

如果需要，所需的基因片段可以使用适当模板通过 PCR 产生，或者通过自动基因合成从合成的寡核苷酸和 PCR 产物合成。将侧翼为单限制性内切核酸酶切割位点的基因片段克隆到

标准克隆/测序载体中。从转化的细菌中纯化质粒 DNA 并通过 UV 光谱法测定浓度。通过 DNA 测序证实亚克隆基因片段的 DNA 序列。基因片段设计有合适的限制性位点，以允许亚克隆到相应的表达载体中。所有构建体均设计有编码前导肽的 5'-末端 DNA 序列，该前导肽指导蛋白质在真核细胞中分泌。

5 **实施例 1: Jurkat 细胞中 CD20 CAR 的产生和评估**

带有信号肽的表 5 中的 CAR 是通过将信号肽融合到 RTX-scFv, Obin-scFv 或 Ofa-scFv, 然后融合三个不同的间隔区和来源于人 CD28 或 CD8 的跨膜区以及编码来自 41BB 和 CD3ζ 的信号基序的胞内域形成的。各 CAR 与截短的 EGFR (EGFRt, 序列如 SEQ ID NO: 40 所示) 共表达, EGFRt 作为一个转导标志物使用。CAR 和 EGFRt 由单一启动子构建体编码, 由自身切割 T2A 肽分隔开。融合于 CAR 的 N 末端的信号肽的序列显示于 SEQ ID NO: 39。

10

表 5. 候选 CAR 的结构 (从 N 末端到 C 末端)

编号	抗原结合结构域	间隔区	跨膜结构域	共刺激结构域	初级胞内信号传导结构域
CAR-1	RTX-scFv	IgG4 铰链	CD28 跨膜结构域	4-1BB	CD3ζ
CAR-2	RTX-scFv	CD28 铰链	CD28 跨膜结构域		
CAR-3	RTX-scFv	CD8 铰链	CD8 跨膜结构域		
CAR-4	Obin-scFv	IgG4 铰链	CD28 跨膜结构域		
CAR-5	Obin-scFv	CD28 铰链	CD28 跨膜结构域		
CAR-6	Obin-scFv	CD8 铰链	CD8 跨膜结构域		
CAR-7	Ofa-scFv	IgG4 铰链	CD28 跨膜结构域		
CAR-8	Ofa-scFv	CD28 铰链	CD28 跨膜结构域		
CAR-9	Ofa-scFv	CD8 铰链	CD8 跨膜结构域		

Raji 细胞购自 ATCC (Cat No.: CCL-86)。通过 CRISPR-Cas9 介导的基因编辑敲除 MS4A1 (编码 CD20 的基因) 来产生 CD20^{KO} Raji 细胞。将不同的构建体转导到 CD20^{KO} Raji 细胞中以产生 CD20^{lo} Raji 细胞 (图 1A)。

15

Jurkat 76 细胞系 (Biovector, Cat#: 921816) 被工程化以在人 IL-2 启动子的控制下表达纳米荧光素酶。将编码每种融合蛋白的核酸分子分别克隆到慢病毒载体中, 并转导到该 IL-2 荧光素酶报告基因 Jurkat 细胞系中。然后将经转导的 Jurkat 细胞与 2 种不同的 Raji 细胞 (CD20^{KO}/CD20^{WT}) 以 5:1 的 E:T 比例共培养。24 小时后, 通过 PE Envision 多模式平板读取器测量上清液中的荧光素酶活性。

20

当与表达 CD20 的 Raji 细胞共培养时, 转导 CAR-4、CAR-7 和 CAR-8 的 Jurkat 细胞显示出更高的荧光素酶活性, 这表明更高的活化水平 (图 1B)。具有 CD28 铰链的 CAR-8 在含有 Ofa-scFv 的 CAR 中诱导最强的激活, 而具有 IgG4 铰链的 CAR (CAR1 和 CAR4) 在含有 Obin-scFv 或 RTX-scFv 的 CAR 中显示出优异的激活信号。

实施例 3: 原代人 T 细胞中 CD20 CAR 的产生和评估

产生表达各种 CAR 的原代人 T 细胞群。采用 CD3/CD28 珠 (DYNABEAD®) 刺激从健康供体的人 PBMC 样本中分离的 T 细胞。刺激三天后, 用慢病毒载体转导细胞, 所述慢病毒载体包含编码融合蛋白 CAR-4、CAR-7 和 CAR-8 的多核苷酸。转导效率通过转导 7 天后的 EGFR 染色测定。将转导的 T 细胞与 3 种不同的 Raji 细胞 (CD20^{WT}/CD20^{lo}/CD20^{KO}) 以 2:1 的 E:T 比例共培养。48 小时后, 分离细胞并用 CD3、EGFR、CD25、CD69 和 Ki67 染色。

在图 2A-2B 中, 与 CAR-7 T 细胞相比, CAR-4 和 CAR-8 显示出更高的 T 细胞活化标志物 CD25 和 CD69 的表达。当用 CD20^{lo} Raji 细胞攻击时, 这一点尤其明显。类似地, 在用 CD20^{lo}-Raji 细胞攻击并用增殖标志物 Ki67 染色时, CAR-4 和 CAR-8 相比 CAR-7 T 细胞略有改善(图 2C)。

实施例 3: 靶细胞刺激后细胞因子释放

使用实施例 2 的效应细胞评估细胞因子释放。收集实施例 2 中的上清液并分析累积的 IFN-γ 和 IL-2 细胞因子。结果示于图 3A-3B 中。细胞因子分泌与抗原表达呈正相关。在与野生型或低表达 CD20 的肿瘤细胞系共培养后, 转导了 CAR-8 的 T 细胞显示出最高的 IFNγ 和 IL-2 分泌。相反, 当用低表达靶标攻击时, CAR-4 具有较低的细胞因子分泌, CAR-7 具有接近背景的背景细胞因子分泌。

实施例 4: CD20 CAR 构建体的杀伤效率

用慢病毒载体转导来自 4 个健康供体的原代人 T 细胞, 该慢病毒载体包含编码实施例 2 中的融合蛋白 CAR-4、CAR-7 或 CAR-8 的多核苷酸。采用 CellTrace Far Red 预染色的 3 种不同 Raji 细胞与转导的 T 细胞以 2:1 的 E:T 比例共培养。将 CellEvent Caspase3/7 绿色检测试剂添加到细胞混合物中以监测靶细胞的凋亡。通过 Incucyte 活细胞分析系统 SX5 每隔 4 小时测量一次, 监测 24 小时的凋亡细胞信号。

每种 CAR-T 的杀伤得分计算为来自靶细胞组的 Caspase3/7 信号与来自单独 CAR-T 组的信号之比。在用 CD20^{lo} Raji 细胞攻击时, CAR-8 相比 CAR-4 显示出优异的杀伤得分(图 4)。当与 CD20^{lo} Raji 靶标共培养时, CAR-7 杀伤得分与背景 CD20^{KO} 对照水平相似。与 CAR-4 和 CAR-7 相比, CAR8 T 细胞对 CD20^{KO} Raji 细胞的非特异性杀伤得分也略低(图 4)。

权 利 要 求

1. 一种融合蛋白，其包含胞外抗原结合结构域，跨膜结构域，位于所述胞外抗原结合结构域和所述跨膜结构域之间的间隔区，和胞内信号传导结构域，其中：
- 5 a) 所述胞外抗原结合结构域能够特异性地与包含 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列的参比抗体结合 CD20 上的相同表位；
- b) 所述间隔区由来自 CD28 的铰链结构域或来自免疫球蛋白的铰链结构域组成，其中所述由来自免疫球蛋白的铰链结构域组成的间隔区的长度为 12、13、14 或 15 个氨基酸；
- c) 所述跨膜结构域包含来自 CD28 的跨膜结构域；以及
- 10 d) 所述胞内信号传导结构域包含初级胞内信号传导结构域和位于所述跨膜结构域和所述初级胞内信号传导结构域之间的共刺激信号传导结构域，其中所述共刺激信号传导结构域包含 CD137 的信号传导结构域，所述初级胞内信号传导结构域包含 CD3 ζ 的胞质信号传导结构域。
2. 根据权利要求 1 所述的融合蛋白，其中所述胞外抗原结合结构域包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），其中：
- 15 所述 VH 包含分别含有 SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7 和 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 VL 包含分别含有 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10 和 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或
- 所述 VH 包含分别含有 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 16 的氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 VL 包含分别含有 SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18
- 20 和 SEQ ID NO: 19 的氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或
- 所述 VH 包含分别含有 SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23 和 SEQ ID NO: 24 的氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 VL 包含分别含有 SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26 和 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；
- 优选地，所述 VH 包含与 SEQ ID NO: 4 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列，所述
- 25 VL 包含与 SEQ ID NO: 5 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列；或
- 所述 VH 包含与 SEQ ID NO: 12 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列，所述 VL 包含与 SEQ ID NO: 13 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列；或
- 所述 VH 包含与 SEQ ID NO: 20 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列，所述 VL 包含与 SEQ ID NO: 21 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列；或
- 30 更优选地，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列；或

所述 VH 包含 SEQ ID NO: 12 的氨基酸序列, 所述 VL 包含 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列; 或

所述 VH 包含 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列, 所述 VL 包含 SEQ ID NO: 21 的氨基酸序列。

5 3. 根据权利要求 1 或 2 所述的融合蛋白, 其中所述胞外抗原结合结构域是 scFv;

优选地, 所述 VH 通过其 C 末端经由柔性多肽接头与所述 VL 的 N 末端融合;

更优选地, 所述胞外抗原结合结构域包含 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的融合蛋白, 其中所述间隔区由来自 CD28 的铰链
10 结构域组成;

优选地, 所述间隔区由 SEQ ID NO: 30 的氨基酸序列组成。

5. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的融合蛋白, 其中所述间隔区由来自 IgG4 的铰链
结构域组成, 其中所述由来自 IgG4 的铰链结构域组成的间隔区的长度为 12 个氨基酸;

优选地, 所述间隔区由 SEQ ID NO: 31 的氨基酸序列组成。

15 6. 根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的融合蛋白, 其中所述跨膜结构域包含 SEQ ID
NO: 33 的氨基酸序列。

7. 根据权利要求 1 至 6 中任一项所述的融合蛋白, 其中所述初级胞内信号传导结构域
包含 SEQ ID NO: 35 的氨基酸序列。

8. 根据权利要求 1 至 7 中任一项所述的融合蛋白, 其中所述共刺激信号传导结构域包
20 含 SEQ ID NO: 34 的氨基酸序列。

9. 根据权利要求 1 至 4 和 6 至 8 中任一项所述的融合蛋白, 其中:

a) 所述胞外抗原结合结构域能够特异性地与包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列的参比抗
体结合 CD20 上的相同表位;

b) 所述间隔区由来自 CD28 的铰链结构域组成;

25 c) 所述跨膜结构域包含来自 CD28 的跨膜结构域; 和

d) 所述胞内信号传导结构域包含 CD137 的信号传导结构域和 CD3 ζ 的胞质信号传导结
构域;

优选地,

a) 所述胞外抗原结合结构域包含 VH 和 VL, 其中 VH 包含分别含有 SEQ ID NO: 6、
30 SEQ ID NO: 7 和 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 和 VL 包含分

别含有 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10 和 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3;

- b) 所述间隔区由 SEQ ID NO: 30 的氨基酸序列组成;
- c) 所述跨膜结构域包含 SEQ ID NO: 33 的氨基酸序列; 和
- 5 d) 所述胞内信号传导结构域包含 SEQ ID NO: 34 和 SEQ ID NO: 35 的氨基酸序列;
更优选地, 所述融合蛋白包含 SEQ ID NO: 36 的氨基酸序列。
- 10. 根据权利要求 1 至 3 和 5 至 8 中任一项所述的融合蛋白, 其中:
 - a) 所述胞外抗原结合结构域能够特异性地与包含 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的参比抗体结合 CD20 上的相同表位;
 - 10 b) 所述间隔区由来自 IgG4 的铰链结构域组成, 其中所述由来自 IgG4 的铰链结构域组成的间隔区的长度为 12 个氨基酸;
 - c) 所述跨膜结构域包含来自 CD28 的跨膜结构域; 和
 - d) 所述胞内信号传导结构域包含 CD137 的信号传导结构域和 CD3 ζ 的胞质信号传导结构域;
 - 15 优选地,
 - a) 所述胞外抗原结合结构域包含 VH 和 VL, 所述 VH 包含分别含有 SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7 和 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 所述 VL 包含分别含有 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10 和 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3; 或
 - 20 所述 VH 包含分别含有 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 16 的氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 所述 VL 包含分别含有 SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19 的氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3;
 - b) 所述间隔区由 SEQ ID NO: 31 的氨基酸序列组成;
 - c) 所述跨膜结构域包含 SEQ ID NO: 33 的氨基酸序列; 和
 - 25 d) 所述胞内信号传导结构域包含 SEQ ID NO: 34 和 SEQ ID NO: 35 的氨基酸序列;
更优选地, 所述融合蛋白包含 SEQ ID NO: 37 或 SEQ ID NO: 38 的氨基酸序列。
 - 11. 一种分离的核酸, 其编码权利要求 1 至 10 中任一项所述的融合蛋白。
 - 12. 一种载体, 其包含权利要求 11 所述的核酸, 优选地, 所述载体是病毒载体, 更优选地, 所述病毒载体是逆转录病毒、慢病毒、腺病毒或腺相关病毒载体。

13. 一种细胞，其包含权利要求 1 至 10 中任一项所述的融合蛋白、权利要求 11 所述的分离的核酸或权利要求 12 所述的载体，优选地，所述细胞是淋巴细胞，更优选地，所述细胞是 NK 细胞或 T 细胞。

14. 一种药物制剂，其包含权利要求 1 至 10 中任一项所述的融合蛋白、权利要求 11 所述的分离的核酸、权利要求 12 所述的载体或权利要求 13 所述的细胞和药学上可接受的载体。

15. 一种治疗个体中的与 CD20 相关的疾病或病症的方法，其包括向个体施用权利要求 1 至 10 中任一项所述的融合蛋白、权利要求 11 所述的分离的核酸、权利要求 12 所述的载体、权利要求 13 所述的细胞或权利要求 14 所述的药物制剂；任选地所述个体患有复发性的或难治性的与 CD20 相关的疾病或病症，或之前接受过至少一个包含针对 CD20 的药物的方案的治疗；

优选地，所述疾病或病症是癌症或自身免疫病；

更优选地，癌症选自白血病、淋巴瘤、肺癌、肝癌、黑素瘤、乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、肾细胞癌、卵巢癌、成神经细胞瘤和横纹肌肉瘤；所述自身免疫性疾病选自类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮，多发性硬化、韦格纳病、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、特发性血小板减少性紫癜、血栓性血小板减少性紫癜、自身免疫性血小板减少症、银屑病、IgA 肾病、IgM 多发性神经病、重症肌无力、ANCA 相关血管炎、糖尿病、雷诺综合征、干燥综合征、视神经脊髓炎和肾小球肾炎。