



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112105368 A

(43) 申请公布日 2020.12.18

(21) 申请号 201980030423.9

(22) 申请日 2019.03.28

(30) 优先权数据

62/649,265 2018.03.28 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.11.05

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/024693 2019.03.28

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/191501 EN 2019.10.03

(71) 申请人 得克萨斯大学体系董事会

地址 美国得克萨斯

(72) 发明人 C·翊 J·王

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

代理人 陈晓娜

(51) Int.Cl.

A61K 35/13 (2006.01)

A61K 35/17 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

C12N 5/0783 (2006.01)

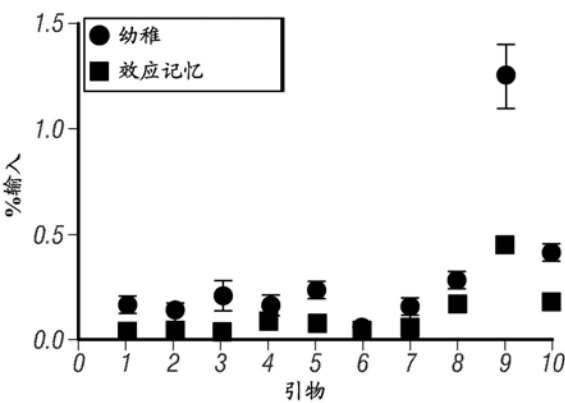
权利要求书4页 说明书30页
序列表4页 附图56页

(54) 发明名称

组蛋白修饰剂将效应T细胞重编程的用途

(57) 摘要

本公开内容提供了将效应T细胞重编程为中央记忆表型的方法,所述方法包括用组蛋白脱乙酰酶抑制剂(HDACi)和IL-21培养效应T细胞。本公开内容进一步提供了治疗癌症的方法,所述方法包括施用中央记忆T细胞。



1. 一种将抗原特异性效应T细胞 (T_{EFF} 细胞) 重编程为中央记忆T细胞 (T_{CM} 细胞) 的方法, 所述方法包括:

(a) 从受试者获得包含 T_{EFF} 细胞的淋巴细胞的起始群体;

(b) 任选地从包含 T_{EFF} 细胞的淋巴细胞的起始群体制备富含 T_{EFF} 细胞的样品; 和

(c) 在组蛋白脱乙酰酶抑制剂 (HDACi) 和白介素-21 (IL-21) 各自以足以将 T_{EFF} 细胞重编程为 T_{CM} 细胞的量的存在下, 培养包含 T_{EFF} 细胞的淋巴细胞的起始群体或富含 T_{EFF} 细胞的样品,

其中, 与从受试者获得的包含 T_{EFF} 细胞的淋巴细胞的起始群体中的 T_{CM} 细胞的数目相比, 所述重编程产生富含 T_{CM} 细胞的淋巴细胞群体。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述获得包含 T_{EFF} 细胞的淋巴细胞的起始群体包括从受试者采集肿瘤浸润性淋巴细胞 (TIL) 的样品或包含外周血单核细胞 (PBMC) 的样品。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法, 所述方法另外包括从包含 T_{EFF} 细胞的淋巴细胞的起始群体制备富含 T_{EFF} 细胞的样品的步骤。

4. 根据权利要求3所述的方法, 其中所述从包含 T_{EFF} 细胞的淋巴细胞的起始群体制备富含 T_{EFF} 细胞的样品的步骤包括从包含 T_{EFF} 细胞的淋巴细胞的起始群体分离 $CD8^+T_{EFF}$ 细胞。

5. 根据权利要求4所述的方法, 其中所述从包含 T_{EFF} 细胞的淋巴细胞的起始群体制备富含 T_{EFF} 细胞的样品的步骤进一步包括将包含 T_{EFF} 细胞的淋巴细胞的起始群体耗竭骨髓来源的抑制细胞 (MDSC)、 T_{REG} 、NK细胞和巨噬细胞。

6. 根据权利要求3所述的方法, 其中所述从包含 T_{EFF} 细胞的淋巴细胞的起始群体制备富含 T_{EFF} 细胞的样品的步骤包括将包含 T_{EFF} 细胞的淋巴细胞的起始群体耗竭骨髓来源的抑制细胞 (MDSC)、 T_{REG} 、NK细胞和巨噬细胞。

7. 根据权利要求4所述的方法, 其中所述从包含 T_{EFF} 细胞的淋巴细胞的起始群体制备富含 T_{EFF} 细胞的样品的步骤进一步包括从包含 T_{EFF} 细胞的淋巴细胞的起始群体分离 $CD8^+T_{EFF}$ 细胞。

8. 根据权利要求5或权利要求7所述的方法, 其中所述 $CD8^+T_{EFF}$ 细胞表达CD45RO。

9. 根据权利要求8所述的方法, 其中在加入IL-21之前在HDACi的存在下培养 $CD8^+T_{EFF}$ 细胞。

10. 根据权利要求9所述的方法, 其中在加入IL-21之前在HDACi的存在下培养 $CD8^+T_{EFF}$ 细胞12-48小时。

11. 根据权利要求9所述的方法, 其中在加入IL-21之前在HDACi的存在下培养 $CD8^+T_{EFF}$ 细胞1-3天。

12. 根据权利要求8所述的方法, 其中在加入HDACi之前在IL-21的存在下培养 $CD8^+T_{EFF}$ 细胞。

13. 根据权利要求12所述的方法, 其中在加入HDACi之前在IL-21的存在下培养 $CD8^+T_{EFF}$ 细胞12-48小时。

14. 根据权利要求12所述的方法, 其中在加入HDACi之前在IL-21的存在下培养 $CD8^+T_{EFF}$ 细胞1-3天。

15. 根据权利要求8所述的方法, 其中在HDACi和IL-21的同时存在下培养 $CD8^+T_{EFF}$ 细胞。

16. 根据权利要求15所述的方法, 其中所述培养持续7-20天。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述培养持续12-16天。
18. 根据权利要求12、权利要求13或权利要求14所述的方法,其中所述IL-21以10ng/mL至50ng/mL的浓度存在。
19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述IL-21以20ng/mL至40ng/mL的浓度存在。
20. 根据权利要求9、权利要求10或权利要求11所述的方法,其中所述HDACi以1nM至5nM的浓度存在。
21. 根据权利要求20所述的方法,其中所述HDACi以2nM至4nM的浓度存在。
22. 根据权利要求15、权利要求16或权利要求17所述的方法,其中所述IL-21以10ng/mL至50ng/mL的浓度存在,且所述HDACi以1nM至5nM的浓度存在。
23. 根据权利要求22所述的方法,其中所述IL-21以20ng/mL至40ng/mL的浓度存在,且所述HDACi以2nM至4nM的浓度存在。
24. 根据权利要求9、10、11、15、16、17、20、21、22和23中任一项所述的方法,其中所述HDACi是经典HDACi。
25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述经典HDACi选自曲古抑菌素A、trapoxin B、苯基丁酸盐、丙戊酸、伏林司他 (suberanilohydroxamic acid或SAHA,作为**Zolinza®**销售)、贝利司他(PXD101,作为**Beleodaq®**销售)、帕比司他(作为**Farydaq®**销售)、达西司他(LAQ824)、恩替司他(SNDX-275或MS-275)、他地那兰(CI994)和莫西司他(MGCD0103)。
26. 根据权利要求25所述的方法,其中所述HDACi是SAHA。
27. 根据权利要求26所述的方法,其中所述HDAC是帕比司他。
28. 根据权利要求1-27中的任一项所述的方法,其中得到的T_{CM}细胞是CD8⁺且也表达CD45R0、CD28、CD62L和CCR7中的至少两种。
29. 根据权利要求28所述的方法,其中得到的T_{CM}细胞是CD8⁺且也表达CD45R0、CD28、CD62L和CCR7中的至少三种。
30. 根据权利要求28所述的方法,其中得到的T_{CM}细胞是CD8⁺且也表达CD45R0、CD28、CD62L和CCR7(即,是CD8⁺/CD45R0⁺/CD28⁺/CD62L⁺/CCR7⁺)。
31. 根据权利要求28、权利要求29或权利要求30所述的方法,其中得到的T_{CM}细胞也表达增加水平的颗粒酶B和穿孔蛋白1。
32. 根据权利要求31所述的方法,所述方法进一步包括扩增T_{CM}细胞的步骤。
33. 根据权利要求32所述的方法,其中所述扩增包括用抗-CD3、抗-CD28和抗-CD137/4-1BB中的至少一种处理T_{CM}细胞。
34. 根据权利要求33所述的方法,其中所述扩增包括用抗-CD3和抗-CD28处理T_{CM}细胞。
35. 根据权利要求33所述的方法,其中所述扩增包括用抗-CD3、抗-CD28和抗-CD137/4-1BB处理T_{CM}细胞。
36. 根据权利要求1-35中的任一项所述的方法,所述方法进一步包括:在HDACi和IL-21各自以足以将T_{EFF}细胞重编程为T_{CM}细胞的量的存在下培养包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体或富含T_{EFF}细胞的样品的步骤之前或与此并行地,使包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体或富含T_{EFF}细胞的样品与IL-2接触的步骤。
37. 根据权利要求36所述的方法,其中所述富含T_{CM}细胞的淋巴细胞群体包含与包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体相比多至少5倍的T_{CM}细胞。

38. 根据权利要求36所述的方法,其中所述富含T_{CM}细胞的淋巴细胞群体包含与包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体相比多至少10倍的T_{CM}细胞。

39. 根据权利要求36所述的方法,其中所述富含T_{CM}细胞的淋巴细胞群体包含与包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体相比多至少30倍的T_{CM}细胞。

40. 根据权利要求36所述的方法,其中与响应于IL-2和/或IL-15处理的包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体相比,富含T_{CM}细胞的淋巴细胞群体响应于IL-2和/或IL-15处理而表现出增加的增殖。

41. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1-40中任一项所述的方法产生的富含T_{CM}细胞的淋巴细胞群体。

42. 根据权利要求41所述的药物组合物,其用于治疗癌症。

43. 治疗有效量的根据权利要求1-40中任一项所述的方法产生的富含T_{CM}细胞的淋巴细胞群体用于治疗癌症的用途。

44. 用于治疗受试者中的癌症的组合物,其包含治疗有效量的通过权利要求1-40中任一项所述的方法产生的富含T_{CM}细胞的淋巴细胞群体。

45. 一种治疗受试者中的癌症的方法,所述方法包括给所述受试者施用治疗有效量的通过权利要求1-40中任一项所述的方法产生的富含T_{CM}细胞的淋巴细胞群体或根据权利要求41所述的药物组合物。

46. 根据权利要求45所述的方法,所述方法进一步包括在施用治疗有效量的富含T_{CM}细胞的淋巴细胞群体之前对所述受试者执行淋巴细胞耗竭的步骤。

47. 根据权利要求46所述的方法,其中所述治疗有效量的富含T_{CM}细胞的淋巴细胞群体衍生自具有抗肿瘤活性的自体肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)的样品。

48. 根据权利要求45、权利要求46或权利要求47所述的方法,其中将富含T_{CM}细胞的淋巴细胞群体静脉内地、腹膜内地或肿瘤内地施用给所述受试者。

49. 根据权利要求48所述的方法,其中所述受试者是人。

50. 根据权利要求49所述的方法,所述方法另外包括给所述受试者施用至少一种额外治疗剂的步骤。

51. 根据权利要求50所述的方法,其中所述至少一种额外治疗剂选自化学疗法、放射疗法和免疫疗法。

52. 根据权利要求51所述的方法,其中所述至少一种额外治疗剂是免疫疗法。

53. 根据权利要求52所述的方法,其中所述免疫疗法是免疫检查点抑制剂。

54. 根据权利要求53所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂抑制选自CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、BTLA、B7H3、B7H4、TIM3、KIR或腺苷A2a受体(A2aR)的免疫检查点蛋白或其配体。

55. 根据权利要求54所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂抑制PD-1。

56. 根据权利要求54所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂抑制CTLA-4。

57. 一种从T_{EFF}细胞产生T_{CM}细胞的方法,所述方法包括:

(a) 从受试者获得包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体;

(b) 向包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体同时加入浓度为2nM至4nM的HDACi和浓度为20ng/mL至40ng/mL的IL-21;和

(c) 将包含 T_{EFF} 细胞的淋巴细胞的起始群体培养12-16天,由此重编程 T_{EFF} 细胞,以产生与包含 T_{EFF} 细胞的淋巴细胞的起始群体中的 T_{CM} 细胞的数目相比富含 T_{CM} 细胞的淋巴细胞群体。

58. 包含人中央记忆样 $CD8^+$ T细胞群体的组合物,其中至少20%的T细胞是 $CD28^+CD62L^+CD127^-CCR7^-$ T细胞。

59. 根据权利要求58所述的组合物,其中至少50%的T细胞是 $CD28^+CD62L^+CD127^-CCR7^-$ T细胞。

60. 根据权利要求58所述的组合物,其中至少60%的T细胞是 $CD28^+CD62L^+CD127^-CCR7^-$ T细胞。

61. 根据权利要求58所述的组合物,其中所述 $CD28^+CD62L^+CD127^-CCR7^-$ T细胞进一步表达Lef1和/或Tcf1。

62. 根据权利要求58所述的组合物,其中所述 $CD28^+CD62L^+CD127^-CCR7^-$ T细胞基本上不具有CD45RA和/或CD45RO表达。

组蛋白修饰剂将效应T细胞重编程的用途

[0001] 本申请要求于2018年3月28日提交的美国临时专利申请号62/649,265的权益,其通过引用整体并入本文。

[0002] 序列表的并入

[0003] 在大小为3.81KB(在Microsoft Windows中测量)且于2019年3月28日创建的名称为“UTFC.P1311WO_ST25.txt”的文件中所含的序列表通过电子呈递随同提交,并通过引用并入本文。

技术领域

[0004] 本发明总体上涉及医学和免疫学的领域。更具体地,本发明涉及产生具有中央记忆表型的T细胞的方法。

技术背景

[0005] 已经证实过继性T细胞疗法(ACT)(即离体激活和扩增的自体肿瘤特异性T淋巴细胞的施用)在先前用常规疗法难治的转移性黑素瘤患者中诱导临床应答。患者应答率与体内输入的T细胞的持久性相关。但是,在外周血和肿瘤部位发现的抗原特异性T细胞经常是分化良好的效应细胞、效应记忆细胞,且有时是具有非常有限的增殖能力的末端效应细胞。中央记忆CD8⁺T细胞能够自我更新并高表达共刺激受体CD28和其它记忆相关的标志物(例如,CD127和CD62L)(Klebanoff等人,2005)。因此,对从分化良好的效应细胞产生能够自我更新的中央记忆T细胞的方法存在未得到满足的需要。这些具有中央记忆表型的T细胞由于其在体内增加的持久性而可以以高应答率用于ACT。

发明内容

[0006] 本公开内容的某些实施方案提供了用于从具有效应子表型的T细胞产生具有中央记忆表型的T细胞的方法(例如,体外或离体),例如通过重编程或去分化进行。

[0007] 在一个实施方案中,提供了一种用于将抗原特异性效应T细胞(T_{EFF}细胞)重编程为中央记忆T细胞(T_{CM}细胞)的方法,所述方法包括:从受试者获得包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体;任选地从包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体制备富含T_{EFF}细胞的样品;和在组蛋白脱乙酰酶抑制剂(HDACi)和白介素-21(IL-21)各自以足以将T_{EFF}细胞重编程为T_{CM}细胞的量的存在下,培养包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体或富含T_{EFF}细胞的样品,其中与从受试者获得的包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体中的T_{CM}细胞的数目相比,所述重编程产生富含T_{CM}细胞的淋巴细胞群体。

[0008] 在某些方面,获得包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体包括从受试者采集肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)的样品或包含外周血单核细胞(PBMC)的样品。在另外的方面,该方法进一步包括从包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体制备富含T_{EFF}细胞的样品的步骤。在某些方面,从包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体制备富含T_{EFF}细胞的样品的步骤包括从包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体分离CD8⁺T_{EFF}细胞。

[0009] 在某些方面,从包含 T_{EFF} 细胞的淋巴细胞的起始群体制备富含 T_{EFF} 细胞的样品的步骤进一步包括将包含 T_{EFF} 细胞的淋巴细胞的起始群体耗竭骨髓来源的抑制细胞(MDSC)、 T_{REG} 、NK细胞和巨噬细胞。在某些方面,从包含 T_{EFF} 细胞的淋巴细胞的起始群体制备富含 T_{EFF} 细胞的样品的步骤包括将包含 T_{EFF} 细胞的淋巴细胞的起始群体耗竭骨髓来源的抑制细胞(MDSC)、 T_{REG} 、NK细胞和巨噬细胞。在某些方面,从包含 T_{EFF} 细胞的淋巴细胞的起始群体制备富含 T_{EFF} 细胞的样品的步骤进一步包括从包含 T_{EFF} 细胞的淋巴细胞的起始群体分离 $CD8^+T_{EFF}$ 细胞。

[0010] 在某些方面, $CD8^+T_{EFF}$ 细胞表达CD45R0。在某些方面,所述 $CD8^+T_{EFF}$ 细胞具有CD45R0的高表达。在特定方面,相对于对照群体中细胞表面标志物、抗原或蛋白的表达水平,定义所述细胞表面标志物、抗原或蛋白的阳性、高或低表达。在特定方面,对照群体是细胞表面标志物、抗原或蛋白阴性或具有不可检测水平的群体。在某些方面,对照群体与具有阳性、高或低表达的群体在同一样品中。在其它方面,对照群体所在的样品基本上类似于含有具有阳性、高或低表达的群体的样品。例如,CD45R0在 $CD8^+T_{EFF}$ 细胞中的高表达可以定义为与CD45R0在对照群体的 $CD8^+T_{EFF}$ 细胞中的表达水平相比升高的表达水平。相对表达水平可以测量为细胞表面标志物、抗原或蛋白的相对荧光信号,特别是通过流式细胞术测量。

[0011] 在特定情况下,细胞表面标志物、抗原或蛋白的高表达可能对应于比在低表达群体中确定的表达水平大2、3、4、5、6、7、8、9或10(或其中可衍生的任何值)倍的表达。具体地,细胞表面标志物、抗原或蛋白的高表达可能对应于相对于对照细胞群体的荧光信号大2、3、4、5、6、7、8、9或10(或其中可衍生的任何值)倍的荧光信号。对照细胞群体可以是具有细胞表面标志物、抗原或蛋白的低的、不可检测的或正常的表达的细胞群体。在其它情况下,细胞表面标志物、抗原或蛋白的高表达可能对应于比在低表达群体中确定的表达水平大20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、1000或10,000(或其中可衍生的任何值)倍的表达。细胞表面标志物、抗原或蛋白的高表达可能对应于相对于对照细胞群体的荧光信号大20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、1000或10,000(或其中可衍生的任何值)倍的荧光信号。

[0012] 细胞表面标志物、抗原或蛋白的低表达可能对应于相对于与所述表面标志物或抗原的阴性或不可检测的表达水平的相应的荧光信号大2、3、4、5、6、7、8、9或10(或其中可衍生的任何值)倍的荧光信号。细胞表面标志物、抗原或蛋白的低表达可能对应于相对于与所述表面标志物或抗原的阴性或不可检测的表达水平的相应的荧光信号大20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、1000或10,000(或其中可衍生的任何值)倍的荧光信号。

[0013] 阳性表达表示,通过给定的检测方法(诸如荧光信号的检测)可检测的细胞表面标志物、抗原或蛋白的表达水平。本文中使用的的高表达水平和低表达水平均可被认为是阳性表达。

[0014] 在某些方面,在加入IL-21之前在HDACi的存在下培养 $CD8^+T_{EFF}$ 细胞。在特定方面,在加入IL-21之前在HDACi的存在下培养 $CD8^+T_{EFF}$ 细胞12-48小时(例如,12-15、15-20、20-25、25-30、30-35、35-40或40-48小时)。在某些方面,在加入IL-21之前在HDACi的存在下培养 $CD8^+T_{EFF}$ 细胞1-3天(例如,1、2或3天)。在具体方面,在加入HDACi之前在IL-21的存在下培养 $CD8^+T_{EFF}$ 细胞。在某些方面,在加入HDACi之前在IL-21的存在下培养 $CD8^+T_{EFF}$ 细胞12-48小时(例如,12-15、15-20、20-25、25-30、30-35、35-40或40-48小时)。在特定方面,在加入

HDACi之前在IL-21的存在下培养CD8⁺T_{EFF}细胞1-3天,诸如1、2或3天。在某些方面,在HDACi和IL-21的同时存在下培养CD8⁺T_{EFF}细胞。在某些方面,所述培养持续7-20天(例如,8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天)。在某些方面,所述培养持续12-16天(例如,12、13、14、15或16天)。在具体方面,IL-21以10ng/mL至50ng/mL(例如,10-20、20-30、30-40或40-50ng/mL)的浓度存在。在特定方面,IL-21以20ng/mL至40ng/mL(例如,20-25、25-30、30-35或35-40ng/mL)的浓度存在。在某些方面,HDACi以1nM至5nM(例如,1-2、2-3、3-4或4-5nM)的浓度存在。在特定方面,HDACi以2nM至4nM(例如,2、3或4nM)的浓度存在。在某些方面,IL-21以10ng/mL至50ng/mL(例如,10-20、20-30、30-40或40-50ng/mL)的浓度存在,且HDACi以1nM至5nM(例如,1-2、2-3、3-4或4-5nM)的浓度存在。在某些方面,IL-21以20ng/mL至40ng/mL(例如,20-25、25-30、30-35或35-40ng/mL)的浓度存在,且HDACi以2nM至4nM(例如,2、3或4nM)的浓度存在。

[0015] 在某些方面,所述HDACi是经典HDACi。在某些方面,经典HDACi选自曲古抑菌素A(trichostatin A)、trapoxin B、苯基丁酸盐(phenylbutyrate)、丙戊酸、伏林司他(vorinostat, suberanilohydroxamic acid或SAHA,作为**Zolinza®**)销售、贝利司他(belinostat, PXD101,作为**Beleodaq®**销售)、帕比司他(panobinostat,作为**Farydaq®**销售)、达西司他(dacinostat, LAQ824)、恩替司他(entinostat, SNDX-275或MS-275)、他地那兰(tacedinaline, CI994)和莫西司他(mocetinostat, MGCD0103)。在特定方面,HDACi是SAHA。在其它方面,HDAC是帕比司他。

[0016] 在某些方面,得到的T_{CM}细胞是CD8⁺且也表达CD45R0、CD28、CD62L和CCR7中的至少两种。在某些方面,得到的T_{CM}细胞是CD8⁺且具有CD45R0、CD28、CD62L和CCR7中的至少两种的高表达。在某些方面,得到的T_{CM}细胞是CD8⁺且也表达CD45R0、CD28、CD62L和CCR7中的至少三种(即,是CD8⁺/CD45R0⁺/CD28⁺/CD62L⁺/CCR7⁺)。在某些方面,得到的T_{CM}细胞是CD8⁺且也具有CD45R0、CD28、CD62L和CCR7的高表达。在某些方面,得到的T_{CM}细胞也表达增加的水平的颗粒酶B和穿孔蛋白1。

[0017] 在另外的方面,该方法进一步包括扩增T_{CM}细胞的步骤。在某些方面,扩增包括用抗-CD3、抗-CD28和抗-CD137/4-1BB中的至少一种处理T_{CM}细胞。在某些方面,扩增包括用抗-CD3和抗-CD28处理T_{CM}细胞。在具体方面,扩增包括用抗-CD3、抗-CD28和抗-CD137/4-1BB处理T_{CM}细胞。

[0018] 在其它方面,该方法进一步包括,在HDACi和IL-21各自以足以将T_{EFF}细胞重编程为T_{CM}细胞的量的存在下培养包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体或富含T_{EFF}细胞的样品的步骤之前或与此并行地,使包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体或富含T_{EFF}细胞的样品与IL-2接触的步骤。在某些方面,与包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体相比,富含T_{CM}细胞的淋巴细胞群体包含多至少5倍(例如,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倍或更高)的T_{CM}细胞。在某些方面,与包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体相比,富含T_{CM}细胞的淋巴细胞群体包含多至少10倍的T_{CM}细胞。在具体方面,与包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体相比,富含T_{CM}细胞的淋巴细胞群体包含多至少30倍的T_{CM}细胞。在某些方面,与响应于IL-2和/或IL-15处理的包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体相比,富含T_{CM}细胞的淋巴细胞群体响应于IL-2和/或IL-15处理而表

现出增加的增殖。

[0019] 在另一个实施方案中,提供了一种药物组合物,其包含根据所述实施方案(例如,从受试者获得包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体;任选地从包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体制备富含T_{EFF}细胞的样品;和在组蛋白脱乙酰酶抑制剂(HDACi)和白介素-21(IL-21)各自以足以将T_{EFF}细胞重编程为T_{CM}细胞的量的存在下,培养包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体或富含T_{EFF}细胞的样品,其中与从受试者获得的包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体中的T_{CM}细胞的数目相比,所述重编程产生富含T_{CM}细胞的淋巴细胞群体)产生的富含T_{CM}细胞的淋巴细胞群体。本文进一步提供了用于治疗癌症的实施方案的药物组合物。

[0020] 另一个实施方案提供了治疗有效量的根据所述实施方案(例如,从受试者获得包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体;任选地从包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体制备富含T_{EFF}细胞的样品;和在组蛋白脱乙酰酶抑制剂(HDACi)和白介素-21(IL-21)各自以足以将T_{EFF}细胞重编程为T_{CM}细胞的量的存在下,培养包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体或富含T_{EFF}细胞的样品,其中与从受试者获得的包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体中的T_{CM}细胞的数目相比,所述重编程产生富含T_{CM}细胞的淋巴细胞群体)产生的富含T_{CM}细胞的淋巴细胞群体用于治疗癌症的用途。

[0021] 在另一个实施方案中,提供了用于治疗受试者中的癌症的组合物,其包含治疗有效量的通过实施方案的方法(例如,从受试者获得包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体;任选地从包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体制备富含T_{EFF}细胞的样品;和在组蛋白脱乙酰酶抑制剂(HDACi)和白介素-21(IL-21)各自以足以将T_{EFF}细胞重编程为T_{CM}细胞的量的存在下,培养包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体或富含T_{EFF}细胞的样品,其中与从受试者获得的包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体中的T_{CM}细胞的数目相比,所述重编程产生富含T_{CM}细胞的淋巴细胞群体)产生的富含T_{CM}细胞的淋巴细胞群体。

[0022] 另一个实施方案提供了一种治疗受试者中的癌症的方法,所述方法包括给所述受试者施用治疗有效量的通过实施方案的方法产生的富含T_{CM}细胞的淋巴细胞群体或实施方案的药物组合物。在某些方面,该方法进一步包括在施用治疗有效量的富含T_{CM}细胞的淋巴细胞群体之前对所述受试者执行淋巴细胞耗竭的步骤。在某些方面,从具有抗肿瘤活性的自体肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)的样品衍生出治疗有效量的富含T_{CM}细胞的淋巴细胞群体。在某些方面,将富含T_{CM}细胞的淋巴细胞群体静脉内地、腹膜内地或肿瘤内地施用给所述受试者。在特定方面,所述受试者是人。

[0023] 在另外的方面,该方法进一步包括给所述受试者施用至少一种额外治疗剂的步骤。在某些方面,至少一种额外治疗剂选自化学疗法、放射疗法和免疫疗法。在特定方面,至少一种额外治疗剂是免疫疗法。在具体方面,免疫疗法是免疫检查点抑制剂。在某些方面,免疫检查点抑制剂抑制选自CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、BTLA、B7H3、B7H4、TIM3、KIR或腺苷A2a受体(A2aR)的免疫检查点蛋白或其配体。在特定方面,免疫检查点抑制剂抑制PD-1。在某些方面,免疫检查点抑制剂抑制CTLA-4。

[0024] 在另一个实施方案中,提供了一种从T_{EFF}细胞产生T_{CM}细胞的方法,其包括:从受试者获得包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体;向包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体同时加入浓度为2nM至4nM的HDACi和浓度为20ng/mL至40ng/mL的IL-21;和将包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体培养12-16天,由此重编程T_{EFF}细胞以产生与包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起

始群体中的T_{CM}细胞的数目相比富含T_{CM}细胞的淋巴细胞群体。

[0025] 在另一个实施方案中,提供了包含人中央记忆样CD8⁺T细胞群体的组合物,其中至少20% (例如,至少25%、26%、27%、28%、29%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%或更高)的T细胞是具有CD28和CD62L的高表达以及CD127和CCR7的低表达的CD28⁺CD62L⁺CD127⁻CCR7⁻T细胞。在某些方面,至少50%或60%的T细胞是CD28⁺CD62L⁺CD127⁻CCR7⁻T细胞。在某些方面,CD28⁺CD62L⁺CD127⁻CCR7⁻T细胞进一步表达或具有Lef1和/或Tcf1的高表达。在特定方面,CD28⁺CD62L⁺CD127⁻CCR7⁻T细胞基本上不具有CD45RA和/或CD45RO表达。在某些方面,CD28⁺CD62L⁺CD127⁻CCR7⁻T细胞具有低CD45RA和/或CD45RO表达。

附图说明

[0026] 以下附图形成本说明书的一部分,并且被包括在内以进一步证实本发明的某些方面。通过参考这些附图中的一个或多个,并结合本文中呈现的具体实施方案的详细描述,可以更好地理解本发明。

[0027] 图1A-1C:在效应记忆(CD45RA⁻CCR7⁻)CD8⁺T细胞中在CD28启动子上降低的AcH3水平。(A)在CD28启动子上的AcH3水平的ChIP结果。引物8-10跨转录起始位点下游的基因组DNA区域。将结果标准化为输入量的百分比。使用幼稚(CD45RA⁺CCR7⁺)CD8⁺T细胞进行对比。(B)SAHA对AcH3水平的剂量依赖性增加的蛋白质印迹结果。H3和β-肌动蛋白用作上样对照。(C)在CTL中IL-21诱导的pSTAT3的蛋白质印迹结果。STAT3和β-肌动蛋白用作上样对照。显示了两次独立实验中的代表性结果。

[0028] 图2A-2C:IL-21和SAHA协同上调CD28和CD62L表达。(A)用指定条件处理4天的CTL上的CD28水平的代表性直方图。每个小图内的数字显示CD28染色的MFI。(B)用指定条件扩增2周的TIL上的CD28和CD62L水平的代表性图。图中的数字注释每个象限中的细胞的百分比。(C)在CD28启动子上在STAT结合位点附近AcH3和STAT3的富集的ChIP结果。将结果标准化为输入量的百分比。IgG用作阴性对照。显示了两次独立实验中的代表性结果。MFI:平均荧光强度。AcH3:H3乙酰化。* * p<0.01, * * * p<0.001。

[0029] 图3A-3D:IL-21和帕比司他协同诱导CD28⁺CD62L⁺CTL。(A)帕比司他对AcH3水平的剂量依赖性增加的蛋白质印迹结果。H3和β-肌动蛋白用作上样对照。(B)用指定条件扩增2周的CTL的微-REP扩增倍数。(C)在微-REP结束时CD28⁺CD62L⁺CTL的百分比。(D)用指定条件扩增2周的CTL的REP扩增倍数。Pano:帕比司他。

[0030] 图4A-4C:IL-21和帕比司他(Pano)协作诱导中央记忆样T细胞。(A)用指定条件扩增2周的CTL上的CD28和CD62L水平的代表性图。图中的数字注释每个象限中的细胞的百分比。(B)当用CFSE稀释指示的IL-2或IL-15处理时,扩增的CTL的增殖。门(gate)代表在2天内分裂2次或更多次的细胞的百分比。(C)常规地或用IL-21扩增的CTL上的CD132(gC)水平的代表性直方图。用指定条件扩增的CTL上的CD132 MFI的总结。显示了三到五次独立实验中的代表性结果。Pano:帕比司他。MFI:平均荧光强度。* * p<0.01。

[0031] 图5A-5B:IL-21/帕比司他诱导的CD28⁺CD62L⁺T细胞表现出记忆相关基因的增加表达。(A)将用IL-21和帕比司他扩增的CD28⁻CD62L⁻CTL和CD28⁺CD62L⁺CTL分类纯化,并将mRNA基因表达针对持家基因RPL13A表达标准化。显示了两次独立实验中的代表性结果。* * p<0.01.n.s.:不显著。(B)TIL的临床Grexx REP扩增倍数。

[0032] 图6A-6B: IL-21/帕比司他-扩增的CTL表现出增强的肿瘤杀死能力。(A) 证实用指定条件扩增的CTL实现的靶肿瘤细胞杀死的百分比的CRA结果。(B) 被靶肿瘤细胞活化的不同CTL中的细胞内IFN- γ 和颗粒酶B表达的代表性图。图中的数字注释每个象限中的细胞的百分比。显示了两次独立实验中的代表性结果。CRA: 铬释放测定。Pano: 帕比司他。

[0033] 图7: IL-21和帕比司他(Pano)协同上调TIL上的CD28和CD62L表达。用指定条件扩增2周的TIL上的CD28和CD62L水平的代表性图。图中的数字注释每个象限中的细胞的百分比。TIL: 肿瘤浸润性淋巴细胞。

[0034] 图8: 描绘幼稚T细胞、中央记忆T细胞和效应T细胞的标志物的示意图。幼稚T细胞表达CD62L、CD127、CD28和CD45RA。中央记忆T细胞表达CD62L、CD45RO、CD127和CD28。效应T细胞表达CD45RO。

[0035] 图9A-9F: IL-21上调活化的人幼稚CD8⁺T细胞中的CD28表达。(A) 在M27-特异性的CD8⁺T细胞上的CD28表面水平的代表性直方图, 且同种型对照抗体用作阴性染色对照。(B) 在M27-特异性的CD8⁺T细胞的表面上的CD28蛋白水平的MFI ($n=12$, 平均值 $\pm$ SEM, $***p<0.0001$, 未配对t检验)。MFI: 平均荧光强度。(C) 在活化后第7天染色的人幼稚CD8⁺T细胞上的CD28表面水平的代表性直方图。同种型对照抗体用作阴性染色对照。(D) 用指定条件活化7天的CD8⁺T细胞的表面上的CD28蛋白水平的MFI ($n=4$, 平均值 $\pm$ SEM, $*p<0.05$, 配对t检验)。(E) 用或不用IL-21产生的分类纯化的人Mart1 (M27)-特异性的CD8⁺T细胞中的CD28 mRNA水平的定量RT-PCR结果。在没有IL-21存在下扩增的细胞中的表达水平设定为1。($n=2$, 平均值 $\pm$ SEM, $**p<0.01$, 未配对t检验)。(F) 用指定条件活化7天的人CD8⁺T细胞中的CD28 mRNA水平的定量RT-PCR结果。用抗-CD3/CD28珠子活化7天的细胞中的表达水平设定为1。($n=6$, 平均值 $\pm$ SEM, $**p<0.01$, 配对t检验)。将关于CD28基因的定量RT-PCR的结果针对RPL13A标准化。在A、B和E中的结果是使用来自不同健康供体的细胞的2次(E)或3次(A-B)独立实验的代表。小图C是使用来自不同健康供体的细胞的4次独立实验的代表。在D和F中的结果由使用来自不同健康供体的细胞的4次(D)或6次(F)独立实验汇总而得。

[0036] 图10A-10G: STAT3活化是IL-21诱导的CD28上调所必需的。(A) 来自健康供体或Job氏综合征患者的活化人CD8⁺T细胞上的CD28表面水平的代表性直方图。HD: 健康供体。(B) CD28 MFI的倍数变化, 其显示为用抗-CD3/CD28和IL-21活化的细胞的MFI相对于仅用抗-CD3/CD28活化的细胞的MFI的倍数。($n=3$, 平均值 $\pm$ SEM, $*p<0.05$, 未配对t检验)。(C) 来自用抗-CD3/CD28或与IL-21一起活化7天的健康供体或Job氏综合征患者的人CD8⁺T细胞中的CD28 mRNA水平的定量RT-PCR结果的倍数变化。来自用单独抗-CD3/28珠子活化7天的健康供体或Job氏综合征患者的细胞中的表达水平设定为1。($n=3$, 平均值 $\pm$ SEM, $**p<0.01$, 未配对t检验)。(D) 用对照、STAT1或STAT3 shRNA转染并用指定条件活化7天的人CD8⁺T细胞上的CD28表面水平的代表性直方图。(E) 用指定条件活化7天的阴性对照(对照)或STAT-敲低CD8⁺T细胞的表面上的CD28 MFI的倍数变化。将数据显示为用抗-CD3/CD28和IL-21活化的细胞的MFI相对于仅用抗-CD3/CD28活化的细胞的MFI的倍数。($n=6$, 平均值 $\pm$ SEM, $*p<0.05$, 单因素方差分析(one-way ANOVA))。(F) 用对照、STAT1或STAT3 shRNA转染并用抗-CD3/CD28或与IL-21一起活化7天的人CD8⁺T细胞中的CD28 mRNA水平的定量PCR结果的倍数变化。用单独CD3/28珠子活化7天的细胞中的表达水平设定为1。($n=4$, 平均值 $\pm$ SEM, $*p<0.05$, 单因素方差分析)。(G) 与人CD28启动子上的近侧和远侧STAT位点结合的STAT3的ChIP

结果。(n=6, 平均值±SEM, **p<0.01, ***p<0.001, 双因素方差分析)。结果是使用不同供体的细胞的独立实验的代表(A、D、G)或由使用不同供体的细胞的3次(B、C、G)、4次(F)或6次(E)独立实验汇总而得。

[0037] 图11A-11F: 响应于IL-21的CD28的差别诱导与幼稚和效应CD8⁺T细胞中的组蛋白H3乙酰化水平相关。(A-B)在有或没有IL-21存在下用M27-脉冲处理的成熟树突细胞活化4天的M27-特异性的效应CD8⁺T细胞上的CD28水平的代表性直方图和总结。同种型抗体用作阴性染色对照。[n=3; 平均值±SEM; ns: 不显著; 配对t检验]。(C) 幼稚和M27-特异性的效应CTL中的IL-21诱导的pSTAT3的蛋白质印迹结果。STAT3和β-肌动蛋白用作上样对照。使用ImageJ定量条带并针对对应样品中的肌动蛋白的密度标准化。以千道尔顿为单位指示分子量。UT: 未处理。(D) 对比幼稚和CD45RA⁺EM (T_{EMRA}) CD8⁺T细胞的CD28启动子上的H3乙酰化水平的ChIP结果。将结果标准化为输入量的百分比。TSS: 转录起始位点。[n=3; 平均值±SEM; *p<0.05, ***p<0.001; 双因素方差分析]。(E) 用抗-CD3/CD28或与IL-21一起活化4天的幼稚和T_{EMRA} CD8⁺T细胞上的CD28水平的代表性直方图。(F) 对比幼稚和M27-特异性的效应CD8⁺T细胞的CD28启动子上的H3乙酰化水平的ChIP结果。将结果标准化为输入量的百分比。[n=3; 平均值±SEM; **p<0.01, ***p<0.001; 双因素方差分析]。结果是使用不同供体的细胞的2次(C、E、F)或3次(A、D)独立实验的代表或由使用不同供体的细胞的3次(B)独立实验汇总而得。

[0038] 图12A-12F: SAHA允许IL-21诱导的pSTAT3接近CD28启动子并上调效应CD8⁺T细胞中的CD28表达。(A) 保持未处理(无)或用SAHA处理24小时的M27-特异性的效应CD8⁺T细胞的CD28启动子上的H3乙酰化水平的ChIP结果。[n=3; 平均值±SEM; ***p<0.001; 双因素方差分析]。(B) STAT3结合M27-特异性的效应CD8⁺T细胞的CD28启动子的ChIP结果, 所述细胞保持未处理或用SAHA处理24小时, 随后IL-21刺激30分钟。[n=3; 平均值±SEM; ns: 不显著, *p<0.05, **p<0.01; 双因素方差分析]。(C) 用指定条件处理4天的CTL上的CD28水平的代表性直方图。在直方图内的数字显示了每种条件的代表性CD28 MFI, 且垂直线分离CD28⁻和CD28⁺群体。(D) 来自独立实验的CTL上的CD28的MFI (n=4; 平均值±SEM; *p<0.05; 单因素方差分析, 对比了IL-2+SAHA和其它条件)。(E) 用指定条件扩增2周的TIL上的CD28和CD62L水平的代表性图。图中的数字注释每个象限中的细胞的百分比。(F) 来自独立实验的用指定条件扩增的TIL中的CD28⁺CD62L⁺细胞的百分比 (n=4; *p<0.05; 单因素方差分析)。显示了2次(B)、3次(A)或4次(C、E)独立实验中的代表性结果。

[0039] 图13A-13B: IL-21和帕比司他(Pano)协作诱导CD28⁺CD62L⁺细胞。(A) 用指定条件扩增2周的CTL上的CD28和CD62L水平的代表性图。图中的数字注释每个象限中的细胞的百分比。(B) 来自独立实验的用指定条件扩增的CTL中的CD28⁺CD62L⁺细胞的百分比 (n=3; *p<0.05; 单因素方差分析, 相对于用常规方案扩增的CTL)。显示了3次(A)独立实验中的代表性结果。

[0040] 图14A-14D: IL-21/帕比司他扩增的CTL在体外表现出中央记忆样特征。(A) 当用CFSE稀释指示的IL-2或IL-15处理时, 扩增的CTL的增殖。数字指示在2天内分裂2次或更多次的细胞的百分比。(B) 用指定条件扩增的CTL上的CD132(γC)水平的代表性直方图。数字显示了在每种条件下CD132的代表性MFI。(C) 来自独立实验的用指定条件扩增的CTL上的CD132 MFI的总结 (n=6; 平均值±SEM; *p<0.05, **p<0.01; 单因素方差分析, 相对于用

常规方案扩增的CTL)。(D)从用IL-21和帕比司他扩增的CTL分选出的CD28⁻CD62L⁻和CD28⁺CD62L⁺细胞中的mRNA基因表达的代表性结果。将基因表达针对持家基因RPL13A表达标准化。(n=2;平均值±SD; **p<0.01, ns:不显著;双尾t检验)。显示了2次(A)、3次(D)或6次(B)独立实验中的代表性结果。

[0041] 图15A-15B:STAT3是人幼稚CD8⁺T细胞中IL-21介导的CD28上调所需要的。(A)在细胞处理后30分钟pSTAT1、pSTAT3和pSTAT5水平的代表性蛋白质印迹结果。(B)用阴性对照、STAT1或STAT3 shRNA转染的人CD8⁺T细胞中的总STAT1和STAT3水平的蛋白质印迹结果。β-肌动蛋白用作上样对照。使用ImageJ定量条带并针对对应样品中的肌动蛋白的密度标准化。以千道尔顿为单位指示分子量。显示了2次(B)或3次(A)独立实验中的代表性结果。UT:未处理。Ct1:对照。

[0042] 图16:SAHA以剂量依赖性的方式增加H3乙酰化。SAHA对H3乙酰化(AcH3)水平的剂量依赖性增加的蛋白质印迹结果。H3和β-肌动蛋白用作上样对照。使用ImageJ定量条带并针对对应样品中的肌动蛋白的密度标准化。以千道尔顿为单位指示分子量。显示了两次独立实验中的代表性结果。

[0043] 图17A-17B:IL-21和帕比司他(Pano)协同上调CD28和CD62L表达。(A)用指定条件扩增2周的TIL上的CD28和CD62L水平的代表性图。图中的数字注释每个象限中的细胞的百分比。(B)帕比司他对AcH3水平的剂量依赖性增加的蛋白质印迹结果。H3和β-肌动蛋白用作上样对照。使用ImageJ定量条带并针对对应样品中的肌动蛋白的密度标准化。以千道尔顿为单位指示分子量。显示了两次独立实验中的代表性结果。

[0044] 图18A-18C:IL-21和帕比司他协同诱导CD28⁺CD62L⁺细胞。(A)用指定条件扩增2周的TIL上的CD28和CD62L水平的代表性图。图中的数字注释每个象限中的细胞的百分比。(B)来自独立实验的REP结束时CD28⁺CD62L⁺TIL的百分比(n=7; *p<0.05;单因素方差分析)。(C)来自4次独立实验的用指定条件扩增2周的CTL的REP扩增倍数。条形图显示了每种条件的平均值±SEM。显示了2次(A)独立实验中的代表性结果。

[0045] 图19:IL-21/帕比司他扩增的CTL表现出与用IL-21扩增的CTL可比较的肿瘤杀死能力。铬释放测定结果证实了用指定条件扩增的CTL的靶肿瘤细胞杀死的百分比(n=5;平均值±SD; ns:不显著;双尾t检验)。

具体实施方式

[0046] I. 定义

[0047] 在本文中和在所附权利要求中使用的单数术语“一个”、“一种”和“所述”包括复数指示物,除非上下文另外清楚地指明。因而,例如,对“一个细胞”的提及包括多个这样的细胞,并且对“所述肽”的提及包括对一种或多种肽以及本领域技术人员已知的其等同物(例如多肽)的提及。

[0048] 在本文中和在所附权利要求中使用的术语“或”是指“和/或”,除非明确指出仅表示替代方案,或者替代方案是相互排斥的。

[0049] 在本文中和在所附权利要求中使用的术语“另一个”可以是指至少第二个或更多个。

[0050] 本文中使用的术语“约”指示特定值或测量值包括与用于获得测量值、计算该值的

装置相关联的固有变化或研究对象之间存在的自然变化。

[0051] 如本文关于溶液的组分(例如,一种或多种蛋白、聚合物或小分子的制剂)所用的术语“基本上不含”是指,该制剂未配制成包括该组分,或这样的组分仅以痕量(例如,作为污染物)存在。在某些实施方案中,如果目标分子的制剂包含小于0.05% (w/w)的特定组分,则该制剂基本上不含该特定组分。在某些实施方案中,如果目标分子的制剂包含小于0.01% (w/w)的特定组分,则该制剂基本上不含该特定组分。在某些实施方案中,如果使用标准分析方法(例如,UV分光光度法、质谱法、核磁共振光谱法等)在目标分子的制剂中没有检测到指定组分的量,则该制剂基本上不含特定组分。

[0052] 本文中关于溶液或悬浮液的组分(例如,一种或多种细胞类型、蛋白、聚合物或小分子的制剂)使用的术语“富集的”是指,该制剂被配制成在该溶液或悬浮液中以高于正常浓度或大于正常数目包含该组分(例如,淋巴细胞的悬浮液可以富集效应T淋巴细胞)。

[0053] 本文中使用的术语“T细胞”或“T淋巴细胞”表示由胸腺产生或在胸腺中加工并积极参与适应性免疫应答的类型的淋巴细胞或白血细胞。该术语包括、但不限于效应T细胞(T_{EFF} 细胞)、 $CD4^+$ 辅助性T细胞($CD4^+$ T细胞或 T_H 细胞)、 $CD8^+$ 细胞毒性或杀伤性T细胞($CD8^+$ 或CTL)、记忆性T细胞、调节性或抑制性T细胞(T_{REG})、天然杀伤T细胞(T_{NK})、粘膜相关的不变性T细胞和 $\gamma\delta$ 或 $\gamma\delta^+$ T细胞($T_{\gamma\delta}$)。

[0054] 每种T细胞表达一种T细胞受体(TCR),在抗原呈递细胞或病原体感染的细胞的表面上显示的主要组织相容性复合物(MHC)分子的背景下,该受体识别肽抗原。主要的TCR种类包含一个 α (α)亚基和一个 β (β)亚基,每个亚基由经历体细胞V(D)J重组以产生抗原反应性T细胞多样性全体的基因编码,在每个个体中多至可能有 10^{14} 种独特的TCR $\alpha\beta$ 异源二聚体。通过体细胞V(D)J重组还产生次要TCR种类($T_{\gamma\delta}$)。功能性TCR的成功重组和从胸腺的出现会产生静止的“幼稚”T细胞,该T细胞主要能够通过次级淋巴组织(淋巴结和脾脏)和外周循环进行迁移,但仍然不能产生任何类型的抵御传染性挑战的应答。

[0055] 产生能够介导免疫保护的T细胞首先需要“激活”幼稚T细胞。这涉及T细胞上的许多分子与抗原呈递细胞(APC)之间的协同相互作用,所述抗原呈递细胞是带有从传染性因子衍生出的抗原肽的细胞,所述抗原肽非共价地结合至主要组织相容性复合物(MHC) I类或II类分子。TCR由两条链(α 和 β)组成,其只有在适当的I类或II类MHC分子背景下结合时才识别肽抗原。在T细胞上,TCR与统称为CD3的膜蛋白复合物(由 γ -、 δ -、 ϵ -和 ζ -亚基组成)结合,并且它是在TCR连接后这种复合物的负责扩大细胞内信号的细胞溶质区域。每种TCR还会与CD4或CD8共受体结合,这取决于T细胞的类型。这两种分子与MHC结合(对于CD8为I类和对于CD4为II类),进一步稳定T细胞和APC之间的相互作用。

[0056] T_{EFF} 的类别包括对免疫刺激(例如,共刺激)作出积极应答的各种T细胞类型,包括 T_H 、CTL、 T_{REG} 和可能的其它T细胞类型。 T_H 细胞在免疫过程中协助其它淋巴细胞,包括将B细胞成熟为浆细胞和记忆B细胞,以及激活CTL和巨噬细胞。当 T_H 细胞与衍生自细胞外蛋白的肽抗原(其与抗原呈递细胞(APC)表面上表达的MHC II类分子结合)一起呈递时, T_H 细胞就会被激活。 T_H 细胞有几种亚型,包括、但不限于, T_H1 、 T_H2 、 T_H3 、 T_H9 、 T_H17 、 T_H22 和T滤泡辅助细胞(T_{FH}),每种分泌一种或多种不同的信号传导蛋白(即,细胞因子)以上调或下调适应性免疫应答的不同方面。CTL能够杀死病毒感染的细胞和肿瘤细胞,并且与移植组织的排斥有关。当CTL与衍生自非自身细胞内蛋白的肽(其与靶细胞的表面上表达的MHC I类分子结合)一

起呈递时,CTL被激活。通过在免疫反应结束时关闭或抑制T细胞介导的免疫性以及抑制在胸腺中逃避负选择的自身反应性T细胞, T_{REG} 在免疫耐受的维持中起关键作用。存在至少三大类 T_{REG} : $CD4^+FoxP3^+$ 、 $CD4^+FoxP3^-T_{REG}$ 和1型调节性T细胞(T_{r1} 细胞),它们是 $CD4^+CD49b^+LAG-3^+CD226^+$ 。

[0057] $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T细胞最简单地分类为幼稚或经历抗原的群体,包括记忆性T细胞(T_{MEM})和 T_{EFF} 细胞。已知 T_{MEM} 细胞的两种主要亚型 T_{CM} 细胞和 T_{EM} 细胞在它们的效应子功能和归巢至不同解剖学部位的能力方面不同。通过分析每种类型特有的一种或多种细胞表面蛋白的表达,可以区分T细胞的各种类型和亚型,例如,幼稚T细胞、 T_{CM} 细胞、 T_{EM} 细胞和 T_{EFF} 细胞。标准标志物包括,例如CD45,即一种在所有造血细胞上表达的调节src-家族激酶的蛋白酪氨酸磷酸酶。通过选择性剪接包含细胞外结构域的部分的三个外显子,可以将人CD45表达为几种异构体之一。传统上在人类中鉴定出六种异构体,包括具有1、2或3个选择性剪接的外显子的变体:CD45RA、CD45RO、CD45RB、CD45RAB、CD45RBC和CD45RABC。

[0058] 幼稚T细胞表达CD45RA、L-选择蛋白(CD62L)、白介素受体7- α 亚基(IL7R α ;CD127)和CD28。记忆性T细胞(T_{MEM})的类别包括各种亚型,包括、但不限于,中央记忆T细胞(T_{CM} 细胞)和效应记忆T细胞(T_{EM} 和 T_{EMRA} 细胞)。 T_{CM} 细胞表达CD45RO、L-选择蛋白(CD62L)、白介素受体7- α 亚基(IL7R α ;CD127)、CD28和C-C趋化因子受体7型(CCR7)。 T_{EM} 细胞表达CD45RO、更低且稍微异质水平的L-选择蛋白(CD62L)、白介素受体7- α 亚基(IL7R α ;CD127)和CD28,但不表达CCR7。 T_{EMRA} 细胞(重新表达CD45RA的末端分化的效应记忆细胞)表达CD45RA、更低且稍微异质水平的L-选择蛋白(CD62L)、白介素受体7- α 亚基(IL7R α ;CD127)和CD28,但不表达CCR7。

[0059] 本文中使用的术语“肿瘤浸润性淋巴细胞”或“TIL”表示在许多不同类型的实体瘤中观察到或从中分离的免疫细胞的复杂混合物,包括细胞毒性T细胞(CTL)和辅助性T细胞(T_H 细胞)、以及B细胞、巨噬细胞、天然杀伤细胞和专职抗原呈递细胞(APC)(例如,树突细胞)的混合物。

[0060] 本文中使用的术语“抗原”表示毒素、蛋白或其它外来物质,其在脊椎动物(例如,人)中诱导体液或细胞免疫应答,尤其是抗体的产生、B细胞的活化和/或T细胞的激活。抗原包含一个或多个表位。

[0061] 本文中使用的术语“表位”或“抗原决定簇”表示特定抗原被免疫系统(例如,抗体、B细胞或T细胞)识别的一个或多个部分。因此,表位是抗体所结合的抗原的特定部分,或是与T细胞受体所结合的主要组织相容性复合物(MHC)分子结合的特异性肽。被抗体识别的表位可以是线性的或构象的。线性表位是通过其一级氨基酸序列与抗体相互作用的表位,例如,其由抗原中氨基酸的连续线性序列形成。构象表位是基于抗原的三维结构或形状(即,其三级结构)与抗体相互作用的表位,例如其由抗原中氨基酸的不连续或非线性区段形成。

[0062] 本文中使用的术语“新表位”表示新表位或新抗原(“新抗原”)上的表位,例如由于存在于癌细胞或癌组织中、但不存在于健康组织中的非天然发生的突变而存在于癌细胞或癌组织中的抗原。

[0063] 术语“肿瘤相关抗原”、“肿瘤抗原”、“肿瘤特异性抗原”或“癌细胞抗原”在本文中互换地用于表示蛋白、碳水化合物或其它分子,与正常的非癌组织相比,其在一个或多个特定肿瘤类型上唯一地或更丰富地表达,且能够在癌症患者中刺激抗原特异性的体液和/或细胞免疫应答。

[0064] 本文中使用的术语“嵌合抗原受体”、“CAR”、“嵌合T细胞受体”、“人工T细胞受体”或“嵌合免疫受体”表示,将期望的非-MHC-限制的抗原结合特异性嫁接到免疫效应细胞(例如,效应T细胞)上的经工程改造的嵌合受体构建体。CAR可以包含例如细胞外抗原结合结构域(例如,抗体或抗体片段,例如,具有期望的抗原特异性的单链可变片段(scFv))、间隔物序列、跨膜结构域以及一个或多个细胞内信号传导结构域。示例性的细胞内信号传导结构域可以包含一个或多个基于细胞内酪氨酸的活化基序(“ITAM”),诸如CD3-zeta (CD3 ζ) 和/或一个或多个共刺激的信号传导结构域,例如,CD28、4-1BB/CD137、ICOS、OX40或它们的组合。

[0065] 本文中使用的术语“抗原呈递细胞”或“APC”表示一类能够进行抗原呈递的免疫细胞,即能够将被细胞表面主要组织相容性复合物分子结合的抗原肽呈递给一种或多种其它免疫细胞,例如,T细胞。大多数免疫细胞类型可以充当某种类型的APC,但是专职APC(例如,巨噬细胞、B细胞和树突细胞)将外来抗原呈递给T_H细胞,而其它细胞类型可以将细胞内抗原呈递给CTL。APC是适应性免疫应答的基本组分,因为CTL和T_H细胞二者行使功能均依赖于APC活性。抗原呈递允许适应性免疫的特异性,并使对细胞内和细胞外病原体的适应性免疫应答成为可能,并且参与对肿瘤的防御。

[0066] 本文中使用的术语“组蛋白脱乙酰酶”、“HDAC酶”或“HDAC”表示一类酶(EC 3.5.1.98),其催化例如从组蛋白上的 ϵ -N-乙酰基-赖氨酸氨基酸除去乙酰基(CH₃-CO-R)。参见,例如,Seto和Yoshida,2014)。组蛋白乙酰化和脱乙酰化在调节基因表达中起重要作用。认为组蛋白的乙酰化会中和其正电荷,并解除其与带负电荷的DNA的相互作用。这会打开染色质结构以促进转录因子的结合以及随后的基因转录。HDAC对组蛋白的脱乙酰化会加强它们与DNA的相互作用,从而导致闭合的染色质结构和基因转录的抑制。组蛋白赖氨酸乙酰化是高度可逆的。赖氨酸残基通过组蛋白/赖氨酸乙酰基转移酶(HAT)的作用被乙酰化,并通过组蛋白脱乙酰酶(HDAC)脱乙酰化。

[0067] 本文中使用的术语“HDAC抑制剂”或“HDACi”表示能够有效地和特异性地抑制一种或多种HDAC酶的组蛋白脱乙酰酶活性的广类化合物。经典HDACi排他地作用于在I、II和IV类中的常规HDAC,包括需要Zn²⁺作为其脱乙酰酶活性的辅因子的那些HDAC。经典HDACi通常根据负责与锌离子结合的化学部分进行分组,但环状四肽除外,后者通过硫醇基与锌离子结合。示例性的经典HDACi包括异羟肟酸或异羟肟酸盐(例如,曲古抑菌素A)、环状四肽(例如,trapoxin B)和酯肽、苯甲酰胺、亲电子的酮和脂肪族酸(例如,苯基丁酸盐和丙戊酸)。第二代经典HDACi包括异羟肟酸伏林司他(suberanilohydroxamic acid或SAHA,作为**Zolinza®**)销售、贝利司他(PXD101,作为**Beleodaq®**销售)、帕比司他(作为**Farydaq®**销售)和达西司他(LAQ824)和苯甲酰胺恩替司他(SNDX-275或MS-275)、他地那兰(CI994)和莫西司他(MGCD0103)。

[0068] 本文中使用的术语“抗体”或“免疫球蛋白”互换使用以表示通常包含通过二硫键连接的四个单独多肽(两个重链和两个轻链)的几种高分子量糖蛋白中的任何一种。在抗原刺激后通常由称为B细胞的专门淋巴细胞产生抗体。抗体能够特异性地结合抗原上的特定表位,所述抗原刺激B细胞作为体液免疫应答的一部分。抗体是免疫球蛋白超家族的成员,并以五种不同的形式(被称作同种型)出现,每种形式以不同重链的存在来区分:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM。抗体可以被蛋白酶切割以释放一系列片段,包括:例如,Fab(片段,抗原结

合),包含决定抗原特异性的互补决定区(CDR)的Fv(片段,可变区),以及Fc(片段,恒定区)。

[0069] 抗体可以是多克隆的或单克隆的。多克隆抗体是由体内不同B细胞谱系分泌的抗体的混合物,其包含与同一抗原反应的多种抗体的集合,每种抗体结合不同的表位。单克隆抗体是由单个细胞克隆(诸如杂交瘤细胞系)产生的抗体,并且包含具有相同特异性的抗体(即,每种结合相同的表位)。术语“抗体”包括保留期望的生物活性(例如,抗原结合、补体结合(complement fixation)、Fc受体结合等)的所有天然存在的和经工程改造的抗体片段。经工程改造的抗体和抗体片段包括,例如,双特异性抗体、Fab、F(ab')₂、单特异性的Fab₂、双特异性的Fab₂、三特异性的Fab₃、单价IgG、scFv、双特异性的双体、三特异性的双体、scFv-Fc等。取决于抗体的来源和期望的应用(即,用作人治疗剂的小鼠单克隆抗体)可以通过称为“人源化”的过程进一步工程化以提高结合亲和力或降低免疫原性。

[0070] 本文中使用的术语“免疫疗法”或“免疫治疗”表示预防或检测或治疗癌症的任何方法,其依赖于涉及免疫系统的机制,例如疫苗、细胞疗法以及参与细胞疗法的生产和应用的载体或相关组分、溶瘤病毒、抗体(例如,裸抗体、药物缀合的抗体、双特异性抗体等)、免疫调节剂(例如,佐剂、细胞因子、生长因子等)和降低免疫抑制、增强免疫细胞的运输和/或激活或有利地改变肿瘤微环境的其它试剂类别以及与针对癌症的免疫应答或其效应的表征有关的任何实验室技术。

[0071] 本文中使用的术语“免疫检查点”或“免疫检查点蛋白”表示众多蛋白质中的任何一种,所述蛋白质参与负调节免疫应答的一个或多个方面(例如,细胞免疫应答)的过程或途径,并在自身耐受性的维持、自身免疫的预防、调节周围组织中的生理学免疫应答的持续时间和幅度以及附带组织损伤的最小化中起关键作用。免疫检查点蛋白包括,例如,程序性细胞死亡途径1(PD-1/CD279)和它的配体(PD-L1/CD274和PD-L2/CD273)、细胞毒性T淋巴细胞-相关的抗原4(CTLA-4/CD152)、淋巴细胞-活化基因3(LAG-3/CD223)、B和T淋巴细胞减弱剂(BTLA)、具有Ig和基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)结构域的T细胞免疫受体(TIGIT)、T细胞免疫球蛋白结构域和粘蛋白结构域3(TIM-3/HAVcr2)、杀死免疫球蛋白样受体(KIR/CD158)、T细胞活化的V结构域免疫球蛋白抑制剂(VISTA)和腺苷A2a受体(A2aR)。

[0072] 本文中使用的术语“免疫检查点抑制剂”表示能够结合免疫检查点蛋白并减轻其对免疫应答的负调节作用的一类治疗剂。示例性的免疫检查点抑制剂包括,例如,伊匹木单抗(ipilimumab,靶向CTLA-4,作为**Yervoy®**销售)、派姆单抗(pembrolizumab,靶向PD-1,作为**Keytruda®**销售)、纳武单抗(nivolumab,靶向PD-1,作为**Opdivo®**销售)、阿特珠单抗(atezolizumab,靶向PD-L1,作为**Tecentriq®**销售)、阿维单抗(avelumab,靶向PD-L1,作为**Bavencio®**销售)和得瓦鲁单抗(durvalumab,靶向PD-L1,作为**Imfinzi®**销售)。免疫检查点抑制包括功能的降低和完全阻断。

[0073] 本文中使用的术语“抗癌剂”、“化学治疗剂”等表示对癌性的或恶性的细胞或组织(即,对具有高增殖率的细胞或组织)具有选择性毒性的任何类别的化学物质或化合物。化学治疗剂可以用于治愈、控制或缓解受试者中的癌症。存在许多不同种类的化疗剂,包括烷化剂、蒽环类抗生素、细胞骨架干扰剂、埃博霉素、组蛋白脱乙酰酶抑制剂(参见上文)、拓扑异构酶I抑制剂、拓扑异构酶II抑制剂、激酶抑制剂、核苷酸类似物和核苷酸前体类似物、肽抗生素、基于铂的化合物、维A酸类、长春花生物碱和衍生物等。烷化剂包括、但不限于:环磷

酰胺、氮芥 (mechloroethamine)、苯丁酸氮芥、美法仑、达卡巴嗪、亚硝基脲和替莫唑胺。蒽环类抗生素包括、但不限于：柔红霉素、多柔比星、表柔比星、伊达比星、米托蒽醌和戊柔比星。细胞骨架干扰剂 (例如，紫杉烷) 包括、但不限于：紫杉醇、多西他赛、注射用紫杉醇 (abraxane, 白蛋白结合型紫杉醇 (nab-paclitaxel)) 和泰索帝 (taxotere)。拓扑异构酶I的抑制剂包括、但不限于：伊立替康和托泊替康。拓扑异构酶II的抑制剂包括、但不限于：依托泊苷、替尼泊苷和他氟泊苷。激酶抑制剂包括、但不限于：硼替佐米、厄洛替尼、吉非替尼、伊马替尼、venurafenib和维莫德吉 (vismodegib)。核苷酸类似物和核苷酸前体类似物包括、但不限于：阿扎胞苷、硫唑嘌呤、卡培他滨、阿糖胞苷、去氧氟尿苷、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、巯基嘌呤、甲氨蝶呤和硫鸟嘌呤。肽抗生素包括、但不限于：博来霉素和放线菌素。基于铂的试剂包括、但不限于：卡铂、顺铂和奥沙利铂。维A酸类包括、但不限于：维A酸 (tretinoin)、阿利维A酸和贝沙罗汀。长春花生物碱和衍生物包括、但不限于：长春碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨。

[0074] 本文中使用的术语“治疗 (treat/treatment/treating)”等表示受试者中疾病或病况的症状的改善、减轻或其它缓解的过程，例如，通过给受试者施用治疗剂，或通过对受试者进行手术、临床或其它医疗操作。

[0075] 本文中使用的术语“受试者”或“患者”在本文中互换地用于表示个体，例如，人或非人生物体，诸如灵长类动物、哺乳动物或脊椎动物。

[0076] 本文中使用的术语“治疗上有效的”或“治疗有益的”等表示治疗剂或手术、临床或其它医疗操作，其改善、缓解或以其它方式解除疾病、病症或病况的一种或多种症状，由此增强患有疾病、病症或病况的受试者的健康状况，例如，通过降低疾病、病症或病况的征象或症状的频率或严重程度。因而，治疗上有效的或治疗有益的癌症治疗可以，例如，减小肿瘤的大小，减小肿瘤的生长速率，减小肿瘤扩散或转移的可能性。

[0077] 本文中使用的术语“药学上可接受的”或“药理学上可接受的”表示，当施用于哺乳动物或脊椎动物受试者时不会产生不利的、变应性的或其它不希望的反应的治疗剂的药物制剂。这样的制剂的配制应当符合关于无菌性、致热原性、纯度的良好生产规范 (GMP) 标准和FDA生物学标准办公室要求的任何其它相关标准。

[0078] 本文中使用的术语“药学上可接受的载体”表示用于配制治疗剂以递送给哺乳动物或脊椎动物受试者的任意的和所有的化学化合物或溶剂，例如，水性溶剂 (例如，水、醇/水溶液、盐水溶液、肠胃外媒介物诸如氯化钠、林格氏右旋糖等)、非水性溶剂 (例如，丙二醇、聚乙二醇、植物油和可注射的有机酯，诸如油酸乙酯)、分散介质、包衣剂、表面活性剂、抗氧化剂、防腐剂 (例如，抗菌剂或抗真菌剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体)、等渗剂、吸收延迟剂、盐、药物、药物稳定剂、凝胶、粘合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂、矫味剂、染料、流体和营养物补充剂，及其任意组合，这些是本领域普通技术人员已知的。

[0079] 本文中使用的术语“单位剂量”、“剂量 (dose)”或“剂量 (dosage)”表示适合用于施用给哺乳动物或脊椎动物受试者的治疗剂的制剂，该制剂含有预定量的当通过适当的途径并根据期望的治疗方案施用时期在受试者中具有治疗效果的药剂。考虑到各种物理和生理参数，包括例如受试者的体重、年龄、健康和性别、所治疗的疾病的类型、疾病进展的程度、先前或同时的治疗干预、施途径以及特定治疗性物质的效能、稳定性和毒性，保健提供者可以凭经验确定要施用给受试者的特定治疗剂的实际剂量。

[0080] II. 重编程T_{EFF}细胞的方法

[0081] 在一个方面,本公开内容提供了将抗原特异性效应T细胞(T_{EFF}细胞)重编程为另一种期望类型的T细胞(例如,中央记忆T细胞(T_{CM}细胞))的方法。因而,本文提供了将抗原特异性效应T细胞(T_{EFF}细胞)重编程为中央记忆T细胞(T_{CM}细胞)的方法。

[0082] 在某些实施方案中,所述方法包括以下步骤:从受试者获得包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体;任选地从包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体制备富含T_{EFF}细胞的样品;和在组蛋白脱乙酰酶抑制剂(HDACi)和白介素-21(IL-21)各自以足以将T_{EFF}细胞重编程为T_{CM}细胞的量的存在下,培养包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体或富含T_{EFF}细胞的样品,其中与从受试者获得的包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体中的T_{CM}细胞的数目相比,所述重编程产生富含T_{CM}细胞的淋巴细胞群体。

[0083] 在某些实施方案中,在加入IL-21之前在HDACi的存在下培养CD8⁺T_{EFF}细胞。在某些实施方案中,在加入IL-21之前在HDACi的存在下培养CD8⁺T_{EFF}细胞12-48小时。在某些实施方案中,在加入IL-21之前在HDACi的存在下培养CD8⁺T_{EFF}细胞1-3天。在某些实施方案中,在加入HDACi之前在IL-21的存在下培养CD8⁺T_{EFF}细胞。在某些实施方案中,在加入HDACi之前在IL-21的存在下培养CD8⁺T_{EFF}细胞12-48小时。在某些实施方案中,在加入HDACi之前在IL-21的存在下培养CD8⁺T_{EFF}细胞1-3天。

[0084] 在某些实施方案中,通过从受试者采集血液样品,获得包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体。在某些实施方案中,通过血液成分部分清除(apheresis)来进一步纯化血液样品。在某些实施方案中,所述血液成分部分清除包括白细胞去除术且产生包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体。在某些实施方案中,通过从取自受试者的新鲜肿瘤活组织检查组织分离肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)的样品,获得包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体。在某些实施方案中,通过从取自受试者的新鲜肿瘤活组织检查组织分离肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)的样品并通过在IL-2的存在下培养它们来扩增TIL,获得包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体。在某些实施方案中,通过从受试者获取外周血单核细胞(PBMC)的样品,获得包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体。在某些实施方案中,通过从受试者(例如,老年受试者)获取外周血单核细胞(PBMC)的样品并通过在IL-2的存在下培养它们来扩增T_{EFF}细胞,获得包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体。在特定方面,不需要预处理(例如,活化)淋巴细胞的起始群体。在某些实施方案中,所述受试者是哺乳动物。在某些实施方案中,所述哺乳动物是人,诸如老年人。

[0085] 在某些实施方案中,肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)的样品包含从取自受试者的新鲜肿瘤活组织检查组织制备的细胞悬浮液。在某些实施方案中,通过机械解聚肿瘤组织来获得细胞悬浮液,例如,使用gentleMACS™解离器(Miltenyi Biotec, Auburn, CA)进行。在某些实施方案中,通过酶促解聚肿瘤组织获得细胞悬浮液,例如,使用胶原酶进行。

[0086] 在某些实施方案中,所述方法还包括从包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体制备富含T_{EFF}细胞的样品的步骤。在某些实施方案中,从包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体制备富含T_{EFF}细胞的样品的步骤包括:从包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体分离期望的T_{EFF}细胞类型和亚型。在某些实施方案中,从包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体分离的期望的T_{EFF}细胞类型或亚型包含CD8⁺T_{EFF}细胞。在某些实施方案中,所述CD8⁺T_{EFF}细胞也表达CD45RO。在某些实施方案中,进一步纯化分离的CD8⁺T_{EFF}细胞。在某些实施方案中,所述进一步纯化

包括将包含 T_{EFF} 细胞的淋巴细胞的起始群体耗竭骨髓来源的抑制细胞 (MDSC)、 T_{REG} 、NK细胞和巨噬细胞的步骤。在某些实施方案中,如下分离或进一步纯化 $CD8+T_{EFF}$ 细胞:使用本领域的普通技术人员众所周知的多种分离免疫细胞类型的方法中的任一种,例如,利用不同细胞类型的物理性能(例如,大小、密度)的差异的沉降、过滤或密度梯度离心;利用表面电荷和粘附性差异附着至塑料或其它聚合物表面以将粘附的细胞与悬浮的自由漂浮细胞分离;细胞表面抗原结合至一种或多种结合剂(例如,抗体、核酸适体)以基于特定细胞表面表型选择性地捕获不同细胞类型;然后可以根据使用的抗体试剂通过流式细胞术、柱色谱法、磁珠分离或其它方法将捕获的细胞从细胞的复杂混合物中分离出来。

[0087] 在某些实施方案中,从包含 T_{EFF} 细胞的淋巴细胞的起始群体制备富含 T_{EFF} 细胞的样品的步骤包括将包含 T_{EFF} 细胞的淋巴细胞的起始群体耗竭骨髓来源的抑制细胞 (MDSC)、 T_{REG} 、NK细胞和巨噬细胞。在某些实施方案中,进一步纯化耗竭了MDSC、 T_{REG} 、NK细胞和巨噬细胞的包含 T_{EFF} 细胞的淋巴细胞的起始群体。在某些实施方案中,所述进一步纯化包括从耗竭了MDSC、 T_{REG} 、NK细胞和巨噬细胞的包含 T_{EFF} 细胞的淋巴细胞的起始群体分离期望的 T_{EFF} 细胞类型和亚型。在某些实施方案中,从耗竭了MDSC、 T_{REG} 、NK细胞和巨噬细胞的包含 T_{EFF} 细胞的淋巴细胞的起始群体分离的期望的 T_{EFF} 细胞类型或亚型包含 $CD8+T_{EFF}$ 细胞。在某些实施方案中,所述 $CD8+T_{EFF}$ 细胞也表达CD45RO。在某些实施方案中,如下分离或进一步纯化 $CD8+T_{EFF}$ 细胞:使用本领域的普通技术人员众所周知的多种分离免疫细胞类型的方法中的任一种,例如,利用不同细胞类型的物理性能(例如,大小、密度)的差异的沉降、过滤或密度梯度离心;利用表面电荷和粘附性差异附着至塑料或其它聚合物表面以将粘附的细胞与悬浮的自由漂浮细胞分离;细胞表面抗原结合至一种或多种结合剂(例如,抗体、核酸适体)以基于特定细胞表面表型选择性地捕获不同细胞类型;然后可以根据使用的抗体试剂通过流式细胞术、柱色谱法、磁珠分离或其它方法将捕获的细胞从细胞的复杂混合物中分离出来。

[0088] 在某些实施方案中,基于一种或多种细胞表面标志物的存在或不存在,从包含 T_{EFF} 细胞的淋巴细胞的起始群体鉴定和/或分离用在本文提供的方法中的一种或多种期望的 T_{EFF} 细胞类型或亚型。可用在这样的鉴定和/或分离中的示例性细胞表面标志物包括、但不限于:例如,CD34,造血祖先干细胞抗原,共刺激分子例如B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、CD28和L-选择蛋白 (CD62L)。在某些实施方案中,基于它们对CD45RO和/或CD45RA的表达,分离或表征用在本文所述的方法中的 T_{EFF} 群体。在某些实施方案中,基于它们缺乏CD28、CD62L、CCR7和/或CD127的表达,分离或表征用在本文所述的方法中的 T_{EFF} 群体。在某些实施方案中,所述分离包括正选择细胞表面标志物(例如,CD8)的表达,使得保留期望类型的 T_{EFF} 细胞,例如, $CD8+T_{EFF}$ 细胞。在某些实施方案中,所述分离包括负选择细胞表面标志物(例如,Foxp3)的表达,使得除去不希望类型的 T_{EFF} 细胞,例如, T_{REG} 。

[0089] 在某些实施方案中,通过本领域已知的多种标准方法中的任一种完成基于细胞表面标志物的表达对期望的 T_{EFF} 类型或亚型的鉴定和/或分离,所述方法包括、但不限于,例如,荧光激活细胞分选术 (FACS)、柱色谱法和其它色谱方法、磁珠淘选、蛋白质印迹法、放射自显影术、电泳和各种其它的众所周知的免疫学方法,例如,酶联免疫吸附测定 (ELISA) 等。

[0090] 在某些实施方案中,在组蛋白脱乙酰酶抑制剂 (HDACi) 和白介素-21 (IL-21) 的存在下培养之前,进一步培养或扩增包含 T_{EFF} 细胞的淋巴细胞的起始群体或富含 T_{EFF} 细胞的样品。在某些实施方案中,在白介素-2 (IL-2) 中进一步培养包含 T_{EFF} 细胞的淋巴细胞的起始群

体或富含 T_{EFF} 细胞的样品。在某些实施方案中,每3天以50U/ml至6000U/ml的浓度施用IL-2。在某些实施方案中,培养包含 T_{EFF} 细胞的淋巴细胞的起始群体或富含 T_{EFF} 细胞的样品直到汇合,例如,约2至约21天,优选约10至约14天。在某些实施方案中,培养包含 T_{EFF} 细胞的淋巴细胞的起始群体或富含 T_{EFF} 细胞的样品直到它们达到期望的浓度,诸如 10^{10} 或更多个细胞。

[0091] 在某些实施方案中,将培养的包含 T_{EFF} 细胞的淋巴细胞的起始群体或富含 T_{EFF} 细胞的样品合并并扩增。在某些实施方案中,与包含 T_{EFF} 细胞的淋巴细胞的起始群体或富含 T_{EFF} 细胞的样品相比,扩增会在约10天至约14天的时间期间提供至少约50倍、至少约60倍、至少约70倍、至少约80倍、至少约90倍或至少约100倍的 T_{EFF} 细胞数目的增加。在某些实施方案中,与包含 T_{EFF} 细胞的淋巴细胞的起始群体或富含 T_{EFF} 细胞的样品相比,扩增会在约10天至约14天的时间期间提供至少约200倍、至少约300倍、至少约400倍、至少约500倍、至少约600倍、至少约700倍、至少约800倍、至少约900倍或至少约1000倍的 T_{EFF} 细胞数目的增加。

[0092] 在某些实施方案中,通过本领域已知的多种标准方法中的任一种完成培养的包含 T_{EFF} 细胞的淋巴细胞的起始群体或富含 T_{EFF} 细胞的样品的扩增,所述方法包括、但不限于,例如,在饲养淋巴细胞和白介素-2 (IL-2) 或白介素-15 (IL-15) 的存在下的非特异性的T-细胞受体刺激。在某些实施方案中,非特异性的T-细胞受体刺激包含30ng/ml OKT3的剂量,所述OKT3是一种小鼠单克隆抗-CD3抗体 (**Ortho-McNeil®**, Raritan, NJ)。

[0093] 在某些实施方案中,本文提供的方法进一步包括基于一种或多种细胞表面标志物的存在或不存在鉴定和/或分离重编程的 T_{CM} 细胞的步骤。可用在这样的鉴定和/或分离中的示例性细胞表面标志物包括、但不限于:例如,CD45RO、CD28、CD62L、CCR7、CD127和CD27。在某些实施方案中,基于它们对CD28和/或CD62L的表达,分离或表征通过本文所述的方法产生的 T_{CM} 群体。在某些实施方案中,基于它们缺乏CD45RA的表达,分离或表征通过本文所述的方法产生的 T_{CM} 群体。在某些实施方案中,所述分离包括正选择细胞表面标志物(例如,CD8)的表达,使得保留期望类型的T细胞,例如,CD8⁺ T_{CM} 细胞。在某些实施方案中,所述分离包括负选择细胞表面标志物(例如,CD45RA)的表达,使得除去不希望类型的T细胞,例如, T_N 。

[0094] 在某些实施方案中,通过本领域已知的多种标准方法中的任一种完成基于细胞表面标志物的表达对 T_{CM} 的鉴定和/或分离,所述方法包括、但不限于,例如,荧光激活细胞分选术(FACS)、柱色谱法和其它色谱方法、磁珠淘选、蛋白质印迹法、放射自显影术、电泳和各种其它的众所周知的免疫学方法,例如酶联免疫吸附测定(ELISA)等。

[0095] A. 经工程改造的 T_{EFF} 细胞

[0096] 在另一个方面,用在本文提供的将抗原特异性 T_{EFF} 细胞重编程为 T_{CM} 细胞的方法中的包含 T_{EFF} 细胞的淋巴细胞的起始群体包含经工程改造的T细胞。在某些实施方案中,所述经工程改造的T细胞包含表达嵌合抗原受体的T细胞(CAR T细胞)。在某些实施方案中,所述经工程改造的T细胞包含表达重组T细胞受体的T细胞,所述重组T细胞受体能够结合肿瘤特异性的表位或新表位。

[0097] 在某些实施方案中,使用本领域技术人员已知的许多充分确定的基因转移方法中的任一种,构建经工程改造的T细胞。在某些实施方案中,使用基于病毒载体的基因转移方法来引入核酸,构建经工程改造的细胞,所述核酸编码对期望的靶肿瘤抗原特异性的嵌合抗原受体或编码对期望的肿瘤特异性的表位或新表位特异性的重组TCR。在某些实施方案中,使用基于非病毒载体的基因转移方法来引入核酸,构建经工程改造的细胞,所述核酸编

码对期望的靶肿瘤抗原特异性的嵌合抗原受体或编码对期望的肿瘤特异性的表位或新表位特异性的重组TCR。在某些实施方案中,所述基于病毒载体的基因转移方法包括慢病毒载体。在某些实施方案中,所述基于病毒载体的基因转移方法包括逆转录病毒载体。在某些实施方案中,所述基于病毒载体的基因转移方法包括腺病毒或腺相关病毒载体。在某些实施方案中,所述基于非病毒载体的基因转移方法包括选自以下的基因编辑方法:锌指核酸酶(ZFN)、转录活化剂样效应子核酸酶(TALEN)和成簇的规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)/CRISPR-相关的蛋白9(Cas9)核酸酶。在某些实施方案中,所述基于非病毒载体的基因编辑方法包括选自以下的转染或转化方法:脂转染、核转染、生物弹道技术、病毒体、脂质体、聚阳离子或脂质:核酸缀合物、裸露DNA、人工病毒粒子和试剂增强的DNA摄取。

[0098] 在某些实施方案中,所述CAR T细胞表达CAR构建体,所述CAR构建体包含一个细胞外抗原结合结构域、一个任选的间隔物序列、一个跨膜结构域、一个或多个细胞内信号传导结构域和用于活化或灭活CAR T细胞的一个或多个任选的调节序列。

[0099] 在某些实施方案中,所述细胞外抗原结合结构域包含能够特异性地结合期望靶标的部分。在某些实施方案中,所述能够特异性地结合期望靶标的部分包含单克隆抗体或其抗原结合片段。在某些实施方案中,其抗原结合片段包含能够特异性地结合期望靶标的单克隆抗体的单链可变片段(scFv)。在某些实施方案中,期望靶标是肿瘤特异性抗原。在某些实施方案中,所述肿瘤特异性抗原选自:CD19、CD20、CD22、癌胚抗原、甲胎蛋白、CA-125、MUC-1、上皮肿瘤抗原、黑素瘤-相关的抗原(MAGE)(例如,MAGE-1、MAGE-11或MAGE-A)、突变的p53、突变的ras、HER2/Neu、ERBB2、叶酸结合蛋白、HIV-1包膜糖蛋白gp120、HIV-1包膜糖蛋白gp41、GD2、CD123、CD23、CD30、CD56、c-Met、间皮素、GD3、HERV-K、IL-11R α 、 κ 链、 λ 链、CSPG4、ERBB2、EGFRvIII、VEGFR2和人乳头瘤病毒(HPV)。在某些实施方案中,期望靶标是肿瘤特异性的新表位。在某些实施方案中,通过计算机模拟分析(in silico analysis)鉴定肿瘤特异性的新表位。在某些实施方案中,从衍生自人受试者的自体TIL群体鉴定和纯化肿瘤特异性的新表位。

[0100] 在某些实施方案中,所述跨膜结构域包含能够形成能跨细胞膜的结构任何合成的或天然的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述能跨细胞膜的结构包含 α 螺旋。在某些实施方案中,跨膜区衍生自天然存在的跨膜蛋白,其选自CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、4-1BB/CD137、CD154、可诱导的T细胞共刺激物(ICOS)/CD278、糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白(GITR)/CD357、NKG2D、TCR α 和TCR β 。在某些实施方案中,衍生自天然存在的跨膜蛋白的跨膜区在已知参与与其它信号传导蛋白相互作用的序列中包含一个或多个氨基酸置换。

[0101] 在某些实施方案中,所述一个或多个细胞内信号传导结构域包含一种或多种基于细胞内酪氨酸的活化基序("ITAM")。在某些实施方案中,所述一种或多种ITAM存在于CD3-zeta(CD3 ζ)分子上。在某些实施方案中,所述一个或多个细胞内信号传导结构域进一步包含共刺激的信号传导结构域,其选自CD28、4-1BB/CD137、ICOS、OX40、CD2、CD40L、CD27、Light-R、GITR或它们的组合。

[0102] B. 重组T细胞受体(TCR)

[0103] 在某些实施方案中,所述T细胞包含能够结合肿瘤特异性的表位或新表位的重组T细胞受体。在某些实施方案中,所述重组T细胞受体包含从分离自受试者的T细胞克隆的天

然存在的TCR。在某些实施方案中,所述重组TCR包含含有TCR alpha (TCR α) 多肽和TCR beta (TCR β) 多肽的异源二聚体(即,TCR $\alpha\beta$)。在某些实施方案中,所述重组TCR包含含有TCR gamma (TCR γ) 多肽和TCRdelta (TCR δ) 多肽的异源二聚体(即,TCR $\gamma\delta$)。

[0104] 在某些实施方案中,所述重组TCR $\alpha\beta$ 包含从受试者分离且对衍生自期望靶标的肽抗原具有特异性的克隆的TCR $\alpha\beta$ 。在某些实施方案中,所述受试者是哺乳动物。在某些实施方案中,所述哺乳动物是人。在某些实施方案中,期望靶标是肿瘤特异性抗原,其选自CD19、CD20、CD22、癌胚抗原、甲胎蛋白、CA-125、MUC-1、上皮肿瘤抗原、黑素瘤-相关的抗原、突变的p53、突变的ras、HER2/Neu、ERBB2、叶酸结合蛋白、HIV-1包膜糖蛋白gp120、HIV-1包膜糖蛋白gp41、GD2、CD123、CD23、CD30、CD56、c-Met、间皮素、GD3、HERV-K、IL-11R α 、 κ 链、 λ 链、CSPG4、ERBB2、EGFRvIII和VEGFR2。在某些实施方案中,所述重组TCR $\gamma\delta$ 包含从受试者分离且对衍生自期望靶标的肽抗原具有特异性的克隆的TCR $\gamma\delta$ 。在某些实施方案中,所述受试者是哺乳动物。在某些实施方案中,所述哺乳动物是人。在某些实施方案中,期望靶标是肿瘤特异性抗原,其选自CD19、CD20、CD22、癌胚抗原、甲胎蛋白、CA-125、MUC-1、上皮肿瘤抗原、黑素瘤-相关的抗原、突变的p53、突变的ras、HER2/Neu、ERBB2、叶酸结合蛋白、HIV-1包膜糖蛋白gp120、HIV-1包膜糖蛋白gp41、GD2、CD123、CD23、CD30、CD56、c-Met、间皮素、GD3、HERV-K、IL-11R α 、 κ 链、 λ 链、CSPG4、ERBB2、EGFRvIII和VEGFR2。

[0105] C. 组蛋白脱乙酰酶抑制剂(HDACi)

[0106] 本文提供了用于将抗原特异性效应T细胞(T_{EFF}细胞)重编程为中央记忆T细胞(T_{CM}细胞)的方法,其包括以下步骤:在组蛋白脱乙酰酶抑制剂(HDACi)和白介素-21(IL-21)各自以足以将T_{EFF}细胞重编程为T_{CM}细胞的量的存在下,培养包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体或富含T_{EFF}细胞的样品,其中与从受试者获得的包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体中的T_{CM}细胞的数目相比,所述重编程产生富含T_{CM}细胞的淋巴细胞群体。组合的IL-21和HDACi处理具有超过累加的效应,以从效应T细胞诱导中央记忆表型和增强对IL-2和IL-15的应答。

[0107] 在某些实施方案中,依次用HDACi和IL-21培养包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体或富含T_{EFF}细胞的样品。在某些实施方案中,将包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体或富含T_{EFF}细胞的样品首先用HDACi(例如,0.1-5nM,诸如1-3nM)培养,然后用IL-21(例如,10-50ng/mL,诸如20-40ng/mL,具体地约30ng/mL)培养。在某些实施方案中,将包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体或富含T_{EFF}细胞的样品首先用IL-21(例如,10-50ng/mL,诸如20-40ng/mL,具体地约30ng/mL)培养,然后用HDACi(例如,0.1-5nM,诸如1-3nM)培养。在某些实施方案中,将包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体或富含T_{EFF}细胞的样品在HDACi和IL-21的同时存在下培养。在某些实施方案中,将包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体或富含T_{EFF}细胞的样品在HDACi和IL-21的同时存在下培养足以诱导T_{CM}表型的时间段。在某些实施方案中,将包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体或富含T_{EFF}细胞的样品在HDACi和IL-21的同时存在下培养7-20天。在某些实施方案中,将包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体或富含T_{EFF}细胞的样品在HDACi和IL-21的同时存在下培养12-16天。在某些实施方案中,将包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体或富含T_{EFF}细胞的样品在HDACi和IL-21的同时存在下培养7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天。在某些实施方案中,将包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体或富含T_{EFF}细胞的样品在HDACi和IL-21的同时存在下培养13、14或15天。

[0108] 在某些实施方案中,将包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体或富含T_{EFF}细胞的样品

在一种或多种额外的细胞因子、趋化因子或生长因子的存在下进一步培养。在某些实施方案中,将包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体或富含T_{EFF}细胞的样品在IL-2的存在下进一步培养。在某些实施方案中,将包含T_{EFF}细胞的淋巴细胞的起始群体或富含T_{EFF}细胞的样品在IL-2的存在下培养,然后在HDACi和IL-21的同时存在下培养。

[0109] 在某些实施方案中,所述HDACi包含经典HDACi,其脱乙酰酶活性需要Zn²⁺作为辅因子。在某些实施方案中,所述经典HDACi选自:异羟肟酸或异羟肟酸盐、环状四肽和酯肽、苯甲酰胺、亲电子的酮和脂肪族酸。在某些实施方案中,所述HDACi包含异羟肟酸或异羟肟酸盐。在某些实施方案中,所述异羟肟酸或异羟肟酸盐选自:伏林司他(suberanilohydroxamic acid或SAHA,作为**Zolinza®**销售),贝利司他(PXD101,作为**Beleodaq®**销售)、帕比司他(作为**Farydaq®**销售)、达西司他(LAQ824)。在某些实施方案中,所述HDACi包含苯甲酰胺。在某些实施方案中,所述苯甲酰胺选自:恩替司他(SNDX-275或MS-275)、他地那兰(CI994)和莫西司他(MGCD0103)。在某些实施方案中,所述HDACi包含环状四肽或酯肽。在某些实施方案中,所述环状四肽或酯肽是trapoxin B。在某些实施方案中,所述HDACi是脂肪族酸。在某些实施方案中,所述脂肪族酸选自苯基丁酸盐和丙戊酸。

[0110] D. 白介素-21 (IL-21)

[0111] 人白介素21 (IL-21) 是由IL-21基因编码的蛋白质细胞因子,其对免疫系统的细胞具有有效的调节作用,所述细胞包括可破坏病毒感染的细胞或癌细胞的天然杀伤(NK)细胞和细胞毒性T细胞。162个氨基酸的人IL-21蛋白(GenBank登记号BBA22643;SEQ ID NO:1)在美国专利号6,307,024,和美国专利号6,686,178中进行了描述,它们二者通过引用并入本文用于任意目的。本方法涉及用IL-21与HDACi组合处理效应T细胞以产生中央记忆T细胞。在某些方面,IL-21以10ng/mL至50ng/mL,诸如15ng/mL至60mg/mL,诸如20ng/mL至40ng/mL,具体地约25、30或35ng/mL的浓度存在于培养基中。

[0112] III. 使用方法

[0113] 在另一个方面,本文提供了治疗受试者中的癌症或感染的方法,所述方法包括给所述受试者施用治疗有效量的通过本文提供的任何方法产生的富含T_{CM}细胞的淋巴细胞群体。可以将所述细胞过继转移给患有癌症的受试者,从其可以培养TIL或从其可以在体外制备肿瘤抗原特异性CTL。

[0114] 本治疗方法对其有用的肿瘤包括任何恶性细胞类型,诸如在实体瘤或血液学肿瘤中发现的那些。示例性的实体瘤可以包括、但不限于选自以下的器官的肿瘤:胰腺、结肠、盲肠、胃、脑、头、颈、卵巢、肾、喉、肉瘤、肺、膀胱、黑素瘤、前列腺和乳房。示例性的血液学肿瘤包括骨髓的肿瘤、T或B细胞恶性肿瘤、白血病、淋巴瘤、母细胞瘤、骨髓瘤等。使用本文提供的方法可以治疗的癌症的其它例子包括、但不限于:肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺的腺癌和肺的鳞状癌)、腹膜的癌症、胃部癌症或胃癌(包括胃肠癌和胃肠间质癌)、胰腺癌、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾部癌症或肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、各种类型的头颈癌和黑素瘤。

[0115] 所述癌症可以具体地是以下组织学类型,尽管它不限于这些:恶性赘生物;癌;未分化的癌;巨大细胞和梭形细胞癌;小细胞癌;乳头状癌;鳞状细胞癌;淋巴上皮癌;基底细胞癌;毛母质癌;移行细胞癌;乳头状移行细胞癌;腺癌;恶性胃泌素瘤;胆管癌;肝细胞癌;混合型肝细胞癌和胆管癌;小梁腺癌;腺样囊性癌;腺瘤性息肉中的腺癌;家族性结肠息肉

腺癌;实体癌;恶性类癌瘤;支气管-肺泡(branchiolo-alveolar)腺癌;乳头状腺癌;嫌色细胞癌(chromophobe carcinoma);嗜酸细胞癌;嗜酸性腺癌;嗜碱性细胞癌;透明细胞腺癌;颗粒细胞癌;滤泡状腺癌;乳头状和滤泡性腺癌;非包囊性硬化癌;肾上腺皮质癌;子宫内膜样癌;皮肤附器癌;大汗腺腺癌;皮脂腺癌;盯眛腺腺癌;粘液表皮样癌;囊腺癌;乳头状囊腺癌;乳头状浆液性囊腺癌;粘液性囊腺癌;粘液性腺癌;印戒细胞癌;浸润性导管癌;髓样癌;小叶癌;炎症性癌;乳房佩吉特病;腺泡细胞癌;腺鳞状癌;具有鳞状组织转化的腺癌;恶性胸腺瘤;恶性卵巢间质瘤;恶性泡膜细胞瘤;恶性颗粒细胞瘤;和恶性雄激素母细胞瘤;塞尔托利细胞癌(sertoli cell carcinoma);恶性莱迪希细胞肿瘤(leydig cell tumor, malignant);恶性脂质细胞肿瘤;恶性副神经节瘤;恶性乳房外副神经节瘤;嗜铬细胞瘤;血管球肉瘤;恶性黑素瘤;无黑色素性黑素瘤;浅表扩散性黑素瘤;雀斑痣恶性黑素瘤;肢端雀斑痣黑色素瘤;结节性黑色素瘤;巨大色素痣中的恶性黑素瘤;上皮样细胞黑素瘤;恶性蓝痣;肉瘤;纤维肉瘤;恶性纤维组织细胞瘤;粘液肉瘤;脂肪肉瘤;平滑肌肉瘤;横纹肌肉瘤;胚胎型横纹肌肉瘤;小泡型横纹肌肉瘤;间质肉瘤;恶性混合瘤;苗勒管混合瘤;肾母细胞瘤;肝胚细胞瘤;癌肉瘤;恶性间叶瘤;恶性brenner瘤;恶性叶状瘤;滑膜肉瘤;恶性间皮瘤;无性细胞瘤;胚胎癌;恶性畸胎瘤;恶性卵巢甲状腺肿;绒毛膜癌;恶性中肾瘤;血管肉瘤;恶性血管内皮瘤;卡波西肉瘤;恶性血管外皮细胞瘤;淋巴管肉瘤;骨肉瘤;皮质旁骨肉瘤;软骨骨肉瘤;恶性软骨母细胞瘤;间叶性软骨肉瘤;骨的巨大细胞瘤;尤因肉瘤;恶性牙源性瘤;成釉细胞牙肉瘤;恶性成釉细胞瘤;成釉细胞纤维肉瘤;恶性松果体瘤;脊索瘤;恶性神经胶质瘤;室管膜瘤;星形细胞瘤;原浆性星形细胞瘤;纤维性星形细胞瘤;星形母细胞瘤;胶质母细胞瘤;少突神经胶质瘤;成少突神经胶质细胞瘤;原始神经外胚层瘤;小脑肉瘤;成神经节细胞瘤;神经母细胞瘤;视网膜母细胞瘤;嗅神经源性肿瘤;恶性脑膜瘤;神经纤维肉瘤;恶性神经鞘瘤;恶性颗粒细胞瘤;恶性淋巴瘤;霍奇金病;霍奇金;副肉芽肿;小淋巴细胞性恶性淋巴瘤;弥漫性大细胞恶性淋巴瘤;滤泡性恶性淋巴瘤;蕈样真菌病;其他特定的非霍奇金淋巴瘤;B-细胞淋巴瘤;低级/滤泡非霍奇金淋巴瘤(NHL);小淋巴细胞性(SL)NHL;中级/滤泡NHL;中级弥散性NHL;高级成免疫细胞性NHL;高级成淋巴细胞性NHL;高级小无核裂细胞NHL;巨大肿块(bulky disease)NHL;套细胞淋巴瘤;AIDS相关的淋巴瘤;沃尔登斯特伦巨球蛋白血症;恶性组织细胞增多症;多发性骨髓瘤;肥大细胞肉瘤;免疫增生性小肠疾病;白血病;淋巴样白血病;浆细胞白血病;红白血病;淋巴肉瘤细胞白血病;髓样白血病;嗜碱性粒细胞性白血病;嗜酸性粒细胞性白血病;单核细胞性白血病;肥大细胞白血病;巨核母细胞性白血病;髓样肉瘤;毛细胞白血病;慢性淋巴细胞白血病(CLL);急性成淋巴细胞性白血病(ALL);急性髓性白血病(AML);和慢性成髓细胞白血病。

[0116] 在某些实施方案中,所述方法进一步包括在施用治疗有效量的T_{CM}细胞群体之前执行淋巴细胞耗竭的步骤。在某些实施方案中,所述淋巴细胞耗竭包括非清髓性淋巴细胞耗竭化学疗法。在某些实施方案中,所述非清髓性淋巴细胞耗竭化学疗法包括环磷酰胺和氟达拉滨的施用。

[0117] 在某些实施方案中,所述方法进一步包括与自体T细胞伴随地或在自体T细胞之后给所述受试者施用促进自体T细胞的生长和活化的T-细胞生长因子的步骤。在某些实施方案中,所述T细胞生长因子包含促进自体T-细胞的生长和活化的任意合适的生长因子。在某些实施方案中,所述T细胞生长因子选自白介素(IL)-2、IL-7、IL-15和IL-12和它们的组合

(例如, IL-2和IL-7, IL-2和IL-15, IL-7和IL-15, L-2、IL-7和IL-15, IL-12和IL-7, IL-12和IL-15或IL-12和IL-2)。

[0118] 在某些实施方案中, 将治疗有效量的通过本文提供的任何方法产生的富含T_{CM}细胞的淋巴细胞群体静脉内地、肿瘤内地或腹膜内地施用给所述受试者。基于要治疗的癌症的类型、疾病的严重程度和病程、个体的临床状况、个体的临床史和对治疗的应答以及主治医师的判断, 可以确定T细胞疗法的合适剂量。

[0119] A. 联合治疗

[0120] 在某些实施方案中, 本文提供的方法进一步包括给所述受试者施用至少一种额外治疗剂的步骤。考虑到任何潜在毒性、可能的副作用和任意其它有关因素, 根据每种具体组合物或疗法的良好临床实践将本文中公开的所有额外治疗剂施用给受试者。

[0121] 在某些实施方案中, 所述额外疗法可以是免疫疗法、放射疗法、手术(例如, 肿瘤的手术切除术)、化学疗法、骨髓移植或前述的组合。所述额外疗法可以是靶向疗法。在某些实施方案中, 在主要治疗之前施用所述额外疗法(即, 作为辅助疗法)。在某些实施方案中, 在主要治疗之后施用所述额外疗法(即, 作为新辅助疗法)。

[0122] 在某些实施方案中, 所述额外疗法包括免疫疗法。在某些实施方案中, 所述免疫疗法包含免疫检查点抑制剂。在某些实施方案中, 所述免疫检查点抑制剂抑制选自以下的免疫检查点蛋白: 程序性细胞死亡途径1 (PD-1/CD279) 及其配体 (PD-L1/CD274和PD-L2/CD273)、细胞毒性T淋巴细胞-相关的抗原4 (CTLA-4/CD152)、淋巴细胞-活化基因3 (LAG-3/CD223)、B和T淋巴细胞减弱剂 (BTLA)、具有Ig和基于免疫受体酪氨酸的抑制基序 (ITIM) 结构域的T细胞免疫受体 (TIGIT)、T细胞免疫球蛋白结构域和粘蛋白结构域3 (TIM-3/HAVcr2)、杀死免疫球蛋白样受体 (KIR/CD158)、T细胞活化的V-结构域免疫球蛋白抑制剂 (VISTA) 和腺苷A2a受体 (A2aR)。

[0123] 在某些实施方案中, 所述免疫检查点抑制剂是PD-1结合拮抗剂。在某些实施方案中, 所述PD-1结合拮抗剂是抗-PD-1抗体。在某些实施方案中, 所述抗-PD-1抗体选自纳武单抗、派姆单抗和CT-011。在某些实施方案中, 所述PD-1结合拮抗剂是免疫粘附素(例如, 包含与免疫球蛋白恒定区(例如, 免疫球蛋白序列的Fc区)融合的PDL1或PDL2的细胞外或PD-1结合部分的免疫粘附素)。

[0124] 在某些实施方案中, 所述免疫检查点抑制剂是CTLA-4结合拮抗剂。在某些实施方案中, 所述CTLA-4结合拮抗剂是抗-CTLA-4抗体。在某些实施方案中, 所述抗-CTLA-4抗体选自伊匹木单抗和曲美木单抗。

[0125] 在某些实施方案中, 所述额外治疗剂包括用放射疗法治疗。在某些实施方案中, 所述放射疗法选自 γ 射线(γ -射线)、X-射线、微波、质子束辐照、紫外辐照和放射性同位素向肿瘤的定向递送。在某些实施方案中, 所述放射疗法包括用X-射线治疗。在某些实施方案中, 在3-4周的时间时期以50-200伦琴的每日剂量施用X-射线。在某些实施方案中, 以2000-6000伦琴的单剂量施用X-射线。在某些实施方案中, 所述放射疗法包括放射性同位素向肿瘤的定向递送。放射性同位素的剂量范围根据同位素的半衰期、发出的辐射的强度和类型以及肿瘤细胞的摄取程度而宽泛地变化, 但是适当的治疗有效剂量的确定是在本领域的普通技术的水平内。

[0126] 在某些实施方案中, 所述额外治疗剂包括用于治疗与主要治疗有关的副作用(例

如,恶心、恶病质等)的药剂的施用。在某些实施方案中,所述额外疗法包括免疫疗法。在某些实施方案中,所述额外疗法包括放射疗法。在某些实施方案中,所述放射疗法包括 γ 辐照。在某些实施方案中,所述额外疗法包括手术。在某些实施方案中,所述额外疗法包括放射疗法和手术的组合。在某些实施方案中,所述额外疗法包括用选自以下的化学治疗剂类别治疗:烷化剂、蒽环类抗生素、细胞骨架干扰剂、埃博霉素、组蛋白脱乙酰酶抑制剂、拓扑异构酶I抑制剂、拓扑异构酶II抑制剂、激酶抑制剂、核苷酸类似物和核苷酸前体类似物、肽抗生素、基于铂的化合物、维A酸类、长春花生物碱及其衍生物。

[0127] 可以在本文提供的组合物的施用之前、之后或并行地施用本文考虑的额外疗法。在某些实施方案中,在本文提供的组合物之前施用额外疗法。在某些实施方案中,在本文提供的组合物之后施用额外疗法。在某些实施方案中,在本文提供的组合物施用之前或之后以一个或多个间隔施用额外疗法。为了使所治疗的受试者受益于联合疗法而施用额外疗法的适当间隔的确定是在本领域的普通技术的水平内的。

[0128] B. 药物组合物

[0129] 在另一个方面,本文提供了包含 T_{CM} 细胞和药学上可接受的载体的药物组合物和制剂。

[0130] 通过将具有所需纯度的活性成分(诸如抗体或多肽)与一种或多种任选的药学上可接受的载体(Remington's Pharmaceutical Sciences第22版,2012)混合,以水溶液的形式,诸如生理盐水(例如,0.9%)和人血清白蛋白(例如,10%),可以制备如本文中所述的药物组合物和制剂。药学上可接受的载体在采用的剂量和浓度对接受者而言通常是无毒的,且包括、但不限于:缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵;苜蓿氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖类、二糖类和其它碳水化合物类,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖类,诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;形成盐的抗衡离子,诸如钠;金属络合物(例如Zn-蛋白复合物);和/或非离子型表面活性剂,诸如聚乙二醇(PEG)。

[0131] IV. 实施例

[0132] 包括以下实施例来证实本发明的优选实施方案。本领域技术人员应该理解,在以下的实施例中公开的技术代表发明人发现的在本发明的实践中良好地起作用的技术,因而可以视为构成其实践的优选模式。但是,本领域技术人员考虑到本公开内容以后应该理解,可以在不背离本发明的精神和范围的前提下在所公开的具体实施方案中做出许多改变且仍然获得类似或相似的结果。

[0133] 实施例1-将效应T细胞重编程为中央记忆T细胞

[0134] 与高CD28表达一致,与效应记忆CD8⁺T细胞相比,幼稚CD8⁺T细胞表现出在启动子上和在CD28的转录起始位点附近显著增加的乙酰化组蛋白H3(AcH3)水平(图1A)。这些结果表明,CD8⁺T细胞分化伴随着组蛋白乙酰化的丧失,且抑制组蛋白脱乙酰化可以逆转CD8⁺T细胞分化。图1B显示,1 μ M或更多的SAHA会增强效应CD8⁺T细胞中的AcH3水平,而图1C指示,IL-21

诱导效应CD8⁺T细胞中的STAT3磷酸化。

[0135] 进行本研究以开发一种将表达CD45RO的效应T细胞重编程或去分化为表达CD62L和CD28的中央记忆T细胞的方法(图8)。评价了IL-21和组蛋白脱乙酰酶抑制剂(HDACi)治疗对中央记忆标志物CD28和CD62L的影响。将MART1 (M27)-特异性的效应CD8⁺T细胞不处理或用SAHA预处理24小时,然后在有或没有SAHA/IL-21存在下用M27-脉冲处理的成熟树突细胞激活4天。与对照细胞(无SAHA,无IL-21)相比,单独的IL-21稍微增加CD28表达。尽管单独的SAHA上调了CD28表达,令人感兴趣的是,SAHA和IL-21一起显著增强了CD28表达,从而证明SAHA和IL-21对CD28表达的协同效应(图2A)。

[0136] 将肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)分离,并然后用细胞因子IL-2扩增。将TIL用IL-21(30ng/mL)或IL-21和HDACi(SAHA)的组合处理2周。在扩增结束时,将TIL用针对CD8、CD28和CD62L的抗体染色,并使用CD8⁺门进行分析。结果表明,HDACi和IL-21处理的组合导致中央记忆T细胞的百分比的显著增加(图2B)。

[0137] 另外,在CD28启动子上在STAT结合位点附近的AcH3和STAT3富集的ChIP结果表明,HDACi(SAHA)处理增加了CD28启动子上的乙酰化H3(AcH3)水平,从而允许IL-21诱导的STAT3结合相同的DNA区域(图2C)。

[0138] 帕比司他在0.5nM或更高剂量会增加AcH3水平(图3A)。在有或没有帕比司他的情况下将IL-21加入微-REP显著提高细胞扩增的产率(图3B),并且帕比司他显著增强IL-21对CD28⁺CD62L⁺细胞群体的诱导(图3C)。在常规REP中,尽管将单独的帕比司他(Pano)添加到REP中会稍微降低扩增产率,但是对于其它三种条件而言,扩增倍数是相似的(图3D)。

[0139] 为了验证这些结果,将包含中央记忆和效应T细胞的抗原特异性CTL细胞系扩增,并用针对CD8、CD28和CD62L的抗体染色,并在CD8⁺门中进行分析。发现IL-21和HDACi帕比司他的联合处理导致从约0.5%中央记忆T细胞增加到超过19%中央记忆T细胞(图4A)。

[0140] 还将扩增的TIL/CTL用针对CD8和CD132的抗体染色,并使用CD8⁺门进行分析。发现IL-21上调CD132(γ 链)表达(图4C)。另外,将扩增的CTL用羧基荧光素琥珀酰亚胺基酯(CFSE)标记,并用IL-2或IL-15培养2天以检查细胞分裂。IL-21和帕比司他处理的细胞表现出增强的对 γ -链细胞因子IL-2和IL-15的应答(图4B)。

[0141] 图5A表明,IL-21和帕比司他诱导的CD28⁺CD62L⁺细胞高度表达CD28、CD62L、Lef1和Tcf1,这提示这些细胞比CD28⁻CD62L⁻细胞更少地分化。

[0142] 评估了IL-21和帕比司他在临床相关的TIL扩增中的作用。尽管在扩增中包括单独的帕比司他会降低一个TIL系的产物收率,但对于常规扩增和在扩增中使用IL-21/帕比司他而言扩增倍数是相似的(图5B)。

[0143] 在扩增结束时,进行了铬释放测定(CRA)以评价在不同条件下扩增的细胞的肿瘤杀死效率。IL-21处理和组合的帕比司他+IL-21处理增强了肿瘤细胞杀死(图6A)。扩增后,将肿瘤抗原特异性CTL细胞用肿瘤细胞重新刺激,然后进行细胞内染色。IL-21增强了IFN γ 和颗粒酶B表达(图6B)。

[0144] 在另一个实验中,将终末分化的和非终末分化的TIL的异质群体扩增,并用针对CD8、CD28和CD62L的抗体染色,并使用CD8⁺门进行分析。IL-21和帕比司他(Pano)处理会上调TIL上的中央记忆标志物CD28和CD62L表达(图7A)。

[0145] 因而,HDACi可用于将效应T细胞重编程,以使它们变得对记忆性T细胞敏感。综上

所述,组合的IL-21和HDACi处理被证实具有协同效应以从效应T细胞诱导中央记忆表型并增强对IL-2和IL-15的应答。

[0146] 实施例2-材料和方法

[0147] 肿瘤抗原特异性CTL系或肿瘤浸润性淋巴细胞 (TIL) 的扩增:使用抗-CD3和照射的同种异体PBMC或成淋巴细胞样细胞系 (LCL) (对于CTL系) 作为饲养细胞用于快速扩增,扩增CTL系或TIL。从患者黑素瘤肿瘤培养TIL。每3天用50U/ml (对于CTL系) 或6000U/ml (对于TIL) 的IL-2饲喂培养物。在第0、4和7天饲喂IL-21 (30ng/ml) 或HDACi帕比司他 (3nM) (作为对照) 或IL-21和HDACi的组合。14天后,将细胞用于进一步分析。对于使用SAHA的研究 (图2), SAHA以1-5 μ M使用。

[0148] 流式细胞术:将细胞用针对CD8、CD28、CD62L或CD132的抗体染色。通过LSR II流式细胞计获取所有FACS数据并通过FlowJo软件(Tree Star, Inc.) 进行分析。

[0149] 细胞内染色:将细胞用肿瘤细胞重新刺激16小时,并用针对CD8的抗体染色,随后固定并在透化缓冲液中用针对IFN- γ 和颗粒酶B的抗体染色。在分析之前,将细胞洗涤并重新悬浮于FACS缓冲液中。

[0150] 定量实时PCR:使用Qiagen RNA纯化试剂盒制备总RNA。使用Superscript逆转录酶和寡(dT) 引物(Life Technology) 制备cDNA,并使用iQ SYBR绿色实时PCR试剂盒(Bio-Rad Laboratories, Inc.) 用Bio-Rad iCycler Optical系统检测基因表达。将数据针对参照基因RPL13A标准化。RPL13A引物购自Qiagen。使用的其它引物对是:CD28正向:CTCACACTTCGGGTTCTCGG (SEQ ID NO:2), 反向:GACTCCACCAACCACCACCAG (SEQ ID NO:3); CD62L正向:ATGGAACGATGACGCCTGCC (SEQ ID NO:4), 反向:GGCCTCCAAAGGCTCACACT (SEQ ID NO:5); 额外引物包括淋巴样增强子-结合因子1 (LEF1) 正向:CACACCCGTCACACATCCCA (SEQ ID NO:6), 反向:TGGGAAAACCAGCCAAGAGGTG (SEQ ID NO:7); 转录因子1 (TCF1) 正向:TGCAGCTATACCCAGGCTGG (SEQ ID NO:8), 反向:CCTCGACCGCCTCTTCTTC (SEQ ID NO:9)。

[0151] 染色质免疫沉淀 (ChIP):根据生产商的说明书(Millipore) 使用ChIP测定试剂盒执行ChIP。用以下引物执行定量实时PCR:CD28启动子近侧STAT位点:正向TCTGCTGGATTTCAGCACCC (SEQ ID NO:10), 反向GACTGCAGCATTTACACAGG (SEQ ID NO:11); 远侧STAT位点:正向TGCTTGACGTAGAATGGGT (SEQ ID NO:12), 反向GGATGGGGACAGGTTGTGTC (SEQ ID NO:13); 兔IgG用作阴性对照。

[0152] 铬释放测定 (CRA):将肿瘤细胞用Cr51标记,然后与抗原特异性CTL一起以20:1的效应子:肿瘤温育4小时。测量上清液中的Cr51量,并且将杀死效率计算为%杀死=100% $\times$ (样品平均值-阴性对照的平均值)/(阳性对照的平均值-阴性对照的平均值)。

[0153] 相应地,微-REP按比例从T25烧瓶开始缩小到24孔板。IL-21和帕比司他剂量保持不变。

[0154] 统计分析:使用GraphPad Prism (版本6, GraphPad软件, San Diego, CA) 和Excel执行数据的图形表示和统计分析。将数据显示为平均值和STD。使用斯氏t检验对比各实验组之间的结果。 $p < 0.05$ 被认为是统计显著性的。将统计显著性显示为* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

[0155] 实施例3-将人效应子重编程为记忆CD8⁺T细胞

[0156] IL-21上调活化的人幼稚CD8⁺T细胞上的CD28表达:CD28是幼稚T细胞活化和记忆

性T细胞功能的关键共刺激分子。先前的研究对比了各种 γ C细胞因子对肿瘤-抗原特异性的CTL体外产生的影响,发现IL-21具有独特的能力来富集CD28^{hi} CTL,其在过继转移后表现出增强的持久性和改善的患者临床应答。为了研究IL-21诱导的CD28表达的分子机制,如先前所述(Li等人,2005),在没有或有IL-21存在下产生由T细胞(MART1,M27)-特异性的CTL识别的黑素瘤抗原。与在没有IL-21存在下产生的细胞相比,用IL-21产生的M27-特异性的CTL显示出明显更高的CD28表达(图9A和B)。为了进一步确证所述发现,在没有或有IL-21存在下用抗-CD3/CD28珠子活化来自健康供体的分类纯化的人幼稚CD8⁺T细胞(CD45RA⁺CCR7⁺),并通过流式细胞术检测表面CD28表达。与抗原特异性CTL一致(图9A和B),在多克隆活化的IL-21处理的人幼稚CD8⁺T细胞中,CD28的表面水平表达显著增加(图9C和D)。与增强的CD28蛋白表达相一致,在有IL-21存在下产生的M27-特异性的CTL中(图9E)和在IL-21处理的抗-CD3/CD28活化的人幼稚CD8⁺T细胞中(图9F)一致地检测到大大增强的CD28 mRNA水平。这些结果一起指示,IL-21上调CD28 mRNA表达以增加CD28表面水平表达。

[0157] STAT3激活是IL-21介导的CD28表达的增强所必需的:IL-21通过活化Janus激活的激酶1(JAK1)和JAK3以及随后的信号转导蛋白和转录活化剂(STAT)-3的磷酸化以及在较小程度上STAT1和STAT5的磷酸化来发挥功能。因而,在培养条件下在幼稚CD8⁺T细胞中检查了STAT1、STAT3和STAT5的磷酸化。将来自健康供体的人幼稚CD8⁺T细胞在没有或有IL-21存在下用抗-CD3/CD28珠子活化不同的时间段。在活化后30分钟,IL-21刺激诱导了强的STAT1和STAT3磷酸化,但弱的STAT5磷酸化(图16A)。由于IL-21诱导强的STAT1和STAT3活化,因此该研究旨在阐明STAT1和/或STAT3活化对于IL-21上调CD28是否必不可少。为了检查STAT3的作用,使用了来自Job氏综合征患者的外周血单核细胞(PBMC)。由于STAT3基因中的显性负效突变导致STAT3功能减弱,造成Job氏综合征(也被称作高IgE综合征,其特征在于血液中免疫球蛋白E(IgE)的异常高水平)。从健康供体或Job氏综合征患者的PBMC中分离出总CD8⁺T细胞,并如上所述进行活化。IL-21增加了来自健康供体的CD8⁺T细胞中蛋白和mRNA水平上的CD28表达,但是,IL-21介导的CD28表达的增强在来自Job氏综合征患者的细胞中被完全消除(图17A-C)。这些结果指示,STAT3活性对于在活化的人CD8⁺T细胞中IL-21对CD28表达的上调是重要的。

[0158] 为了进一步证实该发现并且也评估STAT1在IL-21诱导的CD28上调中的作用,使用靶向人STAT1或STAT3基因的各个区域的不同shRNA构建体敲低未处理的人CD8⁺T细胞中的STAT1或STAT3表达。总STAT1和STAT3水平表明,STAT1或STAT3 shRNA特异性地和有效地降低了它们各自蛋白质的表达(图16B)。如在图10D-F中所示,与对照细胞相比,IL-21诱导的CD28蛋白和mRNA上调在STAT3 shRNA-转染的和活化的CD8⁺T细胞中减少,但在STAT1 shRNA-转染的和活化的细胞中没有减少。这些结果支持STAT3而不是STAT1在活化的人CD8⁺T细胞中的IL-21诱导的CD28表达上调中的关键作用。与该发现相一致,先前对STAT3突变体、STAT1突变体和IL21R突变体患者细胞的研究表明,IL21/STAT3而非STAT1是CD8⁺中央记忆(CD45RA⁻CCR7⁺)细胞和效应子记忆(CD45RA⁻CCR7⁻)细胞体内分化所必需的。

[0159] 为了进一步描述在活化的人CD8⁺T细胞中STAT3介导IL-21诱导的CD28表达上调的分子机制,分析了人CD28启动子并鉴定了簇集在CD28启动子的近侧和远侧部分的几个共有的STAT位点。ChIP测定显示,相对于单独的抗-CD3/CD28处理,STAT3在用抗-CD3/CD28和IL-21激活的细胞中在近侧和远侧CD28启动子区域富集了2-3倍(图10G)。共同地,这些结果提

示,IL-21活化的STAT3与人CD28启动子结合以促进CD28转录。

[0160] 响应于IL-21的CD28的差别诱导与幼稚和效应CD8⁺T细胞中的组蛋白H3乙酰化水平相关:研究证实,在活化后,IL-21独特地增强幼稚CD8⁺T细胞上的CD28表达(图9)。但是,在用其相应的肽-脉冲处理的成熟树突细胞活化的MART1 (M27)-特异性的效应CD8⁺T细胞上未观察到IL-21对CD28的诱导(图11A和B)。由于IL-21主要通过STAT3的磷酸化起作用(图10),因此在幼稚和效应CD8⁺T-细胞中对比了IL-21诱导的STAT3磷酸化水平,并发现是可比较的(图11C),从而提示,IL-21不能增加效应CD8⁺T细胞上的CD28表达不是由于IL-21信号传导的缺失,而是由于pSTAT3不能接近其结合位点。

[0161] 染色质可达性和基因表达可以通过组蛋白乙酰化来调节。为了确定组蛋白乙酰化水平是否与CD28表达相关,对分别具有高和低CD28水平的幼稚(CD45RA⁺CCR7⁺)和T_{EMRA}效应记忆(CD45RA⁺CCR7⁻)CD8⁺T细胞进行染色质免疫沉淀(ChIP)。与T_{EMRA} CD8⁺T细胞相比,与它们的高CD28表达一致,幼稚CD8⁺T细胞表现出在启动子上远侧和近侧STAT3结合位点附近以及在CD28基因的转录起始位点(TSS)附近增加的乙酰化组蛋白H3(AcH3)(图11D)。IL-21处理在活化的T_{EMRA} CD8⁺T细胞中最小地上调CD28表达(图11E)。类似地,与幼稚CD8⁺T细胞相比,MART1 (M27)-特异性的CD28^{neg}效应CD8⁺T细胞表现出在CD28基因座上显著降低的AcH3水平(图11F)。这些结果指示,CD28转录受组蛋白乙酰化调节,这与幼稚和效应CD8⁺T细胞中IL-21对CD28的差别诱导有关。因此,AcH3的调节可以允许在效应CD8⁺T细胞中IL-21介导的CD28上调。

[0162] SAHA允许IL-21诱导的pSTAT3接近CD28启动子并上调效应CD8⁺T细胞中的CD28表达:上述发现指示,CD28转录受组蛋白乙酰化调节,这提示组蛋白乙酰化水平的降低可能导致CD8⁺T细胞分化和导致幼稚/中央记忆标志物表达的丧失。假定通过HDACi的应用增加组蛋白乙酰化将逆转CD8⁺T细胞分化。由于IL-21显著增强了具有较高组蛋白乙酰化水平(图11D)的幼稚CD8⁺T细胞上的CD28表达(图9),有理由认为HDACi和IL-21的组合将对CD28表达具有协同效应。为了检验该假设,评估了临床上可用的化合物辛二酰苯胺异羟肟酸(Suberoylanilide Hydroxamic Acid,SAHA,伏林司他)的作用,它是一种广泛的组蛋白脱乙酰酶抑制剂(HDACi),已被批准用于治疗皮肤T-细胞淋巴瘤,并已在临床试验中用于治疗其它疾病。确定有效剂量的滴定研究表明,1 μ M或更大浓度的SAHA可以增加效应CD8⁺T细胞中的AcH3水平(图16)。

[0163] 为了评估在更生理性的抗原特异性的(相对于非特异性的多克隆的)刺激的背景下SAHA/IL-21对CD28表达的影响,评价了对使用肽-脉冲处理的自体树突细胞产生的MART1 (M27)-特异性的效应子/效应记忆细胞的这种影响。在体外刺激的迭代循环、M27-特异性的CTL的四聚体引导分选和扩增至均匀(>95%MART-1-特异性的效应子CTL)后,产生了MART1 (M27)-特异性的效应CD8⁺T细胞(CD45RO⁺,CD28^{-neg},CD62L^{-neg})。首先,评价了SAHA对pSTAT3与CD28启动子区域结合的影响。SAHA处理显著增加了在CD28基因的启动子和TSS区域上的AcH3水平(图12A)。与增加的AcH3水平相关,SAHA处理增加了IL-21诱导的pSTAT3与CD28启动子的结合(图12B)。接着,将M27-特异性的效应CD8⁺T细胞保持未处理或用SAHA预处理24小时,然后在有或没有SAHA/IL-21存在下用M27-脉冲处理的成熟树突细胞活化4天。令人感兴趣的是,SAHA和IL-21一起显著增强了CD28表达(图12C和D),从而证明了SAHA和IL-21对CD28表达的协同效应。这些结果提示,SAHA处理增加了M27-特异性的效应CD8⁺T细

胞中的AcH3水平和染色质可达性,从而允许IL-21-活化的STAT3与其启动子位点结合并诱导CD28表达。

[0164] IL-21和SAHA协同上调CD28和CD62L表达:为了评估SAHA/IL-21在翻译环境中的作用,在肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)上评价了该程序。TIL细胞的过继转移(用于治疗具有转移性黑素瘤和其它TIL⁺实体瘤的患者)涉及:从肿瘤活检组织中提取浸润淋巴细胞,用高剂量IL-2进行体外处理,使用快速扩增方案(REP)进行体外扩增,然后在高剂量淋巴细胞耗竭调理后输注离体扩增的TIL。尽管TIL治疗已经在转移性黑素瘤患者的治疗中显示出一些成功,但许多患者对TIL治疗没有应答,部分原因是输入的细胞的持久性有限。在TIL产物中的CD8⁺T细胞经常是分化良好的效应细胞、效应记忆细胞和末端效应细胞,其增殖能力降低。为了检查HDAC抑制剂/IL-21组合的可能去分化作用,将TIL保持未处理或用SAHA预处理24小时,然后进行常规REP(辐射的PBMC和LCL细胞,抗-CD3和IL-2)或使用SAHA/IL-21的REP。在REP培养物中添加单独的SAHA造成显著的细胞死亡,而血球计数器计数表明在REP结束时几乎没有活细胞。与单独的REP或使用单独IL-21的REP相比,在REP期间联合施用的SAHA和IL-21不仅增加CD28表达,而且增加CD62L表达(图12E和F),这两种标志物在幼稚和中央记忆T细胞上高表达。这些结果提示,与M27-效应CD8⁺T细胞中的结果相似,SAHA处理增加了TIL中的AcH3水平和染色质可达性,从而允许IL-21活化的STAT3与其启动子位点结合并诱导CD28表达和效应CD8⁺T细胞的去分化的表型证据。

[0165] IL-21和帕比司他(Pano)协作诱导中央记忆样T细胞:

[0166] 由于SAHA的细胞毒性限制了它在ACT中的应用,因此筛选了其它药理学可用的HDACi(图17A),并发现帕比司他(LBH589,Pano)具有与SAHA相似的作用,但具有最小的细胞毒性。帕比司他在0.5nM或更高的剂量增加了AcH3水平(图17B)。最初以小规模研究了帕比司他对REP中TIL的作用,并将预处理(用帕比司他预处理细胞24小时,然后用Pano和IL-21快速扩增)与共处理(在开始细胞扩增时加入帕比司他和IL-21)进行了对比。由于这两种策略在诱导TIL的CD28⁺CD62L⁺细胞群体方面具有可比较的作用(图18A和18B),因此为简洁起见在后续研究中采用了共处理方案。

[0167] 为了检验帕比司他(Pano)在抗原特异性ACT方面的临床适用性,如前所述(Yee, 2014),使用通过ETC方案生成的MART1(M27)-特异性的效应子/效应记忆细胞,并通过REP在体外扩增。用四种不同的方案(常规,单独添加IL-21,单独添加Pano,或IL-21+Pano)扩增细胞。尽管向REP添加单独的帕比司他会稍微降低总收率,但扩增倍数对于其它三种条件是相似的(图18C)。帕比司他的添加诱导了CD28⁺CD62L⁺细胞群体,当与IL-21的添加组合时其进一步增强(图13A和B)。假定帕比司他像SAHA一样可使STAT3和其它转录因子/辅因子进入结合位点并诱导CD28和CD62L表达。

[0168] 通过这些中央记忆样T细胞响应于IL-7和IL-15而经历稳态增殖的能力,评价了与IL-21/Pano诱导的CD28⁺CD62L⁺群体相关的中央记忆功能。将用四种不同方案(常规,单独添加IL-21,单独添加Pano,或IL-21+Pano)扩增的ETC细胞用CFSE标记,并用IL-2、IL-7或IL-15培养2天。IL-7没有诱导细胞分裂,这可能是由于CD127表达的低水平。在IL-21存在下扩增的细胞表现出增强的IL-2和IL-15诱导的增殖(图14A)。向REP单独添加帕比司他会增加响应于IL-15的细胞增殖,但不增加响应于IL-2的细胞增殖。有趣的是,用IL-21和帕比司他的组合扩增的细胞表现出比任意其它组群更大的对IL-2和IL-15的增殖应答(图14A)。由于

IL-2和IL-15共享CD132 (γ C) 和CD122受体亚基,因此在这些细胞的表面上评估了CD132和CD122水平。用IL-21+/-帕比司他处理导致显著增加的表面CD132水平(图14B和C),这可能有助于它们的增加的针对IL-2和IL-15的自我更新。

[0169] 为了进一步证实HDACi/IL-21处理的CTL的中央记忆样性质,评估了相关分化基因的表达。发现已知在中央记忆/干细胞记忆CD8⁺T细胞分化中起作用的中央记忆相关的转录标记(Lef1^{hi}, Tcf7^{hi}) 在通过帕比司他和IL-21组合处理产生的CD28⁺CD62L⁺细胞中高度表达(图14D)。转录因子T-bet和eomesodermin (Eomes) 在效应和记忆T细胞形成中具有重要作用,并且它们的表达在分化的CD8⁺T-细胞中增加。令人感兴趣的是,Tbx21和Eomes表达在CD28⁺CD62L⁺细胞和CD28-CD62L-细胞之间是相似的(图14D)。

[0170] 在该研究中,证实了IL-21和HDACi的组合可用于重编程效应细胞,使其变成更低分化程度的、具有高复制能力的中央记忆样T细胞。总体而言,证明了IL-21+Pano方案在两种临床有关的ACT模式中的潜在应用:ETC和TIL。所述研究已经证实了产生更低分化的ACT产物(其可导致改善的临床结果)的可转移方案。

[0171] 实施例4-材料和方法

[0172] 肿瘤抗原特异性CTL系或肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)的扩增:使用抗-CD3和照射的同种异体PBMC或成淋巴细胞样细胞系(LCL)(对于CTL系)作为饲养细胞用于快速扩增,扩增CTL系或TIL。从患者黑素瘤肿瘤培养TIL。每3天用50U/ml(对于CTL系)或6000U/ml(对于TIL)的IL-2饲喂培养物。在第0、4和7天饲喂IL-2(30ng/ml)或HDACi帕比司他(3nM)(作为对照)或IL-21和HDACi的组合。14天后,将细胞用于进一步分析。对于使用SAHA的研究,SAHA以1-5 μ M使用。

[0173] CD8⁺T细胞的多克隆刺激:将幼稚CD8⁺T细胞(CD8⁺CD45RA⁺CCR7⁺)进行流式细胞术分选或使用EasySepTM人幼稚CD8⁺T细胞富集试剂盒(StemCell)分离。在一些实验中,使用EasySepTM人CD8⁺T细胞富集试剂盒(StemCell)负选择总CD8⁺T细胞。通过流式细胞术确定,幼稚或总CD8⁺T细胞的纯度大于95%。在含有10%胎牛血清和青霉素/链霉素的RPMI 1640中培养CD8⁺T细胞。以1:1的珠子:细胞比率或与30ng/mL人IL-21(PeproTech)一起,使用用于T-细胞扩增和活化的**Dynabeads®**人T-活化剂CD3/CD28(Life Technologies)活化CD8⁺T细胞。在指定的时间点,收获T细胞,并在进行下游分析前使用磁铁除去珠子。

[0174] 细胞培养和快速扩增方案(REP):用于CTL系的培养基是RPMI1640、10%FBS、4 μ M谷氨酰胺和2-巯基乙醇。在含有RPMI1640、10%人AB血清、10mM HEPES和2-巯基乙醇的50% AIM-V、50%TIL完全培养基中培养TIL。对于REP,使用30ng/mL抗-CD3(OKT3)和200x照射的同种异体PBMC或LCL作为饲养细胞扩增CTL系或TIL。每3天用50U/ml的IL-2饲喂培养物。如果在扩增中包含IL-21(30ng/ml)或HDACi SAHA(1-5 μ M)或帕比司他(1-3nM),则在第0、4和7天加入。14天后,将扩增的细胞进行进一步分析。

[0175] 流式细胞术:将细胞用针对CD8、CD28、CD62L或CD132的抗体染色。所有FACS数据通过LSR II流式细胞计获得,并通过FlowJo软件(Tree Star, Inc.)进行分析。

[0176] 细胞内染色:将细胞用肿瘤细胞重新刺激16小时,并用针对CD8的抗体染色,随后固定并在透化缓冲液中用针对IFN- γ 和颗粒酶B的抗体染色。在分析之前,将细胞洗涤并重新悬浮于FACS缓冲液中。

[0177] 定量实时PCR:使用Qiagen RNA纯化试剂盒制备总RNA。使用Superscript逆转录酶

和寡(dT)引物(Life Technology)制备cDNA,并使用iQ SYBR绿色实时PCR试剂盒(Bio-Rad Laboratories, Inc.)用Bio-Rad iCycler Optical系统检测基因表达。将数据针对参照基因RPL13A标准化。RPL13A引物购自Qiagen。使用的其它引物对是:CD28正向:CTCACACTTCGGGTTCTCGG (SEQ ID NO:2),反向:GACTCCACCAACCACCACCAG (SEQ ID NO:3); CD62L正向:ATGGAACGATGACGCCTGCC (SEQ ID NO:4),反向:GGCCTCCAAAGGCTCACACT (SEQ ID NO:5);额外的引物包括淋巴样增强子-结合因子1 (LEF1) 正向:CACACCCGTCACACATCCCA (SEQ ID NO:6),反向:TGGGAAAACCAGCCAAGAGGTG (SEQ ID NO:7);转录因子1 (TCF1) 正向:TGCAGCTATACCCAGGCTGG (SEQ ID NO:8),反向:CCTCGACCGCCTCTTCTTC (SEQ ID NO:9)。

[0178] 人shRNA敲低:将总CD8⁺T细胞分离,并根据生产商的说明书(Lonza)使用Amara人T细胞Nucleofector试剂盒,用5μg阴性对照、STAT1 shRNA或STAT3 shRNA (Dharmacon) 转染。将转染的细胞静置1-2天,并对活的GFP⁺细胞进行分选纯化以进行免疫印迹分析,或如先前所述在进一步分析之前将其刺激7天。

[0179] 蛋白质印迹分析:将相同数目的细胞在2x SDS上样缓冲液中裂解,并用不同的抗体(Cell Signaling)上样以进行免疫印迹分析。抗-β-肌动蛋白-HRP来自Santa Cruz Biotech。β-肌动蛋白用作所有免疫印迹实验的上样对照。使用ImageJ量化结果,并针对对应样品中的肌动蛋白的密度标准化。

[0180] 染色质免疫沉淀(ChIP):根据生产商的说明书(Millipore)使用ChIP测定试剂盒执行ChIP。用以下引物执行定量实时PCR:CD28启动子近侧STAT位点:正向TCTGCTGGATTTCAAGCACCC (SEQ ID NO:10),反向GACTGCAGCATTTACACAGG (SEQ ID NO:11);远侧STAT位点:正向TGCTTGCACGTAGAATGGGT (SEQ ID NO:12),反向GGATGGGGACAGGTTGTGTC (SEQ ID NO:13);兔IgG用作阴性对照。

[0181] 铬释放测定(CRA):将肿瘤细胞用Cr51标记,然后与抗原特异性CTL一起以20:1的效应子:肿瘤温育4小时。测量上清液中的Cr51量,并且将杀死效率计算为%杀死=100% x (样品平均值-阴性对照的平均值)/(阳性对照的平均值-阴性对照的平均值)。

[0182] 相应地,微-REP按比例从T25烧瓶开始缩小到24孔板。IL-21和帕比司他剂量保持不变。

[0183] 统计分析:使用GraphPad Prism (版本6, GraphPad软件, San Diego, CA) 和Excel执行数据的图形表示和统计分析。将数据显示为平均值和STD。使用斯氏t检验对比各实验组之间的结果。p<0.05被认为是统计显著性的。将统计显著性显示为* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001。

[0184] 根据本公开内容,无需过多实验可以实现和执行在本文中公开并要求保护的所有方法。虽然已经以优选实施方案的方式描述了本发明的组合物和方法,但是本领域技术人员显而易见,在不偏离本发明的概念、精神和范围的情况下,可以对本文中所述方法以及本文所述方法的步骤或步骤顺序作出改变。更具体地,显而易见,可以用在化学上和生理学上均相关的某些药剂替代本文所述的药剂,并实现相同或类似的结果。本领域技术人员显而易见的所有这样的类似的替代和修改均被认为落入由所附权利要求书限定的本发明的精神、范围和概念内。

[0185] 参考文献

[0186] 就它们提供示例性操作细节或其它细节来补充本文所述的那些而言,下述参考文

献具体地通过引用并入本文。

[0187] Klebanoff等人,Proc Natl Acad Sci U S A.102(27):9571-6,2005.

[0188] Li等人,J.Immunol.175,2261-2269,2005.

[0189] Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第22版,Pharmaceutical Press.2013.

[0190] Seto和Yoshida,Cold Spring Harb Perspect Biol.6(4):a018713,2014.

[0191] 美国专利号6,307,024

[0192] 美国专利号6,686,178

[0193] Yee,Immunol.Rev.257,250-263,2014。

序列表

<110> 得克萨斯大学体系董事会

YEE, CASSIAN

WANG, JUNMEI

<120> 组蛋白修饰剂将效应T细胞重编程的用途

<130> UTFC.P1311W0

<150> 62649265

<151> 2018-03-28

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 162

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1

```

Met Arg Ser Ser Pro Gly Asn Met Glu Arg Ile Val Ile Cys Leu Met
1           5           10           15
Val Ile Phe Leu Gly Thr Leu Val His Lys Ser Ser Ser Gln Gly Gln
          20           25           30
Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp Gln
          35           40           45
Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro Ala Pro
          50           55           60
Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys Phe Gln
65           70           75           80
Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg Ile Ile
          85           90           95
Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr Asn Ala
          100          105          110
Gly Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr
          115          120          125
Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu Leu
          130          135          140
Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser Glu
145          150          155          160
Asp Ser
<210> 2
<211> 21

```

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 2
ctcacacttc gggttcctcg g 21
<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 3
gactccacca accaccacca g 21
<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 4
atggaacgat gacgcctgcc 20
<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 5
ggcctccaaa ggctcacact 20
<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 6
cacaccgctc acacatccca 20
<210> 7

<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 7
tgggaaaacc agccaagagg tg 22
<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 8
tgcagctata cccaggctgg 20
<210> 9
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 9
cctcgaccgc ctcttcttc 19
<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 10
tctgctggat ttcaagcacc c 21
<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 11
gactgcagca tttcacacag g 21

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 12

tgcttgcacg tagaatgggt 20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 13

ggatggggac aggttgtgtc 20

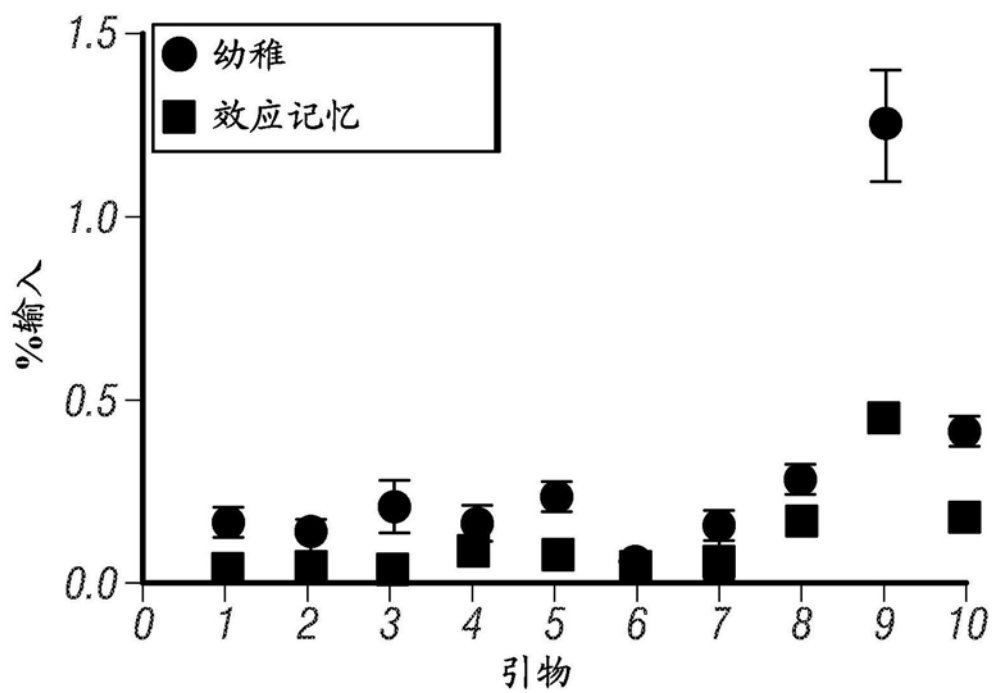


图1A

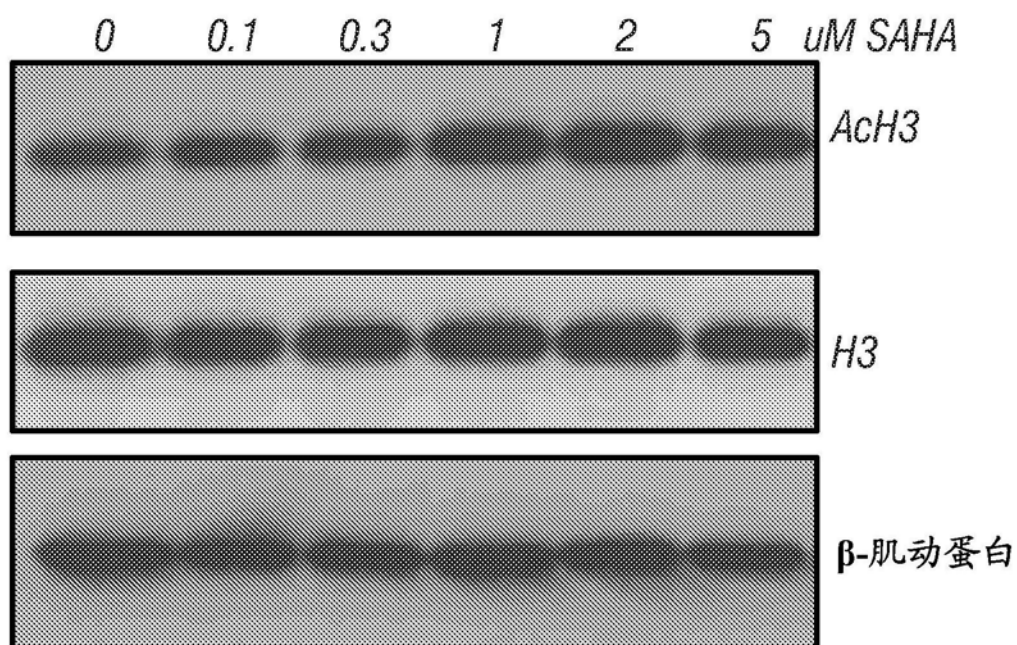


图1B

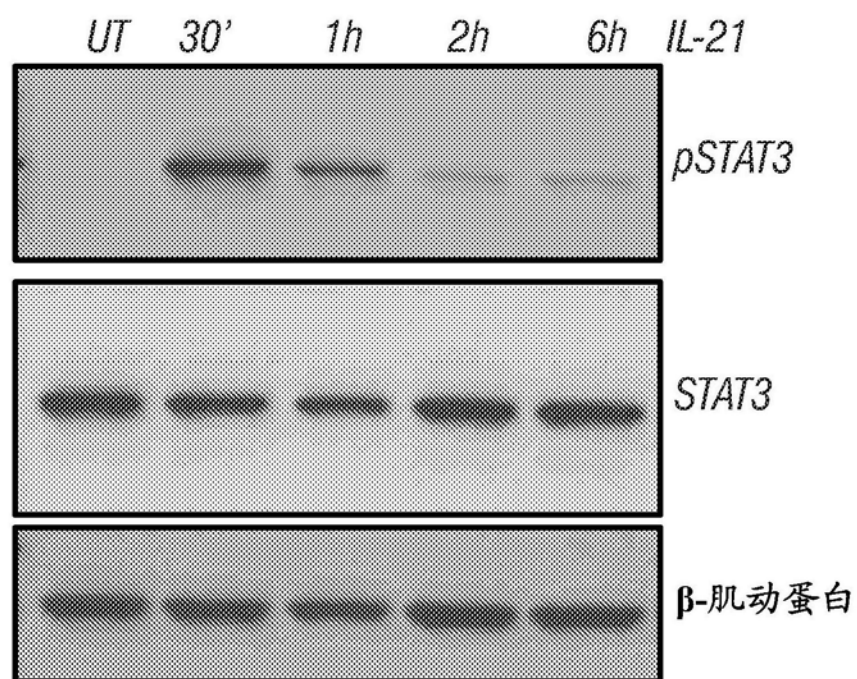


图1C

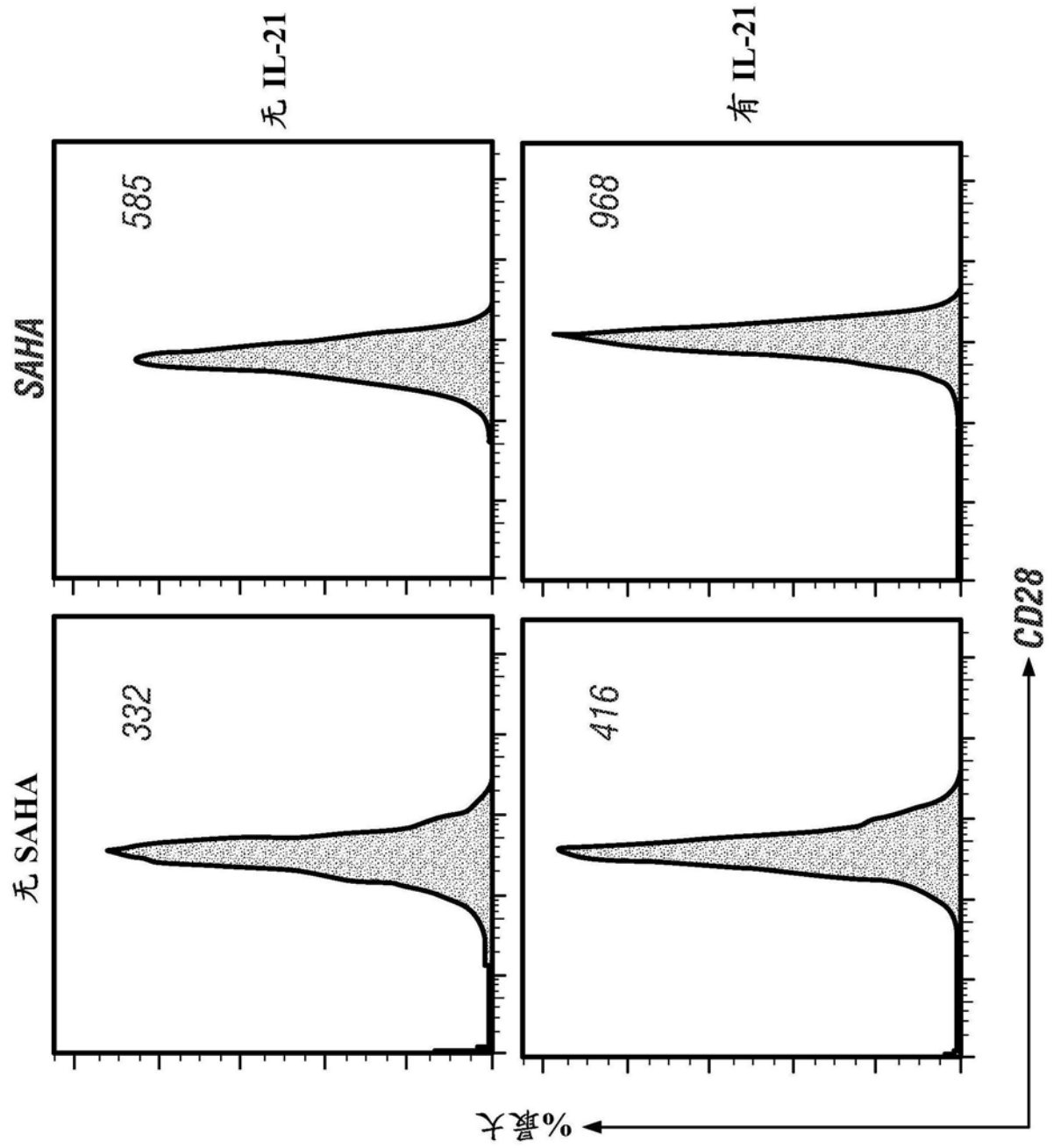


图2A

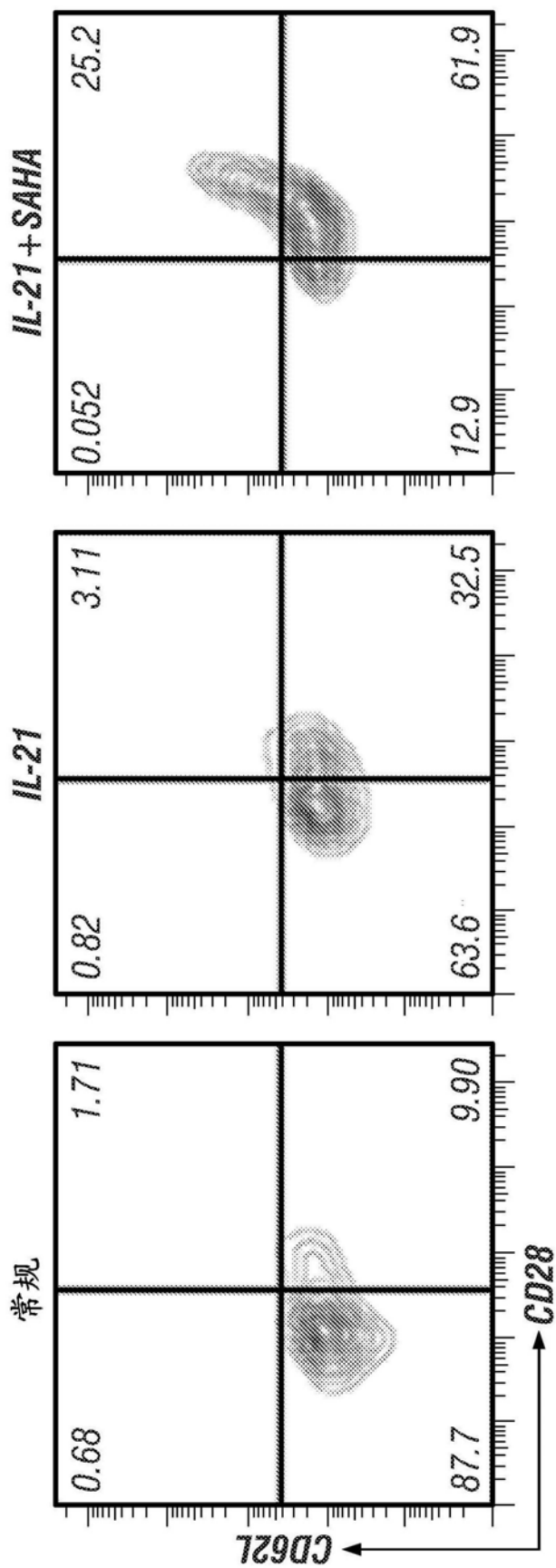


图2B

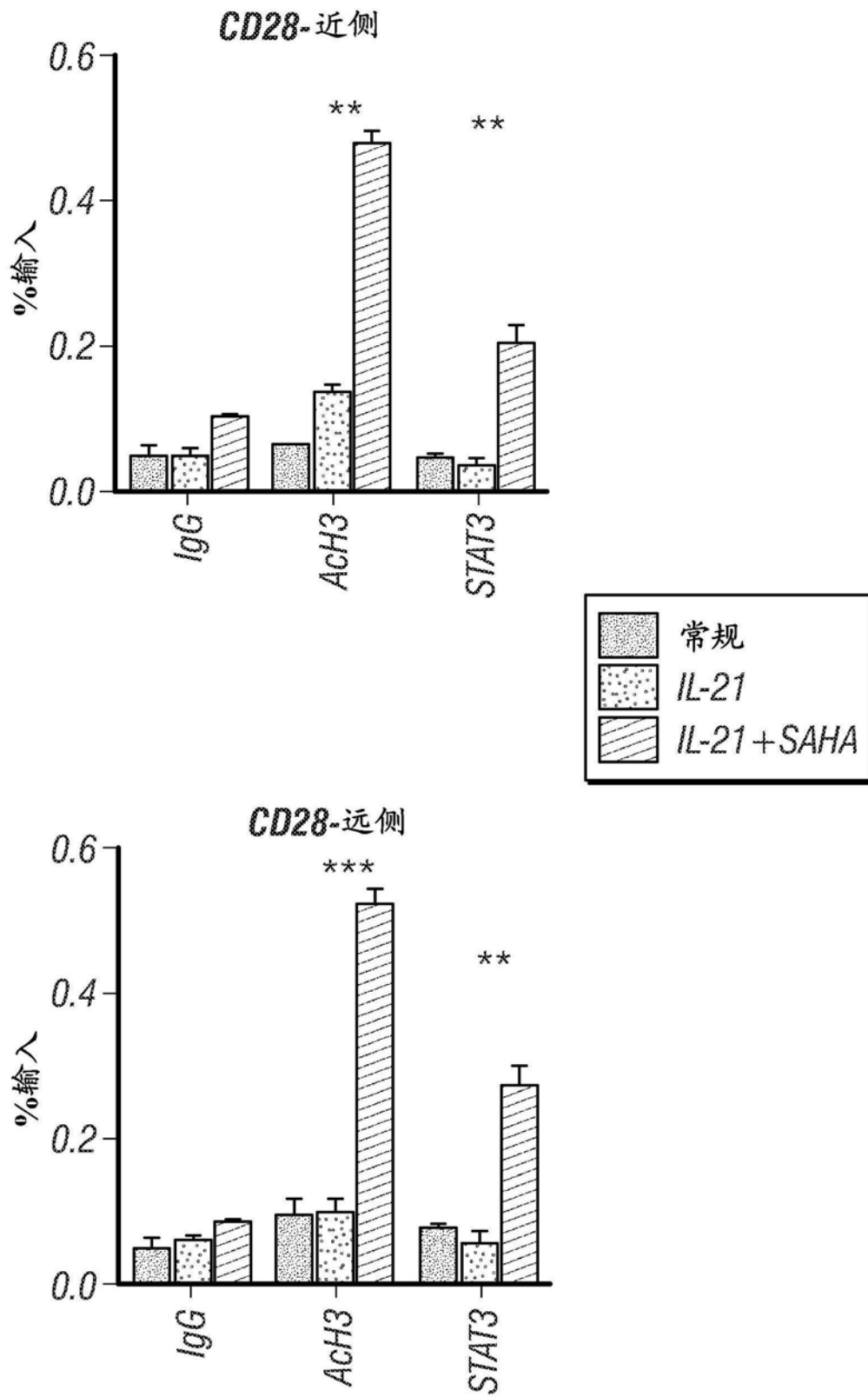


图2C

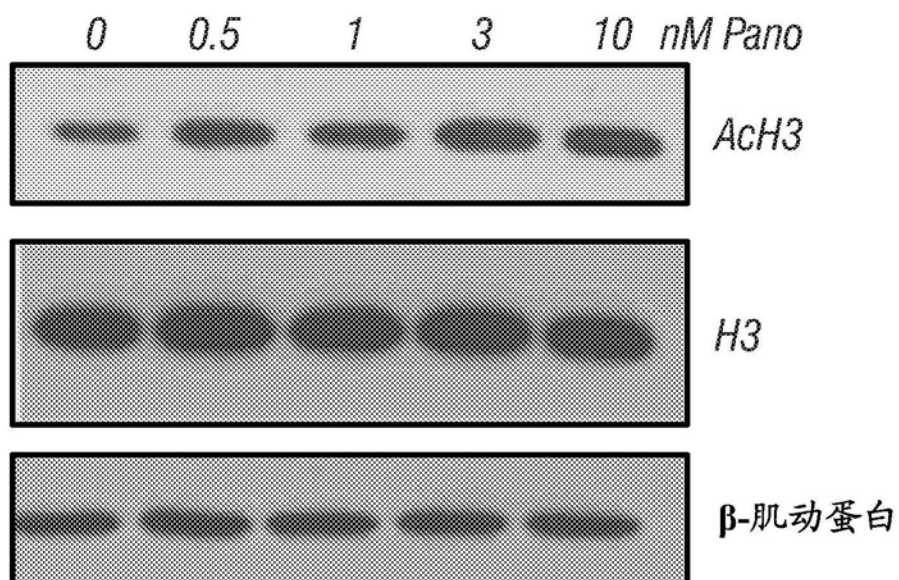


图3A

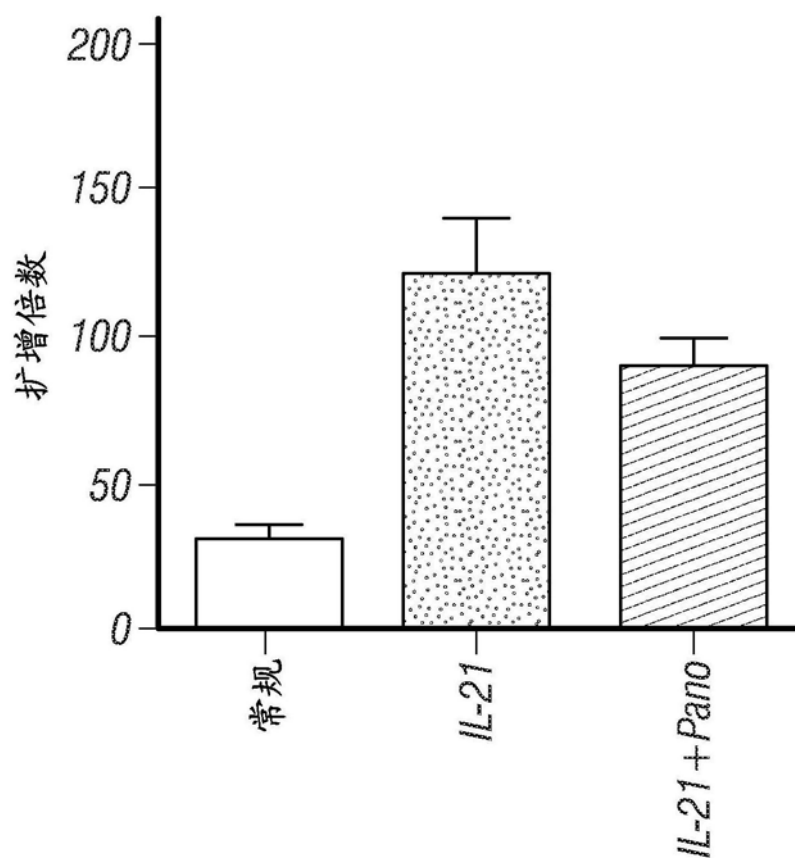


图3B

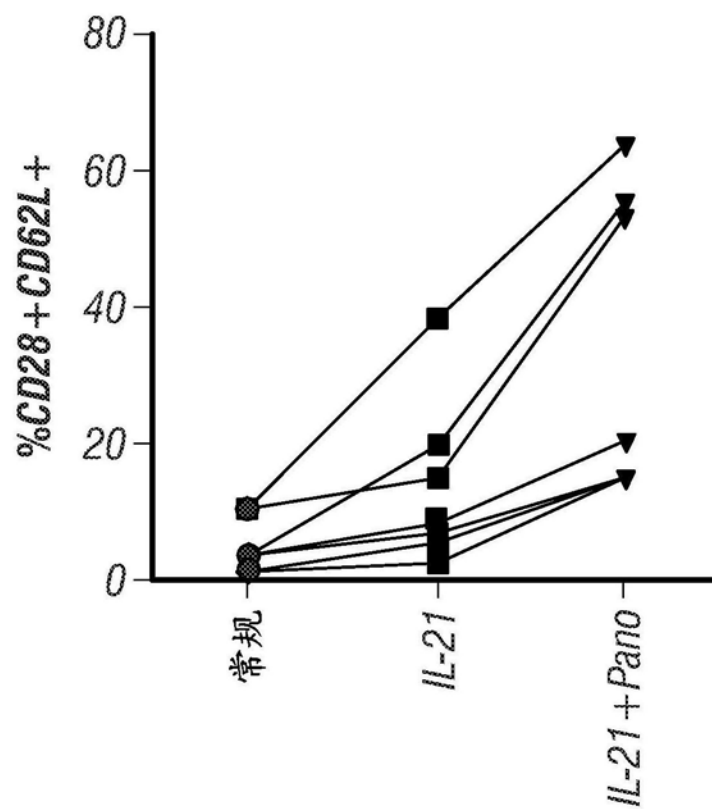


图3C

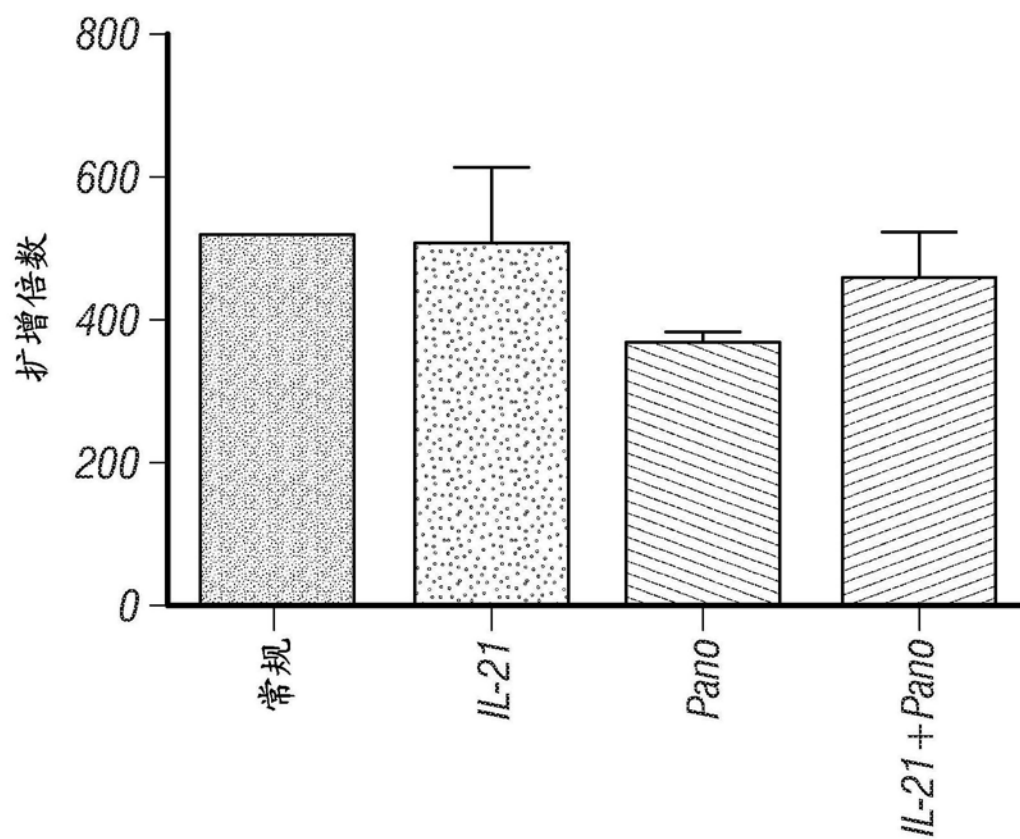


图3D

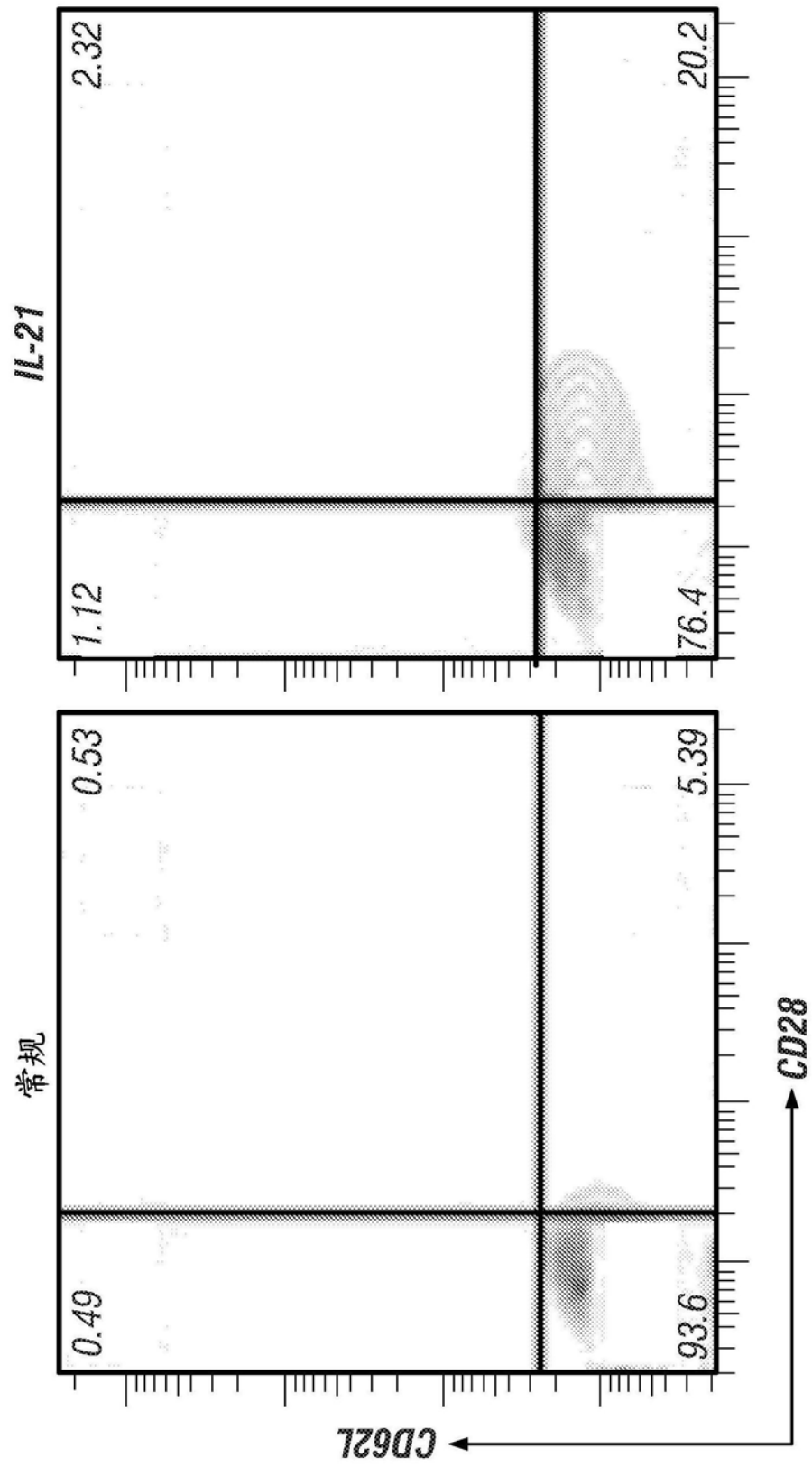


图4A

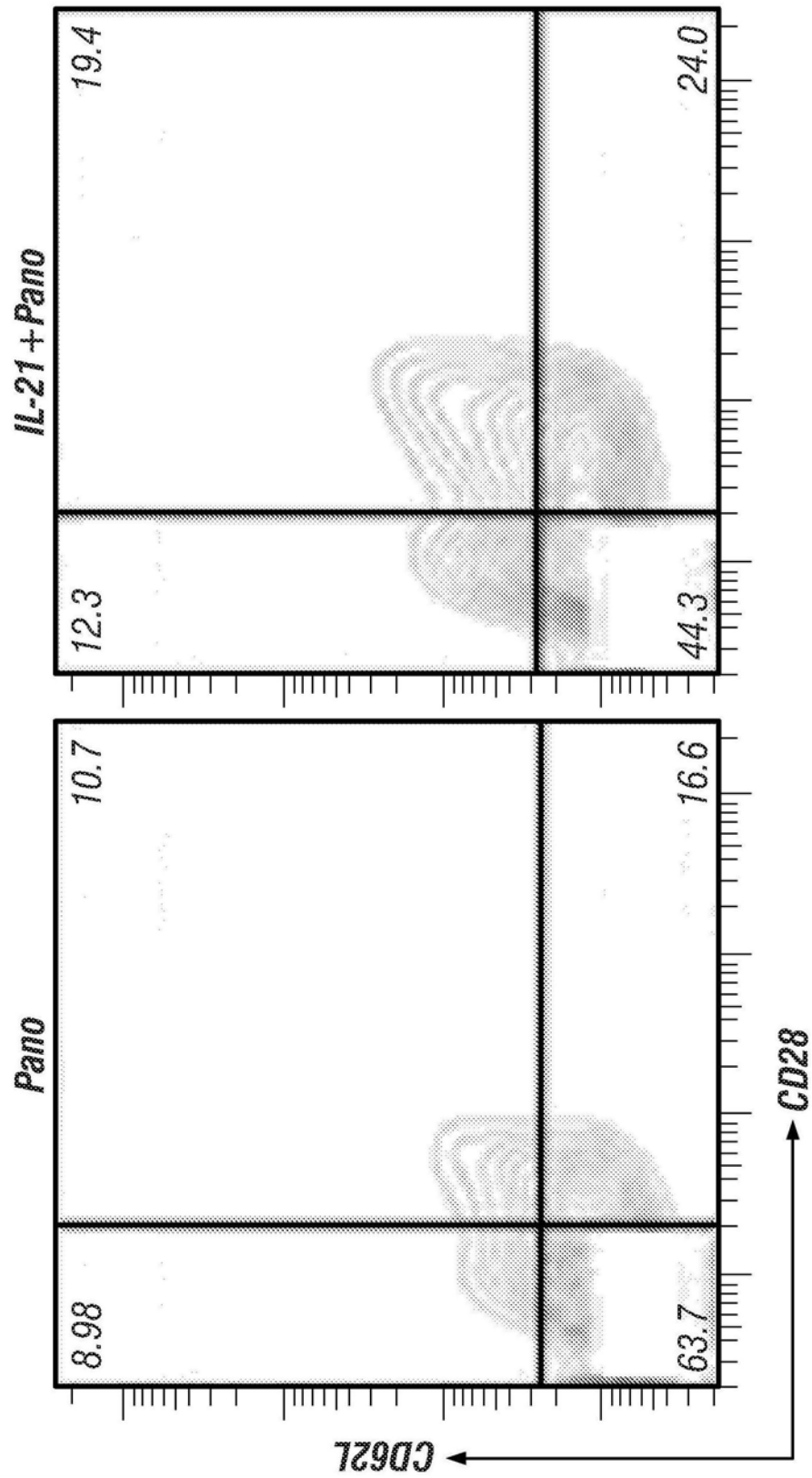


图4A (续)

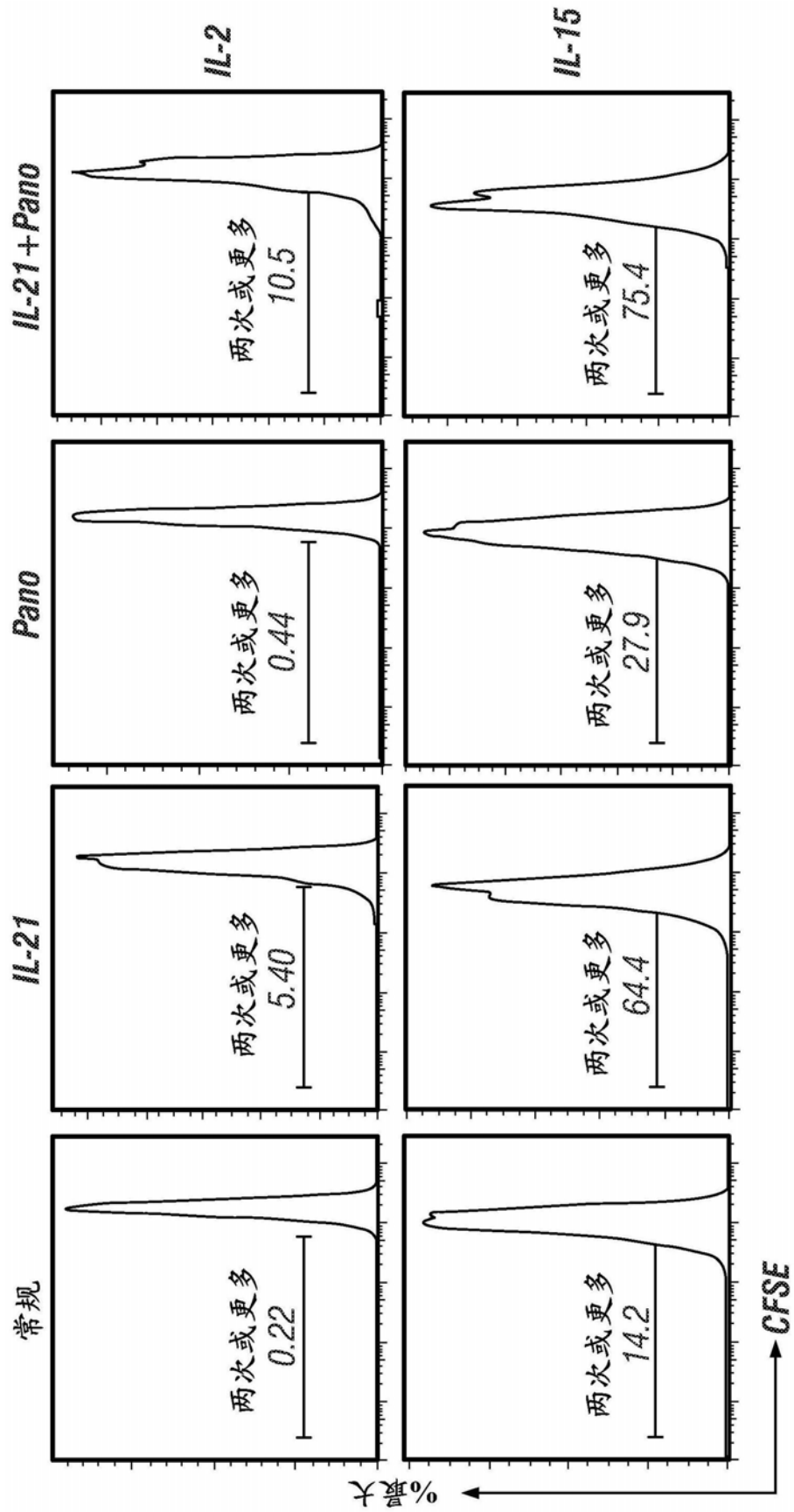


图4B

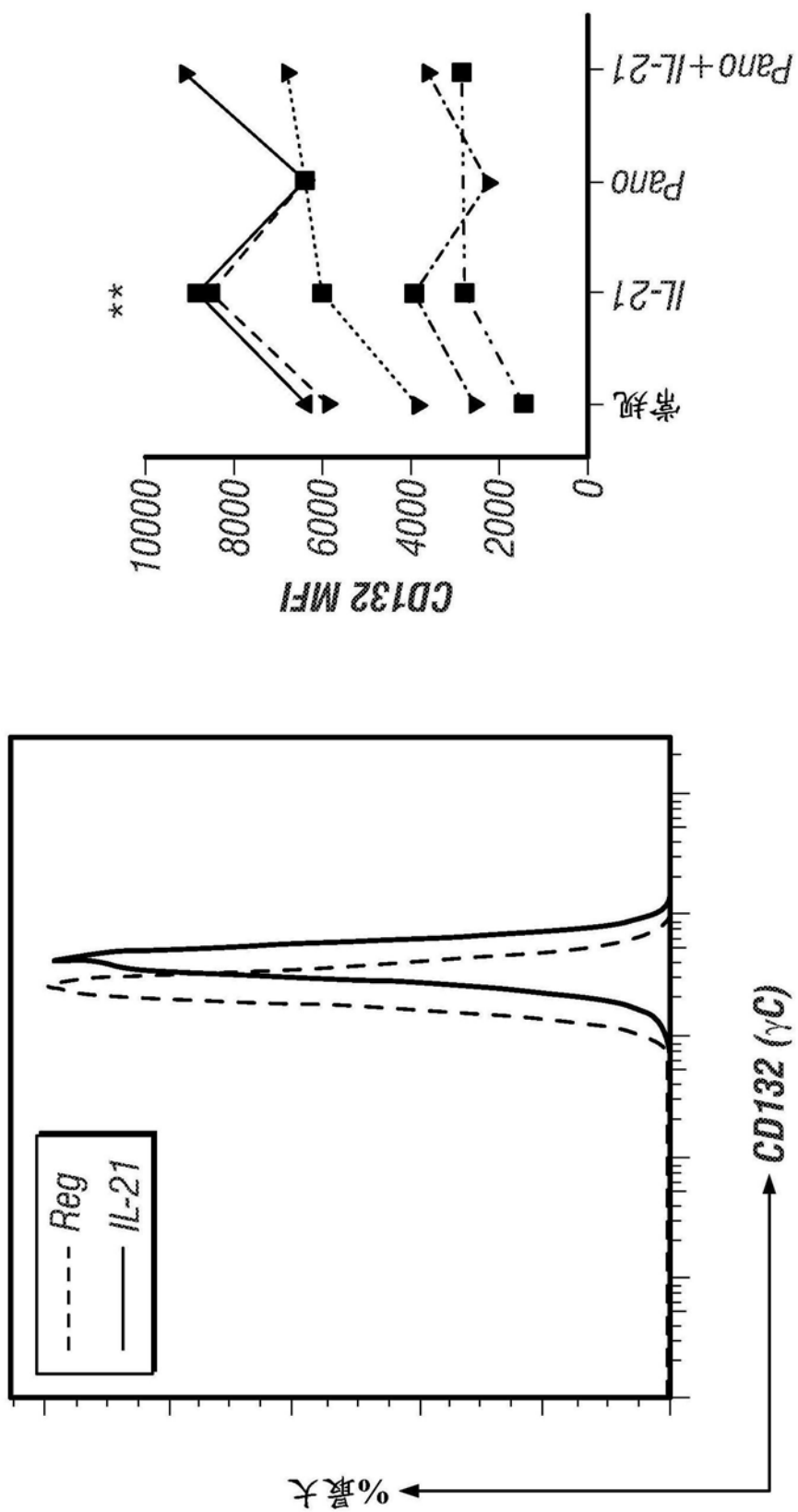


图4C

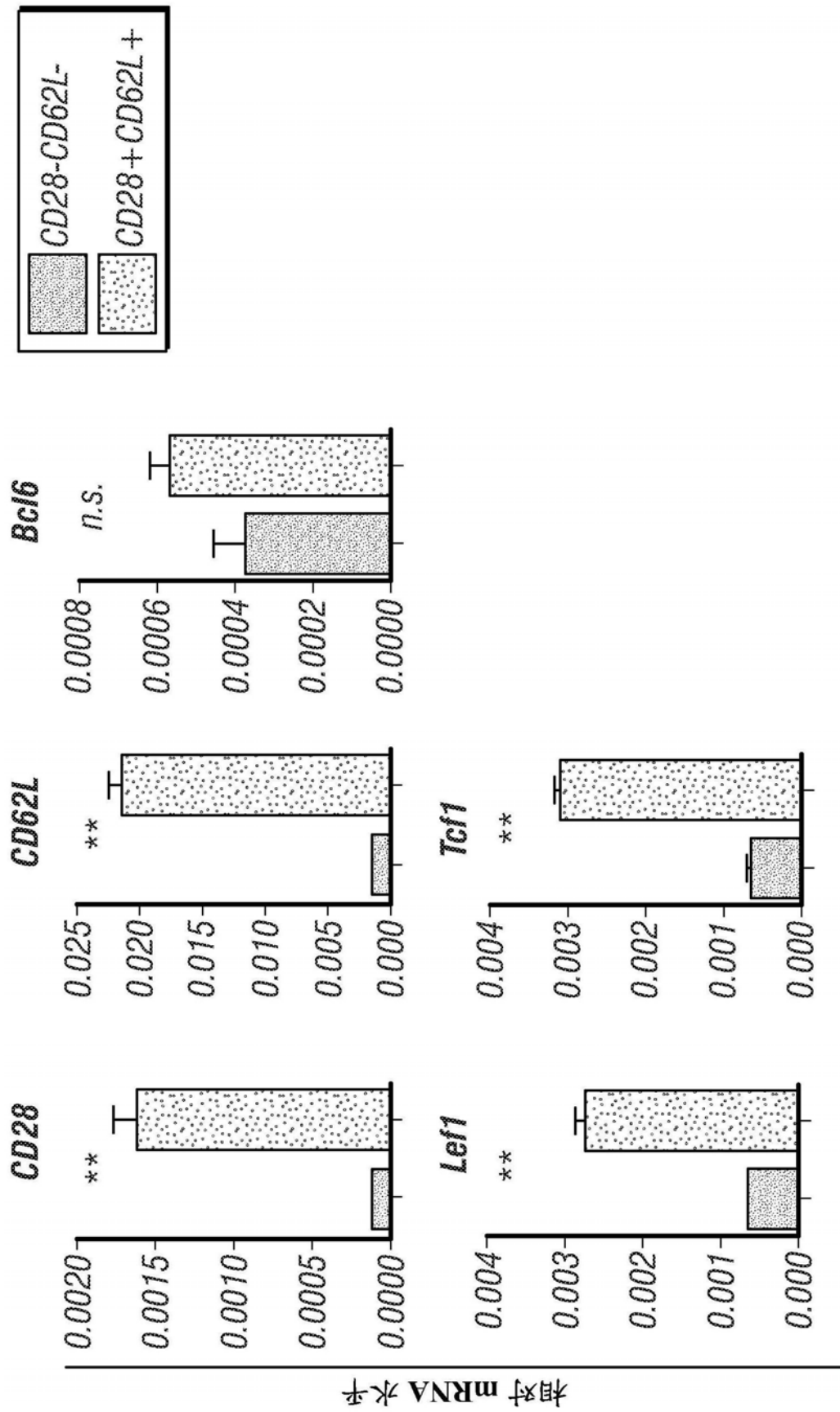


图5A

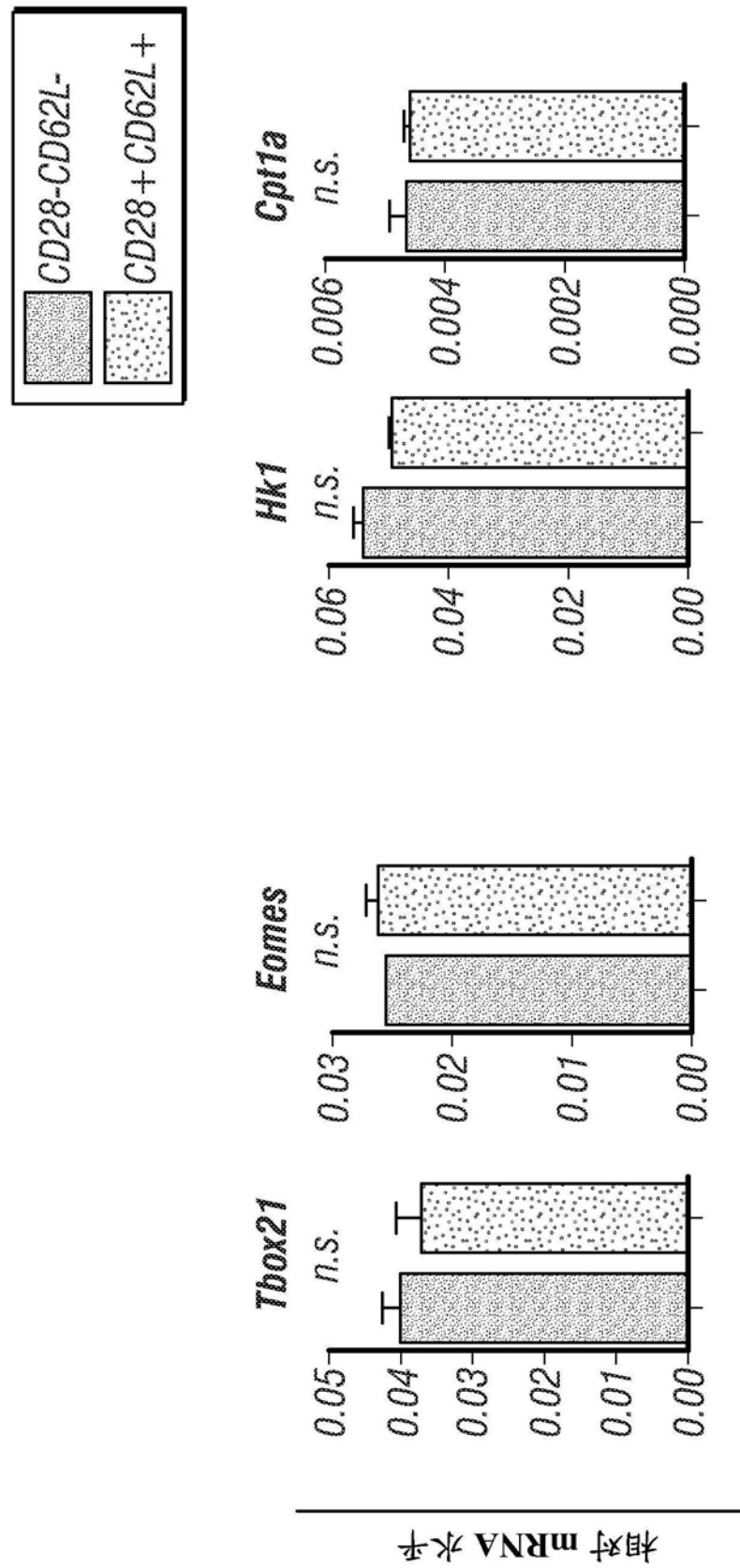


图5A (续)

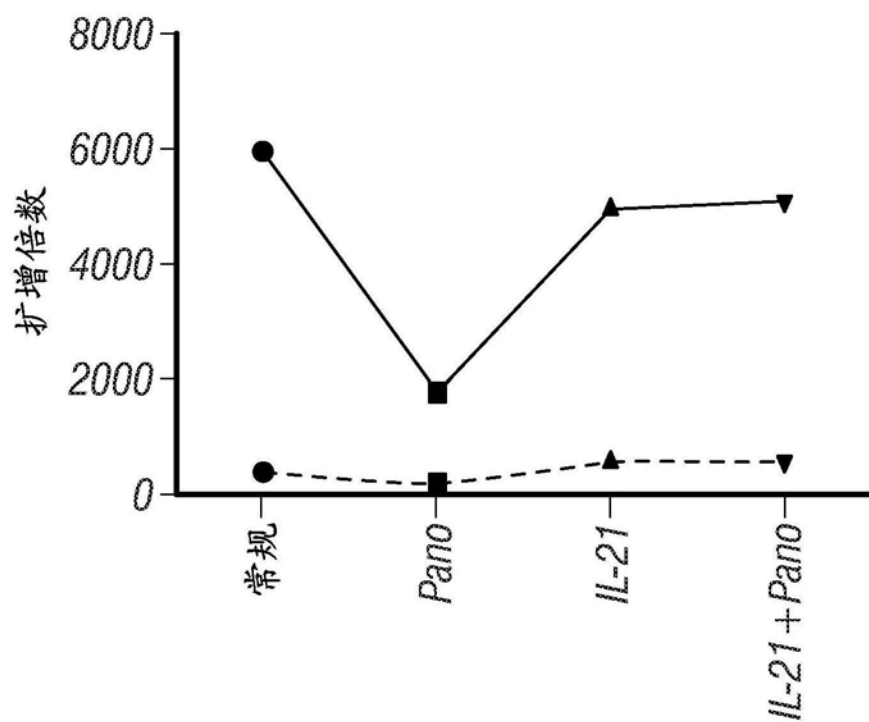


图5B

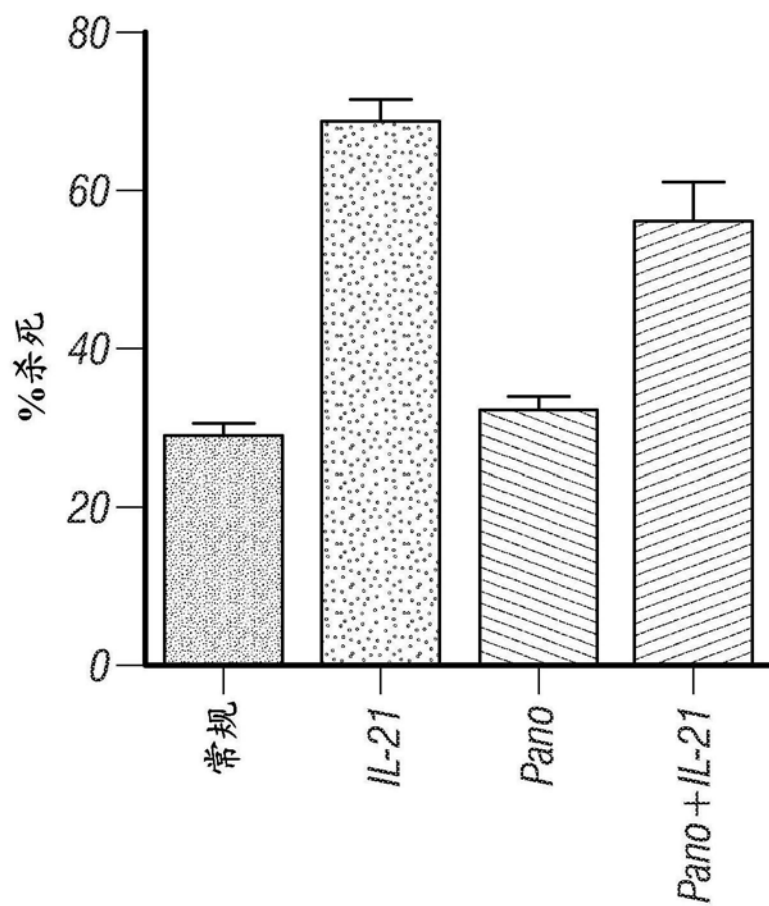


图6A

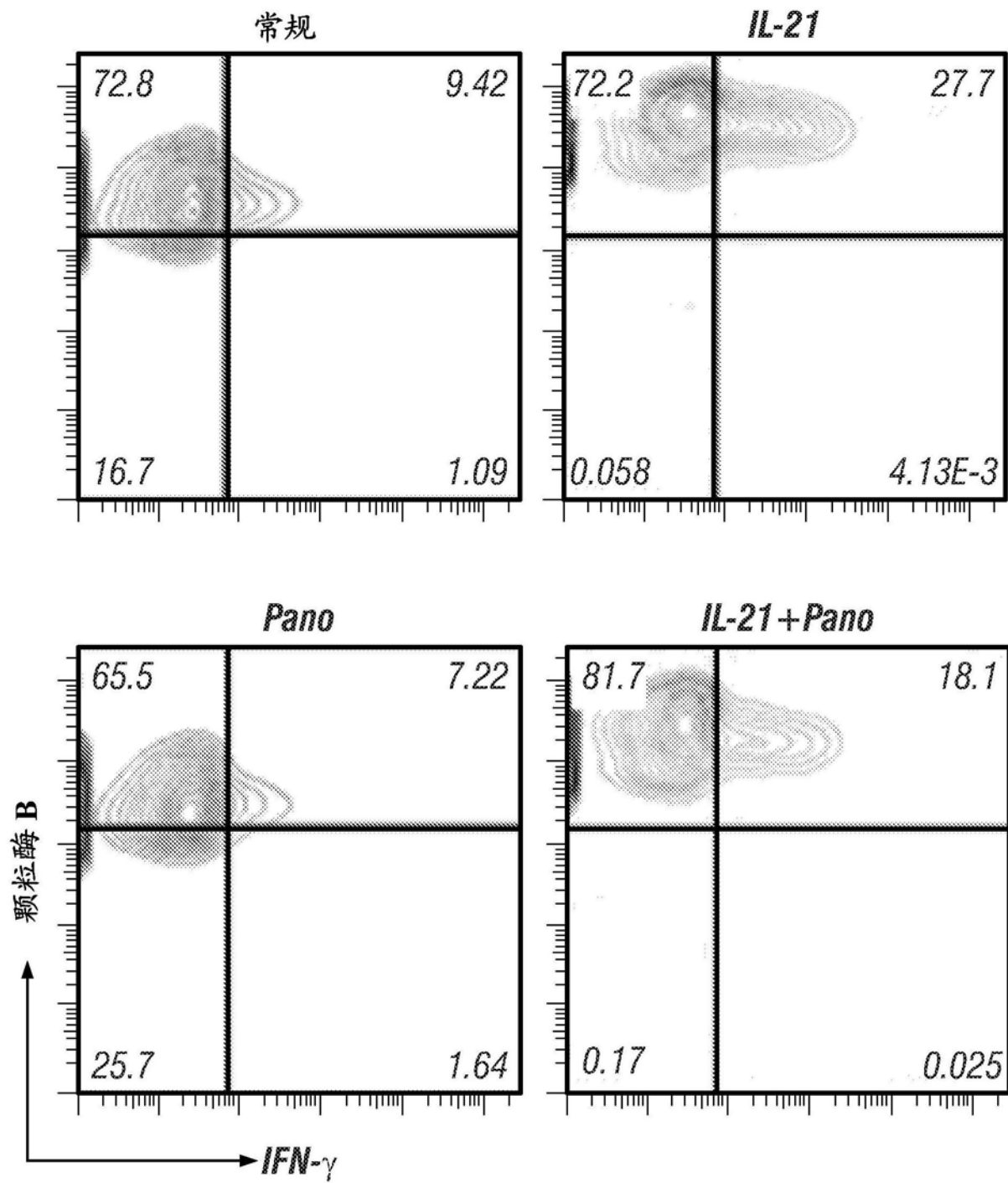


图6B

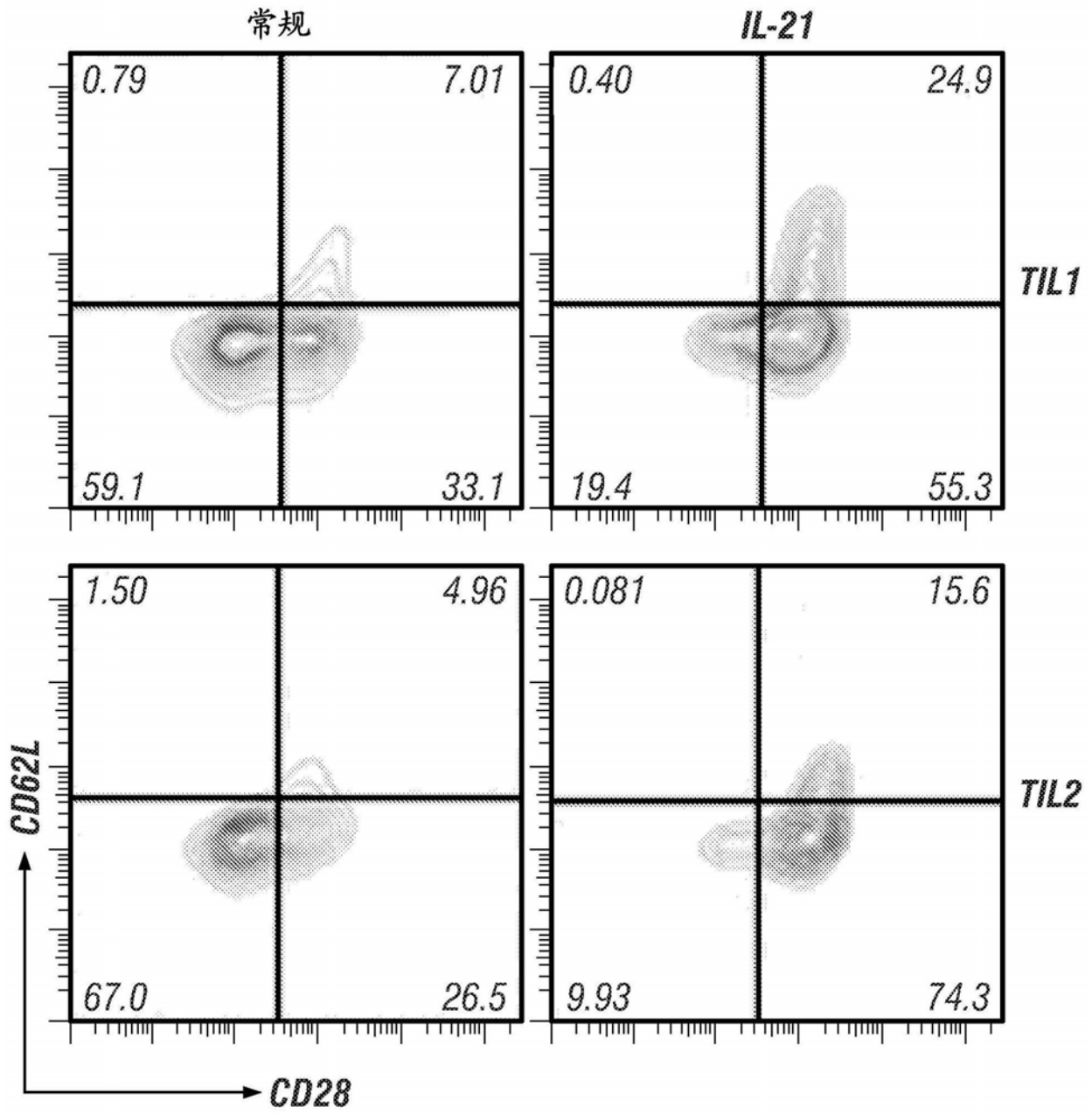


图7

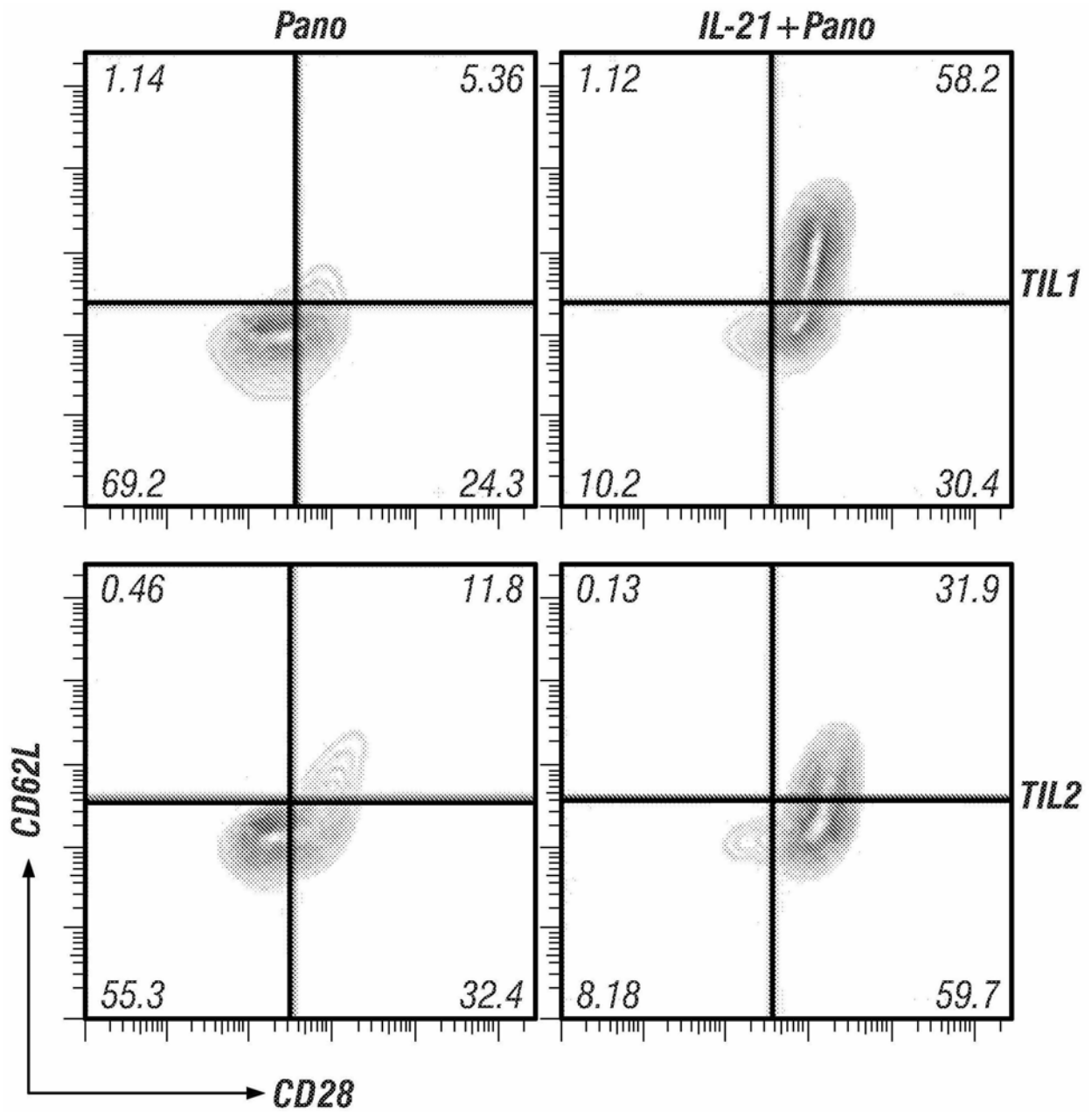


图7(续)

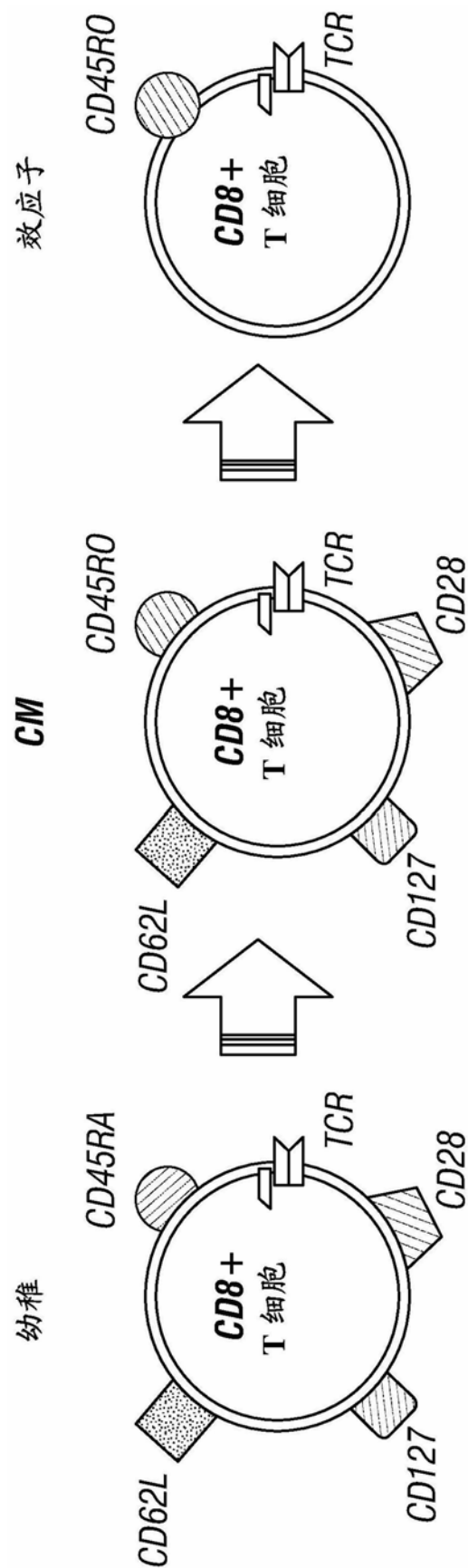


图8

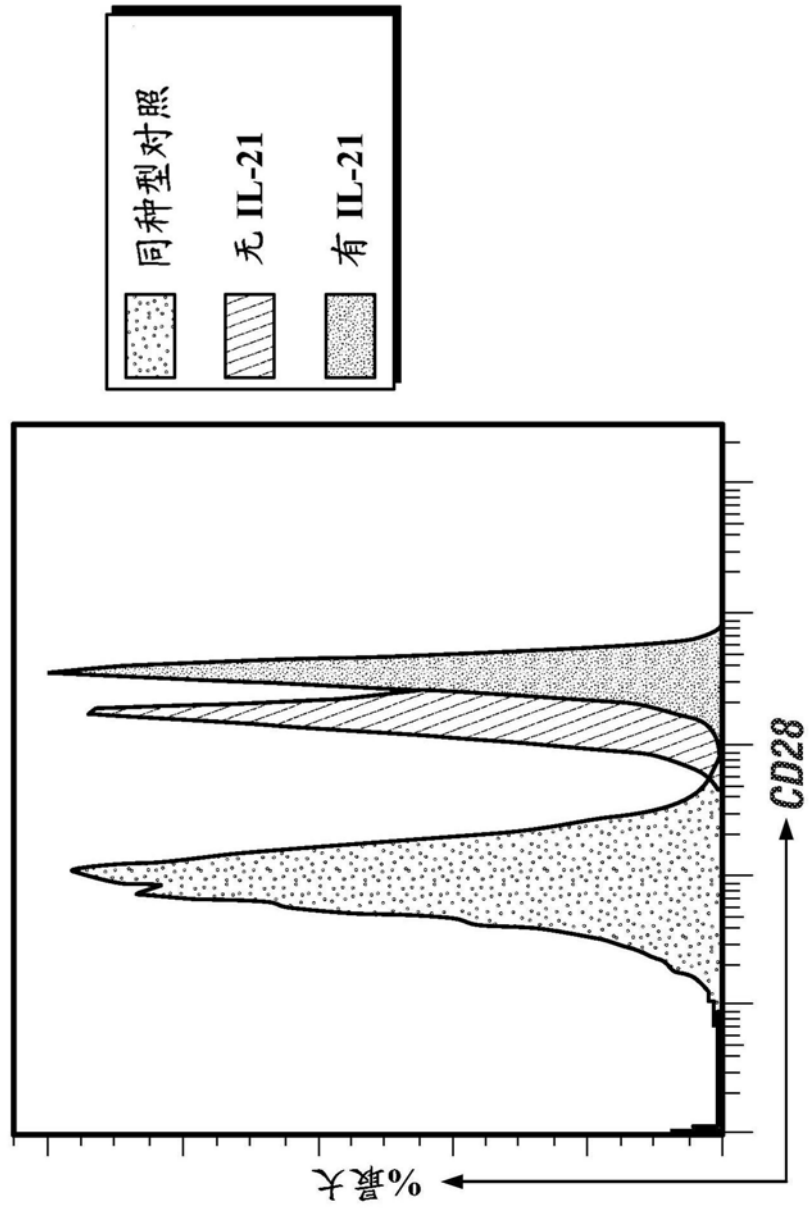


图9A

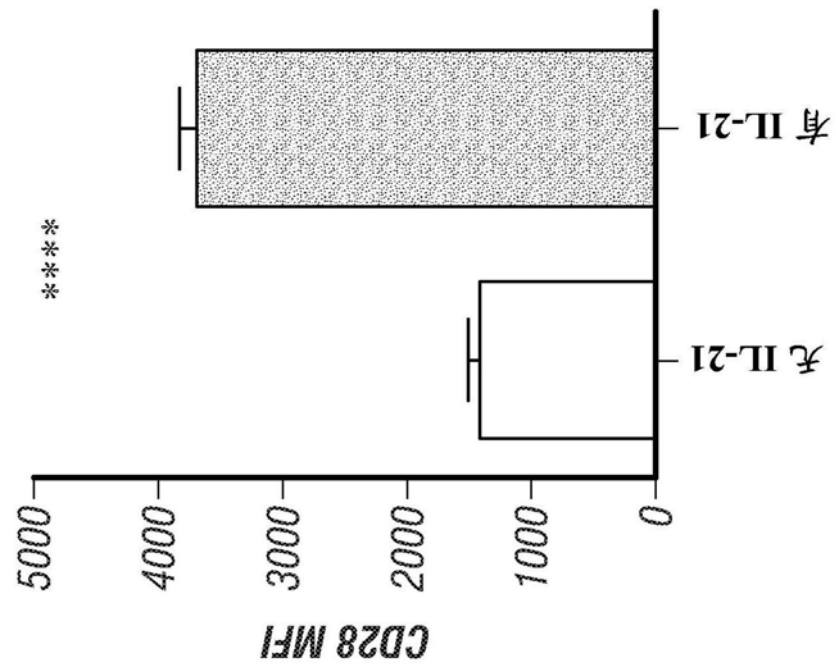


图9B

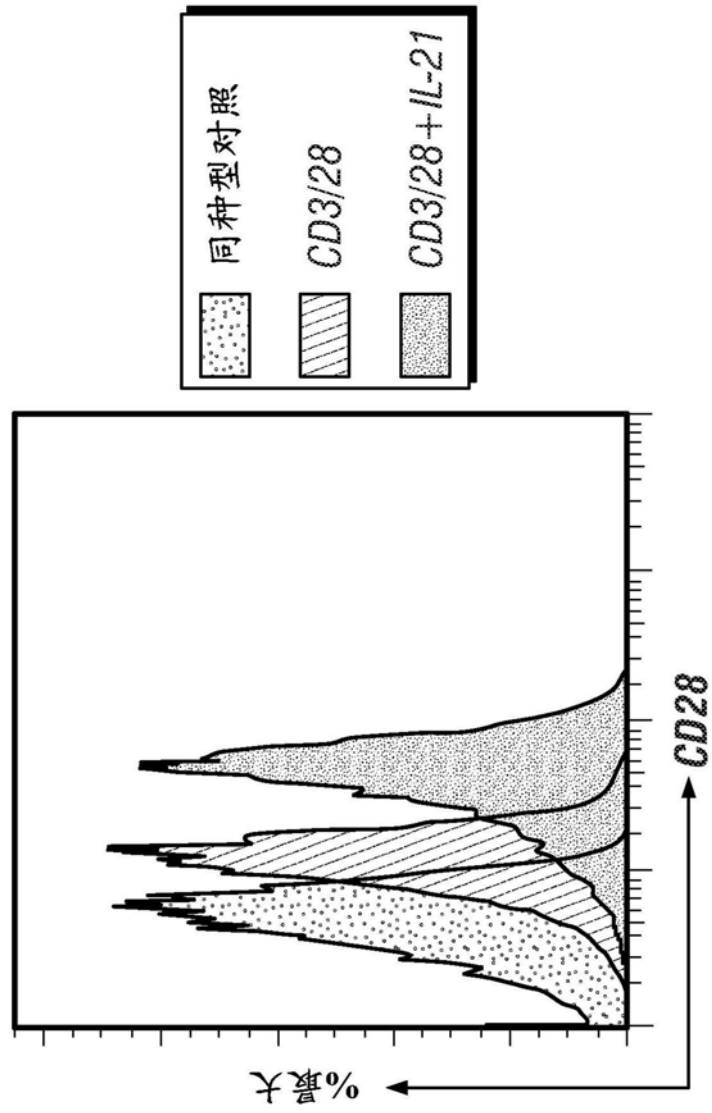


图9C

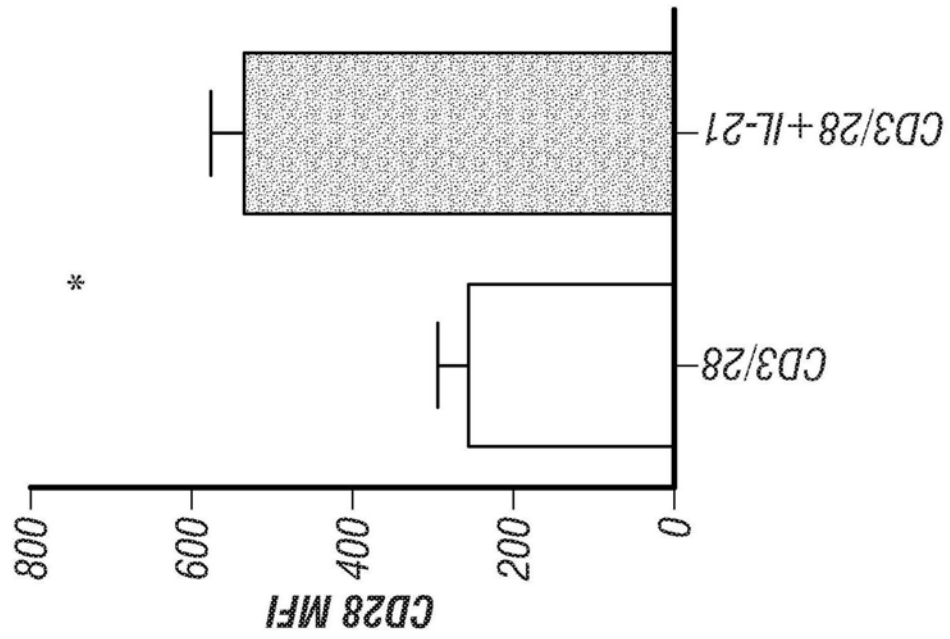


图9D

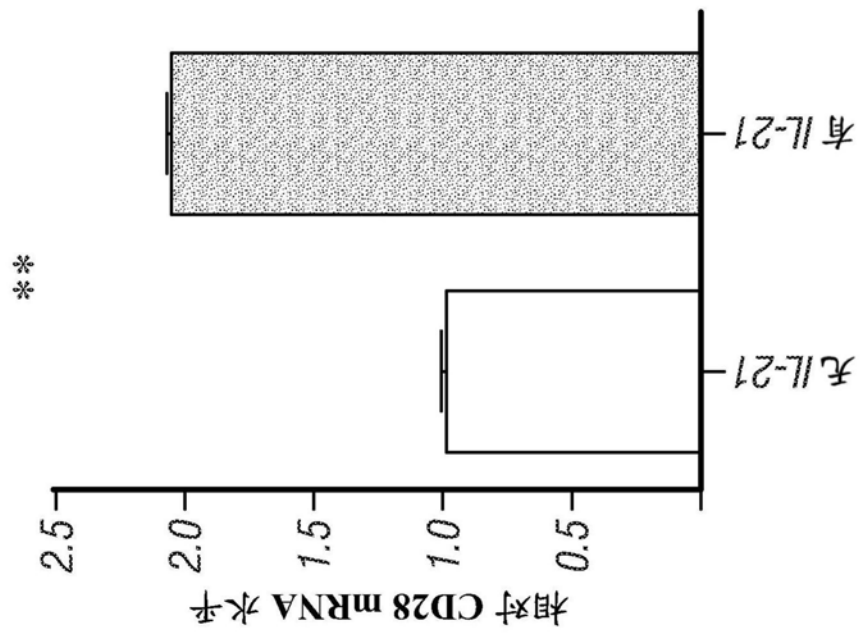


图9E

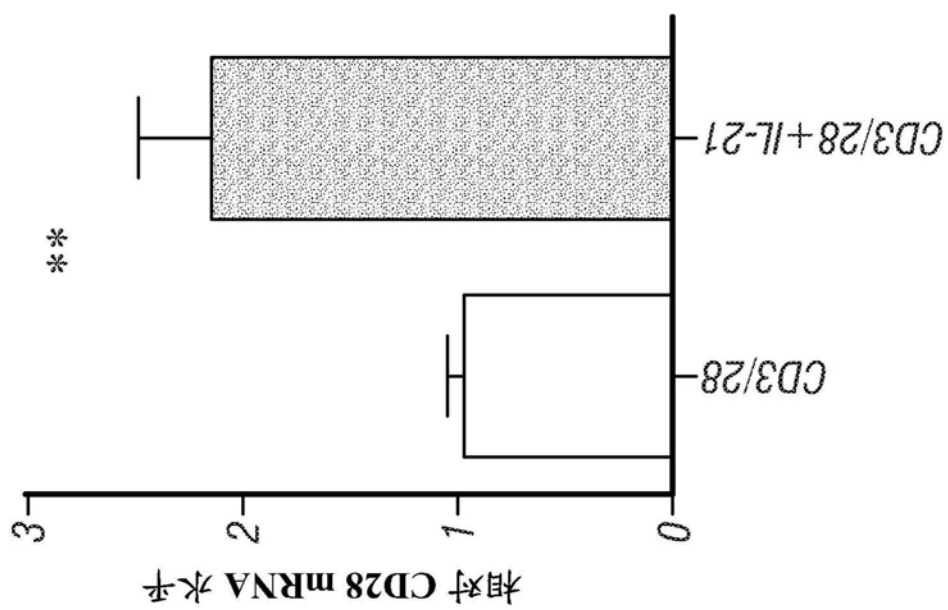


图9F

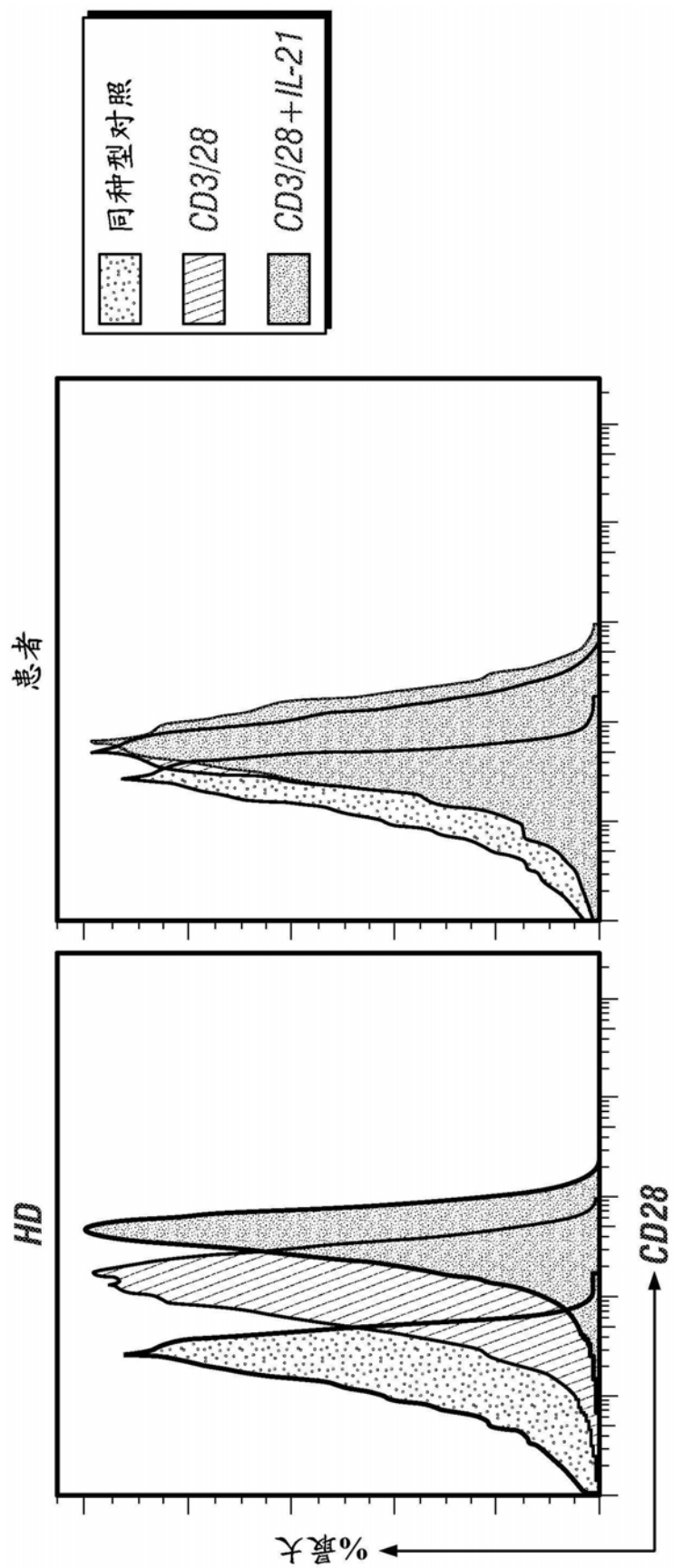


图10A

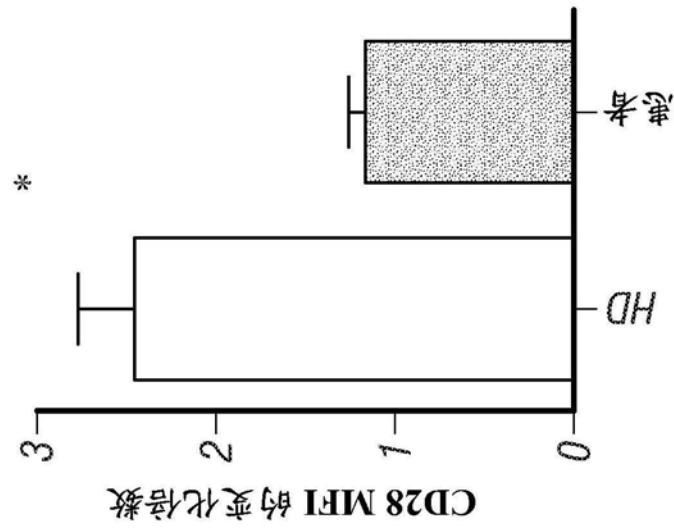


图10B

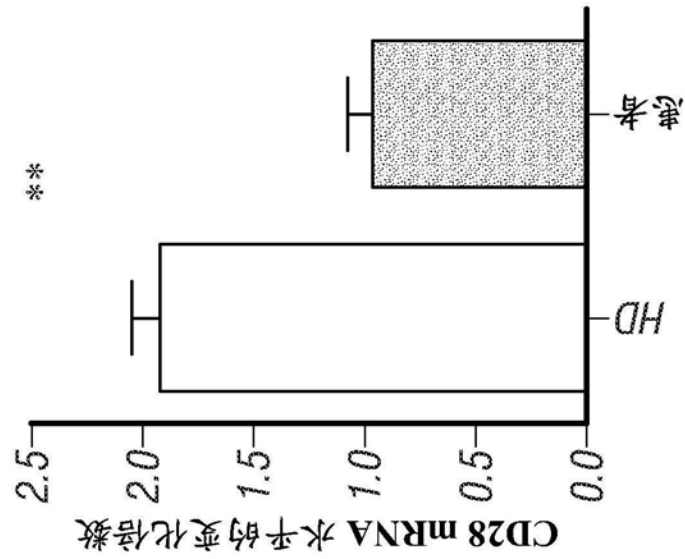


图10C

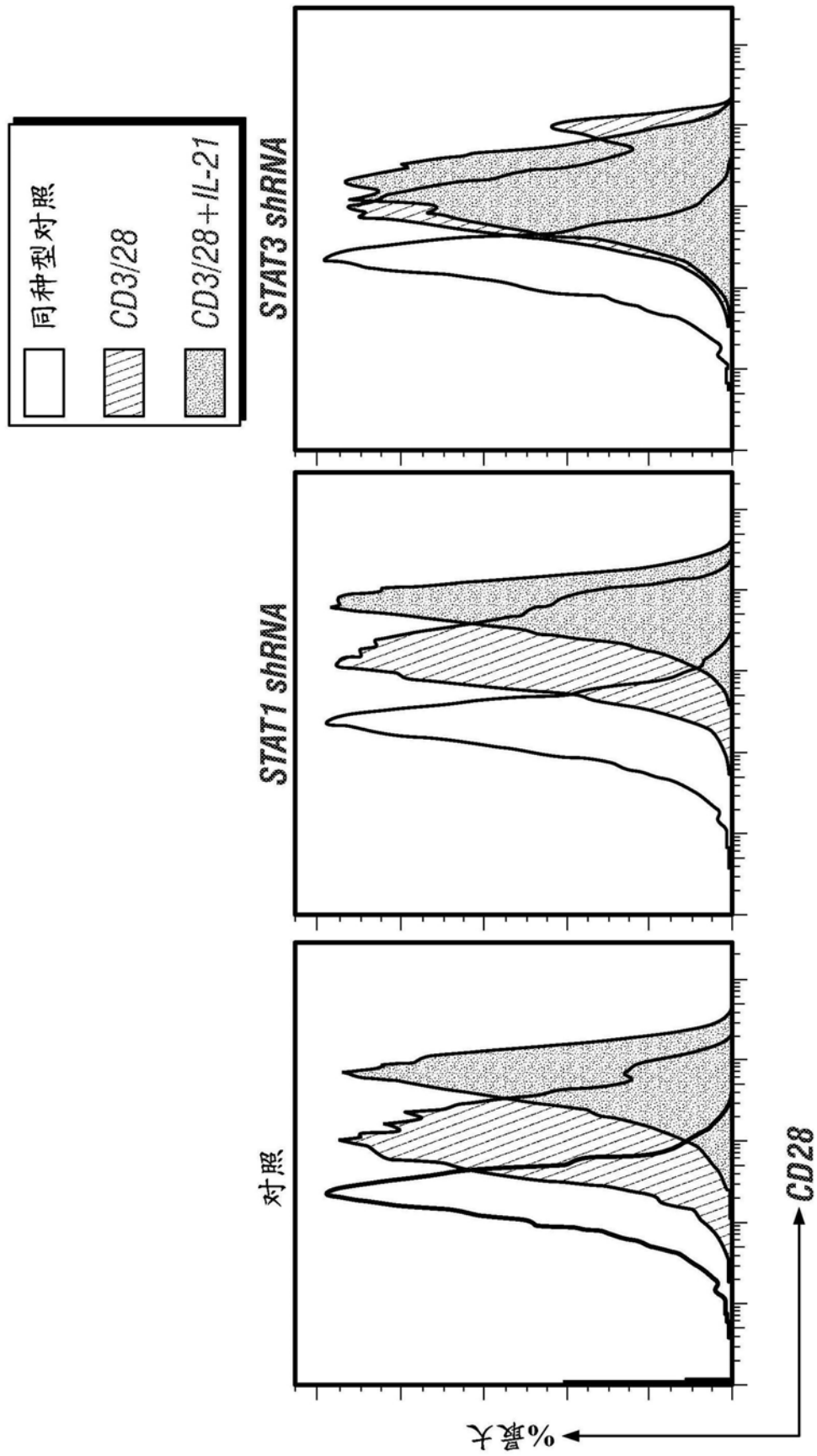


图10D

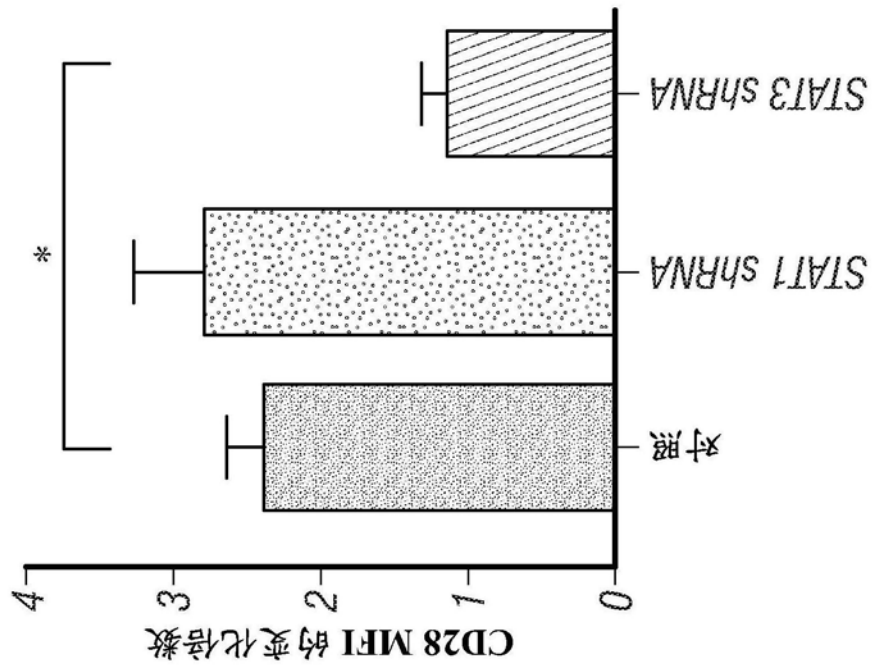


图10E

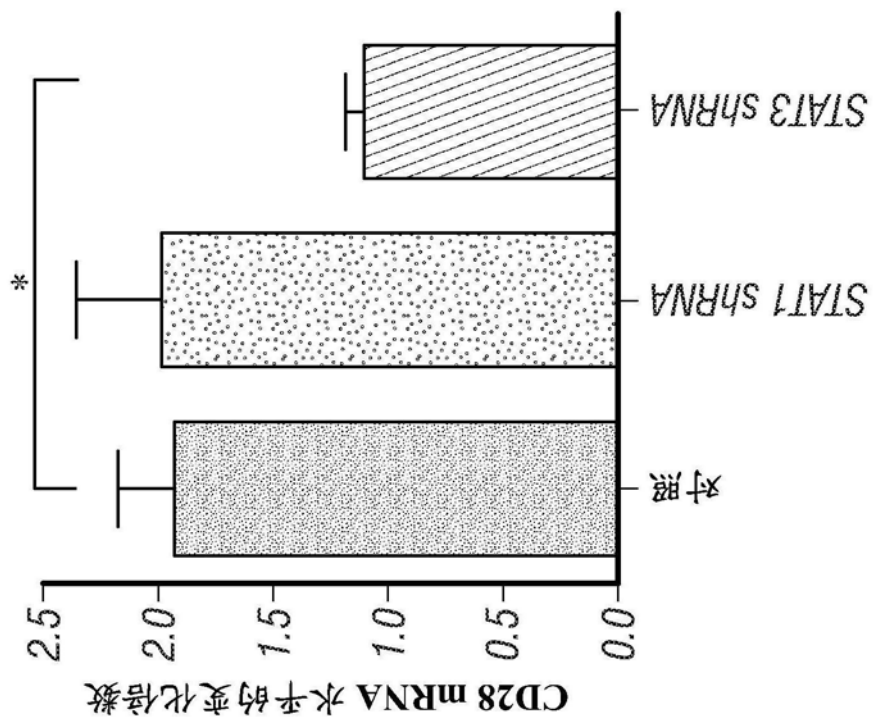


图10F

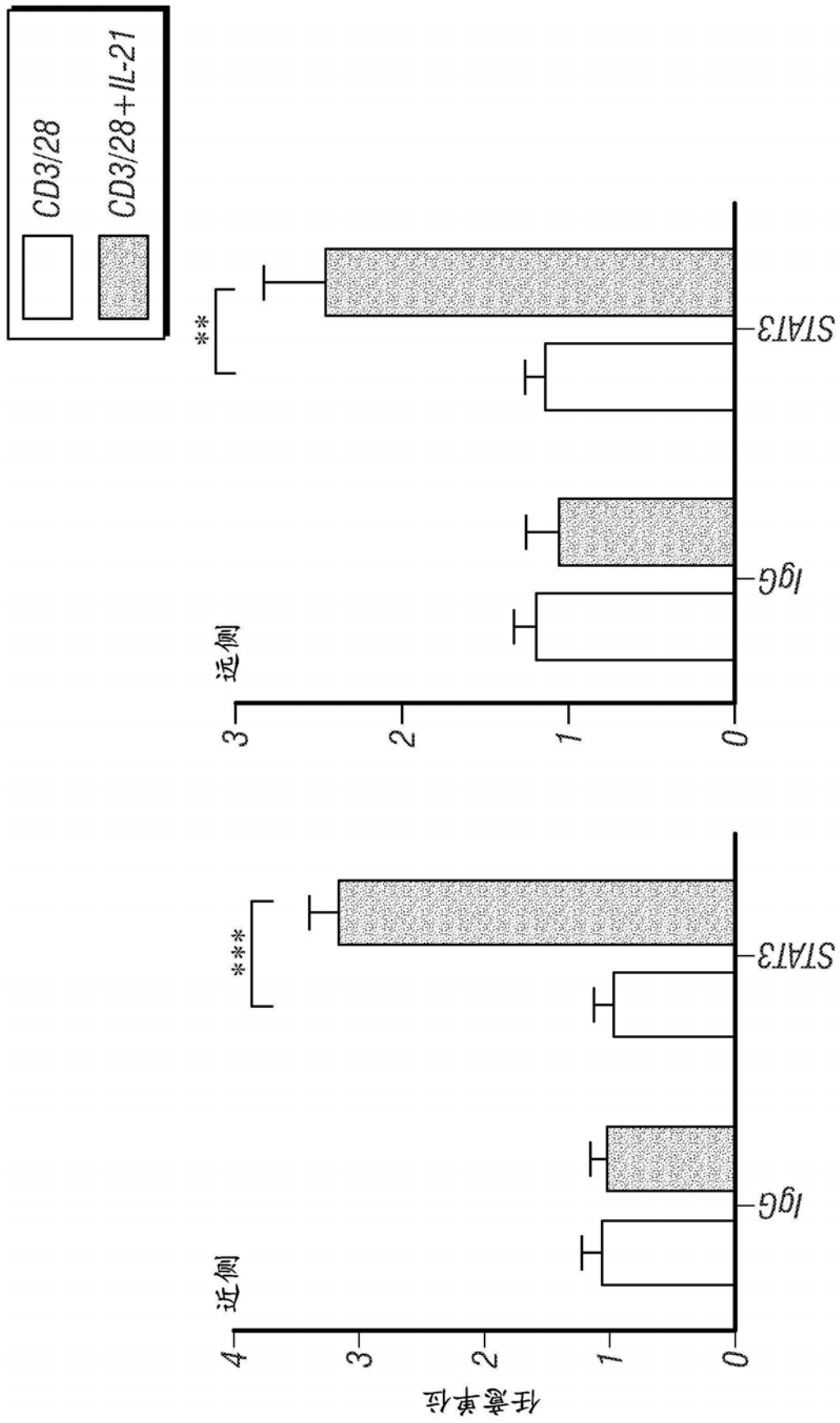


图10G

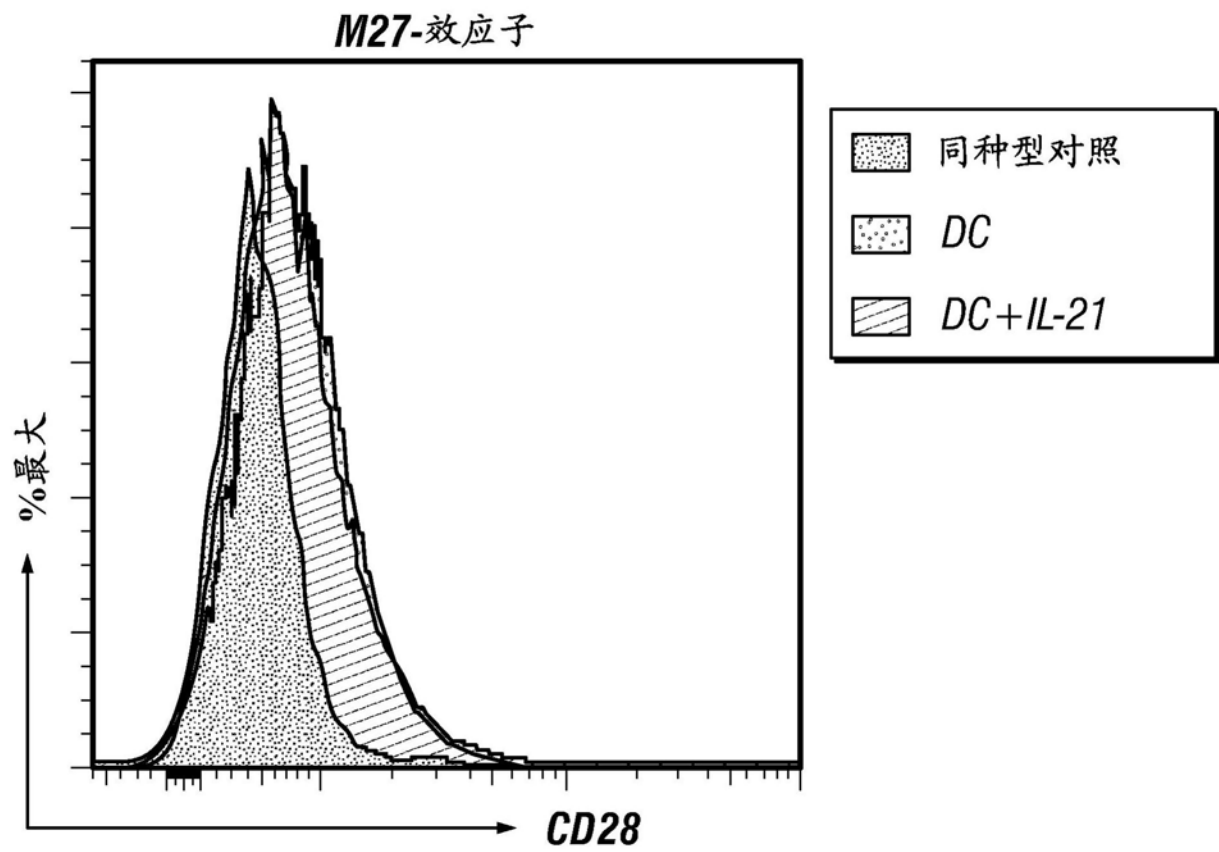


图11A

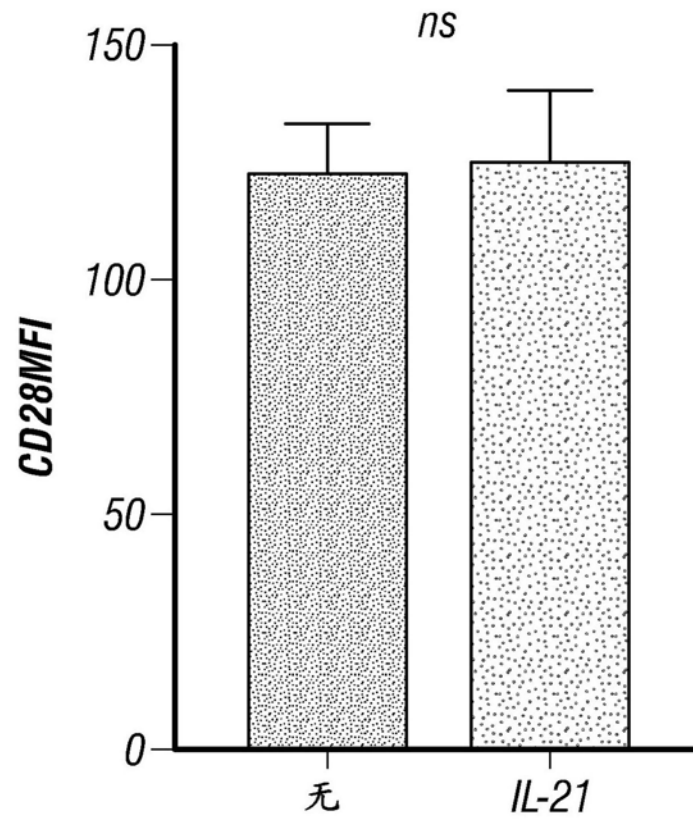


图11B

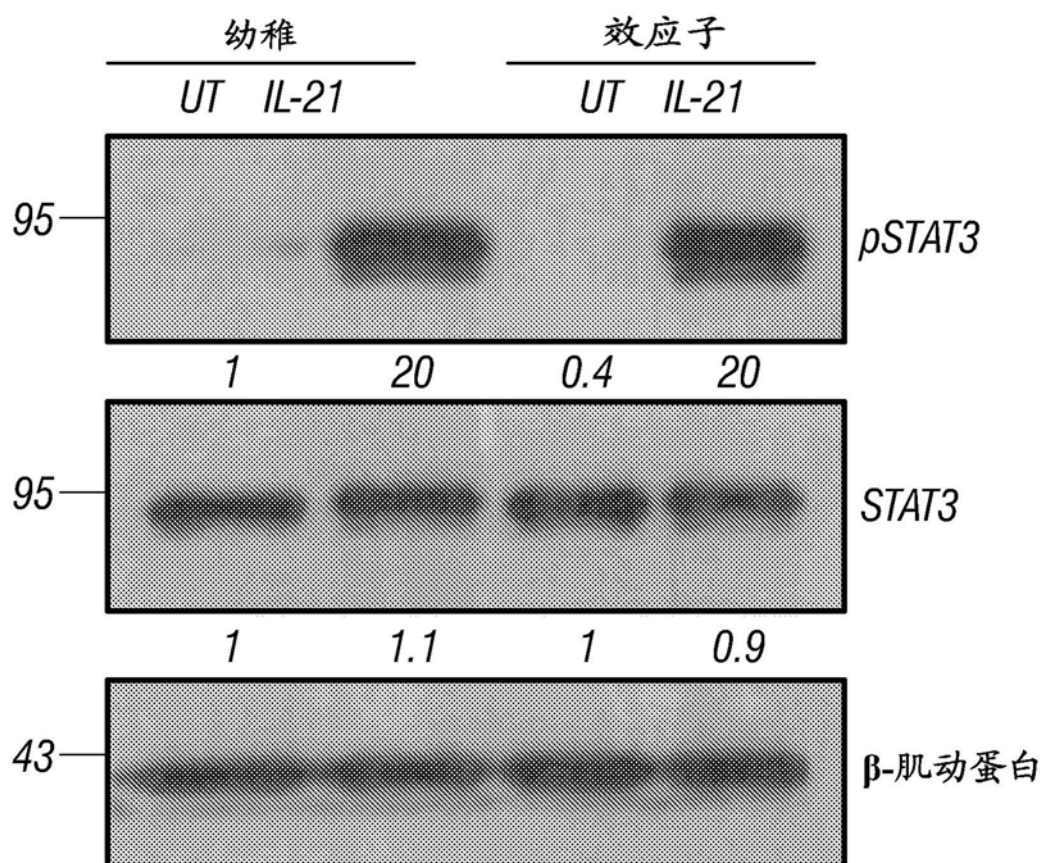


图11C

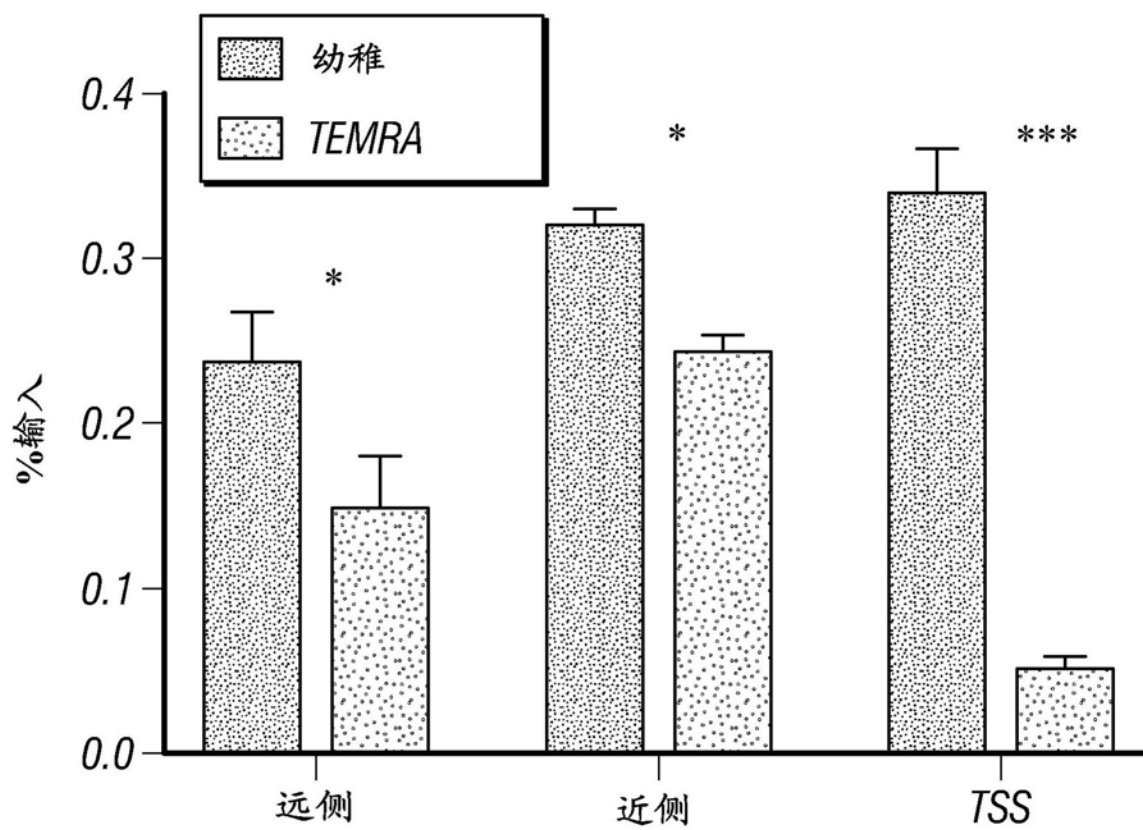


图11D

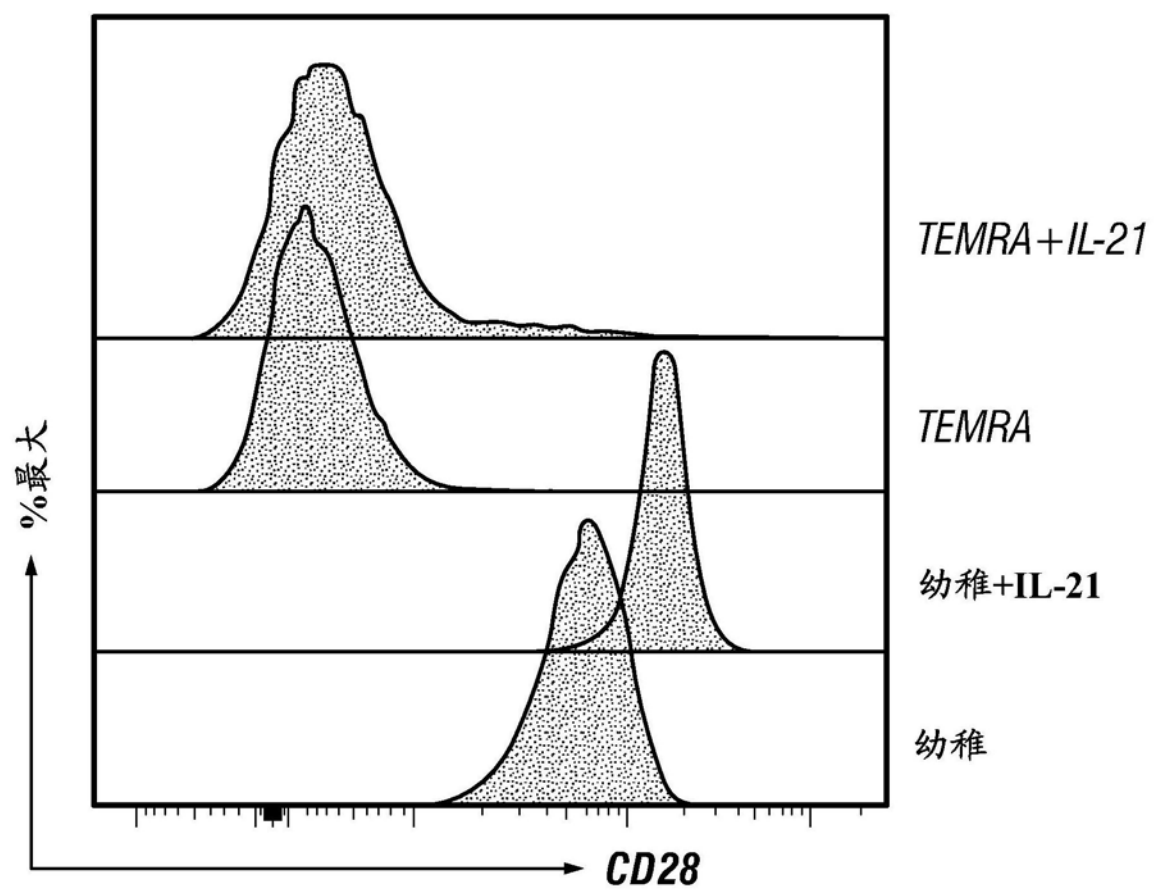


图11E

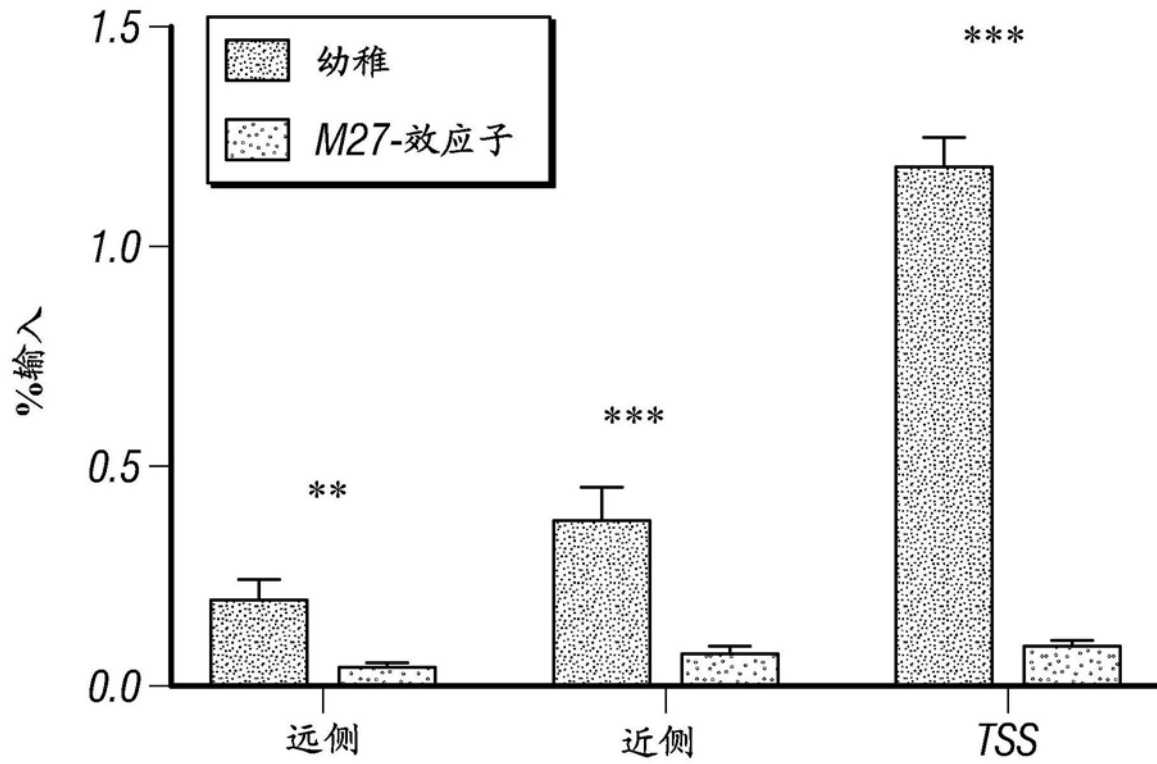


图11F

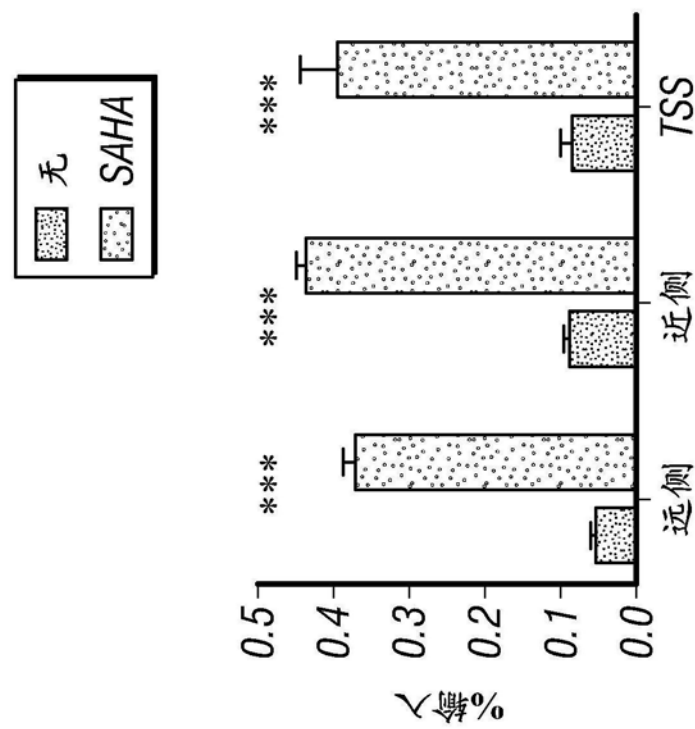


图12A

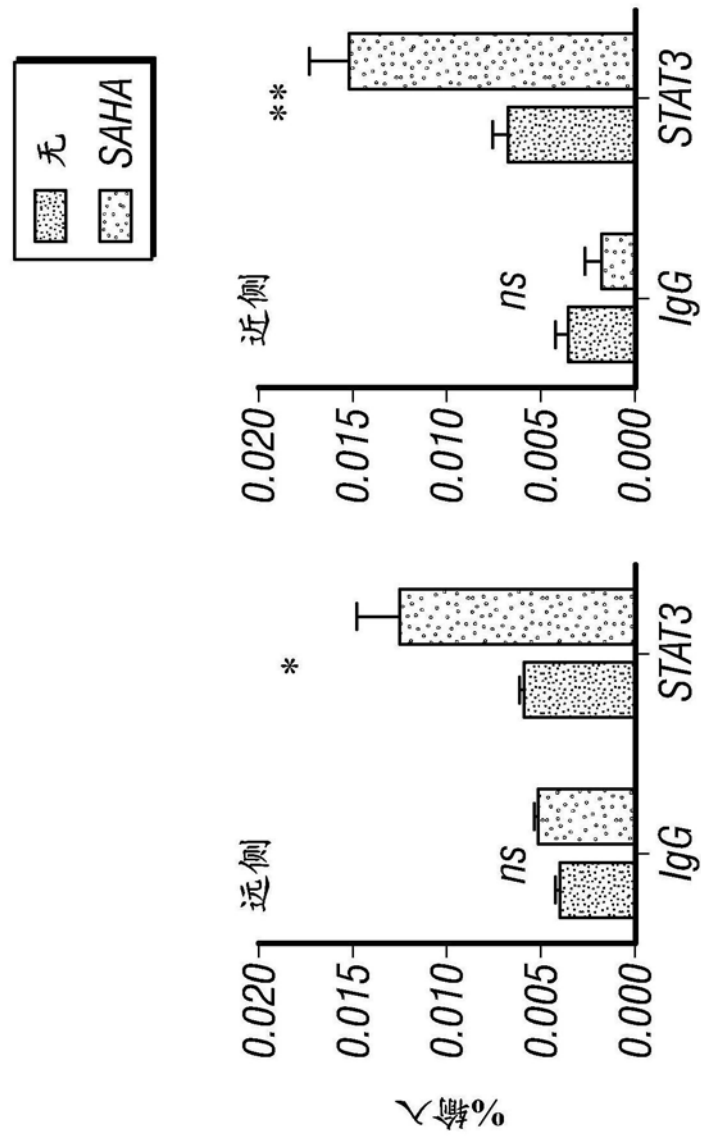


图12B

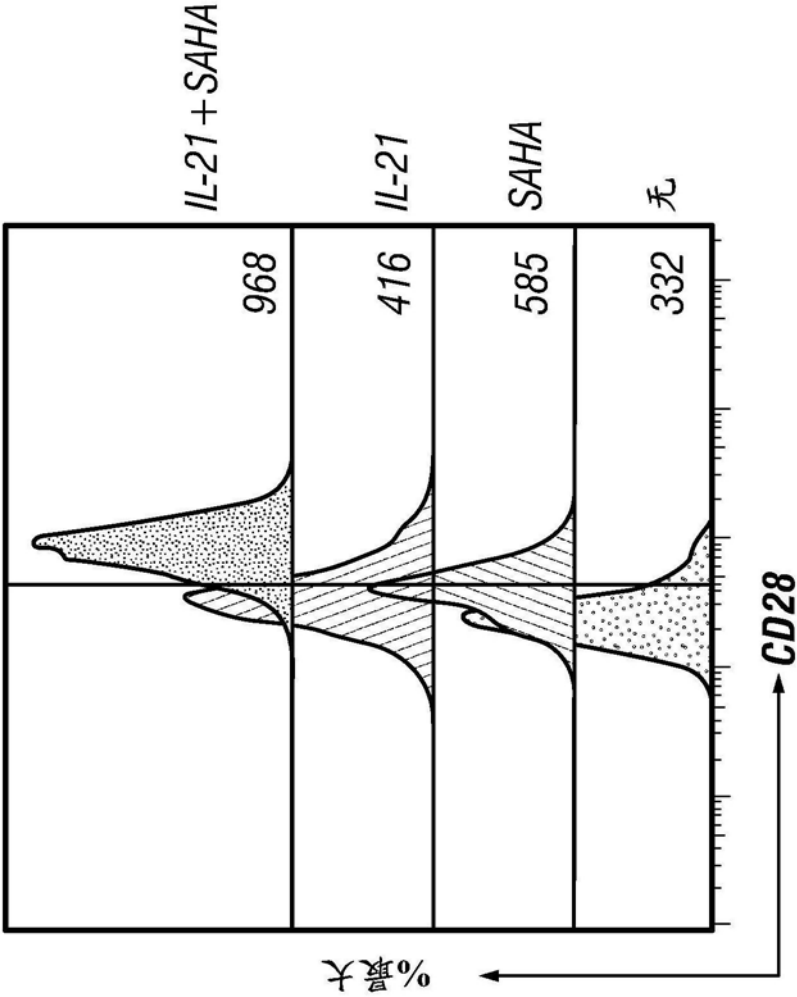


图12C

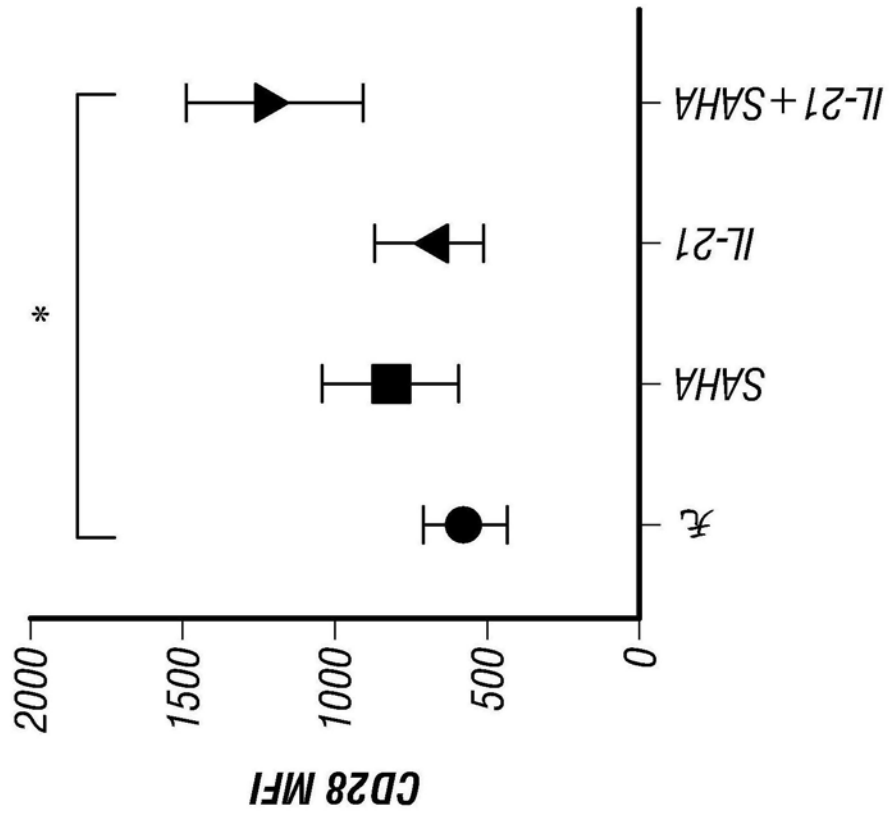


图12D

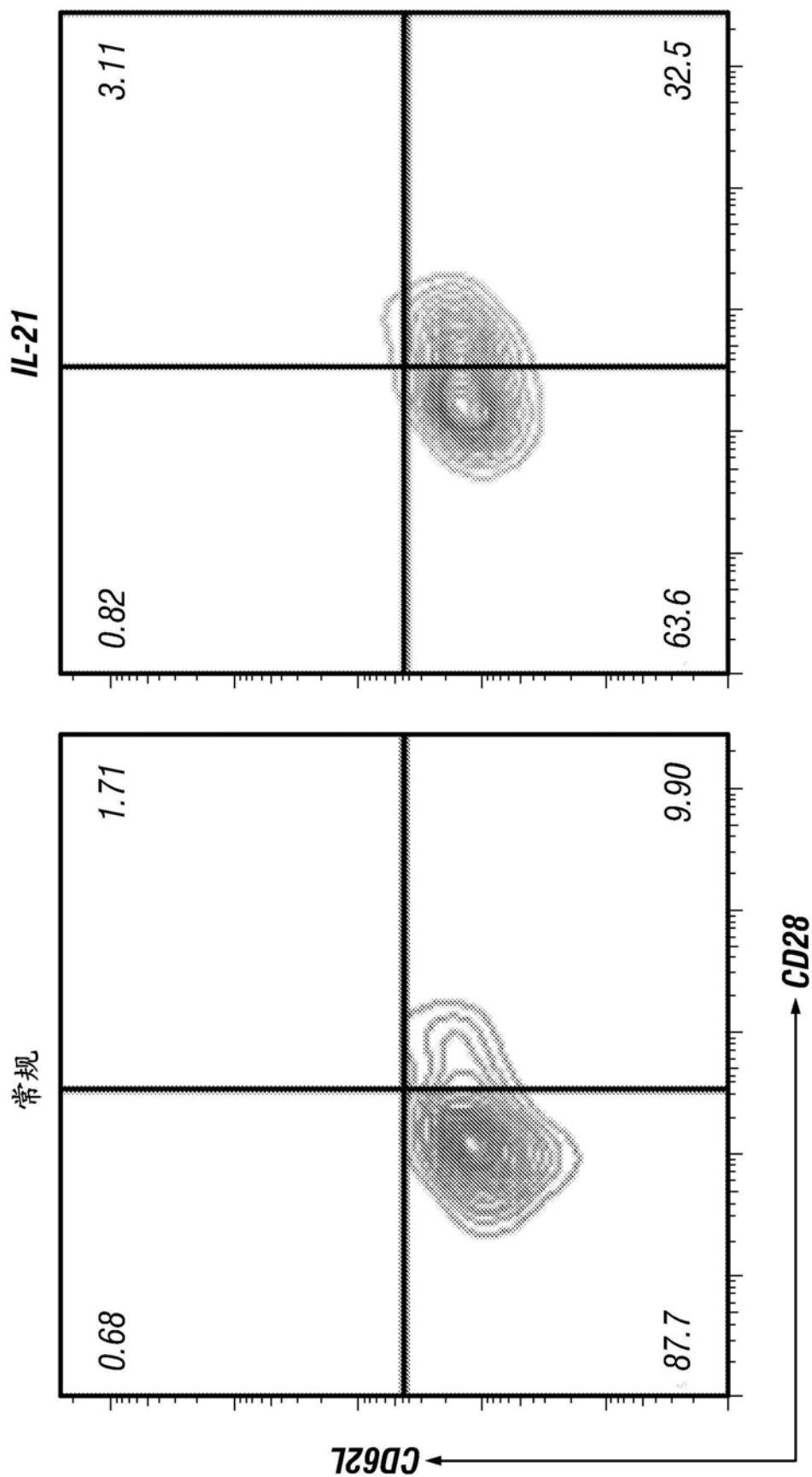


图12E

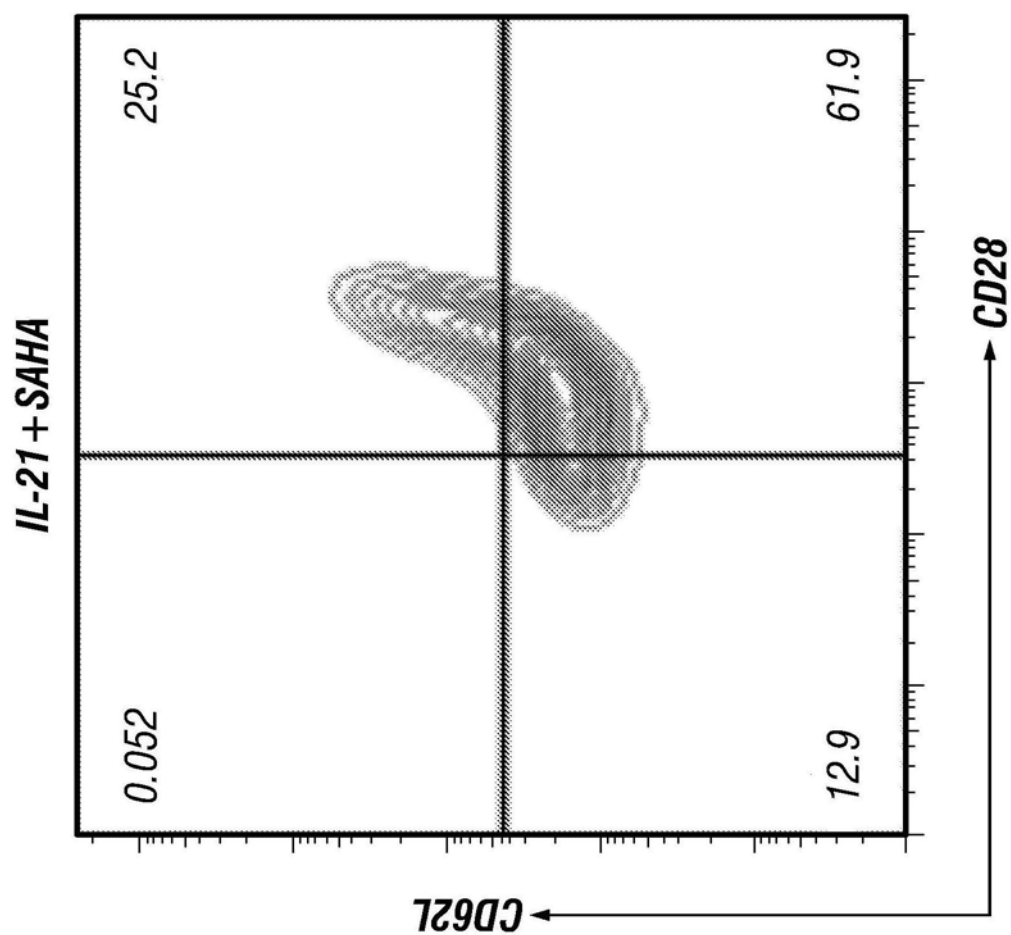


图12E (续)

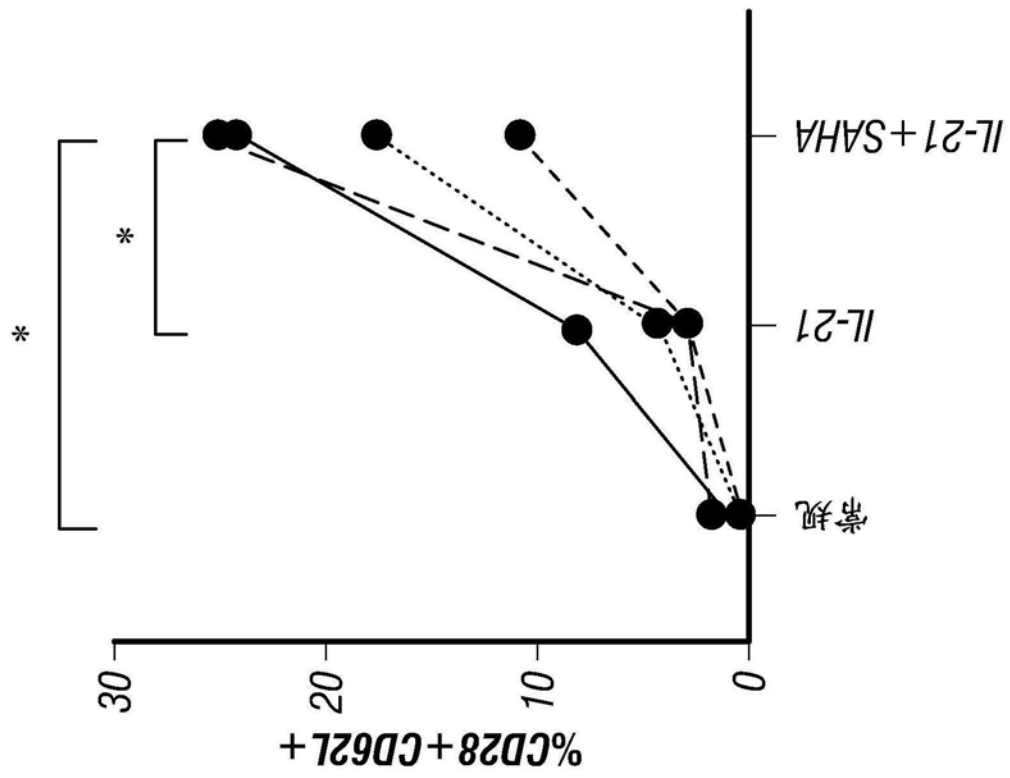


图12F

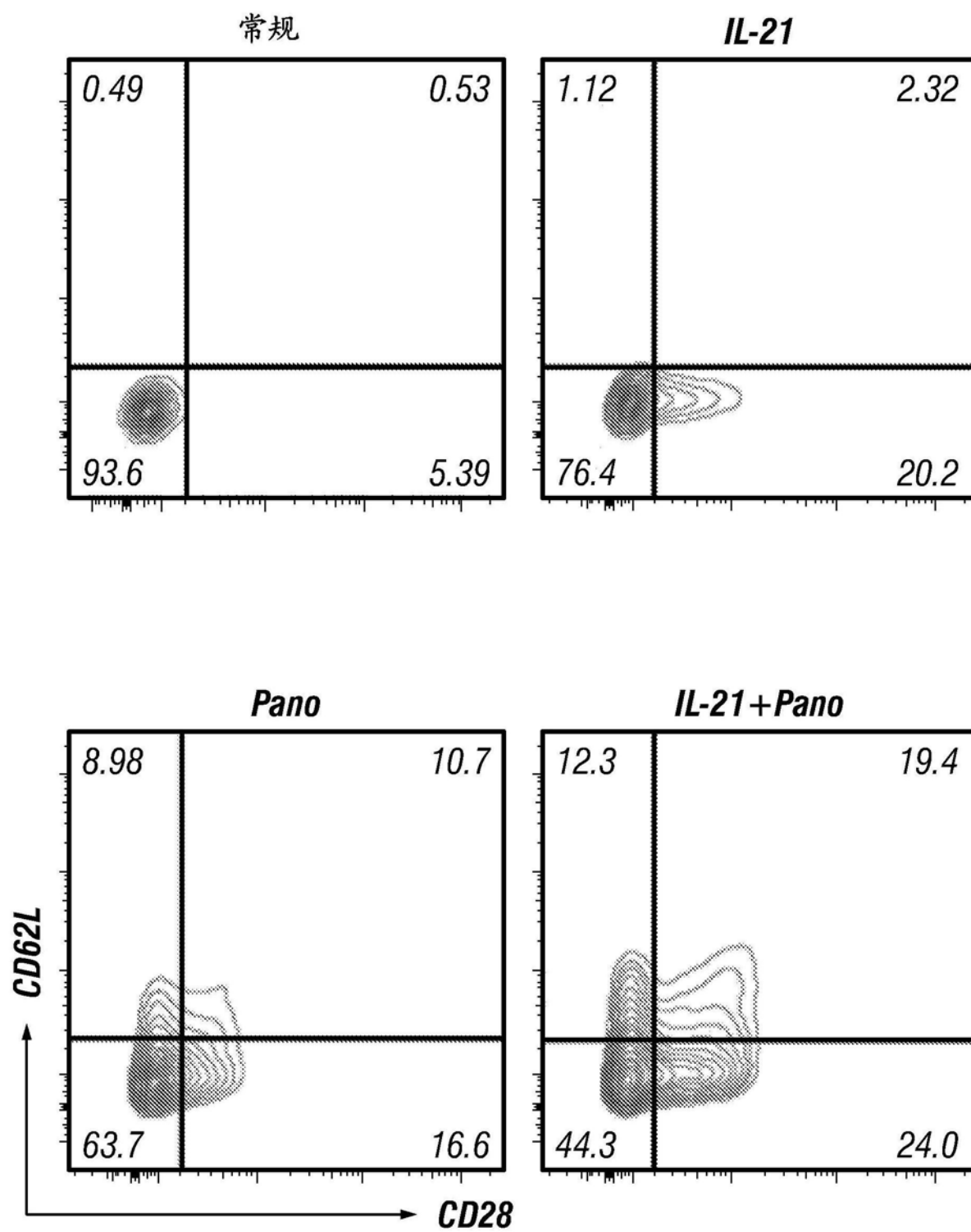


图13A

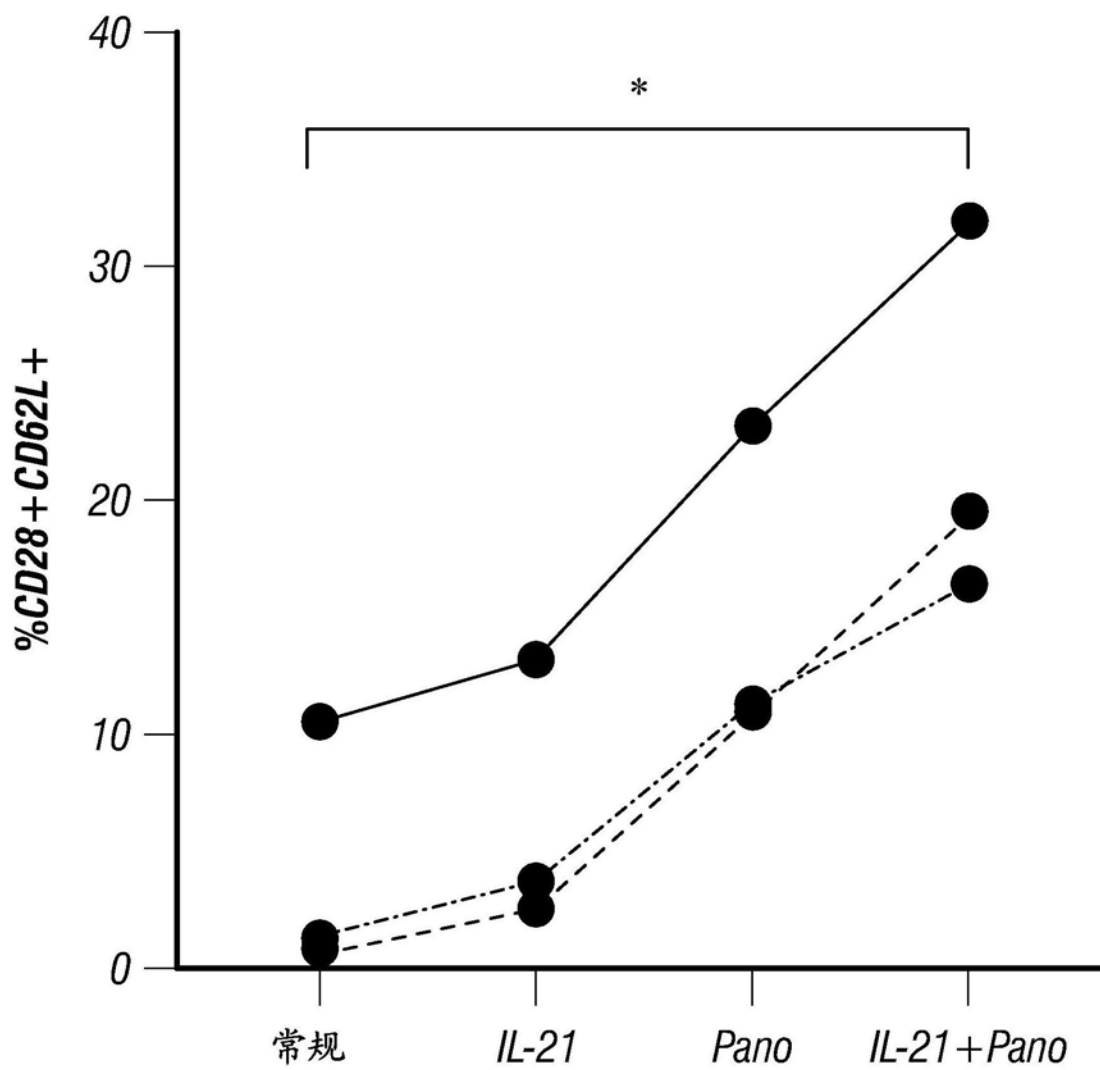


图13B

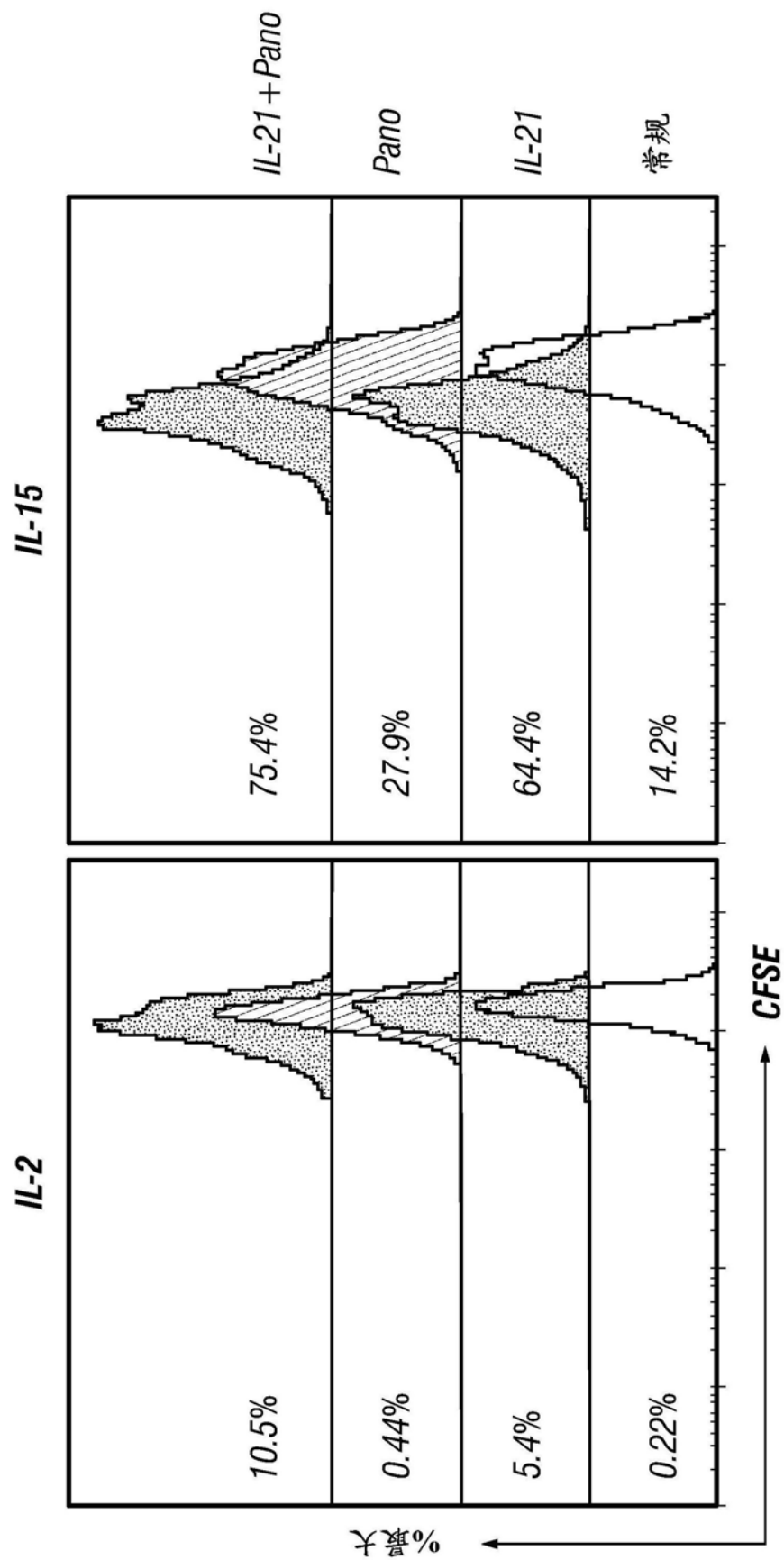


图14A

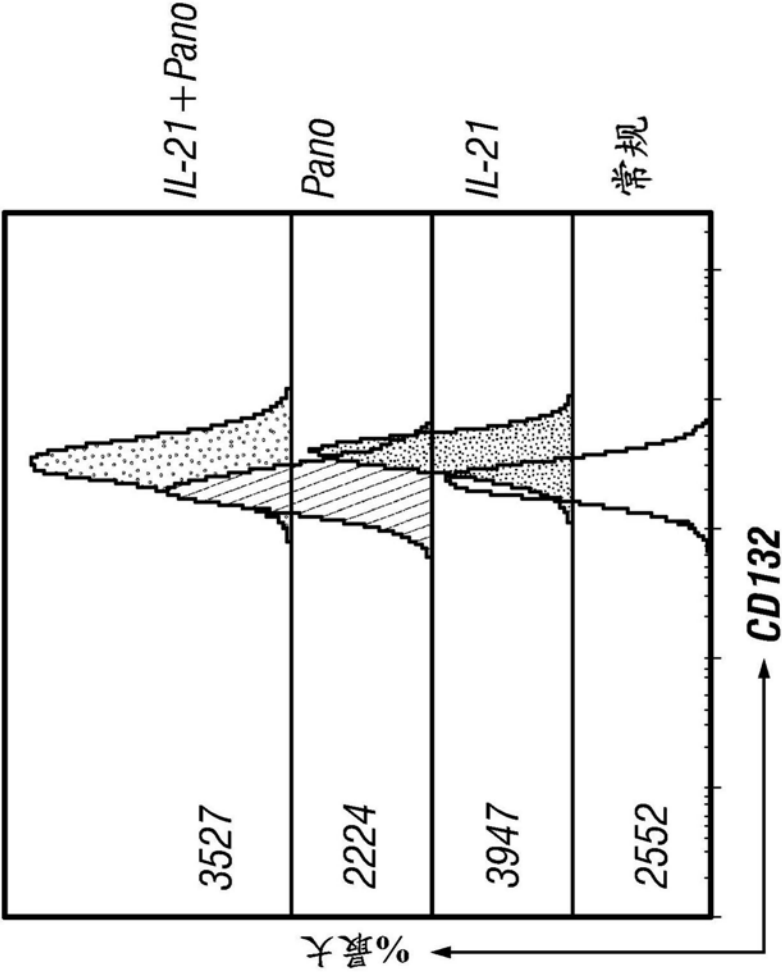


图14B

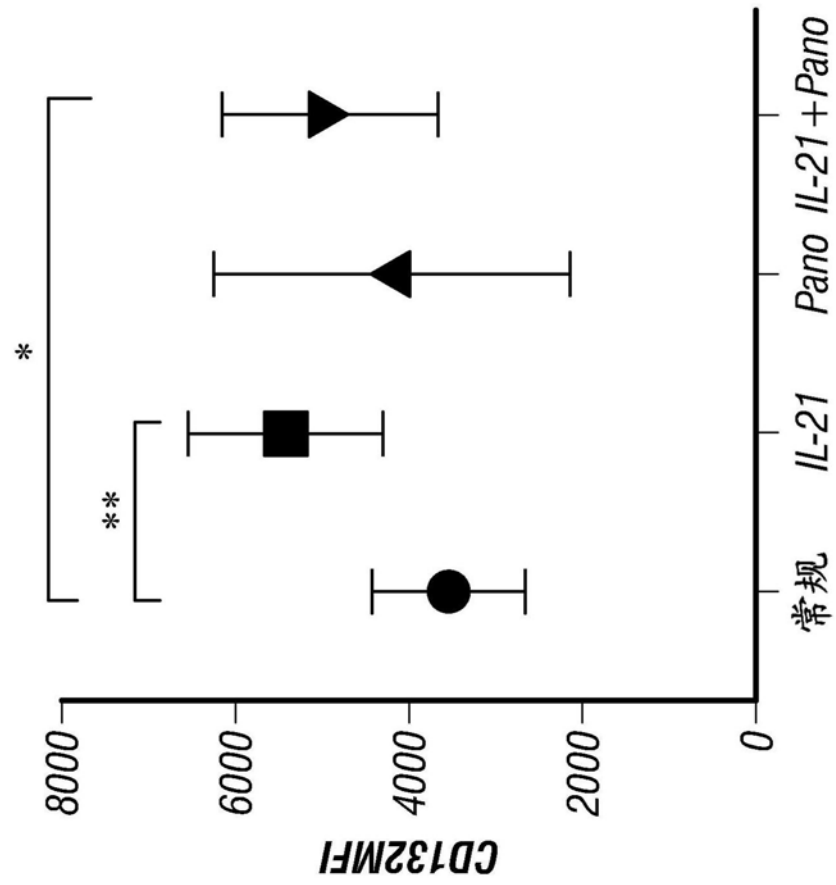


图14C

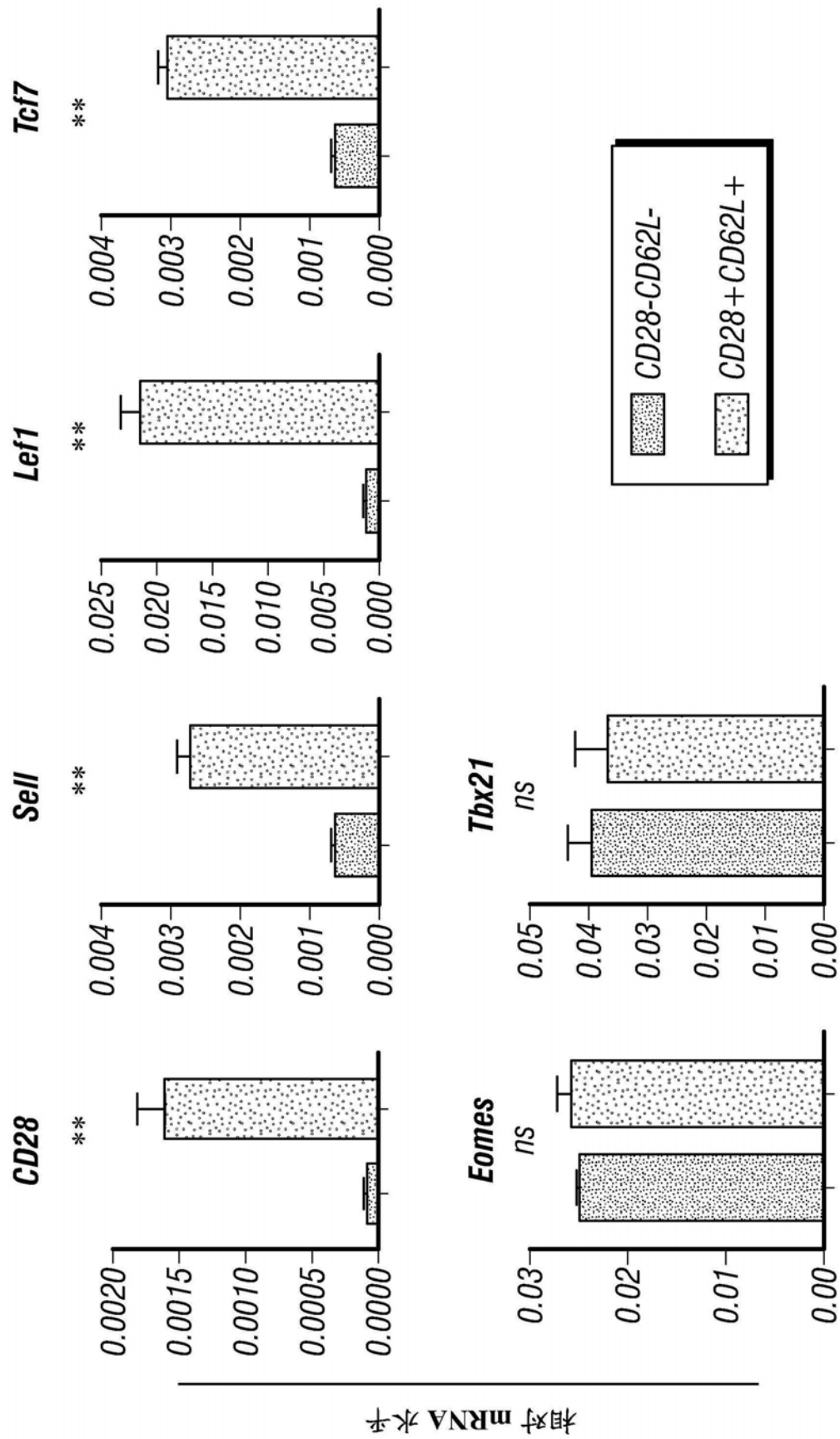


图14D

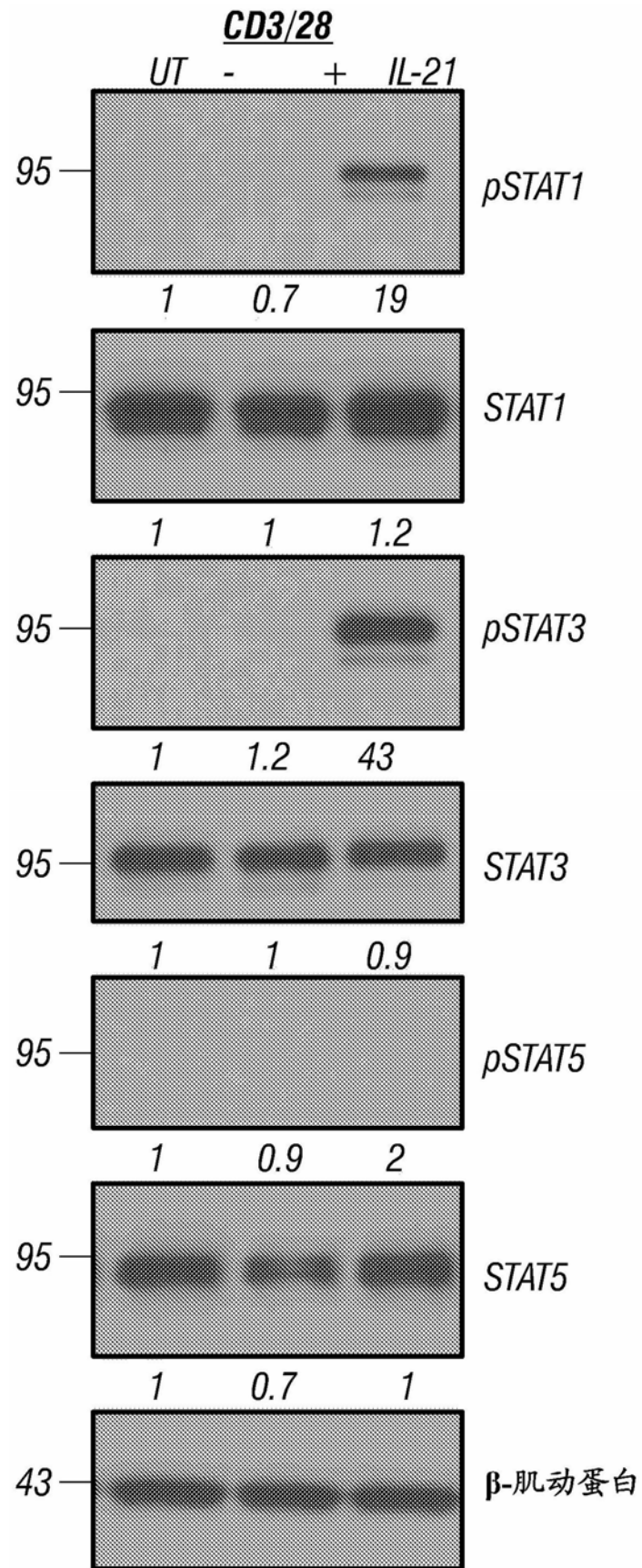


图15A

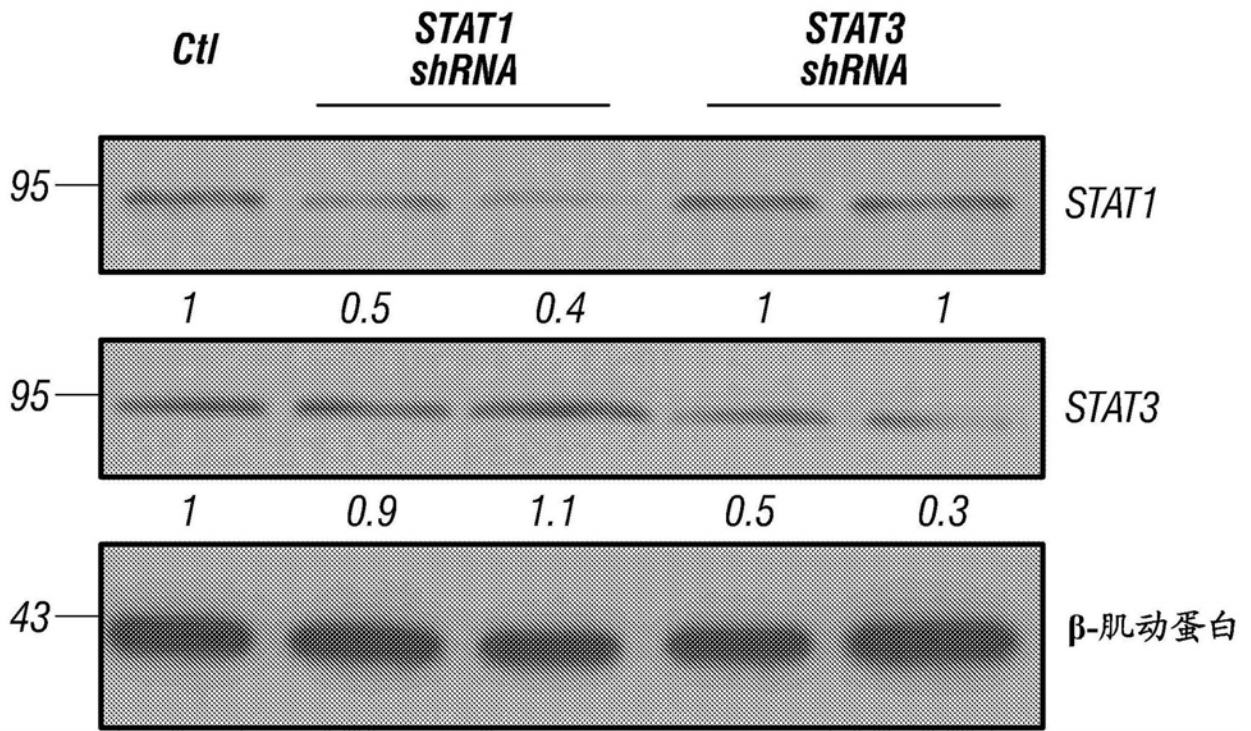


图15B

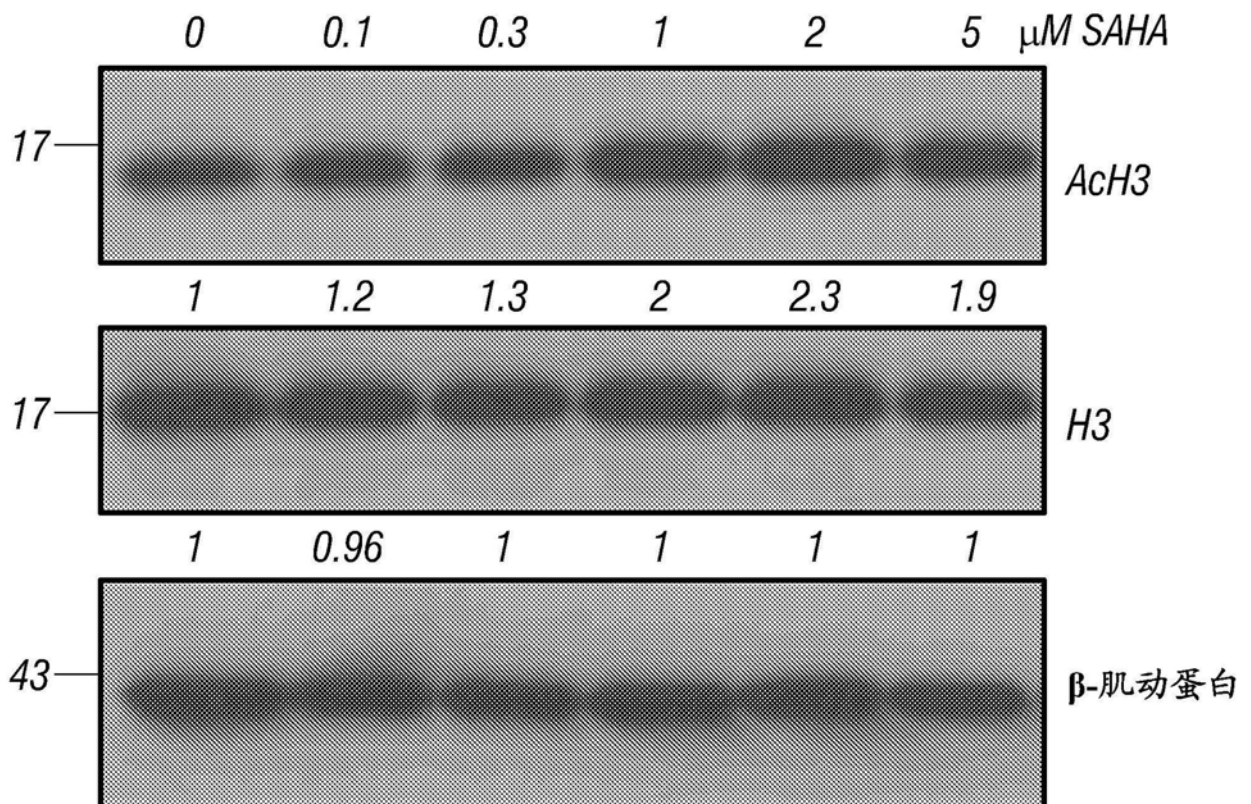


图16

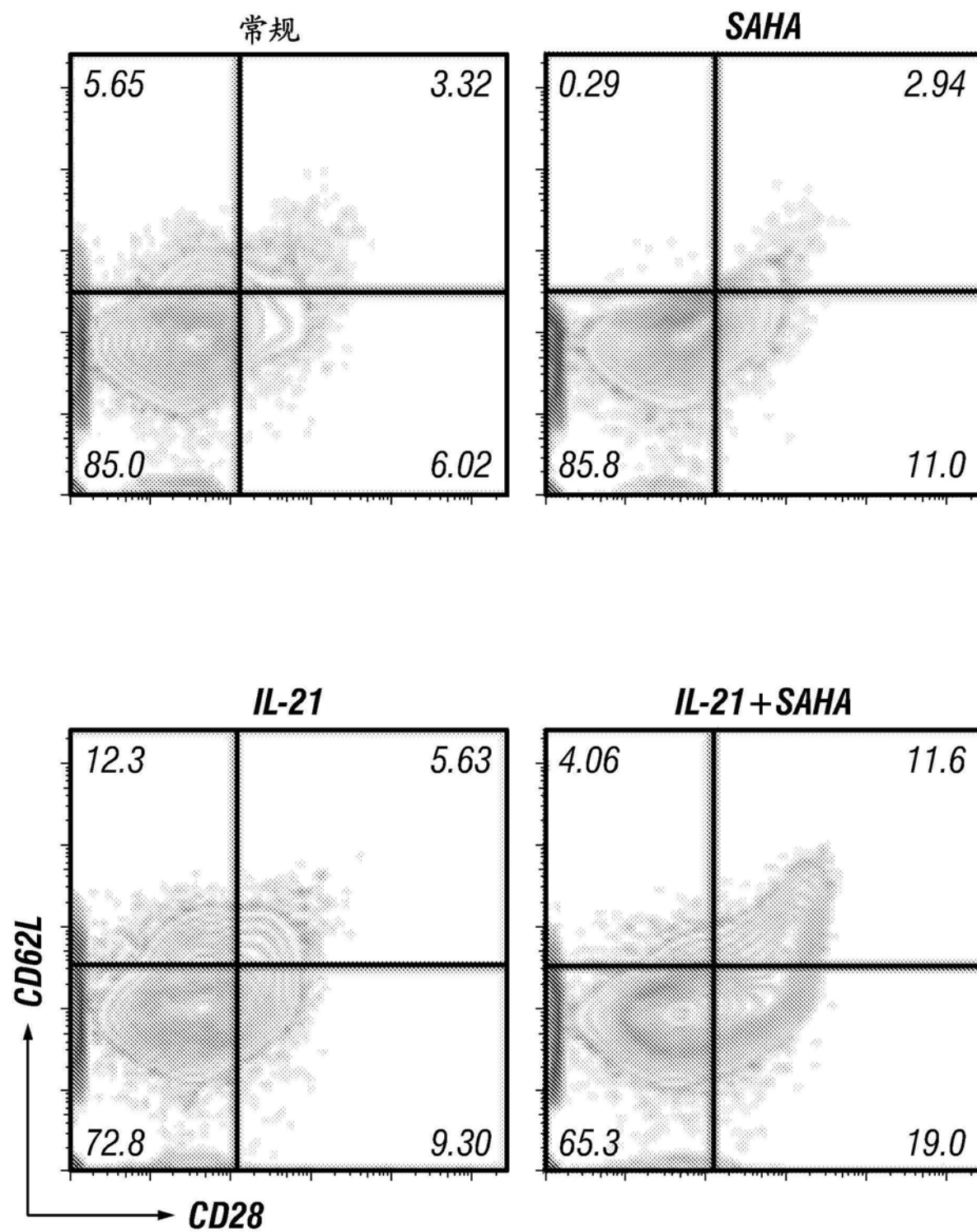


图17A

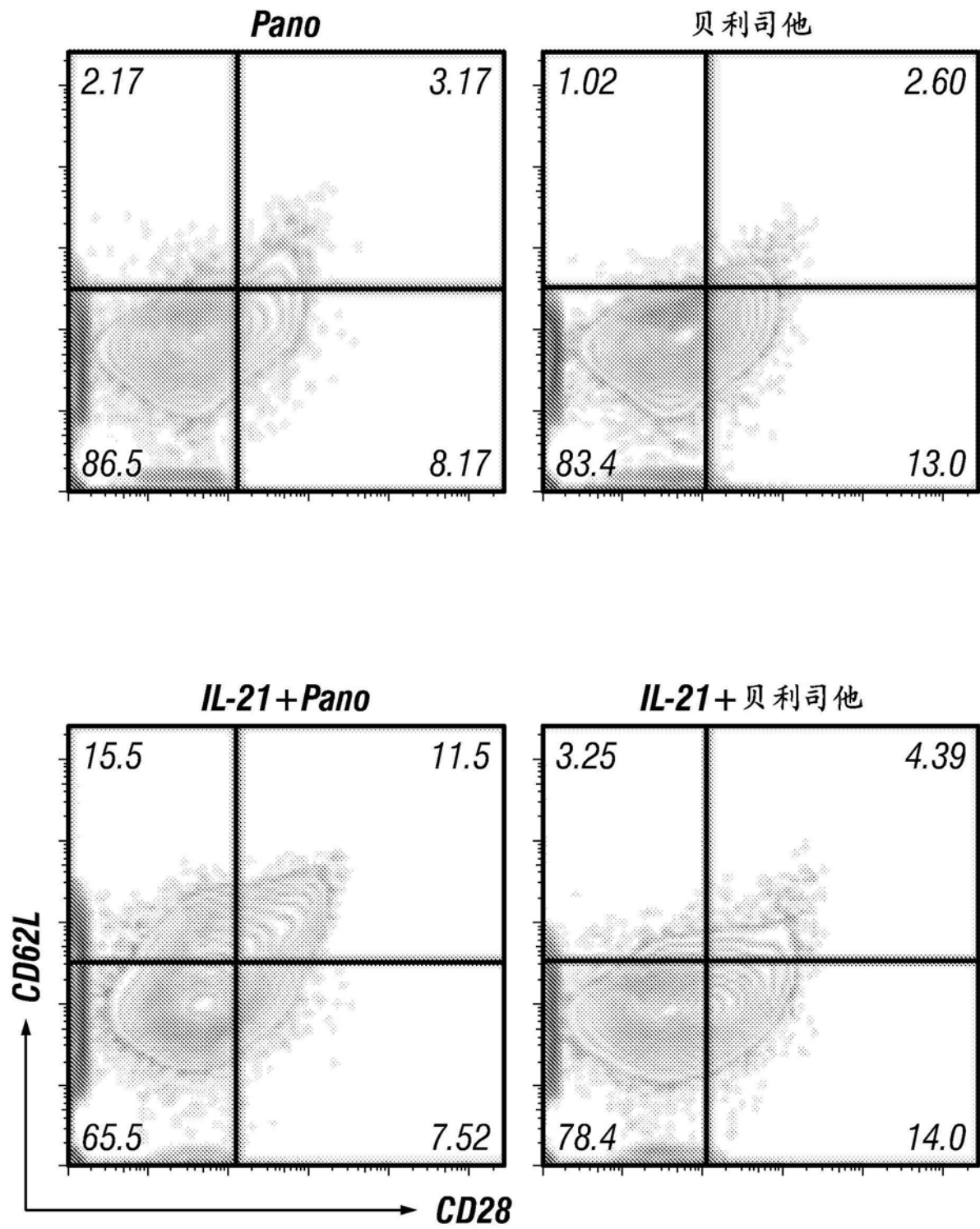


图17A(续)

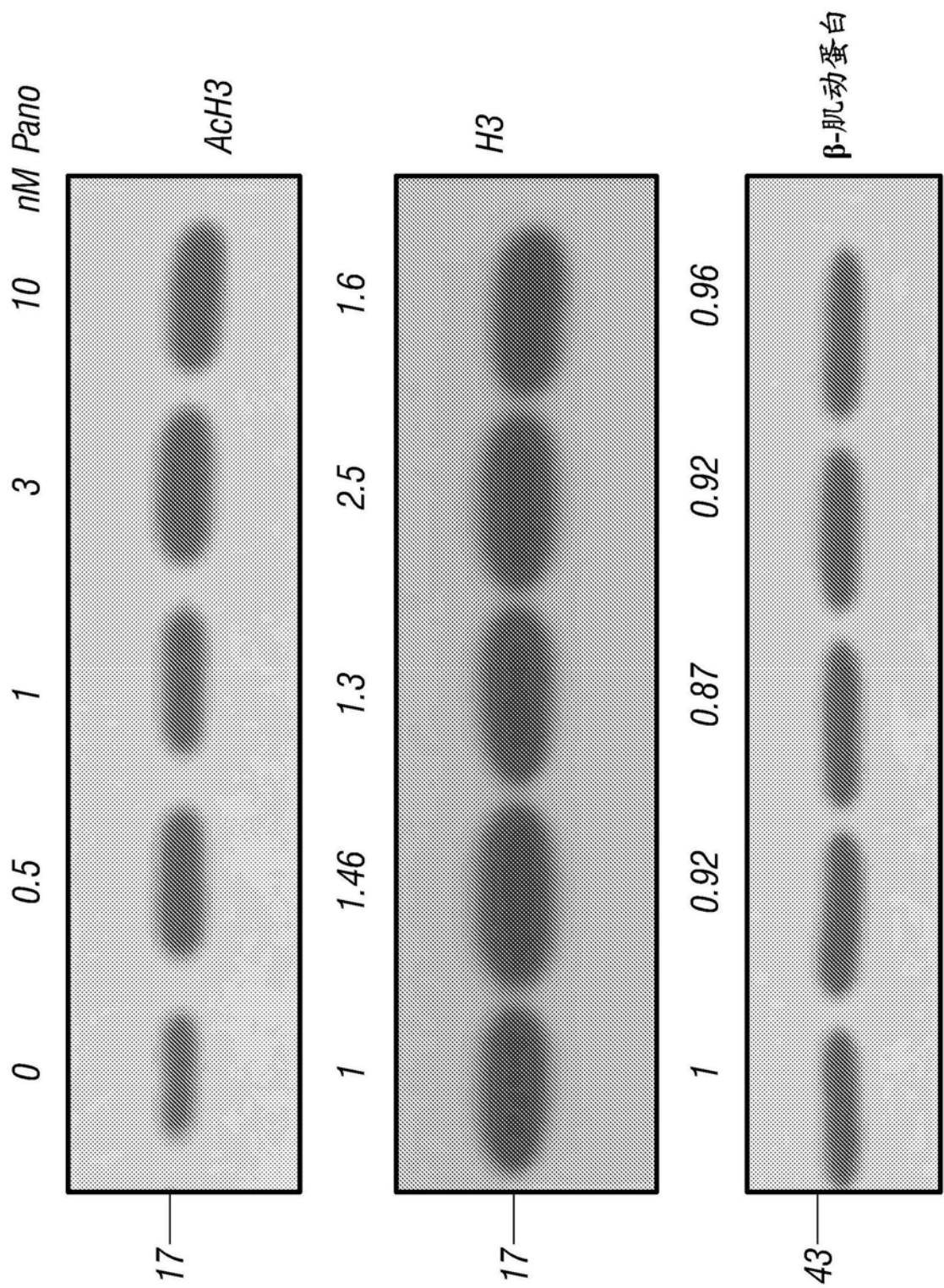


图17B

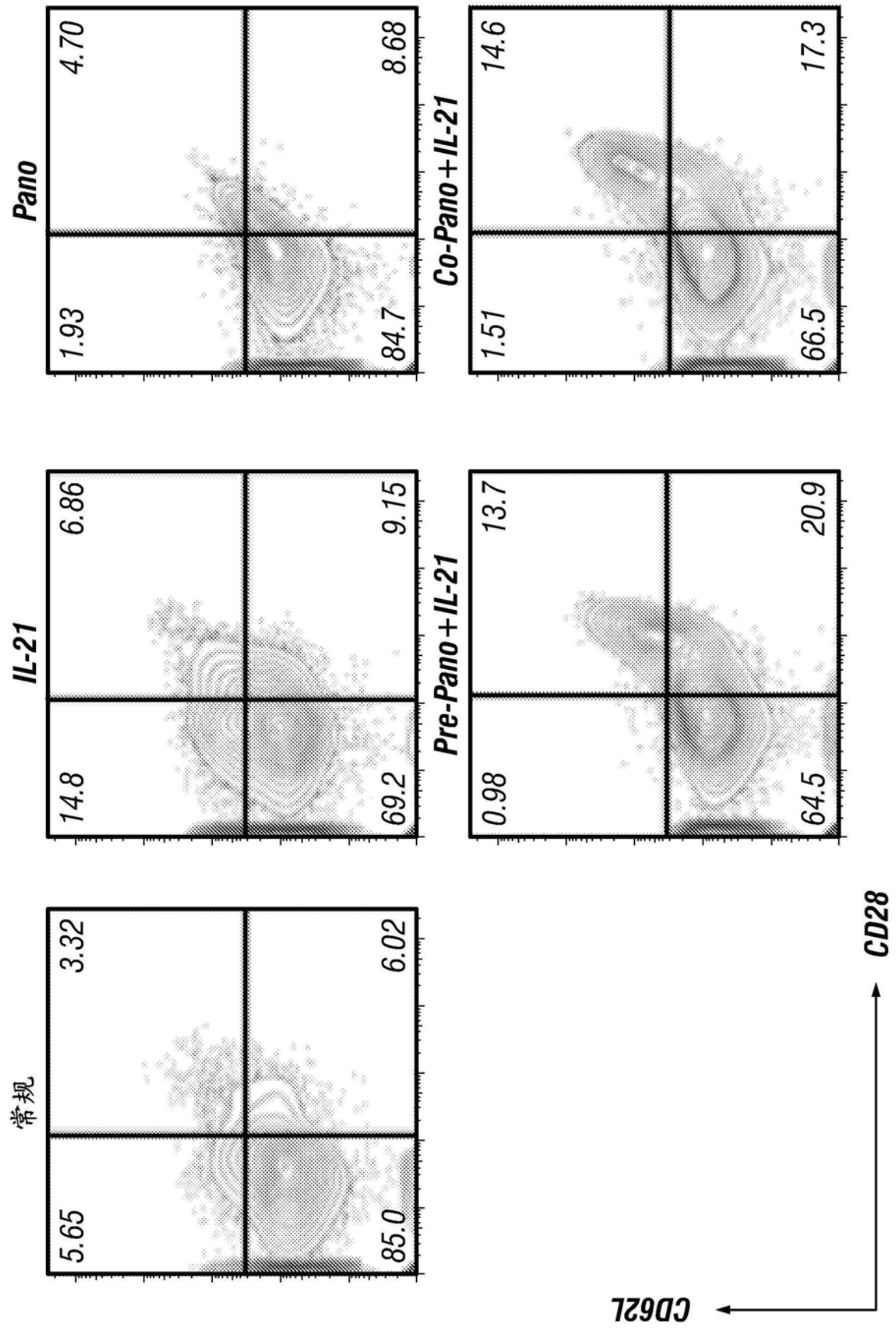


图18A

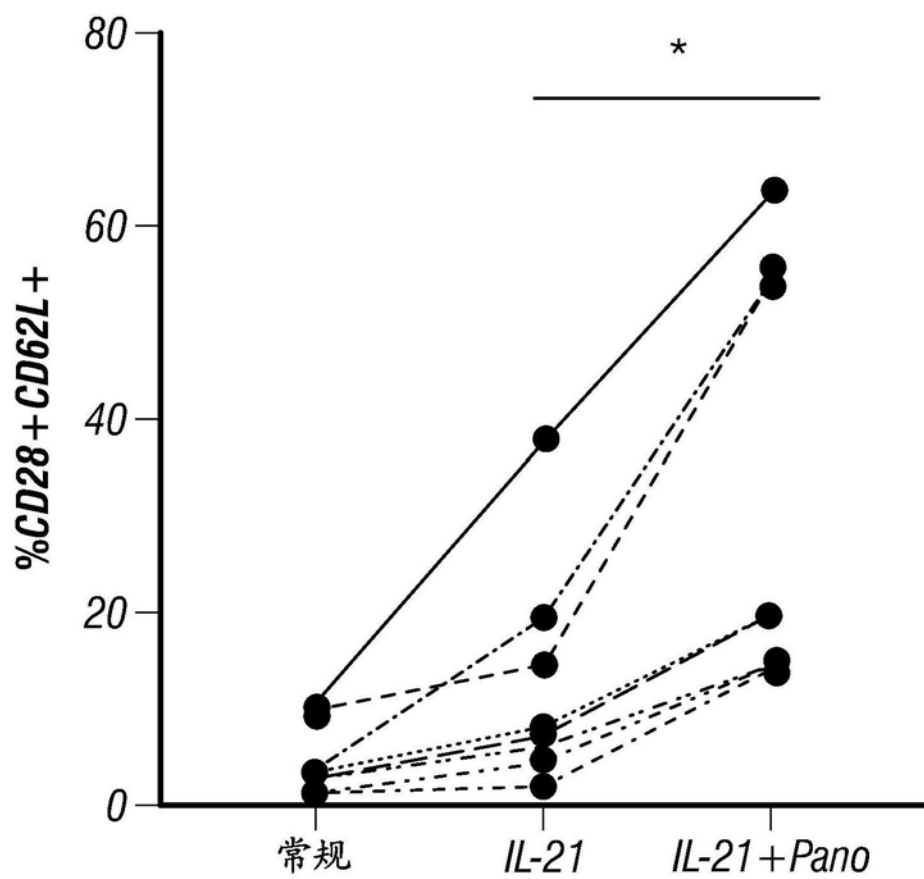


图18B

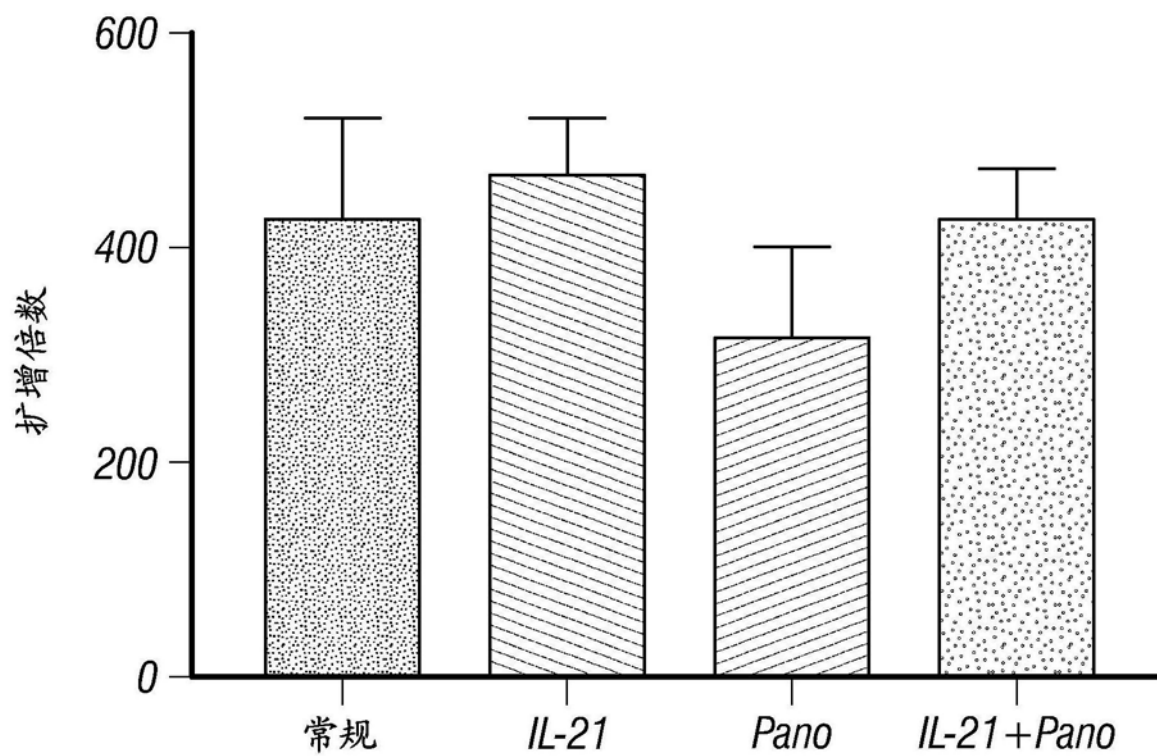


图18C

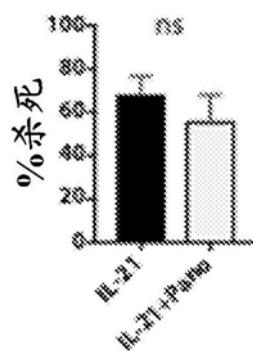


图19