(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 111971052 B
(45)授权公告日 2024.07.05

(21)申请号 201980024106.6
(22)申请日 2019.02.07
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111971052 A
(43)申请公布日 2020.11.20
(30)优先权数据
62/628,015 2018.02.08 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.09.30
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/017017 2019.02.07
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/157158 EN 2019.08.15
(73)专利权人 小利兰.斯坦福大学托管委员会
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 埃弗雷特·于尔托·迈耶
罗伯特·S·内格林
(74)专利代理机构 北京弘权知识产权代理有限公司 11363
专利代理师 郭放 许伟群
(51)Int.Cl.
A61K 35/12(2015.01)
A61K 35/15(2015.01)
A61K 35/17(2015.01)
A61K 35/28(2015.01)
A61P 37/06(2006.01)
(56)对比文件
US 2014294793 A1,2014.10.02
WO 2015066551 A2,2015.05.07
Massimo F. Martelli等.HLA-haploidentical transplantation with regulatory and conventional T-cell adoptive immunotherapy prevents acute leukemia relapse.BLOOD.2014,第124卷(第4期),摘要,第639页右栏第1段、图1.
审查员 陈仕高
权利要求书3页 说明书38页 附图7页

(54)发明名称

用于异基因造血干细胞移植的方法

(57)摘要

本发明提供用于改良造血干细胞移植的方法,包括在维持有效免疫应答(例如,移植物抗肿瘤免疫应答)的同时增强预防移植物抗宿主病能力的方法。本发明提供施用诸如造血干祖细胞、调节性T细胞和常规T细胞等的方法,其中所述常规T细胞在造血干祖细胞和调节性T细胞施用之后施用。本发明还提供施用诸如造血干祖细胞、调节性T细胞和常规T细胞等的方法,其中所述调节性T细胞在施用之前未进行冷冻保存。

CN 111971052 B

1.造血干祖细胞在制备用于治疗人类受试者的血液性恶性肿瘤的药物中的用途,其中所述血液性恶性肿瘤选自急性淋巴细胞白血病(ALL),急性骨髓性白血病(AML),慢性骨髓性白血病(CML),霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤所述药物的施用包含向所述人类受试者施用:

a)造血干祖细胞(HSPC)群体;

b)调节性T细胞(Treg)群体;

c)CD3+常规T细胞群体;以及

d)单一的移植物抗宿主病(GVHD)预防剂,其中所述GVHD预防剂是西罗莫司或他克莫司;

其中所述HSPC群体和所述Treg群体在所述CD3+常规T细胞群体施用之前向所述受试者施用;

其中所述调节性T细胞群体在其施用于所述受试者之前未进行冷冻保存;以及

其中,所述施用还包括在施用所述造血干祖细胞群体、所述调节性T细胞群体和/或所述CD3+常规T细胞群体之前,对所述人类受试者进行清髓性调节。

2.根据权利要求1所述的用途,其中所述造血干祖细胞群体包含少于2%的$CD3^+$细胞。

3.根据权利要求1所述的用途,其中所述调节性T细胞群体包括$CD45^+$细胞,其中超过75%的$CD45^+$细胞是调节性T细胞。

4.根据权利要求1所述的用途,其中所述清髓性调节包括施用全身辐照、环磷酰胺、依托泊苷和白消安中的一种或多种。

5.根据权利要求1所述的用途,其中所述人类受试者在施用所述CD3+常规T细胞群体后100天内未发生GVHD。

6.根据权利要求1所述的用途,其中所述造血干祖细胞、调节性T细胞和/或CD3+常规T细胞的群体是所述人类受试者的同种异体的。

7.根据权利要求1所述的用途,其中在施用所述调节性T细胞群体和/或所述造血干祖细胞群体之后至少12小时施用所述CD3+常规T细胞群体。

8.根据权利要求1所述的用途,其中所述造血干祖细胞群体包含超过1×10^5个造血干祖细胞/千克所述人类受试者体重。

9.根据权利要求1所述的用途,其中所述调节性T细胞群体包含超过1×10^5个调节性T细胞/千克所述人类受试者体重。

10.根据权利要求1所述的用途,其中所述CD3+常规T细胞群体包含少于1×10^7个CD3+常规T细胞/千克所述人类受试者体重。

11.根据权利要求1所述的用途,其中所述调节性T细胞与所述CD3+常规T细胞的比例为1:1至1:3。

12.根据权利要求1所述的用途,其中所述造血干祖细胞是$CD34^+$。

13.根据权利要求1所述的用途,其中所述调节性T细胞是$CD4^+CD25^+CD127^{dim}$或$CD4^+FOXP3^+$。

14.根据权利要求1所述的用途,其中所述人类受试者的外周血在施用所述造血干祖细胞群体后10-16天内显示出大于1×10^9个嗜中性粒细胞/L的供体型移植。

15.根据权利要求1所述的用途,其中所述造血干细胞群体是从相对于所述人类受试者

HLA匹配的供体获得的。

16.造血干祖细胞群体在制备用于治疗人类受试者的血液性恶性肿瘤的药物中的用途,其中所述血液性恶性肿瘤选自急性淋巴细胞白血病(ALL),急性骨髓性白血病(AML),慢性骨髓性白血病(CML),霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤,所述药物的施用包括向所述人类受试者施用:

单一的移植物抗宿主病(GVHD)预防剂,其中所述GVHD预防剂是他克莫司或西罗莫司;

包含造血干祖细胞的细胞群体,其包含最多2%CD3+细胞;

包含调节性T细胞的细胞群体,其中在所述供体调节性T细胞群体中施用的至少80%的有核细胞是FOXP3+细胞;以及

包含CD3+常规T细胞的细胞群体;

其中,所述施用还包括在施用所述造血干祖细胞群体、所述调节性T细胞群体和/或所述CD3+常规T细胞群体之前,对所述人类受试者进行清髓性调节。

17.根据权利要求16所述的用途,其中将所述GVHD预防剂施用于所述人类受试者。

18.根据权利要求16所述的用途,其中所述人类受试者在施用所述CD3+常规T细胞群体后100天内未发生GVHD。

19.根据权利要求16所述的用途,其中所述包含造血干祖细胞的细胞群体、所述包含调节性T细胞的细胞群体和/或所述包含CD3+常规T细胞的细胞群体是所述人类受试者的同种异体。

20.根据权利要求16所述的用途,其中所述包含造血干祖细胞的细胞群体包含超过1×10^5个造血干祖细胞/千克所述人类受试者体重。

21.根据权利要求16所述的用途,其中所述包含调节性T细胞的细胞群体包含超过1×10^5个调节性T细胞/千克所述人类受试者体重。

22.根据权利要求16所述的用途,其中所述包含CD3+常规T细胞的细胞群体包含少于1×10^7个CD3+常规T细胞/千克所述人类受试者体重。

23.根据权利要求16所述的用途,其中所述CD3+常规T细胞群体包含至少1×10^6个CD3+常规T细胞/千克所述人类受试者体重。

24.根据权利要求16所述的用途,其中所施用的调节性T细胞与CD3+常规T细胞的比例为1:1至1:3。

25.根据权利要求16所述的用途,其中所述造血干祖细胞是$CD34^+$。

26.根据权利要求16所述的用途,其中所述调节性T细胞是$CD4^+CD25^+CD127^{dim}$或$CD4^+FOXP3^+$。

27.根据权利要求16所述的用途,其中所述人类受试者的外周血在施用所述造血干祖细胞群体后10-16天内表现出大于1×10^9个嗜中性粒细胞/L的供体型移植。

28.根据权利要求16所述的用途,其中所述造血干细胞群体是从与所述人类受试者HLA匹配的供体获得的。

29.根据权利要求16所述的用途,其中所述造血干细胞群体、所述调节性T细胞群体和/或所述CD3+常规T细胞群体在不同时间施用。

30.根据权利要求16所述的用途,其中所述造血干细胞群体和所述调节性T细胞群体同时施用。

31.根据权利要求16所述的方法,其中所述调节性T细胞群体未进行冷冻保存。

32.根据权利要求16所述的用途,其中在施用所述调节性T细胞和/或所述造血干祖细胞后至少12小时施用所述CD3+常规T细胞群体。

33.根据权利要求16所述的用途,其中所述清髓性调节包括施用全身辐照、环磷酰胺、依托泊苷和白消安中的一种或多种。

用于异基因造血干细胞移植的方法

[0001] 交叉引用

[0002] 本专利申请案主张于2018年2月8日提交的编号为62/628,105的美国临时专利申请案的优先权,上述专利申请全文以引用方式并入本文中。

背景技术

[0003] 高危恶性血液病(例如,首次缓解后复发的白血病和淋巴瘤或复发难治性白血病和淋巴瘤)患者很少能通过标准化疗得以治愈。清髓性异基因造血细胞移植(HCT)可提高所述患者的生存率,其中所述患者的无病生存率介于10％至50％之间,非复发死亡率介于30％至50％之间。与急性移植物抗宿主病(aGVHD)相关的早期发病率和死亡率以及与慢性GVHD相关的长期发病率均是限制HCT成功的主要因素。

[0004] 援引并入

[0005] 在本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请案均通过引用方式并入本文中,犹如每一单独出版物、专利和专利申请案被具体地和单独地表明通过引用方式并入。

发明内容

[0006] 在一些实施例中,本发明公开了一种治疗需要接受本文所述治疗的人类受试者的方法,包含向所述人类受试者施用:a)造血干祖细胞(HSPC)群体;b)包含调节性T细胞(Treg)的细胞群体;以及c)常规T细胞(Tcon)群体;其中所述HSPC群体和所述包含Treg的细胞群体在所述Tcon群体施用之前施用;并且其中所述包含Treg的细胞群体在其所述施用之前未进行冷冻保存。

[0007] 在一些实施例中,本发明公开了一种治疗需要接受本文所述治疗的人类受试者的方法,包含向所述人类受试者施用:a)一种造血干祖细胞(HSPC)群体;b)包含调节性T细胞(Treg)的细胞群体;以及c)常规T细胞(Tcon)群体;其中所述HSPC群体和所述包含Treg的细胞群体在所述常规T细胞群体施用之前施用;并且其中所述人类受试者在所述Tcon群体的所述施用后30天内未发生移植物抗宿主病(GVHD)。

[0008] 在一些实施例中,本发明公开了一种治疗需要接受本文所述治疗的人类受试者的方法,包含向所述人类受试者施用:a)造血干祖细胞(HSPC)群体;b)包含调节性T细胞(Treg)的细胞群体;以及c)常规T细胞(Tcon)群体;其中所述HSPC群体和所述包含Treg的细胞群体在所述Tcon群体施用之前施用;其中所述包含Treg的细胞群体包含$CD45^+$细胞,其中超过90％的所述$CD45^+$细胞是Treg。

附图说明

[0009] 图1提供了一项临床试验的患者特征,所述临床试验包含在Tcon施用之前施用HSPC和Treg。

[0010] 图2阐明了原始及经修改的临床方案图解。

[0011] 图3阐明了向受试者施用的来自外周血单采术产物的Treg细胞的富集情况。

[0012] 图4阐明了包含Treg的细胞群体在混合淋巴细胞反应(MLR)中的抑制能力。

[0013] 图5阐明了一项临床试验的剂量递增方案,所述临床试验包含在Tcon施用之前施用HSPC和Treg。

[0014] 图6提供了移植物产生以及施用新鲜Treg的示意图。

[0015] 图7显示了临床试验中来自供体的Treg的细胞剂量产量。

[0016] 图8提供了临床试验中向受试者施用的细胞剂量详情。

[0017] 图9汇总了临床试验的临床预后数据。

[0018] 图10阐明了HCT后在标准化时间点的免疫细胞重建情况。

[0019] 图11阐明了在HCT后第60天的Treg特征以及在HCT后第90天的Treg TCR组库多样性。

[0020] 实施方式

[0021] 以下描述和示例详细说明了本发明的实施例。应当理解,本发明不限于本文所描述的特定实施例,因为在实际实施中可能会存在差异。本领域技术人员将认识到,可对本发明做出多种变更和修改,所述变更和修改均涵盖在本发明的范围内。

[0022] 本文中使用的单数形式的“一”、“一个”和“所述/该”包括复数指代对象,除非上下文另有明确说明。

[0023] 本文中使用的相对于参考数值及其语法等同物的术语“约”及其语法等同物可以包括使用所述值加或减10%得到的数值范围。例如,数值“约10”包括从9至11的数值。相对于参考数值的术语“约”还可以包括使用所述值加或减10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%得到的数值范围。

[0024] 发明概述

[0025] 本发明提供用于改良异基因造血干细胞移植(HCT)的方法。在一些实施例中,本发明所揭示的方法保留了对癌症受试者施以HCT产生的移植物抗肿瘤(GVT)效应,同时可预防或减少移植物抗宿主病(GVHD)的发生。

[0026] HCT是指将通常来自供体骨髓、外周血或脐带血的多能造血干祖细胞(HSPC)移植至受体体内。受体可接受清髓性预处理,这可以杀灭造血细胞,包括肿瘤细胞和宿主免疫细胞。然后,移植至受体体内的HSPC可以重建造血区室。由于供体T细胞能够发挥抗肿瘤效应(被称为移植物抗肿瘤(GVT)),因此HCT可用于治疗癌症。对于患有难治性恶性血液病、需要接受化疗的患者而言,HCT可以提高生存率。

[0027] 但是,供体T细胞也可能攻击非肿瘤宿主细胞,从而引发移植物抗宿主病(GVHD)。GVHD是引发HCT后并发症的主要原因,并且可能是致命的。治疗GVHD可能需要采用免疫抑制疗法或细胞毒性介导,这可能会产生毒性,导致对感染的敏感性增加或使抗肿瘤免疫力钝化。与急性移植物抗宿主病(aGVHD)相关的早期发病率和死亡率以及与慢性GVHD(cGVHD)相关的长期发病率均是限制HCT成功的主要因素。HLA匹配和不匹配移植均存在发生GVHD的风险。即使供体和受体的HLA相匹配,也可能发生GVHD,因为免疫系统仍可识别其组织之间的其他差异。来自HLA匹配的同胞供体(MSD)的异基因HCT后,aGVHD的发生率介于20%至60%之间,即使使用了各种免疫抑制剂也是如此。

[0028] GVT和GVHD主要由常规T细胞(Tcon)介导,所述Tcon在T细胞受体识别出同源抗原后会引发免疫应答。使HCT移植物中的T细胞耗竭可以减少GVHD的发生,但也可能导致GVT效

应降低以及癌症复发的可能性增加。除Tcon外,Treg是T细胞的另外一种亚型,可对炎症进行负向调节并促进免疫耐受。Treg可通过其对炎症(包括,例如识别受体抗原的供体Tcon引起的炎症)的负向调节来预防或减少GVHD的发生。

[0029] 本发明提供用于改良HCT的方法,包含向受试者施用某些细胞群体,其包括包含HSPC的群体、包含Treg的群体和包含Tcon的群体。在不受理论束缚的情况下,施用Treg可以减少GVHD的发生,而施用Tcon可以增强GVT效应。因此,本发明提供施用所述两种T细胞以增强GVT效应,同时最大限度地减少GVHD的发生的方法。在不受理论束缚的情况下,本发明的所述有益方面可能与本文所述的细胞施用顺序(例如,在Tcon施用之前施用Treg)或与在施用之前未对Treg进行冷冻保存有关。因此,本发明所揭示的方法可以保留对癌症受试者施以HCT产生的移植物抗肿瘤(GVT)效应,同时可预防或减少移植物抗宿主病(GVHD)的发生。在一些实施例中,可以在不同时间施用两个或以上的细胞群体,例如,可以在Tcon施用之前先施用HSPC和Treg。

[0030] 一个或多个细胞群体可以由新鲜细胞构成,也可以在解冻并施用于受试者之前进行冷冻保存。在不受理论束缚的情况下,施用新鲜Treg可以减少受试者GVHD的发生,和/或施用经冷冻保存的Tcon可以减少受试者GVHD的发生。例如,在新鲜Treg施用后施用经冷冻保存的Tcon可以减少受试者GVHD的发生,提高受试者的GVT效应,或在未发生GVHD的情况下提高受试者的GVT效应。

[0031] 本发明还提供包含Treg的细胞群体,其被分选以产生包含高百分比的Treg的细胞群体。在一些实施例中,在Tcon施用之前施用包含高百分比的新鲜Treg的细胞群体可减少受试者GVHD的发生。

[0032] 造血细胞移植与癌症

[0033] 本发明提供了让患有癌症的受体受试者接受造血干细胞移植(HCT)的方法。HCT可帮助治疗或缓解受试者的癌症。在一些实施例中,向受试者施用常规T细胞(Tcon)群体以引发移植物抗肿瘤(GVT)免疫应答。

[0034] 高危恶性血液病患者很少能通过标准化疗得以治愈。举例而言,高危恶性疾病包括首次缓解后发生进展的白血病和淋巴瘤或复发难治性白血病和淋巴瘤。清髓性异基因造血干细胞移植(HCT)可提高所述患者的生存率,其中所述患者的无病生存率介于10%至50%之间,非复发死亡率介于30%至50%之间。

[0035] 造血干细胞移植(HCT)是指通常来自骨髓、外周血或脐带血的多能造血干祖细胞(HSPC)的移植。HSPC具有强大的自我更新能力,并且能够分化成特化细胞类型,例如,能够重构所有造血细胞谱系。HSPC可以进行异步复制,在复制过程中会产生两种具有不同表型的子细胞。造血干细胞可进行有丝分裂,以静默形式存在。

[0036] HSPC可通过从骨髓或外周血中收获而获得。在供体处于局部麻醉或全身麻醉下时,可从后髂嵴或前髂嵴处抽取骨髓。HSPC可通过从外周血中收获而获得,例如,通过外周血单采术。收获的干细胞数量可通过向供体施用动员剂(即,将干细胞从骨髓动员至外周血中的药剂)来增加。动员剂的非限制性示例包括粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、莫佐比尔及其组合。将干细胞动员至外周血中的技术可能包含向供体施用一定剂量的动员剂,例如,每天10至40μ/kg。动员剂可能通过若干剂药剂施用于供体,例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10剂。单采术产物可在一剂动员剂施用后约若干小时

与供体分离,例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、26、28或30小时。

[0037] 本发明所述的方法可用于治疗患有癌症的人类受试者。在一些实施例中,所述受试者已接受癌症治疗,例如,通过化疗药物或放疗进行治疗。本发明所述的方法可帮助治疗恶性血液病,例如,白血病或淋巴瘤。可通过本发明所述的方法治疗的恶性血液病的示例包括但不限于急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、多发性骨髓瘤和淋巴瘤(例如,霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤)。癌症可以是实体瘤。在一些实施例中,癌症是原发性肿瘤或转移性肿瘤。

[0038] 可利用本发明所述的方法治疗的癌症类型包括但不限于白血病、淋巴瘤、肾上腺皮质癌、肛门癌、再生障碍性贫血、胆管癌、膀胱癌、骨癌、骨转移、脑癌、中枢神经系统(CNS)癌症、周围神经系统(PNS)癌症、乳腺癌、宫颈癌、儿童非霍奇金淋巴瘤、结肠直肠癌、子宫内膜癌、食道癌、尤文氏家族肿瘤(例如,尤文氏肉瘤)、眼癌、胆囊癌、胃肠道类癌、胃肠道间质瘤、妊娠滋养细胞疾病、毛细胞白血病、霍奇金淋巴瘤、卡波济氏肉瘤、肾癌、喉癌和咽癌、急性淋巴细胞白血病、急性骨髓性白血病、儿童白血病、慢性淋巴细胞白血病、慢性骨髓性白血病、肝癌、肺癌、肺类癌、男性乳腺癌、恶性间皮瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、骨髓增生性疾病、鼻腔和鼻旁窦癌、鼻咽癌、成神经细胞瘤、口腔和口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、阴茎癌、垂体瘤、前列腺癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、肉瘤、黑色素瘤皮肤癌、非黑色素瘤皮肤癌、胃癌、睾丸癌;胸腺癌、甲状腺癌、子宫癌(例如,子宫肉瘤)、移行细胞癌、阴道癌、外阴癌、间皮瘤、鳞状细胞或表皮样癌、支气管腺瘤、绒毛膜癌、头颈癌、畸胎癌和华氏巨球蛋白血症。

[0039] 造血细胞移植与移植物抗宿主病

[0040] 本发明提供用于改良造血干细胞移植(HCT)的方法,其中可减少或预防GVHD的发生。在一些实施例中,向HCT受体受试者施用本文所述的细胞群体,而且受体受试者在所述细胞施用后的一定时间段内(例如,30、100或200天内)未发生GVHD。例如,可向HCT受体受试者施用本文所述的细胞群体,而且相对于按照不同方案接受HCT的受试者,所述受体受试者在所述细胞施用后的一定时间段内(例如,30、100或200天内)发生GVHD的可能性降低。可向HCT受体受试者施用包含Treg的细胞群体,而且Treg群体可减少或预防HCT受体受试者GVHD的发生。可向HCT受体受试者施用包含新鲜Treg的细胞群体,而且所述细胞群体可减少或预防HCT受体受试者GVHD的发生。在一些实施例中,向HCT受体受试者施用包含高比例的Treg的细胞群体(例如,CD4+FOXP3+或CD4+CD25+CD127dim细胞),而且所述细胞群体可减少或预防HCT受体受试者GVHD的发生。

[0041] 移植物抗宿主病(GVHD)是一种炎性疾病,可能发生于异基因移植环境中。GVHD累及攻击受体细胞(宿主)的供体细胞(移植物)。GVHD可分为急性GVHD(aGVHD)和慢性GVHD(cGVHD)。aGVHD通常发生于移植后前3个月内。aGVHD可能会危及生命,并且可能累及皮肤、肠道和/或肝脏等。cGVHD通常发生于移植后前3个月之后。cGVHD是引发晚期治疗相关并发症的主要原因,并且可能会危及生命。除炎症外,cGVHD还可能导致纤维化发展,从而引发功能性障碍。

[0042] 与急性移植物抗宿主病(aGVHD)相关的早期发病率和死亡率以及与慢性GVHD(cGVHD)相关的长期发病率均是限制HCT成功的主要因素。来自HLA匹配的同胞供体(MSD)的

异基因HCT后,aGVHD的发生率介于20％至60％之间,即使使用了多种免疫抑制剂(例如,他克莫司、环孢霉素、甲氨蝶呤、麦考酚酯、抗胸腺细胞球蛋白和皮质类固醇)也是如此。约三分之一使用MSD和非体外去除T细胞移植物进行异基因HCT的患者会发生慢性GVHD。

[0043] 对GVHD严重程度进行分级,例如,利用Glucksberg分级(I-IV)或国际骨髓移植登记处(IBMTR)分级系统(A-D)进行分级。急性GVHD的严重程度通过评估皮肤、肝脏和胃肠道受累程度来确定。单个器官受累的分期与(Glucksberg)或不与(IBMTR)患者的体力状况相结合,以确定具有预后意义的总体分级。就评估对预防或治疗的反应、对生存率的影响以及与移植物抗白血病效应的关系而言,分级至关重要。

[0044] I(A)级GVHD被表征为轻度疾病;II(B)级GVHD被表征为中度疾病;III(C)级GVHD被表征为重度疾病;以及IV(D)级GVHD被表征为危及生命的疾病。IBMTR分级系统对急性GVHD的严重程度定义如下:A级:1期单纯皮肤受累((25％以下的体表面积出现斑状丘疹),未累及肝脏和胃肠道;B级:2期皮肤受累,1至2期肠道或肝脏受累;C级:任一器官系统3期受累(全身性红皮病;胆红素6.1至15.0mg/dL;腹泻量1500至2000毫升/天);D级:任一器官系统4期受累(全身性红皮病,伴大疱形成;胆红素>15mg/dL;腹泻量>2000毫升/天,或疼痛或肠梗阻)。与患有较轻度疾病的患者相比,中重度GVHD患者的死亡率明显更高,例如,III(C)级aGVHD患者的估计五年生存率为25％,而IV(D)级aGVHD患者的估计五年生存率为5％。

[0045] 治疗GVHD可能需要采用免疫抑制疗法(例如,高剂量皮质类固醇、长期施用免疫抑制剂)或细胞毒性介导,这都可能会产生毒性。在许多情况下,免疫抑制疗法可能无法有效治疗GVHD,或导致对感染的敏感性增加,或使抗肿瘤免疫力钝化。

[0046] 在一些实施例中,本发明所揭示的方法可预防或减少HCT受体受试者GVHD的发生。例如,本发明所揭示的方法可预防接受HCT的受试者出现任何GVHD病理表现。

[0047] 举例而言,本发明所揭示的方法可预防接受HCT的受试者出现1期或以上的任何GVHD、2期或以上的任何GVHD、3期或以上的任何GVHD或4期的任何GVHD。

[0048] 在一些实施例中,本发明所揭示的方法可预防接受HCT的受试者在施用本发明所揭示的细胞群体后若干天出现1、2、3或4期的任何GVHD,所述天数至少大于约10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、365、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、650、700、750、800、850、900、950、1000天或以上。

[0049] 本发明提供可预防接受HCT的受试者在施用本发明所揭示的细胞群体后若干天出现1、2、3或4期的任何GVHD的方法,所述天数不超过约10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、365、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、650、700、750、800、850、900、950、1000天或以下。

[0050] 举例而言,本发明提供可预防接受HCT的受试者出现A级或以上的任何GVHD、B级或以上的任何GVHD、C级或以上的任何GVHD或D级的任何GVHD的方法。

[0051] 在一些实施例中,本文所述的方法可预防接受HCT的受试者在施用本发明所揭示的细胞群体后若干天出现A、B、C或D级的任何GVHD,所述天数至少大于约10、20、30、40、50、

60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、365、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、650、700、750、800、850、900、950、1000天或以上。

[0052] 本发明提供可预防接受HCT的受试者在施用本发明所揭示的细胞群体后若干天出现A、B、C或D级的任何GVHD的方法,所述天数不超过约10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、365、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、650、700、750、800、850、900、950、1000天或以下。

[0053] 举例而言,相较于其他HCT方法,本发明所揭示的方法可减少HCT受体受试者发生1期或以上、2期或以上、3期或以上或4期的任何GVHD的比例。

[0054] 举例而言,相较于其他HCT方法,本发明所揭示的方法可减少HCT受体受试者在施用本发明所揭示的细胞群体后若干天发生1期或以上、2期或以上、3期或以上或4期的任何GVHD的比例,所述天数至少大于约10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、365、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、650、700、750、800、850、900、950、1000天或以上。

[0055] 在一些实施例中,相较于其他HCT方法,本发明所揭示的方法可减少HCT受体受试者在施用本发明所揭示的细胞群体后若干天发生1期或以上、2期或以上、3期或以上或4期的任何GVHD的比例,所述天数不超过约10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、365、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、650、700、750、800、850、900、950、1000天或以下。

[0056] 举例而言,相较于其他HCT方法,本发明公开了可减少HCT受体受试者发生A级或以上、B级或以上、C级或以上或D级的任何GVHD的比例。

[0057] 举例而言,相较于其他HCT方法,本发明所揭示的方法可减少HCT受体受试者在施用本发明所揭示的细胞群体后若干天发生A级或以上、B级或以上、C级或以上或D级的任何GVHD的比例,所述天数至少大于约10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、365、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、650、700、750、800、850、900、950、1000天或以上。

[0058] 在一些实施例中,相较于其他HCT方法,本发明所揭示的方法可减少HCT受体受试者在施用本发明所揭示的细胞群体后若干天发生A级或以上、B级或以上、C级或以上或D级的任何GVHD的比例,所述天数不超过约10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、365、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、650、700、750、800、850、900、950、1000天或

以下。

[0059] 免疫细胞在HCT和GVHD中的作用

[0060] 本发明提供用于改良造血干细胞移植(HCT)的方法,其中与类似治疗方法等相比,所述方法可减少或预防GVHD的发生;其中,未在HSPC和/或Treg施用后施用Tcon,对Treg进行冷冻保存,未对Tcon进行冷冻保存或其任意组合。免疫细胞亚群(例如,常规T细胞(Tcon)、调节性T细胞(Treg)、恒定自然杀伤T细胞(iNKT)和记忆T细胞(Tmem))可能对HCT后发生的GVHD造成影响,而且也可能对诸如GVT免疫应答、免疫重建、对感染的敏感性和生存率等造成影响。

[0061] 本发明公开了包含向HCT受体受试者施用Tcon和Treg群体的方法。在一些实施例中,还施用iNKT。在一些实施例中,还施用Tmem。本发明提供用于施用所述细胞群体的参数,其有助于HCT受体受试者获得良好的临床预后。在不受理论束缚的情况下,举例而言,可能有助于HCT受体受试者获得良好的临床预后的参数包括所施用的群体、不同群体的施用顺序和时间、群体的纯度标准、获得群体的方法、群体的处理或储存方法(例如,使用新鲜细胞群体还是经冷冻的细胞群体)、施用的群体剂量、获得群体的方法及其组合。

[0062] GVHD主要由供体T细胞介导,其在识别出受体抗原后会引发炎性反应。可使供体移植物的T细胞耗竭(TCD),以减少急性和慢性GVHD发生的可能性。可以采用以下方法使T细胞耗竭,所述方法包括但不限于使T细胞物理吸附在蛋白质配体(例如,凝集素)上、利用T细胞特异性抗体实现免疫耗竭以及采用免疫亲和技术(例如,在免疫吸附色谱柱中使用T细胞或淋巴细胞特异性抗体、磁性激活细胞分选(MACS)或荧光激活细胞分选(FACS))。将TCD技术应用于供体移植物可使T细胞耗竭增加10倍至10^5倍,并降低GVHD的发生率。但是,TCD也可能导致癌症复发的发生率增加,因为缺乏T细胞可能使移植物抗肿瘤(GVT)免疫应答减弱。此外,TCD也可能导致免疫恢复受损,并使得对感染的敏感性增加。

[0063] GVT和GVHD主要由常规T细胞(Tcon)介导,所述Tcon在T细胞受体(对于GVT,为肿瘤抗原;对于GVHD,则为非肿瘤受体抗原)识别出同源抗原后会引发免疫应答。举例而言,Tcon可能对GVT、GVHD或其组合造成影响。在不受理论束缚的情况下,在Treg施用之后施用Tcon可以增强GVT免疫力,和/或降低对感染的敏感性。

[0064] 广义上,本文中使用的Tcon是指所有CD3+ T细胞、表达中等至高水平的CD127的细胞、表达CD3和中等至高水平的CD127的细胞或表达CD3、中等至高水平的CD127以及CD4或CD8的细胞。在一些实施例中,Tcon不表达Vα24Jα18TCR。Tcon和Treg可以是非互斥细胞群体。在一些实施例中,Tcon和Treg是互斥细胞群体。

[0065] 调节性T细胞(“Treg”)是一种特殊的T细胞亚群,其可以抑制免疫系统的激活,从而维持免疫耐受性。在不受理论束缚的情况下,通过本发明所述的方法施用的Treg群体可以通过诸如减少或预防移植受体GVHD的发生和/或改善移植受体的免疫重建等,有助于得到良好的临床预后。举例而言,在常规T细胞(Tcon)施用之前施用Treg和HSPC有助于保留移植物抗肿瘤(GVT)效应以及预防GVHD。举例而言,相对于其他HCT方法,在常规T细胞(Tcon)施用之前施用Treg和HSPC有助于保留移植物抗肿瘤(GVT)效应以及减少GVHD的发生。举例而言,相对于其他HCT方法,在常规T细胞(Tcon)施用之前施用Treg和HSPC有助于保留移植物抗肿瘤(GVT)效应以及降低发生GVHD的风险。在不受理论束缚的情况下,举例而言,相对于其他HCT方法,施用Treg可预防GVHD,而施用Tcon可提高GVT效应。在一些实施例中,相对

于其他HCT方法,施用Treg可降低发生GVHD的风险,而施用Tcon可提高GVT效应。

[0066] 现有各种类型的Treg,例如,TCRαβ+CD4+调节性T细胞,其包括自然调节性T细胞(nTreg)和诱导性调节性T细胞(iTreg)。nTreg是在胸腺中产生,作为自身抗原特异性淋巴细胞的长寿谱系传递至外周的T细胞。iTreg募集自循环淋巴细胞,其在外周的特定刺激条件下获得调节特性。nTreg和iTreg是CD4+CD25+;两者均可以剂量依赖性方式抑制CD4+CD25-T细胞的增殖,而且两者均无变应性,在TCR刺激下均不会增殖。除了对CD4和CD25呈阳性外,Treg对转录因子FOXP3(一种细胞内标志物)也呈阳性。Treg可以基于各种标志物表达谱来鉴别或选择。可用于选择Treg的标志物表达谱的非限制性示例包括(1)CD4+CD25+CD127dim;(2)CD4+FOXP3+;(3)CD3+CD4+CD25+;(5)CD3+CD4+CD25+CD127dim;(6)CD3+CD4+CD25+CD127dim FOXP3+;(7)CD3+FOXP3+;(8)CD3+CD4+FOXP3+;(9)CD3+CD4+CD25+FOXP3+;(10)CD3+CD25+FOXP3+;(11)CD3+CD25+CD127dim;(12)CD4+CD25+;(13)CD4+CD25+CD127dimFOXP3+;(14)FOXP3+,CD4+FOXP3+;(15)CD4+CD25+FOXP3+;(16)CD25+FOXP3+;或(17)CD25+CD127dim。

[0067] 基于某些表达谱的选择可以基于细胞外标志物来实现,无需使细胞透化,例如,基于CD4+CD25+CD127dim的选择。

[0068] 举例而言,在本发明所述的方法中,向接受HCT的受试者施用Treg可以帮助预防移植物排斥、帮助预防GVHD、帮助减少GVHD的发生、促进造血重建、促进免疫重建、促进混合嵌合或其组合。

[0069] 在本发明所述的方法中,可以向受试者施用恒定自然杀伤T细胞(iNKT)。iNKT是CD1d限制性自然杀伤T细胞(NKT)的亚类,其在人体中表达由Vα24Jα18TCRα链组成的高度保守的αβ-T细胞受体(本文中称为"Vα24Jα18^{+}")。iNKT细胞可通过与CD1d-多聚体结合来鉴别,例如,加载有α-半乳糖基神经酰胺(GalCer)、PBS-57、PBS-44或其他天然或合成糖脂的CD1d-多聚体,其也可以四聚体、树状大分子、其他结构、Fc融合物或其任意组合的形式存在。另一种鉴别方法是能够特异性识别Vα24Jα18区域的抗体或抗体组合。示例包括Vα24抗体、Jα18抗体或与Vα24Jα18TCR的独特区域特异性结合且可用于鉴别iNKT细胞的单克隆抗体克隆6B11。iNKT可以是CD3^{+}Vα24Jα18^{+}。

[0070] 举例而言,在本发明所述的方法中,向接受HCT的受试者施用iNKT可以促进移植、提高GVT效应、减少GVHD的发生、降低对癌症复发的敏感性、降低对感染的敏感性或其组合。在一些实施例中,iNKT可提高Treg的活性。在一些实施例中,iNKT可提高HSPC的活性。

[0071] 在本发明所述的方法中,可向受试者施用记忆T细胞(Tmem)。Tmem可以指抗原接触T细胞,其表达诸如表型标志物CD45RO、TCRα、TCRβ、CD3、CD4或CD8、CD95和IL-2Rβ等。记忆T细胞具有免疫力,能够长时间处于非活动状态。记忆T细胞在再次经抗原激发后能够迅速获得效应子功能。记忆T细胞群体可以包括亚类中枢记忆性T细胞和效应记忆性T细胞的任意组合。在一些实施例中,Tmem是CD3+CD45RA-CD45RO+。举例而言,在本发明所述的方法中,向接受HCT的受试者施用Tmem可以提高GVT效应、减少GVHD的发生、降低对癌症复发的敏感性、降低对感染的敏感性或其组合。

[0072] HLA类型和供体/宿主匹配

[0073] 本发明提供包含向受试者施用细胞群体的方法。待施用于受体的细胞群体可以来自同种异体供体。可以对供体和受体进行HLA分型,以确定其任何HLA等位基因是否匹配。

[0074] 人白细胞抗原(HLA),也被广泛称为主要组织相容性复合体(MHC)抗原,是在细胞表面表达的蛋白质分子,可以赋予所述细胞抗原性。HLA/MHC抗原是靶分子,可以被T细胞和自然杀伤(NK)细胞识别为来自与免疫效应细胞("自身")同一来源的造血干细胞,或识别为来自另一来源的造血细胞("非自身")。HLA I类抗原(在人类中,包括A、B和C)由绝大多数细胞表达,而HLA II类抗原(在人类中,包括DR、DP和DQ)主要在专业抗原呈递细胞上表达。所述两类HLA都与GVHD有关。

[0075] HLA抗原由高度多态性基因编码;各HLA I类和II类基因均存在一系列等位基因。等位基因产物的α和/或β结构域中有一个或多个氨基酸有所不同。利用表达I类和II类分子的白细胞,将特异性抗体或核酸试剂组用于个体的HLA单倍型分型。HLA等位基因可以在各个细节层次上进行描述。大多数名称以HLA-和基因座名称开头,然后是*和一些数量的(偶数个)表示等位基因的数字。前两位数字表示一组等位基因。以往的分型方法通常无法完全区分等位基因,因此停留在此层次上。第三四位数字表示同义等位基因。第五六位数字表示所述基因编码框架内的任何同义突变。第七八位数字可区分编码区域外的突变。诸如L、N、Q或S等字母后可接等位基因名称,以指示表达水平或其他已知的相关非基因组数据。因此,一个完整描述的等位基因的数字位数可能至多为9位,不包括HLA前缀和基因座符号。

[0076] 三种HLA基因被视为是对潜在移植供体和受体的HLA分型最为重要的基因,即HLA-A、HLA-B和HLA-DR。由于人类受试者携带所述每种基因的两个副本,因此共有六种基因为HLA分型基因。

[0077] HLA匹配是指供体和受体之间的六种HLA-A、HLA-B和HLA-DR等位基因全部匹配的一个供体-受体对。HLA不匹配是指供体和受体之间至少有一种HLA抗原不匹配的一个供体-受体对。即使供体和受体的HLA相匹配,也可能发生GVHD,因为免疫系统仍可识别其组织之间的其他差异。

[0078] 继承自某一亲本的HLA等位基因组形成单倍型。确定患者的单倍型可帮助预测找到匹配供体的概率,且有助于制定检索策略,因为一些等位基因和单倍型相较于其他更为常见,而且它们以不同的频率分布在不同的种族和族裔群体中。HLA单倍体相合是指供体和受体之间有一条染色体至少在HLA-A、HLA-B和HLA-DR上相匹配的一个供体-受体对。单倍体相合对在其他等位基因上可能匹配或可能不匹配,例如,在另一条染色体上的其他HLA基因,或在任一条染色体上的其他组织相容性基因座。所述供体通常出自家庭成员,例如,与孩子单倍体相合的父亲(或母亲);和可能单倍体相合的兄弟姐妹。

[0079] 本发明提供包含向受试者施用细胞群体的方法。待施用于受体的细胞群体可以来自同种异体供体。

[0080] 在一些实施例中,本发明所揭示的细胞群体在对供体和受体进行HLA分型后施用于受体受试者,例如,通过对供体和受体的HLA等位基因HLA-A、HLA-B和HLA-DR进行分型确定供体和受体的HLA相匹配还是HLA不匹配。本发明所述的供体-受体对的HLA可以相匹配、不匹配或单倍体相合。供体和受体之间可以存在亲缘关系(例如,父母、子女、兄弟姐妹、祖父母、孙子、阿姨、叔叔或表亲)。供体和受体之间可以存在亲缘关系,也可以是HLA相匹配、HLA不匹配或单倍体相合。供体和受体之间可以无亲缘关系。

[0081] 嵌合

[0082] 向受体施用来自供体的移植细胞后,可以监测受体体内的嵌合状态。嵌合可以指

接受HCT的个体体内供体细胞与宿主细胞混合。混合而非完全嵌合的患者发生GVHD的风险明显降低,因此,实现混合嵌合是可取的。此外,与混合嵌合相比,在完全嵌合的情况下观察到免疫缺陷和感染的频率更高。在一些实施例中,本发明提供的方法允许人类受试者实现混合嵌合。

[0083] 完全供体型嵌合是指在移植后的任何时间,受试者的给定细胞谱系中显示有超过95%的供体细胞。混合嵌合是指在所述分析中,受试者体内的供体DNA超过1%但低于95%。表现出混合嵌合的受试者可以根据嵌合演变作进一步分类,其中改善混合嵌合可以包含使供体细胞比例在至少6个月的时间内连续增加。稳定混合嵌合可以包含使受体细胞百分比随时间波动,且不会使供体细胞完全丧失。

[0084] 通过分析来自移植物受体的造血细胞样品(例如,外周血或骨髓)来确定受试者是完全嵌合体、混合嵌合体还是非嵌合体。可通过任何实用分型方法来进行分析。在一些实施例中,采用配有小随体分析用探针的PCR来定期监测所有单核细胞、T细胞、B细胞、CD56+NK细胞和CD15+嗜中性粒细胞之间的嵌合程度。例如,可以基于短末端重复长度多态性,使用市售试剂盒来量化提取自细胞的供体和宿主遗传物质。自动读取器根据人造供体和宿主细胞混合物的相应标准曲线提供供体型细胞的百分比。

[0085] 方法

[0086] 采集细胞

[0087] 本发明所述的一种或多种细胞群体可获取自单个供体,例如,通过单个供体的经动员的外周血单采术获取。HSPC、Treg、Tcon、iNKT、Tmem或其任意组合可获取自单个供体。

[0088] 本发明所述的一种或多种细胞群体可获取自一个供体,并且本发明所述的一种或多种其他细胞群体可获取自另一个供体。本发明所述的一种细胞群体可获取自单个供体,并且本发明所述的另一种细胞群体可获取自多个供体。

[0089] 本发明所述的群体可获取自多个供体,例如,通过多个供体的经动员的外周血单采术获取。HSPC可获取自多个供体。Treg可获取自多个供体。Tcon可获取自多个供体。iNKT可获取自多个供体。Tmem可获取自多个供体。

[0090] 本发明所述的供体和受体可以是同种异体的。本发明所述的供体和受体的HLA 可以相匹配。本发明所述的供体和受体的HLA 可以不匹配,例如,在1、2、3、4、5或6个主要HLA等位基因上不匹配。本发明所述的供体和受体可以是单倍体相合的。

[0091] 在一些实施例中,本发明所述的细胞群体可获取自全血。本发明所述的细胞群体可获取自外周血单采术产物,例如,经动员的外周血单采术产物。本发明所述的细胞群体可获取自至少一种单采术产物、两种单采术产物、三种单采术产物、四种单采术产物、五种单采术产物、六种单采术产物或更多种单采术产物。

[0092] 在一些实施例中,本发明所述的细胞群体可获取自骨髓。在一些实施例中,本发明所述的细胞群体可获取自脐带血。

[0093] 细胞处理

[0094] 本发明所述的细胞群体可通过从另一细胞群体(例如,外周血或外周血单采术产物)中进行选择来精制。细胞群体的选择方法可能包含涉及对目的细胞群体进行阳性或阴性选择的方法。细胞群体的选择方法可能包含亲和试剂,包括但不限于抗体、全长抗体、抗体片段、天然抗体、合成抗体、工程抗体、全长亲和体、亲和体片段、全长亲和素、亲和素片

段、全长anticalin、anticalin片段、全长avimer、avimer片段、全长DARPin、DARPin片段、全长fynomer、fynomer片段、全长kunitz结构域肽、kunitz结构域肽片段、全长单体、单体片段、肽或聚氨基酸。在一些实施例中,亲和试剂与检测试剂和/或纯化试剂直接偶联。在某些情况下,检测试剂和纯化试剂是相同的。在其他情况下,检测试剂和纯化试剂是不同的。例如,检测试剂和/或纯化试剂是荧光试剂、磁性试剂等。在某些情况下,检测试剂和/或纯化试剂是用于色谱柱纯化的磁粉。例如,可采用Miltenyi系统(CliniMACs)对色谱柱、抗体、缓冲液、制备材料和试剂进行磁性色谱柱纯化

[0095] 亲和试剂可以包含免疫亲和试剂,其利用抗体或其片段或衍生物的结合特异性来对目的细胞群体进行阳性或阴性选择。细胞群体的选择方法可以包含亲和剂和色谱柱,例如,利用特异性抗体和微珠进行的磁性激活细胞分选(MACS)。细胞群体的选择方法可以包含荧光激活细胞分选(FACS),其基于利用一种或多种荧光偶联抗体得到的染色谱对细胞群体进行分选。细胞群体的选择方法可以包含物理吸附,例如,使T细胞物理吸附在蛋白质配体(例如,凝集素)上。

[0096] 本发明所述的HSPC群体可以基于CD34的表达进行选择。例如,本发明所述的HSPC群体可以利用抗-CD34抗体进行选择,以作为磁性激活细胞分选(MACS)或荧光激活细胞分选(FACS)系统的一部分。

[0097] 举例而言,细胞群体中的HPSC数量可以通过流式细胞术量化CD34+细胞来确定。在一些实施例中,剂量计算结果可以基于细胞存活率测定值的量度来加以调整,例如,通过流式细胞术(采用碘化丙啶或7-AAD)或通过台盼蓝染色排除法确定存活率,

[0098] 本发明所述的包含Treg的细胞群体可以基于标志物的表达进行选择,所述标志物包括CD3、CD4、CD25、CD127、FOXP3及其组合。

[0099] 包含Treg的细胞群体可以利用磁性激活细胞分选(MACS)进行选择。包含Treg的细胞群体可以利用荧光激活细胞分选(FACS)进行选择。包含Treg的细胞群体可以通过多重程序进行选择,例如,多重MACS选择、多重FACS选择或MACS和FACS选择的组合。例如,可以进行首次选择以表达CD25,例如,利用MACS从造血细胞样品中分离出CD25+细胞。可以通过使CD25+细胞与对CD4和CD127具有特异性的抗体接触来进行第二次选择,其中可利用FACS来分离CD4+CD127dim细胞。

[0100] 包含Treg的细胞群体可从全血中分离出来。包含Treg的细胞群体可从外周血单采术产物中分离出来。包含Treg的细胞群体可从先前针对一种或多种其他细胞类型富集和/或耗竭的细胞群体中分离出来,例如,从CD34+细胞耗竭的细胞群体中分离出来。在一些实施例中,将Treg从CD34+MACS分选的流穿组分中分离出来。

[0101] 举例而言,细胞群体中的Treg数量可以通过流式细胞术来确定,其中可以将Treg鉴别为诸如CD4+CD25+CD127dim或CD4+FOXP3+等。剂量计算结果可以基于细胞存活率测定值的量度来加以调整,例如,通过流式细胞术(采用碘化丙啶或7-AAD)或通过台盼蓝染色排除法确定存活率,

[0102] Tcon群体可能源自于外周血。Tcon群体可能源自于外周血单采术产物。

[0103] 在一些实施例中,未执行任何选择步骤,而且Tcon群体直接源自于外周血或单采产物等分试样。在一些实施例中,可以针对Tcon富集细胞群体,例如,通过基于各种标志物的表达、采用MACS、FACS或其组合进行的分选富集。Tcon群体可以通过分选CD3+细胞富集。

Tcon群体可以通过分选CD4+和CD8+细胞富集。Tcon群体可以通过阴性选择富集,其中,去除非Tcon细胞,例如,通过MACS耗尽表达CD34、CD19、CD25或其组合的细胞去除。

[0104] 举例而言,群体中存在的Tcon数量可以通过流式细胞术量化CD3+细胞来加以量化。可以确定等分试样中CD3+细胞的数量,并确定包含向受体施用的适当剂量的CD3细胞的体积。剂量计算结果可以基于细胞存活率的量度来加以调整,例如,通过流式细胞术(采用碘化丙啶或7-AAD)或通过台盼蓝染色排除法确定存活率。

[0105] 本发明所述的单采术产物可分为两部分,一部分用于提供Tcon细胞,另一部分用于分离和纯化HSPC及Treg。在一些实施例中,CD34+细胞从单采术产物中分离出来并进行纯化,从而产生可从中分离出Treg的CD34-阴性细胞组分。

[0106] iNKT群体可能源自于外周血。iNKT群体可能源自于外周血单采术产物。

[0107] 可以针对iNKT富集细胞群体,例如,通过基于各种标志物的表达、采用MACS、FACS或其组合进行的分选富集。举例而言,iNKT群体可以通过分选$CD3^{+}V\alpha24J\alpha18^{+}$细胞富集。

[0108] 举例而言,群体中存在的iNKT数量可以通过流式细胞术量化$CD3^{+}V\alpha24J\alpha18^{+}$细胞来加以量化。可以确定等分试样中$CD3^{+}V\alpha24J\alpha18^{+}$细胞的数量,并确定包含向受体施用的适当剂量的iNKT的体积。在一些实施例中,剂量计算结果可以基于细胞存活率测定值的量度来加以调整,例如,通过流式细胞术(采用碘化丙啶或7-AAD)或通过台盼蓝染色排除法确定存活率。

[0109] Tmem群体可能源自于外周血。Tmem群体可能源自于外周血单采术产物。

[0110] 可以针对Tmem富集细胞群体,例如,通过基于各种标志物的表达、采用MACS、FACS或其组合进行的分选富集。举例而言,Tmem群体可以通过分选CD3+CD45RA-CD45RO+细胞富集。

[0111] 举例而言,群体中存在的Tmem数量可以通过流式细胞术量化CD3+CD45RA-CD45RO+细胞来加以量化。可以确定等分试样中CD3+CD45RA-CD45RO+细胞的数量,并确定包含向受体施用的适当剂量的Tmem的体积。剂量计算结果可以基于细胞存活率测定值的量度来加以调整,例如,通过流式细胞术(采用碘化丙啶或7-AAD)或通过台盼蓝染色排除法确定存活率。

[0112] 使用新鲜或冷冻保存的细胞

[0113] 本发明所述的细胞群体可在分离后于新鲜状态下施用,或在冷冻保存且后续解冻后施用。

[0114] 从供体中新鲜分离出来的细胞(“新鲜细胞”)可施用于受体受试者。新鲜细胞可存放在缓冲液中,例如,含0.5%人血清白蛋白的CliniMACS PBS-EDTA缓冲液,或含2%人血清白蛋白的pH 7.4Plasma-Lyte-A。新鲜细胞可置于低温(例如,2-8℃)下存放,但不得冷冻保存/冷冻。

[0115] 从供体中获得新鲜细胞群体后,所述新鲜细胞可在施用于受试者之前存放若干小时,所述存放时间至少大于约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、120、150、200、300小时或以上。

[0116] 从供体中获得新鲜细胞群体后,所述新鲜细胞可在施用于受试者之前存放若干小时,所述存放时间不超过约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、120、150、200、300小时或以下。

[0117] 本发明所述的细胞可冷冻保存。在一些实施例中,冷冻保存对于本发明所揭示的方法而言可能是有益的。例如,在后续解冻并施用于受试者之前,冷冻保存Tcon可以减少GVHD的发生。

[0118] 冷冻保存可能包含添加防腐剂(例如,DMSO),以及使细胞在可控速率冷冻箱中逐渐冷却,以防止冰晶形成过程中造成细胞渗透性损伤。冷冻保存可能包含市售冷冻保存试剂和物质,例如,冷袋和CryoStor®CS10。

[0119] 冷冻保存细胞可在低温下存放数小时至数年不等。冷冻保存细胞可在超低温下存放,例如,-50℃、-60℃、-70℃、-80℃、-90℃、-100℃、-110℃、-120℃、-130℃、-140℃、-150℃、-160℃、-170℃、-180℃、-190℃、-196℃或以下。冷冻保存细胞可存放在包含液氮的储存设备中。

[0120] 细胞可在本发明所述的其他方法实施之前或之后进行冷冻保存,例如,在分选方法实施之前或之后、在表征方法实施之前或之后(例如,确定细胞存活率或特定类型的细胞浓度)。

[0121] 在一些实施例中,全血可进行冷冻保存。全血可在未经分选或表征的情况下进行冷冻保存。全血可在分选后但未经表征的情况下进行冷冻保存;全血可在表征后但未经分选的情况下进行冷冻保存。全血可在表征和分选后进行冷冻保存。全血可在对本发明所述的一种细胞类型进行量化后予以冷冻保存。全血可在对常规T细胞(Tcon,例如,CD3+细胞)进行量化后予以冷冻保存。全血可在对本发明所述的所有细胞或一种细胞群体(例如,常规T细胞)的存活率进行量化后予以冷冻保存。

[0122] 本发明所述的外周血单采术产物可进行冷冻保存。外周血单采术产物可在未经分选或表征的情况下进行冷冻保存。外周血单采术产物可在分选后但未经表征的情况下进行冷冻保存。外周血单采术产物可在表征后但未经分选的情况下进行冷冻保存。外周血单采术产物可在表征和分选后进行冷冻保存。外周血单采术产物可在对本发明所述的一种细胞类型进行量化后予以冷冻保存。外周血单采术产物可在对常规T细胞(Tcon,例如,CD3+细胞)进行量化后予以冷冻保存。外周血单采术产物可在对本发明所述的所有细胞或一种细胞群体(例如,常规T细胞)的存活率进行量化后予以冷冻保存。

[0123] 可对从另一细胞群体中分选出或选择的细胞群体进行冷冻保存,例如,可对HSPC、Treg、Tcon、iNKT或Tmem群体进行冷冻保存。

[0124] 本发明所述的细胞可在任何时间段内进行冷冻保存。本发明所述的细胞可在解冻并施用于受试者之前冷冻保存若干小时,所述时间至少大于约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、

87、88、89、90、91、92、93、94、95或96小时或以上。

[0125] 本发明所述的细胞可在解冻并施用于受试者之前冷冻保存若干小时,所述时间不超过约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95或96小时或以下。

[0126] 本发明所述的细胞可在解冻并施用于受试者之前冷冻保存若干天,所述天数至少大于约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95或96天或以上。

[0127] 本发明所述的细胞可在解冻并施用于受试者之前冷冻保存若干天,所述天数不超过约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95或96天或以下。

[0128] 细胞施用

[0129] 施用顺序和时间

[0130] 本发明提供用于增强异基因造血干细胞移植的方法,包含向受试者施用细胞群体。

[0131] 在一些实施例中,向受试者施用造血干祖细胞(HSPC)群体、包含调节性T细胞(Treg)的细胞群体和常规T细胞(Tcon)群体。

[0132] 可以在相同或类似时间或不同时间施用HSPC群体和包含Treg的细胞群体。

[0133] 可以至多相隔约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47或48小时施用HSPC群体和包含Treg的细胞群体。

[0134] 可以在先向受试者施用HSPC群体后再施用Tcon群体。

[0135] 可以在先向受试者施用HSPC群体后若干小时再施用Tcon群体,所述时间至少大于约6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95或96小时。

[0136] 在一些实施例中,可以在先向受试者施用HSPC群体后若干小时再施用Tcon群体,所述时间不超过约6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95或96小时。

[0137] 可以在先向受试者施用HSPC群体后若干小时再施用Tcon群体,例如,所述时间范围约为6-96、12-84、12-72、12-66、12-60、12-54、12-48、12-42、12-36、12-30、12-24、12-18、

18-72、18-66、18-60、18-54、18-48、18-42、18-36、18-30、18-24、24-72、24-66、24-60、24-54、24-48、24-42、24-36、24-30、30-72、30-66、30-60、30-54、30-48、30-42、30-36、36-72、36-66、36-60、36-54、36-48、36-42、42-72、42-66、42-60、42-54、42-48、48-72、48-66、48-60、48-54、54-72、54-66、54-60、60-72、60-66或66-72小时。

[0138] 可以在先向受试者施用包含Treg的细胞群体后再施用Tcon群体。

[0139] 可以在先向受试者施用包含Treg的细胞群体后若干小时再施用Tcon群体,所述时间至少大于约6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95或96小时。

[0140] 在一些实施例中,可以在先向受试者施用包含Treg的细胞群体后若干小时再施用Tcon群体,所述时间不超过约6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95或96小时。

[0141] 可以在先向受试者施用Treg群体后若干小时再施用Tcon群体,例如,所述时间范围约为6-96、12-84、12-72、12-66、12-60、12-54、12-48、12-42、12-36、12-30、12-24、12-18、18-72、18-66、18-60、18-54、18-48、18-42、18-36、18-30、18-24、24-72、24-66、24-60、24-54、24-48、24-42、24-36、24-30、30-72、30-66、30-60、30-54、30-48、30-42、30-36、36-72、36-66、36-60、36-54、36-48、36-42、42-72、42-66、42-60、42-54、42-48、48-72、48-66、48-60、48-54、54-72、54-66、54-60、60-72、60-66或66-72小时。

[0142] 可以在先向受试者施用HSPC群体和包含Treg的细胞群体后再施用Tcon群体。

[0143] 可以在先向受试者施用HSPC群体和包含Treg的细胞群体后若干小时再施用Tcon群体,例如,所述时间至少大于约6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95或96小时。

[0144] 在一些实施例中,可以在先向受试者施用HSPC群体和包含Treg的细胞群体后若干小时再施用Tcon群体,所述时间不超过约6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95或96小时。

[0145] 可以在先向受试者施用HSPC群体和包含Treg的细胞群体后若干小时再施用Tcon群体,例如,所述时间范围约为6-96、12-84、12-72、12-66、12-60、12-54、12-48、12-42、12-36、12-30、12-24、12-18、18-72、18-66、18-60、18-54、18-48、18-42、18-36、18-30、18-24、24-72、24-66、24-60、24-54、24-48、24-42、24-36、24-30、30-72、30-66、30-60、30-54、30-48、30-42、30-36、36-72、36-66、36-60、36-54、36-48、36-42、42-72、42-66、42-60、42-54、42-48、48-72、48-66、48-60、48-54、54-72、54-66、54-60、60-72、60-66或66-72小时。

[0146] 在一些实施例中,向受试者施用造血干祖细胞(HSPC)群体、包含调节性T细胞(Treg)的细胞群体、常规T细胞(Tcon)群体和恒定自然杀伤T细胞(iNKT)群体。

[0147] 可以在相同时间或类似时间向受试者施用iNKT群体和HSPC群体。在一些实施例中,在先向受试者施用HSPC群体后再施用iNKT群体。

[0148] 可以在先向受试者施用HSPC群体后若干小时再施用iNKT群体,所述时间至少大于约6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95或96小时。

[0149] 在一些实施例中,在先向受试者施用HSPC群体后若干小时再施用iNKT群体,所述时间不超过约6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95或96小时。

[0150] 可以在先向受试者施用HSPC群体后若干小时再施用iNKT群体,例如,所述时间范围约为6-96、12-84、12-72、12-66、12-60、12-54、12-48、12-42、12-36、12-30、12-24、12-18、18-72、18-66、18-60、18-54、18-48、18-42、18-36、18-30、18-24、24-72、24-66、24-60、24-54、24-48、24-42、24-36、24-30、30-72、30-66、30-60、30-54、30-48、30-42、30-36、36-72、36-66、36-60、36-54、36-48、36-42、42-72、42-66、42-60、42-54、42-48、48-72、48-66、48-60、48-54、54-72、54-66、54-60、60-72、60-66或66-72小时。

[0151] 可以在相同时间或类似时间向受试者施用iNKT群体和包含Treg的细胞群体。在一些实施例中,在先向受试者施用包含Treg的细胞群体后再施用iNKT群体。

[0152] 可以在先向受试者施用包含Treg的细胞群体后若干小时再施用iNKT群体,所述时间至少大于约6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95或96小时。

[0153] 在一些实施例中,在先向受试者施用包含Treg的细胞群体后若干小时再施用iNKT群体,所述时间不超过约6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95或96小时。

[0154] 可以在先向受试者施用Treg群体后若干小时再施用iNKT群体,例如,所述时间范围约为6-96、12-84、12-72、12-66、12-60、12-54、12-48、12-42、12-36、12-30、12-24、12-18、18-72、18-66、18-60、18-54、18-48、18-42、18-36、18-30、18-24、24-72、24-66、24-60、24-54、24-48、24-42、24-36、24-30、30-72、30-66、30-60、30-54、30-48、30-42、30-36、36-72、36-66、36-60、36-54、36-48、36-42、42-72、42-66、42-60、42-54、42-48、48-72、48-66、48-60、48-54、54-72、54-66、54-60、60-72、60-66或66-72小时。

[0155] 在一些实施例中,向受试者施用造血干祖细胞(HSPC)群体、包含调节性T细胞

(Treg)的细胞群体、常规T细胞(Tcon)群体和记忆T细胞(Tmem)群体。

[0156] 可以在相同时间或类似时间向受试者施用Tmem群体和HSPC群体。在一些实施例中,在先向受试者施用HSPC群体后再施用Tmem群体。

[0157] 可以在先向受试者施用HSPC群体后若干小时再施用Tmem群体,所述时间至少大于约6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95或96小时。

[0158] 在一些实施例中,在先向受试者施用HSPC群体后若干小时再施用Tmem群体,所述时间不超过约6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95或96小时。

[0159] 可以在先向受试者施用HSPC群体后若干小时再施用Tmem群体,例如,所述时间范围约为6-96、12-84、12-72、12-66、12-60、12-54、12-48、12-42、12-36、12-30、12-24、12-18、18-72、18-66、18-60、18-54、18-48、18-42、18-36、18-30、18-24、24-72、24-66、24-60、24-54、24-48、24-42、24-36、24-30、30-72、30-66、30-60、30-54、30-48、30-42、30-36、36-72、36-66、36-60、36-54、36-48、36-42、42-72、42-66、42-60、42-54、42-48、48-72、48-66、48-60、48-54、54-72、54-66、54-60、60-72、60-66或66-72小时。

[0160] 可以在相同时间或类似时间向受试者施用Tmem群体和包含Treg的细胞群体。在一些实施例中,在先向受试者施用包含Treg的细胞群体后再施用Tmem群体。

[0161] 可以在先向受试者施用包含Treg的细胞群体后若干小时再施用Tmem群体,所述时间至少大于约6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95或96小时。

[0162] 在一些实施例中,在先向受试者施用包含Treg的细胞群体后若干小时再施用Tmem群体,所述时间不超过约6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95或96小时。

[0163] 可以在先向受试者施用Treg群体后若干小时再施用Tmem群体,例如,所述时间范围约为6-96、12-84、12-72、12-66、12-60、12-54、12-48、12-42、12-36、12-30、12-24、12-18、18-72、18-66、18-60、18-54、18-48、18-42、18-36、18-30、18-24、24-72、24-66、24-60、24-54、24-48、24-42、24-36、24-30、30-72、30-66、30-60、30-54、30-48、30-42、30-36、36-72、36-66、36-60、36-54、36-48、36-42、42-72、42-66、42-60、42-54、42-48、48-72、48-66、48-60、48-54、54-72、54-66、54-60、60-72、60-66或66-72小时。

[0164] 剂量

[0165] HSPC

[0166] 可以按照一定剂量向受试者施用HPSC群体,所述剂量至少大于约每千克受体体重1×10^4、1×10^5、5×10^5、6×10^5、7×10^5、8×10^5、9×10^5、1×10^6、1.1×10^6、1.2×10^6、1.3×10^6、1.4×10^6、1.5×10^6、1.6×10^6、1.7×10^6、1.8×10^6、1.9×10^6、2×10^6、2.1×10^6、2.2×10^6、2.3×10^6、2.4×10^6、2.5×10^6、2.6×10^6、2.7×10^6、2.8×10^6、2.9×10^6、3×10^6、3.1×10^6、3.2×10^6、3.3×10^6、3.4×10^6、3.5×10^6、3.6×10^6、3.7×10^6、3.8×10^6、3.9×10^6、4×10^6、4.1×10^6、4.2×10^6、4.3×10^6、4.4×10^6、4.5×10^6、4.6×10^6、4.7×10^6、4.8×10^6、4.9×10^6、5×10^6、5.1×10^6、5.2×10^6、5.3×10^6、5.4×10^6、5.5×10^6、5.6×10^6、5.7×10^6、5.8×10^6、5.9×10^6、6×10^6、6.5×10^6、7×10^6、7.5×10^6、8×10^6、8.5×10^6、9×10^6、9.5×10^6、1×10^7、1.5×10^7、2×10^7、2.5×10^7、3×10^7、3.5×10^7、4×10^7、4.5×10^7、5×10^7、5.5×10^7、6×10^7、6.5×10^7、7×10^7、7.5×10^7、8×10^7、8.5×10^7、9×10^7、9.5×10^7、1×10^8、1×10^8、1.5×10^8、2×10^8、2.5×10^8、3×10^8、3.5×10^8、4×10^7、4.5×10^8、5×10^8、5.5×10^8、6×10^8、6.5×10^8、7×10^8、7.5×10^8、8×10^8、8.5×10^8、9×10^8、9.5×10^8、1×10^9或以上个细胞。

[0167] 在一些实施例中,可以按照一定剂量向受试者施用HPSC群体,所述剂量不超过约每千克受体体重1×10^4、1×10^5、5×10^5、6×10^5、7×10^5、8×10^5、9×10^5、1×10^6、1.1×10^6、1.2×10^6、1.3×10^6、1.4×10^6、1.5×10^6、1.6×10^6、1.7×10^6、1.8×10^6、1.9×10^6、2×10^6、2.1×10^6、2.2×10^6、2.3×10^6、2.4×10^6、2.5×10^6、2.6×10^6、2.7×10^6、2.8×10^6、2.9×10^6、3×10^6、3.1×10^6、3.2×10^6、3.3×10^6、3.4×10^6、3.5×10^6、3.6×10^6、3.7×10^6、3.8×10^6、3.9×10^6、4×10^6、4.1×10^6、4.2×10^6、4.3×10^6、4.4×10^6、4.5×10^6、4.6×10^6、4.7×10^6、4.8×10^6、4.9×10^6、5×10^6、5.1×10^6、5.2×10^6、5.3×10^6、5.4×10^6、5.5×10^6、5.6×10^6、5.7×10^6、5.8×10^6、5.9×10^6、6×10^6、6.5×10^6、7×10^6、7.5×10^6、8×10^6、8.5×10^6、9×10^6、9.5×10^6、1×10^7、1.5×10^7、2×10^7、2.5×10^7、3×10^7、3.5×10^7、4×10^7、4.5×10^7、5×10^7、5.5×10^7、6×10^7、6.5×10^7、7×10^7、7.5×10^7、8×10^7、8.5×10^7、9×10^7、9.5×10^7、1×10^8、1×10^8、1.5×10^8、2×10^8、2.5×10^8、3×10^8、3.5×10^8、4×10^7、4.5×10^8、5×10^8、5.5×10^8、6×10^8、6.5×10^8、7×10^8、7.5×10^8、8×10^8、8.5×10^8、9×10^8、9.5×10^8、1×10^9或以下个细胞。

[0168] 可以按照一定剂量向受试者施用HPSC群体,例如,所述剂量至少大于约每千克受体体重1×10^4、1×10^5、5×10^5、6×10^5、7×10^5、8×10^5、9×10^5、1×10^6、1.1×10^6、1.2×10^6、1.3×10^6、1.4×10^6、1.5×10^6、1.6×10^6、1.7×10^6、1.8×10^6、1.9×10^6、2×10^6、2.1×10^6、2.2×10^6、2.3×10^6、2.4×10^6、2.5×10^6、2.6×10^6、2.7×10^6、2.8×10^6、2.9×10^6、3×10^6、3.1×10^6、3.2×10^6、3.3×10^6、3.4×10^6、3.5×10^6、3.6×10^6、3.7×10^6、3.8×10^6、3.9×10^6、4×10^6、4.1×10^6、4.2×10^6、4.3×10^6、4.4×10^6、4.5×10^6、4.6×10^6、4.7×10^6、4.8×10^6、4.9×10^6、5×10^6、5.1×10^6、5.2×10^6、5.3×10^6、5.4×10^6、5.5×10^6、5.6×10^6、5.7×10^6、5.8×10^6、5.9×10^6、6×10^6、6.5×10^6、7×10^6、7.5×10^6、8×10^6、8.5×10^6、9×10^6、9.5×10^6、1×10^7、1.5×10^7、2×10^7、2.5×10^7、3×10^7、3.5×10^7、4×10^7、4.5×10^7、5×10^7、5.5×10^7、6×10^7、6.5×10^7、7×10^7、7.5×10^7、8×10^7、8.5×10^7、9×10^7、9.5×10^7、1×10^8、1×10^8、1.5×10^8、2×10^8、2.5×10^8、3×10^8、3.5×10^8、4×10^7、4.5×10^8、5×10^8、5.5×10^8、6×10^8、6.5×10^8、7×10^8、7.5×10^8、8×10^8、8.5×10^8、9×10^8、9.5×10^8、1×10^9或以上个CD34+细胞。

[0169] 可以按照一定剂量向受试者施用HPSC群体,所述剂量不超过约每千克受体体重1

$\times10^4$、1×10^5、5×10^5、6×10^5、7×10^5、8×10^5、9×10^5、1×10^6、1.1×10^6、1.2×10^6、1.3×10^6、1.4×10^6、1.5×10^6、1.6×10^6、1.7×10^6、1.8×10^6、1.9×10^6、2×10^6、2.1×10^6、2.2×10^6、2.3×10^6、2.4×10^6、2.5×10^6、2.6×10^6、2.7×10^6、2.8×10^6、2.9×10^6、3×10^6、3.1×10^6、3.2×10^6、3.3×10^6、3.4×10^6、3.5×10^6、3.6×10^6、3.7×10^6、3.8×10^6、3.9×10^6、4×10^6、4.1×10^6、4.2×10^6、4.3×10^6、4.4×10^6、4.5×10^6、4.6×10^6、4.7×10^6、4.8×10^6、4.9×10^6、5×10^6、5.1×10^6、5.2×10^6、5.3×10^6、5.4×10^6、5.5×10^6、5.6×10^6、5.7×10^6、5.8×10^6、5.9×10^6、6×10^6、6.5×10^6、7×10^6、7.5×10^6、8×10^6、8.5×10^6、9×10^6、9.5×10^6、1×10^7、1.5×10^7、2×10^7、2.5×10^7、3×10^7、3.5×10^7、4×10^7、4.5×10^7、5×10^7、5.5×10^7、6×10^7、6.5×10^7、7×10^7、7.5×10^7、8×10^7、8.5×10^7、9×10^7、9.5×10^7、1×10^8、1×10^8、1.5×10^8、2×10^8、2.5×10^8、3×10^8、3.5×10^8、4×10^7、4.5×10^8、5×10^8、5.5×10^8、6×10^8、6.5×10^8、7×10^8、7.5×10^8、8×10^8、8.5×10^8、9×10^8、9.5×10^8、1×10^9或以下个CD34+细胞。

[0170] 例如,可以按照一定剂量向受试者施用HPSC群体,所述剂量范围为每千克受体体重1×10^4至1×10^9、1×10^5至1×10^8、1×10^5至2×10^7、5×10^5至2×10^7、5×10^5至1.5×10^7、5×10^5至1×10^7、5×10^5至9×10^6、5×10^5至8×10^6、5×10^5至7×10^6、5×10^5至6×10^6、5×10^5至5×10^6、5×10^5至4×10^6、5×10^5至3×10^6、5×10^5至2×10^6、5×10^5至1×10^6、1×10^6至1.5×10^7、1×10^6至1×10^7、1×10^6至9×10^6、1×10^6至8×10^6、1×10^6至7×10^6、1×10^6至6×10^6、1×10^6至5×10^6、1×10^6至4×10^6、1×10^6至3×10^6、1×10^6至2×10^6、1.5×10^6至1.5×10^7、1.5×10^6至1×10^7、1.5×10^6至9×10^6、1.5×10^6至8×10^6、1.5×10^6至7×10^6、1.5×10^6至6×10^6、1.5×10^6至5×10^6、1.5×10^6至4×10^6、1.5×10^6至3×10^6、1.5×10^6至2×10^6、2×10^6至1.5×10^7、2×10^6至1×10^7、2×10^6至9×10^6、2×10^6至8×10^6、2×10^6至7×10^6、2×10^6至6×10^6、2×10^6至5×10^6、2×10^6至4×10^6、2×10^6至3×10^6、2.5×10^6至1.5×10^7、2.5×10^6至1×10^7、2.5×10^6至9×10^6、2.5×10^6至8×10^6、2.5×10^6至7×10^6、2.5×10^6至6×10^6、2.5×10^6至5×10^6、2.5×10^6至4×10^6或2.5×10^6至3×10^6个细胞。

[0171] 可以按照一定剂量向受试者施用HPSC群体,例如,所述剂量范围为每千克受体体重1×10^4至1×10^9、1×10^5至1×10^8、1×10^5至2×10^7、5×10^5至2×10^7、5×10^5至1.5×10^7、5×10^5至1×10^7、5×10^5至9×10^6、5×10^5至8×10^6、5×10^5至7×10^6、5×10^5至6×10^6、5×10^5至5×10^6、5×10^5至4×10^6、5×10^5至3×10^6、5×10^5至2×10^6、5×10^5至1×10^6、1×10^6至1.5×10^7、1×10^6至1×10^7、1×10^6至9×10^6、1×10^6至8×10^6、1×10^6至7×10^6、1×10^6至6×10^6、1×10^6至5×10^6、1×10^6至4×10^6、1×10^6至3×10^6、1×10^6至2×10^6、1.5×10^6至1.5×10^7、1.5×10^6至1×10^7、1.5×10^6至9×10^6、1.5×10^6至8×10^6、1.5×10^6至7×10^6、1.5×10^6至6×10^6、1.5×10^6至5×10^6、1.5×10^6至4×10^6、1.5×10^6至3×10^6、1.5×10^6至2×10^6、2×10^6至1.5×10^7、2×10^6至1×10^7、2×10^6至9×10^6、2×10^6至8×10^6、2×10^6至7×10^6、2×10^6至6×10^6、2×10^6至5×10^6、2×10^6至4×10^6、2×10^6至3×10^6、2.5×10^6至1.5×10^7、2.5×10^6至1×10^7、2.5×10^6至9×10^6、2.5×10^6至8×10^6、2.5×10^6至7×10^6、2.5×10^6至6×10^6、2.5×10^6至5×10^6、2.5×10^6至4×10^6或2.5×10^6至3×10^6个CD34+细胞。

[0172] 本发明所述的HSPC群体可以具有限定的CD34+细胞纯度水平。

[0173] 例如,本发明所述的HSPC群体可以包含在总细胞、有核细胞或CD45+细胞数中占一定比例的CD34+细胞,所述比例至少大于约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、

64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或以上。

[0174] 在一些实施例中,本发明所述的HSPC群体包含在总细胞、有核细胞或CD45+细胞数中占一定比例的CD34+细胞,所述比例不超过约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或以下。

[0175] 本发明所述的HSPC群体可以具有限定水平的污染CD3+细胞。

[0176] 例如,本发明所述的HSPC群体中存在一定量的CD3+细胞,所述量使得每千克受体体重获得的CD3+细胞数至少大于约1×10^2、2×10^2、3×10^2、4×10^2、5×10^2、6×10^2、7×10^2、8×10^2、9×10^2、1×10^3、2×10^3、3×10^3、4×10^3、5×10^3、6×10^3、7×10^3、8×10^3、9×10^3、1×10^4、2×10^4、3×10^4、4×10^4、5×10^4、6×10^4、7×10^4、8×10^4、9×10^4、1×10^5或以上。

[0177] 在一些实施例中,本发明所述的HSPC群体中存在一定量的CD3+细胞,所述量使得每千克受体体重获得的CD3+细胞数不超过约1×10^2、2×10^2、3×10^2、4×10^2、5×10^2、6×10^2、7×10^2、8×10^2、9×10^2、1×10^3、2×10^3、3×10^3、4×10^3、5×10^3、6×10^3、7×10^3、8×10^3、9×10^3、1×10^4、2×10^4、3×10^4、4×10^4、5×10^4、6×10^4、7×10^4、8×10^4、9×10^4、1×10^5或以下。

[0178] 本发明所述的HSPC群体可以包含在总细胞、有核细胞或CD45+细胞数中占一定比例的CD3+细胞,所述比例至少大于约0.001%、0.002%、0.003%、0.004%、0.005%、0.006%、0.007%、0.008%、0.009%、0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07%、0.08%、0.09%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、1.1%、1.2%、1.3%、1.4%、1.5%、1.6%、1.7%、1.8%、1.9%、2%、2.1%、2.2%、2.3%、2.4%、2.5%、2.6%、2.7%、2.8%、2.9%、3%、3.1%、3.2%、3.3%、3.4%、3.5%、3.6%、3.7%、3.8%、3.9%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%或以上。

[0179] 在一些实施例中,本发明所述的HSPC群体包含在总细胞、有核细胞或CD45+细胞数中占一定比例的CD3+细胞,所述比例不超过约0.001%、0.002%、0.003%、0.004%、0.005%、0.006%、0.007%、0.008%、0.009%、0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07%、0.08%、0.09%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、1.1%、1.2%、1.3%、1.4%、1.5%、1.6%、1.7%、1.8%、1.9%、2%、2.1%、2.2%、2.3%、2.4%、2.5%、2.6%、2.7%、2.8%、2.9%、3%、3.1%、3.2%、3.3%、3.4%、3.5%、3.6%、3.7%、3.8%、3.9%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%或以下。

[0180] Treg

[0181] 可以按照一定剂量向受试者施用包含Treg的细胞群体,所述剂量至少大于约每千克受体体重1×10^4、1×10^5、2×10^5、3×10^5、4×10^5、5×10^5、6×10^5、7×10^5、8×10^5、9×10^5、1×10^6、1.1×10^6、1.2×10^6、1.3×10^6、1.4×10^6、1.5×10^6、1.6×10^6、1.7×10^6、1.8×10^6、1.9×10^6、2×10^6、2.1×10^6、2.2×10^6、2.3×10^6、2.4×10^6、2.5×10^6、2.6×10^6、2.7×10^6、2.8×10^6、2.9×10^6、3×10^6、3.1×10^6、3.2×10^6、3.3×10^6、3.4×10^6、3.5×10^6、3.6×10^6、

3.7×10^6、3.8×10^6、3.9×10^6、4×10^6、4.1×10^6、4.2×10^6、4.3×10^6、4.4×10^6、4.5×10^6、4.6×10^6、4.7×10^6、4.8×10^6、4.9×10^6、5×10^6、5.1×10^6、5.2×10^6、5.3×10^6、5.4×10^6、5.5×10^6、5.6×10^6、5.7×10^6、5.8×10^6、5.9×10^6、6×10^6、6.5×10^6、7×10^6、7.5×10^6、8×10^6、8.5×10^6、9×10^6、9.5×10^6、1×10^7、1.5×10^7、2×10^7、2.5×10^7、3×10^7、3.5×10^7、4×10^7、4.5×10^7、5×10^7、5.5×10^7、6×10^7、6.5×10^7、7×10^7、7.5×10^7、8×10^7、8.5×10^7、9×10^7、9.5×10^7、1×10^8、1×10^8、1.5×10^8、2×10^8、2.5×10^8、3×10^8、3.5×10^8、4×10^7、4.5×10^8、5×10^8、5.5×10^8、6×10^8、6.5×10^8、7×10^8、7.5×10^8、8×10^8、8.5×10^8、9×10^8、9.5×10^8、1×10^9或以上个细胞。

[0182] 在一些实施例中,可以按照一定剂量向受试者施用包含Treg的细胞群体,所述剂量不超过约每千克受体体重1×10^4、1×10^5、2×10^5、3×10^5、4×10^5、5×10^5、6×10^5、7×10^5、8×10^5、9×10^5、1×10^6、1.1×10^6、1.2×10^6、1.3×10^6、1.4×10^6、1.5×10^6、1.6×10^6、1.7×10^6、1.8×10^6、1.9×10^6、2×10^6、2.1×10^6、2.2×10^6、2.3×10^6、2.4×10^6、2.5×10^6、2.6×10^6、2.7×10^6、2.8×10^6、2.9×10^6、3×10^6、3.1×10^6、3.2×10^6、3.3×10^6、3.4×10^6、3.5×10^6、3.6×10^6、3.7×10^6、3.8×10^6、3.9×10^6、4×10^6、4.1×10^6、4.2×10^6、4.3×10^6、4.4×10^6、4.5×10^6、4.6×10^6、4.7×10^6、4.8×10^6、4.9×10^6、5×10^6、5.1×10^6、5.2×10^6、5.3×10^6、5.4×10^6、5.5×10^6、5.6×10^6、5.7×10^6、5.8×10^6、5.9×10^6、6×10^6、6.5×10^6、7×10^6、7.5×10^6、8×10^6、8.5×10^6、9×10^6、9.5×10^6、1×10^7、1.5×10^7、2×10^7、2.5×10^7、3×10^7、3.5×10^7、4×10^7、4.5×10^7、5×10^7、5.5×10^7、6×10^7、6.5×10^7、7×10^7、7.5×10^7、8×10^7、8.5×10^7、9×10^7、9.5×10^7、1×10^8、1×10^8、1.5×10^8、2×10^8、2.5×10^8、3×10^8、3.5×10^8、4×10^7、4.5×10^8、5×10^8、5.5×10^8、6×10^8、6.5×10^8、7×10^8、7.5×10^8、8×10^8、8.5×10^8、9×10^8、9.5×10^8、1×10^9或以下个细胞。

[0183] 可以按照一定剂量向受试者施用包含Treg的细胞群体,例如,所述剂量至少大于约每千克受体体重1×10^5、2×10^5、3×10^5、4×10^5、5×10^5、6×10^5、7×10^5、8×10^5、9×10^5、1×10^6、1.1×10^6、1.2×10^6、1.3×10^6、1.4×10^6、1.5×10^6、1.6×10^6、1.7×10^6、1.8×10^6、1.9×10^6、2×10^6、2.1×10^6、2.2×10^6、2.3×10^6、2.4×10^6、2.5×10^6、2.6×10^6、2.7×10^6、2.8×10^6、2.9×10^6、3×10^6、3.1×10^6、3.2×10^6、3.3×10^6、3.4×10^6、3.5×10^6、3.6×10^6、3.7×10^6、3.8×10^6、3.9×10^6、4×10^6、4.1×10^6、4.2×10^6、4.3×10^6、4.4×10^6、4.5×10^6、4.6×10^6、4.7×10^6、4.8×10^6、4.9×10^6、5×10^6、5.1×10^6、5.2×10^6、5.3×10^6、5.4×10^6、5.5×10^6、5.6×10^6、5.7×10^6、5.8×10^6、5.9×10^6、6×10^6、6.5×10^6、7×10^6、7.5×10^6、8×10^6、8.5×10^6、9×10^6、9.5×10^6、1×10^7、1.5×10^7、2×10^7、2.5×10^7、3×10^7、3.5×10^7、4×10^7、4.5×10^7、5×10^7、5.5×10^7、6×10^7、6.5×10^7、7×10^7、7.5×10^7、8×10^7、8.5×10^7、9×10^7、9.5×10^7、1×10^8、1×10^8、1.5×10^8、2×10^8、2.5×10^8、3×10^8、3.5×10^8、4×10^7、4.5×10^8、5×10^8、5.5×10^8、6×10^8、6.5×10^8、7×10^8、7.5×10^8、8×10^8、8.5×10^8、9×10^8、9.5×10^8、1×10^9或以上个Treg,其中Treg被限定为CD4+CD25+CD127dim、CD3+CD4+CD25+、CD3+CD4+CD25+CD127dim、CD3+CD4+CD25+CD127dim FOXP3+、CD3+FOXP3+、CD3+CD4+FOXP3+、CD3+CD4+CD25+FOXP3+、CD3+CD25+FOXP3+、CD3+CD25+CD127dim、CD4+CD25+、CD4+CD25+CD127dimFOXP3+、FOXP3+、CD4+FOXP3+、CD4+CD25+FOXP3+、CD25+FOXP3+或CD25+CD127dim。

[0184] 可以按照一定剂量向受试者施用包含Treg的细胞群体,例如,所述剂量不超过约每千克受体体重1×10^4、1×10^5、5×10^5、6×10^5、7×10^5、8×10^5、9×10^5、1×10^6、1.1×10^6、

1.2×10^6、1.3×10^6、1.4×10^6、1.5×10^6、1.6×10^6、1.7×10^6、1.8×10^6、1.9×10^6、2×10^6、2.1×10^6、2.2×10^6、2.3×10^6、2.4×10^6、2.5×10^6、2.6×10^6、2.7×10^6、2.8×10^6、2.9×10^6、3×10^6、3.1×10^6、3.2×10^6、3.3×10^6、3.4×10^6、3.5×10^6、3.6×10^6、3.7×10^6、3.8×10^6、3.9×10^6、4×10^6、4.1×10^6、4.2×10^6、4.3×10^6、4.4×10^6、4.5×10^6、4.6×10^6、4.7×10^6、4.8×10^6、4.9×10^6、5×10^6、5.1×10^6、5.2×10^6、5.3×10^6、5.4×10^6、5.5×10^6、5.6×10^6、5.7×10^6、5.8×10^6、5.9×10^6、6×10^6、6.5×10^6、7×10^6、7.5×10^6、8×10^6、8.5×10^6、9×10^6、9.5×10^6、1×10^7、1.5×10^7、2×10^7、2.5×10^7、3×10^7、3.5×10^7、4×10^7、4.5×10^7、5×10^7、5.5×10^7、6×10^7、6.5×10^7、7×10^7、7.5×10^7、8×10^7、8.5×10^7、9×10^7、9.5×10^7、1×10^8、1×10^8、1.5×10^8、2×10^8、2.5×10^8、3×10^8、3.5×10^8、4×10^7、4.5×10^8、5×10^8、5.5×10^8、6×10^8、6.5×10^8、7×10^8、7.5×10^8、8×10^8、8.5×10^8、9×10^8、9.5×10^8、1×10^9或以下个Treg,其中Treg被限定为CD4+CD25+CD127dim、CD3+CD4+CD25+、CD3+CD4+CD25+CD127dim、CD3+CD4+CD25+CD127dim FOXP3+、CD3+FOXP3+、CD3+CD4+FOXP3+、CD3+CD4+CD25+FOXP3+、CD3+CD25+FOXP3+、CD3+CD25+CD127dim、CD4+CD25+、CD4+CD25+CD127dimFOXP3+、FOXP3+、CD4+FOXP3+、CD4+CD25+FOXP3+、CD25+FOXP3+或CD25+CD127dim。

[0185] 可以按照一定剂量向受试者施用包含Treg的细胞群体,所述剂量范围为每千克受体体重1×10^4至1×10^9、1×10^5至1×10^8、1×10^5至1×10^7、5×10^5至1×10^7、5×10^5至5×10^6、5×10^5至4×10^6、5×10^5至3×10^6、5×10^5至2×10^6、5×10^5至1×10^6、1×10^6至1×10^7、1×10^6至5×10^6、1×10^6至4×10^6、1×10^6至3×10^6、1×10^6至2×10^6、1×10^6至1.5×10^6、1.5×10^6至1×10^7、1.5×10^6至5×10^6、1.5×10^6至4×10^6、1.5×10^6至3×10^6、1.5×10^6至2×10^6、2×10^6至1×10^7、2×10^6至5×10^6、2×10^6至4×10^6、2×10^6至3×10^6、2×10^6至1×10^7、2×10^6至5×10^6、2×10^6至4×10^6、2×10^6至3×10^6、2×10^6至2×10^6、2.5×10^6至1×10^7、2.5×10^6至5×10^6、2.5×10^6至4×10^6或2.5×10^6至3×10^6个细胞。

[0186] 在一些实施例中,可以按照一定剂量向受试者施用包含Treg的细胞群体,所述剂量范围为每千克受体体重1×10^4至1×10^9、1×10^5至1×10^8、1×10^5至1×10^7、5×10^5至1×10^7、5×10^5至5×10^6、5×10^5至4×10^6、5×10^5至3×10^6、5×10^5至2×10^6、5×10^5至1×10^6、1×10^6至1×10^7、1×10^6至5×10^6、1×10^6至4×10^6、1×10^6至3×10^6、1×10^6至2×10^6、1×10^6至1.5×10^6、1.5×10^6至1×10^7、1.5×10^6至5×10^6、1.5×10^6至4×10^6、1.5×10^6至3×10^6、1.5×10^6至2×10^6、2×10^6至1×10^7、2×10^6至5×10^6、2×10^6至4×10^6、2×10^6至3×10^6、2×10^6至1×10^7、2×10^6至5×10^6、2×10^6至4×10^6、2×10^6至3×10^6、2×10^6至2×10^6、2.5×10^6至1×10^7、2.5×10^6至5×10^6、2.5×10^6至4×10^6或2.5×10^6至3×10^6个Treg,其中Treg被限定为CD4+CD25+CD127dim、CD3+CD4+CD25+、CD3+CD4+CD25+CD127dim、CD3+CD4+CD25+CD127dim FOXP3+、CD3+FOXP3+、CD3+CD4+FOXP3+、CD3+CD4+CD25+FOXP3+、CD3+CD25+FOXP3+、CD3+CD25+CD127dim、CD4+CD25+、CD4+CD25+CD127dimFOXP3+、FOXP3+、CD4+FOXP3+、CD4+CD25+FOXP3+、CD25+FOXP3+或CD25+CD127dim。

[0187] 本发明所述的包含Treg的细胞群体可以包含在总细胞、有核细胞或CD45+细胞数中占一定比例的FOXP3+细胞,例如,所述比例至少大于约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、

92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或以上。

[0188] 在一些实施例中,本发明所述的包含Treg的细胞群体包含在总细胞、有核细胞或CD45+细胞数中占一定比例的FOXP3+细胞,所述比例不超过约50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或以下。

[0189] 本发明所述的包含Treg的细胞群体可以包含在总细胞、有核细胞或CD45+细胞数中占一定比例的CD4+CD25+CD127dim细胞,例如,所述比例至少大于约50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或以下。

[0190] 在一些实施例中,本发明所述的包含Treg的细胞群体包含在总细胞、有核细胞或CD45+细胞数中占一定比例的CD4+CD25+CD127dim细胞,所述比例不超过约50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或以下。

[0191] 例如,本发明所述的包含Treg的细胞群体可以包含在总细胞、有核细胞或CD45+细胞数中占一定比例的Treg,所述比例至少大于约50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或以上,其中Treg被限定为CD4+CD25+CD127dim、CD3+CD4+CD25+、CD3+CD4+CD25+CD127dim、CD3+CD4+CD25+CD127dim FOXP3+、CD3+FOXP3+、CD3+CD4+FOXP3+、CD3+CD4+CD25+FOXP3+、CD3+CD25+FOXP3+、CD3+CD25+CD127dim、CD4+CD25+、CD4+CD25+CD127dimFOXP3+、FOXP3+、CD4+FOXP3+、CD4+CD25+FOXP3+、CD25+FOXP3+或CD25+CD127dim。

[0192] 在一些实施例中,本发明所述的包含Treg的细胞群体包含在总细胞、有核细胞或CD45+细胞数中占一定比例的Treg,所述比例不超过约50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或以下,其中Treg被限定为CD4+CD25+CD127dim、CD3+CD4+CD25+、CD3+CD4+CD25+CD127dim、CD3+CD4+CD25+CD127dim FOXP3+、CD3+FOXP3+、CD3+CD4+FOXP3+、CD3+CD4+CD25+FOXP3+、CD3+CD25+FOXP3+、CD3+CD25+CD127dim、CD4+CD25+、CD4+CD25+CD127dimFOXP3+、FOXP3+、CD4+FOXP3+、CD4+CD25+FOXP3+、CD25+FOXP3+或CD25+CD127dim。

[0193] 本发明所述的包含Treg的细胞群体可以包含在有核细胞或CD45+细胞数中占一定比例的FOXP3+细胞,例如,所述比例范围为50%至100%、60%至100%、70%至100%、75%

至100％、80％至100％、81％至100％、82％至100％、83％至100％、84％至100％、84％至100％、86％至100％、87％至100％、88％至100％、89％至100％、90％至91％、92％至100％、93％至100％、94％至100％、95％至100％、96％至100％、97％至100％、98％至100％、99％至100％、99.5％至100％、50％至99％、60％至99％、70％至99％、80％至99％、81％至99％、82％至99％、83％至99％、84％至99％、85％至99％、86％至99％、87％至99％、88％至99％、89％至99％、90％至99％、91％至99％、92％至99％、94％至99％、95％至99％、96％至97％、98％至99％、50％至98％、60％至98％、70％至98％、80％至98％、81％至98％、82％至98％、83％至98％、84％至98％、85％至98％、86％至98％、87％至98％、88％至98％、89％至98％、90％至98％、91％至98％、92％至98％、94％至98％、95％至98％、96％至97％、98％至98％、50％至97％、60％至97％、70％至97％、80％至97％、81％至97％、82％至97％、83％至97％、84％至97％、85％至97％、86％至97％、87％至97％、88％至97％、89％至97％、90％至97％、91％至97％、92％至97％、94％至97％、95％至97％、96％至97％、50％至96％、60％至96％、70％至96％、80％至96％、81％至96％、82％至96％、83％至96％、84％至96％、85％至96％、86％至96％、87％至96％、88％至96％、89％至96％、90％至96％、91％至96％、92％至96％、94％至96％、95％至96％、50％至95％、60％至95％、70％至95％、80％至95％、81％至95％、82％至95％、83％至95％、84％至95％、85％至95％、86％至95％、87％至95％、88％至95％、89％至95％、90％至95％、91％至95％、92％至95％或94％至95％。

[0194] 本发明所述的包含Treg的细胞群体可以包含在总细胞、有核细胞或CD45+细胞数中占一定比例的Treg,所述比例范围为50％至100％、60％至100％、70％至100％、75％至100％、80％至100％、81％至100％、82％至100％、83％至100％、84％至100％、84％至100％、86％至100％、87％至100％、88％至100％、89％至100％、90％至91％、92％至100％、93％至100％、94％至100％、95％至100％、96％至100％、97％至100％、98％至100％、99％至100％、99.5％至100％、50％至99％、60％至99％、70％至99％、80％至99％、81％至99％、82％至99％、83％至99％、84％至99％、85％至99％、86％至99％、87％至99％、88％至99％、89％至99％、90％至99％、91％至99％、92％至99％、94％至99％、95％至99％、96％至97％、98％至99％、50％至98％、60％至98％、70％至98％、80％至98％、81％至98％、82％至98％、83％至98％、84％至98％、85％至98％、86％至98％、87％至98％、88％至98％、89％至98％、90％至98％、91％至98％、92％至98％、94％至98％、95％至98％、96％至97％、98％至98％、50％至97％、60％至97％、70％至97％、80％至97％、81％至97％、82％至97％、83％至97％、84％至97％、85％至97％、86％至97％、87％至97％、88％至97％、89％至97％、90％至97％、91％至97％、92％至97％、94％至97％、95％至97％、96％至97％、50％至96％、60％至96％、70％至96％、80％至96％、81％至96％、82％至96％、83％至96％、84％至96％、85％至96％、86％至96％、87％至96％、88％至96％、89％至96％、90％至96％、91％至96％、92％至96％、94％至96％、95％至96％、50％至95％、60％至95％、70％至95％、80％至95％、81％至95％、82％至95％、83％至95％、84％至95％、85％至95％、86％至95％、87％至95％、88％至95％、89％至95％、90％至95％、91％至95％、92％至95％或94％至95％,其中Treg被限定为CD4+CD25+CD127dim、CD3+CD4+CD25+、CD3+CD4+CD25+CD127dim、CD3+CD4+CD25+CD127dim FOXP3+、CD3+FOXP3+、CD3+CD4+FOXP3+、CD3+CD4+CD25+FOXP3+、CD3+CD25+FOXP3+、CD3+CD25+CD127dim、CD4+CD25+、CD4+CD25+CD127dimFOXP3+、FOXP3+、CD4+FOXP3+、CD4+CD25+FOXP3+、

CD25+FOXP3+或CD25+CD127dim。

[0195] 本发明所述的包含Treg的细胞群体可以具有限定水平的污染性非Treg细胞。

[0196] 例如,本发明所述的包含Treg的细胞群体中存在一定量的非Treg细胞,所述量使得每千克受体体重获得的非Treg细胞数至少大于约1×10^2、2×10^2、3×10^2、4×10^2、5×10^2、6×10^2、7×10^2、8×10^2、9×10^2、1×10^3、2×10^3、3×10^3、4×10^3、5×10^3、6×10^3、7×10^3、8×10^3、9×10^3、1×10^4、2×10^4、3×10^4、4×10^4、5×10^4、6×10^4、7×10^4、8×10^4、9×10^4、1×10^5或以上,其中非Treg细胞是FOXP3-或CD127+/bright。

[0197] 在一些实施例中,本发明所述的包含Treg的细胞群体中存在一定量的非Treg细胞,所述量使得每千克受体体重获得的非Treg细胞数不超过约1×10^2、2×10^2、3×10^2、4×10^2、5×10^2、6×10^2、7×10^2、8×10^2、9×10^2、1×10^3、2×10^3、3×10^3、4×10^3、5×10^3、6×10^3、7×10^3、8×10^3、9×10^3、1×10^4、2×10^4、3×10^4、4×10^4、5×10^4、6×10^4、7×10^4、8×10^4、9×10^4、1×10^5或以下,其中非Treg细胞是FOXP3-或CD127+/bright。

[0198] 本发明所述的包含Treg的细胞群体可以包含在总细胞、有核细胞或CD45+细胞数中占一定比例的非Treg细胞,例如,所述比例至少大于约0.001%、0.002%、0.003%、0.004%、0.005%、0.006%、0.007%、0.008%、0.009%、0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07%、0.08%、0.09%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、1.1%、1.2%、1.3%、1.4%、1.5%、1.6%、1.7%、1.8%、1.9%、2%、2.1%、2.2%、2.3%、2.4%、2.5%、2.6%、2.7%、2.8%、2.9%、3%、3.1%、3.2%、3.3%、3.4%、3.5%、3.6%、3.7%、3.8%、3.9%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%或以上,其中非Treg细胞是FOXP3-或CD127+/bright。

[0199] 在一些实施例中,本发明所述的包含Treg的细胞群体包含在总细胞、有核细胞或CD45+细胞数中占一定比例的非Treg细胞,所述比例不超过约0.001%、0.002%、0.003%、0.004%、0.005%、0.006%、0.007%、0.008%、0.009%、0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07%、0.08%、0.09%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、1.1%、1.2%、1.3%、1.4%、1.5%、1.6%、1.7%、1.8%、1.9%、2%、2.1%、2.2%、2.3%、2.4%、2.5%、2.6%、2.7%、2.8%、2.9%、3%、3.1%、3.2%、3.3%、3.4%、3.5%、3.6%、3.7%、3.8%、3.9%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%或以下,其中非Treg细胞是FOXP3-或CD127+/bright。

[0200] Tcon

[0201] 可以按照一定剂量向受试者施用Tcon群体,例如,所述剂量至少大于约每千克受体体重1×10^4、1×10^5、2×10^5、3×10^5、4×10^5、5×10^5、6×10^5、7×10^5、8×10^5、9×10^5、1×10^6、1.1×10^6、1.2×10^6、1.3×10^6、1.4×10^6、1.5×10^6、1.6×10^6、1.7×10^6、1.8×10^6、1.9×10^6、2×10^6、2.1×10^6、2.2×10^6、2.3×10^6、2.4×10^6、2.5×10^6、2.6×10^6、2.7×10^6、2.8×10^6、2.9×10^6、3×10^6、3.1×10^6、3.2×10^6、3.3×10^6、3.4×10^6、3.5×10^6、3.6×10^6、3.7×10^6、3.8×10^6、3.9×10^6、4×10^6、4.1×10^6、4.2×10^6、4.3×10^6、4.4×10^6、4.5×10^6、4.6×10^6、4.7×10^6、4.8×10^6、4.9×10^6、5×10^6、5.1×10^6、5.2×10^6、5.3×10^6、5.4×10^6、5.5×10^6、5.6×10^6、5.7×10^6、5.8×10^6、5.9×10^6、6×10^6、6.5×10^6、7×10^6、7.5×10^6、8×10^6、8.5×10^6、9×10^6、9.5×10^6、1×10^7、1.5×10^7、2×10^7、2.5×10^7、3×10^7、3.5×10^7、4×10^7、4.5×10^7、5×10^7、5.5×10^7、6×10^7、6.5×10^7、7×10^7、7.5×10^7、8×10^7、8.5×10^7、$9\times$

10^7、9.5×10^7、1×10^8、1×10^8、1.5×10^8、2×10^8、2.5×10^8、3×10^8、3.5×10^8、4×10^7、4.5×10^8、5×10^8、5.5×10^8、6×10^8、6.5×10^8、7×10^8、7.5×10^8、8×10^8、8.5×10^8、9×10^8、9.5×10^8、1×10^9或以上个细胞。

[0202] 在一些实施例中,可以按照一定剂量向受试者施用Tcon群体,所述剂量不超过约每千克受体体重1×10^4、1×10^5、2×10^5、3×10^5、4×10^5、5×10^5、6×10^5、7×10^5、8×10^5、9×10^5、1×10^6、1.1×10^6、1.2×10^6、1.3×10^6、1.4×10^6、1.5×10^6、1.6×10^6、1.7×10^6、1.8×10^6、1.9×10^6、2×10^6、2.1×10^6、2.2×10^6、2.3×10^6、2.4×10^6、2.5×10^6、2.6×10^6、2.7×10^6、2.8×10^6、2.9×10^6、3×10^6、3.1×10^6、3.2×10^6、3.3×10^6、3.4×10^6、3.5×10^6、3.6×10^6、3.7×10^6、3.8×10^6、3.9×10^6、4×10^6、4.1×10^6、4.2×10^6、4.3×10^6、4.4×10^6、4.5×10^6、4.6×10^6、4.7×10^6、4.8×10^6、4.9×10^6、5×10^6、5.1×10^6、5.2×10^6、5.3×10^6、5.4×10^6、5.5×10^6、5.6×10^6、5.7×10^6、5.8×10^6、5.9×10^6、6×10^6、6.5×10^6、7×10^6、7.5×10^6、8×10^6、8.5×10^6、9×10^6、9.5×10^6、1×10^7、1.5×10^7、2×10^7、2.5×10^7、3×10^7、3.5×10^7、4×10^7、4.5×10^7、5×10^7、5.5×10^7、6×10^7、6.5×10^7、7×10^7、7.5×10^7、8×10^7、8.5×10^7、9×10^7、9.5×10^7、1×10^8、1×10^8、1.5×10^8、2×10^8、2.5×10^8、3×10^8、3.5×10^8、4×10^7、4.5×10^8、5×10^8、5.5×10^8、6×10^8、6.5×10^8、7×10^8、7.5×10^8、8×10^8、8.5×10^8、9×10^8、9.5×10^8、1×10^9或以下个细胞。

[0203] 可以按照一定剂量向受试者施用Tcon群体,所述剂量至少大于约每千克受体体重1×10^5、2×10^5、3×10^5、4×10^5、5×10^5、6×10^5、7×10^5、8×10^5、9×10^5、1×10^6、1.1×10^6、1.2×10^6、1.3×10^6、1.4×10^6、1.5×10^6、1.6×10^6、1.7×10^6、1.8×10^6、1.9×10^6、2×10^6、2.1×10^6、2.2×10^6、2.3×10^6、2.4×10^6、2.5×10^6、2.6×10^6、2.7×10^6、2.8×10^6、2.9×10^6、3×10^6、3.1×10^6、3.2×10^6、3.3×10^6、3.4×10^6、3.5×10^6、3.6×10^6、3.7×10^6、3.8×10^6、3.9×10^6、4×10^6、4.1×10^6、4.2×10^6、4.3×10^6、4.4×10^6、4.5×10^6、4.6×10^6、4.7×10^6、4.8×10^6、4.9×10^6、5×10^6、5.1×10^6、5.2×10^6、5.3×10^6、5.4×10^6、5.5×10^6、5.6×10^6、5.7×10^6、5.8×10^6、5.9×10^6、6×10^6、6.5×10^6、7×10^6、7.5×10^6、8×10^6、8.5×10^6、9×10^6、9.5×10^6、1×10^7、1.5×10^7、2×10^7、2.5×10^7、3×10^7、3.5×10^7、4×10^7、4.5×10^7、5×10^7、5.5×10^7、6×10^7、6.5×10^7、7×10^7、7.5×10^7、8×10^7、8.5×10^7、9×10^7、9.5×10^7、1×10^8、1×10^8、1.5×10^8、2×10^8、2.5×10^8、3×10^8、3.5×10^8、4×10^7、4.5×10^8、5×10^8、5.5×10^8、6×10^8、6.5×10^8、7×10^8、7.5×10^8、8×10^8、8.5×10^8、9×10^8、9.5×10^8、1×10^9或以上个Tcon,其中Tcon被限定为CD3+。

[0204] 可以按照一定剂量向受试者施用Tcon群体,所述剂量不超过约每千克受体体重1×10^4、1×10^5、5×10^5、6×10^5、7×10^5、8×10^5、9×10^5、1×10^6、1.1×10^6、1.2×10^6、1.3×10^6、1.4×10^6、1.5×10^6、1.6×10^6、1.7×10^6、1.8×10^6、1.9×10^6、2×10^6、2.1×10^6、2.2×10^6、2.3×10^6、2.4×10^6、2.5×10^6、2.6×10^6、2.7×10^6、2.8×10^6、2.9×10^6、3×10^6、3.1×10^6、3.2×10^6、3.3×10^6、3.4×10^6、3.5×10^6、3.6×10^6、3.7×10^6、3.8×10^6、3.9×10^6、4×10^6、4.1×10^6、4.2×10^6、4.3×10^6、4.4×10^6、4.5×10^6、4.6×10^6、4.7×10^6、4.8×10^6、4.9×10^6、5×10^6、5.1×10^6、5.2×10^6、5.3×10^6、5.4×10^6、5.5×10^6、5.6×10^6、5.7×10^6、5.8×10^6、5.9×10^6、6×10^6、6.5×10^6、7×10^6、7.5×10^6、8×10^6、8.5×10^6、9×10^6、9.5×10^6、1×10^7、1.5×10^7、2×10^7、2.5×10^7、3×10^7、3.5×10^7、4×10^7、4.5×10^7、5×10^7、5.5×10^7、6×10^7、6.5×10^7、7×10^7、7.5×10^7、8×10^7、8.5×10^7、9×10^7、9.5×10^7、1×10^8、1×10^8、1.5

$\times10^8$、2×10^8、2.5×10^8、3×10^8、3.5×10^8、4×10^7、4.5×10^8、5×10^8、5.5×10^8、6×10^8、6.5×10^8、7×10^8、7.5×10^8、8×10^8、8.5×10^8、9×10^8、9.5×10^8、1×10^9或以下个Tcon,其中Tcon被限定为CD3+。

[0205] 在一些实施例中,可以按照一定剂量向受试者施用Tcon群体,所述剂量范围为每千克受体体重1×10^4至1×10^9、1×10^5至1×10^8、1×10^5至1×10^7、5×10^5至1×10^7、5×10^5至5×10^6、5×10^5至4×10^6、5×10^5至3×10^6、5×10^5至2×10^6、5×10^5至1×10^6、1×10^6至1×10^7、1×10^6至5×10^6、1×10^6至4×10^6、1×10^6至3×10^6、1×10^6至2×10^6、1×10^6至1.5×10^6、1.5×10^6至1×10^7、1.5×10^6至5×10^6、1.5×10^6至4×10^6、1.5×10^6至3×10^6、1.5×10^6至2×10^6、2×10^6至1×10^7、2×10^6至5×10^6、2×10^6至4×10^6、2×10^6至3×10^6、2×10^6至1×10^7、2×10^6至5×10^6、2×10^6至4×10^6、2×10^6至3×10^6、2×10^6至2×10^6、2.5×10^6至1×10^7、2.5×10^6至5×10^6、2.5×10^6至4×10^6或2.5×10^6至3×10^6个细胞。

[0206] 在一些实施例中,可以按照一定剂量向受试者施用包含Tcon群体,所述剂量范围为每千克受体体重1×10^4至1×10^9、1×10^5至1×10^8、1×10^5至1×10^7、5×10^5至1×10^7、5×10^5至5×10^6、5×10^5至4×10^6、5×10^5至3×10^6、5×10^5至2×10^6、5×10^5至1×10^6、1×10^6至1×10^7、1×10^6至5×10^6、1×10^6至4×10^6、1×10^6至3×10^6、1×10^6至2×10^6、1×10^6至1.5×10^6、1.5×10^6至1×10^7、1.5×10^6至5×10^6、1.5×10^6至4×10^6、1.5×10^6至3×10^6、1.5×10^6至2×10^6、2×10^6至1×10^7、2×10^6至5×10^6、2×10^6至4×10^6、2×10^6至3×10^6、2×10^6至1×10^7、2×10^6至5×10^6、2×10^6至4×10^6、2×10^6至3×10^6、2×10^6至2×10^6、2.5×10^6至1×10^7、2.5×10^6至5×10^6、2.5×10^6至4×10^6或2.5×10^6至3×10^6个Tcon,其中Tcon被限定为CD3+。

[0207] 本发明所述的Tcon群体可以包含在总细胞、有核细胞或CD45+细胞数中占一定比例的CD3+细胞,所述比例至少大于约5%、10%、20%、30%、40%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或以上。

[0208] 本发明所述的Tcon群体可以包含在总细胞、有核细胞或CD45+细胞数中占一定比例的CD3+细胞,所述比例不超过约5%、10%、20%、30%、40%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或以下。

[0209] 例如,本发明所述的Tcon群体可以包含在总细胞、有核细胞或CD45+细胞数中占一定比例的CD3+细胞,所述比例范围为10%至100%、10%至90%、10%至80%、10%至70%、10%至60%、10%至50%、10%至40%、10%至30%、10%至20%、20%至100%、20%至90%、20%至80%、20%至70%、20%至60%、20%至50%、20%至40%、20%至30%、30%至100%、30%至90%、30%至80%、30%至70%、30%至60%、30%至50%、30%至40%、40%至100%、40%至90%、40%至80%、40%至70%、40%至60%、40%至50%、50%至100%、50%至90%、50%至80%、50%至70%、50%至60%、60%至100%、60%至90%、60%至80%、60%至70%、70%至100%、70%至90%、70%至80%、80%至100%、80%至90%或

90％至100％。

[0210] iNKT

[0211] 可以按照一定剂量向受试者施用iNKT群体,所述剂量至少大于约每千克受体体重1×10^4、1×10^5、5×10^5、6×10^5、7×10^5、8×10^5、9×10^5、1×10^6、1.1×10^6、1.2×10^6、1.3×10^6、1.4×10^6、1.5×10^6、1.6×10^6、1.7×10^6、1.8×10^6、1.9×10^6、2×10^6、2.1×10^6、2.2×10^6、2.3×10^6、2.4×10^6、2.5×10^6、2.6×10^6、2.7×10^6、2.8×10^6、2.9×10^6、3×10^6、3.1×10^6、3.2×10^6、3.3×10^6、3.4×10^6、3.5×10^6、3.6×10^6、3.7×10^6、3.8×10^6、3.9×10^6、4×10^6、4.1×10^6、4.2×10^6、4.3×10^6、4.4×10^6、4.5×10^6、4.6×10^6、4.7×10^6、4.8×10^6、4.9×10^6、5×10^6、5.1×10^6、5.2×10^6、5.3×10^6、5.4×10^6、5.5×10^6、5.6×10^6、5.7×10^6、5.8×10^6、5.9×10^6、6×10^6、6.5×10^6、7×10^6、7.5×10^6、8×10^6、8.5×10^6、9×10^6、9.5×10^6、1×10^7、1.5×10^7、2×10^7、2.5×10^7、3×10^7、3.5×10^7、4×10^7、4.5×10^7、5×10^7、5.5×10^7、6×10^7、6.5×10^7、7×10^7、7.5×10^7、8×10^7、8.5×10^7、9×10^7、9.5×10^7、1×10^8、1×10^8、1.5×10^8、2×10^8、2.5×10^8、3×10^8、3.5×10^8、4×10^7、4.5×10^8、5×10^8、5.5×10^8、6×10^8、6.5×10^8、7×10^8、7.5×10^8、8×10^8、8.5×10^8、9×10^8、9.5×10^8、1×10^9或以上个细胞。

[0212] 可以按照一定剂量向受试者施用iNKT群体,所述剂量不超过约每千克受体体重1×10^4、1×10^5、5×10^5、6×10^5、7×10^5、8×10^5、9×10^5、1×10^6、1.1×10^6、1.2×10^6、1.3×10^6、1.4×10^6、1.5×10^6、1.6×10^6、1.7×10^6、1.8×10^6、1.9×10^6、2×10^6、2.1×10^6、2.2×10^6、2.3×10^6、2.4×10^6、2.5×10^6、2.6×10^6、2.7×10^6、2.8×10^6、2.9×10^6、3×10^6、3.1×10^6、3.2×10^6、3.3×10^6、3.4×10^6、3.5×10^6、3.6×10^6、3.7×10^6、3.8×10^6、3.9×10^6、4×10^6、4.1×10^6、4.2×10^6、4.3×10^6、4.4×10^6、4.5×10^6、4.6×10^6、4.7×10^6、4.8×10^6、4.9×10^6、5×10^6、5.1×10^6、5.2×10^6、5.3×10^6、5.4×10^6、5.5×10^6、5.6×10^6、5.7×10^6、5.8×10^6、5.9×10^6、6×10^6、6.5×10^6、7×10^6、7.5×10^6、8×10^6、8.5×10^6、9×10^6、9.5×10^6、1×10^7、1.5×10^7、2×10^7、2.5×10^7、3×10^7、3.5×10^7、4×10^7、4.5×10^7、5×10^7、5.5×10^7、6×10^7、6.5×10^7、7×10^7、7.5×10^7、8×10^7、8.5×10^7、9×10^7、9.5×10^7、1×10^8、1×10^8、1.5×10^8、2×10^8、2.5×10^8、3×10^8、3.5×10^8、4×10^7、4.5×10^8、5×10^8、5.5×10^8、6×10^8、6.5×10^8、7×10^8、7.5×10^8、8×10^8、8.5×10^8、9×10^8、9.5×10^8、1×10^9或以下个细胞。

[0213] 在一些实施例中,可以按照一定剂量向受试者施用iNKT群体,所述剂量至少大于约每千克受体体重1×10^4、1×10^5、5×10^5、6×10^5、7×10^5、8×10^5、9×10^5、1×10^6、1.1×10^6、1.2×10^6、1.3×10^6、1.4×10^6、1.5×10^6、1.6×10^6、1.7×10^6、1.8×10^6、1.9×10^6、2×10^6、2.1×10^6、2.2×10^6、2.3×10^6、2.4×10^6、2.5×10^6、2.6×10^6、2.7×10^6、2.8×10^6、2.9×10^6、3×10^6、3.1×10^6、3.2×10^6、3.3×10^6、3.4×10^6、3.5×10^6、3.6×10^6、3.7×10^6、3.8×10^6、3.9×10^6、4×10^6、4.1×10^6、4.2×10^6、4.3×10^6、4.4×10^6、4.5×10^6、4.6×10^6、4.7×10^6、4.8×10^6、4.9×10^6、5×10^6、5.1×10^6、5.2×10^6、5.3×10^6、5.4×10^6、5.5×10^6、5.6×10^6、5.7×10^6、5.8×10^6、5.9×10^6、6×10^6、6.5×10^6、7×10^6、7.5×10^6、8×10^6、8.5×10^6、9×10^6、9.5×10^6、1×10^7、1.5×10^7、2×10^7、2.5×10^7、3×10^7、3.5×10^7、4×10^7、4.5×10^7、5×10^7、5.5×10^7、6×10^7、6.5×10^7、7×10^7、7.5×10^7、8×10^7、8.5×10^7、9×10^7、9.5×10^7、1×10^8、1×10^8、1.5×10^8、2×10^8、2.5×10^8、3×10^8、3.5×10^8、4×10^7、4.5×10^8、5×10^8、5.5×10^8、6×10^8、6.5×10^8、7×10^8、7.5×10^8、8×10^8、8.5×10^8、9×10^8、9.5×10^8、1×10^9或以上个$CD3^+V\alpha24J\alpha18^+$细胞。

[0214] 在一些实施例中,可以按照一定剂量向受试者施用iNKT群体,所述剂量不超过约每千克受体体重1×10^4、1×10^5、5×10^5、6×10^5、7×10^5、8×10^5、9×10^5、1×10^6、1.1×10^6、1.2×10^6、1.3×10^6、1.4×10^6、1.5×10^6、1.6×10^6、1.7×10^6、1.8×10^6、1.9×10^6、2×10^6、2.1×10^6、2.2×10^6、2.3×10^6、2.4×10^6、2.5×10^6、2.6×10^6、2.7×10^6、2.8×10^6、2.9×10^6、3×10^6、3.1×10^6、3.2×10^6、3.3×10^6、3.4×10^6、3.5×10^6、3.6×10^6、3.7×10^6、3.8×10^6、3.9×10^6、4×10^6、4.1×10^6、4.2×10^6、4.3×10^6、4.4×10^6、4.5×10^6、4.6×10^6、4.7×10^6、4.8×10^6、4.9×10^6、5×10^6、5.1×10^6、5.2×10^6、5.3×10^6、5.4×10^6、5.5×10^6、5.6×10^6、5.7×10^6、5.8×10^6、5.9×10^6、6×10^6、6.5×10^6、7×10^6、7.5×10^6、8×10^6、8.5×10^6、9×10^6、9.5×10^6、1×10^7、1.5×10^7、2×10^7、2.5×10^7、3×10^7、3.5×10^7、4×10^7、4.5×10^7、5×10^7、5.5×10^7、6×10^7、6.5×10^7、7×10^7、7.5×10^7、8×10^7、8.5×10^7、9×10^7、9.5×10^7、1×10^8、1×10^8、1.5×10^8、2×10^8、2.5×10^8、3×10^8、3.5×10^8、4×10^7、4.5×10^8、5×10^8、5.5×10^8、6×10^8、6.5×10^8、7×10^8、7.5×10^8、8×10^8、8.5×10^8、9×10^8、9.5×10^8、1×10^9或以下个$CD3^+V\alpha24J\alpha18^+$细胞。

[0215] 可以按照一定剂量向受试者施用iNKT群体,例如,所述剂量范围为每千克受体体重1×10^4至1×10^9、1×10^5至1×10^8、1×10^5至2×10^7、5×10^5至2×10^7、5×10^5至1.5×10^7、5×10^5至1×10^7、5×10^5至9×10^6、5×10^5至8×10^6、5×10^5至7×10^6、5×10^5至6×10^6、5×10^5至5×10^6、5×10^5至4×10^6、5×10^5至3×10^6、5×10^5至2×10^6、5×10^5至1×10^6、1×10^6至1.5×10^7、1×10^6至1×10^7、1×10^6至9×10^6、1×10^6至8×10^6、1×10^6至7×10^6、1×10^6至6×10^6、1×10^6至5×10^6、1×10^6至4×10^6、1×10^6至3×10^6、1×10^6至2×10^6、1.5×10^6至1.5×10^7、1.5×10^6至1×10^7、1.5×10^6至9×10^6、1.5×10^6至8×10^6、1.5×10^6至7×10^6、1.5×10^6至6×10^6、1.5×10^6至5×10^6、1.5×10^6至4×10^6、1.5×10^6至3×10^6、1.5×10^6至2×10^6、2×10^6至1.5×10^7、2×10^6至1×10^7、2×10^6至9×10^6、2×10^6至8×10^6、2×10^6至7×10^6、2×10^6至6×10^6、2×10^6至5×10^6、2×10^6至4×10^6、2×10^6至3×10^6、2.5×10^6至1.5×10^7、2.5×10^6至1×10^7、2.5×10^6至9×10^6、2.5×10^6至8×10^6、2.5×10^6至7×10^6、2.5×10^6至6×10^6、2.5×10^6至5×10^6、2.5×10^6至4×10^6或2.5×10^6至3×10^6个细胞。

[0216] 可以按照一定剂量向受试者施用iNKT群体,所述剂量范围为每千克受体体重1×10^4至1×10^9、1×10^5至1×10^8、1×10^5至2×10^7、5×10^5至2×10^7、5×10^5至1.5×10^7、5×10^5至1×10^7、5×10^5至9×10^6、5×10^5至8×10^6、5×10^5至7×10^6、5×10^5至6×10^6、5×10^5至5×10^6、5×10^5至4×10^6、5×10^5至3×10^6、5×10^5至2×10^6、5×10^5至1×10^6、1×10^6至1.5×10^7、1×10^6至1×10^7、1×10^6至9×10^6、1×10^6至8×10^6、1×10^6至7×10^6、1×10^6至6×10^6、1×10^6至5×10^6、1×10^6至4×10^6、1×10^6至3×10^6、1×10^6至2×10^6、1.5×10^6至1.5×10^7、1.5×10^6至1×10^7、1.5×10^6至9×10^6、1.5×10^6至8×10^6、1.5×10^6至7×10^6、1.5×10^6至6×10^6、1.5×10^6至5×10^6、1.5×10^6至4×10^6、1.5×10^6至3×10^6、1.5×10^6至2×10^6、2×10^6至1.5×10^7、2×10^6至1×10^7、2×10^6至9×10^6、2×10^6至8×10^6、2×10^6至7×10^6、2×10^6至6×10^6、2×10^6至5×10^6、2×10^6至4×10^6、2×10^6至3×10^6、2.5×10^6至1.5×10^7、2.5×10^6至1×10^7、2.5×10^6至9×10^6、2.5×10^6至8×10^6、2.5×10^6至7×10^6、2.5×10^6至6×10^6、2.5×10^6至5×10^6、2.5×10^6至4×10^6或2.5×10^6至3×10^6个$CD3^+V\alpha24J\alpha18^+$细胞。

[0217] Tmem

[0218] 可以按照一定剂量向受试者施用Tmem群体,所述剂量至少大于约每千克受体体重

1×10^4、1×10^5、5×10^5、6×10^5、7×10^5、8×10^5、9×10^5、1×10^6、1.1×10^6、1.2×10^6、1.3×10^6、1.4×10^6、1.5×10^6、1.6×10^6、1.7×10^6、1.8×10^6、1.9×10^6、2×10^6、2.1×10^6、2.2×10^6、2.3×10^6、2.4×10^6、2.5×10^6、2.6×10^6、2.7×10^6、2.8×10^6、2.9×10^6、3×10^6、3.1×10^6、3.2×10^6、3.3×10^6、3.4×10^6、3.5×10^6、3.6×10^6、3.7×10^6、3.8×10^6、3.9×10^6、4×10^6、4.1×10^6、4.2×10^6、4.3×10^6、4.4×10^6、4.5×10^6、4.6×10^6、4.7×10^6、4.8×10^6、4.9×10^6、5×10^6、5.1×10^6、5.2×10^6、5.3×10^6、5.4×10^6、5.5×10^6、5.6×10^6、5.7×10^6、5.8×10^6、5.9×10^6、6×10^6、6.5×10^6、7×10^6、7.5×10^6、8×10^6、8.5×10^6、9×10^6、9.5×10^6、1×10^7、1.5×10^7、2×10^7、2.5×10^7、3×10^7、3.5×10^7、4×10^7、4.5×10^7、5×10^7、5.5×10^7、6×10^7、6.5×10^7、7×10^7、7.5×10^7、8×10^7、8.5×10^7、9×10^7、9.5×10^7、1×10^8、1×10^8、1.5×10^8、2×10^8、2.5×10^8、3×10^8、3.5×10^8、4×10^7、4.5×10^8、5×10^8、5.5×10^8、6×10^8、6.5×10^8、7×10^8、7.5×10^8、8×10^8、8.5×10^8、9×10^8、9.5×10^8、1×10^9或以上个细胞。

[0219] 可以按照一定剂量向受试者施用Tmem群体,所述剂量不超过约每千克受体体重1×10^4、1×10^5、5×10^5、6×10^5、7×10^5、8×10^5、9×10^5、1×10^6、1.1×10^6、1.2×10^6、1.3×10^6、1.4×10^6、1.5×10^6、1.6×10^6、1.7×10^6、1.8×10^6、1.9×10^6、2×10^6、2.1×10^6、2.2×10^6、2.3×10^6、2.4×10^6、2.5×10^6、2.6×10^6、2.7×10^6、2.8×10^6、2.9×10^6、3×10^6、3.1×10^6、3.2×10^6、3.3×10^6、3.4×10^6、3.5×10^6、3.6×10^6、3.7×10^6、3.8×10^6、3.9×10^6、4×10^6、4.1×10^6、4.2×10^6、4.3×10^6、4.4×10^6、4.5×10^6、4.6×10^6、4.7×10^6、4.8×10^6、4.9×10^6、5×10^6、5.1×10^6、5.2×10^6、5.3×10^6、5.4×10^6、5.5×10^6、5.6×10^6、5.7×10^6、5.8×10^6、5.9×10^6、6×10^6、6.5×10^6、7×10^6、7.5×10^6、8×10^6、8.5×10^6、9×10^6、9.5×10^6、1×10^7、1.5×10^7、2×10^7、2.5×10^7、3×10^7、3.5×10^7、4×10^7、4.5×10^7、5×10^7、5.5×10^7、6×10^7、6.5×10^7、7×10^7、7.5×10^7、8×10^7、8.5×10^7、9×10^7、9.5×10^7、1×10^8、1×10^8、1.5×10^8、2×10^8、2.5×10^8、3×10^8、3.5×10^8、4×10^7、4.5×10^8、5×10^8、5.5×10^8、6×10^8、6.5×10^8、7×10^8、7.5×10^8、8×10^8、8.5×10^8、9×10^8、9.5×10^8、1×10^9或以下个细胞。

[0220] 例如,可以按照一定剂量向受试者施用Tmem群体,所述剂量至少大于约每千克受体体重1×10^4、1×10^5、5×10^5、6×10^5、7×10^5、8×10^5、9×10^5、1×10^6、1.1×10^6、1.2×10^6、1.3×10^6、1.4×10^6、1.5×10^6、1.6×10^6、1.7×10^6、1.8×10^6、1.9×10^6、2×10^6、2.1×10^6、2.2×10^6、2.3×10^6、2.4×10^6、2.5×10^6、2.6×10^6、2.7×10^6、2.8×10^6、2.9×10^6、3×10^6、3.1×10^6、3.2×10^6、3.3×10^6、3.4×10^6、3.5×10^6、3.6×10^6、3.7×10^6、3.8×10^6、3.9×10^6、4×10^6、4.1×10^6、4.2×10^6、4.3×10^6、4.4×10^6、4.5×10^6、4.6×10^6、4.7×10^6、4.8×10^6、4.9×10^6、5×10^6、5.1×10^6、5.2×10^6、5.3×10^6、5.4×10^6、5.5×10^6、5.6×10^6、5.7×10^6、5.8×10^6、5.9×10^6、6×10^6、6.5×10^6、7×10^6、7.5×10^6、8×10^6、8.5×10^6、9×10^6、9.5×10^6、1×10^7、1.5×10^7、2×10^7、2.5×10^7、3×10^7、3.5×10^7、4×10^7、4.5×10^7、5×10^7、5.5×10^7、6×10^7、6.5×10^7、7×10^7、7.5×10^7、8×10^7、8.5×10^7、9×10^7、9.5×10^7、1×10^8、1×10^8、1.5×10^8、2×10^8、2.5×10^8、3×10^8、3.5×10^8、4×10^7、4.5×10^8、5×10^8、5.5×10^8、6×10^8、6.5×10^8、7×10^8、7.5×10^8、8×10^8、8.5×10^8、9×10^8、9.5×10^8、1×10^9或以上个$CD3^+$ $CD45RA^-CD45RO^+$细胞。

[0221] 在一些实施例中,可以按照一定剂量向受试者施用Tmem群体,所述剂量不超过约每千克受体体重1×10^4、1×10^5、5×10^5、6×10^5、7×10^5、8×10^5、9×10^5、1×10^6、1.1×10^6、1.2×10^6、1.3×10^6、1.4×10^6、1.5×10^6、1.6×10^6、1.7×10^6、1.8×10^6、1.9×10^6、2×10^6、

2.1×10^6、2.2×10^6、2.3×10^6、2.4×10^6、2.5×10^6、2.6×10^6、2.7×10^6、2.8×10^6、2.9×10^6、3×10^6、3.1×10^6、3.2×10^6、3.3×10^6、3.4×10^6、3.5×10^6、3.6×10^6、3.7×10^6、3.8×10^6、3.9×10^6、4×10^6、4.1×10^6、4.2×10^6、4.3×10^6、4.4×10^6、4.5×10^6、4.6×10^6、4.7×10^6、4.8×10^6、4.9×10^6、5×10^6、5.1×10^6、5.2×10^6、5.3×10^6、5.4×10^6、5.5×10^6、5.6×10^6、5.7×10^6、5.8×10^6、5.9×10^6、6×10^6、6.5×10^6、7×10^6、7.5×10^6、8×10^6、8.5×10^6、9×10^6、9.5×10^6、1×10^7、1.5×10^7、2×10^7、2.5×10^7、3×10^7、3.5×10^7、4×10^7、4.5×10^7、5×10^7、5.5×10^7、6×10^7、6.5×10^7、7×10^7、7.5×10^7、8×10^7、8.5×10^7、9×10^7、9.5×10^7、1×10^8、1×10^8、1.5×10^8、2×10^8、2.5×10^8、3×10^8、3.5×10^8、4×10^7、4.5×10^8、5×10^8、5.5×10^8、6×10^8、6.5×10^8、7×10^8、7.5×10^8、8×10^8、8.5×10^8、9×10^8、9.5×10^8、1×10^9或以下个$CD3^+CD45RA^-CD45RO^+$细胞。

[0222] 在一些实施例中,可以按照一定剂量向受试者施用Tmem群体,所述剂量范围为每千克受体体重1×10^4至1×10^9、1×10^5至1×10^8、1×10^5至2×10^7、5×10^5至2×10^7、5×10^5至1.5×10^7、5×10^5至1×10^7、5×10^5至9×10^6、5×10^5至8×10^6、5×10^5至7×10^6、5×10^5至6×10^6、5×10^5至5×10^6、5×10^5至4×10^6、5×10^5至3×10^6、5×10^5至2×10^6、5×10^5至1×10^6、1×10^6至1.5×10^7、1×10^6至1×10^7、1×10^6至9×10^6、1×10^6至8×10^6、1×10^6至7×10^6、1×10^6至6×10^6、1×10^6至5×10^6、1×10^6至4×10^6、1×10^6至3×10^6、1×10^6至2×10^6、1.5×10^6至1.5×10^7、1.5×10^6至1×10^7、1.5×10^6至9×10^6、1.5×10^6至8×10^6、1.5×10^6至7×10^6、1.5×10^6至6×10^6、1.5×10^6至5×10^6、1.5×10^6至4×10^6、1.5×10^6至3×10^6、1.5×10^6至2×10^6、2×10^6至1.5×10^7、2×10^6至1×10^7、2×10^6至9×10^6、2×10^6至8×10^6、2×10^6至7×10^6、2×10^6至6×10^6、2×10^6至5×10^6、2×10^6至4×10^6、2×10^6至3×10^6、2.5×10^6至1.5×10^7、2.5×10^6至1×10^7、2.5×10^6至9×10^6、2.5×10^6至8×10^6、2.5×10^6至7×10^6、2.5×10^6至6×10^6、2.5×10^6至5×10^6、2.5×10^6至4×10^6或2.5×10^6至3×10^6个细胞。

[0223] 可以按照一定剂量向受试者施用Tmem群体,例如,所述剂量范围为每千克受体体重1×10^4至1×10^9、1×10^5至1×10^8、1×10^5至2×10^7、5×10^5至2×10^7、5×10^5至1.5×10^7、5×10^5至1×10^7、5×10^5至9×10^6、5×10^5至8×10^6、5×10^5至7×10^6、5×10^5至6×10^6、5×10^5至5×10^6、5×10^5至4×10^6、5×10^5至3×10^6、5×10^5至2×10^6、5×10^5至1×10^6、1×10^6至1.5×10^7、1×10^6至1×10^7、1×10^6至9×10^6、1×10^6至8×10^6、1×10^6至7×10^6、1×10^6至6×10^6、1×10^6至5×10^6、1×10^6至4×10^6、1×10^6至3×10^6、1×10^6至2×10^6、1.5×10^6至1.5×10^7、1.5×10^6至1×10^7、1.5×10^6至9×10^6、1.5×10^6至8×10^6、1.5×10^6至7×10^6、1.5×10^6至6×10^6、1.5×10^6至5×10^6、1.5×10^6至4×10^6、1.5×10^6至3×10^6、1.5×10^6至2×10^6、2×10^6至1.5×10^7、2×10^6至1×10^7、2×10^6至9×10^6、2×10^6至8×10^6、2×10^6至7×10^6、2×10^6至6×10^6、2×10^6至5×10^6、2×10^6至4×10^6、2×10^6至3×10^6、2.5×10^6至1.5×10^7、2.5×10^6至1×10^7、2.5×10^6至9×10^6、2.5×10^6至8×10^6、2.5×10^6至7×10^6、2.5×10^6至6×10^6、2.5×10^6至5×10^6、2.5×10^6至4×10^6或2.5×10^6至3×10^6个$CD3^+CD45RA^-CD45RO^+$细胞。

[0224] Treg与Tcon的比率

[0225] 举例而言,在本发明所述的方法中,向受试者施用的Tcon:Treg的比率可以是约1:100、1:50、1:25、1:20、1:15、1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2.5、1:2、1.5:2、1:1.5、1:1、1.5:1、2:1、2:1.5、2.5:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、15:1、20:1、25:1、50:1或100:1。

[0226] 预处理方案、GVHD预防剂和其他药剂。

[0227] 在本发明所述的方法的一些实施例中,可在输注本文所述的细胞群体之前采用清髓性预处理来治疗受试者。

[0228] 在一些实施例中,本发明所述的方法可以包含向受试者施用一种或多种免疫抑制剂或其他药剂。

[0229] 举例而言,可向受试者施用免疫抑制剂,以防止受体免疫系统排斥移植物,或预防或减少因移植物攻击受体细胞而引起的GVHD。免疫抑制剂包括诸如钙调磷酸酶抑制剂(其与结合蛋白结合以抑制钙调磷酸酶活性)和单克隆抗体等。

[0230] 钙调磷酸酶抑制剂包括诸如他克莫司、环孢霉素A等。佐剂可与钙调磷酸酶抑制剂联合施用,并且包括诸如类固醇、硫唑嘌呤、吗替麦考酚酯和西罗莫司等。可用作免疫抑制剂的单克隆抗体包括诸如拮抗剂抗体(例如,拮抗IL-2R的抗体,例如巴利昔单抗和达克珠单抗)和通过抗体依赖性细胞毒性而使免疫细胞群体耗竭的抗体(例如,使T细胞耗竭的抗-CD3抗体,例如muromonab-CD3)等

[0231] 本发明所述的方法还可以进一步包含向需要接受相关治疗的受试者施用抗肿瘤剂或其药学上可接受的盐类或前药。抗肿瘤剂的示例包括但不限于抗肿瘤烷化剂、抗肿瘤抗代谢物、抗肿瘤抗生素、植物源抗肿瘤剂、抗肿瘤有机铂化合物、抗肿瘤喜树碱衍生物、抗肿瘤酪氨酸激酶抑制剂、单克隆抗体、干扰素、生物反应修饰剂和其他具有抗肿瘤活性的药剂或其药学上可接受的盐类。

[0232] 示例性实施例

[0233] 在一些实施例中,本发明公开了一种治疗需要接受本文所述治疗的人类受试者的方法,包含向所述人类受试者施用:a)造血干祖细胞(HSPC)群体,其中所述HSPC群体包含每千克所述人类受试者体重超过1×10^5个HSPC(优选地,5×10^5至2×10^7个HSPC),其中所述HPSC是$CD34^+$;b)包含调节性T细胞(Treg)的细胞群体,其中所述Treg是$CD4^+CD25^+CD127^{dim}$或$CD4^+FOXP3^+$,其中所述包含Treg的细胞群体包含每千克所述人类受试者体重超过1×10^5个Treg(优选地,5×10^5至4×10^6个Treg),其中所述包含Treg的细胞群体在其所述施用之前未进行冷冻保存;以及c)常规T细胞(Tcon)群体,其中所述Tcon是CD3+,其中所述Tcon群体包含每千克所述人类受试者体重少于1×10^7个Tcon(优选地,5×10^5至4×10^6个Tcon),其中所述HSPC群体和所述包含Treg的细胞群体在所述Tcon群体施用之前(优选地,在所述施用之前36-60小时)施用。

[0234] 在一些实施例中,本发明公开了一种治疗需要接受本文所述治疗的人类受试者的方法,包含向所述人类受试者施用:a)造血干祖细胞(HSPC)群体,其中所述HSPC群体包含每千克所述人类受试者体重超过1×10^5个HSPC(优选地,5×10^5至2×10^7个HSPC),其中所述HPSC是$CD34^+$;b)包含调节性T细胞(Treg)的细胞群体,其中所述Treg是$CD4^+CD25^+CD127^{dim}$或$CD4^+FOXP3^+$,其中所述包含Treg的细胞群体包含每千克所述人类受试者体重超过1×10^5个Treg(优选地,5×10^5至4×10^6个Treg),其中所述包含Treg的细胞群体在其所述施用之前未进行冷冻保存;c)常规T细胞(Tcon)群体,其中所述Tcon是CD3+,其中所述Tcon群体包含每千克所述人类受试者体重少于1×10^7个Tcon(优选地,5×10^5至4×10^6个Tcon);以及d)移植物抗宿主病(GVHD)预防剂(优选地,他克莫司或西罗莫司),其中所述HSPC群体和所述包含Treg的细胞群体在所述Tcon群体施用之前(优选地,在所述施用之前36-60小时)施用,并且

其中所述人类受试者在所述Tcon群体的所述施用后30天内(优选地,1年内)未发生移植物抗宿主病(GVHD)。

[0235] 在一些实施例中,本发明公开了一种治疗需要接受本文所述治疗的人类受试者的方法,包含向所述人类受试者施用:a)一种造血干祖细胞(HSPC)群体,其中所述HSPC群体包含每千克所述人类受试者体重超过1×10^5个HSPC(优选地,5×10^5至2×10^7个HSPC),其中所述HPSC是$CD34^+$;b)一种包含调节性T细胞(Treg)的细胞群体,其中所述Treg是$CD4^+CD25^+CD127^{dim}$或$CD4^+FOXP3^+$,其中所述包含Treg的细胞群体包含每千克所述人类受试者体重超过1×10^5个Treg(优选地,5×10^5至4×10^6个Treg),其中所述包含Treg的细胞群体包含$CD45^+$细胞,其中超过50%(优选地,超过90%)的所述$CD45^+$细胞是Treg,其中所述包含Treg的细胞群体在其所述施用之前未进行冷冻保存;以及c)一种常规T细胞(Tcon)群体,其中所述Tcon是CD3+,其中所述Tcon群体包含每千克所述人类受试者体重少于1×10^7个Tcon(优选地,5×10^5至4×10^6个Tcon),其中所述Tcon群体在其所述施用之前进行冷冻保存,其中所述HSPC群体和所述包含Treg的细胞群体在所述Tcon群体施用之前(优选地,在所述施用之前36-60小时)施用。

[0236] 在一些实施例中,本发明公开了一种治疗需要接受本文所述治疗的人类受试者的方法,包含向所述人类受试者施用:a)造血干祖细胞(HSPC)群体,其中所述HSPC群体包含每千克所述人类受试者体重超过1×10^5个HSPC(优选地,5×10^5至2×10^7个HSPC),其中所述HPSC是$CD34^+$;b)包含调节性T细胞(Treg)的细胞群体,其中所述Treg是$CD4^+CD25^+CD127^{dim}$或$CD4^+FOXP3^+$,其中所述包含Treg的细胞群体包含每千克所述人类受试者体重超过1×10^5个Treg(优选地,5×10^5至4×10^6个Treg),其中所述包含Treg的细胞群体在其所述施用之前未进行冷冻保存;c)常规T细胞(Tcon)群体,其中所述Tcon是CD3+,其中所述Tcon群体包含每千克所述人类受试者体重少于1×10^7个Tcon(优选地,5×10^5至4×10^6个Tcon),其中所述Tcon群体在其所述施用之前进行冷冻保存;以及d)移植物抗宿主病(GVHD)预防剂(优选地,他克莫司或西罗莫司),其中所述HSPC群体和所述包含Treg的细胞群体在所述Tcon群体施用之前(优选地,在所述施用之前36-60小时)施用,并且其中所述人类受试者在所述Tcon群体的所述施用后30天内(优选地,1年内)未发生移植物抗宿主病(GVHD)。

[0237] 在一些实施例中,本发明公开了一种治疗需要接受本文所述治疗的人类受试者的方法,包含向所述人类受试者施用:a)造血干祖细胞(HSPC)群体,其中所述HSPC群体包含每千克所述人类受试者体重超过1×10^5个HSPC(优选地,5×10^5至2×10^7个HSPC),其中所述HPSC是$CD34^+$;b)包含调节性T细胞(Treg)的细胞群体,其中所述Treg是$CD4^+CD25^+CD127^{dim}$或$CD4^+FOXP3^+$,其中所述包含Treg的细胞群体包含每千克所述人类受试者体重超过1×10^5个Treg(优选地,5×10^5至4×10^6个Treg),其中所述包含Treg的细胞群体包含$CD45^+$细胞,其中超过50%(优选地,超过90%)的所述$CD45^+$细胞是Treg,其中所述包含Treg的细胞群体在其所述施用之前未进行冷冻保存;c)常规T细胞(Tcon)群体,其中所述Tcon是CD3+,其中所述Tcon群体包含每千克所述人类受试者体重少于1×10^7个Tcon(优选地,5×10^5至4×10^6个Tcon);d)移植物抗宿主病(GVHD)预防剂(优选地,他克莫司或西罗莫司),其中所述HSPC群体和所述包含Treg的细胞群体在所述Tcon群体施用之前(优选地,在所述施用之前36-60小时)施用,并且其中所述人类受试者在所述Tcon群体的所述施用后30天内(优选地,1年内)未发生移植物抗宿主病(GVHD)。

[0238] 在一些实施例中,本发明公开了一种治疗需要接受本文所述治疗的人类受试者的方法,包含向所述人类受试者施用:a)造血干祖细胞(HSPC)群体,其中所述HSPC群体包含每千克所述人类受试者体重超过1×10^5个HSPC(优选地,5×10^5至2×10^7个HSPC),其中所述HPSC是$CD34^+$;b)包含调节性T细胞(Treg)的细胞群体,其中所述Treg是$CD4^+CD25^+CD127^{dim}$或$CD4^+FOXP3^+$,其中所述包含Treg的细胞群体包含每千克所述人类受试者体重超过1×10^5个Treg(优选地,5×10^5至4×10^6个Treg),其中所述包含Treg的细胞群体包含$CD45^+$细胞,其中超过50%(优选地,超过90%)的所述$CD45^+$细胞是Treg,其中所述包含Treg的细胞群体在其所述施用之前未进行冷冻保存;以及c)常规T细胞(Tcon)群体,其中所述Tcon是CD3+,其中所述Tcon群体包含每千克所述人类受试者体重少于1×10^7个Tcon(优选地,5×10^5至4×10^6个Tcon),其中所述Tcon群体在其所述施用之前进行冷冻保存,其中所述HSPC群体和所述包含Treg的细胞群体在所述Tcon群体施用之前(优选地,在所述施用之前36-60小时)施用,并且其中所述人类受试者在所述Tcon群体的所述施用后30天内(优选地,1年内)未发生移植物抗宿主病(GVHD)。

[0239] 在一些实施例中,本发明公开了一种治疗需要接受本文所述治疗的人类受试者的方法,包含向所述人类受试者施用:a)造血干祖细胞(HSPC)群体,其中所述HSPC群体包含每千克所述人类受试者体重超过1×10^5个HSPC(优选地,5×10^5至2×10^7个HSPC),其中所述HPSC是$CD34^+$;b)包含调节性T细胞(Treg)的细胞群体,其中所述Treg是$CD4^+CD25^+CD127^{dim}$或$CD4^+FOXP3^+$,其中所述包含Treg的细胞群体包含每千克所述人类受试者体重超过1×10^5个Treg(优选地,5×10^5至4×10^6个Treg),其中所述包含Treg的细胞群体包含$CD45^+$细胞,其中超过50%(优选地,超过90%)的所述$CD45^+$细胞是Treg,其中所述包含Treg的细胞群体在其所述施用之前未进行冷冻保存;c)常规T细胞(Tcon)群体,其中所述Tcon是CD3+,其中所述Tcon群体包含每千克所述人类受试者体重少于1×10^7个Tcon(优选地,5×10^5至4×10^6个Tcon),其中所述Tcon群体在其所述施用之前进行冷冻保存;以及d)移植物抗宿主病(GVHD)预防剂(优选地,他克莫司或西罗莫司),其中所述HSPC群体和所述包含Treg的细胞群体在所述Tcon群体施用之前(优选地,在所述施用之前36-60小时)施用。

[0240] 在一些实施例中,本发明公开了一种治疗需要接受本文所述治疗的人类受试者的方法,包含向所述人类受试者施用:a)造血干祖细胞(HSPC)群体,其中所述HSPC群体包含每千克所述人类受试者体重超过1×10^5个HSPC(优选地,5×10^5至2×10^7个HSPC),其中所述HPSC是$CD34^+$;b)包含调节性T细胞(Treg)的细胞群体,其中所述Treg是$CD4^+CD25^+CD127^{dim}$或$CD4^+FOXP3^+$,其中所述包含Treg的细胞群体包含每千克所述人类受试者体重超过1×10^5个Treg(优选地,5×10^5至4×10^6个Treg),其中所述包含Treg的细胞群体包含$CD45^+$细胞,其中超过50%(优选地,超过90%)的所述$CD45^+$细胞是Treg,其中所述包含Treg的细胞群体在其所述施用之前未进行冷冻保存;c)常规T细胞(Tcon)群体,其中所述Tcon是CD3+,其中所述Tcon群体包含每千克所述人类受试者体重少于1×10^7个Tcon(优选地,5×10^5至4×10^6个Tcon),其中所述Tcon群体在其所述施用之前进行冷冻保存;以及d)移植物抗宿主病(GVHD)预防剂(优选地,他克莫司或西罗莫司),其中所述HSPC群体和所述包含Treg的细胞群体在所述Tcon群体施用之前(优选地,在所述施用之前36-60小时)施用,并且其中所述人类受试者在所述Tcon群体的所述施用后30天内(优选地,1年内)未发生移植物抗宿主病(GVHD)。

[0241] 示例

[0242] 示例1:包含在Tcon施用之前施用HSPC和Treg的临床试验

[0243] 本实施例阐明了本发明所揭示的方法在治疗患有癌症的受试者方面的效用,包括在未发生GVHD的情况下实现免疫重建和GVT效应。

[0244] 这项研究纳入了具有HLA匹配的同胞供体的十二例高危恶性疾病患者。本研究得到了斯坦福机构审查委员会(NCT01660607)和FDAIND 14686的批准。根据《赫尔辛基宣言》规定,获得所有患者和供体的书面知情同意书。

[0245] 研究设计

[0246] 患者特征见图1;缩写如下:TBI,全身辐照;Cy,环磷酰胺;VP-16,依托泊苷;Bu,白消安;AML,急性骨髓性白血病;CR,完全缓解;MDS,骨髓增生异常综合征;RAEB2,2型过度爆发致难治性贫血;NHL,非霍奇金淋巴瘤;ETP-ALL,早期前体T细胞急性淋巴细胞白血病;MRD,微小残留病;CML,慢性骨髓性白血病;MF,骨髓纤维化

[0247] 进行清髓性预处理后,在第0天向受试者施用HSPC群体和Treg群体,然后在第2天向受试者施用Tcon群体。本研究的主要目的是:确定所述方法的有效性、安全性和可行性;确定输注的Treg和Tcon的最大耐受剂量;以及确定HCT后1年的EFS。依据因治疗引起的任何2级或以上的严重不良事件,对安全性进行评估,并将特定剂量限制性毒性定义为:2级以上的急性GVHD、HCT后持续28天的4级嗜中性白血球减少症和3至5级细胞因子/释放综合征/急性输液反应。

[0248] 入选标准包括:急性白血病(原发性难治性,CR1,伴有微小残留病(MRD)阳性或高危特征,第一次完全缓解后复发)、慢性骨髓性白血病(加速或爆发期)、骨髓增生异常综合征(Int-2或高危)、骨髓增生性疾病、非霍奇金淋巴瘤(伴有低风险特征,不适合自体HCT)、年龄≤60岁、具有HLA 匹配的相关供体以及先前未接受过清髓疗法或HCT。

[0249] 原始临床方案图解见图2A。在Tcon施用前两天,施用Treg和HSPC供体移植物。按照原始方案完成由五例患者组成的第一队列招募后,观察到发生了GVHD。对方案进行了修订,以采用新鲜Treg细胞而非冷冻Treg细胞,并引入靶向剂量的单药他克莫司(4-6ng/ml)或西罗莫司(6-8ng/ml)GVHD预防疗法(图2B)。

[0250] 预处理方案和支持性护理

[0251] 临床方案支持根据入选受试者的疾病特征采用不同的清髓性预处理方案。对于急性白血病、高危CML、骨髓增生异常综合征和骨髓增生性疾病,预处理包括分次全身辐照:fTBI(1320cGy,在四天内分次进行)、VP16(60mg/kg,单次输注)和环磷酰胺(60mg/kg,单次输注);或白消安(起初3.6mg/kg,q24,在4天内输注,目标白消安水平为800-900nM)和环磷酰胺(每次输注60mg/kg,两次输注)。对于非霍奇金淋巴瘤,预处理包括卡莫司汀(300mg/m2)、VP16(60mg/kg)和环磷酰胺(100mg/kg)。

[0252] 原始方案下的受试者未接受GVHD预防疗法,但方案修改后,基于证明西罗莫司有助于Treg发挥作用的临床前证据,受试者可接受他克莫司或西罗莫司给药。在一例接受BU/Cy预处理的受试者发生肝窦阻塞综合征(SOS)之后,西罗莫司GVHD预防疗法仅适用于接受基于TBI的预处理的受试者。

[0253] 传染病预防疗法包括阿昔洛韦400mg(每日三次,口服,持续施用1年)、单一浓度复方新诺明(第30-60天)和环丙沙星500mg(口服,每日两次,第-2天直至移植)。自第+14天起至第+100天,通过定量PCR对EBV(每2周一次)和CMV(每周一次)进行病毒监测。

[0254] 移植工程

[0255] 在每天向志愿者供体给予一剂10mcg/kg rhG-CSF(Neupogen,Amgen,加利福尼亚州千橡市)且施用5剂后,使用连续流动细胞分离器(SPECTRA;Cobe BCT),在斯坦福大学医疗中心(Stanford Health Care)通过单采术从志愿者供体体内获取供体细胞。在第4天和第5天进行两次连续单采术采集,并混合细胞产物。使用Isolex 300i(Baxter healthcare,伊利诺伊州迪尔菲尔德)或CliniMACS细胞选择系统(MiltenyiBiotec,BergishGladbach,德国)采集CD34+细胞。保留CD34还原(流穿)组分并用于分离供体Treg。根据药品生产质量管理规范条件,在BMT细胞疗法设施内使用临床级试剂进行细胞选择。

[0256] 然后,通过微珠纯化(Miltenyi)从CD34耗竭的组分中选择CD25+细胞。从阴性组分中获取Tcon,并将阳性组分用于Treg纯化。使用BD Influx细胞分选仪(BD Biosciences,加利福尼亚州圣何塞)通过FACS对CD4+CD25+CD127dim细胞作进一步选择。针对CD4和FoxP3表达,在CD34+选择、CD25+细胞选择和CD4+CD127+细胞分选后采集的细胞的代表性分析结果见图3。在通过免疫磁性选择法使CD34+细胞耗竭(左图)、通过免疫磁性选择法选择CD25+(中间图)以及通过FACS分选CD4+CD127lowCD25+细胞(右图)后显示Treg富集。本文提供了一例患者的代表性图表。由此可以看出,获得了高纯度的Treg。这些细胞在混合淋巴细胞反应(MLR)中具有高度抑制性。图4A阐明了通过FACS分析得出的T细胞(经培养的HLA 不匹配的PBMC,含/不含Treg(比率:1:1))的$CFSE^{dim}$群体在异基因MLR中的占比。对于MLR,将来自供体外周血或单采术产物的富集的$CD4^+$和$CD8^+$细胞(2×10^5,MACS微珠,Miltenyi Biotech)分成三等份并置于96孔平底培养板中作为应答者。按照制造商提供的说明,在第0天(Invitrogen,分子探针)用CellTrace CFSE标记应答者,或在为期5天的测定的最后16小时按1μCi/孔[^{3}H,胸苷,Perkin-Elmer]对应答者进行脉冲处理。刺激物是来自健康供体的9种不同血沉棕黄层的组合。在33Gy下利用铯辐照器(^{157}Cs)对刺激物进行辐照,并使刺激物与应答者的比率(R:S)为1:0、1:1、1:2和1:4。在应答者与抑制剂的比率(R:SUP)为1:1、1:0.5、1:0.25和1:10的情况下,添加Treg作为抑制剂。向培养基(cRPMI)中加入OKT3(Miltenyi Biotech)。在第5天通过流式细胞仪(LSRII BD)或β读取计数器(Tomtec,Wallac)读取结果。进一步结果载于图4B-C。

[0257] 为了进行临床分选,通过蛋白质A(或G)色谱柱重新纯化抗体,并将其置于低pH环境中30分钟。将抗体与FITC和Alexafluor 647偶联,进行无菌过滤并以一次性等分试样形式保存。

[0258] 剂量递增和移植物特性

[0259] 进行清髓性预处理后,在第0天向受试者施用HSPC群体和Treg群体,然后在第2天向受试者施用Tcon群体。

[0260] 本研究涉及如图5所示的剂量递增方案。将Treg剂量递增确定为Treg:Tcon的比率。在由三例患者组成的第一队列中,初始剂量队列目标剂量为1×10^6Treg/kg和3×10^6CD3+ Tcon/kg。由于观察到一例患者发生GVHD,根据预先确定的剂量递增方案,所述组另外纳入了三例受试者,Treg:Tcon的比率为1:1,即1×10^6Treg/kg和1×10^6Tcon/kg。由于在另外纳入的所述受试者中未观察到剂量限制性毒性,因此将目标剂量增至3×10^6Treg/kg和3×10^6CD3+ Tcon/kg。在另外纳入的三例患者中未观察到剂量限制性毒性后,确定了最大耐受目标剂量,其也是可通过两次单采术采集到的Treg的最大技术剂量,而且在此剂量水平下

又纳入了三例患者。对于许多患者而言,达到3×10^6Treg/kg的剂量是不可行的,但是无论达到何种细胞剂量水平,都应进行施用。

[0261] 移植物产生以及按照经修改的方案施用新鲜Treg的示意图请见图6。剂量为1.0×10^6Treg/kg的所有受试者均接受了Treg的此目标剂量,但是并非所有受试者都接受了3.0×10^6Treg/kg的目标剂量。图7显示了受试者的细胞剂量产量,施用剂量的中位数为2.5×10^6Treg/kg(范围为2.4-3.0×10^6Treg/kg)。基于FOXP3+表达,利用细胞内细胞因子染色得到的中位Treg回收率为67%(范围为50.7-87.8%),中位Treg纯度为94%(范围为91-96%)。除一例患者外,所有其他患者的CD34+剂量均>2.0×10^6个细胞/kg,中位剂量为3.9×10^6个细胞/kg(范围为1.2-15.9×10^6)。剂量详情请见图8。

[0262] 细胞输注、移植和临床结果

[0263] 临床结果汇总请见图9。未观察到输液反应。所有十二例受试者均实现了原发性完全供体型移植,但是一例接受了最低剂量水平(1×10^6Treg/kg和1×10^6CD3+ Tcon/kg)的高危RAEB-2MDS受试者发生继发移植失败。包括该例受试者在内的所有受试者的嗜中性粒细胞在中位天数为11天(范围为10-16天)的情况下达到1.0×10^9/L。血小板在中位天数为16天(范围为9-25天)的情况下达到50×10^9/L。在方案修改之前,接受治疗的五例患者中有三例实现了完全缓解(其中2例的缓解持续时间>1年)。在方案修改后(采用新鲜Treg实施GVHD预防疗法),七例患者中有五例实现了完全缓解(其中四例的缓解持续时间>1年),未观察到发生GVHD。

[0264] 在最初以1:3的比率接受Treg:Tcon的患者中,观察到发生了III级急性GVHD。因此,按照所述方案,以1×10^6/kg的剂量将Treg与Tcon的比率调节至1:1。在此剂量水平下接受治疗的前三例受试者中,观察到一例发生急性GVHD(III级)。按此比率治疗另外两例患者。另有一例患者发生了类固醇反应性I级急性皮肤GVHD。

[0265] 所述方案已修改为仅使用新鲜Treg且包括采用西罗莫司实施低剂量单药GVHD预防疗法,因为已证实所述药剂可保护Treg(图2)。在临床情况下,若施用西罗莫司可能会增加患肝窦阻塞综合征的风险,则使用低剂量的他克莫司代替。在方案修改后,在随后的七例患者中未观察到发生GVHD的病例。虽然一例受试者出现转氨酶升高的症状,并就潜在肝GVHD或药物不耐受性接受了治疗,但在更换药物后,观察到转氨酶升高的症状迅速消退。

[0266] 共有十一例患者的生存期>6个月,可以对其进行慢性GVHD评估。在481天的中位随访时间(范围为212-1887天)中,所述十一例受试者中有两例发生慢性GVHD,这两例受试者均位于原始方案队列中。这两例发生早期III级急性GVHD和慢性GVHD的受试者的表现是限制性皮肤病和类固醇反应性皮肤病。在方案修改后,第二队列中无患者发生慢性GVHD

[0267] 在方案修改后,一例接受白消安和环磷酰胺预处理且接受西罗莫司GVHD预防疗法的患者出现轻度SOS,经去纤苷治疗和支持性护理后,所述症状消退。十二例患者中有十一例发生粘膜炎(有4例为1级粘膜炎;有3例为2级;以及有4例为3级)。

[0268] 免疫重建

[0269] 为了评估入选本研究的患者的免疫重建情况,确定了一个比较标准治疗对照队列,其中包括五例接受清髓性HCT且未发生急性或慢性GVHD或无复发情况的患者。利用流式细胞术,在HCT后于标准化时间点对冻融PBMC中的免疫细胞亚群进行量化(图10)。

[0270] 从液氮中回收BMT患者(已预先输注或未预先输注Treg)的PBMC。用MACS缓冲液洗

涤PBMC,并在4℃下用pan-PBMC板或T_{reg}活化板染色1小时。用MACS缓冲液洗涤后,将已染色的细胞在4℃下用4%甲醛固定过夜。在LSR II上进行流式细胞术分析,并利用FlowJo软件进行数据分析。在室温下使用0.5μM顺铂(Fluidigm,目录号:201064)进行活性染色5分钟。制备细胞表面抗体预混液,并利用0.2μm过滤器进行过滤。将细胞重悬浮于预混液中,并温育30分钟。洗涤细胞,并将其置于按照制造商的建议制备的固定液(eBiosciences,目录号:00-5523)中温育。在室温下将细胞固定1小时,洗涤细胞,然后用细胞内抗体混合物溶于透化缓冲液(eBiosciences,目录号:00-5523)所得到的溶液温育1小时。

[0271] 与按照经修改的方案或标准治疗方案接受治疗的患者相比,原始方案队列中的患者表现出的T、B、NK和Treg重建能力相对较差(图10)。与标准治疗对照组相比,按照经修改的方案接受新鲜Treg治疗的患者在T、B、NK、DC和单核细胞群体中通常表现出相当的免疫重建能力。与对照组相比,在原始和经修改的方案下的患者队列中,前六个月中iNKT细胞的绝对数量均显著减少(双尾student T检验,$p<0.01$)。

[0272] 与未发生急性或慢性GVHD的标准治疗对照组相比,按照经修改的方案接受新鲜Treg治疗的患者在HCT后的Treg占比和绝对值方面表现出相当的免疫重建能力(双尾student T检验,$p<0.01$)。通过流式细胞术对Treg进行的表型表征,结果显示表面受体CTLA-4、PD-1、CD62L、CD45 RO或FOXP3的表达无统计学差异。CyTOF也证实了这一点。此外也观察到,在离体且无刺激的情况下,细胞内IFN-、TNF-表达量似乎未增加。图11A阐明了在HCT后第60天通过流式细胞术量化的Treg的特征(对CD4+CD25+CD127dim设门)。图11B阐明了在HCT后第60天通过CyTOF量化的Treg的特征(对CD4+CD25+CD127dim设门)。

[0273] Treg TCR组库分析

[0274] 为了评估HCT后Treg区室的TCR组库重建情况,在移植后第90天左右采用FACS纯化取自患者的CD4+CD25+CD127dim Treg。为了进行TCR组库分析,通过两步分离程序利用患者的PBMC富集Treg:按照制造商的说明,利用CD25MicroBeads II(Miltenyi Biotech)从PBMC中分离出CD25+细胞。采用抗-CD3(OKT3,BioLegend)、抗-CD4(OKT4,BioLegend)、抗-CD8(RPA-T8,BioLegend)、抗-CD25(BC96,BioLegend)和抗-CD127(A019D5,BioLegend)抗体进行染色后,分离出CD3+、CD4+、CD8-、CD25+、CD127dim细胞,然后用**TRIzol®**Plus试剂裂解所述细胞,并将其置于-80℃下保存。分离出2,700-48,000个Treg细胞。

[0275] 以RNA为模板,采用5'RACE方法和经修饰的基因特异性引物在TCRA或TCRB恒定区中进行TCR Rep-Seq。利用KAPA Hyper Prep试剂盒处理经纯化的5'RACE PCR产物,以制备测序文库。利用Illumina MiSeq 500次循环V2试剂盒,通过双末端250×2次循环进行测序。将MiSeq读取的双末端读段提交至MixCR,以便进行TCRA和TCRB重排分析。根据MixCR结果汇总各样品的独特CDR3氨基酸序列(CDR3克隆)。去除单拷贝CDR3克隆。将克隆型的拷贝数除以样品中所有克隆型的拷贝总数,计算得出克隆型的频率。对数据进行生物信息学分析。按照标准治疗方案或经修改的临床试验方案(其中施用新鲜Treg)进行试验后,结果表明Treg在多样性方面无统计学差异(图11C)。

受试者	年龄	性别	CMV (D/R)	队列	预处理	GVHDPPx	移植时的疾病状态
5126	56	男	-/+	1	TBI/Cy/VP-16	无	AML，活动性病变
5201	61	女	-/-	1A	TBI/Cy/VP-16	无	AML，CR2
5534	65	男	-/-	1A	TBI/Cy/VP-16	无	MDS，RAEB2，活动性病变
5902	45	女	+/+	1A	BCNU/VP-16/Cy	无	γδ NHL，活动性病变
6157	51	男	+/+	1A	TBI/Cy/VP-16	无	AML，活动性病变
6666	49	男	-/-	1A	BCNU/VP-16/Cy	西罗莫司	难治性 NHL，活动性病变
6708	42	男	+/-	2A	Bu/Cy	西罗莫司	FLT3 + AML，CR2
6784	34	男	+/+	2A	TBI/Cy/VP-16	西罗莫司	ETP-ALL，活动性病变
6820	20	男	+/+	2A	Bu/Cy	他克莫司	ALL，CR2 (MRD+)
6857	54	男	+/-	2A	Bu/Cy	他克莫司	CML 爆发危机，活动性病变
6948	53	男	-/-	2A	Bu/Cy	他克莫司	AML，CR2
7011	56	男	+/-	2A	Bu/Cy	他克莫司	MF，活动性病变

图1

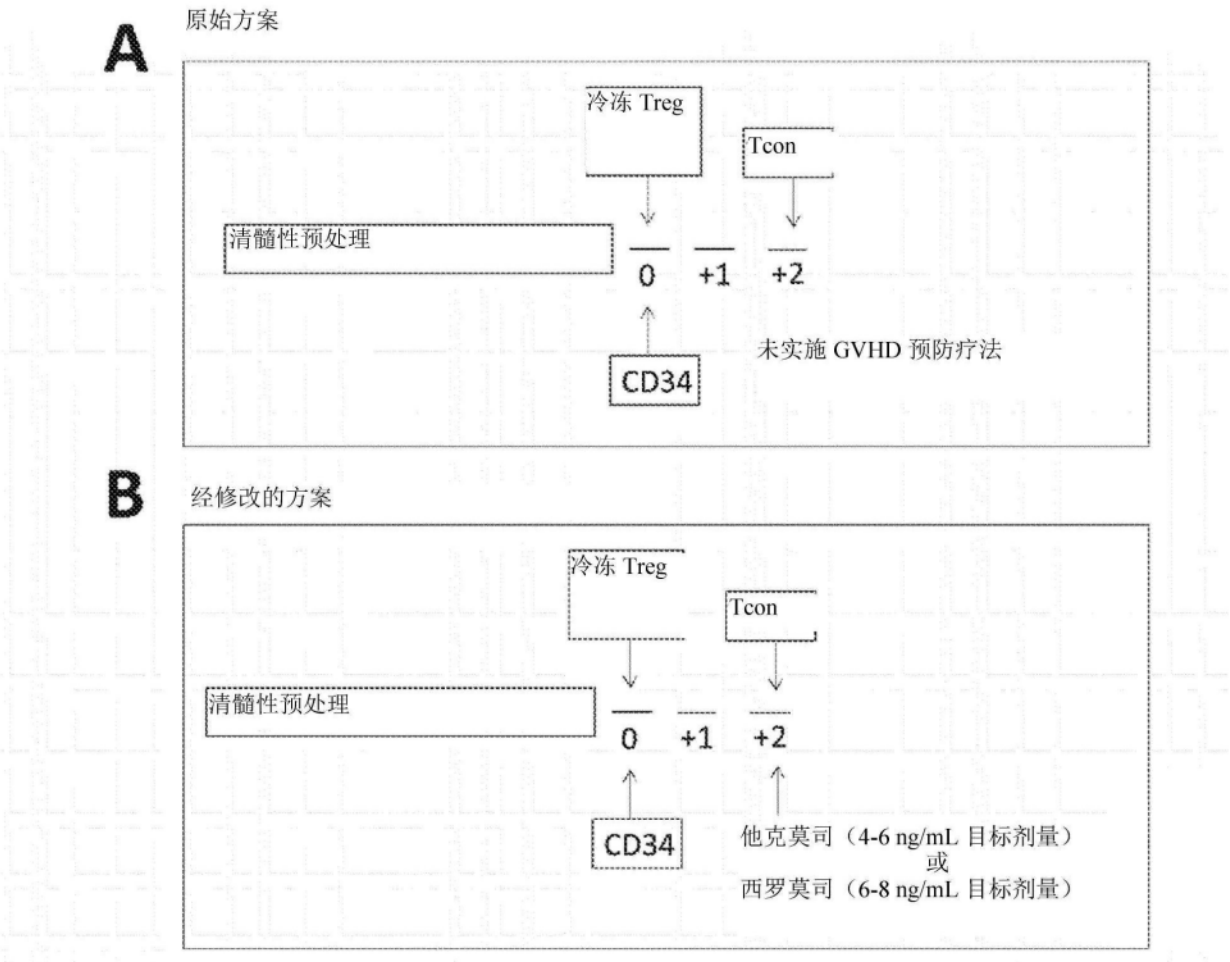


图2

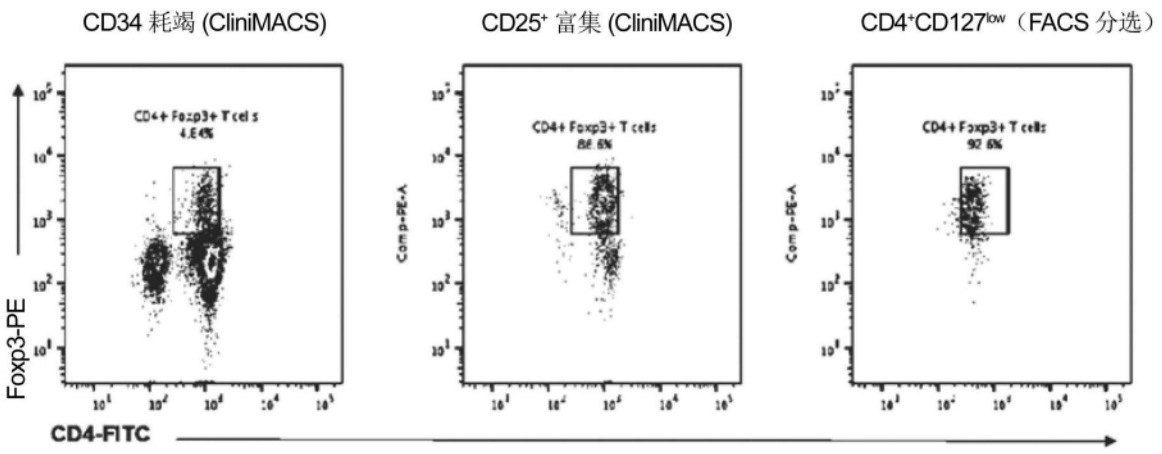

CD34 耗竭 (CliniMACS)
CD25+ 富集 (CliniMACS)
CD4+CD127low（FACS 分选）
CD4+ Foxp3+ T cells
4.64%
CD4+ Foxp3+ T cells
88.6%
CD4+ Foxp3+ T cells
92.6%
Foxp3-PE
CD4-FITC
Comp-PE-A

图3

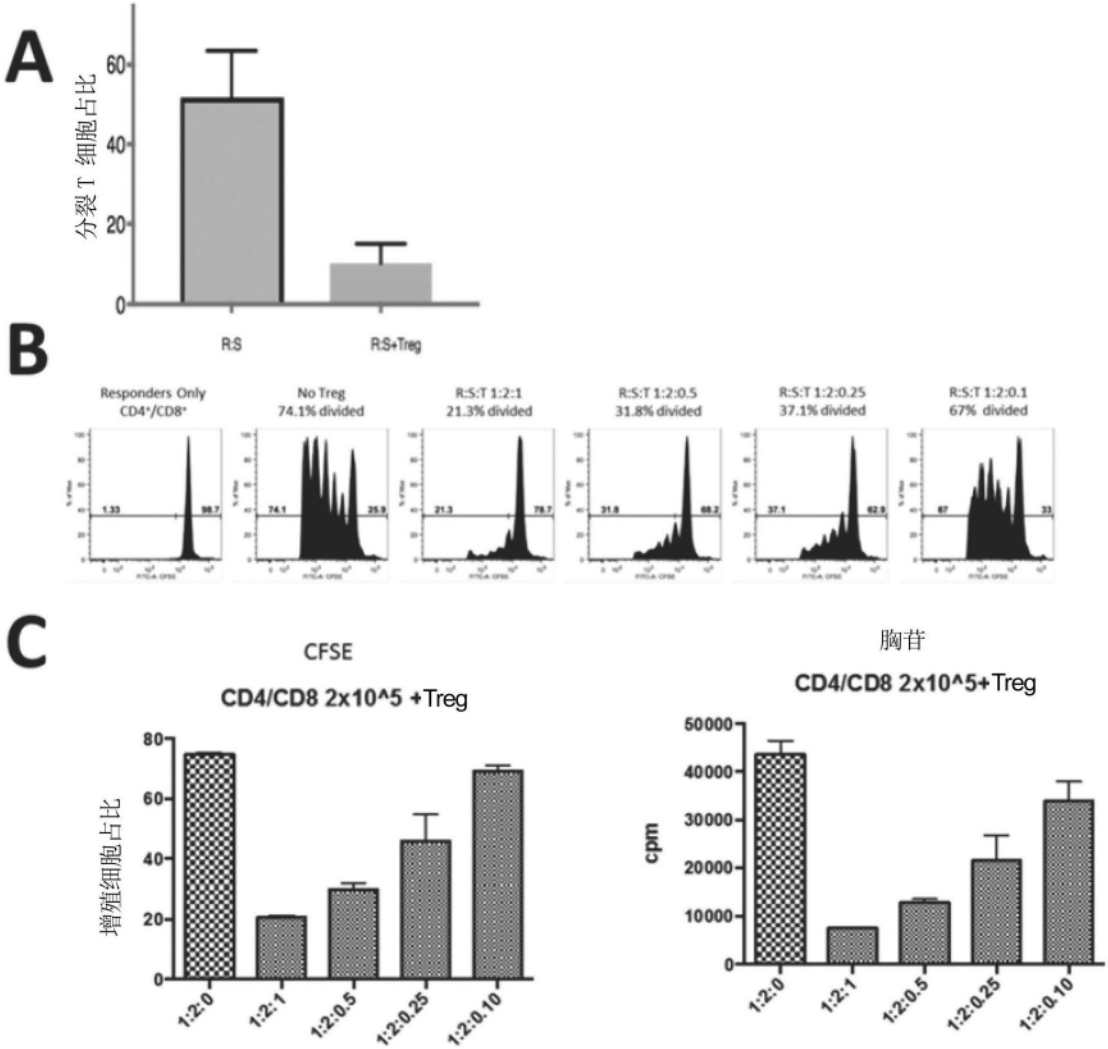

A
分裂 T 细胞占比
60
40
20
0
R:S
R:S+Treg
B
Responders Only
CD4+/CD8+
No Treg
74.1% divided
R:S:T 1:2:1
21.3% divided
R:S:T 1:2:0.5
31.8% divided
R:S:T 1:2:0.25
37.1% divided
R:S:T 1:2:0.1
67% divided
C
CFSE
CD4/CD8 2x10^5 +Treg
增殖细胞占比
80
60
40
20
0
1:2:0
1:2:1
1:2:0.5
1:2:0.25
1:2:0.10
胸苷
CD4/CD8 2x10^5+Treg
cpm
50000
40000
30000
20000
10000
0
1:2:0
1:2:1
1:2:0.5
1:2:0.25
1:2:0.10

图4

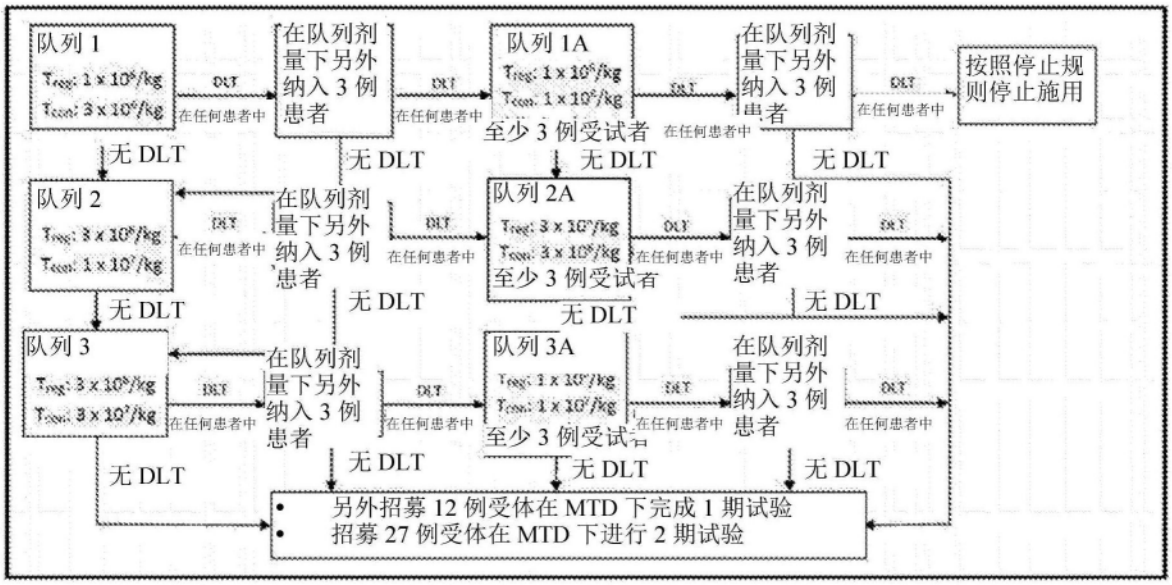

队列 1
在队列剂量下另外纳入 3 例患者
队列 1A
在队列剂量下另外纳入 3 例患者
按照停止规则停止施用
至少 3 例受试者
DLT
在任何患者中
无 DLT
队列 2
在队列剂量下另外纳入 3 例患者
队列 2A
在队列剂量下另外纳入 3 例患者
至少 3 例受试者
队列 3
在队列剂量下另外纳入 3 例患者
队列 3A
在队列剂量下另外纳入 3 例患者
至少 3 例受试者
• 另外招募 12 例受体在 MTD 下完成 1 期试验
• 招募 27 例受体在 MTD 下进行 2 期试验

图5

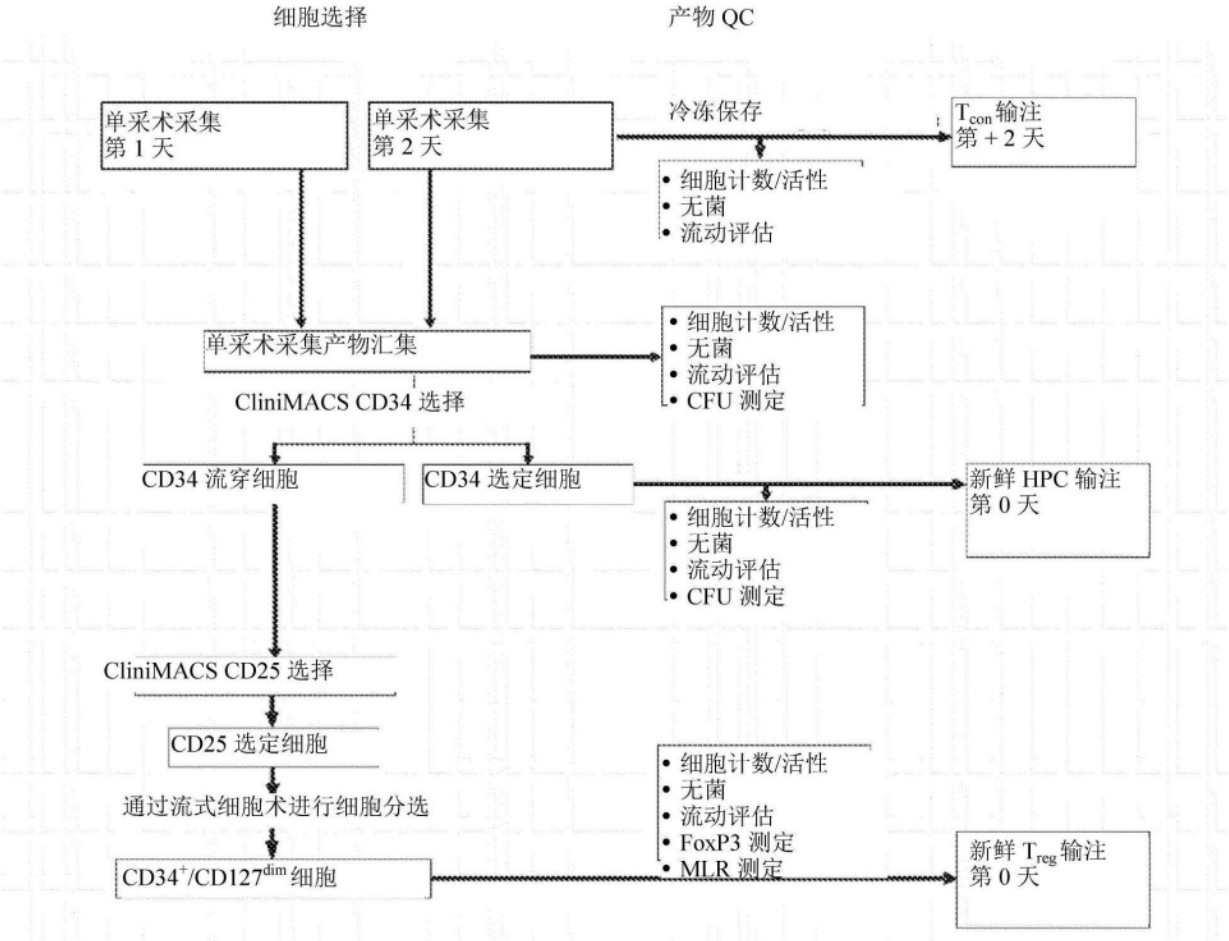

细胞选择
产物 QC
单采术采集 第 1 天
单采术采集 第 2 天
冷冻保存
T_{con} 输注 第 + 2 天
• 细胞计数/活性
• 无菌
• 流动评估
单采术采集产物汇集
• 细胞计数/活性
• 无菌
• 流动评估
• CFU 测定
CliniMACS CD34 选择
CD34 流穿细胞
CD34 选定细胞
新鲜 HPC 输注 第 0 天
CliniMACS CD25 选择
CD25 选定细胞
通过流式细胞术进行细胞分选
$CD34^{+}/CD127^{dim}$ 细胞
• FoxP3 测定
• MLR 测定
新鲜 T_{reg} 输注 第 0 天

图6

	患者	分选后的 FoxP3$^+$占比	分选前的 T_{reg} 计数	分选后的 T_{reg} 计数	回收率
原始方案：**冷冻 T_{reg}**	5126	96	156×10^6	101×10^6	64.7
	5201	96	150×10^6	130×10^6	86.6
	5534	91	150×10^6	112×10^6	74.7
	5902	96	82×10^6	72×10^6	87.8
	6157	94	234×10^6	120×10^6	51.2
经修改的方案：**新鲜 T_{reg}**	6666	94	111×10^6	73×10^6	65.8
	6708	96	137×10^6	72×10^6	52.2
	6784	94	130×10^6	66×10^6	50.7
	6820	92	159×10^6	105×10^6	66.0
	6857	92	293×10^6	191×10^6	79.9
	6948	95	162×10^6	110×10^6	67.9
	7011	92	67×10^6	50×10^6	74.6

图7

	受试者	剂量（T_{reg} 数/kg）	剂量（T_{con} 数/kg）	剂量（CN34$^+$细胞数/kg）
原始方案：**冷冻 T_{reg}**	5126	1.0×10^6	3.0×10^6	4.6×10^6
	5201	1.0×10^6	1.0×10^6	4.2×10^6
	5534	1.0×10^6	1.0×10^6	3.6×10^6
	5902	1.0×10^6	1.0×10^6	4.9×10^6
	6157	1.0×10^6	1.0×10^6	7.4×10^6
经修改的方案：**新鲜 T_{reg}**	6666	1.0×10^6	1.0×10^6	1.2×10^6
	6708	2.4×10^6	3.0×10^6	14.7×10^6
	6784	2.5×10^6	3.0×10^6	5.8×10^6
	6820	2.3×10^6	3.0×10^6	15.9×10^6
	6857	3.0×10^6	3.0×10^6	6.8×10^6
	6948	2.6×10^6	3.0×10^6	3.6×10^6
	7011	2.5×10^6	3.0×10^6	5.2×10^6

图8

	受试者	疾病	移植时的疾病状态	aGVHD	cGVHD	疾病复发	最后一次随访时的状态	严重不良事件(SAE)
原始方案：**冷冻 T_{reg}**	5126	AML	难治性疾病	有，3级，GI和肝脏	不适用	顽固性疾病	第+56天，死亡	严重肺部感染
	5201	AML	CR2	有，3级，皮肤和肝脏	轻度，第+474天	无	第+1887天，缓解	CMV重新激活
	5534	MDS，RAEB2	难治性疾病	无	不适用	顽固性疾病	第+64天，死亡	移植物丢失，真菌性肺炎
	5902	γδ NHL	难治性疾病	有，1级，皮肤	轻度，第+145天	无	第+1184天，缓解	革兰氏阴性菌血症
	6157	AML	难治性疾病	有，1级，皮肤	无	第+175天	第+212天，死亡	急性憩室炎，HHV6病毒血症
经修改的方案：**新鲜 T_{reg}**	6666	难治性NHL	难治性疾病	无	无	顽固性疾病	第+236天，缓解；第+247天，死亡	CoNS菌血症
	6708	FLT3+AML	CR2	无	无	第+483天	第+635天，缓解	轻度VOD
	6784	ETP-ALL	难治性疾病	无	无	无	第+529天，缓解	口唇疱疹
	6820	ALL	CR2 (MRD+)	无	无	无	第+501天，缓解	急性胆囊炎，播散性念珠菌病，CMV重新激活
	6857	CML爆发危机	难治性疾病	无	无	顽固性疾病	第+539天	冠状病毒URI
	6948	AML	CR2	无	无	无	第+447天，缓解	非特异性转氨酶升高
	7011	MF	难治性疾病	无	无	无	第+411天，缓解	轻型链球菌菌血症

图9

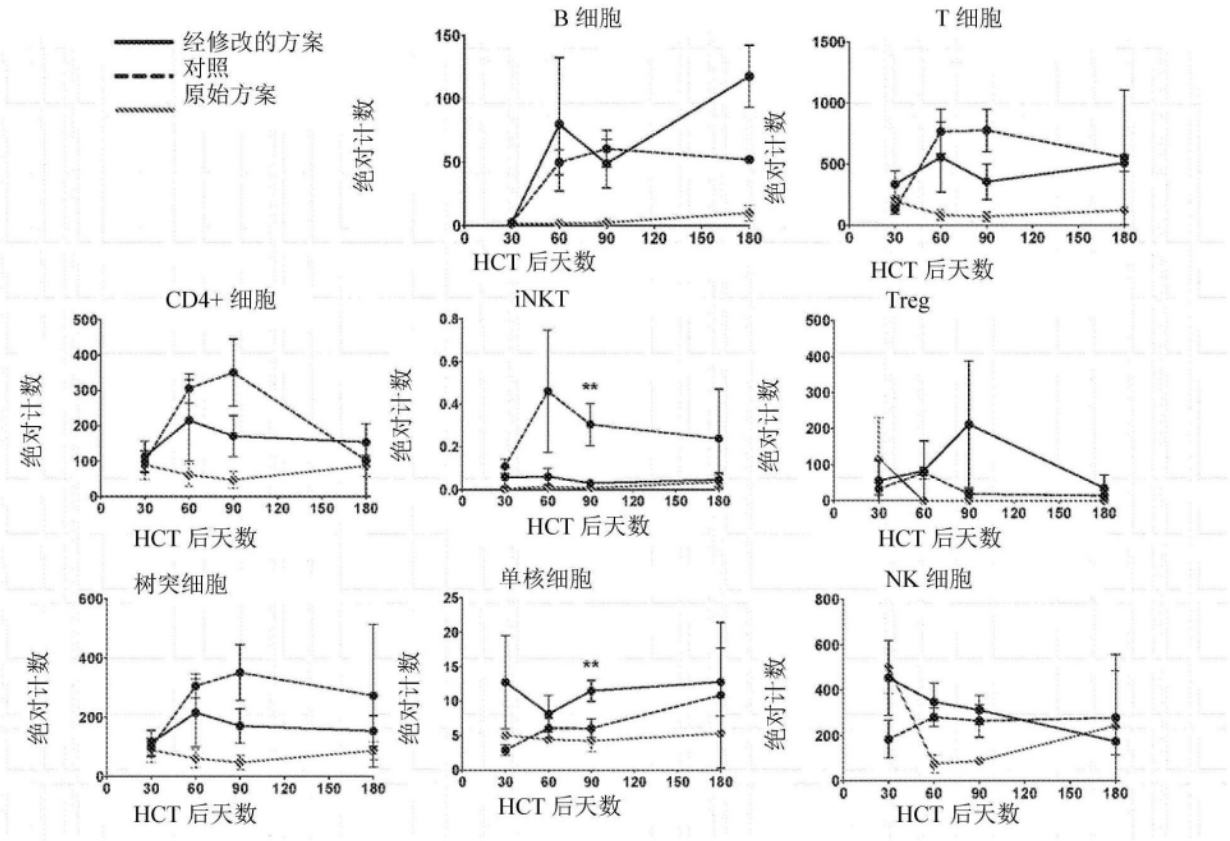

经修改的方案
对照
原始方案
B 细胞
T 细胞
CD4+ 细胞
iNKT
Treg
树突细胞
单核细胞
NK 细胞
绝对计数
HCT 后天数
**

图10

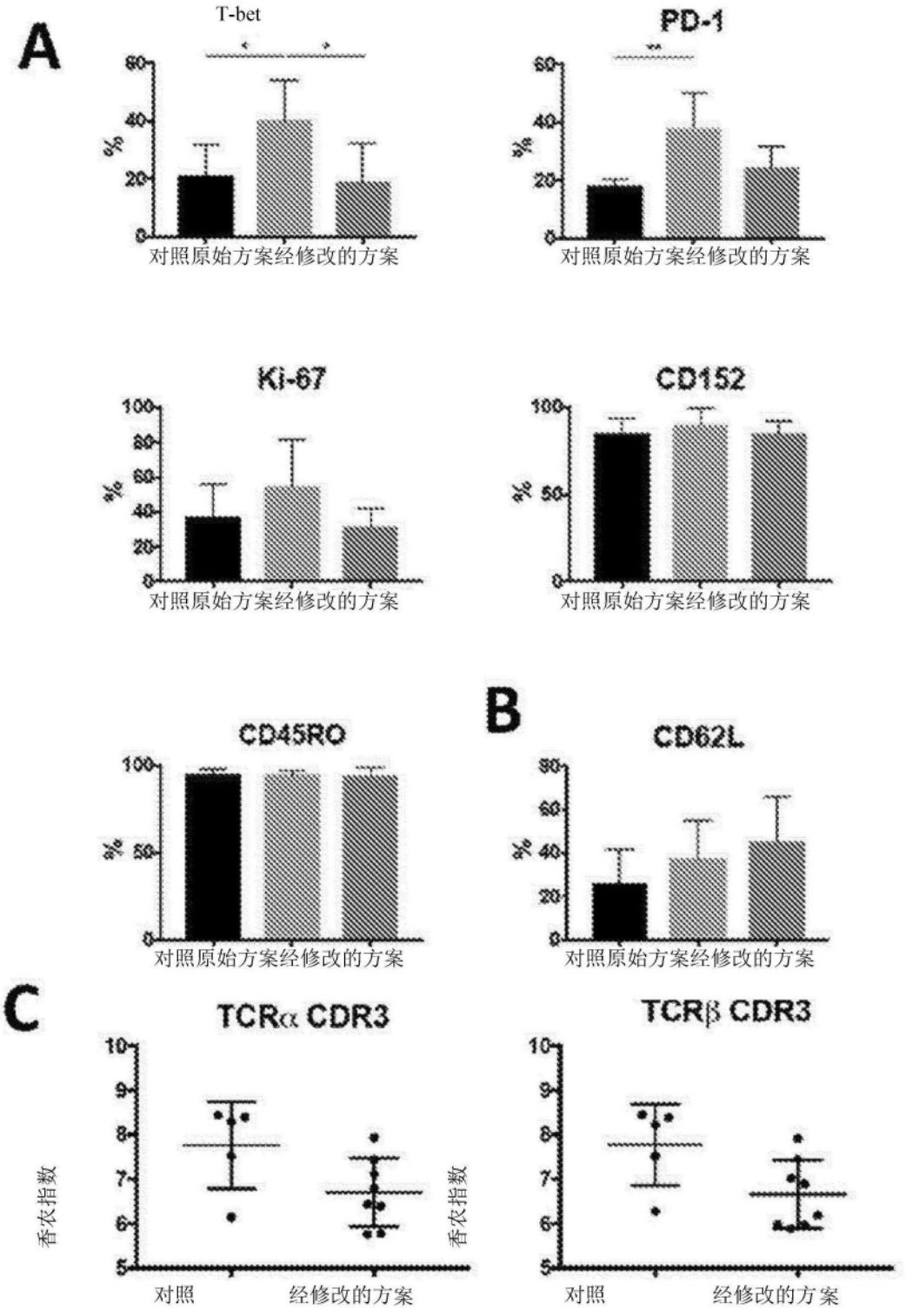

A
T-bet
%
对照原始方案经修改的方案
PD-1
%
对照原始方案经修改的方案
Ki-67
%
对照原始方案经修改的方案
CD152
%
对照原始方案经修改的方案
B
CD45RO
%
对照原始方案经修改的方案
CD62L
%
对照原始方案经修改的方案
C
TCRα CDR3
香农指数
对照
经修改的方案
TCRβ CDR3
香农指数
对照
经修改的方案

图11