



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119136843 A

(43) 申请公布日 2024. 12. 13

(21) 申请号 202280092915.2

(22) 申请日 2022.12.27

(30) 优先权数据

63/295,491 2021.12.30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.08.30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/082431 2022.12.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/129929 EN 2023.07.06

(71) 申请人 TR1X股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 J·E·德弗里斯 M·G·龙卡罗洛

X·帕利阿德 D·德弗里斯

(74) 专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司

11713

专利代理师 王建秀 刘小立

(51) Int.Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 35/17 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01)

C12N 5/0783 (2006.01)

权利要求书15页 说明书92页

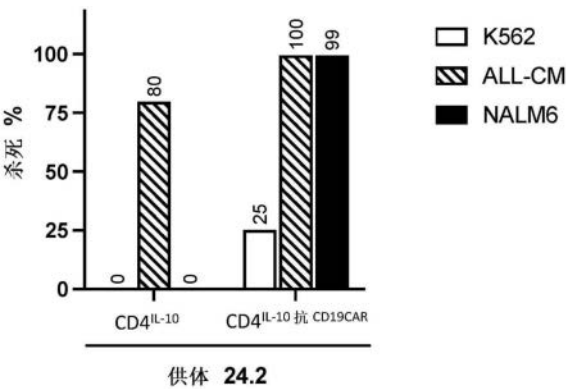
序列表(电子公布) 附图68页

(54) 发明名称

表达IL-10和嵌合抗原受体的CD4⁺ T细胞及其用途

(57) 摘要

本公开内容提供了CD4^{IL-10/CAR}细胞群(自体或同种异体单供体和同种异体多供体),其通过对CD4⁺T细胞进行遗传修饰以表达IL-10和嵌合抗原受体而生成。还提供了生成CD4^{IL-10/CAR}细胞的方法以及使用CD4^{IL-10/CAR}细胞用于免疫耐受、治疗GvHD、细胞和器官移植、癌症以及其他自身免疫性疾病和炎性疾病的方法。



1. 一种遗传修饰的CD4⁺T细胞(CD4^{IL-10/CAR}),其包含:
 - (a) 编码嵌合抗原受体(CAR)的第一外源多核苷酸区段;和
 - (b) 编码白介素-10(IL-10)的第二外源多核苷酸区段。
2. 根据权利要求1所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述第一外源多核苷酸区段包含与所述CAR的编码序列可操作地连接的第一调控元件。
3. 根据权利要求2所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述调控元件驱动所述CAR的组成型表达。
4. 根据权利要求1-3中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述CAR包含抗原结合结构域、铰链区、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域。
5. 根据权利要求4所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述抗原结合结构域是单链抗体片段。
6. 根据权利要求5所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述单链抗体片段包含单链Fv(scFv)。
7. 根据权利要求4-6中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述抗原结合结构域靶向与自身免疫性疾病、炎性疾病或癌症相关的抗原。
8. 根据权利要求7所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述抗原选自由以下组成的组: CD19、CD20、CD22、CD27、CD38、B7-H3、CD23、Lym1、Lym2、CLEC5A、CDH179b、FLT3、GCC、Muc、BCMA、CSF2RA、GFRa4、CD32、CD33、CEA、IL11Ra、IL13Ra、NYBRI、SLa、CD200R、TGFβR2、CD276、TROP2、LAMP1、PTK7、DLL3、CDH1、CDH6、CDH17、CDH19、TSHR、酪氨酸酶、HLA-A*02、HLA-A*24或瓜氨酸化肽、胰岛素、MOG、GAD65、IA2、醇溶蛋白和桥粒黏蛋白。
9. 根据权利要求4-8中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述抗原结合结构域包含抗CD19抗原结合结构域。
10. 根据权利要求9所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述抗CD19抗原结合结构域具有SEQ ID NO:11的序列。
11. 根据权利要求4-8中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中抗原结合结构域是抗BCMA抗原结合结构域。
12. 根据权利要求10所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述抗BCMA抗原结合结构域包含SEQ ID NO:50-53的序列。
13. 根据权利要求1-12中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述铰链区选自人CD8α铰链区、人CD28铰链区、IgG1铰链区或IgG4铰链区。
14. 根据权利要求13所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述铰链区源自人CD8α。
15. 根据权利要求1-14中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述跨膜结构域选自TNFRSF 19跨膜结构域、CD3ζ跨膜结构域、CD8α跨膜结构域、CD4跨膜结构域、CD28跨膜结构域或B7家族诱导型共刺激(ICOS)跨膜结构域。
16. 根据权利要求15所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述跨膜结构域源自CD8α。
17. 根据权利要求1-16中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述CAR进一步包含一个或多个共刺激结构域。
18. 根据任何权利要求17所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述CAR包含两个共刺激结构域。

19. 根据权利要求1-18中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述一个或更多个共刺激结构域选自自由4-1BB、CD28、OX40、ICOS、CD27、MYD88-CD40和KIR2DS2组成的组。

20. 根据权利要求19所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述一个或更多个共刺激结构域中的一个源自CD28。

21. 根据权利要求18-20中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中第二共刺激结构域源自4-1BB。

22. 根据权利要求1-21中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述细胞内信号传导结构域包含基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)。

23. 根据权利要求1-22中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,所述基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)源自CD3 ζ 。

24. 根据权利要求1-23中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述CAR包含:

抗CD19抗原结合结构域、抗BCMA抗原结合结构域或抗CD20抗原结合结构域;

人CD8 α 铰链区;

人CD8 α 跨膜区;

CD28共刺激结构域;和

CD3 ζ 链细胞内信号传导结构域。

25. 根据权利要求1-24中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述CAR包含SEQ ID NO:9、16、22、34、41-49或54的序列。

26. 根据权利要求25所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述第一外源多核苷酸区段包含SEQ ID NO:10、17、23、35或55的序列。

27. 根据权利要求1-26中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述第一外源多核苷酸区段被整合至T细胞核基因组中。

28. 根据权利要求1-27中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述第一外源多核苷酸区段没有被整合至T细胞核基因组中。

29. 根据权利要求27或28所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述第一外源多核苷酸区段在载体中。

30. 根据权利要求1-29中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述第二外源多核苷酸区段包含与IL-10的编码序列可操作地连接的第二调控元件。

31. 根据权利要求1-30中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述IL-10是人IL-10。

32. 根据权利要求1-30中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述IL-10是病毒IL-10。

33. 根据权利要求1-30中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述IL-10是具有SEQ ID NO:1的序列的蛋白。

34. 根据权利要求33所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述第二外源多核苷酸区段具有SEQ ID NO:2的序列。

35. 根据权利要求30-34中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述第二调控元件驱动所述IL-10的组成型或诱导型表达。

36. 根据权利要求1-35中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述第二外源多核

核苷酸区段被整合至T细胞核基因组中。

37. 根据权利要求1-35中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述第二外源多核苷酸区段没有被整合至T细胞核基因组中。

38. 根据权利要求36或37所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述第二外源多核苷酸区段在载体中。

39. 根据权利要求1-38中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述第一外源多核苷酸区段和所述第二外源多核苷酸区段在同一载体中。

40. 根据任何权利要求29、38或39所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述载体是病毒载体。

41. 根据权利要求40所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述载体是慢病毒载体。

42. 根据权利要求1-41中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述CD4⁺T细胞组成型表达至少100pg IL-10/10⁶个CD4⁺T细胞/mL培养基。

43. 根据权利要求42所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述CD4⁺T细胞组成型表达至少100pg、200pg、500pg、1ng、5ng、10ng或50ng IL-10/10⁶个CD4⁺T细胞/mL。

44. 根据权利要求1-43中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述CD4⁺T细胞在用抗CD3和抗CD28抗体激活后表达至少1ng IL-10/10⁶个CD4⁺T细胞/mL。

45. 根据权利要求44所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述CD4⁺T细胞在用抗CD3和抗CD28抗体激活后表达至少2ng、5ng、10ng、100ng、200ng或500ng IL-10/10⁶个CD4⁺T细胞/mL。

46. 根据权利要求1-45中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述CD4⁺T细胞以比未修饰的CD4⁺T细胞高至少5倍的水平表达IL-10。

47. 根据权利要求46所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述CD4⁺T细胞以比未修饰的CD4⁺T细胞高至少10倍的水平表达IL-10。

48. 根据权利要求1-47中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述第一外源多核苷酸区段、第二外源多核苷酸区段或两者进一步包含编码选择标志物的序列。

49. 根据权利要求48所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述选择标志物是ΔNGFR。

50. 根据权利要求49所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述ΔNGFR具有SEQ ID NO:3的序列。

51. 根据权利要求50所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述第二外源多核苷酸区段包含SEQ ID NO:4的序列。

52. 根据权利要求48所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述选择标志物是截短形式的EGFR多肽。

53. 根据权利要求9-10或当从属于权利要求9时的权利要求13-52中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述CD4⁺T细胞能够对CD19⁺靶细胞产生体外细胞毒性。

54. 根据权利要求9-10或当从属于权利要求9时的权利要求13-52中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述CD4⁺T细胞能够对CD19⁺靶细胞产生体内细胞毒性。

55. 根据权利要求53或54所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述CD19⁺靶细胞是产生自身抗体的B细胞。

56. 根据权利要求53或54所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述CD19⁺靶细胞是CD19⁺癌细胞。

57. 根据权利要求1-56中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述CD4⁺T细胞能够对髓系靶细胞产生体外细胞毒性。

58. 根据权利要求1-56中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述CD4⁺T细胞能够对髓系靶细胞产生体内细胞毒性。

59. 根据权利要求53-58中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述CD4⁺T细胞能够对CD19⁺靶细胞和髓系靶细胞产生细胞毒性。

60. 根据权利要求57-59中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述髓系靶细胞表达I类MHC、CD13、CD54和CD112中的一种或更多种。

61. 根据权利要求53-60中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中对CD19⁺靶细胞的细胞毒性在一次或更多次体外再刺激后被维持。

62. 根据权利要求53-60中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中对髓系靶细胞的细胞毒性在一次或更多次体外再刺激后被维持。

63. 根据权利要求1-62中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述CD4⁺T细胞能够抑制同种异体CD4⁺T细胞增殖。

64. 根据权利要求1-63中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述CD4⁺T细胞能够抑制同种异体CD8⁺T细胞增殖。

65. 根据权利要求1-64中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中所述CD4⁺T细胞能够抑制同种异体CD4⁺T细胞增殖、同种异体CD8⁺T细胞增殖和同种异体PBMC。

66. 根据权利要求63-65中任一项所述的遗传修饰的CD4⁺T细胞,其中抑制特性在一次或更多次体外再刺激后被维持。

67. 一种CD4⁺T细胞群,其包含权利要求1-66中任一项的遗传修饰的CD4⁺细胞。

68. 根据权利要求67所述的CD4⁺T细胞群,其中遗传修饰之前的CD4⁺T细胞是从一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个T细胞供体获得并合并的。

69. 根据权利要求68所述的CD4⁺T细胞群,其中所述群中的CD4⁺T细胞总共具有六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或更多种不同的HLA单倍型。

70. 根据权利要求67-69中任一项所述的CD4⁺T细胞群,其中所述群中的所有CD4⁺T细胞在HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1和HLA-DQB1基因座处彼此具有至少1/10、2/10、3/10、4/10、5/10、6/10、7/10、8/10或9/10的匹配。

71. 根据权利要求67-70中任一项所述的CD4⁺T细胞群,其中所述群中的所有CD4⁺T细胞在HLA-A、HLA-B、HLA-C和HLA-DRB1基因座处彼此具有至少1/8、2/8、3/8、4/8、5/8、6/8、7/8或8/8的匹配。

72. 根据权利要求67-71中任一项所述的CD4⁺T细胞群,其中所述群中的所有CD4⁺T细胞在HLA-A基因座处彼此具有2/2的匹配。

73. 根据权利要求67-72中任一项所述的CD4⁺T细胞群,其中所述群中的所有CD4⁺T细胞在HLA-B基因座处彼此具有2/2的匹配。

74. 根据权利要求67-73中任一项所述的CD4⁺T细胞群,其中所述群中的所有CD4⁺T细胞在HLA-C基因座处彼此具有2/2的匹配。

75. 根据权利要求67-74中任一项所述的CD4⁺T细胞群,其中所述群中的所有CD4⁺T细胞在HLA-DRB1和HLA-DQB1基因座处彼此具有至少3/4或4/4的匹配。

76. 根据权利要求67-69中任一项所述的CD4⁺T细胞群,其中所述群中的所有CD4⁺T细胞在HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1和HLA-DQB1基因座处彼此具有小于5/10、6/10、7/10、8/10、或9/10的匹配。

77. 根据权利要求76所述的CD4⁺T细胞群,其中所述群中的所有CD4⁺T细胞在HLA-A、HLA-B、HLA-C和HLA-DRB1基因座处彼此具有小于4/8、5/8、6/8、7/8或8/8的匹配。

78. 根据权利要求76-77中任一项所述的CD4⁺T细胞群,其中所述群中的所有CD4⁺T细胞在HLA-A基因座处彼此具有小于2/2的匹配。

79. 根据权利要求76-78中任一项所述的CD4⁺T细胞群,其中所述群中的所有CD4⁺T细胞在HLA-B基因座处彼此具有小于2/2的匹配。

80. 根据权利要求76-79中任一项所述的CD4⁺T细胞群,其中所述群中的所有CD4⁺T细胞在HLA-C基因座处彼此具有小于2/2的匹配。

81. 根据权利要求76-80中任一项所述的CD4⁺T细胞群,其中所述群中的所有CD4⁺T细胞在HLA-DRB1和HLA-DQB1基因座处彼此具有小于2/4、3/4或4/4的匹配。

82. 根据前述权利要求67-81中任一项所述的CD4⁺T细胞群,其中所述群中的所有CD4⁺T细胞具有A*02等位基因或全部为A*02阴性。

83. 根据前述权利要求67-81中任一项所述的CD4⁺T细胞群,其中所述群中的所有CD4⁺T细胞具有A*24等位基因或全部为A*24阴性。

84. 根据权利要求67-83中任一项所述的CD4⁺T细胞群,其中NGFR⁺细胞群内至少30%的CD4⁺T细胞表达CAR。

85. 根据权利要求84所述的CD4⁺T细胞群,其中所述NGFR⁺细胞群内至少60%的CD4⁺T细胞表达CAR。

86. 根据权利要求85所述的CD4⁺T细胞群,其中所述NGFR⁺细胞群内至少90%的CD4⁺T细胞表达CAR。

87. 根据权利要求67-86中任一项所述的CD4⁺T细胞群,其中所述CD4⁺T细胞处于冷冻悬浮液中。

88. 根据权利要求67-86中任一项所述的CD4⁺T细胞群,其中所述CD4⁺T细胞处于液体悬浮液中。

89. 根据权利要求88所述的CD4⁺T细胞群,其中所述液体悬浮液先前已被冷冻。

90. 一种药物组合物,其包含权利要求1-66中任一项的遗传修饰的CD4⁺T细胞或权利要求67-89中任一项的CD4⁺T细胞群。

91. 一种制备遗传修饰的CD4⁺T细胞(CD4^{IL-10/CAR})细胞的方法,其包括以下步骤:

(a) 从一个或多个T细胞供体获得原代CD4⁺T细胞;以及

(b) 通过引入以下多核苷酸区段来修饰所述CD4⁺T细胞:

(i) 编码嵌合抗原受体(CAR)的第一外源多核苷酸区段,和

(ii) 编码IL-10的第二外源多核苷酸区段。

92. 根据权利要求91所述的方法,其中在步骤(a)中,所述原代CD4⁺T细胞从两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个不同的T细胞供体获得。

93. 根据权利要求92所述的方法,所述方法进一步包括合并来自步骤(b)的遗传修饰的CD4⁺T细胞。

94. 根据权利要求91所述的方法, 其中在步骤(a)中, 所述原代CD4⁺T细胞是患者自体的。

95. 根据权利要求91-94中任一项所述的方法, 所述方法在步骤(a)之后和步骤(b)之前, 或在步骤(b)之后进一步包括以下步骤:

在抗CD3抗体和抗CD28抗体的存在下或者抗CD3抗体和CD28抗体包被的珠或聚合物纳米基质试剂的存在下孵育所述CD4⁺T细胞, 以通过CD3和CD28激活和扩增人T细胞, 或在其他T细胞特异性免疫细胞培养基、激活剂和补充剂的存在下孵育所述CD4⁺T细胞。

96. 根据权利要求95所述的方法, 进一步在IL-2的存在下孵育所述CD4⁺T细胞。

97. 根据权利要求91-96中任一项所述的方法, 其中使用一种或更多种病毒载体, 将所述第一外源多核苷酸区段、第二外源多核苷酸区段或两者引入所述原代CD4⁺T细胞中。

98. 根据权利要求97所述的方法, 其中所述病毒载体是慢病毒载体。

99. 根据权利要求91-98中任一项所述的方法, 其中所述CAR对与自身免疫性疾病、炎性疾病或癌症相关的靶抗原具有特异性。

100. 根据权利要求99所述的方法, 其中所述靶抗原与自身免疫性疾病、炎性疾病或癌症相关。

101. 根据权利要求91-100中任一项所述的方法, 其中所述CAR是抗CD19 CAR、抗CD20 CAR、抗CD22 CAR、抗BCMACAR、抗B7-H3 CAR、抗CD27 CAR或抗CD38 CAR。

102. 根据权利要求91-101中任一项所述的方法, 其中所述CAR具有SEQ ID NO:9、16、22、34、41-49或54的序列。

103. 根据权利要求91-102中任一项所述的方法, 其中所述第一外源多核苷酸区段具有SEQ ID NO:10、17、23、35或55的序列。

104. 根据权利要求91-103中任一项所述的方法, 其中所述IL-10具有SEQ ID NO:1的序列。

105. 根据权利要求91-104中任一项所述的方法, 其中所述第二外源多核苷酸区段具有SEQ ID NO:2的序列。

106. 根据权利要求91-105中任一项所述的方法, 其中所述第一外源多核苷酸区段、第二外源多核苷酸区段或两者进一步包含编码选择标志物的区段。

107. 根据权利要求106所述的方法, 其中编码的选择标志物是 Δ NGFR。

108. 根据权利要求107所述的方法, 其中所述编码的选择标志物具有SEQ ID NO:3的序列。

109. 根据权利要求106所述的方法, 其中所述选择标志物是截短形式的EGFR多肽。

110. 根据权利要求91-109中任一项所述的方法, 所述方法在步骤(b)之后进一步包括以下步骤:

(c) 分离表达选择标志物的遗传修饰的CD4⁺T细胞, 从而生成富集的遗传修饰的CD4⁺T细胞群。

111. 根据权利要求110所述的方法, 其中富集的群中至少30%或至少60%的遗传修饰的CD4⁺T细胞表达IL-10和所述CAR。

112. 根据权利要求111所述的方法, 其中富集的群中至少90%的遗传修饰的CD4⁺T细胞表达IL-10和所述CAR。

113. 根据权利要求110-112中任一项所述的方法, 其中富集的群中至少75%的遗传修

饰的CD4⁺T细胞表达所述选择标志物。

114. 根据权利要求113所述的方法, 其中富集的群中至少90%的遗传修饰的CD4⁺T细胞表达所述选择标志物。

115. 根据权利要求110-114中任一项所述的方法, 所述方法在步骤(c)之后进一步包括孵育所述富集的遗传修饰的CD4⁺T细胞群的步骤。

116. 根据权利要求115所述的方法, 其中孵育所述富集的遗传修饰的CD4⁺T细胞群的步骤在IL-2或聚合物纳米基质试剂的存在下, 在(i)抗CD3抗体和抗CD28抗体, 或(ii)用抗CD3抗体和抗CD28抗体包被的珠的存在下进行, 以通过CD3和CD28激活和扩增人T细胞, 或(iii)在其他T细胞特异性免疫细胞培养基、激活剂和补充剂的存在下进行。

117. 根据权利要求91-116中任一项所述的方法, 所述方法进一步包括冷冻所述遗传修饰的CD4⁺T细胞的后续步骤。

118. 根据权利要求92-117中任一项所述的方法, 其中至少两个T细胞供体在HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1和HLA-DQB1基因座处彼此具有至少1/10、2/10、3/10、4/10、5/10、6/10、7/10、8/10或9/10的匹配。

119. 根据权利要求92-118中任一项所述的方法, 其中至少两个T细胞供体在HLA-A、HLA-B、HLA-C和HLA-DRB1基因座处彼此具有至少1/8、2/8、3/8、4/8、5/8、6/8、7/8或8/8的匹配。

120. 根据权利要求92-119中任一项所述的方法, 其中至少两个T细胞供体在HLA-A基因座处彼此具有2/2的匹配。

121. 根据权利要求92-120中任一项所述的方法, 其中至少两个T细胞供体在HLA-B基因座处彼此具有2/2的匹配。

122. 根据权利要求92-121中任一项所述的方法, 其中至少两个T细胞供体在HLA-C基因座处彼此具有2/2的匹配。

123. 根据权利要求92-122中任一项所述的方法, 其中至少两个T细胞供体在HLA-DRB1和HLA-DQB1基因座处彼此具有至少3/4或4/4的匹配。

124. 根据权利要求92-117中任一项所述的方法, 其中至少两个T细胞供体在HLA-A、HLA-B、HLA C、HLA-DRB1和HLA-DQB1基因座处彼此具有小于5/10、6/10、7/10、8/10或9/10的匹配。

125. 根据权利要求124所述的方法, 其中至少两个T细胞供体在HLA-A、HLA-B、HLAC和HLADRB1基因座处彼此具有小于4/8、5/8、6/8、7/8或8/8的匹配。

126. 根据权利要求124-125中任一项所述的方法, 其中至少两个T细胞供体在HLA-A基因座处彼此具有小于2/2的匹配。

127. 根据权利要求124-126中任一项所述的方法, 其中至少两个T细胞供体在HLA-B基因座处彼此具有小于2/2的匹配。

128. 根据权利要求124-127中任一项所述的方法, 其中至少两个T细胞供体在HLA-C基因座处彼此具有小于2/2的匹配。

129. 根据权利要求124-128中任一项所述的方法, 其中至少两个T细胞供体在HLA-DRB1和HLADQB1基因座处彼此具有小于4/2、3/4或4/4的匹配。

130. 根据权利要求92-129中任一项所述的方法, 其中至少两个T细胞供体中的每一个

具有A*02等位基因或为A*02阴性。

131. 根据权利要求92-129中任一项所述的方法,其中至少两个T细胞供体中的每一个具有A*24等位基因或为A*24阴性。

132. 根据权利要求92-131中任一项所述的方法,其中在步骤(a)中,所述原代CD4⁺T细胞从一个或多个冷冻储备液获得。

133. 根据权利要求92-132中任一项所述的方法,其中在步骤(a)中,所述原代CD4⁺T细胞从至少两个不同的T细胞供体的未冷冻的外周血单核细胞获得。

134. 根据权利要求133所述的方法,所述方法进一步包括从所述外周血单核细胞分离CD4⁺T细胞的步骤。

135. 一种用于治疗血液系统癌症的方法,其包括:

向血液系统癌症患者施用足以诱导抗癌作用的治疗有效量的权利要求1-66中任一项的CD4^{IL-10/CAR}细胞、权利要求67-89中任一项的CD4^{IL-10/CAR}细胞群或权利要求90的药物组合物。

136. 根据权利要求135所述的方法,所述方法进一步包括在施用所述CD4^{IL-10/CAR}之前或之后,向所述患者施用allo-HSCT移植物的步骤。

137. 一种治疗恶性肿瘤患者的方法,其包括:

向所述患者施用allo-HSCT移植物,和

施用治疗有效量的权利要求1-66中任一项的CD4^{IL-10/CAR}细胞、权利要求67-89中任一项的CD4^{IL-10/CAR}细胞群或权利要求90的药物组合物。

138. 根据权利要求137所述的方法,其中CD4^{IL-10/CAR}细胞的量还足以抑制或预防移植物抗宿主病(GvHD),而不抑制allo-HSCT的移植物抗白血病病(GvL)或移植物抗肿瘤(GvT)功效。

139. 根据权利要求135-138中任一项所述的方法,其中所述恶性肿瘤或血液系统癌症是髓系白血病。

140. 根据权利要求135-139中任一项所述的方法,其中所述CD4^{IL-10/CAR}细胞靶向并杀死表达CD13的癌细胞。

141. 根据权利要求135-140中任一项所述的方法,其中所述CD4^{IL-10/CAR}细胞靶向并杀死表达HLA-I类的癌细胞。

142. 根据权利要求135-141中任一项所述的方法,其中所述髓系白血病是急性髓系白血病(AML)。

143. 根据权利要求135-138中任一项所述的方法,其中所述恶性肿瘤或血液系统癌症是CD19⁺、CD20⁺、CD22⁺、BCMA⁺、CD27⁺、CD38⁺或B7-H3⁺血液系统癌症。

144. 根据权利要求143所述的方法,其中所述CD19⁺、CD20⁺、CD22⁺、BCMA⁺、CD27⁺、CD38⁺或B7-H3⁺血液系统癌症选自慢性淋巴细胞白血病、急性淋巴母细胞白血病(ALL)和非霍奇金淋巴瘤。

145. 根据权利要求136-144中任一项所述的方法,其中所述allo-HSCT移植物从与所述患者有亲缘关系或无亲缘关系的供体获得。

146. 根据权利要求135-144中任一项所述的方法,其中所述CD4^{IL-10/CAR}细胞对于所述患者是非自体的。

147. 根据权利要求135-144中任一项所述的方法,其中所述CD4^{IL-10/CAR}细胞是所述患者

自体的。

148. 根据权利要求135-144中任一项所述的方法, 其中所述CD4^{IL-10/CAR}细胞对于所述患者是同种异体的。

149. 根据权利要求135-144中任一项所述的方法, 其中所述CD4^{IL-10/CAR}细胞在施用于所述患者之前对宿主同种异体抗原未失去反应性。

150. 根据权利要求135-144中任一项所述的方法, 其中所述CD4^{IL-10/CAR}细胞是Tr1样细胞。

151. 根据权利要求135-144中任一项所述的方法, 其中所述CD4^{IL-10/CAR}细胞是多克隆的。

152. 根据权利要求135-144中任一项所述的方法, 其中所述CD4^{IL-10/CAR}细胞是多克隆的并且对于所述患者是非自体的。

153. 根据权利要求135-144中任一项所述的方法, 其中所述CD4^{IL-10/CAR}细胞是多克隆的并且是所述患者自体的。

154. 根据权利要求135-144中任一项所述的方法, 其中所述CD4^{IL-10/CAR}细胞从至少两个供体分离, 然后被遗传修饰。

155. 根据权利要求154所述的方法, 其中所述至少两个供体中没有一个与allo-HSCT供体是同一供体。

156. 根据权利要求135-155中任一项所述的方法, 其中所述allo-HSCT移植体从与所述患者匹配或不匹配的供体获得。

157. 根据权利要求135-156中任一项所述的方法, 其中所述CD4^{IL-10/CAR}细胞靶向并杀死表达CD19、CD20或BCMA的细胞。

158. 根据权利要求135-157中任一项所述的方法, 其中所述CD4^{IL-10/CAR}细胞靶向并杀死表达CD54的细胞。

159. 根据权利要求135-158中任一项所述的方法, 其中所述CD4^{IL-10/CAR}细胞靶向并杀死表达HLA-I类和CD54的癌细胞。

160. 根据权利要求135-159中任一项所述的方法, 其中所述CD4^{IL-10/CAR}细胞靶向并杀死表达CD112和CD155的癌细胞。

161. 根据权利要求135-160中任一项所述的方法, 其中所述CD4^{IL-10/CAR}细胞靶向并杀死表达CD58的癌细胞。

162. 根据权利要求135-161中任一项所述的方法, 其中所述CD4^{IL-10/CAR}细胞靶向并杀死所述患者中的癌细胞。

163. 根据权利要求135-162中任一项所述的方法, 其中所述CD4^{IL-10/CAR}细胞靶向并杀死所述患者中的实体肿瘤细胞。

164. 根据权利要求136-163中任一项所述的方法, 其中所述CD4^{IL-10/CAR}细胞抑制同种异体CD4⁺T细胞增殖。

165. 根据权利要求136-164中任一项所述的方法, 其中所述CD4^{IL-10/CAR}细胞抑制同种异体CD8⁺T细胞增殖。

166. 根据权利要求136-163中任一项所述的方法, 其中所述CD4^{IL-10/CAR}细胞抑制同种异体CD4⁺T细胞增殖、同种异体CD8⁺T细胞增殖和PBMC。

167. 一种通过同种异体造血干细胞移植 (allo-HSCT) 治疗血液系统癌症的方法, 其包括:

向患者施用allo-HSCT移植植物;

向所述患者施用一定量的 $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞, 任选地其中所述量足以抑制或预防移植植物抗宿主病 (GvHD), 而不抑制所述allo-HSCT移植植物的移植植物抗白血病 (GvL) 或移植植物抗肿瘤 (GvT) 功效,

其中所述 $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞包含 $CD4^+$ T细胞, 所述 $CD4^+$ T细胞是通过载体介导的在组成型或诱导型启动子控制下的人IL-10的编码序列的基因转移和载体介导的在组成型或诱导型启动子控制下的CAR的编码序列的基因转移进行遗传修饰的;

其中所述 $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞靶向并杀死所述患者中的癌细胞;

其中所述 $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞在施用于所述患者之前对宿主同种异体抗原未失去反应性; 并且

其中所述 $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞对于所述患者是非自体的, 并且是Tr1样的。

168. 一种通过同种异体造血干细胞移植 (allo-HSCT) 治疗血液系统癌症的方法, 其包括:

向患者施用allo-HSCT移植植物;

向所述患者施用一定量的 $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞, 任选地其中所述量足以抑制或预防移植植物抗宿主病 (GvHD), 而不抑制所述allo-HSCT移植植物的移植植物抗白血病 (GvL) 或移植植物抗肿瘤 (GvT) 功效,

其中所述 $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞包含 $CD4^+$ T细胞, 所述 $CD4^+$ T细胞是通过载体介导的在组成型或诱导型启动子控制下的人IL-10的编码序列的基因转移和载体介导的在组成型或诱导型启动子控制下的CAR的编码序列的基因转移进行遗传修饰的;

其中所述 $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞靶向并杀死所述患者中的癌细胞;

其中所述 $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞在施用于所述患者之前对宿主同种异体抗原未失去反应性; 并且

其中所述 $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞是所述患者自体的并且是Tr1样的。

169. 一种用于预防患者的 $CD19^+$ 或 $CD20^+$ 、 $CD22^+$ 、 $BCMA^+$ 、 $CD27^+$ 、 $CD38^+$ 或 $B7-H3^+$ 血液系统癌症复发的方法, 其包括:

向被鉴定为处于具有 $CD19^+$ 、 $CD20^+$ 、 $CD22^+$ 、 $BCMA^+$ 、 $CD27^+$ 、 $CD38^+$ 或 $B7-H3^+$ 血液系统癌症复发的风险的患者施用治疗有效量的权利要求1-66中任一项的 $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞、权利要求67-89中任一项的 $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞群或权利要求90的药物组合物, 其中所述治疗有效量足以诱导抗癌作用。

170. 一种用于预防患者的 $B7-H3^+$ 癌症复发的方法, 其包括:

向被鉴定为患有 $B7-H3^+$ 癌症的患者施用足以诱导抗癌作用的治疗有效量的权利要求1-66中任一项的 $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞、权利要求67-89中任一项的 $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞群或权利要求90的药物组合物。

171. 根据权利要求170所述的方法, 其中所述 $B7-H3^+$ 癌症是实体肿瘤。

172. 根据权利要求171所述的方法, 其中所述实体肿瘤选自以下组成的组: 乳腺癌、脑癌、肺癌、肝癌、胃癌、脾癌、结肠癌、肾癌、胰腺癌、前列腺癌、子宫癌、皮肤癌、头癌、颈癌、

肉瘤、神经母细胞瘤和卵巢癌。

173. 一种用于治疗患有微小残留病的癌症患者的方法,其包括:

向被鉴定为患有微小残留病或处于患有微小残留病的风险的患者施用治疗有效量的权利要求1-66中任一项的CD4^{IL-10/CAR}细胞、权利要求67-89中任一项的CD4^{IL-10/CAR}细胞群或权利要求90的药物组合物,其中所述治疗有效量足以诱导抗癌作用。

174. 一种治疗患者的方法,其包括:

向需要免疫耐受的患者施用治疗有效量的权利要求1-66中任一项的CD4^{IL-10/CAR}细胞、权利要求67-89中任一项的CD4^{IL-10/CAR}群或权利要求90的药物组合物。

175. 根据权利要求174所述的方法,所述方法进一步包括解冻CD4^{IL-10/CAR}细胞或CD4^{IL-10/CAR}细胞群的冷冻悬浮液的在先步骤。

176. 根据权利要求174或175所述的方法,其中所述患者患有炎性疾病或自身免疫性疾病。

177. 根据权利要求176所述的方法,其中所述炎性疾病或自身免疫性疾病选自自由以下组成的组:1型糖尿病、自身免疫性葡萄膜炎、自身免疫性肝炎、类风湿性关节炎、银屑病、银屑病关节炎、白癜风、斑秃、多发性硬化、系统性狼疮、炎性肠病、艾迪生病、格雷夫斯病、干燥综合征、桥本甲状腺炎、重症肌无力、自身免疫性血管炎、恶性贫血、溃疡性结肠炎、大疱性疾病、硬皮病和乳糜泻。

178. 根据权利要求177所述的方法,其中所述炎性疾病或自身免疫性疾病是克罗恩病、溃疡性结肠炎、乳糜泻、1型糖尿病、狼疮、银屑病、银屑病关节炎、强直性脊柱炎或类风湿性关节炎。

179. 根据权利要求174所述的方法,其中所述患者患有涉及NLPR3炎症小体过度活跃的疾病或紊乱。

180. 根据权利要求174所述的方法,其中所述患者患有2型糖尿病、神经退行性疾病、心血管疾病或炎性肠病。

181. 根据权利要求174所述的方法,其中所述患者患有涉及由激活的单核细胞、巨噬细胞或树突状细胞产生增加的IL-1 β 的疾病或紊乱。

182. 根据权利要求174所述的方法,其中所述患者患有涉及由激活的单核细胞、巨噬细胞或树突状细胞产生增加的IL-18的疾病或紊乱。

183. 根据权利要求174所述的方法,其中所述患者患有涉及由激活的单核细胞、巨噬细胞或树突状细胞产生增加的成熟胱天蛋白酶1的疾病或紊乱。

184. 根据权利要求174所述的方法,其中所述患者患有过敏性疾病或特应性疾病。

185. 根据权利要求184所述的方法,其中所述过敏性疾病或特应性疾病选自自由以下组成的组:哮喘、特应性皮炎和鼻炎。

186. 根据权利要求174所述的方法,其中所述患者患有食物过敏。

187. 根据权利要求174所述的方法,其中所述患者患有实体肿瘤。

188. 根据权利要求187所述的方法,其中所述实体肿瘤选自自由以下组成的组:乳腺癌、脑癌、肺癌、肝癌、胃癌、脾癌、结肠癌、肾癌、胰腺癌、前列腺癌、子宫癌、皮肤癌、头癌、颈癌、肉瘤、神经母细胞瘤和卵巢癌。

189. 根据权利要求174所述的方法,所述方法进一步包括在施用所述CD4^{IL-10/CAR}细胞、

所述CD4^{IL-10/CAR}细胞群或所述药物组合物之前或之后,对所述患者进行器官移植的步骤。

190. 根据权利要求189所述的方法,其中所述CD4^{IL-10/CAR}细胞、所述CD4^{IL-10/CAR}细胞群或所述药物组合物防止所述器官移植的宿主排斥或降低所述器官移植的宿主排斥的严重程度。

191. 根据权利要求174所述的方法,所述方法进一步包括在施用所述CD4^{IL-10/CAR}细胞、所述CD4^{IL-10/CAR}细胞群或所述药物组合物之前或之后,将iPS细胞衍生的细胞或组织移植至所述患者的步骤。

192. 根据权利要求191所述的方法,其中所述CD4^{IL-10/CAR}细胞、所述CD4^{IL-10/CAR}细胞群或所述药物组合物防止所述细胞移植的宿主排斥或降低所述细胞移植的宿主排斥的严重程度。

193. 根据权利要求174所述的方法,所述方法进一步包括在施用所述CD4^{IL-10/CAR}细胞、所述CD4^{IL-10/CAR}细胞群或所述药物组合物之前或之后,向所述患者施用重组AAV的步骤。

194. 根据权利要求193所述的方法,其中所述CD4^{IL-10/CAR}细胞、所述CD4^{IL-10/CAR}细胞群或所述药物组合物降低对所述重组AAV的免疫应答。

195. 根据权利要求174所述的方法,所述方法进一步包括在施用所述CD4^{IL-10/CAR}细胞、所述CD4^{IL-10/CAR}细胞群或所述药物组合物之前或之后,向所述患者施用除AAV之外的重组病毒载体的步骤。

196. 根据权利要求195所述的方法,其中所述CD4^{IL-10/CAR}细胞、所述CD4^{IL-10/CAR}细胞群或所述药物组合物降低对所述除AAV之外的重组病毒载体的免疫应答。

197. 根据权利要求196所述的方法,所述方法进一步包括在施用所述CD4^{IL-10/CAR}细胞、所述CD4^{IL-10/CAR}细胞群或所述药物组合物之前或之后,向所述患者施用免疫原性治疗蛋白。

198. 根据权利要求197所述的方法,其中所述CD4^{IL-10/CAR}细胞、所述CD4^{IL-10/CAR}细胞群或所述药物组合物降低对所述免疫原性治疗蛋白的免疫应答。

199. 根据权利要求197或198所述的方法,其中所述免疫原性治疗蛋白选自治疗性抗体、因子VIII替代物、细胞因子和细胞因子突变蛋白。

200. 根据权利要求174所述的方法,其中所述患者对病毒或细菌感染具有过度免疫应答。

201. 根据权利要求200所述的方法,其中所述患者患有冠状病毒感染。

202. 根据权利要求174所述的方法,所述方法进一步包括以下步骤:检测从所述患者获得的生物样品中的选择标志物,从而检测CD4^{IL-10/CAR}细胞的存在与否。

203. 根据权利要求202所述的方法,其中所述生物样品是来自所述患者的活检物或血液。

204. 一种治疗或抑制患者的自身免疫性疾病、过敏性疾病或炎性疾病的方法,其包括:

向被鉴定为患有自身免疫性疾病、过敏性疾病或炎性疾病的患者施用足以治疗或抑制所述自身免疫性疾病、过敏性疾病或炎性疾病的的治疗有效量的权利要求1-66中任一项的CD4^{IL-10/CAR}细胞、权利要求67-89中任一项的CD4^{IL-10/CAR}细胞群或权利要求90的药物组合物。

205. 一种用于减少移植有造血干细胞、骨髓细胞、脐血细胞、组织干细胞或实体器官的患者的移植排斥的方法,其包括:

向被鉴定为对所移植的造血干细胞、骨髓细胞或实体器官具有排斥的患者施用足以减

少移植排斥的治疗有效量的权利要求1-66中任一项的CD4^{IL-10/CAR}细胞、权利要求67-89中任一项的CD4^{IL-10/CAR}细胞群或权利要求90的药物组合物。

206. 一种用于治疗患者的移植物抗宿主病 (GvHD) 的方法, 其包括:

向被鉴定为患有移植物抗宿主病 (GvHD) 或处于患有移植物抗宿主病 (GvHD) 的风险的患者施用足以抑制或预防GvHD的治疗有效量的权利要求1-66中任一项的CD4^{IL-10/CAR}细胞、权利要求67-89中任一项的CD4^{IL-10/CAR}细胞群或权利要求90的药物组合物。

207. 根据权利要求206所述的方法, 其中所述移植物抗宿主病 (GvHD) 包括急性GvHD。

208. 根据权利要求206所述的方法, 其中所述移植物抗宿主病 (GvHD) 包括慢性GvHD。

209. 一种用于治疗患者的组织或器官损伤的方法, 其包括:

向被鉴定为具有组织或器官损伤或处于具有组织或器官损伤的风险的患者施用足以诱导组织或器官损伤的修复的治疗有效量的权利要求1-66中任一项的CD4^{IL-10/CAR}细胞、权利要求67-89中任一项的CD4^{IL-10/CAR}细胞群或权利要求90的药物组合物。

210. 一种多核苷酸构建体, 其包含:

(a) 编码嵌合抗原受体 (CAR) 的第一多核苷酸区段; 和

(b) 编码白介素-10 (IL-10) 的第二多核苷酸区段。

211. 根据权利要求210所述的多核苷酸构建体, 其中所述第一多核苷酸区段包含与所述CAR的编码序列可操作地连接的第一调控元件。

212. 根据权利要求211所述的多核苷酸构建体, 其中所述第一调控元件驱动所述CAR的组成型表达。

213. 根据权利要求210-212中任一项所述的多核苷酸构建体, 其中所述第二多核苷酸区段包含与所述IL-10的编码序列可操作地连接的第二调控元件。

214. 根据权利要求213所述的多核苷酸构建体, 其中所述第二调控元件驱动所述IL-10的组成型表达。

215. 根据权利要求210-214中任一项所述的多核苷酸构建体, 进一步包含位于所述第一多核苷酸区段和所述第二多核苷酸区段之间的内部核糖体进入位点 (IRES) 或自切割肽。

216. 根据权利要求215所述的多核苷酸构建体, 其中所述自切割肽选自由F2A、P2A、T2A和E2A组成的组。

217. 根据权利要求210-216中任一项所述的多核苷酸构建体, 其中所述CAR包含抗原结合结构域、铰链区、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域。

218. 根据权利要求217所述的多核苷酸构建体, 其中所述抗原结合结构域包含单链抗体片段。

219. 根据权利要求218所述的多核苷酸构建体, 其中所述单链抗体片段包含单链Fv (scFv)。

220. 根据权利要求210-219中任一项所述的多核苷酸构建体, 其中所述抗原结合结构域靶向与自身免疫性疾病、炎性疾病或癌症相关的抗原。

221. 根据权利要求220所述的多核苷酸构建体, 其中所述抗原选自由以下组成的组: CD19、CD20、CD22、BCMA、CD27、CD38、CEA、B7-H3、CD23、Lym1、Lym2、CLEC5A、CDH179b、FLT3、GCC、Muc、CSF2RA、GFRa4、CD32、CD33、IL11Ra、IL13Ra、NYBRI、SLea、CD200R、TGFβR2、CD276、TROP2、LAMP1、PTK7、DLL3、CDH1、CDH6、CDH17、CDH19、TSHR、酪氨酸酶、HLA-A*02、HLA-A*24瓜

氨酸化肽、胰岛素、MOG、GAD65、IA2、醇溶蛋白和桥粒黏蛋白。

222. 根据权利要求210-221中任一项所述的多核苷酸构建体, 其中所述抗原结合结构域是抗CD19抗原结合结构域。

223. 根据权利要求222所述的多核苷酸构建体, 其中所述抗CD19抗原结合结构域具有SEQ ID NO:11的序列。

224. 根据权利要求210-221中任一项所述的多核苷酸构建体, 其中所述抗原结合结构域是抗BCMA抗原结合结构域。

225. 根据权利要求224所述的多核苷酸构建体, 其中所述抗BCMA抗原结合结构域具有SEQ ID NO:50-53中任一个的序列。

226. 根据权利要求210-225中任一项所述的多核苷酸构建体, 其中所述铰链区选自人CD8 α 铰链区、人CD28铰链区、IgG1铰链区或IgG4铰链区。

227. 根据权利要求226所述的多核苷酸构建体, 其中所述铰链区源自人CD8 α 。

228. 根据权利要求210-227中任一项所述的多核苷酸构建体, 其中所述跨膜结构域选自TNFRSF 19跨膜结构域、CD3 ζ 跨膜结构域、CD8 α 跨膜结构域、CD4跨膜结构域、CD28跨膜结构域或B7家族诱导型共刺激(ICOS)跨膜结构域。

229. 根据权利要求228所述的多核苷酸构建体, 其中所述跨膜结构域源自C CD8 α 。

230. 根据权利要求210-229中任一项所述的多核苷酸构建体, 其中所述CAR进一步包含一个或更多个共刺激结构域。

231. 根据任何权利要求230所述的多核苷酸构建体, 其中所述CAR包含两个共刺激结构域。

232. 根据权利要求210-231中任一项所述的多核苷酸构建体, 其中所述一个或更多个共刺激结构域选自由4-1BB、CD28、OX40、ICOS、CD27、MYD88-CD40和KIR2DS2组成的组。

233. 根据权利要求232所述的多核苷酸构建体, 其中所述一个或更多个共刺激结构域中的一个源自CD28。

234. 根据权利要求231-233中任一项所述的多核苷酸构建体, 其中第二共刺激结构域源自4-1BB。

235. 根据权利要求210-234中任一项所述的多核苷酸构建体, 其中所述细胞内信号传导结构域包含基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)。

236. 根据权利要求210-235中任一项所述的多核苷酸构建体, 所述基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)源自CD3 ζ 。

237. 根据权利要求210-236中任一项所述的多核苷酸构建体, 其中所述CAR包含:

抗CD19抗原结合结构域、抗BCMA抗原结合结构域或抗CD20抗原结合;

人CD8铰链区;

CD8跨膜区;

CD28共刺激结构域;和

CD3 ζ 链细胞内信号传导结构域。

238. 根据权利要求210-237中任一项所述的多核苷酸构建体, 其中所述CAR包含SEQ ID NO:9、16、22、34、41-49或54的序列。

239. 根据权利要求238所述的多核苷酸构建体, 其中所述第一多核苷酸区段包含SEQ

ID NO:10、17、23、35或55的序列。

240.根据权利要求210-239中任一项所述的多核苷酸构建体,其中所述IL-10是人IL-10。

241.根据权利要求210-239中任一项所述的多核苷酸构建体,其中所述IL-10是病毒IL-10。

242.根据权利要求210-239中任一项所述的多核苷酸构建体,其中所述IL-10是具有SEQ ID NO:1的序列的蛋白。

243.根据权利要求242所述的多核苷酸构建体,其中所述第二多核苷酸区段具有SEQ ID NO:2的序列。

244.根据权利要求210-243中任一项所述的多核苷酸构建体,其中所述第一多核苷酸区段或所述第二多核苷酸区段进一步包含编码选择标志物的序列。

245.根据权利要求244所述的多核苷酸构建体,其中所述选择标志物是 Δ NGFR。

246.根据权利要求245所述的多核苷酸构建体,其中所述 Δ NGFR具有SEQ ID NO:3的序列。

247.根据权利要求245所述的多核苷酸构建体,其中所述多核苷酸构建体包含SEQ ID NO:4的序列。

248.根据权利要求244-247中任一项所述的多核苷酸构建体,其中所述选择标志物是截短形式的EGFR多肽。

249.根据权利要求210-248中任一项所述的多核苷酸构建体,其中所述构建体是载体。

250.根据权利要求249所述的多核苷酸构建体,其中所述载体是病毒载体。

251.根据权利要求250所述的多核苷酸构建体,其中所述载体是慢病毒载体。

252.一种多核苷酸构建体,其包含:

(a) 具有SEQ ID NO:10、17、23、35或55的序列的第一多核苷酸区段;和

(b) 具有SEQ ID NO:2的序列的第二多核苷酸区段。

253.一种多核苷酸构建体,其包含:

(a) 具有SEQ ID NO:10、17、23、35或55的序列的第一多核苷酸区段;

(b) 具有SEQ ID NO:2的序列的第二多核苷酸区段;以及

(c) 位于所述第一多核苷酸区段和所述第二多核苷酸区段之间的具有SEQ ID NO:33的序列的第三多核苷酸区段。

254.一种多核苷酸构建体,其包含:

(a) 具有SEQ ID NO:10、17、23、35或55的序列的第一多核苷酸区段;

(b) 具有SEQ ID NO:2的序列的第二多核苷酸区段;

(c) 位于所述第一多核苷酸区段和所述第二多核苷酸区段之间的具有SEQ ID NO:27的序列的第三多核苷酸区段;以及

(d) 具有SEQ ID NO:4的序列的第四多核苷酸区段。

表达IL-10和嵌合抗原受体的CD4⁺ T细胞及其用途

[0001] 1.相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2021年12月30日提交的美国临时申请号63/295,491的权益,其在此通过引用以其全文并入。

[0003] 2.序列表

[0004] 本申请含有序列表,该序列表已以XML格式提交,并在此通过引用以其全文并入本文。所述XML副本创建于2022年12月24日,命名为37104-50735-Sequence-Listing.xml,并且大小为95.2千字节(KB)。

[0005] 3.背景

[0006] 调节性T细胞属于T细胞的一个小但很重要的亚群,其维持对自身和非致病抗原的免疫耐受性并维持免疫稳态。有两种主要的调节性T细胞群—CD4⁺FOXP3⁺CD25⁺ T细胞(FOXP3⁺)细胞和1型调节性T(Tr1)细胞。FOXP3⁺和Tr1细胞均下调器官和胰岛移植、移植物抗宿主病(GvHD)以及各种自身免疫性疾病和炎症疾病的各种临床前模型中的致病T细胞应答。

[0007] 已显示Tr1细胞在临床研究中有效。向患有持续性中度至重度克罗恩病的患者施用克隆的抗原特异性自体Tr1细胞导致客观的、暂时的缓解(Desreumaux et al., Gastroenterology.2012;143(5):1207-1217.e2.)。此外,在同种异体造血干细胞移植(allo-HSCT)后,将富含同种异体特异性Tr1细胞的供体来源的CD4⁺ T细胞群过继转移至白血病患者,导致免疫系统快速重建并对微生物和病毒感染具有保护作用,而不出现重度GvHD。在应答患者中,实现长期缓解和耐受(>7年),导致治愈(Bacchetta et al., Front Immunol.2014;5:16)。

[0008] 尽管取得了这些令人鼓舞的结果,但为医疗需求高度未满足的患者生产供体来源的或自体Tr1细胞以进行大规模治疗并不总是可行的,而且非常繁琐,并且不能实现大量纯Tr1细胞的生成。

[0009] 最近,Locafaro及其同事通过使用含有人IL-10基因的双向慢病毒载体转导来自单个供体的纯化CD4⁺ T细胞规避了这些问题中的一些问题。由此产生的单供体CD4^{IL-10}细胞群具有天然存在的Tr1细胞的主要功能。与Tr1细胞一样,单供体CD4^{IL-10}细胞产生高水平的IL-10,并下调同种异体CD4⁺ T细胞和同种异体CD8⁺ T细胞的增殖。此外,它们对正常髓系细胞(包括抗原呈递细胞,APC)和髓系白血病细胞均有直接细胞毒性。在人源化异种移植物抗宿主病(GvHD)模型中,这些单供体CD4^{IL-10}细胞被证明能有效减少GvHD,同时保持移植物抗白血病(GvL)活性。参见Locafaro et al.Mol Ther.2017;25(10):2254-2269和WO 2016/146,542。

[0010] 需要将CD4^{IL-10}细胞的细胞毒性能力重定向到非髓系细胞,同时保留这些细胞的免疫抑制和免疫稳态维持活性的方法。

[0011] 4.概述

[0012] 本公开内容提供了新型免疫细胞CD4^{IL-10/CAR}细胞,其经工程化以表达外源IL-10和嵌合抗原受体(CAR)。我们已发现,除了IL-10之外,CAR的表达将这些Tr1样细胞的细胞毒性

特性重定向到除了髓系靶标之外的治疗有用的靶标,同时出乎意料地保持细胞的免疫调节特性完好无损。还描述了使用CD4^{IL-10/CAR}细胞的治疗方法、CD4^{IL-10/CAR}细胞用于治疗的用途以及CD4^{IL-10/CAR}细胞在制备用于治疗各种疾病的药物中的用途,其中CAR将这些Tr1样细胞的细胞毒性特性定向到除了髓系细胞之外的治疗有用的靶标,同时保持细胞的免疫调节特性完好无损。

[0013] 本公开内容提供了遗传修饰的CD4⁺ T细胞(CD4^{IL10/CAR}),其包含:(a) 编码嵌合抗原受体(CAR)的第一外源多核苷酸区段;和(b) 编码白介素-10(IL-10)的第二外源多核苷酸区段。

[0014] 在一些实施方案中,第一外源多核苷酸区段包含与CAR的编码序列可操作地连接的调控元件。在一些实施方案中,调控元件驱动CAR的组成型表达。

[0015] 在一些实施方案中,CAR包含抗原结合结构域、铰链区、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域。

[0016] 在一些实施方案中,抗原结合结构域包含单链抗体片段。在一些实施方案中,单链抗体片段包含单链Fv(scFv)。

[0017] 在一些实施方案中,抗原结合结构域靶向与自身免疫性疾病、炎性疾病或癌症相关的抗原。

[0018] 在一些实施方案中,抗原选自由以下组成的组:CD19、CD20、CD22、BCMA、CD27、CD38、B7-H3、CD23、Lym1、Lym2、CLEC5A、CDH179b、FLT3、GCC、Muc、CSF2RA、GFRa4、CD32、CD33、CEA、IL11Ra、IL13Ra、NYBRI、SLea、CD200R、TGFβR2、CD276、TROP2、LAMP1、PTK7、DLL3、CDH1、CDH6、CDH17、CDH19、TSHR、酪氨酸酶、HLA-A*02、HLA-A*24或瓜氨酸化肽、胰岛素、MOG、GAD65、IA2、醇溶蛋白和桥粒黏蛋白(在相关MHC分子的背景下)。

[0019] 在一些实施方案中,抗原结合结构域包含抗CD19抗原结合结构域。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合结构域包含SEQ ID NO:11的序列。

[0020] 在一些实施方案中,抗原结合结构域是抗CD20抗原结合结构域。在一些实施方案中,抗CD20抗原结合结构域包含SEQ ID NO:18的序列。

[0021] 在一些实施方案中,抗原结合结构域是抗BCMA抗原结合结构域。在一些实施方案中,抗BCMA抗原结合结构域包含SEQ ID NO:50-53的序列。

[0022] 在一些实施方案中,铰链区选自人CD8铰链区、人CD28铰链区、IgG1铰链区或IgG4铰链区。在一些实施方案中,铰链区源自人CD8。

[0023] 在一些实施方案中,跨膜结构域选自TNFRSF 19跨膜结构域、CD3ζ跨膜结构域、CD8α跨膜结构域、CD4跨膜结构域、CD28跨膜结构域或B7家族诱导型共刺激(ICOS)跨膜结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域源自CD8α跨膜结构域。

[0024] 在一些实施方案中,CAR进一步包含一个或更多个共刺激结构域。在一些实施方案中,CAR包含两个共刺激结构域。

[0025] 在一些实施方案中,一个或更多个共刺激结构域选自由4-1BB、CD28、OX40、ICOS、CD27、MYD88-CD40和KIR2DS2组成的组。

[0026] 在一些实施方案中,一个或更多个共刺激结构域中的一个源自CD28。

[0027] 在一些实施方案中,第二共刺激结构域源自4-1BB。

[0028] 在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含基于免疫受体酪氨酸的激活基序

(ITAM)。在一些实施方案中,基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)源自CD3 ζ 。

[0029] 在一些实施方案中,CAR包含:抗CD19抗原结合结构域、抗BCMA抗原结合结构域或抗CD20抗原结合结构域;人CD8铰链区;TNFRSF 19跨膜区;4-1BB共刺激结构域;和CD3 ζ 链细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,CAR包含:抗CD19抗原结合结构域、抗BCMA抗原结合结构域或抗CD20抗原结合结构域;人CD8铰链区;CD8 α 跨膜区;4-1BB共刺激结构域;和CD3 ζ 链细胞内信号传导结构域。

[0030] 在一些实施方案中,CAR包含SEQ ID NO:9、16、22、34、41-49或54的序列。

[0031] 在一些实施方案中,第一外源多核苷酸区段包含SEQ ID NO:10、17、23、35或55的序列。

[0032] 在一些实施方案中,第一外源多核苷酸区段被整合至T细胞核基因组中。

[0033] 在一些实施方案中,第一外源多核苷酸区段未被整合至T细胞核基因组中。

[0034] 在一些实施方案中,第一外源多核苷酸区段在载体中。

[0035] 在一些实施方案中,第二外源多核苷酸区段包含与IL-10的编码序列可操作地连接的调控元件。在一些实施方案中,IL-10是人IL-10。在一些实施方案中,IL-10是病毒IL-10。

[0036] 在一些实施方案中,IL-10是具有SEQ ID NO:1的序列的蛋白。在一些实施方案中,第二外源多核苷酸区段包含SEQ ID NO:2的序列。

[0037] 在一些实施方案中,调控元件驱动IL-10的组成型表达。

[0038] 在一些实施方案中,第二外源多核苷酸区段被整合至T细胞核基因组中。

[0039] 在一些实施方案中,第二外源多核苷酸区段未被整合至T细胞核基因组中。

[0040] 在一些实施方案中,第二外源多核苷酸区段在载体中。

[0041] 在一些实施方案中,第一外源多核苷酸区段和第二外源多核苷酸区段在同一载体中。在一些实施方案中,载体是病毒载体。在一些实施方案中,载体是慢病毒载体。

[0042] 在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞组成型表达至少100pg IL-10/10⁶个CD4⁺ T细胞/mL培养基。

[0043] 在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞组成型表达至少100pg、200pg、500pg、1ng、5ng、10ng或50ng IL-10/10⁶个CD4⁺ T细胞/mL。

[0044] 在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞在用抗CD3抗体和抗CD28抗体激活后表达至少1ng IL-10/10⁶个CD4⁺ T细胞/mL。

[0045] 在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞在用抗CD3抗体和抗CD28抗体激活后表达至少2ng、5ng、10ng、100ng、200ng或500ng IL-10/10⁶个CD4⁺ T细胞/mL。

[0046] 在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞以比未修饰的CD4⁺ T细胞高至少5倍的水平表达IL-10。在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞以比未修饰的CD4⁺ T细胞高至少10倍的水平表达IL-10。

[0047] 在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞表达至少100pg IL-5/10⁶个CD4⁺ T细胞/mL。在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞表达至少100pg、200pg、500pg、1ng、5ng、10ng或50ng IL-5/10⁶个CD4⁺ T细胞/mL。

[0048] 在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞在用抗CD3抗体和抗CD28抗体激活后表达至少1ng IL-5/10⁶个CD4⁺ T细胞/mL。

- [0049] 在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞在用抗CD3抗体和抗CD28抗体激活后表达至少2ng、5ng、10ng、100ng、200ng或500ng IL-5/10⁶个CD4⁺ T细胞/mL。
- [0050] 在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞表达至少100pg IFN- γ /10⁶个CD4⁺ T细胞/mL。
- [0051] 在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞表达至少100pg、200pg、500pg、1ng、5ng、10ng或50ng IFN- γ /10⁶个CD4⁺ T细胞/mL。
- [0052] 在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞在用抗CD3抗体和抗CD28抗体激活后表达至少1ng IFN- γ /10⁶个CD4⁺ T细胞/mL。
- [0053] 在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞在用抗CD3抗体和抗CD28抗体激活后表达至少2ng、5ng、10ng、100ng、200ng或500ng IFN- γ /10⁶个CD4⁺ T细胞/mL。
- [0054] 在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞表达至少25pg IL-4/10⁶个CD4⁺ T细胞/mL。
- [0055] 在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞表达至少25pg、50pg、75pg、100pg、200pg、500pg、1ng、5ng、10ng或50ng IL-4/10⁶个CD4⁺ T细胞/mL。
- [0056] 在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞在用抗CD3抗体和抗CD28抗体激活后表达至少100pg IL-4/10⁶个CD4⁺ T细胞/mL。
- [0057] 在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞在用抗CD3抗体和抗CD28抗体激活后表达至少100pg、200pg、300pg、400pg、500pg、600pg、700pg、800pg、900pg、1000pg、2ng、5ng、10ng、100ng、200ng或500ng IL-4/10⁶个CD4⁺ T细胞/mL。
- [0058] 在一些实施方案中,IL-10、IL-4、IFN- γ 和IL-5中的一种或更多种的表达在一次或更多次再刺激后是稳定的。
- [0059] 在一些实施方案中,第一外源多核苷酸区段或第二外源多核苷酸区段进一步包含编码选择标志物的序列。
- [0060] 在一些实施方案中,选择标志物是 Δ NGFR。在一些实施方案中, Δ NGFR具有SEQ ID NO:3的序列。在一些实施方案中,第二外源多核苷酸区段包含SEQ ID NO:4的序列。
- [0061] 在一些实施方案中,选择标志物是截短形式的EGFR多肽。
- [0062] 在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞能够对CD19⁺靶细胞产生体外细胞毒性。
- [0063] 在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞能够对CD19⁺靶细胞产生体内细胞毒性。
- [0064] 在一些实施方案中,CD19⁺靶细胞是产生自身抗体的B细胞。
- [0065] 在一些实施方案中,CD19⁺靶细胞是CD19⁺癌细胞。
- [0066] 在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞能够对髓系靶细胞产生体外细胞毒性。
- [0067] 在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞能够对髓系靶细胞产生体内细胞毒性。
- [0068] 在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞能够对CD19⁺靶细胞和髓系靶细胞产生细胞毒性。
- [0069] 在一些实施方案中,髓系靶细胞表达I类MHC、CD13、CD54和CD112中的一种或更多种。
- [0070] 在一些实施方案中,对CD19⁺靶细胞的细胞毒性在一次或更多次体外再刺激后被维持。在一些实施方案中,对CD19⁺靶细胞的细胞毒性在一次或更多次体外扩增后被维持。
- [0071] 在一些实施方案中,对髓系靶细胞的细胞毒性在一次或更多次体外再刺激后被维持。在一些实施方案中,对髓系靶细胞的细胞毒性在一次或更多次体外扩增后被维持。
- [0072] 在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞能够抑制同种异体CD4⁺ T细胞增殖。
- [0073] 在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞能够抑制同种异体CD8⁺ T细胞增殖。

[0074] 在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞能够抑制同种异体CD4⁺ T细胞增殖、同种异体CD8⁺ T细胞增殖和PBMC增殖。

[0075] 在一些实施方案中,抑制特性在一次或更多次再刺激后被维持。

[0076] 在另一方面,本公开内容的特征在于CD4⁺ T细胞群,其包含本文提供的任何遗传修饰的CD4⁺细胞。

[0077] 在一些实施方案中,遗传修饰之前的CD4⁺ T细胞是从两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个不同的T细胞供体获得并合并的。

[0078] 在一些实施方案中,群中的CD4⁺ T细胞总共具有六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或更多种不同的HLA单倍型。

[0079] 在一些实施方案中,群中的所有CD4⁺ T细胞在HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1和HLA-DQB1基因座处彼此具有至少1/10、2/10、3/10、4/10、5/10、6/10、7/10、8/10或9/10的匹配。

[0080] 在一些实施方案中,群中的所有CD4⁺ T细胞在HLA-A、HLA-B、HLA-C和HLA-DRB1基因座处彼此具有至少1/8、2/8、3/8、4/8、5/8、6/8、7/8或8/8的匹配。

[0081] 在一些实施方案中,群中的所有CD4⁺ T细胞在HLA-A基因座处彼此具有2/2的匹配。

[0082] 在一些实施方案中,群中的所有CD4⁺ T细胞在HLA-B基因座处彼此具有2/2的匹配。

[0083] 在一些实施方案中,群中的所有CD4⁺ T细胞在HLA-C基因座处彼此具有2/2的匹配。

[0084] 在一些实施方案中,群中的所有CD4⁺ T细胞在HLA-DRB1和HLA-DQB1基因座处彼此具有至少3/4或4/4的匹配。

[0085] 在一些实施方案中,群中的所有CD4⁺ T细胞在HLA-A、HLA-B、HLA C、HLA-DRB1和HLA-DQB1基因座处彼此具有小于5/10、6/10、7/10、8/10或9/10的匹配。

[0086] 在一些实施方案中,群中的所有CD4⁺ T细胞在HLA-A、HLA-B、HLA C和HLADRB1基因座处彼此具有小于4/8、5/8、6/8、7/8或8/8的匹配。

[0087] 在一些实施方案中,群中的所有CD4⁺ T细胞在HLA-A基因座处彼此具有小于2/2的匹配。

[0088] 在一些实施方案中,群中的所有CD4⁺ T细胞在HLA-B基因座处彼此具有小于2/2的匹配。

[0089] 在一些实施方案中,群中的所有CD4⁺ T细胞在HLA-C基因座处彼此具有小于2/2的匹配。

[0090] 在一些实施方案中,群中的所有CD4⁺ T细胞在HLA-DRB1和HLA DQB1基因座处彼此具有小于4/2、3/4或4/4的匹配。

[0091] 在一些实施方案中,群中的所有CD4⁺ T细胞具有A*02等位基因或为A*02阴性。

[0092] 在一些实施方案中,群中的所有CD4⁺ T细胞具有A*24等位基因或为A*24阴性。

[0093] 在一些实施方案中,NGFR⁺细胞群内至少30%的CD4⁺ T细胞表达CAR。

[0094] 在一些实施方案中,NGFR⁺细胞群内至少60%的CD4⁺ T细胞表达CAR。

[0095] 在一些实施方案中,NGFR⁺细胞群内至少90%的CD4⁺ T细胞表达CAR。

- [0096] 在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞处于冷冻悬浮液中。
- [0097] 在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞处于液体悬浮液中。
- [0098] 在一些实施方案中,液体悬浮液先前已被冷冻。
- [0099] 在另一方面,本公开内容的特征在于本文提供的任何药物组合物,其包含本文提供的任何CD4⁺ T细胞或本文提供的任何CD4⁺ T细胞群。
- [0100] 在另一方面,本公开内容的特征在于制备CD4^{IL10/CAR}细胞的方法,其包括以下步骤:
(a) 从一个或多个T细胞供体获得原代CD4⁺ T细胞;以及 (b) 通过引入 (i) 编码嵌合抗原受体 (CAR) 的第一外源多核苷酸区段和 (ii) 编码IL-10的第二外源多核苷酸区段来修饰CD4⁺ T细胞。
- [0101] 在一些实施方案中,在步骤 (a) 中,原代CD4⁺ T细胞从两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个不同的T细胞供体获得。
- [0102] 在一些实施方案中,方法进一步包括合并来自步骤 (b) 的遗传修饰的CD4⁺ T细胞。
- [0103] 在一些实施方案中,其中在步骤 (a) 中,原代CD4⁺ T细胞是患者自体的。
- [0104] 在一些实施方案中,方法在步骤 (a) 之后和步骤 (b) 之前,或者在步骤 (b) 之后进一步包括以下步骤:在抗CD3抗体和抗CD28抗体的存在下或者抗CD3抗体和CD28抗体包被的珠的存在下孵育CD4⁺ T细胞。
- [0105] 在一些实施方案中,方法进一步在IL-2的存在下孵育CD4⁺ T细胞。
- [0106] 在一些实施方案中,使用一种或更多种病毒载体,将第一外源多核苷酸区段、第二外源多核苷酸区段或两者引入原代CD4⁺ T细胞中。在一些实施方案中,病毒载体是慢病毒载体。
- [0107] 在一些实施方案中,第一外源多核苷酸区段包含CAR的编码序列。
- [0108] 在一些实施方案中,CAR对与自身免疫性疾病、炎性疾病或癌症相关的靶抗原具有特异性。
- [0109] 在一些实施方案中,靶抗原与自身免疫性疾病、炎性疾病或癌症相关。
- [0110] 在一些实施方案中,CAR是抗CD19 CAR、抗CD20 CAR、抗CD22CAR、抗BCMA CAR、抗B7-H3 CAR、抗CD27 CAR或抗CD38 CAR。
- [0111] 在一些实施方案中,CAR包含SEQ ID NO:9、16、22、34、41-49或54的序列。
- [0112] 在一些实施方案中,第一外源多核苷酸区段包含SEQ ID NO:10、17、23、35或55的序列。
- [0113] 在一些实施方案中,IL-10包含SEQ ID NO:1的序列。在一些实施方案中,第二外源多核苷酸区段包含SEQ ID NO:2的序列。
- [0114] 在一些实施方案中,第一外源多核苷酸区段或第二外源多核苷酸区段进一步包含编码选择标志物的区段。
- [0115] 在一些实施方案中,编码的选择标志物是 Δ NGFR。在一些实施方案中,编码的选择标志物具有SEQ ID NO:3的序列。
- [0116] 在一些实施方案中,选择标志物是截短形式的EGFR多肽。
- [0117] 在一些实施方案中,方法在步骤 (b) 之后进一步包括以下步骤:分离表达选择标志物的遗传修饰的CD4⁺ T细胞,从而生成富集的遗传修饰的CD4⁺ T细胞群。
- [0118] 在一些实施方案中,富集的群中至少30%或至少60%的遗传修饰的CD4⁺ T细胞表

达IL-10和CAR。

[0119] 在一些实施方案中,富集的群中至少90%的遗传修饰的CD4⁺ T细胞表达IL-10和CAR。

[0120] 在一些实施方案中,富集的群中至少40%的遗传修饰的CD4⁺ T细胞表达选择标志物。

[0121] 在一些实施方案中,富集的群中至少75%的遗传修饰的CD4⁺ T细胞表达选择标志物。

[0122] 在一些实施方案中,富集的群中至少90%的遗传修饰的CD4⁺ T细胞表达选择标志物。

[0123] 在一些实施方案中,方法进一步包括孵育富集的遗传修饰的CD4⁺ T细胞群的步骤。

[0124] 在一些实施方案中,孵育富集的遗传修饰的CD4⁺ T细胞群的步骤在IL-2的存在下,在抗CD3抗体和抗CD28抗体或者CD3抗体和CD28抗体包被的珠的存在下进行。

[0125] 在一些实施方案中,方法进一步包括冷冻遗传修饰的CD4⁺ T细胞的后续步骤。

[0126] 在一些实施方案中,至少两个T细胞供体在HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1和HLA-DQB1基因座处彼此具有至少1/10、2/10、3/10、4/10、5/10、6/10、7/10、8/10或9/10的匹配。

[0127] 在一些实施方案中,至少两个T细胞供体在HLA-A、HLA-B、HLA-C和HLA-DRB1基因座处彼此具有至少1/8、2/8、3/8、4/8、5/8、6/8、7/8或8/8的匹配。

[0128] 在一些实施方案中,至少两个T细胞供体在HLA-A基因座处彼此具有2/2的匹配。在一些实施方案中,至少两个T细胞供体在HLA-B基因座处彼此具有2/2的匹配。在一些实施方案中,至少两个T细胞供体在HLA-C基因座处彼此具有2/2的匹配。

[0129] 在一些实施方案中,至少两个T细胞供体在HLA-DRB1和HLA-DQB1基因座处彼此具有至少3/4或4/4的匹配。

[0130] 在一些实施方案中,至少两个T细胞供体在HLA-A、HLA-B、HLA C、HLA-DRB1和HLA-DQB1基因座处彼此具有小于5/10、6/10、7/10、8/10或9/10的匹配。

[0131] 在一些实施方案中,至少两个T细胞供体在HLA-A、HLA-B、HLA C和HLA DRB1基因座处彼此具有小于4/8、5/8、6/8、7/8或8/8的匹配。

[0132] 在一些实施方案中,至少两个T细胞供体在HLA-A基因座处彼此具有小于2/2的匹配。在一些实施方案中,至少两个T细胞供体在HLA-B基因座处彼此具有小于2/2的匹配。在一些实施方案中,至少两个T细胞供体在HLA-C基因座处彼此具有小于2/2的匹配。

[0133] 在一些实施方案中,至少两个T细胞供体在HLA-DRB1和HLA DQB1基因座处彼此具有小于4/2、3/4或4/4的匹配。

[0134] 在一些实施方案中,至少两个T细胞供体中的每一个具有A*02等位基因或为A*02阴性。在一些实施方案中,至少两个T细胞供体中的每一个具有A*02等位基因或为A*02阴性。

[0135] 在一些实施方案中,在步骤(a)中,原代CD4⁺ T细胞从一个或多个冷冻储备液获得。

[0136] 在一些实施方案中,在步骤(a)中,原代CD4⁺ T细胞从至少两个不同的T细胞供体的未冷冻的外周血单核细胞获得。

- [0137] 在一些实施方案中,方法进一步包括从外周血单核细胞分离CD4⁺ T细胞的步骤。
- [0138] 在另一方面,本公开内容的特征在于用于治疗血液系统癌症的方法,其包括:向血液系统癌症患者施用足以诱导抗癌作用的治疗有效量的所提供的任何CD4^{IL-10/CAR}细胞、本文提供的任何CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物。
- [0139] 在一些实施方案中,方法进一步包括在施用CD4^{IL-10/CAR}之前或之后,向患者施用allo HSCT移植物的步骤。
- [0140] 在另一方面,本公开内容的特征在于治疗恶性肿瘤患者的方法,其包括:向患者施用allo-HSCT移植物,并施用治疗有效量的所提供的任何CD4^{IL-10/CAR}细胞、本文提供的任何CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物。
- [0141] 在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞的量还足以抑制或预防移植物抗宿主病(GvHD),而不抑制allo HSCT的移植物抗白血病病(GvL)或移植物抗肿瘤(GvT)功效。
- [0142] 在一些实施方案中,恶性肿瘤或血液系统癌症是髓系白血病。
- [0143] 在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞靶向并杀死表达CD13的癌细胞。
- [0144] 在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞靶向并杀死表达HLA-I类的癌细胞。
- [0145] 在一些实施方案中,髓系白血病是急性髓系白血病(AML)。
- [0146] 在一些实施方案中,恶性肿瘤或血液系统癌症是CD19⁺、CD20⁺、CD22⁺、CD27⁺、CD38⁺、BCMA⁺或B7-H3⁺血液系统癌症。
- [0147] 在一些实施方案中,CD19⁺、CD20⁺、CD22⁺、CD27⁺、CD38⁺、BCMA⁺或B7-H3⁺血液系统癌症选自慢性淋巴细胞白血病、急性淋巴母细胞白血病(ALL)和非霍奇金淋巴瘤。
- [0148] 在一些实施方案中,allo-HSCT移植物从与患者有亲缘关系或无亲缘关系的供体获得。
- [0149] 在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞对于患者是非自体的。
- [0150] 在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞是患者自体的。
- [0151] 在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞对于患者是同种异体的。
- [0152] 在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞在施用于患者之前对宿主同种异体抗原未失去反应性。
- [0153] 在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞是Tr1样细胞。
- [0154] 在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞是多克隆的。
- [0155] 在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞是多克隆的并且对于患者是非自体的。
- [0156] 在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞是多克隆的并且是患者自体的。
- [0157] 在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞从至少两个供体分离,然后被遗传修饰。
- [0158] 在一些实施方案中,至少两个供体中没有一个是与allo-HSCT供体是同一供体。
- [0159] 在一些实施方案中,allo-HSCT移植物从与患者匹配或不匹配的供体获得。
- [0160] 在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞靶向并杀死表达CD19、CD20或BCMA的细胞。在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞靶向并杀死表达CD54的细胞。在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞靶向并杀死表达HLA-I类和CD54的癌细胞。在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞靶向并杀死表达CD112和CD155的癌细胞。在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞靶向并杀死表达CD58的癌细胞。
- [0161] 在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞靶向并杀死患者中的癌细胞。

- [0162] 在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞靶向并杀死患者中的实体肿瘤细胞。
- [0163] 在另一方面,本公开内容的特征在于通过同种异体造血干细胞移植 (allo-HSCT) 治疗血液系统癌症的方法,其包括:
- [0164] 向患者施用allo-HSCT移植植物;
- [0165] 向患者施用足以抑制或预防移植植物抗宿主病 (GvHD) 而不抑制allo-HSCT移植植物的移植植物抗白血病 (GvL) 或移植植物抗肿瘤 (GvT) 功效的量的CD4^{IL-10/CAR}细胞;
- [0166] 其中CD4^{IL-10/CAR}细胞包含通过一种或更多种载体的载体介导的基因转移进行遗传修饰的CD4⁺ T细胞,所述载体包含在组成型启动子或诱导型启动子控制下的人IL-10的编码序列和在组成型启动子或诱导型启动子控制下的CAR的编码序列;
- [0167] 其中CD4^{IL-10/CAR}细胞靶向并杀死患者中的癌细胞;
- [0168] 其中CD4^{IL-10/CAR}细胞在施用于患者之前对宿主同种异体抗原未失去反应性;并且
- [0169] 其中CD4^{IL-10/CAR}细胞对于患者是非自体的,并且是Tr1样的。
- [0170] 在另一方面,本公开内容的特征在于通过同种异体造血干细胞移植 (allo-HSCT) 治疗血液系统癌症的方法,其包括:
- [0171] 向患者施用allo-HSCT移植植物;
- [0172] 向所述患者施用一定量的CD4^{IL-10/CAR}细胞,任选地其中该量足以抑制或预防移植植物抗宿主病 (GvHD),而不抑制所述allo-HSCT移植植物的移植植物抗白血病 (GvL) 或移植植物抗肿瘤 (GvT) 功效,
- [0173] 其中CD4^{IL-10/CAR}细胞包含通过一种或更多种载体的载体介导的基因转移进行遗传修饰的CD4⁺ T细胞,所述载体包含在组成型启动子或诱导型启动子控制下的人IL-10的编码序列和在组成型启动子或诱导型启动子控制下的CAR的编码序列;
- [0174] 其中CD4^{IL-10/CAR}细胞靶向并杀死患者中的癌细胞;
- [0175] 其中CD4^{IL-10/CAR}细胞在施用于患者之前对宿主同种异体抗原未失去反应性;并且
- [0176] 其中CD4^{IL-10/CAR}细胞是患者自体的,并且是Tr1样的。
- [0177] 在另一方面,本公开内容的特征在于用于预防患者的CD19⁺、CD20⁺、CD22⁺、CD27⁺、CD38⁺、BCMA⁺或B7-H3⁺血液系统癌症复发的方法,其包括:
- [0178] 向被鉴定为患有CD19⁺、CD20⁺、CD22⁺、BCMA⁺或B7-H3⁺血液系统癌症或处于具有CD19⁺、CD20⁺、CD22⁺、BCMA⁺或B7-H3⁺血液系统癌症复发的风险的患者施用足以诱导抗癌作用的治疗有效量的所提供的任何CD4^{IL-10/CAR}细胞、本文提供的任何CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物。在一些实施方案中,在施用HSCT之后施用CD4^{IL-10/CAR}细胞。
- [0179] 在另一方面,本公开内容的特征在于用于预防患者的B7-H3⁺癌症复发的方法,其包括:向被鉴定为患有B7-H3⁺癌症的患者施用足以诱导抗癌作用的治疗有效量的所提供的任何CD4^{IL-10/CAR}细胞、本文提供的任何CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物。
- [0180] 在一些实施方案中,B7-H3⁺癌症是实体肿瘤。
- [0181] 在一些实施方案中,实体肿瘤选自自由以下组成的组:乳腺癌、脑癌、肺癌、肝癌、胃癌、脾癌、结肠癌、肾癌、胰腺癌、前列腺癌、子宫癌、皮肤癌、头癌、颈癌、肉瘤、神经母细胞瘤和卵巢癌。
- [0182] 在另一方面,本公开内容的特征在于用于治疗患有微小残留病 (minimal residual disease) 的患者的方法,其包括:向被鉴定为患有微小残留病或处于患有微小残

留病的风险的患者施用足以诱导抗癌作用的治疗有效量的所提供的任何CD4^{IL-10/CAR}细胞、本文提供的任何CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物。

[0183] 在另一方面,本公开内容的特征在于治疗患者的方法,其包括:向需要免疫耐受的患者施用治疗有效量的所提供的任何CD4^{IL-10/CAR}细胞、本文提供的任何CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物。

[0184] 在一些实施方案中,方法进一步包括解冻CD4^{IL-10/CAR}细胞或CD4^{IL-10/CAR}细胞群的冷冻悬浮液的在先步骤。

[0185] 在一些实施方案中,患者患有炎性疾病或自身免疫性疾病。

[0186] 在一些实施方案中,炎性疾病或自身免疫性疾病选自自由以下组成的组:自身免疫性葡萄膜炎、银屑病、白癜风、斑秃、银屑病关节炎、炎性肠病、桥本甲状腺炎、自身免疫性血管炎、溃疡性结肠炎、大疱性疾病、硬皮病、乳糜泻、格雷夫斯病、系统性硬化、重症肌无力、抗NMDA脑炎、类天疱疮疾病(寻常型和落叶型)、获得性大疱性表皮松解、血栓性血小板减少性紫癜、特发性血小板性紫癜、自身抗体诱导的血管炎症、自身抗体诱导的心脏炎、类风湿性关节炎、自身抗体诱导的类风湿性关节炎、视神经脊髓炎谱系疾病、系统性红斑狼疮(SLE)、多发性硬化(MS)、干燥综合征、自身免疫性肌病、I型糖尿病、艾迪生病、恶性贫血、自身免疫性肝炎、原发性胆汁性胆管炎(PBC)、自身免疫性胰腺炎、古德巴斯捷氏病(goodpasture's disease)、原发性膜性肾病、卵巢功能不全、自身免疫性睾丸炎、干眼病、再生障碍性贫血、自身免疫性中性粒细胞减少症和特发性间质性肺炎。

[0187] 在一些实施方案中,炎性疾病或自身免疫性疾病是克罗恩病、溃疡性结肠炎、乳糜泻、1型糖尿病、狼疮、银屑病、银屑病关节炎、强直性脊柱炎或类风湿性关节炎。

[0188] 在一些实施方案中,患者患有涉及NLPR3炎症小体过度活跃的疾病或紊乱。

[0189] 在一些实施方案中,患者患有2型糖尿病、神经退行性疾病、心血管疾病或炎性肠病。

[0190] 在一些实施方案中,患者患有涉及由激活的单核细胞、巨噬细胞或树突状细胞产生增加的IL-1 β 的疾病或紊乱。

[0191] 在一些实施方案中,患者患有涉及由激活的单核细胞、巨噬细胞或树突状细胞产生增加的IL-18的疾病或紊乱。

[0192] 在一些实施方案中,患者患有涉及由激活的单核细胞、巨噬细胞或树突状细胞产生增加的成熟胱天蛋白酶1的疾病或紊乱。

[0193] 在一些实施方案中,患者患有过敏性疾病或特应性疾病。

[0194] 在一些实施方案中,其中过敏性疾病或特应性疾病选自自由以下组成的组:哮喘、特应性皮炎和鼻炎。

[0195] 在一些实施方案中,患者患有食物过敏。

[0196] 在一些实施方案中,患者患有实体肿瘤。

[0197] 在一些实施方案中,实体肿瘤选自自由以下组成的组:乳腺癌、脑癌、肺癌、肝癌、胃癌、脾癌、结肠癌、肾癌、胰腺癌、前列腺癌、子宫癌、皮肤癌、头癌、颈癌、肉瘤、神经母细胞瘤和卵巢癌。

[0198] 在一些实施方案中,方法进一步包括在施用CD4^{IL-10/CAR}细胞、CD4^{IL-10/CAR}细胞群或药物组合物之前或之后,对患者进行器官移植的步骤。在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞、

CD4^{IL-10/CAR}细胞群或药物组合物防止器官移植的宿主排斥或降低器官移植的宿主排斥的严重程度。

[0199] 在一些实施方案中,方法进一步包括在施用CD4^{IL-10/CAR}细胞、CD4^{IL-10/CAR}细胞群或药物组合物之前或之后,将iPS细胞衍生的细胞或组织移植至患者的步骤。在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞、CD4^{IL-10/CAR}细胞群或药物组合物防止细胞移植的宿主排斥或降低细胞移植的宿主排斥的严重程度。

[0200] 在一些实施方案中,方法进一步包括在施用CD4^{IL-10/CAR}细胞、CD4^{IL-10/CAR}细胞群或药物组合物之前或之后,向患者施用重组AAV的步骤。在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞、CD4^{IL-10/CAR}细胞群或药物组合物降低对重组AAV的免疫应答。

[0201] 在一些实施方案中,方法进一步包括在施用CD4^{IL-10/CAR}细胞、CD4^{IL-10/CAR}细胞群或药物组合物之前或之后,向患者施用除AAV之外的重组病毒载体的步骤。在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞、CD4^{IL-10/CAR}细胞群或药物组合物降低对除AAV之外的重组病毒载体的免疫应答。

[0202] 在一些实施方案中,方法进一步包括在施用CD4^{IL-10/CAR}细胞、CD4^{IL-10/CAR}细胞群或药物组合物之前或之后,向患者施用免疫原性治疗蛋白的步骤。在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞、CD4^{IL-10/CAR}细胞群或药物组合物降低对免疫原性治疗蛋白的免疫应答。在一些实施方案中,免疫原性治疗蛋白选自治疗性抗体、因子VIII替代物、细胞因子和细胞因子突变蛋白。

[0203] 在一些实施方案中,患者对病毒或细菌感染具有过度免疫应答。在一些实施方案中,患者患有冠状病毒感染。在一些实施方案中,患者具有器官和/或组织损伤。

[0204] 在一些实施方案中,方法进一步包括以下步骤:检测从患者获得的生物样品中的选择标志物,从而检测CD4^{IL-10/CAR}细胞的存在与否。

[0205] 在一些实施方案中,生物样品是来自患者的活检物或血液。

[0206] 在另一方面,本公开内容的特征在于治疗或抑制患者的自身免疫性疾病、过敏性疾病或炎性疾病的方法,其包括:向被鉴定为患有自身免疫性疾病、过敏性疾病或炎性疾病的患者施用足以治疗或抑制自身免疫性疾病、过敏性疾病或炎性疾病的治疗有效量的所提供的任何CD4^{IL-10/CAR}细胞、本文提供的任何CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物。

[0207] 在另一方面,本公开内容的特征在于用于减少移植有造血干细胞、骨髓细胞、脐血细胞、组织干细胞或实体器官的患者的移植排斥的方法,其包括:向被鉴定为对移植的造血干细胞、骨髓细胞、组织干细胞或实体器官具有排斥的患者施用足以减少移植排斥的治疗有效量的所提供的任何CD4^{IL-10/CAR}细胞、本文提供的任何CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物。

[0208] 在另一方面,本公开内容的特征在于用于治疗患者的移植物抗宿主病(GvHD)的方法,其包括:向被鉴定为患有移植物抗宿主病(GvHD)或处于患有移植物抗宿主病(GvHD)的风险的患者施用足以抑制或预防GvHD的治疗有效量的所提供的任何CD4^{IL-10/CAR}细胞、本文提供的任何CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物。

[0209] 在一些实施方案中,移植物抗宿主病(GvHD)包括急性GvHD。

[0210] 在一些实施方案中,移植物抗宿主病(GvHD)包括慢性GvHD。

[0211] 在另一方面,本公开内容的特征在于用于治疗患者的组织或器官损伤的方法,其包括:向被鉴定为具有组织或器官损伤或处于具有组织或器官损伤的风险的患者施用足以诱导组织或器官损伤的修复的治疗有效量的本文提供的任何CD4^{IL-10/CAR}细胞、本文提供的任何CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的药物组合物。

[0212] 在另一方面,本公开内容的特征在于多核苷酸构建体,其包含:(a) 编码嵌合抗原受体(CAR)的第一多核苷酸区段;和(b) 编码白介素-10(IL-10)的第二多核苷酸区段。

[0213] 在一些实施方案中,第一多核苷酸区段包含与CAR的编码序列可操作地连接的调控元件。在一些实施方案中,调控元件驱动CAR的组成型表达。

[0214] 在一些实施方案中,第二多核苷酸区段包含与IL-10的编码序列可操作地连接的调控元件。在一些实施方案中,调控元件驱动IL-10的组成型表达。

[0215] 在一些实施方案中,方法进一步包括位于第一多核苷酸区段和第二多核苷酸区段之间的内部核糖体进入位点(IRES)或自切割肽。在一些实施方案中,自切割肽选自F2A、P2A、T2A和E2A组成的组。

[0216] 在一些实施方案中,CAR包含抗原结合结构域、铰链区、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域。

[0217] 在一些实施方案中,抗原结合结构域包含单链抗体片段。在一些实施方案中,单链抗体片段包含单链Fv(scFv)。

[0218] 在一些实施方案中,抗原结合结构域靶向与自身免疫性疾病、炎性疾病或癌症相关的抗原。

[0219] 在一些实施方案中,抗原选自由以下组成的组:CD19、CD20、CD22、BCMA、B7-H3、CD27、CD38、CEA、BCMA、CD23、Lym1、Lym2、CLEC5A、CDH179b、FLT3、GCC、Muc、CSF2RA、GFRa4、CD32、CD33、IL11Ra、IL13Ra、NYBRI、SLea、CD200R、TGFβR2、CD276、TROP2、LAMP1、PTK7、DLL3、CDH1、CDH6、CDH17、CDH19、TSHR、酪氨酸酶、HLA-A2、瓜氨酸化肽、胰岛素、GAD65、IA2、醇溶蛋白和桥粒黏蛋白。

[0220] 在一些实施方案中,抗原结合结构域是抗CD19抗原结合结构域。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合结构域包含SEQ ID NO:11的序列。

[0221] 在一些实施方案中,抗原结合结构域是抗CD20抗原结合结构域。在一些实施方案中,抗CD20抗原结合结构域包含SEQ ID NO:18的序列。

[0222] 在一些实施方案中,抗原结合结构域是抗BCMA抗原结合结构域。在一些实施方案中,抗BCMA抗原结合结构域包含SEQ ID NO:50-53的序列。

[0223] 在一些实施方案中,铰链区选自人CD8铰链区、人CD28铰链区、IgG1铰链区或IgG4铰链区。在一些实施方案中,铰链区源自人CD8。

[0224] 在一些实施方案中,跨膜结构域选自TNFRSF 19跨膜结构域、CD3ζ跨膜结构域、CD8α跨膜结构域、CD4跨膜结构域、CD28跨膜结构域或B7家族诱导型共刺激(ICOS)跨膜结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域源自CD8α。

[0225] 在一些实施方案中,CAR进一步包含一个或更多个共刺激结构域。

[0226] 在一些实施方案中,CAR包含两个共刺激结构域。

[0227] 在一些实施方案中,一个或更多个共刺激结构域选自由4-1BB、CD28、OX40、ICOS、CD27、MYD88-CD40和KIR2DS2组成的组。

- [0228] 在一些实施方案中,一个或多个共刺激结构域中的一个源自CD28。
- [0229] 在一些实施方案中,第二共刺激结构域源自4-1BB。
- [0230] 在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)。在一些实施方案中,基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)源自CD3 ζ 。
- [0231] 在一些实施方案中,CAR包含:抗CD19抗原结合结构域、BCMA或抗CD20抗原结合结构域;人CD8铰链区;CD8跨膜区;4a CD28共刺激结构域;和CD3 ζ 链细胞内信号传导结构域。
- [0232] 在一些实施方案中,CAR包含SEQ ID NO:9、16、22或34的序列。
- [0233] 在一些实施方案中,第一多核苷酸区段包含SEQ ID NO:10、17、23、35或55的序列。
- [0234] 在一些实施方案中,IL-10是人IL-10。在一些实施方案中,IL-10是病毒IL-10。
- [0235] 在一些实施方案中,IL-10是具有SEQ ID NO:1的序列的蛋白。在一些实施方案中,第二多核苷酸区段包含SEQ ID NO:2的序列。
- [0236] 在一些实施方案中,第一多核苷酸区段或第二多核苷酸区段进一步包含编码选择标志物的序列。
- [0237] 在一些实施方案中,选择标志物是 Δ NGFR。在一些实施方案中, Δ NGFR具有SEQ ID NO:3的序列。在一些实施方案中,多核苷酸构建体包含SEQ ID NO:4的序列。
- [0238] 在一些实施方案中,选择标志物是截短形式的EGFR多肽。
- [0239] 在一些实施方案中,构建体是载体。在一些实施方案中,载体是病毒载体。在一些实施方案中,载体是慢病毒载体。
- [0240] 在另一方面,本公开内容的特征在于多核苷酸构建体,其包含:具有SEQ ID NO:10、17、23、35或55的序列的第一多核苷酸区段;和具有SEQ ID NO:2的序列的第二多核苷酸区段。
- [0241] 在另一方面,本公开内容的特征在于多核苷酸构建体,其包含:具有SEQ ID NO:10、17、23、35或55的序列的第一多核苷酸区段;具有SEQ ID NO:2的序列的第二多核苷酸区段;以及位于第一多核苷酸区段和第二多核苷酸区段之间的具有SEQ ID NO:33的序列的第三多核苷酸区段。
- [0242] 在另一方面,本公开内容的特征在于多核苷酸构建体,其包含:具有SEQ ID NO:10、17、23、35或55的序列的第一多核苷酸区段;具有SEQ ID NO:2的序列的第二多核苷酸区段;位于第一多核苷酸区段和第二多核苷酸区段之间的具有SEQ ID NO:27的序列的第三多核苷酸区段;以及具有SEQ ID NO:4的序列的第四多核苷酸区段。
- [0243] 在另一方面,本公开内容的特征在于来自单供体或多供体的CD4^{IL-10}细胞,其中IL-10是病毒IL-10。病毒IL-10具有SEQ ID NO:6或18的序列。在一些实施方案中,病毒IL-10由具有SEQ ID NO:7的序列的多核苷酸编码。在一些实施方案中,IL-10是人IL-10,其中来自人IL-10的一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个氨基酸被来自病毒IL-10的相应氨基酸序列替换。在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞被转导有在组成型启动子控制下的外源病毒IL-10。在一些实施方案中,表达控制元件驱动病毒IL-10在激活的CD4⁺ T细胞中的表达。在一些实施方案中,编码病毒IL-10的外源多核苷酸被整合至T细胞核基因组中。在一些实施方案中,编码病毒IL-10的外源多核苷酸未被整合至T细胞核基因组中。在一些实施方案中,编码病毒IL-10的外源多核苷酸具有SEQ ID NO:7的序列。
- [0244] 在另一方面,本公开内容的特征在于来自单供体或多供体的CD4^{IL-10}细胞,其中IL-

10是小家鼠 (*Mus musculus*) ,“小鼠 (MOUSE)” (SEQ ID NO:58) ;褐家鼠 (*Rattus norvegicus*) ,“大鼠 (RAT)” (SEQ ID NO:59) ;恒河猴 (*Macaca mulatta*) ,“MACMU” (SEQ ID NO:60) ;大猩猩 (*Gorilla gorilla*) ,“大猩猩 (GORILLA)” (SEQ ID NO:61) ;食蟹猴 (*Macaca fascicularis*) ,“CYN0” (SEQ ID NO:62) ;东非狒狒 (*Papio Anubis*) ,“橄榄狒狒 (OLIVE BABOON)” (SEQ ID NO:63) ;倭黑猩猩 (*Pan paniscus*) ,“倭黑猩猩 (BONOB0)” (SEQ ID NO:64) ;黑猩猩 (*Pan troglodytes*) ,“黑猩猩 (CHIMP)” (SEQ ID NO:65) ;和EBVB9 (SEQ ID NO:66) 的IL-10。在一些实施方案中,IL-10是与小家鼠,“小鼠 (MOUSE)” (SEQ ID NO:58) ;褐家鼠,“大鼠 (RAT)” (SEQ ID NO:59) ;恒河猴,“MACMU” (SEQ ID NO:60) ;大猩猩,“大猩猩 (GORILLA)” (SEQ ID NO:61) ;食蟹猴,“CYN0” (SEQ ID NO:62) ;东非狒狒,“橄榄狒狒 (OLIVE BABOON)” (SEQ ID NO:63) ;倭黑猩猩,“倭黑猩猩 (BONOB0)” (SEQ ID NO:64) ;黑猩猩,“黑猩猩 (CHIMP)” (SEQ ID NO:65) ;和EBVB9 (SEQ ID NO:66) 的IL-10具有至少90%、95%、98%或99%序列同一性的蛋白。

[0245] 在另一方面,本公开内容的特征在于来自单供体或多供体的CD4^{IL-10}细胞,其中IL-10是人IL-10的变体。人IL-10变体具有SEQ ID NO:67或SEQ ID NO:68的序列。在一些实施方案中,IL-10是人IL-10,其中来自人IL-10的一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个氨基酸被来自另一物种的IL-10 (例如,小家鼠,“小鼠 (MOUSE)” (SEQ ID NO:58) ;褐家鼠,“大鼠 (RAT)” (SEQ ID NO:59) ;恒河猴,“MACMU” (SEQ ID NO:60) ;大猩猩,“大猩猩 (GORILLA)” (SEQ ID NO:61) ;食蟹猴,“CYN0” (SEQ ID NO:62) ;东非狒狒,“橄榄狒狒 (OLIVE BABOON)” (SEQ ID NO:63) ;倭黑猩猩,“倭黑猩猩 (BONOB0)” (SEQ ID NO:64) ;黑猩猩,“黑猩猩 (CHIMP)” (SEQ ID NO:65) ;和EBVB9 (SEQ ID NO:66) 的IL-10) 的相应氨基酸序列替换。在一些实施方案中,CD4⁺T细胞被转导有在组成型启动子的控制下的外源IL-10变体。在一些实施方案中,表达控制元件驱动IL-10变体在激活的CD4⁺ T细胞中的表达。在一些实施方案中,编码IL-10变体的外源多核苷酸被整合至T细胞核基因组中。在一些实施方案中,编码IL-10变体的外源多核苷酸未被整合至T细胞核基因组中。

[0246] 在又另一方面,本公开内容提供了制备病毒IL-10CD4^{IL-10}的方法,其包括以下步骤:

[0247] (i) 从单个T细胞供体获得原代CD4⁺ T细胞;和

[0248] (ii) 通过引入编码病毒IL-10的外源多核苷酸来修饰供体CD4⁺ T细胞,

[0249] 从而获得遗传修饰的CD4⁺ T细胞。

[0250] 在一些实施方案中,方法在步骤(i)之后或步骤(ii)之后进一步包括以下步骤:在抗CD3抗体和抗CD28抗体或者抗CD3抗体和CD28抗体包被的珠的存在下孵育原代CD4⁺ T细胞。

[0251] 在一些实施方案中,方法包括进一步在IL-2的存在下孵育原代CD4⁺ T细胞。在一些实施方案中,编码病毒IL-10的外源多核苷酸使用载体。

[0252] 在一些实施方案中,编码病毒IL-10的外源多核苷酸包含编码选择标志物的区段。在一些实施方案中,编码的选择标志物是 Δ NGFR。在一些实施方案中,编码的选择标志物具有SEQ ID NO:3的序列。在一些实施方案中,编码的选择标志物是截短的EGFR多肽。在一些实施方案中,编码的选择标志物是截短的人EGFR多肽。

[0253] 在一些实施方案中,方法在步骤(ii)之后进一步包括以下步骤:分离表达选择标

志物的遗传修饰的CD4⁺ T细胞,从而生成富集的遗传修饰的CD4⁺ T细胞群。

[0254] 在一些实施方案中,方法进一步包括孵育富集的遗传修饰的CD4⁺ T细胞群的步骤。在一些实施方案中,孵育富集的遗传修饰的CD4⁺ T细胞群的步骤在IL-2的存在下,在抗CD3抗体和抗CD28抗体或者CD3抗体和CD28抗体包被的珠的存在下进行。

[0255] 在一些实施方案中,在步骤(i)中,原代CD4⁺ T细胞从冷冻储备液获得。在一些实施方案中,在步骤(i)中,原代CD4⁺ T细胞从单个T细胞供体的未冷冻的外周血单核细胞获得。

[0256] 在一些实施方案中,方法进一步包括从外周血单核细胞分离CD4⁺ T细胞的步骤。在一些实施方案中,外周血单核细胞从血沉棕黄层(buffy coat)或单采血液成分术获得。

[0257] 5.附图简述

[0258] 图1是本文提供的各种嵌合抗原受体(CAR)结构的非限制性图示。

[0259] 图2A示出了抗CD19 CAR编码序列的部分结构,其包括来自完全人抗CD19单克隆抗体FMC63的scFv、CD8 α 铰链、CD8 α 跨膜结构域、CD28共刺激结构域和CD3 ζ 激活结构域,其用于将抗CD19 CAR递送至CD4⁺ T细胞中以产生CD4^{IL-10抗CD19 CAR}细胞的慢病毒载体中。

[0260] 图2B示出了用于将抗CD19 CAR递送至CD4⁺ T细胞中以产生CD4^{IL-10抗CD19 CAR}细胞的慢病毒载体(pLV抗CD19 CAR)。

[0261] 图3A-3B示出了用于生成慢病毒载体(LVV;LVV^{IL-10-NGFR})的双向质粒(pLVIL-10),该慢病毒载体用于将人IL-10和 Δ NGFR编码序列递送至CD4⁺ T细胞中以产生CD4^{IL-10}细胞或CD4^{IL-10抗CD19 CAR}细胞。图3A示出了用于将人IL-10和 Δ NGFR编码序列递送至来自多供体的CD4⁺ T细胞中以产生多供体CD4^{IL-10}细胞的双向慢病毒载体的部分结构。图3B示出了用于将人IL-10和 Δ NGFR编码序列递送至来自多供体的CD4⁺ T细胞中以产生多供体CD4^{IL-10}细胞的双向慢病毒载体(hPGK.IL10.WPRE.mhCMV. Δ NGFR.SV40PA)的完整环状结构。

[0262] 图4为了说明性目的显示了天然B细胞分化过程中的抗原表达。

[0263] 图5A-5C示出了生成CD4^{IL-10抗CD19 CAR}细胞的方法的非限制性实例的示意图。在每种方法中,在完全培养基(X-vivo,补充有5%人AB血清和rhIL-2(50U/mL))中,用抗CD3/抗CD28珠(Miltenyi)(3:1细胞:珠的比例)激活人CD4⁺ T细胞。图5A显示了激活的CD4⁺ T细胞在激活后48小时用编码抗CD19 CAR(LVV^{CD19-CAR})的慢病毒载体转导,并在24小时后(即激活后72小时)用编码人IL-10和截短形式的人NGF受体(LVV^{IL-10-NGFR})的双向慢病毒载体转导。两种LVV均以20的感染复数(MOI)使用。图5B显示了激活的CD4⁺ T细胞在激活后48小时用LVV^{IL-10-NGFR}转导,并在24小时后(即激活后24小时)用LVV^{CD19-CAR}转导。图5C显示了激活的CD4⁺ T细胞在激活后48小时用LVV^{IL-10-NGFR}和LVV^{CD19-CAR}同时转导。通过在激活后48小时仅用LVV^{IL-10-NGFR}转导激活的CD4⁺ T细胞生成对照(不表达CAR)。对于图5A-5C中的每一个,转导均在聚凝胺(8 μ g/mL)的存在下进行。此外,对于图5A-5C中的每一个,转导后10-28天,使用抗CD271微珠(Miltenyi)和抗CD19 CAR微珠(Miltenyi)纯化转导的细胞(即 Δ NGFR+细胞)。纯化的细胞如先前所描述的每14天进行再刺激(Andolfi et al.Mol.Ther.20(9):1778-1790(2012)和Locafaro et al.Mol.Ther.25(10):2254-2269(2017))。在第二次(TF2)和第三次(TF3)再刺激后,对所得细胞(CD4^{IL-10抗CD19 CAR}细胞或对照CD4^{IL-10}细胞)进行体外和体内表征。在整个培养期间根据需要每2-3天更换培养基。

[0264] 图6A显示了根据图5A中描述的方法产生的对照(左图)和CD4^{IL-10抗CD19 CAR}(右图)的

流式细胞术图(x轴为抗CD19 CAR表达,并且y轴为NGFR表达(IL-10的替代物))。图6B显示了根据图5B中描述的方法产生的对照(左图)和CD4^{IL-10}抗CD19CAR(右图)的流式细胞术图(x轴为CD19,并且y轴为NGFR)。图6C显示了根据图5C中描述的方法产生的对照(左图)和CD4^{IL-10}抗CD19 CAR(右图)的流式细胞术图(x轴为CD19,并且y轴为NGFR)。

[0265] 图7显示了CD4^{IL-10}T细胞(对照)和CD4^{IL-10}抗CD19 CAR T细胞的流式细胞术图(x轴为抗CD19 CAR表达,并且y轴为NGFR表达)。上图显示了根据图5C所示的方法由供体26.1生成的CD4^{IL-10}T细胞(对照)和CD4^{IL-10}抗CD19 CAR T细胞。下图显示了根据图5C中所示的方法由供体26.2生成的CD4^{IL-10}T细胞(对照)和CD4^{IL-10}抗CD19CAR T细胞。

[0266] 图8A-8D显示了由从三个不同供体(26.1、26.2和26.3)分离的CD4⁺T细胞产生的CD4^{IL-10}T细胞(对照)和CD4^{IL-10}/CAR T细胞的细胞因子产生特征。细胞因子产生特征包括IL-10(图8A)、IFN- γ (图8B)、IL-4(图8C)和IL-5(图8D)。

[0267] 图9显示了由从供体24.2分离的CD4⁺T细胞产生的CD4^{IL-10}T细胞(对照)和CD4^{IL-10}/CAR T细胞的细胞因子产生特征。

[0268] 图10显示了由从供体24.2分离的CD4⁺T细胞产生的CD4^{IL-10}抗CD19CAR细胞在体外杀死表达CD19的NALM6细胞。ALL-CM是髓系细胞系,并且对NK杀伤敏感的细胞系K562被包括作为对照。

[0269] 图11A显示了由从三个不同供体(26.1、26.2和26.3)分离的CD4⁺T细胞产生的CD4^{IL-10}抗CD19CAR细胞在体外杀死CD19⁺NALM6细胞。

[0270] 图11B显示了NALM6细胞与CD4^{IL-10}T细胞(对照)或NALM6细胞与CD4^{IL-10}抗CD19CAR细胞共培养的第3天的上清液中的IL-10水平。BLQ:低于定量水平(31pg/mL)。

[0271] 图12显示了在与在第二次再刺激(TF2)后分离的CD4^{IL-10}T细胞(对照)和CD4^{IL-10}抗CD19CAR细胞(见图5C)共培养后,同种异体CD4⁺T细胞的增殖测定的流式细胞术图(计数相对eFluor®670)。上图显示了与CD4^{IL-10}抗CD19CAR细胞共培养后CD4⁺T细胞的增殖。下图显示了与CD4^{IL-10}T细胞(对照)共培养后CD4⁺T细胞的增殖。流式细胞术图显示“未分裂”细胞和“分裂”细胞,其中由于每次分裂后稀释,所以分裂细胞包括越来越少的eFluor®670量。CD4^{IL-10}T细胞(对照)和CD4^{IL-10}抗CD19CAR细胞介导的抑制如下计算:100-([在CD4^{IL-10}T细胞(对照)或CD4^{IL-10}抗CD19CAR细胞的存在下应答者的增殖/应答者的增殖]×100)。

[0272] 图13显示了在与在第二次再刺激(TF2)后分离的CD4^{IL-10}T细胞(对照)和CD4^{IL-10}抗CD19CAR细胞(见图5C)共培养后,同种异体CD8⁺T细胞的增殖测定的流式细胞术图(计数相对eFluor®670)。上图显示了与CD4^{IL-10}抗CD19CAR细胞共培养后CD8⁺T细胞的增殖。下图显示了与CD4^{IL-10}T细胞(对照)共培养后CD8⁺T细胞的增殖。流式细胞术图显示“未分裂”细胞和“分裂”细胞,其中由于每次分裂后稀释,所以分裂细胞包括越来越少的eFluor®670量。CD4^{IL-10}T细胞(对照)和CD4^{IL-10}抗CD19CAR细胞介导的抑制如下计算:100-([在CD4^{IL-10}T细胞(对照)或CD4^{IL-10}抗CD19CAR细胞的存在下应答者的增殖/应答者的增殖]×100)。

[0273] 图14显示了在与在第三次再刺激(TF3)后分离的CD4^{IL-10}T细胞(对照)和CD4^{IL-10}抗CD19CAR细胞(见图5C)共培养后,同种异体PBMC的增殖测定的流式细胞术图(计数相对eFluor®670)。流式细胞术图显示“增殖”细胞,其中由于每次分裂后稀释,所以分裂细胞包括越来越少的eFluor®670量。CD4^{IL-10}T细胞(对照)和CD4^{IL-10}抗CD19CAR细胞介导的抑制如下计算:100-([在CD4^{IL-10}T细胞(对照)或CD4^{IL-10}抗CD19CAR细胞的存在下应答者的增殖/应答者的

增殖] $\times 100$)。

[0274] 图15显示了用于评估小鼠体内CD19+肿瘤细胞生长的实验概述的示意图。在第0天, NSG小鼠注射(i) NALM6-荧光素酶(每只小鼠 1×10^5 个)、(ii) NALM6-荧光素酶(每只小鼠 1×10^5 个)+PBMC(每只小鼠 2.5×10^6 个)、(iii) NALM6-荧光素酶(每只小鼠 1×10^5 个)+CD4^{IL-10}抗CD19CAR⁺细胞(每只小鼠 2.5×10^6 个), 或(iv) NALM6-荧光素酶(每只小鼠 1×10^5 个)+PBMC(每只小鼠 2.5×10^6 个)+CD4^{IL-10}抗CD19CAR⁺细胞(每只小鼠 2.5×10^6 个)。

[0275] 图16A显示了在注射图15中描述的条件(i)至(iv)后第3、6、9和12天, NSG小鼠中NALM6-荧光素酶细胞的生物发光。

[0276] 图16B显示了对图16A中图像的生物发光进行定量的线图。图15中描述的条件(i)至(iv)的每一种的总通量[p/s]随时间(NALM6-荧光素酶注射后天数)的变化。使用Mann-Whitney检验在第12天测量P值, 将条件(ii)至(iv)与条件(i) (单独的NALM6-荧光素酶)进行比较。

[0277] 图17显示了图15中描述的在条件(i)、(ii)和(iii)下的小鼠的体重减轻随时间变化的线图。体重减轻用作异种移植物抗宿主病(GvHD)的指标。

[0278] 图18A-18C显示了xeno-GvHD的人源化小鼠模型中的单供体CD4^{IL-10}抗CD19CAR⁺细胞和多供体CD4^{IL-10}抗CD19CAR⁺细胞。图18A显示了在由同种异体PBMC诱导的xeno-GvHD的人源化小鼠模型中测试的单供体CD4^{IL-10}抗CD19CAR⁺细胞, 其中在第3天, 经辐照的NSG小鼠静脉内(i.v.)注射(i) 同种异体PBMC(2.5×10^6 个细胞/小鼠)、(ii) 单供体CD4^{IL-10}抗CD19CAR⁺细胞(2.5×10^6 个细胞/小鼠)、(iii) 多供体CD4^{IL-10}抗CD19CAR⁺细胞(2.5×10^6 个细胞/小鼠)、(iv) PBMC+单供体CD4^{IL-10}抗CD19CAR⁺细胞、(v) 或PBMC+多供体CD4^{IL-10}抗CD19CAR⁺细胞(2.5×10^6 个细胞/小鼠)。图18B显示在由同种异体PBMC诱导的xeno-GvHD的人源化小鼠模型中测试的CD4^{IL-10}抗CD19CAR⁺细胞, 其中在第3天, 经辐照的NSG小鼠静脉内(i.v.)注射同种异体PBMC(2.5×10^6 个细胞/小鼠)和/或单供体CD4^{IL-10}抗CD19CAR⁺细胞。图18C显示了在由同种异体PBMC诱导的xeno-GvHD的人源化小鼠模型中测试的CD4^{IL-10}抗CD19CAR⁺细胞, 其中在第3天, 经辐照的NSG小鼠静脉内(i.v.)注射同种异体PBMC(2.5×10^6 个细胞/小鼠)和/或多供体CD4^{IL-10}抗CD19CAR⁺细胞(2.5×10^6 个细胞/小鼠)。PBMC: 外周单核细胞; GvHD: 移植物抗宿主病。

[0279] 图19示出了用于生成CD4^{IL-10}细胞的示例性方案。

[0280] 图20A显示了用LV-IL-10/ Δ NGFR(编码人IL-10和截短形式的人NGF受体的双向慢病毒载体)转导的人CD4⁺ T细胞中CD4⁺ Δ NGFR⁺细胞的百分比(平均值 $\pm$ SD, n=10)和载体拷贝数(VCN, 平均值 $\pm$ SD, n=10)。图20B显示了来自两个代表性供体(供体B和供体C)的用LV-IL-10/ Δ NGFR转导并使用抗CD271微珠纯化的人CD4⁺ T细胞中CD4和 Δ NGFR表达的FACS分析。

[0281] 图21显示了单供体CD4^{IL-10}细胞在第二次(TF2)和第三次(TF3)再刺激之后的细胞因子产生特征。TF2和TF3 CD4^{IL-10}细胞未受刺激(箭头表示自发/未受刺激的样品)或用经固定的CD3($10 \mu\text{g/mL}$)和可溶性CD28 mAb($1 \mu\text{g/mL}$)刺激48小时。收集培养上清液并通过ELISA测定IL-10、IL-4、IL-5、IFN- γ 和IL-22的水平。所有样品均进行三次重复测试。显示了平均值 $\pm$ SD, n=8个测试供体。

[0282] 图22A显示了通过FACS分析的第二轮刺激(TF2)之后表达颗粒酶B(GzB)的CD4^{IL-10}细胞的百分比。显示了n=7个供体和单供体的盒须图(box and whiskers)。图22B显示了当

CD4^{IL-10}细胞(10⁵个/孔)与K562和ALL-CM细胞(10⁵个/孔)以1:1的比例共培养3天时的死细胞%。盒须图代表来自n=4个供体的数据,并且点代表来自单供体的数据。

[0283] 图23A和23B显示了单供体CD4^{IL-10}细胞可以抑制同种异体CD4⁺ T细胞的增殖。同种异体PBMC细胞用eFluor® 670(10⁵个细胞/孔)标记,并在不存在或存在CD4^{IL-10}细胞(10⁵个细胞/孔)(以1:1的应答者:抑制者的比例)的情况下,用同种异体成熟树突状(DC)细胞(5×10⁴个细胞/孔)和可溶性抗CD3 mAb刺激。培养4天后,使用流式细胞术在对CD4⁺ ΔNGFR⁻ T细胞进行门控之后,通过eFluor® 670稀释测定增殖的应答细胞的百分比。图23A显示了供体-C、供体-E和供体-F的结果,并且图23B显示了供体-H、供体-I和供体-L的结果。标出了增殖和抑制的百分比。CD4^{IL-10}细胞介导的抑制如下计算:100-([在CD4^{IL-10}细胞的存在下应答者的增殖/应答者单独的增殖]×100)。

[0284] 图24A和24B显示了单供体CD4^{IL-10}细胞可以抑制同种异体CD8⁺ T细胞的增殖。同种异体PBMC细胞用eFluor® 670(10⁵个细胞/孔)标记,并在不存在或存在CD4^{IL-10}细胞(10⁵个细胞/孔)(以1:1的应答者:抑制者的比例)的情况下,用同种异体成熟树突状(DC)细胞(5×10⁴个细胞/孔)和可溶性抗CD3 mAb刺激。培养4天后,使用流式细胞术在对CD4⁺ ΔNGFR⁻ T细胞进行门控之后,通过eFluor® 670稀释测定增殖的应答细胞的百分比。图24A显示了供体-C、供体-E和供体-F的结果,并且图24B显示了供体-H、供体-I和供体-L的结果。标出了增殖和抑制的百分比。CD4^{IL-10}细胞介导的抑制如下计算:100-([在CD4^{IL-10}细胞的存在下应答者的增殖/应答者单独的增殖]×100)。

[0285] 图25显示了与来自8个供体个体的CD4^{IL-10}细胞产生的平均水平(+/-SD)相比,多供体CD4^{IL-10}细胞在第三次(TF3)再刺激之后的细胞因子产生特征。将来自三个供体的TF3 CD4^{IL-10}细胞以1:1:1的比例合并,并用经固定的CD3(10μg/mL)和可溶性CD28 mAb(1μg/mL)刺激48小时。收集培养上清液并通过ELISA测定IL-10、IL-4、IL-5、IFN-γ和IL-22的水平。点是多供体CD4^{IL-10}细胞的结果;灰色柱代表平均值±SD,n=8个单独供体。

[0286] 图26A显示了与用于生成合并池的n=3个单独供体的CD4^{IL-10}细胞表达颗粒酶B的平均水平% (+/-SD)相比,表达颗粒酶B(GzB)的多供体CD4^{IL-10}细胞的百分比。第三轮刺激(TF3)之后的细胞通过FACS分析。图26B显示了当多供体CD4^{IL-10}细胞(10⁵个/孔)与K562和ALL-CM细胞(10⁵个/孔)以1:1的比例共培养3天时的死细胞%。通过FACS计数每种靶细胞的残留白血病细胞(CD45⁺CD33⁺)。点是多供体CD4^{IL-10}的结果,并且灰色柱代表用于生成合并池的n=3个单独供体的平均值±SD。

[0287] 图27A和27B显示了多供体CD4^{IL-10}细胞可以抑制同种异体CD4⁺ T细胞和CD8⁺ T细胞的增殖。同种异体PBMC细胞用eFluor® 670(10⁵个细胞/孔)标记,并在不存在或存在多供体CD4^{IL-10}细胞(10⁵个细胞/孔)(以1:1的应答者:抑制者的比例)的情况下,用同种异体成熟树突状(DC)细胞(5×10⁴个细胞/孔)和可溶性抗CD3 mAb刺激。培养4天后,使用流式细胞术在对CD4⁺ ΔNGFR⁻ T细胞和CD8⁺ ΔNGFR⁻ T细胞进行门控之后,通过eFluor® 670稀释测定增殖的应答细胞的百分比。图27A显示了包含从供体C、供体E和供体F汇集的CD4⁺细胞的多供体CD4^{IL-10}细胞的结果。图27B显示了包含从供体-H、供体-I和供体-L汇集的CD4⁺细胞的多供体CD4^{IL-10}细胞的结果。CD4^{IL-10}细胞介导的抑制如下计算:100-([在CD4^{IL-10}细胞的存在下应答者的增殖/应答者单独的增殖]×100)。

[0288] 图28示出了用于测试由辐照后第0天注射的人PBMC和/或多供体CD4^{IL-10}细胞诱导

GvHD的方案。

[0289] 图29显示了在注射PBMC (5×10^6 个细胞/小鼠)、多供体(三个供体) $CD4^{IL-10}$ 细胞 (5×10^6 个细胞/小鼠),或PBMC (5×10^6 个细胞/小鼠)与多供体 $CD4^{IL-10}$ 细胞(三个供体) (5×10^6 个细胞/小鼠)的组合之后每天证明发生GvHD的NSG小鼠%。

[0290] 图30显示了在注射PBMC (5×10^6 个细胞/小鼠)、多供体(三个供体) $CD4^{IL-10}$ 细胞 (5×10^6 个细胞/小鼠),或PBMC (5×10^6 个细胞/小鼠)与多供体 $CD4^{IL-10}$ 细胞(三个供体) (5×10^6 个细胞/小鼠)的组的NSG小鼠中 $CD4^{IL-10}$ 细胞向脾(左图)和骨髓(右图)的迁移。显示了n=8个供体和单供体的盒须图。

[0291] 图31示出了用于测试由辐照后第0天注射的 $CD4^+$ T细胞和多供体或单供体(BC-H) $CD4^{IL-10}$ 细胞诱导GvHD的方案。

[0292] 图32显示了注射之后每天证明发生GvHD的NSG小鼠%。

[0293] 图33A-33C显示了基于循环白血病细胞减少和长期无白血病存活率测试的移植物抗白血病(GvL)效应。白血病如先前所描述的进行测量(Locafaro G. et al Molecular Therapy 2017)。在第0天,对NSG小鼠进行亚致死辐照并静脉内注射髓系白血病细胞(ALL-CM) (5×10^6 个)。图33A是实验的图示。图33B显示了在第3天注射PBMC (5×10^6 个)或单供体(来自供体BC-I和供体BC-H) $CD4^{IL-10}$ 细胞 (2.5×10^6 个)的动物的无白血病存活率。图33C显示了第3天注射PBMC (5×10^6 个)或多供体 $CD4^{IL-10}$ 细胞(来自供体BC-I和供体BC-H) (2.5×10^6 个)的动物的无白血病存活率。

[0294] 图34A-34C显示了在第0天接受亚致死辐照和静脉内注射ALL-CM细胞 (5×10^6 个)的NSG小鼠中测量的长期无白血病存活率。图34A显示了实验的图示。图34B显示了在第3天注射单独的单核细胞(PBMC) (5×10^6 个)或单核细胞(PBMC) (5×10^6 个)+单供体(来自供体BC-H和供体BC-I) $CD4^{IL-10}$ 细胞 (2.5×10^6 个)的动物的数据。图34C显示了在第3天注射单独的单核细胞(PBMC) (5×10^6 个)或单核细胞(PBMC) (5×10^6 个)+多供体 $CD4^{IL-10}$ 细胞(BC-I/H) (2.5×10^6 个)的动物的数据。

[0295] 图35A-35G显示了 $CD4^{IL-10}$ 细胞对NLPR3炎症小体激活的抑制。图35A显示了来自单供体(#1)的 $CD4^{IL-10}$ 细胞上清液对LPS激活的单核细胞产生IL-1 β 的影响。图35B显示了来自另一个单供体(#2)的 $CD4^{IL-10}$ 细胞上清液对LPS激活的单核细胞产生IL-1 β 的影响。图35C显示了来自单供体(#1)的 $CD4^{IL-10}$ 细胞上清液对抑制NLPR3炎症小体激活剂,尼日利亚菌素(nigericine, NIG)增强LPS诱导的IL-1 β 产生的影响。图35D显示了来自单供体(#2)的 $CD4^{IL-10}$ 细胞上清液对抑制NLPR3炎症小体激活剂,尼日利亚菌素(NIG)增强LPS诱导的IL-1 β 产生的影响。图35E是显示在存在或不存在抗IL-10受体(抗IL-10R) mAb的情况下,来自单供体的 $CD4^{IL-10}$ 细胞上清液和来自两个不同供体的合并细胞对LPS诱导的单核细胞产生IL-1 β 的影响的柱状图。图35F显示了在存在或不存在抗IL-10受体(抗IL-10R) mAb的情况下,多供体 $CD4^{IL-10}$ 细胞上清液对单核细胞产生IL-1 β 的影响。图35G显示了在存在或不存在抗IL-10R mAb的情况下,多供体 $CD4^{IL-10}$ 细胞上清液对LPS与尼日利亚菌素组合诱导的IL-18产生的影响。

[0296] 图36示出了用于测试移植物抗髓系白血病和xeno-GvHD效应的实验方案。在第0天,对NSG小鼠静脉内注射ALL-CM细胞 (2.5×10^6 个)。在第3天,将小鼠分成五组,并且每组接受以下处理:(i) 无处理作为对照,(ii) 同种异体单核细胞(PBMC);(iii) 同种异体PBMC和

多供体CD4^{IL-10}细胞(BC-E、BC-V、BC-T, 1:1:1合并); (iv) 同种异体PBMC和单供体CD4^{IL-10}细胞(BC-E); 或(v) 多供体CD4^{IL-10}细胞, 浓度如图36所示。

[0297] 图37是描绘单供体CD4^{IL-10}细胞(BC-T、BC-V和BC-E)和多供体CD4^{IL-10}细胞(合并: BC-E、BC-V和BC-T以1:1:1合并)的细胞因子分泌特征的柱状图。

[0298] 图38显示了单供体CD4^{IL-10}细胞(BC-V和BC-E)和多供体CD4^{IL-10}细胞(BC-V/E/T的合并池)对同种异体CD4⁺和CD8⁺ T细胞的体外增殖的抑制作用。同种异体PBMC细胞用eFluor® 670 (5×10⁴个细胞/孔) 标记, 并在不存在或存在CD4^{IL-10}细胞(5×10⁴个细胞/孔)(以1:1的应答者:抑制者的比例)的情况下, 用同种异体成熟树突状(DC)细胞(1×10⁴个细胞/孔)和可溶性抗CD3 mAb刺激。培养3天后, 使用流式细胞术在对CD4⁺ ΔNGFR⁻(上图)或CD8⁺ ΔNGFR⁻(下图) T细胞进行门控后, 通过eFluor® 670稀释测定增殖的应答细胞的百分比。图38显示了来自单供体BC-V和BC-E以及来自供体BC-V、BC-E和BC-T的合并细胞的结果。标出了增殖和抑制的百分比。CD4^{IL-10}细胞介导的抑制如下计算: 100 - ([在CD4^{IL-10}细胞的存在下应答者的增殖/应答者单独的增殖] × 100)。

[0299] 图39显示了单供体CD4^{IL-10}细胞(BC-E和BC-V)或多供体CD4^{IL-10}细胞(BC-E+BC-V+BC-T)与ALL-CM髓系肿瘤细胞或K562细胞共培养时的活细胞%。结果显示单供体和多供体CD4^{IL-10}细胞对ALL-CM髓系肿瘤细胞具有选择性细胞毒性作用, 但对缺乏I类MHC表达的K562细胞无作用。

[0300] 图40显示了在第0天静脉内注射ALL-CM细胞(2.5×10⁶个)的NSG小鼠中测得的无白血病存活率。在第3天, 将小鼠分成五组, 并且每组接受以下处理: (i) 无处理作为对照; (ii) 同种异体单核细胞(PBMC); (iii) 同种异体PBMC和多供体CD4^{IL-10}细胞(BC-V/T/ET); (iv) 同种异体PBMC和单供体CD4^{IL-10}细胞(BC-E)或(v) 多供体CD4^{IL-10}细胞。图显示了各组动物的无白血病存活率。

[0301] 图41显示了在注射ALL-CM细胞(2.5×10⁶个)并随后在第3天施用以下处理后的每天无GvHD的NSG小鼠%: (i) 无处理作为对照; (ii) 同种异体单核细胞(PBMC); (iii) 同种异体PBMC和多供体CD4^{IL-10}细胞(BC-E、BC-V、BC-T); (iv) 同种异体PBMC和单供体CD4^{IL-10}细胞(BC-E)或(v) 多供体CD4^{IL-10}细胞。

[0302] 图42显示了接受2.5E+06个PBMC(对于供体C、E、F和H是同种异体的)给药的NSG小鼠在第22天全部死于急性且致命的xeno-GvHD。单供体CD4^{IL-10}细胞(批次C)或多供体CD4^{IL-10}细胞(批次CEFH)与PBMC组合的施用分别防止了75% (3/4只小鼠)和80% (4/5只小鼠)的小鼠发生致死性xeno-GvHD。相比之下, 2.5E+06个多供体CD4^{IL-10}细胞的转移未诱导任何GvHD体征。总之, 这些结果表明来自4个不同供体的多供体CD4^{IL-10}细胞抑制致病性人T细胞应答, 其与单供体CD4^{IL-10}细胞一样有效, 或略强。PBMC: 外周单核细胞; GvHD: 移植物抗宿主病。

[0303] 图43A显示了不同物种的IL-10蛋白序列比对, 包括人(SEQ ID NO:1); 小家鼠, “小鼠(MOUSE)” (SEQ ID NO:58); 褐家鼠, “大鼠(RAT)” (SEQ ID NO:59); 恒河猴, “MACMU” (SEQ ID NO:60); 大猩猩, “大猩猩(GORILLA)” (SEQ ID NO:61); 食蟹猴, “CYNO” (SEQ ID NO:62); 东非狒狒, “橄榄狒狒(OLIVE BABOON)” (SEQ ID NO:63); 倭黑猩猩, “倭黑猩猩(BONOB0)” (SEQ ID NO:64); 黑猩猩, “黑猩猩(CHIMP)” (SEQ ID NO:65); 和EBVB9 (SEQ ID NO:66)。

[0304] 图43B提供了通过在相应位置处用病毒IL-10 (EBVB9)的氨基酸取代人IL-10的一

个或更多个氨基酸而生成的IL-10变体的序列。还提供了示例性变体、可能的huIL-10杂交体#1(SEQ ID NO:67)和可能的huIL-10杂交体#2(SEQ ID NO:68)的序列。“*”表示被取代的一个或更多个氨基酸位置。“#”表示IL-10杂交体#2(SEQ ID NO:68)的优选的I105至A105氨基酸取代。

[0305] 图43C显示了人IL-10(SEQ ID NO:1)与IL10 EBVB9(SEQ ID NO:66)的比对。“*”表示IL-10杂交体#1中被取代的一个或更多个氨基酸位置。“#”表示IL-10杂交体#2的优选的I105至A105氨基酸取代。

[0306] 附图仅出于说明目的描绘了本发明的各种实施方案。本领域技术人员从以下讨论中将容易地认识到,在不背离本文所描述的发明的原理的情况下,可以采用本文所示的结构和方法的替代实施方案。

[0307] 6. 详述

[0308] 6.1. 定义

[0309] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语均具有本发明所属领域的技术人员通常理解的含义。如本文所用,以下术语具有下面所赋予的含义。

[0310] “移植物抗白血病效应”或“GvL”是指同种异体造血干细胞移植(HSCT)或骨髓移植(BMT)后出现的效应。同种异体移植物中的T淋巴细胞消除恶性残留宿主白血病细胞。

[0311] “移植物抗肿瘤效应”或“GvT”是指同种异体造血干细胞移植(HSCT)或骨髓移植(BMT)后出现的效应。同种异体移植物中的T淋巴细胞消除恶性残留宿主癌细胞,例如骨髓瘤以及淋巴细胞性和髓系白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤和可能的乳腺癌的细胞。术语GvT是GvL的上位概念。

[0312] 术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”等在本文中以医学领域所理解的最广泛意义使用。具体地,这些术语通常意指获得期望的药理和/或生理效果。如本文所用,“治疗”涵盖对哺乳动物(特别是人)的疾病或病况的任何治疗,并且包括:(a)预防疾病或病况在可能易患该疾病或病况但尚未被诊断出患有该疾病或病况的受试者中发生;(b)抑制该疾病或病况(例如,阻止其发展);或(c)缓解该疾病或病况(例如,导致该疾病或病况消退,提供一种或更多种症状的改善)。可以根据本领域已知的标准方法和技术容易地评估任何病况的改善。通过该疾病方法治疗的受试者群体包括患有非期望的病况或疾病的受试者,以及处于发展该病况或疾病的风险的受试者。

[0313] 如本文所用,“HLA匹配的”是指一对个体在HLA I类(HLA-A、HLA-B和HLA-C)和II类(HLA-DRB1和HLA-DQB1)基因座中具有匹配的HLA等位基因,从而使个体彼此在免疫学上相容。可以使用本领域中可用的任何方法来确定HLA相容性,例如,如Tiervy,Haematologica 2016Volume101(6):680-687中所描述的方法,其通过引用并入本文。

[0314] 对于给定的基因座,当一个个体的两个等位基因中的每一个与另一个个体的两个等位基因匹配时,这对个体具有2/2匹配。当一个个体的两个等位基因中仅一个与另一个个体的两个等位基因中的一个匹配时,这对个体具有1/2匹配。当一个个体的所有十个等位基因(HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1和HLA-DQB1基因座各两个)与另一个体的所有十个等位基因匹配时,这对个体在HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1和HLA-DQB1基因座处具有10/10匹配。

[0315] 在优选的实施方案中,等位基因水平分型用于确定HLA相容性。等位基因水平分型

对应于HLA基因的特有核苷酸序列,通过使用第一、第二、第三和第四个字段中的所有数字来定义,例如A*02:01:01:01。在功能上,第三和第四个字段表征分别通过编码序列中的沉默取代和非编码序列中的取代而不同的等位基因,这些取代是不相关的,除非其阻止HLA等位基因的表达(例如,无效等位基因B*15:01:01:02N)。缺失无效等位基因将导致不匹配,这种不匹配很可能被同种反应性T细胞识别并产生有害的临床影响。非编码序列中的取代可能影响表达水平(例如A24low等位基因A*24:02:01:02L)。这种多变性也可能对抗HLA同种识别产生影响。

[0316] 如本文所用,术语“HLA不匹配的”是指一对个体在HLA I类(HLA-A、HLA-B和HLA-C)和II类(HLA-DRB1和HLA-DQB1)基因座中具有不匹配的HLA等位基因,从而使个体彼此在免疫学上不相容。

[0317] 如本文所用,术语“HLA部分不匹配的”是指一对个体在HLA I类(HLA-A、HLA-B、HLA-C)和HLA II类(HLA-DRB1、HLA-DQB1)基因座中具有不匹配的HLA等位基因,使得个体在可允许的程度上彼此在免疫学上不相容性。一些研究已经鉴定了允许的不匹配。一些HLA I类不相容性被认为是更可允许的。

[0318] “HLA单倍型”是指染色体的一系列HLA基因座等位基因,一个来自母亲,并且一个来自父亲。HLA I类(HLA-A、HLA-B和HLA-C)和II类(HLA-DRB1和HLA-DQB1)基因座的基因型可用于确定HLA单倍型。

[0319] 术语“治疗有效量”是指有效治疗疾病并因此改善疾病症状的量。

[0320] 术语“预防有效量”是指完全或部分预防疾病、病况或其症状的量。

[0321] 术语“改善”是指治疗中疾病状态(例如,神经退行性疾病状态)的任何治疗有益结果,包括其预防、减轻严重程度或进展、缓解或治愈。

[0322] 术语“CD4^{IL-10/CAR}”指经遗传修饰以表达嵌合抗原受体的任何CD4^{IL-10}细胞。当CD4^{IL-10/CAR}是指特定嵌合抗原受体时,命名法可以包括对CAR特异性的指定,例如“CD4^{IL-10/抗[抗原]CAR}”细胞。例如,CD4^{IL-10/CAR}和CD4^{IL-10/CD19 CAR}可以互换使用。

[0323] 如本文所用,术语“自体”是指细胞来源于重新引入该细胞的同一个体(例如,患者)。

[0324] 如本文所用,术语“同种异体”是指取自同一物种的两个或多个不同个体且遗传上不相同的细胞。

[0325] 6.2.其他解释惯例

[0326] 本文所述及的范围应理解为该范围内所有值的简写,包括所述及的端点。例如,1至50的范围应理解为包括来自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和50组成的组中的任何数字、数字组合或子范围。

[0327] 6.3.CD4^{IL-10/CAR}细胞

[0328] 在第一方面,描述了CD4⁺ T细胞或CD4⁺ T细胞群,其已被遗传修饰以从编码CAR的第一外源多核苷酸表达嵌合抗原受体(CAR)并从编码IL-10的第二外源多核苷酸表达IL-10(CD4^{IL-10/CAR}细胞)。

[0329] 6.3.1.CD4⁺ T细胞和T细胞供体

[0330] 可以使用本领域中可用的方法从来自供体(优选人供体)的外周血、脐血或其他血

液样品分离用于生成CD4^{IL-10/CAR} (自体或同种异体单供体CD4^{IL-10/CAR}或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR})群的CD4⁺ T细胞。在典型的实施方案中,CD4⁺ T细胞从外周血中分离。在某些实施方案中,CD4⁺ T细胞使用白细胞分离术和血沉棕黄层分离。在某些实施方案中,CD4⁺ T细胞从获自第三方的外周血分离。

[0331] 在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞从预先冷冻的血液储备液或预先冷冻的外周血单核细胞(PBMC)储备液或预先冷冻的CD4⁺ T细胞储备液分离。在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞从外周血或先前未冷冻的PBMC分离。在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞从获自个体供体的血液或PBMC单独分离,并且然后进行合并。在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞从首先从多个供体合并的血液或PBMC分离。

[0332] 在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞从单个T细胞供体获得。在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞从两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个不同的T细胞供体获得。

[0333] 在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞从待用CD4^{IL-10/CAR}细胞治疗的患者获得。

[0334] 在一些实施方案中,选择一个或多个T细胞供体而不考虑基因型。在一些实施方案中,基于基因型选择一个或多个T细胞供体。

[0335] 在某些实施方案中,一个或多个T细胞供体基于其HLA单倍型被选择。

[0336] 在一些实施方案中,至少两个不同的T细胞供体中的一些或全部具有匹配的HLA单倍型。在一些实施方案中,至少两个不同的T细胞供体中的一些或全部具有不匹配的HLA单倍型。

[0337] 在一些实施方案中,群中的所有CD4⁺ T细胞在HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1和HLA-DQB1基因座处彼此具有至少1/10、2/10、3/10、4/10、5/10、6/10、7/10、8/10或9/10的匹配。在一些实施方案中,群中的所有CD4⁺ T细胞在HLA-A、HLA-B、HLA-C和HLA-DRB1基因座处彼此具有至少1/8、2/8、3/8、4/8、5/8、6/8、7/8或8/8的匹配。在一些实施方案中,群中的所有CD4⁺ T细胞在HLA-A基因座处彼此具有2/2的匹配。在一些实施方案中,群中的所有CD4⁺ T细胞在HLA-B基因座处彼此具有2/2的匹配。在一些实施方案中,群中的所有CD4⁺ T细胞在HLA-C基因座处彼此具有2/2的匹配。在一些实施方案中,群中的所有CD4⁺ T细胞在HLA-DRB1和HLA-DQB1基因座处彼此具有至少有3/4或4/4的匹配。在一些实施方案中,群中的所有CD4⁺ T细胞具有A*02等位基因或A*24等位基因。

[0338] 在一些实施方案中,一个或多个T细胞供体中没有一个是待用CD4^{IL-10/CAR}细胞治疗的宿主。在一些实施方案中,一个或多个T细胞供体中没有一个是将与CD4^{IL-10/CAR}细胞一起用于本文所描述的治疗方法的干细胞(例如,HSC)、组织或器官的供体。在一些实施方案中,一个或多个T细胞供体是待用CD4^{IL-10/CAR}细胞治疗的宿主。

[0339] 在一些实施方案中,T细胞供体中的一个或多个与待治疗的患者(宿主)HLA不匹配或部分HLA不匹配。在一些实施方案中,T细胞供体中的一个或多个在HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1和HLA-DQB1基因座处与患者具有小于5/10、6/10、7/10、8/10、9/10或10/10的匹配。在一些实施方案中,T细胞供体中的一个或多个在HLA-A、HLA-B、HLA-C和HLA-DRB1基因座处与患者具有小于4/8、5/8、6/8、7/8或8/8的匹配。在一些实施方案中,T细胞供体中的一个或多个在HLA-A、HLA-B或HLA-C基因座处与患者具有小于2/2的匹配。在一些实施方案中,T细胞供体中的一个或多个在HLA-DRB1和HLA-DQB1基因座处与患者具有小于2/4、3/4或4/4的匹配。

[0340] 在一些实施方案中,T细胞供体中的一个或多个与HSC供体HLA不匹配或部分HLA不匹配。在一些实施方案中,T细胞供体中的一个或多个在HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1和HLA-DQB1基因座处与HSC供体具有小于5/10、6/10、7/10、8/10、9/10或10/10的匹配。在一些实施方案中,T细胞供体中的一个或多个在HLA-A、HLA-B、HLA-C和HLA-DRB1基因座处与HSC供体具有小于4/8、5/8、6/8、7/8或8/8的匹配。在一些实施方案中,T细胞供体中的一个或多个在HLA-A、HLA-B或HLA-C基因座处与HSC供体具有小于2/2的匹配。在一些实施方案中,T细胞供体中的一个或多个在HLA-DRB1和HLA-DQB1基因座处与HSC供体具有小于3/4或4/4的匹配。

[0341] 在优选的实施方案中,没有一个CD4⁺ T细胞是永生化的。

[0342] 6.3.2. 编码CAR的外源多核苷酸

[0343] 本公开内容的CD4^{IL10/CAR}细胞是已被遗传修饰以从编码嵌合抗原受体(CAR)的第一外源多核苷酸区段表达编码CAR的第一外源多核苷酸区段的CD4⁺ T细胞。CAR具有模块化设计,具有四个主要组分:抗原结合结构域、铰链、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域。这些元件中的每一个均具有独特的功能,并且可以通过构成的蛋白结构域的许多变化来实现CAR的最佳分子设计,如Rafiq et al. (Nat.Rev.Clin.Onco.,17:147-167 (2020) 所描述的,其通过引用以其全文并入本文。

[0344] 在一些实施方案中,编码CAR的多核苷酸区段编码第一代CAR、第二代CAR或第三代CAR。在一些实施方案中,第一代CAR包括抗原结合结构域、铰链区、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,第二代CAR包括抗原结合结构域、铰链区、跨膜结构域、共刺激结构域和细胞内信号传导结构域。第二代CAR的非限制性实例包括美国专利公开号2004/0043401、2013/0287748、2014/0227237、2014/0099309和2014/0050708;WO 2012/079000;以及WO 2015/157252中描述的那些,其通过引用以其全文并入本文。

[0345] 在一些实施方案中,第二代CAR是pCAR。在一些实施方案中,pCAR包含第二代CAR,其包含:(i) (a) 信号传导区;(b) 共刺激信号传导区;(c) 跨膜结构域;和(d) 与靶抗原上的第一表位特异性相互作用的第一结合元件;以及(ii) 嵌合共刺激受体(CCR),其包含(e) 不同于(b) 的共刺激信号传导区;(f) 跨膜结构域;和(g) 与第二靶抗原上的第二表位特异性相互作用的第二结合元件。pCAR的非限制性实例如美国专利号10,703,794中所描述,其通过引用以其全文并入本文。

[0346] 在一些实施方案中,第三代CAR包含抗原结合结构域、铰链区、跨膜结构域、第一共刺激结构域和第二共刺激结构域,以及细胞内信号传导结构域。第三代CAR的非限制性实例包括美国专利公开号2014/0322275A1;2019/0345217;2019/0112380A1;和2020/0031904A1中描述的那些;其通过引用以其全文并入本文。

[0347] 在一些实施方案中,抗原结合结构域包含单链抗体片段(例如,scFv)、纳米抗体(例如,骆驼科动物V_HH结构域)、细胞因子、配体或肽(adenectins和DARPs)。

[0348] 6.3.2.1. 抗原结合结构域

[0349] 在一些实施方案中,CAR的抗原结合结构域包含单链抗体片段。在一些实施方案中,单链抗体片段包含单链Fv(scFv)。

[0350] 在一些实施方案中,抗原结合结构域靶向与自身免疫性疾病、炎性疾病或癌症相关的抗原。在一些实施方案中,抗原结合结构域靶向自身抗原。

[0351] 在一些实施方案中,抗原结合结构域靶向与自身免疫性疾病或炎性疾病相关的抗原。在一些实施方案中,与自身免疫性疾病或炎性疾病相关的抗原选自由以下组成的组,但不限于此:抗HLA-A*02、抗HLA-A*24或瓜氨酸化肽、胰岛素、MOG、GAD65、IA2、醇溶蛋白和和桥粒黏蛋白(在相关MHC分子的背景下)。在一些实施方案中,与自身免疫性疾病或炎性疾病相关的抗原选自由以下组成的组:CD19、CD20、CD22、CD27、BCMA和CD38。

[0352] 在一些实施方案中,抗原结合结构域靶向癌症相关抗原。在一些实施方案中,癌症相关抗原选自由以下组成的组:CD19、CD20、CD22、BCMA、B7-H3、CEA、BCMA、CD23、Lym1、Lym2、CLEC5A、CDH179b、FLT3、GCC、Muc、CSF2RA、GFRa4、CD32、CD33、IL11Ra、IL13Ra、NYBRI、SLea、CD200R、TGFβR2、CD276、TROP2、LAMP1、PTK7、DLL3、CDH1、CDH6、CDH17、CDH19、TSHR和酪氨酸酶。

[0353] 在一些实施方案中,抗原结合结构域靶向B细胞抗原。在一些实施方案中,B细胞抗原的选择部分基于其在B细胞分化过程中的表达,例如,如图4所示。靶向B细胞抗原的抗原结合结构域的非限制性实例在WO 2020/010235中描述,其通过引用以其全文并入本文。在一些实施方案中,抗原结合结构域靶向CD19。在一些实施方案中,抗原结合结构域靶向CD20。在一些实施方案中,抗原结合结构域靶向CD22。在一些实施方案中,抗原结合结构域靶向BCMA。在一些实施方案中,抗原结合结构域靶向B7-H3。在一些实施方案中,抗原结合结构域靶向CD27。在一些实施方案中,抗原结合结构域靶向CD38。在一些实施方案中,抗原结合结构域靶向B细胞成熟抗原(BCMA)。在一些实施方案中,抗原结合结构域靶向癌胚抗原(CEA)。

[0354] 在一些实施方案中,单链抗体片段包含与CD19(例如分化簇19蛋白(CD19)(例如,OMIM登录号107265))结合的单链Fv(scFv)。

[0355] 在一些实施方案中,靶向CD19的scFv源自抗人CD19特异性mAb克隆FMC63(Nicholson et al.,Mol.Immunol.,34(16-17):1157-65(1997),其通过引用以其全文并入本文)。在一些实施方案中,靶向CD19的scFv在美国专利公开号2018/0355052或2020/0392200,或者WO 2020/010235中描述,其各自通过引用以其全文并入本文。

[0356] 在一些实施方案中,抗CD19抗原结合结构域包含SEQ ID NO:11的序列。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合结构域包含与SEQ ID NO:11具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施方案中,编码抗CD19抗原结合结构域的多核苷酸区段包含SEQ ID NO:12。在一些实施方案中,编码抗CD19抗原结合结构域的多核苷酸区段包含与SEQ ID NO:12具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列。

[0357] 在一些实施方案中,抗CD19抗原结合结构域包含重链可变结构域,该重链可变结构域包含与SEQ ID NO:13具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合结构域包含轻链可变结构域,该轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:14具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施方案中,抗CD19抗原结合结构域包含重链可变结构域和轻链可变结构域,该重链可变结构域包含与SEQ ID NO:13具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列,该轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:14具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列。

[0358] 在一些实施方案中,单链抗体片段包含与CD20(例如,分化簇20蛋白(CD20)(例如,

OMIM登录号112210))结合的单链Fv(scFv)。靶向CD20的scFv的非限制性实例包括WO 2020/010235和美国专利公开号2020/0392200中描述的那些,其通过引用以其全文并入本文。

[0359] 在一些实施方案中,抗CD20抗原结合结构域包含SEQ ID NO:18的序列。在一些实施方案中,抗CD20抗原结合结构域包含与SEQ ID NO:18具有至少90%、95%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施方案中,编码抗CD20抗原结合结构域的多核苷酸区段包含SEQ ID NO:19。在一些实施方案中,编码抗CD20抗原结合结构域的多核苷酸区段包含与SEQ ID NO:19具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列。

[0360] 在一些实施方案中,抗CD20抗原结合结构域包含重链可变结构域,该重链可变结构域包含与SEQ ID NO:20具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施方案中,抗CD20抗原结合结构域包含轻链可变结构域,该轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:21具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施方案中,抗CD20抗原结合结构域包含重链可变结构域和轻链可变结构域,该重链可变结构域包含与SEQ ID NO:20具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列,该轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:21具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列。

[0361] 在一些实施方案中,单链抗体片段包含与CD22(例如,分化簇22蛋白(CD22)(例如,OMIM登录号107266))结合的单链Fv(scFv)。靶向CD22的scFv的非限制性实例包括WO 2020/010235和美国专利公开号2020/0392200中描述的那些,其通过引用以其全文并入本文。

[0362] 在一些实施方案中,抗CD22抗原结合结构域包含SEQ ID NO:24的序列。在一些实施方案中,抗CD22抗原结合结构域包含与SEQ ID NO:24具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施方案中,编码抗CD22抗原结合结构域的多核苷酸区段包含SEQ ID NO:25。在一些实施方案中,编码抗CD22抗原结合结构域的多核苷酸区段包含与SEQ ID NO:25具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列。

[0363] 在一些实施方案中,抗CD22抗原结合结构域包含重链可变结构域,该重链可变结构域包含与SEQ ID NO:26具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施方案中,抗CD22抗原结合结构域包含轻链可变结构域,该轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:27具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施方案中,抗CD22抗原结合结构域包含重链可变结构域和轻链可变结构域,该重链可变结构域包含与SEQ ID NO:26具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列,该轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:27具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列。

[0364] 在一些实施方案中,单链抗体片段包含与B细胞成熟抗原(BCMA)(也称为肿瘤坏死因子受体超家族成员17(TNFRSF17))结合的单链Fv(scFv)。

[0365] 靶向BCMA的scFv的非限制性实例包括US9765342B2或WO 2010/104949中描述的那些,其通过引用以其全文并入。例如,如WO2010/104949中所描述的,抗BCMA scFv可以包括A7D12.2、C11 D5.3、C12A3.2或C13F12.1抗体的抗原结合结构域。

[0366] 在一些实施方案中,抗BCMA抗原结合结构域包含重链可变结构域,该重链可变结构域包含与SEQ ID NO:50或52具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施方案中,抗BCMA抗原结合结构域包含轻链可变结构域,该轻链可变结构域

包含与SEQ ID NO:51或53具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施方案中,抗BCMA抗原结合结构域包含重链可变结构域和轻链可变结构域,该重链可变结构域包含与SEQ ID NO:50或52具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列,该轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:51或53具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列。

[0367] 在一些实施方案中,单链抗体片段包含与B7-H3(也称为CD276(例如,分化簇276蛋白(CD276)(例如OMIM登录号605715)))结合的单链Fv(scFv)。

[0368] 靶向B7-H3的scFv的非限制性实例包括美国专利公开号2016/0053017和2018/0346544中描述的那些,其通过引用以其全文并入本文。例如,如美国专利公开号2018/0346544中所描述的,抗CD276 scFv可以包括MGA271(CD276.MG)、CD276.N1、CD276.N2、CD276.N3、CD276.N4或CD276.N5抗体的抗原结合结构域。

[0369] 在一些实施方案中,抗B7-H3抗原结合结构域包含SEQ ID NO:36的序列。在一些实施方案中,抗B7-H3抗原结合结构域包含与SEQ ID NO:36具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施方案中,编码抗B7-H3抗原结合结构域的多核苷酸区段包含SEQ ID NO:37。在一些实施方案中,编码抗B7-H3抗原结合结构域的多核苷酸区段包含与SEQ ID NO:37具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列。

[0370] 在一些实施方案中,抗B7-H3抗原结合结构域包含重链可变结构域,该重链可变结构域包含与SEQ ID NO:38具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施方案中,抗B7-H3抗原结合结构域包含轻链可变结构域,该轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:39具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施方案中,抗B7-H3抗原结合结构域包含重链可变结构域和轻链可变结构域,该重链可变结构域包含与SEQ ID NO:38具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列,该轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:39具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列。

[0371] 在一些实施方案中,单链抗体片段包含与CD27(例如,OMIM登录号186711)结合的单链Fv(scFv)。

[0372] 在一些实施方案中,单链抗体片段包含与CD38(例如,OMIM登录号107270)结合的单链Fv(scFv)。

[0373] 在一些实施方案中,单链抗体片段包含与CEA(例如,癌胚抗原蛋白(CEA)(例如,OMIM登录号114890))结合的单链Fv(scFv)。

[0374] 在一些实施方案中,单链抗体片段包含与BCMA(例如,B细胞成熟抗原(BCMA)(例如,OMIM登录号109545))结合的单链Fv(scFv)。

[0375] 6.3.2.2. 铰链区

[0376] 铰链区通过跨膜结构域将细胞外抗原结合结构域与细胞内信号传导结构域(例如,一个或多个共刺激结构域和细胞内信号传导结构域)连接。铰链提供足够的灵活性以克服空间位阻,并提供足够的长度以促进抗原结合结构域接近并结合靶抗原。在一些实施方案中,铰链的长度和组成的差异可以影响抗原结合和通过CAR的信号传导。例如,铰链区中的间隔序列或添加到铰链区的间隔序列促进抗原结合结构域接近并结合靶抗原。在一些实施方案中,铰链区影响细胞因子产生。

[0377] 在一些实施方案中, 铰链区选自人CD8铰链区、人CD28铰链区、IgG1铰链区或IgG4铰链区。在一些实施方案中, 铰链区源自人CD8。在一些实施方案中, 源自人CD8的铰链区包含SEQ ID NO:28的序列。在一些实施方案中, 源自人CD8的铰链区包含与SEQ ID NO:28具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列。

[0378] 6.3.2.3. 跨膜结构域

[0379] 跨膜区将CAR锚定在CD4^{IL10/CAR} T细胞中。在一些实施方案中, 跨膜结构域影响CAR的稳定性和功能。

[0380] 在一些实施方案中, 跨膜结构域选自由以下组成组: TNFRSF 19跨膜结构域、CD3 ζ 跨膜结构域、CD8 α 跨膜结构域、CD4跨膜结构域、CD28跨膜结构域或B7家族诱导型共刺激(ICOS)跨膜结构域。在一些实施方案中, 跨膜结构域源自TNFRSF 19。在一些实施方案中, 源自TNFRSF 19的跨膜结构域包含SEQ ID NO:29的序列。在一些实施方案中, 源自TNFRSF 19的跨膜结构域包含与SEQ ID NO:29具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列。

[0381] 6.3.2.4. 细胞内信号传导结构域和共刺激结构域

[0382] 细胞内信号传导结构域激活CD4^{IL10/CAR} T细胞。在一些实施方案中, 细胞内信号传导结构域参与T细胞功能、代谢和持久性。

[0383] 在一些实施方案中, 细胞内信号传导结构域包含基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)。在一些实施方案中, 细胞内信号传导结构域包含两个或更多个基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)。在一些实施方案中, 基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)源自CD3 ζ 。在一些实施方案中, 源自CD3 ζ 的细胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:30的序列。在一些实施方案中, 源自CD3 ζ 的细胞内信号传导结构域包含与SEQ ID NO:30具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列。

[0384] 在一些实施方案中, 细胞内信号传导结构域进一步包含一个或更多个共刺激结构域。在这种情况下, 与包含不具有一个或更多个共刺激结构域的CAR的CD4⁺ T细胞相比, 一个或更多个共刺激结构域增强了T细胞激活、功能、代谢和持久性。具有除了激活结构域外还含有共刺激结构域的CAR的CD4⁺ (例如, CD4^{IL10/CAR}) T细胞产生IL-2, 并且可以在重复抗原暴露时增殖。

[0385] 在一些实施方案中, 源自不同来源(例如, 4-1BB和CD28)的共刺激结构域在CD4⁺ (例如, CD4^{IL10/CAR}) T细胞中诱导不同的功能和代谢特征。例如, 具有包含源自CD28的共刺激结构域的CAR的CD4⁺ (例如, CD4^{IL10/CAR}) T细胞经历增强的分化成效应记忆T细胞。在另一个实例中, 具有包含源自4-1BB的共刺激结构域的CAR的CD4⁺ (例如, CD4^{IL10/CAR}) T细胞经历增强的分化成中枢记忆T细胞。

[0386] 在一些实施方案中, 一个或更多个共刺激结构域是4-1BB、CD28、OX40、ICOS、CD27、MYD88-CD40和KIR2DS2。

[0387] 在一些实施方案中, 一个或更多个共刺激结构域源自4-1BB。在一些实施方案中, 源自4-1BB的共刺激结构域包含SEQ ID NO:31的序列。在一些实施方案中, 源自4-1BB的共刺激结构域包含与SEQ ID NO:31具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列。

[0388] 在一些实施方案中, 一个或更多个共刺激结构域源自CD28。在一些实施方案中, 一

个或更多个共刺激结构域包含CD28共刺激结构域。在一些实施方案中,源自CD28的共刺激结构域包含SEQ ID NO:32的序列。在一些实施方案中,源自CD28的共刺激结构域包含与SEQ ID NO:32具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列。

[0389] 在一些实施方案中,CAR包含两个共刺激结构域。在一些实施方案中,CAR包含第一共刺激结构域和第二共刺激结构域,该第一共刺激结构域包含源自4-1BB的共刺激结构域,该第二共刺激结构域包含源自CD28共刺激结构域的共刺激结构域。

[0390] 6.3.2.5. 嵌合抗原受体 (CAR)

[0391] 在一些实施方案中,CAR编码多核苷酸区段编码包含抗原结合结构域的CAR,该抗原结合结构域靶向与自身免疫性疾病、炎性疾病或癌症相关的抗原。

[0392] 在一些实施方案中,CAR编码多核苷酸区段编码包含抗原结合结构域的CAR,该抗原结合结构域靶向与自身免疫性疾病或炎性疾病相关的抗原。在一些实施方案中,与自身免疫性疾病或炎性疾病相关的抗原选自以下组成的组,但不限于此:抗HLA-A*02、抗HLA-A*24或瓜氨酸化肽、胰岛素、MOG、GAD65、IA2、醇溶蛋白和桥粒黏蛋白(在相关MHC分子的背景下)。

[0393] 在一些实施方案中,CAR编码多核苷酸区段编码包含靶向癌症相关抗原的抗原结合结构域的CAR。在一些实施方案中,癌症相关抗原选自以下组成的组:CD19、CD20、CD22、B7-H3、CEA、BCMA、CD23、Lym1、Lym2、CLEC5A、CDH179b、FLT3、GCC、Muc、CSF2RA、GFRa4、CD32、CD33、IL11Ra、IL13Ra、NYBRI、SLea、CD200R、TGFβR2、CD276、TROP2、LAMP1、PTK7、DLL3、CDH1、CDH6、CDH17、CDH19、TSHR和酪氨酸酶。

[0394] 在一些实施方案中,CAR编码多核苷酸区段编码包含靶向B细胞抗原的抗原结合结构域的CAR。在一些实施方案中,B细胞抗原的选择部分基于其在B细胞分化过程中的表达,例如,如图4所示。靶向B细胞抗原的抗原结合结构域的非限制性实例在WO 2020/010235中描述,其通过引用以其全文并入本文。在一些实施方案中,抗原结合结构域靶向CD19。在一些实施方案中,抗原结合结构域靶向CD20。在一些实施方案中,抗原结合结构域靶向CD22。在一些实施方案中,抗原结合结构域靶向B7-H3。在一些实施方案中,抗原结合结构域靶向CD27。在一些实施方案中,抗原结合结构域靶向CD38。在一些实施方案中,抗原结合结构域靶向B细胞成熟抗原(BCMA)。在一些实施方案中,抗原结合结构域靶向癌胚抗原(CEA)。

[0395] 在一些实施方案中,CAR编码多核苷酸区段编码包含抗CD19抗原结合结构域的CAR。在一些实施方案中,CAR编码多核苷酸区段编码包含抗CD19抗原结合结构域的第二代CAR。在一些实施方案中,CAR编码多核苷酸区段编码包含抗CD19抗原结合结构域的第三代CAR。

[0396] 在一些实施方案中,CAR编码多核苷酸区段编码抗CD19 CAR,其包含:抗CD19抗原结合结构域、铰链区、跨膜结构域、共刺激结构域和细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,CAR编码多核苷酸区段编码抗CD19抗原结合结构域;人CD8铰链区;TNFRSF 19跨膜区;4-1BB共刺激结构域;和CD3ζ链细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,抗CD19CAR包含SEQ ID NO:9的序列。在一些实施方案中,抗CD19 CAR包含与SEQ ID NO:9具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施方案中,第一外源多核苷酸区段包含SEQ ID NO:10的序列。在一些实施方案中,第一外源多核苷酸区段包含与SEQ ID NO:10具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列。

[0397] 包含抗CD19抗原结合结构域的CAR的非限制性实例包括：美国专利公开号2020/0392200、WO 2020/010235或WO 2012/079000，其通过引用以其全文并入本文。

[0398] 在一些实施方案中，CAR编码多核苷酸区段编码包含抗CD20抗原结合结构域的CAR。在一些实施方案中，CAR编码多核苷酸区段编码包含抗CD20抗原结合结构域的第二代CAR。在一些实施方案中，CAR编码多核苷酸区段编码包含抗CD20抗原结合结构域第三代CAR。

[0399] 在一些实施方案中，CAR编码多核苷酸区段编码抗CD20 CAR，其包含：抗CD20抗原结合结构域、跨膜结构域、共刺激结构域和细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中，CAR编码多核苷酸区段编码抗CD20抗原结合结构域；人CD8跨膜区；4-1BB共刺激结构域；和CD3 ζ 链细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中，抗CD20 CAR包含SEQ ID NO:16的序列。在一些实施方案中，抗CD20 CAR包含与SEQ ID NO:16具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施方案中，第一外源多核苷酸区段包含SEQ ID NO:17的序列。在一些实施方案中，第一外源多核苷酸区段包含与SEQ ID NO:17具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列。

[0400] 包含抗CD20抗原结合结构域的CAR的非限制性实例包括：美国专利公开号2020/0392200或WO 2020/010235，二者均通过引用以其全文并入本文。

[0401] 在一些实施方案中，CAR编码多核苷酸区段编码包含抗CD22抗原结合结构域的CAR。在一些实施方案中，CAR编码多核苷酸区段编码包含抗CD22抗原结合结构域的第二代CAR。在一些实施方案中，CAR编码多核苷酸区段编码包含抗CD22抗原结合结构域第三代CAR。

[0402] 在一些实施方案中，抗CD22 CAR包含SEQ ID NO:22的序列。在一些实施方案中，抗CD22 CAR包含与SEQ ID NO:22具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施方案中，第一外源多核苷酸区段包含SEQ ID NO:23的序列。在一些实施方案中，第一外源多核苷酸区段包含与SEQ ID NO:23具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列。

[0403] 包括抗CD22 CAR在内的CAR的非限制性实例包括WO 2020/010235和美国专利公开号2020/0392200中描述的那些，其通过引用以其全文并入本文。

[0404] 包括抗B7-H3 CAR在内的CAR的非限制性实例包括美国专利公开号2016/0053017、2017/0369585和2018/0346544中描述的那些，其通过引用以其全文并入本文。

[0405] 在一些实施方案中，CAR编码多核苷酸区段编码包含抗B7-H3抗原结合结构域的CAR。在一些实施方案中，CAR编码多核苷酸区段编码包含抗B7-H3抗原结合结构域的第二代CAR。在一些实施方案中，CAR编码多核苷酸区段编码包含抗B7-H3抗原结合结构域第三代CAR。

[0406] 在一些实施方案中，抗B7-H3 CAR包含SEQ ID NO:34的序列。在一些实施方案中，抗B7-H3 CAR包含与SEQ ID NO:34具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施方案中，第一外源多核苷酸区段包含SEQ ID NO:35的序列。在一些实施方案中，第一外源多核苷酸区段包含与SEQ ID NO:35具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列。

[0407] 在一些实施方案中，CAR编码多核苷酸区段编码包含抗CD27抗原结合结构域的

CAR。在一些实施方案中,CAR编码多核苷酸区段编码包含抗CD27抗原结合结构域的第二代CAR。在一些实施方案中,CAR编码多核苷酸区段编码包含抗CD27抗原结合结构域的第三代CAR。

[0408] 在一些实施方案中,CAR编码多核苷酸区段编码包含抗CD38抗原结合结构域的第二代CAR。在一些实施方案中,CAR编码多核苷酸区段编码包含抗CD38抗原结合结构域的第三代CAR。

[0409] 在一些实施方案中,CAR编码多核苷酸区段编码包含抗CEA抗原结合结构域的第二代CAR。在一些实施方案中,CAR编码多核苷酸区段编码包含抗CEA抗原结合结构域的第三代CAR。

[0410] 在一些实施方案中,CAR编码多核苷酸区段编码包含抗BCMA抗原结合结构域的第二代CAR。在一些实施方案中,CAR编码多核苷酸区段编码包含抗BCMA抗原结合结构域的第三代CAR。在一些实施方案中,抗BCMACAR包含SEQ ID NO:41-49和54的序列。在一些实施方案中,抗BCMA CAR包含与SEQ ID NO:41-49和54具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列。

[0411] 第一外源多核苷酸进一步包含与CAR的编码序列可操作地连接的一个或更多个调控元件(例如,本文所描述的或本领域已知的任何调控元件)。在一些实施方案中,调控元件是启动子。

[0412] 在一些实施方案中,调控元件包含能够指导CAR在CD4⁺ T细胞中表达的启动子。在一些实施方案中,启动子驱动CAR在CD4⁺ T细胞中的组成型表达。在一些实施方案中,启动子驱动CAR在激活的CD4⁺ T细胞中的表达。

[0413] 在一些实施方案中,第一外源多核苷酸区段进一步包含编码选择标志物(例如,本文所描述的或本领域已知的任何选择标志物)的区段,该选择标志物允许选择成功转导的CD4⁺ T细胞。

[0414] 在一些实施方案中,使用载体将第一外源多核苷酸区段递送至CD4⁺ T细胞中。在一些实施方案中,载体是质粒载体。在一些实施方案中,载体是病毒载体。在一些实施方案中,载体是逆转录病毒载体(例如, γ 逆转录病毒载体)。在一些实施方案中,载体是慢病毒载体。

[0415] 在一些实施方案中,使用慢病毒载体将第一外源多核苷酸区段递送至CD4⁺ T细胞中,并且第一外源多核苷酸区段包含慢病毒载体序列。在某些实施方案中,使用Mátrai et al.,Molecular Therapy 18(3):477-490(2010) (“Mátrai”) 中公开的慢病毒载体,其通过引用并入本文。在一些实施方案中,编码嵌合抗原受体(CAR)的第一外源多核苷酸区段;和编码白介素-10(IL-10)的第二外源多核苷酸区段存在于单个慢病毒载体中。在这种情况下,第一外源多核苷酸和第二外源多核苷酸区段与第一启动子可操作地连接。例如,慢病毒载体包括人PGK启动子、通过内部核糖体进入位点(IRES)或自切割肽(例如,2A自切割肽)与第二外源多核苷酸区段可操作地连接的第一外源多核苷酸。

[0416] 在一些实施方案中,第一外源多核苷酸区段被整合在T细胞核基因组中。在一些实施方案中,第一外源多核苷酸区段未被整合在核基因组中。在一些实施方案中,第一外源区

段多核苷酸存在于T细胞细胞质中。

[0417] 6.3.3. 编码IL-10的外源多核苷酸

[0418] 本公开内容的单供体CD4^{IL-10/CAR}细胞或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞已被进一步遗传修饰以包含编码IL-10的第二外源多核苷酸区段。第二外源多核苷酸区段包含与一个或更多个调控元件(例如,本文所描述的或本领域已知的一个或更多个调控元件中的任一个)可操作地连接的IL-10编码多核苷酸区段。

[0419] IL-10编码多核苷酸区段可以编码人、倭黑猩猩或恒河猴的IL-10。在一些实施方案中,IL-10编码多核苷酸区段编码具有SEQ ID NO:1的序列的人IL-10。在一些实施方案中,IL-10编码多核苷酸区段编码与SEQ ID NO:1具有至少90%、95%、98%或99%序列同一性的人IL-10变体。在一些实施方案中,IL-10编码多核苷酸区段具有SEQ ID NO:2的核苷酸序列。在一些实施方案中,IL-10编码多核苷酸区段与SEQ ID NO:2具有至少90%、95%、98%或99%序列同一性。

[0420] 在一些实施方案中,外源多核苷酸编码病毒IL-10。在各种实施方案中,外源多肽编码来自HCMV、GMCMV、RhCMV、BaCMV、MOCMV、SMCMV、EBV、Bonobo-HV、BaLCV、OvHV-2、EHV-2、CyHV-3、AngHV-1、ORFV、BPSV、PCPV、LSDV、SPV、GPV或CNPV的IL-10。在一些实施方案中,外源多肽编码来自EBV或ORFV的病毒IL-10。

[0421] 在一些实施方案中,病毒IL-10包含SEQ ID NO:6的序列。在一些实施方案中,病毒IL-10包含与SEQ ID NO:6或18具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施方案中,编码病毒IL-10的外源多肽包含SEQ ID NO:7的序列。在一些实施方案中,编码病毒IL-10的外源多肽包含与SEQ ID NO:7具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%、98%或99%序列同一性的序列。

[0422] 在一些实施方案中,IL-10是包含具有一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个氨基酸修饰的人IL-10的蛋白。在一些实施方案中,一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个氨基酸修饰是在相应的氨基酸位置处用病毒IL-10氨基酸的取代。

[0423] 在一些实施方案中,IL-10编码多核苷酸区段编码人IL-10的变体,与人IL-10(例如,SEQ ID NO:1)相比,该人IL-10的变体具有一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个氨基酸取代。在一些实施方案中,一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个氨基酸取代是在相应的氨基酸位置处用病毒IL-10氨基酸的取代。在一些实施方案中,IL-10编码多核苷酸区段编码人IL-10的变体,与人IL-10(例如,SEQ ID NO:1)相比,该人IL-10的变体具有一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个氨基酸插入、缺失或修饰。在一些实施方案中,人IL-10的变体具有SEQ ID NO:56或57的序列。

[0424] 在一些实施方案中,IL-10编码多核苷酸区段编码小家鼠(*Mus musculus*),“小鼠(MOUSE)”(SEQ ID NO:58);褐家鼠(*Rattus norvegicus*),“大鼠(RAT)”(SEQ ID NO:59);恒河猴(*Macaca mulatta*),“MACMU”(SEQ ID NO:60);大猩猩(*Gorilla gorilla*),“大猩猩(GORILLA)”(SEQ ID NO:61);食蟹猴(*Macaca fascicularis*),“CYNO”(SEQ ID NO:62);东非狒狒(*Papio Anubis*),“橄榄狒狒(OLIVE BABOON)”(SEQ ID NO:63);倭黑猩猩(*Pan paniscus*),“倭黑猩猩(BONOB0)”(SEQ ID NO:64);黑猩猩(*Pan troglodytes*),“黑猩猩

(CHIMP)” (SEQ ID NO:65);和EBVB9 (SEQ ID NO:66)的IL-10。在一些实施方案中,IL-10编码多核苷酸区段编码与小鼠,“小鼠(MOUSE)” (SEQ ID NO:58);褐家鼠,“大鼠(RAT)” (SEQ ID NO:59);恒河猴,“MACMU” (SEQ ID NO:60);大猩猩,“大猩猩(GORILLA)” (SEQ ID NO:61);食蟹猴,“CYN0” (SEQ ID NO:62);东非狒狒,“橄榄狒狒(OLIVE BABOON)” (SEQ ID NO:63);倭黑猩猩,“倭黑猩猩(BONOB0)” (SEQ ID NO:64);黑猩猩,“黑猩猩(CHIMP)” (SEQ ID NO:65);和EBVB9 (SEQ ID NO:66)的IL-10具有至少90%、95%、98%或99%序列同一性的蛋白。

[0425] 在一些实施方案中,IL-10编码多核苷酸区段编码人IL-10的变体,与人IL-10(例如,SEQ ID NO:1)相比,该人IL-10的变体具有一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个氨基酸取代、插入和/或缺失。在一些实施方案中,修饰是在相应位置处用小鼠,“小鼠(MOUSE)” (SEQ ID NO:58);褐家鼠,“大鼠(RAT)” (SEQ ID NO:59);恒河猴,“MACMU” (SEQ ID NO:60);大猩猩,“大猩猩(GORILLA)” (SEQ ID NO:61);食蟹猴,“CYN0” (SEQ ID NO:62);东非狒狒,“橄榄狒狒(OLIVE BABOON)” (SEQ ID NO:63);倭黑猩猩,“倭黑猩猩(BONOB0)” (SEQ ID NO:64);黑猩猩,“黑猩猩(CHIMP)” (SEQ ID NO:65);和EBVB9 (SEQ ID NO:66)的氨基酸的取代、插入和/或缺失。在一些实施方案中,人IL-10的变体具有SEQ ID NO:67或SEQ ID NO:68的序列。

[0426] 在一些实施方案中,IL-10编码多核苷酸区段编码与人IL-10相比具有降低的免疫刺激活性的人IL-10变体。在一些实施方案中,人IL-10的变体包括I105A取代。在一些实施方案中,使用A Single Amino Acid Determines the Immunostimulatory Activity of Interleukin 10, J Exp Med, 191, 2, 2000, p. 213-223中描述的方法制备人IL-10的变体。

[0427] 第二外源多核苷酸区段进一步包含与IL-10编码序列可操作地连接的一个或更多个调控元件,其中一个或更多个调控元件指导编码的IL-10在转导的CD4⁺ T细胞中的表达。

[0428] 在一些实施方案中,调控元件包含能够指导IL-10在CD4⁺ T细胞中表达的启动子。在一些实施方案中,启动子驱动IL-10在CD4⁺ T细胞中的组成型表达。在一些实施方案中,启动子驱动IL-10在激活的CD4⁺ T细胞中的表达。

[0429] 在一些实施方案中,第二外源多核苷酸区段进一步包含编码选择标志物(例如,本文所描述的或本领域已知的任何选择标志物)的区段,该选择标志物允许选择成功转导的CD4⁺ T细胞。

[0430] 在典型的实施方案中,使用载体将外源多核苷酸递送至CD4⁺ T细胞中。在一些实施方案中,载体是质粒载体。在一些实施方案中,载体是病毒载体。

[0431] 在一些实施方案中,编码CAR的第一外源多核苷酸区段和编码IL-10的第二外源多核苷酸区段在同一载体中。在一些实施方案中,编码CAR的第一外源多核苷酸区段和编码IL-10的第二外源多核苷酸区段在同一病毒载体中。在一些实施方案中,编码CAR的第一外源多核苷酸区段和编码IL-10的第二外源多核苷酸区段在同一慢病毒载体中。

[0432] 在某些实施方案中,使用慢病毒载体将外源多核苷酸递送至CD4⁺ T细胞中,并且外源多核苷酸包含慢病毒载体序列。在某些实施方案中,使用Mátrai et al., Molecular Therapy 18(3):477-490 (2010) (“Mátrai”)中公开的慢病毒载体,其通过引用并入本文。

[0433] 在一些实施方案中,第二外源多核苷酸区段被整合在T细胞核基因组中。在一些实施方案中,第二外源多核苷酸区段未被整合在核基因组中。在一些实施方案中,第二外源多

核苷酸区段存在于T细胞细胞质中。

[0434] 在特定实施方案中,第二外源多核苷酸区段具有SEQ ID NO:5的序列。在一些实施方案中,外源多核苷酸与SEQ ID NO:5具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%的序列同一性。

[0435] 6.3.4. 调控元件

[0436] 在一些实施方案中,第一外源多核苷酸区段和/或第二外源多核苷酸区段进一步包含分别与CAR或IL-10的编码序列可操作地连接的调控元件。在一些实施方案中,调控元件包含启动子序列、增强子序列、非编码序列或其任何组合。

[0437] 在一些实施方案中,第一外源多核苷酸区段进一步包含与CAR的编码序列可操作地连接的调控元件,其中调控元件指导编码的CAR在转导的CD4⁺ T细胞中的表达。在一些实施方案中,当在治疗上是适当的情况下,使用诱导型启动子来诱导CAR的表达。

[0438] 在一些实施方案中,第二外源多核苷酸区段进一步包含与IL-10的编码序列可操作地连接的调控元件,其中调控元件指导编码的IL-10在转导的CD4⁺ T细胞中的表达。在一些实施方案中,当在治疗上是适当的情况下,使用诱导型启动子来诱导IL-10的表达。在一些实施方案中,使用IL-10启动子。

[0439] 在一些实施方案中,启动子是组织特异性启动子。在一些实施方案中,启动子是谱系特异性启动子(lineage-specific promoter)。在一些实施方案中,启动子是可以用于驱动CAR或IL-10的普遍表达的启动子。

[0440] 在一些实施方案中,启动子是天然人启动子。在一些实施方案中,启动子是人延伸因子(EF)1 α 启动子。在一些实施方案中,启动子是人磷酸甘油酸激酶启动子(PGK)。在一些实施方案中,启动子是人泛素C启动子(UBI-C)。

[0441] 在一些实施方案中,启动子是合成启动子。在某些实施方案中,启动子是最小CMV核心启动子。在特定实施方案中,启动子是诱导型或组成型双向启动子。在特定实施方案中,使用Amendola et al., Nature Biotechnology, 23(1):108-116(2005)中公开的合成双向启动子。该启动子可以以普遍存在或组织特异性的方式介导两个mRNA的协调转录。在某些实施方案中,双向启动子诱导CAR和选择标志物或IL-10和选择标志物的表达。

[0442] 在一些实施方案中,启动子是天然人启动子。在一些实施方案中,启动子是人延伸因子(EF)1 α 启动子。在一些实施方案中,启动子是人磷酸甘油酸激酶启动子(PGK)。在一些实施方案中,启动子是人泛素C启动子(UBI-C)。

[0443] 在一些实施方案中,第一外源多核苷酸区段和/或第二外源多核苷酸区段进一步包含在编码序列3'的一个或多个非编码序列。在编码序列3'的非编码序列的非限制性实例包括3'非翻译区(UTR)、多聚(A)信号和土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)。

[0444] 在一些实施方案中,外源多核苷酸包含多于一个编码序列。例如,外源多核苷酸包括单个连续多核苷酸序列(例如,单个多核苷酸构建体)上的第一外源多核苷酸区段和第二外源多核苷酸区段。在一些实施方案中,一个或多个编码序列包括编码CAR的序列和编码选择标志物的序列。在一些实施方案中,一个或多个编码序列包括编码IL-10的序列和编码选择标志物的序列。在一些实施方案中,一个或多个编码序列包括编码CAR的序列、编码IL-10的序列和编码选择标志物的一个或多个序列。在一些实施方案中,外源多核苷酸不含选择标志物。

[0445] 在一些实施方案中,多个编码序列由一个或更多个内部核糖体进入位点(IRES)分隔。

[0446] 在一些实施方案中,多个编码序列由一个或更多个自切割肽分隔。在一些实施方案中,自切割肽可以是2A自切割肽。自切割肽的非限制性实例包括2A肽(18-22个氨基酸),包括来自口蹄疫病毒(F2A)、猪捷申病毒-1(P2A)、Thosea asigna病毒(T2A)或马鼻炎A病毒(E2A)的肽。在一些实施方案中,第一外源多核苷酸、第二外源多核苷酸或两者包含编码弗林蛋白酶P2A肽(Furin P2A peptide)的序列。在一些实施方案中,第一外源多核苷酸、第二外源多核苷酸或两者包含编码T2A肽的序列。在一些实施方案中,第一外源多核苷酸、第二外源多核苷酸或两者包含编码E2A肽的序列。

[0447] 在一些实施方案中,编码序列进一步包含位于重链编码序列和轻链编码序列之间的自切割肽。在一些实施方案中,自切割肽选自由F2A、P2A、T2A和E2A组成的组。

[0448] 6.3.5. 选择标志物

[0449] 在一些实施方案中,第一外源多核苷酸区段、第二外源核苷酸区段或两者进一步包含编码选择标志物的多核苷酸区段,该选择标志物允许选择成功转导的CD4⁺ T细胞。在一些实施方案中,第一外源多核苷酸区段、第二外源核苷酸区段或两者不含选择标志物。

[0450] 在一些实施方案中,外源多核苷酸包含单个连续多核苷酸序列(例如,单个多核苷酸构建体)上的第一外源多核苷酸区段和第二外源多核苷酸区段。在这种情况下,外源多核苷酸包括一个或更多个选择标志物,该选择标志物允许选择成功转导的CD4⁺ T细胞。

[0451] 在一些实施方案中,选择标志物是ΔNGFR。在某些实施方案中,选择标志物是具有SEQ ID NO:3的序列的多肽。在某些实施方案中,选择标志物是与SEQ ID NO:3具有至少90%、95%、98%或99%序列同一性的多肽。在特定实施方案中,编码ΔNGFR选择标志物的核苷酸序列具有SEQ ID NO:4的序列。在一些实施方案中,编码ΔNGFR选择标志物的核苷酸序列与SEQ ID NO:4具有至少90%、95%、98%或99%序列同一性。

[0452] 在一些实施方案中,选择标志物的表达与IL-10从外源多核苷酸的表达相关。在一些实施方案中,选择标志物的表达与IL-10从外源多核苷酸的表达线性相关。因此,在一些实施方案中,测量选择标志物的表达以推断IL-10从外源多核苷酸的表达。

[0453] 在一些实施方案中,选择标志物是截短形式的EGFR多肽。在一些实施方案中,选择标志物是截短形式的人EGFR多肽,任选地是Wang et al. "A transgene-encoded cell surface polypeptide for selection, in vivo tracking, and ablation of engineered cells", Blood, v.118, n.5 (2011) 中公开的huEGFR,其通过引用以其全文并入本文。

[0454] 在一些实施方案中,外源多核苷酸进一步包含编码抗生素抗性基因的序列。在一些实施方案中,外源多核苷酸包含编码氨苄青霉素抗性基因的序列。

[0455] 6.3.6. CD4^{IL-10/CAR}细胞或多供体CD4^{IL-10/CAR}的基因表达

[0456] CD4^{IL-10/CAR}细胞表达IL-10。在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞组成型表达IL-10。在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞在激活时表达IL-10。

[0457] 在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞(例如,自体单供体或同种异体单供体)或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞组成型表达至少100pg IL-10/10⁶个CD4⁺ T细胞/mL培养物。在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞组成型表达至少200pg、500pg、1ng、5ng、10ng或50ng IL-10/10⁶个CD4⁺ T细胞/mL培养物。

[0458] 在一些实施方案中,在用抗CD3抗体和抗CD28抗体的组合,或者抗CD3抗体和抗CD28抗体包被的珠激活之后,CD4^{IL-10/CAR}细胞(例如,自体单供体或同种异体单供体)或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞表达至少1ng或2ng IL-10/10⁶个CD4⁺ T细胞/mL培养物。在一些实施方案中,在用抗CD3抗体和抗CD28抗体或者CD3抗体和CD28抗体包被的珠激活之后,多供体CD4^{IL-10}T细胞表达至少5ng、10ng、100ng、200ng或500ng IL-10/10⁶个CD4⁺ T细胞/mL培养物。

[0459] 在多个实施方案中,在激活后12小时、24小时或48小时使用各种蛋白检测和测量方法(例如ELISA、实时聚合酶链反应(PCR)、光谱程序、比色法、氨基酸分析、放射性标记、Edman降解、HPLC、蛋白印迹等)确定IL-10产生的量。在优选的实施方案中,在用抗CD3抗体和抗CD28抗体激活后48小时通过ELISA确定IL-10产生的量。

[0460] 在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞(例如,自体单供体或同种异体单供体)或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞以比未修饰的CD4⁺ T细胞高至少5倍的水平表达IL-10。在一些实施方案中,多供体CD4^{IL-10}T细胞以比未修饰的CD4⁺ T细胞高至少6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、30、40或50倍的水平表达IL-10。

[0461] 在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞(例如,自体单供体或同种异体单供体)或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞表达至少100pg IL-5/10⁶个CD4⁺ T细胞/mL。在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞(例如,自体单供体或同种异体单供体)或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞表达至少100pg、200pg、500pg、1ng、5ng、10ng或50ng IL-5/10⁶个CD4⁺ T细胞/mL。

[0462] 在一些实施方案中,在用抗CD3抗体和抗CD28抗体激活之后,CD4^{IL-10/CAR}细胞(例如,自体单供体或同种异体单供体)或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞表达至少1ng IL-5/10⁶个CD4⁺ T细胞/mL。在一些实施方案中,在用抗CD3抗体和抗CD28抗体激活之后,CD4^{IL-10/CAR}细胞(例如,自体单供体或同种异体单供体)或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞表达至少2ng、5ng、10ng、100ng、200ng或500ng IL-5/10⁶个CD4⁺ T细胞/mL。

[0463] 在多个实施方案中,在激活后12小时、24小时或48小时使用各种蛋白检测和测量方法(例如ELISA、实时聚合酶链反应(PCR)、光谱程序、比色法、氨基酸分析、放射性标记、Edman降解、HPLC、蛋白印迹等)确定IL-5产生的量。在优选的实施方案中,在用抗CD3抗体和抗CD28抗体激活后48小时通过ELISA确定IL-5产生的量。

[0464] 在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞(例如,自体单供体或同种异体单供体)或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞表达至少100pg IFN- γ /10⁶个CD4⁺ T细胞/mL。在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞(例如,自体单供体或同种异体单供体)或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞表达至少100pg、200pg、500pg、1ng、5ng、10ng或50ng IFN- γ /10⁶个CD4⁺ T细胞/mL。

[0465] 在一些实施方案中,在用抗CD3抗体和抗CD28抗体激活之后,CD4^{IL-10/CAR}细胞(例如,自体单供体或同种异体单供体)或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞表达至少1ng I IFN- γ /10⁶个CD4⁺ T细胞/mL。在一些实施方案中,在用抗CD3抗体和抗CD28抗体激活之后,CD4^{IL-10/CAR}细胞(例如,自体单供体或同种异体单供体)或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞表达至少2ng、5ng、10ng、100ng、200ng或500ng IFN- γ /10⁶个CD4⁺ T细胞/mL。

[0466] 在多个实施方案中,在激活后12小时、24小时或48小时使用各种蛋白检测和测量方法(例如ELISA、实时聚合酶链反应(PCR)、光谱程序、比色法、氨基酸分析、放射性标记、Edman降解、HPLC、蛋白印迹等)确定IFN- γ 产生的量。在优选的实施方案中,在用抗CD3抗体和抗CD28抗体激活后48小时通过ELISA确定IFN- γ 产生的量。

[0467] 在一些实施方案中, $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞 (例如, 自体单供体或同种异体单供体) 或多供体 $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞表达至少 25pg IL-4/10⁶ 个 $CD4^+$ T 细胞/mL。在一些实施方案中, $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞 (例如, 自体单供体或同种异体单供体) 或多供体 $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞表达至少 25pg、50pg、75pg、100pg、200pg、500pg、1ng、5ng、10ng 或 50ng IL-4/10⁶ 个 $CD4^+$ T 细胞/mL。

[0468] 在一些实施方案中, 在用抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体激活之后, $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞 (例如, 自体单供体或同种异体单供体) 或多供体 $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞表达至少 100pg IL-4/10⁶ 个 $CD4^+$ T 细胞/mL。在一些实施方案中, 在用抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体激活之后, $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞 (例如, 自体单供体或同种异体单供体) 或多供体 $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞表达至少 100pg、200pg、300pg、400pg、500pg、600pg、700pg、800pg、900pg、1000pg、2ng、5ng、10ng、100ng、200ng 或 500ng IL-4/10⁶ 个 $CD4^+$ T 细胞/mL。

[0469] 在多个实施方案中, 在激活后 12 小时、24 小时或 48 小时使用各种蛋白检测和测量方法 (例如 ELISA、实时聚合酶链反应 (PCR)、光谱程序、比色法、氨基酸分析、放射性标记、Edman 降解、HPLC、蛋白印迹等) 确定 IL-4 产生的量。在优选的实施方案中, 在用抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体激活后 48 小时通过 ELISA 确定 IL-4 产生的量。

[0470] 在一些实施方案中, IL-10、IL-4、IFN- γ 、IL-22 和 IL-5 中的一种或更多种的表达在一次或更多次再刺激后是稳定的。

[0471] 在一些实施方案中, $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞 (例如, 自体单供体或同种异体单供体) 或多供体 $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞进一步表达选择标志物。在一些实施方案中, $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞或多供体 $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞表达通常在 Tr1 细胞中表达的蛋白。在一些实施方案中, $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞或多供体 $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞表达 Tr1 细胞特征性标志物蛋白。

[0472] 在一些实施方案中, $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞 (例如, 自体单供体或同种异体单供体) 或多供体 $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞表达 CD49b。在一些实施方案中, $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞或多供体 $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞表达 LAG-3。在一些实施方案中, $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞或多供体 $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞表达 TGF- β 。在一些实施方案中, $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞或多供体 $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞表达 IFN- γ 。在一些实施方案中, $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞或多供体 $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞表达 GzB。在一些实施方案中, 多供体 $CD4^{IL-10}$ 细胞在用髓系抗原呈递细胞激活时释放 GzB。在一些实施方案中, $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞或多供体 $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞表达穿孔素。在一些实施方案中, $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞或多供体 $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞在用髓系抗原呈递细胞激活时释放穿孔素。在一些实施方案中, $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞或多供体 $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞表达 CD18。在一些实施方案中, $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞或多供体 $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞表达 CD2。在一些实施方案中, $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞或多供体 $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞表达 CD226。在一些实施方案中, 多供体 $CD4^{IL-10}$ 细胞表达 IL-22。在一些实施方案中, $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞或多供体 $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞表达 IL-10。

[0473] 在一些实施方案中, $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞 (例如, 自体单供体或同种异体单供体) 或多供体 $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞表现出 Tr1 细胞的至少一种功能。在多个实施方案中, 该功能是分泌 IL-10、分泌 TGF- β , 以及通过释放颗粒酶 B (GzB) 和穿孔素来特异性杀死髓系抗原呈递细胞。

[0474] 6.3.7. $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞的另外的特性

[0475] 在一些实施方案中, $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞包含抗 CD19 CAR。在一些实施方案中, $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞能够对 CD19⁺ 靶细胞产生体外细胞毒性。在一些实施方案中, $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞能够对 CD19⁺ 靶细胞产生体内细胞毒性。在一些实施方案中, CD19⁺ 靶细胞是产生自身抗体的 B 细

胞。在一些实施方案中,CD19⁺靶细胞是CD19⁺癌细胞。在一些实施方案中,对CD19⁺靶细胞的细胞毒性在一次或更多次再刺激后被维持(参见,例如,图5A-5C中描述的产生方法)。

[0476] 在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞能够对髓系靶细胞产生体外细胞毒性。在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞能够对髓系靶细胞产生体内细胞毒性。在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞能够对CD19⁺靶细胞和髓系靶细胞产生细胞毒性。在一些实施方案中,髓系靶细胞表达I类MHC、CD13、CD54和CD112中的一种或更多种。在一些实施方案中,对髓系靶细胞的细胞毒性在一次或更多次再刺激后被维持(参见,例如,图5A-5C中描述的产生方法)。

[0477] 在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞能够抑制同种异体CD4⁺ T细胞增殖。在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞能够将同种异体CD4⁺ T细胞增殖抑制至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。

[0478] 在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞能够抑制同种异体CD8⁺ T细胞增殖。在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞能够将同种异体CD8⁺ T细胞增殖抑制至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。

[0479] 在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞能够抑制同种异体CD4⁺ T细胞增殖和同种异体CD8⁺ T细胞增殖。在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞能够将同种异体CD4⁺ T细胞增殖抑制至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%,并且将同种异体CD8⁺ T细胞增殖抑制至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。

[0480] 在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞介导的抑制如下计算:100-([在CD4^{IL-10}T细胞(对照)和CD4^{IL-10/CAR} T细胞的存在下应答者的增殖/应答者的增殖]×100)。

[0481] 在一些实施方案中,抑制特性在一次或更多次再刺激后是稳定的。

[0482] 6.3.8.通过方法产生的产品

[0483] 在一些实施方案中,通过用编码CAR的外源多核苷酸区段和编码IL-10的外源多核苷酸区段修饰CD4⁺ T细胞来获得CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体或同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)。在一些实施方案中,用编码CAR的第一外源多核苷酸区段和编码IL-10的第二外源多核苷酸区段修饰CD4⁺ T细胞包括:(i)用编码IL-10的多核苷酸区段进行第一次转导,随后用编码CAR的外源多核苷酸区段进行第二次转导;(ii)用编码CAR的多核苷酸区段进行第一次转导,随后用编码IL-10的外源多核苷酸区段进行第二次转导;(iii)用编码IL-10的多核苷酸区段和编码CAR的外源多核苷酸区段进行同时转导(即共转导);或(iv)用包含编码IL-10的多核苷酸区段和编码CAR的多核苷酸区段的单个多核苷酸构建体进行转导。在一些实施方案中,编码IL-10的多核苷酸进一步包含标志物蛋白(例如,ΔNGFR)的编码序列。

[0484] 在一些实施方案中,通过用(i)包含编码CAR的多核苷酸区段的第一多核苷酸构建体和包含编码IL-10的多核苷酸区段的第二多核苷酸构建体或(ii)包含编码CAR的多核苷酸区段和编码IL-10的多核苷酸区段的单个多核苷酸构建体修饰CD4⁺ T细胞获得CD4^{IL-10/CAR}细胞(单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)。

[0485] 在一些实施方案中,编码CAR的第一外源多核苷酸区段、编码IL-10的第二外源多核苷酸区段、或包含第一和第二外源多核苷酸区段的多核苷酸构建体通过病毒载体或质粒载体引入CD4⁺ T细胞中。在一些实施方案中,用含有编码IL-10的多核苷酸区段的第一病毒

载体(例如,本文所描述的任何病毒载体)转导 $CD4^+$ T细胞,随后用含有编码CAR的多核苷酸区段的第二病毒载体(例如,本文所描述的任何病毒载体)进行第二次转导。在另一个实施方案中,用含有第一外源多核苷酸区段的第一病毒载体(例如,本文所描述的任何病毒载体)和含有第二外源多核苷酸区段的第二病毒载体对 $CD4^+$ T细胞进行共转导。在又一个实施方案中,用含有第一和第二外源多核苷酸区段的病毒载体(例如,本文所描述的任何病毒载体)转导 $CD4^+$ T细胞。

[0486] 在一些实施方案中,多供体 $CD4^{IL-10/CAR}$ T细胞通过以下生成:(i)合并从至少两个不同的T细胞供体获得的原代 $CD4^+$ T细胞;和(ii)根据本文所述的方法修饰合并的 $CD4^+$ T细胞。在一些实施方案中,多供体 $CD4^{IL-10/CAR}$ T细胞通过以下生成:(i)从至少两个不同的T细胞供体获得原代 $CD4^+$ T细胞;(ii)根据本文所述的方法分别修饰每个供体的 $CD4^+$ T细胞;并且然后(iii)合并遗传修饰的 $CD4^+$ T细胞。

[0487] 在一些实施方案中, $CD4^{IL-10/CAR}$ T细胞已在能够激活 $CD4^+$ T细胞的蛋白的存在下培养。在一些实施方案中, $CD4^{IL-10/CAR}$ T细胞在抗CD3抗体和抗CD28抗体,或抗CD3抗体和抗CD28抗体包被的珠的存在下培养。在一些实施方案中, $CD4^{IL-10/CAR}$ T细胞在抗CD3抗体、抗CD28抗体和IL-2的存在下,或在抗CD3抗体和抗CD28抗体包被的珠和IL-2的存在下培养。在一些实施方案中, $CD4^{IL-10/CAR}$ T细胞在聚合物纳米基质试剂的存在下培养,以通过CD3和CD28激活和扩增人T细胞。在一些实施方案中, $CD4^{IL-10/CAR}$ T细胞在其他T细胞特异性免疫细胞培养基、激活剂和补充剂的存在下培养。

[0488] 在一些实施方案中, $CD4^{IL-10/CAR}$ (单供体或多供体 $CD4^{IL-10/CAR}$ T细胞)处于冷冻储备液(例如,冷冻悬浮液)中。在一些实施方案中, $CD4^{IL-10/CAR}$ (单供体或多供体 $CD4^{IL-10/CAR}$ T细胞)处于液体悬浮液中。

[0489] 6.4. $CD4^{IL-10/CAR}$ T细胞群

[0490] 在另一方面,本公开内容的特征在于如以上所描述的 $CD4^{IL-10/CAR}$ T细胞群。在一些实施方案中,该群进一步包含 $CD4^+$ T细胞(例如,原代 $CD4^+$ T细胞)。

[0491] 在一些实施方案中, $CD4^+$ T细胞群包含从自体或同种异体单个T细胞供体(单供体 $CD4^{IL-10/CAR}$ T细胞)获得的 $CD4^+$ T细胞。在一些实施方案中,原代 $CD4^+$ T细胞来自单个T细胞供体。在一些实施方案中,原代 $CD4^+$ T细胞来自同一个体(即同一患者)。在一些实施方案中, $CD4^+$ T细胞群包含从至少两个不同的T细胞供体(多供体 $CD4^{IL-10/CAR}$ T细胞)获得的 $CD4^+$ T细胞。在一些实施方案中,原代 $CD4^+$ T细胞来自allo-HSCT的供体。

[0492] 在一些实施方案中, $CD4^+$ T细胞是从两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个不同的T细胞供体获得并合并的。多供体 $CD4^{IL-10}$ T细胞及其制备和使用方法描述于PCT/US2021/039464,其通过引用以其全文并入本文。其中描述的方法和/或组合物可以被用来生成多供体 $CD4^{IL-10/CAR}$ 细胞。

[0493] 在一些实施方案中,原代 $CD4^+$ T细胞来自在分析供体的遗传信息之后从供体筛选出来的供体。在一些实施方案中,未分析供体(即原代 $CD4^+$ T细胞的供体)的遗传信息。在一些实施方案中,原代 $CD4^+$ T细胞来自基于其HLA单倍型被选择的供体。在一些实施方案中,群中的 $CD4^+$ T细胞总共具有六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或更多种不同的HLA单倍型。在一些实施方案中,群中的所有 $CD4^+$ T细胞在HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1和HLA-DQB1基因座处彼此具有至少1/10、2/10、3/10、4/10、5/10、6/10、7/10、8/10或9/10的匹

配。在一些实施方案中,群中的所有CD4⁺ T细胞在HLA-A、HLA-B、HLA-C和HLA-DRB1基因座处彼此具有至少1/8、2/8、3/8、4/8、5/8、6/8、7/8或8/8的匹配。

[0494] 在一些实施方案中,群中的所有CD4⁺ T细胞在HLA-A基因座处彼此具有2/2的匹配。在一些实施方案中,群中的所有CD4⁺ T细胞在HLA-B基因座处彼此具有2/2的匹配。在一些实施方案中,群中的所有CD4⁺ T细胞在HLA-C基因座处彼此具有2/2的匹配。在一些实施方案中,群中的所有CD4⁺ T细胞在HLA-DRB1和HLA-DQB1基因座处彼此具有至少3/4或4/4的匹配。在一些实施方案中,群中的所有CD4⁺ T细胞具有A*02或A*24等位基因。在一些实施方案中,所有CD4⁺ T细胞为A*02或A*24阴性。

[0495] 在一些实施方案中,群中的所有CD4⁺ T细胞在HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1和HLA-DQB1基因座处彼此具有小于5/10、6/10、7/10、8/10或9/10的匹配。在一些实施方案中,群中的所有CD4⁺ T细胞在HLA-A、HLA-B、HLA-C和HLA-DRB1基因座处彼此具有小于4/8、5/8、6/8、7/8或8/8的匹配。在一些实施方案中,群中的所有CD4⁺ T细胞在HLA-A基因座处彼此具有小于2/2的匹配。在一些实施方案中,群中的所有CD4⁺ T细胞在HLA-B基因座处彼此具有小于2/2的匹配。在一些实施方案中,群中的所有CD4⁺ T细胞在HLA-C基因座处彼此具有小于2/2的匹配。在一些实施方案中,群中的所有CD4⁺ T细胞在HLA-DRB1和HLA DQB1基因座处彼此具有小于3/4或4/4的匹配。

[0496] 在一些实施方案中,如通过 Δ NGFR的表达所推断的,群内至少30% (例如,至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少98%)的CD4⁺ T细胞表达CAR和IL-10。

[0497] 在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞处于冷冻悬浮液中。在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞处于液体悬浮液中。在一些实施方案中,液体悬浮液先前已被冷冻。

[0498] 6.5. 药物组合物

[0499] 在另一方面,提供了药物组合物。在一些实施方案中,药物组合物包含本文提供的任何单供体CD4^{IL-10/CAR} T细胞、本文提供的任何多供体CD4^{IL-10/CAR} T细胞或本文提供的任何多供体CD4^{IL-10/CAR} T细胞群,以及药学上可接受的载体或稀释剂。

[0500] 药物组合物可以被配制用于通过任何适合人或兽医的施用途施用。在典型的实施方案中,组合物被配制用于静脉内(IV)施用。在一些实施方案中,组合物被配制用于静脉内(IV)输注。在配制用于IV施用的实施方案中,药物组合物是肠胃外可接受的水溶液的形式,其无热原并且具有合适的pH值、等渗性和稳定性。

[0501] 在一些实施方案中,药学上可接受的载体或稀释剂是盐水、乳酸林格氏溶液或其他生理相容溶液。在多个实施方案中,药物组合物溶液包含2-20%,优选5%的人血清白蛋白。

[0502] 在一些实施方案中,提供了药物组合物的单位剂型,其适合通过全身施用、特别是静脉内施用来施用药物组合物。

[0503] 在一些实施方案中,单位剂型含有 10^4 至 10^{11} 个CD4^{IL-10/CAR}细胞或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞、 10^4 至 10^{10} 个CD4^{IL-10/CAR}细胞或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞、 10^4 至 10^9 个CD4^{IL-10/CAR} T细胞或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞、 10^5 至 10^{10} 个CD4^{IL-10/CAR}细胞或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞、 10^5 至 10^9 个CD4^{IL-10/CAR}细胞或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞、 10^5 至 10^8 个CD4^{IL-10/CAR}细胞或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞、或 10^5 至 10^7 个CD4^{IL-10/CAR}细胞或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞。

[0504] 在典型的实施方案中,单位剂型中的药物组合物是液体形式。

[0505] 6.6. 制备单供体CD4^{IL10/CAR}细胞或多供体CD4^{IL10/CAR}细胞的方法

[0506] 在另一方面,本公开内容提供了制备CD4^{IL10/CAR}细胞或多供体CD4^{IL10/CAR}细胞的方法。

[0507] 在一些实施方案中,本文提供的方法包括通过引入编码CAR的外源多核苷酸区段和编码IL-10的外源多核苷酸区段来修饰CD4⁺ T细胞或合并的CD4⁺ T细胞。在一些实施方案中,用编码CAR的外源多核苷酸区段和编码IL-10的外源多核苷酸区段修饰CD4⁺ T细胞或合并的CD4⁺ T细胞包括:(i) 用编码IL-10的多核苷酸区段进行第一次转导,随后用编码CAR的外源多核苷酸区段进行第二次转导;(ii) 用编码CAR的多核苷酸区段进行第一次转导,随后用编码IL-10的外源多核苷酸区段进行第二次转导;(iii) 用编码IL-10的多核苷酸区段和编码CAR的外源多核苷酸区段同时转导(即共转导);或(iv) 用包含编码IL-10的多核苷酸区段和编码CAR的多核苷酸区段的单个多核苷酸构建体转导。

[0508] 在一些实施方案中,包含编码IL-10的多核苷酸区段和编码CAR的多核苷酸区段的单个多核苷酸构建体是双向载体,其中IL-10位于一个启动子(例如,PGK或EF1a)的控制下,并且CAR位于第二个启动子(例如CMV)的控制下。在这种情况下,如果构建体包括编码选择标志物的多核苷酸序列,则该多核苷酸序列可以位于IL-10或CAR的下游。

[0509] 在一些实施方案中,包含编码IL-10的多核苷酸区段和编码CAR的多核苷酸区段的单个多核苷酸构建体从5'至3'包含编码IL-10的序列和编码CAR的序列。在此类实施方案中,编码IL-10的序列和编码CAR的序列与单个启动子(例如,组成型或诱导型启动子)可操作地连接。在此类实施方案中,编码内部核糖体进入位点(IRES)的序列或编码2A肽的序列位于编码IL-10的序列和编码CAR的序列之间。

[0510] 在一些实施方案中,包含编码IL-10的多核苷酸区段和编码CAR的多核苷酸区段的单个多核苷酸构建体从5'至3'包含编码CAR的序列和编码IL-10的序列。在此类实施方案中,编码CAR的序列和编码IL-10的序列与单个启动子(例如,组成型或诱导型启动子)可操作地连接。在此类实施方案中,编码内部核糖体进入位点(IRES)的序列或编码2A肽的序列位于编码CAR的序列和编码IL-10的序列之间。

[0511] 在一些实施方案中,方法包括以下步骤:(a) 合并从一个或多个T细胞供体获得的原代CD4⁺ T细胞;和(b) 根据本文提供的方法通过引入编码CAR的第一外源多核苷酸区段和编码IL-10的第二外源多核苷酸区段来修饰合并的CD4⁺ T细胞。在其他实施方案中,方法包括以下步骤:(a) 从一个或多个T细胞供体获得原代CD4⁺ T细胞;(b) 通过引入编码CAR的第一外源多核苷酸区段和编码IL-10的第二外源多核苷酸区段(例如,根据本文提供的方法)分别修饰每个供体的CD4⁺ T细胞;并且然后合并遗传修饰的CD4⁺ T细胞,从而获得CD4^{IL-10/CAR}细胞。可以使用本领域已知的各种方法将编码CAR的第一外源多核苷酸区段、编码IL-10的第二外源多核苷酸区段或两者引入原代CD4⁺ T细胞。

[0512] 在一些实施方案中,方法进一步包括在抗CD3抗体和抗CD28抗体的存在下,或抗CD3抗体和抗CD28抗体包被的珠的存在下孵育原代CD4⁺ T细胞或遗传修饰的CD4⁺ T细胞的步骤。在一些实施方案中,方法进一步包括在抗CD3抗体、抗CD28抗体和IL-2的存在下或抗CD3抗体和抗CD28抗体包被的珠和IL-2的存在下孵育原代CD4⁺ T细胞或遗传修饰的CD4⁺ T细胞的步骤。在一些实施方案中,方法进一步包括在饲养细胞混合物的存在下孵育原代CD4

⁺ T细胞或遗传修饰的CD4⁺ T细胞的步骤。在一些实施方案中,方法进一步包括在抗CD3抗体和抗CD28抗体的纳米制剂的存在下孵育原代CD4⁺ T细胞或遗传修饰的CD4⁺ T细胞的步骤。在一些实施方案中,在聚合物纳米基质试剂的存在下进行孵育,以通过CD3和CD28激活和扩增人T细胞。在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR} T细胞在其他T细胞特异性免疫细胞培养基、激活剂和补充剂的存在下培养。

[0513] 在一些实施方案中,孵育步骤在根据本文提供的方法引入编码CAR的第一外源多核苷酸区段和编码IL-10的第二外源多核苷酸区段之前进行。在一些实施方案中,孵育步骤在(a)合并从一个或多个不同的T细胞供体获得的原代CD4⁺ T细胞之后;但在(b)根据本文提供的方法通过引入编码CAR的第一外源多核苷酸区段和编码IL-10的第二外源多核苷酸区段来修饰合并的CD4⁺ T细胞之前进行。在一些实施方案中,孵育步骤在(a)从一个或多个不同的T细胞供体获得原代CD4⁺ T细胞之后;但在(b)根据本文提供的方法通过引入编码CAR的第一外源多核苷酸区段和编码IL-10的第二外源多核苷酸区段分别修饰每个供体的CD4⁺ T细胞之前进行。

[0514] 在一些实施方案中,孵育步骤在步骤(b)之后进行。换言之,在一些实施方案中,孵育步骤在(b)根据本文提供的方法通过引入编码CAR的第一外源多核苷酸区段和编码IL-10的第二外源多核苷酸区段来修饰合并的CD4⁺ T细胞之后进行。在一些实施方案中,孵育步骤在(b)根据本文提供的方法通过引入编码CAR的第一外源多核苷酸区段和编码IL-10的第二外源多核苷酸区段分别修饰每个供体的CD4⁺ T细胞之后,但在合并遗传修饰的CD4⁺ T细胞之前进行,从而获得遗传修饰的CD4⁺ T细胞。在一些实施方案中,孵育步骤在合并遗传修饰的CD4⁺ T细胞之后进行,从而获得CD4^{IL-10/CAR}细胞。

[0515] 在一些实施方案中,孵育步骤进行多于一次。在一些实施方案中,孵育步骤在CD4⁺ T细胞的遗传修饰之前和之后进行。

[0516] 在一些实施方案中,使用病毒载体,将第一外源多核苷酸区段、第二外源多核苷酸区段或两者引入原代CD4⁺ T细胞中。在一些实施方案中,第一外源多核苷酸区段和第二外源多核苷酸区段位于同一病毒载体上。在一些实施方案中,病毒载体是慢病毒载体。

[0517] 在一些实施方案中,第一外源多核苷酸包含编码具有SEQ ID NO:9、16、22、34、41-49和54的序列的CAR的区段且第二外源多核苷酸区段编码具有SEQ ID NO:1的序列的IL-10。在一些实施方案中,第一外源多核苷酸包含编码与SEQ ID NO:9、16、22、34、41-49和54具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的CAR的区段,并且第二外源多核苷酸包含编码与SEQ ID NO:1具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的IL-10的区段。

[0518] 在一些实施方案中,CAR编码多核苷酸区段具有SEQ ID NO:10、17、23、35或55的序列,并且IL-10编码多核苷酸区段具有SEQ ID NO:2的序列。在一些实施方案中,CAR编码多核苷酸区段与SEQ ID NO:10、17、22、35或55具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性,并且IL-10编码多核苷酸区段与SEQ ID NO:2具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性。在一些实施方案中,第一外源多核苷酸区段、第二外源多核苷酸区段或两者进一步包含编码标志物的区段,所述标志物允许选择成功转导的CD4⁺ T细胞。在一些实施方案中,编码的选择标志物是ΔNGFR。在某些实施方案中,编码的选择标志物具有SEQ ID NO:4的序列。在一些实施方案中,编码的选择标志物是截短形式的人EGFR多肽。

[0519] 在一些实施方案中,方法进一步包括分离表达一种或更多种选择标志物的遗传修饰的CD4⁺ T细胞的步骤,从而生成富集的遗传修饰的CD4^{IL-10/CAR}细胞群。

[0520] 在一些实施方案中,富集的群中至少40% (例如,至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少98%)的遗传修饰的CD4⁺ T细胞表达选择标志物,其中选择标志物是IL-10表达的替代物。在一些实施方案中,富集的群中至少75% (例如,至少80%、至少90%、至少95%或至少98%)的遗传修饰的CD4⁺ T细胞表达选择标志物,其中选择标志物是IL-10表达的替代物。在一些实施方案中,富集的群中至少75%的遗传修饰的CD4⁺ T细胞表达选择标志物。在一些实施方案中,富集的群中至少95%的遗传修饰的CD4⁺ T细胞表达选择标志物。在一些实施方案中,富集的群中至少96%、97%、98%或99%的遗传修饰的CD4⁺ T细胞表达选择标志物。

[0521] 在一些实施方案中,富集的群中至少75% (例如,至少80%、至少90%、至少95%或至少98%)的遗传修饰的CD4⁺ T细胞表达IL-10。在一些实施方案中,富集的群中至少75%的遗传修饰的CD4⁺ T细胞表达IL-10。在一些实施方案中,富集的群中至少95%的遗传修饰的CD4⁺ T细胞表达IL-10。在一些实施方案中,富集的群中至少96%、97%、98%或99%的遗传修饰的CD4⁺ T细胞表达IL-10。

[0522] 在一些实施方案中,富集的群中至少30% (例如,至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少98%)的遗传修饰的CD4⁺ T细胞表达CAR。在一些实施方案中,富集的群中至少50%的遗传修饰的CD4⁺ T细胞表达CAR。在一些实施方案中,富集的群中至少75%的遗传修饰的CD4⁺ T细胞表达CAR。在一些实施方案中,富集的群中至少95%的遗传修饰的CD4⁺ T细胞表达CAR。在一些实施方案中,富集的群中至少96%、97%、98%或99%的遗传修饰的CD4⁺ T细胞表达CAR。

[0523] 在一些实施方案中,富集的群中至少30% (例如,至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少98%)的遗传修饰的CD4⁺ T细胞表达IL-10和CAR。在一些实施方案中,富集的群中至少50%的遗传修饰的CD4⁺ T细胞表达IL-10和CAR。在一些实施方案中,富集的群中至少75%的遗传修饰的CD4⁺ T细胞表达IL-10和CAR。在一些实施方案中,富集的群中至少95%的遗传修饰的CD4⁺ T细胞表达IL-10和CAR。在一些实施方案中,富集的群中至少96%、97%、98%或99%的遗传修饰的CD4⁺ T细胞表达IL-10和CAR。

[0524] 在一些实施方案中,方法进一步包括孵育富集的遗传修饰的CD4⁺ T细胞群的步骤。在一些实施方案中,孵育在抗CD3抗体和抗CD28抗体,或抗CD3抗体和抗CD28抗体包被的珠的存在下进行。在一些实施方案中,孵育进一步在IL-2的存在下进行。在一些实施方案中,孵育在饲养细胞的存在下进行。在一些实施方案中,孵育在抗CD3抗体和抗CD28抗体的纳米制剂的存在下进行。在一些实施方案中,孵育在聚合物纳米基质试剂的存在下进行,以通过CD3和CD28激活和扩增人T细胞。在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR} T细胞在其他T细胞特异性免疫细胞培养基、激活剂和补充剂的存在下培养。

[0525] 在一些实施方案中,方法进一步包括冷冻遗传修饰的CD4⁺ T细胞的步骤。

[0526] 在一些实施方案中,原代CD4⁺ T细胞来自基于其HLA单倍型被选择的供体。在一些实施方案中,方法进一步包括通过分析其遗传信息来选择T细胞供体的步骤。在一些实施方

案中,方法包括分析潜在T细胞供体的遗传信息或HLA单倍型的步骤。

[0527] 在一些实施方案中,原代CD4⁺ T细胞来自与待用原代CD4⁺ T细胞或其修饰物治疗的宿主具有至少部分HLA匹配的供体。在一些实施方案中,原代CD4⁺ T细胞来自与干细胞(HSC)、组织或器官供体具有至少部分HLA匹配的供体。在一些实施方案中,CD4⁺ T细胞来自与干细胞(HSC)、组织或器官供体HLA匹配的供体。在一些实施方案中,原代CD4⁺ T细胞从与宿主无生物上亲缘关系的第三方供体获得。在一些实施方案中,原代CD4⁺ T细胞从与干细胞、组织或器官供体无生物学上亲缘关系的第三方供体获得。

[0528] 在一些实施方案中,在步骤(a)中,原代CD4⁺ T细胞从两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个不同的T细胞供体获得。在一些实施方案中,至少两个T细胞供体在HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1和HLA-DQB1基因座处彼此具有至少1/10、2/10、3/10、4/10、5/10、6/10、7/10、8/10或9/10的匹配。在一些实施方案中,至少两个T细胞供体在HLA-A、HLA-B、HLA-C和HLA-DRB1基因座处彼此具有至少1/8、2/8、3/8、4/8、5/8、6/8、7/8或8/8的匹配。在一些实施方案中,至少两个T细胞供体在HLA-A基因座处彼此具有2/2的匹配。在一些实施方案中,至少两个T细胞供体在HLA-B基因座处彼此具有2/2的匹配。在一些实施方案中,至少两个T细胞供体在HLA-C基因座处彼此具有2/2的匹配。在一些实施方案中,至少两个T细胞供体在HLA-DRB1和HLA-DQB1基因座处彼此具有至少3/4或4/4的匹配。在一些实施方案中,至少两个T细胞供体中的每一个具有A*02或A*24等位基因。在一些实施方案中,T细胞供体为HLA-A*02阴性。在一些实施方案中,至少两个T细胞供体中的每一个为HLA-A*02或HLA-A*24阴性。

[0529] 在一些实施方案中,至少两个T细胞供体在HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1和HLA-DQB1基因座处彼此具有小于5/10、6/10、7/10、8/10或9/10的匹配。在一些实施方案中,至少两个T细胞供体在HLA-A、HLA-B、HLA-C和HLA-DRB1基因座处彼此具有小于4/8、5/8、6/8、7/8或8/8的匹配。在一些实施方案中,至少两个T细胞供体在HLA-A基因座处彼此具有小于2/2的匹配。在一些实施方案中,至少两个T细胞供体在HLA-B基因座处彼此具有小于2/2的匹配。在一些实施方案中,至少两个T细胞供体在HLA-C基因座处彼此具有小于2/2的匹配。在一些实施方案中,至少两个T细胞供体在HLA-DRB1和HLA-DQB1基因座处彼此具有小于3/4或4/4的匹配。

[0530] 在一些实施方案中,在步骤(a)中,原代CD4⁺ T细胞从一个或更多个冷冻储备液获得。在一些实施方案中,在步骤(a)中,原代CD4⁺ T细胞从至少两个不同的T细胞供体的未冷冻的外周血单核细胞获得。在一些实施方案中,方法进一步包括从外周血单核细胞中分离CD4⁺ T细胞的步骤。在一些实施方案中,在步骤(a)中,原代CD4⁺ T细胞从液体悬浮液获得。在一些实施方案中,液体悬浮液从先前冷冻的储备液获得。

[0531] 在一些实施方案中,方法不包括使CD4⁺ T细胞在来自宿主的外周血单核细胞(PBMC)的存在下失去反应性的步骤。在一些实施方案中,方法不包括使CD4⁺ T细胞在重组IL-10蛋白的存在下失去反应性的步骤,其中重组IL-10蛋白不从CD4⁺ T细胞表达。在一些实施方案中,方法不包括使CD4⁺ T细胞在来自宿主的DC10细胞的存在下失去反应性的步骤。

[0532] 在一些实施方案中,本文提供的方法包括在合并、纯化、再刺激和扩增步骤中的一个或更多个步骤之后,通过引入编码CAR的外源多核苷酸区段和编码IL-10的外源多核苷酸

区段来修饰CD4⁺ T细胞或合并的CD4⁺ T细胞。

[0533] 6.7.使用CD4^{IL-10/CAR}细胞或多供体CD4^{IL-10/CAR}的方法

[0534] 在另一方面,本公开内容提供了治疗患者的方法,其包括向有需要的患者施用本文提供的任何CD4^{IL-10/CAR}细胞(例如,自体单供体或同种异体单供体)、本文提供的任何同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR} T细胞、本文提供的任何多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物的步骤。

[0535] 在一些实施方案中,方法进一步包括解冻CD4^{IL-10/CAR}细胞的冷冻悬浮液的在先步骤。

[0536] 在一些实施方案中,自体单供体或同种异体单供体CD4^{IL-10/CAR}细胞或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞或药物组合物防止患者的致病性T细胞应答或降低患者的致病性T细胞应答的严重程度。

[0537] 在一些实施方案中,多供体CD4^{IL-10}细胞或药物组合物防止炎性或自身免疫性应答或降低炎性或自身免疫性应答的严重程度。

[0538] 在一些实施方案中,多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞或药物组合物防止患者的致病性T细胞应答或降低患者的致病性T细胞应答的严重程度。在一些实施方案中,多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞或药物组合物减轻炎症。在一些实施方案中,多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞或药物组合物增强组织修复。在一些实施方案中,多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞或药物组合物增强对自身和非致病性抗原的免疫耐受性并维持免疫稳态。在一些实施方案中,多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞或药物组合物下调与器官移植、GvHD和各种自身免疫性和炎症疾病相关的致病性T细胞应答。在一些实施方案中,多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞或药物组合物治疗自身免疫性疾病。在一些实施方案中,多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞或药物组合物降低NLPR3炎症小体的过度活跃或减少与NLPR3炎症小体的过度活跃相关的症状。在一些实施方案中,多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞或药物组合物诱导肿瘤细胞死亡或减少肿瘤生长。在一些实施方案中,多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞或药物组合物增加无病存活率(例如,不存在微小残留病)。在一些实施方案中,多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞或药物组合物诱导伤口愈合或组织修复。

[0539] 在一些实施方案中,多供体CD4^{IL-10}细胞或药物组合物以有效防止患者的致病性T细胞应答或降低患者的致病性T细胞应答的严重程度的量施用。在一些实施方案中,多供体CD4^{IL-10}细胞或药物组合物以有效减轻炎症的量施用。在一些实施方案中,多供体CD4^{IL-10}细胞或药物组合物以有效增强组织修复的量施用。在一些实施方案中,多供体CD4^{IL-10}细胞或药物组合物以有效增强对自身和非致病性抗原的免疫耐受性并维持免疫稳态的量施用。在一些实施方案中,多供体CD4^{IL-10}细胞或药物组合物以有效下调与器官移植、GvHD和各种自身免疫性或炎症疾病相关的致病性T细胞应答的量施用。在一些实施方案中,多供体CD4^{IL-10}细胞或药物组合物以有效治疗自身免疫性疾病的量施用。在一些实施方案中,多供体CD4^{IL-10}细胞或药物组合物以有效降低NLPR3炎症小体的过度活跃或减少与NLPR3炎症小体的过度活跃相关的症状的量施用。在一些实施方案中,多供体CD4^{IL-10}细胞或药物组合物以有效诱导肿瘤细胞死亡或减少肿瘤生长的量施用。在一些实施方案中,多供体CD4^{IL-10}细胞或药物组合物以有效增加无疾病存活率(例如,不存在微小残留病)的量施用。

[0540] 在一些实施方案中,单供体CD4^{IL-10/CAR}细胞(例如,自体或同种异体)或药物组合物防止患者的致病性T细胞应答或降低患者的致病性T细胞应答的严重程度。在一些实施方案

中,单供体CD4^{IL-10/CAR}细胞或药物组合物减轻炎症。在一些实施方案中,单供体CD4^{IL-10/CAR}细胞或药物组合物增强组织修复。在一些实施方案中,单供体CD4^{IL-10/CAR}细胞或药物组合物增强对自身和非致病性抗原的免疫耐受性并维持免疫稳态。在一些实施方案中,单供体CD4^{IL-10/CAR}细胞或药物组合物下调与器官移植、GvHD和各种自身免疫性和炎性疾病相关的致病性T细胞应答。在一些实施方案中,单供体CD4^{IL-10/CAR}细胞或药物组合物治疗自身免疫性疾病。在一些实施方案中,单供体CD4^{IL-10/CAR}细胞或药物组合物降低NLPR3炎症小体的过度活跃或减少与NLPR3炎症小体的过度活跃相关的症状。在一些实施方案中,单供体CD4^{IL-10/CAR}细胞或药物组合物诱导肿瘤细胞死亡或减少肿瘤生长。在一些实施方案中,单供体CD4^{IL-10/CAR}细胞或药物组合物增加无病存活率(例如,不存在微小残留病)。在一些实施方案中,单供体CD4^{IL-10/CAR}细胞或药物组合物诱导伤口愈合或组织修复。

[0541] 在一些实施方案中,治疗方法进一步包括在施用之后监测患者中的CD4^{IL-10/CAR}细胞。在一些实施方案中,方法包括以下步骤:检测从患者获得的生物样品中的选择标志物,从而检测CD4^{IL-10/CAR}细胞或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞的存在与否。在一些实施方案中,方法包括检测患者中的选择标志物,并使用选择标志物的检测来追踪和/或监测向患者施用后的CD4^{IL-10/CAR}细胞。在一些实施方案中,在多个时间点检测选择标志物以追踪患者中CD4^{IL-10/CAR}细胞的存在的变化。在一些实施方案中,生物样品是来自患者的活检物或血液样品。

[0542] CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)以治疗有效量施用。该量可以基于体重和其他临床因素确定。在一些实施方案中,施用 10^3 至 10^{11} 个细胞/kg。在一些实施方案中,施用 10^3 至 10^{10} 个细胞/kg。在一些实施方案中,施用 10^3 至 10^9 个细胞/kg。在一些实施方案中,施用 10^3 至 10^8 个细胞/kg。在一些实施方案中,施用 10^3 至 10^7 个细胞/kg。在一些实施方案中,施用 10^3 至 10^6 个细胞/kg。在一些实施方案中,施用 10^3 至 10^5 个细胞/kg。在一些实施方案中,施用 10^3 至 10^4 个细胞/kg。

[0543] 在多个实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)按照治疗有效的时间表施用。在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)被施用一次。在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)每天、每3天、每7天、每14天、每21天或每月被施用。

[0544] CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)可以根据不同的施用途径(例如全身施用、皮下施用或腹腔内施用)进行施用。在一些实施方案中,细胞在可以含有2-20%、优选5%人血清白蛋白的盐水或生理溶液中被施用。

[0545] 6.7.1.减少或预防GvHD的方法

[0546] 在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)、单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物用于在造血干细胞(HSC)移植(HSCT)之前、与HSCT同时或在HSCT之后治疗患者。

[0547] 在多个实施方案中,HSCT是匹配的有亲缘关系的HSCT,或匹配的无亲缘关系的HSCT。在多个实施方案中,HSCT是半相合HSCT、不匹配的有亲缘关系的HSCT或不匹配的无亲缘关系的HSCT。

[0548] 在一些实施方案中,患者患有需要用allo-HSCT治疗的血液系统恶性肿瘤。在一些实施方案中,血液系统恶性肿瘤由异常髓系细胞介导。在一些实施方案中,恶性肿瘤或血液

系统癌症是髓系白血病。在一些实施方案中,恶性肿瘤或血液系统癌症是CD19⁺、CD20⁺、CD22⁺、BCMA⁺或B7-H3⁺血液系统癌症。在一些实施方案中,CD19⁺、CD20⁺、CD22⁺或B7-H3⁺血液系统癌症选自慢性淋巴细胞白血病、急性淋巴母细胞白血病(ALL)和非霍奇金淋巴瘤。

[0549] 在一些实施方案中,基于待用CD4^{IL-10/CAR}(自体单供体或同种异体单供体)或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞和HSC治疗的患者的遗传信息,和/或HSC供体的遗传信息来选择T细胞供体。在一些实施方案中,基于待用多供体CD4^{IL-10}细胞和HSC治疗的患者的HLA单倍型和/或HSC供体的HLA单倍型来选择T细胞供体。在一些实施方案中,方法进一步包括在施用CD4^{IL-10}细胞之前分析T细胞供体的遗传信息或HLA单倍型的步骤。在一些实施方案中,方法进一步包括分析宿主的遗传信息或HLA单倍型的步骤。在一些实施方案中,方法进一步包括分析HSC供体的遗传信息或HLA单倍型的步骤。

[0550] 在一些实施方案中,T细胞供体、宿主和HSC供体无生物学上亲缘关系。在一些实施方案中,T细胞供体、宿主和HSC供体具有不同的HLA单倍型。在一些实施方案中,T细胞供体、宿主和HSC供体在HLA单倍型上至少部分不匹配。在一些实施方案中,当T细胞供体具有HLA匹配超过阈值的HLA单倍型时,选择T细胞供体。

[0551] 在一些实施方案中,HSC供体与患者是部分HLA不匹配的。在一些实施方案中,HSC供体在HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1和HLA-DQB1基因座处与患者具有小于5/10、6/10、7/10、8/10、9/10或10/10的匹配。在一些实施方案中,HSC供体在HLA-A、HLA-B、HLA-C和HLA-DRB1基因座处与患者具有小于4/8、5/8、6/8、7/8或8/8的匹配。在一些实施方案中,HSC供体在HLA-A、HLA-B或HLA-C基因座处与患者具有小于2/2的匹配。在一些实施方案中,HSC供体在HLA-DRB1和HLA-DQB1基因座处与患者具有小于3/4或4/4的匹配。

[0552] 在一些实施方案中,T细胞供体中的一个或多个与患者是HLA不匹配的或部分HLA不匹配的。在一些实施方案中,T细胞供体中的一个或多个在HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1和HLA-DQB1基因座处与患者具有小于5/10、6/10、7/10、8/10、9/10或10/10的匹配。在一些实施方案中,T细胞供体中的一个或多个在HLA-A、HLA-B、HLA-C和HLA-DRB1基因座处与患者具有小于4/8、5/8、6/8、7/8或8/8的匹配。在一些实施方案中,T细胞供体中的一个或多个在HLA-A、HLA-B或HLA-C基因座处与患者具有小于2/2的匹配。在一些实施方案中,T细胞供体中的一个或多个在HLA-DRB1和HLA-DQB1基因座处与患者具有小于2/4、3/4或4/4的匹配。

[0553] 在一些实施方案中,T细胞供体中的一个或多个与HSC供体是HLA不匹配的或部分HLA不匹配的。在一些实施方案中,T细胞供体中的一个或多个在HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRB1和HLA-DQB1基因座处与HSC供体具有小于5/10、6/10、7/10、8/10、9/10或10/10的匹配。在一些实施方案中,T细胞供体中的一个或多个在HLA-A、HLA-B、HLA-C和HLA-DRB1基因座处与HSC供体具有小于4/8、5/8、6/8、7/8或8/8的匹配。在一些实施方案中,T细胞供体中的一个或多个在HLA-A、HLA-B或HLA-C基因座处与HSC供体具有小于2/2的匹配。在一些实施方案中,T细胞供体中的一个或多个在HLA-DRB1和HLA-DQB1基因座处与HSC供体具有小于3/4或4/4的匹配。

[0554] 在一些实施方案中,当施用于患者时,CD4^{IL-10/CAR}细胞(单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)、单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物防止移植的造血干细胞的GvHD或减轻移植的造血干细胞的GvHD的严重程度。

[0555] 在一些实施方案中,当施用于患者时,CD4^{IL-10/CAR}细胞(单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)、单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物防止移植的造血细胞的病理性T细胞应答或降低移植的造血细胞的病理性T细胞应答的严重程度。在具体实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞预防或减少GvHD。

[0556] 在一些实施方案中,多供体CD4^{IL-10}细胞或药物组合物防止由致病性T细胞或炎症引起的组织损伤或减少由致病性T细胞或炎症引起的组织损伤的严重程度。

[0557] 6.7.2. 治疗癌症的方法

[0558] 在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)、单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物用于治疗癌症。在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)、单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物用于治疗恶性肿瘤。

[0559] 在优选实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)直接介导抗肿瘤作用,并且在特定实施方案中,介导抗白血病作用。

[0560] 在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)、单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物和同种异体在造血干细胞移植(HSCT)、外周血干细胞(PBSC)移植、脐血(CB)移植或骨髓(BM)移植之前或之后施用。

[0561] 在一些实施方案中,赘生性细胞表达CD19。在一些实施方案中,赘生性细胞表达CD20。在一些实施方案中,赘生性细胞表达CD22。在一些实施方案中,赘生性细胞表达BCMA。在一些实施方案中,赘生性细胞表达B7-H3。在一些实施方案中,赘生性细胞表达CD13。在一些实施方案中,赘生性细胞表达HLA-I类。在一些实施方案中,赘生性细胞表达CD54。在一些实施方案中,赘生性细胞表达CD13、HLA-I类和CD54。在一些实施方案中,赘生性细胞表达CD112。在一些实施方案中,赘生性细胞表达CD58。在一些实施方案中,赘生性细胞表达CD155。在一些实施方案中,肿瘤表达CD112、CD58或CD155。在各种实施方案中,肿瘤是实体肿瘤或血液系统肿瘤。在一些实施方案中,肿瘤是实体肿瘤。在一些实施方案中,实体肿瘤表达B7-H3。在一些实施方案中,实体肿瘤选自自由以下组成的组:乳腺癌、脑癌、肺癌、肝癌、胃癌、脾癌、结肠癌、肾癌、胰腺癌、前列腺癌、子宫癌、皮肤癌、头癌、颈癌、肉瘤、神经母细胞瘤和卵巢癌。

[0562] 在一些实施方案中,患者患有癌症,该癌症选自自由以下组成的组:肾上腺癌、肛门癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、成人脑/CNS肿瘤、儿童脑/CNS肿瘤、乳腺癌、男性乳腺癌、原发部位不明的癌症、Castleman病、宫颈癌、结肠/直肠癌、子宫内膜癌、食道癌、尤文家族肿瘤、眼癌、胆囊癌、胃肠道类癌肿瘤、胃肠道间质肿瘤(GIST)、妊娠滋养细胞疾病、霍奇金病、卡波西肉瘤、肾癌、喉和下咽癌、白血病、急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓系白血病(AML,包括髓系肉瘤和皮肤白血病)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性髓系白血病(CML)、慢性粒单核细胞白血病(CMML)、儿童白血病、肝癌、肺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肺类癌肿瘤、淋巴瘤、皮肤淋巴瘤、恶性间皮瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、鼻腔和鼻窦癌、鼻咽癌、神经母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、儿童非霍奇金淋巴瘤、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-成人软

组织癌、皮肤癌、皮肤癌-基底细胞癌和鳞状细胞癌、皮肤癌-黑色素瘤、皮肤癌-默克尔细胞癌、小肠癌、胃癌、睾丸癌、胸腺癌、甲状腺癌、子宫肉瘤、阴道癌、外阴癌、华氏巨球蛋白血症和维尔姆斯氏瘤。

[0563] 在一些实施方案中,癌症是髓系肿瘤。在特定实施方案中,癌症是AML或CML。在一些实施方案中,癌症是髓系肿瘤。在一些实施方案中,癌症是ALL。

[0564] 在一些实施方案中,方法用于治疗影响血液、骨髓和淋巴结的血液系统癌症。在多个实施方案中,血液系统癌症是淋巴瘤(例如霍奇金淋巴瘤)、淋巴细胞白血病、骨髓瘤。在多个实施方案中,血液系统癌症是急性或慢性骨髓性(髓系)白血病(AML、CML)或骨髓增生异常综合征。

[0565] 在一些实施方案中,恶性肿瘤或血液系统癌症是CD19⁺、CD20⁺、CD22⁺、BCMA⁺或B7-H3⁺血液系统癌症。在一些实施方案中,CD19⁺、CD20⁺、CD22⁺、BCMA⁺或B7-H3⁺血液系统癌症是慢性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病(ALL)和非霍奇金淋巴瘤。

[0566] 在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)用于治疗患有血液系统癌症的患者,其中该方法包括向患者施用治疗有效量的CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)、单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物。

[0567] 在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞用于治疗患有CD19⁺血液系统癌症的患者,其中该方法包括向患者施用治疗有效量的CD4^{IL-10/抗CD19 CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/抗CD19 CAR}细胞)、单供体或多供体CD4^{IL-10/抗CD19 CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物。

[0568] 在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞用于治疗患有CD20⁺血液系统癌症的患者,其中该方法包括向患者施用治疗有效量的CD4^{IL-10/抗CD20 CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/抗CD20 CAR}细胞)、单供体或多供体CD4^{IL-10/抗CD20 CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物。

[0569] 在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞用于治疗患有CD22⁺血液系统癌症的患者,其中该方法包括向患者施用治疗有效量的CD4^{IL-10/抗CD22 CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/抗CD22 CAR}细胞)、单供体或多供体CD4^{IL-10/抗CD22 CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物。

[0570] 在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞用于治疗患有B7-H3⁺癌症(例如,实体癌)的患者,其中该方法包括向患者施用治疗有效量的CD4^{IL-10/抗B7-H3CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/抗B7-H3 CAR}细胞)、单供体或多供体CD4^{IL-10/抗B7-H3 CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物。

[0571] 在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞用于治疗患有BCMA⁺癌症(例如,实体癌)的患者,其中该方法包括向患者施用治疗有效量的CD4^{IL-10/抗BCMA CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/抗BCMA CAR}细胞)、单供体或多供体CD4^{IL-10/抗BCMACAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物。

[0572] 在一些实施方案中,癌症对于治疗干预是难治性的或对其有抗性。

[0573] 在一些实施方案中,本文提供的方法用于预防患者的CD19⁺、CD20⁺、CD22⁺、BCMA⁺或B7-H3⁺血液系统癌症和实体癌的复发,其包括:向被鉴定为患有CD19⁺、CD20⁺、CD22⁺、BCMA⁺或

B7-H3⁺血液系统癌症或实体癌或处于具有CD19⁺、CD20⁺、CD22⁺、BCMA⁺或B7-H3⁺血液系统癌症或实体癌复发的风险的患者施用足以诱导抗癌作用的治疗有效量的CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)、单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物。

[0574] 在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)与治疗干预组合使用。组合可以同时进行或在不同时间进行。优选地,治疗干预选自由以下组成的组:化疗、放疗、allo-HSCT、免疫抑制、输血、骨髓移植、生长因子、生物制剂。

[0575] 在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)用于治疗患有恶性肿瘤的患者,其中该方法包括向患者施用allo-HSCT移植,以及向患者施用治疗有效量的CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)、单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物。

[0576] 在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)用于治疗接受同种异体HSCT(allo-HSCT)的癌症患者,以预防GvHD并诱导长期耐受性(除了直接抗肿瘤作用之外)。CD4^{IL-10/CAR}细胞的量足以抑制或预防移植物抗宿主病(GvHD),而不抑制allo-HSCT(由干细胞制剂中存在的供体T细胞介导)的移植物抗白血病(GvL)或移植物抗肿瘤(GvT)功效。

[0577] 本文还提供了用于治疗患有微小残留病的患者的方法,其包括:向被鉴定为患有微小残留病或处于患有微小残留病的风险的患者施用足以诱导抗癌作用的治疗有效量的CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)、单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物。

[0578] 在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)、单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物诱导浸润肿瘤、促进肿瘤生长的髓系细胞(例如,单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞)的细胞死亡。

[0579] 在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)、单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物诱导B细胞(例如,CD19⁺B细胞、CD20⁺B细胞、CD22⁺B细胞、BCMA⁺、B7-H3⁺B细胞或B7-H3⁺实体肿瘤细胞)的细胞死亡。

[0580] 6.7.3. 治疗炎性疾病或自身免疫性疾病的方法

[0581] 在一些实施方案中,施用单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞以治疗炎性疾病或自身免疫性疾病。在一些实施方案中,施用单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞以治疗涉及NLPR3炎症小体过度活跃的疾病或紊乱。

[0582] NOD样受体家族(NLR)蛋白NLRP3是细胞内信号传导分子,其感知来自致病、环境或内源性来源的危险信号。激活后,NLRP3与胱天蛋白酶1相互作用,形成称为炎症小体的复合物。这导致胱天蛋白酶1的激活,其将促炎细胞因子IL-1 β 和IL-18裂解为它们的活性形式,并介导一种称为细胞焦亡的炎性细胞死亡。

[0583] 在一些实施方案中,施用单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞以治疗选自以下的炎性

疾病:穆克尔-韦尔斯 (Muckle-Wells) 综合征 (MWS)、家族性寒冷性自身炎症综合征 (FCAS) 和新生儿发病多系统炎性疾病 (NOMID)。在一些实施方案中,施用单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞以治疗选自以下的慢性疾病:代谢综合征、2型糖尿病、动脉粥样硬化、阿尔茨海默病、帕金森病、ALS、非酒精性脂肪性肝炎、骨关节炎、矽肺、石棉肺、痛风和肺纤维化。在一些实施方案中,施用单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞以治疗克罗恩病、溃疡性结肠炎、多发性硬化和系统性红斑狼疮或炎性眼病,例如糖尿病视网膜病变、急性青光眼和年龄相关性黄斑变性。

[0584] 在一些实施方案中,施用单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞以治疗与NLRP3相关的疾病。该疾病可以选自由以下组成的组:CAPS、NASH、阿尔茨海默病、帕金森病、心血管疾病、骨关节炎、痛风、假痛风、肾钙质沉着、II型糖尿病、干燥综合征、镰状细胞病 (SCD)、AMD、感染、脑型疟疾、石棉肺、接触性超敏应答、晒伤、矽肺、囊性纤维化、炎性肠病、ALS、骨髓增生异常综合征和葡萄膜炎。

[0585] 在一些实施方案中,疾病是选自以下的脑部疾病:帕金森病、阿尔茨海默病、年龄相关性认知障碍、额颞叶痴呆、创伤性脑损伤、脑出血、脓毒症相关脑病、脑缺血、蛛网膜下腔出血、癫痫、丙烯酰胺中毒、阿片类药物引起的神经炎症、慢性偏头痛、围手术期神经认知障碍、中风后认知障碍、心脏骤停后认知障碍、社会隔离引起的认知障碍、焦虑和创伤后应激障碍。

[0586] 在一些实施方案中,疾病是选自以下的肺部疾病:哮喘、IR肺损伤、ARDS/COPD、颗粒物引起的肺损伤、放射性肺炎、肺高压、结节病、囊性纤维化和过敏性鼻炎。

[0587] 在一些实施方案中,疾病是选自以下的心脏疾病:动脉粥样硬化、心力衰竭、高血压、心肌梗死、心房颤动、代谢功能障碍引起的心脏损伤、心力衰竭和内皮功能障碍。

[0588] 在一些实施方案中,疾病是胃肠道疾病,例如结肠炎。在一些实施方案中,疾病是选自以下的肝脏疾病:急性肝衰竭、免疫昼夜节律调节、NASH、糖尿病认知功能障碍、IR肝损伤、特质性药物引起的肝损伤和肝纤维化。在一些实施方案中,疾病是选自以下的胰腺或肾疾病:糖尿病性脑病、糖尿病相关动脉粥样硬化、胰岛素抵抗、胰岛移植排斥、慢性晶体性肾病、肾纤维化、I/R肾损伤、肥胖相关肾病和肾性高血压。在一些实施方案中,疾病是选自以下的皮肤或眼部疾病:银屑病和视网膜血管新生。在一些实施方案中,疾病是生殖障碍,例如早产。在一些实施方案中,疾病是选自以下的免疫紊乱:原发性痛经、先天免疫、先天至适应性免疫、系统性红斑狼疮-狼疮性肾炎和多发性硬化。在一些实施方案中,疾病是选自以下的遗传性疾病:穆克尔-韦尔斯 (Muckle-Wells) 综合征、类风湿性关节炎、镰状细胞病和VCP相关疾病。在一些实施方案中,疾病是选自以下的疼痛性疾病:多发性硬化相关神经性疼痛、慢性前列腺炎/慢性盆腔疼痛、癌症引起的骨痛和痛觉过敏。在一些实施方案中,疾病是癌症,例如人头颈鳞状细胞癌。在一些实施方案中,疾病是感染性疾病,例如细菌、病毒或寄生虫感染。

[0589] 在一些实施方案中,单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞与目前可用于治疗NLRP3相关疾病的治疗方法(例如靶向IL-1的生物制剂)组合使用。生物制剂包括重组IL-1受体拮抗剂阿那白滞素 (Anakinra)、中和IL-1 β 抗体卡那单抗 (Canakinumab) 和可溶性诱饵IL-1受体利纳西普 (Rilonacept)。

[0590] 在一些实施方案中,施用单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞以治疗选自以下的疾病:

2型糖尿病、代谢综合征、心血管疾病、SLE、MS、CD、溃疡性结肠炎(UC)、骨关节炎、非酒精性脂肪性肝炎(Nash)、帕金森病、ALS、肺纤维化、矽肺、石棉肺、糖尿病视网膜病变和年龄相关性黄斑变性。

[0591] 在一些实施方案中,施用单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞以治疗炎症。炎症可以与冠状动脉疾病(CAD)、2型糖尿病、神经退行性疾病或炎性肠病有关,但不限于此。

[0592] 在一些实施方案中,施用单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞以治疗涉及由激活的单核细胞、巨噬细胞或树突状细胞产生增加的IL-1 β 的疾病或紊乱。在一些实施方案中,施用单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞以治疗涉及由激活的单核细胞、巨噬细胞或树突状细胞产生增加的IL-18的疾病或紊乱。在一些实施方案中,施用单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞以治疗涉及由激活的单核细胞、巨噬细胞或树突状细胞产生增加的成熟胱天蛋白酶1的疾病或紊乱。

[0593] 在一些实施方案中,施用单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞以减少激活的单核细胞、巨噬细胞或树突状细胞产生IL-1 β 。在一些实施方案中,施用单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞以减少激活的单核细胞、巨噬细胞或树突状细胞产生IL-18。在一些实施方案中,施用单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞以减少激活的单核细胞、巨噬细胞或树突状细胞产生成熟胱天蛋白酶1。

[0594] 6.7.4. 治疗其他疾病的方法

[0595] 在一些实施方案中,向需要免疫耐受的患者施用CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)。在一些实施方案中,本文提供的方法包括向需要免疫耐受的患者施用治疗有效量的CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)、单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物。

[0596] 在一些实施方案中,向患者施用CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)、单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物以治疗自身免疫性疾病。

[0597] 在一些实施方案中,自身免疫性疾病选自以下组成的组:自身免疫性葡萄膜炎、银屑病、白癜风、斑秃、银屑病关节炎、炎性肠病、桥本甲状腺炎、自身免疫性血管炎、溃疡性结肠炎、大疱性疾病、硬皮病、乳糜泻、格雷夫斯病、系统性硬化、重症肌无力、抗NMDA脑炎、类天疱疮疾病(寻常型和落叶型)、获得性大疱性表皮松解、血栓性血小板减少性紫癜、特发性血小板性紫癜、自身抗体诱导的血管炎症、自身抗体诱导的心脏炎、类风湿性关节炎、自身抗体诱导的类风湿性关节炎、视神经脊髓炎谱系疾病、系统性红斑狼疮(SLE)、多发性硬化(MS)、干燥综合征、自身免疫性肌病、I型糖尿病、艾迪生病、恶性贫血、自身免疫性肝炎、原发性胆汁性胆管炎(PBC)、自身免疫性胰腺炎、古德巴斯捷氏病、原发性膜性肾病、卵巢功能不全、自身免疫性睾丸炎、干眼病和特发性间质性肺炎。在一些实施方案中,自身免疫性疾病是克罗恩病、溃疡性结肠炎、乳糜泻、1型糖尿病、狼疮、银屑病、银屑病关节炎或类风湿性关节炎。在一些实施方案中,患者患有过敏性疾病或特应性疾病。过敏性疾病或特应性疾病可以选自以下组成的组:哮喘、特应性皮炎和鼻炎。在一些实施方案中,患者患有食物过敏。

[0598] 在一些实施方案中,施用CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异

体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)、单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物,以防止对除HSCT之外的细胞和器官移植的致病性T细胞应答或降低对除HSCT之外的细胞和器官移植的致病性T细胞应答的严重程度。在一些实施方案中,方法包括在施用CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)、单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物之前或之后,对患者进行器官移植的步骤。在某些实施方案中,器官是肾、心脏、肺、肝或胰岛细胞。在优选的实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)、单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物防止器官移植的宿主排斥或降低器官移植的宿主排斥的严重程度。

[0599] 在一些实施方案中,施用CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)、单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物,以预防或降低与基因疗法(例如,施用重组腺病毒、腺相关病毒(AAV)、单纯疱疹病毒(HSV)、逆转录病毒、慢病毒、非整合慢病毒、甲病毒、黄病毒、弹状病毒、麻疹病毒、新城疫病毒、痘病毒或小核糖核酸病毒)相关的免疫应答。在这些实施方案中,方法进一步包括在施用CD4^{IL-10/CAR}细胞或药物组合物之前或之后,向患者施用重组腺病毒、腺相关病毒(AAV)、单纯疱疹病毒(HSV)、逆转录病毒、慢病毒、非整合慢病毒、甲病毒、黄病毒、弹状病毒、麻疹病毒、新城疫病毒、痘病毒或小核糖核酸病毒的步骤。

[0600] 在一些实施方案中,施用CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)、单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物,以预防或减少对除AAV之外的重组病毒载体的免疫应答。在这些实施方案中,方法进一步包括在施用CD4^{IL-10/CAR}细胞、CD4^{IL-10/CAR}细胞群或药物组合物之前或之后,向患者施用除AAV之外的重组病毒载体的步骤。除AAV之外的病毒载体的非限制性实例包括:单纯疱疹病毒(HSV)、逆转录病毒、慢病毒、甲病毒、黄病毒、弹状病毒、麻疹病毒、新城疫病毒、痘病毒或小核糖核酸病毒。

[0601] 在一些实施方案中,施用CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)、单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物,以预防或减少对iPS衍生的组织或细胞的移植相关的免疫应答。iPS衍生的组织和细胞包括但不限于心肌细胞、肝细胞、上皮细胞、软骨、骨和肌肉细胞、神经元。

[0602] 在一些实施方案中,方法进一步包括在施用CD4^{IL-10/CAR}细胞、CD4^{IL-10/CAR}细胞群或药物组合物之前或之后,向患者施用免疫原性治疗蛋白的步骤。在一些实施方案中,CD4^{IL-10/CAR}细胞、CD4^{IL-10/CAR}细胞群或药物组合物降低对免疫原性治疗蛋白的免疫应答。在一些实施方案中,免疫原性治疗蛋白选自治疗性抗体、因子VIII替代物、细胞因子和细胞因子突变蛋白。

[0603] 在一些实施方案中,施用CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)、单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物以治疗炎症。炎症可以与冠状动脉疾病(CAD)、2型糖尿病、神经退行性疾病、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)或炎性肠病有关,但不限于此。

[0604] 在一些实施方案中,施用CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)、单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合

物以治疗涉及NLPR3炎症小体的过度活跃的疾病或紊乱。在一些实施方案中,施用CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)、单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物,以治疗涉及由激活的单核细胞、巨噬细胞或树突状细胞产生增加的IL-1 β 的疾病或紊乱。在一些实施方案中,施用CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)、单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物,以治疗涉及由激活的单核细胞、巨噬细胞或树突状细胞产生增加的IL-18疾病或紊乱。在一些实施方案中,施用CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)、单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物,以治疗涉及由激活的单核细胞、巨噬细胞或树突状细胞产生增加的胱天蛋白酶1的疾病或紊乱。

[0605] 在一些实施方案中,施用CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)、单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物,以减少激活的单核细胞、巨噬细胞或树突状细胞产生IL-1 β 。在一些实施方案中,施用CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)、单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物,以减少激活的单核细胞、巨噬细胞或树突状细胞产生IL-18。在一些实施方案中,施用CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)、单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物,以减少激活的单核细胞、巨噬细胞或树突状细胞产生成熟胱天蛋白酶1。

[0606] 在一些实施方案中,施用CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)、单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物,以降低患者对病毒感染的过度活跃的免疫应答。在一些实施方案中,病毒是SARS-coV-2。在一些实施方案中,施用CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)、单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物,以减少对细菌感染(例如毒性休克、细胞因子风暴、治疗性抗体、因子VIII替代、细胞因子和细胞因子突变蛋白)的过度活跃的免疫应答。

[0607] 在另一方面,本公开内容提供了用于治疗或抑制患者的自身免疫性疾病、过敏性疾病或炎性疾病的方法,其包括向被鉴定为患有自身免疫性疾病、过敏性疾病或炎性疾病的患者施用足以治疗或抑制自身免疫性疾病、过敏性疾病或炎性疾病的治疗有效量的CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)、单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物。

[0608] 在另一方面,本公开内容提供了用于减少移植有造血干细胞、骨髓细胞或实体器官的患者的移植排斥的方法,其包括向被鉴定为对所移植的造血干细胞、骨髓细胞或实体器官具有排斥的患者施用足以减少移植排斥的治疗有效量的CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)、单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物。

[0609] 在另一方面,本公开内容提供了用于治疗患者的移植物抗宿主病(GvHD)的方法,其包括:向被鉴定为患有移植物抗宿主病(GvHD)或处于患有移植物抗宿主病(GvHD)的风险的患者施用足以抑制或预防GvHD的治疗有效量的CD4^{IL-10/CAR}细胞(自体单供体、同种异体单

供体或同种异体多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞)、单供体或多供体CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的任何药物组合物。在一些实施方案中,GvHD是急性GvHD。在一些实施方案中,GvHD是慢性GvHD。

[0610] 在另一方面,本公开内容的特征在于用于治疗患者的组织或器官损伤(例如,伤口愈合)的方法,其包括:向被鉴定为具有组织或器官损伤或处于具有组织或器官损伤的风险的患者施用足以诱导组织或器官损伤修复的治疗有效量的本文提供的任何CD4^{IL-10/CAR}细胞、本文提供的任何CD4^{IL-10/CAR}细胞群或本文提供的药物组合物。

[0611] 6.8. 多核苷酸和载体

[0612] 本公开内容的特征还在于一种或更多种多核苷酸构建体,其包含:(a) 编码嵌合抗原受体(CAR)(例如,本文提供的任何CAR)的第一多核苷酸区段;和(b) 编码白介素-10(IL-10)的第二多核苷酸区段;和(c) 编码截短形式的NGFR的第三多核苷酸区段。在一些实施方案中,第一多核苷酸区段以及第二和第三多核苷酸在同一构建体中。在一些实施方案中,第一多核苷酸在第一多核苷酸构建体中,并且第二和第三多核苷酸区段在第二多核苷酸构建体中。在一些实施方案中,第三多核苷酸区段是任选的。

[0613] 在一些实施方案中,第一多核苷酸区段包含与CAR的编码序列可操作地连接的调控元件(例如,本文所描述的任何示例性调控元件(例如,任何启动子))。在一些实施方案中,调控元件驱动CAR的表达。

[0614] 在一些实施方案中,第二多核苷酸区段包含与IL-10的编码序列可操作地连接的调控元件(例如,本文所描述的任何示例性调控元件(例如,任何启动子))。在一些实施方案中,调控元件驱动IL-10的组成型表达。

[0615] 在一些实施方案中,第三多核苷酸区段包含与选择标志物(例如,ΔNGFR)的编码序列可操作地连接的调控元件(例如,本文所描述的任何示例性调控元件(例如,任何启动子))。在一些实施方案中,调控元件驱动ΔNGFR的组成型表达。

[0616] 在一些实施方案中,多核苷酸构建体包括位于第一多核苷酸区段和第二多核苷酸区段之间的内部核糖体进入位点(IRES)或自切割肽。在一些实施方案中,多核苷酸构建体包括位于第二多核苷酸区段和第一多核苷酸区段之间的内部核糖体进入位点(IRES)或自切割肽。在一些实施方案中,自切割肽选自F2A、P2A、T2A和E2A组成的组。

[0617] 在一些实施方案中,多核苷酸构建体从5'至3'包括:与第一多核苷酸区段可操作地连接的启动子、自切割肽或IRES和第二多核苷酸区段。在一些实施方案中,多核苷酸构建体从5'至3'包括:与第一多核苷酸区段可操作地连接的启动子、自切割肽或IRES和第二多核苷酸区段,以及与第三多核苷酸区段可操作地连接的第二启动子。

[0618] 在一些实施方案中,多核苷酸构建体从5'至3'包括:与第二多核苷酸区段可操作地连接的启动子、自切割肽或IRES和第一多核苷酸区段。

[0619] 在一些实施方案中,多核苷酸构建体包括与第一多核苷酸区段可操作地连接的第一启动子和与第二多核苷酸区段可操作地连接的第二启动子。在一些实施方案中,多核苷酸构建体包括与第一多核苷酸区段可操作地连接的第一启动子、与第二多核苷酸区段可操作地连接的第二启动子和与第三多核苷酸区段可操作地连接的第三启动子。

[0620] 在一些实施方案中,多核苷酸构建体编码靶向与自身免疫性疾病、炎性疾病或癌症相关的抗原的抗原结合结构域。在一些实施方案中,抗原选自以下组成的组:CD19、

CD20、CD22、CD27、BCMA、CD38、HLA*A2、HLA*A24或瓜氨酸化肽、胰岛素、MOG、GAD65、IA2、醇溶蛋白和桥粒黏蛋白(在相关MHC分子的背景下)。

[0621] 在一些实施方案中,多核苷酸构建体包括编码靶向癌症相关抗原的抗原结合结构域的序列。在一些实施方案中,癌症相关抗原选自由以下组成的组:CD19、CD20、CD22、CD23、CD27、CD38、CEA、BCMA、Lym1、Lym2、CLEC5A、CDH179b、FLT3、GCC、Muc、CSF2RA、GFRa4、CD32、CD33、IL11Ra、IL13Ra、NYBRI、SLa、CD200R、TGFβR2、CEA、CD276、TROP2、LAMP1、PTK7、DLL3、CDH1、CDH6、CDH17、CDH19、TSHR、B7-H3和酪氨酸酶。

[0622] 在一些实施方案中,第一多核苷酸区段包含SEQ ID NO:10、17、23、35或55的序列。

[0623] 在一些实施方案中,第二多核苷酸区段包含SEQ ID NO:2的序列。

[0624] 在一些实施方案中,多核苷酸构建体进一步包含一个或更多个选择标志物(例如,本文提供的任何选择标志物)。在一些实施方案中,第一多核苷酸区段、第二多核苷酸区段或两者进一步包含编码选择标志物的序列。

[0625] 在一些实施方案中,多核苷酸构建体包括ΔNGFR作为选择标志物。

[0626] 在一些实施方案中,多核苷酸构建体包括包含SEQ ID NO:4的序列的ΔNGFR。

[0627] 在一些实施方案中,多核苷酸构建体包括截短形式的EGFR作为选择标志物。

[0628] 在一些实施方案中,一个或更多个多核苷酸构建体是一个或更多个载体。在一些实施方案中,载体是病毒载体。病毒载体的非限制性实例包括:慢病毒、逆转录病毒、γ逆转录病毒、腺相关病毒、腺病毒、辅助病毒依赖型腺病毒(helper-dependent adenovirus)、仙台病毒或杆状病毒。在一些实施方案中,多核苷酸构建体是慢病毒载体。

[0629] 在一些实施方案中,第一多核苷酸在第一慢病毒载体中,并且第二多核苷酸区段在第二慢病毒载体中。

[0630] 在一些实施方案中,慢病毒载体能够整合至T细胞核基因组中。在一些实施方案中,慢病毒载体不能够整合至T细胞核基因组中。在一些实施方案中,使用整合缺陷型慢病毒载体。例如,在一些实施方案中,使用Mátrai中公开的整合缺陷型或其他慢病毒载体。在一些实施方案中,使用整合酶缺陷型慢病毒。例如,可以使用整合酶中含有失活突变(D64V)的整合酶缺陷型慢病毒,如Mátrai et al.,Hepatology 53:1696-1707(2011)中所描述的,其通过引用并入本文。

6.9. 实施例

[0631] 提供以下实施例仅用于说明目的,而非限制。

[0632] 6.9.1. 实验观察的总结

[0633] 总体上,下述实验的数据表明,人CD4⁺ T细胞可以用两种不同的慢病毒载体转导:1) 编码合成的CAR的LVV,所述合成的CAR包含人B细胞表面抗原结合结构域、CD8α铰链和CD8α跨膜结构域、CD28共刺激结构域和CD3ζ激活结构域;以及2) 编码人IL-10基因加载短形式的NGFR基因的双向载体。所得的经转导的CD4⁺ T细胞表达CD19 CAR(通过CD19表达测量)和IL-10/NGFR(通过NGFR表达测量)。当用两种不同的慢病毒载体顺序或同时转导后生成双转导的CD4⁺ T细胞(通常指定为CD4^{IL-10/CAR}细胞或当表达图2A-2B中描述的抗CD19 CAR时指定为CD4^{IL-10/抗CD19CAR}细胞)时,转导效率未发现差异。

[0634] 通过CD3和CD28激活后,CD4^{IL-10/CAR}细胞显示出与CD4^{IL-10}细胞和针对Tr1细胞所描述的相似的细胞因子产生特征。例如,CD4^{IL-10/CAR}细胞产生高水平的IL-10,并且不产生或产

生低水平的IL-4、IFN- γ 和IL-5。值得注意的是,这种细胞因子产生特征在长时间培养后保持稳定。

[0635] 令人感兴趣的是,CD19⁺靶细胞和CD4^{IL-10抗CD19CAR}细胞的共培养导致CD4^{IL-10抗CD19CAR}细胞的特异性激活并诱导IL-10产生。

[0636] CD4^{IL-10抗CD19CAR}细胞体外抑制PBMC增殖、同种异体CD4⁺ T细胞增殖和同种异体CD8⁺ T细胞增殖,CD4^{IL-10}细胞也观察到了该结果。

[0637] CD4^{IL-10抗CD19CAR}细胞在体外特异性杀死CD19⁺靶细胞,但与CD4^{IL-10}细胞一样,它们保留杀死髓系靶细胞的能力,这依赖于I类MHC、CD13、CD54和CD112中一种或更多种的表达。此外,CD4^{IL-10抗CD19CAR} T细胞在体内强烈抑制CD19⁺靶细胞的生长。重要地,与关于单供体和多供体CD4^{IL-10}细胞所描述的类似,单供体和多供体CD4^{IL-10抗CD19 CAR}细胞不诱导xeno-GvHD,而PBMC诱导重度xeno-GvHD。最后,CD4^{IL-10抗CD19 CAR}细胞与PBMC发挥协同抗肿瘤作用,表明它们不干扰保护性GvL应答,如关于CD4^{IL-10}细胞所描述的 (Locafaro et al. Mol Ther. 2017; 25 (10): 2254-2269)。此外,在由同种异体PBMC诱导的GvHD人源化小鼠模型中,单供体和多供体CD4^{IL-10抗CD19 CAR}细胞保护小鼠免受xeno-GvHD (见图18A-18C)。

[0638] 这些数据表明,CD4^{IL-10抗CD19 CAR}与靶细胞上表达的CD19之间的特异性相互作用诱导这些细胞的激活,从而特异性杀死CD19⁺靶细胞并产生IL-10。

[0639] 综上所述,数据表明CD4^{IL-10/CAR} T细胞在治疗所有B细胞和T细胞介导的自身免疫性疾病方面具有独特的临床效用,因为它们不仅可以消除产生自身抗体的B细胞,还可以通过产生IL-10同时抑制致病性自身免疫CD4⁺ T细胞和CD8⁺ T细胞应答。数据还显示,单供体或多供体CD4^{IL-10抗CD19 CAR}细胞在治疗/消除CD19⁺肿瘤细胞和预防肿瘤复发方面 (特别是在接受同种异体HSCT的患者中) 具有独特的临床效用,因为CD4^{IL-10抗CD19 CAR}细胞本身不诱导GvHD并且不干扰PBMC的保护性抗肿瘤作用 (GvL作用)。

[0640] 重要地,即使在高浓度,CD4^{IL-10抗CD19 CAR}细胞 (自体或同种异体) 本身也不诱导GvHD。这些结果表明,CD4^{IL-10/CAR}细胞可以用于治疗i) 表达靶抗原的白血病和其他恶性肿瘤,ii) 接受同种异体HSCT或BM移植的患者的白血病和其他恶性肿瘤,以减少GvHD,同时保留HSCT的GvL或GvT治疗效果,iii) 自身免疫性疾病,所述自身免疫性疾病通过去除自身免疫B细胞和下调致病性T细胞应答和NLPR3炎症小体进行治疗,iv) 炎症性疾病,所述炎症性疾病通过下调致病性T细胞应答和NLPR3炎症小体进行治疗,v) 细胞和器官移植排斥,vi) 表达肿瘤相关抗原 (包括但不限于B7-H3) 的实体肿瘤,以及vii) 免疫介导的疾病,所述免疫介导的疾病通过组织修复和伤口愈合进行治疗。

[0641] 6.9.2. 实施例1: CD4^{IL-10/抗CD19 CAR}细胞的生成

[0642] 6.9.2.1. IL-10/ Δ NGFR和抗CD19 CAR的载体产生

[0643] 第二代CD19 CAR用于产生CD4^{IL-10抗CD19 CAR}细胞。CD19 CAR包括来自完全人抗CD19单克隆抗体的scFv (SEQ ID NO: 12)、CD8 α 铰链和CD8 α 跨膜结构域、CD28共刺激结构域和CD3 ζ (CD3 zeta) 激活结构域 (图2A)。如图2A所示,将CD19 CAR插入慢病毒载体 (LVV) 中 (见图2B)。关于靶向CD19、CD20、CD22、BCMA或B7H3的示例性CAR的图示见图1。通过将抗CD19 scFv (FMC63) 的编码序列连接至慢病毒骨架 (包括人CD8 α 铰链区和CD8 α 跨膜区、CD28共刺激结构域和CD3 ζ 细胞内信号传导结构域) 中生成慢病毒载体。使用抗CD19-CAR检测剂 (Miltenyi) 监测抗CD19 CAR的表面表达。

[0644] 为了将编码IL-10的多核苷酸引入CD4⁺ T细胞以产生CD4^{IL-10抗CD19CAR}细胞,使用含有人IL-10 (SEQ ID NO:2) 的编码序列和截短形式的NGFR (也称为CD271) (Δ NGFR) (SEQ ID NO:4) 的编码序列的慢病毒载体 (LVV) (图4)。含有IL-10和 Δ NGFR编码序列的LVV在WO2016/146542中进一步描述,其特此通过引用以其全文并入本文。

[0645] 通过将pH15C (ATCC 68192) 的人IL-10编码序列的549bp片段连接至质粒pLVIL-10中生成慢病毒载体。双向启动子 (人PGK启动子加反向的CMV启动子的最小核心元件) 的存在允许两个转基因共表达。质粒进一步含有抗生素抗性基因 (例如,氨苄青霉素或卡那霉素) 的编码序列。关于IL-10构建体的示例性说明见图3A和图3B。

[0646] 慢病毒载体通过Ca₃PO₄瞬时共转染四种质粒到293T细胞中产生,并通过超速离心浓缩:向培养物中添加1 μ M丁酸钠进行载体收集。通过有限稀释估计293T细胞的滴度,并通过HIV-1Gag p24抗原免疫捕获 (NEN Life Science Products;Waltham,MA) 测量载体颗粒。将载体感染性计算为滴度与颗粒之间的比率。对于浓缩载体,滴度范围为1 $\times$ 10⁸至6 $\times$ 10⁹转导单位/mL,并且感染性范围为5 $\times$ 10⁴至5 $\times$ 10⁵转导单位/ng。

[0647] 6.9.2.2.CD4^{IL-10/CAR}细胞的产生

[0648] 如图5A-5C所示,使用三种不同的方法来生成CD4^{IL-10抗CD19 CAR}细胞。对于每种不同的方法,CD4⁺ T细胞均从健康的人供体纯化获得。在完全培养基 (X-vivo,补充有5%人AB血清和rhIL-2 (50U/mL)) 中,用抗CD3/抗CD28珠 (Miltenyi) (3:1细胞:珠的比例) 激活纯化的人CD4⁺ T细胞。

[0649] 图5A显示了激活的CD4⁺ T细胞在激活后48小时用编码抗CD19 CAR (LVV^{CD19-CAR}) 的慢病毒载体转导,并在24小时后 (即激活后72小时) 用编码人IL-10和截短形式的人NGF受体 (LVV^{IL-10-NGFR}) 的双向慢病毒载体转导。两种LVV以20的感染复数 (MOI) 使用。

[0650] 图5B显示了激活的CD4⁺ T细胞在激活后48小时用LVV^{IL-10-NGFR}转导,并在24小时后 (即激活后72小时) 用LVV^{CD19-CAR}转导。

[0651] 图5C显示了激活的CD4⁺ T细胞在激活后48小时用LVV^{IL-10-NGFR}和LVV^{CD19-CAR}同时转导。通过在激活后48小时仅用LVV^{IL-10-NGFR}转导激活的CD4⁺ T细胞生成对照CD4^{IL10}细胞。对于图5A-5C中的每一个,转导均在聚凝胺 (8 μ g/mL) 的存在下进行。此外,对于图5A-5C中的每一个,转导后10-28天,使用抗CD271微珠 (Miltenyi) 和抗CD19 CAR微珠 (Miltenyi) 纯化经转导的细胞 (即 Δ NGFR⁺细胞)。纯化的细胞如先前所描述的每14天进行再刺激 (Andolfi et al.Mol.Ther.20 (9):1778-1790 (2012) 和Locafaro et al.Mol.Ther.25 (10):2254-2269 (2017))。在第二次 (TF2) 和第三次 (TF3) 再刺激后,对所得细胞 (CD4^{IL-10抗CD19 CAR}) 进行体外和体内表征。在整个培养期间根据需要每2-3天更换培养基。

[0652] CD4^{IL-10抗CD19 CAR}细胞在TF3 (即第三次再刺激后) 通过用抗CD271mAb (Biolegend) 和抗CD19 CAR检测试剂 (Miltenyi) 染色进行分析并通过流式细胞术进行分析。染色表明,对于三种不同转导方法,根据NGFR和抗CD19 CAR共表达确定的CD4^{IL-10抗CD19 CAR}细胞的身份和纯度分别为88.6% (图6A,来自图5A中描述的方法)、64.1% (图6B,来自图5B中描述的方法) 和52.6% (图6C,来自图5C中描述的方法)。如预期,使用图5C中描述的方法分别从相同供体 (供体26.1和26.2) 生成并用作对照的CD4^{IL-10}细胞不表达CD19 CAR (图7)。

[0653] 如图7所示,CD4^{IL-10抗CD19 CAR}细胞表达IL-10 (通过NGFR的表达进行测量) 和抗CD19 CAR。在本实验中,来自两个不同供体 (26.1和26.2) 的CD4⁺ T细胞在珠激活后48小时用

LVV^{IL-10-NGFR}和LVV^{抗CD19 CAR}同时转导(方法5C)。为了生成CD4^{IL-10}T细胞(对照),来自供体26.1和26.2的CD4⁺T细胞在珠激活后48小时仅用LVV^{IL-10-NGFR}转导。对于该分析,在使用饲养细胞进行第二轮再刺激(即TF2)后,对CD4^{IL-10}细胞(对照)和CD4^{IL-10抗CD19 CAR}细胞进行分析。CD4^{IL-10}细胞(对照)和CD4^{IL-10抗CD19 CAR}T细胞均用抗CD271 mAb(Biolegends)和CD19-CAR检测试剂(Miltenyi)染色,并通过流式细胞术进行分析。如图7所示,大多数用LVV^{IL-10-NGFR}和LVV^{CD19-CAR}转导的细胞表达CD271和CD19-CAR(图7,右图),而大多数仅用LVV^{IL-10-NGFR}转导的细胞表达CD271,但不表达CD19-CAR(图7,左图)。

[0654] 这些结果表明,CD4^{IL-10抗CD19 CAR}细胞可以成功生成,其不依赖于使用两种不同LVV进行转导的时间和顺序。此外,这表明可以使用编码IL-10和CAR两者的单个LVV生成CD4^{IL-10/CAR}。

[0655] 6.9.2.3. CD4^{IL-10抗CD19 CAR}细胞具有与天然来源的Tr1细胞和CD4^{IL-10}细胞相当的细胞因子产生特征

[0656] 根据图5C中描述的方法,通过用(i)含有抗CD19-CAR的LVV和(ii)含有IL-10和 Δ NGFR的LVV进行同时转导,生成来自3个不同健康供体(26.1、26.2和26.3)的CD4^{IL-10抗CD19 CAR}细胞。具体地,为了生成CD4^{IL-10抗CD19 CAR}细胞,在珠激活后48小时,用LVV^{IL-10-NGFR}和LVV^{CD19-CAR}同时转导来自三个不同供体(26.1、26.2和26.3)的CD4⁺T细胞。为了生成CD4^{IL-10}T细胞(对照),在珠激活后48小时,用LVV^{IL-10-NGFR}转导来自三个不同供体(26.1、26.2和26.3)的CD4⁺T细胞。

[0657] 对于本分析,每种CD4^{IL-10}细胞(对照)和CD4^{IL-10/CAR}T细胞各 2×10^5 个细胞(200 μ L中)按照Andolfi et al. Mol. Ther. 20 (9):1778-1790 (2012)和Locafaro et al. Mol. Ther. 25 (10):2254-2269 (2017)中所描述的方法进行再刺激。在第二轮(TF2)再刺激后的第14天,用经固定的抗CD3 mAb和可溶性抗CD28 mAb刺激细胞48小时。收集培养上清液并通过ELISA测定IL-10、IL-4、IL-5和IFN- γ 的水平。

[0658] 如图8A-8D所示,尽管观察到细胞因子产生水平存在一些个体差异,但如同CD4^{IL-10}细胞和Tr1细胞(未显示),CD4^{IL-10/CAR}细胞产生高水平的IL-10、低水平的IL-4以及可变水平的IFN- γ 和IL-5。

[0659] 源自供体24.2的在TF₃时收集的CD4^{IL-10抗CD19 CAR}细胞也获得了类似的结果(图9)。为了生成用于本实验的CD4^{IL-10抗CD19 CAR}细胞,在珠激活后48小时,用LVV^{IL-10-NGFR}和LVV^{CD19-CAR}同时转导来自供体24.2的CD4⁺T细胞(见图5C)。为了生成CD4^{IL-10}T细胞(对照),在珠激活后48小时,仅用LVV^{IL-10-NGFR}转导来自供体24.2的CD4⁺T细胞。对于本分析,每种CD4^{IL-10}细胞(对照)和CD4^{IL-10/CAR}T细胞各 2×10^5 个细胞(200 μ L中)按照Andolfi et al. Mol. Ther. 20 (9):1778-1790 (2012)和Locafaro et al. Mol. Ther. 25 (10):2254-2269 (2017)中所描述的方法进行再刺激。简言之,在第三轮(TF3)再刺激后的第14天,用经固定的抗CD3 mAb和可溶性抗CD28mAb刺激细胞48小时。收集培养上清液并通过ELISA测定IL-10、IL-4、IL-5和IFN- γ 的水平。

[0660] 如图9所示,即使经过长期培养,这些细胞仍然产生高水平的IL-10、低水平的IL-4以及可变水平的IL-5和IFN- γ 。

[0661] 总之,图8A-8D和图9中的数据表明,用LVV^{IL-10-NGFR}和LVV^{CD19-CAR}同时转导纯化的CD4^{IL-10}细胞是可行的,并且导致生成具有与CD4^{IL-10}T细胞和Tr1细胞相同的独特和特征性

细胞因子产生特征的CD4^{IL-10-CAR} T细胞。此外,在TF2或TF3时收获CD4^{IL-10-CAR} T时未观察到细胞因子产生特征的差异,表明这些细胞因子产生特征在长时间内是稳定的。

[0662] 6.9.3. 实施例2:CD4^{IL-10抗CD19 CAR}细胞的细胞毒性以及与CD19⁺靶细胞接合后的激活

[0663] 已知CD4^{IL-10}细胞能够在特定条件下杀死髓系肿瘤细胞,例如ALL-CM(Andolfi et al. Mol Ther. 2012; 20 (9) : 1778-1790)。本实验旨在评估抗CD19 CAR的共表达是否产生可以在与表达CD19的细胞系(例如NALM6)共培养时杀死CD19⁺细胞的细胞(CD4^{IL-10抗CD19 CAR})。

[0664] 具体地,在第三次再刺激(TF3)后收集CD4^{IL-10}细胞(对照)和CD4^{IL-10抗CD19 CAR}细胞(它们都是由从供体24.2分离的CD4⁺ T细胞生成的)(见图5C),并以1:1的比例与K562、NALM6(CD19⁺)或ALL-CM靶细胞(10⁵个细胞/孔)共培养三天。经过三天的共培养后,使用流式细胞术确定每个共培养物中残留靶细胞的存在。

[0665] 数据显示,CD4^{IL-10抗CD19 CAR}细胞通过CD19-CAR与CD19⁺靶细胞的接合杀死CD19⁺ NALM6细胞。相比之下,用作对照的CD4^{IL-10}细胞无效,并且不杀死CD19⁺ NALM6细胞(图10)。此外,CD4^{IL-10抗CD19 CAR}细胞与CD4^{IL-10}细胞一样,杀死髓系肿瘤细胞系ALL CM。CD4^{IL-10抗CD19 CAR}细胞和CD4^{IL-10}细胞对K562细胞均不具有细胞毒性作用或具有极低的细胞毒性作用,所述K562细胞对非特异性细胞毒性和NK细胞的杀伤特别敏感(图10)。

[0666] 这些结果表明,CD4^{IL-10抗CD19 CAR}细胞上表达的CD19-CAR与NALM6淋巴瘤细胞上表达的CD19的接合触发CD4^{IL-10抗CD19 CAR}细胞的细胞毒性机制,从而选择性且有效杀死CD19⁺靶细胞。此外,CD4^{IL-10抗CD19 CAR}细胞与如前所述(Andolfi et al. Mol Ther. 2012; 20 (9) : 1778-1790)的CD4^{IL-10}细胞一样,保留杀死表达CD13、I类MHC抗原、CD54和CD112中的一种或更多种的髓系靶细胞的能力。

[0667] 除了诱导选择性细胞毒性活性外,CD4^{IL-10抗CD19 CAR}与CD19⁺ NALM6靶细胞的接合还导致CD4^{IL-10抗CD19 CAR}细胞的选择性激活和产生IL-10。

[0668] 在这些实验中,CD4^{IL-10}细胞(对照)和CD4^{IL-10抗CD19 CAR}细胞由从三个不同供体(26.1、26.2和26.3)分离的CD4⁺ T细胞生成。在评估IL-10产生之前,确认从所述三个不同供体的每一个生成的CD4^{IL-10抗CD19 CAR}细胞选择性杀死CD19⁺细胞。

[0669] 具体地,在第二次再刺激(TF2)后收集CD4^{IL-10}细胞(对照)和CD4^{IL-10抗CD19 CAR}细胞(它们是由从三个不同供体(26.1、26.2和26.3)分离的CD4⁺ T细胞生成的)(见图5C),并以1:1的比例与K562细胞、NALM6(CD19⁺)细胞或ALL-CM靶细胞(10⁵个细胞/孔)共培养三天。经过三天的共培养后,使用流式细胞术确定每个共培养物中残留的白血病靶细胞的存在。K562细胞系对非特异性细胞毒性和NK细胞的杀伤高度敏感,其被用作对照。数据如图11A所示。

[0670] 如图11A所示,由3个不同供体(26.1、26.2和26.3)生成的CD4^{IL-10抗CD19 CAR}细胞有效杀死CD19⁺ NALM6细胞。CD4^{IL-10抗CD19 CAR}细胞保持杀死髓系肿瘤细胞系ALL-CM的能力,而对K562细胞则没有或仅有微弱的细胞毒性,K562细胞不表达CD19,但已知对非特异性细胞毒性和NK细胞的杀伤敏感(图11A)。CD4^{IL-10抗CD19 CAR}还杀死髓系白血病细胞系ALL-CM。与NALM6细胞共培养仅3天后,在细胞毒性测定的上清液中测量出显著量的IL-10(图11B)。相比之下,在NALM6细胞与来自同一供体的CD4^{IL-10}细胞的共培养物中未检测到IL-10(定量限: 31pg/mL)(图11B)。

[0671] 总之,数据表明CD4^{IL-10抗CD19 CAR}细胞通过CD19-CAR与相关靶细胞上表达的CD19接

合而被选择性激活。这种激活导致 (i) 细胞的细胞毒性/细胞溶解活性, 从而杀死CD19⁺靶细胞和(ii) 诱导IL-10产生, 这是CD4^{IL-10⁺抗CD19⁺CAR}细胞免疫调节和抑制功能所必需的。此外, CD4^{IL-10⁺抗CD19⁺CAR}细胞对髓系肿瘤靶细胞保持与先前在CD4^{IL-10⁺}细胞中观察到的相同的细胞毒性能力。最后, CD4^{IL-10⁺}细胞没有杀死CD19⁺NALM6细胞(图11B), 证明CD4^{IL-10⁺抗CD19⁺CAR}细胞的细胞毒性活性是由于抗CD19⁺CAR与CD19⁺靶细胞的接合。

[0672] 6.9.4. 实施例3: CD4^{IL-10⁺抗CD19⁺CAR}细胞抑制同种异体CD4⁺和CD8⁺ T细胞的增殖应答

[0673] 由于在TF2或TF3时收获的CD4^{IL-10⁺抗CD19⁺CAR}细胞和CD4^{IL-10⁺}细胞均产生高水平的IL-10, 因此测试了两者抑制取自健康供体的同种异体CD4⁺和CD8⁺ T细胞增殖的能力。

[0674] 为了评估同种异体CD4⁺ T细胞的增殖, 用eFluor® 670 (每孔1×10⁵个细胞) 标记同种异体PBMC细胞, 并在存在或不存在第二次再刺激(见图5C)后分离的CD4^{IL-10⁺}细胞(对照)或CD4^{IL-10⁺抗CD19⁺CAR}细胞(每孔1×10⁵个细胞)(以1:1的应答者:抑制者的比例)的情况下, 用成熟同种异体树突状细胞(DC)(每孔5×10⁴个细胞)和可溶性抗CD3 mAb刺激。培养4天后, 使用流式细胞术通过eFluor®670稀释确定CD4⁺增殖的应答T细胞的百分比。对于流式细胞术, 以CD4⁺ΔNGFR⁻ T细胞对细胞进行门控。

[0675] 为了评估同种异体CD8⁺ T细胞的增殖, 用eFluor® 670 (每孔1×10⁵个细胞) 标记同种异体PBMC细胞, 并在存在或不存在第二次再刺激(见图5C)后分离的CD4^{IL-10⁺}细胞(对照)或CD4^{IL-10⁺抗CD19⁺CAR}细胞(每孔1×10⁵个细胞)(以1:1的应答者:抑制者的比例)的情况下, 用同种异体成熟树突状细胞(DC)(每孔5×10⁴个细胞)和可溶性抗CD3 mAb刺激。培养4天后, 使用流式细胞术通过eFluor®670稀释确定CD8⁺增殖的应答T细胞的百分比。对于流式细胞术, 以CD8⁺ΔNGFR⁻ T细胞对细胞进行门控。

[0676] 为了评估同种异体PBMC的增殖, 用eFluor® 670 (每孔1×10⁵个细胞) 标记同种异体PBMC细胞, 并在存在或不存在第二次再刺激(见图5C)后分离的CD4^{IL-10⁺}(对照)或CD4^{IL-10⁺抗CD19⁺CAR}细胞(每孔1×10⁵个细胞)(以1:1的应答者:抑制者的比例)的情况下, 用同种异体成熟树突状细胞(DC)(每孔5×10⁴个细胞)和可溶性抗CD3 mAb刺激。培养4天后, 使用流式细胞术通过eFluor®670稀释确定CD8⁺增殖的应答T细胞的百分比。对于流式细胞术, 以CD3⁺ΔNGFR⁻ T细胞对细胞进行门控。

[0677] 如图12所示, 在TF2时收获的源自3个不同健康供体26.1、26.2和26.3的CD4^{IL-10⁺抗CD19⁺CAR}细胞将同种异体CD4⁺ T细胞的增殖分别抑制78%、48%和74%。它们还将同种异体CD8⁺ T细胞的增殖分别抑制77%、41%和42%(图13)。使用来自相同的3个供体(即26.1、26.2和26.3)的CD4^{IL-10⁺}细胞获得了相当的结果, 它们将同种异体CD4⁺ T细胞的增殖分别抑制83%、81%和61%, 并且将CD8⁺ T细胞的增殖分别抑制77%、41%和68%(图12和图13)。最后, 在TF3收获时, CD4^{IL-10⁺抗CD19⁺CAR}细胞和CD4^{IL-10⁺}细胞也能有效抑制同种异体T细胞的增殖。具体地, CD4^{IL-10⁺抗CD19⁺CAR}细胞与CD4^{IL-10⁺}细胞一样, 将PBMC的增殖分别抑制69%和60%(图14)。

[0678] 总之, 这些结果表明CD4^{IL-10⁺/CAR}细胞对同种异体CD4⁺ T细胞和同种异体CD8⁺ T细胞均具有免疫抑制作用, 并且免疫抑制作用与CD4^{IL-10⁺}细胞相当; CAR的共表达没有消除或改变CD4^{IL-10⁺}细胞的免疫抑制作用。结果还表明, 在长时间培养后(即在TF3后分离的CD4^{IL-10⁺抗CD19⁺CAR} T细胞中), 免疫抑制功能是稳定的。

[0679] 6.9.5. 实施例4: 使用CD4^{IL-10⁺抗CD19⁺CAR}细胞治疗或预防GvHD和癌症CD4^{IL-10⁺抗CD19⁺CAR}

细胞在体内的作用。

[0680] 在人源化xeno-GvHD疾病和肿瘤移植NSG小鼠模型中测试CD4^{IL-10^h}CD19^{CAR}细胞群对CD19⁺肿瘤生长、GvL效应和GvHD诱导的影响。

[0681] 根据其体重,用175-200Gr对NSG小鼠进行亚致死辐照。在第0天,NSG小鼠注射(i)NALM6-荧光素酶(每只小鼠 1×10^5 个)、(ii)NALM6-荧光素酶(每只小鼠 1×10^5 个)+PBMC(每只小鼠 2.5×10^6 个)、(iii)NALM6-荧光素酶(每只小鼠 1×10^5 个)+CD4^{IL-10^h}CD19^{CAR}细胞(每只小鼠 2.5×10^6 个),或(iv)NALM6-荧光素酶(每只小鼠 1×10^5 个)+PBMC(每只小鼠 2.5×10^6 个)+CD4^{IL-10^h}CD19^{CAR}(每只小鼠 2.5×10^6 个)(见图15)。

[0682] 通过标准生物发光测量确定对白血病细胞生长的影响(见图16A-16B)。此外,在施用PBMC和/或CD4^{IL-10^h}CD19^{CAR}细胞之后,通过在第0、9、12和15天测量体重来监测小鼠的GvHD的发展(见图17)。

[0683] 如图16A-16B所示,尽管PBMC抑制NALM6细胞生长(图16A-16B),模拟allo-HSCT在人患者中的移植抗白血病效应,但它们在小鼠中诱导xeno-GvHD(图17),类似于人allo-HSCT疗法中观察到的GvHD。相比之下,CD4^{IL-10^h}CD19^{CAR}细胞抑制NALM6细胞生长(图16A-16B),并且没有引起任何xeno-GvHD的体征(根据体重减轻确定)(图17)。用PBMC+CD4^{IL-10^h}CD19^{CAR}T细胞治疗具有最大的抗白血病作用(图16A-16B)和最大的抗肿瘤作用(图17)。

[0684] 这些数据表明,CD4^{IL-10^h}CD19^{CAR}T细胞具有强细胞毒性并在体内选择性杀死CD19⁺靶细胞。此外,它们不干扰PBMC的保护性GvL效应;事实上,它们二者协同作用。与PBMC不同,单独使用CD4^{IL-10^h}CD19^{CAR}T细胞治疗或CD4^{IL-10^h}CD19^{CAR}T细胞与PBMC联合治疗不诱导xeno-GvHD。

[0685] 6.9.6. 实施例5:CD4^{IL-10^h}CD19^{CAR}细胞具有体内抑制活性并有效预防重度xeno-GvHD

[0686] 图18A中描述的另一项研究用于评估单供体或多供体CD4^{IL-10^h}CD19^{CAR}细胞是否诱导GvHD以及它们是否预防PBMC诱导的GvHD。具体地,人源化NSG小鼠受到亚致死辐照,并通过同种异体PBMC诱导GvHD。根据图18A对小鼠进行处理。在第3天,向小鼠静脉内给药(i)PBMC(2.5E6个细胞/小鼠)、(ii)单供体(BC26.3)CD4^{IL-10^h}CD19^{CAR}细胞(2.5E6个细胞/小鼠)、(iii)多供体(BC-26.1、BC26.2和BC26.3)CD4^{IL-10^h}CD19^{CAR}细胞(2.5E6个细胞/小鼠)、(iv)PBMC(2.5E6个细胞/小鼠)和单供体(BC26.3)CD4^{IL-10^h}CD19^{CAR}细胞(2.5E6个细胞/小鼠),或(v)PBMC(2.5E6个细胞/小鼠)和多供体(BC-26.1、BC26.2和BC26.3)CD4^{IL-10^h}CD19^{CAR}细胞(2.5E6个细胞/小鼠)(见图18A)。使用体重减轻、皮毛外观、皮肤外观、弓背和活动性的综合评分来确定GvHD(Bondanza et al. 2006)。综合评分 ≥ 6 和/或体重减轻 $\geq 20\%$ 的小鼠出于人道原因被安乐死。PBMC的供体与用于生成单供体CD4^{IL-10^h}CD19^{CAR}和多供体CD4^{IL-10^h}CD19^{CAR}的供体无亲缘关系。

[0687] 如图18B和图18C所示,注射2.5E6个PBMC细胞在第16天诱导暴发性且快速致死的xeno-GvHD,而接受2.5E6个单供体CD4^{IL-10^h}CD19^{CAR}细胞(图18B)或2.5E6个多供体CD4^{IL-10^h}CD19^{CAR}细胞(图18C)的小鼠没有出现任何xeno-GvHD的体征。此外,当小鼠接受2.5E6个PBMC和2.5E6个单供体CD4^{IL-10^h}CD19^{CAR}细胞(图18B)或2.5E6个PBMC和2.5E6个多供体CD4^{IL-10^h}CD19^{CAR}细胞(图18C)时,PBMC和单供体CD4^{IL-10^h}CD19^{CAR}细胞或多供体CD4^{IL-10^h}CD19^{CAR}细胞的共施用保护小鼠免受PBMC诱导的xeno-GvHD。

[0688] 这些结果表明,单供体CD4^{IL-10/抗CD19 CAR}细胞和多供体CD4^{IL-10/抗CD19 CAR}细胞在体内不诱导xeno-GvHD。此外,单供体CD4^{IL-10/抗CD19 CAR}细胞和多供体CD4^{IL-10/抗CD19 CAR}细胞有效预防PBMC诱导的重度xeno-GvHD,表明它们在体内具有抑制活性。

[0689] 其他实验

[0690] 对处理组的小鼠进行另外一段时间的监测,以确定CD4^{IL-10/CAR}细胞对长期存活率的影响。

[0691] 施用之后,还监测外周血和组织中CD4^{IL-10/CAR}细胞的量和定位。具体地,监测外周血和炎症部位(淋巴结、脾、肠道和骨髓)中CD4^{IL-10/CAR}细胞的存在。对处理组小鼠进行另外3周的监测,以确定其长期存活率。

[0692] 结果表明,xeno-GvHD的减少和预防持续存在。

[0693] 6.9.7. 实施例6:使用CD4^{IL-10/CAR}细胞治疗慢性炎症性疾病和自身免疫性疾病

[0694] 许多慢性炎症性疾病和自身免疫性疾病涉及NLPR3炎症小体的激活。NLPR3炎症小体可以被“危险信号”激活,这导致胱天蛋白酶1介导的单核细胞/巨噬细胞产生促炎细胞因子IL-1 β 和IL-18。进行一系列体外实验,以研究CD4^{IL-10/抗CD19 CAR}细胞对NLPR3炎症小体和人单核细胞产生IL-1 β /IL-18的影响。

[0695] 首先,通过Ficoll/Paque (Sigma-Aldrich) 上的标准密度离心从外周血分离人PBMC。根据生产商的说明,使用单核细胞分离试剂盒II (Miltenyi) 通过负选择从人PBMC分离单核细胞。优选进行负选择,因为正选择或粘附可导致非期望的细胞激活。在每孔CD4^{IL-10/抗CD19 CAR}细胞/200 μ l的上清液的各种稀释液的存在下,将分离的单核细胞以 5×10^4 个细胞/200 μ l铺板于96孔微量滴定板中含有3%人AB血清的无毒素培养基中。

[0696] 表1总结了对不同组单核细胞施加的处理条件,每组包括6个细胞孔。单核细胞由LPS与NLPR3炎症小体激活剂尼日利亚菌素的组合激活。添加胱天蛋白酶1抑制剂Z-YVADfmk和特异性NLPR3抑制剂MC950作为对照。

[0697]

表 1					
组#	单核细胞	CD4 细胞/上清液	YVADfmk*	LPS**加尼日利亚菌素	其他
培养基对照					
孵育时间: 1 小时; 随后通过 LPS 激活 4 小时					
1	单核细胞	无	无	无	
2	单核细胞	无	无	LPS + Nig	
3	单核细胞	无	Z-YVADfmk	LPS + Nig	
4	单核细胞	无	MCC950	LPS + Nig	
在从单供体或多供体 CD4 ^{IL-10/CAR} 细胞或从 CD4 ^{GFP} 细胞培养物获得的上清液***的存在下培养单核细胞					
5	单核细胞	单供体 CD4 ^{IL-10/CAR} 细胞的 50%上清液	无	LPS + Nig	
6	单核细胞	单供体 CD4 ^{IL-10/CAR} 细胞的 25%上清液	无	LPS + Nig	
7	单核细胞	单供体	无	LPS + Nig	

[0698]

		CD4 ^{IL-10/CAR} 细胞的 12.5%上清液			
8	单核细胞	单供体 CD4 ^{IL-10/CAR} 细胞的 50%上清液	无	LPS + Nig	抗 IL-10 受体抗体
9	单核细胞	多供体 CD4 ^{IL-10/CAR} 细胞的 50%上清液	无	LPS + Nig	
10	单核细胞	多供体 CD4 ^{IL-10/CAR} 细胞的 25%上清液	无	LPS + Nig	
11	单核细胞	多供体 CD4 ^{IL-10/CAR} 细胞的 12.5%上清液	无	LPS + Nig	
12	单核细胞	多供体 CD4 ^{IL-10/CAR} 细胞的 50%上清液	无	LPS + Nig	抗 IL-10 受体抗体
13	单核细胞	CD4 ^{GFP} 细胞的 50%上清液	无	LPS + Nig	

[0699] *Z-YVADfmk是胱天蛋白酶1的特异性抑制剂。使用溶解在DMSO中的20μMZ-YVADfmk (Biovision, Enzo Life Sciences, 或Axxora Life Sciences)。

[0700] **LPS (Sigma-Aldrich) 100ng/mL加在LPS孵育的最后30分钟期间添加的尼日利亚菌素 (Nig, Invivogen) 10μM, MCC950 (Invivogen) 10μM。

[0701] ***通过将CD4^{IL-10}或CD4^{GFP}细胞以 1×10^6 /mL孵育3天并收集上清液获得CD4^{IL-10}和CD4^{GFP}或NGFR培养物的上清液。通过IL-10特异性ELISA测量IL-10产生水平。抗IL-10R抗体 (Biolegend) 30μg/mL。

[0702] 经过表1中概述的处理之后,从每组的6个孔中收集上清液,并通过对成熟IL-1β或IL-18 (Biolegend) 特异的ELISA测量IL-1β/IL-18产生。通过蛋白印迹分析从选定组收集的细胞以确定激活的胱天蛋白酶1的水平。

[0703] 实验数据表明,自体单供体、同种异体单供体和同种异体多供体CD4^{IL-10/抗CD19 CAR}细胞下调由激活的单核细胞产生的IL-1β和IL-18。它们进一步显示,自体单供体、同种异体单供体和同种异体多供体CD4^{IL-10/抗CD19 CAR}细胞下调在激活的单核细胞中产生的成熟胱天蛋白酶1。此外,自体单供体、同种异体单供体和同种异体多供体CD4^{IL-10/抗CD19 CAR}和多供体CD4^{IL-10}产生的IL-10下调炎症小体。

[0704] 用人巨噬细胞或树突状细胞代替单核细胞进行类似实验。实验结果表明,CD4^{IL-10/抗CD19 CAR}细胞还下调由激活的巨噬细胞和树突状细胞产生的IL-1β、IL-18和成熟胱天蛋白酶1。

[0705] 这些数据表明,自体单供体、同种异体单供体和同种异体多供体CD4^{IL-10/抗CD19 CAR}细胞可以用于治疗涉及NLPR3炎症小体的过度激活的疾病或紊乱。具体地,自体单供体、同种异体单供体和同种异体多供体CD4^{IL-10/抗CD19 CAR}细胞可以用于治疗慢性炎症性疾病和自身免疫性疾病。NLPR3炎症小体可以被外源性或内源性“危险信号”(例如病原体相关分子模式 (PAMP)、二氧化硅、石棉、危险相关分子模式 (DAMP), 如受损线粒体的产物、坏死和应激细胞

以及尿毒症酸晶体) 激活。

[0706] 6.9.8. 实施例7: 多供体CD4^{IL-10}细胞的生成

[0707] 载体产生

[0708] 多供体CD4^{IL-10}细胞通过用慢病毒载体转导产生, 该慢病毒载体包含人IL-10和截短形式的NGFR (Δ NGFR) 的编码序列(图3A-3B), 如W02016/146542中所述, 其通过引用以其全文并入本文。载体的序列如SEQ ID NO:5所提供。简言之, 通过将pH15C(ATCC 68192) 的人IL-10的编码序列的549bp片段连接至质粒#1074.1071.hPGK.GFP.WPRE.mhCMV.dNGFR.SV40PA生成慢病毒载体。双向启动子(人PGK启动子加反向的CMV启动子的最小核心元件) 的存在允许两个转基因共表达。质粒进一步含有抗生素抗性基因(例如, 氨苄青霉素或卡那霉素) 的编码序列。

[0709] 慢病毒载体通过Ca₃PO₄瞬时共转染四种质粒到293T细胞中产生, 并通过超速离心浓缩: 向培养物中添加1 μ M丁酸钠进行载体收集。通过有限稀释估计293T细胞的滴度, 并通过HIV-1Gag p24抗原免疫捕获(NEN Life Science Products; Waltham, MA) 测量载体颗粒。载体感染性计算为滴度与颗粒之间的比率。对于浓缩载体, 滴度范围为5 $\times$ 10⁸至6 $\times$ 10⁹转导单位/mL, 并且感染性范围为5 $\times$ 10⁴至5 $\times$ 10⁵转导单位/ng。

[0710] CD4^{IL-10}细胞的产生

[0711] 图19是CD4^{IL-10}细胞产生过程的示意图。纯化来自健康供体的CD4⁺ T细胞。用可溶性抗CD3 mAb、可溶性抗CD28 mAb和rhIL-2(50U/mL) 激活人CD4⁺ T细胞48小时, 然后用编码人IL-10和截短形式的人NGF受体(LV-IL-10/ Δ NGFR) 的双向慢病毒载体进行转导, 感染复数(MOI) 为20。

[0712] 11天之后, 通过FACS分析经转导的细胞的 Δ NGFR表达, 并通过数字液滴PCR(ddPCR) 定量载体拷贝数(VCN)。

[0713] 来自10个不同供体的CD4⁺ T细胞的平均转导效率为45 $\pm$ 17%, VCN为2.7 $\pm$ 0.6%。图20A显示了用LV-IL-10/ Δ NGFR(编码人IL-10和截短形式的人NGF受体的双向慢病毒载体) 转导的人CD4⁺ T细胞中CD4⁺ Δ NGFR⁺细胞的百分比(平均值 $\pm$ SD, n=10左侧柱) 和载体拷贝数(VCN, 平均值 $\pm$ SD, n=10右侧柱)。通过数字液滴PCR(ddPCR) 定量CD4^{IL-10}细胞中CD4⁺ Δ NGFR⁺细胞的频率和载体拷贝数。

[0714] 使用抗CD271 mAb包被的微珠纯化 Δ NGFR⁺ T细胞, 并得到纯度>95%的CD4^{IL-10}细胞群。纯化之后, 用针对CD4和 Δ NGFR的标志物对细胞进行染色, 并通过FACS进行分析。数据显示, 纯化步骤产生的纯度超过98%。图20B显示了10个测试供体中的两个代表性供体(供体B和供体C) 的FACS数据。纯化的CD4^{IL-10}细胞以14天的间隔被再刺激3次, 并在第二次(TF2) 和第三次(TF3) 功能再刺激之后测试其体外和体内功能。

[0715] 静息CD4^{IL-10}细胞组成型产生IL-10。激活后, 产生的IL-10水平强烈提高。

[0716] CD4^{IL-10}细胞具有与天然来源的Tr1细胞相当的细胞因子产生特征。

[0717] 在第二次(TF2) 和第三次(TF3) 再刺激之后分析单供体CD4^{IL-10}细胞的细胞因子产生特征, 并且结果在图21中提供。具体地, CD4^{IL-10}细胞(200 μ l中2 $\times$ 10⁵个细胞) 如前所述(Andolfi et al. Mol Ther. 2012; 20(9):1778-1790 and Locafaro et al. Mol Ther. 2017; 25(10):2254-2269) 进行再刺激。在第2轮(TF2) 再刺激之后的第14天和第3轮(TF3) 再刺激之后的第14天, CD4^{IL-10}细胞未再被刺激(橙色柱) 或用经固定的抗CD3 mAb和可溶性抗CD28

mAb(灰色柱)刺激48小时。收集培养上清液并通过ELISA测定IL-10、IL-4、IL-5、IFN- γ 和IL-22的水平。所有样品均进行三次重复测试。显示了平均值 $\pm$ SD, $n=8$ 个测试供体。图21中提供的结果显示,用经固定的抗CD3 mAb和可溶性抗CD28 mAb刺激的CD4^{IL-10}细胞显示出Tr1细胞的细胞因子产生特征。

[0718] 虽然观察到不同供体之间存在相当大的差异,但第二次(TF2)或第三次(TF3)再刺激之后的整体细胞因子产生特征是相当的,并且反映出Tr1细胞的细胞因子产生特征(Roncarolo et al., Immunity, 2018)。与Tr1细胞一样,CD4^{IL-10}细胞产生高水平的IL-10、IL-5、IFN- γ 和IL-22,但低水平的IL-4,以及不可检测水平的IL-2。

[0719] CD4^{IL-10}细胞表达高水平的颗粒酶B并选择性杀死髓系白血病细胞在第二轮(TF2)再刺激之后,进一步分析CD4^{IL-10}细胞的颗粒酶B(GzB)表达。图22A中的数据显示,大多数CD4^{IL-10}细胞表达GzB。源自7个不同供体的所有CD4^{IL-10}细胞中超过95%表达高水平的颗粒酶B。

[0720] 进一步分析来自第2轮(TF2)再刺激之后的CD4^{IL-10}细胞对髓系白血病细胞系(ALL-CM)和红系白血病细胞系(K562)的细胞毒性作用。将CD4^{IL-10}细胞(10^5 /孔)与K562和ALL-CM细胞(10^5 /孔)以1:1的比例共培养3天。通过FACS计数每种靶细胞的残留白血病细胞系(CD45^低CD33⁺)。

[0721] CD4^{IL-10}细胞选择性杀死髓系白血病细胞(ALL-CM),如图22B所示。杀死的ALL-CM细胞百分比在62%至100%之间变化,而杀死的红系白血病细胞系K562(对非特异性细胞毒性活性高度敏感)百分比在0至27%之间变化(4个不同的测试供体)。总之,这些数据证实CD4^{IL-10}细胞表达颗粒酶B并有效杀死髓系白血病细胞。如预期的,观察到来自不同供体的CD4^{IL-10}细胞的杀伤能力存在一些变化。

[0722] CD4^{IL-10}细胞抑制同种异体CD4⁺和CD8⁺ T细胞的增殖应答

[0723] 还分析了CD4^{IL-10}细胞对同种异体CD4⁺ T细胞或CD8⁺ T细胞的影响。具体地,同种异体PBMC细胞用eFluor® 670(10^5 个细胞/孔)标记,并在不存在或存在CD4^{IL-10}细胞(10^5 个细胞/孔)(以1:1的应答者:抑制者的比例)的情况下,用同种异体成熟树突状(DC)细胞(5×10^4 个细胞/孔)和可溶性抗CD3 mAb刺激。培养4天后,使用流式细胞术对CD4⁺ Δ NGFR⁻ T细胞或CD8⁺ Δ NGFR⁻ T细胞进行门控之后,通过eFluor® 670稀释测定增殖的应答细胞的百分比。图23A和23B显示了来自六个不同的未合并的供体(图23A中供体-C、供体-E和供体-F,以及图23B中供体-H、供体-I和供体-L)的CD4^{IL-10}细胞对CD4⁺ T细胞的影响,以及增殖和抑制的百分比。图24A和24B显示了来自六个不同的未合并的供体(图24A中供体-C、供体-E和供体-F,以及图24B中供体-H、供体-I和供体-L)的CD4^{IL-10}细胞对CD8⁺ T细胞的影响。

[0724] 结果表明,来自6个不同供体的CD4^{IL-10}细胞(未合并且单独测试)下调同种异体CD4⁺和CD8⁺ T细胞的增殖应答。对CD4⁺ T细胞的抑制作用在51%至96%之间,而对CD8⁺ T细胞的抑制作用在62%至73%之间。

[0725] 多供体CD4^{IL-10}细胞的产生和表征

[0726] 使用来自多供体的CD4⁺细胞按照上述和图19所述生成CD4^{IL-10}细胞。每个供体的CD4^{IL-10}细胞通过第二次(TF2)和第三次(TF3)再刺激进行刺激。第三次刺激之后,来自三个供体的CD4^{IL-10}细胞以1:1:1的比例合并,并用经固定的抗CD3 mAb和可溶性抗CD28 mAb刺激48小时。

[0727] 多供体CD4^{IL-10}细胞具有与个体供体的CD4^{IL-10}细胞和Tr1细胞相当的细胞因子产生特征。

[0728] 收集培养上清液并通过ELISA测定IL-10、IL-4、IL-5、IFN- γ 和IL-22的水平。图25中提供的结果显示,从3个不同的同种异体供体合并(1:1:1合并)的多供体CD4^{IL-10}细胞(红点)的细胞因子产生与来自个体供体(n=8)来源的CD4^{IL-10}细胞(灰色柱)的CD4^{IL-10}细胞相当。多供体CD4^{IL-10}细胞产生高水平的IL-10、IL-5、IFN- γ 和IL-22,以及低水平的IL-4和不可检测水平的IL-2(未显示)。这些数据表明,合并CD4^{IL-10}细胞是可行的,并且这些多供体CD4^{IL-10}细胞保持了单供体来源的CD4^{IL-10}细胞和Tr1细胞的细胞因子产生特征。重要地,合并的同种异体细胞群含有>95%的活细胞,表明它们不相互杀伤。

[0729] 多供体CD4^{IL-10}细胞表达高水平的颗粒酶B并杀死髓系白血病细胞系。

[0730] 在第3轮(TF3)再刺激之后,进一步分析多供体CD4^{IL-10}细胞的颗粒酶B(GzB)表达。图26A中的数据显示,大多数多供体CD4^{IL-10}细胞表达GzB。超过95%的多供体CD4^{IL-10}细胞表达颗粒酶B,与单供体来源的CD4^{IL-10}细胞的GzB表达相当。

[0731] 进一步分析来自第3轮(TF3)再刺激的CD4^{IL-10}细胞对髓系白血病细胞(ALL-CM细胞系)或K562的细胞毒性作用。将多供体CD4^{IL-10}细胞(10⁵个/孔)与K562和ALL-CM细胞(10⁵个/孔)以1:1的比例共培养3天。通过FACS计数每种靶细胞的残留白血病细胞系(CD45^低CD33⁺)。图26B中提供的结果显示对K562细胞的一定程度的细胞毒性,该K562细胞对非特异性细胞毒性和NK细胞的细胞毒性高度敏感。尽管如此,获得了与单供体来源的CD4^{IL-10}细胞相当的对髓系白血病细胞(ALL-CM)的选择性水平。

[0732] 多供体CD4^{IL-10}细胞抑制同种异体CD4⁺和CD8⁺ T细胞的增殖应答。

[0733] 还分析了多供体CD4^{IL-10}细胞对同种异体CD4⁺ T细胞或CD8⁺ T细胞的影响。具体地,同种异体PBMC细胞用eFluor® 670(10⁵个细胞/孔)标记,并在不存在或存在多供体CD4^{IL-10}细胞(10⁵个细胞/孔)(以1:1的应答者:抑制者的比例)的情况下,用同种异体成熟树突状(DC)细胞(5×10⁴个细胞/孔)和可溶性抗CD3 mAb刺激。培养4天后,使用流式细胞术对CD4⁺ΔNGFR⁻T细胞和CD8⁺ΔNGFR⁻T细胞进行门控之后,通过eFluor®670稀释测定增殖的应答细胞的百分比。图27A显示了包含来自供体-C、供体-E和供体-F的CD4^{IL-10}细胞的多供体CD4^{IL-10}细胞的结果。图27B显示了包含来自供体-H、供体-I和供体-L的CD4^{IL-10}细胞的多供体CD4^{IL-10}细胞(其被冷冻、储存和解冻,然后进行测试)的结果。

[0734] 图27A显示,多供体CD4^{IL-10}细胞(来自3个不同的供体)将CD4⁺和CD8⁺ T细胞应答分别抑制96%和74%。使用第二不同批次的多供体CD4^{IL-10}细胞获得相当的结果,该批次在测试之前进行冷冻、储存和解冻,然后进行测试(图27B)。CD4⁺和CD8⁺ T细胞增殖的抑制分别为68%和75%。这些数据表明多供体CD4^{IL-10}细胞可以冷冻和储存,而不损失功能。

[0735] 总之,使用多供体CD4^{IL-10}细胞获得的数据表明,这些细胞制剂可以被合并而无任何问题。它们含有>95%的活细胞,并保持单供体CD4^{IL-10}细胞的所有相关功能(细胞因子产生、细胞毒性能力和同种异体T细胞应答的抑制)。使用多供体CD4^{IL-10}细胞的更大的合并池应减少来自不同个体供体的CD4^{IL-10}细胞批次之间观察到的自然变异,并且应为人治疗提供大量现成的CD4^{IL-10}细胞。

[0736] 多供体CD4^{IL-10}细胞产品将具有产品更均匀的显著优势,这使得能够确定明确的批次间的更小差异、效力和放行标准。此外,它还将实现连续大规模细胞产生方法的开发。

[0737] 用于产生多供体CD4^{IL-10}细胞的其他方法

[0738] 在慢病毒转导之前,合并来自至少3-5个不同供体的血沉棕黄层。使用抗CD4抗体通过正选择从血沉棕黄层分离CD4⁺细胞。通过FACS检查合并的CD4⁺细胞的纯度。可选地,从至少3-5个正常健康供体获得冷冻的人CD4⁺细胞。冷冻的人CD4⁺细胞在使用前解冻。在IL-2的存在下,来自血沉棕黄层或冷冻储备液的CD4⁺细胞通过CD3和CD28抗体的组合或CD3和CD28抗体包被的珠的组合被激活24-48小时。在一些情况下,来自血沉棕黄层或冷冻储备液的CD4⁺细胞用可溶性抗CD3 mAb、可溶性抗CD28 mAb和rhIL-2 (50U/mL) 激活48小时,并如上所述用编码人IL-10的双向慢病毒载体进行转导,以产生CD4^{IL-10}细胞。

[0739] 在一些情况下,首先确定T细胞供体(或从供体分离的CD4⁺细胞)的HLA单倍型,并且具有期望HLA单倍型的CD4⁺细胞被选择性合并和使用。

[0740] 通过用上述含有人IL-10和ΔNGFR编码序列的慢病毒载体转导上述激活的CD4⁺细胞来生成多供体CD4^{IL-10}细胞。

[0741] 在第7-11天,即转导后5-9天,收获细胞并利用抗NGFR抗体成功纯化转导的T细胞。该过程通常产生95%纯度的多供体CD4^{IL-10}细胞群。

[0742] 对纯化的多供体CD4^{IL-10}细胞进行计数,并在IL-2的存在下,任选地在饲养细胞的存在下,通过CD3和CD28抗体混合物、CD3和CD28抗体包被的珠再刺激8-10天。在一些情况下,在饲养细胞的存在下,再刺激纯化的多供体CD4^{IL-10}细胞。

[0743] 14-18天的总培养期之后,收获、计数CD4^{IL-10}细胞,并测试其自发产生IL-10的能力或者用CD3和CD28抗体或CD3和CD28抗体包被的珠激活后产生IL-10的能力。此外,还测量了GrzB和穿孔素的水平。还测试了它们抑制人T细胞(PBMC)和纯化的CD4⁺和CD8⁺ T细胞增殖的能力。

[0744] 此外,测量200微升体积中的200,000个CD4^{IL-10}细胞的IL-22的组成型产生和如之前关于产生其他细胞因子(例如IFN-γ、IL-10、IL-4和IL-5)所述的,在使用CD3和CD28抗体组合激活后测量200微升体积中的200,000个CD4^{IL-10}细胞的IL-22产生。合并的CD4^{IL-10}细胞在储存前进行冷冻。

[0745] 6.9.9. 实施例8:使用多供体CD4^{IL-10}细胞治疗或预防GvHD

[0746] 多供体CD4^{IL-10}细胞的体内作用

[0747] 在人源化异种GvHD疾病模型(NSG小鼠模型)中测试多供体CD4^{IL-10}细胞群对人PBMC诱导的异种GvHD的影响,如图28所示。NSG小鼠接受亚致死辐照并静脉内注射人PBMC (5×10⁶个细胞/小鼠),多供体(三个供体)CD4^{IL-10}细胞 (5×10⁶个细胞/小鼠),或人PBMC (5×10⁶个细胞/小鼠)与多供体CD4^{IL-10}细胞(BC-C/E/F) (5×10⁶个细胞/小鼠)的组合。如前所述的(Bondanza et al. Blood 2006),基于体重减轻(>20%体重减轻)、皮肤损伤、皮毛状况、活动性和弓背评价xeno-GvHD。

[0748] 图29显示了注射之后每天发生xeno-GvHD的NSG小鼠%。将5×10⁶个人PBMC施用于受辐照的NSG小鼠,意外地导致不同寻常的暴发性GvHD。所有小鼠在第10天死亡,这反映出非常致命的xeno-GvHD。共同施用5×10⁶个多供体CD4^{IL-10}细胞延迟这种暴发性GvHD,但小鼠在第14天被处死,因为它们达到预先指定的人道20%体重减轻处死标准(图29)。尽管如此,这些结果表明多供体CD4^{IL-10}可以延缓极重度xeno-GvHD。重要地,以与PBMC (5×10⁶个细胞)相同的剂量单独施用的多供体CD4^{IL-10}细胞没有诱导任何xeno-GvHD的体征。

[0749] 在注射后14天,还测试了NSG小鼠的脾(图30,左图)和骨髓(图30,右图)中人CD4^{IL-10}细胞的存在情况,这些NSG小鼠注射了人PBMC (5×10^6 个细胞/小鼠)、多供体(三个供体;BC-C/E/F) CD4^{IL-10}细胞 (5×10^6 个细胞/小鼠),或人PBMC (5×10^6 个细胞/小鼠)与多供体CD4^{IL-10}细胞(三个供体;BC-C/E/F) (5×10^6 个细胞/小鼠)的组合。图30中提供的结果显示多供体CD4^{IL-10}细胞迁移至脾和骨髓。在输注细胞后14天发现这些细胞存在的百分比很低。这些结果表明,多供体CD4^{IL-10}细胞延缓由人PBMC诱导的暴发性xeno-GvHD,并且它们本身不诱导任何xeno-GvHD。

[0750] 多供体CD4^{IL-10}细胞抑制纯化的CD4⁺细胞的重度xeno GvHD。

[0751] 在人源化xeno GvHD模型中测试多供体CD4^{IL-10}细胞,其中通过施用 2.5×10^6 个纯化的人CD4⁺ T细胞诱导GvHD疾病,如图31所示。NSG小鼠在第0天接受亚致死辐照,并在第3天被静脉内注射单独的人CD4⁺ T细胞 (2.5×10^6 个细胞/小鼠),或人CD4⁺ T细胞 (2.5×10^6 个细胞/小鼠)与多供体CD4^{IL-10}细胞(三个不同的供体;BC-H/I/L) (2.5×10^6 个细胞/小鼠)的组合,或人CD4⁺ T细胞 (2.5×10^6 个细胞/小鼠)与来自合并池的单供体(BC-H)的CD4^{IL-10}细胞 (2.5×10^6 个细胞/小鼠)的组合。如前所述(Bondanza et al. Blood 2006),基于体重减轻(>20%体重减轻)、皮肤损伤、皮毛状况、活动性和弓背评价xeno-GvHD。

[0752] 图32显示了注射之后每天显示发生GvHD的NSG小鼠%。结果表明,多供体CD4^{IL-10}(BC-H/I/L)细胞可以抑制由人同种异体CD4⁺ T细胞介导的xeno-GvHD。在本实验中,xeno GvHD非常严重,因为对照组中接受CD4⁺ T细胞的所有小鼠在第20天死亡。相比之下,共同施用 2.5×10^6 个多供体CD4^{IL-10}将GvHD抑制75%。单供体CD4^{IL-10}细胞也具有保护作用,但效果较弱。

[0753] 其他实验

[0754] 在四组不同的小鼠中测试了多供体CD4^{IL-10}细胞的治疗效果:(i)小鼠接受来自与CD4^{IL-10}细胞无亲缘关系的供体的人PBMC(xeno-GvHD阳性对照);(ii)小鼠接受多供体CD4^{IL-10}细胞(阴性对照);(iii)小鼠以1:1的比例接受PBMC和多供体CD4^{IL-10}细胞的组合;和(iv)小鼠以2:1的比例或不同比例接受PBMC和多供体CD4^{IL-10}细胞的组合。在接受PBMC和多供体CD4^{IL-10}细胞的组合的动物中,一些动物同时接受PBMC和多供体CD4^{IL-10}细胞,一些动物在接受PBMC之后数天(例如,5天)接受多供体CD4^{IL-10}细胞,并且一些动物在接受PBMC之前数天(例如,5天)接受多供体CD4^{IL-10}细胞。

[0755] 在施用PBMC和/或多供体CD4^{IL-10}细胞之后,通过在第1、2、3、4周以及必要时第5周测量体重来监测小鼠的GvHD的发展。除了体重减轻外,还将检查小鼠的皮肤病变、毛发状况和活动性。对处理组的小鼠进行另外一段时间的监测,以确定多供体CD4^{IL-10}细胞对长期存活率的影响。

[0756] 施用之后,还监测外周血和组织中多供体CD4^{IL-10}细胞的量和定位。具体地,监测外周血和炎症部位(淋巴结、脾、肠道和骨髓)多供体CD4^{IL-10}细胞的存在。对处理组小鼠进行另外3周的监测,以确定其长期存活率。

[0757] 结果表明,多供体CD4^{IL-10}细胞有效减少和预防xeno-GvHD。

[0758] 6.9.10. 实施例9:GvHD的抑制和癌症的治疗

[0759] 在移植了人PBMC和AML肿瘤细胞的NSG小鼠模型中测试多供体CD4^{IL-10}细胞群对人PBMC诱导的异种GvHD和抗肿瘤作用的影响。AML细胞(ALL-CM)如先前在WO 2016/146542中

所述进行静脉内(i.v.)施用。3天后施用PBMC或多供体CD4^{IL-10}细胞或其组合。

[0760] 多供体CD4^{IL-10}细胞如实施例1中所述获得。在四组不同的小鼠中测试多供体CD4^{IL-10}细胞的治疗效果,每组小鼠在第0天接受辐照和 5×10^6 个ALL-CM细胞(AML小鼠):(i)未接受另外处理的AML小鼠;(ii)接受来自与多供体CD4^{IL-10}细胞无亲缘关系的供体的 5×10^6 个人PBMC的AML小鼠——PBMC导致重度xeno-GvHD;(iii)接受 2.5×10^6 个多供体CD4^{IL-10}细胞的AML小鼠;和(iv)以1:1或2:1的比例或不同的比例接受PBMC和多供体CD4^{IL-10}细胞的组合的AML小鼠。另外一组小鼠没有接受ALL-CML细胞,但在辐照之后第3天接受 5×10^6 个人PBMC。

[0761] 基于体重减轻、皮肤病变、皮毛状况、活动性、死亡率和长期存活率,测试多供体CD4^{IL-10}细胞对人PBMC诱导的xeno-GvHD的影响。基于循环中肿瘤细胞的减少和长期无肿瘤存活率,测试多供体CD4^{IL-10}细胞的抗肿瘤或移植物抗白血病(GvL)作用。

[0762] 对一些小鼠进行长达7周的监测,以监测长期存活率和肿瘤完全缓解。

[0763] 结果表明,多供体CD4^{IL-10}细胞有效抑制xeno-GvHD并治疗癌症。

[0764] 6.9.11. 实施例10:使用多供体CD4^{IL-10}细胞治疗癌症

[0765] 在NSG小鼠T细胞疗法的ALL-CM白血病模型中测试多供体CD4^{IL-10}细胞群。

[0766] 在第0天,对NSG小鼠进行亚致死辐照并静脉内注射髓系白血病细胞(ALL-CM) (5×10^6 个)(见图33A)。在第一组动物中,在第3天注射PBMC (5×10^6 个) 或单供体(来自供体BC-I和供体BC-H) CD4^{IL-10}细胞 (2.5×10^6 个)。在第二组动物中,第3天注射PBMC (5×10^6 个) 或多供体CD4^{IL-10}细胞 (2.5×10^6 个)。基于循环白血病细胞减少和长期无白血病存活率,在动物中测试移植物抗白血病(GvL)效应。白血病的测量如前所述(Locafaro G. et al Molecular Therapy 2017)。

[0767] 如图33B和图33C所示,注射ALL-CM髓系白血病细胞的所有小鼠在第17天均出现广泛的白血病进展。施用 5×10^6 个PBMC导致白血病进展的强烈抑制。令人感兴趣的是,较低数量(2.5×10^6 个)的单供体CD4^{IL10}(图33B)或多供体CD4^{IL10}(图33C)获得相当水平的白血病进展抑制。这些数据表明,单供体和多供体CD4^{IL10}具有强烈的直接抗髓系白血病作用。

[0768] 在注射ALL-CM髓系白血病细胞的小鼠中,进一步测试单供体CD4^{IL10}和多供体CD4^{IL10}与PBMC组合的移植物抗白血病(GvL)效应(见图34A)。施用 5×10^6 个PBMC导致强烈抑制白血病进展,并且 5×10^6 个PBMC与单供体CD4^{IL10} (2.5×10^6 个)组合施用具有协同作用(图34B)。令人感兴趣的是, 5×10^6 个PBMC与 2.5×10^6 个多供体CD4^{IL10}的组合施用具有相当的协同GvL效应(图34C)。这些数据表明,多供体CD4^{IL10}与PBMC协同作用以介导强烈的GvL效应。

[0769] 6.9.12. 实施例11:使用多供体CD4^{IL-10}细胞治疗慢性炎症性疾病和自身免疫性疾病

[0770] 许多慢性炎症性疾病和自身免疫性疾病涉及NLPR3炎症小体的激活。NLPR3炎症小体可以被“危险信号”激活,这导致胱天蛋白酶1介导的单核细胞/巨噬细胞产生促炎细胞因子IL-1 β 和IL-18。进行一系列体外实验,以研究多供体CD4^{IL-10}细胞对NLPR3炎症小体和人单核细胞产生IL-1 β /IL-18的影响。

[0771] 首先,通过Ficoll/Paque (Sigma-Aldrich) 上的标准密度离心从外周血分离人PBMC。根据生产商的说明,使用单核细胞分离试剂盒II (Miltenyi) 通过负选择从人PBMC分离单核细胞。优选进行负选择,因为正选择或粘附可导致非期望的细胞激活。在 2×10^5 个或 1×10^5 个多供体CD4^{IL-10}细胞/200 μ l/孔的存在下,将分离的单核细胞以 5×10^4 个细胞/200 μ

1铺板于96孔微量滴定板中含有3%人AB血清的无毒素培养基中。

[0772] 表2总结了对17组单核细胞施加的处理条件,每组包括6个细胞孔。已知单独的LPS可以激活人单核细胞,而不需要ATP提供的第二信号。

表 2					
组#	单核细胞	CD4 细胞/上清液	YVADfmk*	LPS**	其他
培养基对照					
孵育时间: 1.5 小时; 随后通过 LPS 激活 4 小时					
1	单核细胞	无	无	无	
2	单核细胞	无	无	LPS	
3	单核细胞	无	YVADfmk	LPS	
单核细胞和多供体 CD4 ^{IL-10} 细胞共培养					
4	单核细胞	CD4 ^{IL-10} 细胞	无	无	
5	单核细胞	CD4 ^{IL-10} 细胞	无	LPS	
6	单核细胞	CD4 ^{IL-10} 细胞	YVADfmk	LPS	
单核细胞和对照 CD4 GFP+细胞共培养					
7	单核细胞	CD4 GFP 细胞	无	无	
8	单核细胞	CD4 GFP 细胞	无	LPS	
9	单核细胞	CD4 GFP 细胞	YVADfmk	LPS	
在多供体 CD4 ^{IL-10} 细胞或 CD4 GFP+细胞培养物的上清液***的存在下培养单核细胞					
10	单核细胞	CD4 ^{IL-10} 细胞的 50%上清液	无	LPS	
11	单核细胞	CD4 ^{IL-10} 细胞的 25%上清液	无	LPS	
12	单核细胞	CD4 ^{IL-10} 细胞的 12.5%上清液	无	LPS	
13	单核细胞	CD4 ^{IL-10} 细胞的 50%上清液	无	LPS	抗 IL-10 抗体
14	单核细胞	CD4 GFP 细胞的 50%上清液	无	LPS	
15	单核细胞	CD4 GFP 细胞的 25%上清液	无	LPS	
16	单核细胞	CD4 GFP 细胞的 12.5%上清液	无	LPS	
17	单核细胞	CD4 GFP 细胞的 50%上清液	无	LPS	抗 IL-10 抗体

[0775] *YVADfmk是胱天蛋白酶1的特异性抑制剂。使用溶解在DMSO中的20mM Z-YVADfmk (Biovision, Enzo Life Sciences, 或Axxora Life Sciences)。

[0776] **LPS (Sigma-Aldrich) 100ng/mL

[0777] ***通过将CD4^{IL-10}或CD4 GFP细胞以 1×10^6 /mL孵育3天并收集上清液获得CD4^{IL-10}和CD4 GFP或NGFR培养物的上清液。通过IL-10特异性ELISA测量IL-10产生水平。

[0778] 经过表2中概述的处理之后,从每组的6个孔中收集上清液,并通过对成熟IL-1 β 或IL-18 (Biolegend) 特异的ELISA测量IL-1 β /IL-18产生。通过蛋白印迹分析从第3、10、13、14和17组的6个孔中收集的细胞,以确定激活的胱天蛋白酶1的水平。

[0779] 实验数据表明,多供体CD4^{IL-10}细胞下调由激活的单核细胞产生的IL-1 β 和IL-18。

它们进一步显示,多供体CD4^{IL-10}细胞下调激活的单核细胞中成熟胱天蛋白酶1产生。此外,多供体CD4^{IL-10}和由多供体CD4^{IL-10}产生的IL-10下调炎症小体。

[0780] 用人巨噬细胞或树突状细胞代替单核细胞进行类似实验。实验结果表明,多供体CD4^{IL-10}细胞还下调由激活的巨噬细胞和树突状细胞产生的IL-1 β 、IL-18和成熟胱天蛋白酶1。

[0781] 这些结果表明多供体CD4^{IL-10}细胞可以用于治疗涉及NLRP3炎症小体过度活跃的疾病或紊乱。特别地,多供体CD4^{IL-10}细胞可以用于治疗慢性炎症性疾病和自身免疫性疾病。NLRP3炎症小体可以被外源性或内源性“危险信号”(例如病原体相关分子模式(PAMP)、二氧化硅、石棉、危险相关分子模式(DAMP),如受损线粒体的产物、坏死和应激细胞以及尿酸晶体)激活。

[0782] 6.9.13. 实施例12:多供体CD4^{IL-10}细胞上清液抑制NLRP3炎症小体激活以及人单核细胞产生IL-1 β 和IL-18

[0783] 使用泛单核细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)从PBMC分离CD14⁺单核细胞,并将其以每孔 2×10^5 个/200 μ L铺板于96个平底微量滴定孔中,并在LPS的存在下培养。在Z-YVADfmk (20 μ M)、MCC950 (10 μ M)、IL-10 (10ng/mL)或如表1所总结的不同浓度的单一或合并的供体CD4^{IL-10}细胞上清液的存在下进一步培养细胞。

[0784] 从用CD3抗体和CD28抗体的组合激活72小时的单一或合并的供体CD4^{IL-10}细胞获得上清液,如先前所描述的(Andolfi et al. 2012, Mol. Therapy Vol. 20, 1778-1790, Locafaro et al. Mol Ther 2017, 25, 2254)。在一些情况下(图35C和35D),将单核细胞与LPS和NLRP3炎症小体激活剂尼日利亚菌素(“NIG”)的组合孵育,NIG在LPS激活的最后30分钟期间添加。

[0785] NLRP3炎症小体被LPS激活,导致成熟胱天蛋白酶1和生物活性形式的IL-1 β 和IL-18的产生。在不存在LPS激活的情况下铺板的单核细胞在孵育期间没有产生可检测水平的IL-10(未显示)。

[0786] 以50%、25%和12.5%的浓度添加单供体来源的CD4^{IL-10}细胞的上清液(含有1769pg IL-10/mL),分别以剂量依赖性方式抑制来自供体#1和#2的LPS激活的单核细胞产生IL-1 β (图35A和图35B)。用GFP转导的CD4⁺细胞上清液作为对照。在50%和25%的浓度观察到IL-1 β 产生的完全抑制,而50%的浓度的GFP转导的对照CD4⁺细胞上清液无效。

[0787] 在用LPS和尼日利亚菌素(“NIG”)激活的单核细胞上进一步测试不同浓度的CD4^{IL-10} T细胞上清液(50%、25%或12.5%)、Z-YVADfmk或MCC950。来自单供体(BC-E)或合并的供体CD4^{IL-10}细胞的上清液分别含有5295或3532pg IL-10/mL。单供体CD4^{IL-10}细胞的上清液也非常有效地抑制LPS诱导的由NLRP3炎症小体激活剂尼日利亚菌素增强的IL-1 β 产生(图35C和图35D)。

[0788] 数据表明,浓度为50%的CD4^{IL-10}细胞上清液与不可逆胱天蛋白酶1抑制剂Z-YVADfmk(Guo et al. 2015, Nature Med 21, 677)、选择性NLRP3炎症小体抑制剂MCC950(Coll et al. 2019, Nature Chem. Biol 15, 556)和重组IL-10一样有效,表明含有IL-10的上清液抑制NLRP3炎症小体激活和成熟胱天蛋白酶1产生,从而强烈抑制促炎细胞因子IL-1 β 的产生(图35A-35D)。

[0789] 在第二系列实验中,使用单供体(BC-E)的上清液和来自两个不同供体(BC-C/E)的

合并CD4^{IL-10}细胞获得相当的结果。CD4^{IL-10}细胞被CD3和CD28抗体的组合激活,如(Andolfi et al. 2012)所述。3天之后,收集CD4^{IL-10}细胞的上清液。这些上清液分别含有5295和3532pg IL-10/mL,并以剂量依赖性方式抑制供体#3的LPS诱导的单核细胞的IL-1 β 产生(图35E)。浓度为50%的上清液与Z-YVADfmk和MCC950一样有效。合并的CD4^{IL-10}细胞上清液的抑制作用被抗IL-10受体抗体完全中和。类似地,来自3个不同供体的合并的上清液含有2589pg IL-10/mL,剂量依赖性地抑制来自供体#4的单核细胞产生IL-1 β (图35F)。上清液的抑制作用被IL-10受体抗体完全中和,表明NLRP3激活由IL-10介导。结果表明,多供体CD4^{IL-10}T细胞产生的IL-10强烈抑制促炎细胞因子IL-1 β 的产生。如预期的,抗IL-10受体抗体对Z-VADfmk和MCC950介导的IL-1 β 产生的抑制没有影响(图35E)。

[0790] 在由LPS和尼日利亚菌素激活的供体#4的单核细胞上进一步测试CD4^{IL-10}T细胞。测试不同浓度的分别含有2583或2589pg IL-10/mL的单供体(BC-V)或多供体(三个供体;BC-T/U/V)CD4^{IL-10}细胞上清液、ZYVADfmk或MCC950。图35G中提供的数据显示,3个不同供体(BC-T-U-V)的合并上清液下调LPS与尼日利亚菌素的组合诱导的IL-18产生。

[0791] 总之,这些数据表明,单供体和多供体CD4^{IL-10}细胞产生的IL-10强烈下调NLRP3炎症小体,导致强烈抑制促炎细胞因子IL-1 β 和IL-18。

[0792] 6.9.14. 实施例13:单供体和多供体CD4^{IL-10}细胞抑制体内xeno GvHD和髓系肿瘤生长

[0793] 如Andolfi et al. Mol Ther 2012,20,177和Locafaro et al. Mol Ther 2017,25,2254所述,测试单供体(BC-T、BC-V和BC-E)或多供体(BC-V/T/E)CD4^{IL-10}细胞的功能特性和质量。单供体和多供体CD4^{IL-10}细胞均产生高水平的IL-10、可变水平的IFN- γ 、非常低水平的IL-4,以及不可检测的IL-2(后者未显示),反映了Tr1细胞的特征性细胞因子产生特征(图37)。

[0794] 此外,在同种异体PBMC上体外测量单供体(BC-T、BC-V和BC-E)或多供体(BC-V/T/E)CD4^{IL-10}细胞对CD4⁺和CD8⁺T细胞增殖的抑制能力。PBMC用eFluor670(Invitrogen)标记。标记的PBMC(1×10^5 个)用固定的CD3(10mg/mL)和可溶性CD28抗体(1mg/mL)激活。将单供体和多供体CD4^{IL-10}细胞以1:1的比例添加至96孔圆底板中,最终体积为0.2mL。共培养4天之后,使用流式细胞术通过eFluor670稀释确定它们对eFluor670标记的应答细胞的增殖的抑制作用,如(Locafaro et al. Mol Ther 2017,25,2254)所述。图38提供了流式细胞术的结果。单供体和多供体CD4^{IL-10}细胞将同种异体CD4⁺和CD8⁺T细胞的体外增殖强烈抑制超过80%(图38)。

[0795] 进一步分析CD4^{IL-10}细胞对髓系白血病细胞(ALL-CM)和红系白血病细胞系(K562)的细胞毒性作用。单供体(BC-E和BC-V)或多供体(BC-V/T/E)CD4^{IL-10}细胞与ALL-CM或K562细胞以1:1的比例共培养。

[0796] 3天后收获细胞,并计数存活CD45^低,CD3-靶细胞,并通过FACS进行分析,如(Locafaro et al. Mol Ther 2017,25,2254)所述。单供体和多供体CD4^{IL-10}细胞还介导对ALL-CM髓系肿瘤细胞的强烈的直接细胞毒性作用,但它们无法杀死敏感的K562细胞(其缺乏细胞毒性活性所需的I类MHC表达)(图39)。单供体(BC-E和BC-V)或多供体(BC-V/T/E)CD4^{IL-10}细胞对这两种靶细胞系(ALL-CM和K562)具有的细胞毒活性相当。

[0797] 还使用人源化xeno GvHD疾病模型(静脉内注射ALL-CM细胞(2.5×10^6 个)的NSG小

鼠)在体内测试单供体(BC-E)和多供体(BC-V/T/E)CD4^{IL-10}细胞的细胞毒性作用。如图36所示,测试它们对由来自同种异体供体的人PBMC诱导的GvHD的影响以及在治疗背景下它们对细胞系ALL CM的急性髓系白血病生长的影响。

[0798] 从Charles-River Italia (Calco, Italy) 获得八至十周龄的雌性NOD scid gamma (NSG) 小鼠。实验方案已获得Ospedale San Raffaele动物研究内部委员会(机构动物护理和使用委员会(IACUC))的批准。在第0天,小鼠接受来自直线加速器的全身辐照。在第0天注射ALL-CM细胞(2.5×10^6 个)。在第0天,不同组的小鼠未注射任何物质、注射同种异体PBMC(2.5×10^6 个)、与同种异体PBMC(2.5×10^6 个)组合的单供体(BC-E, 2.5×10^6 个)或多供体CD4^{IL-10}细胞(来自3个不同的供体(BC-V/T/E, 2.5×10^6 个)以1:1:1的比例合并),或在第3天多供体CD4^{IL-10}细胞(2.5×10^6 个)。所有细胞在250 μ L体积的Iscove改良的Dulbecco培养基中静脉内施用。每周监测小鼠3-4次。

[0799] 将NSG小鼠分成五个组,每组5只小鼠,并且在第0天每组接受以下处理:(i) 无处理作为对照;(ii) 同种异体单核细胞(PBMC);(iii) 同种异体PBMC和多供体CD4^{IL-10}细胞(BC-V/T/E);(iv) 同种异体PBMC和单供体CD4^{IL-10}细胞(BC-E);或(v) 在第3天施用的多供体(BC-V/T/E)CD4^{IL-10}细胞。如前所述(Locafaro et al. Mol Ther 2017, 25, 2254) 测量髓系白血病进展。

[0800] 向NSG小鼠施用ALL-CM细胞导致这些细胞快速扩增,并且所有小鼠在第20天死亡或不得被处死。如预期的,注射PBMC防止白血病进展。单供体和多供体CD4^{IL-10}细胞与同种异体PBMC组合给予不干扰PBMC的抗髓系白血病作用。

[0801] 在施用ALL-CM细胞后3天(此时这些细胞已在大量扩增),注射多供体CD4^{IL-10}(BC-V/T/E)细胞导致肿瘤生长的抑制。这些结果表明,多供体CD4^{IL-10}细胞在体内具有直接的抗髓系白血病治疗作用(图40)。

[0802] 然而,尽管PBMC具有有益的抗髓系白血病作用,但PBMC诱导极重度形式的xeno-GvHD,并且所有小鼠在第24天死亡(图41)。在本研究中,测试单供体(BC-E)和多供体(BC-V/T/E)CD4^{IL-10}细胞在施用于NSG小鼠后抑制PBMC诱导的xeno-GvHD的能力。在第0天,NSG小鼠注射ALL-CM细胞(2.5×10^6 个)。将小鼠分成五组,并且每组接受以下处理:(i) 无处理作为对照;(ii) 同种异体单核细胞(PBMC);(iii) 同种异体PBMC和多供体(BC-V/T/E)CD4^{IL-10}细胞(BC-E、BC-V、BC-T);(iv) 同种异体PBMC和单供体CD4^{IL-10}细胞(BC-E)或在第3天注射多供体(BC-V/T/E)CD4^{IL-10}细胞。在动物中,xeno-GvHD通过存活率和体重减轻进行测量。此外,还监测弓背、皮毛状况和皮肤完整性,如(Bondanza et al, Blood, 2006, 107, 1828)所述。如果体重减轻大于20%,则出于道德原因处死小鼠。图41显示了在第1天注射ALL-CM细胞(2.5×10^6 个)并且随后用PBMC(有或没有单供体或多供体CD4^{IL-10}细胞)处理后每天的无GvHD的NSG小鼠%。

[0803] 结果表明,多供体CD4^{IL-10}细胞不诱导xeno-GvHD,并且下调同种异体PBMC诱导的xeno-GvHD。总之,这些结果表明多供体CD4^{IL-10}细胞下调重度xeno-GvHD,在治疗环境中具有直接的抗髓系白血病作用,并且不干扰PBMC的保护性抗髓系白血病作用。

[0804] 6.9.15. 实施例14:源自四个不同供体的多供体CD4^{IL-10}细胞的过继转移

[0805] 测试源自四个不同供体的多供体CD4^{IL-10}细胞的过继转移抑制PBMC诱导的xeno-GvHD的转移能力。

[0806] 在这些实验中,在同种异体PBMC诱导的GvHD人源化小鼠模型中测试单供体CD4^{IL-10}细胞(供体C;批次C)和源自4个不同供体(供体C、E、F和H;批次CEFH)的多供体CD4^{IL-10}细胞。在该模型中,NSG小鼠在第0天接受亚致死辐照,并在第3天注射(缓慢静脉内推注)(i)2.5E+06个同种异体PBMC,(ii)2.5E+06个同种异体PBMC与2.5E+06个单供体CD4^{IL-10}细胞(批次C)的组合,(iii)2.5E+06个同种异体PBMC与2.5E+06个多供体CD4^{IL-10}细胞(批次CEFH)的组合,或(iv)单独注射2.5E+06个多供体CD4^{IL-10}细胞(批次CEFH)。使用体重减轻、皮毛外观、皮肤外观、弓背和活动性的综合评分来确定GvHD(参见Bondanza A,et al.Blood2006;107:1828-36)。如图42所示,在研究结束时仅施用多供体CD4^{IL-10}细胞的小鼠才100%无GvHD。

[0807] 总之,这些数据表明,源自四个不同供体的多供体CD4^{IL-10}细胞的过继转移抑制PBMC诱导的xeno-GvHD,并且不诱导xeno GvHD。

[0808] 6.9.16. 实施例15: IL-10变体的生成

[0809] 根据其他物种的IL-10序列,通过引入氨基酸修饰(例如,取代、插入、缺失)来生成人IL-10的变体。修饰位点通过如图43A提供的序列比对来确定。根据比对识别物种间具有不同氨基酸的氨基酸位置,并通过引入氨基酸的取代、插入或缺失进行修饰。

[0810] 图43B提供了人IL-10变体的两个实例。通过在相应位置用病毒IL-10(EBVB9)的三种不同氨基酸(E、A和D)取代人IL-10的三种氨基酸(D、I和A)生成可能的huIL-10杂交体#1(SEQ ID NO:21)。通过在相应位置用病毒IL-10(EBVB9)的另一个氨基酸(A105)取代人IL-10的一个氨基酸(I105)生成可能的huIL-10杂交体#2(SEQ ID NO:22)。图43C显示了人IL-10(SEQ ID NO:1)与IL-10EBVB9(SEQ ID NO:18)的比对,其中“*”表示IL-10杂交体#1中被取代的一个或更多个氨基酸位置,并且“#”表示IL-10杂交体#2中优选的I105至A105氨基酸取代。

[0811] 如上文所述,将人IL-10的变体克隆到表达载体中,并且测试变体蛋白的表达和功能。选定的人IL-10变体用于生成CD4^{IL-10}细胞。CD4^{IL-10}细胞的效率如本文所提供的进行测试。

[0812] 6.9.17. 实施例1-11的另外实验方法和材料

[0813] 细胞制备和细胞系.通过Ficoll-Hypaque梯度离心制备外周血单核细胞(PBMC)。使用CD4⁺ T细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotec,Bergisch Gladbach,Germany)纯化CD4⁺ T细胞,所得纯度>95%。成熟树突状细胞(DC)由外周血CD14⁺单核细胞生成,使用CD14⁺微珠(Miltenyi Biotec,Germany)根据生产商的说明进行正选择,并且在10ng/mL重组人(rh)IL-4(R&D Systems,Minneapolis MN,USA)和100ng/mL rhGM-CSF(Genzyme,Seattle,WA,USA)的存在下,于37℃在补充有10%胎牛血清(FBS;Lonza,Italy)、100U/mL青霉素/链霉素(Lonza,Italy)、2mM L-谷氨酰胺(Lonza,Italy)的RPMI 1640(Lonza,Italy)中培养5天,并用1mg/mL的脂多糖(LPS,Sigma,CA,USA)另外成熟两天。

[0814] 质粒构建.从pH15C(ATCC n°68192)切下人IL-10的编码序列,并将549bp片段克隆到pBluKSM(Invitrogen)的多克隆位点中,以得到pBluKSM-hIL-10。从pBluKSM-hIL-10切下hIL-10,得到555bp的片段并与1074.1071.hPGK.GFP.WPRE.mhCMV.dNGFR.SV40PA(本文命名为LV-ΔNGFR)连接,以得到LV-IL-10/ΔNGFR。双向启动子(人PGK启动子加反向的CMV启动子的最小核心元件)的存在允许两个转基因共表达(Locafaro et al.Mol Ther.2017;25(10):2254-2269)。通过焦磷酸测序(Primm)验证LV-IL-10/ΔNGFR的序列。

[0815] 载体产生和滴定.VSV-G-假型第三代双向慢病毒载体由Ca₃PO₄瞬时共转染四种质粒到293T细胞中产生,并通过超速离心进行浓缩,如(Locafaro et al.Mol Ther.2017;25(10):2254-2269)所述。通过有限稀释来估算滴度,通过HIV-1Gag p24抗原免疫捕获(NEN Life Science Products;Waltham,MA)来测量载体颗粒,并且将载体感染性计算为滴度和颗粒之间的比率。滴度范围为 5×10^8 至 6×10^9 转导单位/mL,并且感染性范围为 5×10^4 至 10^5 转导单位/ng p24。

[0816] CD4^{IL-10}细胞系的生成.多克隆CD4转导细胞如前所述(Andolfi et al.Mol Ther.2012;20(9):1778-1790)获得。简言之,将CD4纯化的T细胞用可溶性抗CD3单克隆抗体(mAb,30ng/mL,OKT3,Janssen-Cilag,Raritan,NJ,USA)、抗CD28 mAb(1μg/mL,BD)和rhIL-2(50U/mL,PROLEUKIN,Novartis,Italy)激活48小时。T细胞用LV-IL-10/ Δ NGFR(CD4^{IL-10})转导,感染复数(MOI)为20。在第11天,使用CD271⁺微珠(Miltenyi Biotec,Bergisch Gladbach,Germany)对CD4⁺ Δ NGFR⁺细胞进行珠选,并在含5%人血清(BioWhittaker-Lonza,Washington)、100U/mL青霉素-链霉素(BioWhittaker)和50U/mL rhIL-2(PROLEUKIN,Novartis,Italy)的X-VIVO15培养基中扩增。在第7天和第10天,将培养基替换为补充有50U/mL rhIL-2的新鲜培养基。在第14天,收集、洗涤细胞,并如前所述(Andolfi et al.Mol Ther.2012;20(9):1778-1790)用同种异体饲养混合物再刺激。14天之后,收集并冷冻细胞。对解冻的CD4^{IL-10}细胞进行再刺激,并在第2次和第3次再刺激和扩增之后在体外进行功能表征并用于体内实验。

[0817] 载体拷贝数分析.转导后培养细胞11天,以去除未整合的载体形式。根据生产商的说明,使用QIAamp DNA Blood Mini Kit(QIAGEN,51106)分离基因组DNA。根据生产商的说明,通过QX200 Droplet Digital PCR System(Bio-Rad)定量载体整合。

[0818] 细胞因子测定.为了测量细胞因子产生,在第2次和第3次再刺激之后,单供体和多供体CD4^{IL-10}细胞不再被刺激或用固定的抗CD3(10μg/mL)和可溶性抗CD28(1μg/mL)mAb在最终体积为200μL的培养基中进行刺激(96孔圆底板, 2×10^5 个/孔)。培养48小时之后收获上清液,并根据生产商(BD Biosciences)的说明通过ELISA测定IL-10、IL-4、IL-5、IFN- γ 和IL-22的水平。

[0819] 流式细胞术分析.对于颗粒酶B的表达(克隆MHGB04,Invitrogen,USA),在用CD4表面染色之后,根据生产商的说明使用BD Cytofix/CytopermTM试剂盒(货号554714,Biolegend,USA)对CD4^{IL-10}细胞进行固定、透化和染色。用补充有1% FBS的PBS洗涤染色细胞两次,并用BD LSRFortessa利用FlowJo 10软件进行分析。

[0820] 杀伤测定.在第2次和第3次再刺激之后,在共培养实验中分析单供体和多供体CD4^{IL-10}细胞的细胞毒性。简言之,分别使用非髓系白血病和髓系白血病细胞系K562和ALL-CM作为靶细胞,并以1:1的比例(10^5 个靶细胞和 10^5 个CD4^{IL-10}细胞)铺板3天。在共培养结束时,收获细胞并通过FACS分析和计数K562和ALL-CM细胞。

[0821] 抑制测定.为了测量单供体和多供体CD4^{IL-10}细胞的抑制能力,在用同种异体成熟DC(5×10^4 个细胞/孔)和可溶性抗CD3(50ng/mL)mAb刺激之前,根据生产商的说明,用细胞增殖染料eFluor® 670(Invitrogen,CA,USA)标记同种异体PBMC。PBMC和抑制细胞以1:1的比例添加(10^5 个PBMC和 10^5 个CD4^{IL-10}细胞)。培养3天之后,通过FACS分析CD4⁺ Δ NGFR⁻或CD8⁺ Δ NGFR⁻T细胞的eFluor670稀释度来确定应答细胞的增殖。

[0822] 移植物抗宿主病模型:所有实验中均使用6/8周龄雌性NSG小鼠。在第0天,根据小鼠的体重,小鼠接受来自直线加速器的175-200cGy单剂量全身辐照,并静脉注射PBMC细胞(5×10^6 个),或CD4^{IL-10}细胞(单供体或多供体——三个供体的合并池—— 5×10^6 个或 2.5×10^6 个),或PBMC(5×10^6 个)与CD4^{IL-10}细胞(5×10^6 个或 2.5×10^6 个)的组合。如前所述(Bondanza et al.Blood.2006;107(5):1828-1836)监测存活率、体重减轻、活动性、皮毛、皮肤和弓背,每周至少3次。出于道德原因,当小鼠体重减轻20%时,则被实施安乐死。

[0823] 可选地,在第0天,小鼠接受如上所述的全身辐照。在第3天,给小鼠注射CD4⁺ T细胞(5×10^6 个或 2.5×10^6 个)、单供体和多供体(三个供体的合并池)CD4^{IL-10}细胞(5×10^6 个或 2.5×10^6 个),或CD4⁺ T细胞(5×10^6 个或 2.5×10^6 个)与单供体和多供体(三个供体的合并池)CD4^{IL-10}细胞(5×10^6 个或 2.5×10^6 个)的组合。如上所示监测GvHD诱导。

[0824] 7.通过引用并入

[0825] 本申请中引用的所有出版物、专利、专利申请和其他文件在此通过引用以其全文并入用于所有目的,其程度如同每个单独的出版物、专利、专利申请或其他文件被单独指明为通过引用并入用于所有目的。

[0826] 8.等同方案

[0827] 虽然已经说明和描述了各种具体实施方案,但上述说明并非限制性的。应理解,在不背离本发明的精神和范围的情况下,可以进行各种改变。在阅读本说明书后,许多变化对于本领域技术人员而言将是明显的。

[0828] 9.序列

[0829] SEQ ID NO:1(人IL-10氨基酸序列——蛋白序列:Ref P22301)

[0830] MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPLNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNL
LLKESLLEDKGYLGCGALSEMIQFYLEEVMQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRLRRCHR
FLPCENKSKAVEQVKNFAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN

[0831] SEQ ID NO:2(人IL-10示例性多核苷酸序列)

[0832] ATGCACAGCTCAGCACTGCTCTGTTGCCTGGTCTCCTGACTGGGGTGAGGGCCAGCCCAGGCC
AGGGCACCCAGTCTGAGAACAGCTGCACCCACTTCCCAGGCAACCTGCCTAACATGCTTCGAGA
TCTCCGAGATGCCTTCAGCAGAGTGAAGACTTTCTTTCAAATGAAGGATCAGCTGGACAACCTTG
TTGTTAAAGGAGTCCTTGCTGGAGGACTTTAAGGGTTACCTGGGTTGCCAAGCCTTGCTCTGAGA
TGATCCAGTTTTACCTGGAGGAGGTGATGCCCCAAGCTGAGAACCAAGACCCAGACATCAAGGC
GCATGTGAACCTCCCTGGGGGAGAACCTGAAGACCCTCAGGCTGAGGCTACGGCGCTGTTCATCGA
TTTCTTCCCTGTGAAAACAAGAGCAAGGCCGTGGAGCAGGTGAAGAATGCCTTTAATAAGCTCC
AAGAGAAAGGCATCTACAAAGCCATGAGTGAGTTTGACATCTTCATCAACTACATAGAAGCCTA
CATGACAATGAAGATACGAAACTGA

[0833] SEQ ID NO:3(Δ NGFR氨基酸序列)

[0834] MGAGATGRAMDGPRLLLLLLLGVSLGGAKEACPTGLYTHSGECCKACNLGEGVAQPCGANQTV
EPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTECVGLQSMSAPCVEADDAVCRCAYGYQDETTGRCEACRVC
EAGSGLVFSQDKQNTVCEECPDGTYSDEANHVDPCLPCTVCEDTERQLRECTRWADAECEEIP
GRWITRSTPPEGSDSTAPSTQEPEAPPEQDLIASTVAGVVTTVMGSSQPVVTRGTTDNLIPVYC
SILAAVVVGLVAYIAFKRWNRGIL

[0835] SEQ ID NO:4(Δ NGFR示例性多核苷酸序列)

[0836]

ATGGGGGCAGGTGCCACCGGCCGCGCCATGGACGGGGCCGCGCCTGCTGCTGTTGCTGCTTCTGG
GGGTGTCCCTTGAGAGTGCCAAGGAGGCATGCCCCACAGGCCTGTACACACACAGCGGTGAGTG
CTGCAAAGCCTGCAACCTGGGCGAGGGTGTGGCCAGCCTTGTGGAGCCAACCAGACCGTGTGT
GAGCCCTGCCTGGACAGCGTGACGTTCTCCGACGTGGTGAGCGCGACCGAGCCGTGCAAGCCGT
GCACCGAGTGCGTGGGGCTCCAGAGCATGTCGGCGCCGTGCGTGAGAGGCCGACGACGCCGTGTG
CCGCTGCGCCTACGGCTACTACCAGGATGAGACGACTGGGCGCTGCGAGGCCTGCCGCGTGTGC
GAGGCGGGCTCGGGCCTCGTGTCTCTGCTGCCAGGACAAGCAGAACACCGTGTGCGAGGAGTGCC
CCGACGGCACGTATTCCGACGAGGCCAACCACGTGGACCCGTGCCTGCCCTGCACCGTGTGCGA
GGACACCGAGCGCCAGCTCCGCGAGTGACACGCTGGGCCGACGCCGAGTGCGAGGAGATCCCT

[0837]

GGCCGTTGGATTACACGGTCCACACCCCCAGAGGGCTCGGACAGCACAGCCCCAGCACCCAGG
AGCCTGAGGCACCTCCAGAACAAGACCTCATAGCCAGCACGGTGGCAGGTGTGGTGACCACAGT
GATGGGCAGCTCCCAGCCCGTGGTGACCCGAGGCACCAACCTCATCCCTGTCTATTGC
TCCATCCTGGCTGCTGTGGTTGTGGGCCTTGTGGCCTACATAGCCTTCAAGAGGTGGAACAGG
GGATCCTCTAG

[0838] SEQ ID NO:5 (pLV-IL10的核苷酸序列):

TGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACAT
TACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGT
TCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCG
CCCCACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGA
CTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGT
GTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTAT
GCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTA
TTACCATGTTGATGCGGTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGG
ATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGGTGGCACCAAAATCAACGGGGAC
TTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGG
AGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCC
TGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCCTGAGTGC
TTCAAGTAGTGTGTGCCGCTGTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCCTTTTA
GTCAGTGTGGAATACTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAG
AGGAGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGGCAGGGGCGGCG
ACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGC
GTCAGTATTAAGCGGGGAGAAATTAGATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAA
AGAAAAAATATAAATTAAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTTCGAGTTAA
TCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTT
CAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATC
AAAGGATAGAGATAAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAAACAAAAG
TAAGACCACCGCACAGCAAGCGGCCGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAA
TTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACC
AAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGACAGAGAGAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCCCTTG
GGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAG
ACAATTATTGTCTGGTATAGTGACGACGAGACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAG
CATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGAAAA
GATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTGGGGTTGCTCTGGAAGCAATTTGGAATCACACGACC
TGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAAT
CGCAAAACCAGCAAGAAAAAGAAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTG
GAATTGGTTTAACATAACAAAATTGGCTGTGGTATATAAAATTATTATATAGTAGTAGGAGGC
TTGGTAGGTTTAAGAATAGTTTTTGTCTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATT
CACCATTATCGTTTCAGACCCACCTCCCAACCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGA
AGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTTCGATTAGTGAACGGATCTCGACGGTAT
CGGTAACTTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACA
TAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTAT
CGATCACGAGACTAGCCTCGAGAGATCTGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTT
ACTTGCTTTAAAAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTT
GTTGTTAACTTGTTTATTGACGCTTATAATGGTTACAAATAAGGCAATAGCATCACAAATTTCA
CAAATAAGGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTTTGGTTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTA
TCATGTCTGGATCTCAAATCCCTCGGAAGCTGCGCCTGTCTTAGGTTGGAGTGATACATTTTTTA
TCACTTTTACCCGTCTTTGGATTAGGCAGTAGCTCTGACGGCCCTCCTGTCTTAGGTTAGTGAA

[0839]

[0840]

AAATGTCACTCTCTTACCCGTCATTGGCTGTCCAGCTTAGCTCGCAGGGGAGGTGGTCTGGATC
CACCATGTCTAGAGGATCCCCCTGTTCCACCTCTTGAAGGCTATGTAGGCCACAAGGCCACAA
CCACAGCAGCCAGGATGGAGCAATAGACAGGGATGAGGTTGTGCGTGGTGCCTCGGGTCAACCAC
GGGCTGGGAGCTGCCCATCACTGTGGTCAACCACACCTGCCACCGTGTGGCTATGAGGTCTTGT
TCTGGAGGTGCCTCAGGCTCCTGGGTGCTGGGGGCTGTGCTGTCCGAGCCCTCTGGGGGTGTGG
ACCGTGTAAATCCAACGGCCAGGGATCTCCTCGCACTCGGCGTGGGCCAGCGTGTGCACTCGCG
GAGCTGGCGCTCGGTGTCTCGCACACGGTGCAGGGCAGGCACGGGTCCACGTGGTTGGCCTCG
TCGGAATACGTGCCGTGCGGGCACTCCTCGCACACGGTGTCTGTCTGTCTGGCAGGAGAACA
CGAGGCCCCGAGCCCGCTCGCACACGCGGCACGCTCGCAGCGCCAGTCGTCTCATCCTGGTA
GTAGCCGTAGGCGCAGCGGCACACGGCGTCTGTCGGCTCCACGCACGGCGCCGACATGCTCTGG
AGCCCCACGCACTCGGTGCACGGCTTGACGGCTCGGTGCGCTCACCACGTGCGGAGAAGCTCA
CGCTGTCCAGGCAGGGCTCACACACGGTCTGGTTGGCTCCACAAGGCTGGGCCACACCCCTCGCC
CAGGTTGCAGGCTTTGCAGCACTCACCGCTGTGTGTGTACAGGCCTGTGGGGCATGCCTCCTTG
GCACCTCCAAGGGACACCCCCAGAAGCAGCAACAGCAGCAGGCGCGGGCCGTCATGGCGCGGC
CGGTGGCACCTGCCCCCATCGCCCGCTCCCGCGGCAGCGCTCGACTTCCAGCTCGGTCCGCTT
TGCGGACTGATGGGGCTGCGCTGCGCTGCGCTCCAGCGCCCCCTGCCCCGCGGAGCTGGCCG
CGGCCCCGAATTCCTGCAGGAATTCGATGGAGGCTGGATCGGTCCCGGTGTCTTCTATGGAGGTC
AAAACAGCGTGGATGGCGTCTCCAGGCGATCTGACGGTTCCTAAACGAGCTCTGCTTATATAG
GCCTCCCACCGTACACGCCTACCTCGAGAAGCTTGATATCGAATTCACGCGGGTTGGGGTTG
CGCCTTTTCCAAGGCAGCCCTGGGTTTGCGCAGGGACGCGGTGCTCTGGGCGTGGTTCCGGGA
AACGCAGCGGCGCCGACCCTGGGTCTCGCACATTCTTACGTCCGTTTCGCAGCGTCACCCGAT
CTTCGCGCTACCTTGTGGGCCCCCGGCGACGCTTCTGCTCCGCCCTAAGTCGGGAAGGT
TCCTTGCGGTTTCGCGGCGTGCCGGACGTGACAAACGGAAGCCGCACGTCTCACTAGTACCTCG
CAGACGGACAGCGCCAGGGAGCAATGGCAGCGCGCCGACC GCGATGGGCTGTGGCCAATAGCGG
CTGCTCAGCGGGGCGCGCCGAGAGCAGCGGCCGGGAAGGGGCGGTGCGGGAGGCGGGGTGTGGG
GCGGTAGTGTGGGCCCTGTTCTGCCCCGCGCGGTGTTCCGCATTCTGCAAGCCTCCGGAGCGCA
CGTCGGCAGTCGGCTCCCTCGTTGACCGAATCACCGACCTCTCTCCCAGGGGGATCCCCGGTC
TGCAGGAATTCATGCACAGCTCAGCACTGCTCTGTTGCCTGGTCTCTCTGACTGGGGTGAGGGC
CAGCCCAGGCCAGGGCAGCCAGTCTGAGAACAGCTGCACCCACTTCCCAGGCAACCTGCCTAAC
ATGCTTCGAGATCTCCGAGATGCCTTCAGCAGAGTGAAGACTTTCTTTCAAATGAAGGATCAGC
TGGACAACTTGTTGTTAAAGGAGTCCTTGTGAGGACTTTAAGGGTTACCTGGGTTGCCAAGC
CTTGCTCGAGATGATCCAGTTTTACCTGGAGGAGGTGATGCCCCAAGCTGAGAACCAAGACCCA
GACATCAAGGCGCATGTGAATCCCTGGGGGAGAACCTGAAGACCCTCAGGCTGAGGCTACGGC
GCTGTCACTGATTTCTTCCCTGTGAAAACAAGAGCAAGGCCGTGGAGCAGGTGAAGAATGCCTT
TAATAAGCTCCAAGAGAAAGGCATCTACAAAGCCATGAGTGAGTTTGACATCTTCATCAACTAC
ATAGAAGCCTACATGACAATGAAGATACGAAACTGAGTCGAGAATCAACCTCTGGATTACAAAA
TTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACATATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGC
TTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTTCATTTTCTCTCCTTGATATAA
TCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTGAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCA
CTGTGTTTGTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTGAGCTCCTTTCCGG
GACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACCTCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGC
TGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTGCGGGGAAATCATCGTCCT
TTCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCTTCTGCTACGTCCC
TTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCTTCCCGCGGCTGCTGCGGCTCTGCGGCTCTTCCG
CGTCTTCGCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCGGCTCCCCGCTGGAATTC
GAGCTCGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAA
GAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACTCCCAACGGAAGACAAGATCTGCTTTTTGCTTGTA
CTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACT
GCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCGCTGTGTTGTGTGAC
TCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTAGTAGTT

[0841]

CATGTCATCTTATTATTCAGTATTTATAACTTGC AAAAGAAATGAATATCAGAGAGTGAGAGGAA
CTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAA
GCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCT
GGCTCTAGCTATCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCCAT
TCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCCTCTG
AGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCCTCGAGACGTACCC
AATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACGCGCGCTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACT
GGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCG
TAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAAGCGGCCGCACGCTCAGTGAACGAAAA
CTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAACAATAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAG
GGGTGTTATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCTTGCTCTAGGCCGCGATTAAATTCCAACATG
GATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCT
ATCGATTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGC
CAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACC
ATCAAGCATTTTATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTTACTCACCCTGCGATCCCCGGGAAAA
CAGCATTCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTAGGTGAAAACATTGTTGATGCGCTGGCAGT
GTTCTGCGCCGGTTGCATTGATTCTGTTTGTAAATTGTCCTTTTAAACAGCGATCGCGTATTT
CGTCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTGATGACG
AGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAACTTTTGCCATTCTCACC
GGATTGAGTCGTCACTCATGGTGATTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTA
ATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATACCAGGATCTTGCCATCCTAT
GGAATGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCATTACAGAAACGGCTTTTTCAAAAATATGGTATTGA
TAATCCTGATATGAATAAATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAAGAATTAATT
CATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGACTATGT
CTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCC
GTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAA
CAAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTGGTTTGGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCC
GAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTA
GGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAG
TGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGA
TAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACC
TACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAA
AGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGG
GGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTT
TTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTTACGGT
TCCTGGCCTTTTTGCTGGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGA
GCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAG
AGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCGCGCGTGTGATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGG
AATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCCGAAT
TAACCCTCACTAAAGGGAACAGCTAGC

[0842] SEQ ID NO:6 (病毒白介素-10同源物亦称白介素-10BCRF1亦称IL10H_EBV9) 蛋白
序列:

[0843] Ref:P03180

[0844] MERRLVVTLQCLVLLYLAPECGGTDQCDNFPQMLRDLRDAFSRVKTFQTKDEVNLLKESLL
EDFKGYLGCAQALSEMIQFYLEEVMQAENQDPEAKDHVNSLGENLKTLLRLRCHRFLPCENK
SKAVEQIKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTIKAR

[0845] SEQ ID NO:7 (病毒白介素-10同源物cDNA序列)

[0846] 核苷酸序列 (cDNA):Ref:NC_007605.1

- 5' _ATGGAGCGAAGGTTAGTGGTCACTCTGCAGTGCCTGGTGCTGCTTTACCTGGCACCTGAGT
GTGGAGGTACAGACCAATGTGACAATTTTCCCCAAATGTTGAGGGACCTAAGAGATGCCTTCAG
TCGTGTTAAAACCTTTTCCAGACAAAGGACGAGGTAGATAACCTTTTCTCAAGGAGTCTCTG
CTAGAGGACTTTAAGGGCTACCTTGGATGCCAGGCCCTGTGAGAAATGATCCAATTCTACCTGG
[0847] AGGAAGTCATGCCACAGGCTGAAAACCAGGACCCTGAAGCCAAAGACCATGTCAATTCTTTGGG
TGAAAATCTAAAGACCCTACGGCTCCGCCTGCGCAGGTGCCACAGGTTCTGCCGTGTGAGAAC
AAGAGTAAAGCTGTGGAACAGATAAAAAATGCCTTTAACAAGCTGCAGGAAAAAGGAATTTACA
AAGCCATGAGTGAATTTGACATTTTTTATTAACATACATAGAAGCATACATGACAATTAAAGCCAG
GTGA_3'
- [0848] SEQ ID NO:9 (抗CD19 CAR氨基酸序列)
MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDG
TVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEI
TGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWL
[0849] GVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQ
GTSVTVSSAAAPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFDTALAIVICSALAT
VLLALLILCVIYCKRQPRRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRS
ADAPAYQQQNQLYNELNLGRREYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY
SEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
- [0850] SEQ ID NO:10 (抗CD19 CAR多核苷酸序列)
ATGCTGCTGCTGGTCACCAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTCCCTCACCCCGCCTTTCTGCTTATCC
CGGACATTGATGACACAGACCACCTCGAGCTTGTCCGCTGCTGCGGATCGCGTGACCAT
CTCCTGCCGGGCCTCCCAAGACATTTCAAAGTATCTCAACTGGTACCAGCAGAAGCCGGACGGA
ACCGTGAAACTGCTGATCTACCATAACAGCCGCCTGCACTCCGGCGTGCCGTCCCGCTTCTCCG
GATCGGGTTCCGGAAGTACTACTGACTATCTCCAAGTGAACAAGAGGACATCGCCAC
TTACTTCTGTCAACAAGGAAATACCTTCCCTACACCTTCGGGGGGGGTACCAAGCTGGAGATC
ACTGGGGGCGGAGGCTCCGGTGGAGGCGGATCCGGCGGTGGAGGGAGCGAAGTCAAGCTGCAGG
AATCAGGACCAGGACTCGTGGCGCCATCCAGTCCCTGTCGGTGACCTGTACTGTCTCCGGAGT
CAGCTCCCCGATTACGGAGTGTGATGGATTAGGCAACCCCCAAGAAAAGGGCTGGAATGGCTC
GGAGTGATCTGGGGCTCCGAAACCACCTACTACAACCTCGGCGCTGAAGTCCCGGCTGACCATCA
TCAAGGACAACCTCAAGAGCCAAGTGTTCTTGAAGATGAACAGCTTGAGACCGACGATACCGC
[0851] AATCTACTACTGTGCCAAGCACTATTACTACGGGGGGTCTTACGCCATGGACTACTGGGGACAG
GGCACCTCCGTGACTGTGTCGTCGCGGCGCGCCCGCCCCCTCGGCCCCGACTCCTGCCCCGA
CGATCGCTTCCCAACCTCTCTCGCTGCGCCCGGAAGCATGCCGCGCCGCGCGGTGGCGCTGT
CCACACTCGCGGACTGGACTTTGATACCGCACTGGCGGCGGTGATCTGTAGCGCCCTGGCCACC
GTGCTGCTGGCGCTGCTCATCCTTTGCGTGATCTACTGCAAGCGGCAGCCTAGGCGAAAGAAGC
TCCTCTACATTTTCAAGCAACCCTTCATGCGCCCCGTGCAAACCACCCAGGAGGAGGATGGATG
CTCATGCCGGTTCCCTGAGGAAGAAGAGGGCGGTTGCGAGCTCAGAGTGAAATTCAGCCGGTCG
GCTGACGCCCCGGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAATGAGCTCAACCTGGGGCGCC
GCGAAGAGTACGACGTGCTGGACAAGAGGAGAGGCAGAGATCCGGAATGGGCGGAAAGCCAAG
GCGGAAGAACCCGCAGGAAGGTCTTTACAACGAAGTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTAC
TCCGAGATTGGGATGAAGGGAGAAAGACGGAGGGGAAAGGGACATGACGGACTTTACCAGGGCC
TGAGCACTGCCACGAAGGACACCTATGATGCCCTGCACATGCAGGCGCTGCCGCCTCGG
- [0852] SEQ ID NO:11 (FMC63的抗CD19 scFV氨基酸序列)
MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDG
TVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEI
[0853] TGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWL
GVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQ
GTSVTVSS
- [0854] SEQ ID NO:12 (抗CD19 scFV多核苷酸序列)

- ATGCTTCTCCTGGTCACCTCCCTGCTCCTCTGCGAACTGCCTCACCTGCCTTCCTTCTGATTC
CTGACATTGAGATGACTCAGACCACCTCTTCCCTTGTCGCGTCACTGGGAGACAGAGTGACCAT
CTCGTGTCGCGCAAGCCAGGATATCTCCAAGTACCTGAACTGGTACCAACAGAAGCCCCGACGGG
ACTGTGAAGCTGCTGATCTACCACACCTCACGCCTGCACAGCGGAGTGCCAAGCAGATTCTCCG
GCTCCGGCTCGGGAACCGATTACTCGCTTACCATTAGCAACCTCGAGCAGGAGGACATCGCTAC
CTACTTCTGCCAGCAAGGAAATACCCTGCCCTACACCTTCGGCGGAGGAACCAAATTGGAAATC
ACCGGCGGAGGAGGCTCCGGGGGAGGAGTTCCGGGGGCGGGGGTTCCGAAGTGAAGCTCCAGG
AGTCCGGCCCCGGCCTGGTGGCGCCGTCGCAATCACTCTCTGTGACCTGTACCGTGTGCGGAGT
GTCCCTGCCTGATTACGGCGTGAGCTGGATTTCGGCAGCCGCCGCGGAAGGGCCTGGAATGGCTG
GGTGTCTATCTGGGGATCCGAGACTACCTACTACAACCTCGGCCCTGAAGTCCCGCCTGACTATCA
TCAAAGACAACCTCGAAGTCCCAGGTCTTTCTGAAGATGAACTCCCTGCAAACTGACGACACCGC
[0855] CATCTATTACTGTGCTAAGCACTACTACTACGGTGAAGCTATGCTATGGACTACTGGGGGCAA
GGCACTTCGGTGACTGTGTCAAGCGCGGCCGCAACTACCACCCCTGCCCTCGGCCGCCGACTC
CGGCCCCAACCATCGCAAGCCAACCCCTCTCCTTGCGCCCCGAAGCTTGCCGCCCGGCCGCGGG
TGGAGCCGTGCATACCCGGGGGCTGGACTTTGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCGCTGGCC
GGCACTTGCGGCGTGCTCCTGCTGTGCTGGTCATCACCTTTACTGCAAGAGGGGCCGGAAGA
AGCTGCTTTACATCTTCAAGCAGCCGTTTCATGCGGCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGG
ATGCTCGTGACAGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGGATGCGAACTGCGCGTCAAGTTCTCACGG
TCCGCCGACGCCCCGCATATCAACAGGGCCAGAATCAGCTCTACAACGAGCTGAACCTGGGAA
GGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGACGCGGACGCGACCCGGAGATGGGGGGGAAACC
ACGGCGGAAAAACCTCAGGAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCC
TACTCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGGGGAAAGGGTCACGACGGGCTGTACCAGG
GACTGAGCACCGCCACTAAGGATACCTACGATGCCTTGCAATATGCAAGCACTCCCACCCCGG
- [0856] SEQ ID NO:13 (FMC63的抗CD19 scFV VH)
- MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDG
- [0857] TVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEI
T
- [0858] SEQ ID NO:14 (FMC63的抗CD19 scFV VL)
- [0859] EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALK
SRLTI IKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGSTVTVSS
- [0860] SEQ ID NO:16 (抗CD20 CAR氨基酸序列)
- MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPG
QGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSY
WFFDVWGAGTTTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMD
[0861] WYQKKPGSSPKPIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPTF
GGGKLEIKAAATTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPL
AGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCELRVKFS
RSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAE
AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
- [0862] SEQ ID NO:17 (抗CD20 CAR多核苷酸序列)

- [0863] ATGCTCCTTCTCGTGACCTCCCTGCTTCTCTGCGAACTGCCCCATCCTGCCTTCCTGCTGATTC
CCGAGGTGCAGTTGCAACAGTCAGGAGCTGAACTGGTCAAGCCAGGAGCCAGCGTGAAGATGAG
CTGCAAGGCCTCCGGTTACACCTTCACCTCCTACAACATGCACTGGGTGAAACAGACCCCGGGA
CAAGGGCTCGAATGGATTGGCGCCATCTACCCCGGGAATGGCGATACTTCGTACAACCAGAAGT
TCAAGGGAAAGGCCACCCTGACCGCCGACAAGAGCTCCTCCACCGCGTATATGCAGTTGAGCTC
CCTGACCTCCGAGGACTCCGCCGACTACTACTGCGCACGGTCCAATACTACTATGGAAGCTCGTAC
TGGTTCTTCGATGTCTGGGGGGCCGGCACCCTGTGACCGTCAGCTCCGGGGGCGGAGGATCCG
GTGGAGGCGGAAGCGGGGTGGAGGATCCGACATTGTGCTGACTCAGTCCCGGGCAATCCTGTC
GGCCTCACCGGGCGAAAAGGTCACGATGACTTGTAGAGCGTCGTCCAGCGTGAATACTACATGGAT
TGGTACCAAAGAAGCCTGGATCGTCACCCAAGCCTTGGATCTACGCTACATCTAACCTGGCCT
CCGGCGTGCCAGCGGTTTCAGCGGGTCCGGCTCGGGCACCTCATACTCGCTGACCATCTCCCG
CGTGGAGGCTGAGGACGCCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCCTTCAACCCGCCGACTTTT
GGAGGCGGTACTAAGCTGGAGATCAAAGCGGCCGCAACTACCACCCCTGCCCTCGGCCGCCGA
CTCCGGCCCCAACCATCGCAAGCCAACCCCTCTCCTTGCGCCCGAAGCTTGCCGCCCGGCCG
GGGTGGAGCCGTGCATACCCGGGGGCTGGACTTTGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCGCTG
GCCGGCACTTGCGGCGTGCTCCTGCTGTCGCTGGTCATACCCTTTACTGCAAGAGGGGCCGGA
AGAAGCTGCTTTACATCTTCAAGCAGCCGTTTCATGCGGCCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGA
CGGATGCTCGTGAGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGGATGCGAACTGCGCGTCAAGTTCTCA
CGGTCCGCCGACGCCCCCGCATATCAACAGGGCCAGAATCAGCTCTACAACGAGCTGAACCTGG
GAAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGACGCGGACGCGACCCGGAGATGGGGGGGAA
ACCACGGCGGAAAAACCTCAGGAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAA
GCCTACTCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGGGGAAAGGGTCACGACGGGCTGTACC
AGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACCTACGATGCCTTGCATATGCAAGCACTCCCACCCG
G
- [0864] SEQ ID NO:18 (抗CD20 scFV氨基酸序列)
- [0865] EVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMEIWVKQTPGQGLEWIGAIYPNGDTSYNQK
FKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSSGGGGS
GGGSGGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKPWIYATSNLA
SGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCOOWSFNPPTFGGGTKLEIK
- [0866] SEQ ID NO:19 (抗CD20 scFV多核苷酸序列)
- [0867] GAGGTGCAGTTGCAACAGTCAGGAGCTGAACTGGTCAAGCCAGGAGCCAGCGTGAAGATGAGCT
GCAAGGCCTCCGGTTACACCTTCACCTCCTACAACATGCACTGGGTGAAACAGACCCCGGGACA
AGGGCTCGAATGGATTGGCGCCATCTACCCCGGGAATGGCGATACTTCGTACAACCAGAAGTTC
AAGGGAAAGGCCACCCTGACCGCCGACAAGAGCTCCTCCACCGCGTATATGCAGTTGAGCTCCC
TGACCTCCGAGGACTCCGCCGACTACTACTGCGCACGGTCCAATACTACTATGGAAGCTCGTACTG
GTTCTTCGATGTCTGGGGGGCCGGCACCCTGTGACCGTCAGCTCCGGGGGCGGAGGATCCGGT
GGAGGCGGAAGCGGGGTGGAGGATCCGACATTGTGCTGACTCAGTCCCGGGCAATCCTGTGCG
CCTCACCGGGCGAAAAGGTCACGATGACTTGTAGAGCGTCGTCCAGCGTGAATACTACATGGATTG
GTACCAAAGAAGCCTGGATCGTCACCCAAGCCTTGGATCTACGCTACATCTAACCTGGCCTCC
GGCGTGCCAGCGCGGTTTCAGCGGGTCCGGCTCGGGCACCTCATACTCGCTGACCATCTCCCGCG
TGGAGGCTGAGGACGCCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCCTTCAACCCGCCGACTTTTGG
AGGCGGTACTAAGCTGGAGATCAA
- [0868] SEQ ID NO:20 (抗CD20 scFV VH)
- [0869] EVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMEIWVKQTPGQGLEWIGAIYPNGDTSYNQK
FKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSS
- [0870] SEQ ID NO:21 (抗CD20 scFV VL)
- [0871] DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGS
SGGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQWSFNPPTFGGGTKLEIK
- [0872] SEQ ID NO:22 (抗CD22 CAR氨基酸序列)

- [0873] MLLLVTSLLLCELPHPAFLLLIPQVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRITYYRSKYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDAFDIWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQTIWSYLNWYQQRPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQAEDFATYYCQQSYSIPQTFGQGTKLEIKAAATTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAFLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDLGYQLSTATKDTYDALHMQALPPR
- [0874] SEQ ID NO:23 (抗CD22 CAR多核苷酸序列)
- ATGCTTCTTTTGGTGACTTCCCTTTTGCTGTGCGAGTTGCCACACCCCGCCTTCCTGCTTATTC
CCCAGGTACAGCTCCAGCAGAGTGGCCAGGGCTCGTGAAGCCAAGCCAGACGCTGTCCCTGAC
TTGTGCAATTTACAGGGGATTAGTTTCATCAAATAGCGCGGCGTGGAATTGGATTGCACAATCT
CCTTCCCGAGGGTTGGAATGGCTTGGACGAACATATTACAGATCCAAATGGTATAACGACTATG
CGGTATCAGTAAAGTCAAGAATAACCATTAACCCGACACAAGCAAGAACCAATTCTCTTTGCA
GCTTAACCTCTGTACGCCAGAAGACACGGCAGTCTATTATTGCGCTCGCGAGGTAACGGGTGAC
CTGGAAGACGCTTTTGACATTTGGGGGCAGGGTACGATGGTGACAGTCAGTTACAGGGGGCGGTG
GGAGTGGGGGAGGGGGTAGCGGGGGGGGAGGGTCAGACATTCAGATGACCCAGTCCCCTTCATC
CTTGCTGCTCCGTCGGTGACAGGGTGACAATAACATGCAGAGCAAGCCAAACAATCTGGAGC
TATCTCAACTGGTACCAGCAGCGACCAGGAAAAGCGCCAAACCTGCTGATTTACGCTGCTTCCT
CCCTCCAATCAGGCGTGCCTAGTAGATTTAGCGGTAGGGGCTCCGGCACCGATTTTACGCTCAC
TATAAGCTCTCTTCAAGCAGAAGATTTGCGACTTATTACTGCCAGCAGTCCTATAGTATACCT
CAGACTTTCGGACAGGGTACCAAGTTGGAGATTAAGGCGGCCGCAACTACCACCCCTGCCCCTC
GGCCGCCGACTCCGGCCCCAACCATCGCAAGCCAACCCCTCTCCTTGCGCCCCGAAGCTTGCCG
CCCGGCCGCGGGTGGAGCCGTGCATACCCGGGGGCTGGACTTTGCCTGCGATATCTACATTTGG
GCCCCGCTGGCCGGCACTTGCGGCGTGCTCCTGCTGTGCTGGTCATCACCCCTTTACTGCAAGA
GGGGCCGGAAGAAGCTGCTTTACATCTTCAAGCAGCCGTTTCATGCGGCCCGTGACAGCAGCTCA
GGAAGAGGACGGATGCTCGTGACAGATTCCTTGAGGAGGAAGAGGGGGGATGCGAACTGCGCGTC
AAGTTCTCACGGTCCGCCGACGCCCCCGCATATCAACAGGGGCCAGAATCAGCTCTACAACGAGC
TGAACCTGGGAAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGACGCGGACGCGACCCGGAGAT
GGGGGGGAAACCACGGCGGAAAAACCTCAGGAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAAG
ATGGCGGAAGCCTACTCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGGGGAAAGGGTCACGACG
GGCTGTACCAGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATACCTACGATGCCTTGACATATGCAAGCACT
CCCACCCCGG
- [0875]
- [0876] SEQ ID NO:24 (抗CD22 scFV氨基酸序列)
- QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRITYYRSK
WYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDAFDIWGQ
- [0877] GTMTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQTIWSYLNWYQQRPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQAEDFATYYCQQSYSIPQTFGQGTKLEIKAAA
- [0878] SEQ ID NO:25 (抗CD22 scFV多核苷酸序列)
- CAGGTACAGCTCCAGCAGAGTGGCCAGGGCTCGTGAAGCCAAGCCAGACGCTGTCCCTGACTT
GTGCAATTTACAGGGGATTAGTTTCATCAAATAGCGCGGCTGGAATTGGATTGCACAATCTCC
TTCCCGAGGGTTGGAATGGCTTGGACGAACATATTACAGATCCAAATGGTATAACGACTATGCG
GTATCAGTAAAGTCAAGAATAACCATTAACCCGACACAAGCAAGAACCAATTCTCTTTGCAGC
TTAACTCTGTACGCCAGAAGACACGGCAGTCTATTATTGCGCTCGCGAGGTAACGGGTGACCT
GGAAGACGCTTTTGACATTTGGGGGCAGGGTACGATGGTGACAGTCAGTTACAGGGGGCGGTGGG
AGTGGGGGAGGGGGTAGCGGGGGGGGAGGGTCAGACATTCAGATGACCCAGTCCCCTTCATCCT
TGTCTGCCTCCGTCGGTGACAGGGTGACAATAACATGCAGAGCAAGCCAAACAATCTGGAGCTA
TCTCAACTGGTACCAGCAGCGACCAGGAAAAGCGCCAAACCTGCTGATTTACGCTGCTTCCTCC
CTCCAATCAGGCGTGCCTAGTAGATTTAGCGGTAGGGGCTCCGGCACCGATTTTACGCTCACTA
TAAGCTCTCTTCAAGCAGAAGATTTGCGACTTATTACTGCCAGCAGTCCTATAGTATACCTCA
GACTTTCGGACAGGGTACCAAGTTGGAGATTAAGGCGGCCGCA
- [0879]
- [0880] SEQ ID NO:26 (抗CD22 scFV VH)

101

- [0900] AGCCGCAGCGCGGATGCGCCGGCGTATCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTATAACGAACTGAACC
TGGGCCGCGCGGAAGAATATGATGTGCTGGATAAACGCCGCGGCGCGATCCGGAAATGGGCGG
CAAACCGCGCGCGCAAAAACCCGAGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGATAAAATGGCG
GAAGCGTATAGCGAAATTGGCATGAAAGGCGAACGCCGCGCGGCAAAGGCCATGATGGCCTGT
ATCAGGGCCTGAGCACCGCGACCAAAGATACCTATGATGCGCTGCATATGCAGGCGCTGCCGCC
GCGC
- [0901] SEQ ID NO:36 (抗B7-H3 scFV氨基酸序列)
- [0902] QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAIWVRQAPGQGLEWMGGIIPILGIANYAQKF
QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGAGGSGSYPLIWGQGTITVTVSSGGGGSG
GGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCGASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSR
ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSSWPPTWTFGQGTKLEIKRAAA
- [0903] SEQ ID NO:37 (抗B7-H3 scFV多核苷酸序列)
- [0904] CAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGCGCGGAAGTAAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTGAGCT
GCAAAGCGAGCGGCGGCACCTTTAGCAGCTATGCGATTAGCTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCA
GGGCTGGAATGGATGGGCGGCATTATTCCGATTCTGGGCATTGCGAACTATGCGCAGAAATTT
CAGGGCCGCGTGACCATTACCGCGGATGAAAGCACCAGCACCAGCGTATATGGAAGTGCAGCAGCC
TGCGCAGCGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGCGCGGCGGCGGGCGGCAGCGGCAGCTA
TTATCCGCTGATTTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGCGGCGGCGGCAGCGGC
GGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGAAATTGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCTGAGCC
TGAGCCCGGGCGAACGCGCGACCCCTGAGCTGCGGCGCGAGCCAGAGCGTGAGCAGCAGCTATCT
GGCGTGATCAGCAGAAACCGGGCCAGGCGCCGCGCCTGCTGATTTATGATGCGAGCAGCCGC
GCGACCGGCATTCCGCGCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGCACCGATTTACCCTGACCATTA
GCAGCCTGGAACCGGAAGATTTTGCAGGTGTATTATTGCCAGCAGCGCAGCAGCTGGCCGCCGAC
CTGGACCTTTGGCCAGGGCACCAAACCTGGAATTAACGCGCGGCGGCG
- [0905] SEQ ID NO:38 (抗B7-H3 scFV VH)
- [0906] QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAIWVRQAPGQGLEWMGGIIPILGIANYAQKF
QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGAGGSGSYPLIWGQGTITVTVSS
- [0907] SEQ ID NO:39 (抗B7-H3 scFV VL)
- [0908] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCGASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPARF
SGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSSWPPTWTFGQGTKLEIKRAAA
- [0909] SEQ ID NO:40 (CD8 α 跨膜区)
- [0910] IYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYC
- [0911] SEQ ID NO:41 (抗BCMACAR氨基酸序列)
- [0912] MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIYWYQQK
PGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGGTK
LEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFRHYSMNWVKQAPG
KGLKWMGRINTESGVPYIADDFKGRFAFSVETSASTAYLVINNLKDEDTASYFCSNDYLYSLDF
WGQGTALTVSFVFPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA
CDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCNHRNRSKRSLHSDYMNMTPRRPGRPTRKHYQPYAPPR
DFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
- [0913] SEQ ID NO:42 (抗BCMACAR氨基酸序列)
- [0914] MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQK
PGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGGTK
LEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRAPG
KGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETASTAYLQINNLKYEDTATYFCALDYSYAMDY
WGQGTSTVTSFVFPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA
CDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCNHRNRSKRSLHSDYMNMTPRRPGRPTRKHYQPYAPPR
DFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
- [0915]

- [0916] SEQ ID NO:43 (抗BCMACAR氨基酸序列)
MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIYWYQQK
PGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGGTK
LEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTTHYSMNWVKQAPG
KGLKWMGRINTETGEPLYADDFKGRFAFSLETSASTAYLVINNKNEDTATFFCSNDYLYSCDY
[0917] WGQGTTLTVSSFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA
CDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPR
DFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEG
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
- [0918] SEQ ID NO:44 (抗BCMACAR氨基酸序列)
MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPDIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQ
KPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGGT
KLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRAP
GKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAYLQINNLYEDTATYFCALDYSYAMD
[0919] YWGQTSVTVSSAAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG
LDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPY
APPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKN
PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
- [0920] SEQ ID NO:45 (抗BCMACAR氨基酸序列)
MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQK
PGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGGTK
LEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRAPG
KGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAYLQINNLYEDTATYFCALDYSYAMDY
[0921] WGQTSVTVSSAAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL
DFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYA
PPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNP
QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
- [0922] SEQ ID NO:46 (抗BCMACAR氨基酸序列)
MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQK
PGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGGTK
LEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRAPG
KGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAYLQINNLYEDTATYFCALDYSYAMDY
[0923] WGQTSVTVSSAAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL
DFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED
GCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGK
PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
- [0924] SEQ ID NO:47 (抗BCMACAR氨基酸序列)
MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQK
PGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGGTK
LEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRAPG
KGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAYLQINNLYEDTATYFCALDYSYAMDY
[0925] WGQTSVTVSSAAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL
DFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAH
STLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEG
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
- [0926] SEQ ID NO:48 (抗BCMACAR氨基酸序列)

- [0927] MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQPPTLLLIQLASNVQTVPARFSGSGSRDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLOSRTIPRTFGGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYFTDYSINWVKRAPGKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAYLQINNLYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQGTSTVTVSSAAAFVFPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRF SVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTP IQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
- [0928] SEQ ID NO:49 (抗BCMACAR氨基酸序列)
- [0929] DIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQPPTLLLIQLASNVQTVPARFSGSGSRDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLOSRTIPRTFGGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYFTDYSINWVKRAPGKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAYLQINNLYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQGTSTVTVSSAAATTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
- [0930] SEQ ID NO:50 (抗BCMA重链氨基酸序列)
- [0931] QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGSISGSGYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVAGLFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPAPAEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
- [0932] SEQ ID NO:51 (抗BCMA轻链氨基酸序列)
- [0933] SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAVYYCQVWDSSSDHVVFGGGKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKGDSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSQCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
- [0934] SEQ ID NO:52 (抗BCMACAR重链氨基酸序列)
- [0935] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSNYWMHWVRQAPGQGLEWMGATYRGHSDTYYNQKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARGAIYDGYDVLNWDGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0936] SEQ ID NO:53 (抗BCMA轻链氨基酸序列)
- [0937] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSNLSHGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYRKLPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0938] SEQ ID NO:54 (抗BCMACAR氨基酸序列)

[0939]

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVKLEESGGGLVQAGRSLRLSCAASEHTFSSHVMGWFRQAPGK
ERESVAVIGWRDISTSYADSVKGRFTISRDNAKKTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAARRIDAADF
SWGQGTQVTVSSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFTMGWFRQAPGKEREFVAA
ISLSPTLAYYAESVKGRFTISRDNAKNTVVLQMNSLKPEDTALYYCAADRKSVMISRPDYWGQG
TQVTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGT
CGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSA
DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYS
EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0940]

SEQ ID NO:55 (包含抗BCMACAR编码序列的核酸序列)

TGTAGTCTTATGCAATACTCTTGTAGTCTTGCAACATGGTAACGATGAGTTAGCAACATGCCTT
ACAAGGAGAGAAAAAGCACCGTGCATGCCGATTGGTGGAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCCTTA
TTAGGAAGGCAACAGACGGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAATTGCCGCATTGCAGAG
ATATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCGATACATAAACGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGC
CTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTG
CTTCAAGTAGTGTGTGCGCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTT
AGTCAGTGTGAAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCA
GAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGC
GACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAG
CGTCAGTATTAAGCGGGGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGA
AAGAAAAATATAAATTAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTTCGCAGTTA
ATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCT
TCAGACAGGATCAGAAGAATTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCCTCTATTGTGTGCAT
CAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAA
GTAAGACCACCGCACAGCAAGCGGCCGCGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGG
GACAATTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCAC
CCACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTT
CCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAG
GCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAAATTTGCTGAGGGGCTATTGAGGCGC
AACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGT
GGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAACTCATTTGC
ACCACTGCTGTGCCTTGGAAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCACA
CGACCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGA
AGAATCGCAAAACCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGT
TTGTGGAATTGGTTTAACATAACAAATTGGCTGTGGTATATAAATATTTCATAATGATAGTAG
GAGGCTTGGTAGGTTTAAGAATAGTTTTTGTCTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGG
ATATTCACCATTATCGTTTTAGACCCACCTCCCAACCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGA
ATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTTCGATTAGTGAACGGATCTCGAC
GGTATCGCCTTTAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACA
TAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAAACAATTACAAAAATTCAAATTTTCG
GGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTATCGATGAGTAATTCATACAAAAGGACTCGCC
CCTGCCTTGGGGAATCCCAGGGACCGCTCGTTAAACTCCCACTAACGTAGAACCAGAGATCGCT
GCGTTCCCGCCCCCTCAGCGCCGCTCTCGTCATCACTGAGGTGGAGAAGAGCATGCGTGAGG
CTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGG
GTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGT
ACTGGCTCCGCTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAA
CGTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGG

[0941]

[0942]

CCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCCTGAATTACTTCCACGCCCCTGGCTGCAG
TACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTTCGAGGCCTTGCGCTT
AAGGAGCCCCCTTCGCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCTTGGGCGCTGGGGCCCGCGCTGCG
AATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTT
TGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGC
ACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATG
TTCGGCGAGGCGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGC
CGGCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGG
CCCGTTCGGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTC
AAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTACCCACACAAAGGAAAAGGGCC
TTTCCGTCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCG
ATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGA
GTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCC
TTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAA
GTTTTTTTCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGAGGATCGCTAGCGCTACCGGACTCAGATCTCGAGCT
CAAGCTTCGAATTCGCCGCCACCATGGCTCTGCCCCTCACCGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCTCT
GCTGCTGCACGCTGCTCGCCCTCAGGTCAAACCTGGAAGAATCTGGCGGAGGCCTGGTGCAGGCA
GGACGGAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCAGCATCCGAGCACACCTTCAGCTCCCACGTGATGGGCT
GGTTTCGGCAGGCCCCAGGCAAGGAGAGAGAGAGCGTGCCCGTGATCGGCTGGAGGGACATCTC
CACATCTTACGCCGATTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAAGACA
CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAAGCCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGCGCAGCAAGGA
GAATCGACGCAGCAGACTTTGATTCTTGGGGCCAGGGCACCCAGGTGACAGTGTCTAGCGGAGG
AGGAGGATCTGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGCGGCCTGGTGCAGGCCGAGGCTCTCTG
AGGCTGAGCTGTGCAGCATCCGGAAGAACCTTACAATGGGCTGGTTTAGGCAGGCACCAGGAA
AGGAGAGGGAGTTCTGTGGCAGCAATCAGCCTGTCCCCTACCCTGGCCTACTATGCCGAGAGCGT
GAAGGGCAGGTTTACCATCTCCCGCGATAACGCCAAGAATACAGTGGTGTGTCAGATGAACTCC
CTGAAACCTGAGGACACAGCCCTGTACTATTGTGCCGCCGATCGGAAGAGCGTGATGAGCATT
GACCAGACTATTGGGGGCAGGGAACACAGGTGACCGTGAGCAGCACTAGTACCACGACGCCAGC
GCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCG
TGCCGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACA
TCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTG
CAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTATGAGACCAGTACAACT
ACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAAGTGA
GAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAA
CGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCCT
GAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAAGTGCAGAAAG
ATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGAGGGGCAAGGGGCA
CGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAG
GCCCTGCCCCCTCGCTAATCTAGATCCGCGTCTGGAACAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTG
TGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACATATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTA
ATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCT
GGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGT
GTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTGAGCTCCTTTCCGGGACT
TTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGGCCGCTGCTGGA
CAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTGCGGGGAAGCTGACGTCTTTCC
ATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCTTCTGCTACGTCCCTTCG
GCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTC
TTCGCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCGCCTCCCCGCCTGGAATTAATTC
TGCAGTCGAGACCTAGAAAAACATGGAGCAATCACAAAGTAGCAATACAGCAGCTACCAATGCTG
ATTGTGCCTGGCTAGAAGCACAAGAGGAGGAGGAGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTACC
TTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAGAAAAGAGGGGA
CTGGAAGGGCTAATTATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCT
GGTTAGACCAGCACTCCCAACGAAGACAAGATGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCA
ATAAAGCTTGCCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAG
AGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAAGTGTGGAATCTCTAGCAGT

[0943] SEQ ID NO:56 (基于病毒IL-10的示例性人IL-10变体取代)

- [0944] MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQTKDEVDNL
LLKESLLEDFKGYLGCGALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPEAKDHVNSLGENLKTLLRLRLRRCHR
FLPCENKSKAVEQIKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN
- [0945] SEQ ID NO:57 (基于病毒IL-10的具有氨基酸取代的示例性人IL-10变体)
- [0946] MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNL
LLKESLLEDFKGYLGCGALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIAKAHVNSLGENLKTLLRLRLRRCHR
FLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN
- [0947] SEQ ID NO:58 (小家鼠;“小鼠”)
- [0948] MPGSALLCCLLLLTMGRISRGQYSREDNNCTHFPVGQSHMLLELRDAFSQVKTFQTKDQLDNI
LLTDSLMDQDFKGYLGCGALSEMIQFYLVEMPPQAEKHGPEIKEHLNSLGEKLTLMRLRLRRCHR
FLPCENKSKAVEQVKSDFNKLQDQGVYKAMNEFDIFINCIEAYMMIKMKS
- [0949] SEQ ID NO:59 (褐家鼠;“大鼠”)
- [0950] MPGSALLCCLLLLTMGRISRGQYSREDNNCTHFPVQSHMLLELRDAFSQVKTFQTKDQLDNI
LLTDSLMDQDFKGYLGCGALSEMIQFYLVEMPPQAEKHGPEIKEHLNSLGEKLTLMRLRLRRCHR
FLPCENKSKAVEQVKNDFNKLQDQGVYKAMNEFDIFINCIEAYVTLKMKN
- [0951] SEQ ID NO:60 (恒河猴;“MACMU”)
- [0952] MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNI
LLKESLLEDFKGYLGCGALSEMIQFYLEEVMPPQAENHDPDIKEHVNSLGENLKTLLRLRLRRCHR
FLPCENKSKAVEQVKNAFSLQEKGVYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIQN
- [0953] SEQ ID NO:61 (大猩猩;“大猩猩”)
- [0954] MHSSALLCCLVLLTGVRASPGHGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNL
LLKESLLEDFKGYLGCGALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRLRRCHR
FLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGVYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN
- [0955] SEQ ID NO:62 (食蟹猴;“CYN0”)
- [0956] MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNI
LLKESLLEDFKGYLGCGALSEMIQFYLEEVMPPQAENHDPDIKEHVNSLGENLKTLLRLRLRRCHR
FLPCENKSKAVEQVKNAFSLQEKGVYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIQN
- [0957] SEQ ID NO:63 (东非狒狒;“橄榄狒狒”)
- [0958] MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNI
LLKESLLEDFKGYLGCGALSEMIQFYLEEVMPPQAENHDPDIKEHVNSLGENLKTLLRLRLRRCHR
FLPCENKSKAVEQVKNAFSLQEKGVYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIQN
- [0959] SEQ ID NO:64 (倭黑猩猩;“倭黑猩猩”)
- [0960] MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNL
LLKESLLEDFKGYLGCGALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKVHVNSLGENLKTLLRLRLRRCHR
FLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN
- [0961] SEQ ID NO:65 (黑猩猩;“黑猩猩”)
- [0962] MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNL
LLKESLLEDFKGYLGCGALXEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKVHVNSLGENLKTLLRLRLRRCHR
FLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN
- [0963] SEQ ID NO:66 (EBVB9)
- [0964] MERRLVVTLQCLVLLYLAPECGGTDQCDNFPQMLRDLRDAFSRVKTFQTKDEVDNLLLKESLL
EDFKGYLGCGALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPEAKDHVNSLGENLKTLLRLRLRRCHRFLPCENK
SKAVEQIKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTIKAR
- [0965] SEQ ID NO:67 huIL-10 杂交体#1

- [0966] MHSSALLCCLVLLTGRASPGQGTQSENSCTHFPGNIPNMLRDIRDAFSRVKTEFQTKDEVNLL
LKESLLEDEKGYLGCGALSEMIQFYLEEVMPPAENQDPEAKDHVNSLGENLKTLLRLRIRRRHRF
LPCENKSKAVEQIKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN
- [0967] SEQ ID NO:68huIL-10杂交体#2
- [0968] MHSSALLCCLVLLTGRASPGQGTQSENSCTHFPGNIPNMLRDIRDAFSRVKTEFQMKDQLDNLL
LKESLLEDEKGYLGCGALSEMIQFYLEEVMPPAENQDPAKAHVNSLGENLKTLLRLRIRRRHRF
LPCENKSKAVEQVKNFAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN

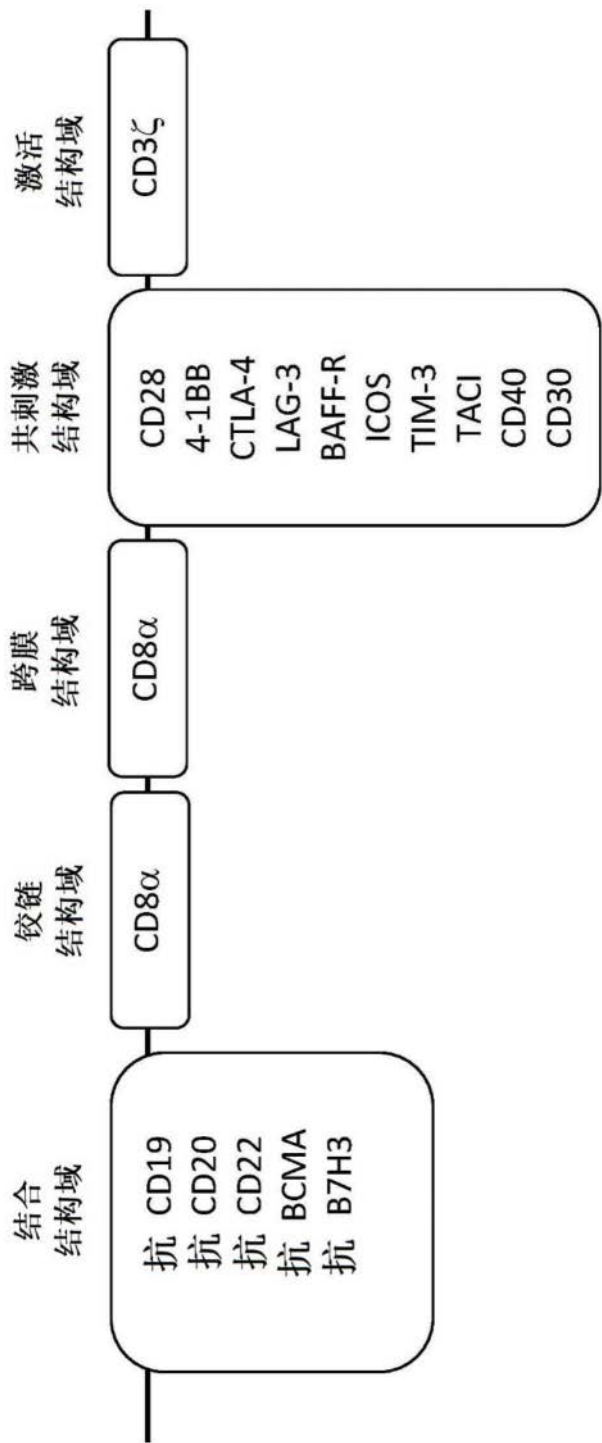


图1

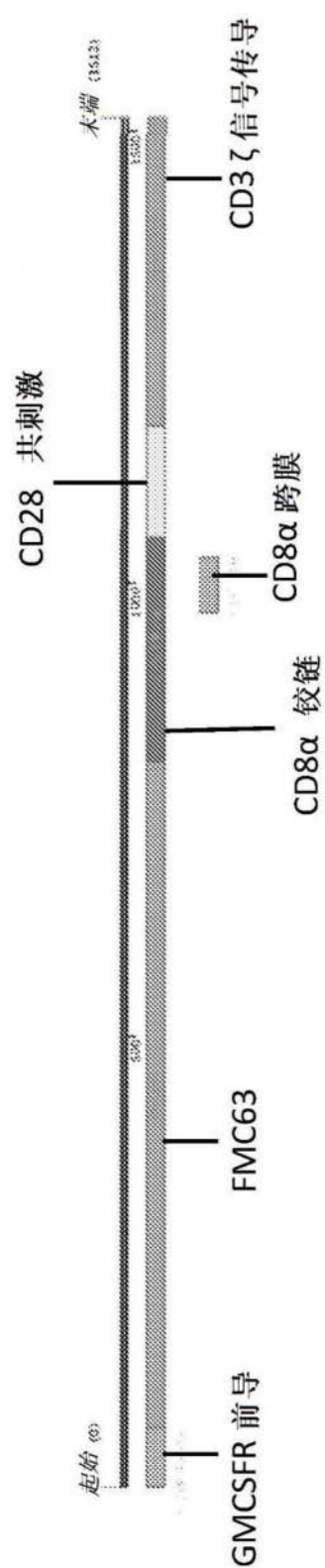


图2A

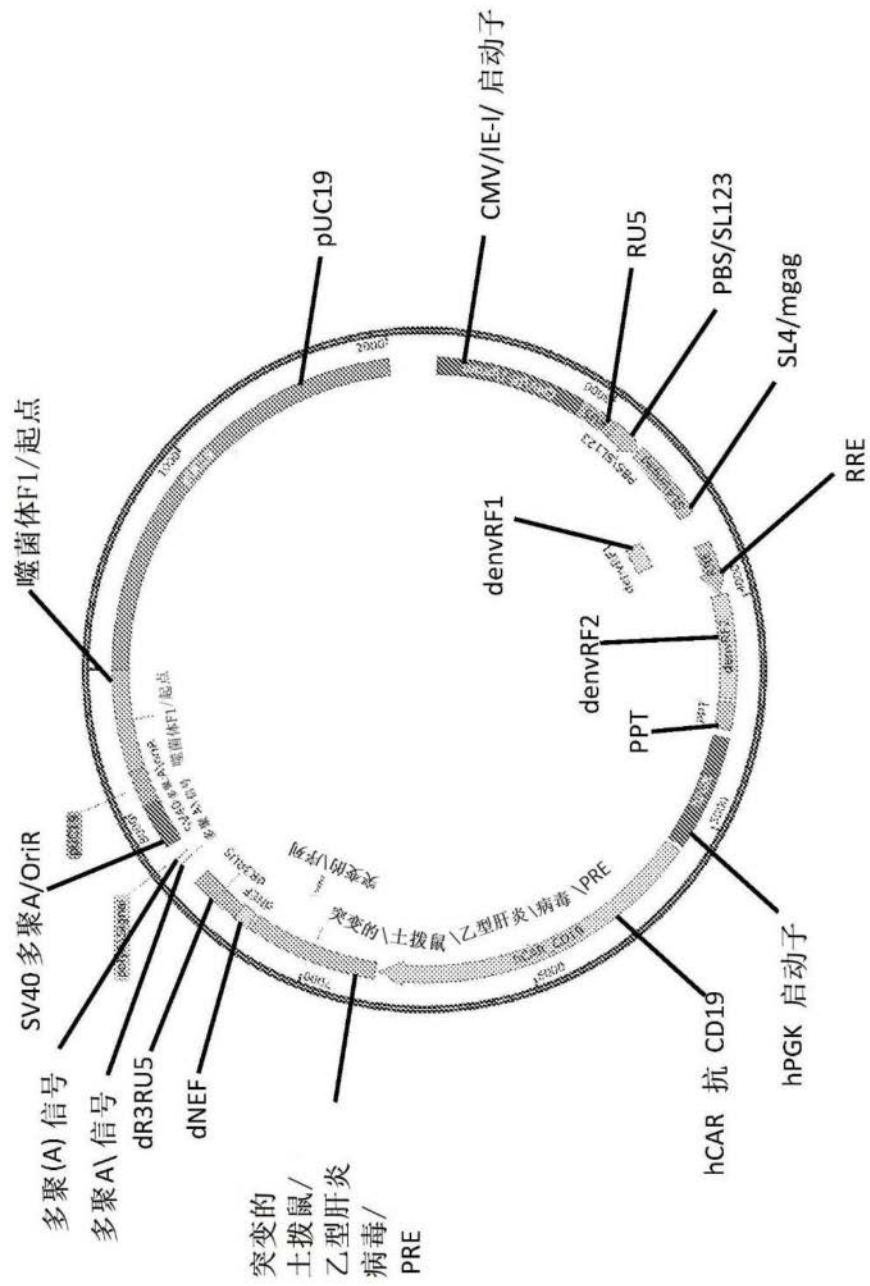


图2B

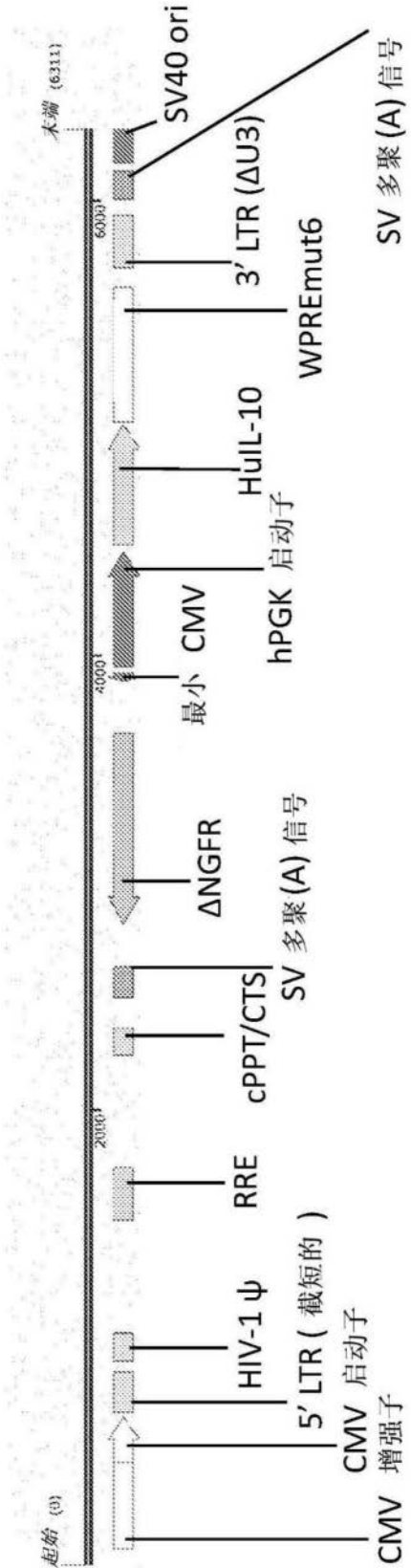


图3A

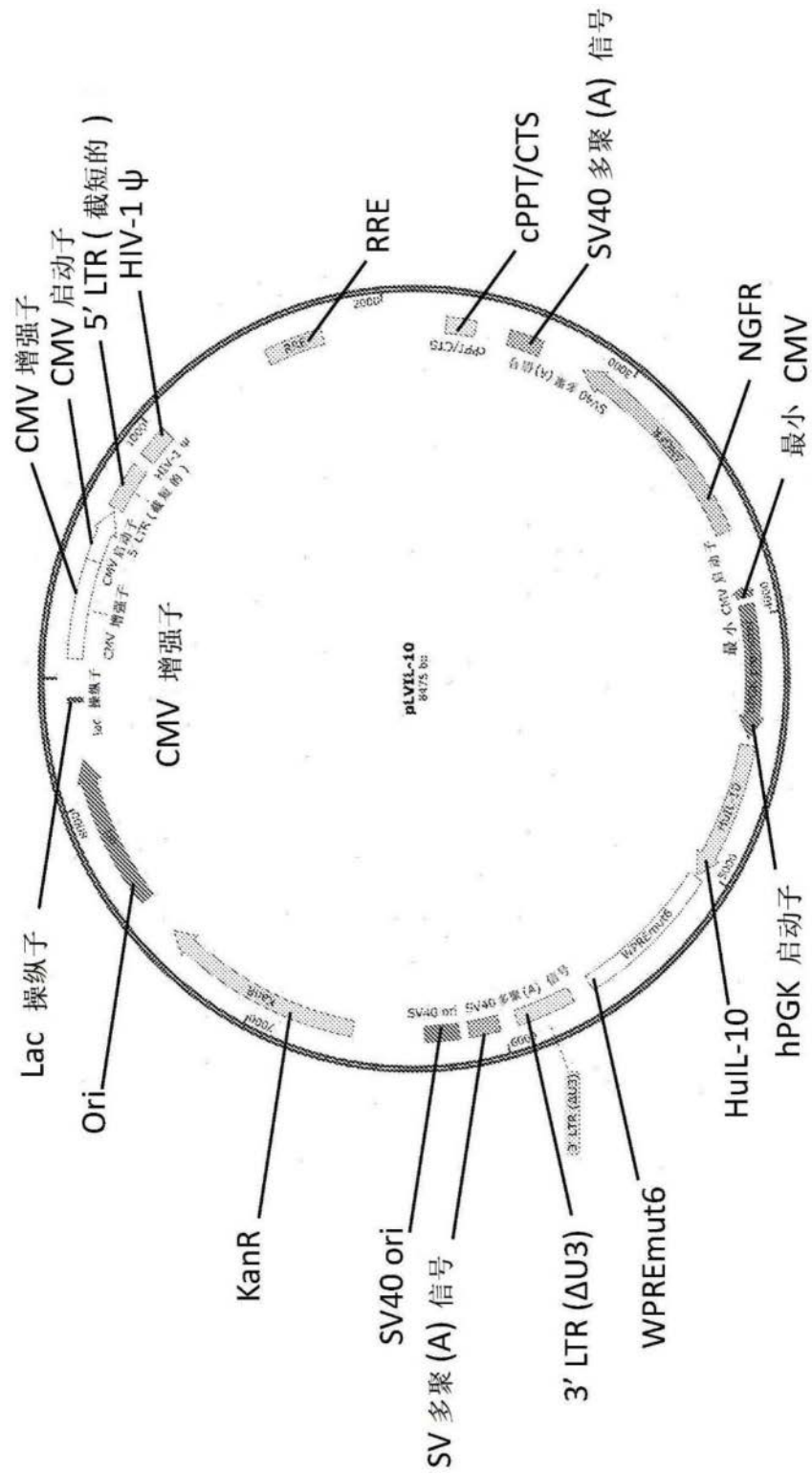
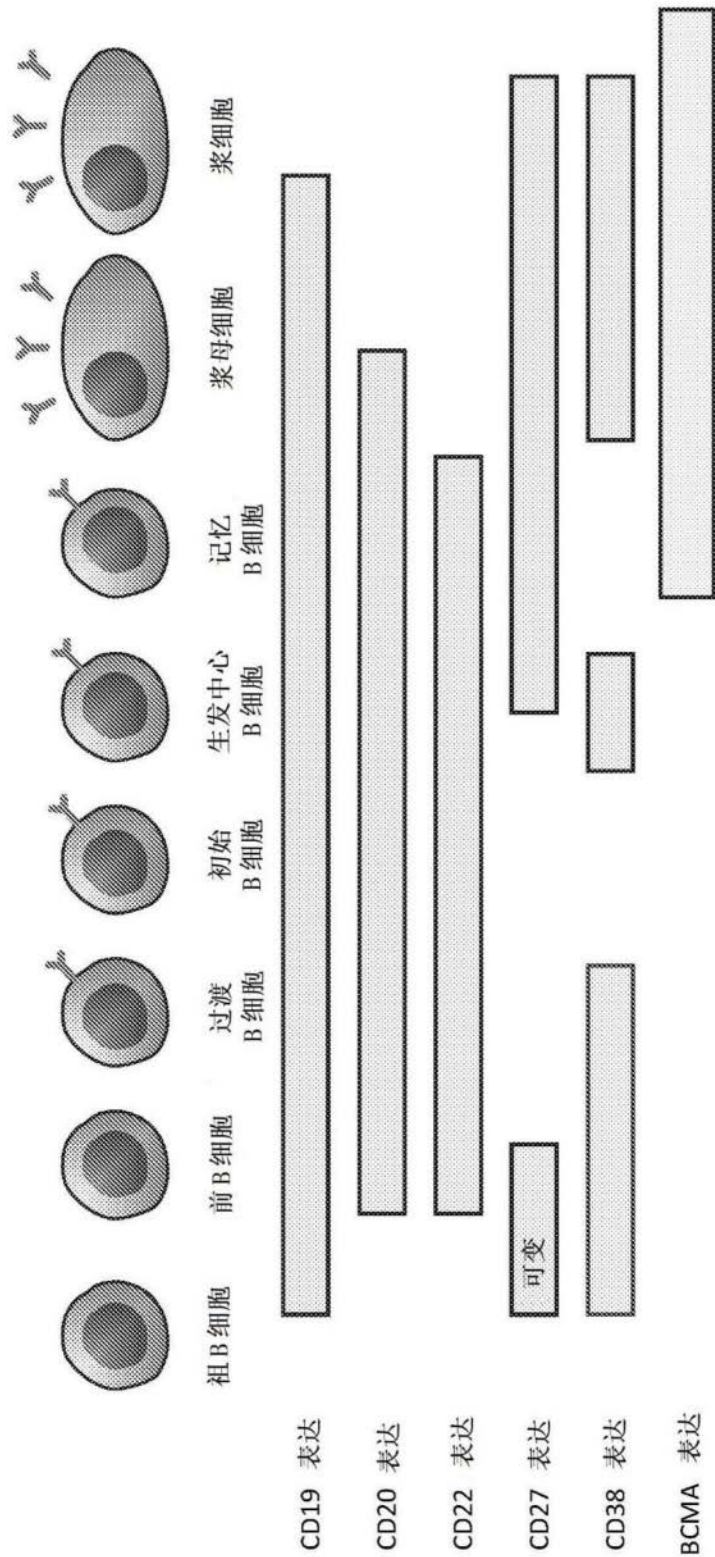


图3B



骨髓和外周B细胞分化过程中CD19、CD20、CD22、CD27、CD38和BCMA的表达

图4

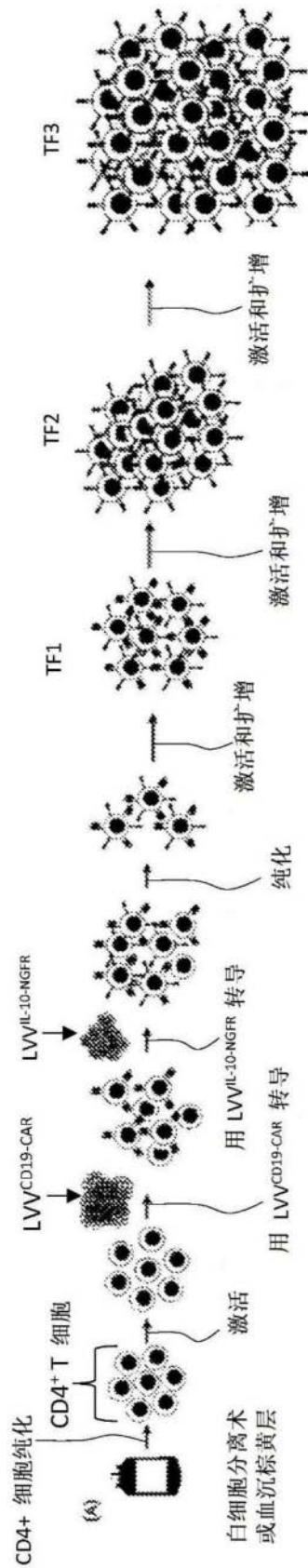


图5A

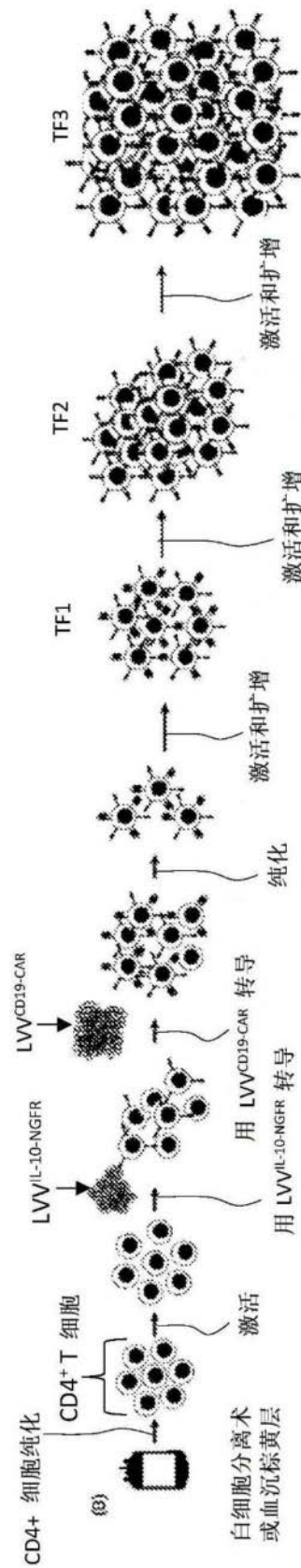


图5B

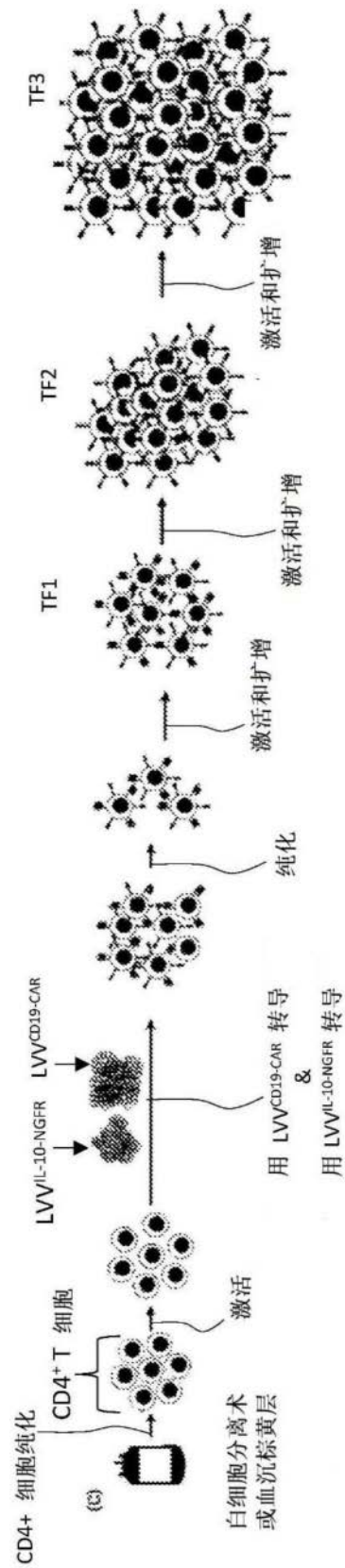


图5C

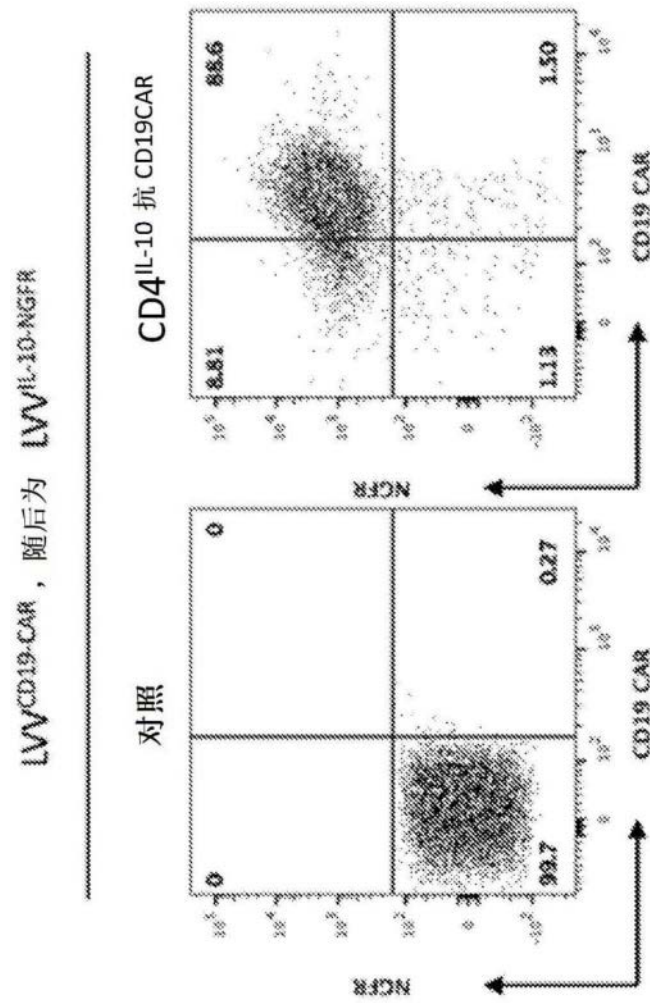


图6A

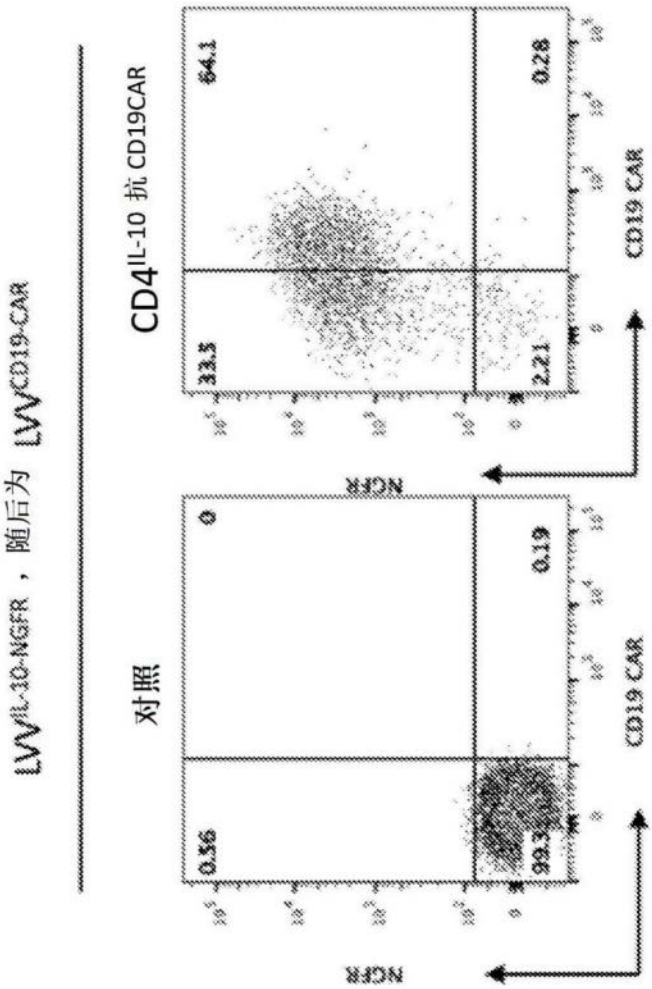


图6B

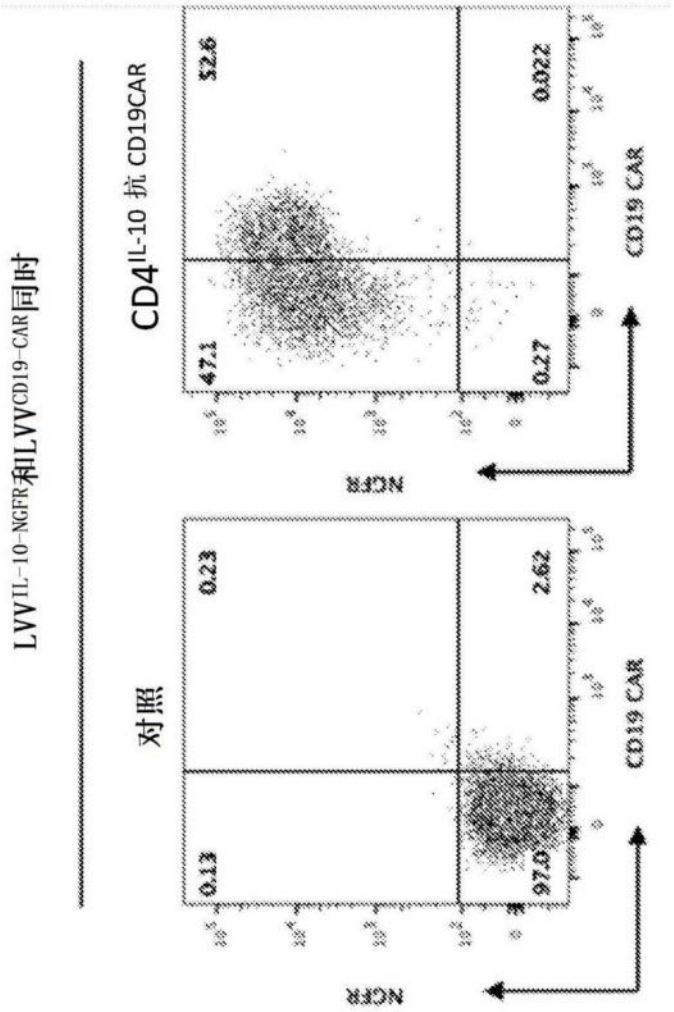


图6C

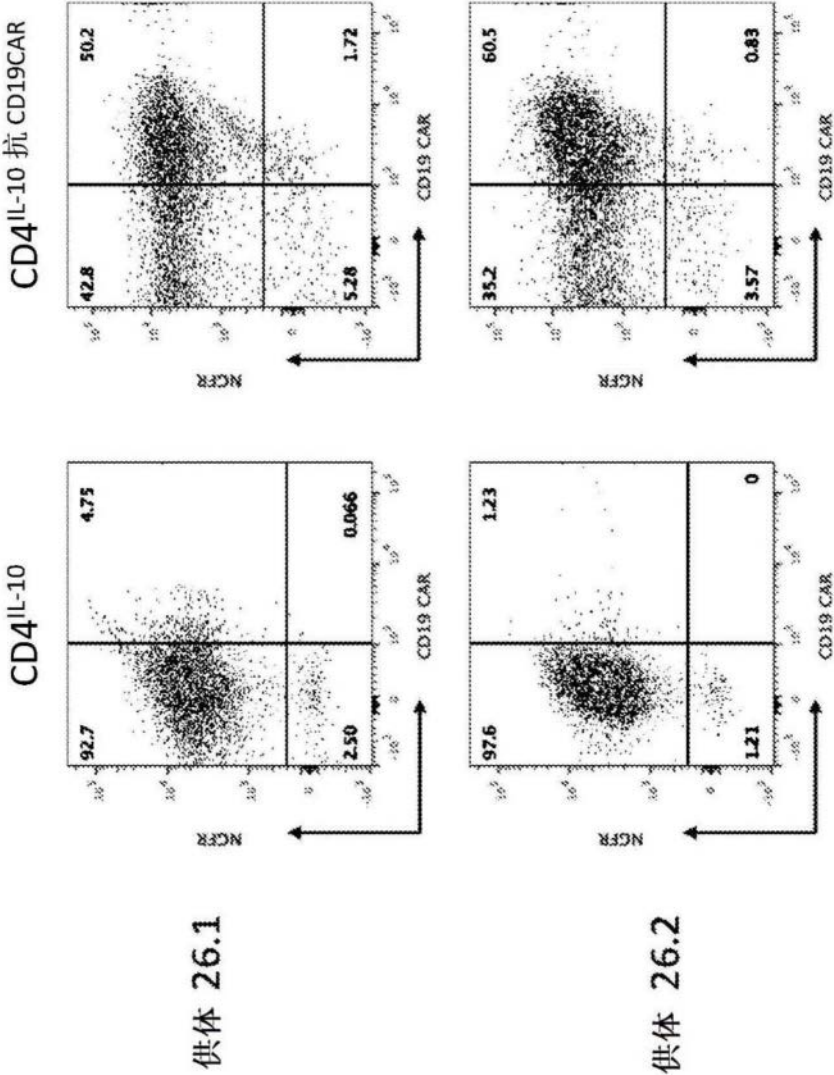


图7

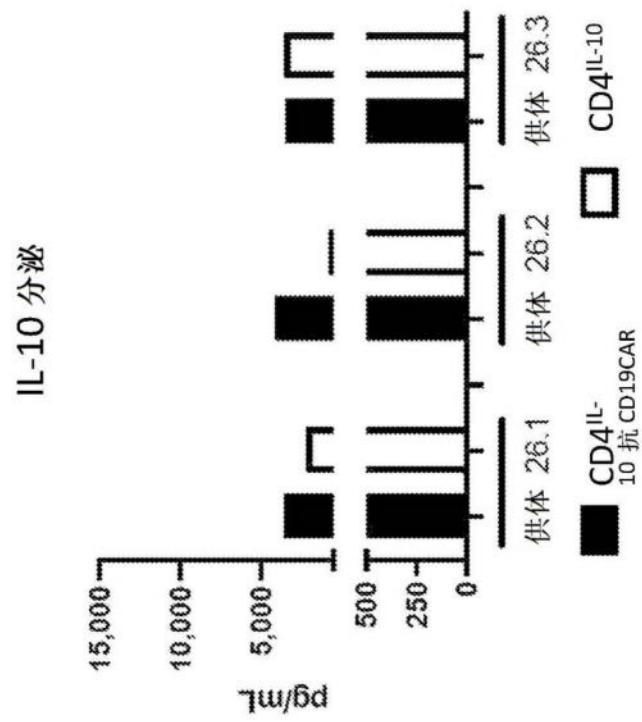


图8A

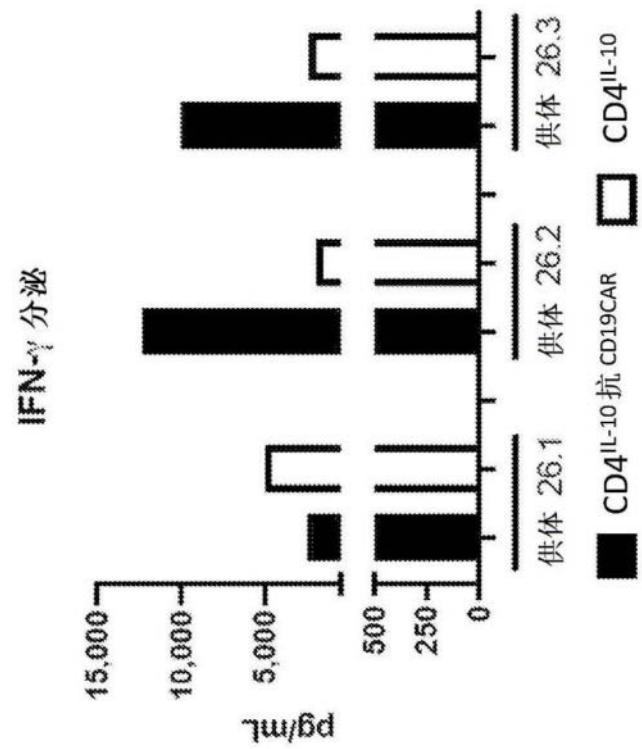


图8B

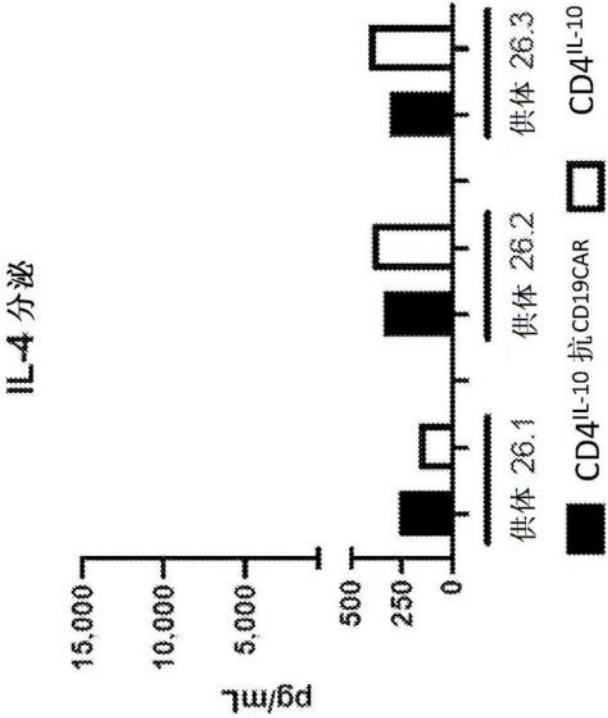


图8C

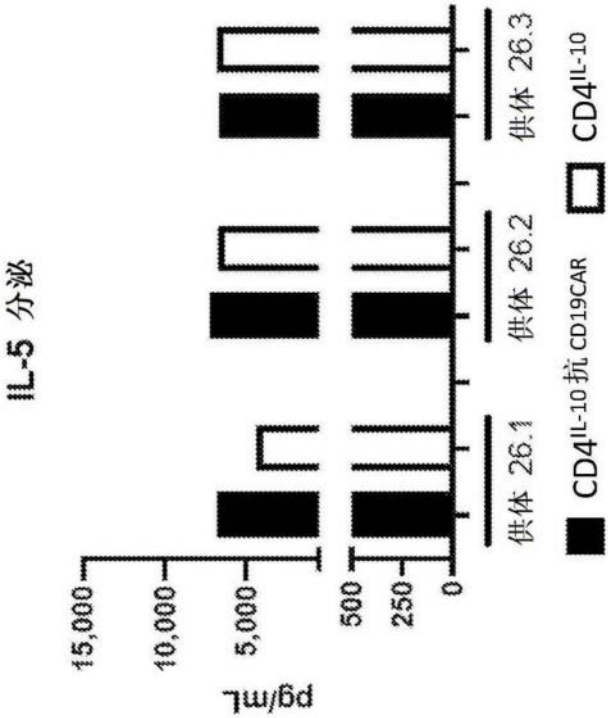


图8D

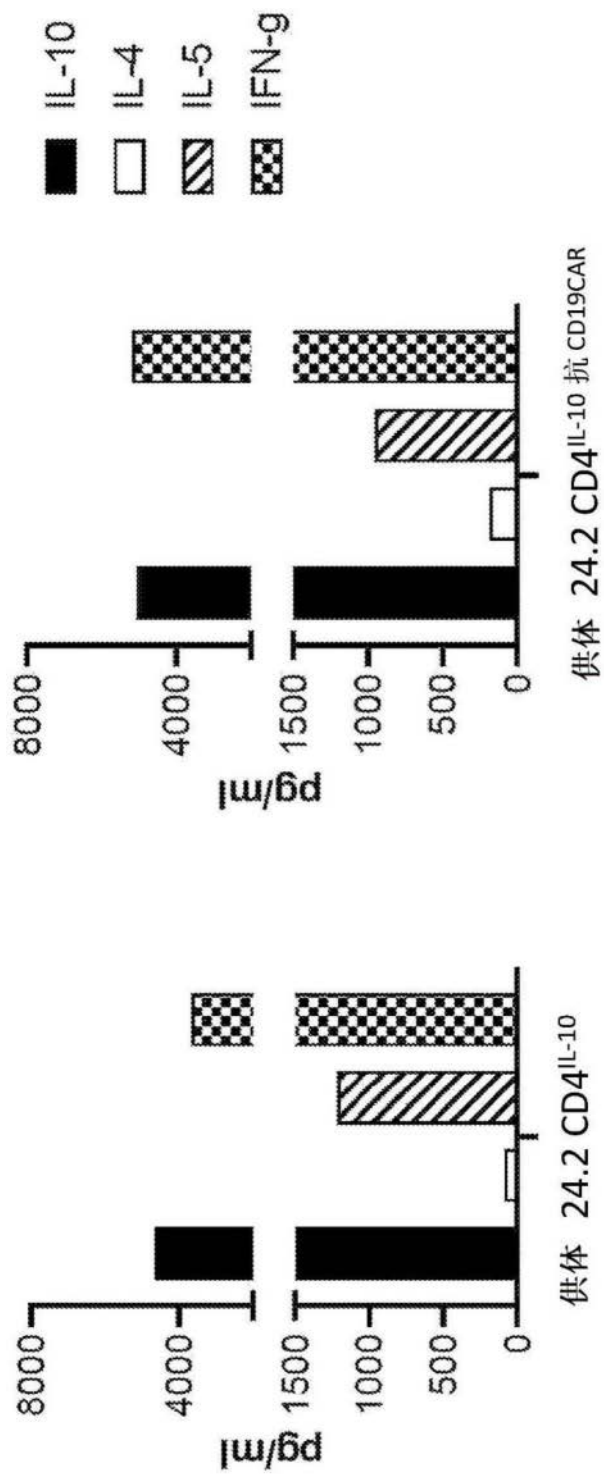


图9

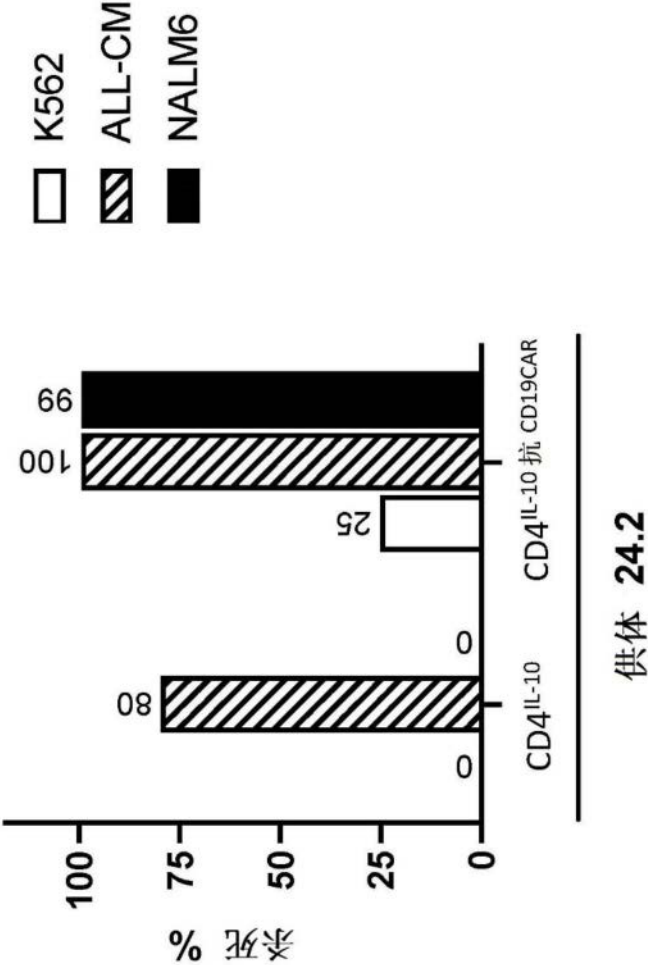


图10

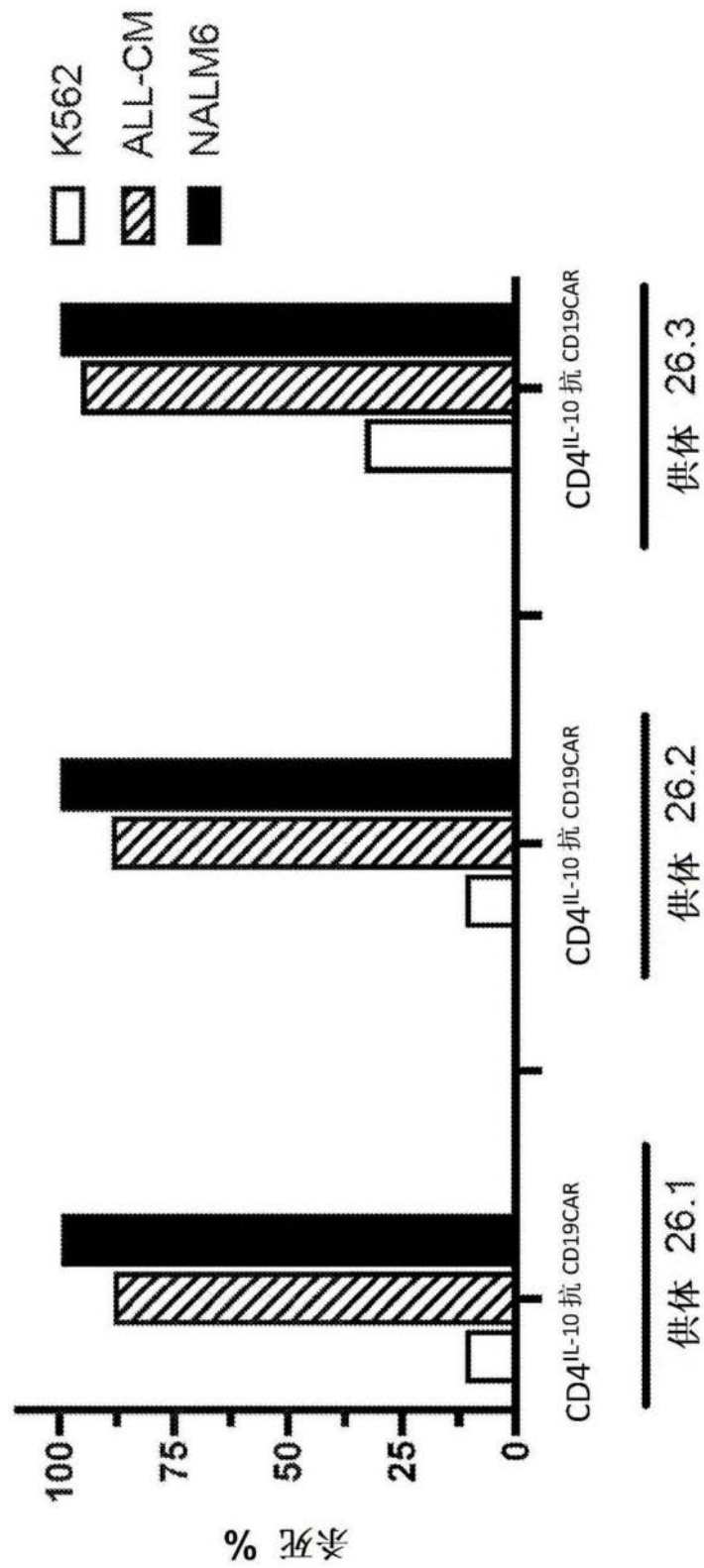


图11A

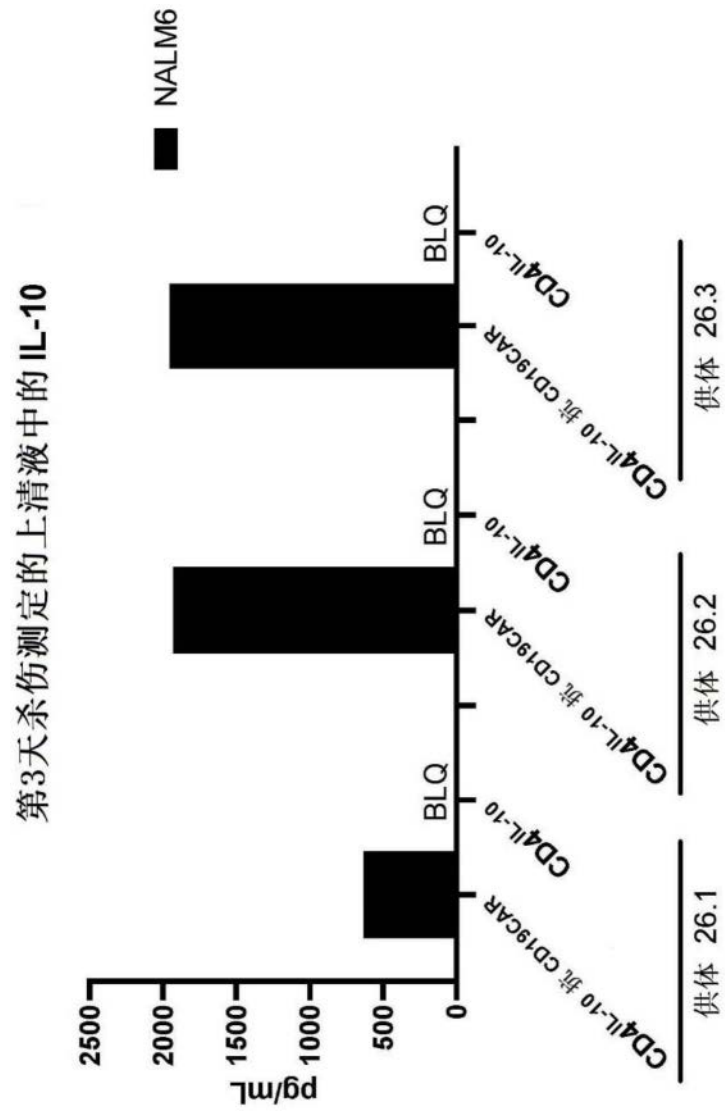


图11B

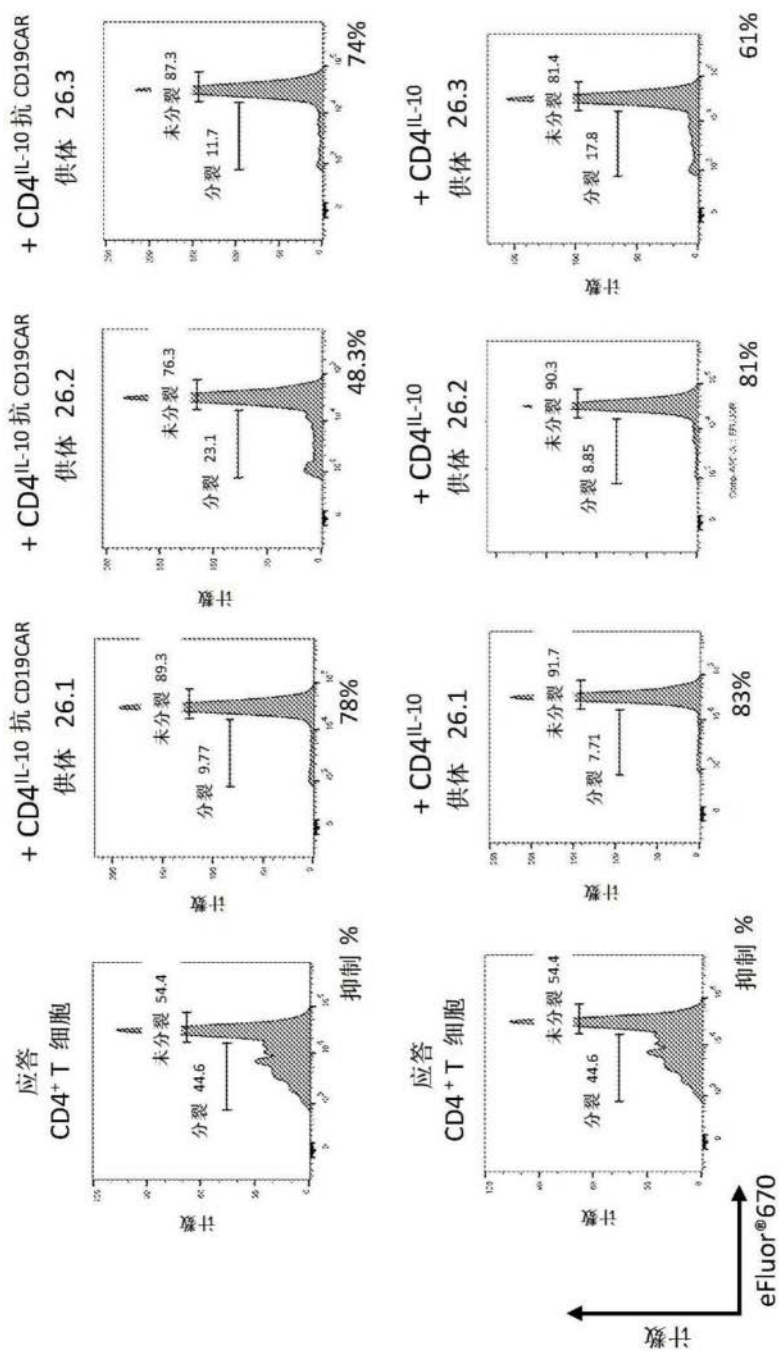


图12

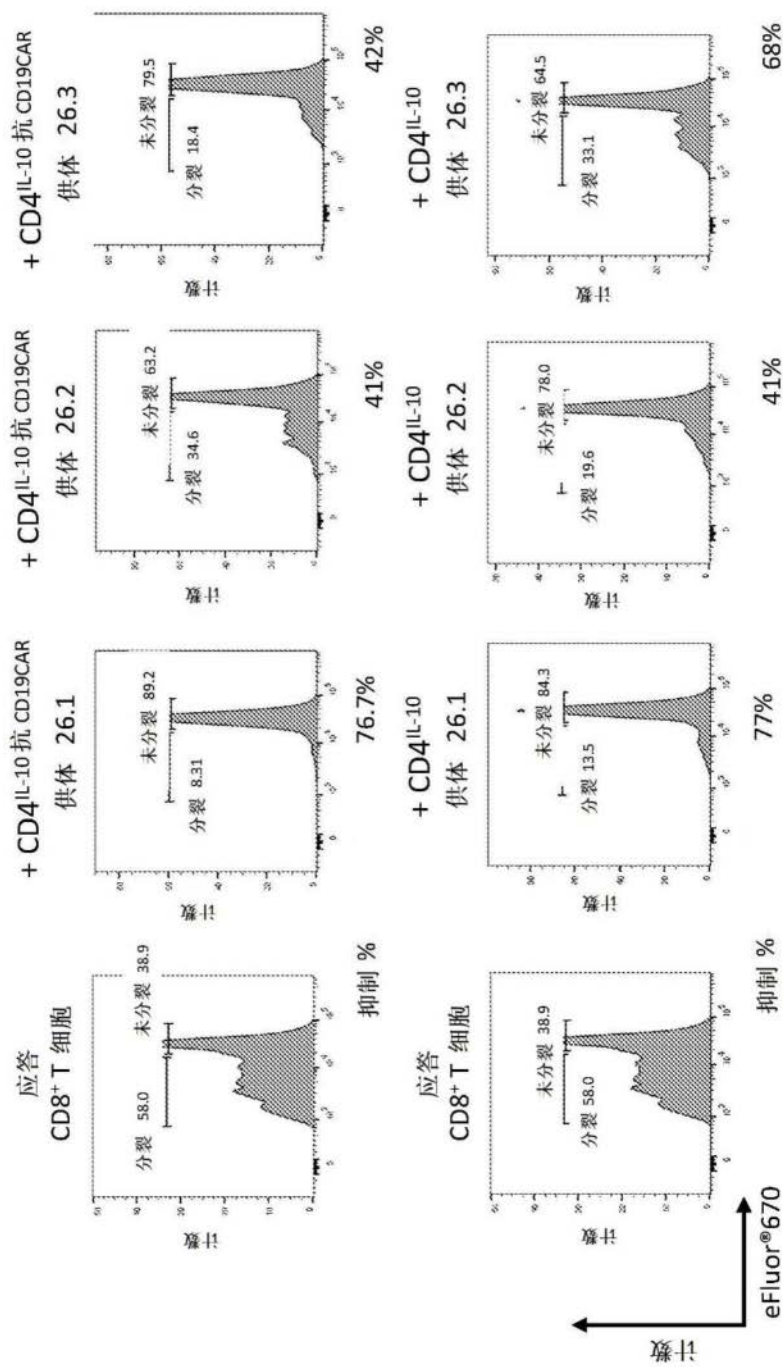


图13

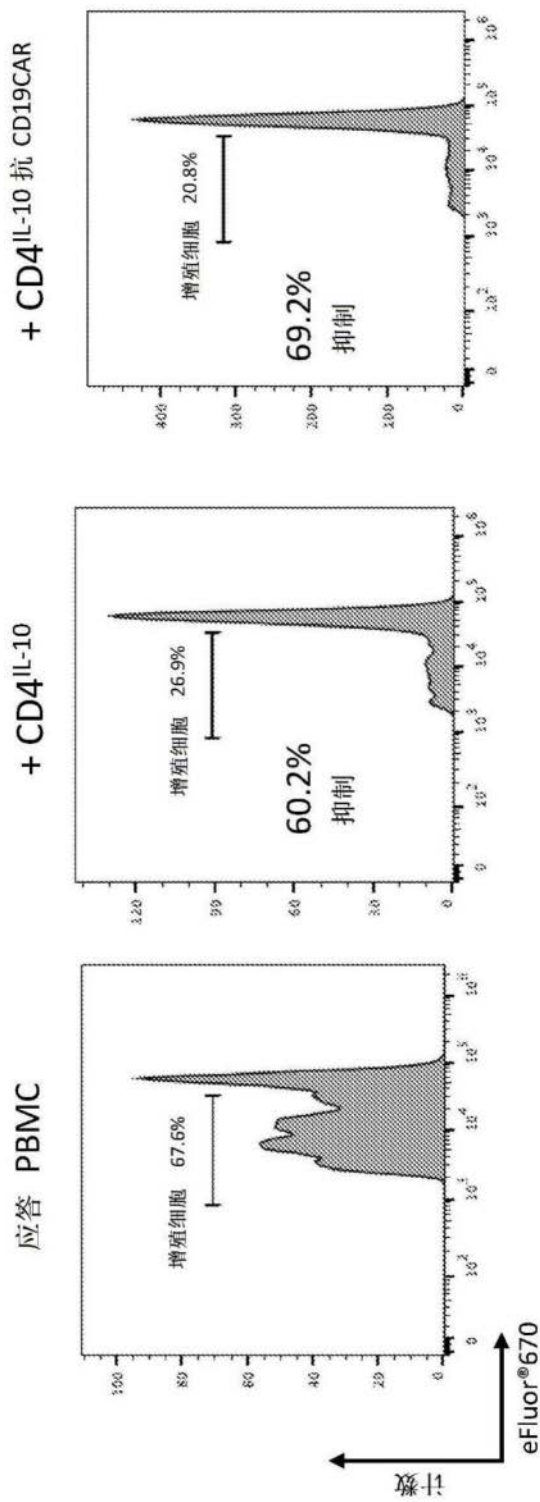


图14

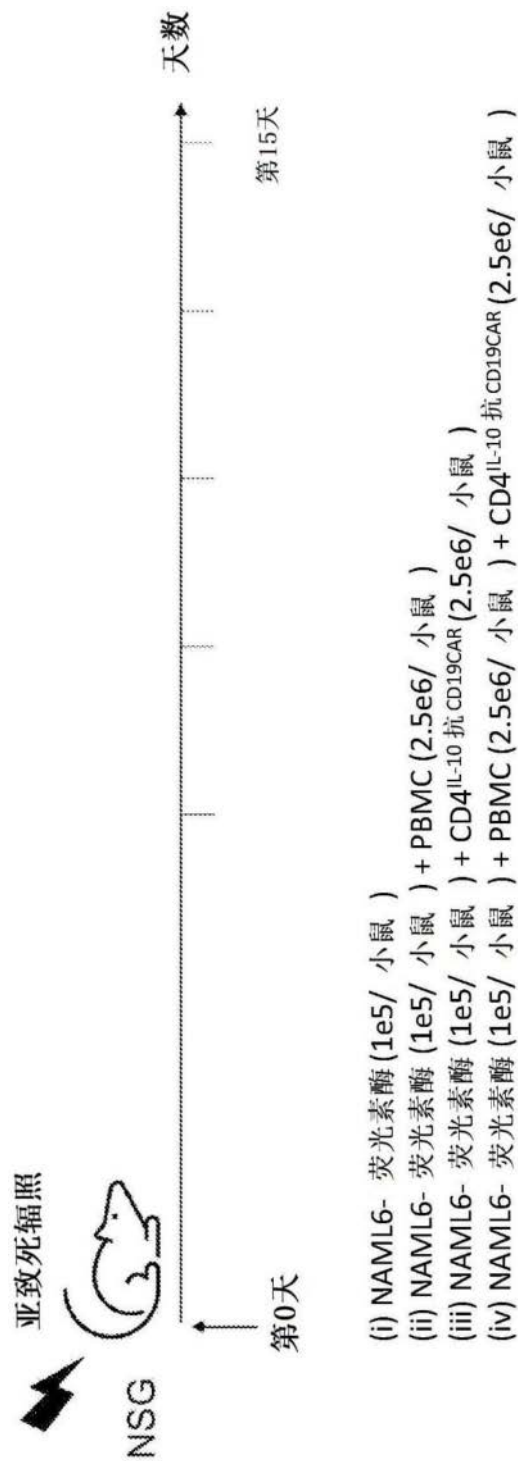


图15

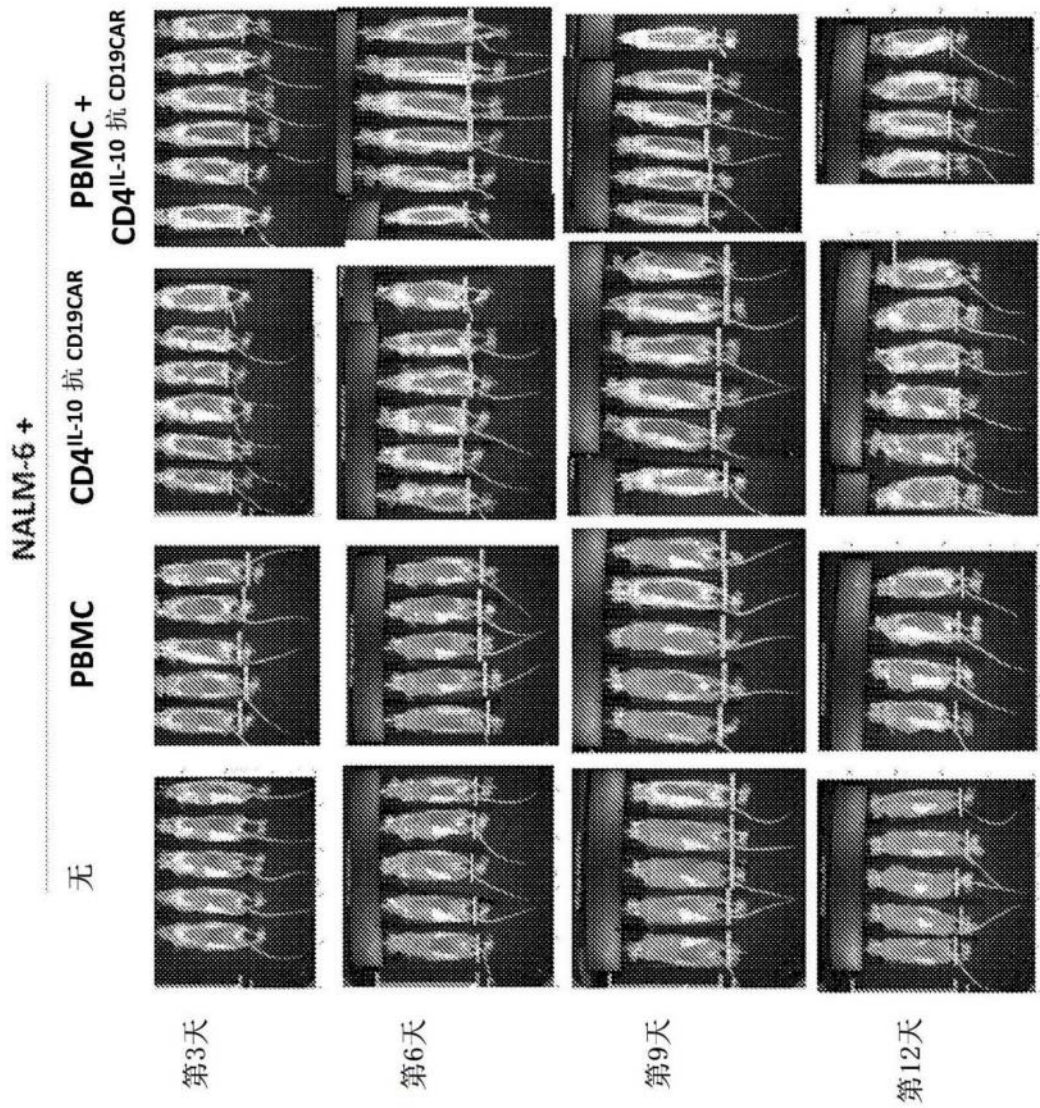


图16A

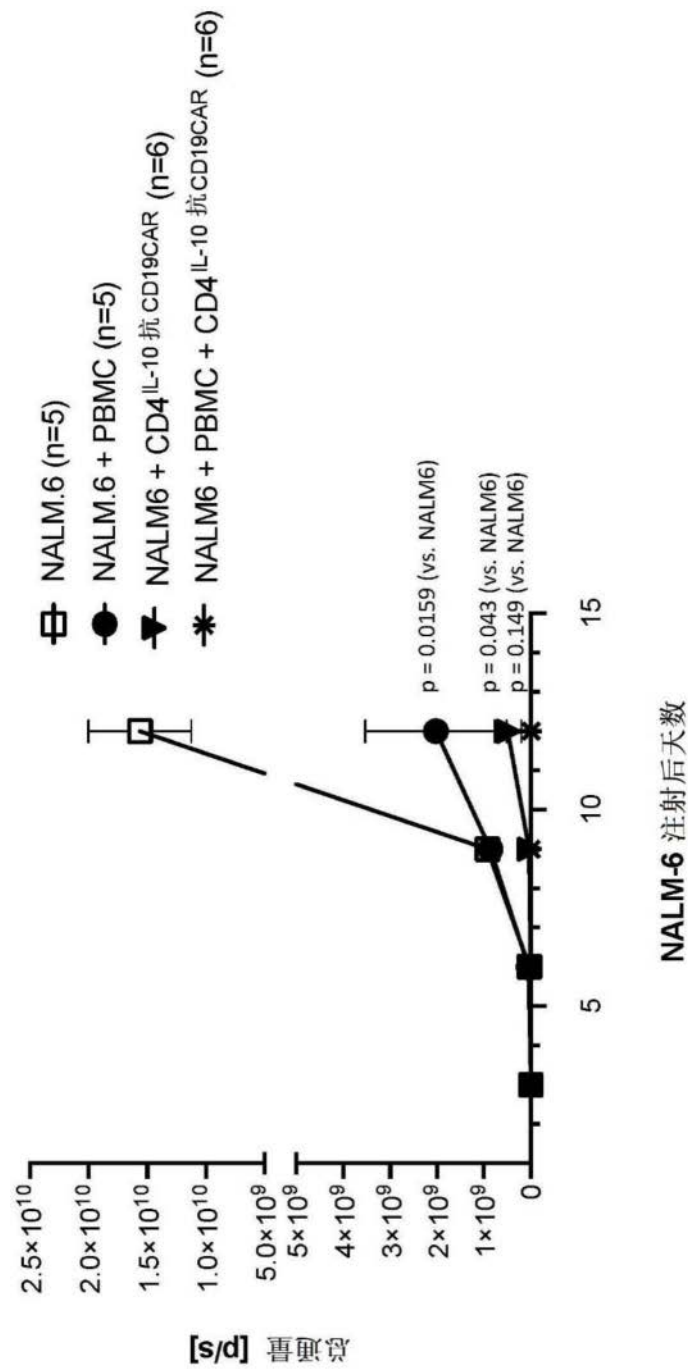


图16B

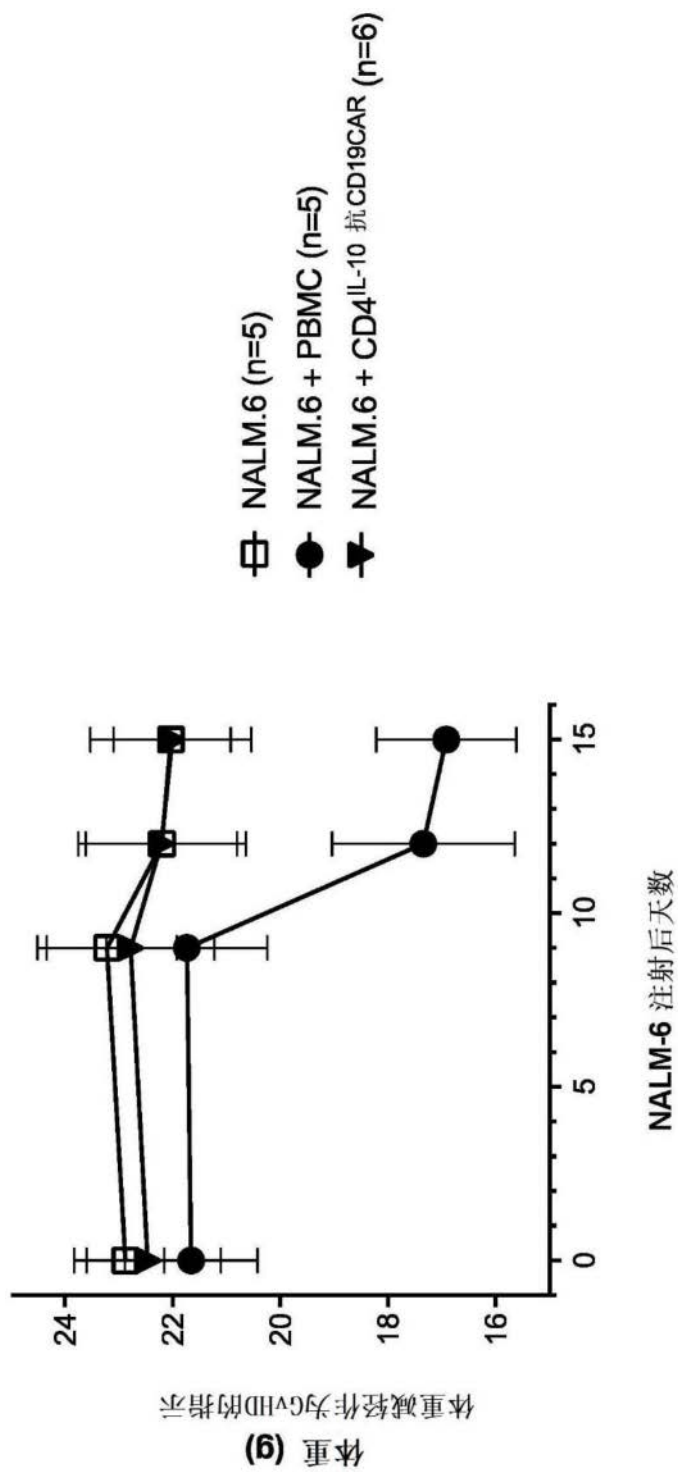


图17

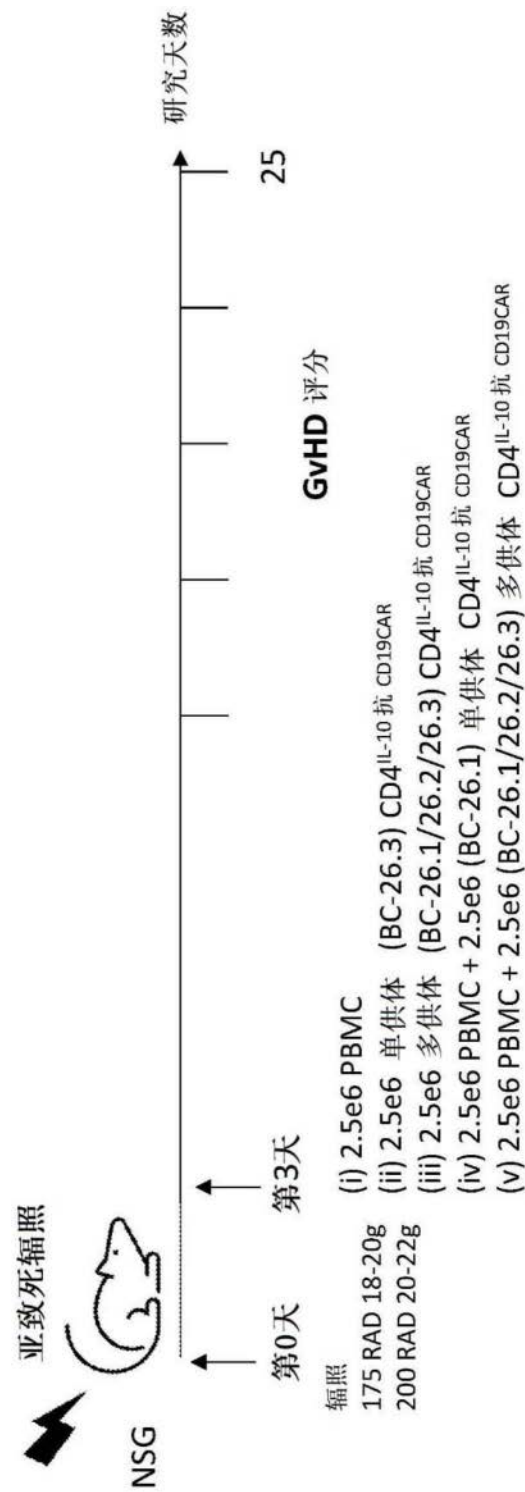


图18A

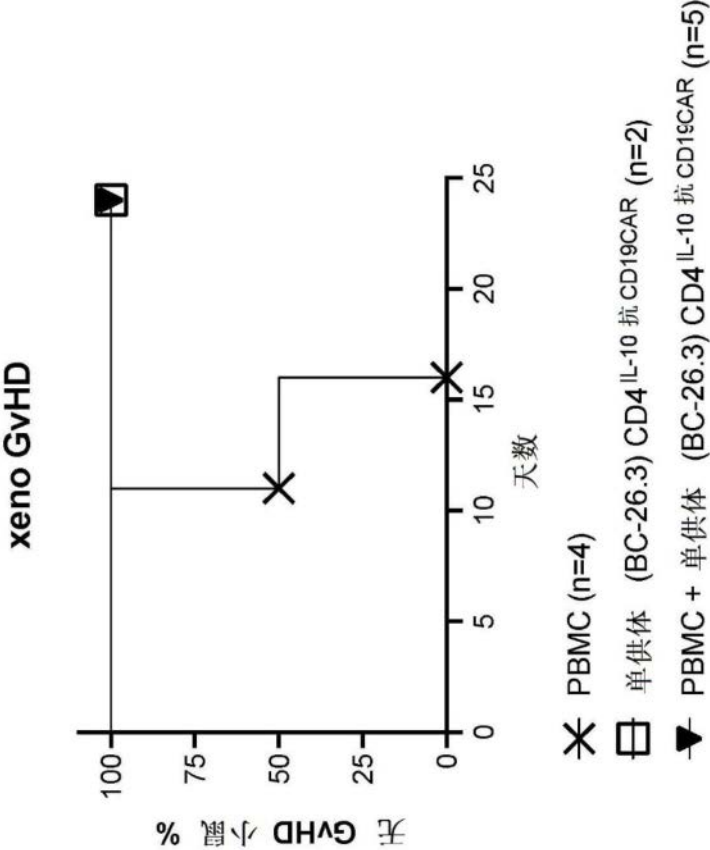


图18B

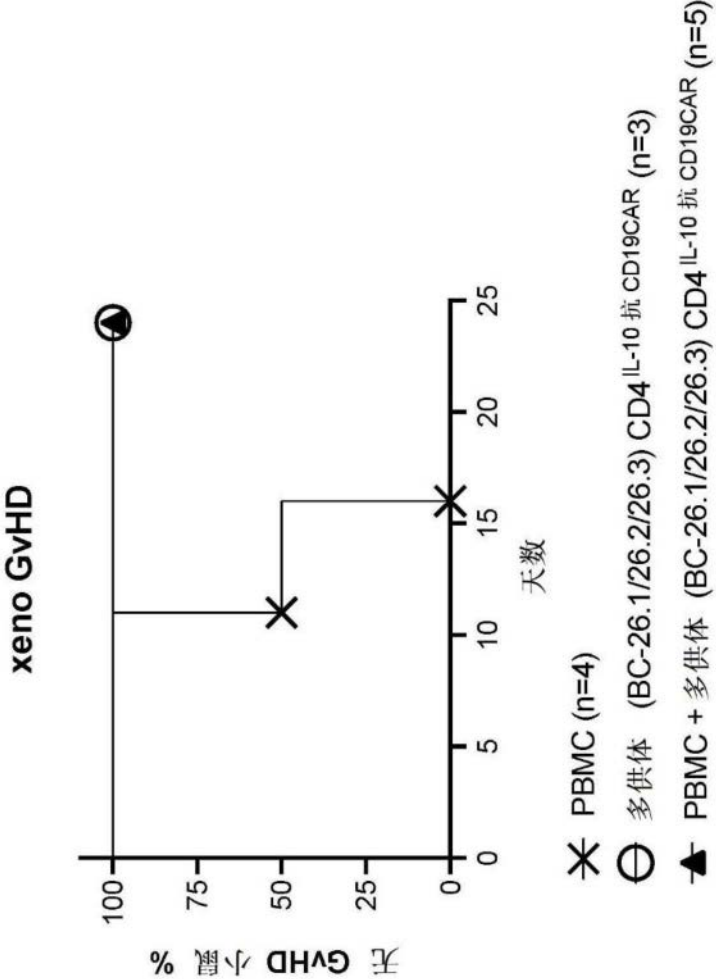


图18C

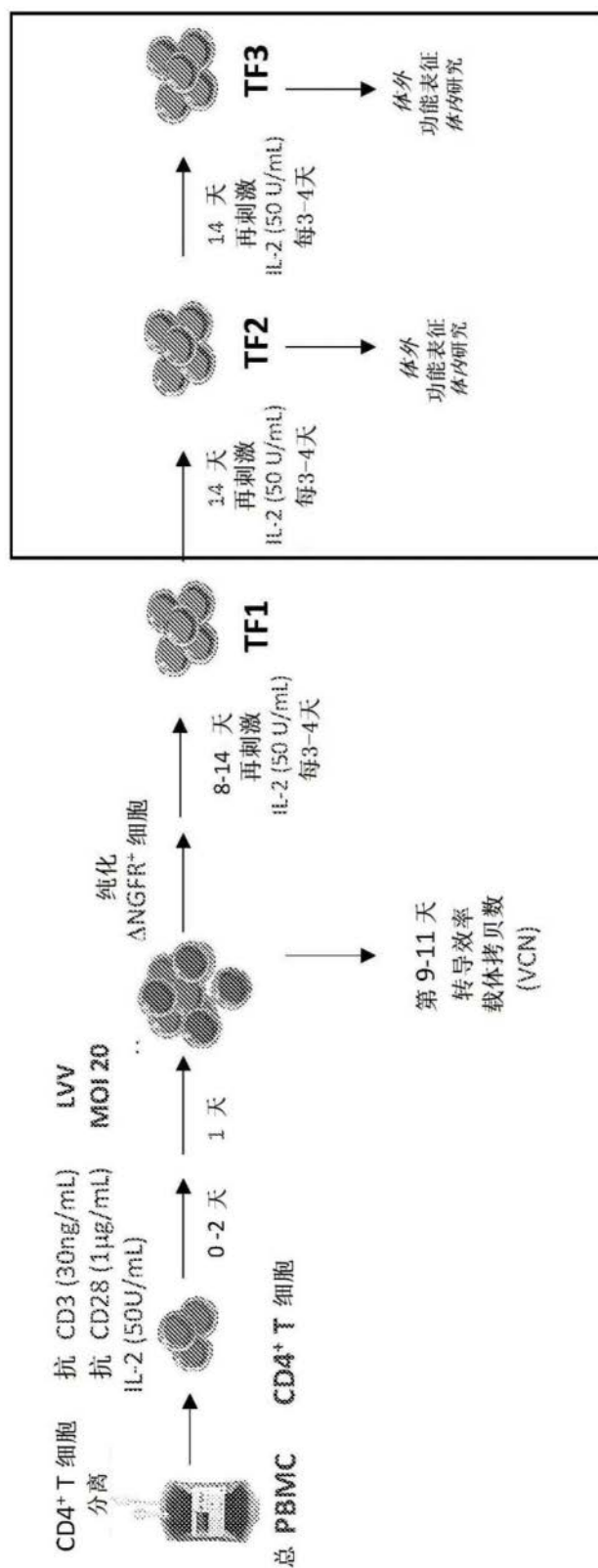


图19

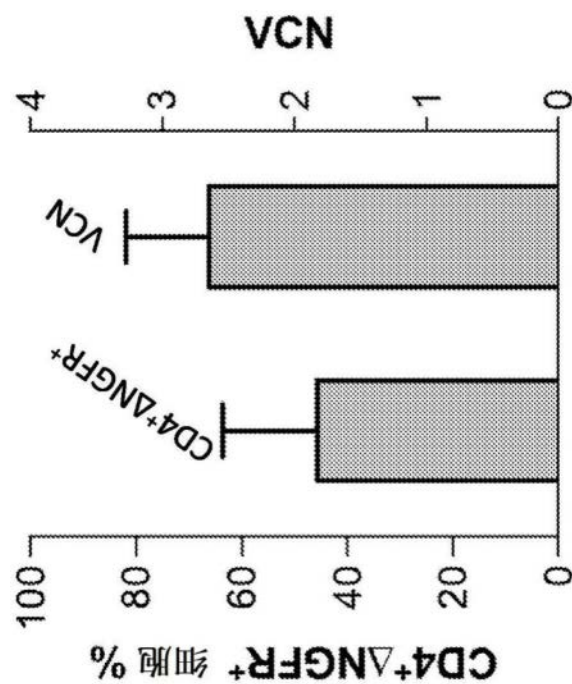


图20A

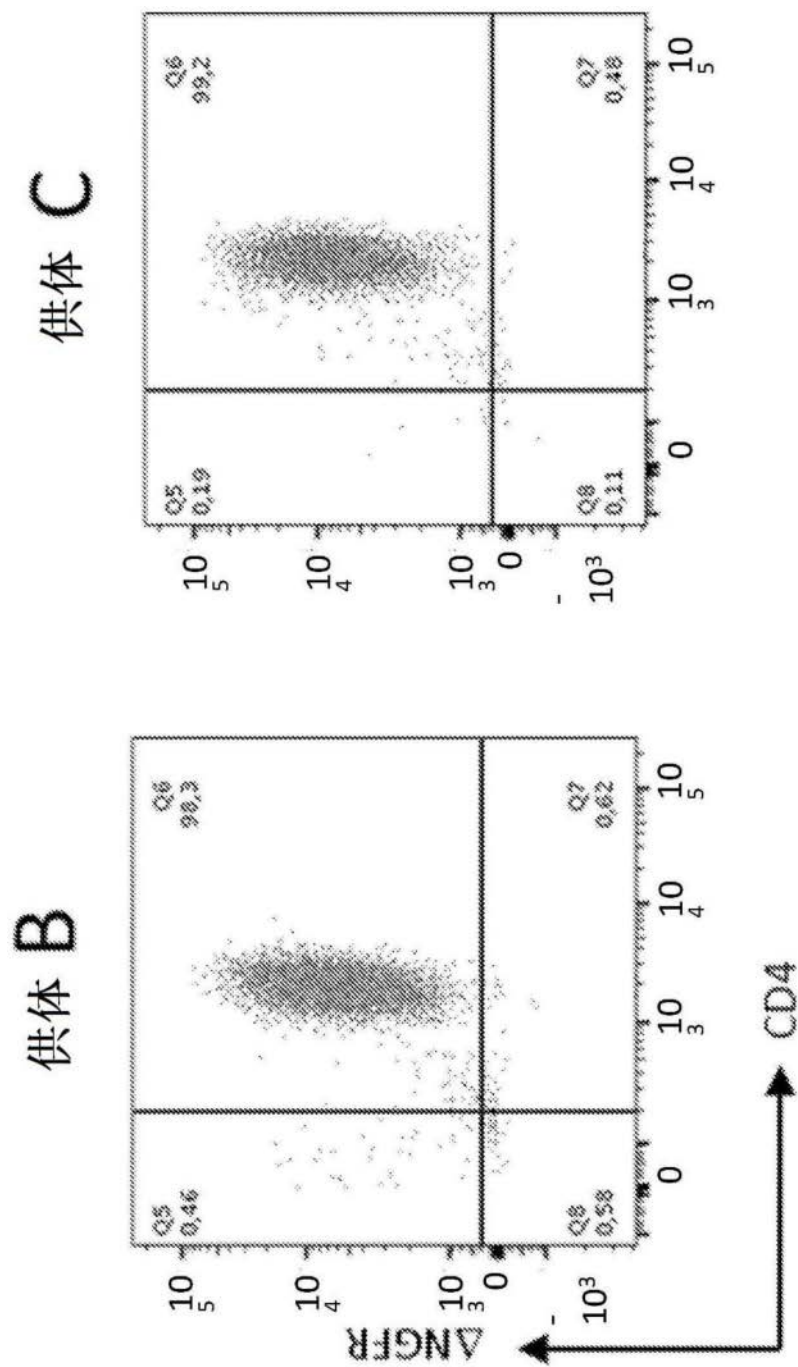


图20B

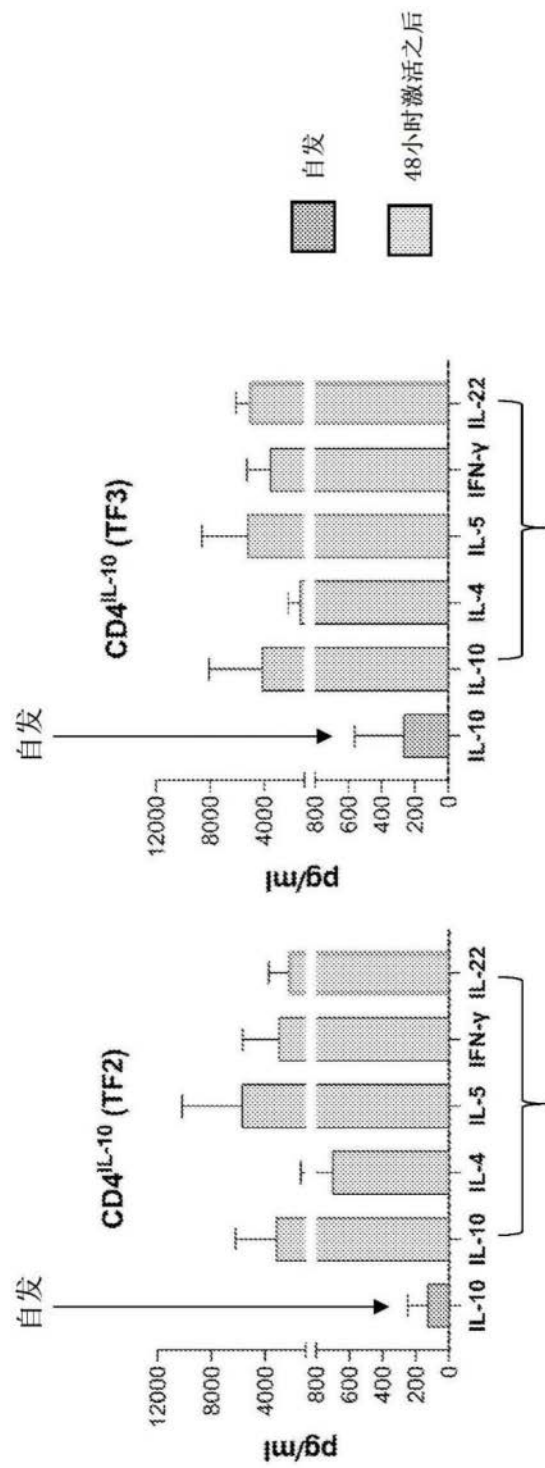


图21

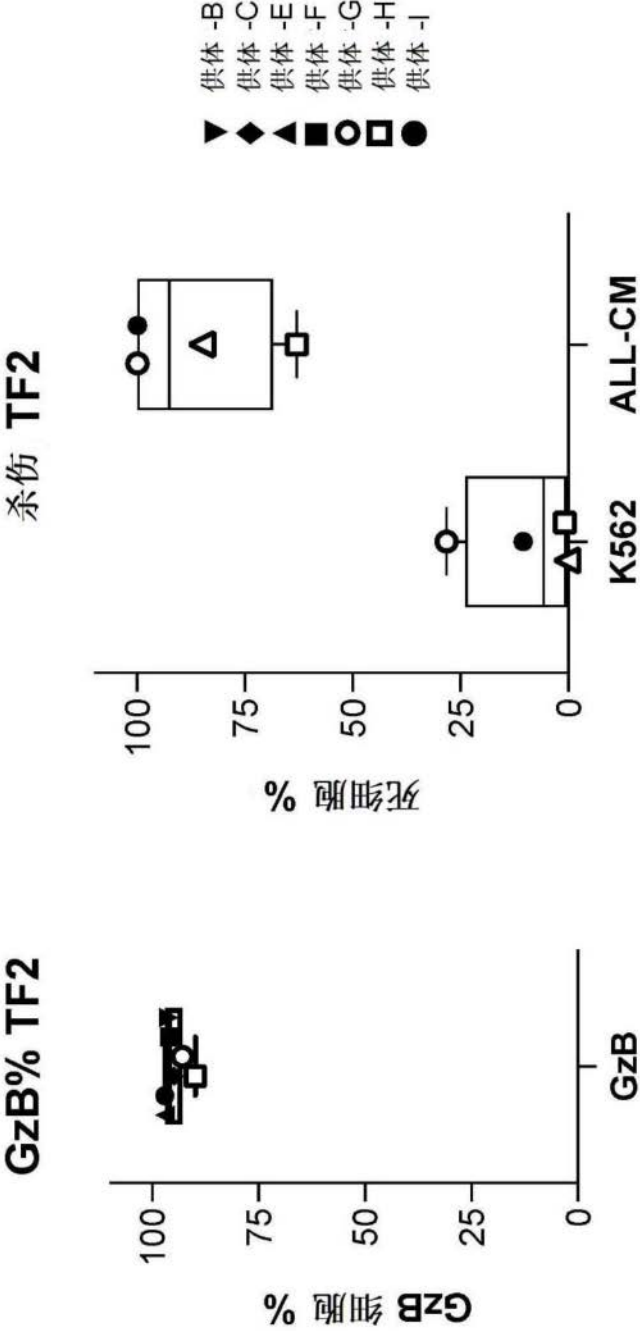


图22B

图22A

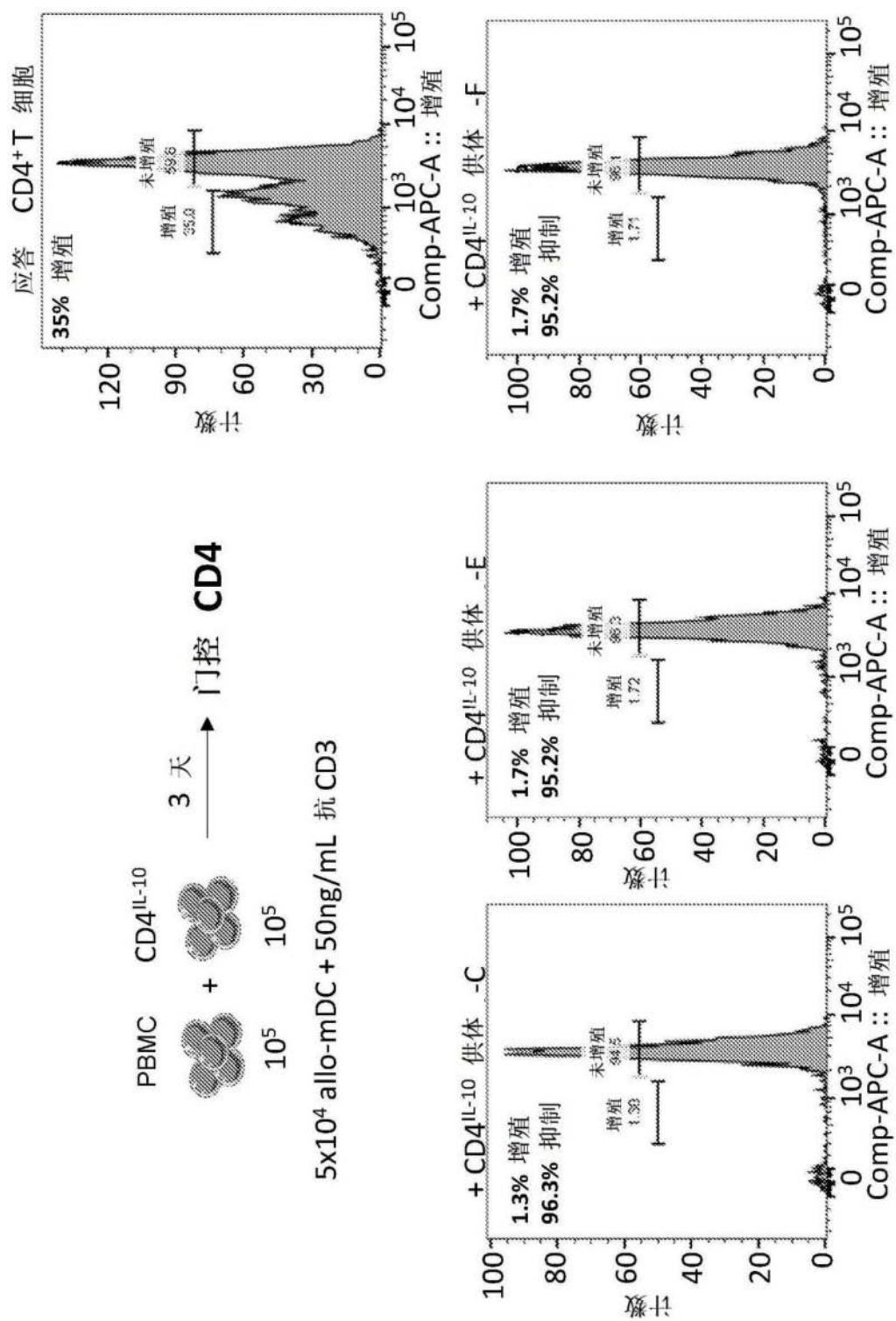


图23A

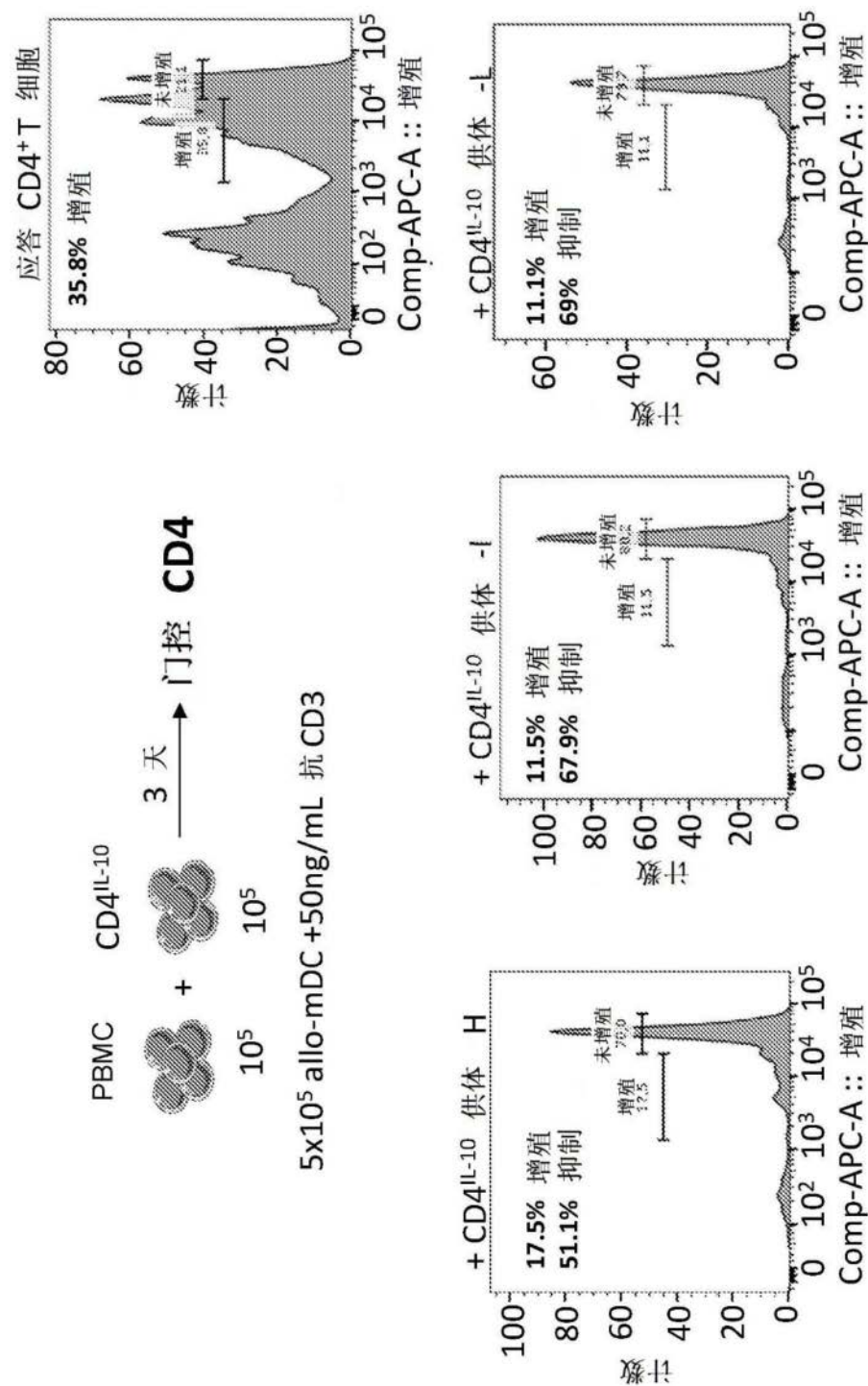


图23B

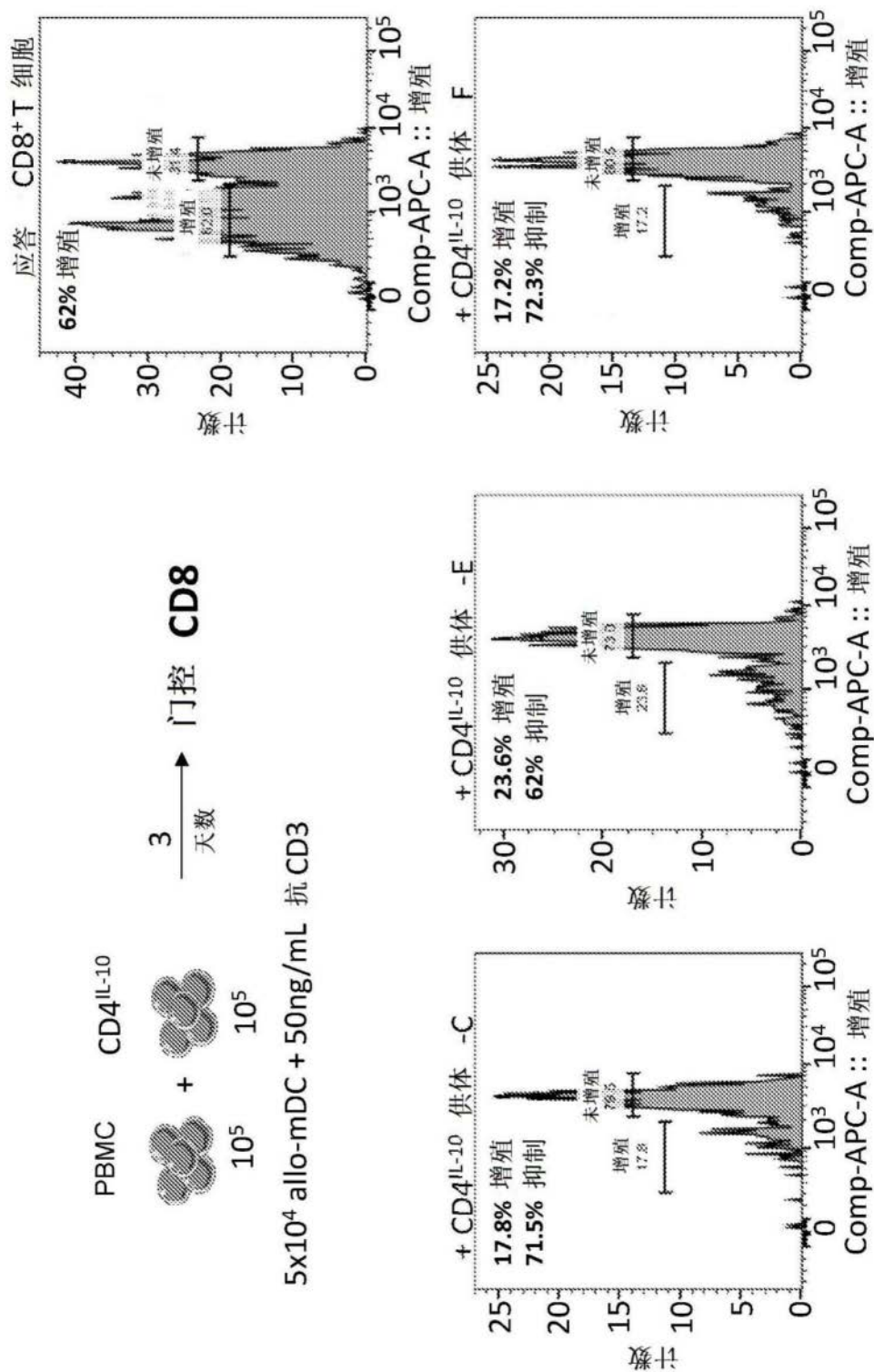


图24A

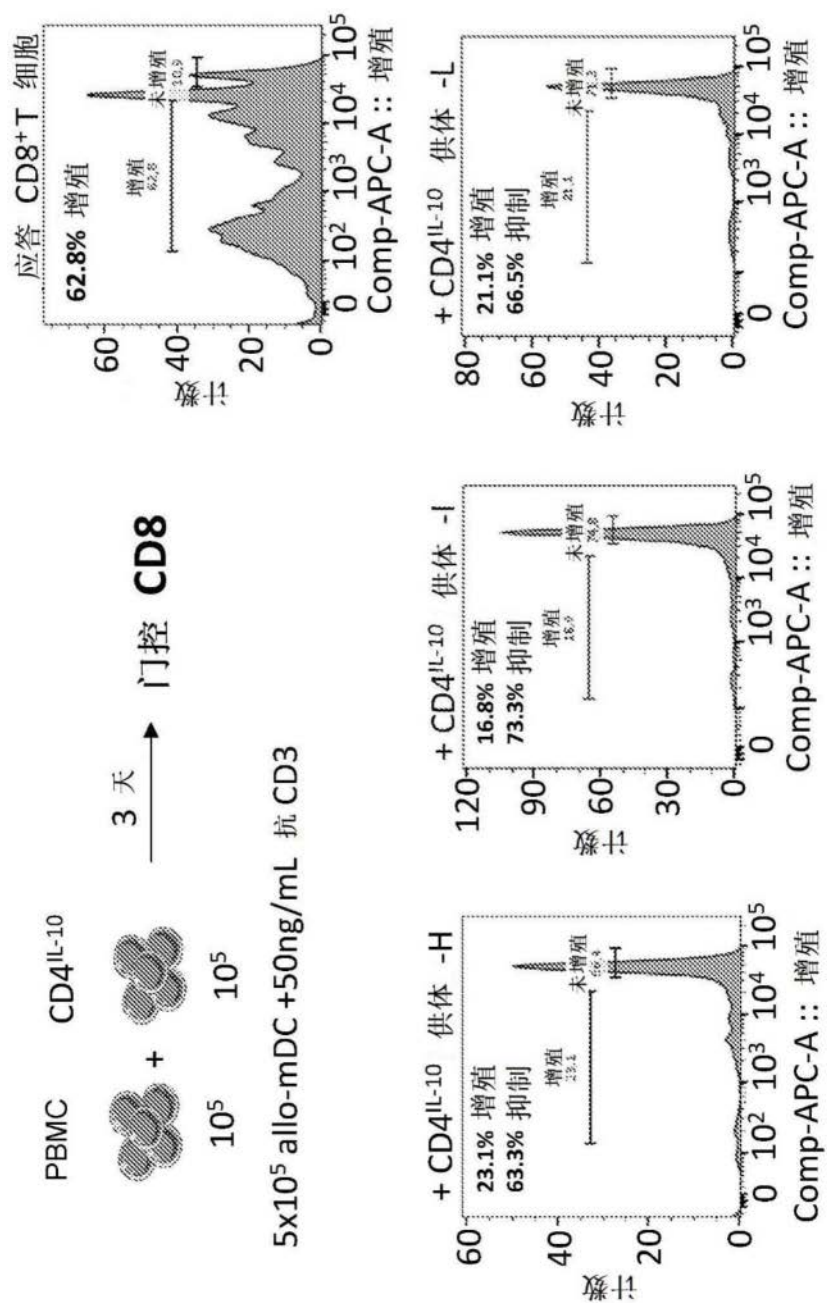


图24B

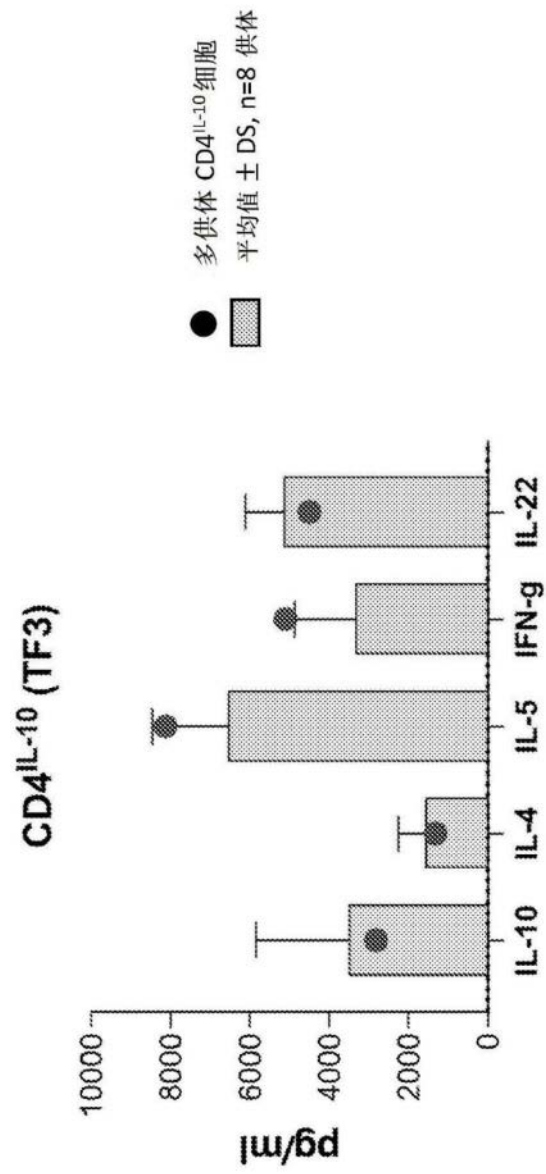


图25

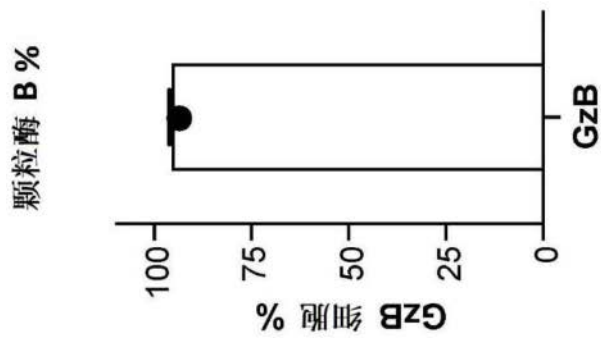


图26A

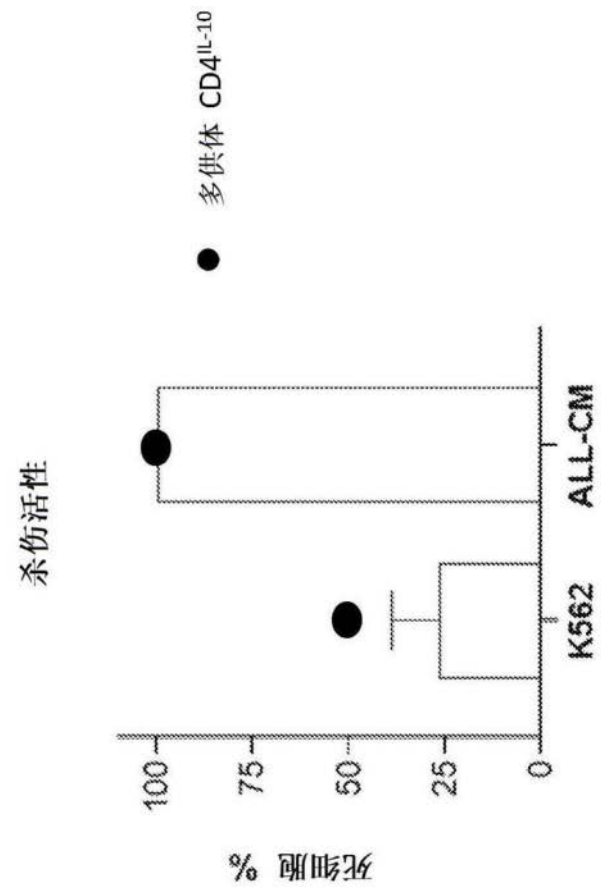


图26B

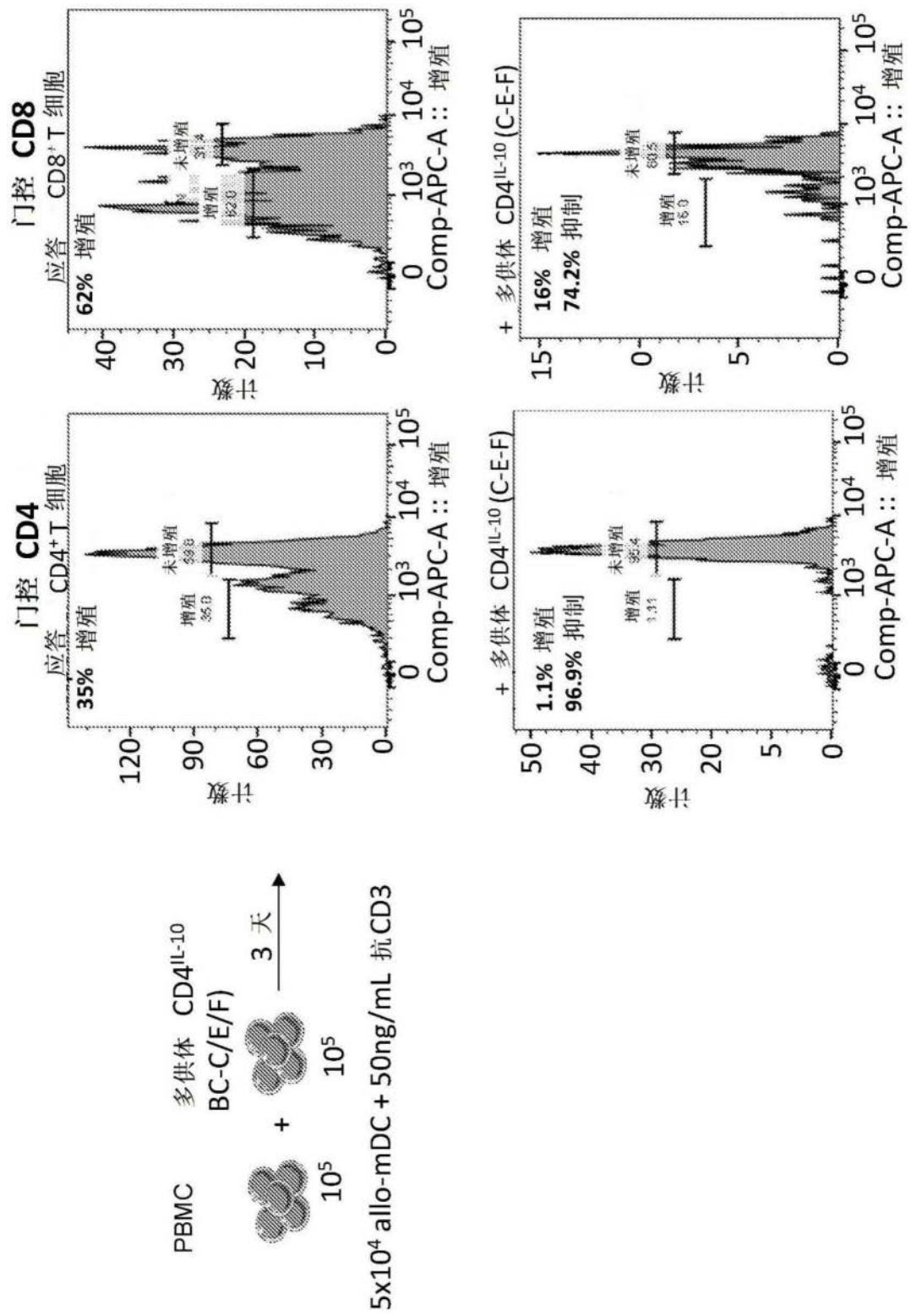


图27A

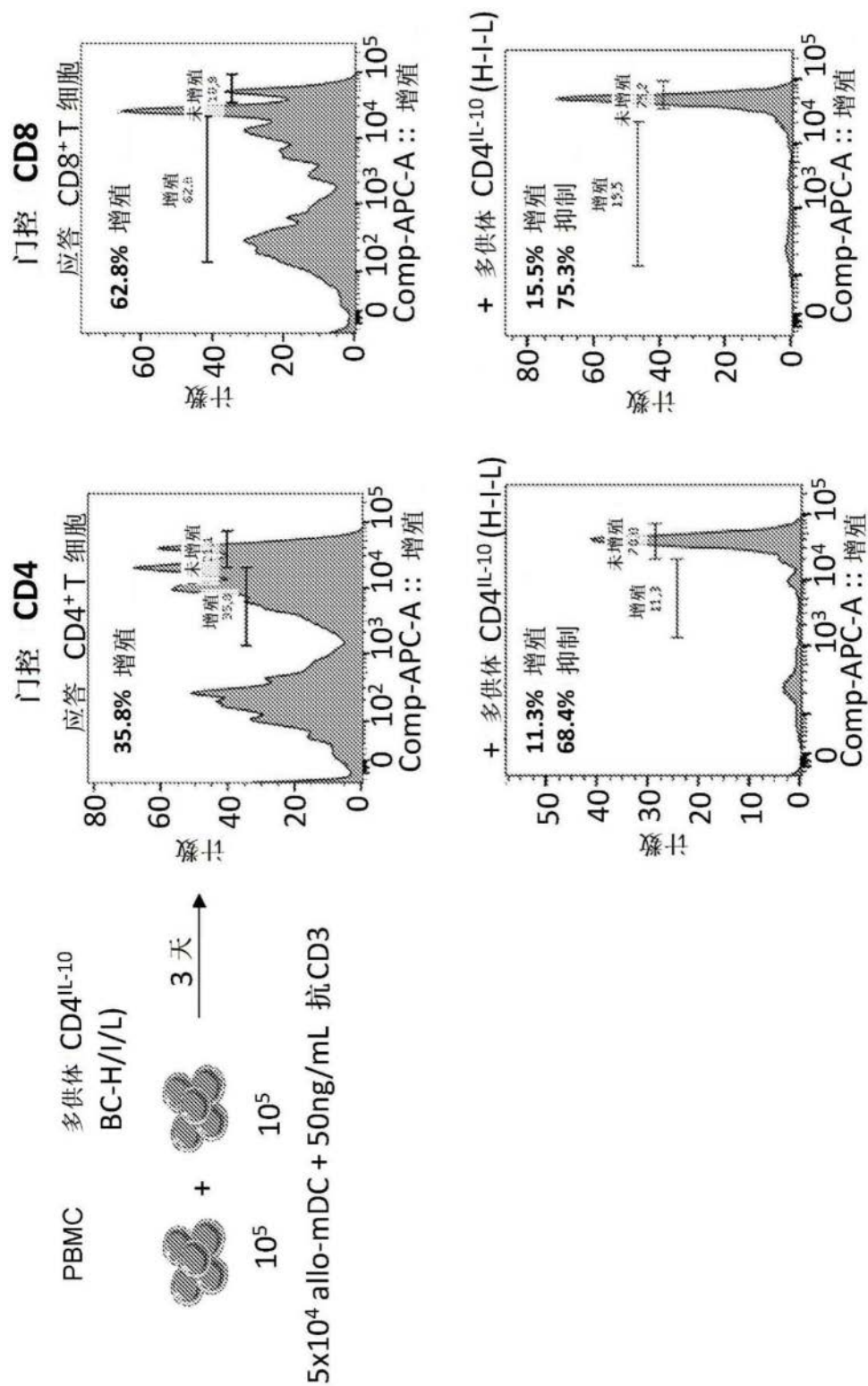


图27B

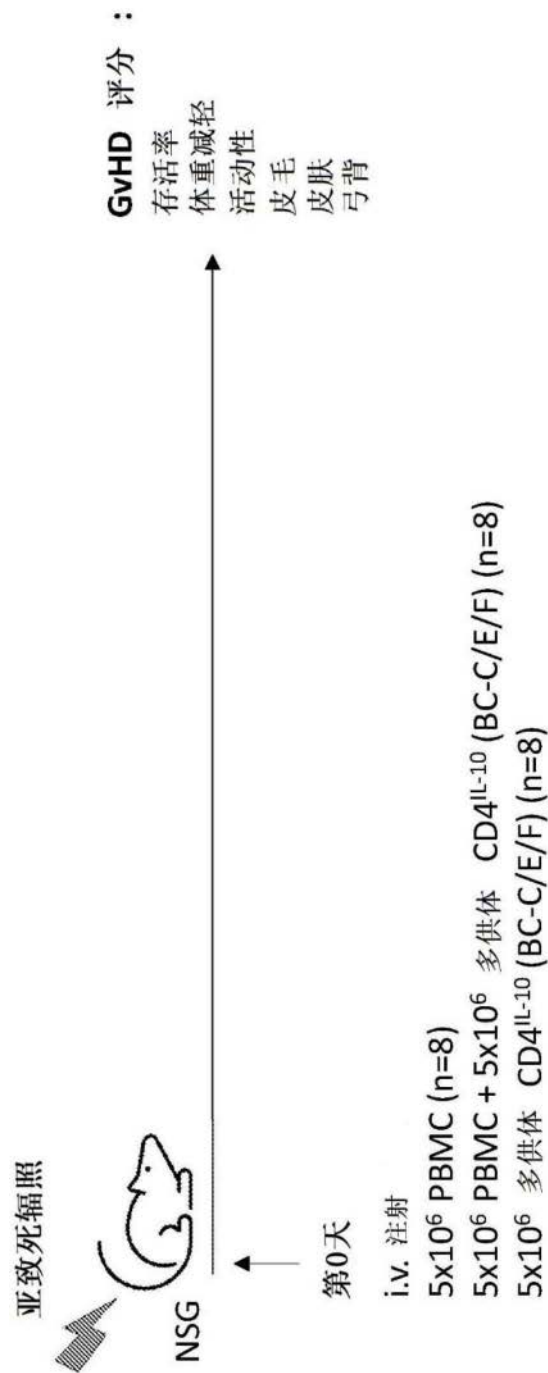


图28

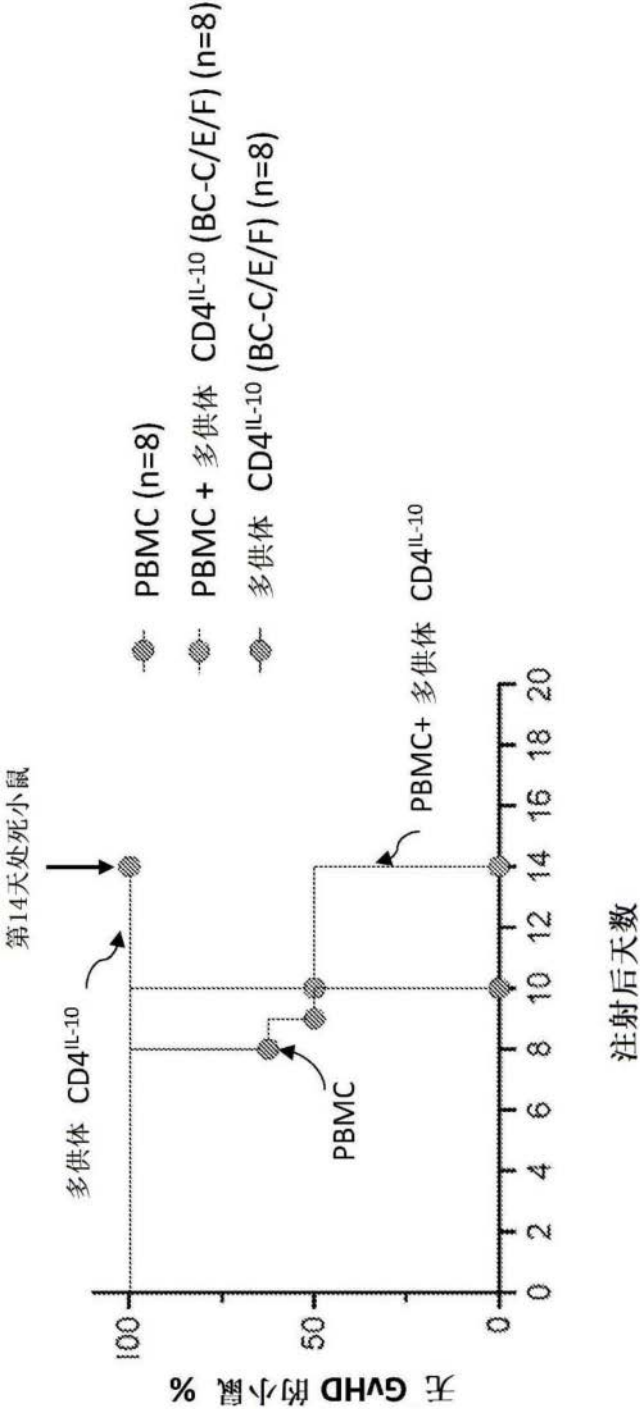


图29

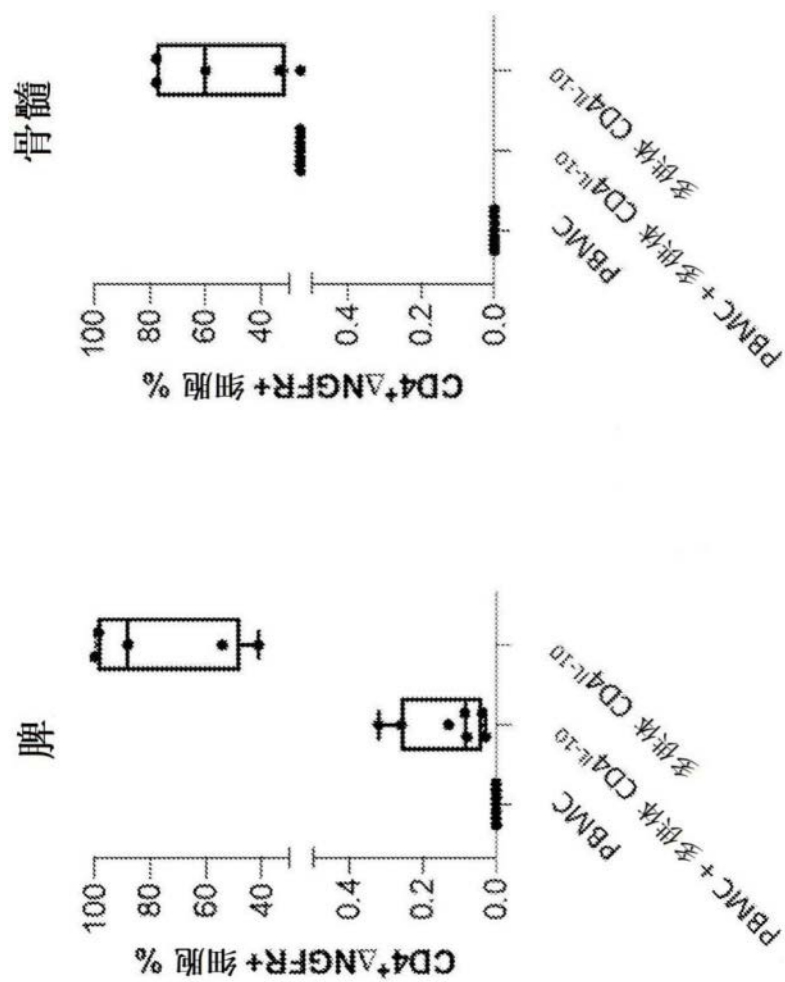


图30

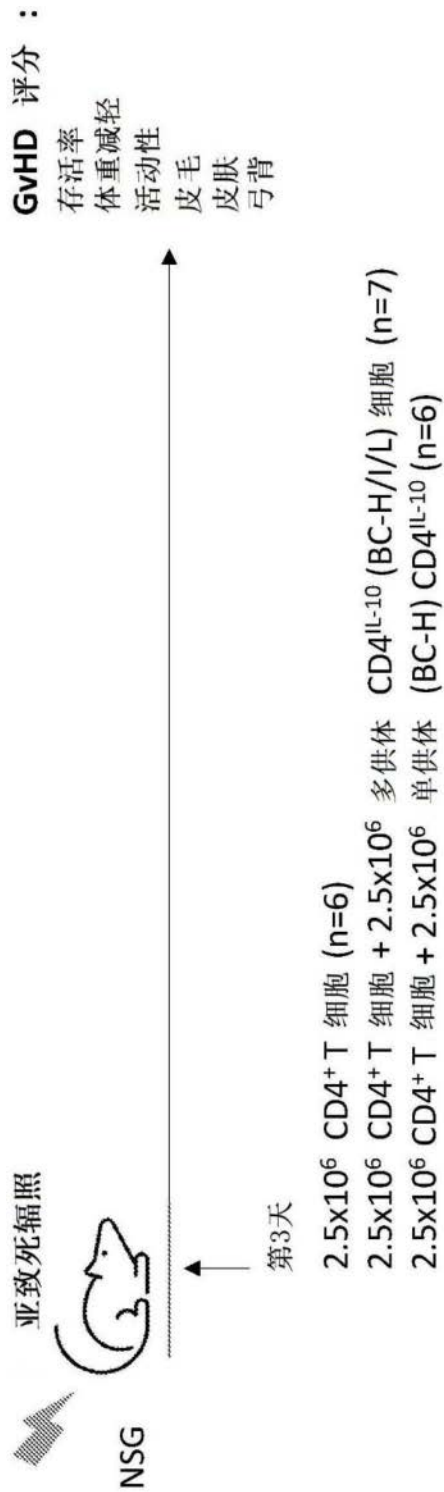


图31

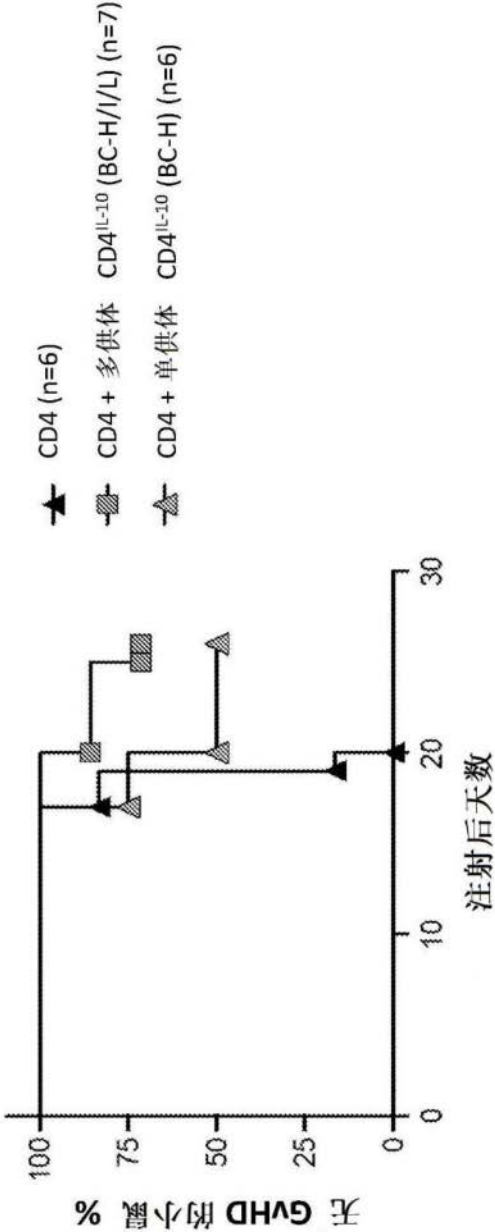


图32

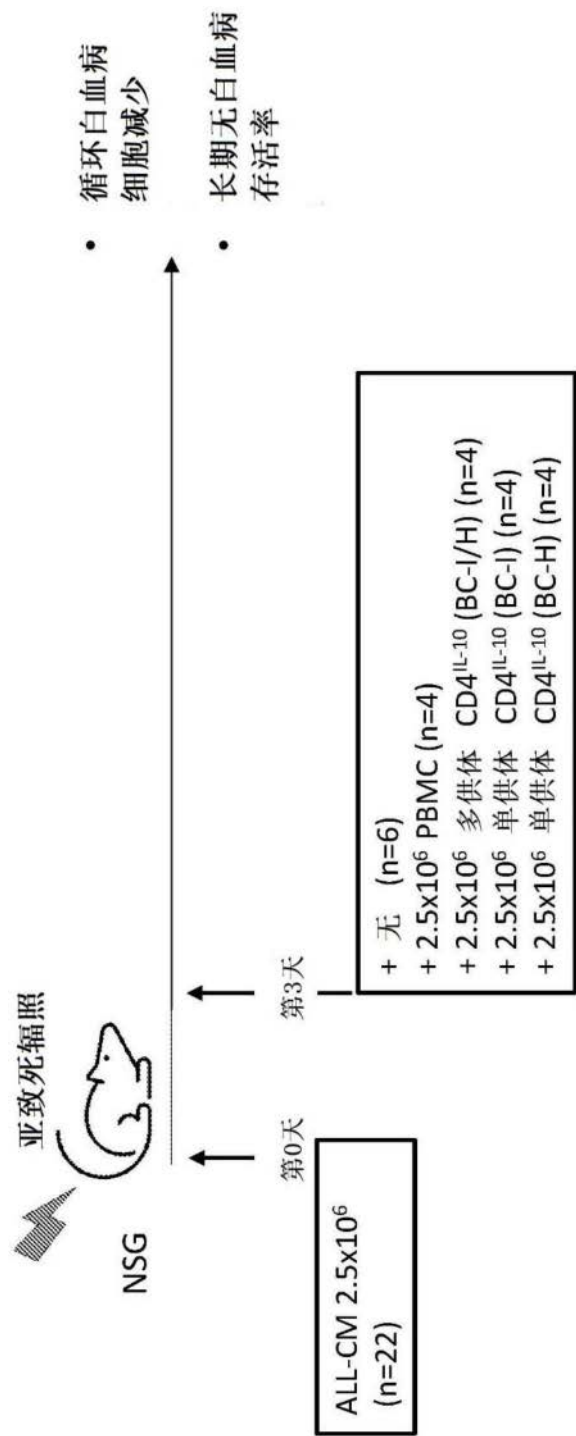


图33A

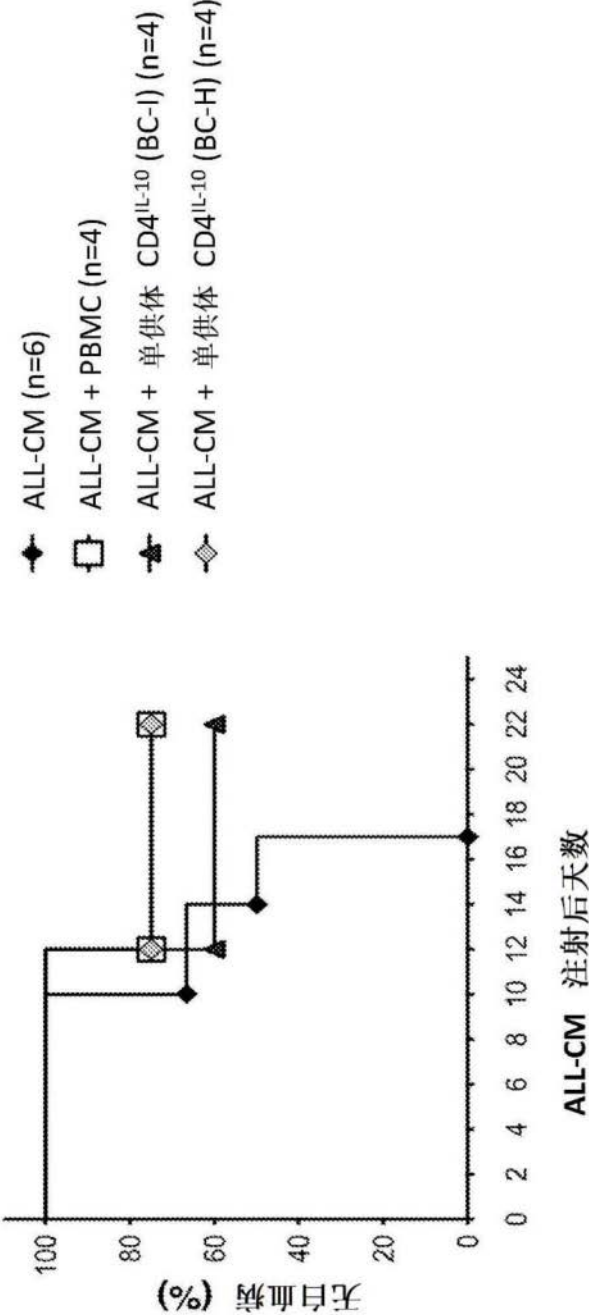


图33B

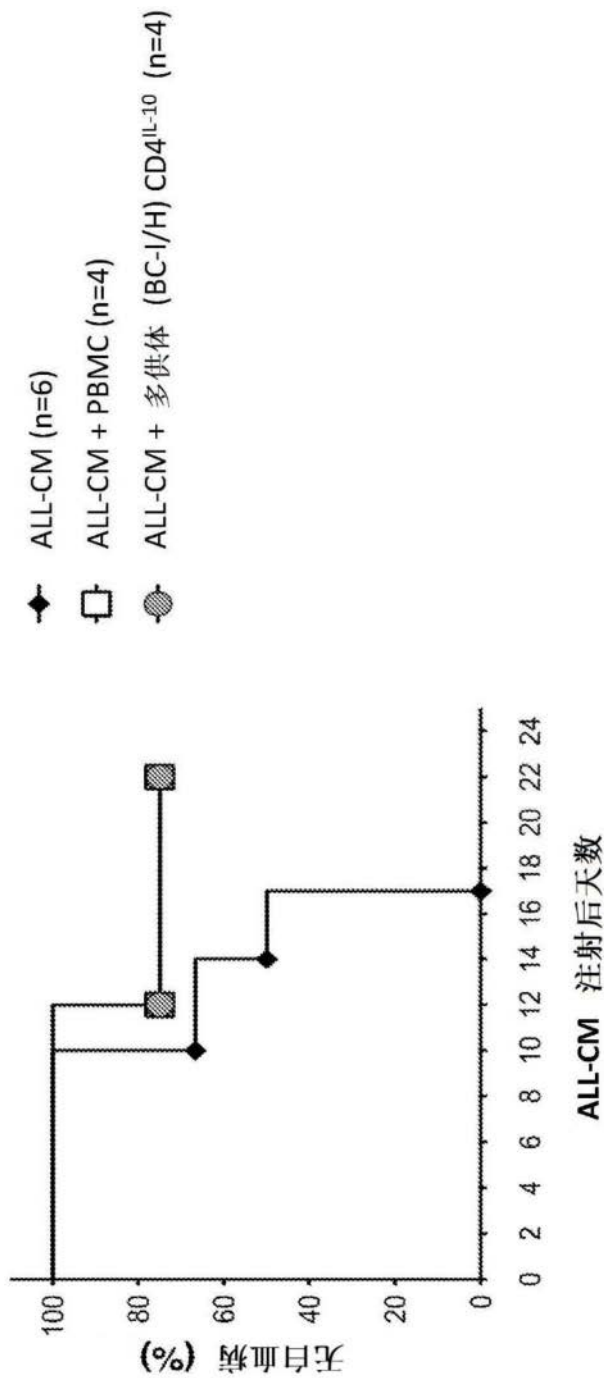


图33C

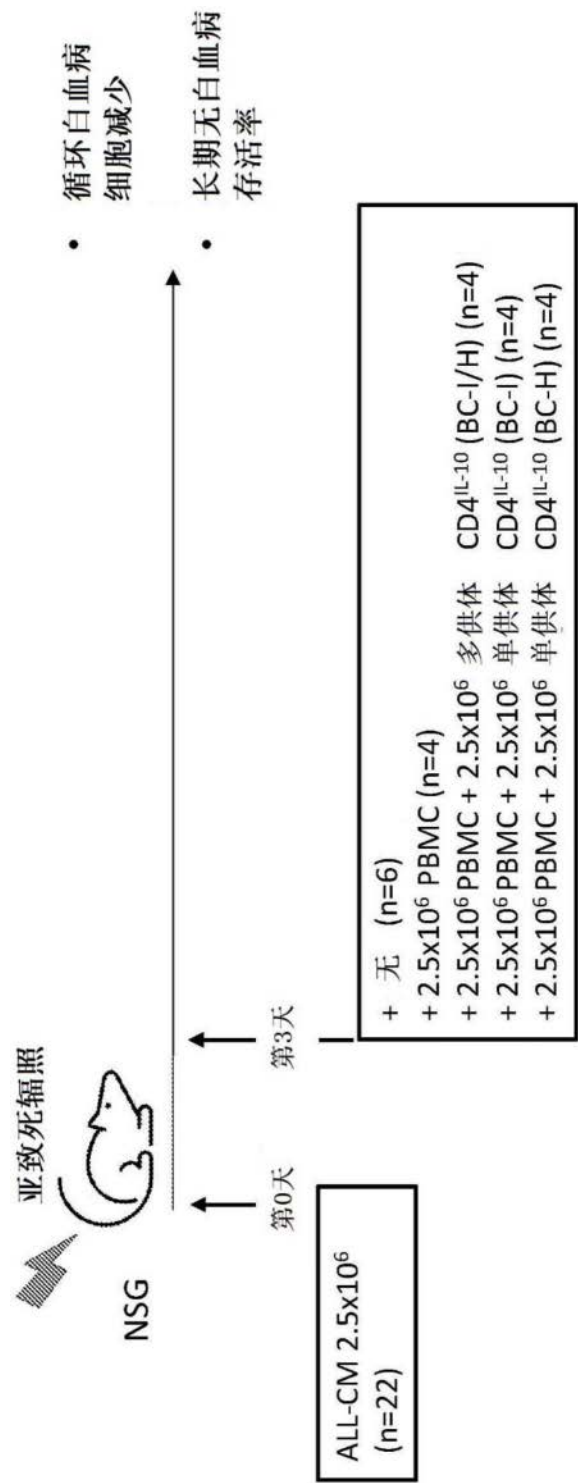


图34A

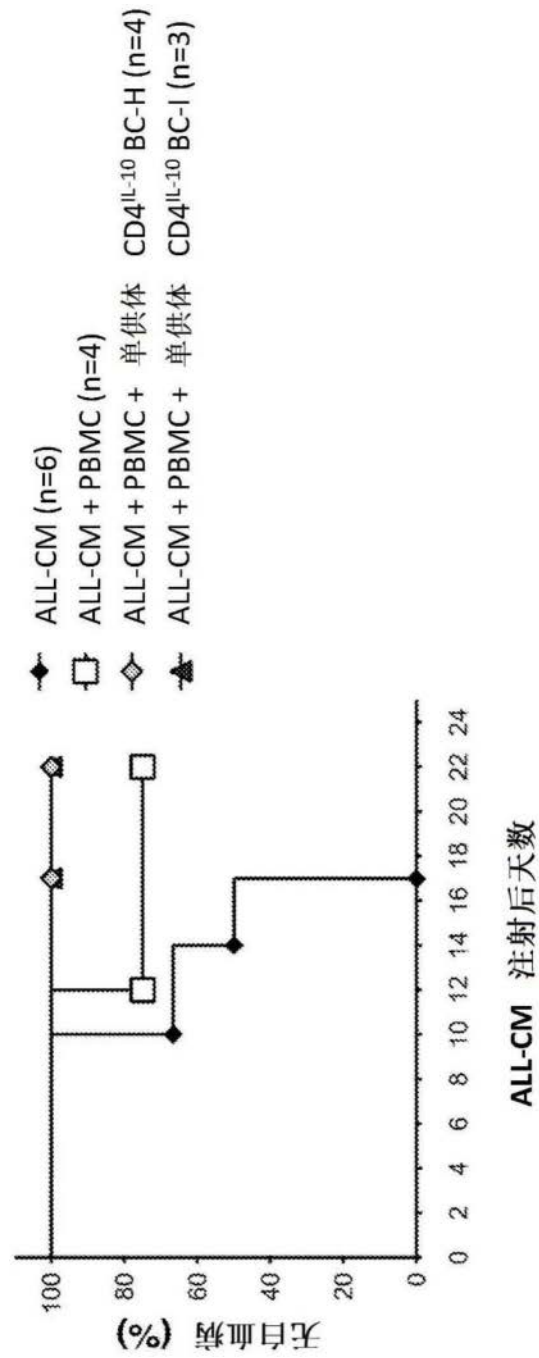


图34B

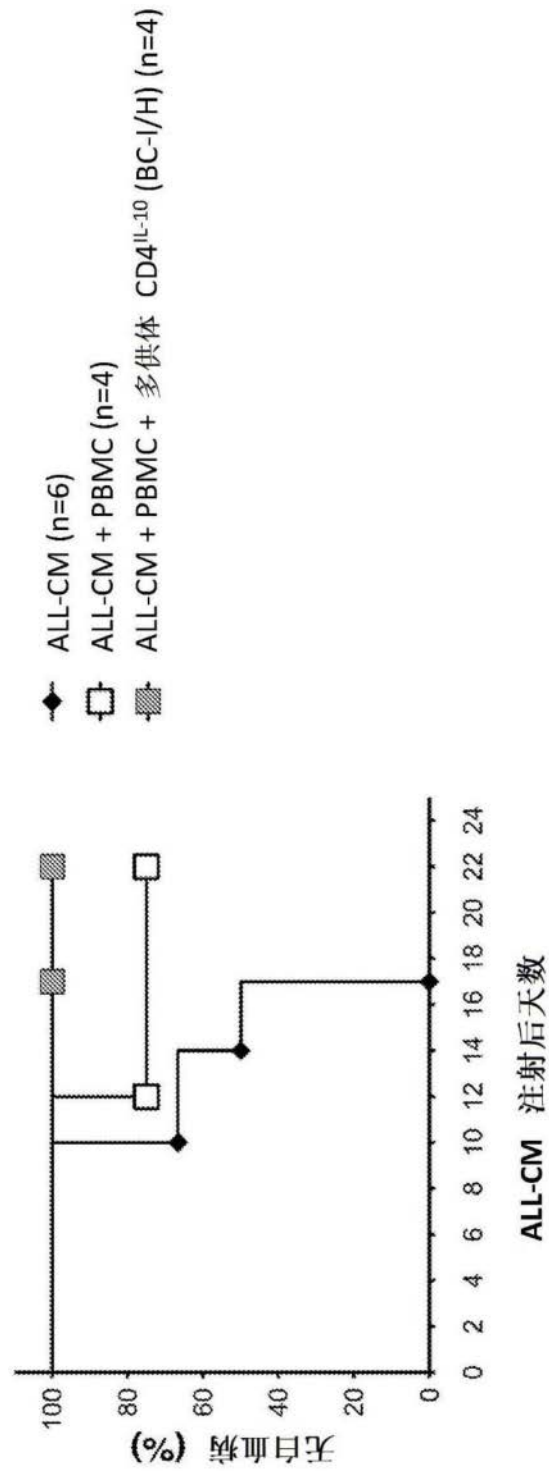


图34C

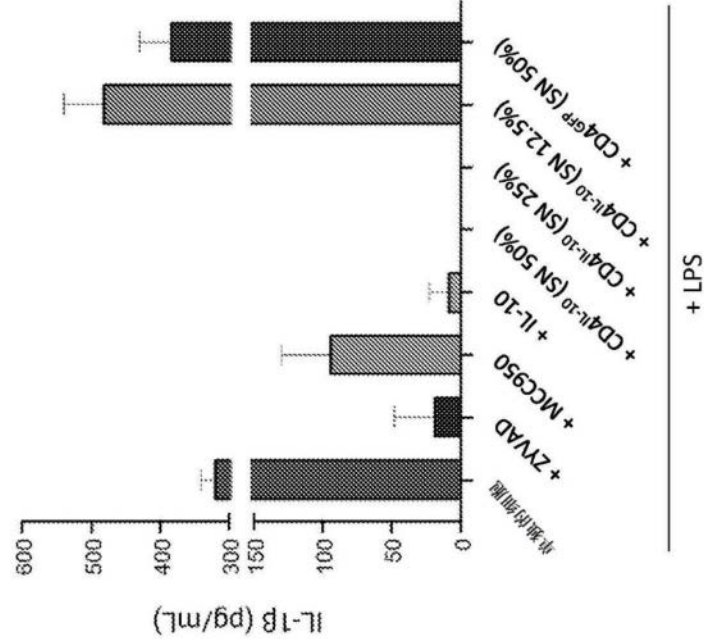


图35A

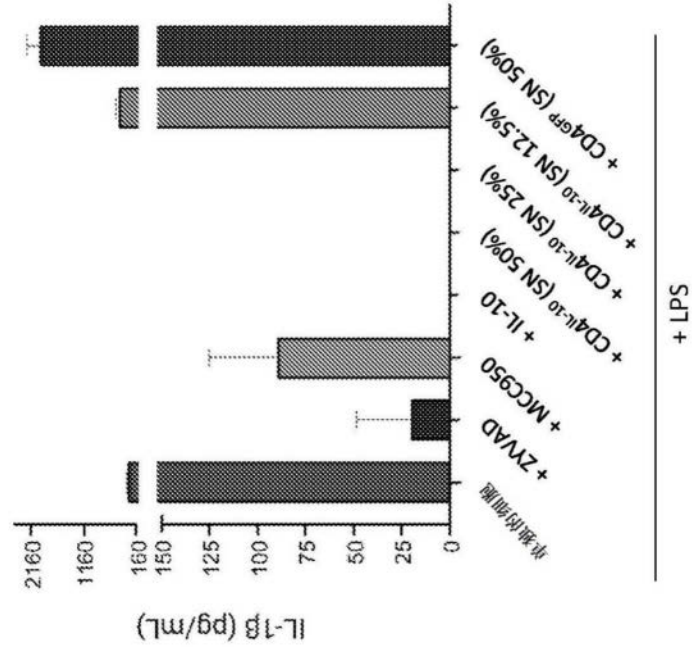


图35B

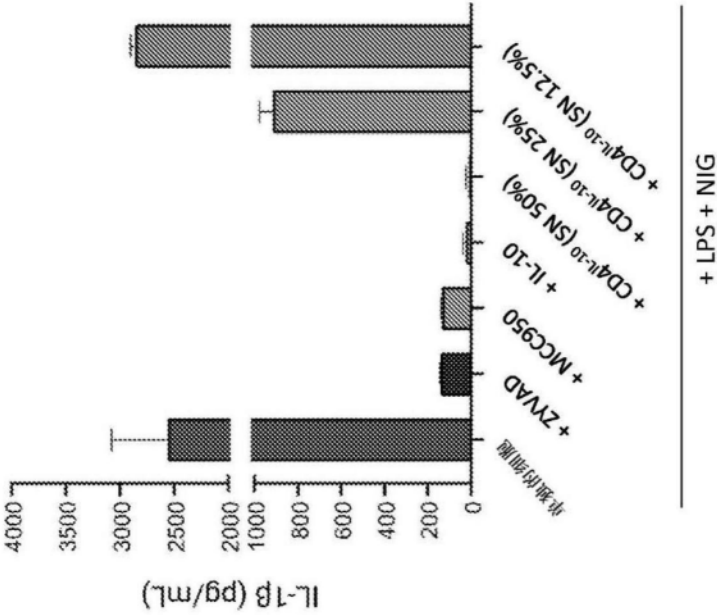


图35C

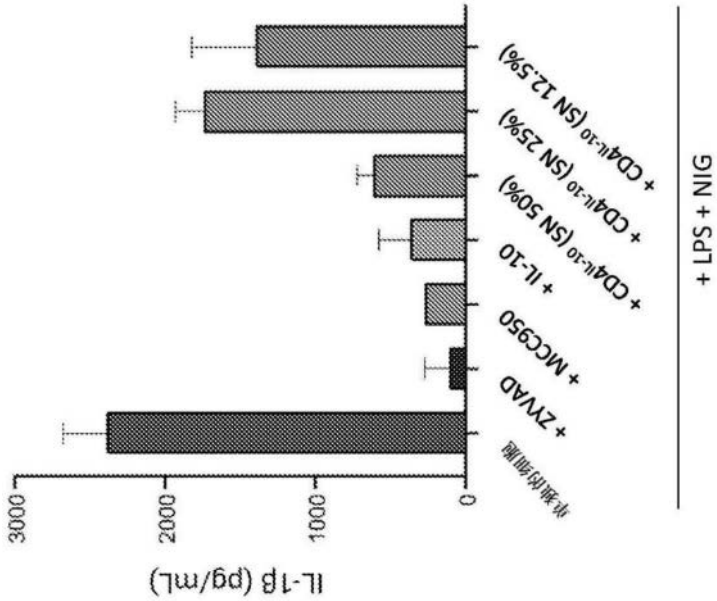


图35D

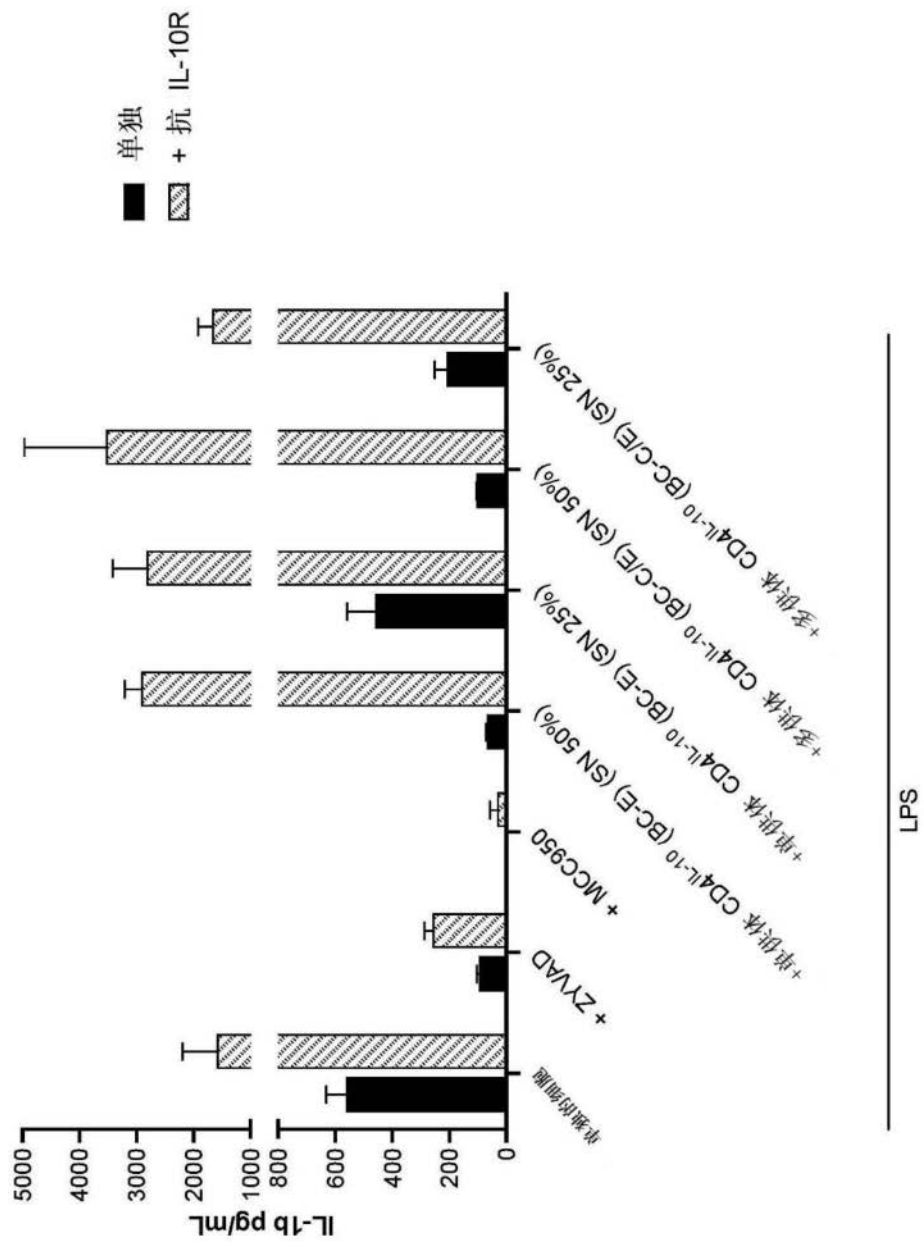


图35E

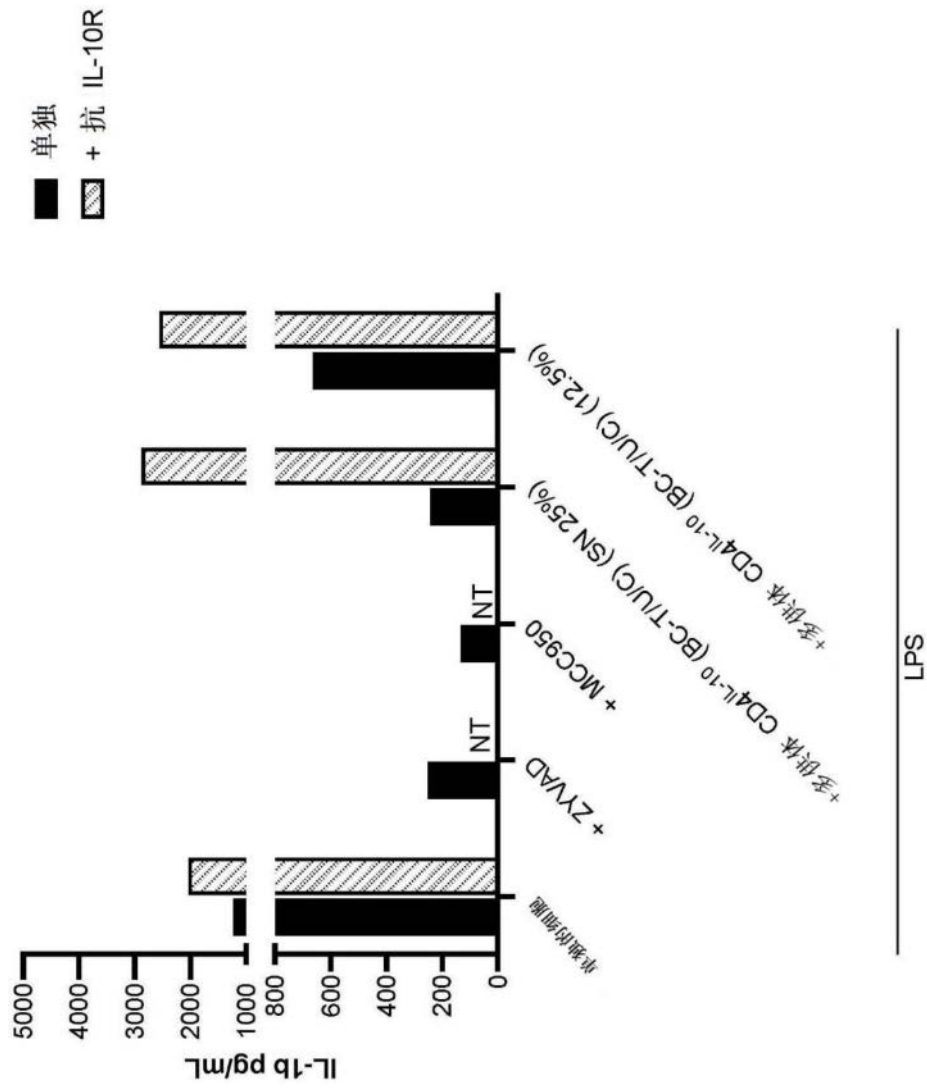


图35F

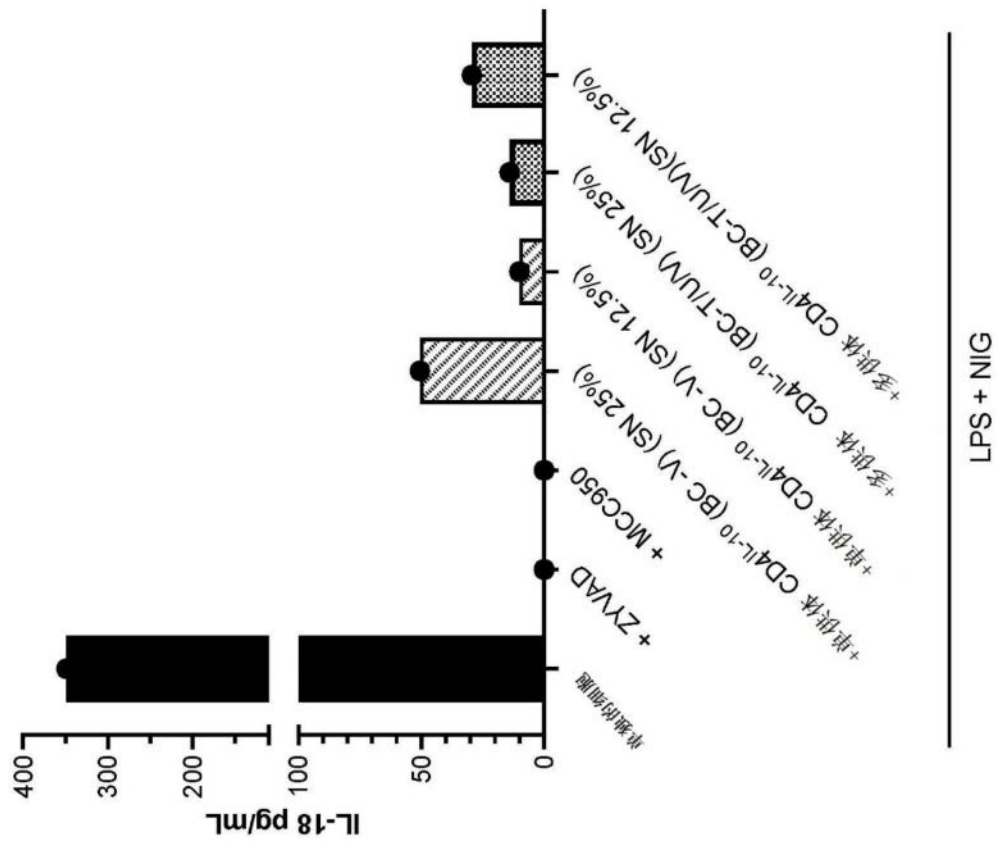


图35G

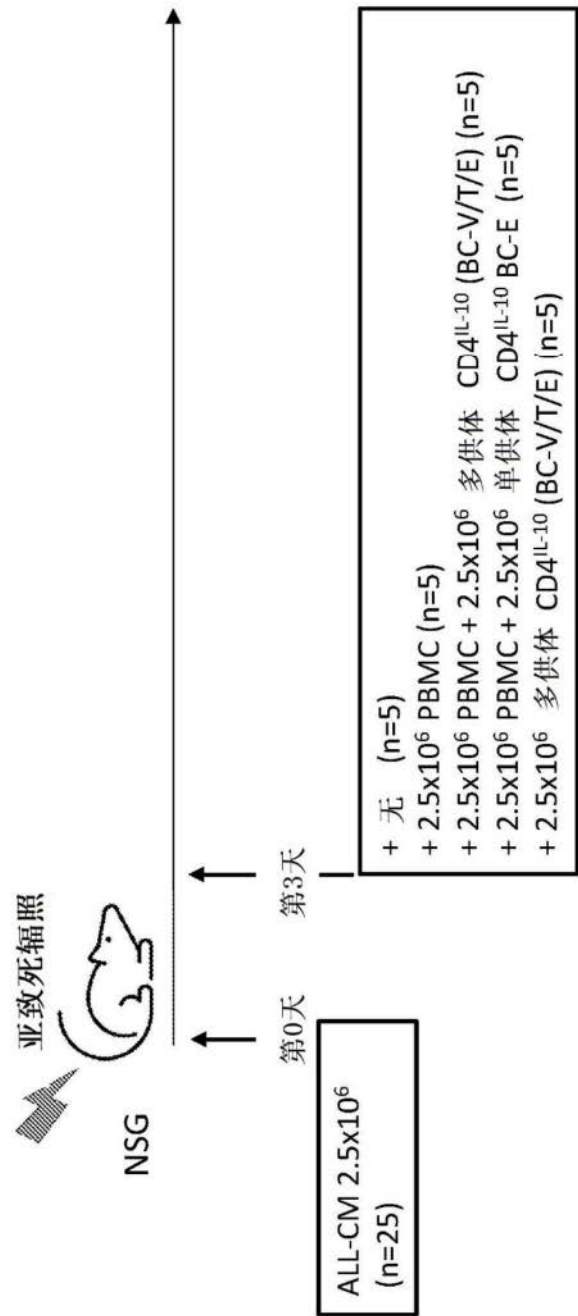


图36

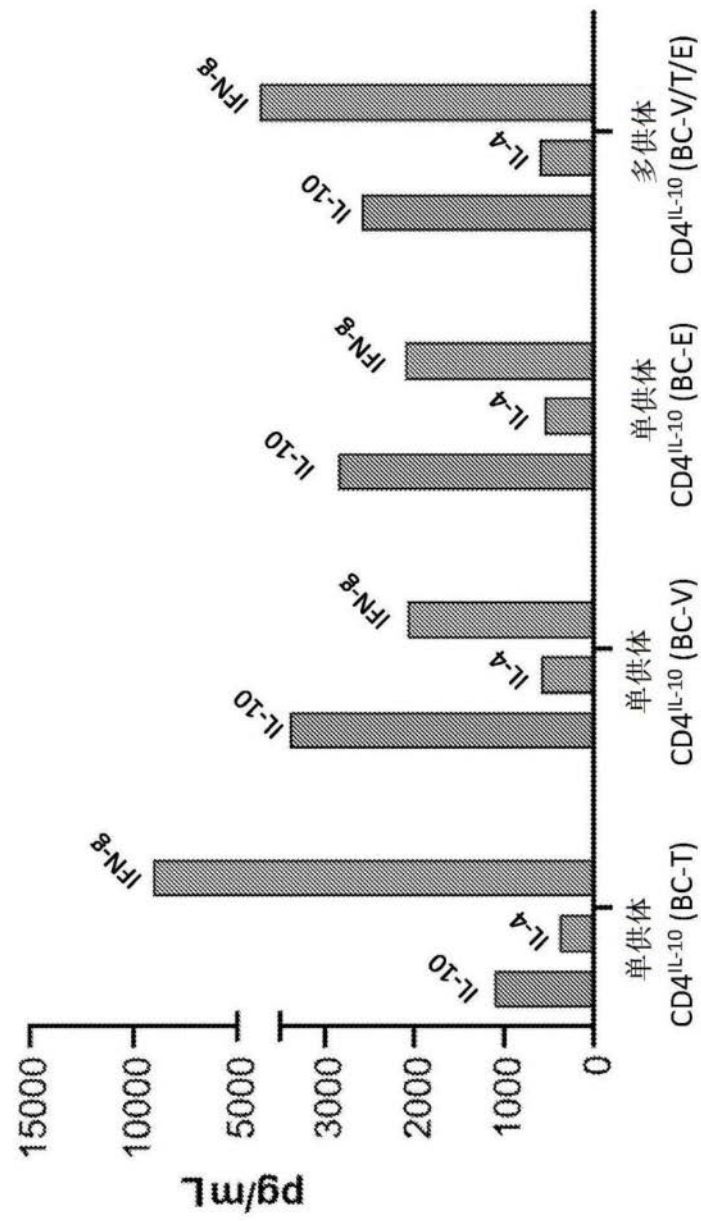


图37

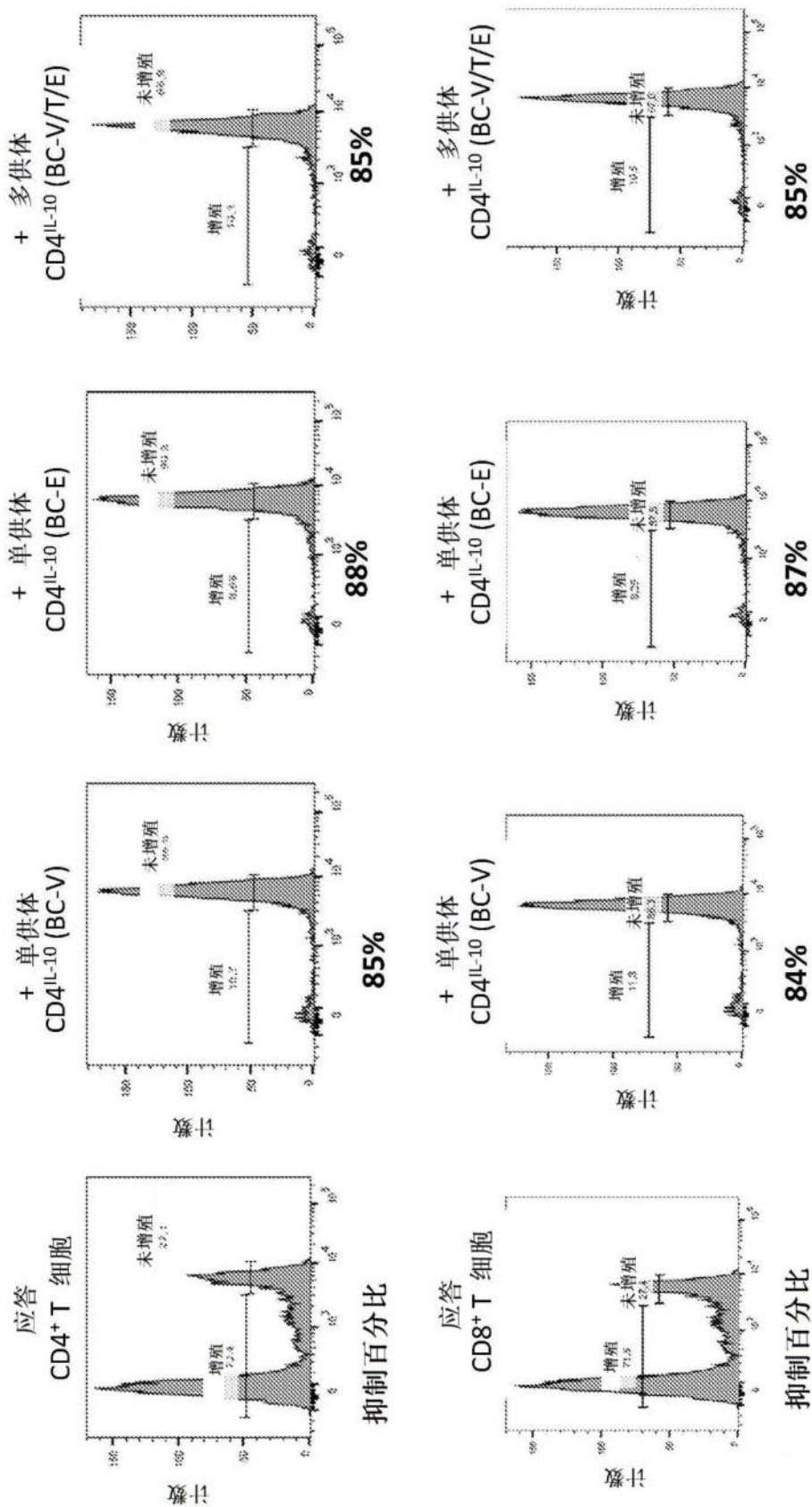


图38

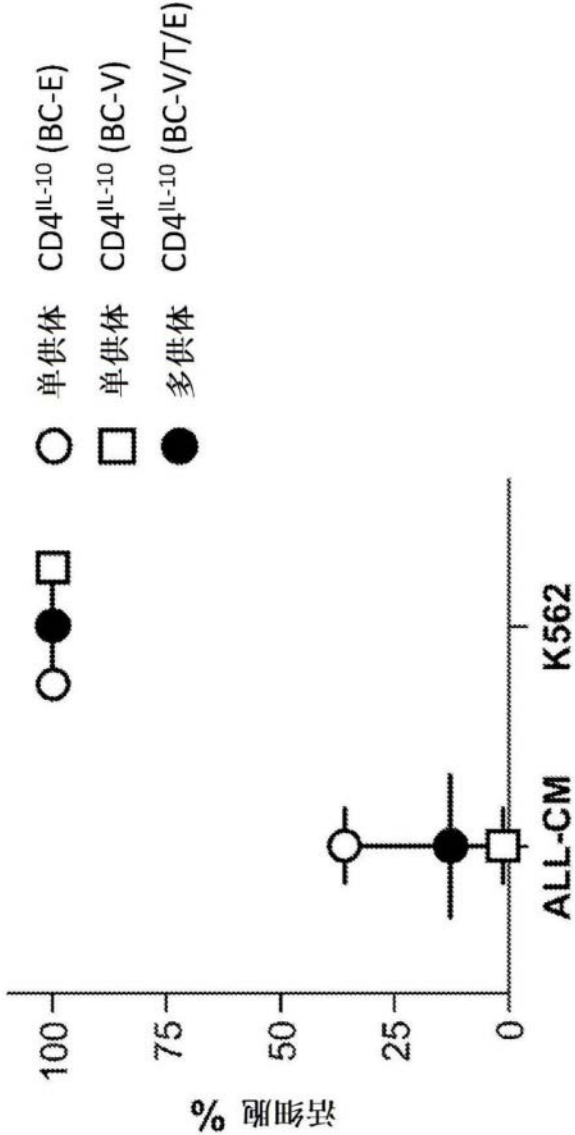


图39

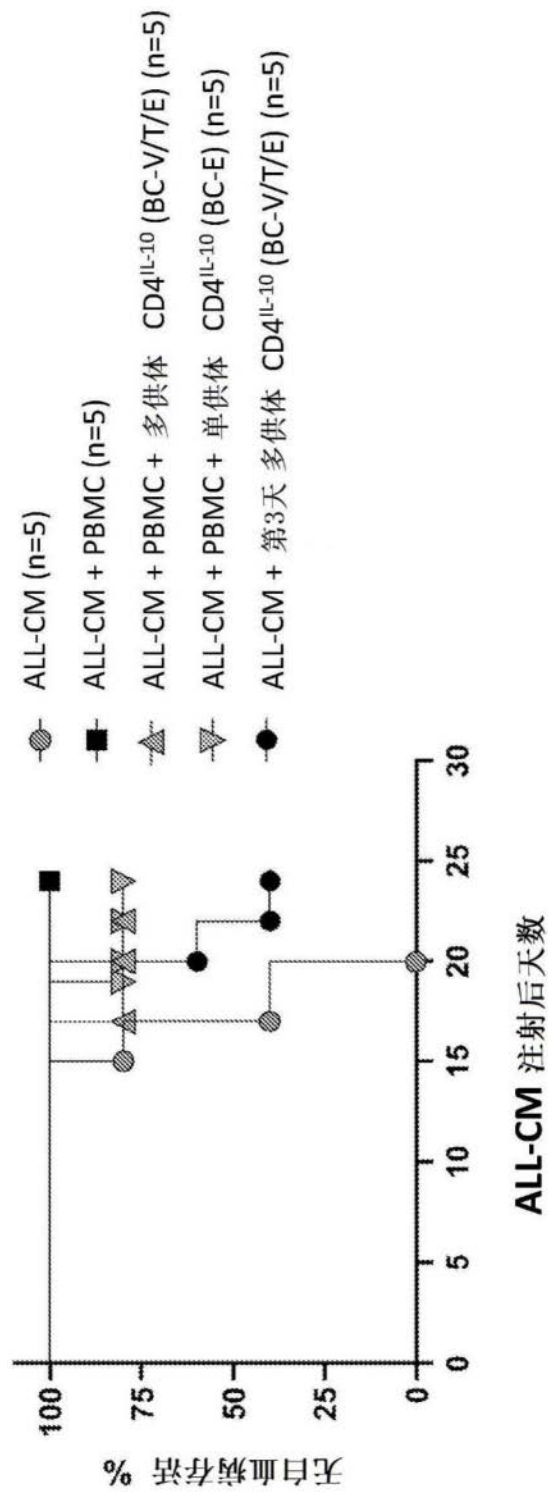


图40

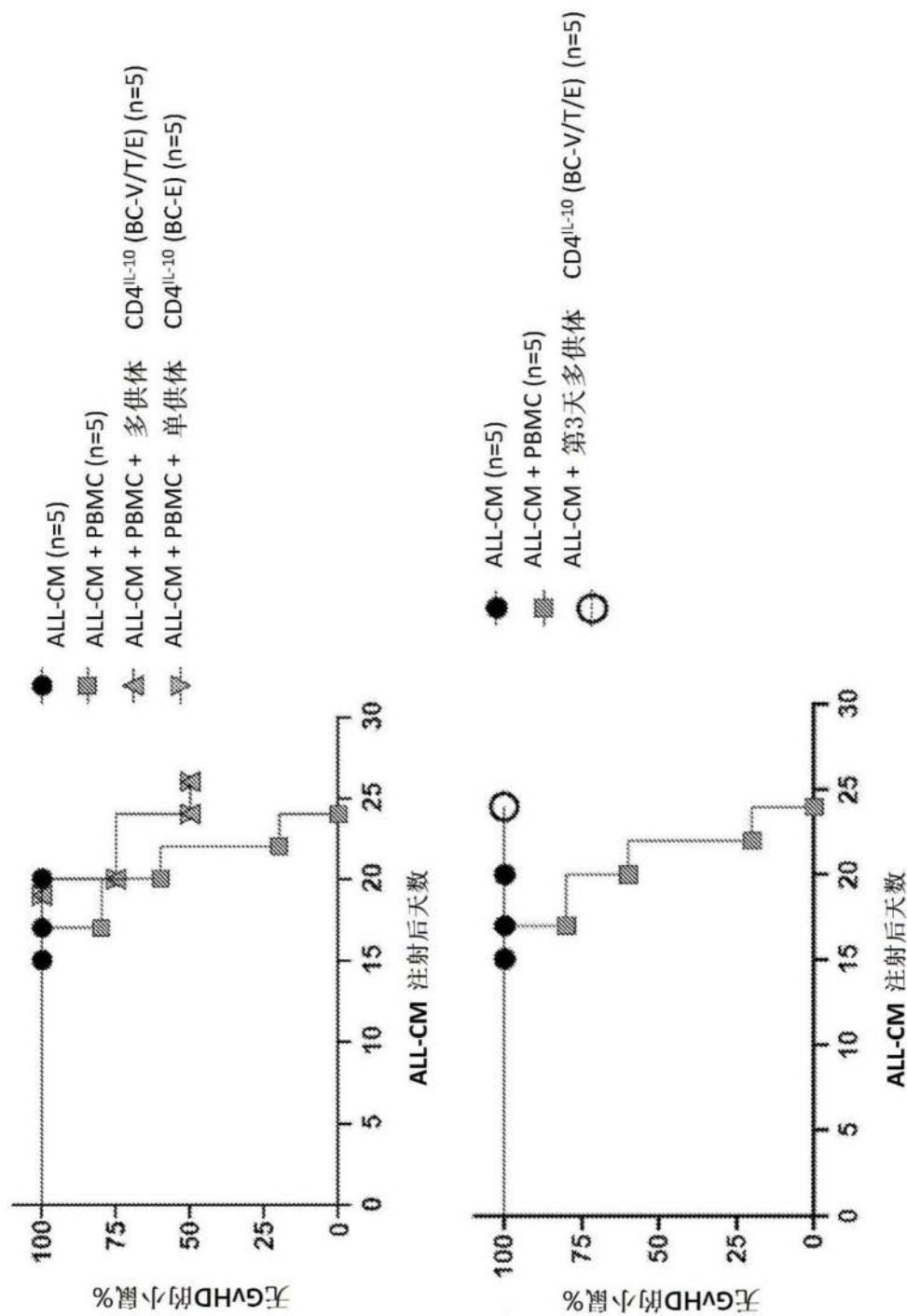


图41

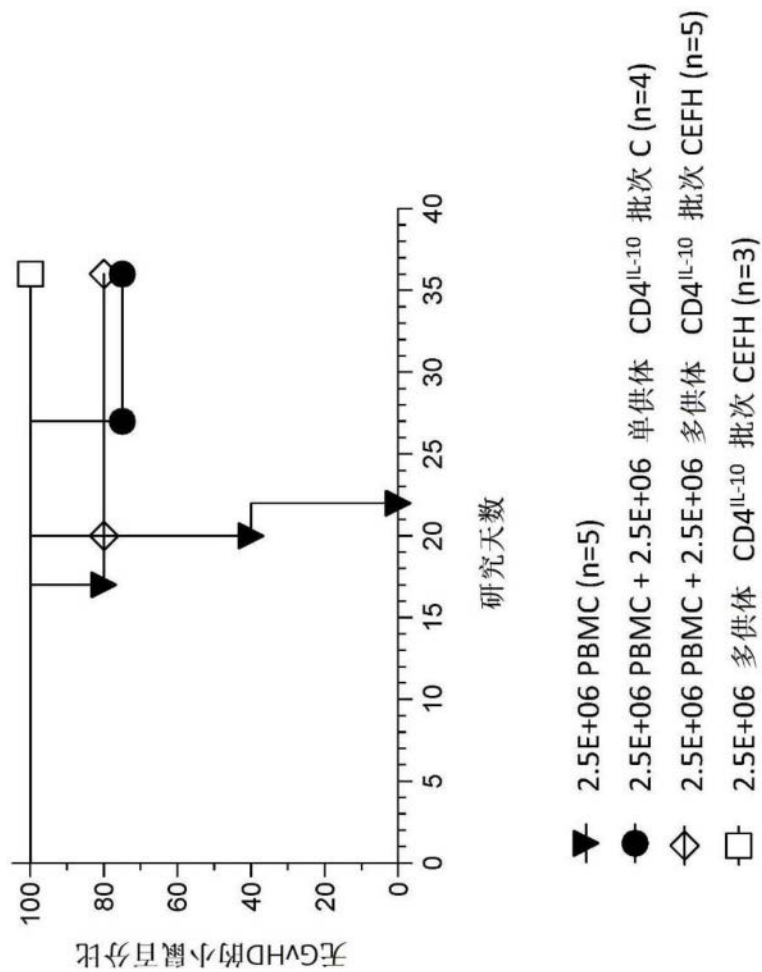


图42

(SEQ ID NO: 1)	IL-10_人	1	--MSSALLCCCLVLLTGVRASPGGQTQSENSTHFPNGNLMRLDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNILLKE
(SEQ ID NO: 58)	IL-10_小鼠	1	--MFGSALLCCCLVLLTGMPISRGQYSRENNCTHFPVGQSHMLELRTAFSVKTFQTKDQLDNILLTD
(SEQ ID NO: 59)	IL-10_大鼠	1	--MFGSALLCCCLVLLAGVKTSGHSGIRGNNTCTHFPVSTHMLRELRAFSQVKTFFQKKDQLDNILLTD
(SEQ ID NO: 60)	IL-10_MACMU	1	--MBSALLCCCLVLLTGVRASPGGQTQSENSTHFPNGNLMRLDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNILLKE
(SEQ ID NO: 61)	IL-10_大猩猩	1	--MBSALLCCCLVLLTGVRASPGHGTQSENSTHFPNGNLMRLDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNILLKE
(SEQ ID NO: 62)	IL-10_CYN0	1	--MBSALLCCCLVLLTGVRASPGGQTQSENSTHFPNGNLMRLDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNILLKE
(SEQ ID NO: 63)	IL-10_橄榄狒狒	1	--MBSALLCCCLVLLTGVRASPGGQTQSENSTHFPNGNLMRLDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNILLKE
(SEQ ID NO: 64)	IL-10_倭黑猩猩	1	--MBSALLCCCLVLLTGVRASPGGQTQSENSTHFPNGNLMRLDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNILLKE
(SEQ ID NO: 65)	IL-10_黑猩猩	1	--MBSALLCCCLVLLTGVRASPGGQTQSENSTHFPNGNLMRLDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNILLKE
(SEQ ID NO: 66)	IL-10H_EBVB9	1	MERPLVNTLQCLVLL--YLAPEG--GTDQCNFP---QMLRDLRDAFSRVKTFQTKDEVDNILLKE
IL-10_人			
IL-10_小鼠		69	SLLDFKGYLGCGQALSEMIQFYLEEVMPQAEHQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRRCRFLPCENKSKA
IL-10_大鼠		69	SLLQDFKGYLGCGQALSEMIQFYLAEVMPQAEKHGPEIKHNSLGEKLTLLRLRRCRFLPCENKSKA
IL-10_MACMU		69	SLLQDFKGYLGCGQALSEMIKFYLAEVMPQAEHGHGPEIKHNSLGEKLTLLRLRRCRFLPCENKSKA
IL-10_大猩猩		69	SLLDFKGYLGCGQALSEMIQFYLEEVMPQAEHHDPIKEHVNSLGENLKTLLRLRRCRFLPCENKSKA
IL-10_CYN0		69	SLLDFKGYLGCGQALSEMIQFYLEEVMPQAEHQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRRCRFLPCENKSKA
IL-10_橄榄狒狒		69	SLLDFKGYLGCGQALSEMIQFYLEEVMPQAEHHDPIKEHVNSLGENLKTLLRLRRCRFLPCENKSKA
IL-10_倭黑猩猩		69	SLLDFKGYLGCGQALSEMIQFYLEEVMPQAEHQDPDIKEHVNSLGENLKTLLRLRRCRFLPCENKSKA
IL-10_黑猩猩		69	SLLDFKGYLGCGQALSEMIQFYLEEVMPQAEHQDPDIKEHVNSLGENLKTLLRLRRCRFLPCENKSKA
IL-10H_EBVB9		62	SLLDFKGYLGCGQALSEMIQFYLEEVMPQAEHQDPDIKEHVNSLGENLKTLLRLRRCRFLPCENKSKA
IL-10_人			
IL-10_小鼠		139	VEQVKNAFNKLQEKGYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN
IL-10_大鼠		139	VEQVKSDFNKLQDQGYKAMNEFDIFINQIEAYMTMKMS
IL-10_MACMU		139	VEQVKNDFNKLQDKGYKAMNEFDIFINQIEAYMTMKMN
IL-10_大猩猩		139	VEQVKNAFSLQEKGYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKION
IL-10_CYN0		139	VEQVKNAFNKLQEKGYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN
IL-10_橄榄狒狒		139	VEQVKNAFSLQEKGYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKION
IL-10_倭黑猩猩		139	VEQVKNAFSLQEKGYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKION
IL-10_黑猩猩		139	VEQVKNAFNKLQEKGYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN
IL-10H_EBVB9		132	VEQVKNAFNKLQEKGYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN

图43A

可能的 **huIL-10** 杂交体 **#1 (SEQ ID NO: 67)**

氨基酸变化的任何组合 (*)

MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPMRLRLRDAFSRVKTFEQTKDQVVDNLLKESLLEDFKGY
 LGCCQALSEMIQFYLEEVPQAENQDPQKQHVNSLGENLKTLLRLRRCHRFPCENKSKAVEQZKNAFNKLQEKGI
 YKAMSEFDIFINYIEAYMTKIRN ** *

可能的 **huIL-10** 杂交体 **#2 (SEQ ID NO: 68)**

优选的单个aa变化I105至A105氨基酸变化 (#)

MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPMRLRLRDAFSRVKTFEQMKDQLDNLLKESLLEDFKGY
 LGCCQALSEMIQFYLEEVPQAENQDPDQKAHVNSLGENLKTLLRLRRCHRFPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGI
 YKAMSEFDIFINYIEAYMTKIRN #

图43B

```

(SEQ ID NO: 1) IL10_人 1 --MHSSALLCCLVLLTGVRASPCQGTQSENSCTHFGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFEQMKDQIDNLLIKE
(SEQ ID NO: 66) IL10H_EBVB9 1 MERRLVVTLQCLVLLYLAPECGGT-----DCCDNF-----QMLRDLRDAFSRVKTFEQMKDQIDNLLIKE
                                     *#*
IL10_人 69 SLEDFKGYLGCGQALSEMIQFYLEEVPQAENQDPEAKAHVNSLGENLKTLLRLRRCHRLFPCENKSKA
IL10H_EBVB9 62 SLEDFKGYLGCGQALSEMIQFYLEEVPQAENQDPEAKAHVNSLGENLKTLLRLRRCHRLFPCENKSKA
                                     *
IL10_人 139 VEQKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN
IL10H_EBVB9 132 VEQKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIR-

```

图43C