



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113710257 A

(43) 申请公布日 2021. 11. 26

(21) 申请号 202080030540.8

(22) 申请日 2020.02.24

(30) 优先权数据

62/809,671 2019.02.24 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.10.22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IL2020/050206 2020.02.24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/170260 EN 2020.08.27

(71) 申请人 盖米达细胞有限公司

地址 以色列耶路撒冷市

(72) 发明人 托尼·佩莱德

(74) 专利代理机构 上海翼胜专利商标事务所

(普通合伙) 31218

代理人 翟羽

(51) Int.Cl.

A61K 35/17 (2015.01)

A61K 31/455 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

C07K 14/725 (2006.01)

A61K 35/28 (2015.01)

A61K 38/19 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

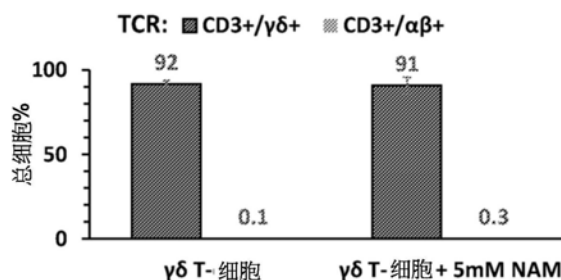
权利要求书3页 说明书27页 附图3页

(54) 发明名称

γ δ T细胞归巢和保留的方法,可选地使用自然杀伤细胞,以用于生成用于治疗的细胞组合物

(57) 摘要

本发明提供多个 γ δ T细胞和 γ δ T细胞富集的多个细胞群的体外培养的多种方法,更具体地,提供了增强多个 γ δ T细胞群的功能的多种方法,通过使用一烟酰胺并结合多个细胞因子处理多个细胞,来增强 γ δ T细胞归巢和/或保留潜能。本发明还设想了包含培养的多个 γ δ T细胞和混合的 γ δ T细胞富集的多个细胞群的多种组合物及其治疗用途。



1. 一种增强 γ δ T 细胞归巢和/或保留潜能的方法,其特征在于,所述方法包含:
 - (a) 获得富集多个 γ δ T 细胞的一选定细胞群;
 - (b) 体外为所述选定细胞群提供 γ δ T 细胞扩增的多个条件;及
 - (c) 提供 0.5 至 50mM 范围内的烟酰胺持续一段时间,以显著增强 γ δ T 细胞归巢和/或保留潜能,从而增强所述选定细胞群中多个 γ δ T 细胞的归巢和/或保留潜能。
2. 一种增强 γ δ T 细胞 CD62L 表达的方法,其特征在于,所述方法包含:
 - (a) 获得富集多个 γ δ T 细胞的一选定细胞群;
 - (b) 体外为所述选定细胞群提供 γ δ T 细胞扩增的多个条件;及
 - (c) 提供 0.5 至 50mM 范围内的烟酰胺持续一段时间,以显著增强 γ δ T 细胞 CD62L 表达,从而增强所述选定细胞群中多个 γ δ T 细胞的 CD62L 表达。
3. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于, γ δ T 细胞扩增的所述多个条件包含提供多种营养素和多个细胞因子,及可选地,其中所述多个细胞因子选自由以下组成的群组:IL-2、IL-15 和 IL-21。
4. 如权利要求 2 所述的方法,其特征在于, γ δ T 细胞扩增的所述多个条件包含提供多种营养素和多个细胞因子,及可选地,其中所述多个细胞因子选自由以下组成的群组:IL-2、IL-15 和 IL-21。
5. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述烟酰胺选自由以下组成的群组:烟酰胺、一烟酰胺类似物、一烟酰胺代谢物、一烟酰胺类似物代谢物及其衍生物。
6. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述选定细胞群是通过 α BT 细胞损耗来富集 γ δ T 细胞的一淋巴细胞群。
7. 如权利要求 6 所述的方法,其特征在于,所述选定细胞群包含多个自然杀伤细胞。
8. 如权利要求 7 所述的方法,其特征在于,所述方法进一步包含为自然杀伤细胞扩增提供多个条件。
9. 如权利要求 7 所述的方法,其特征在于,提供 γ δ T 细胞扩增的所述多个条件和所述烟酰胺来增强所述选定细胞群中所述多个自然杀伤细胞的归巢和/或保留潜能和/或 CD62L 表达。
10. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述选定细胞群是通过选择多个 γ δ T 细胞来富集的 γ δ T 细胞的一淋巴细胞群。
11. 如权利要求 10 所述的方法,其特征在于,所述选定细胞群不含多个自然杀伤细胞。
12. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述多个 γ δ T 细胞的群体衍生自一器官,所述器官选自由以下组成的群组:一肌肉、皮肤、一骨骼、一淋巴器官、一胰腺、一肝脏、一胆囊、一肾脏、一消化道器官、一呼吸道器官、一生殖器官、一泌尿道器官、一血液相关器官、一胸腺、一脾脏、或一神经系统器官。
13. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述多个 γ δ T 细胞的群体来源于选自由以下组成的群组:多个造血细胞、多个脐带血细胞、多个可动的外周血细胞和多个骨髓细胞。
14. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述多个 γ δ T 细胞的群体来源于骨髓或外周血。
15. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述多个 γ δ T 细胞的群体来源于新生儿脐带血。

16. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述多个细胞的群体来源于一单核细胞部分。

17. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述多个 γ δ T细胞的群体来自一单样本。

18. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤(c)的所述时间段为1到3周之间。

19. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤(c)的所述时间段为1到7天之间。

20. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述烟酰胺的一浓度为在0.5-20mM的范围内。

21. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述烟酰胺被提供在一浓度为5mM。

22. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述方法进一步包含根据一细胞标记来选择一 γ δ T细胞群,所述细胞标记选自由以下组成的群组:一肿瘤抗原、一病毒抗原和一细菌抗原。

23. 一种治疗性细胞组合物,其特征在于,所述治疗的细胞组合物包含:一扩增的选定 γ δ T细胞群,所述扩增的细胞群在体外使用 γ δ T细胞扩增的多个条件,及烟酰胺在0.5-50mM范围内的一剂量来培养,其中所述扩增的选定 γ δ T细胞群的特征在于以下至少一个:

(i) 增强的 γ δ T细胞归巢和/或保留潜能,以及

(ii) 增强的CD62L表达,

其与一类似的选定 γ δ T细胞群相比,所述类似的选定 γ δ T细胞群使用相同的多个条件及烟酰胺不超过0.1mM来扩增。

24. 如权利要求23所述的治疗性细胞组合物,其特征在于,所述治疗性细胞组合物包含根据一方法来培养的多个 γ δ T细胞,所述方法包含:

(a) 获得富集多个 γ δ T细胞的一选定细胞群;

(b) 体外为所述选定细胞群提供 γ δ T细胞扩增的多个条件;及

(c) 提供0.5至50mM范围内的烟酰胺持续一时间段,以显著增强 γ δ T细胞归巢和/或保留潜能。

25. 如权利要求23所述的治疗性细胞组合物,其特征在于,所述治疗性细胞组合物进一步包含多个自然杀伤细胞。

26. 一种在一对象中移植多个细胞的方法,其特征在于,所述方法包含:

(a) 体外扩增一选定 γ δ T细胞群,通过使用 γ δ T细胞扩增的多个条件以及0.5-50mM范围内的烟酰胺来培养所述细胞群持续一时间段,足以显著增强 γ δ T细胞归巢和/或保留潜能和/或CD62L表达,其中所述扩增的选定 γ δ T细胞群的特征在于以下至少一个:

(i) 增强的 γ δ T细胞归巢和/或保留潜能,以及

(ii) 增强的CD62L表达,

其与一类似的选定 γ δ T细胞群相比,所述类似的选定 γ δ T细胞群不使用0.5-50mM范围的烟酰胺来扩增,及

(b) 将扩增的多个 γ δ T细胞注入需要的一对象。

27. 如权利要求26所述的方法,其特征在于,所述步骤(a)根据一方法作用,所述方法包含:

(i) 获得富集多个 γ δ T细胞的一选定细胞群;

(ii) 体外为所述选定细胞群提供 γ δ T细胞扩增的多个条件;及

(iii) 提供0.5至50mM范围内的烟酰胺持续一时间段,以显著增强 γ δ T细胞归巢和/或保留潜能。

28. 如权利要求26所述的方法,其特征在于,所述对象是一人类对象。

29. 如权利要求26所述的方法,其特征在于,所述多个 γ δ T细胞与所述对象为同种异体。

30. 如权利要求26所述的方法,其特征在于,所述多个 γ δ T细胞与所述对象为自体固有。

31. 如权利要求26所述的方法,其特征在于,所述对象患有一疾病,所述疾病选自由以下组成的群组:一癌症、一细菌感染、一病毒感染、一自身免疫性疾病和一炎症性疾病。

32. 如权利要求31所述的方法,其特征在于,所述多个细胞在所述对象中的移植包含一辅助疗法。

33. 如权利要求32所述的方法,其特征在于,所述辅助疗法与一疗法组合,所述疗法选自由以下组成的群组:抗病毒疗法、抗炎疗法、抗生素疗法、杀菌疗法、化疗、外科手术、免疫疗法、免疫化疗、放疗、骨髓移植和造血干细胞移植。

34. 如权利要求32所述的方法,其特征在于,所述对象在移植所述扩增的多个 γ δ T细胞之前、同时或之后,使用在大于1.0mM的烟酰胺的培养物中扩增的脐带血造血干细胞进行治疗。

γ δT细胞归巢和保留的方法,可选地使用自然杀伤细胞,以用于生成用于治疗细胞组合物

[0001] 相关申请案

[0002] 本申请要求2019年2月24日提交的美国临时专利申请案第62/809671号的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

[0003] 技术领域和背景技术

[0004] 在本发明的一些实施例中,本发明涉及多种培养γ δ (Gammadelta) T细胞群的方法、多种培养的γ δT细胞群的治疗用途以及多种包含培养的γ δT细胞的试剂盒。更具体地,但并非特定地,本发明涉及多种培养的γ δT细胞单独或与其他细胞组合用于移植的用途。

[0005] 伽玛德尔塔 (Gammadelta, γ δ) T细胞是一种保护的先天性淋巴细胞群体,在组织内环境稳定、感染性疾病、自身免疫性疾病、炎症、移植和肿瘤监测期间参与多种免疫反应。γ δT细胞可以共享适应性或先天性免疫系统的属性,或两者的属性,包含识别应激相关的抗原的胸腺和外周组织亚群 (Vδ1细胞)、由磷酸化抗原激活的循环亚群 (Vδ2细胞) 和主要存在于肝脏中的亚群 (Vδ3细胞),常见于病毒感染和白血病。

[0006] 当被激活时,γ δT细胞发挥强大的、非MHC限制的细胞毒性活性,尤其能有效地杀死各种类型的细胞,特别是致病细胞,如感染(病毒、寄生虫、真菌等感染)和癌细胞。γ δT细胞与造血干细胞移植患者的长期生存密切关联,并且它们在肿瘤样本中的存在被认为是一个显著的有利癌症预后特征。γ δT细胞能够感知多种改变的脂质途径、检测和消除恶性细胞,而不受肿瘤抗原特征影响,并且具有高度的化疗耐药性,使其特别适合于联合免疫化疗。

[0007] γ δT细胞仅占人类外周血和组织驻留T细胞的一小部分(1-5%),甚至占脐带淋巴细胞的一小部分(<1%)。因此,γ δT细胞群的治疗应用需要其扩增的方式。临床使用(如癌症免疫治疗)富集γ δT细胞的两种主要方法包含:通过刺激磷酸化抗原或氨基二磷酸盐与低剂量重组IL-2一起施用来进行内源性γ δ群体的体内(in-vivo)扩增,以及将试管中(in vitro)扩增的γ δT细胞(自体或异体)进行体外(ex-vivo)过继的细胞转移到患者体内(例如,参见Leeks等人的美国专利申请案公开第2017/0196910号)。由于IL-2的不良副作用和短暂的血清半衰期,以及体内IL-2施用的临床试验结果令人失望,体外γ δT细胞的扩增是目前优选的方法。一些研究还表明,IL-15可有效促进γ δT细胞的增殖、存活和细胞毒性。

[0008] 增强γ δT细胞的功能对于有效的T细胞治疗至关重要。γ δT细胞被,特别是,(在癌症中积累的)多种小化合物(例如非特异性HMB-PP;和氨基二磷酸盐),以及多种细胞应激蛋白,例如膜联蛋白A2激活。除IL-2(特别是IL-7、IL-15和IL-21)外,γ 链家族的一些细胞因子也可增加γ δT细胞的增殖、存活和细胞毒性(Van Acker等人,Cytokine and Growth Factor Rev. 期刊,2018年,41:54-64)。γ δT细胞还具有多种整合素(例如beta1、beta2、beta7整合素、玻连蛋白受体),其在移植后组织中γ δT细胞的归巢、粘附、信号、迁移、浸润和保留中发挥作用(Seigers,Front in Immunol期刊,2018年)。γ δT细胞还表达L-选择素(CD62L)、E-和P-选择素配体以及其他归巢分子,以响应炎症,介导其在各种组织类型(皮肤、肠道、肝脏、大脑、骨髓、淋巴结等)中的归巢和滞留(Sackstein等人,Lab Invest期刊,

2017年,97:669-97)。

[0009] 已经提出了用于移植的 γ δ T细胞体外培养的多种方法。例如,Romagne和Laplace的美国专利申请案公开第US2005/0196385号和Moser和Kuchen的美国专利申请案公开第US2009/0130074号中教导使用合成或天然 γ δ T细胞激活剂小分子来进行 γ δ T细胞的扩增和活化。Maeurer的美国专利申请案公开第US2017/0107490号及Hayday等人的美国专利申请案公开第US2018/0312808号中教导通过培养IL-2、IL-15和IL-21的不同组合来进行 γ δ T细胞的体外扩增。 γ δ T细胞扩增的一些模型包含 γ δ T细胞中抗原呈递功能的诱导或工程(参见,例如,Moser和Kuchen的美国专利申请案公开第US2008/0075732号),肿瘤识别部分表达的工程(参见,例如,Jakobovits等人,美国专利申请案公开第US2016/0175358号),从表达CAR(嵌合抗原受体)的多能干细胞中选择 γ δ T细胞(例如:Themeli等人的美国专利申请案公开第US2016/0009813号,Boyd等人的美国专利申请案公开第US2018/0353588号,Leek等人的2018/0125889号,Cooper等人的美国专利申请案公开第US2018/0200299,Lamb等人的美国专利申请案公开第US2018/0250337号),引导HSC分化为 γ δ T细胞(例如,Messina和Tie的美国专利申请案公开第US2016/0213715号),及 γ δ T细胞中CXCR6表达的工程(Kobold等人的美国专利申请案公开第US2018/0256645号)以用于靶向肿瘤。

[0010] 扩增的多种 γ δ T细胞群的治疗用途已成为15项以上已完成、正在进行、正在招募或授权的临床试验的主题(参见clinicaltrials.gov网站),这些试验调查了不同方案扩增的 γ δ T细胞在治疗各种感染性和癌性疾病中的应用。一般来说,已发现扩增的 γ δ T细胞群可维持细胞毒性功能。然而,迄今为止的结果着重说明了设计 γ δ T细胞扩增和治疗方案的困难,其不仅安全,而且能够提供大量扩增的 γ δ T细胞群,针对受影响的组织显著有效。

[0011] 其他相关出版物包含Nicol等人(BJ of Cancer期刊,2011年,105:778-106)、Kobayashi等人(AntiCancer Res期刊,2010年,30:575-580)、Berglund等人(Stem Cell Int期刊,2018年,ID8529104)、Tan等人(J Immunol Sci期刊2018年,2:6-12)、Fisher等人(Frontiers in Immunol期刊,2018年,9:1409)、Belmant的美国专利申请案公开第US20018/0207568号和Fournie等人的美国专利申请案公开第US2009/0304688号。

发明内容

[0012] 根据本发明的一个方面,一种增强 γ δ T细胞归巢和/或保留潜能的方法,所述方法包含:

[0013] (a) 获得富集多个 γ δ T细胞的一选定细胞群;

[0014] (b) 体外为所述选定细胞群提供 γ δ T细胞扩增的多个条件;及

[0015] (c) 提供0.5至50mM范围内的烟酰胺持续一段时间,以显著增强 γ δ T细胞归巢和/或保留潜能,

[0016] 从而增强所述选定细胞群中多个 γ δ T细胞的归巢和/或保留潜能。

[0017] 根据本发明的一个方面,提供了一种增强 γ δ T细胞CD62L表达的方法,所述方法包含:

[0018] (a) 获得富集多个 γ δ T细胞的一选定细胞群;

[0019] (b) 体外为所述选定细胞群提供 γ δ T细胞扩增的多个条件;及

[0020] (c) 提供0.5至50mM范围内的烟酰胺持续一段时间,以显著增强 γ δ T细胞CD62L表

达，

[0021] 从而增强所述选定细胞群中多个 γ δ T 细胞的 CD62L 表达。

[0022] 根据所述优选实施方案中的进一步特征， γ δ T 细胞扩增的所述多个条件包含提供多种营养素和多个细胞因子。

[0023] 根据所述优选实施方案中的进一步特征，所述多个细胞因子选自自由以下组成的群组：IL-2、IL-15 和 IL-21。

[0024] 根据所述优选实施方案中的进一步特征，所述烟酰胺选自自由以下组成的群组：烟酰胺、一烟酰胺类似物、一烟酰胺代谢物、一烟酰胺类似物代谢物及其衍生物。

[0025] 根据所述优选实施方案中的进一步特征，所述选定细胞群是通过 α β T 细胞损耗来富集 γ δ T 细胞的一淋巴细胞群。

[0026] 根据所述优选实施方案中的进一步特征，所述选定细胞群包含多个自然杀伤细胞。

[0027] 根据所述优选实施方案中的进一步特征，所述方法所述方法进一步包含为自然杀伤细胞扩增提供多个条件。

[0028] 根据所述优选实施方案中的进一步特征，提供 γ δ T 细胞扩增的所述多个条件和所述烟酰胺来增强所述选定细胞群中所述多个自然杀伤细胞的归巢和/或保留潜能和/或 CD62L 表达。

[0029] 根据所述优选实施方案中的进一步特征，所述选定细胞群是通过选择多个 γ δ T 细胞来富集 γ δ T 细胞的一淋巴细胞群。

[0030] 根据所述优选实施方案中的进一步特征，所述选定细胞群不含多个自然杀伤细胞。

[0031] 根据所述优选实施方案中的进一步特征，所述多个 γ δ T 细胞的群体衍生自一器官，所述器官选自自由以下组成的群组：一肌肉、皮肤、一骨骼、一淋巴器官、一胰腺、一肝脏、一胆囊、一肾脏、一消化道器官、一呼吸道器官、一生殖器官、一泌尿道器官、一血液相关器官、一胸腺、一脾脏、或一神经系统器官。

[0032] 根据所述优选实施方案中的进一步特征，所述多个 γ δ T 细胞的群体来源于选自自由以下组成的群组：多个造血细胞、多个脐带血细胞、多个可动的外周血细胞和多个骨髓细胞。

[0033] 根据所述优选实施方案中的进一步特征，所述多个 γ δ T 细胞的群体来源于骨髓或外周血。

[0034] 根据所述优选实施方案中的进一步特征，所述多个 γ δ T 细胞的群体来源于新生儿脐带血。

[0035] 根据所述优选实施方案中的进一步特征，所述多个细胞的群体来源于一单核细胞部分。

[0036] 根据所述优选实施方案中的进一步特征，所述多个 γ δ T 细胞的群体来自一单样本。

[0037] 根据所述优选实施方案中的进一步特征，所述方法的所述步骤 (c) 的所述时间段所述的多种方法为 1 到 3 周之间。

[0038] 根据所述优选实施方案中的进一步特征，所述方法的所述步骤 (c) 的所述时间段

所述的多种方法为1到7天之间。

[0039] 根据所述优选实施方案中的进一步特征,所述烟酰胺的一浓度为在0.5-20mM的范围内。

[0040] 根据所述优选实施方案中的进一步特征,所述烟酰胺被提供在一浓度为5mM。

[0041] 根据所述优选实施方案中的进一步特征,所述方法所述方法进一步包含根据一细胞标记来选择一 γ δ T细胞群,所述细胞标记选自由以下组成的群组:一肿瘤抗原、一病毒抗原和一细菌抗原。

[0042] 根据本发明的一个方面,提供了一种治疗性细胞组合物,所述治疗的细胞组合物包含:一扩增的选定 γ δ T细胞群,所述细胞群在体外使用 γ δ T细胞扩增的多个条件,及烟酰胺的在0.5-50mM范围内的一剂量来培养,其中所述扩增的选定 γ δ T细胞群的特征在于以下至少一个:

[0043] (i) 增强的 γ δ T细胞归巢和/或保留潜能,以及

[0044] (ii) 增强的CD62L表达,

[0045] 与一类似的选定 γ δ T细胞群相比,使用相同的多个条件及烟酰胺不超过0.1mM下来扩增。

[0046] 根据所述优选实施方案中的进一步特征,所述治疗性细胞组合物包含根据本文详述的本发明方法培养的多个 γ δ T细胞。

[0047] 根据所述优选实施方案中的进一步特征,所述治疗性细胞组合物还包含自然杀伤细胞。

[0048] 根据本发明的一个方面,提供了一种在一对象中移植多个细胞的方法,所述方法包含:

[0049] (a) 体外扩增一选定 γ δ T细胞群,通过使用 γ δ T细胞扩增的多个条件以及0.5-50mM范围内的烟酰胺来培养所述细胞群持续一段时间,足以显著增强 γ δ T细胞归巢和/或保留潜能和/或CD62L表达,其中所述扩增的选定 γ δ T细胞群的特征在于以下至少一个:

[0050] (i) 增强的 γ δ T细胞归巢和/或保留潜能,以及

[0051] (ii) 增强的CD62L表达,

[0052] 其与一类似的选定 γ δ T细胞群相比,所述类似的选定 γ δ T细胞群不使用0.5-50mM范围的烟酰胺来扩增,及

[0053] (b) 将扩增的多个 γ δ T细胞注入需要的一对象。

[0054] 根据所述优选实施方案中的进一步特征,所述移植多个细胞的方法的所述步骤(a)根据本文详细描述的本发明的 γ δ T细胞扩增方法来作用。

[0055] 根据所述优选实施方案中的进一步特征,所述对象是一人类对象。

[0056] 根据所述优选实施方案中的进一步特征,所述多个 γ δ T细胞与所述对象为同种异体。

[0057] 根据所述优选实施方案中的进一步特征,所述多个 γ δ T细胞与所述对象为自体固有。

[0058] 根据所述优选实施方案中的进一步特征,所述对象患有一疾病,所述疾病选自由以下组成的群组:一癌症、一细菌感染、一病毒感染、一自身免疫性疾病和一炎症性疾病。

[0059] 根据所述优选实施方案中的进一步特征,所述多个细胞在所述对象中的移植包含

一辅助疗法。

[0060] 根据所述优选实施方案中的进一步特征,所述辅助疗法与一疗法组合,所述疗法选自自由以下组成的群组:抗病毒疗法、抗炎疗法、抗生素疗法、杀菌疗法、化疗、外科手术、免疫疗法、免疫化疗、放疗、骨髓移植和造血干细胞移植。

[0061] 根据所述优选实施方案中的进一步特征,所述对象在移植所述扩增的多个 $\gamma\delta$ T细胞之前、同时或之后,使用在大于1.0mM的烟酰胺的培养物中扩增的脐带血造血干细胞进行治疗。

[0062] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和/或科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。尽管在本发明实施例的实行或测试中可以使用与本文所述的方法和材料类似或等效的方法和材料,但下文为描述示例性方法和/或材料。如有冲突,以专利说明书(包含定义)为准。此外,所述材料、方法和示例仅为说明性的,并不旨在必要的限制。

附图说明

[0063] 本文仅以示例的方式,参考附图描述本发明的一些实施例。现在详细地具体参考附图,应该强调的是所示的细节是作为示例并用于本发明实施例的说明性讨论。在此方面,利用附图进行的描述使本领域技术人员清楚地知道如何实施本发明的实施例。

[0064] 在图示中:

[0065] 图1是显示 $\alpha\beta$ 缺失(α beta-depleted)外周血细胞样本中 $\gamma\delta$ T细胞富集的直方图。使用或不使用5mM烟酰胺(NAM)培养 $\alpha\beta$ 缺失血细胞12-13天,选择CD3+细胞,并通过流式细胞仪(FACS)分析CD3+/ $\gamma\delta$ +和CD3+/ $\alpha\beta$ +细胞。注意到在NAM和对照培养物的这些T细胞部分中,超过90%的 $\gamma\delta$ T细胞。

[0066] 图2是显示通过烟酰胺增强 $\gamma\delta$ T细胞中CD62L(L-选择素)表达的直方图。使用5mM烟酰胺(NAM)培养12-13天的 $\alpha\beta$ 缺失血细胞中纯化的 $\gamma\delta$ T细胞对CD62L进行染色,并通过流式细胞仪进行分析。注意到在使用烟酰胺处理的培养物中CD62L表达增加近3倍。

[0067] 图3是显示通过烟酰胺培养增强 $\gamma\delta$ T细胞功能的直方图。使用或不使用5mM烟酰胺(NAM)扩增并用羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)标记的 $\alpha\beta$ 缺失血细胞纯化的 $\gamma\delta$ T细胞注射到辐照的NSG免疫缺陷小鼠体内。4天后,通过流式细胞仪对来自不同器官的CFSE染色细胞的部分进行评估。注意到NAM对所有分析的组织中 $\gamma\delta$ 细胞的体内归巢和组织保留的显著影响。

具体实施方式

[0068] 在本发明的一些实施例中,本发明涉及多种培养 $\gamma\delta$ (Gammadelta)T细胞群的方法、多种培养的 $\gamma\delta$ T细胞群的治疗用途以及多种包含培养的 $\gamma\delta$ T细胞的试剂盒。更具体地,但并非特定地,本发明涉及多种培养的 $\gamma\delta$ T细胞单独或与其他细胞组合用于移植的用途。

[0069] 烟酰胺(NAM),来自烟酸的酰胺形式(烟酰胺,维生素B3)是一种碱基交换基质及NAD(+)依赖酶的有效抑制剂,赋予单ADP核糖转移酶和多ADP核糖转移酶的活性。作为一种微量的微营养素,烟酰胺需要以微摩尔的量来保证体外培养的哺乳动物细胞的活力和增殖,并且通常与其他维生素一起被纳入细胞培养基的配方中。与其他淋巴细胞组分一样, γ

δ T细胞通常在含有烟酰胺的培养基中进行体外培养,浓度范围为约 $8\mu\text{M}$ 烟酰胺(MEM α , RPMI)至约 $33\mu\text{M}$ (DMEM),以促进 $\gamma\delta$ T细胞的强健生长(例如,参见Jakobovits等人美国专利申请案公开第2016/0175358号)。

[0070] 已发现较高浓度的烟酰胺可有效增强CD34+和CD133+造血干细胞和祖细胞(例如,参见美国专利第7,955,852号和第8,846,393号)以及CD56+自然杀伤细胞(例如,参见Frei等人, Blood期刊, 2011年, 118:4035)的扩增和功能,但也有报道称,烟酰胺可抑制对激活信号的反应性及诱导T细胞(例如,参见Liu等人, J Immunol期刊, 2001年, 167:4942-4947)和中性粒细胞(Fernandes等人, Am J Physical Lung Cell Mol Phys期刊, 2011年, 300:L354-361)的细胞凋亡。

[0071] 本申请发明人出人意料地示出,如本文进一步详述的,在 $\gamma\delta$ T细胞增殖条件下体外培养的人类 $\gamma\delta$ T细胞的富集群体中添加毫摩尔浓度的烟酰胺可增强功能性,例如,当注入SCID小鼠宿主时, $\gamma\delta$ T细胞的归巢和组织保留能力更强。

[0072] 由于 $\gamma\delta$ T细胞在组织内环境稳定、感染性和自身免疫性疾病、炎症、移植和肿瘤监测期间参与免疫反应,对感染细胞和肿瘤细胞表现出自发的非MHC限制的细胞毒性活性,并在体内介导对病毒感染和癌症发展的抵抗,有效增加 $\gamma\delta$ T细胞功能性的方法可用于肿瘤治疗和清除感染细胞,具有更强的反应性和更少的不良反应。

[0073] 因此,开发有效增强培养的 $\gamma\delta$ T细胞功能以及在注入后其在宿主组织体内归巢和保留的可能性的方案,可以提高治疗的成功率,例如过继免疫治疗, $\gamma\delta$ T细胞用于治疗实体瘤、恶性肿瘤、病毒性和自身免疫性疾病等。

[0074] 因此,根据本发明实施例的一个方面,提供了一种增强 $\gamma\delta$ T细胞归巢和/或保留潜能的方法,所述方法包含:获得富集多个 $\gamma\delta$ T细胞的一选定细胞群,体外为所述选定细胞群提供 $\gamma\delta$ T细胞扩增的多个条件,及提供0.5至50mM范围内的烟酰胺持续一段时间,以显著增强 $\gamma\delta$ T细胞归巢和/或保留潜能,从而增强所述选定细胞群中多个 $\gamma\delta$ T细胞的归巢和/或保留潜能。

[0075] 如本文所用,术语“ $\gamma\delta$ T细胞”在本文中也可称为 $\gamma\delta$ T细胞($\gamma\delta$ T-cell, gammadelta T cell),或进一步称为gd T-细胞或gd T细胞。

[0076] $\gamma\delta$ T细胞是通过表达由 γ (gamma)链和 δ (delta)链组成的异二聚体T细胞受体(TCR)来定义的。这使它们区别于典型和更为人熟知的表达 $\alpha\beta$ TCR的CD4+辅助T细胞和CD8+细胞毒性T细胞。 $\gamma\delta$ T细胞选择(胸腺的)的机制仍不清楚。

[0077] $\gamma\delta$ T细胞通常显示共享相同TCR链的寡克隆亚群的组织特异性定位。例如,人类外周血 $\gamma\delta$ -T细胞主要是V γ 9/V δ 2+,而小鼠皮肤 $\gamma\delta$ T细胞,即所谓的树突状表皮T细胞(DECT细胞),主要是V γ 5/V δ 1+。一般来说, $\gamma\delta$ T细胞在上皮和粘膜组织中富集,被认为是抵抗致病的挑战的第一道防线。

[0078] 如本文所用,“ $\gamma\delta$ T细胞激活”是指与 $\gamma\delta$ T细胞相关联的任何可测量的生物现象,其代表被激活的此类T细胞。此类生物现象的非限制性示例包含细胞因子产生的增加、细胞表面蛋白质定性或定量组成的变化、T细胞增殖的增加,和/或T细胞效应物功能的增加,如此杀死靶细胞或协助另一效应物细胞以杀死靶细胞。

[0079] 根据本发明的一些实施例,本发明的方法增强 $\gamma\delta$ T细胞的归巢和/或保留潜能。

[0080] 如本文所用,术语“功能”或“ $\gamma\delta$ T细胞功能”是指归属于 $\gamma\delta$ T细胞的任何生物功

能。 γ δ T细胞功能的非限制性列表包含,例如,细胞毒性、诱导凋亡、细胞运动、定向迁移、细胞因子和其他细胞信号反应、细胞因子/趋化因子的产生和分泌、试管中激活和抑制细胞表面分子的表达、细胞归巢和移植宿主体内保留,以及体内疾病或疾病过程的改变。在一些实施例中,通过暴露于烟酰胺和/或其他烟酰胺部分而增强的 γ δ T细胞功能包含CD62L表面标记物的高表达、高迁移反应和 γ δ T细胞的更高的细胞毒性活性中的至少一种,以及增强注入的 γ δ T细胞的归巢和体内保留。在具体实施例中,通过暴露于烟酰胺和/或其他烟酰胺部分而增强的 γ δ T细胞功能包含 γ δ T细胞的CD62L表面标记物的提高的表达和注入的 γ δ T细胞的提高的归巢和体内保留中的至少一种。在具体实施例中,通过将 γ δ T细胞暴露于烟酰胺和/或其他烟酰胺部分而增强 γ δ T细胞的CD62L表面标记物的表达和注入的 γ δ T细胞的归巢和体内保留。

[0081] 在本领域是众所周知,对粘附和迁移分子(例如CD62L、CXCR-4、CD49e等)的分析对于移植中细胞的归巢和保留是非常重要的。例如,可以通过流式细胞术、免疫检测、定量cDNA扩增、杂交等来分析细胞中的CD62L表达。在一个实施方案中,通过将细胞暴露于荧光标记的特异性人抗体(anti-human)的CD62L单克隆抗体(例如,来自BioLegend公司(加利福尼亚州圣地亚哥市,美国)的CD62L PE,目录号304806)并通过荧光激活细胞分选(FACS)分选细胞,在不同的 γ δ T细胞群中检测CD62L表达。

[0082] 细胞迁移的分析在本领域是众所周知的。例如,可以通过迁移分析或间隙闭合(gap closure)分析来分析细胞的迁移。在迁移分析中,如双室(two-chamber)技术,细胞通过屏障(如过滤器)与刺激物分离,并通过以特定间隔计数来源细胞的损失、穿过屏障的细胞累积,或其两者来检测细胞的迁移。在间隙闭合分析中,细胞被放置在可见间隙(刻痕琼脂板、围绕一圈等)的外围,并与刺激物一起培养。利用细胞仪、免疫检测、显微术/形态测定法等可视化通过细胞运动对刺激的反应应用的细胞之间空间的闭合。在一个实施例中,通过Transwell™迁移分析确定不同细胞群的迁移潜能。

[0083] 输血或移植细胞的归巢和体内保留的分析在本领域是众所周知的。如本文所用,术语“归巢”指注入或移植细胞到达宿主靶器官并在宿主靶器官中存活的能力。例如, γ δ T细胞靶器官可以是淋巴组织,肝细胞靶器官可以是肝实质,肺泡细胞靶器官可以是肺实质等。如本文所用,术语“体内保留”是指注入或移植细胞的留在于其中的能力,可选地增殖并在靶器官中保持存活。用于检测移植的 γ δ T细胞归巢和体内保留的动物模型包含但不限于免疫缺陷的小型哺乳动物(例如SCID和IL2R γ 空(IL2R γ null)小鼠等)。SCID-Hu小鼠模型采用C.B-17scid/scid(SCID)小鼠移植人类胎儿胸腺和肝组织或胎儿BM组织,以为评估移植的人类“ γ δ T细胞保留和治疗潜能提供了合适的模型。移植细胞的归巢和体内保留也可以在人类宿主对象中进行评估。在一个实施方案中,在经辐照的NOD/SCID小鼠中分析归巢和体内保留,所述小鼠经输入例如约 15×10^4 、约 15×10^5 、约 15×10^6 、约 15×10^7 或更多的人类 γ δ T细胞富集的多个细胞,所述人类 γ δ T细胞富集的多个细胞根据本发明使用有效浓度的烟酰胺培养,并在输入后一预定时间(例如,输入后约5小时、10小时、12小时、1、2、3、4、5、6、7天、1、2、3、4、5周、2、3、4、4个月或更长时间)处死。处死小鼠后,通过FACS评估脾脏、骨髓、外周血和其他器官样本中是否存在人类 γ δ T细胞。

[0084] 此外,短语“归巢(homing)和/或保留潜能(retention potential)”是指细胞(例如 γ δ T细胞)在注入到宿主生物体(例如对象)中时(最常见的是作为静脉注入进入循环),

以离开循环系统并留在宿主器官或组织的能力。具体而言,如本文所使用的术语“保留(retention)”是指注入的细胞在“归巢”和该组织或器官的群体之后保留在宿主组织或器官中的能力。如本文所使用,短语“增强归巢和/或保留潜能”是指细胞移植的效率、质量或快速的改进,其可由对标靶组织或器官改进的归巢和/或保留、改进的粘附、减少排斥等的结果。

[0085] 细胞毒性(“细胞杀伤”)的分析在本领域是众所周知的。用于重定向杀伤分析的合适靶细胞的示例为癌细胞系、原发性癌细胞、实体瘤细胞、白血病细胞或病毒感染细胞。特别地,可以使用K562、BL-2、colo250和原发性白血病细胞,但是可以使用许多其他细胞类型中的任何一种,并且在本领域是众所周知的(参见,例如,Sivori等人(1997) J.Exp.Med. 期刊186:1129-1136;Vitale等人(1998) J.Exp.Med. 期刊187:2065-2072;Pessino等人(1998) J.Exp.Med. 期刊188:953-960;Neri等人(2001) Clin.Diag.Lab.Immun. 期刊8:1131-1135)。通过细胞活力分析(例如染料排除、铬释放、CFSE)、代谢分析(例如四氮唑盐)和直接观察来评估细胞杀伤。

[0086] 细胞归巢和/或保留潜能可通过测量细胞功能性标记物(例如粘附分子,如CD62L、选择素配体等)或通过SCID-Hu小鼠模型中的体内注入和移植来确定。SCID-Hu小鼠模型采用C.B-17scid/scid(SCID)小鼠移植人类胎儿胸腺和肝组织或胎儿BM组织,以为评估可移植的推定人类淋巴组织和其他细胞提供了合适的模型。由于SCID小鼠与人类胎儿组织的重组,所述模型提供了人类细胞的归巢和保留,并在人类来源的微环境中发挥功能。通常对小鼠进行照射,然后将淋巴细胞送入移植物中,并通过任何数量的方法测量归巢/保留,包含FACS和重新填入器官的免疫组织化学(例如,参见下文的材料和实验方法)。

[0087] 如本文所用,术语“体外”(ex-vivo)是指从活生物体中移除细胞并在生物体外繁殖(例如,在试管中)的过程。

[0088] 如本文所用,术语“在试管中(in-vitro)”是指源自实验室维持的一个或多个细胞系(例如NTera2神经细胞、胚胎细胞系等)的细胞在生物体外被使用的过程。这种细胞系通常是永生化细胞。

[0089] 如本文所用,短语“细胞群”是指同质或异质分离的细胞群,其可包含根据本发明方法适于扩增或移植的细胞群。在优选的实施例中,本发明此方面的细胞群的至少一部分为 $\gamma\delta$ T细胞,表达包含在细胞表面上 γ (gamma)链和 δ (delta)链的异二聚体TCR。

[0090] 在一些方面,本公开提供了用于体外扩增 $\gamma\delta$ T细胞群的方法。本发明的 $\gamma\delta$ T细胞或 $\gamma\delta$ T细胞群可在体外扩增。本发明的 $\gamma\delta$ T细胞或 $\gamma\delta$ T细胞群可在不经多种别藻蓝蛋白(APC)激活或不与多种APC和氨基磷酸盐共培养的情况下扩增。

[0091] 根据本发明方法的一些实施例,向 $\gamma\delta$ T细胞提供 $\gamma\delta$ T细胞扩增的多个条件。

[0092] 在具体实施例中, $\gamma\delta$ T细胞扩增的多个条件包含提供多种营养素和多个细胞因子。

[0093] 能够支持 $\gamma\delta$ T细胞的合适培养基包含HEM、DMEM、RPMI、F-12等。如果需要,培养基可以包含细胞代谢所需的多种补充剂,例如谷氨酰胺和其他氨基酸、维生素、矿物质和有用的蛋白质,例如转铁蛋白等。培养基可能包含也可能不包含添加的血清。培养基还可含有抗生素以防止酵母、细菌和真菌污染,例如青霉素、链霉素、庆大霉素等。如果要培养细胞,多个条件应接近多个生理条件(最好是pH值约为6至8,温度约为30°C至40°C)。在一些实施例

中,培养基可任选地补充以下至少一种:多种增殖诱导生长因子、多个细胞因子和/或多个趋化因子,例如IL-2、IL-4、IL-7、IL-15、IL-12、IL-21、IL-23或IL-33及其组合。在具体实施例中,培养基补充有IL-2和/或IL-15。除增殖诱导生长因子外,还可向培养基中添加其他生长因子。在一些示例性实施方案中, γ δ T细胞在含细胞因子(IL-2、IL-4、IL-7、IL-15、IL-12、IL-21、IL-23或IL-33)、生长因子(胰岛素和转铁蛋白、胰岛素样生长因子)、白蛋白、脂质(胆固醇、脂质溶液、脂质前体)、维生素、铜、铁、硒、蛋白质水解物、必需氨基酸、非必需氨基酸和剪切保护剂(Pluronic F-68)的无血清培养基(例如,Ex-Vivo 10培养基、Ex-Vivo 15培养基、Ex-Vivo 20培养基、AIMV培养基、Optimizer CTS培养基)中被刺激和扩增。

[0094] 多个细胞因子和其他生长因子通常以0.5-100纳克/毫升或1.0-80纳克/毫升、更通常的5-750纳克/毫升、更通常的5.0-50纳克/毫升的浓度提供(可考量最高达这样的浓度的10倍),并可从美国新泽西州洛基山的Perpo Tech公司处购买。在一个实施方案中,允许细胞增殖的多个条件包含提供细胞因子白细胞介素2或白细胞介素15。在具体实施方案中, γ δ T细胞与20纳克/毫升的IL-15和/或IL-2一起培养。

[0095] 此外,在这方面应理解,不断发现新的细胞因子,其中一些可用于本发明的 γ δ T细胞增殖方法。对于将细胞引入(或重新引入)人体的应用,通常优选的使用无血清制剂,例如用于淋巴细胞培养的AIM V^{RTM}无血清培养基或MARROWMAX^{RTM}骨髓培养基。此类培养基配方和补充剂可从商业来源获得,如Invitrogen (GIBCO) (加利福尼亚州卡尔斯巴德)。多种培养物可以补充多种氨基酸、多种抗生素和/或多个细胞因子,以促进最佳生存能力、增殖、功能和/或存活。

[0096] 此类无血清培养基可进一步补充多种添加剂,以支持悬浮培养(例如,WAVE生物反应器)中的高细胞密度 γ δ T细胞生长,同时保持 γ δ T细胞的生物功能性。

[0097] 根据本发明的一个方面,可通过为 γ δ T细胞或 γ δ T细胞群提供体外细胞增殖的多个条件和使用烟酰胺部分体外培养 γ δ T细胞,来实现 γ δ T细胞的体外培养,从而体外扩增和/或体外增强 γ δ T细胞群的归巢和/或保留潜能。

[0098] 如本文所用,“培养”包含提供 γ δ T细胞维持所需的化学和物理条件(例如,温度、气体),以及可选的多个生长因子。在一个实施例中,培养 γ δ T细胞包含为 γ δ T细胞提供 γ δ T细胞扩增(例如增殖)的多个条件。可能支持 γ δ T细胞扩增的多个化学条件的示例包含但不限于多种缓冲液、多种营养素、血清、多种维生素和多种抗生素以及通常在生长(即培养)培养基中提供的多个细胞因子和其他生长因子。在具体实施例中,细胞生长的多个条件包含多种营养素、血清和(多个)细胞因子。在一个实施例中, γ δ T-培养基包含最小基本培养基(MEM),例如MEM α (BI公司,以色列Bet HaEmek)和血清。在具体实施例中,培养基为包含10%人类AB血清(Sigma-Aldrich公司,密苏里州圣路易斯市)的MEM α 。适用于本发明的其他培养基包含但不限于Glascows培养基(Gibco公司,加利福尼亚州卡尔斯巴德市)、RPMI培养基(Sigma-Aldrich公司,密苏里州圣路易斯市)或DMEM培养基(Sigma-Aldrich公司,密苏里州圣路易斯市)。需要注意的是,许多培养基含有烟酰胺作为维生素补充剂,例如,MEM α (8.19 μ M(微摩尔浓度)烟酰胺)、RPMI (8.19 μ M烟酰胺)、DMEM (32.78 μ M烟酰胺)和Glascows培养基 (16.39 μ M烟酰胺),本发明的方法涉及外源添加的烟酰胺,以补充包含在培养基配方的任何烟酰胺和/或烟酰胺部分,或由培养基组分浓度的整体调整产生的烟酰胺和/或烟酰胺部分。

[0099] 根据一个实施方案,用营养素、血清、细胞因子(例如IL-15和/或IL-2)和烟酰胺和/或烟酰胺部分培养 $\gamma\delta$ T细胞或 $\gamma\delta$ T细胞群。如本文所用,术语“烟酰胺部分(nicotinamide moiety)”是指烟酰胺以及衍生自烟酰胺的产物、其衍生物、类似物和代谢物,例如NAD、NADH和NADPH,其能够有效且优先地增强 $\gamma\delta$ T细胞归巢和/或保留。烟酰胺衍生物、类似物和代谢物可在培养物中通过添加如本文所述主张的 $\gamma\delta$ T细胞培养物、添加功能分析(如细胞粘附、滚动和运动性分析)来筛选和评估其对归巢和/或保留的影响,或在为本领域众所周知的高通量分析设计的归巢和/或保留标记物的自动筛选方案中来筛选和评估其对归巢和/或保留的影响。

[0100] 如本文所用,短语“烟酰胺类似物”是指已知在上述或类似分析中类似于烟酰胺作用的任何分子。烟酰胺类似物的代表性示例可包含但不限于苯甲酰胺、烟碱乙酰胺(烟酰胺的硫醇类似物)、烟酸和 α -氨基-3-吡啶丙酸。

[0101] 短语“烟酰胺衍生物”进一步是指烟酰胺本身或烟酰胺类似物的任何结构衍生物。此类衍生物的示例包含但不限于取代的苯甲酰胺、取代的烟酰胺和烟碱乙酰胺以及N-取代的烟酰胺和烟碱甲酰胺、3-乙酰吡咯烷和烟酸钠。在本发明的一个具体实施例中,烟酰胺部分为烟酰胺。

[0102] 适于在本发明的一些实施例中使用的烟酰胺或烟酰胺部分浓度通常在约0.5mM(毫莫尔浓度)至约50mM、约1.0mM至约25mM、约1.0mM至约25mM、约2.5mM至约10mM、约5.0mM至约10mM、约0.5mM至约20mM的范围内。基于这些浓度的烟酰胺对 $\gamma\delta$ T细胞归巢和/或保留的影响,烟酰胺的示例性有效浓度可为约0.5至约15mM、1.0-10.0mM、通常为2.5或5.0mM。根据本发明的一些实施例,以约0.5、约0.75、约1.0、约1.25、约1.5、约1.75、约2.0、约2.25、约2.5、约2.75、约3.0、约3.25、约3.5、约3.75、约4.0、约4.5、约4.75、约5.0、约5.25、约5.5、约5.75、约6.0、约6.25、约6.5、约6.75、约7.0、约7.25、约7.5、约7.75、约8.0、约8.25、约8.5、约8.75、约9.0、约9.25、约9.5、约9.75、约10.0、约11.0、约12.0、约13.0、约14.0、约15.0、约16.0、约17.0、约18.0、约20.0mM、约23.0mM、约25.0mM、约30.0mM、约35.0mM、约40.0mM、约45.0mM或约50.0mM范围内的浓度提供烟酰胺。所有有效的中间浓度皆被考虑在内。在具体实施例中,允许增殖的条件包含0.5至50mM、1.0至10.0mM的烟酰胺。在又一其它实施方案中,增强 $\gamma\delta$ T细胞归巢和/或保留的条件包含5.0mM的烟酰胺。

[0103] 可根据 $\gamma\delta$ T细胞归巢和/或保留或CD62L表达的任何分析来确定烟酰胺和/或烟酰胺部分的适当浓度。与烟酰胺含量小于0.1mM、小于0.2mM或小于0.4mM及来自相同 $\gamma\delta$ T细胞来源(例如脐带血、骨髓或外周血制备)测试的对照培养物相比,在相同分析和类似培养条件下(暴露于烟酰胺的持续时间、暴露于烟酰胺的时间、扩张条件),烟酰胺的适当浓度是在培养物中使用增强或导致 $\gamma\delta$ T细胞归巢和/或保留功能净增加的浓度。

[0104] 应注意的是,根据本发明的方法用于扩增和增强 $\gamma\delta$ T细胞的条件也可能有利于培养在与 $\gamma\delta$ T细胞混合的细胞群中发现的其他类型的细胞。因此,在一些实施例中,根据本文公开的方法提供 $\gamma\delta$ T细胞扩增和烟酰胺的条件也增强了其他淋巴细胞(例如自然杀伤(NK)细胞)的归巢和/或保留潜能,与没有添加烟酰胺培养和/或扩增的类似细胞群相比,提供了扩增细胞群比类似细胞群具有潜在更大治疗功效。

[0105] 在具体实施例中,本发明的方法可以扩增和增强各种 $\gamma\delta$ T细胞群的功能,例如V γ 1+、V γ 2+、V γ 3+、 $\gamma\delta$ T细胞群。在某些情况下, $\gamma\delta$ T细胞群可以被离体培养少于36天、少于

35天、少于34天、少于33天、少于32天、少于31天、少于30天、少于29天、少于28天、少于27天、少于26天、少于25天、少于24天、少于23天、少于22天、少于21天、少于20天、少于19天、少于18天、少于17天、少于16天、少于15天、少于14天、少于13天、少于12天、少于11天、少于10天、少于9天、少于8天、少于7天、少于6天、少于5天、少于4天、少于3天。在某些情况下， γ δ T细胞群培养1至8周、1至5周、1至4周、1至3周、1至2周、1至14天、2至13天、1至10天、2至8天、1至7天、3至12天以及5至14天。在一些实施例中，还设想将 γ δ T细胞的富集细胞短期离体暴露于烟酰胺和/或其他烟酰胺部分，时间为几分钟、几小时、1天等。

[0106] 在一些研究中，通过使用多种营养素、血清、多个细胞因子和烟酰胺培养体外扩增 γ δ T细胞不需要在培养期间补充培养基或进行操作，而其他研究则主张在 γ δ T细胞培养期间以不同的间隔补充培养基（“再饲养(re-feeding)”）。在本发明的某些实施例中， γ δ T细胞部分在培养期间“再饲养”。因此，在具体实施方案中，培养 γ δ T细胞群包含在体外培养开始后8-10天用新鲜的多种营养素、血清、多个细胞因子和烟酰胺补充 γ δ T细胞的富集细胞。在一些实施方案中，在体外培养开始后的8-9天之间、体外培养开始后的9-10天之间或在培养 γ δ T细胞的富集细胞开始后的8-10天之间提供补充。在一些实施方案中，所述补充（或“再饲养”）包含移除约30-80%、约40-70%或约45-55%的培养基，并当培养基移除时，用具有相同成分和水平的多种营养素、血清、多个细胞因子（例如IL-2和/或IL-15）的类似（例如等效）体积的新鲜培养基替换。在一些实施方案中，所述补充（或“再饲养”）包含移除培养的约50%的培养基，并用具有相同成分和水平的多种营养素、血清、多个细胞因子（例如IL-2和/或IL-15）和烟酰胺的类似（例如等效）体积的新鲜培养基替换移除的培养基。在其他实施方案中，再饲养后的培养体积达到 γ δ T细胞富集的多个细胞培养（“接种”）开始时原始培养体积的大约两倍。

[0107] γ δ 细胞群可以使用多种方法和装置进行培养。培养设备的选择通常基于培养的规模和目的。细胞培养的放大优选地包含使用专用装置。在一些实施方案中，在多个烧瓶中以每烧瓶 $100-4000 \times 10^6$ 个细胞的细胞密度培养 γ δ T细胞富集的多个部分。在具体实施方案中，在多个烧瓶中以 $200-300 \times 10^6$ 个细胞/烧瓶的细胞密度培养 γ δ T细胞富集的多个部分（例如，体外培养开始和/或“再饲养”）进行。在某些实施例中，所述多个烧瓶是包含气体可渗透膜的多个烧瓶，例如G-Rex培养装置（G-Rex 100M或封闭系统G-Rex MCS，WolfWilson公司，明尼苏达州圣保罗）。

[0108] 培养 γ δ T细胞富集的多个细胞可以在具有或没有饲养细胞或饲养细胞层的情况下进行。无饲养层离体培养对于培养细胞的临床应用非常有利。因此，根据一个实施例，在没有饲养层或饲养细胞的情况下培养 γ δ T细胞群富集的多个细胞。

[0109] 在一些方面，提供了通过用激活剂接触 γ δ T细胞来扩增各种 γ δ T细胞或 γ δ T细胞群的方法。在某些情况下，激活剂与 γ δ T细胞的细胞表面受体上的特定表位结合，例如单克隆抗体。激活剂可特异性地激活一种或多种类型的 γ δ T细胞的生长，例如 $\delta 1$ 、 $\delta 2$ 或 $\delta 3$ 细胞群。在一些实施例中，激活剂特异性激活 $\delta 1$ 细胞群的生长。在其他情况下，激活剂特异性地激活 $\delta 2$ 细胞群的生长。活化剂可刺激 γ δ T细胞快速生长。

[0110] 在一些实施例中， γ δ T细胞群包含不同百分比的 $\delta 1$ 、 $\delta 2$ 和 $\delta 3$ T细胞。 γ δ T细胞群可包含，例如，少于90%的 $\delta 1$ T细胞、或 $\delta 2$ T细胞、或 $\delta 3$ T细胞，少于80%的 $\delta 1$ T细胞、或 $\delta 2$ T细胞、或 $\delta 3$ T细胞，少于70%的 $\delta 1$ T细胞、或 $\delta 2$ T细胞、或 $\delta 3$ T细胞，少于60%的 $\delta 1$ T细胞、或 $\delta 2$ T细胞、

或 $\delta 3T$ 细胞,少于50%的 $\delta 1T$ 细胞、或 $\delta 2T$ 细胞、或 $\delta 3T$ 细胞,少于40%的 $\delta 1T$ 细胞、或 $\delta 2T$ 细胞、或 $\delta 3T$ 细胞,少于30%的 $\delta 1T$ 细胞、或 $\delta 2T$ 细胞、或 $\delta 3T$ 细胞,少于20%的 $\delta 1T$ 细胞、或 $\delta 2T$ 细胞、或 $\delta 3T$ 细胞,少于10%的 $\delta 1T$ 细胞、或 $\delta 2T$ 细胞、或 $\delta 3T$ 细胞、或少于5%的 $\delta 1T$ 细胞、或 $\delta 2T$ 细胞、或 $\delta 3T$ 细胞。或者, $\gamma \delta T$ 细胞群可包含大于5%的 $\delta 1T$ 细胞、或 $\delta 2T$ 细胞、或 $\delta 3T$ 细胞,大于10%的 $\delta 1T$ 细胞、或 $\delta 2T$ 细胞、或 $\delta 3T$ 细胞,大于20%的 $\delta 1T$ 细胞、或 $\delta 2T$ 细胞、或 $\delta 3T$ 细胞,大于30%的 $\delta 1T$ 细胞、或 $\delta 2T$ 细胞、或 $\delta 3T$ 细胞,大于40%的 $\delta 1T$ 细胞、或 $\delta 2T$ 细胞、或 $\delta 3T$ 细胞,大于50%的 $\delta 1T$ 细胞、或 $\delta 2T$ 细胞、或 $\delta 3T$ 细胞,大于60%的 $\delta 1T$ 细胞、或 $\delta 2T$ 细胞、或 $\delta 3T$ 细胞,大于70%的 $\delta 1T$ 细胞、或 $\delta 2T$ 细胞、或 $\delta 3T$ 细胞,大于80%的 $\delta 1T$ 细胞、或 $\delta 2T$ 细胞、或 $\delta 3T$ 细胞、或大于90%的 $\delta 1T$ 细胞、或 $\delta 2T$ 细胞、或 $\delta 3T$ 细胞。

[0111] 在一些实施例中,(多个) $\gamma \delta T$ 细胞可响应于与一种或多种抗原的接触而快速扩增。在组织培养过程中,一些 $\gamma \delta T$ 细胞(如(多个) $V \gamma 9V\delta 2 + \gamma \delta T$ 细胞)在与某些抗原(如多种焦磷酸戊烯酯、多种烷基胺、多种代谢物或多种微生物提取物)接触时,响应于所述接触在体外迅速扩增。此外,一些野生型 $\gamma \delta T$ 细胞,如 $V \gamma 2V\delta 2 + \gamma \delta T$ 细胞,响应于在人体内某些类型的(多种)接种疫苗迅速扩增。受刺激的 $\gamma \delta T$ 细胞可表现出多种抗原呈递、共刺激和粘附分子,这些分子可便于从复合样本中分离(多个) $\gamma \delta T$ 细胞。复合样本中的(多个) $\gamma \delta T$ 细胞可在试管中用至少一种抗原刺激1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或其他合适的时间段。用合适的抗原刺激 $\gamma \delta T$ 细胞可在体外扩增 $\gamma \delta T$ 细胞群。

[0112] 可用于刺激复合样本中(多个) $\gamma \delta T$ 细胞扩增的多种抗原的非限制性示例包含:多种异戊二烯基-焦磷酸酯(prenyl-pyrophosphate),例如异戊二烯基焦磷酸(isopentenyl pyrophosphate,IPP)、多种烷基胺(alkyl-amines)、多种人类微生物病原体的代谢物、多种共生菌的代谢物、-甲基-3-丁烯基-1-焦磷酸(-methyl-3-butenyl-1-pyrophosphate,2M3B1PP)、(E)-4-羟基-3-甲基-2-烯基焦磷酸((E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate,HMB-PP)、焦磷酸乙酯(ethyl pyrophosphate,EPP)、法尼基焦磷酸(farnesyl pyrophosphate,FPP)、二甲基烯丙基磷酸酯(dimethylallyl phosphate,DMAP)、二甲基烯丙基焦磷酸(dimethylallyl pyrophosphate,DMAPP)、三磷酸乙基腺苷(ethyl-adenosine triphosphate,EPPPA)、焦磷酸香叶酯(geranyl pyrophosphate,GPP)、香叶基香叶基焦磷酸酯(geranylgeranyl pyrophosphate,GGPP)、异戊烯基三磷酸腺苷(isopentenyl-adenosine triphosphate,IPPPA)、磷酸单乙酯(monoethyl phosphate,MEP)、焦磷酸单乙酯(monoethyl pyrophosphate,MEPP)、3-甲酰基-1-丁基-焦磷酸酯(3-formyl-1-butyl-pyrophosphate,TUBAg 1)、X-焦磷酸盐(X-pyrophosphate,TUBAg 2)、3-甲酰基-1-丁基-尿苷三磷酸(3-formyl-1-butyl-uridine triphosphate,TUBAg 3)、3-甲酰基-1-丁基-脱氧胸苷三磷酸(3-formyl-1-butyl-deoxythymidine triphosphate,TUBAg 4)、多种单乙基烷基胺(monoethyl alkylamines)、焦磷酸烯丙酯(allyl pyrophosphate)、巴豆酰焦磷酸(crotyl pyrophosphate)、二甲基烯丙基- γ -尿苷三磷酸(dimethylallyl-gamma-uridine triphosphate)、巴豆酰- γ -尿苷三磷酸(crotyl-gamma-uridine triphosphate)、烯丙基- γ -尿苷三磷酸(allyl-gamma-uridine triphosphate)、乙胺、异丁胺、仲丁胺、异戊胺和多种含氮双磷酸盐。

[0113] $\gamma \delta T$ 细胞的激活和/或扩增可使用本文所述的多种激活和共刺激剂来触发特异性 $\gamma \delta T$ 细胞增殖和持续存在的多个群体。在一些实施例中,来自不同培养物的 $\gamma \delta T$ 细胞的激

活和扩增可实现不同的克隆或混合多克隆群体亚群。在一些实施例中,可以使用不同的激动剂来识别提供特定 $\gamma\delta$ 激活信号的作用物。在一个方面,提供特定 $\gamma\delta$ 激活信号的作用物可以是针对 $\gamma\delta$ TCR的多种不同单克隆抗体(MAbs)。在一个方面,所述多种单克隆抗体可结合 γ TCR和/或 δ TCR恒定或可变区域上的不同表位。在一个方面,所述多种单克隆抗体可包含多种 $\gamma\delta$ TCR泛单克隆抗体(gammadelta TCR pan MAbs)。在一个方面,所述多种 $\gamma\delta$ TCR泛单克隆抗体可识别不同的 γ 和 δ TCR两者上共享的区域,包含 $\delta 1$ 和 $\delta 2$ 细胞群。在一个方面中,多种抗体可以是5A6.E9(Thermo scientific公司)、B1(Biolegend公司)、IMMU510和/或11F12(Beckman Coulter公司)。在一个方面中,所述多种单克隆抗体可定向至伽马链特有于多个可变区域的多个特定区域(7A5 Mab,定向至类似 $V\gamma 9$ TCR(Thermo Scientific公司#TCR1720)),或 $V\delta 1$ 可变区域上的多个区域(Mab TS8.2(Thermo Scientific公司#TCR1730; Mab TC1, Mab R9.12(Beckman Coulter公司))或 $V\delta 2$ 链(Mab 15D(Thermo Scientific公司(#TCR1732))。在一些实施例中,可组合针对 $\gamma\delta$ TCR不同区域的多种抗体(多种泛抗体和识别多个子集群体上特定可变区域的多个表位的多种抗体)。在一些实施例中, $\gamma\delta$ T细胞激活剂可包含多种 $\gamma\delta$ TCR结合剂,例如MICA、NKG2D激动剂抗体、(Fc-标签)融合蛋白:MICA、ULBP1、ULBP3(R&D systems公司,明尼苏达州明尼阿波利斯市)、ULBP2或ULBP6(中国北京华生生物科技有限公司)。在一些实施例中,辅助触发特定 $\gamma\delta$ T细胞增殖而不诱导细胞去活化和凋亡的伴随共刺激剂可组合使用,例如但不限于 $\gamma\delta$ 细胞上表达的受体的配体,例如NKG2D、CD161、CD70、JAML、DNAX辅助分子-1(DNAM-1) ICOS、CD27、CD137、CD30、HVEM、SLAM、CD122、DAP和CD28-或特定于CD2和CD3分子上独特表位的抗体。

[0114] 可用于促进 $\gamma\delta$ T细胞群体外扩增的试剂的非限制性示例包含抗CD3或抗CD2、抗CD27、抗CD30、抗CD70、抗OX40抗体、IL-2、IL-15、IL-12、IL-9、IL-33、IL-18、或IL-21、CD70(CD27配体)、植物血凝素(PHA)、刀豆球蛋白A(ConA)、美洲商陆(PWM)、蛋白质花生凝集素(PNA)、大豆凝集素(SBA)、扁豆凝集素(LCA)、豌豆凝集素(PSA)、蜗牛凝集素(HPA)、野豌豆凝集素(VGA)或其他能够刺激T细胞增殖的合适的有丝分裂原。

[0115] 在一些方面,本发明提供了用于培养已从一对象分离的多个 $\gamma\delta$ T细胞的方法。 $\gamma\delta$ T细胞可以从一对象的一复合样本中分离出来。复合样本可以是外周血样本、脐带血样本、肿瘤、干细胞前体、肿瘤活检、组织、淋巴,或者来自直接接触外部社会环境的一对象的多个上皮部位,或者衍生自干细胞前体细胞。在具体实施例中,样本衍生自一器官,所述器官选自由以下的群组:肌肉、皮肤、骨骼、淋巴器官、胰腺、肝脏、胆囊、肾脏、消化道器官、呼吸道器官、生殖器官、泌尿道器官、血液相关器官、胸腺、脾脏和神经系统器官。在具体实施例中,多个 $\gamma\delta$ 细胞或 $\gamma\delta$ 细胞群衍生自一来源,所述来源选自由以下组成的群组:多个造血细胞、多个脐带细胞、多个外周血细胞(可动的或不可动的)和多个骨髓细胞。在又一实施例中,从骨髓或外周血样本、新生儿脐带血或单核细胞部分分离 $\gamma\delta$ 细胞或群体。

[0116] 例如,通过使用流式细胞术技术对表达一个或多个细胞表面标记物的(多个) $\gamma\delta$ T细胞进行分选,一 $\gamma\delta$ T细胞可直接从一对象的一复合样本中分离。野生型 $\gamma\delta$ T细胞表现出与(多个) $\gamma\delta$ T细胞相关联的许多抗原识别、抗原呈递、共刺激和粘附分子。一个或多个细胞表面标记物,例如特异性 $\gamma\delta$ TCR、抗原识别、抗原呈递、配体、粘附分子或共刺激分子,可用于从复合样本中分离野生型 $\gamma\delta$ T细胞。与 $\gamma\delta$ T细胞相关联或通过 $\gamma\delta$ T细胞表达的各种分子可用于从复合样本中分离 $\gamma\delta$ T细胞。在一些实施例中,本发明提供了用于 $V\delta 1+$ 、 $V\delta 2+$ 、 $V\delta 3+$

细胞或其任何组合的混合群体分离的方法。

[0117] 外周血单个核细胞可以从对象身上采集,例如,使用单采机(apheresis machine),所述单采机包含Ficoll-Paque™PLUS(GE Healthcare公司)系统或其他合适的装置/系统。(多个) γ δ T细胞或(多个) γ δ T细胞的所需亚群可通过例如流式细胞术技术从收集的样本中纯化。脐带血细胞也可以在对象出生时从脐带血中获得。在具体实施例中, γ δ T细胞或 γ δ T细胞群来自单采样本(apheresis sample)或衍生自单采样本。

[0118] 在收集的(多个) γ δ T细胞上表达的细胞表面标记物的阳性和/或阴性选择可用于直接从外周血样本、脐血样本、肿瘤、肿瘤活检、组织、淋巴组织,或者从对象的上皮样本中分离 γ δ T细胞或表达类似细胞表面标记物的(多个) γ δ T细胞的群体。例如,可以基于CD2、CD3、CD4、CD8、CD24、CD25、CD44、套件组(Kit)、TCR α 、TCR β 、TCR δ 、NKG2D、CD70、CD27、CD30、CD16、CD337(NKp30)、CD336(NKp46)、OX40、CD46、CCR7和其他合适的细胞表面标记物的阳性或阴性表达,从复合样本中分离 γ δ T细胞。具体实施例中,所述选定细胞群是通过 α β T细胞损耗来富集 γ δ T细胞的一淋巴细胞群。应了解,这种 γ δ T细胞富集的细胞群可包含其他细胞类型的多个显著部分(significant fraction),例如自然杀伤(NK)细胞。

[0119] 在其它实施例中,所述选定细胞群是通过阳性TCR γ δ T细胞选择来富集 γ δ T细胞的一淋巴细胞群。应了解,在这种 γ δ T细胞富集的细胞群中,非 γ δ T细胞将是稀缺的。在一些实施例中, γ δ T细胞阳性选定的富集的细胞群不含自然杀伤(NK)细胞。

[0120] 可以从体外培养的复合样本中分离 γ δ T细胞。在具体实施例中,多个富集的 γ δ T细胞群可在其特定激活和扩增之前产生。在一些实施例中,例如单核细胞、T细胞、B细胞和自然杀伤细胞等附加细胞群包含在富集的 γ δ T细胞群中,并且在某些情况下可与 γ δ T细胞一起被激活和扩增。在某些方面, γ δ T细胞的激活和扩增在不存在天然或设计的多种别藻蓝蛋白(APCs)的情况下进行。在一些方面,可以使用固定的 γ δ T细胞有丝分裂原(包含 γ δ TCR特异性抗体)和其他 γ δ TCR激活剂(包含凝集素),从肿瘤样本中分离和扩增 γ δ T细胞。

[0121] 在某些实施方案中,在 γ δ T细胞富集的细胞培养开始的14-16天后从培养物中收获 γ δ T细胞富集的多个细胞。可以手动地,通过释放附着的细胞(例如,“刮”培养容器表面)或通过设计用于有效地将细胞从其培养容器中冲洗出来并自动收集细胞的细胞采集装置进行细胞采集。在具体实施例中,通过细胞收获装置(例如,WolfWilson公司(明尼苏达州圣保罗市)的收获装置:g-Rex MCS)从培养容器中收获扩增的细胞部分。

[0122] 在一些实施方案中,从培养物收获扩增的 γ δ T细胞富集的多个细胞为从培养容器中移除大部分或几乎所有细胞。在其他实施例中,可分两个或多个步骤进行收获,允许未收获的细胞保留在培养物中,直到稍后收获。在收获第一部分和第二部分之间,可以以几小时、几天或更长的间隔来收获这两部分。

[0123] 为了制备用于移植的扩增的 γ δ T细胞富集的多个细胞,收获的细胞需要洗去培养基,评估多个关键参数,并将体积调整到适合在临床上合理时间内注入的浓度。

[0124] 收获后,扩增的 γ δ T细胞富集的多个细胞群可手动清洗,或优选地使用用于临床应用的封闭系统的自动装置。洗涤后的细胞可以用输液重新构成(例如,一种示例性输液包含8%w/v人血清白蛋白(HSA)和6.8%w/v葡聚糖-40(Dextran-40))。在一些实施例中,在封闭系统中执行重新构成。在一些实施例中,对输液进行筛选以适合与本发明的方法和组合物一起使用。选择合适输液的示例性标准包含安全性测试,表明无细菌、酵母或霉菌生长、

内毒素含量低于0.5Eu/毫升、外观清晰、无异物颗粒。

[0125] 上文描述的用于体外培养 $\gamma\delta$ T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞的多个富集群体的方法,除其他外,可产生多个 $\gamma\delta$ T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞富集的多个细胞的一培养群体。

[0126] 因此,进一步根据本发明的一个方面,提供了多个 $\gamma\delta$ T细胞的一群体,其特征就在于以下的至少一个:与在其他相同培养条件下使用烟酰胺和/或其他烟酰胺部分小于0.1mM培养的 $\gamma\delta$ T细胞和/或 $\gamma\delta$ T细胞富集的多个细胞的一群体相比,CD62L的表达提高、迁移反应提高、归巢和体内保留提高、细胞毒性活性增强。在一些实施例中,多个 $\gamma\delta$ T细胞和/或 $\gamma\delta$ T细胞富集的多个细胞的群体的特征在于以下的至少任何两个、至少任何三个、至少任何四个或全部五个:与在其他相同培养条件下使用烟酰胺和/或其他烟酰胺部分小于0.1mM培养的 $\gamma\delta$ T细胞富集的多个细胞的一群体相比,CD62L的表达提高、迁移反应提高、归巢和/或体内保留提高、细胞毒性活性增强。

[0127] 在实施例1中,发明人已示出根据本发明方法制备的多个 $\gamma\delta$ T细胞群增加了细胞表面标记物(parker)CD62L(L-选择素)的表达,这对细胞粘附和“滚动(rolling)”很重要。在实施例2中,发明人已示出,根据本发明方法制备的多个富集 $\gamma\delta$ T细胞群具有增加的体内功能潜能,如通过在靶器官(例如脾脏、骨髓)中的定位和体内保留所证明。因此,在本发明的一些实施例的特定方面中,提供了一种 $\gamma\delta$ T细胞富集的多个细胞的群体,其特征就在于在移植时具有以下的至少一种:增强的CD62L表达和增强的归巢和/或体内保留。

[0128] 在一些实施例中, $\gamma\delta$ T细胞可经基因工程。 $\gamma\delta$ T细胞的基因工程可包含将表达肿瘤识别部分的构建物(例如 $\alpha\beta$ TCR、 $\gamma\delta$ TCR、编码抗体的CAR、其抗原结合片段或淋巴细胞激活域)稳定整合到分离的(多个) $\gamma\delta$ T细胞的基因组中,细胞因子(如IL-15、IL-12、IL-2、IL-7、IL-21、IL-18、IL-19、IL-33、IL-4、IL-9、IL-23、IL-1 β),以增强T细胞的体外和体内增殖、存活和功能。分离的 $\gamma\delta$ T细胞的基因工程还可包含从分离的 $\gamma\delta$ T细胞基因组中的一个或多个内源性基因(例如MHC位点(多个位点))中删除或破坏基因表达。

[0129] 基因治疗:对于成功的长期基因治疗来说,高频率的转基因细胞和稳定整合在其基因组中的转基因是一项必须的要求。以病毒为基础(如逆转录病毒)的载体需要活跃的细胞分裂,以便将转基因整合到宿主基因组中。因此,将基因转移到一些未受刺激的新鲜细胞群体中是非常低效的。体外储存和处理所选定 $\gamma\delta$ T细胞群,以及增强其归巢和保留潜能的能力将提供增加成功使用转基因细胞移植的可能性。

[0130] 过继免疫疗法:体外扩增、定义的淋巴亚群已被研究并用于各种恶性肿瘤、免疫缺陷、病毒和遗传疾病的过继免疫治疗(Freedman,Nature Medicine期刊2:46,(1996);Heslop,Nature Medicine期刊2:551,(1996);Protti,Cancer Res期刊56:1210,(1996))。

[0131] 所述治疗可增强所需的免疫反应或取代功能缺陷。Rosenberg等人(Rosenberg,J Natl Cancer Inst.期刊85:622,1993)在临床上率先使用了大量自体 and 同种异体体外扩增的非特异性杀伤性T细胞,以及随后体外扩增的特异性肿瘤浸润淋巴细胞。

[0132] 如本文详述的, $\gamma\delta$ T细胞对于治疗应用是非常理想的。因此,在本发明实施例的一个方面中,提供了一种治疗性细胞组合物,所述治疗的细胞组合物包含:一扩增的选定 $\gamma\delta$ T细胞群,所述细胞群在体外使用 $\gamma\delta$ T细胞扩增的多个条件,及烟酰胺的在0.5-50mM范围内的一剂量来培养,其中所述扩增的选定 $\gamma\delta$ T细胞群的特征在于以下至少一个:增强的 $\gamma\delta$ T细胞归巢和/或保留潜能,以及增强的细胞表面标志物CD62L(L-选择素)的表达,其与一类

似的选定 $\gamma\delta$ T细胞群相比,所述类似的选定 $\gamma\delta$ T细胞群使用相同的多个条件及烟酰胺不超过0.1mM来扩增。具体实施例中,所述治疗性细胞组合物包含根据本发明的多种方法培养的多个 $\gamma\delta$ T细胞。

[0133] 在一些实施例中,所述治疗性细胞组合物是一药物组合物,所述药物组合物包含一扩增的 $\gamma\delta$ T细胞富集的群体和药学上可接受的一载体。如上文详细讨论的, $\gamma\delta$ T细胞富集的多个细胞的体外培养可有利地用于 $\gamma\delta$ T细胞移植或植入。因此,根据本发明的另一方面,提供了一种将多个 $\gamma\delta$ T细胞或 $\gamma\delta$ T细胞富集的多个细胞或群体移植或植入到一接受者的方法。根据本发明此方面的方法通过以下来执行:(a)根据本发明的多种方法,通过用于 $\gamma\delta$ T细胞扩增的多个条件和烟酰胺来培养细胞群,体外扩增一选定 $\gamma\delta$ T细胞群,其中所述扩增的选定 $\gamma\delta$ T细胞群具有增强的 $\gamma\delta$ T细胞归巢和/或保留潜能,其与一类似的选定 $\gamma\delta$ T细胞群相比,所述类似的选定 $\gamma\delta$ T细胞群不使用0.5-50nM范围的烟酰胺来扩增,以及(b)将扩增的多个 $\gamma\delta$ T细胞注入需要的一对象。

[0134] 本发明还设想多种药物组合物,包含根据本发明方法制备的扩增的多个 $\gamma\delta$ T细胞或(多个)群体,以及药学上可接受的载体。根据本发明的多个方法制备的扩增的多个 $\gamma\delta$ T细胞或(多个)群体,以及含有本文所述的一扩增的 $\gamma\delta$ T细胞群的多种药物组合物可用于预防性和/或治疗性的治疗。在治疗应用中,这些组合物可被施用于已经患有疾病或病症的对象,其用量足以治愈或至少部分抑制该疾病或病症的症状。也可以施用 $\gamma\delta$ T细胞或群体来降低病情发展、感染或恶化的可能性。用于治疗用途的扩增 $\gamma\delta$ T细胞群或包含根据本发明方法扩增的 $\gamma\delta$ T细胞的组合物的有效剂量可以基于疾病或状况的严重程度和病程、先前的治疗、对象的健康状况、体重和/或对药物的反应,以及/或者是主治医师的判断来变化。

[0135] 可使用包含本公开这样的扩增 $\gamma\delta$ T细胞群或组合物治疗需要治疗的对象。病症的示例包含癌症、传染病、自身免疫性疾病和败血症。对象可以是人类、非人类灵长类动物(如黑猩猩)以及其他猿类和猴类;家畜,如牛、马、绵羊、山羊、猪;家养动物,如兔子、狗和猫;实验动物,包含啮齿动物,如大鼠、小鼠和豚鼠等。在具体实施例中,被治疗的对象是一人类对象。所述对象可以是任何年龄的人类。例如,对象可以是老年人、成人、青少年、青春期前儿童、儿童、幼儿、婴儿。

[0136] 一种使用一扩增的 $\gamma\delta$ T细胞群或包含根据本发明方法扩增的一 $\gamma\delta$ T细胞群的组合物治疗一对象的一病症(例如,轻症)的方法可包含向所述对象施用本发明的一治疗有效剂量的(多个)扩增 $\gamma\delta$ T细胞或扩增的 $\gamma\delta$ -T细胞群。本发明的 $\gamma\delta$ T细胞可按各种方案(例如,时间、浓度、剂量、治疗间隔和/或配方)施用。在接受本公开的 $\gamma\delta$ T细胞或 $\gamma\delta$ T细胞群之前,正在接受或将接受此类(多个) $\gamma\delta$ T细胞或 $\gamma\delta$ T细胞群的给药的一对象也可通过例如化疗、放疗或两者的组合进行预处理。作为治疗的一部分,可在第一方案中向对象施用 $\gamma\delta$ T细胞或 $\gamma\delta$ T细胞群,并可监测对象以确定第一方案中的治疗是否符合给定的治疗效果水平。在某些情况下,可在第二方案中向对象施用 $\gamma\delta$ T细胞或 $\gamma\delta$ T细胞群,或另一 $\gamma\delta$ T细胞或 $\gamma\delta$ T细胞群。在一个用于治疗对象的示例性方法中,向具有或怀疑具有一给定条件(例如,癌症)的对象施用至少一种 $\gamma\delta$ T细胞或 $\gamma\delta$ T细胞群,可选地在第一方案施用。随后,例如可由医疗保健提供者(例如,治疗医师或护士)向对象进行监测,以确定或评估扩增的 $\gamma\delta$ T细胞或 $\gamma\delta$ T细胞群在治疗对象病症方面的功效,或也确定体内扩增,对象中 $\gamma\delta$ T细胞群的归巢和/或保留。在一些实施例中,在第二方案向对象施用至少一种其他 $\gamma\delta$ T细胞或 $\gamma\delta$ T细胞

群,其可与第一方案相同或不同于第一方案。在某些情况下,发现施用 $\gamma\delta$ T细胞或 $\gamma\delta$ T细胞群是有效的(例如,单轮施用可能足以治疗该疾病),并且是显著的。由于其同种异体和全适输血者的特征,扩增的 $\gamma\delta$ T细胞群可用于各种对象,具有不同的MHC单倍型。 $\gamma\delta$ T细胞或 $\gamma\delta$ T细胞群可在施用给对象之前冷冻或冷冻保存。

[0137] 在一些实施例中,在接受本公开的 $\gamma\delta$ T细胞或 $\gamma\delta$ T细胞群的同时,接受或将接受这种 $\gamma\delta$ T细胞或 $\gamma\delta$ T细胞群的给药的对象也可以用另一种癌症疗法(例如化疗、放疗或两者的组合)来治疗。在其他实施例中,可在另一癌症治疗(例如化疗、放疗、手术或其组合)之前提供此类 $\gamma\delta$ T细胞或 $\gamma\delta$ T细胞群的施用。

[0138] 扩增的 $\gamma\delta$ T细胞群可包含表达相同、不同,或相同和不同肿瘤识别部分的组合的两个或多个细胞。

[0139] 在一个实施例中,以有效减少或消除癌症(例如实体瘤、转移癌或恶性肿瘤)或防止其发生或复发的剂量施用扩增的 $\gamma\delta$ T细胞富集的细胞群。“有效减少或消除癌症或防止其发生或复发的剂量”或“有效减少或消除过度增殖性疾病或防止其发生或复发的剂量”是指在肿瘤治疗后改善患者结果或生存率的治疗组合物的剂量,后续用于通过患者的测试数据、生存数据、肿瘤标记物水平的升高或抑制、基于基因档案或暴露于环境因素的敏感性降低来衡量肿瘤疾病状态或过度增殖性疾病的治疗。“抑制肿瘤生长”是指减小肿瘤的大小、活力或细胞数量。“癌症”、“恶性肿瘤”、“实体瘤”或“过度增殖性疾病”被用作同义词,及是指一些疾病的任何一种,其特征在于细胞不受控制、异常增殖、受影响细胞局部扩散或通过血流和淋巴系统扩散到身体其他部位(即转移)的能力以及许多特征结构和/或分子特征中的任何一种。“癌的”或“恶性细胞”或“实体瘤细胞”被理解为具有特定结构特性、缺乏分化且能够侵袭和转移的细胞。“癌症”是指哺乳动物中发现的所有类型的癌症或肿瘤或恶性肿瘤,包含癌(carcinomas)和肉瘤。例如乳腺癌、肺癌、非小细胞肺癌、胃癌、脑癌、头颈癌、髓母细胞瘤、骨癌、肝癌、结肠癌、泌尿生殖系统癌、膀胱癌、泌尿系癌、肾癌、睾丸癌、子宫癌、卵巢癌、宫颈癌、前列腺癌、黑色素瘤、间皮瘤、肉瘤(参见DeVita等人,(编辑),2001年,《癌症原理与肿瘤学实践》,第6版,Lippincott Williams&Wilkins出版社,宾夕法尼亚州费城;此参考文献以引用方式并入本文,以供参考)。

[0140] “癌症相关联的”是指在一对象细胞中,核酸及其表达或核酸缺失,或蛋白质及其水平或活性或蛋白质缺失与恶性肿瘤发病之间的关系。例如,癌症可能与正常健康细胞中未表达或表达水平较低的特定基因的表达相关联。相反地,癌症相关联的基因可以是在恶性细胞(或正在转化的细胞)中不表达的基因,或在恶性细胞中的表达水平低于在正常健康细胞中的表达水平的基因。

[0141] “过度增殖性疾病”是指细胞增殖快于正常组织生长的任何疾病(disease或disorder)。因此,过度增殖细胞是比正常细胞增殖更快的细胞。

[0142] “晚期癌症”是指不再局限于原发肿瘤部位的癌症,或者根据美国癌症联合委员会(AJCC)的说法是III或IV期癌症。

[0143] “良好耐受性”是指在治疗过程中不会出现健康状况的不利变化,并会影响治疗决定。

[0144] “转移性”是指肿瘤细胞,例如人类实体瘤或泌尿生殖系统恶性肿瘤,在注射到免疫缺陷小鼠的乳腺脂肪垫和/或免疫缺陷小鼠的循环中后,能够在免疫缺陷小鼠的肺、肝、

骨或脑中建立继发性肿瘤病变。

[0145] “实体瘤”包含但不限于肉瘤、黑色素瘤、癌或其他实体瘤癌。“肉瘤”是指由类似胚胎结缔组织的物质构成的肿瘤,通常由嵌在纤维状或均质物质中的紧密排列的细胞组成。肉瘤包含但不限于软骨肉瘤、纤维肉瘤、淋巴肉瘤、黑色素肉瘤、粘液肉瘤、骨肉瘤、阿贝梅西肉瘤、脂肪肉瘤(adipose sarcoma, liposarcoma)、肺泡软部肉瘤、成釉细胞肉瘤、葡萄状肉瘤、绿色肉瘤、绒毛膜癌、胚胎肉瘤、维尔姆斯氏瘤肉瘤、子宫内膜肉瘤、间质肉瘤、尤因肉瘤、筋膜肉瘤、纤维母细胞肉瘤、巨细胞肉瘤、粒细胞肉瘤、霍奇金斯肉瘤、特发性多发性色素性出血肉瘤、B细胞免疫母细胞肉瘤、淋巴瘤、T细胞免疫母细胞肉瘤、詹森氏肉瘤、卡波病肉瘤、库普弗细胞肉瘤、血管肉瘤、白血病性肉瘤、恶性间叶瘤肉瘤、骨膜旁肉瘤、网织细胞肉瘤、劳斯肉瘤、浆膜囊性肉瘤、滑膜肉瘤和毛细血管扩张性肉瘤。

[0146] “黑色素瘤”是指由皮肤和其他器官的黑色素细胞系统引起的肿瘤。黑色素瘤包含,例如,肢端黑色素瘤、无色素黑色素瘤、良性青少年黑色素瘤、克鲁曼氏黑色素瘤、S91黑色素瘤、哈丁-帕西黑色素瘤、幼年黑素瘤、恶性雀斑样痣性黑素瘤、恶性黑色素瘤、结节性黑色素瘤、甲下黑色素瘤和浅表扩散性黑色素瘤。

[0147] “癌”是指由上皮细胞组成的恶性新生物,倾向于浸润周围组织并产生转移。示例性癌包含例如腺泡癌(acinar carcinoma, acinous carcinoma)、腺囊性癌、腺样囊性癌、腺瘤癌、肾上腺皮质癌、肺泡癌、肺泡细胞癌、基底细胞癌(basal cell carcinoma, carcinoma basocellulare, basaloid carcinoma)、基底鳞状细胞癌、细支气管肺泡癌、细支气管癌、支气管癌、脑状癌、胆管细胞癌、绒毛膜癌、胶体癌、粉刺癌、体癌、筛状癌、胸甲癌、皮肤癌、柱状癌、柱状细胞癌、导管癌、硬脑膜癌、胚胎癌、脑样癌、表皮样癌、腺样上皮癌、外生癌、溃疡性癌、纤维癌、明胶样癌、胶状癌、巨细胞癌(giant cell carcinoma, carcinoma gigantocellulare)、腺癌、颗粒细胞癌、毛基质癌、血样细胞癌、肝细胞癌、许特莱氏细胞腺癌、透明癌、肾上腺样癌(hypemephroid carcinoma)、婴儿胚胎癌、原位癌、表皮内癌、上皮内癌、克伦佩赫氏癌、库尔奇茨基细胞癌、大细胞癌、豆状癌(lenticular carcinoma, carcinoma lenticulare)、脂肪瘤癌、淋巴上皮癌、髓样癌(carcinoma medullare, medullary carcinoma)、黑色素癌、莫勒癌、粘液癌(mucinous carcinoma, carcinoma muciparum)、粘液腺癌、粘液细胞癌、粘液表皮样癌、粘液癌(carcinoma mucosum, mucous carcinoma)、粘液瘤样癌、鼻咽癌、燕麦细胞癌、骨化癌、骨样癌、乳头状癌、门静脉周围癌、浸润前癌、棘细胞癌、髓样癌、肾细胞癌、储备细胞癌、肉瘤样癌、施耐德癌、硬癌、阴囊癌、印戒细胞癌、单纯癌、小细胞癌、茄状癌、球状细胞癌、梭形细胞癌、海绵状癌、鳞状癌、鳞状细胞癌、绳捆癌、毛细血管扩张性癌、血管扩张性癌、移行细胞癌、结节癌(carcinoma tuberosum, tuberosus carcinoma)、疣状癌和viflosum癌。

[0148] “白血病”是指造血器官的进行性恶性疾病,通常其特征在于为血液和骨髓中的白细胞及其前体的畸形增殖和发育。白血病通常在临床上是根据下述基准分类:(1)疾病的持续时间和特征-急性或慢性;(2)所涉及的细胞类型;骨髓样的(骨髓性的)、淋巴样的(淋巴性的)或单核细胞;(3)血液中异常细胞数量的增加或不增加-白血性或非白血性(亚白血病)。白血病包含,例如,急性非淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性粒细胞白血病、慢性粒细胞白血病、急性前髓细胞白血病、成人T细胞白血病、非白血性白血病、白细胞性白血病、白细胞性白血病、嗜碱性细胞性白血病、母细胞白血病、牛白血病、慢性髓细胞性白血

病、皮肤白血病、胚胎性白血病、嗜酸性细胞性白血病、Gross氏白血病、毛细胞白血病、成血细胞性白血病 (hemoblastic leukemia)、成血细胞性白血病 (hemocytoblastic leukemia)、组织细胞性白血病、干细胞白血病、急性单核细胞性白血病、白细胞减少性白血病、淋巴性白血病、淋巴母细胞性白血病、淋巴细胞性白血病、淋巴球性白血病、淋巴样白血病、淋巴肉瘤细胞性白血病、肥大细胞白血病、巨核细胞性白血病、小成髓细胞性白血病、单核细胞性白血病、成髓细胞性白血病、髓细胞性白血病、骨髓粒细胞性白血病、骨髓单核细胞性白血病、内格利氏 (Naegeli) 白血病、浆细胞白血病、浆细胞性白血病、早幼粒细胞性白血病、Rieder细胞白血病、Schilling氏白血病、干细胞白血病、亚白血性白血病以及未分化细胞白血病。可使用本发明的方法、组合物或 $\gamma\delta T$ 细胞富集的多个细胞群治疗或预防的其他癌症包含, 例如, 霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、成神经细胞瘤、乳腺癌、卵巢癌、肺癌、横纹肌肉瘤、原发性血小板增多、原发性巨球蛋白血症、小细胞肺部肿瘤、原发性脑部肿瘤、胃癌、结肠癌、恶性胰腺胰岛素瘤、恶性类癌瘤、膀胱癌、癌前皮肤病变、睾丸癌、淋巴瘤、甲状腺癌、神经母细胞瘤、食管癌、泌尿生殖道癌、恶性高钙血症、宫颈癌、子宫内膜癌、肾上腺皮质癌和前列腺癌。

[0149] 在本发明这一方面的另一具体实施例中, 所述方法在造血、造血祖细胞或造血干细胞移植到所述对象的同时、之后或之前受到影响。

[0150] 在具体实施方案中, 本发明的扩增 $\gamma\delta T$ 细胞在使用体外扩增造血干细胞治疗之前、同时或之后移植 (例如注入) 到对象体内。

[0151] 在一些具体实施方案中, 需要其的对象是通过使用大于 1.0mM 的烟酰胺培养而扩增的造血干细胞的过去、现在或未来接受者。使用毫摩尔浓度的烟酰胺 (例如 NiCord™, Gamida Cell 公司, 耶路撒冷, 以色列) 扩增这样造血干细胞群的制备和患者治疗方案在国际专利申请案第 W02018211487 号和第 W02018211509 号, 以及美国专利第 7,955,852 号、第 8,187,876 号和第 8,846,393 号中详细描述。在具体实施例中, 需要其的对象是使用 NiCord™ 治疗后的患者。在又一具体实施例中, 需要其的对象是即将接受 NiCord™ 治疗, 或者目前正在接受 NiCord™ 治疗的患者。在另一个实施例中, 需要其的对象在使用 NiCord™ 治疗后缓解。

[0152] 在又一实施例中, 对象同时用增敏剂或增强剂 (例如蛋白酶体抑制剂、IL-2、IL-15 等) 处理, 进一步增强注入的 $\gamma\delta T$ 细胞富集的多个细胞的体内功能。

[0153] 已观察到自身免疫患者中 $\gamma\delta T$ 细胞的数量和功能减少, 表明 $\gamma\delta T$ 细胞治疗多种自身免疫疾病和条件的可能性。因此, 在本发明的另一个实施例中, 提供了一种治疗有需要的对象的自身免疫性疾病或病症的方法。根据本发明此方面的方法通过向所述对象施用治疗剂量的本发明 $\gamma\delta T$ 细胞群来实现。

[0154] 可通过本发明的方法和/或组合物治疗的自身免疫性疾病包含但不限于心血管疾病、类风湿疾病、腺体疾病、胃肠疾病、皮肤疾病、肝脏疾病、神经疾病、肌肉疾病、肾脏疾病、与生殖有关的疾病、结缔组织疾病和全身性疾病。

[0155] 自身免疫性心血管疾病的示例包含但不限于动脉粥样硬化、心肌梗塞、血栓形成、韦格纳肉芽肿、高安氏动脉炎、川崎综合征、抗 VIII 因子自身免疫性疾病、坏死性小血管管炎、显微镜下多血管炎、丘尔格和施特劳斯综合征、寡免疫局灶性坏死和新月体肾小球肾炎、抗磷脂综合征、抗体诱导的心力衰竭、血小板减少性紫癜、自身免疫性溶血性贫血、恰加斯病心脏自身免疫和抗辅助性 T 淋巴细胞自身免疫。

- [0156] 自身免疫性类风湿性疾病的示例包含但不限于类风湿性关节炎和强直性脊柱炎。
- [0157] 自身免疫性腺病的示例包含但不限于胰腺疾病、I型糖尿病、甲状腺疾病、格雷夫斯病、甲状腺炎、自发性自身免疫性甲状腺炎、桥本甲状腺炎、特发性粘液水肿、卵巢自身免疫、自身免疫性抗精子不育、自身免疫性前列腺炎和I型自身免疫性多腺体综合征。疾病包含但不限于胰腺自身免疫性疾病、I型糖尿病、自身免疫性甲状腺疾病、格雷夫斯病、自发性自身免疫性甲状腺炎、桥本甲状腺炎、特发性粘液水肿、卵巢自身免疫、自身免疫性抗精子不育、自身免疫性前列腺炎和I型自身免疫性多腺体综合征。
- [0158] 自身免疫性胃肠疾病的示例包含但不限于慢性炎症性肠道疾病、乳糜泻、结肠炎、回肠炎和克罗恩病。
- [0159] 自身免疫性皮肤病的示例包含但不限于自身免疫性大疱性皮肤病，例如但不限于寻常性天疱疮、大疱性类天疱疮和叶状天疱疮。
- [0160] 自身免疫性肝病的示例包含但不限于肝炎、自身免疫性慢性活动性肝炎、原发性胆汁性肝硬化和自身免疫性肝炎。
- [0161] 自身免疫性神经疾病的示例包含但不限于多发性硬化症、阿尔茨海默病、重症肌无力、神经病变、运动神经病；格林-巴利综合征和自身免疫性神经病变、肌无力、兰伯特-伊顿肌无力综合征；副肿瘤性神经疾病、小脑萎缩、副肿瘤性小脑萎缩和僵硬综合征；非副肿瘤性僵硬综合征、进行性小脑萎缩、脑炎、拉斯穆森脑炎、肌萎缩侧索硬化症、西德汉姆舞蹈病、吉尔斯-德拉图雷特综合征和自身免疫性多内分泌疾病；免疫障碍性神经病；获得性神经性肌强直、先天多发性关节挛缩症、神经炎、视神经炎和神经退行性疾病。
- [0162] 自身免疫性肌肉疾病的示例包含但不限于肌炎、自身免疫性肌炎、原发性斯约格伦综合征和平滑肌自身免疫性疾病。
- [0163] 自身免疫性肾病的示例包含但不限于肾炎和自身免疫性间质性肾炎。
- [0164] 与生殖有关的自身免疫性疾病的示例包含但不限于反复性胎儿流失。
- [0165] 自身免疫性结缔组织疾病的示例包含但不限于耳病、自身免疫性耳病和内耳自身免疫性疾病。
- [0166] 自身免疫全身性疾病的示例包含但不限于全身性红斑狼疮和全身性硬化症。
- [0167] 在一些情况下，本发明扩增的 $\gamma\delta$ T细胞或公开的 $\gamma\delta$ T细胞群的方法可用于治疗感染性疾病。根据本发明此方面的方法通过向对象施用治疗剂量的本发明培养的 $\gamma\delta$ T细胞富集的多个细胞来实现。例如，所述传染病可能是由致病性细菌或病毒引起。各种致病蛋白、核酸、脂质或其片段可由患病的细胞表达。抗原呈递细胞可以内化这种致病分子，例如通过吞噬作用或通过受体介导的内吞作用，并显示与适当的MHC分子结合的抗原片段。本发明的扩增 $\gamma\delta$ T细胞可识别致病性细菌或病毒的各种抗原和抗原片段。致病性细菌的非限制性示例可在以下列中找到：a) 博德特氏菌属，如百日咳博德特氏菌种；b) 疏螺旋体属，如伯氏疏螺旋体种；c) 布鲁氏菌属，如流产布鲁氏菌、犬布鲁氏菌、马耳他布鲁氏菌和/或猪布鲁氏菌种；d) 弯曲杆菌属，如空肠弯曲杆菌种；e) 衣原体和嗜衣原体属，如肺炎衣原体、沙眼衣原体和/或鹦鹉热嗜衣原体种；f) 梭菌属，如肉毒梭菌、艰难梭菌、产气荚膜梭菌、破伤风梭菌种；g) 棒状杆菌属，如白喉棒状杆菌种；h) 肠球菌属，如粪肠球菌和/或屎肠球菌种；i) 埃希氏菌属，如大肠杆菌种；j) 弗朗西斯氏菌属，如土拉弗朗西斯氏菌种；k) 嗜血杆菌属，如流感嗜血杆菌种；l) 螺杆菌属，如幽门螺杆菌种；m) 军团菌属，如嗜肺军团菌种；n) 钩端螺旋体属，如

问号钩端螺旋体种; o) 李斯特菌属, 如单核细胞增多性李斯特菌种; p) 分枝杆菌属, 如麻风分枝杆菌、结核分枝杆菌和/或溃疡分枝杆菌种; q) 支原体属, 如肺炎支原体种; r) 奈瑟氏菌属, 如淋病奈瑟氏菌和/或脑膜炎奈瑟氏菌种; s) 假单胞菌属, 如铜绿假单胞菌种; t) 立克次氏体属, 如立氏立克次氏体种; u) 沙门氏菌属, 如伤寒沙门氏菌和/或鼠伤寒沙门氏菌种; v) 志贺氏菌属, 如宋内志贺氏菌种; w) 葡萄球菌属, 如金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌和/或腐生葡萄球菌种; x) 链球菌属, 如无乳链球菌、肺炎链球菌和/或酿脓链球菌种; y) 密螺旋体属, 如梅毒螺旋体种; z) 弧菌属, 如霍乱弧菌; 和/或aa) 耶尔森氏菌属, 如鼠疫耶尔森氏菌种。

[0168] 在一些情况下, 本发明或本公开扩增的 γ δ T 细胞或 γ δ T 细胞群的方法和/或组合物可用于治疗感染性疾病, 所感染性疾病可由病毒引起。病毒的非限制性示例可在以下病毒的科中找到并且用示例性种进行说明: a) 腺病毒科, 如腺病毒种; b) 疱疹病毒科, 如1型单纯疱疹、2型单纯疱疹、水痘-带状疱疹病毒、埃-巴二氏病毒、人巨细胞病毒、8型人疱疹病毒种; c) 乳头瘤病毒科, 如人乳头瘤病毒种; d) 多瘤病毒科, 如BK病毒、JC病毒种; e) 痘病毒科, 如天花病毒种; f) 嗜肝DNA病毒科, 如乙型肝炎病毒种; g) 细小病毒科, 如人博卡病毒、细小病毒B19种; h) 星状病毒科, 如人星状病毒种; i) 杯状病毒科, 如诺沃克病毒种; j) 黄病毒科, 如丙型肝炎病毒(HCV)、黄热病毒、登革热病毒、西尼罗河病毒种; k) 披膜病毒科, 如风疹病毒种; l) 肝炎病毒科, 如戊型肝炎病毒种; m) 逆转录病毒科, 如人免疫缺陷病毒(HIV) 种; n) 正粘病毒科, 如流感病毒种; o) 沙粒病毒科, 如瓜纳瑞托病毒、胡宁病毒、拉沙病毒、马丘波病毒和/或萨比亚病毒种; p) 布尼亚病毒科, 如克里米亚-刚果出血热病毒种; q) 丝状病毒科, 如埃博拉病毒和/或马尔堡病毒种; 副粘病毒科, 如麻疹病毒、腮腺炎病毒、副流感病毒、呼吸道合胞病毒、人偏肺病毒、亨德拉病毒和/或尼帕病毒种; r) 弹状病毒科属, 如狂犬病病毒种; s) 呼肠孤病毒科, 如轮状病毒、环状病毒、科婢病毒和/或版纳病毒种。在一些例子中, 病毒未分配至病毒科, 如丁型肝炎。

[0169] 造血细胞移植已成为治疗各种遗传性或恶性疾病的首选方法。然而, 造血细胞成分通常富集T淋巴细胞, 这有助于移植物抗宿主病。由于血液恶性肿瘤患者通常缺乏 γ δ T 细胞数量和功能, 目前正在研究外源性施用 γ δ T 细胞以及造血细胞移植, 以增强长期植入和预防移植物抗宿主病。因此, 在本发明的又一实施例中, 提供了一种治疗或预防有需要的对象的移植物抗宿主病的方法。因此, 在本发明的另一个实施例中, 提供了一种治疗有需要的对象的自身免疫性疾病或病症的方法。根据本发明此方面的方法通过向所述对象施用治疗剂量的本发明 γ δ T 细胞群或包含相同 γ δ T 细胞群的组成物来实现。

[0170] 治疗方案

[0171] 根据本发明一些实施例的一些方面, 提供了包含本发明的 γ δ T 细胞富集的细胞群的药物组合物, 以用于治疗疾病, 例如转移癌、实体瘤、自身免疫性疾病、过度增殖性疾病或病毒感染, 与药学上可接受的载体一起制备。一些组合物包含本发明的多个(例如, 两个或更多) γ δ T 细胞富集的多个细胞群的组合。

[0172] 在预防性应用中, 向易罹患某病或具有疾病或病症(即, 过度增殖性疾病或实体肿瘤)风险的患者施用药物组合物或药物以足以消除或降低过度增殖性疾病或实体肿瘤复发风险的剂量, 以减轻疾病的严重程度或延迟疾病的开始, 包含疾病的生化、组织学和/或行为症状、并发症以及疾病发展过程中出现的中间病理表型。在治疗应用中, 向怀疑患有或已

经患有这样的疾病的患者施用足够剂量的组合物或药物,以治愈或至少部分缓解所述疾病的症状(生化、组织学和/或行为),包含其并发症和疾病发展过程中的中间病理表型。足以完成治疗或预防治疗的剂量定义为治疗或预防有效剂量。在预防和治疗方案中,药物通常分为几个剂量施用,直到达到显著的抗增殖反应。通常,如果抗增殖反应开始减弱,则监测抗增殖反应并重复给药。

[0173] 如本文所述的扩增的(多个) γ δ T细胞或 γ δ T细胞群可在疾病或病症(例如癌症、传染病、免疫疾病、败血症或骨髓移植)发生之前、期间或之后以及治疗所述疾病或病症所需的一段时间内施用,以及施用含有扩增的 γ δ T细胞或 γ δ T细胞群的药物组合物的时间可以变化。例如,扩增的 γ δ T细胞或 γ δ T细胞群可用作预防性药物,可在症状出现期间或之后尽快或在症状出现后的任何时间段内给对象施用。例如,对于癌症的治疗,可在癌症发病数年后以及在其他治疗之前或之后施用一个或多个剂量的扩增 γ δ T细胞或 γ δ T细胞群。治疗的时间长短可针对对象而变化。

[0174] 有效剂量

[0175] 本文所述用于治疗疾病(例如,转移癌、实体瘤或过度增殖性疾病)的 γ δ T细胞群的组合物的有效剂量取决于许多不同的因素,包含给药方式、靶位置、患者的生理状态,患者是人或动物,施用的其他药物,以及治疗是预防性的还是治疗性的。通常,患者是人类,但非人类哺乳动物包含转基因哺乳动物在内的也可以被治疗。治疗剂量需要滴定测量以优化安全性和疗效。

[0176] 对于使用治疗性 γ δ T细胞或 γ δ T细胞富集的细胞群施用,剂量范围为每名患者约 1×10^6 至约 1×10^9 个 γ δ T细胞和/或 γ δ T细胞富集的细胞。对于 γ δ T细胞富集的细胞群的施用,剂量范围为每千克接受者重量约 1×10^5 至约 1×10^9 个 γ δ T细胞和/或 γ δ T细胞富集的细胞,或剂量范围为每千克接受者重量约 5×10^5 至约 1×10^8 个 γ δ T细胞和/或 γ δ T细胞的富集细胞。一种示例性的治疗方案需要每两周或每月或每3到6个月施用一次。在一些方法中,同时施用两种或多种 γ δ T细胞富集的细胞群,在这种情况下,施用的每个 γ δ T细胞富集的细胞群的剂量在指示的范围内。可以多次施用 γ δ T细胞富集的多个细胞群。单一剂量之间的间隔可以是每周、每月或每年。间隔也可以是不规则的,如通过测量患者体内 γ δ T细胞富集的细胞群的血液水平来指示。替代地,可以将 γ δ T细胞富集的多个细胞群作为缓释制剂施用,在这种情况下,需要较少的施用频率。剂量和频率取决于患者体内 γ δ T细胞富集的多个细胞群的半衰期。根据治疗是预防性的还是治疗性的,施用的剂量和频率可能会有所不同。在预防性应用中,在相当长的一段时间内相对频率较少的间隔施用相对较低的剂量。一些患者在其余生继续接受治疗。在治疗应用中,有时需要在相对较短的时间间隔内使用相对较高的剂量,直到疾病进展减少或终止,并且最好直到患者表现出疾病症状的部分或完全改善。据此,本专利可在预防性制度下实施。

[0177] 施用途径

[0178] 用于治疗疾病(例如,转移癌、实体瘤或过度增殖性疾病)的治疗性 γ δ T细胞富集的细胞群的组合物可通过静脉内、囊内、鞘内、肠外、局部、皮下、口内、鼻内、动脉内、颅内、腹腔、或肌肉内的施用方式。作为预防/辅助或治疗疾病,治疗性 γ δ T细胞富集的多个细胞群靶过度增殖性疾病或实体瘤,例如泌尿生殖系统恶性肿瘤和/或治疗性治疗。免疫原的制剂最典型的施用途径是皮下注射,尽管其他途径也同样有效。其次最常见的途径是肌肉

注射。这种类型的注射通常在手臂或腿部肌肉中进行。在一些方法中,药剂被直接注射到沉积物积累的特定组织中,例如颅内注射。静脉输液时肌肉内注射是施用 γ δ T细胞富集的细胞群的优选方法。在某些方法中,将特定的治疗性细胞群直接注入膀胱。

[0179] 配方

[0180] γ δ T细胞富集的细胞群的多种组合物,用于治疗疾病,例如转移癌、实体瘤、病毒或其他感染、炎症或过度增殖性疾病。

[0181] 用于治疗疾病(例如,转移癌、实体瘤或过度增殖性疾病)的治疗性 γ δ T细胞富集的细胞群的多种组合物通常以包含活性治疗剂(即和多种其他药学上可接受的组分)的药物组合物施用。例如,参见Alfonso R Gennaro(编辑),《雷明顿:药学科学与实践》(原雷明顿制药科学)第20版,利平科特,威廉姆斯·威尔金斯出版社,2003年,通过引用全部并入本文。优选的形式取决于预期的施用模式和治疗应用。根据所需的配方,所述组合物还可包含医药上可接受的无毒载体或稀释剂,所述载体或稀释剂被定义为通常用于配制供动物或人类施用的药物组合物的载体。稀释剂的选择是为了不影响组合物的生物活性。此类稀释剂的一个示例是X-vivo 20培养基(Cambrex Bio Science公司,马里兰州沃克斯维尔市)含有10%热失活的人类AB血清或10%自体血清。此类稀释剂的进一步示例为蒸馏水、生理磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液、葡萄糖溶液和汉克斯溶液。此外,药物组合物或制剂还可包含其他载体、佐剂或无毒、非治疗、非免疫原性的稳定剂等。

[0182] 药物组合物还可包含大型的、缓慢代谢的大分子,例如蛋白质、多糖,例如壳聚糖、聚乳酸、聚乙醇酸和共聚物(例如乳液功能化的SepharoseTM、琼脂糖、纤维素等)、聚合氨基酸、氨基酸共聚物和脂质聚集体(如油滴或脂质体)。此外,这些载体可以作为免疫刺激剂(即佐剂)发挥作用。

[0183] 对于肠外给药,本发明的组合物可以作为在生理上可接受的稀释剂中物质的溶液或悬浮液的可注射剂量施用,药物载体可以是无菌液体,例如水油、盐水、甘油或乙醇。此外,组合物中还可以有辅助物质,如润湿剂或乳化剂、表面活性剂、pH缓冲物质等。药物组合物的其他成分为石油、动物、植物或合成成分,例如花生油、大豆油和矿物油。一般来说,乙二醇(如丙二醇或聚乙二醇)是优选的液体载体,尤其是用于注射溶液。治疗性的 γ δ T细胞富集的多个细胞群可以以贮库型注射剂或植入制剂的形式施用,其配制方式可以允许活性成分的持续释放。一种示例性组合物包含5mg/mL的治疗性 γ δ T细胞的富集细胞群,其在含有50mM的L-组氨酸、150mM的NaCl组成的水性缓冲液中配制,并用HCl调节至pH 6.0。

[0184] 通常情况下,将组合物制备为可注射,或作为液体溶液或悬浮液;也可制备适于在注射前在液体载体中溶解或悬浮的固体形式。如上文所述,制剂也可乳化或封装在脂质体或微粒(例如聚乳酸、聚乙交酯或共聚物)中以增强佐剂效果。Langer,科学期刊,249:15271990;Hanes,Advanced Drug Delivery Reviews期刊,28:97-1191997,全部通过引用并入本文。本发明的制剂可以贮库型注射剂或植入制剂的形式施用,其配制方式可允许活性成分的持续或脉动释放。适用于其他施用方式的其他制剂包含口服、鼻内和肺部制剂、栓剂和透皮应用。

[0185] 对于栓剂,粘合剂和载体包含例如聚亚烷基二醇或甘油三酯;此类栓剂可由含有0.5%到10%(优选地1%-2%)范围内的活性成分的混合物形成。口服制剂包含赋形剂,如药用级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素和碳酸镁。这些组合物以溶液、悬浮

液、片剂、丸剂、胶囊、缓释制剂或粉末的形式存在,并且含有10%-95%(优选地25%-70%)的活性成分。

[0186] 所述药物组合物通常包含治疗性 γ δ T细胞富集的细胞群的组合物,其形式适合给患者施用。药物组合物通常是被制备为无菌、基本等渗,并符合美国食品和药物管理局的所有良好生产规范(GMP)规定。

[0187] 毒性

[0188] 优选地,本文所述的 γ δ T细胞富集的细胞群的组合物的治疗有效剂量将提供治疗益处而不会引起实质性毒性。

[0189] 本文所述的治疗性 γ δ T细胞的富集细胞群的毒性可通过细胞培养或实验动物中的标准制药程序来确定,例如,通过确定LD50(对50%的群体致死的剂量)或LD100(对100%的群体致死的剂量)。毒性与疗效之间的剂量比是治疗指标。从这些细胞培养分析和动物研究中获得的数据可用于制定对人体无毒的剂量范围。本文所述的治疗性 γ δ T细胞富集的细胞群的剂量优选地位于循环浓度范围内,该循环浓度包含毒性很小或没有毒性的有效剂量。剂量可以在这个范围内变化,这取决于所采用的剂型和使用的施用途径。具体的配方、给药途径和剂量可由个别医生根据患者情况选择。(参见,例如,Fingl等人,《治疗学的药理学基础》,第1章,1975年),通过引用将其全部内容并入本文。

[0190] 单位剂量

[0191] 本文公开的扩增的 γ δ T细胞或 γ δ T细胞群可配制成适于单次精确剂量施用的单位剂型。在某些情况下,单位剂型包含另外的淋巴细胞,例如,但不限于NK细胞或造血干细胞。在单位剂量形式中,制剂被分为含有适当数量的一种或多种化合物的单位剂量。单位剂量可以是包含离散数量的制剂的包装形式。非限制性示例为包装的片剂或胶囊,以及小瓶或安瓿中的粉末。水悬浮液组合物可包装在单剂量不可重新封闭的容器中。可以使用多剂量可重新封闭的容器,例如,与防腐剂组合或不与防腐剂组合使用。在一些示例中,细胞、组合物或药物组合物不包含防腐剂。用于肠外注射的制剂可以单位剂型呈现,例如,以安瓿形式,或以带有防腐剂的多剂量容器。

[0192] 试剂盒

[0193] 在本发明的范围内还有试剂盒,所述试剂盒包含本发明的组合物(例如,治疗性 γ δ T细胞的富集细胞群)和使用说明书。试剂盒还可包含至少一种附加试剂,或本发明的一种或多种附加人类抗体(例如,具有互补活性的人类抗体,其抗原中不同于第一人类抗体的表位结合)。试剂盒通常包含一个标签,表明试剂盒内容物的预期用途。术语“标签”包含试剂盒上或随试剂盒提供的任何文字或记录材料,或试剂盒附带的其他材料。

[0194] 低温保存

[0195] 在一些实施例中,可将 γ δ T细胞或多个 γ δ T细胞群在低温保存介质中配制,并放置在低温存储单元中,例如液氮冷冻器(-195度)或超低温冷冻器(-65度,-80度或-120度),以进行至少约1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、1年、2年、3年或至少5年的长期存储。低温保存介质可含有二甲基亚砜(DMSO)和/或氯化钠(NaCl)和/或葡萄糖和/或葡聚糖硫酸盐和/或羟乙基淀粉(HES),并带有生理pH缓冲剂,以将pH保持在约6.0至约6.5、约6.5至约7.0、约7.0至约7.5、约7.5至约8.0或约6.5至约7.5之间。冷冻保存的 γ δ T细胞或 γ δ T细胞群可以被解冻及通过如本文所述的抗体、蛋白质、肽和/或细胞因子刺激和进一步处

理。

[0196] 如本文所用,术语“约”是指 $\pm 10\%$ 。

[0197] 术语“包含(comprises、comprising、includes、including)”,“具有”及其共轭词意味着包含但不限于。本术语包含术语“由...组成”和“基本上由...组成”。

[0198] 短语“基本上由...组成”意味着所述组合物或方法可包含附加的成分和/或步骤,但前提是附加的成分和/或步骤不会实质性改变所要求保护的组合物或方法的基本和新颖特征。

[0199] 如本文所用,除非上下文另有明确规定,否则单数形式“一(a、an)”和“所述(the)”包含复数引用。例如,术语“化合物”或“至少一种化合物”可包含多种化合物,包含其混合物。

[0200] 在本申请中,本发明的各种实施例可以范围格式来表示。应当理解,范围格式的描述仅仅是为了方便和简洁,不应当被解释为对本发明范围的僵硬限制。因此,对一个范围的描述应被视为已具体披露了所有可能的子范围以及该范围内的单个数值。例如,对一个范围的描述,如从1到6,应被视为具体披露了从1到3、从1到4、从1到5、从2到4、从2到6、从3到6等子范围,以及该范围内的单个数字,例如1、2、3、4、5和6。无论范围的广度如何,这都适用。

[0201] 每当本文表示一数字范围时,其意指包含表示范围内的任何引用数字(分数或整数)。短语“在第一表示数字和第二表示数字之间的范围(ranging/ranges between)”和“从第一表示数字到第二表示数字的范围(“ranging/ranges from”“to”)”在本文可交换地使用,并且意味着包含第一和第二表示数字以及它们之间的所有分数和整数。

[0202] 如本文所用,术语“方法”是指用于完成给定任务的方式、手段、技术和程序,包含但不限于化学、药理学、生物学、生物化学和医学领域的从业人员已知的或从已知方式、手段、技术和程序容易发展而来的那些方式、手段、技术和程序。

[0203] 如本文所用,术语“治疗”包含消除、实质上抑制、减缓或逆转疾病的进展、实质上改善疾病的临床或美学症状或实质上防止疾病的临床或美学症状的出现。

[0204] 应理解,为清楚起见,在分开的多个实施例的上下文中描述的本发明的某些特征也可以在单个实施例中组合提供。相反地,为简洁起见,在单个实施例的上下文中描述的本发明的各种特征也可以分开地或在任何合适的子组合中提供,或在本发明的任何其他描述的实施例中合适地提供。在各种实施例的上下文中描述的某些特征不应被视为这些实施例的基本特征,,除非该实施例没有这些要素就无法操作。

[0205] 上文所述的本发明的各种实施方案和方面,以及下文权利要求部分中的权利要求,在以下实例中找到了实验支持。

[0206] 示例

[0207] 现在参考以下示例,其与上述描述一起以非限制性方式示出本发明的一些实施例。

[0208] 一般来说,本文使用的术语和本发明中使用的实验室程序包含分子、生物化学、微生物和重组DNA技术。这样的技术在文献中有详细的解释。例如,见《分子克隆实验室手册》: Sambrook等人(1989年);《分子生物学的当前方案》第I-III卷Ausubel,R.M.编辑(1994年); Ausubel等人,《分子生物学的当前方案》,John Wiley and Sons出版社,马里兰州巴尔的摩(1989年);Perbal,《分子克隆实用指南》,John Wiley Sons出版社,纽约(1988年);Watson

等人,《重组DNA》,美国科学出版社,纽约;Birren等人(编辑)《基因组分析:实验室手册系列》,第1-4卷,冷泉港实验室出版社,纽约(1998年);美国专利第4,666,828号;第4,683,202号;第4,801,531号;第5,192,659号和第5,272,057号中阐述的方法;《细胞生物学:实验室手册》,第I-III卷,Cellis, J.E. 编辑(1994年);《动物细胞培养-基本技术手册》,Freshney, Wiley-Liss出版社,纽约(1994年),第三版;《免疫学的当前方案》第I-III卷Coligan J.E. 编辑(1994年);Stites等人(编辑),《免疫学基础和临床》(第8版),Appleton&Lange,康涅狄格州诺沃克市,(1994年);Mishell和Shiigi(编辑),《细胞免疫学中的选择方法》,W.H.Freeman and Co.出版社,纽约(1980年);专利和科学文献中广泛描述了可用的免疫分析方法,例如,参见美国专利第3,791,932号;第3,839,153号;第3,850,752号;第3,850,578号;第3,853,987号;第3,867,517号;第3,879,262号;第3,901,654号;第3,935,074号;第3,984,533号;第3,996,345号;第4,034,074号;第4,098,876号;第4,879,219号;第5,011,771号和第5,281,521号;《寡核苷酸合成步态》Gait, M.J., 编辑(1984年);《核酸杂交》,Hames, B.D., 和Higgins S.J., 编辑(1985年);《转录和转译》Hames, B.D., 和Higgins S.J., 编辑(1984年);《动物细胞培养》Freshney, R.I., 编辑(1986年);《固定化细胞和酶》IRL出版社(1986);《分子克隆实用指南》,Perbal, B. (1984) 和《酶学的方法》第1-317卷,学术出版社;《PCR方案:方法和应用指南》,学术出版社,加利福尼亚州圣地亚哥(1990年);Marshak等人,《蛋白质纯化和表征策略—实验室课程手册》,CSHL出版社(1996年);所有这些内容均通过引用并入本文,如同本文中完全阐述一样。本文中还提供了其他一般参考资料。其中的程序被认为是本领域公知的,并且是为了方便读者而提供的。本文包含的所有信息通过引用并入本文。

[0209] 实验程序

[0210] γ δ T细胞的体外培养

[0211] 使用midiMACS™柱和TCR α / β 试剂盒(Miltenyi Biotec公司,马里兰州盖瑟斯堡市)去除健康献血者血液单位样本中TCR $\alpha\beta$ 表达的T细胞。在VueLife® (Saint-Gobain公司,马里兰州盖瑟斯堡市)袋中,使用添加0(对照组)或5mM烟酰胺(NAM)和50纳克/毫升IL-2的培养基培养 $\alpha\beta$ T细胞损耗群体12-13天。

[0212] T细胞受体特性

[0213] 为了表征培养中CD3+细胞上表达的T细胞受体(TCR),使用CliniMACS™CD3试剂纯化CD3阳性细胞(Miltenyi公司,273-01,马里兰州盖瑟斯堡市),然后对CD3+/ γ δ +和CD3+/ α / β +细胞的百分比进行FACS分析。根据应用细胞表面特异性抗体的标准程序进行FACS染色和分析。

[0214] 在扩增的 γ δ T细胞中的CD62L表达

[0215] 来自NAM处理和对照(-NAM)培养物的纯化 γ δ T细胞对CD62L(L-选择素)进行染色,并使用抗CD62L抗体通过FACS进行分析。

[0216] 扩增的 γ δ T细胞的移植和体内功能

[0217] 如上所述,从培养物中纯化CD3+/ γ δ +细胞,然后用CFSE(Invitrogen, Thermo Fisher公司,加利福尼亚州卡尔斯巴德市)标记。NSG SCID小鼠以350cGy剂量辐射照射。辐射照射后第二天,将来自NAM和对照(-NAM)培养物每只小鼠以5-6x10⁶个CFSE标记的CD3+/ γ δ 阳性细胞静脉注射到小鼠体内。

[0218] 细胞注入后4天处死小鼠,切除器官。通过对器官细胞悬液的FACS评估CFSE染色细胞的部分。

[0219] 示例1:用NAM体外培养人类 $\gamma\delta$ T细胞来增强T细胞功能

[0220] 对用5mM烟酰胺(NAM)培养的 $\alpha\beta$ 损耗T细胞的FACS分析表明, $\alpha\beta$ T细胞部分的损耗提供了一个扩增的CD3+细胞群,所述扩增的CD3+细胞群包含超过90%的 $\gamma\delta$ T细胞。用烟酰胺培养细胞似乎不会影响培养的T细胞群中 $\gamma\delta$ 阳性成分的扩增(图1)。

[0221] CD62L(L-选择素)是一种重要的淋巴细胞粘附分子,是淋巴细胞归巢和进入淋巴组织的“归巢受体”,也是一种T淋巴细胞共刺激信号。图2显示了与没有使用NAM培养的相同细胞相比,使用5mM NAM培养的 $\gamma\delta$ T细胞中CD62L表达的显著增强(通过FACS检测)。

[0222] 示例2:使用NAM培养 $\gamma\delta$ T细胞的增强体内归巢和保留

[0223] 注入淋巴细胞的有效组织归巢和保留的频率低,构成了T细胞治疗成功的严重阻碍,增加了达到最佳效果所需的细胞数量。NAM培养的 $\gamma\delta$ T细胞功能的增加反映在注入到受辐射照射的scid NSG小鼠后,归巢和保留在组织中的发生率提高。

[0224] 图3显示了在注入NAM培养的 $\gamma\delta$ T细胞4天后,NAM对体内归巢和保留的影响程度。特别重要的是,用NAM培养后,留存在淋巴组织(脾脏、骨髓)中的 $\gamma\delta$ T细胞得到了强力的增强,同时留存在血液和肺组织中的 $\gamma\delta$ T细胞也增加了近三倍。

[0225] 尽管已经结合本发明的具体实施例描述了本发明,但显然,对于本领域技术人员来说,许多替代方案、修改和变化将是显而易见的。因此,本发明的目的是旨在包含所有属于所附权利要求的精神和广泛范围内的此类替代方案、修改和变化。

[0226] 本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请均以引用的方式整体并入本文,其程度与每个单独的出版物、专利或专利申请被具体地和单独地表示以引用方式并入本说明书的程度相同。此外,本申请中对任何参考文献的引用或识别不应解释为承认该参考文献可作为本发明的现有技术。在使用章节标题的情况下,不应将其解释为必然的限制。

[0227] 此外,本申请的任何优先权文件全部通过引用并入本文。

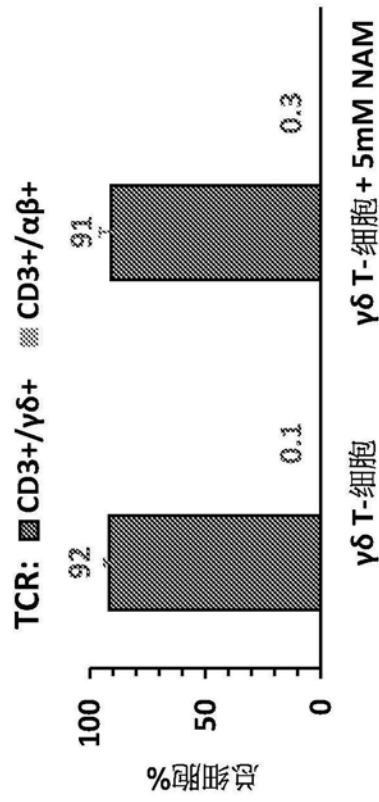


图1

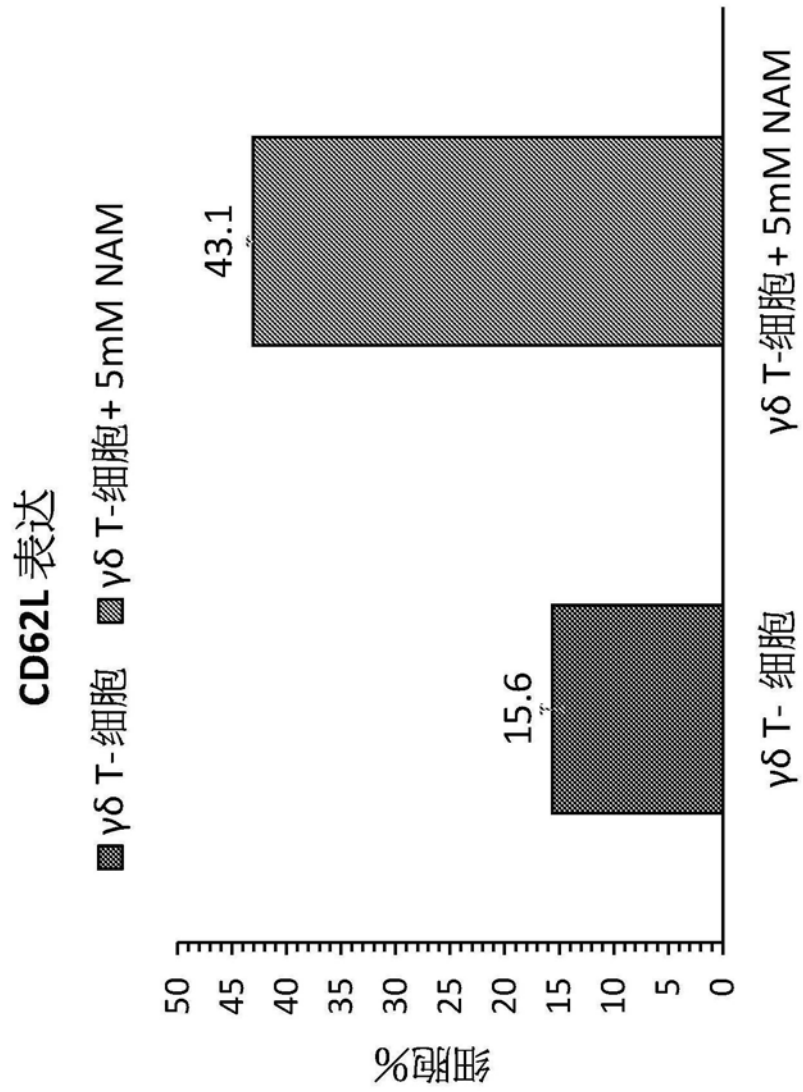


图2

归巢和保留是适应性免疫治疗成功的关键

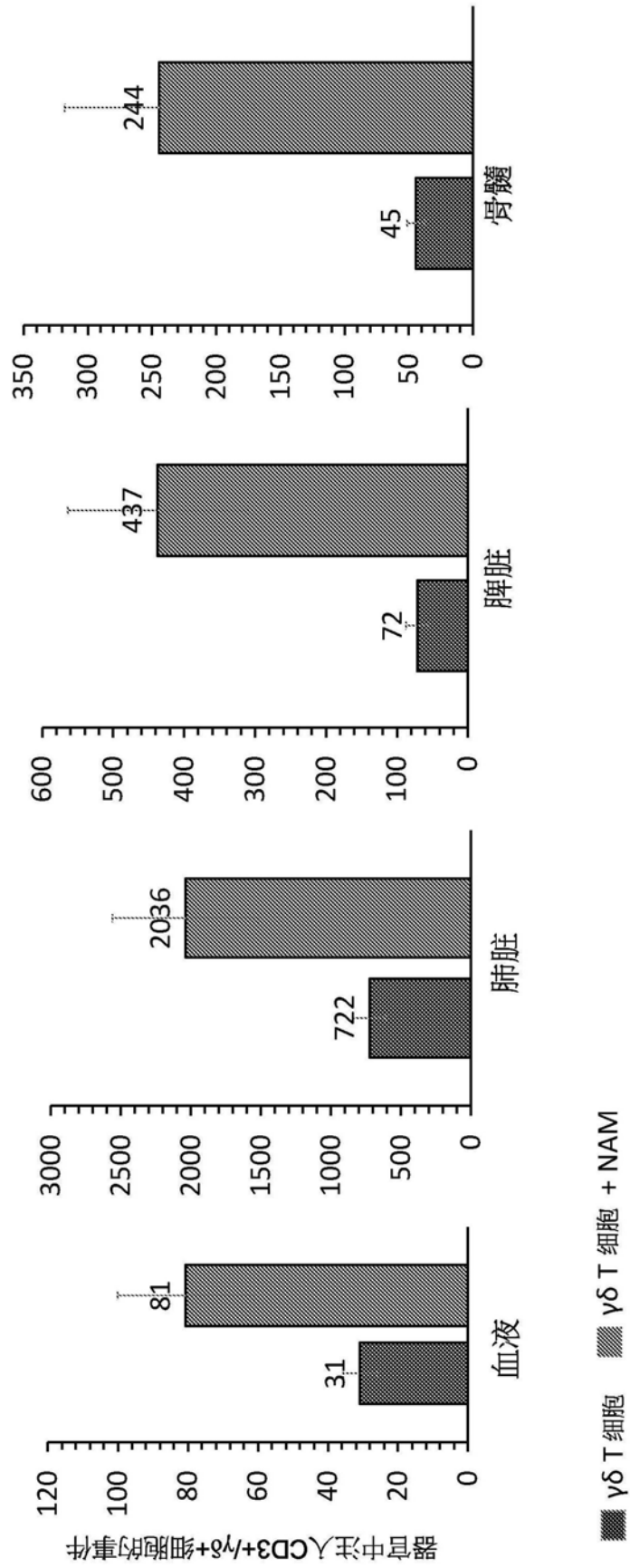


图3 NSG小鼠中NAM增加的γδT细胞归巢和保留