



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117295515 A

(43) 申请公布日 2023. 12. 26

(21) 申请号 202280032274.1

(22) 申请日 2022.05.19

(30) 优先权数据

63/190,387 2021.05.19 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.10.31

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/030109 2022.05.19

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/246112 EN 2022.11.24

(71) 申请人 南加利福尼亚大学

地址 美国加利福尼亚州洛杉矶

(72) 发明人 应其龙 岳士 景雪媛

(74) 专利代理机构 北京三聚阳光知识产权代理

有限公司 11250

专利代理师 邱俊霞

(51) Int.Cl.

A61K 39/00 (2006.01)

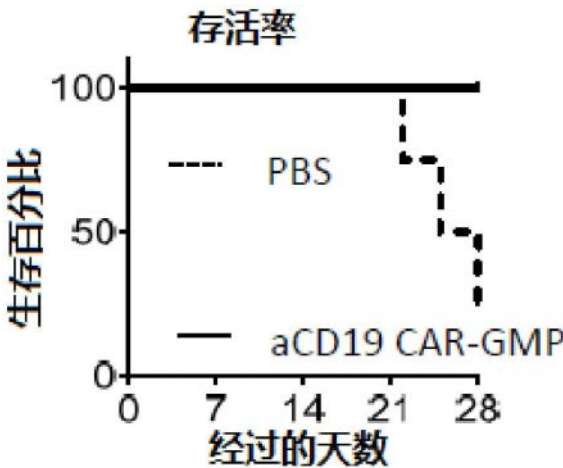
权利要求书3页 说明书28页 附图11页

(54) 发明名称

用于癌症免疫治疗的嵌合抗原受体修饰的
粒细胞-巨噬细胞祖细胞

(57) 摘要

本公开提供了基因工程粒细胞-巨噬细胞祖细胞 (GMP) 表达嵌合抗原受体 (CAR) 的方法及其用途,包括用于癌症免疫治疗。在一个具体的实施方案中,本公开提供了一种基因工程GMP以表达嵌合抗原受体 (CAR) 的方法,所述方法包括:将包含CAR的载体引入GMP中以形成表达CAR的GMP (CAR-GMP);在确定的培养条件下扩增和培养CAR-GMP多次传代,以产生CAR-GMP群体;和在体外诱导CAR-GMP群体分化成粒细胞、巨噬细胞或树突状细胞,其中所述粒细胞、巨噬细胞或树突状细胞表达CAR。



1. 基因工程改造粒细胞-巨噬细胞祖细胞 (GMP) 以表达嵌合抗原受体 (CAR) 的方法, 所述方法包括:

将包含CAR的载体引入GMP中以形成表达CAR的GMP (CAR-GMP);
在确定的培养条件下扩增和培养CAR-GMP多次传代, 以产生CAR-GMP群体; 和
在体外诱导CAR-GMP群体分化成粒细胞、巨噬细胞或树突状细胞, 其中所述粒细胞、巨噬细胞或树突状细胞表达CAR。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述GMP是从干细胞获得的。

3. 根据权利要求2所述的方法, 其中所述干细胞是造血干细胞。

4. 根据权利要求3所述的方法, 其中所述造血干细胞是从受试者的骨髓中分离出来的。

5. 根据权利要求4所述的方法, 其中所述受试者是哺乳动物受试者。

6. 根据权利要求5所述的方法, 其中所述受试者是人类患者。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述CAR包含能够与抗原结合的胞外结构域、跨膜结构域和至少一个胞内结构域, 所述胞内结构域被设计成通过增加粒细胞、巨噬细胞和树突状细胞的吞噬作用和/或促炎细胞因子分泌来增加其抗肿瘤活性。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述载体是病毒载体。

9. 根据权利要求8所述的方法, 其中所述病毒载体可以是复制或非复制的, 并且可以是腺病毒载体、腺相关病毒 (AAV) 载体、麻疹载体、疱疹载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体、弹状病毒载体、呼肠孤病毒载体、塞内加病毒载体、痘病毒载体、细小病毒载体或甲病毒载体。

10. 权利要求9的方法, 其中所述病毒载体是慢病毒载体。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述确定的培养条件包括在培养基中培养CAR-GMP, 所述培养基包括:

(i) 生长因子,

(ii) B-Raf激酶抑制剂, 和

(iii) Wnt活化剂和/或GSK-3抑制剂,

其中所述CAR-GMP在经历多次细胞传代和/或克隆扩增后基本上保持形态不变。

12. 根据权利要求11所述的方法, 其中所述培养基包含DMEM/F12和神经基础培养基。

13. 根据权利要求12所述的方法, 其中所述培养基包含比例为约5:1至约1:5的DMEM/F12和神经基础培养基。

14. 根据权利要求13所述的方法, 其中所述培养基包含比例约为1:1的DMEM/F12和神经基础培养基。

15. 根据权利要求11至14中任一项所述的方法, 其中所述培养基包含选自胰岛素、转铁蛋白、牛血清白蛋白 (BSA) 组分V、腐胺、亚硒酸钠、DL- α 生育酚、亚麻酸和/或亚油酸的一种或多种补充剂。

16. 根据权利要求15所述的方法, 其中所述培养基补充有胰岛素、转铁蛋白、BSA组分V、腐胺、亚硒酸钠、DL- α 生育酚、亚麻酸和/或亚油酸。

17. 根据权利要求11至16中任一项所述的方法, 其中所述生长因子是干细胞因子 (SCF)。

18. 根据权利要求11至17中任一项所述的方法, 其中所述B-Raf激酶抑制剂选自GDC-

0879、PLX4032、GSK2118436、BMS-908662、LGX818、PLX3603、RAF265、R05185426、维拉非尼、PLX8394、SB590885及其任意组合。

19. 根据权利要求11至17中任一项所述的方法, 其中其中所述Wnt活化剂选自SKL 2001、BML-284、WAY 262611、CAS 853220-52-7、QS11及其任意组合。

20. 根据权利要求11至17中任一项所述的方法, 其中所述GSK-3抑制剂选自CHIR99021、CHIR98014、SB216763、BI0、A107022、AR-A014418及其任意组合。

21. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述CAR-GMP被诱导分化成巨噬细胞, 包括:

用包含巨噬细胞集落刺激因子(MCSF)的巨噬细胞分化培养基培养CAR-GMP, 其中所述巨噬细胞表达CAR。

22. 根据权利要求21所述的方法, 其中所述巨噬细胞分化培养基包含RPMI 1640、胎牛血清(FBS)和MCSF。

23. 表达通过权利要求21或权利要求22的方法制备的CAR的巨噬细胞。

24. 根据权利要求1至20中任一项所述的方法, 其还包括将CAR-GMP分化成粒细胞, 包括:

用含有粒细胞集落刺激因子(GCSF)的粒细胞分化培养基培养所述GMP, 其中所述粒细胞表达CAR。

25. 根据权利要求24所述的方法, 其中所述粒细胞分化培养基包含RPMI 1640、FBS和GCSF。

26. 表达通过权利要求24或25的方法制备的CAR的粒细胞。

27. 用表达嵌合抗原受体(CAR)的巨噬细胞或粒细胞治疗患有癌症的受试者的免疫治疗方法:

向患有癌症的受试者施用包含权利要求21所述的巨噬细胞或权利要求24所述的粒细胞的组合物。

28. 根据权利要求27所述的免疫疗法方法, 其中所述组合物静脉内或肿瘤间施用。

29. 根据权利要求27或28所述的免疫治疗方法, 其中所述受试者患有癌症, 所述癌症选自肾上腺皮质癌、艾滋病相关癌症、艾滋病相关淋巴瘤、肛门癌、肛肠癌、肛管癌、附睾尾癌、儿童小脑星形细胞瘤、儿童脑星形细胞瘤、基底细胞癌、皮肤癌(非黑色素瘤)、胆管癌、肝外胆管癌、肝内胆管癌、膀胱癌、膀胱癌、骨关节癌、骨肉瘤和恶性纤维组织细胞瘤、脑癌、脑瘤、脑干胶质瘤、小脑星形细胞瘤、脑星形细胞瘤/恶性胶质瘤、室管膜瘤、髓母细胞瘤、幕上原始神经外胚层肿瘤、视觉通路和下丘脑胶质瘤、乳腺癌、包括三阴性乳腺癌、支气管腺瘤/类癌、类癌瘤、胃肠道癌、神经系统癌、神经系统淋巴瘤、中枢神经系统癌、中枢神经系统淋巴瘤、宫颈癌、儿童癌症、慢性淋巴细胞白血病、慢性粒细胞白血病、慢性骨髓增生性疾病、结肠癌、结直肠癌、皮肤T细胞淋巴瘤、淋巴瘤、蕁样肉芽肿、seziary综合征、子宫内膜癌、食管癌、颅外胚细胞瘤、性腺外生殖细胞肿瘤、肝外胆管癌、眼癌、眼内黑色素瘤、视网膜母细胞瘤、胆囊癌、胃癌、胃肠道类癌、胃肠道间质瘤(GIST)、生殖细胞瘤、卵巢生殖细胞瘤、妊娠滋养细胞肿瘤神经胶质瘤、头颈部癌、肝细胞癌(肝癌)、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、眼内黑色素瘤、眼癌、胰岛细胞瘤(内分泌胰腺)、卡波西肉瘤、肾癌、肾癌、喉癌、急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、慢性粒细胞白血病、毛细胞白血病、唇癌和口腔

癌、肝癌、肺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、艾滋病相关淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、髓母细胞瘤、黑色素瘤、眼内(眼)黑色素瘤、默克尔细胞癌、恶性间皮瘤、间皮瘤、转移性鳞癌、口腔癌、舌癌、多发性内分泌肿瘤综合征、蕈样肉芽肿、骨髓增生异常综合征、骨髓增生异常/骨髓增生性疾病、慢性粒细胞白血病、急性髓细胞白血病、多发性骨髓瘤、慢性骨髓增生性疾病、鼻咽癌、神经母细胞瘤、口腔癌、口腔癌、口咽癌、卵巢癌、卵巢上皮癌、卵巢低恶性潜能肿瘤、胰腺癌、胰岛细胞胰腺癌、鼻窦和鼻腔癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、咽癌、嗜铬细胞瘤、松果体母细胞瘤和幕上原始神经外胚层肿瘤、垂体瘤、浆细胞瘤/多发性骨髓瘤、胸膜肺母细胞瘤、前列腺癌、直肠癌、肾盂和输尿管、移行细胞癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、尤文肉瘤家族肿瘤、软组织肉瘤、子宫癌、子宫肉瘤、皮肤癌(非黑色素瘤)、皮肤癌(黑色素瘤)、乳头瘤、光化性角化病和角化棘皮瘤、默克尔细胞皮肤癌、小肠癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、胃癌(胃癌)、幕上原始神经外胚层肿瘤、睾丸癌、喉癌、胸腺瘤、胸腺瘤和胸腺癌、甲状腺癌、肾盂和输尿管及其他泌尿器官移行细胞癌、妊娠滋养细胞肿瘤、尿道癌、子宫内膜癌、子宫肉瘤、子宫体癌、阴道癌、外阴癌和肾母细胞瘤。

30. 根据权利要求27-29中任一项所述的免疫治疗方法,其还包括向患有癌症的受试者施用一种或多种抗癌剂。

用于癌症免疫治疗的嵌合抗原受体修饰的粒细胞-巨噬细胞祖细胞

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据《美国法典》第35章第119条要求2021年5月19日提交的临时申请序列号63/190387的优先权,其公开内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本发明提供了基因工程改造粒细胞-巨噬细胞祖细胞(GMP)以表达嵌合抗原受体(CAR)的方法及其用途,包括用于癌症免疫治疗。

背景技术

[0004] 粒细胞、巨噬细胞和树突状细胞是人类先天免疫系统的重要组成部分。它们是抵御病原体的第一道防线,在维持体内平衡和预防各种疾病(包括感染、代谢疾病和癌症)方面也发挥着核心作用。这些细胞起源于骨髓中的共同祖细胞,即粒细胞-巨噬细胞祖细胞(GMP)。

发明内容

[0005] 粒细胞-单核细胞祖细胞(GMP)是粒细胞和巨噬细胞的常见祖细胞,粒细胞和巨噬细胞是先天免疫系统的两个主要组成部分。GMP及其衍生物无法进行长期扩增,极大地限制了这些免疫细胞的治疗应用。本文提出的研究表明,在完全确定的条件下,同质GMP可以长期呈指数扩增。扩增的GMP保留了GMP的关键特征,包括分化为功能性粒细胞和巨噬细胞的能力。移植扩增的GMP可有效预防免疫缺陷小鼠的细菌感染。此外,扩增的GMP可以通过基因工程改造以产生专门吞噬癌细胞的巨噬细胞。本文所述的方法和组合物允许指数扩增和基因工程改造GMP。通过本公开的方法和组合物制备的GMP可用于开发免疫疗法以治疗广泛的疾病,特别是传染病和癌症。

[0006] 在一个具体的实施方案中,本公开提供了一种基因工程改造粒细胞-巨噬细胞祖细胞(GMP)以表达嵌合抗原受体(CAR)的方法,包括:将包含CAR的载体引入GMP中以形成表达CAR的GMP(CAR-GMP);在确定的培养条件下扩增和培养CAR-GMP多次传代,以产生CAR-GMP群体;以及在体外诱导CAR-GMP群体分化成粒细胞、巨噬细胞或树突状细胞,其中粒细胞、巨噬细胞或树突状细胞表达CAR。在进一步的实施方案中,GMP获自干细胞。在又一个实施方案中,干细胞是造血干细胞。在另一个实施方案中,造血干细胞分离自受试者的骨髓。在另一实施方案中,受试者是哺乳动物受试者。在进一步的实施方案中,受试者是人类患者。在又一个实施方案中,CAR包含能够与抗原结合的胞外结构域、跨膜结构域和至少一个胞内结构域,所述胞内结构域被设计成通过增加粒细胞、巨噬细胞和树突状细胞的吞噬作用和/或促炎细胞因子分泌来增加其抗肿瘤活性。在另一实施方案中,载体是病毒载体。在另一个实施方案中,病毒载体可以是复制的或非复制的,并且可以是腺病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体、麻疹载体、疱疹载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体、弹状病毒载体、呼肠孤病毒载体、塞

内加谷病毒载体、痘病毒载体、细小病毒载体或甲病毒载体。在某个实施方案中,病毒载体是慢病毒载体。在另一个实施方案中,所定义的培养条件包括在培养基中培养CAR-GMP,所述培养基包括:确定的培养条件包括在培养基中培养CAR-GMP,所述培养基包括:(i)生长因子、(ii)B-Raf激酶抑制剂和(iii)Wnt活化剂和/或GSK-3抑制剂,其中所述CAR-GMP在经历多次细胞传代和/或克隆扩增后基本上保持形态不变。在进一步的实施方案中,培养基包含DMEM/F12和神经基础培养基。在又一个实施方案中,培养基包含DMEM/F12和神经基础培养基的比例为约5:1至约1:5。在另一个实施方案中,所述培养基包含选自胰岛素、转铁蛋白、牛血清白蛋白(BSA)组分V、腐胺、亚硒酸钠、DL- α 生育酚和/或亚麻酸的一种或多种补充剂。在进一步的实施方案中,所述培养基补充有胰岛素、转铁蛋白、BSA组分V、腐胺、亚硒酸钠、DL- α 生育酚和亚麻酸。在某个实施方案中,生长因子是干细胞因子(SCF)。在另一个实施方案中,B-Raf激酶抑制剂选自GDC-0879、PLX4032、GSK2118436、BMS-908662、LGX818、PLX3603、RAF265、R05185426、维拉非尼(vemurafenib)、PLX8394、SB590885及其任意组合。在又一个实施方案中,Wnt活化剂选自SKL 2001、BML-284、WAY 262611、CAS 853220-52-7、QS11及其任意组合。在进一步的实施方案中,GSK-3抑制剂选自CHIR99021、CHIR98014、SB216763、BI0、A107022、AR-A014418及其任意组合。在另一个实施方案中,确定的培养条件包括在包含以下的培养基中培养CAR-GMP:(i)生长因子;(ii)B-Raf激酶抑制剂;(iii)抑制丝裂原活化激酶相互作用蛋白激酶1和2(Mnk1/2)的药剂;(iv)抑制PI3K通路的药剂;(v)任选地,一种或多种血清成分;其中CAR-GMP在经历多次细胞传代和/或克隆扩增后基本上保持形态不变。在进一步的实施方案中,培养基包含DMEM/F12和神经基础培养基。在又一个实施方案中,培养基包含比例为约5:1至约1:5的DMEM/F12和神经基础培养基。在另一个实施方案中,培养基包含比例为约1:1的DMEM/F12和神经基础培养基。在另一个实施方案中,培养基包含选自胰岛素、转铁蛋白、牛血清白蛋白(BSA)组分V、腐胺、亚硒酸钠、DL- α 生育酚和/或亚麻酸的一种或多种补充剂。在进一步的实施方案中,所述培养基补充有胰岛素、转铁蛋白、BSA组分V、腐胺、亚硒酸钠、DL- α 生育酚和亚麻酸。在又一个实施方案中,生长因子是干细胞因子(SCF)。在另一个实施方案中,B-Raf激酶抑制剂选自GDC-0879、PLX4032、GSK2118436、BMS-908662、LGX818、PLX3603、RAF265、R05185426、维拉非尼、PLX8394、SB590885及其任意组合。在进一步的实施方案中,抑制Mnk1/2的药剂选自CGP-57380、尾孢酰胺、BAY1143269、托米沃塞替布(tomivosertib)、ETC-206、SLV-2436及其任意组合。在另一个实施方案中,抑制PI3K通路的药剂选自3-甲基腺嘌呤、LY294002、阿培利司、渥曼青霉素、槲皮素、hSMG-1抑制剂11j、zandelisib、盐酸阿培利司、艾德拉尼、布帕尼西、库潘尼西、IPI549、达克利司、匹替利司(pictilisib)、SAR405、度维利塞、非美诺司他、GDC-0077、PI-103、YM-20163、PF-04691502、塔西利司、奥米利塞、samotolisib、异鼠李素、ZATK474、帕萨利司、瑞格色替、AZD8186、GSK2636771、地司特泰、TG100-115、AS-605240、PI3K-IN-1、dactolisib对甲苯磺酸盐、吉达利塞、TGX-221、厄布利塞、AZD 6482、色雷利塞、比米利塞、apitolisib、 α -亚麻酸、Vps34-PIK-III、PIK-93、Vps34-IN-1、CH5132799、leniolisib、voxtalisib、GSK1059615、sonolisib、PKI-402、PI4KIII β -IN-9、HS-173、BGT226马来酸盐、匹替利司二甲磺酸盐、VS-5584、IC-87114、槲皮素二水合物、CNX-1351、SF2523、GDC-0326、塞来利司、acalisib、SAR-260301、ZAD-8835、GNE-317、AMG319、那拉霉素、IITZ-01、PI-103盐酸盐、木蝴蝶苷B、pilaralisib、AS-252424、库潘尼西二盐酸盐、AMG 511、地司特泰TFA、

PIK-90、泰那利塞、七叶内酯、CGS15943、GNE-477、PI-3065、A66、AZD3458、人参皂苷Rk1、槐果碱、盐酸布帕利西布、Vps34-IN-2、因他瑞、山金车内酯D、KP372-1、CZC24832、PF-4989216、(R)-杜韦利西布、PQR530、P11δ-IN-1、盐酸厄布利塞、MTX-211、PI3K/mTOR抑制剂-2、LX2343、PF-04979064、多聚皂苷F、蓝萼甲素A、NSC781406、MSC2360844、CAY10505、IPI-3063、TG 100713、BEBT-908、PI-828、brevianamide F、ETP-46321、PIK-294、SRX3207、槐果碱一水合物、AS-604850、去甲基黄豆黄素、SKI V、WYE-687、NVP-QAV-572、GNE-493、CAL-130 盐酸盐、GS-9901、BGT226、IHMT-PI3Kδ-372、PI3Kα-IN-4、盐酸帕萨利司、PF-06843195、PI3K-IN-6、(S)-PI3Kα-IN-4、PI3K(γ)-IN-8、BAY1082439、CYH33、PI3K γ 抑制剂2、PI3Kδ抑制剂1、PARP/PI3K-IN-1、LAS191954、PI3K-IN-9、CHMFL-PI3KD-317、PI3K/HDAC-IN-1、MSC2360844半富马酸盐、PI3K-IN-2、PI3K/mTOR抑制剂-1、PI3Kδ-IN-1、桉树酸、KU-0060648、AZD 6482、WYE-687二盐酸盐、GSK2292767、(R)-厄布利塞、PIK-293、艾德拉尼D5、PIK-75、hirsutenone、槲皮素D5、PIK-108、hSMG-1抑制剂11e、PI3K-IN-10、NVP-BAG956、PI3K γ 抑制剂1、CAL-130、ON 146040、PI3Kδ抑制剂1、PI3Kα/mTOR-IN-1, 及其任意组合。在另一个实施方案中, 诱导CAR-GMP分化成巨噬细胞, 包括: 用包含巨噬细胞集落刺激因子(MCSF)的巨噬细胞分化培养基培养CAR-GMP, 其中巨噬细胞表达CAR。在又一个实施方案中, 巨噬细胞分化培养基包含RPMI 1640、胎牛血清(FBS)和MCSF。在替代实施方案中, 该方法还包括将CAR-GMP分化成粒细胞, 包括: 用包含粒细胞集落刺激因(GCSF)的粒细胞分化培养基培养GMP, 其中粒细胞表达CAR。在进一步的实施方案中, 粒细胞分化培养基包含RPMI 1640、FBS和GCSF。

[0007] 在某个实施方案中, 本公开还提供了表达通过本公开的方法制备的CAR的巨噬细胞。

[0008] 在一个具体的实施方案中, 本公开还提供了表达通过本公开的方法制备的CAR的粒细胞。

[0009] 在另一个实施方案中, 本公开提供了用表达CAR的巨噬细胞或粒细胞治疗患有癌症的受试者的免疫治疗方法: 向患有癌症的受试者施用包含表达通过本公开的方法制备的CAR的巨噬细胞或表达通过本公开的方法制备的CAR的粒细胞的组合物。在进一步的实施方案中, 组合物静脉内或肿瘤间施用。在又一个实施方案中, 巨噬细胞或粒细胞从来自待用免疫治疗方法治疗的受试者的干细胞的GMP获得。在另一个实施方案中, 受试者患有癌症, 所述癌症选自肾上腺皮质癌、艾滋病相关癌症、艾滋病相关淋巴瘤、肛门癌、肛肠癌、肛管癌、附阑尾癌、儿童小脑星形细胞瘤、儿童脑星形细胞瘤、基底细胞癌、皮肤癌(非黑色素瘤)、胆管癌、肝外胆管癌、肝内胆管癌、膀胱癌、膀胱癌、骨关节癌、骨肉瘤和恶性纤维组织细胞瘤、脑癌、脑瘤、脑干胶质瘤、小脑星形细胞瘤、脑星形细胞瘤/恶性胶质瘤、室管膜瘤、髓母细胞瘤、幕上原始神经外胚层肿瘤、视觉通路和下丘脑胶质瘤、乳腺癌(包括三阴性乳腺癌)、支气管腺瘤/类癌、类癌瘤、胃肠道癌、神经系统癌、神经系统淋巴瘤、中枢神经系统癌、中枢神经系统淋巴瘤、宫颈癌、儿童癌症、慢性淋巴细胞白血病、慢性粒细胞白血病、慢性骨髓增生性疾病、结肠癌、结直肠癌、皮肤T细胞淋巴瘤、淋巴瘤、蕈样肉芽肿、seziary综合征、子宫内膜癌、食管癌、颅外胚细胞瘤、性腺外生殖细胞肿瘤、肝外胆管癌、眼癌、眼内黑色素瘤、视网膜母细胞瘤、胆囊癌、胃癌、胃肠道类癌、胃肠道间质瘤(GIST)、生殖细胞瘤、卵巢生殖细胞瘤、妊娠滋养细胞肿瘤神经胶质瘤、头颈部癌、肝细胞癌(肝癌)、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、眼

内黑色素瘤、眼癌、胰岛细胞瘤(内分泌胰腺)、卡波西肉瘤、肾癌、肾癌、喉癌、急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、慢性粒细胞白血病、毛细胞白血病、唇癌和口腔癌、肝癌、肺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、艾滋病相关淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、髓母细胞瘤、黑色素瘤、眼内(眼)黑色素瘤、默克尔细胞癌、恶性间皮瘤、间皮瘤、转移性鳞癌、口腔癌、舌癌、多发性内分泌肿瘤综合征、蕈样肉芽肿、骨髓增生异常综合征、骨髓增生异常/骨髓增生性疾病、慢性粒细胞白血病、急性髓细胞白血病、多发性骨髓瘤、慢性骨髓增生性疾病、鼻咽癌、神经母细胞瘤、口腔癌、口腔癌、口咽癌、卵巢癌、卵巢上皮癌、卵巢低恶性潜能肿瘤、胰腺癌、胰岛细胞胰腺癌、鼻窦和鼻腔癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、咽癌、嗜铬细胞瘤、松果体母细胞瘤和幕上原始神经外胚层肿瘤、垂体瘤、浆细胞瘤/多发性骨髓瘤、胸膜肺母细胞瘤、前列腺癌、直肠癌、肾盂和输尿管、移行细胞癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、尤文肉瘤家族肿瘤、软组织肉瘤、子宫癌、子宫肉瘤、皮肤癌(非黑色素瘤)、皮肤癌(黑色素瘤)、乳头瘤、光化性角化病和角化棘皮瘤、默克尔细胞皮肤癌、小肠癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、胃癌(胃癌)、幕上原始神经外胚层肿瘤、睾丸癌、喉癌、胸腺瘤、胸腺瘤和胸腺癌、甲状腺癌、肾盂和输尿管及其他泌尿器官移行细胞癌、妊娠滋养细胞肿瘤、尿道癌、子宫内膜癌、子宫肉瘤、子宫体癌、阴道癌、外阴癌和肾母细胞瘤。在又一个实施方案中,免疫治疗方法还包括向患有癌症的受试者施用一种或多种抗癌剂。

[0010] 附图简要说明

[0011] 图1A-E表明由工程化SCF/2i GMP生成的 α CD19 CAR巨噬细胞可有效吞噬人B-ALL细胞。(A) SCF/2i GMP用GFP mRNA电穿孔或用GFP慢病毒(pSin-GFP)转导。转染后48小时通过荧光显微镜(上图)和流式细胞术(下图)分析GFP表达。流式细胞术数据表示为来自五个独立实验的平均值 $\pm$ 标准差。(B) 用对照或GFP sgRNA对衍生自CAG-Cas9-GFP小鼠的SCF/2i GMP进行电穿孔,电穿孔后48小时通过流式细胞术分析GFP表达。数据表示为来自三个独立实验的平均值 $\pm$ 标准差。(C) 显示CarP-RFP、CarPfc-19-RFP和CarPzFc-19-RFP的结构示意图。(D) 用CarP-RFP或CarPzFc19-RFP慢病毒转导SCF/2i GMP,对RFP阳性GMP进行分类并在SCF/2i中进一步扩增。衍生自RFP阳性GMP的 1×10^5 巨噬细胞与用或不用抗CD47抗体预处理的 1×10^6 GFP阳性人B-ALL细胞共培养。共培养一小时后用PBS洗涤细胞,并拍摄相差和荧光图像。(E) 将(D)中的细胞进行胰蛋白酶消化,并通过流式细胞术分析GFP和RFP表达。对吞噬巨噬细胞的百分比进行定量。数据表示为来自三个独立实验的平均值 $\pm$ 标准差。

[0012] 图2A-C显示了GMP的扩增、分化和基因工程。(A) 通过与GFP标记的大肠杆菌(E.coli)一起孵育1小时,对GMP衍生的巨噬细胞进行吞噬分析。代表性的相差和荧光图像显示了被巨噬细胞吞噬的GFP标记的细菌,以及与有(红色)或没有(蓝色)GFP标记的细菌一起孵育的GMP衍生巨噬细胞的流式细胞术分析的代表性图。流式细胞术数据表示为来自三个独立实验的平均值 $\pm$ 标准差。(B) 将分化细胞以 2×10^4 个细胞/孔的密度接种到96孔板中,并用或不用500ng/ml LPS刺激6小时,之后通过ELISA测量上清液中的细胞因子分泌。数据表示为来自三个独立实验的平均值 $\pm$ 标准差。(C) 用CarP-RFP或人CarPzFc19-RFP慢病毒转导在修饰的SCF/2i中扩增的GMP。RFP阳性GMP被分类并在修饰的SCF/2i中进一步扩增。将衍生自RFP阳性GMP的巨噬细胞以 1×10^5 个细胞/孔的密度接种到24孔板中,并在DMEM/10% FBS中培养过夜,然后用或不用抗CD47预处理 1×10^6 GFP阳性人B-ALL细胞将抗体添加到每

个孔中。共培养一小时后,用PBS洗涤细胞并用胰蛋白酶消化,并通过流式细胞术分析GFP和RFP表达。对吞噬巨噬细胞的百分比进行定量。数据表示为来自三个独立实验的平均值±标准差。

[0013] 图3A-D显示了与图1相关的基因工程SCF/2i GMP衍生的巨噬细胞对人B-ALL细胞的吞噬作用。(A) 用CarP-RFP或CarPzFc19-RFP慢病毒转导SCF/2i小鼠GMP,并在SCF/2i中分选和扩增RFP阳性细胞。将衍生自RFP阳性小鼠GMP的巨噬细胞以 1×10^5 个细胞/孔的密度接种到24孔板中,并在DMEM/10%FBS中培养过夜,之后将 1×10^6 个GFP阳性人B-ALL细胞添加到每个孔中。共培养一小时后,用PBS洗涤细胞并用胰蛋白酶消化,并通过流式细胞术分析GFP和RFP表达。对吞噬巨噬细胞的百分比进行定量。数据表示为来自三个独立实验的平均值±标准差。(B) 延时图像显示表达CarPzFc19-RFP的巨噬细胞在不同时间点的吞噬过程。时间以分钟为单位显示。箭头指向被吞噬前后的GFP阳性B-ALL细胞。图像是从视频中提取的。(C) 用 α HER2-CarPzFc1-RFP慢病毒转导SCF/2i小鼠GMP。RFP阳性GMP在SCF/2i中进行分类和扩增。将衍生自RFP阳性GMP的巨噬细胞以 1×10^5 个细胞/孔的密度接种到24孔板中,并在DMEM/10%FBS中培养过夜,之后将 1×10^6 个GFP阳性SK-BR-3细胞添加到每个孔中。共培养1小时后,拍摄相位对比和荧光图像。(D) 用 α CD19 CarPzFc19 RFP或 α HER2 CarPzFc19 RFP慢病毒转导SCF/2i GMP,并在SCF/2i中分选和进一步扩增RFP阳性的GMP。表达 α CD19 CarPzFc19 RFP或 α HER2 CarPzFc19 RFP的 1×10^5 个巨噬细胞与GFP阳性的人B-ALL细胞或SKBR-3细胞共培养。共培养1小时后,用PBS洗涤细胞并进行胰蛋白酶消化,通过流式细胞术分析GFP和RFP的表达。对吞噬巨噬细胞的百分比进行定量。数据表示为三个独立实验的平均值±标准差。

[0014] 图4A-B证明与图2C相关的衍生自工程化GMP的 α CD19 CAR-巨噬细胞有效吞噬人B-ALL细胞。(A) GMP在修饰的SCF/2i中扩增并用人CarPzFc19-RFP(h CarPzFc19-RFP)慢病毒转导。衍生自表达GMP的hCarPzFc19-RFP的巨噬细胞与GFP标记的人B-ALL细胞共培养。共培养一小时后,拍摄相差和荧光图像。(B) 与用抗CD47抗体预孵育的GFP标记的人B-ALL细胞共培养的表达式hCarPzFc19 RFP的巨噬细胞的连续荧光图像。

[0015] 图5A-D显示 α CD19 CAR-GMP的移植减弱小鼠中的白血病细胞。(A) 将GFP标记的人B细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)细胞注射到NSG小鼠中以创建B-ALL小鼠模型。B-ALL注射后21天,注射 α CD19 CAR-GMP或PBS,每周进行FACS分析以确定外周血中GFP阳性B-ALL细胞的比例。(B) 代表性FACS分析结果。(C) 对照(PBS)和治疗(α CD19 CAR-GMP)的存活率。(D) 对照小鼠和治疗小鼠血液中GFP阳性B-ALL细胞的百分比。

具体实施方式

[0016] 如本文和所附权利要求中所使用的,单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数指示物,除非上下文另外明确指出。因此,例如,提及“细胞”包括多个细胞,提及“粒细胞-巨噬细胞祖细胞”包括提及一种或多种粒细胞-巨噬细胞祖细胞以及本领域技术人员已知的其等同物,等等。

[0017] 另外,除非另有说明,“或”的使用意味着“和/或”。类似地,“包括”(comprise)、“包含”(comprises)、“包括”(comprising)、“包括”(include)和“包含”(includes)、“包括”(including)是可互换的并且不旨在进行限制。

[0018] 还应当理解,在对各种实施例的描述使用术语“包含”的情况下,本领域技术人员将理解,在一些特定情况下,可以替代地使用语言“基本上由.....组成”或“由.....组成”来描述实施例。

[0019] 除非另有定义,本文中使用的所有技术和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。尽管许多方法和试剂与本文描述的那些类似或等同,但本文公开了示例性方法和材料。

[0020] 本文提到的所有出版物均出于描述和公开的目的通过引用全文并入本文可以结合本文的描述使用的方法。此外,对于在一份或多份出版物中出现的与本公开中已明确定义的术语相似或相同的任何术语,本公开中明文规定的术语定义将在所有方面起控制作用。

[0021] 应当理解,本发明不限于本文描述的具体方法、方案和试剂等,并且因此可以变化。本文中使用的术语仅用于描述具体实施例的目的,并不旨在限制本发明的范围,本发明的范围仅由权利要求书限定。

[0022] 除了在操作实施例中或另外指出的情况外,本文使用的表达成分的量或反应条件的所有数字应理解为在所有情况下均由术语“约”修饰。当用于描述本公开时,与百分比相关的术语“约”是指 $\pm 1\%$ 。在其他情况下,如本文所使用的,术语“约”是指可测量值,例如量、持续时间等,并且包括 $\pm 20\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 的变化、规定值的 $\pm 0.5\%$ 或 $\pm 0.1\%$ 。

[0023] 本文所用的术语“施用”是指通过导致药剂至少部分定位于所需位点的方法或通路将本文公开的药剂(例如,工程化的GMP或其衍生的巨噬细胞或粒细胞)置入受试者体内。

[0024] 本文所用的“自体”细胞是指衍生自随后将对其再次施用该细胞的同一个体的细胞。

[0025] 本文所用的术语“抗体片段”是指仅包含完整抗体的一部分的蛋白质片段,通常包含完整抗体的抗原结合位点并因此保留结合抗原的能力。本定义包括的抗体片段的实例包括:(i) Fab片段,具有VL、CL、VH和CH1结构域;(ii) Fab'片段,在CH1结构域的C末端具有一个或多个半胱氨酸残基的Fab片段;(iii) Fd片段,具有VH和CH1结构域;(iv) Fd'片段,具有VH和CH1结构域以及在CH1结构域的C末端处的一个或多个半胱氨酸残基;(v) Fv片段,具有抗体单臂的VL和VH结构域;(vi) dAb片段(Ward等人,Nature 341,544-546(1989)),其由VH结构域组成;(vii) 分离的CDR区域;(viii) F(ab')₂片段,一种二价片段,包括在铰链区通过二硫桥连接的两个Fab'片段;(ix) 单链抗体分子(例如,单链Fv;scFv)(Bird等人,Science 242:423-426(1988);和Huston等人,PNAS(USA) 85:5879-5883(1988));(x) 具有两个抗原结合位点的“双抗体”,其包含在同一多肽链中连接至轻链可变结构域(VL)的重链可变结构域(VH)(参见例如EP404097;WO 93/11161;和Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:644-6448(1993));(xi) 包含一对串联Fd区段(VH-CH1-VH-CH1)的“线性抗体”,其与互补轻链多肽一起形成一对抗原结合区(Zapata等人,Protein Eng.8(10):1057-162(1995);以及美国专利号5641870)。

[0026] “B-Raf”激酶抑制剂是指阻断或降低称为B-Raf激酶的蛋白质的活性或降低B-Raf激酶的量的物质,例如化合物或分子。B-Raf是一种激酶,有助于控制细胞生长和信号传导。它可能以突变(改变)的形式存在于某些类型的癌症中,包括黑色素瘤和结直肠癌。一些B-

Raf激酶抑制剂用于治疗癌症。B-Raf激酶抑制剂的实例包括但不限于GDC-0879、PLX4032、GSK2118436、BMS-908662、LGX818、PLX3603、RAF265、R05185426、维拉非尼、PLX8394和SB590885。在一个具体实施方案中,本文公开的方法包括使用B-Raf激酶抑制剂GDC-0879。

[0027] “有益结果”可以包括但不限于减轻或缓解病情的严重性、防止病情恶化、治愈疾病、防止病情发展、降低患者病情发展的机会并延长患者的生命或预期寿命。作为非限制性示例,“有益结果”或“期望结果”可以是一种或多种症状的减轻、缺陷程度的减小、癌症进展状态的稳定(即不恶化)、转移或侵袭的延迟或减慢、以及与癌症相关的症状的改善或减轻。

[0028] 为了公开的目的,术语“癌症”将用于包括细胞增殖性疾病、肿瘤、癌前细胞疾病和癌症,除非另有具体说明。因此,“癌症”是指经历可导致转移或肿瘤生长的异常细胞增殖的任何细胞。示例性的癌症包括但不限于肾上腺皮质癌、艾滋病相关癌症、艾滋病相关淋巴瘤、肛门癌、肛肠癌、肛管癌、附睾尾癌、儿童小脑星形细胞瘤、儿童脑星形细胞瘤、基底细胞癌、皮肤癌(非黑色素瘤)、胆管癌、肝外胆管癌、肝内胆管癌、膀胱癌、膀胱癌、骨关节癌、骨肉瘤和恶性纤维组织细胞瘤、脑癌、脑瘤、脑干胶质瘤、小脑星形细胞瘤、脑星形细胞瘤/恶性胶质瘤、室管膜瘤、髓母细胞瘤、幕上原始神经外胚层肿瘤、视觉通路和下丘脑胶质瘤、乳腺癌(包括三阴性乳腺癌)、支气管腺瘤/类癌、类癌瘤、胃肠道癌、神经系统癌、神经系统淋巴瘤、中枢神经系统癌、中枢神经系统淋巴瘤、宫颈癌、儿童癌症、慢性淋巴细胞白血病、慢性粒细胞白血病、慢性骨髓增生性疾病、结肠癌、结直肠癌、皮肤T细胞淋巴瘤、淋巴瘤、蕈样肉芽肿、seziary综合征、子宫内膜癌、食管癌、颅外胚细胞瘤、性腺外生殖细胞肿瘤、肝外胆管癌、眼癌、眼内黑色素瘤、视网膜母细胞瘤、胆囊癌、胃癌、胃肠道类癌、胃肠道间质瘤(GIST)、生殖细胞瘤、卵巢生殖细胞瘤、妊娠滋养细胞肿瘤神经胶质瘤、头颈部癌、肝细胞癌(肝癌)、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、眼内黑色素瘤、眼癌、胰岛细胞瘤(内分泌胰腺)、卡波西肉瘤、肾癌、肾癌、喉癌、急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、慢性粒细胞白血病、毛细胞白血病、唇癌和口腔癌、肝癌、肺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、艾滋病相关淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、髓母细胞瘤、黑色素瘤、眼内(眼)黑色素瘤、默克尔细胞癌、恶性间皮瘤、间皮瘤、转移性鳞癌、口腔癌、舌癌、多发性内分泌肿瘤综合征、蕈样肉芽肿、骨髓增生异常综合征、骨髓增生异常/骨髓增生性疾病、慢性粒细胞白血病、急性髓细胞白血病、多发性骨髓瘤、慢性骨髓增生性疾病、鼻咽癌、神经母细胞瘤、口腔癌、口腔癌、口咽癌、卵巢癌、卵巢上皮癌、卵巢低恶性潜能肿瘤、胰腺癌、胰岛细胞胰腺癌、鼻窦和鼻腔癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、咽癌、嗜铬细胞瘤、松果体母细胞瘤和幕上原始神经外胚层肿瘤、垂体瘤、浆细胞瘤/多发性骨髓瘤、胸膜肺母细胞瘤、前列腺癌、直肠癌、肾盂和输尿管、移行细胞癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、尤文肉瘤家族肿瘤、软组织肉瘤、子宫癌、子宫肉瘤、皮肤癌(非黑色素瘤)、皮肤癌(黑色素瘤)、乳头瘤、光化性角化病和角化棘皮瘤、默克尔细胞皮肤癌、小肠癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、胃癌(胃癌)、幕上原始神经外胚层肿瘤、睾丸癌、喉癌、胸腺瘤、胸腺瘤和胸腺瘤、甲状腺癌、肾盂和输尿管及其他泌尿器官移行细胞癌、妊娠滋养细胞肿瘤、尿道癌、子宫内膜癌、子宫肉瘤、子宫体癌、阴道癌、外阴癌和肾母细胞瘤。

[0029] 本文使用的“嵌合抗原受体”或“CAR”或“CARs”是指工程化的受体,其将抗原特异性移植到细胞(例如GMP细胞)上。CAR也称为人工T细胞受体、嵌合T细胞受体或嵌合免疫受体。在各种实施方案中,CAR是包含抗原特异性结构域(ASD)、铰链区(HR)、跨膜结构域

(TMD)、共刺激结构域(CSD)和胞内信号结构域(ISD)的重组多肽。

[0030] “CAR结合结构域”是指CAR中与靶细胞上的抗原特异性结合的部分。在一些实施方案中,CAR的结合结构域包含CAR构建体中使用的任何已知结合结构域(参见例如PCT/US2017/064379),包括抗体或其功能等同物或其片段或其衍生物。靶向区可包含全长重链、Fab片段、单链Fv(scFv)片段、二价单链抗体或双抗体,其各自对靶抗原具有特异性。

[0031] 本文所用的“病症”和“病情”可包括癌症、肿瘤或传染病。在示例性实施方案中,病症包括但决不限于任何形式的恶性肿瘤细胞增殖性病症或疾病。

[0032] 本文使用的“共刺激结构域”是指CAR的包含增强细胞增殖、存活和/或发育的多肽结构域的部分。共刺激结构域是可选结构域或CAR。本发明的CAR可以不包含共刺激结构域或者可以包含一种或多种共刺激结构域。每个共刺激结构域通常包含TNFR超家族的成员、CD28、CD137(4-1BB)、CD134(OX40)、Dap10、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40或其组合。其他共刺激结构域(例如,来自其他蛋白质)对于本领域技术人员来说将是显而易见的。

[0033] 如本文所用,“基因修饰的GMP靶向的疾病”包括本公开的基因修饰的GMP细胞(或其衍生的粒细胞或巨噬细胞)以任何方式靶向参与任何疾病的任何细胞,无论基因修饰的细胞是靶向患病细胞还是靶向健康细胞以实现治疗上有益的结果。基因修饰的细胞表达CAR,CAR可以靶向在靶细胞表面表达的任何抗原。可靶向的抗原的实例包括但不限于在癌、肉瘤、淋巴瘤、白血病、生殖细胞肿瘤和母细胞瘤上表达的抗原;各种免疫细胞上表达的抗原;以及在与各种血液疾病、自身免疫疾病和/或炎症疾病相关的细胞上表达的抗原。可以靶向的其他抗原对于本领域技术人员来说是显而易见的,并且可以被本公开的CAR靶向。

[0034] 本文所用的术语“有效量”或“治疗有效量”是指包含GMP(其衍生的巨噬细胞或粒细胞)的组合物的量,所述GMP已被工程化以表达CAR,从而减少疾病或病症的至少一种或多种症状,并且涉及足以提供所需效果的组合物的量。本文使用的短语“治疗有效量”是指以适用于任何医学治疗的合理的益处/风险比来治疗病症的组合物的足够量。

[0035] 症状的治疗性或预防性显著减轻是,例如与对照或未治疗的受试者或受试者在施用所述细胞组合物之前的状态相比,测量的参数降低至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约125%、至少约150%或更多。测量的或可测量的参数包括临床可检测的疾病标志物,例如生物标志物水平升高或降低。所需的确切量将根据诸如所治疗的疾病类型、受试者的性别、年龄和体重等因素而变化。

[0036] “效应功能”是指分化细胞的特化功能。例如,粒细胞或巨噬细胞的效应功能可以是细胞溶解活性或细胞因子的分泌。

[0037] 术语“表达载体”指包含重组多核苷酸的载体,所述重组多核苷酸包含与待表达的核苷酸序列可操作地连接的表达控制序列。表达载体包含足够的顺式作用元件用于表达;用于表达的其他元件可以由宿主细胞或在体外表达系统中提供。表达载体包括本领域已知的所有那些,包括掺入重组多核苷酸的粘粒、质粒(例如,裸露的或包含在脂质体中)和病毒(例如,慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒等)。

[0038] “粒细胞集落刺激因子”或“GCSF”(也称为集落刺激因子3(CSF 3))是一种糖蛋白,可刺激骨髓产生粒细胞和干细胞。不同物种的基因序列、蛋白质序列和直系同源物是本领

域已知的(参见例如NCBI参考序列:NP_000750.1,其通过引用并入本文)。

[0039] “生长因子”是指有效促进细胞例如干细胞生长的物质,例如化合物或分子,并且除非作为补充剂添加到培养基中,否则不会成为基础培养基的组成部分。生长因子包括但不限于干细胞因子(SCF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)、表皮生长因子(EGF)、胰岛素样生长因子-I(IGF-I)、胰岛素样生长因子-II(IGF-II)、血小板衍生生长因子-AB(PDGF)、血管内皮细胞生长因子(VEGF)、激活素-A、Wnt和骨形态发生蛋白(BMP),胰岛素、细胞因子、趋化因子、形态发生素、中和抗体、其他蛋白质和小分子。还可以将外源生长因子添加到根据本公开的培养基中以帮助将GMP培养物维持在基本上未分化的状态。这些因子及其有效浓度可以如本文别处所述或使用培养领域技术人员已知的技术来鉴定细胞。在一个具体的实施方案中,GMP在包含SCF的培养基中培养。

[0040] 本文使用的“铰链区”是指位于CAR结合结构域和CAR的跨膜结构域之间的亲水性区域。铰链区包括但不限于抗体的Fc片段或其片段或衍生物、抗体的铰链区或其片段或衍生物、抗体的CH2区、抗体的CH3区、人工间隔区序列或其组合。铰链区的实例包括但不限于CD8a铰链和由多肽制成的人工间隔区,所述多肽可以小至例如IgG的CH1结构域和CH3结构域(例如人IgG4)。其他铰链区对于本领域技术人员来说将是显而易见的并且可以与本发明的替代实施例结合使用。

[0041] 如本文所用,“细胞内信号传导结构域”或“细胞质结构域”是指CAR的一部分,其包含转导效应器功能信号并引导细胞执行其特殊功能的结构域。转导效应子功能信号的结构域的实例包括但不限于T细胞受体复合物的 ζ 链或其任何同源物(例如h链、Fc ϵ R1g和b链、MB1(Iga)链、B29(Igb)链等)、人CD3 ζ 链、CD3多肽(D、d和e)、syk家族酪氨酸激酶(Syk、ZAP70等)、src家族酪氨酸激酶(Lck、Fyn、Lyn等)以及参与T细胞转导的其他分子,例如CD2、CD5和CD28。其他细胞内信号传导结构域对于本领域技术人员来说是显而易见的。

[0042] 本文使用的术语“分离的”是指基本上不含其通常相关的其他材料的分子、生物制品、细胞或细胞材料。一方面,术语“分离的”是指分别与天然来源中存在的其他DNA或RNA、或蛋白质或多肽、或细胞或细胞器分离的核酸(例如DNA或RNA)、或蛋白质或多肽(例如,抗体或其衍生物)、或细胞或细胞器。术语“分离的”还指通过重组DNA技术生产时基本上不含细胞物质、病毒物质或培养基的核酸或肽,或化学合成时基本上无化学前体或其他化学物质的核酸或多肽。此外,“分离的核酸”意在包括非天然存在的片段并且在天然状态下不会发现的核酸片段。术语“分离的”在本文中也用于指从其他细胞蛋白分离的多肽,并且意在包括纯化的和重组的多肽。术语“分离的”在本文中还用于指与其他细胞或组织分离的细胞或组织,并且意在包括培养的和工程化的细胞或组织。

[0043] 如本文所用,“连接子”或“连接结构域”是指长度为约1至100个氨基酸的寡肽或多肽区域,其将本公开内容的CAR的任何结构域/区域连接在一起。连接子可由甘氨酸和丝氨酸等柔性残基组成,以便相邻的蛋白质结构域可以相对于彼此自由移动。当需要确保两个相邻结构域不会相互空间干扰时,可以使用较长的连接子。连接子可以是可切割的或不可切割的。可切割的连接子的实例包括2A连接子(例如T2A)、2A样连接子或其功能等同物及其组合。在一些实施方案中,连接子包括小核糖核酸病毒2A样连接子、猪睾丸病毒(P2A)、Thosea asigna病毒(T2A)或其组合、变体和功能等同物的CHYSEL序列。其他连接子对于本领域技术人员来说是显而易见的。

[0044] 术语“慢病毒载体”是指衍生自慢病毒基因组的至少一部分的载体,特别是包括Milone等人,Mol. Ther. 17 (8):1453-1464 (2009)中提供的自失活慢病毒载体。可用于临床的慢病毒载体的其他实例包括但不限于例如来自Oxford BioMedica的LENTIVECTOR®基因递送技术、来自Lentigen的LENTIMAX™载体系统等。非临床类型的慢病毒载体也是可用的并且是本领域技术人员已知的。

[0045] 如本文所用,“长期培养物”或“长期扩增”是指细胞在受控条件下增殖,使得细胞数量扩增和/或保持基本活力和基本相似的形态。在一些实施方案中,该术语指维持所需形态和细胞数量的同时培养的时间段(例如,约两个月或更长时间)或可以与至少10个培养基的传代次数(例如,培养基更换)相关。在其他实施例中,该术语指一段时间内数量的增加(例如,在约两个月的时间段内增加至少一百万倍)。在一些实施方案中,长期培养物培养超过4个月、超过6个月或超过1年。在其他实施方案中,长期培养物传代超过15次、超过18次或超过20次。

[0046] “巨噬细胞集落刺激因子”或“MCSF”(也称为集落刺激因子1(CSF 1))参与单核细胞、巨噬细胞和骨髓祖细胞的增殖、分化和存活。不同物种的基因序列、蛋白质序列和直系同源物是本领域已知的(参见例如NCBI参考序列:NP_000748.4,其通过引用并入本文)。

[0047] 本文使用的“多核苷酸”包括但不限于DNA、RNA、cDNA(互补DNA)、mRNA(信使RNA)、rRNA(核糖体RNA)、shRNA(小发夹RNA)、snRNA(小核RNA)、snoRNA(短核仁RNA)、miRNA(microRNA)、基因组DNA、合成DNA、合成RNA和/或tRNA。

[0048] 与另一序列具有一定百分比(例如,80%、85%、90%或95%)“序列同一性”的多核苷酸或多核苷酸区域(或多肽或多肽区域)是指,当比对时,碱基(或氨基酸)的百分比在比较两个序列时是相同的。比对和同源性或序列同一性百分比可以使用本领域已知的软件程序确定,例如分子生物学当前协议(Ausubel等,eds.1987)补充30,第7.7.18节,表7.7.1中描述的那些。优选地,使用默认参数进行对齐。典型的对齐程序是BLAST,使用默认参数。特别地,典型的程序是BLASTN和BLASTP,使用以下默认值参数:遗传密码=标准;过滤器=无;链=两者;截止值=60;期望值=10;矩阵=BLOSUM62;描述=50个序列;排序依据=高分;数据库=非冗余,GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS翻译+SwissProtein+SPupdate+PIR。这些程序的详细信息可以在以下网址找到:ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST。

[0049] 除非另有说明,否则可以推断,当本公开涉及多肽、蛋白质、多核苷酸、抗体或其片段时,其等同物或生物学等同物意在本公开的范围。如本文所用,当提及参考蛋白质、抗体或其片段、多肽或核酸时,术语“生物等同物”意指与“等同物”同义,意指那些在保持所需结构或功能的同时具有最小同源性的那些。除非本文特别叙述,否则预期上述任一项也包括其等同物。例如,等同物意指与参考蛋白、多肽、抗体或其片段或核酸具有至少约70%的同源性或同一性,或至少80%同源性或同一性,或者至少约85%,或至少约90%,或至少约95%,或至少约98%的同源性或同一性,并且表现出基本上等同的生物活性。或者,当提及多核苷酸时,其等同物是在严格条件下与参考多核苷酸或其互补体杂交的多核苷酸。或者,当提及多肽或蛋白质时,其等同物是来自于在严格条件下与编码参考多肽或蛋白质的多核苷酸或其补体杂交的多核苷酸表达的多肽或蛋白质。

[0050] 术语“逆转录病毒载体”是指衍生自逆转录病毒基因组的至少一部分的载体。逆转录病毒载体的实例包括可从Addgene或Clontech获得的MSCVneo、MSCV-pac(或MSCV-puro)、

MSCV-hygro。逆转录病毒载体的另一个实例是MSCV-Bgl2-AvrII-Bam-EcoRI-Xho-BstB1-Mlu-Sal-Cla1.103(SEQ ID NO:872)。

[0051] 术语“睡美人转座子”或“睡美人转座子载体”是指衍生自睡美人转座子基因组的至少一部分的载体。

[0052] “干细胞因子”或“SCF”(也称为KIT-配体、KL或钢因子)是一种与c-KIT受体(CD117)结合的细胞因子。SCF既可以作为跨膜蛋白也可以作为可溶性蛋白存在。这种细胞因子在造血(血细胞的形成)、精子发生和黑素生成中发挥重要作用。本领域已知不同物种的基因序列、蛋白质序列和直系同源物(参见例如NCBI参考序列NP_000890.1,其通过引用并入本文)。

[0053] 如本文所用,“基本上均匀的群体”是指其中至少80%、优选至少90%、95%、甚至98%或更多的细胞属于指定类型的细胞群体。

[0054] 如本文所用,“跨膜结构域”是指穿过质膜的CAR的区域。CAR的跨膜结构域是跨膜蛋白(例如I型跨膜蛋白)、人工疏水序列或其组合的跨膜区域。其他跨膜结构域对于本领域技术人员来说是显而易见的。在一些实施方案中,跨膜结构域可以包含从选自T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、KIRDS2、OX40、CD2、CD27、LFA-1(CD11a、CD18)、ICOS(CD278)、4-1BB(CD137)、GITR、CD40、BAFFR、HVEM(LIGHTR)、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、CD160、CD19、IL2R β 、IL2R γ 、IL7Ra、ITGA1、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D和/或NKG2C的跨膜结构域的蛋白质衍生或克隆的跨膜结构域。

[0055] 如本文所用,术语“治疗(treat)”、“处理(treatment)”、“治疗(treating)”或“改善(amelioration)”是指治疗性治疗,其中目的是逆转、减轻、改善、抑制、减缓或停止与疾病或病症相关的病症的进展或严重性。术语“治疗”包括减少或减轻病症、疾病或病症例如癌症的至少一种副作用或症状。如果一种或多种症状或临床标志物减少,治疗通常是“有效的”。或者,如果疾病的进展减少或停止,则治疗是“有效的”。也就是说,“治疗”不仅包括症状或标志物的改善,还包括停止至少减慢在没有治疗的情况下预期的症状的进展或恶化。有益的或期望的临床结果包括但不限于减轻一种或多种症状、减轻疾病程度、稳定(即不恶化)疾病状态、延迟或减缓疾病进展、改善或缓解疾病状态和缓解(无论是部分缓解还是全部缓解),无论是可检测到的还是不可检测到的。术语疾病的“治疗”还包括缓解疾病的症状或副作用(包括姑息治疗)。在一些实施方案中,癌症的治疗包括减小肿瘤体积、减少癌细胞数量、抑制癌症转移、增加预期寿命、减少癌细胞增殖、减少癌细胞存活或改善与癌症病症相关的各种生理症状。

[0056] “Wnt激活剂”是指诱导Wnt信号通路的化合物或分子。Wnt信号通路是一组信号转导通路,其起始于通过细胞表面受体将信号传递到细胞的蛋白质。已表征了三种Wnt信号通路:经典Wnt通路、非经典平面细胞极性通路和非经典Wnt/钙通路。所有这三种通路都是通过Wnt蛋白配体与卷曲家族受体的结合而激活,该受体将生物信号传递给卷曲家族受体。细

胞内的蛋白质。Wnt包含多种分泌型脂质修饰信号糖蛋白家族,长度为350-400个氨基酸。这些蛋白质上发生的脂质修饰类型是半胱氨酸以23-24个半胱氨酸残基的保守模式进行棕榈酰化。棕榈酰化是必要的,因为它启动Wnt蛋白靶向质膜进行分泌,并且由于脂肪酸的共价连接,它允许Wnt蛋白结合其受体。Wnt蛋白也会经历糖基化,糖基化会附着碳水化合物以确保正常分泌。在Wnt信号传导中,这些蛋白质充当配体,通过旁分泌和自分泌通路激活不同的Wnt通路。这些蛋白质在物种间高度保守。它们可以在小鼠、人类、爪蟾、斑马鱼、果蝇和许多其他动物中找到。Wnt激活剂的实例包括但不限于SKL2001、BML-284、WAY 262611、CAS 853220-52-7和QS11。在一个具体的实施方案中,本文公开的方法包括使用具有Wnt激活剂活性的本公开的化合物。

[0057] 粒细胞和巨噬细胞是先天免疫系统的两种主要细胞类型。它们是抵御病原体的第一道防线,在维持我们身体的稳态、预防感染和各种疾病(包括代谢性疾病和癌症)方面也发挥着核心作用。粒细胞和巨噬细胞在称为吞噬作用的过程中吞噬并消化入侵的微生物。除了吞噬作用外,巨噬细胞还作为抗原递呈者发挥着关键作用,通过招募淋巴细胞等其他免疫细胞来启动特定的防御机制(适应性免疫)。最近,巨噬细胞也成为对抗癌症的有吸引力的治疗靶点。尽管粒细胞和巨噬细胞具有巨大的治疗潜力,但目前还没有有效的方法来扩增和基因修饰粒细胞和巨噬细胞,这极大地限制了它们的临床应用。

[0058] 一种更有前景的方法是扩增粒细胞-单核细胞祖细胞(GMP)并进行基因修饰,它是骨髓中粒细胞和巨噬细胞的常见祖细胞。如本文所用,GMP可衍生自或获自哺乳动物物种(例如,牛、犬、马、猫科动物、人类、鼠科动物、灵长类动物、大鼠等)。体外扩增的GMP可以产生足够的巨噬细胞用于治疗应用。扩增的GMP还可以被诱导分化为最丰富的粒细胞类型,即中性粒细胞,然后将其注入血液循环,以对抗中性粒细胞减少症或中性粒细胞功能障碍患者的感染。更重要的是,GMP可以很容易地被修饰,以产生具有增强的抗肿瘤或抗菌活性的基因工程改造巨噬细胞。巨噬细胞吞噬并消化任何外来颗粒,包括用于改造它们的遗传物质,但GMP不具有吞噬活性,这使它们成为更有利的靶点。然而,尽管经过数十年的深入研究,GMP以及造血系统其他干细胞/祖细胞的长期离体扩增尚未实现。

[0059] 造血系统的细胞按层次结构组织,顶部为造血干细胞(HSC),底部为各种成熟血细胞,中间为中间造血干细胞和祖细胞(HSPC),例如GMP。受到HSPC巨大治疗潜力的吸引,在过去的二十年里,许多研究小组尝试开发其离体扩增的培养条件。到目前为止,所有的条件都有一个根本的限制:它们无法连续地、指数地扩增任何类型的HSPC的同质群体。

[0060] 一个独特的挑战是难以区分和分离一种类型的HSPC与另一种类型的HSPC,特别是与其直接上游祖细胞和下游后代。事实上,传统的免疫表型分析无法区分一种HSPC类型与其直接上游祖细胞和下游后代。在克隆水平上,前瞻性纯化的HSC仍然具有高度异质性,包含具有不同基因表达模式和不同细胞功能的细胞。这是预料之中的,因为HSPC跨越了一系列具有相似细胞表面标志物表达但具有异质功能的细胞。在这种异质细胞群中,鉴定可以促进单一干/祖细胞类型扩增的生长因子/细胞因子和小分子在技术上非常具有挑战性。

[0061] 粒细胞、巨噬细胞和树突状细胞起源于骨髓中的共同祖细胞,即粒细胞-巨噬细胞祖细胞(GMP)。尽管先天免疫细胞具有巨大的治疗潜力,但由于目前无法有效扩增和基因修饰这些细胞或其祖细胞GMP,因此它们在临床上的应用受到极大限制。本文提供了用于长期扩增GMP的方法。体外扩增的GMP可以在体外和体内有效分化为成熟且有功能的粒细胞、巨

噬细胞和树突状细胞。这些体外扩增的GMP也可以进行基因修饰。本文公开的用于生产GMP的方法以及由其生产的GMP具有很大的实用性,因为:(1)GMP的长期扩增为基础研究和临床应用提供了无限的同质细胞群;(2)GMP的长期扩增允许通过修饰GMP基因及其表达来研究免疫反应的调节;(3)离体扩增的GMP可用于临床应用,包括移植。例如,离体扩增的GMP可以很容易地用于治疗中性粒细胞减少症。此外,本公开还提供了GMP的基因修饰(例如,敲除SIRP α 和/或PI3K γ 基因;血管紧张素转化酶的过表达),其可以进一步被诱导分化为巨噬细胞和树突状细胞。在本文提出的研究中,这些工程巨噬细胞和树突状细胞表现出增强的抗肿瘤作用,并且可以在临床上用于治疗癌症,作为单一疗法或与其他免疫剂(例如抗PD-1/PD-L1抗体和嵌合抗原)的联合疗法受体T(CAR-T)细胞。GMP也被设计用于生产CAR巨噬细胞。这些CAR-巨噬细胞可用于治疗癌症和其他疾病。

[0062] 巨噬细胞显示出最初被分类为M1或M2极性的不同表型。M1极化巨噬细胞表现出呈递抗原、产生IL-12、IL-23、干扰素 γ (IFN γ) 和活性氧(ROS)的能力。M1巨噬细胞在抗肿瘤和扭曲T细胞方面更有效针对1型辅助性T(Th1)的反应或细胞介导的免疫反应。相反,M2巨噬细胞产生IL-10和TGF- β 并参与组织重塑,具有免疫抑制特性,并促进Th2或抗体介导的免疫反应。肿瘤相关巨噬细胞(TAM)构成肿瘤微环境的主要组成部分。这些细胞是促进肿瘤免疫抑制的主要M2表型巨噬细胞。最近的研究支持它们对抑制T细胞功能的贡献,而使用免疫检查点阻断并不能消除T细胞功能。因此,巨噬细胞已成为对抗癌症的有吸引力的治疗靶标。尽管巨噬细胞具有巨大的治疗潜力,但它们在临床上的应用受到很大限制,因为目前还没有有效的方法来扩增和基因修饰巨噬细胞或其祖细胞GMP。GMP的长期扩增允许进行基因修饰,使这些细胞在治疗上更适用。

[0063] 在一个具体实施方案中,本公开提供了用于长期扩增粒细胞/巨噬细胞祖细胞(GMP)的均匀细胞群的方法,所述粒细胞/巨噬细胞祖细胞(GMP)在经历多次细胞传代和克隆扩增后保持形态不变。在另一个实施方案中,本文公开的方法包括在培养基中培养GMP的步骤,所述培养基包括因子和试剂的组合,所述因子和试剂包括但不限于生长因子(例如,SCF)、B-Raf激酶抑制剂(例如GDC-0879)、抑制Mnk1/2的药剂、抑制PI3K通路的药剂、以及任选的一种或多种血清成分。在另一个实施方案中,GMP的长期培养物经过基因工程改造以表达嵌合抗原受体(CAR)。

[0064] 干细胞是能够分化成其他细胞类型的细胞,包括具有特定、专门功能的细胞(例如,组织特异性细胞、实质细胞及其祖细胞)。祖细胞(即“多能”)是能够产生不同终末分化细胞类型的细胞,以及能够产生各种祖细胞的细胞。产生某些或许多(但不是全部)生物体细胞类型的细胞通常被称为“多能干细胞”,它们能够在成熟生物体体内分化成任何细胞类型,尽管没有重新编程,它们无法去分化成它们来源的细胞。可以理解,“多能”干/祖细胞(例如粒细胞/巨噬细胞祖细胞(GMP))比多能干细胞具有更窄的分化潜能。在衍生成GMP之前,本文公开的干细胞可以通过使用许多基因工程技术进行基因修饰,例如基因治疗、基因编辑系统、同源重组等。这种修饰的干细胞可以提供增强的治疗(例如,参见Nowakowski等人,Acta Neurobiol Exp(Wars)73(1):1-18(2013))。在某些实施方案中,干细胞或祖细胞可被工程化以表达或含有编码嵌合抗原受体(CAR)的多核苷酸。

[0065] 在进一步的实施方案中,本文公开的GMP衍生自干细胞。干细胞可包括胚胎干细胞、诱导多能干细胞、非胚胎(成体)干细胞和脐带血干细胞。可以使用本公开内容的培养基

培养的干细胞类型包括衍生自任何哺乳动物物种的干细胞,包括人、小鼠、大鼠、猴子和猿(参见,例如,Nature448:313-318,2007年7月;和Takahashi等人,Cell 131(5):861-872;其通过引用并入本文)。

[0066] 在一个具体实施方案中,本公开的GMP衍生自诱导多能干细胞(iPS或iPSC)。iPSC是一种多能干细胞,通过选择性基因表达(内源基因)或通过异源基因转染从非多能细胞获得。日本京都大学山中伸弥的团队描述了诱导多能干细胞。Yamanaka等人已经鉴定出在胚胎干细胞中特别活跃的基因,并使用逆转录病毒将这些基因的选择转染到小鼠成纤维细胞中。最终,分离出了产生多能干细胞所必需的四个关键多能性基因:Oct-3/4、SOX2、c-Myc和Klf4。最近的研究表明,这些较少的因素与某些培养条件以及其他因素相结合可以诱导多能干细胞。细胞被分离Fbx15⁺细胞的抗生素选择。该小组与哈佛大学、麻省理工学院和加州大学洛杉矶分校的另外两个独立研究小组一起发表了一项研究,表明小鼠成纤维细胞成功重编程为iPS,甚至产生了可行的嵌合体。

[0067] 在一个替代的实施方案中,本文公开的GMP衍生自胚胎干细胞(ESC)。ESC是衍生自人类胚胎未分化内部细胞的干细胞。胚胎干细胞是多能的,这意味着它们能够生长(即分化)成三个初级胚层的所有衍生物:外胚层、内胚层和中胚层。多能性将胚胎干细胞与成人中发现的成体干细胞区分开来;胚胎干细胞可以产生体内所有细胞类型,而成体干细胞是多能的,只能产生有限数量的细胞类型。此外,在确定的条件下,胚胎干细胞能够无限增殖。这使得胚胎干细胞可以用作研究和再生医学的有用工具,因为它们可以产生无限数量的自身用于继续研究或临床使用。

[0068] 在另一个替代的实施方案中,本文公开的GMP衍生自脐带血干细胞。脐带血是婴儿出生后残留在胎盘和脐带中的血液。脐带血由全血中发现的所有元素组成。它含有红细胞、白细胞、血浆、血小板,还富含造血干细胞。可以使用本领域教导的任何数量的分离方法从脐带血分离造血干细胞,包括Chularojmontri等人,J Med Assoc Thai 92(3):S88-94(2009)中教导的那些。此外,商业试剂盒可用于从人类脐带血中分离CD34⁺细胞(即造血干细胞),来自多个供应商,包括STEMCELL Technologies、Thermo Fisher Scientific、Zen-Bio等。

[0069] 在又一个替代的实施方案中,本文公开的GMP衍生自非胚胎干细胞。非胚胎干细胞可以自我更新,并且可以分化以产生组织或器官的一些或全部主要特化细胞类型。非胚胎干细胞在活生物体中的主要作用是维持和修复它们所在的组织。科学家还使用术语“成体干细胞”代替“非胚胎干细胞”,其中“体细胞”指的是身体细胞(不是生殖细胞、精子或卵子)。已在许多器官和组织中发现非胚胎干细胞,包括脑、骨髓、外周血、血管、骨骼肌、皮肤、牙齿、心脏、肠道、肝脏、卵巢上皮和睾丸。它们被认为存在于每个组织的特定区域(称为“干细胞生态位”)。在活体动物中,非胚胎干细胞可以在需要时长时间分裂,并且可以产生具有特定组织的特征形状和专门结构和功能的成熟细胞类型。

[0070] 在一个具体实施方案中,本文公开的GMP衍生自造血干细胞(HSC)。造血干细胞可以很容易地从脐带血和骨髓中分离出来。此类分离方案是本领域已知的并且通常使用CD34⁺作为用于分离HSC的细胞选择标记(例如,参见Lagasse等人,Nat Med.6:1229-1234(2000))。

[0071] 在本文公开的方法中,GMP可以在包含因子和试剂的组合的培养基中生长和扩增,

所述因子和试剂包括但不限于生长因子(例如SCF)、B-Raf激酶抑制剂(例如GDC-0879)、抑制Mnk1/2的药剂、抑制PI3K通路的药剂、以及任选的一种或多种血清成分。培养基可以是补充有各种其他生物制剂的改良基础培养基。基础培养基是指有效支持培养物中细胞生长的氨基酸、维生素、盐和营养物质的溶液,尽管通常这些化合物不会支持细胞生长,除非补充额外的化合物。营养物包括可以被细胞代谢的碳源(例如,诸如葡萄糖等糖),以及细胞生存所必需的其他化合物。这些是细胞本身无法合成的化合物,因为缺乏编码合成化合物(例如必需氨基酸)所需的蛋白质的一种或多种基因,或者就以下化合物而言:细胞可以合成,因为在其特定的发育状态下,编码必需的生物合成蛋白质的基因没有表达足够的水平。许多基础培养基在哺乳动物细胞培养领域中是已知的,例如Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM)、RPMI 1640、Knockout-DMEM (KO-DMEM) 和DMEM/F12,尽管可以补充任何基础培养基可以使用支持基本上未分化状态的干细胞生长的试剂。本文还发现,培养基包含一定比例的上述基础培养基之一(例如DMEM/F12)与神经基础培养基(或者可选地其他基础培养基,例如IMDM和/或StemSpanTMSFEMII)出乎意料地促进了GMP的增长。具体地,可以使用比例为约5:1至约1:5的上文示例的基础培养基之一(例如,DMEM/F12)与神经基础培养基来培养GMP。在进一步的实施方案中,用于生长GMP的培养基包含约1:1的DMEM/F12与神经基础培养基。

[0072] 如上所述,本文公开的用于生长GMP的培养基可以补充一种或多种另外的试剂,包括但不限于胰岛素、转铁蛋白、BSA组分V、腐胺、亚硒酸钠、DL- α 生育酚和亚麻酸。在某个实施方案中,本文公开的用于生长GMP的培养基补充有胰岛素、转铁蛋白、BSA组分V、腐胺、亚硒酸钠、DL- α 生育酚和亚麻酸。

[0073] 应当理解,需要连续地或定期地(通常每1至3天)用新鲜培养基替换用过的培养基。使用新鲜培养基的优点之一是能够调整条件,使细胞比根据常规技术在饲养细胞上或在条件培养基中培养时更均匀、更快速地扩增。

[0074] 与先前的起始细胞群体相比,可以获得扩增4倍、10倍、20倍、50倍、100倍、1000倍或更多的GMP群体。在合适的条件下,与用于启动培养的GMP相比,扩增群体中的细胞将有50%、70%或更多处于未分化状态。每次传代的扩增程度可以通过将培养结束时收获的细胞的近似数量除以最初接种到培养物中的细胞的大致数量来计算。在生长环境的几何形状受到限制或由于其他原因的情况下,细胞可以任选地传代到类似的生长环境中以进一步扩增。总扩增是每个通道中所有扩增的乘积。当然,没有必要在每次传代时保留所有扩增的细胞。例如,如果细胞在每种培养物中扩增两倍,但每次传代仅保留约50%的细胞,则将携带大约相同数量的细胞。但是,经过四次培养后,据说这些细胞经历了16倍的扩增。可以通过本领域已知的低温冷冻技术来储存细胞。

[0075] 如本文更详细地指出的,GMP可以在包含因子和试剂的组合的培养基中生长和扩增,所述因子和试剂包括但不限于生长因子(例如SCF)、B-Raf激酶抑制剂(例如GDC-0879)、抑制Mnk1/2的药剂、抑制PI3K通路的药剂以及任选的一种或多种血清成分。

[0076] 本公开提供了使用基因工程技术对本文公开的GMP进行基因修饰的方法。特别地,本文显示本发明的GMP易受基因修饰技术的影响,从而允许在基础科学研究和临床治疗应用中使用GMP。因此,扩增和基因修饰的GMP可以很容易地转化为广泛的临床应用。因此,本公开进一步提供了对本文公开的GMP进行基因修饰的方法。此类方法可以包括通过使用基

因编辑系统、同源重组或定点诱变对GMP进行基因工程修饰的步骤。基因编辑系统的具体实例包括锌指核酸酶、TALEN和CRISPR。

[0077] 在某个实施方案中,CRISPR系统是II型CRISPR系统,Cas酶是Cas9,其催化DNA切割。衍生自化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的Cas9或任何密切相关的Cas9的酶促作用在靶位点序列处产生双链断裂,所述靶位点序列与引导序列的20个核苷酸杂交并且具有原型间隔区相邻基序(PAM)序列(实例包括NGG/NRG或PAM,其可以如本文所述确定)跟随靶序列的20个核苷酸。通过Cas9进行位点特异性DNA识别和切割的CRISPR活性由引导序列、与引导序列部分杂交的tracr序列和PAM序列定义。Karginov和Hannon的《The CRISPR system:small RNA-guided Defense in bacteria and archaea》(Mol Cell 2010,1月15日;37(1):7)中描述了CRISPR系统的更多方面。

[0078] 来自化脓性链球菌SF370的II型CRISPR基因座,其包含四个基因Cas9、Cas1、Cas2和Csn1的簇,以及两个非编码RNA元件tracrRNA和重复序列(直接重复)的特征阵列,所述重复序列由非重复序列的短片段(间隔区,每个约30bp)间隔。在该系统中,靶向DNA双链断裂(DSB)分四个连续步骤产生。首先,从CRISPR基因座转录两种非编码RNA,即pre-crRNA阵列和tracrRNA。其次,tracrRNA与pre-crRNA的直接重复序列杂交,然后将其加工成含有单个间隔序列的成熟crRNA。第三,成熟的crRNA:tracrRNA复合物通过crRNA的间隔区和原型间隔区DNA之间的异源双链体形成将Cas9引导至包含原型间隔区和相应PAM的靶序列。最后,Cas9介导PAM靶序列的切割以在原型间隔区内产生DSB。在某个实施方案中,基于RNA聚合酶I11的U6启动子用于驱动tracrRNA的表达。

[0079] 通常,在内源性CRISPR系统的情况下,CRISPR复合物(包括与靶序列杂交并与一种或多种Cas蛋白复合的引导序列)的形成导致靶序列内或附近(例如,在1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50或更多个碱基对内)的一条或两条链的切割。不希望受理论束缚,tracr序列可以包含野生型tracr序列的全部或部分或由其组成(例如,约或多于约20、26、32、45、48、54、63、67、85或更多个野生型tracr序列的核苷酸)也可以形成CRISPR复合物的一部分,例如,通过沿着tracr序列的至少一部分与可操作地连接到引导序列的tracr-mate序列的全部或部分杂交。在一些实施方案中,将驱动CRISPR系统的一种或多种元件表达的一种或多种载体引入宿主细胞(例如,GMP或干细胞),使得CRISPR系统的元件的表达引导CRISPR复合物的形成在一个或多个靶位点。例如,Cas酶、与tracr-mate序列连接的引导序列和tracr序列都可以操作地连接到单独载体上的单独调控元件。或者,由相同或不同调控元件表达的两个或更多个元件可以组合在单个载体中,其中一个或多个另外的载体提供不包括在第一载体中的CRISPR系统的任何组件。组合在单个载体中的CRISPR系统元件可以以任何合适的方向排列,例如一个元件位于相对于第二元件(的“上游”)的5'或相对于第二元件(的“下游”)的3'。一个元件的编码序列可以位于第二元件的编码序列的相同或相反的链上,并且以相同或相反的方向取向。在一些实施方案中,单个启动子驱动编码CRISPR酶和一种或多种引导序列、tracr-mate序列(任选地可操作地连接至引导序列)和嵌入一种或多种内含子序列内的tracr序列的转录物的表达。例如,每个在不同的内含子中,两个或更多个在至少一个内含子中,或全部在单个内含子中)。在一些实施方案中,CRISPR酶、引导序列、tracr-mate序列和tracr序列可操作地连接至同一启动子并由其表达。

[0080] 在一些实施方案中,CRISPR表达载体包含一个或多个插入位点,例如限制性内切

核酸酶识别序列(也称为“克隆位点”)。在一些实施方案中,一个或多个插入位点(例如,约或多于约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个插入位点)位于一个或多个载体的一个或多个序列元素的上游和/或下游。在一些实施方案中,载体包括tracr-mate序列上游的插入位点,并且任选地包括可操作地连接到tracr-mate序列的调节元件的下游,使得在将引导序列插入插入位点并在表达后,引导序列引导CRISPR复合物与真核细胞(例如GMP或干细胞)中的靶序列的序列特异性结合。在一些实施方案中,载体包含两个或更多个插入位点,每个插入位点位于两个tracr-mate序列之间,以便允许在每个位点插入引导序列。在这样的布置中,两个或更多个引导序列可以包括单个引导序列的两个或更多个拷贝、两个或更多个不同的引导序列、或者这些的组合。当使用多个不同的引导序列时,可以使用单个表达构建体将CRISPR活性靶向细胞内多个不同的、相应的靶序列。例如,单个载体可包含约或多于约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或更多个引导序列。在一些实施方案中,可以提供约或多于约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个此类含有引导序列的载体,并且任选地递送至细胞。

[0081] 在一些实施方案中,载体包含可操作地连接至编码CRISPR酶(例如Cas蛋白)的酶编码序列的调控元件。Cas蛋白的非限制性实例包括Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9(也称为Csn1和Csx2)、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Ccl1、Csc2、Cs5、Csn2、Csm2、Csp3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4及其同源物,或其修饰形式。在一些实施方案中,未修饰的CRISPR酶具有DNA切割活性,例如Cas9。在一些实施方案中,CRISPR酶引导一条或两条链在靶序列的位置处切割,例如在靶序列内和/或在靶序列的互补序列内。在一些实施方案中,CRISPR酶引导从靶序列的第一个或最后一个核苷酸起约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、50、100、200、500或更多个碱基对之内的一条链或两条链的切割。在一些实施方案中,载体编码CRISPR酶,其相对于相应的野生型酶发生突变,使得突变的CRISPR酶缺乏切割含有靶序列的靶多核苷酸的一条或两条链的能力。例如,来自化脓性链球菌的Cas9的RuvC I催化结构域中的天冬氨酸取代为丙氨酸(D10A)将Cas9从切割双链的核酸酶转化为内切酶(切割单链)。致使Cas9a内切酶的突变的其他实例包括但不限于H840A、N854A和N863A。作为进一步的实例,Cas9的两个或更多个催化结构域(RuvC I、RuvC II和RuvC III或HNH结构域)可以突变以产生基本上缺乏所有DNA切割活性的突变Cas9。在一些实施方案中,D10A突变与H840A、N854A或N863A突变中的一种或多种组合以产生基本上缺乏所有DNA切割活性的Cas9酶。在一些实施方案中,当突变酶的DNA切割活性相对于其非突变形式小于约25%、10%、5%、1%、0.1%、0.01%或更低时,CRISPR酶被认为基本上缺乏所有DNA切割活性。当酶不是SpCas9时,可以在对应于SpCas9的位置10、762、840、854、863和/或986的任何或所有残基处进行突变(其可以例如通过标准序列比较工具来确定)。具体地,SpCas9中优选以下突变中的任何或全部:D10A、E762A、H840A、N854A、N863A和/或D986A;还设想了任何替换氨基酸的保守取代。其他Cas9中相应位置上的相同突变(或这些突变的保守取代)也已示出。

[0082] 本文还描述了指示的直系同源物。Cas酶可以被识别为Cas9,因为这可以指与来自II型CRISPR系统的具有多个核酸酶结构域的最大核酸酶具有同源性的一般酶类。最优选地,Cas9酶来自或衍生自spCas9或saCas9。衍生的意思是衍生的酶在与野生型酶具有高度序列同源性的意义上很大程度上基于野生型酶,但是其已经以本文所述的某种方式突变

(修饰)。

[0083] 应当理解,术语Cas和CRISPR酶在本文中通常可互换使用,除非另有说明。如上所述,许多残基编号使用本文中的“Cas9”是指来自化脓性链球菌中II型CRISPR基因座的Cas9酶。然而,应当理解,本公开内容包括来自其他微生物物种的更多Cas9,例如SpCas9、SaCas9、StlCas9等。

[0084] 基因编辑系统(例指核酸酶、CRISPR和TALEN)可用于对GMP或干细胞进行基因工程修饰,例如替换或破坏GMP或干细胞中发现的现有基因(敲除)。如本文呈现的实施例所示,本公开的GMP特别容易受到敲除突变的影响。此外,预期可以容易地从本公开的GMP产生额外的敲除,例如SIRP α 基因敲除和/或PI3K γ 基因敲除。或者,可以使用相同的编辑系统(例如CRISPR和TALEN)来改变遗传位点,以包含该遗传位点上未发现的序列信息(敲入突变)。此类修饰可用于创建“获得功能”的GMP。这种修饰的GMP特别适用于模拟疾病状态,例如通过表达与疾病或病症相关的生物分子。

[0085] 在另一个实施方案中,使用载体工程改造GMP细胞。例如,可以使用多种技术将本公开的CAR引入细胞中,包括但不限于使用慢病毒载体、逆转录病毒载体、腺相关病毒载体、杆状病毒载体、睡美人转座子、piggybac转座子或通过mRNA转染,或使用上述方法的组合。可以表达CAR,以便它们处于内源启动子(例如,TCR α 或TCR β 启动子)的控制之下。在一些实施方案中,使用外源启动子(例如CMV启动子)来表达CAR。

[0086] 在一些实施方案中,引入编码CAR的核酸分子包括将包含编码CAR核酸分子的载体转染到如本文所述培养的GMP中,或将编码CAR氨基酸分子转染到如本说明书所述的培养的GMP中。

[0087] 在一些实施方案中,该方法包括:a)提供培养的GMP群体以扩增和维持GMP培养物;b)将包含编码CAR构建体的核酸的载体引入所述GMP中;c)培养转化/转染的GMP。在一些实施方案中,该方法进一步提供将GMP分化成血细胞的骨髓和淋巴谱系,例如单核细胞、巨噬细胞、粒细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、红细胞、巨核细胞至血小板、T细胞、B细胞和自然杀伤细胞。在一个具体实施方案中,本文公开的方法进一步包括通过用包含MCSF的巨噬细胞分化培养基培养GMP将本公开的GMP分化成巨噬细胞。在又一个实施方案中,巨噬细胞分化培养基包含RPMI 1640、10% FBS和20ng/mL的MCSF。在一个替代实施方案中,本文公开的方法还包括将本公开的GMP分化成粒细胞,包括:用包含GCSF的粒细胞分化培养基培养GMP。在又一个实施方案中,粒细胞分化培养基包含RPMI 1640、10% FBS和20ng/mL GCSF。

[0088] 在一个具体实施方案中,本发明提供了一种基因工程改造粒细胞-巨噬细胞祖细胞(GMP)以表达嵌合抗原受体(CAR)的方法,包括:将包含CAR的载体引入GMP中以形成表达CAR的GMP(CAR-GMP);在确定的培养条件下扩增和培养CAR-GMP多次传代,以产生CAR-GMP群体;以及在体外诱导CAR-GMP群体分化成粒细胞、巨噬细胞或树突状细胞,其中粒细胞、巨噬细胞或树突状细胞表达CAR。在进一步的实施方案中,GMP获自干细胞。在又一个实施方案中,干细胞是造血干细胞。在另一个实施方案中,造血干细胞分离自受试者的骨髓。在另一实施方案中,受试者是哺乳动物受试者。在进一步的实施方案中,受试者是人类患者。在又一个实施方案中,CAR包含能够与抗原结合的胞外结构域,跨膜结构域和至少一个胞内结构域,所述胞内结构域被设计成通过增加粒细胞、巨噬细胞和树突状细胞的吞噬作用和/或促

炎细胞因子分泌来增加其抗肿瘤活性。在另一实施方案中,载体是病毒载体。在另一个实施方案中,病毒载体可以是复制的或非复制的,并且可以是腺病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体、麻疹载体、疱疹载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体、弹状病毒载体、呼肠孤病毒载体、塞内加谷病毒载体、痘病毒载体、细小病毒载体或甲病毒载体。在某个实施方案中,病毒载体是慢病毒载体。在另一个实施方案中,确定的培养条件包括在培养基中培养CAR-GMP,所述培养基包括:确定的培养条件包括在培养基中培养CAR-GMP,所述培养基包括:(i)生长因子、(ii)B-Raf激酶抑制剂和(iii)Wnt活化剂和/或GSK-3抑制剂,其中所述CAR-GMP在经历多次细胞传代和/或克隆扩增后基本上保持形态不变。在进一步的实施方案中,培养基包含DMEM/F12和神经基础培养基。在又一个实施方案中,培养基包含DMEM/F12和神经基础培养基的比例为约5:1至约1:5。在另一个实施方案中,所述培养基包含选自胰岛素、转铁蛋白、牛血清白蛋白(BSA)组分V、腐胺、亚硒酸钠、DL- α 生育酚和/或亚麻酸的一种或多种补充剂。在进一步的实施方案中,所述培养基补充有胰岛素、转铁蛋白、BSA组分V、腐胺、亚硒酸钠、DL- α 生育酚和亚麻酸。在某个实施方案中,生长因子是干细胞因子(SCF)。在另一个实施方案中,B-Raf激酶抑制剂选自GDC-0879、PLX4032、GSK2118436、BMS-908662、LGX818、PLX3603、RAF265、R05185426、维拉非尼、PLX8394、SB590885及其任意组合。在又一个实施方案中,Wnt活化剂选自SKL 2001、BML-284、WAY 262611、CAS 853220-52-7、QS11及其任意组合。在进一步的实施方案中,GSK-3抑制剂选自CHIR99021、CHIR98014、SB216763、BIO、A107022、AR-A014418及其任意组合。在另一个实施方案中,确定的培养条件包括在包含以下的培养基中培养CAR-GMP:(i)生长因子;(ii)B-Raf激酶抑制剂;(iii)抑制丝裂原活化激酶相互作用蛋白激酶1和2(Mnk1/2)的药剂;(iv)抑制PI3K通路的药剂;(v)任选地,一种或多种血清成分;其中CAR-GMP在经历多次细胞传代和/或克隆扩增后基本上保持形态不变。在进一步的实施方案中,培养基包含DMEM/F12和神经基础培养基。在又一个实施方案中,培养基包含比例为约5:1至约1:5的DMEM/F12和神经基础培养基。在另一个实施方案中,培养基包含比例为约1:1的DMEM/F12和神经基础培养基。在另一个实施方案中,培养基包含选自胰岛素、转铁蛋白、牛血清白蛋白(BSA)组分V、腐胺、亚硒酸钠、DL- α 生育酚和/或亚麻酸的一种或多种补充剂。在进一步的实施方案中,所述培养基补充有胰岛素、转铁蛋白、BSA组分V、腐胺、亚硒酸钠、DL- α 生育酚和亚麻酸。在又一个实施方案中,生长因子是干细胞因子(SCF)。在另一个实施方案中,B-Raf激酶抑制剂选自GDC-0879、PLX4032、GSK2118436、BMS-908662、LGX818、PLX3603、RAF265、R05185426、维拉非尼、PLX8394、SB590885及其任意组合。在进一步的实施方案中,抑制Mnk1/2的药剂选自CGP-57380、尾孢酰胺、BAY1143269、托米沃塞替布(tomivosertib)、ETC-206、SLV-2436及其任意组合。在另一个实施方案中,抑制PI3K通路的药剂选自3-甲基腺嘌呤、LY294002、阿培利司、渥曼青霉素、槲皮素、hSMG-1抑制剂11j、zandelisib、盐酸阿培利司、艾德拉尼、布帕尼西、库潘尼西、IPI549、达克利司、匹替利司、SAR405、度维利塞、非美诺司他、GDC-0077、PI-103、YM-20163、PF-04691502、塔西利司、奥米利塞、samotolisib、异鼠李素、ZATK474、帕萨利司、瑞格色替、AZD8186、GSK2636771、地司特泰、TG100-115、AS-605240、PI3K-IN-1、dactolisib对甲苯磺酸盐、吉达利塞、TGX-221、厄布利塞、AZD 6482、色雷利塞、比米利塞、apitolisib、 α -亚麻酸、Vps34-PIK-III、PIK-93、Vps34-IN-1、CH5132799、leniolisib、voxtalisib、GSK1059615、sonolisib、PKI-402、PI4KIII β -IN-9、HS-173、BGT226马来酸盐、匹替利司二甲磺酸盐、VS-5584、IC-87114、槲皮

素二水合物、CNX-1351、SF2523、GDC-0326、塞来利司、acalisib、SAR-260301、ZAD-8835、GNE-317、AMG319、那拉霉素、IITZ-01、PI-103盐酸盐、木蝴蝶苷B、pilaralisib、AS-252424、库潘尼西盐酸、AMG 511、地司特泰TFA、PIK-90、泰那利塞、七叶内酯、CGS 15943、GNE-477、PI-3065、A66、AZD3458、人参皂苷Rk1、槐果碱、盐酸布帕利西布、Vps34-IN-2、因他瑞、山金车内酯D、KP372-1、CZC24832、PF-4989216、(R)-杜韦利西布、PQR530、P11δ-IN-1、盐酸厄布利塞、MTX-211、PI3K/mTOR抑制剂-2、LX2343、PF-04979064、多聚皂苷F、蓝萼甲素A、NSC781406、MSC2360844、CAY10505、IPI-3063、TG 100713、BEBT--908、PI-828、brevianamide F、ETP-46321、PIK-294、SRX3207、槐果碱一水合物、AS-604850、去甲基黄豆黄素、SKI V、WYE-687、NVP-QAV-572、GNE-493、CAL-130盐酸盐、GS-9901、BGT226、IHMT-PI3K δ-372、PI3Kα-IN-4、盐酸帕萨利司、PF-06843195、PI3K-IN-6、(S)-PI3Kα-IN-4、PI3K(γ)-IN-8、BAY1082439、CYH33、PI3K γ 抑制剂2、PI3Kδ抑制剂1、PARP/PI3K-IN-1、LAS191954、PI3K-IN-9、CHMFL-PI3Kδ-317、PI3K/HDAC-IN-1、MSC2360844半富马酸盐、PI3K-IN-2、PI3K/mTOR抑制剂-1、PI3Kδ-IN-1、桉树酸、KU-0060648、AZD 6482、WYE-687二盐酸盐、GSK2292767、(R)-厄布利塞、PIK-293、艾德拉尼D5、PIK-75、hirsutenone、槲皮素D5、PIK-108、hSMG-1抑制剂11e、PI3K-IN-10、NVP-BAG956、PI3K γ 抑制剂1、CAL-130、ON 146040、PI3Kδ抑制剂1、PI3Kα/mTOR-IN-1,及其任意组合。在另一个实施方案中,诱导CAR-GMP分化成巨噬细胞,包括:用包含巨噬细胞集落刺激因子(MCSF)的巨噬细胞分化培养基培养CAR-GMP,其中巨噬细胞表达CAR。在又一个实施方案中,巨噬细胞分化培养基包含RPMI 1640、胎牛血清(FBS)和MCSF。在替代实施方案中,该方法还包括将CAR-GMP分化成粒细胞,包括:用包含粒细胞集落刺激因子(GCSF)的粒细胞分化培养基培养GMP,其中粒细胞表达CAR。在进一步的实施方案中,粒细胞分化培养基包含RPMI 1640、FBS和GCSF。

[0089] 在本文提出的研究中,发现离体扩增的GMP可以被工程改造以产生靶向癌症细胞的CAR-巨噬细胞,其具有高效率 and 特异性。因此,本公开提供了对粒细胞-巨噬细胞祖细胞(GMP)进行基因工程改造以表达嵌合抗原受体(CAR)以用于癌症免疫疗法的方法。嵌合抗原受体包含能够结合抗原的胞外结构域、跨膜结构域和至少一个胞内结构域。胞内结构域旨在通过增加粒细胞、巨噬细胞和树突状细胞的吞噬作用和/或促炎细胞因子的分泌来增加其抗肿瘤活性。CAR-GMP被扩增并可在体外或体内诱导分化为粒细胞、巨噬细胞或树突状细胞。CAR-GMP或其衍生物粒细胞、巨噬细胞和树突状细胞被过继转移到患者体内,在患者体内,它们通过浸润肿瘤并杀死靶细胞而发挥强大的免疫效应。

[0090] CAR-GMP可以进一步与一种或多种抗癌剂组合施用以治疗患有癌症的受试者。可与本文公开的CAR-GMP一起使用的抗癌剂的实例包括但不限于烷化剂,例如塞替派和CYTOXAN®环磷酰胺;烷基磺酸盐,例如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡;氮杂环丙烷类,例如苯多巴、卡波醌、美妥杜巴和乌瑞多巴;乙烯亚胺和甲基蜜胺类(methylamelamines),包括六甲蜜胺(altretamine)、三亚乙基蜜胺(triethylenemelamine)、三亚乙基磷酰胺(triethylenephosphoramidate)、三亚乙基硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)和三羟甲基蜜胺(methylamelamines);多聚乙酰(acetogenins)(例如,布拉它辛和布拉它辛酮);喜树碱(包括合成类似物拓扑替康);苔藓抑素;卡利他汀(callystatin);CC-1065(包括其阿多来新、卡折来新(carzelesin)以及比折来新(bizelesin)合成类似物);隐藻素(特别是隐藻素1和隐藻素8);多拉司他汀;多卡霉素(包括合成类似物KW-2189和CB1-TM1);五

加素;水鬼蕉碱(pancratistatin);匍枝珊瑚醇(sarcodictyin);海绵抑素(spongistatin);氮芥,例如苯丁酸氮芥、萘氮芥、胆磷酰胺、雌莫司汀、异环磷酰胺、盐酸氮芥(mechlorethamine)、盐酸甲氧氮芥(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑、新恩比兴(novembichin)、胆固醇苯乙酸氮芥(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、三芥环磷酰胺(trofosfamide)、乌拉莫司汀;亚硝基脲类例如卡莫司汀、氯脲霉素、福泰氮芥、洛莫司汀、尼莫司汀和雷莫司汀;长春花生物碱;表鬼臼毒素;抗生素类例如烯二炔类抗生素(例如卡奇霉素,特别是卡奇霉素 γ 1和卡奇霉素omegall;左旋天冬酰胺酸酶;蒽二酮取代尿素;甲基胍衍生物;达内霉素,包括达内霉素A;双膦酸盐,例如氯磷酸二钠;埃斯培拉霉素;新制癌菌素以及相关的色蛋白、烯二酶、抗生素发色团),阿克拉霉素、放线菌素、安曲霉素、重氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素、卡柔比星、洋红霉素、嗜癌素、色霉素、放线菌素、柔红霉素、地托比星、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸、ADRIAMYCIN®阿霉素(包括吗啉代阿霉素、氰基吗啉代阿霉素、2-吡咯啉代阿霉素和脱氧阿霉素)、表阿霉素、依索比星、伊达比星、马塞罗霉素、丝裂霉素例如丝裂霉素C,霉酚酸,羟硝氨糖环素、橄榄霉素、博莱霉素、泊非霉素、嘌呤霉素、奎拉霉素(quelamycin)、罗多比星、链霉黑素、链脲菌素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星;抗代谢物例如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,例如去甲蝶呤、甲氨蝶呤、蝶呤、曲美曲沙;嘌呤类似物,例如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫代米林、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,例如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮杂尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、多西氟尿苷、依西他滨、氟尿苷;雄激素,例如卡芦睾酮、丙酸曲他雄酮、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯;抗肾上腺药例如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦;叶酸补充剂,例如叶酸;乙酰丙酮;醛磷酰胺糖苷;氨基丙酮酸、恩尿嘧啶;安吡啶;阿莫司汀;比生群;依达曲沙;去磷胺(defofamine);脱羧秋水仙碱;亚胺醌;二氟甲基鸟氨酸;依利醋铵;埃博霉素;依托格鲁;硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;氯尼达明;美登素类化合物例如美登素和安丝菌素;米托胍脲;米托蒽醌;莫派达醇;nitiaerine;喷司他丁;蛋氨酸;吡柔比星;洛索蒽醌;鬼臼酸;2-乙基酰肼;甲基苄肼;PSK®多糖复合物(JHS Natural Products, Eugene, Oreg.);雷佐生;根瘤菌素;裂孢菌素;锗螺胺;细交链孢菌酮酸;三亚胺醌;2,2'-三氯三乙胺;单端孢霉烯族化合物(尤其是T-2毒素,维拉库林A、罗里丁A和安圭丁);聚氨酯;长春地辛;达卡巴嗪;甘露莫司汀;米托布罗醇;米托乳醇;吡波溴曼;加胞嘧啶;阿糖苷("Ara-C");环磷酰胺;噻替哌;紫杉醇,例如TAXOL®紫杉醇(Bristol-Myers Squibb Oncology, 普林斯顿, 新泽西州)、ABRAXANE®Cremophor-free、白蛋白工程紫杉醇纳米颗粒制剂(American Pharmaceutical Partners, 绍姆伯格, 伊利诺伊州)和TAXOTERE®(多烯紫杉醇)(Rhone-Poulenc Rorer, 安东尼, 法国);苯丁酸氮芥;GEMZAR®(吉西他滨);6-巯鸟嘌呤;巯基嘌呤;甲氨蝶呤;铂配位络合物,例如顺铂、奥沙利铂和卡铂;长春花碱;铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌;长春新碱;NAVELBINE®长春瑞滨;诺凡特龙;替尼泊苷;依达曲沙;道诺霉素;氨基蝶呤;希罗达;伊班膦酸钠;伊立替康(例如CPT-11);拓扑异构酶抑制剂RFS2000;二氟甲基鸟氨酸(DFMO);类维生素A,例如视黄酸;卡培他滨;亚叶酸(LV);伊立替康;肾上腺皮质抑制剂;肾上腺皮质类固醇;孕激素;雌激素;雄激素;促性腺激素释放激素类似物;以及任何上述物质的药学上可接受的盐、酸或衍生物。还包括抗癌剂是用于调节或抑制激素对肿瘤的作用的抗激素剂,例如抗雌激素和选择性雌激素受体调节剂(SERM),包括例如他莫昔芬(包括NOLVADEX®他莫昔芬)、雷洛昔芬、屈洛昔芬、4-羟基他莫

昔芬、三氧昔芬、酮昔芬、LY117018、奥那司酮和FARESTON-托瑞米芬；抑制芳香酶的芳香酶抑制剂，芳香酶调节肾上腺中雌激素的产生，例如4(5)-咪唑、氨基鲁米特、MEGASE®甲地孕酮醋酸酯、AROMASL®依西美坦、福美斯坦、法屈唑、RIVISOR®伏罗唑、FEMARA®来曲唑和ARTMIDEX®阿那曲唑；和抗雄激素，例如氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮丙瑞林和戈舍瑞林；以及曲沙西他滨(1,3-二氧戊环核苷胞嘧啶类似物)；反义寡核苷酸，特别是那些抑制与异常细胞增殖有关的信号通路中的基因表达的寡核苷酸，例如PKC- α 、Ralf和H-Ras；核酶，例如VEGF-A表达抑制剂(例如，ANGIOZYME®核酶)和HER2表达抑制剂；疫苗，例如基因治疗疫苗，例如ALLOVECTIN®疫苗、LEUVECTIN®疫苗和VAXID®疫苗；PROLEUKIN®rJL-2；LURTOTECAN®拓扑异构酶1抑制剂；ABARELLX®rmRH；抗体例如曲妥珠单抗以及任何上述物质的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0091] 与其他类型的细胞免疫疗法(例如CAR-T疗法)相比，这种基于GMP的癌症免疫疗法有几个优点。GMP的长期扩增为生产用于免疫治疗的现成CAR巨噬细胞提供了机会。现成的CAR-巨噬细胞临床应用的一个主要障碍是人类白细胞抗原(HLA)兼容性。长期扩增和基因工程GMP的能力允许建立从健康供体和/或脐带血收集的GMP主细胞库，用于生成用于免疫治疗的现成CAR巨噬细胞。或者，可以使用如上所述的基因修饰技术来产生HLA-通用GMP。GMP的长期扩增允许对GMP进行复杂且多重的基因工程，以使这些细胞在治疗上更适用。例如，可以敲除信号调节蛋白- α (SIRP α)和磷脂酰肌醇3-激酶- γ (PI3K γ)基因，以进一步增强GMP衍生的CAR-巨噬细胞的抗肿瘤活性。巨噬细胞中的SIRP α 敲除有望通过破坏肿瘤细胞和巨噬细胞之间的CD47-SIRP α 相互作用来增强其抗肿瘤活性。PI3K γ 在巨噬细胞中大量表达并直接控制巨噬细胞在免疫刺激(M1巨噬细胞)和抑制(M2巨噬细胞)之间的转换。巨噬细胞中PI3K γ 的激活会诱导转录程序，从而促进炎症和肿瘤生长期间的免疫抑制，而巨噬细胞PI3K γ 的失活则会促进免疫刺激转录程序。预期PI3K γ -/-巨噬细胞将通过极化至免疫刺激M1表型而具有增强的抗肿瘤活性。

[0092] 基因工程GMP的过继转移有可能逆转免疫抑制性肿瘤微环境(TME)。肿瘤相关巨噬细胞(TAM)是TME的主要组成部分。实验和临床研究发现，大多数TAM是免疫抑制性M2巨噬细胞，防止肿瘤细胞受到自然杀伤(NK)和T细胞的攻击。这些观察结果表明，需要将TAM与其他免疫疗法结合起来，以实现最大的抗肿瘤效果。一种策略是用具有抗肿瘤活性的免疫刺激性M1巨噬细胞补充免疫抑制性M2巨噬细胞。这可以通过消耗TAM，然后过继转移由PI3K γ -/-GMP或过表达IL-12的GMP产生的免疫刺激性M1巨噬细胞来实现。表达IL-12的单核细胞和巨噬细胞已被证明可以将TME从免疫抑制性转变为免疫刺激性。

[0093] GMP可以被工程改造来产生巨噬细胞，与CAR-T细胞相比，巨噬细胞有可能产生更完整、更强大的免疫反应。巨噬细胞通过分泌炎症细胞因子、吞噬癌细胞，更重要的是，将癌症抗原加工和呈递NK和T细胞来发挥抗肿瘤活性。巨噬细胞是专业的抗原呈递细胞(APC)。巨噬细胞激活的内源性NK和T细胞可能会产生高选择性和高效率的免疫反应。因此，通过基因工程利用GMP/巨噬细胞的力量代表了开发下一代癌症免疫疗法的一种有前途的方法。

[0094] 本公开提供了一种治疗或预防与受试者中疾病相关抗原表达相关的疾病的方法，包括向受试者施用有效量的包含嵌合抗原受体(CAR)的GMP(或其衍生的巨噬细胞、粒细胞等)，其中，CAR包含与疾病相关的疾病相关抗原结合的抗原结合结构域，并且所述疾病相关抗原选自：CD5, CD19; CD123; CD22; CD30; CD171; CS-1(也称为CD2子集1、CRACC、SLAMF7、

CD319和19A24);C型凝集素样分子-1(CLL-1或CLECL1);CD33;表皮生长因子受体变体III(EGFRviii);神经节苷脂G2(GD2);神经节苷脂GD3(aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDG1cp(1-1)Cer);TNF受体家族成员B细胞成熟抗原(BCMA);Tn抗原((Tn-Ag)或(GalNAc α -Ser/Thr));前列腺特异性膜抗原(PSMA);受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1);Fms样酪氨酸激酶3(FLT3);肿瘤相关糖蛋白72(TAG72);CD38;CD44v6;在急性白血病或淋巴瘤上表达但不在造血祖细胞上表达的糖基化CD43表位,在非造血癌症,癌胚抗原(CEA)上表达的糖基化CD43表位;上皮细胞粘附分子(EPCAM);B7H3(CD276);KIT(CD117);白细胞介素-13受体亚基 α -2(IL-13Ra2或CD213A2);间皮素;白细胞介素11受体 α (IL-11Ra);前列腺干细胞抗原(PSCA);蛋白酶丝氨酸21(Testisin或PRSS21);血管内皮生长因子受体2(VEGFR2);Lewis(Y)抗原;CD24;血小板衍生生长因子受体 β (PDGFR β);阶段特异性胚胎抗原-4(SSEA-4);CD20;叶酸受体 α ;受体酪氨酸蛋白激酶ERBB2(Her2/neu);粘蛋白1,细胞表面相关(MUC1);表皮生长因子受体(EGFR);神经细胞粘附分子(NCAM);前列腺酶;前列腺酸性磷酸酶(PAP);延伸因子2突变(ELF2M);Ephrin B2;成纤维细胞活化蛋白 α (FAP);胰岛素样生长因子1受体(IGF-I受体),碳酸酐酶IX(CA1X);蛋白酶体(Prosome,Macropain)亚基, β 型,9(LMP2);糖蛋白100(gp100);由断点簇区(BCR)和Abelson鼠白血病病毒癌基因同源物1(Abl)(BCR-Abl)组成的癌基因融合蛋白;酪氨酸酶;ephrin A型受体2(EphA2);岩藻糖基GM1;唾液酸路易斯粘附分子(sLe);神经节苷脂GM3(aNeu5Ac(2-3)bDC1alp(1-4)bDG1cp(1-1)Cer);转谷氨酰胺酶5(TGS5);高分子量黑素瘤相关抗原(HMWMAA);o-乙酰基-GD2神经节苷脂(OAcGD2);叶酸受体 β ;肿瘤内皮标志物1(TEM1/CD248);肿瘤内皮标志物7相关(TEM7R);claudin 6(CLDN6);促甲状腺激素受体(TSHR);G蛋白偶联受体C类5组,成员D(GPRC5D);X染色体开放阅读框61(CXORF61);CD97;CD179a;间变性淋巴瘤激酶(ALK);聚唾液酸;胎盘特异性1(PLAC1);globoH-糖神经酰胺(globoH)的六糖部分;乳腺分化抗原(NY-BR-1);uroplakin 2(UPK2);甲型肝炎病毒细胞受体1(HAVCR1);肾上腺素受体 β 3(ADRB3);pannexin 3(PANX3);G蛋白偶联受体20(GPR20);淋巴细胞抗原6复合物,基因座K 9(LY6K);嗅觉受体51E2(OR51E2);TCR γ 替代阅读框蛋白(TARP);肾母细胞瘤蛋白(WT1);癌症/睾丸抗原1(NY-ES0-1);癌症/睾丸抗原2(LAGE-1a);黑色素瘤相关抗原1(MAGE-A1);ETS易位变异基因6,位于12p染色体上(ETV6-AML);精子蛋白17(SPA17);X抗原家族,成员1A(XAGE1);血管生成素结合细胞表面受体2(Tie 2);黑色素瘤睾丸抗原-1(MAD-CT-1);黑色素瘤睾丸抗原-2(MAD-CT-2);Fos相关抗原1;肿瘤蛋白p53(p53);p53突变体;前列腺素;幸存;端粒酶;前列腺癌肿瘤抗原-1(PCT A-1或半乳糖凝集素8),T细胞1(MelanA或MART1)识别的黑素瘤抗原;大鼠肉瘤(Ras)突变体;人端粒酶逆转录酶(hTERT);肉瘤易位断点;黑色素瘤凋亡抑制剂(ML-IAP);ERG(跨膜蛋白酶,丝氨酸2(TMPS2)ETS融合基因);N-乙酰氨基葡萄糖基转移酶V(NA17);配对盒蛋白Pax-3(PAX3);雄激素受体;细胞周期蛋白B1;v-myc禽骨髓细胞瘤病毒致癌基因神经母细胞瘤衍生同源物(MYCN);Ras同源家族成员C(RhoC);酪氨酸酶相关蛋白2(TRP-2);细胞色素P450 1B 1(CYP1B 1);CCCTC结合因子(锌指蛋白)样(BORIS或印迹位点调节剂的兄弟),T细胞3(SART3)识别的鳞状细胞癌抗原;配对盒蛋白Pax-5(PAX5);顶体蛋白酶结合蛋白sp32(OY-TES1);淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶(LCK);激酶锚蛋白4(AKAP-4);滑膜肉瘤,X断点2(SSX2);晚期糖基化终产物受体(RAGE-1);renal ubiquitous 1型(RU1);renal ubiquitous 2型(RU2);legumain;人乳头瘤病毒E6(HPV E6);人乳头瘤病

毒E7 (HPV E7); 肠羧酸酯酶; 热休克蛋白70-2突变 (mut hsp70-2); CD79a; CD79b; CD72; 白细胞相关免疫球蛋白样受体1 (LAIR1); IgA受体的Fc片段 (FCAR或CD89); 白细胞免疫球蛋白样受体亚家族A成员2 (LILRA2); CD300分子样家族成员f (CD300LF); C型凝集素结构域家族12成员A (CLEC12A); 骨髓基质细胞抗原2 (BST2); 含有粘蛋白样激素受体样2 (EMR2) 的EGF样模块; 淋巴细胞抗原75 (LY75); 磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 (GPC3); Fc受体样5 (FCRL5); 和免疫球蛋白λ样多肽1 (IGLL1)、MPL、生物素、c-MYC表位标签、CD34、LAMP1、TROP2、GFRα4、CDH17、CDH6、NYBR1、CDH19、CD200R、Slea (CA19.9; 唾液酸Lewis抗原) 岩藻糖基-GM1、PTK7、gpNMB、CDH1-CD324、DLL3、CD276/B7H3、IL11Ra、IL13Ra2、CD179b-IGL11、ALK、TCR γ-δ、NKG2D、CD32 (FCGR2A)、CSPG4-HMW-MAA、Tim1-/HVCR1、CSF2RA (GM-CSFR-α)、TGFβR2、VEGFR2/KDR、Lewis Ag、TCR-β1链、TCR-β2链、TCR γ链、TCRδ链、FITC、亮化激素受体 (LHR)、促卵泡激素受体 (FSHR)、绒毛膜促性腺激素受体 (CGHR)、CCR4、SLAMF6、SLAMF4、HIV1包膜糖蛋白、HTLV1 Tax、CMV pp65、EBV-EBNA3c、甲型流感血凝素 (HA)、GAD、PDL1、鸟苷酸环化酶C (GCC)、KSHV-K8.1蛋白、KSHV gH蛋白、桥粒芯糖蛋白3自身抗体 (Dsg3)、桥粒芯糖蛋白1自身抗体 (Dsg1)、HLA、HLA-A、HLA-A2、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ、HLA-DR、HLA-G、IGE、CD99、RAS G12V、组织因子1 (TF1)、AFP、GPRC5D、claudin18.2 (CLD18A2或CLDN18A.2))、P-糖蛋白、STEAP1、LIV1、NECTIN-4、CRIPTO、GPA33、BST1/CD157、低电导氯离子通道和TNT抗体识别的抗原, 从而治疗受试者或预防受试者的疾病。

[0095] 另一方面, 治疗受试者的方法包括施用有效量的包含嵌合抗原受体 (CAR) 的GMP (或其衍生的巨噬细胞、粒细胞等), 用于减轻或改善过度增殖性疾病或病症 (例如, 癌症) 提供了受试者中的实体瘤、软组织肿瘤、血癌或转移性病变。如本文所用, 术语“癌症”意在包括所有类型的癌性生长或致癌过程、转移组织或恶性转化的细胞、组织或器官, 而不管侵袭性的组织病理学类型或阶段。示例性实体瘤包括各种器官系统的恶性肿瘤, 例如腺癌、肉瘤和癌, 例如影响乳腺、肝脏、肺、脑、淋巴、胃肠道 (例如结肠)、泌尿生殖道 (例如肾、尿路上皮细胞)、前列腺和咽部的那些。腺癌包括癌症, 例如大多数结肠癌、直肠癌、肾细胞癌、肝癌、非小细胞肺癌、小肠癌和食道癌。在一个实施方案中, 癌症是黑色素瘤, 例如晚期黑色素瘤。上述癌症的转移性病变也可使用本公开的方法和组合物可以治疗或预防。可以治疗或预防的其他癌症的实例包括胰腺癌、骨癌、皮肤癌、皮肤或眼内恶性黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、头部或颈部癌症、肛门区域癌症、胃癌、睾丸癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、食道癌、小癌肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、慢性或急性白血病, 包括急性髓性白血病、慢性粒细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、儿童实体瘤、淋巴细胞淋巴瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统 (CNS) 肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管生成、脊柱肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮样癌、鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤、环境诱发的癌症, 包括石棉诱发的癌症, 以及所述癌症的组合。

[0096] 另一方面, 治疗受试者的方法包括施用有效量的包含嵌合抗原受体 (CAR) 的GMP (或其衍生的巨噬细胞、粒细胞等), 用于减轻或改善过度增殖性疾病或病症 (例如, 癌症) 提供了受试者中的实体瘤、软组织肿瘤、血癌或转移性病变。如本文所用, 术语“癌症”意在包括所有类型的癌性生长或致癌过程、转移组织或恶性转化的细胞、组织或器官, 而不管侵袭性的组织病理学类型或阶段。示例性实体瘤包括各种器官系统的恶性肿瘤, 例如腺癌、肉瘤

和癌,例如影响乳腺、肝脏、肺、脑、淋巴、胃肠道(例如结肠)、泌尿生殖道(例如肾、尿路上皮细胞)、前列腺和咽部的那些。腺癌包括癌症,例如大多数结肠癌、直肠癌、肾细胞癌、肝癌、非小细胞肺癌、小肠癌和食道癌。在一个实施方案中,癌症是黑色素瘤,例如晚期黑色素瘤。上述癌症的转移性病变也可使用本公开的方法和组合物可以治疗或预防。可以治疗或预防的其他癌症的实例包括胰腺癌、骨癌、皮肤癌、皮肤或眼内恶性黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、头部或颈部癌症、肛门区域癌症、胃癌、睾丸癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、食道癌、小细胞癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、慢性或急性白血病,包括急性髓性白血病、慢性粒细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、儿童实体瘤、淋巴细胞淋巴瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管生成、脊柱肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮样癌、鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤、环境诱发的癌症,包括石棉诱发的癌症,以及所述癌症的组合。

[0097] 以下实施例旨在说明但不限制本公开。虽然它们是可以使用的那些典型的过程,但是也可以替代地使用本领域技术人员已知的其他过程。

[0098] 实施例

[0099] 小鼠C57BL/6J(JAX库存号#000664),B6.129(Cg)-Gt(ROSA)26Sortm4(ACTB-ttdTomato,-EGFP)Luo/J(mTmG,JAX股票#007676),B6.129S-CybtmlDin/J(gp91phox-,JAX库存号#002365),NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl(NSG,JAX库存号#35557)和B6J.129(Cg)-Gt(ROSA)26Sortm1.1(CAG-cas9*, -EGFP)Fezh/J(CAG-cas9-EGFP,JAX库存号#026179)小鼠购自杰克逊实验室。所有小鼠(雄性和雌性)均在6至12周龄之间使用。所有动物实验均按照南加州大学动物护理和使用委员会批准的方案进行。向动物(每笼 ≤ 5 只小鼠)提供食物和水,并保持正常的12小时光暗循环。NSG小鼠在无菌条件下繁殖。

[0100] CGD小鼠模型。用致死剂量(950cGy)照射gp91phox小鼠(CGD小鼠),并仅通过尾静脉注射移植 5×10^6 tdTomato阳性GMP和 2.5×10^4 gp91phox全骨髓细胞(辅助细胞)或 2.5×10^4 辅助细胞。移植后两天,给小鼠腹膜内注射 2×10^8 金黄色葡萄球菌502A株(ATCC号27217; ATCC)或200B洋葱伯克霍尔德菌(ATCC号25609; ATCC)。通过连续稀释和平板接种确认接种物中的细菌数量。接种细菌后立即通过尾静脉注射PBS或 5×10^6 tdTomato阳性GMP,此后每3天重复注射一次。每天检查小鼠,如果濒死或腹膜攻击后7天,则对其实施安乐死。通过目视检查评估腹腔脓肿的存在。在一些实验中,从尾静脉血样中获得血培养物,并通过平板培养定量菌血症。

[0101] 培养基和试剂。DMEM/F-12(12400024)和Neurobasal(21103049)培养基购自Thermo Fisher Scientific。人胰岛素(91077C-250MG),人全转铁蛋白(T0665-100MG),腐胺(P5780-5G),亚硒酸钠(S9133-1MG),亚油酸(L1012-100MG),DL- α -生育酚(vit E,T3251-5G)和牛血清白蛋白(A8806-5G)购自Sigma。重组鼠SCF(250-03),重组人M-CSF(300-25)和重组人G-CSF(300-23)购自PeproTech。GDC-0879(S1104)和SKL2001(S8302)购自Selleck。

[0102] 为了制备B7培养基,将500ml DMEM/F-12和500ml Neurobasal培养基混合,并补充4mg人胰岛素、20mg人全转铁蛋白,16mg腐胺,12.5 μ g亚硒酸钠,1mg亚油酸,1mg维生素E和2.5g牛血清白蛋白。胰岛素不易溶解;将胰岛素在无菌0.01M HCl中于4 $^{\circ}$ C溶解过夜,产生10mg/mL储备溶液。在-20 $^{\circ}$ C下以1ml等分试样储存。在等分之前将悬浮液充分混合。

[0103] 小鼠GMP衍生、扩增和分化。细胞在37℃在5% CO₂水套培养箱(Thermo Scientific)中。培养。将从C57BL/6J,mTmG或CAG-Cas9-EGFP小鼠分离的骨髓细胞以 2×10^6 个细胞/孔的密度接种到6孔板中,并在补充有50ng/mL SCF,1 μ M GDC-0879和10 μ M SKL2001(SCF/2i)的2mL B7培养基中培养。3-4天后,通过上下移液将细胞解离成单细胞悬液,并以 2×10^6 个细胞/孔的密度重新接种到6孔板中,并在补充有SCF/2i的2mL B7培养基中培养。在SCF/2i中传代2代后,大多数细胞是GMP。GMP通常每3天传代一次。为了诱导分化,将GMP接种到10厘米组织培养皿中,并在含有10% FBS的RPMI-1640培养基中培养,并补充20ng/mL M-CSF(用于巨噬细胞分化)或20ng/mL G-CSF(用于粒细胞分化)。在第7天收获GMP衍生的巨噬细胞(在第4天更换培养基一次),并在第3天收获GMP衍生的粒细胞并用于进一步的实验。

[0104] 为了产生骨髓源性巨噬细胞,将从C57BL/6J小鼠分离的 2×10^6 骨髓细胞接种到10cm组织培养皿中,并在含有10% FBS和20ng/ml M-CSF的RPMI-1640培养基中培养。第4天更换培养基,第7天收获细胞。

[0105] 在移植tdTomato阳性GMP后立即将1mL 2% Bio-Gel P-100(Bio-Rad,1504174)注射到小鼠腹腔中,然后在4天后用无菌PBS进行腹膜灌洗,从而产生腹膜巨噬细胞。从腹膜腔收集的细胞用于荧光成像和流式细胞术分析。

[0106] GMP细胞衍生和扩增。脐带血样本购自StemCyte(Baldwin Park,CA),全骨髓购自Stemcell Technologies(Cat#70502.2),动员外周血购自StemExpress(Cat#MLE4GCSF5)。使用Ficoll-Paque™分离单核细胞PLUS试剂盒(GE Healthcare Life Sciences,17-1440-03)。简而言之,用PBS按1:3比例稀释血液,然后添加到预装有15ml Ficoll-Paque™PLUS的SepMate™-50根管(Stemcell Technologies,85460)中。在室温下以1200g离心20分钟后,收集顶层并在4℃以 $300 \times g$ 离心10分钟。使用ACK裂解缓冲液去除残留的红细胞。细胞立即使用或冷冻保存在液氮中。

[0107] 为了扩增GMP,从脐带血、全骨髓或动员的外周血中分离的单核细胞中分选Lin⁻(CD3、CD14、CD19和CD56)CD34⁺CD38⁺CD45RA⁺GMP。将分选的GMP以 4×10^4 个细胞/孔的密度接种到96孔板中,并在补充有SCF(50ng/mL AF-300-07,PeproTech)、GDC-0879(1mM)的B6培养基中培养。

[0108] 初次接种后五天,通过将GMP以 1×10^5 个细胞/孔的密度重新接种到48孔板中,并在改良的SCF/2i中培养,每3天常规传代一次。用SB590885(0.5mM,S2220,Selleck)替换GDC-0879可以略微提高GMP增殖率。为了制备B6培养基,将500mL DMEM/F-12和500mL Neurobasal培养基混合并补充4mg胰岛素,20mg全转铁蛋白,12.5 μ g亚硒酸钠,1mg亚油酸,1mg维生素E和2.5g血清白蛋白。

[0109] 人类白血病细胞衍生。临床标本取自成人B细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)患者。通过分选人CD45⁺和CD19⁺细胞,从B-ALL患者的骨髓抽吸物中分离出人B-ALL细胞。用GFP慢病毒转导人B-ALL细胞。将细胞移植到NSG小鼠中,并在移植后6周从小鼠脾脏中分选GFP⁺白血病细胞。

[0110] 巨噬细胞吞噬作用的嵌合抗原受体(CarP)。通过将人CD19 scFv或HER2 scFv融合到人CD8铰链和跨膜区域并连接到P2A-RFP(CarP-RFP),小鼠Fcer1g(NM\U 010185.4,aa19-86)-小鼠CD19(NM\U 009844.2,aa491-535)-P2A-RFP(CARFC19-RFP)或小鼠CD3 ζ (NM\U 001113391.2,aa52-164)-小鼠Fcer1g(aa45-86)-小鼠CD19-P2A-RFP(CARFPC19-RFP)来构

建用于小鼠GMP的CarP构建体。。用于GMP的 α CD19 CarP构建体的细胞内结构域是人CD3 ζ (NM\U 198053.2,aa52-164) - 人Fcer1g (NM\U 004106.1,aa45-86) - 人CD19 (NM\U 001178098.1,aa498-544)。所有CarP受体都含有用于膜靶向的N端CD8a信号肽 (MALPVTALLLPLALLLHAARP (序列号:1))。所有受体均经过密码子优化,通过Integrated DNA Technologies合成,并通过限制酶切割和T4连接克隆到修饰的pSin-EF2慢病毒骨架中。

[0111] 电穿孔、慢病毒产生和GMP转导。使用Neon转染系统 (ThermoFisher,MPK5000) 将GFP mRNA (TriLink,L7601-100) 和单引导RNA (Synthego,序列:CCGUCCAGCUCGACCAGGAU (序列号:2)) 电穿孔到GMP中。简而言之,衍生自WT或CAG-Cas9-EGFP小鼠的GMP在SCF/2i中扩增。为了进行转染,收获GMP并用PBS洗涤两次,然后以 1×10^7 /mL的浓度重悬于缓冲液R中。将5 μ g GFP mRNA或sgRNA加入10 μ l WT或CAG-Cas9-EGFP GMP悬浮液中,并以1600V 20ms 1脉冲电穿孔。电穿孔后,将GMP接种并在SCF/2i中培养。48小时后,使用荧光显微镜和流式细胞术检查GFP表达。

[0112] 慢病毒是通过在Lenti-X 293T细胞 (Takara,632180) 中使用lipofectamine LTX和plus transfection reagent (ThermoFisher,15338100) 共转染pSin质粒和编码包装蛋白 (pSPAX和pVSVG) 的载体产生的,接种在10厘米的培养皿中,融合率约为80%。转染后2天收集病毒上清液,0.45mM过滤并用Lenti-X浓缩器 (Takara,631232) 浓缩。浓缩的病毒立即用于转导或冷冻长期储存。对于GMP转导,将慢病毒添加到GMP培养物中,并在32°C下以800g离心1.5小时。将细胞重悬于新鲜培养基中并培养48小时。RFP阳性细胞通过FACS分选。

[0113] 量化和统计分析。使用PRISM程序 (GraphPad) 进行统计分析 (不包括RNA-seq实验)。使用非配对t检验对两组进行比较。为了评估两种以上治疗之间差异的统计显著性,使用双向方差分析。

[0114] SCF/2i GMP的基因工程选择性地靶向癌细胞。巨噬细胞是治疗癌症的一个有吸引力的治疗靶点。巨噬细胞通过吞噬癌细胞并随后将癌抗原呈递给T细胞来发挥其抗癌作用。由于巨噬细胞是难以转染的细胞,因此评估了是否可以对SCF/2i GMP进行基因工程,以及来自这些基因工程GMP的巨噬细胞是否可以用于选择性地靶向癌细胞。首先,证明在SCF/2i GMP中可以实现高效率的基因修饰。接下来,作为原理验证研究,GMP经过基因改造,专门针对人类B细胞淋巴瘤。嵌合抗原受体 (CAR) T细胞疗法已获得美国食品和药物管理局 (FDA) 批准用于治疗B细胞淋巴瘤。最近的研究表明,巨噬细胞介导的癌细胞吞噬作用可以通过改造巨噬细胞来表达吞噬作用的CAR (CarP) 来增强。生成的CarP含有识别人B细胞抗原CD19 (α CD19 scFv) 的胞外单链抗体可变片段 (scFv)、人CD8跨膜结构域以及与人Fc受体的小鼠常见亚基 (FcR γ) 融合的小鼠CD19细胞质结构域。该CarPFc19基因修饰与红色荧光蛋白 (RFP) (CarPFc19-RFP) 连接,以方便监测基因修饰表达。构建了含有胞外 α CD19 scFv抗体片段、CD8跨膜结构域和细胞质RFP但不含细胞质信号传导结构域 (CarP-RFP) 的对照CarP (参见图1C)。

[0115] 通过慢病毒感染将CarPFc19-RFP和CarP-RFP引入SCF/2i GMP后,在SCF/2i中对RFP阳性GMP进行分选和扩增。为了评估吞噬作用,从CarPFc19-RFP和CarP-RFP GMP生成巨噬细胞,并与GFP标记的人B细胞急性淋巴细胞白血病 (B-ALL) 细胞共培养。正如预期的那样,在CarP-RFP组中观察到非常罕见 ($0.21 \pm 0.08\%$) 的吞噬作用,因为CarP-RFP缺乏负责激活吞噬信号的细胞质结构域。相比之下,共培养1小时内, $5.23 \pm 1.32\%$ 的CarPFc19-RFP

巨噬细胞吞噬了GFP阳性人B-ALL细胞(见图S2A)。

[0116] 由于表达CarPFc19-RFP的巨噬细胞的吞噬效率仍然较低,因此测试是否可以通过组合可促进吞噬的信号基序来提高效率。由于CD3 ζ 胞内结构域含有与FcR γ 相同的基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM),并且已被证明能够增强吞噬作用(Isakov,1997),通过添加小鼠CD3 ζ 胞质结构域(CarPzFc19-RFP)来修饰CarPFc19-RFP的胞质结构域(见图1C)。当与人B-ALL细胞共培养时,表达CarPzFc19-RFP的巨噬细胞立即开始吞噬白血病细胞。一些巨噬细胞吞噬多种白血病细胞(参见图1D和图3B)。流式细胞术分析显示 $41.57 \pm 9.26\%$ 的表达CarPzFc19-RFP的巨噬细胞在共培养的1小时内吞噬白血病细胞(参见图1E)。

[0117] 接下来,评估了CarP巨噬细胞靶向癌细胞的特异性。用人表皮生长因子受体2(HER2)scFv替换CarPzFc19 RFP的 α CD19 scFv盒以产生 α HER2-CarP。由 α HER2 CarP GMP产生的 α HER2CarP巨噬细胞与GFP标记的SK-BR-3细胞(一种过表达HER2的人乳腺癌细胞系)共培养。 $30.8 \pm 6.3\%$ α HER2 CarP巨噬细胞在共培养1小时内吞噬SK-BR-3-GFP细胞,而当 α HER2 CarP巨噬细胞与GFP标记的不表达HER2的人B-ALL细胞共培养时,吞噬作用非常罕见(参见图3C-D)。相反,CarPzFc19-RFP巨噬细胞有效地吞噬表达CD19的人B-ALL细胞,但不吞噬CD19阴性的SK-BR-3细胞(参见图3D)。这些结果表明CarP巨噬细胞以高度特异性的方式靶向癌细胞。

[0118] CD47阻断可协同增强CarP巨噬细胞的吞噬作用。先前的研究表明,通过阻断巨噬细胞“不要吃我”信号CD47可以提高巨噬细胞的吞噬效率。测试CarPzFc19和抗CD47抗体是否可以协同作用增强巨噬细胞的吞噬作用。共培养1小时内, $86.2 \pm 13.8\%$ 表达CarPzFc19-RFP的巨噬细胞吞噬了与 $20\mu\text{g/ml}$ 抗CD47抗体预孵育30分钟的人B-ALL细胞,相比之下,相比之下,未预孵育的巨噬细胞吞噬率为 $41.6 \pm 9.3\%$ 。对于表达CarP-RFP的巨噬细胞,当人B-ALL细胞与抗CD47抗体预孵育时,吞噬效率从 $0.21 \pm 0.08\%$ 增加到 $18.57 \pm 2.85\%$ 。更显著的是,共培养24小时后,几乎所有与抗CD47抗体预孵育的人B-ALL细胞都被表达CarPzFc19-RFP的巨噬细胞吞噬和消化。这些数据表明CarP和抗CD47抗体协同作用以改善巨噬细胞对癌细胞的吞噬作用。

[0119] 离体工程扩增了GMP以选择性地靶向癌细胞。为了确定离体扩增的GMP是否可以通过基因工程选择性地吞噬人B-ALL细胞,在改良的SCF/2i中生成并扩增表达CarPzFc19-RFP的GMP。为了评估吞噬作用,将CarPzFc19-RFP GMP产生的巨噬细胞与GFP标记的人B-ALL细胞共培养。流式细胞术分析显示,在共培养1小时内, $28.6 \pm 4.5\%$ 的表达CarPzFc19-RFP的巨噬细胞吞噬白血病细胞,相比之下,表达CarP-RFP的巨噬细胞为 $0.87 \pm 0.2\%$ (参见图2C和图4A)。当人B-ALL细胞与抗CD47抗体预孵育时,CarPzFc19-RFP和CarP-RFP巨噬细胞的吞噬效率分别进一步增加至 $69.5 \pm 5.6\%$ 和 $32.8 \pm 5.5\%$ (参见图2C)。更显著地,共培养36小时后,CarPzFc19-RFP巨噬细胞吞噬并消化几乎所有与抗CD47抗体预温育的人B-ALL细胞(参见图4B)。

[0120] 应当理解,在不脱离本公开的精神和范围的情况下,可以做出各种修改。因此,其他实施例在所附权利要求的范围内。

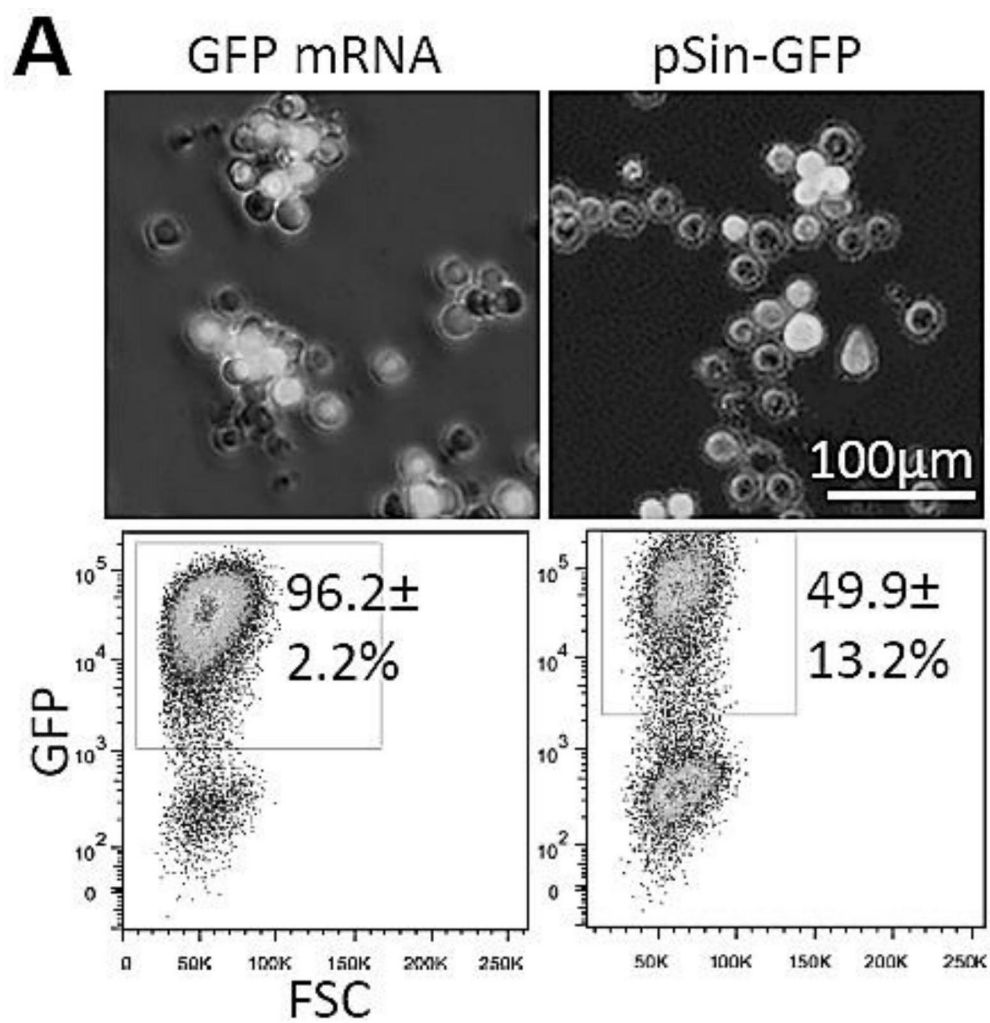


图1A

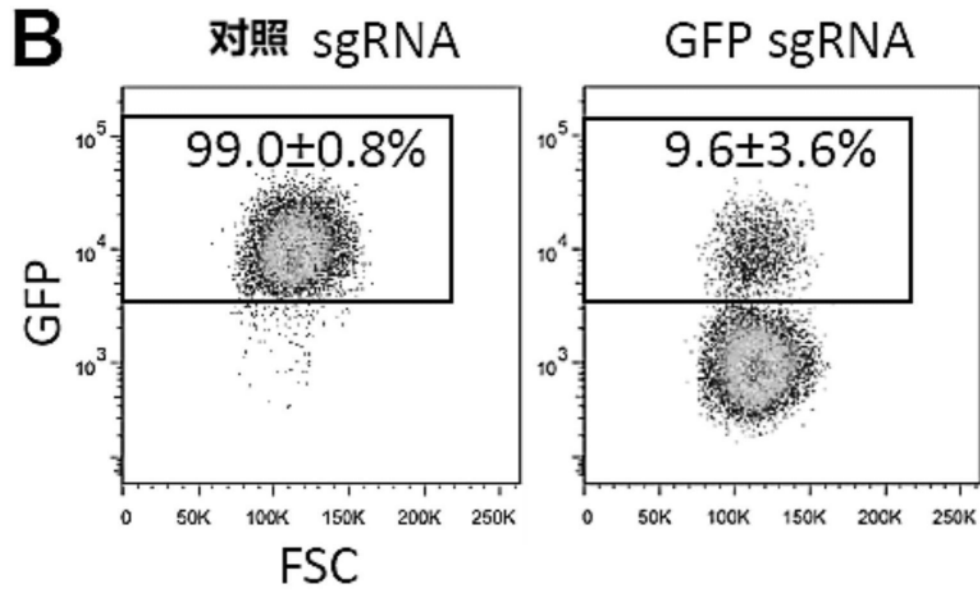


图1B

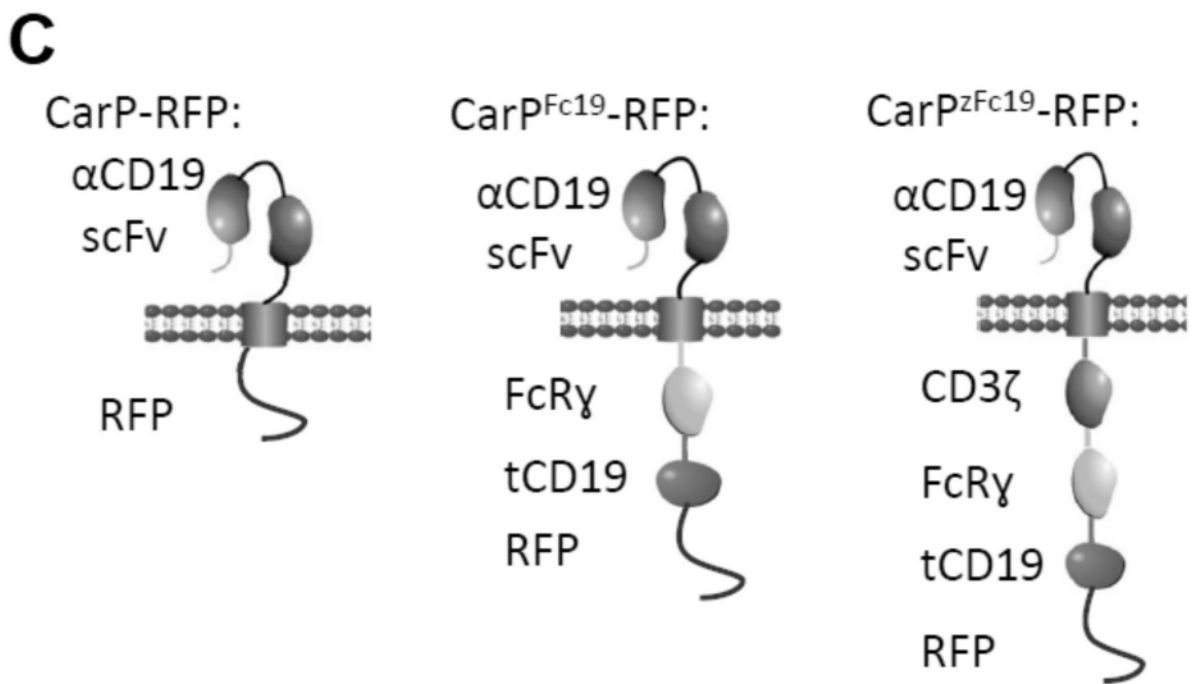


图1C

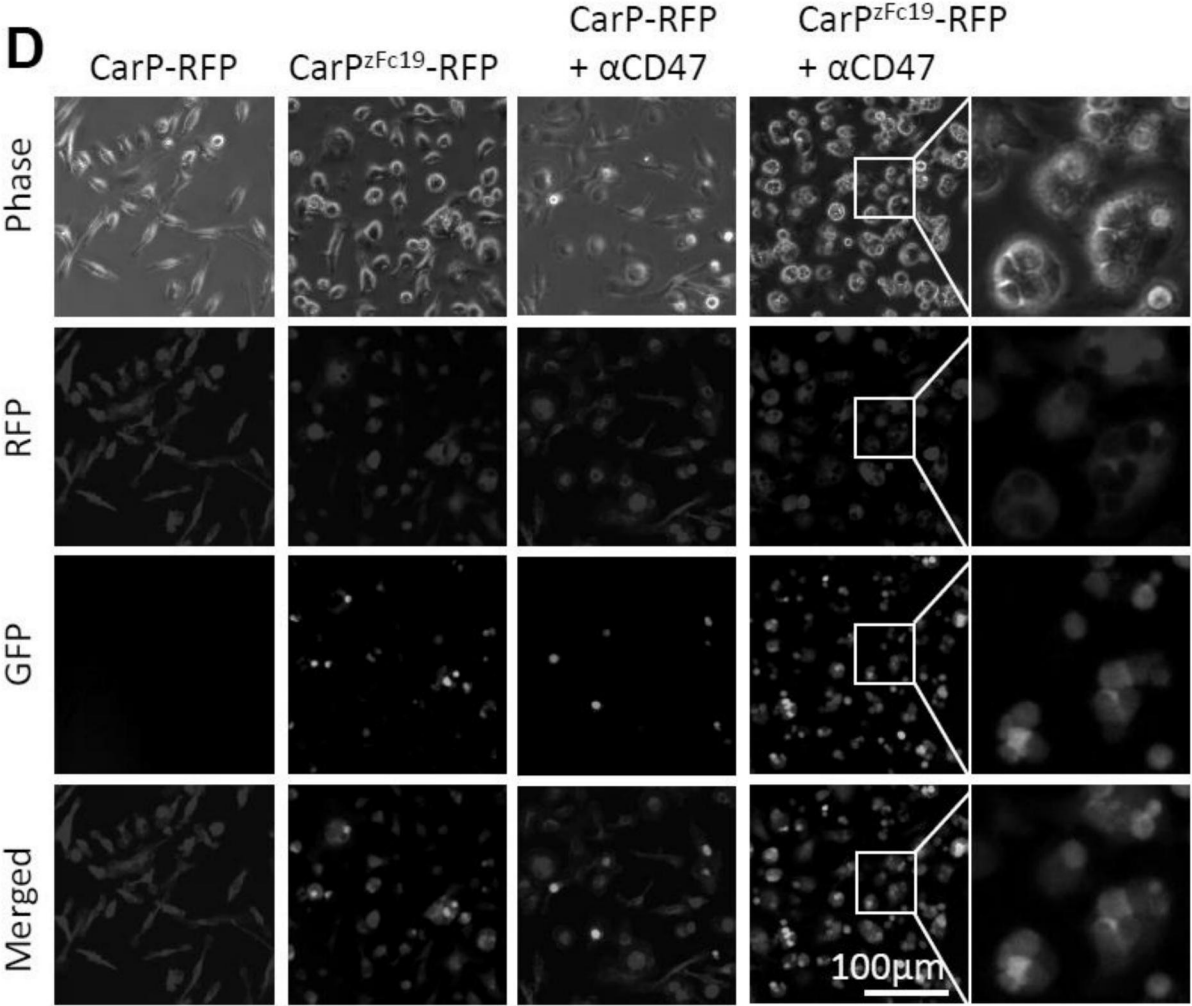


图1D

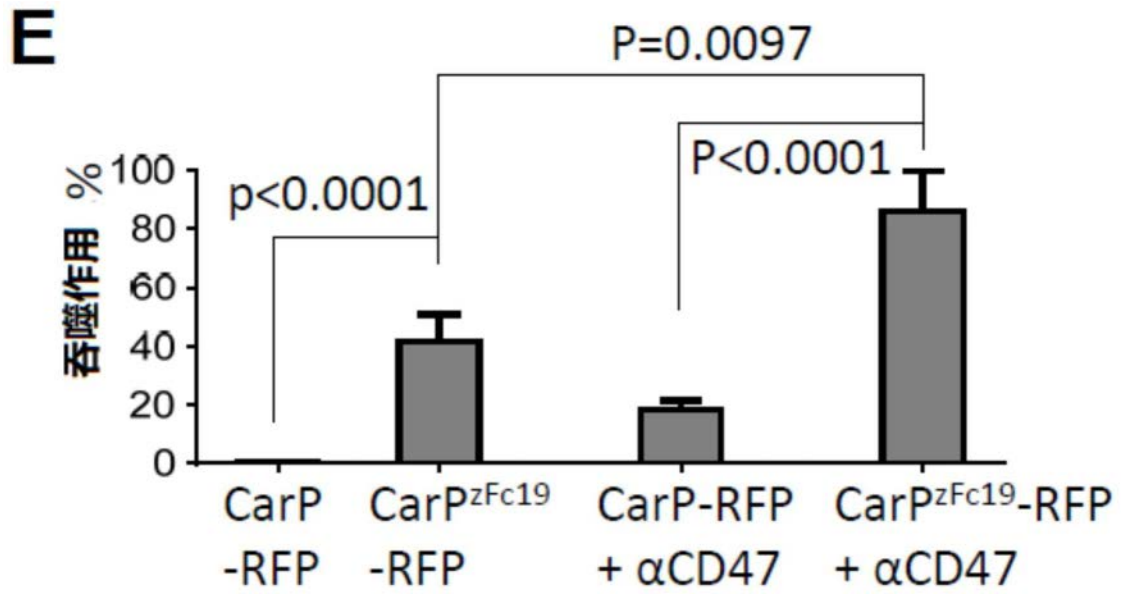


图1E

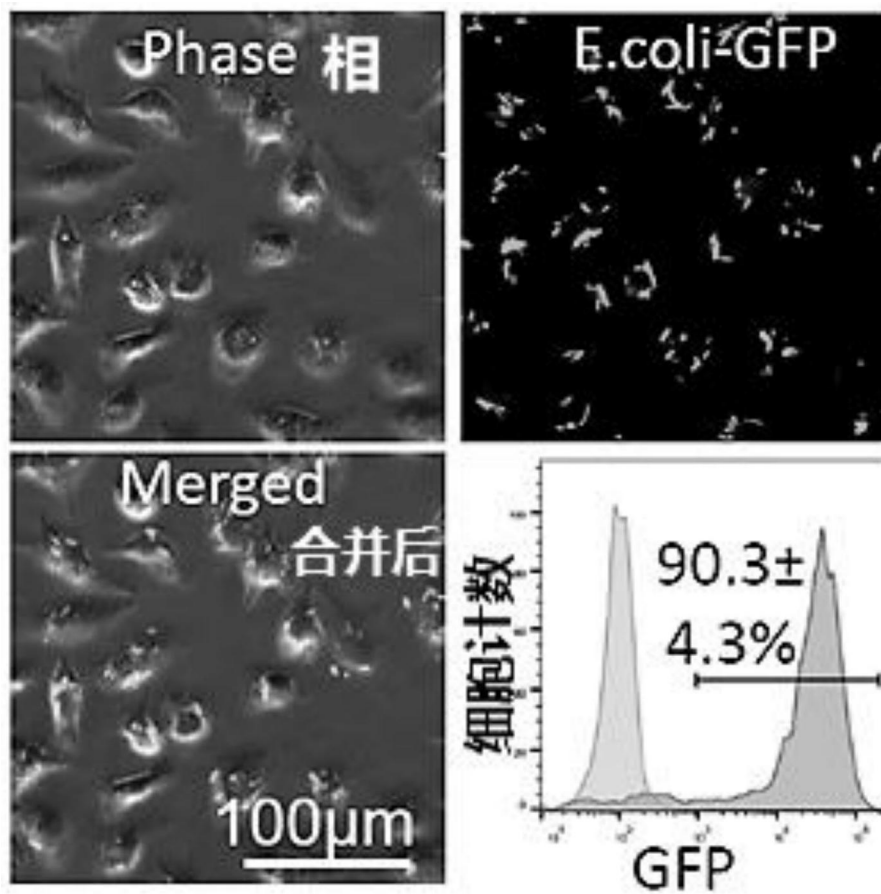


图2A

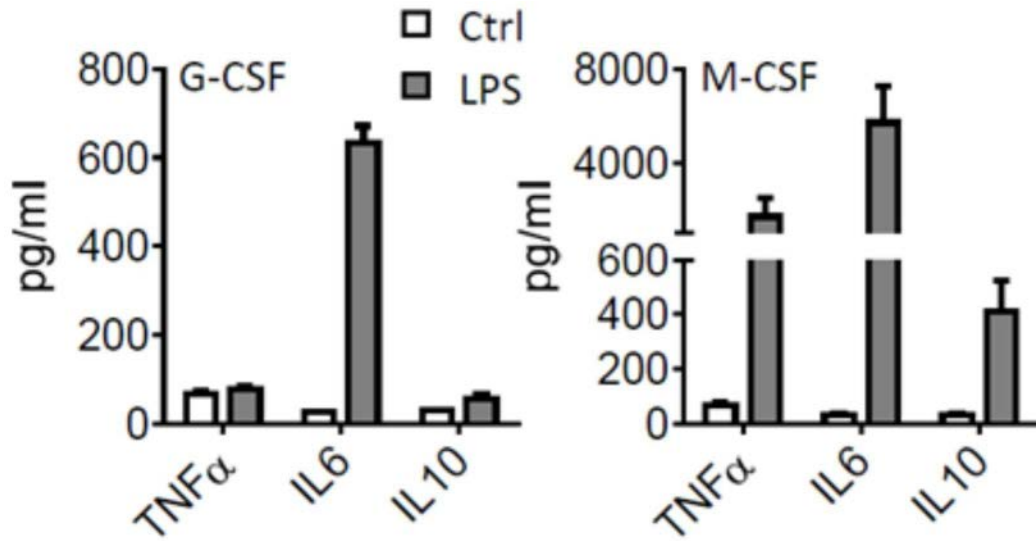


图2B

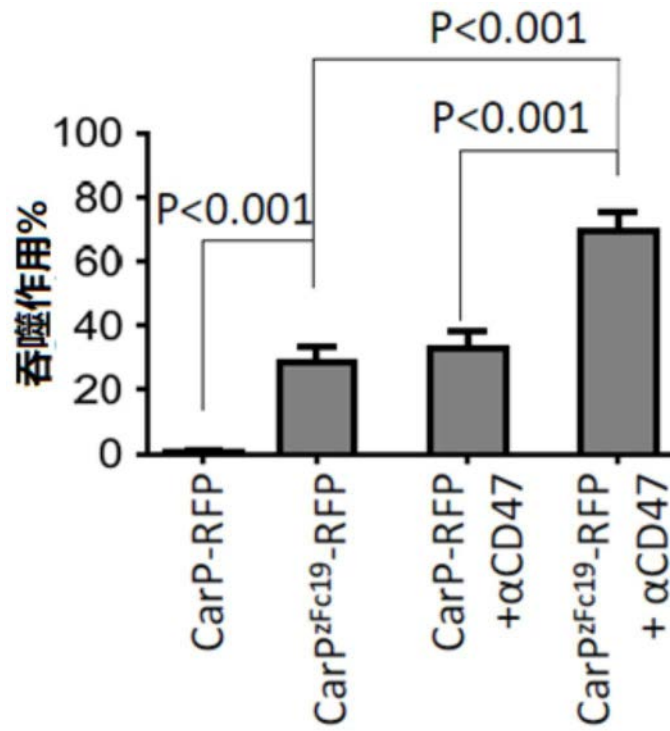


图2C

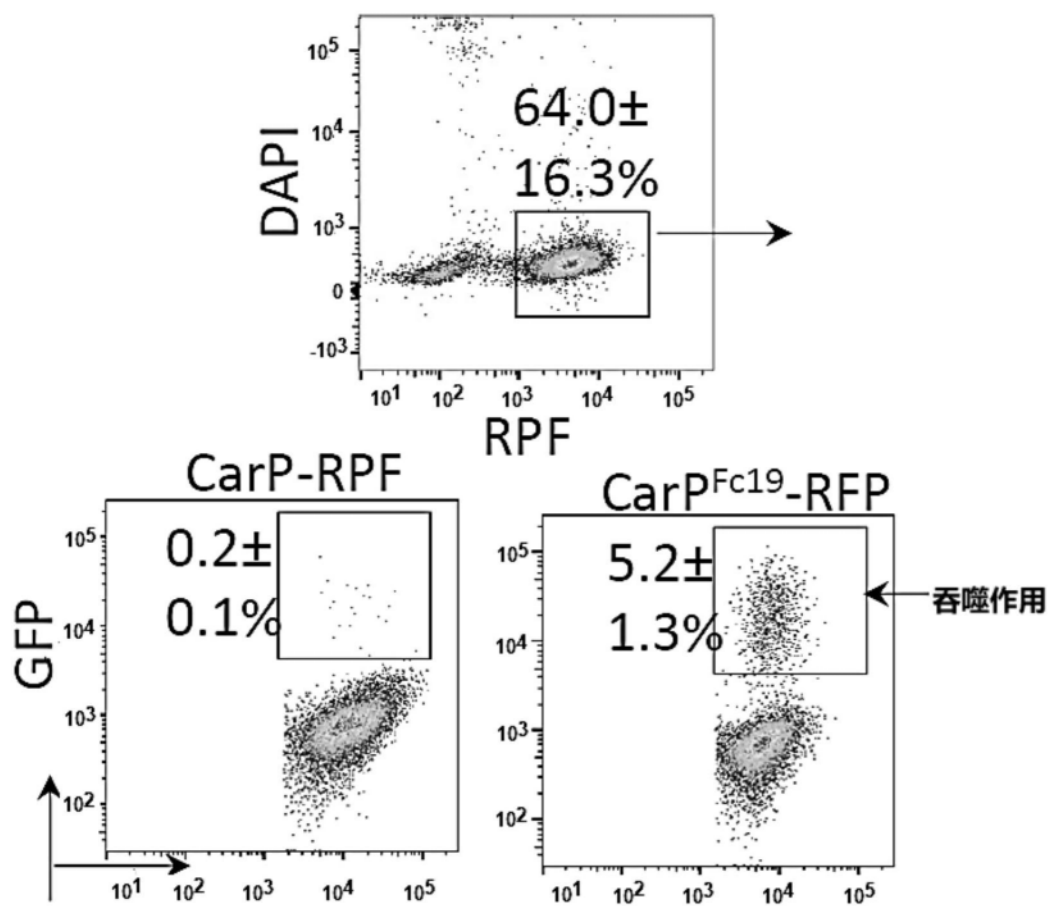


图3A

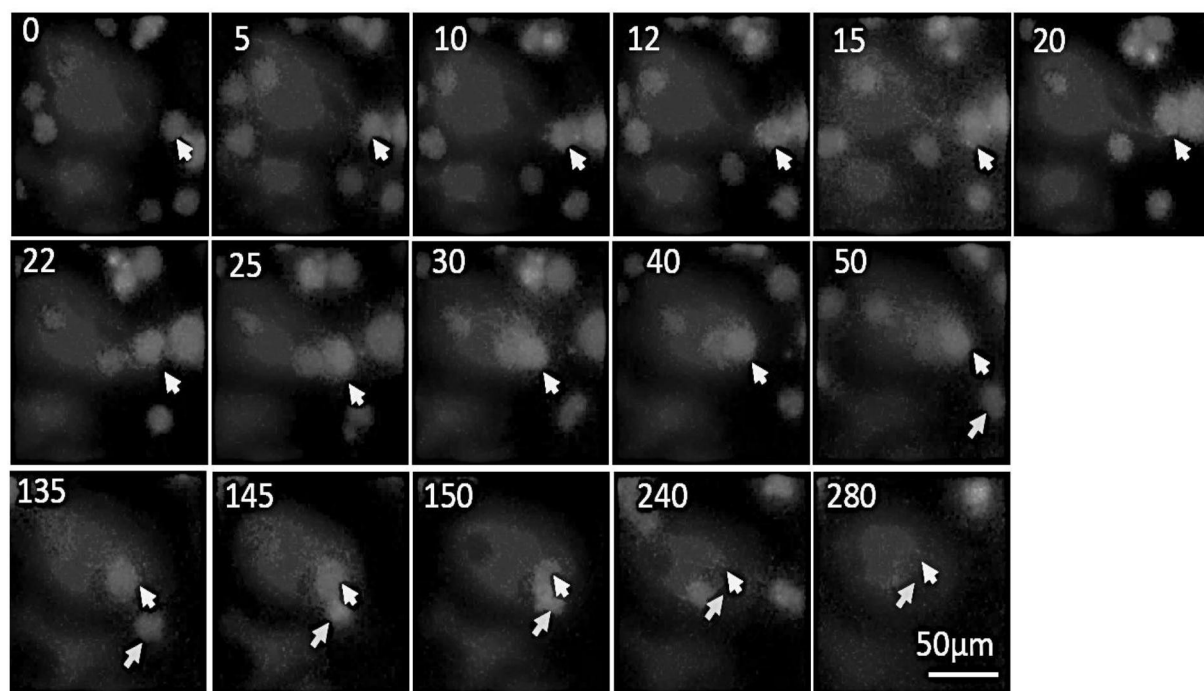


图3B

C

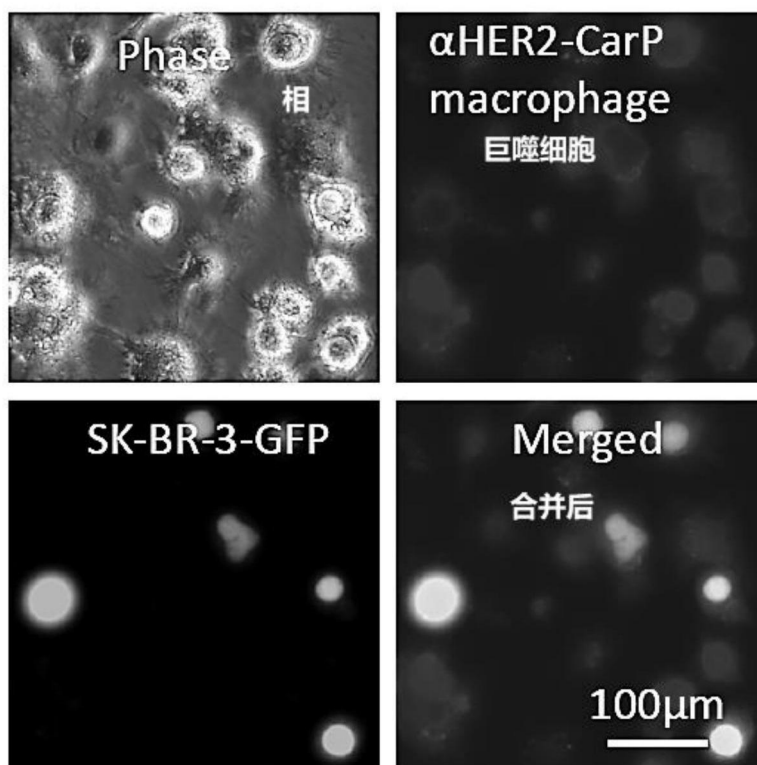


图3C

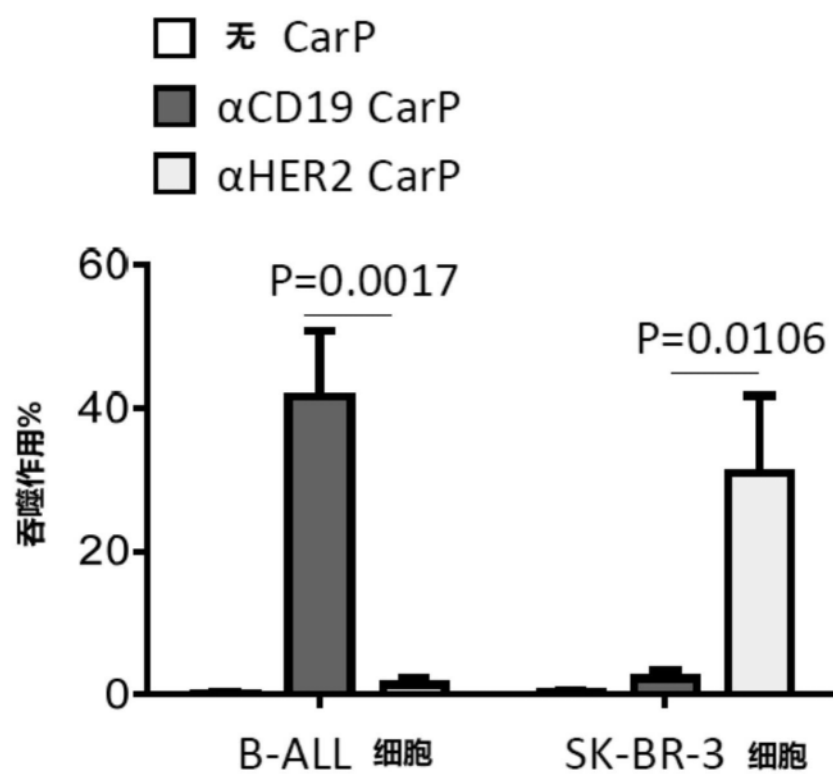
D

图3D

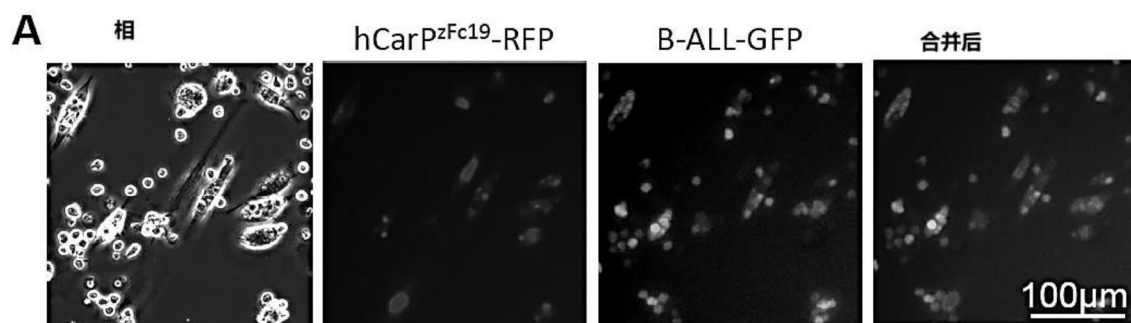


图4A

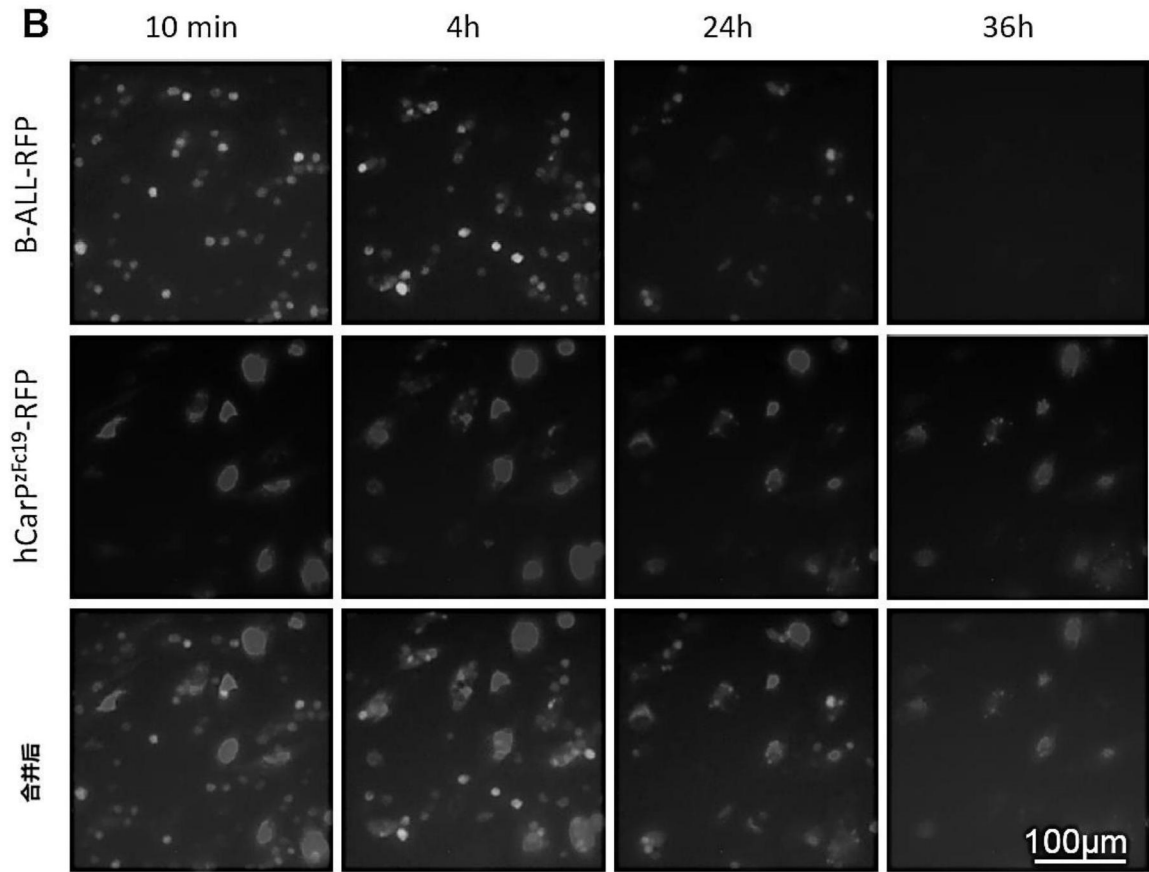


图4B



图5A

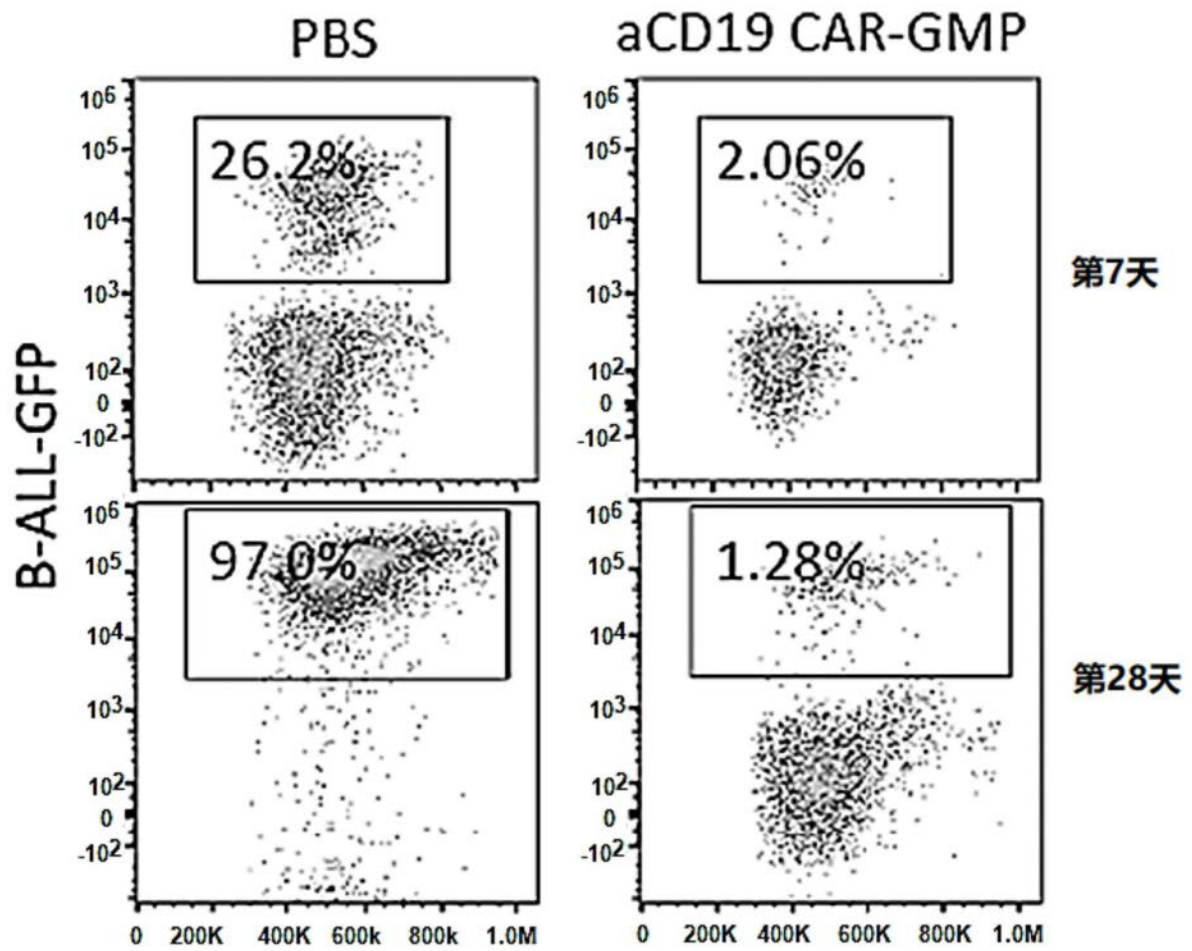


图5B

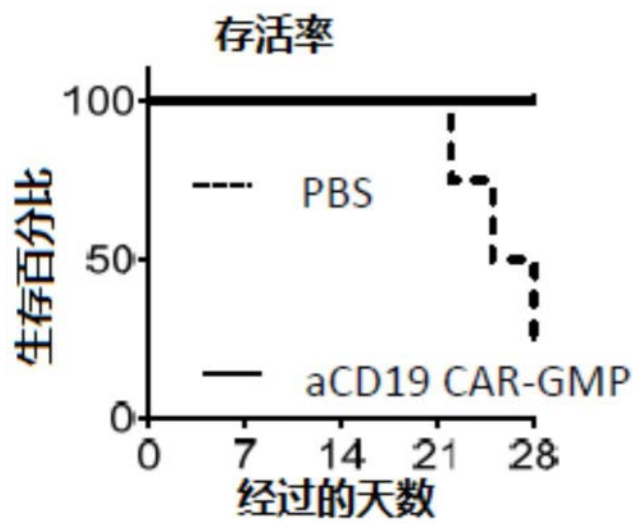


图5C

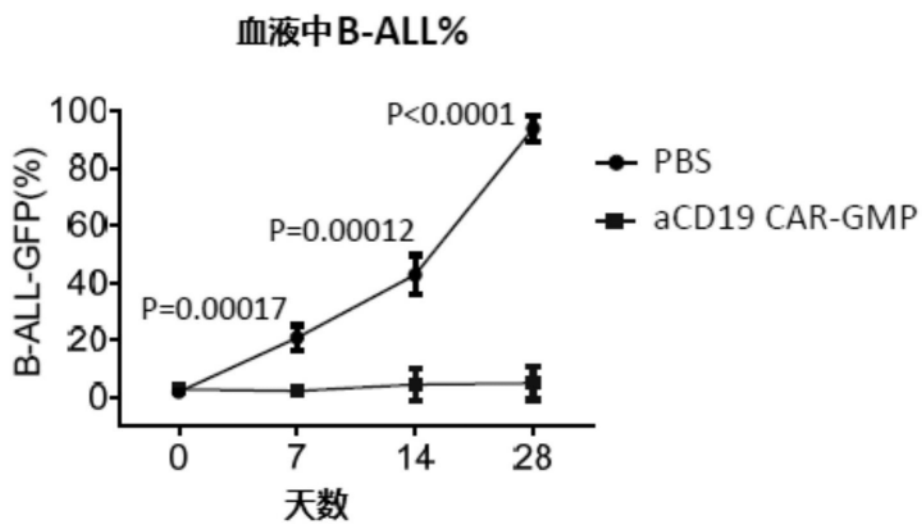


图5D