



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114929865 A

(43) 申请公布日 2022. 08. 19

(21) 申请号 202080091459.0

(22) 申请日 2020.12.07

(30) 优先权数据

62/944,634 2019.12.06 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.06.30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2020/051682 2020.12.07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/108926 EN 2021.06.10

(71) 申请人 大学健康网络

地址 加拿大多伦多

(72) 发明人 张丽 J·B·李 D·瓦西奇

I·卡特里 D·莱 Y·S·L·梁

(74) 专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司

11713

专利代理师 王思琪 王建秀

(51) Int.Cl.

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 35/17 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 5/0783 (2006.01)

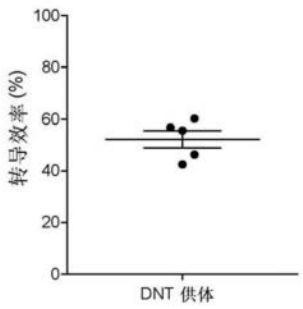
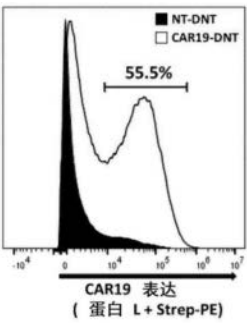
权利要求书4页 说明书20页 附图19页

(54) 发明名称

作为过继细胞疗法的基因工程化双阴性T细胞

(57) 摘要

本公开涉及CD4-CD8-双阴性T (DNT) 细胞的开发和用途,该DNT细胞经基因修饰以例如通过嵌合抗原受体 (CAR) 与一种或多种靶抗原结合从而增强DNT细胞抗癌活性。基因修饰的DNT细胞可以从同种异体健康供体细胞离体产生并扩增,并且用作现成可用型疗法以克服癌症治疗中的同种异体移植抗宿主病 (GvHD) 和/或宿主抗移植排斥反应。



1. 一种治疗有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的已经基因修饰以与一种或多种靶抗原结合的双阴性T (DNT) 细胞群。

2. 有效量的已经基因修饰以与一种或多种靶抗原结合的双阴性T (DNT) 细胞群用于治疗有需要的受试者的癌症的用途。

3. 根据权利要求1所述的方法或权利要求2所述的用途,其中所述DNT细胞经基因修饰以表达编码与所述靶抗原结合的嵌合抗原受体 (CAR) 的核酸分子。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法或用途,其中所述基因修饰的DNT细胞群包含以下细胞或由以下细胞组成:CD4⁻、CD8⁻、CD3⁺、 $\gamma\delta$ -TCR⁺和/或 $\alpha\beta$ -TcR⁺。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法或用途,其中所述基因修饰的DNT细胞群包含自体细胞或由自体细胞组成。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法或用途,其中所述基因修饰的DNT细胞群包含同种异体细胞或由同种异体细胞组成,所述同种异体细胞任选地来自一个或多个健康供体。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法或用途,其中所述基因修饰的DNT细胞群不诱导所述受试者的移植物抗宿主病 (GvHD),或者相对于常规T细胞或基因修饰的常规T细胞,诱导所述受试者的较轻的GvHD。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法或用途,其中所述基因修饰的DNT细胞群防止或抑制所述受试者的宿主抗移植物 (HvG) 排斥反应,任选地,其中相对于常规T细胞或基因修饰的常规T_{conv}细胞,所述DNT细胞群防止或抑制所述受试者的HvG排斥反应。

9. 根据权利要求8所述的方法或用途,其中相比对照CD4⁺CD8⁺CAR⁺ T细胞群,所述基因修饰的DNT细胞群在所述受试者中持续更长,任选地超过2周、3周或4周,和/或基因修饰的同种异体DNT细胞群防止HvG排斥反应而无需另外的免疫抑制疗法。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的方法或用途,其中所述受试者在施用所述基因修饰的DNT细胞群后不接受免疫抑制疗法。

11. 根据权利要求9所述的方法或用途,其中所述受试者在施用所述基因修饰的DNT细胞群后的60天、30天、21天或14天内不接受免疫抑制疗法。

12. 根据权利要求1至10中任一项所述的方法或用途,其中所述受试者在施用所述基因修饰的DNT细胞群之前接受淋巴细胞清除化疗预处理,任选地,其中所述淋巴细胞清除化疗包括氟达拉滨和/或环磷酰胺。

13. 根据权利要求1至11中任一项所述的方法或用途,其中所述基因修饰的DNT细胞群包含用载体、质粒或mRNA转导的DNT细胞,所述载体、质粒或mRNA包含编码一种或多种嵌合抗原受体的核酸序列。

14. 根据权利要求1至12中任一项所述的方法或用途,其中所述基因修饰的DNT细胞是CAR-DNT,并且所述CAR包含细胞外结合结构域、铰链区、跨膜结构域和/或细胞内信号传导结构域。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的方法或用途,其中所述基因修饰的DNT细胞是CAR-DNT,并且所述CAR包含与在所述受试者的癌细胞上表达的靶抗原结合的细胞外抗原结合结构域。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的方法或用途,其中所述靶抗原选自CD4、CD8、

CD33、CD19、CD20、CD123和/或LeY、间皮素、EGFR、ROR1、EpCam、MUC1、HER1/2、MET/HGF、新抗原(驱动子、非驱动子)、MAGE家族和NY-ESO-1。

17. 根据权利要求16所述的方法或用途,其中所述靶抗原是CD4。

18. 根据权利要求16所述的方法或用途,其中所述靶抗原是CD19。

19. 根据权利要求1至18中任一项所述的方法或用途,其中所述基因修饰的DNT群已被冷冻保存。

20. 根据权利要求1至19中任一项所述的方法或用途,其中所述癌症是血液恶性肿瘤,任选地白血病或淋巴瘤。

21. 根据权利要求20所述的方法或用途,其中所述癌症是非霍奇金淋巴瘤、急性成淋巴细胞白血病、急性骨髓性白血病或慢性淋巴细胞白血病。

22. 根据权利要求20所述的方法或用途,其中所述癌症是急性成淋巴细胞白血病。

23. 根据权利要求1至19中任一项所述的方法或用途,其中所述受试者的癌症包括一种或多种实体瘤。

24. 根据权利要求23所述的方法或用途,其中所述癌症是肺癌。

25. 根据权利要求1至24中任一项所述的方法或用途,其中所述癌症是对所述靶抗原呈阴性的复发性癌症,或其中所述受试者既往接受过CAR-T_{conv}细胞群治疗,任选地接受CAR19-T_{conv}细胞群或CAR20-T_{conv}细胞群治疗。

26. 根据权利要求1至25中任一项所述的方法或用途,其中所述癌症表现出所述靶抗原的异质表达。

27. 根据权利要求25所述的方法或用途,其中所述癌症是复发性急性成淋巴细胞白血病,任选地是复发性B细胞急性成淋巴细胞白血病或复发性CD19-B细胞急性成淋巴细胞白血病。

28. 根据权利要求1至27中任一项所述的方法或用途,其中所述基因修饰的DNT细胞是CAR-DNT,并且所述CAR-DNT对所述受试者的癌细胞表现出CAR靶向和CAR非依赖性杀伤。

29. 根据权利要求1至27中任一项所述的方法或用途,其中所述基因修饰的DNT未进行降低或消除选自编码HLA、T细胞受体CD7和CD52的基因的一种或多种基因的表达的基因修饰。

30. 根据权利要求1至29中任一项所述的方法或用途,其中相对于常规T细胞(T_{conv}),任选地CAR-T_{conv}细胞,产生的细胞因子,所述基因修饰的DNT群产生的细胞因子刺激单核细胞产生较低水平的IL-1 β 和/或IL-6。

31. 根据权利要求1至30中任一项所述的方法或用途,其中所述基因修饰的DNT细胞群不诱导所述受试者的重度细胞因子释放综合征(CRS)或者相对于常规T细胞(T_{conv}),任选地CAR-T_{conv}细胞,诱导较少CRS。

32. 一种治疗有需要的受试者的CD4+癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的已经基因修饰以与CD4靶抗原结合的DNT细胞群。

33. 已经基因修饰以与CD4靶抗原结合的DNT细胞群用于治疗有需要的受试者的CD4+癌症的用途。

34. 根据权利要求32所述的方法或权利要求33所述的用途,其中所述基因修饰的DNT细胞是靶向CD4的嵌合抗原受体(CAR)-DNT细胞(CAR4-DNT细胞)。

35. 根据权利要求32至34中任一项所述的方法或用途,其中所述CD4+癌症是T细胞急性成淋巴细胞白血病(T-ALL)、外周T细胞淋巴瘤(PTCL)或皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)。

36. 根据权利要求32至35中任一项所述的方法或用途,其中所述基因修饰的DNT细胞群包含以下细胞或由以下细胞组成:CD4⁻、CD8⁻、CD3⁺、 $\gamma\delta$ -TCR⁺和/或 $\alpha\beta$ -TcR⁺。

37. 根据权利要求32至36中任一项所述的方法或用途,其中所述基因修饰的DNT细胞群不诱导自相残杀或相对于CAR4转导的常规T细胞群诱导较轻的自相残杀。

38. 根据权利要求32至37中任一项所述的方法或用途,其中所述基因修饰的DNT细胞群包含同种异体细胞或由同种异体细胞组成,所述同种异体细胞任选地来自一个或多个健康供体。

39. 根据权利要求31至35中任一项所述的方法或用途,其中所述基因修饰的DNT细胞群不诱导所述受试者的移植物抗宿主病(GvHD),或者相对于常规T细胞或CAR-T_{conv}细胞,诱导所述受试者的较轻的GvHD

40. 根据权利要求32至39中任一项所述的方法或用途,其中所述基因修饰的DNT细胞群防止或抑制所述受试者的宿主抗移植物(HvG)排斥反应,任选地其中相对于常规T细胞或CAR-T_{conv}细胞,所述基因修饰的DNT细胞群防止或抑制所述受试者的HvG排斥反应。

41. 根据权利要求32至40中任一项所述的方法或用途,其中相比对照CAR4 CD4⁺CD8⁺T细胞(CAR4-Tconv细胞)群,所述基因修饰的DNT细胞群在所述受试者中持续更长,任选地超过2周、3周或4周,和/或其中基因修饰的同种异体DNT细胞群防止或抑制HvG排斥反应而无需另外的免疫抑制疗法。

42. 根据权利要求32至41中任一项所述的方法或用途,其中所述受试者在施用所述基因修饰的DNT细胞群后不接受免疫抑制疗法。

43. 根据权利要求42所述的方法或用途,其中所述受试者在施用所述基因修饰的DNT细胞群后的60天、30天、21天或14天内不接受免疫抑制疗法。

44. 根据权利要求32至43中任一项所述的方法或用途,其中所述癌症是复发性癌症,并且所述受试者既往接受过CAR-Tconv细胞群治疗,或者其中所述癌症是对所述CD4靶抗原呈阴性的复发性癌症。

45. 根据权利要求32至44中任一项所述的方法或用途,其中所述癌症表现出所述CD4靶抗原的异质表达。

46. 根据权利要求32至45中任一项所述的方法或用途,其中所述基因修饰的DNT未进行降低或消除选自编码HLA、内源性T细胞受体、CD7和CD52的基因的一种或多种基因的表达的基因修饰。

47. 根据权利要求32至46中任一项所述的方法或用途,其中相对于CAR4-T_{conv}细胞产生的细胞因子,所述基因修饰的DNT群产生的细胞因子刺激单核细胞产生较低水平的IL-1 β 和/或IL-6。

48. 根据权利要求32至47中任一项所述的方法或用途,其中所述基因修饰的DNT细胞群不诱导所述受试者的细胞因子释放综合征(CRS),或者相对于CAR4-T_{conv}细胞,诱导受试者的较轻的CRS。

49. 一种双阴性T(DNT)细胞,所述DNT细胞经基因修饰以与靶抗原结合。

50. 根据权利要求49所述的基因修饰的DNT细胞,其中所述DNT细胞经基因修饰以表达

编码与所述靶抗原结合的嵌合抗原受体 (CAR) 的核酸序列。

51. 根据权利要求49或50所述的基因修饰的DNT细胞, 其中所述DNT细胞是CD4⁻、CD8⁻、CD3⁺、 $\gamma\delta$ -TCR⁺和/或 $\alpha\beta$ -TcR⁺。

52. 根据权利要求49至51中任一项所述的基因修饰的DNT细胞, 其中基因修饰的同种异体DNT细胞群不诱导受试者的移植物抗宿主病 (GvHD), 或者相对于常规T细胞或常规CAR-T细胞 (CAR-T_{conv} 细胞), 诱导受试者的较轻的GvHD。

53. 根据权利要求49至52中任一项所述的基因修饰的DNT细胞, 其中基因修饰的同种异体DNT细胞群防止或抑制所述受试者的宿主抗移植物排斥反应, 任选地其中相对于CAR-T_{conv} 细胞, 所述CAR-DNT细胞群抑制受试者的HvG排斥反应。

54. 根据权利要求49至53中任一项所述的基因修饰的DNT细胞, 其中所述DNT细胞用载体、质粒或mRNA转导, 任选地所述载体、质粒或mRNA包含编码CAR的核酸序列。

55. 根据权利要求49至54中任一项所述的基因修饰的DNT细胞, 其中所述CAR包含细胞外结合结构域、铰链区、跨膜结构域和/或细胞内信号传导结构域。

56. 根据权利要求49至55中任一项所述的基因修饰的DNT细胞, 其中所述CAR包含与在癌细胞上表达的靶抗原结合的细胞外抗原结合结构域。

57. 根据权利要求56所述的基因修饰的DNT细胞, 其中所述DNT细胞经基因修饰以与靶抗原结合, 所述靶抗原选自CD4、CD8、CD33、CD19、CD20、CD123、LeY、间皮素、EGFR、ROR1、EpCam、MUC1、HER1/2、MET/HGF、新抗原 (驱动子、非驱动子)、MAGE家族和NY-ESO-1。

58. 根据权利要求57所述的基因修饰的DNT细胞, 其中所述靶抗原是CD4。

59. 根据权利要求57所述的基因修饰的DNT细胞, 其中所述靶抗原是CD19。

60. 根据权利要求49至59中任一项所述的基因修饰的DNT细胞, 其中所述CAR-DNT细胞已被冷冻保存。

61. 根据权利要求49至60中任一项所述的基因修饰的DNT细胞, 其中所述CAR-DNT未进行降低或消除选自编码HLA、内源性T细胞受体、CD7或CD52的基因的一种或多种基因的表达的基因修饰。

62. 根据权利要求49至61中任一项所述的基因修饰的DNT细胞, 其中相对于CAR-T_{conv} 细胞产生的细胞因子, 所述基因修饰的DNT细胞群产生的细胞因子刺激单核细胞产生较低水平的IL-1 β 和/或IL-6。

63. 根据权利要求49至62中任一项所述的基因修饰的DNT细胞, 其中所述基因修饰的DNT细胞群不诱导细胞因子释放综合征 (CRS), 或者相对于CAR-T_{conv} 细胞, 诱导较轻的CRS。

64. 一种组合物, 所述组合物包含权利要求49至63中任一项所述的基因修饰的DNT细胞群和药学上可接受的运载体。

65. 权利要求64所述的组合物用于治疗有需要的受试者的癌症的用途。

作为过继细胞疗法的基因工程化双阴性T细胞

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于2019年12月6日提交的美国临时专利申请号62/944,634的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本公开涉及细胞疗法,并且更具体地涉及用于过继细胞疗法的双阴性T细胞,其已经基因修饰以与一种或多种靶抗原结合。

背景技术

[0004] 同种异体造血干细胞移植(allo-HSCT)是用于高风险造血系统恶性肿瘤患者的潜在治愈性治疗方法,并且与常规化疗相比具有更高无病生存率(Alatrash和Molldrem, 2009)。供体来源的T细胞介导的抗白血病作用有助于延长患者的生存期,因为T细胞耗竭的移植物导致更高复发率(Alatrash和Molldrem 2010)。然而,由于缺乏合适的供体、治疗的毒性和其他相关并发症,特别是移植物抗宿主病(GvHD),allo-HSCT在临床上的使用受到限制(Shlomchik 2007;Alatrash和Molldrem 2010)。GvHD主要由供体来源的淋巴细胞引起,这些淋巴细胞将患者的正常组织识别为异物(Shlomchik 2007)。随后,可以对正常组织诱导有效免疫应答,导致组织损伤,并在严重情况下可能导致患者死亡(Shlomchik 2007, Alatrash和Molldrem 2010)。因此,GvHD是限制细胞疗法在同种异体环境中使用的主要障碍。

[0005] 尽管如此,allo-HSCT获得的临床益处为科学家探索免疫细胞的抗白血病功能奠定了基础。现在,癌症免疫疗法与化疗、放疗和手术一起被认为是癌症治疗的第四大支柱。特别是,使用T细胞治疗不同血液和实体恶性肿瘤的过继细胞疗法(ACT)的有效性已在多项临床研究中得到证实(Tran,Robbins等人2016;Park,Riviere等人2018)。技术的进步,例如基因修饰免疫细胞以表达嵌合抗原受体(CAR)或转基因T细胞受体,以及已经使用人工抗原呈递细胞来提高ACT的治疗效力(Maus,Thomas等人2002;Kalos和June 2013;Harris和Kranz 2016)。特别是,使用CD19-CAR技术对患者自体T细胞进行基因修饰,在治疗B细胞白血病和淋巴瘤患者方面取得了巨大成功。在难治性或复发性CD19+B细胞急性成淋巴细胞白血病(B-ALL)患者已经实现了高达90%的完全缓解(CR)率,其中常规化疗的预期应答率为约30%(Neelapu,Locke等人2017;Schuster,Svoboda等人2017;Maude,Laetsch等人2018)。CD19-CAR T细胞疗法已获FDA批准用于这些疾病的临床治疗(Ruella和Kenderian 2017, 2018)。然而,随着越来越多的患者接受CAR19-T细胞疗法治疗,当前形式的局限性变得明显。复杂的扩增方法导致产生治疗相关数量的T细胞的不确定性;细胞扩增所需的时间使得疾病进展,这可能导致患者在治疗前死亡;以及对临床批准的机构和训练有素的人员进行细胞扩增的要求导致生产的细胞产品不一致和高生产成本(June,Riddell等人2015;Dwarshuis,Parratt等人2017;Ren,Liu等人2017)。总体上,CAR-T细胞疗法的当前形式成本高而使许多患者无法获得,这使得它们对于广泛的临床转化在实践上具有挑战性。此外,

CD19下调是B-ALL用来逃逸CAR19介导的细胞毒性的常见耐药机制,尽管初始应答率很高,但导致中位生存期相对较短,为12.9个月(Park,Riviere等人,2018)。

[0006] 双阴性T细胞(DN T细胞或DNT)是成熟的外周T淋巴细胞,其表达CD3-TCR复合物,但不表达CD4、CD8或NKT细胞标志物;它们占外周血单核细胞(PBMC)的1~3%(Zhang,Yang等人2000)。已经描述了从健康供体(HD)扩增DNT的方案,并且DNT对各种癌症类型具有显著的抗白血病活性(Lee,Minden等人2017)。DNT通过穿孔素/颗粒酶依赖性途径以剂量依赖性方式诱导对同种异体急性骨髓性白血病(AML) 胚细胞(blast) 的杀伤(Merims,Li等人2011; Lee,Minden等人2017)。已知同种异体免疫细胞的使用具有非期望的同种异体免疫应答的风险,例如GvHD和宿主抗移植物(HvG) 排斥反应。然而,在动物模型中,已经证明,与常规的CD4⁺或CD8⁺ T细胞不同,同种异体小鼠DNT的输注不导致GvHD(Zhang,Yang等人2000; Young,DuTemple等人2003;He,Ma等人2007)。与这些发现一致,在接受allo-HSCT的患者中,GvHD的减少的发病率和严重程度与血液中较高频率的DNT细胞水平相关(McIver,Serio等人2008)。最近,证明从HD外周血(PB) 扩增的同种异体DNT对正常细胞没有毒性,并且将DNT输注至小鼠体内未引起异种GvHD(Lee,Minden等人2017)。此外,同种异体DNT与常规T细胞共存,而未在体外和异种移植模型中产生同种异体反应性,这表明DNT可以防止HvG排斥反应(Lee,Kang等人2019)。此外,DNT以供体非依赖性方式靶向一系列血液学癌症靶标,共同支持将DNT用作现成可用型(off-the-shelf) 细胞疗法。

[0007] 目前的CAR-T产品形式以高度个性化方式生产,CAR-T疗法的广泛适用性受到生产成本高、批次间不一致性和物流复杂的限制,这推动了产生可以以现成可用型方式使用的新CAR-T疗法的需求(Dwarshius,Parrat等人,2017;Torikai,Cooper等人,2016)。最近,探索使用ACT作为现成可用型治疗的研究数量有所增加(Torikai,Cooper等人2016;Ruella,Kenderian等人2017;Poirot,Ren等人2015;Ren等人2017;Qasim等人2017;Boyiadzis等人2017;Sheridan,C.等人2018;Suck等人2016;Zeng,Tang等人2017)。由于现成可用型ACT不具有患者特异性,因此可以将细胞产品预生产成即用型治疗。此外,在集中式设施中对较大规模生产的细胞产品进行验证可以以较低的成本提高产品的一致性和可靠性(Dwarshius,Parrat等人2017;Torikai,Cooper等人2016;Ruella,Kenderian等人2017)。然而,有效的临床适用的现成可用型同种异体T细胞疗法应满足以下标准:1) 在临床依从性条件下可扩增至治疗数量;2) 可以以不受供体限制的方式靶向一系列癌症;3) 不引起移植物抗宿主病(GvHD);4) 能够防止HvG排斥反应;并且5) 可在当前药品生产质量管理规范(current Good Manufacturing Practice,cGMP) 条件下储存而不妨碍其功能(June,Riddell等人2015)。几种不同的方法已经在进行临床前开发以满足这些标准,包括使用不同的细胞产品(Boyiadzis等人2017;Suck等人2016;Zeng,Tang等人2017;Li,Hermanson等人2018;Deniger等人2014);然而,将同种异体免疫细胞产品重复输注至患者体内的可扩展性、持久性或可行性问题仍有待解决(Boyiadzis等人2017)。目前,最成熟的现成可用型CAR转导的细胞产品,称为通用CAR19 T(UCART19) 细胞,涉及使用遗传工具破坏常规T细胞(T_{conv}) 上的 $\alpha\beta$ TCR受体(Poirot,Ren等人2015;Ren等人2017;Qasim等人2017),其为GvHD的主要介质。此外,CD52通过基因编辑被扰乱,使UCART19细胞对强免疫抑制药物阿仑单抗(Alemtuzumab) 产生抗药性,阿仑单抗是广泛耗竭表达CD52的免疫细胞的抗体药物。为了使同种异体UCART19持续存在,患者接受阿仑单抗治疗以延长免疫抑制,但这增加各种免疫抑制不良事

件(例如感染)的风险。尽管目前在临床试验中投入巨资策略(Qasim等人2017;Sheridan, C.2018),但不完全修饰已导致所有接受UCART19细胞治疗的患者出现有害的GvHD(Qasim等人2017)。其他途径提出了一些想法,例如敲除HLA I类以防止HvG排斥反应,但是,由于“缺失自我”信号,这些细胞可能容易发生NK细胞介导的排斥反应。此外,引入另外的基因修饰将降低产品产量并增加CAR-T生产的成本,这已经对CAR-T疗法的广泛应用构成了重大障碍。总之,这突出了依赖另外的基因修饰来开发成可用型CAR-T疗法可能产生的潜在问题和增加的复杂性。

发明内容

[0008] 在一方面,提供了一种双阴性T (DNT) 细胞,其已经基因修饰以与一种或多种靶抗原结合,以及提供了基因修饰的DNT细胞用于治疗癌症的相关用途。靶抗原可以是任何合适的抗原,例如在癌细胞表面富集或优先表达的抗原。在一个实施方案中,提供了一种双阴性T (DNT) 细胞,其已经修饰以表达编码与靶抗原结合的嵌合抗原受体 (CAR) 的核酸分子。在一个实施方案中,DNT细胞是CD4⁻、CD8⁻、CD3⁺、 $\gamma\delta$ -TCR⁺和/或 $\alpha\beta$ -TcR⁺。

[0009] 在一个实施方案中,靶抗原是在癌细胞上表达的抗原。在一个实施方案中,CAR包含与癌细胞上表达的靶抗原结合的细胞外抗原结合结构域。例如,在一个实施方案中,靶抗原选自CD4、CD33、CD19、CD20、CD123、LeY、间皮素、EGFR、ROR1、EpCam、MUC1、HER1/2、MET/HGF、新抗原(驱动子(driver)、非驱动子)、MAGE家族和NY-ESO-1。在一个实施方案中,靶抗原是CD4。在一个实施方案中,靶抗原是CD19。任选地,本文所述的DNT细胞可以经基因修饰以与多种靶抗原结合(例如通过修饰细胞以表达靶向不同抗原的多种CAR)。还提供了本文所述的CAR-DNT细胞用于治疗癌症的方法和用途。

[0010] 如实施例所示,经修饰以表达针对CD19的CAR (CAR19) 的DNT细胞保留了与未进行CAR转导扩增的细胞相当的扩增曲线(expansion profile)。此外,在小鼠异种移植模型中使用CAR19-DNT的体内实验显示,在降低白血病负荷和增加存活率方面的剂量依赖性作用。值得注意的是,CAR19-DNT在靶细胞上没有CD19表达的情况下也被证明表现出细胞毒性作用,证实了它们的双重细胞毒性功能和CAR-DNT靶向癌症的能力,这些癌症在治疗后或治疗期间可表现出靶抗原表达减少。

[0011] 此外,虽然非转导的同种异体DNT和CD19 CAR转导的DNT均已被证明不引起移植物抗宿主病(GvHD),但尚不清楚DNT的CAR修饰是否将导致宿主抗移植反应和/或同种异体反应。值得注意的是,虽然用同种异体抗原预激(primed)的常规CAR T_{conv}细胞引起对同种异体供体细胞强杀伤,但CAR-DNT未对同种异体细胞产生细胞毒性(图7a和7b)。此外,与CAR-T_{conv}细胞共培养的同种异体PBMC产生同种异体反应,因为PBMC杀伤的CAR-T_{conv}细胞数量显著增加,而与CAR-DNT共培养的那些在随后共培养时未对CAR-DNT产生细胞毒性。

[0012] 因此,在一个实施方案中,提供了一种治疗有需要的受试者的癌症的方法,该方法包括向受试者施用有效量的已经基因修饰以与靶抗原结合的双阴性T (DNT) 细胞群。还提供了有效量的已经基因修饰以与靶抗原结合的DNT细胞群用于治疗有需要的受试者的癌症的用途。还提供了一种治疗有需要的受试者的CD4⁺癌症的方法,该方法包括向受试者施用有效量的已经基因修饰以与CD4靶抗原结合的DNT细胞群。还提供了有效量的已经基因修饰以与CD4靶抗原结合的DNT细胞群用于治疗有需要的受试者的CD4⁺癌症的用途。还提供了DNT

细胞或DNT细胞群,其已经基因修饰以与如本文所述的靶抗原结合,以及包含基因修饰的DNT细胞的药物组合物。在一个实施方案中,DNT细胞经基因修饰以表达编码与靶抗原结合的嵌合抗原受体(CAR)的核酸分子。

[0013] 在一个实施方案中,DNT细胞群包含同种异体细胞或由其组成,所述同种异体细胞任选地来自一个或多个健康供体。在一个实施方案中,用于产生基因修饰的DNT细胞的DNT细胞是来自多个供体的合并的DNT细胞。在一个实施方案中,基因修饰的DNT细胞群不诱导受试者的移植物抗宿主病(GvHD)。在一个实施方案中,相对于常规CD4+CD8+ T细胞(T_{conv} 细胞),基因修饰的DNT细胞群诱导受试者较轻的GvHD。在一个实施方案中,基因修饰的DNT细胞群防止或抑制受试者的宿主抗移植物(HvG)排斥反应。在一个实施方案中,相对于CAR- T_{conv} 细胞,基因修饰的DNT细胞群抑制受试者中的HvG排斥反应。在一个实施方案中,基因修饰的DNT细胞群在受试者体内持续超过2周、3周或4周。在一个实施方案中,基因修饰的DNT细胞群在受试者体内持续的时间比对照CD4+CD8+CAR T细胞群更长,任选地超过2周、3周或4周。在一个实施方案中,受试者在施用基因修饰的DNT细胞群后不接受免疫抑制疗法。例如,在一个实施方案中,受试者在施用基因修饰的DNT细胞群后60、30、21或14天内不接受免疫抑制疗法。

[0014] 在一个实施方案中,相对于基因修饰的 T_{conv} 细胞产生的细胞因子,基因修饰的DNT细胞群产生的细胞因子刺激单核细胞产生较低水平的IL-1 β 和/或IL-6。在一个实施方案中,基因修饰的DNT细胞不诱导细胞因子释放综合征(CRS),或者相对于基因修饰的 T_{conv} 细胞,例如CAR- T_{conv} 细胞,诱导较轻的CRS。

[0015] 在一个实施方案中,基因修饰的DNT细胞未进行降低或消除选自编码HLA、内源性T细胞受体、CD7和CD52的基因的一种或多种基因的表达的基因修饰。

[0016] 在一个实施方案中,靶抗原是CD4或CD8。在一个实施方案中,相对于常规T细胞群或CAR4或CAR8转导的常规T细胞群,与例如CD4或CD8靶抗原结合的基因修饰的DNT细胞群不诱导自相残杀(fratricide)或诱导较轻的自相残杀。

[0017] 在一个实施方案中,癌症是血液恶性肿瘤,任选地白血病或淋巴瘤。在一个实施方案中,癌症是非霍奇金淋巴瘤、急性成淋巴细胞白血病、急性骨髓性白血病或慢性淋巴细胞白血病。在一个实施方案中,受试者的癌症包括一种或多种实体瘤。在一个实施方案中,癌症是肺癌。

[0018] 在一个实施方案中,癌症是复发性癌症。在一个实施方案中,癌症是既往接受CAR- T_{conv} (CD4+/CD8+)细胞群治疗的受试者的复发性癌症。在一个实施方案中,癌症表现出靶抗原的异质表达。

[0019] 前述部分仅作为实例提供,并不旨在限制本公开和所附权利要求的范围。根据本发明的权利要求、描述和实施例,本领域普通技术人员将理解与本公开的组合物和方法相关的其他目的和优点。例如,本公开的各个方面和实施方案可以以多种组合使用,本说明书明确设想了所有这些。这些另外的优点、目的和实施方案明确地包括在本公开的范围内。本文用于阐明本公开的背景并且在特定情况下提供关于实践的另外详细信息的出版物和其他材料通过引用并入,并且为了方便在所附的参考文献部分中列出。

附图说明

[0020] 本公开的其他目的、特征和优点将通过以下详细描述结合示出本公开的说明性实施方案的附图变得显而易见,其中:

[0021] 图1a-d显示了离体扩增的DNT细胞可以用CAR转导而不影响它们的表型和扩增曲线。体外扩增的DNT细胞是非转导的(NT-DNT)或是用CAR-19转导的(CAR19-DNT)。1a)直方图显示了对CAR19-DNT(空心)或NT-DNT(实心)的蛋白L和链霉亲和素染色。数字代表表达CAR19的DNT细胞的百分比。点图显示了源自5个不同个体的DNT细胞的CAR19转导率的总结。每个点代表从单个供体扩增的DNT的转导率。水平线代表平均值,并且误差线代表SD。1b)DNT细胞上的CAR19表达随时间保持。CAR19表达水平通过在转导后第0、3、6、9和12天对从两个不同的供体(供体A和供体B)获得的CAR19转导的DNT细胞的蛋白L染色来确定。每条线代表不同的供体。1c)离体扩增的DNT细胞(用或未用CAR19转导)用抗CD3抗体、抗CD4抗体和抗CD8抗体染色。所示图对CD3⁺细胞进行设门。左图显示NT-DNT细胞,右图显示CAR19转导的DNT细胞。1d)来自两个不同供体的NT-DNT和CAR19转导的DNT细胞的扩增曲线。

[0022] 图2a-c显示了CAR19转导在体外增强DNT细胞针对CD19⁺B-ALL靶标的抗白血病活性。2a和2b)由DNT细胞在以指定的效应物与靶标的比(a) 孵育4小时后针对CD19⁺B-ALL细胞系NALM-6或以4比1的效应物与靶标的比(b) 进行2小时针对来自5名患者的CD19⁺原发性B-ALL胚细胞诱导的特异性杀伤百分比。2c)使用ELISA测量与NALM-6共培养后NT-DNT或CAR19-DNT细胞上清液中的IFN γ 水平。

[0023] 图3a-d显示了在异种移植模型中CAR19转导增强DNT细胞针对CD19⁺B-ALL靶标的抗白血病活性。在第0天,经亚致死辐照的NSG小鼠接种 10^6 个NALM-6细胞,然后在第3天静脉内施用各种剂量的CAR19-DNT细胞(每只小鼠 0.33×10^6 、 10^6 或 3×10^6 个细胞)或媒介物对照。在NALM-6注射后3周收集骨髓样品,用抗人CD10染色并通过流式细胞术分析以检测NALM6。3a和3b)NALM-6在NALM-6移植的NSG小鼠的骨髓中的频率。3a.每个点代表每只小鼠的NALM-6移植水平。水平条代表每组的平均值。误差线代表SD。单因素ANOVA用于确定不同处理组之间的差异。3b.流式细胞术点图显示了每只小鼠中NALM-6的频率,对人CD10⁺细胞设门。用媒介物(虚线)或CAR19-DNT(实线;每只小鼠 3×10^6 个细胞)处理的NALM-6移植的NSG小鼠的总体疾病评分(3c)和存活率(3d)。

[0024] 图4a和4b显示了在异种移植模型中CAR19-DNT诱导针对B细胞成淋巴细胞系Daudi的优异的抗白血病活性。在第0天,经亚致死辐照的NSG小鼠接种 10^6 个Daudi细胞,然后在第3天静脉施用NT-DNT细胞或CAR19-DNT细胞(每只小鼠 3×10^6 个细胞)。4a)在Daudi注射后48天收集骨髓样品,用抗人CD20染色并通过流式细胞术分析以检测Daudi。每个点代表每只小鼠的Daudi移植水平。水平条代表每组的平均值。误差线代表SD。Student t检验用于确定不同处理组之间的差异。4b)监测体重变化以评估小鼠的健康状况。每个点代表每组的平均值。误差线代表SEM。双因素ANOVA用于确定两组之间的差异。

[0025] 图5a-c显示了CAR19-DNT可以杀伤CD19低NALM-6。5a)CD10⁺NALM-6细胞(获自未处理或CAR19-DNT细胞处理的小鼠的骨髓)的CD19表达水平的代表性流式图(flow plot)。数字代表CD19⁺细胞的频率。5b)在人道终点测量的NALM-6的CD19表达水平的总结。水平条代表每组的平均值,误差条代表SD。每个点代表单只小鼠。5c)NALM-6细胞从CAR19-DNT处理(CD19低)或BPS处理(CD19高)的小鼠中分离,并在2小时体外细胞毒性测定中用作CAR19-

DNT的靶标。观察到相当程度的细胞毒性。

[0026] 图6a-c显示了在体外和体内CAR19-DNT和CAR19- T_{conv} 细胞对CD19+B-ALL具有相当程度的抗白血病活性。6a) CAR19-DNT或CAR19- T_{conv} 细胞与NALM-6以指定的效应物与靶标的比共培养2小时。通过流式细胞术测定对NALM-6的特异性杀伤%。6b) 使用ELISA测量与NALM-6共培养的CAR19-DNT或CAR19- T_{conv} 细胞的上清液中的IFN γ 水平。6c) NALM-6移植NSG小鼠骨髓中NALM-6的频率,通过流式细胞术测定,所述小鼠在NALM-6注射后三周静脉内施用 3×10^6 个CAR19-DNT细胞、CAR- T_{conv} 细胞或媒介物对照。

[0027] 图7a-c显示了CAR19-DNT可以通过内源性抗白血病活性靶向CD19阴性白血病细胞。7a) 使用针对CD19阴性白血病细胞系OCI-AML3的CAR19-DNT (实心符号) 或NT-DNT (空心符号) 以指定的效应物与靶标的比进行的两小时体外杀伤测定表明,CAR19-DNT和NT-DNT均可以以相当的水平有效地靶向OCI-AML3。7b) 以不同的效应物与靶标的比,使用DNT细胞对获自患者(其疾病在CD19-CAR T_{conv} 细胞治疗后复发)的原发性CD19阴性B-ALL样品进行两小时体外杀伤测定,证明DNT针对抗CAR19- T_{conv} 细胞的胚细胞的内源性白血病活性。7c) 在以所示的各种DNT与Daudi比进行的两小时体外杀伤试验中,NT-DNT或CAR19-DNT均用作针对CD19+淋巴瘤细胞系Daudi的效应物。

[0028] 图8a-b显示了NT-DNT (而非NT- T_{conv} 细胞) 介导针对B-ALL的抗白血病活性,并且对于 T_{conv} 和DNT细胞,CAR19-转导增强针对B-ALL的抗白血病活性。NALM-6细胞在有或没有NT-DNT细胞、CAR19-DNT细胞、NT- T_{conv} 细胞或CAR19- T_{conv} 细胞的情况下,以1:1的DNT与NALM-6的比培养2或5天。确定有活力的NALM-6细胞的绝对数量(8a)和频率的相对变化(8b)。图8c显示了每个共培养物在不同天数的代表性流式细胞术图。单因素(a)或双因素(b)ANOVA检验用于统计分析。ns-不显著;* $p < 0.05$;** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$ 。

[0029] 图9a-f显示了CAR19-DNT未发展针对正常细胞的同种异体反应性并且通过对同种异体效应物进行抑制来防止它们的同种异体反应性。9a. 混合淋巴细胞反应(MLR)示意图。CAR19-DNT和CAR19- T_{conv} 细胞用经辐照的同种异体PBMC预激6天,然后在随后的过夜杀伤测定中用作针对相同同种异体PBMC的效应细胞。9b. CAR19- T_{conv} 细胞(实心符号)和CAR19-DNT细胞(空心符号)介导的同种异体PBMC在各种效应物与靶标的比下的特异性杀伤百分比,表明CAR19- T_{conv} 细胞诱导同种异体反应性,而CAR19-DNT细胞未诱导。9c) MLR示意图,进行MLR以确定CAR19- T_{conv} 细胞或CAR19-DNT是否诱导同种异体PBMC的同种异体反应性。同种异体PBMC与源自另一供体的CAR19- T_{conv} 细胞或CAR19-DNT细胞共培养6天。随后,分离PBMC来源的CD8+ T细胞并将其用作针对相同 T_{conv} 细胞或DNT细胞(用于在过夜体外杀伤测定中共培养)的效应细胞。9d) 如上所述,在与CD8+ T细胞培养过夜后剩余的有活力的CAR- T_{conv} 细胞(实心符号)或CAR-DNT细胞(空心符号)的数量减少,表明与同种异体CAR19- T_{conv} 细胞相比,同种异体CAR19-DNT未诱导受体免疫细胞的同种异体反应,并且可以逃避宿主抗移植物排斥反应。9e) 用于确定在存在或不存在DNT的情况下,用同种异体抗原预激时同种异体反应性CD8+ T细胞的细胞毒性程度的测定的示意图。在有或没有DNT的情况下,同种异体CD8+ T细胞用经辐照的PBMC刺激4天。随后,将CD8+ T细胞分离并用作针对最初用于刺激的相同同种异体细胞的效应细胞。9f) 显示了在存在或不存在DNT的情况下,以各种效应物与靶标的比刺激的CD8+ T细胞对同种异体细胞的杀伤百分比。*** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$ 。

[0030] 图10a-d显示了CAR19-DNT细胞未诱导异种GvHD,而CAR19- T_{conv} 细胞诱导异种

GvHD。幼稚 (Naïve) -NSG小鼠输注 5×10^6 个CAR19转导的DNT或 T_{conv} 细胞。监测每组小鼠体重的变化 (10a)、总体疾病评分 (10b) 和存活率。10d) 对小鼠肝组织进行苏木精和伊红染色以评估组织损伤。使用双因素ANOVA检验 (10a和10b) 和Mantel-Cox检验 (10c) 进行统计分析。n.s.-不显著; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001

[0031] 图11a-b显示了CAR19-DNT可导致较轻的重度CRS。NT或CAR19转导的DNT细胞或 T_{conv} 细胞与NALM-6以5:1 (a) 或1:1 (b) 的T细胞与NALM-6的比培养3天。将从共培养物收集的上清液添加到巨噬细胞样细胞系mTHP-1 (11a) 或单核细胞系THP-1 (11b) 中。在培养3-4天后通过ELISA测定分别由mTHP-1和THP-1产生的IL-1 β (11a) 和IL-6 (11b) 水平。双因素ANOVA检验用于统计分析。ns-不显著; *p<0.05; ****p<0.0001。

[0032] 图12显示了CAR19-DNT细胞在冷冻保存后保留它们的抗肿瘤功能。使用新鲜和冷冻保存的CAR19-DNT对NALM-6进行两小时的体外杀伤测定, 显示冷冻保存超过一个月的CAR19-DNT在介导针对CD19+白血病靶标的细胞毒性方面与新鲜扩增的CAR19-DNT一样有效。

[0033] 图13显示了CAR19转导的DNT细胞以供体非依赖性方式发挥作用。从三个不同供体获得的DNT细胞用CAR19转导并用作针对NALM-6的效应细胞。每条线代表来自每个供体的CAR19转导的DNT细胞, 并显示出对NALM-6细胞的相似杀伤 (供体A、B或C)

[0034] 图14a-c显示了DNT可以用作靶向一系列癌症类型的平台。14a) 使用NT-DNT或CAR19-DNT作为针对肺癌细胞系A549 (野生型或经基因修饰以表达CD19) 的效应物, 以1比1的效应物与癌细胞比过夜进行体外杀伤测定。14b) 使用针对肺癌细胞系H460 (野生型或经基因修饰以表达CD19) 的NT-DNT或CAR19-DNT, 以1比1的效应物与癌细胞比过夜进行体外杀伤测定。14c) NT-DNT或CAR19-DNT与A549或CD19转导的A549以1:1的DNT:A549的比例共培养1天。使用ELISA测定从每组收集的上清液中的IFN γ 。

[0035] 图15a-b显示了CAR-DNT细胞在肺癌异种移植模型中对实体瘤表现出有效的抗肿瘤活性。在第0天, NSG小鼠皮下输注CD19转导的A549 (10^6 /小鼠)。在第11天, 每只小鼠未处理或通过肿瘤周围注射接受 5×10^6 个NT-DNT或CAR-19+DNT细胞处理。随后, 每2-4天监测肿瘤体积 (15a), 并在研究结束时测量肿瘤重量 (15b)。双因素 (15a) 或单因素 (15b) ANOVA检验用于统计分析。n.s.-不显著; *p<0.05; ***p<0.001; ****p<0.0001。

[0036] 图16a-b显示了DNT可以用作不同CAR构建体的平台以靶向表达CD19以外的抗原的癌症, 并且可以用作CD4-CAR的运载体 (carrier) 而不自相残杀。16a) NT-DNT (●) 和CD4-CAR (CAR4; ■) 转导的DNT的相当的扩增倍数支持在生产CAR4-DNT中缺乏自相残杀。16b) 在两小时杀伤测定中, NT-DNT (实心符号) 或用CD4-CAR转导的DNT (CAR4-DNT; 空心符号) 以所示的各种DNT与CCRF-CEM的比, 用作针对CD4+急性淋巴细胞性T细胞白血病系CCRF-CEM的效应细胞。

[0037] 图17a-b显示了CAR4-DNT的抗原特异性。健康供体来源的同种异体PBMC与NT或空病毒载体 (EV) 或者CAR19或CAR4转导的DNT细胞以不同的DNT:PBMC比共培养。针对CD4+ (17a) 和CD4- (17b) PBMC测量特异性杀伤%。双因素ANOVA检验用于统计分析。n.s.-不显著; ****p<0.0001。

[0038] 图18a-b显示了DNT可以用CAR4转导而无自相残杀。 T_{conv} 细胞或DNT细胞未转导或用CAR4转导。在转导后第4天, 比较相对数量 (18a) 和CD4+、CD8+和CD4-CD8- (DN; 18b) 的组

成。

具体实施方式

[0039] 以下是详细描述,其被提供以助于本领域技术人员实施本公开。除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语均具有与本公开所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。本文描述中使用的术语仅用于描述特定实施方案,并不旨在限制本公开。本文提及的所有出版物、专利申请、专利、附图和其他参考文献均通过引用以其整体明确并入本文。

[0040] I. 定义

[0041] 如本文所用,除非另有说明,否则以下术语可以具有下文赋予它们的含义。然而,应当理解,本领域普通技术人员已知或理解的其他含义也是可能的,并且在本公开的范围内。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献均通过引用以其全文并入。在冲突的情况下,以本说明书(包括定义)为准。此外,材料、方法和实施例仅是说明性的而不是限制性的。

[0042] 如本文所用,术语“癌症”是指由可扩散到邻近组织或身体其他部位的细胞的不受控制的异常生长引起的一组疾病中的一种。癌细胞可以形成实体瘤,其中癌细胞聚集在一起,或者作为分散的细胞存在,如在血液学癌症(例如白血病)中。

[0043] 术语“癌细胞”是指以不受控制的异常生长和侵入另一组织的能力为特征的细胞或源自这种细胞的细胞。癌细胞包括,例如,从癌症患者获得的原发性癌细胞或源自这种细胞的细胞系。在一个实施方案中,癌细胞是血液学癌细胞,例如白血病细胞或淋巴瘤细胞。

[0044] 如本文所用,术语“受试者”包括动物界的所有成员,包括哺乳动物,并且适当地是指人。任选地,术语“受试者”包括已被诊断患有癌症或处于缓解期的哺乳动物。在一个实施方案中,术语“受试者”是指患有或怀疑患有癌症的人。

[0045] 在一个实施方案中,本文所述的方法和用途提供了癌症的治疗。如本文所用且如本领域所熟知的,术语“治疗(treating或treatment)”是指用于获得有益或期望结果(包括临床结果)的方法。有益的或期望的临床结果可以包括但不限于减轻或改善一种或多种症状或病况、减轻疾病程度、稳定(即不恶化)疾病状态(例如使患者保持缓解)、预防疾病或防止疾病扩散、延缓或减缓疾病进展、改善或减轻疾病状态、减少疾病的复发和缓解(无论是部分的还是全部的),无论是可检测还是不可检测。“治疗还可以意指与未接受治疗的预期生存率相比延长生存率。如本文所用,治疗还包括预防性治疗。在一个实施方案中,治疗方法包括向受试者施用治疗有效量的如本文所述的CAR-DNT细胞并且任选地由单次施用组成,或可选地包括一系列施用。

[0046] 如本文所用,短语“有效量”或“治疗有效量”意指在达到期望结果所需的剂量和时间段内有效的量。例如,在治疗癌症的背景中,有效量是与未施用化合物获得的反应相比,例如诱导缓解、降低肿瘤负荷和/或防止肿瘤扩散或癌细胞生长的量。有效量可根据各种因素而变化,例如动物的疾病状态、年龄、性别和体重。对应于该量的给定化合物的量将根据各种因素而变化,例如给定的药物或化合物、药物制剂、施用途径、疾病或病症的类型、接受治疗的受试者或宿主的身份等,但仍然可以由本领域技术人员常规确定。

[0047] 在一个实施方案中,本文所述的方法、用途和组合物涉及产生、施用或使用已经基

因修饰以与一种或多种靶抗原结合的DNT细胞。例如,在一个实施方案中,本文所述的方法、用途和组合物涉及CAR-DNT细胞或CAR-DNT的产生、施用或使用。如本文所用,“CAR-DNT细胞”或“CAR-DNT”是指已经修饰以表达一种或多种嵌合抗原受体(CAR)分子的双阴性T细胞(“DNT细胞”或“DNT”)。此类CAR-DNT细胞可以被描述为源自DNT细胞。

[0048] DNT表现出许多将它们与其他类型的T细胞区分的特征。在一个实施方案中,DNT不表达CD4或CD8。在一个实施方案中,扩增10-20天的DNT表达CD3-TCR复合物并且不表达CD4和CD8。在一个实施方案中,DNT是CD4⁻、CD8⁻、CD3⁺、 $\gamma\delta$ -TCR⁺和/或 $\alpha\beta$ -TcR⁺。在一个实施方案中,DNT是CD4⁻、CD8⁻、CD3⁺、 $\gamma\delta$ -TCR⁺和 $\alpha\beta$ -TcR⁺。在一个实施方案中,扩增的DNT可以是CD11a⁺、CD18⁺、CD10⁻和/或TCR V α 24-J α 18⁻。在一个实施方案中,扩增的DNT可以是CD49d⁺、CD45⁺、CD58⁺、CD147⁺、CD98⁺、CD43⁺、CD66b⁺、CD35⁻、CD36⁻和/或CD103⁻。

[0049] DNT可以使用本领域已知的技术获得,例如但不限于荧光激活细胞分选(FACS)。用于产生和/或扩增DNT细胞的方法还描述于W02007056854以及W02016023134中,它们通过引用并入本文。

[0050] 如本文所用,术语“自体 (autologous)”是指最初从作为所述细胞的预期受体的受试者获得的细胞。在一个实施方案中,本文所述的DNT细胞或DNT细胞群包含自体细胞或由其组成。

[0051] 如本文所用,术语“同种异体 (allogenic)”是指最初从受试者获得的细胞,该受试者是与所述细胞的预期受体不同的个体,但与受体属于同一物种。任选地,同种异体细胞可以是来自细胞培养物的细胞。在一个实施方案中,DNT是从健康供体获得的同种异体细胞。如本文所用,术语“健康供体”(“HD”)是指一名或多名未患癌症的受试者。在一个实施方案中,健康供体是没有可检测的癌细胞的受试者,例如没有可检测的白血病细胞的受试者。在一个实施方案中,本文所述的基因修饰的DNT细胞是同种异体细胞,任选地来自一个或多个健康供体。在一个实施方案中,所述的基因修饰的DNT细胞群包含同种异体细胞或由其组成,任选地所述同种异体细胞来自一个或多个健康供体。

[0052] 如本文所用,术语“CAR”是指嵌合抗原受体。在一个实施方案中,CAR分子包含细胞外抗原结合结构域、铰链区、跨膜结构域和一个或多个细胞内结构域,例如共刺激信号传导结构域和/或CD3 ζ 结构域。抗原结合结构域可以结合任何合适的抗原,例如在癌细胞表面富集或优先表达的抗原。在一个实施方案中,抗原结合结构域结合CD19。在一个实施方案中,抗原结合结构域结合CD4。

[0053] 在一个实施方案中,基因修饰的DNT细胞通过将细胞基因修饰成在DNT细胞表面上表达与靶抗原结合的蛋白质而源自DNT细胞。例如,在一个实施方案中,CAR-DNT细胞通过修饰DNT细胞以表达一种或多种CAR分子而源自DNT细胞。可以通过任何合适的技术修饰DNT细胞以表达一种或多种CAR分子。任选地,可以通过用合适的表达载体、质粒或mRNA转导对DNT进行基因修饰。

[0054] 在一个实施方案中,基因修饰的DNT可以在施用或用于受试者之前冷冻保存。如本文所用,“冷冻保存”是指通过冷却至极低温度来保存细胞,例如基因修饰的DNT(例如CAR-DNT)的过程。这种低温可以在-70℃至-90℃(使用-80℃冰箱或固体二氧化碳)或至-196℃(使用液氮)的范围内,并用于减缓/停止可能损害细胞的任何酶促或化学活性。冷冻保存方法寻求达到低温而不会因冷冻过程中细胞内冰晶的形成而造成另外的损害。可选地,未经

冷冻保存的新鲜扩增的DNT细胞可以如本文所述进行基因修饰和使用或施用。

[0055] 如本文所用,“免疫抑制疗法”是指施用或使用一种或多种药剂来抑制受试者的免疫系统,以预防或减轻移植物抗宿主病(GvHD)、宿主抗移植物排斥反应和/或同种异体反应。免疫抑制疗法的实例包括但不限于阿仑单抗、钙调磷酸酶抑制剂例如环孢素A(CSA)、他克莫司(TAC)、雷帕霉素靶标(TOR)抑制剂例如西罗莫司(SIR)和/或抗增殖剂例如霉酚酸酯(MMF)。

[0056] 如本文所用,“细胞因子释放综合征”或“CRS”是指可以在免疫疗法之后发生的病况,其特征在于由输注的产品和受免疫疗法影响的宿主免疫细胞大量、快速和全身释放炎性细胞因子,导致全身性炎症反应。

[0057] 在提供数值范围的情况下,除非上下文另有明确规定,否则应理解每个至下限单位的十分之一的中间值,该范围的上限和下限之间的中间值、以及所述范围内的任何其他所述值或中间值均包含在本说明书内。从任何下限至任何上限的范围均被考虑。这些可以独立包括在较小范围内的较小范围的上限和下限也涵盖在本说明书内,但受所述范围内任何具体排除限定的限制。在所述范围包括一个或两个限值的情况下,排除所包含的那些限值中的一个或两个限值的范围也包括在说明书中。

[0058] 必须注意,如本文和所附权利要求中使用的,单数形式“一种(a、an)”和“该”包括复数指代,除非上下文另有明确规定。

[0059] 本文的详细描述和权利要求中的所有数值均以“约”或“近似”所示值来修饰,并考虑了本领域普通技术人员预期的实验误差和变化。

[0060] 如本文在说明书和权利要求书中使用的短语“和/或”,应理解为表示如此结合的要素中的“一个或两个”,即,在一些情况下结合存在而在其他情况下分离存在的要素。用“和/或”列出的多个要素应以相同的方式解释,即“一个或多个”这样结合的要素。除了由“和/或”子句具体标识的要素之外,可以可选地存在其他要素,无论是否与那些具体标识的要素相关或不相关。

[0061] 如本文在说明书和权利要求书中使用的,“或”应理解为与如上定义的“和/或”具有相同的含义。例如,当分隔列表中的项目时,“或”或“和/或”应解释为是包括性的,即包括至少一个,但还包括多个要素或要素列表中的超过一个要素,以及任选地包括其他未列出的项目。只有明确相反表示的术语,例如“仅…中一个”或“就…中一个”或,当在权利要求中使用,“由…组成”是指就包括多个要素中的一个要素或列出的要素。通常,如果前面带有排他性术语,例如“任一”、“…中一个”、“仅…中一个”或“就…中一个”,本文使用的术语“或”仅应解释为表示排他性的替代方案(即“一个或另一个,但不是两者”)。

[0062] 在权利要求以及上述说明书中,所有过渡性短语,例如“包含”、“包括”、“携带”、“具有”、“含有”、“涉及”、“持有”、“由……构成”等应被理解为是开放式的,即意指包括但不限于。仅过渡词组“由……组成”和“主要由……组成”分别是封闭或半封闭过渡词组。

[0063] 如本文在说明书和权利要求书中使用的,对于一个或多个要素的列表的短语“至少一个”应理解为表示选自要素列表中的任何一个或多个要素的至少一个要素,但不一定包括在要素列表中具体列出的每个要素中的至少一个,并且不排除要素列表中的要素的任何组合。该定义还允许除了在短语“至少一个”所指的要素列表中具体标识的要素之外的要素可以任选地存在,无论是否与那些具体标识的要素相关或不相关。

[0064] 如本文所用,术语“约”是指被引用的数字加或减0.1至50%、5-50%、或10-40%、10-20%、10%-15%、优选地5-10%、最优选地约5%。

[0065] 还应理解,在本文所述的某些包括多于一个步骤或动作的方法中,除非上下文另有说明,否则该方法的步骤或动作的顺序不一定限于描述的该方法的步骤或动作的顺序。

[0066] 尽管与本文描述的那些相似或等同的任何方法和材料也可以用于本公开的实践或测试,但是现在描述优选的方法和材料。

[0067] II. 产品和组合物

[0068] 在一方面,提供了一种双阴性T (DNT) 细胞,其已经基因修饰以与一种或多种靶抗原结合。在一个实施方案中,DNT细胞经基因修饰以表达编码与特定靶抗原结合的嵌合抗原受体 (CAR) 的核酸分子。

[0069] 可以使用任何合适的方法来修饰DNT细胞以表达编码与靶抗原结合的蛋白(例如,但不限于CAR)的核酸。如实施例中所示,修饰的DNT细胞可以通过用包含编码CAR的序列的载体、质粒或mRNA转导产生。因此,在一个实施方案中,修饰的DNT细胞通过用载体转导产生,该载体包含编码CAR或与靶抗原结合的另一种合适的蛋白的核酸分子。

[0070] 靶抗原可以是任何合适的抗原,例如在癌细胞表面上表达的靶标。合适的抗原包括,但不限于CD4、CD33、CD19、CD20、CD123 LeY、间皮素、EGFR、ROR1、EpCam、MUC1、HER1/2、MET/HGF、新抗原(驱动子、非驱动子)、MAGE家族和NY-ESO-1。在一个实施方案中,靶抗原是CD19。在一个实施方案中,靶抗原是CD4

[0071] 在一个实施方案中,CAR包含细胞外结合结构域、铰链区、跨膜结构域和/或细胞内信号传导结构域。在一个实施方案中,CAR的细胞外结合结构域与合适的靶抗原结合。例如,CAR可以包含与癌细胞上表达的靶抗原结合的细胞外抗原结合结构域。

[0072] 如实施例中所示,本文所述的基因修饰的DNT细胞在冷冻保存后保持活性。因此,在一个实施方案中,基因修饰的DNT细胞已被冷冻或冷冻保存。例如,在一个实施方案中,如本文所述的基因修饰的同种异体DNT细胞群可以离体扩增和修饰,然后冷冻保存以产生适合临床使用的现成可用型细胞疗法。在一个实施方案中,细胞在低于-20℃、低于50℃、低于60℃、-20至-196℃之间、-70℃至-196℃之间、或-70℃至-90℃之间的温度下冷冻。

[0073] 根据本公开的修饰的DNT细胞可以以组合物的形式提供。例如,在一个实施方案中,提供了一种组合物,其包含本文所述的修饰的DNT细胞群和药学上可接受的运载体。CAR-DNT可以使用本领域已知的药学上可接受的配方来配制以供使用或制备用于施用于受试者。用于选择和制备合适制剂的常规程序和成分描述于,例如,雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences) (2003-第20版) 和1999年发表的美国药典:国家处方集(The United States Pharmacopeia:The National Formulary) (USP 24NF19) 中。术语“药学上可接受的”是指与动物(特别是人)的治疗相容。还提供了包含本文所述的基因修饰的DNT的试剂盒,以及合适的容器或包装和/或它们的使用说明,例如用于治疗受试者的癌症。

[0074] 还提供了如本文所述的修饰的DNT细胞群。在一个实施方案中,提供了从一个或多个健康供体产生的基因修饰的同种异体DNT群。在一个实施方案中,基因修饰的同种异体DNT细胞群不诱导受试者的移植物抗宿主病 (GvHD)。在一个实施方案中,相对于常规CAR-T细胞 (CAR-Tconv细胞),基因修饰的同种异体DNT细胞群诱导受试者较轻的GvHD。

[0075] 在一个实施方案中,基因修饰的同种异体DNT细胞群防止或抑制受试者的宿主抗移植物排斥反应。在一个实施方案中,相对于CAR-T_{conv}细胞,CAR-DNT细胞群防止或抑制受试者的HvG排斥反应。在一个实施方案中,提供了CAR4-DNT群。在一个实施方案中,CAR4-DNT群不诱导自相残杀。还提供了CAR8-DNT群。

[0076] 在一个实施方案中,本文所述的基因修饰的DNT细胞不需要修饰以防止HvG排斥反应或GvHD。例如,在一个实施方案中,本文所述的基因修饰的DNT细胞,任选的CAR-DNT,例如CAR4-DNT,未进行减少或消除选自编码HLA(任选地I类或II类)、T细胞受体、CD7或CD52的基因的一种或多种基因的表达的基因修饰。

[0077] III. 方法和用途

[0078] 如实施例所示,已证明基因修饰的DNT细胞可增强对癌细胞的细胞毒性,所述癌细胞包括B细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)细胞系(NALM-6)以及患者ALL胚细胞。在鼠NALM-6异种移植模型中,CAR19-DNT还显示出可有效延长生存期,相对于对照,接受CAR19-DNT处理的小鼠表现出更高的总体健康评分。值得注意的是,与非转导对照相比,CAR19-DNT还表现出对CD19+肺癌细胞系的细胞毒性活性增加。与常规CAR19 T细胞相比,还证明CAR-DNT不诱导脱肿瘤(off-tumor)同种异体反应。值得注意的是,虽然T_{conv}细胞的基因修饰可能由于外源肽而增加宿主抗移植物(HvG)排斥反应,但修饰的DNT不诱导显著的同种异体反应或表现出比常规CAR T细胞更轻的同种异体反应。不受理论的限制,这可能是由于DNT抑制T_{conv}细胞介导的免疫应答的能力所致。还产生了用抗CD4 CAR转导的DNT,并证明其对CD4+白血病细胞系有效,而无任何自相残杀体征,这表明DNT可能可用作通用CAR运载体或用于其他靶向细胞疗法。

[0079] 因此,在一方面,提供了一种治疗有需要的受试者的癌症的方法,该方法包括向受试者施用有效量的与靶抗原结合的基因修饰的DNT群。还提供了有效量的与一种或多种靶抗原结合的基因修饰的DNT细胞群用于治疗有需要的受试者的癌症的用途。在一个实施方案中,CAR-DNT细胞群包含以下细胞或由以下细胞组成:CD4⁻、CD8⁻、CD3⁺、 $\gamma\delta$ -TCR⁺和/或 $\alpha\beta$ -TcR⁺。在一个实施方案中,靶抗原在癌细胞表面上表达。在一个实施方案中,基因修饰的DNT是嵌合抗原受体(CAR)-双阴性T(DNT)细胞。

[0080] 用于本文所述的方法或用途的基因修饰的DNT细胞群可以来自一个或多个合适的供体。合适的供体包括被治疗的受试者或与受试者相同物种的一个或多个供体。因此,在一个实施方案中,基因修饰的DNT细胞群包含自体细胞或由其组成。在一个实施方案中,基因修饰的DNT细胞群包含同种异体细胞或由其组成。任选地,基因修饰的DNT细胞群包含来自一个或多个健康供体的同种异体细胞或由其组成。在一个实施方案中,CAR-DNT细胞群包含来自一个或多个供体的基因修饰的DNT或由其组成,该DNT在其用于治疗癌症或施用之前被冷冻保存。

[0081] 目前可获得的同种异体CAR免疫细胞疗法涉及另外的基因修饰,以敲除同种异体CAR-T细胞上的HLA或耗竭CD52+受体T细胞以避免HvG排斥反应(Zhao等人2018年)。可选地,利用免疫抑制剂的重复施用以允许同种异体CAR产品的多次输注。然而,这些将增加产品生产的成本和复杂性,或阻碍受体免疫系统抵抗感染。如图7所示,如本文所述的同种异体CAR-DNT细胞可与常规T细胞持续共存而不产生同种异体反应和/或相对于常规(CD4⁺/CD8⁺) CAR T细胞产生较轻的同种异体反应。在一个实施方案中,本文提供的基因修饰的同种异

体DNT未进行防止HvG排斥反应的基因修饰。在一个实施方案中,基因修饰的DNT未进行减少或消除选自编码HLA(任选地I类或II类)、内源性T细胞受体、CD7或CD52的基因的一种或多种基因的表达的修饰。

[0082] 在一个实施方案中,基因修饰的同种异体DNT在施用于或用于受试者时不引起移植植物抗宿主病。在一个实施方案中,基因修饰的同种异体DNT避免宿主抗移植植物同种异体排斥反应。在一个实施方案中,相对于常规(CD4+/CD8+) CAR T细胞,基因修饰的同种异体DNT对宿主抗移植植物同种异体排斥反应具有抗性,在一个实施方案中,基因修饰的同种异体DNT通过抑制同种异体反应性T细胞来避免宿主抗移植植物同种异体排斥反应,因此,在标准的淋巴细胞清除(lymphodepletion)预处理后,可以使用而无需另外的免疫抑制治疗。

[0083] 在一个实施方案中,在施用基因修饰的DNT细胞群之前,受试者接受淋巴细胞清除化疗。淋巴细胞清除预处理一般被认为在受试者中为过继转运的淋巴细胞的扩增和生长创造空间和有利的稳态细胞因子环境。例如,在一个实施方案中,可以在施用T细胞疗法(包括DNT)之前使用化疗(例如氟达拉滨+环磷酰胺)进行淋巴细胞清除。淋巴细胞清除预处理通常持续数周,这与长期免疫抑制不同,长期免疫抑制可以在施用细胞疗法的同时或之后使用,以助于防止或减少同种异体反应,例如GvHD或HvG排斥反应。

[0084] 在一个实施方案中,受试者在施用或使用基因修饰的DNT细胞治疗癌症的同时或之后不接受免疫抑制疗法。在一个实施方案中,在淋巴细胞清除化疗预处理的受试者中不需要另外的免疫抑制剂(例如阿仑单抗)来抑制或降低对输注的基因修饰的同种异体DNT细胞的同种异体反应或HvG。例如,在一个实施方案中,受试者在施用基因修饰的DNT细胞群后的60、30、21、14、0或-7天内不接受另外的免疫抑制治疗。

[0085] 在一个实施方案中,虽然常规同种异体CD4+/CD8+ T细胞易受宿主抗移植植物(HvG)排斥反应的影响,并且需要另外的免疫抑制疗法(例如阿仑单抗)来抑制HvG,但是基因修饰的DNT细胞群防止或抑制HvG而不需要另外的免疫抑制疗法(例如阿仑单抗)。例如,在一个实施方案中,基因修饰的同种异体DNT细胞在淋巴细胞清除预处理的受试者中持续超过2周、3周、4周、6周或8周,而无需另外的免疫抑制疗法来抑制HvG。在一个实施方案中,在向受试者施用或使用细胞后2周、3周、4周、6周或8周,可以在来自受试者的生物样品中检测到基因修饰的DNT细胞。

[0086] 在一个实施方案中,可以将多剂量的基因修饰的同种异体DNT细胞输注至患者中,而无需对细胞或患者进行另外的操作。例如,在实施方案中,可以在初始输注后约1周、2周、3周和/或4周内将基因修饰的同种异体DNT细胞再输注至患者中。

[0087] 可以通过任何合适的方法产生与适用于本文所述方法的一种或多种靶抗原结合的基因修饰的DNT细胞。例如,在一个实施方案中,CAR-DNT细胞群包含用载体、质粒或mRNA转导的DNT细胞,该载体、质粒或mRNA包含编码一种或多种嵌合抗原受体的核酸序列。

[0088] 用于根据本文所述方法使用的CAR-DNT细胞可以表达一种或多种合适的CAR分子。在一个实施方案中,CAR包含细胞外结合结构域、铰链区、跨膜结构域和/或细胞内信号传导结构域。CAR的细胞外结合结构域可以结合适用于本文所述方法的任何靶抗原。因此,在一个实施方案中,CAR包含与在受试者的癌细胞上表达的靶抗原结合的细胞外抗原结合结构域。合适的靶抗原包括CD4、CD33、CD19、CD20、CD123、LeY、间皮素、EGFR、ROR1、EpCam、MUC1、HER1/2、MET/HGF、新抗原(驱动子、非驱动子)、MAGE家族和NY-ESO-1。在一个实施方案中,靶

抗原是CD19。在一个实施方案中,靶抗原是CD4。

[0089] 本文所述的基因修饰的DNT细胞可以用于治疗各种癌症。在一个实施方案中,癌症是血液恶性肿瘤,例如白血病或淋巴瘤。任选地,癌症是非霍奇金淋巴瘤、急性成淋巴细胞白血病、急性骨髓性白血病或慢性淋巴细胞白血病。在一个实施方案中,癌症包括一种或多种实体瘤,包括但不限于肺癌。

[0090] 在一个实施方案中,提供了一种治疗有需要的受试者的CD4+癌症的方法,该方法包括向受试者施用有效量的已经基因修饰以与CD4结合的DNT细胞群。还提供了有效量的已经基因修饰以与CD4结合的DNT用于治疗有需要的受试者的CD4+癌症的用途。在一个实施方案中,DNT细胞是靶向CD4的CAR-DNT (CAR4-DNT)。在一个实施方案中,基因修饰的DNT是同种异体的。在一个实施方案中,癌症是血液恶性肿瘤。在一个实施方案中,癌症是T细胞癌,例如T细胞急性成淋巴细胞白血病 (T-ALL)、外周T细胞淋巴瘤 (PTCL) 和/或皮肤T细胞淋巴瘤 (CTCL)。鉴于患者体内的癌性T细胞可污染用于制备CART细胞的自体T细胞产品,因此T细胞癌对使用自体常规CART疗法提出了挑战。此外,常规T细胞本身中的CD4表达可导致靶向CD4的常规CART细胞之间自相残杀,而CAR4-DNT细胞制备没有显示出自相残杀的迹象(图10a)。如图10b所示,同种异体CAR4-DNT细胞对CD4+急性淋巴细胞性T细胞白血病细胞系显示出细胞毒性。此外,同种异体CAR4-DNT可以避免与自体T细胞疗法相关的问题,因为它们不表达CD4,并且可以由健康供体产生而不污染癌性T细胞。

[0091] 如实施例所述,本文所述的CAR-DNT表现出对癌细胞的双重CAR靶向和CAR非依赖性杀伤。在一个实施方案中,本文所述的基因修饰的DNT用于或施用于患有复发性或反复发作的癌症的受试者。例如,在一个实施方案中,本文所述的基因修饰的DNT在常规CAR T细胞治疗(例如常规CAR19 T细胞治疗)之后用于或施用于患有复发性癌症的受试者。在一个实施方案中,癌症是复发性急性成淋巴细胞白血病,任选地是B细胞急性成淋巴细胞白血病 (B-ALL)。在一个实施方案中,癌症包括CD19-B-ALL或由其组成。

[0092] 在一个实施方案中,本文所述的方法和用途用于治疗表现出靶抗原的异质表达的癌症,例如表现出CD4、CD33、CD19、CD20、CD123和/或LeY的异质表达的癌症。在一个实施方案中,本文所述的方法和用途用于治疗表现出间皮素、EGFR、ROR1、EpCam、MUC1、HER1/2、MET/HGF、新抗原(驱动子、非驱动子)、MAGE家族和/或NY-ESO-1的异质表达的癌症。

[0093] IV. 实施例

[0094] 实施例1

[0095] 为了确定是否可以用嵌合抗原受体 (CAR) 转导DNT,用广泛使用的CD19-CAR (CAR19) 转导DNT,并使用蛋白L结合确定其表达。用CAR19转导DNT,平均转导率为55.5% ± 7.51% (图1a),并且CAR19表达保持至少12天 (图1b)。通过CAR19转导未观察到DNT的表型变化;DNT保留了CD3阳性CD4和CD8双阴性表型 (图1c),并且DNT保留了与没有CAR19转导的那些扩增的细胞相当的扩增曲线 (图1d)。

[0096] 使用针对CD19+B-ALL细胞系NALM-6 (图2a) 和五种原发性B-ALL患者胚细胞 (图2b) 的非转导 (NT) -DNT或CAR19-DNT细胞进行的体外杀伤测定表明,虽然非转导 (NT) -DNT可以诱导针对NALM-6和一些B-ALL患者样品 (100709、110291和090652) 的一定程度的细胞毒性,但CAR19转导显著增强了细胞毒性程度。此外,与NT-DNT细胞相比,CAR19+DNT细胞与B-ALL共培养后,上清液中检测到更高水平的IFN γ (图2c)。

[0097] 为了确定CAR19-DNT在体内的抗白血病活性,移植NALM-6的免疫缺陷NSG小鼠未经处理或用不同数量的CAR19-DNT细胞(每只小鼠 0.33×10^6 、 10^6 或 3×10^6 个细胞)处理,并且比较白血病负荷和小鼠的生存率。通过流式细胞术测定骨髓中NALM-6移植水平。CAR19-DNT细胞以剂量依赖性方式降低白血病负荷,其中用最高剂量CAR19-DNT细胞处理的小鼠的平均NALM-6移植水平为 $0.19\% \pm 0.11\%$,而未处理组为 $79.2\% \pm 3.6\%$ (图3a和3b)。此外,用 3×10^6 个CAR19-DNT细胞处理的小鼠显示出生存期延长,中位生存期为44天,相比之下,未处理组的中位生存期为28天(图3c)。与此一致的是,在CAR19-DNT处理的受体中观察到通过邈遯(scruffiness)、弓背、脱毛和活性损失评价的显著优异的总体健康评分(图3d)。

[0098] 为了使用不同的B-ALL靶标验证我们的发现,移植B细胞成淋巴细胞系Daudi的NSG小鼠接受NT-DNT或CAR19-DNT细胞处理。在用CAR19-DNT细胞处理的小鼠的骨髓中观察到的Daudi移植水平显著低于在用NT-DNT处理的小鼠中观察到的水平(图4a)。此外,在NT-DNT组中观察到小鼠体重显著低于CAR-DNT组(图4b),表明与用NT-DNT细胞处理的小鼠相比,用CAR19-DNT细胞处理的小鼠具有更好的健康状况(fitness)。

[0099] 在人道终点对NALM-6的离体分析显示,从CAR19-DNT细胞处理组获得的NALM-6的CD19表达低于未处理组(图5a和5b; $53.22\% \pm 5.12\%$ 相对于 $91.67\% \pm 0.30\%$),表明NALM-6可能通过CD19下调来逃逸CAR19-DNT细胞介导的抗白血病活性,如CAR-T细胞治疗后CD19-B-ALL复发患者所观察到的。出人意料的是,当从CAR19-DNT处理的小鼠获得的NALM-6被离体用作CAR19-DNT的靶标时,它们与未经处理的NALM-6一样被CAR19-DNT细胞有效杀死(图5c),表明用CAR19-DNT细胞进行另外的治疗可增强CAR19-DNT细胞的治疗效果。

[0100] 为了比较CAR19-DNT与CAR19- T_{conv} 细胞的效力,使用源自相同健康供体的CAR19-DNT和CAR19- T_{conv} 细胞进行针对NALM-6的体外杀伤测定,结果表明这两种细胞类型均诱导相当程度的细胞毒性(图6a)。类似地,在与NALM-6共培养后,CAR19-DNT和CAR19- T_{conv} 产生相当数量的IFN γ (图6b)。此外,用相同数量的CAR19-DNT和CAR19- T_{conv} 细胞处理NALM-6移植NSG小鼠均导致白血病根除,这支持CAR19-DNT与CAR19- T_{conv} 细胞诱导相当程度的抗白血病活性(图6c)。

[0101] Ruella等人(Ruella,Barrett等人2016)表明具有双重特异性的CAR可以通过CD19下调来预防B-ALL复发。鉴于DNT细胞具有由NKG2D和DNAM-1介导的内源性抗白血病活性,检测CAR19转导的DNT和NT-DNT介导对CD19白血病细胞系和来自CAR19- T_{conv} 细胞治疗后复发患者的原发性B-ALL胚细胞的细胞毒性的能力。值得注意的是,CAR19-DNT在靶细胞上没有CD19表达的情况下有效地诱导细胞毒性(图7a)。有趣的是,对于从以剂量依赖性方式接受常规CD19-CAR T细胞治疗后复发的患者获得的原发性B-ALL胚细胞,观察到显著程度的体外DNT介导的细胞毒性(图7b)。此外,虽然CAR19-DNT对CD19+非霍奇金淋巴瘤细胞系Daudi表现出优异的细胞毒性,但NT-DNT以剂量依赖性方式对Daudi诱导显著程度的细胞毒性(图7c)。这些结果表明,通过其双重细胞毒性功能、CAR介导的和内源性抗白血病活性,CAR-DNT具有预防患者抗原阴性复发的潜力,从而提高其总体治疗值。总之,CAR19-DNT可以通过CAR-抗原下调来防止免疫逃逸,从而相比CAR19- T_{conv} 细胞诱导更优异的抗白血病活性,并具有治疗常规CAR19 T细胞治疗后的复发患者的潜能。

[0102] 为了比较内源性和CAR19介导的对B-ALL的抗白血病活性,将NALM-6细胞在有或没有NT-DNT细胞、CAR19-DNT细胞、NT- T_{conv} 细胞或CAR19- T_{conv} 细胞的情况下培养2或5天。观察

到相比用NT- T_{conv} 细胞处理的培养物,NT-DNT细胞处理的培养物中NALM-6细胞的数量显著更低,这表明DNT细胞(而不是 T_{conv} 细胞)介导针对NALM-6的内源性抗白血病活性(图8a和8b)。然而,在CAR19-DNT细胞和CAR19- T_{conv} 细胞之间培养的NALM-6细胞的数量没有观察到显著差异(图8a和8b)。类似地,当与NT-DNT细胞共培养时,观察到NALM-6细胞频率随时间显著降低,而与NT- T_{conv} 细胞共培养并没有降低相对NALM-6频率(图8c)。与CAR19-DNT细胞和CAR19- T_{conv} 细胞两者的共培养在2天内将NALM-6细胞频率降低至低于10%(图8c)。

[0103] 先前已证明非基因修饰的DNT不引起GvHD或诱导同种异体反应。为了使用同种异体CAR-DNT作为现成可用型细胞疗法,重要的是确定这些细胞是否引发GvHD和/或HvG排斥反应,因为CAR19转导的T细胞由于来自CAR的细胞内结构域的激活增加而具有更高的基础激活水平,并且可由于来自CAR的外来抗原而诱导同种异体反应。因此,进行体外混合淋巴细胞反应(MLR)测定以确定CAR19-DNT诱导同种异体免疫应答的潜力。用经辐照的同种异体PBMC刺激CAR19-DNT(图9a)。平行地,刺激CAR19- T_{conv} 细胞作为对照。然后收获用同种异体抗原预激的CAR19-DNT和CAR19- T_{conv} 细胞,并用作针对来自相同同种异体供体的有活力的PBMC的效应物。如由不含CAR修饰的DNT(NT-DNT)所见,同种异体抗原预激的CAR19-DNT未产生同种异体反应,这通过缺乏针对用于刺激的相同同种异体细胞引起的细胞毒性得到证明,而CAR19- T_{conv} 细胞以剂量依赖性方式产生高度同种异体反应性(图9b)。同时,如图9c所示,将CAR19- T_{conv} 细胞与先前用CAR19- T_{conv} 细胞预激的同种异体CD8⁺ T细胞共培养,以剂量依赖性方式诱导显著程度的杀伤(图9d),表明同种异体CAR19- T_{conv} 细胞可以引起受体免疫系统的同种异体反应并被排斥。相反,被用CAR19-DNT细胞刺激的同种异体CD8⁺ T细胞杀伤的CAR19-DNT数量显著减少(图9c-d),这再次支持CAR19-DNT细胞的同种异体反应性较低,并可以避免HvG排斥反应。为了了解CAR19-DNT细胞如何避免同种异体反应,进行体外测定,其中DNT细胞与同种异体CD8⁺ T细胞在同种异体抗原(allo-Ags)存在下共培养(图9e)。出人意料的是,DNT细胞的存在抑制CD8⁺ T细胞同种异体反应的发生,而在不存在DNT的情况下被刺激的那些诱导有效的同种异体反应(图9f),这表明CAR19-DNT细胞正在积极抑制同种异体反应以保护自己免受同种异体排斥。

[0104] 为了进一步确定同种异体CAR19-DNT的安全性,幼稚NSG小鼠未经处理或输注CAR19-DNT细胞或CAR19- T_{conv} 细胞。观察到CAR19- T_{conv} 细胞处理的小鼠出现GvHD的症状,因为小鼠开始体重减轻并表现出其他疾病症状,例如弓背和减少的活动性(图10a和10b)。还观察到用CAR19- T_{conv} 细胞处理的小鼠的生存率降低,相比之下,CAR19-DNT组没有显示死亡病例(图10c)。在CAR19- T_{conv} 细胞处理组的肝组织学中也观察到严重的组织损伤,但在未处理和CAR19-DNT细胞处理的小鼠中未观察到(图10d)。

[0105] 细胞因子释放综合征是患者中常见的CAR-T细胞相关毒性(Giavridis等人,2018),主要由CAR-T细胞激活的单核细胞产生的IL-1 β 和IL-6介导。为了评价CAR-DNT细胞相对于CAR- T_{conv} 细胞对单核细胞产生IL-1 β 和IL-6的影响,将NALM-6细胞与NT或CAR转导的-DNT细胞或CAR- T_{conv} 细胞一起培养。随后,T细胞产生的细胞因子用于刺激单核细胞系THP-1或mTHP-1持续3-4天,并测量CRS相关细胞因子IL-1 β 和IL-6的水平。与NT-DNT相比,当使用CAR19-DNT细胞产生的上清液刺激时,观察到单核细胞系产生的IL-1 β 和IL-6显著增加。然而,相比CAR19-DNT细胞,在CAR19- T_{conv} 细胞产生的细胞因子存在下,获得显著更高水平的IL-1 β 和IL-6(分别见图11a和11b)。总之,结果表明,相比CAR- T_{conv} 细胞,基因修饰的

DNT细胞,包括但不限于CAR19-DNT细胞以及靶向其他抗原(例如CD4、CD8)的CAR-DNT,引起重度CRS的可能性更低。

[0106] 为了确定CAR19-DNT细胞在冷冻保存后是否保留了它们的现成可用型特性,测定冷冻保存的CAR19-DNT细胞的抗白血病活性和CAR19-DNT细胞对 T_{conv} 细胞同种异体反应性的抗性。与新鲜CAR19-DNT细胞抗NALM-6相比,冷冻保存超过60天的CAR19-DNT细胞表现出相似程度的抗白血病活性(图12)。

[0107] 先前已经证明NT-DNT细胞以供体非依赖性方式介导其抗白血病活性,满足现成可用型T细胞疗法的要求之一。为了确定CAR-DNT细胞是否以类似的方式发挥作用,在体外细胞毒性测定中,使用从三个不同供体获得的DNT细胞生产的CAR19-DNT细胞被用作针对NALM-6的效应细胞。所有三个供体均观察到对NALM-6相当的剂量依赖性杀伤(图13),这支持了CAR19-DNT细胞以供体非依赖性方式发挥作用,保持其现成可用型潜力。

[0108] 为了确定CAR-DNT技术是否适用于其他形式的恶性肿瘤(包括实体瘤),检测CAR19-DNT靶向肺癌细胞系A549和H460(针对CD19表达被转导)的功效。与B-ALL的相似,CAR19-DNT对CD19+A549和CD19+H460诱导的细胞毒性活性优于NT-DNT的,而CAR19-DNT和NT-DNT对野生型A549(图14a)和H460(图14b)诱导相似程度的细胞毒性。此外,仅当CAR19-DNT细胞与CD19转导的A549共培养时,才观察到上清液中IFN γ 水平增加(图14c)。总之,结果表明,用识别实体瘤上表达的抗原的受体进行基因修饰的DNT可以显著增强其抗癌活性。

[0109] 为了进一步评价基因修饰的DNT细胞是否可以在异种移植模型中有效靶向实体瘤,NSG小鼠皮下注射CD19转导的A549细胞。随后,小鼠未经处理或用NT-DNT或CAR19-DNT细胞处理。相对于未处理的对照,在用NT-DNT细胞处理的小鼠中观察到显著延迟的肿瘤生长,表明NT-DNT细胞的不完全但有效的内源性抗肿瘤活性(图15a)。来自CAR19-DNT细胞处理的小鼠的肿瘤大小基本没有变化,并且与未处理组和NT-DNT细胞处理组相比,显示肿瘤体积的倍数变化显著降低。类似地,在研究结束时,与未处理的小鼠相比,观察到NT-DNT和CAR19-DNT细胞处理的小鼠的肿瘤重量均减少,其中通过CAR19-DNT细胞处理观察到更大的减少(图15b)。

[0110] 由于抗CD4 CAR T细胞在产生过程中自相残杀,使用常规T细胞产生抗CD4 CAR来治疗T细胞白血病和淋巴瘤一直很困难。此外,T细胞癌对制备自体CART产品提出了挑战,因为患者的癌性T细胞可污染自体CART产品。为了确定同种异体DNT是否可以通过基因修饰来靶向T细胞癌,例如T-ALL、PTCL和CTCL等,我们利用DNT细胞缺乏CD4表达的优势,开发并用抗CD4 CAR(CAR4)转导了同种异体DNT。我们没有发现自相残杀的迹象,因为CAR4-DNT的扩增与非转导的DNT一样好(图16a)。如预期,CAR4-DNT比NT-DNT更有效地靶向CD4⁺ T细胞白血病细胞系CCRF-CEM(图16b)。由于CAR4-DNT可以由同种异体健康供体产生而不污染癌性T细胞或自相残杀,因此同种异体CAR4-DNT在治疗CD4⁺ T细胞癌方面具有独特的优势。由于DNT细胞也不表达CD8,因此预期抗CD8 CAR(CAR8)可以转导至DNT并用于治疗CD8 T细胞恶性肿瘤。

[0111] 为了进一步评价CAR4-DNT细胞的抗原特异性,健康供体来源的PBMC与NT或空病毒载体(EV)、CAR19或CAR4转导的DNT细胞以增加的DNT与PBMC的比例共培养。观察到CAR4-DNT细胞对PBMC内CD4⁺细胞的杀伤显著提高,而NT-DNT、EV-DNT和CAR19-DNT显示对CD4⁺PBMC的极小毒性(图17a)。相比之下,观察到CD4-DNT、EV-DNT、NT-DNT细胞对CD4⁺PBMC的极小毒性,

而CD19-DNT细胞显示出增加的毒性,这可能是由于对CD19⁺PBMC的靶向。总之,这些结果表明CAR4-DNT细胞的抗原特异性以及在DNT细胞平台上使用不同CAR技术靶向各种抗原的灵活性。如上所述,自相残杀是转化 (translation) CAR-T细胞以治疗T细胞恶性肿瘤的主要障碍。为了评估CAR4-T细胞制造过程中自相残杀的程度,比较NT或CAR4转导的DNT或T_{conv}细胞的数量和组成。当用CAR4转导T_{conv}细胞时,观察到细胞数量显著减少(图18a)。此外,与NT-T_{conv}细胞相比,在CAR4-T_{conv}细胞中观察到CD4⁺T细胞的频率显著降低(图18b)。相比之下,与NT-DNT相比,CAR4-DNT的相对数量和组成相当。这些结果表明,在没有自相残杀的情况下,可以将CAR4有效地转导到DNT上。因此,CAR4和CAR8群可以以比NT-DNT和CAR4-T_{conv}和CAR8-T_{conv}低得多的剂量使用或施用来治疗癌症。

[0112] 总之,这些结果支持DNT作为平台的广泛适用性,其可以1) 用作现成可用型疗法; 2) 采用不同的抗原靶向技术,例如CAR-技术;和3) 用于治疗其他液体和实体癌症类型。

[0113] 参考文献:

[0114] "FDA Approves Second CAR T-cell Therapy." (2018). *Cancer Discov* 8(1):5-6.

[0115] Alatrash,G.and J.J.Molldrem (2010). "Immunotherapy of AML." *Cancer Treat Res* 145:237-255.

[0116] Dwarshuis,N.J.,K.Parratt,A.Santiago-Miranda and K.Roy (2017). "Cells as advanced therapeutics:State-of-the-art,challenges,and opportunities in large scale biomanufacturing of high-quality cells for adoptive immunotherapies." *Adv Drug Deliv Rev* 114:222-239.

[0117] Giavridis,T.,van der Stegen,S.J.C.,Eyquem,J.et al.CAR T cell-induced cytokine release syndrome is mediated by macrophages and abated by IL-1blockade.*Nat Med*24,731-738 (2018) .

[0118] Harris,D.T.and D.M.Kranz (2016). "Adoptive T Cell Therapies:A Comparison of T Cell Receptors and Chimeric Antigen Receptors." *Trends Pharmacol Sci*37 (3):220-230.

[0119] He,K.M.,Y.Ma,S.Wang,W.P.Min,R.Zhong,A.Jevnikar and Z.X.Zhang (2007). "Donor double-negative Treg promote allogeneic mixed chimerism and tolerance." *Eur J Immunol*37 (12):3455-3466.

[0120] June,C.H.,S.R.Riddell and T.N.Schumacher (2015). "Adoptive cellular therapy:a race to the finish line." *Sci Transl Med* 7 (280):280ps287.

[0121] Kalos,M.and C.H.June (2013). "Adoptive T cell transfer for cancer immunotherapy in the era of synthetic biology." *Immunity* 39 (1):49-60.

[0122] Lee,J.,M.D.Minden,W.C.Chen,E.Streck,B.Chen,H.Kang,A.Arruda,D.Ly,S.D.Der,S.Kang,P.Achita,C.D'Souza,Y.Li,R.W.Childs,J.E.Dick and L.Zhang (2017). "Allogeneic Human Double Negative T Cells as a Novel Immunotherapy for Acute Myeloid Leukemia and Its Underlying Mechanisms." *Clin Cancer Res*.

[0123] Lee,J.B.,H.Kang,L.Fang,C.D'Souza,O.Adeyi and L.Zhang (2019). "Developing Allogeneic Double-Negative T Cells as a Novel Off-the-Shelf

Adoptive Cellular Therapy for Cancer." *Clin Cancer Res*.

[0124] Maude, S.L., T.W. Laetsch, J. Buechner, S. Rives, M. Boyer, H. Bittencourt, P. Bader, M.R. Verneris, H.E. Stefanski, G.D. Myers, M. Qayed, B. De Moerloose, H. Hiramatsu, K. Schlis, K.L. Davis, P.L. Martin, E.R. Nemecek, G.A. Yanik, C. Peters, A. Baruchel, N. Boissel, F. Mechinaud, A. Balduzzi, J. Krueger, C.H. June, B.L. Levine, P. Wood, T. Taran, M. Leung, K.T. Mueller, Y. Zhang, K. Sen, D. Lebwohl, M.A. Pulsipher and S.A. Grupp (2018). "Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia." *N Engl J Med* 378 (5): 439-448.

[0125] Maus, M.V., A.K. Thomas, D.G. Leonard, D. Allman, K. Addya, K. Schlienger, J.L. Riley and C.H. June (2002). "Ex vivo expansion of polyclonal and antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by artificial APCs expressing ligands for the T-cell receptor, CD28 and 4-1BB." *Nat Biotechnol* 20 (2): 143-148.

[0126] Mclver, Z., B. Serio, A. Dunbar, C.L. O'Keefe, J. Powers, M. Wlodarski, T. Jin, R. Sobecks, B. Bolwell and J.P. Maciejewski (2008). "Double-negative regulatory T cells induce allotolerance when expanded after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation." *Br J Haematol* 141 (2): 170-178.

[0127] Merims, S., X. Li, B. Joe, P. Dokouhaki, M. Han, R.W. Childs, Z.Y. Wang, V. Gupta, M.D. Minden and L. Zhang (2011). "Anti-leukemia effect of ex vivo expanded DNT cells from AML patients: a potential novel autologous T-cell adoptive immunotherapy." *Leukemia* 25 (9): 1415-1422.

[0128] Neelapu, S.S., F.L. Locke, N.L. Bartlett, L.J. Lekakis, D.B. Miklos, C.A. Jacobson, I. Braunschweig, O.O. Oluwole, T. Siddiqi, Y. Lin, J.M. Timmerman, P.J. Stiff, J.W. Friedberg, I.W. Flinn, A. Goy, B.T. Hill, M.R. Smith, A. Deol, U. Farooq, P. McSweeney, J. Munoz, I. Avivi, J.E. Castro, J.R. Westin, J.C. Chavez, A. Ghobadi, K.V. Komanduri, R. Levy, E.D. Jacobsen, T.E. Witzig, P. Reagan, A. Bot, J. Rossi, L. Navale, Y. Jiang, J. Aycock, M. Elias, D. Chang, J. Wieszorek and W.Y. Go (2017). "Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma." *N Engl J Med* 377 (26): 2531-2544.

[0129] Park, J.H., I. Riviere, M. Gonen, X. Wang, B. Senechal, K.J. Curran, C. Sauter, Y. Wang, B. Santomasso, E. Mead, M. Roshal, P. Maslak, M. Davila, R.J. Brentjens and M. Sadelain (2018). "Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia." *N Engl J Med* 378 (5): 449-459.

[0130] Ren, J., X. Liu, C. Fang, S. Jiang, C.H. June and Y. Zhao (2017). "Multiplex Genome Editing to Generate Universal CAR T Cells Resistant to PD1 Inhibition." *Clin Cancer Res* 23 (9): 2255-2266.

[0131] Ruella, M., D.M. Barrett, S.S. Kenderian, O. Shestova, T.J. Hofmann, J. Perazzelli, M. Klichinsky, V. Aikawa, F. Nazimuddin, M. Kozlowski, J. Scholler, S.F. Lacey, J.J. Melenhorst, J.J. Morrisette, D.A. Christian, C.A. Hunter, M. Kalos, D.L. Porter, C.H. June, S.A. Grupp and S. Gill (2016). "Dual CD19 and CD123 targeting

prevents antigen-loss relapses after CD19-directed immunotherapies." *J Clin Invest* 126(10):3814-3826.

[0132] Ruella, M. and S.S. Kenderian (2017). "Next-Generation Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy: Going off the Shelf." *BioDrugs* 31(6):473-481.

[0133] Schuster, S. J., J. Svoboda, E. A. Chong, S. D. Nasta, A. R. Mato, O. Anak, J. L. Brogdon, I. Pruteanu-Malinici, V. Bhoj, D. Landsburg, M. Wasik, B. L. Levine, S. F. Lacey, J. J. Melenhorst, D. L. Porter and C. H. June (2017). "Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas." *N Engl J Med* 377(26):2545-2554.

[0134] Shlomchik, W. D. (2007). "Graft-versus-host disease." *Nat Rev Immunol* 7(5):340-352.

[0135] Sterner RM, Sakemura R, Cox MJ, Yang N, Khadka RH, Forsman CL, et al. GM-CSF inhibition reduces cytokine release syndrome and neuroinflammation but enhances CAR-T cell function in xenografts. *Blood* 2019;133(7):697-709

[0136] Tran, E., P. F. Robbins, Y. C. Lu, T. D. Prickett, J. J. Gartner, L. Jia, A. Pasetto, Z. Zheng, S. Ray, E. M. Groh, I. R. Kriley and S. A. Rosenberg (2016). "T-Cell Transfer Therapy Targeting Mutant KRAS in Cancer." *N Engl J Med* 375(23):2255-2262.

[0137] Young, K. J., B. DuTemple, M. J. Phillips and L. Zhang (2003). "Inhibition of Graft-Versus-Host Disease by Double-Negative Regulatory T Cells." *The Journal of Immunology* 171(1):134-141.

[0138] Zeng, J., Tang, S. Y., Toh, L. L. & Wang, S. Generation of 'Off-the-Shelf' Natural Killer Cells from Peripheral Blood Cell-Derived Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rep.* 9, 1796-1812 (2017).

[0139] Zhang, Z. X., L. Yang, K. J. Young, B. DuTemple and L. Zhang (2000). "Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression." *Nat Med* 6(7):782-789.

[0140] Zhao, J., Lin, Q., Song, Y. et al. Universal CARs, universal T cells, and universal CAR T cells. *J Hematol Oncol* 11, 132 (2018).

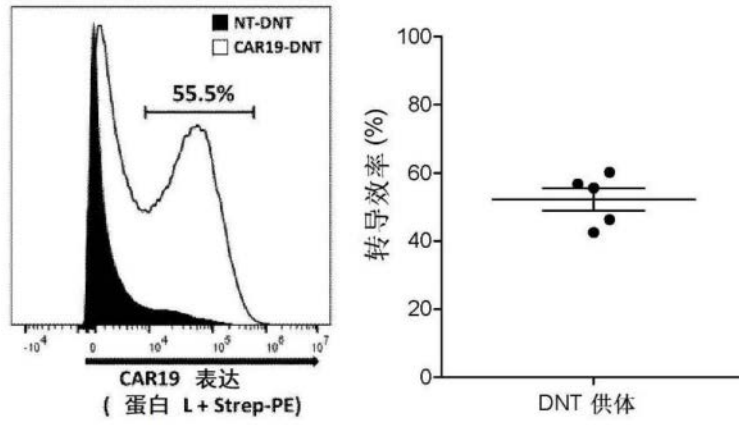


图1a

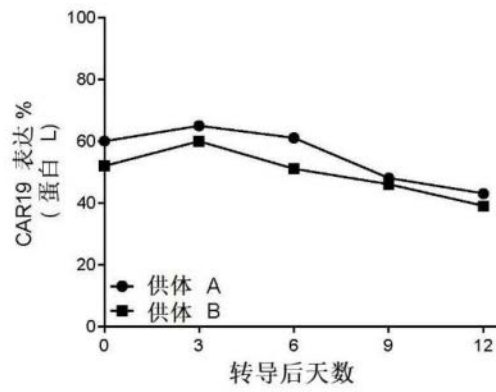


图1b

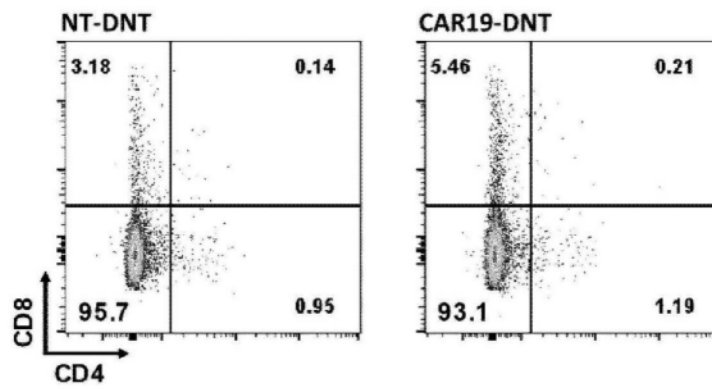


图1c

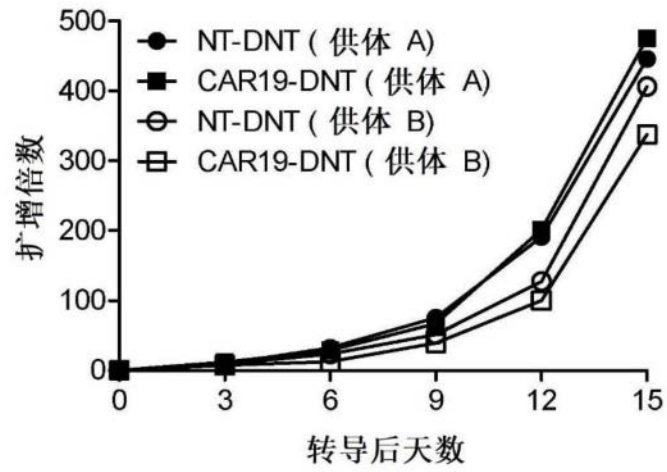


图1d

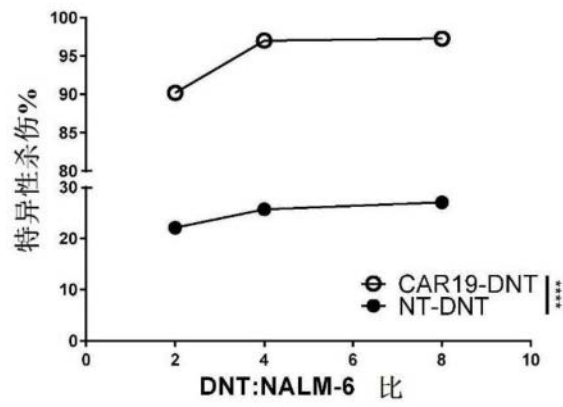


图2a

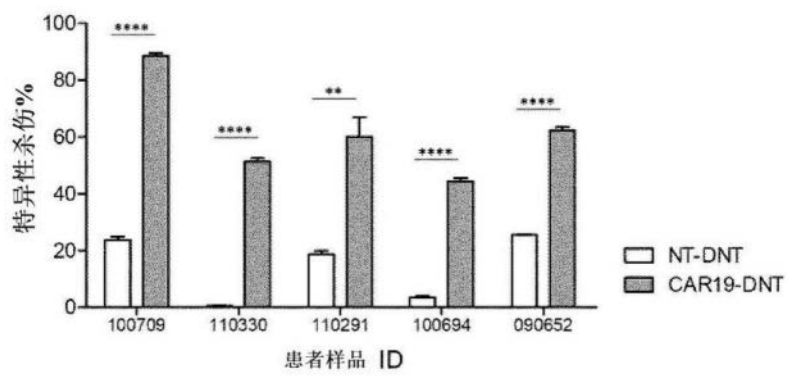


图2b

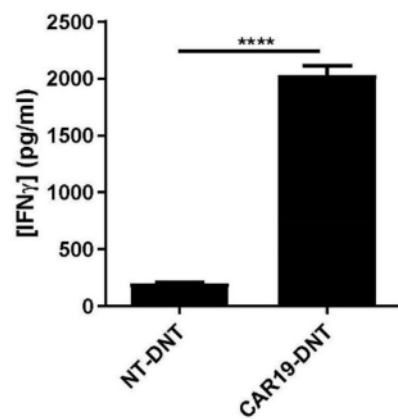


图2c

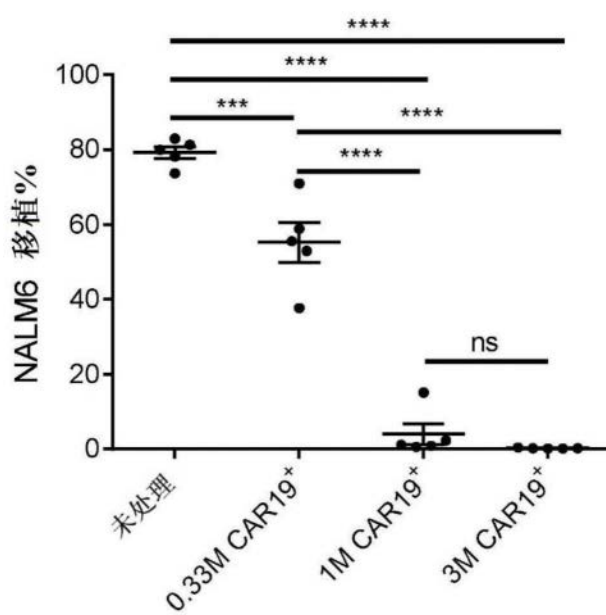


图3a

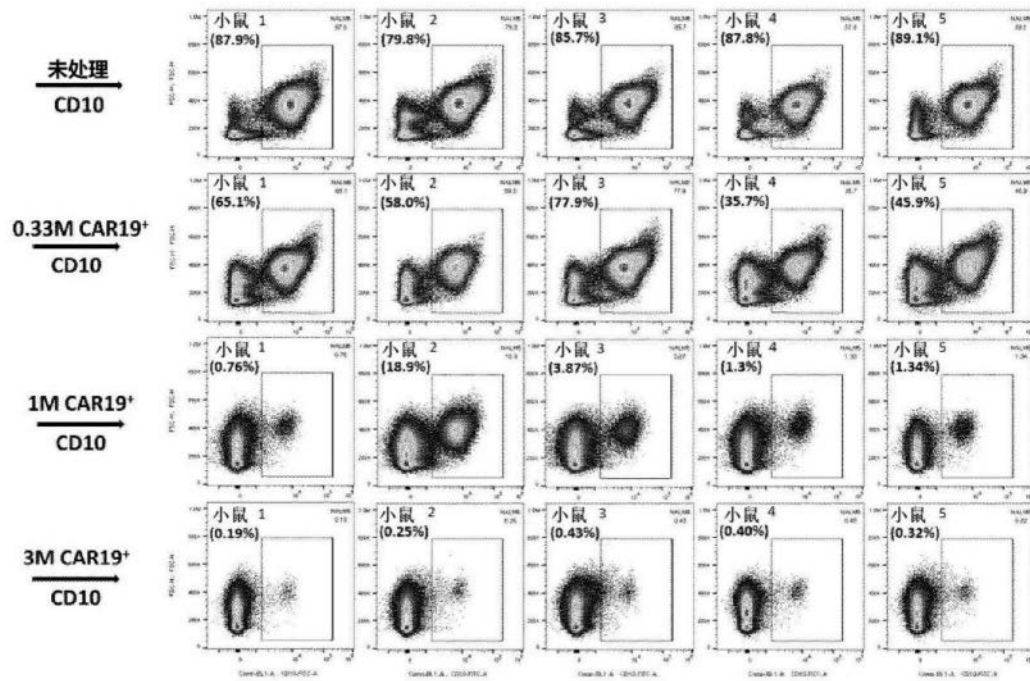


图3b

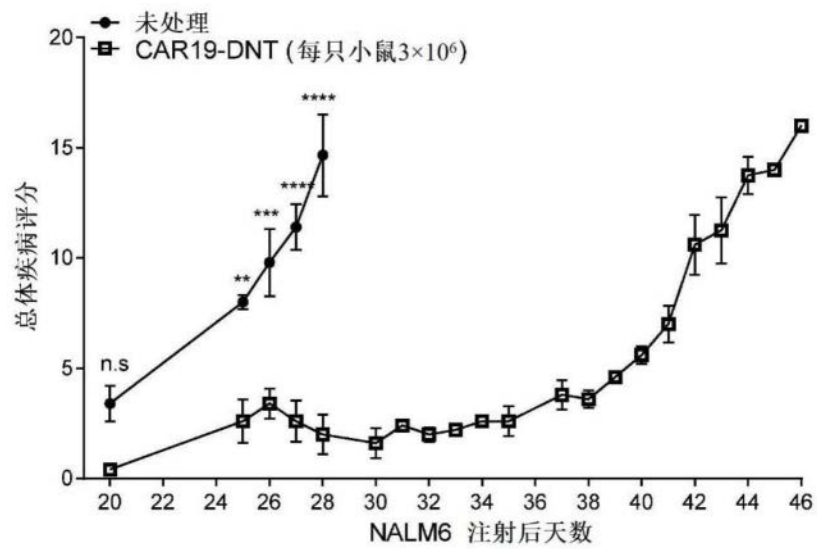


图3c

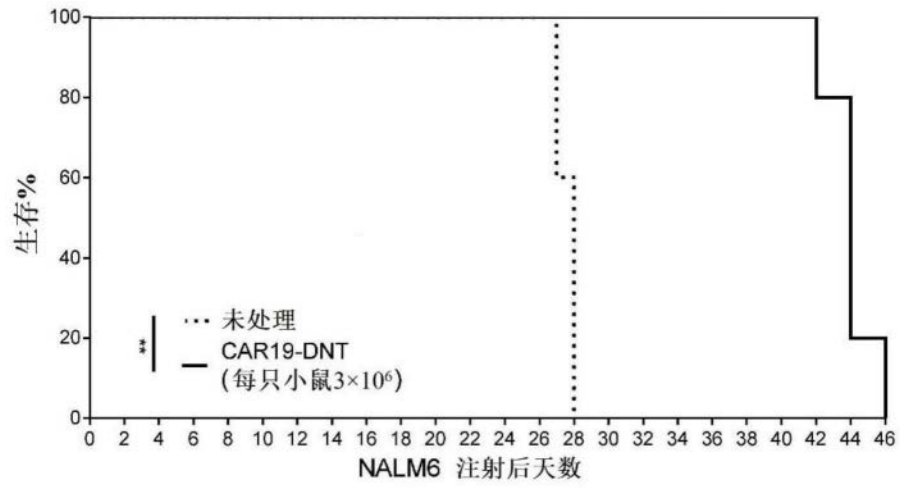


图3d

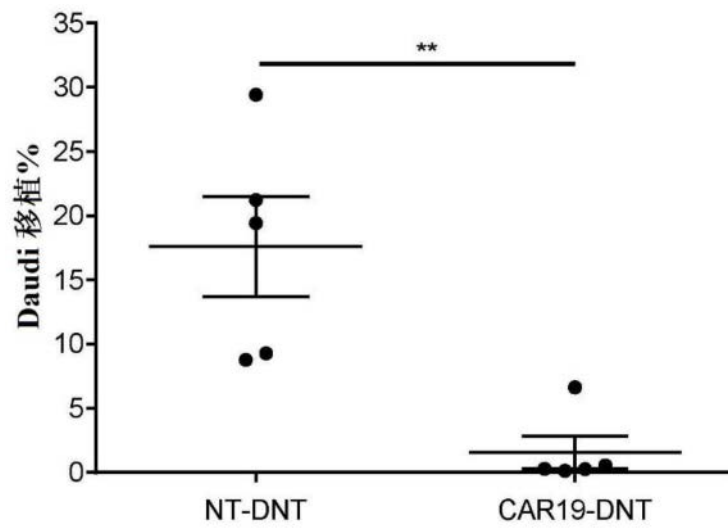


图4a

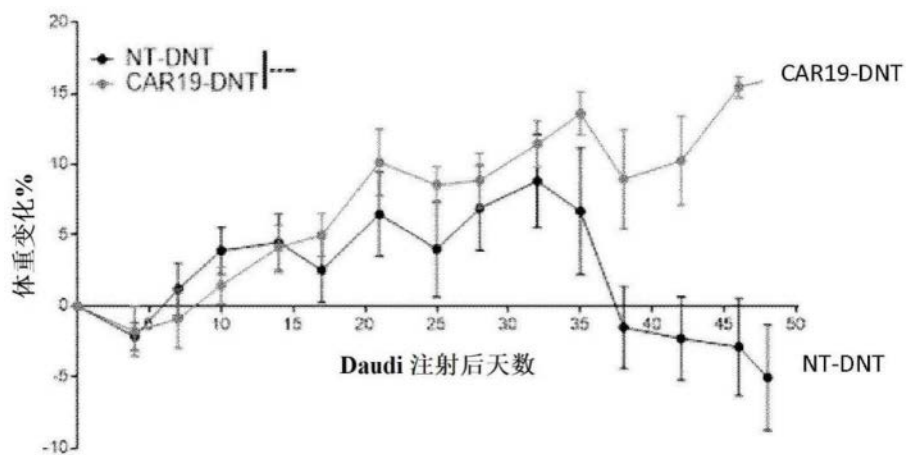


图4b

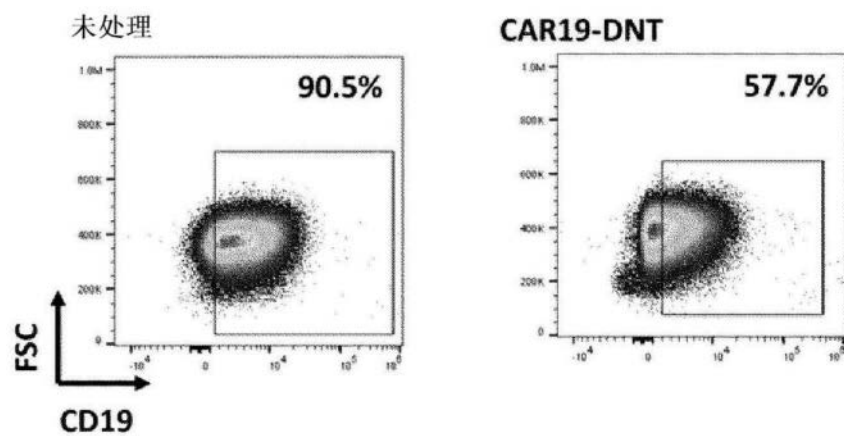


图5a

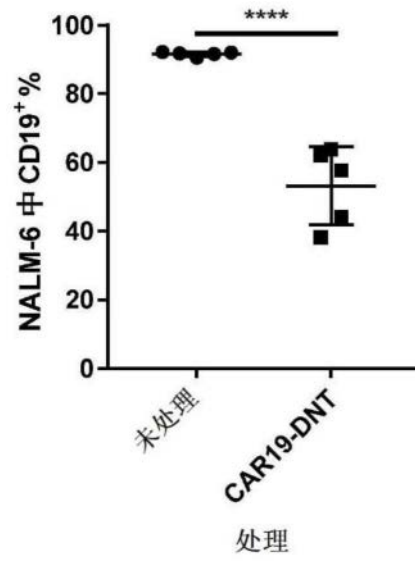


图5b

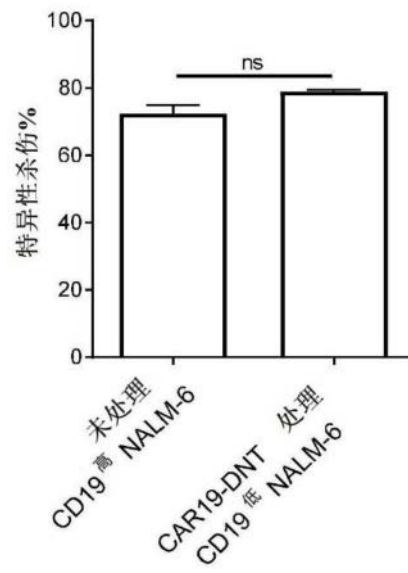


图5c

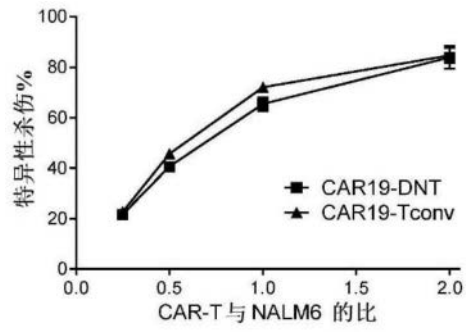


图6a

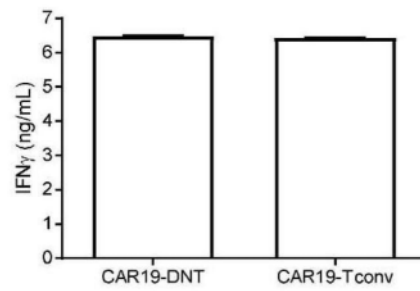


图6b

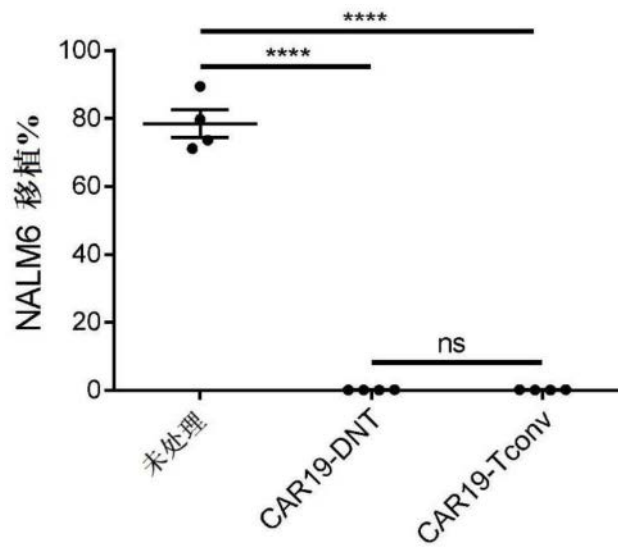


图6c

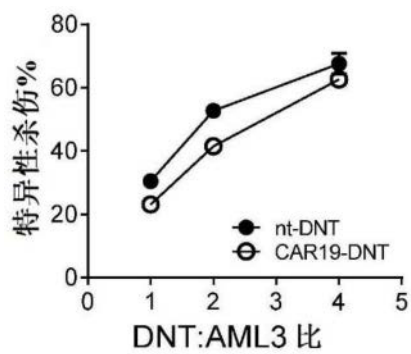


图7a

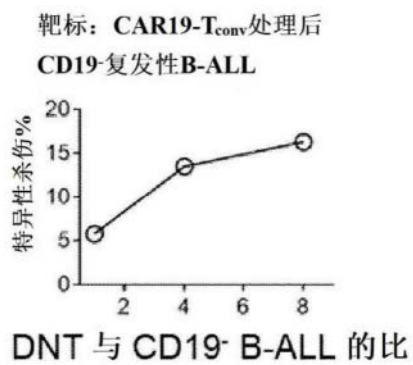


图7b

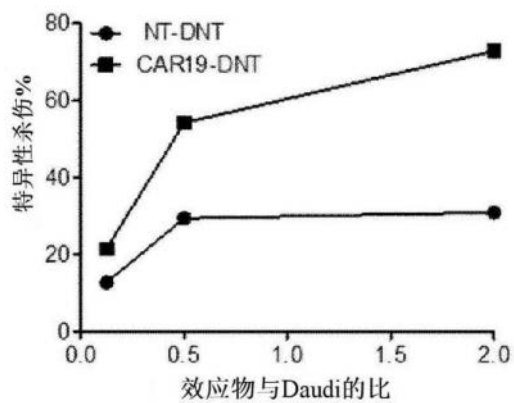


图7c

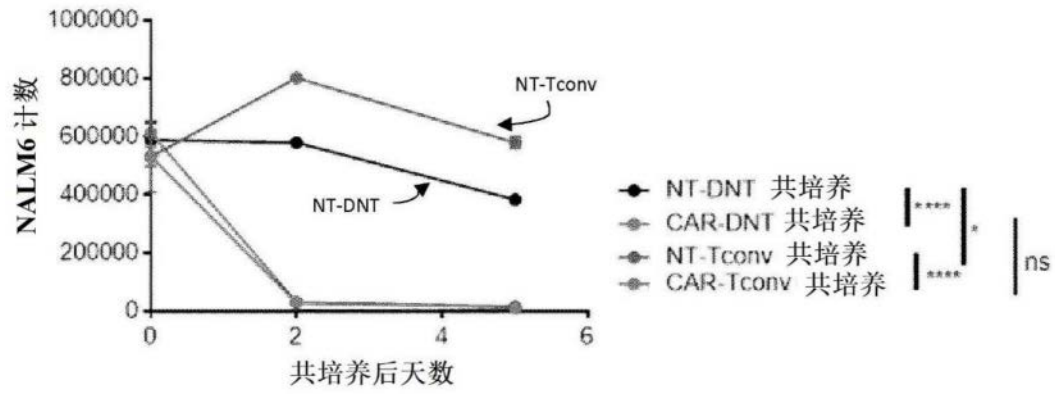


图8a

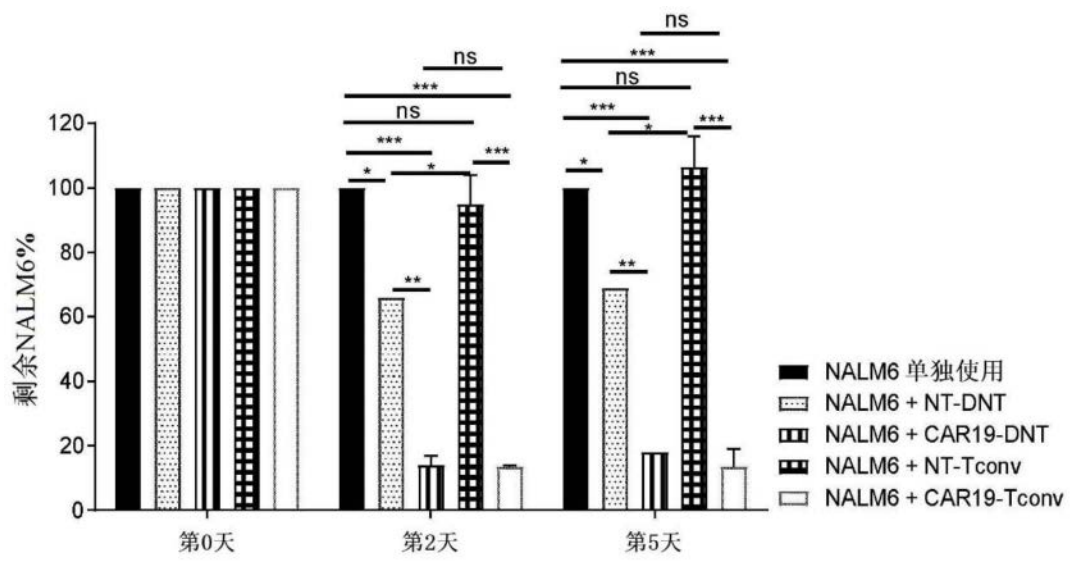


图8b

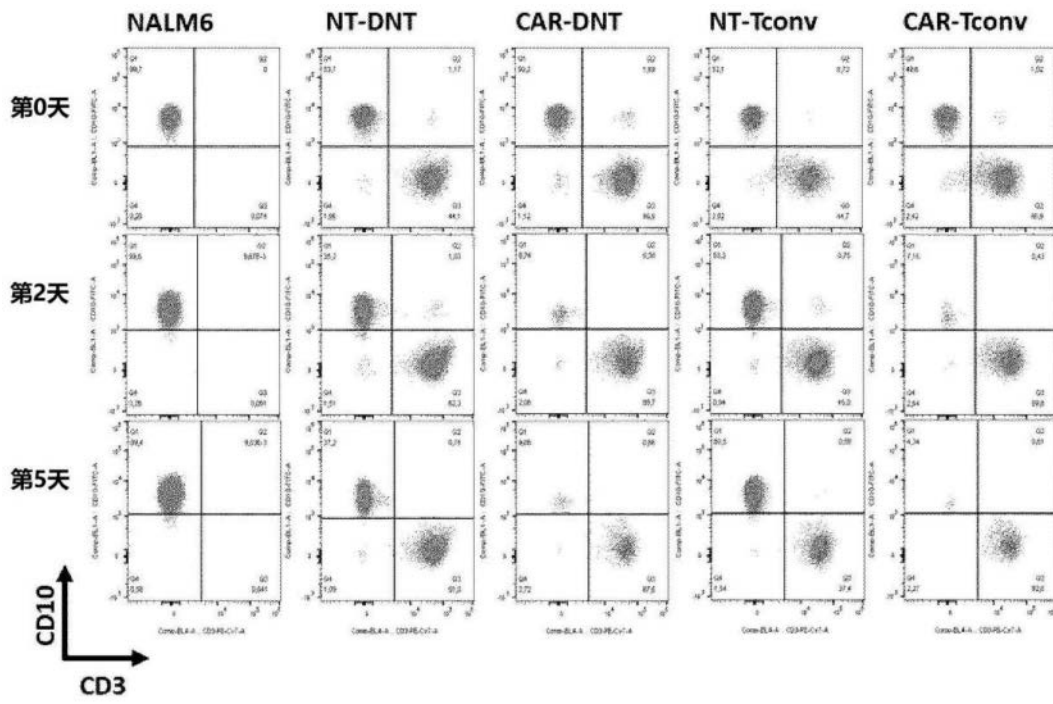


图8c

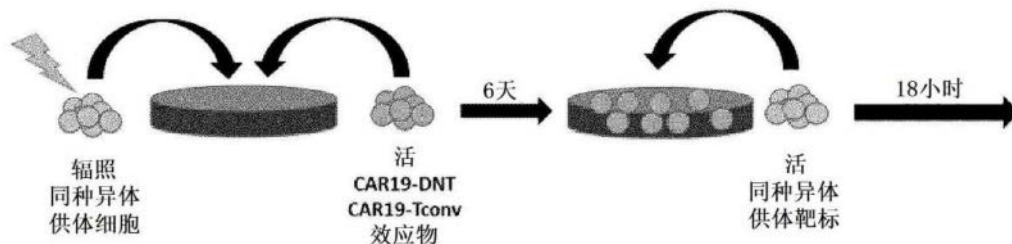


图9a

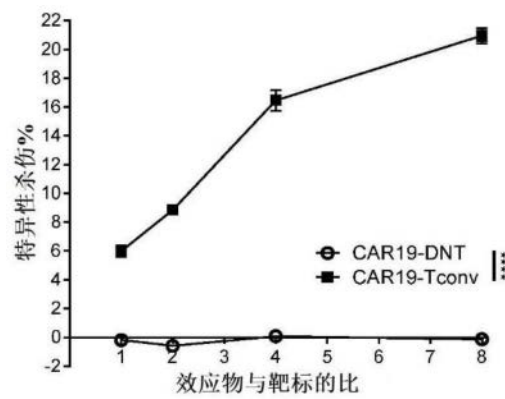


图9b

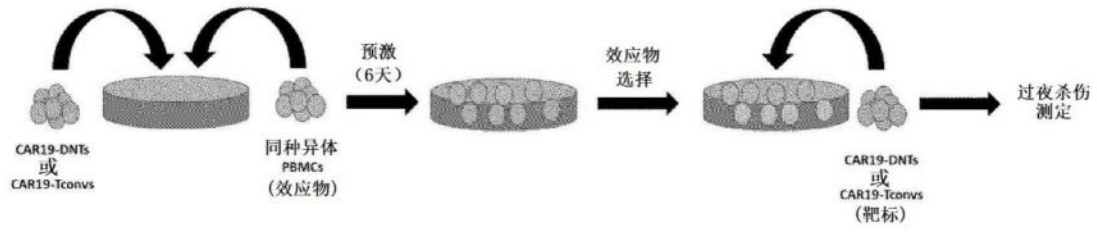


图9c

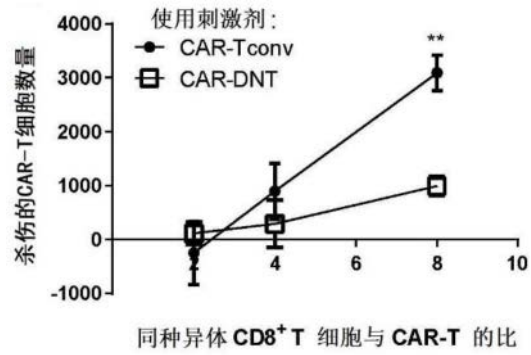


图9d

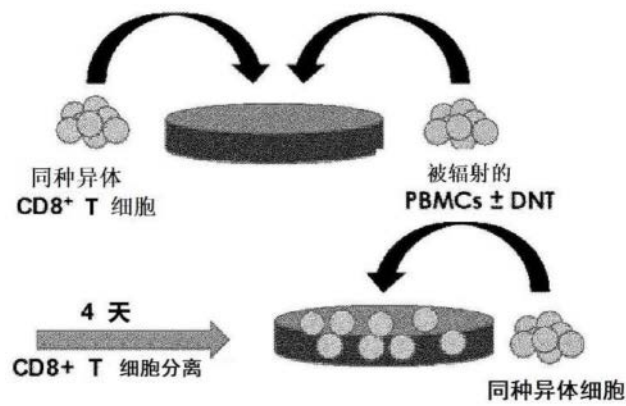


图9e

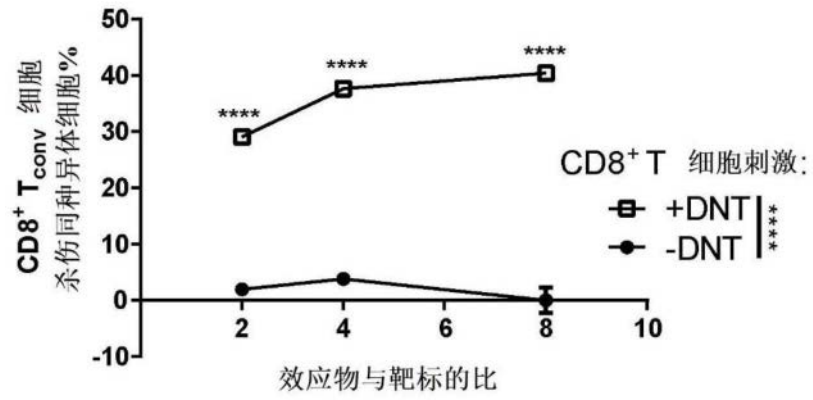


图9f

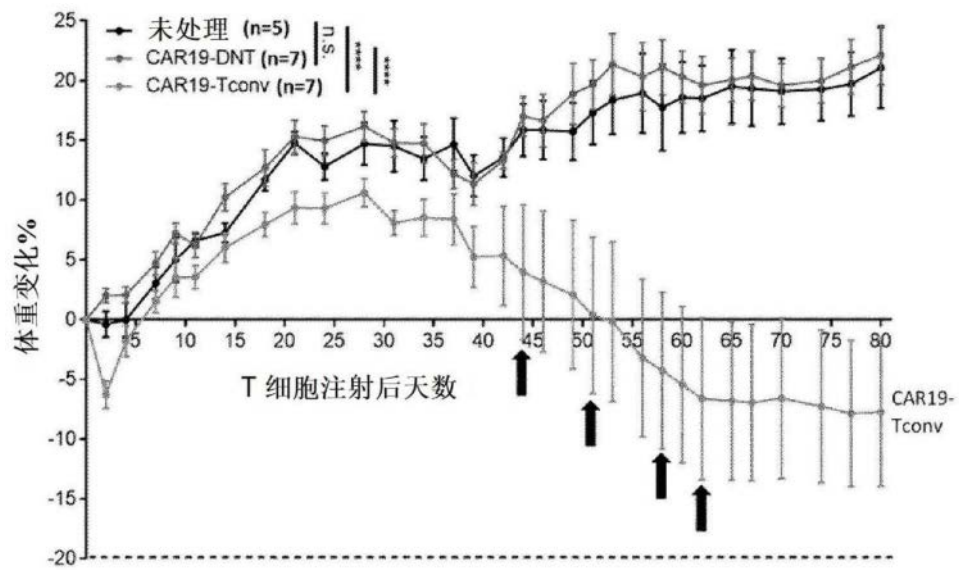


图10a

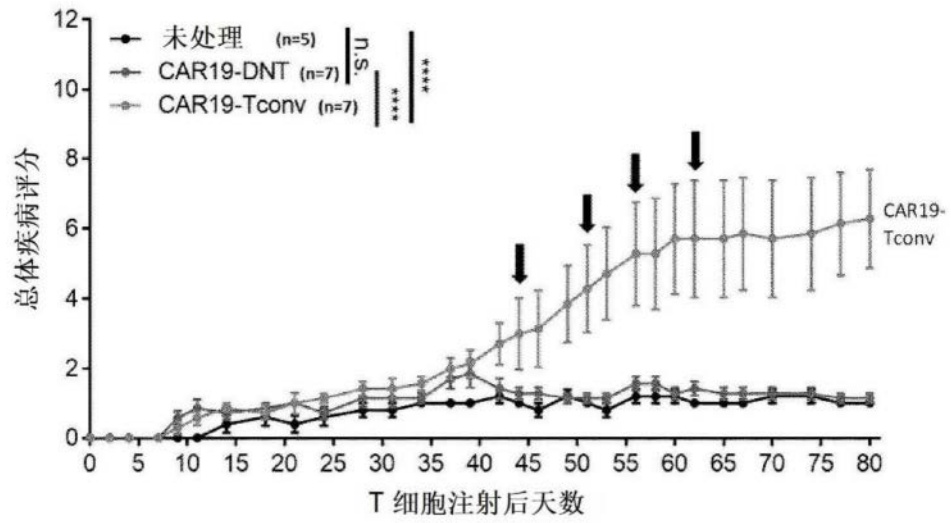


图10b

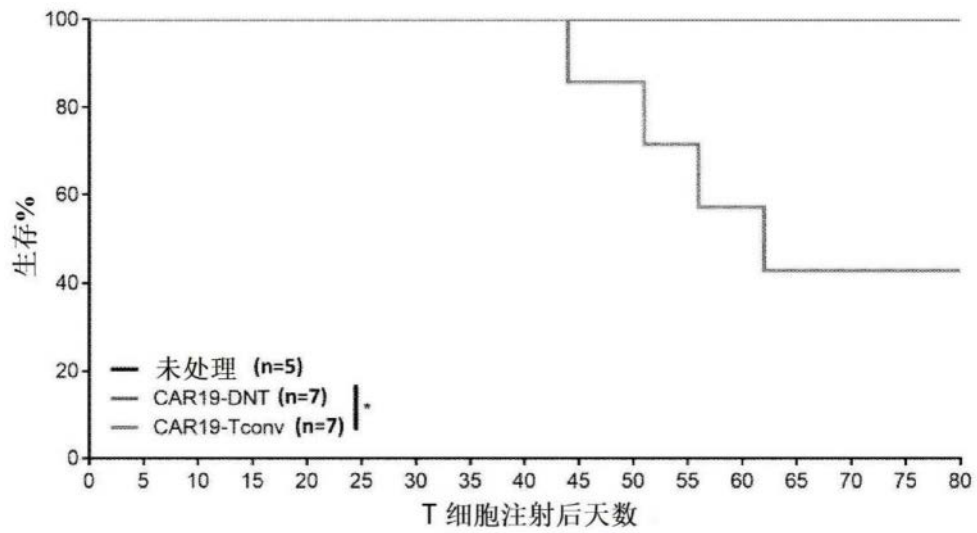


图10c

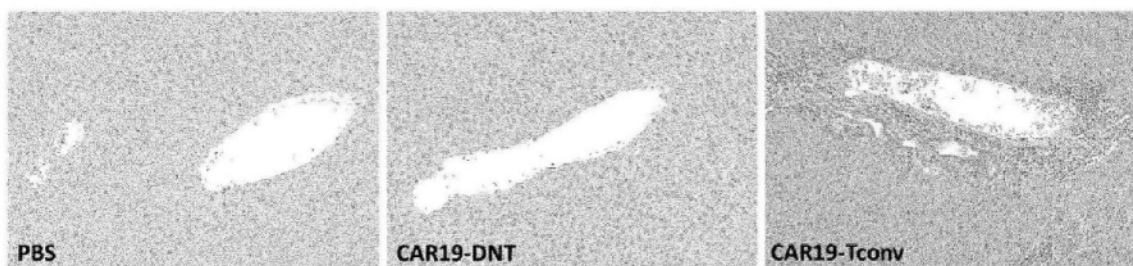


图10d

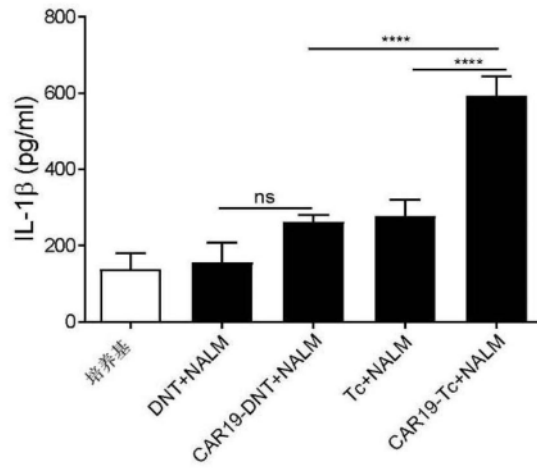
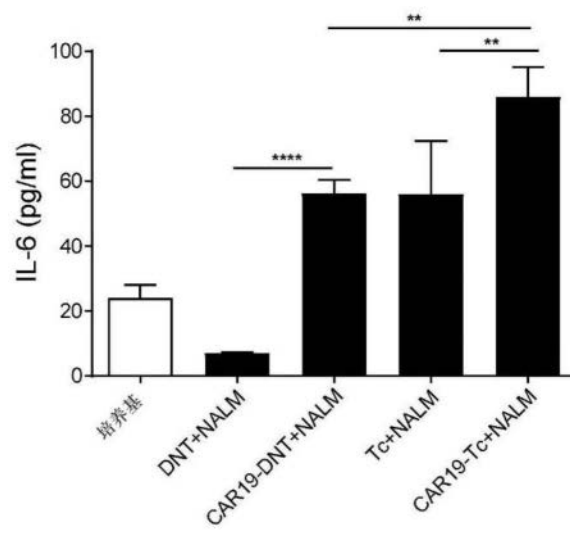


图11a



用于刺激THP-1的
上清液来源

图11b

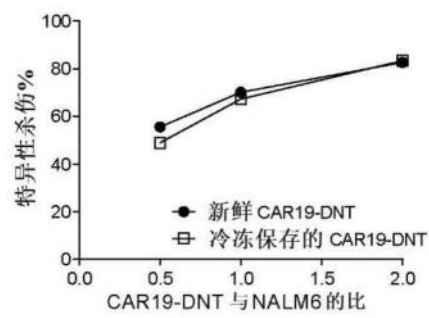


图12

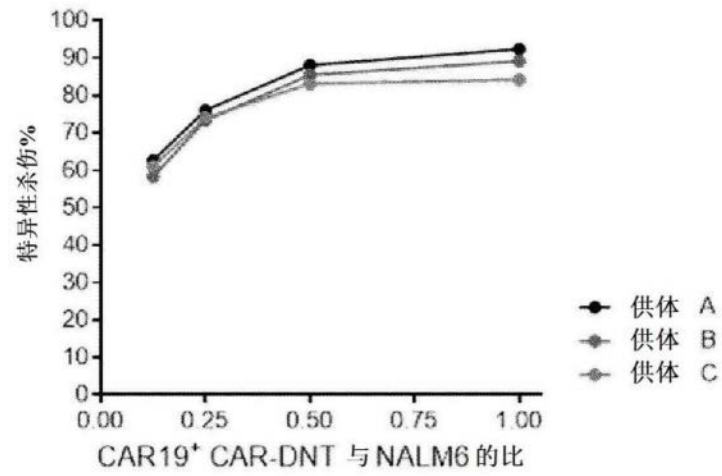


图13

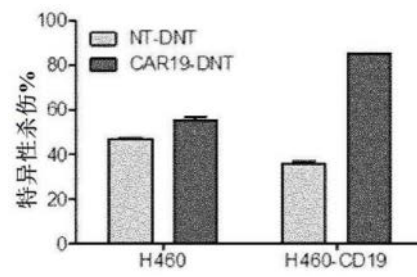


图14a

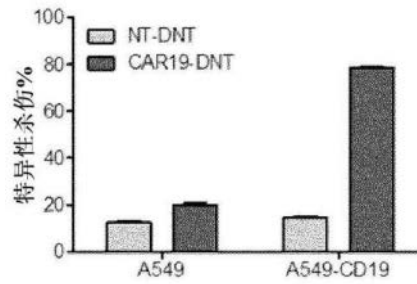


图14b

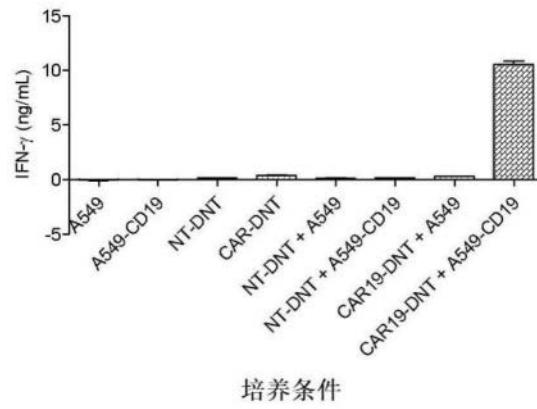


图14c

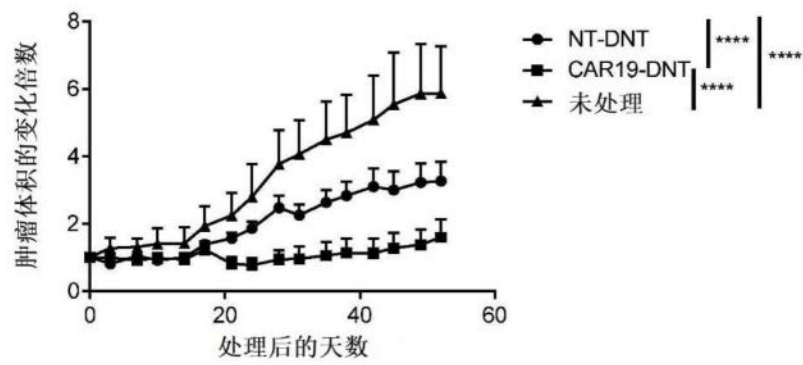


图15a

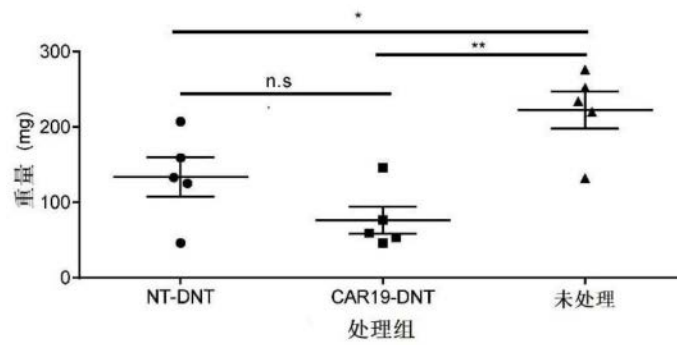


图15b

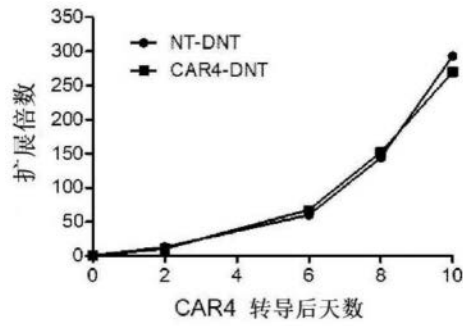


图16a

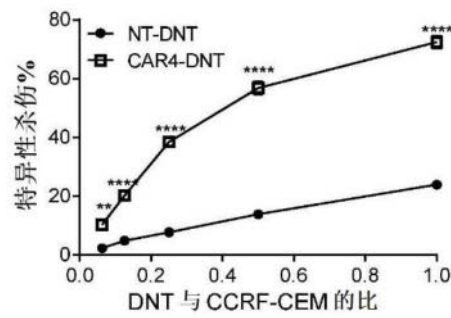


图16b

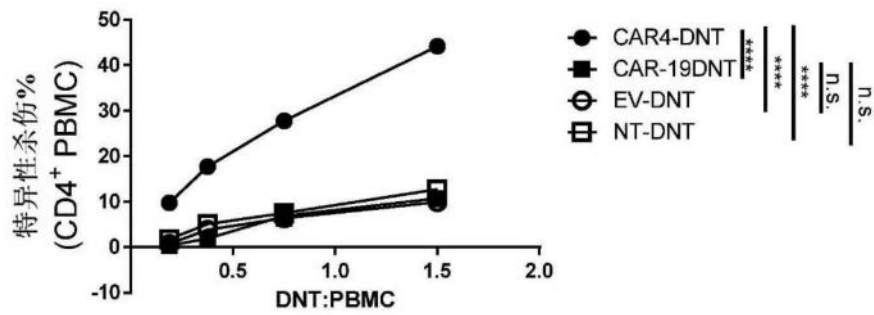


图17a

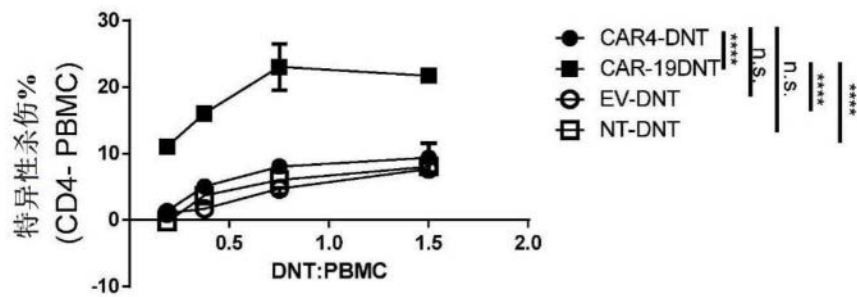


图17b

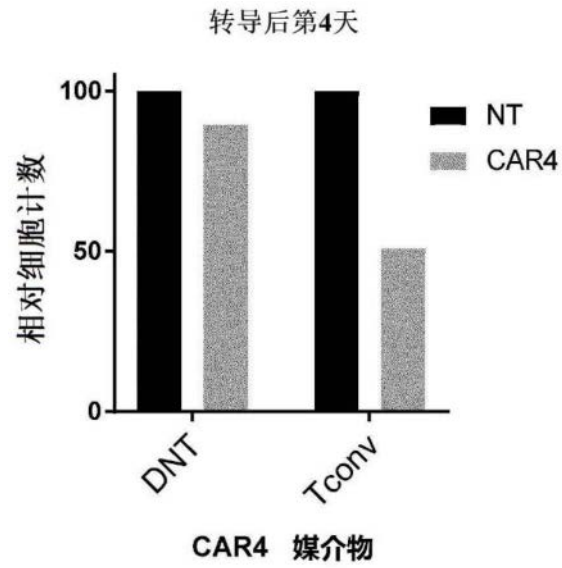


图18a

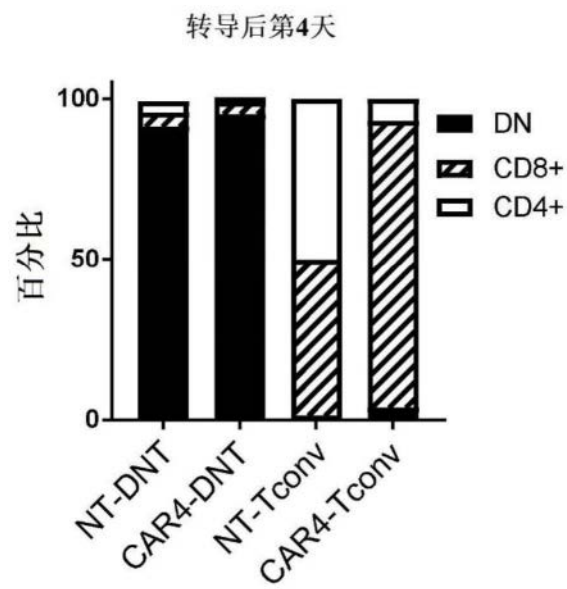


图18b