



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108291209 A

(43)申请公布日 2018.07.17

(21)申请号 201680060533.6

(22)申请日 2016.09.06

(30)优先权数据

62/214,071 2015.09.03 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.04.16

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/050428 2016.09.06

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/041106 EN 2017.03.09

(71)申请人 UAB研究基金会

地址 美国阿拉巴马

申请人 埃默里大学

亚特兰大儿童健康护理股份有限公

司

(72)发明人 L·S·兰姆 H·T·斯潘塞

G·Y·吉莱斯皮

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 左路 林晓红

(51)Int.Cl.

C12N 5/22(2006.01)

C12N 5/0783(2006.01)

C07K 14/705(2006.01)

A61K 35/17(2006.01)

A61K 31/495(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

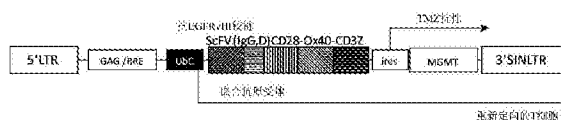
权利要求书4页 说明书24页 附图13页

(54)发明名称

基因工程化的抗药性T细胞和其使用方法

(57)摘要

本公开提供了新颖细胞组合物,所述细胞组合物被工程化成至少表达嵌合抗原受体和存活因子。还描述了使用这类细胞组合物的方法。



1. 一种使用免疫疗法治疗和额外治疗剂治疗来治疗罹患癌症的受试者的方法,所述方法包括:

a. 向受试者施用包括 $\gamma\delta$ T细胞的细胞组合物,所述 $\gamma\delta$ T细胞至少表达针对肿瘤抗原的嵌合抗原受体(CAR)、针对应激诱发的抗原的受体以及允许表达所述CAR的免疫系统细胞在由所述额外治疗剂治疗产生的治疗环境中存活的存活因子;以及

b. 向所述受试者施用所述额外治疗剂治疗,其中所述额外治疗剂治疗在向所述受试者施用所述细胞组合物之前、向所述受试者施用所述细胞组合物之后、或者向所述受试者施用所述细胞组合物的同时施用,或上述方式的任何组合。

2. 根据权利要求1所述的方法,进一步包括至少再一次向所述受试者施用所述细胞组合物。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述额外治疗剂治疗任选地在所述至少再一次向所述受试者施用所述细胞组合物的施用之前、在所述至少再一次向所述受试者施用所述细胞组合物的施用之后、与所述至少再一次向所述受试者施用所述细胞组合物的施用的同时施用,或上述方式的任何组合。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中在第X天向所述受试者施用所述细胞组合物,并且在第X天前的12至72小时、在第X天后的12至72小时或是在第X天前和第X天后的12至72小时向所述受试者施用所述额外治疗剂治疗。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中在第X天向所述受试者施用所述细胞组合物,并且在第X天前的12至72小时、第X天后的12至72小时或是在第X天前和第X天后的12至72小时向所述受试者施用所述额外治疗剂治疗,接着在第Y天向所述受试者再一次施用所述细胞组合物,其中在第Y天前12至72小时、第Y天后12至72小时或是在第Y天前和第Y天后12至72小时,任选地向所述受试者施用所述额外治疗剂治疗。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述癌症选自由以下组成的组中:脑癌、乳腺癌、前列腺癌、肺癌、结肠癌、上皮癌、头颈癌、皮肤癌、生殖泌尿道癌、卵巢癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、肾癌、胃癌、小肠癌、肝癌、胰腺癌、胆囊癌、胆管癌、食道癌、涎腺癌、甲状腺癌和血液恶性病白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤和骨髓增生异常综合征。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述癌症选自由以下组成的组中:松果体肿瘤、垂体肿瘤、PNET、神经鞘瘤、淋巴瘤、髓母细胞瘤、脑膜瘤、转移性脑癌、神经纤维瘤、神经元和混合神经元-神经胶质肿瘤、少突星形细胞瘤、少突神经胶质瘤、星形细胞瘤、非典型畸胎样横纹肌样瘤(ATRT)、软骨肉瘤、脉络丛肿瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、生殖细胞肿瘤、成神经细胞瘤、成胶质细胞瘤和神经胶质瘤。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述癌症对所述额外治疗剂治疗敏感。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述癌症对所述额外治疗剂治疗具抗性。

10. 根据权利要求1所述的方法,其中所述肿瘤抗原选自由以下组成的组中:EphA2、B细胞成熟抗原(BCMA)、B7-H3、B7-H6、CAIX、CA9、CD22、CD19、CD20、ROR1、 κ 或轻链、癌胚抗原、 α -胎蛋白、CA-125、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3、上皮肿瘤抗原、黑色素瘤相关抗原、EGP2、EGP40、EPCAM、ERBB3、ERBB4、ErbB3/4、PAP、FAR、FBP、胎儿AChR、叶酸受体 α 、突变p53、突变ras、HER2、ERBB2、HER3、叶酸结合蛋白、HIV-1包膜糖蛋白gp120、HIV-1包膜糖蛋白gp41、5T4、8H9、GD2、CD123、CD23、CD33、CD30、CD38、CD56、c-Met、fap、间皮素、GD3、HERV-K、IL-11R α 、

IL-13R α 、CSPG4、Lewis-Y、MCSP、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2D配体、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSC1、PSMA、EGFR、Sp17、存活素、TAG72、TEM1、TEM8、EGFRvIII和VEGFR2。

11. 根据权利要求1所述的方法,其中所述癌症是成胶质细胞瘤并且所述肿瘤抗原选自由以下组成的组中:NKG2D配体、ULBP-1、ULBP-2、ULBP-3、ULBP-4、ULBP-5、ULBP-6、MIC-A、MIC-B、EGFRvIII和IL13R α 。

12. 根据权利要求1所述的方法,其中所述癌症是成胶质细胞瘤并且所述肿瘤抗原是EGFRvIII或IL13R α 。

13. 根据权利要求1所述的方法,其中所述癌症是成神经细胞瘤并且所述肿瘤抗原选自由以下组成的组中:NKG2D配体、ULBP-1、ULBP-2、ULBP-3、ULBP-4、ULBP-5、ULBP-6、MIC-A、MIC-B和GD2。

14. 根据权利要求1所述的方法,其中所述癌症是成神经细胞瘤并且所述肿瘤抗原是GD2。

15. 根据权利要求1所述的方法,其中所述细胞组合物包括 γ δ T细胞,以及 α β T细胞与NK细胞中的至少一种。

16. 根据权利要求1所述的方法,其中所述细胞组合物包括 γ δ T细胞,且任选地包括 α β T细胞和NK细胞。

17. 根据权利要求1所述的方法,其中所述细胞组合物包括大于或等于60% γ δ T细胞和小于或等于5% α β T细胞和小于或等于25%NK细胞。

18. 根据权利要求1所述的方法,其中所述针对应激诱发的抗原的受体是NKG2D受体。

19. 根据权利要求1所述的方法,其中所述额外治疗剂治疗是用核苷类似物、烷基化剂、抗代谢物、抗生素、拓扑异构酶抑制剂、有丝分裂抑制剂、分化剂或激素治疗剂治疗,并且所述存活因子提供对所述额外治疗剂治疗的抗性。

20. 根据权利要求1所述的方法,其中所述存活因子是O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶、多重耐药蛋白1或5'核苷酸酶II。

21. 根据权利要求1所述的方法,其中所述额外治疗剂治疗是用烷基化剂治疗,并且所述存活因子是O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶。替莫唑胺

22. 根据权利要求1所述的方法,其中所述额外治疗剂治疗是用替莫唑胺治疗,并且所述存活因子是O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶。

23. 根据权利要求1所述的方法,其中所述 γ δ T细胞被工程化成表达所述针对肿瘤抗原的CAR和所述存活因子,并且所述针对应激诱发的抗原的受体天然存在于所述免疫系统细胞上。

24. 根据权利要求1所述的方法,其中所述 γ δ T细胞被工程化成表达所述针对肿瘤抗原的CAR、所述存活因子和所述针对应激诱发的抗原的受体。

25. 根据权利要求1所述的方法,其中所述 γ δ T细胞进一步表达自杀基因。

26. 根据权利要求1所述的方法,其中所述额外治疗剂治疗提供至少一个以下益处:

- a. 通过诱发应激诱发的抗原,增加所述组合物的效力;
- b. 增加所述组合物的稳态复原;
- c. 增加所述组合物的体内增殖;以及
- d. 增加所述组合物的持久性。

27. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述额外治疗剂治疗增加由以下组成的组中选出的应激活发的抗原的表达: ULBP-1、ULBP-2、ULBP-3、ULBP-4、ULBP-5、ULBP-6、MIC-A和MIC-B。

28. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述 $\gamma\delta$ T 细胞是从所述受试者获得, 并且任选地离体扩增。

29. 一种细胞组合物, 包括 $\gamma\delta$ T 细胞, 所述 $\gamma\delta$ T 细胞至少表达针对肿瘤抗原的嵌合抗原受体 (CAR) 和允许免疫系统细胞在由额外治疗剂治疗创造的治疗环境中存活的存活因子, 并且进一步表达针对应激活发的抗原的受体。

30. 根据权利要求29所述的细胞组合物, 其中所述癌症选自由以下组成的组中: 脑癌、乳腺癌、前列腺癌、肺癌、结肠癌、上皮癌、头颈癌、皮肤癌、生殖泌尿道癌、卵巢癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、肾癌、胃癌、小肠癌、肝癌、胰腺癌、胆囊癌、胆管癌、食道癌、涎腺癌、甲状腺癌和血液恶性病白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤和骨髓增生异常综合征。

31. 根据权利要求29所述的细胞组合物, 其中所述癌症选自由以下组成的组中: 松果体肿瘤、垂体肿瘤、PNET、神经鞘瘤、淋巴瘤、髓母细胞瘤、脑膜瘤、转移性脑癌、神经纤维瘤、神经元和混合神经元-神经胶质肿瘤、少突星形细胞瘤、少突神经胶质瘤、星形细胞瘤、非典型畸胎样横纹肌样瘤 (ATRT)、软骨肉瘤、脉络丛肿瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、生殖细胞肿瘤、成神经细胞瘤、成胶质细胞瘤和神经胶质瘤。

32. 根据权利要求29所述的细胞组合物, 其中所述癌症对所述额外治疗剂治疗敏感。

33. 根据权利要求29所述的细胞组合物, 其中所述肿瘤抗原选自由以下组成的组中: EphA2、B细胞成熟抗原 (BCMA)、B7-H3、B7-H6、CAIX、CA9、CD22、CD19、CD20、ROR1、 κ 或轻链、癌胚抗原、 α -胎蛋白、CA-125、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3、上皮肿瘤抗原、黑色素瘤相关抗原、EGP2、EGP40、EPCAM、ERBB3、ERBB4、ErbB3/4、PAP、FAR、FBP、胎儿AchR、叶酸受体 α 、突变p53、突变ras、HER2、ERBB2、HER3、叶酸结合蛋白、HIV-1包膜糖蛋白gp120、HIV-1包膜糖蛋白gp41、5T4、8H9、GD2、CD123、CD23、CD33、CD30、CD38、CD56、c-Met、fap、间皮素、GD3、HERV-K、IL-11R α 、IL-13R α 、CSPG4、Lewis-Y、MCSP、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2D配体、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSC1、PSMA、EGFR、Sp17、存活素、TAG72、TEM1、TEM8、EGFRvIII和VEGFR2。

34. 根据权利要求29所述的细胞组合物, 其中所述癌症是成胶质细胞瘤, 并且所述肿瘤抗原选自由以下组成的组中: NKG2D配体、ULBP-1、ULBP-2、ULBP-3、ULBP-4、ULBP-5、ULBP-6、MIC-A、MIC-B、EGFRvIII和IL13R α 。

35. 根据权利要求29所述的细胞组合物, 其中所述癌症是成胶质细胞瘤, 并且所述肿瘤抗原是EGFRvIII或IL13R α 。

36. 根据权利要求29所述的细胞组合物, 其中所述癌症是成神经细胞瘤并且所述肿瘤抗原选自由以下组成的组中: NKG2D配体、ULBP-1、ULBP-2、ULBP-3、ULBP-4、ULBP-5、ULBP-6、MIC-A、MIC-B和GD2。

37. 根据权利要求29所述的细胞组合物, 其中所述癌症是成神经细胞瘤并且所述肿瘤抗原是GD2。

38. 根据权利要求29所述的细胞组合物, 其中所述细胞组合物包括 $\gamma\delta$ T 细胞, 以及 $\alpha\beta$ T 细胞与NK细胞中的至少一种。

39. 根据权利要求29所述的细胞组合物, 其中所述细胞组合物包括 $\gamma\delta$ T 细胞, 且任选地

包括 $\alpha\beta$ T细胞和NK细胞。

40. 根据权利要求29所述的细胞组合物,其中所述细胞组合物包括大于或等于60% $\gamma\delta$ T细胞和小于或等于5% $\alpha\beta$ T细胞和小于或等于25%NK细胞。

41. 根据权利要求29所述的细胞组合物,其中所述 $\gamma\delta$ T细胞被工程化成表达所述CAR和所述存活因子,并且任选地被工程化成表达所述针对应激诱发的抗原的受体。

42. 根据权利要求41所述的细胞组合物,其中所述针对应激诱发的抗原的受体是NKG2D受体。

43. 根据权利要求29所述的细胞组合物,其中所述 $\gamma\delta$ T细胞天然表达针对应激诱发的抗原的受体。

44. 根据权利要求43所述的细胞组合物,其中所述针对应激诱发的抗原的受体是NKG2D受体。

45. 根据权利要求29所述的细胞组合物,其中所述额外治疗剂治疗是用核苷类似物、烷基化剂、抗代谢物、抗生素、拓扑异构酶抑制剂、有丝分裂抑制剂、分化剂或激素治疗剂治疗,并且所述存活因子提供对所述额外治疗剂治疗的抗性。

46. 根据权利要求29所述的细胞组合物,其中所述存活因子是 O^6 -甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶、多重耐药蛋白1或5'核苷酸酶II。

47. 根据权利要求29所述的细胞组合物,其中所述额外治疗剂治疗是用烷基化剂治疗,并且所述存活因子是 O^6 -甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶。

48. 根据权利要求29所述的细胞组合物,其中所述额外治疗剂治疗是用替莫唑胺治疗,并且所述存活因子是 O^6 -甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶。

49. 根据权利要求29所述的细胞组合物,其中所述 $\gamma\delta$ T细胞被工程化成进一步表达自杀基因。

50. 根据权利要求29所述的细胞组合物,其中所述额外治疗剂治疗增加应激诱发的抗原的表达。

51. 根据权利要求29所述的细胞组合物,其中所述额外治疗剂治疗增加由以下组成的组中选出的应激诱发的抗原的表达:ULBP-1、ULBP-2、ULBP-3、ULBP-4、ULBP-5、ULBP-6、MIC-A和MIC-B。

基因工程化的抗药性T细胞和其使用方法

背景技术

[0001] 虽然用于治疗癌症的常规治疗策略在许多方面是有前景的,但仍然需要改善。举例来说,尽管进行大量的尝试,但例如多形性成胶质细胞瘤 (glioblastoma multiforme, GBM) 等高度恶性原发性脑肿瘤的疗法无法显著并一直延长中位存活期超出两年。

[0002] 一个正在研究的研究区域是免疫疗法。这些治疗利用患者的免疫系统对抗例如癌症等疾病的能力。具体地说,正在研究过继性细胞转移。在过继性细胞转移的许多形式中,收集患者的免疫细胞,进行扩增和修饰以获得更高效的反应。在这点上,已经使用嵌合抗原受体 (chimeric antigen receptor, CAR)。CAR是工程化的受体,其赋予免疫效应细胞以任意和界定的特异性。通常, CAR用于赋予T细胞以单克隆抗体的特异性。在这种方法中,从患者或合适的供体中移出T细胞,并进行修饰,从而使其表达对癌症的具体形式具有特异性的受体。接着将能够识别和杀死癌细胞的T细胞再引入到患者中。这种方法的初始临床研究已经显示功效。

[0003] 然而, CAR在过继性细胞转移中的使用仍然具有若干缺点。本公开提供了一种新的免疫系统细胞组合物,其被工程化成表达对肿瘤抗原具有特异性的CAR和提供对可能施用于患者的额外治疗剂治疗 (例如化学疗法治疗方案) 的抗性的存活因子。所述细胞组合物可以进一步包括自杀基因和其它元件。还提供了使用细胞组合物治疗疾病的方法。因而,本公开提供了新而所需的解决方案来解决使用免疫疗法进行治疗所产生的问题。在某些实施方案中,所提供的细胞组合物是 $\gamma\delta$ T 细胞。

附图说明

[0004] 图1A展示共表达eGFP的EGFRvIII CAR对照载体,eGFP可以用于通过流式细胞术容易地追踪细胞转导。

[0005] 图1B展示共表达萤火虫荧光素酶的EGFRvIII CAR对照载体,萤火虫荧光素酶可以用于追踪体内的细胞迁移/归巢。

[0006] 图1C展示编码EGFRvIII CAR的对照载体,其缺乏编码存活因子的序列并且无法赋予抗药性。对照构建体可以用作CAR表达的阳性对照和抗药性的阴性对照。

[0007] 图1D展示共表达编码赋予对替莫唑胺 (temozolomide, TMZ) 的抗性的存活因子 (此图中是MGMT) 的序列的EGFRvIII CAR。预期这种构建体为成胶质细胞瘤的体内治疗提供最大的益处。

[0008] 图2展示用于治疗的示例性实验设计。

[0009] 图3A展示SPECT/CT融合图像 (轴向视图),其展示在使用未经处理的 $\gamma\delta$ T 细胞进行注射后48小时,4T1乳腺脂肪垫肿瘤中¹¹¹[In] 标记的 $\gamma\delta$ T 细胞的分布,并且示出未经处理的 $\gamma\delta$ T 细胞结合肿瘤;加点圆圈描绘肿瘤区域。

[0010] 图3B展示使用在注射前经抗 $\gamma\delta$ TCR单克隆抗体预处理的 $\gamma\delta$ T 细胞进行的图3A中所述的相同成像,并且示出处理过的 $\gamma\delta$ T 细胞未结合肿瘤;加点圆圈描绘肿瘤区域。

[0011] 图4A展示X12T和X22T神经胶质瘤异种移植物上应激相关的NKG2DL表达。两种细胞

类型都展示自身荧光。黑色=同型对照,蓝色=肿瘤,红色=暴露于400 μ M TMZ 4小时的肿瘤。

[0012] 图4B展示被修饰成对TMZ具抗性的离体扩增/活化的 $\gamma\delta$ T细胞对来源于X12T和X22T神经胶质瘤异种移植物的细胞具有细胞毒性,所述细胞在体外与递增的效应:靶(E:T)比率的X12T和X22T一起培养,并且裂解%表示为通过流式细胞术获得的活/死比率。

[0013] 图5A展示在用单独TMZ (TMZ)、TMZ加包括被修饰成表达用于获得TMZ抗性的存活因子的 $\gamma\delta$ T细胞和NK细胞的组合物的组合(DRI)、未经修饰的 $\gamma\delta$ T细胞和NK细胞(CT)处理后负载X12P神经胶质瘤的小鼠和未接受处理的对照小鼠的存活。

[0014] 图5B展示在用单独TMZ (TMZ)、TMZ加包括被修饰成表达用于获得TMZ抗性的存活因子的 $\gamma\delta$ T细胞和NK细胞的组合物的组合(DRI)、未经修饰的 $\gamma\delta$ T细胞和NK细胞(CT)处理后负载X12P神经胶质瘤的小鼠和未接受处理的对照小鼠的存活。

[0015] 图6展示与转移性脑肿瘤组织相邻的正常脑组织中应激诱发的抗原表达未增加。

[0016] 图7展示在放射处理后正常脑组织中应激诱发的抗原表达未增加。

[0017] 图8A展示现有技术的方法的一实施方案。

[0018] 图8B展示本公开的方法的一实施方案。

具体实施方式

[0019] 用于癌症的常规治疗策略需要改善。本公开提供了一种新颖的解决方案来解决在本领域中遇到的问题,并且描述了新颖细胞组合物和使用新颖细胞组合物治疗多种癌症、包含(但不限于)GBM的方法。本公开提供了使用 $\gamma\delta$ T细胞的细胞组合物的实例并且提供CAR和存活因子的特定实例。然而,其它免疫系统细胞、其它CAR和其它存活因子可以用于本公开。免疫系统细胞、CAR和存活因子的选择可以至少部分地受待治疗的癌症类型和用于治疗患者的其它疗法影响。

[0020] 本公开提供了新颖细胞组合物和这类细胞组合物用于治疗方法中的用途。

[0021] 在第一方面中,细胞组合物包括免疫系统细胞,所述免疫系统细胞被工程化成表达针对肿瘤抗原的CAR和允许免疫系统细胞在由额外治疗剂治疗创造的治疗环境中存活的存活因子(例如赋予对与所述细胞组合物一起使用的化学治疗剂的抗性的多肽)。

[0022] 在第二方面中,细胞组合物包括 $\gamma\delta$ T细胞,所述 $\gamma\delta$ T细胞被工程化成表达针对肿瘤抗原的CAR和允许 $\gamma\delta$ T细胞在由额外治疗剂治疗创造的治疗环境中存活的存活因子(例如赋予对与所述细胞组合物一起使用的化学治疗剂的抗性的多肽)。

[0023] 在第三方面中,细胞组合物包括 $\gamma\delta$ T细胞,所述 $\gamma\delta$ T细胞被工程化成表达针对神经胶质瘤特异性肿瘤相关抗原(TAA)的CAR和用于获得对替莫唑胺(TMZ)化学疗法的抗性的允许 $\gamma\delta$ T细胞在例如TMZ化学疗法的治疗环境中存活的存活因子。

[0024] 在第四方面中,细胞组合物包括 $\gamma\delta$ T细胞,所述 $\gamma\delta$ T细胞被工程化成表达针对神经胶质瘤特异性TAA EGFRvIII的CAR和用于获得对例如TMZ化学疗法的抗性的允许 $\gamma\delta$ T细胞在例如TMZ化学疗法的治疗环境中存活的O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶(O⁶-Methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT)。

[0025] 在第五方面中,细胞组合物包括 $\gamma\delta$ T细胞,所述 $\gamma\delta$ T细胞被工程化成表达针对神经胶质瘤特异性TAA IL13R α 的CAR和用于获得对例如TMZ化学疗法的抗性的允许 $\gamma\delta$ T细胞

在例如TMZ化学疗法的治疗环境中存活的MGMT。

[0026] 在第六方面中,本公开提供了一种治疗癌症的方法,所述方法包括向受试者施用本公开的细胞组合物并且在施用本公开的细胞组合物之前、施用本公开的细胞组合物之后或在施用本公开的细胞组合物之前与施用本公开的细胞组合物之后提供额外治疗剂治疗。

[0027] 在第七方面中,本公开提供了一种治疗神经胶质瘤的方法,所述方法包括向受试者施用本公开的细胞组合物并且在施用本公开的细胞组合物之前、施用本公开的细胞组合物之后或在施用本公开的细胞组合物之前与施用本公开的细胞组合物之后提供额外治疗剂治疗。

[0028] 在第八方面中,本公开提供了一种治疗GBM的方法,所述方法包括向受试者施用本公开的细胞组合物并且在施用本公开的细胞组合物之前、施用本公开的细胞组合物之后或在施用本公开的细胞组合物之前与施用本公开的细胞组合物之后提供额外治疗剂治疗。

[0029] 在第九方面中,本公开提供了一种治疗GBM的方法,所述方法包括向受试者施用第四或第五方面的细胞组合物并且在施用本公开的细胞组合物之前、施用本公开的细胞组合物之后或在施用本公开的细胞组合物之前与施用本公开的细胞组合物之后提供额外治疗剂治疗。

[0030] 在第十方面中,本公开提供了一种治疗GBM的方法,所述方法包括向受试者施用例如TMZ化学疗法,向受试者施用第四或第五方面的细胞组合物并且任选地施用例如TMZ化学疗法的其它过程和/或本公开的其它细胞组合物。

[0031] 在第十一方面中,本公开提供了一种使用免疫疗法治疗和额外治疗剂治疗来治疗罹患癌症的受试者的方法,所述方法包括:(i)向所述受试者施用包括免疫系统细胞的细胞组合物,所述免疫系统细胞表达针对肿瘤抗原的CAR、针对应激诱发的抗原的受体和允许表达CAR的免疫系统细胞在由额外治疗剂治疗产生的治疗环境中存活的存活因子;以及(ii)向所述受试者施用额外治疗剂治疗,其中所述额外治疗剂治疗在向所述受试者施用所述细胞组合物之前、向所述受试者施用所述细胞组合物之后、与向所述受试者施用所述细胞组合物同时施用或上述方式的任何组合。

[0032] 在第十二方面中,本公开提供了一种使用免疫疗法治疗和额外治疗剂治疗来治疗受试者的方法,所述方法包括:(i)向所述受试者施用包括 $\gamma\delta$ T细胞的细胞组合物,所述 $\gamma\delta$ T细胞表达针对肿瘤抗原的CAR、针对应激诱发的抗原的受体和允许表达CAR的 $\gamma\delta$ T细胞在由额外治疗剂治疗产生的治疗环境中存活的存活因子;以及(ii)向所述受试者施用额外治疗剂治疗,其中所述额外治疗剂治疗在向所述受试者施用所述细胞组合物之前、向所述受试者施用所述细胞组合物之后、与向所述受试者施用所述细胞组合物同时施用或上述方式的任何组合。

[0033] 在第十三方面中,本公开提供了一种使用免疫疗法治疗和利用例如TMZ化学疗法的额外治疗剂治疗来治疗受试者的方法,所述方法包括:(i)向所述受试者施用包括 $\gamma\delta$ T细胞的细胞组合物,所述 $\gamma\delta$ T细胞表达针对神经胶质瘤特异性TAA的CAR、针对应激诱发的抗原的受体和用于获得对例如TMZ化学疗法的抗性的允许表达CAR的 $\gamma\delta$ T细胞在由额外治疗剂治疗产生的治疗环境中存活的存活因子;以及(ii)向所述受试者施用额外治疗剂治疗,其中所述额外治疗剂治疗在向所述受试者施用所述细胞组合物之前、向所述受试者施用所述细胞组合物之后、与向所述受试者施用所述细胞组合物同时施用或上述方式的任何组

合。

[0034] 在第十四方面中,本公开提供了一种使用免疫疗法治疗和利用例如TMZ化学疗法的额外治疗剂治疗来治疗受试者的方法,所述方法包括:(i)向所述受试者施用包括 γ δ T细胞的细胞组合物,所述 γ δ T细胞表达针对神经胶质瘤特异性TAA EGFRvIII的CAR、NKGD2受体和提供对例如TMZ化学疗法的抗性的允许表达CAR的 γ δ T细胞在由额外治疗剂治疗产生的治疗环境中存活的O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶;以及(ii)向所述受试者施用额外治疗剂治疗,其中所述额外治疗剂治疗在向所述受试者施用所述细胞组合物之前、向所述受试者施用所述细胞组合物之后、与向所述受试者施用所述细胞组合物同时施用或上述方式的任何组合。

[0035] 在第十五方面中,本公开提供了一种使用免疫疗法治疗和利用例如TMZ化学疗法的额外治疗剂治疗来治疗受试者的方法,所述方法包括:(i)向所述受试者施用包括 γ δ T细胞的细胞组合物,所述 γ δ T细胞表达针对神经胶质瘤特异性TAA IL13R α 的CAR、NKGD2受体和提供对例如TMZ化学疗法的抗性的允许表达CAR的 γ δ T细胞在由额外治疗剂治疗产生的治疗环境中存活的O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶;以及(ii)向所述受试者施用额外治疗剂治疗,其中所述额外治疗剂治疗在向所述受试者施用所述细胞组合物之前、向所述受试者施用所述细胞组合物之后、与向所述受试者施用所述细胞组合物同时施用或上述方式的任何组合。

[0036] 细胞组合物

[0037] 一般来说,本公开利用存活因子来提供抗药性细胞免疫疗法(DRI)。通过这种机制,提供了能够在向受试者施用后在治疗环境中存活、扩增和发挥抗肿瘤活性的本公开的细胞组合物。基于可以与本公开的细胞组合物和方法组合使用的额外治疗剂治疗选择存活因子。

[0038] 如本文所用,短语“在由额外治疗剂治疗创造的治疗环境中存活”可以与短语“在额外治疗剂治疗存在下存活”互换使用并且每个短语是指细胞能够与额外治疗剂治疗中所用的药剂直接接触存活,或者在由使用其它治疗剂而产生的本发明的细胞组合物的环境中在细胞毒性的存在下存活。额外治疗剂治疗包含(但不限于)用以下治疗:抗癌剂、代谢拮抗剂、DNA去甲基剂、源于植物的抗肿瘤剂、核苷/核苷酸类似物化学疗法药物、烷基化剂、抗代谢物、抗癌抗生素、拓扑异构酶抑制剂、有丝分裂抑制剂、分化剂、激素治疗剂和上述各剂的组合。如本领域中已知和如本文所论述,多种特定药剂可以用于额外治疗剂治疗中。

[0039] 在一个实施方案中,细胞组合物包括免疫系统细胞,所述免疫系统细胞被工程化成至少表达针对肿瘤抗原的CAR和允许免疫系统细胞在由额外治疗剂治疗创造的治疗环境中存活的存活因子(例如赋予对与所述细胞组合物一起使用的化学治疗剂的抗性的多肽)。赋予对某些化学治疗剂的抗药性的这类多肽包含(但不限于):MGMT、5'核苷酸酶II(NT5C2)、二氢叶酸还原酶的抗药性变异体(L22Y-DHFR)、胸苷酸合成酶和多重耐药-1蛋白(MDR1)。

[0040] 在另一实施方案中,细胞组合物包括 γ δ T细胞,所述 γ δ T细胞被工程化成表达针对肿瘤抗原的CAR和允许 γ δ T细胞在由额外治疗剂治疗创造的治疗环境中存活的存活因子(例如赋予对与所述细胞组合物一起使用的化学治疗剂的抗性的多肽)。

[0041] 在另一实施方案中,细胞组合物包括 γ δ T细胞,所述 γ δ T细胞被工程化成至少表

达针对神经胶质瘤特异性TAA的CAR和允许 $\gamma\delta$ T细胞在由额外治疗剂治疗创造的治疗环境中存活的存活因子(例如赋予对与所述细胞组合物一起使用的化学治疗剂的抗性的多肽)。

[0042] 在另一实施方案中,细胞组合物包括 $\gamma\delta$ T细胞,所述 $\gamma\delta$ T细胞被工程化成至少表达针对TAA的CAR和用于获得对例如TMZ化学疗法的抗性的允许 $\gamma\delta$ T细胞在例如TMZ化学疗法的治疗环境中存活的存活因子。

[0043] 在另一实施方案中,细胞组合物包括 $\gamma\delta$ T细胞,所述 $\gamma\delta$ T细胞被工程化成至少表达针对神经胶质瘤特异性TAA EGFRvIII的CAR和用于获得对例如TMZ化学疗法的抗性的允许 $\gamma\delta$ T细胞在例如TMZ化学疗法的治疗环境中存活的MGMT。

[0044] 在另一实施方案中,细胞组合物包括 $\gamma\delta$ T细胞,所述 $\gamma\delta$ T细胞被工程化成至少表达针对神经胶质瘤特异性TAA IL13R α 的CAR和用于获得对例如TMZ化学疗法的抗性的允许 $\gamma\delta$ T细胞在例如TMZ化学疗法的治疗环境中存活的MGMT。

[0045] 在另一实施方案中,细胞组合物包括 $\gamma\delta$ T细胞,所述 $\gamma\delta$ T细胞被工程化成至少表达针对成神经细胞瘤特异性TAA的CAR和允许 $\gamma\delta$ T细胞在由额外治疗剂治疗创造的治疗环境中存活的存活因子(例如赋予对与所述细胞组合物一起使用的化学治疗剂的抗性的多肽)。

[0046] 在另一实施方案中,细胞组合物包括 $\gamma\delta$ T细胞,所述 $\gamma\delta$ T细胞被工程化成至少表达针对成神经细胞瘤特异性TAA的CAR和用于获得对例如TMZ化学疗法的抗性的允许 $\gamma\delta$ T细胞在例如TMZ化学疗法的治疗环境中存活的存活因子。

[0047] 在另一实施方案中,细胞组合物包括 $\gamma\delta$ T细胞,所述 $\gamma\delta$ T细胞被工程化成至少表达针对成神经细胞瘤特异性TAA GD2的CAR和用于获得对例如TMZ化学疗法的抗性的允许 $\gamma\delta$ T细胞在例如TMZ化学疗法的治疗环境中存活的O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶(MGMT)基因。

[0048] 在某些实施方案中,细胞组合物包括免疫系统细胞或 $\gamma\delta$ T细胞,所述免疫系统细胞或 $\gamma\delta$ T细胞被工程化成仅仅表达针对肿瘤抗原或神经胶质瘤特异性TAA的CAR的和存活因子,例如用于获得对例如TMZ的抗性的存活因子。在某些实施方案中,细胞组合物包括免疫系统细胞或 $\gamma\delta$ T细胞,所述免疫系统细胞或 $\gamma\delta$ T细胞被工程化成仅仅表达针对肿瘤抗原、神经胶质瘤特异性TAA或成神经细胞瘤特异性TAA的CAR、自杀基因和存活因子,例如用于获得对例如TMZ的抗性的存活因子。在某些实施方案中,细胞组合物包括免疫系统细胞或 $\gamma\delta$ T细胞,所述免疫系统细胞或 $\gamma\delta$ T细胞被工程化成仅仅表达针对肿瘤抗原、神经胶质瘤特异性TAA或成神经细胞瘤特异性TAA的CAR、针对应激诱发的抗原的受体和存活因子,例如用于获得对例如TMZ的抗性的存活因子。在某些实施方案中,细胞组合物包括免疫系统细胞或 $\gamma\delta$ T细胞,所述免疫系统细胞或 $\gamma\delta$ T细胞被工程化成仅仅表达针对肿瘤抗原、神经胶质瘤特异性TAA或成神经细胞瘤特异性TAA的CAR、针对应激诱发的抗原的受体、自杀基因和存活因子,例如用于获得对例如TMZ的抗性的存活因子。在某些实施方案中,细胞组合物包括免疫系统细胞或 $\gamma\delta$ T细胞,所述免疫系统细胞或 $\gamma\delta$ T细胞被工程化成仅仅表达针对肿瘤抗原、神经胶质瘤特异性TAA或成神经细胞瘤特异性TAA的CAR、NKG2D受体和存活因子,例如用于获得对例如TMZ的抗性的存活因子。在某些实施方案中,细胞组合物包括免疫系统细胞或 $\gamma\delta$ T细胞,所述免疫系统细胞或 $\gamma\delta$ T细胞被工程化成仅仅表达针对肿瘤抗原、神经胶质瘤特异性TAA或成神经细胞瘤特异性TAA的CAR、NKG2D受体、自杀基因和存活因子,

例如用于获得对TMZ的抗性的存活因子。

[0049] 在某些实施方案中,免疫系统细胞或 $\gamma\delta$ T细胞进一步包括针对应激诱发的抗原的受体。在某些实施方案中,免疫系统细胞或 $\gamma\delta$ T细胞进一步包括NKGD2受体。在某些实施方案中,针对应激诱发的抗原的受体或NKGD2受体天然存在于免疫系统细胞或 $\gamma\delta$ T细胞上。在某些实施方案中,针对应激诱发的抗原的受体或NKGD2受体在免疫系统细胞或 $\gamma\delta$ T细胞上被诱发至增加的水平。因此,在其中细胞组合物包括被工程化成仅仅表达针对肿瘤抗原、神经胶质瘤特异性TAA或成神经细胞瘤特异性TAA的CAR、存活因子和任选的自杀基因的免疫系统细胞或 $\gamma\delta$ T细胞的那些实施方案中,免疫系统细胞或 $\gamma\delta$ T细胞还可以表达应激诱发的抗原或NKGD2受体。

[0050] 在某些实施方案中,免疫系统细胞是可用于免疫疗法中的任何免疫系统细胞。在上述的另一个方面中,免疫系统细胞是表达针对应激诱发的抗原的受体的任何细胞。在某些实施方案中,免疫系统细胞是表达NKGD2受体的任何细胞。在某些实施方案中,免疫系统细胞是NK细胞或 $\gamma\delta$ T细胞。在某些实施方案中,免疫系统细胞是 $\gamma\delta$ T细胞。在某些实施方案中,免疫系统细胞是NK细胞与 $\gamma\delta$ T细胞的组合。在某些实施方案中,免疫系统细胞是NK细胞与 $\gamma\delta$ T细胞的组合,其中NK细胞和/或 $\gamma\delta$ T细胞的至少一部分表达针对应激诱发的抗原的受体。在某些实施方案中,免疫系统细胞是NK细胞与 $\gamma\delta$ T细胞的组合,其中NK细胞和/或 $\gamma\delta$ T细胞的至少一部分表达NKGD2受体。

[0051] 在某些实施方案中,细胞组合物包括 $\gamma\delta$ T细胞和其它免疫系统细胞。举例来说,细胞组合物可以包括 $\gamma\delta$ T细胞和NK细胞,或可以包括 $\gamma\delta$ T细胞、 $\alpha\beta$ T细胞和NK细胞。在某些实施方案中,细胞组合物包括 $\gamma\delta$ T细胞和其它免疫系统细胞,其中 $\gamma\delta$ T细胞以大于或等于总细胞群体的60%存在。在某些实施方案中,细胞组合物包括 $\gamma\delta$ T细胞和NK细胞,其中 $\gamma\delta$ T细胞以大于或等于总细胞群体的60%存在。在某些实施方案中,细胞组合物包括 $\gamma\delta$ T细胞和NK细胞,其中 $\gamma\delta$ T细胞以大于或等于总细胞群体的60%存在并且NK细胞以小于或等于25%存在。在某些实施方案中,细胞组合物包括 $\gamma\delta$ T细胞和 $\alpha\beta$ T细胞,其中 $\gamma\delta$ T细胞以大于或等于总细胞群体的60%存在。在某些实施方案中,细胞组合物包括 $\gamma\delta$ T细胞和 $\alpha\beta$ T细胞,其中 $\gamma\delta$ T细胞以大于或等于总细胞群体的60%存在并且 $\alpha\beta$ T细胞以小于或等于5%存在。在某些实施方案中,细胞组合物包括 $\gamma\delta$ T细胞、 $\alpha\beta$ T细胞和NK细胞,其中 $\gamma\delta$ T细胞以大于或等于总细胞群体的60%存在。在某些实施方案中,细胞组合物包括 $\gamma\delta$ T细胞、 $\alpha\beta$ T细胞和NK细胞,其中 $\gamma\delta$ T细胞以大于或等于总细胞群体的60%存在, $\alpha\beta$ T细胞以小于或等于5%存在并且NK细胞以小于或等于25%存在。在一个实施方案中,通过如实例3中所述的流式细胞术测定所存在的多种细胞类型的百分比。

[0052] 在某些实施方案中,构成细胞组合物的细胞的至少一部分(例如免疫系统细胞或 $\gamma\delta$ T细胞)进一步包括针对应激诱发的抗原的受体。在某些实施方案中,构成细胞组合物的细胞的至少一部分(例如免疫系统细胞或 $\gamma\delta$ T细胞)进一步包括NKGD2受体。在某些实施方案中,针对应激诱发的抗原的受体或NKGD2受体天然存在于构成细胞组合物的细胞的至少一部分(例如免疫系统细胞或 $\gamma\delta$ T细胞)上。在某些实施方案中,在构成细胞组合物的细胞的至少一部分(例如免疫系统细胞或 $\gamma\delta$ T细胞)上针对应激诱发的抗原的受体或NKGD2受体被诱发至增加的水平。在某些实施方案中,构成细胞组合物的细胞的至少一部分(例如免疫系统细胞或 $\gamma\delta$ T细胞)被工程化成表达针对应激诱发的抗原的受体或NKGD2受体。在某些实

施方案中,细胞组合物包括 γ δ T细胞并且 γ δ T细胞的至少一部分表达针对应激诱发的抗原的受体或NKGD2受体。在某些实施方案中,细胞组合物包括 γ δ T细胞、 α β T细胞和NK细胞,并且 γ δ T细胞的至少一部分表达针对应激诱发的抗原的受体或NKGD2受体。在某些实施方案中,细胞组合物包括 γ δ T细胞、 α β T细胞和NK细胞,并且 γ δ T细胞的至少一部分表达针对应激诱发的抗原的受体或NKGD2受体,其中 γ δ T细胞以大于或等于总细胞群体的60%存在。在某些实施方案中,细胞组合物包括 γ δ T细胞、 α β T细胞和NK细胞,并且 γ δ T细胞的至少一部分表达针对应激诱发的抗原的受体或NKGD2受体,其中 γ δ T细胞以大于或等于总细胞群体的60%存在, α β T细胞以小于或等于5%存在,并且NK细胞以小于或等于25%存在。在某些实施方案中,针对应激诱发的抗原的受体或NKGD2受体天然存在于 γ δ T细胞、 α β T细胞和/或NK细胞的至少一部分上。在某些实施方案中,在 γ δ T细胞、 α β T细胞和/或NK细胞的至少一部分上针对应激诱发的抗原的受体或NKGD2受体被诱发至增加的水平。在某些实施方案中, γ δ T细胞、 α β T细胞和/或NK细胞的至少一部分被工程化成表达针对应激诱发的抗原的受体或NKGD2受体。在一个实施方案中,通过如实例3中所述的流式细胞术测定所存在的多种细胞类型的百分比。

[0053] 在上述内容的一个方面中,肿瘤抗原是本领域中已知的任何肿瘤抗原。在某些实施方案中,选择存在至少一个以下特征的肿瘤抗原:抗原在尽可能多的癌症阶段中表达,抗原在肿瘤的表面上表达,抗原对于肿瘤细胞的存活力来说是重要的,并且抗原在非肿瘤组织上不表达,或者以脱靶效应是临床上可接受的水平表达。在某些实施方案中,肿瘤抗原选自由以下组成的组中:EphA2、B细胞成熟抗原(BCMA)、B7-H3、B7-H6、CAIX、CA9、CD22、CD19、CD20、ROR1、 κ 或轻链、癌胚抗原、 α -胎蛋白、CA-125、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3、上皮肿瘤抗原、黑色素瘤相关抗原、EGP2、EGP40、EPCAM、ERBB3、ERBB4、ErbB3/4、PAP、FAR、FBP、胎儿AchR、叶酸受体 α 、突变p53、突变ras、HER2、ERBB2、HER3、叶酸结合蛋白、HIV-1包膜糖蛋白gp120、HIV-1包膜糖蛋白gp41、5T4、8H9、GD2、CD123、CD23、CD33、CD30、CD38、CD56、c-Met、fap、间皮素、GD3、HERV-K、IL-11Ra、IL-13Ra、CSPG4、Lewis-Y、MCSP、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2D配体、NY-ES0-1、PRAME、PSCA、PSC1、PSMA、EGFR、Sp17、存活素、TAG72、TEM1、TEM8、EGFRvIII和VEGFR2。

[0054] 在上述内容的一个方面中,神经胶质瘤特异性TAA是本领域中已知的任何神经胶质瘤特异性TAA。在某些实施方案中,选择存在至少一个以下特征的神经胶质瘤特异性TAA:神经胶质瘤特异性TAA在尽可能多的癌症阶段中表达,神经胶质瘤特异性TAA在肿瘤的表面上表达,神经胶质瘤特异性TAA对于肿瘤细胞的存活力来说是重要的,并且神经胶质瘤特异性TAA在非肿瘤组织上不表达,或者以脱靶效应是临床上可接受的水平表达。在某些实施方案中,神经胶质瘤特异性TAA选自由以下组成的组中:NKG2D配体、ULBP-1、ULBP-2、ULBP-3、ULBP-4、ULBP-5、ULBP-6、MIC-A、MIC-B、EGFRvIII和IL13Ra。在某些实施方案中,神经胶质瘤特异性TAA是EGFRvIII。在某些实施方案中,神经胶质瘤特异性TAA是IL13Ra。

[0055] 在上述内容的一个方面中,成神经细胞瘤特异性TAA是本领域中已知的任何神经胶质瘤特异性TAA。在某些实施方案中,选择存在至少一个以下特征的成神经细胞瘤特异性TAA:成神经细胞瘤特异性TAA在尽可能多的癌症阶段中表达,成神经细胞瘤特异性TAA在肿瘤的表面上表达,成神经细胞瘤特异性TAA对于肿瘤细胞的存活力来说是重要的,并且成神经细胞瘤特异性TAA在非肿瘤组织上不表达,或者以脱靶效应是临床上可接受的水平表达。

在某些实施方案中,成神经细胞瘤特异性TAA选自由以下组成的组中:NKG2D配体、ULBP-1、ULBP-2、ULBP-3、ULBP-4、ULBP-5、ULBP-6、MIC-A、MIC-B和GD2。在某些实施方案中,成神经细胞瘤特异性TAA是GD2。

[0056] 存活因子可以是本领域中已知的提供对额外治疗剂治疗的抗性和/或允许构成细胞组合物的细胞在治疗环境(例如化学疗法的治疗环境)中存活的任何因子。在某些实施方案中,额外治疗剂治疗是用抗癌剂、代谢拮抗剂、DNA去甲基剂、源于植物的抗肿瘤剂、核苷/核苷酸类似物化学疗法药物、烷基化剂、抗代谢物、抗癌抗生素、拓扑异构酶抑制剂、有丝分裂抑制剂、分化剂、激素治疗剂和上述各剂的组合治疗,并且存活因子提供对额外治疗剂治疗的抗性。如本领域中已知和如本文所论述,多种特定药剂可以用于额外治疗剂治疗中。代表性烷基化剂包含(但不限于)环磷酰胺(cyclophosphamide)、异环磷酰胺(ifosfamide)和美法仑(melphalan)。代表性代谢拮抗剂包含(但不限于)甲氨蝶呤(methotrexate,MTX)、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)或其衍生物。代表性DNA去甲基剂(亦称为抗代谢物)包含(但不限于)阿扎胞苷(azacitidine)。代表性核苷/核苷酸类似物化学疗法药物包含(但不限于)取代的核苷酸和取代的核苷。代表性抗肿瘤抗生素包含(但不限于)丝裂霉素(mitomycin)、亚德里亚霉素(adriamycin)和阿霉素(doxorubicin)。代表性源于植物的抗肿瘤剂包含(但不限于)长春新碱(vincristine)、长春地辛(vindesine)、TAXOL®、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、阿布拉生(abraxane);顺铂(cisplatin);卡铂(carboplatin);依托泊苷(etoposide)等等。代表性抗癌剂包含(但不限于)三甲曲沙(trimethotrexate,TMTX)、替莫唑胺(temozolomide,TMZ)、雷替曲赛(raltitrexed)、S-(4-硝基苯甲基)-6-硫肌苷(NBMPR)、6-苄胍(6-BG)、亚硝基脲[例如双氯亚硝基脲(BCNU;卡莫司汀(carmustine))、洛莫司汀(lomustine,CCNU)+/-丙卡巴肼(Procarbazine)和长春新碱(PCV方案)、阿霉素、福莫司汀(fotemustine)、阿糖胞苷(Cytarabine)、喜树碱和上述任一抗癌剂的治疗衍生物。优选地,额外治疗剂治疗中所用的药剂包括TMZ、阿霉素、美法仑、亚硝基脲和其任何组合。

[0057] 在某些实施方案中,存活因子是MGMT、多重耐药蛋白1(MDR1)或5'核苷酸酶II(NT5C2)。其它存活因子包括例如二氢叶酸还原酶的抗药性变异体(L22Y-DHFR)和胸苷酸合成酶。优选地,存活因子是MGMT。然而,可以使用其它存活因子,取决于治疗环境的性质(即,什么其它额外治疗剂治疗与本公开的细胞组合物组合施用于患者)。

[0058] 在上述内容的一个方面中,组合物的细胞进一步包括自杀基因。

[0059] 在上述内容的一个方面中,细胞组合物包括大于或等于60%、70%、80%、90%、95%的单一免疫系统细胞类型。在上述内容的一个方面中,细胞组合物包括大于或等于60%、70%、80%、90%、95%的 $\gamma\delta$ T细胞。在上述内容的一个方面中,细胞组合物包括大于或等于60%的 $\gamma\delta$ T细胞和小于或等于5%的 $\alpha\beta$ T细胞和小于或等于25%的NK细胞。在一个实施方案中,通过如实例3中所述的流式细胞术测定所存在的多种细胞类型的百分比。

[0060] 在上述内容的一个方面中, $\gamma\delta$ T细胞是从患者获得的并且离体扩增/活化;接着可以将细胞再引入到患者中。

[0061] 所述细胞组合物可以被称为DRI-CAR T细胞。

[0062] 本文所述的细胞组合物可以通过将编码和能够表达CAR和存活因子以及其它元件(例如自杀基因和/或针对应激诱发的抗原的受体)的核酸构建体合并来产生。在某些实施方案中,单一核酸构建体编码CAR和存活因子以及其它元件(例如自杀基因和/或针对应激

诱发的抗原的受体)。在某些实施方案中,分开的核酸构建体编码CAR和存活因子以及其它元件(例如自杀基因和/或针对应激诱发的抗原的受体)。本领域中已知产生这类核酸构建体的方法。编码CAR和/或存活因子的代表性核酸构建体展示于图1A-1D中。

[0063] 在某些实施方案中,核酸构建体编码CAR和存活因子。

[0064] 在以上实施方案中,CAR可以包括本文所述的结构域和/或序列。在某些实施方案中,核酸构建体编码CAR,所述CAR包括含有针对EGFRvIII抗原的scFv的胞外域、铰链区、跨膜区和包括至少一个信号传导结构域的胞内域。在某些实施方案中,核酸构建体编码CAR,所述CAR包括含有针对IL13R α 抗原的scFv的胞外域、铰链区、跨膜区和包括至少一个信号传导结构域的胞内域。在某些实施方案中,核酸构建体编码CAR,所述CAR包括含有针对EGFRvIII抗原的scFv的胞外域、来自IgG的铰链区、来自CD3- ζ 的跨膜区和包括CD28、Ox40和CD32信号传导结构域的胞内域。在某些实施方案中,核酸构建体编码CAR,所述CAR包括含有针对IL13R α 抗原的scFv的胞外域、来自IgG的铰链区、来自CD3- ζ 的跨膜区和包括CD28、Ox40和CD32信号传导结构域的胞内域。

[0065] 核酸构建体可以在引入宿主细胞中之前合并到表达载体中。这类方法是本领域中已知的。如上文所论述,可以使用单个表达载体,或者可以使用多个表达载体,取决于核酸构建体的性质。可以使用多种表达载体。在某些实施方案中,表达载体是质粒。在某些实施方案中,表达载体是病毒载体。在某些实施方案中,表达载体是反转录病毒载体。在某些实施方案中,表达载体是慢病毒载体。表达载体能够在免疫系统细胞(又称宿主细胞)内复制,或者表达载体可以完全或部分地整合到免疫系统细胞的基因组中,从而允许核酸构建体与宿主细胞的基因组一起复制。

[0066] 表达载体包括呈适合于在宿主细胞中表达核酸构建体的形式的核酸构建体。因而,表达载体含有在宿主细胞中表达核酸构建体所需的元件。所需元件将取决于宿主细胞和载体的性质以及其它因素(例如所需表达水平)而变化。举例来说,载体可以含有一个或多个调控序列(例如启动子序列、增强子序列和其它这类序列),所述调控序列与核酸构建体可操作地连接,以允许表达核酸构建体。调控序列可以是细胞特异性的,使得核酸构建体仅仅在特定细胞类型中表达,或者调控序列可以是组成型的,使得核酸构建体在任何细胞类型中表达。

[0067] 嵌合抗原受体

[0068] 构成本公开的细胞组合物的细胞合并有一个或多个CAR。虽然给出CAR的特定实例用于治疗GBM,但还可以使用被设计用于治疗其它癌症的其它CAR。本公开可以利用本领域中已知的任何CAR。产生对肿瘤相关抗原具有所需特异性的CAR的方法是本领域中已知的。CAR允许本公开的免疫系统细胞以不受MHC限制的方式识别肿瘤抗原。此外,CAR可以被工程化成识别非蛋白质来源的抗原。

[0069] CAR一般具有以下结构:包括抗原识别域的胞外域、跨膜域和胞内域。在某些实施方案中,具有1至15个氨基酸的肽连接子可以存在于CAR中以将CAR的多个结构域分开。举例来说,肽连接子可以存在于抗原识别域与跨膜域之间或跨膜域与胞内域之间。肽连接子可以存在于所有结构域之间或仅仅存在于一部分结构域之间。此外,当胞内域包括超过一个元件时,连接肽可以存在于胞内域中的一些或所有个别元件之间。

[0070] CAR最初可以合并信号序列(其一般随后在加工CAR期间去除)而产生。一旦表达,

信号肽就将新生蛋白质引到内质网中,这允许修饰CAR(例如糖基化)和插入细胞膜中。可以使用任何真核信号肽序列。一般来说,使用天然附接到最氨基端组分的信号肽(例如在具有轻链-连接子-重链取向的scFv中,使用轻链的天然信号)。

[0071] 抗原识别域可以是识别肿瘤抗原的任何结构域。在特定实施方案中,抗原识别域针对神经胶质瘤特异性TAA。在特定实施方案中,抗原识别域针对肿瘤抗原。在特定实施方案中,抗原识别域针对成神经细胞瘤特异性TAA。上文提供抗原识别域识别的特定抗原。存在抗原识别域的许多替代物。来自天然T细胞受体(TCR) α 和 β 单链的抗原识别域已经被描述成具有简单胞外域(例如识别HIV感染细胞的CD4胞外域)和包括例如连接的细胞因子(其使载有细胞因子受体的细胞得到识别)的识别组分的更加外来的胞外域。实际上,以高亲和力结合给定标靶的任何部分都可以用作抗原识别区。在一个优选实施方案中,抗原识别区是scFv。在某些实施方案中,连接肽(即,间隔区或铰链区)将抗原结合域连接到跨膜域。

[0072] 在某些实施方案中,抗原识别域是scFv。scFv是指免疫球蛋白的重链(V_H)和轻链(V_L)的可变区用短连接肽(一般是约10个至约25个氨基酸)连接以产生 V_H -连接子- V_L 结构(又称抗原结合域)而成的融合蛋白。连接子通常为求灵活性而富含甘氨酸,以及为求溶解性而富含丝氨酸或苏氨酸,并且可以将 V_H 的N端与 V_L 的C端连接,或反之亦然。尽管去除了恒定区并引入了连接子,但此scFv保持初始免疫球蛋白的特异性。

[0073] 在某些实施方案中,抗原识别域是多价scFv。多价scFv包括两个由额外连接子接合的免疫球蛋白来源的抗原结合域(例如 V_H -连接子- V_L 链),其中抗原结合域识别不同抗原或相同抗原的不同部分。在某些方面中,抗原结合域之一识别标靶细胞上的活化分子。在某些方面中,抗原结合域之一识别由于额外治疗剂治疗而在标靶细胞上的表达增加的抗原(例如(但不限于)应激诱发的抗原)。

[0074] 在某些实施方案中,抗原识别域是二价scFv。举例来说,这类二价scFv可以具有结构 V_{H1} -连接子 a - V_{L1} - V_H -连接子 b - V_L -连接子 c - V_H -连接子 d - V_L (应了解 V_H 和 V_L 可以呈如上文所论述的不同取向布置)。

[0075] 连接肽应该足够灵活而允许抗原结合域采用适合于抗原识别和结合的构象。最简单的形式是来自IgG1的铰链区。多种连接肽可以与本文所述的CAR结合使用。

[0076] 跨膜域是跨越其中合并有CAR的细胞的膜的疏水区(例如 α 螺旋)。可以使用来自任何膜包埋蛋白质的跨膜域。一般来说,使用来自胞内域的最靠近膜的组分的跨膜域,例如以促进信号从抗原识别域传输到胞内域。有趣地,使用CD3- ζ 跨膜域可以将人造TCR合并到天然TCR中,TCR是取决于天然CD3- ζ 跨膜带电天冬氨酸残基的存在的一种因子。

[0077] 胞内域允许在抗原结合后传输信号。在抗原识别后,受体群集并且信号被传输到含有CAR的免疫系统细胞。胞内域包括至少一个信号传导结构域。在某些实施方案中,胞内域包括超过1个信号传导结构域。最常使用的信号传导结构域是CD3- ζ ,其含有三个基于免疫受体酪氨酸的活化基元(ITAM)。因此,在某些实施方案中,信号传导结构域包括至少一个ITAM。在某些实施方案中,胞内域包括CD3- ζ 。在某些实施方案中,胞内域包括CD3- ζ 和至少一个其它信号传导结构域。胞内域在抗原结合后将活化信号传输到细胞。“第一代”CAR通常具有来自CD3- ζ 的胞内域,其是来自内源性TCR的信号的主要发射器。“第二代”CAR将来自多种共刺激蛋白质受体(例如CD28、41BB、DAP10、OX40或ICOS)的细胞内信号传导结构域加到胞内域的细胞质尾区以向T细胞提供其它信号。近来,“第三代”CAR具有将多个信号传导结

构域组合的胞内域,例如CD3- ζ -CD28-41BB或CD3- ζ -CD28-OX40,以进一步增加效能。在某些实施方案中,胞内域包括CD3- ζ -CD28-OX40。

[0078] 使用方法

[0079] 还描述了使用本公开的细胞组合物的方法。

[0080] 在一个实施方案中,本公开提供了一种治疗癌症的方法,所述方法包括向受试者施用本公开的细胞组合物并且在施用本公开的细胞组合物之前、在施用本公开的细胞组合物之后或在施用本公开的细胞组合物之前与施用本公开的细胞组合物之后提供额外治疗剂治疗。

[0081] 在另一实施方案中,本公开提供了一种治疗神经胶质瘤的方法,所述方法包括向受试者施用本公开的细胞组合物并且在施用本公开的细胞组合物之前、施用本公开的细胞组合物之后或在施用本公开的细胞组合物之前与施用本公开的细胞组合物之后提供额外治疗剂治疗。

[0082] 在另一实施方案中,本公开提供了一种治疗GBM的方法,所述方法包括向受试者施用本公开的细胞组合物并且在施用本公开的细胞组合物之前、施用本公开的细胞组合物之后或在施用本公开的细胞组合物之前与施用本公开的细胞组合物之后提供额外治疗剂治疗。

[0083] 在另一实施方案中,本公开提供了一种治疗GBM的方法,所述方法包括向受试者施用包括 $\gamma\delta$ T细胞的细胞组合物并且在施用本公开的细胞组合物之前、施用本公开的细胞组合物之后或在施用本公开的细胞组合物之前与施用本公开的细胞组合物之后提供额外治疗剂治疗,所述 $\gamma\delta$ T细胞被工程化成表达针对神经胶质瘤特异性TAA EGFRvIII或IL13R α 的CAR和用于获得对例如TMZ化学疗法的抗性的MGMT基因。

[0084] 在另一实施方案中,本公开提供了一种治疗GBM的方法,所述方法包括向受试者施用例如TMZ化学疗法,施用包括 $\gamma\delta$ T细胞的细胞组合物并且任选地施用例如TMZ化学疗法的其它过程和/或本公开的其它细胞组合物,所述 $\gamma\delta$ T细胞被工程化成表达针对神经胶质瘤特异性TAA EGFRvIII或IL13R α 的CAR和用于获得对例如TMZ化学疗法的抗性的MGMT基因。

[0085] 在另一实施方案中,本公开提供了一种使用免疫疗法治疗和额外治疗剂治疗来治疗罹患癌症的受试者的方法,所述方法包括:(i)向所述受试者施用包括免疫系统细胞的细胞组合物,所述免疫系统细胞表达针对肿瘤抗原的CAR、针对应激诱发的抗原的受体和允许表达CAR的免疫系统细胞在由额外治疗剂治疗产生的治疗环境中存活的存活因子;以及(ii)向所述受试者施用额外治疗剂治疗,其中所述额外治疗剂治疗在向所述受试者施用所述细胞组合物之前、向所述受试者施用所述细胞组合物之后、与向所述受试者施用所述细胞组合物同时施用或上述方式的任何组合。

[0086] 在另一实施方案中,本公开提供了一种使用免疫疗法治疗和额外治疗剂治疗来治疗罹患癌症的受试者的方法,所述方法包括:(i)向所述受试者施用包括 $\gamma\delta$ T细胞的细胞组合物,所述 $\gamma\delta$ T细胞表达针对肿瘤抗原的CAR、针对应激诱发的抗原的受体和允许表达CAR的 $\gamma\delta$ T细胞在由额外治疗剂治疗产生的治疗环境中存活的存活因子;以及(ii)向所述受试者施用额外治疗剂治疗,其中所述额外治疗剂治疗在向所述受试者施用所述细胞组合物之前、向所述受试者施用所述细胞组合物之后、与向所述受试者施用所述细胞组合物同时施用或上述方式的任何组合。

[0087] 在另一实施方案中,本公开提供了一种使用免疫疗法治疗和利用例如TMZ或其它适当化学疗法的额外治疗剂治疗来治疗罹患神经胶质瘤的受试者的方法,所述方法包括:(i)向所述受试者施用包括 $\gamma\delta$ T细胞的细胞组合物,所述 $\gamma\delta$ T细胞表达针对神经胶质瘤特异性TAA的CAR、针对应激诱发的抗原的受体和用于获得对例如TMZ化学疗法的抗性的允许表达CAR的 $\gamma\delta$ T细胞在由额外治疗剂治疗产生的治疗环境中存活的存活因子;以及(ii)向所述受试者施用额外治疗剂治疗,其中所述额外治疗剂治疗在向所述受试者施用所述细胞组合物之前、向所述受试者施用所述细胞组合物之后、与向所述受试者施用所述细胞组合物同时施用或上述方式的任何组合。

[0088] 在另一实施方案中,本公开提供了一种使用免疫疗法治疗和利用例如TMZ化学疗法的额外治疗剂治疗来治疗罹患成神经细胞瘤的受试者的方法,所述方法包括:(i)向所述受试者施用包括 $\gamma\delta$ T细胞的细胞组合物,所述 $\gamma\delta$ T细胞表达针对成神经细胞瘤特异性TAA的CAR、针对应激诱发的抗原的受体和用于获得对例如TMZ化学疗法的抗性的允许表达CAR的 $\gamma\delta$ T细胞在由额外治疗剂治疗产生的治疗环境中存活的存活因子;以及(ii)向所述受试者施用额外治疗剂治疗,其中所述额外治疗剂治疗在向所述受试者施用所述细胞组合物之前、向所述受试者施用所述细胞组合物之后、与向所述受试者施用所述细胞组合物同时施用或上述方式的任何组合。

[0089] 在另一实施方案中,本公开提供了一种使用免疫疗法治疗和利用例如TMZ化学疗法的额外治疗剂治疗来治疗罹患神经胶质瘤的受试者的方法,所述方法包括:(i)向所述受试者施用包括 $\gamma\delta$ T细胞的细胞组合物,所述 $\gamma\delta$ T细胞表达针对神经胶质瘤特异性TAA EGFRvIII的CAR、NKGD2受体和提供对例如TMZ化学疗法的抗性的允许表达CAR的 $\gamma\delta$ T细胞在由额外治疗剂治疗产生的治疗环境中存活的 O^6 -甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶;以及(ii)向所述受试者施用额外治疗剂治疗,其中所述额外治疗剂治疗在向所述受试者施用所述细胞组合物之前、向所述受试者施用所述细胞组合物之后、与向所述受试者施用所述细胞组合物同时施用或上述方式的任何组合。

[0090] 在另一实施方案中,本公开提供了一种使用免疫疗法治疗和利用例如TMZ化学疗法的额外治疗剂治疗来治疗罹患癌症的受试者的方法,所述方法包括:(i)向所述受试者施用包括 $\gamma\delta$ T细胞的细胞组合物,所述 $\gamma\delta$ T细胞表达针对神经胶质瘤特异性TAA IL13R α 的CAR、NKGD2受体和提供对例如TMZ化学疗法的抗性的允许表达CAR的 $\gamma\delta$ T细胞在由额外治疗剂治疗产生的治疗环境中存活的 O^6 -甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶;以及(ii)向所述受试者施用额外治疗剂治疗,其中所述额外治疗剂治疗在向所述受试者施用所述细胞组合物之前、向所述受试者施用所述细胞组合物之后、与向所述受试者施用所述细胞组合物同时施用或上述方式的任何组合。

[0091] 在另一实施方案中,本公开提供了一种使用免疫疗法治疗和利用例如TMZ化学疗法的额外治疗剂治疗来治疗罹患成神经细胞瘤的受试者的方法,所述方法包括:(i)向所述受试者施用包括 $\gamma\delta$ T细胞的细胞组合物,所述 $\gamma\delta$ T细胞表达针对成神经细胞瘤特异性TAA GD2的CAR、NKGD2受体和提供对例如TMZ化学疗法的抗性的允许表达CAR的 $\gamma\delta$ T细胞在由额外治疗剂治疗产生的治疗环境中存活的 O^6 -甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶;以及(ii)向所述受试者施用额外治疗剂治疗,其中所述额外治疗剂治疗在向所述受试者施用所述细胞组合物之前、向所述受试者施用所述细胞组合物之后、与向所述受试者施用所述细胞组合物同

时施用或上述方式的任何组合。

[0092] 在任一上述方法的某些实施方案中,细胞组合物是本文所述的任何细胞组合物。在任一上述方法的某些实施方案中,可以向受试者施用细胞组合物超过一次,其中额外治疗剂治疗在细胞组合物每次施用之前、施用之后或施用之前与施用之后施用。在任一上述方法的某些实施方案中,可以向受试者施用细胞组合物超过一次,其中额外治疗剂治疗在细胞组合物第一次施用之前、施用之后或施用之前与施用之后施用,并且任选地在细胞组合物每次另外施用之前、施用之后或施用之前与施用之后施用。在任一上述方法的某些实施方案中,可以每周向受试者施用细胞组合物一次,历时2周、3周或4周或更长时间。

[0093] 在任一上述方法的某些实施方案中,在施用细胞组合物之前、施用细胞组合物之后、或施用细胞组合物之前或施用细胞组合物之后24至48小时向受试者施用额外治疗剂治疗。在任一上述方法的某些实施方案中,在第X天向受试者施用细胞组合物,并且在第X天前的12至72小时、第X天后的12至72小时或在第X天前的12至72小时与第X天后的12至72小时,向受试者施用额外治疗剂治疗。在任一上述方法的某些实施方案中,在第X天向受试者施用细胞组合物,并且在第X天前的12至72小时、第X天后的12至72小时或在第X天前的12至72小时与第X天后的12至72小时,向受试者施用额外治疗剂治疗,接着在第Y天向受试者另外施用细胞组合物,任选地在第Y天前的12至72小时、第Y天后的12至72小时或在第Y天前的12至72小时与第Y天后的12至72小时向受试者施用额外治疗剂治疗。

[0094] 在任一上述方法的一个方面中,细胞组合物的CAR对待治疗的癌症具有特异性。在任一上述方法的一个方面中,细胞组合物的存活因子赋予对治疗剂治疗/额外治疗剂治疗的抗性。

[0095] 本公开的细胞组合物可以通过本领域中已知的任何方法来施用。在任一上述方法的一个方面中,细胞组合物经静脉内施用。在任一上述方法的一个方面中,细胞组合物经颅内施用。在任一上述方法的一个方面中,细胞组合物经动脉内施用。在任一上述方法的一个方面中,细胞组合物直接施用到肿瘤床(tumor bed)中。在任一上述方法的一个方面中,细胞组合物靠近或邻近肿瘤施用。在任一上述方法的一个方面中,细胞组合物通过上述方式的组合来施用。

[0096] 在任一上述方法的一个方面中,额外治疗剂治疗(例如TMZ化学疗法)提供至少一种以下益处:通过诱发应激诱发的抗原增加细胞组合物的效力;增加细胞组合物的稳态复原;增加体内增殖;以及增加细胞组合物的持久性(上述与省去额外治疗剂治疗时的类似治疗相比)。

[0097] 在某些实施方案中,癌症对细胞被工程化成产生抗性的额外治疗剂治疗敏感。癌细胞可能敏感的这类额外治疗剂治疗包含(但不限于):抗癌剂、代谢拮抗剂、DNA去甲基剂、源于植物的抗肿瘤剂、核苷/核苷酸类似物化学疗法药物、烷基化剂、抗代谢物、抗癌抗生素、拓扑异构酶抑制剂、有丝分裂抑制剂、分化剂、激素治疗剂和上述各剂的组合。如本领域中已知和如本文所论述,多种特定药剂可以用于额外治疗剂治疗中。代表性烷基化剂包含(但不限于)环磷酰胺、异环磷酰胺和美法仑。代表性代谢拮抗剂包含(但不限于)甲氨蝶呤(MTX)、5-氟尿嘧啶或其衍生物。代表性DNA去甲基剂(又称为抗代谢物)包含(但不限于)阿扎胞苷。代表性核苷/核苷酸类似物化学疗法药物包含(但不限于)取代的核苷酸和取代的核苷。代表性抗肿瘤抗生素包含(但不限于)丝裂霉素、亚德里亚霉素和阿霉素。代表性源于

植物的抗肿瘤剂包含(但不限于)长春新碱、长春地辛、TAXOL®、太平洋紫杉醇、阿布拉生;顺铂;卡铂;依托泊苷等等。代表性抗癌剂包含(但不限于)三甲曲沙(TMTX)、替莫唑胺(TMZ)、雷替曲赛、S-(4-硝基苯甲基)-6-硫肌苷(NBMPR)、6-苄胍(6-BG)、亚硝基脒[例如双氯亚硝基脒(BCNU;卡莫司汀)、洛莫司汀(CCNU)+/-丙卡巴肼和长春新碱(PCV方案)、阿霉素、福莫司汀、阿糖胞苷、喜树碱和上述任一抗癌剂的治疗衍生物。优选地,癌细胞可能敏感的额外治疗剂治疗中所用的药剂包括TMZ、阿霉素、美法仑、亚硝基脒和其任何组合。

[0098] 在某些实施方案中,癌症对细胞被工程化成产生抗性的额外治疗剂治疗具抗性。在这类实施方案中,额外治疗剂治疗提供至少一种上述益处。在一个实施方案中,额外治疗剂治疗增加应激诱发的抗原的表达,应激诱发的抗原是NKG2D受体的配体。上调的特定的应激诱发的抗原包含(但不限于)ULBP-1、ULBP-2、ULBP-3、ULBP-4、ULBP-5、ULBP-6、MIC-A和MIC-B。

[0099] 在某些实施方案中,癌症选自以下组成的组中:脑癌、乳腺癌、前列腺癌、肺癌、结肠癌、上皮癌、头颈癌、皮肤癌、生殖泌尿道癌、卵巢癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、肾癌、胃癌、小肠癌、肝癌、胰腺癌、胆囊癌、胆管癌、食道癌、涎腺癌、甲状腺癌和血液恶性病白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤和骨髓增生异常综合征。

[0100] 在某些实施方案中,癌症是脑癌。在某些实施方案中,癌症是松果体肿瘤、垂体肿瘤、PNET、神经鞘瘤、淋巴瘤、髓母细胞瘤、脑膜瘤、转移性脑癌、神经纤维瘤、神经元和混合神经元-神经胶质肿瘤、少突星形细胞瘤、少突神经胶质瘤、星形细胞瘤、非典型畸胎样横纹肌样瘤(ATRT)、软骨肉瘤、脉络丛肿瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、生殖细胞肿瘤、成神经细胞瘤、成胶质细胞瘤(GBM)和神经胶质瘤。在某些实施方案中,癌症是成胶质细胞瘤。在某些实施方案中,癌症是成神经细胞瘤。

[0101] 在某些实施方案中,肿瘤抗原是本领域中已知的任何肿瘤抗原。在某些实施方案中,选择存在至少一个以下特征的肿瘤抗原:抗原在尽可能多的癌症阶段中表达,抗原在肿瘤的表面上表达,抗原对于肿瘤细胞的存活力来说是重要的,并且抗原在非肿瘤组织上不表达,或以脱靶效应是临床上可接受的水平表达。在某些实施方案中,肿瘤抗原选自以下组成的组中:EphA2、B细胞成熟抗原(BCMA)、B7-H3、B7-H6、CAIX、CA9、CD22、CD19、CD20、ROR1、 κ 或轻链、癌胚抗原、 α -胎蛋白、CA-125、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3、上皮肿瘤抗原、黑色素瘤相关抗原、EGP2、EGP40、EPCAM、ERBB3、ERBB4、ErbB3/4、PAP、FAR、FBP、胎儿AChR、叶酸受体 α 、突变p53、突变ras、HER2、ERBB2、HER3、叶酸结合蛋白、HIV-1包膜糖蛋白gp120、HIV-1包膜糖蛋白gp41、5T4、8H9、GD2、CD123、CD23、CD33、CD30、CD38、CD56、c-Met、fap、间皮素、GD3、HERV-K、IL-11R α 、IL-13R α 、CSPG4、Lewis-Y、MCSP、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2D配体、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSC1、PSMA、EGFR、Sp17、存活素、TAG72、TEM1、TEM8、EGFRvIII和VEGFR2。

[0102] 在某些实施方案中,神经胶质瘤特异性TAA是本领域中已知的任何神经胶质瘤特异性TAA。在某些实施方案中,选择存在至少一个以下特征的神经胶质瘤特异性TAA:神经胶质瘤特异性TAA在尽可能多的癌症阶段中表达,神经胶质瘤特异性TAA在肿瘤的表面上表达,神经胶质瘤特异性TAA对于肿瘤细胞的存活力来说是重要的,并且神经胶质瘤特异性TAA在非肿瘤组织上不表达,或以脱靶效应是临床上可接受的水平表达。在某些实施方案中,神经胶质瘤特异性TAA选自以下组成的组中:NKG2D配体、ULBP-1、ULBP-2、ULBP-3、ULBP-4、ULBP-5、ULBP-6、MIC-A、MIC-B、GD2、EGFRvIII和IL13R α 。在某些实施方案中,神经胶

质瘤特异性TAA是EGFRvIII。在某些实施方案中,神经胶质瘤特异性TAA是IL13R α 。

[0103] 在某些实施方案中,成神经细胞瘤特异性TAA是本领域中已知的任何神经胶质瘤特异性TAA。在某些实施方案中,选择存在至少一个以下特征的成神经细胞瘤特异性TAA:成神经细胞瘤特异性TAA在尽可能多的癌症阶段中表达,成神经细胞瘤特异性TAA在肿瘤的表面上表达,成神经细胞瘤特异性TAA对于肿瘤细胞的存活力来说是重要的,并且成神经细胞瘤特异性TAA在非肿瘤组织上不表达,或以脱靶效应是临床上可接受的水平表达。在某些实施方案中,成神经细胞瘤特异性TAA选自由以下组成的组中:NKG2D配体、ULBP-1、ULBP-2、ULBP-3、ULBP-4、ULBP-5、ULBP-6、MIC-A、MIC-B和GD2。在某些实施方案中,成神经细胞瘤特异性TAA是GD2。

[0104] 例如使用MGMT基因的DRI基因工程使得本公开的细胞组合物能够在富含化学疗法的环境中在肿瘤可能最大限度地受应激时发挥作用。在某些实施方案中,对肿瘤的应激作用增加 γ δ T细胞上被例如NKG2D受体等受体识别的应激抗原的表达。利用化学疗法诱发应激抗原和减少调节性T细胞的双重作用显著改善肿瘤的减少,超过任一个别方案。基因修饰保护本公开的细胞组合物避免例如TMZ等化学疗法方案的淋巴细胞耗尽作用,并且允许本公开的细胞组合物在恶性细胞最大限度地受化学疗法应激时经由TAA特异性接近肿瘤,与未受损的T细胞细胞毒性功能组合。相信与任一单独化学疗法(例如TMZ)治疗或单独 γ δ T细胞输注相比,本公开的细胞组合物(称为DRI-CAR T细胞疗法)的使用显著延长存活和减少肿瘤负荷,并且在无显著不利的全身或神经后果下实现此。

[0105] 本公开的细胞组合物和方法的基本原理是基于先前展示以下结果的工作:(a) 人类GBM细胞很容易被离体扩增/活化的 γ δ T细胞侵袭(1、2);(b) 在具有免疫活性的C56BL/6小鼠模型中扩增/活化的 γ δ T细胞的局部颅内注射通过减缓GBM异种移植物(3)和GL261来源的肿瘤的进展来延长负载肿瘤的小鼠的存活;(c) 在TMZ存在下经MGMT修饰的 γ δ T细胞以比TMZ或 γ δ T细胞任一者显著更大的功效杀死人类SNB-19和U373GBM细胞系的TMZ抗性克隆(4);并且最重要的是,(d) 当用基因修饰的 γ δ T细胞的颅内注射液处理时,与任一单独处理相比,负载原发性人类GBM异种移植物的未经修饰或TMZ抗性克隆的小鼠展示改善的存活。因此,预期与任一单独治疗相比,包括被修饰用于获得针对额外治疗剂治疗(例如TMZ)的抗性的 γ δ T细胞的本公开的细胞组合物显著延长存活并减少肿瘤负荷,并且在无显著不利的全身或神经后果下实现此。

[0106] 若干近期的研究已经显示实体颅外肿瘤的化学疗法和免疫疗法的时间安排策略调节先天性反应与肿瘤细胞上的应激相关抗原的化学疗法诱发的表达(8-10)和调节性T细胞的耗尽。诱发应激抗原和减少调节性T细胞的双重作用会显著改善肿瘤的减少,超过任一个别方案(11-17)。针对包含(但不限于)GBM在内的癌症的这种策略的成功实施将显著偏离经典的方法,经典的方法依赖于肿瘤相关抗原的适应性识别(18、19)、神经胶质瘤细胞MHC I类表达(20、21)或淋巴因子活化的杀伤(LAK)细胞疗法(22-26)。

[0107] 申请者先前已经研发出一种稳固的用于制造扩增/活化的 γ δ T细胞的系统,所述 γ δ T细胞经由肿瘤所表达的应激诱发的抗原(即NKG2D配体)明确地靶向高度恶性神经胶质瘤(3、27、28)。已经显示在设计成复制治疗条件的特定体内模型中的体外细胞毒性与改善的存活/增加的进展时间(1、2)。申请者已经显示TMZ短暂上调神经胶质瘤细胞表面上的NKG2D配体的表达,并且使肿瘤更容易被 γ δ T细胞识别(4、8),并且在治疗浓度的TMZ存在下

经MGMT基因修饰的 $\gamma\delta$ T细胞增强TMZ抗性神经胶质瘤株系的杀死。通过使用本公开的细胞组合物和方法,可以调整细胞免疫疗法和化学疗法的时间安排以使两种疗法的作用达到最大。因此,本公开不仅提供如所描述的新颖细胞组合物,而且还提供了新颖的抗成胶质细胞瘤治疗策略,这提供了一种先前未曾探索过的治疗高度恶性神经胶质瘤的方法。

[0108] 虽然可以经由以外科手术方式放置的导管(例如脑室切开术导管)将本公开的细胞组合物直接施用到肿瘤床中,但切除与TMZ剂量强化之间的时间间隔可能跨越长达八周,这将患者暴露于感染的潜在风险或用于在靠近细胞疗法施用时间放置导管的其它程序。合并到所述细胞组合物中的CAR被设计成靶向肿瘤相关抗原(例如神经胶质瘤特异性肿瘤相关抗原)以在考虑到使用多种施用方法下,在通过多种施用方法向患者施用而使DRI-CAR T细胞集中于肿瘤中。举例来说,当通过静脉内途径或动脉内途径向治疗者施用细胞组合物时,合并到所述细胞组合物中的CAR帮助增加DRI-CAR T细胞浸润到肿瘤床中,并且使肿瘤床中DRI-CAR T细胞的浓度增加。同样,当施用其它工具(例如经由李克汗导管(Rickham catheter)或类似装置,直接到肿瘤床中或通过脑室内施用)时,合并到所述细胞组合物中的CAR允许实现相同的结果。活化和细胞毒性可以经由CAR和/或通过 $\gamma\delta$ T细胞对NKG2D配体的识别来介导,这在表达TAA的密度不足够经由CAR活化T细胞的非均质肿瘤中是一种特别重要的策略。重要的是,这种疗法是在高剂量化学疗法期间当肿瘤细胞受到高度应激、耗尽调节性T细胞、其它肿瘤相关免疫防御受损并且血管床更加可渗透时进行。TMZ介导的淋巴细胞耗尽也有利于稳态复原、体内增殖和DRI-CAR T细胞的持久性。

[0109] 图8A和8B中分别展示免疫疗法的现有技术方法和本公开的改良方法的概述。在现有技术方法中,具有免疫活性的细胞是由细胞因子治疗和其它方法产生。因而具有免疫活性的细胞显示肿瘤破坏活性。当施用其它治疗,例如化学疗法方案时,耗尽了具有免疫活性的细胞,由于杀死治疗细胞而限制治疗的效力。本公开的方法通过提供包括肿瘤特异性CAR和存活因子(DRI-CAR)的细胞组合物,例如(但不限于) $\gamma\delta$ T细胞而克服了这类限制。当与例如化学疗法方案等额外治疗剂治疗合时,DRI-CAR细胞借助于所存在的CAR以及通过识别应激诱发的配体,保持侵袭肿瘤细胞的能力,同时能够在治疗环境中存活。此外,调节性T细胞的减少提供了另外的治疗益处。再进一步,化学疗法方案引起的淋巴细胞耗尽也有利于稳态复原、体内增殖和DRI-CAR T细胞的持久性,进一步提高治疗效果。

[0110] 实例

[0111] 实例1-基因工程化的 $\gamma\delta$ T细胞的研究和体外测试:

[0112] 将产生共表达CAR和赋予抗药性的存活因子的cDNA序列的慢病毒载体,以确定提供最佳转基因表达的载体配置并且确定用于产生基因工程化的 $\gamma\delta$ T细胞的最佳转导时间安排。为了定量最佳递送和持久性,通过在免疫缺陷小鼠中在TMZ化学疗法期间,针对患者来源的神经胶质瘤异种移植株系比较颅内施用途径对比静脉内施用途径的效能、持久性和功效来评估经负载EGFRvIII或IL13 α 的¹¹¹[In]-标记的 $\gamma\delta$ T细胞工程化的 $\gamma\delta$ T细胞免疫疗法(DRI-CAR)。

[0113] 将产生编码识别神经胶质瘤细胞并且已知靶向成胶质细胞瘤(GBM)的IL13 α 和EGFRvIII CAR的载体。另外,编码赋予对TMZ的抗性的MGMT的cDNA将与CAR共表达。还将产生编码流动或成像标记物的对照载体以供对基因修饰的细胞的基因转移和追踪进行最佳分析。编码EGFRvIII CAR的示例性构建体展示于图1中。

[0114] 来自本发明人的先前工作已经验证了插入简单的SIV编码的p140K-MGMT载体的最佳转导时间是在基于唑来膦酸盐/IL2的 $\gamma\delta$ T细胞扩增培养起始之后的3天与7天之间。在这些条件下,产生在超出400 μ M的浓度下足够赋予对TMZ的抗性的MGMT拷贝数,MOI低至5。使用跨越第2天到第7天和1到25的MOI的转导时间和MOI的矩阵,验证这些条件,并且针对DRI-CAR转导进行优化。

[0115] 表1:实验设计

[0116]

组	n	肿瘤	处理 (参见图2)
1	20	是	无处理
2	20	是	TMZ 60mg/kg IP
3	20	是	IV基因修饰的 $\gamma\delta$ T细胞, (1.5×10^8 /kg), TMZ 60mg/kg IP
4	20	是	IC基因修饰的 $\gamma\delta$ T细胞, (1.5×10^6), TMZ 60mg/kg IP

[0117] 颅内神经胶质瘤异种移植物将由来自原发性GBM的GBM-X12 (经典)、GBM-X22 (间质)、GBM-X1066 (神经) 和GBM-XD456 (原神经) 外植体的亲本 (由“P”指示) 和TMZ抗性克隆 (由“T”指示) 组成。使用白克 (Beck) (5) 研发的方法,将小鼠用 1.5×10^6 个细胞/公斤 (颅内) 或 5×10^8 个细胞/公斤 (静脉内) 111 [In] 标记的DRI-CAR $\gamma\delta$ T细胞注射,并且基于表I (IC=颅内; IP=腹膜内, IV=静脉内) 和图2中所示的实验设计,评估多种处理。在注射后,通过X-SPECT,如图3中针对乳房肿瘤模型化,以24小时时间间隔进行成像研究,至少三天。还在注射 5×10^8 个细胞/公斤 111 [In] 标记的 $\gamma\delta$ T细胞/公斤后24小时,分开进行生物分布研究,并且计数主要器官和肿瘤,结果表示为% 111 [In] 所注射剂量 (ID) /g。 $\gamma\delta$ T细胞的肿瘤定位将来源于与影像相关的色标,并且通过肿瘤内累积的放射性 (按照惯例) 来定量,所述放射性表示为每克肿瘤发现的注射放射剂量的百分比。预期静脉内施用以及颅内施用将是有效的。

[0118] 每种DRI-CAR产物的效能将通过针对四个选择的异种移植株系进行体外细胞毒性分析来测定。通过比较基于表I和图2中所示的实验设计处理的负载肿瘤的小鼠的存活与未经处理的对照的存活来评估功效。将收获肿瘤和正常组织,以供组织学和功能评估,包括肿瘤组织病理学、侵袭、淋巴细胞浸润和淋巴细胞免疫表型。将利用非参数t检验和/或ANOVA进行迁移和分布研究以及存活资料的非参数对数秩分析,进行统计分析。预测处理组与对照组之间的差异是0.15,20个复本/组提供了80%的能力来检测 $p \leq 0.05$ 下的差异。

[0119] 实例2-评估DRI-CAR疗法在可能在治疗 (例如先前放射疗法、TMZ) 期间普遍的条件下的安全性

[0120] 将使用DRI-CAR针对培养的人类星形胶质细胞的体外毒理学分析,测试本公开的细胞组合物和方法的局部脱靶细胞毒性的可能性。此外,将确定表达自杀基因的 $\gamma\delta$ T细胞是否赋予安全性优点,此优点被视为有利的。还将确定载体整合位点分析。将进行体外毒理学分析,因为不存在V γ 9V δ 2T细胞的可比动物模型。将针对暴露于250cGy电离辐射或在200 μ M TMZ中培育4小时的所培养的人类星形胶质细胞测试DRI-CAR T细胞 (20个副本),并通过评估NKG2D配体表达和DRI-CAR细胞介导的细胞毒性,与未经处理的星形胶质细胞相比。初始工作显示MIC-A和ULBP2略微上调,并且针对培养的星形胶质细胞的 $\gamma\delta$ T细胞细胞毒性不显著。

[0121] 为了防止级联发炎反应或脱靶细胞毒性,将针对合并到CAR基因产物中的情况评估自杀基因。 γ -反转录病毒SFG.i卡斯蛋白酶9.2A. δ CD19是由经由2A样序列连接到充当可选标记的截短人类CD19的iC9组成。卡斯蛋白酶9(Caspase 9)自杀基因的AP1903诱导性活化通过表达与来源于人类FK506-结合蛋白(FKBP)的药物结合域融合的嵌合蛋白(iC9)来实现。iC9在细胞内是休眠的,直至暴露于AP1903,其与FKBP结构域交联,起始iCasp9信号传导,并且诱发基因修饰的细胞的细胞凋亡。基因和AP1903将由Bellicum Pharmaceuticals (Houston, TX) 供应,其还将帮助进行功能研究。已经描述了此构建体的使用(6、7),并且将用于在NSG小鼠中进行功能研究,以优化给药,从而在全身和颅内DRI-CAR T细胞中诱发快速细胞凋亡。

[0122] 慢病毒位点整合分析最初在实验室中使用Lenti-X™系统(克隆科技公司(Clontech))使用GenomeWalker技术进行。

[0123] 实例3-供DRI-CAR用于人类疗法的细胞制造和释放准则的标准化

[0124] 细胞毒性(效能和毒理学)分析、流式细胞术移植组合物分析和关于cGMP细胞制造的感染性疾病测试将能够转变成临床试验。对于细胞和基因疗法产品,需要如FDA在21CFR 211.165和610中关于无菌性、纯度、身份和效能所定义的释放准则。FDA规定关于无菌性测试的程序。身份测试将由临床HLA分型来实现。细胞产品的纯度/组成和效能测试将需要在实验室中进行标准化。FDA条例21CFR 600.3要求产品如所指示发挥作用的特定能力应通过适当实验室测试来定义,并且21CFR 610.10规定效能的评估应由针对产品特定设计的体外和/或体内测试组成。FDA还建议细胞毒性与标靶表型相关;因此,将使用具有一致传代数的界定的标靶神经胶质瘤细胞系作为标准来证实细胞毒性,以在满足如针对实验室研发测试的1988年临床实验室改进法案(CLIA)中所定义的临床要求下评估DRI-CAR移植功能。最佳功能将临时定义为在20:1E:T(效应:标靶)比率下杀死50%。培养的星形胶质细胞将充当阴性标靶,并且K562红细胞白血病细胞标靶作为阳性标靶。最终纯度和组成将通过针对总T细胞%(CD3)、 $\gamma\delta$ T细胞%、 $\alpha\beta$ T细胞%(CD3+CD4+ $\gamma\delta$ -和CD3+CD8+ $\gamma\delta$ -)、NK细胞%(CD16/56)、B细胞%(CD19)和单核细胞%(CD14)进行流式细胞术来评估。标靶释放准则是 $\geq 60\%$ $\gamma\delta$ T细胞、 $\leq 5\%$ $\alpha\beta$ T细胞和 $\leq 25\%$ NK细胞。统计分析将由以下组成:在纯度/组成分析中针对个别细胞表型,并且在最少进行20次分析的功能分析中针对每个E:T比率的每个杀死%,建立平均值、SD和95%CI。ANOVA将用于比较群组之间个别E:T比率的差异。将合并体外细胞毒性功能以及动物模型中的迁移研究和存活后果。

[0125] 实例4-在0期临床试验中评估CAR-DRI¹¹¹[In]标记的 $\gamma\delta$ T细胞在具有原发性成胶质细胞瘤的三名患者中作为切除后细胞疗法的安全性、毒性、运输和迁移可能性

[0126] 将进行少数初始实验,这些实验使用¹¹¹[In]标记的DRI-CAR T细胞证实临床条件下的TMZ抗性和向微小残留疾病的潜在区域的迁移。本研究将作为0期临床试验进行,其中毒性是主要关注终点。符合条件的患者将依次进入并且给与一次输注。副作用的频率将通过身体系统、级别和因果关系,使用频率和百分比来概述。将提供个别受试者清单,清单包括以上信息加上症状发作的研究天数和不良事件的时间长度。未进行统计学比较。次要目标将包括监测进展时间、早期和晚期全身造血嵌合体的存在、全身免疫功能和总体存活,以达成I期和II期临床试验的假设生成和设计的目的。将征选至多3个可评估的患者,由至少18岁的针对组织学上证实的原发性GBM进行切除的成年男性和非怀孕女性组成。患者在切

除后和起始RT(放射疗法)+TMZ疗法前将进行单一白细胞去除术,以便制造DRI-CAR。在高剂量TMZ疗法期间在静止期之后在组合RT+TMZ结束时,施用单一剂量的 $1 \times 10^6/\text{kg}$ DRI-CAR T细胞。一部分细胞产物将标记有 $^{111}\text{[In]}$ 以追踪细胞的迁移。将在输注后12小时、24小时和48小时进行单光子发射计算机断层扫描(SPECT)。单个经验丰富的核医学医师将评述所有衰减校正后的 $^{111}\text{[In]}$ -喔星(oxine)标记的白细胞平面和SPECT影像。在征收下一名患者前,针对毒性,追踪个别患者至少30天。如果认为毒性可能或很可能与DRI-CAR T细胞相关,那么用于给不良事件定级的癌症疗法评估程序常见毒性标准将用于界定涉及肝脏、肺和心脏的任何3级或4级毒性或任何其它4级毒性为剂量限制性毒性(DLT)。如果可能或很可能相关,那么被视为DLT的重要的其它事件包括死亡、中风、需要手术的血肿、无法治疗的神经功能衰退、无反应的全身感染和移植物抗宿主疾病。假定的脱靶毒性或例如发炎或脑白质病等颅内事件将引发AP1903的施用,从而经由iC9自杀基因活化DRI-CAR T细胞的细胞凋亡。

[0127] 实例5-应激诱发的抗原的表达

[0128] 神经胶质瘤异种移植物中所选的应激诱发的配体(NKG2DL)在暴露于TMZ时上调(图4A)。图4展示X12T和X22T神经胶质瘤异种移植物中NKG2DL MIC-A、MIC-B、ULBP-1、ULBP-2、ULBP-3和ULBP-4的表达。X12T神经胶质瘤异种移植物展示在用 $400\mu\text{M}$ TMZ处理4小时后MIC-A、ULBP-1和ULBP-4的表达,上调的程度最小。X22T神经胶质瘤异种移植物展示在用 $400\mu\text{M}$ TMZ处理4小时后MIC-A、MIC-B、ULBP-1和ULBP-4的表达,其中MIC-A和ULBP-4上调。离体扩增/活化的 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞有效地杀死来源于X12T和X22T神经胶质瘤异种移植物的细胞,如图4B中所示。4.将被修饰成表达用于获得TMZ抗性的存活因子的 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞在递增的效应:靶靶(E:T)比率下与来源于X12T和X22T神经胶质瘤异种移植物的细胞一起培养,并且溶解百分比(如通过流式细胞术来测定,由活细胞与死细胞的比率确定)表示为E:T比率的函数。在E:T比率超过10:1下, $\gamma\delta\text{T}$ 细胞对来源于X12T和X22T神经胶质瘤异种移植物的细胞是有细胞毒性的。 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞未显示在20:1的E:T比率下针对培养的人类星形胶质细胞的毒性的证据。

[0129] 实例6-应激诱发的抗原的表达增加了 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞疗法的效力

[0130] 肿瘤细胞上NKG2DL的表达增加 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞疗法的总体效能。图5A和5B分别展示响应于多种处理的负载X12P和X12T(TMZ抗性)神经胶质瘤的小鼠的存活。图5A展示在用单独TMZ(TMZ)、TMZ加包含被修饰成表达用于获得TMZ抗性的存活因子的 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞和NK细胞的组合物的组合(DRI)处理的负载X12P神经胶质瘤的小鼠、接受未经修饰的 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞和NK细胞的(CT)和未接受处理的对照小鼠的存活。与CT处理方案(绿色)和未处理的小鼠(黑色)相比,TMZ处理方案(蓝色)和DRI处理方案(红色)增加负载X12P神经胶质瘤的小鼠的存活($p < 0.001$)。DRI处理方案使中位存活期从57天增加到75天,超过TMZ处理方案。图5B展示如图5A中所述处理的负载X12T神经胶质瘤的小鼠的存活。与未经处理的小鼠(黑色)相比,DRI处理方案(红色)延长负载X12T神经胶质瘤的小鼠的存活($p = 0.0147$)。正如所料,与未经处理的小鼠相比,TMZ处理方案未提高负载X12T神经胶质瘤的小鼠的存活。DRI处理方案使中位存活期从22天增加到27天,超过TMZ处理方案。可以通过将 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞和NK细胞的施用从每周施用一次(如图2所示)加强到每周施用两次(数据未示)来增加DRI处理方案的作用。在此改变的施用下,与未经处理的小鼠相比,DRI处理方案延长负载X12T神经胶质瘤的小鼠的存活,并且使中位存活期从22天增加到38天,超过TMZ处理方案。

[0131] 实例7-应激诱发的抗原在正常脑组织中不上调

[0132] 放射后的转移性脑肿瘤组织和相邻正常脑组织的观测结果显示应激诱发的抗原 (NKG2D配体) 在肿瘤组织中上调, 在正常 (即, 非肿瘤) 周围脑组织中基本上不表达 (图6)。图6展示来自放射后的转移性脑肿瘤组织和相邻的正常脑组织的应激诱发的抗原表达。转移性脑肿瘤组织展示ULBP-1的强烈表达和ULBP-2和ULBP-3的轻度表达。在相邻正常脑组织中未观测到应激诱发的抗原表达。因而, 本文所述的细胞组合物的脱靶效应和由此对正常脑组织的损伤是不大可能的。

[0133] 实例8-在放射处理下应激诱发的抗原未上调

[0134] 类似地, 应激诱发的抗原 (NKG2D配体) 在经受放射的小鼠脑中未上调, 其它发炎征象也不可见 (图7)。图7展示使用160kV X射线的前-后和后-前射线束对在17Gy的剂量下放射的WT C56BL/6小鼠 (图b、d) 和未接受放射的对照小鼠 (图a、c) 的全脑。杀死小鼠并且在70天收获大脑。图a和b比较对照与放射小鼠之间的应激抗原MULT-1染色。图c和d比较对照与放射小鼠之间利用抗CD3的染色。放射小鼠对MULT-1和抗CD3呈阴性, 表明正常脑组织中应激诱发的抗原未响应于放射处理而上调, 并且正常脑组织中淋巴细胞浸润未响应于放射处理而诱发。

[0135] 引用的文献

[0136] 1. Bryant NL, Suarez-Cuervo C, Gillespie GY, Markert JM, Nabors LB, Meleth S, Lopez RD, Lamb LS, Jr. 《具有成胶质细胞瘤的患者中 $\gamma\delta$ T 细胞的表征和免疫治疗潜能 (Characterization and immunotherapeutic potential of gammadelta T-cells in patients with glioblastoma)》.《神经肿瘤学 (Neuro Oncol.)》2009;11 (4):357-67. PubMed PMID:19211933; PubMed Central PMCID:PMC2743216。

[0137] 2. Lamb LS, Jr. 《作为针对高度恶性神经胶质瘤的免疫效应细胞的 $\gamma\delta$ T 细胞 (gammadelta T cells as immune effectors against high-grade gliomas)》.《免疫学研究 (Immunol Res.)》2009;45 (1):85-95. PubMed PMID:19711198。

[0138] 3. Bryant NL, Gillespie GY, Lopez RD, Markert JM, Cloud GA, Langford CP, Arnouk H, Su Y, Haines HL, Suarez-Cuervo C, Lamb LS, Jr. 《用于多形性成胶质细胞瘤的免疫疗法的离体扩增/活化的 $\gamma\delta$ T 细胞的临床前评估 (Preclinical evaluation of ex vivo expanded/activated gammadelta T cells for immunotherapy of glioblastoma multiforme)》.《神经肿瘤学杂志 (Journal of neuro-oncology)》.2011;101 (2):179-88. Epub 2010/06/10. doi:10.1007/s11060-010-0245-2. PubMed PMID:20532954。

[0139] 4. Lamb LS, Jr., Bowersock J, Dasgupta A, Gillespie GY, Su Y, Johnson A, Spencer HT. 《在化学疗法激发期间工程化的抗药性 $\gamma\delta$ T 细胞杀死成胶质细胞瘤细胞系: 用于组合化学和免疫疗法的策略 (Engineered drug resistant gammadelta T cells kill glioblastoma cell lines during a chemotherapy challenge: a strategy for combining chemo-and immunotherapy)》.《公共科学图书馆·综合 (PLoS One.)》2013;8 (1):e51805. Epub 2013/01/18. doi:10.1371/journal.pone.0051805. PubMed PMID:23326319; PubMed Central PMCID:PMC3543433。

[0140] 5. Beck BH, Kim HG, Kim H, Samuel S, Liu Z, Shrestha R, Haines H, Zinn K, Lopez RD. 《在乳腺癌的临床前小鼠模型中过继转移的离体扩增的 $\gamma\delta$ T 细胞介导体内抗肿瘤活性 (Adoptively transferred ex vivo expanded gammadelta-T cells mediate in

vivo antitumor activity in preclinical mouse models of breast cancer)》.《乳腺癌研究和治疗(Breast cancer research and treatment)》.2010;122(1):135-44.Epub 2009/09/19.doi:10.1007/s10549-009-0527-6.PubMed PMID:19763820;PubMed Central PMCID:PMC2883655。

[0141] 6.Zhou X,Di Stasi A,Tey SK,Krance RA,Martinez C,Leung KS,Durett AG,Wu MF,Liu H,Leen AM,Savoldo B,Lin YF,Grilley BJ,Gee AP,Spencer DM,Rooney CM,Heslop HE,Brenner MK,Dotti G.《表达诱导性卡斯蛋白酶9安全性转基因的T细胞在单倍体相合干细胞移植和输注后的长期结果(Long-term outcome after haploidentical stem cell transplant and infusion of T cells expressing the inducible caspase 9safety transgene)》.《血液(Blood)》.2014;123(25):3895-905.Epub 2014/04/23.doi:10.1182/blood-2014-01-551671.PubMed PMID:24753538;PubMed Central PMCID:PMC4064331。

[0142] 7.Di Stasi A,Tey SK,Dotti G,Fujita Y,Kennedy-Nasser A,Martinez C,Straathof K,Liu E,Durett AG,Grilley B,Liu H,Cruz CR,Savoldo B,Gee AP,Schindler J,Krance RA,Heslop HE,Spencer DM,Rooney CM,Brenner MK.《诱导性细胞凋亡是过继性细胞疗法的安全性开关(Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy)》.《新英格兰医学杂志(N Engl J Med)》.2011;365(18):1673-83.Epub 2011/11/04.doi:10.1056/NEJMoal106152.PubMed PMID:22047558;PubMed Central PMCID:PMC3236370。

[0143] 8.Zitvogel L,Apetoh L,Ghiringhelli F,Kroemer G.《癌症化学疗法的免疫学方面(Immunological aspects of cancer chemotherapy)》.《自然·免疫学综述(Nat Rev Immunol)》.2008;8(1):59-73.PubMed PMID:18097448。

[0144] 9.Lake RA,Robinson BW.《免疫疗法和化学疗法--实际合作伙伴(Immunotherapy and chemotherapy--a practical partnership)》.《自然·癌症综述(Nat Rev Cancer)》.2005;5(5):397-405.Epub2005/05/03.doi:nrc1613[pil]10.1038/nrc1613.PubMed PMID:15864281。

[0145] 10.van der Most RG,Robinson BW,Lake RA.《免疫疗法与化学疗法组合治疗癌症(Combining immunotherapy with chemotherapy to treat cancer)》.药物开发(Discov Med)》.2005;5(27):265-70.Epub2005/06/01.PubMed PMID:20704886。

[0146] 11.Ramakrishnan R,Assudani D,Nagaraj S,Hunter T,Cho HI,Antonia S,Altiook S,Celis E,Gabrilovich DI.《在小鼠中癌症免疫疗法期间化学疗法增强肿瘤细胞对CTL介导的杀死的敏感性(Chemotherapy enhances tumor cell susceptibility to CTL-mediated killing during cancer immunotherapy in mice)》.《临床调查杂志(The Journal of clinical investigation)》.2010;120(4):1111-24.Epub2010/03/18.doi:10.1172/JCI40269.PubMed PMID:20234093;PubMed Central PMCID:PMC2846048。

[0147] 12.Gulley JL,Madan RA,Arlen PM.《通过与其它模式组合增强治疗性疫苗接种的功效(Enhancing efficacy of therapeutic vaccinations by combination with other modalities)》.《疫苗(Vaccine)》.2007;25增刊2:B89-96.Epub 2007/06/19.doi:10.1016/j.vaccine.2007.04.091.PubMed PMID:17573164;PubMed Central PMCID:

PMC2062504。

[0148] 13.Fridlender ZG,Sun J,Singhal S,Kapoor V,Cheng G,Suzuki E,Albelda SM.《在病毒免疫基因疗法后递送的化学疗法经由多个免疫介导的机制加强抗肿瘤功效 (Chemotherapy delivered after viral immunogene therapy augments antitumor efficacy via multiple immune-mediated mechanisms)》.《分子治疗学 (Mol Ther)》.2010;18(11):1947-59.Epub 2010/08/05.doi:10.1038/mt.2010.159.PubMed PMID:20683443;PubMed Central PMCID:PMC2990510。

[0149] 14.Arlen PM,Gulley JL,Parker C,Skarupa L,Pazdur M,Panicali D,Beetham P,Tsang KY,Grosenbach DW,Feldman J,Steinberg SM,Jones E,Chen C,Marte J,Schlom J,Dahut W.《在转移性非雄激素依赖性前列腺癌中同时多烯紫杉醇加疫苗对比单独疫苗的随机化II期研究 (A randomized phase II study of concurrent docetaxel plus vaccine versus vaccine alone in metastatic androgen-independent prostate cancer)》.《临床癌症研究 (Clinical cancer research)》:美国癌症研究协会的官方杂志.2006;12(4):1260-9.Epub 2006/02/21.doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2059.PubMed PMID:16489082;PubMed Central PMCID:PMC1526707。

[0150] 15.Ramakrishnan R,Antonia S,Gabrilovich DI.《组合模式免疫疗法和化学疗法:新视角 (Combined modality immunotherapy and chemotherapy:a new perspective)》.《癌症免疫与免疫疗法 (Cancer Immunol Immunother)》.2008;57(10):1523-9.Epub 2008/05/20.doi:10.1007/s00262-008-0531-4.PubMed PMID:18488219。

[0151] 16.Mitchell MS.《抗癌药物与免疫疗法的组合 (Combinations of anticancer drugs and immunotherapy)》.《癌症免疫与免疫疗法 (Cancer Immunol Immunother)》.2003;52(11):686-92.Epub2003/08/28.doi:10.1007/s00262-003-0427-2.PubMed PMID:12942200。

[0152] 17.Antonia SJ,Mirza N,Fricke I,Chiappori A,Thompson P,Williams N,Bepler G,Simon G,Janssen W,Lee JH,Menander K,Chada S,Gabrilovich DI.《在患有广泛期小细胞肺癌的患者中p53癌症疫苗与化学疗法的组合 (Combination of p53cancer vaccine with chemotherapy in patients with extensive stage small cell lung cancer)》.《临床癌症研究 (Clinical cancer research)》:美国癌症研究协会的官方杂志.2006;12(3Pt 1):878-87.Epub 2006/02/10.doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2013.PubMed PMID:16467102。

[0153] 18.Merchant RE,Baldwin NG,Rice CD,Bear HD.《使用肿瘤致敏的T淋巴细胞的恶性神经胶质瘤的过继性免疫疗法 (Adoptive immunotherapy of malignant glioma using tumor-sensitized T lymphocytes)》.《神经病学研究 (Neurol Res)》.1997;19(2):145-52.PubMed PMID:9175143。

[0154] 19.Plautz GE,Barnett GH,Miller DW,Cohen BH,Prayson RA,Krauss JC,Luciano M,Kangisser DB,Shu S.《恶性神经胶质瘤的全身T细胞过继性免疫疗法 (Systemic T cell adoptive immunotherapy of malignant gliomas)》.《神经外科杂志 (J Neurosurg)》.1998;89(1):42-51.PubMed PMID:9647171。

[0155] 20.Kruse CA,Cepeda L,Owens B,Johnson SD,Stears J,Lillehei KO.《用腔内

同种异体反应性细胞毒性T淋巴细胞和白细胞介素-2治疗复发性神经胶质瘤 (Treatment of recurrent glioma with intracavitary alloreactive cytotoxic T lymphocytes and interleukin-2)》.《癌症免疫与免疫疗法 (Cancer Immunol Immunother)》.1997;45 (2):77-87.PubMed PMID:9390198。

[0156] 21.Read SB,Kulprathipanja NV,Gomez GG,Paul DB,Winston KR,Robbins JM,Kruse CA.《人类同种异体反应性CTL与神经胶质瘤和由于外源性IFN- γ 或IFN- γ 基因修饰而使得HLA表达上调的神经胶质瘤相互作用 (Human alloreactive CTL interactions with gliomas and with those having upregulated HLA expression from exogenous IFN-gamma or IFN-gamma gene modification)》.《干扰素与细胞因子研究杂志 (J Interferon Cytokine Res)》.2003;23 (7):379-93.PubMed PMID:14511464。

[0157] 22.Merchant RE,Ellison MD,Young HF.《使用人类重组白细胞介素-2和活化的自身淋巴细胞的针对恶性神经胶质瘤的免疫疗法 (Immunotherapy for malignant glioma using human recombinant interleukin-2and activated autologous lymphocytes)》.《临床前和临床研究综述 (A review of pre-clinical and clinical investigations)》.《神经肿瘤学杂志 (J Neurooncol)》.1990;8 (2):173-88。

[0158] 23.Barba D,Saris SC,Holder C,Rosenberg SA,Oldfield EH.人类神经胶质瘤的瘤内LAK细胞和白细胞介素-2疗法 (Intratumoral LAK cell and interleukin-2therapy of human gliomas)》.《神经外科杂志 (J Neurosurg)》.1989;70 (2):175-82.PubMed PMID:2643685。

[0159] 24.Saris SC,Patronas NJ,Rosenberg SA,Alexander JT,Frank J,Schwartzentruber DJ,Rubin JT,Barba D,Oldfield EH.《静脉内白细胞介素-2对脑含水量的作用 (The effect of intravenous interleukin-2on brain water content)》.《神经外科杂志 (J Neurosurg)》.1989;71 (2):169-74.PubMed PMID:2787395。

[0160] 25.Hayes RL,Koslow M,Hiesiger EM,Hymes KB,Hochster HS,Moore EJ,Pierz DM,Chen DK,Budzilovich GN,Ransohoff J.针对具有复发性恶性神经胶质瘤的成年人在腔内白细胞介素-2和淋巴因子活化的杀伤细胞后改善的长期存活 (Improved long term survival after intracavitary interleukin-2and lymphokine-activated killer cells for adults with recurrent malignant glioma)》.《癌症 (Cancer)》.1995;76 (5):840-52.PubMed PMID:8625188。

[0161] 26.Dillman RO,Duma CM,Schiltz PM,DePriest C,Ellis RA,Okamoto K,Beutel LD,De Leon C,Chico S.《在切除复发性成胶质细胞瘤后自身淋巴因子活化的杀伤 (LAK) 细胞的腔内放置 (Intracavitary placement of autologous lymphokine-activated killer (LAK) cells after resection of recurrent glioblastoma)》.《免疫疗法杂志 (J Immunother)》.2004;27 (5):398-404.PubMed PMID:15314549。

[0162] 27.Wu J,Groh V,Spies T.《在人类上皮 $\gamma\delta$ T细胞识别应激诱导性MHC I类相关链中的T细胞抗原受体接合和特异性 (T cell antigen receptor engagement and specificity in the recognition of stress-inducible MHC class I-related chains by human epithelial gamma delta T cells)》.《免疫学杂志 (J Immunol)》.2002;169 (3):1236-40.PubMed PMID:12133944。

[0163] 28.Poggi A,Carosio R,Fenoglio D,Brenci S,Murdaca G,Setti M,Indiveri F,Scabini S,Ferrero E,Zocchi MR.《在健康供体和HIV-1感染患者中V δ 1和V δ 2T细胞响应于CXCR3和CXCR4配体的迁移:与HIV-1Tat竞争 (Migration of V delta 1and V delta 2T cells in response to CXCR3and CXCR4ligands in healthy donors and HIV-1-infected patients:competition by HIV-1Tat)》.《血液 (Blood)》.2004;103 (6) :2205-13.PubMed PMID:14630801。

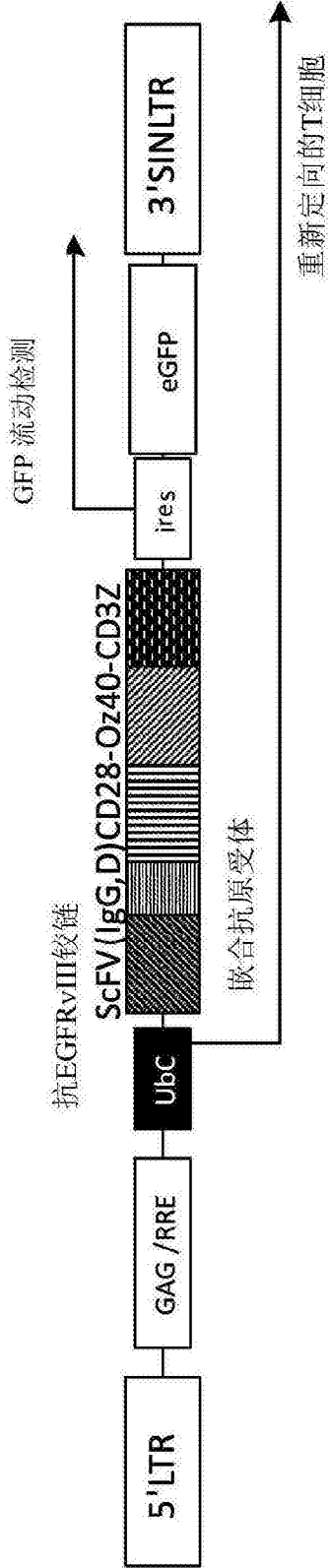


图1A

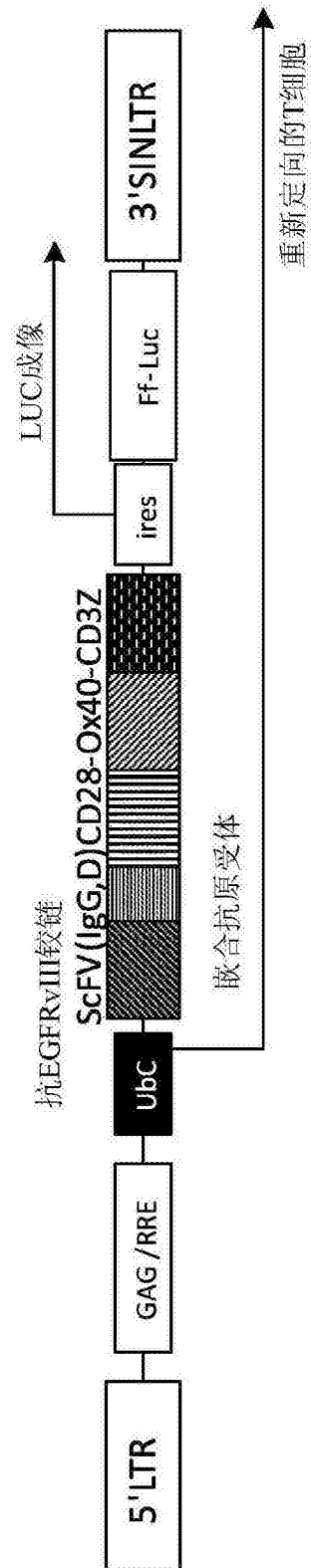


图1B

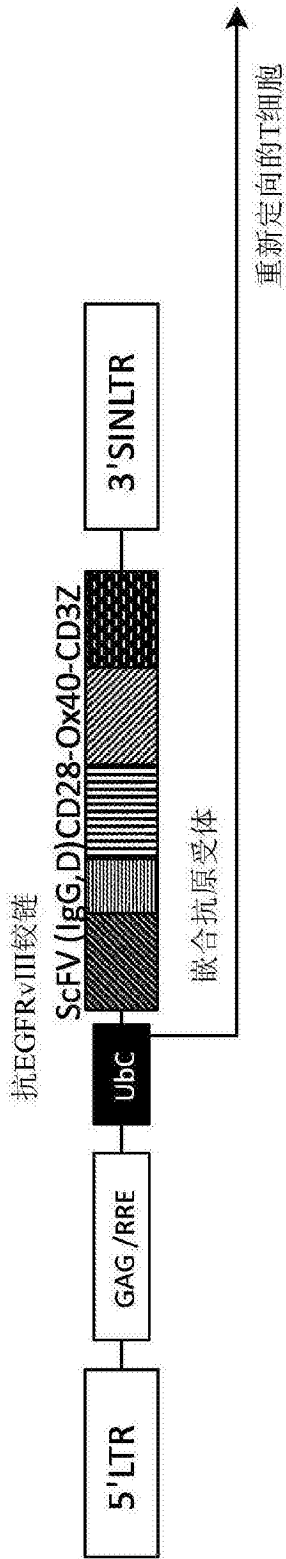


图1C

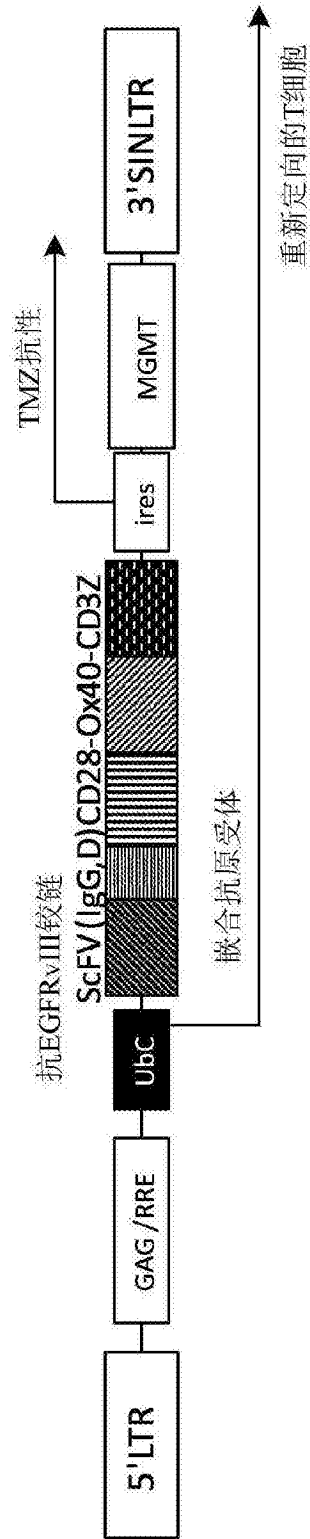


图1D

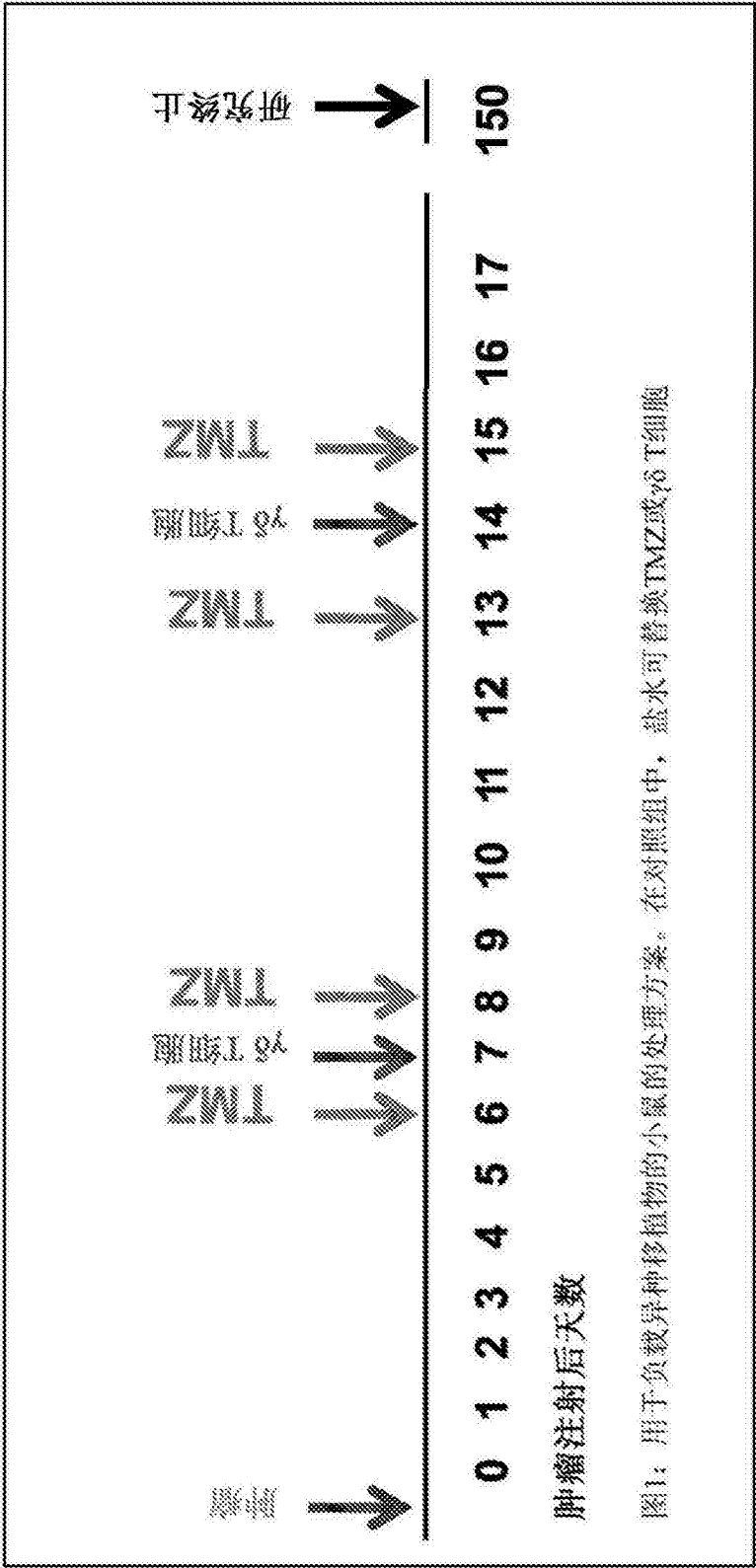


图1：用于负载异种移植物的老鼠的处理方案。在对照中，盐水可替换TMZ或γδ T细胞

图2

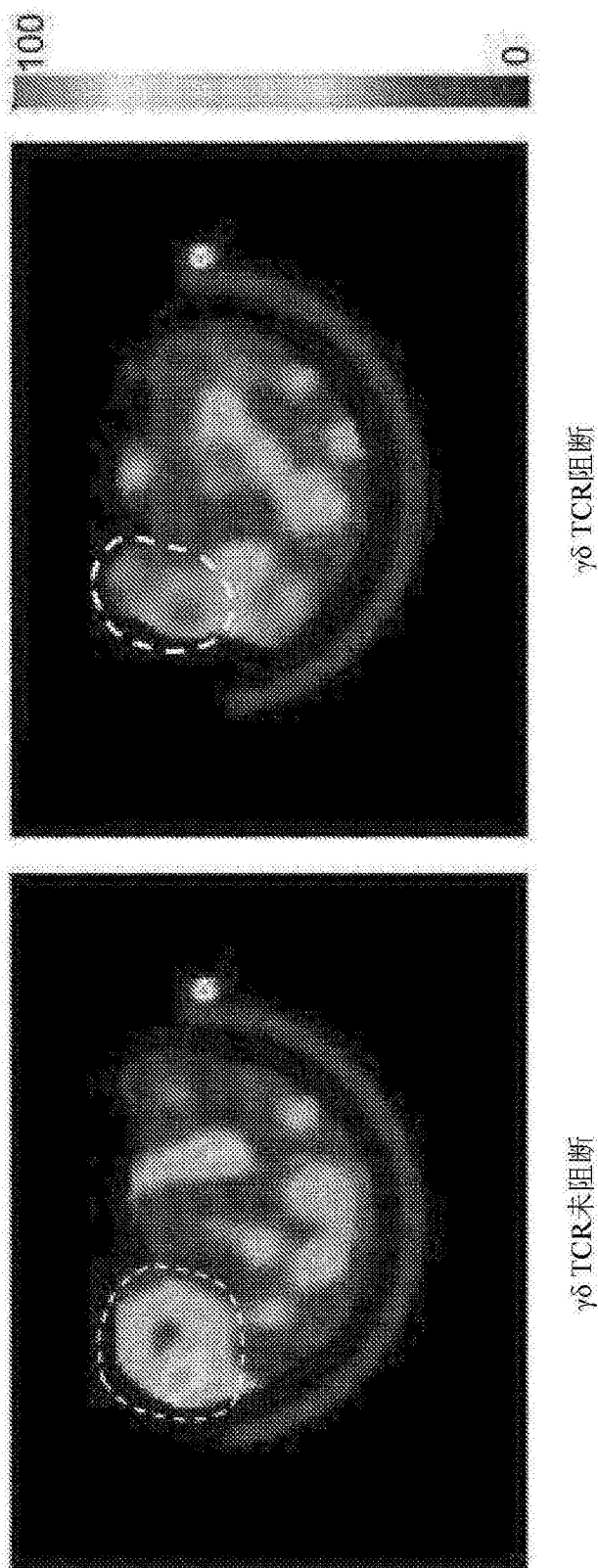


图3

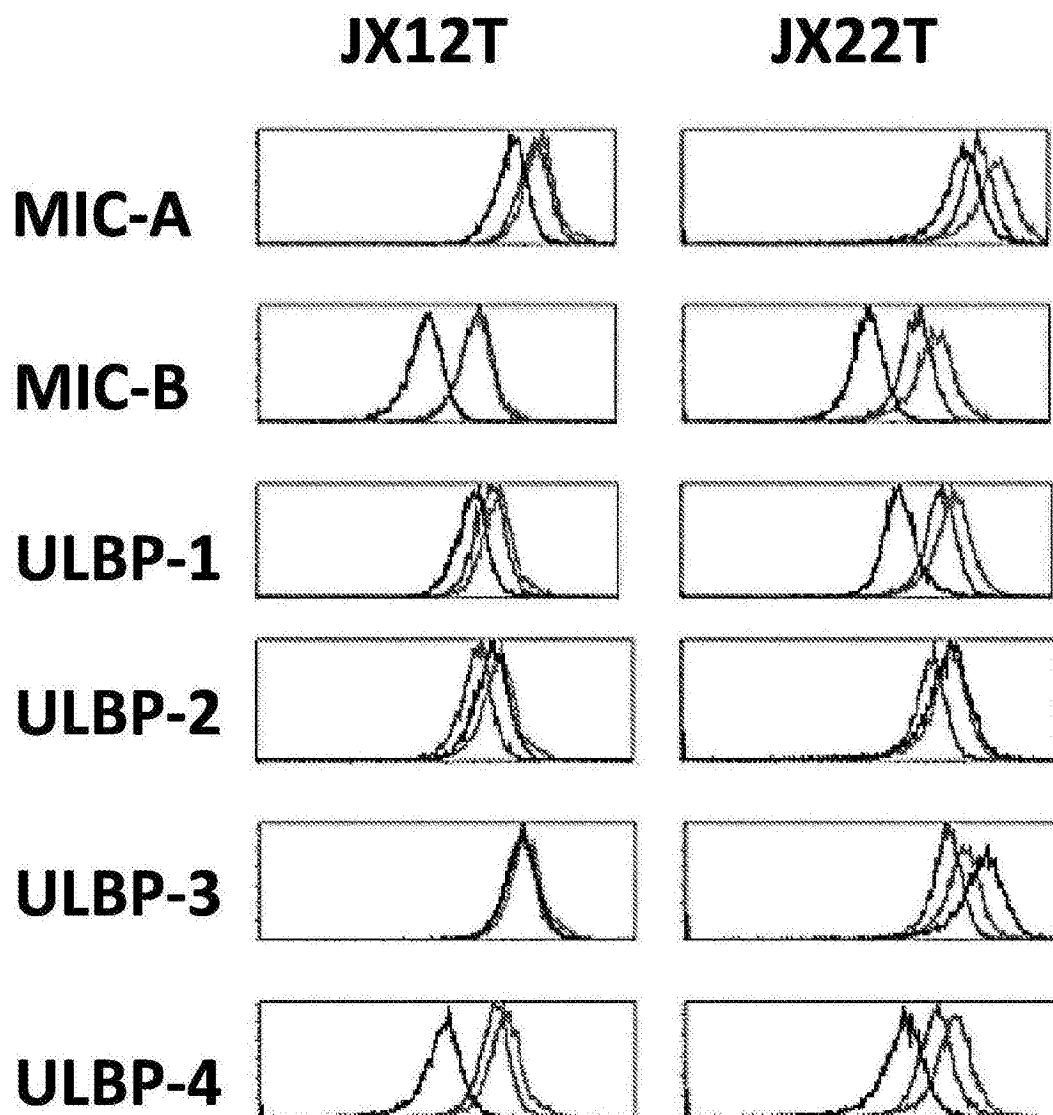


图4A

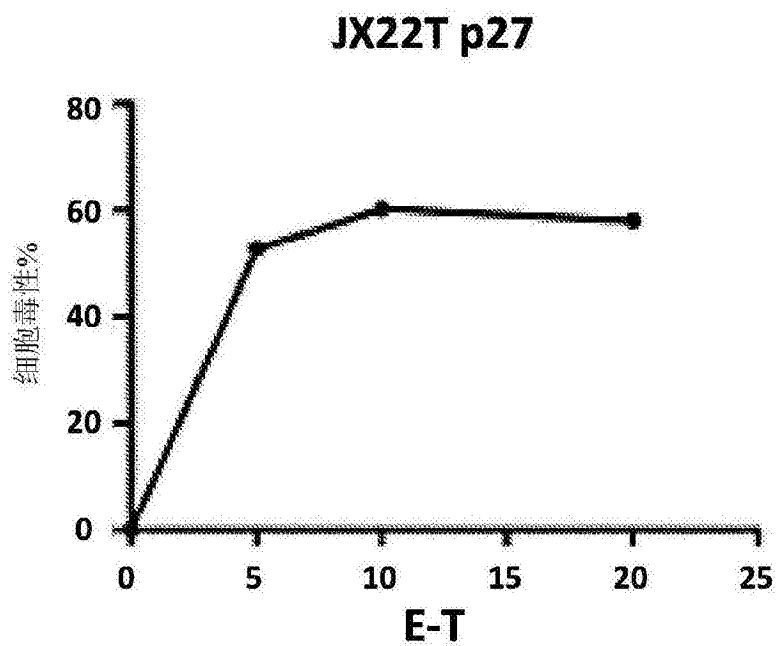
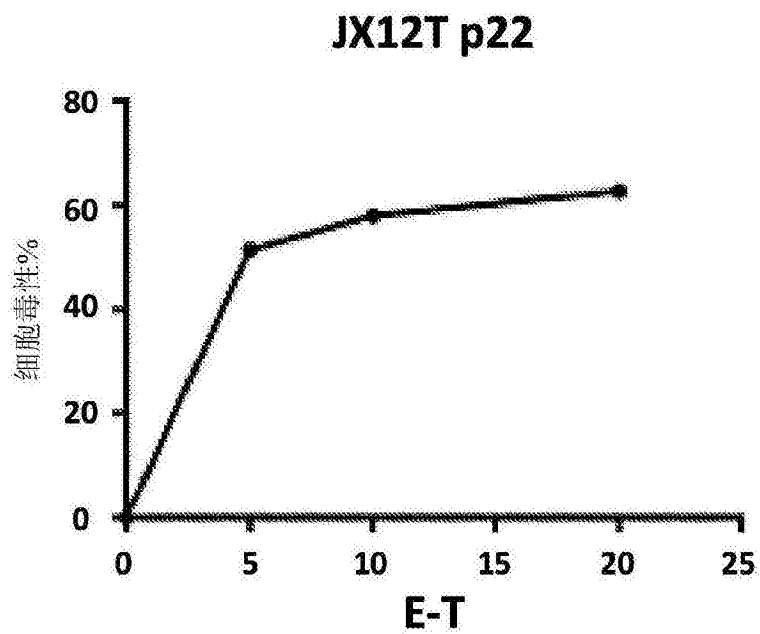


图4B

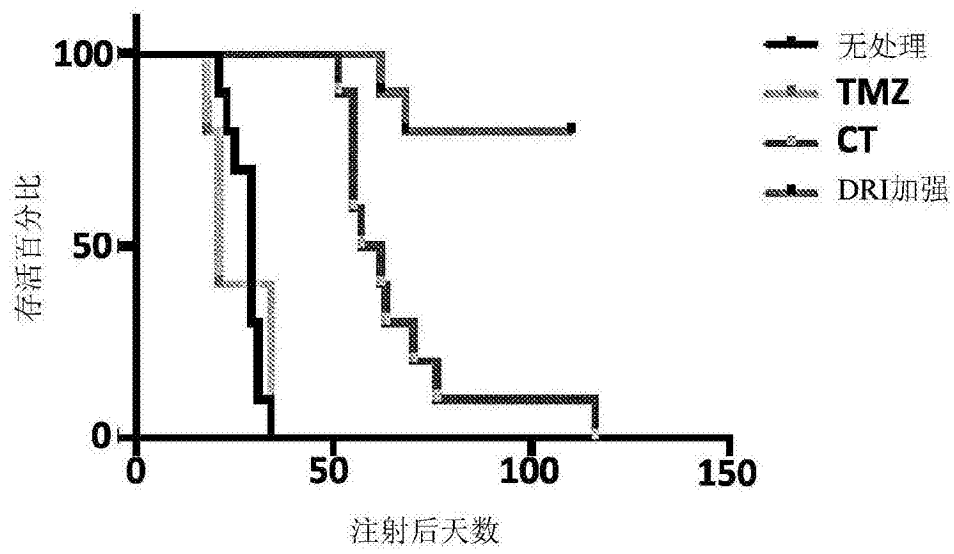
X12P

图5A

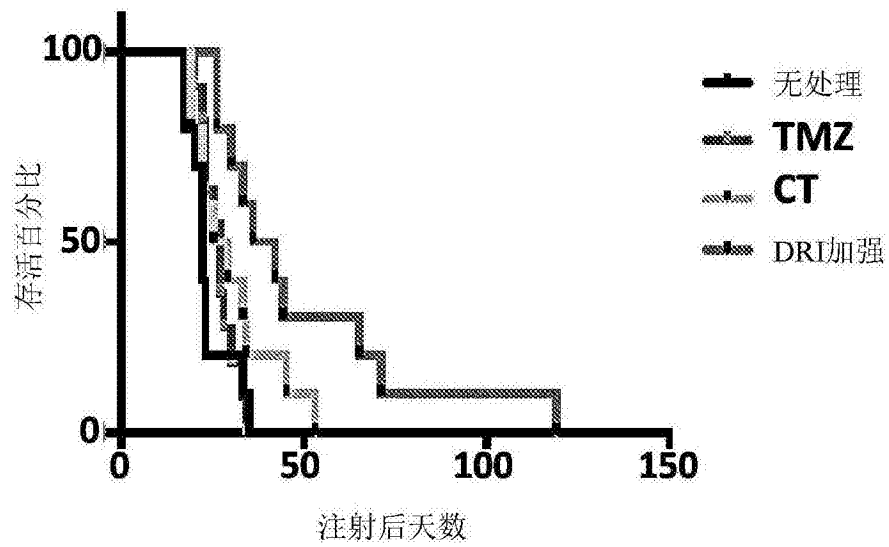
X12T

图5B

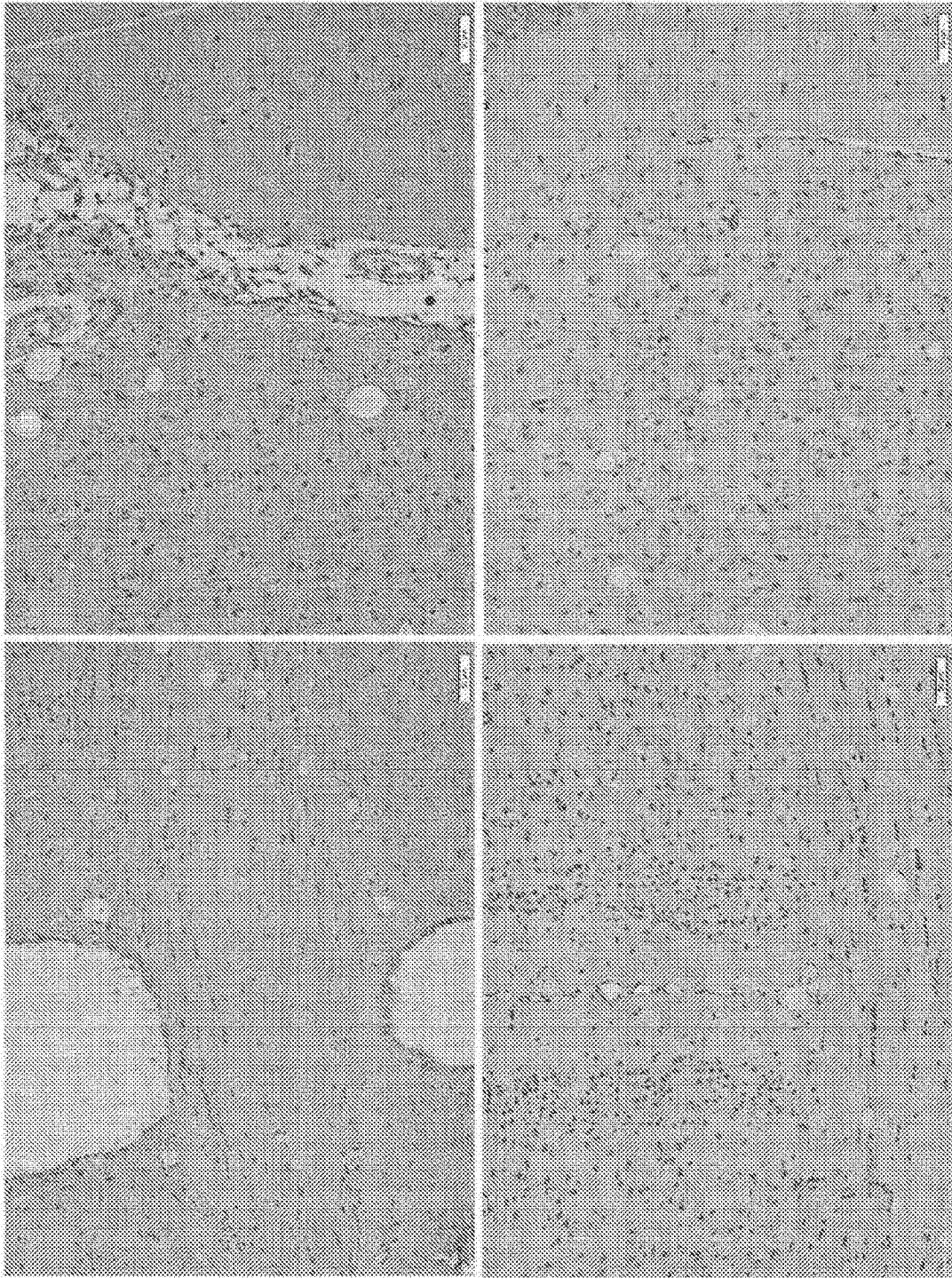


图6

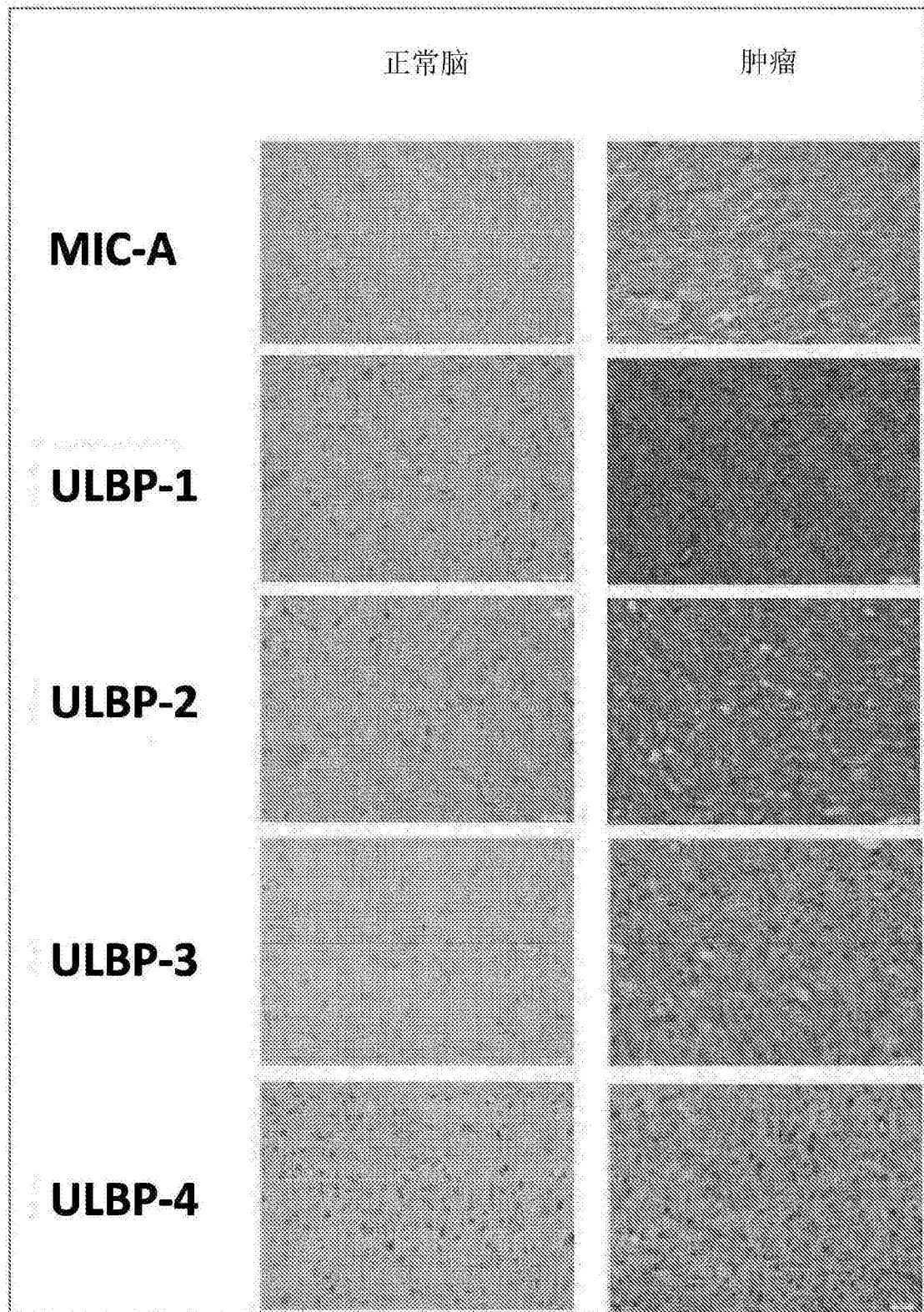


图7

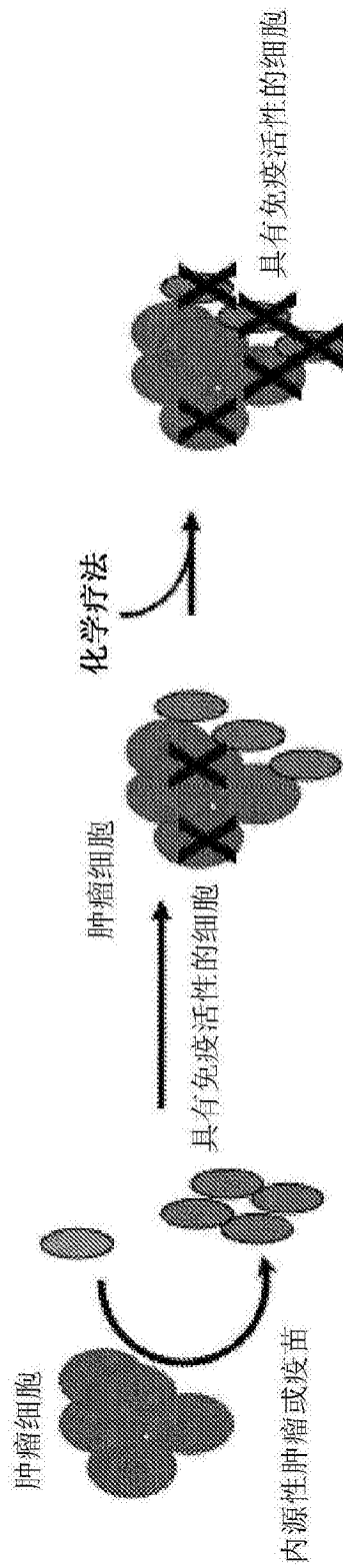


图8A

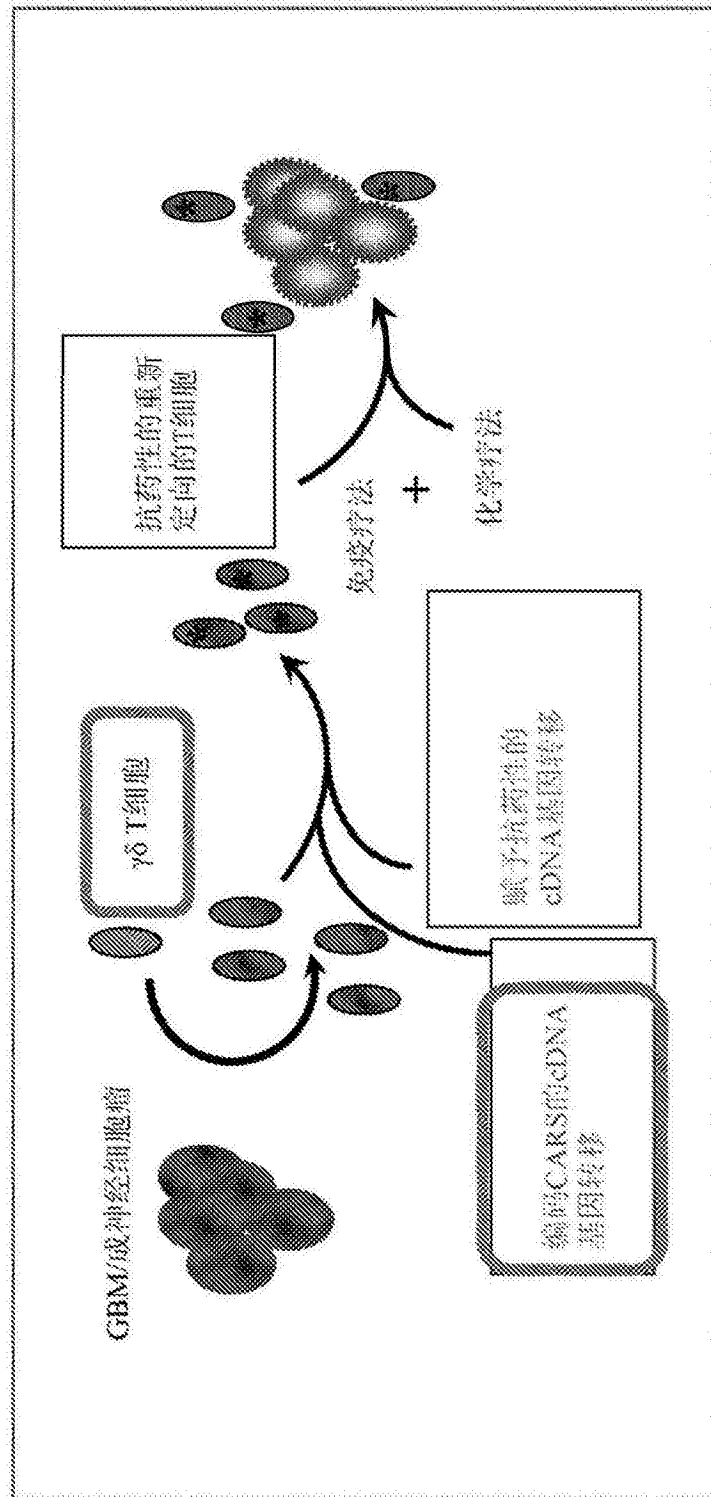


图8B