201920659

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 201920659 A

(43)公開日： 中華民國 108 (2019) 年 06 月 01 日

(21)申請案號：107120586 (22)申請日： 中華民國 107 (2018) 年 06 月 14 日

(51)Int. Cl.： *C12N5/0775 (2010.01)* *A61K35/28 (2015.01)*
A61P37/02 (2006.01)

(30)優先權：2017/06/16 澳大利亞 2017902301

(71)申請人：澳大利亞商辛那塔治療有限公司 (澳大利亞) CYNATA THERAPEUTICS LIMITED (AU)
澳大利亞

(72)發明人：凱利 基利安 KELLY, KILIAN (AU) ；斯勒克文 伊格爾 SLUKVIN, IGOR (US)

(74)代理人：鄭志玲

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：17 項 圖式數：9 共 60 頁

(54)名稱

用於治療免疫療法的副作用之方法

METHOD FOR TREATING A SIDE EFFECT OF IMMUNOTHERAPY

(57)摘要

本發明涉及治療免疫療法的副作用之方法，該方法包含將間質幹細胞(mesenchymal stem cell，MSC)施予已經歷或正在接受免疫療法的個體。本發明還涉及包含 MSC 之治療組合物以及包含 MSC 或治療組合物之容器。

The invention relates to a method for treating a side effect of immunotherapy, the method comprising administering a mesenchymal stem cell (MSC) to a subject who has undergone or is undergoing immunotherapy. The invention also relates to a therapeutic composition comprising a MSC and a container comprising a MSC or therapeutic composition.

【發明說明書】

【中文發明名稱】　用於治療免疫療法的副作用之方法

【英文發明名稱】　METHOD FOR TREATING A SIDE EFFECT OF IMMUNOTHERAPY

【技術領域】

【0001】 本發明涉及治療免疫療法的副作用。

【先前技術】

【0002】 免疫療法為一種生物療法，目的在改善一個體的天然免疫系統以對抗疾病。通常，免疫療法係指癌症免疫療法。

【0003】 已建立的癌症免疫療法包括細胞激素療法，而癌症免疫療法的發展領域包括檢查點抑制劑、先天免疫刺激劑，以及抗體綴合物。

【0004】 免疫療法在臨床前以及臨床試驗中表現出令人印象深刻的反應，且該領域正在快速擴張。

【0005】 儘管免疫療法的前景看好，但免疫療法並非沒有副作用與顯著的風險。觀察到的副作用包括細胞激素釋放症候群 (cytokine release syndrome，CRS)，其可能與巨噬細胞活化症候群 (macrophage activation syndrome，MAS)，對於標靶，癌症外效應相關，導致結果類似於移植物抗宿主病 (graft-versus-host disease，GVHD)以及B細胞發育不良、腫瘤裂解症候群 (tumour lysis syndrome，TLS)、神經毒性如腦水腫，以及由個體對非人類抗原的IgG反應引起的過敏反應。

【0006】 已經有用標準支持療法，包括類固醇，治療細胞激素釋放症候群(CRS)。然而，類固醇可能影響個體中T細胞的活性或增殖。細胞激素釋放症候群(CRS)的另一種療法是給予在細胞激素釋放症候群 (CRS)中會升高的促發炎細胞激素之抑制劑。託珠單抗 (Tocilizumab)是一種抗介白素6 (IL-6)受體的抗體，而依那西普 (etanercept)是一種腫瘤壞死因子 (tumour necrosis factor，TNF)抑制劑，已被用於治療細胞激素釋放症候群 (CRS)。

【0007】 已經有以靜脈內免疫球蛋白治療會導致抗體產量減少的B細胞發育不良來預防感染。

【0008】 腫瘤裂解症候群 (TLS)已透過標準支持療法進行治療，包括水合、利尿、別嘌呤醇以及重組尿酸氧化酶的施用，以及根據需要進行的血液透析。

【0009】 儘管這些副作用已經有不同程度的控制，但這些控制並未完全成功，因為不良事件還是常常發生，甚至在許多臨床試驗中發生個體死亡的情形。

【0010】 顯然地，需要改進預防及/或治療免疫療法的副作用。

【0011】 應當理解的是，若本文提及任何現有技術出版物，則此類參考並不構成本文承認該出版物構成澳大利亞或任何其他國家的本領域公知常識的一部分。

【發明內容】

【0012】 第一方面提供了一種治療免疫療法的副作用之方法，該方法包含將間質幹細胞 (mesenchymal stem cell，MSC)施予已經歷或正在進行免疫療法的個體。

【0013】第一方面的替代或額外的具體實施例提供間質幹細胞 (MSC)在製備藥物中之用途，該藥物用於治療在已經歷或正在進行免疫療法的個體中的免疫療法的副作用。

【0014】第一方面的另一個替代或額外的具體實施例提供了間質幹細胞 (MSC)，其用於治療在已經歷或正在進行免疫療法的個體中的免疫療法的副作用。

【0015】於一具體實施例中，該間質幹細胞 (MSC)具有$CD73^+CD105^+CD90^+CD146^+CD44^+CD10^+CD31^-CD45^-$的表型。

【0016】於一具體實施例中，該間質幹細胞 (MSC)表現miR-145-5p、miR-181b-5p，以及miR-214-3p，但不表現miR-127-3p與miR-299-5p。

【0017】於一具體實施例中，治療包含施予該個體約1×10^6至約1×10^7個間質幹細胞 (MSC)/kg體重。

【0018】於一具體實施例中，治療包含在觀察到免疫療法的副作用後24小時內施予該間質幹細胞 (MSC)。

【0019】於一具體實施例中，治療包含在免疫療法之前、期間或之後施予該間質幹細胞 (MSC)。於一具體實施例中，治療包含在免疫療法後施用該間質幹細胞 (MSC)。於一具體實施例中，治療包含在免疫療法後24小時至72小時內施予該間質幹細胞 (MSC)。

【0020】於一具體實施例中，該副作用或症狀為：細胞激素釋放症候群 (cytokine release syndrome，CRS)，可視需要地釋放介白素-6 (interleukin-6，IL-6)、干擾素-γ (interferon-γ，IFN-γ)、腫瘤壞死因子 (tumour necrosis factor，TNF)、介白素-2 (IL-2)、介白素-2 (IL-2)-受體α、介白素-8 (IL-8)、介白素-10 (IL-10)，或

顆粒球巨噬細胞株刺激因子 (granulocyte macrophage colony-stimulating factor，GMCSF)；巨噬細胞活化症候群 (macrophage activation syndrome，MAS)；一種針對標靶、不針對癌症的作用，可視需要地為B細胞發育不良；腫瘤溶解症候群 (tumour lysis syndrome，TLS)；神經毒性，可視需要地為腦水腫；或過敏性休克。

【0021】 於一具體實施例中，該免疫療法用於治療：淋巴瘤；白血病；黑色素瘤；上皮癌；或肉瘤。

【0022】 於一具體實施例中，該免疫療法用於治療：瀰漫性大B細胞淋巴瘤 (diffuse large B cell lymphoma，DLBCL)；何杰金氏淋巴瘤；非何杰金氏淋巴瘤 (non-Hodgkin lymphoma，NHL)；非何杰金氏B、T或NK細胞淋巴瘤；原發性縱隔B細胞淋巴瘤 (primary mediastinal B cell lymphoma，PMBCL)；變化型濾泡性淋巴瘤 (transformed follicular lymphoma，TFL)；被套細胞淋巴瘤 (mantle cell lymphoma，MCL)；多發性骨髓瘤 (multiple myeloma，MM)；慢性淋巴性白血病 (chronic lymphocytic leukaemia，CLL)；急性骨髓性白血病 (acute myeloid leukaemia，AML)；或急性淋巴球性白血病 (acute lymphoblastic leukaemia，ALL)。

【0023】 於一具體實施例中，該免疫療法為檢查點抑制劑、雙專一性T細胞接合者、干擾素基因促效劑的刺激劑、類RIG I受體促效劑、類鐸受體促效劑、細胞激素、抗體-細胞激素融合蛋白，或抗體-藥物偶聯物。

【0024】 於一具體實施例中，該個體為哺乳動物，可視需要地為人類。

【0025】 第二方面提供一種用於治療、改善，或減輕在哺乳動物個體中免疫治療的副作用之治療組合物，其中該治療組合物包含間質幹細胞 (MSC)，其中該間質幹細胞 (MSC)由包含以下之方法所製備：

(a) 於間質集落形成培養基 (mesenchymal-colony forming medium，M-CFM) 中培養原始的中胚層細胞，該培養基 (M-CFM)包含LiCl與FGF2，但不包括PDGF，在含氧量正常的條件下培養足夠的時間以形成間質集落；以及

(b) 黏附地培養(a)的該間質集落以產生該間質幹細胞 (MSC)，

其中(b)的該間質幹細胞(MSC)表現miR-145-5p、miR-181b-5p，以及miR-214-3p，但不表現miR-127-3p與miR-299-5p，及/或具有$CD73^+CD105^+CD90^+CD146^+CD44^+CD10^+CD31^-CD45^-$的表型。

【0026】第三方面提供了一種容器，包含間質幹細胞 (MSC)，其表現miR-145-5p、miR-181b-5p，以及miR-214-3p，但不表現miR-127-3p與miR-299-5p，及/或具有$CD73^+CD105^+CD90^+CD146^+CD44^+CD10^+$ $CD31^-CD45^-$的表型。

【0027】第四方面提供了一種容器，包含該第二方面的治療組合物。

【圖式簡單說明】

圖1為實施例14的實驗設計之示意圖。

圖2為顯示實施例14的對照組與測試小鼠的直腸溫度的圖。

圖3為顯示實施例14的對照組與測試小鼠的臨床評分的圖。0 = 正常活性；1 = 正常活性、豎毛，踮腳走路；2 = 彎背，活性減少但仍會動；3 = 活動力不足，但在提示時仍會動；4 = 垂死狀態、安樂死。

圖4為顯示實施例14的小鼠周圍血中小鼠CD45+細胞百分比、人類CD45+細胞百分比、CD4+細胞佔人類CD45+細胞中的百分比，以及CD8+細胞佔人類CD45+細胞中的百分比的一組圖。

圖5為顯示實施例14的小鼠周圍血中人類CD4+ T細胞上CD69表現的一組圖。

圖6為顯示實施例14的小鼠周圍血中人類CD8+ T細胞上CD69表現的一組圖。

圖7為顯示實施例14的小鼠脾臟中小鼠CD45+細胞百分比、人類CD45+細胞百分比、CD4+細胞佔人類CD45+細胞中的百分比，以及CD8+細胞佔人類CD45+細胞中的百分比的一組圖。

圖8為顯示實施例14的小鼠脾臟中人類CD4+ T細胞上CD69表現的一組圖。

圖9為顯示實施例14的小鼠脾臟中人類CD8+ T細胞上CD69表現的一組圖。

【實施方式】

【0028】 除非在本說明書中另有定義，否則本文使用的技術及科學術語具有與本發明所屬領域的技術人員通常理解的含義相同的含義，並且參考公開的文本。

【0029】 應當注意的是，術語「一」或「一個」係指一個或多個，例如，「MSC」應理解為代表一個或多個MSCs，包括一群MSCs。因此，術語「一」或「一個」、「一個或多個」，以及「至少一個」在本文中可互換使用。

【0030】 在以下與在本發明的描述中的申請專利範圍中，除非上下文由於明確的語言或必要的含義而另外要求，否則詞語「包含」或例如「包含(單數形式)」或「包含(動名詞)」的變體用於包含意義，即指定所述特徵的存在，但不排除在本發明的各種具體實施例中存在或添加其他特徵。

【0031】 如本文所用，「約」乙詞考慮了該數量的±25%的給定數量的一系列值。在其他具體實施例中，「約」乙詞考慮給定數量的數字大小的±20%、±15%、±10%、±5%、±4%、±3%、±2%或±1%的值的範圍。例如，於一具體實施例中，「約3克」表示2.7克至3.3克 (即3克±10%)的值等。

【0032】 類似地，事件的時間或持續時間可以變化至少25%。例如，雖然於一具體實施例中可以將特定事件公開為持續一天，但事件可持續多於或少於一天。例如，「一天」可包括約18小時至約30小時的時段。在其他具體實施例中，時間的時段可以在該時間的時段的±20%、±15%、±10%、±5%、±4%、±3%、±2%或±1%之間變化。

【0033】 如本文所用，「免疫療法」包括，但不限於，用以下物質治療個體：檢查點抑制劑；雙專一性T細胞接合者；干擾素基因的刺激物；類RIG I受體；類鐸受體；抗體-細胞激素融合蛋白；細胞激素；或抗體-藥物偶聯物。

【0034】 免疫療法不需要單獨使用，並且可以組合使用。例如，可以組合兩種檢查點抑制劑，例如，納武單抗 (nivolumab)與帕姆單抗 (pembrolizumab)或納武單抗 (nivolumab)與伊匹單抗 (ipilimumab)，或檢查點抑制劑可以與常規癌症療法組合，例如，放射線療法或化學療法。

【0035】 如本文所用，「抗體」被廣泛使用並且表示抗原結合分子。因此，「抗體」乙詞包括免疫球蛋白，例如IgA、IgD、IgE、IgG、IgM、IgY或IgW，片段，例如Fab、 $(Fab')_2$、scFv、scFv-Fc、微抗體、雙抗體、單結構域抗體 (sdAb或奈米抗體)、雙專一性抗體、多專一性抗體，以及抗體模擬物，如affibody、affilin、affimer、affitin、alphabody、anticalin、avimer DARPin、fynomer，Kunitz結構域胜肽，以及monobody。sdAbs包括來自軟骨魚的駱駝 (camelid)抗體與

IgNARs。抗體可以是多株或單株抗體 (mAb)。抗體可以是嵌合的、人源化的或人類的抗體。

【0036】 抗體產生在本領域中為公知的，並且包括例如融合瘤、噬菌體呈現技術、單B細胞培養，以及單B細胞擴增技術。可以使用重組技術產生嵌合及人源化抗體。可以使用噬菌體呈現技術或轉基因動物，例如轉基因小鼠，生產人類抗體，這些平台可商購獲得。一旦鑑定出具有適當專一性的抗體並確定其序列，就可以重組產生抗體，例如在細胞培養物中，例如CHO細胞培養，如本領域已知的。

【0037】 如本文所用，「副作用」包括「症狀」，而且這兩個術語係指免疫療法的不希望的或不利的影響，定性地確定，即以任何形式不希望的，或定量地確定，在特定閾值之上或之下不期望的。這種症狀也可稱為「不良症狀」，以區分效果與免疫療法的必要或所需效果。免疫療法的副作用或症狀也可稱為「不良事件」、「免疫調節的不良事件」，或「免疫相關的不良事件」。

【0038】 **檢查點抑制劑**

【0039】 檢查點為負調節T細胞免疫反應的蛋白質。迄今為止，已經確定了兩個檢查點：細胞毒性T淋巴細胞抗原-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4，CTLA-4或CD152)以及程式死亡-1 (programmed death-1，PD-1或CD279)。PD-1由程式死亡配體1 (PD-L1)以及程式死亡配體2 (PD-L2)活化。檢查點或其配體的抑制消除了T細胞的負調節並使免疫反應朝向T細胞活化轉變。

【0040】 伊匹單抗 (ipilimumab)為人類抗-CTLA-4單株抗體。例如，伊匹單抗可以每2週或3週以3 mg/kg或以每2週10 mg/kg施用。儘管以伊匹單抗治療更多癌症的臨床試驗正在進行評估中，伊匹單抗可用於治療例如，黑色素瘤、非小

細胞肺癌 (non-small cell lung carcinoma，NSCLC)、小細胞肺癌 (small cell lung cancer，SCLC)、膀胱癌，以及前列腺癌。伊匹單抗可以與其他藥劑組合使用，例如納武單抗 (nivolumab)、巴維昔單抗 (bavituximab)、達卡巴仁注射劑 (dacarbazine)、IL-2或gp100。

【0041】 伊匹單抗 (ipilimumab)的副作用或症狀包括，例如，瘙癢、皮疹、白斑病、腹瀉、結腸炎、ALT增加、AST升高、肝炎、甲狀腺機能減退、垂體機能減退、垂體炎、腎上腺皮質功能不全、促甲狀腺激素增加、促腎上腺皮質激素減少、急性炎症性脫髓鞘性多發性神經病變、上行運動癱瘓，以及重症肌無力。

【0042】 納武單抗 (nivolumab)為人類IgG4抗PD-1單株抗體。例如，納武單抗可以每2週3 mg/kg施用。儘管以納武單抗治療更多癌症的臨床試驗正在進行評估中，納武單抗可用於治療，例如，黑色素瘤、轉移性黑色素瘤、轉移性鱗狀NSCLC、腎細胞癌，以及膀胱癌。納武單抗可以與其他藥劑組合使用，例如伊匹單抗 (ipilimumab)或帕姆單抗 (pembrolizumab)。

【0043】 納武單抗 (nivolumab)的副作用或症狀包括，例如，瘙癢、皮疹、白斑病、腹瀉、結腸炎、ALT升高、AST升高、膽紅素升高、肺炎、血清肌酐升高、腎功能衰竭、甲狀腺機能減退、甲狀腺功能亢進、TSH升高、糖尿病、垂體炎、腎上腺素不足，以及疲勞。

【0044】 帕姆單抗 (pembrolizumab)為人源化抗PD-1單株抗體。帕姆單抗可以，例如，每2週或3週以2 mg/kg或10 mg/kg施用。帕姆單抗可用於治療，例如，黑色素瘤、轉移性黑色素瘤、轉移性NSCLC、頭頸部鱗狀細胞癌 (head and neck squamous cell carcinoma，HNSCC)，以及何杰金氏淋巴瘤。評估帕姆單抗用於治

療更多癌症，例如乳腺癌、胃癌，以及泌尿道上皮癌，的臨床試驗正在進行中。帕姆單抗可以與其他藥劑組合使用，例如納武單抗 (nivolumab)、溶瘤病毒 (talimogene laherparepvec)、達拉非尼 (dabrafenib)加曲美替尼 (trametinib)，或伊匹單抗 (ipilimumab)。

【0045】 帕姆單抗 (pembrolizumab)的副作用或症狀包括，例如，瘙癢、皮疹、皮疹斑痣、痤瘡性皮炎、腹瀉、結腸炎、肝炎、ALT升高、AST升高、呼吸困難、肺炎、甲狀腺功能減退、甲狀腺功能亢進、澱粉酶增加、胰腺炎、關節痛、葡萄膜炎、發熱，以及疲勞。

【0046】 另一種開發中的抗PD-1抗體為BGB-A317，而抗PD-L1抗體包括阿特珠單抗 (atezolizumab)、阿維魯單抗 (avelumab)，以及度伐魯單抗 (durvalumab)。同樣在開發中的是抗PD-L1 affimer蛋白。

【0047】 雙專一性T細胞接合者 (Bispecific T cell engagers，BiTE)

【0048】 雙專一性T細胞接合物 (BiTE)為一種雙專一性抗體，其在單一蛋白質中將以T細胞表面抗原 (例如CD3ε)作為標靶的scFv與以癌細胞上的表面抗原作為標靶的scFv連接。使用本領域已知的重組技術製造BiTE。

【0049】 BiTE類別中的第一種為博納吐單抗 (blinatumomab)，其為針對CD3ε與CD19的雙專一性抗體，而且通常可以用於治療B細胞惡性腫瘤，例如急性淋巴球性白血病 (ALL)、非何杰金氏淋巴瘤 (NHL)、瀰漫性大B細胞淋巴瘤 (DLBCL)、慢性淋巴性白血病 (CLL)、原發性縱隔B細胞淋巴瘤 (PMBCL)、轉化性濾泡性淋巴瘤 (TFL)、多發性骨髓瘤 (MM)、被套細胞淋巴瘤 (MCL)，以及急性骨髓性白血病 (AML)。博納吐單抗 (blinatumomab)可以5 $\mu g/m^2/d$至60 $\mu g/m^2/d$施用，例如5、15或60 $\mu g/m^2/d$。

【0050】 博納吐單抗 (blinatumomab)最常見的副作用是細胞激素釋放症候群 (CRS)、發熱、疲勞、頭痛，以及體重變化。對於大多數BiTE來說，細胞激素釋放症候群 (CRS)是可以預期的。

【0051】 因為BiTE為一種平台技術，其他癌症標靶是可能的，其中一些包括CD20、CD33、上皮細胞黏附分子 (Epithelial cell adhesion molecule，EpCAM)、癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen，CEA)、前列腺專一性膜抗原 (prostate specific membrane antigen，PSMA)、人類表皮生長因子受體2 (human epidermal growth factor receptor 2，HER2)、表皮生長因子受體 (epidermal growth factor receptor，EGFR)，Ephrin A型受體2 (Ephrin type-A receptor 2，EphA2)，黏蛋白1 (MUC1)，以及黑色素瘤相關的硫酸軟骨素蛋白多醣 (melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan，MCSP)。

【0052】 **干擾素基因的刺激物 (Stimulator of interferon genes，STING)**

【0053】 干擾素基因的刺激物 (STING，也稱為TMEM173)為一種與環狀二核苷酸結合並被其活化的訊息分子，環狀二核苷酸如環狀GMP-AMP以及環狀二-AMP，其因應DNA進入細胞溶質而被產生。干擾素基因的刺激物 (STING)還結合雙股DNA。活化後，干擾素基因的刺激物 (STING)導致IRF3調節以及NF-κB調節的第I型干擾素 (IFNs)以及發炎細胞激素如TNF、IL-1β，以及IL-6的轉錄，進而導致細胞死亡並促進樹突細胞、自然殺手以及$CD8^+$ T細胞的功能。在其他細胞中，干擾素基因的刺激物 (STING)存在於腫瘤內樹突細胞中。

【0054】 如本領域已知的，可以生物合成/酶促產生環狀二核苷酸，雖然這種方式偏好於天然存在的環狀二核苷酸。另外，環狀二核苷酸可以透過核苷酸

環化或通過本領域已知的環狀雙 (3'-5')-糖磷酸上的立體專一性鹼基插入以化學產生。溶液相及固體載體合成這兩種已經被開發且為本領域已知的。

【0055】 例如，環狀二核苷酸，包括合成的二硫代混合連接環狀二核苷酸，正在開發階段以作為癌症的免疫療法。正在開發的藥劑包括ML RR-S2 CDA以及MIW815，以及SB 11285。環狀二核苷酸可以與其他療法組合，例如放射療法、化學療法、檢查點抑制劑，或致死照射的GM-CSF分泌腫瘤細胞(STINGVAX)。

【0056】 干擾素基因的刺激物 (STING)促效劑可用於治療，例如，黑色素瘤及結腸癌。

【0057】 類RIG I受體 (RIG I like receptors，RLRs)

【0058】 類RIG I受體包括視黃酸可誘導基因I (RIG-I或DDX58)，黑色素瘤分化相關蛋白5 (MDA5或IFIH1)，以及遺傳學及生理學實驗室2 (LGP2或DHX58)，其為細胞溶質RNA感測器。

【0059】 RIG-1通常識別5'-三磷酸化RNA (5'-ppp-RNA或3pRNA)以及短雙股RNA，並且依賴於功能性LGP2。MDA5通常識別長於2000個核苷酸的雙股RNA，並且還依賴於功能性LGP2。LGP2本身不能誘導訊息傳遞，但對於RIG-I調節的以及MDA5調節的反應是必需的。

【0060】 活化後，RIG-I與MDA5導致IRF1-、IRF3-、IRF7-，以及NFκB調節的IFNs以及發炎細胞激素的表現，其可直接作用於腫瘤細胞以及活化T細胞與自然殺手細胞。

【0061】 RLR配體可用於免疫療法並包括5'-ppp-siRNAs，其通過RLR途徑以依賴序列的方式作用並通過RNA干擾 (RNAi)途徑以序列依賴方式作用，如同日本包膜 (HVJ-E)載體的血凝性病毒，以及聚肌胞苷：聚胞苷酸 (poly I:C)。

【0062】 例如，RLR活化可用於治療黑色素瘤、胰腺癌、前列腺癌、神經膠質瘤、惡性胸膜間皮瘤 (malignant pleural mesothelioma，MPM)，以及卵巢癌。

【0063】 **類鐸受體 (Toll-like receptors，TLRs)**

【0064】 迄今為止，已經鑑定了10種人類類鐸受體 (TLR)，每種受體具有不同的配體專一性：TLR2識別脂蛋白與胜肽聚醣；TLR3識別病毒雙股RNA與poly I:C；TLR4識別脂多醣 (LPS)；TLR5識別細菌鞭毛蛋白；TLR7/8識別單股RNA；TLR9識別含有CpG的寡去氧核苷酸 (CpG-ODN)；TLR2/6、TLR2以及TLR4識別基質蛋白聚醣多功能蛋白聚醣以及熱休克蛋白 (heat-shock proteins，HSPs)。

【0065】 許多這些配體已被核准用於癌症免疫療法，包括用於治療膀胱癌的TLR2/4促效劑Bacillus Calmette-Guérin (BCG)，用於治療子宮頸癌的TLR4促效劑單磷醯脂質A (monophosphoryl lipid A，MPL)，以及用於治療乳腺癌的TLR7促效劑咪喹莫特。Coley毒素與larix leptolepis (ELL)的萃取物也被核准用於免疫療法。

【0066】 正在開發用於免疫療法的其他TLR配體，例如用於治療晚期實質固態瘤以及肝癌的TLR5促效劑鞭毛蛋白衍生的CBLB502 (Entolimod)、用於治療黑色素瘤以及惡性血液病的TLR7促效劑852A，以及TLR3促效劑聚肌胞苷酸(poly I:C/polyinosinic-polycytidylic)以聚離胺酸以及羧甲基纖維素 (poly-ICLC)穩定，並且以TLR9促效劑合成的CpG-ODN作為癌症疫苗佐劑，用於治療多種癌症類型，包括神經膠質母細胞瘤。

【0067】 因此，TLR配體可用於治療例如膀胱癌、乳腺癌、子宮頸癌、神經膠質母細胞瘤、惡性血液病、肝細胞瘤、黑色素瘤，以及實質固態瘤。

【0068】 **細胞激素** (Cytokines)

【0069】 IL-2在臨床上用於免疫療法以改善細胞毒性T細胞的抗癌功效。IL-2也已被用於促進用於過繼細胞轉移 (adoptive cell transfer，ACT)的離體T細胞擴增。用於免疫療法或開發免疫療法的其他細胞激素包括IL-7、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IFNα、IFNβ、IFNγ、顆粒球巨噬細胞株刺激因子 (granulocyte-macrophage colony stimulating factor，GM-CSF)，以及TNF。細胞激素可以如本領域已知的那些方式重組產生。

【0070】 細胞激素可用於治療例如，黑色素瘤、腎細胞癌、淋巴瘤、B細胞淋巴瘤、濾泡性淋巴瘤、毛細胞白血病、肉瘤、B/C型肝炎、慢性肉芽腫病、惡性骨質疏鬆症、乳腺癌、前列腺癌、肉瘤、尤因氏肉瘤、卡波西氏肉瘤、神經母細胞瘤、蕈樣真菌病、頭頸癌、AML、肺癌、卵巢癌、慢性骨髓性白血病 (chronic myeloid leukaemia，CML)、CLL，以及嗜中性白血球減少症。

【0071】 然而，細胞激素通常不能在腫瘤部位達到治療濃度，因為它們沒有優先運輸的方式且其初始血清半衰期非常短 (幾分鐘到幾小時)。此外，細胞激素具有嚴重的副作用，包括全身性炎症以及血管滲漏症候群。其他副作用包括發燒、寒顫、不適、低血壓、器官功能障礙，以及血球減少。

【0072】 **抗體-細胞激素融合蛋白**

【0073】 鑑於游離細胞激素在免疫療法中的侷限性，透過將細胞激素重組融合至具有所需抗原專一性的抗體，已經改善了該侷限性。這些抗體不僅將細胞激素轉運到腫瘤作用位點，抗體還可經由抗體依賴性細胞毒性

(antibody-dependent cellular cytotoxicity，ADCC)與補體依賴性細胞毒性(complement-dependent cytotoxicity，CDC)發揮其自身的免疫治療作用。

【0074】抗體-細胞激素融合蛋白包括：hu14.18-IL-2，一種與IL-2融合的人源化抗GD2 IgG抗體，用於治療神經母細胞瘤；DI-Leu16-IL2，一種與IL2融合的去免疫且突變的抗CD20 IgG抗體，用於治療B細胞惡性腫瘤；L19-IL2，一種與IL-2融合的高親和力抗纖維接合素外結構域B雙抗體，用於治療淋巴瘤、轉移性黑色素瘤、腎細胞癌，以及實質固態瘤；抗CD20-IL-21，一種與IL-21融合的抗CD20 IgG抗體，用於治療DLBCL與MCL；BC1-IL12，一種抗人類纖維接合素同種型B-FN（外結構域B)的IgG抗體，用於治療惡性黑色素瘤與RCC；L19-TNFα，一種與TNF融合的抗纖維接合素外結構域B的人類scFv，用於治療黑色素瘤、實質固態瘤、結腸直腸癌；抗CD20-IFNα，一種與IFNα融合的嵌合抗CD20 IgG抗體，用於治療B細胞淋巴瘤與白血病；抗CD20-四聚體hIFNα(20-2b-2b)，一種與4分子IFNα2b融合的人源化抗CD20 IgG 維妥珠單抗(veltuzumab)，用於治療B細胞淋巴瘤；F16-IL2，一種與IL-2融合的抗肌腱蛋白C外結構域A1人類scFv，用於治療乳腺癌、肺癌、麥克氏細胞癌 (Merkel cell carcinoma，MCC)、膠質母細胞瘤、AML，以及實質固態瘤；NHS-IL2LT，一種小鼠-人類嵌合抗體，針對與兩分子IL-2融合的壞死腫瘤細胞釋放的DNA，用於治療實質固態瘤、NHL，以及NSCLC；NHS-IL12，一種小鼠-人類嵌合抗體，針對與兩分子IL-12融合的壞死腫瘤細胞釋放的DNA，用於治療腎細胞癌、卡波西肉瘤、T細胞淋巴瘤，以及NHL；C2 2b-2b，一種與四分子IFNα2b融合的人源化抗HLA-DR IgG抗體，用於治療造血系統癌症、B細胞淋巴瘤與白血病，以及

MM；以及huKS-IL2，一種與IL-2融合的抗上皮細胞黏附分子 (EpCAM或KS)IgG，用於治療卵巢癌、前列腺癌、結腸直腸癌，以及NSCLC。

【0075】 hu14.18-IL-2的副作用類似於IL-2免疫療法的副作用，包括毛細血管滲漏、缺氧、轉胺酶升高、高膽紅素血症、低血壓以及腎功能不全。

【0076】 **抗體-藥物偶聯物 (ADC)**

【0077】 抗癌藥物可以與抗體綴合，以使藥物專一性地將癌細胞當作標靶。該方法在遞送抗癌藥物中特別有用，所述抗癌藥物在遠低於標準化學治療藥物的濃度下發揮細胞毒性，因此毒性太大而不能以其游離形式給藥。其中主要為微血管抑制劑，例如美登木素生物鹼 (maytansinoids)與阿里他汀(auristatins)。或者，藥物可以為放射性核素。

【0078】 ADC的抗體通常但不一定為IgG，通常為IgG1。

【0079】 藥物，包括放射性核素，的產生為本領域已知的。

【0080】 可以使用連接子綴合抗體及藥物，所述連接子可以為可切割的或不可切割的。一旦ADC被癌細胞內化，連接子可以為可切割的，但在內化之前在循環中是穩定的。然而，一旦切割，藥物可能逃脫標靶細胞並攻擊非癌細胞的旁觀者細胞。不可切割的連接子目的在於將ADC保留在細胞內。

【0081】 綴合方法為本領域已知的。可切割的連接子化學可以使用二硫化物、腙或胜肽，而不可切割的連接子化學可以使用硫醚。可以改造抗體以操縱連接子化學，例如可以操縱半胱胺酸胺基酸殘基以修飾可用於連接子化學的巯基的數量及/或位置。

【0082】 兩種ADCs，以CD30為標靶的brentuximab vedotin偶聯物以及以HER2為標靶的trastuzumab emtansine偶聯物被核准臨床使用，而且許多ADCs正

在開發中，包括inotuzumab ozogamicin (CD22)、gemtuzumab ozogamicin (抗CD33)、ABT-414 (抗EGFR)、glembatumumab vedotin (抗gpNMB)、labetuzumab govitecan (抗CEACAM5)、sacituzumab govitecan (抗TROP2，EGP1)、lifastuzumab vedotin (抗NaPi2b)、indusatumab vedotin (抗GCC)、polatuzumab vedotin (抗CD79b)、pinatuzumab vedotin (抗CD22)、PSMA ADC (抗PSMA)、coltuximab ravtansine (抗CD19)、BMS-986148 (抗MSLN)、indatuximab ravtansine (抗CD138，syndecan 1)、milatuzumab doxorubicin (抗-CD74)、MLN2704 (抗PSMA)、SAR408701 (抗CEACAM5)、rovalpituzumab tesirine (抗DLL3)、ABBV-399、AGS-16C3F (抗ENPP3)、ASG-22ME (抗nectin 4)、AGS67E (抗-CD37)、AMG 172 (抗CD27)、AMG 595 (抗EGFRvIII)、AGS-15E (抗SLTRK6)、BAY1129980 (抗C4.4a)、BAY1187982 (抗FGFR2)、anetumab ravtansine (抗mesothelin)、GSK2857916 (抗-BCMA)、tisotumab vedotin (抗TF)、IMGN289 (抗EGFR)、IMGN529 (抗CD37)、mirvetuximab soravtansine (抗FOLR1)、LOP628 (抗c-KIT)、PCA062 (抗-p-鈣黏蛋白)、BMS936561 (抗-CD70)、MEDI-547 (抗-EphA2)、PF 06263507 (抗-5T4)、PF-06647020、PF-06647263 (抗肝配蛋白A)、PF-06664178 (抗-TROP2)、RG7450 (抗STEAP1)、RG7458 (抗MUC16)、RG7598、SAR566658 (抗CA6)、SGN-CD19A (抗CD19)、SGN-CD33A (抗CD33)、SGN-CD70A (抗CD70)、SGN-LIV1A (抗LIV1)，以及曲妥珠單抗vc-seco (抗HER2)。

【0083】包含放射性核素的ADC的實例包括Y^{90}-ibritumomab tiuxetan與I^{131}-tositumomab。

【0084】ADCs可用於治療血液癌症與實質固態瘤，例如乳腺癌、黑色素瘤、肺癌、SCLC、胰腺癌、結腸直腸癌、卵巢癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、前

列腺癌、間皮瘤、膀胱癌、RCC、肝癌、胃癌、NSCLC、膠質母細胞瘤、頭頸癌、食道癌、何杰金氏淋巴瘤、NHL、間變性大細胞淋巴瘤、ALL、DLBCL、多發性骨髓瘤、CLL，以及AML。

【0085】 例如，ADC可以0.05 mg/kg至16 mg/kg的劑量施用。

【0086】 ADC的副作用包括血小板減少症、嗜中性白血球減少症、眼毒性、皮疹、斑疹、噁心、呼吸困難、肝毒性、黏膜炎、貧血、神經病、毛細血管滲漏症候群，以及腹瀉。

【0087】 **適應症**

【0088】 免疫療法可用於治療，例如，急性淋巴球性白血病 (acute lymphoblastic leukaemia，ALL)、急性骨髓性白血病 (acute myeloid leukaemia，AML)、間變性大細胞淋巴瘤、B細胞淋巴瘤或白血病、B細胞惡性腫瘤、膀胱癌、乳腺癌、子宮頸癌、慢性肉芽腫病、慢性淋巴性白血病 (chronic lymphocytic leukaemia，CLL)、慢性骨髓性白血病 (chronic myeloid leukaemia，CML)、結腸癌、結直腸癌、瀰漫性大B細胞淋巴瘤 (diffuse large B cell lymphoma，DLBCL)、子宮內膜癌、尤文氏肉瘤、濾泡性淋巴瘤、胃癌、膠質母細胞瘤、神經膠質瘤、血液系統癌症、造血系統癌症、多毛細胞白血病、頭頸癌、頭頸部鱗狀細胞癌、血液系統惡性腫瘤、B/C型肝炎、肝癌、何杰金氏淋巴瘤、卡波西肉瘤、肝癌、肺癌、淋巴瘤、惡性黑色素瘤、惡性骨質疏鬆症、惡性胸膜間皮瘤 (malignant pleural mesothelioma，MPM)、被套細胞淋巴瘤 (mantle cell lymphoma，MCL)、麥克氏細胞癌 (Merkel cell carcinoma，MCC)、黑色素瘤、間皮瘤(mesothelioma)、多發性骨髓瘤 (multiple myeloma，MM)、蕈樣真菌病、神經母細胞瘤、嗜中性白血球減少症、非何杰金氏淋巴瘤 (non-Hodgkin's lymphoma，NHL)、非小細胞

肺癌 (non-small cell lung carcinoma，NSCLC)、轉移性黑色素瘤、轉移性NSCLC、轉移性鱗狀NSCLC、食管癌、卵巢癌、胰腺癌、原發性縱隔B細胞淋巴瘤 (primary mediastinal B cell lymphoma，PMBCL)、腎細胞癌、肉瘤(sarcoma)、小細胞肺癌 (small cell lung cancer，SCLC)、實質固態瘤、T細胞淋巴瘤、轉化的濾泡性淋巴瘤 (transformed follicular lymphoma，TFL)，或泌尿道上皮癌。

【0089】 **副作用以及症狀**

【0090】 細胞激素釋放症候群 (Cytokine-release syndrome，CRS)是一種免疫療法的嚴重副作用。細胞激素釋放症候群 (CRS)被認為是由釋放大量細胞激素的增殖T細胞引起的，包括IL-6、IFN-γ、TNF、IL-2、IL-2受體α、IL-8、IL-10，以及GMCSF。

【0091】 細胞激素釋放症候群 (CRS)的症狀包括：高燒、不適、疲勞、肌痛、噁心、厭食、心動過速/低血壓、毛細血管滲漏、心功能不全、腎功能損害、肝功能衰竭，以及彌散性血管內凝血。

【0092】 因此，患有細胞激素釋放症候群 (CRS)的個體可能經歷發熱、心血管症狀，包括心動過速、低血壓、心律失常、心臟射血分數降低、肺部症狀包括水腫、缺氧、呼吸困難及肺炎、通常由腎灌注減少引起的急性腎損傷、肝臟與胃腸道症狀包括血清轉氨酶與膽紅素升高、腹瀉、結腸炎、噁心和腹痛、血液學症狀包括3-4級貧血、血小板減少、白血球減少、嗜中性白血球減少與淋巴細胞減少等血細胞減少、凝血紊亂、包括凝血酶原的延長時間以及活化部分促凝血酶原激酶時間 (partial thromboplastin time，PTT)、D-二聚體升高、低纖維接合素原、彌散性血管內凝血、巨噬細胞活化症候群 (macrophage activation syndrome，MAS)、出血、B細胞再生障礙與低伽瑪球蛋白血症、感染性疾病包

括菌血症、沙門氏菌、泌尿道感染、病毒感染如流感、呼吸道疾病合胞體病毒與帶狀皰疹病毒、肌肉骨骼症狀，包括肌酸激酶升高、肌痛和虛弱、神經系統症狀包括譫妄、精神錯亂，以及癲癇發作的任何一種或多種。

【0093】 巨噬細胞活化症候群 (MAS)臨床上與細胞激素釋放症候群 (CRS)重疊，患者可能出現肝脾腫大、淋巴結腫大、全血細胞減少、肝功能障礙、彌散性血管內凝血、低纖維接合素原血症、高鐵蛋白血症，以及高甘油三酯血症。與細胞激素釋放症候群 (CRS)一樣，患有巨噬細胞活化症候群 (MAS)的個體表現出升高的細胞激素含量，包括IFN-γ與GMCSF。

【0094】 針對標靶、不針對癌症的作用可導致類似於GVHD與B細胞發育不良的結果，其在標靶癌抗原在其他健康/正常細胞類型上內源表現時引起。

【0095】 例如，B細胞發育不良的發生是因為抗CD19抗體也靶向表現CD19的正常B細胞。B細胞發育不良的後果是由於低免疫球蛋白血症而對抗感染的能力降低。靜脈注射免疫球蛋白替代療法用於預防感染。

【0096】 免疫療法的另一個副作用是腫瘤溶解症候群 (TLS)，最常發生於淋巴瘤及白血病，瘤溶解症候群 (TLS)發生在細胞內容物釋出時，而細胞內容物釋出是由導致細胞死亡的治療所引起。TLS的特徵在於血液離子與代謝物失衡，症狀包括噁心、嘔吐、急性尿酸腎病、急性腎衰竭、癲癇發作、心律失常，以及死亡。

【0097】 神經毒性可能由免疫療法引起，症狀可能包括腦水腫、譫妄、幻覺、語言障礙、運動性緘默症、頭痛、精神錯亂、清醒改變、共濟失調、失用症、顏面神經麻痺、震顫、辨距不良，以及癲癇發作。

【0098】過敏性休克（anaphylaxis）可以來自非宿主蛋白質，例如形成免疫療法一部分的鼠源蛋白質，例如，嵌合或人源化單株抗體。

【0099】如本文所公開的經歷免疫療法的個體可能經歷一種或多種副作用或症狀，包括貧血、失語症、心律失常、關節痛、背痛、血液與骨髓疾病、血液與淋巴系統疾病、心臟疾病、寒顫、凝血障礙、結腸炎、混淆狀態、體質症狀、咳嗽、食慾減退、腹瀉、定向障礙、頭暈、呼吸困難、腦病、疲勞、發熱、胃腸功能紊亂、一般心血管疾病、出血、肝功能紊亂、高血糖、低鉀血症、甲狀腺功能減退、ALT升高、AST升高、增加的C-反應蛋白、感染性發熱性嗜中性白血球減少症、白血球減少症、不適、異常代謝實驗室檢測結果、新陳代謝營養障礙、黏膜炎症、肌肉骨骼疾病、肌痛、噁心、神經系統疾病、神經系統疾病、嗜中性白血球減少、水腫、疼痛、手掌-足底紅斑感覺、感覺異常、肺炎、瘙癢、肺臟疾病、發熱、皮疹、腎臟泌尿生殖系統疾病、呼吸系統疾病、皮膚與皮下組織疾病、嗜睡、言語障礙、盜汗、胸部縱隔疾病、血小板減少症、震顫、腫瘤突發、腫瘤溶解症候群、血管疾病，以及嘔吐。

【0100】反之，上面列出的任何副作用或症狀可以表示例如細胞激素釋放症候群 (CRS)、巨噬細胞活化症候群 (MAS)、腫瘤溶解症候群 (TLS)、針對標靶、不針對癌症的作用、神經毒性，或過敏性休克。

【0101】副作用的管理

【0102】一般而言，免疫療法的副作用透過標準支持療法來控制任何出現症狀。然而，鑑於免疫療法可能導致的無數副作用及症狀，可能需要同時進行多種支持療法。支持療法主要使用類固醇，例如地塞米松，儘管最近已經使用

抗細胞激素療法來治療細胞激素釋放症候群 (CRS)，例如etanercept，一種抗TNF分子，以及托珠單抗，一種抗IL-6受體抗體。

【0103】 已提出建議，在出現3級或4級不良事件時，應永久停用免疫治療。

【0104】 間質幹細胞

【0105】 因此，本發明提供了一種改進的療法，用於透過施用間質幹細胞(MSCs)來減少由免疫療法引起的副作用的數量、嚴重性和持續時間。間質幹細胞(MSCs)透過其免疫調節特性發揮作用，因此對於許多副作用及症狀，間質幹細胞(MSCs)能夠直接作用於副作用或症狀的免疫原性原因。

【0106】 間質幹細胞(MSCs)分泌生物活性分子，如細胞激素，趨化因子以及生長因子，並具有調節免疫系統的能力。已顯示間質幹細胞(MSCs)不依賴於植入就能促進再生與對免疫系統的作用。換句話說，間質幹細胞(MSCs)本身並不一定被納入宿主-- 相反地，它們發揮作用，然後在短時間內消除。但是，仍可植入間質幹細胞(MSCs)。

【0107】 如本文所用，「間質幹細胞」或「MSC」係指特定類型的幹細胞，其可以從多種組織中分離，包括骨髓、脂肪組織 (脂肪)、胎盤以及臍帶血。或者，間質幹細胞(MSCs)可以由多能幹細胞 (pluripotent stem cells，PSCs)產生。間質幹細胞(MSCs)也稱為「間質基質細胞」。或者或另外，間質幹細胞(MSCs)係指由國際細胞療法學會的間質與組織幹細胞委員會定義的MSC：(1)當在標準培養條件下維持時，間質幹細胞(MSCs)必須是黏附於塑料的；(2) 間質幹細胞(MSCs)必須表現CD105、CD73與CD90，缺乏CD45、CD34、CD14或CD11b、CD79α或CD19與HLA-DR表面分子的表現；(3) 間質幹細胞(MSCs)必須在體外分化為成骨細胞、脂肪細胞以及成軟骨細胞。

【0108】來自多能幹細胞 (PSCs)的間質幹細胞(MSCs)的生產描述於2017年3月14日申請的國際專利申請號PCT/AU2017/050228，其透過此交叉引用全部併入，並在實施例1及2中描述。

【0109】已顯示間質幹細胞(MSCs)對T細胞、B細胞、樹突細胞、巨噬細胞，以及自然殺手細胞發揮免疫調節活性。雖然不希望受理論束縛，但潛在的機制可包含免疫調節的調節劑，例如一氧化氮、吲哚胺2,3、雙加氧酶、前列腺素E2、腫瘤壞死因子誘導基因6蛋白、CCL-2，以及PD-L1。這些調節劑以低含量表現直至被刺激，例如通過發炎細胞激素，例如IFNγ、TNF，以及IL-17。

【0110】於一具體實施例中，間質幹細胞(MSCs)在施用前進行預處理。預處理可以為生長因子，或是透過基因編輯，例如，其中生長因子可以引發間質幹細胞(MSCs)且基因編輯可以賦予新的或改進的，例如，間質幹細胞(MSCs)上更有效的治療特性。

【0111】如本文所用，「多能幹細胞」或「PSC」係指具有無限繁殖自身並分化成任何其他細胞類型的能力的細胞。多能幹細胞(PSCs)有兩種主要類型：胚胎幹細胞 (embryonic stem cells，ESCs)以及誘導的多能幹細胞 (induced pluripotent stem cells，iPSCs)。

【0112】如本文所用，「胚胎幹細胞」或「ESC」係指從已經完成體外受精治療的個體同意捐獻的五至七日齡胚胎中分離的細胞，並且具有多餘的胚胎。從人類胚胎中萃取細胞的倫理問題在某種程度上阻礙了胚胎幹細胞的使用。

【0113】合適的人類多能幹細胞(PSCs)包括H1與H9人類胚胎幹細胞。

【0114】如本文所用，「誘導的多能幹細胞」或「iPSC」係指衍生自成體細胞的類胚胎幹細胞(ESC)細胞。誘導的多能幹細胞 (iPSCs)具有與胚胎幹細胞

(ESCs)非常相似的特徵，但避免了與胚胎幹細胞(ESCs)相關的倫理問題，因為誘導的多能幹細胞 (iPSCs)並非來自胚胎。相反地，誘導的多能幹細胞 (iPSCs)通常衍生自完全分化的成體細胞，其已被「重新編程」回到多能狀態。

【0115】 合適的人類誘導的多能幹細胞 (iPSCs)包括但不限於衍生自纖維母細胞的iPSC19-9-7T、MIRJT6i-mND1-4與MIRJT7i-mND2-0以及衍生自骨髓單核細胞的iPSC BM119-9。其他合適的誘導的多能幹細胞 (iPSCs)可以從美國威斯康星州麥迪遜市的Cellular Dynamics International (CDI)獲得。

【0116】 於一具體實施例中，根據本發明使用的間質幹細胞(MSCs)由原始中胚層細胞形成。原始中胚層細胞可能具有間質血管母細胞(mesenchymoangioblast，MCA)潛能。原始中胚層細胞可具有 $^{EMH}lin^{-}KDR^{+}APLNR^{+}PDGFR\alpha^{+}$表型。於一具體實施例中，根據本發明使用的間質幹細胞 (MSCs) 由具有間質血管母細胞 (MCA) 潛能的 $^{EMH}lin^{-}KDR^{+}APLNR^{+}PDGFR\alpha^{+}$原始中胚層細胞形成。

【0117】 透過在低氧條件下在包含FGF2、BMP4、活化素A，以及LiCl的分化培養基中培養多能幹細胞 (PSCs)約2天以形成原始中胚層細胞，可以將原始中胚層細胞與多能幹細胞 (PSCs) (例如誘導的多能幹細胞 (iPSCs))區分開。

【0118】 因此，還公開了一種將多能幹細胞(PSCs)分化為間質幹細胞(MSCs)的方法，該方法包含：

(a) 在低氧條件下在含有FGF2、BMP4、活化素A，以及LiCl的分化培養基中培養多能幹細胞 (PSCs)約2天，以形成原始中胚層細胞；

(b) 以包含LiCl與FGF2但不包括PDGF的間質集落形成培養基(mesenchymal colony forming medium，M-CFM)代替(a)的分化培養基；

(c) 在常氧條件下在(b)的M-CFM中培養(b)的原始中胚層細胞足夠的時間以形成間質集落；以及

(d) 培養(c)的間質集落黏附以產生間質幹細胞(MSCs)。

【0119】 於一些具體實施例中，BMP4在分化培養基中的濃度為約10 ng/mL至約250 mg/mL；FGF2為約5 ng/mL至約50 ng/mL；活化素A約為1 ng/mL至約15 ng/mL；和LiCl約為1 mM至約2 mM。於一具體實施例中，分化培養基包含約50 ng/mL BMP4；約50 ng/mL FGF2；約1.5 ng/mL活化素A；以及約2 mM LiCl。

【0120】 如本文所用，「間質血管母細胞」和「MCA」係指共同的或雙潛在的間質細胞與內皮細胞前體。

【0121】 如本文所用，「具有間質血管母細胞(MCA)潛能的$^{EMH}lin^{-}KDR^{+}APLNR^{+}PDGFR\alpha^{+}$原始中胚層細胞」係指表現典型原條與側板/胚外中胚層基因的細胞。這些細胞有可能在無血清培養基中對纖維母細胞生長因子2(fibroblast growth factor 2，FGF2)有反應而形成間質血管母細胞(MCA)與血管母細胞株。當根據實施例2培養時，這些細胞變成間質幹細胞(MSCs)。

【0122】 $^{EMH}lin^{-}$乙詞表示缺乏CD31、VE鈣黏蛋白內皮標誌物、CD73以及CD105間質/內皮標誌物，以及CD43與CD45造血標誌物的表現。

【0123】 於一具體實施例中，根據本發明使用的間質幹細胞(MSCs)表現出$CD73^{+}CD105^{+}CD90^{+}CD146^{+}CD44^{+}CD10^{+}CD31^{-}CD45^{-}$表型。儘管未明確指出，但該表型符合國際細胞療法協會的間質與組織幹細胞委員會對間質幹細胞(MSCs)的定義。

【0124】於一具體實施例中，根據本發明使用的間質幹細胞(MSCs)表現miR-145-5p、miR-181b-5p，以及miR-214-3p中的每一種，但不表現miR-127-3p與miR-299-5p。

【0125】間質幹細胞(MSCs)具有「免疫調節活性」，其可以在體外評估為間質幹細胞(MSCs)抑制T輔助 ($CD4^+$)淋巴細胞增殖的能力。免疫調節活性可以相對於參考體外定量，例如使用ImmunoPotency Assay測定。

【0126】合適的免疫力學測定使用經輻射照射的測試間質幹細胞(MSCs)(例如，根據本文公開的方法產生的誘導的多能幹細胞 (iPSCs)-間質幹細胞(MSCs)與經輻射照射的參照樣品間質幹細胞(MSCs)，其以各種濃度分別培養於平板上，其中羧基螢光素琥珀醯亞胺酯標記的白血球從健康供體周圍血中純化。透過添加CD3與CD28抗體刺激代表參照樣品子集的T輔助 ($CD4^+$)淋巴細胞。使用流式細胞儀計數CD4標記的T細胞以評估T細胞增殖。報告IC50值作為參考樣品的函數。IC50值越高表示T輔助 ($CD4^+$)淋巴細胞增殖的抑制程度越大，因此表明T細胞免疫調節性能優越。在用於該測定之前照射間質幹細胞(MSCs)樣品以消除其增殖潛力的混雜因素。

【0127】本領域技術人員將理解，向個體施用治療有效量的間質幹細胞(MSCs)用於治療個體的免疫療法的副作用或症狀的確切方式將由醫師決定。給藥方式，包括劑量，與其他藥劑的組合、給藥的時間以及頻率等，可能受到個體的病症及病史的影響。

【0128】間質幹細胞(MSCs)可以作為治療組合物施用。如本文所用，「治療組合物」乙詞係指包含間質幹細胞(MSCs)或本文所述的間質幹細胞(MSCs)群體的組合物，其已經配製用於施用於個體。間質幹細胞(MSCs)可以配製在及/或

治療組合物中可以包含賦形劑、載體、緩衝劑或其他有助於將間質幹細胞(MSCs)施用於個體的添加劑。較佳地，治療組合物為無菌的。於一具體實施例中，治療組合物為無熱原的。

【0129】 於一具體實施例中，本公開的間質幹細胞(MSCs)，例如一種表現miR-145-5p、miR-181b-5p，以及miR-214-3p但不表現miR-127-3p與miR-299-5p的間質幹細胞(MSCs)，及/或具有表型$CD73^+CD105^+CD90^+CD146^+CD44^+CD10^+CD31^-CD45^-$，或者本發明的一種治療組合物提供在容器中，較佳為一無菌容器，較佳為一無熱原容器。於一具體實施例中，該容器適合於推注給藥，例如注射器。於另一具體實施例中，該容器適於輸注，例如輸液袋。

【0130】 間質幹細胞(MSCs)將以符合良好醫療實踐的方式配製、配量以及管理。在這種情況下需要考量的因素包括所治療的特定類型的疾病以及預期的副作用或症狀、所治療的特定個體、個體的臨床狀況、給藥部位、給藥方法、給藥方案，以及醫生所知的其他因素。待施用的間質幹細胞(MSCs)的治療有效量將受這些考量因素的支配。

【0131】 間質幹細胞(MSCs)的劑量可以為約10^3個細胞/m^2至約10^{10}個細胞/m^2，例如約10^6個細胞/m^2至約$2x10^8$個細胞/m^2，或約10^3個細胞/m^2、約$5x10^3$個細胞/m^2、約10^4個細胞/m^2、約$5x10^4$個細胞/m^2、約10^5個細胞/m^2、約$5x10^5$個細胞/m^2、約10^6個細胞/m^2、約$5x10^6$個細胞/m^2、約10^7個細胞/m^2、約$5x10^7$個細胞/m^2、約10^8個細胞/m^2、約$5x10^8$個細胞/m^2、約10^9個細胞/m^2、約$5x10^9$個細胞/m^2、約10^{10}個細胞/m^2，或約$5x10^{10}$個細胞/m^2。

【0132】 間質幹細胞(MSCs)的劑量可以為約10^3個細胞/kg至約10^{10}個細胞/kg，例如約10^6個細胞/kg至約$2x10^8$個細胞/kg，或約10^3個細胞/kg、約$5x10^3$個細

胞/kg、約10^4個細胞/kg、約5x10^4個細胞/kg、約10^5個細胞/kg、約5x10^5個細胞/kg、約10^6個細胞/kg、約5x10^6個細胞/kg、約10^7個細胞/kg、約5x10^7個細胞/kg、約10^8個細胞/kg、約5x10^8個細胞/kg、約10^9個細胞/kg、約5x10^9個細胞/kg、約10^{10}個細胞/kg，或約5x10^{10}個細胞/kg。

【0133】 間質幹細胞(MSCs)的劑量可以為約10^3個細胞至約10^{10}個細胞，例如約10^6個細胞至約2x10^8個細胞，或約10^3個細胞、約5x10^3個細胞、約10^4個細胞、約5x10^4個細胞、約10^5個細胞、約5x10^5個細胞、約10^6個細胞、約5×10^6個細胞、約10^7個細胞、約5×10^7個細胞、約10^8個細胞、約5×10^8個細胞、約10^9個細胞、約5×10^9個細胞、約10^{10}個細胞或約5×10^{10}個細胞。

【0134】 間質幹細胞(MSCs)可以以單劑量，分劑量或多劑量施用。間質幹細胞(MSCs)可以在治療週期中施用不止一次。

【0135】 間質幹細胞(MSCs)可以通過任何合適的方法全身或外周給予個體，例如透過包括靜脈內 (intravenous，IV)、動脈內、肌肉內、腹膜內、腦脊髓內、顱內、皮下 (subcutaneous，SC)、關節內、滑膜內、鞘內、冠狀動脈內、經心內膜、手術植入、局部與吸入 (例如肺內)途徑。最較佳地，靜脈內(IV)給予間質幹細胞(MSCs)。間質幹細胞(MSCs)可以與生物相容性材料的支架組合施用。

【0136】 間質幹細胞(MSCs)可以在免疫療法之前、期間或之後施用於個體。於一具體實施例中，在發炎期間施用間質幹細胞(MSCs)。因此，於一具體實施例中，在免疫療法開始後施用間質幹細胞(MSCs)，可視需要地在發炎開始後及/或促發炎細胞激素釋放開始或相對於對照增加，例如相對於免疫療法的預施用。不希望受理論束縛，認為透過在免疫療法後施用間質幹細胞(MSCs)可獲得最大益處。這是因為免疫療法本質上是免疫/發炎反應，而間質幹細胞(MSCs)

發揮免疫調節和抗發炎作用。因此，在免疫療法之前、期間或過早施用間質幹細胞(MSCs)可以抑制免疫療法的效果。儘管有這種理論，但本發明不限於此。

【0137】 然而，本領域技術人員理解並接受這種明顯的矛盾。例如，由免疫療法引起的細胞激素釋放症候群 (CRS)的主要治療為施用類固醇，其具有極大的免疫抑制性。間質幹細胞(MSCs)的優勢，例如，可能包括相對於類固醇的全身免疫抑制之局部免疫調節、在體內缺乏持久性、為未能對類固醇或其他免疫抑制療法做出反應的個體提供進一步的防禦、降低毒性、提高對類固醇的專一性，以及相對於類固醇之間質幹細胞(MSCs)的自我調節。降低毒性，增加專一性與自我調節是相關的，並且透過自我調節，意味著間質幹細胞(MSCs)被認為具有降低其免疫調節活性的能力，因為免疫療法的副作用或症狀的免疫反應消失，相對之下，例如，類固醇必須由醫生撤回，隨後在類固醇濃度降至治療濃度以下之前的半衰期。

【0138】 於一具體實施例中，治療包含在觀察免疫療法的副作用後24小時內施用間質幹細胞(MSCs)。於另一具體實施例中，間質幹細胞(MSCs)可以在觀察到免疫療法的副作用後約7天、約6天、約5天、約4天、約72小時、約48小時、約36小時、約24小時、約16小時、約12小時、約8小時、約4小時、約3小時、約2小時、約60分鐘、約45分鐘、約30分鐘、約15分鐘，或約5分鐘給予接受免疫療法的個體。

【0139】 因此，於一具體實施例中，可以在免疫療法後約1週將間質幹細胞(MSCs)施用於接受免疫療法的個體。於另一具體實施例中，可以在免疫療法後約5分鐘將間質幹細胞(MSCs)施用於接受免疫療法的個體。於另一具體實施例中，可以在免疫療法後約6天、約5天、約4天、約72小時、約48小時、約36小時、

約24小時、約16小時、約12小時、約8小時、約4小時、約2小時、約60分鐘、約45分鐘、約30分鐘、約15分鐘，或約5分鐘將間質幹細胞(MSCs)施用於接受免疫療法的個體。於一具體實施例中，可以在免疫療法後約24小時至約72小時內將間質幹細胞(MSCs)施用於接受免疫療法的個體。

【0140】於一具體實施例中，可以在免疫療法前約1週將間質幹細胞(MSCs)施用於接受免疫療法的個體。於另一具體實施例中，可以在免疫療法前約5分鐘將間質幹細胞(MSCs)施用於接受免疫療法的個體。於另一具體實施例中，可以在免疫療法前約6天、約5天、約4天、約72小時、約48小時、約36小時、約24小時、約16小時、約12小時、約8小時、約4小時、約2小時、約60分鐘、約45分鐘、約30分鐘，或約15分鐘將間質幹細胞(MSCs)施用於接受免疫療法的個體。

【0141】於另一具體實施例中，可以在免疫療法的同時或期間將間質幹細胞(MSCs)施用於接受免疫療法的個體。

【0142】如本文所用，「免疫療法」在「之前」、「期間」、「經歷中」、「之後」、「經歷過」以及類似方式的背景下使用，係指在免疫治療劑之前、期間、經歷中、之後，或經歷過，免疫治療劑例如，一種檢查點抑制劑、一種雙專一性T細胞接合者、一種干擾素基因促效劑的刺激物、一種類RIG I受體促效劑、一種類鐸受體促效劑、一種細胞激素、一種抗體-細胞激素融合蛋白，或一種抗體-藥物綴合物。如本文所用，「經歷中」包括將進行免疫療法但尚未施用免疫療法的個體。

【0143】「治療有效量」乙詞係指有效治療個體的免疫療法的副作用或症狀的間質幹細胞(MSCs)的量。

【0144】「治療(動詞)」、「治療(動名詞)」或「治療(名詞)」等詞係指治療性治療以及預防疾病的或預防性措施，其中該目的為預防、減輕或改善個體免疫治療的副作用或症狀或減慢(減輕)個體中免疫療法的副作用或症狀的進展。需要治療的個體包括已經具有免疫療法的副作用或症狀的個體以及要預防或改善免疫療法的副作用或症狀的個體。

【0145】「預防(動名詞)」、「預防(名詞)」、「預防性的」或「預防疾病的」等詞係指防止發生，或阻止、防禦，或保護免疫療法的副作用或症狀的發生。需要預防的個體可能易於發展免疫療法的副作用或症狀。

【0146】「改善(動詞)」或「改善(名詞)」等詞係指減少、降低或消除免疫療法的副作用或症狀。

【0147】可以量化免疫療法的副作用或症狀。免疫療法的副作用或症狀可以半定量標度定量，例如0至5，其中0代表不存在，1至4代表可識別的嚴重性的增加，5代表最大嚴重性。臨床試驗通常使用1至5級，其中：1代表輕度不良事件 (副作用)；2代表中度不良事件 (副作用)；3代表嚴重不良事件 (副作用)；4代表危及生命或致殘的不良事件 (副作用)；5代表與不良事件有關的死亡 (副作用)。或者，免疫療法的副作用或症狀可以量化為二元事件，即存在或不存在，0或1。其他半定量標度對於本領域技術人員來說是顯而易見的。於另一具體實施例中，免疫療法的副作用或症狀可以以定量標度定量，例如：每體積質量，例如每體積組織液的細胞激素質量；溫度；持續時間；速率；酶活性；氧飽和度；等等。

【0148】本領域技術人員將容易理解如何評估及量化免疫療法的任何副作用或症狀，並且能夠毫無困難或過度負擔地進行。例如，本領域技術人員將

能夠測量：血漿或血清中的細胞激素濃度；溫度 (發燒)；心率 (心動過速)；血壓 (低血壓)；心臟功能不全；腎臟功能不全；血清或血漿酶濃度 (肝功能)；等等。

【0149】 可以將免疫療法的副作用或症狀的任何定量與對照組比較，例如既不接受免疫療法也不接受間質幹細胞(MSCs)的健康對照組個體，接受免疫療法但未使用間質幹細胞(MSCs)或群體治療的受影響對照組個體。

【0150】 通過施用間質幹細胞(MSCs)治療免疫療法的副作用或症狀可以減少約1%、減少約2%、減少約3%、減少約4%、減少約5%、減少約6%、減少約7%、減少約8%、減少約9%、減少約10%、減少約20%、減少約30%、減少約40%、減少約50%、減少約60%、減少約70%、減少約80%、減少約90%，約100%或更大程度地降低免疫療法的副作用或症狀。或者，治療免疫療法的副作用或症狀可以為約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10倍或更多的減少免疫療法的副作用或症狀。因此，「較不嚴重的副作用」係指這種免疫療法的副作用或症狀的降低。

【0151】 如本文所用，「個體」乙詞可以指哺乳動物。哺乳動物可為靈長類動物，具體而言是人類，或者可以為家養、動物園或伴侶動物。儘管特別考慮到本文公開的方法適用於人類的醫學治療，但它也適用於獸醫治療，包括治療家畜如馬、牛及羊，伴侶動物如狗及貓，或動物園動物如貓科動物、犬科動物、牛科動物以及有蹄類動物。

【0152】 以下實施例有助於描述本發明，但本發明不限於這些實施例。

【0153】 **實施例**

【0154】 **實施例1. 用於間質幹細胞(MSCs)生產的試劑**

【0155】 *表1.試劑*

描述	供應商/型號或參考號
DMEM/F12 基礎培養基	Invitrogen 公司/A1516901
E8 補充物	Invitrogen 公司/A1517101
玻璃黏連蛋白	Life Technologies 公司/A14700
第 IV 型膠原蛋白	Sigma 公司/C5533
H-1152 ROCK 抑制劑	EMD Millipore 公司/555550
Y27632 二鹽酸鹽 ROCK 抑制劑	Tocris 公司/1254
FGF2	Waisman Biomanufacturing 公司 /WC-FGF2-FP
人類內皮細胞-無血清培養基	Life Technologies 公司/11111-044
幹細胞 II 造血幹細胞擴增培養基	Sigma 公司/S0192
GLUTAMAX	Invitrogen 公司/35050-061
胰島素	Sigma 公司/I9278
氯化鋰(LiCl)	Sigma 公司/L4408
第 I 型膠原蛋白溶液	Sigma 公司/C2249
纖維接合素	Life Technologies 公司/33016-015
DMEM/F12	Invitrogen 公司/11330032
重組人類 BMP4	Peprotech 公司/120-05ET
活化素 A	Peprotech 公司/120-14E
Iscove 所改良之 Dulbecco 氏培養基(Iscove's modified Dulbecco's medium，IMDM)	Invitrogen 公司/12200036
漢氏 F12 營養混合物	Invitrogen 公司/21700075
碳酸氫鈉	Sigma 公司/S5761
L-抗壞血酸 2-磷酸鎂 Mg^{2+}	Sigma 公司/A8960
1-硫代甘油	Sigma 公司/M6145
亞硒酸鈉	Sigma/S5261
非必需胺基酸	HyClone 公司/SH30853.01
化學定義的脂質濃縮物	Invitrogen 公司/11905031
胚胎轉移等級水	Sigma 公司/W1503
聚乙烯醇(polyvinyl alcohol，PVA)	MP Bio 公司/151-941-83
全鐵轉鐵蛋白	Sigma 公司/T0665
ES-CULT M3120	Stem Cell Technologies 公司/03120
STEMSPAN無血清擴增培養基(serum-free expansion medium，SFEM)	Stem Cell Technologies 公司/09650
L-抗壞血酸	Sigma 公司/A4544
血小板衍生的生長因子亞基B同源二聚體 (Platelet-derived growth factor subunit B homodimer，PDGF-BB)	Peprotech 公司/110-14B

【0156】 表1中列出的試劑為本領域技術人員已知的並且具有可接受的組合物，例如IMDM與Ham's F12。GLUTAMAX包含L-丙胺醯-L-谷胺醯胺二胜肽，通常在0.85% NaCl中以200 mM的濃度提供。GLUTAMAX在被培養的細胞切割二胜肽鍵時釋放L谷胺醯胺。化學定義的脂質濃縮物包含花生四烯酸2 mg/L、膽固醇220 mg/L、DL-α-生育酚乙酸酯70 mg/L、亞油酸10 mg/L、亞麻酸10 mg/L、肉荳蔻酸10 mg/L、油酸10 mg/L、棕櫚酸10 mg/L、棕櫚油酸10 mg/L、pluronic F-68 90 g/L、硬脂酸10 mg/L、TWEEN 80® 2.2g/L，以及乙醇。H-1152與Y27632為高效的，細胞可滲透的，選擇性ROCK (Rho相關的捲曲螺旋形成蛋白絲胺酸/蘇胺酸激酶)抑制劑。

【0157】 *表*2. IF6S*培養基* (10*倍濃度*)

10 倍 IF6S	**數量**	**最終濃度**
IMDM	1 包，配製為 1 L 的粉末	5X
漢氏 F12 營養混合物	1 包，配製為 1 L 的粉末	5X
碳酸氫鈉	4.2 g	21 mg/mL
L-抗壞血酸 2-磷酸鎂 Mg^{2+}	128 mg	640 µg/mL
1-硫代甘油	80 µL	4.6 mM
亞硒酸鈉(0.7 mg/mL 溶液)	24 µL	84 ng/mL
GLUTAMAX	20 mL	10X
非必需胺基酸	20 mL	10X
化學定義的脂質濃縮物	4 mL	10X
胚胎轉移等級水	至 200 mL	NA

【0158】 *表3. IF9S培養基 (1倍濃度；基於IF6S)*

IF9S	**數量**	**最終濃度**
IF6S	5 mL	1X
聚乙烯醇(PVA；20 mg/mL溶液)	25 mL	10 mg/mL
全鐵轉鐵蛋白(10.6 mg/mL溶液)	50 μL	10.6 μg/mL
胰島素	100 μL	20 μg/mL
胚胎轉移等級水	至50 mL	NA

【0159】 *表4. 分化培養基 (1倍濃度；基於IF9S)*

分化培養基	**數量**	**最終濃度**
IF9S	36 mL	1X
FGF2	1.8 μg	50 ng/mL
氯化鋰(2M溶液)	36 μL	2mM
BMP4 (100 μg/mL溶液)	18 μL	50 ng/mL
活化素A (10 mg/mL溶液)	5.4 μL	1.5 ng/mL

【0160】 *表5. 間質集落形成培養基 (1倍濃度)*

間質集落形成培養基(Mesenchymal colony forming medium，M-CFM)	**數量**	**最終濃度**
ES-CULT M3120	40 mL	40%
STEMSPAN SFEM	30 mL	30%
人類內皮細胞-無血清培養基	30 mL	30%
GLUTAMAX	1 mL	1X
L-抗壞血酸(250 mM 溶液)	100 μL	250 μM
氯化鋰((2M 溶液)	50 μL	1 mM
1-硫代甘油(100 mM 溶液)	100 μL	100 μM
FGF2	600 ng	20 ng/mL

【0161】 *表6. 間質無血清擴增培養基 (1倍濃度)*

間質無血清擴增培養基(Mesenchymal serum-free expansion medium，M-SFEM)	**數量**	**最終濃度**
人類內皮細胞-無血清培養基	5 L	50%
STEMLINE II HSFM	5 L	50%
GLUTAMAX	100 mL	1X
1-硫代甘油	87 μL	100 μM
FGF2	100 μg	10 ng/mL

【0162】實施例2. 用於將人類多能幹細胞 (PSCs)分化為間質幹細胞 (MSCs)的方法

1. 在塗覆有玻璃黏連蛋白 (0.5μg/ckg)的塑膠器皿上於E8完全培養基 (DMEM/F12基礎培養基 + E8補充物) +1 μM H1152中解凍誘導的多

能幹細胞 (iPSCs)。於37°C，5% CO_2，20% O_2 (含氧量正常)下培養接種的誘導的多能幹細胞 (iPSCs)。

2. 在塗覆有玻璃黏連蛋白 (0.5μg/ckg)的塑膠器皿上於E8完全培養基(無ROCK抑制劑)中擴增誘導的多能幹細胞 (iPSCs)三次繼代，並在開始分化過程之前於37°C，5% CO_2，20% O_2 (含氧量正常)下培養。
3. 收穫並以單細胞/小集落於5×10^3細胞/ckg的濃度下將誘導的多能幹細胞 (iPSCs)接種於塗覆有第IV型膠原蛋白(0.5μg/ckg)的塑膠器皿上並在E8完全培養基 + 10 μM Y27632中，於37°C，5% CO_2，20% O_2 (含氧量正常)下培養24小時。
4. 以分化培養基替換E8完全培養基 + 10 μM Y27632，並於37°C，5% CO_2，5% O_2 (缺氧)下培養48小時以產生原始中胚層細胞。
5. 收穫的菌落形成來自分化培養基貼壁培養物的原始中胚層細胞作為單細胞懸浮液，轉移至M-CFM懸浮培養物並於37°C，5% CO_2，20% O_2 (含氧量正常)下培養12天，直至間質集落形成。
6. 收穫並接種間質集落於塗覆有纖維接合素/第I型膠原蛋白(0.67 μg/ckg纖維接合素，1.2 μg/ckg膠原蛋白I)的塑膠器皿上並在M-SFEM培養基中，於37°C，5% CO_2，20% O_2 (含氧量正常)下培養3天至產生間質幹細胞(MSCs) (第0代)。
7. 收穫的菌落並作為單細胞(第1代)以1.3×10^4 個細胞/ckg的密度接種於塗覆有纖維接合素/第I型膠原蛋白的塑膠器皿上並在M-SFEM培養基中，於37°C，5% CO_2，20% O_2 (含氧量正常)下培養3天。
8. 收穫並作為單細胞(第2代)以1.3×10^4 個細胞/ckg的密度接種於塗覆有纖維接合素/第I型膠原蛋白的塑膠器皿上並在M-SFEM培養基中，於37°C，5% CO_2，20% O_2 (含氧量正常)下培養3天。

9. 收穫並作為單細胞(第3代) 以1.3×10^4 個細胞/ckg的密度接種於塗覆有纖維接合素/第I型膠原蛋白的塑膠器皿上並在M-SFEM培養基中，於37°C，5% CO_2，20% O_2 (含氧量正常)下培養3天。
10. 收穫並作為單細胞(第4代) 以1.3×10^4 個細胞/ckg的密度接種於塗覆有纖維接合素/第I型膠原蛋白的塑膠器皿上並在M-SFEM培養基中，於37°C，5% CO_2，20% O_2 (含氧量正常)下培養3天。
11. 收穫並作為單細胞(第5代)以1.3×10^4 個細胞/ckg的密度接種於塗覆有纖維接合素/第I型膠原蛋白的塑膠器皿上並在M-SFEM培養基中，於37°C，5% CO_2，20% O_2 (含氧量正常)下培養3天。
12. 作為單細胞收穫並冷凍最終產物。

【0163】進行兩個實驗 (TC-A-96與DAD-V-90)以研究補充M-CFM與PDGF-BB (10 ng/mL)及/或氯化鋰(1 mM)對誘導的多能幹細胞 (iPSCs)-間質幹細胞(MSCs)的T細胞抑制作用的影響。使用Waisman Biomanufacturing的免疫效力測定(ImmunoPotency Assay，IPA)評估T細胞抑制作用。

【0164】如表7所示，評估血小板衍生生長因子 (platelet-derived growth factor，PDGF)與氯化鋰的以下組合：PDGF+/LiCl+、PDGF-/LiCl-、PDGF+/LiCl-，以及PDGF-/LiCl+。請注意，兩種不同的Dneg1的種植密度 (5x10^{3}個細胞/ckg與1x10^{4}個細胞/ckg)以及在分化培養基中兩種不同濃度的活化素A (activin A，AA) (1倍 AA = 15 ng/mL，而0.1倍 AA = 1.5 ng/mL)在TC-A-96實驗中進行了比較。在DAD-V-90實驗中則使用單一Dneg1種植密度 (5×10^{3}個細胞/ckg)以及活化素A濃度(1.5 ng/mL)。還要注意在第一個IPA (IPA 1)中使用單一leukopak (LPK7)，在第二個IPA (IPA 2)中使用兩個leukopak (LPK7與LPK8)。

【0165】設計該測定以評估每個間質幹細胞(MSCs)株可以抑制T輔助(CD4+)淋巴細胞增殖的程度。使用從健康個體的周圍血 (來自Leucopaks (LPK)的周圍血單核細胞 (peripheral blood mononucleocyte cells，PBMC)) 純化的冷凍保存的白血球測試冷凍保存的間質幹細胞(MSCs)。因此，預期從供體到供體的LPK細胞群變異。針對臨床級材料，以來自兩個不同個體的周圍血單核細胞 (PBMC)測試每個間質幹細胞(MSCs)測試樣品，並且可以選擇將測試限制為用於研究等級材料的單個周圍血單核細胞 (PBMC)樣品。每個間質幹細胞(MSCs)測試樣品的測定與參考標準間質幹細胞(MSCs)株一起進行，以確保測定完整性/再現性並使測試樣品標準化。Bloom等人於Cytotherapy期刊，2015年，17 (2):140-51描述了該測定法。

【0166】簡言之，將測試間質幹細胞(MSCs)暴露於21Gy的γ輻射。在48孔組織培養盤中，將4×10^5個、2×10^5個、4×10^4個和2×10^4個輻射的間質幹細胞(MSCs)接種到各個孔中。周圍血單核細胞 (PBMC)分別以羧基螢光素琥珀醯亞胺酯標記。標記的周圍血單核細胞 (PBMC)以每孔4×10^5個細胞的濃度種植，每孔含有上述間質幹細胞(MSCs)。這導致滴定的周圍血單核細胞 (PBMC)：間質幹細胞(MSCs)比例為1：1、1：0.5、1：0.1，以及1：0.05。另一額外的孔僅用受刺激的周圍血單核細胞(PBMC)種植，且另一孔以單獨的間質幹細胞(MSCs)種植，而另一孔以無刺激的細胞以1：0.05比例種植，所有這些都作為對照組。隨後，將T細胞刺激性單株抗體，抗人類CD3-epilson與抗人類CD28 (R＆D Systems公司，明尼亞波利斯城，明尼蘇達州)加入每個孔中。

【0167】在培養的第四天，從各個孔收穫細胞。將來自每個孔的細胞與別藻藍蛋白標記的抗人類CD4一起作用。然後使用流式細胞儀經由羧基螢光素強度

分析$CD4^+$細胞的增殖。單獨的間質幹細胞(MSCs)對照組用於從共培養孔中篩選出間質幹細胞(MSCs)。單獨的周圍血單核細胞(PBMC)對照組作為最大T細胞增殖的陽性對照組，對其測量間質幹細胞(MSCs)調節的抑制程度。使用未刺激的1：0.05比例的細胞產生一陰性對照門檻，針對增殖進行測量。

【0168】 根據測試樣品比率，使用最佳擬合曲線來產生IC50值。將IC50值標準化為參考標準品 (IC50 Ref Std/IC50測試樣品)。這種標準化的IC50對於較有效(較具抑制性)的樣品產生較大的值，對於效力較小的樣品產生較小的值。

【0169】 **結果**

【0170】 表7中所示的IC50數據顯示補充有氯化鋰但不包含血小板衍生生長因子 (PDGF) (即PDGF-/LiCl+)的M-CFM培養基對於分化誘導的多能幹細胞(iPSCs)以產生免疫調節的誘導的多能幹細胞-間質幹細胞(iPSC-MSCs)是最佳的。此外，較低濃度的活化素A也改善了誘導的多能幹細胞-間質幹細胞(iPSC-MSCs)的免疫抑制。

【0171】 *表7. 免疫效力測定*

IC50 (LPK7)	**IC50 (LPK8)**	**樣本**	**血小板衍生生長因子**	**氯化鋰**	**活化素 A**	**種植密度 (D2)**
NA	NS	TC-A-96-B3	+	+	0.1 倍 (1.5 ng/mL)	$5x10^3$ 個細胞/cm^2
NA	0.17	TC-A-96-B1	+	+	1 倍 (15 ng/mL)	$5x10^3$ 個細胞/cm^2
NA	0.17	DAD-V-90-4	+	+	0.1 倍 (1.5 ng/mL)	$5x10^3$ 個細胞/cm^2
NA	0.19	TC-A-96-D3	+	+	0.1 倍 (1.5 ng/mL)	$1x10^4$ 個細胞/cm^2
NA	0.36	DAD-V-90-2	+	-	0.1 倍 (1.5 ng/mL)	$5x10^3$ 個細胞/cm^2
NA	0.57	DAD-V-90-1	-	-	0.1 倍 (1.5 ng/mL)	$5x10^3$ 個細胞/cm^2
0.39	0.54	TC-A-96-B2	-	+	1 倍 (15 ng/mL)	$5x10^3$ 個細胞/cm^2
0.37	0.58	TC-A-96-D2	-	+	1 倍 (15 ng/mL)	$1x10^4$ 個細胞/cm^2
0.69	0.93	DAD-V-90-3	-	+	0.1 倍 (1.5 ng/mL)	$5x10^3$ 個細胞/cm^2

NA表示不適用，NS表示不具有抑制性

【0172】根據該實施例產生的間質幹細胞(MSCs)表現出$CD73^+CD105^+CD90^+CD146^+CD44^+CD10^+CD31^-CD45^-$表型。

【0173】實施例3. 間質幹細胞(MSCs) microRNA分析

【0174】根據實施例2產生的間質幹細胞(MSCs)進行針對包含1194個miRNA的微RNA (miRNA)微陣列的分析以及由miR-127-3p、miR-145-5p、miR-181b-5p、miR-214-3p、miR-299-5p組成的專有miRNA組，針對71個間質幹細胞(MSCs)樣本以及94個非間質幹細胞(MSCs)樣本進行了驗證。

【0175】根據實施例2產生的間質幹細胞(MSCs)表現miR-145-5p、miR-181b-5p，以及miR-214-3p各自，但不表現miR-127-3p與miR-299-5p。

【0176】實施例4. 替代免疫效力測定1

【0177】間質幹細胞(MSCs)的免疫效力評估如下：在磷酸鹽緩衝鹽水中合併來自不同供體的人類周圍血單核細胞(PBMC) (以使免疫反應中的個體間差異最小化)，並以羧基螢光素琥珀醯亞胺酯 (carboxyfluorescein succinimidyl ester，CFSE，2 μM)於37°C、黑暗中染色15分鐘，細胞密度為2×10^7個周圍血單核細胞(PBMCs)/mL。通過加入等量的補充有10%人類血型AB型血清的RPMI-1640培養基來終止反應。將3×10^5個羧基螢光素琥珀醯亞胺酯(CFSE)標記的周圍血單核細胞(PBMC)重新懸浮於補充有10%合併的人類血小板裂解物、2 IU/mL無防腐劑肝素 (Biochrom公司)、2 mM L-谷胺醯胺、10 mM (4-(2-羥乙基)-1-哌嗪乙磺酸(HEPES；Gibco公司)、100 IU/mL青黴素(Sigma公司)，以及100 μg/mL鏈黴素(Sigma公司)的RPMI-1640培養基中，然後將該些細胞種植於96孔平底盤 (Corning公司)中，每孔細胞三重複。使用Gallios 10色流式細胞儀以及Kaluza G1.0軟體 (均為Coulter公司)測定T細胞的增殖。在4至7天後分析活的7-胺基放線菌素-D-排除

(7-AAD-；BD Pharmingen公司) $CD3^-APC^+$ (eBioscience公司)的T細胞。使用Modfit 4.1軟體 (Verity公司)分析增殖動力學及群體分佈。

【0178】 **實施例5. 替代免疫效力測定2**

【0179】 間質幹細胞(MSCs)的免疫效力評估如下：T輔助細胞 ($CD4^+$)淋巴細胞將根據製造商的說明以細胞追蹤紫 (CellTrace violet，CTV；Invitrogen公司)染色，然後以抗CD3/CD28包覆的珠子 (Dynabeads，Invitrogen公司)進行刺激，在96孔U形底盤中T細胞/珠子的比例為5：1。然後將反應者CD4 T細胞與經照射(於100 Gy)的Karpas 299細胞 (K299細胞；Sigma公司)作為參照標準或與間質幹細胞(MSCs)共培養。將共培養的細胞在RPMI-1640培養基中，於37°C、5% CO_2的環境下培養72小時。然後以AnnexinV結合緩衝液 (BD Biosciences公司)洗滌細胞，並在室溫下於黑暗中以膜聯蛋白V-螢光素異硫氰酸酯或APC (BD Biosciences公司)染色15分鐘。在作用後，將細胞以碘化丙錠 (propidium iodide，PI) (Molecular Probes公司)染色，然後立即在LSRII Fortessa (BD Biosciences公司)上獲得數據。收集使用FlowJo軟體 (版本8.8.6；Tree Star公司)分析的數據。透過膜聯蛋白V-陰性與PI陰性的T細胞群測量活力。以CTV暗淡分析活細胞的比例(%增殖)。T細胞增殖的抑制作用將透過以下公式計算：%抑制作用 = 100 - (a/b * 100)，其中a為抑制細胞存在下的增殖百分比，b為沒有抑制細胞時的增殖百分比。

【0180】 **實施例6. 間質幹細胞(MSCs)治療檢查點抑制劑療法對未治療的黑色素瘤的副作用**

【0181】 具有組織學證實的第III期 (不可切除的)或第IV期黑色素瘤並且未接受過先前全身性治療晚期疾病的個體將被隨機分成兩組。每組每2週靜脈注射

3 mg/kg 納武單抗(nivolumab)。將間歇性地監測患者的反應 (無進展存活)，並持續監測毒性及副作用。

【0182】 在一組個體中，在以納武單抗(nivolumab)輸注該個體後觀察副作用的24小時內，每個個體將以1x10^6至1x10^7個間質幹細胞(MSCs)每公斤體重靜脈輸注。

【0183】 在所有個體中，無進展生存期預計為6.9個月 (預期95%CI為4.3至9.5個月)，客觀反應率預計為44% (預期95%CI為38%至50%)，且完全反應率預計為9%。

【0184】 單獨使用納武單抗(nivolumab)的組別中82%的個體預期有任何等級的治療相關副作用，包括腹瀉 (預期19%)、疲勞 (預期34%)、瘙癢 (預期19%)、皮疹 (預計26%)、噁心 (預期13%)、發熱 (預期6%)、食慾下降 (預期11%)、ALT升高 (預期4%)、AST升高 (預期4%)、嘔吐 (預期6%)、甲狀腺機能減退 (預期9%)、結腸炎 (預期1%)、關節痛 (預期8%)，以及呼吸困難 (預期5%)。

【0185】 與未以間質幹細胞(MSCs)治療的個體相比，預期輸注間質幹細胞(MSCs)的個體表現出較不嚴重且可能較少的副作用。

【0186】 實施例7. 間質幹細胞(MSCs)治療復發/難治性DLBCL的雙專一性T細胞接合治療的副作用

【0187】 患有復發/難治性DLBCL的個體將被隨機分成兩組。兩組均接受逐步劑量的博納吐單抗(blinatumomab)，第1週為9 mg/d，第2週為28 mg/d，之後為112 mg/d。博納吐單抗(blinatumomab)將通過連續靜脈輸注給藥8週 (第1週期)，4週未治療，然後再治療4週 (第2週期)。

【0188】將間歇地監測個體的反應，並持續監測毒性及副作用。反應將包括在兩個週期的博納吐單抗(blinatumomab)後第10週的總體反應率、完全反應率、反應持續時間、無進展存活、總體存活，以及副作用的發生率及嚴重性。

【0189】總體反應率將根據Cheson修訂的惡性淋巴瘤反應標準，包括第10週的對比增強電腦斷層掃描以及第11週的氟去氧葡萄糖正電子發射斷層掃描(positron emission tomography，PET)檢查，透過獨立的中心放射學評估來確定。

【0190】在一組個體中，在以博納吐單抗(blinatumomab)輸注該個體後觀察副作用的24小時內，每個個體將以$1x10^6$至$1x10^7$個間質幹細胞(MSCs)每公斤體重靜脈輸注。

【0191】預計在19%的個體中會有完整的反應。所有個體的總體反應率預計為35%。預計基線時患有難治性疾病的個體的總體反應率為19%。預計基線時復發疾病的個體的總體反應率為67%。中位反應持續時間預計為11.6個月。

【0192】在所有個體中，中位無進展生存期預計為3.7個月，中位隨訪時間為15.0個月。在所有個體中，預計中位總生存期為5.0個月，中位隨訪時間為11.7個月。

【0193】未給予間質幹細胞(MSCs)的個體的預期副作用包括震顫 (預期48%)、發熱 (預期44%)、疲勞 (預期26%)、水腫 (預期26%)、血小板減少症 (預期22%)、肺炎 (預期22%) 、腹瀉 (預期22%)、白血球減少 (預計17%)、C-反應蛋白增加 (預期17%)、高血糖 (預期17%)、言語障礙 (預期17%)、咳嗽 (預期17%)、背痛 (預計17%)、低鉀血症 (預期17%)、頭暈 (預期13%)、腦病 (預期13%)、失語症 (預期9%)、嗜睡 (預期9%)、定向障礙 (預期9%)、混亂狀態 (預期為9%)，以及感覺異常 (預期9%)。

【0194】 與未以間質幹細胞(MSCs)治療的個體相比，預期輸注間質幹細胞(MSCs)的個體表現出較不嚴重且可能較少的副作用。

【0195】 實施例8. 間質幹細胞(MSCs)治療抗體-細胞激素融合療法對轉移性乳腺癌的副作用

【0196】 患有轉移性乳腺癌的個體將被隨機分為兩組。兩組均接受靜脈注射F16-IL2 2500萬國際單位 (million international units，MIU)組合阿黴素25 mg/m^2。F16-IL2為對肌腱蛋白-C的A1結構域特異性的人類scFv，命名為F16，並與人類細胞激素IL2融合。

【0197】 每個治療週期包含在第1、8以及15天施用F16-IL2與多柔比星(doxorubicin)，然後休息13天。將根據實質固態瘤反應評估標準 (Response Evaluation Criteria In Solid Tumours，RECIST)進行腫瘤評估。

【0198】 將間歇地監測個體的反應，並持續監測毒性及副作用。反應將包括客觀反應率與無進展生存期。

【0199】 在一組個體中，在向個體施用F16-IL2後觀察副作用的24小時內，每個個體將以$1x10^6$至$1x10^7$個間質幹細胞(MSCs)每公斤體重靜脈輸注。

【0200】 在8週 (2個治療週期)後，所有個體的疾病控制率預計為67%。在所有個體中，中位無進展生存期預計為125天，中位總生存期預計為351天。

【0201】 未服用間質幹細胞(MSCs)的個體的預期副作用包括血液及淋巴系統疾病 (預期至少50%)、心臟疾病 (預期7%)、胃腸道疾病 (預期至少67%)、代謝和營養障礙 (預期14%)、神經系統疾病 (預計7%)、腎臟和泌尿系統疾病 (預計7%)、呼吸系統、胸廓和縱隔疾病 (預計7%)、皮膚及皮下組織疾病 (預計至少20%)，以及血管疾病 (預期7%)。

【0202】 與未以間質幹細胞(MSCs)治療的個體相比，預期輸注間質幹細胞(MSCs)的個體表現出較不嚴重且可能較少的副作用。

【0203】 實施例9. 間質幹細胞(MSCs)治療細胞激素療法對晚期黑色素瘤的副作用

【0204】 具有第IV期或局部晚期第III期皮膚黑色素瘤並表現HLA*A0201(以允許將胜肽疫苗呈遞給T細胞)的個體將被隨機分配至兩組之一。每個週期一次，個體將接受1 mg的gp100:209-217 (210M) (胺基酸序列為IMDQVPFSV)加弗氏不完全佐劑 (Montanide ISA-51) (胜肽疫苗)皮下注射，然後接著進行IL-2 (720 000 IU)/kg)靜脈注射。IL-2將作為靜脈推注每8小時施用一次。

【0205】 每個個體將以耐受的IL-2治療，每個週期最多12個劑量。每3週重複一次治療，每兩個週期後再加1週，以評估反應。

【0206】 將間歇地監測個體的反應，並持續監測毒性和副作用。反應將包括臨床反應與無進展生存。

【0207】 在一組個體中，在向個體施用IL2後觀察副作用的24小時內，每個個體將用$1x10^6$至$1x10^7$個間質幹細胞(MSCs)每公斤體重靜脈輸注。

【0208】 兩組的回應率預計為20%。兩組中心驗證的整體臨床反應預計為16%。兩組的無進展生存期預計為2.2個月 (預期95%CI為1.7至3.9個月)。在兩組中，中位總生存期預計為17.8個月 (預期95%CI為11.9至25.8個月)。

【0209】 未施用間質幹細胞(MSCs)的個體的預期副作用包括血液或骨髓(預期48%)、一般心血管 (預期36%)、心律失常 (預期19%)、凝血 (預期4%)、全身症狀 (預期28%)、皮膚 (預計7%)、胃腸道 (預計21%)、出血 (預期2%)、肝臟 (預期40%)、感染或發熱性嗜中性白血球減少症 (預期8%)、代謝或實驗室檢測結果

(預期42%)、肌肉骨骼 (預計7%)、神經系統疾病 (預期26%)、肺部 (預期22%)、疼痛 (預期13%)、腎臟或泌尿生殖系統 (預期19%)，以及腫瘤溶解症候群或腫瘤發作 (預期2%)。

【0210】 與未以間質幹細胞(MSCs)治療的個體相比，預期輸注間質幹細胞(MSCs)的個體表現出較不嚴重且可能較少的副作用。

【0211】 實施例10. 間質幹細胞(MSCs)治療抗體-藥物偶聯療法對HER2陽性晚期乳腺癌的副作用

【0212】 HER2陽性晚期 (不可切除，局部晚期或轉移性)乳腺癌的個體將被隨機分為兩組。兩組均每21天接受trastuzumab emtansine 3.6 mg/kg靜脈注射。

【0213】 將間歇地監測個體的反應，並持續監測毒性及副作用。反應將包括無進展生存期、總生存期，以及客觀反應率。將根據修改的RECIST評估進展。

【0214】 在一組個體中，在對該個體施用trastuzumab emtansine後24小時內觀察到副作用的情況下，每個個體將以$1x10^6$至$1x10^7$個間質幹細胞(MSCs)每公斤體重靜脈輸注。

【0215】 在兩組中，中位無進展生存期預計為9.6個月，中位總生存期預計為30.9個月。客觀反應率預計為44%。預計1年生存率預計為85%，預計2年生存率預計為65%。

【0216】 未給予間質幹細胞(MSCs)的個體的預期副作用包括腹瀉 (預期為23%)、手掌-足底紅斑感覺異常 (預期為1%)、嘔吐 (預期為19%)、嗜中性白血球減少 (預期為6%)、低鉀血症 (預期為9%)、疲勞 (預期為35%)、噁心 (預期為39%)、黏膜炎症 (預期為7%)、貧血 (預期為10%)、ALT升高 (預期為17%)、AST升高 (預期為22%)，以及血小板減少症 (預期為28%)。

【0217】 與未以間質幹細胞(MSCs)治療的個體相比，預期輸注間質幹細胞(MSCs)的個體表現出較不嚴重且可能較少的副作用。

【0218】 實施例11. 間質幹細胞(MSCs)治療TLR促效劑治療對血液惡性腫瘤的副作用

【0219】 患有復發或難治性血液系統惡性腫瘤的個體將被隨機分為兩組。兩組均每週兩次以皮下注射接受TLR7促效劑852A (一種小分子咪唑喹啉)，持續12週。個體將開始以0.6 mg/m^2每週兩次給藥，並且在每2次劑量後升高0.2 mg/m^2，耐受目標劑量為1.2 mg/m^2。

【0220】 將間歇地監測個體的反應、毒性，以及持續的副作用。每8劑 (急性白血病)或每12劑 (多發性骨髓瘤或淋巴瘤)後評估反應。反應將包括完全反應、部分反應，以及穩定的疾病。

【0221】 在一組個體中，在向該個體施用852A後觀察副作用的24小時內，每個個體將以$1x10^6$至$1x10^7$個間質幹細胞(MSCs)每公斤體重靜脈輸注。

【0222】 兩組的預期總體反應率在1年時為18%。兩組的中位生存期預計為3.5個月。預計完全反應為6%，預計兩組的部分反應均為6%。兩組中12%的個體預計會出現穩定的疾病。

【0223】 未服用間質幹細胞(MSCs)的個體的預期副作用包括噁心(預期為88%)、嘔吐 (預期為18%)、呼吸困難 (預期為82%)、發熱 (預期為71%)、發冷 (預期為82%)、肌痛 (預期為76%)、出汗 (預期為94%)、不適 (預期為100%)、水腫 (預期為59%)、咳嗽 (預期為47%)，以及疼痛 (預期為12%)。

【0224】 與未以間質幹細胞(MSCs)治療的個體相比，預期輸注間質幹細胞(MSCs)的個體表現出較不嚴重且可能較少的副作用。

【0225】 **實施例12. 間質幹細胞(MSCs)治療RLR促效劑治療對胰腺癌的副作用**

【0226】 患有胰腺癌的個體將被隨機分為兩組。兩組均接受靜脈注射 2.9 mg/kg雙功能ppp-siRNA，其在每週的第1天及第4天每週兩次施用RIG-1活化與$TGF\beta_1$ (ppp-TGF-β)的基因沉默組合，持續6週。

【0227】 將間歇性地監測個體的無進展存活，並持續監測毒性與副作用，預期其包括增加的ALT以及白血球減少。

【0228】 在一組個體中，在對該個體施用ppp-TGF-β後觀察副作用的24小時內，每個個體將以$1x10^6$至$1x10^7$個間質幹細胞(MSCs)每公斤體重靜脈輸注。

【0229】 與未以間質幹細胞(MSCs)治療的個體相比，預期輸注間質幹細胞(MSCs)的個體表現出較不嚴重且可能較少的副作用。

【0230】 **實施例13. 間質幹細胞(MSCs)治療STING促效劑治療結腸癌的副作用**

【0231】 患有結腸癌的個體將被隨機分成兩組。兩組在每週的第1天及第4天每週兩次以靜脈注射接受5 mg/kg的cGAMP，持續6週。

【0232】 將間歇地監測個體的無進展存活，並持續監測毒性及副作用。

【0233】 在一組個體中，在對該個體施用cGAMP後24小時內觀察到副作用後，每個個體將以$1x10^6$至$1x10^7$個間質幹細胞(MSCs)每公斤體重靜脈輸注。

【0234】 與未以間質幹細胞(MSCs)治療的個體相比，預期輸注間質幹細胞(MSCs)的個體表現出較不嚴重且可能較少的副作用。

【0235】 **實施例14. 預防或治療細胞激素釋放症候群**

【0236】本實施例使用嚴重免疫缺陷的NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG)小鼠，免疫缺陷允許這些小鼠透過周圍血單核細胞 (PBMC)的植入及分化而人源化，導致在小鼠的周圍血及脾臟中具有高百分比的人類CD4^{+}與CD8^{+} T細胞。OKT3抗體與人類T細胞結合並引起人類細胞激素的強烈誘導，從而對人類的細胞激素釋放症候群 (CRS)進行建立模型。

【0237】在第0天時，將8至12週齡雌性NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG)小鼠透過尾靜脈靜脈注射20x10^{6}個人類周圍血單核細胞 (hu PBMC)。圖3中提供了實驗設計的示意圖。

【0238】冷凍的人類周圍血單核細胞(PBMC)購自StemCell Technologies公司，NSG小鼠購自The Jackson Laboratory公司。

【0239】按照製造商的說明儲存及解凍冷凍人類周圍血單核細胞(huPBMC)樣本。簡而言之，將小瓶冷凍細胞在37°C水浴中解凍，用70%乙醇清洗小瓶外部，將細胞轉移到含有在37°C下預先加熱的10 mL RPMI 10%FBS的15 mL錐形管中，以1500rpm離心10分鐘，以10 mL PBS洗滌一次，並懸浮於1 mL PBS中，透過台盼藍染料排除進行細胞計數。製備在150 μlPBS中的20x10^{6} 個人類周圍血單核細胞(huPBMC)等分試樣並保持在冰上，同時製備用於注射的小鼠。

【0240】將小鼠置於籠中並以燈加熱2至3分鐘以誘導尾靜脈擴張。接下來，將小鼠置於小鼠限制器中，用70%乙醇清潔尾部，並透過尾靜脈注射20x10^{6}個人類周圍血單核細胞(huPBMC)，以1 ml注射器，27G針頭注射小鼠。注射後，對注射部位施加輕微壓力以防止出血。每天監測小鼠的疾病跡象直至安樂死當天為止。

【0241】 在人類周圍血單核細胞(huPBMC)植入後10-12天，將小鼠分配至對照組 (n = 2)或試驗組 (n = 5)。對照組透過腹膜內注射以10 μg的劑量接受莫羅單抗(muromonab)-CD3 (OKT3)抗體。OKT3抗體為一種抗CD3抗體，作為免疫抑制劑，用於治療器官移植後的急性排斥反應。OKT3抗體可購自商業供應商，例如abcam公司 (型號ab86883)或ThermoFisher Scientific公司 (型號14-0037-82)或其他來源，例如Walter and Eliza Hall Institute's Antibody Facility公司。在給予人類周圍血單核細胞(huPBMC)後12小時，對照組與試驗組通過腹膜內注射接受OKT3抗體。試驗組在OKT3施用前5小時 (即人類周圍血單核細胞(huPBMC)施用後7小時)通過尾靜脈注射接受2×10^6個間質幹細胞(MSCs)。在其他實施例中，間質幹細胞(MSCs)將與OKT3施用同時施用或施用OKT3後1小時、3小時、5小時或24小時施用 (圖3)。

【0242】 在施用OKT3抗體後0、1、3、5，以及24小時獲得小鼠的溫度。使用非接觸式紅外線溫度計測量溫度，該溫度計已針對標準直腸溫度計進行校準，以調整直腸與表面/皮膚溫度之間的差異。

【0243】 施用OKT3抗體5小時後，使用無菌4 mm Goldenrod Animal Lancet透過頰靜脈穿刺或通過從尾靜脈抽取血液以獲得周圍血樣品。

【0244】 根據臨床評分及體溫，在OKT3施用後5或24小時犧牲小鼠。透過心臟穿刺在安樂死後立即獲得周圍血樣品，然後收穫脾臟。透過標準流式細胞儀染色及分析測定在循環與脾臟中發現的人類CD45、CD4以及CD8 T細胞的百分比。透過表面染色及流式細胞儀分析評估循環與脾臟中CD4及CD8 T細胞上的CD69表現。

【0245】 在OKT3施用後5及24小時收集的血漿樣品將評估IL-1β、IL-2、IL-6、IFNγ、TNF、IL-10，以及任選的IL-4及IL-5的表現。

【0246】 在該細胞激素釋放症候群 (CRS)模型中，相較於對照組小鼠，試驗組小鼠表現出更高的直腸溫度 (圖4)。此外，相較於細胞激素釋放症候群 (CRS)模型中的試驗組小鼠 (圖5)，測試小鼠的臨床評分降低。

【0247】 對照組與試驗組小鼠之間在周圍血 (圖6)或脾臟(圖9)中$CD45^+$細胞的百分比沒有觀察到差異。

【0248】 然而，與周圍血(圖7)以及脾臟 (圖10)中的人類$CD4^+$細胞中，以及在周圍血 (圖8)以及脾臟 (圖11)中的人類$CD8^+$細胞中，與對照組小鼠相比，試驗組小鼠的CD69表現降低。

【0249】 鑑於相對於對照組小鼠，試驗組小鼠的人類$CD4^+$細胞與人類$CD8^+$細胞中CD69表現降低，IL-1β、IL-2、IL-6、IFNγ、TNF、IL-10、IL-4以及IL-5中的一種或多種的表現，相對於對照組小鼠，預期試驗組小鼠的表現減少。

【符號說明】無

【生物材料寄存】無

【序列表】無

201920659
專利案號：107120586

201920659

【發明摘要】

【中文發明名稱】　用於治療免疫療法的副作用之方法

【英文發明名稱】　METHOD FOR TREATING A SIDE EFFECT OF IMMUNOTHERAPY

【中文】

本發明涉及治療免疫療法的副作用之方法，該方法包含將間質幹細胞(mesenchymal stem cell，MSC)施予已經歷或正在接受免疫療法的個體。本發明還涉及包含MSC之治療組合物以及包含MSC或治療組合物之容器。

【英文】

The invention relates to a method for treating a side effect of immunotherapy, the method comprising administering a mesenchymal stem cell (MSC) to a subject who has undergone or is undergoing immunotherapy. The invention also relates to a therapeutic composition comprising a MSC and a container comprising a MSC or therapeutic composition.

【指定代表圖】　無

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明申請專利範圍】

【第1項】 一種間質幹細胞 (mesenchymal stem cell，MSC)，用於在已經歷或正在接受免疫療法的個體中治療免疫療法的副作用。

【第2項】 一種間質幹細胞 (MSC) 的用途，在於製備藥物供在已經歷或正在接受免疫療法的個體中治療免疫療法的副作用。

【第3項】 如請求項1之間質幹細胞(MSC)或如請求項2之用途，其中該間質幹細胞 (MSC)具有$CD73^+CD105^+CD90^+CD146^+CD44^+CD10^+CD31^-CD45^-$的表型。

【第4項】 如請求項1之間質幹細胞 (MSC)或如請求項2之用途，其中該間質幹細胞 (MSC)表現miR-145-5p、miR-181b-5p，以及miR-214-3p，但不表現miR-127-3p以及miR-299-5p。

【第5項】 如請求項1之間質幹細胞(MSC)或如請求項2之用途，其中治療包含施予該個體約1×10^6至約1×10^7個間質幹細胞 (MSC)/kg體重。

【第6項】 如請求項1之間質幹細胞(MSC)或如請求項2之用途，其中治療包含在施予免疫療法之前、期間或之後施予該間質幹細胞 (MSC)。

【第7項】 如請求項1之間質幹細胞(MSC)或如請求項2之用途，其中治療包含在免疫療法後施予該間質幹細胞 (MSC)。

【第8項】 如請求項1之間質幹細胞(MSC)或如請求項2之用途，其中治療包含在觀察到免疫療法的副作用後24小時內施予該間質幹細胞 (MSC)。

【第9項】 如請求項1之間質幹細胞(MSC)或如請求項2之用途，其中治療包含在免疫療法後24小時至72小時內施予該間質幹細胞 (MSC)。

【第10項】 如請求項1之間質幹細胞(MSC)或如請求項2之用途，其中該副作用為：細胞激素釋放症候群 (cytokine release syndrome，CRS)，可視需要地釋放

介白素-6 (interleukin-6，IL-6)、干擾素-γ (interferon-γ，IFN-γ)、腫瘤壞死因子 (tumour necrosis factor，TNF)、介白素-2 (IL-2)、介白素-2 (IL-2)受體α、介白素-8 (IL-8)、介白素-10 (IL-10)，或顆粒球巨噬細胞株刺激因子 (granulocyte macrophage colony-stimulating factor，GMCSF)；巨噬細胞活化症候群 (macrophage activation syndrome，MAS)；一種針對標靶、不針對癌症的作用，可視需要地為B細胞發育不良；腫瘤溶解症候群 (tumour lysis syndrome，TLS)；神經毒性，可視需要地為腦水腫；或過敏性休克。

【第11項】 如請求項1之間質幹細胞(MSC)或如請求項2之用途，其中該免疫療法用於治療：淋巴瘤；白血病；黑色素瘤；上皮癌；或肉瘤。

【第12項】 如請求項1之間質幹細胞(MSC)或如請求項2之用途，其中該免疫療法用於治療：瀰漫性大B細胞淋巴瘤 (diffuse large B cell lymphoma，DLBCL)；何杰金氏淋巴瘤；非何杰金氏淋巴瘤 (non-Hodgkin lymphoma，NHL)；非何杰金氏B、T或NK細胞淋巴瘤；原發性縱隔B細胞淋巴瘤 (primary mediastinal B cell lymphoma，PMBCL)；變化型濾泡性淋巴瘤 (transformed follicular lymphoma，TFL)；被套細胞淋巴瘤 (mantle cell lymphoma，MCL)；多發性骨髓瘤 (multiple myeloma，MM)；慢性淋巴性白血病 (chronic lymphocytic leukaemia，CLL)；急性骨髓性白血病 (acute myeloid leukaemia，AML)；或急性淋巴球性白血病 (acute lymphoblastic leukaemia，ALL)。

【第13項】 如請求項1之間質幹細胞(MSC)或如請求項2之用途，其中該免疫療法為檢查點抑制劑、雙專一性T細胞接合者、干擾素基因促效劑的刺激劑，類RIG I受體促效劑、類鐸受體促效劑、細胞激素、抗體-細胞激素融合蛋白，或抗體-藥物偶聯物。

【第14項】 如請求項1之間質幹細胞(MSC)或如請求項2之用途，其中該個體為哺乳動物，可視需要地為人類。

【第15項】 一種用於治療、改善，或減輕在哺乳動物個體中免疫治療的副作用之治療組合物，其中該治療組合物包含間質幹細胞 (MSC)，其中該間質幹細胞 (MSC)由包含以下之方法所製備：

(a) 於間質集落形成培養基 (mesenchymal-colony forming medium，M-CFM)中培養原始的中胚層細胞，該培養基(M-CFM)包含LiCl與FGF2，但不包括PDGF，在含氧量正常的條件下培養足夠的時間以形成間質集落；以及

(b) 黏附地培養 (a)的該間質集落以產生該間質幹細胞 (MSC)，

其中(b)的該間質幹細胞 (MSC)表現miR-145-5p、miR-181b-5p，以及miR-214-3p，但不表現miR-127-3p與miR-299-5p，及/或具有$CD73^+CD105^+CD90^+CD146^+CD44^+CD10^+CD31^-CD45^-$的表型。

【第16項】 一種容器，包含間質幹細胞 (MSC)，其表現miR-145-5p、miR-181b-5p，以及miR-214-3p，但不表現miR-127-3p與miR-299-5p，及/或具有$CD73^+CD105^+CD90^+CD146^+CD44^+CD10^+$ $CD31^-CD45^-$的表型。

【第17項】 一種容器，包含如請求項15之治療組合物。