



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109789092 A

(43)申请公布日 2019.05.21

(21)申请号 201780054844.6

(22)申请日 2017.07.13

(30)优先权数据

62/361,891 2016.07.13 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.03.06

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/041912 2017.07.13

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/013797 EN 2018.01.18

(71)申请人 哈佛学院院长等

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 A·S·张 D·J·穆尼

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 徐志明

(51)Int.Cl.

A61K 9/127(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

B82Y 5/00(2006.01)

权利要求书6页 说明书87页 附图83页

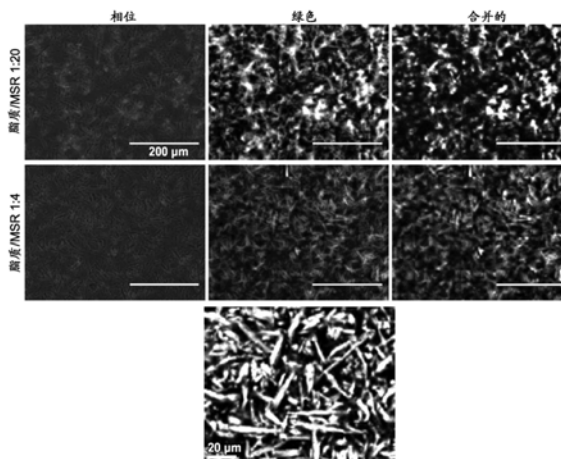
(54)发明名称

抗原呈递细胞模拟支架及其制备和使用方法

法

(57)摘要

本文中描述的实施方式提供了抗原呈递细胞模拟支架(APC-MS)和这样的支架用于操纵T细胞的用途。更具体地,所述支架可用于促进各种情况(例如,体外、离体,或体内)中的T细胞的生长、分裂、分化、扩增、增殖、活性、生活力、耗尽、无能、休眠、凋亡或死亡。本文中所述的实施方式进一步涉及含有这样的支架的药物组合物、试剂盒和包装。其他实施方式涉及用于制备所述支架、组合物和试剂盒/包装的方法。本文中还描述了在疾病(如癌症、免疫缺陷障碍和/或自身免疫障碍)的诊断或治疗中使用所述支架、组合物和/或试剂盒的方法。



1. 一种抗原呈递细胞模拟支架 (APC-MS), 包括
包含高表面积介孔二氧化硅微棒 (MSR) 的基层层;
于所述MSR基层层上成层的连续的、流体支撑的脂质双层 (SLB);
吸附于所述支架上的多种T细胞激活分子和T细胞共刺激分子; 和
吸附于所述支架上的多种T细胞稳态剂。
2. 权利要求1的支架, 其中所述T细胞选自自然杀伤 (NK) 细胞、CD3+T细胞、CD4+T细胞、CD8+T细胞和调节T细胞 (Treg), 或其组合。
3. 权利要求1的支架, 其中所述T细胞稳态剂吸附于所述SLB层上。
4. 权利要求1的支架, 其中所述T细胞稳态剂吸附于所述MSR基层层上。
5. 权利要求1的支架, 其中所述T细胞稳态剂以受控释放方式从所述支架释放。
6. 权利要求1的支架, 其中所述T细胞稳态剂以持续方式从所述支架释放至少30天。
7. 权利要求1的支架, 其中所述T细胞稳态剂选自IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-21和转化生长因子 β (TGF- β), 或其激动剂、其模拟物、其变体、其功能性片段, 或其组合。
8. 权利要求7的支架, 其中所述T细胞稳态剂是IL-2、其激动剂、其模拟物、其变体、其功能性片段, 或其与选自IL-7、IL-21、IL-15和IL-15超激动剂的第二稳态剂的组合。
9. 权利要求7的支架, 其中所述T细胞稳态剂选自包含IL-2的前30个氨基酸 (p1-30) 的N-末端IL-2片段、IL-2superkine肽和IL-2部分激动剂肽, 或其组合。
10. 权利要求1的支架, 其中所述T细胞激活分子和所述T细胞共刺激分子各自独立地吸附于所述流体支撑的脂质双层 (SLB) 上。
11. 权利要求10的支架, 其中所述T细胞激活分子和所述T细胞共刺激分子通过亲和性配对或化学偶联吸附。
12. 权利要求11的支架, 其中所述亲和性偶联包括生物素-抗生物素蛋白链菌素对、抗体-抗原对、抗体-半抗原对、亲和性对、捕获蛋白对、Fc受体-IgG对、金属-螯合脂质对, 或其组合。
13. 权利要求11的支架, 其中所述化学偶联包括叠氮化物-炔烃化学 (AAC) 反应、二苯并环辛炔连接 (DCL) 或四嗪-烯炔连接 (TAL)。
14. 权利要求10的支架, 其中所述T细胞激活分子和所述T细胞共刺激分子各自独立地涂覆于所述流体支撑脂质双层 (SLB) 上。
15. 权利要求10的支架, 其中所述T细胞激活分子和所述T细胞共刺激分子各自独立地部分包埋于所述流体支撑的脂质双层 (SLB) 上。
16. 权利要求1的支架, 其中所述T细胞激活分子和所述T细胞共刺激分子各自独立地吸附于所述介孔二氧化硅微棒 (MSR) 上。
17. 权利要求1的支架, 其中所述T细胞激活分子和所述T细胞共刺激分子各自独立地是抗体分子或其抗原结合片段。
18. 权利要求1的支架, 其中所述T细胞激活分子选自抗CD3抗体或其抗原结合片段、抗巨噬细胞清道夫受体 (MSR1) 抗体或其抗原结合片段、抗T细胞受体 (TCR) 抗体或其抗原结合片段、抗CD2抗体或其抗原结合片段、抗CD47抗体或其抗原结合片段、加载有MHC肽的主要组织相容性复合物 (MHC) 分子或其多聚体和MHC-免疫球蛋白 (Ig) 缀合物或其多聚体, 或其组

合。

19. 权利要求1的支架,其中所述T细胞共刺激分子是抗体,或其抗原结合片段,其特异性地结合选自CD28、4.1BB (CD137)、OX40 (CD134)、CD27 (TNFRSF7)、GITR (CD357)、CD30 (TNFRSF8)、HVEM (CD270)、LT β R (TNFRSF3)、DR3 (TNFRSF25)、ICOS (CD278)、CD226 (DNAM1)、CRTAM (CD355)、TIM1 (HAVCR1、KIM1)、CD2 (LFA2、OX34)、SLAM (CD150、SLAMF1)、2B4 (CD244、SLAMF4)、Ly108 (NTBA、CD352、SLAMF6)、CD84 (SLAMF5)、Ly9 (CD229、SLAMF3) 和CRACC (CD319、BLAME) 的共刺激抗原。

20. 权利要求1的支架,其中所述T细胞激活分子和所述T细胞共刺激分子包括双特异性抗体或其抗原结合片段。

21. 权利要求1的支架,其中所述T细胞激活分子和所述T细胞共刺激分子包括选自CD3/CD28、CD3/ICOS、CD3/CD27和CD3/CD137,或其组合的对。

22. 权利要求1的支架,其中所述支架进一步包括特异性地结合Fc融合蛋白的免疫球蛋白分子。

23. 权利要求1的支架,其中所述支架包括选自粒细胞巨噬细胞-集落刺激因子 (GM-CSF)、趋化因子 (C-C基序) 配体21 (CCL-21)、趋化因子 (C-C基序) 配体19 (CCL-19)、趋化因子 (C-X-C基序) 配体12 (CXCL12)、干扰素 γ (IFN γ) 或FMS-样酪氨酸激酶 (Flt-3) 配体的募集化合物。

24. 权利要求23的支架,其中所述募集化合物包括粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)。

25. 权利要求1的支架,其中所述支架进一步包括抗原。

26. 权利要求25的支架,其中所述抗原包括肿瘤抗原。

27. 权利要求25的支架,其中所述肿瘤抗原选自MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、CEA、酪氨酸酶、midkin、BAGE、CASP-8、 β -连环蛋白、 β -连环蛋白、 γ -连环蛋白、CA-125、CDK-1、CDK4、ESO-1、gp75、gp100、MART-1、MUC-1、MUM-1、p53、PAP、PSA、PSMA、ras、trp-1、HER-2、TRP-1、TRP-2、IL13R α 、IL13R α 2、AIM-2、AIM-3、NY-ESO-1、C9orf 112、SART1、SART2、SART3、BRAP、RTN4、GLEA2、TNKS2、KIAA0376、ING4、HSPH1、C13orf24、RBPSUH、C6orf153、NKTR、NSEP1、U2AF1L、CYNL2、TPR、SOX2、GOLGA、BMI1、COX-2、EGFRvIII、EZH2、LICAM、Livin、Livin β 、MRP-3、巢蛋白、OLIG2、ART1、ART4、B-细胞周期蛋白、Gli1、Cav-1、组织蛋白酶B、CD74、E-钙粘蛋白、EphA2/Eck、Fra-1/Fos1、GAGE-1、神经节苷脂/GD2、GnT-V、 β 1,6-N、Ki67、Ku70/80、PROX1、PSCA、SOX10、SOX11、生存素、UPAR、WT-1、二肽基肽酶IV (DPPIV)、腺苷脱氨酶结合蛋白 (AD Abp)、亲环蛋白b、结直肠相关抗原 (CRC) -C017-1A/GA733、T-细胞受体/CD3- ξ 链、肿瘤抗原的GAGE-家族、RAGE、LAGE-I、NAG、GnT-V、RCAS1、 α -甲胎蛋白、p120ctn、Pmel117、PRAME、脑糖原磷酸化酶、SSX-I、SSX-2 (HOM-MEL-40)、SSX-I、SSX-4、SSX-5、SCP-I、CT-7、cdc27、腺瘤性结肠息肉蛋白 (APC)、fodrin、P1A、连接蛋白37、Ig-独特型、p15、GM2、GD2神经节苷脂、肿瘤抗原的Smad家族、Irf-1、EBV编码的核抗原 (EBNA) -I、UL16-结合蛋白样转录产物1 (Mu1t1)、RAE-1蛋白、H60、MICA、MICB和c-erbB-2、患者特异性新抗原,或其免疫原性肽,或其组合。

28. 权利要求1的支架,其中所述支撑的脂质双层 (SLB) 与所述介孔二氧化硅微棒 (MSR) 的重量比为约10:1至约1:20。

29. 权利要求1的支架,其中所述连续的流体支撑的脂质双层(SLB)包含选自(DMPC)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)、二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)、棕榈酰基-油酰基磷脂酰胆碱(POPC)、二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)、二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)、二肉豆蔻酰基磷脂酰乙醇胺(DMPE)和二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(DPPE)或其组合的脂质。

30. 权利要求1的支架,其中所述介孔二氧化硅微棒-脂质双层(MSR-SLB)支架保持连续的流体架构至少14天。

31. 权利要求1的支架,其中所述介孔二氧化硅微棒(MSR)与所述T细胞激活/共刺激分子的干重比为1:1至50:1。

32. 一种包括多个权利要求1的支架的设备,其中所述支架堆叠以选择性地允许T细胞渗透到所述介孔二氧化硅微棒(MSR)中。

33. 权利要求32的设备,其中所述T细胞激活和/或共刺激分子以足以允许原位操纵T细胞的浓度存在于所述支架上。

34. 一种包含权利要求1的支架和药物学上可接受的载体的药物组合物。

35. 权利要求34的药物组合物,其中将所述组合物配制用于静脉内给药、皮下给药、腹膜内给药或肌内给药。

36. 一种包含权利要求1的支架和在其中簇集的T细胞的组合物。

37. 权利要求36的组合物,其中所述T细胞选自自然杀伤(NK)细胞、CD3+T细胞、CD4+T细胞、CD8+T细胞和调节T细胞(Treg),或其组合。

38. 一种治疗需要的受试者的疾病的方法,包括

将获自受试者的包含T细胞群体的样品接触权利要求1的抗原呈递细胞模拟支架(APC-MS),由此激活、共刺激和稳态地维持所述T细胞群体;

任选扩增所述T细胞群体;和

将激活的、共刺激的、维持的和任选地扩增的T细胞施用于所述受试者,由此治疗所述受试者的疾病。

39. 权利要求38的方法,其中所述方法进一步包括在施用步骤前再刺激所述T细胞群体。

40. 权利要求38的方法,其中所述样品是血样、骨髓样品、淋巴样品和脾脏样品。

41. 权利要求38的方法,其中所述受试者是人。

42. 权利要求38的方法,其中所述疾病是癌症,并且所述支架包含至少一种细胞毒性T细胞特异性激活分子和至少一种细胞毒性T细胞特异性共刺激分子。

43. 权利要求42的方法,其中所述癌症选自头颈癌、乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、食道癌、骨癌、睾丸癌、宫颈癌、胃肠癌、成胶质细胞瘤、白血病、淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、肺部的肿瘤前病变、结肠癌、黑素瘤和膀胱癌。

44. 权利要求43的方法,其中所述方法包括从所述样品和/或所述扩增的细胞群体进一步分选和任选地富集所述细胞毒性T细胞。

45. 权利要求38的方法,其中所述疾病是免疫缺陷障碍,并且所述支架包含至少一种辅助T细胞特异性激活分子和至少一种辅助T细胞特异性共刺激分子。

46. 权利要求45的方法,其中所述免疫缺陷障碍选自原发性免疫缺陷障碍和获得性免疫缺陷障碍。

47. 权利要求46的方法,其中所述获得性免疫缺陷障碍是由于获得性免疫缺陷综合征(AIDS)引起的。

48. 权利要求45的方法,其中所述免疫缺陷障碍是由于选自DiGeorge综合征(DGS)、染色体断裂综合征(CBS)、共济失调毛细血管扩张症(AT)和Wiskott-Aldrich综合征(WAS),或其组合的遗传性障碍引起的。

49. 权利要求45的方法,其中所述方法包括从所述样品和/或所述扩增的细胞群进一步分选和任选地富集所述辅助T细胞。

50. 权利要求38的方法,其中所述疾病是自身免疫障碍。

51. 权利要求38的方法,其中所述激活的、共刺激的、稳态维持的和任选地扩增的T细胞皮下施用于所述受试者。

52. 权利要求38的方法,其中所述激活的、共刺激的、稳态维持的和任选地扩增的T细胞静脉内施用于所述受试者。

53. 权利要求38的方法,其中通过将所述样品接触所述支架1天至约20天的时间段来激活、共刺激、稳态维持和任选地扩增所述T细胞群体。

54. 一种用于操纵T细胞的方法,包括

将权利要求1的支架接触受试者的生物样品,由此激活、共刺激、稳态维持和任选地扩增所述样品内存在的T细胞群体,由此操纵所述T细胞。

55. 权利要求54的方法,其中所述操纵包括促进T细胞的生长、分裂、分化、扩增、增殖、活性、生活力、耗尽、无能、休眠、凋亡或死亡。

56. 权利要求55的方法,其中所述操纵包括促进T细胞的扩增或增殖。

57. 权利要求54的方法,其中与对照支架相比,所述方法使得在接触所述支架约1周后赋予T细胞群体扩增的提高,所述对照支架包含所述包含高表面积介孔二氧化硅微棒(MSR)的基底层和所述连续的流体支撑的脂质双层(SLB),但不含所述T细胞激活分子和所述T细胞共刺激分子。

58. 权利要求57的方法,其中与对照支架相比,所述方法使得在接触所述支架约1周后赋予T细胞群体的扩增约50倍至500倍的提高,所述对照支架包含所述包含高表面积介孔二氧化硅微棒(MSR)的基底层和所述连续的流体支撑的脂质双层(SLB),但不含所述T细胞激活分子和所述T细胞共刺激分子。

59. 权利要求57的方法,其中与包含所述T细胞激活分子和所述T细胞共刺激分子的超顺磁性球形聚合物颗粒(DYNABEAD)相比,所述方法使得在接触所述支架约1周后赋予T细胞群体扩增的提高。

60. 权利要求59的方法,其中与包含所述T细胞激活分子和所述T细胞共刺激分子的超顺磁性球形聚合物颗粒(DYNABEAD)相比,所述方法使得在接触所述支架约1周后赋予T细胞群体的扩增约5倍至20倍的提高。

61. 权利要求54的方法,其中所述操纵包括提高T细胞的代谢活性。

62. 权利要求54的方法,其中与对照支架相比,所述方法使得在接触所述支架约1周后赋予T细胞群体的代谢活性的提高,所述对照支架包含所述包含高表面积介孔二氧化硅微棒(MSR)的基底层和所述连续的流体支撑的脂质双层(SLB),但不含所述T细胞激活分子和所述T细胞共刺激分子。

63. 权利要求62的方法,其中与对照支架相比,所述方法使得在接触所述支架约1周后赋予T细胞群体的代谢活性约5倍至20倍的提高,所述对照支架包含所述包含高表面积介孔二氧化硅微棒(MSR)的基底层和所述连续的流体支撑的脂质双层(SLB),但不含所述T细胞激活分子和所述T细胞共刺激分子。

64. 权利要求61的方法,其中与包含所述T细胞激活分子和所述T细胞共刺激分子的超顺磁性球形聚合物颗粒(DYNABEAD)相比,所述方法使得在接触所述支架约1周后赋予T细胞群体代谢活性的提高。

65. 权利要求64的方法,其中与包含所述T细胞激活分子和所述T细胞共刺激分子的超顺磁性球形聚合物颗粒(DYNABEAD)相比,所述方法使得在接触所述支架约1周后赋予T细胞群的代谢活性约1倍至10倍的提高。

66. 权利要求54的方法,其中所述扩增的T细胞在接触所述支架后至少约7天是代谢活性的。

67. 权利要求54的方法,其中所述扩增的T细胞在接触所述支架后至少约7天形成聚集体。

68. 权利要求54的方法,其中所述T细胞选择性地扩增以产生CD8⁺T细胞的多克隆群体。

69. 权利要求54的方法,其中所述T细胞选择性地扩增以产生CD4⁺T细胞的多克隆群体。

70. 权利要求54的方法,其中所述T细胞选择性地扩增以产生CD4⁺/FOXP3细胞的多克隆群体。

71. 权利要求54的方法,其中所述T细胞选择性地扩增以产生CD44⁺/CD62L⁻T细胞(效应记忆和/或效应T细胞)的多克隆群体。

72. 权利要求54的方法,其中所述T细胞选择性地扩增以产生CD8⁺/CD69⁺T细胞(激活的T细胞)的多克隆群体。

73. 权利要求54的方法,其中所述T细胞选择性地扩增以产生颗粒酶B⁺CD8⁺T细胞(细胞毒素分泌T细胞)的多克隆群体。

74. 权利要求54的方法,其中所述T细胞选择性地扩增以产生IFN γ +T细胞(激活剂细胞因子分泌T细胞)的多克隆群体。

75. 权利要求68-74任一项的方法,其中在接触所述支架约3天后,所述T细胞群体扩增。

76. 权利要求68-74任一项的方法,其中在接触所述支架约5天后,所述T细胞群体扩增。

77. 权利要求54的方法,其中所述操纵包括鉴定或分离耗尽的T细胞和任选地除去所述耗尽的T细胞。

78. 权利要求77的方法,其中所述耗尽的T细胞基于CD8⁺/PD-1⁺的细胞表面表达来鉴定或分离。

79. 权利要求54的方法,其中生物样品获自受试者;并且将权利要求1的支架离体接触所述生物样品以离体操纵所述受试者的T细胞。

80. 权利要求79的方法,其中所述样品接触所述支架约1天至约20天的时间段。

81. 权利要求79的方法,进一步包括检测由操纵的T细胞产生的一种或多种细胞因子或细胞毒素的产生。

82. 权利要求81的方法,还包括进一步检测选自干扰素 γ (IFN γ)、组织坏死因子 α (TNF α)、IL-2、IL-1、IL-4、IL-5、IL-10和IL-13,或其组合的细胞因子的产生。

83. 权利要求82的方法,其中所述操纵的T细胞是T辅助1 (Th1) 细胞,并且所述方法包括检测选自IL-2、干扰素 γ (IFN γ) 和组织坏死因子 α (TNF α),或其组合的细胞因子的产生。

84. 权利要求82的方法,其中所述操纵的T细胞是T辅助2 (Th2) 细胞,并且所述方法包括检测选自IL-4、IL-5、IL-10和IL-13,或其组合的细胞因子的产生。

85. 权利要求54的方法,其中所述操纵的T细胞是细胞毒性T (Tc) 细胞,并且所述方法包括检测选自干扰素 γ (IFN γ) 和淋巴毒素 α (LT α /TNF β) 或其组合的细胞因子的产生。

86. 权利要求54的方法,其中所述操纵的T细胞是细胞毒性T (Tc) 细胞,并且所述方法包括检测选自颗粒酶或穿孔素或其组合的细胞毒素的分泌。

87. 权利要求79的方法,进一步包括检测所述操纵的T细胞中的细胞表面标志物的表达。

88. 权利要求87的方法,其中所述细胞表面标志物选自CD69、CD4、CD8、CD25、CD62L、FOXP3、HLA-DR、CD28和CD134,或其组合。

89. 权利要求87的方法,其中所述细胞表面标志物是选自CD36、CD40和CD44,或其组合的非T细胞标志物。

90. 权利要求54的方法,其中所述受试者是人。

91. 权利要求54的方法,其中所述支架施用于所述受试者以允许包含T细胞的所述生物样品在体内接触所述支架。

92. 权利要求91的方法,其中所述支架在所述受试者中维持约7天的时间段。

93. 一种用于制备权利要求1的支架的方法,包括

(a) 提供包含高表面积介孔二氧化硅微棒 (MSR) 的基底层;

(b) 任选将所述T细胞稳态剂加载至MSR上;

(c) 将连续的流体支撑的脂质双层 (SLB) 在所述包含MSR的基底层上成层,由此产生MSR-SLB复合物;

(d) 如果没有进行步骤(b),则将所述T细胞稳态剂加载于所述MSR-SLB复合物上;

(e) 任选用阻断剂将所述MSR-SLB复合物中的一个或多个非特异性整合位点阻断;和

(f) 将所述T细胞激活分子和所述T细胞共刺激分子加载于所述MSR-SLB复合物上,由此制备权利要求1的支架。

94. 权利要求93的方法,进一步包括组装多个支架以产生具有足够多孔性的堆叠而允许T细胞渗透。

95. 权利要求93的方法,进一步包括加载选自生长因子、细胞因子、白细胞介素、粘附信号传导分子、整联蛋白信号传导分子,或其片段,或其组合的至少一种另外的试剂。

抗原呈递细胞模拟支架及其制备和使用方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2016年7月13日提交的美国临时专利申请号No.62/361,891的优先权,将其完整内容特意按引用并入本文中。

[0003] 政府支持的声明

[0004] 本发明是使用美国国立卫生研究院(U.S.National Institutes of Health)授予的授权号No.EB015498、EB014703和DE013033的政府支持进行的。政府在本发明中具有一定的权利。

背景技术

[0005] 涉及T淋巴细胞(T细胞)的启动(priming)和扩增的免疫治疗对癌症和传染病的治疗仍然抱有希望,特别是在人类中(Melief等,Immunol.Rev.145:167-177(1995);Riddell等,Annu.Rev.Immunol.13:545-586(1995))。目前在病毒感染和/或癌症患者中的过继性转移的研究涉及输注已经在自体同源的树突状细胞(DC)、病毒感染的B细胞和/或同种异体的饲养细胞上体外刺激、克隆和扩增多周的T细胞(Riddell等,Science 257:238-241(1992);Yee等,J.Exp.Med.192:1637-1644(2000),Brodie等,Nat.Med.5:34-41(1999);Riddell等,Hum.Gene Ther.3:319-338(1992),Riddell等,J.Immunol.Methods 128:189-201(1990))。然而,由于过继性T细胞免疫治疗临床试验常常需要数十亿的细胞(Riddell等,1995),现有的体外T细胞扩增方案常常不足以满足这样的试验的需求。

[0006] 此外,最佳的移植在再灌注时需要使用功能性的T细胞,而不是衰老的T细胞。对于临床应用,重要的是确保T细胞具有所需的功能性,即,它们以所需的方式增殖、执行效应子功能和产生细胞因子(Liebowitz等,Current Opinion Oncology,10,533-541,1998)。在自然环境中,通过与抗原呈递细胞(APC)表面上的主要组织相容性复合物(MHC)分子结合的肽-抗原的T细胞受体/CD3复合物(TCR/CD3)的啮合来启动T细胞激活(Schwartz,Science 248:1349)。尽管这是T细胞激活中的主要信号,但对于完全激活,还需要APC和T细胞之间的其他受体-配体相互作用。例如,在没有其他分子相互作用的情况下,TCR刺激可以诱导无能(anergy)状态,使得这些细胞不能响应再刺激时的完全激活信号(Schwartz,1990;Harding等,Nature 356:607,1992;Dudley等,Clinical Cancer Research.,16,6122-6131,2010;Rosenberg等,Clinical Cancer Research.,17,4550-4557,2011)。在可选方式中,通过单独的TCR啮合激活时,T细胞可能通过程序化细胞死亡(凋亡)而死亡(Webb等,Cell 63:1249,1990;Kawabe等,Nature 349:245,1991;Kabelitz等,Int.Immunol.4:1381,1992;Groux等,Eur J.Immunol.23:1623,1993)。

[0007] 因此,通过使用第二信号传导分子,例如,膜结合蛋白或APC的分泌产物,可以给予最佳的功能性。在膜结合蛋白的情况中,这样的次级相互作用通常在性质上是粘附性的,加强了两个细胞之间的接触(Springer等,Ann.Rev.Immunol.5:223,1987)。还可能涉及其他信号传导分子,如其他激活信号从APC传导至T细胞(Bierer等,Adv.Cancer Res.56:49,1991)。例如,CD28是存在于人类中的80%外周T细胞上的表面糖蛋白并且存在于静息和激

活的T细胞上。CD28结合B7-1 (CD80) 或B7-2 (CD86) 并且是已知的共刺激分子最有效的之一 (June等, *Immunol. Today* 15:321 (1994), Linsley等, *Ann. Rev. Immunol.* 11:191 (1993))。T细胞上的CD28连接与TCR啮合结合诱导白细胞介素-2 (IL-2) 的产生 (June等, 1994; Jenkins等, 1993; Schwartz, 1992)。分泌的IL-2是用于离体T细胞扩增的重要因子 (Smith等, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 332:423-432 (1979); Gillis等, *Nature* 268:154-156 (1977))。

[0008] T细胞的共刺激已经显示出影响T细胞激活的多种方面 (June等, 1994)。其降低了诱导培养物中的增殖响应需要的抗CD3的浓度 (Gimmi等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:6575 (1991))。CD28共刺激也通过基因表达的转录和转录后调控显著增强了辅助T细胞的淋巴因子产生 (Lindsten等, *Science* 244:339 (1989); Fraser等, *Science* 251:313 (1991))，并且可以激活细胞毒性T细胞的细胞溶解潜能。体内CD28共刺激的抑制可以阻断异种移植排斥，并且同种异体移植排斥显著延迟 (Lenschow等, *Science* 257:789 (1992); Turka等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11102 (1992))。

[0009] 更重要地，上述用于刺激/共刺激性刺激的效应子已经广泛用于体外T细胞操纵的情况中。在这点上，抗CD3单克隆抗体 (第一信号) 和抗CD28单克隆抗体 (第二信号) 的结合最常用于刺激APC。将抗体固定于固体表面上时，抗CD3和抗CD28单克隆抗体提供的信号被最佳地递送至T细胞，所述固体表面如塑料板 (Baroja等, *Cellular Immunology*, vol. 120, 205-217, 1989; Damle等, *The Journal of Immunology*, vol. 143, 1761-1767, 1989) 或琼脂糖珠 (Anderson等, *Cellular Immunology*, vol. 115, 246-256, 1988)。还参见授权于June等的美国专利No. 6,352,694。

[0010] 已经研发了含有抗CD3和抗CD28单克隆抗体的各种表面和试剂，用于获得和扩增用于各种应用的T细胞。例如，Levine等 (*The Journal of Immunology*, vol. 159, No. 12: pp. 5921-5930, 1997) 公开了含有抗CD3和抗CD28单克隆抗体的具有4.5微米 (μM) 直径的甲苯磺酰基-激活的顺磁珠，其可以用于刺激和增殖T细胞并诱导它们产生促炎性细胞因子。还已经证明，用这些珠子激活的T细胞呈现出使其可能用于过继性免疫治疗的特性，如细胞因子产生 (Garlie等, *J Immunother* 22 (4):336-45, 1999; Shibuya等, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, vol. 126, No. 4:473-479, 2000)。这些珠可以依据商品名DYNABEADS CD3/CD28T-细胞扩增从Thermo-Fisher Scientific, Inc. 购得。

[0011] 在细胞疗法中使用用于T细胞扩增的具有固定的单克隆抗体的顺磁珠需要在患者输注前从T细胞分离和除去珠子。这是非常费力的过程并且导致细胞损耗、细胞损伤、提高的污染风险和增加的加工成本。由于珠子上固定的单克隆抗体与靶T-细胞表面上的相应配体的紧密结合，从T细胞除去珠子是困难的。常常通过等待直至T细胞将靶抗原内在化并且随后使用机械破坏技术来分离珠子与T细胞，从而分离珠-细胞缀合物。这种技术可以引起T细胞的损伤并且还可以引起T细胞上连接的抗原从细胞表面除去 (Rubbi等, *Journal of Immunology Methods*, 166, 233-241, 1993)。此外，由于激活的T细胞对于用于细胞治疗方案中常常是最需要的，并且在24-72小时等待时间期间失去理想的细胞特性，因此顺磁分离在过继性细胞治疗情况中具有有限的使用。

[0012] 用于分离和纯化粘附于顺磁珠的细胞的技术在临床情况中也是不可用的。例如，与T细胞分离后取出顺磁珠的方法需要将细胞/珠溶液通过磁铁。这个方法尽管在很大程度上降低了保持与T细胞一起的珠子数量，但没有完全消除珠子。将含有珠子的组合物植入患

者中可以引起毒性作用。珠除去过程也降低了可用于治疗的T细胞的数量,因为许多T细胞保持与顺磁珠相结合,即使在机械解离后。对于经操纵但没有另外结合于珠子的T细胞,也发生了一定的细胞损失,因为这些细胞在内在化和/或机械去除步骤前洗掉了。

[0013] 因此,对于允许T细胞分离的组合物和方法存在着尚未满足的需求,所述T细胞可以容易地用于人类疾病的治疗,如免疫缺陷障碍、自身免疫障碍和癌症。以下详细描述的本发明的实施方式解决了这些需求。

发明内容

[0014] 本发明提供了用于操纵(例如,激活、刺激、扩增、增殖或赋能)T细胞的组合物和方法。在这一点上,本发明的实施方式提供了用于产生大量激活的T细胞(或基本上纯的亚群)的方法,所述激活的T细胞表达某些标志物和/或细胞表面受体或产生对于T细胞介导的免疫应答最佳的某些细胞因子。这样操纵的T细胞可以用于许多疾病的治疗和预防中,如癌症、传染病、自身免疫疾病、过敏、与衰老相关的免疫功能障碍,或其中对于治疗需要T细胞的任何其他疾病状态。本文中所述的另外的实施方式涉及通过利用具有最佳反应性的T细胞有效地治疗上述任一疾病的方法和组合物,所述细胞使用本发明的组合物和/或方法选择或筛选。本发明的组合物和方法比现有的组合物和方法更有效,不仅是对于产生大量的激活的T细胞的能力而言,而且还涉及这样的T细胞在体内环境中显著提高的有效性。因此,本发明的组合物和方法对于产生用于移植、自体转移和用于治疗应用的高度合乎需要的人T淋巴细胞是有用的。

[0015] 因此,在一个实施方式中,本发明提供了抗原呈递细胞模拟支架(APC-MS),其包括包含高表面积介孔二氧化硅微棒(MSR)的基底层;于MSR基底层成层上的连续的、流体支撑的脂质双层(SLB);吸附于支架上的多种T细胞激活分子和T细胞共刺激分子;和吸附于支架上的多种T细胞稳态剂(homeostatic agent)。

[0016] 在一个实施方式中,本发明提供了抗原呈递细胞模拟支架(APC-MS),其隔离(sequester)选自自然杀伤(NK)细胞、CD3+T细胞、CD4+T细胞、CD8+T细胞和调节T细胞(Treg)的T细胞,或其组合。

[0017] 在一个实施方式中,本发明提供了含有多重吸附于SLB层上的T细胞稳态剂的抗原呈递细胞模拟支架(APC-MS)。

[0018] 在一个实施方式中,本发明提供了含有多重吸附于MSR层上的T细胞稳态剂的抗原呈递细胞模拟支架(APC-MS)。

[0019] 在一个实施方式中,本发明提供了含有多重以受控释放方式从支架释放的T细胞稳态剂的抗原呈递细胞模拟支架(APC-MS)。在一些实施方式中,所述T细胞稳态剂在1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、30天、35天、40天、45天、50天、60天、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月或更长的时间段内以受控释放方式从支架释放。

[0020] 在一个实施方式中,本发明提供了含有多重以持续方式从支架释放长达15天的T细胞稳态剂的抗原呈递细胞模拟支架(APC-MS)。在一些实施方式中,T细胞稳态剂以持续方式从支架释放长达1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、

15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、30天、35天、40天、45天、50天、60天、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月或更长。在一些实施方式中，T细胞稳态剂以持续方式从支架释放至少30天。在一些实施方式中，T细胞稳态剂以持续方式从支架释放至少1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、30天、35天、40天、45天、50天、60天、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月或更长。

[0021] 在一个实施方式中，本发明提供了含有多种T细胞稳态剂的抗原呈递细胞模拟支架 (APC-MS)，所述T细胞稳态剂选自IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-21和转化生长因子 β (TGF- β)，或其激动剂，其模拟物，其变体，其功能性片段，或其组合。

[0022] 在一个实施方式中，本发明提供了含有多种T细胞稳态剂的抗原呈递细胞模拟支架 (APC-MS)，所述T细胞稳态剂是IL-2，其激动剂，其模拟物，其变体，其功能性片段，或其与选自IL-7、IL-21、IL-15和IL-15超激动剂的第二稳态剂的组合物。在一个实施方式中，所述T细胞稳态剂可以选自包含IL-2的前30个氨基酸 (p1-30) 的N-末端IL-2片段、IL-2superkine肽和IL-2部分激动剂肽，或其组合。

[0023] 在另一个实施方式中，本发明涉及含有多种激活和共刺激分子的抗原呈递细胞模拟支架 (APC-MS)，其中T细胞激活分子和T细胞共刺激分子各自独立地吸附于流体支撑的脂质双层 (SLB) 上。在一个实施方式中，T细胞激活分子和T细胞共刺激分子可以通过亲和性配对或化学偶联吸附。在一些实施方式中，化学偶联包括点击化学试剂 (例如，DBCO或叠氮化物)。在一个实施方式中，T细胞激活分子和T细胞共刺激分子可以通过亲和性配对吸附，所述亲和性配对包括生物素-抗生物素蛋白链菌素对、抗体-抗原对、抗体-半抗原对、适体亲和性对、捕获蛋白对、Fc受体-IgG对、金属-螯合脂质对、金属-螯合脂质-组氨酸 (HIS) 标记蛋白对，或其组合。在一个实施方式中，T细胞激活分子和T细胞共刺激分子可以通过化学偶联吸附，所述化学偶联包括叠氮化物-炔烃化学 (AAC) 反应、二苯并-环辛炔连接 (DCL) 或四嗪-烯烃连接 (TAL)。

[0024] 在另一个实施方式中，本发明涉及含有多种激活和共刺激分子的抗原呈递细胞模拟支架 (APC-MS)，其中T细胞激活分子和T细胞共刺激分子各自独立地覆盖于流体支撑的脂质双层 (SLB) 上。或者，在另一个实施方式中，本发明涉及含有多种激活和共刺激分子的抗原呈递细胞模拟支架 (APC-MS)，其中T细胞激活分子和T细胞共刺激分子各自独立地部分包埋在流体支撑的脂质双层 (SLB) 上。

[0025] 在另一个实施方式中，本发明涉及含有多种激活和共刺激分子的抗原呈递细胞模拟支架 (APC-MS)，其中T细胞激活分子和T细胞共刺激分子各自独立地吸附于介孔二氧化硅微棒 (MSR) 上。

[0026] 在另一个实施方式中，本发明涉及含有多种激活和共刺激分子的抗原呈递细胞模拟支架 (APC-MS)，其中T细胞激活分子和T细胞共刺激分子各自独立地是抗体分子或其抗原结合片段。

[0027] 在另一个实施方式中，本发明涉及含有多种激活和共刺激分子的抗原呈递细胞模拟支架 (APC-MS)，其中T细胞激活分子选自抗CD3抗体或其抗原结合片段、抗CD2抗体或其抗

原结合片段、抗CD47抗体或其抗原结合片段、抗巨噬细胞清道夫受体 (MSR1) 抗体或其抗原结合片段、抗T细胞受体 (TCR) 抗体或其抗原结合片段、主要组织相容性复合物 (MHC) 分子或其加载有MHC肽的多聚体及MHC-免疫球蛋白 (Ig) 缀合物或其多聚体,或其组合。

[0028] 在另一个实施方式中,本发明涉及含有多种激活和共刺激分子的抗原呈递细胞模拟支架 (APC-MS),其中T细胞共刺激分子是抗体或其抗原结合片段,其特异性地结合选自以下的共刺激抗原:CD28、4.1BB (CD137)、OX40 (CD134)、CD27 (TNFRSF7)、GITR (CD357)、CD30 (TNFRSF8)、HVEM (CD270)、LT β R (TNFRSF3)、DR3 (TNFRSF25)、ICOS (CD278)、CD226 (DNAM1)、CRTAM (CD355)、TIM1 (HAVCR1、KIM1)、CD2 (LFA2、OX34)、SLAM (CD150、SLAMF1)、2B4 (CD244、SLAMF4)、Ly108 (NTBA、CD352、SLAMF6)、CD84 (SLAMF5)、Ly9 (CD229、SLAMF3)、CD279 (PD1) 和 CRACC (CD319、BLAME)。

[0029] 在另一个实施方式中,本发明涉及含有多种激活和共刺激分子的抗原呈递细胞模拟支架 (APC-MS),其中T细胞激活分子和T细胞共刺激分子包括双特异性抗体或其抗原结合片段。

[0030] 在另一个实施方式中,本发明涉及含有多种激活和共刺激分子的抗原呈递细胞模拟支架 (APC-MS),其中T细胞激活分子和T细胞共刺激分子包括选自CD3/CD28、任选与CD28一起的CD3/ICOS、任选与CD28一起的CD3/CD27及任选与CD28一起的CD3/CD137,或其组合的对。

[0031] 在另一个实施方式中,本发明涉及抗原呈递细胞模拟支架 (APC-MS),其进一步包括特异性地结合Fc-融合蛋白的免疫球蛋白分子。

[0032] 在另一个实施方式中,本发明涉及抗原呈递细胞模拟支架 (APC-MS),其进一步包括选自以下的募集化合物:粒细胞巨噬细胞-集落刺激因子 (GM-CSF)、趋化因子 (C-C基序) 配体21 (CCL-21)、趋化因子 (C-C基序) 配体19 (CCL-19)、C-X-C基序趋化因子配体12 (CXCL12)、干扰素 γ (IFN γ) 或FMS-样酪氨酸激酶 (Flt-3) 配体,或其激动剂,其模拟物,其变体,其功能性片段,或其组合。在一个实施方式中,支架进一步包括募集化合物,其是粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF),或其激动剂,其模拟物,其变体,或其功能性片段。

[0033] 在另一个实施方式中,本发明涉及抗原呈递细胞模拟支架 (APC-MS),其进一步包括抗原。在一个实施方式中,所述抗原包括肿瘤抗原。在这个实施方式下更进一步地,所述肿瘤抗原选自MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、CEA、酪氨酸酶、midkin、BAGE、CASP-8、 β -连环蛋白、 β -连环蛋白、 γ -连环蛋白、CA-125、CDK-1、CDK4、ESO-1、gp75、gp100、MART-1、MUC-1、MUM-1、p53、PAP、PSA、PSMA、ras、trp-1、HER-2、TRP-1、TRP-2、IL13R α 、IL13R α 2、AIM-2、AIM-3、NY-ESO-1、C9orf112、SART1、SART2、SART3、BRAP、RTN4、GLEA2、TNKS2、KIAA0376、ING4、HSPH1、C13orf24、RBPSUH、C6orf153、NKTR、NSEP1、U2AF1L、CYNL2、TPR、SOX2、GOLGA、BMI1、COX-2、EGFRvIII、EZH2、LICAM、Livin、Livin β 、MRP-3、巢蛋白、OLIG2、ART1、ART4、B-细胞周期蛋白、Gli1、Cav-1、组织蛋白酶 (cathepsin) B、CD74、E-钙粘蛋白、EphA2/Eck、Fra-1/Fosl1、GAGE-1、神经节苷脂/GD2、GnT-V、 β 1,6-N、Ki67、Ku70/80、PROX1、PSCA、SOX10、SOX11、生存素、UPAR、WT-1、二肽基肽酶IV (DPPIV)、腺苷脱氨酶结合蛋白 (AD Abp)、亲环蛋白b、结直肠癌相关抗原 (CRC)-C017-1A/GA733、T-细胞受体/CD3- ξ 链、肿瘤抗原的GAGE-家族、RAGE、LAGE-I、NAG、GnT-V、RCAS1、 α -甲胎蛋白、p120ctn、Pmel117、PRAME、脑糖原磷酸化酶、SSX-I、SSX-2 (HOM-MEL-40)、SSX-I、SSX-4、SSX-5、SCP-I、CT-7、cdc27、腺瘤性结肠息肉蛋白 (APC)、

fodrin、P1A、连接蛋白37、Ig-独特型、p15、GM2、GD2神经节苷脂、肿瘤抗原的Smad家族、1mp-1、EBV编码的核抗原(EBNA)-I、UL16-结合蛋白样转录物1(Mult1)、RAE-1蛋白、H60、MICA、MICB、c-erbB-2、以患者特异性方式鉴定的新抗原,或其免疫原性肽,或其组合。

[0034] 在相关的实施方式中,本发明涉及抗原呈递细胞模拟支架(APC-MS),包括包含高表面积介孔二氧化硅微棒(MSR)的基底层;于MSR基底层上成层的连续的、流体支撑的脂质双层(SLB);吸附于支架上的多种T细胞激活分子和T细胞共刺激分子;和吸附于支架上的多种T细胞稳态剂,其中支撑的脂质双层(SLB)与介孔二氧化硅微棒(MSR)的重量比在约10:1至约1:20之间。在一个实施方式中,重量比反映加载前的SLB与MSR的比例。在另一个实施方式中,调节重量比以获得所需的支架组成。在一个实施方式中,SLB与MSR的重量比可以在约9:1至约1:15,之间,约5:1至约1:10之间,约3:1至约1:5之间,包括之间所有的比例,例如,约3:1,约2:1,约1:1,约1:2,约1:3,约1:4,约1:5,约1:6,约1:7,约1:8,约1:9,约1:10。

[0035] 在另一个实施方式中,本发明涉及抗原呈递细胞模拟支架(APC-MS),包括包含高表面积介孔二氧化硅微棒(MSR)的基底层;于MSR基底层上成层的连续的、流体支撑的脂质双层(SLB);吸附于支架上的多种T细胞激活分子和T细胞共刺激分子;和吸附于支架上的多种T细胞稳态剂,其中连续的流体支撑的脂质双层(SLB)包括包含14至23个碳原子的脂质。在一个实施方式中,所述脂质是磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酸(PA)、磷脂酰丝氨酸(PS)或磷酸肌醇,或其衍生物。在一个实施方式中,APC-MS包括流体支撑的脂质双层(SLB),其包含选自二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱(DMPC)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)、二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)、棕榈酰基-油酰基磷脂酰胆碱(POPC)、二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)、二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)、二肉豆蔻酰基磷脂酰乙醇胺(DMPE)和二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(DPPE)或其组合的脂质。在一些实施方式中,脂质双层包括模拟哺乳动物细胞膜(例如,人细胞质膜)的脂质组成的脂质组合物。许多哺乳动物细胞膜的脂质组成已经被表征并且是本领域技术人员容易确定的(参见,例如,Essaid等,Biochim.Biophys.Acta 1858(11):2725-36(2016),将其完整内容按引用并入本文中)。在一些实施方式中,脂质双层包括胆固醇。在一些实施方式中,脂质双层包括鞘脂。在一些实施方式中,脂质双层包括磷脂。在一些实施方式中,所述脂质是磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷酸肌醇、具有包含6-20个碳的饱和或不饱和尾的鞘磷脂,或其组合。

[0036] 在另一个实施方式中,本发明涉及抗原呈递细胞模拟支架(APC-MS),包括包含高表面积介孔二氧化硅微棒(MSR)的基底层;于MSR基底层上成层的连续的、流体支撑的脂质双层(SLB);吸附于支架上的多种T细胞激活分子和T细胞共刺激分子;和吸附于支架上的多种T细胞稳态剂,其中介孔二氧化硅微棒-脂质双层(MSR-SLB)支架保持连续的、流体架构至少14天。在一些实施方式中,MSR-SLB支架保持连续的、流体架构1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、25天、30天、35天、40天、50天或更长。在一些实施方式中,MSR-SLB支架的MSR在约1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、25天、30天、35天、40天、50天或更长时间内降解。在一些实施方式中,MSR-SLB支架的脂质双层在约1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、25天、30天、35天、40天、450天或更长时间内降解。

[0037] 在另一个实施方式中,本发明涉及抗原呈递细胞模拟支架(APC-MS),包括包含高

表面积介孔二氧化硅微棒 (MSR) 的基底层;于MSR基底层上成层的连续的、流体支撑的脂质双层 (SLB);吸附于支架上的多种T细胞激活分子和T细胞共刺激分子;和吸附于支架上的多种T细胞稳态剂,其中介孔二氧化硅微棒 (MSR) 与T细胞激活/共刺激分子的干重比在约1:1至约50:1之间。在一个实施方式中,MSR与T细胞激活/共刺激分子的比例是MSR重量与用作T细胞激活/共刺激分子的抗体的重量的反映。在另一个实施方式中,调节MSR:抗体重量比以获得所需的支架组成。在一个实施方式中,SLB与抗体组合物的重量比为约2:1至约20:1之间,约3:1至约10:1之间,约4:1至约8:1之间,包括其中所有的比例,例如,约1:1,约2:1,约3:1,约4:1,约5:1,约6:1,约7:1,约8:1,约9:1,约10:1,约15:1,约20:1,约25:1,约30:1,约40:1。

[0038] 在另一个实施方式中,本发明涉及抗原呈递细胞模拟支架 (APC-MS),包括包含高表面积介孔二氧化硅微棒 (MSR) 的基底层;于MSR基底层上成层的连续的、流体支撑的脂质双层 (SLB);吸附于支架上的多种T细胞激活分子和T细胞共刺激分子;和吸附于支架上的多种T细胞稳态剂,其中将支架堆叠以选择性地允许T细胞渗入介孔二氧化硅微棒 (MSR) 中。在一个实施方式中,本发明进一步提供其中T细胞激活和/或共刺激分子以足以允许原位操纵T细胞的浓度存在于支架上的APC-MS。

[0039] 在另一个方面中,本发明涉及包含抗原呈递细胞模拟支架 (APC-MS) 和药物学上可接受载体的药物组合物,所述抗原呈递细胞模拟支架包括包含高表面积介孔二氧化硅微棒 (MSR) 的基底层;于MSR基底层上成层的连续的、流体支撑的脂质双层 (SLB);吸附于支架上的多种T细胞激活分子和T细胞共刺激分子;和吸附于支架上的多种T细胞稳态剂。在一个实施方式中,本发明进一步提供了配制用于静脉内给药、皮下给药、腹膜内给药或肌内给药的药物组合物。

[0040] 在另一个方面中,本发明涉及包括抗原呈递细胞模拟支架 (APC-MS) 和在其中成簇的T细胞的药物组合物,所述抗原呈递细胞模拟支架包括包含高表面积介孔二氧化硅微棒 (MSR) 的基底层;于MSR基底层上成层的连续的、流体支撑的脂质双层 (SLB);吸附于支架上的多种T细胞激活分子和T细胞共刺激分子;和吸附于支架上的多种T细胞稳态剂。在一个实施方式中,本发明进一步提供含有APC-MS和选自自然杀伤 (NK) 细胞、CD3+T细胞、CD4+T细胞、CD8+T细胞和调节T细胞 (Treg) 或其组合的T细胞的组合物。

[0041] 再进一步,本发明的实施方式涉及治疗需要的受试者中的疾病的方法,包括将包含获自受试者的T细胞群体的样品接触抗原呈递细胞模拟支架 (APC-MS),由此激活、共刺激和稳态地维持T细胞群体;任选扩增T细胞群体;并将激活的、共刺激的、维持的和任选扩增的T细胞给药于受试者,由此治疗受试者的疾病。在一个实施方式中,本发明进一步提供了治疗需要的受试者中的疾病的方法,其中所述方法进一步包括在给药步骤前,重新刺激T细胞群体。在一个实施方式中,所述方法包括在接触支架2天至5天的时间段后扩增T细胞群体。

[0042] 在另一个治疗实施方式中,本发明涉及治疗需要的受试者中的疾病的方法,包括将样品接触抗原呈递细胞模拟支架 (APC-MS),所述样品是包含获自受试者的T细胞群体的血液样品、骨髓样品、淋巴样品或脾脏样品,由此激活、共刺激和稳态地维持T细胞群体;任选扩增T细胞群体;并将激活的、共刺激的、维持的和任选扩增的T细胞给药于受试者,由此治疗受试者中的疾病。在一个实施方式中,受试者是人受试者。在一个实施方式中,所述方

法提供了癌症的治疗,并且所述支架包括至少一种细胞毒性T细胞特异性激活分子和至少一种细胞毒性T细胞特性共刺激分子。

[0043] 在另一个治疗实施方式中,本发明涉及治疗需要的受试者中的癌症的方法,包括将包含获自受试者的T细胞群体的样品接触抗原呈递细胞模拟支架(APC-MS),由此激活、共刺激和稳态地维持T细胞群体;任选扩增T细胞群体;并将激活的、共刺激的、维持的和任选扩增的T细胞给药于受试者,由此治疗受试者中的癌症。在一个实施方式中,所述癌症选自头颈癌、乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、食道癌、骨癌、睾丸癌、宫颈癌、胃肠癌、成胶质细胞瘤、白血病、淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、肺部的肿瘤前病变、结肠癌、黑素瘤和膀胱癌。在一个实施方式中,所述方法可以进一步包括从样品和/或扩增的细胞群体裁分选和任选富集细胞毒性T细胞。

[0044] 在再另一个治疗实施方式中,本发明涉及治疗需要的受试者中的免疫缺陷障碍的方法,包括将包含获自受试者的T细胞群体的样品接触抗原呈递细胞模拟支架(APC-MS),由此激活、共刺激和稳态地维持T细胞群体;任选扩增T细胞群体;并将激活的、共刺激的、维持的和任选扩增的T细胞给药于受试者,由此治疗受试者中的免疫缺陷障碍。在一个实施方式中,所述支架包括至少一种辅助T细胞(Th)特异性激活分子和至少一种辅助T细胞(Th)特异性共刺激分子。在一个实施方式中,所述方法可以用于治疗选自原发性免疫缺陷障碍和获得性免疫缺陷障碍的免疫缺陷障碍。在一个实施方式中,所述方法可以用于治疗获得性缺陷免疫综合征(AIDS)或选自DiGeorge综合征(DGS)、染色体断裂综合征(CBS)、共济失调毛细血管扩张症(AT)和Wiskott-Aldrich综合征(WAS),或其组合的遗传性障碍。

[0045] 在另一个实施方式中,本发明涉及治疗需要的受试者中的疾病的方法,包括将包含获自受试者的T细胞群体的样品接触抗原呈递细胞模拟支架(APC-MS),由此激活、共刺激和稳态地维持T细胞群体;任选扩增T细胞群体;进一步从样品和/或扩增的细胞群体分选和任选富集T细胞;并将激活的、共刺激的、维持的和任选扩增的T细胞给药于受试者,由此治疗受试者中的疾病。在一个实施方式中,T细胞可以选自自然杀伤(NK)细胞、CD3+T细胞、CD4+T细胞、CD8+T细胞和调节T细胞(Treg),或其组合。

[0046] 在另一个实施方式中,本发明涉及治疗需要的受试者中的自身免疫障碍的方法,包括将包含获自受试者的T细胞群体的样品接触抗原呈递细胞模拟支架(APC-MS),由此激活、共刺激和稳态地维持T细胞群体;任选扩增T细胞群体;进一步任选从样品和/或扩增的细胞群体分选和富集T细胞;并将激活的、共刺激的、维持的和任选扩增的T细胞给药于受试者,由此治疗受试者中的自身免疫障碍。

[0047] 在另一个实施方式中,本发明涉及治疗需要的受试者中的疾病的方法,包括将包含获自受试者的T细胞群体的样品接触抗原呈递细胞模拟支架(APC-MS),由此激活、共刺激和稳态地维持T细胞群体;任选扩增T细胞群体;进一步任选从样品和/或扩增的细胞群体分选和富集T细胞;并将激活的、共刺激的、维持的和任选扩增的T细胞皮下或静脉内给药于受试者,由此治疗受试者中的疾病。在一个实施方式中,可以通过将样品接触支架约1天至约20天的时间段来激活、共刺激、稳态地维持和任选扩增T细胞。

[0048] 在另一个实施方式中,本发明涉及用于操纵T细胞的方法,包括将抗原呈递细胞模拟支架(APC-MS)接触受试者的生物样品,由此激活、共刺激、稳态地维持和任选扩增样品内存在的T细胞群体,由此操纵T细胞。在一个实施方式中,所述操纵可以包括T细胞的刺激、激

活、生活力的改变、生长的促进、分裂、分化、扩增、增殖、耗尽、无能、休眠、凋亡、死亡。在一个实施方式中,所述操纵优选包括促进T细胞的扩增或增殖。在其他的实施方式中,可以进一步转化操纵的T细胞。在特定的实施方式中,可以转化T细胞以表达嵌合抗原受体(CAR)。可以通过用含有对CAR T细胞特异性的抗原的抗原呈递细胞模拟支架(APC-MS)孵育来进一步扩增CAR T-细胞产物。在某些实施方式中,CAR T细胞特异性抗原选自CD19、CD22,或其片段或其变体。在一些实施方式中,CAR T-细胞特异性抗原是肿瘤抗原。肿瘤抗原是本领域公知的,并且包括,例如,神经胶质瘤相关抗原、癌胚抗原(CEA)、 β -人绒毛膜促性腺激素、 α 甲胎蛋白(AFP)、凝集素-反应性AFP、甲状腺球蛋白、RAGE-1、MN-CA IX、人端粒酶逆转录酶、RU1、RU2(AS)、肠羧基酯酶、mut hsp70-2、M-CSF、前列腺酶(prostase)、前列腺特异性抗原(PSA)、PAP、NY-ESO-1、LAGE-1a、p53、prostein、PSMA、Her2/neu、生存素和端粒酶、前列腺癌肿瘤抗原-1(PCTA-1)、MAGE、ELF2M、嗜中性粒细胞弹性蛋白酶、蝶素(ephrein) B2、CD22、胰岛素生长因子(IGF)-I、IGF-II、IGF-I受体和间皮素。在一些实施方式中,CAR T-细胞产物可以在产生后多克隆地扩增,以产生较大的CAR T-细胞群体。

[0049] 在另一个实施方式中,本发明涉及用于操纵T细胞的方法,包括接触抗原呈递细胞模拟支架(APC-MS),其中与对照支架相比,所述方法使得在接触支架约1周后给予T细胞群体扩增的提高,所述对照支架包括包含高表面积介孔二氧化硅微棒(MSR)的基底层和连续的流体支撑的脂质双层(SLB),但不含T细胞激活分子和T细胞共刺激分子。在一个实施方式中,与对照支架相比,所述方法使得在接触支架约1周后T细胞群体的扩增提高约50倍至800倍,所述对照支架包括包含高表面积介孔二氧化硅微棒(MSR)的基底层和连续的流体支撑的脂质双层(SLB),但不含T细胞激活分子和T细胞共刺激分子。

[0050] 在另一个实施方式中,本发明涉及用于操纵T细胞的方法,包括接触抗原呈递细胞模拟支架(APC-MS),其中与包括T细胞激活分子和T细胞共刺激分子的超顺磁性球形聚合物颗粒(DYNABEAD)相比,所述方法使得在接触支架约1周后给予T细胞群体扩增的提高。在一个实施方式中,与包括T细胞激活分子和T细胞共刺激分子的超顺磁性球形聚合物颗粒(DYNABEAD)相比,所述方法使得在接触支架约1周后T细胞群体的扩增提高约5倍至20倍。

[0051] 在另一个实施方式中,本发明涉及用于提高T细胞的代谢活性的方法,包括将抗原呈递细胞模拟支架(APC-MS)接触受试者的生物样品,由此激活、共刺激、稳态地维持和任选扩增样品内存在的T细胞群体,由此提高T细胞的代谢活性。在一个实施方式中,与对照支架相比,所述方法使得在接触支架约1周后给予T细胞群体代谢活性的提高,所述对照支架包括包含高表面积介孔二氧化硅微棒(MSR)的基底层和连续的流体支撑的脂质双层(SLB),但不含T细胞激活分子和T细胞共刺激分子。在一个实施方式中,与对照支架相比,所述方法使得在接触支架约1周后T细胞群体的代谢活性提高约5倍至20倍,所述对照支架包括包含高表面积介孔二氧化硅微棒(MSR)的基底层和连续的流体支撑的脂质双层(SLB),但不含T细胞激活分子和T细胞共刺激分子。在一个实施方式中,与包括T细胞激活分子和T细胞共刺激分子的超顺磁性球形聚合物颗粒(DYNABEAD)相比,所述方法使得在接触支架约1周后给予T细胞群体代谢活性的提高。在一个实施方式中,与包括T细胞激活分子和T细胞共刺激分子的超顺磁性球形聚合物颗粒(DYNABEAD)相比,所述方法进一步使得在接触支架约1周后T细胞群的扩增提高约1倍至10倍。

[0052] 在另一个实施方式中,本发明涉及用于筛选代谢活性的T细胞的方法,包括将抗原

呈递细胞模拟支架 (APC-MS) 接触受试者的生物样品, 由此激活、共刺激、稳态地维持和任选扩增样品内存在的T细胞群体; 鉴定激活的、共刺激的、稳态维持的和任选扩增的T细胞群体中的代谢活性细胞; 由此筛选代谢活性的T细胞。在一个实施方式中, 扩增的T细胞保持代谢活性至少接触支架后约7天。在一个实施方式中, 扩增的T细胞形成聚集物至少接触支架后约7天。

[0053] 再在另一个实施方式中, 本发明涉及用于产生多克隆T细胞群体的方法, 包括将抗原呈递细胞模拟支架 (APC-MS) 接触受试者的生物样品, 由此激活、共刺激、稳态地维持和任选扩增样品内存在的T细胞群体; 基于扩增的T细胞中多种标志物的表达从扩增的T细胞群体鉴定特定的T细胞群体; 任选分离或纯化鉴定的T细胞群体, 由此产生T细胞的多克隆群体。在一个实施方式中, 所述方法可以用于产生CD4⁺细胞或CD8⁺细胞的多克隆群体。在相关实施方式中, 所述方法可以用于产生CD4⁺/FOXP3⁺T细胞的多克隆群体。再进一步, 所述方法可以适应于产生CD44⁺/CD62L⁺T细胞 (效应子记忆和/或效应子T细胞) 的多克隆群体。在另一个实施方式中, 所述方法可以用于产生CD8⁺/CD69⁺T细胞 (激活的T细胞) 的多克隆群体。在另一个实施方式中, 所述方法可以用于产生颗粒酶B⁺CD8⁺T细胞 (分泌细胞毒性的T细胞) 的多克隆群体。在再另一个实施方式中, 所述方法可以用于产生IFN γ +T细胞 (分泌激活细胞因子的T细胞) 的多克隆群体。在再另一个实施方式中, 所述方法可以用于产生CD62L⁺/CCR7⁺T细胞 (记忆T细胞) 的多克隆群体。

[0054] 在另一个实施方式中, 本发明涉及用于产生T细胞的多克隆亚群的方法, 包括将抗原呈递细胞模拟支架 (APC-MS) 接触受试者的生物样品, 由此激活、共刺激、稳态地维持和任选扩增样品内存在的T细胞群体; 基于扩增的T细胞中多种标志物的表达从扩增的T细胞群体鉴定特定的耗尽T细胞群体; 任选除去鉴定的T细胞群体, 由此产生T细胞的多克隆亚群。在一个实施方式中, 基于CD8⁺/PD-1⁺的细胞表面表达来鉴定或分离耗尽的T细胞。在另一个实施方式中, 基于LAG3⁺/TIM3⁺的细胞表面表达来鉴定或分离耗尽的T细胞。

[0055] 在另一个实施方式中, 本发明涉及用于离体操纵T细胞的方法, 包括将抗原呈递细胞模拟支架 (APC-MS) 离体接触受试者的生物样品, 由此激活、共刺激、稳态地维持和任选扩增样品内存在的T细胞群体, 由此离体操纵T细胞。在一个实施方式中, 将样品接触支架约1天至约20天的时间段。在一个实施方式中, 所述方法可涉及检测由操纵的T细胞产生的一种或多种细胞因子的产生。在一个实施方式中, 所述方法涉及进一步检测操纵的T细胞的选自干扰素 γ (IFN γ)、组织坏死因子 α (TNF α)、IL-2、IL-1、IL-4、IL-5、IL-10和IL-13、IL-17或其组合的细胞因子的产生。

[0056] 在相关实施方式中, 本发明涉及根据之前方法的用于离体操纵T细胞的方法, 其中操纵的T细胞是T辅助1 (Th1) 细胞, 并且所述方法包括检测选自IL-2、干扰素 γ (IFN γ) 和组织坏死因子 α (TNF α), 或其组合的细胞因子的产生。或者, 在相关实施方式中, 本发明涉及根据之前方法的用于离体操纵T细胞的方法, 其中操纵的T细胞是T辅助2 (Th2) 细胞, 并且所述方法包括检测选自IL-4、IL-5、IL-10和IL-13, 或其组合的细胞因子的产生。再进一步地在相关实施方式中, 本发明涉及根据之前方法的用于离体操纵T细胞的方法, 其中操纵的T细胞是细胞毒性T (Tc) 细胞, 并且所述方法包括检测选自干扰素 γ (IFN γ) 和淋巴毒素 α (LT α /TNF β) 或其组合的细胞因子的产生。在一个实施方式中, 操纵的T细胞是细胞毒性 (Tc) 细胞, 并且所述方法包括检测选自颗粒酶或穿孔素或其组合物的细胞毒素的分泌。

[0057] 在相关实施方式中,本发明涉及根据之前方法的用于离体操纵T细胞的方法,其中所述方法进一步包括检测操纵的T细胞中细胞表面标志物的表达。在一个实施方式中,所述细胞表面标志物选自CD69、CD4、CD8、CD25、CD62L、FOXP3、HLA-DR、CD28和CD134,或其组合。可选地或另外地,在一个实施方式中,所述细胞表面标志物是选自CD36、CD40和CD44,或其组合的非T细胞标志物。

[0058] 在另一个相关实施方式中,本发明涉及根据之前方法的用于离体操纵T细胞的方法,其中所述受试者是人类受试者。

[0059] 在另一个相关实施方式中,本发明涉及根据之前方法的用于体内操纵T细胞的方法,其中将支架施用于受试者以允许包含T细胞的生物样品在体内接触支架。在一个实施方式中,支架可以在受试者中维持约3天至约15天的时间段,优选约7天至约11天的时间段。在一些实施方式中,所述支架可以在受试者中维持至少1天、至少2天、至少3天、至少4天、至少5天、至少6天、至少7天、至少8天、至少9天、至少10天、至少11天、至少12天、至少13天、至少14天、至少15天、至少16天、至少17天、至少18天、至少19天、至少20天、至少21天、至少25天、至少30天、至少35天、至少40天、至少50天或更长的时间段。

[0060] 在再另一个实施方式中,本发明涉及用于制备抗原呈递细胞模拟支架(APC-MS)的方法,包括(a)提供包括高表面积介孔微棒(MSR)的基底层;(b)任选将T细胞稳态剂加载于MSR上;(c)将连续的流体支撑的脂质双层(SLB)于包括MSR的基底层上成层,由此产生MSR-SLB支架;(d)如果没有进行步骤(b),将T细胞稳态剂加载于MSR-SLB支架上;(e)任选用阻断剂阻断MSR-SLB支架中的一个或多个非特异性整合位点;和(f)将T细胞激活分子和T细胞共刺激分子加载于MSR-SLB支架上,由此制得APC-MS。在一个实施方式中,所述方法可以进一步涉及组装多个支架以产生具有允许T细胞渗入的足够的多孔性的堆叠。在一个实施方式中,所述方法可以包括加载选自生长因子、细胞因子、白细胞介素、粘附信号传导分子、整联蛋白信号传导分子,或其片段,或其组合的至少一种另外的试剂。

[0061] 从以下详述和附图将清楚本发明的其他特征和优点。

附图说明

[0062] 图1显示了与介孔二氧化硅微棒(MSR)结合的脂质的相衬和荧光显微镜图像。上图显示了在1:20的脂质:MSR比率下脂质和介孔二氧化硅微棒的合并图(比例尺=200 μ m)。中图显示了在1:4的脂质:MSR比率下脂质和介孔二氧化硅微棒的合并图(比例尺=200 μ m)。下图显示了在较高放大倍数下与MSR结合的脂质的合并相衬显微镜图像(比例尺=20 μ m)。

[0063] 图2A、2B、2C和2D显示抗原呈递细胞模拟支架(APC-MS)的组装和特征取决于脂质的类型和脂质的含量。图2A显示了各种脂质的化学结构。缩写:DOPC-二油酰基磷脂酰胆碱;POPC-棕榈酰-油酰基磷脂酰胆碱;和DSPC-二硬脂酰基磷脂酰胆碱。图2B显示了含有介孔二氧化硅微棒(MSR)和流体支撑的脂质双层(SLB)的各种组合中保留的脂质百分比。在这个实验中,将250 μ g脂质的有效负载输入500 μ g MSR组合中。图2C显示了在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中含有DOPC、POPC或DSPC的各种MSR-SLB组合在37 $^{\circ}$ C下在两周(14天)内的相对荧光变化。图2D显示了在完全Roswell Park Memorial Institute培养基(cRPMI)中含有DOPC、POPC或DSPC的各种MSR-SLB组合在37 $^{\circ}$ C下在两周(14天)内的相对荧光变化。

[0064] 图3显示了各种MSR-SLB组合在PBS中在第0天、第3天、第7天和第14天的稳定性,

如使用相衬和荧光显微镜分析的(脂质涂层)。上图显示了DOPC在MSR-SLB组合物中的稳定性;中图显示了POPC在MSR-SLB组合物中的稳定性;和下图显示了DSPC在MSR-SLB组合物中的稳定性。

[0065] 图4A、4B、4C、4D和4E显示出MSR-SLB流体结构的组装和特征随着时间的变化。图4A显示了在脂质组合物漂白前(pre)、就在漂白后($t=0$)和漂白后5分钟($t=5\text{min}$),在高放大倍数(比例尺= $2\mu\text{m}$)获取的与介孔二氧化硅微棒(MSR)结合的脂质的相衬和荧光显微镜图像。图4B显示了光漂白(FRAP)后随着时间的荧光恢复的变化。在区域(2)中描绘了荧光“源”,在区域(3)中描绘了荧光“沉降(sink)”,且通过区域(1)表示了标准化点。差异分布在接种(seeding)后的早期时间点最佳地看到了并且在大约2min(120s)时实现了平衡。图4C显示了描绘FRAP随着时间的平均变化的平滑-拟合曲线,如源自标准化图像的。图4D和4E显示出脂质组合物漂白前(pre),就在漂白后($t=0$)和漂白后3分钟($t=3\text{min}$)的MSR-SLB流体结构的两组高分辨率图像。

[0066] 图5A和5B显示了含有各种不同部分的MSR-S;B组合物的结构和功能性质。基于使用B3Z报告T细胞系的实验,当所有单个组分存在于支架中时,观察到了APC-MS支架的最大功能性。图5A显示了含有POPC脂质双层的APC-MS的结构示意图,所述POPC脂质双层含有藻红蛋白生物素(生物素PE),其与抗生物素蛋白链菌素分子(例如,抗生物素蛋白链菌素二聚体)缀合,其随后与生物素化的抗体(例如,生物素化的抗CD3抗体或生物素化的抗CD28抗体或另一种特异性的或非特异性的抗体)缀合。图5B显示了用MPS(二氧化硅)、POPC(脂质)、MPS-POPC复合物、生物素化的MPS-POPC复合物(在存在或不存在抗生物素蛋白链菌素的情况下)以及在存在或不存在藻红蛋白生物素(生物素PE)和/或抗生物素蛋白链菌素的情况下的MPS-POPC复合物与生物素化的抗体一起的组合处理后,B3Z报告细胞 β -半乳糖苷酶表达的分光光度分析。在含有所有单个组分-通过抗生物素蛋白链菌素接头与生物素化的抗体缀合的磷酸乙醇胺生物素(生物素PE)的MSR-SLB组合物中观察到了吸光度的显著提高(暗色条;**表示统计学显著性($p<0.001$,使用单因素ANOVA,接着Tukey HSD post-hoc检验进行分析;数据表示三个实验重复的平均 \pm s.d.并且是至少两个独立实验的代表)。

[0067] 图6A和6B显示了IL-2从含有IL-2的MSR-SLB组合物的受控释放。图6A显示了含有IL-2的MSR的多孔结构的电子显微照片(比例尺= 100nm)。图6B显示了在15天时间段内IL-2的累积释放水平的曲线。

[0068] 图7A和7B显示了共焦显微镜图像,其显示出T细胞(球形)渗透入含有MSR-SLB复合材料的抗原呈递细胞模拟支架中。图7A显示了已经用两种不同染料染色的细胞。图7B显示了已经用单一染料染色(表明是活细胞)的细胞。

[0069] 图8显示了结合用原代T细胞共培养的与介孔二氧化硅微棒(MSR)结合的脂质的相衬显微和荧光图像。观察到在T细胞激活信号(cue)连接到材料的表面时,原代T细胞倾向于形成细胞/材料簇。下图显示了含有缀合的抗体、IL-2或缀合的抗体与IL-2组合的MSR-SLB复合材料中的脂质和介孔二氧化硅微棒的合并图。右侧的图像显示了高放大倍数下的含有缀合的抗体和IL-2两者的MSR-SLB复合材料(比例尺= $20\mu\text{m}$)。

[0070] 图9A和9B显示了小鼠脾脏T细胞中抗体诱导的变化的剂量-反应图。图9A显示了用对照支架(模拟;无;仅POPC脂质;以及POPC和IL-2的组合)和实验支架(含有POPC和IL-2的组合,以及抗体)刺激T细胞3天后T细胞的多克隆扩增。研究了抗体的三个不同剂量(1:50、

1:25和1:10的MSR:抗体比率)。图9B显示了用对照支架(模拟;无;仅POPC脂质;以及POPC和IL-2的组合)和实验支架(含有POPC和IL-2的组合,以及抗体)刺激T细胞3天后的IFN γ 分泌。研究了抗体的三个不同剂量(1:50、1:25和1:10的MSR:抗体比率)。

[0071] 图10和11显示本发明的抗原呈递细胞模拟支架(APC-MS)促进了代谢活性T细胞的快速扩增。图10显示了用对照(模拟;无;SLB+IL-2;DYNABEAD+IL-2)或实验组合物孵育时原代T细胞的倍数扩增。与模拟组合物或无SLB的组合物相比,用本发明的组合物孵育原代T细胞明显诱导T细胞扩增(使用或未用再刺激)。更重要地,与DYNABEADS和IL-2的组合物相比,用本发明的支架孵育原代T细胞导致在第7天再刺激时可测量地更强的增殖。图11显示了用加载了IL-2的本发明的支架(SLB/IL2/ABS)或加载了IL-2的DYNABEADS(DYNABEADS-IL2)孵育的T细胞的细胞代谢活性(如通过相对于细胞数标准化的Alamar蓝还原的相对荧光单位(RFU)测量的)的条形图。

[0072] 图12A和12B显示了本发明的支架(APC-MS)给予脾脏T细胞(小鼠)的多克隆扩增并促进T细胞聚集物的形成。图12A显示了在第0天、第3天和第7天,用DYNABEADS或APC-MS孵育时脾脏T细胞的聚集物的显微照片(在4 \times 放大倍数下)。图12B显示了在第0天、第3天和第7天,用DYNABEADS或APC-MS孵育时脾脏T细胞的聚集物的显微照片(在10 \times 放大倍数下)。(白色比例尺=100 μ m)。

[0073] 图13A和13B显示了用APC-MS或DYNABEADS孵育时小鼠脾脏T细胞的多克隆扩增。图13A显示了用APC-MS或DYNABEADS孵育(孵育7天后具有再刺激或IL-2处理)后的各个不同时间点($t=0$ 天、5天、7天、11天和13天)的T细胞群的流式细胞术(FACS)散点图,其中X轴上的值描绘了CD8+染色的强度,而Y轴上的值描绘了CD4+染色的强度。在每个时间点,针对每个样品将流数据相对Fluorescence Minus One (FMO)对照进行门控。数据代表至少两个独立实验。图13B是显示各个不同时间点($t=0$ 天、5天、7天、11天和13天)用APC-MS(方块)或DYNABEADS(三角)孵育后CD4+vs.CD8+T细胞亚群的百分比变化的线图。孵育7天后,将细胞分成两个亚群,其中第一亚群是再刺激的(虚线),而第二亚群用IL-2处理(实线)。将APC-MS用于APC-MS条件的再刺激,DYNABEADS用于再刺激DYNABEADS条件。

[0074] 图14显示了用APC-MS或DYNABEADS孵育时FoxP3+小鼠脾脏T细胞子集的多克隆扩增的测量。在用APC-MS或DYNABEADS(孵育7天后使用再刺激或IL-2处理)后的各个不同时间点($t=0$ 天、5天、7天、11天和13天)以T细胞群体的流式细胞术(FACS)散点图的形式描绘了结果,其中X轴上的值描绘了FoxP3+染色的强度,而Y轴上的值描绘了CD4+染色的强度。将矩形门控用于计数各个不同部分中的FoxP3+细胞的数量和/或比例。如所示的,使用特定的配方,FoxP3+小鼠脾脏T细胞存在有限的扩增或无扩增。

[0075] 图15显示了用APC-MS或DYNABEADS孵育时CD62L+小鼠脾脏T细胞子集的多克隆扩增。在用APC-MS或DYNABEADS孵育(孵育7天后使用再刺激或IL-2处理)后的各个不同时间点($t=0$ 天、5天、7天、11天和13天)以T细胞群体的流式细胞术(FACS)散点图的形式描绘了结果,其中X轴上的值描绘了CD62L+染色的强度,而Y轴上的值描绘了CD44+染色的强度。CD62L+细胞出现在散点图的右侧(上和下的右象限)。

[0076] 图16显示了用APC-MS或DYNABEADS孵育时CD8+/CD69+小鼠脾脏T细胞子集的多克隆扩增。在用APC-MS或DYNABEADS孵育(孵育7天后使用再刺激或IL-2处理)后的各个不同时间点($t=0$ 天、5天、7天、11天和13天)以T细胞群体的流式细胞术(FACS)散点图的形式描绘

了结果,其中X轴上的值描绘了CD8+染色的强度,而Y轴上的值描绘了CD69+染色的强度。CD8+/CD69+细胞出现在散点图的右上象限。

[0077] 图17显示了用APC-MS或DYNABEADS孵育时CD8+/颗粒酶B+小鼠脾脏T细胞子集的多克隆扩增。以用APC-MS或DYNABEADS孵育(孵育7天后使用再刺激或IL-处理)后的各个不同时间点($t=0$ 天、5天、7天、11天和13天)以T细胞群的流式细胞术(FACS)散点图的形式描绘了结果,其中X轴上的值描绘了CD8+染色的强度,而Y轴上的值描绘了颗粒酶B+染色的强度。CD8+/颗粒酶B+细胞出现在散点图的右上象限。

[0078] 图18显示了用APC-MS(方块)或DYNABEADS(三角)后的各个不同时间点($t=0$ 天、5天、7天、11天和13天)的IFN γ 的T细胞分泌(pg/细胞)。孵育7天后,将细胞分成两个亚群,其中第一亚群进行再刺激(虚线),而第二亚群用IL-2处理(实线)。在本文中,将APC-MS用于APC-MS孵育和DYNABEAD孵育的细胞群体的再刺激。

[0079] 图19显示了用APC-MS或DYNABEADS孵育时PD-1+小鼠脾脏T细胞的水平。在用APC-MS或DYNABEADS孵育(孵育7天后使用再刺激或IL-处理)后的各个不同时间点($t=0$ 天、5天、7天、11天和13天)以T细胞群体的流式细胞术(FACS)散点图的形式描绘了结果,其中X轴上的值描绘了CD8+染色的强度,而Y轴上的值描绘了PD-1+染色(耗尽的潜在标志物)的强度。

[0080] 图20A和20B显示了用各种不同的组合物孵育人外周血T细胞的效果。图20A显示了在各个不同的时间点($t=0$ 天、5天、7天、11天和13天)用对照支架或实验支架孵育的原代T细胞的多克隆扩增的线图。对照支架包括假(“模拟”;黑线)组合物和无SLB(“无”;红线)的组合物。实验支架包括(1) DYNABEADS(蓝线)和(2) 本发明的脂质双层(SLB)(绿线)。图20B显示了条形图,其显示了在各个不同的时间点($t=0$ 天、5天、7天、11天和13天)用对照支架或实验支架孵育的原代T细胞的代谢活性(用标准Alamar蓝染色分析测量的)。对照支架包括假组合物(“模拟”;“m”)和无SLB的组合物(“无”;“f”)。实验支架包括(1) DYNABEADS(“d”)和(2) 本发明的脂质双层(SLB)(“s”)。

[0081] 图21A和21B显示了用各种不同的抗CD3抗体孵育人外周血T细胞的效果。用对照支架(“模拟”)或含有所列抗CD3抗体-莫罗单抗(OKT3)、识别CD3抗原/T细胞抗原受体(TCR)复合物(HIT3a)内的CD3的17-19kDe-链的抗体和识别CD3e(UCHT1)内的TCR复合物的20kDa亚基的单克隆抗体的实验支架孵育获自受试者1(图21A)和受试者2(图21B)的人血液样品。研究了三个不同的剂量-5 μ g(上载玻片)、1 μ g(针对受试者2的下载玻片)和0.5 μ g(针对受试者1的下载玻片)。在每种情况中,提供了抗CD28抗体的共刺激,其中抗CD3抗体:抗CD28抗体的比率维持在1:1。在各个不同时间点($t=0$ 天、5天、7天、11天和13天)测量了T细胞的倍数扩增。

[0082] 图22显示了用对照支架(“模拟”)或含有所列抗CD3抗体-OKT3、HIT3a和UCHT1的实验支架孵育时人T细胞的多克隆扩增。下图显示了用含有作为刺激分子的抗CD3抗体和作为共刺激分子的抗CD28抗体的每一种的APC-MS孵育后各个不同时间点($t=8$ 天、11天和14天)的T细胞群体的流式细胞术(FACS)散点图。散点图的X轴上的值描绘了CD8+染色的强度,而Y轴上的值描绘了CD4+染色的图。曲线概括于上图的线图中,其显示了用含有上述抗CD3抗体-OKT3(圈)、HIT3a(方块)和UCHT1(三角)的APC-MS孵育后CD4+vs. CD8+T细胞亚群的百分比变化。研究了两个不同的抗体剂量-5 μ g(1 \times 稀释)和0.5 μ g(1:10 \times 稀释)。

[0083] 图23显示了在1 \times 加载浓度(约5 μ g)下,使用含有IL-2以及1:1比率的上述抗CD3抗

体-OKT3 (左图)、HIT3a (中图) 和UCHT1 (右图) 与抗CD28抗体的APC-MS扩增14天的活T细胞上的CD62L和CCR7表达。在上图中显示了总的活细胞中的CD62L和CCR7的表达,而在下图中显示了这些标志物在门控的CD8⁺细胞中的表达。使用本发明的APC-MS扩增的大部分细胞在孵育14天后保持CD62L+CCR7⁺,其证明对于人患者的体内功能性是重要的。另外,含有OKT3的APC-MS支架与含有UCHT1和/或HIT3a的支架相比,在扩增和/或保持CD62L+CCR7⁺T细胞中特别有效。

[0084] 图24略述了用于制备本发明支架的代表性方案。

[0085] 图25A和25B描绘了抗原呈递细胞模拟支架 (APC-MS) 的设计。图25A描绘了用于制备APC-MS的示例性方法:1) 合成介孔二氧化硅微棒 (MSR); 2) MSR吸附IL-2; 3) 将吸附IL-2的MSR用脂质体涂覆,形成MSR-SLB; 4) 将T细胞激活信号附着于MSR-SLB的表面; 5) MSR-SLB用T细胞培养; 和6) 将MSR-SLB沉降和堆叠以形成被T细胞渗透的支架。加载有IL-2并用T细胞激活信号表面工程化的从MSR-SLB形成的支架称为APC-MS。图25B描绘了不同的APC-MS配置的示例性结构和功能。随着时间,IL-2从APC-MS释放,导致IL-2旁分泌递送至局部T细胞。将预定量的生物素化的磷脂掺入脂质体制剂中使得能够通过抗生物素蛋白链菌素-生物素相互作用精确地表面粘附生物素化的T细胞激活信号,模拟通过天然APC对T细胞的信号细胞表面呈递。对于多克隆T细胞扩增,粘附抗CD3 (α CD3) 和CD28 (α CD28) 的激活抗体 (左)。对于抗原特异性T细胞扩增,粘附肽加载的MHC (pMHC) 和 α CD28。

[0086] 图26A和26B描绘了用于组装MSR-SLB的组分的物理表征。图26A显示了MSR的代表性亮场显微镜图像。比例尺=100 μ m。图26B描绘了POPC脂质体的大小分布,如通过动态光散射 (DLS) 测量的。图26B中的数据表示3个样品的平均大小分布。

[0087] 图27A和27B是脂质涂覆的MSR的显微图像。图27A是显示了低脂质:MSR下的MSR聚集的显微图像。脂质涂覆的MSR (脂质:MSR1:20w/w) 的代表性显微图像显示了MSR的亮场图像 (左)、荧光团标记的磷脂 (总脂质的1mol%; 中), 以及MSR和脂质的共同定位 (右)。比例尺=200 μ m。图27B是脂质涂覆的MSR (脂质:MSR 1:4w/w) 的显微图像,显示了MSR的亮场图像 (左)、荧光团标记的磷脂 (总脂质的1mol%; 中), 以及MSR和脂质的共同定位 (右)。比例尺=200 μ m。

[0088] 图28A-28E描绘了APC-MS的组装和表征。图28A描绘了在细胞培养条件下维持的,在PBS或含有10%血清的RPMI培养基 (cRPMI) 中,MSR上的脂质涂层 (含有1mol% 荧光团标记的脂质) 随着时间保留。图28B是在标准细胞培养条件下的cRPMI中维持的脂质涂覆的MSR随着时间的代表性覆盖荧光显微图像 (MSR, 亮场; 脂质 (1mol% 荧光团标记的脂质), 绿色)。比例尺=100 μ m。数据表示三个实验重复的平均 \pm s.d., 并且是至少两个独立实验的表示。图28C是描绘了随着时间 (数据点) 在体外从MSR-SLB (500 μ g MSR) 释放的IL-2的定量的图,具有单相指数拟合 (虚线; $R^2=0.98$)。数据表示三个实验重复的平均 \pm s.d., 并且是至少两个独立实验的表示。图28D是描绘了生物素化IgG的各种输入的粘附到涂覆含有0.01mol%, 0.1mol% 或1mol% 生物素化脂质的脂质制剂的MSR上的定量的图。条上方的值表示针对每种相应条件粘附的IgG的浓度 (μ g)。数据表示四个实验重复的平均 \pm s.d., 并且是至少两个独立实验的代表。图28E是显示了原代人T细胞与APC-MS紧密结合的SEM图像。比例尺=10 μ m。

[0089] 图29显示了T细胞与APC-MS的结合。用原代小鼠T细胞培养一天的,在低 (左) 和高

(右)放大倍数下,没有呈递任何表面信号(信号-),或表面呈递 α CD3和 α CD28(信号+)的MSR-SLB的代表性显微图像。细胞和材料在亮场图像中是可见的(上),并且MSR-SLB脂质涂层在绿色通道中是可见的(1mol%荧光团标记的脂质;中)。合并图像显示于底部。低放大倍数比例尺=500 μ m,高放大倍数比例尺=100 μ m。

[0090] 图30A、30B、30C、30D、30E、30F和30G显示了原代小鼠和人T细胞的多克隆扩增。图30A是在低放大倍数(左)或使用APC-MS的高放大倍数下(右),在各个不同时间点,用DYNABEADS或APC-MS培养的原代小鼠T细胞的代表性亮场显微图像。比例尺=100 μ m。图30B显示了未处理的(模拟),或用游离信号(110nM α CD3、110nM α CD28、1.3 μ g/ml IL-2)、商业CD3/CD28小鼠T细胞扩增珠和外源性IL-2(DYNABEADS)、没有在双层表面上呈递的T细胞信号的加载IL-2的MSR-SLB(MSR-SLB(信号-)),或APC-MS(加载 α CD3、 α CD28、IL-2)培养的原代小鼠T细胞的扩增。模拟和游离的曲线可以与MSR-SLB(信号-)曲线区分开。图30C描绘了在APC-MS或Dynabead培养中,活的单细胞中随着时间的CD4⁺和CD8⁺细胞的频率,使用FACS测量的。使用双因素ANOVA接着Tukey HSD post-hoc检验分析数据。图30D是在各个不同时间点,用DYNABEADS或APC-MS制剂培养的原代人T细胞的代表性亮场显微图像。比例尺=100 μ m。(F1)饱和1mol%生物素化脂质的呈递 α CD3和 α CD28的APC-MS,在333 μ g/ml的MSR下输入至初始培养物,(F2)饱和1mol%生物素化脂质的呈递 α CD3和 α CD28的APC-MS在33 μ g/ml的MSR下输入至初始培养物,(F3)饱和0.1mol%生物素化脂质的呈递 α CD3和 α CD28的APC-MS在333 μ g/ml的MSR下输入至初始培养物,和(F4)饱和0.1mol%生物素化脂质的呈递 α CD3和 α CD28的APC-MS在33 μ g/ml的MSR下输入至初始培养物。图30E显示了未处理的(模拟),或用商业CD3/CD28人T细胞扩增珠和外源性IL-2(DYNABEADS),或使用各种不同的APC-MS制剂培养的原代人T细胞的扩增。图30F描绘了在用DYNABEADS或用各种APC-MS制剂扩增14天的样品中,活的单一CD3⁺细胞中CD4和CD8单阳性细胞的FACS定量。图30G描绘了用DYNABEADS或用各种不同的APC-MS制剂扩增的样品中,在活的单细胞中共表达PD-1和LAG-3的细胞的FACS定量。图30F和30G中的数据表示三个实验重复的平均 \pm s.d.,并且是至少两个独立实验的表示。图30E中的数据表示来自两个独立实验的至少三个不同供体样品的平均 \pm s.d.。图30F和30G中的数据表示三个不同供体样品的平均 \pm s.d.,并且是至少两个独立实验的表示。* $p < 0.01$,*** $p < 0.001$ 。

[0091] 图31描绘了多克隆扩增的原代小鼠T细胞上的CD4和CD8表达的代表性FACS图。代表性的FACS图显示了用APC-MS或DYNABEADS多克隆扩增的活的单细胞上的CD4和CD8表达。在每个时间点,针对每个样品将流数据相对Fluorescence Minus One (FMO)对照进行门控。

[0092] 图32A、32B、32C和32D描绘了多克隆扩增的原代小鼠T细胞扩展的表型表征。图32A描绘了用DYNABEADS或用APC-MS扩增的样品中,活的单CD8⁺细胞中颗粒酶B阳性细胞的FACS定量(左),和代表性的FACS图(右)。图32B描绘了在用DYNABEADS或用APC-MS扩增的样品中,活的单CD4⁺细胞中FoxP3阳性细胞的FACS定量。图32C和32D显示了代表性的FACS图,其显示了作为CD8表达的函数,活的单细胞上的PD-1表达。在每个时间点,对于每个样品,将流数据相对Fluorescence Minus One (FMO)对照进行门控。数据表示三个实验重复的平均 \pm s.d.,并且是至少两个独立实验的表示。

[0093] 图33显示了多克隆扩增的原代人T细胞上的粘附分子表达。在用DYNABEADS或使用各种不同的APC-MS制剂扩增的样品中,共表达CD62L和CCR7的活的单细胞的FACS定量。(F1)

饱和1mol%生物素化脂质的呈递 α CD3和 α CD28的APC-MS,在333 μ g/ml的MSR下输入至初始培养物,(F2)饱和1mol%生物素化脂质的呈递 α CD3和 α CD28的APC-MS,在33 μ g/ml的MSR下输入至初始培养物,(F3)饱和0.1mol%生物素化脂质的呈递 α CD3和 α CD28的APC-MS,在333 μ g/ml的MSR下输入至初始培养物,和(F4)饱和0.1mol%生物素化脂质的呈递 α CD3和 α CD28的APC-MS,在33 μ g/ml的MSR下输入至初始培养物。数据表示三个不同供体样品的平均 \pm s.d.,并且是至少两个独立实验的表示。

[0094] 图34A、34B、34C、34D和34E描绘了原代小鼠T细胞的抗原特异性扩增。图34A显示了在H-2K(b)中用呈递无关肽(SVYDFVWL (SEQ ID NO:3);左)或相关肽(SIINFELK (SEQ ID NO:4);右)的APC-MS培养原代CD8+OT-IT细胞两天的代表性亮场显微图像。比例尺=100 μ m。图34B显示了未处理的(模拟),或用各种APC-MS制剂培养的原代CD8+OT-IT细胞的扩增。(F1)饱和1mol%生物素化脂质的呈递SIINFELK (SEQ ID NO:4)/H-2K(b)和 α CD28的APC-MS,在333 μ g/ml的MSR下输入至初始培养物,(F2)饱和1mol%生物素化脂质的呈递SIINFELK (SEQ ID NO:4)/H-2K(b)和 α CD28的APC-MS,在33 μ g/ml的MSR下输入至初始培养物,(F3)饱和0.1mol%生物素化脂质的呈递SIINFELK (SEQ ID NO:4)/H-2K(b)和 α CD28的APC-MS,在333 μ g/ml的MSR下输入至初始培养物,和(F4)饱和0.1mol%生物素化脂质的呈递SIINFELK (SEQ ID NO:4)/H-2K(b)和 α CD28的APC-MS,在33 μ g/ml的MSR下输入至初始培养物。图34C描绘了用各种APC-MS制剂扩增13天并且随后与B16-F10细胞共培养的活的单CD8+OT-IT细胞的IFN γ 和TNF α 表达的FACS定量,所述B16-F10细胞模拟脉冲(-),或用SIINFELK (SEQ ID NO:4)肽脉冲(+).图34D描绘了通过用各种APC-MS制剂扩增13天并随后在各种效应:靶细胞比率下共培养的CD8+OT-I T细胞对模拟脉冲(-)或SIINFELK (SEQ ID NO:4)脉冲的(+)B16-F10靶细胞的体外杀灭的定量。图34E描绘了用各种APC-MS制剂扩增13天的CD8+OT-IT细胞响应于各种不同效应:靶细胞比率下与模拟脉冲(pep-)或SIINFELK (SEQ ID NO:4)肽脉冲(pep+)的B16-F10细胞的共培养的IFN γ 分泌的定量。图34B、34C、34D和34E中的数据表示三个实验重复的平均 \pm s.d.,并且是至少两个独立实验的表示。

[0095] 图35A、35B、35C、35D和35E显示了用抗原特异性APC-MS制剂扩增的原代人T细胞的扩展表征。图35A显示了模拟处理的(30U/ml IL-2)或用呈递HLA-A2中的CLG或GLC肽的APC-MS(加载pMHC、 α CD28、IL-2)培养的原代人CD8+T细胞的总扩增。对于模拟处理的细胞仅第0天和第7天的数据可用。图35B、35C和35D显示了用未脉冲的(肽-) (图35B)、用CLG肽脉冲的(+CLG肽) (图35C)或用GLC肽脉冲的(+GLC肽) (图35D)的T2细胞共培养后,模拟处理(30U/ml IL-2)的或用呈递CLG肽(APC-MS CLG)或GLC肽(APC-MS GLC)的APC-MS培养的CD8+T细胞分离物的IFN γ 分泌的定量。对于模拟处理的细胞仅第7天的数据可用。图35E显示了代表性的FACS图,其显示了在与用未脉冲的(无肽;上)、用CLG肽脉冲的(+CLG肽;中)或用GLC肽脉冲的(+GLC肽;下)的T2细胞共培养后,用呈递CLG肽(APC-MS/CLG)或GLC肽(APC-MS/GLC)的APC-MS培养的CD8+T细胞分离物的IFN γ 和TNF α 表达。图35A和35B中的数据表示三个实验重复的平均 \pm s.d.,并且是使用两个不同的供体样品的两个实验的表示。

[0096] 图36A、36B、36C、36D、36E、36F、36G、36H、36I、36J、36K、36L、36M和36N显示了原代人T细胞的抗原特异性扩增。图36A、36B、36C、36D、36E、36F、36G、36H、36I和36J描绘了来自CD8+T细胞分离物的原代人T细胞的抗原特异性扩增。图36A、36B和36D描绘了对EBV衍生的肽CLGGLTMV (SEQ ID NO:1) (CLG;图36A和36B)和GLCTLVAML (SEQ ID NO:2) (GLC;图36D和

36E) 特异性的活的CD8+单细胞的四聚体分析。模拟处理的 (30U/ml IL-2) 或用呈递HLA-A2中的CLG或GLC肽的APC-MS (加载pMHC、 α CD28、IL-2) 培养的原代HLA-A2+人CD8+T细胞的代表性的FACS图, 门中的数字表示对于相应四聚体阳性的活的单CD8+细胞的百分比 (图36A和36D), 以及各个不同时间点的FACS数据的定量 (图36B和36E)。对于模拟处理的细胞仅第0天和第7天的数据可得。图36F显示了模拟处理的, 或用呈递在HLA-A2中的CLG或GLC肽的APC-MS培养的, 对CLG (图36C) 或GLC (图36F) 特异性的原代人CD8+T细胞的扩增。对于模拟处理的细胞仅第0天和第7天的数据可得。图36G、36H和36I描绘了在与未脉冲的 (肽-) (图36G)、用CLG肽脉冲的 (+CLG肽; 图36H) 或用GLC肽脉冲的 (+GLC肽; 图36I) 的T2细胞共培养后, 模拟处理 (30U/ml IL-2) 的或用呈递在HLA-A2中的CLG或GLC肽的APC-MS培养的活的单CD8+T细胞中的TNF α +IFN γ +细胞的频率。对于模拟处理的细胞仅第7天的数据可得。图36J显示了通过用呈递HLA-A2中的CLG或GLC肽的APC-MS扩增14天的原代人CD8+T细胞对模拟脉冲的 (无肽) 或用CLG肽 (+CLG) 或GLC肽 (+GLC) 脉冲的T2靶细胞的体外杀灭的定量。图36K、36L、36M和36N显示了来自PBMC的原代人T细胞的抗原特异性扩增。图36K描绘了30U/ml IL-2 (模拟) 中或用呈递HLA-A2中的GLC肽的APC-MS培养7天的PBMC内的活的单CD8+T细胞中的GLC特异性细胞的频率。图36L显示了30U/ml IL-2 (模拟) 中或用呈递HLA-A2中GLC肽的APC-MS培养7天的PBMC内的GLC特异性CD8+T细胞的数量。条上方的数字表示倍数扩增 (平均 \pm s.d.)。图36M和36N显示了在与未脉冲的 (无肽)、用CLG肽脉冲的 (+CLG) 或用GLC肽脉冲的 (+GLC肽) 的T2细胞共培养后, 来自30U/ml IL-2 (模拟) 中或用呈递HLA-A2中GLC肽的APC-MS培养7天的PBMC的活的单CD8+T细胞中的TNF α +IFN γ 细胞的频率 (图36M) 和IFN γ 分泌 (图36N)。所有数据表示三个实验重复的平均 \pm s.d., 并且是使用两个不同的供体样品的两个实验的表示。

[0097] 图37描绘了APC-MS支架在体外的降解。用原代小鼠T细胞 (25×10^4 T细胞/167 μ g APC-MS) 培养呈递 α CD3/ α CD28 (1%生物素化的脂质) 并释放IL-2的APC-MS (167 μ g)。在各个不同时间点, 将培养物在700rcf下离心5min, 并且通过电感耦合等离子体发射光谱法 (ICP-OES; Galbraith Laboratories) 定量沉淀物中的Si含量。直至开始培养后1周, 培养物沉淀物中Si是不可检测的。

[0098] 图38显示了多样的可溶性免疫指导有效负载从APC-MS的受控释放。产生了4种APC-MS, 其在脂质涂覆前各自包含加载至500 μ g APC-MS中的2 μ g IL-2、IL-21、TGF β 或IL-15SA。将样品彻底洗涤以除去未结合的蛋白质, 并随后在37 $^{\circ}$ C下维持长达28天。通过ELISA评价随着时间的有效负载释放。

[0099] 图39A和39B描绘了使用含有头基标记的脂质中10%的羧基荧光素的MSR-SLB的光漂白 (FRAP) 实验后的荧光恢复。图39A是三个独立的FRAP事件的代表性图像。图像显示了光漂白前 (左)、紧接在光漂白后 (中) 和荧光恢复后 (右) 的荧光标记的MSR-SLB。光漂白区域通过红色箭头来表示。图39B显示了随着时间的荧光恢复的定量。用黑色虚线显示了不同的MSR-SLB上的8个独立的光漂白的荧光恢复, 并用实线显示了平均趋势。

[0100] 图40A、40B、40C和40D描绘了与DYNABEAD相比, 使用APC-MS进行的T细胞扩增实验的结果, 其中将DYNABEAD的量标准化以包含与APC-MS相同量的抗CD3和抗CD28抗体。图40A. 进行针对总蛋白质定量的二喹啉甲酸分析 (BCA) 以测定商业的小鼠或人CD3/CD28T细胞激活剂DYNABEAD表面上结合的蛋白质量。将DYNABEAD原液彻底洗涤, 并且通过BCA分析评价

DYNABEAD抗体负载。发现靶向小鼠和人T细胞的DYNABEAD具有相似的抗体载荷($\sim 20\mu\text{g}/\text{ml}$)。按照每个细胞,5:1比率的DYNABEAD:细胞(条件D-B)对应于与 $16.7\mu\text{g}$ 下呈递0.1%T细胞信号的APC-MS(条件M-D)相同剂量的抗CD28/抗CD3。图40B.在13天的培养期间对于APC-MS观察到原代小鼠T细胞的剂量依赖性扩增,但在测试的剂量范围内对于DYNABEAD没有观察到。与呈递相同量的抗CD3和抗CD28抗体的DYNABEAD相比,APC-MS显著促进了增强的T细胞扩增(参见条件M-D vs. D-B)。图40C.尽管具有较高的扩增,但与使用呈递相同量的抗CD3和抗CD28抗体的DYNABEAD(条件D-B)相比,采用APC-MS条件M-D扩增的细胞没有显示出增强的耗尽标志物PD-1和LAG-3的共表达。图40D.用低至中等剂量的DYNABEAD扩增的T细胞显示出主要CD4-偏倚的偏斜(CD4-biased skewing)(条件D-A, D-B)。当加入非常高剂量的DYNABEAD时,观察到了中等的CD8偏倚的偏斜(条件D-C)。相反,APC-MS倾向于显示出重度的CD8偏倚的偏斜,偏斜的程度取决于APC-MS的配方。图40B、40C和40D中的数据表示来自四只不同小鼠的样品的平均 \pm s.d.,并且是至少两个独立实验的表示。*** $p < 0.001$, (b) 使用双因素ANOVA,接着Tukey HSD post-hoc检验来分析。

[0101] 图41A和41B描绘了进行实验来评价与DYNABEAD相比,IL-2剂量以及从APC-MS的持续释放对原代小鼠T细胞扩增的作用的结果。图41A显示了用加载IL-2的APC-MS(M-D)、加入培养基中的APC-MS和IL-2(M-D bIL2);DYNABEAD(D-B)或加入培养基的DYNABEAD和IL-2(D-B bIL-2)处理的原代小鼠T细胞的扩增。D-B: DYNABEAD 5:1; D-B-bIL-2: DYNABEAD 5:1+IL-2大丸; M-D: 0.1%T细胞信号/1:10 \times 材料/加载的IL-2; M-S/bIL-2: 0.1%T细胞信号/1L10 \times 材料/IL-2大丸。图41B显示了用加载IL-2的APC-MS(M-D)、加入培养基中的APC-MS和IL-2(M-D bIL2);DYNABEAD(D-B)或加入培养基中的DYNABEAD和IL-2(D-B bIL-2)扩增的原代小鼠T细胞中耗尽标志物PD-1和LAG-3的共表达。数据表示来自四只不同小鼠的样品的平均 \pm s.d.,并且是至少两个独立实验的表示。*** $p < 0.001$, 使用双因素ANOVA,接着Tukey HSD post-hoc检验进行分析。

[0102] 图42A和42B描绘了叠氮化物-标记的IgG与DBCO-呈递MSR-SLB通过点击化学缀合的连接。图42A.用含有不同量的DBCO修饰的脂质的MSR-SLB(如所示的)孵育不同量的叠氮化物修饰的IgG(如所示的)。条上方的值表示连接于MSR-SLB的叠氮化物修饰的IgG的 μg 数。图42B显示了对含有不同量的DBCO修饰的脂质的MSR-SLB的叠氮化物修饰的IgG输入的较宽剂量滴定。nIgG表示未叠氮化物修饰的IgG。条上方的值表示连接于MSR-SLB的叠氮化物修饰的IgG的 μg 数。

具体实施方式

[0103] 本发明提供了操纵T细胞的问题的解决方法。具体地,本发明提供了抗原呈递细胞模拟支架(APC-MS),其在这样的细胞操纵中是有用的。所述支架包括介孔二氧化硅棒(MSR),其结合或覆盖有连续的、流体支撑的脂质双层(SLB),由此形成MSR-SLB支架。MSR-SLB支架进一步含有多种T细胞激活和T细胞共刺激分子,连同多种T细胞稳态剂,其一起构成了模拟抗原呈递细胞(APC)并且允许所述支架引发靶细胞(例如,T细胞)上的各种效应子作用的结构。在一些实施方式中,所述支架通过靶细胞中存在的细胞表面分子与支架呈递的各种结合伴侣之间的直接或间接相互作用来介导这些作用。根据使用支架的应用,所述支架通过支架自身的物理或化学特征调节靶向的细胞的存活和生长。根据应用,所述支架

组合物可以修饰来含有特定的激活和共刺激信号,以及稳态信号传导分子,其一起作用于介导各种效应子功能,例如,靶细胞的激活、分裂、促进分化、生长、扩增、重编程、无能、休眠、衰老、凋亡或死亡。在这些应用中,发现所述支架令人惊讶地提高了靶向的细胞的细胞代谢活性和生长。此外,通过本发明的支架赋予的生长和代谢活性的提高出乎预料地优于现有的平台,如磁珠。

[0104] 为了允许特定的细胞(如T细胞)的操纵,可以调节支架组合物的渗透性,例如,通过针对更大或更小的孔径、密度、聚合物交联、刚性、韧性、延展性或弹性来选择或工程化材料。所述支架组合物可以含有物理通道或路径,靶向的细胞通过其与支架相互作用和/或移动至支架的特定区室或区域中。为了促进区室化,所述支架组合物可以任选组织成区室或层,其各自具有不同的渗透性,使得细胞被分选或过滤以只允许特定的细胞亚群进入。支架中靶细胞群的隔离也可以通过支架组合物的降解、脱水或再水合、氧合、化学或pH改变或正在进行的自我组装来调节。捕获后,可以允许靶向的细胞在支架内借助支架中存在的刺激分子、细胞因子和其他辅因子来生长或扩增。在其他情况中,可以使用阴性选择剂排斥或除去另外渗入支架中的非靶向细胞。

[0105] 本发明的支架内包含或隔离的细胞主要是免疫细胞。在某些实施方式中,本发明涉及用于隔离和/或操纵T细胞的支架。在其他实施方式中,本发明涉及其他淋巴细胞(例如,B细胞)可渗透的支架。再在其他实施方式中,本发明涉及支架的组合,例如,T细胞支架和B细胞支架的组合。任选收集和分析免疫细胞(例如,T细胞)来鉴定在疾病的诊断或治疗中有用的不同亚群。还可以将收集的细胞重新编程或扩增,用于研发用于治疗中的组合物或制剂。

[0106] 在以下分节中更详细地进一步描述本发明。

[0107] I. 抗原呈递细胞模拟支架(APC-MS)

[0108] 在一个实施方式中,本发明提供了抗原呈递细胞模拟支架(APC-MS)。所述支架含有包含高表面积介孔二氧化硅微棒(MSR)的基底层;于MSR基底层上成层的连续的、流体支撑的脂质双层(SLB);吸附于支架上的多种T细胞激活分子和T细胞共刺激分子;和吸附于支架上的多种T细胞稳态剂。

[0109] A. 介孔二氧化硅

[0110] 在一个实施方式中,本发明的支架的组分包括介孔二氧化硅。介孔二氧化硅是具有六边形密排的、圆柱形的均一孔隙的多孔体。通过使用表面活性剂的棒状胶束作为模板来合成这种材料,其通过在酸或碱催化剂的存在下,将二氧化硅源(如烷氧基硅烷、硅酸钠溶液、水硅钠石(kanemite)、二氧化硅细粒)在水或醇中溶解和水合而在水中形成。参见,美国公开No.2015-0072009和Hoffmann等,Angewandte Chemie International Edition,45,3216-3251,2006。许多种类的表面活性剂,如阳离子、阴离子和非离子表面活性剂,已经研究作为表面活性剂,并且已知一般而言,阳离子表面活性剂的烷基三甲铵盐导致具有最大比表面积和孔体积的介孔二氧化硅。参见,美国公开No.2013/0052117和Katiyar等(Journal of Chromatography 1122(1-2):13-20)。如本说明书中使用的术语“中尺度”、“介孔”、“介孔的”等可以是指具有5nm至100nm范围中,特别是2nm至50nm的范围中的特征尺寸的结构。因此,在一些实施方式中,介孔材料包括具有5nm至100nm范围的直径的孔隙,其可以是有序或随机分布的。

[0111] 本发明支架中使用的介孔二氧化硅可以以各种形式来提供,例如,微球、不规则颗粒、矩形棒、圆形纳米棒等,尽管特别优选结构化的棒形式(MSR)。所述颗粒可以具有各种预定的形状,包括,例如,球形、椭球形、棒状或弯曲圆柱形。组装介孔二氧化硅以产生微棒的方法是本领域已知的。参见,Wang等,Journal of Nanoparticle Research,15:1501,2013。在一个实施方式中,通过将原硅酸四乙酯与胶束棒制得的模板反应来合成介孔二氧化硅纳米颗粒。结果是充满规则排列孔隙的纳米大小的球或棒的集合。随后可以通过使用调节至适当pH的溶剂洗涤除去模板。在这个实例中,除去表面活性剂模板后,制得了特征在于均一、有序和连通的介孔性的亲水性二氧化硅纳米颗粒,其具有例如约 $600\text{m}^2/\text{g}$ 至约 $1200\text{m}^2/\text{g}$,特别是约 $800\text{m}^2/\text{g}$ 至约 $1000\text{m}^2/\text{g}$,并且尤其是约 $850\text{m}^2/\text{g}$ 至约 $950\text{m}^2/\text{g}$ 的比表面积。在另一个实施方式中,可以使用简单的溶胶-凝胶法或喷雾干燥法来合成介孔颗粒。还将原硅酸四乙酯与另外的聚合物单体(作为模板)一起使用。在再另一个实施方式中,可以将一个或多个四烷氧基-硅烷和一个或多个(3-氰基丙基)三烷氧基-硅烷共同缩合,以提供作为棒的介孔硅酸盐颗粒。参见,美国公开No.2013-0145488、2012-0264599和2012-0256336,将其按引用并入。

[0112] 介孔二氧化硅棒可以包括直径为2-50nm的孔隙,例如,2-5nm、10-20nm、10-30nm、10-40nm、20-30nm、30-50nm、30-40nm、40-50nm的孔隙。在特定的实施方式中,微棒包括直径大约为5nm、6nm、7nm、8nm、9nm、10nm、11nm、12nm或更大的孔隙。孔径可以根据应用的类型而改变。

[0113] 在另一个实施方式中,微棒的长度在微米范围中,范围从约 $5\mu\text{m}$ 至约 $500\mu\text{m}$ 。在一个实例中,微棒包括 $5\text{--}50\mu\text{m}$,例如, $10\text{--}20\mu\text{m}$, $10\text{--}30\mu\text{m}$, $10\text{--}40\mu\text{m}$, $20\text{--}30\mu\text{m}$, $30\text{--}50\mu\text{m}$, $30\text{--}40\mu\text{m}$, $40\text{--}50\mu\text{m}$ 的长度。在其他实施方式中,所述棒包括 $50\mu\text{m}$ 至 $250\mu\text{m}$,例如,约 $60\mu\text{m}$, $70\mu\text{m}$, $80\mu\text{m}$, $90\mu\text{m}$, $100\mu\text{m}$, $120\mu\text{m}$, $150\mu\text{m}$, $180\mu\text{m}$, $200\mu\text{m}$, $225\mu\text{m}$ 或更长的长度。对于细胞的募集,可以优选使用具有较高纵横比的MSR组合物,例如,使用包括 $50\mu\text{m}$ 至 $200\mu\text{m}$ 长度,特别是 $80\mu\text{m}$ 至 $120\mu\text{m}$ 的长度,尤其是约 $100\mu\text{m}$ 或更长的长度的棒。

[0114] 在再另一个实施方式中,所述MSR提供了用于连接和/或结合靶细胞(例如,T细胞)的高表面积。获得高表面积介孔硅酸盐的方法是本领域已知的。参见,例如,美国专利No.8,883,308和美国公开No.2011-0253643,将其完整内容按引用并入本文中。在一个实施方式中,高表面积是由于纳米颗粒的纤维形态引起的,这使其可以在表面上获得高浓度的高度分散的且易于接近的部分。在某些实施方式中,高表面积MSR具有至少约 $100\text{m}^2/\text{g}$, $150\text{m}^2/\text{g}$,或至少 $300\text{m}^2/\text{g}$ 的表面积。在其他实施方式中,高表面积MSR具有约 $100\text{m}^2/\text{g}$ 至约 $1000\text{m}^2/\text{g}$ 的表面积,包括其中的所有值或子范围,例如, $50\text{m}^2/\text{g}$, $100\text{m}^2/\text{g}$, $200\text{m}^2/\text{g}$, $300\text{m}^2/\text{g}$, $400\text{m}^2/\text{g}$, $600\text{m}^2/\text{g}$, $800\text{m}^2/\text{g}$, $100\text{--}500\text{m}^2/\text{g}$, $100\text{--}300\text{m}^2/\text{g}$, $500\text{--}800\text{m}^2/\text{g}$ 或 $500\text{--}1000\text{m}^2/\text{g}$ 。

[0115] B. 脂质

[0116] 本发明的支架包括MSR基底层上的连续的、流体支撑的脂质双层(SLB)。术语“脂质”通常表示与活的系统相结合的异质物质组,其具有不溶于水的共性,可以通过低极性的有机溶剂(如氯仿和醚)从细胞提取。在一个实施方式中,“脂质”是指包括长的脂肪酸链的任何物质,优选含有10-30个碳单元,特别是含有14-23个碳单元,尤其是含有16-18个碳单元。

[0117] 在一个实施方式中,脂质作为单层提供。在另一个实施方式中,脂质作为双层提

供。脂质双层是由两层脂质分子形成的薄极性膜。优选，脂质双层是流体，其中单个脂质分子能够在单层内快速扩散。膜脂质分子优选是两性的。

[0118] 在一个实施方式中，脂质层是连续的双层，例如，类似天然生物膜（如细胞质膜）中发现的那些。在另一个实施方式中，以支撑的双层（SLB）的形式提供脂质。SLB是安置在固体支持物（例如，介孔二氧化硅棒（MSR））上的平面状结构。在这样的配置中，支撑的双层的上表面暴露，而支撑的双层的内面接触支持物。MSR-SLB支架是稳定的并且很大程度上保持完整，即使经受高流速或振动时，并且可以承受空洞，例如，与介孔二氧化硅基层的孔对齐的空洞。由于这种稳定性，使用支撑的双层将实验持续数周和甚至数月是可能的。SLB还易于修饰、衍生化以及和许多化学和/或生物部分化学缀合。

[0119] 在一个实施方式中，可以使用任何已知方法，包括共价和非共价相互作用，将SLB固定于MSR基层上。非共价相互作用的类型包括，例如，静电相互作用、van der Waals' 相互作用、 π -效应、疏水性相互作用等。在一个实施方式中，将脂质吸附于MSR基层上。在另一个实施方式中，将SLB通过共价相互作用连接或栓系于MSR基层上。用于将脂质连接硅酸盐的方法是本领域已知的，例如，表面吸附、物理固定，例如，使用相变来捕获支架材料中的物质。在一个实施方式中，将脂质双层于MSR基层上成层。例如，可以将脂质膜（含有例如，氯仿中77.5:20:2.5摩尔比的DPPC/胆固醇/DSPE-PEG的溶液）点在介孔二氧化硅上，并且使用旋转蒸发器蒸发溶剂。参见Meng等，ACS Nano, 9 (4), 3540-3557, 2015。在一个实施方式中，例如，可以使用标准方案，通过将水合的脂质膜通过具有例如约100nm孔径的滤器的挤出来制备脂质双层。随后可以将滤过的脂质双层膜与多孔颗粒核心融合，例如，通过移液混合。

[0120] 或者，通过烷化剂或酰化剂的共价偶联可以用于在MSR层上提供稳定的、结构化的和长期保持的SLB。在这样的实施方式中，可以使用已知技术将脂质双层可逆或不可逆地固定于MSR层上。例如，MSR基层可以是亲水性的并且可以进一步处理以提供更亲水的表面，例如，使用氢氧化铵或过氧化氢。例如，使用已知的偶联术，可以将脂质双层融合至多孔MSR基层上，以形成MSR-SLB支架。所述支架可以用其他部分进一步加工和衍生化，以允许其他次要试剂连接和/或固定于所述结构上。

[0121] 因此，在一个实施方式中，本发明提供了MSR-SLB支架，其中所述SLB组分是磷脂。这样的脂质的代表性实例包括，但不限于，美国专利No. 9,066,867和8,367,628中所述的两性脂质体。例如，所述脂质双层可以包括选自二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱（DMPC）、二棕榈酰基磷脂酰胆碱（DPPC）、二硬脂酰基磷脂酰胆碱（DSPC）、棕榈酰基-油酰基磷脂酰胆碱（POPC）、二油酰基磷脂酰胆碱（DOPC）、二油酰基磷脂酰乙醇胺（DOPE）、二肉豆蔻酰基磷脂酰乙醇胺（DMPE）和二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺（DPPE）或其组合的脂质。在一些实施方式中，所述脂质双层包括模拟哺乳动物细胞膜（例如，人细胞质膜）的脂质组成的脂质组合物。许多哺乳动物细胞膜的脂质组成已经得到表征并且是本领域技术人员容易获得的（参见，例如，Essaid等，Biochim. Biophys. Acta 1858 (11): 2725-36 (2016)，将其完整内容按引用并入本文中）。脂质双层的组成可以改变以改变脂质双层的电荷或流动性。在一些实施方式中，所述脂质双层包括胆固醇。在一些实施方式中，所述脂质双层包括鞘脂。在一些实施方式中，所述脂质双层包括磷脂。在一些实施方式中，所述脂质是磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷酸肌醇、具有包含6-20个碳的饱和或不饱和尾的磷酸鞘脂，或其组合。

[0122] 在另一个实施方式中,所述脂质是DIYNE PC脂质。这样的脂质的代表性实例包括,但不限于,1-棕榈酰-2-10,12-二十三烷二炔酰基(Tricosadiynoyl)-sn-甘油-3-磷酸胆碱(16:0-23:2DIYNE PC)和1,2-双(10,12-二十三烷二炔酰基)-SN-甘油-3-磷酸胆碱(23:2Diyne PC)。

[0123] 在一个实施方式中,本发明的MSR-SLB支架保持连续的、流体1ks构至少1天,至少2天,至少3天,至少4天,至少5天,至少6天,至少7天,至少8天,至少9天,至少10天,至少11天,至少12天,至少13天,至少14天,至少15天,至少16天,至少17天,至少18天,至少19天,至少20天,至少21天,至少25天,至少30天,至少35天,至少40天,至少50天,或更长。

[0124] 可以使用任何已知技术,包括,以下实施例中说明的显微镜可视化技术,来研究MSR-SLB支架的架构。

[0125] C. 功能性分子

[0126] 在本发明的一个实施方式中,所述MSR-SLB支架可以含有一种或多种功能性分子。术语“功能性分子”包括具有生物学上所需的特性的任何分子。在本发明的内容中,这样的功能性分子的实例包括蛋白质、肽、抗原、抗体、DNA、RNA、碳水化合物、半抗原和其他小分子,例如,药物。在一个实施方式中,所述功能性分子是T细胞激活分子。在一个实施方式中,所述功能性分子是T-细胞共刺激分子。再进一步,在一个实施方式中,所述功能性分子是T细胞稳态剂。在某些实施方式中,所述MSR-SLB支架包括多种功能性分子,例如,至少一种T细胞激活分子、至少一种T细胞共刺激分子和至少一种T细胞稳态剂。

[0127] T细胞激活分子

[0128] 在一个实施方式中,本发明提供了含有多多种T细胞激活分子的MSR-SLB支架。这些激活分子可以介导靶T细胞群体的直接、间接或半直接激活。参见,Benichou等,Immunotherapy,3(6):757-770,2011。优选,T细胞激活分子介导T细胞的直接激活。

[0129] 在一个实施方式中,本发明提供了含有直接激活T细胞的分子的MSR-SLB支架,例如,通过结合靶T细胞上的细胞表面受体。特别地,直接激活可以通过分化簇3(CD3)介导,其是帮助激活细胞毒性T细胞的T细胞共受体。在另一个实施方式中,T细胞可以直接激活而没有CD3的伴随参与,例如,以非CD3依赖性方式激活。

[0130] 在一个实施方式中,以CD3依赖性方式激活靶T细胞。通常认为T细胞激活需要T细胞受体(TCR)来识别其在MHC分子情况中的同源肽。此外,CD3与TCR-肽-MHC复合物的结合将激活信号传递至胞内信号传导分子,来启动T细胞中的信号传导级联。参见,Ryan等,Nature Reviews Immunology 10,7,2010。T细胞上发现的CD3受体复合物含有CD3 γ 链、CD3 δ 链和两条CD3 ϵ 链,其结合TCR和 ζ 链(zeta-链;CD247),以在T细胞中产生激活信号。TCR、 ζ -链和CD3分子一起构成T细胞受体(TCR)复合物。激活分子(例如,抗体)与TCR复合物的一个或多个成员的结合可以激活T细胞。

[0131] 在一个实施方式中,T细胞激活分子是抗体或其抗原结合片段。在T细胞激活分子以CD3依赖性方式起作用的情况下,T细胞激活分子优选是抗CD3抗体或其抗原结合片段。在另一个实施方式中,T细胞激活分子可以包括,例如,抗CD2抗体或其抗原结合片段、抗CD47抗体或其抗原结合片段、抗巨噬细胞清道夫受体(MSR1)抗体或其抗原结合片段、抗T细胞受体(TCR)抗体或其抗原结合片段等。在另一个实施方式中,T细胞激活分子是主要组织相容性复合物(MHC)分子或其任选加载MHC肽的多聚体。再进一步,T细胞激活分子是含有MHC和

免疫球蛋白 (Ig) 的缀合物或其多聚体。

[0132] 如本文中使用的, 术语“抗体”, 宽泛地是指由四条多肽链 (两条重 (H) 链和两条轻 (L) 链) 组成的任何免疫球蛋白 (Ig) 分子, 或保留 Ig 分子的重要表位结合特征的其任何功能性片段、突变体、变体或衍生物。这样的突变、变体或衍生抗体形式是本领域已知的。本文中讨论了其非限制性实施方式。在一个实施方式中, 本公开的组合物和方法中使用的 T 细胞激活抗体是抗 CD3 抗体, 其选自莫罗单抗 (OKT3)、otelixizumab (TRX4)、替利珠单抗 (hOKT3 γ 1 (Ala-Ala))、visilizumab、识别 CD3 抗原/T 细胞抗原受体 (TCR) 复合物 (HIT3a) 内的 CD3 的 17-19kDa 链的抗体和识别 CD3e 内的 TCR 复合物 (UCHT1) 的 20kDa 亚基的抗体, 或其抗原结合片段。其他抗 CD3 抗体, 包括其抗原结合片段, 描述于美国专利公开 No. 2014-0088295 中, 将其按引用并入。

[0133] 本发明的实施方式包括“全长”抗体。在全长抗体中, 每条重链由重链可变区 (在本文中缩写为 HCVR 或 VH) 和重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域 CH1、CH2 和 CH3 组成。每条轻链由轻链可变区 (在本文中缩写为 LCVR 或 VL) 和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。VH 和 VL 区可以进一步细分成超可变区, 称为互补决定区 (CDR), 其散布着更保守的区域, 称为框架区 (FR)。每个 VH 和 VL 由三个 CDR 和四个 FR 组成, 以以下顺序从氨基末端排列至羧基末端排列: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。免疫球蛋白分子可以是任何类型 (例如, IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 和 IgY)、类别 (例如, IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2) 或亚类。

[0134] 如本文中使用的, 术语抗体的“抗原结合部分” (或简称“抗体部分”) 是指保留特异性地结合抗原 (例如, IL-13) 的能力的抗体的一个或多个片段。已经表明可以通过全长抗体的片段来执行抗体的抗原结合功能。这样的抗体实施方式还可以是双特异性的、双重特异性的或多特异性的形式; 特异性地结合两个或更多个不同的抗原。术语抗体的“抗原结合部分”内包括的结合片段的实例包括 (i) Fab 片段, 由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域的单价片段; (ii) F(ab')₂ 片段, 包括在铰链区通过二硫键连接的两个 Fab 片段的二价片段; (iii) Fd 片段, 由 VH 和 CH1 结构域组成; (iv) Fv 片段, 由抗体的单臂的 VL 和 VH 结构域组成, (v) dAb 片段 (Ward 等 (1989) Nature 341:544-546, Winter 等, PCT 公开 W0 90/05144A1, 按引用并入本文中), 其包括单个可变结构域; 和 (vi) 分离的补体决定区 (CDR)。此外, 尽管 Fv 片段的两个结构域, VL 和 VH, 通过分开的基因编码, 但可以使用重组方法, 通过合成接头将它们连接, 所述接头能使其作为单个蛋白质链制得, 其中 VL 和 VH 区配对形成单价分子 (称为单链 Fv (scFv)); 参见, 例如, Bird 等 (1988) Science 242:423-426; 和 Huston 等 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)。这样的单链抗体也打算包括在术语抗体的“抗原结合部分”内。还包括单链抗体的其他形式, 如双抗体。双抗体是二价的、双特异性抗体, 其中 VH 和 VL 结构域在单个多肽链上表达, 但使用太短以致不允许同一链上的两个结构域之间配对的接头, 由此迫使结构域与另一条链的互补结构域配对, 并且形成两个抗原结合位点 (参见, 例如, Holliger 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993); Poljak 等, Structure 2:1121-1123 (1994))。这样的抗体结合部分是本领域已知的 (Kontermann 和 Dubel 编辑, Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. New York. 790pp. (ISBN 3-540-41354-5))。

[0135] “抗体片段”只包括完整抗体的一部分, 其中所述部分优选保留至少一种并且通常大部分或全部正常与该部分存在于完整抗体中时相关的功能。在一个实施方式中, 抗体片

段包括完整抗体的抗原结合位点并且因此保留结合抗原的能力。在另一个实施方式中,抗体片段,例如,包括Fc区的,保留至少一种通常与Fc区存在于完整抗体中时相关的生物学功能,如FcRn结合、抗体半衰期调节、ADCC功能和补体结合。在一个实施方式中,抗体片段是具有与完整抗体基本上相似的体内半衰期的单价抗体。例如,这样的抗体片段可以包括连接于能够赋予所述片段体内稳定性的Fc序列的抗原结合臂。

[0136] 如本文中使用的,术语“抗体构建体”是指包括与接头多肽或免疫球蛋白恒定结构域连接的本公开的一个或多个抗原结合部分的多肽。接头多肽包括两个或更多个通过肽键连接的氨基酸残基并且用于连接一个或多个抗原结合部分。这样的接头多肽是本领域公知的(参见,例如,Holliger等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448 (1993);Poljak等,Structure 2:1121-1123 (1994))。免疫球蛋白恒定结构域是指重链或轻链恒定结构域。人IgG重链和轻链恒定结构域氨基酸序列是本领域已知的并且公开于美国专利No.7,915,388的表2中,将其完整内容按引用并入本文中。

[0137] 再进一步,抗体或其抗原结合部分可以是较大的免疫粘附分子的一部分,所述较大的免疫粘附分子通过抗体或抗体部分与一个或多个其他的蛋白质或肽的共价或非共价结合形成。这样的免疫粘附分子的实例包括使用抗生物素蛋白链菌素核心区域来制备四聚scFv分子(Kipriyanov等,Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101 (1995))和使用半胱氨酸残基、标志物肽和C-末端多组氨酸标签来制备二价和生物素化的scFv分子(Kipriyanov等,Mol.Immunol.31:1047-1058 (1994))。可以分别使用常规技术例如完整抗体的分别木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化从完整抗体制备抗体部分如Fab和F(ab')₂片段。此外,可以如本文中所述的使用标准重组DNA技术,获得抗体、抗体部分和免疫粘附分子。

[0138] 如本文中使用的,“分离的抗体”意欲指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(例如,特异性地结合CD3的分离抗体基本上不含特异性地结合CD3以外的其他抗原的抗体)。然而,特异性地结合CD3的分离抗体可以具有与其他抗原(如来自其他物种的CD3分子)的交叉反应性。此外,分离的抗体可以基本上不含其他细胞材料和/或化学物质。

[0139] 如本文中使用的,术语“人抗体”意欲包括具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本公开的人抗体可以包括不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或定点诱变或通过体内体细胞突变引入的突变),例如,在CDR中,并且特别是在CDR3中。然而,如本文中使用的,术语“人抗体”不打算包括其中源自另一个哺乳动物物种(如小鼠)的种系的CDR序列已经嫁接至人框架序列上的抗体。

[0140] 如本文中使用的,术语“重组人抗体”意欲包括通过重组方式制备、表达、形成或分离的所有人抗体,如使用转染至宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体(进一步描述于美国专利No.7,915,388,将其内容按引用并入本文中)、从重组的组合人抗体文库分离的抗体(Hoogenboom等,TIB Tech.15:62-70 (1994);Azzazy等,Clin.Biochem.35:425-445 (2002);Gavilondo等,BioTechniques 29:128-145 (2002);Hoogenboom等,Immunology Today 21:371-378 (2000))、从对于人免疫球蛋白基因是转基因的动物(例如,小鼠)分离的抗体(参见,例如,Taylor等,Nucl.Acids Res.20:6287-6295 (1992);Kellermann等,Current Opinion in Biotechnology 13:593-597 (2002);Little等,Immunology Today 21:364-370 (2002))或通过涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接至其他DNA序列的任何其他方式制备、表达、形成或分离的抗体。这样的重组人抗体具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区

和恒定区。然而,在某些实施方式,将这样的重组人抗体接受体外诱变(或,使用对于人Ig序列是转基因的动物时,体内体细胞诱变)并且因此重组抗体的VH和VL区的氨基酸序列是如下序列:尽管源自并且涉及人种系VH和VL序列,但可能没有天然存在于体内人抗体种系库中。一个实施方式提供了能够结合人CD3的完全人抗体,其可以使用本领域公知的技术来产生,如,但不限于,使用人Ig噬菌体文库,如Jermutus等,PCT公开No.WO2005/007699A2中公开的那些。

[0141] 术语“嵌合抗体”是指包括来自一个物种的重链和轻链可变区序列和来自另一个物种的恒定区序列的抗体,如具有连接人恒定区的小鼠重链和轻链可变区的抗体。用于生产嵌合抗体的方法是本领域已知的并且在实施例2.1中有详细讨论。参见,例如,Morrison, *Science* 229:1202 (1985); Oi等, *BioTechniques* 4:214 (1986); Gillies等 (1989), *J. Immunol. Methods* 125:191-202; 美国专利No. 5,807,715; 4,816,567和4,816,397,将其全部按引用并入本文中。此外,可以通过本领域已知的技术来产生“嵌合抗体”。参见, Morrison等, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:851-855; Neuberger等, 1984, *Nature* 312:604-608; Takeda等, 1985, *Nature* 314:452-454, 将其全部按引用并入本文中。

[0142] 如本文中使用的,术语“特异性结合”或“特异性地结合”,关于抗体、蛋白质或肽与第二个化学物质的相互作用,表示相互作用依赖于化学物质上特定结构(例如,抗原决定簇或表位)的存在;例如,抗体识别并结合特定的蛋白质结构,而不是一般地结合蛋白质。如果抗体对于表位“A”是特异性的,在包含标记的“A”和抗体的反应中,含有表位A(或游离的,未标记的A)的分子的存在将降低标记的A结合抗体的量。

[0143] 本发明的支架中使用的抗体可以是“单特异性的”、“双特异性的”或“多特异性的”。如本文中使用的,本文中的表述“抗体”意欲包括单特异性的抗体(例如,抗CD3抗体)以及包括结合目标抗原的一条臂(例如,CD3结合臂)和结合第二靶抗原的第二条臂的双特异性抗体。CD3双特异性抗体的另一条臂结合的靶抗原可以细胞、组织、器官、微生物或病毒之上或附近表达的任何抗原,相对其的靶向免疫应答是所需的。在某些实施方式中,CD3结合臂结合人CD3,并且诱导人T细胞增殖。该术语的含义内还包括结合CD3分子的不同区域的抗体,例如,结合CD3抗原/T细胞抗原受体(TCR)复合物(例如,源自HIT3a)内的CD3的17-19kD ϵ -链的臂,以及结合CD3 ϵ 的TCR复合物(例如,源自UCHT1)的20kDa亚基的臂。优选,所述抗CD3抗体是OKT3或其CD3结合片段。

[0144] 在一个实施方式中,本发明的支架中使用的抗体分子是双特异性抗体。双特异性抗体可以用于本发明的情况中,使得目标细胞(例如,癌细胞或病原体)接近本发明的靶效应细胞(例如,细胞毒性T细胞),使得在目标细胞上特异性地介导靶效应细胞的效应子功能。因此,在一个实施方式中,本发明提供了含有双特异性抗体的支架,其中抗体的一条臂结合CD3,而另一条臂结合靶抗原,其是肿瘤相关抗原。特定的肿瘤相关抗原的非限制性实例包括,例如,AFP、ALK、BAGE蛋白、 β -连环蛋白、bcr-abl、BRCA1、BORIS、CA9、碳酸酐酶IX、半胱天冬酶-8、CCR5、CD19、CD20、CD30、CD40、CDK4、CEA、CTLA4、细胞周期蛋白-B1、CYP1B1、EGFR、EGFRv111、ErbB2/Her2、ErbB3、ErbB4、ETV6-AML、EpCAM、EphA2、Fra-1、FOLR1、GAGE蛋白(例如,GAGE-1、-2)、GD2、GD3、GloboH、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3、GM3、gp100、Her2、HLA/B-raf、HLA/k-ras、HLA/MAG E-A3、hTERT、LMP2、MAGE蛋白(例如,MAGE-1、-2、-3、-4、-6和-12)、MART-1、间皮素、ML-IAP、Mud、Muc2、Muc3、Muc4、Muc5、Muc16 (CA-125)、MUM1、NA17、NY-BR1、

NY-BR62、NY-BR85、NY-ES01、OX40、p15、p53、PAP、PAX3、PAX5、PCTA-1、PLAC1、PRLR、PRAME、PSMA (FOLHI)、RAGE蛋白、Ras、RGS5、Rho、SART-1、SART-3、Steap-1、Steap-2、生存素、TAG-72、TGF- β 、TMPRSS2、Tn、TRP-1、TRP-2、酪氨酸酶和urolakin-3。

[0145] 在一个特定的实施方式中,所述癌抗原是表皮生长因子受体(EGFR)家族的成员,例如,选自EGFR (ErbB-1)、HER2/c-neu (ErbB-2)、Her3 (ErbB-3) 和Her4 (ErbB-4) 或其突变体的受体。

[0146] 在另一个实施方式中,本发明涉及含有双特异性T细胞啮合剂(engager) (BiTE) 分子的支架。BiTE分子特别是识别至少一种上述肿瘤抗原和至少一种T细胞细胞表面分子(例如,CD3) 的抗体。这样的双特异性T细胞啮合剂分子的代表性实例包括,但不限于,solitomab (CD3 \times EpCAM)、blinatumomab (CD3 \times CD19)、MAB MT-111 (CD3 \times CEA) 和BAY-2010112 (CD3 \times PSMA)。

[0147] 双特异性抗体还可以用于本发明的情况中以靶向效应细胞,如T细胞或B细胞,来直接或间接介导对病原体的作用,所述病原体例如为细菌、病毒、真菌、原生动物和其他微生物。在一个实施方式中,所述病原体是病毒。在另一个实施方式中,所述病原体是细菌。双特异性抗体已经用于治疗细菌感染,例如,抗药性铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。参见,DiGiandomenico等,Sci Transl Med.,6(262),2014;Kingwell等,Nat Rev Drug Discov.,14(1):15,2015。已经研发了其他双特异性来重定向细胞毒性T淋巴细胞来杀灭HIV(Berg等,Proc Natl Acad Sci.,88(11):4723-7,1991)、保护对抗HBV感染(Park等,Mol Immunol.,37(18):1123-30,2000) 和其他原型病原体(Taylor等,J Immunol.,159(8):4035-44,1997)。

[0148] 因此,在一个实施方式中,本发明提供了含有双特异性抗体的支架,其中抗体的一条臂结合CD3,而另一条臂结合靶抗原,其是传染病相关抗原(例如,细菌、原生动物、病毒或真菌抗原)。传染病相关抗原的非限制性实例包括,例如,在病毒颗粒的表面上表达的,或在感染了病毒的细胞上优先表达的抗原,其中所述病毒选自HIV、肝炎(甲肝、乙肝或丙肝)、疱疹病毒(例如,HSV-1、HSV-2、CMV、HAV-6、VZV、Epstein Barr病毒)、腺病毒、流感病毒、黄病毒、艾柯病毒、鼻病毒、柯萨奇病毒、冠状病毒、呼吸道合胞病毒、腮腺炎病毒、轮状病毒、麻疹病毒、风疹病毒、细小病毒、牛痘病毒、HTLV、登革热病毒、乳头状瘤病毒、软疣病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、JC病毒和虫媒病毒性脑炎病毒。或者,靶抗原可以是在细菌表面上表达的,或在感染细菌的细胞上优先表达的抗原,其中所述细菌来自选自衣原体、立克次体、分枝杆菌、葡萄球菌、链球菌、Pneumococci、脑膜炎球菌、淋球菌、克雷伯氏菌、变形杆菌、沙雷氏菌、假单胞菌、军团菌、Diphtheria、沙门氏菌、芽孢杆菌、梭菌和钩端螺旋体的属。在一些实施方式中,所述细菌引起霍乱、破伤风、肉毒梭菌中毒、炭疽、瘟疫或莱姆病。在某些实施方式中,靶抗原是在真菌表面上表达的,或在感染真菌的细胞上优先表达的抗原,其中所述真菌选自念珠菌属(例如,白色念珠菌、克柔念珠菌、光滑念珠菌、热带念珠菌等)、新生隐球菌、曲霉属(例如,烟曲霉、黑曲霉等)、毛霉菌目(例如,M.mucor、M.absidia、M.rhizopus等)、申克氏孢子丝菌、皮炎芽生菌、巴西副球孢子菌、粗球孢子菌和荚膜组织胞浆菌。在某些实施方式中,靶抗原是在寄生物表面上表达的,或在感染寄生物的细胞上优先表达的抗原,其中所述寄生物选自溶组织内阿米巴、结肠小袋纤毛虫、福氏耐格里变形虫、棘阿米巴属、兰伯氏贾第虫、隐孢子虫属、卡氏肺孢子虫、间日疟原虫、微小巴贝虫、布氏锥

虫、克氏锥虫、杜氏利什曼虫、刚地弓形虫、巴西日圆线虫、肥头绦虫和马来丝虫。特定的病原体相关抗原的非限制性实例包括,例如,HIV gp120、HIV CD4、乙肝糖蛋白L、乙肝糖蛋白M、乙肝糖蛋白S、丙肝E1、丙肝C E2、肝细胞特异性蛋白、单纯疱疹病毒gB、巨细胞病毒gB和HTLV包膜蛋白。

[0149] 在一些实施方式中,本发明的支架可以用于治疗和/或预防过敏反应或过敏应答。例如,在一些实施方式中,所述支架可以用于产生抑制过敏应答或反应的T细胞(例如,Treg)。例如,在一些实施方式中,所述支架包括抗CD3抗体和TGF- β 。在一些实施方式中,所述支架包括抗CD3抗体和IL-10。在一些实施方式中,所述支架包括抗CD3抗体和雷帕霉素。在一些实施方式中,所述支架包括抗CD3抗体、TGF- β 、IL-10和雷帕霉素。在一些实施方式中,所述支架包括抗CD3抗体、TGF- β 和IL-10。在一些实施方式中,所述支架包括抗CD3抗体和TGF- β 和雷帕霉素。在一些实施方式中,所述支架包括抗CD3抗体和IL-10和雷帕霉素。

[0150] 在一些实施方式中,本发明的支架可以用于选择性地扩增过敏原反应性T细胞(例如,Treg)。在一些实施方式中,所述支架包括源自过敏原的肽。在一些实施方式中,所述源自过敏原的肽在MHC分子(例如,I类MHC或II类MHC分子)上呈递(例如,与其复合)。在一些实施方式中,所述MHC分子是单体。在一些实施方式中,所述过敏原是食物过敏原(例如,香蕉、牛奶、豆类、贝类、树坚果、核果、蛋类、鱼类、大豆或小麦过敏原)。在一个实施方式中,所述过敏原选自食物过敏原、植物过敏原、昆虫过敏原、动物过敏原、真菌过敏原、病毒过敏原、乳胶过敏原和霉菌孢子过敏原。在一个实施方式中,过敏原多肽是昆虫过敏原。在一个实施方式中,昆虫过敏原是尘螨过敏原(例如,来自粉尘螨或屋尘螨的过敏原)。在一个实施方式中,所述过敏原多肽是卵白蛋白多肽。在一个实施方式中,所述过敏原多肽是食物过敏原多肽。在一些实施方式中,所述支架包括源自过敏原的肽和Th1-偏倚(skewing)细胞因子(例如,IL-12或IFN γ)。在一个实施方式中,所述过敏原多肽是食物过敏原多肽。在一些实施方式中,所述支架包括源自在MHC分子上呈递的过敏原的肽和Th1-偏倚细胞因子(例如,IL-12或IFN γ)。

[0151] 根据某些示例性实施方式,本发明包括特异性地结合CD3和CD28的双特异性抗原结合分子。这样的分子在本文中可以被称为例如“抗CD3/抗CD28”,或“抗CD3 \times CD28”或“CD3 \times CD28”双特异性分子,或其他相似的术语。

[0152] 如本文中使用的,术语“CD28”是指人CD28蛋白,除非特意指出来自非人物种(例如,“小鼠CD28”、“猴CD28”等)。人CD28蛋白具有GENBANK登录号No.NP_001230006.1、NP_001230007.1或NP_006130.1中所示的氨基酸序列。小鼠CD28蛋白具有GENBANK登录号No.NP_031668.3中所示的氨基酸序列。上述登录号包括的各种不同多肽序列包括相应的mRNA和基因序列,全部按引用并入本文中。如本文中使用的,表述“抗原结合分子”表示包括至少一个互补决定区(CDR)或由至少一个互补决定区(CDR)组成的蛋白质、多肽或分子复合物,所述CDR单独地或与一个或多个另外的CDR和/或框架区(FR)结合特异性地结合特定抗原。在某些实施方式中,抗原结合分子是抗体或抗体的片段,如本文中别处限定的那些术语。

[0153] 如本文中使用的,表述“双特异性抗原结合分子”表示至少包括第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的蛋白质、多肽或分子复合物。双特异性抗原结合分子内的每个抗原结合结构域包括至少一个CDR,所述CDR单独地或与一个或多个另外的CDR和/或框架区

(FR) 结合特异性地结合特定抗原。在本发明的内容中,所述第一抗原结合结构域特异性地结合第一抗原(例如,CD3),而第二抗原结合结构域特异性地结合第二个不同的抗原(例如,CD28)。

[0154] 双特异性抗体的第一抗原结合结构域和第二抗原结构域可以彼此直接或间接结合。或者,第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域可以各自连接单独的多聚化结构域。一个多聚化结构域与另一个多聚化结构域的结合促进了两个抗原结合结构域之间的结合,由此形成双特异性抗原结合分子。如本文中所用的,“多聚化结构域”是具有与相同或相似结构或构造的第二多聚化结构域结合的能力的任何大分子、蛋白质、多肽、肽或氨基酸。例如,多聚化结构域可以是包括免疫球蛋白CH3结构域的多肽。多聚化组分的非限制性实例是免疫球蛋白的Fc部分(包括CH2-CH3结构域),例如,选自同种型IgG1、IgG2、IgG3和IgG4以及每个同种型组内的任何同种异型的IgG Fc结构域。

[0155] 本发明的双特异性抗原结合分子通常将包括两个多聚化结构域,例如,各自单独地是独立的抗体重链的部分的两个Fc结构域。第一个和第二多聚化结构域可以是相同的IgG同种型,如,例如,IgG1/IgG1、IgG2/IgG2、IgG4/IgG4。或者,第一和第二多聚化结构域可以是不同的IgG同种型,如,例如,IgG1/IgG2、IgG1/IgG4、IgG2/IgG4等。

[0156] 在某些实施方式中,多聚化结构域是Fc片段或含有至少一个半胱氨酸残基的长度为1至约200个氨基酸的氨基酸序列。在其他实施方式中,多聚化结构域是半胱氨酸残基或短的含半胱氨酸的肽。其他多聚化结构域包括包含亮氨酸拉链、螺旋-环基序或卷曲-卷曲基序或由其组成的肽或多肽。

[0157] 双特异性抗体形式或技术可以用于制备本发明的双特异性抗原结合分子。例如,具有第一抗原结合特异性的抗体或其片段可以功能性地连接(例如,通过化学偶联、基因融合、非共价结合或其他)一个或多个其他分子实体,如具有第二抗原结合特异性的另一抗体或抗体片段,以产生双特异性抗原结合分子。可以用于本发明的情况中的特定示例性双特异性形式包括,不限于,例如,基于scFv或双抗体的双特异性形式、IgG-scFv融合体、双可变结构域(DVD)-Ig、Quadroma、杵-臼(knobs-into-hole)、共同轻链(例如,具有杵-臼的共同轻链等)、CrossMab、CrossFab、(SEED)体、亮氨酸拉链、Duobody、IgG1/IgG2、双作用Fab(DAF)-IgG和Mab2双特异性形式(对于前述的形式概述,参见,例如,Klein等,mAbs 4:6, 1-11, 2012和其中引用的参考文献)。

[0158] 多特异性抗体可以是对一个靶多肽的不同表位是特异性的或可以含有对超过一个靶多肽是特异性的抗原结合结构域。参见,例如,Tutt等,1991,J. Immunol. 147:60-69; Kufer等,2004,Trends Biotechnol. 22:238-244。本发明的抗CD3抗体可以连接另一个功能性分子,或与另一个功能性分子共表达,例如,另一个肽或蛋白质。例如,抗体或其片段可以功能性地连接(例如,通过化学偶联、基因融合、非共价结合或其他)一个或多个其他分子实体,如另一抗体或抗体片段,以产生具有第二结合特异性的双特异性或多特异性抗体。抗体的多特异性抗原结合片段通常将包含至少两个不同的可变结构域,其中每个可变结构域能够特异性地结合单独的抗原或同一抗原上的不同表位。可以使用本领域可利用的常规技术,使任何多特异性抗体形式,包括本文中公开的示例性双特异性抗体形式适用于本发明的抗体的抗原结合片段的情况中。本发明的多特异性抗原结合分子源自嵌合的、人源化的或全人抗体。用于制备多特异性抗体的方法是本领域公知的。例如,使用VELOCIMMUNE™技术

可以制备本发明的双特异性抗原结合分子的一条或多条重链和/或轻链。使用 VELOCIMUNE™ 技术 (或任何其他抗体产生技术), 最初分离了对特定抗原 (例如, CD3 或 CD28) 的高亲和性嵌合抗体, 其具有人可变区和小鼠恒定区。针对所需特征, 包括亲和性、选择性、表位等, 表征和选择抗体。用所需的人恒定区替代小鼠恒定区, 以产生可以并入本发明的双特异性抗原结合分子中的全人重链和/或轻链。

[0159] 在本发明的双特异性抗原结合分子的情况中, 与野生型、天然产生的 Fc 结构域形式相比, 多聚化结构域, 例如, Fc 结构域, 可以包括一个或多个氨基酸改变 (例如, 插入、删除或置换)。例如, 本发明包括双特异性抗原结合分子, 其在 Fc 结构域中包括一个或多个改变, 导致具有改变的 (例如, 增强的或消除的) 在 Fc 和 FcRn 之间的结合相互作用的修饰 Fc 结构域。在一个实施方式中, 双特异性抗原结合分子包括 CH2 或 CH3 区中的修饰, 其中所述修饰提高了酸性环境中 Fc 结构域对 FcRn 的亲合性 (例如, 在核内体中, 其中 pH 范围为约 5.5 至约 6.0)。例如, 在美国公开 No. 2014-0088295 中提供了非限制性实例。本发明还包括双特异性抗原结合分子, 其包括第一 CH3 结构域和第二 Ig CH3 结构域, 其中第一和第二 Ig CH3 结构域彼此有至少一个氨基酸不同, 并且其中与缺乏氨基酸差异的双特异性抗体相比, 该至少一个氨基酸差异降低了双特异性抗体与蛋白 A 的结合。在某些实施方式中, Fc 结构域可以是源自超过一个免疫球蛋白同种型的嵌合的、组合的 Fc 序列。

[0160] 在另一个实施方式中, T 细胞激活分子是主要组织相容性复合物 (MHC) 分子, 其结合 CD3。代表性实例包括, 但不限于, 结合 TCR 和 CD8 的 I 型 MHC 或结合 TCR 和 CD4 的 II 型 MHC。MHC 分子可以任选加载有抗原, 例如, 生物素化的肽。在其他实施方式中, MHC 分子可以与免疫球蛋白缀合, 例如, 免疫球蛋白 G (IgG) 链的 Fc 部分。在另一个实施方式中, 可以使用多个 MHC-肽复合物。在后一种情况中, 可以将 MHC-肽复合物的多个拷贝共价或非共价地连接多聚化结构域。这样的 MHC 多聚体的已知实例包括, 但不限于, MHC-二聚体 (含有两个 MHC-肽的拷贝; 将 IgG 用作多聚化结构域, 并且 MHC 蛋白的结构域中的一个共价连接 IgG); MHC-四聚体 (含有四个 MHC-肽的拷贝, 其各自是生物素化的并且 MHC 复合物通过抗生物素蛋白链菌素四聚体蛋白一起保持在复合物中, 在抗生物素蛋白链菌素单体和 MHC 蛋白之间提供非共价连接); MHC-五聚体 (含有五个 MHC-肽复合物的拷贝, 通过自组装卷曲-卷曲结构域多聚化); MHC dextramer (通常含有超过十个 MHC 复合物, 其连接葡聚糖聚合物) 和 MHC 连锁状多聚体 (streptamer) (含有 8-12 个连接抗生物素蛋白链菌素的 MHC-肽复合物)。MHC 四聚体描述于美国专利 No. 5,635,363; MHC 五聚体描述于美国专利 2004109295 中; MHC-dextramer 描述于专利申请 WO 02/072631 中。MHC 连锁状多聚体描述于 Knabel M 等, Nature Medicine 6.631-637, 2002 中。

[0161] 还可以以非 CD3 依赖性方式激活靶 T 细胞, 例如, 通过 CD3 以外的一个或多个细胞表面受体的结合和/或连接。这样的细胞表面分子的代表性实例包括, 例如, CD2、CD47、CD81、MSR1 等。

[0162] 在这种情况下, CD2 实际上在所有 T 细胞 (并且还有自然杀伤 (NK) 细胞) 上发现了, 并且在 T 淋巴细胞功能中是重要的。CD2 与几种蛋白质相关, 包括 CD3、CD5 和 CD45。CD2-CD58 相互作用促进了 T 细胞和 APC 之间的细胞-细胞接触, 由此通过 TCR/CD3 复合物增强了抗原识别。CD2 还起到信号传导作用。使用针对 CD2 的抗体的共刺激阻断可能是器官移植中有效的免疫抑制策略。因此, 在一个实施方式中, 通过使用特异性地结合 CD2 的抗体或其抗原结合

片段来激活T细胞。抗CD2抗体的代表性实例包括,例如,siplizumab (MEDI-507) 和LO-CD2b (ATCC登录号No.PTA-802;于1999年6月22日保藏)。

[0163] CD47 (IAP) 属于免疫球蛋白超家族并且是膜整联蛋白伴侣,以及还结合配体血小板反应素-1 (TSP-1) 和信号调节蛋白 α (SIRP α)。参见Barclay等,Curr.Opin.Immunol.21 (1):47-52,2009;Br.J.Pharmacol.,167 (7):1415-30,2012。CD47与信号调节蛋白 α (SIRP α) 相互作用,信号调节蛋白 α (SIRP α) 是存在于骨髓细胞上的跨膜受体。CD47/SIRP α 相互作用导致双向信号传导,导致不同的细胞-细胞反应,包括吞噬作用的抑制、细胞-细胞融合的刺激和T细胞激活。参见,Reinhold等,J Exp Med.,185 (1):1-12,1997。根据本发明,在一个实施方式中,通过使用特异性地结合CD47的抗体或其抗原结合片段激活T细胞。抗CD47抗体的代表性实例包括,例如,单克隆抗体Hu5F9-G4,在对抗骨髓性白血病的各种临床试验中对其进行了研究,以及单克隆抗体MABL-1和MABL-2 (FERM保藏号No.BP-6100和BP-6101)。参见,例如,W01999/12973,将其中的公开内容按引用并入本文中。

[0164] CD81是蛋白质的四跨膜蛋白超家族的成员。其在广泛的组织上表达,包括T细胞和造血细胞。已知CD81起着免疫调节作用。特别地,CD81的交联在体外增强CD3介导的 $\alpha\beta$ 和 $\gamma\delta$ T-淋巴细胞的激活并且诱导 $\gamma\delta$ T细胞的非TCR依赖性地细胞因子产生。根据本发明,在一个实施方式中,通过使用特异性地结合CD81的抗体或其抗原结合片段来激活T细胞。参见,Menno等,J.Clin.Invest.,4:1265,2010。抗CD81抗体的代表性实例包括,例如,单克隆抗体5A6。参见,例如,Maecker等,BMC Immunol.,4:1,2003.,将其中的公开内容按引用并入本文中。

[0165] MSR1 (CD204) 属于A类巨噬细胞清道夫受体的家族,其包括通过交替剪接MSR1基因产生的三个不同类型 (1、2、3)。这些受体或亚型是三聚的整合膜糖蛋白并且涉及许多巨噬细胞相关的生理和病理过程,包括动脉粥样硬化、阿尔茨海默病和宿主防御。参见,Matsumoto等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.87 (23):9133-7,1990。最近的研究证明了树突 (DC) MSR1影响CD8T细胞的激活和增殖,并且抗体介导的MSR1的阻断提高了体外T细胞的增殖和扩增。Lerret等,PLoS One.,7 (7):e41240,2012。根据本发明,在一个实施方式中,通过使用特异性地结合MSR1的抗体或其抗原结合片段来激活T细胞。抗MSR1抗体的代表性实例包括,例如,大鼠抗人CD204抗体 (Thermo目录号No.MA5-16494) 和山羊抗人CD204/MSR1抗体 (Biorad目录号No.AHP563)。

[0166] 在另一个实施方式中,通过连接/结合于在T细胞中普遍表达的T细胞受体 (TCR) 分子来激活T细胞。TCR是由两条不同的蛋白质链组成的杂二聚体。在人类中,在95%T细胞中,TCR由 α (alpha) 和 β (beta) 链组成,而在5%T细胞中,TCR由 γ (gamma) 和 δ (delta) 链组成。TCR与抗原肽和MHC (肽/MHC) 啮合时,通过信号传导激活T淋巴细胞。根据本发明,在一个实施方式中,通过使用特异性地结合TCR的抗体或其抗原结合片段来激活T细胞。抗TCR抗体的代表性实例包括,例如,小鼠抗人TCR单克隆抗体IMMU510 (Immunotech,Beckman Coulter,Fullerton,CA) (描述于Zhou等,Cell Mol Immunol.,9 (1):34-44,2012) 和限定 α/β TCR WT31的单克隆抗体 (描述于Gupta等,Cell Immunol.,132 (1):26-44,1991)。

[0167] 在另一个实施方式中,T细胞激活分子是任选加载MHC肽的主要组织相容性复合物 (MHC) 分子。存在两个大类的MHC分子。I类MHC (pMHC) 分子在几乎全部细胞上发现了并将肽呈递给细胞毒性T淋巴细胞 (CTL)。II类MHC分子主要在抗原呈递免疫细胞 (APC) 上发现,其

摄入多肽抗原(例如,在微生物中),并将其消化成肽片段。随后MHC-II分子将肽片段呈递给辅助T细胞,其在激活后通常为免疫系统的其他细胞(例如,CTL或产生抗体的B细胞)的反应提供所需的辅助活性。I类MHC(pMHC)的重链的结合裂隙中结合的肽和T细胞受体的互补决定区(CDR)之间的相互作用决定了细胞免疫性的输入和输出阶段中T细胞激活的潜能。在TCR和MHC肽复合物之间存在的亲和性在效应子功能的发生、初始激活期间和执行期间调节T细胞命运。

[0168] 因此,在一个实施方式中,本发明涉及含有任选加载肽的人MHC分子的MSR-SLB支架。这样的MHC分子的代表性实例包括HLA-A、HLA-B、HLA-C、DP、DQ和DR,或其组合。MHC分子是单价或双价的。在一些实施方式中,MHC分子的二价或多价性是信号递送(激活或抑制信号)至T细胞所需的。因此,在一些实施方式中,本发明的MSR-SLB支架包括至少两个连接于接头的相同的MHC分子。

[0169] 二价MHC分子的接头起到三个作用。首先,接头给予所需的二价或多价性。其次,接头提高整个融合蛋白在体内的半衰期。第三,接头决定融合蛋白是否将激活或抑制T细胞。T细胞启动需要通过TCR的刺激和通常通过APC递送的另外的第二信号。在不存在第二信号的情况下,可能导致T细胞响应低下。通过构建其中接头允许递送第二信号的融合蛋白,T细胞刺激导致增强的T细胞免疫性。通过构建其中接头没有提供第二信号递送的融合蛋白,T细胞抑制导致免疫抑制。可以通过使用允许第二信号递送至T细胞(除了通过TCR递送的信号外)的接头,构建具有T细胞刺激性质的融合蛋白。这可以通过使用对另一细胞上的细胞表面结构具有结合亲和性的接头来完成,所述另一细胞能够将第二信号递送至T细胞。因此,接头用于桥接T细胞和其他细胞。通过将其他细胞带至T细胞附近,所述其他细胞可以将第二信号递送至T细胞。

[0170] 实例包括可以结合其他细胞上的Fc受体的接头,如某些免疫球蛋白链或免疫球蛋白链的部分。特定的实例包括IgG、IgA、IgD、IgE和IgM。使用免疫球蛋白时,不需要整个蛋白质。例如,可以在铰链区分裂免疫球蛋白基因,并且仅编码重链的铰链、CH2和CH3结构域的基因用于形成融合蛋白。接头可以结合其他细胞表面结构。例如,接头可以包括用于许多细胞表面抗原的同源部分,其可以用作将第二细胞带至T细胞附近的桥。接头还可以独立地递送第二信号。例如,对T细胞抗原CD28具有结合亲和性的接头可以递送第二信号。此外,接头可以提高整个融合蛋白在体内的半衰期。可以通过使用不导致第二信号递送的接头来构建具有T细胞抑制性质的融合蛋白。实例包括不结合Fc受体的Ig链、Ig F(ab')₂片段、锌指基序、亮氨酸拉链和非生物物质。非生物物质的实例包括塑料微珠,或甚至是较大的塑料元件,如塑料杆或管,以及其他可植入体内的生理上可接受的载体。

[0171] 在一些实施方式中,MHC分子没有连接接头。不希望受到任何特定理论的束缚,据信脂质双层的流体性质允许T细胞识别膜并形成多价簇。这些簇随后可以被分解,而如果信号传导分子与接头连接在一起,则这是不可能的。无法分解这些多价簇可能潜在地导致过度刺激和T细胞耗尽或无能(参见,例如,Lee K-H等,Science 302(5648):1218-22(2003))。

[0172] 在一些实施方式中,APC-MS的脂质双层包括有利于脂质物质自发分配到液体有序结构域(liquid-ordered domain)中的脂质组合物(参见,例如,Wang T-Y等,Biochemistry 40(43):13031-40(2001))。

[0173] 任选,MHC分子可以加载特定的肽(例如,源自病毒抗原、细菌抗原或过敏原的肽)。

制得融合蛋白后,融合蛋白的特定肽可以加载至MHC分子中。所述肽随后还可以共价连接MHC,例如,通过UV交联。或者,可以将肽序列并入编码融合蛋白的DNA序列中,使得肽在融合蛋白产生过程中加载至MHC分子中。在后一种情况中,肽可以利用系链(tether),如聚赖氨酸连接,这允许其与融合蛋白的MHC部分复合。待加载至MHC分子中的特定肽实际上是无限的,并且基于所需的应用来确定。例如,为了增强T细胞免疫性,可以使用来自不同来源例如病毒、真菌和细菌感染或肿瘤的,的肽。为了抑制自身免疫中的T细胞免疫性,可以使用自身反应性肽。为了抑制对移植的组织的T细胞免疫性,可以使用通过同种异体抗原呈递的自身肽。

[0174] 毒素,如蓖麻毒素和白喉毒素,以及放射性同位素可以与融合蛋白复合(例如,使用5-甲基-2-亚氨基硫杂环戊烷),来杀灭特定的T细胞克隆。这些毒素可以与接头或融合蛋白的MHC部分化学偶联,或它们可以结合至编码融合蛋白的DNA序列中,使得毒素在融合蛋白产生的过程中与融合蛋白复合。

[0175] 可以通过构建编码融合蛋白产生的基因来制备MHC-肽/免疫球蛋白融合蛋白。或者,可以使用化学缀合方法来组装融合蛋白的组分。编码MHC分子和接头的基因的来源可以获自各种数据库。在I类MHC融合蛋白的情况中,MHC片段可以连接接头,并且可以允许 β 2微球蛋白自我结合。或者,可以构建融合蛋白基因,使得 β 2微球蛋白通过醚连接MHC片段。在II类MHC融合蛋白的情况中, α 或 β 链可以连接接头并且可以允许另一条链自我结合。或者,可以构建融合蛋白基因,使得 α 和 β 链通过系链连接。可以通过编码成融合蛋白基因构建体来制备肽,或可选地,使用本领域普通技术人员可利用的标准方法使用肽合成仪来制备肽。可以使用常规技术来施用所得到的完整融合蛋白。

[0176] T细胞共刺激分子

[0177] 在一个实施方式中,本发明提供了含有多数T细胞共刺激分子的MSR-SLB支架。这些共刺激分子可以介导靶T细胞群体的直接、间接或半直接刺激。优选,在一种或多种T细胞激活分子的存在下,共刺激分子介导T细胞的激活。

[0178] 术语“共刺激分子”根据本领域认知的其在免疫T细胞激活中的意义用于本文中。具体地,“共刺激分子”是指一组免疫细胞表面受体/配体,其在T细胞和抗原呈递细胞之间啮合,并且在T细胞中产生刺激性信号,其与从抗原呈递细胞上抗原的T细胞受体(“TCR”)识别产生的T细胞中的刺激信号结合(即,“共刺激”)。如本文中使用的,“源自APC”的共刺激分子的可溶性形式是指通常通过B细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突细胞和其他APC表达的共刺激分子。参见,Huppa等,Nature Reviews Immunology.3,973-983(2003)。“T细胞激活的共刺激剂”是指共刺激配体结合并激活T细胞的能力,该T细胞已经通过上述任一种机理或途径激活,例如,通过CD3依赖性或非CD3依赖性T细胞激活。可以如公知的通过细胞因子的产生和通过公知的增殖分析(例如,CFSE染色)和/或按照以下实施例中所述的,测量T细胞的共刺激激活。

[0179] 在一个实施方式中,本发明提供了含有特异性地结合共刺激抗原的分子的MSR-SLB支架。特别地,MSR-SLB支架含有多数T细胞共刺激分子,其特异性地结合CD28、4.1BB(CD137)、OX40(CD134)、CD27(TNFRSF7)、GITR(CD357)、CD30(TNFRSF8)、HVEM(CD270)、LT β R(TNFRSF3)、DR3(TNFRSF25)、ICOS(CD278)、CD226(DNAM1)、CRTAM(CD355)、TIM1(HAVCR1)、KIM1、CD2(LFA2、OX34)、SLAM(CD150、SLAMF1)、2B4(CD244、SLAMF4)、Ly108(NTBA、CD352、

SLAMF6)、CD84 (SLAMF5)、Ly9 (CD229、SLAMF3)、CD279 (PD-1) 和/或CRACC (CD319、BLAME)。

[0180] 在一个实施方式中,共刺激分子是特异性地结合一种或多种上述共刺激抗原的抗体或其抗原结合片段。在这点上,CD28是原型T细胞共刺激抗原并且结合APC (如树突细胞和激活的B细胞) 上表达的B7家族的分子。在全部CD4+T细胞和约一半的CD8+T细胞上发现人CD28。归因于CD28的T细胞活性包括能量的阻止、细胞因子基因转录的诱导、细胞因子mRNA的稳定和CD8+细胞毒性T淋巴细胞的激活。鉴定为CD80 (B7-1) 和CD86 (B7-2) 的CD28配体分别是60kd和80kd的免疫球蛋白超家族单体跨膜糖蛋白。

[0181] 在一个实施方式中,本发明涉及含有特异性地结合CD28的抗体或其抗原结合片段的MSR-SLB支架。抗CD28抗体的代表性实例包括,例如,lulizumab pegol和TGN1412。还参见美国专利No.8,785,604。

[0182] 在另一个实施方式中,本发明涉及含有特异性地结合ICOS (CD278) 的抗体或其抗原结合片段的MSR-SLB支架。ICOS是在激活的T细胞上表达的CD28超家族共刺激分子。其据认为特别是对于Th2细胞是重要的。抗ICOS抗体的代表性实例包括,例如,单克隆抗体2C7,其识别在激活的T细胞上表达的ICOS分子并且诱导抗人CD3单克隆抗体预刺激的T细胞的激活以及增殖。参见,Deng等,Hybrid Hybridomics.,23 (3):176-82,2004。

[0183] 在另一个实施方式中,本发明提供了含有特异性地结合CD152 (CTLA4) 的抗体或其抗原结合片段的MSR-SLB。所述抗体优选是中和抗体或阻断抗体。CD152在激活的CD4+和CD8+T细胞上以及在调节T细胞 (Treg) 上表达。其在T细胞生物学中起作用,在针对感染的免疫应答过程中,并且作为癌症免疫治疗的靶标,已经得到了充分描述 (Egen等,Nat. Immunol., 3 (7):611-618,2002)。CTLA-4是CD28的同源对应物,两者都结合APC上的CD80和CD86。CTLA-4对于免疫耐受性的重要性是清楚的 (Waterhouse等,Science,270 (5238):985-988,1995)。这些包括对于配体结合比CD28分子显著 (out-competing) 较低的亲和性以最小化T细胞共刺激、对TCR复合物的抑制性磷酸酶的募集 (以破坏正向信号级联) 和通过反内吞作用从APC的表面除去CD80和CD86,由此消除APC正确地激活另外响应性的T细胞的能力。因此,CTLA-4受体/途径的利用是有吸引力的调节T细胞免疫性的策略。实际上,抗CTLA-4是FDA批准的第一种用于癌症患者的检查点阻断治疗的单克隆抗体 (ipilimumab)。根据本发明可以使用的CTLA-4抗体的其他实例包括tremelimumab及其抗原结合片段。

[0184] 在另一个实施方式中,本发明提供含有特异性地结合程序化死亡-1 (PD-1;CD279) 的抗体或其抗原结合片段的MSR-SLB支架。PD1是与CD28和CTLA-4相同的受体家族的成员,并且在淋巴和骨髓细胞上广泛表达。PD-1唯一结合APC和其他周围组织上的B7配体PD-L1和PD-L2,很大程度上影响了慢性感染情况中反应的CD8+T细胞的命运。在T细胞上,PD-1在遇到抗原后表达,但几乎立即起作用以通过PD-1细胞质尾中的信号基序募集磷酸酶SHP-1和SHP-2来阻止T细胞激活,这降低了Akt磷酸化并且降低了T细胞代谢、增殖和存活。因此,所述抗体优选是中和抗体或阻断抗体。这样的抗PD-1抗体的代表性实例包括,例如,纳武单抗 (nivolumab)、lambrolizumab (MK-3475)、pidilizumab (CT-011) 和AMP-224。

[0185] 在另一个实施方式中,本发明涉及含有特异性地结合CD81的抗体或其抗原结合片段的MSR-SLB支架。CD81的啮合降低了CD4+T细胞中引发T细胞/CD3介导的前病毒DNA需要的信号传导阈值 (Tardif等,J. Virol. 79 (7):4316-28,2005)。抗CD81抗体的代表性实例包括,例如,单克隆抗体5A6。参见,例如,Maecker等,BMC Immunol., 4:1,2003,将其中的公开内容

按引用并入本文中。

[0186] 在另一个实施方式中,本发明涉及含有特异性地结合CD137的抗体或其抗原结合片段的MSR-SLB支架。CD137的交联增强了T细胞增殖、IL-2分泌、存活和细胞溶解活性。此外,其可以增强免疫活性以消除体内肿瘤。因此,结合CD137的抗体优选是激动抗体。抗CD137抗体的代表性实例包括,例如,单克隆抗体utomilumab,其是目前在正临床试验中研究的人IgG。参见国家临床试验ID:NCT01307267。

[0187] 在另一个实施方式中,本发明涉及含有特异性地结合OX40 (CD134) 的抗体或其抗原结合片段的MSR-SLB支架。OX40L结合T细胞上的OX40受体,从而防止其死亡并且随后提高细胞因子产生。OX40维持头几天后的免疫应答中具有关键作用,并且由于其增强存活的能力,有助于记忆应答。OX40在体内的Th1和Th2介导的反应中也都起着关键作用。因此,结合OX40的抗体优选是激动抗体。抗OX40抗体的代表性实例包括,例如,抗OX40单克隆抗体utomilumab,其正在各种临床试验中进行研究(参见国家临床试验ID:NCT01644968、NCT01303705和NCT01862900)。

[0188] 在另一个实施方式中,本发明涉及含有特异性地结合CD27 (TNFRSF7) 的抗体或其抗原结合片段的MSR-SLB支架。CD27是TNF-受体超家族的成员并且是T细胞免疫性的产生和长期维持所需的。其结合配体CD70,并且在调节免疫球蛋白合成中起着关键作用。CD27支持天然(*naïve*)T细胞的抗原特异性扩增(但没有效应细胞成熟),与CD28和IL2的细胞周期促进活性无关(Hendriks等,Nature Immunology 1,433-440,2000)。因此,本发明的MSR-SLB支架优选包括结合CD27的激动抗体。抗CD27抗体的代表性实例包括,例如,单克隆抗体varlilumab。参见,Ramakrishna等,Journal for ImmunoTherapy of Cancer,3:37,2015。

[0189] 在另一个实施方式中,本发明涉及含有特异性地结合糖皮质激素诱导的TNF受体家族调节的基因(GITR或CD357)的抗体或其抗原结合片段的MSR-SLB支架。GITR是25kD TNF受体超家族成员,其在激活的淋巴细胞上表达。GITR通过T细胞受体啮合上调。GITR的细胞质结构域与CD40、4-1BB和CD27同源。GITR信号传导已经显示出调节T细胞增殖和TCR介导的凋亡,并且破坏免疫自身耐受性。GITR进一步结合GITRL,并且涉及调节T细胞的发育和调节Th1子集的活性。用激动抗体调节GITR已经显示出能通过多重机制扩增动物模型中的抗肿瘤免疫应答。设计抗GITR抗体来激活GITR受体,由此提高效应T细胞的增殖和功能。同时,Treg表面上的GITR连接可以消除这些细胞对肿瘤特异性效应T细胞的抑制功能,因此进一步增强T细胞免疫应答。抗GITR抗体的代表性实例包括,例如,人源化的、Fc失能的抗人GITR单克隆抗体TRX518,其诱导肿瘤抗原特异性T效应细胞的激活,以及消除由不当激活的T调节细胞诱导的抑制。TRX518正在各种临床试验中进行研究(参见国家临床试验ID:NCT01239314)。

[0190] 在另一个实施方式中,本发明涉及含有特异性地结合CD30 (TNFRSF8) 的抗体或其抗原结合片段的MSR-SLB支架。CD30抗原是属于肿瘤坏死因子受体超家族的跨膜糖蛋白,其在受到刺激时,对细胞生长和存活发挥多向性作用。在正常或发炎的组织中,CD30表达限于中等/大的激活的B和/或T淋巴细胞。其通过激活的而不是静止的T和B细胞来表达(Guo等,Infect.Immun.,81(10),3923-3934,2013)。通过体内施用激动抗CD30单克隆抗体(MAb)刺激CD30L/CD30信号恢复了CD30L敲除小鼠中 $V\gamma 1-V\gamma 4-\gamma\delta$ T细胞的IL-17A产生。抗CD30抗体的代表性实例包括,例如,brentuximab vedotin(Adcetris)。

[0191] 在另一个实施方式中,本发明涉及含有特异性地结合HVEM (CD270) 的抗体或其抗原结合片段的MSR-SLB支架。CD270是TNF-受体超家族的成员。这个受体鉴定为单纯疱疹病毒 (HSV) 进入的细胞介质。这个基因中的突变已经重复地与弥散性大B-细胞淋巴瘤的病例相关。抗CD270抗体的代表性实例包括,例如,单克隆抗体HVEM-122。参见,Cheung等,J. Immunol., 185:1949,2010;Hobo等,J. Immunol., 189:39,2012。

[0192] 在另一个实施方式中,本发明涉及含有特异性地结合淋巴毒素 β 受体 (LT β R; TNFRSF3) 的抗体或其抗原结合片段的MSR-SLB支架。LT β R涉及CD4+T细胞启动 (Summers deLuca等,J. Exp. Med., 204 (5) :1071-81,2007)。抗LT β R抗体的代表性实例包括,例如,单克隆抗体BBF6抗体。还参见W02010/078526,将其按引用并入。

[0193] 在另一个实施方式中,本发明涉及含有特异性地结合DR3 (TNFRSF25) 的抗体或其抗原结合片段的MSR-SLB支架。据认为DR3涉及控制由T细胞激活诱导的淋巴细胞增殖。具体地,DR3的激活依赖于T细胞受体的预先啮合。结合TL1A后,DR3信号传导提高了T细胞通过IL-2受体对内源性IL-2的敏感性并且增强了T细胞增殖。因为受体的激活是T细胞受体依赖性的,体内DR3活性对于遇到同源抗原的那些T细胞是特异性的。静止时,并且对于没有基础自身免疫的个体,规律地遇到同源抗原的大部分T细胞是FoxP3+调节T细胞。TNFRSF25的刺激,在不存在任何其他外源信号的情况下,刺激明显的并且高度特异性的FoxP3+调节T细胞的增殖,在5天内从全部CD4+T细胞的8-10%到全部CD4+T细胞的35-40%。DR3激动剂的代表性实例包括,例如,特异性地结合DR3的抗体 (Reddy等,J. Virol., 86 (19) 10606-10620, 2012) 和激动剂4C12 (Wolf等,Transplantation, 27;94 (6) :569-74,2012)。

[0194] 在另一个实施方式中,本发明涉及含有特异性地结合CD26 (DNAM1) 的抗体或其抗原结合片段的MSR-SLB支架。CD226是在天然杀伤细胞、血小板、单核细胞和T细胞子集的表面上表达的~65kDa糖蛋白。其是免疫球蛋白超家族的成员并且介导细胞粘附于带有其配体CD112和CD155的其他细胞。CD226与抗体的交联引起细胞激活,并且CD226和LFA-1与其各自的配体的连接在引发T和NK细胞的细胞毒性和细胞因子分泌中合作 (Tahara等, Int. Immunol. 16 (4) :533-8,2004)。

[0195] 在另一个实施方式中,本发明涉及含有特异性地结合CRTAM (CD355) 的抗体或其抗原结合片段的MSR-SLB支架。CTRAM是I类MHC限制的T细胞相关分子,其调节一些CD4+T细胞中的晚期细胞极性。CTRAM还调节干扰素- γ (IFN γ) 和白细胞介素-22 (IL-22) 产生。在一个实施方式中,MSR-SLB支架包括单克隆抗CTRAM抗体。CRRAM抗体的代表性实例包括例如小鼠抗人CTRAM抗体21A9 (GENTEX Inc. USA, Irvine, CA)。

[0196] 在另一个实施方式中,本发明涉及含有特异性地结合TIM1 (HAVCR1, KIM1) 的抗体或其抗原结合片段的MSR-SLB支架。TIM基因属于I型细胞表面糖蛋白,其包括N-末端免疫球蛋白 (Ig)-样结构域、具有不同长度的粘液素结构域、单跨膜结构域和C-末端短细胞质尾。TIM基因的定位和功能在每个成员之间是发散的。TIM-1优选在Th2细胞上表达并且已经鉴定为用于T细胞激活的刺激分子 (Umetsu等, Nat. Immunol. 6 (5) :447-54,2005)。在一个实施方式中,MSR-SLB支架包括单克隆抗TIM1抗体。TIM1抗体的代表性实例包括,例如,兔抗人TIM1抗体ab47635 (ABCAM, Cambridge, MA)。

[0197] 在另一个实施方式中,本发明涉及含有特异性地结合SLAM (CD150, SLAMF1) 的抗体或其抗原结合片段的MSR-SLB支架。SLAM (CD150) 是自身配体和细胞表面受体,其起到共刺

激分子的作用并且还是控制巨噬细胞杀灭革兰氏阴性细菌的微生物传感器。特别地,SLAM调节NADPH氧化酶NOX2复合物的活性和在进入吞噬体后(在与细菌外膜蛋白相互作用后)的吞噬溶酶体成熟(Berger等,Nature Immunology 11,920-927,2010)。Slamf1在激活的和记忆T细胞的表面上以及在激活的B细胞、树突细胞、巨噬细胞和血小板上表达(Calpe等,Adv.Immunol.2008;97:177)。在一个实施方式中,MSR-SLB支架包括单克隆抗SLAM1抗体或其抗原结合片段。SLAM1抗体的代表性实例包括,例如,兔抗人SLAM1抗体600-401-EN3(Rockland Antibodies,Limerick,PA)。

[0198] 在另一个实施方式中,本发明涉及含有特异性地结合2B4 (CD244,SLAMF4) 的抗体或其抗原结合片段的MSR-SLB支架。CD244是在介导非主要组织相容性复合物(MHC)限制性杀灭的自然杀伤细胞(NK细胞)(和一些T细胞)上表达的细胞表面受体。据认为NK细胞和靶细胞之间通过这种受体的相互作用介导了NK细胞溶细胞活性。CD244是共抑制SLAM家族成员,其在存在选择性CD28阻断的免疫调节的情况下,削弱了初级抗原特异性CD8(+) T细胞应答。最近的研究揭示了在其中CD28信号传导被阻断的动物中,2B4对抗原特异性CD8(+) T细胞的特异性上调(Liu等,J Exp Med.2014年2月10日;211(2):297-311)。在一个实施方式中,所述MSR-SLB支架包括单克隆抗CD244抗体或其抗原结合片段。CD244抗体的代表性实例包括,例如,抗2B4抗体C1.7或PE缀合的抗2B4(C1.7),其已经在Sandusky等中进行了表征(Eur J Immunol.2006年12月;36(12):3268-76)。

[0199] 在另一个实施方式中,本发明涉及含有特异性地结合Ly108 (NTBA、CD352、SLAMF6) 的抗体或其抗原结合片段的MSR-SLB支架。SLAMF6是I型跨膜蛋白,属于免疫球蛋白超家族的CD2亚家族,其在自然杀伤(NK)、T和B淋巴细胞上表达。与标准CD28途径相比时,T淋巴细胞通过SLAMF3/SLAMF6途径的共刺激介导了更有效的对IL-17A表达的作用。SLAMF3/SLAMF6信号传导介导了提高的核丰度并将ROR γ t募集至附近的IL17A启动子,导致提高的反式激活和基因表达(Chatterjee等,J Biol Chem.,287(45):38168-38177,2012)。在一个实施方式中,MSR-SLB支架包括单克隆抗CD244抗体或其抗原结合片段。CD244抗体的代表性实例包括,例如,在Flaig等(J.Immunol.2004.172:6524-6527)和Stark等(J.Immunol.Methods 2005.296:149-158)中表征的抗NTB-A抗体。

[0200] 在另一个实施方式中,本发明涉及含有特异性地结合CD84 (SLAMF5) 的抗体或其抗原结合片段的MSR-SLB支架。CD84是免疫球蛋白受体超家族的CD2亚组的成员。这个家族的成员涉及T细胞和NK细胞的激活。CD84提高了激活的T细胞的增殖反应,并且同亲型(homophilic)相互作用增强了淋巴细胞中的干扰素 γ 分泌。CD84还可以作为用于造血祖细胞的标志物。参见具有PUBMED ID Nos.11564780、12115647、12928397、12962726、16037392的参考文献中的公开内容,其表示它是延长的T细胞:B细胞接触、最佳Th功能和生发中心形成所需的。在一个实施方式中,MSR-SLB支架包括单克隆抗CD84抗体或其抗原结合片段。CD84抗体的代表性实例包括,例如,PE抗人CD84抗体CD84.1.21,其能够增强CD3诱导的IFN- γ 产生并部分阻断CD84-Ig与淋巴细胞的结合(BioLegend,San Diego,CA;目录号No.326008)

[0201] 在另一个实施方式中,本发明涉及含有特异性地结合Ly9 (CD229,SLAMF3) 的抗体或其抗原结合片段的MSR-SLB支架。CD229通过同亲型相互作用参与T淋巴细胞和副卫细胞之间的粘附反应。其还促进T细胞分化成辅助T细胞Th17表型,导致提高的IL-17分泌;共刺

激活性需要SH2D1A (Chatterjee等, J Biol Chem., 287 (45) :38168-38177, 2012)。特别地, CD229和TCR与固定的CD229-His蛋白和抗CD3抗体的同时连接以剂量依赖性方式显著增强了鼠CD3+脾细胞中的细胞增殖和IFN- γ 分泌 (Wang等, The Journal of Immunology, 188 (增补1) 176.7, 2012年5月)。因此, 在一个实施方式中, MSR-SLB支架包括单克隆抗CD229抗体或其抗原结合片段。CD229抗体的代表性实例包括, 例如, PE抗人CD229抗体HLy-9.1.25 (BIOLEGEND, San Diego, CA; 目录号No. 326108) 或小鼠抗人CD229抗体 (R&D Systems目录号No. AF1898)。

[0202] 在另一个实施方式中, 本发明涉及含有特异性地结合CD279 (PD-1) 的抗体或其抗原结合片段的MSR-SLB支架。PD-1作为免疫检查点发挥功能并且通过防止T细胞的激活 (这随后降低了自身免疫并促进自身耐受性) 在免疫系统下调中起着重要作用。通过促进淋巴结中的抗原特异性T细胞的凋亡 (程序化细胞死亡) 同时降低调节T细胞 (抑制性T细胞) 中的凋亡的双重机制来完成PD-1的抑制作用。CD229抗体的代表性实例包括, 例如, 纳武单抗、派姆单抗、pidilizumab (CT-011, Cure Tech)、BMS936559和atezolizumab。

[0203] 在另一个实施方式中, 本发明涉及含有特异性地结合CRACC (CD319, BLAME) 的抗体或其抗原结合片段的MSR-SLB支架。CD319通过非SH2D1A依赖性的胞外信号调节的ERK介导的途径介导NK细胞激活 (Bouchon等, J Immunol. 2001年11月15日; 167 (10) :5517-21)。CD319还正向地调节NK细胞功能并且可能有助于NK细胞的激活。因此, 在一个实施方式中, MSR-SLB支架包括单克隆抗CD319抗体或其抗原结合片段。CD319抗体的代表性实例包括, 例如, 埃罗妥珠单抗 (elotuzumab) 或其抗原结合片段。

[0204] 在某些实施方式中, 本发明提供了含有结合对的MSR-SLB支架, 所述结合对含有至少一种T细胞激活分子和至少一种T细胞共刺激分子。这样的对的代表性实例包括, 但不限于, 例如, 结合CD3/CD28、CD3/ICOS、CD3/CD27和CD3/CD137的抗体, 或其组合。在这点上, 根据所需的共刺激分子的活性的调节, 可能期望使用对于第一组分 (CD3) 的激动抗体和对于第二组分的激动或拮抗抗体。

[0205] 在某些实施方式中, 本发明提供了含有结合对的MSR-SLB支架, 所述结合对含有至少一种T细胞激活分子 (其是结合CD3的抗体) 和至少一种T细胞共刺激分子 (其是结合CD28的抗体), 任选与第二共刺激分子 (其是结合选自ICOS、CD27和CD137的抗原的抗体) 一起。在一个实施方式中, MSR-SLB支架含有选自以下组合的功能性分子的组合: (a) 结合CD3、CD28和ICOS的抗体, (b) 结合CD3、CD28和CD27的抗体, (c) 结合CD3、CD28和CD137的抗体, (d) 结合CD3、CD28、ICOS和CD27的抗体。在这点上, 实验数据表明这些第二T细胞共刺激因子的刺激在与合适的激活刺激物 (如CD3+CD28) 一起施用, 可以刺激某些类型的T细胞的分化。例如, ICOS刺激与CD3+CD28+刺激配合时有助于Th效应细胞的分化, 而在共刺激信号不足时其支持调节T细胞的分化。参见, Mesturini等, Eur J Immunol., 36 (10) :2601-12, 2006。相似地, 抗CD27抗体可以用于微调该系统。在这点上, 抗CD27抗体1F5 (与抗CD3抗体一起使用时) 没有潜在地引发危险的多克隆T细胞激活-使用共刺激CD28特异性超激动抗体观察到的现象。参见, Thomas等, Oncoimmunology, 3:e27255, 2014。

[0206] 在一个实施方式中, 所述结合对包括单特异性抗体, 其中第一抗体结合所述对的第一成员 (例如, CD3) 和第二抗体结合所述对的第二成员 (例如, CD28)。在另一个实施方式中, 所述对包括双特异性抗体, 其中单个抗体结合单个对成员, 例如, 结合CD3和CD28的双特

异性抗体。在这点上,由于其给予增强的T细胞激活的能力,双特异性抗体是优选的。参见,Willems等,Cancer Immunol Immunother.2005年11月;54(11):1059-71。

[0207] 或者,所述结合对包括单特异性抗体,其中第一抗体结合CD3和第二抗体结合ICOS。在抗体结合ICOS的情况中,在分子涉及移植抗宿主病的病因学时(参见,Sato等,Transplantation,96(1):34-41,2013),可以优选使用中和ICOS的拮抗抗体。可以使用含有激动性CD3结合抗体片段和拮抗性ICOS结合抗体片段的双特异性抗体。

[0208] 或者,所述结合对包括单特异性抗体,其中第一抗体结合CD3和第二抗体结合CD27。在这个实施方式中,两种抗体都优选是刺激或激动抗体。已经报道了CD27共刺激增强了体内重新定向的人T细胞的存活和抗肿瘤活性(Song等,Blood,119(3):696-706,2012)。还可以使用含有激动CD3结合抗体片段和激动CD27结合抗体片段的双特异性抗体。

[0209] 或者,所述结合对包括单特异性抗体,其中第一抗体结合CD3和第二抗体结合CD137。在这个实施方式中,两种抗体都优选是刺激或激动抗体。已经报道了CD137共刺激提高了用于过继性T细胞治疗的CD8(+)黑素瘤肿瘤浸润性淋巴细胞的扩增和功能(Chacon等,PLoS One.2013;8(4):e60031,2013)。还可以使用含有激动CD3结合抗体片段和激动CD27结合抗体片段的双特异性抗体。

[0210] T-细胞稳态剂

[0211] 在一个实施方式中,MSR-SLB支架和/或抗原呈递细胞模拟支架含有选自IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-21和转化生长因子 β ,或其激动剂,其模拟物,其变体,其功能性片段,或其组合的稳态剂。在一些实施方式中,MSR-SLB支架和/或抗原呈递细胞模拟支架含有选自IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-21和转化生长因子 β ,或其激动剂,其模拟物,其变体,其功能性片段,或其组合的多种稳态剂。还可以使用这些稳态剂的功能性片段,其特征在于其调节靶细胞活性的能力。表1中提供了稳态剂的代表性类型,包括,其人和/或小鼠同源物的NCBI登录号。

[0212] 表1.可以用于支架中的T细胞稳态剂的类型

[0213]

T-细胞稳态剂 (homeostats)	NCBI 登录 No.
IL-1 (IL-1 α)	NP_000566.3 (人)
	NP_034684.2 (小鼠)
	NP_000567.1 (人)

[0214]

IL-1 (IL-1 β)	NP_032387.1 (小鼠)
IL-2	NP_000577.2 (人) NP_032392.1 (小鼠)
IL-4	NP_000580.1; NP_758858.1 (人) NP_067258.1 (小鼠)
IL-5	NP_000870.1 (人) NP_034688.1 (小鼠)
IL-7	NP_000871.1; NP_001186815.1; NP_001186816.1; NP_001186817.1 (人) NP_032397.1 (小鼠)
IL 10	NP_000563.1 (人) NP_034678.1 (小鼠)
IL 12A	NP_000873.2 (人) NP_001152896.1; NP_032377.1 (小鼠)
IL-12B	NP_002178.2 (人) NP_001290173.1 (小鼠)
IL-15	NP_000576.1; NP_751915.1 (人) NP_001241676.1; NP_032383.1 (小鼠)
IL-17 (A)	NP_002181.1; NP_034682.1 (人) NP_002181.1; NP_034682.1 (小鼠)
TGF- β 1	NP_000651.3 (人) NP_035707.1 (小鼠)
TGF- β 2	NP_001129071.1; NP_003229.1 (人) NP_033393.2 (小鼠)
TGF- β 3	NP_003230.1 (人)

[0215] 上述T细胞稳态剂的片段和变体是本领域已知的。例如，上述每种稳态剂的

UNIPROT数据库条目列出了“天然变体”，包括变体和野生型生物标志物之间的结构关系。纯粹作为代表，人IL-1 β 蛋白 (UNIPROT:P01584) 包括在推定的人IL-1 β 蛋白质序列的氨基酸残基141具有E \rightarrow N氨基酸置换的天然变体 (VAR_073951)。如果已知，将片段相似地列于该部分下。

[0216] 优选，T细胞稳态剂是白细胞介素-2 (IL-2) 或其激动剂、其模拟物、其变体、其功能性片段，或其与表1中所列的一种或多种T细胞稳态剂的组合。IL-2激动剂的实例包括，例如，BAY 50-4798 (Margolin等, Clin Cancer Res. 2007年6月1日; 13 (11) : 3312-9)。IL-2模拟物的实例包括，例如，肽1-30 (P1-30)，其与IL-2协同作用 (Eckenberg等, J Immunol 2000; 165: 4312-4318)。IL-2片段的实例包括，例如，含有IL-2的头100个氨基酸的稳定器 (ballast) 部分 (参见，美国专利No. 5,496,924)。IL-2变体的实例包括，例如，天然变体VAR_003967和天然变体VAR_003968。还包括含有IL-2的融合蛋白，例如，F16-IL2，其是对抗肌腱蛋白-C的额外结构域A1的scFv，其通过短的5-氨基酸接头与人IL-2的重组形式融合。F16-IL2融合蛋白的单克隆抗体部分结合表达肿瘤相关抗原 (TAA) 肌腱蛋白-C的肿瘤细胞。随后，融合蛋白的IL-2部分刺激天然杀伤 (NK) 细胞、巨噬细胞和嗜中性粒细胞，并诱导T细胞抗肿瘤细胞免疫应答。根据本发明可以使用的其他IL-2模拟物包括，例如，IL-2superkine肽 (Levin等, Nature 484, 529-533, 2012) 和IL-2部分激动剂肽 (Zurawski等, EMBO Journal, 9 (12) : 3899-3905, 1990和美国专利No. 6,955,807)，或其组合。

[0217] 本发明的实施方式进一步包括MSR-SLB支架，包括，从这样的支架制得的APC-MS支架，其进一步包括多种上述的T细胞稳态剂。因此，在一个实施方式中，本发明提供了含有为IL-2的第一T细胞稳态剂和为IL-7、IL-21、IL-15或IL-15超激动剂的第二T细胞稳态剂的MSR-SLB支架。在这点上，IL-15超激动剂 (IL-15SA) 是IL-15与可溶性IL-15受体- α 的组合，其具有高于单独的IL-15的生物活性。由于其选择性地扩增NK和记忆CD8+T (mCD8+T) 淋巴细胞的能力，IL-15SA被认为是有吸引力的抗肿瘤和抗病毒剂。参见，Guo等, J Immunol. 2015年9月1日; 195 (5) : 2353-64。

[0218] 本发明的实施方式进一步涉及包括多种T细胞刺激分子、T细胞共刺激分子和T细胞稳态剂的支架。典型的支架可以包括至少2种、至少3种、至少4种、至少5种、至少6种、至少7种、至少8种、至少9种、至少10种、至少11种或更多种的上述T细胞刺激分子、T细胞共刺激分子和T细胞稳态剂。

[0219] 在本发明的支架中，可以使用常规技术，将任何功能性分子，例如，抗原、抗体、蛋白质、酶，包括其片段，直接或间接地固定于MSR基底层和/或SLB上。在某些实施方式中，功能性分子可以在细胞器 (例如，高尔基膜或质膜)、细胞、细胞簇、组织、微生物、动物、植物或其提取物中提供，随后将其固定于MSR层或SLB层上。还可以通过在所需位置 (例如，SLB层的外表面) 的遗传工程化或化学反应来合成功能性分子。

[0220] 本文中所述的支架包括并释放信号传导分子，例如，T细胞稳态剂，以引发功能性T细胞应答。在一个实施方式中，释放的T细胞稳态剂是从内源性来源分离的或在体内或体外合成的多肽。例如，内源性IL-2多肽可以从健康的人组织分离。或者，合成的功能性分子可以通过将模板DNA转染或转化至宿主生物体或细胞 (例如，培养的人细胞系或哺乳动物 (例如，人源化小鼠或兔子) 中来合成。或者，可以通过聚合酶链式反应 (PCR) 或其他本领域已知的方法在体外合成蛋白质形式的合成功能性分子 (Sambrook, J., Fritsch, E. F. 和

Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1, 2, 3 (1989), 按引用并入本文中)。

[0221] 可以对功能性分子进行修饰,以提高体内的蛋白质稳定性。或者,将功能性分子工程化为更高或更低免疫原性的。例如,在各种功能性分子的结构是已知的情况下,可以在一个或多个氨基酸残基(例如,糖基化位点)处修饰序列,以产生免疫原性变体。

[0222] 在一个实施方式中,所述功能性分子是重组的。或者,所述功能性分子是哺乳动物对应物的人源化衍生物。功能性分子从其衍生的示例性哺乳动物物种包括,但不限于,小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、雪貂、猫、狗、猴或灵长类。在优选实施方式中,所述功能性分子是上述功能性分子的人或人源化形式。

[0223] 上述功能性分子的每一种,例如,T细胞刺激分子、T细胞共刺激分子和T细胞稳态剂,可以彼此独立地吸附或整合至MSR基底层或SLB基底层中。因此,在一个实施方式中,提供了一种APC-MS,其中将T细胞刺激分子吸附或整合至MSR基底层中。优选,提供了一种APC-MS,其中将所述T细胞刺激分子吸附或整合至SLB层中。在另一个实施方式中,提供了一种APC-MS,其中将所述T细胞刺激分子吸附或整合至MSR基底层以及SLB层中。在另一个实施方式中,提供了一种APC-MS,其中将T细胞共刺激分子吸附或整合至MSR基底层中。优选,提供了一种APC-MS,其中将T细胞共刺激分子吸附或整合至SLB层中。再在另一个实施方式中,提供了一种APC-MS,其中将T细胞共刺激分子吸附或整合至MSR基底层以及SLB层中。在另一个实施方式中,提供了一种APC-MS,其中将T细胞稳态剂吸附或整合至MSR基底层中。在另一个实施方式中,提供了一种APC-MS,其中将T细胞稳态剂吸附或整合至SLB层中。再在另一个实施方式中,提供了一种APC-MS,其中将T细胞稳态剂吸附或整合至MSR基底层以及SLB层中。

[0224] 通常,所述功能性分子和MSR基底层和/或SLB层可以通过使用反应基团连接在一起,所述反应基团通常通过连接过程转化成新的官能团或非反应性物质。反应性官能团可以位于上述任一种组分中。在实施本发明中有用的反应基团和反应类别通常是生物缀合物化学领域中公知的那些。目前有利的可用于与反应性螯合物一起利用的反应类别是在相对温和的条件下进行的那些。这些包括,但不限于亲核置换(例如,胺和醇与酰基卤化物、活性酯的反应)、亲电子置换(例如,烯胺反应)以及碳-碳和碳-杂原子多键加成(例如,Michael反应、Diels-Alder加成)。这些和其他有用的反应在例如March, *Advanced Organic Chemistry*, 第3版, John Wiley & Sons, New York, 1985; Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, 1996; 和 Feeney 等, *Modification of Proteins*; vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982 中有讨论。

[0225] 有用的反应性侧基官能团包括,例如:

[0226] (a) 羧基及其各种衍生物,包括,但不限于,N-羟基琥珀酰亚胺酯、N-羟基苯并三唑酯、酸性卤化物(例如,I、Br、Cl)、酰基咪唑、硫酯、p-硝基苯基酯、烷基、烯基、炔基和芳香族酯;

[0227] (b) 羟基基团,其可以转化成例如酯、醚、醛等。

[0228] (c) 卤代烷基基团,其中卤化物可以之后被亲核基团替代,所述亲核基团如,例如,胺、羧酸酯阳离子、硫醇阴离子、负碳离子或醇盐离子,由此产生在卤素原子的官能团处新基团的共价连接;

[0229] (d) 亲双烯体基团,其能够参与Diels-Alder反应,如,例如,马来酰亚胺基团;

[0230] (e) 醛或酮基团,使得随后通过羰基衍生物(例如,亚胺、腙、半卡巴腙(semicarbazones)或肟)的形成或通过如Grignard加成或烷基锂加成这样的机制的衍生化是可能的;

[0231] (f) 磺酰卤基团,用于随后与胺的反应,例如,形成磺胺;

[0232] (g) 硫醇基团,其可以例如转化成二硫化物,或与酰基卤反应;

[0233] (h) 胺或巯基基团,其可以例如酰基化、烷基化或氧化;

[0234] (i) 烯烃,其可以经历例如环加成、酰基化、Michael加成等;

[0235] (j) 环氧化物,其可以与例如胺或羟基化合物反应;和

[0236] (k) 亚磷酰胺和其他在核酸合成中有用的标准官能团。

[0237] 可以选择反应性官能团,使得它们不参与或干扰组装反应性螯合物所需的反应。或者,可以将反应性官能团保护起来,以通过保护基团的存在防止其参与反应。本领域技术人员了解怎样保护特定的官能团使得其不干扰选定反应条件集。参见,例如,Green等, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley&Sons, New York, 1991。

[0238] 在一个实施方式中,将所述功能性分子通过亲和性配对或化学偶联加载/吸附至MSR基底层或SLB或MSR层和SLB两者上。

[0239] 如本文中使用的术语“亲和性对”包括抗原-抗体、受体-激素、受体-配体、激动剂-拮抗剂、凝集素-碳水化合物、核酸(RNA或DNA)杂交序列、Fc受体或小鼠IgG-蛋白A、抗生物素蛋白-生物素、抗生物素蛋白链菌素-生物素、生物素/生物素结合剂、Ni²⁺或Cu²⁺/HisTag(6×组氨酸)和病毒-受体相互作用。考虑将各种其他特异性结合对用于实施本发明的方法中。

[0240] 如本文中使用的,“生物素结合剂”包括抗生物素蛋白、抗生物素蛋白链菌素和其他抗生物素蛋白类似物,如抗生物素蛋白链菌素或抗生物素蛋白缀合物、抗生物素蛋白或抗生物素蛋白链菌素的高度纯化和分级分离的物质,以及非或部分氨基酸变体、具有氨基酸或化学置换的重组或化学合成的抗生物素蛋白类似物(其仍然适应生物素结合)。优选,每个生物素结合剂分子结合至少两个生物素部分,并且更优选结合至少四个生物素部分。如本文中使用的,“生物素”包括除了生物胞素以外的生物素和其他生物素类似物,如生物素酰胺己酸酯N-羟基琥珀酰亚胺酯、生物素4-酰胺苯甲酸、生物素酰胺己酰肼以及其他生物素衍生物和缀合物。其他衍生物包括生物素-葡聚糖、生物素-二硫化物-N-羟基琥珀酰亚胺酯、生物素-6-酰胺喹啉、生物素肼、d-生物素-N-羟基琥珀酰亚胺酯、生物素马来酰亚胺、d-生物素p-硝基苯基酯、生物素化核苷酸和生物素化氨基酸,如Nε-生物素基-1-赖氨酸。

[0241] 可以通过亲和性配对官能化的配体包括,但不限于,从天然或合成来源制备或分离的受体、单克隆或多克隆抗体、病毒、化疗剂、受体激动剂和拮抗剂、抗体片段、凝集素、白蛋白、肽、蛋白质、激素、氨基糖、脂质、脂肪酸、核酸和细胞。简而言之,可以利用针对待通过本发明的实施检测的任何分子表位或受体的任何位点特异性配体。优选,所述配体是膜锚定的蛋白质。配体还可以是膜锚定的蛋白质的衍生物,如可溶性胞外结构域。配体可以是涉及受体-受体细胞相互作用的受体,如结合MHC受体的TCR。

[0242] 可以通过本领域已知的任何方法来表达和纯化本发明的配体。在某些实施方式中,可以通过基于杆状病毒的昆虫表达系统或哺乳动物表达系统来表达所述蛋白质。可以将十五个残基的AVITAG™肽添加至所有分子的C-末端。AVITAG™(Avidity, CO)中的赖氨酸

残基可以特意地通过BirA酶 (Avidity, CO) 生物素化。蛋白质还可以设计成分泌至细胞培养物的上清液中。

[0243] 如上文所述,所述功能性分子可以是任何蛋白质或肽。优选,所述蛋白质涉及配体-受体相互作用。例如,T细胞激活的重要事件是T细胞和APC之间的膜-膜接触的结果,其中在两个相对的膜之间发生了各种配体-受体相互作用,包括,MHC-肽和TCR、LFA-1和ICAM-1、CD2和CD48,以及B7或CTLA-4和CD28。理解这些相互作用的化合价需求将促进治疗剂的设计,所述治疗剂增强或抑制对某些抗原的免疫应答。本发明还可以用作工具来研究通过激动剂或拮抗剂抗原诱导的T细胞胞内信号传导途径中的微妙差异。所述支架提供了一种明确的生理环境来测试所述微妙的差异,而无需使用常常使生化分析复杂化的天然抗原呈递细胞。

[0244] 尽管在整个说明书和实施例中举例说明了抗生物素蛋白链菌素-生物素相互作用,但上文中描述的特定结合对成员可以替代本发明方法中的抗生物素蛋白链菌素和生物素来使用。此外,可以使用超过一组的特定结合对,特别是当超过一种配体连接到膜表面时。在这一点上,传统的pep-MHC-抗生物素蛋白链菌素四聚体技术也可以用于筛选具有特定pep-MHC特异性的T细胞。然而,具有相同特异性的T细胞可以通过相同抗原刺激而激活或不激活。为了研究免疫应答(例如,对疫苗接种[病毒或癌症疫苗]的应答、免疫耐受性、自身免疫),重要的是基于其对抗原的反应性来区分T细胞。将通过显微镜观察的钙通量用作T细胞激活的指示,本发明还提供了一种筛选分析用于定量对特定抗原反应性的原代T细胞。或者,可以将生物素化的pep-MHC和共刺激分子偶联至抗生物素蛋白链菌素覆盖的芯片上,并且将所述芯片与本发明的支架配对。

[0245] 在另一个实施方式中,将所述功能性分子与MSR基底层和/或SLB层化学偶联。在某些实施方式中,所述化学偶联包括,点击化学试剂,例如,叠氮化物-炔化学(AAC)反应、二苯并-环新炔连接(DCL)或四嗪-烯烃连接(TAL)。例如,在AAC的情况中,MSR或SLB含有多种单点击化学官能性,并且常常含有两种、三种或更多种这样的官能性。优选的是每个分子一种或两种这样的官能性。在一个实施方式中,可点击试剂,如3-叠氮丙胺或10-十一炔酸可以通过点击反应分别酰胺-键合至肽或蛋白质的羧基或氨基末端,所述点击反应使用相应的炔烃或叠氮化合物和合适的催化剂来形成1,2,3-三唑环连接基团。参见,例如,美国公开No.2007/0060658。为了进一步扩展生物正交无铜点击试剂的库,可以将用于叠氮化物-偶合反应的含有氮杂-二苯并环辛炔(ADIBO)的化合物用于蛋白质功能性分子(例如,抗体)、白细胞介素和细胞因子的位点特异性共价锚定。将相同的无金属点击反应用于表面的未功能化区域的PEG化。这样的处理允许非特异性结合的显著降低或完全消除。无铜点击固定方法可以用于制备各种类型的阵列,以及微珠和纳米颗粒的衍生化。参见,例如,美国专利No.8,912,322。在一些实施方式中,使用选自叠氮化物、二苯并环辛炔(DBCO)、反式环辛烯、四嗪和降冰片烯及其变体的点击试剂将所述功能性分子与MSR基底层和/或SLB层偶联。在一些实施方式中,所述功能性分子包括叠氮化物,并且所述MSR-SLB的脂质双层的脂质包括DBCO。

[0246] 术语“点击化学”是指斯凯里普研究所(The Scripps Research Institute)的K.Barry Sharpless 介绍的化学理念,描述了为了通过将包括反应性基团的小的单元连接在一起而快速和可靠地产生共价键而定制的化学作用。点击化学不是指特定的反应,而

是指包括模拟自然界中发现的的反应的概念。在一些实施方式中,点击化学反应是模块化的、范围广泛、给予高化学产量、产生无害的副产物,是立体特异性的,呈现出 $>84\text{kJ/mol}$ 的大的热力学驱动力以利于具有单一反应产物的反应,和/或可以在生理条件下进行。明显的放热反应使得反应物是“弹簧加载的 (spring loaded)”。在一些实施方式中,点击化学反应呈现出高原子经济性,可以在简单的反应条件下进行,使用容易得到的起始材料和试剂,使用无毒溶剂或使用良性或容易去除的溶剂(优选水),和/或提供通过非色谱方法(结晶或蒸馏)的简单产物分离。

[0247] 如本文中使用的,术语“点击化学手柄 (handle)”,是指可以参与点击化学反应的反应物,或反应性基团。例如,应变炔烃 (strained alkyne),例如,环辛炔,是点击化学手柄,因为其可以参与应变促进的环加成。通常,点击化学反应需要至少两个包括可以反应的点击化学手柄的分子。这样的彼此反应性的点击化学手柄对有时候在本文中称为伴侣点击化学手柄。例如,叠氮化物是环辛炔或任何其他炔烃的伴侣点击化学手柄。本文中描述了根据本发明的一些方面适用的示例性点击化学手柄,例如,US 2014/0249296。其他合适的点击化学手柄是本领域技术人员已知的。

[0248] 在一个实施方式中,本发明提供了包括多种T细胞激活分子和T细胞共刺激分子,任选地以及与T细胞稳态剂(其通过金属螯合脂质端基吸附至支架上)的APC-MS。参见, Maloney等, *Chem Biol.*, 3 (3):185-92, 1996。已经报道了使用螯合的金属离子的几种方法,其允许组氨酸标记的蛋白质固定于几种类型的界面上,如脂质界面和具有金属螯合脂质的脂质单层,具有用金属螯合链烷醇形成的自组装单层的金表面和具有金属螯合硅烷的氧化物表面。例如, Peterson等 (US 5,674,677) 描述了通过将有机螯合剂与蛋白质(例如,酶)偶联来连接两个氨基酸序列并且将螯合剂加载金属离子的方法。随后将这种复合物与含有组氨酸标签的任何蛋白质混合以将复合物与组氨酸标记的蛋白质偶联。还参见US6,087,452,将其全部按引用并入本文中。

[0249] 本发明的功能性分子优选是蛋白质。术语“蛋白质”、“肽”和“多肽”可互换使用,并且是指通过肽(酰胺)键连接在一起的氨基酸残基的聚合物。所述术语是指任何大小、结构或功能的蛋白质、肽或多肽。通常,蛋白质、肽或多肽是至少三个氨基酸长。蛋白质、肽或多肽可以是指单个蛋白质或蛋白质的集合。蛋白质、肽或多肽中的一个或多个氨基酸可以例如通过添加化学实体来修饰,所述化学实体如碳水化合物基团、羟基基团、磷酸酯基团、法尼基基团、异法尼基基团、接头,用于缀合、功能化或其他修饰等。蛋白质、肽或多肽也可以是单个分子或可以是多分子复合物。蛋白质、肽或多肽可以仅是天然产生的蛋白质或肽的片段。蛋白质、肽或多肽可以是天然产生的、重组的或合成的,或其任意组合。

[0250] 术语“缀合的”或“缀合”是指两个分子(例如,两个蛋白质)彼此以通过直接或间接共价或非共价相互作用连接的方式的结合。在通过点击化学缀合的情况中,所述缀合是通过点击化学手柄的反应形成的共价键。在某些实施方式中,所述结合是共价的,并且将实体称为彼此是“缀合的”。在一些实施方式中,通过在蛋白质翻译后蛋白质,并且在一些实施方式中,在蛋白质分离后与其他分子之间形成共价键,蛋白质翻译后与另一分子,例如,第二蛋白质缀合。在一些实施方式中,通过在蛋白质上安置点击化学手柄以及在第二分子上安置可以与第一点击化学手柄反应的点击化学手柄,并进行其中点击化学手柄反应并在蛋白质和第二分子之间形成共价键的点击化学反应,由此产生嵌合蛋白质,来实现蛋白质

和第二分子(例如,第二蛋白质)的翻译后缀合。在一些实施方式中,两个蛋白质在其各自的C-末端缀合,产生C-C缀合的嵌合蛋白。在一些实施方式中,两个蛋白质在其各自的N-末端缀合,产生N-N缀合的嵌合蛋白。

[0251] 在某些实施方式中,多种可检测标记可以用于分析和/或研究缀合过程。如本文中使用的,“可检测标记”是指具有至少一种掺入所述部分中的元素、同位素或官能团的部分,其使得能够检测标记与其连接的分子,例如,蛋白质或多肽,或其他实体。标记可以直接连接(例如,通过键)或可以通过栓系(如,例如,任选取代的烷撑;任选取代的烯撑;任选取代的炔撑;任选取代的杂烷撑;任选取代的杂烯撑;任选取代的杂炔撑;任选取代的芳撑;任选取代的杂芳撑;或任选取代的酰撑,或其任意组合,其可以构成栓系)连接。将认识到所述标记可以在任何位置连接或结合至分子中,例如,蛋白质、多肽或其他实体。

[0252] 通常,标记可以落入以下五类中的任何一类(或多类):a)含有同位素部分的标记,其可以是放射性或重同位素,包括,但不限于, ^2H 、 ^3H 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{18}F 、 ^{31}P 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{67}Ga 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Tc-99m)、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{153}Gd 、 ^{169}Yb 和 ^{186}Re ;b)含有免疫部分的标记,其可以是抗体或抗原,其可以结合酶(例如,如辣根过氧化物酶);c)作为有色的、发光、磷光或荧光部分的标记(例如,如,荧光标记异硫氰酸荧光素(FITC)或羧基荧光素);d)具有一个或多个光亲和性部分的标记;和e)作为一个或多个已知结合伴侣的配体的标记(例如,生物素-抗生物素蛋白链菌素、FK506-FKBP)。在某些实施方式中,标记包括放射性同位素,优选发射可检测颗粒的同位素。在某些实施方式中,标记包括荧光部分。在某些实施方式中,标记是荧光标记异硫氰酸荧光素(FITC)。在某些实施方式中,标记包括具有一个或多个已知结合伴侣的配体部分。在某些实施方式中,标记包括生物素。在一些实施方式中,标记是荧光多肽(例如,GFP或其衍生物,如增强的GFP(EGFP)或荧光素酶(例如,萤火虫、Renilla或Gaussia荧光素酶)。将认识到,在某些实施方式中,标记可以与合适的底物(例如,荧光素)反应以产生可检测的信号。荧光蛋白的非限制性实例包括GFP及其衍生物,包括发射不同颜色的光的发色团的蛋白质,如红色、黄色和青色荧光蛋白等。示例性荧光蛋白包括,例如,Sirius、Azurite、EBFP2、TagBFP、mTurquoise、ECFP、Cerulean、TagCFP、mTFP1、mUkG1、mAG1、AcGFP1、TagGFP2、EGFP、mWasabi、EmGFP、TagYFP、EYFP、Topaz、SYFP2、Venus、Citrine、mK0、mK02、mOrange、mOrange2、TagRFP、TagRFP-T、mStrawberry、mRuby、mCherry、mRaspberry、mKate2、mPlum、mNeptune、T-Sapphire、mAmetrine、mKeima。对于GFP和许多其他荧光或发光蛋白的讨论,参见,例如,Chalfie,M.和Kain,S R(编辑)Green fluorescent protein:properties, applications, and protocols(Methods of Biochemical Analysis,v.47).Wiley-Interscience,Hoboken,N.J.,2006,和/或Chudakov等,Physiol Rev.90(3):1103-63,2010。在一些实施方式中,标记包括淬灭剂,例如,吸收来自荧光团的激发能并将能量作为热耗散的物质。

[0253] 在另一个实施方式中,可以使用本领域已知的、共价或非共价加载技术将功能性分子加载至介孔二氧化硅和/或脂质双层上。在一个实施方式中,非共价地加载所述功能性分子。例如,Lei等(美国公开No.2011-0256184)描述了介孔硅酸盐,其提供天然或功能化结构内通过非共价键合的抗体(如IgG)的增强的自发加载。因此,可以用这样的硅酸盐来配制本发明的支架。

[0254] 在另一个实施方式中,可以功能性分子化学偶联至MSR上。在这样的实施方式中,

可以通过利用一种或多种以下的分子和其中所含的反应基团来进行偶联：半胱氨酸(巯醇基)、丝氨酸或苏氨酸(羟基)、赖氨酸(氨基)、天冬氨酸或谷氨酸(羧基)。或者，功能性分子可以通过利用多聚组氨酸-标签(His-标签)、含有多聚组氨酸标签的肽或含有多聚组氨酸-标签的抗体与MSR缀合。在本文中，多聚组氨酸-标签由至少四个、五个、六个或七个组氨酸(His)残基组成。

[0255] 在一个实施方式中，使用锚，将功能性分子连接孔隙壁。然而，锚不是必需组分。在某些实施方式中，介孔二氧化硅的每个孔隙容纳至少一个功能性分子。因此，孔隙必须具有适于固定生物物质的大小。孔径取决于待固定的功能性分子的大小。当功能性分子固定于孔隙中时，功能性分子可以通过静电键合吸附于孔隙的内表面上。功能性分子还可以通过非共价键合(如van der Waals力、氢键键合或离子键合)保持在孔隙中。

[0256] 在其中MSR包括锚定部分的上述实施方式中，锚可以具有减少功能性分子的大的结构变化的作用，以将其稳定地保持。优选，锚由与介孔材料基本上相同的组分组成。锚可以包括一个或多个官能团以允许结合所需的功能性分子：羟基、酰胺基、氨基、吡啶基、脒基、氨基甲酸酯基、羧基、酚基、偶氮基、羟基、马来酰亚胺基、硅烷衍生物或氨基烷基基。

[0257] 本发明的实施方式进一步涉及本发明的MSR-SLB支架，包括，含有这样的支架的支架，所述支架包括吸附于脂质基质中的多种上述功能性分子。

[0258] 在一个实施方式中，将所述功能性分子通过物理插入吸附于支撑脂质双层中。用于将蛋白质插入两性分子的双层中的技术是本领域已知的。在一个实施方式中，双层的环境中的蛋白质，例如，在疏水性介质和/或亲水主体和/或水合支撑物中，可以自发地插入双层中。或者，可以通过施加电压和/或将加载蛋白质的囊泡与双层融合，驱使蛋白质进入双层中。囊泡可以包含在亲水主体中或引入亲水主体中。在一种情况中，可以通过使用PCT公开No. WO2009/024775中公开的探针方法将蛋白质引入膜中。插入的蛋白质可以是已知的膜相关蛋白，例如，上述T细胞激活分子和/或T细胞共刺激分子中的一种或多种。

[0259] 在另一个实施方式中，功能性分子可以是用于T细胞扩增中的抗原。这样在T细胞扩增中有用的抗原的代表性实例包括，全长CD19或其片段或其变体。CD19是嵌合抗原受体(CAR) T细胞的扩增中使用的原型抗原。参见，Turtle等，Blood, 126:184, 2015; Turtle等，J Clin Invest., 126, 2123-38, 2016。在另一个实施方式中，抗原是全长CD22或其片段或其变体，其在CAR T细胞的扩增中也是有用的。参见，Haso等，Blood, 121(7):1165-1174, 2013; Qin等，Blood, 122:1431, 2013。

[0260] 在可替换的实施方式中，功能性分子可以是膜相关蛋白，其直接或间接锚定于双层。其他功能性分子，例如，选择性或非选择性膜转运蛋白、离子通道、孔形成蛋白或膜驻留受体等，也可以通过这种方法插入SLB中。

[0261] 在另一个实施方式中，功能性分子可以与膜相关蛋白缀合，所述膜相关蛋白可以结合和/或插入SLB中，例如，短杆菌肽； α -螺旋束，例如，噬菌体调理素或K⁺通道；和 β -桶状结构，例如， α -溶血素、杀白细胞素或大肠杆菌孔蛋白(E.coli porin)；或其组合。

[0262] 在某些实施方式中，可以通过如离子或非离子表面活性剂这样的化合物来稳定制造的SLB(含有一种或多种功能性分子)。合适的表面活性剂包括，但不限于，以下实例：合成的磷脂、其氢化衍生物及其混合物、鞘脂和糖鞘脂、饱和或不饱和脂肪酸、脂肪醇、聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物、乙氧基化脂肪酸及其酯或醚、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱、二肉豆蔻酰磷

脂酰甘油或上述两种或多种的组合。根据本发明优选的表面活性剂是二肉豆蔻酰基磷脂酰甘油。

[0263] 制造的SLB任选可以通过至少一种共表面活性剂来稳定,所述共表面活性剂选自丁醇、丁酸、己酸、胆酸钠、牛黄胆酸钠和甘氨酸胆酸钠,更特别是胆酸钠,或由其组成。

[0264] 制造的SLB还可以包括其他赋形剂,如具有生物粘附性或吸附增强特性的聚合物并且选自包含丙烯酸类聚合物(CARBOPOL®、Polycarbophil、NOVEON®)、中链脂肪酸和聚乙二醇或由其组成的组。优选的赋形剂是上述丙烯酸类聚合物。

[0265] 可以用用于检测膜相关蛋白的试剂来修饰SLB。优选,膜相关蛋白质是离子通道蛋白和/或孔形成蛋白。优选,膜相关蛋白扩散至双层中和/或结合双层,引起双层性质的可检测变化。所改变的性质可以是物理、光学、电学或生物化学的。

[0266] 在一些实施方式中,MSR-SLB支架和/或抗原呈递细胞模拟支架包括小分子药物。在一些实施方式中,MSR-SLB支架和/或抗原呈递细胞模拟支架包括沙利度胺类似物。在一些实施方式中,MSR-SLB支架和/或抗原呈递细胞模拟支架包括IDO/MEK抑制剂。在一些实施方式中,MSR-SLB支架和/或抗原呈递细胞模拟支架包括具有免疫调节作用的小分子药物。具有免疫调节作用的小分子是本领域已知的(参见,例如,Murphy等,Hum.Vaccin.Immunother.11(10):2463-8(2015),将其完整内容特意按引用并入本文中)。

[0267] 在某些实施方式中,含有功能性分子的MSR-SLB支架可以用于检测能够与双层中的两性分子和/或双层中的功能性分子相互作用的细胞。所述相互作用性质上可以是特异性的或非特异性的。或者,所述细胞可以与功能性分子或与脂质双层相互作用以引起物理、光学、电学或生物化学变化。这样的相互作用可以以许多不同的方式来检测,包括,但不限于,通过视觉变化、通过SLB中的荧光标记的脂质或蛋白质的激活,或SLB的电容变化。

[0268] 生物可降解支架

[0269] 本发明的实施方式进一步涉及生物可降解支架。在一个实施方式中,当暴露于生物环境时,所述支架结构可以基本上降解。在一个实施方式中,所述生物环境是组织培养条件,例如,已经任选适用于培养淋巴细胞(如T细胞)的组织培养基。在另一个实施方式中,所述生物环境是生物流体,例如,血液、淋巴、CSF、腹水等。在再另一个实施方式中,所述生物环境是在植入部位(例如,血管、淋巴系统、脂肪组织等)的组织环境。

[0270] 在某些实施方式中,生物可降解支架在体内接触生物环境1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、20天、30天、45天、60天、90天或更长时间后,基本上降解。在某些实施方式中,生物可降解支架在体内接触生物环境短于1周后,基本上降解。在某些实施方式中,生物可降解支架在体外接触生物环境过1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、20天、30天、45天、60天、90天或更长时间后,基本上降解。在某些实施方式中,生物可降解支架在体外接触生物环境短于1周后,基本上降解。基本上降解表示支架组合物接触生物环境时,至少30%,至少50%,至少60%,至少70%,至少90%,至少95%或更多支架组合物降解。

[0271] 在某些实施方式中,可以有利地使用生物可降解支架。例如,通过制造支架组合物使得其在孵育期间(例如,允许T细胞扩增时)基本上降解,可能可以利用扩增的T细胞而无需将其接受另外的纯化和/或配制步骤。避免下游纯化和/或配制步骤将确保T细胞健康并具有用于所需应用的所需功能性。

[0272] 因此,在某些实施方式中,可以通过改变介孔二氧化硅棒的性质,如大小、几何形状、多孔性,来有利地定制支架组合物的降解动力学。或者,可以通过改变培养条件(例如,通过调节培养基的pH),来改变支架组合物的降解动力学。

[0273] 根据上述目的,本发明的实施方式涉及包括多种功能性分子的MSR-SLB支架,其任选是生物可降解的。在一个实施方式中,本发明的支架可以包封在其他生物可降解支架中。在制备这样的复合生物可降解支架组合物中有用的试剂和技术是本领域已知的。参见,Liao等,J.Biomed.Mater.Res.B.Appl.Biomater.,102(2):293-302,2014。在一个实施方式中,支架由生理上相容的和任选生物可降解的聚合物制成。可用于支架中的聚合物的实例是本领域已知的。参见,例如,美国公开No.2011/0020216,将其完整内容按引用并入本文中。这样的聚合物的代表性实例包括,但不限于,聚(丙交酯)、聚(乙交酯)、聚(乳酸)、聚(乙醇酸)、聚酐、聚原酸酯、聚醚酯、聚己酸内酯、聚酰胺酯、聚碳酸酯、聚氰基丙烯酸酯、聚氨酯、聚丙烯酸酯,及其混合物或共聚物。生物可降解支架可以包括生物可降解材料,例如,胶原蛋白、海藻酸盐、多糖、聚乙二醇(PEG)、聚(乙交酯)(PGA)、聚(L-丙交酯)(PLA)或聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)或丝。用于制造支架组合物的方法是本领域已知的。参见,例如,Martinsen等(Biotech.&Bioeng.,33(1989)79-89)、(Matthew等(Biomaterials,16(1995)265-274),Atala等(J Urology,152(1994)641-643)和Smidsrod(TIBTECH 8(1990)71-78),将其中的公开内容按引用并入本文中。

[0274] 示例性支架利用相对低分子量的乙交酯或海藻酸盐,优选溶解后在人的肾清除阈值处的大小,例如,将海藻酸盐或多糖减小至1000至80,000道尔顿的分子量。优选,分子量为1000至60,000道尔顿,特别优选1000至50,000道尔顿。使用高古洛糖醛酸(guluronate)含量的海藻酸盐材料也是有用的,因为古洛糖醛酸单体(与甘露糖醛酸单元相反)提供用于通过二价阳离子的离子交联使聚合物胶凝的位点。例如,美国专利No.6,642,363,将其按引用并入本文中,公开了用于制备和使用含有多糖(如海藻酸盐)的聚合物的方法。

[0275] 本发明的支架可以是多孔的,使得支架可以维持抗原递呈,并且吸引和操纵免疫细胞。在一个实施方式中,支架含有多孔基质,其中孔隙具有10nm至500 μ m的直径,特别是100nm至100 μ m。在这些实施方式中,本发明利用包括介孔支架的支架。制备具有所需孔径和孔排列的聚合物基质的方法在本领域中有描述,例如,美国公开No.2011/0020216和美国专利No.6,511,650,将其按引用并入本文中。

[0276] 介孔二氧化硅棒可以修饰成多功能递送平台,用于递送药物如化疗剂和DNA/siRNA、抗体和蛋白质生物制剂、细胞等(Lee等,Adv.Funct.Mater.,215-222,2009;Liong等,ACS Nano,889-896,2008;Meng等,ACS Nano,4539-4550,2010;Meng等,J.Am.Chem.Soc.,12690-12697,2010;Xia等,ACS Nano,3273-3286,2009;Radu等,J.Am.Chem.Soc.,13216-13217,2004;Slowing等,J.Am.Chem.Soc.,8845-8849,2007)。这种递送平台允许疏水性的和带电的抗癌药物的有效且保护性的包装,用于受控和按需的递送,还具有使递送位点成像的附加能力(Liong等,ACS Nano,vol.2,pp.889-896,2008)。现在的挑战是针对有效且安全的体内药物递送来优化设计特征(He等,Small,vol.7,pp.271-280,2011;Lee等,Angew.Chem.Int.Ed.,vol.49,pp.8214-8219,2010;Liu等,Biomaterials,vol.32,pp.1657-1668,2011;Al Shamsi等,Chem.Res.Toxicol.,vol.23,pp.1796-1805,2010),其可以通过在裸鼠中使用人异种移植物肿瘤来评价(Lu等,Small,

vol.6, pp.1794-1805, 2010)。

[0277] 本文中所述的实施方式进一步涉及MSR-SLB支架,包括,含有这样的支架的支架,其中介孔二氧化硅微棒 (MSR) 与T细胞激活/共刺激分子的干重比为约1:1至约100:1,优选约10:1至约50:1,特别为约20:1至约50:1。在一些实施方式中,MSR-SLB支架的介孔二氧化硅微棒 (MSR) 与T细胞激活/共刺激分子的干重比为约10,000:1至约1:1。在一些实施方式中,MSR-SLB支架的介孔二氧化硅微棒 (MSR) 与T细胞激活/共刺激分子的干重比为约5,000:1至约1:1,约1,000:1至约1:1,约500:1至约1:1,约100:1至约1:1。在一些实施方式中,MSR-SLB支架的介孔二氧化硅微棒 (MSR) 与T细胞激活/共刺激分子的干重比为约10,000:1,约5,000:1,约2,500:1,约1,000:1,约750:1,约500:1,约250:1,约100:1,约75:1,约50:1,约40:1,约30:1,约25:1,约20:1,约10:1或约1:1。

[0278] 本文中所述的实施方式进一步涉及含有上述支架的组合物和设备,所述支架含有MSR-SLB支架与功能性分子(例如,T细胞激活分子和T细胞共刺激分子以及T细胞稳态剂),任选地以及一种或多种其他试剂(以下列出的)。在一个实施方式中,本发明提供了包括支架和其中成簇的T细胞的组合物。在一个实施方式中,T细胞选自自然杀伤(NK)细胞、CD3+T细胞、CD4+T细胞、CD8+T细胞和调节T细胞(Treg),或其组合。在其他实施方式中,所述组合物可以是药物组合物,其可以使用本领域公知的方法来生产。例如,可以通过本领域技术人员,使用公认的药物化学原理,来生产药物组合物。所述组合物、支架和设备可以提供一种或多种试剂用于选择、培养、扩增、维持和/或移植目标细胞。用于T细胞、B细胞和抗原呈递细胞的细胞选择试剂盒、培养试剂盒、扩增试剂盒、移植试剂盒的代表性实例是本领域已知的。例如,在目标靶细胞是T细胞的情况中,最初可以使用DYNABEADS,MACS-珠(Miltenyi Biosciences)来分选,维持在STEMXVIVO人T细胞基础培养基(R&D Systems)中,并且用OPTIMIZER培养基(Thermo Fisher Scientific)扩增。可以通过使用本领域技术人员已知的离心技术,包括,例如,FICOLL®梯度,在样品中富集细胞。还可以基于某些标志物的表达,通过使用阳性选择、阴性选择,或其组合在样品中富集细胞。

[0279] 本发明的更多实施方式涉及T细胞操纵装置。所述装置含有本发明的支架以及吸引/结合靶T细胞的多种分子。在一个实施方式中,本发明涉及含有堆叠以选择性地允许T细胞渗入介孔二氧化硅微棒 (MSR) 中的支架的装置。选择性渗透表示由于选择性的容许性/渗透性、结合特异性、选择性消除(不合需要的细胞)和/或扩增(所需的细胞),一段孵育时间后,与全血中存在的相比,支架含有至少多10%,多20%,多30%,多40%,多50%,多60%,多70%,多80%,多90%,多100%,多150%,多200%,多300%,多400%,多500%,多600%,多800%,多1000%,或更多数量的靶T细胞。在某些实施方式中,孵育时间段为1-30天,优选4-15天,特别是7-12天。在其他实施方式中,选择性渗透涉及与全血中存在的其他血液细胞(例如,B细胞、树突细胞、巨噬细胞、红血球或血小板)相比T细胞的保留和/或扩增。

[0280] 在其他实施方式中,本发明的支架允许特定的T细胞亚群的选择性渗透,所述T细胞亚群例如自然杀伤(NK)细胞、CD3+T细胞、CD4+T细胞、CD8+T细胞或调节T细胞(Treg)。在本文中,在4-14天孵育后,与全血中存在的相比,支架含有至少多10%,多20%,多30%,多40%,多50%,多60%,多70%,多80%,多90%,多100%,多150%,多200%,多300%,多400%,多500%,多600%,多800%,多1000%,或更多数量的靶T细胞。人全血中各种类型的淋巴细胞的百分比和范围如下:NK细胞7%(范围:2-13%);辅助T细胞46%(范围:28-

59%);细胞毒性T细胞19%(范围13-32%); γ δ T细胞5%(范围:2%-8%);B细胞23%(范围:18-47%)(Berrington等,Clin Exp Immunol 140(2):289-292,2005)。

[0281] 其他试剂

[0282] 本发明的支架包括一种或多种试剂,其可以是天然产生的、合成产生的或重组化合物,例如,肽、多肽、蛋白质、核酸、小分子、半抗原、碳水化合物或其他试剂,包括其片段或其组合。在一个实施方式中,所述试剂是抗原。在一个实施方式中,所述抗原是肽或蛋白质或其免疫活性片段。在一个实施方式中,本文中所述的抗原是纯化的。纯化的化合物含有至少60%重量(干重)的目标化合物。特别地,抗原是至少75%纯,优选至少90%纯,和更优选至少99%纯。通过任何合适的标准方法,例如,通过柱色谱、凝胶电泳或HPLC分析,来测量纯度。所述抗原可以是自身抗原或非自身抗原。

[0283] 非自身抗原的代表性实例包括,例如,源自病原体的抗原,所述病原体选自病毒、细菌、原生动物、寄生物和真菌。所述抗原可以任选加载于MHC分子上,例如,HLA-A、HLA-B、HLA-C、DP、DQ和DR,其随后结合至支架中。

[0284] 或者,支架含有多种自身抗原,其任选与疾病或障碍关联或相关。优选,自身抗原特别地与人疾病或障碍相关。在一个实施方式中,自身抗原与选自以下的自身免疫障碍相关:类风湿性关节炎、狼疮、乳糜泻、炎性肠病或节段性回肠炎、**sjögren's**综合征、风湿性多肌痛、多发性硬化、强制性脊柱炎、1型糖尿病、斑秃、脉管炎、颞动脉炎等。与1型糖尿病、多发性硬化、节段性回肠炎和类风湿性关节炎等相关的特定类型的抗原,包括其片段,在文献中已经鉴定。例如,类风湿性关节炎相关的抗原是47kDa蛋白(RA-A47)。参见Hattori等,J Bone Miner Metab.,18(6):328-34(2000)。在节段性回肠炎中,抗原可以是细菌鞭毛蛋白。参见,Lodes等,J Clin Invest.113(9):1296-306(2004)。同样,主要的髓鞘蛋白,如髓鞘碱性蛋白(MBP)和蛋白脂蛋白(PLP),很可能在多发性硬化(MS)的病程中是重要的。参见,deRosbo等,J Clin Invest.92(6):2602-260(1993)。在1型糖尿病的情况下,可能涉及多种自身抗原,如,前胰岛素原(PPI)、胰岛特异性葡萄糖-6-磷酸酶(IGRP)、谷氨酸脱羧酶(GAD65)、胰岛瘤抗原-2(IA-2)、嗜铬粒蛋白A和热休克蛋白60。参见,Roep等,Cold Spring Harb Perspect Med.2(4),2012(PMID:22474615)。

[0285] 在另一个实施方式中,自身抗原与癌症相关。癌抗原的代表性类型包括,例如,MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、CEA、酪氨酸酶、midkin、BAGE、CASP-8、 β -连环蛋白、 β -连环蛋白、 γ -连环蛋白、CA-125、CDK-1、CDK4、ESO-1、gp75、gp100、MART-1、MUC-1、MUM-1、p53、PAP、PSA、PSMA、ras、trp-1、HER-2、TRP-1、TRP-2、IL13 α 、IL13 α 2、AIM-2、AIM-3、NY-ESO-1、C9orf112、SART1、SART2、SART3、BRAP、RTN4、GLEA2、TNKS2、KIAA0376、ING4、HSPH1、C13orf24、RBPSUH、C6orf153、NKTR、NSEP1、U2AF1L、CYNL2、TPR、SOX2、GOLGA、BMI1、COX-2、EGFRvIII、EZH2、LICAM、Livin、Livin β 、MRP-3、巢蛋白、OLIG2、ART1、ART4、B-细胞周期蛋白、Gli1、Cav-1、组织蛋白酶B、CD74、E-钙粘着蛋白、EphA2/Eck、Fra-1/Fos11、GAGE-1、神经节苷脂/GD2、GnT-V、 β 1,6-N、Ki67、Ku70/80、PROX1、PSCA、SOX10、SOX11、生存素、UPAR、WT-1、二肽酰基肽酶IV(DPP-IV)、腺苷脱氨酶-结合蛋白(AD Abp)、亲环蛋白b、结直肠相关抗原(CRC)-C017-1A/GA733、T-细胞受体/CD3- ζ 链、肿瘤抗原的GAGE家族、RAGE、LAGE-I、NAG、GnT-V、RCAS1、 α -甲胎蛋白、p120ctn、Pmel117、PRAME、脑糖原磷酸化酶、SSX-I、SSX-2(HOM-MEL-40)、SSX-I、SSX-4、SSX-5、SCP-I、CT-7、cdc27、腺瘤性结肠息肉病蛋白(APC)、胞衬蛋

白、PlA、连接蛋白37、Ig-独特型、p15、GM2、GD2神经节苷脂、肿瘤抗原的Smad家族、lmp-1、EBV-编码的核抗原(EBNA)-I、UL16-结合蛋白样转录产物1(Mult1)、RAE-1蛋白、H60、MICA、MICB和c-erbB-2,或其免疫原性肽,及其组合。

[0286] 在另一个实施方式中,抗原是修饰的T细胞(例如,以上所述的CAR T细胞)的靶标。在这样的实施方式中,抗原是CD19或其片段或其变体。在另一个实施方式中,抗原是CD22或其片段或其变体。

[0287] 可以使用任何已知方法,包括共价和非共价相互作用,将上述抗原与支架组合物结合。在以上涉及制造本发明的具有功能性分子的MSR-SLB的章节中已经列出了这些方法中的一些。非共价相互作用的实例包括,例如,静电相互作用、van der Waals' 相互作用、 π -效应、疏水性相互作用、物理插入等。例如,可以使用常规方法,通过物理插入将全长跨膜蛋白抗原结合至脂质双层中。参见,Cymer等,Journal of Molecular Biology,427.5:999-1022,2015和美国专利No.7,569,850,其通过引用并入本文。

[0288] 抗原还可以通过共价相互作用连接或栓系于支架组合物。用于将抗原连接于支架/表面的方法是本领域已知的,例如,表面吸附、物理固定,例如,使用相变来捕获支架材料中的物质。或者,通过烷化或酰化剂的共价偶联可以用于提供抗原在支架上以限定的构象的稳定、长期的呈现。用于将肽/蛋白质共价与聚合物偶联的示例性试剂和方法是本领域已知的。参见,例如,美国专利No.6,001,395,将其按引用并入本文中。在其他实施方式中,将抗原包封在支架中。用于将抗原包封至合适的支架(例如,PLGA微球)中的方法是本领域已知的。参见,例如,美国专利No.6,913,767和国际公开No.WO 1995/011010,将每篇的公开内容按引用并入本文中。

[0289] 可以将抗原配制成通过直接结合或间接结合与免疫细胞相互作用。直接结合的类型包括,例如,抗原与同源受体(例如,T细胞受体)的啮合或偶联。间接结合可以通过一种或多种次级试剂或细胞类型的中介进行。例如,抗原可以首先结合B细胞或抗原呈递细胞(APC),在靶细胞群体(例如,T细胞)与其结合的细胞表面主要组织相容性复合物(MHC)上获得加工(例如,降解)和呈递。或者,抗原可以募集分泌各种细胞因子、生长因子、趋化因子等的其他中间细胞,其转而吸引靶免疫细胞群体。不管机理如何,所述组分协同作用来操纵或修饰免疫细胞。

[0290] 抗原可以源自细胞裂解物、分级的细胞裂解物、新鲜收集的细胞、生物流体(包括血液、血清、腹水)、组织提取物等。在一个实施方式中,抗原源自所需免疫细胞(例如,T细胞)与其结合的靶细胞的裂解物。在这些实施方式中,在加载支架前,首先分级分离细胞裂解物中的抗原。裂解物可以源自所需的靶组织,例如,获自原代组织的自身免疫疾病特异性细胞。或者,裂解物可以源自癌细胞,例如,从活检组织学获得的肿瘤样品或组织培养物或肿瘤细胞获得的个体细胞。

[0291] 本发明的支架还可以含有一种或多种募集剂。所述募集剂可以是选自T细胞募集剂、B细胞募集剂、树突细胞募集剂和巨噬细胞募集剂的试剂。

[0292] 在一个实施方式中,所述支架含有T细胞募集剂。T细胞募集剂的非限制性实例包括,例如,粒细胞巨噬细胞-集落刺激因子(GM-CSF)、趋化因子(C-C基序)配体21(CCL-21)、趋化因子(C-C基序)配体19(CCL-19)或FMS样酪氨酸激酶3(Flt-3)配体、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、IFN γ 、C-X-X基序趋化因子配体(CXCL)(选自CXCL12和CXCR4),或其片段,其变

体,或其组合。其他类型的T细胞募集剂包括,用于募集1型T辅助(Th1)子集的CCR5和CXCR3受体的配体。CCR5配体、CCL5和巨噬细胞炎性蛋白(MIP-1 α)是已知的。或者,CCR3、CCR4、CCR8和CXCR4的配体可以用于Th2子集的特异性募集。还可以使用配体的组合。

[0293] 上述T细胞募集剂的各种同源物,包括其功能性片段,或其变体,是本领域已知的。同源物的代表性实例包括来自苍蝇、小鼠、大鼠、猪、牛、猴、人等的相关蛋白。同源物优选包括上述募集剂的人或小鼠同源物。

[0294] 本发明的支架适用于优先募集单一类型或单一亚型的细胞,例如,优先募集T细胞并且特别是Treg细胞或NK细胞的子集。优先募集特征在于与装置(或缺乏募集剂的对照支架)中其他类型的免疫细胞相比,装置中的一种或多种特定类型的免疫细胞(例如,T细胞、B细胞、DC/巨噬细胞)增加至少10%,至少20%,至少30%,至少50%,至少75%,至少100%,至少2倍,至少5倍,至少8倍,至少10倍或更高的累积。在适用于募集免疫细胞组合(例如,T细胞和DC/巨噬细胞的组合)的支架中,优先募集特征在于募集的细胞的总百分比与装置中(或对照支架中)的其他类型的免疫细胞相比高至少10%,至少20%,至少30%,至少50%,至少75%,至少100%,至少2倍(即,200%),至少5倍,至少8倍,至少10倍或更高。特别地,优先募集特征在于与其它免疫细胞相比,目标细胞数量1-10倍的增加。

[0295] 在一个实施方式中,本发明涉及进一步包括募集剂(其是GM-CSF、其激动剂、其模拟物、其片段、其变体或其组合)的MSR-SLB支架。优选,募集剂是GM-CSF,与其CCL-21、CCL-19、Flt-3或GCSF中的至少一种结合。这样的募集剂的代表性实例包括例如人GM-CSF(NCBI登录号#NP_000749.2)和小鼠GM-CSF(NCBI登录号#NP_034099.2)。在另一个实施方式中,本发明涉及含有GM-CSF片段的MSR-SLB支架,例如,含有hGM-CSF序列的氨基酸18-144的多肽。在再另一个实施方式中,本发明涉及含有GM-CSF变体的支架,所述变体包括例如VAR_013089和VAR_001975,其序列已经登记在UNIPROT中(登录No.P04141)。在另一个实施方式中,本发明涉及含有GM-CSF模拟物的MSR-SLB支架,所述模拟物包括例如结合GM-CSF受体的抗体,例如,Monfardini等,Curr Pharm Des.,8(24):2185-99,2002中所述的那些。

[0296] 本发明的实施方式进一步提供用于操纵免疫细胞的支架,其包括多种其他试剂。在这样的实施方式中,所述其他试剂可以包括生长因子、细胞因子、趋化因子、白细胞介素、粘附信号传导分子、整联蛋白信号传导分子或其片段或其组合。

[0297] 生长因子/细胞因子的代表性实例包括,但不限于,肾上腺髓质素(AM)、促血管生成素(Ang)、自分泌运动因子、骨形态形成蛋白(BMP)、脑源神经营养因子(BDNF)、表皮生长因子(EGF)、促红细胞生成素(EPO)、成纤维细胞生长因子(FGF)、胎牛生长激素(FBS)、胶质细胞系衍生的神经营养因子(GDNF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、生长分化因子9(GDF9)、肝细胞生长因子(HGF)、肝细胞瘤衍生的生长因子(HDGF)、胰岛素样生长因子(IGF)、角化细胞生长因子(KGF)、移动刺激因子(MSF)、肌抑制素(GDF-8)、神经生长因子(NGF)、神经营养因子、血小板源生长因子(PDGF)、促血小板生成素(TPO)、T细胞生长因子(TCGF)、转化生长因子(TGF- α 或TGF- β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、血管内皮生长因子(VEGF)、Wnt、胎盘生长因子(PGF),或其功能性片段,或其组合。

[0298] 白细胞介素的代表性类型包括,但不限于,IL-1(激活T细胞、B细胞、NK细胞和巨噬细胞)、IL-2(激活B细胞和NK细胞)、IL-3(刺激非淋巴样细胞)、IL-4(用于激活的B细胞、静止T细胞和肥大细胞的生长因子)、IL-5(用于激活的B细胞的分化)、IL-6(用于浆细胞和T细

胞的生长因子)、IL-7 (用于前B细胞/前T细胞和NK细胞的生长因子)、IL-10 (激活巨噬细胞、B细胞、肥大细胞、Th1/Th2细胞)、IL-12 (激活T细胞和NK细胞)、IL-17 (激活Th细胞)。也可以使用白细胞介素的功能性片段,其特征在于调节靶细胞活性的能力。

[0299] 任选,所述支架可以含有粘附分子,其也可以作为信号传导剂。粘附信号传导分子的代表性实例包括,但不限于,纤连蛋白、层粘连蛋白、胶原蛋白、血小板反应蛋白1、玻连蛋白、弹性蛋白、肌腱蛋白、聚集蛋白聚糖、聚集蛋白、骨唾液蛋白、软骨基质蛋白、血纤维蛋白原、血纤维蛋白、纤蛋白、粘蛋白、巢蛋白、骨桥蛋白、血纤维蛋白溶酶原、限制素(restitin)、丝甘蛋白、SPARC/骨连接素、versican、von Willebrand因子、多糖硫酸肝素、接合素、胶原蛋白、RGD (Arg-Gly-Asp) 和YIGSR (Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg) 肽和环状肽、糖胺聚糖(GAG)、透明质酸(HA)、6-硫酸软骨素、整联蛋白配体、选择蛋白、钙粘蛋白和免疫球蛋白超家族的成员。其他实例包括神经细胞粘附分子(NCAM)、细胞间粘附分子(ICAM)、血管细胞粘附分子(VCAM-1)、血小板-内皮细胞粘附分子(PECAM-1)、L1和CHL1。也可以使用粘附分子的功能性片段,其特征在于调节靶细胞与本发明的支架结合的能力。特别地,粘附分子包括含有氨基酸序列精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)的肽或环状肽,其称为细胞粘附配体并且在各种天然胞外基质分子中发现。在另一个实施方式中,粘附肽是胶原蛋白模拟物。代表性实例包括,具有结构GGYGGGPC (GPP) 5GFOGER (GPP) 5GPC的肽,其中O是羟基脯氨酸。这样的肽可以总称为GFOGER肽。GFOGER肽之前已经显示出对于T细胞粘附是特别良好的。参见,Stephan等,Nature Biotechnology 33,2015。

[0300] 具有这样的修饰的聚合物基质给本发明的支架提供了细胞粘附特性,并且维持哺乳动物细胞系统的长期存活,以及支持细胞生长和分化。粘附分子可以与聚合物基质偶联,使用本领域普通技术人员通常已知的和实施例中描述的合成方法来完成。参见,例如,Hirano等,Advanced Materials,17-25,2004;Hermanson等,Bioconjugate Techniques, p.152-185,1996;Massia和Hubbell,J.Cell Biol.114:1089-1100,1991;Mooney等,J.Cell Phys.151:497-505,1992;和Hansen等,Mol.Biol.Cell 5:967-975,1994,将其中的公开内容按引用并入。

[0301] 根据靶细胞类型,可以优选使用靶细胞特异性的粘附信号传导分子。因此,在一个实施方式中,所述支架含有在T细胞的结合/隔离(sequestration)中有用的粘附受体。在这些实施方式中,所述支架可以含有T细胞特异性粘附分子,例如,选自II类MHC (对于CD4+细胞)、I类MHC (对于CD8+细胞)、LFA-3 (CD2配体)、ICAM1 (对于LFA-1的配体)或其变体,其片段或其组合的受体。

[0302] 根据需求,所述支架可以特意配制成含有募集剂和粘附分子的子集,使得操纵特定子集的免疫细胞,例如,特定的T细胞亚群。在这些实施方式中,可以使用特异性地结合靶细胞中表达的细胞表面标志物的试剂来配制/制造所述支架。例如,在T细胞的情况中,所述支架可以适用于辅助T细胞(T_H 细胞;其差异表达CD4+)、细胞毒性T细胞(T_c 细胞;其差异表达CD8+)、记忆T细胞(T_m 细胞;其差异表达CD45RO)、抑制T细胞(T_s ,其细胞)、调节T细胞(Treg;进一步表征为FOXP3+Treg细胞和FOXP3-Treg)、自然杀伤T细胞(NK细胞;差异表达CD1d+)、粘膜相关不变体(invariant) (MAIT;差异表达MR1)、gamma delta T细胞($\gamma\delta$ T细胞;包括含有一条 γ 链和一条 δ 链的TCR)的优先募集。这类结合细胞表面标志物的试剂可以包括,例如,半抗原、肽、配体、抗体等。可以任选原位(in situ)或非原位(ex situ)使用用于富集具

有一种或多种细胞亚型的分离物的其他常规技术

[0303] 所述支架还可以适用于募集疾病特异性的免疫细胞。例如,可以募集对于特定类型的自身免疫疾病特异性的多种T细胞。因此,在一个实施方式中,在自身免疫疾病的诊断中有用的支架可以配制成含有对于障碍中涉及的免疫细胞特异性的募集剂。这样的募集剂可以例如是对于调节T细胞(Treg)、抑制T细胞(Ts)或其组合特异性的。在相关实施方式中,在癌症诊断中有用的支架可以配制成含有用于优先募集癌症特异性T细胞类型(例如,细胞毒性T细胞(Tc)、自然杀伤细胞(NK)或其组合)的募集剂。

[0304] 在某些实施方式中,所述支架用于淘选疾病特异性细胞。这可以包括例如直接促进疾病进展的细胞。在许多自身免疫疾病的情况下,所述疾病可以通过特定细胞群的靶向杀灭来介导和促进,例如,T1D中的胰腺的 β 细胞和多发性硬化中的神经元细胞。在其他自身免疫疾病中,所述疾病可以通过特定表位的靶向攻击来促成,如,例如,在类风湿性关节炎情况中的类风湿因子(RF)和瓜氨酸肽,以及在节段性回肠炎的情况下,肠道菌群中存在的抗原。细胞的靶向破坏通常涉及特定类型或子集的免疫细胞。因此,基于细胞靶标的性质和特性,可以使用本发明的支架优先操纵对其特异性的免疫细胞。

[0305] 在上述实施方式中,给支架提供了疾病特异性免疫细胞(例如,T细胞)结合的抗原。这些自身免疫细胞可以被操纵和任选重新编程至非自身免疫表型。将T细胞重新编程至多能性的方法是本领域已知的。参见,Nishimura等,Stem Cell 12,114-126(2013); Themeli等,Nature Biotechnology 31,928-933(2013)。在某些情况中,特别是在癌症特异性T细胞的情况下,可以将重新编程的细胞更新以靶向癌症。或者,在对于自身免疫疾病特异性的T细胞的情况下,可以将细胞消除。

[0306] 在某些实施方式中,将本发明的支架制成已经工程化来维持抗原呈递的多孔结构。用于制造多孔支架的方法在本领域中已经有描述。参见,例如,美国公开No.2011/0020216、2013/0202707、2011/0020216和美国专利No.8,067,237,将其中的公开内容按引用并入本文中。

[0307] 本发明的实施方式进一步提供了含有对于各种离体和体内应用具有所需稳定性的MSR-SLB支架的支架。例如,所述支架在组织培养应用、细胞生长实验中或作为待施用于组织(收集的或工程化的)以及受试者的移植材料是稳定的。在一个实施方式中,本发明涉及介孔二氧化硅微棒-脂质双层(MSR-SLB)支架,其保持连续的流体架构至少0.5天、1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、25天、30天、35天、40天、45天、50天或更长时间。可以使用常规技术,例如,以下实施例中说明的显微可视化技术,来监测支架的稳定性和/或流体架构。

[0308] II. 制备本发明支架的方法

[0309] 本发明的实施方式进一步涉及用于制备本发明的抗原呈递细胞模拟支架(APC-MS)的方法。所述方法包括提供包括高表面积介孔二氧化硅微棒(MSR)的基底层;任选将T细胞稳态剂加载于MSR上;将连续的流体支撑的脂质双层(SLB)成层于包括MSR的基底层上,由此产生MSR-SLB支架;如果没有进行步骤(b),将T细胞稳态剂加载于MSR-SLB支架上;任选用阻断剂阻断MSR-SLB支架中的一个或多个非特异性整合位点;以及将T细胞激活分子和T细胞共刺激分子加载于MSR-SLB支架上,由此制得APC-MS。在这些实施方式中,所述方法可以包括进一步将至少一种其他试剂加载于支架中,所述其他试剂是生长因子、细胞因子、白细

胞介素、粘附信号传导分子、整联蛋白信号传导分子,或其片段,或其组合。之前已经在设备制造部分中描述了用于加载其他成分的方法。图24中提供了用于制备本发明支架的代表性方法。

[0310] 在一个实施方式中,将含有1:1的T细胞激活分子和T细胞共刺激分子(例如,抗CD3抗体和抗CD28抗体)混合物的功能性分子混合物与MSR-SLB支架混合,使得功能性分子:MSR-SLB支架的重量比为约1:2至约1:20,优选约1:4至约1:15,特别是约1:5至约1:10。可以调节T细胞激活分子和T细胞共刺激分子的重重量比,例如,约5:1至约1:5,同时保持功能性分子和MSR-SLB支架之间相同的干重比。

[0311] 此外,本发明的实施方式进一步涉及通过组装多个支架产生具有允许T细胞(更特别地,不同的辅助T细胞或细胞毒性T细胞的亚群)渗透的充足多孔性的堆叠来制备APC-MS的方法。

[0312] III. 使用本发明支架的方法

[0313] 本发明的支架可以用于各种应用,包括,但不限于,靶效应细胞(例如,T细胞)的操纵、特定效应细胞群(例如,CD8⁺T细胞的亚群)的分离、疾病的诊断和治疗以及用于疾病的诊断和治疗的组合物和试剂盒的生产。

[0314] 用于操纵靶细胞的方法

[0315] 在一个实施方式中,本发明提供了一种用于操纵靶效应细胞或其亚群(例如,辅助T细胞或细胞毒性T细胞)的方法。在这点上,术语“操纵”包括,例如,靶效应细胞的激活、分裂、分化、生长、扩增、重编程、无能、休眠、衰老、凋亡或死亡。

[0316] 在一个实施方式中,通过提供本发明的支架使得靶效应细胞接触支架,从而在原位操纵(例如,激活)靶效应细胞,例如,T细胞。为了促进接触,可以将支架植入受试者体内的合适部位处,例如,皮下或静脉内植入。在其他实施方式中,通过用本发明的支架培养含有靶效应细胞的样品非原位地操纵靶细胞。

[0317] 可以操纵多种靶效应细胞,包括,使用来自受试者的新鲜样品、原代培养细胞、永生细胞、细胞系、杂交瘤。操纵的细胞可以用于各种免疫治疗应用以及用于研究中。

[0318] 靶效应细胞的操纵部位可以是在原位或非原位。因此,在一个实施方式中,在原位(例如,在支架内)操纵细胞。在这点上,不需要将细胞从支架物理地取出以操纵。在另一个实施方式中,非原位地操纵细胞(例如,通过首先从支架取出细胞并操纵取出的细胞)。在将支架植入受试者中时,可以在植入部位或附近操纵细胞。在其他实施方式中,首先可以将植入的支架从植入部位取出,并且按照之前所述的在原位或非原位操纵效应细胞。

[0319] 在某些实施方式中,操纵效应细胞中使用的支架可以具有抗原呈递细胞(APC)和/或源自这些APC的各种抗原。可以在支架结构中提供或外部提供(例如,在培养基中)这些次级试剂(例如,APC或源自APC的抗原)。在某些实施方式中,所述支架可以具有吸引和/或募集APC的各种抗原。之前的部分中已经提供了这样的吸引和/或募集分子的代表性实例。

[0320] 在某些实施方式中,含抗原支架可以用于在体内操纵靶效应细胞。对于这样的应用,所述支架可以植入血管内部、淋巴组织内、肿瘤部位、疾病部位(例如,受类风湿性关节炎影响的组织周围的区域)或皮下植入,使得靶效应细胞接触支架。或者,支架可以以最小侵入性方式注射,例如,通过针、导管等。可以允许植入的支架在植入部位保留约0.5天、1天、2天、3天、4天、5天、6天、1周、2周、3周、4周、1个月、2个月、3个月、6个月、7个月、8个月、9

个月、1年、2年或更长时间。定期地,可以将支架外植,以研究、分子乃至进一步操纵效应细胞。

[0321] 在相关实施方式中,本发明涉及在原位操纵抗原特异性效应细胞。在这点上,本发明的支架可以含有目标抗原,使用用于吸附功能性分子的相同策略将所述目标抗原吸附至支架上。或者,本发明的支架可以用含有培养基中的抗原特异性效应T细胞及展示目标抗原的APC的样品孵育。随后允许靶效应细胞接触支架并且支架中所含的功能性分子一起来促进效应细胞的操纵。单纯作为代表性实施方式,如实施例部分中所述的,用本发明的支架孵育含有T细胞的样品,其激活、共同刺激和稳态地维持靶效应细胞。可以用支架孵育样品约1天至30天,约1至15天或约4至13天,例如,约7-8天,导致效应细胞群体的选择性操纵。可以通过基于某些基因产物(例如,识别目标抗原或抗原呈递细胞的T细胞受体(TCR))的表达选择细胞来另外操纵抗原特异性效应细胞。

[0322] 本文中所述的实施方式进一步涉及用于非原位操纵抗原特异性效应细胞的方法,其中所述支架具有表达目标抗原的APC或抗原自身。所述操纵步骤可以非原位或原位进行。

[0323] 在另一个实施方式中,可以相对于其他效应细胞选择性地操纵对抗原或APC特异性的效应靶细胞(例如,相对于CD4+T细胞偏向于CD8+T细胞)。例如,可以用本发明的支架孵育含有CD8+T细胞(连同CD4+T细胞一起)的样品,本发明的支架机械或化学制造以允许CD8+T细胞渗入和/或隔离。可以使用本领域已知技术,使渗入和/或隔离的CD8+T细胞进一步扩增、激活、增殖或生长。之前已经描述了代表性方法。

[0324] 在另一个实施方式中,抗原或APC特异性的效应靶细胞可能是不合需要的(例如,调节/抑制T细胞),并且在接触本发明的支架后它们被诱导经历凋亡、无能或死亡。例如,可以用本发明的支架孵育含有调节T细胞(连同其他T细胞一起)的样品,所述支架机械或化学制造以允许调节/抑制T细胞渗入和/或隔离。可以使用本领域已知技术消除渗入和/或隔离的T细胞。

[0325] 在这点上,可以用本领域已知的技术来进一步测定本发明支架中已经渗入和/或隔离的细胞的性质。因此,在一个实施方式中,用于鉴定或选择激活T细胞的基因产物可以是细胞表面标志物或细胞因子,或其组合。用于鉴定激活的T细胞的细胞表面标志物包括,但不限于,CD69、CD4、CD8、CD25、HLA-DR、CD28和CD134。CD69是在B和T淋巴细胞、NK细胞和粒细胞上发现的早期激活标志物。CD25是IL-2受体并且是激活的T细胞和B细胞的标志物。CD4是TCR共受体并且是胸腺淋巴细胞、TH1-和TH2-型T细胞、单核细胞和巨噬细胞的标志物。CD8也是TCR共受体并且是细胞毒性T细胞的标志物。CD134只在激活的CD4+T细胞中表达。

[0326] 用于选择激活的T细胞的细胞表面标志物包括,但不限于,CD36、CD40和CD44。CD28作为与T细胞受体途径无关的刺激性T细胞激活途径,并且在CD4+和CD8+细胞上表达。CD36是膜糖蛋白并且是用于血小板、单核细胞和内皮细胞的标志物。CD40是B细胞、巨噬细胞和树突细胞的标志物。CD44是巨噬细胞和其他吞噬细胞的标志物。可以通过使用辅助T细胞或细胞毒性T细胞(例如,CD4vs.CD8)的细胞表面基因产物的表达的阳性选择、阴性选择或其组合来分离T细胞子集。用于鉴定本发明的激活的T细胞的细胞因子包括,但不限于由TH1型T细胞(细胞介导的应答)和TH2型T细胞(抗体应答)产生的细胞因子。用于鉴定激活的TH1型T细胞的细胞因子包括,但不限于,IL-2、 γ 干扰素(γ IFN)和组织坏死因子 α (TNF α)。用于鉴定激活的TH2型T细胞的细胞因子包括,但不限于,IL-4、IL-5、IL-10和IL-13。也可以通过辅

助T细胞或细胞毒性T细胞的细胞因子产物(例如, γ IFN vs. IL4)的表达的阳性选择、阴性选择或其组合来分离T细胞的子集。

[0327] 可以通过鉴定表达CD69、CD4、CD25、IL-2、IFN γ 、TNF α ,或其组合的细胞来分离对于目标抗原特异性的激活的TH1型T细胞。还可以通过鉴定与IFN γ 或TNF α 一起表达CD69和CD4的细胞来分离对目标抗原特异性的激活的TH1型T细胞。可以通过鉴定表达CD69、CD4、IL-4、IL-5、IL-10、IL-13或其组合的细胞来分离对目标抗原特异性的激活的TH2型T细胞。可以通过鉴定表达CD69、CD4、CD25、IL-2、IFN γ 、TNF α 或其组合的细胞和表达CD69、CD4、IL-4、IL-5、IL-10、IL-13或其组合的细胞来分离对目标抗原特异性的激活的TH1型T细胞和TH2型T细胞的组合。

[0328] 可以通过本领域技术人员已知的利用抗体的免疫选择技术来鉴定用于本发明的激活的T细胞的阳性或阴性选择的基因产物,所述技术包括但不限于荧光激活细胞分选(FACS)、磁性细胞分选、淘选和色谱。可以在一个或多个步骤中进行激活的T细胞上的两种或更多种标志物的鉴定。使用FACS在一个步骤中进行两种或更多种标志物的免疫选择时,用不同的荧光团标记两种或更多种不同的抗体。或者,如上所述,可以使用微珠来分选细胞。

[0329] 对于细胞表面表达的基因产物,抗体可以直接结合基因产物并且可以用于细胞选择。对于以低浓度表达的细胞表面基因产物,可以将磁荧光(magnetofluorescent)脂质体用于细胞选择。在低表达水平下,常规荧光标记的抗体可能不够灵敏来检测细胞表面表达的基因产物的存在。可以将含有荧光团的脂质体与具有目标特异性的抗体缀合,由此允许检测细胞表面标志物。

[0330] 对于细胞内基因产物,如细胞因子,抗体可以在渗透细胞后使用。或者,为了避免细胞被渗透杀灭,如果细胞内基因产物最终从细胞分泌出来,可以在其通过细胞膜分泌时使用细胞表面上的“捕获”抗体进行检测。捕获抗体可以是对两种不同的抗原特异性的双重抗体:(i)分泌的目标基因产物和(ii)细胞表面蛋白。通常,细胞表面蛋白可以是T细胞(特别地,或淋巴细胞)上存在的任何表面标志物(例如,CD45)。捕获抗体可以首先结合细胞表面蛋白并且随后结合目标细胞内基因产物(在其通过膜分泌时),由此将基因产物保留在细胞表面上。随后可以将对捕获的基因产物特异性的标记的抗体用于结合捕获的基因产物,这允许选择激活的T细胞。还发现某些形式的细胞因子在细胞表面上以低浓度表达。例如, γ IFN以低浓度在细胞表面上呈现,具有与胞内 γ IFN表达相似的动力学(Assenmacher等, Eur J. Immunol, 1996, 26:263-267)。对于细胞表面上表达的细胞因子的形式,常规荧光标记的抗体或含有荧光团的脂质体可以用于检测目标细胞因子。本领域普通技术人员将认识到用于检测 and 选择对激活的T细胞特异性的胞外和胞内基因产物的其他技术。

[0331] 通过本发明的方法分离的T细胞可以从全血富集至少40-90%。T细胞还可以从全血富集至少95%。T细胞还可以从全血富集至少98%。T细胞还可以从全血富集至少99.5%。相似的方法可以用于B细胞的原位或非原位操纵中。在某些实施方式中,按照本文中所述的,将冷冻保存的细胞解冻并洗涤,并在激活前使其在室温下静置一小时。

[0332] 根据应用,可以调节支架与细胞样品的干重比。例如,支架:细胞干重比范围可以从1:500至500:1,并且其中的任何整数值可以用于操纵效应细胞。如本领域普通技术人员可以容易地获知的,支架与细胞的比例可能取决于相对于靶细胞的支架大小。

[0333] T细胞群体的扩增

[0334] 在相关实施方式中,本发明进一步涉及用于从免疫细胞群体扩增T细胞的方法,例如,扩增含有B细胞、树突细胞、巨噬细胞、浆细胞等的样品中所含的T细胞。在另一个实施方式中,本发明还涉及用于扩增特定的T细胞群体的方法,例如,扩增来自含有辅助T细胞、自然杀伤T细胞、调节/抑制T细胞等的样品的细胞毒性T细胞。特定的T细胞亚群可以随后用于各种免疫治疗应用中。不希望受到任何特定理论的束缚,据认为本发明的APC-MS对于T细胞的扩增特别有效,因为介孔二氧化硅棒的相对大尺寸和高纵横比允许与每个棒相互作用的T细胞形成大的簇,这通过允许T细胞/T细胞相互作用和/或旁分泌信号传导而促进了T细胞的有效扩增。

[0335] 在一个实施方式中,通过提供本发明的支架,使得靶效应细胞接触支架,在原位扩增(例如,生长或分化)靶效应细胞,例如,T细胞。为了促进接触,可以将支架植入受试者体内的合适部位,例如,皮下或静脉内植入。在其他实施方式中,可以通过用本发明的支架培养含有靶效应细胞的样品,非原位地扩增靶细胞。在一个实施方式中,可以通过首先从样品分离T细胞并随后通过接触本发明的支架来刺激T细胞使得效应T细胞被激活、共刺激和稳态地维持,从而进行非原位的T细胞扩增。

[0336] 在本发明的一个实施方式中,T细胞是获自受试者的原代T细胞。术语“受试者”意欲包括其中可以引发免疫应答的活生物体(例如,哺乳动物)。受试者的实例包括人、狗、猫、小鼠、大鼠及其转基因物种。T细胞可以获得多种来源,包括外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、来自感染部位的组织、脾组织和肿瘤。在本发明的某些实施方式中,可以使用本领域中可利用的任何数量的原代T细胞和/或T细胞系。

[0337] 对全血计数的研究揭示了全血中的T细胞数量非常低。例如,根据Stem Cell Technologies,Vancouver,BC,CANADA (Document#23629,VERSION 2.1.0)公开的产品目录,全血中的白细胞群体为约0.1-0.2% (由于红细胞的优势),其中T细胞构成全部白细胞群体的约7-24%。在T细胞中,CD4+T细胞构成全部白细胞群体的约4-20% (转换成低于全血中全部细胞群体的0.04%) 和CD8+T细胞构成全部白细胞群体的约2-11% (转换成低于全血中全部细胞群的0.022%)。因此,在本发明的某些实施方式中,本发明的方法可以结合其他本领域已知的用于靶细胞富集的技术。可以在将样品接触本发明的支架前进行富集步骤。在另一个实施方式中,可以在样品接触本发明的支架后进行富集步骤。

[0338] 在一个实施方式中,可以使用FICOLL分离富集效应细胞群体。在一个实施方式中,通过单采术(apheresis)或白细胞去除法(leukapheresis)获得来自个体循环血液的细胞。单采术产物通常含有淋巴细胞(包括T细胞)、单核细胞、粒细胞、B细胞、其他有核白细胞、红细胞和血小板。可以将通过单采术收集的细胞洗涤以除去血浆部分并且将细胞置于合适的缓冲液或介质中用于随后的处理步骤。随后用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤细胞。或者,洗涤液缺乏钙并且可以缺乏镁或可以缺乏许多二价阳离子(如果不是全部的话)。还可以根据制造商的说明,使用半自动化的“流通”离心。洗涤后,可以将细胞重悬浮于各种生物相容性缓冲液中,如,例如,无Ca、无Mg-PBS。或者,可以除去单采法样品的不合需要的组分并且将细胞直接悬浮于培养基中。

[0339] 在另一个实施方式中,可以通过裂解红细胞并且耗尽单核细胞,例如,通过PERCOLL™梯度离心,来富集外周血或全血T细胞。可以通过阳性或阴性选择技术来进一步分

离特定的T细胞亚群,如CD28+、CD4+、CD8+、CD45RA+和CD45ro+T细胞。

[0340] 根据本发明,可以任选使用各种分选技术。例如,可以使用针对细胞独特的表面标志物的抗体的组合来进一步分选扩增的或操纵的T细胞群体。优选的方法是通过使用针对选定的细胞上存在的细胞表面标志物的单克隆抗体的混合物的磁免疫粘附或流式细胞术的细胞分选和/或选择。例如,为了通过阴性选择富集CD4+细胞,单克隆抗体混合物通常包括CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。在某些实施方式中,可能希望富集或阴性选择调节T细胞,其通常表达CD4+、CD25+、CD62Lhi、GITR+和FoxP3+。

[0341] 对于所需细胞群体的分离,细胞的浓度和支架表面可以改变。在某些实施方式中,可能希望显著降低其中将支架和细胞混合在一起的体积(即,提高细胞的浓度)以确保细胞和支架的最大接触。例如,在一个实施方式中,使用20亿细胞/ml的浓度。在一个实施方式中,使用10亿细胞/ml的浓度。在进一步的实施方式中,使用高于100百万细胞/ml。在进一步的实施方式中,使用10、15、20、25、30、35、40、45或50百万细胞/ml的细胞浓度。在再另一个实施方式中,使用75、80、85、90、95或100百万细胞/ml的细胞浓度。在进一步的实施方式中,可以使用125或150百万细胞/ml的浓度。使用高浓度可以导致提高的细胞产量、细胞激活和细胞扩增。此外,使用高细胞浓度允许更有效地捕获可能弱表达目标靶抗原的细胞,如CD28阴性T细胞,或从其中存在许多肿瘤细胞的样品捕获(即,白血病血液、肿瘤组织等)。这样的细胞群体可以具有治疗价值并且是希望获得的。例如,使用高浓度的细胞允许更有效地选择通常具有较弱CD28表达的CD8+T细胞。

[0342] 在相关实施方式中,可能希望使用较低浓度的细胞。这可以通过降低支架:细胞比率来实现,使得支架和细胞之间的相互作用最小化。这种方法选择表达高的待结合支架的所需抗原量的细胞。例如,CD4+T细胞表达较高水平的CD28并且在稀浓度下比CD8+T细胞更有效地捕获。在一个实施方式中,使用的细胞浓度为 5×10^6 /ml。在其他实施方式中,使用的浓度为约 1×10^5 /ml至 1×10^9 /ml,以及其中的任何整数值,例如, 1×10^5 /ml至 1×10^8 /ml, 1×10^6 /ml至 1×10^7 /ml, 1×10^7 /ml至 1×10^9 /ml。

[0343] 在一个实施方式中,本发明可以包括本领域已知的用于样品制备的程序。例如,可以在洗涤步骤后将T细胞冷冻并在使用前解冻。冷冻和随后的解冻通过除去细胞群体中的粒细胞和一定程度的单核细胞提供了更均一的产品。除去血浆和血小板的洗涤步骤后,可以将细胞悬浮于冷冻液中。尽管许多冷冻液和参数是本领域已知的并且在这点上将是有用的,但一种方法涉及使用含有20%DMSO和8%人血清白蛋白的PBS,或其他合适的含有例如HESPAN和PLASMALYTE A的细胞冷冻介质,随后以1℃/分钟的速率将细胞冷冻至-80℃,并且储存在液氮存储罐的蒸汽相中。可以使用其他受控冷冻方法,以及在-20℃或液氮中立即冷冻的未受控冷冻。

[0344] 在本发明的情况中还考虑了在可能需要本文中所述的扩增细胞时的前一段时间,从受试者收集血样或白细胞去除法产物。因此,可以在需要的任何时间点收集待扩增的细胞源,并且将所需的细胞,如T细胞,分离并冷冻用于之后针对各种将得益于T细胞治疗的疾病或病症的T细胞治疗中,如本文中所述的那些。在一个实施方式中,血样或白细胞去除法取自整体健康的受试者。在某些实施方式中,血样或白细胞去除法取自处于产生疾病的风险中但尚未发展成疾病的整体健康的受试者,并且将目标细胞分离并冷冻用于之后的用途。在某些实施方式中,可以将T细胞扩增、冷冻并在之后的时间使用。在某些实施方式中,

就在如本文中所述的特定疾病诊断后不久但在任何治疗之前,从患者收集样品。在进一步的实施方式中,在各种相关治疗方法前,从受试者的血样或白细胞去除法分离细胞,所述治疗包括但不限于使用药剂的治疗,如抗病毒剂、化疗、放疗、免疫抑制剂如环磷酰胺、硫唑嘌呤、氨甲喋呤、霉酚酸酯和FK506、抗体,或其他免疫消融剂,如CAMPATH、抗CD3抗体、FR901228和辐射。这些药物抑制钙依赖性磷酸酶钙调磷酸酶(环孢菌素和FK506)或抑制对生长因子诱导的信号传导重要的p70S6激酶(雷帕霉素)(Liu等,Cell 66:807-815,1991;Henderson等,Immun.73:316-321,1991;Bierer等,Curr.Opin.Immun.5:763-773,1993;Isoniemi(上文))。在进一步的实施方式中,针对患者分离细胞,并冷冻用于之后结合(例如,在其之前、同时或之后)骨髓移植、使用化疗剂(如氟达拉滨)的T细胞消融治疗、外部束放疗(XRT)、环磷酰胺或抗体(如OKT3或CAMPATH)使用。在另一个实施方式中,之前分离细胞并可以冷冻用于之后B细胞消融治疗(如与CD20反应的药剂,例如,Rituxan)后的治疗。

[0345] 在本发明的再一个实施方式中,治疗后直接从患者获得T细胞。在这点上,已经观察到在某些癌症治疗后,特别是使用破坏免疫系统的药物的治疗,就在治疗后不久在患者正常从治疗恢复时的时间段期间,获得的T细胞质量对于其离体扩增的能力可能是最佳的或提高的。同样,使用本文中所述的方法离体操纵后,这些细胞对于增强的移植和体内扩增是处于优选的状态。因此,在本发明的情况内考虑了在这个恢复期期间收集血液细胞,包括T细胞、树突细胞或造血谱系的其他细胞。此外,在某些实施方式中,动员(例如,使用GM-CSF的动员)和调理方案可以用于在受试者中形成其中有利于特定细胞类型的再分群、再循环、再生和/或扩增的条件,尤其是在治疗后的限定时间窗口期间。说明性的细胞类型包括T细胞、B细胞、树突细胞和免疫系统的其他细胞。

[0346] 根据本发明可以使用含有任何比率的T细胞激活分子:T细胞共刺激分子的支架。在一个实施方式中,其中T细胞激活分子和T细胞共刺激分子都是抗体,可以使用1:1比率的每种抗体。在一个实施方式中,结合支架的CD3:CD28抗体的比率范围为100:1至1:100以及其中的所有整数值。在本发明的一个方面中,结合支架的抗CD28抗体比抗CD3抗体多,即,CD3:CD28的比率低于一。在本发明的某些实施方式中,结合支架的抗CD28抗体与抗CD3抗体的比率高于2:1。在一个特别的实施方式中,可以使用1:100CD3:CD28比率的结合支架的抗体。在另一个实施方式中,可以使用1:75CD3:CD28比率的结合支架的抗体。在再一个实施方式中,使用1:50CD3:CD28比率的结合支架的抗体。在另一个实施方式中,使用1:30CD3:CD28比率的结合支架的抗体。在一个优选实施方式中,使用1:10CD3:CD28比率的结合支架的抗体。在另一个实施方式中,使用1:3CD3:CD28比率的结合支架的抗体。在再另一个实施方式中,使用3:1CD3:CD28比率的结合支架的抗体。

[0347] 本发明的一个方面源于令人惊讶的发现:其中与含有基底层(其含有高表面积介孔二氧化硅微棒(MSR))和连续的流体支撑的脂质双层(SLB)但不含T细胞激活分子和T细胞共刺激分子的对照支架相比,接触所述支架约1周后,所述方法给予T细胞群体扩增的提高。在一个实施方式中,根据本发明的方法,与含有基底层(其含有高表面积介孔二氧化硅微棒(MSR))和连续的流体支撑的脂质双层(SLB)但不含T细胞激活分子和T细胞共刺激分子的对照支架相比,接触所述支架约1周后,观察到T细胞群体的扩增提高约10倍至1000倍,优选约50倍至500倍,或更高。

[0348] 本发明的另一个方面源于令人惊讶的发现:其中与含有T细胞激活分子和T细胞共

刺激分子的超顺磁性球形聚合物颗粒 (DYNABEAD) 相比,接触所述支架约1周后,所述方法给予T细胞群体扩增的提高。在一个实施方式中,根据本发明的方法,与含有T细胞激活分子和T细胞共刺激分子的超顺磁性球形聚合物颗粒 (DYNABEAD) 相比,接触所述支架约1周后,观察到T细胞群的扩增提高约2倍至100倍,优选约5倍至20倍,或更高。

[0349] 本发明的再一个方面源于令人惊讶的发现:根据上述方法操纵T细胞提高了T细胞的代谢活性。特别地,与含有基底层(其含有高表面积介孔二氧化硅微棒 (MSR)) 和连续的流体支撑的脂质双层 (SLB) 但不含T细胞激活分子和T细胞共刺激分子的对照支架相比,接触所述支架约1周后,观察到提高的T细胞的代谢活性。在一个实施方式中,根据本发明的方法,与含有基底层(其含有高表面积介孔二氧化硅微棒 (MSR)) 和连续的流体支撑的脂质双层 (SLB) 但不含T细胞激活分子和T细胞共刺激分子的对照支架相比,接触所述支架约1周后,观察到T细胞群的代谢活性提高约2倍至100倍,优选约5倍至20倍,或更大。

[0350] 本发明的另一个方面源于令人惊讶的发现:与含有T细胞激活分子和T细胞共刺激分子的超顺磁性球形聚合物颗粒 (DYNABEAD) 相比,接触所述支架约1周后,所述方法给予更好的T细胞群体的代谢活性。在一个实施方式中,根据本发明的方法,与含有T细胞激活分子和T细胞共刺激分子的超顺磁性球形聚合物颗粒 (DYNABEAD) 相比,接触所述支架约1周后,观察到T细胞群的扩增提高约1倍(例如,提高100%)至20倍,优选2倍至10倍,或更多的提高。

[0351] 另外,根据本发明的方法,发现接触所述支架后,扩增的T细胞保持代谢活性至少约7天。通过常规技术,例如,分析细胞因子产生的水平或监测细胞倍增,来测量T细胞代谢活性。此外,根据本发明的方法,扩增的T细胞比对照支架形成更大且更稳定的聚集物(例如,持续更长时间)。例如,在一个实验中,接触所述支架后,扩增的T细胞形成稳定的聚集物至少约7天,而用只含有MSR基底层和SLB层的对照支架孵育的样品中的聚集物明显不同。

[0352] 本发明的更多实施方式涉及用于获得CD8+细胞的多克隆群体的方法,包括将本发明的支架接触受试者的生物样品,由此激活、共刺激、稳态地维持和任选扩增样品内存在的T细胞群体;将样品中的T细胞接触用于检测CD8+细胞的试剂;以及从样品分离出检测到的CD8+T细胞亚群。

[0353] 在相关实施方式中,本发明涉及用于获得CD4+细胞的多克隆群体的方法,包括将本发明的支架接触受试者的生物样品,由此激活、共刺激、稳态地维持和任选扩增样品内存在的T细胞群体;将样品中的T细胞接触用于检测CD4+细胞的试剂;以及从样品分离出检测到的CD4+T细胞亚群。

[0354] 在相关实施方式中,本发明涉及用于获得CD4+/FOXP3+或CD4+/FOXP3-细胞的多克隆群体的方法。所述方法包括将本发明的支架接触受试者的生物样品,由此激活、共刺激、稳态地维持和任选扩增样品内存在的T细胞群;将样品中的T细胞接触用于检测CD4+细胞的试剂;进一步将T细胞接触用于检测FOXP3+细胞的试剂;以及从样品分离出检测到的CD4+/FOXP3+或CD4+/FOXP3-T细胞亚群。在这些实施方式中,用于CD4+和/或FOXP3+T细胞的检测和/或分离的试剂优选是特异性地结合CD4+和FOXP3标志物的抗体或其抗原结合片段。在这点上,在FOXP3被识别为调节T细胞(其调低免疫应答)的发育和功能中的调节途径的主要调节子的范围中,可能期望分离FOXP3+细胞用于某些应用,以及FOXP3-细胞用于其他应用。例如,在癌症治疗应用中,可能期望消除或降低T细胞药物组合物中的调节T细胞活性。因此,

所述方法可以适用于筛选FOXP3⁻细胞。或者,在自身免疫疾病治疗的情况中,可能期望提高T细胞药物组合物中的调节T细胞活性(因为减弱的调节T细胞活性可能造成身体的自身免疫状况)。因此,在这样的情况中,可以改变配制方法以阳性选择并包括FOXP3⁺细胞。

[0355] 在再另一个实施方式中,本发明涉及用于获得效应记忆和/或效应T细胞的多克隆群体的方法。所述方法包括将本发明的支架接触受试者的生物样品,由此激活、共刺激、稳态地维持和任选扩增样品内存在的T细胞群体;将样品中的T细胞接触用于检测CD44⁺细胞的试剂;进一步将T细胞接触用于检测CD62L⁺的试剂;以及从样品分离检测到的CD4⁺/CD62L⁺或CD4⁺/CD62L⁻T细胞亚群。在这些实施方式中,所述效应记忆和/或效应T细胞优选是CD4⁺/CD62L⁻。

[0356] 在再另一个实施方式中,本发明涉及用于获得激活的CD8⁺T细胞的多克隆群体的方法。所述方法包括将本发明的支架接触受试者的生物样品,由此激活、共刺激、稳态地维持和任选扩增样品内存在的T细胞群体;将样品中的T细胞接触用于检测CD8⁺细胞的试剂;进一步将T细胞接触用于检测CD69⁺的试剂;以及从样品中分离出检测到的CD8⁺/CD69⁺或CD8⁺/CD69⁻T细胞亚群。在这些实施方式中,所述激活的T细胞优选是CD8⁺/CD69⁺。

[0357] 在再另一个实施方式中,本发明涉及用于获得细胞毒素分泌T细胞的多克隆群体的方法。所述方法包括将本发明的支架接触受试者的生物样品,由此激活、共刺激、稳态地维持和任选扩增样品内存在的T细胞群体;将样品中的T细胞接触用于检测CD8⁺细胞的试剂;进一步将T细胞接触用于检测颗粒酶B⁺的试剂;以及从样品中分离出检测到的CD8⁺/颗粒酶B⁺或CD8⁺/颗粒酶B⁻T细胞亚群。在这些实施方式中,所述细胞毒素分泌T细胞优选是CD8⁺/颗粒酶B⁺。

[0358] 在再另一个实施方式中,本发明涉及用于获得激活细胞因子分泌T细胞的多克隆群体的方法。所述方法包括将本发明的支架接触受试者的生物样品,由此激活、共刺激、稳态地维持和任选扩增样品内存在的T细胞群;将样品中的T细胞接触用于检测IFN γ ⁺细胞的试剂;以及从样品中分离出检测到的IFN γ ⁺T细胞亚群。在这些实施方式中,所述T细胞优选是IFN γ 分泌细胞。

[0359] 在再另一个实施方式中,本发明涉及用于获得记忆T细胞的多克隆群体的方法。所述方法包括将本发明的支架接触受试者的生物样品,由此激活、共刺激、稳态地维持和任选扩增样品内存在的T细胞群体;将样品中的T细胞接触用于检测CD62L⁺CCR7⁺T细胞的试剂;以及从样品分离出检测到的CD62L⁺CCR7⁺T细胞亚群。在这些实施方式中,所述T细胞优选是CD62L⁺CCR7⁺CD4⁺中心记忆T细胞。参见,Okada等,Int Immunol., 20 (9):1189-99, 2008。在另一个实施方式,本发明涉及用于获得记忆T细胞的多克隆群体的方法,包括将本发明的支架接触受试者的生物样品,由此激活、共刺激、稳态地维持和任选扩增样品内存在的T细胞群体;将样品中的T细胞接触用于检测CD62L⁺CCR7⁺T细胞的试剂;以及从样品中分离出检测到的CD62L⁻CCR7⁻T细胞亚群。在这些实施方式中,所述CD62L⁻CCR7⁻T细胞是效应记忆T细胞。参见,Sallusto等,Nature 401:708-712, 1999。

[0360] 在再另一个实施方式中,本发明涉及用于从样品检测和/或除去耗尽的T细胞多克隆群体的方法。所述方法包括将本发明的支架接触受试者的生物样品,由此激活、共刺激、稳态地维持和任选扩增样品中存在的T细胞群体;将样品中的T细胞接触用于检测CD8⁺T细胞的试剂;进一步将T细胞接触用于检测PD-1⁺T细胞的试剂;以及从样品中分离出检测到的

CD8+/PD-1+T细胞亚群。可以任选从样品中消除CD8+/PD-1+T细胞,其表示是耗尽的细胞。

[0361] 在另一个用于从样品检测和/或除去T细胞的实施方式中,本发明提供了一种方法,包括将本发明的支架接触受试者的生物样品,由此激活、共刺激、稳态地维持和任选扩增样品内存在的T细胞群体;将样品中的T细胞接触用于检测T细胞上的共抑制受体的试剂;以及从样品分离出表达共抑制受体的T细胞亚群。所述共抑制受体的表达通常表示耗尽的细胞,其可以任选从样品中消除。在这些实施方式中,所述共抑制受体是选自CTLA-4、TIM3、LAG3、2B4、BTLA、CD160和KLRG1的受体。参见,Legat等,Front Immunol.,2013Dec19;4:455。

[0362] 在上述实施方式中,用于检测和/或分离细胞的试剂优选是抗体或其抗原结合片段,例如,特异性地结合上述标志物的抗体,例如,CD8、CD4、FOXP3、CD62L、PD-1、颗粒酶B等。优选使用FACS分析进行这些细胞标志物的检测。

[0363] 本发明进一步涉及使用一种或多种上述方法分离多克隆T细胞群体并且进一步检测细胞因子的产生,所述细胞因子选自干扰素 γ (IFN γ)、组织坏死因子 α (TNF α)、IL-2、IL-1、IL-4、IL-5、IL-10和IL-13,或其组合。所述细胞因子可以允许验证分离方法。例如,其中操纵的T细胞是T辅助1 (Th1) 细胞,所述方法可以包括检测选自IL-2、干扰素 γ (IFN γ) 和组织坏死因子 α (TNF α),或其组合的细胞因子的产生。同样,其中操纵的T细胞是T辅助2 (Th2) 细胞,并且所述方法包括检测选自IL-4、IL-5、IL-10和IL-13,或其组合的细胞因子的产生。此外,其中操纵的T细胞是细胞毒性T (Tc) 细胞,所述方法可以进一步包括检测选自干扰素 γ (IFN γ) 和淋巴毒素 α (LT α /TNF β) 或其组合的细胞因子的产生,任选与选自颗粒酶或穿孔素或其组合的分泌细胞毒素的检测一起。

[0364] 使用某些方法,在约12至约14天的时间段后,通过将T细胞与刺激物分离,可以有利地在初始激活和刺激后维持T细胞群体的长期刺激。例如,通过检查T细胞的大小或测量T细胞的体积,如使用Coulter Counter,周期性地(例如,每天)监测T细胞增殖速率。在这点上,静止T细胞具有约6.8微米的平均直径,并且在初始激活和刺激时,在刺激配体的存在下,T细胞平均直径将在第4天增加至超过12微米,并且在约第6天开始降低。当平均T细胞直径降至大约8微米时,可以将T细胞再激活和再刺激,以诱导更多的T细胞增殖。或者,可以通过分析细胞表面分子的存在来监测T细胞增殖速率和用于T细胞再刺激的时间,所述细胞表面分子如选自CD69、CD4、CD8、CD25、CD62L、FOXP3、HLA-DR、CD28和CD134,或其组合的细胞表面标志物。另外,可以通过分析非T细胞表面分子的存在来完成所述方法,所述非T细胞表面分子如CD36、CD40和CD44,或其组合。在某些情况中,所述方法可以通过分析在激活的T细胞上诱导的非T细胞表面分子的存在来补充,所述非T细胞表面分子如CD154、CD54、CD25、CD137、CD134。

[0365] 疾病的诊断和治疗

[0366] 本文中所述的实施方式进一步涉及用于治疗受试者的疾病或障碍的方法。在一个实施方式中,所述疾病是癌症。在另一个实施方式中,所述疾病是自身免疫疾病。在第三实施方式中,所述疾病是由病原体引起的疾病。

[0367] 在这些实施方式中,可以通过将包括T细胞群体的受试者样品接触本发明的抗原呈递细胞模拟支架 (APC-MS),由此激活、共刺激和稳态地维持T细胞群;任选扩增T细胞群;以及将激活的、共刺激的、维持的和任选扩增的T细胞施用于受试者,由此治疗受试者的疾病而治疗患有疾病的受试者。在一个实施方式中,将T细胞群体接触支架一段时间,例如,

0.5天、1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、25天、30天、35天、38天、45天、50天、60天,或更长时间,并且使用一种或多种上述技术操纵其中所含的细胞。操纵的实例包括例如激活、分裂、分化、生长、扩增、再编程、无能、静止、衰老、凋亡或死亡等。不需要从待操纵的支架物理地取出细胞。因此,在一个实施方式中,将支架在原位接触受试者的样品(例如,通过将支架植入受试者中)。在其他实施方式中,非原位地操纵细胞(例如,孵育支架和受试者抽取的血样)。

[0368] 在本发明的治疗实施方式中,施用于哺乳动物的T细胞为约4至约35天大,由此促进了哺乳动物中疾病的消退。在一些实施方式中,施用的T细胞小于约14天大,例如,约7至约21天大。本发明的方法提供了多个优势。例如,据信约4至约14天大的T细胞与约60天大或更大的T细胞相比,提供了提高的体内增殖、存活和活性。产生用于过继性细胞治疗(ACT)的T细胞需要的时间段可以从平均的约44天缩短至约4至约15天的范围(或短于约35天,例如,约7至约15天)。因此,更多的患者可以在疾病负荷进展成其中施用ACT不再安全或可能的阶段前进行治疗。此外,因为本发明方法的优选实施方式不需要在施用前体外测试特定的抗原反应性,因此本发明的方法减少了与患者治疗相关的时间、费用和劳动。另外,本发明的方法可以有利地施用从大量培养物汇合的T细胞,替代源自微量培养物的那些。据信更简单且更快速的产生临床上有效的T细胞的方法的研发有助于更广泛地使用过继性细胞治疗。本发明的方法还有利地利用通过体外测试特定抗原反应性而错误地预测在体内非反应性的T细胞培养物。因为从单个肿瘤样本产生的T细胞培养物具有多样的特定反应性,缺乏体外抗原反应性测试有利地避免了必需选择仅少数的T细胞来扩增,并且因此提供了更多样化的待施用于患者的肿瘤反应性库。约4至约30天大的T细胞还含有更高的细胞多样性和比T细胞更高的活性/健康细胞频率。此外,本发明方法的一个或多个方面(例如,但不限于,培养和/或扩增)可以是自动化的。

[0369] 所述方法的一个实施方式包括培养自体T细胞。从患者获得肿瘤样品,并且获得单细胞悬浮液。单细胞悬浮液可以以任何合适的方式获得,例如,通过机械(使用例如GENTLEMACS™ Dissociator, Miltenyi Biotec, Auburn, Calif. 分解肿瘤)或通过酶(例如,胶原蛋白酶或DNase)。在支架或本发明的支架中培养肿瘤酶消化物的单细胞悬浮液。将细胞培养直至汇合(例如,约 2×10^6 淋巴细胞),例如,约2至约21天,优选约4至约14天。例如,细胞可以培养5天、5.5天或5.8天、6.0天、6.5天、7.0天至21天、21.5天或21.8天,优选10天、10.5天或10.8天至14天、14.5天或14.8天。

[0370] 所述方法的一个实施方式包括扩增培养的T细胞。将培养的T细胞汇合并快速扩增。快速扩增提供了在约7至约14天的时间段中,优选约14天,抗原特异性T细胞的数量提高至少约10倍(例如,10、20、40、50、60、70、80、90或100倍或更高)。更优选,快速扩增提供了在约7至约14天的时间段中,优选约14天,提高至少约200倍(例如,200、300、400、500、600、700、800、900倍或更高)。最优选,快速扩增提供了在约10至约14天的时间段中,优选约14天,提高至少约400倍或更高。任选,细胞可以在支架中经历最初的扩增,那时将其接受快速扩增。在这两步扩增方案下,可以实现约7至14天的时间段中提高约1000倍。

[0371] 可以通过本领域已知的多种方法中的任何一种来完成扩增。例如,在饲养淋巴细胞和白细胞介素-2(IL-2)或白细胞介素-15(IL-15)的存在下,优选IL-2,可以使用非特异性T细胞受体刺激快速扩增T细胞。非特异性T细胞受体刺激可以包括约30ng/ml的OKT3,小

鼠单克隆抗CD3抗体(可获自 **Ortho-McNeil®**, Raritan, N.J.)。或者,可以通过在T细胞生长因子的存在下,如300IU/ml IL-2或IL15,优选IL-2,在体外使用一种或多种癌症抗原(包括其抗原部分,如表位,或细胞)刺激外周血单核细胞来快速扩增T细胞,所述抗原任选可以从载体表达,如人白细胞抗原A2 (HLA-A2) 结合肽,例如,0.3 μ M MART-1:26-35 (27L) 或 gp100:209-217 (210M)。体外诱导的T细胞通过用脉冲至HLA-A2表达抗原呈递细胞上的相同癌症抗原再刺激来快速扩增。或者,例如,可以用照射过的自体同源淋巴细胞或用照射过的HLA-A2+同种异体淋巴细胞和IL-2再刺激T细胞。

[0372] 所述方法的一个实施方式包括将扩增的T细胞施用于受试者,其中施用于哺乳动物的T细胞为约4至约35天大。例如,施用的细胞可以为6、7或8至14、15或16天大。在一些实施方式中,施用于哺乳动物的T细胞为约4至约29或约7至约15天大,或约10天大。在这点上,根据本发明的实施方式,施用于哺乳动物的T细胞是“年轻的”T细胞,即,最少培养的T细胞。

[0373] 根据本发明的实施方式,施用于哺乳动物的年轻的T细胞培养物有利地具有与体内持久性、增殖和抗肿瘤活性相关的特征。例如,年轻的T细胞培养物比约44天大的T细胞具有更高的CD27和/或CD28表达。不受特定理论的束缚,认为CD27和CD28与T细胞的增殖、体内持久性和较少的分化状态相关(认为提高的T细胞分化负面地影响T细胞在体内发挥作用的能力)。认为表达较高水平的CD27的T细胞比低CD27细胞具有更好的抗肿瘤活性。此外,年轻的T细胞培养物比约44天大的T细胞具有更高的CD4+细胞频率。

[0374] 此外,年轻的T细胞培养物具有比约44天大的T细胞长的平均端粒长度。不束缚于特定理论,认为培养物中的T细胞每周失去0.8kb的估算端粒长度,并且年轻的T细胞培养物端粒比约44天大的T细胞长约1.4kb。不束缚于特定理论,认为较长的端粒长度与患者中积极的客观临床反应和细胞在体内的持久性相关。

[0375] 可以通过本领域已知的任何合适的途径来施用T细胞。优选,作为动脉内或静脉内输注来施用T细胞,所述输注优选持续约30至约60分钟。施用途径的其它实例包括皮下、腹膜内、鞘内和淋巴内。

[0376] 另外,本发明的实施方式提供了施用包括扩增细胞的治疗组合物的各种方式。在一个实施方式中,首先纯化扩增的细胞并随后施用于受试者。或者,可以在施用于受试者之前,将扩增的细胞与本发明的支架混合。在这种替换方法下,支架(APC-MS)可以持续在体内刺激细胞并且还用于在体内环境中选择性地操纵靶全血细胞。

[0377] 本发明的治疗方法可以涉及在施用步骤前再刺激T细胞群体。可以使用本领域已知的技术来进行再刺激步骤。在一个实施方式中,通过用支架组合物再孵育细胞来进行再刺激步骤。在另一个实施方式中,通过添加佛波醇-12-肉豆蔻酸酯-13-醋酸酯(PMA,10ng/ml,Sigma-Aldrich,Inc.)、离子霉素(0.5 μ g/ml,Sigma-Aldrich,Inc.)和布雷非德菌素A(eBiosciences,Inc.)进行再刺激。在再另一个实施方式中,通过在支架中或外部地在培养物中包括抗原(例如,病原体抗原或癌症抗原)来进行再刺激步骤。

[0378] 在一个实施方式中,通过操纵获自受试者的血液样品、骨髓样品、淋巴样品或脾脏样品的T细胞进行治疗方法。

[0379] 因此,本发明的实施方式提供了用于治疗受试者癌症的方法。所述方法包括将包括T细胞群体的受试者样品接触本发明的抗原呈递细胞模拟支架(APC-MS),由此激活、共刺激和稳态地维持T细胞群体;任选扩增T细胞群体;以及将激活的、共刺激的、维持的和任选

扩增的T细胞施用于受试者,由此治疗受试者的癌症。在某些实施方式中,所述支架具有癌症抗原。在一个实施方式中,所述癌症抗原在MHC分子或其片段中呈递,例如,用于通过T细胞识别。在某些情况中,可以提供完整细胞产品。

[0380] 癌症抗原的代表性实例包括,但不限于,MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、CEA、酪氨酸酶、midkin、BAGE、CASP-8、 β -连环蛋白、 β -连环蛋白、 γ -连环蛋白、CA-125、CDK-1、CDK4、ESO-1、gp75、gp100、MART-1、MUC-1、MUM-1、p53、PAP、PSA、PSMA、ras、trp-1、HER-2、TRP-1、TRP-2、IL13 α 、IL13 α 2、AIM-2、AIM-3、NY-ESO-1、C9orf 112、SART1、SART2、SART3、BRAP、RTN4、GLEA2、TNKS2、KIAA0376、ING4、HSPH1、C13orf24、RBPSUH、C6orf153、NKTR、NSEP1、U2AF1L、CYNL2、TPR、SOX2、GOLGA、BMI1、COX-2、EGFRvIII、EZH2、LICAM、Livin、Livin β 、MRP-3、巢蛋白、OLIG2、ART1、ART4、B-细胞周期蛋白、Gli1、Cav-1、组织蛋白酶B、CD74、E-钙粘着蛋白、EphA2/Eck、Fra-1/Fosl1、GAGE-1、神经节苷脂/GD2、GnT-V、 β 1,6-N、Ki67、Ku70/80、PROX1、PSCA、SOX10、SOX11、生存素、UPAR、WT-1、二肽酰基肽酶IV (DPPIV)、腺苷脱氨酶结合蛋白 (AD Abp)、亲环蛋白b、结直肠相关抗原 (CRC) -C017-1A/GA733、T-细胞受体/CD3- ζ 链、肿瘤抗原的GAGE家族、RAGE、LAGE-I、NAG、GnT-V、RCAS1、 α -甲胎蛋白、p120ctn、Pmel117、PRAME、脑糖原磷酸化酶、SSX-I、SSX-2 (HOM-MEL-40)、SSX-I、SSX-4、SSX-5、SCP-I、CT-7、cdc27、腺瘤性结肠息肉蛋白 (APC)、fodrin、PlA、连接蛋白37、Ig-独特型、p15、GM2、GD2神经节苷脂、肿瘤抗原的Smad家族、lmp-1、EBV-编码的核抗原 (EBNA) -I、UL16-结合蛋白样转录产物1 (Mullt1)、RAE-1蛋白、H60、MICA、MICB和c-erbB-2,或其免疫原性肽,及其组合。

[0381] 在另一个实施方式中,所述癌症抗原是在患者中鉴定的新抗原。新抗原决定簇是新抗原上的表位,新抗原是之前尚未被免疫系统识别的新形成的抗原。新抗原常常与肿瘤抗原相关并且在致癌细胞中被发现。在蛋白质经历生物化学途径内的更多修饰,如糖基化、磷酸化或蛋白水解,导致新表位的产生时,可以形成新抗原并且相关地形成新抗原决定簇。可以通过单独的特异性抗体来识别这些表位。参见,Schumacher等,Science 348 (6230): 69-74,2015。在一个实施方式中,可以以患者特异性方式来检测新抗原。用于检测来自患者样品(例如,血液样品)的新抗原的方法描述于US 9,1115,402中,将其按引用并入本文中。在一个实施方式中,新抗原是源自SF3B1、MYD88、TP53、ATM、Ab1、A FBXW7、a DDX3X、MAPK1、GNB1、CDK4、MUM1、CTNNB1、CDC27、TRAPPC1、TPI、ASCC3、HHAT、FN1、OS-9、PTPRK、CDKN2A、HLA-A11、GAS7、GAPDH、SIRT2、GPNMB、SNRP116、RBAF600、SNRPD1、Prdx5、CLPP、PPP1R3B、EF2、ACTN4、ME1、NF- γ C、HLA-A2、HSP70-2、KIAA1440、CASP8或其组合的肽。参见,Lu等,Seminars in Immunology,28 (1),22-27,2016。

[0382] 在实施以上列出的癌症治疗实施方式中,可以有利地提供已经用细胞毒性T细胞特异性的激活分子和细胞毒性T细胞特异性的共刺激分子,任选与一种或多种给予细胞毒性T细胞的激活、分裂、分化、生长、扩增或再编程的其他试剂一起制造的支架。以上已经提供了这样的分子和试剂的代表性实例。

[0383] 在某些实施方式中,隔离和/或分离的细胞通常可以进行遗传修饰。在一个实施方式中,将效应细胞遗传修饰以表达CD19特异性的嵌合抗原受体 (CAR) (CD19CAR-T细胞)。这种特定类型的T细胞在患有复发性和难治性B细胞急性淋巴母细胞性白血病 (B-ALL) 的成年和儿科患者的小的I期临床试验中产生了高比例的完全缓解 (CR)。参见,Turtle等 (J Clin Invest.,126,2123-38,2016) 和其中引用的参考文献。在非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 和慢性淋巴

细胞性白血病 (CLL) 的 CD19CAR-T 细胞治疗的临床试验中也看到了有利的结果。这些研究表明接受者中转移的 CAR-T 细胞的强烈增殖与临床反应有关, 并且功能性 CAR T 细胞延长的体内持久性可以防止疾病复发。因此, 在一个实施方式中, 本发明涉及用于进一步配制用于癌症治疗的 T 细胞组合物的方法, 包括进一步遗传修饰获自支架的 T 细胞。遗传修饰可以非原位或原位介导。任何技术可以用于遗传修饰 T 细胞, 包括, 但不限于, 使用病毒载体、质粒、转座子/转座酶系统、shRNA、siRNA、反义 RNA 等。在一些实施方式中, 使用基因编辑系统 (例如, CRISPR/Cas9 系统), 对 T 细胞进行遗传修饰。在一些实施方式中, 使用病毒递送系统, 对分离的 T 细胞进行遗传修饰。在一些实施方式中, 使用慢病毒系统对分离的 T 细胞进行遗传修饰。在一些实施方式中, 使用逆转录病毒系统对分离的 T 细胞进行遗传修饰。在一些实施方式中, 使用腺病毒系统对分离的 T 细胞进行遗传修饰。在一些实施方式中, 将分离的 T 细胞接触促进与病毒递送系统的相互作用或病毒隔离的试剂 (例如, 促进受体介导的与病毒递送系统的相互作用的试剂或促进与病毒递送系统的静电相互作用的试剂)。

[0384] 在一些实施方式中, 使用病毒递送系统在原位对分离的 T 细胞进行遗传修饰。在其中在原位对分离的 T 细胞进行遗传修饰的实施方式中, 支架可以包括促进病毒隔离的试剂。促进病毒隔离的试剂可以通过吸附或通过连接脂质端基存在于 MSR-SLB 脂质双层的表面上。在一些实施方式中, 促进病毒隔离的试剂是纤连蛋白肽, 如 **RetroNectin[®]**。在一些实施方式中, 促进病毒隔离的试剂是两性肽, 如 **Vectofusin-1[®]**。在一些实施方式中, 支架可以进一步包括 T 细胞激活分子、T 细胞共刺激分子和/或 T 细胞稳态剂。不希望受到任何特定理论的束缚, 认为 T 细胞接触包括与 T 细胞激活分子、T 细胞共刺激分子和/或 T 细胞稳态剂结合的促进隔离的试剂的支架时, 支架可以促进 T 细胞的激活和扩增, 这可以导致细胞成簇并允许病毒递送系统密切接触 T 细胞, 由此促进更有效的细胞转导。可以选择支架上存在的 T 细胞激活分子、T 细胞共刺激分子和/或 T 细胞稳态剂, 以导致所需的 T 细胞表型, 其可以增强所得到的 T 细胞的疗效 (参见, 例如, Sommermeyer 等, *Leukemia* 30 (2):492-500 (2016))。

[0385] 在一些实施方式中, 对分离的 T 细胞进行遗传修饰以表达嵌合抗原受体 (CAR)。在一个实施方式中, CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞以慢病毒转导来表达 CD19CAR 和截短的人表皮生长因子受体 (EGFRt), 其使得能够使用抗 EGFR 单克隆抗体西妥昔单抗通过流式细胞术鉴定转导的细胞。转导的 EGFRt+CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞在培养过程中通过用照射过的 CD19⁺ 淋巴母细胞系 (LCL) 的单次刺激富集。释放用于输注 (其给予了良好的治疗结果) 时, 产品中的 CD3⁺CD4⁺ 和 CD3⁺CD8⁺ 子集内的 EGFRt+CAR-T 细胞的中值频率分别为约 80% (范围 50.0%-95.9%) 和约 85% (范围 13.0-95.6%)。参见, Turtle 等 (*J Clin Invest.*, 126, 2123-38, 2016)。可以通过用本发明的支架孵育 T 细胞产品来进一步扩增遗传修饰的 T 细胞。在一个实施方式中, 含有 CAR T 细胞特异性抗原 (例如, CD19、CD22 或其片段, 或其变体) 的支架可以用于选择性地扩增所需的 CAR T 细胞。

[0386] 在某些实施方式中, 支架配备有在实施癌症治疗方法中有用的产品。代表性的实例包括, 例如, B 细胞的杂交瘤、稳定的 T 细胞谱系、源自 B 细胞或其杂交瘤的抗体、结合癌症抗原的受体 (结合呈递抗原的 MHC 分子的受体), 包括其片段、编码受体或其抗原结合结构域的核酸、编码抗体的核酸, 包括完整细胞。

[0387] 本发明的实施方式提供了用于治疗受试者的免疫缺陷障碍的方法, 包括将受试者

的包括T细胞群体的样品接触本发明的抗原呈递细胞模拟支架 (APC-MS), 由此激活、共刺激和稳态地维持T细胞群; 任选扩增T细胞群体; 以及将激活、共刺激、维持和任选扩增的T细胞施用于受试者, 由此治疗受试者的免疫缺陷障碍。

[0388] 在一个实施方式中, 提供了一种用于治疗选自原发性免疫缺陷障碍和获得性免疫缺陷障碍的免疫缺陷障碍的方法, 包括将受试者的包括T细胞群体的样品接触本发明的APC-MS, 由此激活、共刺激和稳态地维持T细胞群体; 任选扩增T细胞群体; 以及将激活、共刺激、维持和任选扩增的T细胞施用于受试者, 由此治疗受试者的免疫缺陷障碍。在一个实施方式中, 免疫缺陷障碍可以是获得性免疫缺陷障碍, 例如, 获得性免疫缺陷综合征 (AIDS), 或遗传性障碍, 例如, DiGeorge综合征 (DGS)、染色体断裂综合征 (CBS)、共济失调毛细血管扩张 (AT) 和Wiskott-Aldrich综合征 (WAS), 或其组合。

[0389] 在实施免疫缺陷障碍的治疗中, 如以上列出的, 可以有利地提供已经用辅助T细胞特异性的激活分子和辅助T细胞特异性的共刺激分子, 任选与一种或多种赋予辅助T细胞的激活、分裂、分化、生长、扩增或再编程的其他试剂一起制造的支架。以上已经提供了这样的分子和试剂的代表性实例。

[0390] 本发明的实施方式提供了用于治疗受试者的病原体性疾病的方法, 包括将受试者的包括T细胞群体的样品接触本发明的抗原呈递细胞模拟支架 (APC-MS), 由此激活、共刺激和稳态地维持T细胞群体; 任选扩增T细胞群体; 以及将激活、共刺激、维持和任选扩增的T细胞施用于受试者, 由此治疗受试者的病原体性疾病。在一些情况中, 可以预防性地施用源自操纵步骤的免疫细胞或组合物, 例如, 在受试者的疾病症状发作前。根据上述实施方式可以治疗的病原体性疾病包括细菌性疾病、病毒性疾病、真菌性疾病, 或其组合。

[0391] 本发明的实施方式提供了用于治疗受试者的自身免疫疾病的方法。所述方法包括将受试者的包括T细胞群体的样品接触本发明的抗原呈递细胞模拟支架 (APC-MS), 由此激活、共刺激和稳态地维持T细胞群体; 任选扩增T细胞群体; 以及将激活、共刺激、维持和任选扩增的T细胞施用于受试者, 由此治疗受试者的自身免疫疾病。

[0392] 在治疗自身免疫疾病的情况中, 可以优选不施用活性免疫细胞 (因为这些是自身反应性的), 而是施用休眠、衰老或灭活的免疫细胞。优选, 免疫细胞是T细胞。或者, 可以施用免疫细胞的调节子, 例如, 调节T细胞或抑制T细胞。所述支架/设备可以制造用于Ts/Treg细胞亚群的操纵, 随后将其施用于受试者。

[0393] 因此, 在一些实施方式中, 本发明提供了治疗自身免疫疾病的方法, 通过将本发明的支架施用于需要的受试者, 其中支架中的多种抗原是自身免疫疾病特异性的, 收集支架/设备中的多种调节或抑制T细胞, 其中多种调节或抑制T细胞是自身免疫疾病特异性的, 并且将多种调节T细胞或抑制T细胞或其衍生的产品施用于受试者, 由此治疗自身免疫疾病。

[0394] 在实施自身免疫疾病的治疗中有用的细胞产品包括, 例如, 结合自身反应性细胞的抗体和受体、位于抑制或调节T细胞中的调节蛋白, 包括编码这些分子的核酸序列。

[0395] 在上述治疗实施方式中, 可以以包括约 5×10^2 细胞/ml至约 1×10^9 细胞/ml的总细胞浓度来配制细胞。优选的T细胞剂量范围为约 2×10^6 细胞至约 9×10^7 细胞。

[0396] 本发明的实施方式进一步涉及通过施用一种或多种上述组合物的疾病治疗。所述组合物可以是药物组合物, 其通过实现其计划的任何方式来施用。例如, 施用可以通

过非肠道、皮下、静脉内、动脉内、皮内、肌内、腹膜内、经皮、经粘膜、颅内、鞘内或心室内途径。替换地,或同时地,施用可以通过口服途径。可以通过弹丸注射或通过随着时间的逐渐输注来施用药物组合物。

[0397] 施用的剂量可以取决于接受者的年龄、性别、健康和重量,同时进行的治疗的种类(如果有的话),治疗频率以及所需效果的形式。用于施用药物组合物的剂量范围可以足够大以产生所需的效果,由此例如耗尽自身反应性T细胞和/或自身免疫疾病得到明显预防、抑制或治疗。剂量不能太大以致引起不良副作用,如不合需要的交叉反应、广义免疫抑制、过敏反应等。

[0398] 本文中所述的实施方式进一步涉及用于检测或诊断受试者的疾病或障碍的方法。使用上述方法可以检测或诊断任何疾病或障碍。特别优选,所述疾病是选自类风湿性关节炎、狼疮、乳糜泻、炎性肠病或节段性回肠炎、干燥综合征风湿性多肌痛、多发性硬化、强制性脊柱炎、1型糖尿病、斑秃、脉管炎、颞动脉炎等的自身免疫疾病。在其他实施方式中,所述疾病是选自头颈癌、乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、食道癌、骨癌、睾丸癌、宫颈癌、胃肠道癌、成胶质细胞瘤、白血病、淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、肺部的肿瘤前病变、结肠癌、黑素瘤和膀胱癌的癌症。根据上述实施方式可以诊断的病原性疾病包括细菌性疾病、病毒性疾病、真菌性疾病,或其组合。

[0399] 在这些实施方式中,可以通过首先将含有目标免疫细胞的受试者样品接触本发明的支架来诊断患有疾病的受试者,其中支架中的抗原是所述疾病特异性的。在一个实施方式中,样品含有T细胞,并且将支架/设备接触样品一段时间,例如,0.5天、1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、25天、30天、35天、40天、45天、50天、60天,或更长时间,并且使用一种或多种上述技术来分析支架中的细胞。例如,在诊断自身免疫疾病的情况中,分析的细胞可以包括激活的T细胞。在癌症诊断的情况中,分析的细胞可以包括肿瘤抗原特异性T细胞。在病原性疾病的情况中,分析的细胞可以包括特异性地消除病原体的T细胞(例如,在胞内病原体的情况中,分析Th1细胞,以及在胞外病原体的情况中,分析Th2细胞)。

[0400] 受试者是动物,优选哺乳动物或鸟类。特别优选,受试者选自人、狗、猫、猪、母牛、水牛和马。最优选,受试者是人。任何免疫细胞可以用于疾病或障碍的诊断中。优选,使用淋巴细胞(例如,T细胞)进行诊断。

[0401] 可以使用任何常规方法来进行分析步骤。因此,在一个实施方式中,分析步骤可以涉及测定自身免疫疾病特异性的免疫细胞的数量。任何常规技术可以用于测定免疫细胞的抗原结合特异性,例如,将细胞样品加载至抗原覆盖的表面上,洗掉非特异性结合的细胞,并且使用检测剂(例如,结合位于抗原特异性细胞上的细胞表面表位的抗体)定量抗原特异性细胞的数量(以通过释放结合的细胞的游离形式,或以结合形式)。在另一个实施方式中,分析步骤可以涉及测定抗原特异性免疫细胞的物理或生物学特征。物理特征的实例包括,例如,大小、形状、反射率、形态学、密度。生物学特征的实例包括,例如,特定细胞表面标志物的表达、细胞因子的分泌、对特定抗原或试剂的反应性、基因表达的模式。

[0402] 分析步骤可以与相关步骤结合,其中,分析步骤的结果可以与目标参数相关联。参数的代表性类型包括,疾病存在(或不存在)、疾病的类型(例如,侵袭性vs.非侵袭性自身免疫障碍;可用药vs.不可用药的疾病,例如,抗生素易感的vs.抗生素抗性的细菌感染、免疫

治疗抗性vs.免疫治疗敏感性癌症)、疾病的阶段、疾病(随着时间)的进展/消退等。在一个实施方式中,所述参数涉及疾病的存在或不存在(其可以以二元术语来表述)。在另一个实施方式中,所述参数涉及疾病的分级(其可以以名义上的等级来表示,例如,I-IV级,IV级为最高)。在再另一个实施方式中,参数涉及疾病发病率的几率或可能性,例如,至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、2倍、3倍、5倍、10倍、20倍或更高。

[0403] 在上述诊断方法中,可以将所述参数与基线值比较。基线值可以是预定的值,例如,在健康受试者群体中。例如,在目标抗原是类风湿性关节炎(RA)抗原的情况中,健康受试者中的RA特异性抗体(或T细胞)的基线水平可以用于相关步骤中。或者,可以使用合适的对照通过实验鉴定基线值。本领域技术人员可以使用常规技术在不同受试者组之间进行校正和/或得出推论。

[0404] 因此,本发明的实施方式涉及检测或诊断受试者的自身免疫疾病、癌症或病原性疾病,其是通过将受试者的样品接触本发明的含有自身免疫疾病、癌症疾病或病原性疾病特异性的抗原的支架,并分析其中所含的免疫细胞。接触步骤可以在体内(例如,通过将支架植入受试者中)或离体(例如,通过用支架培养从受试者抽取的血样)进行。在某些实施方式中,可以通过首先使用常规技术从支架取出免疫细胞来进行分析步骤,即,通过非原位分析。例如,可以使用温和的去污剂和酶从支架取出细胞。或者,可以在没有从支架取出细胞的情况下进行检测/分析步骤,即,通过原位分析。

[0405] 相关实施方式涉及监测受试者的疾病进展的方法。所述方法包括将受试者的样品接触本发明的含有疾病特异性的抗原的支架,并且分析其中所含的免疫细胞。设备中所含的免疫细胞的数量/类型可以给予有价值的关于疾病进展的线索。或者,在受试者已经经历了治疗干预的情况中,类似的方法可以用于监测疾病治疗和/或疾病控制。

[0406] 上述方法可以用于监测自身免疫障碍、癌症、病原性疾病等的进展/治疗。优选,诊断方法中使用的免疫细胞是T细胞。

[0407] 在自身免疫障碍的情况中,可以通过分析自身反应性T细胞的数量和/或类型来监测疾病进展。根据分析结果,可以设计干预和/治疗方法来最小化症状的严重性。在其他情况中,可以采取预防方法,包括给受试者提供关于膳食、营养和/或其他生活方式改变的推荐。

[0408] 本文中所述的实施方式进一步涉及用于设计和生产用于治疗疾病的新组合物的方法。所述方法包括将本发明的含有疾病特异性抗原的支架施用于受试者,其随后操纵疾病特异性的免疫细胞,任选分离、富集和扩增设备中操纵的免疫细胞,并随后将免疫细胞返回受试者。或者,可以将源自这样的免疫细胞的产品施用于受试者。源自免疫细胞的产品实例包括核酸(包括含有这样的核酸的载体和细胞)、肽、蛋白质、抗体、细胞因子等。

[0409] 优选,所述疾病是自身免疫疾病。在一个实施方式中,可以将通过上述方法分离的(和任选如本文中所述的在培养物中扩增的)自身反应性T细胞原位或非原位灭活。将T细胞灭活的方法是本领域已知的。实例包括,但不限于,化学灭活或照射。可以使用本领域技术人员已知的各种技术,包括,但不限于,冷冻保存,在灭活之前或之后保存自身反应性T细胞。如以下所述的,所述组合物可以用作疫苗来耗尽自身免疫患者中的自身反应性T细胞。

[0410] 本文中所述的实施方式进一步涉及通过上述方法产生的组合物和疫苗。所述组合物可以是药物组合物,其可以使用本领域公知的方法来生产。可以通过技术人员,使用公认

的诊断和治疗原则,来生产用作疾病或障碍治疗中的临床前和临床治疗剂的药物组合物。

[0411] 在一个实施方式中,所述疫苗可以包括自身反应性T细胞,其包括同源(“单克隆”)或异源(“多克隆”)模式的VB-DB-JB基因用法。临床研究表明接受自体同源的单克隆T细胞疫苗接种的自身免疫患者可以显示出对抗自身反应性T细胞的免疫性的逐渐下降。在一些情况中,重新出现的自身反应性T细胞可能源自不同的克隆群,表明T细胞可以经历潜在地与正在进行的疾病过程相关的克隆移位或表位扩散。克隆移位或表位扩散在自身反应性T细胞介导的自身免疫疾病中可能是个问题。能够耗尽多个自身反应性T细胞群的包含多克隆自身反应性T细胞的疫苗可以避免与克隆移位或表位扩散相关的问题。本发明的含有所需T细胞的组合物/疫苗可以配有药物学上可接受的载体。还可以提供T细胞的冻干制备物。

[0412] IV. 试剂盒/设备

[0413] 在某些实施方式中,本发明提供了在一个或单独的区室中包括本发明支架的试剂盒。所述试剂盒可以进一步包括其他成分。所述试剂盒可以任选包括用于配制支架用于诊断或治疗应用的说明书。所述试剂盒还可以包括在各种障碍和/或疾病的治疗或诊断中单独或一起使用试剂盒组分的说明书。

[0414] 在相关实施方式中,本发明提供了包括本发明的支架连同用于选择、培养、扩增、维持和/或移植目标操纵细胞的试剂的试剂盒。用于T细胞、B细胞和抗原呈递细胞的细胞选择试剂盒、培养试剂盒、扩增试剂盒、移植试剂盒的代表性实例是本领域已知的。

[0415] 通过以下实施例来进一步说明本发明,所述实施例不应当解释为限制性的。整个申请中引用的所有参考文献、专利和公开的专利申请的完整内容,以及附图,按引用并入本文中。

[0416] 实施例

[0417] 实施例1:支架的构建和组装结构的显微分析

[0418] 使用以下所述的方法组装抗原呈递细胞模拟支架(APC-MS)。简而言之,首先提供含有高表面积介孔二氧化硅微棒(MSR)的基底层,在其上任选加载各种T细胞稳态剂,例如,白细胞介素,如IL2,和/或细胞因子,如TGF- β 。在某些实施方式中,可以优选将稳态剂加载至MSR层上。随后,将连续的流体支撑的脂质双层(SLB)成层于基底层上,由此产生MSR-SLB支架。如果没有将稳态剂直接加载于MSR层上,则它们可以在SLB有效负载已经应用于MSR层顶部后加载。随后,可以施用阻断剂,如BSA,以阻断MSR-SLB支架中的非特异性整合位点,此后,将一种或多种T细胞激活分子和T细胞共刺激分子加载于MSR-SLB支架上。用相差显微技术观察与介孔二氧化硅微棒(MSR)结合的脂质的结构,其中将安装在显微镜上的数码相机用于获得图1中所示的结构图像。上图显示了1:20的脂质:MSR比率下脂质(绿色)和介孔二氧化硅微棒(灰色)的合并图(比例尺=200 μ m)。中图显示了1:4的脂质:MSR比率下脂质(绿色)和介孔二氧化硅微棒(灰色)的合并图(比例尺=200 μ m)。下图显示了在较高放大倍数下与MSR结合的脂质的合并相差显微镜图像(比例尺=20 μ m)。

[0419] 发现抗原呈递细胞模拟支架(APC-MS)的特征取决于脂质的类型和脂质的含量。图2A提供了可以用于获得所需的支架架构和/或性质的脂质列表,例如,二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC);棕榈酰-油酰基磷脂酰胆碱(POPC);或二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)。此外,发现了在MSR-SLB组合物上成层的脂质的停留时间取决于脂质的类型和/或含量(参见图2B)。接着,使用荧光分析研究了本发明的支架中的脂质双层的组织化。图2C显示了含有DOPC、POPC

或DSPC的各种MSR-SLB组合物在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中在两周(14天)的时间中的相对荧光变化。图2D显示了含有DOPC、POPC或DSPC的各种MSR-SLB组合物在完全Roswell Park Memorial Institute培养基(cRPMI)中在37℃下两周(14天)的时间中的相对荧光变化。

[0420] 另外,通过将支架在PBS中悬浮3天、7天和14天,研究了各种MSR-SLB组合物在各个不同时间点的稳定性。随后用相差荧光显微镜检查来分析支架架构和/或结构。结果显示于图3中。上图显示了MSR-SLB组合物中的DOPC的稳定性;中图显示了MSR-SLB组合物中的POPC的稳定性;和下图显示了MSR-SLB组合物中的DSPC的稳定性。

[0421] 随后,采用相差显微镜检查,随着时间研究了MSR-SLB流体结构的组装和特征。结果显示于图4A-4E中。图4A显示了在漂白脂质组合物之前(“前”)、漂白脂质组合物时($t=0$)和漂白脂质组合物后5分钟($t=5\text{min}$),在高放大倍数(比例尺= $2\mu\text{m}$)下获取的与介孔二氧化硅微棒(MSR)结合的脂质的相差共焦荧光显微镜图像。图4B显示了光漂白后随着时间的荧光恢复的变化(FRAP)。源描绘于区域(2)中,沉降(sink)描绘于区域(3)中,并且标准化点表示为区域(1)。在漂白后的早期时间点处最佳地看到了差异分布,并且在约2min(120s)时获得了平衡。右图显示了平滑拟合曲线,其描绘了随着时间的FRAP的平均变化,如从标准化图像得到的。图4C和图4D显示了脂质组合物在漂白前(前)、漂白时($t=0$)和漂白后3分钟后($t=3\text{min}$),MSR-SLB流体结构的两组高分辨率图像。

[0422] 此外,使用分光光度分析研究了含有各种脂质部分的MSR-SLB组合物的结构和功能性质。结果显示于图5A和5B中。图5A显示了含有POPC的脂质双层的MSR-SLB的示意图,所述脂质双层含有磷酸乙醇胺生物素(生物素PE),其与抗生物素蛋白链菌素分子(例如,抗生物素蛋白链菌素二聚体)缀合,其转而与生物素化的抗体(例如,生物素化的抗CD3抗体或生物素化的抗CD28抗体或另一种特异性或非特异性抗体)缀合。图5B显示了MPS(二氧化硅)、POPC(脂质)、MPS-POPC复合物、生物素化的MPS-POPC复合物(在抗生物素蛋白链菌素存在或不存在下)以及在藻红蛋白生物素(生物素PE)和/或抗生物素蛋白链菌素的存在或不存在下与生物素化的抗体一起的MPS-POPC复合物的分光光度分析。在含有通过抗生物素蛋白链菌素接头与生物素化的抗体缀合的磷酸乙醇胺生物素(生物素PE)的MSR-SLB组合物中观察到了吸光度的显著提高(暗条;**表示统计学显著性)。在所有组分存在下,观察到了B3Z杂交瘤细胞(其响应激活而产生 β -半乳糖苷酶)的活性提高,表明APC-MS主要采用(A)中所绘的结构。

[0423] 实施例2:APC-MS的功能性性质的分析

[0424] 稳态因子(如IL-2)的释放

[0425] 使用实施例1中所述的方法制造含有介孔二氧化硅棒(MSR)和支撑的脂质双层(SLB)的APC-MS,其进一步含有IL-2。使用染色技术和/或结合测定分析了IL-2从这些MSR-SLB的释放。结果呈现于图6A和6B中。如图6A的电子显微照片中所指示的,MSR的高表面积孔可用于IL2或其他可溶性有效负载的潜在吸附(比例尺= 100nm)。显示了在15天时间段中的累积IL-12释放的图(图6B)说明本发明的APC-MS能够在两周研究时间的整个过程中以受控和持续的方式释放稳态剂,如IL-2。

[0426] 与T细胞的结合

[0427] 用含有功能性T细胞的培养基孵育包含MSR-SLB支架(APC-MS)的抗原呈递细胞模拟支架,并且用相差显微镜检查分析T细胞进入支架中的渗透。结果呈现于图7A和7B中。图

7A显示了用活细胞染料和核染料染色的完整细胞。图像描绘了已经渗入堆叠的高纵横比的脂质覆盖的MSR-SLB支架的颗粒间空间中的活T细胞。图5B显示了已经用单种染料染色的细胞。

[0428] 实施例3:抗体加载

[0429] 随后将含有MSR-SLB的APC-MS加载各种刺激分子、共刺激分子和/或T细胞稳态剂,并且用荧光显微镜检查分析所得到的结构。分析了四种不同类型的MSR-SLB支架--(1)裸MSR-SLB支架(对照);(2)含有缀合的抗体的MSR-SLB;(3)含有IL-2的MSR-SLB;和(4)含有缀合的抗体和IL-2的MSR-SLB。显微照片显示于图8中(低分辨率图像在左侧和高分辨率图像在右侧)。上图(灰色调图像)含有上述每种MSR-SLB支架的相差显微图像。下图合并了捕获脂质荧光的图像和介孔二氧化硅微棒(MSR)的灰色调图像。右图显示了高放大倍数下的MSR-SLB支架(比例尺=20 μ m)。

[0430] 实施例4:抗体加载的APC-MS的性质

[0431] 使用常规细胞学分子研究了加载抗体的APC-MS对T细胞扩增的作用。为此,将T细胞接触各种对照和实验支架,并且通过Alamar蓝染料(表示代谢活性)测量了每种对T细胞群体的作用,并通过ELISA测量了IFN γ 产生。对照支架包括假(“模拟”)、无SLB的支架(“无”)、只含POPC脂质的支架(“POPC”)以及含有POPC和IL-2组合的支架。实验支架含有POPC和IL-2的组合,以及抗体。研究了三个不同剂量的抗体(1:50、1:25和1:10的MSR:抗体比例)。结果呈现于图9A和9B中。如图9A中所示,用实验支架刺激T细胞3天显著提高了T细胞扩增。此外,发现抗体对T细胞扩增的作用是剂量依赖性的。接着,使用相同的设置来分析T细胞的IFN γ 产生。结果呈现于图9B中。发现了与在对照支架中孵育的T细胞相比,在实验支架(含有POPC和IL-2以及抗体)中孵育T细胞大幅提高了IFN γ 分泌。此外,发现抗体对IFN γ 的T细胞依赖性分泌的作用是剂量依赖性的。

[0432] 使用常规细胞术研究分析了本发明的抗原呈递细胞模拟支架(APC-MS)对代谢活性T细胞的扩增的作用。结果呈现于图10和11中。通常,发现本发明的支架在体外促进T细胞的快速扩增。在这点上,图10显示出用对照或实验支架孵育时原代T细胞的倍数扩增。发现了与模拟组合物或不含SLB的组合物相比,用本发明的组合物孵育原代T细胞显著诱导了T细胞扩增(使用或未用再刺激)。更重要地,与DYNABEADS和IL-2的组合物相比,用本发明的支架孵育原代T细胞导致了在第7天再刺激时可测量地更强烈的增殖。图11显示了用加载了IL-2的本发明的支架(SLB/IL2/ABS)或加载了IL-2的DYNABEADS(DYNABEADS-IL2)孵育的T细胞的代谢活性(通过相对的每细胞Alamar蓝(RFU)测量的)的条形图。在第5天和第7天(再刺激之前)以及在第11天(在未再刺激的样品中,如通过绿色和橙色条指示的),用本发明的支架孵育的样品中(左手柱)观察到了明显较高的代谢活性。与未再刺激的细胞相比,第7天的再刺激提高了两个组的T细胞的代谢活性,即,用SLB/IL2/ABS组合物或DYNABEADS-IL2组合物孵育的那些,获得了之前在第7天观察到的水平。第13天的再刺激未能升高有丝分裂活性,表明在这个点的T细胞耗尽。

[0433] 还使用显微镜分析研究了本发明的支架对T细胞聚集物的形成的作用。结果呈现于图12中。左手图上的图像显示了在第0天、第3天和第7天用DYNABEADS或APC-MS孵育时脾脏T细胞的聚集物的显微照片(4 \times 放大倍数)。右手图上的图像显示了在第0天、第3天和第7天用DYNABEADS或APC-MS孵育时脾脏T细胞的聚集物的显微照片(10 \times 放大倍数)。(白色比

例尺=100 μ M)。发现了本发明的支架 (APC-MS) 比DYNABEADS给予了更高的脾脏T细胞 (小鼠) 的多克隆扩增,并促进了T细胞聚集物的形成。

[0434] 实施例5: 支架刺激和扩增不同的T细胞亚群的用途

[0435] 使用细胞分选技术执行了本发明的APC-MS组合在刺激和扩增特定的T细胞亚群中的用途。用APC-MS或DYNABEADS孵育脾脏T细胞,并且在孵育后的不同时间点($t=0$ 天、5天、7天、11天和13天)通过FACS分析了细胞表型(基于细胞表面标志物的表达)的变化。在第一实验中,使用FACS分析了CD4⁺和CD8⁺T细胞的相对频率的变化,其中X轴上的值描绘了CD8⁺染色的强度,而Y轴上的值描绘了CD4⁺染色的强度。在第二实验中,分析了用APC-MS或DYNABEADS孵育时FoxP3⁺小鼠脾脏T细胞子集的多克隆扩增。在第三实验中,用本发明的支架 (APC-MS) 或DYNABEADS孵育时CD62L⁺小鼠脾脏T细胞的子集的多克隆扩增。在第四实验中,用APC-MS或DYNABEADS孵育时CD8⁺/CD69⁺小鼠脾脏T细胞的子集的多克隆扩增。在第五实验中,用APC-MS或DYNABEADS孵育时CD8⁺/颗粒酶B⁺小鼠脾脏T细胞的子集的多克隆扩增。在上述每个实验中,在7天后,将第一T细胞亚群接受IL-2处理,同时将第二T细胞亚群再刺激,并且将细胞悬浮液再培养6天。另外,确保实验中使用的APC-MS和DYNABEADS含有相同的刺激和共刺激分子组(repertoire)。

[0436] 第一实验的结果呈现于图13A和13B中。结果显示与使用DYNABEADS的孵育相比,使用本发明的支架 (APC-MS) 的孵育在14天孵育阶段结束时获得了更高的多克隆CD8⁺小鼠脾脏T细胞的扩增。此外,尽管IL-2处理抑制了使用DYNABEADS刺激的细胞的扩增(约降低20%),但在使用APC-MS孵育的细胞中没有观察到这种作用。

[0437] 在第二实验中,使用矩形门控来计数各个部分中的FoxP3⁺细胞的数量和/或比例。结果呈现于图14中。

[0438] 在第三实验中,其结果显示于图15中,发现了本发明的APC-MS组合以与使用DYNABEADS获得的那些相似和相当的方式给予CD62L⁺小鼠脾脏T细胞子集的多克隆扩增。结果在用APC-MS或DYNABEADS(7天孵育后使用再刺激或IL-2处理)孵育后的各个不同时间点($t=0$ 天、5天、7天、11天和13天)以T细胞群体的流式细胞术(FACS)散点图的形式描绘。CD62L⁺细胞出现在散点图的右手(上和下)象限。结果证明了本发明的APC-MS组合在选择性地扩增靶T细胞亚群上同等有效,其随后可以使用已知的细胞学技术进行操纵或配制。

[0439] 在第四实验中,其结果显示于图16中,发现了本发明的APC-MS组合以使用DYNABEADS获得的那些相似和相当的方式给予CD8⁺/CD69⁺小鼠脾脏T细胞子集的多克隆扩增。在用APC-MS或DYNABEADS(7天孵育后使用再刺激或IL-2处理)孵育后的各个不同时间点($t=0$ 天、5天、7天、11天和13天)以T细胞群的流式细胞术(FACS)散点图的形式描绘了其结果。CD8⁺/CD69⁺细胞出现在散点图的右上象限。结果证明了与使用DYNABEADS的孵育相比,使用APC-MS的孵育在14天孵育阶段结束时获得了更高的多克隆CD8⁺/CD69⁺T细胞的扩增(用APC-MS孵育的样品中约90%CD8⁺/CD69⁺T细胞vs. 用DYNABEADS孵育的样品中约50%CD8⁺/CD69⁺T细胞的相对比例)。

[0440] 在第五实验中,其结果显示于图17中,发现了本发明的APC-MS组合以使用DYNABEADS获得的那些相似和相当的方式给予CD8⁺/颗粒酶B⁺小鼠脾脏T细胞子集的多克隆扩增。在用APC-MS或DYNABEADS(7天孵育后使用再刺激或IL-2处理)孵育后的各个不同时间点($t=0$ 天、5天、7天、11天和13天)以T细胞群的流式细胞术(FACS)散点图的形式描绘了其

结果。CD8+/颗粒酶B+细胞出现在散点图的右上象限。结果证明了与使用DYNABEADS的孵育相比,使用APC-MS的孵育在14天孵育阶段结束时获得了更高的多克隆CD8+/颗粒酶B+T细胞的扩增(用APC-MS孵育的样品中约95%CD8+/颗粒酶B+T细胞vs.用DYNABEADS孵育的样品中约80%CD8+/颗粒酶B+T细胞的相对比例)。

[0441] 实施例6:支架刺激和扩增细胞因子分泌细胞的用途

[0442] 用APC-MS或DYNABEADS孵育小鼠脾脏T细胞各个不同的持续时间($t=0$ 天、5天、7天、11天和13天)。孵育7天后,分别用APC-MS或DYNABEADS再刺激T细胞的第一亚群,并且用IL-2处理第二亚群。使用用于测量生物样品中的IFN γ 浓度的标准分析,例如,ELISA分析,测量了细胞因子(IFN γ)分泌。呈现于图18中的结果证明了与使用DYNABEADS的孵育相比,使用APC-MS的孵育在孵育5天后获得了更高的多克隆CD8小鼠脾脏T细胞的扩增。这个效果在整个13天的实验阶段中持续。用支架孵育脾脏T细胞提高了IFN γ 分泌。此外,发现了再刺激在增强用DYNABEADS孵育的细胞亚群的IFN γ 分泌中特别有效。

[0443] 实施例7:支架除去无能的、休眠的或消耗的T细胞的用途

[0444] 基于其与B7和CD28家族的同源性发现了几种新的共刺激分子。程序化死亡蛋白1(PD1;UNIPROT登录号No.Q15116)在激活的T细胞上表达并且具有两个B7样配体,PD-L1和PD-L2(Freeman等,J.Exp.Med.192:1027-1034(2000);Latchman等,Nat.Immunol.2:261-268(2001);Dong等,Nat.Med.5:1365-1369(1999);Tseng等,J.Exp.Med.193:839-846(2001))。据认为PD-1是无能的标志物(Chikuma等,J.Immunol.,182(11):6682-9,2009)。因此,使用流式细胞术研究了本发明的支架对诱导T细胞无能的作用。用本发明的支架(APC-MS)或DYNABEADS孵育小鼠脾脏T细胞各种不同的持续时间($t=0$ 天、5天、7天、11天和13天)。孵育7天后,将T细胞的第一亚群再刺激,并用IL-2处理第二亚群。使用FACS散点图分析每个T细胞亚群的细胞表面标志物的表达,其中X轴上的值描绘了CD8+染色的强度,而Y轴上的值描绘了PD-1+染色的强度。呈现于图19中的结果显示了随着时间提高的小鼠脾脏T细胞的PD-1表达(即,提高的无能)。在两个亚群中都实现了T细胞耗尽。结果表明整个培养阶段中的大部分细胞是PD-1阴性的(下象限),尽管一些细胞确实上调了PD-1的表达。APC-MS的再刺激倾向于提高PD-1表达。注意:在所有设定中提供了IL-2暴露。

[0445] 实施例8:支架提高T细胞扩增和提高细胞活性的用途

[0446] 使用细胞计数术分析了本发明的APC-MS组合物在提高T细胞扩增和/或代谢活性中的作用。用对照支架或实验支架孵育人外周血T细胞,并且使用标准分析在各个不同时间点($t=0$ 天、5天、7天、11天和13天)测量了T细胞的数量和/或代谢活性,例如,使用台盼蓝排除/血球计的活细胞人工细胞计数,使用Alamar蓝分析分析代谢活性。结果呈现于图20A和20B。在T细胞扩增研究的情况中,对照支架包括假组合物(标记:“模拟”;用黑线描绘)和含有可溶性的游离形式的刺激物抗CD3、抗CD28、IL-2的组合物(“游离”;用红线描绘),而实验支架包括(1)DYNABEADS(蓝线)和(2)本发明的脂质双层(SLB)(绿线)。结果显示于图20A中。可以看到在13天实验阶段结束时,与使用DYNABEADS的孵育相比,使用SLB的孵育导致了T细胞几乎高两倍的扩增。更令人惊讶地,甚至“游离”支架对T细胞引发了与DYNABEADS作用相当的刺激性作用。

[0447] 本发明的支架对原代T细胞的代谢活性的作用的结果呈现于图20B中。用对照支架或实验支架孵育脾脏T细胞,并且使用Alamar蓝染色测量了各个不同时间点($t=0$ 天、5天、7

天、11天和13天)的T细胞代谢活性。对照支架包括假组合物(“模拟”;“m”)和无SLB的组合物(“无”,“f”),而实验支架包括(1) DYNABEADS (“d”)和(2) 脂质双层(SLB) (“s”)。可以看到在14天实验结果结束时,使用“模拟”支架孵育的细胞全部死亡,而使用实验支架(SLB或DYNABEADS)孵育的细胞经历了随着时间的持续生长和扩增。更重要地,与DYNABEADS给予的作用相比,本发明的SLB支架在14天实验阶段结束时促进了更好的T细胞生长和代谢活性。

[0448] 实施例9: 支架促进人T细胞扩增的用途

[0449] 用对照支架(“模拟”)或含有所列的抗CD3抗体-莫罗单抗(OKT3)、识别CD3抗原内的CD3的17-19kD ϵ -链的抗体/T细胞受体(TCR)复合物(HIT3a)和识别CD3 ϵ 内的TCR复合物的20kDa亚基的单克隆抗体(UCHT1)的实验支架孵育获自受试者1(图21A)和受试者2(图21B)的人血样。研究了三个不同的剂量-5 μ g(上载玻片)、1 μ g(针对受试者2的下载玻片)和0.5 μ g(针对受试者1的下载玻片)。在每种情况中,用抗CD28抗体提供了共刺激,其中将抗CD3抗体:抗CD28抗体的比率维持在1:1。在各个不同时间点($t=0$ 天、7天、11天和13天)测量了T细胞的倍数扩增。呈现于图21A和21B的结果显示了在较高抗体剂量下(5 μ g),所有三种抗CD3抗体能够刺激人T细胞的扩增。在所有情况中,T细胞群体的扩增开始是缓慢的直至第7天,此后,其按指数增加。在最高剂量下,在实验阶段结束时(第13天),获得了T细胞数量600-800倍增加。使用中等剂量(1 μ g),只有OKT3和HIT3a(但UCHT1没有)能够刺激T细胞扩增,其中,在实验阶段结束时(第13天)获得了T细胞数量300-400倍提高。在最低剂量下(0.5 μ g),只有OKT3(但UCHT1和/或HIT3a没有)能够刺激T细胞扩增,其中,在实验阶段结束时(第13天)获得了T细胞数量600-700倍增加。结果表明了抗CD3抗体克隆以及抗体剂量两者对表达速率的作用。

[0450] 接着,通过流式细胞术分析了用对照支架(“模拟”)或含有所列的抗CD3抗体-OKT3、HIT3a和UCHT1的实验支架孵育时人T细胞的多克隆扩增。结果呈现于图22中,其中下图显示出用含有每种抗CD3抗体作为刺激分子和抗CD28抗体作为T细胞共刺激分子的APC-MS孵育后各个不同时间点($t=8$ 天、11天和14天)的T细胞群体的流式细胞(FACS)散点图。散点图的X轴上的值描绘了CD8+染色的强度,而Y轴上的值描绘了CD4+染色的强度。散点图概括于上图的线图中,其显示了用含有上述抗CD3抗体-OKT3(圆形)、HIT3a(方块)和UCHT1(三角)的APC-MS孵育后,CD4+vs. CD8+T细胞亚群百分比的变化。研究了两个不同的抗体剂量-5 μ g的第一剂量(1 \times 稀释)和0.5 μ g的第二个剂量(1:10 \times 稀释)。结果表明在低抗体剂量下(1:10 \times 稀释;0.5 μ g),所有三种抗CD3抗体能够使用低抗体浓度vs. 高抗体浓度富集CD8+特异性T细胞。在实验阶段结束时(第14天),获得了CD8+特异性T细胞数量3-4倍增加。例如,在实验开始时,CD8+T细胞的相对频率为20%,其在第14天提高至约60%-80%。此外,发现了在促进CD8+T细胞的扩增中,抗CD3抗体UCHT1和OKT1同等有效并且优于抗CD3抗体HIT3a。在高(5 μ g)抗体剂量下,整体T细胞群中的CD8+:CD4+的比率在第14天未改变(或甚至减弱)。结果表明了抗CD3抗体克隆以及抗体的剂量两者对CD8+特异性T细胞扩增的作用。

[0451] 实施例10: 支架促进特定的人T细胞亚群扩增的用途

[0452] 用含有1 \times 剂量(5 μ g)的所列抗CD3抗体-莫罗单抗(OKT3)、HIT3a和UCHT1的实验支架孵育人血样。在每种情况中,提供了使用抗CD28抗体的共刺激。在14天后测量了T细胞的倍数扩增。在上图中显示了总的活细胞中的CD62L和CCR7的表达,而下图显示了这些标志物在门控的CD8+细胞中的表达。呈现于图23中的结果表明了所有三种抗CD3抗体能够刺激

不同的人T细胞亚群的扩增。令人惊讶地,用本发明的不同抗原呈递细胞模拟支架(APC-MS)扩增的大部分细胞保留了CD62L+CCR7+,即使在孵育14天后。结果表明离体扩增后扩增的T细胞保留体内功能性。因此,可以使用抗原呈递细胞模拟支架选择性地扩增和维持不同的CD62L+CCR7+T细胞(例如,记忆细胞)的亚群。

[0453] 另外,与含有UCHT1和/或HIT3a的支架相比,含有OKT3的APC-MS支架在扩增和/或保持CD62L+CCR7+T细胞中特别有效。

[0454] 实施例11:使用抗原呈递细胞模拟支架(APC-MS)的T细胞离体扩增

[0455] T细胞的过继性细胞转移(ACT)是具有前景的针对癌症和传染病的治疗。然而,目前用于离体T细胞扩增的方法(ACT中的关键步骤)常常产生次佳的扩增速率和有限的细胞功能性。在此,我们研发了介孔二氧化硅微棒支撑的脂质双层,其提供了用于流体脂质双层上T细胞受体刺激和局部预定密度的共刺激的信号,并且促进了可溶性白细胞介素-2的受控释放,与通过抗原呈递细胞(APC)自然地呈递这些信号的情况相似。在细胞培养物中,材料形成了APC-模拟支架(APC-MS),其促进了渗入的小鼠和人T细胞的激活。两周后,APC-MS比商业扩增珠促进了高两倍至十倍的多克隆T细胞扩增,以及罕见的功能性细胞毒性T细胞亚群的强烈抗原特异性扩增。这个研究证明了快速扩增用于ACT的功能性T细胞的新平台。

[0456] 使用T细胞的过继性细胞转移(ACT)是具有前景的用于各种恶性疾病和传染病治疗的方法(参见,例如,Rosenberg,S.A.&Restifo,N.P.Science 348,62-68(2011);June,C.H.等,Science Translational Medicine 7(280):280ps7(2015);和Fesnak,A.D.等,Nature Reviews Cancer 16,566-581(2016))。然而,功能性T细胞的快速离体扩增(用于ACT的T细胞产生中的关键步骤)仍然是主要的挑战。T细胞激活需要三个信号:(1)T细胞受体(TCR)刺激,(2)共刺激和(3)促存活细胞因子(Huppa,J.B.&Davis,M.M.Nature Reviews Immunology 3,973-983(2003))。在体内,这些信号通过抗原呈递细胞(APC)来提供,其以特定的时空模式将这些信号呈递给T细胞(Huppa和Davis(2003);Lee,K.-H.等,Science 302,1218-1222(2003);Alarcón,B.等,Immunology 133,420-425(2011);和Minguet,S.等,Immunity 26,43-54(2007))。使用各种方法来离体扩增用于ACT的T细胞,并且合成的人工APC(aAPC)特别方便(Rosenberg和Restifo(2015);Hasan,A.等,Advancements in Genetic Engineering 2015(2015);Hollyman,D.等,Journal of Immunotherapy(Hagerstown,Md.:1997)32,169(2009);Maus,M.V.等,Nature Biotechnology 20,143-148(2002);Zappasodi,R.等,Haematologica 93,1523-1534(2008);Perica,K.等,ACS Nano 9,6861-6871(2015);Mandal,S.等,ACS Chemical Biology 10,485-492(2014);Steenblock,E.R.&Fahmy,T.M.Molecular Therapy 16,765-772(2008);Fadel,T.R.等,Nature Nanotechnology 9,639-647(2014);Sunshine,J.C.等,Biomaterials 35,269-277(2014);Fadel,T.R.等,Nano letters 8,2070-2076(2008);Meyer,R.A.等,Small 11,1519-1525(2015);和Steenblock,E.R.等,Journal of Biological Chemistry 286,34883-34892(2011))。目前,用针对CD3(aCD3;TCR刺激物)和CD28(aCD28;共刺激信号)的激活抗体功能化的商业微珠(DYNABEADS)是唯一FDA批准的用于扩增T细胞的合成系统(Hollyman等(2009))。这些珠在外源性白细胞介素-2(IL-2)补充下促进多克隆T细胞激活。尽管这些培养物为T细胞提供三个关键信号,但其中这些信号被呈递的情况不是通过APC天然呈递的情况典型的。这种情境不一致性可能导致次佳的T细胞扩增速率和具有有限的或失调的功能

的T细胞产品 (Zappasodi等 (2008); Fadel等 (2014); Li, Y. & Kurlander, R. J. *Journal of Translational Medicine* 8, 1 (2010); 和JJin, C.等, *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development* 1 (2014))。此外, 这些珠不适于大的信号集的呈递, 这可能对于高度功能性的治疗性T细胞的产生是重要的 (Hasan等 (2015); 和Hendriks, J.等, *Nature immunology* 1, 433-440 (2000))。

[0457] 研发了由高纵横比介孔二氧化硅微棒 (MSR) 上形成的支撑脂质双层 (SLB) 组成的复合材料 (Kim, J.等, *Nature Biotechnology* 33, 64-72 (2015); 和Li, W. A.等, *Biomaterials* 83, 249-256 (2016))。SLB能够在流体脂质双层上以预定的密度呈递T细胞激活信号的组合, 同时MSR促进了可溶性信号持续旁分泌释放至附近的T细胞。因此, 复合MSR-SLB能够在类似天然APC的环境中将表面和可溶性信号呈递给T细胞。在细胞培养物中, 高纵横比微棒沉降并堆叠, 形成3D支架结构。将从用T细胞激活信号功能化的MSR-SLB形成的支架称为APC-模拟支架 (APC-MS)。两周后, APC-MS促进了原代小鼠和人T细胞比商业DYNABEADS高两倍至十倍的多克隆扩增。APC-MS还促进了功能性小鼠和人细胞毒性T细胞的强烈抗原特异性扩增。特别地, 呈递EB病毒 (EBV) 相关抗原的APC-MS针对人T细胞的罕见亚群以抗原特异性方式扩增和富集。总之, APC-MS代表了灵活且可调的能够以特定的时空模式快速扩增用于ACT的高功能性T细胞的平台 (Huppa和Davis (2003); Lee等 (2003); Alarcón等 (2011); 和Minguet等 (2007))。

[0458] APC-MS的组装和表征

[0459] 使用针对多克隆和抗原特异性扩增的独特信号 (图25B), 针对T细胞激活制备了APC-MS (图25A)。按照之前实施所述的 (Kim等 (2015) 和Li等 (2016)) 合成了具有88 μm 长, 4.5 μm 直径 (纵横比 ~ 20) 的平均尺寸和10.9nm孔隙的高纵横比MSR (参见图26A), 并吸附了IL-2。

[0460] 制备含有预定量的生物素化脂质的脂质体 (140nm), 并涂覆于负载IL-2的MSR上, 形成MSR-SLB (参见图26B)。接着, 将用于TCR激活和共刺激的生物素化信号通过抗生物素蛋白链菌素中间体连接到MSR-SLB表面。在细胞培养物中, 通过棒的沉降和随机堆叠自发形成3D支架, 形成APC-MS。T细胞渗透支架的空间。总之, 支架在脂质双层的表面上呈递用于TCR激活和共刺激的信号, 并随着时间以旁分泌方式释放可溶性IL-2以渗透T细胞, 与通过天然APC将这些信号递呈给T细胞的情况相似 (参见Huppa和Davis (2003))。

[0461] 将MSR用磷脂1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (POPC) 涂覆, 其通常用于哺乳动物细胞膜的模型 (Jerabek, H. R.等, *Journal of the American Chemical Society* 132, 7990-7 (2010); 和Torres等, *Lab on a Chip* 13, 90-99 (2013))。在低脂质: MSR比率下, 观察到脂质介导的MSR的聚集 (图27A), 而在高脂质: MSR比率下, 脂质涂覆的MSR以充分分散的单颗粒状态维持 (图27B)。在这种较高脂质: MSR比率下, 最初 $34.1 \pm 0.9\%$ 的输入POPC与MSR结合, 并且随着POPC涂覆的MSR降解 (图28B), 细胞培养条件中的POPC涂层随着时间缓慢流失 (图28A)。还用1, 2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DOPC) 和1, 2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DSPC) 成功地涂覆了MSR。与MSR结合的脂质量与脂质的饱和成逆相关, 很可能是由于更多高度饱和的脂质更紧密的填充在脂质双层中。在各种脂质涂层的稳定性中没有观察到显著差异。为了评价MSR脂质涂层是否是连续的流体SLB结构, 使用荧光团标记的脂质进行了光漂白后荧光恢复 (FRAP) 的研究。观察到脂质涂覆的MSR的光漂白区

域的荧光恢复和整个漂白的棒的荧光的一致性标准化,证明了MSR脂质涂层是连续的流体SLB(图39A和39B)。

[0462] 还分析了可溶性信号的加载和释放,以及表面信号的加载。MSR具有非常高的可用于分子有效负载表面吸附的表面积(Kim等(2015)),并且用 $2\mu\text{g IL-2}$ (0.04mg/ml IL-2) 加载 $500\mu\text{g MSR}$ 时,MSR保留了 $50\pm 1\%$ 的输入IL-2。加载的IL-2随后在9天中以受控方式释放。趋势可以使用单相指数函数($R^2=0.98$)良好估算,表明IL-2的释放遵循一级动力学(图28E)。

[0463] 还分析了表面信号的连接随着掺入脂质制剂中的生物素化脂质物质的量而改变。在相应MSR-SLB制剂上以30%摩尔量的生物素化脂质基团来添加抗生物素蛋白链菌素,并且作为表面信号代理来添加生物素化IgG。在饱和下,可以加载至各种MSR-SLB制剂上的生物素化IgG的最大量相差 ~ 10 倍(图28F)。这种差异与各种MSR-SLB制剂中生物素化脂质量的相对差异相一致,表明了可以通过限定涂层脂质制剂中的粘附性脂质的量来精确地控制表面结合的IgG的密度。在所有随后的实验中,按照所述的,MSR-SLB用表面信号饱和,并且通过制剂中的生物素化脂质的mol%来描述相对表面信号密度。

[0464] 为了证实支架表面上激活信号的呈递促进了T细胞相互作用,用不含表面T细胞信号的MSR-SLB或完整的APC-MS培养原代T细胞。然而T细胞大部分无视了不含表面T细胞信号的MSR-SLB,但它们与APC-MS强烈地相互作用,将支架结构重组以形成大范围、高密度的细胞材料簇(图28G和图29)。

[0465] 原代小鼠和人T细胞的多克隆扩增

[0466] 用DYNABEADS或用APC-MS培养原代小鼠T细胞。使用APC-MS的培养导致了大的细胞材料簇的形成,并且APC-MS培养物中的这些簇的大小和频率高于Dynabead培养物中(图30A)。使用APC-MS的培养比使用DYNABEADS的培养促进了高超过两倍的扩增(图30B)。有趣地,尽管DYNABEADS在培养期间促进了适度的T细胞群体的CD8偏倚的偏斜,但APC-MS促进了高于95%的总T细胞是CD8+ (图30C和图31)。使用APC-MS扩增的效应CD8+T细胞比使用DYNABEADS扩增的CD8+T细胞在培养期间更快速地上调细胞毒性介质颗粒酶B并且扩增至更高的程度(图32A)。在Dynabead和APC-MS扩增的T细胞产物中,没有观察到CD4+FoxP3+细胞的扩增(图32B)。重要地,尽管观察到了快速扩增速率,但大部分APC-MS扩增的T细胞对耗尽标志物PD-1保持阴性(图32C)。

[0467] 还评价了APC-MS制剂的原代人T细胞的多克隆扩增。使用APC-MS培养原代人T细胞还导致大的细胞材料簇的形成,APC-MS培养物中的这些簇的大小和频率比Dynabead培养物中的更高。观察到了这些簇的稳定性和持久性取决于表面信号密度和最初的材料输入(图30D)。全部测试的APC-MS制剂培养14天导致扩增比DYNABEADS高两倍至十倍(图30E)。有趣地,通过较高表面信号密度或较高初始材料质量,含有较高量的T细胞刺激的APC-MS制剂在14天培养后促进了极端CD4偏倚的偏移。相反,含有较低整体含量的T细胞刺激物的APC-MS制剂相对于其他APC-MS制剂(F4)促进了更平衡的CD4+和CD8+扩增,与DYNABEADS相当(图30F)。在测试的APC-MS制剂中,制剂中的T细胞刺激总量和培养阶段结束时共表达耗尽标志物PD-1和LAG-3的细胞频率之间观察到了正相关。引入注目地,尽管在两周培养阶段中接近高十倍的扩增,但使用低T细胞刺激物APC-MS制剂(F4)观察到了低频率的PD-1和LAG-3共表达细胞($<5\%$),与DYNABEADS相似。然而,在第7天,在DYNABEADS条件中观察到了高频率的共

表达PD-1和LAG-3的细胞(图30G)。在Dynabead和APC-MS扩增的T细胞产物之间的共表达淋巴归巢分子CCR7和CD62L的细胞的频率中没有观察到显著差异(图33),这表明了更天然的T细胞表型并且已经显示出对于体内转移后的功能是重要的(Gattinoni,L.等,The Journal of Clinical Investigation 115,1616-1626 (2005))。合起来,这些数据表明APC-MS能够比DYNABEADS更快速地多克隆地扩增小鼠和人T细胞。

[0468] 原代小鼠T细胞的抗原特异性扩增

[0469] 为了确定APC-MS是否可适用于抗原特异性扩增,使用从OT-I小鼠分离的原代小鼠CD8⁺T细胞,其在H-2K(b) I类MHC的情况中表达对来自鸡卵白蛋白的SIINFEKL (SEQ ID NO: 4) 肽特异性的TCR。用呈递加载无关肽的MHC (pMHC) 的APC-MS制剂培养这些细胞时,观察到了最小的细胞材料相互作用。然而,用呈递SIINFEKL (SEQ ID NO: 4) 的APC-MS制剂培养细胞时,观察到了导致大范围的细胞材料簇形成的强烈相互作用(图34A)。呈递SIINFEKL (SEQ ID NO: 4) 的APC-MS制剂促进了OT-ICD8⁺T细胞的强烈扩增,即使使用低如0.01mol%的脂质上递呈的表面信号(图34B)。应答来自B16-F10黑素瘤细胞的SIINFEKL (SEQ ID NO: 4) 呈递,扩增的T细胞分泌IFN γ (图34E),上调了IFN γ 和TNF α 的共表达(图34C)并在体外杀灭了靶细胞(图34D)。

[0470] 原代人T细胞的抗原特异性扩增

[0471] 为了确定APC-MS是否可以用于罕见的人T细胞亚群的抗原特异性富集和扩增,这对于来自肿瘤或血液的罕见癌症特异性T细胞的选择性扩增是有用的(Cohen,C.J.等,The Journal of Clinical Investigation 125,3981-3991 (2015);和Streinen,E.等,Science 352,1337-1341 (2016))。在I类MHC的HLA-A2同种异型的情况中,APC-MS制剂呈递来自不同EBV相关蛋白的两种肽(缩写为CLG或GLC)中的一种。从具有之前的EBV暴露的HLA-A2匹配的供体的人血样分离CD8⁺T细胞,并用单独的可溶性IL-2 (30U/ml) (模拟) 处理,或用呈递CLG或GLC肽的APC-MS培养。观察到了两个T细胞子集强烈的抗原特异性富集和扩增,同时注意到总T细胞的最小增加(图35A)。用递呈CLG的APC-MS培养时,CLG-特异性CD8⁺T细胞的频率从第0天的全部CD8⁺T细胞的0.04%提高至第14天的CD8⁺T细胞的 $3.3 \pm 0.9\%$ (图36A和36B),对应于细胞数量的 170 ± 70 倍扩增(图36C)。相似地,用递呈GLC的APC-MS培养时,GLC-特异性CD8⁺T细胞的频率从第0天的全部CD8⁺T细胞的0.66%提高至第14天的 $48 \pm 9\%$ (图36D和36E),对应于细胞数量 300 ± 100 倍扩增(图36F)。通过评价IFN γ 分泌(图35B)、IFN γ 和TNF α 共表达(图35C,以及图36G、36H和36I),以及加载肽的靶细胞的体外杀灭(图36J),在用T2刺激剂细胞的共培养实验中分析了各种T细胞产物的功能性。用呈递CLG或GLC的APC-MS扩增的CD8⁺T细胞群体强烈地应答呈递其同源抗原的刺激细胞。值得注意的是,用T2细胞共培养后,通过四聚体染色检测的CLG-和GLC-特异性细胞的频率与共表达IFN γ 和TNF α 的细胞的频率相似,表明大部分扩增的T细胞是功能性的。

[0472] 为了确定是否可以从异源细胞群(PBMC) 直接扩增抗原特异性T细胞,避免对T细胞分离的需求,进行了以下实验。用呈递GLC的APC-MS制剂培养来自之前EBV暴露的BLA-A2匹配的供体的PBMC样品。显著地,GLC特异性T细胞的频率从第0天的总CD8⁺T细胞的0.66%提高至第7天的 $15 \pm 1\%$;在模拟处理的样品中发现了最小改变(图36K)。这对应于GLC特异性T细胞的 60 ± 9 倍的扩增(图36L)。通过与未脉冲的或用CLG或GLC肽脉冲的T2细胞共培养来评价扩增的T细胞的功能性。共表达TNF α 和IFN γ 的细胞的频率(图36M)以及IFN1分泌(图36N)

的定量证明了使用呈递GLC的APC-MS从PBMC扩增的CD8⁺T细胞群只强烈应答呈递其同源抗原的T2细胞。合起来,这些数据证明了APC-MS以抗原特异性方式强烈扩增小鼠和人T细胞的能力。

[0473] 为了确定使用APC-MS相对于DYNABEADS观察到的提高是否不仅仅是归因于呈递的抗CD3抗体和抗CD28抗体量的差异,将DYNABEADS中的抗CD3和抗CD28抗体的量标准化以对应于APC-MS中的这些抗体的浓度。如图40B、40C和40D中所示,匹配APC-MS和DYNABEADS中存在的抗CD3和抗CD28量,APC-MS促进了更快速的原代小鼠T细胞的扩增(图40B),同时维持相当的耗尽标志物PD-1和LAG-3的共表达水平(图40C)。此外,通过调整APC-MS制剂,可以调整CD4:CD8比率(图40D)。

[0474] 观察到在大约一周的过程中,IL-2以持续方式从APC-MS释放。为了评价IL-2剂量以及从APC-MS持续释放的作用,用呈递相同量的抗CD3和抗CD28抗体的DYNABEADS或APC-MS培养原代小鼠T细胞7天。对于APC-MS条件,将IL-2加载于APC-MS上并允许随着时间释放(M-D),或在第0天将相同剂量的IL-2作为可溶性大丸剂加入培养基中(M-D/bIL-2)。对于DYNABEAD条件,在培养基中补充了制造商推荐剂量的IL-2并且在每次培养基更换时重新补充(D-B),或在d0以加载至APC-MS中的相同剂量作为可溶性大丸剂加入培养基中(D-B/bIL-2)。如图41A中所示的,将IL-2加载至APC-MS中并允许随着时间释放时,APC-MS促进了比将相同剂量的IL-2作为可溶性弹丸加入培养基中时更高的原代小鼠T细胞扩增,证明了在这种情况下呈递IL-2的益处。在呈递的抗CD3、抗CD28和IL-2的含量匹配时(M-D/bIL-2vs D-B/eIL-2),APC-MS促进了比DYNABEADS更高的原代小鼠T细胞的扩增,证明了在APC-MS的情况下呈递这些信号的益处。如图41B中所示的,在呈递的抗CD3、抗CD28和IL-2的量匹配时,使用APC-MS扩增的T细胞显示出比使用DYNABEADS扩增更低的耗尽标志物PD-1和LAG-3的共表达(M-D/bIL-2vs D-B/bIL-2)。

[0475] 以上的实验证明了APC-MS是可以在流体脂质双层表面上局部呈递TCR刺激物和共刺激信号并且促进可溶性细胞因子持续的旁分泌递送至附近T细胞的多功能性材料。呈递aCD3或pMHC、aCD28和IL-2的三元制剂促进了原代小鼠和人T细胞的快速多克隆和抗原特异性扩增,包括显著快于商业DYNABEADS的多克隆扩增。重要地,尽管在这个实施例中使用APC-MS观察到了提高的扩增速率,扩增的T细胞保留了功能性表型,证明了扩增速率根本上不是与功能逆相关。T细胞大部分无视了APC-MS,除非它们配制以呈递相关TCR信号,这允许即使是复杂细胞混合物如PBMC中的罕见T细胞亚群的特异性扩增。

[0476] 这些研究的结果支持以与天然呈递这些信号相当的方式将表面和可溶性信号呈递给T细胞的重要性。之前关于合成aAPC的工作已经证明了以旁分泌方式将细胞因子(如,IL-2)递送给T细胞可以加强细胞因子的作用(Steenblock和Fahmy (2008);和Fadel等(2014))。当前系统主要聚焦于通过刺激的静态高密度呈递以促进TCR成簇而增强T细胞激活(Zappasodi等人(2008);Fadel等人(2014);和Fadel等人(2008))。然而,TCR的成簇只是涉及许多细胞表面分子随着时间的重组组织化的动态过程中的一个步骤,其不仅用于增强T细胞激活,而且限制TCR信号传导的持续时间,以防止T细胞过度刺激(Huppa和Davis (2003);Lee等(2003);Alarcón等(2011))。当跨过流体脂质双层呈递T细胞信号时,模拟这些信号怎样天然地在APC质膜的表面上遇到,观察到相对较低的表面信号密度以促进更快速的扩增速率并产生具有更高功能性和较低耗尽表型的T细胞。

[0477] 使用非常高纵横比的颗粒来形成APC-MS,这与大部分之前描述的合成aAPC材料(Steenblock和Fahmy(2008);Fadel等(2014);Sunshine等(2014);Fadel等(2008);Meyer等(2015)和Steenblock(2011))形成对比。这些颗粒自发沉降并堆叠以形成高表面积3D结构,其渗透重塑的T细胞形成密集的细胞材料簇,形成其中T细胞接近该材料的微环境。这很可能允许更有效的IL-2的旁分泌递送,和提高的T细胞-T细胞旁分泌信号传导(Long,M.&Adler,A.J.The Journal of Immunology 177,4257-4261(2006))。相对于Dynabead培养物,棒的相对大的尺寸和高纵横比很可能有助于APC-MS中观察到的较大簇的形成,因为与较小的球形DYNABEADS相比,更多的T细胞与每个棒相互作用。这些簇在APC-MS培养物中的持久性取决于培养物中的表面信号密度和材料量,这很可能造成各种APC-MS条件中观察到的不同表型。

[0478] 在多克隆小鼠T细胞扩增研究中,APC-MS促进了T细胞群体极端的CD8偏倚的偏斜。这与之前的观察相一致:IL-2的旁分泌递送增强了小鼠CD8+T细胞的增殖,但促进了小鼠CD4+T细胞中激活诱导的细胞死亡(Steenblock等(2011))。然而,在多克隆人T细胞扩增研究中,偏斜取决于APC-MS呈递的T细胞刺激物的总量,使用含有较高T细胞刺激物量的条件促进极端CD4偏倚的偏移。这种差异可以表明小鼠和人T细胞怎样应答这些信号中的根本差异。更好地理解这种行为能够使材料制剂将混合的T细胞群体偏向特定的CD4:CD8比率,这是最近已经表明对于过继性转移的T细胞的功能重要的性质(Turtle,C.J.等,The Journal of Clinical Investigation 126(2016))。

[0479] 离体快速产生治疗相关数量的功能性T细胞的需求是个性化T细胞治疗中的重要挑战,并且这个研究的结果表明APC-MS提供了满足这个需求的显著进展(Turtle,C.J.&Riddell,S.R.Cancer Journal (Sudbury,Mass.) 16,374(2010);和Eggermont,L.J.等,Trends in Biotechnology 32,456-465(2014))。观察到使用三元APC-MS制剂的单次刺激促进了明显比商业DYNABEADS更快的T细胞扩增,并且证明了可以操纵材料的参数来提高细胞产物的表型,而没有损害快速扩增速率。因为APC-MS是模块化平台技术,所述系统的组成部分可以改变或变化以改变其中信号被呈递的空间和时间环境。例如,改变MSR性质可以允许调节支架微环境或降解动力学。改变脂质制剂可以使得能够调节SLB稳定性、流动性或表面信号分区,或信号通过不同化学作用的连接(Torres等(2013);Puu,G.&Gustafson,I.Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-Biomembranes 1327,149-161(1997);Anderson,N.A.等Journal of the American Chemical Society 129,2094-2100(2007);Collins,M.D.&Keller,S.L.Proceedings of the National Academy of Sciences 105,124-128(2008);Reich,C.等,Biophysical Journal 95,657-668(2008);Longo,G.S.et al.Biophysical Journal 96,3977-3986(2009);Kwong,B.等,Biomaterials 32,5134-5147(2011);Koo,H.等,Angewandte Chemie International Edition 51,11836-11840(2012);和Desai,R.M.等,Biomaterials 50,30-37(2015))。本文中所述的APC-MS还可以改变以呈递较大的表面和可溶性信号集,这可以使得能够产生进一步优化的T细胞用于ACTS(Hasan等(2015);和Hendriks等(2000))。

[0480] 方法

[0481] 细胞和试剂

[0482] B16-F10小鼠黑素瘤细胞系获自ATCC,并且证实了对于支原体是阴性的。将B16-

F10细胞在补充了10%热灭活的胎牛血清(FBS)(HI-FBS)和1%青霉素-链霉素的Dulbecco's改良的Eagle's培养基(DMEM)中培养。将B3Z鼠T细胞杂交瘤细胞在补充了10%HI-FBS、2mM L-谷氨酰胺、1mM丙酮酸钠、50μMβ-巯基乙醇和1%青霉素-链霉素的RPMI 1640中培养。将T2(174×CEM.T2)人淋巴母细胞在补充了10%HI-FBS、2mM L-谷氨酰胺、1mM丙酮酸钠、50μMβ-巯基乙醇、0.1mM非必需氨基酸、1mM丙酮酸钠、10mM HEPES和1%青霉素-链霉素的RPMI 1640中培养。将原代小鼠和人T细胞在补充了10%HI-FBS、2mM L-谷氨酰胺、1mM丙酮酸钠、50μMβ-巯基乙醇、0.1mM非必需氨基酸、1mM丙酮酸钠、10mM HEPES、1%青霉素-链霉素,分别补充了30U/ml重组小鼠-或人-IL-2的RPMI 1640中培养。

[0483] 用于MSR合成的所有化学试剂购自Sigma-Aldrich。所有脂质购自Avanti Polar Lipids。这些研究中使用的特定脂质如下:DOPC(850375C)、POPC(850457C)、DPSC(850365C)、PE-帽-生物素(870273C)、18:1PE-羧基荧光素(810332C)。FoxP3抗体购自eBioscience。所有其他抗体购自Biolegend。鼠和人重组IL-2购自Biolegend。生物素化肽加载的MHC单体和荧光团标记的四聚体获自National Institutes of Health Tetramer Core Facility。小鼠和人CD3/CD28T细胞扩增DYNABEADS购自ThermoFisher Scientific。卵白蛋白衍生的肽SIIFEKL(SEQ ID NO:4)购自Anaspec。EBV衍生的肽CLGGLTMTV(SEQ ID NO:1)和GLCTLVAML(SEQ ID NO:2)购自Proimmune。

[0484] 介孔二氧化硅微棒(MSR)的合成

[0485] 按照之前报道的(Kim等(2015);和Li等(2016))合成了MSR。简而言之,将4g Pluronic P123表面活性剂(平均Mn~5,800,Sigma-Aldrich)溶解于150g 1.6M HCl溶液中,并且在40℃下与8.6g原硅酸四乙酯(TEOS,98%,Sigma-Aldrich)搅拌20h,接着在100℃下老化24h。随后,通过在1%HCl/乙醇(v/v)中在70℃下提取20小时,从如此制备的颗粒中除去表面活性剂。颗粒通过将悬浮液通过0.22μm滤器收集,用乙醇洗涤,并干燥。

[0486] 原代小鼠T细胞分离

[0487] 涉及动物的所有程序遵从国立卫生研究院和机构指导方针来进行。动物购自Jackson实验室。对于多克隆T细胞扩增研究,将C57BL/6J小鼠用作细胞供体。对于抗原特异性T细胞扩增研究,将C57BL/6-Tg(TcraTcrb)1100Mjb/J(OT-I)小鼠用作细胞供体。所有动物是雌性的并且在实验开始时为6至9周大。为了分离T细胞,通过将脾脏通过70μm尼龙细胞筛网压碎来制备脾细胞,并且将红细胞在ACK缓冲液中裂解。随后,使用淘选T细胞分离MACS试剂盒(Miltenyi Biotec)分离CD3+T细胞用于多克隆T细胞扩增研究,或使用CD8a+T细胞分离MACS试剂盒(Miltenyi Biotec)分离CD8+T细胞用于抗原特异性T细胞扩增研究。

[0488] 原代人T细胞分离

[0489] 去识别白细胞减少圈(de-identified leukoreduction collar)获自Brigham and Women's Hospital Specimen Bank。PBMC在Ficoll梯度中自白细胞减少分离,接着两次洗涤以除去血小板杂质。随后,在一些研究中,使用淘选T细胞分离MACS试剂盒(Miltenyi Biotec)分离CD3+T细胞用于多克隆T细胞扩增研究,或使用CD8+T细胞分离MACS试剂盒(Miltenyi Biotec)分离CD8+T细胞用于抗原特异性T细胞扩增研究。

[0490] 抗原呈递细胞模拟支架(APC-MS)的制备

[0491] MSR和脂质体在APC-MS组装前制备。为了制备脂质体,首先通过混合脂质-氯仿悬浮液、在氮气下蒸发大量氯仿以及在真空室中过夜除去残余氯仿制备由预先得定的脂质制

剂组成的脂质膜。对于所有功能研究,将1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(POPC)用作主要脂质,并且将脂质制剂掺杂0.01-1mol%的羧基荧光素标记的脂质1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-(羧基荧光素)或生物素化的脂质1,2-二-(9Z-十八烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-(帽生物素基)。对于一些表征研究,将脂质1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)和1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)交替地用作主要脂质。将脂质膜以2.5mg/ml脂质重悬浮于PBS中,并且通过每10分钟涡旋再水合,持续一小时。随后使用微型挤出机(Avanti Polar Lipids)将脂质悬浮液通过100nm聚碳酸酯滤器挤出以获得单分散的脂质体悬浮液。将脂质体悬浮液储存于4℃下,并在一周内使用。为了制备APC-MS制剂,在室温下用PBS中的重组IL-2(0.04mg/ml)孵育MSR(10mg/ml),持续1小时。为了形成MSR-SLB,以脂质:MSR1:4(w/w)添加脂质体,并且在室温下孵育1小时,每10分钟吸移。接着,用PBS洗涤材料两次,并且随后通过将材料以2.5mg/ml(相对于MSR)重悬浮于PBS中的0.25%牛血清白蛋白(BSA)(w/v)中阻断15分钟。随后对应于特定制剂中生物素化脂质量(假定对于POPC为34%脂质保留)的30%理论饱和的摩尔量加入抗生物素蛋白链菌素(对于1%生物素化脂质制剂,每500μg MSR 25μg抗生物素蛋白链菌素),并且通过每5分钟吸移来混合悬浮液,持续20分钟。接着,以对应于添加的抗生物素蛋白链菌素的80%摩尔饱和的量添加生物素化的T细胞激活信号(1:1摩尔比TCR激活信号:αCD28),并且通过每10分钟吸移混合悬浮液,持续1小时。最后,用PBS将材料洗涤两次,并且重悬浮于细胞培养物中用于体外分析中。将APC-MS制剂立即用于T细胞扩增实验中,或储存在4℃并且在一周内使用用于表征研究。

[0492] MSR支撑的脂质双层(MSR-SLB)结构和稳定性的表征

[0493] 使用EVOS FL细胞成像系统进行了亮场和荧光显微镜检查用于评价MSR脂质涂层、MSR-SLB分散性和MSR-SLB降解。使用Zeiss LSM 710共焦系统进行了共焦显微镜检查。为了评价MSR的脂质保留,用含有1mol%荧光团标记的脂质的脂质制剂涂覆MSR,并且使用平板阅读器定量脂质保留。为了计算随着时间的脂质保留百分比,通过以700rcf下离心5分钟在特定的时间点收集培养的材料,并且将荧光强度相对于培养前的荧光强度标准化。为了评价MSR-SLB流动性,使用Zeiss LSM 710共焦系统对涂覆有包含1mol%荧光团标记的脂质的脂质制剂的MSR进行了光漂白后荧光恢复(FRAP)实验。在488nm激光线上进行光漂白并且每10秒钟获取图像,持续至少150秒。使用ImageJ,通过将每个时间点的光漂白区域内的荧光强度相对于不同棒上的未漂白区域中的荧光强度标准化来分析荧光恢复。

[0494] 为了定量IL-2加载和释放,将500μg MSR加载2μg IL-2,并随后用所述的脂质涂覆。用PBS洗涤两次后,将加载IL-2的MSR-SLB重悬浮于500μl释放缓冲液(PBS中的1%BSA(w/v))中并且在细胞培养条件下孵育。在所示时间点,将样品离心(700rcf,5分钟),并且收集上清液。随后,将MSR重悬浮于新鲜释放缓冲液中并返回到培养。通过ELISA(Biolegend)定量上清液样品中的IL-2。

[0495] 为了定量表面信号加载,使用含有0.01、0.1或1mol%生物素化脂质的脂质制剂来制备MSR-SLB样品。加入对应于保留的生物素化脂质(假定对于POPC,35%脂质保留)的30%理论饱和的量的抗生物素蛋白链菌素,接着添加量等于添加的抗生物素蛋白链菌素的40%或80%饱和的生物素化IgG。作为对照,还制备了含有相同量的生物素化IgG但不含材料的样品。将所有样品在700rcf下离心5分钟以沉淀材料,并且通过ELISA(eBioscience)定量上

清液级分中的IgG量。还将用于制备样品的生物素化IgG储液用于制备标准曲线。通过从相应材料样品上清液中检测的IgG量减去对照样品上清液中检测的IgG量计算加载至材料上的Ig量。对于扫描电子显微镜(SEM),细胞在玻璃盖玻片上用APC-MS培养过夜,在4%多聚甲醛中固定,并且随后在2000rpm下离心5分钟。将固定的样品通过水中0、30、50、75、90、100%乙醇梯度按序转移。将样品浸没在六甲基二硅氮烷(Electron Microscopy Sciences)中并且在台式干燥器中保持过夜。使用碳胶带将干燥的盖玻片安装在SEM杆上,溅涂5nm铂-钨,并且使用Carl Zeiss Supra 55VP场发射扫描电子显微镜上的二次电子检测来成像。

[0496] 体外T细胞扩增研究

[0497] 使用原代CD3+T细胞进行了多克隆小鼠和人T细胞扩增实验。使用从OT-I小鼠分离的CD8+T细胞进行了抗原特异性小鼠T细胞扩增实验。使用从去识别的供体血样分离的CD8+T细胞或PBMC进行了抗原特异性人T细胞扩增实验。将分离的原代小鼠或人T细胞或人PBMC与激活刺激物混合,并培养长达两周。在所有实验中,使用了非组织培养物处理的培养容器。对于人抗原特异性T细胞扩增研究,在建立培养物之前,通过FACS分析供体样品的HLA-A2MEW I表达,并且通过血清的抗EBV VCA ELISA(1BL International)分析之前的EBV暴露。仅将HLA-A2+经历EBV的样品用于扩增研究。

[0498] 将人抗原特异性T细胞扩增实验中的模拟处理的样品在补充了30U/ml重组IL-2的培养基中培养。将所有其他T细胞扩增实验中的模拟处理的样品在未补充的培养基中培养。对于商业Dynabead条件,根据试剂盒中包括的制造商优化的实验方案来使用DYNABEADS。简而言之,在补充了30U/ml重组IL-2的培养基中,以珠与细胞1:1的比例使用预洗涤的DYNABEADS,以 1×10^6 T细胞/ml的密度接种T细胞。对于Dynabead培养物,将 1×10^5 细胞接种于起始培养物中。每三天将细胞计数并且加入新鲜的补充IL-2的培养基以使细胞悬浮液达到 $0.5-1 \times 10^6$ 细胞/ml的密度。通常,在整个培养期间,将细胞维持在低于 2.5×10^6 细胞/ml的密度。

[0499] 对于小鼠多克隆研究,以1:1摩尔比,在0.2-1mol%脂质上制备了呈递表面信号(α CD3+ α CD28)的APC-MS,并以333 μ g/ml加入起始培养物中。对于人多克隆研究,以1:1摩尔比在0.1mol%或1mol%脂质上制备了呈递表面信号(α CD3+ α CD28)的APC-MS,并以33 μ g/ml或333 μ g/ml加入起始培养物中。对于小鼠抗原特异性研究,以1:1摩尔比在0.01mol%或0.1mol%脂质上制备了呈递表面信号(SVYDFVWL (SEQ ID NO:3)/H-2K(b)或SIINFELK (SEQ ID NO:4)/H-2K(b)+ α CD28)的APC-MS,并以33 μ g/ml或333 μ g/ml加入起始培养物中。对于人抗原特异性研究,以1:1摩尔比在1mol%脂质上制备了呈递表面信号(CLGGLTMV (SEQ ID NO:1)/HLA-A2或GLCTLVAML (SEQ ID NO:2)/HLA-A2+ α CD28)的APC-MS,并以333 μ g/ml加入起始培养物中。以333 μ g/ml添加的在1mol%脂质上呈递信号的APC-MS对应于起始培养物中~55nM TCR刺激物和 α CD28。对于APC ms条件,在没有补充IL-2的培养基中将 5×10^4 细胞/ml的T细胞接种特定含量的材料。在所有APC-MS条件中,将 2.5×10^4 细胞接种于起始培养物中。在整个培养期间添加培养基以将细胞维持在低于 2.5×10^6 细胞/ml的密度。在第7天开始,大部分材料加载的IL-2已经释放时,添加补充了30U/ml重组IL-2的新鲜培养基。在特定的时间点,使用台盼蓝排除使用血球计手动计数活细胞,以避免作为材料污染结果的自动化计数系统可能的假象。计数后,使用流式细胞术评价细胞表型。基于荧光减一(FMO)对照,对每个时间点和样品集独立地设定门控。

[0500] 体外T细胞功能研究

[0501] 对于其中通过胞内细胞因子染色评价IFN γ 和TNF α 的T细胞表达的共培养实验,首先对刺激细胞(小鼠,B16-F10;人,T2)不脉冲或用1 μ g/ml肽(小鼠,SIINFEKL (SEQ ID NO:4);人,CLGGLTMV (SEQ ID NO:1)或GLCTLVAML (SEQ ID NO:2))在37 $^{\circ}$ C下脉冲30分钟。随后,在添加布雷菲德菌素A(BD Biosciences)来抑制细胞因子分泌前,用 2×10^4 刺激细胞培养 1×10^5 扩增的细胞一小时,并且随后再培养四小时。随后将细胞染色,并使用FACS进行分析。

[0502] 首先在20 μ g/ml钙黄绿素AM(Biotium)中在37 $^{\circ}$ C下孵育靶细胞(小鼠,B16-F10;人,T2)30分钟来进行体外杀灭分析。随后对靶细胞不脉冲或用1 μ g/ml肽(小鼠,SIINFEKL (SEQ ID NO:4);人,CLGGLTMV (SEQ ID NO:1)或GLCTLVAML (SEQ ID NO:2))在37 $^{\circ}$ C下脉冲30分钟。随后以0、1、10、25或50的效应细胞:靶细胞(E:T)比例用扩增的效应细胞培养 5×10^3 靶细胞四小时。随后将细胞沉淀,并且使用平板阅读器定量上清液样品的荧光强度。还通过ELISA(Biolegend)定量上清液样品中的IFN γ 浓度。

[0503] 统计学分析

[0504] 作为平均 \pm s.d.表示所有值,除非另外指出。使用GraphPad Prism进行了统计学分析,并且统计方法在文字中有记载。在所有情况中,认为 $p < 0.05$ 是显著性的。

[0505] 实施例12:体外APC-MS降解的分析

[0506] 为了研究示例性APC-MS的体外降解,进行了以下的实验。用原代小鼠T细胞(25×10^4 T细胞/167 μ g MSR)培养包括 α CD3/ α CD28抗体(1%生物素化脂质)并释放IL-2的APC-ms(167 μ g)。在各个不同的时间点,将培养物以700rcf离心5min,并且通过电感耦合等离子体光发射光谱法(ICP-OES;Galbraith Laboratories)定量沉淀物中的二氧化硅(Si)含量。如图37中所示,在约1周后,培养沉淀物中的二氧化硅是不可检测的。

[0507] 实施例13:多样的可溶性免疫指导有效负载从APC-MS的受控释放

[0508] 为了研究细胞因子有效负载从示例性APC-MS的释放,进行了以下实验。在脂质涂覆前,将各自包括IL-2、IL-21、TGF β 或IL-15SA的四个APC-MS加载至500 μ g介孔二氧化硅微棒(MSR)中。将样品彻底洗涤以除去任何未加载的蛋白质,并随后在37 $^{\circ}$ C下维持长达28天。使用ELISA评价了随着时间的有效负载释放。如图38中所示,在实验过程中观察到细胞因子从APC-MS的受控释放。释放动力学很可能取决于特定细胞因子的物理化学性质。

[0509] 实施例14:抗体通过点击化学反应与MSR-SLB缀合

[0510] 为了确定功能性分子是否可以与MSR-SLB脂质双层缀合,进行了以下实验。使用Thermo SiteClick抗体标记系统,用叠氮化物基团位点特异性地标记IgG。还制备了含有不同量(mol%)的DBCO修饰的脂质(Avanti Polar Lipids)的MSR-SLB。如图42A和42B中所示,叠氮化物修饰的IgG以浓度依赖性方式成功地缀合至MSR-SLB的脂质双层上。

[0511] 等同

[0512] 本领域技术人员将认识到或能够仅使用常规的实验确定本文中所述的特定实施方式和方法的许多等同方式。打算通过以下权利要求的范围来包括这样的等同方式。

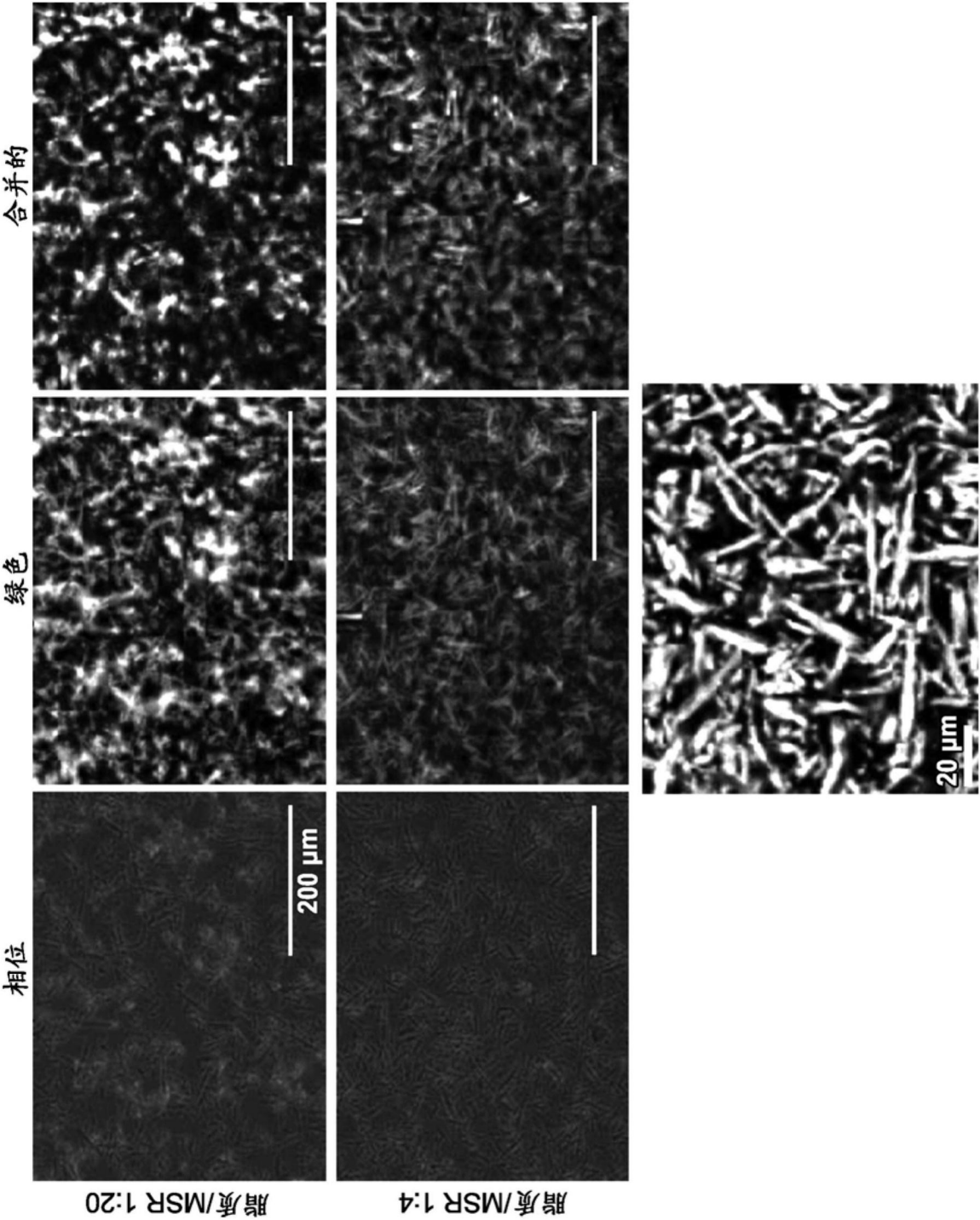


图1

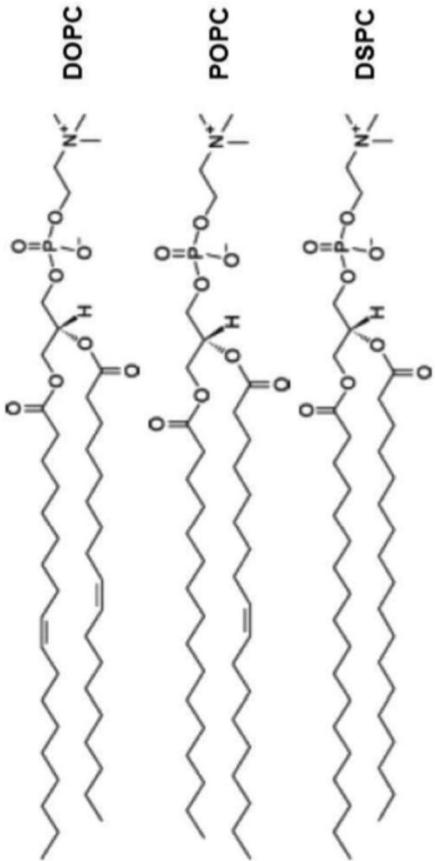


图2A

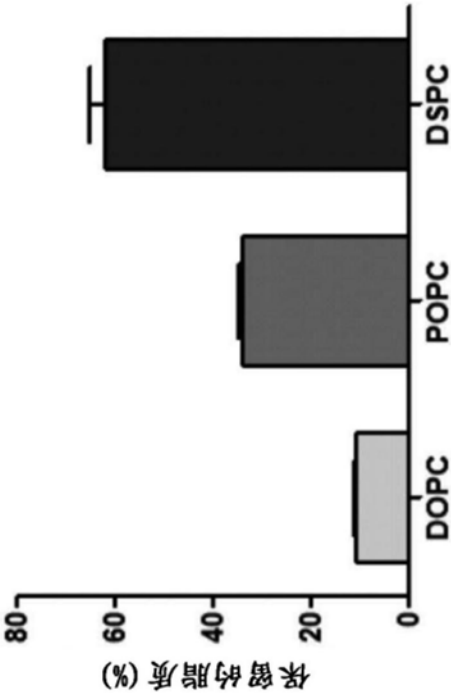


图2B

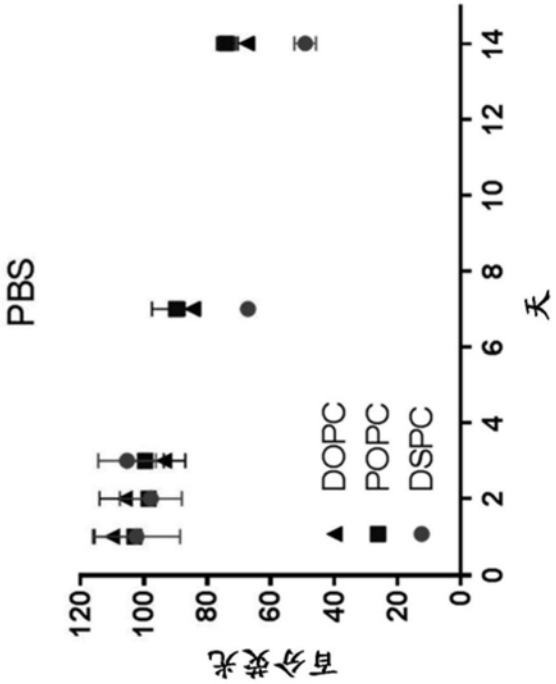


图2C

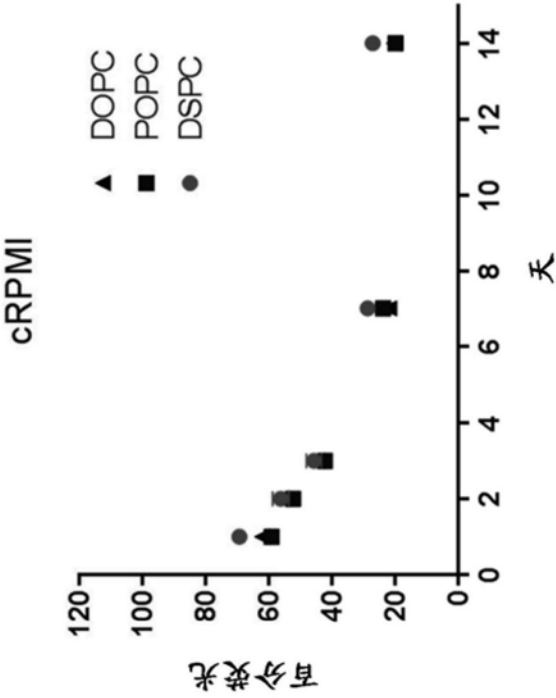


图2D

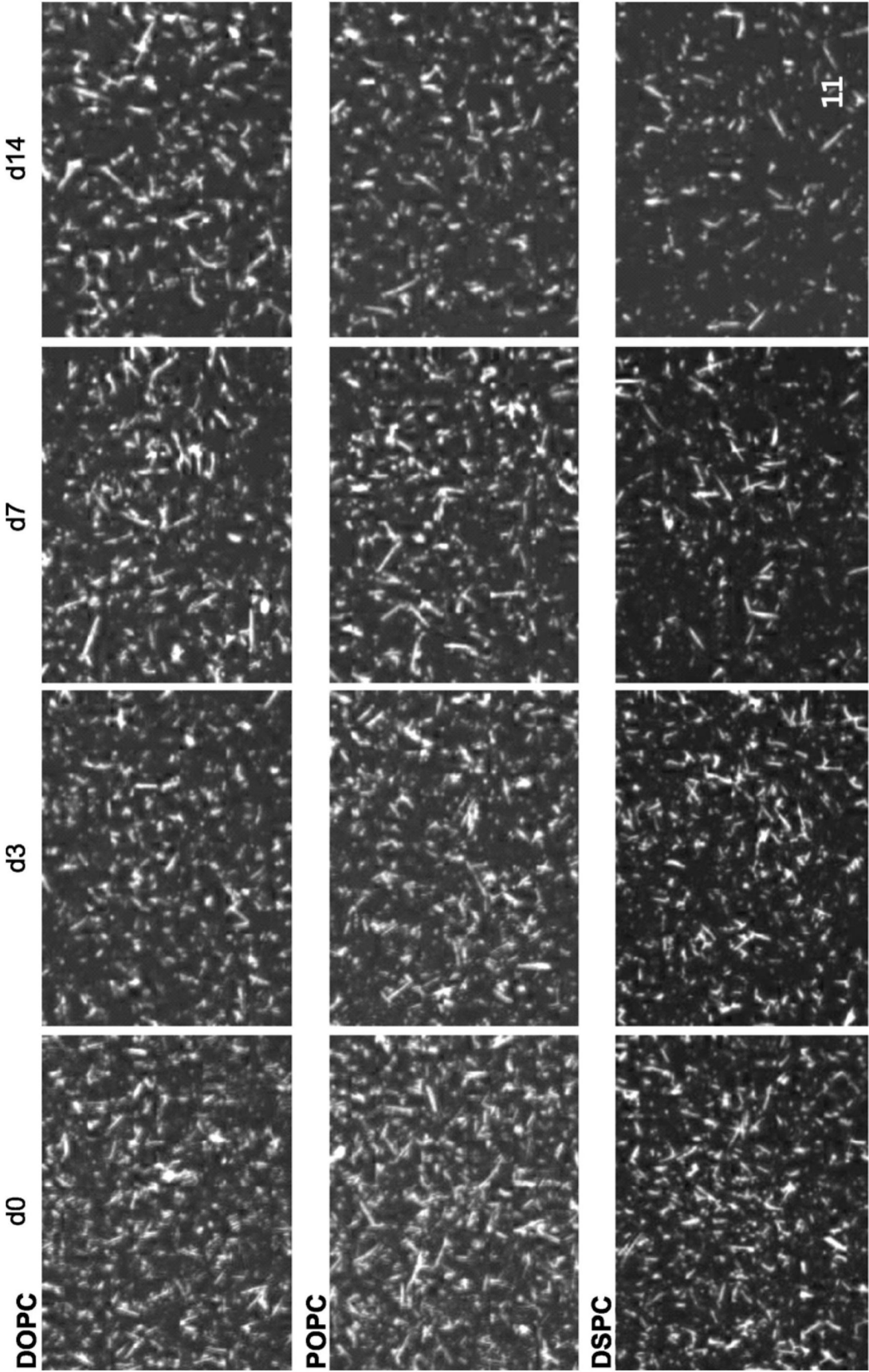


图3

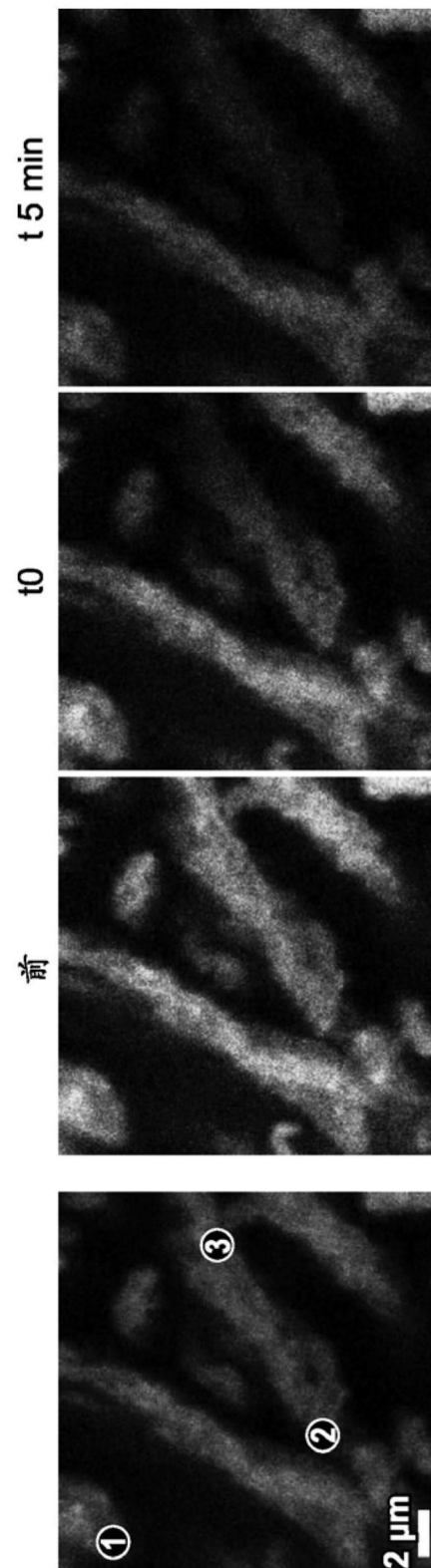


图4A

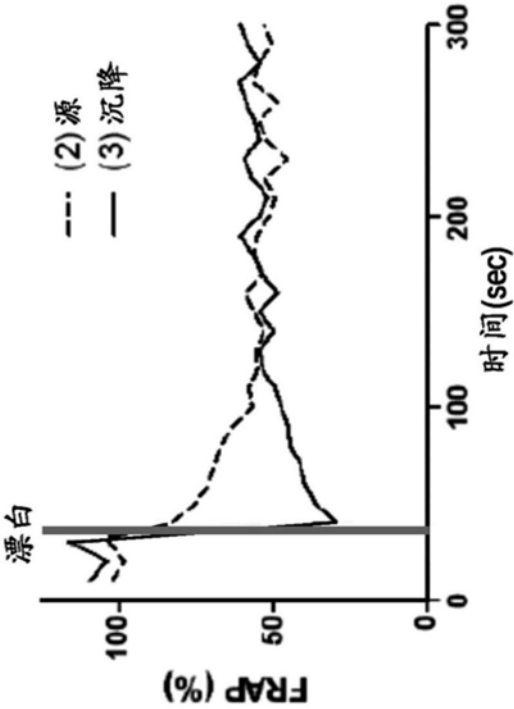


图4B

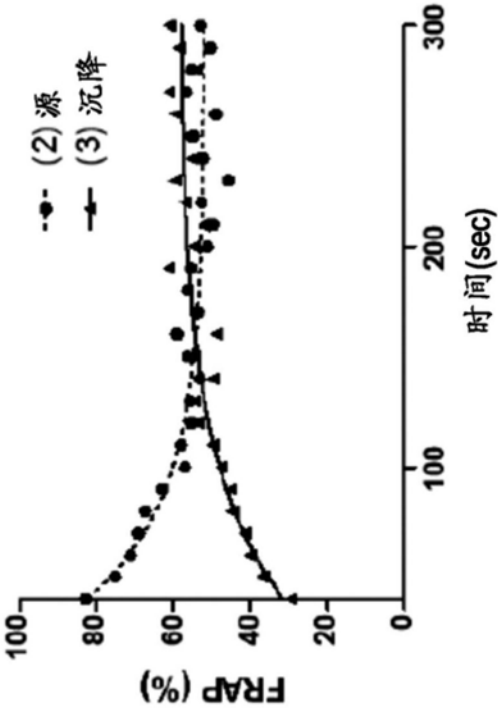


图4C

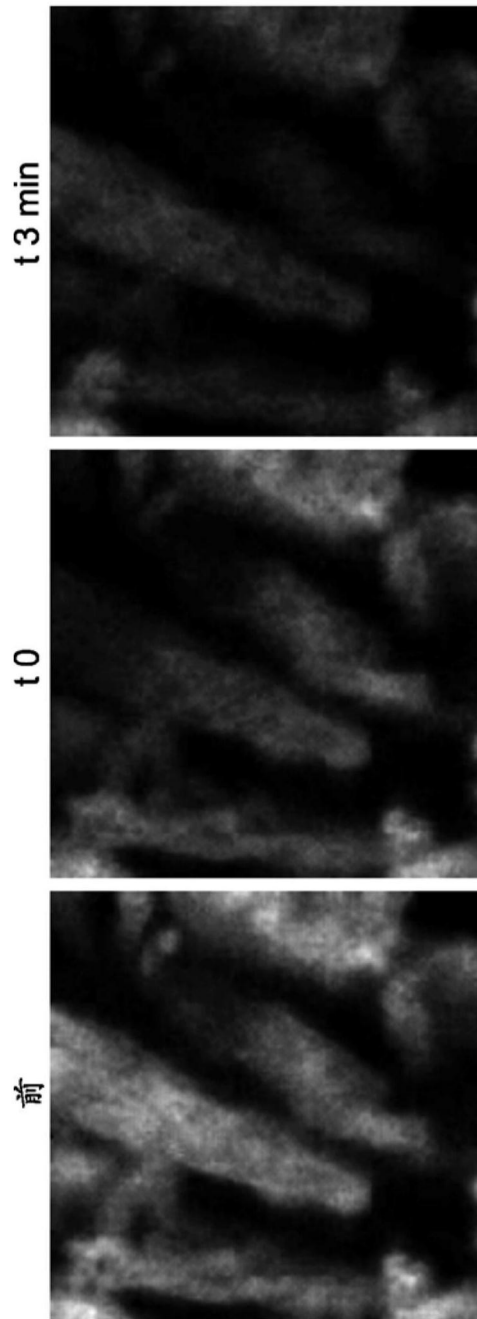


图4D

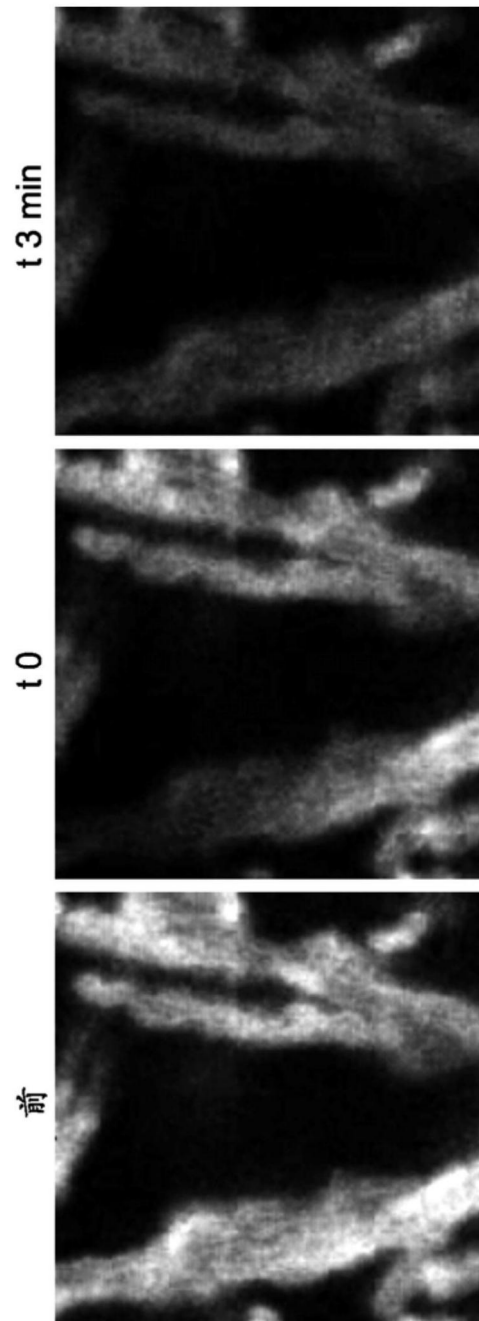


图4E

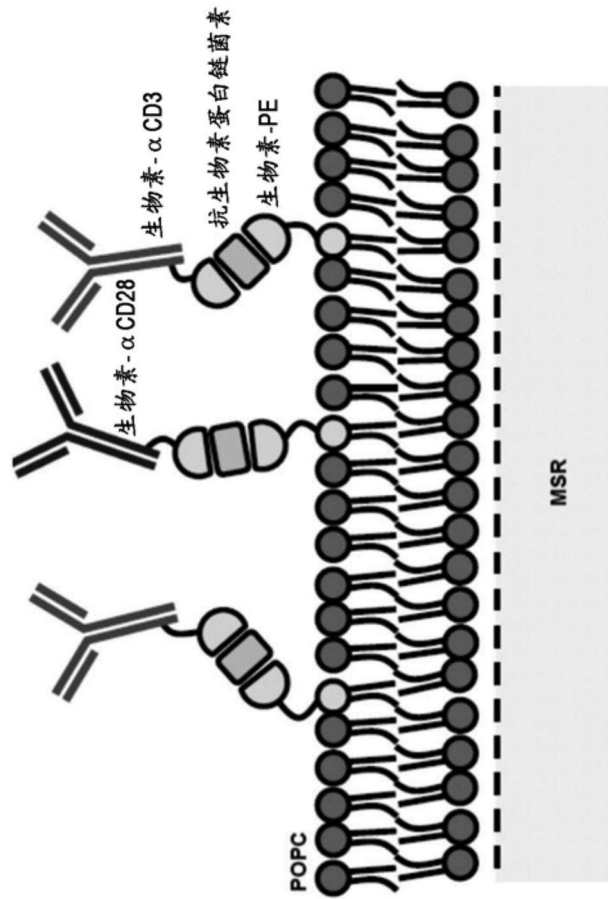


图5A

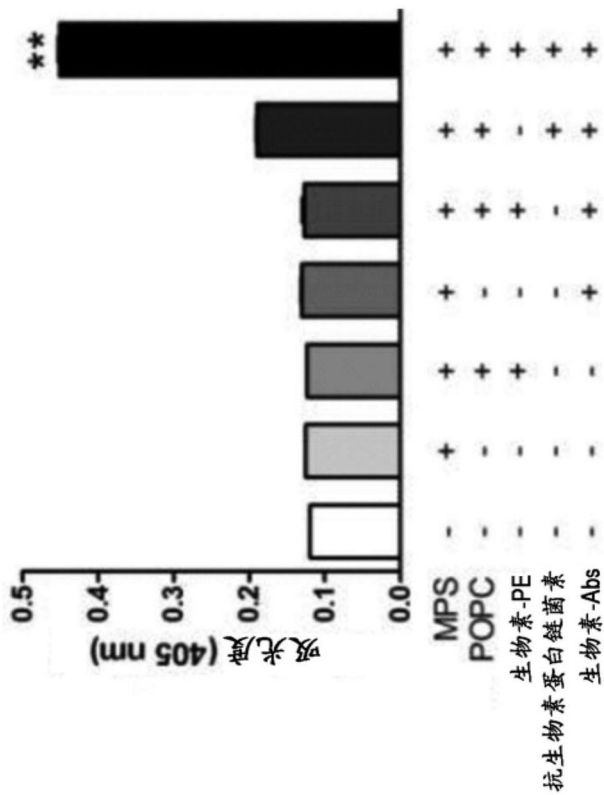


图5B

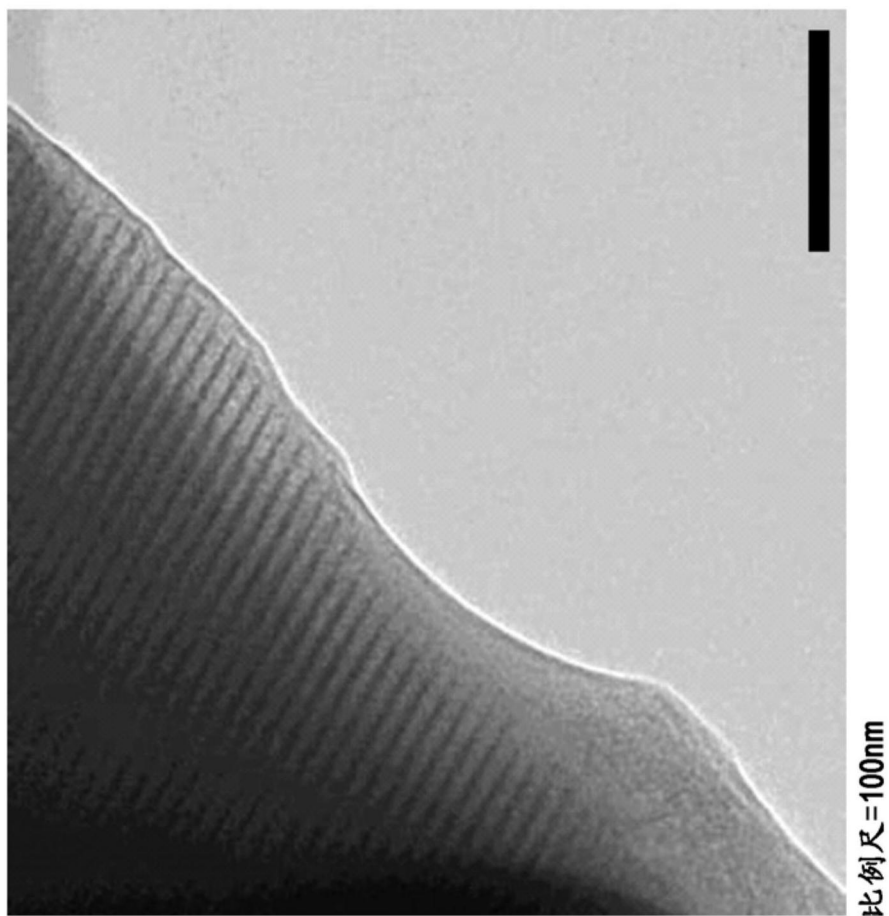


图6A

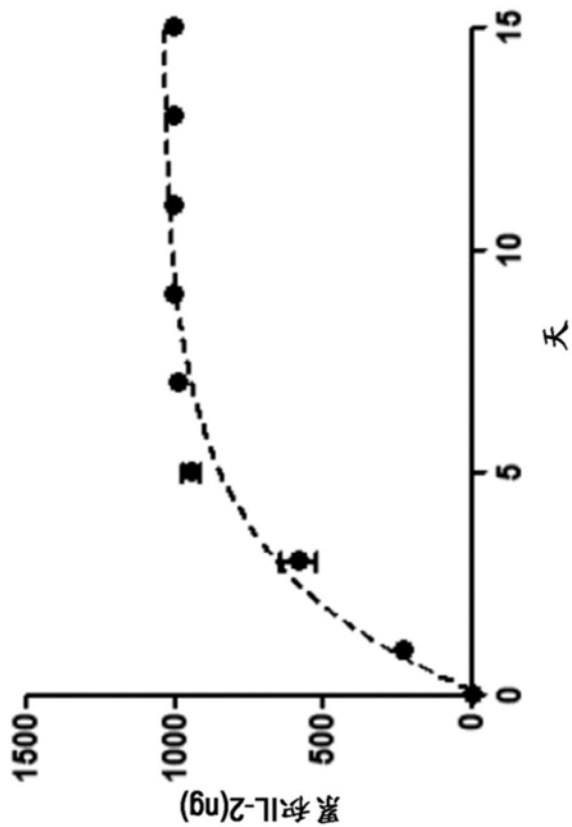


图6B

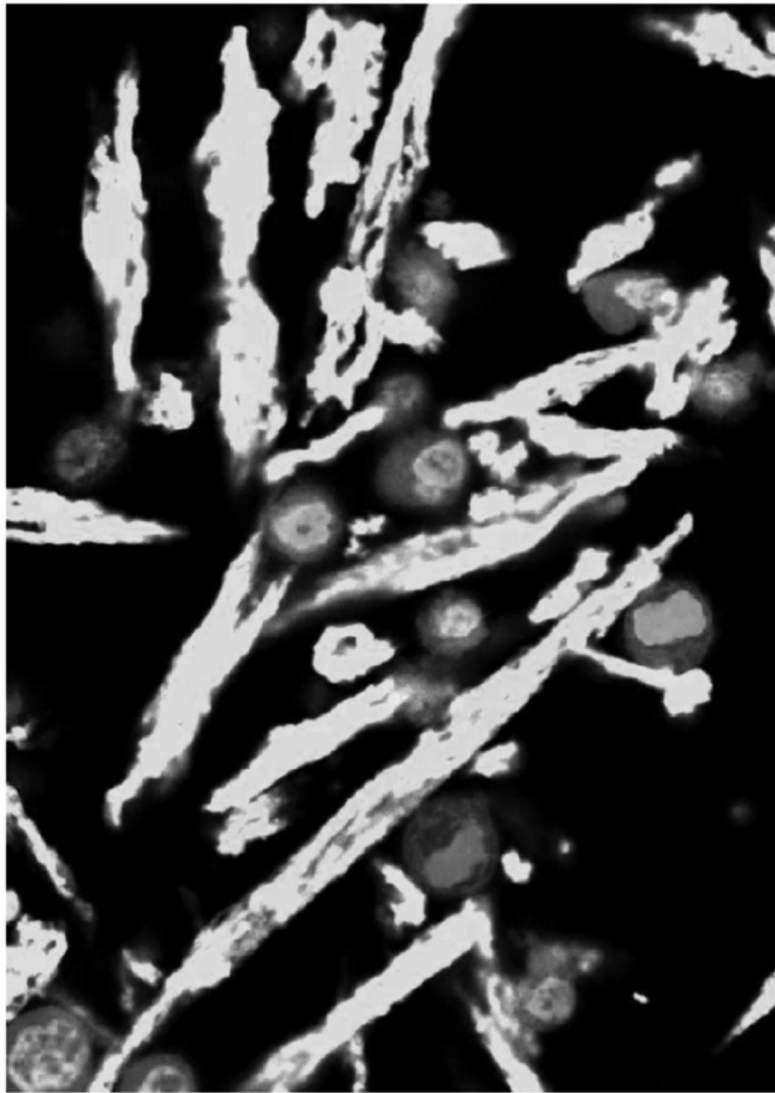


图7A

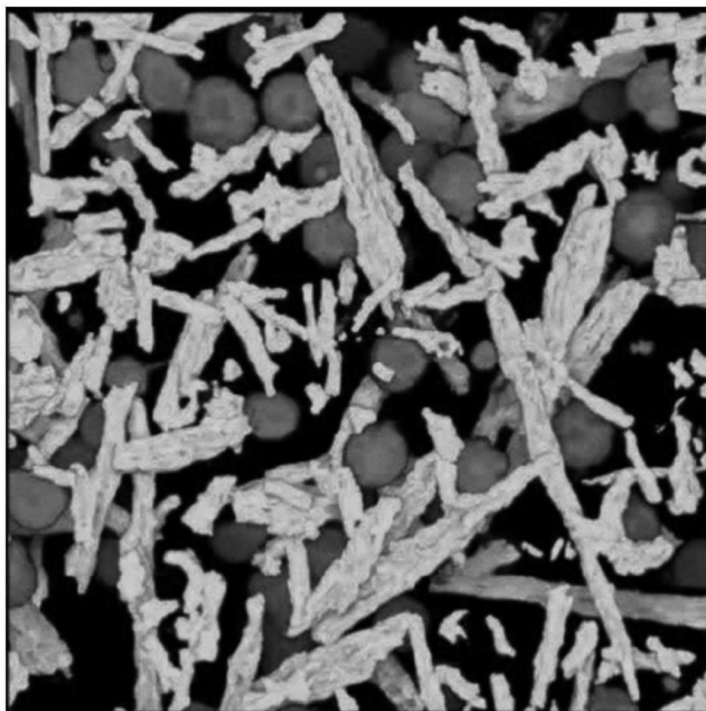


图7B

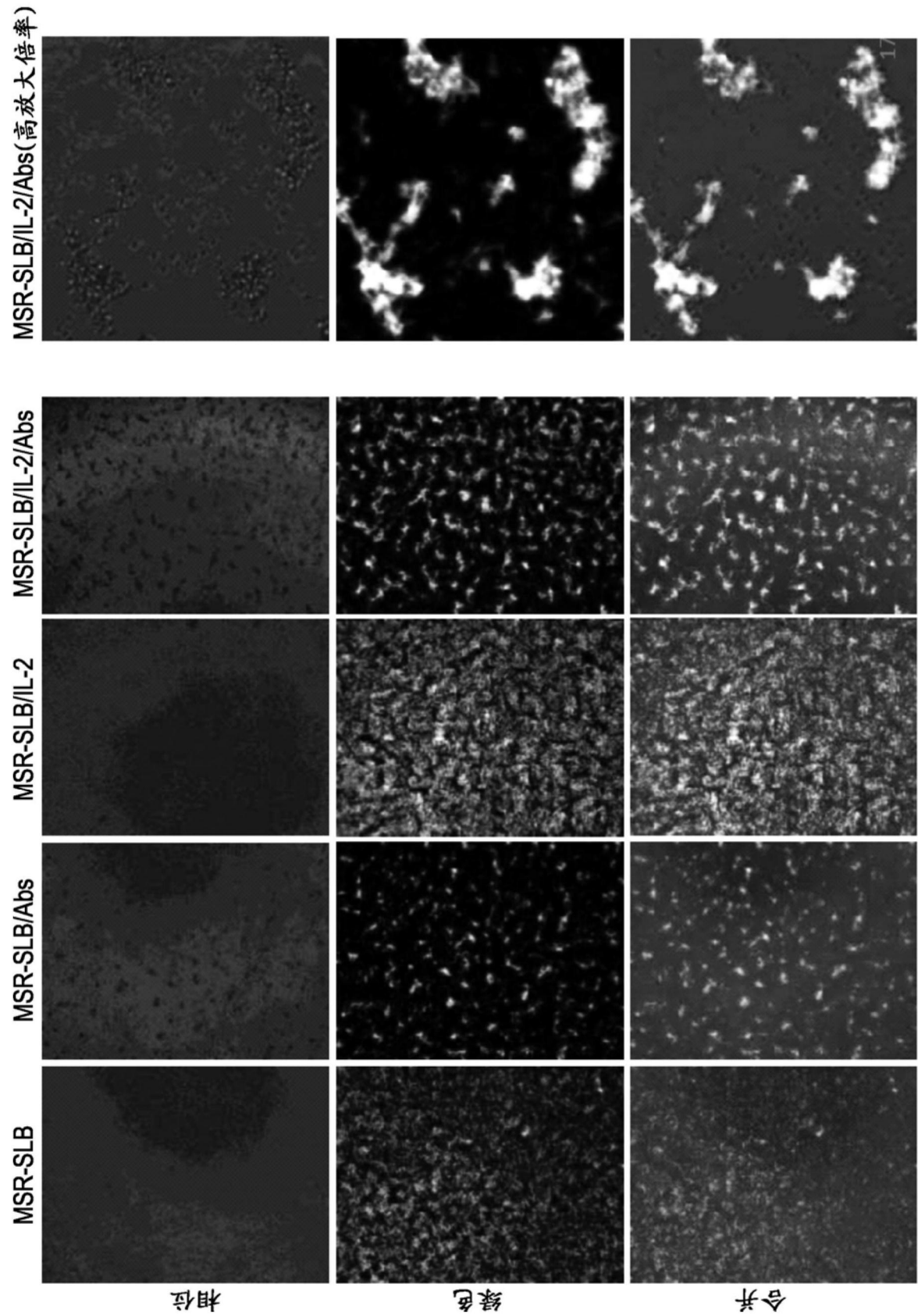


图8

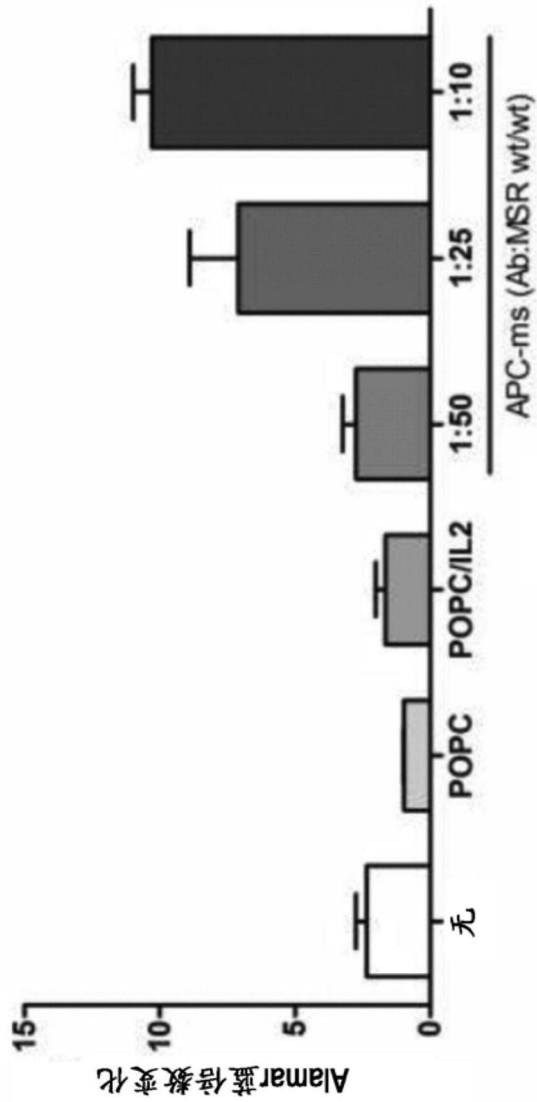


图9A

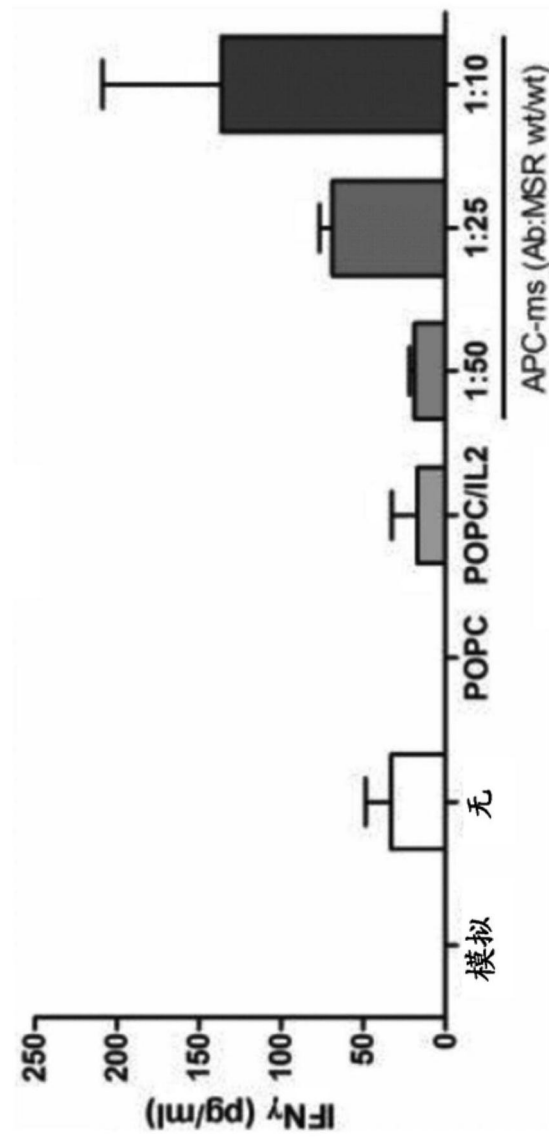


图9B

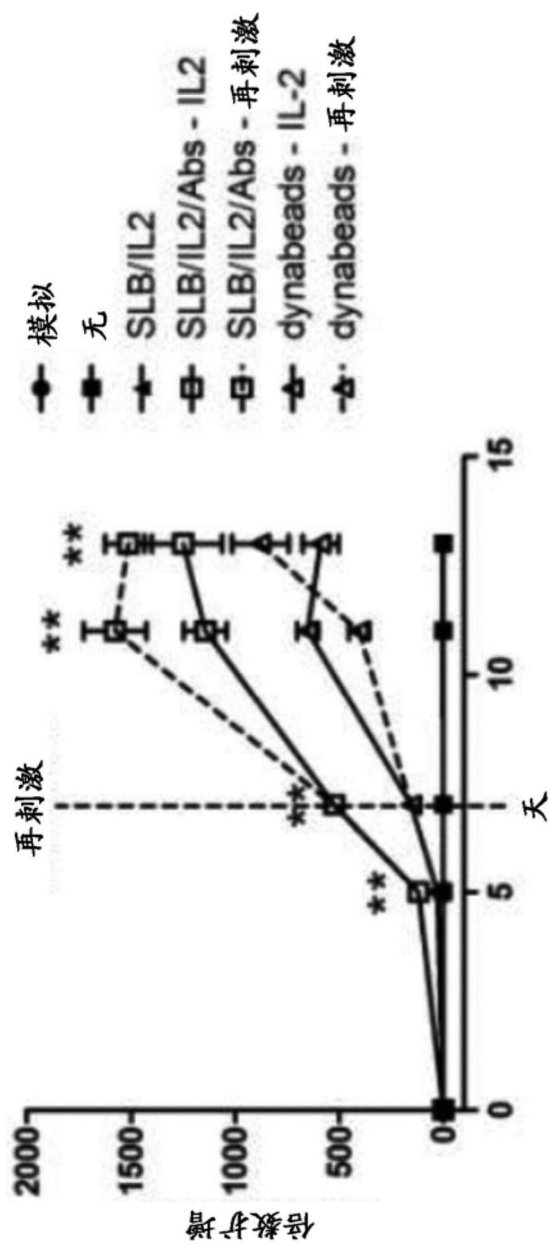


图10

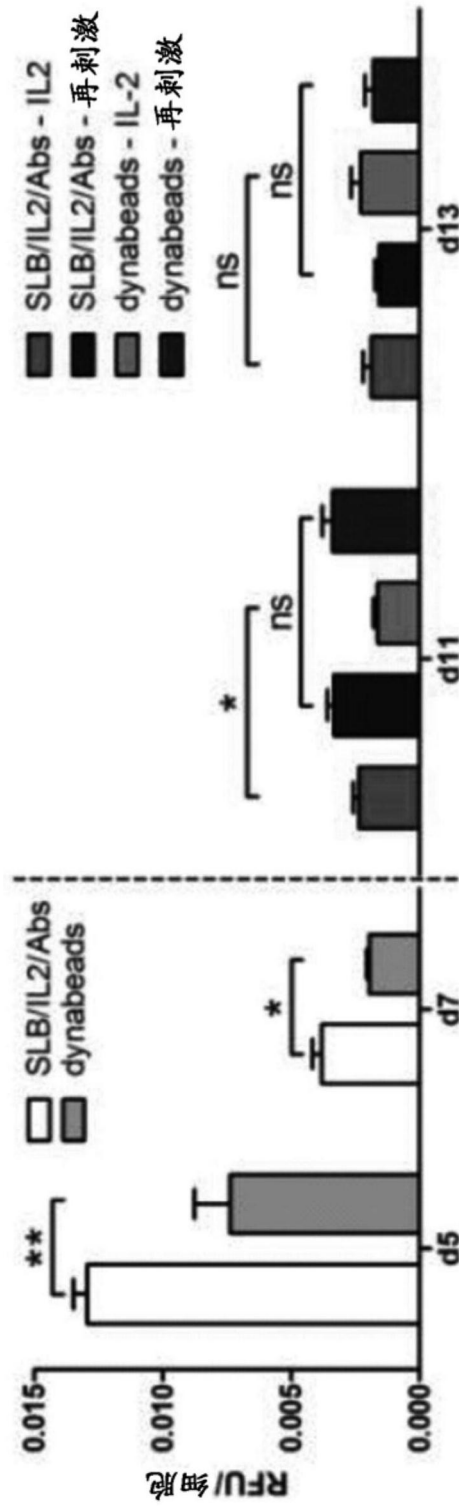


图11

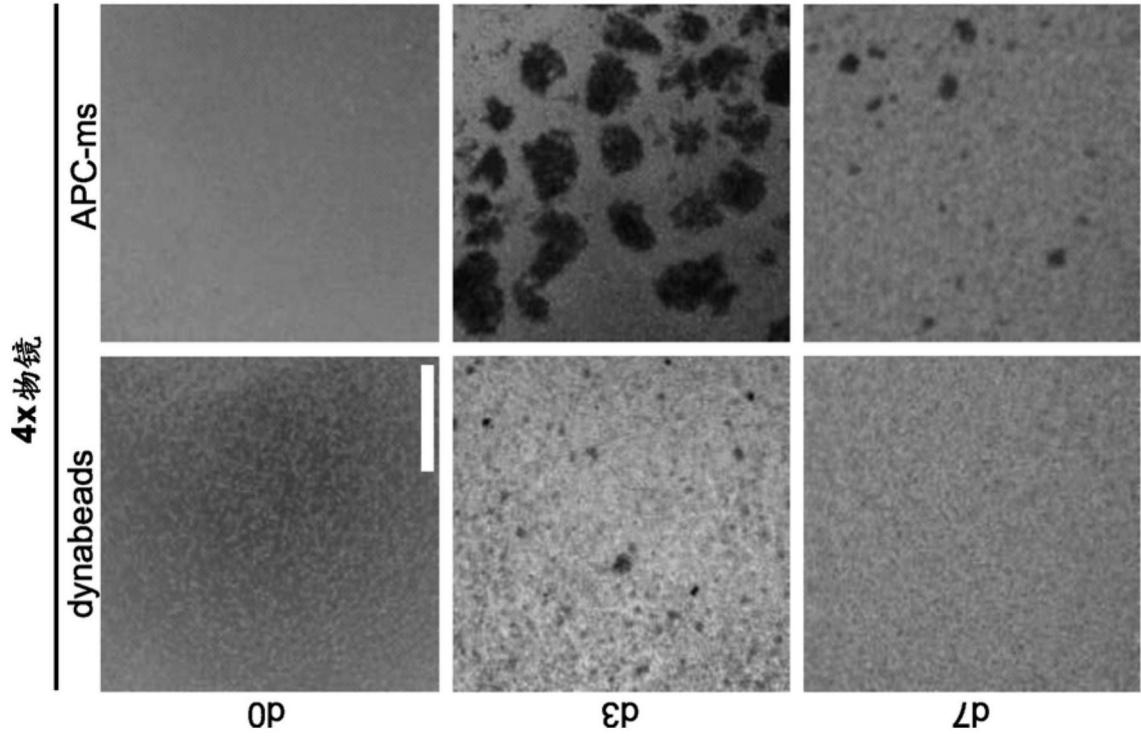


图12A

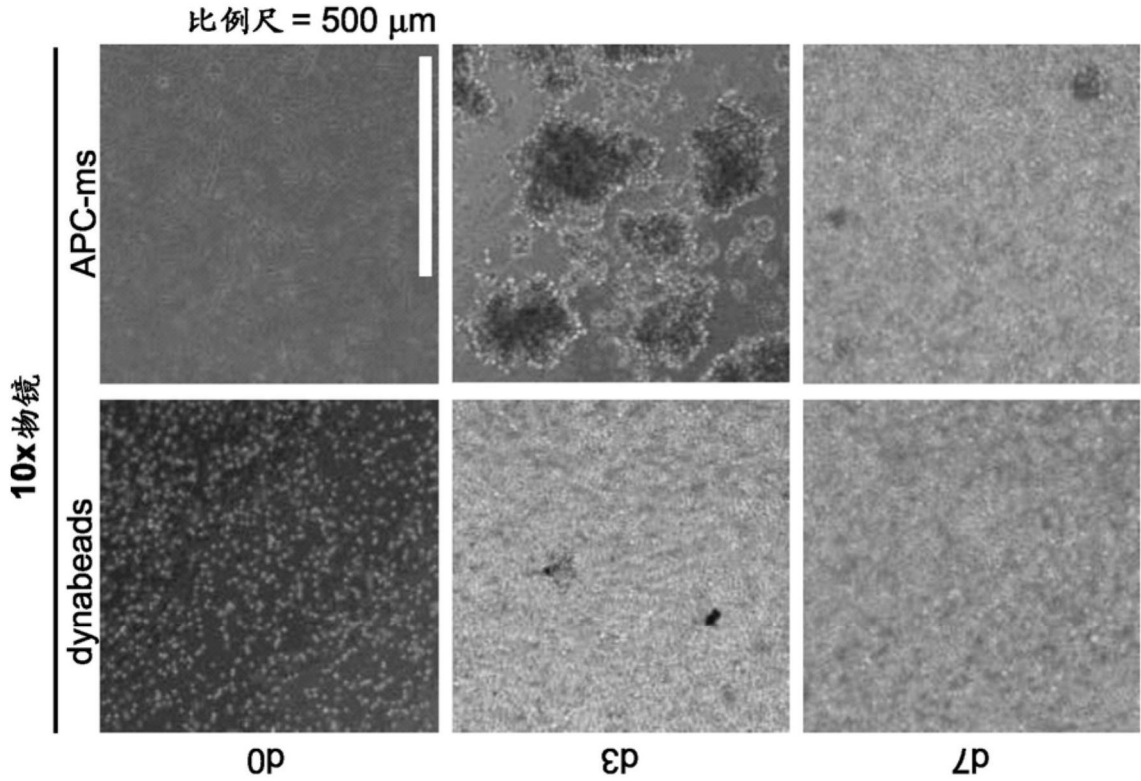


图12B

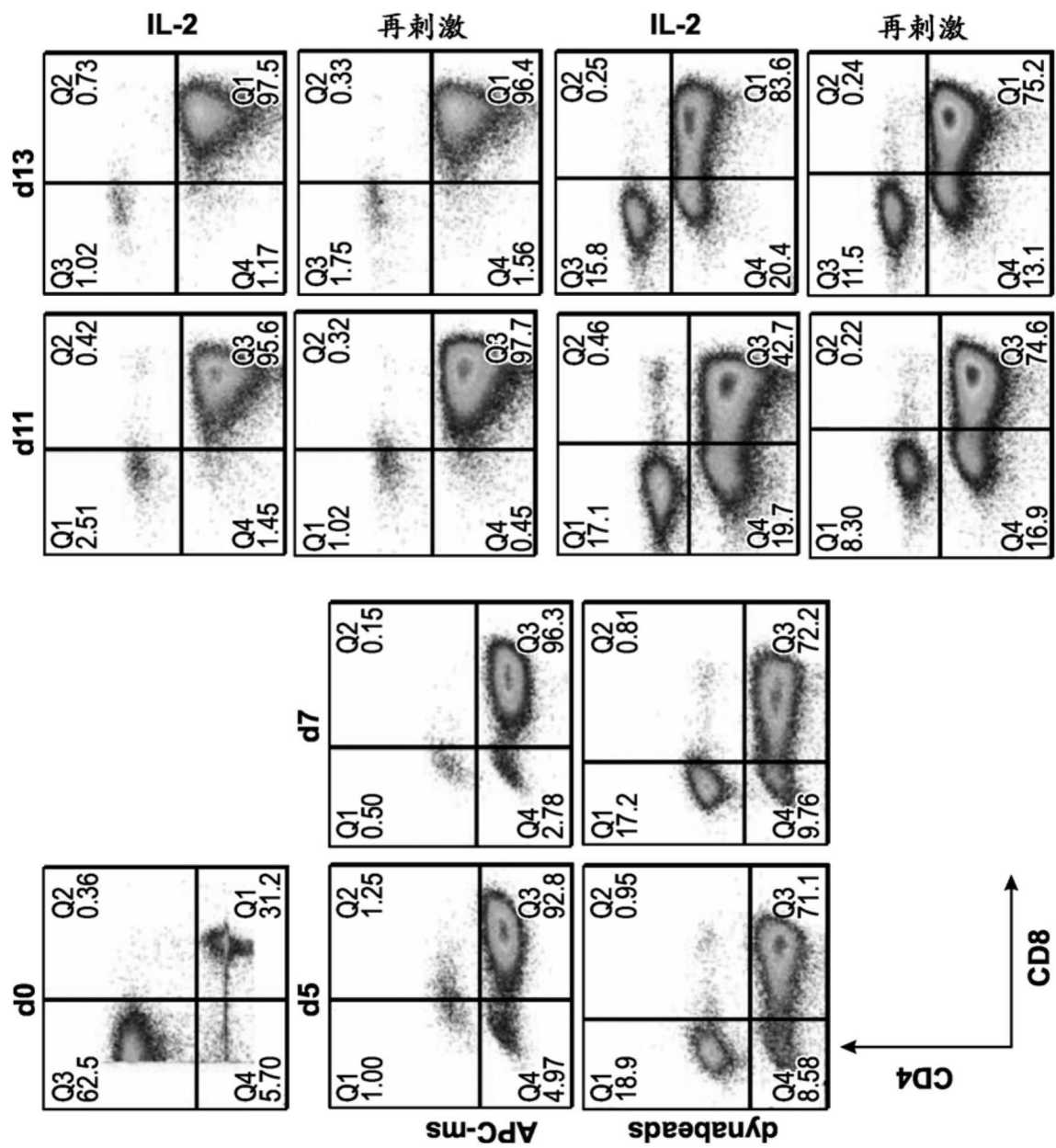


图13A

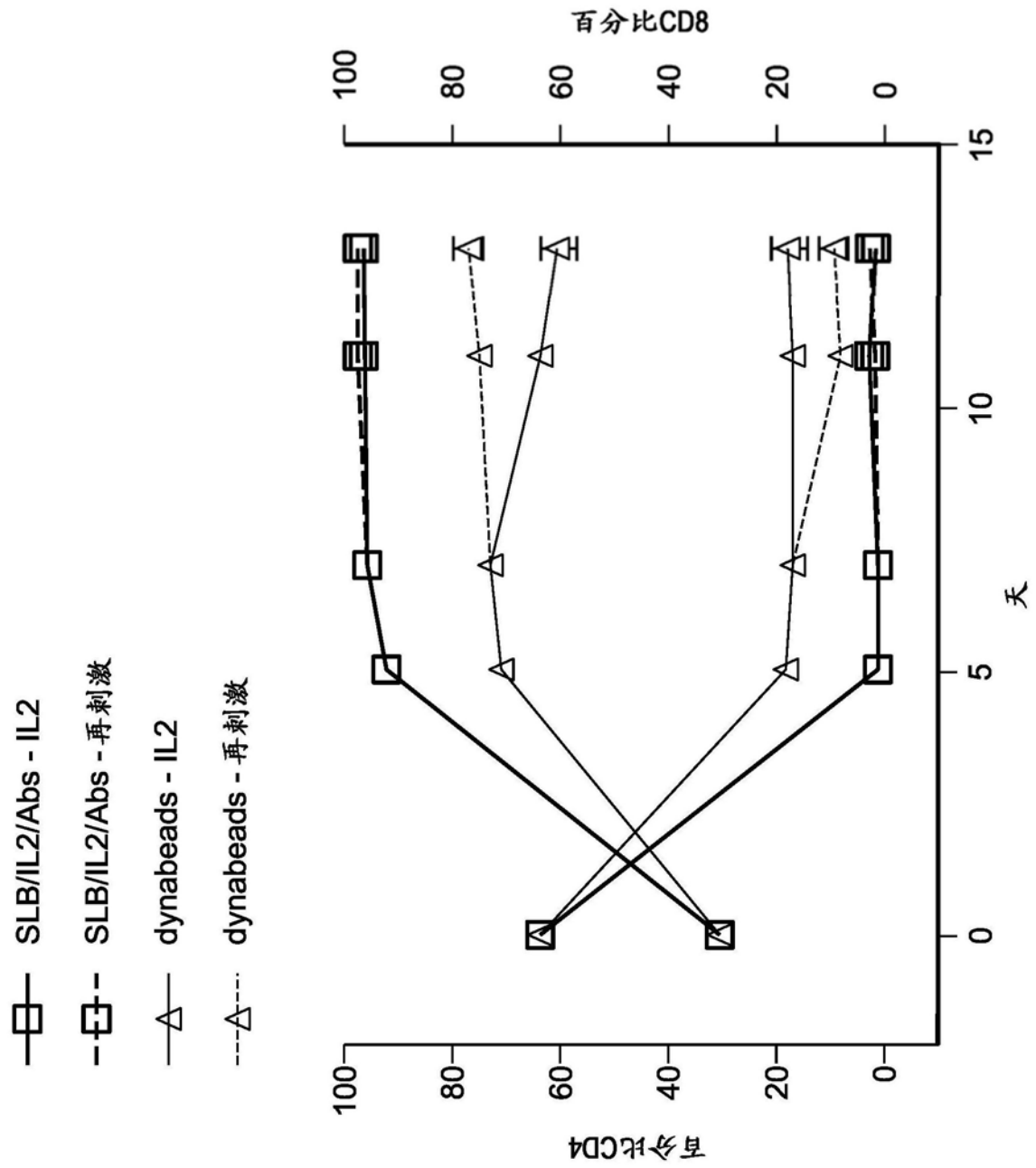


图13B

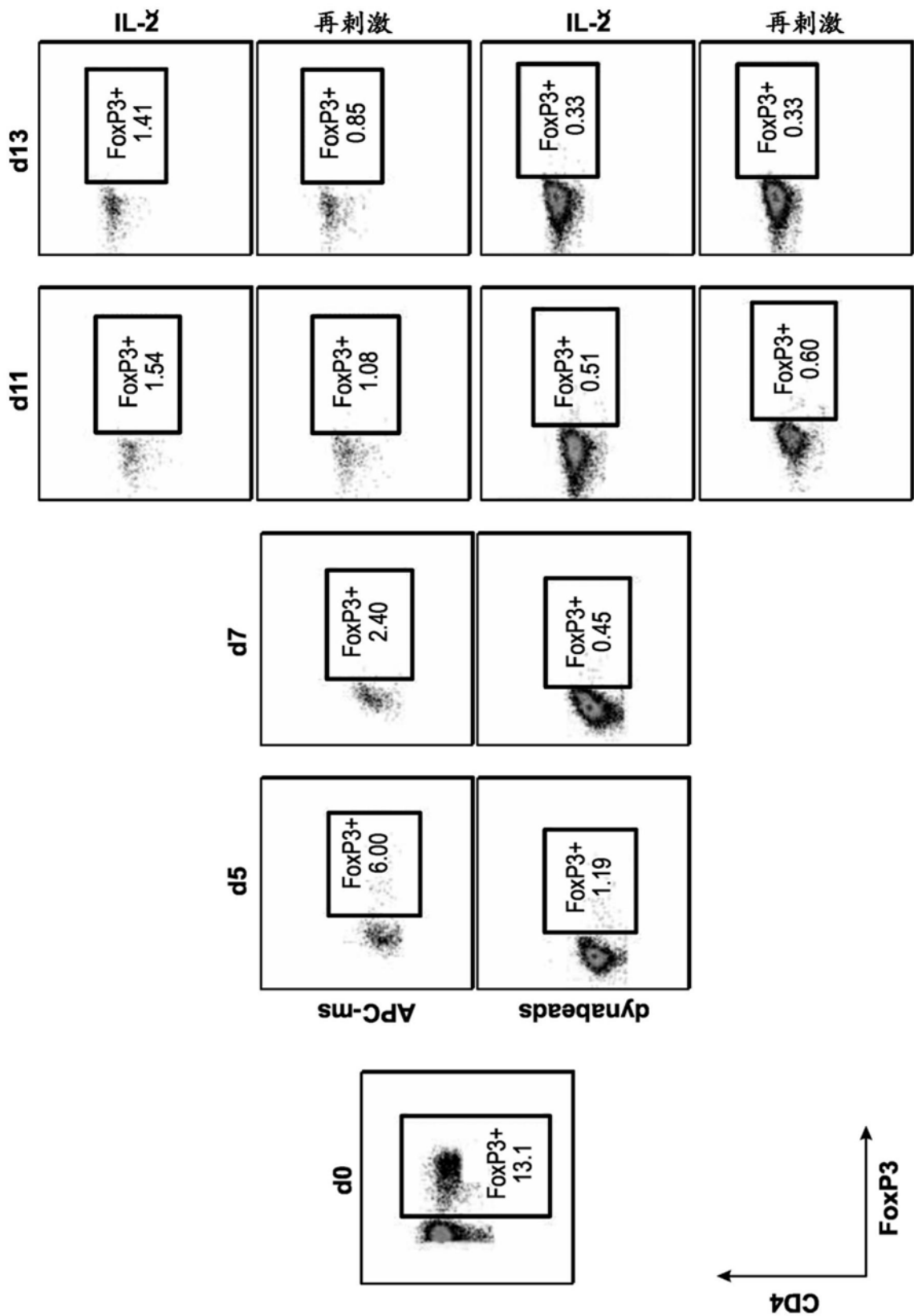


图14

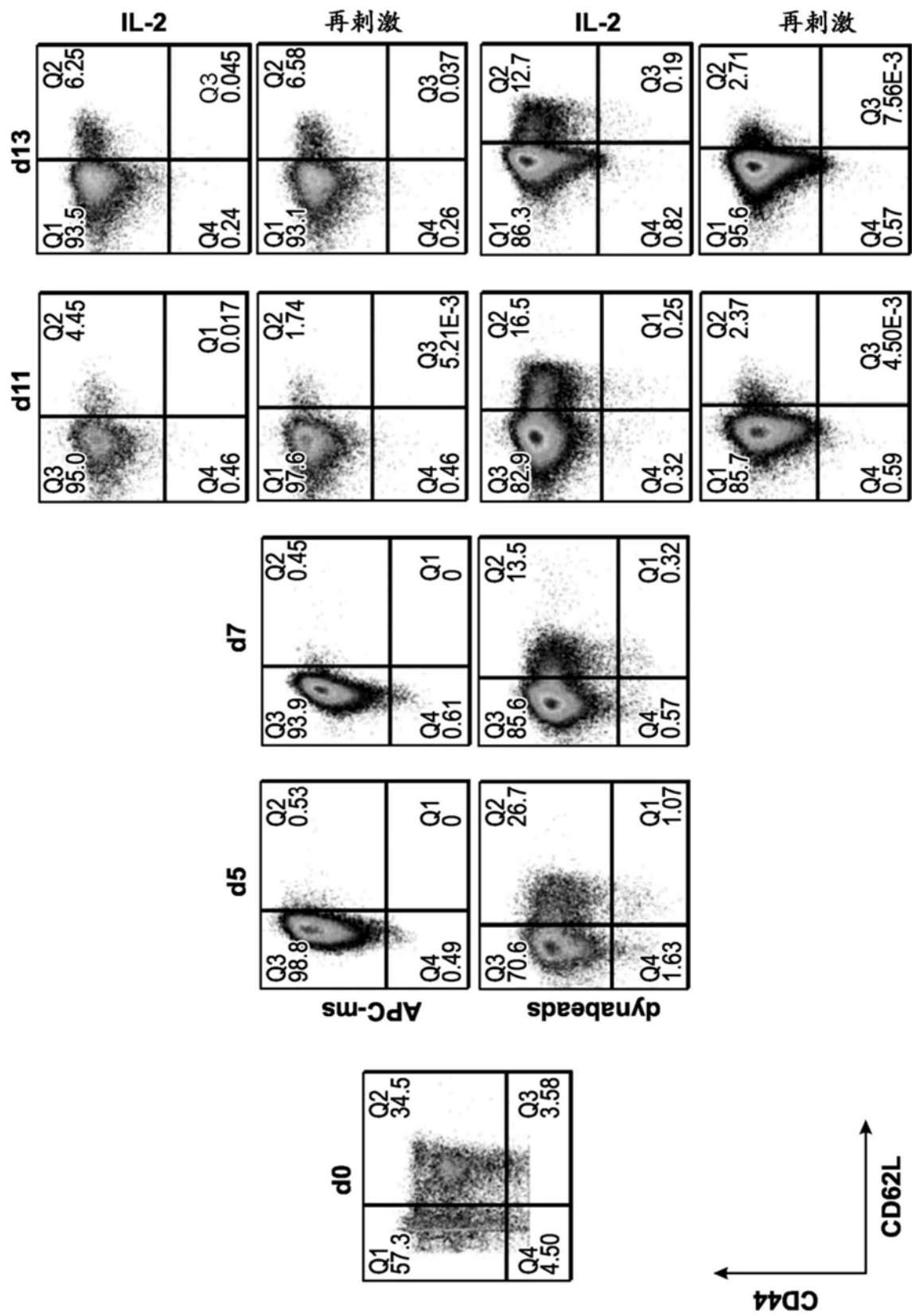


图15

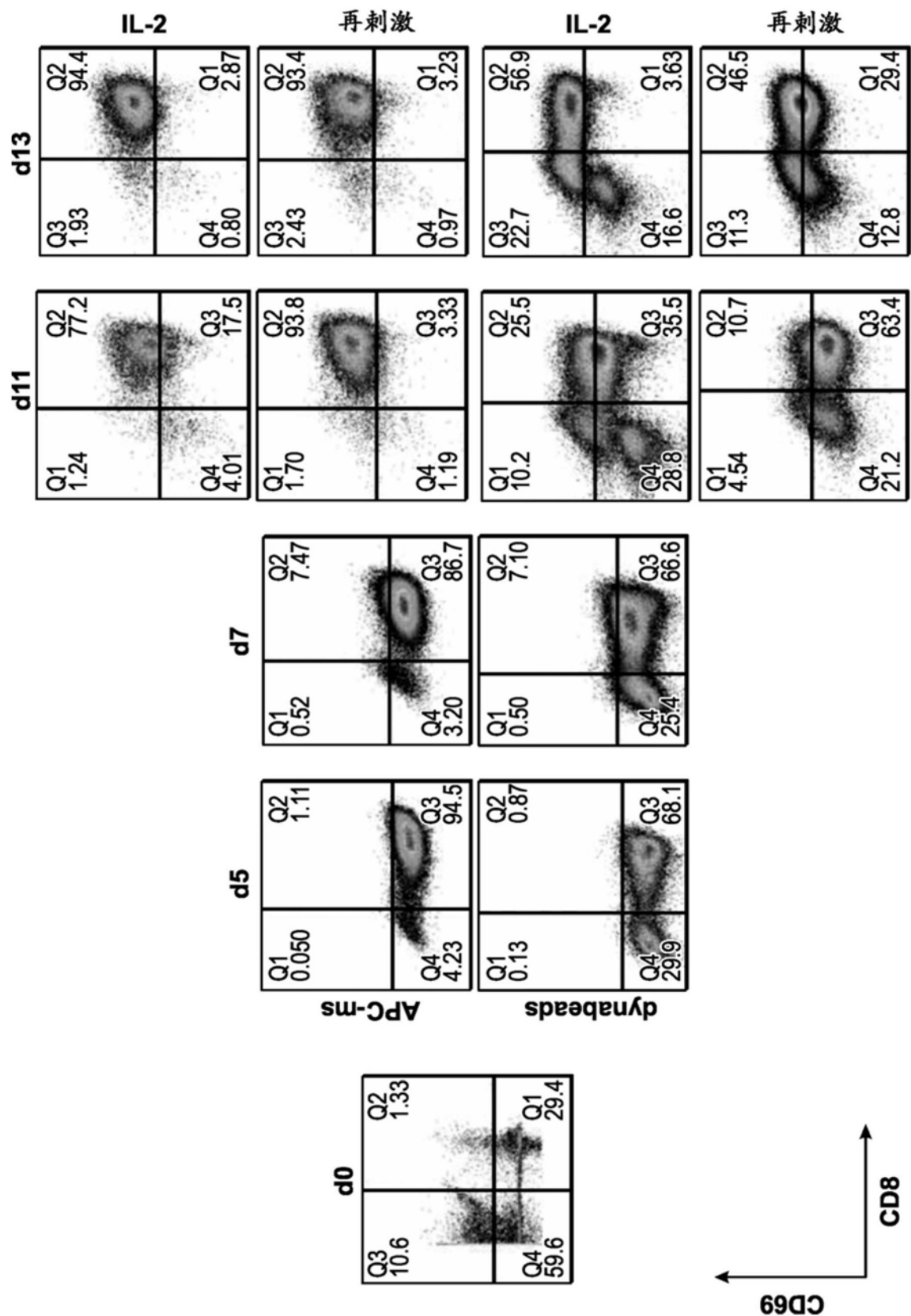


图16

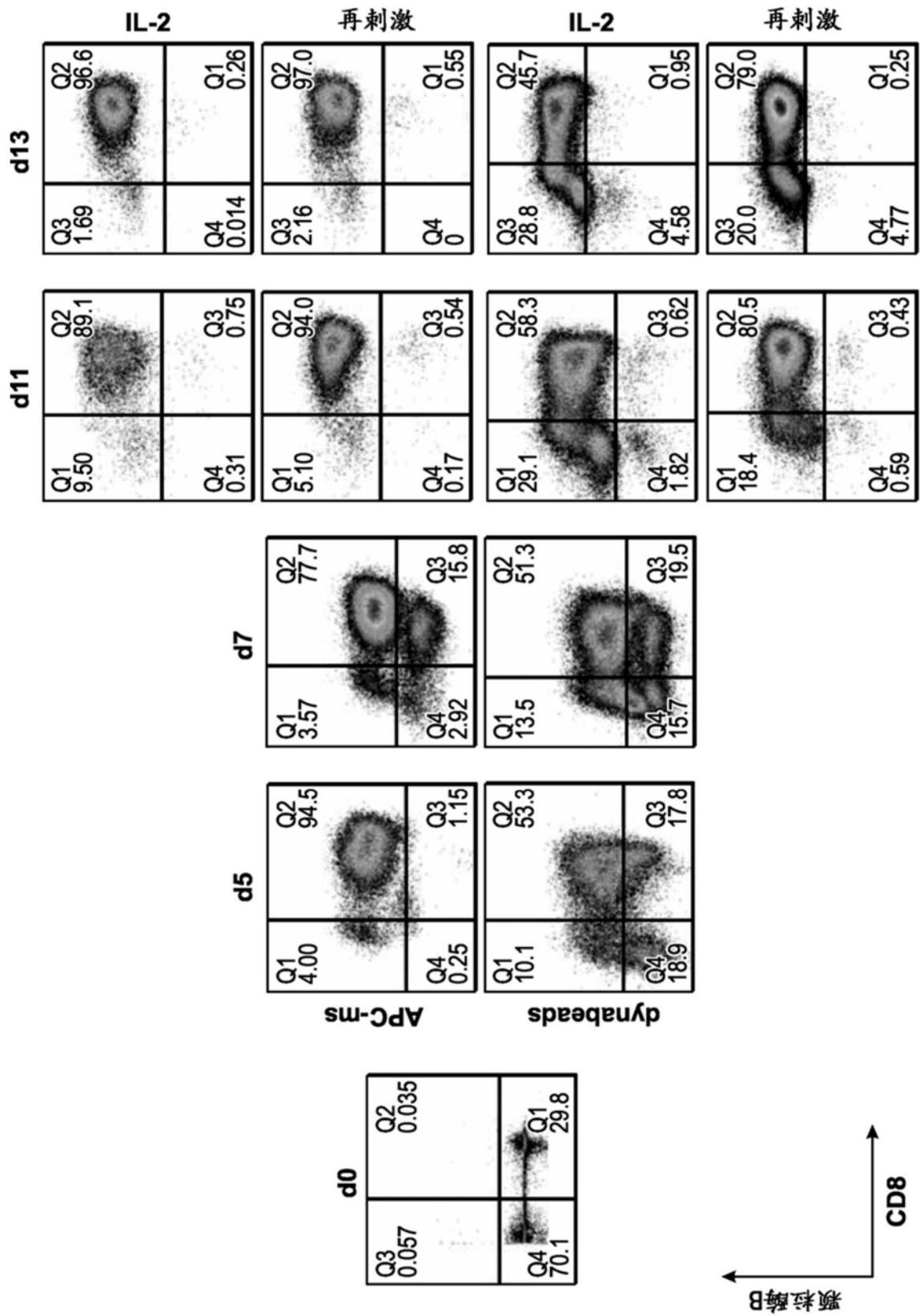


图17

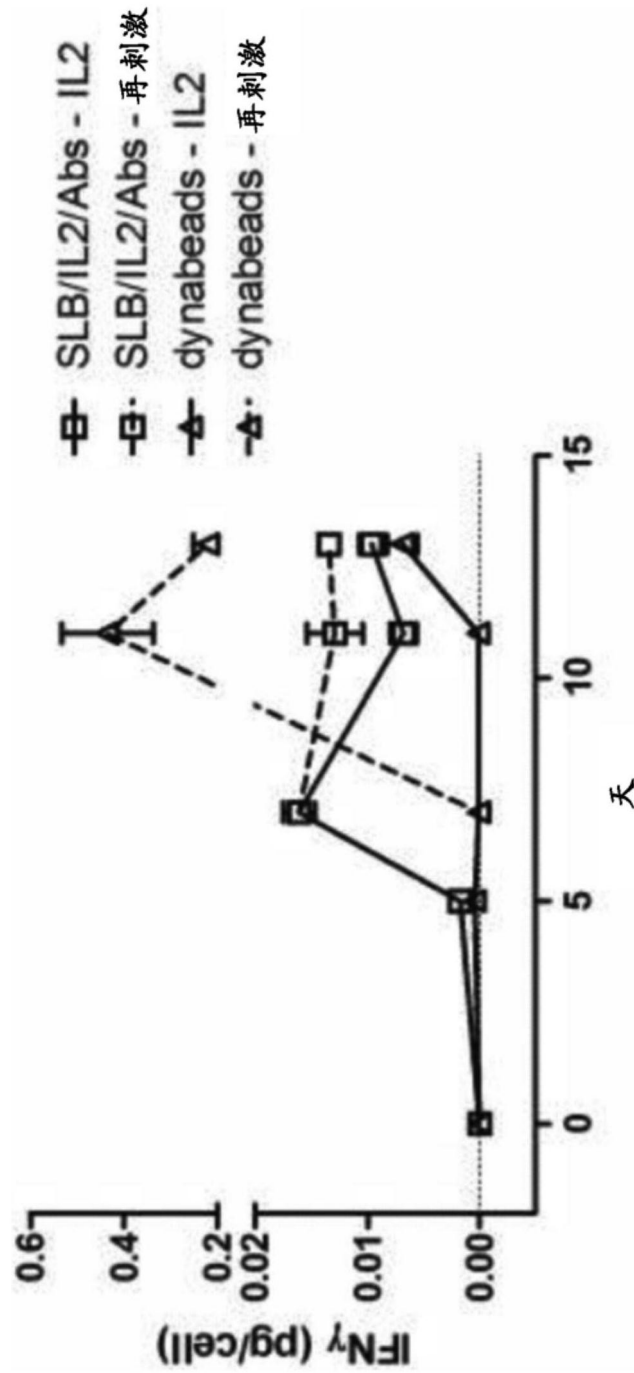


图18

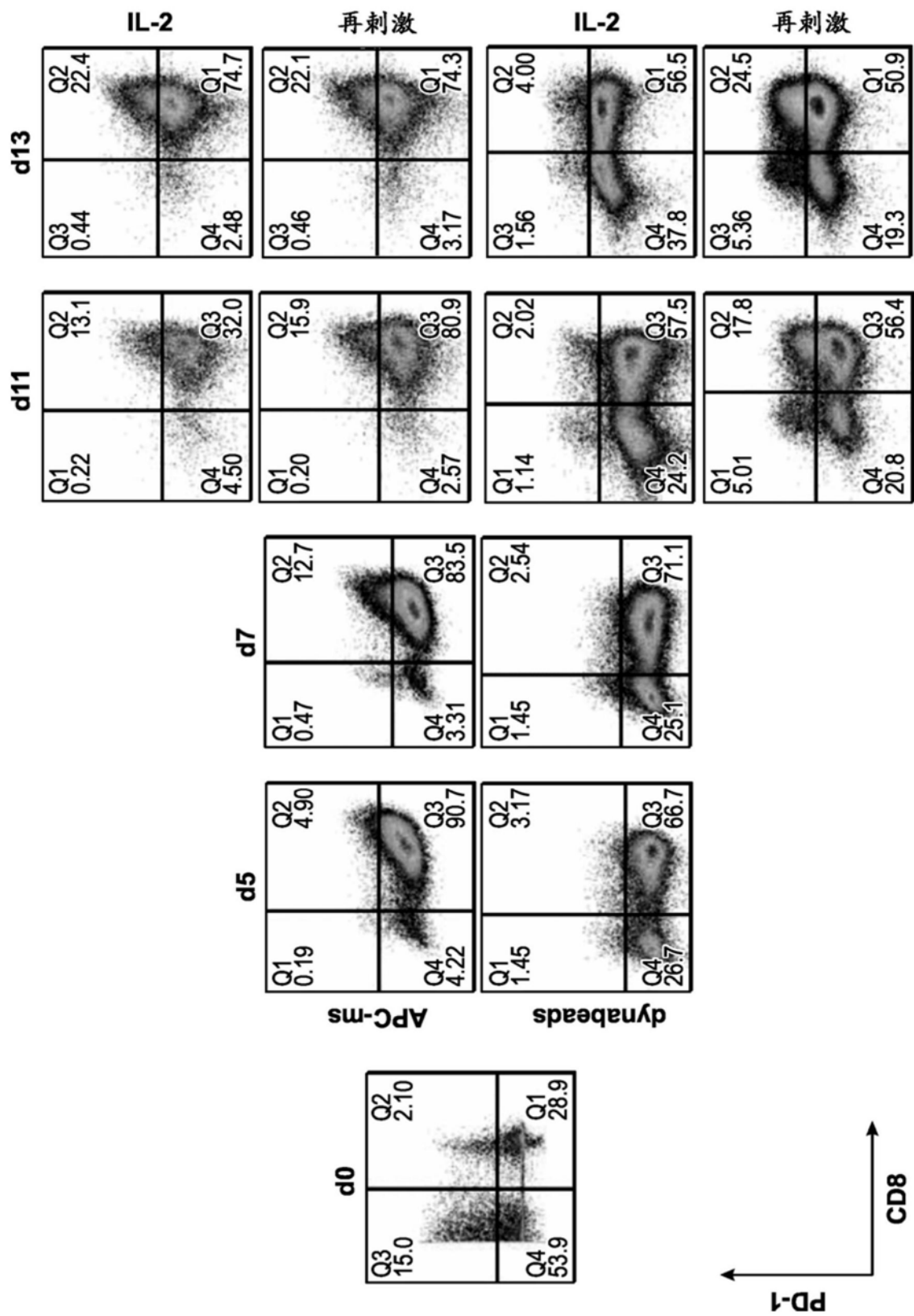


图19

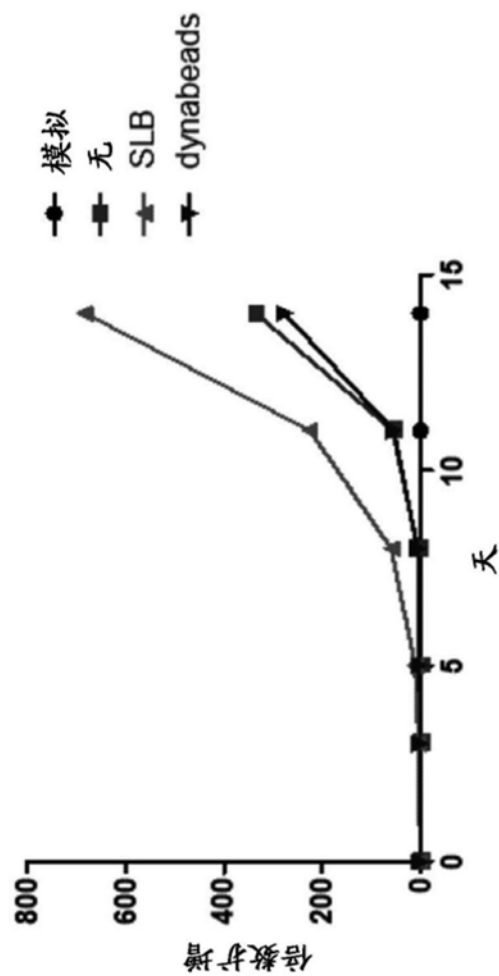


图20A

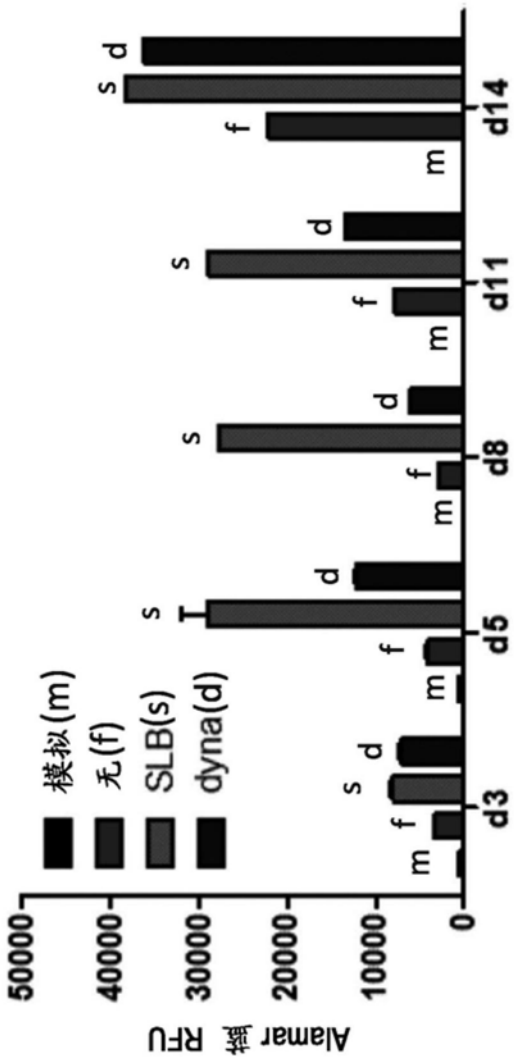


图20B

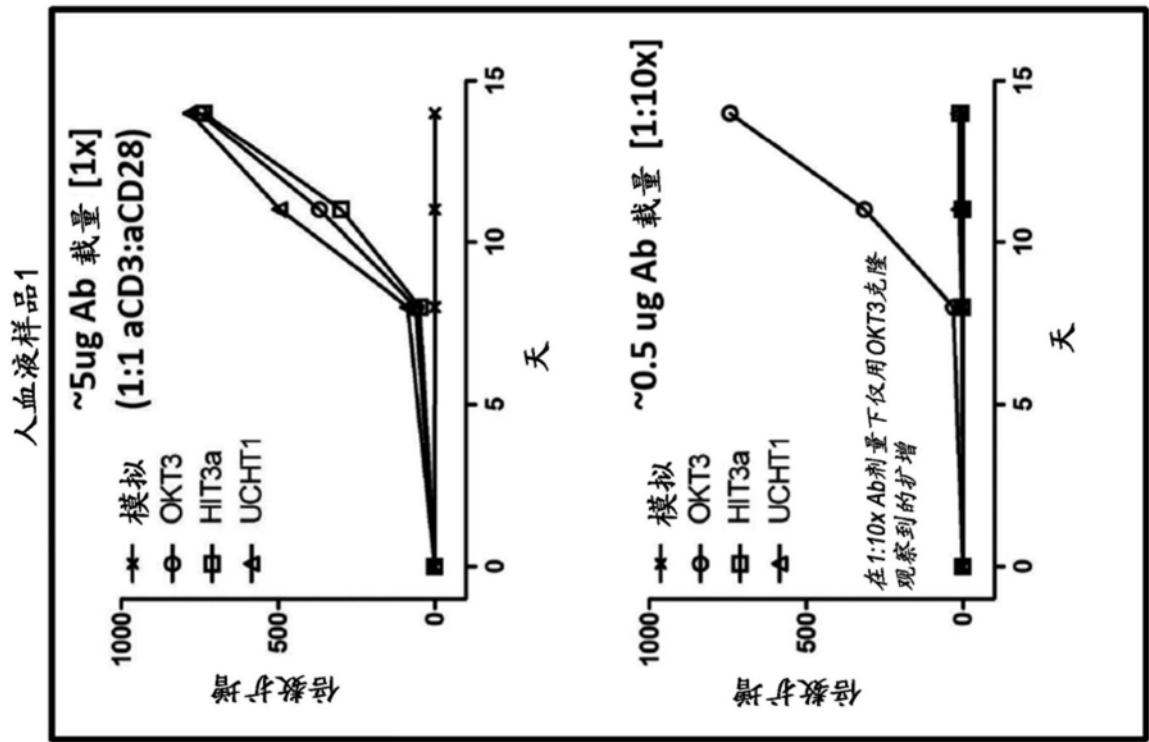


图21A

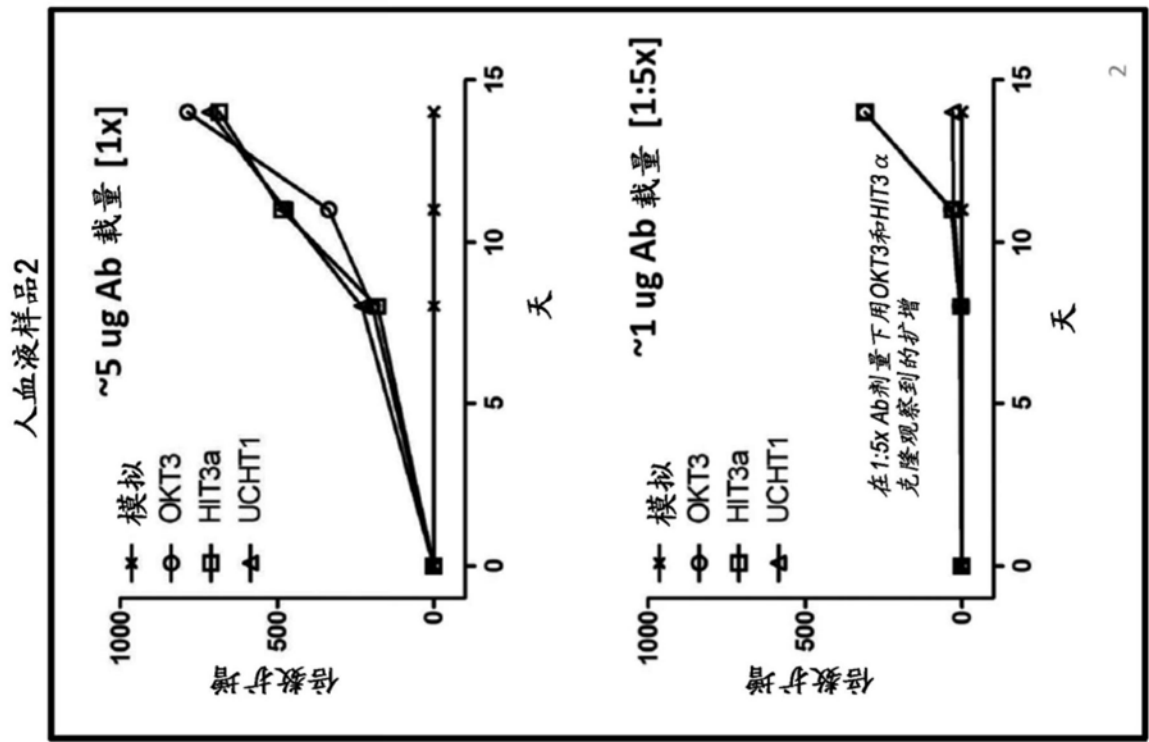


图21B

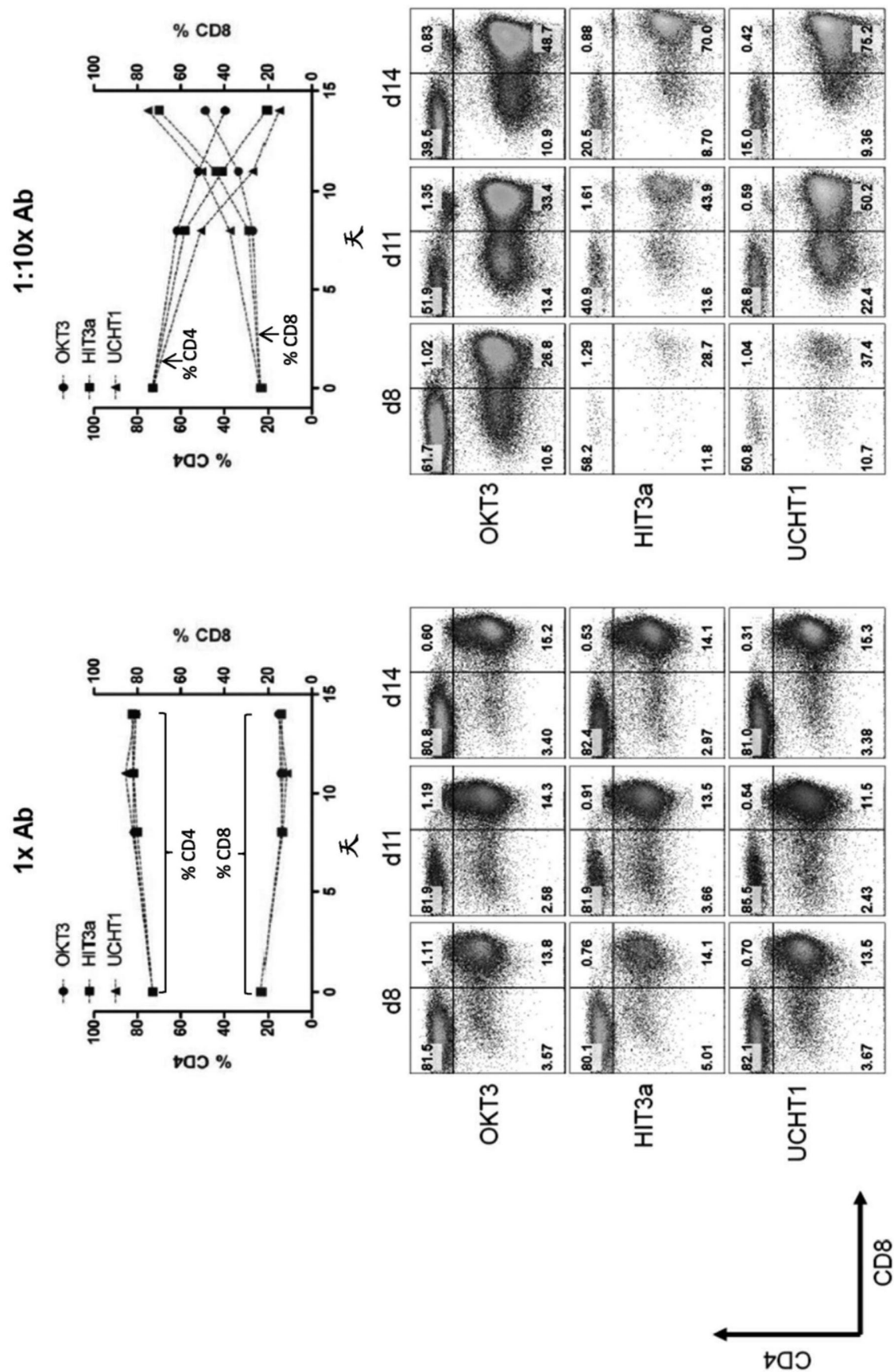


图22

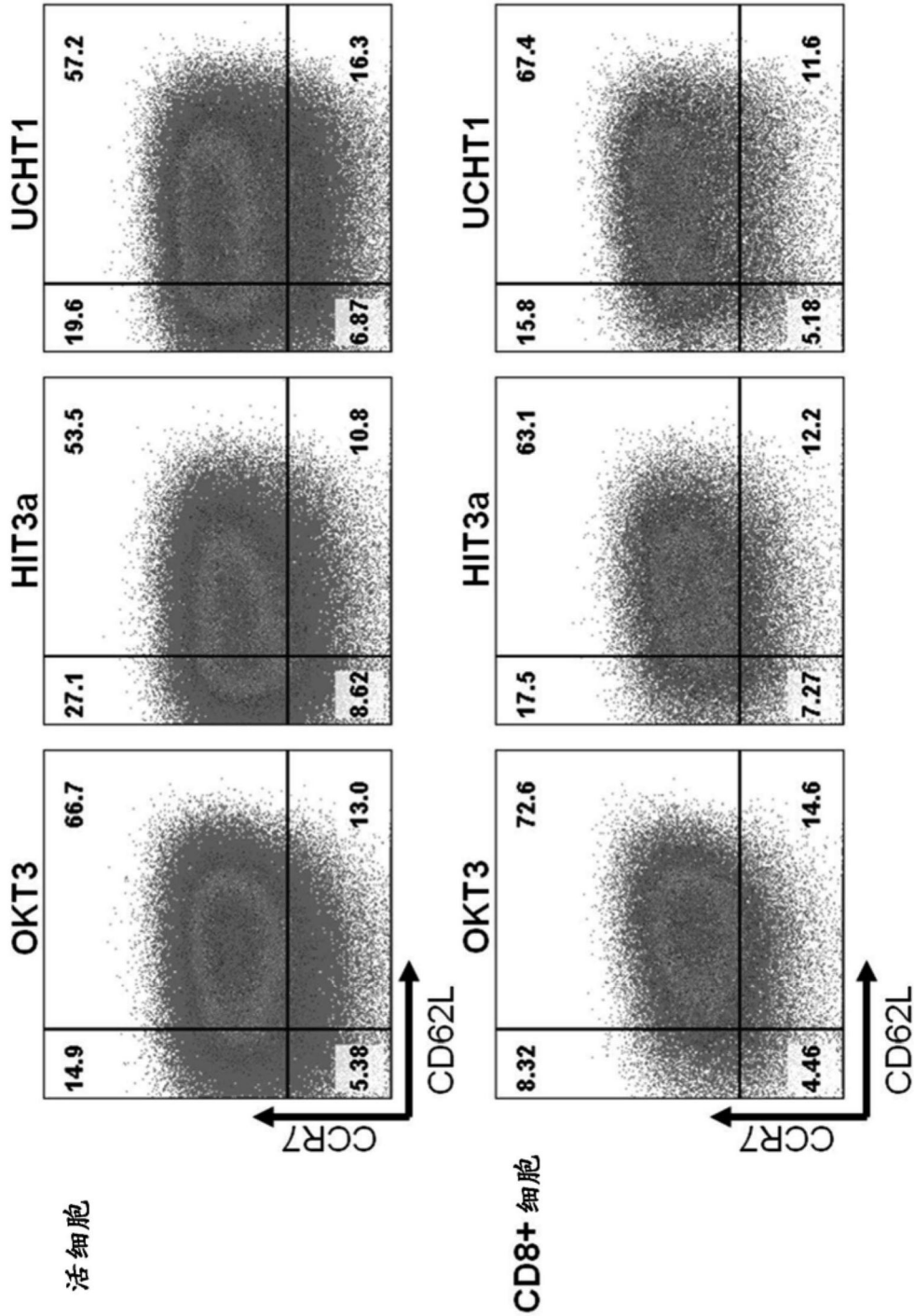


图23

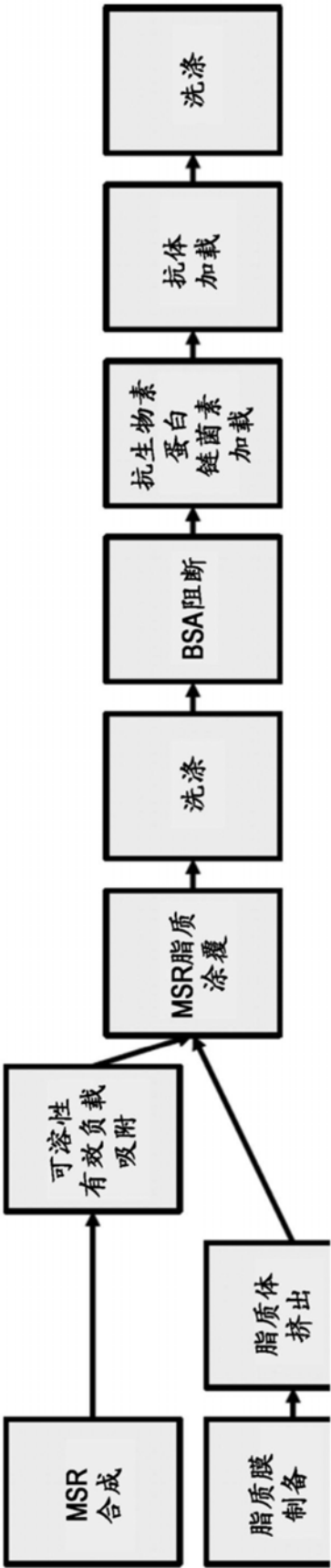


图24

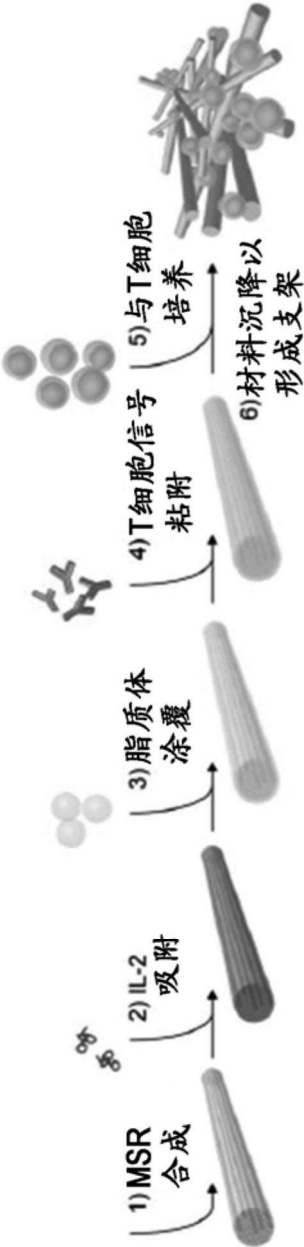


图25A

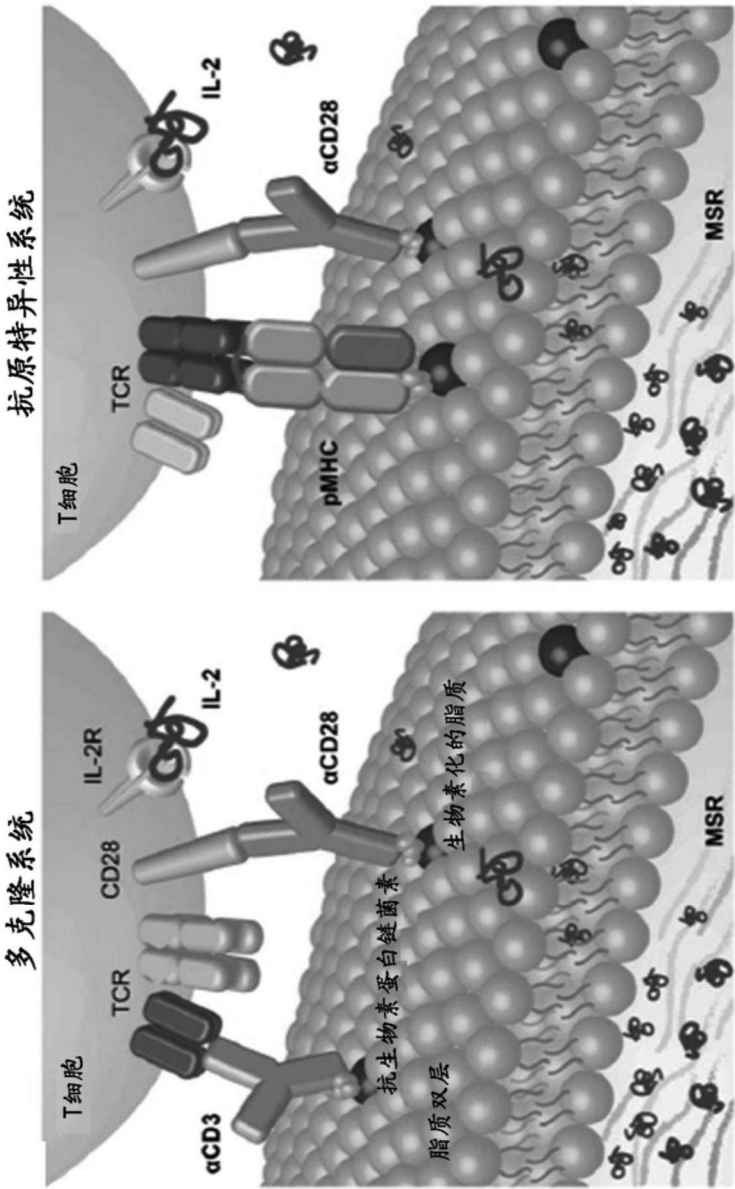


图25B

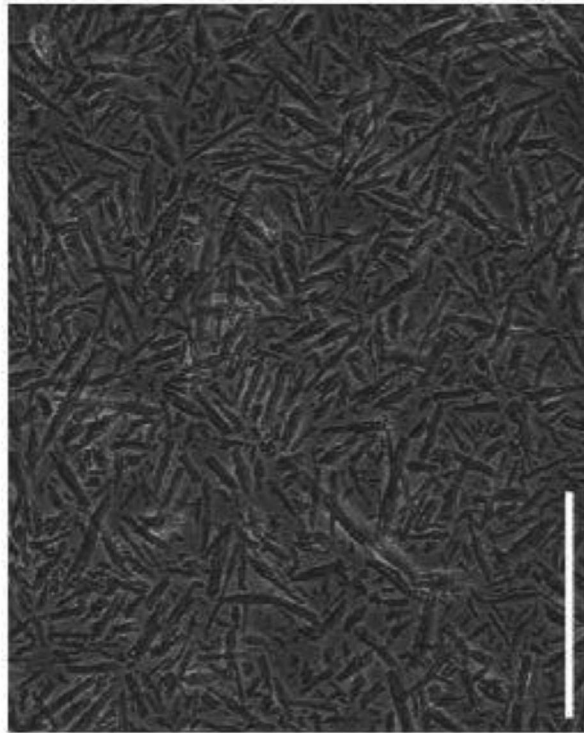


图26A

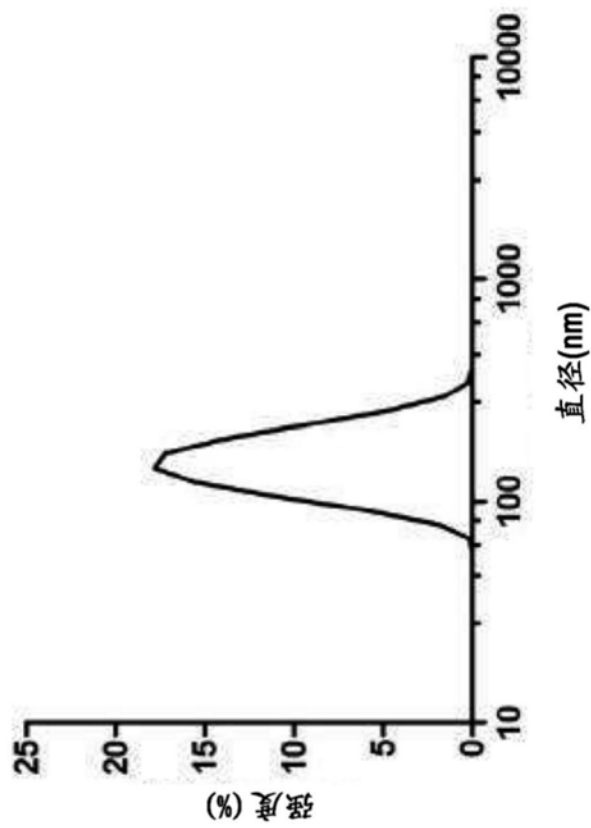


图26B

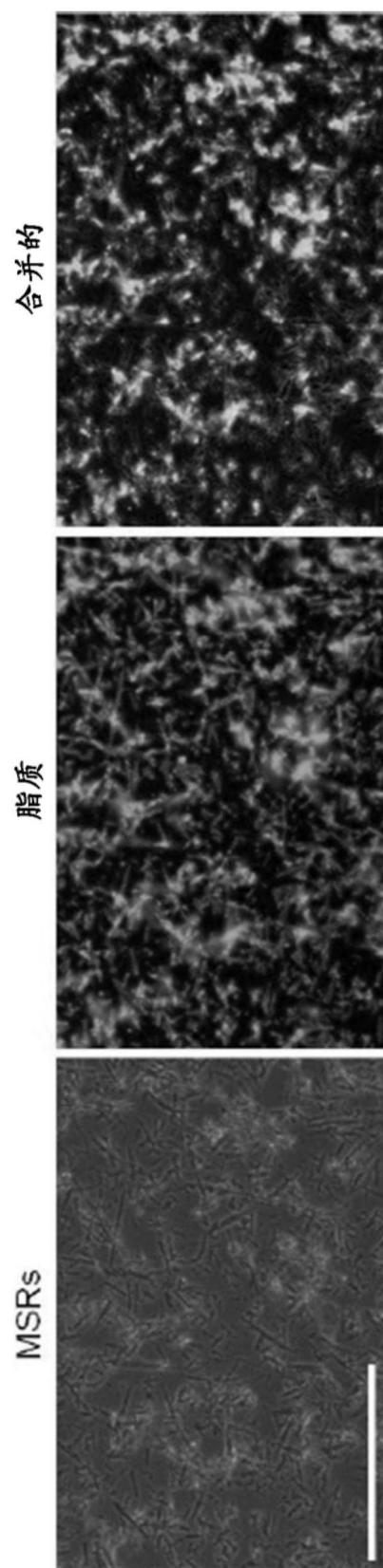


图27A

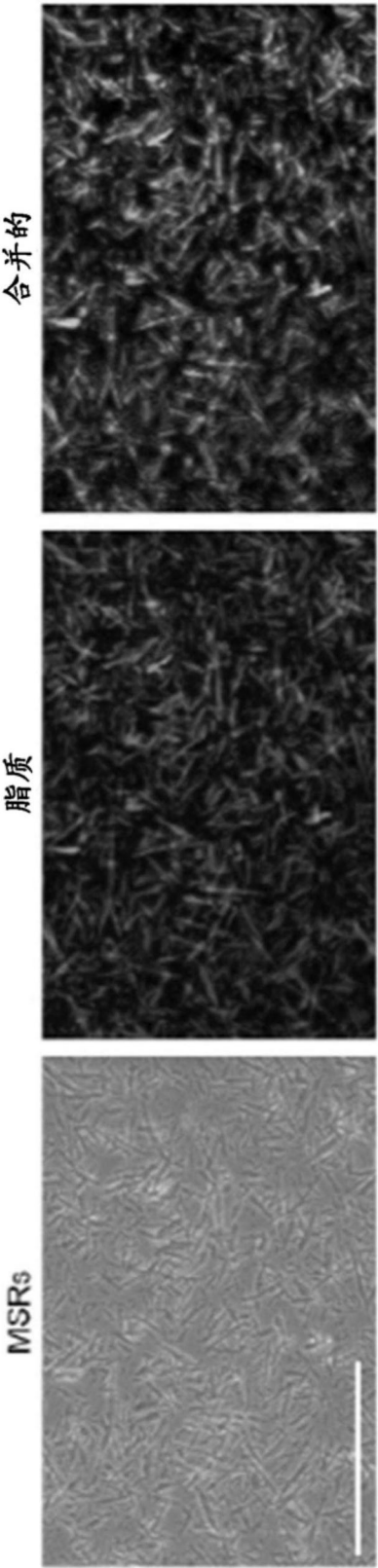


图27B

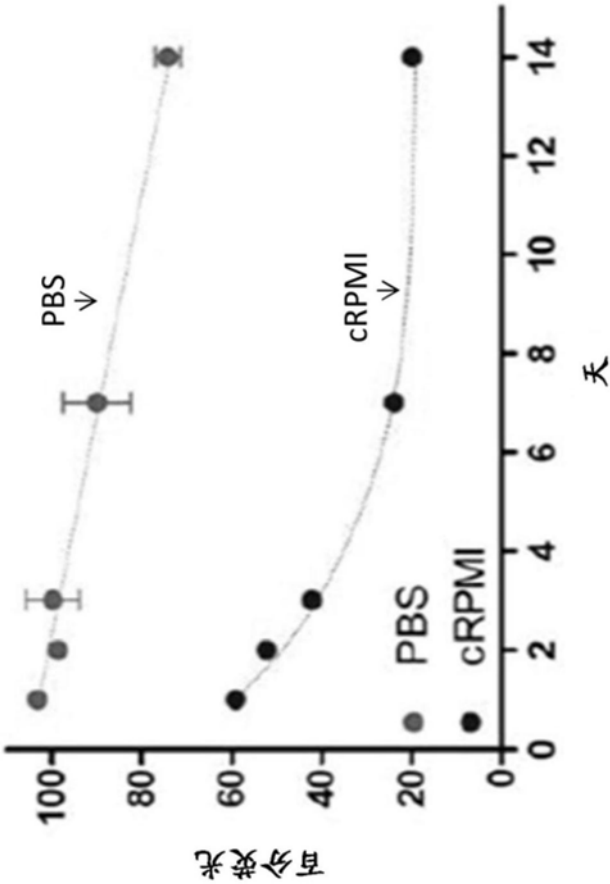


图28A

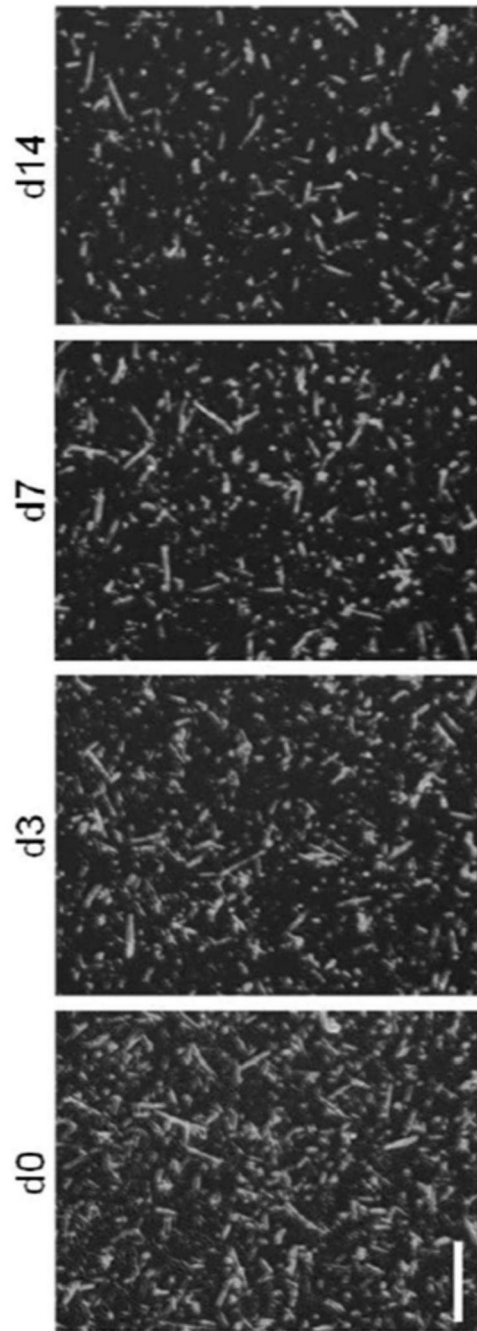


图28B

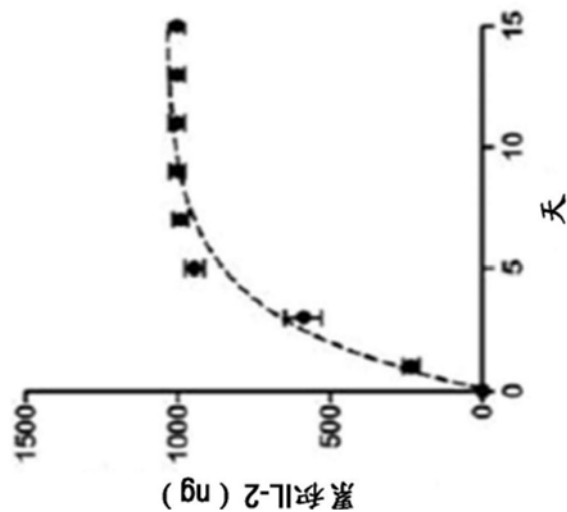


图28C

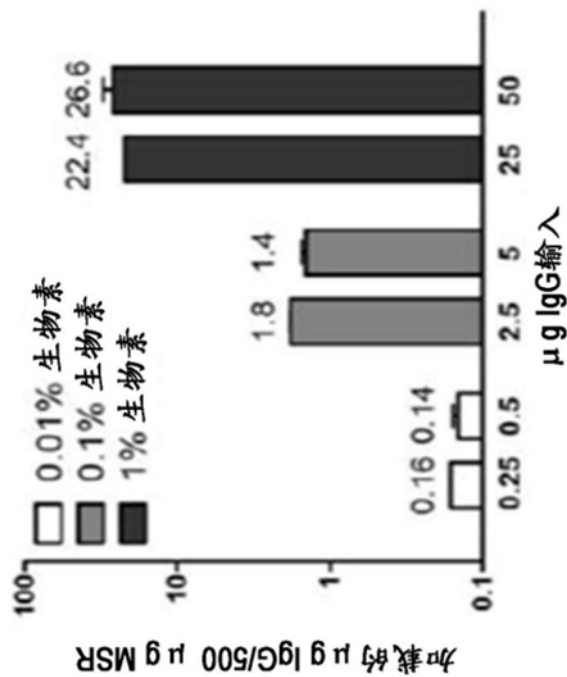


图28D

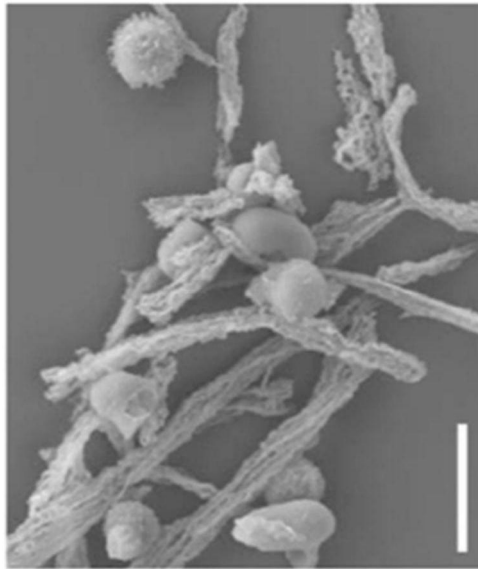


图28E

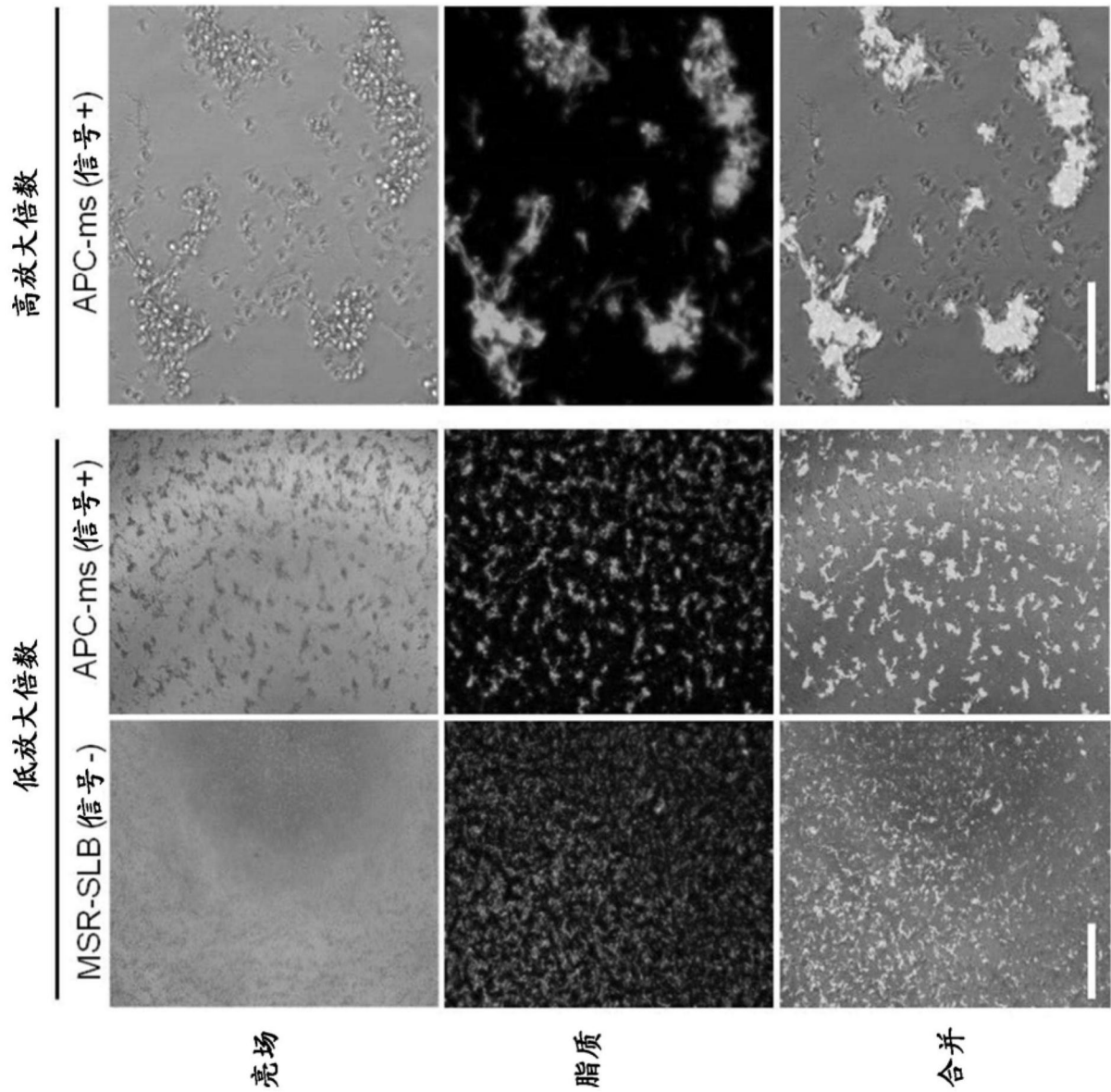


图29

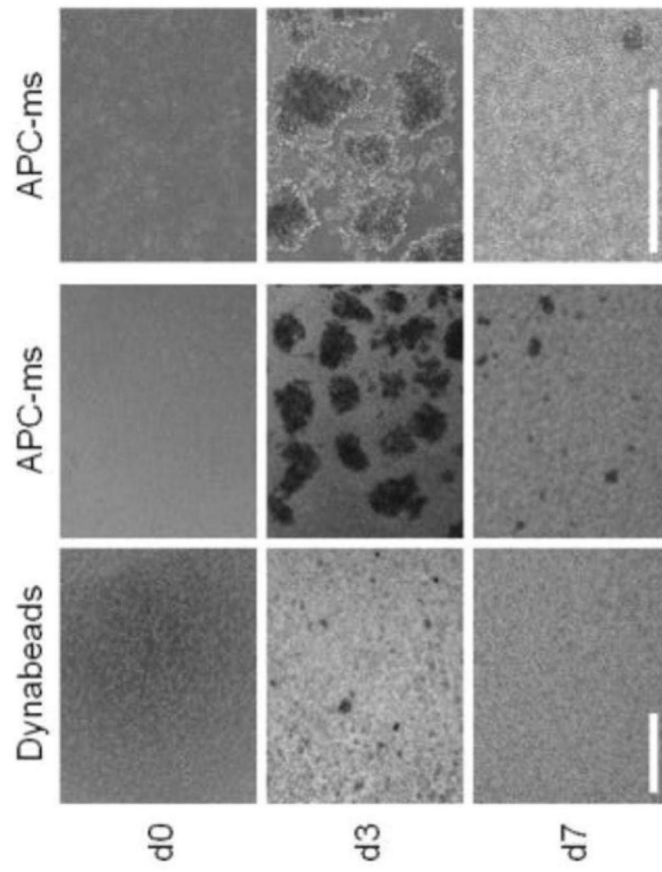


图30A

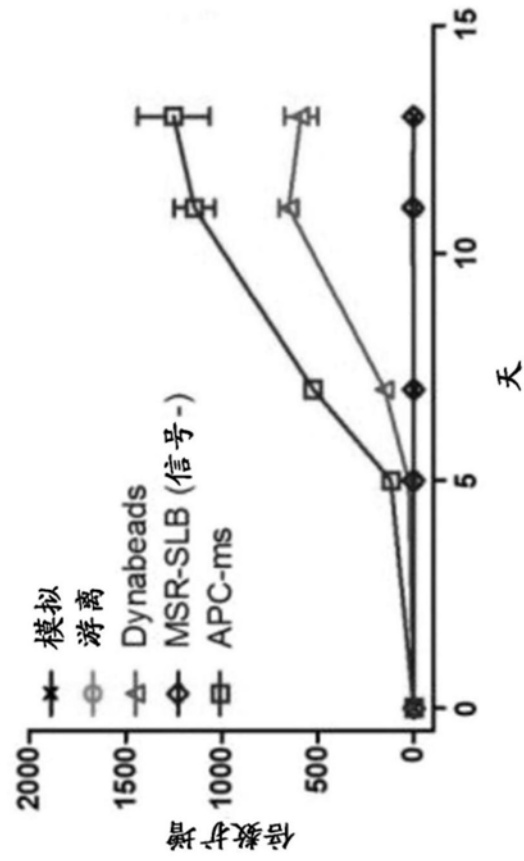


图30B

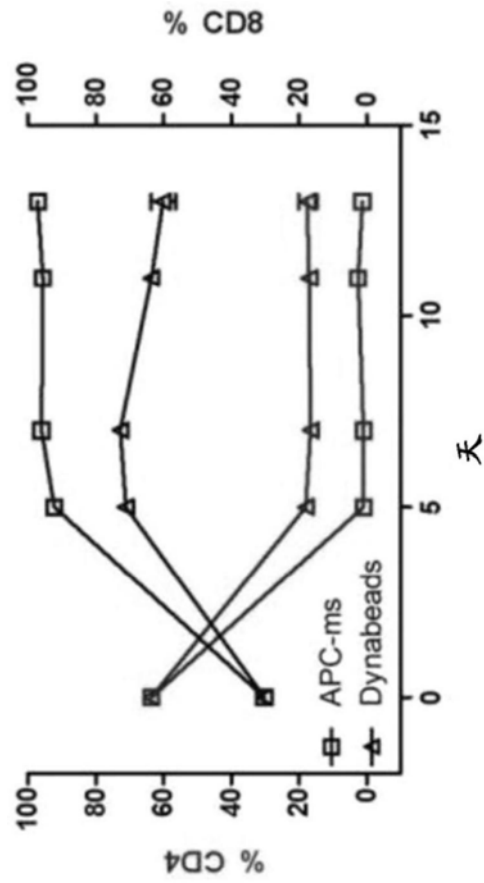


图30C

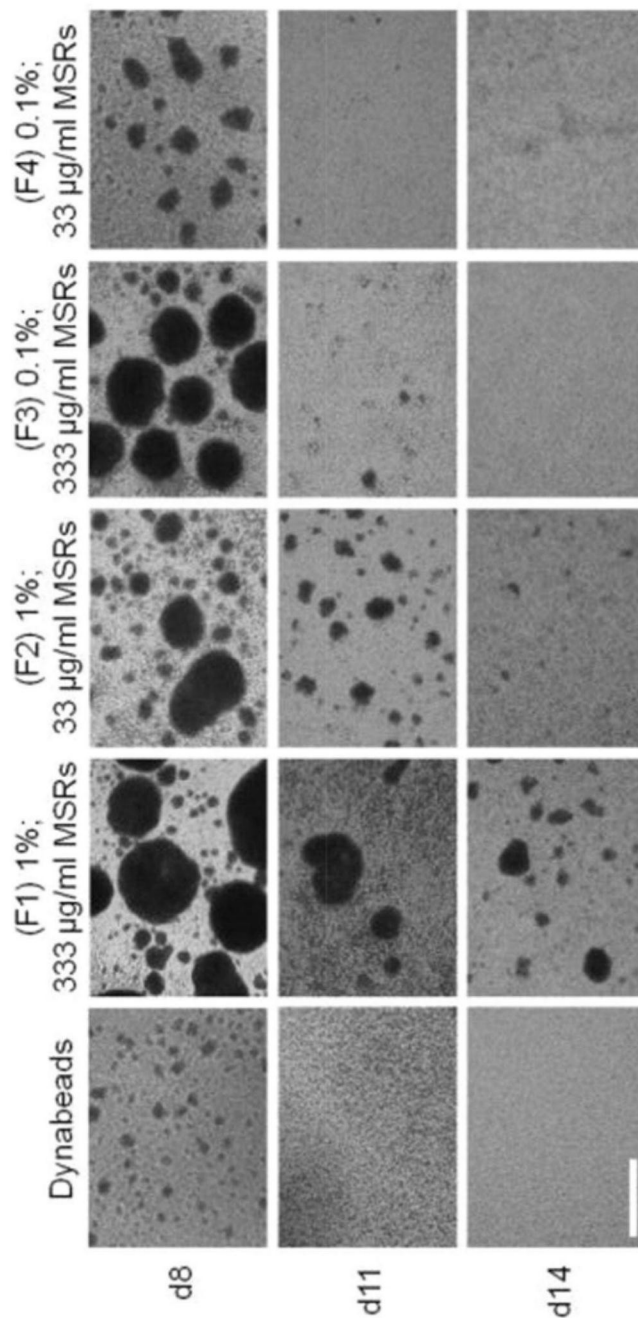


图30D

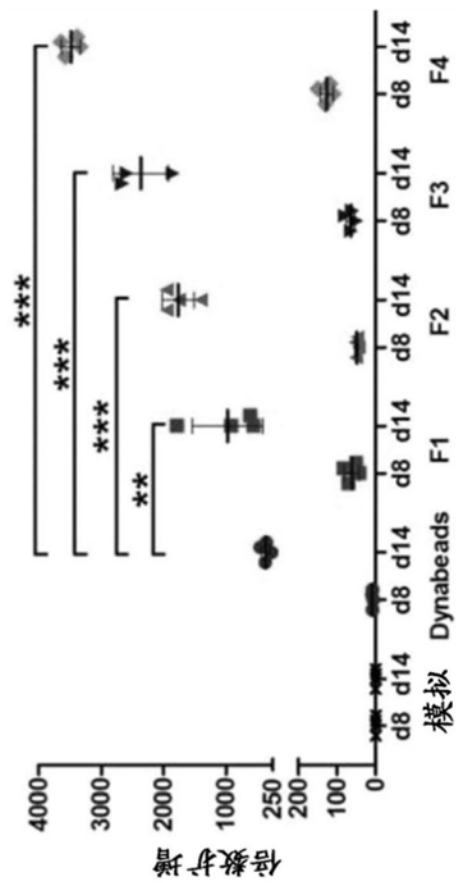


图30E

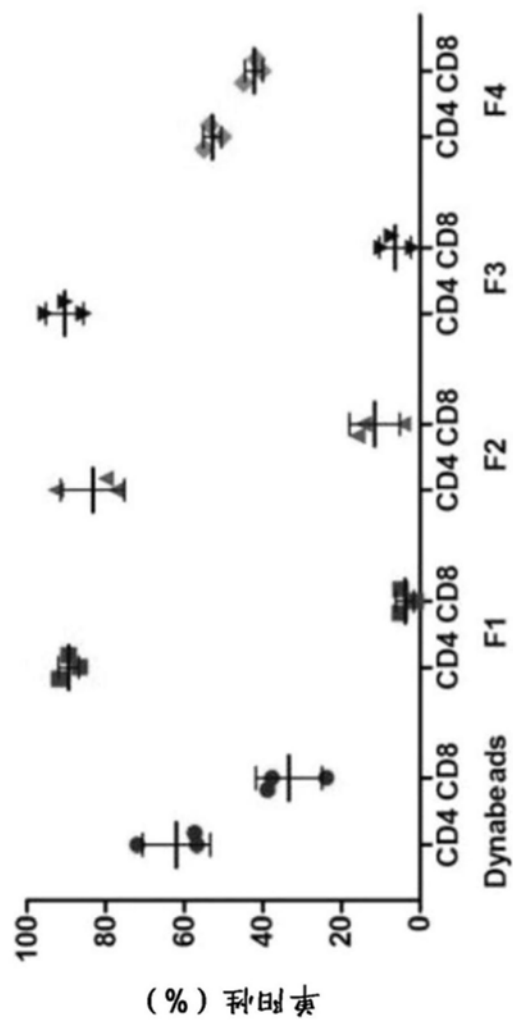


图30F

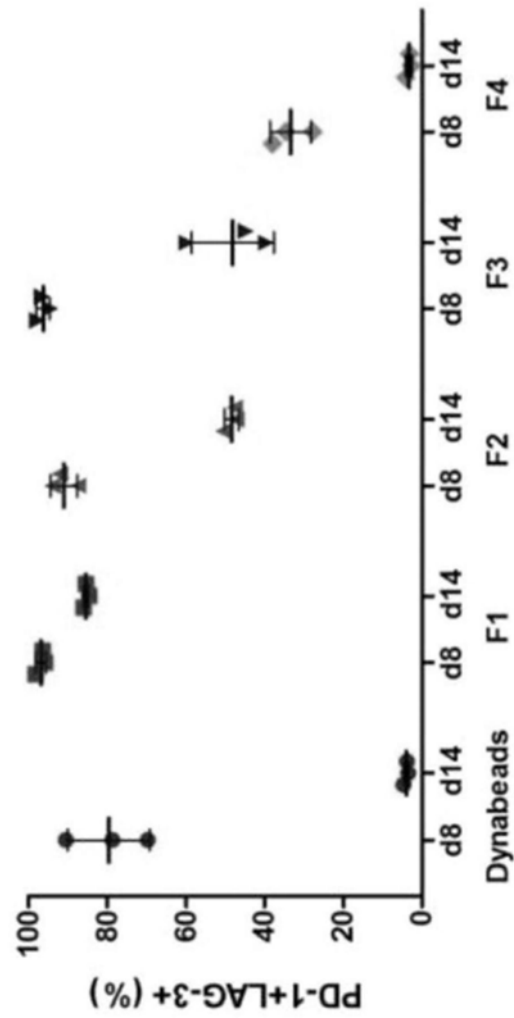


图30G

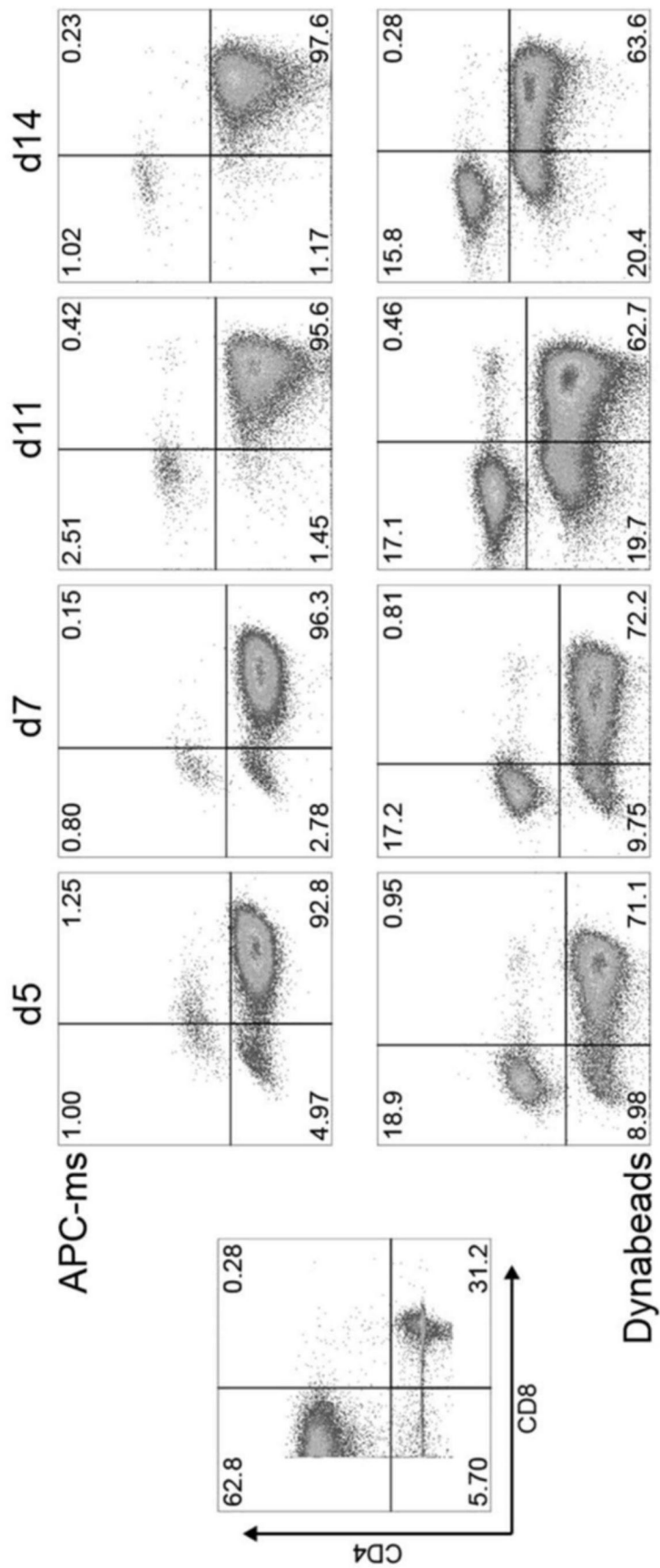


图31

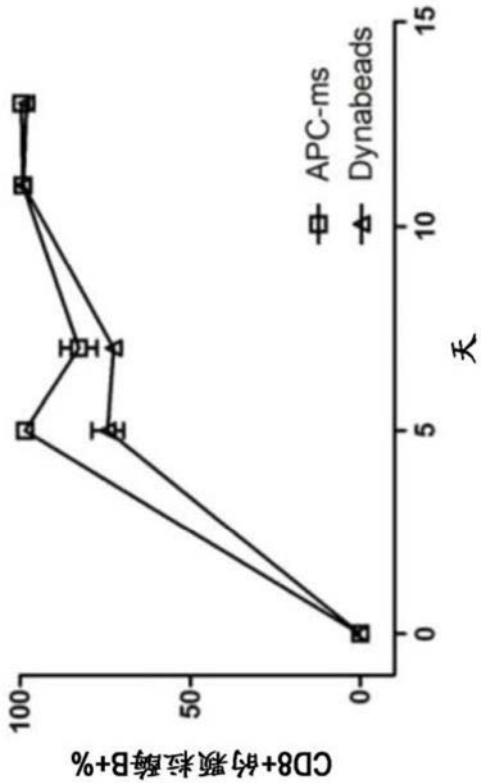


图32A

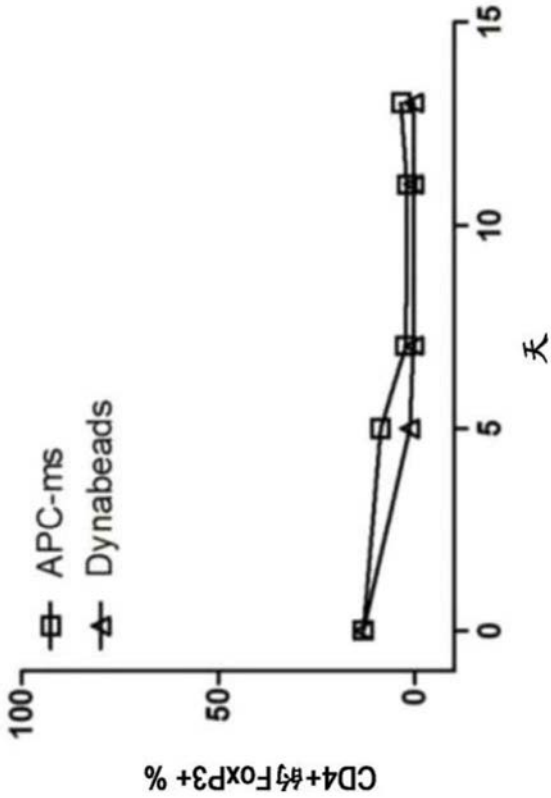


图32B

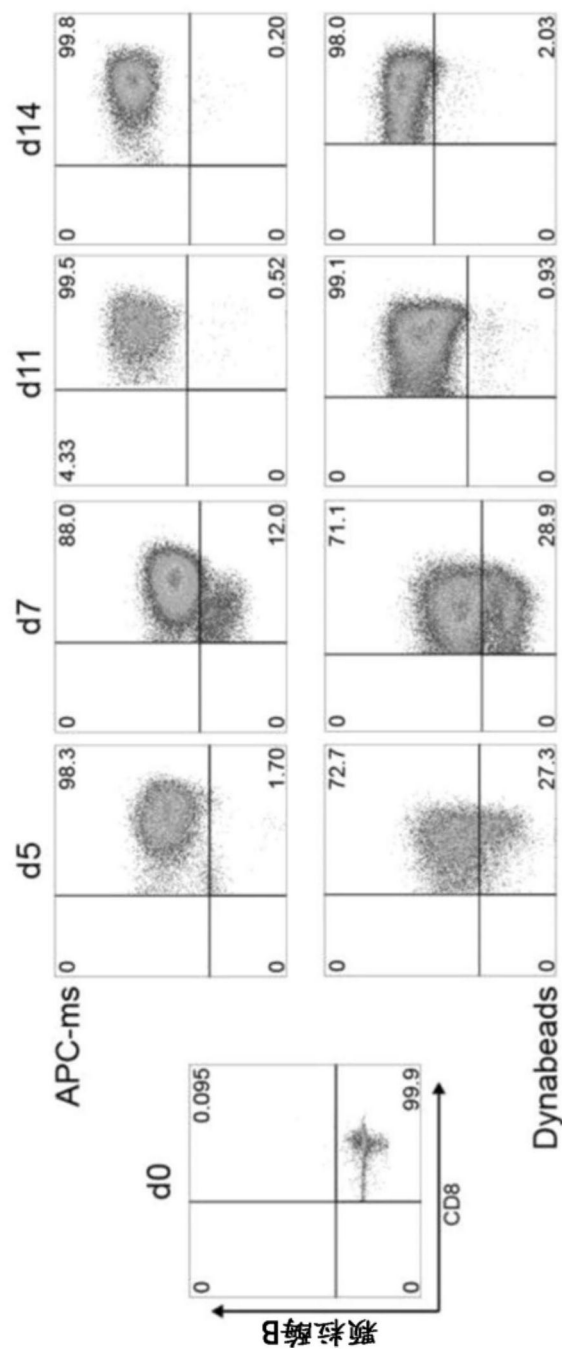


图32C

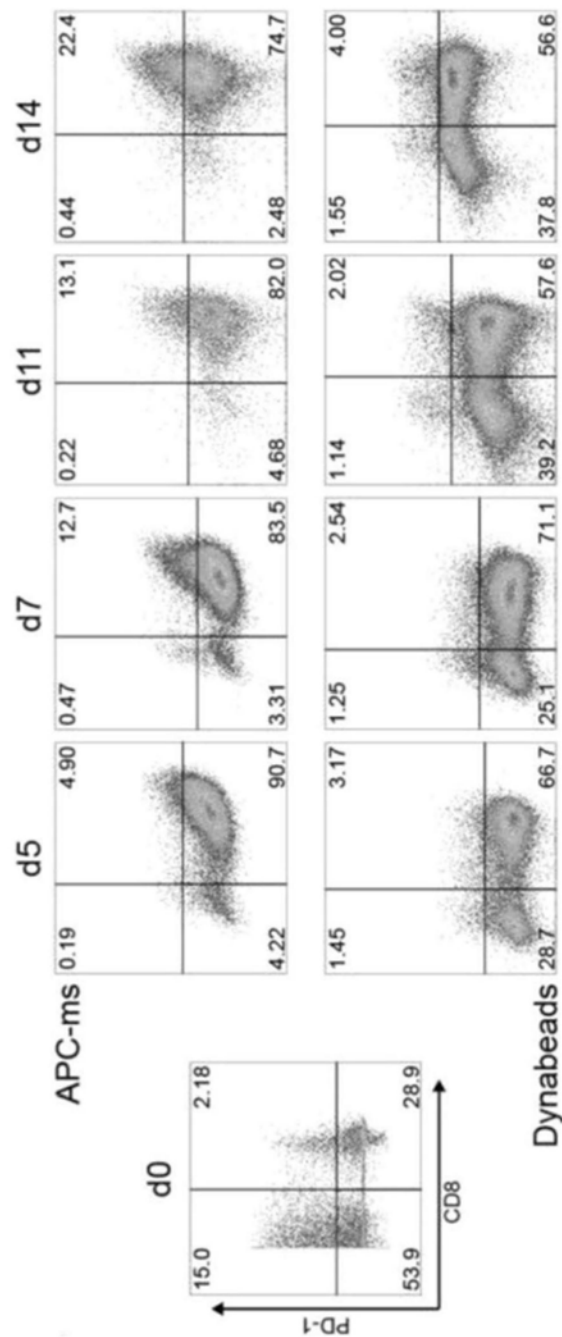


图32D

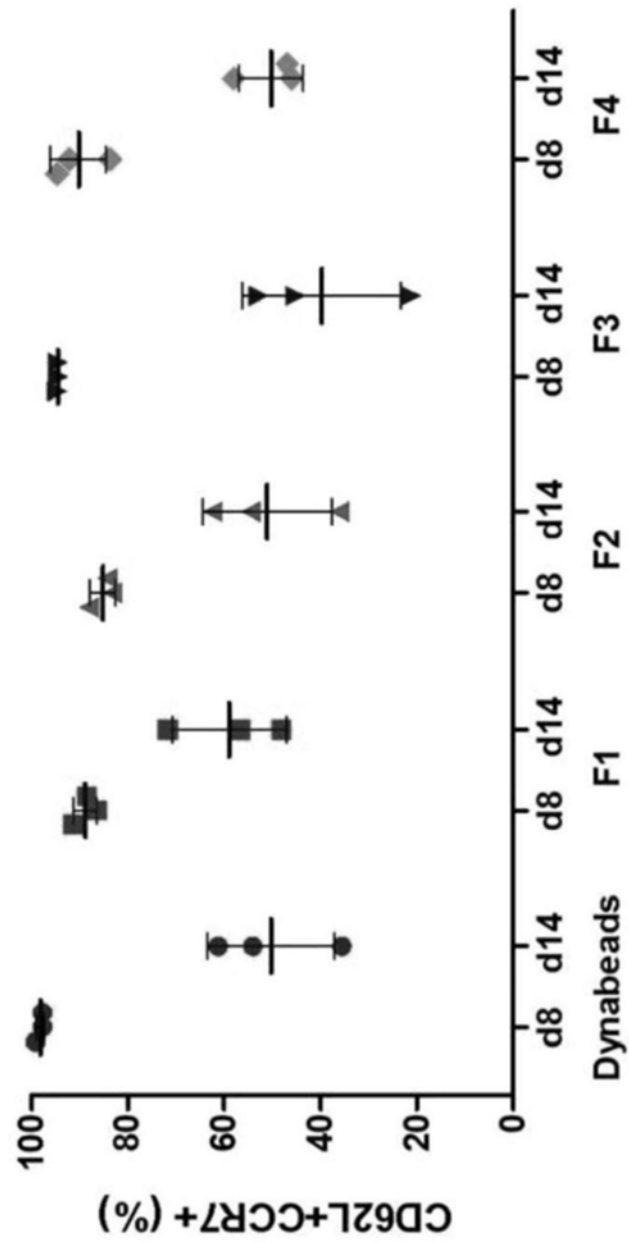


图33

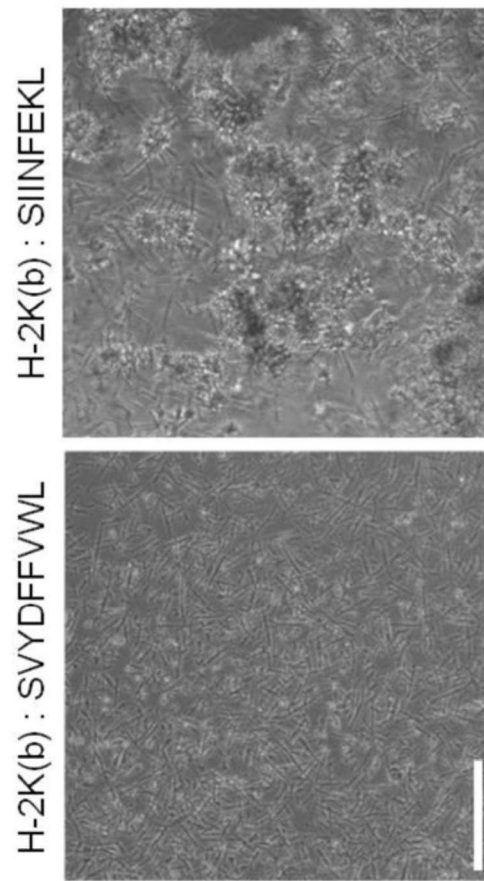


图34A

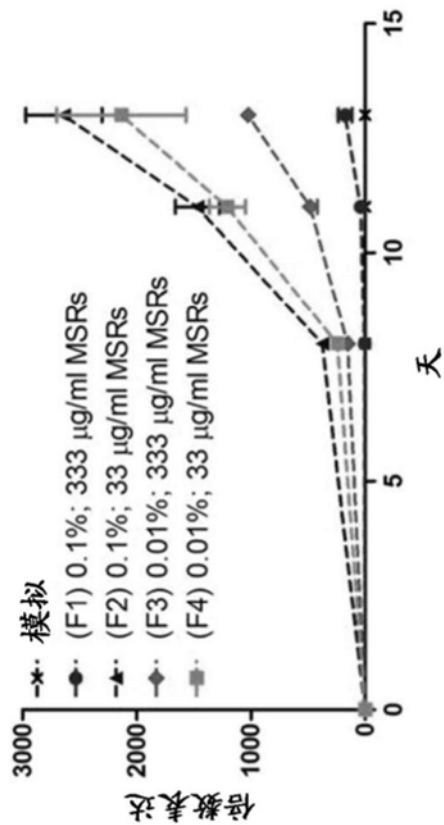


图34B

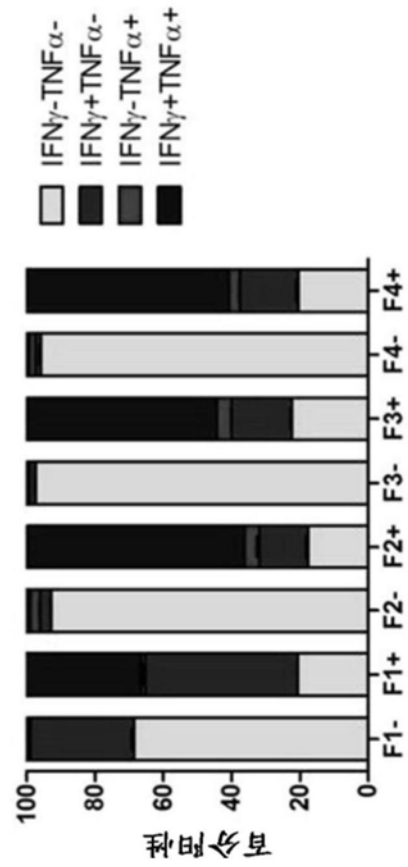


图34C

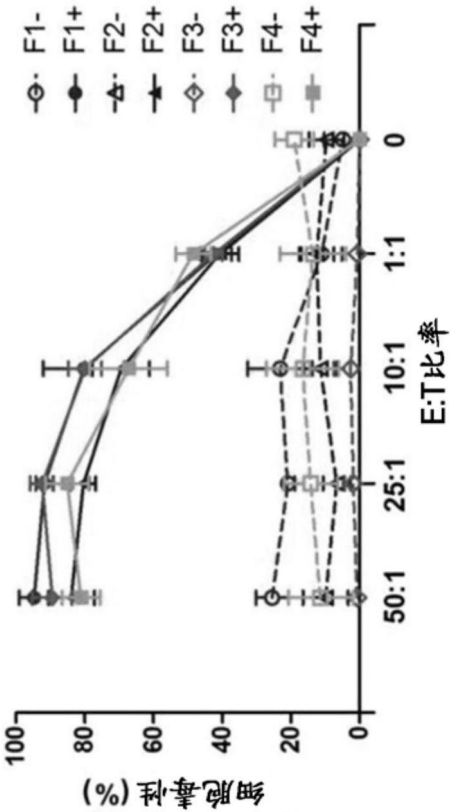


图34D

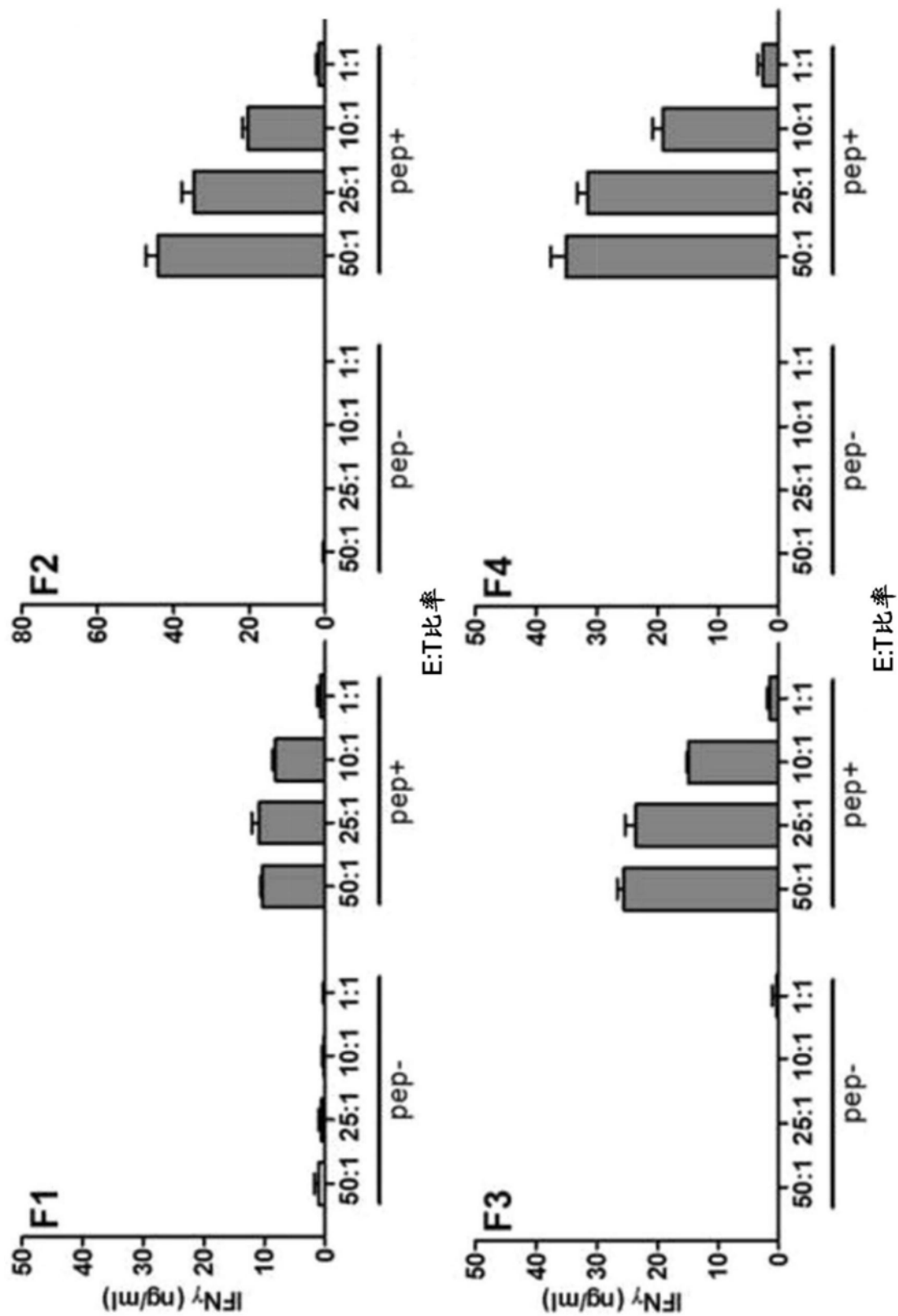


图34E

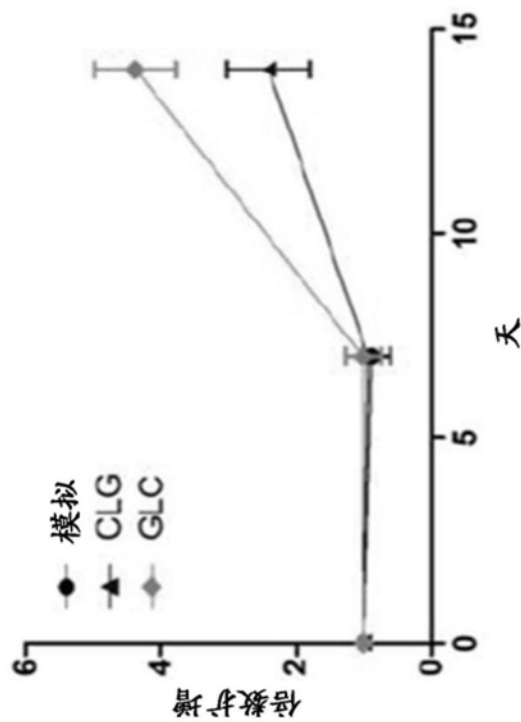


图35A

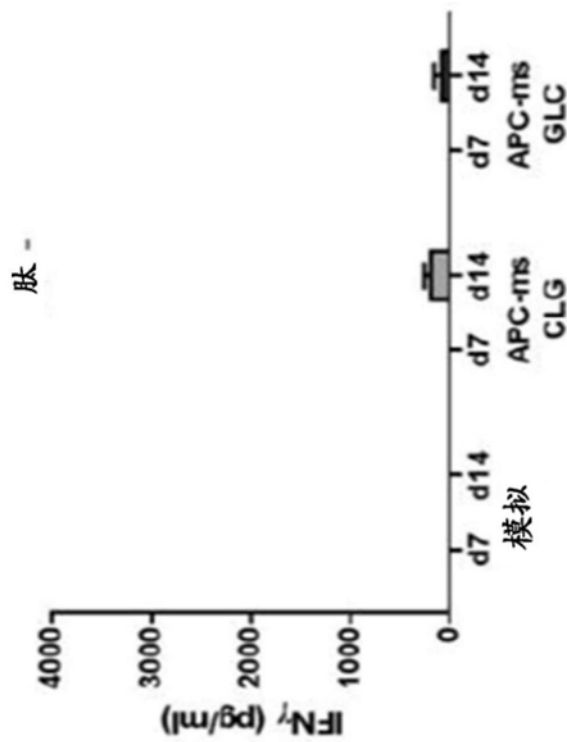


图35B

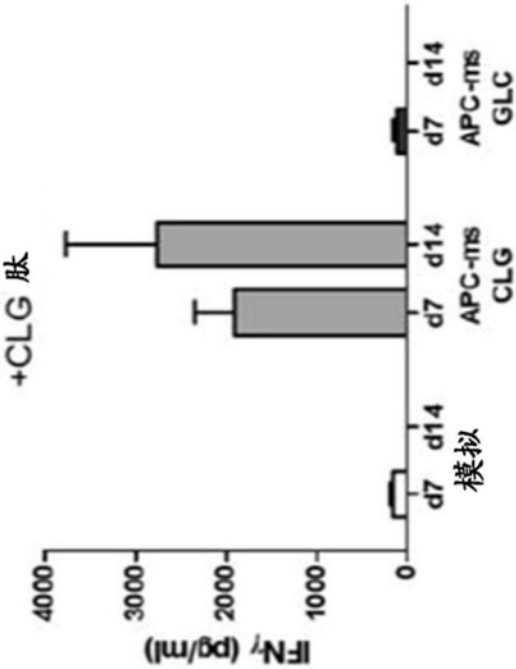


图35C

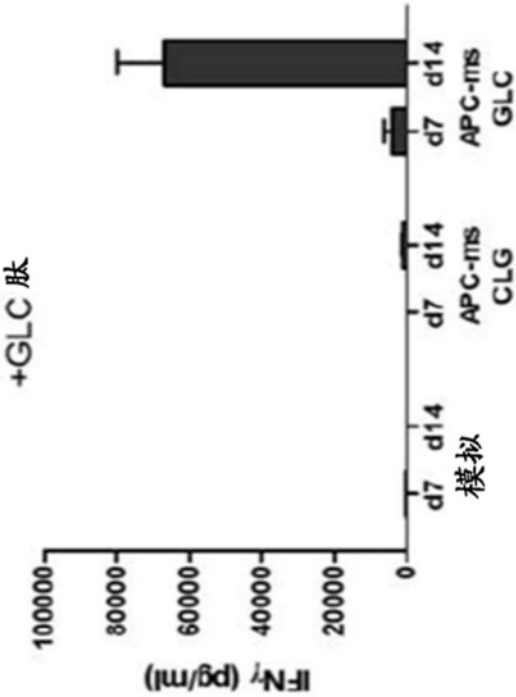


图35D

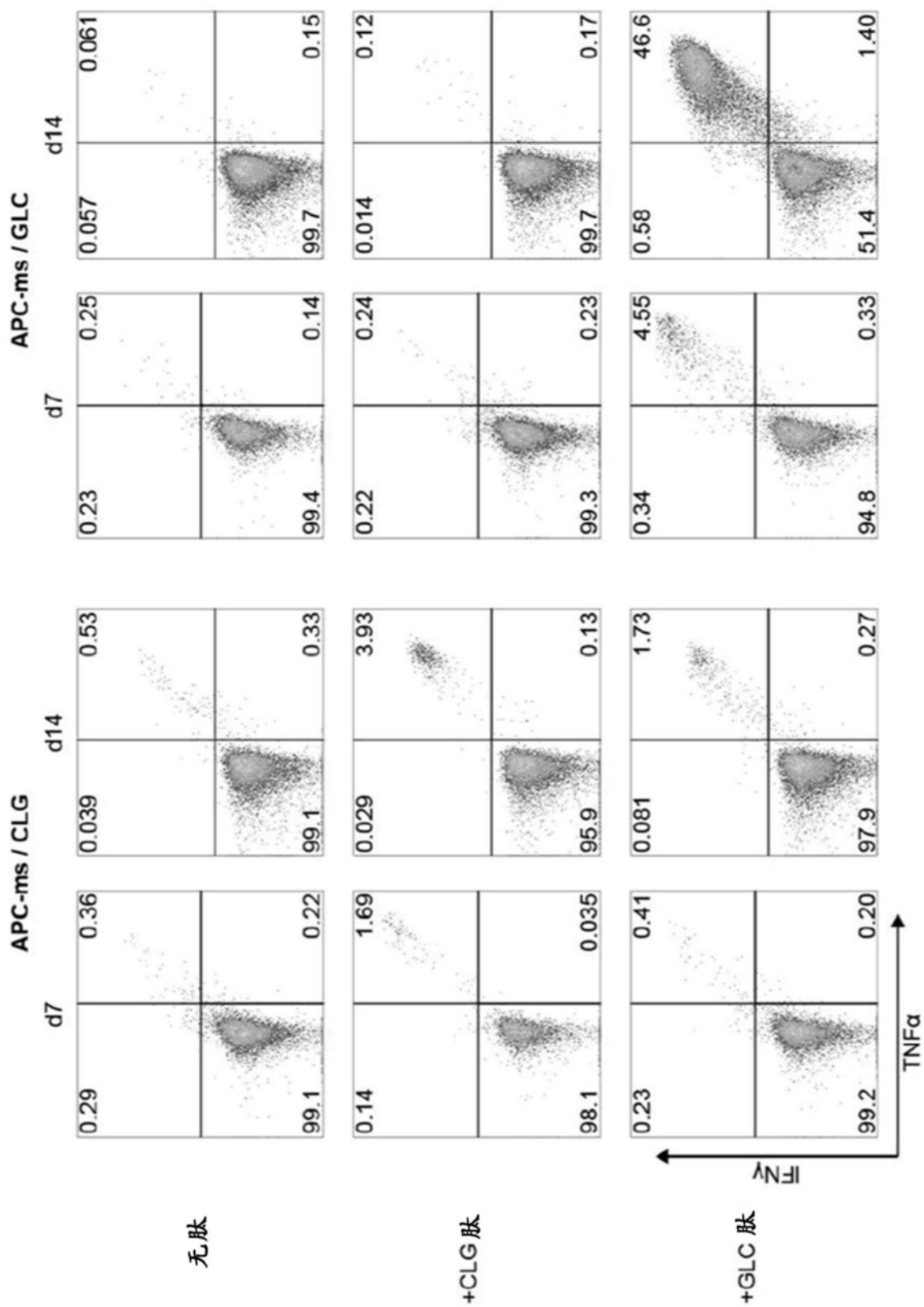


图35E

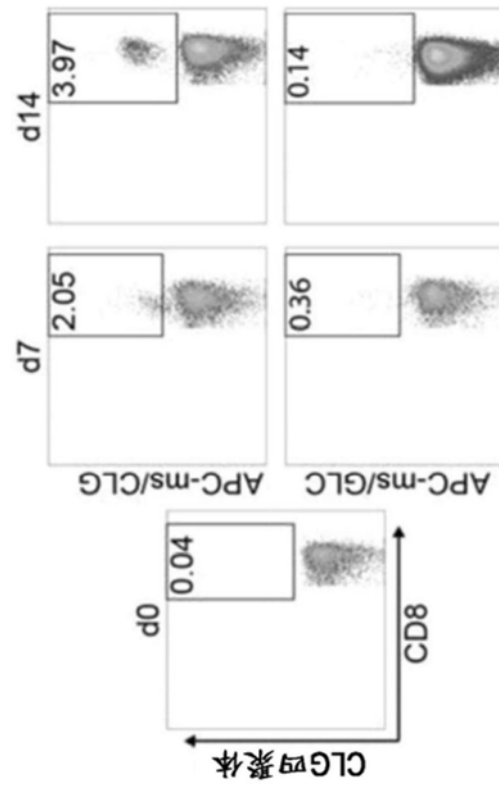


图36A

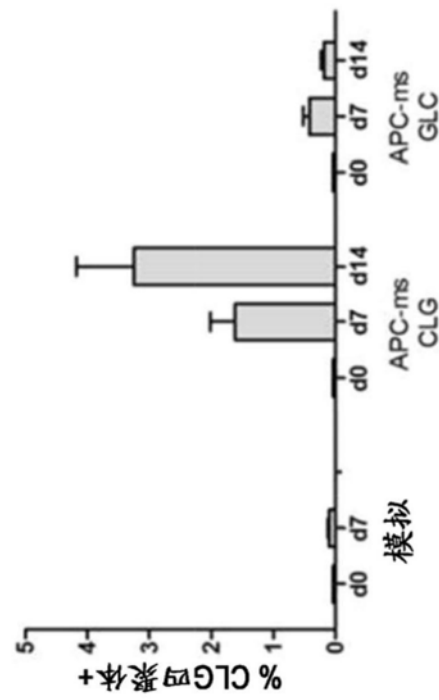


图36B

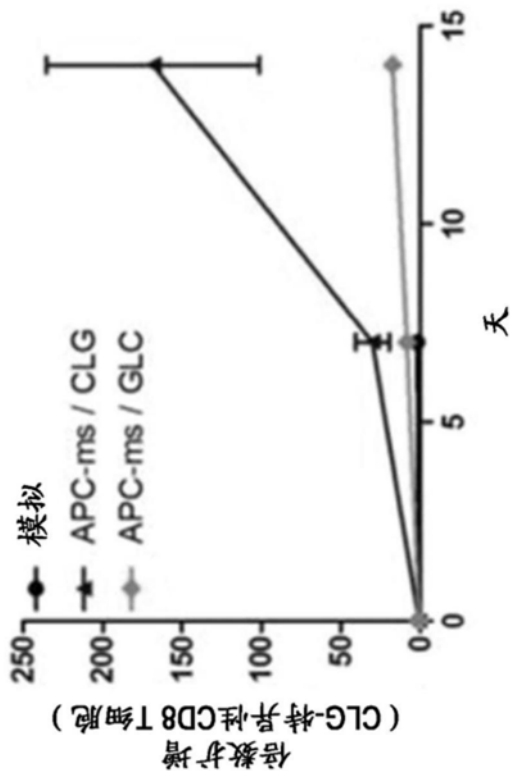


图36C

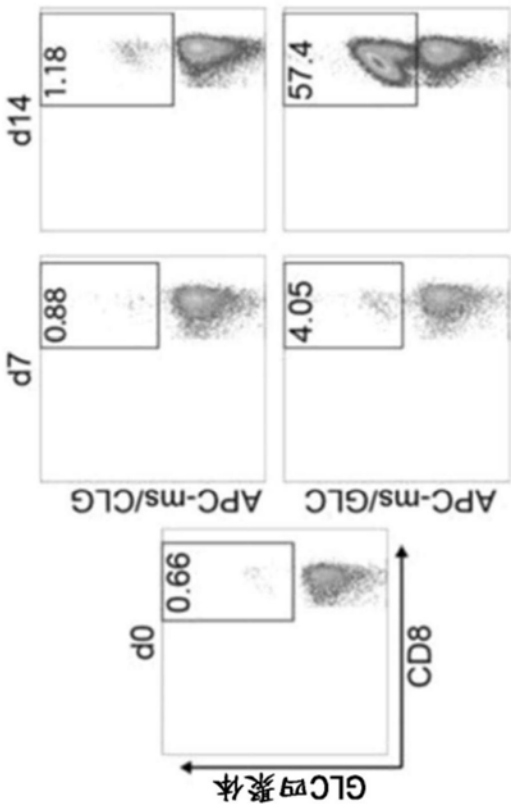


图36D

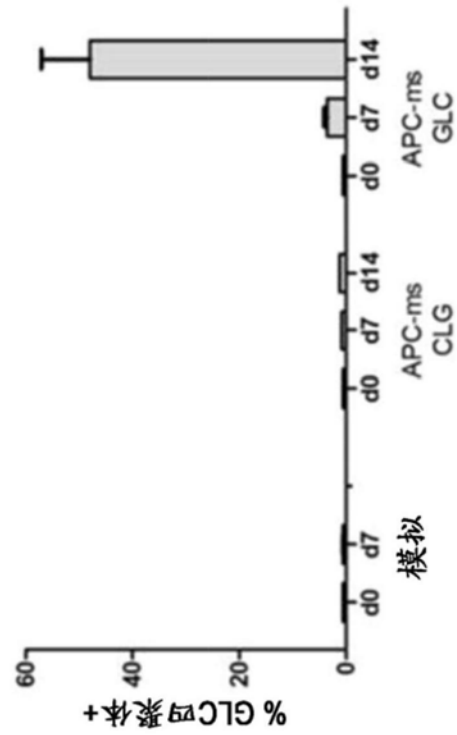


图36E

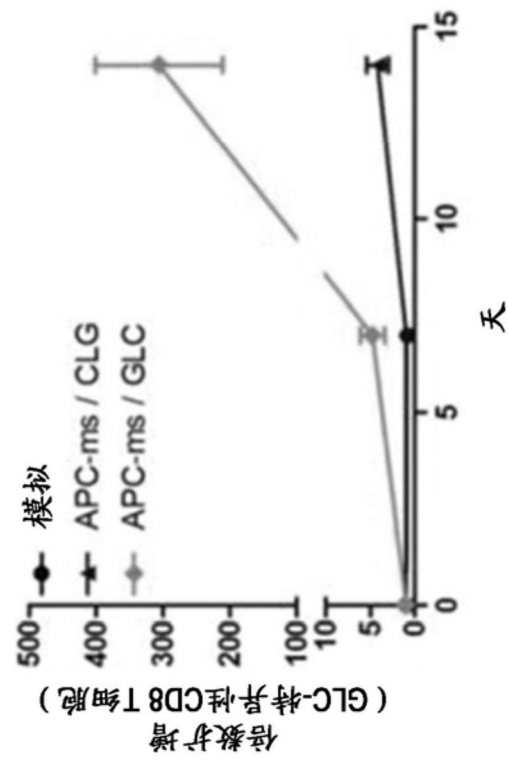


图36F

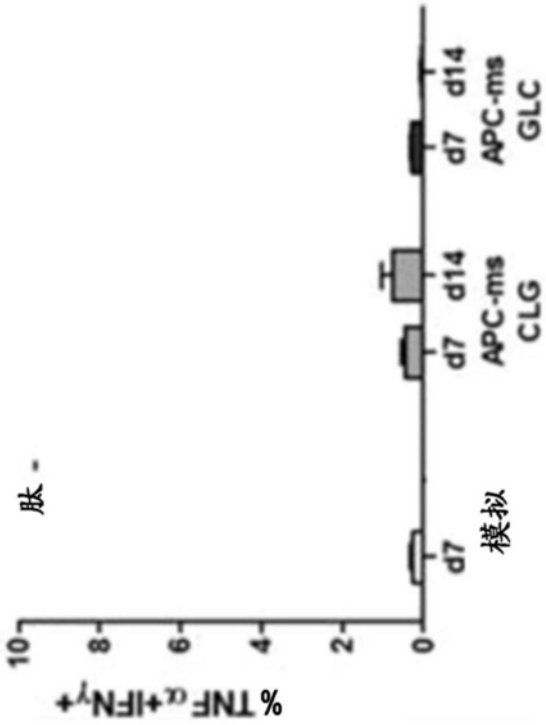


图36G

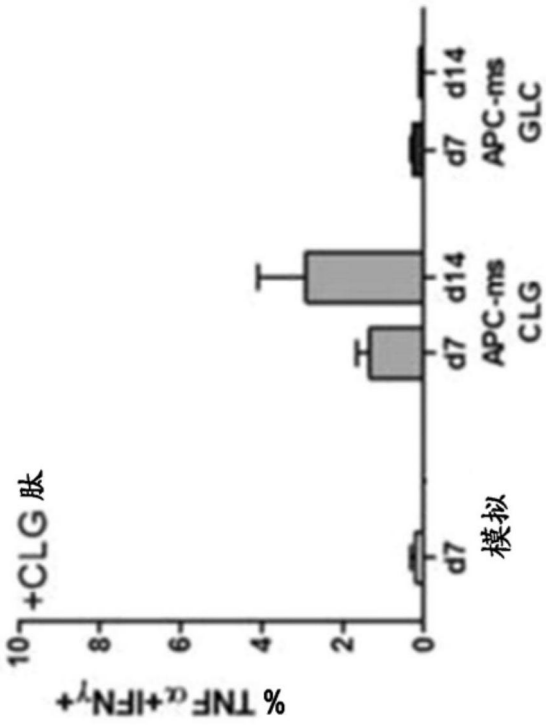


图36H

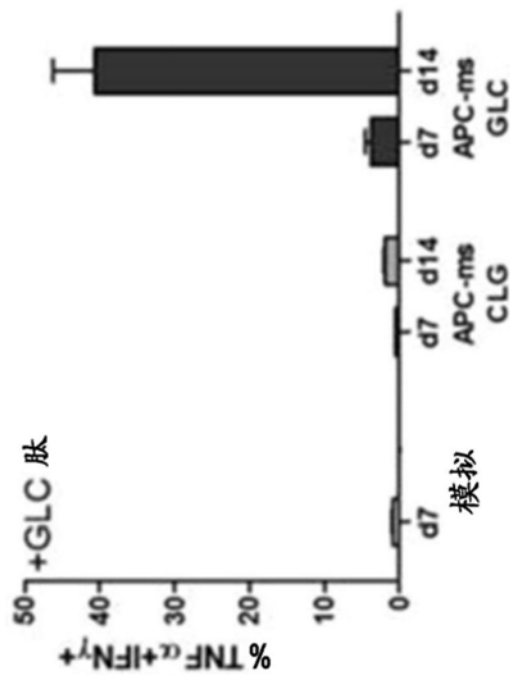


图36I

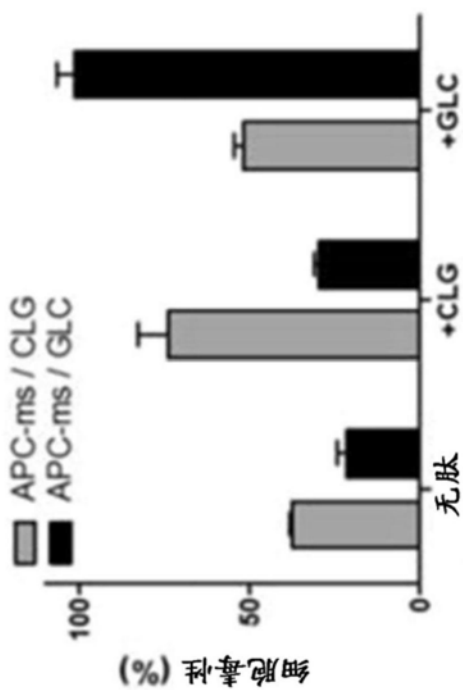


图36J

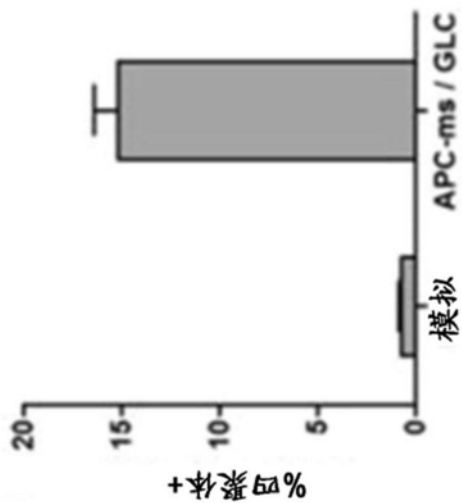


图36K

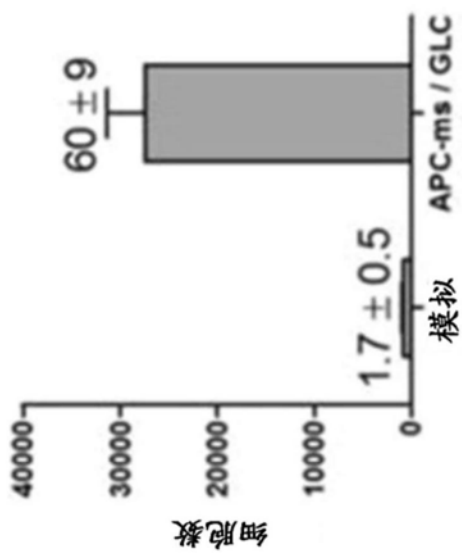


图36L

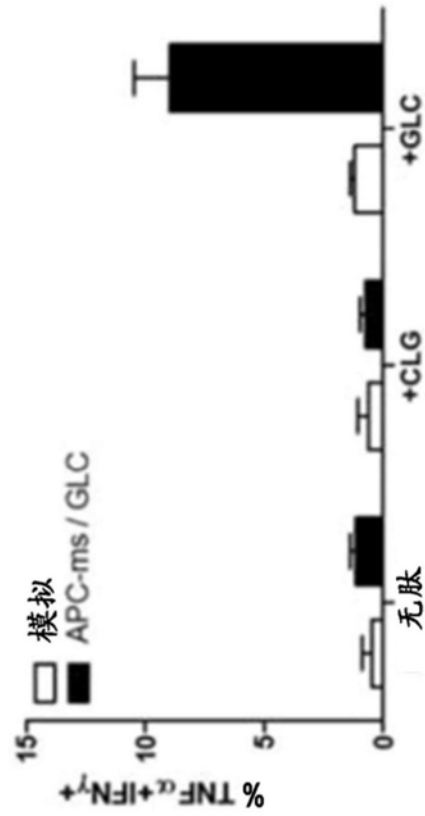


图36M

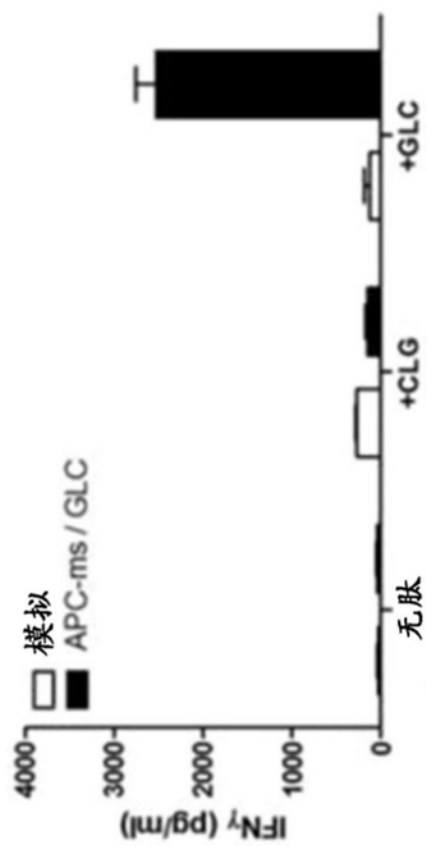


图36N

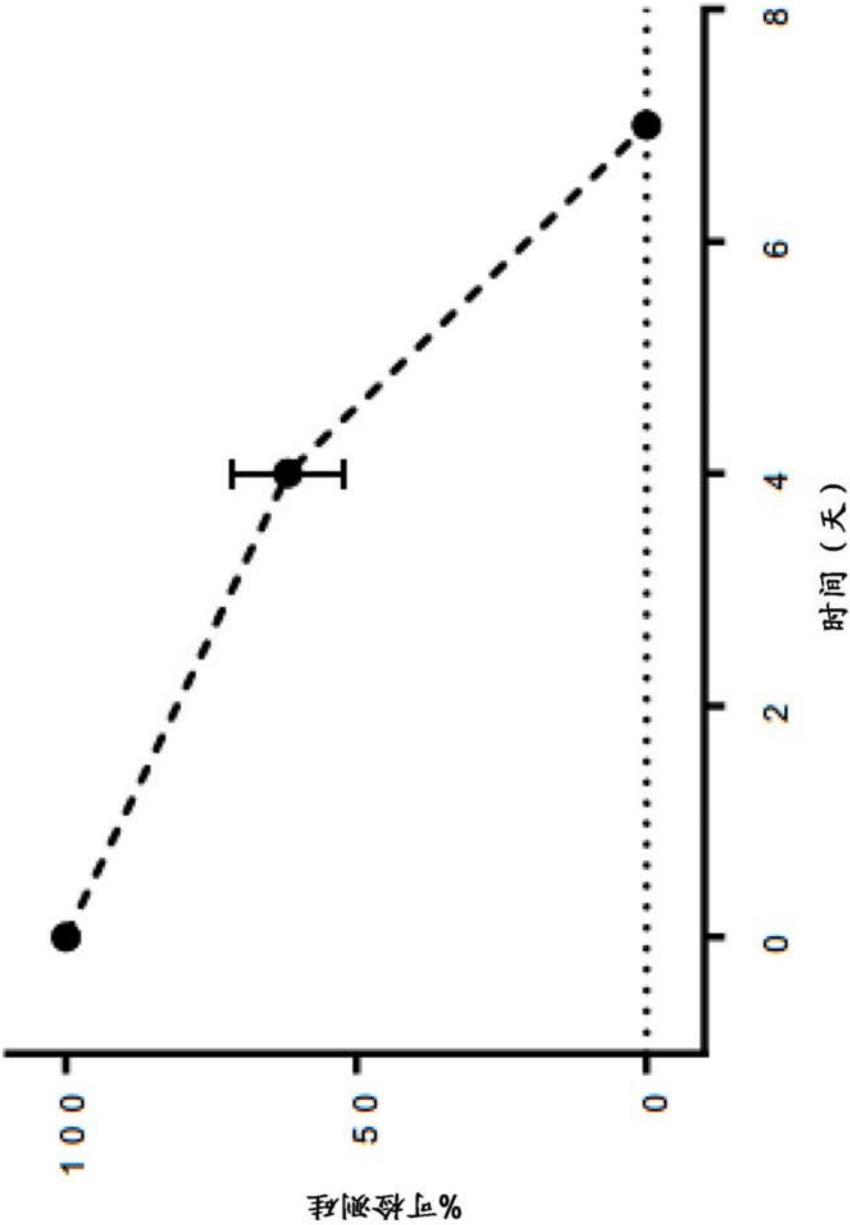


图37

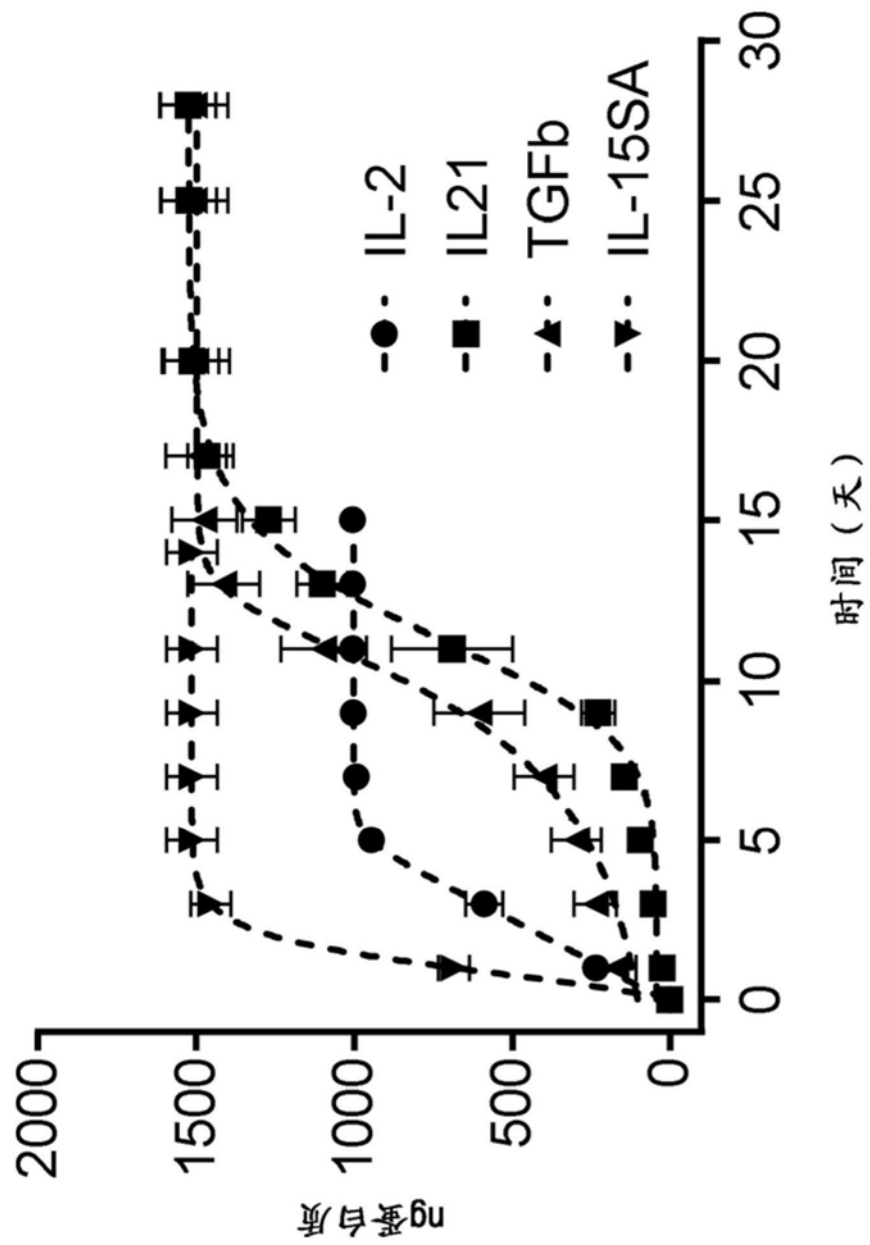


图38

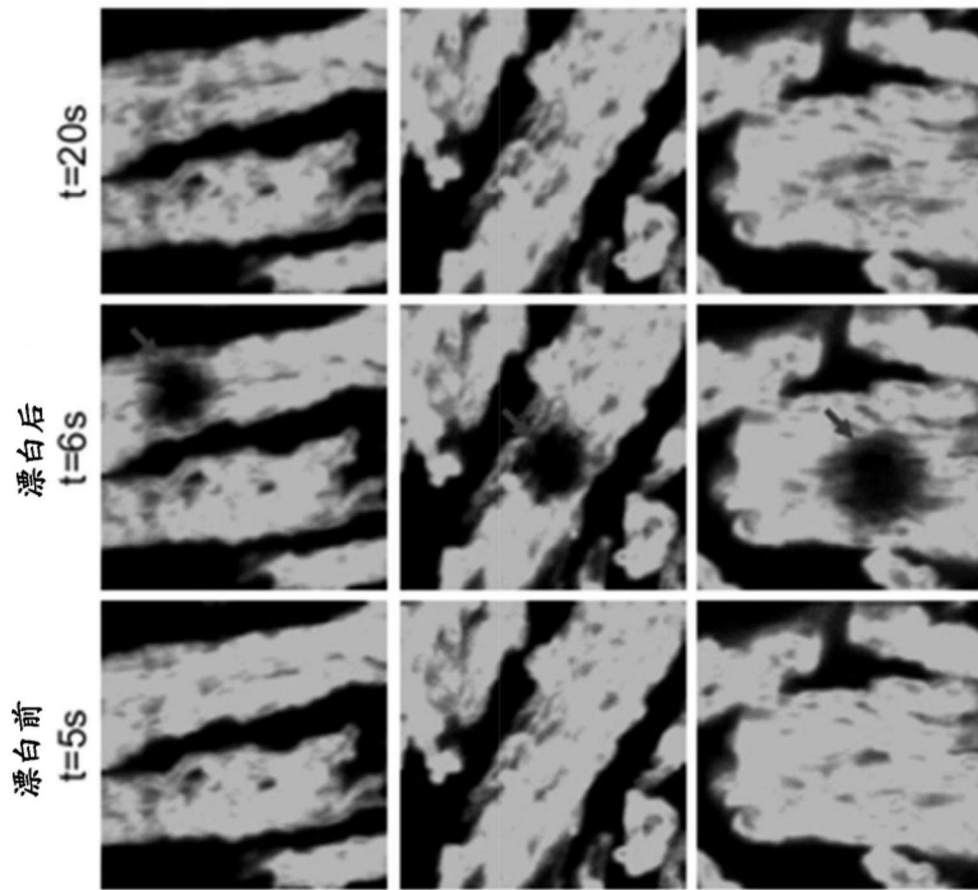


图39A

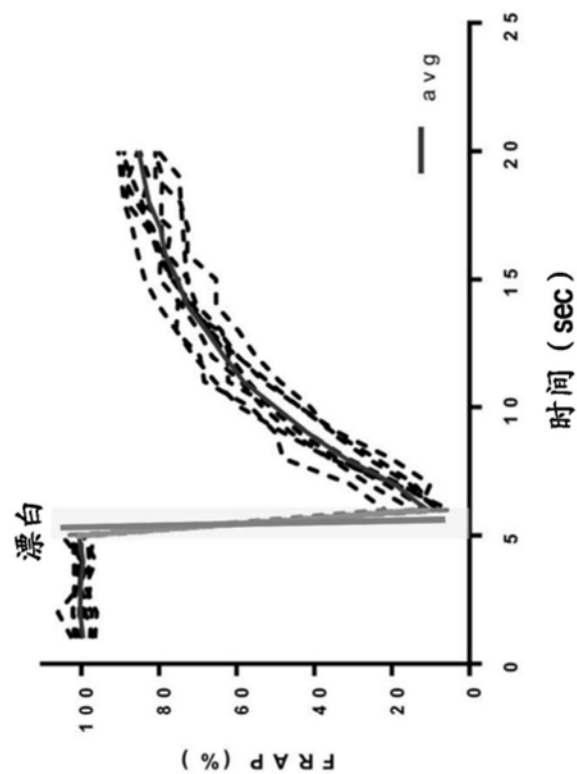


图39B

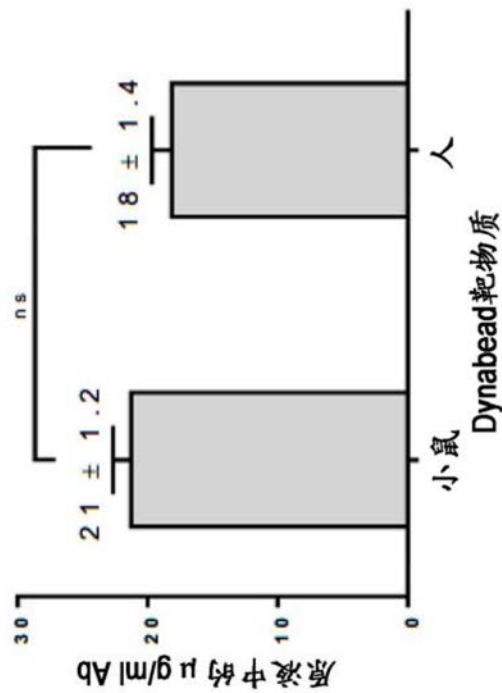


图40A

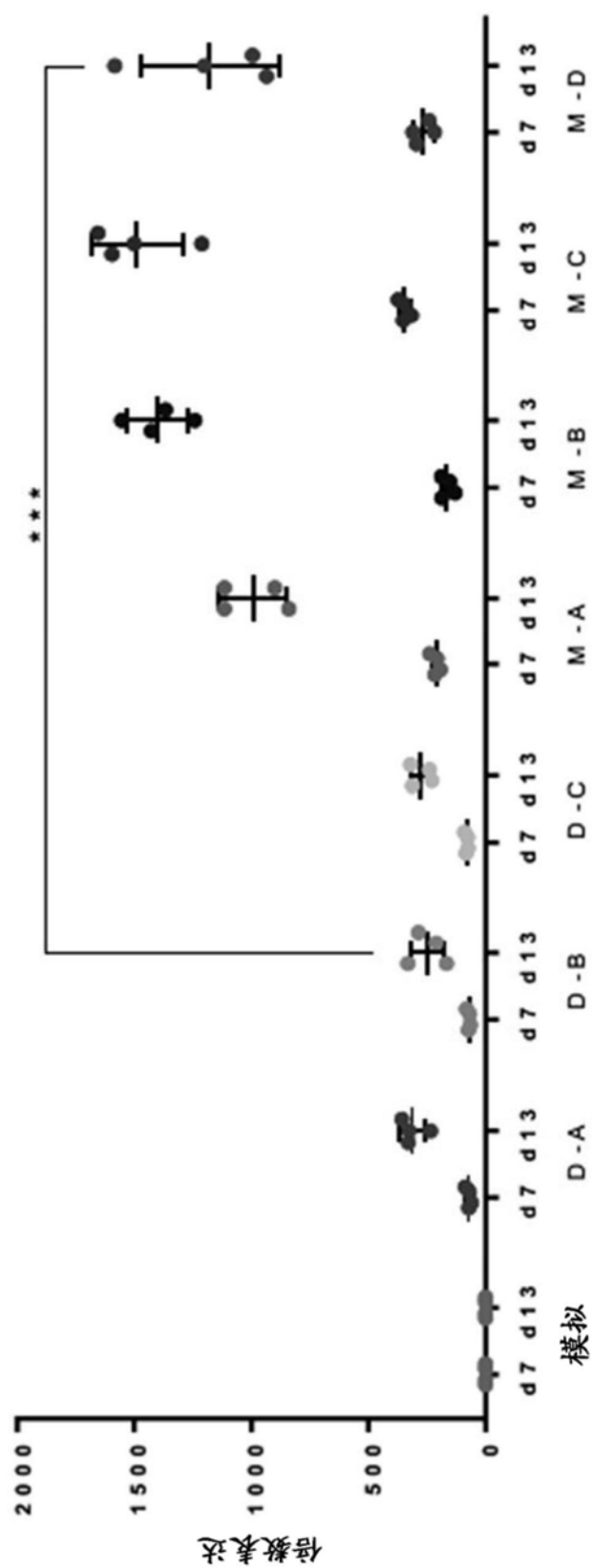


图40B

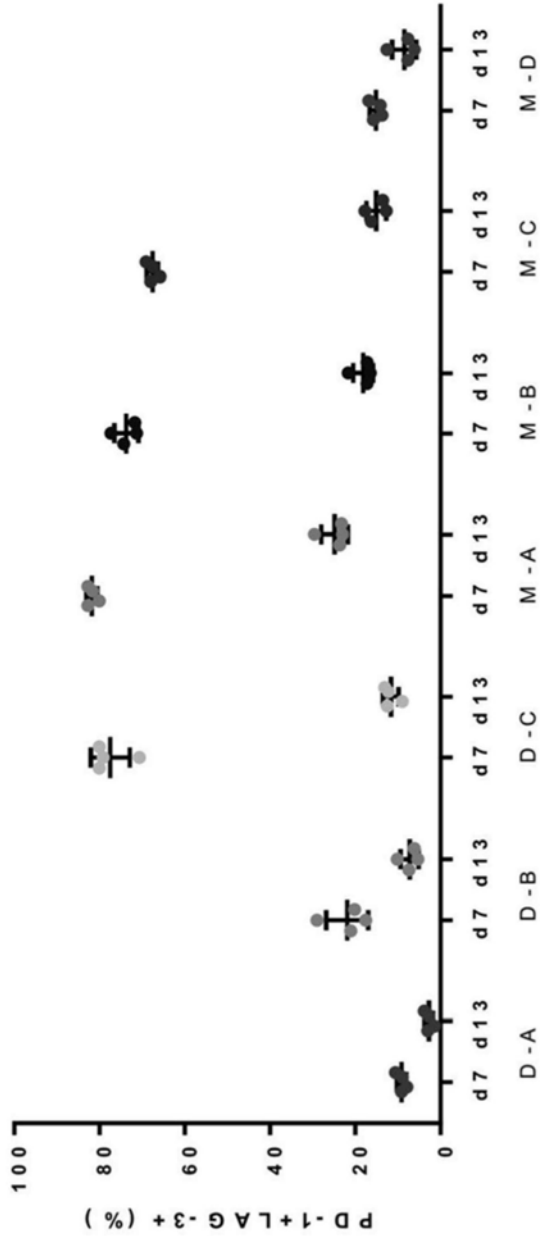


图40C

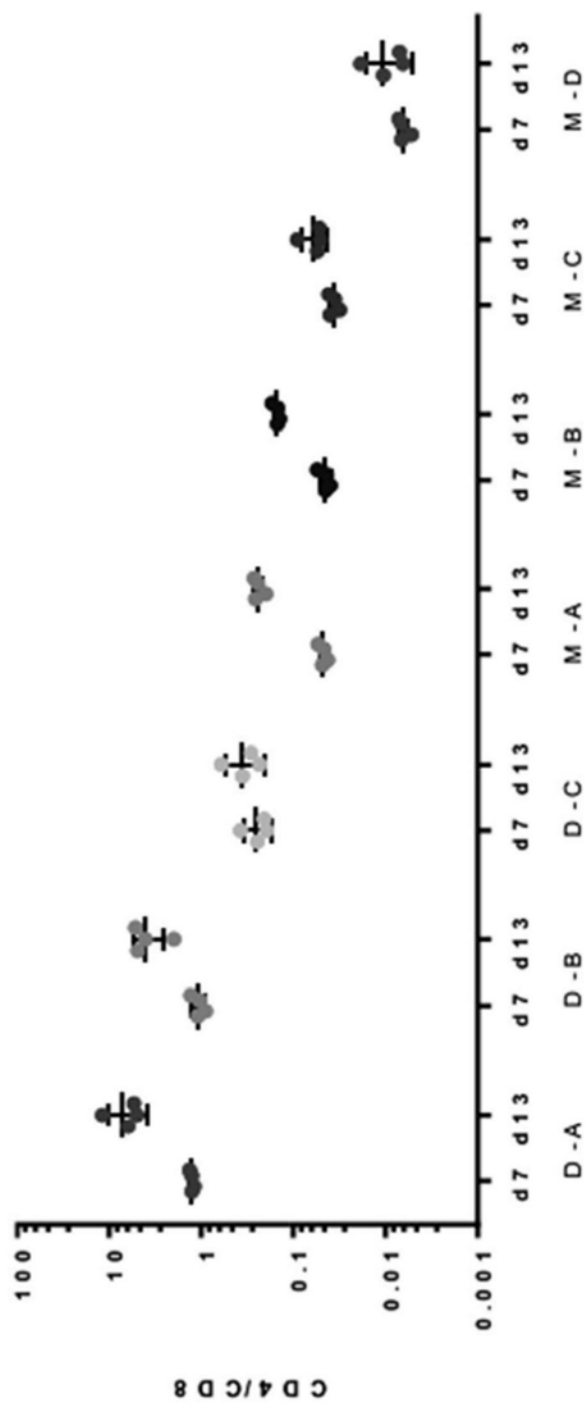


图40D

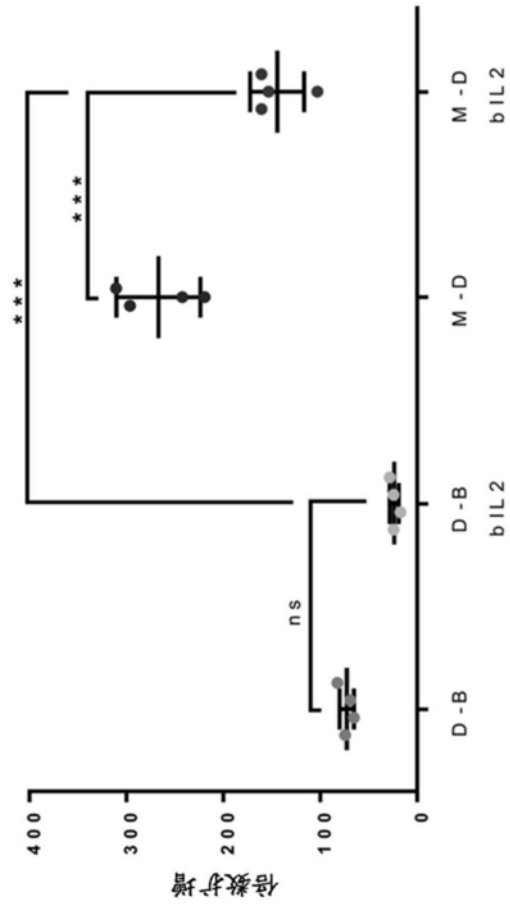


图41A

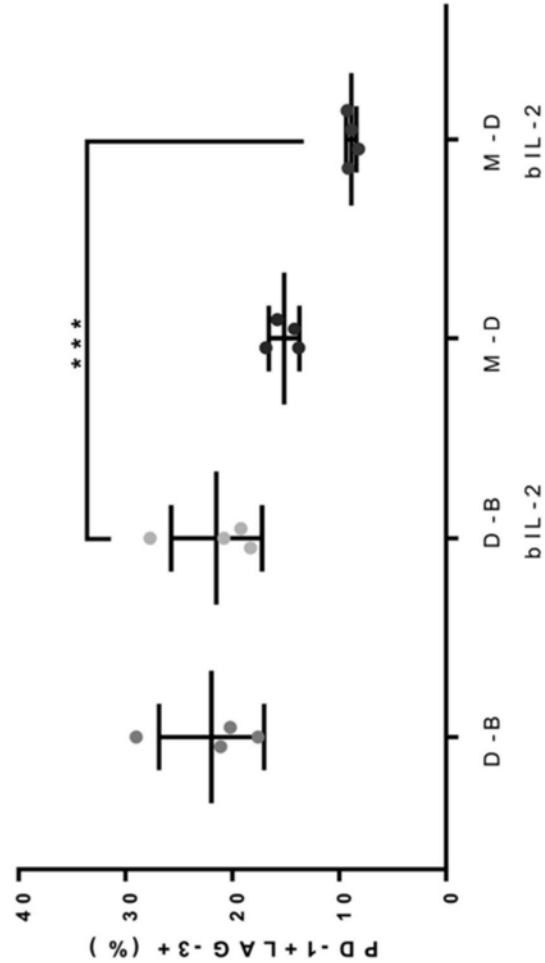


图41B

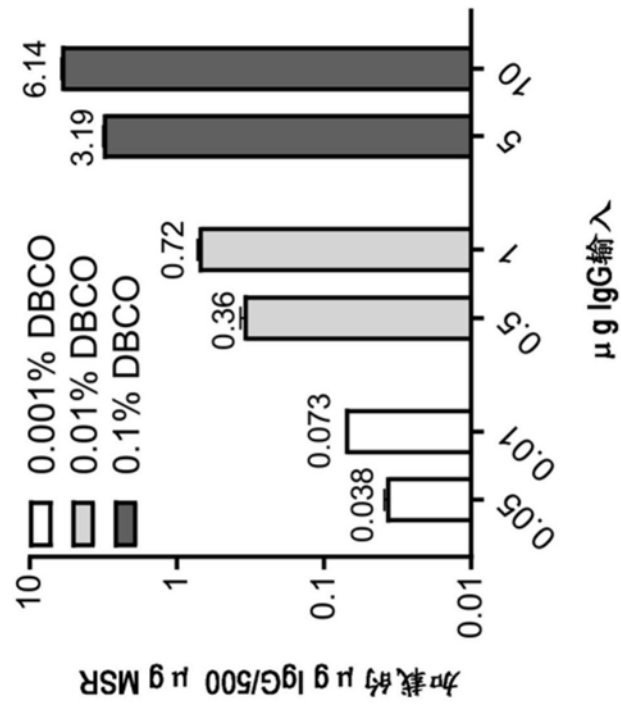


图42A

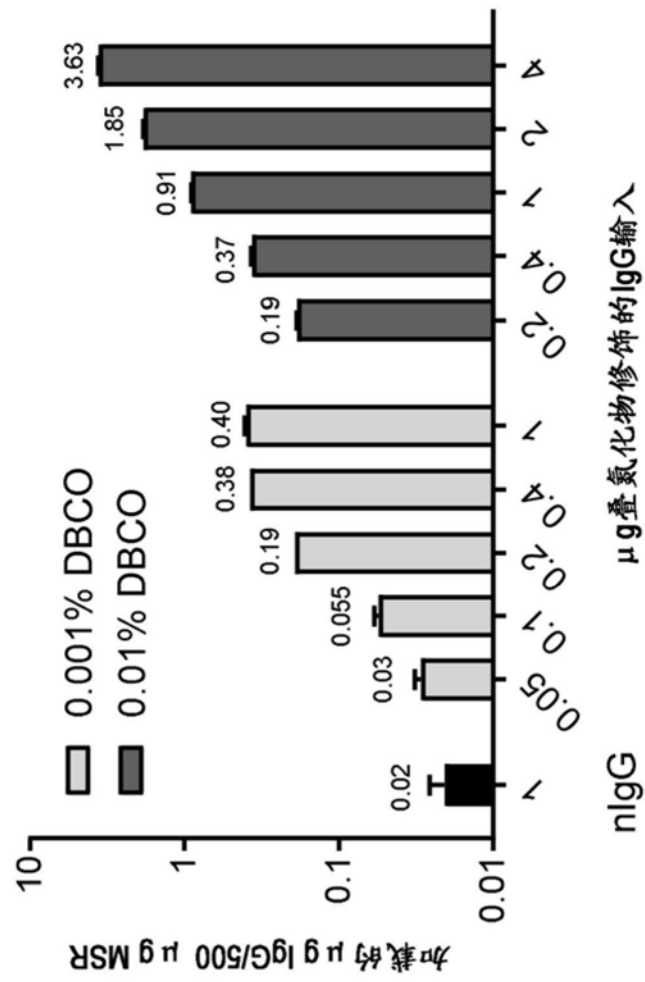


图42B