



(10) 授权公告号 CN 109661463 B

(45) 授权公告日 2023. 04. 04

(21) 申请号 201780052593.8

S. 卡甘

(22) 申请日 2017.06.27

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109661463 A

专利代理师 初明明 杨思捷

(43) 申请公布日 2019.04.19

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C12N 5/0783 (2010.01)

62/354950 2016.06.27 US

A61K 39/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.02.26

A61K 35/17 (2015.01)

A01K 67/00 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/IL2017/050716 2017.06.27

(56) 对比文件

CN 103930130 A, 2014.07.16

CN 102271702 A, 2011.12.07

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/002924 EN 2018.01.04

Bogdan Mazur. Expression of naive/
memory (CD45RA/CD45RO) markers by
peripheral blood CD4+ and CD8+ T cells in
children with asthma.《Archivum
Immunologiae et Therapiae Experimentalis
volume》.2008,

(73) 专利权人 耶达研究及发展有限公司
地址 以色列雷霍沃特邮箱95号

审查员 修旺珊

(72) 发明人 Y. 瑞斯内 N. 奥-格瓦
R. 吉德伦布德弗斯基
E. 巴沙-鲁斯缇格 A. 拉斯克

权利要求书3页 说明书42页 附图18页

(54) 发明名称

从记忆T细胞生成的反抑细胞

(57) 摘要

本发明揭示了一种生成非移植物抗宿主病(GvHD)诱导细胞的分离群的方法,所述细胞包含中央记忆T淋巴细胞(T_{cm})表型,所述细胞为耐受诱导细胞和/或赋有抗病活性,和能够在移植后归巢至淋巴结。所述方法包括:(a)提供至少70%记忆T细胞的群;(b)使所述记忆T细胞的群与一种或多种抗原接触,以使得抗原反应性细胞富集;以及(c)在细胞因子存在下培养步骤(b)产生的所述细胞,以使得包含T_{cm}表型的细胞增殖。本发明还揭示了所述方法产生的细胞,药物组合物以及治疗方法。

1. 一种生成非GvHD诱导细胞的分离群的方法,所述细胞包含中央记忆T淋巴细胞(Tcm)表型,所述细胞赋有抗病活性,和在移植之后能够归巢至淋巴结,所述方法包括:

(a) 使用能够耗竭CD4⁺、CD56⁺以及CD45RA⁺细胞的试剂处理非贴壁的外周血单核细胞(PBMC)以获得富集包含CD45RA⁻CD8⁺表型的记忆T细胞的细胞群;

(b) 在IL-21的存在下,使从步骤(a)得到的所述细胞群与一种或多种抗原接触,以使得对所述一种或多种抗原具有反应性的细胞富集;以及

(c) 在IL-21、IL-15和/或IL-7存在下培养步骤(b)产生的所述细胞,以使得包含所述Tcm表型的细胞增殖,由此生成非GvHD诱导细胞的分离群。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述一种或多种抗原选自病毒抗原、细菌抗原、肿瘤抗原、自身免疫性疾病相关抗原和蛋白提取物。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述一种或多种抗原是纯化的蛋白质。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述一种或多种抗原是合成肽。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述一种或多种抗原由自体抗原递呈细胞、非自体抗原递呈细胞、人工载体或人工抗原递呈细胞递呈。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述一种或多种抗原由与所述记忆T细胞相同来源的抗原递呈细胞递呈。

7. 一种生成非GvHD诱导细胞的分离群的方法,所述细胞包含中央记忆T淋巴细胞(Tcm)表型,所述细胞赋有抗病活性,和在移植之后能够归巢至淋巴结,所述方法包括:

(a) 使用能够耗竭CD4⁺、CD56⁺以及CD45RA⁺细胞的试剂处理非贴壁的外周血单核细胞(PBMC)以获得富集包含CD45RA⁻CD8⁺表型的记忆T细胞的细胞群;

(b) 在IL-21的存在下,使从步骤(a)得到的所述细胞群与一种或多种病毒抗原接触,以使得对所述一种或多种抗原具有反应性的细胞富集;以及

(c) 在IL-21、IL-15和/或IL-7存在下培养步骤(b)产生的所述细胞,以使得包含所述Tcm表型的细胞增殖,由此生成非GvHD诱导细胞的分离群。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述一种或多种病毒抗原由自体抗原递呈细胞、非自体抗原递呈细胞、人工载体或人工抗原递呈细胞递呈。

9. 根据权利要求7-8中任一项所述的方法,其中所述一种或多种病毒抗原由与PBMC相同来源的抗原递呈细胞递呈。

10. 根据权利要求5-6、8或9任一项所述的方法,其中所述抗原递呈细胞是树突状细胞。

11. 根据权利要求2-9任一项所述的方法,其中所述一种或多种病毒抗原包含两种或更多种病毒肽。

12. 根据权利要求2-9或11任一项所述的方法,其中所述一种或多种病毒抗原包含EBV肽、CMV肽、腺病毒(Adv)肽和/或BK病毒肽。

13. 根据权利要求2-9、11或12任一项所述的方法,其中所述一种或多种病毒抗原包含三种EBV肽、两种CMV肽以及两种腺病毒(Adv)肽。

14. 根据权利要求2-9、11-12或13任一项所述的方法,其中所述一种或多种病毒抗原选自EBV-LMP2、EBV-BZLF1、EBV-EBNA1、CMV-pp65、CMV-IE-1、Adv-五邻体以及Adv-六邻体。

15. 根据权利要求2-9、11-12或13任一项所述的方法,其中所述一种或多种病毒抗原包含EBV-LMP2、EBV-BZLF1、EBV-EBNA1、CMV-pp65、CMV-IE-1、Adv-五邻体以及Adv-六邻体中的

两种或更多种。

16. 根据权利要求2-9、11-14或15任一项所述的方法,其中所述抗原包含一种或多种病毒和细菌抗原。

17. 根据权利要求1或7任一项所述的方法,其中在所述IL-21存在下使从步骤(a)得到的所述细胞群与所述一种或多种抗原接触进行12小时至5天。

18. 根据权利要求1或7任一项所述的方法,其中在所述IL-21存在下使从步骤(a)得到的所述细胞群与所述一种或多种抗原接触进行3天。

19. 根据权利要求1或7任一项所述的方法,其中在IL-21、IL-15和/或IL-7存在下培养步骤(b)产生的所述细胞进行12小时至15天。

20. 根据权利要求1或7任一项所述的方法,其中在IL-21、IL-15和/或IL-7存在下培养步骤(b)产生的所述细胞进行4天至10天。

21. 根据权利要求1或7任一项所述的方法,其中在IL-21、IL-15和/或IL-7存在下培养步骤(b)产生的所述细胞进行6天至10天。

22. 根据权利要求1-21任一项所述的方法,其中生成所述非GvHD诱导细胞的总时长为10天。

23. 根据权利要求1或7任一项所述的方法,其进一步包括在步骤(c)之后耗竭同种异体反应性细胞。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中所述耗竭所述同种异体反应性细胞通过在使包含所述Tcm表型的所述细胞与宿主抗原递呈细胞(APC)接触之后耗竭CD137⁺和/或CD25⁺细胞而进行。

25. 根据权利要求1、7或9任一项所述的方法,其中所述PBMC相对于受试者是非同源的。

26. 根据权利要求1或7任一项所述的方法,其中所述具有所述Tcm表型的细胞包含CD3⁺、CD8⁺、CD62L⁺、CD45RA⁻、CD45RO⁺标记。

27. 根据权利要求1-26任一项所述的方法生成的非GvHD诱导细胞的分离群。

28. 一种药物组合物,所述药物组合物包含作为活性成分的权利要求27所述的非GvHD诱导细胞的分离群,和药学可接受的载体。

29. 权利要求27所述的非GvHD诱导细胞的分离群在制备用作受试者中细胞或组织移植物的辅助治疗的药物中的用途,其中所述受试者需要细胞或组织移植。

30. 根据权利要求29所述的用途,其中所述细胞或组织移植与受试者是非同源的。

31. 根据权利要求29-30任一项所述的用途,其中所述细胞或组织移植和所述非GvHD诱导细胞的分离群获自相同供体。

32. 根据权利要求29-31任一项所述的用途,其中所述细胞或组织移植包括未成熟的造血细胞。

33. 根据权利要求29-31任一项所述的用途,其中所述细胞或组织移植选自肝脏、胰腺、脾脏、肾脏、心脏、肺、皮肤、肠、脑、卵巢以及淋巴/造血细胞或组织。

34. 根据权利要求29-31任一项所述的用途,其中所述细胞或组织移植包括数种器官的细胞或组织。

35. 根据权利要求34所述的用途,其中所述细胞或组织移植包括未成熟的造血细胞和实体器官。

36. 根据权利要求35所述的用途, 其中所述未成熟的造血细胞和所述实体器官获自相同供体。

37. 根据权利要求29所述的用途, 其中所述受试者患有恶性病。

38. 根据权利要求37所述的用途, 其中所述恶性病为实体瘤或肿瘤转移。

39. 根据权利要求37所述的用途, 其中所述恶性病为血液恶性肿瘤。

40. 根据权利要求37-39任一项所述的用途, 其中所述恶性病选自白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、黑素瘤、肉瘤、成神经细胞瘤、结肠癌、结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、食管癌、滑膜细胞癌、肝癌以及胰腺癌。

41. 根据权利要求29所述的用途, 其中所述受试者患有非恶性病。

42. 根据权利要求41所述的用途, 其中所述非恶性病选自器官功能障碍或衰竭、血液病、移植物相关疾病、感染性疾病、自身免疫性疾病、炎症、变态反应、创伤以及损伤。

43. 根据权利要求25所述的方法, 或根据权利要求29、37或41任一项所述的用途, 其中所述受试者为人受试者。

从记忆T细胞生成的反抑细胞

[0001] 技术领域和发明背景

[0002] 本发明在其一些实施方案中涉及从记忆T细胞生成的反抑细胞(veto cell),更具体地但非排他地涉及其制备方法并且涉及其在移植中和在疾病治疗中的应用。

[0003] 越来越多的证据显示,在人类中,CD45RA耗竭的外周血单核细胞(PBMC)表现移植物抗宿主(GvH)反应减轻。此方法的前提涉及经受过抗原的T细胞上的CD45RA表达下调,由此通过耗竭CD45RA⁺细胞,幼稚T细胞被消除,而经受过功能性抗原的细胞(包括记忆T细胞)则被保留。因此,相对于仅使用T细胞耗竭的干细胞(TCD)移植,移植物抗宿主病(GvHD)的风险显著减轻,而移植物植入、免疫重建以及移植物抗白血病/淋巴瘤(GvL)则提高。另外,调节T细胞(Treg)也属于CD45RA⁺群,可能促成此细胞制备物表现的致耐受性效应。此方法基于如下临床前研究:即,证明小鼠CD4⁺记忆T细胞以及效应CD8记忆T细胞无移植物抗宿主(GvH)反应[Anderson BE等人,*J Clin Invest* (2003) 112(1):101-8]。

[0004] 然而,Zheng等人,[Zheng H.等人,*Immunol.* (2009) 182(10):5938-48]证明,CD8⁺中央记忆T细胞(T_{cm})相对于幼稚T细胞表现显著(即便略微降低)的GvHD。考虑到此减轻的GvHD可能与经受过抗原的记忆T细胞库中同种异体反应性克隆的频率减少有关,Juchem等人进一步探究了针对受者中遍在表达的抗原肽表达相似水平TCR转基因的幼稚T细胞和记忆T细胞之间可能的内在差异 [Juchem KW等人,*Blood.* (2011) 118(23):6209-19]。此研究证明,尽管效应记忆T细胞(T_{em})表现低GvH反应性(可能由于这些细胞的不同归巢模式和/或分泌INF γ 的分化能力),但T_{cm}表现高GvH反应性,与幼稚T细胞相当[Juchem KW. (2011),同上文]。

[0005] 最近,两项主要研究尝试在白血病患者中使用CD45RA⁺耗竭的造血干细胞移植(HSCT) [Bleakley M.等人,*J Clin Invest.* (2015) 125(7):2677-89;Triplet, B.M.等人,*Bone Marrow Transplant.* (2015) 50(7):968-977],然而,GvHD发生未完全消除。这可能归因于大量融合的CD45RA⁺ T细胞,和CD45RA耗竭的部分同时包含T_{em}和T_{cm}的事实,而与清楚地显示T_{cm}是GvHD的有效诱导因子的临床前数据无关。

[0006] 抗第三方供体衍生的CD8⁺中央记忆T细胞(反抑T_{cm})先前显示在非骨髓性减轻调节下支持同种异体T细胞耗竭的骨髓移植(TDBMT)植入,导致对供体型器官移植物的耐受诱导,而不导致GvHD [Ophir, E.等人,*Blood.* (2013) 121(7):1220-1228]。

[0007] 另外,多种方法被考虑用于生成无GvH反应的耐受诱导细胞(例如反抑细胞)及其用作移植物移植的辅助治疗,其中一些概述在下文中。

[0008] PCT公开号W0 2001/49243揭示了一种将源自供体的移植物植入受者的方法,所述方法包括如下步骤:(a)将所述移植物植入受者;和(b)给所述受者施用包含非同种异体反应性抗第三方细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的药剂,其中所述非同种异体反应性抗第三方CTL通过使供体的T淋巴细胞针对一种或多种第三方抗原而产生(在外源性IL-2不存在下),所述药剂基本上耗竭能够发育为同种异体反应性CTL的T淋巴细胞(例如,CD4⁺ T细胞和/或CD56⁺天然杀伤细胞),由此预防或缓解受者的移植物排斥和移植物抗宿主病。

[0009] PCT公开号W0 2007/023491公开了致耐受性细胞用于在受试者中减少或预防非同

源移植物的移植物排斥的用途。所揭示的致耐受性调节T细胞(例如 $CD4^+CD25^+$ 细胞)可源自与受试者和移植物两者均非同源的任何供体(“第三方”致耐受性细胞)。移植物(例如骨髓)可源自与受试者同种异体或异种异体的任何移植物供体。

[0010] PCT公开号W0 2010/049935揭示了细胞分离群,其包含具有中央记忆T淋巴细胞(Tcm)表型的非GvHD诱导抗第三方细胞,所述细胞是耐受诱导细胞,和在移植后能够归巢至淋巴结。根据W0 2010/049935,所述细胞通过如下步骤生成:(a)在允许GVH反应性细胞消除的条件下(例如缺乏细胞因子的培养物)使非同源性外周血单核细胞(PBMC)与一种或多种第三方抗原接触;和(b)在允许包含Tcm表型的细胞增殖的条件下(例如存在IL-7和/或IL-21)在IL-15存在下培养步骤(a)产生的所述细胞。

[0011] PCT公开号W0 2012/032526揭示了一种治疗受试者疾病的方法,所述方法包括:(a)将非同源细胞或组织移植物移植至受试者;和(b)给所述受试者施用治疗有效量的细胞分离群,所述细胞分离群包含非移植物抗宿主(GvHD)诱导的具有中央记忆T淋巴细胞(Tcm)表型的抗第三方细胞,所述细胞为耐受诱导细胞,能够在移植后归巢至淋巴结。根据W0 2012/032526,所述细胞通过如下步骤生成:(a)在允许GVH反应性细胞消除的条件下存在或不存在IL-21下使PBMC与一种或多种第三方抗原接触(例如培养1-5天);和(b)于无抗原环境中在允许包含Tcm表型的细胞增殖的条件下(例如进一步存在IL-7)在IL-15存在下培养步骤(a)产生的所述细胞。

[0012] PCT公开号W0 2013/035099揭示了生成包含具有中央记忆T淋巴细胞(Tcm)表型的抗第三方细胞的细胞分离群的新方法,所述细胞是耐受诱导细胞和/或赋有抗病活性,在移植后能够归巢至淋巴结。根据W0 2013/035099,所述细胞通过如下步骤生成:(a)在IL-21存在下使PBMC与一种或多种第三方抗原接触,以使得抗原反应性细胞富集;和(b)于无抗原环境中在IL-21、IL-15以及IL-7存在下培养步骤(a)产生的所述细胞,以使得包含Tcm表型的细胞增殖。

发明内容

[0013] 根据本发明的一些实施方案的方面,提供了一种生成非移植物抗宿主病(GvHD)诱导细胞的分离群的方法,所述细胞包含中央记忆T淋巴细胞(Tcm)表型,所述细胞为耐受诱导细胞和/或赋有抗病活性,在移植之后能够归巢至淋巴结,所述方法包括:(a)提供至少70%记忆T细胞的群;(b)使所述记忆T细胞的群与一种或多种抗原接触,以使得抗原反应性细胞富集;以及(c)在细胞因子存在下培养步骤(b)产生的所述细胞,以使得包含Tcm表型的细胞增殖,由此生成所述非GvHD诱导细胞的分离群。

[0014] 根据本发明的一些实施方案的方面,提供了一种生成非GvHD诱导细胞的分离群的方法,所述细胞包含中央记忆T淋巴细胞(Tcm)表型,所述细胞为耐受诱导细胞和/或赋有抗病活性,在移植之后能够归巢至淋巴结,所述方法包括:(a)使用能够耗竭 $CD4^+$ 、 $CD56^+$ 以及 $CD45RA^+$ 细胞的试剂处理非贴壁(non-adherent)的外周血单核细胞(PBMC)以获得包含 $CD45RA^-CD8^+$ 表型的记忆T细胞群;(b)在IL-21的存在下,使所述记忆T细胞群与一种或多种抗原接触,以使得抗原反应性细胞富集;以及(c)在IL-21、IL-15和/或IL-7存在下培养步骤(b)产生的所述细胞,以使得包含Tcm表型的细胞增殖,由此生成所述非GvHD诱导细胞的分离群。

[0015] 根据本发明的一些实施方案的方面,提供了一种生成非GvHD诱导细胞的分离群的方法,所述细胞包含中央记忆T淋巴细胞(Tcm)表型,所述细胞为耐受诱导细胞和/或赋有抗病活性,在移植之后能够归巢至淋巴结,所述方法包括:(a)使用能够耗竭CD4⁺、CD56⁺以及CD45RA⁺细胞的试剂处理非贴壁的外周血单核细胞(PBMC)以获得包含CD45RA⁻CD8⁺表型的记忆T细胞群;(b)在IL-21的存在下,使所述记忆T细胞群与一种或多种病毒抗原接触,以使得抗原反应性细胞富集;以及(c)在IL-21、IL-15和/或IL-7存在下培养步骤(b)产生的所述细胞,以使得包含Tcm表型的细胞增殖,由此生成所述非GvHD诱导细胞的分离群。

[0016] 根据本发明的一些实施方案的方面,提供了根据本发明一些实施方案的方法生成的一种非GvHD诱导细胞的分离群,所述细胞包含具有中央记忆T淋巴细胞(Tcm)表型的细胞,所述细胞为耐受诱导细胞和/或赋有抗病活性,在移植之后能够归巢至淋巴结。

[0017] 根据本发明的一些实施方案的方面,提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含本发明一些实施方案的作为活性成分的非GvHD诱导细胞的分离群,和药学可接受的载体。

[0018] 根据本发明的一些实施方案的方面,提供了一种在有需要的受试者中治疗疾病的方法,所述方法包括给所述受试者施用治疗有效量的本发明一些实施方案的非GvHD诱导细胞的分离群,由此治疗所述受试者的疾病。

[0019] 根据本发明的一些实施方案的方面,提供了本发明一些实施方案的非GvHD诱导细胞的分离群在制备经鉴定用于治疗有需要的受试者的疾病的药剂中的用途。

[0020] 根据本发明的一些实施方案的方面,提供了一种治疗有需要的受试者的疾病的方法,所述方法包括:(a)分析受试者的生物样品是否存在疾病相关的一种或多种抗原;(b)根据本发明的一些实施方案的方法针对疾病相关的一种或多种抗原生成非GvHD诱导细胞的分离群,以使得抗原反应性细胞富集;以及(c)给所述受试者施用治疗有效量的(b)的非GvHD诱导细胞的分离群,由此治疗所述受试者的疾病。

[0021] 根据本发明的一些实施方案的方面,提供了一种治疗需要细胞或组织移植的受试者的方法,所述方法包括:(a)将细胞或组织移植物移植至所述受试者;和(b)给所述受试者施用治疗有效量的本发明一些实施方案的非GvHD诱导细胞的分离群,由此治疗所述需要细胞或组织移植的受试者。

[0022] 根据本发明的一些实施方案的方面,提供了本发明的一些实施方案的非GvHD诱导细胞的分离群在制备经鉴定作为受试者中细胞或组织移植物的辅助治疗的药剂中的用途,其中所述受试者需要细胞或组织移植。

[0023] 根据本发明的一些实施方案,所述记忆T细胞无CD45RA⁺细胞。

[0024] 根据本发明的一些实施方案,所述记忆T细胞无CD4⁺和/或CD56⁺细胞。

[0025] 根据本发明的一些实施方案,使记忆T细胞群与一种或多种抗原接触在IL-21存在下实现。

[0026] 根据本发明的一些实施方案,在细胞因子存在下培养步骤(b)产生的细胞包括在IL-21、IL-15和/或IL-7任一者存在下培养所述细胞。

[0027] 根据本发明的一些实施方案,所述方法进一步包括在提供至少70 %记忆T细胞的细胞群之前使用一种或多种抗原处理细胞供体。

[0028] 根据本发明的一些实施方案,针对所述一种或多种抗原富集至少70 %记忆T细胞

的细胞群。

[0029] 根据本发明的一些实施方案,所述一种或多种抗原选自病毒抗原、细菌抗原、肿瘤抗原、自身免疫性疾病相关抗原、蛋白提取物、纯化的蛋白质以及合成肽。

[0030] 根据本发明的一些实施方案,所述一种或多种抗原由自体抗原递呈细胞、非自体抗原递呈细胞、人工载体或人工抗原递呈细胞递呈。

[0031] 根据本发明的一些实施方案,所述一种或多种抗原由与记忆T细胞相同来源的抗原递呈细胞递呈。

[0032] 根据本发明的一些实施方案,所述一种或多种病毒抗原由自体抗原递呈细胞、非自体抗原递呈细胞、人工载体或人工抗原递呈细胞递呈。

[0033] 根据本发明的一些实施方案,所述一种或多种病毒抗原由与PBMC相同来源的抗原递呈细胞递呈。

[0034] 根据本发明的一些实施方案,抗原递呈细胞是树突状细胞。

[0035] 根据本发明的一些实施方案,所述一种或多种病毒抗原包含两种或更多种病毒肽。

[0036] 根据本发明的一些实施方案,所述一种或多种病毒抗原包含EBV肽、CMV肽和/或腺病毒(Adv)肽。

[0037] 根据本发明的一些实施方案,所述一种或多种病毒抗原包含三种EBV肽、两种CMV肽以及两种腺病毒(Adv)肽。

[0038] 根据本发明的一些实施方案,所述一种或多种病毒抗原选自EBV-LMP2、EBV-BZLF1、EBV-EBNA1、CMV-pp65、CMV-IE-1、Adv-五邻体以及Adv-六邻体。

[0039] 根据本发明的一些实施方案,所述一种或多种病毒抗原包含EBV-LMP2、EBV-BZLF1、EBV-EBNA1、CMV-pp65、CMV-IE-1、Adv-五邻体以及Adv-六邻体中的两种或更多种。

[0040] 根据本发明的一些实施方案,所述一种或多种病毒抗原进一步包含细菌抗原。

[0041] 根据本发明的一些实施方案,在IL-21存在下使记忆T细胞群与所述一种或多种抗原接触进行12小时至5天。

[0042] 根据本发明的一些实施方案,在IL-21存在下使记忆T细胞群与所述一种或多种抗原接触进行3天。

[0043] 根据本发明的一些实施方案,在IL-21、IL-15和/或IL-7存在下培养步骤(b)产生的细胞进行12小时至10天。

[0044] 根据本发明的一些实施方案,在IL-21、IL-15和IL-7存在下培养步骤(b)产生的细胞进行4天至8天。

[0045] 根据本发明的一些实施方案,在IL-21、IL-15和/或IL-7存在下培养步骤(b)产生的细胞进行6天。

[0046] 根据本发明的一些实施方案,生成所述非GvHD诱导细胞的总时长为10天。

[0047] 根据本发明的一些实施方案,所述方法还包括在步骤(c)之后耗竭同种异体反应性细胞。

[0048] 根据本发明的一些实施方案,耗竭同种异体反应性细胞通过在使包含Tcm表型的细胞与宿主抗原递呈细胞(APC)接触之后耗竭CD137⁺和/或CD25⁺细胞而进行。

[0049] 根据本发明的一些实施方案,所述方法离体进行。

- [0050] 根据本发明的一些实施方案,PBMC相对于受试者是非同源的。
- [0051] 根据本发明的一些实施方案,PBMC相对于受试者是同种异体的。
- [0052] 根据本发明的一些实施方案,具有T中央记忆表型的细胞包含 $CD3^+$ 、 $CD8^+$ 、 $CD62L^+$ 、 $CD45RA^-$ 、 $CD45RO^+$ 标记。
- [0053] 根据本发明的一些实施方案,所述生物样品选自血液、血浆、血清、脊髓液、淋巴液以及组织活检。
- [0054] 根据本发明的一些实施方案,所述一种或多种抗原选自病毒抗原、细菌抗原、肿瘤抗原以及自身免疫性疾病相关抗原。
- [0055] 根据本发明的一些实施方案,所述方法还包括将细胞或组织移植物植入受试者。
- [0056] 根据本发明的一些实施方案,所述药剂还包含细胞或组织移植物。
- [0057] 根据本发明的一些实施方案,移植是在施用非GvHD诱导细胞的分离群同时、之前或之后进行。
- [0058] 根据本发明的一些实施方案,所述疾病是恶性病。
- [0059] 根据本发明的一些实施方案,所述疾病是非恶性病。
- [0060] 根据本发明的一些实施方案,非GvHD诱导细胞的分离群在细胞或组织移植之前、同时或之后施用。
- [0061] 根据本发明的一些实施方案,在本发明的一些实施方案的方法中于(a)之前进行(b)。
- [0062] 根据本发明的一些实施方案,在本发明的一些实施方案的方法中(a)和(b)同时进行。
- [0063] 根据本发明的一些实施方案,所述方法还包括在移植之前于亚致死、致死或超致死条件下调节受试者。
- [0064] 根据本发明的一些实施方案,非GvHD诱导细胞的分离群的用途还包括亚致死、致死或超致死调节方案。
- [0065] 根据本发明的一些实施方案,亚致死、致死或超致死调节选自全身辐射(TBI)、体分区辐射、骨髓性调节、非骨髓性调节、共刺激性阻断、化疗药物以及抗体免疫疗法。
- [0066] 根据本发明的一些实施方案,所述细胞或组织移植物与受试者是非同源的。
- [0067] 根据本发明的一些实施方案,所述细胞或组织移植物和非GvHD诱导细胞的分离群获自相同供体。
- [0068] 根据本发明的一些实施方案,所述细胞或组织移植物源于选自HLA相同的同种异体供体、HLA不相同的同种异体供体以及异种供体的供体。
- [0069] 根据本发明的一些实施方案,所述细胞或组织移植物包括未成熟的造血细胞。
- [0070] 根据本发明的一些实施方案,所述细胞或组织移植物选自肝脏、胰腺、脾脏、肾脏、心脏、肺、皮肤、肠、脑、卵巢以及淋巴/造血细胞或组织。
- [0071] 根据本发明的一些实施方案,所述细胞或组织移植物包括数种器官联合移植。
- [0072] 根据本发明的一些实施方案,所述联合移植包括移植未成熟的造血细胞和实体器官。
- [0073] 根据本发明的一些实施方案,未成熟的造血细胞和实体器官获自相同供体。
- [0074] 根据本发明的一些实施方案,未成熟的造血细胞在实体器官移植之前、同时或之

后移植。

[0075] 根据本发明的一些实施方案,所述受试者患有恶性病。

[0076] 根据本发明的一些实施方案,所述恶性病为实体瘤或肿瘤转移。

[0077] 根据本发明的一些实施方案,所述恶性病为血液恶性肿瘤。

[0078] 根据本发明的一些实施方案,所述恶性病选自白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、黑素瘤、肉瘤、成神经细胞瘤、结肠癌、结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、食管癌、滑膜细胞癌、肝癌以及胰腺癌。

[0079] 根据本发明的一些实施方案,所述受试者患有非恶性病。

[0080] 根据本发明的一些实施方案,所述非恶性病选自器官功能障碍或衰竭、血液病、移植植物相关疾病、感染性疾病、自身免疫性疾病、炎症、变态反应、创伤以及损伤。

[0081] 根据本发明的一些实施方案,所述感染性疾病为病毒疾病或细菌疾病。

[0082] 根据本发明的一些实施方案,所述受试者为人受试者。

[0083] 除非另外定义,本文使用的所有技术和/或科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。尽管与本文描述的那些类似或等同的方法和材料可用于本发明实施方案的实践或测试,但是以下描述示例性的方法和/或材料。如果发生冲突,以包括定义在内的专利说明书为准。另外,材料、方法和实例仅为说明性的,并且不打算为必然限制性的。

附图说明

[0084] 本文仅通过实例并参照附图描述本发明的一些实施方案。现具体详细地参照附图,需要强调的是,所显示的细节仅作为实例并且为了本发明实施方案的说明性讨论的目的。在这方面,结合附图的描述对本领域技术人员而言可如何实践本发明的实施方案是显而易见的。

[0085] 附图中:

[0086] 图1是使用源于来自OVA免疫小鼠的 $CD44^{+}CD8^{+}$ 记忆T细胞的反抑Tcm细胞,减少调节T细胞耗竭骨髓移植(TDBMT)模型的示意图。

[0087] 图2A是描述使用卵清蛋白免疫OT1小鼠之后从整群接触过抗原的细胞($CD8^{+}CD44^{+}$)制备的反抑Tcm细胞诱导T细胞耗竭的(TCD)同种异体干细胞移植(SCT)的耐受的曲线图。在有或无:源自OT-1 OVA免疫小鼠的 5×10^6 个 $CD8^{+}CD44^{+}$ 细胞或 5×10^6 个同种异体C57BL/6反抑Tcm细胞(H-2^b)的情况下,使用 20×10^6 个C57BL/6裸鼠(H-2^b)BM细胞移植亚致死辐射的(5.25 Gy)Balb/c(H-2^d)小鼠。在移植之后使用抗宿主(H-2D^d)抗供体(H-2K^b)抗体通过FACS分析外周血液中供体细胞百分数45天。

[0088] 图2B-C是描述 $CD8^{+}CD44^{+}$ Tcm细胞不诱导严格鼠模型中GvHD的曲线图。使用 5×10^6 或 10×10^6 个同种异体OVA免疫的C57BL/6(H-2b)衍生的 $CD8^{+}CD44^{+}$ Tcm细胞或新鲜 $CD8^{+}CD44^{+}$ 细胞移植亚致死辐射的(5 Gy)Balb/c(H-2d)小鼠。 $CD8^{+}CD44^{-}$ 幼稚细胞用作GvHD的阳性对照。(图2B)转移细胞之后62天期间的平均重量变化。(图2C)存活曲线描述了指定组中小鼠存活时间线。

[0089] 图2D是通过源自天然存在的记忆细胞(例如 $CD44^{+}CD8^{+}$ 抗-OVA)的Tcm细胞检测耐受诱导的降低强度调节(RIC)模型的示意图。

[0090] 图2E是描述从天然存在的记忆细胞($CD8^+CD44^+$)群制备的反抑Tcm细胞诱导TCDalloSCT耐受的曲线图。在有或无:源自OVA免疫小鼠的 5×10^6 个 $CD8^+CD44^+$ 细胞或 5×10^6 个同种异体C57BL/6反抑Tcm细胞(H-2^b)、或 5×10^6 个同种异体C57BL/6新鲜分离的 $CD8^+CD44^+$ 细胞的情况下使用 20×10^6 个C57BL/6裸鼠(H-2^b)BM细胞移植亚致死辐射的(5 Gy)Balb/c(H-2^d)小鼠。在移植之后使用抗宿主(H-2D^d)抗供体(H-2K^b)抗体通过FACS分析外周血液中供体细胞百分数55天。

[0091] 图3A-D是描述使用病毒肽生成抗第三方 $CD4^-CD56^-$ 反抑Tcm细胞的曲线图。将第0天在耗竭来自供体PBMC的 $CD4^+$ 和 $CD56^+$ 细胞之后建立的人 $CD4^-CD56^-$ 应答细胞与IL-21一起针对使用EBV、CMV以及腺病毒的病毒肽脉冲的经辐射的源于供体的DC联合培养至第+3天,其中从第+3至+9天添加IL-21、IL-15以及IL-7。(图3A-B)在第0天 $CD4^-CD56^-$ 应答细胞的反抑Tcm表型的FACS分析(图3A)和在培养第9天由其生成的抗病毒Tcm细胞的FACS分析。(图3C-D)在第+9天,收获细胞,并针对辐射的宿主PBMC培养5天(即分批培养),然后收获并在有限稀释分析(LDA)中在IL-2存在下针对辐射的宿主PBMC再刺激7天用于诱导效应细胞表型。在第+21天,针对ConA-blast宿主来源进行S³⁵-甲硫氨酸LDA杀伤测定。在5小时混合淋巴细胞反应(MLR)之后,从孔采集上清液,在β计数器中进行放射性计数。(图3C)呈现%应答培养物相对于每一培养物的细胞数量的曲线。(图3D)呈现%非应答培养物相对于每一培养物的细胞数量的线性回归曲线。从线性回归斜率计算特定培养物中抗宿主克隆的频率(f)。

[0092] 图4A是用于生成白细胞分离术衍生的抗病毒 $CD4^-CD56^-CD45RA^-$ 人反抑Tcm细胞和检测其抗宿主反应的方案的示意图。

[0093] 图4B是生成病毒肽负载的人成熟树突状细胞的示意图。

[0094] 图5A-B是描述使用负载病毒肽的自体DC作为第三方刺激从 $CD4^-CD56^-CD45RA^-$ 应答细胞生成的抗病毒反抑Tcm细胞的图。(图5A)第0天 $CD4^-CD56^-$ 应答细胞的表型和第+9天Tcm细胞的表型(右小图)。(图5B)第0天 $CD4^-CD56^-CD45RA^-$ 应答细胞的表型和第+9天Tcm细胞的表型(右小图)。

[0095] 图5C是描述与新鲜 $CD4^-CD56^-CD19^-$ T细胞相比自 $CD4^-CD56^-CD45RA^-$ 和 $CD4^-CD56^-$ 细胞部分生成的抗病毒Tcm细胞中抗宿主CTL前体频率的有限稀释分析(LDA)的图。在第+9天,从新鲜解冻的供体细胞微珠分选新鲜的 $CD4^-CD56^-CD19^-$ 细胞的对照群。在第+9天,针对辐射的宿主PBMC培养所有三种供体型细胞制备物(即,抗病毒反抑Tcm $CD4^-CD56^-$,抗病毒反抑Tcm $CD4^-CD56^-CD45RA^-$ 以及新鲜 $CD4^-CD56^-CD19^-$ 细胞)(即分批培养),然后收获并在IL-2存在下在LDA中针对辐射的宿主PBMC再刺激7天用于诱导效应细胞表型。在第+21天,针对宿主来源的ConA-blast进行S³⁵-甲硫氨酸LDA杀伤测定。在5小时MLR之后,从孔采集上清液,在β计数器中进行放射性计数。呈现%非应答培养物相对于每一培养物的细胞数量的线性回归曲线。从线性回归斜率计算特定培养物中抗宿主克隆的频率(f)。

[0096] 图6是总结针对病毒肽生成反抑Tcm细胞之前和之后抗宿主T细胞耗竭的表格(如图4A和图5A-C中进行的)。值得注意的是,基于LDA测定的低抗宿主CTL-p频率和总抗宿主CTL-p水平(曲线上所圈的)。

[0097] 图7是生成源自记忆T细胞并在自体抗原递呈细胞背景中针对病毒抗原培养的人反抑Tcm细胞的方案的实施方案的示意图。

[0098] 图8是总结其中通过图7呈现的方案从记忆T细胞生成反抑Tcm细胞的10个实验的

表格。值得注意的是,细胞回收率和纯度非常具有可再现性。

[0099] 图9A-H是描述显示通过图7中呈现的方案从记忆T细胞生成的反抑Tcm细胞的纯度的一个实验的典型FACS分析的图。该图如下显示了图8中呈现的各步骤的FACS分析:图9A-B描述了纯化前外周血单核细胞(PBMC)的FACS分析,图9C-D描述了在CD4⁺CD56⁺纯化之后的FACS分析,图9E-F描述了在CD4⁺CD56⁺CD45RA⁺纯化之后的FACS分析(即CD4⁺CD56⁺CD45RO⁺细胞的富集),图9G-H描述了抗病毒Tcm细胞的FACS分析。

具体实施方案

[0100] 本发明在其一些实施方案中涉及从记忆T细胞生成的反抑细胞,更具体地但非排他地涉及其制备方法并且涉及其在移植中和在疾病治疗中的应用。

[0101] 本发明的原理和操作可参照附图和随附描述更好地理解。

[0102] 在详细解释本发明的至少一种实施方案之前,应该理解的是,本发明的应用不一定限于以下描述中阐述或通过实施例例示的细节。本发明能够具有以多种方式实践或实施的其他实施方案。另外,应该理解的是,本文使用的用语和术语是为了描述的目的,而不应认为是限制性的。

[0103] 骨髓(BM)移植为患有血液恶性肿瘤和其他病症(例如血液疾病、器官衰竭)的许多患者提供治愈性治疗。另外,BM可与多种其他器官(例如,来自相同器官供体的肾脏或肝脏移植)联合移植,以通过诱导嵌合增加移植成功率。然而,BM移植物包含对宿主抗原(Ag)应答并导致多系统移植物抗宿主病(GvHD)的供体T细胞。在这些情况下几乎均一致死的GvHD的问题可通过移植T细胞耗竭的骨髓(TDBMT)来预防。然而,GvHD预防的益处可通过显著增加的移植物排斥抵消。

[0104] 克服同种异体TDBMT的排斥的一种方法是利用多种反抑细胞制备物,如PCT 公开号WO 2001/49243、WO 2007/023491、WO 2010/049935、WO 2012/032526以及WO 2013/035099所教导的。然而,移植物排斥和GvHD仍是过继性细胞治疗的主要问题,特别是在同种异体情况下更是如此。

[0105] 在将本发明应用于实践时,本发明的发明人揭示了还包含抗病活性(例如抗病活性)而不诱导移植物抗宿主(GvH)反应的改进的反抑细胞群。这些新颖的细胞由抗原活化的方式通过耗竭来自记忆T细胞的同种异体反应性克隆而生成。

[0106] 如下文中以及随后的实施例章节中所示出的,本发明的发明人提供了起始于记忆T细胞生成用于HLA错配(例如同种异体)应用的反抑细胞的新方法。特别地,如图1所示,本发明的发明人利用小鼠模型从天然存在的记忆T细胞生成反抑Tcm细胞。由记忆T细胞生成的Tcm细胞诱导降低强度调节的T细胞耗竭的骨髓移植(TDBMT)模型中的耐受,无移植物抗宿主反应(图2A),表现出降低强度调节方案后嵌合显著提高(图2E)。然而,显示新鲜CD8⁺CD44⁺记忆细胞(不经历抗原活化)诱导GvHD导致的显著致死性和重量减轻(图2B-C)。

[0107] 接下来,病毒抗原用于从CD4⁺CD56⁺细胞群生成Tcm反抑细胞。如图3A-B所示,在自体树突状细胞递呈的病毒抗原存在下培养从培养开始的9天包含93 % Tcm表型(CD62⁺CD45RO⁺细胞)。另外,与新鲜CD4⁺CD56⁺细胞相比,这些Tcm细胞提供两个对数级的宿主同种异体反应性克隆的耗竭(图3C-D和下面的表2)。然后,通过首先耗竭获自CD4⁺、CD56⁺以及CD45RA⁺细胞的细胞供体的外周血单核细胞(PBMC)从人记忆细胞生成反抑细胞(图

4A)。因此,其余的细胞群包含供体CD8⁺T记忆细胞。将CD8⁺T记忆细胞与树突状细胞(相同细胞供体)联合培养,其中树突状细胞已被处理表达抗原(例如,病毒抗原混合物(cocktail),包括EBV、CMV以及腺病毒)。在前三天,给细胞培养物补充IL-21,然后,从第3天起,将IL-21、IL-15以及IL-7添加至培养物,直至第9天。所产生的细胞群包含Tcm表型,不产生任何抗宿主反应(如图5A-C和6所示)。

[0108] 总体而言,通过抗原活化(例如使用病毒抗原、肿瘤抗原)耗竭T细胞记忆库中的同种异体反应性克隆可解决记忆T细胞库中保留的残余GvHD的问题。另外,这些结果表明从记忆细胞生成的新型反抑细胞制备物可用于细胞疗法,以诱导移植耐受,无GvHD并发症,以及用于疾病治疗(例如用于抗病毒或抗癌应用)。

[0109] 因此,根据本发明的一个方面,提供了一种生成非移植物抗宿主病(GvHD)诱导细胞的分离群的方法,所述细胞包含中央记忆T淋巴细胞(Tcm)表型,所述细胞为耐受诱导细胞和/或赋有抗病活性,在移植之后能够归巢至淋巴结,所述方法包括:(a)提供至少70 %记忆T细胞的细胞群;(b)使所述记忆T细胞的细胞群与一种或多种抗原接触,以使得抗原反应性细胞富集;以及(c)在细胞因子存在下培养步骤(b)产生的所述细胞,以使得包含中央记忆T淋巴细胞(Tcm)表型的细胞增殖,由此生成所述非GvHD诱导细胞的分离群。

[0110] 本文使用的用语“细胞分离群”是指已经从其天然环境(例如人体)中分离出来的细胞。

[0111] 本文使用的术语“非移植物抗宿主病”或“非-GvHD”是指具有显著降低的移植物抗宿主诱导反应性或不具有移植物抗宿主(GvH)诱导反应性。因此,如在移植后的30-120天内通过受移植的受试者的存活、体重和总体外观所证明的,所产生的本发明的细胞不会显著导致移植物抗宿主病(GvHD)。评价受试者减轻的GvHD的方法为本领域技术人员公知。

[0112] 根据一种实施方案,相对于不根据本发明的教导生成的细胞,本发明的细胞对宿主的反应性降低至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或者甚至100%。

[0113] 本文使用的用语“中央记忆T淋巴细胞(Tcm)表型”是指归巢至淋巴结的T细胞毒性细胞的亚群。人的具有Tcm表型的细胞通常包含CD3⁺/CD8⁺/CD62L⁺/CD45RO⁺/CD45RA⁻特征。应认识到,Tcm细胞可在单细胞上表达所有特征标志物,或者可在单细胞上仅表达部分特征标志物。细胞表型的确定可使用本领域技术人员已知的任何方法进行,例如,通过荧光活化细胞分选(FACS)或捕获ELISA标记。

[0114] 根据一种实施方案,至少20 %、至少30%、至少40%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或者甚至100%的细胞分离群具有Tcm细胞标志物。

[0115] 根据一种具体实施方案,约20-40 %、约30-50 %、约40-60 %、约50-70 %、约60-80 %、约70-90 %、约80-100 %、或约90-100 %的细胞分离群具有Tcm细胞标志物。

[0116] 本文中本发明的非GvHD诱导细胞的分离群也称为“Tcm细胞”。

[0117] 如所提及的那样,Tcm细胞通常在移植后归巢至淋巴结。根据一些实施方案,本发明的细胞分离群可在移植后归巢至淋巴结中的任何一种,例如外周淋巴结和肠系膜淋巴结。这些细胞的归巢性质使其能够以快速和有效的方式发挥其反抑性效应。

[0118] 本发明的Tcm细胞分离群为耐受诱导细胞。

[0119] 本文使用的用语“耐受诱导细胞”是指与不存在施用的耐受诱导细胞的情况下受者细胞的反应性相比较,当其与受者细胞接触时引起受者细胞(例如受者T细胞)的反应性降低的细胞。如先前在PCT公开号W0 2001/049243和W0 2002/102971中描述的,耐受诱导细胞包括反抑细胞(即在与宿主T细胞接触时导致其细胞凋亡的T细胞)。

[0120] 术语“反抑活性”涉及免疫细胞(例如供体来源的T细胞),其在识别并结合于反抑细胞时导致抗供体的受者T细胞失活。根据一种实施方案,失活导致抗供体的受者T细胞的细胞凋亡。

[0121] 另外或可选地,本发明Tcm细胞分离群包含抗病活性。

[0122] 术语“抗病活性”是指Tcm细胞针对病变细胞的功能。所述抗病活性可直接针对病变细胞,例如病变细胞的杀伤能力。此活性可归因于由LFA1-I/CAM1结合介导的TCR独立杀伤[Arditti等人,Blood(2005) 105(8):3365-71. Epub 2004 Jul 6]。另外或可选地,所述抗病活性可为间接的,例如通过活化导致病变细胞死亡(例如,通过杀伤、细胞凋亡,或通过分泌其他因子,例如抗体、细胞因子等)的其他类型的细胞(例如,CD4⁺ T细胞,B细胞,单核细胞,巨噬细胞,NK细胞)。

[0123] 病变细胞可包含,例如病毒感染细胞、细菌感染细胞、癌细胞[例如,实体瘤或白血病/淋巴瘤细胞,本文也称为Tcm细胞的移植物抗白血病(GVL)活性],自身免疫性疾病相关细胞,变态反应相关细胞,或由于应激、辐射或年龄导致改变的细胞。

[0124] 根据一些实施方案,本发明的Tcm细胞可是非基因修饰的细胞或基因修饰的细胞(例如,已经过基因工程设计以表达或不表达特定基因、标记物或肽或以分泌或不分泌特定细胞因子的细胞)。可使用本领域中任何已知的方法来基因工程设计细胞,例如通过失活相关基因或通过插入干扰多肽表达的反义RNA(参见例如W0/2000/039294,在此通过引用并入)。

[0125] 根据本发明的一些实施方案,提供了一种生成细胞分离群的方法,所述方法包括:(a)提供记忆T细胞群;(b)使所述记忆T细胞群与一种或多种抗原接触,以使得抗原反应性细胞富集;以及(c)在细胞因子存在下培养步骤(b)产生的所述细胞,以使得包含中央记忆T淋巴细胞(Tcm)表型的细胞增殖。

[0126] 本文使用的术语“记忆T细胞”是指先前已经经历和应答抗原的淋巴细胞子集,也称为接触过抗原的T细胞。

[0127] 根据一种实施方案,所述记忆T细胞包含至少约50 %、至少约60 %、至少约70 %、至少约80 %、至少约90 %、至少约95 %、至少约99 %、或甚至100 %的细胞群。

[0128] 根据一种实施方案,所述记忆T细胞包含表达CD8标志物的细胞毒性T细胞(即CD8⁺ T细胞)。

[0129] 根据另一种实施方案,所述记忆T细胞包含CD8⁺CD45RO⁺表型。

[0130] 根据另一种实施方案,所述记忆T细胞包含CD8⁺CD45RA⁻表型。

[0131] 根据另一种实施方案,所述记忆T细胞包含CD8⁺CD45RO⁺CD45RA⁻表型。

[0132] 记忆CD8⁺ T细胞的筛选可通过筛选共表达CD8⁺和CD45RA⁻的细胞和/或共表达CD8⁺和CD45RO⁺的细胞来进行,可使用本领域已知的任何方法来实施,例如通过基于亲和力的纯化(例如,通过使用MACS珠、FACS分选仪和/或捕获ELISA标记)。

[0133] 记忆CD8⁺ T细胞的筛选可进一步通过筛选效应T细胞和中央记忆T细胞来进行,后

者表达例如CD62L、CCR7、CD27和/或CD28。

[0134] 根据一种实施方案,记忆T细胞获自外周血单核细胞(PBMC)。

[0135] 根据一种实施方案,记忆T细胞获自淋巴组织,例如淋巴结或脾脏。

[0136] 为了获得包含高纯度记忆T细胞(例如至少约50-70%记忆T细胞)的细胞群或为了增加记忆T细胞的数量,可对PBMC耗竭幼稚细胞(例如CD45RA⁺细胞)、粘附细胞(例如单核细胞、巨噬细胞)、CD4⁺细胞(例如T辅助细胞)、CD56⁺细胞(例如NK细胞)、或不包含记忆T细胞表型的任何其他细胞。

[0137] 耗竭幼稚T细胞(例如,表达CD45RA⁺的细胞)、CD4⁺和/或CD56⁺细胞可使用本领域已知的任何方法进行,例如通过基于亲和力的纯化(例如,通过使用MACS珠、FACS分选仪和/或捕获ELISA标记)。

[0138] 耗竭粘附细胞可使用本领域已知的任何方法进行,例如,通过于细胞培养皿培养PBMC(例如2-6小时),和收集非粘附细胞。

[0139] 根据一种实施方案,所述记忆T细胞无CD45RA⁺细胞。

[0140] 根据一种实施方案,所述记忆T细胞无CD4⁺和/或CD56⁺细胞。

[0141] 为了从记忆T细胞库耗竭同种异体反应性克隆,使记忆T细胞与一种或多种抗原接触。

[0142] 本文使用的用语“一种或多种抗原”是指能够诱导免疫反应的可溶性或非可溶性(例如膜相关)分子。

[0143] 例如,一种或多种抗原可为完整细胞(例如活细胞或死细胞)、细胞级分(例如裂解细胞)、细胞抗原(例如细胞表面抗原)、蛋白提取物、纯化蛋白或合成肽。例如,本发明的一些实施方案的一种或多种抗原包括恶性病相关抗原(例如肿瘤抗原)、自身免疫性疾病相关抗原(即自身免疫抗原)、变态反应相关抗原(即变态反应抗原)、病毒的抗原(即病毒抗原)、细菌的抗原(即细菌抗原)或真菌的抗原(例如真菌性抗原)

[0144] 根据一种实施方案,所述一种或多种抗原为感染性生物体(例如病毒、细菌、真菌生物体),其通常影响受试者(例如移植患者)的免疫。可影响患者免疫的例示的感染性生物体包括但不限于:病毒,例如细小病毒(例如细小病毒B19),轮状病毒,水痘-带状疱疹病毒(VZV),单纯疱疹病毒(HSV),细胞巨化病毒(CMV),EB病毒(EBV),多瘤病毒(例如BK病毒);细菌,例如肺炎链球菌,铜绿假单胞菌,嗜肺性军团病杆菌(*Legionella pneumophila*),单核细胞增生性李斯特菌(*L. monocytogenes*),诺卡氏菌(*Nocardia species*),分枝杆菌(*Mycobacterium species*),金黄色葡萄球菌(*S. aureus*),诺卡氏菌(*Nocardia species*),铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*),*Serratia species*,色素杆菌属(*Chromobacterium*),链球菌(streptococci),*Burkholderia*,分枝杆菌(例如,鸟-胞内分枝杆菌复合菌),有荚膜的细菌,例如肺炎链球菌,流感嗜血杆菌(*H. influenzae*)和脑膜炎奈瑟菌(*N. meningitidis*);真菌,例如*P. jiroveci*,念珠菌,以及曲霉菌;以及寄生虫,例如弓形虫、隐孢子虫以及类圆线虫。

[0145] 根据一种实施方案,所述抗原是病毒抗原,例如但不限于EB病毒(EBV)、腺病毒(Adv)、巨细胞病毒(CMV)、感冒病毒、流感病毒、甲型、乙型以及丙型肝炎病毒、单纯疱疹病毒、人类免疫缺陷病毒(HIV)、流感病毒、日本脑炎病毒、麻疹病毒、脊髓灰质炎病毒、呼吸道合胞病毒、风疹病毒、天花病毒、水痘带状疱疹病毒、西尼罗病毒、多瘤病毒(例如BK病毒)或

寨卡病毒。

[0146] 作为病毒抗原的进一步具体的实例,腺病毒抗原包括但不限于Adv-五邻体或Adv-六邻体;CMV抗原包括但不限于包膜糖蛋白B、CMV IE-1以及CMV pp65;EBV抗原包括但不限于EBV LMP2、EBV BZLF1、EBV EBNA1、EBV P18、以及EBV P23;肝炎抗原包括但不限于乙型肝炎病毒的S、M以及L蛋白,乙型肝炎病毒的前S抗原,HBCAG DELTA、HBV HBE,丙型肝炎病毒RNA,HCV NS3以及HCV NS4;单纯疱疹病毒抗原包括但不限于,立即早期蛋白和糖蛋白D;HIV抗原包括但不限于,gag、pol以及env基因的基因产物,例如,HIV gp32、HIV gp41、HIV gp120、HIV gp160、HIV P17/24、HIV P24、HIV P55 GAG、HIV P66 POL、HIV TAT、HIV GP36、Nef蛋白,以及逆转录酶;流感抗原包括但不限于血凝素和神经氨酸苷酶;日本脑炎病毒抗原包括但不限于E、M-E、M-E-NS1、NS1、NS1-NS2A蛋白和80% E蛋白;麻疹抗原包括但不限于,麻疹病毒融合蛋白;狂犬抗原包括但不限于狂犬糖蛋白和狂犬核蛋白;呼吸道合胞病毒抗原包括但不限于RSV融合蛋白和M2蛋白,轮状病毒抗原包括但不限于VP7sc;风疹抗原包括但不限于E1和E2蛋白;水痘带状疱疹病毒抗原包括但不限于gp和gp11。

[0147] 根据一种实施方案,所述抗原是细菌抗原,例如但不限于炭疽抗原,革兰氏阴性杆菌,衣原体,白喉,流感嗜血杆菌,幽门螺旋杆菌,疟疾,结核分枝杆菌,百日咳毒素,肺炎球菌,立克次氏体,葡萄球菌,链球菌,以及破伤风菌。

[0148] 作为细菌抗原的进一步具体实例,炭疽抗原包括但不限于炭疽保护性抗原;革兰氏阴性杆菌抗原包括但不限于脂多糖;流感嗜血杆菌流感嗜血杆菌抗原包括但不限于荚膜多糖;白喉抗原包括但不限于白喉毒素;结核分枝杆菌抗原包括但不限于分枝菌酸,热休克蛋白65(HSP65),30 kDa的主要分泌蛋白以及85A抗原;百日咳毒素抗原包括但不限于血凝素、粘附素、FIM2、FIM3以及腺苷酸环化酶;肺炎球菌抗原包括但不限于肺炎球菌溶酶和肺炎球菌荚膜多糖;立克次氏体抗原包括但不限于、rompA;链球菌抗原包括但不限于M蛋白;破伤风抗原包括但不限于破伤风毒素。

[0149] 根据一种实施方案,所述抗原是超级细菌(superbug)抗原(例如多重耐药细菌)。超级细菌的实例包括但不限于屎肠球菌、艰难梭菌、鲍氏不动杆菌、铜绿假单胞菌,以及肠杆菌科(包括大肠杆菌、肺炎克雷伯氏杆菌、肠道细菌)。

[0150] 根据一种实施方案,所述抗原是真菌抗原。真菌的实例包括但不限于念珠菌、球孢菌、隐球菌、组织胞浆菌、利什曼原虫、疟原虫、原虫、寄生虫、血吸虫、癣真菌、弓形虫、以及克氏锥虫。

[0151] 作为真菌抗原的进一步具体的实例,球孢菌抗原包括但不限于内孢囊(spherule)抗原,隐球菌抗原包括但不限于荚膜多糖,组织胞浆菌抗原包括但不限于热休克蛋白60(HSP60),利什曼原虫抗原包括但不限于gp63和脂磷酸聚糖,镰状疟原虫(plasmodium falciparum)抗原包括但不限于裂殖子表面抗原,子孢子表面抗原,环子孢子抗原,配子母细胞/配子表面抗原,原虫和其他寄生虫抗原,包括血液期抗原pf 155/RESA;血吸虫抗原包括但不限于谷胱甘肽-S-转移酶和副肌球蛋白(paramyosin),癣真菌抗原包括但不限于发癣菌素;弓形虫抗原包括但不限于SAG-1和p30;克氏锥虫抗原包括但不限于75-77 kDa抗原和56 kDa抗原。

[0152] 根据一种实施方案,所述抗原是由不期望的自身免疫或变态反应病症相关的细胞表达的抗原。例示的自身免疫病症包括但不限于急性坏死出血性脑病,变应性哮喘,贫血,

口疮性溃疡,关节炎(包括类风湿性关节炎,青少年类风湿性关节炎,骨关节炎,银屑病关节炎),哮喘,自身免疫性甲状腺炎,结膜炎,克隆病,皮肤红斑狼疮,皮炎(包括特应性皮炎和湿疹性皮炎),糖尿病(diabetes),糖尿病(diabetes mellitus),麻风结节性红斑,角膜结膜炎,多发性硬化症,重症肌无力,银屑病,硬皮病,斯耶格伦氏综合征(Sjogren's syndrome),包括斯耶格伦氏综合征继发的干性角膜结膜炎,史蒂文斯-约翰逊综合征(Stevens-Johnson syndrome),系统性红斑狼疮,溃疡性结肠炎,阴道炎,以及韦格纳氏肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)。

[0153] 自身免疫抗原的实例包括但不限于谷氨酸脱羧酶65(GAD 65)、天然DNA、髓磷脂碱蛋白,髓磷脂脂蛋白,乙酰胆碱受体组分,甲状腺球蛋白,以及促甲状腺激素(TSH)受体。

[0154] 变应性抗原的实例包括但不限于花粉抗原,例如日本雪松花粉抗原,豚草花粉抗原,黑麦花粉抗原,动物来源的抗原(例如尘螨抗原,猫抗原),组织相容性抗原,青霉素以及其他治疗性药物。

[0155] 根据一种实施方案,所述抗原是肿瘤细胞表达的抗原(或其部分,例如抗原表位)。根据一种实施方案,所述抗原(或其部分)源自造血组织(例如血液恶性肿瘤,例如白血病抗原)中表达或实体瘤(例如黑素瘤、胰腺癌、肝癌、胃肠癌)中表达的蛋白。

[0156] 肿瘤抗原的实例包括但不限于、A33、BAGE、Bcl-2、B细胞成熟抗原(BCMA)、BCR-ABL、 β -连环蛋白,睾丸癌抗原(CTA,例如MAGE-1、MAGE-A2/A3以及NY-ESO-1)、CA 125、CA 19-9、CA 50、CA 27.29(BR 27.29)、CA 15-3、CD5、CD19、CD20、CD21、CD22、CD33、CD37、CD45、CD123、CEA、c-Met、CS-1、细胞周期蛋白B1、DAGE、EBNA、EGFR、ELA2、ephrinB2、雌激素受体、FAP、铁蛋白,叶酸结合蛋白,GAGE、G250/CA IX、GD-2、GM2、gp75、gp100(Pmel 17)、HA-1、HA-2、HER-2/neu、HM1.24、HPV E6、HPV E7、hTERT、Ki-67、LRP、间皮素(mesothelin),粘蛋白样癌症相关抗原(MCA)、MUC1、p53、PR1、PRAME、PRTN3、RHAMM(CD168)、WT-1。其他肿瘤抗原在 Molldrem J. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* (2006) 12:13-18; Alatrash G. and Molldrem J., *Expert Rev Hematol.* (2011) 4(1):37-50; Renkvist et al., *Cancer Immunol Immunother* (2001) 50:3-15; van der Bruggen P, Stroobant V, Vigneron N, Van den Eynde B. Peptide database: T cell-defined tumor antigens. *Cancer Immun* (2013), www.cancerimmunity.org/peptide/; Rittenhouse, Manderino 和 Hass, *Laboratory Medicine* (1985) 16(9) 556-560 中提供,所有这些文献通过引用并入本文。

[0157] 下面是可根据本发明的一些实施方案的教导使用的肿瘤抗原的列表。

[0158] 表1 - 肿瘤抗原列表

[0159]

癌症	TAA/标志物	肿瘤抗原的 GenBank 登录号	HLA
移行细胞癌	Uroplakin II (UPKII)	NP_006751.1	HLA-A2
移行细胞癌	Uroplakin Ia (UPK1A)	NP_001268372.1; NP_008931.1	HLA-A2
前列腺癌	前列腺特异性抗原 (NPSA)	AAO16090.1	HLA-A2
前列腺癌	前列腺特异性膜抗原 (PSCA)	NP_005663.2	HLA-A2
前列腺癌	前列腺酸性磷酸酶 (ACPP)	NP_001090.2; NP_001127666.1; NP_001278966.1	HLA-A2
乳腺癌	BA-46 MFGE8 乳脂肪球 EGF 因子 8 蛋白 [乳凝集素]	NP_001108086.1; NP_005919.2;	HLA-A2
乳腺癌	粘液素 1 (MUC1)	NP_001018016.1; NP_001018017.1; NP_001037855.1; NP_001037856.1; NP_001037857.1; NP_001037858.1; NP_001191214.1; NP_001191215.1; NP_001191216.1; NP_001191217.1; NP_001191218.1; NP_001191219.1; NP_001191220.1; NP_001191221.1; NP_001191222.1; NP_001191223.1; NP_001191224.1; NP_001191225.1; NP_001191226.1; NP_002447.4	HLA-A2
黑色素瘤	前黑色素小体 (PMEL; 也称为 Gp100)	NP_001186982.1 ; NP_001186983.1 ; NP_008859.1	HLA-A2
黑色素瘤	melan-A (MLANA; 也称为 MART1)	NP_005502.1;	HLA-A2
所有肿瘤	端粒酶逆转录酶 (TERT)	NP_001180305.1; NP_937983.2	HLA-A2
白血病和伯基特 淋巴瘤	TAX tax p40 [人嗜 T 淋 巴细胞病毒 1]和 Tax [人嗜 T 淋巴细 胞病毒 4];	NP_057864.1; YP_002455788.1	HLA-A2
癌	NY-ESO 癌/睾丸 癌 1B (CTAG1B)	NP_001318.1	HLA-A2
黑色素瘤	黑色素瘤抗原家族 A1 (MAGEA1)	NP_004979.3	HLA-A2
黑色素瘤	黑色素瘤抗原家族 A3 (MAGEA3, MAGE-A3)	NP_005353.1	HLA-A24
癌	HER2; erb-b2 受体 酪氨酸激酶 2 (ERBB2)	NP_001005862.1 ; NP_001276865.1 ; NP_001276866.1 ; NP_001276867.1 ; NP_004439.2;	HLA-A2
黑色素瘤	β -连环蛋白; 连环 蛋白 (钙粘着蛋白 相关蛋白), β 1, 88kDa (CTNNB1)	NP_001091679.1 ; NP_001091680.1 ; NP_001895.1;	HLA-A24
黑色素瘤	酪氨酸酶 (TYR)	NP_000363.1	HLA-DRB1
白血病	Bcr-abl	AAA35594.1	HLA-A2

	癌症	TAA/标志物	肿瘤抗原的 GenBank 登录号	HLA
[0160]	头和颈	胱天蛋白酶 8, 细胞凋亡相关半胱氨酸蛋白酶 (CASP8)	NP_001073593.1 ; NP_001073594.1 ; NP_001219.2; NP_203519.1; NP_203520.1; NP_203522.1	HLA-B35

[0161] 根据一种实施方案,所述抗原包含一种抗原(例如,病毒、细菌或肿瘤抗原)。

[0162] 根据一种实施方案,所述一种或多种抗原包含两种或更多种抗原(例如,一组抗原中的抗原的混合物,例如病毒抗原、肿瘤抗原等;或来自不同组抗原中的抗原的混合物,例如,病毒抗原和细菌抗原,病毒抗原和肿瘤抗原,病毒抗原和自身免疫性抗原,肿瘤抗原和自身免疫抗原,或自身免疫抗原和变应性抗原)。

[0163] 根据一种实施方案,所述一种或多种抗原包含两种、三种、四种、五种或更多种抗原(例如,在单一制剂或在数种制剂中)。

[0164] 根据一种实施方案,所述一种或多种抗原包含两种、三种、四种、五种或更多种肿瘤抗原(例如,在单一制剂或在数种制剂中)。

[0165] 根据一种实施方案,所述一种或多种抗原包含两种、三种、四种、五种或更多种病毒抗原(例如,在单一制剂或在数种制剂中)。

[0166] 根据一种具体实施方案,所述一种或多种抗原包含三种病毒抗原,例如,EBV肽,CMV肽以及腺病毒肽。

[0167] 根据一种具体实施方案,所述一种或多种抗原包含EBV-LMP2、EBV-BZLF1、EBV-EBNA1、CMV-pp65、CMV-IE-1、Adv-五邻体以及Adv-六邻体中的两种或更多种(例如,两种、三种、四种、五种、六种或所有七种)。

[0168] 根据一种具体实施方案,所述一种或多种抗原包含作为跨如下三种病毒完整蛋白序列的重叠肽文库(例如,重叠11个氨基酸的15mer)的pepmix的混合物:CMV,EBV以及腺病毒(这些pepmix可从例如JPT Technologies, Berlin, Germany商购)。

[0169] 根据另一种具体实施方案,所述一种或多种抗原包含跨EBV-LMP2、EBV-BZLF1、EBV-EBNA1、CMV-pp65、CMV-IE-1、Adv-五邻体以及Adv-六邻体的七种pepmix的混合物,浓度为例如100 ng/种肽或700 ng/七种肽的混合物。

[0170] 根据一种具体实施方案,所述病毒抗原进一步包含一种或多种细菌抗原。

[0171] 为了刺激记忆T细胞的免疫反应,使用其他刺激性抗原,例如蛋白限于卵清蛋白、DNP(二硝基苯)、KLH(匙孔蛾血蓝蛋白)。

[0172] 根据一种实施方案,所述一种或多种抗原是“一种或多种第三方抗原”,即不存在于供体或受者的一种或多种可溶性或非可溶性(例如膜相关)抗原。例如,第三方抗原可为第三方细胞。

[0173] 就供体和受者而言,第三方细胞可为同种异体或异种的(下文进一步详细解释)。在同种异体第三方细胞的情况下,这些细胞具有与供体不同的HLA抗原,但其不与受者HLA抗原交叉反应,以致针对这些细胞生成的抗第三方细胞不会对移植物或受者抗原发生反应。

[0174] 根据本发明的一种实施方案,同种异体或异种第三方细胞为选自以下的刺激性细胞:由外周血淋巴细胞(PBL)、脾脏或淋巴结、细胞因子动员的PBL、体外扩增的抗原递呈细胞(APC)、体外扩增的树突状细胞(DC)和人工抗原递呈细胞纯化的细胞。

[0175] 本发明的抗原可递呈在细胞、病毒、真菌或细菌表面上,或者由此来源和/或纯化。

另外,病毒、真菌或细菌抗原可展示在感染细胞上,或者细胞抗原可展示在人工载体(例如脂质体)或人工抗原递呈细胞(例如用一种或多种抗原转染的细胞系)上。由此,病毒、细菌或真菌抗原可通过这样或那样感染而被制备成表达病毒/细菌/真菌肽的细胞递呈。相似地,肿瘤抗原、自身免疫抗原或变应性抗原可通过被制备以表达这些抗原的细胞递呈。

[0176] 利用细胞、病毒感染的细胞、细菌感染的细胞、病毒肽递呈细胞或细菌肽递呈细胞作为抗原特别有利,因为这些抗原包括各种各样的抗原决定簇,并且因此引导形成多样化群体的T_{cm}细胞,其可在其中需要这种重建的情况下,例如,在致死或亚致死辐射或化疗程序(如下文详细讨论的)之后进一步用于更快速地重建T细胞,或抵抗疾病(如下文详细讨论的)。

[0177] 由此,抗原递呈细胞(如下文讨论的自体或非自体抗原递呈细胞)、细胞系、人工载体(例如脂质体)或人工抗原递呈细胞(例如使用一种或多种抗原感染的白血病细胞系或成纤维细胞系)可用于递呈融合或装载于其上的短合成肽或者递呈蛋白质提取物或纯化的蛋白质。这种短肽、蛋白质提取物或纯化的蛋白质可为病毒抗原、细菌抗原、真菌抗原、肿瘤抗原、自身免疫抗原或变应性抗原来源的肽或代表任何其他抗原的肽。

[0178] 专用软件可用于分析病毒抗原、细菌抗原、真菌抗原、肿瘤抗原、自身免疫抗原或变应性抗原序列以鉴定免疫原性短肽,即可在I类MHC(主要组织相容性复合物)或II类MHC的情况下递呈的肽。

[0179] 另外,本发明的人工载体或人工APC可被工程改造为呈现MHC,而不需用外源性肽脉冲。由此,根据一种实施方案,人工APC包含使用MHC决定簇(例如就记忆T细胞而言为自体的)和共刺激分子转染的K562肿瘤细胞[如先前描述的,例如Suhoski MM等人,Mol Ther. (2007) 15(5):981-8],或使用相同物质转染的成纤维细胞。

[0180] 根据一种实施方案,所述一种或多种抗原由就记忆T细胞而言自体同源例如相同来源(如相同供体)的抗原递呈细胞(例如DC)递呈,以使得能够在I类MHC或II类MHC的情况下进行记忆T细胞识别。

[0181] 根据一种实施方案,所述一种或多种抗原由呈现可被记忆T细胞识别的MHC抗原(也称为人白细胞抗原(HLA))的基因修饰的抗原递呈细胞或人工抗原递呈细胞递呈。

[0182] 根据一种实施方案,所述抗原递呈细胞包括人细胞。

[0183] 根据一种实施方案,所述抗原递呈细胞包括树突状细胞(DC)。

[0184] 根据一种实施方案,所述抗原递呈细胞包括成熟的树突状细胞。

[0185] 根据一种实施方案,所述抗原递呈细胞包括受辐射的树突状细胞。

[0186] 由此,根据一种实施方案,以约5-10Gy、约10-20Gy、约20-30Gy、约20-40Gy、约20-50Gy、约10-50Gy来辐射DC。根据一种具体实施方案,以约10-50Gy(例如30Gy)来辐射DC。

[0187] 利用树突状细胞作为APC的方法为本领域已知。由此,作为非限制性实例,可从细胞供体[例如,从记忆T细胞相同的细胞供体]获得外周血单核细胞(PBMC)。将PBMC接种于培养板,在37 °C和5 % CO₂/O₂使用补充有人血清(例如1%人血清)和青霉素/链霉素(例如1%青霉素/链霉素)的DC细胞培养基(例如Cellgro DC培养基)孵育1-5小时(例如3小时)。弃除上清细胞(包含T细胞),在添加细胞因子GM-CSF(例如800-1600 IU/ml)和IL-4(例如750 IU/ml)(可获自例如 Peprotech, Hamburg, Germany)的相同培养条件将剩余的细胞(即贴壁细胞)进一步孵育48-96小时(例如72小时)。2-4天(例如3天)后,收集悬浮细胞(即包含大部分

未成熟树突状细胞), 将其与用于成熟DC的细胞因子一起接种, 例如GM-CSF (例如800IU/ml)、IL-4 (例如750 IU/ml)、LPS (例如, 40ng/ml的来自大肠杆菌055:B5) 和IFN γ (例如200IU/ml) (可获自例如 Peprotech, Hamburg, Germany), 过夜孵育。第二天, 可在冰上孵育10-60分钟 (例如30分钟) 之后弃除非贴壁细胞, 使用例如包含例如2 mM EDTA和1 % HS的冷PBS轻柔地移取成熟的DC, 由此获得由成熟DC组成的大细胞。

[0188] 为了将所述一种或多种抗原递呈至APC (例如成熟DC) 上, 在37 °C和5% CO₂/O₂将所述一种或多种抗原与APC (例如DC) 联合培养约30分钟至3小时 (例如1小时)。例如, 可通过在37 °C和5% CO₂/O₂孵育约小时孵育将pepmix (病毒肽) 混合物负载于DC。根据本发明的一些实施方案, 然后将负载抗原的APC (例如DC) 备用于自记忆T细胞生成Tcm细胞。

[0189] 本发明的Tcm细胞通常通过首先在补充有IL-21的培养物中 (例如在无其他细胞因子的培养物中, 即, 未添加任何另外的细胞因子) 使记忆T细胞群与一种或多种抗原 (如上所述) 接触而生成。这个步骤通常进行约12-24小时、约12-36小时、约12-72小时、约12-96小时、约24-36小时、约24-36小时、约24-48小时、约24-72小时、约36-48小时、约36-72小时、约48-72小时、0.5-1天、0.5-2天、0.5-3天、0.5-5天、1-2天、1-3天、1-5天、1-7天、1-10天、2-3天、2-4天、2-5天、2-6天、2-8天、3-4天、3-5天、3-7天、4-5天、4-8天、5-7天、6-8天或8-10天, 并使得抗原反应性细胞富集。

[0190] 根据一种具体实施方案, 在补充有IL-21的培养物中 (无其他细胞因子) 使记忆T细胞群与一种或多种抗原 (如上所述) 接触进行1-5天 (例如3天)。

[0191] 在补充有IL-21的培养物中使记忆T细胞群与一种或多种抗原 (如上所述) 接触通常在存在约0.001-3000 IU/ml、0.01-3000 IU/ml、0.1-3000 IU/ml、1-3000 IU/ml、10-3000 IU/ml、100-3000 IU/ml、1000-3000 IU/ml、0.001-1000 IU/ml、0.01-1000 IU/ml、0.1-1000 IU/ml、1-1000 IU/ml、10-1000 IU/ml、100-1000 IU/ml、250-1000 IU/ml、500-1000 IU/ml、750-1000 IU/ml、10-500 IU/ml、50-500 IU/ml、100-500 IU/ml、250-500 IU/ml、100-250 IU/ml、0.1-100 IU/ml、1-100 IU/ml、10-100 IU/ml、30-100 IU/ml、50-100 IU/ml、1-50 IU/ml、10-50 IU/ml、20-50 IU/ml、30-50 IU/ml、1-30 IU/ml、10-30 IU/ml、20-30 IU/ml、10-20 IU/ml、0.1-10 IU/ml或1-10 IU/ml IL-21的情况下进行。根据一种具体的实施方案, IL-21的浓度为50-150 IU/ml (例如100 IU/ml)。

[0192] 根据一种具体的实施方案, 在无细胞因子的培养物 (例如仅补充有IL-21) 中实现使记忆T细胞与所述一种或多种抗原接触, 这种培养条件仅使得经历用所述一种或多种抗原 (即抗原反应性细胞的抗原) 刺激和活化的那些细胞能够存活和富集, 因为这些细胞分泌使得其能够存活的细胞因子 (例如IL-2) (所有其余的细胞则在这些培养条件下死亡)。

[0193] 一种或多种抗原 (例如, 诸如树突状细胞脉冲的抗原) 与记忆T细胞的比率通常为约1:2至约1:10, 例如约1:4、约1:5、约1:6、约1:8或约1:10。根据一种具体的实施方案, 一种或多种抗原 (例如递呈在APC上的) 与记忆T细胞的比率约为1:2至约1:8 (例如1:5)。

[0194] 接下来, 在无抗原环境中 (即未添加一种或多种抗原) 在存在IL-21、IL-15和/或IL-7的情况下培养所产生的记忆T细胞 (即在与IL-21一起培养之后), 以致使得包含Tcm表型的细胞增殖。该步骤通常实施约12-24小时、约12-36小时、约12-72小时、约12-96小时、约12-120小时、约12-240小时、24-36小时、24-48小时、约24-72小时、24-96小时、24-120小时、24-240小时、约48-72小时、约48-120小时、约48-240小时、约96-240小时、约120-144小时、

约120-240小时、约144-240小时、0.5-1天、0.5-2天、0.5-3天、0.5-5天、0.5-10天、1-2天、1-3天、1-4天、1-6天、1-8天、1-10天、1-15天、2-3天、2-4天、2-5天、2-6天、2-8天、2-10天、4-5天、4-6天、4-8天、4-10天、5-6天、5-7天、5-8天、5-10天、5-15天、6-7天、6-8天、6-10天、7-8天、7-9天、7-10天、7-13天、7-15天、8-10天、10-12天、10-14天、12-14天、14-16天、14-18天、16-18天或18-20天。根据一种具体实施方案,在无抗原环境中存在IL-21、IL-15以及IL-7的情况下培养所产生的记忆T细胞(即在与IL-21一起培养之后)约4-8天(例如6天)。

[0195] 此步骤一般地在以约0.001-3000 IU/ml、0.01-3000 IU/ml、0.1-3000 IU/ml、1-3000 IU/ml、10-3000 IU/ml、100-3000 IU/ml、1000-3000 IU/ml、0.001-1000 IU/ml、0.01-1000 IU/ml、0.1-1000 IU/ml、1-1000 IU/ml、10-1000 IU/ml、100-1000 IU/ml、250-1000 IU/ml、500-1000 IU/ml、750-1000 IU/ml、10-500 IU/ml、50-500 IU/ml、100-500 IU/ml、250-500 IU/ml、100-250 IU/ml、0.1-100 IU/ml、1-100 IU/ml、10-100 IU/ml、30-100 IU/ml、50-100 IU/ml、1-50 IU/ml、10-50 IU/ml、20-50 IU/ml、30-50 IU/ml、1-30 IU/ml、10-30 IU/ml、20-30 IU/ml、10-20 IU/ml、0.1-10 IU/ml或1-10 IU/ml IL-21的浓度存在IL-21的情况下实施。根据一种具体的实施方案,IL-21的浓度为50-150 IU/ml(例如100 IU/ml)。

[0196] 此步骤进一步地在以约0.001-3000 IU/ml、0.01-3000 IU/ml、0.1-3000 IU/ml、1-3000 IU/ml、10-3000 IU/ml、100-3000 IU/ml、125-3000 IU/ml、1000-3000 IU/ml、0.001-1000 IU/ml、0.01-1000 IU/ml、0.1-1000 IU/ml、1-1000 IU/ml、10-1000 IU/ml、100-1000 IU/ml、125-1000 IU/ml、250-1000 IU/ml、500-1000 IU/ml、750-1000 IU/ml、10-500 IU/ml、50-500 IU/ml、100-500 IU/ml、125-500 IU/ml、250-500 IU/ml、250-500 IU/ml、125-250 IU/ml、100-250 IU/ml、0.1-100 IU/ml、1-100 IU/ml、10-100 IU/ml、30-100 IU/ml、50-100 IU/ml、1-50 IU/ml、10-50 IU/ml、20-50 IU/ml、30-50 IU/ml、1-30 IU/ml、10-30 IU/ml、20-30 IU/ml、10-20 IU/ml、0.1-10 IU/ml、或1-10 IU/ml的浓度存在IL-15的情况下实施。根据一种具体的实施方案,IL-15的浓度为50-150 IU/ml(例如125 IU/ml)。

[0197] 此步骤进一步地在以约0.001-3000 IU/ml、0.01-3000 IU/ml、0.1-3000 IU/ml、1-3000 IU/ml、10-3000 IU/ml、30-3000 IU/ml、100-3000 IU/ml、1000-3000 IU/ml、0.001-1000 IU/ml、0.01-1000 IU/ml、0.1-1000 IU/ml、1-1000 IU/ml、10-1000 IU/ml、30-1000 IU/ml、100-1000 IU/ml、250-1000 IU/ml、500-1000 IU/ml、750-1000 IU/ml、10-500 IU/ml、30-500 IU/ml、50-500 IU/ml、100-500 IU/ml、250-500 IU/ml、100-250 IU/ml、0.1-100 IU/ml、1-100 IU/ml、10-100 IU/ml、30-100 IU/ml、50-100 IU/ml、1-50 IU/ml、10-50 IU/ml、20-50 IU/ml、30-50 IU/ml、1-30 IU/ml、10-30 IU/ml、20-30 IU/ml、10-20 IU/ml、0.1-10 IU/ml或1-10 IU/ml存在IL-7的情况下实施。根据一种具体的实施方案,IL-7的浓度为1-100 IU/ml(30 IU/ml)。

[0198] 应理解,在与IL-21一起培养之后残留的一种或多种抗原可存在于细胞培养物中(即,在Tcm增殖步骤中,包含例如添加的IL-21、IL-15以及IL-7),由此,无抗原环境与在不添加补充的一种或多种抗原的细胞培养物有关。

[0199] 可根据本发明教导进行的另外的步骤包括在IL-21、IL-15以及IL-7存在下(即在生成无抗原环境之前)将所产生的记忆T细胞与一种或多种抗原一起培养(即在与IL-21一

起培养之后)。此步骤通常进行约12-24小时、约12-36小时、约12-72小时、24-48小时、24-36小时、约24-72小时、约48-72小时、1-2天、2-3天、1-3天、2-4天、1-5天或2-5天,并且在如上所述的相同剂量的IL-21、IL-15以及IL-7存在下进行。根据一种具体实施方案,在IL-21、IL-15以及IL-7存在下将记忆T细胞与一种或多种抗原一起培养进行12小时至4天(例如1-2天)。根据一种实施方案,生成T_{cm}细胞的总时长为约7、8、9、10、11或12天(例如9天)。

[0200] 可根据本发明教导实施的另外的步骤包括筛选和移取活化的细胞。这种筛选步骤有助于移取潜在的宿主反应性T细胞。

[0201] 分离活化的细胞可以以两阶段方法实施。在第一阶段中,在IL-21、IL-15以及IL-7存在下培养细胞之前实施分离活化的细胞。此第一阶段通常在IL-21的存在下使记忆T细胞与一种或多种抗原初始接触之后实施。此筛选过程仅挑选被一种或多种抗原活化(例如,如下所述的表达活化标志物)的那些细胞,并且通常在记忆T细胞与一种或多种抗原初始接触后约12-24小时、约24-36小时、约12-36小时、约36-48小时、约12-48小时、约48-60小时、约12-60小时、约60-72小时、约12-72小时、约72-84小时、约12-84小时、约84-96小时、约12-96小时实现。根据一种具体的实施方案,筛选过程在记忆T细胞与一种或多种抗原初始接触后约12-24小时(例如14小时)实现。

[0202] 分离活化的细胞可通过基于亲和力的纯化(例如通过使用MACS珠、FACS分选仪和/或捕获ELISA标记)来实现,并可针对任何激活标志物实现,包括细胞表面标志物,例如但不限于CD69、CD44、CD25、CFSE、CD137或非细胞表面标志物,例如但不限于IFN- γ 和IL-2。分离活化的细胞还可使用本领域已知的任何方法(例如通过FACS)通过基于形态学的纯化(例如分离大细胞)实现。通常,还筛选活化的细胞用于表达CD8⁺细胞。此外,以上方法的任何组合可用于有效分离活化的细胞。

[0203] 根据本发明的一种实施方案,对活化的细胞的筛选通过筛选CD137⁺和/或CD25⁺细胞来实现。

[0204] 通常在培养结束时(即,在无抗原环境中用IL-21、IL-15和IL-7培养之后)实施分离活化的细胞的第二阶段。此阶段通过耗竭在中央记忆T淋巴细胞(T_{cm})与经辐射的宿主抗原递呈细胞(APC,例如树突状细胞)接触之后活化的那些细胞而耗竭同种异体反应性细胞。如以上提及的那样,分离活化的细胞可通过基于亲和力的纯化(例如通过使用MACS珠、FACS分选仪和/或捕获ELISA标记)来实现,并可针对任何活化标志物实现,包括细胞表面标志物,例如但不限于CD69、CD44、CD25、CFSE、CD137或非细胞表面标志物,例如但不限于IFN- γ 和IL-2。

[0205] 根据本发明的一种实施方案,耗竭同种异体反应性细胞通过耗竭CD137⁺和/或CD25⁺细胞来实现。

[0206] 根据本发明的一种实施方案,耗竭同种异体反应性细胞通过将T_{cm}细胞与经辐射的宿主抗原递呈细胞(APC,例如树突状细胞)一起自培养开始(即,第0天为将使用一种或多种抗原培养记忆T细胞的第一天)培养例如12-24小时(例如16小时)约6-9天(例如第8天)来实现。

[0207] 根据一种实施方案,分离活化的细胞仅通过使用如上所述的第一阶段来进行。

[0208] 根据另一种实施方案,分离活化的细胞仅通过使用如上所述的第二阶段来进行。

[0209] 根据一种实施方案,本发明具有中央记忆T淋巴细胞(T_{cm})表型的非GvHD诱导细胞

为非天然存在的,非天然产物。这些细胞通常通过离体操作制备(即,在特定细胞因子存在下暴露于一种或多种抗原)。

[0210] 根据本发明的一种实施方案,提供了一种生成非GvHD诱导细胞的分离群的方法,所述细胞包含中央记忆T淋巴细胞(Tcm)表型,为反抑细胞和/或赋有抗病活性,在移植之后能够归巢至淋巴结,所述方法包括:(a)使用能够耗竭CD4⁺、CD56⁺以及CD45RA⁺细胞的试剂处理非贴壁的外周血单核细胞(PBMC)以获得包含CD45RA⁻CD8⁺表型的记忆T细胞群;(b)在IL-21的存在下,使所述记忆T细胞群与一种或多种抗原接触,以使得抗原反应性细胞富集;以及(c)在IL-21、IL-15和/或IL-7存在下培养步骤(b)产生的所述细胞,以使得包含Tcm表型的细胞增殖,由此生成所述非GvHD诱导细胞的分离群。

[0211] 根据本发明的一种实施方案,提供了一种生成非GvHD诱导细胞的分离群的方法,所述细胞包含中央记忆T淋巴细胞(Tcm)表型,为反抑细胞和/或赋有抗病活性,在移植之后能够归巢至淋巴结,所述方法包括:(a)使用能够耗竭CD4⁺、CD56⁺以及CD45RA⁺细胞的试剂处理非贴壁的外周血单核细胞(PBMC)以获得包含CD45RA⁻CD8⁺表型的记忆T细胞群;(b)在IL-21的存在下,使所述记忆T细胞群与一种或多种病毒抗原接触,以使得抗原反应性细胞富集;以及(c)在IL-21、IL-15和/或IL-7存在下培养步骤(b)产生的所述细胞,以使得包含Tcm表型的细胞增殖,由此生成所述非GvHD诱导细胞的分离群。

[0212] 根据一种实施方案,为了获得一种或多种抗原的特异性的记忆T细胞,将所述抗原(例如肿瘤抗原、病毒抗原)施用于记忆T细胞供体,然后从中获得记忆T细胞(例如,然后提供至少70 %记忆T细胞的细胞群)。可应用针对抗原免疫细胞供体的任何方法以引发免疫原性反应(例如生成记忆T细胞)。

[0213] 可将抗原作为包含佐剂(例如,弗氏完全佐剂或(CFA)或弗氏不完全佐剂(IFA))的组合物或其一部分来施用。根据一种实施方案,将抗原施用于记忆T细胞供体一次。根据一种实施方案,记忆T细胞供体接收至少一次另外的(例如强化)抗原施用(例如,2、3、4或更多次施用)。所述另外的施用可在第一次抗原施用之后进行1、3、5、7、10、12、14、21、30天或更多天。

[0214] 可与本发明的一些实施方案一起使用的针对肿瘤抗原免疫受试者的另外的方法(例如,基于细胞的疫苗,例如肽特异性DC疫苗,针对非限定的表位的DC疫苗,用于接种的源于白细胞的DC, GVAX[®]平台)在Alatrash G. and Molldrem J., *Expert Rev Hematol.* (2011) 4 (1):37-50(通过引用并入本文)中有描述。

[0215] 为了进一步富集针对特定抗原的记忆T细胞和自记忆T细胞库耗竭同种异体反应性克隆,可进一步使记忆T细胞与本文上述相同的一种或多种抗原(例如与施用于细胞供体相同的抗原)接触。

[0216] 上述方案通常用于非同源性应用,因此,就受试者而言,所使用的记忆T细胞或PBMC通常为同种异体的(例如,来自同种异体供体)。类似地,在其中异种应用可有益的情况下,所使用的记忆T细胞或PBMC可为如下所述的异种来源。

[0217] 然而,在其中同源性应用可有益的情况下,就受试者而言,所使用的记忆T细胞或PBMC可为自体的(例如来自受试者)。这样的决定完全处于本领域技术人员的能力范围内,特别是考虑所提供的本文内容的环境下更是如此。

[0218] 由此,如所述,就受试者而言,记忆T细胞或PBMC可为同源的或非同源的。

[0219] 本文使用的术语“同源”细胞指的是与受试者或受试者的基本上所有淋巴细胞基本上基因相同的细胞。同源细胞的实例包括源自受试者（本领域也称为“自体”）、源自受试者的克隆或源自受试者的同卵双胞胎的细胞。

[0220] 本文使用的术语“非同源”细胞指的是与受试者或受试者的基本上所有淋巴细胞基本上基因不相同的细胞，例如同种异体细胞或异种异体细胞。

[0221] 本文使用的术语“同种异体”指的是源自与受试者属于相同物种的供体但对受试者明显为非克隆的细胞。一般地，相同物种的远交、非合子孪生哺乳动物为彼此同种异体的。应该意识到，就受试者而言，同种异体细胞可为HLA相同、部分HLA相同的或HLA不相同的（即呈现一种或多种不同HLA决定簇）。

[0222] 根据一种实施方案，细胞供体是人类。

[0223] 本文使用的术语“异种”是指相对于受试者的相当大比例淋巴细胞的种类明显表达不同种类抗原的细胞。一般地，不同物种的远交哺乳动物为彼此异种的。

[0224] 本发明设想异种细胞源自多种物种。因此，根据一种实施方案，细胞可源自任何哺乳动物。细胞的合适物种来源包括主要的驯养或家畜动物和灵长类动物。这种动物包括但不限于猪类（例如猪）、牛科动物（例如奶牛）、马科动物（例如马）、绵羊类（例如山羊、绵羊）、猫科动物（例如家猫（*Felis domestica*））、犬科动物（例如家犬（*Canis domestica*））、啮齿类动物（例如小鼠、大鼠、兔、豚鼠、沙鼠、仓鼠）和灵长类动物（例如黑猩猩、恒河猴、猕猴、绒猴）。

[0225] 异种来源（例如猪源）的细胞优选地得自已知没有人畜共患病例如猪内源性逆转录病毒的来源。类似地，人源细胞或组织优选地得自基本上无病原体的来源。

[0226] 因此，记忆T细胞或PBMC的来源应就细胞的预期用途来确定（见下文进一步详述），这完全处于本领域技术人员的能力范围内，特别是根据本文提供的详细内容的情况下更是如此。

[0227] 反抑细胞的用途在其中需要消除移植物排斥和克服移植物抗宿主病（GvHD）的情形下特别有益，例如在同种异体或异种细胞或组织的移植中。

[0228] 如上所述，本发明的反抑细胞进一步赋有抗病活性，因此在其中受试者（例如经移植的受试者）患有疾病或病症（例如恶性、病毒性、细菌性、真菌性、自身免疫或变应性疾病或病症）、移植前或移植后（例如在免疫重建被建立之前）的情形下是有益的。

[0229] 因此，根据本发明的另一方面，提供了一种治疗有需要的受试者疾病的方法，所述方法包括给所述受试者施用治疗有效量的本发明一些实施方案的非GvHD诱导细胞的分离群（即Tcm细胞），由此治疗所述受试者的疾病。

[0230] 根据本发明的另一方面，提供了一种治疗需要细胞或组织移植的受试者的方法，所述方法包括：(a) 将细胞或组织移植物移植至所述受试者；和(b) 给所述受试者施用治疗有效量的本发明一些实施方案的非GvHD诱导细胞的分离群（即Tcm细胞）细胞分离群，由此治疗所述需要细胞或组织移植的受试者。

[0231] 本文使用的术语“治疗”包括终止、基本上抑制、减缓或逆转病症的进展，基本上改善病症的临床或美学症状或者基本上预防出现病症的临床或美学症状。

[0232] 本文使用的术语“受试者”或“有需要的受试者”是指需要细胞或组织移植或患有可用Tcm细胞治疗的疾病的任何年龄的雄性或雌性哺乳动物，优选人。通常，受试者由于适

合于经细胞或组织移植进行治疗的病症或者病理或不期望的病症、状态或综合征或者身体、形态或生理异常而有移植的需要(本文也称为受者)。下文进一步提供这种病症的实例。

[0233] 本文使用的术语“治疗有效量”是对于耐受(即反抑效应)、抗疾病效应、抗肿瘤效应和/或免疫重建而不诱导GvHD有效的Tcm细胞的数量。由于本发明的Tcm细胞在移植后归巢至淋巴结,可需要低量的细胞(相对于先前使用的细胞剂量,见例如WO 2001/049243)来实现细胞的有益效应(例如耐受化、抗疾病效应、抗肿瘤效应和/或免疫重建)。应理解,低水平的免疫抑制药(下文讨论)可需要与本发明的Tcm细胞联合(例如从治疗方案去除雷帕霉素)。

[0234] 治疗有效量的确定完全处于本领域技术人员的能力范围内,尤其是根据本文提供的详细内容的情况下更是如此。

[0235] 对于用于本发明方法的任何制剂,治疗有效量或剂量最初可自体外和细胞培养测定估计。例如,剂量可以动物模型配制以获得期望的浓度或滴度。这种信息可用于更准确地确定用于人的有用剂量。

[0236] 例如,在细胞移植的情况下,输注给受者的Tcm细胞的数目应多于 $1 \times 10^4/\text{Kg}$ 体重。输注给受者的Tcm细胞的数目应一般地在 $1 \times 10^3/\text{Kg}$ 体重至 $1 \times 10^4/\text{Kg}$ 体重的范围内、 $1 \times 10^4/\text{Kg}$ 体重至 $1 \times 10^5/\text{Kg}$ 体重的范围内、 $1 \times 10^4/\text{Kg}$ 体重至 $1 \times 10^6/\text{Kg}$ 体重的范围内、 $1 \times 10^4/\text{Kg}$ 体重至 $10 \times 10^7/\text{Kg}$ 体重的范围内、 $1 \times 10^4/\text{Kg}$ 体重至 $1 \times 10^8/\text{Kg}$ 体重的范围内、 $1 \times 10^3/\text{Kg}$ 体重至 $1 \times 10^5/\text{Kg}$ 体重的范围内、 $1 \times 10^4/\text{Kg}$ 体重至 $1 \times 10^6/\text{Kg}$ 体重的范围内、 $1 \times 10^6/\text{Kg}$ 体重至 $10 \times 10^7/\text{Kg}$ 体重的范围内、 $1 \times 10^5/\text{Kg}$ 体重至 $10 \times 10^7/\text{Kg}$ 体重的范围内、 $1 \times 10^6/\text{Kg}$ 体重至 $1 \times 10^8/\text{Kg}$ 体重的范围内。根据一种具体的实施方案,输注给受者的Tcm细胞的数目应在 $1 \times 10^5/\text{Kg}$ 体重至 $10 \times 10^7/\text{Kg}$ 体重的范围内。

[0237] 由此,本发明的方法可用于治疗任何疾病,例如但不限于恶性病、移植相关的疾病(例如移植物排斥、移植物抗宿主病)、感染性疾病(例如病毒性疾病、真菌性疾病或细菌性疾病)、炎症性疾病、自身免疫性疾病和/或变应性疾病或病症。

[0238] 根据一种实施方案,所述受试者患有恶性病。

[0239] 可通过本发明一些实施方案的方法治疗的恶性病(也称为癌症)可为任何实体或非实体肿瘤和/或肿瘤转移。

[0240] 癌症的实例包括但不限于癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤和白血病。更具体地讲,这种癌症的实例包括鳞状细胞癌、软组织肉瘤、卡波齐肉瘤、黑素瘤、肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌或胃癌(包括胃肠癌)、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞癌(hepatoma)、乳腺癌、结肠癌、结直肠癌、直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、类癌(carcinoid carcinoma)、唾液腺癌、肾癌或肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌、间皮瘤、多发性骨髓瘤、移植后淋巴增生性障碍(PTLD)及各种类型的头颈癌(例如脑瘤)。适合于本发明治疗的癌性病症包括转移性癌症。

[0241] 根据一种实施方案,恶性病为血液恶性肿瘤。示例性的血液恶性肿瘤包括但不限于白血病[例如急性淋巴细胞白血病、急性成淋巴细胞白血病、急性成淋巴细胞性前体B细胞白血病、急性成淋巴细胞性T细胞白血病、急性-巨核细胞白血病、单核细胞白血病、急性髓性白血病、急性髓样白血病、伴随嗜酸性粒细胞增多的急性髓样白血病、B细胞型白血病、嗜碱性粒细胞白血病、慢性髓样白血病、慢性白血病、B细胞型白血病、嗜酸性粒细胞白血

病、Friend白血病、粒细胞白血病或髓细胞白血病、多毛细胞白血病、淋巴细胞白血病、巨核细胞白血病、单核细胞白血病、单核细胞-巨噬细胞白血病、成髓细胞白血病、髓样白血病、髓单核细胞白血病、浆细胞白血病、前体B细胞白血病、早幼粒细胞白血病、亚急性白血病、T细胞白血病、淋巴样肿瘤、易患髓样恶性肿瘤、急性非淋巴细胞白血病、T细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL)和B-细胞慢性淋巴细胞白血病(B-CLL)]和淋巴瘤[例如霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、组织细胞淋巴瘤、成淋巴细胞性淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、胸腺淋巴瘤、B细胞淋巴瘤(包括低度/滤泡性淋巴瘤)、小淋巴细胞(SL)NHL、中度/滤泡性NHL、中度弥漫性NHL、高级别成免疫细胞NHL、高级别成淋巴细胞NHL、高级小无裂细胞NHL、巨块病变NHL(bulky disease NHL)、套细胞淋巴瘤、艾滋病相关淋巴瘤和瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症]。

[0242] 根据一种具体的实施方案,恶性病为白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、黑素瘤、肉瘤、成神经细胞瘤、结肠癌、结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、食管癌、滑膜细胞癌、肝癌以及胰腺癌。

[0243] 根据一种实施方案,受试者患有非恶性病。

[0244] 根据一种实施方案,非恶性病是器官功能障碍或衰竭、血液病、移植物相关疾病、感染性疾病、炎性疾病、自身免疫性疾病、变应性疾病、创伤以及损伤。

[0245] 炎性疾病一包括但不限于慢性炎性疾病和急性炎性疾病。

[0246] 与超敏反应相关的炎性疾病

[0247] 超敏反应的实例包括但不限于I型超敏反应、II型超敏反应、III型超敏反应、IV型超敏反应、速发型超敏反应、抗体介导的超敏反应、免疫复合物介导的超敏反应、T淋巴细胞介导的超敏反应和DTH。

[0248] I型或速发型超敏反应,例如哮喘。

[0249] II型超敏反应包括但不限于类风湿性疾病、类风湿性自身免疫性疾病、类风湿性关节炎(Krenn V.等人,Histol Histopathol 2000 Jul;15(3):791);脊柱炎、强直性脊柱炎(Jan Voswinkel等人,Arthritis Res 2001;3(3):189);系统性疾病、系统性自身免疫性疾病、系统性红斑狼疮(Erikson J.等人,Immunol Res 1998;17(1-2):49);硬化症、系统性硬化症(Renaudineau Y.等人,Clin Diagn Lab Immunol. 1999 Mar;6(2):156);Chan OT.等人,Immunol Rev 1999 Jun;169:107);腺性疾病、腺体自身免疫性疾病、胰腺自身免疫性疾病、糖尿病、I型糖尿病(Zimmet P. Diabetes Res Clin Pract 1996 Oct;34 Suppl: S125);甲状腺疾病、自身免疫性甲状腺疾病、格雷夫斯病(Orgiazzi J. Endocrinol Metab Clin North Am 2000 Jun;29(2):339);甲状腺炎、自发性自身免疫性甲状腺炎(Braley-Mullen H. and Yu S,J Immunol 2000 Dec 15;165(12):7262);桥本氏甲状腺炎(Toyoda N.等人,Nippon Rinsho 1999 Aug;57(8):1810);粘液性水肿、特发性粘液性水肿(Mitsuma T. Nippon Rinsho. 1999 Aug;57(8):1759);自身免疫性生殖疾病、卵巢疾病、卵巢自身免疫(Garza KM.等人,J Reprod Immunol 1998 Feb;37(2):87);自身免疫性抗精子不育症(Diekman AB.等人,Am J Reprod Immunol. 2000 Mar;43(3):134);反复胎儿丧失(Tincani A.等人,Lupus 1998;7 Suppl 2:S107-9);神经退行性疾病、神经疾病、神经系统自身免疫性疾病、多发性硬化症(Cross AH.等人,J Neuroimmunol 2001 Jan 1;112(1-2): 1);阿尔茨海默病(Oron L.等人,J Neural Transm Suppl. 1997;49:77);重症肌无力(Infante AJ. And Kraig E,Int Rev Immunol 1999;18(1-2):83);运动神经病(Kornberg

AJ. J Clin Neurosci. 2000 May;7(3):191); 吉兰-巴雷综合征、神经病和自身免疫性神经病(Kusunoki S. Am J Med Sci. 2000 Apr;319(4):234); 肌无力疾病、兰伯特-伊顿肌无力综合征(Takamori M. Am J Med Sci. 2000 Apr;319(4):204); 副肿瘤性神经系统疾病、小脑萎缩、副肿瘤性小脑萎缩、非副肿瘤性僵人综合征、小脑萎缩、进行性小脑萎缩、脑炎、拉斯穆森脑炎、肌萎缩侧索硬化症、西登哈姆舞蹈病、日勒德拉图雷特综合征、多内分泌腺疾病、自身免疫性多内分泌腺疾病(Antoine JC. and Honnorat J. Rev Neurol (Paris) 2000 Jan;156(1):23); 神经病、免疫不全神经病(dysimmune neuropathies)(Nobile-Orazio E.等人,Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl 1999;50:419); 神经性肌强直、获得性神经性肌强直、先天性多发性关节挛缩症(Vincent A.等人,Ann N Y Acad Sci. 1998 May 13;841:482); 心血管疾病、心血管自身免疫性疾病、动脉粥样硬化(Matsuura E.等人,Lupus. 1998;7 Suppl 2:S135); 心肌梗死(Vaarala O. Lupus. 1998;7 Suppl 2:S132); 血栓形成(Tincani A.等人,Lupus 1998;7 Suppl 2:S107-9); 肉芽肿、韦格纳肉芽肿、动脉炎、高安动脉炎和川崎综合征(Praprotnik S.等人,Wien Klin Wochenschr 2000 Aug 25;112(15-16):660); 抗因子VIII的自身免疫性疾病(Lacroix-Desmazes S.等人,Semin Thromb Hemost. 2000;26(2):157); 血管炎、坏死性小血管血管炎、显微镜下多血管炎、Churg-Strauss综合征、肾小球肾炎、寡免疫局灶性坏死性肾小球肾炎、新月体性肾小球肾炎(Noel LH. Ann Med Interne (Paris). 2000 May;151(3):178); 抗磷脂综合征(Flamholz R.等人,J Clin Apheresis 1999;14(4):171); 心力衰竭、心力衰竭中的激动剂样 β -肾上腺素受体抗体(Wallukat G.等人,Am J Cardiol. 1999 Jun 17;83(12A):75H); 血小板减少性紫癜(Moccia F. Ann Ital Med Int. 1999 Apr-Jun;14(2):114); 溶血性贫血、自身免疫性溶血性贫血(Efremov DG.等人,Leuk Lymphoma 1998 Jan;28(3-4):285); 胃肠疾病、胃肠道的自身免疫性疾病、肠道疾病、慢性炎性肠道疾病(Garcia Herola A.等人,Gastroenterol Hepatol. 2000 Jan;23(1):16); 乳糜泻(Landau YE. and Shoenfeld Y. Harefuah 2000 Jan 16;138(2):122); 肌肉组织的自身免疫性疾病、肌炎、自身免疫性肌炎、斯耶格伦综合征(Feist E.等人,Int Arch Allergy Immunol 2000 Sep;123(1):92); 平滑肌的自身免疫性疾病(Zauli D.等人,Biomed Pharmacother 1999 Jun;53(5-6):234); 肝脏疾病、肝脏自身免疫性疾病、自身免疫性肝炎(Manns MP. J Hepatol 2000 Aug;33(2):326) 及原发性胆汁性肝硬化(Strassburg CP.等人,Eur J Gastroenterol Hepatol. 1999 Jun;11(6):595)。

[0250] IV型或T细胞介导的超敏反应包括但不限于类风湿性疾病、类风湿性关节炎(Tisch R,McDevitt HO. Proc Natl Acad Sci U S A 1994 Jan 18;91(2):437); 系统性疾病、系统性自身免疫性疾病、系统性红斑狼疮(Datta SK.,Lupus 1998;7(9):591); 腺性疾病、腺体自身免疫性疾病、胰腺疾病、胰腺自身免疫性疾病、I型糖尿病(Castano L. and Eisenbarth GS. Ann. Rev. Immunol. 8:647); 甲状腺疾病、自身免疫性甲状腺疾病、格雷夫斯病(Sakata S.等人,Mol Cell Endocrinol 1993 Mar;92(1):77); 卵巢疾病(Garza KM.等人,J Reprod Immunol 1998 Feb;37(2):87); 前列腺炎、自身免疫性前列腺炎(Alexander RB.等人,Urology 1997 Dec;50(6):893); 多腺体综合征、自身免疫性多腺体综合征、I型自身免疫性多腺体综合征(Hara T.等人,Blood. 1991 Mar 1;77(5):1127); 神经疾病、自身免疫性神经疾病、多发性硬化症、神经炎、视神经炎(Soderstrom M.等人,J

Neurol Neurosurg Psychiatry 1994 May;57(5):544);重症肌无力(Oshima M.等人,Eur J Immunol 1990 Dec;20(12):2563);僵人综合征(Hiemstra HS.等人,Proc Natl Acad Sci U S A 2001 Mar 27;98(7):3988);心血管疾病、南美洲锥虫病的心脏自身免疫(Cunha-Neto E.等人,J Clin Invest 1996 Oct 15;98(8):1709);自身免疫性血小板减少性紫癜(Semple JW.等人,Blood 1996 May 15;87(10):4245);抗辅助T淋巴细胞自身免疫(Caporossi AP.等人,Viral Immunol 1998;11(1):9);溶血性贫血(Sallah S.等人,Ann Hematol 1997 Mar;74(3):139);肝脏疾病、肝脏自身免疫性疾病、肝炎、慢性活动性肝炎(Franco A.等人,Clin Immunol Immunopathol 1990 Mar;54(3):382);胆汁性肝硬化、原发性胆汁性肝硬化(Jones DE. Clin Sci (Colch) 1996 Nov;91(5):551);肾病、肾脏自身免疫性疾病、肾炎、间质性肾炎(Kelly CJ. J Am Soc Nephrol 1990 Aug;1(2):140);结缔组织疾病、耳疾病、自身免疫性结缔组织疾病、自身免疫性耳疾病(Yoo TJ.等人,Cell Immunol 1994 Aug;157(1):249);内耳疾病(Gloddek B.等人,Ann N Y Acad Sci 1997 Dec 29;830:266);皮肤疾病、皮肤病、皮肤疾病、大疱性皮肤病、寻常型天疱疮、大疱性类天疱疮和落叶型天疱疮。

[0251] 迟发型超敏反应的实例包括但不限于接触性皮炎和药疹。

[0252] 介导超敏反应的T淋巴细胞类型的实例包括但不限于辅助T淋巴细胞和细胞毒性T淋巴细胞。

[0253] 辅助T淋巴细胞介导的超敏反应的实例包括但不限于 T_H1 淋巴细胞介导的超敏反应和 T_H2 淋巴细胞介导的超敏反应。

[0254] 自身免疫性疾病

[0255] 包括但不限于心血管疾病、类风湿性疾病、腺性疾病、胃肠疾病、皮肤疾病、肝脏疾病、神经疾病、肌肉疾病、肾病、与生殖相关的疾病、结缔组织疾病和系统性疾病。

[0256] 自身免疫性心血管疾病的实例包括但不限于动脉粥样硬化(Matsuura E.等人,Lupus. 1998;7 Suppl 2:S135);心肌梗死(Vaarala O. Lupus. 1998;7 Suppl 2:S132);血栓形成(Tincani A.等人,Lupus 1998;7 Suppl 2:S107-9);韦格纳肉芽肿、高安动脉炎、川崎综合征(Praprotnik S.等人,Wien Klin Wochenschr 2000 Aug 25;112(15-16):660);抗因子VIII的自身免疫性疾病(Lacroix-Desmazes S.等人,Semin Thromb Hemost. 2000;26(2):157);坏死性小血管血管炎、显微镜下多血管炎、Churg-Strauss综合征、寡免疫局灶性坏死性和新月体性肾小球肾炎(Noel LH. Ann Med Interne(Paris). 2000 May;151(3):178);抗磷脂综合征(Flamholz R.等人,J Clin Apheresis 1999;14(4):171);抗体诱导的心力衰竭(Wallukat G.等人,Am J Cardiol. 1999 Jun 17;83(12A):75H);血小板减少性紫癜(Moccia F. Ann Ital Med Int. 1999 Apr-Jun;14(2):114;Semple JW.等人,Blood 1996 May 15;87(10):4245);自身免疫性溶血性贫血(Efremov DG.等人,Leuk Lymphoma 1998 Jan;28(3-4):285;Sallah S.等人,Ann Hematol 1997 Mar;74(3):139);南美洲锥虫病的心脏自身免疫(Cunha-Neto E.等人,J Clin Invest 1996 Oct 15;98(8):1709)和抗辅助T淋巴细胞自身免疫(Caporossi AP.等人,Viral Immunol 1998;11(1):9)。

[0257] 自身免疫性类风湿性疾病的实例包括但不限于类风湿性关节炎(Krenn V.等人,Histol Histopathol 2000 Jul;15(3):791;Tisch R,McDevitt HO. Proc Natl Acad Sci units S A 1994 Jan 18;91(2):437)和强直性脊柱炎(Jan Voswinkel等人,Arthritis

Res 2001;3(3):189)。

[0258] 自身免疫性腺性疾病的实例包括但不限于胰腺疾病、I型糖尿病、甲状腺疾病、格雷夫斯病、甲状腺炎、自发性自身免疫性甲状腺炎、桥本氏甲状腺炎、特发性粘液性水肿、卵巢自身免疫、自身免疫性抗精子不育症、自身免疫性前列腺炎和I型自身免疫性多腺体综合征。疾病包括但不限于胰腺自身免疫性疾病、I型糖尿病(Castano L. and Eisenbarth GS. Ann. Rev. Immunol. 8:647;Zimmet P. Diabetes Res Clin Pract 1996 Oct;34 Suppl: S125);自身免疫性甲状腺疾病、格雷夫斯病(Orgiazzi J. Endocrinol Metab Clin North Am 2000 Jun;29(2):339;Sakata S.等人,Mol Cell Endocrinol 1993 Mar;92(1):77);自发性自身免疫性甲状腺炎(Braleay-Mullen H. and Yu S,J Immunol 2000 Dec 15;165(12):7262);桥本氏甲状腺炎(Toyoda N.等人,Nippon Rinsho 1999 Aug;57(8):1810);特发性粘液性水肿(Mitsuma T. Nippon Rinsho. 1999 Aug;57(8):1759);卵巢自身免疫(Garza KM.等人,J Reprod Immunol 1998 Feb;37(2):87);自身免疫性抗精子不育症(Diekman AB.等人,Am J Reprod Immunol. 2000 Mar;43(3):134);自身免疫性前列腺炎(Alexander RB.等人,Urology 1997 Dec;50(6):893)和I型自身免疫性多腺体综合征(Hara T.等人,Blood. 1991 Mar 1;77(5):1127)。

[0259] 自身免疫性胃肠疾病的实例包括但不限于慢性炎性肠道疾病(Garcia Herola A.等人,Gastroenterol Hepatol. 2000 Jan;23(1):16);乳糜泻(Landau YE. and Shoenfeld Y. Harefuah 2000 Jan 16;138(2):122);结肠炎、回肠炎和克罗恩病。

[0260] 自身免疫性皮肤病的实例包括但不限于自身免疫性大疱性皮肤病,例如但不限于寻常型天疱疮、大疱性类天疱疮和落叶型天疱疮。

[0261] 自身免疫性肝脏疾病的实例包括但不限于肝炎、自身免疫性慢性活动性肝炎(Franco A.等人,Clin Immunol Immunopathol 1990 Mar;54(3):382);原发性胆汁性肝硬化(Jones DE. Clin Sci(Colch)1996 Nov;91(5):551;Strassburg CP.等人,Eur J Gastroenterol Hepatol. 1999 Jun;11(6):595)和自身免疫性肝炎(Manns MP. J Hepatol 2000 Aug;33(2):326)。

[0262] 自身免疫性神经疾病的实例包括但不限于多发性硬化症(Cross AH.等人,J Neuroimmunol 2001 Jan 1;112(1-2):1);阿尔茨海默病(Oron L.等人,J Neural Transm Suppl. 1997;49:77);重症肌无力(Infante AJ. And Kraig E,Int Rev Immunol 1999;18(1-2):83;Oshima M.等人,Eur J Immunol 1990 Dec;20(12):2563);神经病、运动神经病(Kornberg AJ. J Clin Neurosci. 2000 May;7(3):191);吉兰-巴雷综合征和自身免疫性神经病(Kusunoki S. Am J Med Sci. 2000 Apr;319(4):234);肌无力、兰伯特-伊顿肌无力综合征(Takamori M. Am J Med Sci. 2000 Apr;319(4):204);副肿瘤性神经系统疾病、小脑萎缩、副肿瘤性小脑萎缩和僵人综合征(Hiemstra HS.等人,Proc Natl Acad Sci units S A 2001 Mar 27;98(7):3988);非副肿瘤性僵人综合征、进行性小脑萎缩、脑炎、拉斯穆森脑炎、肌萎缩侧索硬化症、西登哈姆舞蹈病、日勒德拉图雷特综合征和自身免疫性多内分泌腺疾病(Antoine JC. and Honnorat J. Rev Neurol(Paris)2000 Jan;156(1): 23);免疫不全神经病(Nobile-Orazio E.等人,Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl 1999;50:419);获得性神经性肌强直、先天性多发性关节挛缩症(Vincent A.等人,Ann N Y Acad Sci. 1998 May 13;841:482);神经炎、视神经炎(Soderstrom M.等人,J

Neurol Neurosurg Psychiatry 1994 May;57(5):544) 和神经退行性疾病。

[0263] 自身免疫性肌肉疾病的实例包括但不限于肌炎、自身免疫性肌炎和原发性斯耶格伦综合征(Feist E.等人, Int Arch Allergy Immunol 2000 Sep;123(1):92) 和平滑肌的自身免疫性疾病(Zauli D.等人, Biomed Pharmacother 1999 Jun;53(5-6):234)。

[0264] 自身免疫性肾病的实例包括但不限于肾炎和自身免疫性间质性肾炎(Kelly CJ. J Am Soc Nephrol 1990 Aug;1(2):140)。

[0265] 与生殖相关的自身免疫性疾病的实例包括但不限于反复胎儿丧失(Tincani A.等人, Lupus 1998;7 Suppl 2:S107-9)。

[0266] 自身免疫性结缔组织疾病的实例包括但不限于耳疾病、自身免疫性耳疾病(Yoo TJ.等人, Cell Immunol 1994 Aug;157(1):249) 和自身免疫性内耳疾病(Gloddek B.等人, Ann N Y Acad Sci 1997 Dec 29;830:266)。

[0267] 自身免疫性系统性疾病的实例包括但不限于系统性红斑狼疮(Erikson J.等人, Immunol Res 1998;17(1-2):49) 和系统性硬化症(Renaudineau Y.等人, Clin Diagn Lab Immunol. 1999 Mar;6(2):156); Chan OT.等人, Immunol Rev 1999 Jun;169:107)。

[0268] 感染性疾病

[0269] 感染性疾病的实例包括但不限于慢性感染性疾病、亚急性感染性疾病、急性感染性疾病、病毒性疾病、细菌性疾病、原生动物性疾病、寄生虫病、真菌性疾病、支原体病和朊病毒病。

[0270] 引起可根据本发明的教导治疗的感染性疾病的病毒病原体的具体类型包括但不限于逆转录病毒、圆环病毒、细小病毒、乳多空病毒、腺病毒、疱疹病毒、虹彩病毒、痘病毒、嗜肝病毒、小核糖核酸病毒、杯状病毒、披膜病毒、黄病毒、呼肠孤病毒、正粘病毒、副粘病毒、棒状病毒、本雅病毒、冠状病毒、沙粒病毒和丝状病毒。

[0271] 可根据本发明的教导治疗的病毒感染的具体实例包括但不限于人免疫缺陷病毒(HIV) 诱导的获得性免疫缺陷综合征(AIDS)、流感、鼻病毒感染、病毒性脑膜炎、EB病毒(EBV) 感染、甲型、乙型或丙型肝炎病毒感染、麻疹、乳头状瘤病毒感染/疣、巨细胞病毒(CMV) 感染、单纯疱疹病毒感染、黄热病、埃博拉病毒感染、狂犬病、腺病毒(Adv)、感冒病毒、流感病毒、日本脑炎病毒、麻疹病毒、呼吸道合胞病毒、风疹病毒、天花病毒、水痘带状疱疹病毒、轮状病毒、西尼罗病毒以及寨卡病毒引起的那些。

[0272] 可根据本发明教导治疗的细菌感染的具体实例包括但不限于炭疽杆菌, 革兰氏阴性杆菌, 衣原体, 白喉, 流感嗜血杆菌, 幽门螺旋杆菌, 疟疾, 结核分枝杆菌, 百日咳毒素, 肺炎球菌, 立克次氏体, 葡萄球菌, 链球菌以及破伤风菌引起的那些。

[0273] 可根据本发明教导治疗的超级细菌(例如多重耐药细菌) 感染的具体实例包括但不限于屎肠球菌、艰难梭菌、鲍氏不动杆菌、铜绿假单胞菌以及肠杆菌科(包括大肠杆菌、肺炎克雷伯氏杆菌、肠道细菌) 引起的那些。

[0274] 可根据本发明教导治疗的真菌感染的具体实例包括但不限于念珠菌、球孢菌、隐球菌、组织胞浆菌、利什曼原虫、疟原虫、原虫、寄生虫、血吸虫、癣真菌、弓形虫、以及克氏锥虫引起的那些。

[0275] 移植物排斥性疾病

[0276] 根据其他实施方案, 疾病与移植物的移植相关。与移植物的移植相关的疾病的实

例包括但不限于移植物排斥、慢性移植物排斥、亚急性移植物排斥、超急性移植物排斥、急性移植物排斥、同种异体移植物排斥、异种移植物排斥和移植物抗宿主病(GVHD)。

[0277] 变应性疾病

[0278] 变应性疾病的实例包括但不限于哮喘、荨麻疹、风疹、花粉变态反应、尘螨变态反应、毒液变态反应、化妆品变态反应、乳胶变态反应、化学品变态反应、药物变态反应、昆虫叮咬变态反应、动物皮毛变态反应、刺痛植物变态反应、毒葛变态反应和食物变态反应。

[0279] 非恶性血液病

[0280] 非恶性血液病的实例包括但不限于贫血、骨髓病症、深静脉血栓形成/肺栓塞、diamond blackfan贫血、血色素沉着症、血友病、免疫性血液病、铁代谢病症、镰状细胞病、地中海贫血、血小板减少症以及冯·威利布兰德病(Von Willebrand disease)。

[0281] 为了提高Tcm细胞的抗病活性,选择与待治疗的疾病相关的一种或多种抗原并生成用于治疗的Tcm细胞特异性的抗原是有益的。

[0282] 由此,根据一种实施方案,所述方法包括:(a)分析受试者的生物样品是否存在疾病相关的一种或多种抗原;(b)根据本发明的一些实施方案的方法针对疾病相关的一种或多种抗原生成非GvHD诱导细胞的分离群,以使得抗原反应性细胞富集;以及(c)给所述受试者施用治疗有效量的(b)的非GvHD诱导细胞的分离群,由此治疗所述受试者的疾病。

[0283] 本文使用的“生物样品”是指源于受试者的液体或组织样品。“生物样品”的实例包括但不限于全血,血清,血浆,脊髓液,淋巴液,组织活检,以及呼吸道、肠道和生殖泌尿道的多种外分泌物,泪液,唾液,乳汁,以及血白细胞,组织,细胞培养物,例如原代培养物。

[0284] 获得这些生物样品的方法为本领域已知,包括但不限于标准血回收程序、尿液收集以及腰椎穿刺。

[0285] 确定生物样品中是否存在一种或多种抗原可使用本领域已知的任何方法进行,例如,通过血清学方法(检测是否存在病原体),细菌培养,细菌易感性检测,真菌、病毒、分枝杆菌(afb检测)和/或寄生虫检测,电泳,酶联免疫吸附试验(ELISA),蛋白质印迹分析以及荧光活化的细胞分选(FACS)。

[0286] 一旦进行分析,筛选一种或多种抗原,使用疾病特异性的一种或多种抗原(例如肿瘤抗原、病毒抗原、细菌抗原等)如上所述从记忆T细胞群生成Tcm细胞,并将其施用于受试者用于治疗。

[0287] 如上所述,本发明的Tcm细胞赋有反抑活性。因此,本发明的Tcm细胞可用作细胞或组织移植的辅助治疗。由于本发明的Tcm细胞还赋有抗病活性,因此本发明的方法可进一步有利地用于治疗受试者中的疾病,同时有利于细胞或组织移植物的植入。

[0288] 本文所使用的用语“细胞或组织移植”是指身体的细胞(例如单个细胞或一组细胞)或组织(例如实体组织/器官或软组织,其可以全部或部分地移植)。可根据本发明的教导移植的例示性组织或器官包括但不限于肝脏、胰腺、脾脏、肾脏、心脏、肺、皮肤、肠和淋巴/造血组织(例如淋巴结、派尔(Peyer)氏斑胸腺或骨髓)。可根据本发明的教导移植的例示性细胞包括但不限于未成熟的造血细胞,包括干细胞,心脏细胞、肝细胞、胰腺细胞、脾脏细胞、肺脏细胞、脑细胞、肾细胞、肠/消化道细胞、卵巢细胞、皮肤细胞(例如这些细胞中任何种类的分离群)。另外,本发明还考虑了整个器官的移植,例如肾脏、心脏、肝脏或皮肤。

[0289] 根据应用,可使用与受试者同源或非同源的细胞或组织来实现所述方法。

[0290] 根据本发明的一种实施方案,受试者和供体都是人类。

[0291] 根据应用和可获得的来源,本发明的细胞或组织可获自产前生物体、产后生物体、成人或尸体供体。另外,根据所需的应用,细胞或组织可为幼稚的或基因修饰的。此类确定完全处于本领域普通技术人员的能力范围内。

[0292] 可利用本领域已知的任何方法来获得细胞或组织(例如,用于移植)。

[0293] 可以以多种方式来实现细胞或组织向受试者的移植,其取决于不同的参数,例如细胞或组织类型;受者的疾病的类型、阶段或严重度(例如,器官衰竭);受试者特定的身体或生理参数;和/或所期望的治疗结果。

[0294] 根据应用,本发明的细胞或组织移植物的移植可通过将细胞或组织移植物移植至各种解剖位置的任何一处来实现。可将细胞或组织移植物移植至同位(homotopic)解剖位置(用于移植物的正常解剖位置)、或至异位(ectopic)解剖位置(用于移植物的非正常解剖位置)。根据应用,可有利地将细胞或组织移植物植入在肾小囊下或植入至肾脏、睾丸脂肪、皮下、大网膜、门静脉、肝脏、脾脏、心脏腔、心脏、胸腔、肺脏、皮肤、胰腺和/或腹腔内的空间中。

[0295] 例如,根据本发明的教导,可将肝组织移植至肝脏、门静脉、肾小囊、皮下、大网膜、脾脏和腹腔内的空间中。将肝移植至多种解剖位置在本领域中被普遍地实行用于治疗可通过肝脏移植进行治疗的疾病(例如肝衰竭)。类似地,根据本发明的移植胰腺组织的可通过将所述组织移植至门静脉、肝、胰腺、睾丸脂肪、皮下、大网膜、肠袢(小肠的U形环的浆膜下层)和/或腹腔内的空间中来实现。胰腺组织的移植可用于治疗可通过胰腺移植进行治疗的疾病(例如糖尿病)。同样地,可将诸如肾脏、心脏、肺或皮肤组织的组织移植至上述的任何解剖位置以用于治疗患有例如肾衰竭、心脏衰竭、肺衰竭或皮肤损伤(例如烧伤)的受者。在其中移植分离细胞的情况下,这样的细胞可通过例如静脉内途径、气管内途径、腹腔途径或鼻内途径来施用。

[0296] 本发明的方法还可用于例如治疗患有需要未成熟的造血干细胞移植的疾病的受者。

[0297] 在后一种情况下,可将来源于例如供体的骨髓、动员的外周血(例如通过白细胞分离法)、胎肝、卵黄囊和/或脐带血的未成熟的自体、同种异体或异种的造血细胞(包括干细胞)且移植至患有疾病的受者。根据一种实施方案,未成熟的造血干细胞是T细胞耗竭的CD34⁺未成熟的造血干细胞。此类疾病包括但不限于白血病[例如,急性淋巴细胞性白血病、急性淋巴母细胞性白血病(ALL)、急性淋巴母细胞性前B细胞白血病、急性淋巴母细胞性T细胞白血病、急性-巨核细胞白血病、单核细胞白血病、急性髓系白血病、急性髓细胞性白血病、伴随嗜酸粒细胞增多的急性髓细胞性白血病(acutemyeloid with eosinophilia)、B细胞型白血病、嗜碱性粒细胞白血病、慢性髓细胞性白血病、慢性白血病、B细胞型白血病、嗜酸性粒细胞白血病、Friend白血病、粒细胞或髓细胞白血病、急性髓细胞性白血病(AML)或慢性髓细胞性白血病(CML)、毛细胞白血病、淋巴细胞白血病、巨核细胞白血病、单核细胞白血病、单核细胞-巨噬细胞白血病、髓母细胞性白血病(myeloblastic)、髓细胞性白血病、骨髓单核细胞性白血病(myelomonocytic)、浆细胞性白血病、前B细胞型白血病、早幼粒细胞白血病(promyelocytic)、亚急性白血病、T细胞型白血病、淋巴瘤、易患骨髓恶性肿瘤、急性非淋巴细胞性白血病、急性非淋巴母细胞性白血病(ANLL)、T细胞急性淋巴细胞性白血病

(T-ALL)和B-细胞慢性淋巴细胞性白血病(B-CLL)]、淋巴瘤(例如,霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、B细胞淋巴瘤、Burkitt淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、组织细胞淋巴瘤、淋巴瘤母细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、胸腺淋巴瘤)、严重联合免疫缺陷综合征(SCID),包括腺苷脱氨酶(ADA)、骨硬化病(osteopetrosis)、再生障碍性贫血、高雪氏病(Gaucher's disease)、地中海贫血和其他先天性或遗传决定的造血异常。

[0298] 应理解,可使用本领域中已知的用于细胞移植的任何方法来将本发明的未成熟的自体、同种异体或异种的造血细胞移植至受者,例如但不限于细胞输注(例如I.V.)或通过腹膜内途径。

[0299] 任选地,当将本发明的细胞或组织移植物移植至具有有缺陷器官的受试者中时,可有利的是首先至少部分地从受试者中移除衰退的器官,由此使移植物的发育及其结构/功能与该受试者的解剖学/生理学的整合获得最佳化。

[0300] 根据一种实施方案,细胞或组织移植物源自同种异体供体。根据一种实施方案,细胞或组织移植物源自HLA相同的同种异体供体或源自HLA不相同的同种异体供体。根据一种实施方案,细胞或组织移植物源自异种供体。

[0301] 根据一种实施方案,细胞或组织移植物和Tcm细胞分离群源自相同(例如非同源)供体。

[0302] 根据一种实施方案,细胞或组织移植物和Tcm细胞分离群源自不同(例如非同源)供体。因此,细胞或组织移植物可与Tcm细胞是非同源的。

[0303] 根据一种实施方案,未成熟的造血细胞和Tcm细胞分离群源自相同(例如非同源)供体。

[0304] 根据一种实施方案,未成熟的造血细胞和Tcm细胞分离群源自不同(例如非同源)供体。因此,未成熟的造血细胞可与Tcm细胞分离群是非同源的。

[0305] 本发明的方法还设想了联合移植多种器官(例如心脏和肺组织),在这种情况下,受试者可通过此程序而获得有益的影响。

[0306] 根据一种实施方案,联合移植包括移植未成熟的造血细胞和实体组织/器官或一些实体器官/组织。

[0307] 根据一种实施方案,未成熟的造血细胞和实体器官获自相同供体。

[0308] 根据另一种实施方案,未成熟的造血细胞和实体器官/组织或多个器官/组织获自不同(非同源的)供体。

[0309] 根据一种实施方案,未成熟的造血细胞是在移植实体器官之前、同时或之后进行移植的。

[0310] 根据一种实施方案,首先通过将未成熟的造血细胞连同本发明的Tcm细胞一起移植以在受试者中诱导造血嵌合,引起移植自相同供体的其他组织/器官的耐受性。

[0311] 根据一种实施方案,使用本发明的Tcm细胞本身来减少对移植自相同供体的移植的组织/器官的排斥。

[0312] 在根据本教导将组织移植至受试者后,建议根据标准医学实践,根据各种标准技术中的任何一种监测器官的生长功能和免疫相容性。例如,胰腺组织移植物的功能性可在移植后通过标准胰腺功能测试(例如分析血清胰岛素水平)来监测。同样地,肝组织移植可在移植后通过标准肝功能测试(例如分析白蛋白、总蛋白质、ALT、AST和胆红素的血清水平,

和分析凝血时间)来监测。细胞或组织的结构发育可经计算机断层扫描或超声波成像来监测。

[0313] 根据移植背景,为了促进细胞或组织移植物的植入,所述方法可进一步有利地包括在移植之前,于亚致死、致死或超致死条件下调节受试者。

[0314] 当涉及调节本发明的受试者时,本文使用的术语“亚致死”、“致死”和“超致死”是指骨髓毒性和/或淋巴细胞毒性治疗,其在应用于受试者的代表性群体时,一般地分别为:对群体的基本上所有成员为非致死的;对群体的一些而不是所有成员为致死的;或者在正常的不育条件下对群体的基本上所有成员为致死的。

[0315] 根据本发明的一些实施方案,亚致死、致死或超致死调节包括全身辐射(TBI)、全淋巴辐射(TLI,即所有淋巴结、胸腺和脾脏的暴露)、体分区辐射(例如肺、肾、脑等的特定暴露)、清髓性调节和/或非清髓性调节,例如用包括但不限于共刺激性阻断、化疗药物和/或抗体免疫疗法的不同组合。根据本发明的一些实施方案,调节包括任何以上描述的调节方案的组合(例如化疗药物与TBI、共刺激性阻断与化疗药物、抗体免疫疗法与化疗药物等)。

[0316] 根据一种实施方案,TBI包含在以下范围内的单次或分次辐射剂量:0.5-1 Gy、0.5-1.5 Gy、0.5-2.5 Gy、0.5-5 Gy、0.5-7.5 Gy、0.5-10 Gy、0.5-15 Gy、1-1.5 Gy、1-2 Gy、1-2.5 Gy、1-3 Gy、1-3.5 Gy、1-4 Gy、1-4.5 Gy、1-1.5 Gy、1-7.5 Gy、1-10 Gy、2-3 Gy、2-4 Gy、2-5 Gy、2-6 Gy、2-7 Gy、2-8 Gy、2-9 Gy、2-10 Gy、3-4 Gy、3-5 Gy、3-6 Gy、3-7 Gy、3-8 Gy、3-9 Gy、3-10 Gy、4-5 Gy、4-6 Gy、4-7 Gy、4-8 Gy、4-9 Gy、4-10 Gy、5-6 Gy、5-7 Gy、5-8 Gy、5-9 Gy、5-10 Gy、6-7 Gy、6-8 Gy、6-9 Gy、6-10 Gy、7-8 Gy、7-9 Gy、7-10 Gy、8-9 Gy、8-10 Gy、10-12 Gy或10-15 Gy

[0317] 根据一种具体的实施方案,TBI包含在1-7.5 Gy范围内的单次或分次辐射剂量。

[0318] 根据一种实施方案,调节通过在超致死条件下,例如在清髓性条件下调节受试者实现。

[0319] 或者,调节可通过在致死或亚致死条件下调节受试者来实现,例如通过在清髓条件或非清髓性条件下调节受试者。

[0320] 根据一种实施方案,调节通过用清髓性药物(例如白消安或美法仑)或非清髓性药物(例如环磷酰胺和/或氟达拉滨)调节受试者来实现。

[0321] 可用于调节受试者的调节物质的实例包括(非限制性地)辐射、药物和耐受性诱导细胞(如本文描述的那样)。

[0322] 药物的实例包括骨髓毒性药物、淋巴细胞毒性药物和免疫抑制药物(以下详细讨论)。

[0323] 骨髓毒性药物的实例包括(非限制性地)白消安、二甲基马利兰(dimethyl mileran)、美法仑和噻替派。

[0324] 另外或者可备选地,所述方法可进一步包括在移植组织移植物之前、同时或之后用免疫抑制方案调节受试者。

[0325] 合适类型的免疫抑制方案的实例包括施用免疫抑制药物、耐受性诱导细胞群(例如,如上文详细描述的Tcm细胞)和/或免疫抑制性辐射。

[0326] 用于选择和施用合适的用于移植的免疫抑制方案的充分指导提供在本领域的文献中(例如参照:Kirkpatrick CH. and Rowlands DT Jr.,1992. JAMA. 268,2952;

Higgins RM.等人,1996. Lancet 348,1208;Suthanthiran M. and Strom TB.,1996. New Engl. J. Med. 331,365;Midthun DE.等人,1997. Mayo Clin Proc. 72,175;Morrison VA.等人,1994. Am J Med. 97,14;Hanto DW.,1995. Annu Rev Med. 46,381; Senderowicz AM.等人,1997. Ann Intern Med. 126,882;Vincenti F.等人,1998. New Engl. J. Med. 338,161;Dantal J.等人 1998. Lancet 351,623)。

[0327] 优选地,免疫抑制方案由施用受试者至少一种免疫抑制药物组成。

[0328] 免疫抑制药物的实例包括但不限于他克莫司(也称为FK-506或藤霉素,商品名: Prograf, Advagraf, Protopic)、霉酚酸酯、霉酚酸钠、泼尼松、甲氨蝶呤、环磷酰胺、环孢菌素、环孢菌素A、氯喹、羟氯喹、柳氮磺吡啶(sulfasalazine或sulphasalazopyrine)、金盐、D-青霉胺、来氟米特、硫唑嘌呤、阿那白滞素、英夫利昔单抗(REMICADE)、依那西普、TNF- α 阻断剂(靶向炎性细胞因子的生物药物)和非甾体抗炎药(NSAID)。NSAID的实例包括但不限于乙酰水杨酸、水杨酸胆碱镁、二氟尼柳、水杨酸镁、水杨酰水杨酸、水杨酸钠、双氯芬酸、依托度酸、非诺洛芬、氟比洛芬、吲哚美辛、酮洛芬、酮咯酸、甲氯灭酸盐、萘普生、萘丁美酮、保泰松、吡罗昔康、舒林酸、托美丁、对乙酰氨基酚、布洛芬、Cox-2抑制剂、曲马多、雷帕霉素(西罗莫司)和雷帕霉素类似物(例如CCI-779、RAD001、AP23573)。这些药物可单个或组合施用。

[0329] 与移植物的类型无关,为了避免移植物排斥和移植物抗宿主病,本发明的方法利用了新型的Tcm细胞(如上文详细描述)。

[0330] 根据本发明的方法,这些Tcm细胞在移植细胞或组织移植物的同时、之前或之后施用。

[0331] 可通过本领域已知的用于细胞移植的任何方法施用Tcm细胞,例如但不限于细胞输注(例如静脉内)或通过腹膜内途径。

[0332] 本发明的一些实施方案的Tcm细胞可自身施用于生物体,或在其中与合适的载体或赋形剂混合的药物组合物中施用。

[0333] 本文使用的“药物组合物”是指本文描述的一种或多种活性成分与其他化学组分例如生理学上合适的载体和赋形剂的制剂。药物组合物的目的为促进化合物施用于生物体。

[0334] 本文中术语“活性成分”是指可引起生物效应的Tcm细胞。

[0335] 在下文中,可互换使用的用语“生理学上可接受的载体”和“药学上可接受的载体”是指不对生物体造成显著刺激并且不消除所施用化合物的生物活性和性质的载体或稀释剂。佐剂包括在这些用语中。

[0336] 本文中术语“赋形剂”是指加入到药物组合物中以进一步促进活性成分施用的惰性物质。赋形剂的非限制性实例包括碳酸钙、磷酸钙、各种糖类和各种类型淀粉、纤维素衍生物、明胶、植物油类和聚乙二醇类。

[0337] 用于配制和施用药物的技术可在“Remington's Pharmaceutical Sciences”, Mack Publishing Co., Easton, PA, latest edition(最新版本)中找到,其通过引用并入本文。

[0338] 合适的施用途径可包括例如口腔,直肠,经粘膜,特别是经鼻、肠和胃肠外递送(包括肌内、皮下和髓内注射以及鞘内),直接心室内、心内,例如注入右心室腔或左心室腔、注入普通冠状动脉,静脉内、腹膜内、鼻内或眼内注射。

[0339] 用于药物递送至中枢神经系统(CNS)的传统方法包括:神经外科策略(例如脑内输注或脑室内输注);试图采用血脑屏障的内源性运输途径之一的药剂分子操作(例如包含对内皮细胞表面分子具有亲和力的运输肽连同自身能够跨血脑屏障(BBB)的制剂的嵌合输注蛋白);被设计以增加药剂脂溶性的药理学策略(例如水溶性制剂与脂质体或胆固醇载体缀合);以及通过高渗性破坏短暂破坏血脑屏障的完整性(由输注甘露醇溶液至颈动脉或使用生物活性剂例如加压素肽而产生)。然而,这些策略中的各策略具有限制性,例如侵入性手术操作相关的固有风险、外源性运输系统中固有限制性赋予的尺寸限制,与包含载体基序(在CNS外可具有活性)的嵌合分子全身施用相关的潜在不期望的生物学副作用,破坏血脑屏障的脑区内可能的脑损伤,使其成为次选的递送方法。

[0340] 可选地,可以以局部方式而非全身方式来施用所述药物组合物,例如,通过将所述药物组合物直接注射至患者的组织区域。

[0341] 本发明一些实施方案的药物组合物可通过本领域公知的方法制备,例如通过常规混合、溶解、制粒、制糖衣丸剂、磨细(levitating)、乳化、包封、捕获或冻干方法。

[0342] 用于本发明一些实施方案的用途的药物组合物可以以常规方式使用一种或多种生理学上可接受的载体配制,所述载体包含赋形剂和助剂,其促进将活性成分加工成可药用的制剂。适当的制剂取决于所选择的施用途径。

[0343] 对于注射,药物组合物的活性成分可以以水溶液,优选地以生理学上相容的缓冲液例如汉克氏液、林格氏液或生理盐缓冲液配制。对于经粘膜施用,在制剂中使用适合于渗透屏障的渗透剂。这样的渗透剂通常为本领域已知的。

[0344] 对于口服施用,药物组合物可通过将活性化合物与本领域公知的药学上可接受的载体组合而易于配制。这样的载体使得药物组合物能够配制成用于由患者口服摄入的片剂、丸剂、糖衣丸、胶囊剂、液体、凝胶剂、糖浆剂、浆剂、混悬剂等。可使用固体赋形剂制备用于口服使用的药物制剂,任选地研磨生成的混合物,并且如果需要,在加入合适的助剂之后加工颗粒混合物以获得片剂或糖衣丸芯。合适的赋形剂具体为:填充剂,例如糖类,包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨醇;纤维素制剂,例如玉米淀粉、小麦淀粉、大米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄蓍胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠;和/或生理学上可接受的聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。如果需要,可加入崩解剂,例如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或者海藻酸或其盐,例如海藻酸钠。

[0345] 糖衣丸芯被提供合适的包衣。为此目的,可使用可任选地含有阿拉伯树胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、卡伯波凝胶、聚乙二醇、二氧化钛、漆液(lacquer solution)和合适的有机溶剂或溶剂混合物的浓缩糖液。向片剂或糖衣丸包衣中加入染料或颜料用于鉴别或表征活性化合物剂量的不同组合。

[0346] 可口服使用的药物组合物包括由明胶制成的推入配合式胶囊(push-fit capsule)以及由明胶和增塑剂例如甘油或山梨醇制成的软密封胶囊。推入配合式胶囊可含有与填充剂(例如乳糖)、粘合剂(例如淀粉)、润滑剂(例如滑石或硬脂酸镁)和任选的稳定剂混合的活性成分。在软胶囊中,活性成分可溶解或悬浮于合适的液体例如脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇中。另外,可加入稳定剂。所有用于口服施用的制剂应以适合于所选择的施用途径的剂量存在。

[0347] 对于颊施用,组合物可采取以常规方式配制的片剂或锭剂的形式。

[0348] 对于通过鼻吸入施用,用于本发明一些实施方案的用途的活性成分便利地以来自加压包装或喷雾器的气溶胶喷雾剂形式递送,其中使用合适的推进剂例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷或二氧化碳。在加压气溶胶的情况下,可通过提供递送计量的量的阀门来确定剂量单位。用于分配器的例如明胶胶囊和药筒可配制含有化合物与合适的粉末基质(例如乳糖或淀粉)的粉末混合物。

[0349] 本文描述的药物组合物可配制用于胃肠外施用,例如通过大剂量注射或连续输注。用于注射的制剂可以以单位剂型,例如以安瓿或多剂量容器呈现,任选地添加防腐剂。组合物可为在油性或水性载体中的混悬剂、溶液剂或乳剂,并可含有配制剂例如助悬剂、稳定剂和/或分散剂。

[0350] 用于肠胃外施用的药物组合物包括水溶性形式的活性制剂的水溶液。另外,活性成分的混悬剂可制备成合适的油性或水基注射用混悬剂。合适的亲脂性溶剂或载体包括脂肪油类例如芝麻油或合成的脂肪酸酯类例如油酸乙酯、甘油三酯或脂质体。水性注射用混悬剂可含有提高混悬剂粘度的物质,例如羧甲基纤维素钠、山梨醇或葡聚糖。任选地,混悬剂还可含有合适的稳定剂或提高活性成分的溶解度以使得能够制备高度浓缩的溶液剂物质。

[0351] 可选地,活性成分可以用于在使用前用合适的载体例如无菌无热原的水基溶液构建的粉末形式存在。

[0352] 本发明一些实施方案的药物组合物还可使用例如常规栓剂基质例如可可脂或其他甘油酯类以直肠组合物例如栓剂或保留灌肠剂配制。

[0353] 适合于在本发明一些实施方案的情况下使用的药物组合物包括其中以有效达到预期目的的量包含活性成分的组合物。更具体地,治疗有效量意指有效预防、减轻或改善病症(例如恶性或非恶性病)的症状或延长正在治疗的受试者的存活的活性成分(Tcm细胞)的量。

[0354] 治疗有效量的确定完全处于本领域技术人员的能力范围内,尤其是根据本文提供的详细内容的情况下更是如此。

[0355] 对于用于本发明方法的任何制剂,治疗有效量或剂量最初可自体外和细胞培养测定估计。例如,剂量可以动物模型配制以获得期望的浓度或滴度。这样的信息可用于更准确地确定用于人的有用剂量。

[0356] 本文描述的活性成分的毒性和治疗效力可通过体外标准药理学程序,以细胞培养物或实验动物来确定。自这些体外和细胞培养测定以及动物研究获得的数据可用于配制用于人的剂量范围。剂量可依使用的剂型和采用的施用途径而定变化。确切的剂型、施用途径和剂量可由个体医生鉴于患者的状况来选择(参见例如Fingl,等人,1975,“The Pharmacological Basis of Therapeutics”中,第1章第1页)。

[0357] 剂量和间隔可单个调整以提供足以诱导或抑制生物效应的活性成分水平(最小有效浓度,MEC)。每种制剂的MEC有所不同,但可自体外数据估算。获得MEC必要的剂量取决于个体特征和施用途径。检测分析可用于确定血浆浓度。

[0358] 根据待治疗病症的严重程度和反应性,施用可为单次或多次施用,治疗过程持续几天至几周或者直至实现治愈或实现疾病状态的减轻。

[0359] 当然,待施用的组合物的量将取决于正在治疗的受试者、痛苦的严重程度、施用方

式、处方医生的判断等。

[0360] 如果需要,本发明的一些实施方案的组合物可以以包装或分配器装置呈现,例如FDA批准的试剂盒,其可含有一个或多个单位剂型,所述单位剂型含有活性成分。包装可例如包含金属或塑料箔,例如泡罩包装。包装或分配器装置可附有给药说明书。包装或分配器也可以政府机构规定的规范药品生产、使用或销售的形式附有与容器相关的注意事项,该注意事项反映机构对组合物或人或兽医施用的批准形式。例如,这种注意事项可为由美国食品和药品管理局批准的用于处方药或经批准的产品说明书的标签。包含以相容性药用载体配制的本发明制剂的组合物也可被制备,置于适当的容器中,并被标记用于治疗指示的病征,如以上进一步详述的那样。

[0361] 本文使用的术语“约”是指 $\pm 10\%$ 。

[0362] 术语“包含”、“包涵”、“包括”、“涵盖”、“具有”及其词形变化形式意指“包括但不限于”。

[0363] 术语“由……组成”意指“包括并限于”。

[0364] 术语“基本上由……组成”意指组合物、方法或结构可包括另外的成分、步骤和/或部分,但只是在另外的成分、步骤和/或部分不实质上改变所要求保护的组合物、方法或结构的基本和新颖特征时才可行。

[0365] 本文使用的单数形式“一种”、“一个”和“该”包括复数指涉,除非上下文另外明确规定。例如,术语“一种化合物”或“至少一种化合物”可包括多种化合物,包括其混合物。

[0366] 在整个该申请中,本发明的各种实施方案可以范围样式呈现。应该理解的是,以范围样式呈现的描述仅是为了方便和简洁,并且不应解释为对本发明范围的刻板限制。因此,范围的描述应认为已具体公开所有可能的子范围以及该范围内的单个数值。例如,范围的描述例如1-6应认为已具体公开子范围例如1-3、1-4、1-5、2-4、2-6、3-6等,以及处于该范围内的单个数字,例如1、2、3、4、5和6。无论范围的宽度如何,这都适用。

[0367] 每当本文指示数值范围时,其意指包括处于指示范围内的任何引用的数值(分数或整数)。短语“在第一个指示数字与第二个指示数字之间的范围”和“第一个指示数字至第二个指示数字的范围”本文可互换使用,并且意指包括第一和第二个指示数字及其间的所有分数和整数数字。

[0368] 本文使用的术语“方法”是指用于完成给定任务的方式、手段、技术和程序,包括但不限于已经为化学、药理学、生物学、生物化学和医学领域的从业者已知或者可易于自己知的方式、手段、技术和程序开发的那些方式、手段、技术和程序。

[0369] 应该意识到,为了清楚起见而在单独实施方案的情况下描述的本发明的某些特征,也可以单个实施方案的组合提供。相反地,为了简便起见而在单个实施方案的情况下描述的本发明的各种特征,也可单独地或以任何适合的子组合或者合适时以任何其他描述的本发明实施方案提供。在各种实施方案的情况下描述的某些特征不认为是那些实施方案的必要特征,除非实施方案在没有那些元素的情况下不起作用。

[0370] 如上文描绘的和如在以下权利要求部分要求保护的本发明的各种实施方案和方面在以下实施例中找到实验支持。

实施例

[0371] 现参照以下实施例,其与以上描述一起以非限制性方式说明本发明。

[0372] 通常,本文使用的命名以及本发明中采用的实验室程序包括分子、生物化学、微生物学和重组DNA技术。这样的技术在文献中有充分解释。参见例如“Molecular Cloning: A laboratory Manual”Sambrook等人,(1989);“Current Protocols in Molecular Biology”Volumes I-III Ausubel,R.M.,ed.(1994);Ausubel等人,“Current Protocols in Molecular Biology”,John Wiley and Sons,Baltimore,Maryland(1989);Perbal,“A Practical Guide to Molecular Cloning”,John Wiley & Sons,New York(1988);Watson等人,“Recombinant DNA”,Scientific American Books,New York;Birren等人(eds)“Genome Analysis:A Laboratory Manual Series”,Vols. 1-4,Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York(1998);如在美国专利第4666828、4683202、4801531、5192659和5272057号中阐述的方法学;“Cell Biology:A Laboratory Handbook”,Volumes I-III Cellis,J.E.,ed.(1994);“Current Protocols in Immunology”Volumes I-III Coligan J.E.,ed.(1994);Stites等人(eds),“Basic and Clinical Immunology”(8th Edition),Appleton & Lange,Norwalk,CT(1994);Mishell和Shiigi(eds),“Selected Methods in Cellular Immunology”,W.H. Freeman and Co.,New York(1980);可用的免疫测定在专利和科学文献中得到广泛描述,参见例如美国专利第3791932、3839153、3850752、3850578、3853987、3867517、3879262、3901654、3935074、3984533、3996345、4034074、4098876、4879219、5011771和5281521号;“Oligonucleotide Synthesis”Gait,M.J.,ed.(1984);“Nucleic Acid Hybridization”Hames,B.D.和Higgins S.J.,eds.(1985);“Transcription and Translation”Hames,B.D.和Higgins S.J.,Eds.(1984);“Animal Cell Culture”Freshney,R.I.,ed.(1986);“Immobilized Cells and Enzymes”IRL Press,(1986);“A Practical Guide to Molecular Cloning”Perbal,B.,(1984)和“Methods in Enzymology”Vol. 1-317,Academic Press;“PCR Protocols:A Guide To Methods And Applications”,Academic Press,San Diego,CA(1990);Marshak等人,“Strategies for Protein Purification and Characterization-A Laboratory Course Manual”CSHL Press(1996);所有这些参考文献通过参照结合,好像本文充分阐述那样。在整个该文件中提供其他一般参考文献。确信其中的程序为本领域熟知的,并且为读者提供便利。其中含有的所有信息通过参照结合到本文中。

[0373] 通用材料和实验程序

[0374] 动物

[0375] 雌性6-12周龄BALB/c、FVB、C57BL/6和BALB/c-NUDE小鼠得自Harlan Laboratories。在魏兹曼研究所动物中心(Weizmann Institute Animal Center)繁育同系的B6.SJL,C57BL/6-Tg(CAG-OVA)916Jen/J小鼠(表达OVA的小鼠)以及OT1小鼠(表达被设计成在H2Kb MHC-I背景下识别卵清蛋白(OVA)残基257-264的转基因(Tg)TCR)以及OT1/Rag-/CD45.1。所有小鼠维持在小笼中(每笼5只动物)并喂以无菌食物和酸性水。这些研究得到魏兹曼科学研究所的机构动物护理和使用委员会(Weizmann Institute of Science Institutional Animal Care and Use Committee)的批准。

[0376] 从小鼠记忆T细胞生成反抑细胞

[0377] 使用表达被设计成在H2Kb MHC-I背景下识别卵清蛋白(OVA)残基257-264的转基因(Tg)TCR的OT1小鼠。这些小鼠用作反抑Tcm细胞的供体。在收获这些OT1 CD8⁺ T细胞之前,使用OVA肽与弗氏完全佐剂(CFA)的混合物免疫小鼠,并在起始攻击之后14天使用OVA肽+弗氏不完全佐剂(IFA)加强免疫。免疫后7-14天,处死小鼠,移取其脾脏和淋巴结并碾碎,利用磁珠分选从普通CD8⁺细胞库分离记忆细胞(CD8⁺CD44⁺)。所产生的细胞群通过在细胞因子剥夺的情况下与经辐射的自OVA表达小鼠的脾脏生成的脾细胞联合培养而经受第三方刺激。联合培养起始后6小时,添加hIL-15(10ng/ml)至培养物中以推动细胞表达下文所述的对于野生型(WT)Tcm的Tcm样表型,即先前所述的反抑Tcm细胞,其基本如先前所述从全脾或外周血单核细胞生成[Ophir,E.(2013),同上文]。

[0378] 负载病毒肽的人树突状细胞的生成

[0379] 如图4B所述制备负载病毒肽的人树突状细胞(DC)。简言之,将供体外周血单核细胞(PBMC)接种于培养板,在37 °C和5 % CO₂/O₂培养3小时。弃除上清细胞(包含T细胞),将贴壁细胞进一步在添加细胞因子(IL-4和GM-CSF)的情况下(在相同培养条件)培养72小时。3天后,收集漂浮的细胞(未成熟的树突状细胞),接种并使用下列细胞因子INF- γ 、IL-4、GM-CSF以及LPS过夜孵育,用于DC的成熟。第4天,分离负载病毒肽混合物的贴壁细胞(成熟的DC,即mDC),在37 °C孵育1小时。病毒混合物包含EBV、CMV以及腺病毒(Adv)的7种pepmix。pepmix为重叠感兴趣的抗原的完整蛋白质序列的11个氨基酸的15 mer(购自JPT Technologies (Berlin, Germany))。使用淘选EBV (LMP2、BZLF1、EBNA1)、Adv- (五邻体、六邻体)以及CMV- (pp65、IE-1)的Pepmix。然后如下所述对负载病毒肽的人mDC辐射30 Gy并添加至T细胞部分。

[0380] 使用病毒肽生成抗第三方Tcm细胞

[0381] 通过首先耗竭从细胞供体获得的外周血单核细胞(PBMC)的CD4⁺和CD56⁺细胞,生成抗第三方人反抑细胞(利用获自Milteni Biotec的磁珠,使用磁细胞分选)。

[0382] 将余下的细胞群与经辐射(30 Gy)的树突状细胞(相同细胞供体)联合培养,其中树突状细胞已被脉冲以表达第三方抗原(例如包含EBV、CMV以及腺病毒的病毒抗原混合物)。对于培养的前3天,仅给细胞补充IL-21,然后从第+3天起,将IL-21、IL-15以及IL-7添加至培养物,直至第+9天。

[0383] 使用病毒肽从记忆T细胞生成反抑Tcm细胞

[0384] 通过首先耗竭从细胞供体获得的外周血单核细胞(PBMC)的CD4⁺、CD56⁺以及CD45RA⁺细胞,从人记忆细胞生成反抑细胞(利用获自Milteni Biotec的磁珠,使用磁细胞分选)。余下的细胞群包含CD8⁺CD45RO⁺记忆T细胞。接下来,将CD8⁺CD45RO⁺记忆T细胞与经辐射(30 Gy)的树突状细胞(相同细胞供体)联合培养,其中树突状细胞已被脉冲以表达抗原(例如包含EBV、CMV以及腺病毒的病毒抗原混合物)。对于培养的前3天,仅给细胞补充IL-21,然后从第+3天起,将IL-21、IL-15以及IL-7添加至培养物,直至第+9天。

[0385] 使用肿瘤肽从记忆T细胞生成反抑Tcm细胞

[0386] 通过首先使用肿瘤肽(例如BCR-ABL、ELA2、G250/碳酸酐酶IX、HA-1、HA-2、hTERT、MAGE-1、MUC1、NY-ESO-1、PRAME、PR1、PRTN3、RHAMM以及WT-1、或它们的组合,如Molldrem J. Biology of Blood and Marrow Transplantation(2006)12:13-18;Alatrash G.和Molldrem J.,Expert Rev Hematol.(2011)4(1):37-50中所述)与弗氏完全佐剂(CFA)免疫

细胞供体并在起始攻击之后14天使用肿瘤肽+弗氏不完全佐剂(IFA)加强免疫而生成反抑细胞。接下来,获取外周血单核细胞(PBMC)并使其耗竭 $CD4^+$ 、 $CD56^+$ 以及 $CD45RA^+$ 细胞(利用获自Milteni Biotec的磁珠,使用磁细胞分选)。余下的细胞群包含 $CD8^+CD45RO^+$ 记忆T细胞。接下来,将 $CD8^+CD45RO^+$ 记忆T细胞与经辐射(30 Gy)的树突状细胞(相同细胞供体)联合培养,其中树突状细胞已被脉冲以表达肿瘤抗原。对于培养的前3天,仅给细胞补充IL-21,然后从第3天起,将IL-21、IL-15以及IL-7添加至培养物,直至第9天。

[0387] 流式细胞术分析

[0388] 使用Becton Dickinson FACScanto II进行荧光激活细胞分选(FACS)分析,以确定生成的Tcm细胞(即 $CD8^+CD45RO^+CD62L^+$ 和 $CD4^-CD56^-CD45RA^-$)的纯度水平和表型。使用下列标记抗体以两组对细胞进行染色。

[0389] 组1: $CD8$ -异硫氰酸荧光素(FITC)、 $CD45RO$ -藻红蛋白(PE)、 $CD62L$ -别藻蓝素(APC)、 $CD56$ -APC-Cy7、 $CD3$ -Brilliant Violet 711、 $CD16$ -PE-Cy7以及7AAD-PerCp。

[0390] 组2: $CD3$ -Brilliant Violet 711、 $CD8$ -FITC、 $CD45RA$ -PE-Cy7、 $CD45RO$ -APC-Cy7、 $CD20$ -PE以及7AAD-PerCp。

[0391] 有限稀释分析(LDA)和 ^{35}S -甲硫氨酸杀伤测定

[0392] 为了评价在不同纯化阶段从PBMC生成的抗第三方Tcm培养物中残余抗宿主反应性细胞的频率,例如 $CD4^-CD56^-$ (即富集的 $CD8^+$ 细胞)或 $CD4^-CD56^-CD45RA^-$ (即记忆细胞),与新鲜 $CD4^-CD56^-CD19^-$ 细胞(用作同种异体阳性对照)比较来进行有限稀释分析(LDA)。在MLR培养物中针对辐射的宿主PBMC培养三种受检测的细胞制备物5天(即分批培养物),以使得诱导抗宿主活性。5天后,从MLR培养物收获效应细胞,并于Ficoll上分离效应细胞。在96孔圆底培养板中(每输入号重复16次)以不同稀释度(1至40 000个细胞/孔的范围)对效应细胞铺板。还将用于批MLR的经辐射(30 Gy)的宿主刺激物添加至各孔。有限稀释培养物用于允许滴定抗宿主信号的终点,并在IL-2存在下维持7天用于放大效应细胞信号。

[0393] 7天后,在标准5小时测定中针对 ^{35}S -甲硫氨酸标记的细胞检测细胞毒活性。简言之,使用 ^{35}S -甲硫氨酸标记用作靶细胞的来自宿主的伴刀豆球蛋白A—制备的blast(Sigma, St Louis, MO),并与各种稀释度的受检测的诱导的效应细胞一起铺板。5小时孵育后,计算16个重复样品的上清液中的平均放射活性,通过下列方程式计算特定裂解的百分数: $100 \times (\text{平均实验性释放} - \text{平均自发性释放}) / (\text{平均总释放} - \text{平均自发性释放})$ 。靶细胞释放的 ^{35}S -甲硫氨酸水平代表表示抗宿主反应水平的杀伤水平。

[0394] 为了从有限稀释培养物读数计算频率,使用下列方程式: $\ln y = -fx + \ln a$ (表示Poisson分布的零阶项),其中 y 是非应答培养物的百分数, x 是每一培养物中应答细胞的数量, f 是应答前体的频率, a 是理论上等于100 %的 y 截取值。仅包含靶细胞的16孔的平均值加上3个标准差被确定为背景放射性的截断值。当超过截断值时实验孔计为裂解阳性。通过计算阳性培养物的百分数限定应答培养物的百分数。利用数据的线性回归分析从所画的直线的斜率确定CTL-p频率(f)和标准误差(SE)。

[0395] IFN- γ -Elispot分析

[0396] 使用酶联免疫印迹(ELISpot)测定—在单细胞水平检测分泌细胞因子的细胞的频率的高灵敏性免疫测定。具体地,INF- γ (干扰素- γ)ELISpot测定用于评价抗第三方Tcm培养物中残余的抗宿主反应性细胞的频率,这是因为IFN- γ 主要由活化的T细胞和NK细胞

产生。

[0397] 简言之,将96孔PVDF膜微滴定板中的膜表面包被捕获抗体(纯化的抗人INF- γ),所述抗体结合被测定的细胞因子(INF- γ)的特定表位。在MLR和刺激步骤的16小时期间,将不同稀释度(1至40,000个细胞/孔的范围)的受检测的细胞连同经辐射的抗宿主刺激物接种到培养板的孔中。这些细胞在孔的膜表面上形成单层。由于抗宿主特异性细胞被活化,这些细胞释放INF- γ ,其直接于膜表面由固定化抗体捕获。由此,INF- γ 在直接围绕分泌细胞周围的区域中“被捕获”,然后其有机会扩散至培养基中,或被蛋白酶降解,以及被旁观细胞上的受体结合。后续的检测步骤观察了作为免疫斑点的固定化的INF- γ 。在洗涤孔以去除细胞、碎片以及培养基组分之后,将人INF- γ 特异性的生物素化抗体添加至孔中。此抗体与INF- γ 细胞因子的不同表位具有反应性,由此用来检测被捕获的细胞因子。在洗涤以去除任何未结合的生物素化抗体之后,使用缀合辣根过氧化物酶(HRP)的链霉亲和素和沉淀底物(例如AEC、BCIP/NBT)观察检测的细胞因子。显色的终末产物(对于HRP为红色斑点)通常代表单个的产INF- γ 的细胞。人工(例如,使用解剖显微镜)或使用自动读数仪对斑点进行计数,以捕获微孔图像,并分析斑点数量和大小。

[0398] 实施例1:针对同源抗原扩增的TCR转基因CD8记忆T细胞显著提高充分同种异体T细胞耗竭的BM的植入

[0399] 记忆T细胞可与GvHD风险减少相关的可能性在过去十年一直存在争议。原则上,记忆库使用抗病毒克隆来富集,因此其可包含降低水平的同种异体反应性T细胞。然而,最近,两个试图在白血病患者中使用CD45RA⁺耗竭的HSCT的主要研究报道了显著水平的GvHD,甚至当使用移植后GvHD预防措施时也是如此[Bleakley M.等人,J Clin Invest.(2015)125(7):2677-89;Triplett,B.M.等人,Bone Marrow Transplant.(2015)50(7):968-977]。因此,通过抗第三方T细胞活化和扩增从T记忆细胞库耗竭同种异体反应性克隆可解决耗竭CD45RA细胞后保留的残余GvHD的问题。另外,作为第三方刺激的常用病毒抗原肽的使用可潜在生成耗竭同种异体反应性和赋有抗病毒活性的反抑Tcm细胞。

[0400] 为此目的,本发明的发明人已经通过使用现有记忆T细胞库的TCR针对的特异性肽建立刺激,对先前的方案进行修改以生成抗第三方反抑Tcm细胞。由此,使用表达被设计成在H2Kb MHC-I背景下识别卵清蛋白(OVA)残基257-264的转基因(Tg)TCR的OT1小鼠,在鼠模型中进行了概念实验的证明。这些小鼠用作反抑Tcm细胞的供体。在收获这些OT1 CD8⁺ T细胞之前,使用OVA肽与弗氏完全佐剂(CFA)的混合物免疫小鼠,并在起始攻击之后14天使用OVA肽+弗氏不完全佐剂(IFA)加强免疫(见图1所示)。免疫后7-14天,处死小鼠,移取其脾脏和淋巴结并碾碎,利用磁珠分选从普通CD8⁺细胞库分离记忆细胞(CD8⁺CD44⁺)。所产生的细胞群通过在细胞因子剥夺的情况下与经辐射的自OVA表达小鼠的脾脏生成的脾细胞联合培养而经受第三方刺激。联合培养起始后6小时,添加hIL-15(10ng/ml)至培养物中以推动细胞表达上述对于野生型(WT)Tcm的Tcm样表型(即,如下所述的“常规”Tcm细胞)。

[0401] 如图2A所示,从记忆细胞(CD8⁺CD44⁺)起始群制备的OT-1 Tcm细胞能够提高同种异体T细胞耗竭的骨髓移植物的植入,这与通过“常规”抗第三方Tcm细胞(即,先前描述的反抑Tcm细胞,其基本如先前所述从全脾或外周血单核细胞制备[Ophir,E.(2013),同上文])诱导的嵌合性相似。总而言之,这些结果显著证实了针对同源肽扩增的CD8⁺CD44⁺衍生的Tcm细胞确实可诱导耐受,而不产生GvHD。

[0402] 实施例2:从CD8记忆T细胞生成的Tcm反抑细胞提供了具有降低的GVHD风险的显著反抑活性

[0403] 接下来,本发明的发明人试图在使用OVA免疫后从B6-WT CD8记忆T细胞获得Tcm细胞。为此目的,在免疫C57BL/6小鼠之后,磁性分选CD8⁺CD44⁺记忆T细胞,使其经受使用所有OVA刺激物进行Tcm生成的相同方案。一开始,本发明的发明人要测试这些CD8⁺CD44⁺ Tcm细胞与先前用于临床的CD8⁺CD44⁺起始群相比较诱导GvHD的能力。预期由于使用OVA肽的抗原性刺激,CD8⁺CD44⁺ Tcm细胞会耗竭同种异体反应性克隆,所述OVA肽选择性仅活化具有相关TCR的那些T细胞克隆。

[0404] 事实上,显示CD8⁺CD44⁺ Tcm细胞并不诱导动物模型中的显著GvHD症状,而未经第三方活化的新鲜CD8⁺CD44⁺记忆细胞由于GvHD而诱导显著致死性和重量减轻(图2B-C)。接下来,本发明的发明人要评价这些细胞是否能够在降低强度调节(RIC)模型中诱导耐受(图2D所示)。如图2E中可见,CD8⁺CD44⁺ Tcm表现了在将C57BL-Nude-BM移植至使用5 Gy TBI调节的Balb/c受者之后显著提高嵌合性。

[0405] 实施例3:使用病毒抗原生成抗第三方人Tcm细胞

[0406] 本发明的发明人先前已经使用用于耗竭同种异体反应性的两阶段磁性分选方法,开发了从CD4⁻CD56⁻细胞起始群以最小GvHD风险生成来源抗第三方反抑Tcm细胞的方案。为了预防GvHD的目的,此方案使用三种细胞供体开发,其中选择第三方供体以确保其I类HLA等位基因无一共有宿主的I类HLA等位基因。

[0407] 在当前的实验中,与上述用于小鼠概念验证实验相似地,本发明的发明人开发了天然存在的CD8记忆细胞作为用于制备反抑Tcm细胞的起始材料的用途,这是因为这些细胞已被报道相对于幼稚细胞具有降低的GvHD诱导的倾向。此选择最近随着用于耗竭幼稚T细胞的GMP级CD45RA磁珠的公布而实现。如以上以及在上文的“技术领域和发明背景”部分中所述,在白血病患者中在两个临床试验中检测了输注CD45RA⁻细胞的方法[Bleakley M. et al. (2015)同上文;Triplett, B.M. et al. (2015)同上文]。然而,对于表现严重形式的GvHD的几名患者,GvHD未得到预防,即便在移植后使用免疫抑制治疗。这些数据导致本发明的发明人评估CD45RA耗竭的CD8⁺ T细胞针对特异性抗原的刺激可完全耗竭具有所有GvH反应性的这些细胞的可能性。由于此记忆库中大多数细胞的TCR针对常规病毒和细菌抗原,并由此天然很少可能具有宿主同种异体反应性,本发明的发明人得出如下理论,即,可便利地使用供体DC(即与Tcm细胞相同的细胞供体)上负载的病毒抗原肽(例如CMV、EBV以及腺病毒)作为刺激物。使用此方法,可获得这些细胞除其反抑活性之外可能的抗病毒活性的益处,这对于其中病毒再活化为常见有害事件的移植建立而言是特别有吸引力的属性。

[0408] 为了解决此假设,启动了其中使用反抑Tcm细胞的相同培养条件的初步实验,除了代替用于第三方DC的第三HLA全异供体,针对使用三种主要病毒(EBV、CMV以及腺病毒)的病毒肽混合物脉冲的供体DC进行针对抗原的刺激以外。值得注意的是,从先前描述的CD4⁻CD56⁻群(即未去除CD45RA⁺细胞)开始此实验。如在图3A-3B中可见,响应此抗病毒刺激,反抑Tcm细胞生长良好,显示到第9天时的10倍扩增,其中高百分比(93.2 %)的细胞表现反抑Tcm表型。

[0409] 图3C-D中显示了通过有限稀释分析(LDA)分析的抗宿主反应性,下列表2中总结了相关参数。结果显示此方法提供了宿主同种异体反应性克隆的两个对数级的耗竭,这与先

前针对全异HLA供体使用“常规”第三方活化的结果相似。这些结果通过IFN γ -Elispot分析(在分批培养之后进行)进一步得到确证,其中,当宿主活化时,新鲜细胞(CD4⁺CD56⁻CD19⁻)产生约25,000个斑点/10⁶个T细胞,在反抑Tcm细胞培养物中未检测到斑点(数据未显示)。

[0410] 表2:在生成针对病毒肽的反抑Tcm细胞之前和之后的抗宿主T细胞耗竭

细胞部分	对于抗宿主分批培养物所接种的细胞数量(第9天)	分批培养之后收获的细胞数量(第14天)	基于LDA的抗宿主CTL-p频率	基于LDA的总抗宿主CTL-p($\times 10^6$)(标准化至100 $\times 10^6$)	耗竭倍数
新鲜 CD4 ⁺ 56 ⁻ 19 ⁻	50 $\times 10^6$	32.4 $\times 10^6$	1/2251	28,700	x
抗病毒 Tcm CD4 ⁺ 56 ⁻	200 $\times 10^6$	19.4 $\times 10^6$	1/32,664	290	98.9

[0412] 实施例4:使用病毒抗原从记忆T细胞生成反抑细胞

[0413] 接下来,本发明的发明人检测了从针对供体DC(即,与Tcm细胞相同的细胞供体)上递呈的病毒抗原活化的CD45RA耗竭的细胞群生长的Tcm细胞的反应性(如图4A和4B所示)。

[0414] 使用LDA杀伤测定检测了自此起始细胞群(CD4⁺CD56⁻CD45RA⁻细胞)生长的反抑Tcm细胞的反应性。如结果所示,显而易见从记忆细胞生成的反抑细胞不发挥任何抗宿主反应性(图5A-C和图6)。

[0415] 总而言之,这些结果显著表明抗病毒肽作为刺激物的方法可用于CD45RA耗竭的应答细胞(例如CD4⁺CD56⁻CD45RA⁻细胞)的起始群,所述细胞已知具有相对低的GvHD倾向性。如所示,当进行抗病毒刺激时,此细胞群可进一步被推定的抗宿主克隆稀释,其可产生极其安全的无GvHD的细胞制备物。

[0416] 实施例5:使用非病毒抗原从记忆T细胞生成反抑细胞

[0417] 本发明的发明人从针对非病毒肽,包括癌症(例如,实体瘤或血液恶性肿瘤)所鉴定的肽而刺激的记忆细胞(CD45RA⁺细胞)的起始群生成反抑细胞。

[0418] 如上所述,通过使从供体获得的记忆T细胞(即CD45RA耗竭的细胞群)经历供体DC上递呈的肿瘤抗原而生成反抑细胞。

[0419] 或者,首先使用肿瘤肽(如上文“通用材料和实验程序”部分中所讨论的)与弗氏完全佐剂(CFA)免疫小鼠,并在起始攻击之后14天使用肿瘤肽+弗氏不完全佐剂(IFA)加强免疫。接下来,从受试者获得外周血单核细胞(PBMC),使其耗竭CD4⁺CD56⁺CD45RA⁺细胞。将余下的细胞群(即CD8⁺CD45RO⁺记忆T细胞)与供体DC上递呈的肿瘤抗原联合培养。

[0420] 这些细胞可进一步用于治疗性消除残余的癌症细胞。

[0421] 实施例6:用于大规模生成抗病毒CD8中央记忆反抑T细胞(Tcm)的良好操作规范(GMP)方案

[0422] 本发明的发明人已经成功重复了使用自体抗原递呈细胞上递呈的病毒抗原从记忆T细胞生成反抑细胞的方案10次(图7)。如图8和9A-H中可见,新方案的细胞回收率和纯度非常具有再现性。

[0423] 尽管本发明已结合其具体实施方案进行了描述,但显而易见的是,许多备选方案、

修改和变化对本领域技术人员将是显而易见的。因此，旨在包括落入随附权利要求的精神和广泛范围内的所有这种备选方案、修改和变化。

[0424] 本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请以其整体结合到本说明书中，至好像每一个单独出版物、专利或专利申请被具体和单个地表明通过参照结合到本文中的相同程度。另外，本申请中任何参考文献的引用或识别不应解释为承认这种参考文献可作为本发明的现有技术得到。在使用章节标题方面，它们不应解释为必然限制性的。

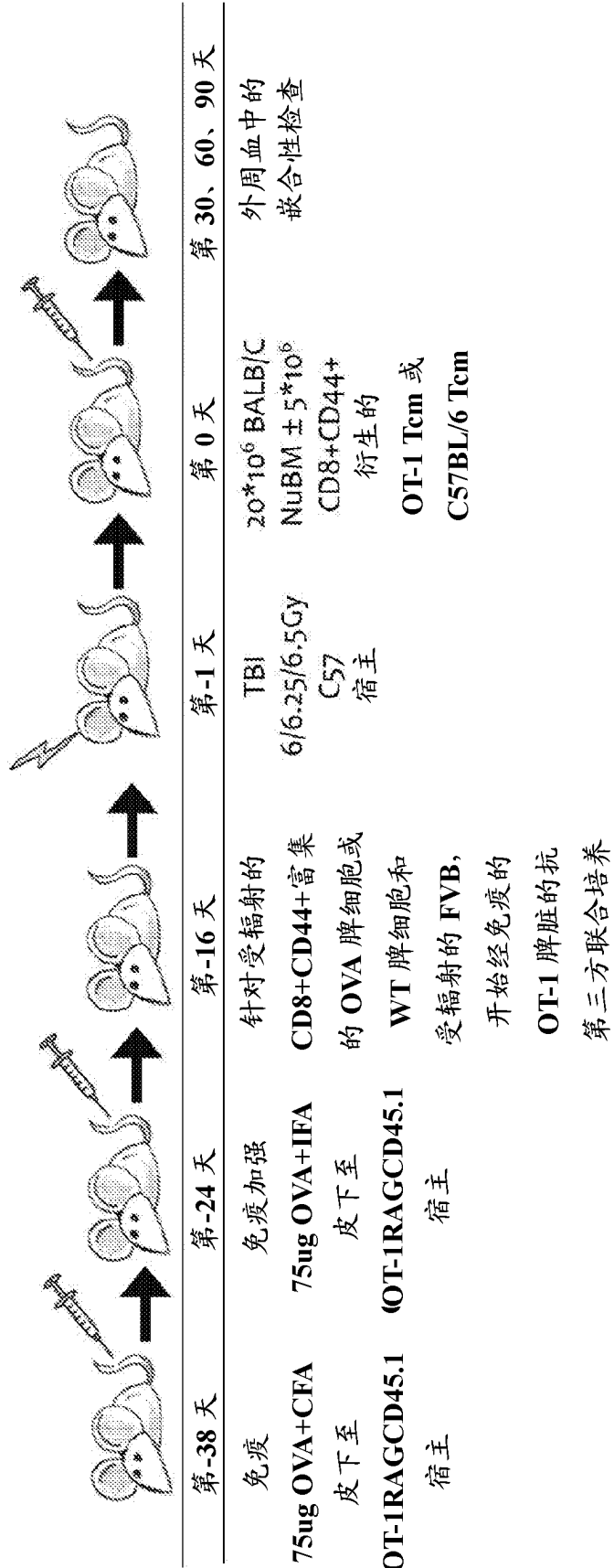


图 1

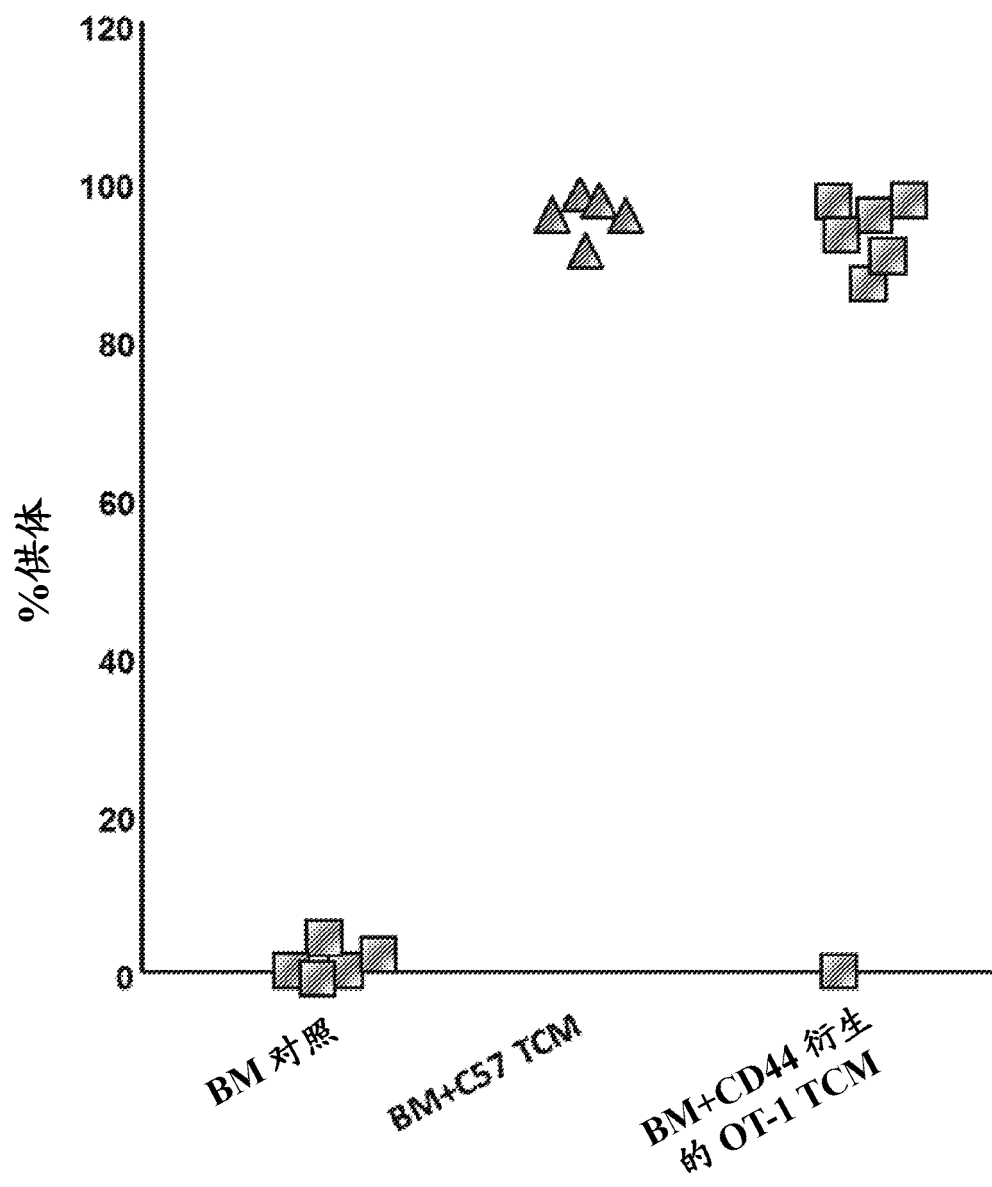


图 2A

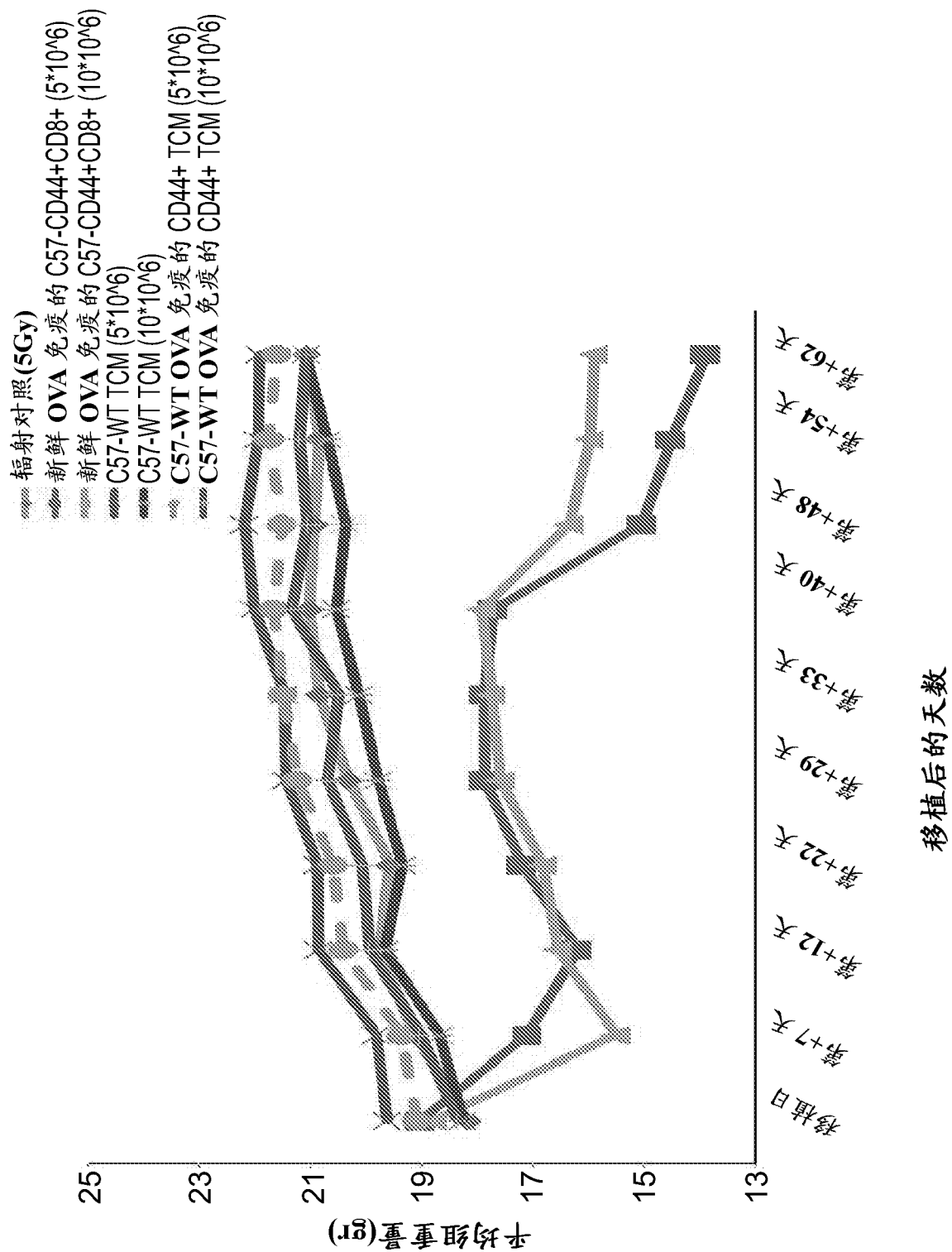


图 2B

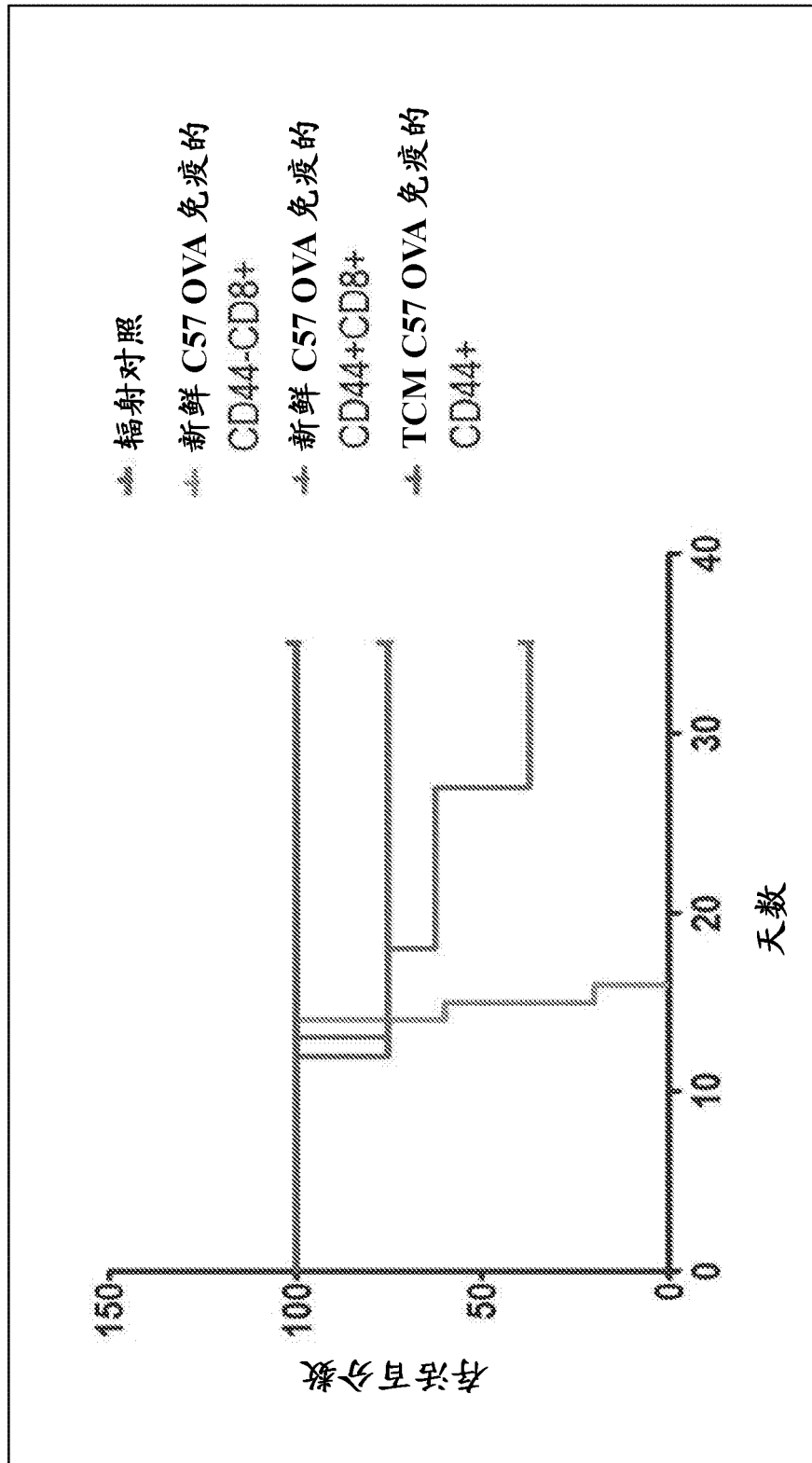


图 2C

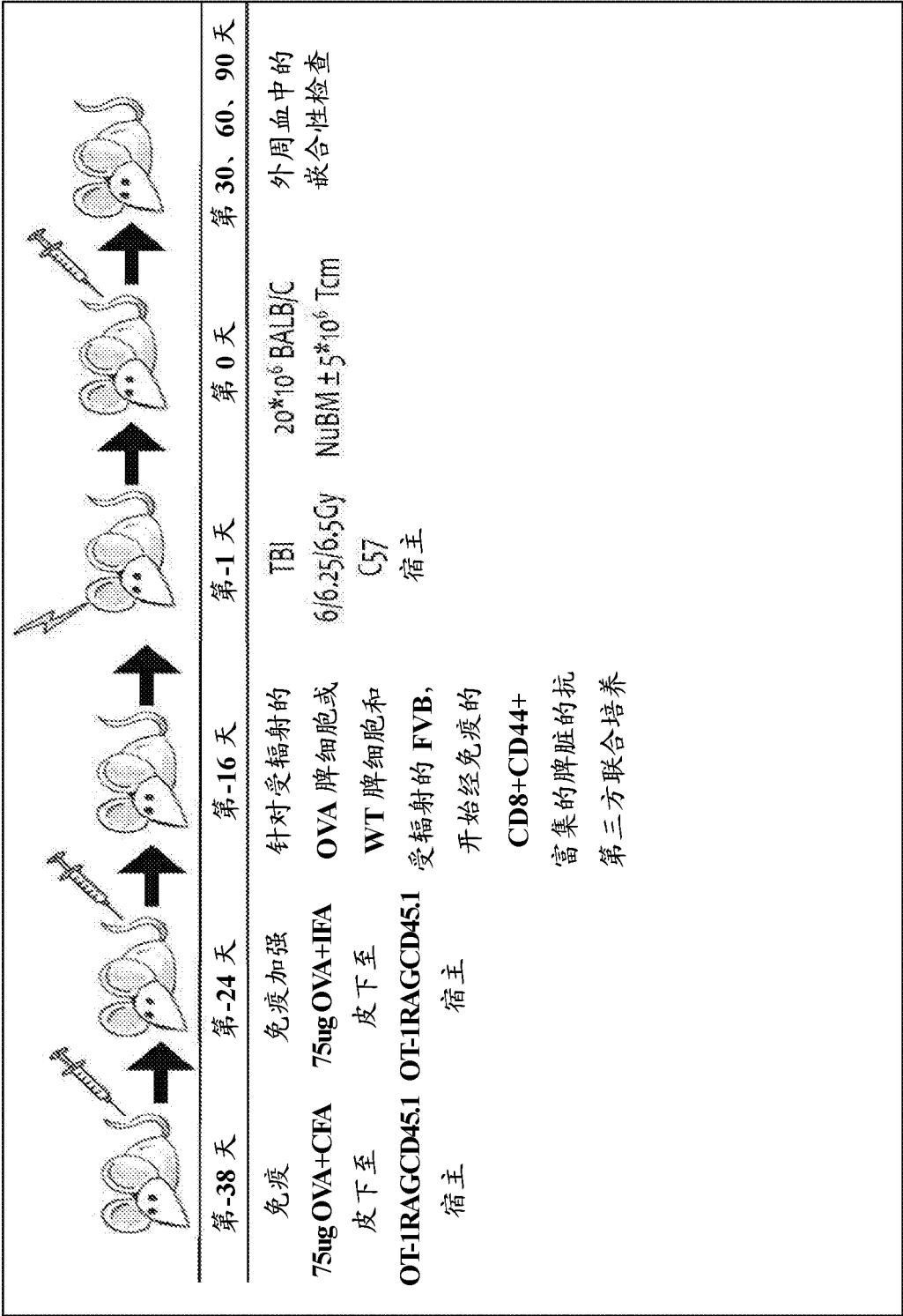


图 2D

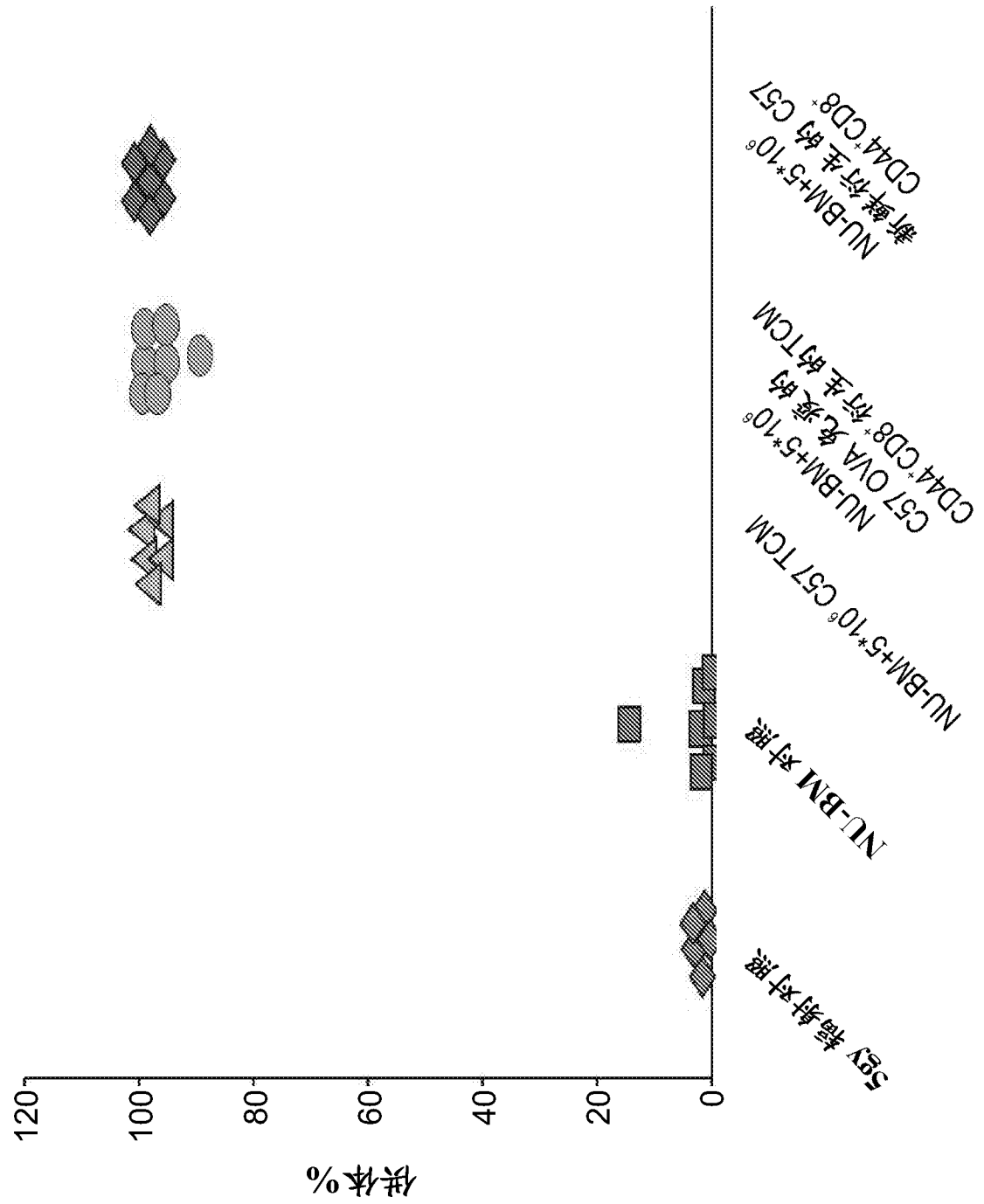


图 2E

图 3B
第 9 天
CD4-CD56-Tcm

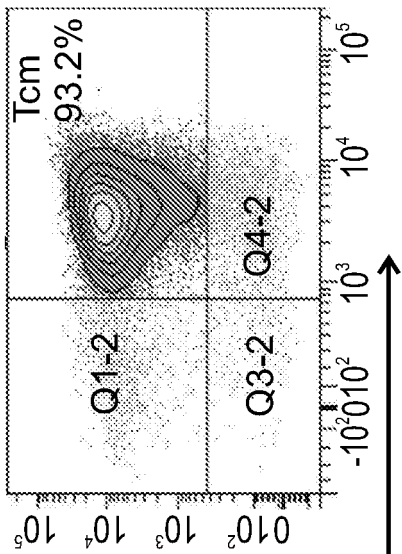
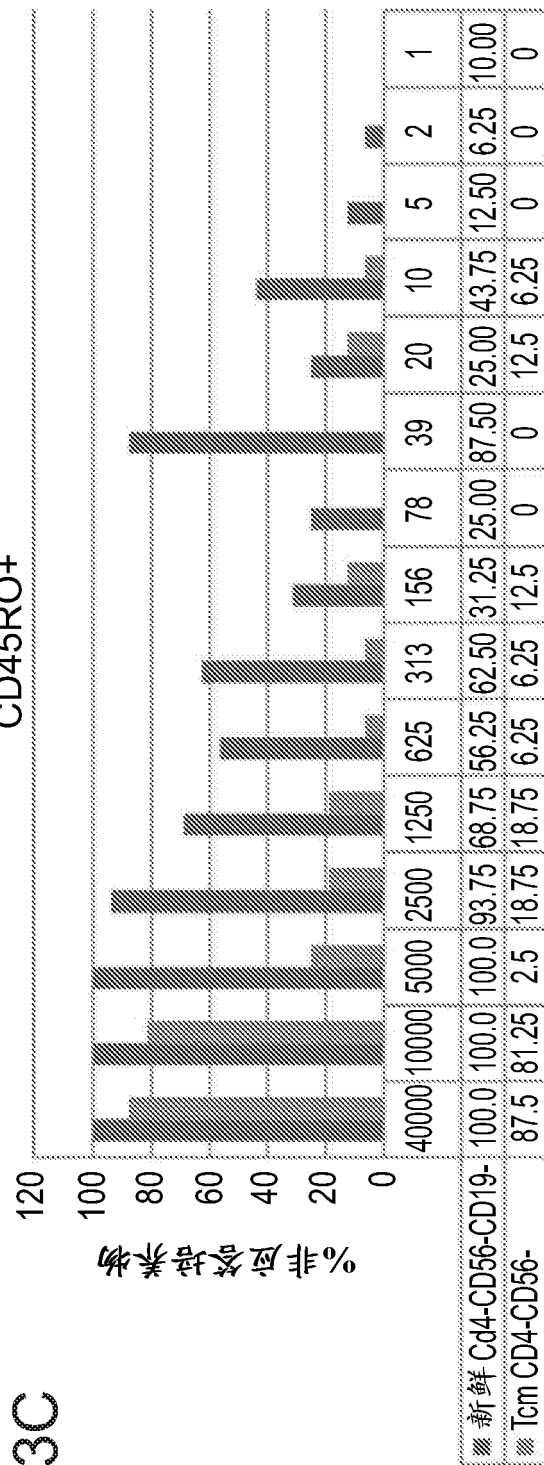
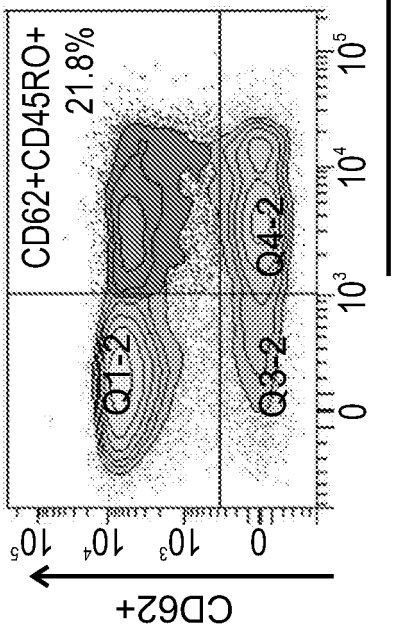


图 3A
第 0 天
CD4-CD56- 应答细胞



신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
사망아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
사망아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
사망아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
사망아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
사망아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
사망아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
사망아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
사망아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
사망아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
사망아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
사망아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
사망아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
사망아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
사망아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
사망아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
사망아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
사망아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
사망아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
사망아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
사망아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
사망아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
사망아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
사망아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
사망아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
사망아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
사망아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
사망아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
사망아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
사망아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
사망아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
사망아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
사망아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
사망아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
사망아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
사망아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
사망아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
사망아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
사망아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
신생아	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	

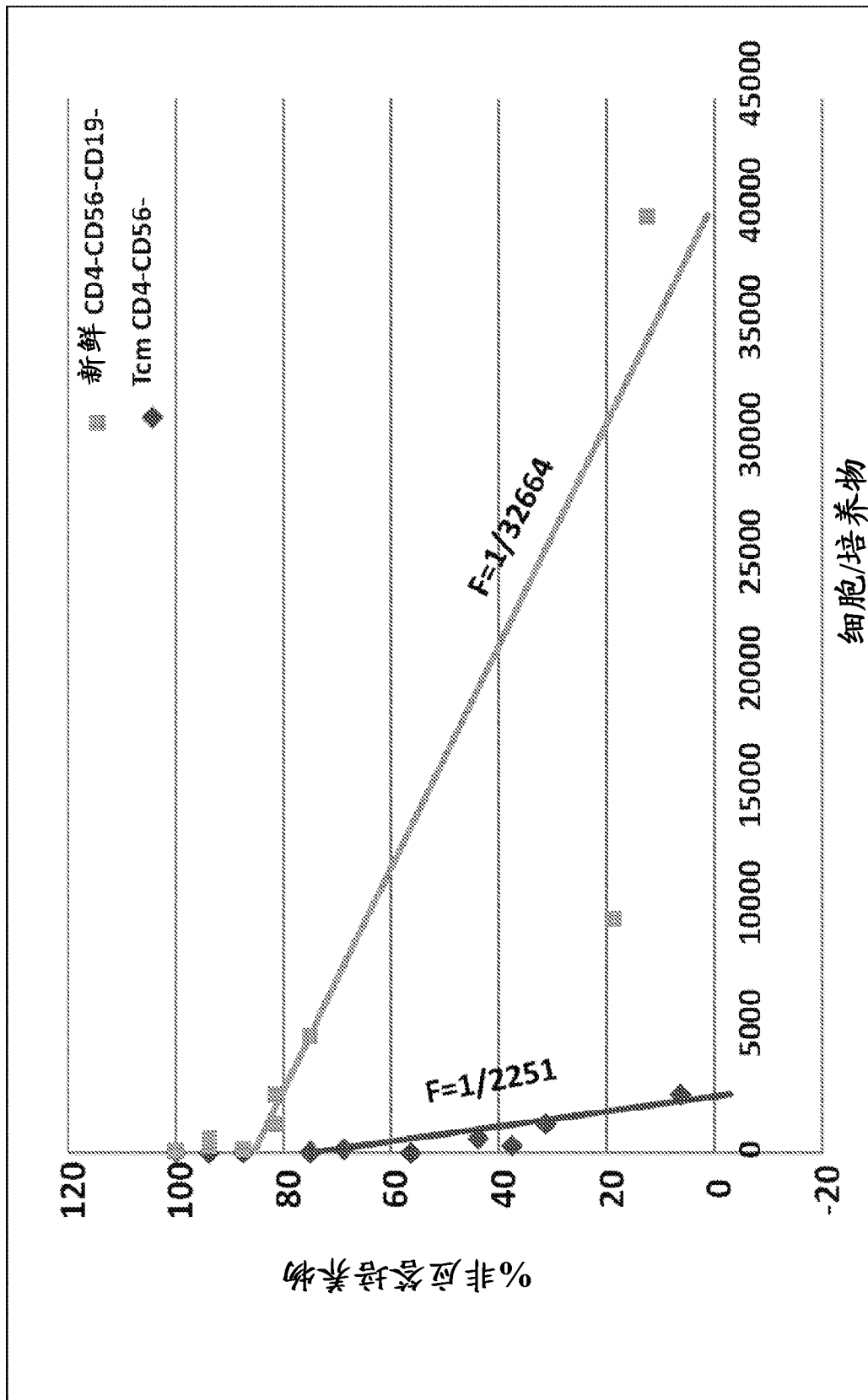


图 3D

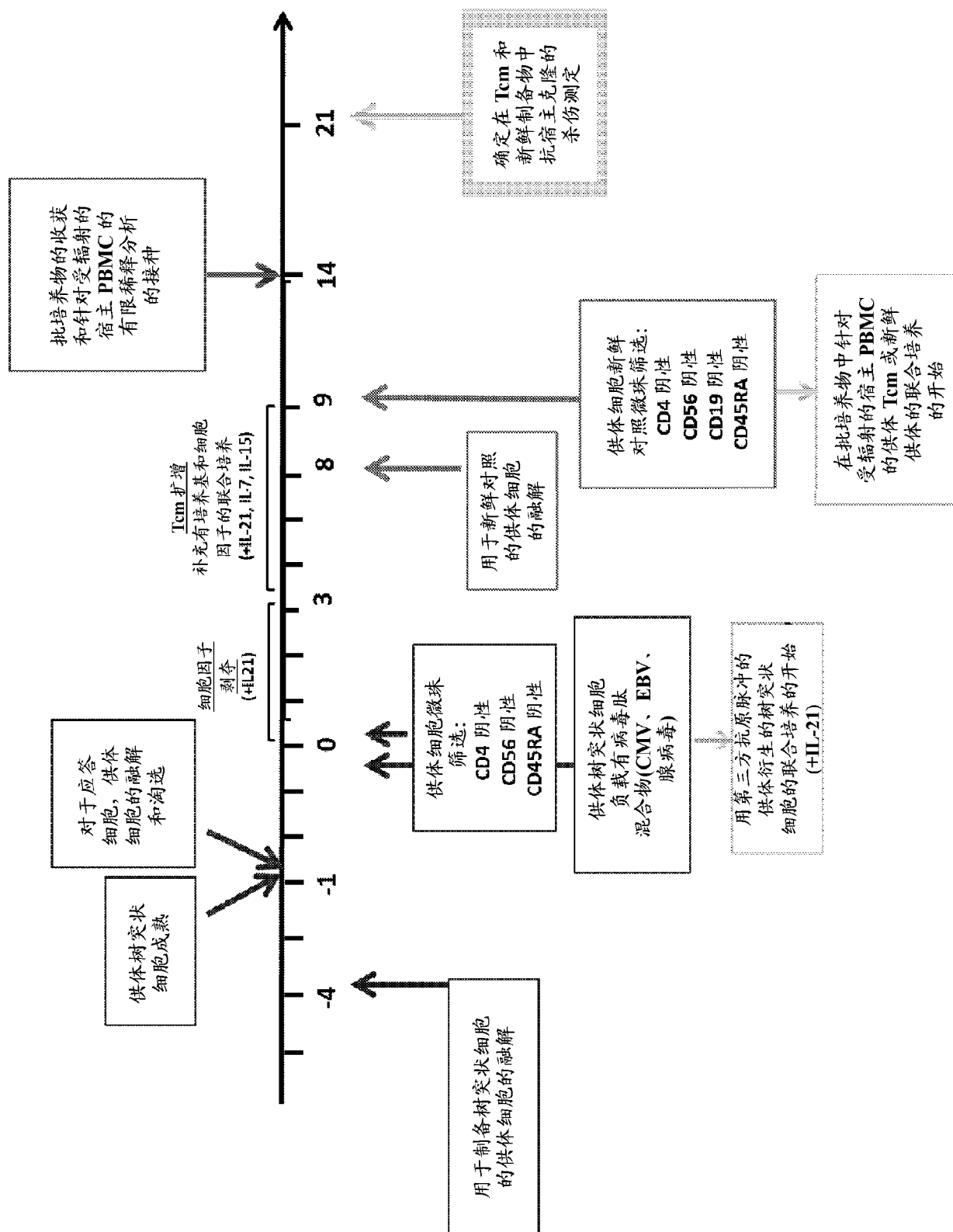


图 4A

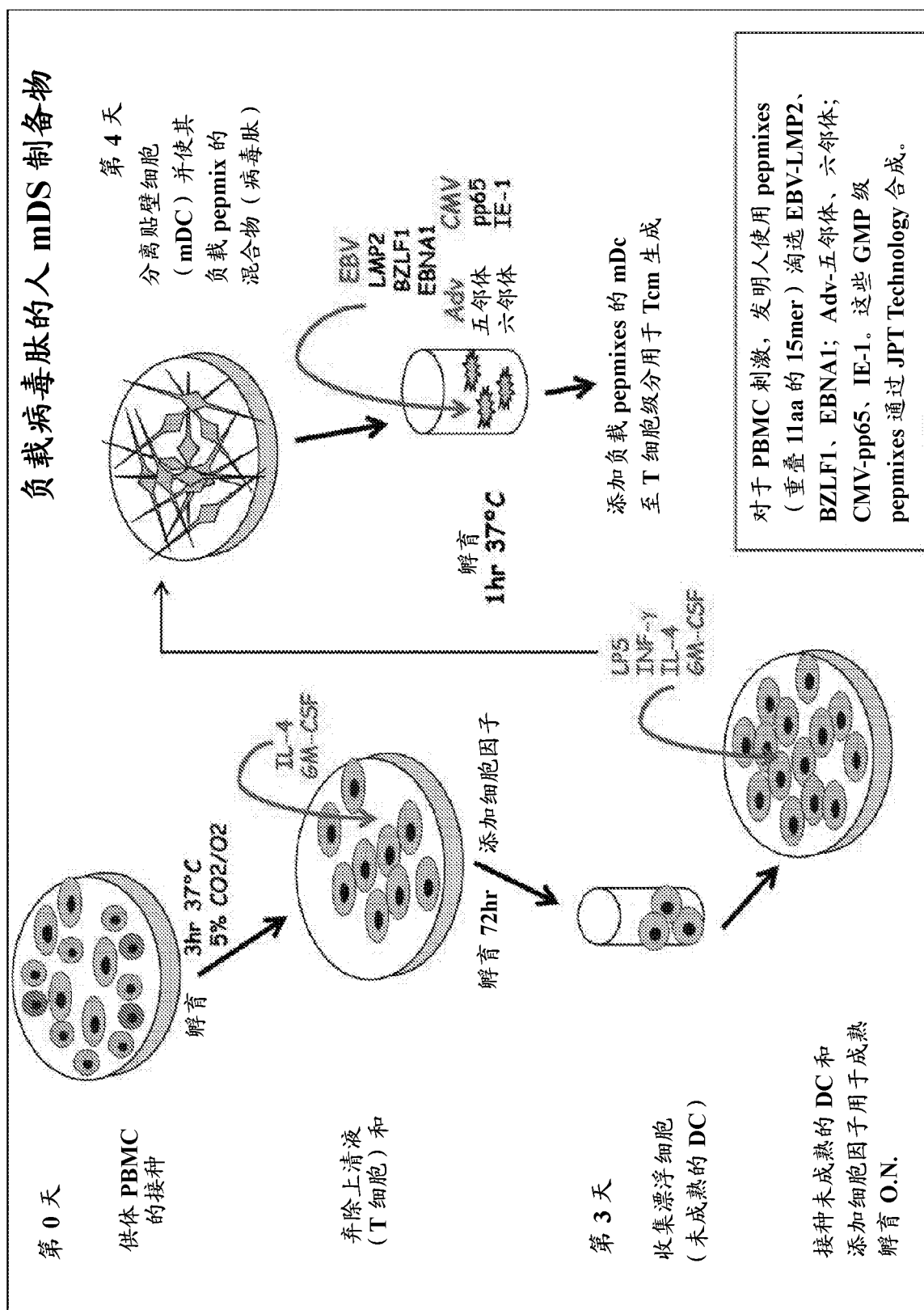


图 4B

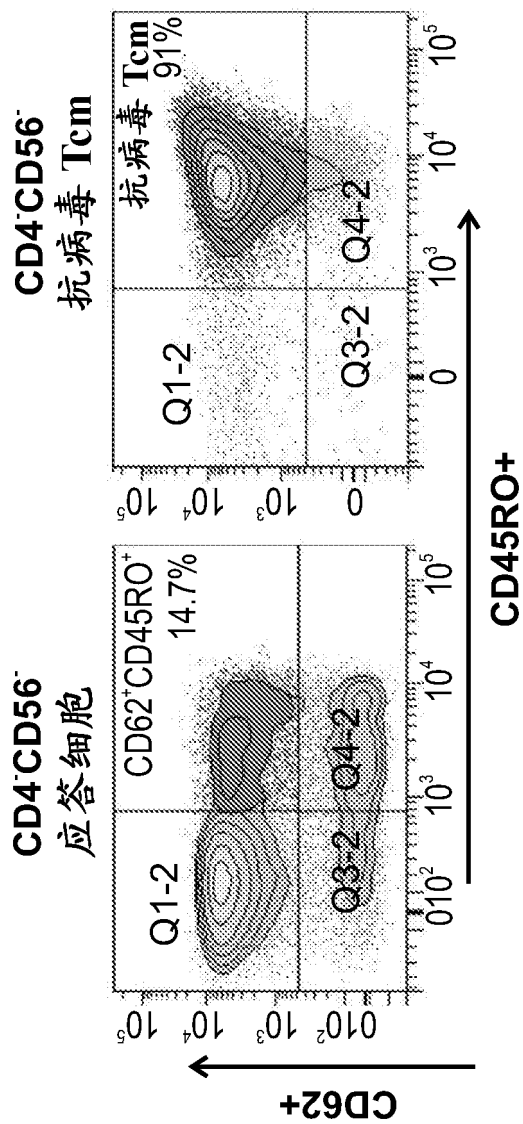


图 5A

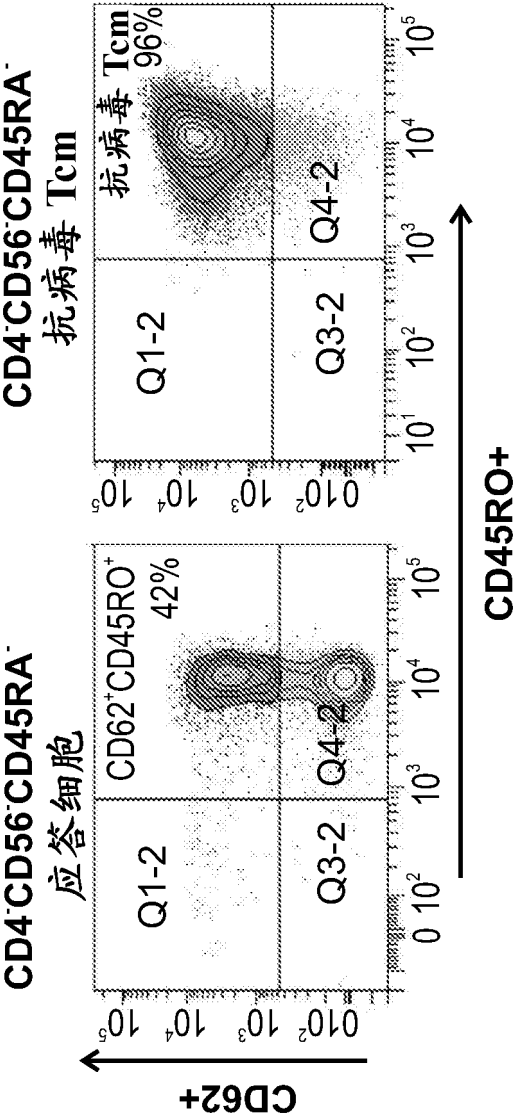


图 5B

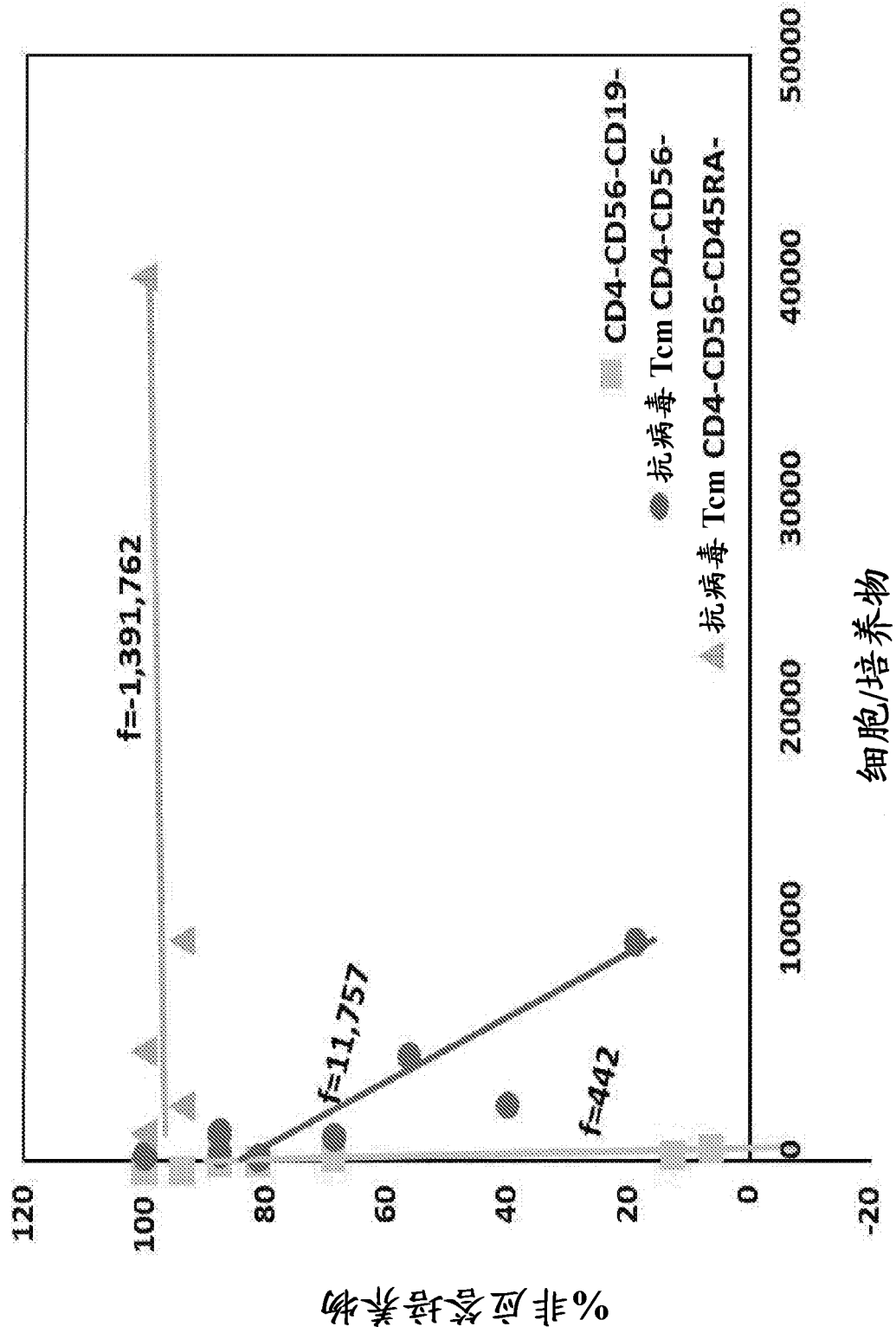


图 5C

细胞级分	用于抗宿主 的批培养物 而接种的 细胞数量 (第 9 天)	批培养之后 收获的细胞 数量 (第 14 天)	基于 LDA 的抗宿主 CTL-p 频率	基于 LDA 的 总抗宿主 CTL-p($\times 10^6$) (标准化 至 100×10^6)	耗竭 倍数
新鲜 CD4-56-19-	50×10^6	30×10^6	1/442	0.136	
抗病毒 Tcm CD4-56-	200×10^6	30×10^6	1/11,757	0.00128	106
抗病毒 Tcm CD4-56-RA-	200×10^6	60×10^6	1/-1,391,762	0.000022	6181

图 6

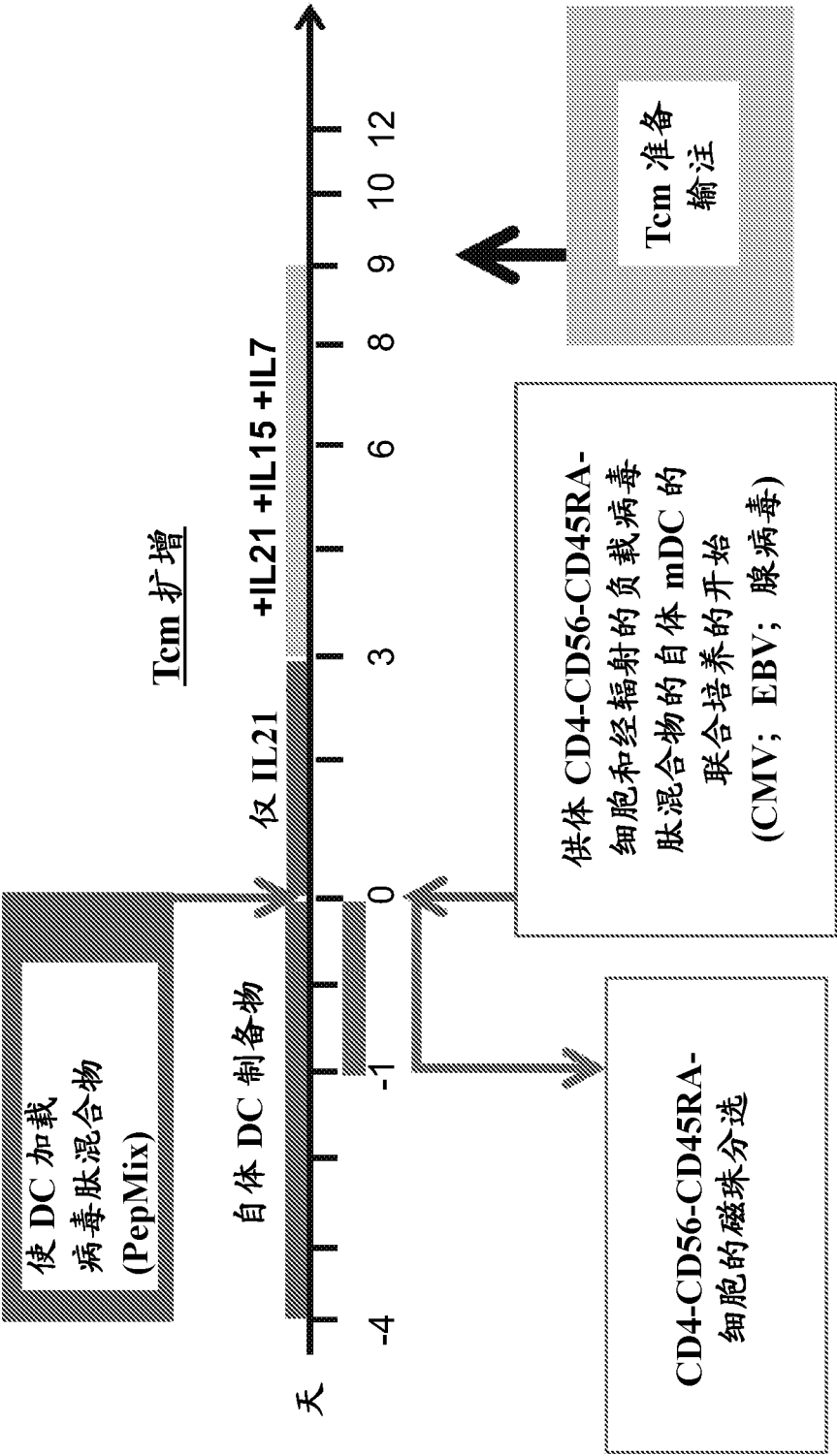


图 7

		第-1天	第-1天	第0天	第0天	第0天	第9天	第9天
	管 量	融解 前	融解 后	淘选 后	CD4-CD56 后	CD4-CD56-RA- 后	抗病毒 Tcm	倍数扩增
		(x10 ⁶)	(x10 ⁶)	(x10 ⁶)	(x10 ⁶)	细胞数(x10 ⁶)	细胞数(x10 ⁶)	%
供体 A (3 次实验的平均) 总细胞数	32	3167	2308	1083	462	26	1158	
供体 B (2 次实验的平均) 总细胞数	22	2200	1450	1000	400	78	404	
供体 C (2 次实验的平均) 总细胞数	30	3000	2025	1150	325	67	338	
供体 D (1 次实验) 总细胞数	30	3000	2120	1000	276	58	583	
供体 E (2 次实验的平均) 总细胞数	30	2950	1943	1300	340	47	783	
平均值	29	2863	1969	1107	361	55	653	
SD	4	380	321	125	72	20	331	11.8
供体 A (3 次实验的平均) CD3+CD8+部分的细胞数						17	1088	94
供体 B (2 次实验的平均) CD3+CD8+部分的细胞数						19	349	86
供体 C (2 次实验的平均) CD3+CD8+部分的细胞数						16	318	92
供体 D (1 次实验) CD3+CD8+部分的细胞数						31	550	94
供体 E (2 次实验的平均) CD3+CD8+部分的细胞数						14	731	93
平均值						19	607	92
SD						7	316	3
供体 A (3 次实验的平均) CD62L+CD45RO+部分的细胞数						7	897	77
供体 B (2 次实验的平均) CD62L+CD45RO+部分的细胞数						8	187	47
供体 C (2 次实验的平均) CD62L+CD45RO+部分的细胞数						8	228	65
供体 D (1 次实验) CD62L+CD45RO+部分的细胞数						12	466	80
供体 E (2 次实验的平均) CD62L+CD45RO+部分的细胞数						5	699	89
平均值						8	495	72
SD						2	304	16

图 8

图 9B

纯化前的 PBMC

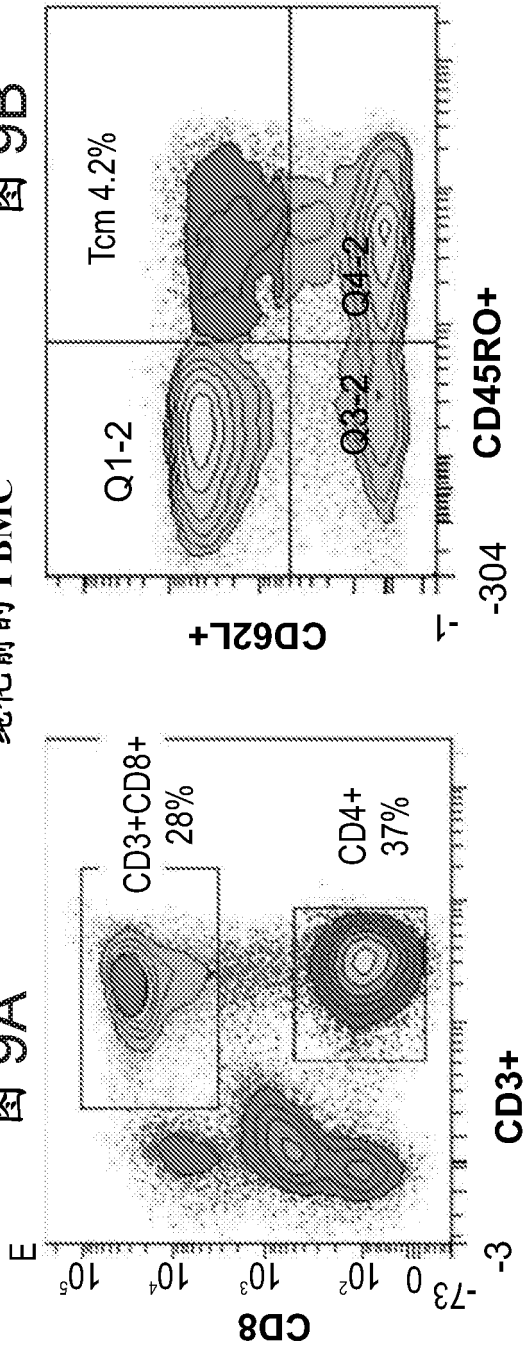


图 9D

CD4-CD56-纯化后

图 9C

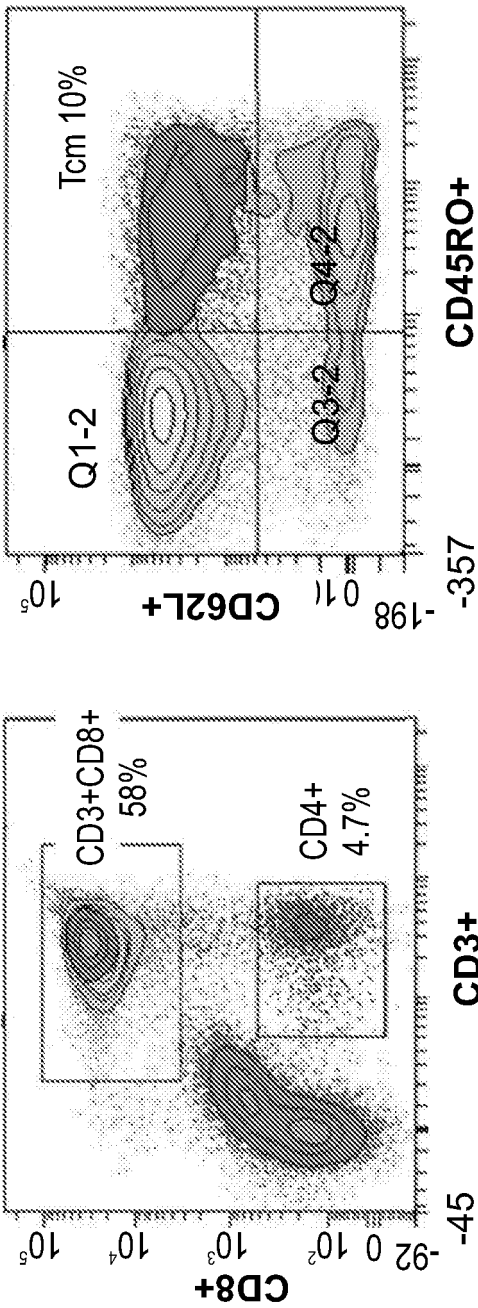


图 9E CD4-CD56-CD45RA-纯化后

图 9F

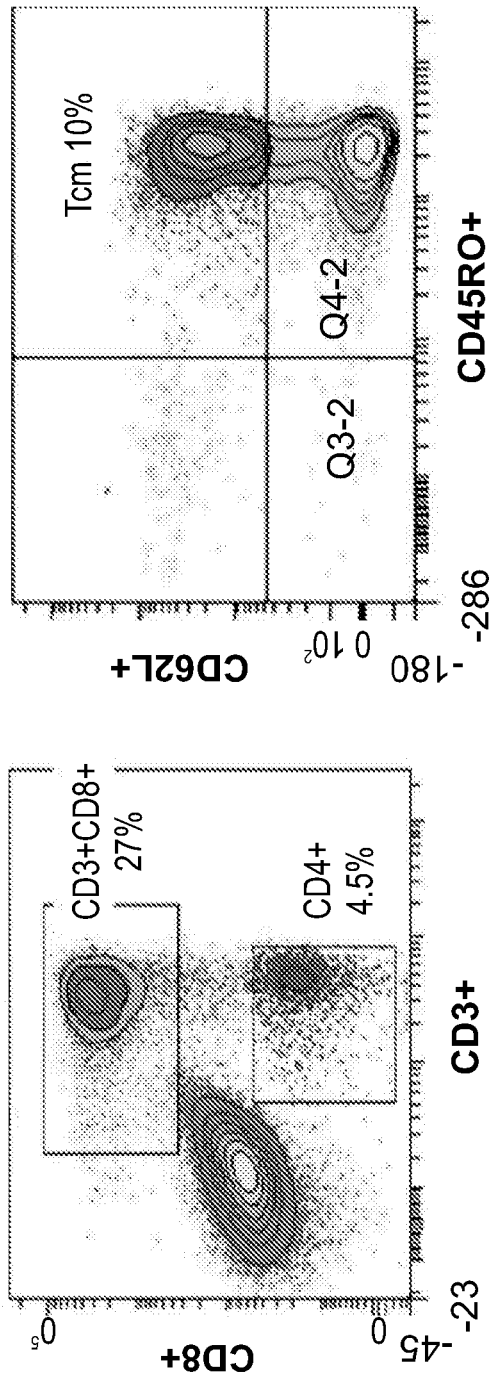


图 9G 抗病毒 Tcm

图 9H

