



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114457039 B

(45) 授权公告日 2025.06.10

(21) 申请号 202210206490.5

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

(22) 申请日 2016.07.14

72001

(65) 同一申请的已公布的文献号

专利代理人 李唐

申请公布号 CN 114457039 A

(51) Int.CI.

(43) 申请公布日 2022.05.10

C12N 5/10 (2006.01)

(30) 优先权数据

C12N 5/0783 (2010.01)

62/193207 2015.07.16 US

A61K 39/00 (2006.01)

62/193229 2015.07.16 US

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

(56) 对比文件

201680053580.8 2016.07.14

CN 103930130 A, 2014.07.16

(73) 专利权人 耶达研究及发展有限公司

WO 2014/059173 A2, 2014.04.17

地址 以色列雷霍沃特邮箱95号

WO 2011/140170 A1, 2011.11.10

(72) 发明人 Y.雷斯纳 N.奥-格瓦 E.奥普希

James C. Zimring et al.. Location,

Y.埃德斯泰恩

location, location: advancing veto cell

R.吉德龙布多维斯基

therapies. BLOOD. 2014, 第121卷(第7期), 第

1069-1070页.

审查员 李亦晗

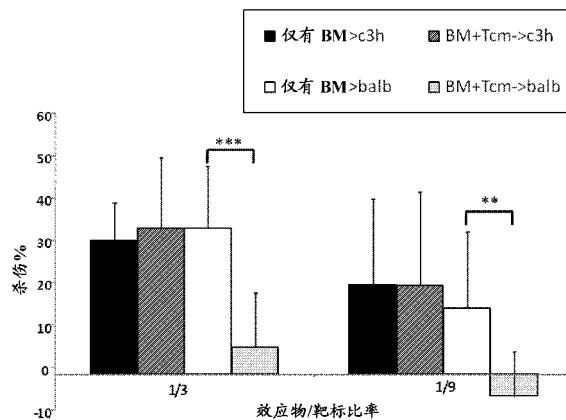
权利要求书4页 说明书47页 附图9页

(54) 发明名称

基因修饰的抗第三方中央型记忆T细胞及其在免疫疗法中的用途

(57) 摘要

本发明涉及基因修饰的抗第三方中央型记忆T细胞及其在免疫疗法中的用途。公开了一种具有中央型记忆T淋巴细胞(Tcm)表型的分离的细胞,所述细胞为耐受性诱导细胞并能够在移植后归巢至淋巴结,所述细胞被转导以表达包含T细胞受体信号传导模块的细胞表面受体。还公开了产生和使用所述细胞的方法。



1. 一种具有中央型记忆T淋巴细胞(Tcm)表型的分离的细胞,其中所述Tcm表型包含CD3⁺、CD8⁺、CD62L⁺、CD45RA⁻、CD45RO⁺特征,所述细胞为非移植物抗宿主病(GVHD)诱导的抗第三方细胞、为耐受性诱导的并能够在移植后归巢至淋巴结,所述细胞被转导以表达细胞表面受体,其中所述细胞表面受体包含T细胞受体信号传导模块和针对疾病抗原的胞外结构域,其中具有所述Tcm表型并且为非GVHD诱导的抗第三方细胞、耐受性诱导的并能够在移植后归巢至淋巴结的所述细胞通过包括以下步骤的方法产生:

(a) 在存在IL-21的情况下使外周血单核细胞(PBMC)与一种或多种第三方抗原接触,以致使能够富集抗原反应性细胞;和

(b) 在存在IL-21、IL-15和IL-7的情况下培养自步骤(a)生成的所述细胞,以致使能够包含所述中央型记忆T淋巴细胞(Tcm)表型的抗第三方细胞能够增殖。

2. 一种具有中央型记忆T淋巴细胞(Tcm)表型的分离的细胞,其中所述Tcm表型包含CD3⁺、CD8⁺、CD62L⁺、CD45RA⁻、CD45RO⁺特征,所述细胞为非移植物抗宿主病(GVHD)诱导的抗第三方细胞、为耐受性诱导的并能够在移植后归巢至淋巴结,所述细胞被转导以表达包含针对疾病抗原的胞外结构域的嵌合抗原受体(CAR),其中具有所述Tcm表型并且为非GVHD诱导的抗第三方细胞、耐受性诱导的并能够在移植后归巢至淋巴结的所述细胞通过包括以下步骤的方法产生:

(a) 在存在IL-21的情况下使外周血单核细胞(PBMC)与一种或多种第三方抗原接触,以致使能够富集抗原反应性细胞;和

(b) 在存在IL-21、IL-15和IL-7的情况下培养自步骤(a)生成的所述细胞,以致使能够包含所述中央型记忆T淋巴细胞(Tcm)表型的抗第三方细胞能够增殖。

3. 一种具有中央型记忆T淋巴细胞(Tcm)表型的分离的细胞,其中所述Tcm表型包含CD3⁺、CD8⁺、CD62L⁺、CD45RA⁻、CD45RO⁺特征,所述细胞为非移植物抗宿主病(GVHD)诱导的抗第三方细胞、为耐受性诱导的并能够在移植后归巢至淋巴结,所述细胞被转导以表达嵌合抗原受体(CAR),其中所述CAR包含共刺激结构域和包含针对疾病抗原的胞外结构域,其中具有所述Tcm表型并且为非GVHD诱导的抗第三方细胞、耐受性诱导的并能够在移植后归巢至淋巴结的所述细胞通过包括以下步骤的方法产生:

(a) 在存在IL-21的情况下使外周血单核细胞(PBMC)与一种或多种第三方抗原接触,以致使能够富集抗原反应性细胞;和

(b) 在存在IL-21、IL-15和IL-7的情况下培养自步骤(a)生成的所述细胞,以致使能够包含所述中央型记忆T淋巴细胞(Tcm)表型的抗第三方细胞能够增殖。

4. 一种具有中央型记忆T淋巴细胞(Tcm)表型的分离的细胞,其中所述Tcm表型包含CD3⁺、CD8⁺、CD62L⁺、CD45RA⁻、CD45RO⁺特征,所述细胞为非移植物抗宿主病(GVHD)诱导的抗第三方细胞、为耐受性诱导的并能够在移植后归巢至淋巴结,所述细胞被转导以表达嵌合抗原受体(CAR),其中所述CAR包含至少两个共刺激结构域和包含针对疾病抗原的胞外结构域,其中具有所述Tcm表型并且为非GVHD诱导的抗第三方细胞、耐受性诱导的并能够在移植后归巢至淋巴结的所述细胞通过包括以下步骤的方法产生:

(a) 在存在IL-21的情况下使外周血单核细胞(PBMC)与一种或多种第三方抗原接触,以致使能够富集抗原反应性细胞;和

(b) 在存在IL-21、IL-15和IL-7的情况下培养自步骤(a)生成的所述细胞,以致使能够包

含所述中央型记忆T淋巴细胞(Tcm)表型的抗第三方细胞能够增殖。

5. 权利要求1的分离的细胞,其中所述细胞表面受体包含转基因T细胞受体(tg-TCR)或嵌合抗原受体(CAR)。

6. 权利要求2-5中任一项的分离的细胞,其中所述CAR包含为抗体或抗原结合片段的抗原结合结构域。

7. 权利要求6的分离的细胞,其中所述抗原结合片段为Fab或scFv。

8. 权利要求2-5中任一项的分离的细胞,其中所述CAR包含CD3ζ。

9. 权利要求2-5中任一项的分离的细胞,其中所述CAR包含至少一个选自CD28、CD134/OX40、CD137/4-1BB、Lck、ICOS和DAP10的共刺激结构域。

10. 权利要求2-5中任一项的分离的细胞,其中所述CAR包含至少两个选自CD28、CD134/OX40、CD137/4-1BB、Lck、ICOS和DAP10的共刺激结构域。

11. 权利要求1-5中任一项的分离的细胞,其中所述疾病抗原选自肿瘤抗原、病毒抗原、细菌抗原、真菌抗原、原生动物抗原和寄生虫抗原。

12. 权利要求11的分离的细胞,其中所述肿瘤抗原与实体瘤相关。

13. 权利要求11的分离的细胞,其中所述肿瘤抗原与血液恶性肿瘤相关。

14. 权利要求11的分离的细胞,其中所述肿瘤抗原选自CD19、CD20、CD22、ROR1、间皮素、CD33/IL3Ra、c-Met、PSMA、糖脂F77、EGFRvIII、Her2、GD2、gp100、p53、癌胚抗原(CEA)、MART-1、端粒酶逆转录酶(TERT)、Caudin-6、受体酪氨酸蛋白激酶的胞外结构域(ErbB2-ECD)、受体酪氨酸蛋白激酶的胞内结构域(ErbB2-ICD)、组蛋白H1.2、组蛋白H4、酪氨酸酶、甲胎蛋白(AFP)、MAGE A3、AIM-2a、AFP、ART-4、CLCA2、Cyp-B、EphA2、hTERT、iCE、FGF-5、G250、GnT-V、HST-2(FGF-6)、Livin(ML-IAP)、MUC1、MUC2、PRAME、PSMA、P15、RAGE、RU1、RU2、SART-1、SART-3、SART-2、SOX10、存活素、存活素-2Bg、TRG、Neo-PAP、CAMEL和NY-ESO-1。

15. 权利要求11的分离的细胞,其中所述病毒抗原属于选自以下的病毒:人免疫缺陷病毒(HIV)、巨细胞病毒(CMV)、T细胞白血病1型病毒(TAX)、流感病毒、疱疹病毒、乳头状瘤病毒、肝炎病毒、水痘病毒、脑炎病毒、埃博拉病毒、人嗜T淋巴细胞病毒(HTLV)、风疹病毒、麻疹病毒、狂犬病毒、淋巴细胞脉络丛脑膜炎(LCM)、轮状病毒、腮腺炎病毒、腺病毒、BK多瘤病毒(BKV)、EB病毒(EBV)、和水痘-带状疱疹病毒(VZV)。

16. 权利要求1-5中任一项的分离的细胞,其中所述细胞进一步经基因修饰以抑制所述细胞中至少一种内源性免疫检查点基因的表达。

17. 权利要求16的分离的细胞,其中所述免疫检查点基因选自PD或CTLA基因。

18. 权利要求1-5中任一项的分离的细胞,其中产生具有所述Tcm表型并且为非GVHD诱导的抗第三方细胞、耐受性诱导的并能够在移植后归巢至淋巴结的所述细胞的方法进一步包括:

(c) 将自步骤(b)生成的所述细胞分离成单细胞悬液。

19. 权利要求1-5中任一项的分离的细胞,其中产生具有所述Tcm表型并且为非GVHD诱导的抗第三方细胞、耐受性诱导的并能够在移植后归巢至淋巴结的所述细胞的方法进一步包括在步骤(a)之后和在步骤(b)之前选择激活的细胞。

20. 权利要求19的分离的细胞,其中所述选择激活的细胞通过选择CD137+和/或CD25+细胞来实现。

21. 权利要求1-4中任一项的分离的细胞,其中所述分离的细胞的至少50%为CD3+CD8+细胞,其中CD3+CD8+细胞的至少50%具有所述特征。

22. 一种产生权利要求1-17中任一项的分离的细胞的方法,所述方法包括用编码所述包含T细胞受体信号传导模块的细胞表面受体或所述嵌合抗原受体(CAR)的多核苷酸转导具有中央型记忆T淋巴细胞(Tcm)表型的细胞,其中所述Tcm表型包含CD3⁺、CD8⁺、CD62L⁺、CD45RA⁻、CD45RO⁺特征,为非移植植物抗宿主病(GVHD)诱导的抗第三方细胞、为耐受性诱导的并能够在移植后归巢至淋巴结的所述细胞通过包括以下的方法产生:

(a) 在存在IL-21的情况下使外周血单核细胞(PBMC)与一种或多种第三方抗原接触,以致使能够富集抗原反应性细胞;和

(b) 在存在IL-21、IL-15和IL-7的情况下培养自步骤(a)生成的所述细胞,以致使包含所述中央型记忆T淋巴细胞(Tcm)表型的抗第三方细胞能够增殖。

23. 权利要求22的方法,其中所述方法离体实现。

24. 权利要求22的方法,其中所述细胞用包含所述多核苷酸的载体转导。

25. 权利要求22或24的方法,其中所述多核苷酸编码转基因T细胞受体(tg-TCR)或嵌合抗原受体(CAR)。

26. 一种包含权利要求1-21中任一项的分离的细胞的细胞群。

27. 一种包含权利要求26的细胞群和药用活性载体的药用组合物。

28. 一种用于在有需要的受试者中治疗疾病的治疗有效量的权利要求26的细胞群。

29. 权利要求28的用于用途的治疗有效量的细胞群,其中所述疾病选自恶性疾病、病毒性疾病、细菌性疾病、真菌性疾病、原生动物性疾病和寄生虫病。

30. 权利要求29的用于用途的治疗有效量的细胞群,其中所述恶性疾病为实体肿瘤或肿瘤转移。

31. 权利要求29的用于用途的治疗有效量的细胞群,其中所述恶性疾病为血液恶性肿瘤。

32. 权利要求31的用于用途的治疗有效量的细胞群,其中所述血液恶性肿瘤包括白血病或淋巴瘤。

33. 权利要求29的用于用途的治疗有效量的细胞群,其中所述恶性疾病选自白血病、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、滑膜细胞癌和胰腺癌。

34. 权利要求29的用于用途的治疗有效量的细胞群,其中所述病毒性疾病选自免疫缺陷病毒(HIV)、流感、巨细胞病毒(CMV)、T细胞白血病1型病毒(TAX)、丙型肝炎病毒(HCV)和乙型肝炎病毒(HBV)。

35. 权利要求28-34中任一项的用于用途的治疗有效量的细胞群,其中所述细胞群为与受试者非同源。

36. 权利要求28-34中任一项的用于用途的治疗有效量的细胞群,进一步包括亚致死、致死或超致死预处理方案。

37. 权利要求36的用于用途的治疗有效量的细胞群,其中所述亚致死、致死或超致死预处理选自全身照射(TBI)、体分区照射、清髓性预处理、非清髓性预处理、共刺激性阻断、化疗药物和抗体免疫疗法。

38. 权利要求28-34中任一项的用于用途的治疗有效量的细胞群,其中所述受试者为人受试者。

基因修饰的抗第三方中央型记忆T细胞及其在免疫疗法中的用途

[0001] 本申请是申请日为2016年7月14日的中国专利申请201680053580.8“基因修饰的抗第三方中央型记忆T细胞及其在免疫疗法中的用途”的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明在其一些实施方案中涉及转导以表达细胞表面受体的基因修饰的耐受性诱导中央型记忆T淋巴细胞，并且更具体地讲(但非排他地)涉及其在免疫疗法中的用途。

背景技术

[0003] 过继细胞疗法 (ACT) 为一种治疗程序，其中给予患者淋巴细胞(例如T细胞)以治疗癌症或病毒感染。

[0004] 该方法需要离体产生肿瘤或病毒特异性T细胞并将其输注给患者。为了支持T细胞的接受性，患者一般地还用预处理方案例如预处理方案(例如照射或化学疗法)和/或给予淋巴细胞生长因子(比如IL-2)来治疗。许多方法已被描述用于产生肿瘤特异性淋巴细胞，其中两种主要方法为使用基因工程扩增抗原特异性T细胞或重定向T细胞。

[0005] 根据一种方法，肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)分离自患者自己的肿瘤块(例如黑素瘤或肾癌)，将其离体扩增并重新输注回患者体内。TIL为一种有前途的细胞来源，因为它们是患者自己细胞的混合群，这些细胞具有对存在于肿瘤上的肿瘤相关抗原(TAA)特异性的T细胞受体(TCR)。然而，它们仅适用于其中可自肿瘤块分离T细胞的情况。

[0006] 这种方法在治疗转移性黑素瘤方面已经很有前途。

[0007] 根据另一种方法，基因修饰用于经使用转基因TCR链或嵌合受体使淋巴细胞针对肿瘤重定向。目前，靶识别取决于单克隆抗体的单链可变区结构域(scFv)的嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)的逆转录病毒或慢病毒或电穿孔转移一般地用于稳定产生治疗性T细胞(分别为CAR-T细胞或TCR-T细胞) [Fujiwara, Pharmaceuticals (2014) 7: 1049-1068]。

[0008] TCR转基因细胞(TCR-T)需要特异性HLA分子用于识别靶抗原(即HLA限制性)并具有识别胞内蛋白质的能力，这提供广泛的靶肿瘤相关抗原或病毒抗原。TCR-T细胞的治疗质量取决于其亲合力。为了产生更高的亲合力，已实施了几项策略，包括使用自具有相关表位的免疫人HLA转基因小鼠选定的TCR和/或在与HLA/表位复合物相互作用的TCR α/β链可变区的CDR区2或3中插入靶向突变[Fujiwara, Pharmaceuticals (2014)，见上]。

[0009] 或者，CAR-T细胞不受HLA限制。嵌合受体(嵌合抗原受体-CAR)的构建体一般地由胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和细胞质信号传导结构域组成。初始嵌合受体(即‘第一代’)由与CD3ζ链的胞内结构域融合的scFv片段组成。

[0010] 还产生了‘第二代’嵌合受体，其将来自各种共刺激蛋白受体(例如CD28、CD137、4-1BB、ICOS)的胞内信号传导结构域添加到CAR的胞质尾，以提供给T细胞另外的信号。临床前研究表明，‘第二代’CAR改善了T细胞的抗肿瘤活性。最近产生了组合多种信号传导结构域

的‘第三代’CAR,比如CD3 ζ -CD28-4-1BB或CD3 ζ -CD28-0X40,以进一步增强效力。

[0011] 靶向多种肿瘤抗原的肿瘤特异性CAR正在临床试验中用于治疗多种不同癌症。这些癌症及其被靶向抗原的实例包括滤泡性淋巴瘤(CD20或GD2)、成神经细胞瘤(CD171)、非霍奇金淋巴瘤(CD20)、淋巴瘤(CD19)、成胶质细胞瘤(IL13Ra2)、慢性淋巴细胞白血病或CLL和急性淋巴细胞白血病或ALL(两者均为CD19)。正在研究证实对包括卵巢、前列腺、乳腺、肾、结肠、成神经细胞瘤等在内的实体肿瘤的活性的CAR。病毒特异性CAR也已被开发用来攻击带有病毒比如HIV的细胞。例如,使用Gp100特异性CAR启动临床试验用于治疗HIV(Chicaybam,同上)。

[0012] 一个主要目的是应用ACT,包括基因修饰的T细胞,使用完全或部分错配的同种异体细胞而不是借助骨髓移植。

[0013] 已考虑各种方法来修饰用于过继细胞疗法的T细胞,其中一些描述于Gilham等人, Human Gene Therapy (2015) 26:276-285; 于Sharpe and Mount, Disease Models and Mechanisms (2015) 8:337-350和Gouble等人 Blood (2014) 124(21) 4689中。

[0014] 已考虑用于产生没有移植物抗宿主(GVH)活性的耐受性诱导细胞的各种方法,以及将其用于移植物移植的用途,其中一些概述在下文中。

[0015] Reisner与同事描述了一种被开发产生没有GVH活性的否决CTL(veto CTL)的方法,其中在不存在外源性IL-2的情况下刺激CTL针对第3方刺激物。这种方法基于以下观察结果:在原代培养物中仅有激活的细胞毒性T淋巴细胞前体(CTLp)能够存活于IL-2剥夺(deprivation)(IL-2饥饿导致未诱导的T细胞的细胞凋亡)。这种方法在体外和体内都显示出耗尽来自抗第3方否决CTL的GVH反应性[PCT公开号WO 2001/049243, Bachar-Lustig等人, Blood. 2003; 102:1943-1950; Aviner等人, Hum Immunol. (2005) 66:644-652]。将这些抗第3方否决CTL引入到接受者(与移植物一起)防止了移植物排斥反应而不诱导移植物抗宿主病(GVHD) (PCT公开号WO 2001/049243)。

[0016] PCT公开号WO 2010/049935公开了一种包含具有中央型记忆T淋巴细胞(Tcm)表型的非GVHD诱导抗第三方细胞的分离的细胞群,所述细胞为耐受性诱导细胞并能够在移植后归巢至淋巴结。

[0017] PCT公开号WO 2013/035099公开了产生分离的细胞群的新方法,所述细胞群包含具有中央型记忆T淋巴细胞(Tcm)表型的抗第三方细胞,所述细胞为耐受性诱导细胞和/或具有抗病活性,并能够在移植后归巢至淋巴结。

发明内容

[0018] 本发明一些实施方案的一个方面提供一种具有中央型记忆T淋巴细胞(Tcm)表型的分离的细胞,所述细胞为耐受性诱导细胞并能够在移植后归巢至淋巴结,所述细胞被转导以表达包含T细胞受体信号传导模块的细胞表面受体。

[0019] 本发明一些实施方案的一个方面提供一种具有中央型记忆T淋巴细胞(Tcm)表型的分离的细胞,所述细胞为耐受性诱导细胞并能够在移植后归巢至淋巴结,所述细胞被转导以表达嵌合抗原受体(CAR)。

[0020] 本发明一些实施方案的一个方面提供一种具有中央型记忆T淋巴细胞(Tcm)表型的分离的细胞,所述细胞为耐受性诱导细胞并能够在移植后归巢至淋巴结,所述细胞被转

导以表达嵌合抗原受体 (CAR) ,其中所述CAR包含共刺激结构域。

[0021] 本发明一些实施方案的一个方面提供一种具有中央型记忆T淋巴细胞 (Tcm) 表型的分离的细胞,所述细胞为耐受性诱导细胞并能够在移植后归巢至淋巴结,所述细胞被转导以表达嵌合抗原受体 (CAR) ,其中所述CAR包含至少两个共刺激结构域。

[0022] 本发明一些实施方案的一个方面提供一种产生本发明一些实施方案的分离的细胞的方法,所述方法包括用编码包含T细胞受体信号传导模块的细胞表面受体或嵌合抗原受体 (CAR) 的多核苷酸转导具有中央型记忆T淋巴细胞 (Tcm) 表型的细胞,所述细胞为耐受性诱导细胞并能够在移植后归巢至淋巴结。

[0023] 本发明一些实施方案的一个方面提供一种包含本发明一些实施方案的分离的细胞的细胞群。

[0024] 本发明一些实施方案的一个方面提供一种包含本发明一些实施方案的细胞群和药用活性载体的药用组合物。

[0025] 本发明一些实施方案的一个方面提供一种在有需要的受试者中治疗疾病的方法,所述方法包括给予所述受试者治疗有效量的本发明一些实施方案的细胞群,从而治疗受试者。

[0026] 本发明一些实施方案的一个方面提供用于在有需要的受试者中治疗疾病的治疗有效量的本发明一些实施方案的细胞群。

[0027] 根据本发明的一些实施方案,方法离体实现。

[0028] 根据本发明的一些实施方案,细胞用包含多核苷酸的载体转导。

[0029] 根据本发明的一些实施方案,多核苷酸编码转基因T细胞受体 (tg-TCR) 或嵌合抗原受体 (CAR) 。

[0030] 根据本发明的一些实施方案,具有中央型记忆T淋巴细胞 (Tcm) 表型的细胞为抗第三方细胞。

[0031] 根据本发明的一些实施方案,细胞表面受体包含转基因T细胞受体 (tg-TCR) 或嵌合抗原受体 (CAR) 。

[0032] 根据本发明的一些实施方案,CAR包含为抗体或抗原结合片段的抗原结合结构域。

[0033] 根据本发明的一些实施方案,抗原结合片段为Fab或scFv。

[0034] 根据本发明的一些实施方案,CAR包含CD3 ζ 。

[0035] 根据本发明的一些实施方案,CAR包含至少一种选自CD28、CD134/OX40、CD137/4-1BB、Lck、ICOS和DAP10的共刺激结构域。

[0036] 根据本发明的一些实施方案,CAR包含至少两种选自CD28、CD134/OX40、CD137/4-1BB、Lck、ICOS和DAP10的共刺激结构域。

[0037] 根据本发明的一些实施方案,细胞表面受体或CAR结合选自肿瘤抗原、病毒抗原、细菌抗原、真菌抗原、原生动物抗原、寄生虫抗原、变态反应抗原和自身免疫性抗原的抗原。

[0038] 根据本发明的一些实施方案,肿瘤抗原与实体瘤相关。

[0039] 根据本发明的一些实施方案,肿瘤抗原与血液恶性肿瘤相关。

[0040] 根据本发明的一些实施方案,肿瘤抗原选自CD19、CD20、CD22、ROR1、间皮素、CD33/IL3Ra、c-Met、PSMA、糖脂F77、EGFRvIII、Her2、GD2、gp100、p53、癌胚抗原 (CEA) 、MART-1、端粒酶逆转录酶 (TERT) 、Caudin-6、受体酪氨酸蛋白激酶的胞外结构域 (ErbB2-ECD) 、受体酪

氨酸蛋白激酶的胞内结构域 (ErbB2- ICD)、组蛋白H1.2、组蛋白H4、酪氨酸酶、甲胎蛋白 (AFP)、MAGE A3、AIM-2a、AFP、ART-4、CLCA2、Cyp-B、EphA2、hTERT、iCE、FGF-5、G250、GnT-V、HST-2 (FGF-6)、Livin (ML-IAP)、MUC1、MUC2、PRAME、PSMA、P15、RAGE、RU1、RU2、SART-1、SART-3、SART-2、SOX10、存活素、存活素-2Bg、TRG、Neo-PAP、CAMEL和NY-ESO-1。

[0041] 根据本发明的一些实施方案，病毒抗原属于选自以下的病毒：人免疫缺陷病毒 (HIV)、流感、巨细胞病毒 (CMV)、T细胞白血病1型病毒 (TAX)、丙型肝炎病毒 (HCV)、流感病毒、狂犬病毒、疱疹病毒、乳头状瘤病毒、肝炎病毒、水痘病毒、脑炎病毒、巨细胞病毒、埃博拉病毒、人嗜T淋巴细胞病毒 (HTLV)、风疹病毒、麻疹病毒、狂犬病毒、淋巴细胞脉络丛脑膜炎 (LCM)、轮状病毒、腮腺炎病毒、腺病毒、3型腺病毒 (HADV-3)、5型腺病毒 (HADV-5)、腺伴随病毒6 (AAV6)、腺伴随病毒8 (AAV8)、BK多瘤病毒 (BKV)、念珠菌、EB病毒 (EBV)、人疱疹病毒 (HHV)、水痘-带状疱疹病毒 (VZV) 和乙型肝炎病毒 (HBV)。

[0042] 根据本发明的一些实施方案，自身免疫性抗原与选自1型糖尿病、多发性硬化症、狼疮、类风湿性关节炎、克罗恩病、乳糜泻和中风的疾病相关。

[0043] 根据本发明的一些实施方案，细胞进一步基因修饰以抑制细胞中至少一种内源性免疫检查点 (checkpoint) 基因的表达。

[0044] 根据本发明的一些实施方案，免疫检查点基因选自PD或CTLA基因。

[0045] 根据本发明的一些实施方案，具有中央型记忆T淋巴细胞 (Tcm) 表型的细胞 (所述细胞为耐受性诱导细胞并能够在移植后归巢至淋巴结) 通过包括以下的方法产生：(a) 在存在IL-21的情况下使外周血单核细胞 (PBMC) 与一种或多种第三方抗原接触，以致使得能够富集抗原反应性细胞；和 (b) 在存在IL-21、IL-15和IL-7的情况下培养自步骤 (a) 生成的细胞，以致使得包含中央型记忆T淋巴细胞 (Tcm) 表型的抗第三方细胞能够增殖，从而产生具有Tcm表型的细胞，所述细胞为耐受性诱导细胞并能够在移植后归巢至淋巴结。

[0046] 根据本发明的一些实施方案，方法进一步包括：(c) 将自步骤 (b) 生成的细胞分离成单细胞悬液。

[0047] 根据本发明的一些实施方案，方法进一步包括在步骤 (a) 之后和在步骤 (b) 之前选择激活的细胞。

[0048] 根据本发明的一些实施方案，选择激活的细胞通过选择CD137+和/或CD25+细胞来实现。

[0049] 根据本发明的一些实施方案，Tcm表型包含CD3⁺、CD8⁺、CD62L⁺、CD45RA⁻、CD45RO⁺特征。

[0050] 根据本发明的一些实施方案，分离的细胞的至少50%为CD3+CD8+细胞，其CD3+CD8+细胞的至少50%具有所述特征。

[0051] 根据本发明的一些实施方案，疾病选自恶性疾病、病毒性疾病、细菌性疾病、真菌性疾病、原生动物性疾病、寄生虫病、变态反应性疾病和自身免疫性疾病。

[0052] 根据本发明的一些实施方案，恶性疾病为实体肿瘤或肿瘤转移。

[0053] 根据本发明的一些实施方案，恶性疾病为血液恶性肿瘤。

[0054] 根据本发明的一些实施方案，血液恶性肿瘤包括白血病或淋巴瘤。

[0055] 根据本发明的一些实施方案，恶性疾病选自白血病、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、滑膜细胞癌和胰腺癌。

[0056] 根据本发明的一些实施方案,病毒性疾病选自免疫缺陷病毒(HIV)、流感、巨细胞病毒(CMV)、T细胞白血病1型病毒(TAX)、丙型肝炎病毒(HCV)和乙型肝炎病毒(HBV)。

[0057] 根据本发明的一些实施方案,自身免疫性疾病选自1型糖尿病、多发性硬化症、类风湿性关节炎、狼疮、乳糜泻和中风。

[0058] 根据本发明的一些实施方案,细胞群为与受试者非同源。

[0059] 根据本发明的一些实施方案,方法进一步包括在给予之前,于亚致死、致死或超致死预处理方案下预处理受试者。

[0060] 根据本发明的一些实施方案,用于用途的治疗有效量进一步包括亚致死、致死或超致死预处理方案。

[0061] 根据本发明的一些实施方案,亚致死、致死或超致死预处理选自全身照射(TBI)、体分区照射、清髓性预处理、非清髓性预处理、共刺激性阻断、化疗药物和抗体免疫疗法。

[0062] 根据本发明的一些实施方案,给予通过选自气管内、支气管内、肺泡内、静脉内、腹膜内、鼻内、皮下、髓内、鞘内、脑室内、心脏内、肌内、浆膜内、粘膜内、经粘膜、经鼻、直肠和肠道的途径实现。

[0063] 根据本发明的一些实施方案,受试者为人受试者。

[0064] 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,并且不旨在成为一定的限制。

附图说明

[0065] 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可如何实践本发明的实施方案是显而易见的。

[0066] 附图中:

[0067] 图1A-C为用于研究Tcm细胞在不存在同种异体BM的诱导特性的情况下诱导耐受性的能力的模型示意图。经FACS分析Tcm细胞存活和增殖,同时使用⁵¹Cr测定法测试宿主CTL活性通过Tcm细胞的下调。

[0068] 图2A-B为说明在同源骨髓移植(BMT)环境下过继转移的F1-Tcm细胞的持续存在的图表。如在图1A中概述的那样移植C57BL/6 (H-2b) 小鼠。使用 α H2D^d (供体) 和 α H2K^b,通过FACS分析移植后60天每组中1只小鼠的代表性散点图(显示小鼠外周全血中Tcm细胞的百分数),以鉴定F1 (H2D^dXH2K^b) -Tcm细胞。

[0069] 图3为说明Tcm细胞特异地缺失来自多克隆宿主T细胞(HTC)群的抗供体T细胞,同时保留其他HTC以呈现细胞毒活性的图表。如在图1A中概述的那样移植小鼠。移植后60天处死小鼠,收获脾脏和淋巴结(LN),并选择CD8⁺细胞(并且负选择H-2D^d以排除Tcm)。以铬释放测定法测试了这些首次实验的HTC的C3H (H-2^k) 或BALB/c (H-2^d) 靶标的杀伤能力。条呈现如下的杀伤效果:来自仅接受BM的小鼠的HTC (黑色条,“仅BM→C3H”) 或来自也接受Tcm

的小鼠的细胞(深灰色条,“仅BM + Tcm→C3H”)杀伤C3H靶标,或者来自仅接受BM的小鼠的HTC(白色条,“仅BM→BALB”)或来自也接受Tcm的小鼠的T细胞(亮灰色条,“BM + Tcm→BALB”)杀伤BALB/c靶标。结果以每组12个孔的杀伤百分比的平均值±SD呈现。呈现所实施的2个独立实验中的代表性实验。(**)代表p值小于0.01,(***)代表p值小于0.001。

[0070] 图4为说明CB6 F1来源的Tcm细胞持续存在于接受了亚致死5.5 Gy TBI与同源T细胞耗尽的骨髓(TDBMT)的小鼠中的图表。将Balb/c (H2D^d)小鼠亚致死性地(5.5 Gy)照射并如在图1B中描述的那样移植。使用αH2D^d(宿主)和αH2K^b,通过FACS分析移植后40、80和132天的外周血,以鉴定H2^{db} F1-Tcm细胞。散点图显示每只小鼠中CB6 Tcm细胞的百分数,每个点代表属于适当组的1只小鼠中的Tcm细胞群,显示每组的平均值和SD。

[0071] 图5为说明在没有TDBMT的情况下使得Tcm细胞能够存活的照射剂量校准的图表。Balb/c (H2D^d)小鼠在第-1天用2/4/5.5/6.5 Gy亚致死性地照射。在第0天,小鼠接受过继转移至小鼠尾静脉的5 × 10⁶或9 × 10⁶ F1 CB6 (H-2^{db}) Tcm细胞。使用αH2D^d(宿主)和αH2K^b,移植后42天通过FACS分析描绘Balb/c宿主小鼠的外周全血中CB6 Tcm细胞的百分数的散点图,以鉴定H2^{db} F1-Tcm细胞。显示每组的平均值和SD。

[0072] 图6A-B为说明完全同种异体Tcm细胞长时间持续存在于5.5 Gy Balb/c小鼠中的图表。如在图1C中概述的那样移植Balb/c (H-2^d)小鼠。Tcm细胞属于CB6-F1 (H-2^{db})或C57BL/6 (H-2^b)来源。小鼠在指示的日子放血,并使用αH2D^d(宿主)和αH2K^b(供体)通过FACS分析Tcm细胞群以鉴定H2^{db} F1-Tcm和H2^b A11o-Tcm细胞。图6A为描绘Balb/c宿主中Tcm细胞百分数的散点图。每个点代表属于适当组的1只小鼠中的Tcm细胞群,显示每组的平均值和SD。图6B为说明外周血中Tcm细胞群经长时间减少的时间曲线图。

[0073] 图7为说明完全同种异体Tcm细胞持续存在于5.5 Gy Balb/c小鼠中并促进另外的供体T细胞植入的图表。Balb/c (H-2^b)小鼠在第-1天接受5.5 Gy TBI,并在第0天接受5 × 10⁶ CB6 (H-2^{db})或C57BL/6 (H-2^b)来源的Tcm细胞。Tcm细胞注射后89天,小鼠用2 Gy TBI照射,第二天它们接受2 × 10⁶ CD45.1⁺、OT1⁺、RAG⁺CD8⁺细胞。散点图显示Tcm细胞移植后120天和OT-1细胞移植后30天出血。

[0074] 图8为说明亚致死性地照射的Balb/c小鼠的外周血中OT-1细胞的分析的图表。Balb/c (H-2^d)小鼠在第-1天接受5.25 Gy TBI,并在第0天转而接受首次实验的CD8⁺ OT-1⁺ CD45.1⁺ RAG⁻细胞,伴有或没有指示数目的CB6 (H-2^{db})或C57BL/6 (H-2^b)来源的Tcm细胞。Tcm细胞注射后60天,使用FACS分析测试小鼠的外周血,以检测OT-1细胞的存在。散点图显示总CD8⁺H-2^{b+}细胞中不同组的OT-1细胞的百分数。

[0075] 图9为说明自在减低强度预处理(RIC) Balb/c小鼠模型中移植的OT-1小鼠制备的Tcm细胞的植入和存活的图表。

具体实施方式

[0076] 本发明在其一些实施方案中涉及转导以表达细胞表面受体的基因修饰的耐受性诱导中央型记忆T淋巴细胞,并且更具体地讲(但非排他地)涉及其在免疫疗法中的用途。

[0077] 本发明的原理和操作可参照附图和随附描述更好地理解。

[0078] 在详细解释本发明的至少一个实施方案之前,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举例说明的细节。本发明能够具有以各种方式实践或

实施的其他实施方案。而且,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。

[0079] 用淋巴细胞和抗原呈递细胞的基于细胞的疗法为用于免疫疗法的有前途的方法。过继细胞转移(ACT),包括自自体或非自体来源转移免疫源性细胞,提供将免疫功能和特征转移至宿主中的目标。先前用于ACT的一种方法包括基因修饰的T细胞(例如表达T细胞受体或嵌合抗原受体),其中细胞的特异性被重定向于靶抗原。然而,移植物排斥反应(由于移植者接受者)和/或移植物抗宿主病(由于移植的细胞)的问题是一个需要克服以追求这些细胞治疗潜力的持续存在的问题。

[0080] 在实践本发明时,本发明人已经发现,没有移植物抗宿主反应性的抗第三方中央型记忆T(Tcm)细胞具有内在的否决(veto)耐受性诱导活性,并可在不存在造血祖细胞的情况下自行诱导耐受性。本发明人进一步发现,抗第三方Tcm细胞可被基因修饰以表达T细胞受体(例如转基因T细胞受体或嵌合抗原受体),并可用于抵抗疾病,同时诱导否决活性并且没有移植物抗宿主潜力。

[0081] 如本文以下和随后的实施例部分中显示的那样,本发明人已显示同种异体供体型抗第三方Tcm细胞可在伴有或没有骨髓移植的情况下在宿主中长时间(例如超过120天,分别参见图2A-B和图6A-B)存活。此外,抗第三方Tcm细胞发挥否决活性(图3)。因此,单独应用抗第三方Tcm细胞(即在不存在BM前体的情况下)提供一种用于免疫疗法的有用工具,特别是用于靶向肿瘤抗原、病原体(例如病毒抗原)和自身抗原。因此,这些结果进一步证实,基因修饰来自任何细胞供体的致耐受性抗第三方Tcm细胞以表达异源T细胞效应子功能,因此导致用于靶向疾病抗原并避免移植物排斥反应和移植物抗宿主病(GVHD)的免疫疗法的通用产物。

[0082] 综合考虑,这些细胞提供没有移植物抗宿主潜力、移植物排斥反应和靶向单细胞中全部特定抗原的解决方案。这些细胞不需要使用自体细胞进行治疗或不需要移植造血细胞。此外,这些细胞克服了对以“每名患者基础”制造基于细胞的疗法的需要,并且使得能够制造用于疗法的“现成(off-the-shelf)”产物。

[0083] 因此,本发明的一个方面提供一种具有中央型记忆T淋巴细胞(Tcm)表型的分离的细胞,所述细胞为耐受性诱导细胞并能够在移植后归巢至淋巴结,所述细胞被转导以表达包含T细胞受体信号传导模块的细胞表面受体。

[0084] 本文使用的术语“分离的细胞”指的是已自其天然环境(例如来自人体的例如组织)分离的细胞。

[0085] 本文使用的短语“中央型记忆T淋巴细胞(Tcm)表型”指的是归巢至淋巴结的T细胞毒性细胞的亚群。人的具有Tcm表型的细胞一般地包含CD3+/CD8+/CD62L+/CD45R0+/CD45RA-特征。应该意识到,Tcm细胞可在单个细胞上表达所有特征标志物,或者可在单个细胞上仅表达部分特征标志物。

[0086] Tcm细胞一般地在移植后归巢至淋巴结。

[0087] 根据一些实施方案,本发明的Tcm细胞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耐受性效应。

[0088] 本文使用的短语“耐受性诱导细胞”指的是与不存在给予的耐受性诱导细胞的情

况下接受者细胞的反应性相比较,当其与接受者细胞接触时引起接受者细胞(例如接受者T细胞)的反应性降低的细胞。如先前在PCT公开号WO 2001/049243和WO 2002/102971中描述的那样,耐受性诱导细胞包括否决细胞(即在与宿主T细胞接触时导致其细胞凋亡的T细胞)。

[0089] 根据一个实施方案,本发明的Tcm细胞也为非GVHD诱导细胞。

[0090] 本文使用的术语“非GVHD”指的是具有显著降低的或没有移植物抗宿主诱导反应性。因此,产生本发明的细胞以致不显著引起移植物抗宿主病(GVHD),如由移植的受试者在移植后30-100天的存活、体重和总体外观证实的那样。

[0091] 根据一个实施方案,相对于不为抗第三方Tcm细胞的T细胞移植,本发明的细胞对宿主的反应性降低至少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%。

[0092] 根据一个实施方案,包含Tcm表型的本发明细胞被基因修饰。

[0093] 根据一个实施方案,本发明的细胞被转导以表达包含T细胞受体信号传导模块的细胞表面受体。

[0094] 本文使用的术语“转导的”可与术语“转染的”或“转化的”互换使用,并且指的是一种将外源性核酸(异源的)转移或引入到细胞中的过程。“转染的”或“转化的”或“转导的”细胞为已用外源性核酸转染、转化或转导的细胞。细胞包括原代细胞及其后代或其细胞系。

[0095] 本文使用的术语“细胞表面受体”指的是存在于细胞膜上,结合于配体(例如抗原)并介导细胞激活的重组或合成分子。

[0096] 本文使用的术语“抗原”或“Ag”定义为引起免疫反应的分子。技术人员将会理解,任何大分子(包括几乎所有的蛋白质或肽、以及碳水化合物、脂质和DNA)都可用作抗原。

[0097] 根据本发明的一些实施方案,抗原与恶性疾病相关,即肿瘤抗原(例如肿瘤特异性抗原或肿瘤相关抗原)、病毒蛋白质抗原、细菌蛋白质抗原、真菌蛋白质抗原、与变态反应相关的抗原(即变态反应抗原)或自身免疫相关的抗原(例如“自身”抗原),如下文进一步详细描述的那样。

[0098] 本发明的细胞表面受体包含T细胞受体信号传导模块。

[0099] 术语“T细胞受体信号传导模块”指的是负责激活其中受体已置于其中的T细胞的至少一种正常效应子功能的受体的细胞内部分。T细胞的正常效应子功能可包括例如免疫刺激性细胞因子(例如IFN- γ 、IL-2、TNF- α)的分泌、抗原特异性细胞毒性和细胞增殖。因此,本发明的T细胞受体信号传导模块指的是转导效应子功能信号并引导细胞执行特化功能的蛋白质部分。

[0100] 根据一个实施方案,细胞表面受体包含转基因T细胞受体(tg-TCR)或嵌合抗原受体(CAR)。

[0101] 本文使用的术语“转基因T细胞受体”或“tg-TCR”指的是包含T细胞受体(TCR)的特异性,即识别由主要组织相容性复合物(MHC)蛋白质呈递的抗原肽(即抗原)的重组或合成分子。

[0102] 本发明的tg-TCR一般地包含两条链(即多肽链),比如T细胞受体(TCR)的 α 链、TCR的 β 链、TCR的 γ 链、TCR的 δ 链或其组合(例如 $\alpha\beta$ 链或 $\gamma\delta$ 链)。tg-TCR的多肽可包含任何氨基酸序列,条件是tg-TCR具有如以上描述的抗原特异性和T细胞效应子功能。应该意识到,抗

原特异性由TCR异源二聚体(即由 $\alpha\beta$ 或 $\gamma\delta$ 链)确定。

[0103] 应该意识到,两条链中的每一条一般地包含两个胞外结构域,即可变(V)区和恒定(C)区。

[0104] 根据一个实施方案,tg-TCR包含TCR的可变区。根据一个具体的实施方案,tg-TCR包含TCR的 α 和 β 链的可变区。根据另一个具体的实施方案,tg-TCR包含TCR的 γ 和 δ 链的可变区。

[0105] 根据本发明的一些实施方案,tg-TCR的可变区包含能够特异性地结合抗原的互补决定区(CDR)。CDR可选自CDR1、CDR2、CDR3和/或CDR4中的任何一种。根据一个具体的实施方案,CDR存在于单链上,优选地CDR存在于tg-TCR的两条链上。

[0106] 根据一个实施方案,tg-TCR包含TCR的恒定区。根据一个具体的实施方案,tg-TCR包含TCR的 α 和 β 链的恒定区。根据另一个具体的实施方案,tg-TCR包含TCR的 γ 和 δ 链的恒定区。

[0107] 为了避免在内源性TCR(即来源于转导的细胞内的TCR)与tg-TCR链之间形成混合二聚体,本发明的tg-TCR可包含恒定区鼠(例如小鼠)TCR。可用于增加tg-TCR链的特异性配对的另一种方法为在tg-TCR链(例如 α 和 β 链)的恒定区内引入另外的半胱氨酸残基,这导致形成另外的二硫键。或者,可引入tg-TCR链(例如 α 和 β 链)恒定区中的关键相互作用氨基酸的突变反转,这有利于tg-TCR链的配对并且还增加tg-TCR反应性。或者或另外地,可使用例如用于特异性地下调内源性TCR的小干扰RNA(siRNA)来实施内源性TCR的下调。对于进一步的细节参见例如Zhang and Morgan, Adv Drug Deliv Rev. (2012) 64 (8) : 756-762,本文通过参照结合。

[0108] 如所提及的那样,tg-TCR以MHC依赖性方式识别抗原。

[0109] 本文使用的短语“主要组织相容性复合物”或“MHC”指的是由一组连锁基因座编码的抗原复合物,其在小鼠中统称为H-2,并且在人中统称为人白细胞抗原(HLA)。MHC抗原的两个主要类别(I类和II类)各包含一组细胞表面糖蛋白,其在确定组织类型和移植植物相容性方面起作用。

[0110] 本文考虑主要MHC I类分子。

[0111] 主要组织相容性复合物(MHC)I类分子在几乎所有细胞的表面表达。这些分子的功能是将主要源自内源性合成蛋白质的肽经与 $\alpha\beta$ T细胞受体的相互作用呈递给CD8+T细胞。在人中,存在几种MHC单倍体型(haplotype),比如HLA-A2、HLA-A1、HLA-A3、HLA-A24、HLA-A28、HLA-A31、HLA-A33、HLA-A34、HLA-B7、HLA-B45和HLA-Cw8,其序列可在kabat数据库中找到,网址为www. immuno. bme. nwu. edu。关于MHC单倍体型的进一步信息可见于Paul, B. Fundamental Immunology Lippincott-Raven Press。

[0112] tg-TCR的选择取决于定义靶细胞表面的抗原类型和数目。例如,可选择tg-TCR以识别起与特定疾病状态相关的靶细胞上的细胞表面标志物作用的抗原。因此,例如,可起用于经tg-TCR识别的抗原作用的细胞表面标志物可包括与病毒、细菌和寄生虫感染、自身免疫性疾病和癌细胞相关的那些细胞表面标志物。以下提供实施例。

[0113] 为了产生成功的tg-TCR,需要首先鉴定合适的靶序列。因此,可自抗原反应性T细胞(例如肿瘤反应性T细胞)分离TCR,或者如果这是不可能的,则可使用备选技术。根据示例性的实施方案,将转基因动物(例如兔或小鼠,优选地为人HLA转基因小鼠)用人抗原肽(例

如肿瘤或病毒抗原)免疫,以产生表达针对人抗原的TCR的T细胞[如例如在Stanislawski等人,Nat Immunol. (2001) 2(10):962-70中描述的那样]。根据另一个示例性的实施方案,自正经历疾病(例如肿瘤)缓解的患者分离抗原特异性T细胞(例如肿瘤特异性T细胞),并从中分离反应性TCR序列[如例如在de Witte等人,Blood (2006) 108 (3):870中描述的那样]。

[0114] 根据另一个示例性的实施方案,使用体外技术来改变现有TCR的序列以增强弱反应性抗原特异性TCR与靶抗原的亲合力(这种方法在以下描述)。

[0115] 根据一个实施方案,选择本发明的tg-TCR以识别具有高亲合力(即TCR与肽-MHC复合物之间的单体相互作用的物理强度)的抗原肽-HLA复合物。

[0116] 产生具有高功能性亲合力的细胞(即对抗原有效反应的细胞)可使用本领域普通技术人员已知的任何方法实现。因此,根据一个实施例,通过增加tg-TCR的亲和力(即TCR与其配体的结合强度)或增加细胞表面tg-TCR的表达来达到增加tg-TCR的亲合力。根据一个示例性的实施方案,通过修饰tg-TCR基因来实施增加TCR亲和力。例如,tg-TCR基因的一种可能修饰包括对tg-TCR的互补决定区(CDR)例如第三个CDR(CDR3)的修饰。因此,可采用CDR链(例如 α 或 β 链)中的单或双氨基酸取代以增加tg-TCR的亲和力并增强转导的细胞中的抗原特异性反应性。根据另一个示例性的实施方案,增加tg-TCR的功能性亲和力通过除去tg-TCR链的恒定结构域中定义的N-糖基化基序来实施。根据另一个示例性的实施方案,增加亲和力通过密码子优化来实施。

[0117] 因此,tg-TCR的稀有密码子被最常分布于高度表达的人基因中的密码子取代。在优化过程期间,顺式作用富AT或GC序列片段、模糊剪接和RNA不稳定性基序也可被去除。对于进一步的信息参见例如Zhang and Morgan, Adv Drug Deliv Rev. (2012),见上,本文通过参照结合。

[0118] 根据一个实施方案,tg-TCR的信号传导模块可包含单个亚基或多个信号传导单元。因此,本发明的tg-TCR可使用与TCR共同起作用的共受体(以启动抗原受体接合后的信号转导)及其具有相同功能性能能力的任何衍生物或变体。

[0119] 根据一个实施方案,TCR信号传导模块包含CD3复合物(例如CD3链,例如CD3 δ/ϵ 、CD3 γ/ϵ 和/或 ζ 链,例如 ζ/ζ 或 ζ/η)。

[0120] 另外或者备选地,TCR信号传导模块可包含共刺激蛋白受体,以向T细胞提供另外的信号。这些在下文详细讨论。

[0121] 根据一个实施方案,tg-TCR可包含如下文详细描述的跨膜结构域。

[0122] 用TCR转导细胞的方法在下文详细描述。

[0123] 本文使用的短语“嵌合抗原受体(CAR)”指的是组合对期望的抗原的特异性与T细胞受体激活胞内结构域(即T细胞受体信号传导模块)以产生对特定抗原呈现细胞免疫活性的嵌合蛋白的重组或合成分子。

[0124] 因此,本发明的CAR通常包含胞外结构域(包含抗原结合部分)、跨膜结构域和T细胞对抗原有效反应需要的胞内结构域(即细胞质结构域)。

[0125] 抗原结合部分

[0126] 在一个实施方案中,本发明的CAR包含另外称为抗原结合部分的靶标特异性结合元件。部分的选择取决于定义靶细胞表面的配体(即抗原)的类型和数目。例如,可选择抗原

结合结构域以识别起与特定疾病状态相关的靶细胞上的细胞表面标志物作用的配体(即抗原)。因此,可起本发明CAR中抗原部分结构域的配体作用的细胞表面标志物的实例包括与病毒、细菌和寄生虫感染、自身免疫性疾病和癌细胞相关的那些细胞表面标志物。

[0127] 根据本发明的一些实施方案,抗体结合部分包含能够特异性地结合抗原的互补决定区(CDR)。这种CDR可得自抗体。

[0128] 本发明中使用的术语“抗体”包括完整分子及其功能片段,比如Fab、Fab' ,F(ab') 2、Fv、线性抗体、scFv抗体和由能够结合于抗原的抗体片段形成的多特异性抗体。这些功能性抗体片段定义如下:(1) Fab,为含有抗体分子的单价抗原结合片段的片段,可通过用木瓜蛋白酶消化全抗体以得到完整轻链和一个重链的一部分来产生;(2) Fab',可通过用胃蛋白酶处理全抗体,随后还原以得到完整轻链和重链的一部分获得的抗体分子的片段;每个抗体分子获得两个Fab' 片段;(3) F(ab') 2,可通过用胃蛋白酶处理全抗体而没有随后还原获得的抗体片段;F(ab') 2为经两个二硫键连在一起的两个Fab' 片段的二聚体;(4) Fv,定义为含有轻链可变区和重链可变区表示为两条链的基因工程片段;(5) 单链抗体(“SCA”),含有轻链可变区和重链可变区的基因工程分子,通过合适的多肽接头连接成基因融合的单链分子;(6) CDR肽为编码单个互补决定区(CDR)的肽,和(7) 单域抗体(也称为纳米抗体),一种基因工程改造的单个单体可变抗体结构域,其选择性地结合于特异性抗原。纳米抗体的分子量仅为12-15 kDa,远小于普通抗体(150-160 kDa)。

[0129] 本文使用的“抗体重链”指的是以其天然存在的构象存在于所有抗体分子中的两种类型多肽链中较大的一种。

[0130] 本文使用的“抗体轻链”指的是以其天然存在的构象存在于所有抗体分子中的两种类型多肽链中较小的一种。 κ -和 λ -轻链指的是两种主要抗体轻链同种型。

[0131] 所谓的本文使用的术语“合成抗体”意味着使用重组DNA技术产生的抗体,比如如本文描述的那样通过细菌噬菌体表达的抗体。该术语还应解释为意指通过合成编码抗体的DNA分子(并且其DNA分子表达抗体蛋白)或指定抗体的氨基酸序列产生的抗体,其中DNA或氨基酸序列使用本领域可得到的和熟知的合成DNA或氨基酸序列技术获得。

[0132] 产生多克隆和单克隆抗体及其片段的方法为本领域熟知的(参见例如Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988, 本文通过参照结合)。

[0133] 本发明的抗体片段可通过蛋白水解抗体或通过在大肠杆菌或哺乳动物细胞(例如中国仓鼠卵巢细胞培养物或其他蛋白质表达系统)中表达编码该片段的DNA来制备。抗体片段可通过常规方法经胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化全抗体来获得。例如,抗体片段可通过用胃蛋白酶对抗体进行酶促裂解以提供表示为F(ab') 2的5S片段产生。该片段可使用巯醇还原剂进一步裂解,和任选地使用封端基用于二硫键裂解生成的巯基,以产生3.5S Fab' 单价片段。或者,使用胃蛋白酶的酶促裂解直接产生两个单价Fab' 片段和Fc片段。这些方法例如由Goldenberg, 美国专利第4036945和4331647号以及其中包含的参考文献描述,这些专利特此通过参照以其全部结合。还可参见R.R. [Biochem. J. 73: 119-126 (1959)]。也可使用裂解抗体的其他方法,比如分离重链以形成单价轻-重链片段、进一步裂解片段或其它酶促、化学或基因技术,只要片段结合于被完整抗体识别的抗原。

[0134] Fv片段包含VH和VL链的缔合。这种缔合可为非共价的,如在Inbar等人 [Proc.

Nat'l Acad. Sci. USA 69:2659-62 (1972) 中描述的那样。或者,可变链可通过分子间二硫键连接或通过化学品比如戊二醛交联。优选地,Fv片段包含通过肽接头连接的VH和VL链。这些单链抗原结合蛋白(sFv)通过构建包含编码通过寡核苷酸连接的VH和VL结构域的DNA序列的结构基因来制备。将结构基因插入到表达载体中,随后将其导入到宿主细胞比如大肠杆菌中。重组宿主细胞利用桥接两个V结构域的接头肽合成单个多肽链。用于产生sFv的方法例如由[Whitlow and Filpula, Methods 2: 97-105 (1991); Bird等人, Science 242:423-426 (1988); Pack等人, Bio/Technology 11:1271-77 (1993); 和美国专利第4946778号描述,其特此通过参照以其全部结合。

[0135] CDR肽(“最小识别单元”)可通过构建编码目标抗体的CDR的基因来获得。这种基因例如通过使用聚合酶链式反应自抗体产生细胞的RNA合成可变区来制备。参见例如Larrick and Fry [Methods, 2: 106-10 (1991)]。

[0136] 一旦鉴定了抗体的CDR,使用常规基因工程技术,编码本文描述的抗体的任何形式或片段的可表达多核苷酸可以多种方式之一合成和修饰,以产生一系列相关产物。

[0137] 根据本发明的一些实施方案,CDR源自特异性地结合于抗原的 $\alpha\beta$ T细胞受体(TCR)。

[0138] 根据本发明的一些实施方案,CDR源自特异性地结合于抗原的 $\gamma\delta$ T细胞受体(TCR)。

[0139] 根据本发明的一些实施方案,CDR源自特异性地结合于抗原的工程改造的亲和力增强的 $\alpha\beta$ T细胞受体或 $\gamma\delta$ T细胞受体(TCR)(如上文详细讨论的那样)。

[0140] 根据本发明的一些实施方案,CDR源自具有改善的稳定性或任何其他生物物理性质的工程改造的 $\alpha\beta$ T细胞受体或 $\gamma\delta$ T细胞受体(TCR)。

[0141] 根据本发明的一些实施方案,CDR源自特异性地结合于抗原的T细胞受体样(TCRL)抗体。TCRL的实例及其产生方法描述于W003/068201、W02008/120203、W02012/007950、W02009125395、W02009/125394中,其每一个以其全部完全结合到本文中。

[0142] 根据本发明的一些实施方案,抗原结合结构域包含单链Fv(scFv)分子。

[0143] 细胞质结构域

[0144] 本发明CAR分子的细胞质结构域(也称为“胞内信号传导结构域”或“T细胞受体信号传导模块”)负责激活其中CAR已置于其中的细胞的至少一种正常效应子功能。

[0145] 尽管通常可使用整个胞内信号传导结构域,但在许多情况下没有必要使用整个链。就使用胞内信号传导结构域的截短部分而言,可使用这种截短部分代替完整链,只要其转导效应子功能信号。术语胞内信号传导结构域因此意在包括足以转导效应子功能信号的胞内信号传导结构域的任何截短部分。

[0146] 用于本发明的CAR分子的胞内信号传导结构域的优选实例包括T细胞受体(TCR)的细胞质序列和共同起作用以启动抗原受体接合后的信号转导的共受体,以及这些序列的任何衍生物或变体和具有相同功能性能能力的任何合成序列。

[0147] 已知单独通过TCR产生的信号不足以完全激活T细胞,并且还需要次级或共刺激信号。因此,T细胞激活可通过两个不同种类的细胞质信号传导序列介导:通过TCR启动抗原依赖性初级激活的那些细胞质信号传导序列(初级细胞质信号传导序列)和以抗原非依赖性方式起作用以提供次级或共刺激信号的那些细胞质信号传导序列(次级细胞质信号传导序

列)。

[0148] 初级细胞质信号传导序列以刺激方式或以抑制方式调节TCR复合物的初级激活。以刺激方式起作用的初级细胞质信号传导序列可含有称为基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)的信号传导基序。

[0149] 在本发明中特定有用的含有初级细胞质信号传导序列的ITAM的实例包括源自TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的那些ITAM。特别优选的是，本发明CAR中的细胞质信号传导分子包含源自CD3 ζ 的细胞质信号传导序列。

[0150] 在一个优选的实施方案中，CAR的细胞质结构域可被设计成本身包含CD3 ζ 信号传导结构域或者与在本发明CAR的情况下有用的所有其他期望的细胞质结构域组合。例如，CAR的细胞质结构域可包含CD3 ζ 链部分和共刺激信号传导区。共刺激信号传导区指的是包含共刺激分子胞内结构域的CAR的一部分。共刺激分子为除了抗原受体或其配体以外的淋巴细胞对抗原有效反应需要的细胞表面分子。这种分子的实例包括CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3及特异性地与CD83结合的配体等。因此，尽管本发明主要以4-1BB作为共刺激信号传导元件举例说明，但其他共刺激元件处于本发明的范围内。

[0151] 根据本发明的一些实施方案，胞内结构域包含共刺激信号传导区和 ζ 链部分。共刺激信号传导区指的是包含共刺激分子胞内结构域的CAR分子的一部分。共刺激分子为除了抗原受体或其配体以外的淋巴细胞对抗原有效反应需要的细胞表面分子。

[0152] 如本文中使用的术语“共刺激配体”包括特异性地结合T细胞上的同源共刺激分子，从而除了由例如TCR/CD3复合物与负载有肽的MHC分子的结合提供的初级信号以外还提供介导T细胞反应(包括但不限于增殖、激活、分化等)的信号的抗原呈递细胞[例如aAPC (人工抗原呈递细胞)、树突状细胞、B细胞等]上的分子。共刺激配体可包括但不限于 CD7、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、诱导型共刺激配体 (ICOS- L)、细胞间贴壁分子 (ICAM)、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB、HVEM、淋巴毒素 β 受体、3/TR6、ILT3、ILT4、HVEM、结合To11配体受体的激动剂或抗体和特异性地与B7-H3结合的配体。共刺激配体还尤其包括特异性地与存在于T细胞上的共刺激分子结合的抗体，所述共刺激分子比如但不限于 CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3及特异性地与CD83结合的配体。

[0153] “共刺激分子”指的是在特异性地与共刺激配体结合，从而介导T细胞的共刺激反应比如但不限于增殖的T细胞上的同源结合配偶体。共刺激分子包括但不限于 MHC I类分子、BTLA和To11配体受体。

[0154] 本文使用的“共刺激信号”指的是与初级信号比如TCR/CD3连接组合导致T细胞增殖和/或关键分子的上调或下调的信号。

[0155] 所谓的术语“刺激”意味着通过刺激分子(例如TCR/CD3复合物)与其同源配体结合，从而介导信号转导事件比如但不限于经TCR/CD3复合物的信号转导而诱导的初级反应。刺激可介导某些分子的表达改变，比如TGF- β 下调和/或细胞骨架结构的重组等。

[0156] 如本文中使用的术语“刺激分子”意指特异性地与存在于抗原呈递细胞上的同源刺激配体结合的T细胞上的分子。

[0157] 本文使用的“刺激配体”意指当存在于抗原呈递细胞(例如aAPC、树突状细胞、B细

胞等)上时可特异性地与T细胞上的同源结合配偶体(本文称为“刺激分子”)结合,从而介导T细胞的初级反应(包括但不限于激活、免疫反应的启动、增殖等)的配体。刺激配体为本领域熟知的,并且尤其包括负载有肽的MHC I类分子、抗CD3抗体、超激动剂抗CD28抗体和超激动剂抗CD2抗体。

[0158] 就细胞质结构域而言,本发明一些实施方案的CAR分子可被设计成本身包含CD28和/或4-1BB信号传导结构域,或者与在本发明一些实施方案的CAR分子的情况下有用的任何其他期望的细胞质结构域组合。在一些实施方案中,CAR的细胞质结构域可被设计成进一步包含CD3 ζ 的信号传导结构域。例如,CAR的细胞质结构域可包括但不限于CD3 ζ 、4-1BB和CD28信号传导模块及其组合。

[0159] 根据本发明的一些实施方案,胞内结构域包含选自以下的多肽中的至少一种,例如至少两种、至少三种、至少四种、至少五种,例如至少六种:CD3 ζ (CD247、CD3z)、CD27、CD28、4-1BB/CD137、ICOS、OX40/CD134、DAP10、肿瘤坏死因子受体(TNFr)和Lsk。

[0160] 根据本发明的一些实施方案,胞内结构域包含CD3 ζ 链[CD247分子,也称为“CD3-ZETA(ζ)”和“CD3z”;GenBank登录号NP_000725.1和NP_932170.1],其为来自内源性TCR的信号的初级发送者。

[0161] 根据本发明的一些实施方案,胞内结构域包含CAR胞质尾的各种共刺激蛋白受体,以提供给T细胞另外的信号(“第二代”CAR)。实例包括但不限于 CD28 [例如GenBank登录号NP_001230006.1、NP_001230007.1、NP_006130.1]、4-1BB [肿瘤坏死因子受体超家族成员9 (TNFRSF9),也称为“CD137”,例如GenBank登录号NP_001552.2]、ICOS [诱导型T细胞共刺激因子,例如GenBank登录号NP_036224.1]、DAP10 [造血细胞信号转导分子,例如GenBank登录号NP_001007470、NP_055081.1]和Lsk [LCK原癌基因,Src家族酪氨酸激酶,例如GenBank登录号NP_001036236.1、NP_005347.3]。临床前研究表明,“第二代CAR设计改善了T细胞的抗肿瘤活性。

[0162] 根据本发明的一些实施方案,胞内结构域包含多种信号传导结构域,比如CD3z-CD28-4-1BB或CD3z-CD28-OX40,以进一步增强效力。术语“OX40”指的是肿瘤坏死因子受体超家族成员4 (TNFRSF4),例如GenBank登录号NP_003318.1 (“第三代”CAR)。

[0163] 根据本发明的一些实施方案,胞内结构域包含CD28-CD3z、CD3z、CD28-CD137-CD3z。术语“CD137”指的是肿瘤坏死因子受体超家族成员9 (TNFRSF9),例如GenBank登录号NP_001552.2。

[0164] 根据本发明的一些实施方案,胞内结构域包含CD3z、CD28和肿瘤坏死因子受体(TNFr)。

[0165] 根据本发明的一些实施方案,CAR包含CD3 ζ 链。

[0166] 根据本发明的一些实施方案,CAR包含至少一种选自CD28、CD134/OX40、CD137/4-1BB、Lck、ICOS和DAP10的共刺激结构域。

[0167] 根据本发明的一些实施方案,CAR包含至少两种选自CD28、CD134/OX40、CD137/4-1BB、Lck、ICOS和DAP10的共刺激结构域。

[0168] 跨膜结构域

[0169] CAR的跨膜结构域可源自天然来源或源自合成来源。当来源为天然时,则结构域可源自任何膜结合的或跨膜蛋白质。本发明中特别有用的跨膜区可源自(即至少包含其跨膜

区) T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ε 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154。或者跨膜结构域可被合成,在这种情况下,其将主要包含疏水性残基比如亮氨酸和缬氨酸。优选地,苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体将在合成跨膜结构域的每个末端找到。

[0170] 任选地,长度优选地在2-10个氨基酸之间的短的寡肽或多肽接头可形成CAR的跨膜结构域和细胞质信号传导结构域之间的连接。甘氨酸-丝氨酸双联体提供特别合适的接头。

[0171] 根据本发明的一些实施方案,包含在本发明一些实施方案的CAR分子中的跨膜结构域为天然与CAR中的一个结构域结合的跨膜结构域。根据本发明的一些实施方案,可选择或通过氨基酸取代来修饰跨膜结构域,以避免这种结构域结合于相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域,以使与受体复合物其他成员的相互作用减至最小。

[0172] 根据本发明的一些实施方案,跨膜结构域为CD8 α 铰链结构域。

[0173] 根据一些实施方案,可在CAR分子的胞外结构域与跨膜结构域之间或在CAR分子的细胞质结构域与跨膜结构域之间掺入间隔域。本文使用的术语“间隔域”通常意指起将跨膜结构域连接至多肽链的胞外结构域或细胞质结构域的作用的任何寡肽或多肽。间隔域可包含多达300个氨基酸,优选地10-100个氨基酸和最优先地25-50个氨基酸。

[0174] 如所提及的那样,本发明细胞的细胞表面受体(例如tg-TCR和/或CAR)结合于抗原(例如在靶细胞上)。

[0175] 根据一个实施方案,抗原可包含肿瘤相关抗原、病毒抗原、细菌抗原、真菌抗原、原生动物抗原、寄生虫抗原、变态反应相关抗原和/或自身免疫性抗原。

[0176] 本文使用的短语“肿瘤抗原”指的是对特定过度增殖性障碍比如癌症常见的抗原。肿瘤抗原为由引发免疫反应(特别是T细胞介导的免疫反应)的肿瘤细胞产生的蛋白质。本发明抗原结合部分的选择取决于待治疗的癌症的特定类型。

[0177] 根据一个实施方案,肿瘤抗原与实体瘤相关。

[0178] 根据一个实施方案,肿瘤抗原与血液恶性肿瘤相关。

[0179] 本发明中提及的肿瘤抗原的类型包括肿瘤特异性抗原(TSA)或肿瘤相关抗原(TAA)。“TSA”指的是对肿瘤细胞独特的蛋白质或多肽抗原,并且其不发生在机体的其他细胞上。“TAA”指的是由肿瘤细胞表达的蛋白质或多肽抗原。例如,TAA可为肿瘤细胞的一种或多种表面蛋白或多肽、核蛋白或糖蛋白或其片段。

[0180] 本文讨论的抗原仅作为实例被包括在内。列表不旨在为排他性的,并且进一步的实例对本领域技术人员为易于显而易见的。

[0181] 肿瘤抗原为本领域熟知的,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、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)、肠羧酯酶、突变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、存活素和端粒酶、前列腺癌肿瘤抗原-1(PCTA-1)、MAGE、ELF2M、嗜中性粒细胞弹性蛋白酶、肝配蛋白B2、CD22、胰岛素生长因子(IGF)-I、(IGF)-II、IGF-1受体和间皮素。

[0182] 这些分子包括但不限于组织特异性抗原比如黑素瘤中的MART-1、酪氨酸酶和GP100及前列腺癌中的前列腺酸性磷酸酶(PAP)和前列腺特异性抗原(PSA)。其他靶分子属

于转化相关分子组,比如致癌基因HER-2/Neu/ErbB-2。然而另一组靶抗原为癌胚抗原,比如癌胚抗原(CEA)。在B细胞淋巴瘤中,肿瘤特异性独特型免疫球蛋白构成对个体肿瘤独特的真正的肿瘤特异性免疫球蛋白抗原。B细胞分化抗原比如CD19、CD20和CD37为B细胞淋巴瘤中靶抗原的其他候选物。这些抗原中的一些(例如CEA、HER-2、CD19、CD20、独特型)已被用作单克隆抗体被动免疫疗法的靶标,但成功的有限。

[0183] TSA或TAA抗原的非限制性实例包括以下:分化抗原比如MART-1/MelanA (MART-1)、gp100 (Pmel 17)、酪氨酸酶、TRP-1、TRP-2和肿瘤特异性多谱系抗原比如MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15;过度表达的胚胎抗原比如CEA;过度表达的致癌基因和突变的肿瘤抑制基因比如p53、Ras、HER-2/neu;自染色体易位生成的独特的肿瘤抗原比如BCR-ABL、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR;和病毒抗原比如EB病毒抗原EBVA和人乳头状瘤病毒(HPV)抗原E6和E7。其他的基于蛋白质的抗原包括TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、RAGE、NY-ESO、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、PSA、TAG-72、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、 β -连环蛋白、CDK4、Mum-1、p 15、p 16、43-9F、5T4、791Tgp72、甲胎蛋白、 β -HCG、BCA225、BTAA、CA 125、CA 15-3\CA 27.29\BCAA、CA 195、CA 242、CA-50、CAM43、CD68\P1、CO-029、FGF-5、G250、Ga733\EpCAM、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB/70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-901\Mac-2结合蛋白\亲环蛋白C-相关蛋白、TAAL6、TAG72、YLP和TPS。

[0184] 肿瘤抗原的进一步实例包括但不限于A33、BAGE、Bcl-2、 β -连环蛋白、CA125、CA19-9、CD5、CD19、CD20、CD21、CD22、CD33、CD37、CD45、CD123、CEA、c-Met、CS-1、细胞周期蛋白B1、DAGE、EBNA、EGFR、肝配蛋白B2、雌激素受体、FAP、铁蛋白、叶酸结合蛋白、GAGE、G250、GD-2、GM2、gp75、gp100 (Pmel 17)、HER-2/neu、HPV E6、HPV E7、Ki-67、LRP、间皮素、p53和PRAME。进一步的肿瘤抗原提供于van der Bruggen P, Stroobant V, Vigneron N, Van den Eynde B. Peptide database: Tcell-defined tumor antigens. *Cancer Immun* (2013), www.cancerimmunity.org/peptide/,本文通过参照结合。

[0185] 根据一个具体的实施方案,肿瘤抗原包括但不限于 CD19、CD20、CD22、ROR1、间皮素、CD33/IL3Ra、c-Met、PSMA、糖脂F77、EGFRvIII、Her2、GD-2、gp100、p53、癌胚抗原(CEA)、NY-ESO-1、MART-1、MAGE A3等。

[0186] 根据一个实施方案,靶抗原为CD19。

[0187] 根据本发明的一些实施方案,抗原为病毒抗原。病毒抗原可源自任何病毒,比如但不限于人免疫缺陷病毒(HIV)、流感、巨细胞病毒(CMV)、T细胞白血病1型病毒(TAX)、丙型肝炎病毒(HCV)、(HBV)、EB病毒(EBV)、腺病毒(Adv)、感冒病毒、流感病毒、甲型、乙型和丙型肝炎病毒、单纯疱疹、日本脑炎、麻疹、脊髓灰质炎、狂犬病、呼吸道合胞体、风疹、天花、水痘带状疱疹、轮状病毒、西尼罗病毒、多瘤病毒(例如BK病毒)和/或寨卡病毒。

[0188] 根据本发明的一些实施方案,病毒抗原包括但不限于来自选自以下的多肽的病毒表位:人嗜T淋巴细胞病毒1型(HTLV-1)转录因子(TAX)、流感基质蛋白表位、EB病毒(EBV)来源的表位、HIV-1 RT、HIV Gag、HIV Pol、流感膜蛋白M1、流感血凝素、流感神经氨酸酶、流感核蛋白、流感核蛋白、流感基质蛋白(M1)、流感病毒离子通道(M2)、流感非结构蛋白NS-1、流感非结构蛋白NS-2、流感PA、流感PB1、流感PB2、流感BM2蛋白、流感NB蛋白、流感核衣壳蛋白、巨细胞病毒(CMV)磷酸化基质蛋白(pp65)、TAX、丙型肝炎病毒(HCV)、HBV pre-S蛋白85-

66、HTLV-1 tax 11-19、HBV表面抗原185-194。

[0189] 根据本发明的一些实施方案，抗原为细菌抗原。细菌抗原可源自任何细菌，比如但不限于炭疽、革兰阴性杆菌、衣原体、白喉、流感嗜血杆菌、幽门螺杆菌、疟疾、结核分枝杆菌、百日咳毒素、肺炎链球菌、立克次氏体、葡萄球菌、链球菌和破伤风。

[0190] 根据本发明的一些实施方案，细菌抗原包括但不限于炭疽抗原（包括但不限于炭疽保护性抗原）、革兰阴性杆菌抗原（包括但不限于脂多糖）、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、热激蛋白65（HSP65）、30 kDa主要分泌蛋白和抗原85A）、百日咳毒素抗原（包括但不限于血凝素、百日咳杆菌贴壁素、FIM2、FIM3和腺苷酸环化酶）、肺炎链球菌抗原（包括但不限于肺炎球菌溶血素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）和破伤风抗原（包括但不限于破伤风毒素）。

[0191] 根据本发明的一些实施方案，抗原为超级细菌（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（Enterococcus faecium）、艰难梭菌（Clostridium difficile）、鲍曼不动杆菌（Acinetobacter baumannii）、铜绿假单胞菌（Pseudomonas aeruginosa）和肠杆菌科（Enterobacteriaceae）（包括大肠杆菌（Escherichia coli））、肺炎克雷伯菌（Klebsiella pneumoniae）、肠杆菌（Enterobacter spp.）。

[0192] 根据本发明的一些实施方案，抗原为真菌抗原。真菌的实例包括但不限于念珠菌属（candida）、球孢子菌属（coccidioides）、隐球菌属（cryptococcus）、组织胞浆菌属（histoplasma）、利什曼原虫属（leishmania）、疟原虫属（plasmodium）、原生动物门（protozoa）、寄生虫、血吸虫属（schistosomae）、癣（tinea）、弓形虫（toxoplasma）和克氏锥虫（trypanosoma cruzi）。

[0193] 根据本发明的一些实施方案，真菌抗原包括但不限于球孢子菌属抗原（包括但不限于小球抗原）、隐球菌属抗原（包括但不限于荚膜多糖）、组织胞浆菌属抗原（包括但不限于热激蛋白60（HSP60））、利什曼原虫属抗原（包括但不限于 gp63 和脂磷酸聚糖）、恶性疟原虫抗原（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）、原生动物和其他寄生虫抗原（包括血液阶段抗原 pf 155/RESA）、血吸虫属抗原（包括但不限于谷胱甘肽-S-转移酶和副肌球蛋白）、癣真菌抗原（包括但不限于发癣菌素）、弓形体抗原（包括但不限于 SAG-1 和 p30）和克氏锥虫抗原（包括但不限于 75-77 kDa 抗原和 56 kDa 抗原）。

[0194] 根据本发明的一些实施方案，抗原为由与变态反应性病症相关的细胞表达的抗原。变态反应抗原的实例包括但不限于花粉抗原比如日本柳杉花粉抗原、豚草花粉抗原、黑麦草花粉抗原、动物源性抗原（比如尘螨抗原和猫抗原）、组织相容性抗原和青霉素及其他治疗药物。

[0195] 根据本发明的一些实施方案，抗原为与自身免疫性疾病相关的自体抗原。

[0196] 本文使用的术语“自身免疫性疾病”定义为由自身免疫反应造成的障碍。自身免疫性疾病为对自身抗原不适当过度反应的结果。

[0197] 自身免疫性疾病的实例包括但不限于爱迪生氏病、斑秃（alopecia areata）、强直性脊柱炎、自身免疫性肝炎、自身免疫性腮腺炎、克罗恩病、炎性肠病（IBD）、乳糜泻、皮炎

(包括特应性皮炎和湿疹性皮炎)、I型糖尿病、营养不良性大疱性表皮松解症、附睾炎、肾小球肾炎、格雷夫斯病、吉兰-巴雷综合征、桥本氏病、溶血性贫血、系统性红斑狼疮(SLE)、多发性硬化症(MS)、重症肌无力、寻常型天疱疮、牛皮癣、风湿热、关节炎(包括类风湿性关节炎、幼年型类风湿性关节炎、骨性关节炎、牛皮癣性关节炎)、结节病、硬皮病、斯耶格伦综合征、史蒂文斯-约翰逊综合征、韦格纳肉芽肿、脊柱关节病、甲状腺炎、血管炎、白癜风、粘液性水肿、贫血、哮喘、恶性贫血、溃疡性结肠炎和中风等。

[0198] 本文使用的短语“自体抗原性肽”指的是源自内源性(即自身蛋白质)或消耗的蛋白质(例如通过食物)的抗原,作为自身免疫性炎症反应的一部分对其引发炎症反应。

[0199] 应该指出的是,短语“内源性的”、“自身”为指其中引发自身免疫反应的个体的相对表达。

[0200] 自体抗原包括但不限于细胞蛋白、磷蛋白、细胞表面蛋白、细胞脂质、核酸、糖蛋白,包括细胞表面受体。

[0201] 根据本发明的一些实施方案,自体抗原性肽与选自以下的疾病相关:糖尿病、多发性硬化症、类风湿性关节炎、乳糜泻和中风。

[0202] 多发性硬化症自体抗原包括但不限于髓磷脂蛋白质类(myelin proteins),比如髓磷脂碱性蛋白(MBP)、蛋白脂质蛋白(PLP)和髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白(MOG)。

[0203] 类风湿性关节炎相关自体抗原包括但不限于源自胶原蛋白II(COL2A1)、基质金属蛋白酶-1(MMP1)、聚集蛋白聚糖核心蛋白前体(ACAN)、基质金属蛋白酶-16(MMP16)、肌腱蛋白(TNXB)和异性核糖核蛋白A2(HNRNPA2B1)的自体抗原性肽。

[0204] 1型糖尿病(T1D)自体抗原包括但不限于在胰岛中表达的抗原,包括谷氨酸脱羧酶(GAD65)和 β 细胞自体抗原性肽。

[0205] 乳糜泻(Celiac或Coeliac)自体抗原包括但不限于醇溶蛋白(gliadin)(例如 α -醇溶蛋白、 γ -醇溶蛋白)和热激蛋白20。

[0206] 克罗恩病、溃疡性结肠炎或炎性肠病(IBD)自体抗原包括但不限于FAM84A、颗粒膜糖蛋白2(GP2)、CUB和透明带样结构域1(CUZD1)、补体C3、过氧化氢酶和 α -烯醇化酶。

[0207] 根据本发明的一些实施方案,中风相关自体抗原包括但不限于源自脑抗原的自体抗原性肽,比如髓磷脂碱性蛋白、神经丝和N-甲基-D-天冬氨酸受体(MOG-35-55)的NR2A/2B亚型。

[0208] 本发明一些实施方案的一个方面提供一种产生本发明一些实施方案的分离的细胞的方法,所述方法包括用编码包含T细胞受体信号传导模块的细胞表面受体的多核苷酸转导具有中央型记忆T淋巴细胞(Tcm)表型的细胞,所述细胞为耐受性诱导细胞并能够在移植后归巢至淋巴结。

[0209] 根据一个实施方案,具有中央型记忆T淋巴细胞(Tcm)表型,为耐受性诱导细胞并能够在移植后归巢至淋巴结的细胞为抗第三方细胞。

[0210] 本文使用的短语“抗第三方细胞”指的是针对(即通过T细胞识别)一种或多种第三方抗原的淋巴细胞(即T淋巴细胞)。

[0211] 本文使用的短语“一种或多种第三方抗原”指的是不存在于供体或接受者中的一种或多种可溶性或不可溶性(比如膜缔合)抗原,如下文详细描绘的那样。

[0212] 例如,第三方抗原可为第三方细胞、细胞抗原(例如细胞表面抗原)、病毒的抗原

(即病毒抗原)比如EB病毒(EBV)或巨细胞病毒(CMV)、或细菌的抗原(即细菌抗原)比如鞭毛蛋白。病毒或细菌抗原可由被其感染或者以其他方式使得表达病毒/细菌蛋白质的细胞(例如细胞系)呈递。

[0213] 自体或非自体抗原呈递细胞或人工载体或人工抗原呈递细胞可用于呈递融合或装载于其上的短合成肽或者呈递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或细菌来源的肽或代表任何其他抗原的肽。

[0214] 专用软件可用于分析病毒或其他序列以鉴定免疫原性短肽,即可在I类MHC或II类MHC的情况下呈递的肽。

[0215] 第三方细胞就接受者而言可为同种异体或异种异体的(下文进一步详细解释)。在同种异体第三方细胞的情况下,这种细胞具有与供体不同的HLA抗原,但其不与接受者HLA抗原交叉反应,以致针对这种细胞产生的抗第三方细胞不会对移植植物或接受者抗原产生反应。

[0216] 根据本发明的一个实施方案,同种异体或异种异体第三方细胞为选自以下的刺激细胞:由外周血淋巴细胞(PBL)、脾脏或淋巴结、细胞因子动员的PBL、体外扩增的抗原呈递细胞(APC)、体外扩增的树突状细胞(DC)和人工抗原呈递细胞纯化的细胞。

[0217] 本发明的人工APC可被工程改造为呈现具有第3方肽的自体MHC或未用外源性肽脉冲的第3方MHC。因此,根据一个实施方案,人工APC包含用第三方MHC决定簇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]或用相同物质转染的成纤维细胞。

[0218] 第三方抗原可呈递在细胞、病毒或细菌表面上,或者由此衍生和/或纯化。另外,病毒或细菌抗原可呈现在感染细胞上,并且细胞抗原可呈现在人工载体比如脂质体或人工抗原呈递细胞(例如用一种或多种第三方抗原转染的白血病或成纤维细胞系)上。

[0219] 第三方抗原可进一步包含由自体呈递细胞、非自体呈递细胞或在人工载体上或在人工抗原呈递细胞上呈递的合成肽。

[0220] 另外,第三方抗原可例如为自多种来源提取或纯化的蛋白质。可用作本发明第三方抗原的纯化蛋白质的实例为卵清蛋白。可设想其他实例。

[0221] 利用细胞、病毒感染的细胞、细菌感染的细胞、病毒肽呈递细胞或细菌肽呈递细胞作为第三方抗原特别有利,因为这种第三方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抗第三方细胞,其可在其中需要这种重建的情况下,例如在致死或亚致死照射或化疗程序之后进一步用于更快速地重建T细胞。

[0222] 此外,当抗第三方细胞针对第三方抗原时,细胞具有抗病活性。术语“抗病活性”指的是Tcm细胞针对病变细胞(例如癌细胞,比如移植植物抗白血病(GVL)活性)的活性(例如杀伤能力)。该活性一般地是由于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]。

[0223] 根据一个实施方案,第三方细胞包含树突状细胞。

[0224] 根据一个实施方案,第三方细胞包含成熟的树突状细胞。

[0225] 产生第三方树突状细胞(其可用作用于诱导Tcm细胞的刺激细胞)的方法为本领域熟知的。因此,作为非限制性实例,外周血单核细胞(PBMC)可得自第三方非同源细胞供体[例如在Tcm细胞为同源例如自体的情况下,就受试者而言树突状细胞(DC)可为非同源例如

同种异体的；而如果Tcm细胞为非同源例如同种异体的，则DC选自为非同源例如同种异体的供体，和HLA与受试者和Tcm细胞两者错配]。单核细胞然后可通过塑料贴壁分离，并使用补充有人血清(例如1%人血清)、青霉素/链霉素和GM-CSF(例如800 IU/ml)和IL-4(例如20 ng/ml)(可得自例如Peprotech, Hamburg, Germany)的DC细胞培养基(例如Cellgro DC培养基)中培养(例如在细胞培养板中)。在培养约24-72小时(例如48小时)后，可加入包含GM-CSF(例如1600 IU/ml)和IL-4(例如20 ng/ml)的DC培养基。约12-36小时(例如24小时)后，可收获非贴壁细胞，并可将大细胞(大多数为未成熟DC)重悬浮于含有GM-CSF(例如800 IU/ml)、IL-4(例如20 ng/ml)、LPS(例如来自大肠杆菌055:B5, 以例如10 ng/ml)和IFN γ (例如100 IU/ml)(可得自例如Peprotech, Hamburg, Germany)的新鲜培养基中，铺板并温育过夜。第二天，可弃去非贴壁的细胞，并可在于冰上温育约15-30分钟(例如20分钟)后使用例如冷的PBS/1% HS轻轻去除贴壁的DC，从而获得由成熟DC组成的大细胞。

[0226] 根据一个实施方案，第三方细胞包含照射的树突状细胞。

[0227] 因此，根据一个实施方案，DC用约5-10 Gy、约10-20 Gy、约20-30 Gy、约20-40 Gy、约20-50 Gy、约10-50 Gy照射。根据一个具体的实施方案，DC用约10-50 Gy(例如30 Gy)照射。

[0228] 按照本发明可使用产生抗第三方Tcm细胞的任何方法，如先前在PCT公开号W0 2010/049935、W0 2012/032526和W0 2013/035099中描述的那样，特此通过参照结合。

[0229] 根据一个实施方案，产生具有Tcm表型的抗第三方细胞可通过包括以下的方法实施：(a) 在存在或不存在IL-21的情况下使外周血单核细胞(PBMC)与一种或多种第三方抗原接触，以致使得能够富集抗原反应性细胞；和(b) 在存在IL-21、IL-15和IL-7的情况下，在无抗原环境中培养自步骤(a)生成的细胞，以致使得包含中央型记忆T淋巴细胞(Tcm)表型的细胞能够增殖。

[0230] 根据一个实施方案，步骤(a)中的PBMC在不存在IL-21的情况下与一种或多种第三方抗原接触。

[0231] 根据一个实施方案，步骤(a)中的PBMC在存在IL-21的情况下与一种或多种第三方抗原接触。

[0232] 根据一个实施方案，在仅存在IL-15的情况下，在无抗原环境中(例如不向细胞培养物添加抗原)培养自步骤(a)生成的细胞。IL-21和/或IL-7可任选地添加。

[0233] 本发明的抗第三方Tcm细胞一般地通过首先使同源(例如自体)或非同源(例如非自体比如同种异体或异种异体，如下文进一步详细描述的那样)外周血单核细胞(PBMC)与一种或多种第三方抗原(比如以上描述的)在补充有IL-21的培养物中(例如在无细胞因子的培养物中，即不添加任何另外的细胞因子)中接触来产生。该步骤一般地实施约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、2-5天、2-6天、1-7天、5-7天、2-8天、8-10天或1-10天，并使得能够富集抗原反应性细胞。

[0234] 根据一个具体的实施方案，在补充有IL-21的培养物(本来无细胞因子的培养物)中实现使同源或非同源PBMC与一种或多种第三方抗原(比如以上描述的)接触1-5天(例如3天)。

[0235] 使同源或非同源PBMC与一种或多种第三方抗原(比如以上描述的)在补充有IL-21

的培养物中接触一般地在存在约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的情况下实施。

[0236] 根据一个具体的实施方案, IL-21的浓度为50-150 IU/ml (例如100 IU/ml)。

[0237] 根据一个具体的实施方案,在无细胞因子的培养物(例如仅补充有IL-21)中实现使同源或非同源PBMC与一种或多种第三方抗原接触,这种培养条件仅使得经历用一种或多种第三方抗原(即抗原反应性细胞的抗原)刺激和激活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)(所有其余的细胞在这些培养条件下死亡)。

[0238] 一种或多种第三方抗原(例如树突状细胞)与PBMC的比率一般地为约1:2-约1:10,比如约1:4、约1:6、约1:8或约1:10。

[0239] 根据一个具体的实施方案,一种或多种第三方抗原(例如树突状细胞)与PBMC的比率为约1:2-约1:8(例如1:5)。

[0240] 接下来,抗第三方细胞在存在IL-21、IL-15和/或IL-7的情况下,在无抗原环境中进行培养,以使得包含Tcm表型的细胞能够增殖。该步骤一般地实施约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、1-20天、1-15天、1-10天、1-5天、5-20天、5-15天、5-10天、1-2天、2-3天、1-3天、2-4天、2-5天、2-8天、2-10天、4-10天、4-8天、6-8天、8-10天、7-9天、7-11天、7-13天、7-15天、10-12天、10-14天、12-14天、14-16天、14-18天、16-18天或18-20天。根据一个具体的实施方案,抗第三方细胞在存在IL-21、IL-15和IL-7的情况下,在无抗原环境中培养约7-11天(例如8天)。

[0241] 该步骤一般地在以约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。

[0242] 根据一个具体的实施方案,IL-21的浓度为50-150 IU/ml(例如100 IU/ml)。

[0243] 该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 IL-15的浓度存在IL-15的情况下实施。根据一个具体的实施方案,IL-15的浓度为100-150 IU/ml (例如125 IU/ml)。

[0244] 该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 IL-7的浓度存在IL-7的情况下实施。根据一个具体的实施方案,IL-7的浓度为10-50 IU/ml (例如30 IU/ml)。

[0245] 本发明人已通过辛苦的实验和筛选收集了许多可用于改善包含中央型记忆T淋巴细胞(Tcm)表型的抗第三方细胞增殖的标准,所述抗第三方细胞没有移植物抗宿主(GVH)反应性细胞和/或被增强抗病(例如GVL)反应性细胞。

[0246] 根据一个实施方案,在存在IL-21的情况下与一种或多种第三方抗原接触之前,PBMC被耗尽贴壁细胞。

[0247] 根据一个实施方案,在存在IL-21的情况下与一种或多种第三方抗原接触之前,PBMC被耗尽CD4+和/或CD56+细胞。

[0248] 根据一个实施方案,在存在IL-21的情况下与一种或多种第三方抗原接触之前,选择PBMC的CD45RA+细胞。

[0249] 耗尽CD4⁺和/或CD56⁺细胞可使用本领域已知的任何方法实施,比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)。为了增加培养物中CD8⁺细胞的纯度(即清除细胞培养物中的其它淋巴细胞,例如T CD4⁺细胞或NK细胞)或为了增加CD8⁺ T细胞的数目,这种步骤可为有益的。

[0250] 根据一个实施方案,PBMC包含非贴壁细胞。

[0251] 根据一个实施方案,PBMC包含CD8+ T细胞。

[0252] 根据一个实施方案,PBMC包含首次实验的CD8+ T细胞。

[0253] 首次实验的CD8+ T细胞的选择可通过选择表达CD45RA+的细胞和/或表达CD45R0-的细胞来实现,并可使用本领域已知的任何方法实施,比如通过基于亲和力的纯化(比如通过使用MACS珠、FACS分选仪和/或捕获ELISA标记)。

[0254] 根据一个实施方案,PBMC包含CD45RA+细胞。

[0255] 可按照本教导实施的另外步骤包括在自细胞培养物去除一种或多种第三方抗原之前(即在产生无抗原环境之前),在存在IL-21、IL-15和IL-7的情况下用一种或多种第三方抗原培养PBMC细胞。

[0256] 该步骤一般地实施约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,并且以相同剂

量的以上指明的IL-21、IL-15和IL-7实现。根据一个具体的实施方案,在存在IL-21、IL-15和IL-7的情况下用一种或多种第三方抗原培养PBMC细胞实施12小时-4天(例如1-2天)。

[0257] 另外或者备选地,可实施使得能够选择和分离激活的细胞的另外两个步骤过程。这种选择步骤助于在其中PBMC为与受试者非同源的情况下去除潜在的宿主反应性T细胞(例如同种异体反应性细胞)(如下文进一步详细描述的那样)。

[0258] 因此,分离激活的细胞可以两阶段方法实施。在第一阶段中,在存在IL-15和IL-7的情况下培养细胞之前选择激活的细胞。该第一阶段一般地在PBMC与一种或多种第三方抗原于存在IL-21的情况下初始接触之后实施。该选择过程仅挑选被第三方抗原激活的那些细胞(例如如以下描述的那样表达激活标志物),并且一般地在PBMC与一种或多种第三方抗原初始接触后约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。

[0259] 根据一个具体的实施方案,选择过程在PBMC与一种或多种第三方抗原初始接触后约12-24小时(例如14小时)实现。

[0260] 分离激活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比如但不限于CD69、CD44、CD25、CFSE、CD137或非细胞表面标志物比如但不限于IFN- γ 和IL-2。分离激活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。一般地,还针对CD8+细胞表达选择激活的细胞。此外,以上方法的任何组合可用于有效分离激活的细胞。

[0261] 根据本发明的一个实施方案,对激活的细胞的选择通过选择CD137+和/或CD25+细胞来实现。

[0262] 一般地在培养结束时(即在无抗原环境种用IL-21、IL-15和IL-7培养之后)实施分离激活的细胞的第二阶段。该阶段通过耗尽在中央型记忆T淋巴细胞(Tcm)与经照射的宿主抗原呈递细胞(APC,例如树突状细胞)接触之后激活的那些细胞而耗尽同种异体反应性细胞。如以上提及的那样,分离激活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比如但不限于CD69、CD44、CD25、CFSE、CD137或非细胞表面标志物比如但不限于IFN- γ 和IL-2。

[0263] 根据本发明的一个实施方式,耗尽同种异体反应性细胞通过耗尽CD137+和/或CD25+细胞和/或IFN- γ 捕获来实现。

[0264] 以下为可根据本发明的一些实施方案使用的示例性方案。

[0265] 本发明的一个实施方案提供一种产生具有中央型记忆表型的分离的细胞的方法,所述细胞为耐受性诱导细胞并能够在移植后归巢至淋巴结,所述方法包括:(a) 在存在IL-21的情况下使外周血单核细胞(PBMC)与一种或多种第三方抗原接触(例如12小时-5天),以致使能够富集抗原反应性细胞;和(b) 在无抗原环境中,在存在IL-21、IL-15和IL-7的情况下培养自步骤(a)生成的细胞(例如5-20天),以致使包含中央型记忆T淋巴细胞(Tcm)表型的抗第三方细胞能够增殖。

[0266] 根据一个实施方案,方法进一步包括:(c) 将自步骤(b)生成的细胞分离成单细胞

悬液。

- [0267] 根据一个实施方案,方法进一步包括在步骤(a)之前自PBMC耗尽贴壁细胞。
- [0268] 根据一个实施方案,方法进一步包括在步骤(a)之前自PBMC耗尽CD4+和/或CD56+细胞.
- [0269] 根据一个实施方案,方法进一步包括在步骤(a)之后在步骤(b)之前选择激活的细胞。
- [0270] 根据一个实施方案,方法进一步包括通过选择CD137+和/或CD25+细胞来实现选择激活的细胞。
- [0271] 本发明的一个实施方案提供一种产生具有中央型记忆表型的分离的细胞的方法,所述细胞为耐受性诱导细胞并能够在移植后归巢至淋巴结,所述方法包括: (a) 用能够耗尽CD4+和/或CD56+细胞的物质处理非贴壁外周血单核细胞(PBMC),以致获得CD8+ T细胞; (b) 在存在IL-21的情况下使CD8+ T细胞与第三方树突状细胞接触(例如12小时-5天),以致使能够富集抗原反应性细胞; (c) 在存在IL-21、IL-15和IL-7的情况下用第三方树突状细胞培养自步骤(b)生成的细胞(例如12小时-3天);和(d) 在无抗原的环境中,在存在IL-21、IL-15和IL-7的情况下培养自步骤(c)生成的细胞(例如5-20天),以致使包含中央型记忆T淋巴细胞(Tcm)表型的细胞能够增殖。
- [0272] 根据一个实施方案,方法进一步包括将自步骤(d)生成的细胞分离成单细胞悬液。
- [0273] 根据一个实施方案,包含Tcm表型的抗第三方细胞包含CD3⁺、CD8⁺、CD62L⁺、CD45RA⁻、CD45RO⁺特征。
- [0274] 应该意识到,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%的抗第三方细胞为CD3+CD8+细胞。根据一个具体的实施方案,抗第三方细胞包含约70-90% CD3+CD8+细胞。
- [0275] 应该意识到,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CD3+CD8+细胞具有Tcm细胞特征。根据一个具体的实施方案,约30-80%的CD3+CD8+细胞具有Tcm细胞特征(例如40-50%)。
- [0276] 根据一个实施方案,细胞中至少50%为CD3+CD8+细胞,其CD3+CD8+细胞的至少50%具有特征。
- [0277] 因此,具有中央型记忆T淋巴细胞(Tcm)表型的本发明细胞不是天然存在的,也不是自然的产物。这些细胞一般地通过离体操作产生(即在存在特定细胞因子的情况下暴露于一种或多种第三方抗原)。
- [0278] 如所提及的那样,本发明的Tcm细胞用编码包含T细胞受体信号传导模块的细胞表面受体的多核苷酸转导。
- [0279] 本文使用的术语“多核苷酸”指的是以RNA序列、互补多核苷酸序列(cDNA)、基因组多核苷酸序列和/或复合多核苷酸序列(例如以上的组合)的形式分离并提供的单链或双链核酸序列。
- [0280] 术语“分离的”指的是至少部分地分离自天然环境,例如分离自细胞或分离自组织,例如分离自人体。
- [0281] 分离的多核苷酸可使用本领域已知的重组方法获得,比如使用标准技术,通过自表达该基因的细胞筛选文库、通过自己知包含所述基因的载体衍生该基因或者通过直接自

含有所述基因的细胞和组织分离。或者，目标基因可合成而不是克隆产生。

[0282] 本发明一些实施方案的多核苷酸可包含单一多核苷酸，其包含编码细胞表面受体（例如tg-TCR和/或CAR）的胞外结构域、跨膜结构域和/或信号传导模块的核酸序列。或者，可使用两种或更多种多核苷酸，其中一种多核苷酸可包含编码例如胞外结构域和跨膜结构域的核酸序列，和另一种多核苷酸可包含编码信号传导模块的核酸序列。

[0283] 本发明一些实施方案的一个方面提供一种核酸构建体，其包含一种分离的多核苷酸，所述分离的多核苷酸包含编码本发明一些实施方案的分子的核酸序列和用于指导分离的多核苷酸在宿主细胞内转录的顺式作用调控元件。

[0284] 因此，编码本发明的细胞表面受体（例如tg-TCR或CAR分子）的天然或合成核酸的表达一般地通过将编码细胞表面受体（例如tg-TCR或CAR）多肽或其部分的核酸有效地连接至顺式作用调节元件（例如启动子序列），并将该构建体掺入到表达载体中来实现。

[0285] 本发明的核酸构建体还可包括增强子、转录和翻译起始序列、转录和翻译终止子及多腺苷酸化信号、5'LTR、tRNA结合位点、包装信号、第二链DNA合成的起点及3'LTR或其部分；另外的多核苷酸序列，其使得能够例如翻译来自单链mRNA（比如内部核糖体进入位点（IRES））的几种蛋白质，和用于启动子-嵌合多肽的基因组整合的序列；被工程改造以增强所表达的肽的稳定性、产生、纯化、产量或毒性的序列。

[0286] 增强子调节转录起始的频率。一般地，启动子元件位于起始位点上游30-110 bp的区域，尽管最近已经显示出许多启动子在起始位点下游也含有功能元件。启动子元件之间的间隔通常是灵活的，以致当元件颠倒或相对于彼此移动时保持启动子功能。在胸苷激酶（tk）启动子中，启动子元件之间的间隔可在活性开始下降之前相距增加至50 bp。依启动子而定，似乎单个元件可合作或独立地起作用以激活转录。

[0287] 合适的启动子的一个实例为立即早期巨细胞病毒（CMV）启动子序列。该启动子序列为能够驱动与其有效连接的任何多核苷酸序列的高水平表达的强组成型启动子序列。合适的启动子的另一个实例为延伸生长因子-1 α （EF-1 α ）。然而，也可使用其他组成型启动子序列，包括但不限于猿猴病毒40（SV40）早期启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒（MMTV）、人免疫缺陷病毒（HIV）长末端重复序列（LTR）启动子、MoMuLV启动子、禽白血病病毒启动子、EB病毒立即早期启动子、劳斯肉瘤病毒启动子以及人基因启动子，比如但不限于肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、血红蛋白启动子和肌酸激酶启动子。进一步地，本发明应不限于使用组成型启动子。诱导型启动子也考虑作为本发明的部分。诱导型启动子的使用提供一种分子开关，其能够在期望这种表达时开启有效连接的多核苷酸序列的表达，或者在不期望表达时关闭表达。诱导型启动子的实例包括但不限于金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素启动子。

[0288] 本发明的分离的多核苷酸可克隆到许多类型的载体中。例如分离的多核苷酸可被克隆到包括但不限于以下的载体中：质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、动物病毒和粘粒。特别引人关注的载体包括表达载体、复制载体、探针产生载体和测序载体。

[0289] 哺乳动物表达载体的实例包括但不限于pcDNA3、pcDNA3.1 (+/-)、pGL3、pZeoSV2 (+/-)、pSecTag2、pDisplay、pEF/myc/cyto、pCMV/myc/cyto、pCR3.1、pSinRep5、DH26S、DHBB、pNMT1、pNMT41、pNMT81（可得自Invitrogen）、pCI（可得自Promega）、pMbac、pPbac、pBK-RSV和pBK-CMV（可得自Strategene）、pTRES（可得自Clontech）及其衍生物。

[0290] 也可使用含有来自真核病毒比如逆转录病毒的调控元件的表达载体。SV40载体包括pSVT7和pMT2。源自牛乳头状瘤病毒的载体包括pBV-1MTHA, 和源自EB病毒的载体包括pHEBO和p205。其他示例性的载体包括pMSG、pAV009/A⁺、pMT010/A⁺、pMAMneo-5、杆状病毒pDSVE和任何其他使得能够在SV-40早期启动子、SV-40晚期启动子、金属硫蛋白启动子、鼠乳腺肿瘤病毒启动子、劳斯肉瘤病毒启动子、多角体蛋白启动子或其他对于在真核细胞中表达显示有效的启动子的指导下表达蛋白质的载体。

[0291] 目前优选的体内或体外核酸转移技术包括用病毒或非病毒构建体比如腺病毒、慢病毒、I型单纯疱疹病毒或腺伴随病毒(AAV)转染。重组病毒载体提供比如横向感染和靶向特异性的优点。通过病毒感染引入核酸提供优于其他方法比如脂质体转染和电穿孔的几个优点,因为由于病毒的感染性质可获得更高的转染效率。

[0292] 病毒载体技术为本领域熟知的,并且描述于例如Sambrook等人(2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)及其他病毒学和分子生物学手册中。可用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒和慢病毒。通常,合适的载体含有在至少一种生物体中功能性的复制起点、启动子序列、便利的限制性核酸内切酶位点和一种或多种选择性标志物(例如WO 01/96584、WO 01/29058和美国专利第6326193号)。

[0293] 根据本发明的一些实施方案,本发明的核酸构建体为病毒载体。

[0294] 源自逆转录病毒比如慢病毒的载体为实现长期基因转移的合适工具,因为其使得转基因能够长期稳定整合及其在子细胞中繁殖。慢病毒载体具有超过源自致癌逆转录病毒比如鼠白血病病毒的载体的额外优点,因为其可转导非增殖细胞,比如肝细胞。

[0295] 此外,慢病毒载体提供更大的基因插入能力,并且还具有免疫原性低的额外优点。或者,可使用γ-逆转录病毒载体。γ-逆转录病毒载体具有良好的转导效率并且没有载体相关毒性[参见例如Zhang and Morgan, Adv Drug Deliv Rev. (2012), 见上]。

[0296] 例如,逆转录病毒为基因递送系统提供一种便利的平台。可使用本领域已知的技术将选择的基因插入到载体中并包装在逆转录病毒颗粒中。然后可将重组病毒分离并在体内或离体递送至受试者的细胞。

[0297] 为了评价细胞表面受体(例如tg-TCR或CAR)多肽或其部分的表达,待引入到细胞中的核酸构建体也可含有选择性标志物基因或报告基因或两者以促进自试图通过病毒载体转染或感染的细胞群鉴别和选择表达细胞。在其他方面,选择性标志物可携带在单独的DNA片段上并用于共转染程序。选择性标志物和报告基因两者侧翼可为合适的调控序列以使得能够在宿主细胞中表达。有用的选择性标志物包括例如抗生素抗性基因,比如neo等。

[0298] 报告基因用于鉴定潜在转染的细胞和用于评估调控序列的功能性。通常,报告基因为不存在于接受者生物体或组织中或者由接受者生物体或组织表达并且编码多肽(其表达通过一些可易于检测的性质例如酶活性显现)的基因。在将DNA导入到接受者细胞后,于合适的时间测定报告基因的表达。合适的报告基因可包括编码萤光素酶、β-半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、分泌型碱性磷酸酶或绿色荧光蛋白基因的基因(例如Ui-Tei等人, 2000 FEBS Letters 479: 79-82)。合适的表达系统为熟知的,并可使用已知技术制备或市售获得。通常,具有最小5'侧翼区显示最高水平报道基因表达的构建体被鉴定为启动子。这种启动子区可连接于报告基因并用于评估物质调节启动子驱动的转录的能力。

[0299] 可使用各种方法将本发明的核酸构建体引入到宿主细胞,例如哺乳动物、细菌、酵母或昆虫细胞中。这种方法通常描述于Sambrook等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992); Ausubel等人, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989); Chang等人, Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995); Vega等人, Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995); Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988) 和Gilboa等人 [Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986] 中,并且包括物理、化学或生物学手段(例如稳定或瞬时转染、脂质体转染、电穿孔和用重组病毒载体感染)。另外,对于正-负选择方法参见美国专利第5464764和5487992号。

[0300] 用于将多核苷酸引入到宿主细胞中的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂质体转染、粒子轰击、显微注射、电穿孔等。用于产生包含载体和/或外源性核酸的细胞的方法为本领域熟知的。参见例如Sambrook等人(2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)。用于将多核苷酸引入到宿主细胞中的优选方法为磷酸钙转染。

[0301] 用于将多核苷酸引入到宿主细胞中的化学手段包括胶体分散系统,比如大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠和基于脂质的系统,包括水包油乳液、胶束、混合胶束和脂质体。用作体外和体内递送载体的示例性胶体系统为脂质体(例如人工膜囊泡)。

[0302] 用于将目标多核苷酸引入到宿主细胞中的生物学方法包括使用DNA和RNA载体(如以上描述的那样)。病毒载体,并且尤其是逆转录病毒载体,已经成为用于将基因插入到哺乳动物例如人细胞中的最广泛使用的方法。其他病毒载体可源自慢病毒、痘病毒、I型单纯疱疹病毒、腺病毒、腺伴随病毒等。参见例如美国专利第5350674和5585362号。

[0303] 在其中采用非病毒递送系统的情况下,示例性的递送载体为脂质体。

[0304] “脂质体”为上位术语,包括通过产生封闭的脂质双层或聚集体形成的多种单层和多层脂质载体。脂质体可表征为具有磷脂双层膜和内部水性介质的囊泡结构。多层脂质体具有由水性介质分开的多个脂质层。它们在磷脂悬浮于过量的水溶液中时自发形成。

[0305] 脂质组分在封闭结构形成之前经历自我重排,并在脂质双分子层之间俘获水和溶解的溶质(Ghosh等人, 1991 Glycobiology 5: 505-10)。然而,也包括在溶液中具有不同于正常囊泡结构的结构的组合物。例如,脂质可呈现胶束结构或仅作为脂质分子的非均匀聚集体存在。还考虑lipofectamine-核酸复合物。

[0306] 考虑使用脂质制剂用于将核酸引入到宿主细胞中(体外、离体或体内)。另一方面,核酸可与脂质结合。与脂质结合的核酸可被包封在脂质体的水性内部、散布在脂质体的脂质双分子层内、经与脂质体和寡核苷酸两者结合的连接分子连接于脂质体、俘获在脂质体中、与脂质体复合、分散在含有脂质的溶液中、与脂质混合、与脂质组合、作为悬浮液在脂质中含有、含有胶束或与胶束复合、或者以其他方式与脂质结合。脂质、脂质/DNA或脂质/表达载体结合的组合物不限于溶液中的任何特定结构。例如,其可以双分子层结构存在,作为胶束或具有“塌陷”结构。其也可简单地散布在溶液中、可能形成大小或形状不均匀的聚集体。脂质为可天然存在的脂肪物质或合成脂质。例如,脂质包括天然存在于细胞质中的脂肪滴以及含有长链脂肪族烃及其衍生物比如脂肪酸、醇、胺、氨基醇和醛的化合物类别。

[0307] 适合于使用的脂质可得自市售来源。例如,二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(“DMPC”)可得自Sigma, St. Louis, Mo.;磷酸二鲸蜡酯(“DCP”)可得自K & K Laboratories (Plainview, N.Y.);胆固醇(“Choi”)可得自Calbiochem-Behring;二肉豆蔻酰磷脂酰甘油(“DMPG”);和其他脂质可得自Avanti Polar Lipids, Inc, (Birmingham, Ala.)。另外或者备选地,可使用DOTMA、DOPE和DC-Chol [Tonkinson等人, Cancer Investigation, 14 (1): 54-65 (1996)]脂质。氯仿或氯仿/甲醇中的脂质储备液可储存在约-20℃下。氯仿被用作唯一的溶剂,因为其比甲醇更易于蒸发。

[0308] 可按照本发明使用的另一种示例性非病毒递送系统为基于转座子的非病毒基因递送系统,比如,Sleeping Beauty或PiggyBac。

[0309] 不管用于将外源性核酸引入到宿主细胞中的方法,为了证实宿主细胞中存在重组DNA序列,可实施多种测定。这种测定包括例如本领域技术人员熟知的“分子生物学”测定,比如DNA印迹和RNA印迹、RT-PCR和PCR;“生物化学”测定,比如通过免疫学手段(ELISA和蛋白质印迹)或通过本文描述的测定来检测特定肽的存在或不存在以鉴定落入本发明范围内的物质。

[0310] 应该意识到,用细胞表面受体(例如tg-TCR和/或CAR)转导的细胞可进一步基因修饰以抑制细胞中至少一种内源性免疫检查点基因的表达。

[0311] 免疫检查点基因可包含PD或CTLA基因。

[0312] 本文使用的术语“免疫检查点基因”指的是参与用于调节免疫反应的幅度的抑制过程(例如反馈回路)的任何基因,抑制过程例如减轻有害免疫反应的不受控制的传播的免疫抑制反馈回路。

[0313] 免疫检查点基因的非限制性实例包括扩展的CD28家族受体成员及其配体以及参与共抑制途径的基因(例如CTLA-4和PD-1)。

[0314] 因此,根据一个实施方案,可采用PD1和/或CTLA-4靶向的核酸酶或转录抑制因子(transcription repressor),如在美国专利申请第20140120622号中讨论的那样,本文通过参照结合。

[0315] 另外或者备选地,调节T细胞的激活或功能的免疫检查点蛋白包括例如PD1、PDL-1、B7H2、B7H4、CTLA-4、CD80、CD86、LAG-3、TIM-3、KIR、IDO、CD19、OX40、4-1BB (CD137)、CD27、CD70、CD40、GITR、CD28和/或ICOS (CD278),可在转导的细胞中通过使用免疫检查点调节因子来调节(例如根据需要上调或下调)。

[0316] 根据具体的实施方案,免疫检查点调节因子选自抗CTLA4、抗PD-1、抗PDL-1、CD40激动剂、4-1BB激动剂、GITR激动剂和OX40激动剂。

[0317] 本发明一些实施方案的一个方面提供一种包含本发明一些实施方案的分离的细胞的细胞群。

[0318] 本发明一些实施方案的分离的细胞或细胞群可本身或以与合适的载体或赋形剂混合的药用组合物给予生物体。

[0319] 本文使用的“药用组合物”指的是本文描述的一种或多种活性成分与其他化学组分比如生理学上合适的载体和赋形剂的制剂。药用组合物的目的为促进把化合物给予生物体。

[0320] 本文中术语“活性成分”指的是可引起生物效应的本发明一些实施方案的细胞。

[0321] 在下文中,可互换使用的短语“生理学上可接受的载体”和“药学上可接受的载体”指的是不对生物体造成显著刺激并且不消除所给予化合物的生物活性和性质的载体或稀释剂。佐剂包括在这些短语中。

[0322] 本文中术语“赋形剂”指的是加入到药用组合物中以进一步促进给予活性成分的惰性物质。赋形剂的实例(非限制性地)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。

[0323] 用于配制和给予药物的技术可在“Remington's Pharmaceutical Sciences”, Mack Publishing Co., Easton, PA, latest edition (最新版本)中找到,其通过参照结合到本文中。

[0324] 例如,合适的给予途径可包括口服、直肠、经粘膜(尤其是经鼻)、肠道或肠胃外递送,包括肌内、皮下和髓内注射以及鞘内、直接脑室内、心脏内(例如进入右或左心室腔、进入普通冠状动脉)、静脉内、腹膜内、鼻内或眼内注射。

[0325] 用于向中枢神经系统(CNS)递送药物的常规方法包括:神经外科手术(例如脑内注射或侧脑室输注)、试图利用BBB的内源性运输途径之一的物质分子操作(例如产生嵌合融合蛋白,其包含对内皮细胞表面分子具有亲和力的转运肽与本身不能穿过BBB的物质的组合);被设计增加物质的脂溶性的药理学策略(例如水溶性物质与脂质或胆固醇载体的缀合);和BBB的完整性由于高渗性破坏导致的短暂破坏(由于向颈动脉输注甘露醇溶液或使用生物活性物质比如血管紧张素肽造成的)。然而,这些策略中的每一种都具有局限性,比如与侵入性外科手术相关的固有风险、由内源性运输系统固有的限制赋予的尺寸限制、与全身给予可能在CNS之外具有活性的包含载体基序的嵌合分子相关的潜在不合需要的生物副作用,以及BBB被破坏的大脑区域内可能存在脑损伤的风险,这使得其不是最理想的递送方法。

[0326] 或者,可以局部而非全身方式给予药用组合物,例如经将药用组合物直接注射到患者的组织区域。

[0327] 根据一个实施方案,给予途径包括例如注射、摄取、输液、植入或移植。本文描述的组合物可皮下、皮内、瘤内、结节内、髓内、肌内、通过静脉内(i.v.)注射或腹膜内给予患者。在一个实施方案中,本发明的药用组合物通过皮内或皮下注射给予患者。在另一个实施方案中,本发明的药用组合物优选地通过i.v.注射给予。药用组合物可直接注射到肿瘤、淋巴结或感染部位。

[0328] 本发明一些实施方案的药用组合物可通过本领域熟知的方法制备,例如通过常规混合、溶解、制粒、制糖衣丸剂、磨细(levitating)、乳化、包封、浮游或冻干方法。

[0329] 因此,用于本发明一些实施方案的用途的药用组合物可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给予途径。

[0330] 对于注射,药用组合物的活性成分可以水溶液,优选地以生理学上相容的缓冲液比如汉克氏液、林格氏液或生理缓冲盐水配制。对于经粘膜给予,在制剂中使用适合于渗透屏障的渗透剂。这种渗透剂通常为本领域已知的。

[0331] 对于口服给予,药用组合物可通过将活性化合物与本领域熟知的药学上可接受的载体组合而易于配制。这种载体使得药用组合物能够配制成为适用于由患者口服摄取的片剂、

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。合适的赋形剂具体地讲为填充剂比如糖类，包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨醇；纤维素制剂比如玉米淀粉、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比如聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。如果需要，可加入崩解剂，比如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或者海藻酸或其盐比如海藻酸钠。

[0332] 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。可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。

[0333] 可口服使用的药用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比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比如乳糖、粘合剂比如淀粉、润滑剂比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比如脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇中。另外，可加入稳定剂。所有用于口服给予的制剂应以适合于所选择的给予途径的剂量存在。

[0334] 对于颊给予，组合物可采取以常规方式配制的片剂或锭剂的形式。

[0335] 对于通过鼻吸入给予，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型式递送，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成为含有化合物与合适的粉末基质比如乳糖或淀粉的粉末混合物。

[0336] 本文描述的药用组合物可配制成为用于肠胃外给予，例如通过大剂量注射或连续输注。

[0337] 用于注射的制剂可以单位剂型，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，并可含有配制剂比如助悬剂、稳定剂和/或分散剂。

[0338] 用于肠胃外给予的药用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比如芝麻油或合成的脂肪酸酯类比如油酸乙酯、甘油三酯或脂质体。

[0339] 水性注射用混悬剂可含有提高混悬剂粘度的物质，比如羧甲基纤维素钠、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的物质。

[0340] 或者，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。

[0341] 本发明一些实施方案的药用组合物还可使用例如常规栓剂基质比如可可脂或其他甘油酯类以直肠组合物比如栓剂或保留灌肠剂配制。

[0342] 适合于在本发明的情况下使用的药用组合物包括其中活性成分以有效达到预期

目的的量包含的组合物。更具体地讲,治疗有效量意指有效预防、减轻或改善病理学症状或延长正在治疗的受试者的存活的活性成分的量。

[0343] 治疗有效量的确定很好地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公开。

[0344] 当指明“治疗量”时,待给予的本发明组合物的准确量可由医生考虑到患者(受试者)的年龄、体重、疾病状态,例如肿瘤大小、感染或转移的程度以及状况的个体差异来确定。通常可以说,包含本文描述的细胞的药用组合物可以 $10^4\text{-}10^9$ 个细胞/kg体重的剂量给予,包括那些范围内的所有整数值。

[0345] 例如,输注给接受者的细胞数目应多于 $1 \times 10^4/\text{Kg}$ 体重。输注给接受者的细胞数目应一般地在 $1 \times 10^3/\text{Kg}$ 体重- $1 \times 10^4/\text{Kg}$ 体重的范围内、 $1 \times 10^4/\text{Kg}$ 体重- $1 \times 10^5/\text{Kg}$ 体重的范围内、 $1 \times 10^4/\text{Kg}$ 体重- $1 \times 10^6/\text{Kg}$ 体重的范围内、 $1 \times 10^4/\text{Kg}$ 体重- $1 \times 10^7/\text{Kg}$ 体重的范围内、 $1 \times 10^4/\text{Kg}$ 体重- $1 \times 10^8/\text{Kg}$ 体重的范围内、 $1 \times 10^3/\text{Kg}$ 体重- $1 \times 10^5/\text{Kg}$ 体重的范围内、 $1 \times 10^4/\text{Kg}$ 体重- $1 \times 10^6/\text{Kg}$ 体重的范围内、 $1 \times 10^6/\text{Kg}$ 体重- $1 \times 10^7/\text{Kg}$ 体重的范围内、 $1 \times 10^5/\text{Kg}$ 体重- $1 \times 10^7/\text{Kg}$ 体重的范围内、 $1 \times 10^6/\text{Kg}$ 体重- $1 \times 10^8/\text{Kg}$ 体重的范围内或 $1 \times 10^6/\text{Kg}$ 体重- $1 \times 10^9/\text{Kg}$ 体重的范围内。根据一个具体的实施方案,输注给接受者的细胞数目应在 $1 \times 10^6/\text{Kg}$ 体重- $1 \times 10^8/\text{Kg}$ 体重的范围内。

[0346] 本发明一些实施方案的细胞组合物也可以这些剂量给予多次。细胞可通过使用在免疫疗法通常已知的输注技术来给予(参见例如Rosenberg等人, New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988)。用于特定患者的最佳剂量和治疗方案可由医学领域的技术人员通过监测患者的疾病体征并相应地调整治疗而易于确定。

[0347] 例如,活性成分(例如本发明一些实施方案的细胞)对病理学的影响可通过使用熟知的方法(例如ELISA、FACS等)监测生物样本中的标志物(例如激素、葡萄糖、肽、碳水化合物等)水平或通过使用熟知的方法(例如超声波、CT、MRI等)监测肿瘤大小来评估。

[0348] 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物测定估计。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。

[0349] 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物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。

[0350] 剂量可依使用的剂型和采用的给予途径而变化。确切的剂型、给予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, in "The Pharmacological Basis of Therapeutics" Ch. 1 p.1)。

[0351] 剂量和间隔可单独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给予途径。检测分析可用于确定血浆浓度。

[0352] 依待治疗病症的严重程度和反应性而定,给予可为单次或多次给予,治疗过程持续几天-几周或者直至实现治愈或实现疾病状态的减轻。

[0353] 当然,待给予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、给予方式、处方医生的判断等。

[0354] 根据本发明的一些实施方案,可将本发明的治疗药物连同被设计用于治疗病理学的其他药物一起提供给受试者[组合疗法(例如之前、同时或之后)]。

[0355] 在本发明的某些实施方案中,将本发明一些实施方案的细胞连同任何数目的以下相关治疗模式一起给予患者:包括但不限于用以下药物治疗,比如抗病毒药物(例如更昔洛韦、伐昔洛韦、阿昔洛韦、缬更昔洛韦、膦甲酸、西多福韦、马利巴韦、来氟米特)、化疗药物(例如抗肿瘤药物,比如但不限于烷化剂,包括例如环磷酰胺、白消安、氮芥或莫司汀(HN2)、乌拉莫司汀或尿嘧啶氮芥、美法仑、苯丁酸氮芥、异环磷酰胺、苯达莫司汀、亚硝脲类(Nitrosoureas)、卡莫司汀、洛莫司汀、链佐星、噻替派、铂、顺铂、卡铂、奈达铂、奥沙利铂、沙铂、四硝酸三铂、丙卡巴肼、六甲蜜胺、三氮烯类(达卡巴嗪、米托唑胺、替莫唑胺)、达卡巴嗪、替莫唑胺、马利兰、白舒非、氟达拉滨、二甲基马利兰或阿糖胞苷)、用于治疗MS的药物(例如那他珠单抗)、或用于治疗牛皮癣的药物(例如依法珠单抗)。

[0356] 在进一步的实施方案中,本发明一些实施方案的细胞可与化学疗法、放射、免疫抑制药物(例如环孢菌素、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤、霉酚酸酯和FK506)、抗体或其他免疫清除药物组合使用(下文进一步详细讨论)。

[0357] 在进一步的实施方案中,本发明一些实施方案的细胞组合物连同骨髓移植一起(例如之前,同时或之后)给予患者。

[0358] 在进一步的实施方案中,本发明一些实施方案的细胞组合物在使用例如化疗药物比如氟达拉滨、外束放射疗法(XRT)、环磷酰胺或抗体比如OKT3或CAMPATH的T细胞消除疗法之后给予患者。

[0359] 在另一个实施方案中,本发明的细胞组合物在B细胞消除疗法比如与CD20反应的药物例如Rituxan之后给予。

[0360] 组合疗法可增加本发明药物在所治疗受试者中的治疗效果。

[0361] 如果需要,本发明一些实施方案的组合物可以包装或分配器装置呈现,比如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,比如泡罩包装。包装或分配器装置可附有给药说明。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给予的批准形式。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明的病症,如以上进一步详述的那样。

[0362] 试剂盒可例如包含金属或塑料箔,比如泡罩包装。包装或分配器装置可附有给药说明。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给予的批准形式。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明的病症,如以上进一步详述的那样。

[0363] 根据一个实施方案,试剂盒进一步包含化疗药物(例如抗肿瘤药物,如上文详细讨论的那样)。

[0364] 根据一个实施方案,试剂盒进一步包含抗病毒药物(如上文详细讨论的那样)。

[0365] 本发明一些实施方案的一个方面提供一种在有需要的受试者中治疗疾病的方法，所述方法包括给予所述受试者治疗有效量的本发明一些实施方案的细胞群，从而治疗受试者。

[0366] 本发明一些实施方案的一个方面提供一种用于在有需要的受试者中治疗疾病的治疗有效量的本发明一些实施方案的细胞群。

[0367] 术语“治疗”指的是抑制、预防或阻止病理学(疾病、障碍或病症)的发展和/或引起病理学的减轻、缓解或消退。本领域的技术人员应该理解，各种方法学和测定可用于评价病理学的发展，并且类似地，各种方法学和测定可用于评价病理学的减轻、缓解或消退。

[0368] 本文使用的术语“受试者”包括哺乳动物，优选地为患有病理学的任何年龄或性别的人。

[0369] 病理学可为但不限于恶性疾病(癌症)、感染性疾病(例如病毒感染、细菌感染、真菌感染、原生动物感染或寄生虫感染)、变态反应和/或自身免疫性疾病。

[0370] 癌性疾病

[0371] 可通过本发明一些实施方案的方法治疗的恶性疾病(也称为癌症)可为任何实体或非实体肿瘤和/或肿瘤转移。

[0372] 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。

[0373] 根据一个实施方案，恶性疾病为血液恶性肿瘤。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、急性和淋巴细胞白血病、急性和淋巴细胞性前体B细胞白血病、急性和淋巴细胞性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]。

[0374] 根据一个具体的实施方案，恶性疾病为白血病、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、滑膜细胞癌或胰腺癌。

- [0375] 根据本发明的一些实施方案，病理学为实体肿瘤。
- [0376] 根据本发明的一些实施方案，病理学为肿瘤转移。
- [0377] 根据本发明的一些实施方案，病理学为血液恶性肿瘤。
- [0378] 根据本发明的一些实施方案，病理学为白血病或淋巴瘤。
- [0379] 可通过本发明一些实施方案的方法治疗的示例性恶性疾病列于以下表1和2中。
- [0380] 表1：采用tg-TCR转导的细胞和任选的预处理方案的临床应用
(改写自Fujiwara, Pharmaceuticals (2014), 7: 1049-1068)
- [0382] 表2：采用CAR转导的细胞和任选的预处理方案的临床应用
(改写自Fujiwara, Pharmaceuticals (2014), 7: 1049-1068)
- [0384] 根据一个具体的实施方案，恶性疾病为白血病、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、滑膜细胞癌和胰腺癌。
- [0385] 感染性疾病
- [0386] 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。
- [0387] 引起可按照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。
- [0388] 可按照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)引起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、埃博拉病毒感染和狂犬病。
- [0389] 根据一个具体的实施方案，病毒性疾病选自免疫缺陷病毒(HIV)、流感、巨细胞病毒(CMV)、T细胞白血病1型病毒(TAX)、丙型肝炎病毒(HCV)和乙型肝炎病毒(HBV)。
- [0390] 变态反应性疾病
- [0391] 变态反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。
- [0392] 自身免疫性疾病
- [0393] 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。
- [0394] 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) 。

[0395] 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) 15 (3):791; Tisch R and McDevitt HO. Proc Natl Acad Sci USA (1994) 18; 91(2): 437-438] 和强直性脊柱炎 [Jan Voswinckel 等人, Arthritis Res (2001) 3 (3): 189] 。

[0396] 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 (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) ; 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) 。

[0397] 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。

[0398] 自身免疫性皮肤疾病的实例包括但不限于自身免疫性大疱性皮肤病, 比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。

[0399] 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) 。

[0400] 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。

[0401] 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)。

[0402] 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)。

[0403] 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)。

[0404] 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(Gloddekk B.等人, Ann N Y Acad Sci 1997 Dec 29; 830:266)。

[0405] 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)。

[0406] 根据一个具体的实施方案,自身免疫性疾病选自1型糖尿病、多发性硬化症、类风湿性关节炎、乳糜泻和中风。

[0407] 如所提及的那样,本发明的细胞可得自任何细胞供体。因此,待治疗的受试者可为人受试者,而细胞可得自同源(例如自体)或非同源供体(例如就受试者而言为同种异体或异种异体的)。

[0408] 本文使用的术语“同源”细胞指的是与受试者或受试者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。

[0409] 本文使用的术语“非同源”细胞指的是与受试者或受试者基本上所有淋巴细胞基本上基因不相同的细胞,比如同种异体细胞或异种异体细胞。

[0410] 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相同或HLA不相同的(即呈现一种或多种不同HLA决定簇)。

[0411] 本文使用的术语“异种异体”指的是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异体的。

[0412] 本发明设想异种异体细胞源自多种物种。因此,根据一个实施方案,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)。

[0413] 异种异体来源(例如猪源)的细胞优选地得自已知没有人畜共患病比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。

[0414] 根据一个实施方案,细胞为与受试者非同源。

[0415] 根据一个实施方案,细胞为与受试者同种异体。

[0416] 根据一个实施方案,细胞为与受试者同源(例如自体)。

[0417] 根据本发明的一个实施方案,受试者为人,并且细胞来自人源(即非自体)。

[0418] 根据一个实施方案,受试者为人,并且细胞来自异种异体来源(例如猪源)。

[0419] 本领域已知的任何方法可用于获得用于移植的细胞。因此,例如免疫细胞(例如T细胞、B细胞、NK细胞、DC)可通过自供体收集外周血获得。收集外周血的方法为本领域熟知的,并且包括但不限于自供体取高达500-1000 ml的全血并收集在含有抗凝血剂(例如肝素或枸橼酸盐)的容器中,或者通过单采术,其为使个体的外周血通过装置,产生主要成分(例如单核细胞,比如淋巴细胞、单核细胞或树突状细胞),并使其他成分返回到受试者的循环的程序。或者,细胞可通过细胞的体外或离体培养获得。应该意识到,本发明的细胞可属于新鲜或冷冻(例如冷冻保存)制剂。

[0420] 依移植背景而定,为了促进植入细胞,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预处理受试者。

[0421] 当涉及预处理本发明的受试者时,本文使用的术语“亚致死”、“致死”和“超致死”指的是骨髓毒性和/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。

[0422] 根据本发明的一些实施方案,亚致死、致死或超致死预处理包括全身照射(TBI)、全淋巴照射(TLI,即所有淋巴结、胸腺和脾脏的暴露)、体分区照射(例如结肠、乳腺等的特定暴露)、清髓性预处理和/或非清髓性预处理,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,预处理包括任何以上描述的预处理方案的组合(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)。

[0423] 根据一个实施方案,TBI包含在以下范围内的单次或分次照射剂量: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。

[0424] 根据一个具体的实施方案,TBI包含在1-7.5 Gy范围内的单次或分次照射剂量。

[0425] 根据一个实施方案,预处理步骤通过在超致死条件下,比如在清髓性条件下预处理受试者实现。

[0426] 或者,预处理步骤可通过在致死或亚致死条件下预处理受试者来实现,比如通过在myeloreductive条件或非清髓性条件下预处理受试者。

[0427] 根据一个实施方案,预处理步骤通过用清髓性药物(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)预处理受试者来实现。

[0428] 可用于预处理受试者的预处理物质的实例包括(非限制性地)照射、药物和耐受性诱导细胞(如本文描述的那样)。

[0429] 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)。

[0430] 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、美法仑和噻替派。

[0431] 另外或者备选地,方法可进一步包括在移植细胞之前、同时或之后用免疫抑制方案预处理受试者。

[0432] 合适类型的免疫抑制方案的实例包括给予免疫抑制药物和/或免疫抑制性照射。

[0433] 用于选择和给予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; Dantall J.等人 1998. Lancet 351, 623)。

[0434] 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(比如CCI-779、RAD001、AP23573)。这些药物可单个或组合给予。

[0435] 本文使用的术语“约”指的是±10%。

[0436] 术语“包含”、“包涵”、“涵盖”、“包括”、“具有”及其词形变化形式意指“包括但不限

于”。

[0437] 术语“由……组成”意指“包括并限于”。

[0438] 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。

[0439] 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。

[0440] 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,范围的描述比如1-6应认为已具体公开子范围比如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。

[0441] 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”在本文可互换使用,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。

[0442] 本文使用的术语“方法”指的是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。

[0443] 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。

[0444] 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。

[0445] 一种具有中央型记忆T淋巴细胞(Tcm)表型的分离的细胞,所述细胞为耐受性诱导细胞并能够在移植后归巢至淋巴结,所述细胞被转导以表达包含T细胞受体信号传导模块的细胞表面受体。

[0446] 2. 一种具有中央型记忆T淋巴细胞(Tcm)表型的分离的细胞,所述细胞为耐受性诱导细胞并能够在移植后归巢至淋巴结,所述细胞被转导以表达嵌合抗原受体(CAR)。

[0447] 3. 一种具有中央型记忆T淋巴细胞(Tcm)表型的分离的细胞,所述细胞为耐受性诱导细胞并能够在移植后归巢至淋巴结,所述细胞被转导以表达嵌合抗原受体(CAR),其中所述CAR包含共刺激结构域。

[0448] 4. 一种具有中央型记忆T淋巴细胞(Tcm)表型的分离的细胞,所述细胞为耐受性诱导细胞并能够在移植后归巢至淋巴结,所述细胞被转导以表达嵌合抗原受体(CAR),其中所述CAR包含至少两个共刺激结构域。

[0449] 5. 一种产生实施方案1-4中任何一项的分离的细胞的方法,所述方法包括用编码所述包含T细胞受体信号传导模块的细胞表面受体或所述嵌合抗原受体(CAR)的多核苷酸

转导具有中央型记忆T淋巴细胞(Tcm)表型的细胞,所述细胞为耐受性诱导细胞并能够在移植后归巢至淋巴结。

[0450] 6. 实施方案5的方法,其中所述方法离体实现。

[0451] 7. 实施方案5的方法,其中所述细胞用包含所述多核苷酸的载体转导。

[0452] 8. 实施方案5或7的方法,其中所述多核苷酸编码转基因T细胞受体(tg-TCR)或嵌合抗原受体(CAR)。

[0453] 9. 实施方案1-4中任何一项的分离的细胞或实施方案5-8中任何一项的方法,其中所述具有中央型记忆T淋巴细胞(Tcm)表型的细胞为抗第三方细胞。

[0454] 10. 实施方案1的分离的细胞或实施方案5的方法,其中所述细胞表面受体包含转基因T细胞受体(tg-TCR)或嵌合抗原受体(CAR)。

[0455] 11. 实施方案2-4或10中任何一项的分离的细胞或者实施方案5或10的方法,其中所述CAR包含为抗体或抗原结合片段的抗原结合结构域。

[0456] 12. 实施方案11的分离的细胞或方法,其中所述抗原结合片段为Fab或scFv。

[0457] 13. 实施方案2-4或10中任何一项的分离的细胞或者实施方案5或10的方法,其中所述CAR包含CD3 ζ 。

[0458] 14. 实施方案2-4或10中任何一项的分离的细胞或者实施方案5或10的方法,其中所述CAR包含至少一种选自CD28、CD134/OX40、CD137/4-1BB、Lck、ICOS和DAP10的共刺激结构域。

[0459] 15. 实施方案2-4或10中任何一项的分离的细胞或者实施方案5或10的方法,其中所述CAR包含至少两种选自CD28、CD134/OX40、CD137/4-1BB、Lck、ICOS和DAP10的共刺激结构域。

[0460] 16. 实施方案1-4或9-15中任何一项的分离的细胞或者实施方案5-15中任何一项的方法,其中所述细胞表面受体或所述CAR结合选自肿瘤抗原、病毒抗原、细菌抗原、真菌抗原、原生动物抗原、寄生虫抗原、变态反应抗原和自身免疫性抗原的抗原。

[0461] 17. 实施方案16的分离的细胞或方法,其中所述肿瘤抗原与实体瘤相关。

[0462] 18. 实施方案16的分离的细胞或方法,其中所述肿瘤抗原与血液恶性肿瘤相关。

[0463] 19. 实施方案16-18中任何一项的分离的细胞或方法,其中所述肿瘤抗原选自CD19、CD20、CD22、ROR1、间皮素、CD33/IL3Ra、c-Met、PSMA、糖脂F77、EGFRvIII、Her2、GD2、gp100、p53、癌胚抗原(CEA)、MART-1、端粒酶逆转录酶(TERT)、Caudin-6、受体酪氨酸蛋白激酶的胞外结构域(ErbB2-ECD)、受体酪氨酸蛋白激酶的胞内结构域(ErbB2-ICD)、组蛋白H1.2、组蛋白H4、酪氨酸酶、甲胎蛋白(AFP)、MAGE A3、AIM-2a、AFP、ART-4、CLCA2、Cyp-B、EphA2、hTERT、iCE、FGF-5、G250、GnT-V、HST-2(FGF-6)、Livin(ML-IAP)、MUC1、MUC2、PRAME、PSMA、P15、RAGE、RU1、RU2、SART-1、SART-3、SART-2、SOX10、存活素、存活素-2Bg、TRG、Neo-PAP、CAMEL和NY-ESO-1。

[0464] 20. 实施方案16的分离的细胞或方法,其中所述病毒抗原属于选自以下的病毒:人免疫缺陷病毒(HIV)、流感、巨细胞病毒(CMV)、T细胞白血病1型病毒(TAX)、丙型肝炎病毒(HCV)、流感病毒、狂犬病毒、疱疹病毒、乳头状瘤病毒、肝炎病毒、水痘病毒、脑炎病毒、巨细胞病毒、埃博拉病毒、人嗜T淋巴细胞病毒(HTLV)、风疹病毒、麻疹病毒、狂犬病毒、淋巴细胞脉络丛脑膜炎(LCM)、轮状病毒、腮腺炎病毒、腺病毒、3型腺病毒(HADV-3)、5型腺病毒

(HADV-5)、腺伴随病毒6 (AAV6)、腺伴随病毒8 (AAV8)、BK多瘤病毒 (BKV)、念珠菌、EB病毒 (EBV)、人疱疹病毒 (HHV)、水痘-带状疱疹病毒 (VZV) 和乙型肝炎病毒 (HBV)。

[0465] 21. 实施方案16的分离的细胞或方法,其中所述自身免疫性抗原与选自1型糖尿病、多发性硬化症、狼疮、类风湿性关节炎、克罗恩病、乳糜泻和中风的疾病相关。

[0466] 22. 实施方案1-4或9-15中任何一项的分离的细胞或者实施方案5-15中任何一项的方法,其中所述细胞进一步经基因修饰以抑制所述细胞中至少一种内源性免疫检查点基因的表达。

[0467] 23. 实施方案22的分离的细胞或方法,其中所述免疫检查点基因选自PD或CTLA基因。

[0468] 24. 实施方案5-15中任何一项的方法,其中所述具有中央型记忆T淋巴细胞 (Tcm) 表型的细胞为耐受性诱导细胞并能够在移植后归巢至淋巴结,所述细胞通过包括以下的方法产生:

[0469] (a) 在存在IL-21的情况下使外周血单核细胞 (PBMC) 与一种或多种第三方抗原接触,以致使得能够富集抗原反应性细胞;和

[0470] (b) 在存在IL-21、IL-15和IL-7的情况下培养所述自步骤(a)生成的细胞,以致使得包含所述中央型记忆T淋巴细胞 (Tcm) 表型的抗第三方细胞能够增殖,从而产生具有Tcm 表型的细胞,所述细胞为耐受性诱导细胞并能够在移植后归巢至淋巴结。

[0471] 25. 实施方案24的方法,进一步包括:

[0472] (c) 将所述自步骤(b)生成的细胞分离成单细胞悬液。

[0473] 26. 实施方案24的方法,进一步包括在步骤(a)之后和在步骤(b)之前选择激活的细胞。

[0474] 27. 实施方案26的方法,其中所述选择激活的细胞通过选择CD137+和/或CD25+细胞来实现。

[0475] 28. 实施方案1-4中任何一项的分离的细胞或实施方案24的方法,其中所述Tcm表型包含CD3⁺、CD8⁺、CD62L⁺、CD45RA⁻、CD45RO⁺特征。

[0476] 29. 实施方案28的分离的细胞或方法,其中所述分离的细胞的至少50%为CD3+CD8+细胞,其中CD3+CD8+细胞的至少50%具有所述特征。

[0477] 30. 一种包含实施方案1-4、9-23或28-29中任何一项的分离的细胞的细胞群。

[0478] 31. 一种包含实施方案30的细胞群和药用活性载体的药用组合物。

[0479] 32. 一种在有需要的受试者中治疗疾病的方法,所述方法包括给予所述受试者治疗有效量的实施方案30的细胞群,从而治疗所述受试者。

[0480] 33. 一种用于在有需要的受试者中治疗疾病的治疗有效量的实施方案30的细胞群。

[0481] 34. 实施方案32的方法或实施方案33的用于用途的治疗有效量,其中所述疾病选自恶性疾病、病毒性疾病、细菌性疾病、真菌性疾病、原生动物性疾病、寄生虫病、变态反应性疾病和自身免疫性疾病。

[0482] 35. 实施方案34的方法或用于用途的治疗有效量,其中所述恶性疾病为实体肿瘤或肿瘤转移。

[0483] 36. 实施方案34的方法或用于用途的治疗有效量,其中所述恶性疾病为血液恶性

肿瘤。

[0484] 37. 实施方案36的方法或用于用途的治疗有效量,其中所述血液恶性肿瘤包括白血病或淋巴瘤。

[0485] 38. 实实施方案34-36中任何一项的方法或用于用途的治疗有效量,其中所述恶性疾病选自白血病、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、滑膜细胞癌和胰腺癌。

[0486] 39. 实实施方案34的方法或用于用途的治疗有效量,其中所述病毒性疾病选自免疫缺陷病毒(HIV)、流感、巨细胞病毒(CMV)、T细胞白血病1型病毒(TAX)、丙型肝炎病毒(HCV)和乙型肝炎病毒(HBV)。

[0487] 40. 实实施方案34的方法或用于用途的治疗有效量,其中所述自身免疫性疾病选自1型糖尿病、多发性硬化症、类风湿性关节炎、狼疮、乳糜泻和中风。

[0488] 41. 实实施方案32或34-40中任何一项的方法或实施方案33-40中任何一项的用于用途的治疗有效量,其中所述细胞群为与受试者非同源。

[0489] 42. 实实施方案32或34-40中任何一项的方法,进一步包括在所述给予之前,于亚致死、致死或超致死预处理方案下预处理所述受试者。

[0490] 43. 实实施方案33-40中任何一项的用途的治疗有效量,进一步包括亚致死、致死或超致死预处理方案。

[0491] 44. 实实施方案42的方法或实施方案43的用于用途的治疗有效量,其中所述亚致死、致死或超致死预处理选自全身照射(TBI)、体分区照射、清髓性预处理、非清髓性预处理、共刺激性阻断、化疗药物和抗体免疫疗法。

[0492] 45. 实实施方案32的方法,其中所述给予通过选自气管内、支气管内、肺泡内、静脉内、腹膜内、鼻内、皮下、髓内、鞘内、脑室内、心脏内、肌内、浆膜内、粘膜内、经粘膜、经鼻、直肠和肠道的途径实现。

[0493] 46. 实实施方案32或34-45中任何一项的方法或者实施方案33-45中任何一项的用于用途的治疗有效量,其中所述受试者为人受试者。

实施例

[0494] 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。

[0495] 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。这种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 and 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., and Higgins S.J., eds. (1985); “Transcription and Translation” Hames, B.D., and 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) and “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本文通过参照结合。

[0496] 一般材料和实验程序

[0497] 动物

[0498] 雌性6-12周龄的BALB/c、CB6 (F1) 和C57BL/6小鼠得自Harlan Laboratories或生长于Weizmann Institute of Science的动物设施。将所有小鼠保持在小笼中(每笼5只动物)并喂食无菌食物和酸水。所有研究得到了Weizmann Institute of Science Institutional Animal Care and Use Committee的批准。

[0499] 宿主非反应性小鼠抗第3方Tcm的制备

[0500] 如先前描述的那样制备抗第三方Tcm [Ophir E等人, Blood (2010) 115: 2095-2104]。简而言之, 在细胞因子剥夺下将供体小鼠的脾细胞针对经照射的第三方脾细胞培养60小时。随后, 使用磁性粒子(BD Pharmingen)正选择CD8⁺细胞并在无Ag环境中培养。每隔一天加入rhIL-15 (20 ng/mL; R&D Systems)。为了在培养结束时获得纯化的群体(第16天), 通过磁性激活细胞分选针对CD62L表达正选择Tcm细胞[MACS, Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany]。

[0501] 骨髓移植

[0502] 1. 自Balb/c或C57BL/6小鼠收获长骨[裸鼠(Nude)或野生型(WT)]。通过冲洗或研磨骨头来提取骨髓以获得单细胞悬液。通过磁性激活细胞分选使自WT小鼠收获的一些制剂经受T细胞耗尽。计数骨髓并使其达到正确的浓度, 并然后静脉内注射到小鼠尾静脉或眶内。

[0503] 2. 在移植之前, 使小鼠经受预处理方案。减低强度预处理(RIC)包括使小鼠经受亚致死照射剂量(即接受者小鼠可自发恢复的照射剂量)或使小鼠经受低剂量的清髓性(例如白消安)或非清髓性(例如环磷酰胺)药物。使用 γ 射线机或X射线(例如XRAD-320)给予全身照射(TBI)。药物通过i.v.、s.c.、i.p.或口服给予。

[0504] OT1+细胞移植

[0505] 自OT-1转基因小鼠收获淋巴结和/或脾脏。小鼠为携带CD45.1基因的OT-1小鼠和/或在RAG-/-突变背景下。或者,OT-1小鼠为F1-OT1小鼠,宿主XOT-1小鼠的后代,可用于消除同种异体现象。创建单细胞悬液,并然后通过磁性激活细胞分选经受T细胞纯化[MACS, Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany]。经FACS测试生成的OT-1 T细胞群的纯度。然后将细胞作为“新鲜”细胞注射或者离体培养以产生如以上描述的Tcm细胞,即通过第三方激活来自卵清蛋白表达小鼠的经照射的脾细胞。然后如本文描述的那样注射OT-1 Tcm细胞。

[0506] 流式细胞术分析

[0507] 使用改进的Becton Dickinson FACScan实施荧光激活细胞分选(FACS)分析。细胞用对V α 2、V β 5、H2Dd、H2Kb、CD45.1、CD45.2、CD8a、CD4、CD25、CD69、CD19特异性的标记抗体染色(Biolegend; BD; Miltenyi)。

[0508] CTL活性测定(^{51}Cr 测定)

[0509] 处死小鼠,收获脾脏和LN并选择CD8 $^+$ 细胞(并且负选择 H-2D d 以排除‘Tcm’)。以铬释放测定法测试了这些首次实验的HTC的C3H (H-2 k) 或BALB/c (H-2 d) 靶标的杀伤能力。将用作靶细胞的BALB/c和C3H脾细胞用2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 伴刀豆球蛋白A (Sigma, St. Louis, MO) 预处理48小时,并暴露于70 μCi ^{51}Cr (Perkin Elmer, Wellesley, MA) 1小时。自C57BL/6小鼠的CD8+选择的细胞制备效应细胞,并在含有IL-2 (20 U/ml) 的96孔板以每种稀释度重复12次对BALB/c或C3H脾细胞以不同稀释度温育6天。第6天,将滴定数目的效应细胞和 5×10^3 个 ^{51}Cr 标记的靶标在V形底板中以各种效应物/靶标(E:T)比率混合。以4小时 ^{51}Cr 释放测定测量细胞毒活性。特异性溶解的百分数计算为(实验释放-自发释放)/(最大释放-自发释放) $\times 100$ 。培养基中单独培养的或用1% SDS溶解的靶细胞的 ^{51}Cr 释放分别定义为自发释放或总释放。

[0510] 外周血单核细胞(PBMC)

[0511] 通过Ficoll密度梯度离心自患者和健康志愿者的全血分离PBMC。当指明时,细胞通过如先前描述的血清学方法按I类HLA分类[Manual of Tissue Typing Techniques. Washington DC, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH DHEW Publication 76-545, 1976, 第22页]。

[0512] 树突状细胞产生

[0513] 通过塑料贴壁分离单核细胞并使用3 ml补充有1%人血清和青霉素/链霉素+GM-CSF (800 IU/ml) 和IL-4 (20 ng/ml) 的Cellgro DC培养基(Peprotech, Hamburg, Germany) 在6孔板中进行培养。培养48小时后,加入1.5 ml培养基(1600 IU/ml的+GM-CSF和20 ng/ml的IL4)。24小时后,收获非贴壁细胞,并将大细胞进行计数(大多数为未成熟DC),重悬浮于含有GM-CSF 800 IU/ml、IL-4 20 ng/ml、10 ng/ml来自大肠杆菌O55:B5的LPS (Sigma, Deisenhofen, Germany) 和IFN γ (Peprotech, 100 IU/ml) 的新鲜培养基中,并以约10⁶ DC每孔以2 ml接种且温育过夜。第二天,弃去非贴壁细胞,并在冰上温育20分钟后使用冷的PBS/1% HS轻轻地去除贴壁DC。对由成熟DC组成的大细胞进行计数。用30 Gy照射细胞以避免生长少数潜在污染的NK或记忆T细胞,并然后用于T细胞刺激。

[0514] 自PBMC分离首次实验的CD8 T细胞

[0515] 按照制造商的说明书,使用CD8负选择试剂盒(Miltenyi, Bergisch Gladbach,

Germany), 通过初始负选择分离首次实验的CD8 T细胞。然后使用CD45R0-珠和在LD柱上耗尽经历抗原的CD8+ T细胞。

[0516] 抗第3方中央型记忆人CD8 T细胞的产生

[0517] 分离首次实验的CD8 T细胞并将其重悬浮于补充有IL-21 (Peprotech, 30 ng/ml) 的T细胞培养基中。将经照射的DC以1:4 DC:T细胞比率与 4×10^5 个T细胞加入到48孔板的每孔中。每孔的总容量为500 μ l。

[0518] 在培养开始后72小时, 加入500 μ l含有IL-7和IL-15 (Peprotech, 5 ng/ml最终浓度) 的T细胞培养基, 并如在结果部分中概述的那样随后每2-3天喂养细胞。

[0519] 统计分析

[0520] 存活数据的分析使用Kaplan-Meier曲线(对数秩检验)实施。使用Student t检验进行平均值的比较。

[0521] 实施例1

[0522] MHC错配Tcm在同源骨髓环境下于宿主小鼠中存活并发挥特异性否决活性

[0523] 考虑到同源骨髓移植(BMT)即使在致死全身照射(TBI)的情况下给予在人中远比同种异体BMT更安全, 本发明人首先试图确定过继转移的F1-Tcm细胞在连同同源TDBMT一起输注时是否在宿主抗供体HTC的攻击下存活(图1A-B)。如在图2A-B可见的那样, 在移植后60天时, F1-Tcm持续存在于外周血中。Tcm细胞构成总CD8+部分的约13%±10 (数据未显示)。接下来, 为了评估Tcm诱导野生型多克隆HTC群内抗原特异性克隆缺失的能力并验证其余的HTC保留其功能性, 使用铬释放杀伤测定法。结果显示, 来自Tcm处理小鼠的H2^bCD8+HTC呈现H-2^d靶标的杀伤显著减少并且保留H-2^k靶标的杀伤能力, 而未用Tcm治疗的小鼠(即单独BM组)对两种细胞类型呈现相似的杀伤水平(图3)。这些结果表明Tcm对多克隆HTC群发挥特异性否决活性并证实未由于Tcm缺失的克隆保留其功能性。随后, 在用减低强度预处理(RIC)预处理的小鼠中重复这些实验, RIC更适合于临床实施。因此, 在经5.5 Gy TBI亚致死照射的Balb/c小鼠中的研究得出类似结果(图4), 该小鼠注射同源T细胞耗尽的骨髓(TDBMT)和同种异体(Balb×Black) F1 Tcm(在图1C中说明)。Tcm细胞在这些小鼠的外周血中存在超过15个月(此时实验终止, 数据未显示)。因此, MHC错配Tcm的存活可在非常安全的程序下诱导, 该程序包括用亚致死5.5 Gy TBI和自体BMT预处理。

[0524] 实施例2

[0525] MHC错配Tcm在不存在骨髓移植物的情况下于宿主小鼠中存活

[0526] 鉴于以上数据, 评价了Tcm细胞在不存在BM的情况下单独诱导耐受性的能力。这种方案的范围会大得多。具体地讲, 通过在安全预处理下单独给予抗第3方Tcm细胞来诱导免疫耐受性不仅对于免疫受损个体而言具有价值, 而且可能允许治疗非恶性血液疾病(例如贫血和地中海贫血)、自身免疫性疾病, 并可为给予细胞疗法提供平台。首先, 本发明人试图定义F1来源的Tcm细胞植入的最小照射剂量, 以建立可以测试宿主耐受性诱导的模型。为此目的, 使Balb/c小鼠在有和没有过继转移CB6 F1-Tcm细胞的情况下暴露于一系列亚致死预处理剂量。分析整个外周血的H2^{db}阳性Tcm细胞, 显示Tcm可被检测到的最小照射剂量(即其中Tcm细胞不被排斥)为5.5 Gy TBI(图5)。因此, 测试了完全同种异体C57BL/6来源的Tcm在亚致死TBI剂量5.5 Gy下存活的可持续性(如在图1C中描绘的那样)。该实验旨在验证同种异体来源的细胞不诱导GVHD, 并且抗供体T细胞的缺失不是通过同种异体反应性而是通

过否决活性介导。此外,一旦转变成人并且为了产生“现成”耐受性诱导Tcm,细胞将最可能源自同种异体的不匹配的来源。结果显示,C57BL/6来源的同种异体Tcm能够在经5.5 Gy照射的Balb/c宿主体内存活(如在图1C中描绘的那样),在外周血中比在接受CB6 F1 Tcm的小鼠中呈现略低的Tcm百分数(图6A-B)。该结果可归因于Tcm细胞的非常缓慢的排斥过程。尽管Tcm细胞在血液中持续存在超过1年,但在注射后头几个月其数目的减少与在铬释放测定中检测到的抗宿主克隆的消除一起,强烈提示Tcm诱导外周耐受性。

[0527] 因此,Tcm的单独应用可用于创建用于给予治疗比如细胞疗法的机会窗口,至少几个月。

[0528] 实施例3

[0529] MHC错配Tcm支持来自相同供体的细胞的过继转移

[0530] 为了检验Tcm细胞可用于过继细胞疗法的假设,本发明人采用携带针对卵清蛋白肽的TCR的转基因OT1小鼠。在该情况下使用OT1转基因细胞的动机源自这样的想法,即这些细胞可用作称为供体淋巴细胞输注(DLI)的细胞疗法的模型,其中所述供体淋巴细胞输注(DLI)具有整个供体T细胞群或者具有针对病毒或肿瘤抗原的抗原特异性T细胞。

[0531] 首先,在Tcm的初始过继转移后90天,将首次实验的CD8⁺OT1⁺CD45.1⁺ T细胞输注到Tcm嵌合小鼠体内。主要目的为确定存活的Tcm群是否可促进新输入的同种异体细胞的植入。在注射首次实验的Tg细胞之前,通过FACS分析嵌合小鼠中的Tcm群。因此,分别接受了C57BL/6 Tcm或CB6-Tcm的2/5和9/11小鼠保持了其Tcm群(图6A-B)。

[0532] 这些小鼠在移植后第90天用2 Gy TBI进一步预处理(为了耗尽一些T细胞以允许引入新的T细胞),并然后对小鼠输入 2×10^6 个OT1细胞(H-2^b)。有趣的是,当在第120天(OT1细胞移植后30天)评估时,OT1细胞仅能在移植之前呈现出Tcm群的那些小鼠中检测到(图7)。这些初步结果显示在呈现Tcm群的小鼠中可接受添加来自相同供体来源的细胞,使用转基因OT-1细胞如下进一步证实:CD8+OT-1细胞与Tcm 在第0天一起移植,以防止需要进行二次预处理(先前在第90天使用2 Gy TBI),并且在细胞输入后于不同时间点监测到外周血中OT1细胞的存在。

[0533] 如在图8中显示的那样,该实验的结果说明:

[0534] 1. C57BL/6 Tcm以及(BalbxC57BL) F1 Tcm可持续存在于同种异体接受者。

[0535] 2. 当共注射时,C57BL/6 Tcm可赋予基于C57BL/6背景(OT-1+CD45.1+RAG-)孕育的CD8+OT-1首次实验的细胞以保护,而OT-1细胞自行退出循环。

[0536] 3. 表达C57BL/6 (H-2^b) 小鼠的MHC单倍体型的CB6 (F1) Tcm也可赋予OT-1幼稚细胞保护。

[0537] 实施例4

[0538] 自OT-1小鼠细胞制备的抗第三方Tcm否决细胞的植入和体内存活

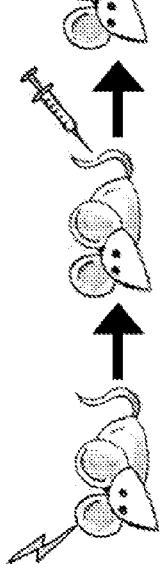
[0539] 在用减低强度预处理(RIC)预处理的小鼠中实施实验,RIC适合于临床实施。因此,经5.5 Gy TBI亚致死照射的Balb/c小鼠用来自OT-1小鼠来源的不同浓度的非同源Tcm细胞注射(在图9中说明)。Tcm细胞在这些小鼠的外周血中持续存在至少30天。因此,在安全RIC程序下可诱导MHC错配Tcm细胞的存活。

[0540] 尽管本发明已连同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,旨在包括落入附加权利要求的精神

和广泛范围内的所有这种备选方案、修改和变化。

[0541] 该说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请本文以其全部结合到说明书中，至好像每一个单个出版物、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，该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。在一定程度上使用了章节标题，但其不应解释为必然的限制。

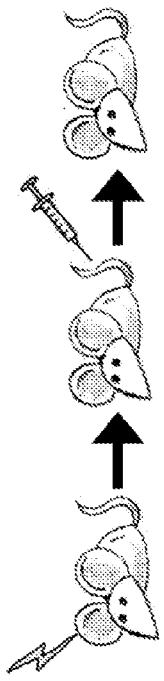
图 1A C57BL/6 同源模型



TBI 10 Gy
C57BL/6
宿主
注射含有 5×10^6
CB6-F1 抗第 3 方
Tcm 的 5×10^6
C57BL/6-Nude BM

第-1 天	第 0 天	第 30、60、90 天	第-1 天	第 0 天	第 30、60、90 天
TBI 10 Gy C57BL/6 宿主	注射含有 5×10^6 CB6-F1 抗第 3 方 Tcm 的 5×10^6 C57BL/6-Nude BM	外周血的嵌合 现象检查和 用于铬测定 的 HTC 分离	TBI 8 Gy 或 5.5 Gy Balb/c 宿主	注射含有 5×10^6 CB6-F1 抗第 3 方 Tcm 的 5×10^6 Balb/c-Nude BM	外周血的嵌合 现象检查和 用于铬测定 的 HTC 分离

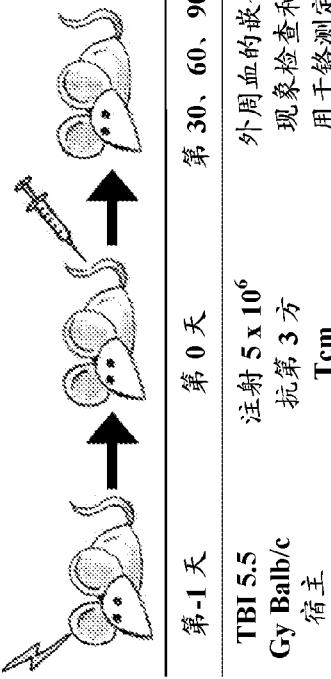
图 1B Balb/c 同源模型



TBI 8 Gy
或
5.5 Gy Balb/c
宿主
注射含有 5×10^6
CB6-F1 抗第 3 方
Tcm 的 5×10^6
Balb/c-Nude BM

图 1C

在没有 BM 的情况下 Tcm 诱导的耐受性



TBI 5.5 Gy
Balb/c
宿主
注射 5×10^6
抗第 3 方
Tcm

图 2A
BM + F1-Tcm 治疗的小鼠

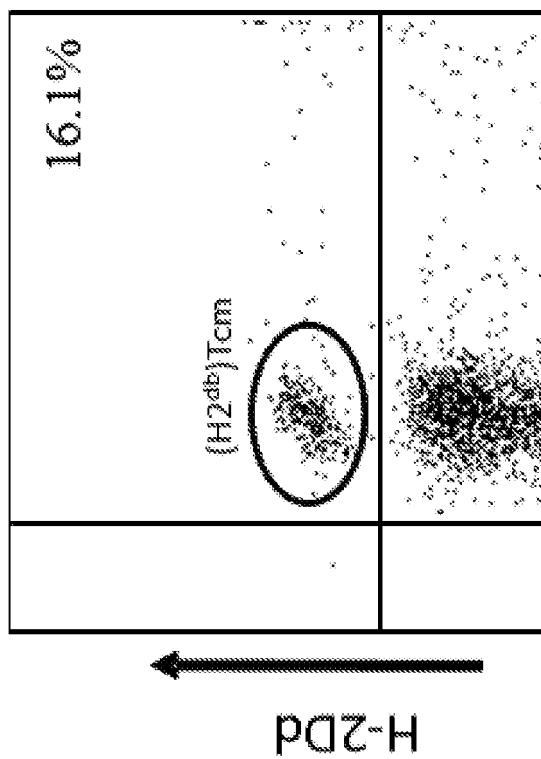
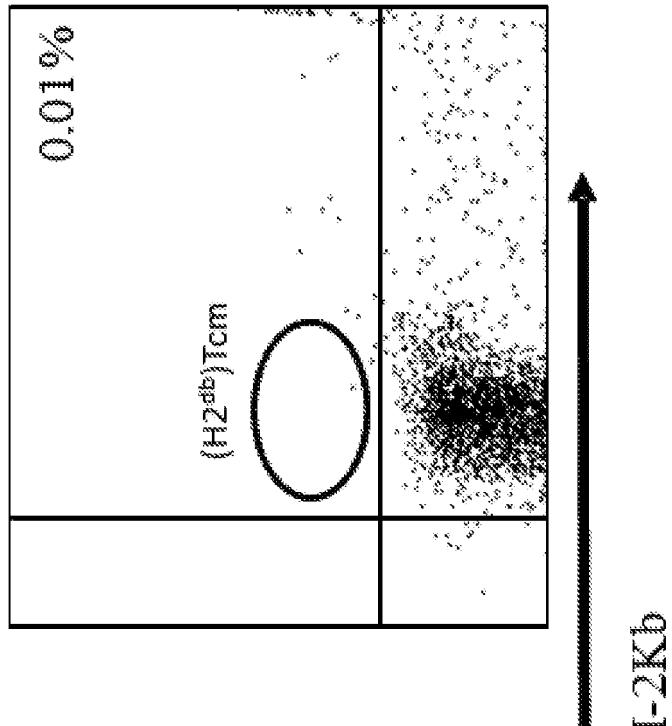


图 2B
单独 BM



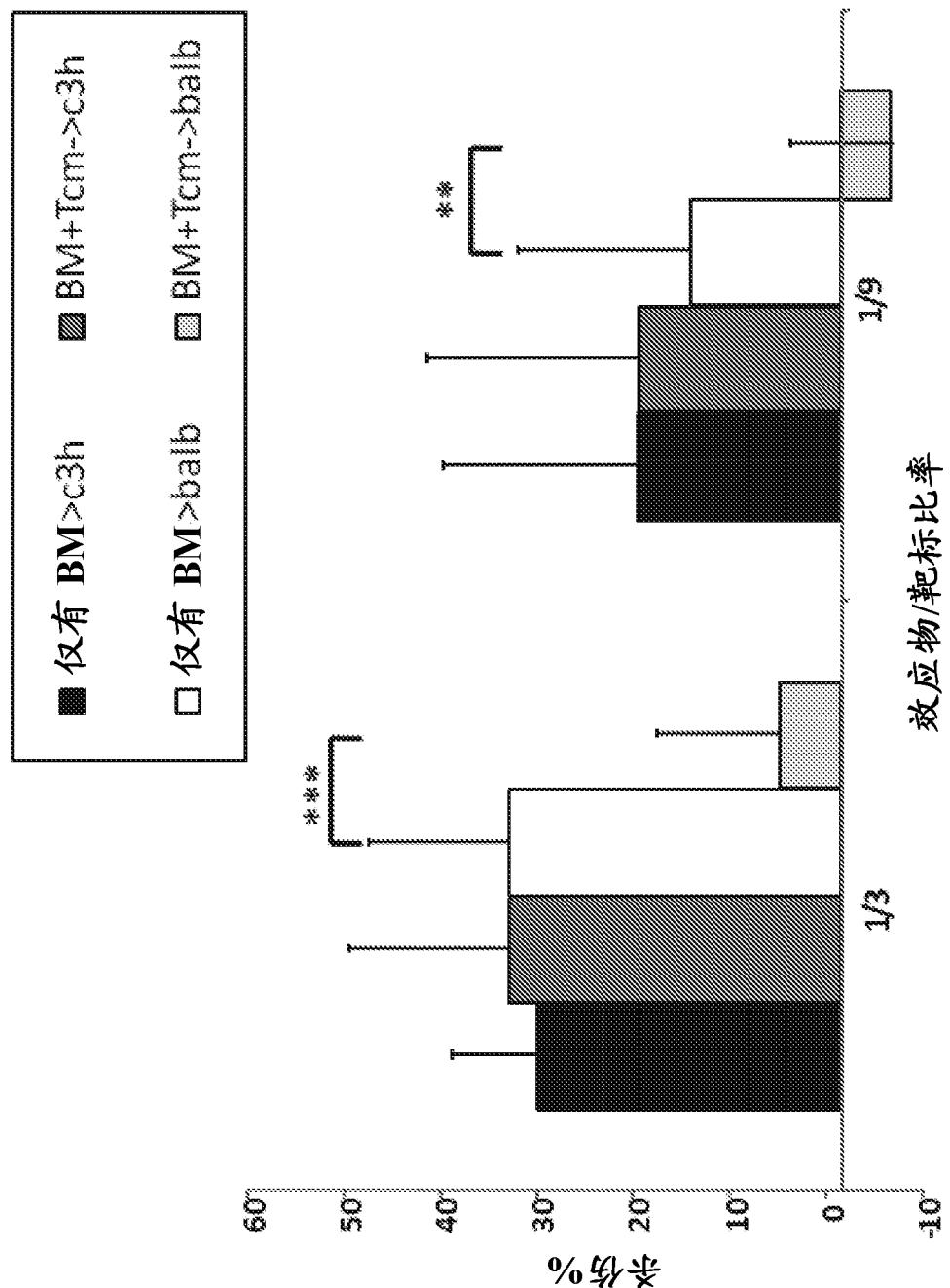
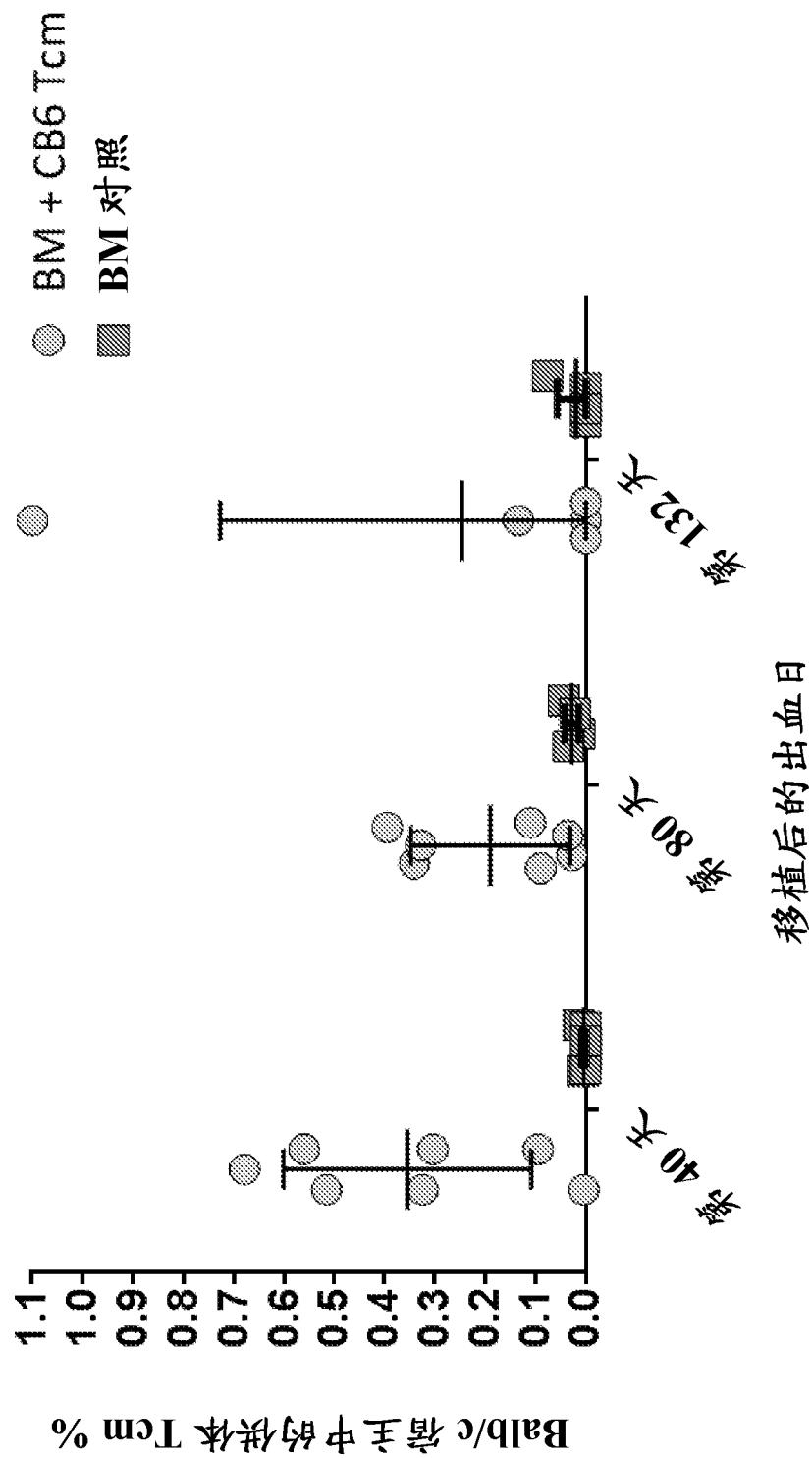


图 3



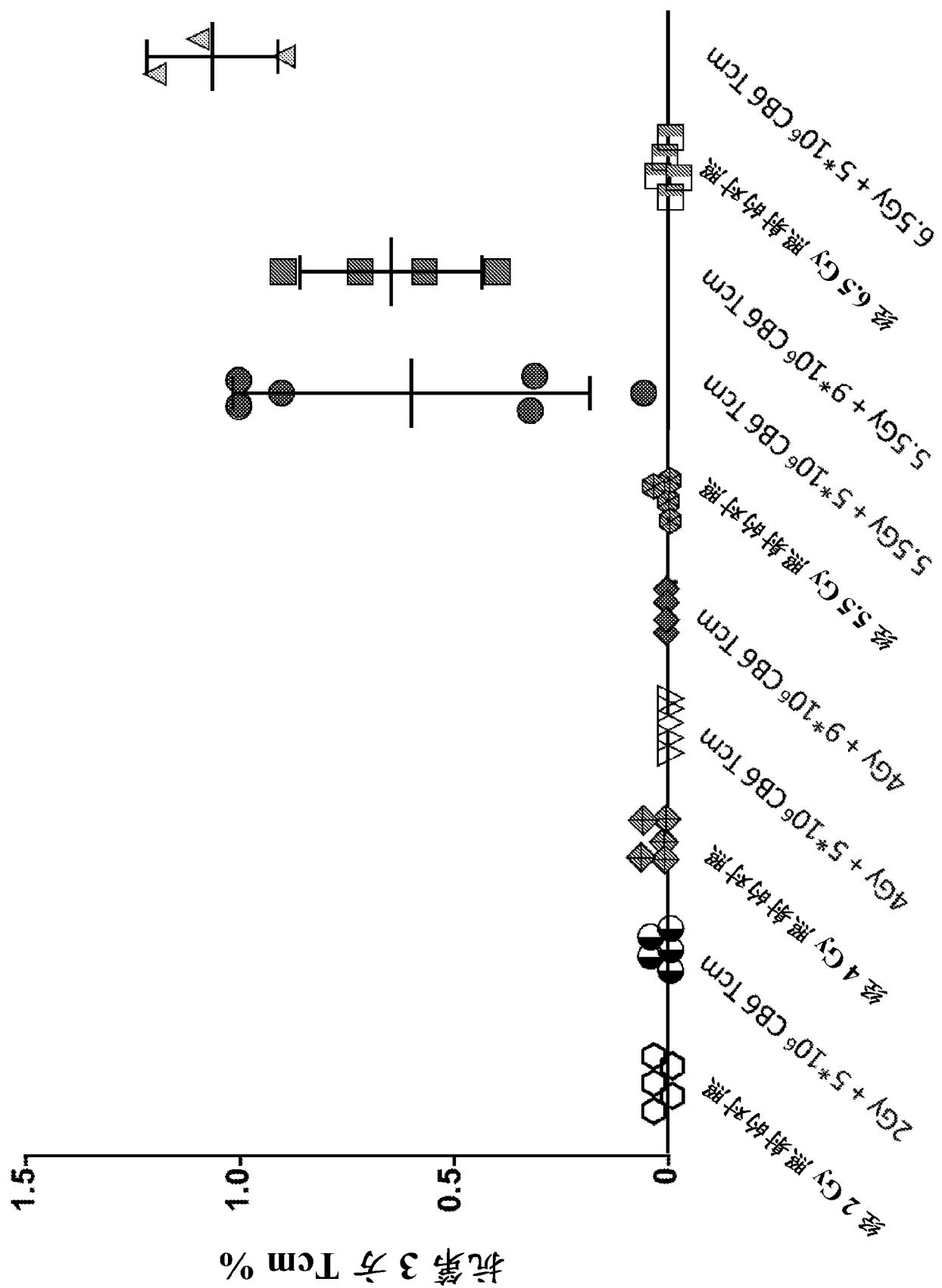
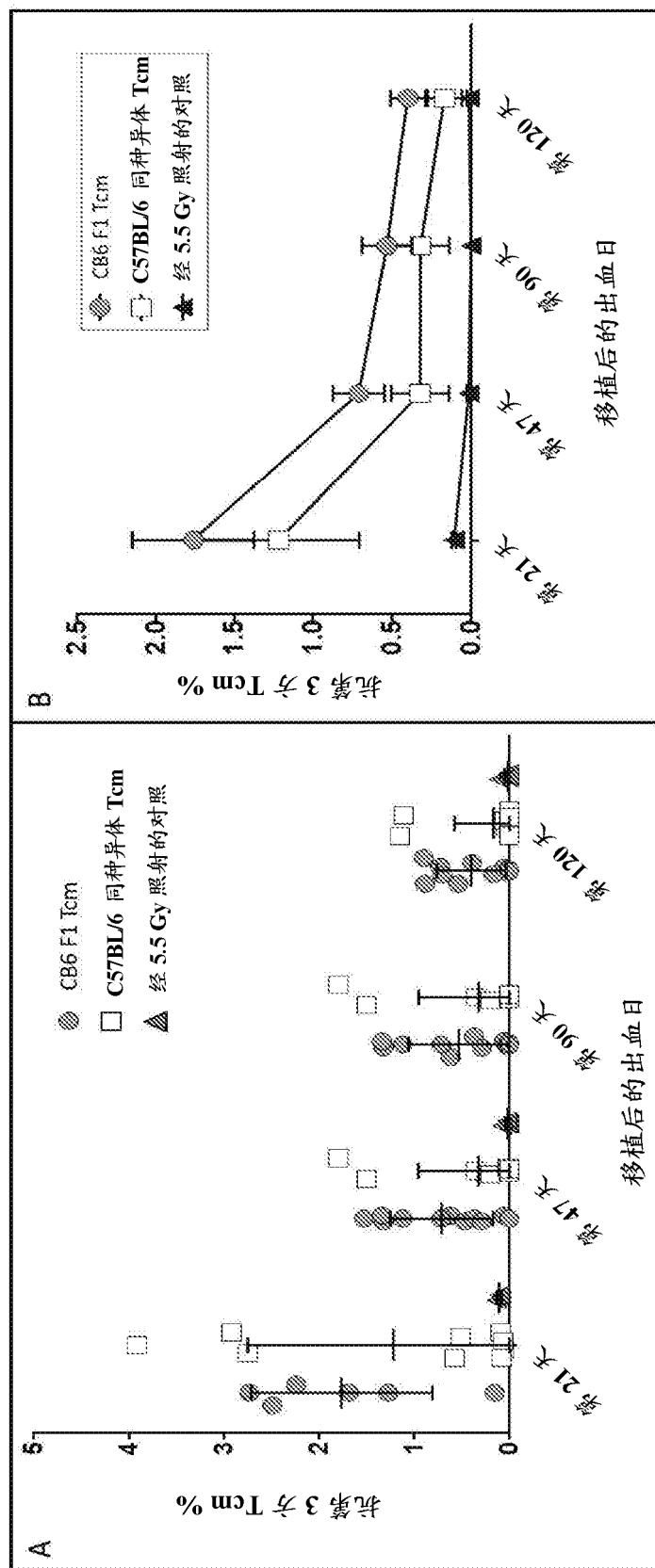


图 5

图 6A
图 6B



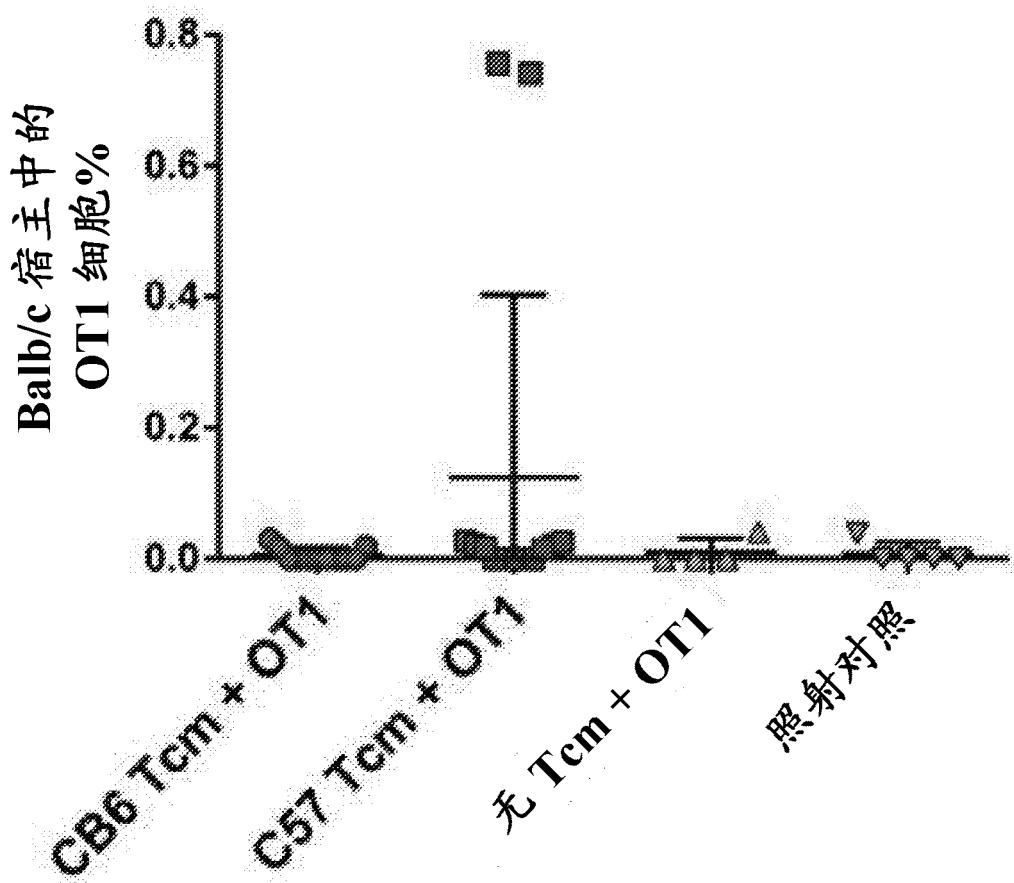


图 7

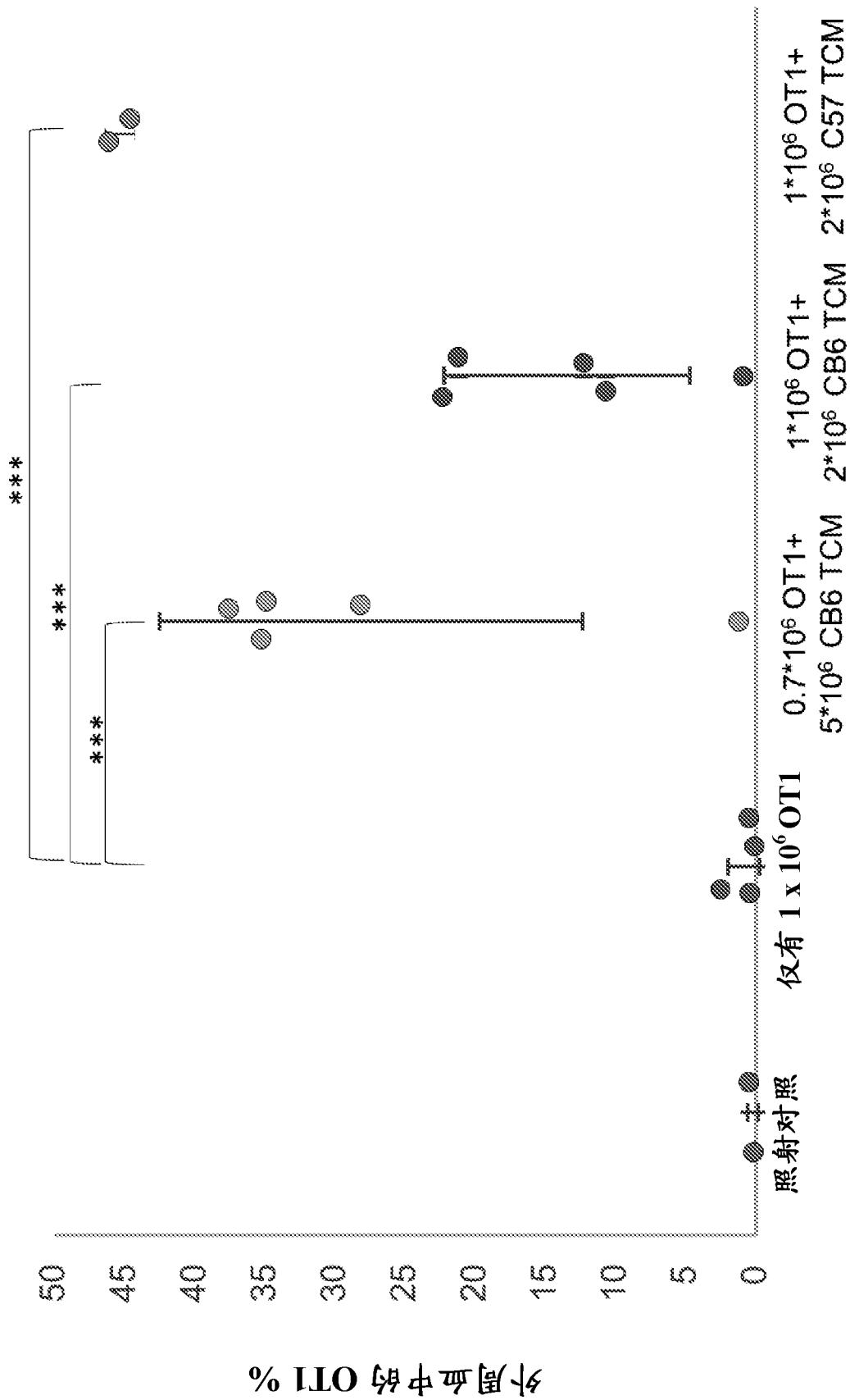


图 8

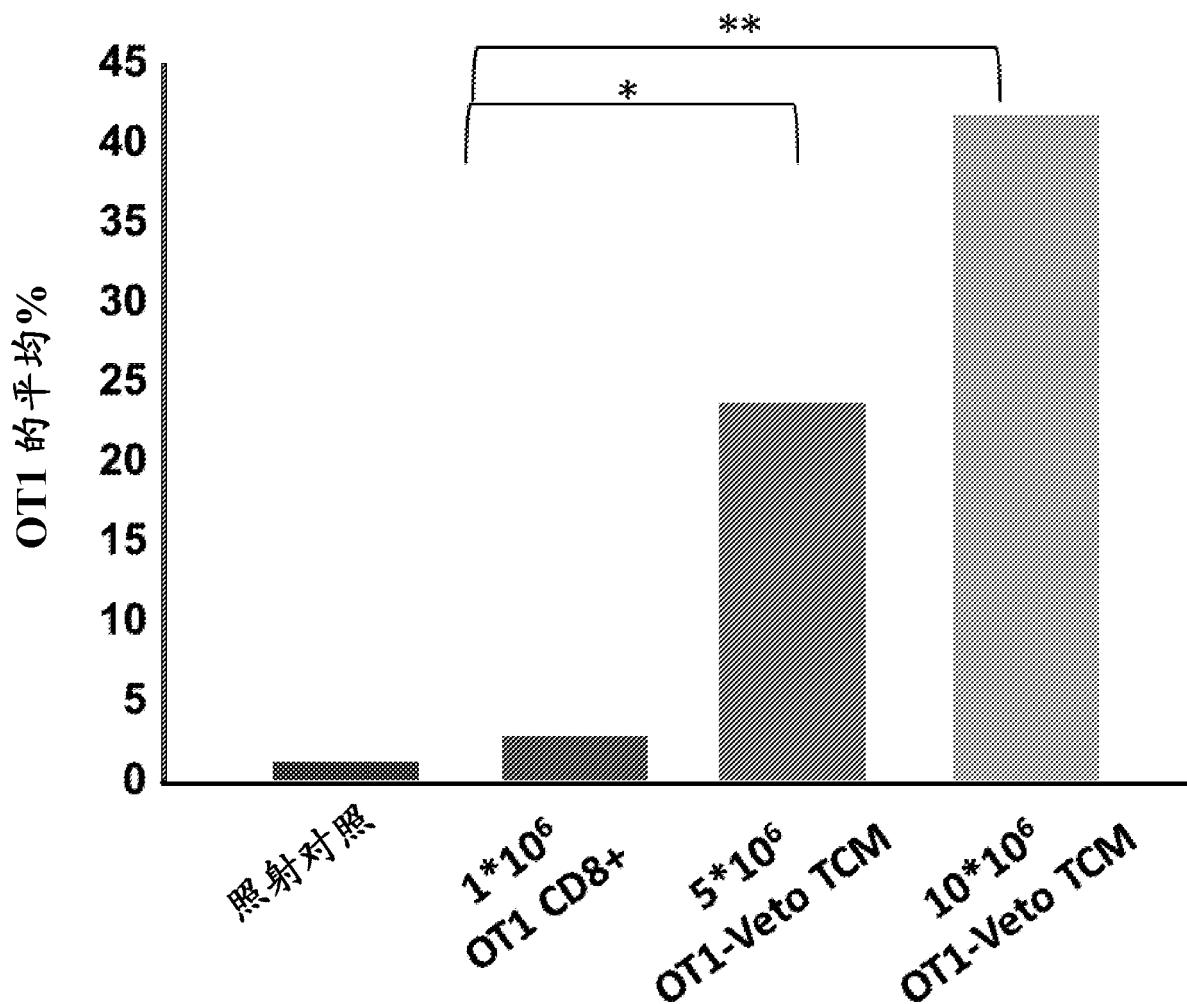


图 9