



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119698465 A

(43) 申请公布日 2025. 03. 25

(21) 申请号 202280085189.1

(22) 申请日 2022.12.22

(30) 优先权数据

63/292,843 2021.12.22 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.06.21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/053815 2022.12.22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/122277 EN 2023.06.29

(71) 申请人 克尔人工智能公司

地址 美国俄亥俄州

(72) 发明人 大卫·瓦尔德

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

专利代理师 刘奇

(51) Int.Cl.

C12N 5/0783 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

权利要求书2页 说明书21页

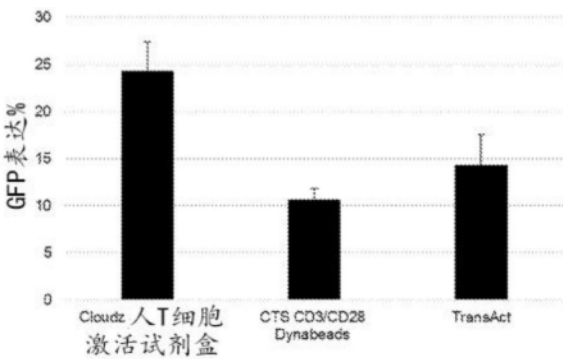
序列表(电子公布) 附图5页

(54) 发明名称

快速T细胞制造

(57) 摘要

本公开提供了快速制造基因修饰的免疫效应细胞如T细胞的方法。该方法允许快速(<1天)生产基因修饰的免疫效应细胞,如CAR T细胞。



1. 一种用于快速制造基因修饰的T细胞群的方法,包括:
获得混合的单个核细胞群;
基本上同时:
激活包含在所述混合单个核细胞群中的T细胞群;和
将所述混合的单个核细胞群暴露于病毒载体,所述病毒载体适于用外源核苷酸转导至少所述混合的单个核细胞群中包含的T细胞群。
2. 根据权利要求1所述的方法,包括从同时激活和暴露于至少一种病毒载体的步骤起至多24小时收获所述混合的单个核细胞群,所述混合的单个核细胞群包含至少基因修饰的T细胞群。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述激活通过将所述混合的单个核细胞暴露于选自IL-2、IL-7、IL-15、IL-12、IL-18和IL21的细胞因子中的一种或多种的激活剂,和/或暴露于选自CD3、CD28、OX40、CD2、CD27、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278) 和4-1BB (CD137) 中的一个或多种的活化剂的激活剂来进行。
4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述激活通过将所述混合的单个核细胞暴露于选自IL-7和IL-15中的一种或多种的激活剂来进行。
5. 根据权利要求1所述的方法,包括在激活和暴露于所述病毒载体的步骤之前通过粘附所述单个核细胞群中包含的单核细胞群而至少部分耗竭的步骤。
6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述激活和暴露于所述病毒载体的步骤在不存在任何外源性细胞因子的情况下进行。
7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述激活步骤通过将所述混合的单个核细胞群暴露于CD3活化剂、CD28活化剂、可溶性或表面结合的CD3抗体、或可溶性或表面连接的CD28抗体中的一种或多种来进行。
8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述激活步骤通过将所述混合的单个核细胞群暴露于CD3活化剂、或可溶性或表面结合的CD3抗体中的一种或两者来进行。
9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述激活和暴露于所述病毒载体的步骤在没有事先进行T细胞分离或预激活步骤的情况下进行。
10. 根据权利要求1所述的方法,进一步包括冷冻保存所述混合的单个核细胞群,所述混合的单个核细胞群包含所述经基因修饰的T细胞群。
11. 根据权利要求1所述的方法,包括通过单采或外周血提取获得所述混合的单个核细胞群。
12. 权利要求1的方法,包括从慢病毒、逆转录病毒和腺病毒中选择病毒转导载体。
13. 根据权利要求1所述的方法,还包括差速离心的步骤,所述差速离心是在基本上同时激活和暴露于所述病毒转导载体之后进行的,以通过DNA大小选择从基因组DNA中去除质粒DNA的步骤。
14. 一种基因修饰的T细胞,通过权利要求1-12中任一项所述的方法产生。
15. 一种封闭系统试剂盒,用于实施根据权利要求1-12中任一项所述的用于快速制造基因修饰的T细胞群的方法,包括:
第一无菌容器,适于接收混合的单个核细胞群;
第二无菌容器,适于接收单核细胞耗竭的混合的单个核细胞群;

无珠T细胞激活剂；
病毒载体，适于用外源核苷酸转导T细胞群；
合适的培养基；和
合适的细胞洗涤溶液；
其中至少所述第一容器由适于从所述混合的单个核细胞群中耗竭单核细胞的材料制成；

进一步其中所述第一和第二容器适于无菌引入所述无珠T细胞激活剂、所述病毒转导载体、所述培养基和所述细胞洗涤溶液。

16. 根据权利要求15所述的封闭系统试剂盒，其中所述无珠T细胞激活剂选自CD3活化剂、CD28活化剂、OX40活化剂、CD2活化剂、CD 27活化剂、ICAM-1活化剂，LFA-1 (CD11a/CD18) 活化剂、ICOS (CD278) 活化剂，4-1BB (CD137) 活化剂和CD3抗体中的一种或多种。

17. 根据权利要求16所述的封闭系统试剂盒，进一步包括一种或多种选自IL-2、IL-7和IL-15的细胞因子。

18. 根据权利要求16所述的封闭系统试剂盒，其中所述无珠T细胞激活剂选自可溶性或表面结合的CD3抗体和可溶性或表面结合的CD28抗体中的一种或多种。

19. 根据权利要求18所述的封闭系统试剂盒，其中所述无珠T细胞激活剂选自一种或多种可溶性或表面结合的CD3抗体。

20. 根据权利要求15所述的封闭系统试剂盒，其中所述病毒载体选自慢病毒、逆转录病毒和腺病毒。

21. 根据权利要求15所述的封闭系统试剂盒，其中所述第一容器和所述第二容器之一或两者选自细胞培养袋和细胞培养瓶。

快速T细胞制造

[0001] 相关申请

[0002] 本发明专利申请要求于2021年12月22日提交的序号为63/292,843的美国临时申请的优先权,其全部公开内容通过引用并入本文。

[0003] 对以电子方式提交的序列表的引用

[0004] 序列表作为命名为2459S_005W0.xml的XML文件与本申请一起以电子方式提交,其创建于2022年12月22日,大小为13000字节,其通过引用全部并入本文。

技术领域

[0005] 本公开涉及一种快速T细胞制造工作流程,该工作流程能够使用病毒介导的转导在不到1天的时间内生产基因修饰的T细胞产品,并且还提供了产品放行测试的创新,以利于克服临床上使用该产品的障碍。

背景技术

[0006] T细胞疗法在治疗疾病,特别是癌症、传染病和自身免疫性疾病方面显示出巨大的潜力。一种增强T细胞治疗的方法是使用病毒介导的基因转移对T细胞进行基因修饰,以增强其对所需靶细胞的活性和/或特异性。例如,使用慢病毒和逆转录病毒在T细胞上表达嵌合抗原受体(CAR)在癌症治疗中显示出巨大的潜力。表达特别针对CD19的嵌合抗原受体(CAR-T细胞)的自体T细胞在复发或难治性B细胞恶性肿瘤患者中表现出显著疗效。

[0007] 自体CD19CAR-T细胞在复发/难治性非霍奇金淋巴瘤(NHL)和急性淋巴细胞白血病(ALL)中的显著临床成功凸显了基因工程化T细胞的潜力。如果疾病仍然对化疗敏感,则对侵袭性、复发性或难治性疾病采用高剂量治疗,然后进行自体干细胞解救(1,2)。不幸的是,高达50%的患者复发或变得难治,并且复发/难治患者用传统化疗的效果较差(例如,完全缓解率(CR)为7%和中位总生存率(OS)(3)为6.3个月)。相比之下,CD19CAR-T疗法在这些患者中已显示出显著改善的效果(例如,CR>50%,OS为1年(4))。

[0008] 尽管美国食品药品监督管理局批准了商业化CD 19和BCMACAR-T细胞产品,并在全球许多其他国家获得了监管部门的批准,但现有疗法在世界大多数地区的使用成本仍然过高,甚至在美国也构成了巨大的经济负担。据估计,制药公司目前生产自体CAR-T产品的成本约为每位患者10万美元(5)。除了成本之外,制造过程缓慢,导致患者治疗出现不期望的延误。目前美国食品药品监督管理局批准的产品需要3-6周或更长时间才能交付给患者,这导致大量患者因治疗延迟而出现病情进展。目前CAR-T疗法的另一个挑战是,它们对B细胞恶性肿瘤以外的大多数恶性肿瘤(如NHL、急性淋巴细胞白血病和多发性骨髓瘤)的疗效较差。此外,即使对于NHL这种有望获得初步结果的疾病,许多患者(约50%)在1年后也不会有持久的缓解(6,7)。尽管患者CAR-T治疗结果不佳的原因可能是多因素的,但一个挑战是输注的CAR-T细胞在患者中的持久性较差。据报道,CAR-T细胞的持久性与制造的CAR-T产品的分化状态相关。特别是,与具有更多未成熟/幼稚细胞的产品相比,更分化的产品被认为具有降低的体内持久性(在(8)中综述)。

[0009] 传统的CAR-T制造是一个漫长、复杂和昂贵的过程,通常涉及T细胞分离、T细胞活化、T细胞转导(通常与提高转导效率的策略相结合,如旋转接种、重组人纤维连接蛋白片段、聚凝胺等)。T细胞刺激以实现有效转导通常包括用CD3或CD3/CD28抗体的刺激和细胞因子刺激(例如IL-2、IL-7、IL-21和/或IL-15)。除了利用复杂和精密的制造工艺(所述工艺在许多情况下需要昂贵设备)外,该工艺还耗费时间和劳动力。例如,T细胞通常使用磁珠进行分离,这涉及漫长而昂贵的过程。珠子通常也需要去除,这又增加了一个需要时间、专业设备和专业知识的制造步骤。复杂的制造几乎总是需要使用专门的洁净室设施来确保产物的无菌性。

[0010] 为了用病毒(如慢病毒或逆转录病毒)有效地转导T细胞,先前已经报道并在该领域几乎普遍实践的是,在病毒转导之前,T细胞需要首先在细胞因子(如IL-2、IL-7和/或IL-15)的存在下活化(如用CD3或CD3/CD28刺激)1-3天。因此,传统的制造涉及CD3和/或CD3/CD28的初始活化步骤1-3天,然后才能有效地进行转导。广泛的做法是T细胞在活化后扩增1-2周。在病毒转导后,传统制造部分地利用T细胞扩增阶段来产生足够的T细胞用于患者输注。

[0011] 在临床CAR-T细胞制造的大部分情况中,T细胞在最初的制造阶段(即病毒转导之前)被分离。特别是,T细胞分离步骤是先前报道的所有涉及病毒基因工程化的快速基因工程化T细胞制造工作流程(1天或更短时间)的一部分。在几乎所有为临床制造而分离T细胞的情况下,都使用磁珠(通常是CD3/CD28 **Dynabeads®** (ThermoFisher Scientific, 沃尔瑟姆, 麻州) 或CD4/CD8磁珠 (Miltenyi Biotec, 贝尔吉施格拉德巴赫, 德国))对T细胞进行纯化。在患者输注之前需要大量去除的这些磁珠与T细胞紧密结合,并且需要数天才能脱落(通常发生在靶表面抗原内化之后)。例如,制造商ThermoFisher Scientific报告称,CD3/CD28珠子需要数天才能脱落,如果在约3天之内尝试去除珠子将导致相当大部分T细胞丢失(由于与珠子结合)。(assets.fishersci.com/TFS-assets/LSG/manuals/11131D_32D_61D.pdf)。

[0012] MiltenyiBiotec报告称,它们的磁珠在2-3天内不会从结合的细胞中释放。事实上,据报道,MiltenyiBiotec珠子可能在几天后内化,而不是实际释放,因此,它们可能对T细胞产品产生未知影响(thermofisher.com/us/en/home/life-science/cell-analysis/cell-isolation-and-expansion/cell-isolation/see-how-miltenyi-microbeads-interact-with-your-t-cells.html)。

[0013] 由于复杂的制造工作流程中固有的费用和治疗延迟,以及减少T细胞培养持续时间以维持幼稚群的好处(例如,为了增强体内持久性),需要简单快速的制造工作流程。特别地,1天或更短的工作流程是特别有利的,因为培养持续时间的减少将显著增加幼稚T细胞群,并最终实现在洁净室设施之外的简单、封闭系统制造。此外,由于多种原因,不需要分离T细胞的工艺将是有利的,包括增加工艺的简单性,需要更少的成本和专业知识,并减少实际操作需求,从而提高可扩展性。此外,通过避免T细胞分离步骤,该产品可以包含额外的细胞类型,例如NK细胞,其也具有已知的有利的治疗特性,例如裂解肿瘤或病原体感染的细胞的能力。令人惊讶的是,我们的研究还揭示了使用混合单个核细胞群(如PBMC或单核细胞耗竭的PBMC),而不是用于快速CAR-T制造的分离的T细胞的额外益处。例如,与使用没有T细胞分离步骤的PBMC进行的相同制造过程相比,分离的T细胞在制造的产品中显示出非常理想

的幼稚T细胞群的减少。

[0014] 已有报道称,现有技术的临床快速CAR-T制造工作流程使用病毒基因递送。制造方法利用T细胞分离步骤,这增加了额外的不必要的成本和复杂性,并且由于不能在无显著细胞损失的情况下从细胞中去除磁珠,因此可能会削弱在尽可能短的时间内有效制造细胞的能力。

[0015] 在一个现有技术的工作流程中,据报道,<2天的生产方案涉及约24小时的离体培养(ashpublications.org/blood/article/138/Supplement%20124848/481328/T-Cell-Stemness-with-a-New1)。据报道,该过程涉及T细胞分离步骤。关键区别在于T细胞分离、T细胞活化方法、细胞因子的使用和自动化的使用,这显著增加了仪器的成本(约40万美元)且耗材成本高。由于使用了微珠,该产品还可能包括内化的微珠。

[0016] 在另一现有技术工作流程中,据报道需要进行1天以上,需要在分离的T细胞上使用CD3/CD28 Dynabeads和高剂量IL-2(300u1/ml)。由于Dynabeads的使用,如果在1天时收获细胞,所述工艺将导致T细胞的显著损失。此外,使用高剂量的IL-2可以导致T细胞的显著分化。

[0017] 由于基因修饰的T细胞复杂、漫长和昂贵的制造工作流程的局限性,以及当前许多方法对T细胞分化的挑战,开发快速、经济高效和可扩展的CAR-T制造平台以生产有效且价格合理的CAR-T产品的需求尚未得到满足。本文的方法和系统满足了这种长期以来的需求。

发明内容

[0018] 根据本文所述的目的和益处,在本公开的一个方面中,提供了一种快速制造基因修饰的T细胞群的方法,包括获得混合的单个核细胞群和基本上同时激活混合的单个核细胞群中所包含的T细胞群,并将混合的单个核细胞群暴露于病毒载体的步骤,所述病毒载体适于用外源核苷酸转导至少包含于混合的单个核细胞群中的T细胞。不需要T细胞分离的步骤。在实施方案中,所述方法包括从同时激活和暴露于至少一种病毒载体的步骤起至多24小时收获包含至少基因修饰的T细胞群的混合的单个核细胞群。

[0019] 在实施方案中,活化步骤通过将混合的单个核细胞暴露于选自IL-2、IL-7、IL-15和IL21的细胞因子组中的一种或多种的激活剂和/或暴露于选自CD3、CD28、OX40、CD2、CD27、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、ICOS(CD278)和4-1BB(CD137)中的一种或多种的活化剂的激活剂来进行。在实施方案中,通过将混合的单个核细胞暴露于选自IL-7和IL-15中的一种或多种的活化剂来进行活化。在其他实施方案中,所述方法包括在活化和暴露于病毒载体的步骤之前至少部分耗竭的步骤,所述步骤通过粘附单个核细胞群中所包含的单核细胞群进行。

[0020] 在所述方法的实施方案中,活化和暴露于病毒载体的步骤优选在不存在任何外源性细胞因子的情况下进行。活化步骤可以通过将混合的单个核细胞群暴露于CD3活化剂、CD28活化剂、可溶性或表面结合的CD3抗体、或可溶性或表面结合的CD28抗体中的一种或多种来进行。

[0021] 所述混合的单个核细胞群包括所述经基因修饰的T细胞群。所述混合的单个核细胞群可以通过单采或外周血抽取获得。

[0022] 在实施方案中,病毒转导载体选自慢病毒、逆转录病毒和腺病毒。在实施方案中,

在基本上同时激活并暴露于病毒转导载体的步骤之后提供差速离心步骤,以通过DNA大小选择从基因组DNA中去除质粒DNA。

[0023] 在另一个方面,本公开提供了通过上述方法产生的基因修饰的T细胞。

[0024] 在另一个方面,本公开提供了一种封闭系统试剂盒,用于根据上述方法实施快速生产基因修饰的T细胞群的方法。所述封闭系统试剂盒可包括适于接收混合的单个核细胞群的第一无菌容器、适于接收单核细胞耗竭的混合的单个核细胞的第二无菌容器、无珠T细胞激活剂、适于用外源核苷酸转导T细胞群的病毒载体、合适的培养基和合适的细胞洗涤溶液。在实施方案中,至少第一容器由适合于混合的单个核细胞群中单核细胞耗竭的材料制成。第一和第二容器可适于无菌引入所述无珠T细胞激活剂、所述病毒转导载体、所述培养基和所述细胞洗涤溶液。

[0025] 所述封闭系统试剂盒的各种元件/试剂基本上如上所述。所述第一和第二容器之一或两者可以选自细胞培养袋和细胞培养瓶。

附图说明

[0026] 本发明的新颖特征在所附的权利要求中被特别地阐述。通过参考以下具体实施方式可更好的理解本发明的特征和优点,所述具体实施方式阐述了使用本发明的原理的示例性实施方案,以及附图:

[0027] 图1A示出了使用20小时同时转导/激活工艺并使用不同T细胞激活剂的GFP慢病毒载体对单核细胞耗竭的PBMC的转导效率的比较。20小时后,洗涤细胞以除去游离的病毒/激活剂,并用溶解缓冲液除去**Cloudz®**试剂。在转导/激活后3天通过流式细胞术测定GFP的表达。所使用的工作流程在标题为“快速制造工作流程的详细实施例”部分中进行了描述。图A描述了3种商业试剂的使用,它们都涉及与基质或珠缀合的CD3和CD28抗体。

[0028] 图1B示出了如图1A所示进行的T细胞制造,除了使用可溶性CD3(100ng/ml 10KT3)或可溶性CD3(100ng/ml)和CD28(300ng/ml)抗体的组合作为激活剂。此外,制造是在不存在或存在IL-7和IL-15的情况下进行的。

[0029] 图1C示出了如图1B所述进行的T细胞制造,除了使用制造商推荐浓度的**Immunocult®**(包括作为T细胞激活剂)且所有样本均使用细胞因子(IL-7和IL-15)。

[0030] 图1D示出了使用图1A中描述的工作流程进行的T细胞制造,除了T细胞激活是使用可溶性CD3(100ng/ml 10KT3)、表面结合的CD3(表面涂有5 μ g/ml 10KT3)或**TransAct®**(以制造商建议的浓度)进行的。在产物收获(20小时培养)时通过流式细胞术测量CD69的表达。

[0031] 图2说明了同时与顺序T细胞激活:使用抗FMC63抗体(AcroBiosystems,纽瓦克,特拉华州)通过流式细胞术评估CD19CAR表达。在转导后第4天检测细胞的CAR表达。在添加慢病毒载体的同时或在添加病毒前24小时,用**Cloudz®**T细胞激活剂对PBMC进行接种和激活。

[0032] 图3示出了使用快速制造工作流程调节转导效率的各种细胞因子的比较。使用所述细胞因子快速制造工作流程的详细实施例部分中描述的方法,使用指定的细胞因子,使用CD19CAR慢病毒载体转导单核细胞耗竭的PBMC,并在72小时后使用FMC63特异性抗体(AcroBiosystems)通过流式细胞术评估CD19CAR的表达。

[0033] 图4示出了使用快速制造工作流程对不同培养持续时间的评估。如快速制造工作

流程的详细实施例部分所述,激活并用CD19CAR载体转导单核细胞耗竭的PBMC。洗涤细胞以除去游离病毒,并在该过程开始后6或17小时除去CloudZ®T细胞激活剂。然后将细胞保持培养72小时,以便通过流式细胞术评估CD19CAR表面表达。

[0034] 图5示出了与制造6天的类似CAR-T细胞相比,UF-KURE19细胞显示出增加的体内效力。NSG小鼠(每组n=5-7)静脉注射RAJI荧光素酶细胞(0.5×10^6),然后在第7天注射所示数量的UF-Kure19CAR-T细胞或制造6天的表达相同CAR的CAR-T细胞。

[0035] 图6示出了有效的快速T细胞制造工作流程不需要外源性细胞因子。将Raji荧光素酶细胞注射给NSG小鼠,并在7天后注射指定的CD19CAR-T产物或载体,随后在所指示的日期进行生物发光成像。

[0036] 图7A示出了低片段去除的qPCR放行测试。数据示出使用快速制造工作流程从CD19CAR-T转导的细胞制备并在20小时后收获的DNA样本上VSVG(复制型慢病毒)的基于TaqMan的qPCR检测的结果。使用上述方案(使用PacBio试剂)进行DNA制备,用于低片段去除。对去除和未去除低片段的样本进行PCR检测。

[0037] 图7B示出了用CD19 CAR慢病毒载体转导并在各种MOI下培养8天的T细胞的每个转导细胞的载体拷贝数结果的数据。使用CD19 CAR特异性抗体(AcroBiosystems)通过流式细胞术测定CD19 CAR的表达,并通过GAG和PTPB2进行qPCR确定拷贝数。

[0038] 图7C示出了使用快速制造工作流程制造的T细胞的每个转导细胞的载体拷贝数和CD19 CAR表面表达的数据,图7B中描述的载体的MOI为10:1。如图7B所示,通过qPCR和流式细胞术测定每个转导细胞的载体拷贝数。在使用SRE试剂盒(PacBio)进行PCR之前去除低片段大小的DNA。

[0039] 图7D示出了DNA凝胶电泳的结果,表明低片段去除不会显著影响基因组DNA的量或大小分布。使用DNeasy血液和组织试剂盒制备来自用CD19CAR载体慢病毒转导并在20小时后收获的两个不同T细胞样本的基因组DNA。直接用基因组DNA样本进行琼脂糖凝胶电泳,或者在使用PacBio 10kb SRE试剂盒进行低输入耗竭后进行。泳道1:DNA标记物;泳道2:样本1总基因组DNA;泳道3:SRE试剂盒处理后的总基因组DNA;泳道4:样本2总基因组DNA;泳道5:SRE试剂盒处理后的样本2总基因组DNA。

[0040] 虽然本公开容易受到各种修改和替代形式的影响,但其具体实施方案已在附图中以示例的方式示出,并在下文中详细描述。然而,应当理解,特定实施方案的描述并不旨在将本公开进行限制,其涵盖落入所附权利要求所定义的本公开的精神和范围内的所有修改、等价物和替代方案。

具体实施方式

[0041] 本文件阐述了当前公开的主题的一个或多个实施方案的细节。在研究了本文件中提供的信息之后,对本文件中描述的实施方式的修改以及其他实施方式对于本领域的普通技术人员来说将是显而易见的。本文件中提供的信息,特别是所描述的示例性实施方案的具体细节,主要是为了清楚理解而提供的,并且此不应当理解为不必要的限制。如有冲突,以本文件的说明书(包括定义)为准。

[0042] 为了解决现有技术方法中上述总结的和其他缺点,并为了开发一种稳健、经济、简单和可扩展的超快T细胞制造方法(即1天或更短时间),我们开发了不使用磁珠或在某些情

况下甚至不需要T细胞分离或不需要使用细胞因子来制造CAR-T细胞的方法。在这种情况下,我们出人意料地发现了一种方法,所述方法能够在不需要任何增强子(如聚凝胺、旋转接种、重组人纤维连接蛋白片段)的情况下同时使用T细胞活化和病毒转导来实现T细胞的高转导效率(起始于混合的PBMC、去除单核细胞的PBMC或分离的T细胞)。令人惊讶的是,所述方法也可以在不存在任何细胞因子(例如IL-2、IL-7和/或IL-15)或存在细胞因子的情况下进行。与先前的建议相反,发现使用该方法的T细胞转导效率与使用更传统的T细胞活化然后在活化后1-3天进行病毒转导的转导效率一样高。值得注意的是,与分离的T细胞相比,使用PBMC作为起始源的另一个优点是由于存在提供刺激信号的其他单个核细胞而能够单独利用CD3活化而不需要CD28共刺激。已知当进行T细胞活化时,在不需要使用CD3/CD28活化剂的情况下单独进行CD3刺激,可以更多地保存所需的中央记忆T细胞(9)。因此,与先前报道的方法相比,所开发的T细胞制造工作流程涉及高度简化的过程,该过程可以显著降低成本并提高效率。

[0043] 一种可以利用PBMC、单核细胞耗竭的PBMC或分离的T细胞作为起始产物的超快制造工艺的开发

[0044] 根据目前公开的方法,可以在需要或不需要T细胞预分离步骤的情况下进行制造。通过不进行T细胞预分离步骤,制造的工作流程可以进行地更快并降低成本,并且令人惊讶地还产生具有更高百分比的所需的幼稚T细胞的产品。如果在没有直接分离T细胞的情况下使用单采血液或外周血样本,则可以通过单核细胞耗竭来富集T细胞,所述单核细胞耗竭通过简单地粘附在固体表面(例如组织培养瓶/板或袋)上进行。单核细胞耗竭可以在诸如板或袋的粘附表面上进行,也可以在封闭系统中进行。单核细胞耗竭是一种简单、廉价、快速的部分纯化产品的方法。

[0045] 在另一个方面,通过避免进行T细胞分离步骤,最终产物不仅可以包括基因工程化的T细胞,还可以包括其他细胞类型,如可能表现出有益治疗特性的NK细胞。

[0046] 根据本公开,在一个方面,使用无珠激活剂同时活化T细胞,并在低浓度IL-7和IL-15(例如,5-10ng/ml或更低)存在下转导,重要的是在不存在IL-2的情况下转导。IL-2是已知的驱动T细胞分化的细胞因子,并且已知在IL-2存在下培养的培养细胞显示出其幼稚/未分化表型的保存减少。当使用高剂量(例如300IU/ml)时尤其如此(11-12)。

[0047] 在另一个方面,令人惊讶的是,已经发现在IL-7或IL-15存在的情况下涉及T细胞的同时激活和转导的工作流程是高效的,并且不需要这两种细胞因子同时存在。因此,制造的工作流程可以单独使用IL-7或单独使用IL-15来进行。

[0048] 在另一个方面,令人惊讶的是,在完全不添加外源性细胞因子(包括IL-2、IL-7或IL-15)的情况下,涉及T细胞的同时激活和转导的工作流程是高效的。因此,可以在添加任何外源性细胞因子的情况下执行制造工作流程。

[0049] 在另一个方面,基因修饰的T细胞产品可以在24小时内制造,优选包括约17-20小时的培养时间。

[0050] 在该工作流程中,在病毒转导或T细胞分离之前不需要预激活步骤,这两种方法都节省了关键的制造时间和成本。先前没有报道称,使用未纯化的单个核细胞(例如PBMC)或单核细胞耗竭的PBMC(与纯化的T细胞相反)的同时转导和激活可以有效地进行快速CAR-T制造。

[0051] 细胞活化可以使用通过CD3或CD3和CD28活化T细胞的各种试剂进行,包括Transact (MiltenyiBiotec)、Cloudz T细胞激活剂(Biotechne)、可溶性或表面结合的CD3和/或CD28抗体或具有结合的CD3和/或CD3/CD28抗体的定制微泡的各种试剂活化T细胞。特别地,与Transact相比,发现Cloudz T细胞激活剂能够实现同时激活和病毒转导T细胞的高且出乎意料的能力。此外,可溶性或表面结合的CD3(含或不含CD28)也将在本文所述的少于1天的工作流程中发挥作用。

[0052] 细胞活化也可以使用通过CD3和除CD28之外(或除CD28以外)的其他共刺激分子(如OX40、CD2、CD27、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278) 和4-1BB (CD137)) 活化T细胞的试剂进行。

[0053] 在细胞活化和转导后,细胞可在转导后不到一天(例如~17-20hr)内收获,并可直接用于治疗目的或冷冻保存以备日后使用。尽管当细胞被收获以及输注到受体时转导到T细胞中的基因的表达没有完全表达,但是这种制造方法导致T细胞表现出高的治疗效力。

[0054] 因此,该方法能够在不到1天的时间内完成细胞治疗产品的快速制造方案。

[0055] 在该方法的另一个组成部分中,T细胞制造工艺可以在完全封闭的系统中使用手动或自动工艺进行。在另一个组成部分中,制造可以在洁净室外的完全封闭的系统中进行,从而允许在许多没有专门的洁净室基础设施的中心进行制造。

[0056] 该方法的另一个组成部分是一种消除快速制造中病毒转导的细胞治疗产品所需的放行测试中假阳性反应性的方法。在制造的前几天,细胞转染(例如293或293T细胞)以产生慢病毒或逆转录病毒的残余质粒DNA存在于细胞治疗产品中。该质粒DNA在载体拷贝数和复制型病毒测试qPCR分析中示出了假阳性结果。在该工作流程中,放行测试被整合到工作流程中并包括基于差速离心的尺寸分离步骤,以消除该质粒DNA并使快速制造的T细胞产物能够在临床上使用,这通常是产物放行所需的。

[0057] 以下具体但非限制性的实施例进一步说明了当前公开的主题。以下实施例可以包括代表在与本发明相关的开发和实验过程中的不同时间收集的数据的数据汇编。

[0058] 实施例

[0059] 快速基因修饰的T细胞制备工艺的发展

[0060] 迄今为止,前述的基于病毒的快速(例如1天或更短时间)基因修饰的T细胞制造过程涉及初始T细胞分离步骤。在这里,我们开发了一种快速制造工艺,除了分离的T细胞外,还可以利用PBMC或单核细胞耗竭的PBMC。如果将PBMC用作起始来源,则可选的初始步骤是进行单核细胞耗竭,因为在某些情况下,需要从产物中部分耗竭单核细胞。例如,这种耗竭将使病毒能够优先感染最终产物更需要的特定细胞类型,包括T细胞和在某些情况下的NK细胞。然而,耗竭并不完全,这将允许单核细胞(例如CD80/CD86)向T细胞提供刺激信号(例如,在不需要与外源性CD28或其他刺激共同刺激的情况下,单独使用外源性CD3刺激使T细胞活化)。通常,如图1所示,在接种2小时后开始,以下所述的耗竭方法导致起始血液产物中单核细胞减少约50%。2小时后额外的孵育时间对使用这种方法的耗竭没有显著影响。此外,接种细胞的细胞密度(5×10^6 细胞/ml和 2×10^6 细胞/ml)显示出等效的结果。使用组织培养板或烧瓶,或在封闭系统中使用袋,如Saint Gobain(法国巴黎)制造的VueLife®“AC”系列袋的耗竭显示出类似的结果。

[0061] 表1.PBMC中单核细胞的耗竭。

[0062]		1小时	2小时	3小时	4小时
	接种的细胞浓度	M0%	M0%	M0%	M0%
	2x10 ⁶ /ml	21.46	13.77	14.86	14.95
	5x10 ⁶ /ml	20.87	11.25	10.97	11.09

[0063] 将来自外周血单采样本的单个核细胞在组织培养箱中的6孔组织培养板中于37℃下孵育指定的时间点。使用血液分析仪 (**Hemavet®**, Drew Scientific, 迈阿密湖, 佛罗里达州) 在以下时间点检测未粘附细胞中单核细胞百分比。起始群由25.02%的起始单核细胞百分比组成。M0% = 单核细胞百分比。

[0064] 如果要使用分离的T细胞, 那么它们可以直接从全血、单采样本或其他T细胞来源中分离。可以使用任何可用的方法来分离T细胞。例如, 可以使用磁珠方法, 如CD3、CD4或CD8磁珠 (例如Miltenyi Biotec微珠或ThermoFisher Scientific **dynabeads®**)。还可以使用CD3微泡、CD3/CD28或与CD3和任何其他T细胞共刺激配体缀合的微泡来有效且快速地分离T细胞。特别是微泡, 特别是脂质微泡提供了快速有效的分离方法, 同时也提供了激活信号。

[0065] T细胞的活化可以通过多种途径实现。如果使用PBMC或单核细胞PBMC, 相对于基于磁珠的方法, 可溶性激活剂或表面结合的 (例如板/袋) 优选用于快速制造工作流程。一种有效的活化方法是使用CD3/CD28可溶性微球 (来自Biotechne/R&D Systems (Minneapolis, Minnesota) 的 **Cloudz®** 人T细胞激活剂)。该试剂由藻酸盐共聚物组成, 该共聚物可在几分钟内溶解, 因此不需要磁珠, 也不会导致产物污染。也可以使用替代激活剂, 如 **Immunocut®** CD3/CD28活化剂 (加拿大温哥华干细胞技术公司)。可使用的替代活化剂包括CD3或CD3/CD28磁珠 (例如 **Dynabeads®** ThermoFisher Scientific) 或 **TransAct®** (Miltenyi Biotec)。基于磁珠和 **TransAct®** 的试剂并不被认为是最佳的, 因为磁珠需要增加劳动力, 并且由于磁珠在早期紧密结合, 去除步骤具有挑战性。这可能会导致细胞过度流失。据报道, 与其他产品相比, **TransAct®** 激活剂是一种“更温和、更慢”的激活剂, 可在较晚的时间点产生最佳的病毒转导窗口。据报道, **TransAct®** 在病毒转导前需要1-2天的T细胞活化才能实现最佳的病毒转导。此外, 据报道, 如果 **TransAct®** 在添加后2-3天之前被洗掉, 它会阻碍T细胞增殖 (miltenyibiotec.com/upload/assets/IM0017348.PDF)。因此, 对于涉及在不到一天的时间内同时激活/转导和收获产物的生产方案, **TransAct®** 不是首选的激活剂。

[0066] 除了基质相关的激活剂外, 单独或与可溶性CD28抗体或其他T细胞共刺激刺激物组合的可溶性或表面包被的CD3抗体 (例如OKT3抗体或其他CD3抗体) 是另一种有效的激活策略, 其与所述快速制备工作流程完全兼容。特别地, 该方法受益于基于PBMC的方法, 该方法能够在不需要外源性CD28或其他用于共刺激的试剂的情况下激活T细胞。此外, 与其他激活刺激物相比, 这种使用CD3抗体如OKT3的方法显著降低了成本, 并最大限度地降低了制造产品中存在的支架 (如藻酸盐、磁珠等) 可能对患者产生未知副作用的风险。

[0067] 已经发现, 使用本文所述的不超过1天的快速制造工作流程, 特异性T细胞激活剂可以更有效地发挥作用。为了比较特异性T细胞激活剂, 将单核细胞耗竭的PBMC (在100μl中有200000个细胞) 接种在含有IL-7 (10ng/ml) 和IL-15 (5ng/ml) 的 **TexMAC®** (Miltenyi

Biotec)培养基中的3%**CTS®**免疫细胞血清替代物(ThermoFisher Scientific)的96孔板中。加入GFP慢病毒载体和指示的激活剂(使用制造商建议的浓度),并将细胞培养4天。洗涤细胞并在20小时后更换培养基以除去游离病毒和游离激活剂。对于含有**Cloudz®**试剂的细胞,溶解缓冲液也用于去除激活剂。通过流式细胞术测定GFP的表达。如图2A所示,与**TransAct®**和CTSCD3/CD28**Dynabeads®**相比,**Cloudz®**人T细胞激活剂在利用快速制造工作流程最大化转导效率方面更有效。值得注意的是,对于大多数图,所使用的病毒载体的量保持较低,以容易地促进条件之间的差异,而不是使用过量的病毒来最大限度地提高转导效率。在图2中,使用高水平的慢病毒载体(尽管仍保持每个转导细胞的载体拷贝数小于5),可以观察到快速制造工作流程导致高转导效率的能力。如图2B所示,快速制造工作流程也适用于可溶性CD3和/或可溶性CD3及CD28抗体(图2C)。例如,广泛使用的CD3抗体OKT3可以用于该工作流程(图2C)。使用单核细胞耗竭的PBMC的制造工艺,与添加CD3和CD28抗体相比,单独使用CD3在转导效率方面具有相似的功能。值得注意的是,在该制造工作流程中,就转导效率而言,OKT3CD3抗体刺激的作用比**Immunocut®**更有效(图2C)。使用快速制造工作流程,表面结合的(例如平板或烧瓶)CD3抗体和可溶性CD3抗体都导致类似的CD4和CD8T细胞的活化,如在产物收获时(培养开始后20小时)通过CD69表达所测量的。值得注意的是,与用可溶性/表面结合CD3处理的组相比,**Transact®**导致CD4T细胞中CD69上调水平降低。这一发现表明,使用快速工作流程,可溶性CD3或与培养容器结合的CD3可以有效地用于T细胞活化。此外,这些激活剂似乎优于其他试剂,如**TransAct®**。

[0068] 本领域通常认为,需要依次激活T细胞,然后进行病毒转导,以最大限度地提高病毒转导效率。然而,这里的结果表明,至少利用我们特定的制造工作流程,同时进行T细胞激活和病毒转导得到与顺序进行的方法基本相同的转导效率。例如,使用**Cloudz®**T细胞激活剂激活单核细胞耗竭的PBMC,并在添加**Cloudz®**的同时用慢病毒CD19嵌合抗原受体(CAR)载体转导,或在24小时后使用快速制造工作流程的详细实施例部分描述的制造过程转导。如图2所示,使用所述制造工作流程同时或顺序病毒转导在CAR表达之间没有显著差异。

[0069] 传统的和先前报道的快速T细胞制造方法都使用几乎普遍使用细胞因子如IL-2、IL-15和/或IL-7的培养条件。为了评估在快速制造工作流程中使用的最佳细胞因子,使用IL-2(300u/ml)、IL-15(5ng/ml)、IL-7(10ng/ml),IL-15和IL-7的组合或完全不存在外源性细胞因子,进行快速制造工作流程详细实施例部分中所述的制造过程(图4)。当比较转导后72小时T细胞中CD19CAR的表达时,在不同细胞因子组之间观察到的转导效率没有差异。令人惊讶的是,在完全不存在细胞因子的情况下转导效率也没有差异。因此,制造过程可以进一步简化为在不存在任何外源性细胞因子的情况下进行,以进一步降低成本并防止对T细胞的刺激作用,所述刺激作用可能导致不需要的分化/活化。如图1B所示,当比较使用和不使用细胞因子进行的制造时,快速T细胞制造在导致T细胞的GFP转导方面也几乎同样有效。

[0070] 制造过程的另一个关键属性是培养持续时间。由于制造工作流程的一个目标是限制其持续时间以保存幼稚T细胞部分,因此比较了使用6小时和17小时的培养持续时间的制造过程。在这两个时间点结束时,使用溶解缓冲液去除**Cloudz®**试剂,洗涤细胞以去除病毒,并悬浮在没有病毒或激活剂的新鲜培养基中,总共培养72小时,以测量CAR表达。如图4

所示,慢病毒载体和T细胞激活剂的6小时培养时间不足以导致显著的CD19CAR表达,如在第3天通过流式细胞仪测量的。由于能够在通常的工作日时间内进行制造的限制,大于小时且小于约15小时的中间持续时间不被认为是优选的。

[0071] 由于制造平台可以使用PBMC或单核细胞耗竭的PBMC作为起始来源,并且产物培养小于一天,因此最终产品将由除T细胞外的额外单个核细胞组成。为了评估产品的成分,使用快速制造工作流程的详细实施例部分中描述的方法执行了3次制造过程。如表2所示,T细胞是该产品的最大部分,但该产物也含有少量的B细胞、NK细胞和单核细胞。由于工作流程的首选方法涉及冷冻保存产物的生产,因此该测试是在产物解冻后进行的。由于粒细胞是起始单采产品的一小部分,而且对冷冻/解冻高度敏感,因此在该产品中几乎没有检测到粒细胞。

[0072] 表2. 在解冻的UF-KURE19产品上执行3次制造过程的产品组成(制造17小时)。

	产品 1	产品 2	产品 3
生存能力%	88	94	90
[0073] T 细胞 (CD3) %	78	82	78
T 细胞的 CD4%	53	45	56
T 细胞的 CD8%	47	55	44
B 细胞 (CD19) %	7	5	5
[0074] NK 细胞 (CD56) %	11	6	8
单核细胞 (CD14) %	6	3	7

[0075] 使用流式细胞仪测定产品组成,使用CD3、CD4、CD8、CD19、CD56和CD14抗体以及7-AAD来评估生存能力。

[0076] 由于慢病毒转导后蛋白质如CAR在T细胞中的显著表达在17-20小时内不会发生,为了在体外评估转导的CD19CAR-T产物的活性,我们使用快速制造工作流程的详细实施例部分中描述的制造工作流程,从单核细胞耗竭的PBMC制造CD19CAR-T细胞。激活/转导20小时后,洗涤细胞中的游离病毒,并去除**CloudZ®**T细胞激活剂。然后将细胞培养3天的总培养时间,然后评估针对靶RAJI人淋巴瘤细胞的细胞毒性活性,并测量CAR表面表达。如表3所示,快速制造的CAR-T细胞能够有效裂解RAJI肿瘤细胞。

[0077] 表3. 培养3天后在体外测试快速制造的CD19CAR-T细胞的细胞毒性活性的结果。

	产品 1	产品 2	产品 3
[0078] 在 T 细胞上的 CAR 表达%	50	44	53
RAJI 细胞的裂解 (5:1 CAR-T/RAJI 比率) %	51	56	56

[0079] 用CD19CAR慢病毒载体转导单核细胞耗竭的PBMC,并用**CloudZ®**T细胞激活剂活化T细胞,如快速制造工作流程的详细实施例部分所述。20小时后除去游离病毒并溶解T细胞激活剂,并继续细胞培养3天。CD19CAR-T细胞对RAJI肿瘤细胞的细胞毒性活性通过流式

细胞术测量与CAR-T细胞共培养4小时后肿瘤细胞的钙AM染料的损失来评估。使用FMC63特异性抗体(AcroBiosystems)通过流式细胞术测量CD19CAR的表达。

[0080] 当在培养17-20小时收获产品时,使用标准流式细胞术方法,CD19CAR蛋白在T细胞表面上没有显著表达,因此也在小鼠模型中评估了T细胞的活性,以证明产物的功效。以这种方式,CAR的完全表达在体内发生,随后使T细胞能够获得其对表达人CD19的细胞的细胞毒性活性。为了证明快速制造的CAR-T产物的改善的功效,这项体内研究使用了冷冻保存的细胞,这些细胞从单核细胞耗竭的PBMC开始制造17小时,并按照快速制造工作流程的详细实施例部分中描述的工作流程用CD19 CAR慢病毒载体转导。这种表达CD19 CAR的产物被称为UF-KURE19细胞。使用相同的工作流程制造但在培养物中保持6天而不是17小时的细胞被称为Kure19。在人淋巴瘤的循环小鼠模型中测试细胞,该模型包括将人RAJI肿瘤细胞静脉注射到免疫缺陷小鼠(NSG)中,然后在肿瘤细胞注射后第7天静脉注射单剂量CAR-T产物。尽管传统上,在该模型中使用约500万个CAR T细胞来证明显著的疗效,但由于快速生产的产品效力有望提高,因此使用了较低的剂量。在这种情况下,对于UF-Kure19产物,剂量为200万和400万CAR阳性T细胞用于UF-KURE19队列,200万CAR阴性T细胞用于6天制造的产品。如图5所示,UF-KURE19细胞在低剂量和高剂量水平下都表现出显著的疗效。相反,尽管与载体处理的小鼠相比,6天培养的产品显示出肿瘤进展减少,但与UF-KURE19产物相比,其疗效显著降低。与使用Kure19的小鼠研究类似,UF-KURE19注射组耐受治疗良好(通过体重变化、进食、外观和行为监测),没有明显的毒性迹象。

[0081] CD19 CAR-T细胞已被发现持续数月甚至数年(通过检测转基因来测量)。例如,Tisa-cel产品已被发现在一些具有良好临床结果的患者中持续使用至少2年(10)。用流式细胞术测定了RAJI淋巴瘤荷瘤NSG小鼠血液中人T细胞的增殖。在图9中,显示了在将RAJI肿瘤细胞注射(静脉注射50万)到雌性NSG小鼠中后的指定时间点(每个时间点对n=3-5只小鼠进行测量)的每微升小鼠外周血检测到的人类T细胞的平均数量。值得注意的是,这些测量的血液样本来源于上述小鼠疗效研究。如表4所示,UF-KURE19细胞的功效显著高于6天制造的KURE19 CAR-T细胞,这与人T细胞扩增相关。

[0082] 表4.通过流式细胞术检测每微升小鼠血液中的T细胞

[0083]	UF-Kure19 4x106细胞	UF-Kure19 2x106细胞	6天CAR-T2x106细胞
第32天	126.7	60.1	2.7
第39天	410.1	ND	7.3
第46天	969.1	995.6	14.9

[0084] ND=未测定

[0085] 如上所述,在快速制造工作流程中使用细胞因子对于实现显著的转导效率是不必要的。因此,通过流式细胞术评估细胞因子的使用对收获时(20小时)T细胞的记忆/分化状态的影响。此外,本研究采用了如图10所示在制造过程中使用不同细胞因子或不使用细胞因子的方法,以更好地评估细胞因子对产品的影响。最后,本研究还比较了单核细胞耗竭的PBMC和使用分离的T细胞作为起始来源。除了使用纯化的T细胞作为样本子集的起始来源外,使用了快速制造工作流程的详细实施例部分中描述的制造工作流程。使用RosetteSep®人T细胞富集试剂盒(StemCell Technologies)从外周血中纯化T细胞。如表5所示,在CD8+T细胞中,当将从分离的T细胞开始制造的产品与单核细胞耗竭的PBMC进行比

较时,观察到产品的CD8+T细胞组分不相同。特别地,当从PBMC开始时,效应记忆T细胞的水平略低,TEMRA细胞的百分比略高。CD8+TERA细胞的作用尚未完全阐明,但它们被认为具有增加的细胞毒性活性,这可能是有益的。在CD8+T细胞室中,已知与CAR-T功效相关的高度有益的幼稚T细胞的水平在以PBMC或从分离的T细胞起始是相似的,然而,与分离的T淋巴细胞相比,PBMC中有益的中央记忆T细胞的百分比更高,分化程度更高且不太理想的效应记忆细胞的水平更低。在CD4+T细胞室中,与分离的T细胞相比,当以PBMC起始时,高度有益的幼稚T细胞百分比增加。因此,基于对产品的表型分析,发现使用PBMC起始工作流程赋予了更优选的工作流程,可以预测该工作流程会导致临床结果的改善和CAR-T细胞在体内的更大持久性。此外,本研究还调查了制造过程中使用不同细胞因子(IL2、IL7、IL-15)或不使用细胞因子的情况。如表5所示,以PBMC起始,在任何条件下,在20小时的工作流程中,T细胞记忆/分化表型都没有显著差异,这进一步表明,当以单核细胞耗竭的PBMC起始时,细胞因子并不是制造工作流程的必要成分。有趣的是,当从分离的T细胞开始时,当不使用细胞因子时,注意到幼稚T细胞的减少,这表明当使用分离的T淋巴细胞作为起始来源时,细胞因子的使用可能对制造更重要。PBMC可能提供了细胞因子的内源性来源。

[0086] 表5. 使用快速工作流程制造的T细胞表型。

CD8+T 细胞

T 细胞

[0087]

TEMRA	幼稚	CM	EM
CCR7-	CCR7+	CCR7+	CCR7-

	激活	细胞因子	CD45RA+	CD45RA+	CD45RA-	CD45RA-
	否	无	4.79	63	6.01	26.2
	是	无	5.87	58.9	8.53	26.7
	是	IL2 (300u/ml)	6.75	65.7	5.81	21.7
	是	IL7 (10ng/ml)	6.73	62.1	6.6	24.6
	是	IL15 (5ng/ml)	5.02	66.1	6.13	22.8
	是	IL7+IL15	5.62	65.4	6.86	22.2
PBMC						
			TEMRA	幼稚	CM	EM
			CCR7-	CCR7+	CCR7+	CCR7-
	激活	细胞因子	CD45RA+	CD45RA+	CD45RA-	CD45RA-
[0088]	否	无	3.3	66.8	8.2	21.8
	是	无	10.4	64.8	10.1	14.8
	是	IL2 (300u/ml)	10	64.7	12	13.3
	是	IL15 (5ng/ml)	8.2	66.3	11.6	13.9
	是	IL7+IL15	5.6	68.4	11.8	14.2
CD4+T 细胞						
T 细胞						
			TEMRA	幼稚	CM	EM
			CCR7-	CCR7+	CCR7+	CCR7-
	激活	细胞因子	CD45RA+	CD45RA+	CD45RA-	CD45RA-
	否	无	4.1	66.1	18.1	11.6
	是	无	3.5	63.6	23.2	9.7

是	IL2 (300u/ml)	4.1	70.3	18.3	7.3
是	IL7 (10ng/ml)	3.3	68.0	20.4	8.3
是	IL15 (5ng/ml)	1.9	70.1	21.2	6.8
是	IL7+IL15	2.4	70.2	20.6	6.8

PBMC

		TEMRA	幼稚	CM	EM
[0089]		CCR7-	CCR7+	CCR7+	CCR7-
激活	细胞因子	CD45RA+	CD45RA+	CD45RA-	CD45RA-
否	无	2.0	74.4	15.9	7.8
是	无	5.4	77.0	13.8	3.8
是	IL2 (300u/ml)	4.7	79.7	12.4	3.2
是	IL15 (5ng/ml)	3.8	78.7	14.3	3.2
是	IL7+IL15	2.7	82.0	12.3	3.1

[0090] 使用快速制造工作流程的详细实施例部分中描述的快速工作流程或使用除了以分离的T细胞作为起始细胞源而其他工作流程相同的方法制造T细胞。20小时后,通过流式细胞术评估细胞的T细胞表型。

[0091] 由于体外研究表明,当使用快速制造工艺时以PBMC起始时,细胞因子似乎不是有效转导T细胞或维持优选记忆/分化T细胞表型所必需的,因此进行了小鼠体内疗效研究以进一步证实这些发现。CD19CAR-T细胞是使用快速制造工作流程制造的,以单核细胞耗竭的PBMC起始,在培养过程中使用IL-7 (10ng/ml) 和IL-15 (5ng/ml) 或不使用细胞因子。采用与上述相同的NSG小鼠的人淋巴瘤肿瘤模型 (RAJI)。在这种情况下,在肿瘤细胞注射后第7天,每只小鼠注射 1.2×10^6 个CD19CAR阳性T细胞。如图6所示,在完全不存在外源性细胞因子的情况下生产的CAR-T产品以与使用细胞因子生产的产品类似的方式有效控制了肿瘤进展。在第45天进行成像之前,所有载体对照小鼠都死于疾病进展。值得注意的是,如图6A所示,低剂量 1.2×10^6 CD19CAR阳性T细胞显示出高效力,进一步证明了快速CAR-T产品的效力。这项研究还清楚地表明,以PBMC起始的快速(不到1天)生产CAR-T产品不需要外源性细胞因子。

[0092] 除了类似的疗效外,当使用无细胞因子的产品时,小鼠中循环的人类T细胞没有减少。在肿瘤细胞注射后第41天,使用人特异性CD3抗体和流式细胞仪分析对图6所示实验的小鼠血液中的T细胞进行定量。无细胞因子CAR-T组:每微升小鼠血液4495个人T细胞。IL7/IL15CAR-T组:每微升小鼠血液1618个人T细胞。

[0093] 快速制造工作流程的详细实施例。

[0094] 括号中示出了对该工作流程的选定代表性修改。除了下面介绍的这种相对人工的

工作流程外,整个工作流程可以以完全封闭和/或半自动化或自动化的方式进行。例如,可以使用自动化设备进行细胞洗涤、收获等。

[0095] 以单核细胞耗竭的PBMC起始生产不到1天的CAR-T产品的制造工艺:

[0096] A. 获取起始细胞(第-1天或第0天)

[0097] 自体外周血单个核细胞是使用白细胞分离术(或外周血抽取)从患者身上获得的。细胞产物被立即处理或保存过夜。(如果需要,细胞产物也可以冷冻保存,并在以后进行处理)。

[0098] B. 单采样本处理(第0天)

[0099] 通过离心洗涤单采样本以去除血浆并减少污染血小板的数量。(如果使用外周血而不是单采样本,则通过基于ficoll的分离方法分离PBMC)。接下来,将单采样本在添加了CTS免疫细胞血清替代物(ThermoFisher Scientific)的培养基如TexMACS(Miltenyi Biotec)中稀释,在组织培养瓶或细胞培养袋中孵育,并在37°C(±2°C)的培养箱中放置,以粘附浓度高达500万个细胞/ml的单核细胞。在单核细胞粘附到烧瓶或袋上至少2小时后,将未粘附的细胞转移到新的组织培养烧瓶或袋中。用含有IL7(10ng/ml)和IL15(5ng/ml)的培养基将体积调节至200万个细胞/ml。(培养基也可以在不添加任何外源性细胞因子或单独使用IL-7、单独使用IL15或其他细胞因子的情况下制备)。

[0100] C. T细胞的激活(第0天)

[0101] **Cloudz®**CD3/CD28T细胞激活剂(R&D Systems/Biotechne)可以添加到含有单核细胞耗竭和处理过的单采产物的烧瓶中。(其他激活剂包括可溶性CD3抗体、可溶性CD3/CD28抗体、表面结合CD3抗体(含或不含CD28可溶性抗体)、**Immunocut®**(Stemcell Technologies)或任何其他T细胞激活剂可以被使用)。

[0102] D. 细胞转导(第0天)

[0103] 在加入T细胞激活剂后立即将病毒载体加入含有单核细胞耗竭的PBMC的烧瓶或袋中,使用被确定为导致每个细胞的拷贝数小于5的感染复数(MOI)。将细胞在37°C(±2°C)的5%(±0.5%)CO₂培养箱中培养17-20小时。

[0104] E. 细胞收获(第1天)

[0105] 如果使用**Cloudz®**试剂激活细胞,则将GMP级6X释放缓冲液(R&D Systems/Biotechne)直接添加到含有激活/转导细胞的烧瓶或袋中。接下来,将细胞洗涤并重悬于冷冻缓冲液中,例如冷冻袋或小瓶中的Plasmalyte-A、5%HSA和5%DMSO。

[0106] 用快速基因工程化的T细胞产物进行载体拷贝数和复制型病毒放行测试的方法描述:

[0107] 由于涉及病毒载体的快速T细胞制造工作流程领域的一个关键障碍是进行所需的产品放行测试,因此开发了以下方法。逆转录病毒或慢病毒转导的细胞治疗产品目前所需的放行测试要求包括评估复制型慢病毒和载体拷贝数。当使用传统的基于qPCR的测定时,即使游离质粒的污染水平很低,这两种测定法都有明显的假阳性结果。293细胞转染的残余游离质粒存在于病毒载体中。在病毒转导后进行制造的早期时间点,载体中残留有质粒,使用传统的检测方法几乎不可能消除假阳性结果。这种假阳性反应一直是一个主要的障碍,并限制了快速生产可用于患者的产品的能力。

[0108] 由于对病毒整合和复制型载体两者的目标DNA是整合的病毒DNA,因此这里包括的

制造工作流程与去除游离残余质粒DNA的方法相结合,从而可以对载体拷贝数和复制型慢病毒进行PCR反应或其他分子测试,而不会出现这种假阳性反应。特别地,游离质粒DNA比基因组DNA小得多。使用基于离心的方法来耗竭小DNA,同时保持较大的基因组DNA。使用这种方法,质粒DNA没有假阳性反应,这克服了快速制造CAR-T的主要障碍,同时测量整合到基因组中的DNA仍然是可行的。

[0109] 为了去除短时间(例如0-3天)扩增的CAR-T产品中的游离质粒DNA,可以耗竭小尺寸DNA(例如小于10kb),同时可以使用离心(例如使用溶液如盐/聚合物溶液以优先沉淀高分子量DNA)来保持基因组DNA。例如,可以使用PacBio短读消除器试剂盒(PacBio;门洛帕克,加利福尼亚州),并且能够从单个离心步骤中进行这种分离(circulomics.com/store/short-read-eliminator-kit-pl31401036)。除了这种商业试剂之外,另一种方法是在下文描述的方案中使用4%PVP360000、1.2MKCL、20mMTris-HCLph8来代替商业缓冲液SRE,因为它之前已经被证明可以有效地耗竭小尺寸片段(例如,总DNA中<10kb的DNA)(11)。然后纯化的DNA可以直接用于测定(例如qPCR测定)。虽然该试剂盒不是为这种特定的适应症而设计的,但它功能良好,提供了一种简单、经济高效和快速的方法。

[0110] 如何使用这种方法的一个实例是使用任何可以分离人类基因组DNA的商业总DNA分离试剂盒(例如,DNeasy血液和组织试剂盒,Qiagen,希尔登,德国)来初步分离总DNA。接下来,可以采用以下方法或类似方法来去除低片段DNA。

[0111] 1.使用宽孔移液管吸头,将缓冲液SRE加入起始基因组DNA样本中,并通过吸打充分混合。如果不使用PacBio或其他商业试剂,可以以1:1的体积比将4%PVP360000、1.2MKCL、20mMTris-HCLph8添加到总DNA样本中。

[0112] 2.在室温下以10000×g离心30分钟。

[0113] 3.用移液管移走上清液。

[0114] 4.向试管中加入70%的乙醇。

[0115] 5.在室温下以10000×g对试管进行离心约2分钟。

[0116] 6.去除上清液并重复用70%乙醇洗涤。

[0117] 7.将缓冲液EB(或10mM Tris-HCLph 8,如果不使用PacBio试剂盒)加入试管中,在50°C下孵育10-30分钟,然后重悬DNA颗粒。

[0118] 将低片段去除工作流程与快速制造工作流程相结合,证明这是一种有效的工艺,可以在培养的早期时间点(例如17小时至3天)对基因工程化T细胞产品进行放行测试。例如,使用17-20小时工作流程制造的CAR-T产物在20小时收获,替代等分试样在72小时收获。使用DNeasy血液和组织试剂盒(Qiagen)分离总DNA,并使用短读消除器试剂盒(PacBio)制备低片段耗竭的DNA。使用对VSV-G的实时PCR测定低片段耗竭的DNA以及总DNA样本的复制型慢病毒并使用对GAG和管家基因PTBP2的实时PCR检测法测试载体整合。用于PCR反应的引物和荧光探针可见表6。

[0119] 表6.用于GAG、VSV-G和PTBP2-qPCR测定的PCR引物和探针。

[0120] GAG引物

[0121] 5'-GGAGCTAGAACGATT CGCAGT TA-3'

[0122] 5'GGT TGTAGC TGT CCCAGTATT TGT C-3'

[0123] GAG探针

[0124] 5'-/56-FAM/ACA GCC TTC TGATGT TTC TAACAG GCCAGG 3'BHQ-1

[0125] PTPB2引物

[0126] 5'-TCT CCATTC CCTATG TTCATG C-3'

[0127] 5'-GTT CCC GCAGAATGG TGA GGT G-3'

[0128] PTPB2探针

[0129] 5'-/5HEX/ATG TTC CTC/ZEN/GGA CCAACT TG 3iabfq 3'

[0130] VSVG引物

[0131] 5'-AGG GAA CTG TGG GAT GAC TG

[0132] 5'-GAACAC CTGAGC CTT TGA GC

[0133] VSVG探针

[0134] 5'-6FAM-GAACACCTGAGCTTTGAGC MGBNFQ-3'

[0135] 使用标准探针对PCR产物进行定量,该探针由线性化质粒组成,该质粒被工程化以表达GAG、VSV-G和PTBP2的单拷贝。如图7A所示,用低片段耗竭的DNA进行的qPCR反应没有检测到VSV-G,因此对复制性慢病毒呈阴性,正如在制造20小时的两种不同产品上预期的那样。相反,当使用没有低片段耗竭的总基因组DNA时,两个样本都示出了VSV-G的假阳性qPCR结果,这可能是由于低片段游离质粒污染。为了评估替代方法,如细胞洗涤或培养3天(而不是20小时)是否可以克服复制型慢病毒检测的假阳性反应性,我们进行了进一步的测定。特别地,我们在20小时和72小时收获慢病毒转导的CD19CAR-T产物,并在基因组DNA分离之前对细胞进行大量洗涤。特别地,对72小时的样本,将细胞(5×10^6 个细胞)在50ml PBS体积中洗涤15次,对20小时的样本,细胞(5×10^6 个细胞)在50ml PBS体积中洗涤5次。在所有情况下(两种产物的20小时和72小时样本),使用VSV-G qPCR测定存在假阳性反应性。因此,将培养持续时间增加到3天和大量的细胞洗涤不足以减少这种假阳性反应性。

[0136] 值得注意的是,对于复制型慢病毒检测,在过去10年中,从未向美国食品药品监督管理局报告过临床产物的阳性检测,这加强了快速产物制造在17-20小时和72小时内一致观察到的阳性反应是由于假阳性反应所致(fda.gov/media/113790/download)。此外,当培养持续时间延长至8天时,VSV-GqPCR测定结果变为阴性,这表明在该时间点游离质粒DNA丢失,并且不存在真正的复制型病毒。

[0137] 与复制型慢病毒测试类似,病毒转导的细胞治疗产物的另一个重要放行测试是载体整合,其通常通过针对GAG基因的qPCR进行测量,对于GAG基因,病毒载体中也存在游离质粒污染,并可产生假阳性反应性。最初,进行GAG/PTPB2 qPCR以确定在培养8天的CD 19CAR慢病毒转导的T细胞上的载体拷贝数,以便评估载体的感染复数(MOI)和评估完全载体整合的基线。如图7B所示,10:1的MOI导致每个转导的T细胞(即表达CD19CAR)的峰值载体拷贝数为1.5。接下来,除了在第20小时、第3天和第7天收获细胞之外,当CD19CAR载体的MOI采用10:1时,使用快速制造工作流程确定每个转导细胞的载体拷贝数。此外,SRE试剂盒(PacBio)用于去除低片段DNA。如图7C所示,载体整合结果在所有时间点上都是相似的。值得注意的是,CD 19CAR表面表达在20小时时非常低,尽管它在72小时左右完全表达。

[0138] 最后,低片段去除前后的两个20小时快速制造的T细胞产物制备的总DNA样本的凝胶电泳表明,基因组DNA如预期的那样得到了维持,因此只有不需要的低分子量片段被耗竭(图7D)。此外,使用Nanodrop®分光光度计(ThermoFisher Scientific)对DNA浓度进行定

量,在低片段去除前后,没有发现任何DNA浓度的可测量的变化,这表明只有微量的DNA被去除。

[0139] 如将理解的,目前描述的CAR-T细胞制造工作流程提供了对现有技术方法的显著改进。特别地,不旨在任何限制:

[0140] 1. 主要使用来自单采产物的未分级细胞或通过粘附到固体表面而经历单核细胞耗竭的单采细胞进行制造。此外,可以利用直接从外周血分离的外周血单个核细胞(PBMC)或单核细胞耗竭的PBMC。因此,它不需要纯化T细胞,而纯化T细胞被认为对涉及病毒转导的快速CAR-T工作流程非常重要。据我们所知,这是第一个使用PBMC而不是分离的T细胞作为起始来源,使用病毒转导进行快速基因修饰的T细胞制造的1天或小于1天的方案。

[0141] 2. 使用不同的方法进行细胞活化。磁珠从细胞上脱落需要数天时间,因此使用这种磁珠的方法要么延迟了可以收获产品的日期,和/或由于珠结合细胞的损失而导致产品产量显著降低。此外,我们出乎意料地观察到使用特定的非磁性珠基T细胞激活剂提高了转导效率。目前描述的激活方法提供了改进的转导效率,同时避免了如现有技术方法中所要求的利用磁珠所涉及的增加的成本和增加的制造复杂性。

[0142] 3. 目前描述的制造过程是所描述的第一个工作流程快速CAR-T制造工作流程,其可以在不存在外源性细胞因子的情况下有效地进行。制造过程中的细胞因子显著增加了成本,也可能导致T细胞的变化。由于快速制造工作流程的一个主要好处是保持T细胞(如幼稚T细胞)的起始群尽可能接近从患者身上收集的原始细胞,因此避免外源性细胞因子被视为一个主要优点。

[0143] 4. 所描述的使用完全封闭的系统来使用袋子制造T细胞产品的用途允许提供一种方便的基于试剂盒的产品,其中病毒/培养基/激活剂等将被提供在袋子中,然后与单采产品混合。所述产品可以使用这种方法在洁净室外制造,以促进产品的广泛使用和制造,这可以降低成本并增加可获得性。

[0144] 5. 目前描述的方法克服了进行所需产品放行测试领域中的一个关键障碍。逆转录病毒或慢病毒转导的细胞治疗产品目前所需的放行测试要求包括评估复制型慢病毒和载体拷贝数。当使用传统的基于qPCR的测定时,即使游离质粒的污染水平很低,这两种检测也具有显著的假阳性结果。来自病毒产生细胞如293细胞的残余游离质粒存在于病毒载体中。在病毒转导后制造的早期时间点,载体中残留有质粒,使用传统的检测方法几乎不可能消除假阳性结果。这种假阳性反应一直是其他组的主要障碍,并限制了快速生产可用于患者的产品的能力。由于对病毒整合和复制型载体两者的目标DNA是整合的病毒DNA,因此本文所包括的制造工作流程与去除游离残余质粒DNA的方法相结合,从而可以对载体拷贝数和复制型慢病毒进行qPCR反应,而不会出现这种假阳性反应。特别地,游离质粒DNA比基因组DNA小得多。使用基于离心的方法来耗竭小的DNA,同时保持较大的基因组DNA。使用这种方法,质粒DNA没有假阳性反应性,这克服了快速制造CAR-T的主要障碍,同时测量整合到基因组中的DNA仍然是可行的。

[0145] 除非另有定义,否则本文中所述的所有技术和科学术语具有本发明所属领域的技术人员通常理解的含义。

[0146] 除非另有说明,否则在本文的整个公开中提及的所有专利、专利申请、已公布的申请和出版物、GenBank序列、数据库、网站和其他已公布的资料均通过引用的方式整体并入

本文。

[0147] 当提及URL或其他此类标识符或地址时,应理解此类标识符可能会发生变化,互联网上的特定信息可能不断变化,但可以通过搜索互联网找到等效信息。参考文献证明了此类信息的可获得性和公开传播性。

[0148] 如本文所用,除非另有说明,否则任何保护基、氨基酸和其他化合物的缩写都是符合其常见用法、公认缩写,或IUPAC-IUB生物化学命名法(见Biochem. (1972) 11 (9) :1726-1732)。

[0149] 尽管与本文所述方法、装置和材料相似或等效的任何方法、装置或材料可用于实践或测试当前公开的主题,但本文描述了具有代表性的方法、装置及材料。

[0150] 在某些情况下,本文公开的核苷酸和多肽包含在公开可用的数据库中,如GENBANK®和SWISSPROT。包括序列在内的信息以及与包括在这样的公开可用的数据库中的这样的核苷酸和多肽相关的其他信息通过引用被明确地并入。除非另有说明或显而易见,否则对此类公开可用数据库的引用是对截至本申请提交之日的数据库的最新版本的引用。

[0151] 除非另有说明,说明书和权利要求书中使用的所有表示成分数量、性质(如反应条件)等的数字在所有情况下都应理解为用术语“约”修饰。因此,除非相反地指示,否则本说明书和权利要求书中提出的数值参数是近似值,其可以根据当前公开的主题所寻求的所需性质而变化。

[0152] 无论在何处使用任何短语“例如”、“诸如”、“包括”等,除非另有明确说明,否则应理解为“且不限于”跟随其后。类似地,“示例”、“示例性”等被理解为非限制性的。术语“基本上”允许偏离描述符,不会对预期目的产生负面影响。即使没有明确引用“基本上”一词,描述性术语也被理解为被术语“基本上”所修饰。因此,例如,短语“杠杆垂直延伸”是指“杠杆基本上垂直延伸”,只要杠杆执行其功能不需要精确的垂直布置。

[0153] 术语“包含(comprising)”和“包括(including)”以及“具有(having)”和“涉及(involving)”(类似地,“包含(comprises)”、“包括(includes)”、“具有(has)”、“涉及(involves)”等可互换使用,具有相同含义。具体而言,每个术语的定义与美国专利法中“包含(comprising)”的定义一致,因此被解释为一个开放术语,意思是“至少如下”,也被解释为不排除其他特征、限制、方面等。因此,例如,“涉及步骤a、b和c的过程”意味着该过程至少包括步骤a、b和c。何时使用术语“一”或“一个”,都应理解为“一个或多个”,除非这种解释在上下文中是无意义的。术语“包含(comprise)”、“具有(have)”、“包括(include)”和“含有(contain)”(及其变体)是开放式连接动词,在权利要求中使用时允许添加其他元素。

[0154] 除非上下文另有规定,否则当与权利要求或说明书中的术语“包含(comprising)”一起使用时,单词“一”或“一个”的使用是指一个或多个。

[0155] 如本文所用,当提及质量、重量、时间、体积、浓度或百分比的值或量时,术语“大约”是指在一些实施方案中包括与指定量相比 $\pm 20\%$ 、在一些实施方案中 $\pm 10\%$ 、在一些实施方案中 $\pm 5\%$ 、在一些实施方案中 $\pm 1\%$ 、在一些具体实施方案中 $\pm 0.5\%$ 、在一些实施方案中为 $\pm 0.1\%$ 、在一些实施方案中为 $\pm 0.01\%$ 和在一些实施方案中为 $\pm 0.001\%$ 的变化,只要这样的变化适合于进行所公开的方法。权利要求中“或”一词的使用是指“和/或”,除非明确表示仅指替代物,或者如果替代物是互斥的。

[0156] 如本文所用,范围可以表示为从“大约”一个特定值和/或到“大约”另一特定值。还应理解,本文公开了许多值,并且每个值在本文也被公开为“大约”该特定值。例如,如果值“10”被公开,那么“大约10”也被公开。还应当理解,还公开了两个特定单元之间的每个单元。例如,如果公开了10和15,那么也公开了11、12、13和14。

[0157] 如本文所用,“任选的”或“任选地”是指随后描述的事件或情况发生或不发生,并且描述包括所述事件或情况发生的实例和没有发生的实例。例如,可选地变体部分意味着该部分是变体或非变体。

[0158] 应当理解,在不脱离本文公开的主题范围的情况下,可以改变当前公开的主题的各种细节。此外,上述描述仅用于说明的目的,而不是用于限制的目的。根据上述教导,明显的修改和变化是可能的。当根据所附权利要求公平、合法和公正地享有的宽泛程度进行解释时,所有这些修改和变化都在所附权利要求的范围内。

[0159] 参考文献:

[0160] 1.Rodriguez J,Caballero MD,Gutierrez A,Solano C,Arranz R,Lahuerta JJ, Sierra J,Gandarillas M,Perez-Simon JA,Zuazu J,Lopez-Guillermo A,Sureda A, Carreras E,Garcia-Larana J,Marin J,Garcia JC,Fernandez De Sevilla A,Rifon J, Varela R,Jarque I,Albo C,Leon A,SanMiguel J,Conde E.Autologous stem-cell transplantation in diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma not achieving complete response after induction chemotherapy:the GEL/TAMO experience.*Ann Oncol*.2004;15(10):1504-9.Epub2004/09/16.doi:10.1093/annonc/mdh391.PubMed PMID:15367411.

[0161] 2.Vose JM,Zhang MJ,Rowlings PA,Lazarus HM,Bolwell BJ,Freytes CO, Pavlovsky S,Keating A,Yanes B,van Besien K,Armitage JO,Horowitz MM,Autologous B,Marrow Transplant Registry Lymphoma WorkingC.Autologous transplantation for diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma in patients never achieving remission:a report from the Autologous Blood and Marrow Transplant Registry.*J Clin Oncol*.2001;19(2):406-13.Epub 2001/02/24.doi:10.1200/JCO.2001.19.2.406.PubMed PMID:11208832.

[0162] 3.Crump M,Neelapu SS,Farooq U,Van Den Neste E,Kuruvilla J,Westin J, Link BK,Hay A,Cerhan JR,Zhu L,Boussetta S,Feng L,Maurer MJ,Navale L,Wiezonek J,Go WY,Gisselbrecht C.Outcomes in refractory diffuse large B-cell lymphoma: results from the international SCHOLAR-1 study.*Blood*.2017;130(16):1800-8.Epub 2017/08/05.doi:10.1182/blood-2017-03-769620.PubMed PMID:28774879;PMCID: PMC5649550.

[0163] 4.Westin JR,Kersten MJ,Salles G,Abramson JS,Schuster SJ,Locke FL, Andreadis C.Efficacy and Safety of CD19-Directed CAR-T Cell Therapies in Patients With Relapsed/Refractory Aggressive B-Cell Lymphomas:Observations From the JULIET,ZUMA-1,and TRANSCEND Trials.*American journal of hematology*.2021.Epub 2021/07/27.doi:10.1002/ajh.26301.PubMed PMID:34310745.

[0164] 5.Harrison RP,Zylberberg E,Ellison S,Levine BL.Chimeric antigen

receptor-T cell therapy manufacturing:modelling the effect of offshore production on aggregate cost of goods.Cytotherapy.2019;21(2):224-33.Epub 2019/02/17.doi:10.1016/j.jcyt.2019.01.003.PubMed PMID:30770285.

[0165] 6.Neelapu SS,Locke FL,Bartlett NL,Lekakis LJ,Miklos DB,Jacobson CA,Braunschweig I,Oluwole OO,Siddiqi T,Lin Y,Timmerman JM,Stiff P J,Friedberg JW,Flinn IW,Goy A,Hill BT,Smith MR,Deol A,Farooq U,McSweeney P,Munoz J,Avivi I,Castro JE,Westin JR,Chavez JC,Ghobadi A,Komanduri KV,Levy R,Jacobsen ED,Witzig TE,Reagan P,Bot A,Rossi J,Navale L,Jiang Y,Aycock J,Elias M,Chang D,Wiezorek J,Go WY.Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma.N Engl J Med.2017;377(26):2531-44.Epub 2017/12/12.doi:10.1056/NEJMoal 707447.PubMed PMID:29226797;PMCID:PMC5882485.

[0166] 7.Kersten MJ,Spanjaart AM,Thieblemont C.CD19-directed CAR T-cell therapy in B-cell NHL.Curr Opin Oncol.2020;32(5):408-17.Epub 2020/08/03.doi:10.1097/CCO.0000000000000668.PubMed PMID:32740094.

[0167] 8.Zhang H,Zhao P,Huang H.Engineering better chimeric antigen receptor T cells.Exp Hematol Oncol.2020;9(1):34.Epub 2020/12/10.doi:10.1186/s40164-020-00190-2.PubMed PMID:33292660;PMCID:PMC7709221.

[0168] 9.Li Y,Kurlander RJ.Comparison of anti-CD3 and anti-CD28-coated beads with soluble anti-CD3 for expanding human T cells:differing impact on CD8 T cell phenotype and responsiveness to restimulation.Journal of translational medicine.2010;8:104.Epub 2010/10/28.doi:10.1186/1479-5876-8-104.PubMed PMID:20977748;PMCID:PMC2987859.

[0169] 10.Schuster SJ,Bishop MR,Tam CS,Waller EK,Borchmann P,McGuirk JP,Jager U,Jagowski S,Andreadis C,Westin JR,Fleury I,Bachanova V,Foley SR,Ho PJ,Mielke S,Magenau JM,Holte H,Pantano S,Pacaud LB,Awasthi R,Chu J,Anak O,Salles G,Maziarz RT,Investigators J.Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma.The New England journal of medicine.2019;380(1):45-56.Epub 2018/12/07.doi:10.1056/NEJMoal 804980.PubMed PMID:30501490.

[0170] 11.Jones A,Torkel C,Stanley D,Nasim J,Borevitz J,Schwessinger B.High-molecular weight DNA extraction,clean-up and size selection for long-read sequencing.PloS one.2021;16(7):e0253830.Epub 2021/07/16.doi:10.1371/journal.pone.0253830.PubMed PMID:34264958;PMCID:PMC8282028.

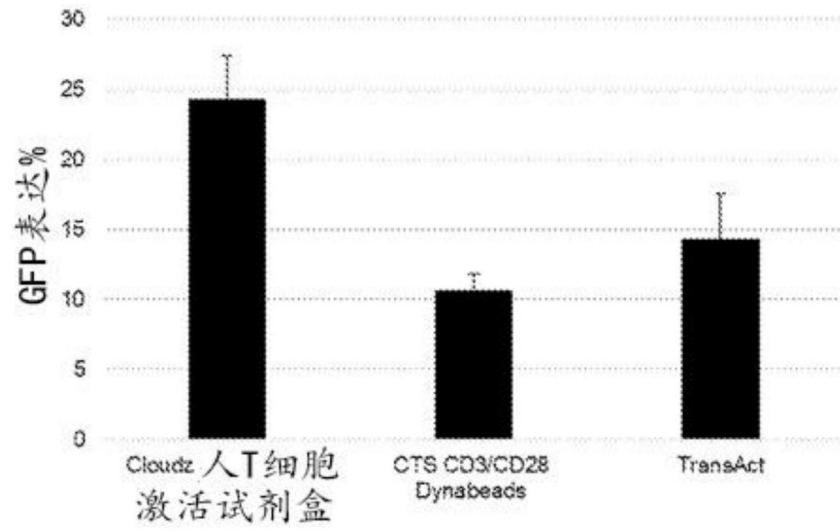


图1A

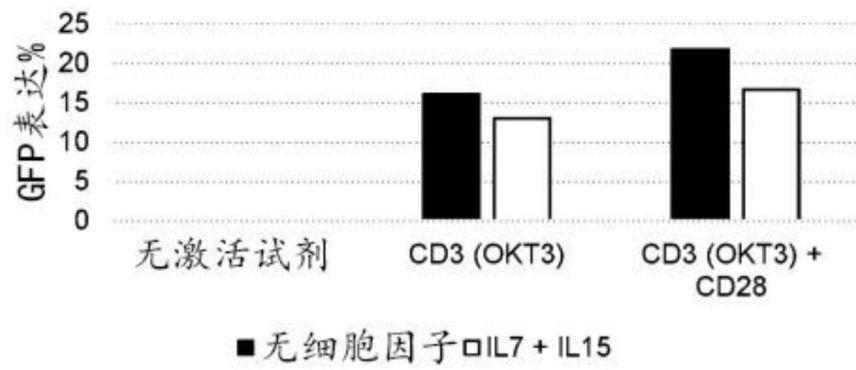


图1B

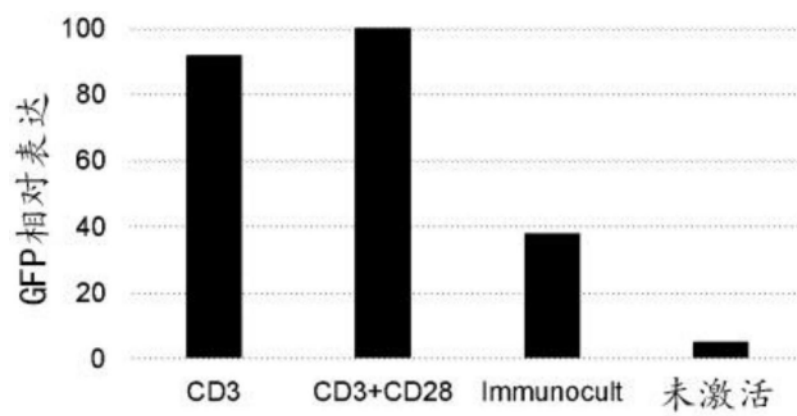


图1C

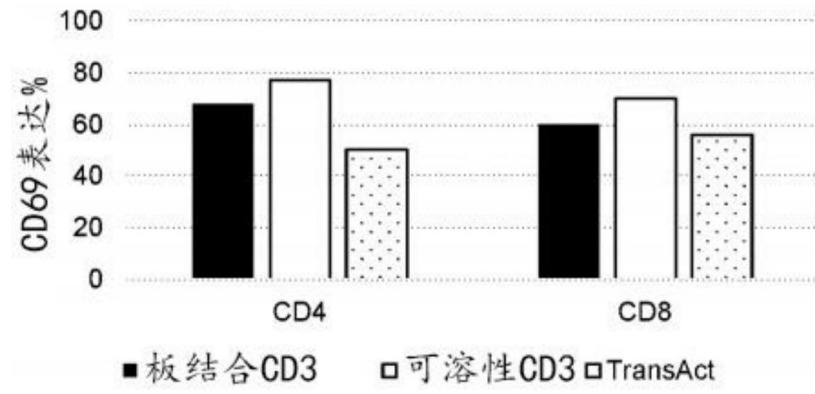


图1D

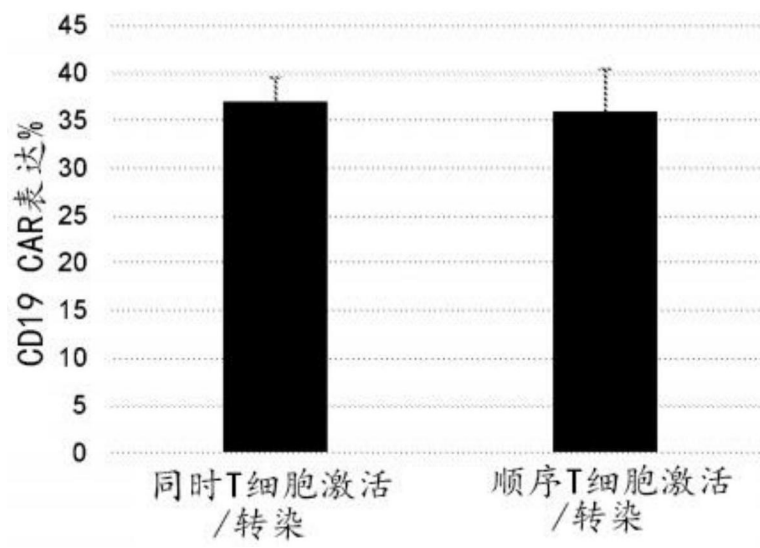


图2

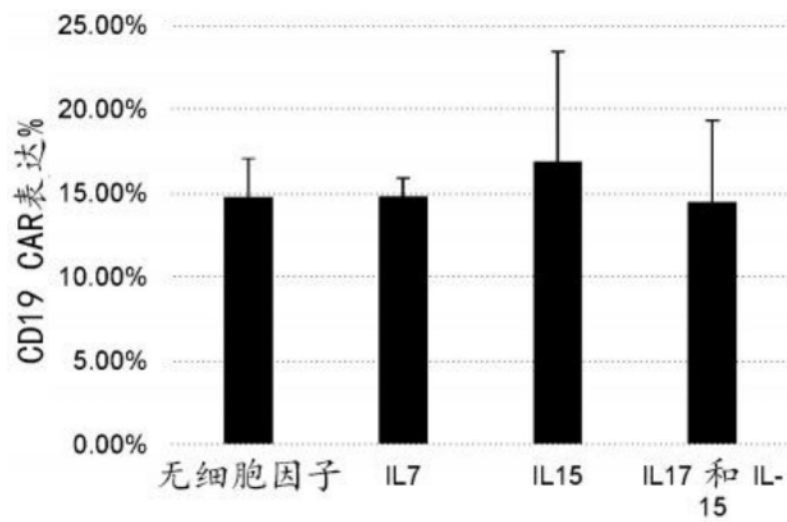


图3

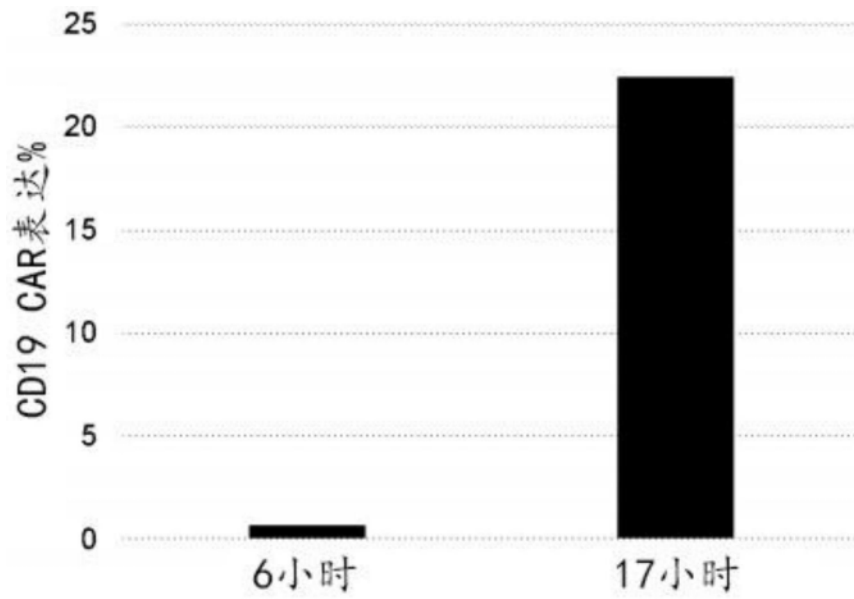


图4

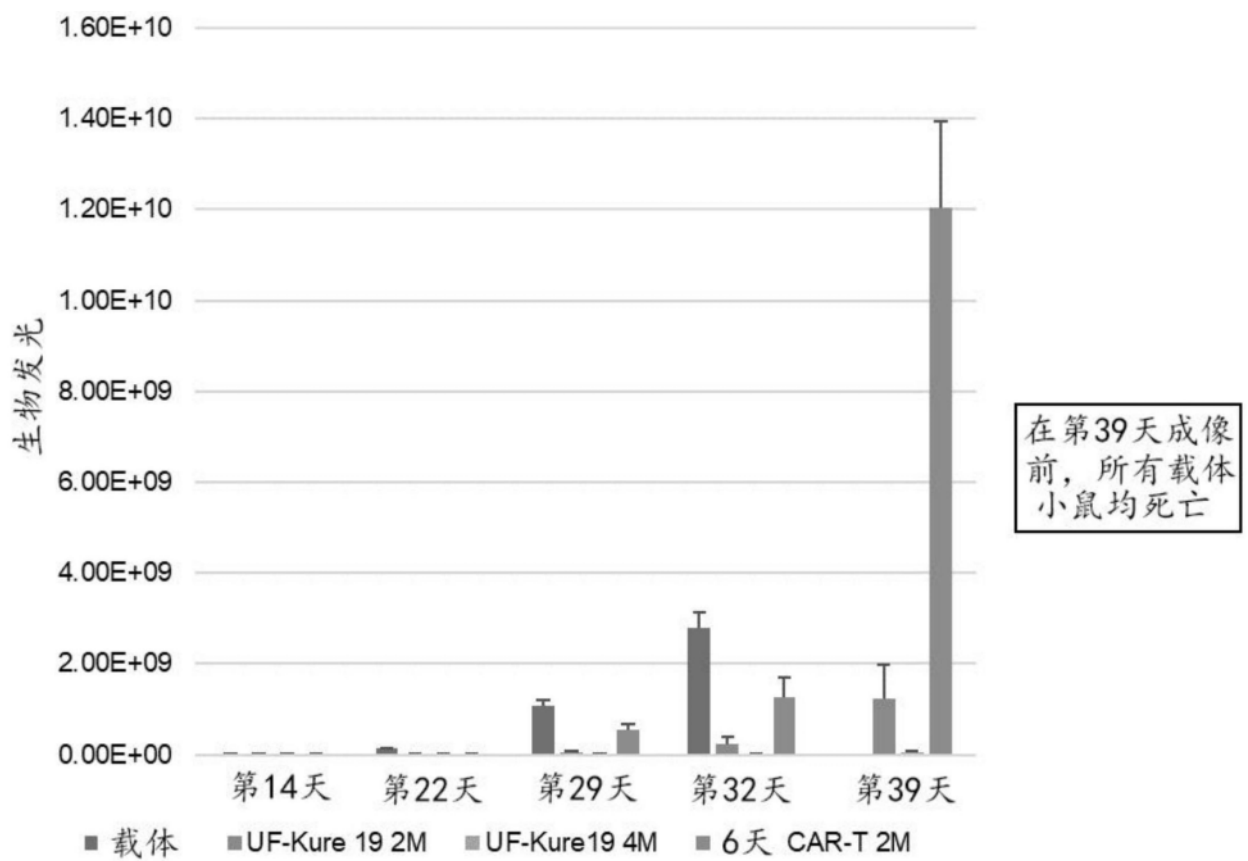


图5

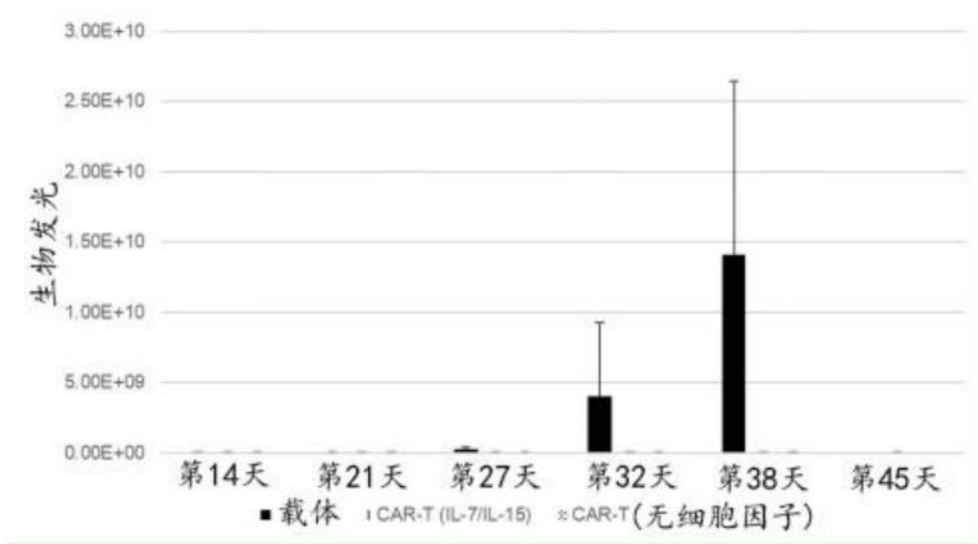


图6

VSV-G		
产品1	总基因组 DNA +	总基因组 DNA + SRE -
产品2	总基因组 DNA +	总基因组 DNA + SRE -

图7A

	拷贝数
未转导的T细胞	0
2:1	0.25
5:1	0.93
7.5:1	1.2
10:1	1.5

图7B

	20小时	3天	7天
CAR表达%	0.3	33	31
VCN/转导的细胞	1.4	1.3	1.5

图7C

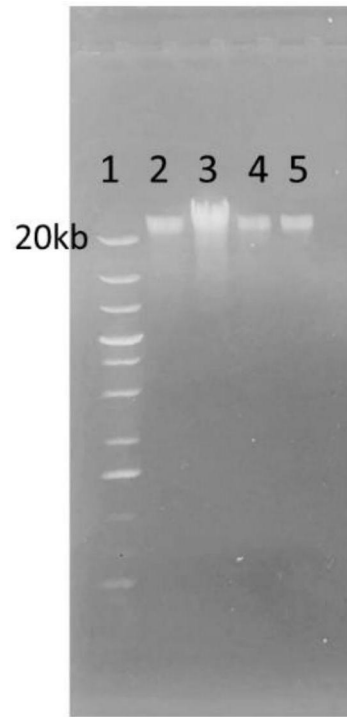


图7D