



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116096861 A

(43) 申请公布日 2023. 05. 09

(21) 申请号 202180032504.X

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256

(22) 申请日 2021.04.02

专利代理师 陈文平

(30) 优先权数据

63/005,167 2020.04.03 US

(51) Int. Cl.

C12N 5/0783 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.11.01

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/025643 2021.04.02

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2021/203046 EN 2021.10.07

(71) 申请人 赛立维公司

地址 美国得克萨斯州

(72) 发明人 A·舒勒 S·基普里亚诺夫

N·杜马蒂奥兹

权利要求书7页 说明书54页 附图13页

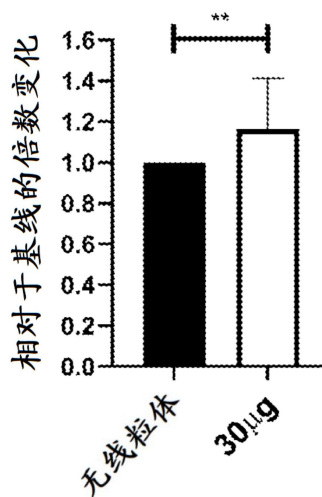
(54) 发明名称

过继性细胞转移的增强

(57) 摘要

本公开涉及线粒体增强的干细胞和免疫细胞、它们的组合物和治疗用途。

CD8 T细胞的扩增



1. 一种药物组合物,其包含在药学上可接受的载剂中配制的相对于不包含分离的活线粒体的人免疫细胞有效增强人免疫细胞存活、活性或其组合的量的分离的活线粒体。
2. 如权利要求1所述的组合物,其中所述线粒体包括真核细胞线粒体。
3. 如权利要求1或2所述的组合物,其中所述线粒体来源于人细胞系。
4. 如权利要求1或2所述的组合物,其中所述线粒体来源于健康供体。
5. 如权利要求1或2所述的组合物,其中所述线粒体来源于患者。
6. 如权利要求5所述的组合物,其中所述患者是癌症患者。
7. 如权利要求1至6中任一项所述的组合物,其中所述药学上可接受的载剂被配制用于递送至人免疫细胞中。
8. 如权利要求7所述的组合物,其中所述人免疫细胞是自体的。
9. 如权利要求7所述的组合物,其中所述人免疫细胞是同种异体的。
10. 如前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述人免疫细胞是T细胞。
11. 如前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述人免疫细胞是CD8 T细胞或CD4 T细胞。
12. 如前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述免疫细胞包含嵌合抗原受体(“CAR”)或人工T细胞受体(“TCR”)亚基或其组合。
13. 如前述权利要求中任一项所述的组合物,其包含在药学上可接受的载剂中配制的相对于不包含分离的活线粒体的人免疫细胞的基础耗氧率(OCR)有效增强所述人免疫细胞基础耗氧率(OCR)的量的分离的活线粒体。
14. 如前述权利要求中任一项所述的组合物,其包含在药学上可接受的载剂中配制的相对于不包含分离的活线粒体的人免疫细胞有效增强所述人免疫细胞最大耗氧率(OCR)的量的分离的活线粒体。
15. 如前述权利要求中任一项所述的组合物,其包含在药学上可接受的载剂中配制的相对于不包含分离的活线粒体的人免疫细胞有效增强所述人免疫细胞扩增的量的分离的活线粒体。
16. 如前述权利要求中任一项所述的组合物,其包含在药学上可接受的载剂中配制的相对于不包含分离的活线粒体的人免疫细胞有效增强所述人免疫细胞代谢活性的量的分离的活线粒体。
17. 如前述权利要求中任一项所述的组合物,其包含在药学上可接受的载剂中配制的有效增强所述人免疫细胞存活的量的分离的活线粒体,其中所述存活通过相对于不包含分离的活线粒体的人免疫细胞减少所述细胞耗竭而增强。
18. 一种包含外源性线粒体的人干细胞或免疫细胞,其中所述外源性线粒体以有效增强免疫细胞存活、活性或其组合的量存在于所述人干细胞或所述人免疫细胞中。
19. 如权利要求18所述的人干细胞,其中所述干细胞是胚胎干细胞。
20. 如权利要求18所述的人干细胞,其中所述干细胞是诱导型多能干细胞。
21. 如权利要求18所述的人免疫细胞,其中所述免疫细胞是多能干细胞来源的免疫细胞。
22. 如权利要求18或21所述的人免疫细胞,其中所述免疫细胞是T淋巴细胞。
23. 如权利要求22所述的人免疫细胞,其中所述T淋巴细胞是CD8 T细胞。

24. 如权利要求22所述的人免疫细胞,其中所述T淋巴细胞是CD4 T细胞或Treg细胞。
25. 如权利要求18或21所述的人免疫细胞,其中所述免疫细胞是自然杀伤(NK)细胞。
26. 如权利要求18或21所述的人免疫细胞,其中所述免疫细胞是单核细胞或巨噬细胞。
27. 如权利要求18或21所述的人免疫细胞,其中所述免疫细胞是嗜中性粒细胞。
28. 如权利要求18或21所述的人免疫细胞,其中所述免疫细胞是B淋巴细胞。
29. 如权利要求18至28中任一项所述的人干细胞或免疫细胞,其中所述干细胞或免疫细胞包含嵌合抗原受体(“CAR”)和/或人工T细胞受体(“TCR”)亚基。
30. 如权利要求29所述的人干细胞或免疫细胞,其中所述干细胞或免疫细胞包含选自以下组成的组的外源性多核苷酸:编码所述CAR或所述人工TCR亚基的DNA、双链RNA、单链mRNA和环状RNA载体,任选地其中所述外源性多核苷酸整合至所述干细胞或免疫细胞的基因组中。
31. 如权利要求29或30所述的干细胞或免疫细胞,其中所述CAR包含:
 - a. 抗原结合结构域;
 - b. 间隔区结构域;
 - c. 跨膜结构域;
 - d. 任选地,共刺激结构域;以及
 - e. 细胞内信号传导结构域,任选地其中所述细胞内信号传导结构域是细胞内T细胞信号传导结构域。
32. 如权利要求29或30所述的干细胞或免疫细胞,其中所述CAR包含:
 - a. 第一CAR,所述第一CAR包含对第一抗原具有特异性的抗原结合结构域、间隔区结构域、跨膜结构域和共刺激结构域和/或细胞内T细胞信号传导结构域;
 - b. 可裂解结构域;和
 - c. 第二CAR,所述第二CAR包含对第二抗原具有特异性的抗原结合结构域、间隔区结构域、跨膜结构域和共刺激结构域和/或细胞内T细胞信号传导结构域。
33. 如前述权利要求中任一项所述的干细胞或免疫细胞,其中所述共刺激结构域选自以下的组:CD28、4-1BB、OX40、CD27、ICOS、GITR、CD40、CD2、SLAM以及它们的组合。
34. 如前述权利要求中任一项所述的干细胞或免疫细胞,其中所述细胞内T细胞信号传导结构域选自CD3 ζ (ζ)、OX40、CD27、ICOS以及它们的组合。
35. 如前述权利要求中任一项所述的干细胞或免疫细胞,其中所述间隔区结构域选自C_H2-C_H3、CD28、CD8或它们的组合。
36. 如前述权利要求中任一项所述的干细胞或免疫细胞,其中所述CAR是包含对至少2种不同抗原具有特异性的抗原结合结构域的多特异性CAR。
37. 如前述权利要求中任一项所述的干细胞或免疫细胞,其中所述人工TCR包含选自以下组成的组的一个或多个亚基:TCR α (α)、TCR β (β)、TCR γ (γ)和TCR δ (δ)亚基。
38. 如前述权利要求中任一项所述的干细胞或免疫细胞,其中所述CAR或人工TCR亚基存在于所述细胞表面上。
39. 如前述权利要求中任一项所述的干细胞或免疫细胞,其中所述干细胞或免疫细胞是同种异体或自体干细胞或免疫细胞。
40. 如前述权利要求中任一项所述的免疫细胞,其中所述免疫细胞由包括间充质干细

胞或诱导型多能干细胞(iPSC)的干细胞产生。

41. 如权利要求18至20和权利要求29至39中任一项所述的干细胞,其中所述干细胞具有针对靶细胞的增强的增殖和细胞溶解活性。

42. 如权利要求18和权利要求21至40中任一项所述的免疫细胞,其中与不包含所述外源性线粒体的人免疫细胞相比,所述免疫细胞具有增强的细胞溶解活性。

43. 如权利要求18和权利要求21至40中任一项所述的免疫细胞,其中与不包含所述外源性线粒体的人免疫细胞相比,所述免疫细胞具有增强的基础耗氧率(OCR)。

44. 如权利要求18和权利要求21至40中任一项所述的免疫细胞,其中与不包含所述外源性线粒体的人免疫细胞相比,所述免疫细胞具有增强的最大耗氧率(OCR)。

45. 如权利要求18和权利要求21至40中任一项所述的免疫细胞,其中与不包含所述外源性线粒体的人免疫细胞相比,所述免疫细胞具有增强的代谢活性。

46. 如权利要求18和权利要求21至40中任一项所述的免疫细胞,其中与不包含所述外源性线粒体的人免疫细胞相比,所述免疫细胞具有增强的扩增活性。

47. 如权利要求18和权利要求21至40中任一项所述的免疫细胞,其中所述免疫细胞具有增强的存活,并且其中所述存活通过与不包含所述外源性线粒体的人免疫细胞相比减少所述免疫细胞耗竭而增强。

48. 如前述权利要求中任一项所述的人干细胞或免疫细胞,所述干细胞或免疫细胞用于治疗癌症、感染性疾病、炎症性疾病或自身免疫性疾病。

49. 一种干细胞或免疫细胞群体,其分别包含权利要求18至48中任一项所述的干细胞或免疫细胞。

50. 如前述权利要求中任一项所述的免疫细胞群体,其中所述免疫细胞群体包含NK细胞、NKT细胞、巨噬细胞、 α/β T细胞、 γ/δ T细胞、Treg细胞、嗜中性粒细胞或它们的组合。

51. 如前述权利要求中任一项所述的免疫细胞群体,其中所述免疫细胞群体包含 $CD3^+$ T细胞、 $CD4^+$ T细胞或 $CD8^+$ T细胞或它们的组合。

52. 如前述权利要求中任一项所述的干细胞或免疫细胞群体,其中使用慢病毒、腺病毒、逆转录病毒纳米颗粒或可操作地连接至靶向部分的纳米颗粒将所述CAR或人工TCR亚基引入所述干细胞或免疫细胞中。

53. 如前述权利要求中任一项所述的干细胞或免疫细胞群体,其中将编码所述CAR和/或人工TCR亚基的所述外源性多核苷酸体外引入所述干细胞或免疫细胞中。

54. 如前述权利要求中任一项所述的干细胞或免疫细胞群体,其中所述群体以有效治疗有需要的人受试者的癌症的量配制在药物组合物中。

55. 如前述权利要求中任一项所述的免疫细胞群体,其中与缺乏外源性线粒体的等效免疫细胞群体相比,所述免疫细胞群体更有效地和/或时间更长地杀伤肿瘤细胞。

56. 如前述权利要求中任一项所述的干细胞或免疫细胞群体,其中所述干细胞或免疫细胞群体包含CAR或人工TCR亚基,所述CAR或人工TCR亚基包含对选自下组的抗原具有特异性的抗原结合结构域: B细胞成熟抗原(BCMA,也称为肿瘤坏死因子受体超家族成员17, TNFRSF17)、CD19、CD123、CD22、CD30、CD171、CS-1(也称为CD2亚群1、CRACC、SLAMF7、CD319和19A24)、C-型凝集素样分子-1(CLL-1或CLECL1)、CD33、表皮生长因子受体变体III(EGFRvIII)、神经节苷脂G2(GD2)、神经节苷脂GD3、Tn抗原(Tn Ag或GalNAc-Ser/Thr)、前

列腺特异性膜抗原 (PSMA)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR1)、Fms样酪氨酸激酶3 (FLT3)、肿瘤相关糖蛋白72 (TAG72)、CD38、CD44v6、癌胚抗原 (CEA)、上皮细胞粘附分子 (EpCAM)、B7H3 (CD276)、KIT (CD117)、白细胞介素-13受体亚基 α -2 (IL-13Ra2或CD213A2);间皮素、白细胞介素11受体 α (IL-11Ra)、前列腺干细胞抗原 (PSCA)、蛋白酶丝氨酸21 (羧蛋白或PRSS21)、血管内皮生长因子受体2 (VEGFR2)、Lewis Y抗原、CD24、血小板源性生长因子受体 β (PDGFR- β);阶段特异性胚胎抗原4 (SSEA-4);CD20;叶酸受体 α ;受体酪氨酸蛋白激酶 ERBB2 (Her2/neu);细胞表面相关粘蛋白1 (MUC1);表皮生长因子受体 (EGFR);神经细胞粘附分子 (NCAM);前列腺酶;前列腺酸性磷酸酶 (PAP);延伸因子2突变型 (ELF2M);肝配蛋白B2;成纤维细胞活化蛋白 α (FAP);胰岛素样生长因子1受体 (IGF-I受体)、碳酸酐酶IX (CAIX);蛋白酶体 (前体,巨蛋白因子)亚基 β 型9 (LMP2);糖蛋白100 (gp100);由断裂点簇区 (BCR) 和艾贝尔森鼠白血病毒致癌基因同系物1 (Ab1) 组成的致癌基因融合蛋白 (bcr-ab1);酪氨酸酶;肝配蛋白A型受体2 (EphA2);岩藻糖基GM1;唾液酸化路易斯粘附分子 (sLe);神经节苷脂 GM3 (aNeu5Ac (2-3) bDG a1p (1-4) bDGlcp (1-1) Cer);转谷氨酰胺酶5 (TGS5);高分子量黑素瘤相关抗原 (HMWMAA);o-乙酰基-GD2神经节苷脂 (OAcGD2);叶酸受体 β ;肿瘤内皮标记物1 (TEM1/CD248);肿瘤内皮标记物7相关 (TEM7R);紧密连接蛋白6 (CLDN6);促甲状腺激素受体 (TSHR);G蛋白偶联受体C类5组成员D (GPCR5D);染色体X开放阅读框61 (CXORF61);CD97;CD179a;间变性淋巴瘤激酶 (ALK);聚唾液酸;胎盘特异性1 (PLAC1);globoH甘神经酰胺 (GloboH) 的六糖部分;乳腺分化抗原 (NY-BR-1);尿溶蛋白2 (UPK2);甲型肝炎病毒细胞受体1 (HAVCR1);肾上腺素受体 β 3 (ADRB3);泛连接蛋白3 (PANX3);G蛋白偶联受体20 (GPR20);淋巴细胞抗原6复合物基因座K9 (LY6K);嗅觉受体51E2 (OR51E2);TCR γ 交替阅读框蛋白 (TARP);维尔姆斯肿瘤蛋白 (WT1);癌症/睾丸抗原1 (NY-ESO-1);癌症/睾丸抗原2 (LAGE-1a);黑素瘤相关抗原1 (MAGE-A1);位于染色体12p上的ETS易位变体基因6 (ETV6-AML);精子蛋白17 (SPA17);X抗原家族成员1A (XAGE1);血管生成素结合细胞表面受体2 (Tie 2);黑素瘤癌症睾丸抗原-1 (MAD-CT-1);黑素瘤癌症睾丸抗原-2 (MAD-CT-2);Fos相关抗原1;肿瘤蛋白p53 (p53);p53突变体;前列腺素;存活;端粒酶;前列腺癌肿瘤抗原-1 (PCTA-1或半乳凝素8)、由T细胞识别的黑素瘤抗原1 (MelanA或MART1);大鼠肉瘤 (Ras) 突变体;人端粒酶逆转录酶 (hTERT);肉瘤易位断裂点;黑素瘤细胞凋亡抑制剂 (ML-IAP);ERG (跨膜蛋白酶丝氨酸2 (TMPRSS2) ETS融合基因);N-乙酰基葡糖胺基-转移酶V (NA17);配对盒蛋白Pax-3 (PAX3);雄激素受体;细胞周期蛋白B1;v-myc禽类骨髓细胞瘤病毒致癌基因神经母细胞瘤源性同源物 (MYCN);Ras同源物家族成员C (RhoC);酪氨酸酶相关蛋白2 (TRP-2);细胞色素P450 1B1 (CYP1B1);CCCTC结合因子 (锌指蛋白) 样 (BORIS或印记位点调控因子样蛋白)、由T细胞识别的鳞状细胞癌抗原3 (SART3);配对盒蛋白Pax-5 (PAX5);前顶体蛋白结合蛋白sp32 (OY- TES1);淋巴细胞特异性蛋白质酪氨酸激酶 (LCK);A激酶锚定蛋白4 (AKAP-4);滑膜肉瘤X断裂点2 (SSX2);高级糖化终末产物的受体 (RAGE-1);肾遍在1 (RU1);肾遍在2 (RU2);豆荚蛋白;人乳头瘤病毒E6 (HPV E6);人乳头瘤病毒E7 (HPV E7);肠羧基酯酶;热休克蛋白70-2突变型 (mut hsp70-2);CD79a;CD79b;CD72;白细胞相关免疫球蛋白样受体1 (LAIR1);IgA受体的Fc片段 (FCAR或CD89);白细胞免疫球蛋白样受体亚家族A成员2 (LILRA2);CD300分子样家族成员f (CD300LF);C型凝集素结构域家族12成员A (CLEC12A);骨髓基质细胞抗原2 (BST2);含有EGF样模块的粘蛋白样激素受体样2 (EMR2);淋巴细胞抗原75 (LY75);磷脂酰肌醇蛋白

聚糖-3(GPC3);Fc受体样5(FCRL5);和免疫球蛋白λ样多肽1(IGLL1)。

57. 一种增强干细胞或免疫细胞群体的方法,所述方法包括以下步骤:

a. 用能够驱动淋巴细胞激活的特异性激活受体激动剂抗体在无细胞培养基中体外激活干细胞或免疫细胞;

b. 将所述干细胞或免疫细胞暴露于包含分离的活线粒体的组合物,从而扩增所述干细胞或免疫细胞群体;以及

c. 用编码CAR或人工TCR亚基的外源性多核苷酸转导所述干细胞或免疫细胞。

58. 如权利要求57所述的方法,其中所述干细胞或免疫细胞群体在步骤a.至c.之前表达CAR或人工TCR亚基。

59. 如权利要求57或58所述的方法,其中所述步骤b.包括:将所述免疫细胞暴露于包含分离的活线粒体的组合物,从而增强所述干细胞或免疫细胞群体的代谢活性。

60. 如权利要求57或58所述的方法,其中所述步骤b.包括:将免疫细胞暴露于包含分离的活线粒体的组合物,从而增强所述干细胞或免疫细胞群体的存活。

61. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述干细胞或免疫细胞来源于选自下组的生物样品:血液和其它生物来源的液体样品、固体组织样品、源自它们的细胞的组织培养物及其后代、来自生物样品的分离的细胞。

62. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述特异性淋巴细胞激活受体激动剂缀合至模拟细胞的无细胞支持物。

63. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述模拟细胞的支持物是顺磁性珠粒。

64. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述载体是病毒载体。

65. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述病毒载体来源于逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺相关病毒或杂合载体。

66. 一种用于治疗癌症、感染性疾病、炎症性疾病或自身免疫性疾病的药物组合物,其包含前述权利要求中任一项所述的干细胞或免疫细胞或干细胞或免疫细胞群体。

67. 如前述权利要求中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物以可溶状态制备。

68. 如前述权利要求中任一项所述的药物组合物,其中所述干细胞或免疫细胞由活真核细胞产生。

69. 如前述权利要求中任一项所述的药物组合物,其中所述干细胞或免疫细胞通过自体细胞移植或同种异体细胞移植的方法产生。

70. 如前述权利要求中任一项所述的药物组合物,其中所述同种异体细胞移植的方法包括:

a. 从供体获得活血液样品;

b. 从步骤(a)中获得的所述血液样品中分离干细胞或免疫细胞;

c. 用一种或多种编码CAR或人工TCR亚基的外源性多核苷酸转导所述免疫细胞;

d. 任选地,使所述干细胞或免疫细胞与前述权利要求中任一项所述的小分子接触;以及

e. 将经修饰的干细胞或免疫细胞施用至有需要的受试者中。

71. 如前述权利要求中任一项所述的药物组合物,其中所述自体细胞移植的方法包括:

a. 获得取自有需要的受试者的活血液样品;

- b. 从步骤(a)中获得的所述血液样品中分离干细胞或免疫细胞;
- c. 用一种或多种编码CAR或人工TCR亚基的外源性多核苷酸转导所述免疫细胞;
- d. 任选地,使所述干细胞或免疫细胞与前述权利要求中任一项所述的小分子接触;以及
- e. 将经修饰的免疫细胞重新引入所述受试者中。

72. 如前述权利要求中任一项所述的药物组合物,其处于有效治疗有需要的人受试者的癌症的量。

73. 一种治疗有需要的受试者的方法,其包括向受试者施用前述权利要求中任一项所述的干细胞或免疫细胞或干细胞或免疫细胞群体。

74. 如权利要求73所述的治疗方法,其中所述干细胞或免疫细胞的活性通过在体内共同施用权利要求1至17中任一项所述的包含线粒体的药物组合物来增强,任选地其中所述药物组合物的所述共同施用在前述干细胞或免疫细胞的施用之前、同时和/或之后进行。

75. 如权利要求73或74所述的治疗方法,其中所述药物组合物与所述免疫细胞通过静脉内输注至所述患者中共同施用。

76. 如权利要求73或74所述的治疗方法,其中所述药物组合物与所述免疫细胞通过肿瘤内注射共同施用。

77. 如权利要求73或74所述的治疗方法,其中所述药物组合物与所述免疫细胞通过器官内注射或通过器官特异性血管系统共同施用。

78. 一种治疗有需要的受试者的方法,其包括共同施用干细胞或免疫细胞或干细胞或免疫细胞群体以及分离的活线粒体,任选地其中所述分离的活线粒体包含在权利要求1至17中任一项所述的药物组合物中。

79. 如权利要求73所述的方法,其中所述分离的活线粒体的所述共同施用在前述干细胞或免疫细胞的施用之前、同时和/或之后进行。

80. 如前述权利要求中任一项所述的治疗方法,其中所述受试者患有选自下组的癌症:急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、肺泡横纹肌肉瘤、膀胱癌(例如,膀胱癌)、骨癌、脑癌(例如,成胶质细胞瘤)、乳腺癌、肛门癌、肛管癌或肛门直肠癌、眼癌、肝内胆管癌、关节癌、颈癌、胆囊癌或胸膜癌、鼻癌、鼻腔癌或中耳癌、口腔癌、外阴癌、慢性淋巴细胞性白血病、慢性骨髓性癌症、结肠癌、食道癌、宫颈癌、纤维肉瘤、胃肠类癌肿瘤、头颈癌(例如头颈鳞状细胞癌)、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、肾癌、喉癌、白血病、液体肿瘤、肝癌、肺癌(例如,非小细胞肺癌和肺腺癌)、淋巴瘤、间皮瘤、肥大细胞瘤、黑素瘤、多发性骨髓瘤、鼻咽癌、非霍奇金淋巴瘤、B-慢性淋巴细胞性白血病、毛细胞白血病、伯基特淋巴瘤、卵巢癌、胰腺癌、腹膜癌、网膜癌和肠系膜癌、咽癌、前列腺癌、直肠癌、肾癌、皮肤癌、小肠癌、软组织癌、实体瘤、滑膜肉瘤、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌和输尿管癌。

81. 如权利要求1至17中任一项所述的药物组合物,其中所述活线粒体在配制于药学上可接受的载剂中之前,已先前通过使用包括以下步骤的分离方法进行了分离:

- (i) 通过使用枯草杆菌蛋白酶A从培养的细胞、组织或器官中分离所述线粒体。

82. 如权利要求1至17中任一项所述的药物组合物,其中所述活线粒体在配制于药学上可接受的载剂中之前,已先前通过使用包括以下步骤的分离方法进行了分离:

- (i) 通过一个或多个过滤器过滤所述线粒体;或

(i) 通过使用枯草杆菌蛋白酶A从培养的细胞、组织或器官中分离所述线粒体；并且随后

(ii) 通过一个或多个过滤器过滤所述线粒体。

83. 如权利要求18至48中任一项所述的包含外源性线粒体的人干细胞或免疫细胞，其中所述线粒体在被移植到所述人干细胞或免疫细胞中之前，已先前通过使用包括以下步骤的分离方法进行了分离：

(i) 通过使用枯草杆菌蛋白酶A从培养的细胞、组织或器官中分离所述线粒体。

84. 如权利要求18至48中任一项所述的包含外源性线粒体的人干细胞或免疫细胞，其中所述线粒体在被移植到所述人干细胞或免疫细胞中之前，已先前通过使用包括以下步骤的分离方法进行了分离：

(i) 通过一个或多个过滤器过滤所述线粒体；或

(i) 通过使用枯草杆菌蛋白酶A从培养的细胞、组织或器官中分离所述线粒体；并且随后

(ii) 通过一个或多个过滤器过滤所述线粒体。

过继性细胞转移的增强

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年4月3日提交的美国临时申请号63/005,167的优先权,所述申请的内容特此以引用的方式整体并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及生物医学领域,并且具体地说可用于治疗癌症、感染性疾病和自身免疫性疾病的方法。特别地,本发明涉及一种使用线粒体增强的免疫效应细胞的治疗性治疗,所述免疫效应细胞如但不限于嵌合抗原受体(CAR) T细胞、CAR-NK细胞、CAR-巨噬细胞、嗜中性粒细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、 γ - δ T细胞。本发明涉及用于治疗癌症、感染性疾病和自身免疫性疾病的线粒体增强的干细胞或免疫细胞。本发明涉及提高细胞技术的功效,从而产生具有更高代谢活性和/或更高存活,特别是在肿瘤恶劣微环境中具有更高存活的免疫细胞或干细胞。本发明涉及提高细胞技术的功效,从而产生更高比例的细胞毒性效应细胞,以及提供由此产生的杀伤细胞的更高细胞溶解活性。线粒体移植还可用于提高用于治疗自身免疫性疾病和移植器官或组织排斥的免疫抑制调节性T细胞的扩增并增强其活性。线粒体移植还可用于提高用于治疗自身免疫性疾病和移植器官或组织排斥的调节性T细胞的免疫抑制活性。

背景技术

[0004] 癌症和自身免疫具有共同起源,但施加在相反方向上作用的强大力量。两种疾病均由身体免疫系统的失效引起。癌症的发生往往是因为免疫系统无法识别和/或攻击缺陷细胞和/或转化细胞,从而允许细胞分裂和生长。相反,自身免疫-一种导致诸如结肠炎和狼疮的疾病的错误免疫应答-在免疫系统错误地攻击健康细胞时发生。免疫系统可靶向几乎身体的任何部位,包括心脏、脑、神经、肌肉、结缔组织、皮肤、眼睛、肺、肾、消化道、血细胞和血管。存在广泛范围的自身免疫性疾病,基于它们根据免疫系统所靶向的身体部位而不同。常见的自身免疫性疾病包括类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、多发性硬化症、自身免疫性血管炎、重症肌无力、恶性贫血、桥本氏甲状腺炎、1型糖尿病、炎症性肠病(IBS)、自身免疫性艾迪生氏病(Addison's disease)、格雷夫斯病(Grave's disease)、薛格连氏综合征(Sjögren's syndrome)、银屑病和乳糜泻。到目前为止,美国自身免疫相关疾病协会(AARDA)已经对超过100种自身免疫性疾病进行了分类,使其成为美国第三种最常见的疾病类型。事实上,自身免疫性疾病影响全球人口的5%至10%,特别是女性,女性患自身免疫性疾病的可能性是男性的2至10倍。尽管大多数疾病可发生在任何年龄,但一些疾病主要发生在儿童和青少年(例如1型糖尿病)、中年(例如重症肌无力、多发性硬化症)或老年人(例如类风湿性关节炎、原发性系统性血管炎)中(Wang等人,2015,"Human autoimmune diseases:a comprehensive update",J Intern Med 278:369-95)。

[0005] 癌症也是发达国家中死亡的主导原因之一,预期在2019年仅在美国就诊断超过170万例癌症病例。从这个数字来看,由各种癌症导致的预计死亡数超过600,000(Seigel等

人,CA Cancer J Clin.2019;69(1):7-34)。根据世界卫生组织(WHO),癌症是全球死亡的主要原因,在2018年导致估计960万例死亡。最常见的癌症是肺癌(209万例)、乳腺癌(209万例)、结肠直肠癌(180万例)、前列腺癌(128万例)、皮肤癌(非黑素瘤;104万例)、胃癌(103万例)。癌症死亡的最常见原因是肺癌(176万例死亡)、结肠直肠癌(862,000例死亡)、胃癌(783,000例死亡)、肝癌(782,000例死亡)、乳腺癌(627,000例死亡)。

[0006] 两大类T细胞共同作用以确保针对病原体和肿瘤的特异性和长期免疫,同时保护身体免受针对自身的异常应答的影响。第一亚群由效应T细胞和/或激活的抗原特异性T细胞组成,所述细胞消除病原体和肿瘤。调节性T(Treg)细胞构成第二亚群并且功能是预防针对自身的免疫应答。尽管效应T细胞应答通常是强有力的,但一些感染性疾病和肿瘤已经发展出多种逃避机制来绕过T细胞控制。类似地,自身免疫性疾病(如1型糖尿病)的发病率突出表明,Treg细胞在预防异常免疫应答方面并不总是成功的。此外,在器官移植中,Treg细胞往往不能保护救命组织免受免疫排斥。

[0007] 免疫系统是通过T细胞激活受体(加速器)和抑制性受体(制动器)传递的信号传导途径网络来保持健康,以调节免疫应答与免疫耐受之间的平衡(Pardoll,2012,“The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy”,Nat Rev Cancer 12:252-64;Li等人,2018,“Lessons learned from the blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy”,J Hematol Oncol 11:31)。主要组织相容性复合物(MHC)分子在肿瘤细胞的异常蛋白的监测中起关键作用。T淋巴细胞表面上的T细胞受体(TCR)识别由这些异常蛋白与MHC复合产生的抗原肽片段。在正常免疫应答期间,在主要MHC/肽抗原呈递的背景下,这些抗原与TCR的结合起始细胞内变化,从而导致T细胞激活和/或被癌细胞的T细胞识别。

[0008] 在癌症患者中,T细胞通常针对同基因转化细胞产生较差应答或无应答,(i)因为它们的抗原性差,(ii)因为转化细胞在表型上不是外来性,并且(iii)由于通常与癌症相关的广泛性免疫抑制条件。因此,针对肿瘤的充分免疫应答很少被观察到,至少在用化疗剂治疗的患者中是这样(Medler等人,2015,“Immune response to cancer therapy:mounting an effective antitumor response and mechanisms of resistance”,Trends Cancer 1:66-75)。

[0009] 为了抵消免疫系统的这些缺陷,最近已经开发了多种形式的过继性细胞转移(ACT)。最显著的是,Novartis向市场引入了第一癌症疗法之一KYMRIAH®(Tisagenlecleucel),其是使用含有4-1BB共刺激结构域的嵌合抗原受体(CAR)重编程患者自身的T细胞的个体化疗法。涉及离体产生的自体抗原特异性T细胞的转移的ACT是有前景的治疗病毒感染和癌症的策略。用于过继免疫疗法的T细胞可通过抗原特异性T细胞的扩增或通过遗传工程化重定向T细胞而产生(Park等人,2011,“Treating cancer with genetically engineered T cells”,Trends Biotechnol 29:550-7)。ACT尚未实现其治疗多种疾病的潜力,所述疾病包括癌症、感染性疾病、自身免疫性疾病、炎症性疾病和免疫缺陷。

[0010] 嵌合抗原受体(CAR)是被设计用于向免疫细胞(如T细胞)传递抗原特异性的人工受体,在一些情况下不需要MHC抗原呈递,例如MCH I抗原呈递,如在具有抗体来源的抗原结合结构域的CAR中。CAR是具有双重功能的跨膜嵌合分子,如(i)肿瘤细胞表面上表达的肿瘤

抗原的免疫识别;和(ii)控制裂解机制的激活的信号传导事件的主动促进和传播。这种系统允许提供全新激活机制的“重编程T细胞”,打破肿瘤细胞所获得的耐受,并且绕过人白细胞抗原(HLA)/MHC介导的抗原识别的限制,从而跨越细胞免疫疗法的更广泛应用的障碍之一。

[0011] 嵌合抗原受体表达T(CAR-T)细胞可用于各种疗法,包括癌症疗法。例如,CAR-T细胞的过继性转移是用于治疗某些血液系统恶性肿瘤的有效疗法。抗CD19 CAR-T细胞的使用在受复发性B细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(B-CLL)和非霍奇金淋巴瘤(NHL)影响的儿童和成人中具有一致高抗肿瘤功效,在不同临床试验中完全缓解百分比在70%至94%的范围内(Wang等人,2017,“New development in CAR-T cell therapy”,*J Hematol Oncol* 10:53)。然而,在这些患者中,抗肿瘤活性伴随着通常与毒性(即,严重细胞因子释放综合征和神经毒性)相关的稳健CAR-T细胞输注后扩增,而CAR-T增殖和持久性较差的患者显示持久缓解率降低。因此,需要在输注后展现CAR-T细胞扩增和持久的持久性、同时平衡CAR-T细胞效力与安全性的CAR-T细胞疗法。

[0012] 虽然CAR-T细胞疗法已在某些患者群体中显示出功效,但CAR-T细胞疗法在其它群体如实体瘤患者中展现的活性有限。进入实体瘤的CAR-T细胞可由于被称为T细胞耗竭的现象而停止作用。这是在许多慢性感染和癌症期间出现的T细胞功能障碍的状态。其通常通过较差的效应功能、抑制性受体的持续表达以及与功能效应子或记忆T细胞的转录状态不同的转录状态表征。耗竭可阻止对感染和肿瘤的最佳控制(Wherry,2011,“T cell exhaustion”,*Nat Immunol* 12:492-9)。在耗竭的发展期间,CD8⁺ T细胞可以分层方式失去效应功能:IL-2的产生,高增殖能力和离体细胞溶解活性首先丧失,其次是TNF α 、IFN γ 、 β 趋化因子产生的功能障碍和脱颗粒,并且在耗竭最末期,这些细胞可被物理地缺失,可能是由于过度刺激而死亡(Pauken和Wherry,2015,“Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer”,*Trends Immunol* 36:265-76)。

[0013] 在T细胞耗竭方面,存在工程化T细胞疗法的功能挑战。首先,来自患者的T细胞暴露于肿瘤微环境可导致获得耗竭表型,所述耗竭表型导致朝向末端分化进展。肿瘤微环境中抑制性受体(例如,程序性细胞死亡蛋白-1,PD-1)的上调显示显著抑制T细胞功能,从而表明由功能受损的T细胞产生的CAR-T细胞可能在肿瘤细胞中显示较低有效性。此外,T细胞的内源性TCR可对CAR-T细胞的持久性产生负面影响。当CAR被引入具有明显TCR特异性的T细胞中时,TCR抗原的存在显示引起由于T细胞耗竭和凋亡所致的CD8⁺CAR-T细胞功效的丧失。最后,来自CAR的一些信号传导可增加T细胞的分化和耗竭,因为由CAR的抗原非依赖性簇集触发的毒性(tonic)CAR CD3 ζ 磷酸化将迫使CAR-T细胞的早期耗竭(Kasakovski等人,2018,“T cell senescence and CAR-T cell exhaustion in hematological malignancies”,*J Hematol Oncol* 11:91)。因此,需要减少或消除T细胞免疫耗竭的CAR-T细胞疗法。

[0014] 免疫系统损伤的另一个原因是原初T细胞的免疫多样性下降和随着年龄增长的衰老效应细胞数量增加。这导致老年人中对疾病的更高易感性并潜在促进恶性肿瘤的进展(van Deursen,2014,“The role of senescent cells in ageing”,*Nature* 509:439-46)。许多国家面临人口结构的变化,与年轻人相比,老年人的增长比例过高。T细胞衰老通过限制变异性而损害终身免疫保护和有效疫苗接种。T细胞组成从未分化的原初T细胞转向确定

的记忆T细胞,并且进一步转向衰老T细胞(Kasakovski等人,2018,“T cell senescence and CAR-T cell exhaustion in hematological malignancies”,*J Hematol Oncol* 11: 91)。衰老的T细胞在表达杀伤细胞凝集素样受体亚家族G (KLRG-1) 和CD57时往往失去共刺激分子如CD27和CD28。此外,衰老细胞累积功能失调的线粒体;氧化磷酸化效率降低,并且活性氧物质产生增加(Korolchuk等人,2017,“Mitochondria in Cell Senescence:Is Mitophagy the Weakest Link?”,*EBioMedicine* 21:7-13)。在若干实体肿瘤中也观察到衰老CD8⁺CD28⁻T细胞的累积,从而表明使用衰老T细胞的抑制活性作为免疫逃避的策略。此外,较高数量的CD28⁻CD57⁺PD-1⁺ T细胞与自体干细胞移植(ASCT)后多发性骨髓瘤(MM)患者中的早期复发相关(Chung等人,2016,“T-cell Exhaustion in Multiple Myeloma Relapse after Autotransplant:Optimal Timing of Immunotherapy”,*Cancer Immunol Res* 4: 61-71)。此外,患者中的衰老和耗竭T细胞不利地影响T细胞免疫疗法。因此,需要解决T细胞衰老的CAR-T细胞疗法。

[0015] 白细胞去除术是指从目标患者收集单核细胞(MNC),包括T细胞亚群的过程,并且其涉及通过闭环、连续或间歇收集系统和离心进行持续血液流动。这在外周血通路较低的恶性肿瘤晚期患者是困难的。此外,化学疗法和放射减少淋巴细胞计数,并且可从已经通过多个细胞毒性疗法周期的复发性或难治性患者中收集更少T细胞。

[0016] 因此,本发明针对的潜在技术问题是提供用于抑制肿瘤相关的、更具体地说癌症相关的T细胞耗竭以及恢复耗竭和衰老的CAR-T细胞功能如细胞存活和靶特异性细胞毒性的新的治疗剂和治疗策略。此外,激活的T淋巴细胞对能量的需求比静止T淋巴细胞高许多倍。能量主要用于增殖、分化、代谢活性和各种效应机制(例如细胞因子产生)。因此,在T淋巴细胞激活过程中需要代谢的快速增加。所述技术问题的解决方案通过提供在权利要求书中表征的实施方案而实现。

发明内容

[0017] 本公开提供了一种包含免疫细胞的组合物或一种免疫细胞组合物,所述组合物由包含线粒体,如能够增强或扩增免疫细胞的活的有呼吸能力的线粒体的一种或多种增强剂(enhancer)增强。本公开进一步提供了一种包含免疫细胞的组合物或一种免疫细胞组合物,所述组合物由包含能够增强或扩增免疫细胞或免疫细胞群体的活的有呼吸能力的线粒体的增强剂增强。所述免疫细胞可包括但不限于表达嵌合抗原受体(CAR)或人工T细胞受体(TCR)亚基的免疫细胞,如但不限于CAR-T细胞、CAR-NK细胞、CAR-巨噬细胞、嗜中性粒细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、 γ - δ T细胞以及免疫抑制Treg细胞。本说明书进一步提供了包含CAR-T细胞或其它体外工程化或繁殖的天然免疫细胞如肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、自然杀伤细胞(NK)、单核细胞、巨噬细胞或嗜中性粒细胞的组合物,包括药物组合物,所述组合物由外源性线粒体如外源性活的有呼吸能力的线粒体增强。外源性线粒体可具有不同来源,例如自体的、自生的或异种的。它们可以是新鲜分离的,或先前分离的,并且随后储存直到使用。线粒体的来源可具有不同的性质-例如组织、血液、更具体地说血液中循环的细胞或培养细胞。所描述的方法至少部分地基于以下发现:分离的线粒体本身以及与治疗剂、诊断剂和/或显像剂连接的分离的线粒体可在体外和体内递送至靶细胞中。

[0018] 本文提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含在药学上可接受的载剂中配制

的相对于不包含分离的活线粒体的人免疫细胞有效增强人免疫细胞存活、活性或其组合的量的分离的活线粒体。

[0019] 在一些方面,所述线粒体包括真核细胞线粒体。在一些方面,所述线粒体来源于人细胞系。在一些方面,所述线粒体来源于健康供体。在一些方面,所述线粒体来源于患者。在一些方面,所述患者是癌症患者。在一些其它方面,所述患者是患有自身免疫性疾病的患者。在一些其它方面,所述患者是移植患者。在一些其它方面,所述患者是患有感染性和/或炎症性疾病的患者。

[0020] 在一些方面,所述活线粒体在被配制在药学上可接受的载剂之前已先前通过使用下文所述的分离方法中的一种分离,每种方法包括以下步骤:(i)通过使用枯草杆菌蛋白酶A从培养的细胞、组织或器官分离所述线粒体;或(ii)通过一个或多个过滤器过滤所述线粒体;或(i)通过使用枯草杆菌蛋白酶A从培养的细胞、组织或器官分离所述线粒体,并且随后(ii)通过一个或多个过滤器过滤所述线粒体。

[0021] 在一些方面,所述药学上可接受的载剂被配制用于递送至人免疫细胞中。在一些方面,所述药学上可接受的载剂被配制用于递送至人组织和/或器官中。在一些方面,所述人免疫细胞是自体的。在一些方面,所述人免疫细胞是同种异体的。在一些方面,所述人免疫细胞是T细胞,如CD8 T细胞或CD4 T细胞,特别是CD8细胞。在一些方面,所述免疫细胞包含嵌合抗原受体(“CAR”)和/或人工T细胞受体(“TCR”)亚基或其组合。

[0022] 在一些方面,前述实施方案中任一个的组合物包含在药学上可接受的载剂中配制的相对于不包含分离的活线粒体的人免疫细胞有效增强人免疫细胞基础耗氧率(OCR)和/或增强人免疫细胞最大耗氧率(OCR)的量的分离的活线粒体。

[0023] 在一些方面,前述实施方案中任一个的组合物包含在药学上可接受的载剂中配制的相对于不包含分离的活线粒体的人免疫细胞有效增强人免疫细胞扩增的量的分离的活线粒体。

[0024] 在一些方面,前述实施方案中任一个的组合物包含在药学上可接受的载剂中配制的相对于不包含分离的活线粒体的人免疫细胞有效增强人免疫细胞代谢活性的量的分离的活线粒体。

[0025] 在一些方面,前述实施方案中任一个的组合物包含在药学上可接受的载剂中配制的相对于不包含分离的活线粒体的人免疫细胞通过减少细胞耗竭有效增强人免疫细胞存活的量的分离的活线粒体。

[0026] 本文还提供了一种包含外源性线粒体的人干细胞或免疫细胞,任选地其中所述外源性线粒体以有效增强免疫细胞存活、活性或其组合的量存在于所述人干细胞或人免疫细胞中。

[0027] 在一些方面,所述干细胞是胚胎干细胞。在一些方面,所述干细胞是诱导型多能干细胞。在一些方面,所述免疫细胞是多能干细胞来源的免疫细胞。在一些方面,所述免疫细胞是T淋巴细胞,如辅助T细胞、细胞毒性T细胞、调节性T细胞、记忆T细胞。在一些方面,所述T淋巴细胞是CD8 T细胞。在一些方面,所述T淋巴细胞是CD4T细胞或Treg细胞。在一些方面,所述免疫细胞是自然杀伤(NK)细胞。在一些方面,所述免疫细胞是粘膜相关恒定T细胞。在一些方面,所述免疫细胞是 γ - δ T细胞。在一些方面,所述免疫细胞是单核细胞或巨噬细胞。在一些方面,所述免疫细胞是嗜中性粒细胞。在一些方面,所述免疫细胞是B淋巴细胞。

[0028] 在一些方面,所述干细胞或免疫细胞包含嵌合抗原受体 (“CAR”) 和/或人工T细胞受体 (“TCR”) 亚基。在一些方面,所述干细胞或免疫细胞包含选自以下组成的组的外源性多核苷酸:编码所述CAR或所述人工TCR亚基的DNA、双链RNA、单链mRNA和环状RNA载体,任选地其中所述外源性多核苷酸整合至所述干细胞或免疫细胞的基因组中。

[0029] 在一些方面,所述CAR包含:a. 抗原结合结构域;b. 间隔区结构域;c. 跨膜结构域;d. 任选地,共刺激结构域;和e. 细胞内信号传导结构域,任选地其中所述细胞内信号传导结构域是细胞内T细胞信号传导结构域。在一些方面,所述CAR包含:a. 第一CAR,所述第一CAR包含对第一抗原具有特异性的抗原结合结构域、间隔区结构域、跨膜结构域和共刺激结构域和/或细胞内T细胞信号传导结构域;b. 可裂解结构域;和c. 第二CAR,所述第二CAR包含对第二抗原具有特异性的抗原结合结构域、间隔区结构域、跨膜结构域和共刺激结构域和/或细胞内T细胞信号传导结构域。

[0030] 在一些方面,所述共刺激结构域选自以下的组:CD28、4-1BB、OX40、CD27、ICOS、GITR、CD40、CD2、SLAM以及它们的组合。在一些方面,所述细胞内T细胞信号传导结构域选自CD3 ζ (ζ)、OX40、CD27、ICOS以及它们的组合。在一些方面,所述间隔区结构域选自CH2-CH3、CD28、CD8或它们的组合。

[0031] 在一些方面,所述CAR是包含对至少2种不同抗原具有特异性的抗原结合结构域的多特异性CAR。在一些方面,所述人工TCR包含选自以下组成的组的一个或多个亚基:TCR α (α)、TCR β (β)、TCR γ (γ) 和TCR δ (δ) 亚基。在一些方面,所述CAR或人工TCR亚基存在于细胞表面上。

[0032] 在一些方面,所述干细胞或免疫细胞是同种异体或自体干细胞或免疫细胞。在一些方面,所述免疫细胞由包括间充质干细胞或诱导型多能干细胞 (iPSC) 的干细胞产生。

[0033] 在一些方面,所述干细胞或免疫细胞具有针对靶细胞的增强的增殖和细胞溶解活性。

[0034] 在一些方面,与不包含所述外源性线粒体的人免疫细胞相比,所述免疫细胞具有增强的细胞溶解活性。

[0035] 在一些方面,与不包含所述外源性线粒体的人免疫细胞相比,所述免疫细胞具有增强的基础耗氧率 (OCR) 和/或最大耗氧率 (OCR)。

[0036] 在一些方面,与不包含所述外源性线粒体的人免疫细胞相比,所述免疫细胞具有增强的代谢活性。

[0037] 在一些方面,与不包含所述外源性线粒体的人免疫细胞相比,所述免疫细胞具有增强的扩增活性。

[0038] 在一些方面,所述免疫细胞具有增强的存活,其中与不包含所述外源性线粒体的人免疫细胞相比,所述存活通过减少人免疫细胞耗竭而增强。

[0039] 在一些方面,任何前述实施方案的人干细胞或免疫细胞用于治疗癌症、感染性疾病、炎症性疾病或自身免疫性疾病。

[0040] 本文还提供了分别包含本文所述的任何干细胞或免疫细胞的干细胞或免疫细胞群体。在一些方面,所述免疫细胞群体包含NK细胞、自然杀伤T细胞 (NKT细胞)、巨噬细胞、 α/β T细胞、 γ/δ T细胞、Treg细胞、嗜中性粒细胞或它们的组合。在一些方面,所述免疫细胞群体包含CD3⁺ T细胞、CD4⁺ T细胞或CD8⁺ T细胞或它们的组合。

[0041] 在一些方面,使用病毒(如慢病毒或腺病毒或逆转录病毒)、纳米颗粒或可操作地连接至靶向部分的纳米颗粒将所述CAR或人工TCR亚基引入所述干细胞或免疫细胞中。在一些方面,将编码所述CAR和/或人工TCR亚基的外源性多核苷酸体外引入干细胞或免疫细胞中。

[0042] 在一些方面,所述群体以有效治疗有需要的人受试者的癌症的量配制在药物组合物中。在一些方面,所述群体以有效治疗有需要的人受试者的自身免疫性疾病的量配制在药物组合物中。在一些方面,所述群体以有效治疗有需要的人受试者的感染性疾病的量配制在药物组合物中。在一些方面,所述群体以有效治疗有需要的人受试者的炎症性疾病的量配制在药物组合物中。在一些方面,所述群体以有效治疗有需要的人受试者的移植物抗宿主病(GvHD)的量配制在药物组合物中。

[0043] 在一些方面,与缺乏外源性线粒体的等效免疫细胞群体相比,所述免疫细胞群体更有效地和/或时间更长地杀伤肿瘤细胞。在一些方面,当与缺乏外源性线粒体的等效免疫细胞群体的应答相比时,所述群体的免疫细胞的异常免疫应答(如在自身免疫性疾病的情况下)更轻(更少)和/或完全不存在。

[0044] 在一些方面,所述干细胞或免疫细胞群体包含CAR或人工TCR亚基,所述CAR或人工TCR亚基包含对选自下组的抗原具有特异性的抗原结合结构域: B细胞成熟抗原(BCMA,也称为肿瘤坏死因子受体超家族成员17, TNFRSF17)、CD19、CD123、CD22、CD30、CD171、CS-1(也称为CD2亚群1、CRACC、SLAMF7、CD319和19A24)、C-型凝集素样分子-1(CLL-1或CLECL1)、CD33、表皮生长因子受体变体III(EGFRvIII)、神经节苷脂G2(GD2)、神经节苷脂GD3、Tn抗原(Tn Ag或GalNAca-Ser/Thr)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)、Fms样酪氨酸激酶3(FLT3)、肿瘤相关糖蛋白72(TAG72)、CD38、CD44v6、癌胚抗原(CEA)、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、B7H3(CD276)、KIT(CD117)、白细胞介素-13受体亚基 α -2(IL-13Ra2或CD213A2); 间皮素、白细胞介素11受体 α (IL-11Ra)、前列腺干细胞抗原(PSCA)、蛋白酶丝氨酸21(羧蛋白或PRSS21)、血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)、Lewis Y抗原、CD24、血小板源性生长因子受体 β (PDGFR- β); 阶段特异性胚胎抗原4(SSEA-4); CD20; 叶酸受体 α ; 受体酪氨酸蛋白激酶ERBB2(Her2/neu); 粘蛋白1; 细胞表面相关(MUC1); 表皮生长因子受体(EGFR); 神经细胞粘附分子(NCAM); 前列腺酶; 前列腺酸性磷酸酶(PAP); 延伸因子2突变型(ELF2M); 肝配蛋白B2; 成纤维细胞活化蛋白 α (FAP); 胰岛素样生长因子1受体(IGF-I受体)、碳酸酐酶IX(CAIX); 蛋白酶体(前体, 巨蛋白因子)亚基 β 型9(LMP2); 糖蛋白100(gp100); 由断裂点簇区(BCR)和艾贝尔森鼠白血病病毒致癌基因同系物1(Ab1)组成的致癌基因融合蛋白(bcr-ab1); 酪氨酸酶; 肝配蛋白A型受体2(EphA2); 岩藻糖基GM1; 唾液酸化路易斯粘附分子(sLe); 神经节苷脂GM3(aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer); 转谷氨酰胺酶5(TGS5); 高分子量黑素瘤相关抗原(HMWMAA); o-乙酰基-GD2神经节苷脂(OAcGD2); 叶酸受体 β ; 肿瘤内皮标记物1(TEM1/CD248); 肿瘤内皮标记物7相关(TEM7R); 紧密连接蛋白6(CLDN6); 促甲状腺激素受体(TSHR); G蛋白偶联受体C类5组成员D(GPRC5D); 染色体X开放阅读框61(CXORF61); CD97; CD179a; 间变性淋巴瘤激酶(ALK); 聚唾液酸; 胎盘特异性1(PLAC1); globoH甘神经酰胺(GloboH)的六糖部分; 乳腺分化抗原(NY-BR-1); 尿溶蛋白2(UPK2); 甲型肝炎病毒细胞受体1(HAVCR1); 肾上腺素受体 β 3(ADRB3); 泛连接蛋白3(PANX3); G蛋白偶联受体20(GPR20); 淋巴细胞抗原6复合物基因座K9(LY6K); 嗅觉受体51E2

(OR51E2); TCR γ 交替阅读框蛋白 (TARP); 维尔姆斯肿瘤蛋白 (WT1); 癌症/睾丸抗原1 (NY-ESO-1); 癌症/睾丸抗原2 (LAGE-1a); 黑素瘤相关抗原1 (MAGE-A1); 位于染色体12p上的ETS易位变体基因6 (ETV6-AML); 精子蛋白17 (SPA17); X抗原家族成员1A (XAGE1); 血管生成素结合细胞表面受体2 (Tie 2); 黑素瘤癌症睾丸抗原-1 (MAD-CT-1); 黑素瘤癌症睾丸抗原-2 (MAD-CT-2); Fos相关抗原1; 肿瘤蛋白p53 (p53); p53突变体; 前列腺素; 存活; 端粒酶; 前列腺癌肿瘤抗原-1 (PCTA-1或半乳凝素8)、由T细胞识别的黑素瘤抗原1 (MelanA或MART1); 大鼠肉瘤 (Ras) 突变体; 人端粒酶逆转录酶 (hTERT); 肉瘤易位断裂点; 黑素瘤细胞凋亡抑制剂 (ML-IAP); ERG (跨膜蛋白酶丝氨酸2 (TMPRSS2) ETS融合基因); N-乙酰基葡萄糖胺基-转移酶V (NA17); 配对盒蛋白Pax-3 (PAX3); 雄激素受体; 细胞周期蛋白B1; v-myc禽类骨髓细胞瘤病毒致癌基因神经母细胞瘤源性同源物 (MYCN); Ras同源物家族成员C (RhoC); 酪氨酸酶相关蛋白2 (TRP-2)、细胞色素P450 1B1 (CYP1B1); CCCTC结合因子 (锌指蛋白) 样 (BORIS或印记位点调控因子样蛋白 (Brother of the Regulator of Imprinted Sites))、由T细胞识别的鳞状细胞癌抗原3 (SART3); 配对盒蛋白Pax-5 (PAX5); 前顶体蛋白结合蛋白sp32 (OY-YES1); 淋巴细胞特异性蛋白质酪氨酸激酶 (LCK); A激酶锚定蛋白4 (AKAP-4); 滑膜肉瘤X断裂点2 (SSX2); 高级糖化终末产物的受体 (RAGE-1); 肾遍在1 (RU1); 肾遍在2 (RU2); 豆荚蛋白; 人乳头瘤病毒E6 (HPV E6); 人乳头瘤病毒E7 (HPV E7); 肠羧基酯酶; 热休克蛋白70-2突变型 (mut hsp70-2); CD79a; CD79b; CD72; 白细胞相关免疫球蛋白样受体1 (LAIR1); IgA受体的Fc片段 (FCAR或CD89); 白细胞免疫球蛋白样受体亚家族A成员2 (LILRA2); CD300分子样家族成员f (CD300LF); C型凝集素结构域家族12成员A (CLEC12A); 骨髓基质细胞抗原2 (BST2); 含有EGF样模块的粘蛋白样激素受体样2 (EMR2); 淋巴细胞抗原75 (LY75); 磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 (GPC3); Fc受体样5 (FCRL5); 和免疫球蛋白 λ 样多肽1 (IGLL1)。在一些方面, 所述干细胞或免疫细胞群体包含第一代、第二代、第三代或第四代CAR。

[0045] 本文还提供了一种增强干细胞或免疫细胞群体的方法, 任选地, 其中所述干细胞或免疫细胞表达CAR或人工TCR亚基, 所述方法包括以下步骤: a. 用能够驱动淋巴细胞激活的特异性激活受体激动剂抗体在无细胞培养基中体外激活干细胞或免疫细胞; b. 将所述干细胞或免疫细胞暴露于包含分离的活线粒体的组合物, 从而扩增所述干细胞或免疫细胞群体; 以及c. 用编码CAR或人工TCR亚基的外源性多核苷酸转导所述干细胞或免疫细胞。在一些方面, 所述方法可替代地包括以下步骤: a. 任选地在重组白细胞介素如IL-2存在下, 用包被的CD3/CD28珠粒在无细胞培养基中体外激活干细胞或免疫细胞。在一些方面, 所述方法可替代地包括以下步骤: b. 将所述干细胞或免疫细胞暴露于包含分离的线粒体的组合物, 从而增强代谢活性或存活或它们的组合。

[0046] 在一些方面, 所述干细胞或免疫细胞来源于选自下组的生物样品: 血液和其它生物来源的液体样品、固体组织样品、源自它们的细胞的组织培养物及其后代、来自生物样品的分离的细胞。在一些方面, 所述特异性淋巴细胞激活受体激动剂缀合至模拟细胞的无细胞支持物。在一些方面, 所述模拟细胞的支持物是顺磁性珠粒。

[0047] 在一些方面, 所述载体是病毒载体。在一些方面, 所述病毒载体来源于逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺相关病毒或杂合载体。

[0048] 本文还提供了一种用于治疗癌症、感染性疾病、炎症性疾病或自身免疫性疾病的药物组合物, 所述药物组合物包含前述实施方案中任一个的干细胞或免疫细胞或干细胞或

免疫细胞群体。特别地,本文提供了一种用于治疗癌症的药物组合物,所述药物组合物包含前述实施方案中任一个的干细胞或免疫细胞或干细胞或免疫细胞群体。特别地,本文提供了一种用于治疗自身免疫性疾病的药物组合物,所述药物组合物包含前述实施方案中任一个的干细胞或免疫细胞或干细胞或免疫细胞群体。

[0049] 前述实施方案中任一个的药物组合物,其中所述组合物以可溶状态制备。在一些方面,所述干细胞或免疫细胞由活的真核细胞产生。在一些方面,所述干细胞或免疫细胞体外或离体产生。在一些方面,所述干细胞或免疫细胞通过自体细胞移植或同种异体细胞移植的方法产生。

[0050] 在一些方面,所述同种异体细胞移植的方法包括:a.从供体获得活血液样品;b.从步骤(a)中获得的血液样品中分离干细胞或免疫细胞;c.用一种或多种编码CAR或人工TCR亚基的外源性多核苷酸转导所述免疫细胞;d.任选地,使所述干细胞或免疫细胞与前述实施方案中任一个小分子接触;以及e.将经修饰的干细胞或免疫细胞施用至有需要的受试者中。

[0051] 在一些方面,所述自体细胞移植的方法包括:a.获得取自有需要的受试者的活血液样品;b.从步骤(a)中获得的血液样品中分离干细胞或免疫细胞;c.用一种或多种编码CAR或人工TCR亚基的外源性多核苷酸转导所述免疫细胞;d.任选地,使所述干细胞或免疫细胞与前述实施方案中任一个小分子接触;以及e.将经修饰的免疫细胞重新引入(例如,重新输注)至受试者中。

[0052] 在一些方面,所述药物组合物以有效治疗有需要的人受试者的癌症的量施用。在一些方面,所述药物组合物以有效治疗有需要的人受试者的感染性疾病的量施用。在一些方面,所述药物组合物以有效治疗有需要的人受试者的炎症性疾病的量施用。在一些方面,所述药物组合物以有效治疗有需要的人受试者的自身免疫性疾病的量施用。

[0053] 本文还提供了一种治疗有需要的受试者的方法,所述方法包括向受试者施用前述实施方案中任一个的干细胞或免疫细胞或干细胞或免疫细胞群体。在一些方面,所述干细胞或免疫细胞的活性通过在体内共同施用前述组合物中任一个的包含线粒体的药物组合物,例如包含在药学上可接受的载剂中配制的相对于不包含分离的活线粒体的人免疫细胞有效增强人免疫细胞存活和/或活性的量的分离的活线粒体、特别是分离的活的有呼吸能力的线粒体的药物组合物或包含免疫细胞的组合物而增强,任选地其中所述药物组合物的共同施用与所述干细胞或免疫细胞施用之前、同时和/或之后进行。在一些方面,所述药物组合物与所述免疫细胞通过静脉内输注至患者中共同施用。在一些方面,所述药物组合物与所述免疫细胞通过瘤内注射共同施用。在一些方面,所述药物组合物与所述免疫细胞通过器官内注射或通过器官特异性血管系统共同施用。

[0054] 本文还提供了一种治疗有需要的受试者的方法,所述方法包括共同施用干细胞或免疫细胞、或干细胞或免疫细胞群体以及分离的活线粒体,任选地其中分离的活线粒体包含在前述组合物中任一个的药物组合物中,例如包含在药学上可接受的载剂中配制的相对于不包含分离的活线粒体的人免疫细胞有效增强人免疫细胞存活和/或活性的量的分离的活线粒体、特别是分离的活的有呼吸能力的线粒体的药物组合物,或包含含有外源性线粒体的免疫细胞的组合物。在一些方面,所述分离的活线粒体的共同施用施用所述干细胞或免疫细胞之前、同时和/或之后进行。

[0055] 在一些方面,所述受试者患有选自下组的癌症:急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、肺泡横纹肌肉瘤、膀胱癌(例如,膀胱癌)、骨癌、脑癌(例如,成胶质细胞瘤)、乳腺癌、肛门癌、肛管癌或肛门直肠癌、眼癌、肝内胆管癌、关节癌、颈癌、胆囊癌或胸膜癌、鼻癌、鼻腔癌或中耳癌、口腔癌、外阴癌、慢性淋巴细胞性白血病、慢性骨髓性癌症、结肠癌、食道癌、宫颈癌、纤维肉瘤、胃肠类癌肿瘤、头颈癌(例如头颈鳞状细胞癌)、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、肾癌、喉癌、白血病、液体肿瘤、肝癌、肺癌(例如,非小细胞肺癌和肺腺癌)、淋巴瘤、间皮瘤、肥大细胞瘤、黑素瘤、多发性骨髓瘤、鼻咽癌、非霍奇金淋巴瘤、B-慢性淋巴细胞性白血病、毛细胞白血病、伯基特淋巴瘤、卵巢癌、胰腺癌、腹膜癌、网膜癌和肠系膜癌、咽癌、前列腺癌、直肠癌、肾癌、皮肤癌、小肠癌、软组织癌、实体瘤、滑膜肉瘤、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌和输尿管癌。

附图说明

[0056] 图1.用于从组织细胞或培养的细胞分离线粒体的一种示例性方案的示意图。

[0057] 图2.使用流式细胞术和荧光显微术测定的线粒体的剂量依赖性整合。图2A通过流式细胞术,整合线粒体的Mitotracker Red CMXRos的MFI。2B通过流式细胞术,整合线粒体的Mitotracker Green FM的MFI。图2C通过流式细胞术,移植的CD8⁺ T细胞Mitotracker Red CMXRos+的百分比。图2D通过荧光显微术,整合线粒体的Mitotracker Red CMXRos的信号。如通过流式细胞术和荧光显微术所观察到,已整合至CD8⁺ T细胞中的染色线粒体的线粒体活性和质量在经处理的CD8⁺ T细胞中以剂量依赖性方式显著增加。在激活后第18天将来自5个不同供体的CD8⁺ T细胞用外源性线粒体处理,并在线粒体移植后4小时进行分析。将1 μ g、5 μ g、10 μ g、20 μ g、30 μ g剂量水平的线粒体(如使用QubitTM蛋白质测定所测量)施用于至100万个T细胞中。数据代表4个独立实验(流式细胞术)和2个独立实验(荧光显微术),呈现为5个供体(流式细胞术)和1个代表性供体(荧光显微术)的平均值+SD。*p<0.05;**p<0.01;***p<0.001;****p<0.0001。

[0058] 图3.线粒体移植后CD8⁺ T细胞的总体扩增。线粒体移植到CD8⁺ T细胞中显示增强细胞增殖。CD8⁺ T细胞的总体扩增。数据代表两个合并的独立实验,并呈现为平均值+SD(每个合并时间点每组6个供体:移植后24小时、48小时、72小时、140小时,以在各时间点与对照组相比的倍数变化表示)。在线粒体移植后24小时、48小时、72小时和140小时,对在激活后第12天与第18天之间的静息CD8⁺ T细胞进行分析。*p<0.05;**p<0.01;***p<0.001;****p<0.0001。

[0059] 图4.经处理的CD8⁺ T细胞表现出增加的基础耗氧率和最大耗氧率。线粒体移植增加CD8⁺ T细胞中的基础耗氧率和最大耗氧率(OCR)。图4A基础OCR(pmol/min)。图4B最大呼吸(在FCCP处理后的OCR-基础OCR)(pmol/min)。图4C基础OCR的倍数变化。图4D最大呼吸的倍数变化(FCCP处理后的OCR-基础OCR)。数据代表三个独立实验,并呈现为两个供体的平均值 \pm SD(每组且每个供体7-11个技术重复)。*p<0.05;**p<0.01;***p<0.001;****p<0.0001。

[0060] 图5.对经处理的和未处理的CD8⁺ T细胞中的线粒体适应度的评估。线粒体移植到CD8⁺ T细胞中显示增强线粒体适应度。

[0061] 图5A Mitotracker Red CMXRos的MFI。图5B Mitotracker Green FM的MFI。

[0062] 图5C线粒体活性的倍数变化。图5D线粒体质量的倍数变化。

[0063] 图5E Mitotracker Red CMXRos相对于Mitotracker Green FM的比率。数据代表三个合并的独立实验,并呈现为平均值±SD(每组6-11个技术重复)。在线粒体移植后24小时,对激活后第11天与第17天之间来自一个供体的CD8⁺ T细胞进行分析。*p<0.05;**p<0.01;***p<0.001;****p<0.0001。

[0064] 图6. 线粒体移植减少T细胞耗竭。图6A刺激一次或四次的T细胞的LAG-3的MFI。图6B刺激一次或四次的T细胞的TIM-3的MFI。图6C LAG-3的MFI。图6D TIM-3的MFI。图6E LAG-3的倍数变化。

[0065] 图6F TIM-3的倍数变化。图6G刺激后非耗竭的CD8⁺ T细胞的百分比。数据代表一个实验,并呈现为来自一个健康供体的平均值+SD(4个技术重复)。*p<0.05;**p<0.01;***p<0.001;****p<0.0001。

[0066] 统计分析:所有测试均使用GraphPad Prism软件(La Jolla,CA)进行。所有数据均呈现为平均值+SD。用夏皮罗-威尔克检验(Shapiro-Wilk test)检验数据的正态性。两组未配对组之间的比较通过参数学生t检验或非参数曼-惠特尼(Mann-Whitney)检验进行。两个不遵循正态分布的配对组之间的比较通过非参数Wilcoxon配对符号秩次检验进行。对于多重比较,进行参数单因素方差分析(ANOVA)或非参数Kruskal-Wallis检验(用邓恩多重比较检验进行校正)。p<0.05被认为是统计上显著的(*p<0.05;**p<0.01;***p<0.001;****p<0.0001)。

具体实施方式

[0067] 除非另有定义,否则本文所用的所有技术、符号和其它科学术语均旨在具有与本发明所属领域的技术人员通常所理解的含义相同的含义。在一些情况下,为清楚和/或便于参考起见,本文定义了具有通常理解的含义的术语,并且本文此类定义的包括不必被解释为代表与本领域通常所理解的相比的差异。本文所描述或引用的技术和程序通常被很好地理解,且通过使用常规方法被本领域技术人员通常采用,诸如,例如,广泛使用的分子克隆技术描述于Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual第4版(2012) Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY。在适当的情况下,除非另有说明,否则通常根据制造商定义的方案和条件进行涉及使用市售药盒和/或试剂的程序。

[0068] 如本文所用,单数形式“一种”、“一个”和“所述”包括复数个指示物,除非上下文中另外明确指示。除非另外明确指出,否则术语“包括”、“诸如”等旨在传达包括而不受限制。

[0069] 如本文所用,除非另外明确指出,否则术语“包括”还具体包括实施方案“由所列举的要素组成”和“基本上由所列举的要素组成”。

[0070] 术语“约”指示并涵盖指示值以及高于和低于该值的范围。在某些实施方案中,术语“约”指示指定值±10%、±5%或±1%。在某些实施方案中,在适用的情况下,术语“约”指示一个或多个指定值±该一个或多个值的一个标准偏差。

[0071] 术语“分离的”是指从天然状态或环境发生改变或去除。例如,在活动物或细胞中天然存在的核酸或肽不是“分离的”,但部分地或完全地从其天然状态的共存物质分离出来的相同核酸或肽是“分离的”。如本文所用,术语“分离的线粒体”是指不含外来真核细胞物质的活线粒体。分离的线粒体可以大致上纯化的形式存在,或者可存在于非天然环境(例

如,外源性宿主细胞)中。

[0072] 术语“活线粒体”在整个说明书中用于描述活线粒体,所述线粒体是有活性的、有功能的且有呼吸能力的线粒体。

[0073] 如本文所用,术语“移植”在整个说明书中用作通用术语来描述将器官、组织、细胞团、单独细胞或细胞器植入受体的过程。术语“细胞移植”在整个说明书中用作通用术语以描述将至少一个细胞(例如,本文所述的增强的免疫细胞)转移至受体的过程。所述术语包括本领域中已知的所有移植类别,包括输血。移植按部位和供体与受体之间的遗传关系进行分类。所述术语包括例如自体移植(将细胞或组织从患者的一个位置移除并转移至同一受试者的相同或另一个位置)、同种异体移植(同一物种的成员之间的移植)和异种移植(不同物种的成员之间的移植)。

[0074] 术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换使用,指由通过肽键共价连接的氨基酸残基组成的化合物。蛋白质或肽必须含有至少两个氨基酸并且对于可构成蛋白质或肽序列的氨基酸的最大数目没有限制。多肽包括含有通过肽键彼此连接的两个或更多个氨基酸的任何肽或蛋白质。如本文中所用,所述术语指短链和长链,所述短链在本领域中通常也称为例如肽、寡肽和寡聚物,所述长链在本领域中通常称为蛋白质,所述蛋白质具有许多类型。“多肽”包括例如生物活性片段、基本上同源的多肽、寡肽、同源二聚体、异源二聚体、多肽的变体、修饰的多肽、衍生物、类似物、融合蛋白等。多肽包括天然肽、重组肽或它们的组合。

[0075] 术语“抗体”在本文中以其最广泛的含义使用并且包括某些类型的免疫球蛋白分子,所述免疫球蛋白分子包含一个或多个与抗原或表位特异性地结合的抗原结合结构域。所述术语还包括非免疫球蛋白抗原结合蛋白分子,所谓的抗体模拟物。抗体具体地包括完整抗体(例如,完整免疫球蛋白G、IgG)、抗体片段(例如,Fab片段,单链Fv(scFv)、单结构域抗体、 V_H 、 V_L 、 V_{HH} 、NAR、串联scFv、双抗体、单链双抗体、DART、tandAb、微型抗体、单结构域抗体(例如,骆驼科动物 V_{HH})、其它抗体片段或本领域技术人员已知的形式)以及抗体模拟物(例如,adnectin、亲和体(affibodies)、affilin、抗运载蛋白(Anticalin)、avimer、DARPin、打结素(knottin)等)。抗体可以是单特异性、双特异性和多特异性的。

[0076] 术语“抗原结合结构域”是指能够通过可变结构域特异性地结合至抗原或表位的抗体或T细胞受体的部分。抗原结合结构域的一个实例是分别由抗体重链和轻链的可变结构域 V_H 和 V_L 的界面形成的抗原结合结构域。抗原结合结构域的另一个实例是通过从抗体模拟物的某些环多样化形成的抗原结合结构域。抗原结合结构域的另一个实例是TCR的可变结构域,如含有CDR,如 α CDR1、 α CDR2、 α CDR3、 β CDR1、 β CDR2和 β CDR3的TCR结构域。

[0077] 如本文所用,“可变结构域”是指由重组事件产生的可变核苷酸序列,例如,它可包括来自T细胞(如激活的T细胞)的T细胞受体(TCR)序列的V、J和/或D区,或者它可包括抗体的V、J和/或D区。术语“抗原结合片段”是指足以赋予抗原结合片段与靶标如抗原及其限定表位的识别和特异性结合的含有抗原结合域,即可变结构域和高变环(所谓的互补决定区域(CDR))的抗体或TCR或其重组变体的至少一个部分。抗原结合片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段、单链(sc)Fv(“scFv”)抗体片段、线性抗体、单结构域抗体(缩写为“sdAb”) (V_L 或 V_H)、骆驼科动物 V_{HH} 结构域(纳米抗体)、由抗体片段形成的多特异性抗体和TCR片段。示例性抗体和抗体片段形式详细描述于Brinkmann等人(MABS, 2017, 第9卷, 第2期, 182-212)中,其出于其所教示的全部内容以引用的方式并入本文。

[0078] 术语“scFv”是指包含经由柔性肽接头在其C末端与抗体轻链(V_L)的可变片段的N末端连接的抗体重链(V_H)的可变片段并且能够表达为单个多肽链的融合蛋白,并且其中所述scFv保持其所来源的完整抗体的特异性。

[0079] 如在scFv的上下文中使用的术语“接头”和“柔性多肽接头”是指由单独或组合使用的诸如甘氨酸和/或丝氨酸残基的氨基酸组成以将可变重链和可变轻链区连接在一起的肽接头。在一个实施方案中,柔性多肽接头是Gly/Ser接头并且包含氨基酸序列(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n,其中n是等于或大于1的正整数。例如,n=1、n=2、n=3、n=4、n=5、n=6、n=7、n=8、n=9和n=10。在一个实施方案中,柔性多肽接头包括但不限于(Gly₄Ser)₃或(Gly₄Ser)₄。在另一个实施方案中,接头包括(Gly₂Ser)、(GlySer)或(Gly₃Ser)的多个重复序列。描述于W02012/138475(以引用的方式并入本文)中的接头也包括在本发明的范围内。

[0080] 关于抗体的“重链可变区”或“ V_H ”(或者,在骆驼科动物单结构域抗体,例如纳米抗体的情况下,“ V_{HH} ”)是指含有三个CDR的重链的片段,所述三个CDR插入在称为框架区(FR)的侧翼链段之间;这些框架区通常比CDR更保守并且形成支持CDR的支架。

[0081] 除非说明,否则如本文所用,scFv可以任一顺序(例如,相对于多肽的N端和C端)具有 V_L 和 V_H 可变区,scFv可包含 V_L -接头- V_H 或者可包含 V_H -接头- V_L 。

[0082] 术语“抗体重链”是指存在于抗体分子中的呈其天然存在构象的两种类型的多肽链中较大者,并且其通常决定抗体所属的免疫球蛋白类别。

[0083] 术语“抗体轻链”是指存在于抗体分子中的呈其天然存在构象的两种类型的多肽链中的较小者。 κ (“ κ ”)和 λ (“ λ ”)轻链是指两种主要的抗体轻链同种型。

[0084] 术语“重组抗体”是指使用重组DNA技术产生的抗体,例如由细菌、酵母、植物或哺乳动物细胞表达的抗体。所述术语应被解释为意指一种抗体,所述抗体通过合成编码所述抗体并且表达抗体蛋白的DNA分子或指定所述抗体的氨基酸序列来生成,其中所述DNA或氨基酸序列使用本领域中可得到的且熟知的重组DNA或氨基酸序列技术来获得。

[0085] 术语“抗原”或“Ag”是指能够被抗体特异性结合或以其它方式引发免疫应答的分子,例如当抗原通过抗原呈递细胞(APC)加工时。这种免疫应答可涉及抗体产生或特定免疫活性细胞的激活或两者。

[0086] 本领域技术人员将理解任何大分子(包括几乎所有的蛋白质或肽)都可用作抗原。此外,抗原可源自重组或基因组DNA。技术人员将理解,包含编码引发免疫反应的蛋白质的核苷酸序列或部分核苷酸序列的任何DNA因而编码“抗原”,正如所述术语在本文使用的含义那样。此外,本领域技术人员将理解抗原不需要仅由基因的全长核苷酸序列编码。显而易见的是,本公开包括但不限于使用多于一种基因的部分核苷酸序列,并且这些核苷酸序列被安置在多种组合中以编码引发所需免疫应答的多肽。此外,本领域技术人员将理解抗原根本不需要由“基因”编码。显而易见的是,抗原可通过化学合成产生;它也可源自生物样品,或者可以是除肽以外的大分子,例如脂质或碳水化合物。这种生物样品可包括但不限于组织样品、肿瘤样品、细胞或具有其它生物组分的生物流体。

[0087] 术语“抗肿瘤作用”是指可通过各种手段显现的生物学作用,包括但不限于例如肿瘤体积减少、肿瘤细胞数量减少、转移数量减少、预期寿命延长、肿瘤细胞增殖减少、肿瘤细胞存活降低或改善与癌性疾患相关的各种生理症状。“抗肿瘤效应”还可通过本发明的肽、多核苷酸、细胞和抗体最初预防肿瘤发生的能力表现出来。

[0088] “人源化”形式的非人(例如,鼠)抗体是免疫球蛋白,其含有完全人恒定结构域(例如, C_{κ} 或 C_{λ} , C_{H1} 、 C_{H2} 、 C_{H3})和可变结构域(V_H 、 V_L),其最小序列来源于非人免疫球蛋白。在大多数情况下,人源化抗体、TCR及其抗原结合片段是人免疫球蛋白(例如,受体抗体、TCR或抗原结合片段),其中来自受体的CDR的残基完全或部分被来自非人物种(供体抗体或TCR)如小鼠、大鼠、兔、鸡或非人灵长类动物抗体的CDR的具有所需特异性、亲和力和功能活性(例如,阻断受体-配体相互作用)的残基替代。在一些情况下,人免疫球蛋白的 V_H 或 V_L 框架区(FR)的一些残基被相应的非人残基替代,以恢复人源化抗体结合活性。此外,人源化抗体/TCR/抗原结合片段可包含残基,所述残基既不存在于受体抗体也不存在于输入的CDR或框架序列中。这些修饰可进一步细化和优化抗体、TCR或抗原结合片段性能。一般来说,人源化抗体或其抗体片段将包含基本上全部或至少一个和通常两个可变结构域,其中全部或基本上全部的CDR区对应于非人免疫球蛋白的那些,并且全部或显著部分的FR区是人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体或抗原片段还可包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白的至少一部分。对于其他细节,参见Jones等人,Nature,1986,321:522-525; Riechmann等人,Nature,1988,332:323-329;以及Presta,Curr.Op.Struct.Biol.,1992,2:593-596,所述文献各自以引用的方式整体并入。

[0089] “人抗体”或“人TCR”是具有对应于由人或人细胞产生的抗体的氨基酸序列或源自利用人抗体或TCR库或人抗体/TCR编码序列的非人来源的抗体的氨基酸序列的氨基酸序列的抗体(例如,从人来源获得或从头设计)。人抗体和TCR分别明确排除人源化抗体和TCR。

[0090] 关于抗体、TCR或其抗原结合片段与靶分子的结合,术语“结合”特定抗原(例如,多肽靶标)或特定抗原上的表位、与特定抗原(例如多肽靶标)或特定抗原上的表位“特异性结合”、“特异性地结合至”特定抗原(例如多肽靶标)或特定抗原上的表位、“对特定抗原(例如多肽靶标)或特定抗原上的表位具有特异性”、“选择性地结合”特定抗原(例如多肽靶标)或特定抗原上的表位和“对特定抗原(例如多肽靶标)或特定抗原上的表位具有选择性”意指结合在可测量程度上不同于非特异性或非选择性相互作用(例如与非靶标分子的相互作用)。特异性结合可例如通过测量与靶标分子的结合以及将它和与非靶标分子的结合进行比较来测量。特异性结合还可通过与模拟在靶标分子上识别的表位的对照分子的竞争来测定。在所述情况下,如果抗体、TCR或其抗原结合片段与靶分子的结合由对照分子竞争性抑制,则指示特异性结合。如本文所用的特异性结合可指亲和力,其中 K_D 值低于 $10^{-6}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $10^{-9}M$ 或 $10^{-10}M$ 。亲和力可通过本领域中已知的常用方法测量,所述方法包括本文所述的那些,诸如表面等离子体共振(SPR)技术(例如, **BIACORE**[®])或生物层干涉测量术(例如, **FORTEBIO**[®])。

[0091] 术语“自体的”是指源自同一个体的任何材料,所述材料之后将被重新引入所述个体。

[0092] 术语“同种异体的”是指源自与引入所述材料的个体相同的物种的不同动物或与所述个体不同的患者的任何材料。当一个或多个基因座处的基因不相同,两个或更多个体被称为彼此同种异体。在一些方面,来自同一物种的个体的同种异体物质可能在遗传上完全不同,从而在抗原性上相互作用。

[0093] 术语“异种的”是指来源于不同物种的动物的移植物。

[0094] 术语“治疗(treating)”(及其变型,诸如“治疗(treat)”或“治疗(treatment)”)是指试图改变有需要的受试者中疾病或疾患的自然进程的临床干预。可在预防上和临床病理过程期间进行治疗。理想的治疗效果包括:防止疾病的发生或复发、缓解症状、消除疾病的任何直接或间接的病理学后果、防止转移、降低疾病进展的速率、改善或减轻疾病状态以及缓解或改善预后。

[0095] 如本文中所用,“治疗有效量”是足以向施用组合物的个体提供有益效果或以其它方式减少有害的非有益事件的组合物或其活性成分的量。本文的“治疗有效剂量”是指对其所施用的对象产生一种或多种所需或令人希望(例如,有益)的效果的剂量,这种施用在规定时间内发生一次或多次。确切的剂量将取决于治疗的目的,并且将可由本领域技术人员使用已知技术来确定(参见,例如Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (第1-3卷, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); 以及Pickar, *Dosage Calculations* (1999))。

[0096] 如本文所用,术语“嵌合抗原受体”或“CAR”是指源自包含抗原结合部分的各种多肽的重组多肽(例如,至少具有抗原结合结构域或其抗原结合片段的多肽),所述重组多肽与以刺激方式起作用并且可含有被称为基于免疫受体酪氨酸的激活基序或“ITAM”的信号传导基序的初级细胞质信号传导序列(也称为“初级信号传导结构域”)融合。在本发明中特别使用的含有ITAM的初级细胞质信号传导序列的实例包括但不限于源自CD3 ζ (ζ)、FcR γ (γ)、FcR β (β)、CD3 γ 、CD3 δ (δ)、CD3 ϵ (ϵ)、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278(也称为“ICOS”)和CD66d的那些。CAR通常提供具有抗体类型特异性或TCR类型特异性的工程化免疫细胞,如T淋巴细胞,并激活效应细胞的部分或全部功能,包括IL-2的产生和T细胞中信号传导后靶细胞的裂解。

[0097] 本文所述的CAR的抗原结合结构域或其抗原结合片段可以多种形式存在,例如,其中抗原结合结构域表示为与抗原结合连续多肽链的一部分,包括例如,天然来源的或合成的单结构域抗体片段(sdAb)或重链抗体(HCAb)、单链Fv抗体(scFv)。本文所述的CAR的抗原结合结构域或其抗原结合片段可包括本文所述的任何抗体形式或抗体片段形式。本文所述的CAR的抗原结合结构域或其抗原结合片段可包括非来源于抗体的序列,包括但不限于嵌合或人工T细胞受体(TCR)。这些嵌合/人工TCR可包含识别靶抗原的多肽序列,其中识别序列可以是例如但不限于,源自TCR或scFv的识别序列。细胞内结构域多肽是其发挥作用以激活T细胞的那些。嵌合/人工TCR论述于例如Gross, G. 和Eshhar, Z., *FASEB Journal* 6: 3370-3378 (1992) 以及Zhang, Y. 等人, *PLoS Pathogens* 6:1-13 (2010) 中。

[0098] “CAR-T细胞”是根据本文公开的方法转导并表达CAR基因的T细胞,例如,随机并入基因组中或有意整合至CCR5和AAVS1基因座中,或整合至T细胞受体 α 恒定(TRAC)基因座中。在一些实施方案中,T细胞是CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞或CD4⁺/CD8⁺ T细胞。在一些实施方案中,T细胞是调节性T细胞。在一些实施方案中,T细胞关于受试者是自体的、同种异体的或异种的。

[0099] 如本文所用,术语“受试者”意指哺乳动物受试者。示例性受试者包括人、猴、狗、猫、小鼠、大鼠、牛、马、骆驼、山羊、兔和绵羊。在某些实施方案中,受试者是人。“患者”是患有疾病、病症或疾患或有发展所述疾病、病症或疾患的风险或另外地需要本文提供的组合物和方法的受试者。

[0100] 如本文所用,“预防”是指预防患者的疾病或疾患,例如肿瘤形成。例如,如果用本发明的方法治疗了有发展肿瘤或其它形式的癌症的风险的个体,并且所述个体后来没有发展肿瘤或其它形式的癌症,则在所述个体中在至少一段时间内所述疾病已被预防。

[0101] 如本文所用,术语“CD19”、B淋巴细胞抗原CD19、CD19分子(分化簇19)、B淋巴细胞表面抗原B4、T细胞表面抗原Leu-12和CVID3是在人体内由基因CD19编码的跨膜蛋白。在人中,除了浆细胞和滤泡树突细胞外,CD19在所有B谱系细胞中表达。CD19在人B细胞中起着两大作用。它充当衔接蛋白以将细胞质信号传导蛋白募集至膜上,并且其在CD19/CD21复合物内工作以降低B细胞受体信号传导途径的阈值。由于它存在于所有B细胞上,所以它是B淋巴细胞发育、淋巴瘤诊断的生物标记物,并且可用作白血病和淋巴瘤免疫治疗的靶标。

[0102] 使用术语“包装说明书”是指通常在治疗或诊断产品(例如,试剂盒)的商业包装中包括的说明,其含有关于使用此类治疗或诊断产品的适应症、用法、剂量、施用、联合疗法、禁忌症和/或警告的信息。

[0103] 本文所用的术语“细胞毒性剂”是指抑制或阻止细胞功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质。

[0104] “化学治疗剂”是指用于治疗癌症的化合物。化学治疗剂包括“抗激素剂”或“内分泌治疗剂”,其作用是调节、减少、阻断或抑制可促进癌症生长的激素的作用。

[0105] 术语“肿瘤”是指所有赘生性细胞生长和增殖(无论恶性还是良性)以及所有癌前和癌性细胞和组织。术语“癌症”、“癌性”、“细胞增殖性病征”、“增生性病征”和“肿瘤”如本文所提及不是相互排斥的。术语“细胞增殖性病征”和“增生性病征”是指与某种程度的异常细胞增殖相关的病症。在一些实施方案中,细胞增殖性病征是癌症。在一些方面,肿瘤是实体瘤。在一些方面,肿瘤是血液恶性肿瘤(血液肿瘤)。

[0106] 术语“药物组合物”是指这样一种制剂,其形式允许其中所含的活性成分的生物活性对治疗受试者有效和/或维持或提高其中所含的生物实体(例如,细胞)的活力,并且不含在所述药物组合物中提供对受试者具有不可接受的毒性的量的另外组分。

[0107] 术语“药学上可接受的载剂”包括与药物施用相容的生理盐水、溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。在一些实施方案中,药学上可接受的载剂是磷酸盐缓冲盐水、生理盐水、Krebs缓冲液、台罗德氏(Tyrode's)溶液、造影剂或欧乃派克(omnipaque)或它们的混合物。术语“药学上可接受的载剂”也包括无菌线粒体缓冲液(300mM蔗糖;10mM K⁺-HEPES(钾缓冲的(4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸,pH 7.2);1mM K⁺-EGTA,(钾缓冲的乙二醇四乙酸,pH 8.0))。所述术语还包括呼吸缓冲液(250mM蔗糖、2mM KH₂PO₄、10mM MgCl₂、20mM K-15HEPES缓冲液(pH 7.2)和0.5mM K-EGTA(pH 8.0))。所述术语还包括T细胞培养基,例如RPMI1640培养基GlutaMAX™补充剂500ml(ThermoFisher, 61870010)。

[0108] 术语“调节(modulation)”和“调节(modulation)”是指减少或抑制或可替代地激活或增加所陈述变量。

[0109] 术语“增加”和“激活”是指所叙述变量的5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、87%、90%、95%、98%、99%、100%、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、5.5倍、6倍、6.5倍、7倍、7.5倍、8倍、8.5倍、9倍、9.5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、65倍、

70倍、75倍、80倍、85倍、90倍、95倍、100倍或更大的增加。

[0110] 术语“减少”和“抑制”是指所叙述变量的10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或更大的减少。

[0111] 术语“激动”是指使受体信号传导激活以诱导与受体的激活相关的生物应答。“激动剂”是结合受体以及使受体激动的实体。

[0112] 术语“拮抗”是指使受体信号传导抑制以抑制与受体的活化相关的生物应答。“拮抗剂”是结合受体以及使受体拮抗的实体。

[0113] 术语“效应T细胞”包括T辅助(即CD4⁺)细胞和细胞毒性(即CD8⁺)T细胞。CD4⁺效应T细胞通常有助于若干免疫过程的发展,包括B细胞成熟为浆细胞和记忆B细胞,以及细胞毒性T细胞和巨噬细胞的激活。CD8⁺效应T细胞通常破坏病毒感染的细胞和肿瘤细胞。有关效应T细胞的额外信息,参见以引用的方式整体并入的Seder和Ahmed,2003(Seder和Ahmed,2003,“Similarities and differences in CD4⁺ and CD8⁺ effector and memory T cell generation”,*Nat Immunol*4:835-42)。

[0114] 术语“调节性T细胞”或“Treg”包括例如通过抑制效应T细胞来调节免疫耐受的细胞。在一些方面,调节性T细胞具有CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺表型。在一些方面,调节性T细胞具有CD8⁺CD25⁺表型。关于效调节性T细胞的额外信息,参见Nocentini等人,*Br. J. Pharmacol.*,2012,165:2089-2099,其以引用的方式整体并入。

[0115] 术语“树突细胞”是指能够激活原初T细胞并刺激B细胞的生长和分化的专职抗原呈递细胞。

[0116] 短语“与[靶标]的表达相关的疾病”包括但不限于与[靶标]的表达相关的疾病或与表达[靶标]的细胞相关的疾患,包括例如增生性疾病(如癌症或恶性肿瘤)或癌前疾患。在一个方面,癌症是间皮瘤。在一个方面,癌症是胰腺癌。在一个方面,癌症是卵巢癌。在一个方面,癌症是胃癌。在一个方面,癌症是肺癌。在一个方面,癌症是子宫内膜癌。与[靶标]的表达相关联的非癌症相关适应症包括但不限于,例如,自身免疫性疾病(例如,狼疮、类风湿性关节炎、结肠炎)、炎症性病症(过敏症和哮喘)和移植。

[0117] 术语“保守序列修饰”是指不显著地影响或改变含有氨基酸序列的抗体或抗体片段的结合特征的氨基酸修饰。此类保守性修饰包括氨基酸取代、添加和缺失。可通过本领域已知的标准技术(诸如定点诱变和PCR介导的诱变)将修饰引入本发明的抗体或抗体片段中。保守性氨基酸取代是其中氨基酸残基被具有类似侧链的氨基酸残基替代的取代。具有相似侧链的氨基酸残基的家族已在本领域中定义。这些家族包括具有以下氨基酸:碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸),酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸),不带电荷的极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸),非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸),β支链的侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)以及芳香族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,本发明的CAR内的一个或多个氨基酸残基可被来自相同侧链家族的其它氨基酸残基替代,并且可使用本文描述的功能测定来测试改变的CAR。

[0118] 术语“刺激”是指通过刺激结构域或刺激分子(例如,CAR或TCR/CD3复合物)与其同源配体或抗原独立性CD3/CD28珠粒在体外的结合诱导的初级应答,从而介导信号转导事

件,如但不限于通过TCR/CD3复合物的信号转导。刺激可介导某些分子的表达改变,和/或细胞骨架结构的重组等。

[0119] 术语“刺激分子”或“刺激结构域”是指由T细胞或工程化免疫细胞(例如,工程化以表达CAR的免疫细胞)表达的分子或其部分,其提供对于信号传导途径如T细胞信号传导途径的至少一些方面以刺激方式调控TCR/CAR复合物的初级激活的初级细胞质信号传导序列。在一个方面,所述初级信号通过例如TCR/CD3复合物与负载有肽的MHC分子的结合而起始,并且导致T细胞应答(包括但不限于增殖、激活、分化等)的介导。在一个方面,初级信号由例如CAR(例如,抗体片段或嵌合TCR)与其同源抗原或表位的结合而起始。

[0120] 术语“抗原呈递细胞”或“APC”是指在其表面上展示与主要组织相容性复合物(MHC)复合的外来抗原的免疫系统细胞,如辅助细胞(例如,B细胞、树突细胞等)。T细胞可使用它们的T细胞受体(TCR)识别这些复合物。APC通常加工抗原并将其呈递给T细胞,但也可能“负载”预加工的抗原肽。

[0121] “细胞内信号传导结构域”如所述术语在本文所用是指参与产生信号的分子的细胞内部分,所述信号促进免疫效应功能,如表达TCR或CAR的T细胞的效应功能。免疫效应功能(例如,在表达CAR的T细胞中)的实例包括细胞溶解活性和T辅助细胞活性,包括细胞因子的分泌。在一个实施方案中,细胞内信号传导结构域可包含初级细胞质信号传导序列。示例性初级细胞内信号传导结构域包括源自负责初级刺激或抗原依赖性模拟的分子的那些。在一个实施方案中,细胞内信号传导结构域可包含共刺激细胞内结构域。示例性共刺激细胞内信号传导结构域包括源自负责共刺激信号或抗原独立刺激的分子的那些。

[0122] 术语“共刺激分子”是指T细胞上与共刺激配体特异性地结合、从而介导T细胞的共刺激应答(如但不限于增殖)的同源结合配偶体。共刺激分子是除抗原受体或其配体外的细胞表面分子,其是高效免疫应答所需的。共刺激分子包括但不限于MHC I类分子、BTLA和To11配体受体以及DAP10、DAP12、CD30、LIGHT、OX40、CD2、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)和4-1BB(CD137)。共刺激细胞内信号传导结构域可以是共刺激分子的细胞内部分。共刺激分子可在以下蛋白质家族中表示:TNF受体蛋白、免疫球蛋白样蛋白、细胞因子受体、整联蛋白、信号传导淋巴细胞激活分子(SLAM蛋白)和激活NK细胞受体。此类分子的实例包括CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、GITR、CD30、CD40、ICOS、BAFFR、HVEM、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、SLAMF7、Nkp80、CD160、B7-H3以及与CD83特异性地结合的配体等。细胞内信号传导结构域可包含其所来源的分子的整个细胞内部分或整个天然细胞内信号传导结构域或其功能片段。术语“4-1BB”是指TNFR超家族的成员,其氨基酸序列提供为GenBank登录号AAA62478.2,或来自非人物种(例如小鼠、啮齿动物、猴、猿等)的等效残基;并且“4-1BB共刺激结构域”被定义为GenBank登录号AAA62478.2的氨基酸残基214-255,或来自非人物种(例如小鼠、啮齿动物、猴、猿等)的等效残基。

[0123] 术语“编码”是指多核苷酸(诸如基因、cDNA或mRNA)中特定核苷酸序列在具有确定的核苷酸序列(例如,rRNA、tRNA和mRNA)或确定的氨基酸序列以及由此产生的生物性质的生物过程中,用作合成其它聚合物和大分子的模板的固有性质。因此,基因、cDNA或RNA编码蛋白质,如果对应于所述基因的mRNA的转录和翻译在细胞或其它生物系统中产生蛋白质的话。其核苷酸序列与mRNA序列相同且通常在序列表中提供的编码链,以及用作基因或cDNA的转录模板的非编码链都可被称为编码所述基因或cDNA的蛋白质或其它产物。

[0124] 除非另有说明,否则“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括为彼此的简并型式且编码同一氨基酸序列的所有核苷酸序列。短语编码蛋白质或RNA的核苷酸序列也可包括内含子,其程度使得编码蛋白质的核苷酸序列在一些型式中含含有一个或多个内含子。

[0125] 术语“内源性的”是指来自生物体、细胞、组织或系统或在其内部产生的任何物质。

[0126] 术语“外源性的”是指从生物体、细胞、组织或系统引入或在其外部产生的任何物质。在患者的情况下,术语“外源性”可指患者、供体或细胞培养物来源的物质。例如,从患者的肌肉组织分离且随后引入免疫细胞群体(其可以是患者自体的或自生的)中的线粒体被认为是外源性的。术语“外源性线粒体”是指从自生来源、同种异体来源和/或异种来源分离的任何线粒体,其中来源的性质可以是组织、血液或培养细胞。

[0127] 术语“表达”是指由启动子驱动的特定核苷酸序列的转录和/或翻译。

[0128] 如本文所用,术语“表达载体”是指含有编码能够被转录的基因产物的至少一部分的核酸序列的载体。在一些情况下,RNA分子然后被翻译成蛋白质、多肽或肽。在其它情况下,这些序列在例如反义分子或核酶的产生中不翻译。表达载体包含足够的顺式作用表达元件;其他表达元件可由宿主细胞或在体外表达系统中提供。表达载体包括本领域中所有已知的表达载体,包括粘粒、质粒(例如,裸露或包含在脂质体中)和病毒(例如,慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒),所述表达载体并入有重组多核苷酸。

[0129] 如本文所用,术语“表达构建体”或“转基因”被定义为可插入载体中的含有编码基因产物的核酸的任何类型的遗传构建体,其中核酸编码序列的部分或全部能够被转录。转录物被翻译成蛋白质,但这并不必需。在某些实施方案中,表达包括基因的转录和mRNA翻译为基因产物两者。在其它实施方案中,表达仅包括编码目标基因的核酸的转录。术语“治疗性构建体”也可用来指表达构建体或转基因。例如,表达构建体或转基因可用作疗法以治疗过度增生性疾病或病症,如癌症,因此表达构建体或转基因是治疗性构建体或预防性构建体。如本文关于疾病、病症或疾患所用,术语“治疗(treatment/treat/treated/treating)”是指预防和/或疗法。

[0130] 术语“慢病毒”是指逆转录病毒科的属。慢病毒在逆转录病毒中在感染非分裂细胞方面是独特的;所述慢病毒可将显著量的遗传信息递送到宿主细胞的DNA中,所以它们是基因递送载体的最高效方法中的一种。HIV、SIV和FIV是慢病毒的所有实例。

[0131] 术语“慢病毒载体”是指源自慢病毒基因组的至少一部分的载体,尤其包括如以下文献中提供的自灭活慢病毒载体:Milone等人,Mol. Ther. 17(8):1453-1464(2009)。可用于临床的慢病毒载体的其它实例包括但不限于,例如来自Oxford BioMedica的LENTIVECTOR™基因传递技术、来自Lentigen的LENTIMAX™载体系统等。非临床类型的慢病毒载体也可获得,并且将是本领域技术人员已知的。

[0132] 术语“同源”或“同一性”是指两个聚合分子之间,例如两个核酸分子(如两个DNA分子或两个RNA分子)之间或两个多肽分子之间的亚基序列同一性。当两个分子中的亚基位置都被相同的单体亚基占据时;例如,如果两个DNA分子中的每一个中的位置都被腺嘌呤占据,那么它们在所述位置处是同源或相同的。两个序列之间的同源性是匹配或同源位置的数量直接函数;例如,如果两个序列中的一半(例如,长度为十个亚基的聚合物中的五个位置)是同源的,则两个序列是50%同源的;如果90%的位置(例如,10个中的9个)是匹配的或同源的,则两个序列是90%同源的。

[0133] 在本发明的上下文中,使用普遍存在的核酸碱基的以下缩写。“A”是指腺苷,“C”是指胞苷,“G”是指鸟苷,“T”是指胸苷,并且“U”是指尿苷。

[0134] 术语“可操作地连接”或“转录控制”是指调控序列与异源核酸序列之间的导致后者的表达的功能性连接。例如,当第一核酸序列与第二核酸序列以功能性关系放置时,第一核酸序列与第二核酸序列可操作地连接。例如,如果启动子影响编码序列的转录或表达,则该启动子与该编码序列可操作地连接。可操作地连接的DNA序列可以彼此邻接,并且例如在需要连接两个蛋白质编码区的情况下,它们处于同一阅读框中。

[0135] 术语“肠胃外”施用免疫原性组合物包括例如皮下(s.c.)、静脉内(i.v.)、肌肉内(i.m.)、鼻内或胸骨内注射、肿瘤内或输注技术。

[0136] 术语“核酸”或“多核苷酸”是指单链或双链形式的脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)及其聚合物。除非特别限制,否则所述术语涵盖含有天然核苷酸的已知类似物的核酸,所述核酸具有与参考核酸相似的结合特性并且以与天然存在的核苷酸相似的方式被代谢。除非另外指明,否则特定核酸序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体(例如,简并密码子取代)、等位基因、直向同源物、SNP和互补序列以及明确指明的序列。特别地,简并密码子取代可通过产生其中一个或多个所选(或所有)密码子的第三位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来实现(Batzer等人,Nucleic Acid Res.19:5081(1991);Ohtsuka等人,J.Biol.Chem.260:2605-2608(1985);和Rossolini等人,Mol.Cell.Probes 8:91-98(1994))。如本文所用,多核苷酸包括但不限于通过本领域中可用的任何手段获得的所有核酸序列,所述手段包括但不限于重组手段(即,克隆来自重组文库或细胞基因组的核酸序列、使用普通的克隆技术和聚合酶链式反应(PCR)等)和通过合成手段。此外,多核苷酸包括通过本领域中熟知的方法得到的多核苷酸的突变,包括但不限于核苷酸或核苷的突变。核酸可包含一个或多个多核苷酸。

[0137] 术语“启动子”是指由细胞的转录机制或可起始多核苷酸序列的特异性转录的引入的合成机制识别的DNA序列。

[0138] 术语“启动子/调控序列”是指可用于表达与启动子/调控序列可操作地连接的基因产物的核酸序列。在一些情况下,此序列可以是核心启动子序列,并且在其它情况下,此序列可包括增强子序列和基因产物的表达所需的其它调控元件。启动子/调控序列可以是例如以组织特异性方式表达基因产物的启动子/调控序列。

[0139] 术语“组成型启动子”是指是当与编码或指定基因产物的多核苷酸可操作地连接时致使基因产物在细胞的大多数或全部生理条件下在细胞中产生的核苷酸序列。

[0140] 术语“诱导型启动子”是指当与编码或指定基因产物的多核苷酸可操作地连接时,基本上仅当细胞中存在对应于所述启动子的诱导物时,才致使在细胞中产生基因产物的核苷酸序列。

[0141] 术语“组织特异性启动子”是指当与编码基因或由基因指定的多核苷酸可操作地连接时致使基因产物大体上仅在细胞是对应于启动子的组织型细胞的情况下在细胞中产生的核苷酸序列。

[0142] 如本文所用,5'-帽(也称为RNA帽,RNA 7-甲基鸟苷帽或RNA m7G帽)是在转录开始后不久添加至真核信使RNA的“前面”或5'端的经修饰的鸟嘌呤核苷酸。5'帽由端基组成,所述端基与第一个转录的核苷酸连接。它的存在对于被核糖体识别和保护免遭RNA酶至关重要

要。帽添加与转录结合,并在协同转录过程中发生,因此相互影响。转录开始后不久,所合成的mRNA的5'端由与RNA聚合酶缔合的帽合成复合物结合。这种酶复合物催化可以是mRNA加帽所需的化学反应。合成过程是多步骤的生物化学反应。加帽部分可进行被修饰以调节mRNA的功能性,如其稳定性或翻译效率。

[0143] 如本文所用,“体外转录的RNA”是指在体外合成的RNA,优选mRNA。通常,体外转录的RNA是由体外转录载体产生。体外转录载体包含用于生成体外转录RNA的模板。

[0144] 如本文所用,“poly(A)”是通过聚腺苷化连接至mRNA的一系列腺苷。在用于瞬时表达的构建体的优选实施方案中,poly(A)在50与5000之间,优选大于64、更优选大于100、最优选大于300或400。可对Poly(A)序列进行化学或酶修饰以调节mRNA的功能性,如定位、稳定性或翻译效率。

[0145] 如本文所用,“聚腺苷酸化”是指聚腺苷酰基部分或其经修饰变体与信使RNA分子的共价连接。在真核生物体中,大多数信使RNA(mRNA)分子在3'端聚腺苷酸化。3' poly(A)尾是通过酶聚腺苷酸化聚合酶的作用添加至前mRNA的长腺嘌呤核苷酸序列(通常几百个)。在高等真核生物中,poly(A)尾被添加到含有特定序列的转录物上,即聚腺苷酸化信号。poly(A)尾和与之结合的蛋白质有助于保护mRNA免于被核酸外切酶降解。聚腺苷酸化对于转录终止、mRNA从细胞核的输出和翻译也是重要的。聚腺苷酸化在DNA转录成RNA后立即在细胞核中发生,但另外也可稍后在细胞质中发生。在转录已经终止后,通过与RNA聚合酶缔合的核酸内切酶复合物的作用裂解mRNA链。裂解位点的特征通常在于在裂解位点附近存在碱基序列AAUAAA。mRNA被裂解后,腺苷残基被添加至裂解位点的游离3'端。

[0146] 如本文所用,“瞬时”是指非整合转基因的持续数小时、数天或数周时间段的表达,其中表达的时间段小于如果整合到基因组中或包含在宿主细胞中的稳定质粒复制子内的基因的表达的时间段。

[0147] 术语“信号转导途径”是指多种信号转导分子之间的生物化学关系,所述信号转导分子在将信号从细胞的一部分传递至细胞的另一部分中起作用。短语“细胞表面受体”包括能够接收信号并跨细胞的膜传递信号的分子和分子复合物。

[0148] 术语“受试者”意图包括可在其中引发免疫应答的活生物体(例如,哺乳动物、人)。

[0149] 术语“基本上纯化的”细胞是指基本上不含其它细胞类型的细胞。基本上纯化的细胞也指已经与在其天然存在的状态下通常与其结合的其它细胞类型分离的细胞。在一些情况下,基本上纯化的细胞群体是指同质的细胞群体。在其它情况下,所述术语仅指已与在它们的天然状态下与它们天然结合的细胞分离的细胞。在一些方面,细胞在体外进行培养。在其它方面,细胞不在体外进行培养。

[0150] 如本文所用的术语“治疗剂”意指治疗。通过减轻、遏制、缓解或根除疾病状态获得治疗作用。

[0151] 如本文所用的术语“预防”是指疾病或疾病状态的预防或保护性治疗。

[0152] 在本发明的上下文中,“肿瘤抗原”是指特定过度增生性病征所共有的抗原。在某些方面,本发明的过度增生性病征抗原源自癌症,包括但不限于原发性或转移性黑色素瘤、间皮瘤、肾细胞癌、胃癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、结肠癌、宫颈癌、脑癌、肝癌、胰腺癌、肾癌、子宫内膜癌和胃癌。

[0153] 在一些情况下,疾病是选自由靶向和定制特定癌症列表组成的组的癌症,其可包

括：间皮瘤、乳头状浆液性卵巢腺癌、透明细胞卵巢癌、混合性苗勒氏卵巢癌 (mixed Mullerian ovarian carcinoma)、子宫内膜样粘液性卵巢癌、恶性胸膜疾病、胰腺腺癌、导管性胰腺腺癌、子宫浆液性癌、肺腺癌、肝外胆管癌、胃腺癌、食管腺癌、结肠直肠腺癌、乳腺腺癌、与靶向表达相关的疾病以及它们的任何组合。

[0154] 术语“转染的”或“转化的”或“转导的”是指籍以将外源核酸转移或引入宿主细胞的过程。“转染的”或“转化的”或“转导的”细胞是已用外源核酸转染、转化或转导的细胞。所述细胞包括原代主题细胞及其子代。

[0155] 术语“T细胞耗竭”和“耗竭的T细胞”是指低反应性T细胞或“功能失调的”T细胞。

[0156] 术语“增强细胞存活、活性或其组合”或“增强细胞存活或活性或其组合”是指增强两种或两种细胞特征中的一种。术语“活性”是指细胞效应功能，如对表达某种抗原的靶细胞的细胞毒性活性，并通过所述抗原或细胞因子产生具有特异性的TCR检测。它进一步指是代谢活性、增殖能力以及扩增和分裂能力、抗耗竭能力和抑制活性。

[0157] 范围：贯穿本公开，本公开的各个方面可以范围形式呈现。应当了解，呈范围形式的描述仅仅是为了方便和简洁，并且不应解释为对本公开范围的硬性限制。因此，范围的描述应该被认为已经具体地公开了所有可能的子范围以及所述范围内的各个数值。例如，诸如1至6的范围的描述应该被认为已经具体地公开了子范围，诸如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等以及所述范围内的单个数字，例如1、2、2.7、3、4、5、5.3和6。另一个实例是，诸如95%-99%同一性的范围包括具有95%、96%、97%、98%或99%同一性的范围，并且包括诸如96%-99%、96%-98%、96%-97%、97%-99%、97%-98%和98%-99%同一性的子范围。这在任何宽度范围的条件均适用。

[0158] 增强的免疫细胞及与其相关的组合物

[0159] 本公开考虑了包含细胞 (例如，干细胞和/或免疫细胞，如但不限于 $\alpha\beta$ T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、Treg细胞、CAR-T细胞如CD4 CAR-T细胞或CD8 CAR-T细胞、NK细胞、CAR-NK细胞、NK T细胞、巨噬细胞、CAR-巨噬细胞、嗜中性粒细胞、CAR-嗜中性粒细胞等) 的组合物，其中所述细胞包含外源性线粒体。外源性线粒体可以是自体线粒体、同种异体线粒体、异种线粒体、包封线粒体或具有遗传修饰的自生或自体线粒体。

[0160] 因此，本文提供了药物组合物，所述药物组合物包含在药学上可接受的载剂中配制的有效增强人免疫细胞存活、活性或其组合的量的分离的活线粒体。

[0161] 在一些实施方案中，所述药物组合物包含在药学上可接受的载剂中配制的相对于不包含线粒体的人免疫细胞有效增强人免疫细胞基础OCR或最大OCR的量的分离的活线粒体。在一些实施方案中，人免疫细胞基础OCR或最大OCR的增强在介于1.1倍至100倍之间的范围内 (以倍数表示)，如1.1至99、1.1至90、1.1至80、1.1至70、1.1至60、1.1至50、1.1至40、1.1至30、1.1至20、1.1至10、1.1至5、1.1至2、1.1至1.8、1.1至1.5、1.2至99、1.2至90、1.2至80、1.2至70、1.2至60、1.2至50、1.2至20、1.2至10、1.2至5、1.2至2.5、1.3至90、1.3至80、1.3至70、1.3至50、1.3至40、1.3至30、1.3至20、1.3至10、1.3至5、1.3至1.5、1.4至100、1.4至95、1.4至90、1.4至80、1.4至70、1.4至60、1.4至50、1.4至30、1.4至25、1.4至20、1.4至10、1.4至5、1.4至3、1.4至2.5、1.5至99、1.5至95、1.5至90、1.5至80、1.5至70、1.5至60、1.5至50、1.5至50、1.5至40、1.5至30、1.5至20、1.5至10、1.5至5、1.5至2.5、2至99、2至90、2至80、2至70、2至60、2至50、2至40、2至35、2至30、2至20、2至10、2至5、2至4、2至2.5、3至99、3至90、

3至80、3至70、3至60、3至50、3至40、3至30、3至25、3至20、3至10、4至99、4至80、4至70、4至60、4至50、4至55、4至25、4至20、4至15、4至10、5至100、5至80、5至50、5至30、5至20、5至10、5.5至9、5.5至7、10至90、10至50、10至20、20至100、20至50、25至40、20至35、30至100、30至50、40至100、40至70、40至60、40至50、50至100、50至90、50至80、50至70、55至65、60至80、75至90、75至100、80至90、80至85、85至100。

[0162] 在一些实施方案中,所述药物组合物包含在药学上可接受的载剂中配制的相对于不包含分离的活线粒体的人免疫细胞有效增强人免疫细胞扩增的量的分离的活线粒体。在一些实施方案中,人免疫细胞扩增的增强在介于1.1至20倍之间的范围内(以倍数表示),如:1.1至1.5、1.1至2.0、1.1至3.0、1.1至5.0、1.1至10、1.1至15、1.1至20、1.3至1.5、1.3至2.0、1.3至3.0、1.3至5.0、1.3至10、1.3至15、1.3至20、1.5至2.0、1.5至3.0、1.5至5.0、1.5至10、1.5至15、1.5至20、2.0至3.0、2.0至5.0、2.0至10、2.0至15、2.0至20、3.0至5.0、3.0至10、3.0至15、3.0至20、4.0至5.0、4.0至10、4.0至15、4.0至20、5.0至10、5.0至15、5.0至20、6.0至10、6.0至15、6.0至20、7.0至10、7.0至15、7.0至20、8.0至10、8.0至15、8.0至20、9.0至10、9.0至15、9.0至20、10至15、10至20、11至15、11至20、12至15、12至20、13至15、13至20、14至15、14至20、15至20、16至20、17至20、18至20、19至20。

[0163] 在一些实施方案中,所述药物组合物包含在药学上可接受的载剂中配制的相对于不包含分离的线粒体的人细胞有效增强人免疫细胞代谢活性的量的分离的活线粒体。在一些实施方案中,代谢活性的增强在介于1.1倍至100倍之间的范围内(以倍数表示),如1.1倍至100倍,如1.1至99、1.1至90、1.1至80、1.1至70、1.1至60、1.1至50、1.1至40、1.1至30、1.1至20、1.1至10、1.1至5、1.1至2、1.1至1.8、1.1至1.5、1.2至99、1.2至90、1.2至80、1.2至70、1.2至60、1.2至50、1.2至20、1.2至10、1.2至5、1.2至2.5、1.3至90、1.3至80、1.3至70、1.3至50、1.3至40、1.3至30、1.3至20、1.3至10、1.3至5、1.3至1.5、1.4至100、1.4至95、1.4至90、1.4至80、1.4至70、1.4至60、1.4至50、1.4至30、1.4至25、1.4至20、1.4至10、1.4至5、1.4至3、1.4至2.5、1.5至99、1.5至95、1.5至90、1.5至80、1.5至70、1.5至60、1.5至50、1.5至50、1.5至40、1.5至30、1.5至20、1.5至10、1.5至5、1.5至2.5、2至99、2至90、2至80、2至70、2至60、2至50、2至40、2至35、2至30、2至20、2至10、2至5、2至4、2至2.5、3至99、3至90、3至80、3至70、3至60、3至50、3至40、3至30、3至25、3至20、3至10、4至99、4至80、4至70、4至60、4至50、4至55、4至25、4至20、4至15、4至10、5至100、5至80、5至50、5至30、5至20、5至10、5.5至9、5.5至7、10至90、10至50、10至20、20至100、20至50、25至40、20至35、30至100、30至50、40至100、40至70、40至60、40至50、50至100、50至90、50至80、50至70、55至65、60至80、75至90、75至100、80至90、80至85、85至100。

[0164] 在一些实施方案中,所述药物组合物包含在药学上可接受的载剂中配制的相对于不包含分离的线粒体的人细胞通过减少细胞耗竭有效增强人免疫细胞存活的量的分离的活线粒体。在一些实施方案中,细胞耗竭的减少在0.5%至100%的范围内,如:0.5%至1.5%、0.5%至2.0%、0.5%至3.0%、0.5%至5.0%、0.5%至10%、0.5%至15%、0.5%至20%、0.5%至30%、0.5%至40%、0.5%至50%、0.5%至60%、0.5%至70%、0.5%至80%、0.5%至90%、0.5%至100%、1.5%至2.0%、1.5%至3.0%、1.5%至5.0%、1.5%至10%、1.5%至15%、1.5%至20%、1.5%至30%、1.5%至40%、1.5%至50%、1.5%至60%、1.5%至70%、1.5%至80%、1.5%至90%、1.5%至100%、2.0%至3.0%、2.0%至5.0%、2.0%至

10%、2.0%至15%、2.0%至20%、2.0%至30%、2.0%至40%、2.0%至50%、2.0%至60%、2.0%至70%、2.0%至80%、2.0%至90%、2.0%至100%、5.0%至10%、5.0%至15%、5.0%至20%、5.0%至30%、5.0%至40%、5.0%至50%、5.0%至60%、5.0%至70%、5.0%至80%、5.0%至90%、5.0%至100%、10%至15%、10%至20%、10%至30%、10%至40%、10%至50%、10%至60%、10%至70%、10%至80%、10%至90%、10%至100%、20%至30%、20%至40%、20%至50%、20%至60%、20%至70%、20%至80%、20%至90%、20%至100%、30%至40%、30%至50%、30%至60%、30%至70%、30%至80%、30%至90%、30%至100%、40%至50%、40%至60%、40%至70%、40%至80%、40%至90%、40%至100%、50%至60%、50%至70%、50%至80%、50%至90%、50%至100%、60%至70%、60%至80%、60%至90%、60%至100%、70%至80%、70%至90%、70%至100%、80%至90%、80%至100%、90%至100%。

[0165] 因此,本文还提供了包含外源性线粒体的人免疫细胞群体,所述外源性线粒体如但不限于自体线粒体、同种异体线粒体、遗传工程化线粒体和由脂质体包封或与特定剂偶联的线粒体。这些细胞可以是本领域中已知的具有抗肿瘤活性的效应细胞,或能够预防自身免疫的免疫抑制免疫细胞。在一些实施方案中,免疫细胞可包括但不限于 $\alpha\beta$ T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、Treg细胞、NK细胞、NK T细胞、巨噬细胞或嗜中性粒细胞。在一些实施方案中,细胞是多能干细胞(胚胎干细胞和诱导型多能干细胞)和多能干细胞来源的免疫细胞,如但不限于自然杀伤细胞、巨噬细胞和淋巴样细胞,特别是T细胞。描述了用于从多能干细胞产生免疫细胞(如T细胞、NK细胞和巨噬细胞)的合适方法的实例(Lee, 2019, "When CAR Meets Stem Cells", Int J Mol Sci 20)。

[0166] 在一些实施方案中,包含外源性线粒体的干细胞或免疫细胞是工程化细胞,例如,工程化以表达嵌合抗原受体(CAR),如本文所述的任何CAR形式。CAR通常包含被选择以响应于抗原结合部分结合其同源配体而激活免疫细胞的抗原结合部分(例如,抗原结合结构域或其抗原结合片段)、跨膜组分和初级细胞质信号传导序列。在一些实施方案中,嵌合抗原受体(CAR)的基本组分包括以下:(1)肿瘤特异性单克隆抗体的可变重链(V_H)和可变轻链(V_L)与来自T细胞受体复合物的CD3 ζ -链框内融合。(2) V_H 和 V_L 通常使用柔性甘氨酸-丝氨酸接头连接在一起,且然后通过间隔区(例如,CD8a柄或 C_H2-C_H3 恒定结构域)连接至跨膜结构域上,以使scFv远离细胞表面延伸,以使得其可与肿瘤抗原容易地相互作用。在一些实施方案中,包含外源性线粒体的工程化免疫细胞是CAR-干细胞、CAR-T细胞、CAR-NK细胞、CAR-NK T细胞、CAR-巨噬细胞或CAR-嗜中性粒细胞。

[0167] 在一些实施方案中,人干细胞或免疫细胞包含外源性线粒体,其中所述外源性线粒体以有效增强免疫细胞存活、免疫细胞基础OCR、免疫细胞代谢活性、免疫细胞扩增或其组合的量存在于所述人干细胞或人免疫细胞中。

[0168] 在一些实施方案中,包含外源性线粒体的免疫细胞的细胞基础或最大OCR的增强在介于1.1倍至100倍之间的范围内(以倍数表示),如1.1倍至100倍,如1.1至99、1.1至90、1.1至80、1.1至70、1.1至60、1.1至50、1.1至40、1.1至30、1.1至20、1.1至10、1.1至5、1.1至2、1.1至1.8、1.1至1.5、1.2至99、1.2至90、1.2至80、1.2至70、1.2至60、1.2至50、1.2至20、1.2至10、1.2至5、1.2至2.5、1.3至90、1.3至80、1.3至70、1.3至50、1.3至40、1.3至30、1.3至20、1.3至10、1.3至5、1.3至1.5、1.4至100、1.4至95、1.4至90、1.4至80、1.4至70、1.4至60、

1.4至50、1.4至30、1.4至25、1.4至20、1.4至10、1.4至5、1.4至3、1.4至2.5、1.5至99、1.5至95、1.5至90、1.5至80、1.5至70、1.5至60、1.5至50、1.5至50、1.5至40、1.5至30、1.5至20、1.5至10、1.5至5、1.5至2.5、2至99、2至90、2至80、2至70、2至60、2至50、2至40、2至35、2至30、2至20、2至10、2至5、2至4、2至2.5、3至99、3至90、3至80、3至70、3至60、3至50、3至40、3至30、3至25、3至20、3至10、4至99、4至80、4至70、4至60、4至50、4至55、4至25、4至20、4至15、4至10、5至100、5至80、5至50、5至30、5至20、5至10、5.5至9、5.5至7、10至90、10至50、10至20、20至100、20至50、25至40、20至35、30至100、30至50、40至100、40至70、40至60、40至50、50至100、50至90、50至80、50至70、55至65、60至80、75至90、75至100、80至90、80至85、85至100。

[0169] 在一些实施方案中,包含外源性线粒体的免疫细胞的细胞扩增的增强在介于1.1至20倍之间的范围内(以倍数表示),如:1.1至1.5、1.1至2.0、1.1至3.0、1.1至5.0、1.1至10、1.1至15、1.1至20、1.3至1.5、1.3至2.0、1.3至3.0、1.3至5.0、1.3至10、1.3至15、1.3至20、1.5至2.0、1.5至3.0、1.5至5.0、1.5至10、1.5至15、1.5至20、2.0至3.0、2.0至5.0、2.0至10、2.0至15、2.0至20、3.0至5.0、3.0至10、3.0至15、3.0至20、4.0至5.0、4.0至10、4.0至15、4.0至20、5.0至10、5.0至15、5.0至20、6.0至10、6.0至15、6.0至20、7.0至10、7.0至15、7.0至20、8.0至10、8.0至15、8.0至20、9.0至10、9.0至15、9.0至20、10至15、10至20、11至15、11至20、12至15、12至20、13至15、13至20、14至15、14至20、15至20、16至20、17至20、18至20、19至20。

[0170] 在一些实施方案中,包含外源性线粒体的免疫细胞的细胞代谢活性的增强在介于1.1倍至100倍之间的范围内(以倍数表示),如1.1至99、1.1至90、1.1至80、1.1至70、1.1至60、1.1至50、1.1至40、1.1至30、1.1至20、1.1至10、1.1至5、1.1至2、1.1至1.8、1.1至1.5、1.2至99、1.2至90、1.2至80、1.2至70、1.2至60、1.2至50、1.2至20、1.2至10、1.2至5、1.2至2.5、1.3至90、1.3至80、1.3至70、1.3至50、1.3至40、1.3至30、1.3至20、1.3至10、1.3至5、1.3至1.5、1.4至100、1.4至95、1.4至90、1.4至80、1.4至70、1.4至60、1.4至50、1.4至30、1.4至25、1.4至20、1.4至10、1.4至5、1.4至3、1.4至2.5、1.5至99、1.5至95、1.5至90、1.5至80、1.5至70、1.5至60、1.5至50、1.5至50、1.5至40、1.5至30、1.5至20、1.5至10、1.5至5、1.5至2.5、2至99、2至90、2至80、2至70、2至60、2至50、2至40、2至35、2至30、2至20、2至10、2至5、2至4、2至2.5、3至99、3至90、3至80、3至70、3至60、3至50、3至40、3至30、3至25、3至20、3至10、4至99、4至80、4至70、4至60、4至50、4至55、4至25、4至20、4至15、4至10、5至100、5至80、5至50、5至30、5至20、5至10、5.5至9、5.5至7、10至90、10至50、10至20、20至100、20至50、25至40、20至35、30至100、30至50、40至100、40至70、40至60、40至50、50至100、50至90、50至80、50至70、55至65、60至80、75至90、75至100、80至90、80至85、85至100。

[0171] 在一些实施方案中,通过减少包含外源性线粒体的免疫细胞的耗竭来增强细胞存活是使得细胞耗竭的减少在0.5%至100%的范围内,如:0.5%至1.5%、0.5%至2.0%、0.5%至3.0%、0.5%至5.0%、0.5%至10%、0.5%至15%、0.5%至20%、0.5%至30%、0.5%至40%、0.5%至50%、0.5%至60%、0.5%至70%、0.5%至80%、0.5%至90%、0.5%至100%、1.5%至2.0%、1.5%至3.0%、1.5%至5.0%、1.5%至10%、1.5%至15%、1.5%至20%、1.5%至30%、1.5%至40%、1.5%至50%、1.5%至60%、1.5%至70%、1.5%至80%、1.5%至90%、1.5%至100%、2.0%至3.0%、2.0%至5.0%、2.0%至10%、2.0%至15%、2.0%至20%、2.0%至30%、2.0%至40%、2.0%至50%、2.0%至60%、2.0%至70%、

2.0%至80%、2.0%至90%、2.0%至100%、5.0%至10%、5.0%至15%、5.0%至20%、5.0%至30%、5.0%至40%、5.0%至50%、5.0%至60%、5.0%至70%、5.0%至80%、5.0%至90%、5.0%至100%、10%至15%、10%至20%、10%至30%、10%至40%、10%至50%、10%至60%、10%至70%、10%至80%、10%至90%、10%至100%、20%至30%、20%至40%、20%至50%、20%至60%、20%至70%、20%至80%、20%至90%、20%至100%、30%至40%、30%至50%、30%至60%、30%至70%、30%至80%、30%至90%、30%至100%、40%至50%、40%至60%、40%至70%、40%至80%、40%至90%、40%至100%、50%至60%、50%至70%、50%至80%、50%至90%、50%至100%、60%至70%、60%至80%、60%至90%、60%至100%、70%至80%、70%至90%、70%至100%、80%至90%、80%至100%、90%至100%。

[0172] T细胞

[0173] 在一个实施方案中,包含外源性线粒体或通过外源性线粒体增强的免疫细胞是T细胞(也称为T淋巴细胞),其属于一组称为淋巴细胞的白细胞。淋巴细胞通常参与细胞介导的免疫。“T细胞”中的“T”是指源自胸腺或其成熟受胸腺影响的细胞。T细胞可与其它淋巴细胞类型如B细胞和自然杀伤细胞(NK)细胞区别在于存在识别细胞表面上呈递的抗原的称为T细胞受体(TCR)的细胞表面蛋白质。在典型的免疫应答中,在MHC抗原呈递的背景下,这些抗原与T细胞受体的结合起始细胞内变化,从而导致T细胞激活。

[0174] T细胞根据T细胞受体(TCR)分为两组, $\alpha\beta$ T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞。含有TCR2的 $\alpha\beta$ T细胞主要介导细胞免疫和免疫调控,而含有TCR1的 $\gamma\delta$ T细胞除了维持局部微环境中的免疫稳态外,还在伤口愈合、除去受损或转化上皮细胞和抑制过度炎症方面发挥重要作用。 $\alpha\beta$ T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞在自身免疫性疾病、肿瘤和血管疾病中发挥着不同的作用。 $\alpha\beta$ T细胞占外周血单核细胞(PBMC)的65%-75%,而 $\gamma\delta$ T细胞占不到10%。它们表达不同的CD4和CD8表面标记物,例如60%的 $\alpha\beta$ T细胞为CD4阳性,30%为CD8阳性,并且在 $\alpha\beta$ T细胞中两者阳性小于1%。

[0175] 如本文所用的术语“激活的T细胞”是指被刺激以通过识别例如,在I类或II类主要组织相容性(MHC)标记物的背景下呈递的抗原决定簇而产生免疫应答(例如,激活的T细胞的克隆扩增)的T细胞。T细胞通过抗原决定簇、细胞因子和/或淋巴因子和分化簇细胞表面蛋白(例如,CD3、CD4、CD8等及其组合)的存在激活。表达差异蛋白簇的细胞通常被称为对于在T细胞表面上表达所述蛋白呈“阳性”(例如,对于CD3、CD4或CD8表达呈阳性的细胞被称为 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 或 $CD8^+$)。CD3和CD4蛋白是可直接和/或间接参与T细胞中的信号转导的细胞表面受体或共受体。

[0176] 在一些实施方案中,包含外源性线粒体和/或通过外源性线粒体增强的免疫细胞包括CAR-T细胞群体。在一些实施方案中,CAR-T细胞群体被选择、富集或纯化,以包含例如至少20%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的表达某种标记物、受体或细胞表面糖蛋白例如CD8、CD4、CD3、CD34的细胞类型。

[0177] 在一些实施方案中,CAR-T细胞群体包含 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T细胞。在一些实施案例中,CAR-T细胞群体被富集以包含至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的 $CD8^+$ T细胞。在一些实施方案中,CAR-T细胞群体被富集以包含至少80%的 $CD8^+$ T细胞。在一些实施方案中,CAR-T细胞群体被富集以包含至少

90%的CD8⁺ T细胞。因此,在一些实施方案中,所述组合中经遗传修饰的CD8⁺ T细胞多于经遗传修饰的CD4⁺ T细胞,即CD4⁺细胞与CD8⁺细胞的比率小于1,例如小于0.9、小于0.8、小于0.7、小于0.6或小于0.5。

[0178] 富集的免疫细胞群体

[0179] 在一些实施方案中,提供了包含外源性线粒体或通过外源性线粒体增强的富集的细胞群体,其中所述富集的细胞群体已被选择为包含特定比率或百分比的一种或多种细胞类型。所谓“细胞群体”或“经修饰的细胞群体”是指一组细胞,如多于两个细胞。细胞群体可以是同质的,包含相同类型的细胞,或者各自包含相同标记物,或者它可能是异质的。在一些实例中,细胞群体来源于从受试者获得的样品,并且包含例如从骨髓、脐带血、外周血或任何组织制备的细胞。在一些实例中,细胞群体已经与核酸接触,其中所述核酸包含异源多核苷酸,例如编码嵌合抗原受体的多核苷酸、诱导型嵌合促凋亡多肽或共刺激多肽,例如嵌合骨髓分化初级应答88 (MyD88) 或截短的MyD88和CD40多肽。在一些实例中,细胞群体和经修饰的细胞群体是已经与包含异源多核苷酸的核酸接触的原始细胞的后代。细胞群体可被选择、富集或纯化,以包含例如至少20%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的表达某种标记物、受体或细胞表面糖蛋白例如CD8、CD4、CD3、CD34的细胞类型。不意图受任何理论束缚,在一些实施方案中,富集T细胞群体以获得增加比率的CD8⁺和CD4⁺T细胞可能降低CAR-T细胞相关的细胞因子释放综合征和神经毒性的水平。

[0180] 经嵌合抗原受体修饰的免疫细胞(例如CAR T细胞)的功效通常取决于过继性转移后它们的体内扩增。额外的基因扩增以提高CAR-T扩增可提高治疗功效,但可能具有增加CAR-T毒性的风险。CAR-T细胞、表达共刺激多肽的CAR-T细胞以及表达MyD88或MyD88-CD40嵌合蛋白的CAR-T细胞(无论是组成性的还是在诱导型多聚化区域的控制下)都能有效地消除肿瘤,但可能诱导急性细胞因子相关毒性。细胞毒性的可能性可能减少可施用于受试者的CAR-T细胞的剂量。实施例部分显示,线粒体移植可导致CAR-T细胞具有更良性的安全性特征。因此,在一些实施方案中,本文提供了包含外源性线粒体或通过外源性线粒体增强的免疫细胞,如CAR T细胞,所述免疫细胞与不包含外源性线粒体的免疫细胞相比在免疫治疗应用中细胞毒性更低。

[0181] 收集来自患者血液的T淋巴细胞和富集T细胞

[0182] T细胞,如通过外源性线粒体增强和/或工程化以表达CAR的T细胞可从任何健康供体获得。供体一般将是成人(至少18岁),但儿童也适合作为T细胞供体(Styczynski, 2018, "Young child as a donor of cells for transplantation and lymphocyte based therapies", *Transfus Apher Sci* 57:323-30)。用于从供体获得T细胞的合适方法的一个实例描述于(Di Stasi等人, 2011, "Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy", *N Engl J Med* 365:1673-83)中。一般来说, T细胞从供体获得,进行遗传修饰和选择,然后可施用于受体受试者。T细胞的有用来源是供体的外周血。外周血样品通常将进行白细胞去除术,以提供富集白细胞的样品。这种富集的样品(也称为“leukopak”)可由多种血细胞组成,包括单核细胞、淋巴细胞、血小板、血浆和红细胞。消除污染物(如红细胞、血小板、单核细胞和肿瘤细胞)需要多管齐下的方法,通常需要使用本领域中已知的方法。与静脉穿刺或血沉棕黄层产物相比,leukopak通常含有更高浓度的细胞。

[0183] 患有复发性癌症的患者可能具有低T细胞计数,因此难以收集足够的自体T细胞。这个问题可通过本领域中已知的方法来克服,如通过使用从健康供体收集的同种异体T淋巴细胞。

[0184] 在经修饰的细胞群体中,细胞类型的选择、富集或纯化可通过任何合适的方法实现。在一些实施方案中,CD8⁺和CD4⁺ T细胞的比例可通过流式细胞术来确定。在一些实例中,可使用MAC柱。在一些实例中,经修饰的细胞群体在施用于受试者之前被冷冻和解冻,并在施用于受试者之前测试活细胞的某种细胞类型的百分比或比率。在转导或转染后,通过磁性选择(MACS柱)将T细胞分离为纯化的CD4⁺和CD8⁺ T细胞。所述组合物可包含CD4⁺和CD8⁺ T细胞,并且理想地,所述组合物中的经遗传修饰的CD3⁺ T细胞群体包含CD4⁺和CD8⁺细胞。尽管在leukopak中CD4⁺细胞与CD8⁺细胞的比率通常高于2,但在一些实施方案中,本发明的组合物中经遗传修饰的CD4⁺细胞与经遗传修饰的CD8⁺细胞的比率小于2,例如小于1.5。在一些实施方案中,所述组合物中经遗传修饰的CD8⁺ T细胞多于经遗传修饰的CD4⁺ T细胞,即CD4⁺细胞与CD8⁺细胞的比率小于1,例如小于0.9、小于0.8、小于0.7、小于0.6或小于0.5。因此,从供体细胞开始并且产生经遗传修饰的T细胞的整个程序被设计为相对于CD4⁺ T细胞富集CD8⁺ T细胞。在一些实施方案中,60%或更多的经遗传修饰的T细胞是CD8⁺ T细胞,并且在一些实施方案中,65%或更多的经遗传修饰的T细胞是CD8⁺ T细胞。在经遗传修饰的CD3⁺ T细胞群体中,在一些实施方案中,CD8⁺ T细胞的百分比介于55%-75%之间,例如55%-65%、55%-70%、56%-71%、63%-73%、60%-70%、59%-74%、65%-71%或65%-75%。在一些实施方案中,提供了细胞群体,选择、富集或纯化所述细胞群体,以包含一定比率的一种细胞类型与另一种细胞类型,例如,CD8⁺与CD4⁺ T细胞的比率例如为3:2、7:3、4:1、9:1、19:1或39:1或更大。在一些实施方案中,选择或富集或纯化经修饰的细胞群体,以包含至少20%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的CD8⁺ T细胞。在一些实施方案中,CD8⁺与CD4⁺ T细胞的比率是4:1或9:1或更大。

[0185] 在一些实施方案中,对于包含如本文所述的共刺激多肽的经遗传修饰的CD3⁺ T细胞的群体,CD8⁺ T细胞的百分比介于55%-75%之间,例如,55%-65%、55%-70%、56%-71%、59%-74%、63%-73%、60%-70%、60%-75%、65%-75%或65%-71%。在一些实施方案中,CD8⁺与CD4⁺ T细胞的比率是3:2、7:3、4:1、9:1、19:1或39:1或更大。在一些实施方案中,选择或富集或纯化包含共刺激多肽的经修饰的细胞群体,以包含至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的CD8⁺ T细胞。在一些实施方案中,CD8⁺与CD4⁺ T细胞的比率是4:1或9:1或更大。共刺激多肽可包含一个或多个共刺激信号传导区,如CD27、ICOS、RANK、TRANCE、CD28、4-1BB、OX40、DAP10、MyD88或CD40。共刺激多肽可包含激活由CD27、ICOS、RANK、TRANCE、CD28、4-1BB、OX40、DAP10、MyD88或CD40激活的信号传导途径的一个或多个共刺激信号传导区。共刺激多肽可诱导型或组成型激活。

[0186] 在一些实施方案中,本发明提供了包含含有诱导型促凋亡多肽的CAR-T细胞群体的组合物和方法,其中至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%是CD8⁺ T细胞。在一些实施方案中,包含诱导型促凋亡多肽的经修饰的细胞群体是至少80%的CD8⁺ T细胞。在一些实施方案中,经修饰的细胞群体至少包含诱导性促凋亡多肽90%CD8⁺ T细胞。

[0187] 在一些实施方案中,本发明提供了包含含有共刺激多肽和诱导型促凋亡多肽的CAR-T细胞群体的组合物和方法,其中至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%

是CD8⁺ T细胞。在一些实施方案中,包含共刺激多肽和诱导型促凋亡多肽的经修饰的细胞群体是至少80%的CD8⁺ T细胞。在一些实施方案中,包含共刺激多肽和诱导型促凋亡多肽的经修饰的细胞群体是至少90%的CD8⁺ T细胞。

[0188] 根据本公开,包含例如自体线粒体、同种异体线粒体、异种线粒体、包封线粒体或具有适当遗传修饰的自生线粒体的线粒体制剂可在遗传修饰(例如,CAR基因的引入)之前、同时或之后递送至富集的T细胞中。

[0189] 线粒体

[0190] 本发明至少部分基于以下发现,即分离的线粒体可通过分别将其添加至细胞培养物中或通过将其注射至患者的组织或通向组织的血管中而递送到(也称为移植到)培养的细胞或患者组织中(Cowan等人,2017,"Transit and integration of extracellular mitochondria in human heart cells",Sci Rep 7:17450;McCully等人,2017,"Mitochondrial transplantation:From animal models to clinical use in humans",Mitochondrion 34:127-34)。

[0191] 线粒体可在离体递送至目标细胞中。目标细胞包括但不限于本文所述的任何免疫细胞、干细胞和/或由其分化的细胞、培养的细胞、先前工程化的免疫细胞(例如,CAR T细胞)、或有待进一步工程化(例如,以表达CAR或人工TCR)和/或培养的(例如,分化的、激活的、处理的或孵育)细胞。线粒体可使用合成脂质体如Lipofectin[®]通过脂质体介导的转移离体递送(Shi等人,2008."Mitochondria transfer into fibroblasts:liposome-mediated transfer of labeled mitochondria into cultured cells",Ethn.Dis.18:S1-43)。线粒体可通过细胞(如本文所述的任何免疫细胞)与线粒体在2-24小时时间段内的共孵育(即共培养)离体递送(Masuzawa等人,2013,"Transplantation of autologously derived mitochondria protects the heart from ischemia-reperfusion injury",Am J Physiol Heart Circ Physiol 304:H966-82)。不希望受理论束缚,移植的线粒体通过肌动蛋白依赖性途径内化。如先前在心肌细胞中所证实的,线粒体内化可在1小时共孵育后发生(Pacak等人,2015,"Actin-dependent mitochondrial internalization in cardiomyocytes:evidence for rescue of mitochondrial function",Biol Open 4:622-6)。

[0192] 线粒体也可通过直接注射至靶向区域,或者通过经由器官或组织特异性血管系统(如受试者的冠状动脉、受试者的肺动脉、受试者的肝门静脉、受试者的胰腺大动脉、受试者的肾动脉或受试者的前列腺动脉)递送而递送至组织或器官中。在后一种情况下,线粒体保留在下游器官或组织中。例如,当通过冠状动脉施用,线粒体几乎完全递送至心脏(Shin等人,2019,"Myocardial Protection by Intracoronary Delivery of Mitochondria: Safety and Efficacy in the Ischemic Myocardium",JACC:Basic to Translational Science第4卷,第8期,2019),而线粒体可通过肺动脉递送至肺中,或通过肾动脉递送至肾中。直接注射线粒体允许所注射的线粒体的集中浓度。用于注射的线粒体的数量可能不同,这取决于靶向器官或组织的大小以及预期用途。线粒体可悬浮在呼吸缓冲液中,并使用例如具有28-32号针的结核菌素注射器在不同部位注射(Emani等人,2017,"Autologous mitochondrial transplantation for dysfunction after ischemia-reperfusion injury",J Thorac Cardiovasc Surg 154:286-9;McCully等人,2017,"Mitochondrial

transplantation:From animal models to clinical use in humans”,Mitochondrion 34:127-34)。

[0193] 体内线粒体移植可使用单一或连续注射自体或异源线粒体,不需要直接或间接、急性或慢性同种异体反应性、同种异体识别性或损伤相关的分子模式分子而进行(Ramirez-Barbieri等人,2019,“Alloreactivity and allorecognition of syngeneic and allogeneic mitochondria”,Mitochondrion 46:103-15)。

[0194] 不希望受理论束缚,活的、具有呼吸能力的线粒体通过内吞作用被缺血和非缺血组织吸收(Cowan等人,2016,“Intracoronary Delivery of Mitochondria to the Ischemic Heart for Cardioprotection”,PLoS One 11:e0160889;Kesner等人,2016,“Characteristics of Mitochondrial Transformation into Human Cells”,Sci Rep 6:26057;Cowan等人,2017,“Transit and integration of extracellular mitochondria in human heart cells”,Sci Rep 7:17450)。

[0195] 熟练的医生可出于各种目的使用相对简单的医疗程序,在局部和/或一般情况下将线粒体分配到患者的组织和/或细胞中。与一些涉及纳米颗粒的传统治疗方案相比,需要进一步指出的是,线粒体是无毒的并且不会引起任何实质性的不良免疫或自身免疫应答。

[0196] 虽然不意图受任何理论束缚,但认为输注的线粒体通过首先附着至内皮而通过毛细血管壁外渗。在它们被注射或输注到动脉中后,线粒体可穿过血管的内皮,并通过核内体肌动蛋白依赖性内化过程而被组织细胞吸收。

[0197] 体内线粒体移植可包括本文所述的任何目标细胞与本文提供的外源性线粒体的共同施用。在一些实施方案中,外源性线粒体和目标细胞共同施用,以促进或增强目标细胞的所需治疗效果,以治疗患者中的疾病。目标细胞包括但不限于本文所述的任何免疫细胞、干细胞和/或由其分化的细胞、培养的细胞、先前工程化的免疫细胞(例如,CAR T细胞)、或有待进一步工程化(例如,以表达CAR或人工TCR)的细胞。在外源性线粒体和目标细胞包含在不同药物组合物中的实施方案中,外源性线粒体的施用可在目标细胞施用之前、同时和/或之后发生。在一些方面,外源性线粒体和目标细胞的施用在彼此的约一个月内发生。在一些方面,外源性线粒体和目标细胞的施用在彼此的约一周内发生。在一些方面,外源性线粒体和目标细胞的施用在彼此的约五天、四天、三天或两天内发生。在一些方面,外源性线粒体和目标细胞的施用在彼此的约一天内发生。在一些方面,外源性线粒体和目标细胞的施用在彼此的约十二小时内发生。在一些方面,外源性线粒体和目标细胞的施用在彼此的约六小时内发生。在一些方面,外源性线粒体和目标细胞的施用在彼此的约三小时内发生。在一些方面,外源性线粒体和目标细胞的施用在彼此的约两小时内发生。在一些方面,外源性线粒体和目标细胞的施用在彼此的约一小时内发生。在一些方面,外源性线粒体和目标细胞的施用在彼此的约三十分钟内发生。在一些方面,外源性线粒体和目标细胞的施用在彼此的约十五分钟内发生。在一些方面,外源性线粒体和目标细胞的施用在彼此的约数分钟内发生。在一些方面,外源性线粒体和目标细胞的共同施用包括外源性线粒体和/或目标细胞的重复施用。

[0198] 分离线粒体

[0199] 用于本发明描述的方法中的线粒体可从任何来源分离或提供,例如,从培养的细胞或组织分离。示例性细胞包括但不限于肌肉组织细胞、心脏成纤维细胞、海拉细胞(HeLa

cells)、前列腺癌细胞、酵母细胞等以及它们的任何混合物。示例性组织包括但不限于肝组织、骨骼肌、心脏、脑和脂肪组织。线粒体可从自生来源、同种异体来源和/或异种来源的细胞或组织(例如,活检材料)分离。在一些情况下,线粒体从具有遗传修饰的细胞,例如具有经修饰的mtDNA或经修饰的核DNA的细胞中分离。

[0200] 线粒体可通过本领域技术人员已知的任何方式从细胞或组织中分离。在一个实例中,收集组织样品或细胞样品,然后均质化。均质化之后,通过重复离心分离线粒体(Kesner等人,2016,“Characteristics of Mitochondrial Transformation into Human Cells”, Sci Rep 6:26057)。可替代地,可通过尼龙网过滤器过滤细胞匀浆。典型的分离线粒体的方法描述于例如McCully JD,Cowan DB,Pacak CA,Toumpoulis IK,Dayalan H和Levitsky S,“Injection of isolated mitochondria during early reperfusion for cardioprotection”,Am J Physiol 296,H94-H105.PMC2637784(2009);Frezza,C.,Cipolat,S.,和Scorrano,L,“Organelle isolation:functional mitochondria from mouse liver,muscle and cultured fibroblasts”,Nature protocols,2(2),287-295(2007);以及标题为“Products and Methods to Isolate Mitochondria”的PCT申请(PCT/US2015/035584;WO 2015192020);其各自以引用的方式并入。

[0201] 线粒体(如用于疗法或包含在药物组合物中的线粒体)可从自生来源、同种异体来源或异种来源的细胞或组织中分离。在一些情况下,从受试者的培养的细胞或组织中收集线粒体,并将这些线粒体施用回同一受试者(自体)。在一些其它情况下,从第二受试者的培养的细胞(例如,人心脏成纤维细胞)或组织中收集线粒体,并将这些线粒体施用于第一受试者(同种异体)。在一些情况下,从不同物种(例如,小鼠、猪和酵母)的培养的细胞或组织中收集线粒体(异种)。

[0202] 在本文所述的方法的某些实施方案中,线粒体可具有不同的来源,例如,外源性线粒体可以是自体的、自生的、同种异体的或异种的。在某些实施方案中,线粒体已新鲜分离(在取得组织活检样品后120分钟内)。在一些实施方案中,线粒体已被分离并随后储存直到使用。在某些实施方案中,自生线粒体可具有外源性mtDNA。在一些实施方案中,线粒体来自受试者的一级亲属。在一些实施方案中,线粒体已被包封。

[0203] 在一些实施方案中,所描述的方法包括在施用前从细胞中收集分离的线粒体的步骤。分离的线粒体可移植到目标细胞,例如,本文所述的任何免疫效应细胞中,或与使用目标细胞的治疗结合施用于受试者。

[0204] 在本公开中,外源性线粒体被移植到免疫细胞中以加强它们的存活、活性或其组合,结果是增强的过继性细胞转移(EACT)。可替代地,或另外地,将线粒体结合递送ACT或EACT引入患者中,结果是提高ACT或EACT的功效或安全性。

[0205] 工程化表达构建体

[0206] 在一些实施方案中,对包含外源性线粒体或通过外源性线粒体增强的免疫细胞进行工程化,例如工程化以表达CAR。本文提供了表达本发明的嵌合抗原受体、嵌合信号传导多肽和诱导型安全开关的表达构建体。

[0207] 如本文所用,术语“cDNA”意图是指使用信使RNA(mRNA)作为模板制备的DNA。与基因组DNA或从基因组、非加工或部分加工的RNA模板聚合的DNA相比,使用cDNA的优点在于,cDNA主要含有相应蛋白质的编码序列。有时使用全或部分基因组序列,如最佳表达需要非

编码区的情况下或在反义策略中靶向非编码区如内含子的情况。

[0208] 在某些实例中,编码嵌合抗原受体的多核苷酸与编码第二多肽的多核苷酸包含在同一载体,例如病毒或质粒载体中。此第二多肽可以是例如嵌合信号传导多肽、诱导型半胱天冬酶多肽(如本文论述)或标记物多肽。在这些实例中,可设计构建体,其中一个启动子可操作地连接至通过2A多肽连接的包含编码两个多肽的多核苷酸的核酸。在此实例中,第一和第二多肽在翻译过程中分离,从而产生两个多肽,或者在包括漏2A(leaky 2A)的实例中,产生一个或两个多肽。在其它实例中,两个多肽可从同一载体分别表达,其中包含编码所述多肽之一的多核苷酸的每种核酸可操作地连接至单独启动子。在其它实例中,一个启动子可以可操作地连接至两个多核苷酸,从而指导两种单独RNA转录物的产生,并且由此产生两个多肽;在一个实例中,启动子可以是双向的,并且编码区可处于相反的方向5' -3'。因此,本文论述的表达构建体可包含至少一个或至少两个启动子。

[0209] 在一些实施方案中,核酸构建体,例如本文描述的任何嵌合抗原受体包含在病毒载体中。在某些实施方案中,病毒载体是逆转录病毒载体。在某些实施方案中,病毒载体是腺病毒载体或慢病毒载体。据了解,在一些实施方案中,使细胞与病毒载体离体接触,并且在一些实施方案中,使细胞与病毒载体在体内接触。因此,可将表达构建体插入载体,例如病毒载体或质粒中。所提供的方法的步骤可使用任何合适的方法进行;这些方法包括但不限于本文所述的转导、转化细胞或以其它方式向细胞提供核酸的方法。

[0210] 如本文所用,术语“基因”被定义为功能性蛋白质、多肽或肽编码单元。如所理解的,此功能术语包括基因组序列、cDNA序列和表达或适合表达蛋白质、多肽、结构域、肽、融合蛋白和/或突变体的更小的工程化基因区段。

[0211] “功能保守性变体”是指这样的蛋白质或酶,其中给定氨基酸残基已被改变,而不改变蛋白质或酶的总体构象和功能,包括但不限于用具有类似性质(包括极性或非极性的性质、大小、形状和电荷)的氨基酸替代氨基酸。对于许多众所周知的非遗传编码的氨基酸的保守性氨基酸取代是本领域中众所周知的。对于其它非编码氨基酸的保守取代可与经遗传编码的氨基酸的性质相比,根据它们的物理性质来确定。

[0212] 在蛋白质或酶中,除被指示为保守氨基酸之外的氨基酸可能不同,因此任何两个功能相似的蛋白质之间的蛋白质或氨基酸序列相似性百分比可能不同,并且如根据校准方案所确定可以是例如至少70%、至少80%、至少90%和至少95%。如本文所提及,“序列相似性”是指核苷酸或蛋白质序列相关的程度。两个序列之间的相似性程度可基于序列同一性和/或保守百分比。本文的“序列同一性”意指两个核苷酸或氨基酸序列不变的程度。“序列比对”意指对两个或更多个序列进行排列,以实现最大同一性(并且在氨基酸序列的情况下,保守)水平以评估相似性程度的过程。用于比对序列并评估相似性/同一性的许多方法是本领域中已知的,例如聚类方法,其中相似性是基于MEGALIGN算法,以及BLASTN、BLASTP和FASTA。当使用任何这些程序时,可选择产生最高序列相似性的设置。如本文所用,术语“启动子”被定义为起始基因的特异性转录所需的由细胞合成机制或引入的合成机制所识别的DNA序列。在一些实施方案中,启动子是发育调控启动子。如本文所用,术语“在转录控制下”、“可操作连接的”或“操作性地连接的”被定义为启动子处于与控制基因的RNA聚合酶起始和表达的核酸有关的正确位置和方向上。在一些实例中,一个或多个多肽被称为“操作性地连接的”。一般而言,术语“可操作地连接的”用于指示启动子序列在功能上连接至第

二序列,其中启动子序列起始并介导与第二序列对应的DNA的转录。

[0213] 用于控制目标多核苷酸序列的表达的特定启动子不被认为是重要的,只要其能够指导靶细胞内的多核苷酸序列的表达即可。因此,在靶向人细胞的情况下,多核苷酸序列编码区可例如被置于能够在人细胞中表达的启动子附近并受其控制。这样的启动子可包括人或病毒启动子。可选择适合于用于表达CAR和本文提供的其它多肽的载体的启动子。

[0214] 在各种实施方案中,例如在表达载体是逆转录病毒(例如慢病毒)的情况下,适当启动子的一个实例是鼠莫洛尼白血病毒(MMLV)启动子。慢病毒在逆转录病毒中在感染非分裂细胞方面是独特的;所述慢病毒可将显著量的遗传信息递送到宿主细胞的DNA中,所以它们是基因递送载体的最高效方法中的一种。HIV、SIV和FIV是慢病毒的所有实例。慢病毒载体可包括自灭活慢病毒载体,如Milone等人,Mol. Ther. 17 (8) :1453-1464 (2009)中所提供。可用于临床的慢病毒载体的其它实例包括但不限于来自Oxford BioMedica的LENTIVECTOR™基因递送技术、来自Lentigen的LENTIMAX™载体系统等。非临床类型的慢病毒载体也可获得,并且将是本领域技术人员已知的。

[0215] 在其它实施方案中,启动子可以是,例如巨细胞病毒(CMV)立即早期基因启动子、猿猴病毒40(SV40)早期启动子、劳斯肉瘤病毒(RSV)长末端重复序列、 β -肌动蛋白、大鼠胰岛素启动子和甘油醛-3-磷酸脱氢酶可用于获得目标编码序列的高水平表达。还考虑了使用本领域中众所周知的其它病毒或哺乳动物细胞或细菌噬菌体启动子以实现目标编码序列的表达,只要表达水平足以达到给定目的即可。通过采用具有众所周知的性质的启动子,可优化转染或转化后目标蛋白的表达水平和表达模式。

[0216] 选择启动子和其它调控元件,使得它们在所需的细胞或组织中具有功能。此外,此启动子列表不应被解释为详尽无遗或限制性的;其它启动子与本文所公开的启动子和方法结合使用。

[0217] 本文论述的核酸可包含一个或多个多核苷酸。在一些实施方案中,一个或多个多核苷酸可被描述为定位为或是另一个多核苷酸的5'或3'或以5'至3'顺序定位。在这些情况下,提及5'至3'被理解为指核酸中多核苷酸的编码区的方向,例如,其中第一多核苷酸位于第二多核苷酸的5',并与编码不可切割接头多肽的第三多核苷酸连接,翻译产物将产生由位于包含第一、第三和第二多核苷酸的翻译产物的更大多肽的氨基末端的第一多核苷酸编码的多肽。

[0218] 表达构建体如CAR基因可诸如通过病毒介导的整合随机并入到基因组中,或有意整合到免疫细胞基因组如T细胞基因组中的特定位置,包括但不限于CCR5和AAVS1基因座,或整合到T细胞受体恒定(TRAC)基因座中。靶向整合可使用基因编辑工具如核酸酶介导的基因组编辑系统,包括成簇规律间隔的短回文重复序列(CRISPR/Cas9)系统、锌指核酸酶(ZFN)和转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)(Liu等人,2019,"Building Potent Chimeric Antigen Receptor T Cells With CRISPR Genome Editing",Front Immunol 10:456)。

[0219] 共刺激

[0220] 在一些实施方案中,包含外源性线粒体或通过外源性线粒体增强的免疫细胞是经工程化以表达CAR的免疫细胞,如包含共刺激多肽的CAR-T细胞。在一些实施方案中,包含外源性线粒体或通过外源性线粒体增强的免疫细胞是包含共刺激多肽的CAR-T细胞。CAR可被

工程化以包含共刺激结构域,如源自T细胞共刺激分子的细胞质部分的那些,包括但不限于CD28、4-1BB、OX40、ICOS和DAP10(参见,例如Carpenito等人(2009)Proc Natl Acad Sci U.S.A.106:3360-3365;Finney等人(1998)J Immunol 161:2791-2797;Hombach等人J Immunol 167:6123-6131;Maher等人(2002)Nat Biotechnol 20:70-75;Imai等人(2004)Leukemia 18:676-684;Wang等人(2007)Hum Gene Ther 18:712-725;Zhao等人(2009)J Immunol 183:5563-5574;Milone等人(2009)Mol Ther 17:1453-1464;Yvon等人(2009)Clin Cancer Res 15:5852-5860),其允许CAR-T细胞在靶抗原接合时接受适当的共刺激。共刺激分子可包括CD28和4-1BB(CD137),它们在肿瘤识别后可起始信号传导级联,从而导致NF- κ B激活,其促进T细胞增殖和细胞存活。用具有CD28或4-1BB信号传导结构域的抗CD19 CAR治疗难治性急性成淋巴细胞性白血病(ALL)进行的临床试验已经表明,过继性转移后的显著T细胞持久性、扩增和连续肿瘤杀伤(Kalos等人(2011)Sci Transl Med 3:95ra73;Porter等人(2011)N Engl J Med 365:725-733;Brentjens等人(2013)Sci Transl Med 5:177ra38)。第三代CAR-T细胞附加CD28修饰的CAR-T,具有来自肿瘤坏死因子(TNF)家族蛋白的额外信号传导分子,如OX40和4-1BB(Finney HM,等人J Immunol 172:104-13,2004;Guedan S等人,Blood,2014)。

[0221] 由于由高度激活的T细胞引起的细胞因子风暴和肿瘤溶解综合征,一些第二代和第三代CAR-T细胞与患者死亡有关。在一个方面,通过外源性线粒体递送增强免疫细胞的本文描述的本发明涉及包含CAR-T细胞的组合物和方法,所述CAR-T细胞包含用于增强和维持表达T细胞的嵌合抗原受体,同时降低CAR-T细胞疗法的细胞毒性作用的共刺激多肽。

[0222] 本发明的共刺激多肽可诱导型或组成型激活。共刺激多肽可包含一个或多个共刺激信号传导区,如CD27、ICOS、RANK、TRANCE、CD28、4-1BB、OX40、DAP10、MyD88或CD40,或例如其细胞质区。共刺激多肽可包含激活由CD27、ICOS、RANK、TRANCE、CD28、4-1BB、OX40、DAP10、MyD88或CD40激活的信号传导途径的一个或多个合适的共刺激信号传导区。共刺激多肽包括激活肿瘤坏死因子受体(TNFR)家族(即CD40、RANK/TRANCE-R、OX40、4-1BB)和CD28家族成员(CD28、ICOS)的NF- κ B途径、Akt途径和/或p38途径的任何分子或多肽。在本文论述的经修饰的T细胞中,可表达多于一个共刺激多肽或共刺激多肽细胞质区。

[0223] 在一些实施方案中,选择或富集或纯化包含共刺激多肽的CAR-T细胞群体,以包含例如至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%的表达某种标记物、受体或细胞表面糖蛋白例如CD8、CD4、CD3、CD34的细胞类型。

[0224] 在一些实施方案中,包含共刺激多肽的CAR-T细胞群体包含CD4⁺和CD8⁺T细胞。在一些实施方案中,富集包含共刺激多肽的CAR-T细胞群体,以包含至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%的CD8⁺T细胞。在一些实施方案中,富集包含共刺激多肽的CAR-T细胞群体,以包含至少80%的CD8⁺T细胞。在一些实施方案中,富集包含共刺激多肽的CAR-T细胞群体,以包含至少90%的CD8⁺T细胞。因此,在一些实施方案中,所述组合物中经遗传修饰的CD8⁺T细胞多于经遗传修饰的CD4⁺T细胞,即CD4⁺细胞与CD8⁺细胞的比率小于1,例如小于0.9、小于0.8、小于0.7、小于0.6或小于0.5。

[0225] 第二代CAR-T细胞的主要功能之一是能够通过由CD3 ζ (信号1)激活激活的T细胞核因子(NFAT)转录因子并且由CD28或4-1BB激活NF- κ B(信号2)而产生支持T细胞存活和生长的IL-2。

[0226] 其它类似地激活NF- κ B的分子也可能与CAR分子中的CD3 ζ 链配对。一种方法使用T细胞共刺激分子,所述共刺激分子最初作为树突细胞(DC)疫苗的佐剂开发(Narayanan等人(2011) *J Clin Invest* 121:1524-1534;Kemnade等人(2012) *Mol Ther* 20(7):1462-1471)。对于DC的完全激活或许可,通常涉及Toll样受体(TLR)信号传导。在TLR信号传导中,TLR的细胞质TLR/IL-1结构域(称为TIR结构域)二聚化,其导致细胞质衔接蛋白如骨髓分化初级反应蛋白(MyD88)的募集和缔合。MyD88是在先天性和适应性免疫应答中起着核心作用的细胞质衔接蛋白。这种蛋白质在白细胞介素-1和Toll样受体(TLR)信号传导途径中充当重要的信号转导子。这些途径调控大量促炎性基因的激活。TLR信号传导还上调CD40(其是肿瘤坏死因子受体(TNFR)家族的成员)的表达,CD40与引发的CD4⁺T细胞上的CD40配体(CD154或CD40L)相互作用。CD40是适应性免疫应答的重要组成部分,通过与其同源CD40L接合而帮助激活APC,进而极化更强的CTL应答。CD40/CD154信号传导系统是T细胞功能和B细胞/T细胞相互作用的重要组分。CD40信号传导通过CD40同型二聚体的形成和与TNFR相关因子(TRAF)的相互作用行进,通过TRAF募集至CD40的细胞质结构域进行,从而导致涉及诸如NF- κ B、JNK和AKT途径的若干次级信号的T细胞激活。

[0227] 除了存活和生长优点外,基于MyD88或MyD88-CD40融合嵌合多肽的刺激也可向CAR-修饰的细胞提供额外的功能。MyD88信号传导对于Th1和Th17应答两者通常是重要的,并且通过IL-1发挥作用以使CD4⁺T细胞对调节性T细胞(Treg)驱动的抑制具有抗性(参见例如,Schenten等人(2014) *Immunity* 40:78-90)。此外,CD8⁺T细胞中经由Ras、PI3K和蛋白激酶C的CD40信号传导导致裂解CD4⁺CD25⁺Treg细胞的细胞毒性介质颗粒酶和穿孔素的NF- κ B依赖性诱导(Martin等人(2010) *J Immunol* 184:5510-5518)。因此,MyD88和CD40共激活可使CAR-T细胞对Treg细胞的免疫抑制作用具有抗性,这一功能可能在实体瘤和其它类型的癌症的治疗中至关重要。一种共刺激CAR工程化细胞如CAR-T细胞的方法是表达MyD88的信号传导元件的融合蛋白(称为MC)。

[0228] 在一些实施方案中,诱导型嵌合信号传导多肽包含两个共刺激多肽细胞质信号传导区,例如4-1BB和CD28,或选自CD27、ICOS、RANK、TRANCE、CD28、4-1BB、OX40、DAP10组成的组的一个或两个或更多个共刺激多肽细胞质信号传导区。在一些实施方案中,CAR-工程化细胞如CAR-T细胞包含核酸,所述核酸编码第一多核苷酸,所述第一多核苷酸编码诱导型嵌合信号多肽;和第二多核苷酸,所述第二多核苷酸编码所述CAR。在一些实施方案中,第一多核苷酸位于第二多核苷酸的5'处。在一些实施方案中,第一多核苷酸位于第二多核苷酸的3'处。在一些实施方案中,编码接头多肽的第三多核苷酸位于第一多核苷酸与第二多核苷酸之间。在一些实施方案中,接头多肽是2A多肽,其可在翻译期间或翻译后分离由所述第一和第二多核苷酸编码的多肽。

[0229] 载体

[0230] 在一些实施方案中,包含外源性线粒体(例如,如自体、同种异体线粒体、异种线粒体、包封线粒体或具有适当遗传修饰的自生线粒体)或通过外源性线粒体增强的免疫细胞群体包含由DNA、双链RNA、单链mRNA或环状RNA载体产生的CAR或人工TCR亚基。应了解,本文提供的载体可使用本技术中已知的方法进行修饰,以改变区的位置或顺序,以用一个区取代另一个区。例如,包含编码嵌合信号传导多肽的多核苷酸的载体可包括编码嵌合信号传导多肽的多核苷酸,所述嵌合信号传导多肽包含按不同顺序排列的一个或两个或更多个共

刺激多肽细胞质信号传导区,例如,选自由CD27、CD28、4-1BB、OX40、ICOS、RANK、TRANCE和DAP10组成的组的那些。编码CAR的多核苷酸也可被修饰,使得抗原结合结构域可被具有相同或不同靶特异性的抗原结合结构域取代;跨膜区可被不同的跨膜区取代;可添加茎多肽。编码标记物多肽的多核苷酸可包含在其中一个多肽内或与其中一个多肽分离;可添加编码安全开关的额外多肽的多核苷酸、可添加编码接头多肽的多核苷酸或非编码多核苷酸或间隔区,或者可改变多核苷酸5'至3'的顺序。

[0231] 载体可编码抗原结合结构域,所述抗原结合结构域例如作为CAR构建体的一部分,对一种或多种靶抗原具有特异性,所述靶抗原例如,BCMA、CD123、CD20、CD22、CD30、CD33、EGFR、EGFRvIII、GD2、Her2、间皮素、MUC1、MUC16、NKG2D、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、ROR1等。如本文所论述,载体也可通过每个多肽区的适当取代来进行修饰。

[0232] 载体可编码共刺激多肽细胞质信号传导区,所述共刺激多肽细胞质信号传导区例如,作为CAR构建体的一部分,包含一个或两个或更多个共刺激多肽细胞质信号传导区,例如,选自由CD27、CD28、4-1BB、OX40、ICOS、RANK、TRANCE和DAP10组成的组的那些。共刺激多肽可包含但不限于本文所提供的氨基酸序列,并且可包括功能保守性突变,包括缺失或截短,并且可包含与本文提供的氨基酸序列具有70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%同一性的氨基酸序列。

[0233] 载体可编码接头,所述接头例如作为CAR构建体的一部分,如CAR多肽与共刺激多肽之间的接头。例如,本文提供的核酸可包含编码CAR的CD3 ζ 部分的多核苷酸3'的共刺激多肽信号传导区,其中两个多核苷酸通过编码接头的多核苷酸分隔。在一些实施方案中,两个多核苷酸可通过编码具有例如约5至20个氨基酸或例如约6至10个氨基酸的接头多肽的多核苷酸分隔。

[0234] 本发明的工程化免疫细胞,如T细胞(例如,CAR-T细胞)可表达安全开关,也称为诱导型自杀基因或自杀开关,如果需要,例如如果发生移植物抗宿主病(GVHD),则其可用于在体内根除工程化免疫细胞。在一些实例中,表达嵌合抗原受体的工程化免疫细胞被提供给患者,其触发不良事件,如中靶肿瘤外毒性。在一些治疗情况下,患者在使用CAR-修饰的细胞的治疗期间可能经历一些阴性症状。在一些情况下,这些疗法导致了不良事件,部分是由于对健康组织的非特异性攻击。在一些实例中,可能不再需要治疗性工程化免疫细胞,或者预期疗法持续一段特定的时间,例如治疗性工程化免疫细胞可起作用以减少肿瘤细胞或肿瘤大小,或者可能不再需要。因此,在一些实施方案中提供了核酸、细胞和方法,其中工程化免疫细胞还表达安全开关,如诱导型半胱天冬酶-9多肽。本领域已知的其它自杀开关系统包括但不限于,(a)单纯疱疹病毒(HSV)-tk,其将无毒的前药更昔洛韦(GCV)转化为GCV-三磷酸,从而通过停止DNA复制导致细胞死亡;(b) iCasp9可结合至小分子AP1903并产生二聚体,从而激活内在凋亡途径;以及(c)在转导的iNKT细胞中表达的可靶向表面抗原(例如,CD20和截短的EGFR),从而允许在施用相关的单克隆抗体后,通过补体/抗体依赖性细胞毒性(CDC/ADCC)有效地消除经修饰的细胞。例如,如果需要减少工程化免疫细胞的数量,则可向患者施用诱导型配体,从而诱导工程化免疫细胞的凋亡。这些开关对触发物(如药理学剂)作出反应,所述触发物在需要根除工程化免疫细胞时提供,并且导致细胞死亡(例如,通过触发坏死或凋亡)。这些剂可导致有毒基因产物的表达,但如果工程化免疫细胞已经表达蛋白质,所述蛋白质响应于剂转换成有毒的形式,则可获得更快速的应答。

[0235] 选择性标记物

[0236] 在某些实施方案中,表达构建体含有如下核酸构建体,其表达通过在表达构建体中包含标记物而在体外或体内鉴定。此类标记物将赋予细胞可鉴定的变化,从而使含有表达构建体的细胞易于鉴定。通常,药物选择标记物的包含有助于克隆和转化体的选择。例如,赋予对新霉素、嘌呤霉素、潮霉素、DHFR、GPT、博莱霉素和组氨酸耐药性的基因是有用的选择性标记物。可替代地,采用诸如单纯疱疹病毒胸苷激酶(tk)的酶。还可采用含有细胞外非信号传导结构域或各种蛋白质(例如,CD34、CD19、LNGFR)的免疫表面标记物,从而允许磁性或荧光抗体介导的分选的分选的直接方法。所采用的选择性标记物不认为是重要的,只要它能够与编码基因产物的核酸同时表达即可。选择性标记物的其它实例包括例如,报告基因如GFP、EGFP、 β -gal或氯霉素乙酰转移酶(CAT)。在某些实施方案中,标记物蛋白(例如CD19)用于例如在免疫磁性选择中选择用于输入的细胞。如本文所论述,CD19标记物与抗CD19抗体、或例如scFv、TCR或其它与CD19结合的抗原识别部分区别开来。

[0237] 在某些实施方案中,标记物多肽连接至诱导型嵌合刺激分子。例如,标记物多肽可通过多肽序列,例如可裂解2a样序列连接至诱导型嵌合刺激分子。

[0238] 在一些实施方案中,多肽可包含在多肽,例如,由表达载体编码的CAR中,以帮助分选细胞。在一些实施方案中,用于表达本文提供的嵌合抗原受体或嵌合刺激分子的表达载体还包含编码16个氨基酸的CD34最小表位的多核苷酸。在一些实施方案中,如在本文的实施例中提供的某些实施方案中,CD34最小表位在CD8茎的氨基末端位置处并入。

[0239] 接头多肽

[0240] 接头多肽包括,例如,可裂解和不可裂解接头多肽。不可裂解多肽可包括,例如,可在共刺激多肽细胞质信号传导区与嵌合抗原受体的ITAM部分(例如,CD3 ζ)之间可操作连接的任何多肽。接头多肽包括例如由约2至30个氨基酸组成的多肽(例如,弗林蛋白酶裂解位点或甘氨酸-丝氨酸接头,如(GGGGS)_n)。在一些实施方案中,接头多肽由约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸组成。在一些实施方案中,接头多肽由约18至22个氨基酸组成。在一些实施方案中,接头多肽由20个氨基酸组成。在一些实施方案中,可裂解接头包括由对群体中经修饰的细胞而言外源性的酶裂解的接头,所述酶例如由通过转染或转导在与编码接头的多核苷酸同时或不同时间引入所述细胞中的多核苷酸编码的酶。在一些实施方案中,可裂解接头包括由对群体中经修饰的细胞而言内源性的酶裂解的接头,所述酶包括例如在所述细胞中天然表达的酶以及由所述细胞天然的多核苷酸编码的酶,例如溶菌酶。

[0241] 2A肽键跳跃序列

[0242] 2A自裂解肽或2A肽或“肽键跳跃”2A序列来源于例如许多不同的病毒,包括例如来源于口蹄疫病毒、马鼻A病毒、明脉扁刺蛾(Thomomys asigna)病毒等。2A肽是一类18-22aa长的肽,其可诱导细胞中重组蛋白的裂解。当这种类型的序列被放置在顺反子中时,在意图分隔的两个多肽之间,核糖体似乎跳跃肽键。例如,在明脉扁刺蛾病毒2A序列的情况下,在羧基末端“P-G-P”处的Gly与Pro氨基酸残基之间的肽键被省略。这可能留下两至三种多肽,例如,诱导型嵌合促凋亡多肽和嵌合抗原受体,或例如标记物多肽和诱导型嵌合促凋亡多肽。当使用这个序列时,在2A序列之前的多肽可能结束于羧基末端处的额外氨基酸,包括Gly残基和2A序列中的任何上游残基。编码2A序列的3'的肽可能结束于氨基末端处的额外

氨基酸,包括Pro残基和2A序列之后的任何下游残基。在一些实施方案中,可裂解接头是源自猪捷申病毒-1 (P2A)的2A多肽。在一些实施方案中,2A共翻译序列是2A样序列。在一些实施方案中,2A共翻译序列是T2A(明脉扁刺蛾病毒2A)、F2A(口蹄疫病毒2A)、P2A(猪捷申病毒-12A)、BmCPV 2A(细胞质多角体病毒2A)、BmIFV 2A(家蚕软化病病毒2A)或E2A(马鼻肺炎病毒2A)。在一些实施方案中,2A共翻译序列是T2A-GSG、F2A-GSG、P2A-GSG或E2A-GSG。在一些实施方案中,2A共翻译序列选自由T2A、P2A和F2A组成的组。“可裂解接头”是指接头通过任何方式裂解,例如包括非酶促方式,如肽跳跃或酶促方式。(Donnelly, ML2001, J.Gen.Virol.82:1013-25)。

[0243] 2A样序列有时是“漏”的,在于在翻译过程中一些多肽没有分离,而是在翻译后保留为一个长多肽。关于漏接头的原因的一种理论认为,短2A序列偶尔可能不折叠成促进核糖体跳跃的所需结构(“2A折叠”)。在这些情况下,核糖体可能不会错过脯氨酸肽键,其然后产生融合蛋白。为了降低漏水平且由此减少所形成的融合蛋白的数量,可向2A多肽的氨基末端添加GSG(或类似的)接头;GSG接头阻断新翻译多肽的二级结构自发折叠和破坏“2A折叠”。

[0244] 治疗性应用

[0245] 本文提供的用外源性线粒体增强的免疫细胞(如其中移植了自体线粒体、同种异体线粒体、异种线粒体、包封线粒体或具有遗传修饰的线粒体的免疫细胞)可用于治疗涉及靶标的任何疾病或疾患。如果应用公开了免疫细胞的一般应用(不是结合剂特异性的),则可使用“肿瘤相关抗原”(“TAA”)作为靶细胞分子。在一些实施方案中,所述疾病或疾患是可受益于用过继性细胞疗法治病的疾病或疾患。在一些实施方案中,所述疾病或疾患是肿瘤。在一些实施方案中,所述疾病或疾患是细胞增殖性病。在一些实施方案中,所述疾病或疾患是癌症。在一些实施方案中,所述疾病或疾患是病毒感染。

[0246] 在一些实施方案中,本文提供了一种治疗有需要的受试者的疾病或疾患的方法,所述方法通过向所述受试者施用有效量的本文提供的用外源性线粒体增强的免疫细胞,例如先前离体移植有外源性线粒体的免疫细胞来进行。在一些实施方案中,本文提供了一种通过将有效量的免疫细胞与本文提供的外源性线粒体共同施用于有需要的受试者来治疗所述受试者的疾病或疾患的方法。在一些方面,所述疾病或疾患是癌症。在一些方面,所述疾病或疾患是病毒感染。

[0247] 任何合适的癌症都可用本文提供的用外源性线粒体增强的免疫细胞进行治疗。说明性的合适的癌症包括,例如,急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、肾上腺皮质癌、肛门癌、阑尾癌、星形细胞瘤、基底细胞癌、脑肿瘤、胆管癌、膀胱癌、骨癌、乳腺癌、支气管肿瘤、未知原发来源的癌、心脏肿瘤、宫颈癌、脊索瘤、结肠癌、结肠直肠癌、颅咽管瘤、导管癌、胚胎性肿瘤、子宫内膜癌、室管膜瘤、食管癌、神经母细胞瘤、纤维组织细胞瘤、尤文肉瘤、眼癌、生殖细胞肿瘤、胆囊癌、胃癌、胃肠类癌、胃肠间质瘤、妊娠滋养细胞疾病、神经胶质瘤、头颈癌、肝细胞癌、组织细胞增生症、霍奇金淋巴瘤(HL)、下咽癌、眼内黑色素瘤、胰岛细胞瘤、卡波西肉瘤、肾癌、朗格汉斯细胞组织细胞增生症、喉癌、唇和口腔癌、肝癌、原位小叶癌、肺癌、巨球蛋白血症、恶性纤维组织细胞瘤、黑素瘤、梅克尔细胞癌、间皮瘤、原发性灶隐匿的转移性鳞状颈癌、涉及NUT基因的中线道癌、口腔癌、多发性内分泌瘤综合征、多发性骨髓瘤、蕈样真菌病、骨髓增生异常综合征、骨髓增生异常/骨髓增生性肿瘤、鼻

腔和鼻窦癌、鼻咽癌、神经母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、非小细胞肺癌(NSCLC)、口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳头状瘤病、副神经节瘤、甲状旁腺癌、阴茎癌、咽癌、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、胸膜肺母细胞瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、前列腺癌、直肠癌、肾细胞癌、肾盂和输尿管癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌样瘤、唾液腺癌、塞扎莱综合征、皮肤癌、小细胞肺癌(SCLC)、小肠癌、软组织肉瘤、脊髓肿瘤、胃癌、T细胞淋巴瘤、畸胎瘤、睾丸癌、咽喉癌、胸腺瘤和胸腺癌、甲状腺癌、尿道癌、子宫癌、阴道癌、外阴癌和维尔姆斯肿瘤。

[0248] 组合疗法

[0249] 在一些实施方案中,用本文提供的外源性线粒体增强的免疫细胞(如T细胞或CAR T细胞)与至少一种额外治疗剂一起施用。用外源性线粒体增强的免疫细胞可包括先前离体移植有外源性线粒体的免疫细胞,或与外源性线粒体共同施用使得外源性线粒体体内移植到免疫细胞中的免疫细胞。任何合适的另外治疗剂都可与本文提供的用外源性线粒体增强的免疫细胞一起施用。在一些方面,额外治疗剂选自放射、细胞毒性剂、化学治疗剂、细胞生长抑制剂、抗激素剂、EGFR抑制剂、免疫刺激剂、抗血管生成剂以及其组合。

[0250] 在一些实施方案中,所述额外治疗剂包括免疫刺激剂。

[0251] 在一些实施方案中,所述免疫刺激剂是阻断免疫细胞的抑制性受体或其配体的信号传导的剂。在一些方面,抑制性受体或配体选自细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4,也称为CD152)、程序性细胞死亡蛋白1(也称为PD-1或CD279)、程序性死亡配体1(也称为PD-L1或CD274)、转化生长因子 β (TGF β)、淋巴细胞活化基因3(LAG-3,也称为CD223)、Tim-3(甲型肝炎病毒细胞受体2或HAVCR2或CD366)、神经突蛋白、B和T淋巴细胞衰减剂(也称为BTLA或CD272)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)以及其组合。在一些方面,所述剂选自抗PD-1抗体(例如,派姆单抗或纳武单抗)和抗PD-L1抗体(例如,阿特殊单抗)、抗CTLA-4抗体(例如,伊匹单抗)、抗TIM3抗体、癌胚抗原相关细胞粘附分子1(CECAM-1,也称为CD66a)和5(CEACAM-5,也称为CD66e)、vset免疫调控受体(也称为VISR或VISTA)、白细胞相关免疫球蛋白样受体1(也称为LAIR1或CD305)、CD160、自然杀伤细胞受体2B4(也称为CD244或SLAMF4)以及其组合。在一些方面,所述剂是派姆单抗。在一些方面,所述剂是纳武单抗。在一些方面,所述剂是阿特殊单抗。

[0252] 在一些实施方案中,所述额外治疗剂是抑制PD-1与PD-L1之间的相互作用的剂。在一些方面,抑制PD-1与PD-L1之间的相互作用的额外治疗剂选自抗体、肽模拟物和小分子。在一些方面,抑制PD-1与PD-L1之间的相互作用的额外治疗剂选自派姆单抗(KeytrudaTM)、纳武单抗(OpdivoTM)、阿特殊单抗(TecentriqTM)、阿维鲁单抗(BavencioTM)、匹地利珠单抗、德瓦鲁单抗、BMS-936559、磺胺间甲氧嘧啶1和磺胺甲噻二唑2。在一些实施方案中,抑制PD-1与PD-L1之间的相互作用的额外治疗剂是本领域已知的具有这种活性的任何治疗剂,例如如Weinmann等人(Weinmann,2016,“Corrigendum:Cancer Immunotherapy:Selected Targets and Small-Molecule Modulators”,ChemMedChem 11:1576)中所描述,所述文献以引用的方式整体并入。在一些实施方案中,将抑制PD-1与PD-L1之间的相互作用的剂与本文提供的抗体配制在相同的药物组合物中。在一些实施方案中,将抑制PD-1与PD-L1之间的相互作用的剂与本文提供的抗体配制在不同的药物组合物中。在一些实施方案中,在施用本文提供的抗体之前施用抑制PD-1与PD-L1之间的相互作用的剂。在一些实施方案中,在施用本文提供的抗体之后施用抑制PD-1与PD-L1之间的相互作用的剂。在一些实施方案中,与

本文提供的抗体同时施用抑制PD-1与PD-L1之间的相互作用的剂,但是在分开的药物组合物中施用所述剂和抗体。

[0253] 在一些实施方案中,免疫刺激剂是免疫细胞的共刺激受体的激动剂。在一些方面,共刺激受体选自GITR、OX40、ICOS、LAG-2、CD27、CD28、4-1BB、CD40、STING、toll样受体、RIG-1和NOD样受体。在一些实施方案中,激动剂是抗体。

[0254] 在一些实施方案中,免疫刺激剂调节精氨酸酶、吡嗪胺-2,3-双加氧酶或腺苷A2A受体的活性。

[0255] 在一些实施方案中,免疫刺激剂是细胞因子。在一些方面,细胞因子选自IL-2、IL-5、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21以及其组合。在一些方面,细胞因子是IL-2。

[0256] 在一些实施方案中,免疫刺激剂是溶瘤病毒。在一些方面,溶瘤病毒选自单纯疱疹病毒、水疱性口炎病毒、腺病毒、新城疫病毒(NDV)、痘苗病毒和马拉巴病毒。

[0257] 额外治疗剂的进一步实例包括紫杉烷(例如,紫杉醇或多西他赛);铂剂(例如,卡铂、奥沙利铂和/或顺铂);拓扑异构酶抑制剂(例如,伊立替康、拓扑替康、依托泊苷和/或米托蒽醌);亚叶酸(例如,甲酰四氢叶酸);或核苷代谢抑制剂(例如,氟尿嘧啶、卡培他滨和/或吉西他滨)。在一些实施方案中,额外治疗剂是亚叶酸、5-氟尿嘧啶和/或奥沙利铂。在一些实施方案中,额外治疗剂是5-氟尿嘧啶和伊立替康。在一些实施方案中,额外治疗剂是紫杉烷和铂剂。在一些实施方案中,额外治疗剂是紫杉醇和卡铂。在一些实施方案中,额外治疗剂是培美曲赛。在一些实施方案中,额外治疗剂是靶向治疗剂,如EGFR、RAF或MEK靶向剂。

[0258] 额外治疗剂可通过任何合适的方式施用。在一些实施方案中,本文提供的药物和额外治疗剂包含在同一药物组合物中。在一些实施方案中,本文提供的抗体和额外治疗剂包含在不同的药物组合物中。

[0259] 在本文提供的抗体和额外治疗剂包含在不同药物组合物中的实施方案中,抗体的施用可在施用额外治疗剂之前、同时和/或之后进行。在一些方面,本文提供的抗体和额外治疗剂的施用在彼此的约一个月内发生。在一些方面,本文提供的抗体和额外治疗剂的施用在彼此的约一周内发生。在一些方面,本文提供的抗体和额外治疗剂的施用在彼此的约一天内发生。在一些方面,本文提供的抗体和额外治疗剂的施用在彼此的约十二小时内发生。在一些方面,本文提供的抗体和额外治疗剂的施用在彼此的约一小时内发生。

[0260] 使用方法

[0261] 本说明书提供了将分离的线粒体或分离的线粒体的药物组合物离体递送至患者或同种异体供体的细胞和/或体内递送至患者的组织的方法。不希望被理论束缚,线粒体通过肌动蛋白依赖性内吞作用被组织细胞或培养细胞吸收,从而提供了一种将药物组合直接递送至细胞中的方法。在非限制性说明性实例中,通过例如线粒体(10^7 个/孔)与细胞(50,000个/孔)在培养基中共孵育2-24小时的时间段来将线粒体移植到靶免疫细胞中。本领域的技术人员可认识到,离体施用至免疫细胞或在体内施用至患者的组织的线粒体的剂量可基于增强一个或多个靶免疫细胞方面的预期结果如优化活力、功效、活性、存活、耐力和/或毒性而有所不同。在线粒体(例如通过共孵育)离体递送至免疫细胞时,线粒体的剂量可在每个靶细胞0.2个线粒体与每个靶细胞5,000个线粒体之间。在线粒体体内递送至患者的组织时,可递送每1mL 1个线粒体与 10^7 个线粒体之间。

[0262] 本公开考虑了包含增强的免疫细胞($\alpha\beta$ T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、Treg细胞、CAR-T细胞、

NK细胞、CAR-NK细胞、NK T细胞、巨噬细胞、CAR-巨噬细胞、嗜中性粒细胞、CAR-嗜中性粒细胞等)的组合物,其中所述细胞包含外源性线粒体或通过外源性线粒体增强,所述外源性线粒体可以是自体线粒体、同种异体线粒体、异种线粒体、包封线粒体或具有遗传修饰的自生线粒体。这些细胞可以是本领域中已知的具有抗肿瘤活性的效应细胞,或能够预防自身免疫的免疫抑制免疫细胞。因此,本说明书提供了将包含外源性线粒体或通过外源性线粒体增强的免疫细胞或包含外源性线粒体或通过外源性线粒体增强的免疫细胞的药物组合物递送至患者的细胞和/或组织或源自同种异体供体的细胞的方法。包含外源性线粒体或通过外源性线粒体增强的免疫细胞可用于治疗多种疾病,包括但不限于各种形式的癌症、肿瘤和自身免疫性疾病。

[0263] 在一些实施方案中,CAR T细胞的制备可包括以下步骤:

[0264] 1.通过白细胞去除术从患者的血液中收集T淋巴细胞。

[0265] 2.通过密度梯度离心、淘洗和免疫磁珠选择富集T细胞。

[0266] 3.使用电穿孔、逆转录病毒/慢病毒转导或核酸酶介导的基因组编辑进行遗传修饰(例如,将CAR基因引入靶细胞的基因组中)。

[0267] 4.使用本领域已知的方法,通过人工抗原呈递系统(抗CD8/抗CD28免疫磁珠/LV-APC)经由多克隆激活进行CAR-T细胞的激活和扩增。

[0268] 一致性通常通过根据cGMP(当前良好生产规范)对原材料和方案进行标准化和验证来实现。

[0269] 5.质量保证-根据FDA指南使用本本领域中已知的方法针对活力、表型、革兰氏染色、内毒素、细菌、真菌和支原体污染物进行测试。

[0270] 6.配制和施用-使用本技术中已知的方法,针对临床处方剂量和施用途径进行测试。

[0271] 治疗性细胞保存、包装、运输、接收和施用一般应保持产品稳定性和监管链。

[0272] 在一个特定实施方案中,在进行遗传修饰(例如,引入CAR基因)(1)之前、(2)同时或(3)之后将线粒体制剂递送至免疫细胞中。在一个特定实施方案中,在进行离体遗传修饰(例如,引入CAR基因)(1)之前、(2)同时或(3)之后将线粒体制剂离体递送至免疫细胞中,如在包括离体遗传修饰的方法中。在一个特定实施方案中,在进行体内遗传修饰(例如,引入CAR基因)(例如,体内病毒介导的遗传修饰)之前,将线粒体制剂离体递送至免疫细胞。不希望受理论束缚,步骤(1)对于从免疫受损癌症患者取得的自体T细胞(耗竭或衰老的T细胞)的再生通常是重要的。线粒体可与离体细胞以0.2:1至5000:1的比率,例如以0.2:1、0.5:1、1:1、10:1、50:1、100:1、200:1、500:1、1000:1或5000:1的比率共孵育。

[0273] 为了加强体内免疫细胞活性,如CAR-T细胞活性,线粒体也可(4)与免疫细胞一起递送至患者中。在一个特定实施方案中,在进行体内遗传修饰(例如,引入CAR基因)(例如,体疗病毒介导的遗传修饰)(1)之前、(2)同时或(3)之后将线粒体制剂体内递送至免疫细胞。在一个特定实施方案中,在进行离体遗传修饰(例如,引入CAR基因)之后将线粒体制剂体内递送至免疫细胞。在本发明的一个特定实施方案中,CAR-T细胞或其它免疫细胞通过全身(静脉内)输注递送,而线粒体通过(5)肿瘤内注射、(6)器官内注射、(7)组织内注射或(8)通过器官特异性或组织特异性血管系统递送。

[0274] 实施例

[0275] 以下是本发明的方法和组合物的实施例。可理解,考虑到本文提供的一般性描述,可实践各种其它实施方案。

[0276] 实施例1a:从组织样品或培养细胞中分离线粒体

[0277] 进行了实验以从组织样品或培养细胞中分离线粒体。

[0278] 制备

[0279] 制备以下溶液以分离完整的、活的、具有呼吸能力的线粒体。为了使用本发明的方法成功分离线粒体,溶液和组织样品应保持在冰上,以保持线粒体活力。即使保持在冰上时,分离的线粒体也将随时间推移表现出功能活性的降低(Olson等人,J Biol Chem 242: 325-332,1967)。如果可能,应提前准备以下溶液:

[0280] -1M K-HEPES储备溶液(用KOH将pH调节至7.2)。

[0281] -0.5MK-EGTA储备溶液(用KOH将pH调节至8.0)。

[0282] -1M KH_2PO_4 储备溶液。

[0283] -1M MgCl_2 储备溶液。

[0284] -均质化缓冲液(pH 7.2):300mM蔗糖、10mM K-HEPES和1mM K-EGTA。储存在4°C下。

[0285] -呼吸缓冲液:250mM蔗糖、2mM KH_2PO_4 、10mM MgCl_2 、20mM K-HEPES缓冲液(pH 7.2)和0.5mM K-EGTA(pH 8.0)。储存在4°C下。

[0286] -10×PBS储备溶液:将80g的NaCl、2g的KCl、14.4g的 Na_2HPO_4 和2.4g的 KH_2PO_4 溶解于1L重蒸馏 H_2O (pH7.4)中。

[0287] -通过将100mL 10×PBS吸移至1L重蒸馏 H_2O 中制备1×PBS。通过将4mg的枯草杆菌蛋白酶A称出到1.5mL微量离心管中来制备枯草杆菌蛋白酶A储备溶液。储存在-20°C下直到使用。

[0288] 从组织中分离线粒体

[0289] 概述使用组织解离和差分过滤分离线粒体中的程序步骤的方案在图1中示出。将取自骨骼肌的两个6mm活检新鲜样品穿孔转移至gentleMACS C管(Miltenyi Biotec, Somerville,MA)中的5mL均质化缓冲液中,并使用gentleMACS™解离器(Miltenyi Biotec)1分钟均质化程序将样品均质化。将枯草杆菌蛋白酶A储备溶液(250μL)添加至gentleMACS C管中的匀浆中,并在冰上孵育10分钟。将匀浆以750×g离心4分钟(作为任选的步骤)。然后,将匀浆在50mL锥形离心管中在冰上通过预湿润的40μm筛网过滤器过滤。将滤液在50mL锥形离心管中在冰上通过新的预湿润的40μm筛网过滤器重新过滤。将滤液在50mL锥形离心管中在冰上通过新的预湿润的10μm筛网过滤器再次重新过滤。将滤液在50mL锥形离心管中在冰上通过新的预湿润的6μm筛网过滤器重新过滤。所得滤液立即使用或者通过离心浓缩。在浓缩的情况下,将滤液转移至1.5mL微量离心管,并且在4°C下以9000×g离心10分钟。除去上清液,并且重新悬浮含有线粒体的沉淀,并合并到1mL呼吸缓冲液中。

[0290] 从培养细胞中分离线粒体

[0291] 还从培养细胞,例如,从人心脏成纤维细胞(HCF)细胞系(获自ScienCell Research Laboratories,Carlsbad,CA)中分离线粒体。

[0292] 人心脏成纤维细胞(HCF)的培养

[0293] 根据供应商的说明(ScienCell)将人心脏成纤维细胞(HCF)保持在含有胎牛血清、成纤维细胞生长补充剂-2和抗生素(青霉素/链霉素)溶液的成纤维细胞培养基-2中。将细

胞在37°C下在5%CO₂的湿润气氛中保持为单层,并且当达到80%汇合时传代。

[0294] 人心脏成纤维细胞(HCF)的制备

[0295] 将来自两个烧瓶(T150)的处于80%汇合度的HCF细胞用PBS洗涤一次。然后根据供应商的说明(ScienCell Research Laboratories,Carlsbad,CA)使用胰蛋白酶来分离细胞。根据供应商的说明(ScienCell Research Laboratories,Carlsbad,CA)通过添加胰蛋白酶中和溶液来终止反应。将细胞收集在50ml离心管中,并以1000rpm(190x g)离心5分钟。丢弃上清液,并使用1x PBS总计进行3次洗涤。

[0296] 与HCF不同的培养细胞的制备应根据制造商的说明进行。值得注意的是,用作线粒体来源的细胞可以是附着的、半附着的或悬浮的。

[0297] 线粒体分离程序基本上与用于从组织样品中分离线粒体的程序相同,除了使用人成纤维细胞而不是活检样品。

[0298] 可替代地,可通过重复离心分离线粒体(Kesner等人,2016,"Characteristics of Mitochondrial Transformation into Human Cells",Sci Rep 6:26057)。简言之,通过胰蛋白酶消化收集细胞,悬浮于PBS中并离心(5分钟,250×g)两次。线粒体分离程序在4°C下或在冰上进行。将离心的细胞重新悬浮于线粒体分离缓冲液(320mM蔗糖、5mMTris-HCl(pH 7.4)、2mM EGTA)中,并用杜恩斯(Dounce)匀浆器均质化。通过在3000×g下5分钟两次离心除去细胞核和细胞碎片,并收集上清液(任选的步骤)。然后将上清液以12,000×g离心10分钟,并将线粒体沉淀重新悬浮于线粒体分离缓冲液中。通过Bradford测定来确定线粒体浓度。

[0299] 线粒体数量

[0300] 通过用MitoTracker Orange CMTMRos(5μmol/L;Thermo Fisher Scientific)标记分离的线粒体的等分试样(10μL)来测定活线粒体数量。将经标记的线粒体的等分试样点样到载玻片上,并使用具有63×C-复消色差物镜(1.2W Korr/0.17NA,Zeiss)的旋转式共聚焦显微镜进行计数。将线粒体用线粒体特异性染料MitoFluor Green(Thermo Fisher Scientific)进行复染色。选择适当的波长,以使用未染色的细胞和组织测量自身荧光和背景荧光。简言之,将1μL的经标记的线粒体置于显微镜载玻片上并覆盖。使用MetaMorph成像分析软件在覆盖整个标本区域的低(×10)放大倍率下测定线粒体数量。

[0301] 实施例1b:从培养细胞中分离线粒体

[0302] 进行了实验以从培养细胞中分离线粒体。

[0303] 制备

[0304] 制备以下溶液以分离完整的、活的、具有呼吸能力的线粒体。为了使用本发明的方法成功分离线粒体,溶液和组织样品应保持在冰上,以保持线粒体活力。即使保持在冰上时,分离的线粒体也将随时间推移表现出功能活性的降低(Olson等人,J Biol Chem 242:325-332,1967)。如果可能,应提前准备以下溶液:

[0305] -1M K-HEPES储备溶液(用KOH将pH调节至7.2)。

[0306] -0.5MK-EGTA储备溶液(用KOH将pH调节至8.0)。

[0307] -均质化缓冲液(pH 7.2):300mM蔗糖、10mM K-HEPES和1mM K-EGTA。储存在4°C下。

[0308] -1x PBS(ThermoFisher,10010031)

[0309] -通过将2mg的枯草杆菌蛋白酶A称出到1.5mL微量离心管中来制备枯草杆菌蛋白

酶A储备溶液。储存在-20℃下直到使用。在均质化缓冲液中以2mg/ml制备。

[0310] 人心脏成纤维细胞(HCF)的培养

[0311] 如实施例1a中所描述培养人心脏成纤维细胞(HCF) (获自ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA), 唯一的区别是当达到90%汇合时将细胞传代。

[0312] 与HCF不同的培养细胞的制备应根据制造商的说明进行。值得注意的是, 用作线粒体来源的细胞可以是附着的、半附着的或悬浮的。

[0313] 从培养细胞中分离线粒体

[0314] 还从培养细胞, 例如, 从人心脏成纤维细胞(HCF) 细胞系中分离线粒体。HCF细胞的制备根据实施例1a进行。然后将来自每个烧瓶的HCF细胞转移至gentleMACS C管(Miltenyi Biotec, Somerville, MA) 中的5mL均质化缓冲液中, 并使用gentleMACS™解离器(Miltenyi Biotec) 1分钟均质化程序将样品均质化。将枯草杆菌蛋白酶A储备溶液(250μL) 添加至gentleMACS C管中的匀浆中, 并在冰上孵育10分钟。将匀浆在50mL锥形离心管中在冰上通过预湿润的40μm筛网过滤器过滤。将滤液在50mL锥形离心管中在冰上通过新的预湿润的40μm筛网过滤器重新过滤。将滤液在50mL锥形离心管中在冰上通过新的预湿润的10μm筛网过滤器再次重新过滤。任选地, 将滤液在50mL锥形离心管中在冰上通过新的预湿润的5μm筛网过滤器再次重新过滤。所得滤液立即使用或者通过离心浓缩。在浓缩的情况下, 将滤液转移至1.5mL微量离心管, 并且在4℃下以9500×g离心5分钟。以相同的离心速度进行三次洗涤。

[0315] 分离的线粒体的定量

[0316] 将分离的线粒体悬浮在实施例1b的均质化缓冲液中, 并保持在冰上直到使用。为准备用于不同的剂量施用, 根据制造商的说明采用Qubit™蛋白质测定试剂盒, 使用Qubit™荧光计(ThermoFisher Scientific/Invitrogen) 测量线粒体数量。为了蛋白质浓度测量, 将线粒体重新悬浮于PBS(ThermoFisher, 10010031) 中。将线粒体剂量就以μg表示的蛋白质含量而言进行估计。

[0317] 实施例2:T细胞分离、激活和培养

[0318] 从健康供体的血沉棕黄层中分离CD8⁺ T细胞。根据制造商说明使用Ficoll Paque plus(Cytiva, 17144002) 通过密度梯度离心收集外周血单核细胞(PBMC)。使用EasySep™人CD8⁺ T细胞分离试剂盒(Stemcell, 17953) 和The Big Easy™EasySep™磁体(Stemcell, 18001) 从PBMC中收获人CD8⁺ T细胞。在100U/ml的重组人IL-2(Peprotech, 200-02) 存在下将分离的CD8⁺ T细胞用1:1比率的Dynabeads人T-激活剂CD3/CD28(ThermoFisher, 111.32D) 激活。将CD8⁺ T细胞在补充有1% L-谷氨酰胺(ThermoFisher, 25030024)、1%青霉素-链霉素(10⁷ 000U/mL, Gibco, 15140122)、1%非必需氨基酸(NEAA, ThermoFisher, 11140050)、1%丙酮酸钠(ThermoFisher, 11360070)、10%胎牛血清和0.1%β-巯基乙醇(Gibco, 31350-010) 的RPMI 1640培养基GlutaMAX™补充剂500ml(ThermoFisher, 61870010) 中培养。将CD8⁺ T细胞以50万个细胞/mL的浓度涂铺, 并且在细胞达到200万个细胞/mL的汇合度或在培养基变黄时分裂。

[0319] 实施例3:T细胞移植

[0320] 在线粒体移植前24小时, 将CD8⁺ T细胞以50万个细胞/mL涂铺于24孔板中。在分离线粒体时, 收集CD8⁺ T细胞并以1500rpm(430x g) 离心5分钟。丢弃上清液, 并将细胞重新悬浮于浓度为100万个细胞/100μL的新鲜T细胞培养基中。T细胞培养基在实施例2下描述。

[0321] 将移植的CD8⁺ T细胞与分离的线粒体一起以每100万个CD8⁺ T细胞10μg至100μg蛋白质的范围在24孔板的每孔中以200μL T细胞培养基的最终体积孵育4小时。外源性线粒体和CD8⁺ T细胞共孵育4小时后,每孔添加1.8ml的新鲜T细胞培养基。

[0322] 实施例4a:线粒体标记和内化

[0323] 在4℃下将分离的线粒体用pHrodo红色颗粒标签(Life Technologies,Grand Island,NY)标记10分钟,然后在呼吸缓冲液(250mM蔗糖、2mM KH₂PO₄、10mM MgCl₂、20mM K⁺-HEPES缓冲液(pH 7.2)、0.5mM K⁺-EGTA(pH 8.0)、5mM谷氨酸盐、5mM苹果酸盐、8mM琥珀酸盐、1mM ADP)中洗涤4次。将标记的线粒体重新悬浮于新鲜呼吸缓冲液中,并且保存最后的洗涤上清液。将标记的线粒体与分离的T细胞一起共孵育。在每个时间点结束时,除去培养基,并用1×PBS洗涤细胞4次,且将200μL的新鲜培养基添加至每个孔。将对照细胞与最后一次pHrodo洗涤液一起共孵育。使用ImageJ 1.48软件测定线粒体内化。

[0324] ATP测定

[0325] 使用ATPlite发光ATP检测测定系统(Perkin Elmer,Waltham,MA)测定ATP含量。所有测定都是在没有荧光染料的情况下进行的,因为这些染料可能干扰线粒体功能。

[0326] 结果证明,与线粒体一起共孵育的T细胞以时间依赖性方式内化。与对照组比,内化的线粒体显著增加T细胞ATP含量。

[0327] 实施例4b:线粒体标记和内化

[0328] 实施例4b.1-使用染色的分离线粒体的T细胞移植

[0329] 在线粒体移植前24小时,将CD8⁺ T细胞以50万个细胞/mL涂铺于24孔板中。根据实施例1b中描述的程序分离线粒体。然后在37℃下在实施例1b的均质化缓冲液中以200nM用Mitotracker Red CMXRos(ThermoFisher,M7512)和Mitotracker Green FM(ThermoFisher,M7514)将线粒体染色10至15分钟。在4℃下用实施例1b的均质化缓冲液以9500x g持续5分钟进行染色的线粒体的3次洗涤,并且将最后一次洗涤的上清液保存作为对照。收集CD8⁺ T细胞并以1500rpm(430x g)离心5分钟。除去上清液,并将细胞以100万个细胞/100μL重新悬浮于新鲜T细胞培养基中。T细胞培养基在实施例2下描述。将染色的线粒体(立即)添加至T细胞中,以获得24孔板的每孔200μL的最终体积。将染色的线粒体的最后一次洗涤液以相等体积添加至对照非移植CD8⁺ T细胞中。从移植后5分钟至24小时,通过流式细胞术(例如,用FACSLyric(BD Biosciences)获得的数据)或通过荧光显微术(Keyence显微镜,BZ-X810)评价染色线粒体的整合。在外源性线粒体与CD8⁺ T细胞共孵育超过4小时的情况下,每孔添加1.8ml的新鲜T细胞培养基。

[0330] 实施例4b.2-线粒体移植后染色

[0331] 将移植的CD8⁺ T细胞与分离的线粒体一起以每100万个CD8⁺ T细胞10μg至100μg蛋白质的范围在24孔板的每孔中以200μL T细胞培养基的最终体积孵育4小时。外源性线粒体和CD8⁺ T细胞共孵育4小时后,每孔添加1.8ml的新鲜T细胞培养基。在共孵育后24小时评价移植细胞中的线粒体呼吸和质量。将染料Mitotracker Red CMXRos(ThermoFisher,M7512)和Mitotracker Green FM(ThermoFisher,M7514)在无酚红(ThermoFisher,11835030)、补充有1%青霉素-链霉素(10'000U/mL,Gibco,15140122)、5%胎牛血清的RPMI 1640培养基中稀释至100nM的最终浓度。每100万个CD8⁺ T细胞添加100μl的染色,并在37℃下进行染色15分钟。然后将细胞用FACS缓冲液(1x PBS(ThermoFisher,10010031)、2%FBS、1%EDTA

0.5M(Sigma-Aldrich,E6758))以1500rpm(430x g)持续5分钟洗涤两次。丢弃上清液,并将CD8⁺ T细胞重新悬浮于300μL的FACS缓冲液中,并在FACS机器上(FACSLyric, BD Biosciences)获得。

[0332] 实施例5:外源性线粒体移植到T细胞中

[0333] 当移植到从健康供体分离并随后培养的CD8⁺ T细胞中时,采用两种实验设置来确定外源性线粒体的摄取及其剂量依赖性。首先是采用流式细胞术的实验,且其次是采用荧光显微术的实验。

[0334] 程序

[0335] (i) T细胞分离、激活和培养如实施例2中所述进行。

[0336] (ii) 线粒体分离:如先前实施例1b中所述,从人心脏成纤维细胞

[0337] (HCF)中分离线粒体。将分离的线粒体悬浮在实施例1b的均质化缓冲液中,并保持在冰上直到使用。为准备用于不同的剂量施用,根据制造商的说明采用QubitTM蛋白质测定试剂盒,使用QubitTM荧光计(ThermoFisher Scientific/Invitrogen)测量线粒体数量。将线粒体剂量就以μg表示的蛋白质含量而言进行估计。

[0338] (iii) 使用染色的分离线粒体的T细胞移植如

[0339] 实施例4b.1中所述进行。从移植后5分钟至24小时,通过流式细胞术(例如,用FACSLyric(BD Biosciences)获得的数据)和通过荧光显微术(Keyence显微镜,BZ-X810)评价染色线粒体的整合。

[0340] 结果

[0341] (i) 通过流式细胞术和荧光显微术证实的线粒体的剂量依赖性整合

[0342] 为了研究线粒体在CD8⁺ T细胞中的剂量依赖性摄取,将染色的外源性线粒体以每100万个CD8⁺ T细胞1μg-30μg线粒体之间变化的剂量水平移植到CD8⁺ T细胞中。如上所述从五个不同供体的血液中提取CD8⁺ T细胞,且随后针对每个供体分别培养。将外源性线粒体从人心脏成纤维细胞中分离并用Mitotracker Red CMXRos和Mitotracker Green FM染色,如实施例4b.1中所述。随后,将来自每个供体的CD8⁺ T细胞以下列剂量水平用染色的外源性线粒体处理:在200μl的最终体积中每100万个CD8⁺ T细胞1μg、5μg、10μg、20μg和30μg。孵育4小时后,根据制造商的说明使用FACSLyric(BD Biosciences)通过流式细胞术且使用Keyence显微镜(BZ-X810)通过荧光显微术评估Mitotracker Red CMXRos和Mitotracker Green FM的表达。如图2中所示,在经处理的CD8⁺ T细胞中存在Mitotracker Red CMXRos和Mitotracker Green FM的明显剂量依赖性表达。CD8⁺ T细胞的移植效率以剂量依赖性方式增加。与未接受外源性线粒体的CD8⁺ T细胞相比,在经处理的细胞中整合线粒体的线粒体活性和线粒体质量两者均显著增加。从10μg线粒体开始,显示线粒体活性和线粒体质量两者的显著增加。

[0343] 实施例6:将外源性线粒体移植到T细胞中以提高增殖

[0344] 进行实验以评估移植外源性线粒体对CD8⁺ T细胞增殖能力的影响。具体地说,在线粒体移植后24小时、48小时、72小时和140小时评价T细胞扩增。将细胞在台盼蓝溶液0.4%(ThermoFisher,15250061)中稀释,并计数活细胞(白色),而死亡细胞(蓝色)被排除在分析之外。在每个时间点针对每个供体计算在对照组与经处理的组(其接受30μg的线粒体)中的细胞数量之间的倍数变化。显示在移植有外源性线粒体的CD8⁺ T细胞中总体增殖

增强。

[0345] 程序

[0346] (i) T细胞分离、激活和培养如实施例2中所述。

[0347] (ii) 线粒体分离如实施例1b中所述。线粒体分离在无菌环境中进行,并测定总体扩增。

[0348] (iii) 线粒体移植:在线粒体移植前24小时,将CD8⁺ T细胞以50万个细胞/mL涂铺于24孔板中。如先前在实施例1b中所述,从人心脏成纤维细胞中分离线粒体。在分离线粒体时,收集CD8⁺ T细胞并以1500rpm(430x g)离心5分钟。丢弃上清液,并将细胞重新悬浮于浓度为100万个细胞/100 μ L的新鲜T细胞培养基中。将线粒体添加至T细胞中,以获得24孔板的每孔200 μ L的最终体积。孵育后4小时,每孔添加1.8mL的新鲜T细胞培养基。T细胞培养基描述于实施例2中。用于处理T细胞的线粒体的量是30 μ g。

[0349] 结果:移植的CD8⁺ T细胞的增殖增强

[0350] 如图3中所描绘,用来源于人心脏成纤维细胞的外源性线粒体处理CD8⁺ T细胞显著提高了增殖。

[0351] 实施例7:评估线粒体移植对CD8⁺ T细胞活性-潜能的影响

[0352] 为了评估线粒体移植对靶细胞的能量代谢和活性-潜能的影响,进行Mito Stress测试(Agilent Seahorse,P/N 103015-100)来测量暴露于FCCP后的基础耗氧率(OCR)和最大OCR。FCCP(三氟甲氧基-羰基氰化物-苯胺;羰基-氰化物-4-(三氟甲氧基)-苯胺)是通过破坏电化学梯度抑制ATP合成的线粒体中氧化磷酸化的有效解偶联剂。使用Seahorse XFe96分析仪(Vigilant)。

[0353] 程序

[0354] (i) T细胞分离、激活和培养如实施例2中所述进行。

[0355] (ii) 线粒体分离:根据实施例1b中描述的程序从人心脏成纤维细胞(HCF)中分离线粒体。

[0356] (iii) 分离的线粒体的定量:根据实施例1b中描述的程序,将线粒体剂量就以 μ g表示的蛋白质含量而言进行估计。

[0357] (iv) 根据实施例3的程序进行T细胞移植。将30 μ g量的线粒体移植到CD8⁺ T细胞中。

[0358] (v) 用于评估细胞代谢的Seahorse测定:将移植的CD8⁺ T细胞根据供应商的说明(Agilent)在Seahorse XFe96分析仪中进行分析。在用每100万个T细胞30 μ g分离的线粒体移植前24小时,将T细胞以50万个细胞/mL涂铺。移植后4小时,将24孔板的每孔添加补充有100U/mL重组IL-2的新鲜T细胞培养基。将盒(Agilent Seahorse,P/N102416-100)用250 μ L的超纯水水合,并在37 $^{\circ}$ C下在烘箱(VWR,390-0384)中孵育过夜。在测定当天,用来使所述盒水合的超纯水被替换为250 μ L的校准物(Agilent Seahorse,P/N102416-100)。将细胞培养微板(Agilent Seahorse,P/N 102416-100)的孔在4 $^{\circ}$ C下用50 μ L的在PBS中1/50稀释的Cell-Tak(Corning,354241)包被过夜。移植后24小时,将CD8⁺ T细胞以200x g离心5分钟,丢弃上清也,并将细胞计数且重新悬浮于补充有10mM葡萄糖(Agilent Seahorse,103577-100)、2mM谷氨酰胺(Agilent Seahorse,103579-100)和1mM丙酮酸盐(Agilent Seahorse,103578-100)的Seahorse XF RPMI pH7.4(Agilent Seahorse,P/N 103576-100)中。将细胞

培养板用PBS洗涤1次,并以300'000个细胞/50 μ L涂铺CD8⁺ T细胞。将板以100xg不间断地离心5分钟,每孔添加130 μ L补充的温热Seahorse XF RPMI pH7.4培养基,并且然后将板在37 $^{\circ}$ C下在烘箱中孵育1小时。根据供应商的说明制备来自Seahorse XF Mito Stress试剂盒(Agilent Seahorse,P/N 103015-100)的药物。使用2 μ M寡霉素、1.5 μ M FCCP和0.5 μ M鱼藤酮/抗霉素A的最终浓度终填充盒,然后将所述盒负载至Seahorse XFe96机器进行校准。将含有移植的T细胞的细胞培养板负载至Seahorse XFe96机器中,并且选择XP细胞Mito Stress测试程序。

[0359] 结果:经处理的CD8⁺ T细胞表现出增加的基础耗氧率和最大耗氧率。

[0360] XP细胞Mito Stress测试程序中的Seahorse XFe96定量CD8⁺ T细胞在基础水平和在用寡霉素处理并随后用FCCP处理后的随时间推移的耗氧率。基础耗氧率度量线粒体呼吸(Gerritje J.W.等人,Current Protocols in Immunology 3.16B-1-3.16B 14, April 2016),而细胞对FCCP的反应允许得出关于细胞的最大耗氧能力活性水平的结论。如图4A和图4C所示,在用外源性线粒体处理的CD8⁺ T细胞中基础耗氧率显著增强。同样,在线粒体移植到CD8⁺ T细胞中后,在暴露于FCCP后细胞的耗氧率显著增加-图4B和图4D中示出。

[0361] 实施例8:将外源性线粒体移植到CD8⁺ T细胞中以提高能量代谢

[0362] 进行实验以评估将外源性线粒体移植到CD8⁺ T细胞中的功能影响。在移植后24小时评估经处理的细胞中的线粒体适应度。线粒体活性和质量分别通过Mitotracker Red CMXRos (ThermoFisher, M7512) 和Mitotracker Green FM (ThermoFisher, M7514) 经由流式细胞术(例如, FACSLyric (BD Biosciences)) 作为平均荧光强度进行测量。Mitotracker Red CMXRos相对于Mitotracker Green FM的比率计算CD8⁺ T细胞内每线粒体质量的线粒体活性,并已被确定为线粒体适应度的指标(Pendergrass等人Cytometry Part A 61A: 162-169 (2004))。通过流式细胞术(例如, FACSLyric (BD Biosciences)) 测量平均荧光强度。结果表明,通过用外源线粒体处理细胞提高CD8⁺ T细胞的线粒体适应度。

[0363] 程序

[0364] (i) T细胞分离、激活和培养如实施例2中所述。

[0365] (ii) 线粒体分离如实施例1b中所述。

[0366] (iii) 线粒体移植和线粒体移植后染色:其根据实施例4b.2中描述的程序进行。

[0367] 结果:CD8⁺ T细胞中的线粒体适应度的提高

[0368] 如图5A和图5C中所描绘,用来源于人心脏成纤维细胞的外源性线粒体处理CD8⁺ T细胞显著提高了线粒体活性。同时,在用外源性线粒体处理的CD8⁺ T细胞中线粒体质量显著降低(图5B和图5D)。当以Mitotracker Red CMXRos相对于Mitotracker Green FM的平均荧光强度的比率组合在一起时,揭示在用外源性线粒体处理的CD8⁺ T细胞中的线粒体适应度增强(图5E)。此外,线粒体适应度-即线粒体活性与线粒体质量的比率-的提高显示出剂量依赖性,在处理组之间存在显著差异。

[0369] 实施例9:评估线粒体移植对CD8⁺ T细胞耗竭的影响

[0370] 进行了实验,以确定外源性线粒体移植到CD8⁺ T细胞能够在多大程度上减轻T细胞耗竭。

[0371] 程序

[0372] (i) 从健康供体中分离CD8⁺ T细胞并培养。分离过程描述于实施例2中。

[0373] (ii) 通过重复CD3/CD28珠粒刺激在体外人工耗竭CD8⁺ T细胞(ThermoFisher, 111.32D)。T细胞激活后3天,使用The Big Easy™ EasySep™磁体(Stemcell, 18001)除去CD3/CD28珠粒,并以1:1的比率将新鲜CD3/CD28珠粒添加至CD8⁺ T细胞中。这一步骤每两天重复一次,连续三次。根据供应商的说明,使用抗人LAG-3PE/Cyanine7(Biolegend, 369310)和抗人TIM-3APC(Biolegend, 345012)关于典型耗竭迹象随时间推移分析T细胞。将细胞样品用FACS缓冲液洗涤两次,并重新悬浮于300μl中,然后通过流式细胞仪(FACSLyric, BD Biosciences)获取。在将CD8⁺ T细胞用Dynabeads人T-激活剂CD3/CD28(ThermoFisher, 111.32D)刺激4次后,所建立的T细胞耗竭标志物-LAG-3和TIM-3-显示与仅接受单次珠粒刺激的CD8⁺ T细胞相比过表达。

[0374] 为了模拟从癌症患者收集的CD8⁺ T细胞,将细胞在激活后第10天从肿瘤床的持续TCR刺激中挽救,从培养的T细胞中除去CD3/CD28珠粒。在激活后第11天将T细胞移植线粒体,并且在24小时后,将CD8⁺ T细胞用珠粒再刺激,以模拟通过ACT重新输注至患者。再刺激后48小时,收获CD8⁺ T细胞,并通过流式细胞术(例如,FACSLyric(BD Biosciences))评估其耗竭表型。在随后用外源性线粒体的耗竭的CD8⁺ T细胞中,耗竭标志物的表达显著降低。结果证实了线粒体移植以剂量依赖性方式有效减轻T细胞耗竭。

[0375] (iii) T细胞分离、激活和培养如实施例2中针对对照细胞所述进行。实施例2中所述的细胞的分离和激活在上述段落(ii)中描述的细胞耗竭之前进行。线粒体移植后24小时,在移植后72小时测量耗竭标记物之前,进行CD8⁺ T细胞的最后再刺激。

[0376] (iv) 线粒体分离:如先前在实施例1b中所述,从人心脏成纤维细胞中分离线粒体。将分离的线粒体悬浮在实施例1b的均质化缓冲液中,并保持在冰上直到使用。为准备用于不同的剂量施用,根据制造商的说明采用Qubit蛋白质测定试剂盒,使用Qubit荧光计(ThermoFisher Scientific/Invitrogen)测量线粒体数量。为了蛋白质浓度测量,将线粒体重新悬浮于PBS(ThermoFisher, 10010031)中。将线粒体剂量就以μg表示的蛋白质含量而言进行估计。

[0377] (v) 线粒体移植:在线粒体移植前24小时,将CD8⁺ T细胞以50万个细胞/mL涂铺于24孔板中。在分离线粒体时,收集CD8⁺ T细胞并以1500rpm(430x g)离心5分钟。丢弃上清液,并将细胞重新悬浮于浓度为100万个细胞/100μL的新鲜T细胞培养基中。将线粒体添加至T细胞中,以获得24孔板的每孔200μL的最终体积。处理T细胞的线粒体的量不同,在10μg至100μg之间的范围内。将线粒体与CD8⁺ T细胞共孵育72小时,然后测定耗竭参数。

[0378] 结果:通过线粒体移植减轻耗竭

[0379] 与仅接受单次刺激的CD8⁺ T细胞相比,LAG-3和TIM-3在暴露于四轮刺激的CD8⁺ T细胞中过表达,如图6A和图6B中所描绘。如上所述,以每100万个CD8⁺ T细胞10μg、30μg、100μg蛋白质的剂量将线粒体移植到耗竭的CD8⁺ T细胞中。随后,以1:1的比率用CD3/CD28珠粒再刺激细胞。再刺激后48小时,根据制造商的说明,使用抗人LAG-3(Biolegend, 369310)和抗人TIM-3(Biolegend, 345012),通过流式细胞术,采用FACSLyric(BD Biosciences)评估耗竭标志物的表达。如图6(C-F)中所示,LAG-3和TIM-3显著减少,从而表明细胞耗竭状态的改善。这种改善可预示体内对癌症诱导的免疫抑制机制的更高抗性。如所指示,表达的差异显著。此外,在30μg和100μg线粒体的剂量水平下,未耗竭细胞(即,既不表达TIM-3也不表达LAG-3的CD8⁺ T细胞)的百分比显著增加,如图6G中所描绘。结果证实,通过将外源性线粒体

以剂量依赖性方式移植到T细胞中减轻T细胞耗竭。

[0380] 实施例10:体外诱导的Treg细胞活性对线粒体移植的影响

[0381] 程序

[0382] 从健康供体的血沉棕黄层中分离CD4⁺ T细胞。根据制造商说明使用Ficoll Paque plus (cytiva, 17144002)通过密度梯度离心收集外周血单核细胞(PBMC)。使用EasySep™人原初CD4⁺ T细胞分离试剂盒(Stemcell, 19555)和The Big Easy™ EasySep™磁体(Stemcell, 18001)从PBMC中收获人CD4⁺ T细胞。在100U/mL的重组人IL-2 (Peprotech, 200-02)存在下将分离的原初CD4⁺ T细胞用1:1比率的Dynabeads人T-激活剂CD3/CD28 (ThermoFisher, 111.32D)激活。将原初T细胞在无血清X-Vivo 15培养基(Lonza, BE02-060F)中培养,所述培养基补充有2mM L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(ThermoFisher, 35050061)。通过向培养基中添加5ng/mL的TGF-β1 (R&D Systems, 240-B-002)和10nM溶解于DMSO中的ATRA (Sigma-Aldrich, R2625)来诱导Treg分化(Schmidt等人,“Comparative Analysis of Protocols to Induce Human CD4+Foxp3+ Regulatory T Cells by Combinations of IL-2, TGF-beta, Retinoic Acid, Rapamycin and Butyrate”, PLOS ONE, 2016)。培养后6天,根据制造商的说明,使用真核人Treg Flow试剂盒(Biolegend, 320027)分析诱导的Treg (iTreg)的CD4、CD25、FOXP3表达。将iTreg细胞移植在每百万细胞10μg至100μg范围内的不同剂量的线粒体。如实施例2所述,在培养的T细胞上在线粒体移植后评价iTreg的抑制功能。

[0383] 结果

[0384] 在线粒体移植后, iTreg表现出通过对培养的T细胞的更强抑制功能所示的增强的活性。

[0385] 实施例11:T细胞再刺激和增强

[0386] 探讨了与线粒体共孵育(增强)对T细胞的再刺激/增强(如生长增强)的影响。CD8⁺ T细胞在再刺激和增强如生长增强后仍然具有细胞毒性。当观察到增殖率降低时,可能需要再刺激/增强。

[0387] 对于再刺激实验,将 5×10^4 个纯化的T细胞在100-200μL培养基中添加至96孔组织培养板中的每个孔。将细胞在含有2mM L-谷氨酰胺、10%FCS/FBS和100U/mL青霉素/链霉素的高级RPMI培养基1640中培养。可替代地,可使用含有100U/mL青霉素/链霉素的Cancer Stem Premium™ (ProMab Biotechnologies, Richmond, CA)。将线粒体(10^6 - 10^7 /孔)添加至细胞中,并在37°C下在湿润CO₂孵育箱中孵育1-24小时。为了T细胞激活,添加2μL预先洗涤且重新悬浮的CD3/CD28 Macrobeads™ (ProMab),以获得1:1的珠粒与细胞比率。收获激活的T细胞并直接用于进一步分析。

[0388] 与线粒体一起共孵育后,在再刺激和增强后,CD8⁺ T细胞具有提高的扩增。

[0389] 实施例12:线粒体转移提高CAR-T细胞的杀伤能力

[0390] 为了评估线粒体移植对CAR-T细胞杀伤能力的影响,在移植后24小时进行基于FACS的杀伤测定。CAR-T细胞(CD19-41BB-CD3z, PMC746)购自ProMab Biotechnologies (Richmond, CA 94806)。为了分别测量表达细胞凋亡的早期标志物、向细胞凋亡过渡或凋亡的靶细胞的百分比:对膜联蛋白V+、膜联蛋白V+/PI+或PI+百分比进行了评价。将移植或未移植的CAR-T细胞以5:1的效应物与靶标比率涂铺。将CAR-T细胞与靶细胞Daudi (ATCC CCL-213) (一种表达CD19的B成淋巴细胞系)一起共孵育4小时。共孵育后,收集细胞,并用抗

人CD8 PerCP-Cy5.5 (Stemcell, 60022PS) 和抗人CD3 APC (Stemcell, 60011AZ) 在4℃下染色20分钟。在用FACS缓冲液洗涤后, 根据供应商的说明将细胞在室温下用膜联蛋白V FITC (Biolegend, 640914) 和碘化丙啶 (PI, Biolegend, 640914) 染色15分钟, 并在FACSLyric (BD Biosciences) 上获得。

[0391] 程序

[0392] (i) 如实施例2中所述进行CAR-T细胞培养。

[0393] (ii) 线粒体分离: 根据实施例1b中描述的程序从人心脏成纤维细胞 (HCF) 中分离线粒体。

[0394] (iii) 分离的线粒体的定量: 根据实施例1b中描述的程序, 将线粒体剂量就以 μg 表示的蛋白质含量而言进行估计。

[0395] (iv) 根据实施例3的程序的CAR-T细胞移植。将30 μg 或100 μg 量的线粒体移植到CAR-T细胞中。

[0396] 线粒体移植增强CAR-T细胞的杀伤能力。在与移植的CAR-T细胞共孵育后, 表达细胞凋亡的早期标志物、向细胞凋亡过渡或细胞凋亡晚期标志物的靶细胞的百分比增加。

[0397] 实施例13: CAR-T细胞培养和标记

[0398] 将人抗CD19scFv-FLAG-CD28-CD3 ζ (ProMab) T细胞 (CAR-T细胞) 以 5×10^5 个细胞/mL的浓度在补充有IL-2 (10ng/mL, BioLegend, Dedham, MA) 的完全X-Vivo 10 (Lonza, Morristown, NJ) 培养基中培养。为了鉴定CD4⁺和CD8⁺亚群, 将 1×10^5 个CAR-T细胞沉淀并重新悬浮于100 μL 含有抗人CD4 FITC (Miltenyi Biotec) 和抗人CD8 AlexaFluor 647 (BD Biosciences, Billerica, MA) 的PBS中。将标记反应在黑暗中在室温下孵育15分钟。然后将细胞在PBS中冲洗两次, 并在含有10% FBS (v/v; Zenbio, Research Triangle, NC) 的完全RMPI培养基 (Thermo Fisher Scientific) 中冲洗一次。按照制造商的说明用Vybrant DiD (Thermo Fisher Scientific) 标记Raji细胞 (ATCC, Manassas, VA)。简言之, 将Raji细胞以 1×10^6 个细胞/mL的密度重新悬浮于含有5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ Vybrant DiD溶液的无血清RPMI中, 并在37℃下孵育20分钟。然后将标记的细胞在完全RMPI培养基中洗涤三次, 并在使用前保持在4℃。

[0399] 为了制备用外源线粒体增强的CAR T样品, 将CAR T细胞在100-200 μL 培养基中添加至96孔组织培养板中的每个孔。将细胞在补充有IL-2 (10ng/mL, BioLegend) 的完全X-Vivo 10 (Lonza) 培养基中培养。将线粒体 (10^6 - 10^7 /孔) 添加至细胞中, 并在37℃下在湿润CO₂孵育箱中孵育1-24小时。

[0400] 实施例14: 用靶肿瘤细胞刺激CAR-T细胞

[0401] 探讨了CAR T细胞与线粒体共孵育 (增强) 对肿瘤模型中CAR T细胞刺激的影响。

[0402] 将CAR-T细胞 (如上所述用或未用外源性线粒体增强) 和Raji细胞 (5×10^4 个细胞/mL浓度) 在圆底孔板或平底板中孵育6小时。孵育后, 收集共培养的细胞并以1000rpm (190x g) 离心, 以除去碎片和死亡细胞。随后, 使用MagCollect (R&D Systems, Minneapolis, MN) 的B细胞选择的方案通过阳性选择从共培养物中分离Raji细胞。简言之, 将CAR-T: 将Raji细胞共培养物离心, 并将细胞沉淀重新悬浮于无血清RPMI培养基中, 并用抗CD19生物素化抗体 (BioLegend) 标记。按照制造商的方案, 将MagCollect链霉亲和素铁磁流体添加至溶液中, 并根据产品说明书将混合物孵育推荐量的时间。通过施加磁体将与抗CD19生物素化Raji细

胞结合的链霉亲和素铁磁流体珠粒收集在试管的一侧上,且然后将CAR-T细胞吸移出反应。将此程序重复两次,以确保大多数Raji细胞被分离。然后将分离的CAR-T细胞添加至微孔阵列装置中以用于mRNA捕获和转录组测序。将未刺激的CAR-T细胞(5×10^4 个细胞/mL)单独孵育6小时,然后进行单细胞RNA测序(scRNA-seq)。

[0403] 与未增强的或对照CAR-T细胞相比,用外源性线粒体增强的CAR-T细胞在与靶细胞共培养时产生更高水平的IL-2和IFN- γ mRNA以及TNF- α 和颗粒酶B。相比之下,与抗原阴性细胞共培养导致很少或没有细胞因子mRNA产生。

[0404] 实施例15:在靶细胞存在下线粒体转移增加CAR-T细胞增殖

[0405] 探讨了CAR T细胞与线粒体共孵育(增强)对响应于抗原特异性刺激的CAR T细胞增殖的影响。

[0406] 为了测量抗原特异性增殖,在孵育终点前1小时将EdU(5-乙基-2'-脱氧尿苷)添加至CAR-T细胞中(如上所述用或未用外源性线粒体增强)至10 μ M的最终浓度。孵育2-4小时后,通过在4 $^{\circ}$ C下以300g离心5分钟来收获细胞。将细胞沉淀在室温下与人Fc块一起孵育10分钟。对于细胞表面染色,添加40 μ L的流式细胞术增殖组(CD3、CD4、CD8、同种型对照;所使用的体积取决于所使用的缀合物),并在黑暗中以4 $^{\circ}$ C下孵育30分钟。将细胞在室温下用4%多聚甲醛固定15分钟,然后用基于Triton X-100的渗透缓冲液充分洗涤。根据制造商的说明制备Click-iT[®]EdU反应混合物。将100 μ L的渗透缓冲液和100 μ L的Click-iT[®]EdU反应混合物添加至细胞沉淀中。将混合物吸移至均匀悬浮液中,然后在4 $^{\circ}$ C(可接受范围2 $^{\circ}$ C-8 $^{\circ}$ C)下在黑暗中孵育30分钟。所测量的EdU⁺细胞%指示正在活跃增殖、从而合成DNA的细胞群体。

[0407] 为了染色细胞总DNA,将样品在渗透缓冲液中洗涤一次。在流式细胞术数据采集前15分钟向细胞中添加DNA染色溶液(用渗透缓冲液1至20倍稀释)。在孵育期后,将200 μ L的渗透缓冲液添加至细胞中,并且随后使用Becton Dickinson(BD)FACSVerse[™]、BD LSRFORTESSA[™]、BD FACSCanto[™]、BD FACSCalibur[™]、BD[™] LSR II或ACEA NovoCyte[™]流式细胞仪,分别使用FACSuite[™]、FACSDiva[™]或NovoExpress[™]软件对细胞进行分析。

[0408] 相对于未增强的或对照CAR-T细胞,用外源性线粒体增强的CAR-T细胞在与靶细胞共培养时展现更高的细胞增殖水平。相比之下,与抗原阴性细胞共培养导致很少或没有CAR-T细胞增殖。

[0409] 实施例16:细胞因子释放分析

[0410] 探讨了CAR T细胞与线粒体共孵育(增强)对响应于抗原特异性刺激的CAR T细胞细胞因子产生的影响。

[0411] 制备CAR-T细胞(如上所述用或未用外源性线粒体增强)并如上所述进行刺激。使用细胞计数珠粒阵列人Th1/Th2/Th17试剂盒(BD Biosciences)来测量每个样品中的IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、TNF α 、IFN- γ 和IL-17A蛋白水平。根据制造商的说明通过冻干人Th1/Th2/Th17细胞因子的连续稀释制备细胞因子标准物。流式细胞术用于检测细胞因子水平。

[0412] 相对于未增强的或对照CAR-T细胞,用外源性线粒体增强的CAR-T细胞在与靶细胞共培养时产生更高的细胞因子水平。相比之下,与抗原阴性细胞共培养导致很少或没有细胞因子产生。

[0413] 实施例17:线粒体转移增加CAR-T细胞的细胞毒性活性

[0414] 探讨了CAR T细胞与线粒体共孵育(增强)对肿瘤模型中CAR T细胞细胞毒性活性的影响。

[0415] 通过离心收集在标准条件下培养的CD19⁺Raji靶细胞,洗涤两次,并重新悬浮于RPMI-1640培养基中。将含 2.5×10^6 个细胞的1mL与钙黄绿素-AM(LifeTechnologies)混合至10 μ M的最终浓度并在37 $^{\circ}$ C下孵育30分钟。将靶细胞在RPMI-1640/10%胎牛血清(FBS)中洗涤3次,并将细胞密度调整至 3×10^5 个细胞/mL。将人抗CD19scFv-FLAG-CD28-CD3 ζ (Promab) T细胞以 5×10^5 个细胞/mL的浓度在补充有IL-2(10ng/ml, BioLegend)的完全X-Vivo 10(Lonza)培养基中培养。将CAR-T细胞沉淀并以 6×10^6 个细胞/mL的密度重新悬浮于新鲜培养基中。将50 μ L的靶细胞和不同量的效应CAR-T细胞(如上所述制备的含有或不含外源性线粒体)混合在96孔微量滴定板的同一孔中,从而提供一系列效应物与靶细胞(E:T)比率,并将板在37 $^{\circ}$ C下孵育4小时。在孵育3小时45分钟后,向对照孔中添加20 μ L 0.9% Triton X-100,以实现靶细胞的完全裂解(称为最大裂解)。然后将每个样品的100 μ L上清液转移至黑色微量滴定板中,并使用Tecan M200酶标仪记录荧光(在488nm下激发,在518nm下发射)。每个实验一式四份进行。将不含CAR-T细胞的样品的荧光强度作为背景减去,并计算含有抗体的样品中的特异性裂解的百分比。为了确定ED₅₀值(导致50%最大杀伤的效应细胞的有效剂量),使用软件程序PRISM(GraphPad, San Diego, CA)通过非线性回归分析和三参数拟合模型‘log[激动剂]与应答’计算剂量反应曲线。

[0416] 另外,使用Pierce LDH细胞毒性测定试剂盒(Thermo Fisher Scientific)评估细胞毒性。将效应细胞与靶细胞以三种比率,即1:1、5:1、10:1混合。将靶细胞和效应细胞以 7×10^5 个细胞/mL的最终浓度在完全RPMI培养基中孵育6小时。根据制造商的说明在上清液中测量LDH释放。通过所提供的10 \times 裂解缓冲液中孵育靶细胞获得最大LDH释放。使用下式计算靶细胞细胞毒性:细胞毒性% = $100 \times [(CAR-T:靶细胞 - 单独CAR-T细胞 - 单独靶细胞) / (最大靶细胞裂解 - 无裂解缓冲液的单独靶细胞)]$ 。

[0417] 相对于未增强的或对照CAR-T细胞,用外源性线粒体增强的CAR-T细胞在与靶细胞共培养时展现更高的细胞毒性(较低ED₅₀值)。相比之下,与抗原阴性细胞共培养导致很少或没有细胞杀伤。

[0418] 实施例18:线粒体转移增加CAR-T细胞在体内的抗肿瘤活性

[0419] 将表达抗CD 19CAR-T构建体(抗CD 19scFv-FLAG-CD28-CD3 ζ , Promab)的人T细胞(用或未用外源性线粒体增强)在B细胞淋巴瘤的小鼠异种移植物模型中进行评价。

[0420] 淋巴瘤模型

[0421] 将9周龄雌性NOD/SCID小鼠(非肥胖糖尿病;缺乏T细胞、巨噬细胞和NK细胞; Taconic, Denmark)皮下(s.c.)注射人伯基特淋巴瘤CD19⁺Raji细胞(2.5×10^6 个细胞/小鼠)。当肿瘤达到60-100mm³的大小时,将动物随机分为处理组;每组5-8只肿瘤大小相等的小鼠被选择进行处理。动物接受了 10^7 个模拟转导的T细胞或抗CD19 CAR-T细胞或线粒体增强的抗CD19 CAR-T细胞的静脉内注射。用卡尺样仪器在二维上测量肿瘤大小。通过式 $V = 0.56 \times (\text{长度} + \text{宽度})^2$ 计算单独肿瘤体积(V)。在达到1,500mm³肿瘤体积的人道终点时,将动物通过颈椎脱位处死。使用软件程序PRISM(GraphPad)生成卡普兰-迈耶(Kaplan-Meier)存活曲线,并使用对数秩(Mantel-Cox)检验比较存活曲线。

[0422] 白血病模型

[0423] 将购自Jackson实验室的8周龄雄性NSG (NOD/SCID γ 小鼠; 缺乏T细胞、B细胞和NK细胞) 小鼠在动物园中圈养在无菌笼中。将100 μ L PBS中的Raji/Luc-GFP细胞(10^6) 使用胰岛素注射器通过侧尾静脉内注射(指定为第0天)。第6天通过生物发光成像测量荧光素酶活性以评估肿瘤负荷。在第7天, 在100 μ L PBS中制备 10^7 个模拟转导的T细胞、抗CD19 CAR-T细胞或线粒体增强的抗CD19CAR-T细胞, 并使用胰岛素注射器静脉内注射。使用IVIS成像系统通过生物发光成像监测肿瘤进展。在第60天, 将存活小鼠安乐死, 收获脾和骨髓细胞, 并将其重新悬浮于总体积为2mL的流式细胞术(FACS)缓冲液(PBS, 补充有2%FCS)中。然后用PE-抗huCD3和APC-抗huCD45抗体标记200微升的细胞悬浮液, 并通过流式细胞术进行分析以测定人T细胞的百分比。

[0424] 与未增强的或对照CAR-T细胞相比, 用外源性线粒体增强的CAR-T细胞在经处理的小鼠中展现更高的抗肿瘤活性(中值存活时间更长)。

[0425] 以引用的方式并入

[0426] 本文引用的所有专利和非专利公布的全部公开内容出于所有目的各自以引用的方式整体并入。

[0427] 其它实施方案

[0428] 上述公开可涵盖具有独立效用的多个不同发明。尽管这些发明中的每一者都以其优选形式公开, 但在本文公开和说明的其具体实施方案不应被视为限制性的, 因为许多变化是可能的。本发明的主题包括本文所公开的各种元件、特征、功能和/或性质的全部新颖的和非显而易见的组合和子组合。以下权利要求特别指出被视为新颖的和非显而易见的某些组合和子组合。体现在特征、功能、元件和/或性质的其他组合和子组合中的发明可在本申请、要求本申请的优先权的申请或相关申请中要求保护。此类权利要求(无论是针对不同的发明还是针对相同的发明, 以及无论与原始权利要求相比范围更宽、更窄、相等还是不同)也被认为包括在本公开的发明的主题之内。

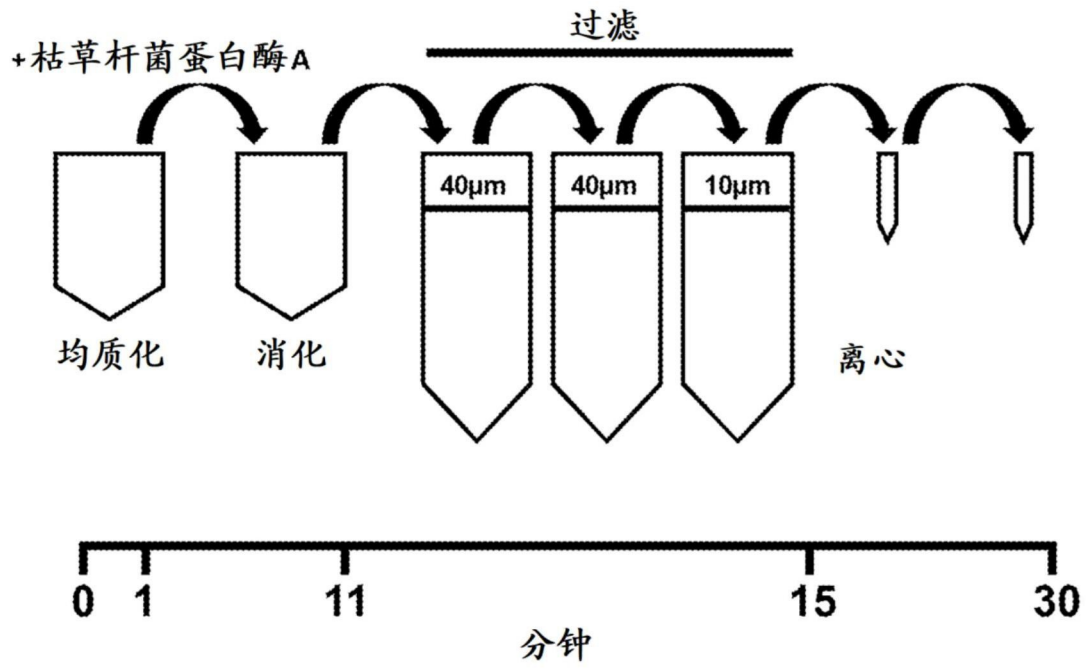


图1

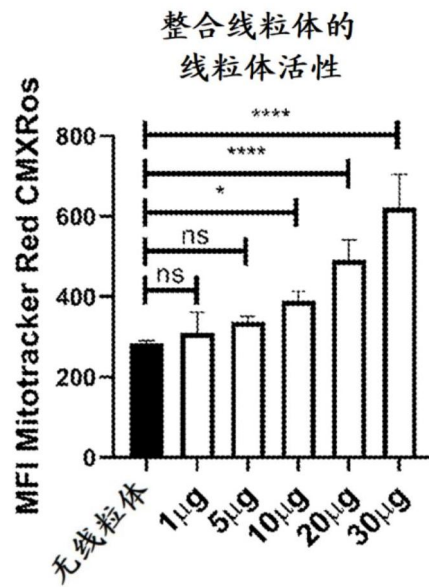


图2A

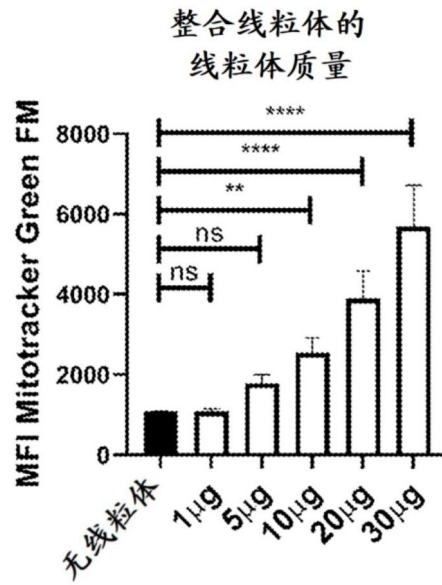


图2B

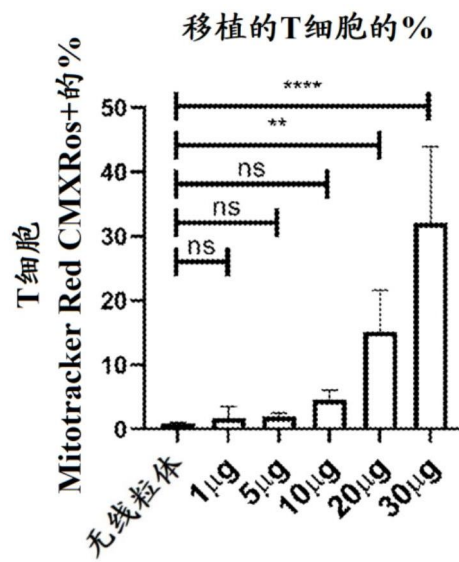


图2C

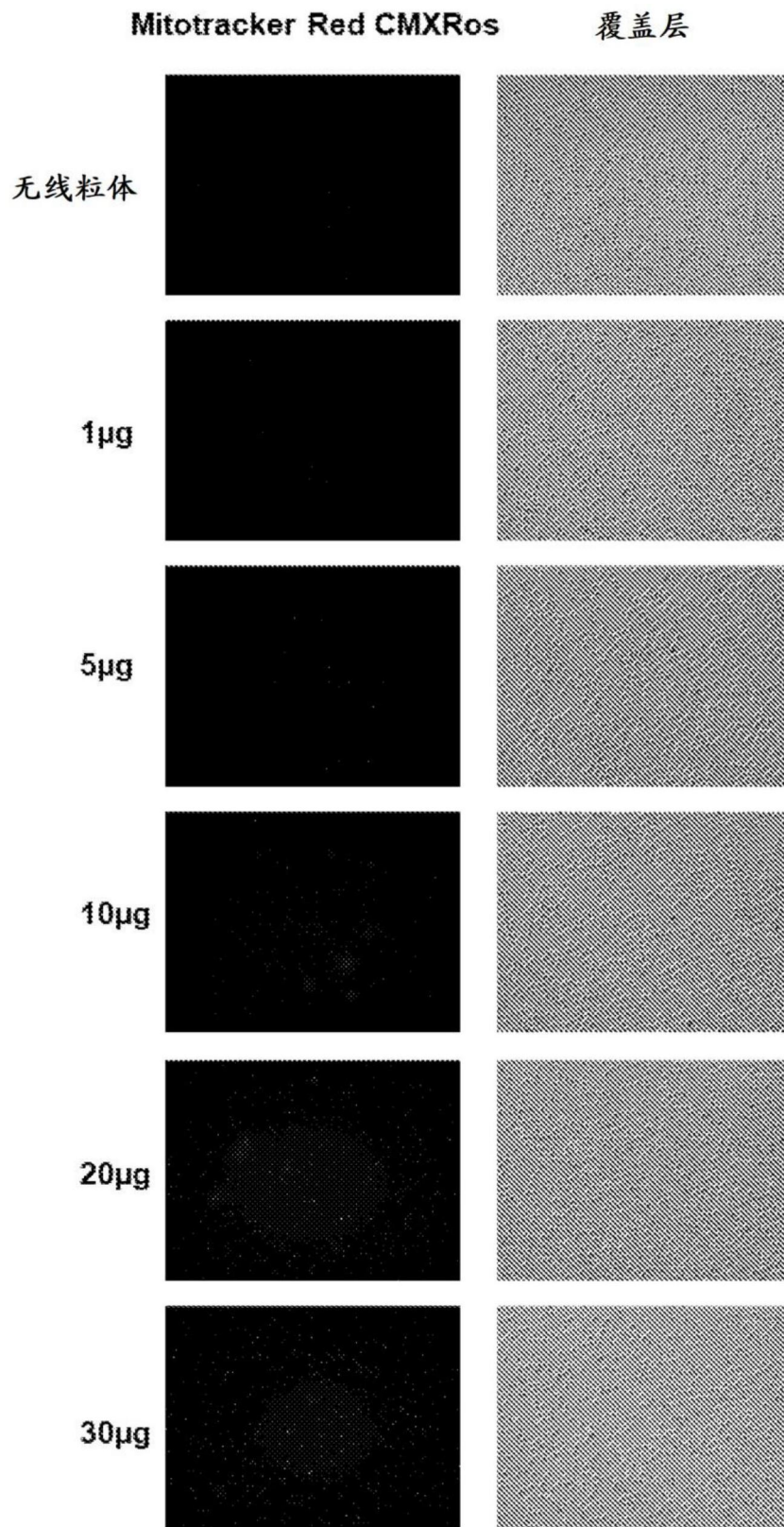


图2D

CD8 T细胞的扩增

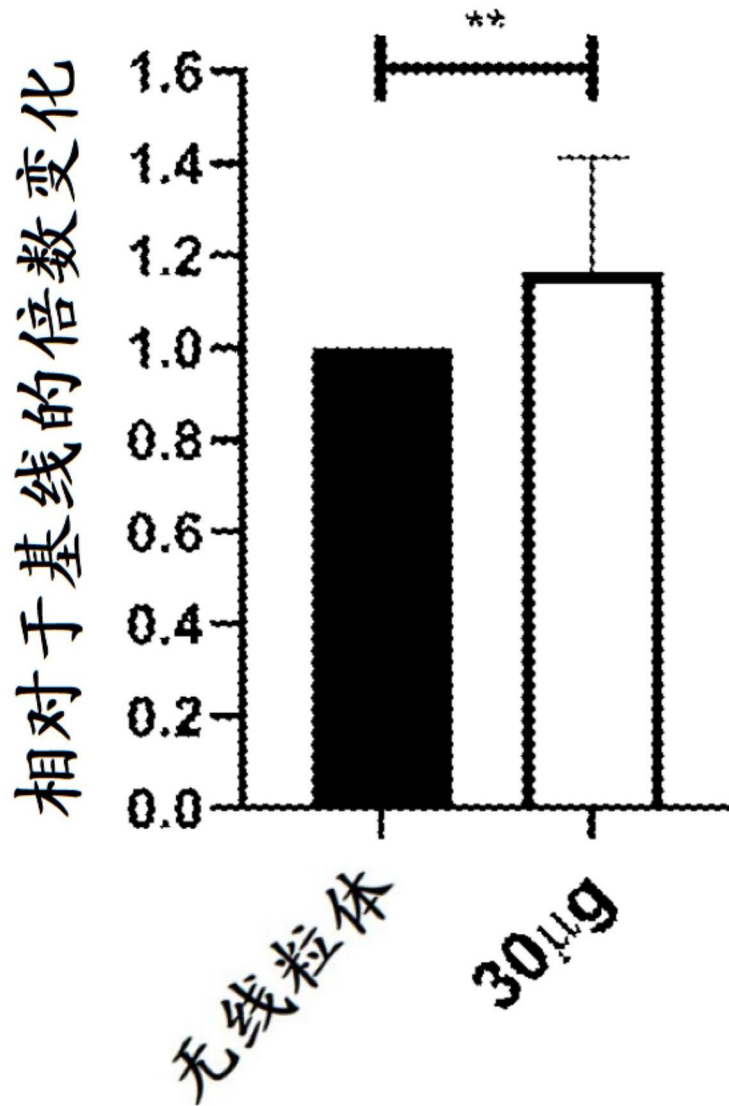


图3

基础 OCR

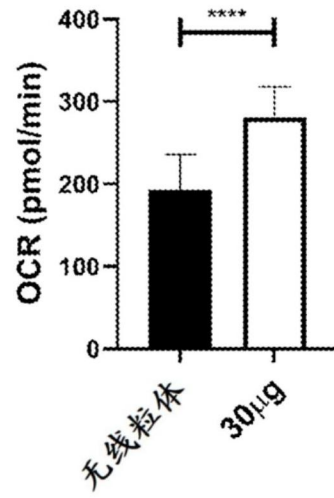


图4A

在 FCCP 处理后的 OCR

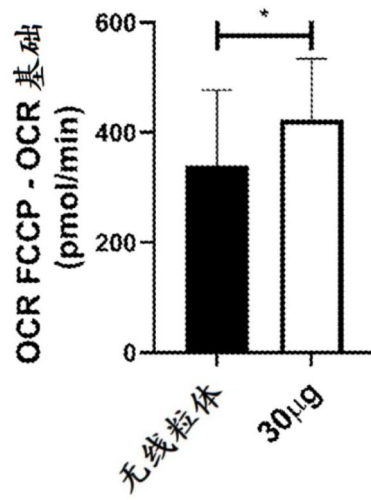


图4B

基础OCR的倍数变化

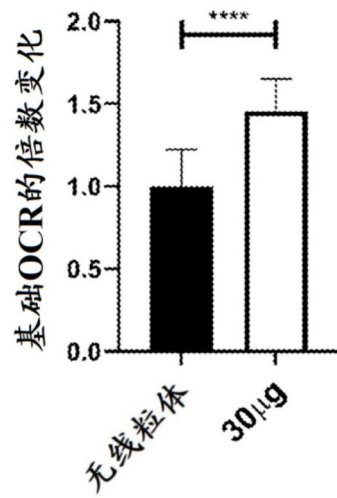


图4C

在FCCP处理后的OCR的倍数变化

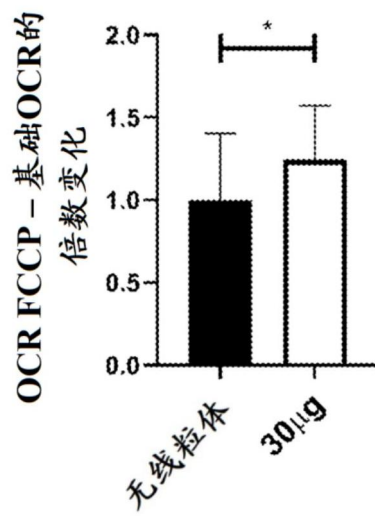


图4D

线粒体活性

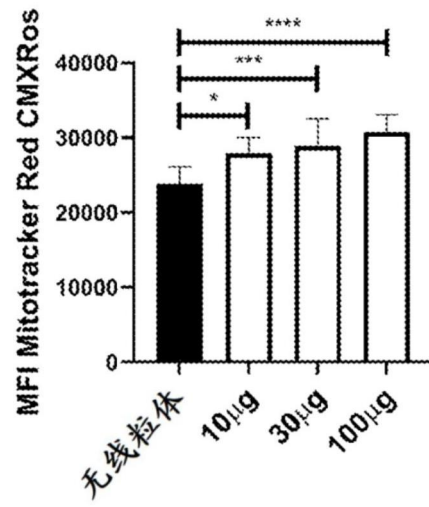


图5A

线粒体质量

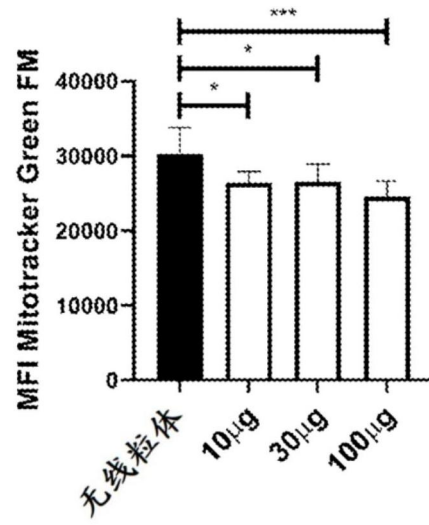


图5B

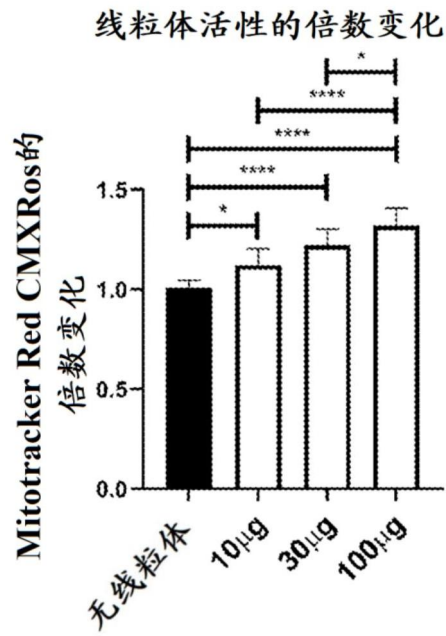


图5C

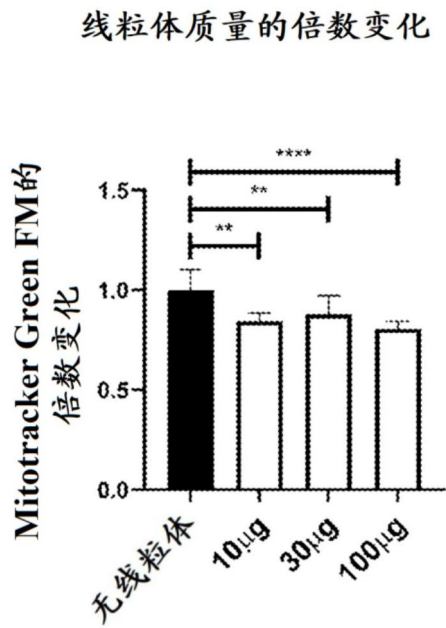


图5D

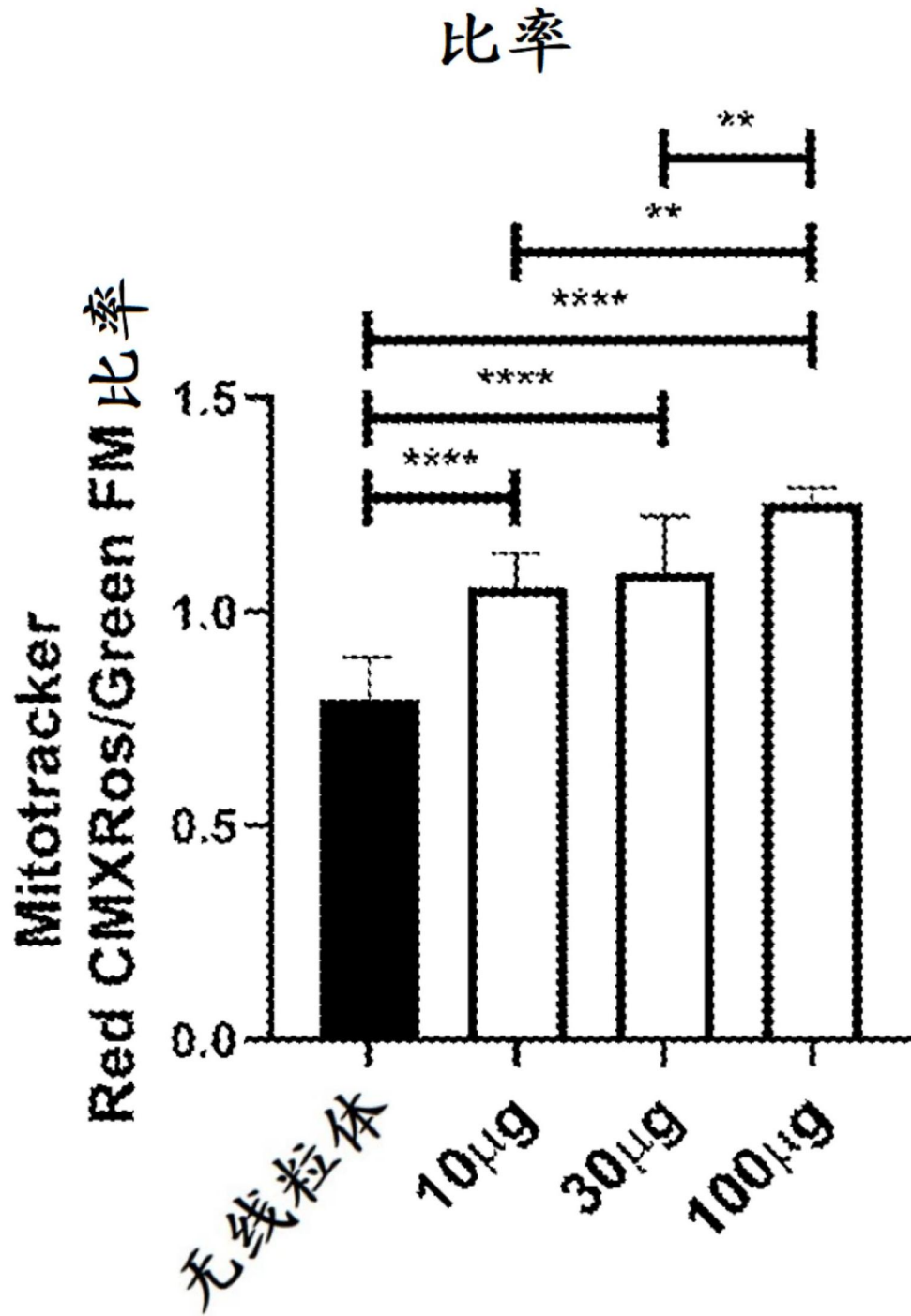


图5E

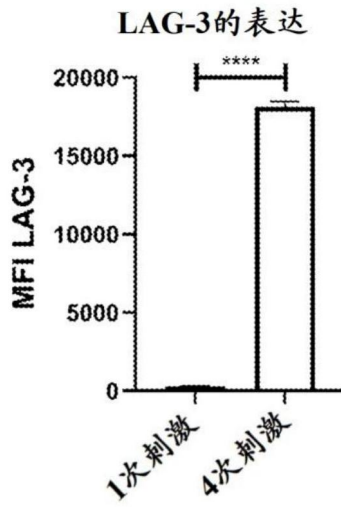


图6A

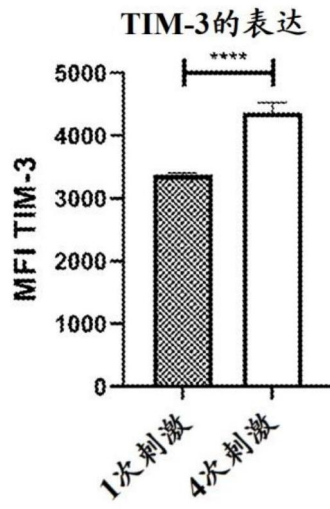


图6B

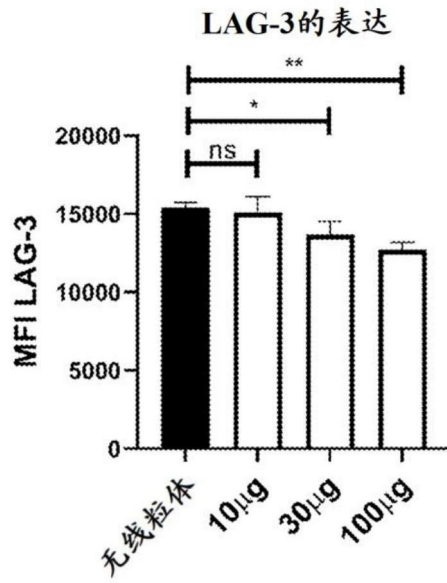


图6C

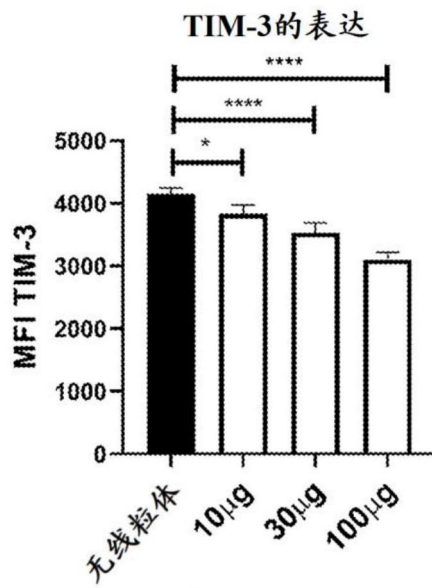


图6D

LAG-3表达的倍数变化

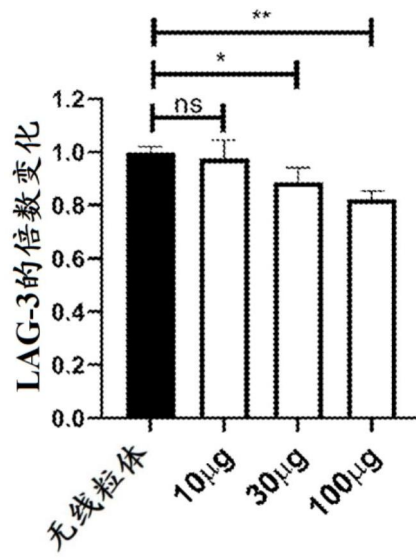


图6E

TIM-3表达的倍数变化

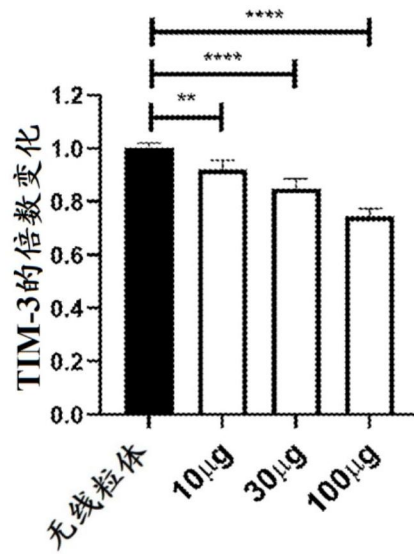


图6F

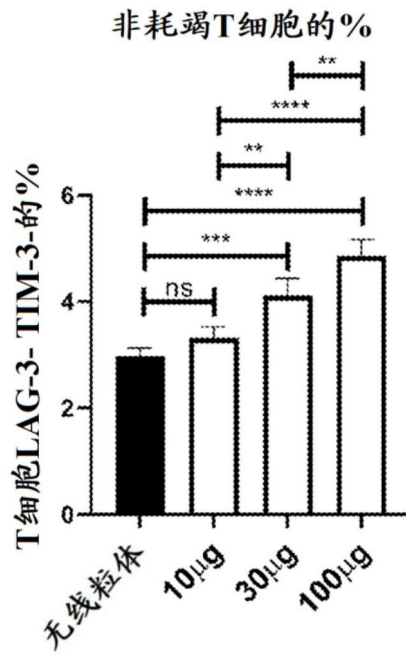


图6G