



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118251487 A

(43) 申请公布日 2024.06.25

(21) 申请号 202280071961.4

(22) 申请日 2022.10.26

(30) 优先权数据

21306493.4 2021.10.26 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.04.25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2022/080008 2022.10.26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/073062 EN 2023.05.04

(71) 申请人 巴黎-萨克雷大学

地址 法国

申请人 公共事业救济局-巴黎医院

法国国家卫生及研究医学协会

法国古斯塔柏罗斯学院

(72) 发明人 亚希内·陶非克

玛丽-吉斯兰内·玛德琳·德戈尔

德海尔韦

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

专利代理师 金海霞 刘慧

(51) Int.Cl.

C12N 5/0783 (2006.01)

权利要求书3页 说明书25页 附图5页

(54) 发明名称

源自高功能性自体干细胞的T细胞免疫疗法

(57) 摘要

本发明涉及一种基于使用记忆干T细胞(Tscm)、特别是在抑制性受体表达的基础上负选择的高功能性记忆干T细胞(Tscm)的新的特异性T细胞治疗策略。这种新的细胞免疫疗法可应用于PML患者,但也可应用于特异性记忆T细胞应答功能受损的其他感染或癌症。

1. 一种用于获得包含抗原特异性T细胞的细胞群体的体外方法,所述方法包括:
 - a) 从来自患有癌症或病原体引起的疾病的受试者的细胞样品中分选具有包含CD4+或CD8+、CD45RA+、CCR7+和/或CD62L+和CD95+的细胞表面表型的Tscm细胞群体,
 - b) 在负载有至少一种感兴趣的抗原或衍生自至少一种感兴趣的抗原的至少一种肽的抗原呈递细胞存在下,并任选地在IL-7和IL-15或其他刺激性细胞因子存在下,培养所述Tscm细胞群体,和任选地
 - c) 回收在步骤b)中获得的细胞,特别是CD8+和/或CD4+细胞,优选为CD8+和CD4+细胞。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中在步骤a)中分选的Tscm细胞群体具有进一步包含PD1-、TIGIT-、LAG3-、TIM3-、CTLA4-和/或CD160-,优选为PD1-、TIGIT-、LAG3-和/或TIM3-的细胞表面表型。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中在步骤a)中分选的Tscm细胞群体具有进一步包含PD1-和TIGIT-以及任选的LAG3-、TIM3-、CTLA4-和/或CD160-、优选为LAG3-和/或TIM3-、更优选为LAG3-和TIM3-的细胞表面表型。
4. 根据权利要求1或3所述的方法,其中在步骤a)中分选的Tscm细胞群体具有进一步包含CD3+、CD45RO-、CXCR3+和/或CD122+、优选为CD3+和CD45RO-的细胞表面表型。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中在步骤a)中分选的Tscm细胞群体包含具有包含CD4+、CD8-、CD45RA+、CD95+、CCR7+、PD1-和TIGIT-的细胞表面表型的细胞,和具有包含CD4-、CD8+、CD45RA+、CD95+、CCR7+、PD1-和TIGIT-的细胞表面表型的细胞。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中在步骤a)中分选的Tscm细胞群体包含具有包含CD4+、CD8-、CD45RA+、CD95+、CCR7+、PD1-、TIGIT-、LAG3和TIM3-、优选为CD3+、CD45RO-、CD4+、CD8-、CD45RA+、CD95+、CCR7+、PD1-、TIGIT-、LAG3和TIM3-的细胞表面表型的细胞,和具有包含CD4-、CD8+、CD45RA+、CD95+、CCR7+、PD1-、TIGIT-、LAG3-和TIM3-、优选为CD3+、CD45RO-、CD4-、CD8+、CD45RA+、CD95+、CCR7+、PD1-、TIGIT-、LAG3-和TIM3-的细胞表面表型的细胞。
7. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述抗原呈递细胞是树突状细胞、单核细胞、外周血单核细胞(PBMC)、Epstein-Barr病毒转化的B淋巴母细胞样细胞系细胞(EBV-BLCL细胞)或人工抗原呈递细胞(AAPC)。
8. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中所述抗原呈递细胞是所述受试者自体的。
9. 根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述抗原呈递细胞是单核细胞或树突状细胞,优选为所述受试者自体的单核细胞或树突状细胞。
10. 根据权利要求1至9中任一项所述的方法,其中所述至少一种感兴趣的抗原是病原体抗原、优选为病毒、细菌或真菌抗原,或由肿瘤细胞表达的抗原例如肿瘤特异性抗原(TSA)或肿瘤相关抗原(TAA)。
11. 根据权利要求1至10中任一项所述的方法,其中所述受试者患有癌症。
12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述至少一种感兴趣的抗原是由肿瘤细胞表达的抗原例如肿瘤特异性抗原(TSA)或肿瘤相关抗原(TAA)。
13. 根据权利要求1至10中任一项所述的方法,其中所述受试者患有由人多瘤病毒引起的疾病。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述至少一种感兴趣的抗原是人多瘤病毒的抗原。

15. 根据权利要求13或14所述的方法,其中所述受试者患有进行性多灶性脑白质炎、梅克尔细胞癌或BK病毒相关性肾病。

16. 根据权利要求13至15中任一项所述的方法,其中所述至少一种感兴趣的抗原选自多瘤病毒JC、多瘤病毒MPCyV和多瘤病毒BK。

17. 根据权利要求1至10中任一项所述的方法,其中所述受试者患有梅克尔细胞癌。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中所述至少一种感兴趣的抗原是多瘤病毒MPCyV的抗原。

19. 根据权利要求1至10中任一项所述的方法,其中所述受试者患有进行性多灶性脑白质炎。

20. 根据权利要求17所述的方法,其中所述至少一种感兴趣的抗原是多瘤病毒JC的抗原。

21. 根据权利要求1至20中任一项所述的方法,其中在步骤b)中,将所述Tscm细胞群体在IL-7和IL-15存在下培养。

22. 根据权利要求1至21中任一项所述的方法,其中在步骤b)中,将所述Tscm细胞群体培养8至20天,优选地10至18天,更优选地12至16天。

23. 根据权利要求1至22中任一项所述的方法,其中所述细胞样品是骨髓细胞样品、血液细胞样品、分级或未分级的全血样品、分级或未分级的血液单采收集物、肿瘤浸润性淋巴细胞、PBMC或来自血液样品或PBMC的富含T细胞的群体。

24. 一种包含抗原特异性CD8⁺T细胞和任选的抗原特异性CD4⁺T细胞的分离的细胞群体,其通过根据权利要求1至23中任一项所述的方法获得或可获得。

25. 根据权利要求24所述的分离的细胞群体,其包含Tscm细胞、T效应(Teff)细胞、T中央记忆(Tcm)细胞和T效应记忆(Tem)细胞或由所述细胞组成。

26. 根据权利要求24或25所述的分离的细胞群体,其中在所述分离的细胞群体中,Tscm、Tcm和Tem细胞占总细胞的至多90%,优选地50%至90%,并且Teff细胞占总细胞的10%至50%,优选地10%至20%。

27. 根据权利要求24至26中任一项所述的分离的细胞群体,其作为细胞疗法药物。

28. 一种药物组合物,其包含根据权利要求24至26中任一项所述的分离的细胞群体和药学上可接受的载体和/或赋形剂。

29. 根据权利要求24至26中任一项所述的分离的细胞群体或根据权利要求28所述的药物组合物,其用于治疗癌症或病原体引起的疾病。

30. 根据权利要求29所述的用途的分离的细胞群体或药物组合物,其用于治疗由人多瘤病毒引起的疾病。

31. 根据权利要求30所述的用途的分离的细胞群体或药物组合物,其中所述疾病是进行性多灶性脑白质炎、梅克尔细胞癌或BK病毒相关性肾病。

32. 根据权利要求30或31所述的用途的分离的细胞群体或药物组合物,其中所述病原体是多瘤病毒JC,并且所述疾病是进行性多灶性脑白质炎。

33. 根据权利要求30或31所述的用途的分离的细胞群体或药物组合物,其中所述病原

体是多瘤病毒MCPyV,并且所述疾病是梅克尔细胞癌。

34.根据权利要求29至33中任一项所述的用途的分离的细胞群体或药物组合物,其中所述群体是待治疗的受试者自体的。

35.根据权利要求29至34中任一项所述的用途的分离的细胞群体或药物组合物,其中待给药的分离的细胞群体或药物组合物的剂量包括1000至10,000,000个抗原特异性CD8+T细胞/kg受试者体重。

36.根据权利要求35所述的用途的分离的细胞群体或药物组合物,其中待给药的分离的细胞群体或药物组合物的剂量进一步包括1000至10,000,000个抗原特异性CD4+T细胞/kg受试者体重。

37.根据权利要求24至26中任一项所述的分离的细胞群体或根据权利要求28所述的药物组合物在制备用于治疗癌症或病原体引起的疾病的药物中的用途。

38.一种治疗患有癌症或病原体引起的疾病的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者给药治疗有效量的根据权利要求24至26中任一项所述的分离的细胞群体或根据权利要求28所述的药物组合物。

39.一种用于获得记忆干T细胞(Tscm细胞)群体的体外方法,所述方法包括从来自受试者的细胞样品中分选具有包含CD4+或CD8+、CD45RA+、CD95+、CCR7+和/或CD62L+、PD1-和TIGIT-以及任选的LAG3-、TIM3-、CTLA4-和/或CD160-、优选为LAG3-和/或TIM3-的细胞表面表型的Tscm细胞群体。

40.根据权利要求39所述的方法,其中所述受试者患有癌症或病原体引起的疾病。

41.根据权利要求40所述的方法,其中所述受试者患有由人多瘤病毒引起的疾病。

42.根据权利要求41所述的方法,其中所述受试者患有进行性多灶性脑白质炎、梅克尔细胞癌或BK病毒相关性肾病。

43.根据权利要求42所述的方法,其中所述受试者患有进行性多灶性脑白质炎。

44.根据权利要求42所述的方法,其中所述受试者患有梅克尔细胞癌。

45.一种分离的Tscm细胞群体,其具有包含下述的细胞表面表型:(i) CD4+、CD45RA+、CD95+、CCR7+和/或CD62L+、PD1-、TIGIT-、以及任选的LAG3-、TIM3-、CTLA4-和/或CD160-、优选为LAG3-和/或TIM3-、和/或(ii) CD8+、CD45RA+、CD95+、CCR7+和/或CD62L+、PD1-、TIGIT-、以及任选的LAG3-、TIM3-、CTLA4-和/或CD160-、优选为LAG3-和/或TIM3-。

46.根据权利要求45所述的分离的Tscm细胞群体,其中所述细胞具有包含下述的细胞表面表型:(i) CD4+、CD45RA+、CD95+、CCR7+和/或CD62L+、PD1-、TIGIT-、LAG3-和TIM3-、和/或(ii) CD8+、CD45RA+、CD95+、CCR7+和/或CD62L+、PD1-、TIGIT-、LAG3-和TIM3-。

源自高功能性自体干细胞的T细胞免疫疗法

技术领域

[0001] 本发明涉及医学领域,具体而言涉及使用T细胞免疫疗法治疗癌症或病原体引起的疾病,优选为由人多瘤病毒引起的疾病例如进行性多灶性脑白质炎。

背景技术

[0002] 进行性多灶性脑白质炎(PML)是一种脱髓鞘、机会性疾病,预后不良,与多瘤病毒JC(JCV)在中枢神经系统中的复制有关。PML仅在长期和严重的细胞免疫抑制期间,主要在AIDS患者或恶性血液病患者中或在免疫抑制疗法(包括新的强效免疫抑制生物疗法)后观察到。这种毁灭性疾病与高死亡率和存活者中的重大神经系统后遗症相关。

[0003] PML与细胞毒性记忆CD8 T淋巴细胞对病毒复制的脑内免疫控制受损有关,所述细胞毒性记忆CD8 T淋巴细胞需要有功能的记忆CD4 T细胞才能发挥最佳功能。抗JC病毒CD8 T细胞应答的受损涉及几种机制,包括失能和功能衰竭以及抑制性受体例如PD1、LAG3、TIGIT、TIM3、CTLA4、CD160的过表达。

[0004] 目前尚无针对PML的特异性抗病毒治疗。显示出一定疗效的唯一治疗方法是在可能的情况下功能性恢复抗JCV T细胞应答,例如在HIV感染患者中通过开始有效的抗反转录病毒治疗或通过停止免疫抑制疗法。然而,此类免疫恢复可能需要较长时间,在此期间JCV继续复制,延长神经系统损害,并影响存活和神经系统预后。

[0005] 因此,对能够高效地在PML患者中产生针对JCV的有效且持续的免疫应答的新治疗方案,存在着迫切需求。

发明内容

[0006] 本发明人开发了一种新的特异性T细胞治疗策略,其基于使用记忆干T细胞(Tscm),特别是在抑制性受体表达的基础上负选择的高功能性Tscm。这种方法是基于一个关键观察结果,即,在具有严重且长期的免疫抑制的患者例如PML患者中,这种罕见的记忆T细胞亚群可能在扩增和分化方面保持高功能,并可能产生针对病毒或肿瘤抗原的离体有效特异性细胞毒性效应细胞;而分化程度更高的记忆T细胞亚群例如效应记忆(Tem)或中央记忆(Tcm)或效应(Teff)细胞,针对病毒或肿瘤抗原的功能不佳。这种新的细胞免疫疗法可以应用于PML患者,但也可以应用于特异性记忆T细胞应答功能受损的其他感染或癌症。

[0007] 因此,第一方面,本发明涉及一种用于获得包含抗原特异性T细胞的细胞群体的体外方法,所述方法包括:

[0008] a) 从来自患有癌症或病原体引起的疾病、特别是特异性记忆T细胞应答功能受损的癌症或病原体引起的疾病的受试者的细胞样品中分选具有包含CD4⁺或CD8⁺、CD45RA⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺和CD95⁺的细胞表面表型的Tscm细胞群体,

[0009] b) 在负载有至少一种感兴趣的抗原或衍生自至少一种感兴趣的抗原的至少一种肽的抗原呈递细胞存在下,并任选地在IL-7和IL-15或其他刺激性细胞因子存在下,培养所述Tscm细胞群体,和任选地

[0010] c) 回收在步骤b) 中获得的细胞,特别是CD8+和/或CD4+细胞,优选为CD8+和CD4+细胞。

[0011] 所述在步骤a) 中分选的Tscm细胞群体可以具有进一步包含PD1⁻、TIGIT⁻、LAG3⁻、TIM3⁻、CTLA4⁻和/或CD160⁻,优选为PD1⁻、TIGIT⁻、LAG3⁻和/或TIM3⁻的细胞表面表型。具体而言,所述在步骤a) 中分选的Tscm细胞群体可以具有进一步包含PD1⁻和TIGIT⁻以及任选的LAG3⁻、TIM3⁻、CTLA4⁻和/或CD160⁻、优选为LAG3⁻和/或TIM3⁻、更优选为LAG3⁻和TIM3⁻的细胞表面表型。

[0012] 或者,所述方法可以包括:

[0013] a) 从来自受试者的细胞样品中分选具有包含CD4⁺或CD8⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺、PD1⁻和TIGIT⁻的细胞表面表型的Tscm细胞群体,

[0014] b) 在负载有衍生自至少一种感兴趣的抗原的至少一种免疫原性肽的抗原呈递细胞存在下,并任选地在IL-7和IL-15或其他刺激性细胞因子存在下,培养所述Tscm细胞群体,和

[0015] c) 从在步骤b) 中获得的细胞群体中分选CD8⁺细胞和任选的CD4⁺细胞,优选地从所述在步骤b) 中获得的细胞群体中分选CD8⁺细胞和CD4⁺细胞。

[0016] 任选地,所述在步骤a) 中分选的Tscm细胞群体具有进一步包含LAG3⁻、TIM3⁻、CTLA4⁻和/或CD160⁻,优选为LAG3⁻和/或TIM3⁻的细胞表面表型。

[0017] 所述在步骤a) 中分选的Tscm细胞群体可以具有进一步包含CD3⁺、CD45RO⁻、CXCR3⁺和/或CD122⁺,优选为CD3⁺和CD45RO⁻的细胞表面表型。

[0018] 具体而言,所述在步骤a) 中分选的Tscm细胞群体可以包含具有包含CD4⁺、CD8⁻、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺、PD1⁻和TIGIT⁻的细胞表面表型的细胞,和具有包含CD4⁻、CD8⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺、PD1⁻和TIGIT⁻的细胞表面表型的细胞。

[0019] 更具体而言,所述在步骤a) 中分选的Tscm细胞群体可以包含具有包含CD4⁺、CD8⁻、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺、PD1⁻、TIGIT⁻、LAG3和TIM3⁻,优选为CD3⁺、CD45RO⁻、CD4⁺、CD8⁻、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺、PD1⁻、TIGIT⁻、LAG3和TIM3⁻的细胞表面表型的细胞,和具有包含CD4⁻、CD8⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺、PD1⁻、TIGIT⁻、LAG3和TIM3⁻,优选为CD3⁺、CD45RO⁻、CD4⁻、CD8⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺、PD1⁻、TIGIT⁻、LAG3和TIM3⁻的细胞表面表型的细胞。

[0020] 所述抗原呈递细胞可以是树突状细胞、单核细胞、外周血单核细胞(PBMC)、Epstein-Barr病毒转化的B淋巴母细胞样细胞系细胞(EBV-BLCL细胞)或人工抗原呈递细胞(AAPC)。

[0021] 优选地,所述抗原呈递细胞是所述受试者自体的。

[0022] 优选地,所述抗原呈递细胞是单核细胞或树突状细胞,更优选为所述受试者自体的单核细胞或树突状细胞。

[0023] 所述至少一种感兴趣的抗原可以是病原体抗原,优选为病毒、细菌或真菌抗原,或由肿瘤细胞表达的抗原例如肿瘤特异性抗原(TSA)或肿瘤相关抗原(TAA)。

[0024] 所述受试者可以患有癌症。

[0025] 所述至少一种感兴趣的抗原可以由肿瘤细胞表达的抗原例如肿瘤特异性抗原(TSA)或肿瘤相关抗原(TAA)。

[0026] 所述受试者可以患有由人多瘤病毒引起的疾病,优选为进行性多灶性脑白质炎、

梅克尔细胞癌或BK病毒相关性肾病。

[0027] 优选地,所述至少一种感兴趣的抗原是人多瘤病毒(特别是选自多瘤病毒JC、多瘤病毒MPCyV或多瘤病毒BK)的抗原。更优选地,所述至少一种感兴趣的抗原是多瘤病毒JC或MPCyV的抗原,特别是多瘤病毒JC的抗原。

[0028] 在步骤b)中,可以将所述Tscm细胞群体在IL-7和IL-15存在下培养,和/或可以将其培养8至20天,优选地10至18天,更优选地12至16天。

[0029] 所述细胞样品可以是骨髓细胞样品、血液细胞样品、分级或未分级的全血样品、分级或未分级的血液单采(apheresis)收集物、肿瘤浸润性淋巴细胞、PBMC或来自血液样品或PBMC的富含T细胞的群体。

[0030] 本发明还涉及一种包含抗原特异性CD8+T细胞和任选的抗原特异性CD4+T细胞的分离的细胞群体,其通过本发明的用于获得包含抗原特异性T细胞的细胞群体的方法获得或可获得。所述分离的群体可以包含Tscm细胞、T效应(Teff)细胞、T中央记忆(Tcm)细胞和T效应记忆(Tem)细胞或由所述细胞组成。

[0031] 在本发明的分离的细胞群体中,Tscm、Tcm和Tem细胞可以占总细胞的至多90%,优选地50%至90%,并且Teff细胞可以占总细胞的10%至50%,优选地10%至20%。

[0032] 本发明还涉及一种用于获得记忆干T细胞(Tscm细胞)群体的体外方法,所述方法包括从来自受试者的细胞样品中分选具有包含CD4+或CD8+、CD45RA+、CD95+、CCR7+和/或CD62L+、PD1-和TIGIT-以及任选的LAG3-、TIM3-、CTLA4-和/或CD160-、优选为LAG3-和/或TIM3-的细胞表面表型的Tscm细胞群体。

[0033] 所述受试者可以患有癌症或病原体引起的疾病,特别是特异性记忆T细胞应答功能受损的癌症或病原体引起的疾病。

[0034] 优选地,所述受试者患有由人多瘤病毒引起的疾病。

[0035] 更优选地,所述受试者患有进行性多灶性脑白质炎、梅克尔细胞癌或BK病毒相关性肾病。

[0036] 本发明还涉及一种分离的Tscm细胞群体,其具有包含下述的细胞表面表型:(i) CD4+、CD45RA+、CD95+、CCR7+和/或CD62L+、PD1-、TIGIT-,以及任选的LAG3-和/或TIM3-,和/或(ii) CD8+、CD45RA+、CD95+、CCR7+和/或CD62L+、PD1-、TIGIT-,以及任选的LAG3-、TIM3-、CTLA4-和/或CD160-,优选为LAG3-和/或TIM3-,更优选为LAG3-和TIM3-。

[0037] 本发明还涉及本发明的包含抗原特异性CD8+T细胞和任选的抗原特异性CD4+T细胞的分离的细胞群体,或本发明的分离的Tscm细胞群体,其作为细胞疗法药物。本发明还涉及一种药物组合物,其包含本发明的所述包含抗原特异性CD8+T细胞的分离的细胞群体或本发明的所述分离的Tscm细胞群体,以及药学上可接受的载体和/或赋形剂。

[0038] 本发明还涉及本发明的所述包含抗原特异性CD8+T细胞和任选的抗原特异性CD4+T细胞的分离的细胞群体、本发明的所述分离的Tscm细胞群体或所述药物组合物,其用于治疗癌症或病原体引起的疾病,特别是特异性记忆T细胞应答功能受损的癌症或病原体引起的疾病。

[0039] 优选地,所述待治疗的疾病是由多瘤病毒引起、更优选地由人多瘤病毒引起的疾病。具体而言,所述待治疗的疾病可以是进行性多灶性脑白质炎、梅克尔细胞癌或BK病毒相关性肾病。

[0040] 优选地,所述待治疗的疾病是病原体引起的疾病,其中所述病原体是多瘤病毒JC,并且所述疾病是进行性多灶性脑白质炎(PML)。或者,所述待治疗的疾病是病原体引起的疾病,其中所述病原体是多瘤病毒MCPyV,并且所述疾病是梅克尔细胞癌,或者所述待治疗的疾病是病原体引起的疾病,其中所述病原体是多瘤病毒BKV,并且所述疾病是BK病毒相关性肾病。

[0041] 优选地,所述用于治疗的细胞是所述待治疗的受试者自体的。

[0042] 所述待给药的分离的细胞群体或药物组合物的剂量可以包括1000至10,000,000个抗原特异性CD8+T细胞/kg受试者体重。所述剂量可以进一步包括1000至10,000,000个抗原特异性CD4+T细胞/kg受试者体重。

[0043] 本发明还涉及本发明的分离的细胞群体或本发明的药物组合物在制备用于治疗癌症或病原体引起的疾病、特别是特异性记忆T细胞应答功能受损的癌症或病原体引起的疾病的药物中的用途。

[0044] 本发明还涉及一种治疗患有癌症或病原体引起的疾病、特别是特异性记忆T细胞应答功能受损的癌症或病原体引起的疾病的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者给药治疗有效量的本发明的分离的细胞群体或本发明的药物组合物。

附图说明

[0045] 图1:Tscm、Tcm、Tem CD4或CD8 T细胞上抑制性受体(PD1、TIGIT、LAG3、TIM3)的任何组合的表达。每条线代表一名患者。

[0046] 图2:抑制性受体主要包括PD1和/或TIGIT。饼图的黑色部分表示单独的或与其他抑制性受体组合的PD1和/或TIGIT阳性的细胞。灰色部分表示对PD1和/或TIGIT以外的其他抑制性受体呈阳性的细胞。白色部分代表对抑制性受体呈阴性的细胞。每条线代表一名患者。

[0047] 图3:用于分离高功能性Tscm的门控策略。将相同的门控策略应用于CD4和CD8 T细胞。

[0048] 图4:不同的分选T细胞亚群的增殖能力。左图:总Tscm(合并的CD4和CD8 Tscm)相比于分化程度更高的CD45RO+记忆细胞(合并的CD4和CD8 Tcm和Tem)。右图:对PD1、TIGIT、TIM3和LAG3呈阴性的Tscm相比于对PD1和/或TIGIT和/或TIM3和/或LAG3呈阳性的Tscm。扩增率计算如下:[第14天培养物中的细胞数量]/[第0天的细胞数量]。统计显著性:* $p < 0.05$, wilcoxon检验。

[0049] 图5:从不同的分选T细胞亚群在培养14天后获得的细胞的特异性细胞毒性潜力。统计显著性:* $p < 0.05$, wilcoxon检验。细胞毒性潜力通过在使用装载有JCV-肽的自体细胞(CD14和CD3贫化的PBMC)重新刺激后颗粒酶b和穿孔素的表达来评估。

[0050] 图6:在体外培养14天后PD1-TIGIT-Tscm CD8 T细胞的分化。

具体实施方式

[0051] 本发明人开发了一种新的自体 and 特异性T细胞治疗策略,以绕过PML患者中的抗JCV T细胞功能抑制。所述方法是基于使用记忆干T细胞(Tscm),优选为在抑制性受体表达的基础上负选择的高功能性Tscm。事实上,他们观察到在具有严重和长期免疫抑制的患者

例如PML患者中,这种罕见的记忆T细胞亚群可能在扩增和分化方面保持高功能,并可能产生针对病毒或肿瘤抗原的离体有效特异性细胞毒性效应细胞。他们还证明,在来自不同免疫背景(包括HIV感染、血液恶性肿瘤和用免疫抑制性生物疗法治疗)的PML患者中,Tscm细胞与分化程度更高的记忆细胞相比表达的抑制性受体的量更低。他们进一步证明,基于PD1和TIGIT排除的选择允许贫化绝大部分表达抑制性受体的Tscm。他们还表明,与PD1+和/或TIGIT+Tscm以及分化程度更高的记忆细胞相比,这些PD1-TIGIT-Tscm细胞显示出更好的增殖能力和更好的细胞毒性能力。这些细胞在体外高效地分化为分化程度更高的记忆细胞,包括效应细胞,但大部分保留Tscm表型,允许在给药后在体内经历进一步的分化循环,从而延长治疗效果。因此,在体外活化、分化和扩增后,这些细胞能够提供包含抗原特异性T细胞,并且能够在PML患者中产生针对JCV的有效且持续的免疫应答的细胞群体。这种新的基于细胞疗法的个性化药物也可应用于特异性抗病毒或抗肿瘤记忆T细胞应答功能受损的其他慢性病毒感染或癌症。

[0052] 第一方面,本发明涉及一种用于获得包含抗原特异性T细胞的细胞群体的体外方法,所述方法包括:

[0053] a) 从来自受试者的细胞样品中分选Tscm细胞群体,即具有包含(i) CD4+或CD8+、(ii) CD45RA+、(iii) CD95+和(iv) CCR7+和/或CD62L+的细胞表面表型的Tscm细胞群体,

[0054] b) 在负载有至少一种感兴趣的抗原或衍生自所述至少一种感兴趣的抗原的一种或多种肽的抗原呈递细胞存在下,并任选地在IL-7和IL-15或其他刺激性细胞因子存在下,培养所述Tscm细胞群体,和任选地

[0055] c) 回收在步骤b)中获得的细胞,特别是CD8+和/或CD4+细胞,优选为CD8+和CD4+细胞。

[0056] 优选地,在步骤a)中,所述Tscm细胞群体具有进一步包含PD1-、TIGIT-、LAG3-、TIM3-、CTLA4-和/或CD160-,更优选为PD1-、TIGIT-、LAG3-和/或TIM3-的细胞表面表型。

[0057] 在优选实施方式中,所述方法包括:

[0058] a) 从来自受试者的细胞样品中分选高功能性Tscm细胞群体,即具有包含(i) CD4+或CD8+、(ii) CD45RA+、(iii) CD95+、(iv) CCR7+和/或CD62L+、(v) PD1-和(vi) TIGIT-的细胞表面表型的Tscm细胞群体,

[0059] b) 在负载有至少一种感兴趣的抗原或衍生自所述至少一种感兴趣的抗原的一种或多种肽的抗原呈递细胞存在下,并任选地在IL-7和IL-15或其他刺激性细胞因子存在下,培养所述Tscm细胞群体,和任选地

[0060] c) 回收在步骤b)中获得的细胞,特别是CD8+和/或CD4+细胞,优选为CD8+和CD4+细胞。

[0061] 具体而言,在步骤c)中,可以从所述在步骤b)中获得的细胞群体中分选CD8+细胞和任选的CD4+细胞。

[0062] 任选地,步骤a)可以进一步包括贫化表达一种或几种其他抑制性受体例如LAG3、TIM3、CTLA4或CD160的细胞。具体而言,步骤a)可以进一步包括贫化表达LAG3、TIM3、CTLA4和/或CD160的细胞。在这种情况下,所述分选的细胞群体可以具有包含下述的细胞表面表型:(i) CD4+或CD8+、CD45RA+、CD95+、CCR7+和/或CD62L+、PD1-和TIGIT-,和(ii) LAG3-、TIM3-、CTLA4-和/或CD160-。

[0063] 优选地,步骤a)进一步包括贫化表达LAG3和/或TIM3的细胞。在这种情况下,所述分选的细胞群体可以具有包含下述的细胞表面表型:(i) CD4⁺或CD8⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺、PD1⁻和TIGIT⁻,和(ii) LAG3⁻和/或TIM3⁻,优选为包含CD4⁺或CD8⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺、PD1⁻、TIGIT⁻、LAG3⁻和TIM3⁻的细胞表面表型。

[0064] 任选地,步骤a)可以进一步包括贫化表达CD45R0的细胞和/或选择表达CD3的细胞。在这种情况下,所述分选的细胞群体可以具有包含下述的细胞表面表型:(i) CD4⁺或CD8⁺、CD3⁺、CD45RA⁺、CD45R0⁻、CD95⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺,优选为CD4⁺或CD8⁺、CD3⁺、CD45RA⁺、CD45R0⁻、CD95⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺、PD1⁻和/或TIGIT⁻,更优选为CD4⁺或CD8⁺、CD3⁺、CD45RA⁺、CD45R0⁻、CD95⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺、PD1⁻和TIGIT⁻,和任选的(ii) LAG3⁻、TIM3⁻、CTLA4⁻和/或CD160⁻。优选地,步骤a)进一步包括贫化表达LAG3和/或TIM3的细胞,优选地贫化表达LAG3和TIM3的细胞。在这种情况下,所述分选的细胞群体可以具有包含下述的细胞表面表型:(i) CD4⁺或CD8⁺、CD3⁺、CD45RA⁺、CD45R0⁻、CD95⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺,优选为CD4⁺或CD8⁺、CD3⁺、CD45RA⁺、CD45R0⁻、CD95⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺、PD1⁻和/或TIGIT⁻,更优选为CD4⁺或CD8⁺、CD3⁺、CD45RA⁺、CD45R0⁻、CD95⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺、PD1⁻和TIGIT⁻,和(ii) LAG3⁻和/或TIM3⁻,优选为LAG3⁻和TIM3⁻。

[0065] 本文所使用的术语“CD4”是指T细胞表面糖蛋白CD4,一种充当T细胞受体(TCR)的辅助受体的糖蛋白。在人类中,CD4蛋白由CD4基因编码。

[0066] 本文所使用的术语“CD8”是指一种充当T细胞受体(TCR)的辅助受体的跨膜糖蛋白。所述蛋白质有两种亚型 α 和 β ,每种由不同的基因编码。CD8形成由一对CD8链组成的二聚体。本文所使用的术语“CD8”是指在人类中由CD8A基因编码的CD8- α 链。

[0067] 本文所使用的术语“CD3”是指一种蛋白质复合体和T细胞辅助受体。在哺乳动物中,所述复合物含有一条CD3 γ 链、一条CD3 δ 链和两条CD3 ϵ 链。CD3是包括T细胞受体(TCR)的更大复合物的一部分。在免疫应答过程中,与TCR结合的CD3复合物参与识别与I类和II类主要组织相容性复合物结合的肽。本文所使用的术语“CD3”是指在人类中由CD3G基因编码的CD3 γ 链、在人类中由CD3D基因编码的CD3 δ 链或在人类中由CD3E基因编码的CD3 ϵ 链。

[0068] 本文所使用的术语“CD45RA”是指受体型酪氨酸蛋白磷酸酶C(也被称为CD45)的200-220kDa亚型。在人类中,CD45蛋白由PTPRC基因编码。这种酪氨酸磷酸酶是通过抗原受体激活T细胞所需要的。CD45RA亚型只包括A蛋白区。

[0069] 本文所使用的术语“CD45R0”是指受体型酪氨酸蛋白磷酸酶C(也被称为CD45)的180kDa亚型。这种亚型是最短的CD45亚型,缺少A、B和C所有三个区域。

[0070] 本文所使用的术语“CD95”是指Fas受体,也被称为Fas、FasR、凋亡抗原1或肿瘤坏死因子受体超家族成员6(TNFRSF6)。在人类中,CD95蛋白由FAS基因编码。

[0071] 本文所使用的术语“CCR7”是指C-C趋化因子受体7型,也被称为CD197,并且是G蛋白偶联受体家族的成员。在人类中,CCR7蛋白由CCR7基因编码。

[0072] 本文所使用的术语“CD62L”是指L-选择素,一种钙依赖性凝集素,其通过与邻近细胞上的糖蛋白结合来介导细胞黏附。具体而言,CD62L介导淋巴细胞与外周淋巴结中高内皮小静脉的内皮细胞的黏附。在人类中,CD62L由SELL基因编码。

[0073] 本文所使用的术语“PD1”是指程序化细胞死亡蛋白1,也被称为CD279。PD1是一种属于免疫球蛋白超家族的细胞表面受体,并在T细胞和B细胞的表面上表达。在人类中,PD-1

蛋白由PDCD1基因编码。

[0074] 本文所使用的术语“TIGIT”是指一种免疫受体,也被称为具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体、WUCAM或Vstm3。在人类中,TIGIT蛋白由TIGIT基因编码。

[0075] 本文所使用的术语“LAG3”是指淋巴细胞活化基因3,也被称为CD223。LAG3是一种对T细胞功能具有多种生物学效应的细胞表面分子。在人类中,LAG3蛋白由LAG3基因编码。

[0076] 本文所使用的术语“TIM3”是指含有T细胞免疫球蛋白和黏蛋白结构域的蛋白3,也被称为甲型肝炎病毒细胞受体2(HAVCR2)。TIM3是一种参与调节先天性和适应性免疫应答的表面受体。在人类中,TIM3蛋白由HAVCR2基因编码。

[0077] 本文所使用的术语“CTLA4”是指细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4,也被称为CD152。CTLA4是一种起到免疫检查点的作用并下调免疫应答的蛋白质受体。在人类中,CTLA4蛋白由CTLA4基因编码。

[0078] 本文所使用的术语“CD160”是指免疫细胞上的一种糖蛋白受体,其能够递送调节细胞活化和分化的刺激性或抑制性信号。在人类中,CD160蛋白由CD160基因编码。

[0079] 此外,所述在步骤a)中分选的Tscm细胞群体也可以表达CXCR3和/或CD122,并且也可以在这些额外标志物的基础上选择。在这种情况下,所述分选的细胞群体可以具有包含下述的细胞表面表型:(i) CD4+或CD8+、CD45RA+、CD95+、CCR7+和/或CD62L+、CXCR3+和/或CD122+,优选为CD4+或CD8+、CD45RA+、CD95+、CCR7+和/或CD62L+、CXCR3+和/或CD122+、PD1-和/或TIGIT-,更优选为CD4+或CD8+、CD45RA+、CD95+、CCR7+和/或CD62L+、CXCR3+和/或CD122+、PD1-和TIGIT-,或(ii) CD4+或CD8+、CD3+、CD45RA+、CD45RO-、CD95+、CCR7+和/或CD62L+、CXCR3+和/或CD122+,优选为CD4+或CD8+、CD3+、CD45RA+、CD45RO-、CD95+、CCR7+和/或CD62L+、CXCR3+和/或CD122+、PD1-和/或TIGIT-,更优选为CD4+或CD8+、CD3+、CD45RA+、CD45RO-、CD95+、CCR7+和/或CD62L+、CXCR3+和/或CD122+、PD1-和TIGIT-。任选地,这些分选的细胞群体可以具有进一步包含LAG3-、TIM3-、CTLA4-和/或CD160-,优选为LAG3-和/或TIM3-,更优选为LAG3-和TIM3-的细胞表面表型。

[0080] 本文所使用的术语“CXCR3”是指趋化因子受体CXCR3,也被称为G蛋白偶联受体9(GPR9)和CD183。在人类中,CXCR3由CXCR3基因编码。本文所使用的术语“CD122”是指白介素-2受体亚基 β ,也被称为IL15RB。CD122是白介素-2的受体。该 β 亚单位参与受体介导的内吞作用并转导IL2的促有丝分裂信号。在人类中,CD122由IL2RB基因编码。

[0081] 本文所使用的术语“细胞表面表型”是指在细胞表面处特定细胞表面标志物的组合的存在或不存在。所谓“细胞表面标志物”是指在细胞表面上表达的分子,其可以例如使用标记的抗体或本领域中已知的其他手段进行检测。细胞表面标志物可以包括蛋白质、糖蛋白或一组蛋白质和/或糖蛋白。在本发明的情况下,所述在步骤a)中分选/选择的Tscm细胞群体可以通过包含CD4或CD8、CD45RA、CD95、CCR7和/或CD62L和优选CD3的标志物的特定组合的表达,以及缺少包含PD1和/或TIGIT、优选为PD1和TIGIT和任选的LAG3、TIM3、CTLA4和/或CD160、优选为LAG3和/或TIM3、更优选为LAG4和TIM3的标志物的特定组合的表达来鉴定。任选地,所述在步骤a)中分选/选择的Tscm细胞群体可以通过缺少CD45RO的表达来进一步鉴定。

[0082] 所述在步骤a)中获得的Tscm细胞群体富含具有特定细胞表面表型的Tscm细胞。

[0083] 在特定实施方式中,所述在步骤a)中获得的Tscm细胞群体富含具有包含CD4+或

CD8⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺以及任选的CD3⁺、CD45RO⁻、CXCR3⁺和/或CD122⁺的细胞表面表型的Tscm细胞,优选地富含具有包含CD4⁺或CD8⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺、CD3⁺和CD45RO⁻的细胞表面表型的Tscm细胞。优选地,所述细胞表面表型进一步包含PD1⁻、TIGIT⁻、LAG3⁻、TIM3⁻、CTLA4⁻和/或CD160⁻,优选为PD1⁻和/或TIGIT⁻,以及任选的LAG3⁻和/或TIM3⁻,更优选为PD1⁻和TIGIT⁻和任选的LAG3⁻和/或TIM3⁻,甚至更优选为PD1⁻、TIGIT⁻、LAG3⁻和TIM3⁻。

[0084] 在优选实施方式中,所述在步骤a)中获得的Tscm细胞群体富含具有包含CD4⁺或CD8⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺、PD1⁻和TIGIT⁻,以及任选的LAG3⁻、TIM3⁻、CTLA4⁻和/或CD160⁻,优选地LAG3⁻和/或TIM3⁻,更优选地LAG3⁻和TIM3⁻的细胞表面表型的Tscm细胞。优选地,Tscm细胞具有进一步包含CD3⁺和CD45RO⁻的细胞表面表型。

[0085] 所谓“富集”或“富含”是指一种包含细胞的组合物,所述细胞在总细胞中存在的百分率高于在另一种组合物中发现的百分率。具体而言,在所述步骤a)中获得的群体中,具有如上所定义的特定细胞表面表型,例如包含CD4⁺或CD8⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺、PD1⁻和TIGIT⁻,以及任选的LAG3⁻、TIM3⁻、CTLA4⁻和/或CD160⁻,优选为LAG3⁻和/或TIM3⁻的细胞表面表型的Tscm细胞,在总细胞中存在的百分率高于它们在所述细胞样品中的百分率。在所述步骤a)中获得的群体中,具有所述特定细胞表面表型,例如包含CD4⁺或CD8⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺、PD1⁻和TIGIT⁻,以及任选的LAG3⁻、TIM3⁻、CTLA4⁻和/或CD160⁻,优选为LAG3⁻和/或TIM3⁻的细胞表面表型的Tscm细胞,占所述群体中总细胞的超过70%,优选地占超过80%、90%、95%或99%,甚至更优选地占所述群体中总细胞的超过95%或99%。

[0086] 相反,所述在步骤a)中获得的Tscm细胞群体可以贫化表达抑制性受体PD1、TIGIT、LAG3、TIM3、CTLA4和/或CD160的细胞,优选地贫化表达抑制性受体PD1和TIGIT和任选的LAG3⁻、TIM3⁻、CTLA4⁻和/或CD160⁻、优选为LAG3和/或TIM3的细胞。优选地,所述在步骤a)中获得的Tscm细胞群体进一步贫化表达CD45RO⁻的细胞。所谓的“贫化”是指一种包含细胞的组合物,所述细胞在总细胞中存在的百分率低于在另一种组合物中发现的百分率,特别是低于在所述细胞样品中发现的百分率。在优选实施方式中,在所述步骤a)中获得的群体中,具有包含PD1⁺和TIGIT⁺以及任选的LAG3⁺、TIM3⁺、CTLA4⁺和/或CD160⁺,优选为LAG3⁺和/或TIM3⁺的细胞表面表型的Tscm细胞在总细胞中存在的百分率低于它们在所述细胞样品中的百分率。具体而言,在所述步骤a)中获得的群体中,表达抑制性受体PD1和TIGIT以及任选的LAG3、TIM3、CTLA4和/或CD160,优选为LAG3和/或TIM3的Tscm细胞可以占所述群体中总细胞的少于5%、2%或1%。

[0087] 优选地,在所述步骤a)中获得的群体中,具有包含CD4⁺或CD8⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺,优选地包含CD4⁺或CD8⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺和CD3⁺,更优选地包含CD4⁺或CD8⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺、CD3⁺和CD45RO⁻的细胞表面表型的Tscm细胞占所述群体中总细胞的超过95%、96%、97%、98%或99%。

[0088] 更优选地,在所述步骤a)中获得的群体中,具有包含(i) CD4⁺或CD8⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺、PD1⁻和TIGIT⁻,优选为CD4⁺或CD8⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺、CD3⁺、PD1⁻和TIGIT⁻,更优选为CD4⁺或CD8⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺、CD3⁺、CD45RO⁻、PD1⁻和TIGIT⁻,和(ii)任选的LAG3⁻、TIM3⁻、CTLA4⁻和/或CD160⁻,优选为

LAG3-和/或TIM3-的细胞表面表型的Tscm细胞占所述群体中总细胞的超过95%、96%、97%、98%或99%。在这种情况下,具有包含CD4+或CD8+、CD45RA+、CD95+、CCR7+和/或CD62L+、PD1+和/或TIGIT+,优选为CD4+或CD8+、CD45RA+、CD95+、CCR7+和/或CD62L+、CD3+、PD1+和/或TIGIT+,更优选为CD4+或CD8+、CD45RA+、CD95+、CCR7+和/或CD62L+、CD3+、CD45RO-、PD1+和TIGIT+,以及任选的LAG3+、TIM3+、CTLA4+和/或CD160+,优选为LAG3+和/或TIM3+的细胞表面表型的Tscm细胞可以占所述群体中总细胞的少于5%,更优选地占所述群体中总细胞的少于2%或1%。

[0089] 在一个特定实施方式中,所述在步骤a)中获得的群体由具有如上所定义的细胞表面表型,优选为包含CD4+或CD8+、CD45RA+、CD95+、CCR7+和/或CD62L+,优选地包含CD4+或CD8+、CD45RA+、CD95+、CCR7+和/或CD62L+和CD3+,更优选地包含CD4+或CD8+、CD45RA+、CD95+、CCR7+和/或CD62L+、CD3+和CD45RO-的细胞表面表型的Tscm细胞组成。

[0090] 在另一个特定实施方式中,所述在步骤a)中获得的群体由具有如上所定义的细胞表面表型,优选为包含(i)CD4+或CD8+、CD45RA+、CD95+、CCR7+和/或CD62L+、PD1-和TIGIT-,优选地包含CD4+或CD8+、CD45RA+、CD95+、CCR7+和/或CD62L+、CD3+、PD1-和TIGIT-,更优选地包含CD4+或CD8+、CD45RA+、CD95+、CCR7+和/或CD62L+、CD3+、CD45RO-、PD1-和TIGIT-,和(ii)任选的LAG3-、TIM3-、CTLA4-和/或CD160-,优选为LAG3-和/或TIM3-的细胞表面表型的Tscm细胞组成。

[0091] 优选地,所述在步骤a)中获得的群体表现出至少0.2的CD4+/CD8+比率。在所述在步骤a)中获得的群体表现出低于0.2的CD4+/CD8+比率的实施方式中,可以向所述群体添加抗CD40抗体,以便补偿CD4 T细胞辅助信号的缺乏。

[0092] 在步骤a)中,从细胞样品中分选并回收具有特定细胞表面表型的细胞。所述具有特定细胞表面表型的细胞的分选可以使用本领域中已知的任何方法来进行。正选择和/或负选择可以使用本领域中已知的材料和技术容易地完成。例如,表达特定细胞表面标志物的细胞可以使用与所述标志物结合并与柱或磁珠偶联的单克隆抗体而与其他细胞分离;所述分离根据标准技术和/或制造商或供应商的指示容易地进行。具体而言,在步骤a)中,可以通过荧光活化细胞分选(FACS)或通过磁分离对细胞进行分选。

[0093] 所述细胞样品可以是含有T细胞、特别是Tscm细胞或可以在培养中诱导以变成Tscm细胞的细胞的任何样品。优选地,所述样品是含有Tscm细胞的样品。适合的样品的实例包括但不限于骨髓细胞样品、血液细胞样品、分级或未分级的全血样品、分级或未分级的血液单采收集物(例如白细胞单采收集物)、肿瘤浸润性淋巴细胞、PBMC或T细胞群体(例如来自血液样品或PBMC的富含T细胞的群体)。

[0094] 在一个特定实施方式中,所述细胞样品是PBMC。PBMC可以通过本领域中已知的任何方法,例如通过ficoll密度梯度离心从血液样品中分离。

[0095] 本文所使用的术语“分离的”是指与细胞在自然界中通常相伴的成分分离。

[0096] 在另一个特定实施方式中,所述细胞样品是来自PBMC或血液样品的富含T细胞的群体,优选为来自PBMC的富含T细胞的群体。T细胞可以通过本领域中已知的任何方法从PBMC或血液样品富集。例如,T细胞可以通过贫化CD14+细胞和/或通过使用抗CD3抗体分选并保留CD3+细胞,从PBMC或血液样品富集。优选地,T细胞通过贫化CD14+细胞并选择CD3+细胞从PBMC或血液样品富集。

[0097] 所述方法可以进一步包括提供所述来自受试者的细胞样品。

[0098] 本文所使用的术语“受试者”或“患者”是指动物,优选为哺乳动物,更优选为人类。

[0099] 如下所述,通过本发明的方法获得的细胞群体可用于提供过继性细胞疗法,特别是自体疗法(通过将衍生自所述Tscm细胞的细胞输回同一患者)或同种异体疗法(通过将衍生自所述Tscm细胞的细胞输注到另一名患者中)。因此,所述细胞样品可以从健康受试者获得,特别是对于同种异体疗法而言,或者从患有将要用所述过继性细胞疗法治疗的疾病的受试者获得。

[0100] 具体而言,所述受试者可能患有特异性记忆T细胞应答功能受损的感染或癌症。优选地,这种受损的功能涉及T细胞失能,特别是T细胞对感兴趣的抗原、即肿瘤或病原体抗原的应答失能,和/或T细胞耗竭(其特征具体而言是抑制性受体例如PD-1或TIGIT的高水平表达),和/或T细胞功能负调控的任何其他机制。因此,在优选实施方式中,所述受试者患有感染或癌症,并表现出T细胞失能、特别是T细胞对感兴趣的抗原的应答失能,和/或T细胞耗竭,和/或T细胞功能负调控的任何其他机制。在某些特定实施方式中,所述受试者患有感染或癌症,并表现出T细胞失能、特别是T细胞对感兴趣的抗原的应答失能,和/或T细胞耗竭。

[0101] 优选地,所述受试者患有如下所述的癌症或病原体引起的疾病,更优选为由多瘤病毒引起的疾病,甚至更优选为由人多瘤病毒引起的疾病。

[0102] 在优选实施方式中,所述受试者患有进行性多灶性脑白质炎(PML)、梅克尔细胞癌或BK病毒相关性肾病,优选地患有进行性多灶性脑白质炎(PML)或梅克尔细胞癌,更优选地患有进行性多灶性脑白质炎。

[0103] 在本发明的方法的步骤b)中,将所述在步骤a)中获得的Tscm细胞群体在装载有至少一种感兴趣的抗原或衍生自至少一种感兴趣的抗原的至少一种免疫原性肽、优选为装载有衍生自至少一种感兴趣的抗原的至少一种免疫原性肽的抗原呈递细胞存在下进行培养。

[0104] 在本文中,术语“肽”和“蛋白质”可互换使用,并且是指通过肽键相连的氨基酸链,而与形成所述链的氨基酸的数量无关。

[0105] 在这个步骤中使用的抗原呈递细胞(APC)可以是适合于呈递所述至少一种感兴趣的抗原或至少一种免疫原性肽,并在所述APC表面上与肽复合的主要组织相容性复合物(MHC)受体与T细胞表面上的TCR相互作用时激活T细胞的任何抗原呈递细胞。APC的实例包括但不限于树突状细胞、单核细胞、外周血单核细胞(PBMC)、Epstein-Barr病毒转化的B淋巴瘤母细胞样细胞系细胞(EBV-BLCL细胞)或人工抗原呈递细胞(AAPC)。优选地,所述在步骤b)中使用的APC选自树突状细胞、单核细胞和PBMC及其组合。更优选地,所述在步骤b)中使用的APC是单核细胞或树突状细胞,优选为单核细胞。

[0106] 在步骤b)中使用的APC可以是自体的(即从提供所述细胞样品的同一受试者,优选地从所述待治疗的受试者获得),或者可以是同种异体的(即从提供所述细胞样品的受试者之外的另一名受试者,优选地从所述待治疗的受试者之外的另一名受试者获得)。

[0107] 在一个优选实施方式中,在步骤b)中使用的APC是自体的。专业技术人员可以使用广泛的已知程序,使用不同的来源例如外周血单核细胞、天然存在的DC或从骨髓动员的CD34+造血前体细胞产生自体APC。优选地,自体APC从外周血单核细胞或天然存在的DC获得,更优选地从外周血单核细胞获得。

[0108] 正如本领域中已知的,CD34+干细胞可通过将所述细胞与适合的细胞因子温育而

分化为树突状细胞。例如,人CD34+造血干细胞可以通过将所述细胞与人GM-CSF和TNF- α 培养而在体外分化(参见例如Szabolcs等,(1995),J.Immunol.154:5851-5861)。然后可以基于细胞表面标志物的表达通过荧光活化细胞分选(FACS)或通过任何其他标准方法来分离树突状细胞。

[0109] 具体而言,所述方法可以进一步包括在步骤b)之前从来自所述受试者的细胞样品获得所述自体APC,并用至少一种感兴趣的抗原或衍生自至少一种感兴趣的抗原的至少一种免疫原性肽,优选地用衍生自至少一种感兴趣的抗原的至少一种免疫原性肽装载所述自体APC。所述用于获得自体APC的细胞样品可以与步骤a)中使用的细胞样品相同或不同,但两者都从同一受试者获得。

[0110] 优选地,所述方法进一步包括在步骤b)之前使用CD14+正选择从来自所述受试者的细胞样品中分选单核细胞群体,并用至少一种感兴趣的抗原或衍生自至少一种感兴趣的抗原的至少一种免疫原性肽,优选地用衍生自至少一种感兴趣的抗原的至少一种免疫原性肽装载所述单核细胞。优选地,所述单核细胞来自所述受试者的PBMC样品获得。

[0111] 或者,在抗原装载之前或之后,可以将从所述样品获得(例如使用CD14+正选择)的单核细胞在GM-CSF和IL-4存在下进行培养,以便诱导分化成树突状细胞。任选地,在培养的第5天与第10天之间,优选地在第6天,在约24h期间向培养基添加IL-6、IL-1 β 和TNF- α ,以便诱导树突状细胞的最佳成熟。

[0112] APC可以通过专业技术人员已知的任何抗原装载方法装载。例如,APC、特别是树突状细胞、单核细胞或PBMC可以通过以下来装载:将APC与一种或多种感兴趣的抗原和/或衍生自所述一种或多种感兴趣的抗原的一种或多种肽、特别是一种或多种免疫原性肽脉冲或温育,或使用病毒载体或mRNA转染将一种或多种抗原和/或衍生自所述一种或多种感兴趣的抗原的一种或多种肽、特别是一种或多种免疫原性肽递送到APC中。

[0113] 在优选实施方式中,APC装载有衍生自所述一种或多种感兴趣的抗原的一种或多种肽,特别是一种或多种免疫原性肽,优选为衍生自所述一种或多种感兴趣的抗原的重叠肽的合并物,特别是重叠免疫原性肽的合并物。

[0114] 感兴趣的抗原是可以被免疫系统靶向以提供治疗效果的任何抗原。所述感兴趣的抗原由专业技术人员根据待治疗的疾病容易地选择。在优选实施方式中,所述感兴趣的抗原根据所述提供细胞样品的受试者中待治疗的疾病、即癌症或感染来选择。

[0115] 具体而言,所述感兴趣的抗原可以选自病原体抗原或由肿瘤细胞表达的抗原例如肿瘤特异性抗原(TSA)(即仅在肿瘤细胞上而不在健康细胞上存在的抗原)或肿瘤相关抗原(TAA)(即在肿瘤细胞上具有高水平但在健康细胞上也以较低水平表达的抗原)。

[0116] 在一个实施方式中,所述感兴趣的抗原选自癌症的一种或多种抗原。本文所使用的术语“癌症”或“肿瘤”是指存在具有导致癌症的细胞的典型特征例如不受控制的增殖、永生、转移潜力、快速生长和增殖速率以及某些特征性形态特征的细胞。该术语是指任何类型的恶性肿瘤(原发性或转移性),并且是指实体癌或造血系统癌症。

[0117] 在另一个实施方式中,所述感兴趣的抗原选自病原体、特别是病毒、细菌或真菌的一种或多种抗原。

[0118] 在一个优选实施方式中,所述感兴趣的抗原选自一种或多种病毒抗原,优选为来自人类病毒的一种或更多种抗原。优选地,所述病毒选自多瘤病毒、人免疫缺陷病毒(HIV)、

人嗜T淋巴细胞病毒 (HTLV)、乙型肝炎病毒 (HBV)、丙型肝炎病毒 (HCV)、疱疹病毒和乳头瘤病毒。更优选地,所述病毒选自人多瘤病毒,特别是选自多瘤病毒John Cunningham(JC)、BK病毒 (BKV) 和梅克尔细胞多瘤病毒 (MCPyV或MCV)。

[0119] 在一个特定实施方式中,所述感兴趣的抗原选自多瘤病毒的抗原。例如,由APC呈递的肽可以包括多瘤病毒的一种或多种肽,特别是一种或多种免疫原性肽,其来自所述多瘤病毒的VP1、VP2、VP3、大T、小T蛋白和/或任何其他蛋白。具体而言,由APC呈递的肽可以是覆盖这些蛋白中的一者或几者的重叠肽。更具体而言,由APC呈递的肽、优选为免疫原性肽,可以包括覆盖所述多瘤病毒的VP1、VP2和VP3区的重叠肽合并物。

[0120] 在一个更特定实施方式中,所述感兴趣的抗原选自多瘤病毒MCPyV的抗原。例如,由APC呈递的肽可以包括一种或多种MCPyV肽,特别是一种或多种MCPyV免疫原性肽,其来自MCPyV的VP1、VP2、VP3、大T、小T蛋白和/或任何其他蛋白。具体而言,由APC呈递的肽可以是覆盖这些蛋白中的一者或几者的重叠肽。更具体而言,由APC呈递的肽、优选为免疫原性肽,可以包括覆盖MCPyV的VP1、VP2和VP3区的重叠肽合并物。

[0121] 在另一个更特定实施方式中,所述感兴趣的抗原选自多瘤病毒BKV的抗原。例如,由APC呈递的肽可以包括一种或多种BKV肽,特别是一种或多种BKV免疫原性肽,其来自BKV的VP1、VP2、VP3、大T、小T蛋白和/或任何其他蛋白。具体而言,由APC呈递的肽可以是覆盖这些蛋白中的一者或几者的重叠肽。更具体而言,由APC呈递的肽、优选为免疫原性肽,可以包括覆盖BKV的VP1、VP2和VP3区的重叠肽合并物。

[0122] 在另一个更特定实施方式中,所述感兴趣的抗原选自多瘤病毒JC的抗原。例如,由APC呈递的肽可以包括一种或多种JCV肽,特别是一种或多种JCV免疫原性肽,其来自JCV的VP1、VP2、VP3、大T、小T蛋白和/或任何其他蛋白。具体而言,由APC呈递的肽可以是覆盖这些蛋白中的一者或几者的重叠肽。更具体而言,由APC呈递的肽、优选为免疫原性肽,可以包括覆盖JCV的VP1、VP2和VP3区的重叠肽合并物。

[0123] 用于装载APC的抗原可以通过专业技术人员已知的任何方法,根据所述抗原的本质来制备。例如,所述抗原可以通过化学合成、重组表达、从来自所述受试者的样品、特别是从受试者自己的癌细胞例如使用全肿瘤裂解物或从癌细胞系裂解物制备。

[0124] 在本发明的方法的步骤b)中,将Tscm细胞在如上所述的APC存在下培养,从而扩增并分化成包含与特定抗原或一组抗原具有反应性的T细胞的群体。

[0125] 使用APC从Tscm细胞群体获得抗原特异性T细胞的方法在本领域中是公知的,并且专业技术人员可以使用这些已知方法中的任一者。

[0126] 通常,所述培养在IL-15、IL-7和/或其他刺激性细胞因子、优选为重组细胞因子例如IL-21存在下进行。优选地,所述培养步骤包括用IL-15和IL-7和任选的IL-21进行培养增补。所述增补优选地在培养的前7天内,更优选地在培养的第2天至第4天之间开始。IL-15和IL-7可以有助于维持Tscm细胞的干细胞样表型。

[0127] 在培养开始时,可以调节Tscm细胞与APC的比例,以设置为1/1(Tscm数目/APC数目)至1/20,优选为1/5至1/15,更优选为1/9至1/11。

[0128] Tscm细胞在APC存在下的培养可以持续8至20天,优选地10至18天,更优选地12至16天。在一个特定实施方式中,Tscm细胞在APC存在下的培养持续14天。

[0129] 任选地,所述细胞可以培养更长的时间段,优选地在不存在装载抗原的APC的情况

下。具体而言,可以将细胞在步骤a)之后和步骤b)之前在不存在装载抗原的APC的情况下培养,和/或在步骤b)之后和步骤c)之前,优选地在不存在装载抗原的APC的情况下培养。

[0130] 在其中所述受试者受反转录病毒例如HIV影响的某些特定实施方式中,所述培养可以在一种或几种抗反转录病毒化合物存在下进行。

[0131] 任选地,本发明的方法可以进一步包括步骤c)回收在步骤b)中获得的细胞,特别是CD8+和/或CD4+细胞,优选为CD8+和CD4+细胞。

[0132] 具体而言,在步骤c)中,可以对所述在步骤b)中获得的细胞群体进行分选,以便选择CD8+细胞和任选的CD4+细胞。

[0133] 在特定实施方式中,在本发明的方法的步骤c)中,对所述在步骤b)中获得的细胞群体进行分选,以便选择/回收CD8+细胞和CD4+细胞。CD8+细胞和CD4+细胞可以分开地或一起回收。在某些实施方式中,CD8+细胞和CD4+细胞被分开地回收,优选地随后进行混合。这种分离允许调整所述获得的细胞群体中的CD8+/CD4+比率。

[0134] 在优选实施方式中,在步骤c)中,回收所述在步骤b)中获得的细胞群体,即培养物的所有细胞,其包括CD8+细胞和CD4+细胞。回收的细胞也可能包括其他细胞类型,特别是APC例如单核细胞或树突状细胞。

[0135] 细胞可以通过专业技术人员已知的任何方法,包括过滤法或如上所述的细胞分选方法来回收。

[0136] 具体而言,所述在步骤c)中选择/回收的群体可以包含Tscm细胞(具有包含CD45RA+CCR7+的细胞表面表型)、T效应(Teff)细胞(具有包含CD45RA+CCR7-的细胞表面表型)、T中央记忆(Tcm)细胞(具有包含CD45RA-CCR7+的细胞表面表型)和T效应记忆(Tem)细胞(具有包含CD45RA-CCR7的细胞表面表型)。

[0137] 在优选实施方式中,Tscm、Tcm和Tem细胞占所述选择/回收的群体中总细胞的至多90%,优选地50%至90%,允许在体内经历进一步的分化循环并因此获得延长的治疗效果。通常,Teff细胞可以占所述选择/回收的群体中总细胞的10%至50%,优选地10%至20%。

[0138] 另一方面,本发明涉及一种包含抗原特异性CD8+T细胞和任选的抗原特异性CD4+T细胞的分离的细胞群体,其通过本发明的用于获得包含抗原特异性T细胞的细胞群体的方法获得或可获得。优选地,所述群体包含抗原特异性CD8+T细胞和抗原特异性CD4+T细胞。

[0139] 上文公开的并涉及所述用于获得包含抗原特异性T细胞的细胞群体的方法的所有实施方式也涵盖在这一方面中。

[0140] 具体而言,所述群体可以包含Tscm细胞(具有包含CD45RA+CCR7+的细胞表面表型)、T效应(Teff)细胞(具有包含CD45RA+CCR7-的细胞表面表型)、T中央记忆(Tcm)细胞(具有包含CD45RA-CCR7+的细胞表面表型)和T效应记忆(Tem)细胞(具有包含CD45RA-CCR7的细胞表面表型)。

[0141] 优选地,Tscm、Tcm和Tem细胞占本发明的分离的群体中总细胞的至多90%,优选地50%至90%。通常,Teff细胞可以占本发明的分离的群体中总细胞的10%至50%,优选地10%至20%。

[0142] 优选地,抗原特异性CD8+T细胞占本发明的分离的群体中总细胞的10%至90%,并且抗原特异性CD4+T细胞占所述总细胞的1%至90%。具体而言,抗原特异性CD8+T细胞可以占本发明的分离的群体中总细胞的50%至90%,并且抗原特异性CD4+T细胞占本发明的分

离的群体中总细胞的1%至50%。

[0143] 在一个特定实施方式中,所述包含抗原特异性CD8⁺T细胞和任选的抗原特异性CD4⁺T细胞,优选地包含抗原特异性CD8⁺T细胞和抗原特异性CD4⁺T细胞的分离的细胞群体,通过包括下述步骤的方法获得或可获得:

[0144] a) 从来自患有癌症或病原体引起的疾病、特别是特异性记忆T细胞应答功能受损的癌症或病原体引起的疾病的受试者的细胞样品中分选具有包含CD4⁺或CD8⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺的细胞表面表型的T_{scm}细胞群体。

[0145] b) 在装载有至少一种感兴趣的抗原或衍生自所述至少一种感兴趣的抗原的至少一种肽、特别是至少一种免疫原性肽的抗原呈递细胞(优选为所述受试者自体的)存在下,并任选地在IL-7和IL-15或其他刺激性细胞因子存在下培养所述T_{scm}细胞群体,和任选地

[0146] c) 回收在步骤b)中获得的细胞,特别是CD8⁺和/或CD4⁺细胞,优选为CD8⁺和CD4⁺细胞。

[0147] 在步骤c)中,CD8⁺细胞和任选的CD4⁺细胞可以从所述在步骤b)中获得的细胞群体中分选。

[0148] 所述受试者可以患有癌症。在这种情况下,所述至少一种感兴趣的抗原可以选自自由肿瘤细胞表达的抗原例如肿瘤特异性抗原(TSA)或肿瘤相关抗原(TAA)。

[0149] 所述受试者可以患有病原体引起的疾病。在这种情况下,所述至少一种感兴趣的抗原可以选自所述病原体的抗原。

[0150] 优选地,所述受试者患有进行性多灶性脑白质炎(PML)、梅克尔细胞癌或BK病毒相关性肾病。对于患有梅克尔细胞癌的受试者而言,所述至少一种感兴趣的抗原可以选自梅克尔细胞多瘤病毒(MCPyV或MCV)的抗原,特别是选自MCPyV的VP1、VP2、VP3、大T、小T蛋白和/或任何其他蛋白。对于患有BK病毒相关性肾病的受试者而言,所述至少一种感兴趣的抗原可以选自BK病毒(BKV)的抗原,特别是选自BKV的VP1、VP2、VP3、大T、小T蛋白和/或任何其他蛋白。

[0151] 更优选地,所述受试者患有进行性多灶性脑白质炎(PML),并且所述至少一种感兴趣的抗原选自多瘤病毒JC的抗原,优选地选自BKV的VP1、VP2、VP3、大T、小T蛋白和/或任何其他蛋白。例如,由APC呈递的肽、优选为免疫原性肽,可以包括覆盖ICV的VP1、VP2和VP3区的JCV重叠肽合并物。

[0152] 优选地,所述在步骤a)中分选的T_{scm}细胞群体具有进一步包含PD1⁻、TIGIT⁻、LAG3⁻、TIM3⁻、CTLA4⁻和/或CD160⁻,优选地包含PD1⁻、TIGIT⁻、LAG3⁻和/或TIM3⁻,更优选地包含PD1⁻和TIGIT⁻和任选的LAG3⁻和/或TIM3⁻,甚至更优选地包含PD1⁻、TIGIT⁻、LAG3⁻和TIM3⁻的细胞表面表型。

[0153] 优选地,所述在步骤a)中分选的T_{scm}细胞群体具有进一步包含CD3⁺、CD45RO⁻、CXCR3⁺和/或CD122⁺,优选为CD3⁺和CD45RO⁻的细胞表面表型。

[0154] 另一方面,本发明涉及一种用于获得记忆干T细胞(T_{scm}细胞)群体、即高功能性T_{scm}细胞群体的体外方法,所述方法包括从来自受试者的细胞样品中分选具有包含CD4⁺或CD8⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺、PD1⁻和TIGIT⁻的细胞表面表型的T_{scm}细胞群体。

[0155] 优选地,所述T_{scm}细胞群体具有进一步包含CD3⁺、CD45RO⁻、CXCR3⁺和/或CD122⁺,优选为CD3⁺和CD45RO⁻的细胞表面表型。

[0156] 任选地,所述方法可以进一步包括贫化表达一种或几种其他抑制性受体例如LAG3、TIM3、CTLA4或CD160的细胞。具体而言,所述方法可以进一步包括贫化表达LAG3、TIM3、CTLA4和/或CD160,优选为LAG3和/或TIM3,更优选为LAG3和TIM3的细胞。在这种情况下,所述分选的细胞群体可以具有包含下述的细胞表面表型:(i) CD4⁺或CD8⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺、PD1⁻和TIGIT⁻,和(ii) LAG3⁻、TIM3⁻、CTLA4和/或CD160,优选为LAG3⁻和/或TIM3⁻,更优选为LAG3⁻和TIM3⁻。优选地,所述分选的细胞群体具有包含下述的细胞表面表型:(i) CD4⁺或CD8⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺、CD3⁺、CD45RO⁻、PD1⁻和TIGIT⁻,和(ii) LAG3⁻、TIM3⁻、CTLA4和/或CD160,优选为LAG3⁻和/或TIM3⁻,更优选为LAG3⁻和TIM3⁻。

[0157] 任选地,所述方法进一步包括扩增所述选择的Tscm群体。这个步骤可以通过专业技术人员公知的任何方法来进行,例如在饲养细胞例如单核细胞(未装载的单核细胞)和适合的细胞因子存在下培养所述Tscm细胞。

[0158] 上文公开的并涉及本发明的用于获得包含抗原特异性T细胞的细胞群体的方法的步骤a)的所有实施方式也涵盖在这一方面中。

[0159] 另一方面,本发明涉及一种用于获得记忆干T细胞(Tscm细胞)群体、即Tscm细胞群体的体外方法,所述方法包括从来自受试者的细胞样品中分选具有CD4⁺或CD8⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺的细胞表面表型的Tscm细胞群体,并且其中所述受试者患有癌症或病原体引起的疾病,特别是特异性记忆T细胞应答功能受损的癌症或病原体引起的疾病。

[0160] 优选地,所述Tscm细胞群体具有进一步包含CD3⁺、CD45RO⁻、CXCR3⁺和/或CD122⁺,优选为CD3⁺和CD45RO⁻的细胞表面表型。

[0161] 优选地,所述受试者患有由人多瘤病毒引起的疾病。

[0162] 更优选地,所述受试者患有进行性多灶性脑白质炎(PML)、梅克尔细胞癌或BK病毒相关性肾病。

[0163] 在优选实施方式中,所述受试者患有进行性多灶性脑白质炎(PML)。

[0164] 任选地,所述方法可以进一步包括贫化表达一种或几种抑制性受体例如PD1、TIGIT、LAG3、TIM3、CTLA4或CD160的细胞。

[0165] 具体而言,所述方法可以进一步包括贫化表达PD1和/或TIGIT的细胞和任选的表达LAG3、TIM3、CTLA4和/或CD160的细胞,优选为表达PD1和TIGIT的细胞和任选的表达LAG3和/或TIM3的细胞。在这种情况下,所述分选的细胞群体可以具有包含下述的细胞表面表型:(i) CD4⁺或CD8⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺,和(ii) PD1⁻、TIGIT⁻、LAG3⁻、TIM3⁻、CTLA4和/或CD160,优选为PD1⁻、TIGIT⁻、LAG3⁻和/或TIM3⁻,更优选为PD1⁻和TIGIT⁻和任选的LAG3⁻和/或TIM3⁻。优选地,所述分选的细胞群体具有包含下述的细胞表面表型:(i) CD4⁺或CD8⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺、CD3⁺和CD45RO⁻,和(ii) PD1⁻、TIGIT⁻、LAG3⁻、TIM3⁻、CTLA4和/或CD160,优选为PD1⁻、TIGIT⁻、LAG3⁻和/或TIM3⁻,更优选为PD1⁻和TIGIT⁻和任选的LAG3⁻和/或TIM3⁻。

[0166] 更优选地,所述方法可以进一步包括贫化表达PD1、TIGIT、LAG3和TIM3的细胞。在这种情况下,所述分选的细胞群体可以具有包含下述的细胞表面表型:(i) CD4⁺或CD8⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺,和(ii) PD1⁻、TIGIT⁻、LAG3⁻和TIM3⁻。优选地,所述分选的细胞群体具有包含下述的细胞表面表型:(i) CD4⁺或CD8⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺和/或

CD62L⁺、CD3⁺和CD45RO⁻，和(ii)PD1⁻、TIGIT⁻、LAG3⁻和TIM3⁻。

[0167] 任选地，所述方法进一步包括扩增所述选择的Tscm群体。这个步骤可以通过专业技术人员公知的任何方法来进行，例如在饲养细胞例如单核细胞(未装载的单核细胞)和适合的细胞因子存在下培养所述Tscm细胞。

[0168] 上文公开的并涉及本发明的用于获得包含抗原特异性T细胞的细胞群体的方法的步骤a)的所有实施方式也涵盖在这一方面中。

[0169] 另一方面，本发明涉及一种分离的Tscm细胞群体，其通过本发明的用于获得Tscm细胞群体的方法获得或可获得。

[0170] 这个群体可以包含具有包含下述的细胞表面表型的Tscm细胞：

[0171] (i) CD4⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺、PD1⁻和TIGIT⁻；和/或

[0172] (ii) CD8⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺、PD1⁻和TIGIT⁻；和/或

[0173] (iii) CD4⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CD62L⁺、PD1⁻和TIGIT⁻；和/或

[0174] (iv) CD8⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CD62L⁺、PD1⁻和TIGIT⁻；和/或

[0175] (v) CD4⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺、CD62L⁺、PD1⁻和TIGIT⁻；和/或

[0176] (vi) CD8⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺、CD62L⁺、PD1⁻和TIGIT⁻。

[0177] 优选地，这些Tscm细胞具有进一步包含CD3⁺和/或CD45RO⁻，优选为CD3⁺和CD45RO⁻的细胞表面表型。

[0178] 任选地，这些Tscm细胞可以具有进一步包含LAG3⁻、TIM3⁻、CTLA4和/或CD160，优选为LAG3⁻和/或TIM3⁻，更优选为LAG3⁻和TIM3⁻的细胞表面表型。

[0179] 优选地，所述Tscm细胞群体包含至少95%、96%、97%、98%或99% (占总细胞的)的具有包含下述的细胞表面表型的Tscm细胞：CD4⁺或CD8⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺、PD1⁻和TIGIT⁻，优选为CD4⁺或CD8⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺、CD3⁺、CD45RO⁻、PD1⁻和TIGIT⁻，以及任选的LAG3⁻、TIM3⁻、CTLA4和/或CD160，优选为LAG3⁻和/或TIM3⁻，更优选为LAG3⁻和TIM3⁻。

[0180] 更优选地，所述Tscm细胞群体包含至少95%或至少99% (占总细胞的)的具有包含下述的细胞表面表型的Tscm细胞：CD4⁺或CD8⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺、PD1⁻和TIGIT⁻，优选为CD4⁺或CD8⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺、CD3⁺、CD45RO⁻、PD1⁻和TIGIT⁻，以及任选的LAG3⁻、TIM3⁻、CTLA4和/或CD160，优选为LAG3⁻和/或TIM3⁻，更优选为LAG3⁻和TIM3⁻。

[0181] 在优选实施方式中，具有包含CD4⁺或CD8⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺、PD1⁺和/或TIGIT⁺和任选的LAG3⁺、TIM3⁺、CTLA4和/或CD160⁺、优选为LAG3⁺和/或TIM3⁺的细胞表面表型的Tscm细胞，占所述群体中总细胞的少于5%，优选地占所述群体中总细胞的少于2%或1%。

[0182] 在一个特定实施方式中，所述Tscm细胞群体由具有包含下述的细胞表面表型的Tscm细胞组成：CD4⁺或CD8⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺、PD1⁻和TIGIT⁻，优选为CD4⁺或CD8⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺、CD3⁺、CD45RO⁻、PD1⁻和TIGIT⁻，以及任选的LAG3⁻、TIM3⁻、CTLA4⁻和/或CD160⁻，优选为LAG3⁻和/或TIM3⁻，更优选为LAG3⁻和TIM3⁻。

[0183] 上文公开的并涉及本发明的用于获得包含抗原特异性T细胞的细胞群体的方法的步骤a)或涉及本发明的用于获得Tscm细胞群体的方法的所有实施方式也涵盖在这一方面

中。

[0184] 另一方面,本发明还涉及

[0185] -本发明的包含抗原特异性CD8+T细胞和任选的抗原特异性CD4+T细胞的分离的细胞群体(即通过本发明的用于获得包含抗原特异性T细胞的细胞群体的方法获得或可获得),优选为本发明的包含抗原特异性CD8+T细胞和抗原特异性CD4+T细胞的分离的细胞群体,或

[0186] -本发明的分离的Tscm细胞群体(即通过本发明的用于获得Tscm细胞群体的方法获得或可获得),

[0187] 其作为细胞疗法药物。

[0188] 本发明还涉及所述群体,其用于基于细胞的疗法中。

[0189] 上文公开的并涉及本发明的用于获得包含抗原特异性T细胞的细胞群体的方法、本发明的包含抗原特异性CD8+T细胞和任选的抗原特异性CD4+T细胞的分离的细胞群体、本发明的用于获得Tscm细胞群体的方法和本发明的分离的Tscm细胞群体的所有实施方式也涵盖在这一方面中。

[0190] 另一方面,本发明涉及一种药物组合物,其包含

[0191] -本发明的包含抗原特异性CD8+T细胞和任选的抗原特异性CD4+T细胞的分离的细胞群体(即通过本发明的用于获得包含抗原特异性T细胞的细胞群体的方法获得或可获得),优选为本发明的包含抗原特异性CD8+T细胞和抗原特异性CD4+T细胞的分离的细胞群体,或

[0192] -本发明的分离的Tscm细胞群体(即通过本发明的用于获得Tscm细胞群体的方法获得或可获得)。

[0193] 在优选实施方式中,所述药物组合物包含本发明的包含抗原特异性CD8+T细胞和任选的抗原特异性CD4+T细胞的分离的细胞群体(即通过本发明的用于获得包含抗原特异性T细胞的细胞群体的方法获得或可获得)。优选地,所述药物组合物包含本发明的包含抗原特异性CD8+T细胞和抗原特异性CD4+T细胞的分离的细胞群体。

[0194] 根据给药途径,所述药物组合物被配制在药学上可接受的载体和/或赋形剂中。

[0195] 优选地,所述药物组合物被配制成适合用于有需要的受试者中的基于细胞的疗法。

[0196] 所述药物组合物可以根据专业技术人员已知的标准药物实践来配制(参见例如《Remington:药物学科学与实践》(Remington:The Science and Practice of Pharmacy)(第20版),A.R.Gennaro主编,Lippincott Williams&Wilkins,2000和《制药技术百科全书》(Encyclopedia of Pharmaceutical Technology),J.Swarbrick和J.C.Boylan主编,1988-1999,Marcel Dekker,New York)。

[0197] 优选地,所述药物组合物适合于肠胃外给药,优选为静脉内输注。

[0198] 适合于这种给药的药物组合物可以包含本发明的细胞群体与一种或多种药学上可接受的无菌等渗水性或非水性溶液(例如平衡盐溶液(BSS))、分散体、悬液或乳液或可以在即将使用之前重新构建成无菌注射溶液或分散体的无菌粉剂的组合,其可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、溶质或悬浮剂或增稠剂。

[0199] 任选地,所述包含细胞的组合物可以在适合于储存所述细胞的任何温度下冷冻储

存。例如,所述细胞可以在约-150°C或-196°C下冷冻。低温冷冻的细胞可以储存在适合的容器中并进行储存制备,以降低细胞损伤的风险并使细胞在解冻后存活的可能性最大化。

[0200] 待给药的细胞的量可以通过本领域普通技术人员公知的标准程序来确定。为了确定适合的剂量,必须考虑患者的生理数据(例如年龄、大小和体重)以及正在治疗的疾病的类型和严重程度。

[0201] 本发明的药物组合物可以单剂或多剂给药。每个单位剂量可以含有例如 10^5 至 7.10^8 个细胞,优选为 7.10^6 至 7.10^8 个细胞。

[0202] 本发明的药物组合物可以进一步包含额外的活性化合物例如治疗性单克隆抗体以贫化淋巴细胞亚群或阻断参与免疫功能的受体,例如抗PD-1抗体或抗TIGIT抗体。

[0203] 本发明还涉及本发明的药物组合物,其用于有需要的受试者中的基于细胞的疗法。本发明还涉及本发明的药物组合物,其用于治疗癌症或病原体引起的疾病。本发明还涉及一种用于治疗患有癌症或病原体引起的疾病的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者给药治疗有效量的本发明的药物组合物。本发明还涉及本发明的药物组合物在制备用于治疗癌症或病原体引起的疾病的药物中的用途。

[0204] 上文公开的并涉及本发明的用于获得包含抗原特异性T细胞的细胞群体的方法、本发明的包含抗原特异性CD8+T细胞和任选的抗原特异性CD4+T细胞的分离的细胞群体、本发明的用于获得Tscm细胞群体的方法、本发明的分离的Tscm细胞群体和本发明的药物组合物的所有实施方式也涵盖在这一方面中。

[0205] 本文所使用的术语“治疗”是指旨在改善患者健康状况的任何行为,如疾病的治疗、阻止、预防和延缓。在某些实施方式中,该术语是指疾病或与疾病相关的症状的改善或根除。在其他实施方式中,该术语是指使疾病的蔓延或恶化最小化,其由向患有这种疾病的受试者给药一种或多种治疗剂引起。

[0206] 所述有效量可以是治疗或预防有效量。“治疗有效量”是指在必需的剂量和时间长度内有效地实现所需治疗或预防效果的量。具体而言,该术语是指给药到患者的本发明的药物组合物的量,其足以提供针对所靶向的病原体或肿瘤细胞的免疫应答。治疗有效量可以根据各种因素而变,例如待治疗的疾病、待治疗的受试者的生理状况、痛苦的严重程度和给药途径。治疗有效量涵盖了治疗有益效果超过任何毒性或有害效果的量。“预防有效量”是指在必需的剂量和时间长度内有效地实现所需预防效果的量。通常但不是必然的,由于预防剂量在疾病之前或早期阶段用于受试者中,因此预防有效量将小于治疗有效量。用于确定治疗或预防有效量的适合手段和措施是本领域技术人员可获得的。

[0207] 优选地,所述药物组合物通过肠胃外途径,更优选地通过静脉内输注给药。在某些实施方式中,特别是对于局部疾病的治疗而言,所述给药可以是靶向的,以便将细胞递送到受所述疾病影响的器官或组织中。

[0208] 在一个特定实施方式中,本发明的方法包括向所述受试者给药 10^3 至 10^8 个细胞/kg体重、优选地 10^4 至 10^8 个细胞/kg体重、更优选地 10^5 至 10^7 个细胞/kg体重的本发明的分离的细胞群体,优选为本发明的包含抗原特异性CD8+T细胞和任选的抗原特异性CD4+T细胞的分离的细胞群体。

[0209] 更具体而言,本发明的方法可以包括给药本发明的包含抗原特异性CD8+T细胞和任选的抗原特异性CD4+T细胞的分离的细胞群体,特别是1000至10,000,000个抗原特异性

CD8+T细胞/kg体重,优选为5000至1,000,000个抗原特异性CD8+T细胞/kg体重,更优选为5000至100,000个抗原特异性CD8+T细胞/kg体重。在这种情况下,所述待给药的剂量可以通过对本发明的群体或药物组合中存在的CD8+T细胞进行定量来获得。

[0210] 在某些实施方式中,本发明的方法可以包括给药本发明的包含抗原特异性CD8+T细胞和抗原特异性CD4+T细胞的分离的细胞群体。优选地,将给药1000至10,000,000个抗原特异性CD8+T细胞/kg体重、优选地5000至1,000,000个抗原特异性CD8+T细胞/kg体重、更优选地5000至100,000个抗原特异性CD8+T细胞/kg体重,并且将给药1000至10,000,000个抗原特异性CD4+T细胞/kg受试者体重、优选地5000至1,000,000个抗原特异性CD4+T细胞/kg受试者体重、更优选地5000至100,000个抗原特异性CD4+T细胞/kg受试者体重。在这种情况下,所述待给药的剂量可以通过对本发明的群体或药物组合中存在的CD8+T细胞进行定量并任选地对CD4+T细胞进行定量来获得。

[0211] 本发明的药物组合可以作为推注给药或重复给药。给药的频率可以是例如每两周、每月、每三个月或每六个月一次。

[0212] 所述治疗可以是自体疗法(通过将衍生自受试者的细胞给药回同一受试者)或同种异体疗法(通过将衍生自受试者的细胞给药到另一名受试者中)。优选地,所述治疗是自体疗法。

[0213] 如上所述,所述待治疗的受试者、优选为人类,患有癌症或病原体引起的疾病。

[0214] 所述待治疗的癌症或病原体引起的疾病可以是任何感染或癌症,特别是特异性记忆T细胞应答功能受损的任何感染或癌症。

[0215] 所述病原体引起的疾病可以是病毒、细菌或真菌的感染。

[0216] 为了治疗病原体引起的疾病,所述药物组合可以包含本发明的分离的Tscm细胞群体(即通过本发明的用于获得Tscm细胞群体的方法获得或可获得)。这些Tscm细胞的给药是为了增加Tscm细胞库并允许通过接触体内APC来体内激活所述细胞。

[0217] 优选地,为了治疗病原体引起的疾病,所述药物组合包含本发明的包含抗原特异性CD8+T细胞和任选的抗原特异性CD4+T细胞的分离的细胞群体,优选为本发明的包含抗原特异性CD8+T细胞和抗原特异性CD4+T细胞的分离的细胞群体。为了治疗这类疾病,已通过在本发明有待靶向的病原体的至少一种抗原或衍生自所述至少一种抗原的至少一种肽、特别是免疫原性肽的APC存在下培养Tscm细胞,以便获得被激活以识别带有所述至少一种抗原的靶细胞的T细胞群体,来获得本发明的包含抗原特异性CD8+T细胞和任选的抗原特异性CD4+T细胞的细胞群体。

[0218] 优选地,所述病原体引起的疾病是病毒感染,特别是慢性病毒感染。在一个实施方式中,所述病原体引起的疾病是由选自多瘤病毒、优选为人多瘤病毒、人免疫缺陷病毒(HIV)、人嗜T淋巴细胞病毒(HTLV)、乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、疱疹病毒和乳头瘤病毒的病毒引起的病毒感染。优选地,所述病毒选自人多瘤病毒,特别是选自多瘤病毒John Cunningham(JC)、BK病毒(BKV)和梅克尔细胞多瘤病毒(MCPyV或MCV)。

[0219] 在一个特定实施方式中,所述病原体是多瘤病毒JC,并且所述病原体引起的疾病是进行性多灶性脑白质炎(PML)。

[0220] 在另一个特定实施方式中,所述病原体是BK病毒,并且所述病原体引起的疾病是BK病毒相关性肾病。

[0221] 在另一个特定实施方式中,所述病原体是梅克尔细胞多瘤病毒,并且所述病原体引起的疾病是梅克尔癌。

[0222] 在另一个特定实施方式中,所述病原体选自人免疫缺陷病毒(HIV)、人嗜T淋巴细胞病毒(HTLV)、乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、疱疹病毒和乳头瘤病毒,并且所述病原体引起的疾病是慢性或急性病毒感染。

[0223] 为了治疗病原体引起的疾病,可以将本发明的基于细胞的治疗单独地或与其他治疗例如抗生素治疗、抗病毒治疗或抗反转录病毒治疗组合地使用。

[0224] 所述待治疗的疾病也可以是与致癌病毒相关或不相关的实体癌或造血系统癌症。

[0225] 本文所使用的术语“癌症”或“肿瘤”是指存在具有引起癌症的细胞的典型特征例如不受控制的增殖、永生、转移潜力、快速生长和增殖速率以及某些特征性形态特征的细胞。该术语是指任何类型的恶性肿瘤(原发性或转移性)。

[0226] 实体癌的实例包括但不限于乳腺癌、胃癌、食道癌、肉瘤、卵巢癌、子宫内膜癌、膀胱癌、宫颈癌、直肠癌、结肠癌、肺癌或ORL癌以及儿童肿瘤(成神经细胞瘤、多形性成胶质细胞瘤)。

[0227] 造血系统癌症的实例包括但不限于淋巴瘤、白血病、骨髓瘤、精原细胞瘤、霍奇金和恶性血液病。

[0228] 为了治疗这类疾病,所述药物组合物可以包含本发明的包含抗原特异性CD8+T细胞和任选的抗原特异性CD4+T细胞的分离的细胞群体,其通过在装载有至少一种由肿瘤细胞表达的抗原例如肿瘤特异性抗原(TSA)或肿瘤相关抗原(TAA)或衍生自所述至少一种抗原的至少一种肽、特别是免疫原性肽的APC存在下培养Tscm细胞,以便获得被激活以识别带有所述至少一种抗原的靶细胞的T细胞群体来获得。

[0229] 可选地,并且特别是对于没有鉴定到的特异性抗原的疾病而言,所述药物组合物可以包含本发明的分离的Tscm细胞群体(即通过本发明的用于获得Tscm细胞群体的方法获得或可获得)。这些Tscm细胞的给药是为了增加Tscm细胞库,并允许通过接触体内APC来体内激活所述细胞。

[0230] 为了治疗癌症,本发明的基于细胞的治疗可以单独地或与其他治疗例如化学治疗、手术治疗和/或放射治疗组合地使用。

[0231] 在一个特定实施方式中,所述待治疗的疾病是病原体引起的疾病,其中所述病原体是多瘤病毒JC,并且所述疾病是进行性多灶性脑白质炎(PML)。在这个实施方式中,所述待给药的包含抗原特异性T细胞的细胞群体可以通过包括下述步骤的方法获得:

[0232] a) 从来自患有PML的受试者的细胞样品中分选具有包含CD4+或CD8+、CD45RA+、CD95+、CCR7+和/或CD62L+、PD1-和TIGIT-、任选的LAG3-、TIM3-、CTLA4-和/或CD160-、优选为LAG3-和/或TIM3-、更优选为LAG3-和TIM3-的细胞表面表型的Tscm细胞群体,

[0233] b) 在负载有多瘤病毒JC的至少一种抗原或衍生自所述至少一种抗原的至少一种肽、特别是免疫原性肽的抗原呈递细胞存在下,并任选地在IL-7和IL-15或其他刺激性细胞因子存在下,培养所述Tscm细胞群体,和任选地

[0234] c) 回收在步骤b)中获得的细胞,特别是CD8+和/或CD4+细胞,优选为CD8+和CD4+细胞。

[0235] 或者,所述待给药的包含抗原特异性T细胞的细胞群体可以通过包括下述步骤的

方法获得：

[0236] a) 从来自患有PML的受试者的细胞样品中分选具有包含CD4+或CD8+、CD45RA+、CD95+、CCR7+和/或CD62L+的细胞表面表型的Tscm细胞群体，

[0237] b) 在负载有多瘤病毒JC的至少一种抗原或衍生自所述至少一种抗原的至少一种肽、特别是免疫原性肽的抗原呈递细胞存在下，并任选地在IL-7和IL-15或其他刺激性细胞因子存在下，培养所述Tscm细胞群体，和任选地

[0238] c) 回收在步骤b)中获得的细胞，特别是CD8+和/或CD4+细胞，优选为CD8+和CD4+细胞。

[0239] 优选地，在步骤a)中，所述Tscm细胞群体具有进一步包含PD1-、TIGIT-、LAG3-、TIM3-、CTLA4-和/或CD160-、更优选为PD1-、TIGIT-、LAG3-和/或TIM3-的细胞表面表型。

[0240] 优选地，在步骤a)中，所述Tscm细胞群体具有进一步包含CD3+和/或CD45RO-、优选为CD3+和CD45RO-的细胞表面表型。

[0241] 在步骤c)中，可以从所述在步骤b)中获得的细胞群体中分选CD8+细胞和任选的CD4+细胞。

[0242] 优选地，由APC呈递的肽可以包括一种或多种JCV肽、特别是一种或多种JCV免疫原性肽，其来自JCV的VP1、VP2、VP3、大T、小T蛋白和/或任何其他蛋白。具体而言，由APC呈递的肽可以是覆盖这些蛋白中的一者或几者的重叠肽。更具体而言，由APC呈递的肽、优选为免疫原性肽，可以包括覆盖JCV的VP1、VP2和VP3区的重叠肽合并物。

[0243] 如果所述受试者进一步受到反转录病毒例如HIV影响，则步骤b)的培养可以在抗反转录病毒化合物存在下进行。

[0244] 本发明的方面

[0245] 本发明的各个方面和实施方式也在下面列出的条款第1至15号中描述：

[0246] 条款1.一种用于获得包含抗原特异性T细胞的细胞群体的体外方法，所述方法包括：

[0247] a) 从来自受试者的细胞样品中分选具有包含CD4+或CD8+、CD45RA+、CD95+、CCR7+和/或CD62L+、PD1-和TIGIT-的细胞表面表型的Tscm细胞群体，

[0248] b) 在负载有衍生自至少一种感兴趣的抗原的至少一种免疫原性肽的抗原呈递细胞存在下，并任选地在IL-7和IL-15或其他刺激性细胞因子存在下，培养所述Tscm细胞群体，和

[0249] c) 从在步骤b)中获得的细胞群体中分选CD8+细胞和任选的CD4+细胞。

[0250] 条款2.根据条款1所述的方法，其中在步骤a)中分选的Tscm细胞群体具有进一步包含LAG3-、TIM3-、CTLA4-和/或CD160-、优选为LAG3-和/或TIM3-的细胞表面表型。

[0251] 条款3.根据条款1或2所述的方法，其中所述抗原呈递细胞是树突状细胞、单核细胞、外周血单核细胞(PBMC)、Epstein-Barr病毒转化的B淋巴瘤母细胞样细胞系细胞(EBV-BLCL细胞)或人工抗原呈递细胞(AAPC)。

[0252] 条款4.根据条款1至3中任一项所述的方法，其中所述至少一种感兴趣的抗原是病原体抗原、优选为病毒、细菌或真菌抗原，或由肿瘤细胞表达的抗原例如肿瘤特异性抗原(TSA)或肿瘤相关抗原(TAA)。

[0253] 条款5.根据条款1至4中任一项所述的方法，其中所述至少一种感兴趣的抗原是人

多瘤病毒、优选地选自多瘤病毒JC、多瘤病毒MPCyV或多瘤病毒BK的人多瘤病毒的抗原。

[0254] 条款6.根据条款1至5中任一项所述的方法,其中所述至少一种感兴趣的抗原是多瘤病毒JC的抗原。

[0255] 条款7.一种包含抗原特异性CD8⁺T细胞和任选的抗原特异性CD4⁺T细胞的分离的细胞群体,其通过根据条款1至6中任一项所述的方法获得或可获得。

[0256] 条款8.根据条款7所述的分离的细胞群体,其包含Tscm细胞、T效应(Teff)细胞、T中央记忆(Tcm)细胞和T效应记忆(Tem)细胞或由所述细胞组成。

[0257] 条款9.根据条款7或8所述的分离的细胞群体,其作为细胞疗法药物。

[0258] 条款10.一种药物组合物,其包含根据条款9所述的分离的细胞群体和药学上可接受的载体和/或赋形剂。

[0259] 条款11.根据条款7至9中任一项所述的分离的细胞群体或根据条款10所述的药物组合物,其用于治疗癌症或病原体引起的疾病,优选为由人多瘤病毒引起的疾病。

[0260] 条款12.根据条款11所述的用途的分离的细胞群体或药物组合物,其中所述病原体是多瘤病毒JC,并且所述疾病是进行性多灶性脑白质炎(PML)。

[0261] 条款13.根据条款11或12所述的用途的分离的细胞群体或药物组合物,其中所述群体是待治疗的受试者自体的。

[0262] 条款14.一种用于获得记忆干T细胞(Tscm细胞)群体的体外方法,所述方法包括从来自受试者的细胞样品中分选具有包含CD4⁺或CD8⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺、PD1⁻和TIGIT⁻,以及任选的LAG3⁻、TIM3⁻、CTLA4⁻和/或CD160⁻、优选为LAG3⁻和/或TIM3⁻的细胞表面表型的Tscm细胞群体。

[0263] 条款15.一种分离的Tscm细胞群体,其具有包含下述的细胞表面表型:(i) CD4⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺、PD1⁻、TIGIT⁻,以及任选的LAG3⁻和/或TIM3⁻,和/或(ii) CD8⁺、CD45RA⁺、CD95⁺、CCR7⁺和/或CD62L⁺、PD1⁻、TIGIT⁻,以及任选的LAG3⁻、TIM3⁻、CTLA4⁻和/或CD160⁻,优选为LAG3⁻和/或TIM3⁻。

[0264] 在本说明书中引用的所有参考文献均通过引用并入本申请。本发明的其他特征和优点将在下面的实施例中变得更加清楚,所述实施例是为了说明而非限制的目的而给出的。

[0265] 实施例

[0266] 材料和方法

[0267] PBMC分离

[0268] 使用100mL肝素化血液。血液从具有不同免疫背景(包括HIV感染、血液系统恶性肿瘤和使用免疫抑制性生物疗法治疗)的PML患者获得。将血液用NaCl 0,9% (v/v) 稀释,并通过ficoll密度梯度离心分离PBMC。

[0269] 抑制性受体表型确定

[0270] 将1百万个PBMC用下述组合染色:抗CD3抗体、抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗CD45RA抗体、抗CD45RO抗体、抗CCR7抗体、抗CD95抗体、抗PD1抗体、抗TIGIT抗体、抗LAG-3抗体、抗TIM-3抗体。如果需要,可以用CD62L代替CCR7。将细胞在含有1% PFA的PBS1X中固定,并通过流式细胞术(BD LSR Fortessa)进行分析。利用FlowJo软件分析数据。

[0271] 在CD3⁺CD4⁺T细胞和CD3⁺CD8⁺T细胞两者中,细胞亚群定义如下:

- [0272] -幼稚T细胞:CD45RA+CD45RO-CCR7+CD95-
- [0273] -干细胞记忆 (Tscm) :CD45RA+CD45RO-CCR7+CD95+
- [0274] -中央记忆 (Tcm) :CD45RA-CD45RO+CCR7+CD95+
- [0275] -效应记忆 (Tem) :CD45RA-CD45RO+CCR7-CD95+
- [0276] 在每个CD4+和CD8+T细胞亚群中分析PD1、TIGIT、LAG3、TIM3表达。
- [0277] 细胞分选
- [0278] T细胞亚群分离
- [0279] 将PBMC在缓冲液(PBS1X,EDTA 2mM SVF 0,5%)中清洗。利用抗CD14抗体包被的磁珠分离单核细胞。随后利用抗体包被的磁珠在允许贫化非CD3+细胞的负选择级分上分离T细胞。
- [0280] 然后将T细胞在含有0,5% SVF的PBS中清洗。将细胞浓度调整到2千万个细胞/mL,然后将细胞用下述抗体在4°C下染色15分钟:抗CD3抗体、抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗CD45RA抗体、抗CD62L抗体、抗CD95抗体、抗PD1抗体、抗TIGIT抗体。将细胞清洗,在0.22μm滤器上过滤以除去细胞团块,并进行处理以用于细胞分选。
- [0281] 门控策略
- [0282] 首先将细胞在前向和侧向散射上门控,然后在FSC-A和FSC-H上门控以排除双联体,然后如下进行门控:
- [0283] 对抑制性受体呈阴性的CD4 Tscm:CD3+CD4+CD8-CD45RA+CD45RO-CCR7+CD95+PD1-TIGIT-
- [0284] 对抑制性受体呈阳性的CD4 Tscm:CD3+CD4+CD8-CD45RA+CD45RO-CCR7+CD95+和非(PD1-TIGIT-)
- [0285] 对抑制性受体呈阴性的CD8 Tscm:CD3+CD4-CD8+CD45RA+CD45RO-CCR7+CD95+PD1-TIGIT-
- [0286] 对抑制性受体呈阳性的CD8 Tscm:CD3+CD4-CD8+CD45RA+CD45RO-CCR7+CD95+和非(PD1-TIGIT-)
- [0287] 细胞在SVF包被的管上进行分选。然后将细胞重悬浮在培养基中。
- [0288] 细胞培养
- [0289] 在2mL培养基中,每孔接种500万个单核细胞。添加横跨VP1、VP2和VP3蛋白的全序列的交叠的15mer JCV肽(其中11个氨基酸重叠)(每种合并物的终浓度为10μg/mL),在37°C下2小时。然后将单核细胞在培养基中清洗两次。将纯化的Tscm离心并重悬浮在培养基中。将Tscm与500万个装载肽的单核细胞在24孔培养板中培养,总体积为6mL。这被认为是第0天。第2天,向培养物添加rIL-7和rIL-15(各为10ng/ml,终浓度)。每3天取出4mL培养基,并用含有10ng/mL IL-7和IL-15的新鲜培养基代替。在第14天,对细胞进行计数。
- [0290] CD4和CD8细胞计数
- [0291] 将细胞用抗CD3抗体、抗CD4抗体和抗CD8抗体染色。分析活门中CD4和CD8 T细胞的百分率。我们通过用CD4或CD8 T细胞的百分率乘以每个孔中包含的总细胞数来计算每个孔中CD4和CD8 T细胞的数量。通过将第14天的细胞计数除以D0时的细胞计数来计算扩增倍数。
- [0292] 细胞毒性测定

[0293] 将CD14和CD3贫化的细胞解冻,清洗,并与横跨VP1、VP2和VP3蛋白的JCV肽合并物(终浓度:每种合并物10 μ g/mL)温育2小时。在清洗后,将细胞用作靶细胞,以1个靶细胞/10个培养的T细胞的比例重新刺激培养的Tscm。将细胞培养过夜。

[0294] 然后将细胞清洗并用抗CD3抗体、抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗CD45RA抗体、抗CD45RO抗体、抗CCR7抗体、抗CD27抗体、抗CD95抗体染色。然后将细胞清洗,并在+4 $^{\circ}$ C下固定20分钟。将细胞清洗并通透化。添加抗颗粒酶B和抗穿孔素抗体,在+4 $^{\circ}$ C下30分钟,然后进行最后的清洗并通过流式细胞术采集。

[0295] 分析

[0296] 使用FlowJo软件分析结果。利用GraphPad Prism软件进行统计分析并绘图。

[0297] 结果

[0298] 1-与Tcm或Tem相比CD4和CD8 Tscm表达显著更少的抑制性受体

[0299] 我们分析了在来自PML患者的CD4和CD8 T细胞中,Tscm、Tcm和Tem亚群的抑制性受体PD1、TIGIT、LAG3和TIM3的表达。我们显示了在9名患者中,与Tcm或Tem细胞相比CD4和CD8 Tscm表达更少的抑制性受体(参见图1:白色部分对应于不表达抑制性受体的细胞)。

[0300] 在这4种抑制性受体中,PD1和TIGIT表达最多(图2,黑色)。结果表明,基于PD1和TIGIT的负选择可能能够贫化绝大部分表达抑制性受体的细胞。因此,我们分离了对PD1和TIGIT两者呈阴性的Tscm,并分析了它们在体外培养后增殖的能力。

[0301] 2-对PD1和TIGIT抑制性受体呈阴性的Tscm具有更好的细胞增殖

[0302] 我们建立了一种门控策略,以纯化PD1-TIGIT-Tscm细胞(参见图3)。

[0303] 将分选的细胞在装载有JCV-肽的自体单核细胞存在下,在IL-7和IL-15存在下培养14天,以扩增JCV特异性细胞。我们比较了在第14天培养结束时细胞数量的扩增倍数(参见图4)。我们比较了i) Tscm相比于其他记忆细胞(CD45RO阳性细胞,包括Tcm和Tem,无论其抑制性受体表达状态如何)(参见图4a)和ii) 对PD1和TIGIT呈阴性的Tscm相比于对PD1和/或TIGIT呈阳性的Tscm(参见图4b)的增殖能力。

[0304] 这些数据显示,Tscm与其他(分化程度更高的)记忆细胞相比更加高效地扩增(图4A),并且PD1-TIGIT-Tscm与表达PD1和/或TIGIT的Tscm相比更加高效地扩增(图4B)。

[0305] 3-对PD1和TIGIT抑制性受体呈阴性的Tscm显示出更好的细胞毒性潜力

[0306] 然后测试对抑制性受体呈阴性的Tscm在重新刺激后的细胞毒性性能。在扩增阶段结束时(第14天),将装载有JCV肽的自体细胞添加到培养物中过夜。对细胞内穿孔素和颗粒酶B进行染色。确定总CD8T细胞中表达颗粒酶B和穿孔素的CD8 T细胞的百分率(参见图5)。这些数据显示,衍生自对抑制性受体呈阴性的Tscm的效应CD8 T细胞与表达抑制性受体的Tscm或其他(分化程度更高的)记忆CD8 T细胞相比表现出更高的细胞毒性潜力。

[0307] 4-在体外培养后从高功能性Tscm获得的CD8 T细胞保留可在体内使用的高分化能力

[0308] 基于下述组合,我们分析了在培养结束时(第14天)从对PD和TIGIT呈阴性的高功能性干细胞记忆(T_{SCM})或分化程度更高的记忆T细胞(T_{MEM})分化的CD8 T细胞的表型:

[0309] 干细胞记忆(Tscm):CD45RA+CCR7+

[0310] 效应细胞(Teff):CD45RA+CCR7-

[0311] 中央记忆(Tcm):CD45RA-CCR7+

[0312] 效应记忆 (Tem) :CD45RA-CCR7-

[0313] 我们发现Tscm分化成Tcm、Tem和Teff,但大部分保留Tscm表型(参见图6)。

[0314] 结论

[0315] 总之,这些结果证实:

[0316] i) 在来自不同免疫背景的PML患者中,Tscm细胞与分化程度更高的记忆细胞相比表达更低量的抑制性受体。这些抑制性受体主要包括PD-1和TIGIT;

[0317] ii) 总Tscm与传统的记忆T细胞(包括Tcm和Tem)相比扩增得更好;

[0318] iii) 基于PD1和TIGIT排除的选择允许贫化绝大部分表达抑制性受体的Tscm;

[0319] iv) 与PD1+和/或TIGIT+Tscm以及与分化程度更高的记忆细胞相比,那些PD1-TIGIT-Tscm显示出更好的增殖能力;

[0320] v) 与PD1+和/或TIGIT+Tscm以及与分化程度更高的记忆细胞相比,PD1-TIGIT-Tscm显示出更好的细胞毒性能力;并且

[0321] vi) PD1-TIGIT-Tscm在体外高效地分化成分化程度更高的记忆细胞,包括效应细胞,但大部分保留Tscm表型。这可以允许在体内经历进一步的分化循环,从而延长治疗效果。

[0322] 总之,这些数据显示,PD1-TIGIT-Tscm能够在PML患者中产生有效且持续的针对JCV的免疫应答。

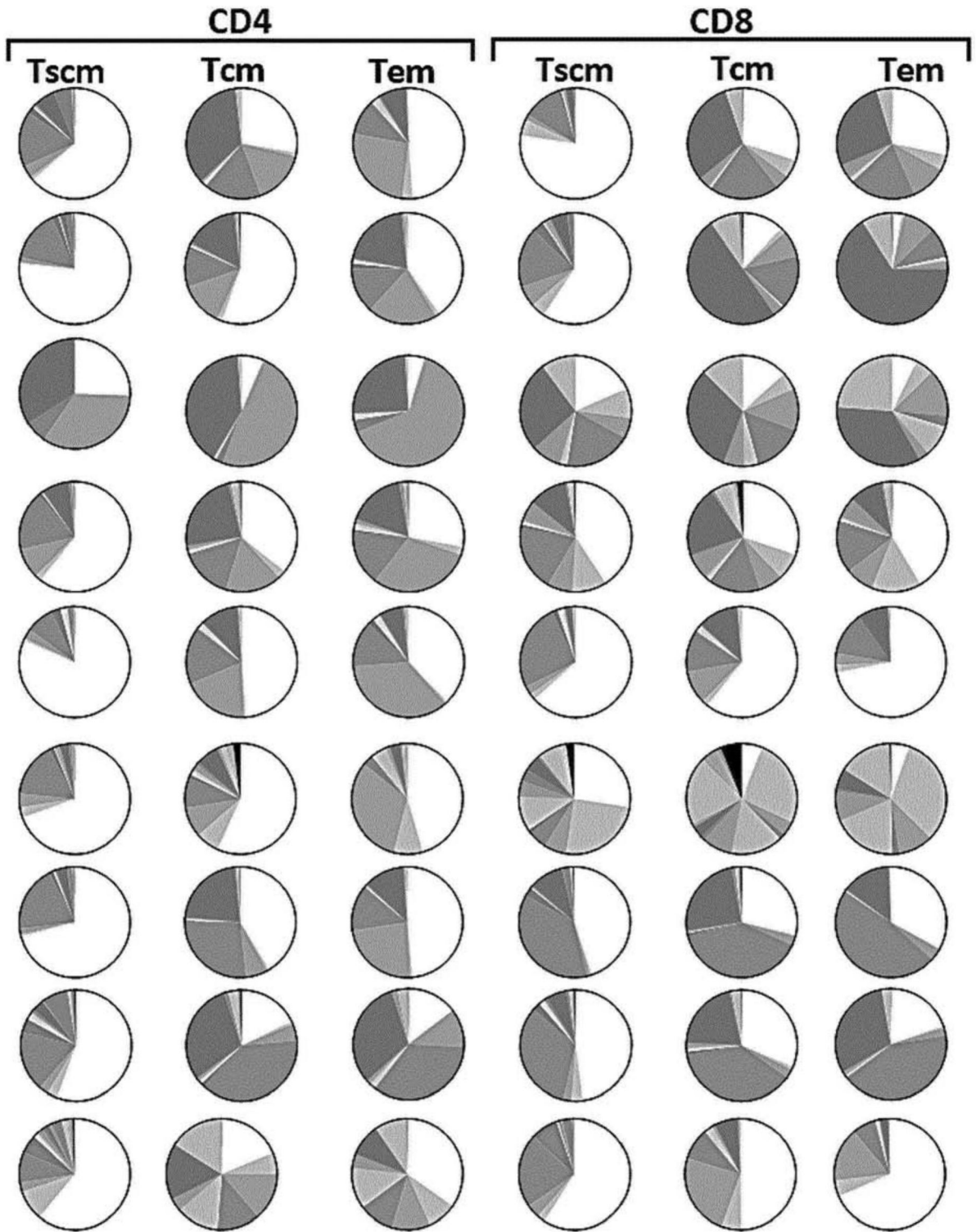


图1

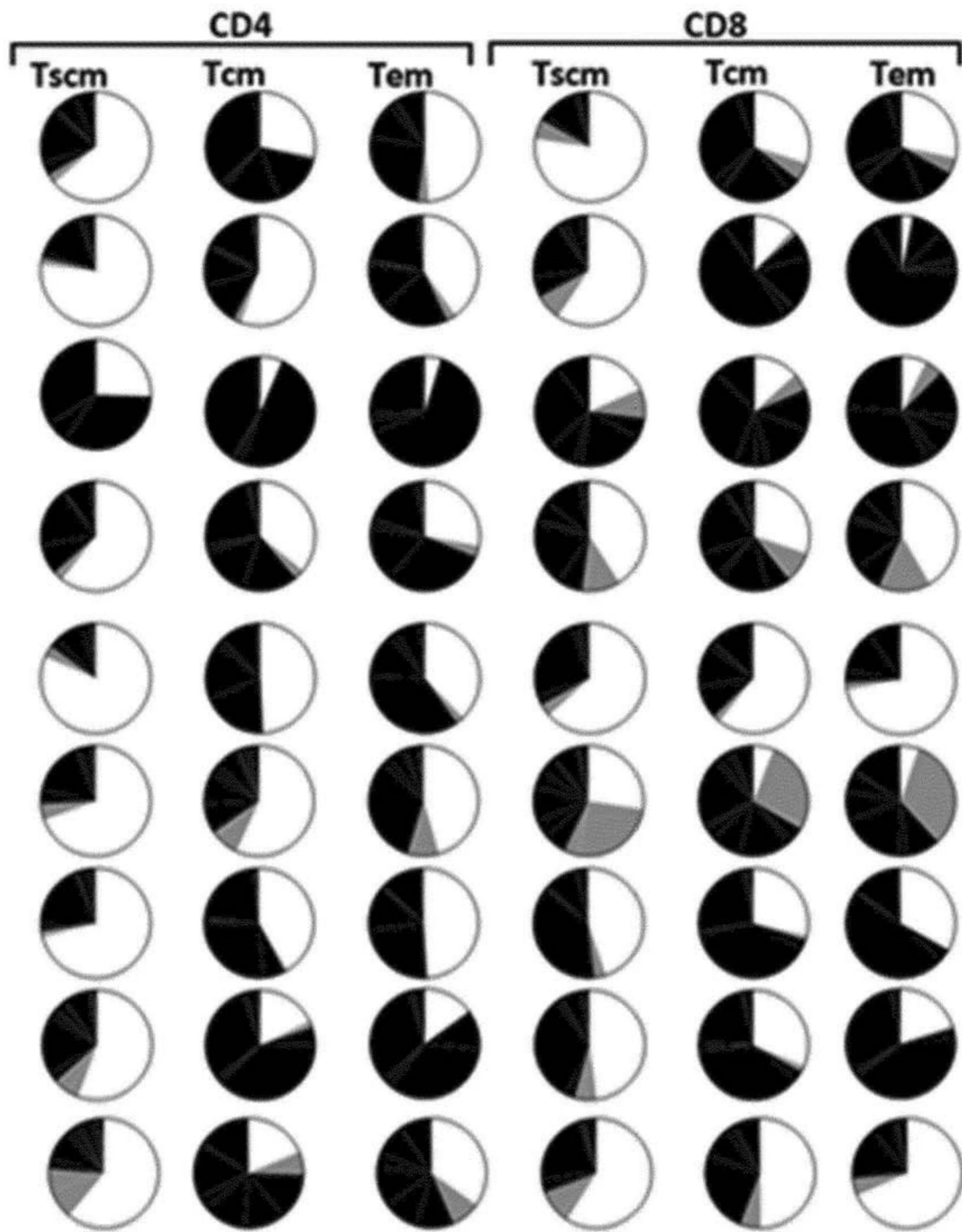


图2

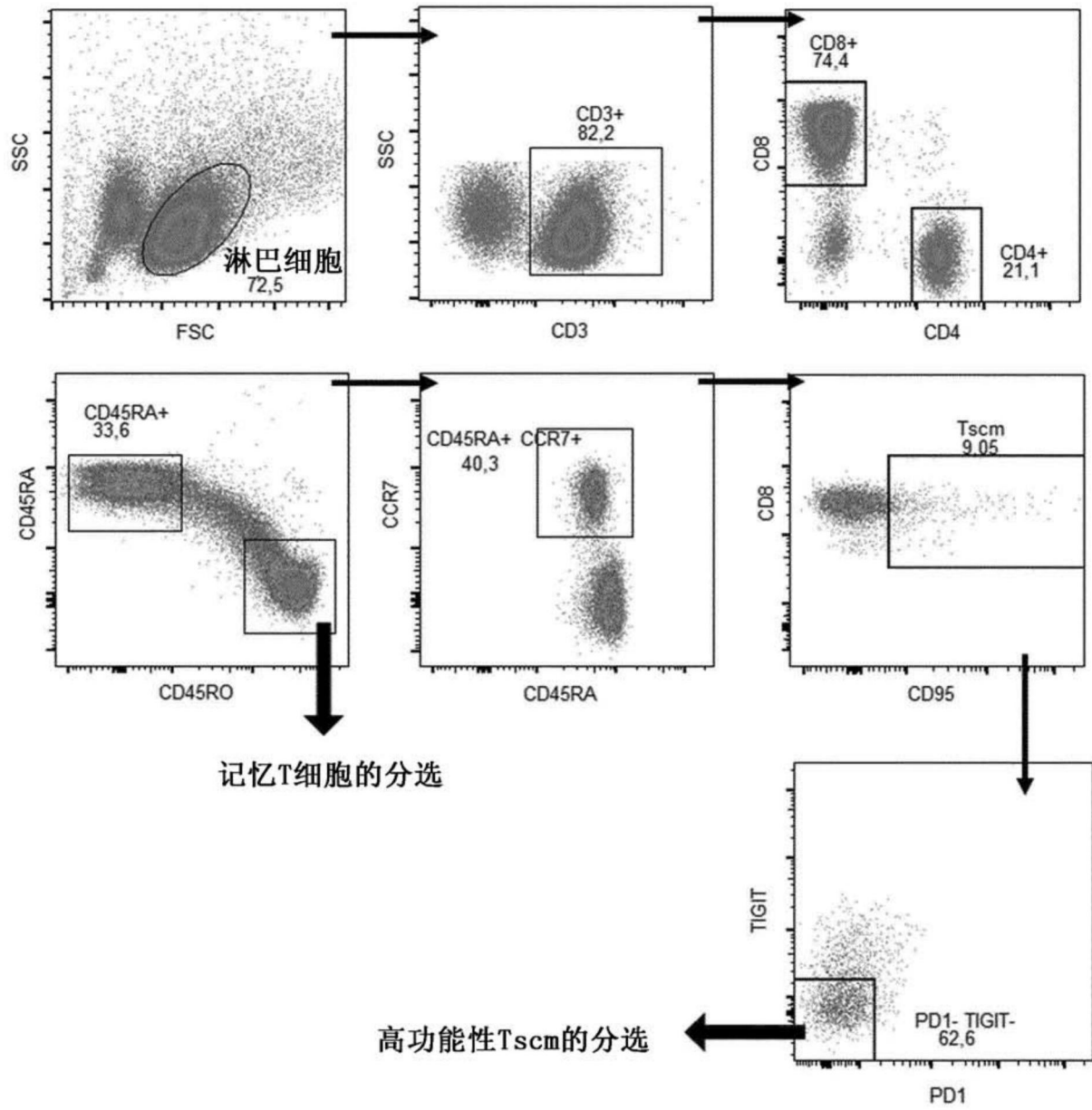


图3

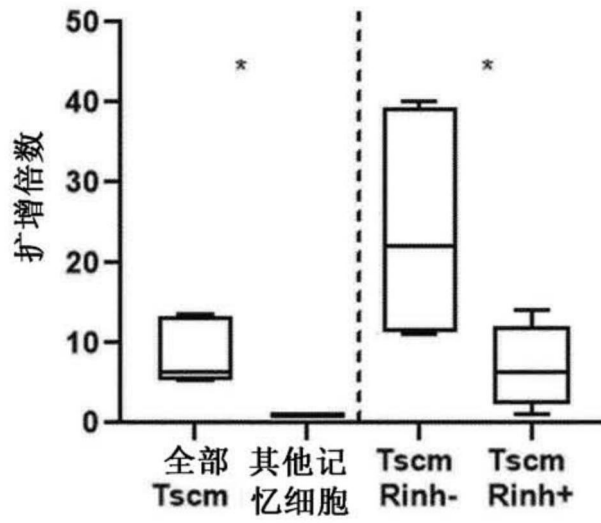


图4

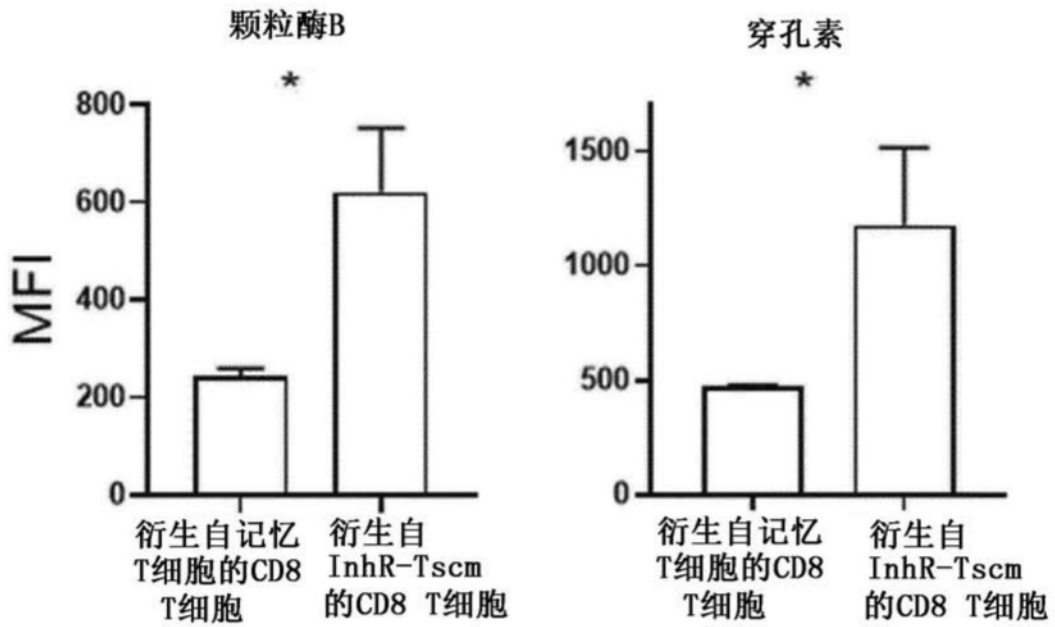


图5

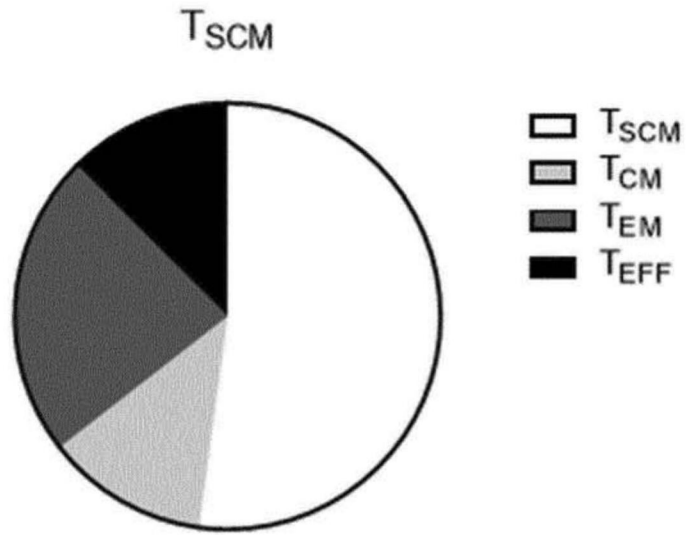


图6