



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118541160 A

(43) 申请公布日 2024.08.23

(21) 申请号 202280080879.8

(22) 申请日 2022.10.06

(30) 优先权数据

63/253,058 2021.10.06 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.06.05

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/077721 2022.10.06

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/060212 EN 2023.04.13

(71) 申请人 赛立维公司

地址 美国德克萨斯州

(72) 发明人 N·杜马蒂奥兹

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

专利代理师 刘晓杰 武晶晶

(51) Int.Cl.

A61K 35/17 (2006.01)

C12N 5/078 (2006.01)

C12N 5/0783 (2006.01)

权利要求书2页 说明书50页 附图2页

(54) 发明名称

通过促进优越的适应性免疫细胞群体增强
过继细胞转移

(57) 摘要

本公开涉及线粒体增强的免疫细胞、它们的
组合物以及治疗用途。

1. 一种用分离的可存活线粒体处理的免疫细胞, 诸如人类免疫细胞, 所述可存活线粒体的量有效地:

相对于未用分离的可存活线粒体处理的免疫细胞例如免疫细胞 (i) 增强适应性免疫细胞的存活, (ii) 促进适应性免疫细胞的选择, 或 (iii) 其组合。

2. 一种包含外源性线粒体诸如外源性分离的可存活线粒体的免疫细胞, 诸如人类免疫细胞, 所述外源性线粒体的量有效地:

相对于不包含外源性分离的可存活线粒体的免疫细胞例如人类适应性免疫细胞 (i) 增强适应性免疫细胞的存活, (ii) 促进适应性免疫细胞的选择, 或 (iii) 其组合。

3. 根据权利要求1或2所述的免疫细胞, 其中所述免疫细胞是淋巴细胞, 诸如B细胞或T细胞, 优选T细胞, 诸如CD8免疫T细胞或CD4免疫T细胞。

4. 根据权利要求1或2所述的免疫细胞, 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。

5. 根据权利要求1或2所述的免疫细胞, 其中所述免疫细胞是体外或离体产生的。

6. 根据权利要求1或2所述的适应性免疫细胞, 其中所述适应性免疫细胞是记忆T细胞, 诸如人类记忆T细胞。

7. 根据权利要求1或2所述的适应性免疫细胞, 其中所述适应性免疫细胞是效应细胞, 诸如效应CD8 T细胞或效应CD4 T细胞, 优选人类效应CD4 T细胞或CD8 T细胞。

8. 根据权利要求1或2所述的适应性免疫细胞, 其中所述适应性免疫细胞是干细胞样记忆细胞或记忆样细胞, 诸如CD8记忆样细胞。

9. 根据权利要求1或2所述的适应性免疫细胞, 其中所述适应性免疫细胞是幼稚细胞。

10. 根据权利要求1或2所述的适应性免疫细胞, 其中所述适应性免疫细胞是组织驻留记忆细胞 (Trm细胞)。

11. 根据权利要求1、2或6中任一项所述的适应性免疫细胞, 其中所述适应性免疫细胞是记忆CD8 T细胞。

12. 根据权利要求1、2、6或11中任一项所述的适应性免疫细胞, 其中所述适应性免疫细胞是效应记忆CD8 T细胞、中枢记忆CD8 T细胞, 或其组合。

13. 根据权利要求1或2所述的适应性免疫细胞, 其中所述适应性免疫细胞是调节性 (Treg) T细胞, 诸如Treg CD4 T细胞。

14. 一种包含根据前述权利要求中任一项所述的免疫细胞诸如人类免疫细胞例如人类适应性免疫细胞的群体。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的免疫细胞, 其中所述线粒体源自真核细胞线粒体。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的免疫细胞, 其中所述线粒体源自人类细胞系。

17. 根据前述权利要求中任一项所述的免疫细胞, 其中所述线粒体源自健康的志愿者。

18. 根据前述权利要求中任一项所述的免疫细胞, 其中所述线粒体源自患者, 诸如癌症患者。

19. 根据前述权利要求中任一项所述的免疫细胞, 其中所述线粒体源自患者, 诸如患有自身免疫性疾病的患者。

20. 根据前述权利要求中任一项所述的免疫细胞, 其中所述线粒体是自体的或同种异

体的。

21. 根据前述权利要求中任一项所述的免疫细胞,其中所述线粒体是基因工程化线粒体,或通过脂质体封装的或与特定药剂偶联的线粒体。

22. 根据前述权利要求中任一项所述的免疫细胞,其中线粒体的所述有效量在0.0001ng和2.5ng之间,例如0.001ng和2.0ng之间。

23. 一种组合物,其包含根据前述权利要求中任一项所述的免疫细胞例如适应性免疫细胞或免疫细胞群体,和至少药学上可接受的载剂。

24. 根据权利要求22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类免疫细胞中。

25. 根据权利要求23或24所述的组合物,其中所述组合物被配制为固体或液体形式。

26. 一种根据前述权利要求中任一项所述 (i) 增强免疫细胞的存活, (ii) 促进免疫细胞的选择,或其组合的方法,所述方法包括步骤:

(a) 在体外在具有能够驱动适应性细胞(诸如T细胞)活化的特异性活化受体激动剂抗体的无细胞培养基中活化所述免疫细胞;和

(b) 将所述免疫细胞暴露于包含分离的可存活线粒体的药物组合物至少3天,诸如至少5天。

27. 一种根据前述权利要求中任一项所述 (i) 增强免疫细胞的存活, (ii) 促进免疫细胞的选择,或其组合的方法,包括步骤:

(a) 任选地在诸如IL-2的重组白细胞介素的存在下,在体外在具有涂覆的CD3/CD28珠的无细胞培养基中活化所述免疫细胞;和

(b) 将所述免疫细胞暴露于包含分离的可存活线粒体的药物组合物至少3天,诸如至少5天。

28. 根据前述权利要求中任一项所述的免疫细胞,例如人类免疫细胞,诸如人类T细胞,用于治疗有需要的对象的方法中,包括向对所述对象施用前述权利要求中任一项所述的免疫细胞或免疫细胞群体。

29. 根据前述权利要求中任一项所述的免疫细胞,例如人类免疫细胞,诸如人类T细胞,用于治疗癌症、传染病、炎症性疾病或自身免疫性疾病的方法中。

通过促进优越的适应性免疫细胞群体增强过继细胞转移

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2021年10月6日提交的美国临时申请号63/253,058的权益,该申请通过引用整体并入,用于所有目的。

技术领域

[0003] 本发明涉及生物医学领域,并且特别是可用于治疗癌症、传染病和自身免疫性疾病的方法。具体而言,本发明针对使用线粒体增强的免疫细胞(诸如但不限于,线粒体增强的适应性免疫细胞)的治疗性治疗。本发明涉及线粒体增强的免疫细胞,用于治疗癌症、传染病和自身免疫性疾病。具体而言,本发明的免疫细胞是免疫细胞,诸如但不限于,T免疫细胞或体外繁殖的T细胞。更具体地,本发明的免疫细胞是免疫细胞,诸如但不限于,在血液中循环的CD8免疫细胞、肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)、工程化T细胞、嵌合抗原受体(CAR)T细胞、在血液中循环的CD4免疫细胞、免疫抑制调节性T细胞(Treg细胞)、效应T细胞、记忆T细胞、 α - β T细胞($\alpha\beta$ T细胞)和 γ - δ T细胞($\gamma\delta$ T细胞)。线粒体增强的免疫细胞具有改善的持久性、更高的存活和/或分化能力。更具体地,本发明涉及线粒体增强的记忆T细胞(例如,用外源性线粒体移植的记忆T细胞),其具有改善的持久性、更高的存活能力和/或更高的分化能力。本发明的线粒体增强的记忆T细胞在过继细胞转移治疗(ACT)中显示出增加的疗效,这是由于比如大群体中高度持久性细胞的比例的增强。本发明进一步提供了线粒体增强的免疫抑制调节性T细胞(Treg)(例如,用外源性线粒体移植的Treg CD4 T细胞),其具有改善的存活能力和/或更高的分化能力以用于治疗自身免疫性疾病和移植的器官或组织排斥。本发明针对包含线粒体增强的免疫细胞的药物组合物。本发明涉及增加细胞技术的疗效,该细胞技术导致生成更高比例的免疫T细胞或在某些分化的阶段生成更高比例的免疫T细胞,其具有改善的持久性、更高的存活能力和/或更高的分化能力。

背景技术

[0004] 癌症和自身免疫有共同的起源,但施加着作用方向相反的强大的力量。这两种疾病都是由身体的免疫系统的失败引起的。癌症通常因为免疫系统未能识别和/或攻击有缺陷的和/或转化的细胞,使细胞分裂和生长而发展。相反地,当免疫系统错误地攻击了健康的细胞时,则发生自身免疫——导致诸如结肠炎和狼疮的疾病的错误免疫应答。通过免疫系统几乎可以靶向身体的任何部位,包括心脏、脑、神经、肌肉、结缔组织、皮肤、眼睛、肺、肾脏、消化道、血细胞和血管。

[0005] 癌症是发达国家的主要死因之一,2021年美国估计有190万例诊断的新癌症病例和608,570例癌症死亡(<https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2021/cancer-facts-and-figures-2021.pdf>)。根据世界卫生组织(WHO)的数据,癌症是世界范围的主要死因,2020年造成近1000万例死亡(Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M等人 Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon: International Agency

for Research on Cancer;2020 (<https://gco.iarc.fr/today>,2021年2月访问)。2020年最常见的(就新癌症病例而言)是:乳腺癌(226万例);肺癌(221万例);结肠和直肠癌(193万例);前列腺癌(141万例);皮肤癌(非黑色素瘤)(120万例);和胃癌(109万例)。2020年最常见的癌症死亡原因是:肺癌(180万例死亡);结肠和直肠癌(935'000例死亡);肝脏癌(830'000例死亡);胃癌(769'000例死亡);和乳腺癌(685'000例死亡)。

[0006] 癌症是由有缺陷的细胞引起的,其获得了突变,使它们能够绕过正常的细胞周期检查点。随时间推移,突变细胞的过度生长造成由各种细胞类型组成的异质性肿瘤肿块。一旦获得转移的标志,诸如运动和侵袭能力、调控环境以有利于癌细胞存活的能力,癌细胞可以在体内扩散,造成远离原始肿瘤床的远处转移。

[0007] 免疫细胞是检测、控制和根除癌细胞和病原体至关重要的参与者。T淋巴细胞表面上的T细胞受体(TCR)识别主要组织相容性复合体(MHC)分子上存在的抗原肽片段。在急性感染期间,在MHC/抗原呈递的背景下,特异性针对入侵病原体的幼稚T细胞通过它们的TCR被活化,被克隆扩增,并产生效应细胞。通过直接杀伤,效应细胞介导从体内移除受感染的细胞。病原体清除后,启动的免疫应答收缩,导致大多数活化CD8 T细胞的凋亡。一部分抗原特异性T细胞进一步分化以生成记忆T细胞池,向个体提供长期保护(图1)。值得注意的是,记忆细胞具有明显的特点,诸如增强的持久性、自我更新能力和再次感染所遇到过的病原体时的有效的回忆能力。在第二次感染完全相同的病原体的情况下,相比于幼稚T细胞,通过记忆细胞触发的启动的免疫应答将发生得更快、更强(Vanja Lazarevic等人,“T-bet:a bridge between innate and adaptive immunity”*Nat Rev Immunol.*2013Nov;13(11):777-789)。

[0008] 有趣的是,已经显示出幼稚、效应和记忆CD8 T细胞的代谢是不同的。幼稚CD8 T细胞是休眠的,主要依靠氧化磷酸化(OXPHOS)来供应它们的能量需求。一旦活化,效应CD8 T细胞有利于糖酵解,以维持它们的效应功能和克隆扩增。实际上,葡萄糖分子的分解参与了至关重要的构建块的生成,以满足它们的高度增殖的需求。另一方面,记忆CD8T细胞依靠OXPHOS和脂肪酸氧化(FAO)。示出了记忆细胞具有比幼稚T细胞更多的线粒体质量。记忆细胞依赖于线粒体来维持其ATP的产生,给予它们生物能量优势。事实上,记忆CD8 T细胞表现出增强的呼吸储备,以备用呼吸能力(SRC)来测量(Gerritje J.W.van der Windt等人;*Immunity*,2012January 27;36(1):68-78;Guillermo O.Rangel Rivera等人,*Front.Immunol.*,18March 2021|<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.645242>)。

[0009] 记忆CD8 T细胞的不同亚群具有互补作用或定位。除其他外:干细胞样记忆、效应记忆、中枢记忆和组织驻留记忆可以被突出显示。干细胞样记忆和中枢记忆T细胞都表达CD62L,一种介导粘附并使归巢到次级淋巴组织的L选择蛋白。这种进入淋巴结(LN)的独特能力导致了对在它们的表面携带各种抗原的抗原呈递细胞(APC)的优化筛选,以及通过中枢记忆细胞诱导的强烈回忆应答。效应记忆T细胞对血流的循环受限,并在再次感染所遇到过的病原体时表现出直接的细胞毒性的功能和效应功能。相反地,组织驻留记忆细胞不循环,而是定位于诸如皮肤、肺和肠道的外周组织中,以有效地阻断在不同的进入部位的病原体。

[0010] 免疫系统被驯育为容忍并不针对自我做出反应,因此,可能无法以与入侵病原体相同的强度检测到癌细胞。在癌症患者中,T细胞通常对同基因转化的细胞建立较差的应答

或没有应答, (i) 因为它们的抗原性较差, (ii) 转化细胞不是表型外来的, 以及 (iii) 由于通常与癌症有关的广泛免疫抑制条件 (Medler 等人, 2015, "Immune response to cancer therapy: mounting an effective antitumor response and mechanisms of resistance", *Trends Cancer* 1:66-75)。

[0011] 有趣的是, 通过检查点阻断治疗来靶向某些免疫抑制机制, 增强了针对癌症的启动的免疫应答。此外, 在肿瘤部位, 癌细胞与浸润性免疫细胞之间可以存在代谢竞争。经常观察到癌细胞对糖酵解的高度依赖, 导致来自肿瘤内环境的葡萄糖 (一种燃料来源) 减少。无法参与效应 CD8T 细胞的糖酵解对它们的效应功能和杀伤能力具有巨大的负面影响。

[0012] 基于 T 细胞的免疫治疗使用癌症患者的免疫系统来靶向其自身的肿瘤肿块。直接从肿瘤中提取免疫细胞, 诸如肿瘤浸润性淋巴细胞 (TIL), 或从血液中提取免疫细胞, 诸如外周血单核细胞 (PBMC)。可以通过细胞培养方法和经验证的杀伤能力来选择具有正确的抗肿瘤特异性的 TIL。可以修饰从血液中提取的 CD8 T 细胞以获得肿瘤反应性, 诸如通过嵌合抗原受体 (CAR)。在重新输注至患者之前诸如在高剂量的 IL-2 存在下在体外培育 TIL 或 CAR-T 细胞, 从而促进强烈扩增, 该方法被称为过继细胞转移 (ACT) (Rohaani, M.W., Wilgenhof, S. & Haanen, J.B.A.G., "Adoptive cellular therapies: the current landscape", *Virchows Arch* 474, 449-461 (2019))。与诸如化疗、放疗和手术的常规治疗相比, ACT 的一个优势在于其高度特异性。此外, 在一些癌症中, 诸如黑色素瘤和肺癌, 具有自体 TIL 的 ACT 代表了治疗患者的最有效的途径。接受常规化疗的晚期黑色素瘤患者的总存活率为 10%, 而在 ACT 后, 总存活率增加至 41% (Larkin, James 等人 "Overall Survival in Patients With Advanced Melanoma Who Received Nivolumab Versus Investigator's Choice Chemotherapy in CheckMate 037: A Randomized, Controlled, Open-Label Phase III Trial." *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* vol.36, 4 (2018): 383-390. doi:10.1200/JCO.2016.71.8023; Dafni, U 等人 "Efficacy of adoptive therapy with tumor-infiltrating lymphocytes and recombinant interleukin-2 in advanced cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis." *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology* vol.30, 12 (2019): 1902-1913. doi:10.1093/annonc/mdz398)。同样, 靶向 CD19 表达的 CAR 治疗在受复发的 B 细胞急性淋巴细胞白血病 (B-ALL)、慢性淋巴细胞白血病 (B-CLL) 和非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 影响的儿童和成人中显示出一致的高度抗肿瘤疗效, 在不同的临床试验中, 完全缓解的百分比从 70% 至 94% 不等 (Wang 等人, 2017, "New development in CAR-T cell therapy", *J Hematol Oncol* 10:53; Morotti, M., Albukhari, A., Alsaadi, A. 等人, "Promises and challenges of adoptive T-cell therapies for solid tumours", *Br J Cancer* 124, 1759-1776 (2021))。ACT 尚未实现其治疗广泛种类的疾病的潜力, 包括癌症、传染疾病、自身免疫性疾病、炎症性疾病和免疫缺陷。然而, 在 ACT 治疗方面仍有障碍需要克服。没有表现出肿瘤浸润性 T 细胞或肿瘤浸润 T 细胞的量过低的患者将不会从这种疗法中受益。可以将肿瘤分为 "热" 肿瘤, 即 T 细胞浸润水平升高的肿瘤和 "冷" 肿瘤, 即 T 细胞浸润水平低的肿瘤。对于在重新输注前收集足够量的 CD8 T 细胞进行体外扩增, "热" 肿瘤是优选的。此外, 培养的 TIL 应该保持效应功能、增殖能力和自我更新能力, 以在 ACT 时诱导强烈的抗肿瘤应答。因此, 输注终末分化的 TIL, 诸如具有限制性

增殖和自我更新能力的细胞,在患者的临床结果方面有害。重要的是,表现出记忆样表型的TIL的最佳选择将改善转移至患者后的抗肿瘤应答。靶向提取的TIL中的一个亚群的当前方法非常耗时,可以对细胞产生代谢攻击,并且可能需要表面荧光标记,诸如通过流式细胞术来分选。

[0013] 尽管CAR-T细胞针对血液性恶性肿瘤显示出高效力,通过CAR-T细胞引发的强烈抗肿瘤应答通常与毒性(即严重的细胞因子释放综合征和神经毒性)有关,而具有CAR-T增殖和持久性较差的患者示出了持久缓解的比率的减少。综上所述,以简单且有效的方式来选择记忆样TIL或CAR-T细胞将有可能通过改善介导的应答的持续时间,对临床结果大有裨益。

[0014] 当免疫系统错误地攻击了健康的细胞时,发生自身免疫——导致诸如结肠炎和狼疮的疾病的错误免疫应答。通过免疫系统几乎可以靶向身体的任何部位,包括心脏、脑、神经、肌肉、结缔组织、皮肤、眼睛、肺、肾脏、消化道、血细胞和血管。存在广泛的自身免疫性疾病,因为它们根据免疫系统所针对的身体部位而不同。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、炎症性肠道疾病(IBS)、艾迪生疾病、格雷夫氏疾病、干燥综合征、牛皮癣和乳糜泻。迄今为止,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,使其成为美国的第三最常见的疾病类型。事实上,自身免疫性疾病影响了5%至10%的全球人口,尤其是女性,她们患有自身免疫性疾病的可能性是男性的二至十倍。虽然大部分疾病可以发生在任何年龄,一些疾病主要发生在童年和青春期(例如,1型糖尿病)、中年期(例如,重症肌无力、多发性硬化症)或在老年人(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)。

[0015] 调节性T细胞(Treg)属于CD4⁺ T细胞小室,并且是控制、减少或治疗自身免疫性疾病至关重要的参与者。它们依靠线粒体来维持它们的功能和能量需要。Treg致力于平衡启动的免疫应答,以允许对入侵的病原体做出适当的应答,并且避免或限制免疫系统靶向的组织损伤。它们(i)通过直接与免疫细胞结合,(ii)通过产生抗炎性细胞因子,诸如IL-10和IL-35,以及(iii)通过以更高亲和力竞争存活信号IL-2,来介导其抑制免疫应答的作用。多克隆Treg治疗使用与ACT相同的原理,因此在向患者重新输注前,提取的自体Treg在体外扩增,目的是恢复启动的免疫应答的平衡(Peter J.Eggenhuizen等人,“Treg Enhancing Therapies to Treat Autoimmune Diseases”,*Int J Mol Sci.*2020Oct;21(19):7015)。

[0016] 因此,本发明的技术问题是提供新的治疗方法和治疗策略,用于从血液中选择持久性或记忆样TIL和CD8⁺ T细胞或从CD4⁺小室中选择Treg。本发明目的是增加CD8⁺ T细胞在体外扩增后具有更高存活能力的比例,以在ACT或Treg的背景下被选择用于Treg治疗。通过提供权利要求中表征的实施方案来实现所述技术问题的解决方案。

发明内容

[0017] 本公开涉及线粒体增强的免疫细胞、它们的组合物以及治疗用途。

[0018] 本公开提供了免疫细胞,例如人类免疫细胞,其用分离的可存活线粒体处理或包含外源性分离的可存活线粒体,其量有效地相对于未用分离的可存活线粒体处理或不包含

外源性可存活线粒体的适应性免疫细胞,例如人类适应性免疫细胞提高适应性免疫细胞的存活和/或促进适应性免疫细胞的选择,该适应性免疫细胞例如人类适应性免疫细胞,诸如B细胞或T细胞,优选T细胞,诸如CD4免疫T细胞或CD8免疫T细胞。在一些方面,本公开的线粒体增强记忆CD8⁺ T细胞的存活并且/或促进其选择,该记忆CD8⁺ T细胞诸如中枢记忆CD8⁺ T细胞和效应记忆CD8⁺ T细胞。在一些其他方面,可存活线粒体的量有效地增强调节性T(Treg)细胞的存活并且/或促进其选择,该调节性T(Treg)细胞诸如Treg CD4细胞。

[0019] 本文提供了包含免疫细胞的组合物或用分离的可存活线粒体处理的免疫细胞的组合物或包含外源性分离的可存活线粒体的组合物。组合物可以进一步包含一种或多种药学上可接受的载剂。

[0020] 本文还提供了增强免疫细胞或免疫细胞群体(诸如适应性免疫细胞,例如人类T细胞)的存活并且/或促进其选择的方法,包括步骤:(a)在体外在具有能够驱动适应性细胞(诸如T细胞)活化的特异性活化受体激动剂抗体的无细胞培养基中活化免疫细胞;(b)将免疫细胞暴露于包含分离的可存活线粒体的药物组合物至少3天。在一些方面,增强免疫细胞或免疫细胞群体的存活并且/或促进其选择的方法可选地包括步骤(a)任选地在诸如IL-2的重组白细胞介素的存在下,在体外在具有涂覆的CD3/CD28珠的无细胞培养基中活化免疫细胞;(b)将免疫细胞暴露于包含分离的可存活线粒体的药物组合物至少3天。

[0021] 本文还提供了免疫细胞,例如人类免疫细胞,诸如人类T细胞或免疫细胞群体,其用分离的可存活线粒体处理或包含外源性分离的可存活线粒体,用于治疗有需要的对象的方法中。

附图说明

[0022] 图1急性感染时启动的免疫应答。

[0023] 图2用于从组织或培养的细胞中分离线粒体的一个示例性方案的示意图。

[0024] 图3A线粒体移植后第9天,中枢和效应记忆CD8⁺ T细胞的增加的比例。线粒体移植时中枢记忆CD8⁺ T细胞的倍数转变比例。如使用QubitTM蛋白质测定法测量的,在活化后第12天,每100万个CD8⁺ T细胞中,来自大群体的CD8⁺ T细胞被移植外源性线粒体,剂量水平为30 μ g和100 μ g的线粒体。移植后第9天,对CD8⁺ T细胞进行染色,使用FACSLyric(BD Biosciences)通过流式细胞术进行分析,并分为中枢记忆(CD62L⁺、CD45RA⁻、CD45RO⁺)和效应记忆(CD62L⁻、CD45RA⁻、CD45RO⁺)。

[0025] 数据代表了三个独立实验,表示为三个供体的平均值 \pm SD。 $*p<0.05$; $**p<0.01$; $***p<0.001$; $****p<0.0001$ 。

[0026] 图3B线粒体移植后第9天,中枢和效应记忆CD8⁺ T细胞的增加的比例。线粒体移植时效应记忆CD8⁺ T细胞的倍数转变比例。如使用QubitTM蛋白质测定法测量的,在活化后第12天,每100万个CD8⁺ T细胞中,来自大群体的CD8⁺ T细胞被移植外源性线粒体,剂量水平为30 μ g和100 μ g的线粒体。移植后第9天,对CD8⁺ T细胞进行染色,使用FACSLyric(BD Biosciences)通过流式细胞术进行分析,并分为中枢记忆(CD62L⁺、CD45RA⁻、CD45RO⁺)和效应记忆(CD62L⁻、CD45RA⁻、CD45RO⁺)。

[0027] 数据代表了三个独立实验,表示为三个供体的平均值 \pm SD。 $*p<0.05$; $**p<0.01$; $***p<0.001$; $****p<0.0001$ 。

具体实施方式

[0028] 除非另有定义,否则本文所用的所有专业术语、符号和其他科学术语旨在具有本发明所属领域的技术人员通常理解的含义。在一些情况下,为了清楚起见和/或为了便于参考,本文定义了具有共同理解含义的术语,并且本文所包含的此类定义并不一定被解释为代表对本领域中通常理解的内容的差异。本文所描述或本文所引用的技术和程序通常被本领域技术人员很好地理解并且通常使用常规方法来利用,诸如,例如,Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 4th ed. (2012) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY中所描述的广泛采用的分子克隆方法。适当地,除非另有说明,否则涉及到使用市售的试剂盒和试剂的程序通常按照制造商定义的方案和条件进行。

[0029] 如本文所用,除非上下文另有明确指示,单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数引用。除非另有特别指示,否则术语“包括”、“诸如”等旨在表达无限制的包含。

[0030] 如本文所用,除非另有特别指示,术语“包含”还具体包括“由所阐述的元素组成”和“大体上由所阐述的元素组成”的实施方案。

[0031] 术语“约”指示并涵盖所指的值以及高于和低于该值的范围。在某些实施方案中,术语“约”指示所指定值 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 或 $\pm 1\%$ 。在某些实施方案中,在适用的情况下,术语“约”指示所指定值 \pm 该值的一个标准差。

[0032] 术语“分离”意为从自然状态或环境中改变或移除。例如,天然存在于活着的动物或细胞中的核酸或肽不是“分离”的,但从其自然状态的共存材料中部分地或完全地分离的相同核酸或肽是“分离”的。

[0033] 本文所用术语“线粒体 (mitochondria)”或“线粒体 (mitochondrion)”是指(大体上)不含真核细胞材料诸如外来真核细胞物质的可存活线粒体,例如已经从细胞或细胞培养物中分离/纯化的。因此,仅有极少量的细胞成分(线粒体除外)存在于本文所用的线粒体(线粒体组合物)中。优选地,除线粒体外没有其他细胞成分存在于本文所用的线粒体(线粒体组合物)中。分离的线粒体优选地以基本上纯化的形式存在,例如部分地或完全地与其自然状态的共存物质分离。从这个意义上说,本文所用的“线粒体”是“分离的线粒体”,并且术语“线粒体”和“分离的线粒体”可以互换使用。任何目前本领域已知的技术都可用于分离线粒体,诸如例如,通过重复差分离心(DC)或密度梯度离心(DGC)进行亚细胞分级。因此,本发明的线粒体优选地是有活力的或可存活的,并且具有负膜电位。在本发明的意义上,“有活力”意为具有或保持新陈代谢或另一生物学功能或结构。

[0034] 如本文所用,术语“可存活线粒体”在本文中被用于描述可存活线粒体,它们是完整的、活性的、功能性的和具有呼吸活性的线粒体。根据一些实施方案,“可存活线粒体”是指展现出生物学功能诸如例如呼吸以及ATP和/或蛋白质合成的线粒体。

[0035] 如本文所用,术语“完整的线粒体”在整个说明书中被用于描述线粒体,其包括完整外膜和内膜、完整膜间空间、完整嵴(由内膜形成)和完整基质。可替代地,完整的线粒体是保留其结构和超微结构的线粒体。另一方面,完整的线粒体含有嵌入内膜的活性呼吸链复合体I-V,维持膜电位和合成ATP的能力。

[0036] 如本文所用,术语“移植”在整个说明书中被用作通用术语,用于描述将器官、组织、细胞团、单个细胞或细胞器植入受体的过程。术语“细胞移植”在整个说明书中被用作通

用术语,用于描述将至少一个细胞(例如,本文所描述的增强的免疫细胞)转移至受体的过程。术语包括本领域已知的所有类别的移植,包括输血。移植通过供体与受体之间的部位和遗传关系进行分类。该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相同对象的相同位置或另一个位置)、同种异体移植(相同物种成员之间的移植)和异种移植(不同物种成员之间的移植)。

[0037] 术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”互换使用,并且是指由通过肽键共价连接的氨基酸残基构成的化合物。蛋白质或肽必须含有至少两个氨基酸,并且不限制可以构成蛋白质或肽序列的氨基酸的最大数量。多肽包括任何肽或蛋白质,包含通过肽键相互连接的两个或更多个氨基酸。如本文所用,术语既是指短链,其在本领域中通常也被称为例如肽、寡肽和低聚物,也是指长链,其在本领域中通常被称为蛋白质,其有许多的类型。“多肽”包括,例如,生物学活性片段、基本上同源的多肽、寡肽、同源二聚体、异二聚体、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、重组肽或其组合。

[0038] 术语“抗体”在本文中以其最广泛意义上使用,并且包括某些类型的免疫球蛋白分子,其包含与抗原或表位特异性结合的一个或多个抗原结合结构域。术语还包括非免疫球蛋白抗原结合的蛋白质分子,即所谓的抗体模拟物。抗体具体包括完整的抗体(例如,完整的免疫球蛋白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、双特异抗体(diabody)、单链双特异抗体、DART、tandAb、微抗体(minibody)、单结构域抗体(例如,骆驼科 V_{HH})、本领域技术人员已知的其他抗体片段或格式)和抗体模拟物(例如,adnectin、亲和体(affibody)、affilin、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。

[0039] 术语“抗原结合结构域”意为抗体或T细胞受体的部分,其能够经由可变结构域特异性结合至抗原或表位。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,其可以包括来自T细胞的T细胞受体(TCR)序列的V、J和/或D区,诸如活化T细胞,或其可以包括抗体的V、J和/或D区。术语“抗原结合片段”是指抗体或TCR的至少一部分,或其重组变体,它含有抗原结合结构域,即足以赋予抗原结合片段与靶标(诸如抗原及其定义的表位)识别和特异性结合的可变结构域和高变环,即所谓的互补决定区(CDR)。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 V_{HH} 结构域(纳米抗体)、从抗体片段产生的多特异性抗体和TCR片段。Brinkmann等人(MABS, 2017, Vol. 9, No. 2, 182-212)中详细描述了示例性抗体和抗体片段格式,本文通过引用并入其教导的所有内容。

[0040] 术语“scFv”是指融合蛋白质,其包含抗体重链(V_H)的可变片段,在该可变片段的C端经由柔性肽接头与抗体轻链(V_L)的可变片段的N端连接,并且能够表达为单个多肽链,并且其中scFv保留其源自的完整抗体的特异性。

[0041] 在scFv的背景下使用的术语“接头”和“柔性多肽接头”是指由氨基酸(诸如甘氨酸和/或丝氨酸残基)组成的肽接头,其单独或组合使用以将可变重链区和可变轻链区连接在一起。在一个实施方案中,柔性多肽接头是Gly/Ser接头,并且包括氨基酸序列(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(Gly $_4$ Ser) $_3$ 或(Gly $_4$ Ser) $_4$ 。在另一实施方案中,接头包括(Gly $_2$ Ser)、(GlySer)或(Gly $_3$ Ser)的多个重复。本

发明的范围内还包括W02012/138475中所描述的接头(通过引用并入本文)。

[0042] 关于抗体的“重链可变区”或“ V_H ”(或在骆驼科单域抗体的情况下,例如,纳米抗体,“ V_{HH} ”)是指重链的片段,其含有三个间插在被称为框架区(FR)的侧翼段之间的CDR;这些框架区通常比CDR更保守,并形成支撑CDR的支架。

[0043] 除非指定,否则如本文所用的scFv可以以任一顺序具有 V_L 和 V_H 可变区,例如,相对于多肽的N端和C端,scFv可以包含 V_L -接头- V_H 或可以包含 V_H -接头- V_L 。

[0044] 术语“抗体重链”是指抗体分子中以它们的天然存在的构象存在于两种类型的多肽链中的较大者,其通常决定了抗体所属的免疫球蛋白类别。

[0045] 术语“抗体轻链”是指抗体分子中以它们的天然存在的构象存在于两种类型的多肽链中的较小者。Kappa(“ κ ”)和lambda(“ λ ”)轻链是指两种主要抗体轻链同种型。

[0046] 术语“重组抗体”是指使用重组DNA技术产生的抗体,诸如,例如,由细菌、酵母、植物或哺乳动物细胞表达的抗体。术语还应该被解释为是指通过合成编码抗体的DNA分子而产生的抗体,并且该DNA分子表达抗体蛋白质或指定抗体的氨基酸序列,其中已经使用本领域可用的且公知的重组DNA或氨基酸序列技术来获得DNA或氨基酸序列。

[0047] 术语“抗原”或“ag”是指身体外来的分子,诸如存在于病原体上的分子,其可以被抗体或T细胞受体结合。抗原可以由抗原呈递细胞(APC)呈递,并且在某些情况下可以触发免疫应答。

[0048] 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,都可以作为抗原。此外,抗原可以源自重组或基因组DNA。熟练的技术人员将理解,包含编码引发免疫应答的蛋白质的核苷酸序列或部分核苷酸序列的任何DNA因此编码本文所用的术语“抗原”。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,使用超过一个基因的部分核苷酸序列,并且将这些核苷酸序列以各种组合排列来编码引发所需免疫应答的多肽。此外,熟练的技术人员将理解,抗原根本不需要由“基因”编码。显而易见的是,抗原可以通过化学合成产生;它还可以源自生物样品,或者可以是多肽以外的大分子,例如,脂质或碳水化合物。此类生物样品可以包括,但不限于,组织样品、肿瘤样品、细胞或具有其他生物学成分的液体。

[0049] 术语“抗肿瘤效应”是指可以通过各种方式表现出来的生物效应,包括但不限于,例如,肿瘤体积的降低、肿瘤细胞数量的降低、转移数量的降低、预期寿命的增加、肿瘤细胞增殖的降低、肿瘤细胞存活的降低或改善与癌症性病况有关的各种生理症状。“抗肿瘤效应”还可以通过本发明的肽、多核苷酸、细胞和抗体在最初预防肿瘤发生方面的能力表现出来。

[0050] 术语“免疫抑制效应”是指可以抑制或干扰正常免疫功能的生物效应。

[0051] “人类抗体”或“人类TCR”是一种具有与由人类或人类细胞产生的抗体的氨基酸序列相对应的氨基酸序列的抗体,或源自采用人类抗体或TCR库或人类抗体/TCR编码序列(例如,从人类来源获得或从头设计)的非人类来源的抗体。人类抗体和TCR分别特异性排除人类抗体和TCR。

[0052] 关于抗体、TCR或其抗原结合片段与靶向分子的结合,术语“结合”、“特异性结合”、“特异性结合至”、“对…特异的”、“特异性结合”和“对…选择性的”特定抗原(例如,多肽靶标)或特定抗原上的表位意为与非特异性或非选择性相互作用(例如,与非靶向分子)可测

量地不同的结合。可以测量特异性结合,例如,通过测量与靶向分子的结合并将其与对非靶向分子的结合进行比较。特异性结合还可以通过模拟靶向分子上识别的表位的对照分子竞争来确定。在这种情况下,如果抗体、TCR或其抗原结合片段与靶向分子的结合被对照分子竞争性抑制,则指示特异性结合。如本文所用的,特异性结合可以指 K_D 值低于 $10^{-6}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $10^{-9}M$ 或 $10^{-10}M$ 的亲合力。可以通过本领域中已知的常见方法测量亲合力,包括本文所描述的方法,诸如表面等离子体共振 (SPR) 技术 (例如, **BIACORE**[®]) 或生物层干涉测量 (例如, **FORTEBIO**[®])。

[0053] 术语“自体的”是指源自个体的任何材料,其之后被重新引入同一个体内。

[0054] 术语“同种异体的”是指源自相同物种的不同动物或与该材料被引入的个体不同的患者的任何材料。当两个或更多个的个体在一个或多个基因座的基因不完全相同时,就称为彼此是同种异体的。在一些方面,来自相同物种的个体的同种异体材料可以在基因上足够不同,以进行抗原性相互作用。

[0055] 术语“异种的”是指源自不同物种的动物的移植物。

[0056] 术语“治疗 (treating)” (及其变体,诸如“治疗 (treat)”或“治疗 (treatment)”) 是指试图改变有需要的对象中的疾病或病况的自然过程的临床干预。治疗既可以用于预防性治疗,并且也可以用于临床病理学的过程。治疗的预期效果包括预防疾病的发生或复发、缓解症状、减弱疾病的任何直接或间接病理后果、预防转移、降低疾病进展速率、改善或缓解疾病状态以及缓解或改善预后。

[0057] 如本文所用,“治疗有效量”是足以对被施用组合物的个体提供有益效果或以其他方式减少有害的非有益事件的组合物或其活性成分的量。本文中“治疗有效剂量”意为所施用者产生一种或多种所需的或满足需要的 (例如,有益的) 效果的剂量,此类施用在给定时间段内发生一次或多次。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* (vols. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); 和 Pickar, *Dosage Calculations* (1999))。

[0058] 如本文所用,术语“嵌合抗原受体”或“CAR”是指源自包括融合到初级细胞质信号传导序列 (也被称为“初级信号传导结构域”) 的抗原结合部分 (例如,具有至少抗原结合结构域或其抗原结合片段的多肽) 的各种多肽的重组多肽,该初级细胞质信号传导序列以刺激方式起作用,并且可以含有被称为基于免疫受体酪氨酸的活化基序或“ITAM”的信号传导基序。含有本发明中特定使用的初级细胞质信号传导序列的ITAM的实例包括,但不限于,源自CD3 ζ (zeta)、FcR γ (gamma)、FcR β (beta)、CD3 γ 、CD3 δ (delta)、CD3 ϵ (epsilon)、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278 (也称为“ICOS”) 和CD66d的ITAM。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 (诸如T淋巴细胞),并活化效应细胞的一些或全部功能,包括IL-2的产生和T细胞中信号传导后的靶细胞的裂解。

[0059] 本文所描述的CAR的抗原结合结构域或其抗原结合片段可以以多种形式存在,例如,其中抗原结合结构域表达为连续多肽链的一部分,包括例如,与抗原结合的天然提取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)。本文所描述的CAR的抗原结合结构域或其抗原结合片段可以包括本文所描述的任何抗体格式或抗体片段格式。本文所描述的CAR的抗原结合结构域或其抗原结合片段可以包括非源自抗体的序列,

包括但不限于,嵌合或人工的T细胞受体(TCR)。这些嵌合/人工TCR可以包括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起活化T细胞作用的多肽。例如,Gross,G.和Eshhar,Z.,FASEB Journal 6:3370-3378(1992)和Zhang,Y.等人,PLoS Pathogens 6:1-13(2010)中所讨论的嵌合/人工TCR。

[0060] “CAR-T细胞”是指根据本文所公开的方法转导并表达CAR基因的T细胞,例如,随机地掺入基因组或有意地整合到CCR5和AAVS1基因座中或到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细胞相对于对象是自体的、同种异体的或异种的。

[0061] 如本文所用,术语“对象”意为哺乳动物对象。术语“对象”旨在包括可以引发免疫应答的活体生物体(例如,哺乳动物、人类)。示例性对象包括人类、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,对象是人类。“患者”是患有疾病、病症或病况,或具有发展疾病、病症或病况的风险,或以其他方式需要本文所提供的组合物和方法的对象。

[0062] 如本文所用,“预防”是指预防患者中的疾病或病况,例如,肿瘤的形成。例如,如果用本发明的方法治疗具有发展肿瘤或其他形式癌症的风险的个体,并且后来没有发展为肿瘤或其他形式的癌症,则在该个体中,至少在一段时间内该疾病已经被预防。

[0063] 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是跨膜蛋白,在人类中由基因CD19编码。在人类中,CD19在所有B谱系细胞(浆细胞除外)和滤泡树突状细胞中表达。CD19在人类B细胞中起两个主要作用。它作为一种衔接蛋白,将细胞质信号传导蛋白质募集到膜上,并在CD19/CD21复合体内起作用以降低B细胞受体信号传导通路的阈值。由于它存在于所有B细胞上,它是B淋巴细胞发育、淋巴瘤诊断的生物标志物,并且可以被采用为白血病和淋巴瘤免疫疗法的靶标。

[0064] 术语“包装插页”被用于指通常包含在治疗产品或诊断产品(例如,试剂盒)的商业包装中的说明书,其含有关于使用此类治疗产品或诊断产品的适应症、用法、剂量、施用、联合治疗、禁忌症和/或警告的信息。

[0065] 如本文所用,术语“细胞毒性剂”是指抑制或阻止细胞功能和/或导致细胞死亡或破坏的物质。

[0066] “化疗剂”是指可用于治疗癌症的化学化合物。化疗剂包括“抗激素剂”或“内分泌药物”,其作用是调节、减少、阻断或抑制可以促进癌症生长的激素的效果。

[0067] 术语“肿瘤”是指恶性或良性的所有赘生性细胞生长和增殖,以及所有癌前和癌性细胞和组织。本文中提到的术语“癌症”、“癌性”、“细胞增殖性病征”、“增殖性病征”和“肿瘤”并非相互排斥。术语“细胞增殖性病征”和“增殖性病征”是指与某种程度的异常细胞增殖有关的病症。在一些实施方案中,细胞增殖性病征是癌症。在一些方面,肿瘤是实体肿瘤。在一些方面,肿瘤是血液性恶性肿瘤(血液性肿瘤)。

[0068] 术语“药物组合物”是指这样的制剂,其形式允许活性组分有生物学活性并且/或者保持或改善其中所含有的生物学实体(例如,细胞)的生存力以有效治疗对象,并且不含有在药物组合物中所提供的量下对于对象具有不可接受的毒性的附加成分。

[0069] 术语“药学上可接受的载剂”包括与药物施用相容的盐水、溶剂、分散介质、涂层、抗菌剂和抗真菌剂、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、盐水、Krebs缓冲液、Tyrode溶液、对比剂或碘海醇(omnipaque)或其混合物。术语“药学上可接受的载剂”还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))。该术语进一步包括呼吸缓冲液(250mM蔗糖,2mM KH₂PO₄,10mM MgCl₂,20mM K⁺-15HEPES缓冲液(pH 7.2)和0.5mM K⁺-EGTA(pH 8.0))。该术语进一步包括T细胞培养基,例如,RPMI 1640培养基GlutaMAX™补充剂500ml(ThermoFisher,61870010)。

[0070] 术语“调控(modulate)”和“调控(modulation)”是指减少或抑制,可替代地,活化或增加所列举的变量。

[0071] 术语“增加”、“活化”和“增强”是指增加了所列举的变量的5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、87%、90%、95%、98%、99%、100%,增加至所列举的变量的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倍或更多。

[0072] 术语“减少”和“抑制”是指降低了所列举的变量的10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%,降低至所列举的变量的1/2、1/3、1/4、1/5、1/10、1/15、1/20、1/25、1/30、1/35、1/40、1/45、1/50、1/60、1/70、1/80、1/90、1/100倍或更低。

[0073] 术语“激动”是指活化受体信号传导以诱导与受体的活化有关的生物学应答。“激动剂”是与受体结合并使受体激动的实体。

[0074] 术语“拮抗”是指抑制受体信号传导以抑制与受体的活化有关的生物学应答。“拮抗剂”是与受体结合并拮抗受体的实体。

[0075] 术语“免疫细胞”是指属于免疫系统的细胞,用以保护生物体免于诸如感染或癌症的疾病。“免疫细胞”分为先天免疫应答和适应性免疫应答。

[0076] 术语“免疫细胞群体”或“适应性免疫细胞群体”是指免疫细胞或适应性免疫细胞的异质性组。

[0077] 术语“效应T细胞”和“记忆T细胞”包括T辅助性(即CD4⁺)细胞和细胞毒性(即,CD8⁺)T细胞。CD4⁺效应T细胞通常有助于多种免疫学过程的发展,包括B细胞向浆细胞和记忆B细胞的成熟,以及细胞毒性T细胞和巨噬细胞的活化。CD8⁺效应T细胞通常杀伤病毒感染的细胞和肿瘤细胞。CD8⁺记忆T细胞通常通过增强回忆能力来提供针对再次感染或癌症复发的长期保护。有关效应T细胞的更多信息,参见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),其通过引用整体并入。CD8效应记忆细胞表达表面标志物CD62L⁻、CD45RA⁺、CD45RO⁻。

[0078] 术语“中枢记忆T细胞”(“T_{cm}细胞”)是指表达表面标志物CD62L⁺、CD45RA⁻、CD45RO⁺的细胞。人类T_{cm}细胞组成型地表达CD62L,CD62L是通过高内皮小静脉(HEV)细胞外渗和迁移至次级淋巴器官的T细胞区域所必需的。T_{cm}细胞在第二次遇到完全相同的抗原时有效地介导回忆应答。

[0079] 术语“效应记忆细胞”,如CD8效应记忆细胞,是指表达表面标志物CD62L⁻、

CD45RA⁻、CD45RO⁺的细胞,能够迁移至发炎的外周组织并表现出效应功能。

[0080] 术语“记忆样细胞”,诸如“记忆样T细胞”,是指表现出记忆细胞的特征和特性的细胞。它们可以模拟一种或多种表面标志物表达,表现出记忆细胞的至少一种或多种标志,诸如增强的回忆能力、存活、自我更新。比如,在急性感染的存在下,可以根据其表面表达和行为将T细胞分为记忆类。一些T细胞在抗肿瘤应答期间将表现出记忆样特性(Shiki Takamura, *International Immunology*, 第32卷,第9期,2020年9月1日,第571-581页)。

[0081] 术语“Tscm细胞”或“干细胞样记忆细胞”是指处于最早和持久发育阶段的记忆细胞,表现出干细胞样特性,并展现出介于幼稚与中枢记忆T细胞之间的基因谱。干细胞样记忆细胞表达表面标志物CD62L⁺、CD45RA⁺、CD45RO⁺。

[0082] 术语“Trm细胞”或“组织驻留T细胞”是指长寿命记忆T细胞的亚群,其占据上皮和粘膜组织(皮肤、粘膜、肺、脑、胰腺、胃肠道)而不会再循环。Trm细胞在转录、表现型和功能上与中枢记忆T细胞(T_{CM})和效应记忆T细胞(T_{EM})不同,其在血液、次级淋巴器官的T细胞区、淋巴与非淋巴组织之间再循环。因为驻留组织的特化,Trm细胞本身代表了不同的群体。

[0083] 术语“幼稚细胞”是指这样的细胞:其是静息的细胞,并且尚未被活化。例如,幼稚T细胞尚未遇到它们的抗原,并在生物体中循环以筛选通过APC呈递的肽。幼稚T细胞表达表面标志物CD62L⁺、CD45RA⁺、CD45RO⁻。

[0084] 术语“适应性免疫细胞”是指属于“适应性免疫系统”或“获得性免疫系统”并在适应性免疫中起至关重要的作用的细胞。适应性免疫细胞是免疫细胞的亚群,它们是高度特化的全身细胞。具体而言,淋巴细胞B细胞和T细胞是适应性免疫细胞。适应性免疫细胞可以具有消除病原体或预防其生长的功能。适应性免疫可以在对特定病原体产生初始应答后产生免疫学记忆(例如,记忆B细胞或记忆T细胞),并导致对与该病原体的未来相遇产生增强的应答。术语“适应性免疫细胞”和“适应性细胞”可以互换使用。

[0085] 术语“CD4 T细胞”和“CD8 T细胞”分别指的是CD4阳性T细胞和CD8阳性T细胞。术语“CD4 T细胞”、“CD4免疫T细胞”和“CD4免疫细胞”可以互换使用。术语“CD8 T细胞”、“CD8免疫T细胞”和“CD8免疫细胞”可以互换使用。

[0086] 术语“调节性T细胞”或“Treg”包括例如通过阻遏效应T细胞而调节免疫耐受性的细胞。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。调节性T细胞的附加信息参见Nocentini等人, *Br. J. Pharmacol.*, 2012, 165: 2089-2099, 其通过引用整体并入。如本文所用,术语“调节性T细胞(Treg)”优选地指示对免疫稳态至关重要的CD4⁺ T细胞亚群。Treg是通过它们的转录因子叉头盒蛋白P3 (Foxp3)的表达来定义的,这对它们的发育和阻遏功能是必要的。Foxp3功能的丧失导致严重的淋巴组织增生性疾病和自身免疫。除了预防自身免疫和炎症性疾病外,Treg还确保在遇到病原体时免疫应答可控,并且从而预防免疫病理学。相反地,Treg的过度抑制可阻碍病原体清除并促进慢性感染。此外,Treg还可以约束抗肿瘤免疫应答,并且从而促进肿瘤进展。

[0087] 术语“树突状细胞”是指能够活化幼稚T细胞并刺激B细胞的生长和分化的专业抗原呈递细胞。

[0088] 短语“与[靶标]的表达有关的疾病”包括,但不限于,与[靶标]的表达有关的疾病或与表达[靶标]的细胞有关的病况,包括,例如,增殖性疾病,诸如癌症或恶性肿瘤,或癌症前病况,诸如实体肿瘤或血液性肿瘤。与[靶标]的表达有关的非癌症相关的适应症包括,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(过敏和哮喘)和移植。

[0089] 术语“刺激”是指在体外通过刺激结构域或刺激分子(例如,CAR或TCR/CD3复合体)与其同源配体或抗原独立性CD3/CD28珠的结合而诱导的初级应答,由此介导信号转导事件,诸如,但不限于,经由TCR/CD3复合体的信号转导。刺激可以介导某些分子的表达改变,和/或细胞骨架结构的重组等。

[0090] 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,为表达CAR而工程化的免疫细胞)表达的分子或其部分,其提供初级细胞质信号传导序列,该序列针对信号传导通路(诸如T细胞信号传导通路)的至少一些方面以刺激途径调节TCR/CAR复合体的初级活化。在一方面,初级信号是通过比如TCR/CD3复合体与负载肽的MHC分子结合来起始的,其导致T细胞应答的介导,包括,但不限于,增殖、活化、分化等。在一方面,初级信号是通过CAR(例如抗体片段或嵌合TCR)与其同源抗原或表位的结合起始的。

[0091] 术语“抗原呈递细胞”或“APC”是指免疫系统细胞,诸如辅助细胞(例如,树突状细胞、巨噬细胞等),其表现出与其表面上的主要组织相容性复合体(MHC)复合的外来抗原。T细胞可以使用它们的T细胞受体(TCR)识别这些复合体。APC通常处理抗原并将其呈递至T细胞,但还可以“负载”预处理的抗原肽。

[0092] 如本文所用,术语“细胞内信号传导结构域”是指参与生成促进免疫效应功能(诸如表达TCR或CAR的T细胞的效应功能)的信号的分子的细胞内部分。术语“共刺激分子”是指T细胞上的同源结合伴侣,其与共刺激配体特异性结合,从而通过T细胞介导共刺激应答,诸如,但不限于,增殖。共刺激分子是除抗原受体或它们的配体以外的细胞表面分子,其可以是有效的免疫应答所需要的。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。共刺激分子可以在以下蛋白质家族中表示:TNF受体蛋白质、免疫球蛋白样蛋白质、细胞因子受体、整合蛋白、信号传导淋巴细胞活化分子(SLAM蛋白质)和活化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、淋巴细胞功能有关的抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、SLAMF7、NKP80、CD160、B7-H3以及与CD83特异性结合的配体等。细胞内信号传导结构域可以包括其衍生自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超级家族的成员,具有基因库Acc编号AAA62478.2所提供的氨基酸序列,或来自非人类物种(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”被定义为基因库Acc编号AAA62478.2的氨基酸残基214-255,或来自非人类物种(例如,小鼠、啮齿动物、猴子、猿等)的等效残基。

[0093] 术语“编码”是指多核苷酸中特定核苷酸序列(诸如基因、cDNA或mRNA)的固有特性,作为在生物学过程中合成其他聚合物和大分子的模板,该生物学过程具有限定的核苷酸序列(例如,rRNA、tRNA和mRNA)或限定的氨基酸序列以及从中产生的生物学特性。因此,如果与该基因相对应的mRNA的转录和翻译在细胞或其他生物系统中产生蛋白质,则基因、cDNA或RNA编码该蛋白质。编码链(其核苷酸序列与mRNA序列相同,并且通常提供于序列表中)和非编码链(用作基因或cDNA转录的模板)均可以被称为编码该基因或cDNA的蛋白质或

其他产物。

[0094] 除非另有说明,否则“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括为彼此的简并版本并且编码相同的氨基酸序列的所有核苷酸序列。编码蛋白质或RNA的短语核苷酸序列还可以包括内含子,在这个意义上编码蛋白质的核苷酸序列在某些版本中可以含有一个或多个内含子。

[0095] 术语“内源性”是指来自或产生于生物体、细胞、组织或系统内部的任何材料。

[0096] 术语“外源性”是指从生物体、细胞、组织或系统外部引入或产生的任何材料。就患者而言,术语“外源性”可以指患者、供体或细胞培养物所衍生的材料。例如,从患者的肌肉组织分离并且随后被引入免疫细胞群体(其可以是患者自体的或自生的)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、血液或培养的细胞。

[0097] 术语“表达”是指通过启动子驱动的特定核苷酸序列的转录和/或翻译。

[0098] 如本文所用,术语“表达载体”是指含有编码至少一部分能够被转录的基因产物的核酸序列的载体。在一些情况下,RNA分子随后被翻译成蛋白质、多肽或肽。在其他情况下,这些序列不被翻译,例如,在反义分子或核酶的产生中。表达载体包括本领域已知的所有表达载体,包括掺入重组多核苷酸的黏粒、质粒(例如,裸露的或包含在脂质体中)和病毒(例如,慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0099] 如本文所用,术语“表达构建体”或“转基因”被定义为包含编码基因产物的核酸的任何类型的基因构建体,其中部分或全部的能够被转录的核酸编码序列可被插入载体中。

[0100] 如本文关于疾病、病症或病况所用,术语“治疗(treatment)”、“治疗(treat)”、“治疗(treated)”或“治疗(treating)”是指预防法和/或疗法。

[0101] 术语“慢病毒”是指逆转录病毒科的属。在逆转录病毒中,慢病毒在能够感染非分裂细胞方面是独特的;它们可以将大量的遗传信息递送至宿主细胞的DNA中,所以它们是基因递送载体的最有效的方法之一。HIV、SIV和FIV都是慢病毒的实例。

[0102] 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,尤其包括在Milone等人,Mol. Ther. 17(8):1453-1464(2009)中提供的自灭活慢病毒载体。

[0103] 术语“同源”或“同一性”是指两个聚合分子之间,例如,两个核酸分子之间,诸如两个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被相同单体亚基占据时;例如,如果两个DNA分子中的每一个都有一个位置被腺嘌呤占据,则它们在该位置是同源的或完全相同的。两个序列之间的同源性是匹配或同源位置的数量的直接函数;例如,如果两个序列中位置的一半(例如,长度为十个亚基的聚合物中的五个位置)是同源的,则这两个序列是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。

[0104] 在本发明的背景下,使用常见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。

[0105] 术语“可操作连接”或“转录控制”是指调节性序列与异源核酸序列之间的功能连接,导致后者的表达。

[0106] 免疫原性组合物的术语“肠胃外”施用包括,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。

[0107] 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,否则术语包括含有已知天然核苷酸的类似物的核酸,这些类似物具有与参考核酸类似的结合特性,并且以类似于天然存在的核苷酸的方式代谢。除非另有指示,否则特定核酸序列还隐含包括其保守修饰的变体(例如,简并密码子取代)、等位基因、直系同源物、SNP和互补序列以及明确指示的序列。具体地,简并密码子取代可以通过生成其中一个或多个选定(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))。如本文所用的多核苷酸包括,但不限于,通过本领域可用的任何方式获得的所有核酸序列,包括,但不限于,重组方式,即,使用普通克隆技术和聚合酶链反应(PCR)等并通过合成方式从重组文库或细胞基因组克隆核酸序列。此外,多核苷酸包括多核苷酸的突变,包括但不限于,通过本领域中公知的方法来突变核苷酸或突变核苷。核酸可以包含一个或多个多核苷酸。

[0108] 术语“启动子”是指通过细胞的转录机制或引入的合成机制识别的DNA序列,其可以引发多核苷酸序列的特异性转录。

[0109] 术语“启动子/调节性序列”是指可以用于表达与启动子/调节性序列可操作连接的基因产物的核酸序列。在一些情况下,该序列可以是核心启动子序列,并且在其他情况下,该序列可以包括增强子序列和其他调节性元件,其是基因产物表达所需要的。启动子/调节性序列可以是例如以组织特异性方式表达基因产物的一种启动子/调节性序列。

[0110] 术语“组成型启动子”是指这样的核苷酸序列:当与编码或指定基因产物的多核苷酸可操作地连接时,导致在细胞的大多数或所有生理条件下在细胞中产生基因产物。

[0111] 术语“诱导型启动子”是指这样的核苷酸序列: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与启动子相对应的诱导剂时,才能在细胞中产生基因产物。

[0112] 术语“组织特异性启动子”是指这样的核苷酸序列:当与编码基因或由基因指定的多核苷酸可操作地连接时,基本上仅当细胞是与启动子相对应的组织类型的细胞时,才导致基因产物在细胞中产生。

[0113] 如本文所用,“瞬时”是指非整合的转基因的表达持续数小时、数天或数周的时间段,其中表达的时间段小于该基因在被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时的表达时间段。

[0114] 术语“信号转导途径”是指各种信号转导分子之间的生化关系,其在信号从细胞的一部分传输至细胞的另一部分中发挥作用。短语“细胞表面受体”包括能够接收信号并跨越细胞的膜传输信号的分子和分子复合体。

[0115] 术语“基本上纯化”的细胞是指大体上不含其他细胞类型的细胞。基本上纯化的细胞还是指已经从与通常以其天然存在的状态有关联的其他细胞类型中分离出来的细胞。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。在其他情况下,该术语仅是指已经从它们的自然状态下与它们天然有关联的细胞中分离出来的细胞。在一些方面,细胞是在体外培养的。在其他方面,细胞不是在体外培养的。

[0116] 如本文所用,术语“治疗性”意为治疗。通过减少、抑制、缓解或根除疾病状态来获

得治疗效果。

[0117] 如本文所用,术语“预防性”意为对于疾病或疾病状态的预防或防护治疗。

[0118] 在本发明的背景下,“肿瘤抗原”是指特异性增生过多病症所共有的抗原。在某些方面,本发明的增生过多病症抗原源自癌症,包括但不限于,原发性或转移性黑色素瘤、间皮瘤、肾脏细胞癌症、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、肾脏、子宫内膜和胃癌。

[0119] 术语“转染”或“转化”或“转导”是指将外源性核酸转移或引入宿主细胞的过程。“转染”或“转化”或“转导”的细胞是用外源核酸转染、转化或转导的细胞。细胞包括原发性对象细胞及其后代。

[0120] 术语“T细胞耗竭”和“耗竭的T细胞”是指低响应性的T细胞或“功能失调”的T细胞。

[0121] 术语“活性”或“免疫细胞的活性”是指细胞效应功能,诸如针对表达某种抗原并通过对该抗原或细胞因子产生特异的TCR检测的靶细胞的细胞毒性活性。其进一步指代谢活性、增殖能力以及扩增和分裂的能力、抵抗耗竭的能力和阻遏活性。

[0122] 细胞或细胞群体的术语“存活”是指,但不限于,细胞持久性、细胞自我更新能力、细胞耐力。可以将细胞存活定义为涵盖细胞的生存力和其维持和保持细胞过程的完整性的能力的过程。存活机制确保细胞将能够适应和进行细胞活动,诸如复制、修复和新陈代谢。

[0123] 免疫细胞(诸如T细胞)的术语“增强存活”指示,比如,免疫细胞的以下特性的一种或多种的增强:(i)在静息期和重新刺激时存活的能力;(ii)对白细胞介素的响应性:诸如IL-7、IL-15(例如,细胞可以需要较少的信号才能存活,因为它们应该增加它们的受体的表达以对那些白细胞介素作出应答);(iii)对活化诱导细胞死亡(AICD)的抗性;(iv)通过上调抗凋亡分子(诸如BCL-XL、BCL-2等)对凋亡的抗性;(v)通过下调促凋亡分子(诸如Fas和FasL表达)对凋亡的抗性;(vi)表观基因修饰和转录改变,其可以影响某些基因的表达,诸如Bcl2、Bcl2l2、Mcl1、Bcl2a1d、Birc2、Birc3、Xiap、Cflar;(viii)端粒的长度。

[0124] 术语“促进选择”是指免疫细胞的一个或多个亚群相对于大部分免疫细胞或免疫细胞群体的量的增加和/或一些特性的增强。

[0125] 术语“分化”或“细胞分化/细胞的分化”是指细胞从一种细胞类型变为另一种细胞类型的过程,通常,但不仅是,从特化较少的类型(干细胞)到更特化的类型。分化,尤其是免疫细胞分化,可以响应抗原暴露而发生。分化可以显著地转变细胞的大小、形状、膜电位、代谢活性和对信号的应答。

[0126] 术语“用线粒体处理的免疫细胞”可以指暴露于线粒体、与线粒体密切接触、与线粒体共温育或用线粒体移植的免疫细胞。术语“线粒体治疗”是指将细胞暴露于线粒体的行动,或将细胞与线粒体紧密安置/放置的行动,或将细胞与线粒体共温育的行动,或将线粒体移植到细胞中的行动。

[0127] 术语“自我更新能力”或“细胞自我更新能力”是指无限地产生相同细胞类型的更多细胞的细胞过程。自我更新是分裂和保留母细胞的所有特征的能力。自我更新使细胞的数量大致相同。

[0128] 术语“回忆能力”是指由记忆细胞启动的次级免疫应答,导致快速增殖和分化为效应细胞。这种迅速回忆应答在控制感染的程度和预防疾病中十分关键。

[0129] 术语“移植的线粒体”是指基本上整合到靶细胞中的外源性线粒体(例如部分或完

全整合到细胞中)。术语“线粒体移植”、“线粒体的移植”或“线粒体的转移”是指将外源性线粒体整合/转移至宿主细胞中的行动。

[0130] 范围:贯穿本公开,本公开的各个方面都可以以范围格式呈现。应当理解,范围格式的描述只是为了方便和简洁,并且不应被解释为对本公开范围的僵化限制。因此,对范围的描述应被认为已经具体公开了所有可能的子范围以及该范围内的个体数值。例如,对范围(诸如从1至6)的描述应被认为已经具体公开了子范围,诸如从1至3、从1至4、从1至5、从2至4、从2至6、从3至6等,以及该范围内的个体数字,例如,1、2、2.7、3、4、5、5.3和6。作为另一实例,诸如95-99%同一性的范围包括具有95%、96%、97%、98%或99%同一性的事物,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。无论范围的广度如何,这一点均适用。

[0131] 增强的免疫细胞及其相关组合物

[0132] 在下文中,更详细地描述了本发明。具体而言,本发明涉及以下各项:

[0133] 1.本公开提供了用分离的可存活线粒体处理的免疫细胞,例如人类免疫细胞,该可存活线粒体的量有效地相对于未用分离的可存活线粒体处理的适应性免疫细胞例如人类适应性免疫细胞而言增强适应性免疫细胞的存活并且/或者促进适应性免疫细胞的选择,该适应性免疫细胞例如人类适应性免疫细胞,诸如B细胞或T细胞,优选T细胞,诸如CD8免疫细胞或CD4免疫细胞。

[0134] 2.本公开进一步提供了用分离的可存活线粒体处理的免疫细胞,例如人类免疫细胞,该可存活线粒体的量有效地相对于未用分离的可存活线粒体处理的免疫细胞而言促进适应性免疫细胞的记忆细胞分化和/或适应性免疫细胞的记忆细胞选择,例如记忆T细胞。

[0135] 3.具体而言,本公开提供了用分离的可存活线粒体处理的免疫细胞,例如人类免疫细胞,诸如人类免疫T细胞,该可存活线粒体的量有效地相对于未用分离的可存活线粒体处理的免疫细胞例如人类适应性免疫细胞而言增强记忆CD8 T细胞的存活并且/或促进记忆CD8 T细胞的选择。在一些特定方面,相对于未用分离的可存活线粒体处理的免疫细胞例如人类适应性免疫细胞,分离的可存活线粒体的量有效地增强中枢记忆CD8 T细胞的存活并且/或促进中枢记忆CD8 T细胞的选择。在一些其他特定方面,相对于未用分离的可存活线粒体处理的免疫细胞,分离的可存活线粒体的量有效地增强效应记忆CD8 T细胞的存活并且/或促进效应记忆CD8 T细胞的选择。

[0136] 4.具体而言,本公开提供了用分离的可存活线粒体处理的免疫细胞,例如人类免疫细胞,诸如人类T免疫细胞,该可存活线粒体的量有效地相对于未用分离的可存活线粒体处理的免疫细胞例如人类适应性免疫细胞诸如CD4免疫细胞,增强Treg细胞的存活并且/促进Treg细胞的选择。

[0137] 5.本公开还提供了包含外源性分离的可存活线粒体(例如包含被部分地完全整合到细胞中的线粒体)的免疫细胞,例如人类免疫细胞,该可存活线粒体的量有效地相对于不包含外源性分离的可存活线粒体的适应性免疫细胞例如人类适应性免疫细胞而言提高适应性免疫细胞的存活并且/或者促进适应性免疫细胞的选择,该适应性免疫细胞例如人类适应性免疫细胞,诸如B细胞或T细胞,优选T细胞,诸如CD8或CD4免疫细胞。

[0138] 6.本公开进一步提供了包含外源性分离的可存活线粒体的免疫细胞,例如人类免疫细胞,诸如人类免疫T细胞,该外源性分离的可存活线粒体的量有效地相对于不包含外源

性分离的可存活线粒体的免疫细胞例如人类适应性免疫细胞而言促进适应性免疫细胞的记忆细胞分化和/或适应性免疫细胞的记忆细胞选择,例如记忆T细胞。

[0139] 7. 具体而言,本公开提供了包含外源性分离的可存活线粒体的免疫细胞,例如人类免疫细胞,诸如人类T免疫细胞,该外源性分离的可存活线粒体的量有效地相对于不包含分离的可存活线粒体的免疫细胞例如人类适应性免疫细胞而言增强记忆CD8 T细胞的存活并且/或促进记忆CD8 T细胞的选择。在一些特定方面,相对于不包含外源性分离的可存活线粒体的免疫细胞,分离的可存活线粒体的量有效地增强中枢记忆CD8 T细胞的存活并且/或促进中枢记忆CD8 T细胞的选择。在一些其他特定方面,相对于不包含分离的可存活线粒体的免疫细胞,分离的可存活线粒体的量有效地增强效应记忆CD8 T细胞的存活并且/或促进效应记忆CD8 T细胞的选择。

[0140] 8. 具体而言,本公开提供了包含外源性分离的可存活线粒体的免疫细胞,例如人类免疫细胞,诸如人类T免疫细胞,该外源性分离的可存活线粒体的量有效地相对于不包含外源性分离的可存活线粒体的免疫细胞诸如人类适应性免疫细胞例如CD4免疫细胞而言增强Treg细胞的存活并且/或促进Treg细胞的选择。

[0141] 9. 本文还提供了包含前述项中任一项所述的免疫细胞诸如人类免疫细胞例如人类适应性免疫细胞的群体。

[0142] 10. 本公开还提供了一种包含免疫细胞的组合物或一种免疫细胞的组合物,该免疫细胞诸如人类免疫细胞例如人类适应性免疫细胞并用分离的可存活线粒体处理,该分离的可存活线粒体的量有效地相对于未用分离的可存活线粒体处理的适应性免疫细胞例如人类适应性免疫细胞而言增强适应性免疫细胞的存活并且/或促进适应性免疫细胞的选择,该适应性免疫细胞例如人类适应性免疫细胞,诸如B细胞或T细胞,优选T细胞,诸如CD8免疫细胞或CD4免疫细胞。具体而言,组合物包含用分离的可存活线粒体处理的免疫细胞,例如人类免疫细胞,该分离的可存活线粒体的量有效地相对于未用分离的可存活线粒体处理的免疫细胞例如人类适应性免疫细胞而言有效地增强记忆CD8 T细胞的存活并且/或促进记忆CD8 T细胞的选择,该记忆CD8 T细胞诸如中枢记忆CD8 T、效应记忆CD8

[0143] T细胞,或其组合。具体而言,组合物包含用分离的可存活线粒体处理的免疫细胞,诸如人类免疫细胞,例如人类T细胞,该分离的可存活线粒体的量有效地相对于未用分离的可存活线粒体处理的免疫细胞例如人类适应性免疫细胞诸如CD4免疫细胞而言有效地增强Treg细胞的存活并且/或促进Treg细胞的选择。

[0144] 11. 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的组合物,该免疫细胞诸如人类免疫细胞并用分离的可存活线粒体处理,该分离的可存活线粒体的量有效地相对于未用分离的可存活线粒体处理的免疫细胞而言促进适应性免疫细胞的记忆细胞分化和/或适应性免疫细胞的记忆细胞选择,例如记忆T细胞。

[0145] 12. 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的组合物,该免疫细胞诸如人类免疫细胞,其中该免疫细胞包含外源性分离的可存活线粒体,其量相对于不包含外源性分离的可存活线粒体的适应性免疫细胞例如人类适应性免疫细胞而言有效地提高适应性免疫细胞的存活和/或促进适应性免疫细胞的选择,该适应性免疫细胞例如人类适应性免疫细胞,诸如B细胞或T细胞,优选T细胞,诸如CD8免疫细胞或CD4免疫细胞。具体而言,组合物包括包含外源性分离的可存活线粒体的免疫细胞,例如人类免疫细胞,该外源

性分离的可存活线粒体的量有效地相对于不包含外源性分离的可存活线粒体的免疫细胞例如人类适应性免疫细胞而言增强记忆CD8 T细胞的存活并且/或促进记忆CD8 T细胞的选择,该记忆CD8 T细胞诸如中枢记忆CD8 T细胞、效应记忆CD8 T细胞,或其组合。具体而言,组合物包括包含外源性分离的可存活线粒体的免疫细胞,例如人类免疫细胞,该外源性分离的可存活线粒体的量有效地相对于不包含外源性分离的可存活线粒体的免疫细胞例如人类免疫细胞诸如CD4免疫细胞而言增强Treg细胞的存活并且/或促进Treg细胞的选择。

[0146] 13.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的组合物,该免疫细胞例如人类免疫细胞,其中该免疫细胞包含外源性分离的可存活线粒体,其量有效地相对于不包含分离的可存活线粒体的免疫细胞促进适应性免疫细胞的记忆细胞分化和/或适应性免疫细胞的记忆细胞选择,例如记忆T细胞。

[0147] 14.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的组合物,该免疫细胞诸如人类免疫细胞并用分离的可存活线粒体处理,该分离的可存活线粒体的量有效地相对于未用线粒体处理的免疫细胞群体例如人类免疫细胞而言增强适应性免疫细胞群体的存活并且/或促进适应性免疫细胞群体的选择,该适应性免疫细胞群体例如人类适应性免疫细胞群体,诸如B细胞或T细胞,优选T细胞,诸如CD8免疫细胞或CD4免疫细胞。

[0148] 15.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的组合物,该免疫细胞诸如人类免疫细胞并用分离的可存活线粒体处理,该分离的可存活线粒体的量有效地相对于未用分离的可存活线粒体处理的免疫细胞群体而言增强适应性免疫细胞群体的记忆细胞分化并且/或促进适应性免疫细胞群体的记忆细胞选择,例如记忆T细胞。

[0149] 16.具体而言,本公开提供了一种包含用分离的可存活线粒体处理的免疫细胞例如人类免疫细胞诸如人类T细胞的组合物,该分离的可存活线粒体的量有效地相对于未用分离的可存活线粒体处理的免疫细胞例如适应性免疫细胞而言增强记忆CD8 T细胞群体的存活并且/或促进记忆CD8 T细胞群体的选择,该记忆CD8 T细胞群体诸如中枢记忆CD8 T细胞、效应记忆CD8 T细胞,或其组合。在一些方面,线粒体能够使记忆适应性细胞例如中枢记忆CD8 T细胞或效应记忆CD8 T细胞的比例增强至少20%,优选至少30%,更优选至少50%。

[0150] 17.本公开还提供了一种包含免疫细胞的组合物或一种免疫细胞的组合物,该免疫细胞例如人类免疫细胞,其中该免疫细胞包含外源性分离的可存活线粒体,其量有效地相对于不包含外源性分离的线粒体的免疫细胞群体例如人类免疫细胞而言增强适应性免疫细胞群体的存活并且/或促进适应性免疫细胞群体的选择,该适应性免疫细胞群体例如人类适应性免疫细胞群体,诸如B细胞或T细胞,优选T细胞,诸如CD8免疫细胞或CD4免疫细胞。

[0151] 18.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的组合物,该免疫细胞例如人类免疫细胞,其中该免疫细胞包含外源性分离的可存活线粒体,其量有效地相对于不包含外源性线粒体的免疫细胞群体例如记忆T细胞而言增强适应性免疫细胞群体内适应性免疫细胞的记忆细胞分化并且/或促进适应性免疫细胞群体内适应性免疫细胞的记忆细胞选择。

[0152] 19.具体而言,本公开提供了一种包含免疫细胞的组合物,该免疫细胞例如人类免疫细胞诸如人类T细胞并且包含外源性分离的可存活线粒体,其量有效地相对于不包含外源性分离的可存活线粒体的免疫细胞例如适应性免疫细胞而言增强记忆CD8 T细胞群体的

存活并且/或促进记忆CD8 T细胞群体的选择,该记忆CD8 T细胞群体诸如中枢记忆CD8 T细胞、效应记忆CD8 T细胞,或其组合。在一些方面,线粒体能够使记忆适应性细胞(例如中枢记忆CD8 T细胞或效应记忆CD8T细胞)的比例增强至少20%、优选至少30%、更优选至少50%。

[0153] 20. 根据前述各项中任一项所述的组合物可以被配制为固体或液体形式,优选液体形式。

[0154] 21. 在一些方面,根据前述各项中任一项所述的适应性免疫细胞诸如记忆免疫细胞(例如中枢记忆CD8 T细胞和效应记忆CD8 T细胞)或记忆样细胞的存活为适应性免疫细胞的自我更新能力。在一些其他方面,已经通过根据前述各项中任一项所述的线粒体促进了其选择的适应性免疫细胞的增强的存活为改善的自我更新能力。

[0155] 22. 在一些方面,根据前述各项中任一项所述的适应性免疫细胞诸如记忆免疫细胞(例如中枢记忆CD8 T细胞和效应记忆CD8 T细胞)或记忆样免疫细胞的存活为在静息期和重新刺激后适应性免疫细胞的存活能力。在一些其他方面,已经通过根据前述各项中任一项所述的线粒体促进了其选择的适应性免疫细胞的增强的存活为在静息期和重新刺激后改善的存活能力。

[0156] 23. 在一些方面,根据前述各项中任一项所述的适应性免疫细胞诸如记忆免疫细胞(例如中枢记忆CD8 T细胞和效应记忆CD8 T细胞)或记忆样免疫细胞的存活在于适应性免疫细胞应答白细胞介素信号传导诸如IL-7和/或IL-15的信号传导的能力。在一些其他方面,已经通过根据前述各项中任一项所述的线粒体促进了其选择的适应性免疫细胞的增强的存活为应答白细胞介素信号传导诸如IL-7和/或IL-15的信号传导的改善的能力。

[0157] 24. 在一些方面,根据前述各项中任一项所述的适应性免疫细胞诸如记忆免疫细胞(例如中枢记忆CD8 T细胞和效应记忆CD8 T细胞)或记忆样免疫细胞的存活在于适应性免疫细胞抵抗活化诱导细胞死亡(AICD)的能力。在一些其他方面,适应性免疫细胞(通过根据前述各项中任一项所述的线粒体已经促进了其选择)的增强的存活在于适应性免疫细胞的改善的能力,为抵抗适应性免疫的活化诱导细胞死亡(AICD)的改善的能力。

[0158] 25. 在一些方面,根据前述各项中任一项所述的适应性免疫细胞诸如记忆免疫细胞(例如中枢记忆CD8 T细胞和效应记忆CD8 T细胞)或记忆样免疫细胞的存活在于适应性免疫细胞通过上调抗凋亡分子(诸如BCL-XL、BCL-2)或通过下调促凋亡分子(诸如Fas和FasL)表达来抵抗凋亡的能力。在一些方面,已经通过根据前述各项中任一项所述的线粒体促进了其选择的适应性免疫细胞的增强的存活在于通过上调抗凋亡分子(诸如BCL-XL、BCL-2)或通过下调促凋亡分子(诸如Fas和FasL)表达来抵抗凋亡的改善的能力。

[0159] 26. 在一些方面,根据前述各项中任一项所述的适应性免疫细胞诸如记忆免疫细胞(例如中枢记忆CD8 T细胞和效应记忆CD8 T细胞)或记忆样免疫细胞的存活在于适应性免疫细胞表达影响基因表达的表观基因修饰和转录改变的能力,该基因选自Bcl2、Bcl2l2、Mcl1、Bcl2ald、Birc2、Birc3、Xiap和Cflar。在一些方面,已经通过根据前述各项中任一项所述的线粒体促进了其选择的适应性免疫细胞的增强的存活在于产生影响基因表达的表观基因修饰和转录改变的改善的能力,该基因选自Bcl2、Bcl2l2、Mcl1、Bcl2ald、Birc2、Birc3、Xiap和Cflar。

[0160] 27. 在一些方面,根据前述各项中任一项所述的适应性免疫细胞诸如记忆免疫细

胞(例如中枢记忆CD8 T细胞和效应记忆CD8 T细胞)或记忆样免疫细胞的存活在于适应性免疫细胞保持它们的长端粒的能力。在一些方面,已经通过根据前述各项中任一项所述的线粒体促进了其选择的适应性免疫细胞的增强的存活在于相对于未用分离的可存活线粒体处理的或不包含外源性分离的可存活线粒体的免疫细胞,保持长端粒的改善的能力。

[0161] 28. 在一些方面,根据前述各项中任一项所述的适应性免疫细胞诸如记忆免疫细胞(例如中枢记忆CD8 T细胞和效应记忆CD8 T细胞)或记忆样免疫细胞的存活在于相对于未用分离的可存活线粒体处理的或不包含外源性线粒体的免疫细胞,适应性免疫细胞增殖或展现出持久性或其组合的能力。

[0162] 29. 在一些方面,根据前述各项中任一项所述的适应性免疫细胞例如记忆免疫细胞(例如中枢记忆CD8 T细胞和效应记忆CD8 T细胞)或记忆样免疫细胞的存活在于相对于未用分离的可存活线粒体处理的或不包括外源性线粒体的免疫细胞,减弱适应性免疫细胞的耗竭。

[0163] 30. 在一些方面,前述各项中任一项的组合是药物组合物。在一些其他方面,药物组合物进一步包含至少一种药学上可接受的载剂。在一些方面,药学上可接受的载剂被配制用于递送至人类免疫细胞中。在一些方面,药学上可接受的载剂被配制用于递送至人类组织和/或器官中。药学上可接受的载剂包括,但不限于,与药物施用相容的盐水、分散介质、等渗剂等。在一些方面,药学上可接受的载剂是磷酸盐缓冲盐水、盐水、Krebs缓冲液、Tyrode溶液、对比剂或碘海醇或其混合物。在一些其他方面,载剂是包含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)的缓冲液;包含250mM蔗糖、2mM KH₂PO₄、10mM MgCl₂、20mM K⁺-15HEPES缓冲液(pH 7.2)和0.5mM K⁺-EGTA(pH 8.0)的缓冲液,或RPMI 1640培养基GlutaMAX™补充剂500ml(ThermoFisher,61870010)。

[0164] 31. 在一些方面,根据前述各项中任一项所述的免疫细胞例如人类免疫细胞诸如适应性免疫细胞源自选自以下的生物样品:血液和生物学起源的其他液体样品、固体组织样品、源自其细胞及其后代的组织培养物、从生物样品分离的细胞。

[0165] 32. 在一些方面,如前述各项中任一项所述的免疫细胞产自可存活真核细胞。在一些其他方面,免疫细胞是体外或离体产生的。

[0166] 33. 在一些方面,根据前述各项中任一项所述的免疫细胞例如人类免疫细胞诸如适应性免疫细胞是同种异体的或自体的免疫细胞。在一些方面,免疫细胞是异种的。

[0167] 34. 在一些方面,根据前述各项中任一项所述的免疫细胞例如人类免疫细胞诸如适应性免疫细胞产自包括或间质干细胞或诱导多能干细胞(iPSC)的干细胞。

[0168] 35. 在一些方面,根据前述各项中任一项所述的免疫细胞优选地是哺乳动物免疫细胞,更优选人类免疫细胞。

[0169] 36. 在一些方面,免疫细胞可以包括,但不限于,工程化或体外繁殖的天然免疫细胞。

[0170] 37. 在一些方面,根据前述各项中任一项所述的免疫细胞优选地是适应性免疫细胞,诸如B淋巴细胞或T淋巴细胞,优选T淋巴细胞。

[0171] 在一些方面,适应性免疫细胞是体外繁殖的B淋巴细胞或T淋巴细胞,优选体外繁殖的T淋巴细胞。

[0172] 38. 在一些方面,根据前述实施方案中任一项的免疫细胞是T淋巴细胞,诸如不限于, α - β T细胞($\alpha\beta$ T细胞)、 γ - δ T细胞($\gamma\delta$ T细胞)、CD4免疫细胞、CD8免疫细胞,或其组合。在一些方面,T淋巴细胞是幼稚T细胞、效应T细胞、记忆T细胞(例如,组织驻留记忆(T_{rm})细胞、T_{scm}细胞、中枢记忆细胞和效应记忆细胞)、记忆样T细胞,或其组合。在一些其他方面,T细胞优选地是记忆T细胞。在一些方面,根据前述各项中任一项所述的免疫细胞例如人类免疫细胞是多能干细胞衍生的免疫细胞。在一些其他方面,T淋巴细胞是辅助性T细胞(T_H)、细胞毒性T细胞(CTL)、调节性T(Treg)细胞、记忆T细胞,或其组合。在一些其他方面,T细胞优选地是调节性T细胞(Treg)。在一些方面,免疫细胞是与粘膜有关的不变T细胞。在一些其他方面,免疫细胞是在血液中循环的T细胞或肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)。

[0173] 39. 在一些方面,根据前述各项中任一项所述的免疫细胞优选地是CD8 T细胞,诸如但不限于,在血液中循环的CD8 T细胞、肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL),例如CD8 TIL、幼稚CD8 T细胞、效应CD8T细胞、记忆CD8 T细胞(例如T_{rm} CD8 T细胞、T_{scm} CD8 T细胞、中枢记忆CD8 T细胞和效应记忆CD8 T细胞)、记忆样CD8T细胞,或其组合。在一些优选的方面,CD8 T细胞是TIL。在一些更优选的方面,免疫细胞是记忆CD8 T细胞,特别是效应记忆CD8 T细胞、中枢记忆CD8 T细胞,或其组合。在一些优选的方面,免疫细胞是记忆样CD8 T细胞。

[0174] 40. 在一些方面,T细胞是CD4 T细胞,诸如幼稚CD4 T细胞、效应CD4 T细胞(例如,Th1、Th2或Th17)、记忆CD4 T细胞、记忆样CD4 T细胞、调节性CD4 T细胞(Treg)、在血液中循环的CD4T细胞、肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)CD4 T细胞,或其组合。优选地,CD4 T细胞是Treg细胞,例如人类调节性(Treg)CD4 T细胞。

[0175] 41. 在一些方面,如前述各项中任一项所述的免疫细胞例如人类免疫细胞可以包括,但不限于,表达嵌合抗原受体(“CAR”)和/或人工T细胞受体(“TCR”)亚基的工程化免疫细胞,诸如但不限于CAR-

[0176] T细胞,例如CD8 CAR-T细胞。CAR T细胞通常包括抗原结合部分(例如,其抗原结合结构域或抗原结合片段)、跨膜成分以及初级细胞质信号传导序列,其被选择用于响应于结合其同源配体的抗原结合部分而活化免疫细胞。在一些方面,嵌合抗原受体(CAR)的基础成分包括以下:(1)用于肿瘤特异性单克隆抗体的可变重链(V_H)和轻链(V_L)与来自T细胞受体复合体的CD3 ζ -链融合于框内。(2)V_H和V_L通常使用柔性甘氨酸-丝氨酸接头连接到一起,并且然后通过间隔物(例如,CD8a柄或C_H2-C_H3恒定结构域)附接到跨膜结构域以使scFv远离细胞表面延伸,使得其可以易于与肿瘤抗原相互作用。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-T细胞。

[0177] 42. 在一些方面,使用病毒诸如慢病毒或腺病毒或逆转录病毒、纳米颗粒或可操作连接到靶向部分的纳米颗粒,将CAR或人工TCR亚基引入免疫细胞。在一些方面,将编码CAR和/或人工TCR亚基的外源性多核苷酸在体外引入免疫细胞。在一些方面,载体是病毒载体。在一些方面,病毒载体源自逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺相关病毒或杂交载体。

[0178] 43. 在一些方面,根据前述各项中任一项所述的免疫细胞或免疫细胞群体包括CAR或人工TCR亚基,其包含选自以下的抗原: B细胞成熟抗原(BCMA,也称为肿瘤坏死因子受体超级家族成员17, TNFRSF17)、CD19、CD123、CD22、CD30、CD171、CS-1(也被称为CD2亚群1、CRACC、SLAMF7、CD319和19A24)、C类型凝集素样分子-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)、路易斯Y抗原、CD24、血小板衍生的生长因子受体 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-蛋白质激酶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;前列腺酸性磷酸酶(PAP);延伸因子2突变(ELF2M);肝配蛋白B2;成纤维细胞活化蛋白质 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(Prosome、Macropain)亚基、 β 类型、9(LMP2);糖蛋白100(gp100);由断点簇区(BCR)和Abelson鼠白血病病毒致癌基因同源物1(Ab1)(bcr-ab1)组成的致癌基因融合蛋白质;酪氨酸酶;肝配蛋白类型-A受体2(EphA2);岩藻糖基GM1;唾液酸化的路易斯粘附分子(sLe);神经节苷脂GM3(aNeu5Ac(2-3)bDG alp(1-4)bDG1cp(1-1)Cer);转谷氨酰胺酶5(TGS5);高分子量黑色素瘤相关抗原(HMWMAA);o-乙酰基-GD2神经节苷脂(OAcGD2);叶酸受体 β ;肿瘤内皮标志物1(TEM1/CD248);肿瘤内皮标志物7相关(TEM7R);claudin 6(CLDN6);甲状腺刺激激素受体(TSHR);G蛋白质偶联受体类C群5,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);多唾液酸;胎盘特异性1(PLAC1);globoH糖基神经酰胺(GloboH)的六聚糖部分;乳腺分化抗原(NY-BR-1);uropalakin 2(UPK2);肝炎A病毒细胞受体1(HAVCR1);肾上腺受体 β 3(ADRB3);泛连接蛋白3(PANX3);G蛋白质偶联受体20(GPR20);淋巴细胞抗原6复合体、基因座K 9(LY6K);嗅觉受体51E2(OR51E2);TCR γ 交替阅读框蛋白质(TARP);肾母细胞瘤蛋白质(WT1);癌/睾丸抗原1(NY-ESO-1);癌/睾丸抗原2(LAGE-1a);黑色素瘤相关抗原1(MAGE-A1);ETS迁移变体基因6,位于染色体12p(ETV6-AML);精子蛋白质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);黑色素瘤癌睾丸抗原-1(MAD-CT-1);黑色素瘤癌睾丸抗原-2(MAD-CT-2);Fos相关抗原1;肿瘤蛋白质p53(p53);p53突变;prostelin;幸存蛋白;端粒酶;前列腺癌肿瘤抗原-1(PCTA-1或半乳凝素8)、通过T细胞1识别的黑色素瘤抗原(MelanA或MART1);大鼠肉瘤(Ras)突变;人类端粒酶逆转录酶(hTERT);肉瘤迁移断点;凋亡的黑色素瘤抑制剂(ML-IAP);ERG(跨膜蛋白酶、丝氨酸2(TMPRSS2)ETS融合基因);N-乙酰氨基葡萄糖基-转移酶V(NA17);成对箱形蛋白质Pax-3(PAX3);雄激素受体;细胞周期素B1;v-myc禽骨髓细胞瘤病毒致癌基因神经母细胞瘤衍生的同源物(MYCN);Ras同源性家族成员C(RhoC);酪氨酸酶相关蛋白质2(TRP-2);细胞色素P450 1B1(CYP1B1);CCCTC结合因子(锌指蛋白质)样(BORIS或印迹位点调节因子兄弟蛋白)、通过T细胞3识别的鳞状细胞癌抗原(SART3);成对箱形蛋白质Pax-5(PAX5);前顶体素结合蛋白质sp32(OY- TES1);淋巴细胞特异性蛋白质酪氨酸激酶(LCK);A激酶锚定蛋白质4(AKAP-4);滑膜肉瘤、X断点2(SSX2);晚期糖基化终产物的受体(RAGE-1);肾脏遍在蛋白1(RU1);肾脏遍在蛋白2(RU2);豆荚蛋白;人类乳头状瘤病毒E6(HPV E6);人类乳头状瘤病毒E7(HPV E7);肠羧酯酶;热休克蛋白质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族A成员2(LILRA2);CD300分子样家族成员f(CD300LF);

[0179] C类型外源凝集素结构域家族12成员A (CLEC12A);骨髓基质细胞抗原2 (BST2);EGF样含模块的粘蛋白样激素受体样2

[0180] (EMR2);淋巴细胞抗原75 (LY75);磷脂酰肌醇聚糖3 (GPC3);

[0181] Fc受体样5 (FCRL5);和免疫球蛋白λ样多肽1 (IGLL1)。在一些方面,如前述各项中任一项所述的免疫细胞或免疫细胞群体包括第一、第二、第三或第四代的CAR。

[0182] 44. 在一些方面,如前述各项所述的任一免疫细胞的特异性淋巴细胞活化受体激动剂被缀合至模拟细胞的无细胞支持物。在一些方面,模拟细胞的支持物是顺磁珠。

[0183] 45. 在一些方面,如前述各项中任一项所述的免疫细胞是具有抗肿瘤或免疫抑制和活性的细胞,例如本领域中已知的效应细胞。在一些其他方面,免疫细胞是具有免疫调节活性的细胞。

[0184] 46. 如前述各项中任一项所述的分离的可存活线粒体优选地是具有呼吸活性的线粒体。

[0185] 47. 根据前述各项中任一项所述的分离的可存活线粒体的有效量是每个靶细胞0.0001ng至2.5ng之间的线粒体,例如0.001ng至2.0

[0186] ng之间,诸如,例如,0.01ng至1.5ng之间或0.05ng至1.0ng之间,例如每个靶细胞0.1ng至0.5ng之间的线粒体。

[0187] 48. 如前述各项中任一项的分离的可存活线粒体可以是自体的,或同种异体线粒体。在一些其他方面,它们是异种线粒体。

[0188] 49. 在一些其他方面,如前述各项中任一项所述的分离的可存活线粒体可以是新分离的或先前分离的并且随后储存直至使用,例如在低于0°C的温度下储存。

[0189] 50. 在一些方面,如前述各项中任一项所述的分离的可存活线粒体的来源可以具有不同的性质——例如,组织、血液,更特别的是在血液中循环的细胞或培养的细胞。

[0190] 51. 在一些方面,分离的可存活线粒体是真核细胞线粒体。在一些方面,线粒体源自人类细胞系。

[0191] 52. 在一些方面,如前述各项中任一项所述的分离的可存活线粒体源自健康的供体。在一些方面,分离的可存活线粒体源自患者。在一些方面,患者是癌症患者。在一些其他方面,患者是患有自身免疫性疾病的患者。在一些其他方面,患者是移植的患者。在一些其他方面,患者是患有传染病和/或炎症性疾病的患者。

[0192] 53. 在一些方面,分离的可存活线粒体可以是具有基因修饰的自生或自体可存活线粒体。在一些方面,分离的可存活线粒体可以是具有基因修饰的同种异体的可存活线粒体。

[0193] 54. 在一些方面,可以将如前述各项中任一项所公开的分离的可存活线粒体在体外和体内递送至靶细胞例如免疫细胞中。

[0194] 55. 在一些方面,可以将如前述各项中任一项所公开的分离的可存活线粒体在体内或离体递送至靶向器官和/或组织(诸如靶向器官和/或组织的细胞)中。

[0195] 56. 在一些方面,可存活线粒体通过使用下文所描述的分离方法之一进行分离,每种方法包括以下步骤:(i)使用肽链内切酶诸如枯草杆菌蛋白酶A从培养的细胞、组织或器官中分离线粒体;或(ii)通过一个或多个过滤器过滤线粒体;或(i)使用肽链内切酶诸如枯草杆菌蛋白酶A从培养的细胞、组织或器官中分离线粒体并且随后(ii)通过一个或多个过

滤器过滤线粒体。

[0196] 57. 在一些方面,外源性可存活线粒体是但不限于,自体的或同种异体线粒体、基因工程化的线粒体,或通过脂质体封装的或与特定药剂偶联的线粒体。

[0197] 58. 在一些方面,从线粒体治疗后第3天开始,诸如从线粒体治疗后第3.5天或第4天开始,优选从线粒体治疗后第5天开始,诸如从第6天、第7天或第8天开始,更优选从线粒体治疗后第9天开始,根据前述各项中任一项所述的线粒体,例如分离的可存活线粒体,能够分别相对于未用线粒体处理的免疫细胞或免疫细胞群体而言增强适应性免疫细胞或适应性免疫细胞群体的存活并且/或促进适应性免疫细胞或适应性免疫细胞群体的选择。

[0198] 59. 在一些方面,从线粒体移植至免疫细胞中后第3天开始,诸如从线粒体移植后第3.5天或第4天开始,优选从线粒体移植后第5天开始,诸如从线粒体移植后第6天、第7天或第8天开始,更优选从线粒体移植后第9天开始,如前述各项中任一项所述的线粒体,例如分离的可存活线粒体,能够分别相对于不包含外源性线粒体的免疫细胞或免疫细胞群体而言增强适应性免疫细胞或适应性免疫细胞群体的存活并且/或促进适应性免疫细胞或适应性免疫细胞群体的选择。

[0199] 60. 在一些方面,免疫细胞或免疫细胞群体的存活的增强,诸如用根据前述各项中任一项所述的分离的可存活线粒体处理后选择的适应性免疫细胞或适应性免疫细胞群体的存活的增强,是相对于未用线粒体处理的免疫细胞的至少1.2倍。在一些方面,其是相对于未用线粒体处理的免疫细胞的至少1.3倍,诸如至少1.5倍或2倍。在一些方面,其分别相对于未用线粒体处理的免疫细胞(例如适应性免疫细胞)或免疫细胞群体在1.2倍至50倍之间的范围(以倍数表示)内,诸如1.2至45、1.2至40、1.2至30、1.2至20、1.2至15、1.2至10、1.2至5、1.2至2.5、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3.5、1.5至30、1.5至25、1.5至20、1.5至15、1.5至10、1.5至5、1.5至3、1.5至2.5、2至50、2至40、2至30、2至20、2至15、2至10、2至5、2至4、3至30、3至20、3至10、3至5、5至50、5至40、5至30、

[0200] 5至20、5至10、5至8、10至50、10至40、10至30、10至20、至15、15至50、15至40、15至30、15至20、20至50、20至30、20至25、30至35、30至40、30至45、40至50倍。

[0201] 61. 在一些方面,免疫细胞或免疫细胞群体的存活的增强,诸如用根据前述各项中任一项所述的外源性线粒体移植后选择的适应性免疫细胞或适应性免疫细胞群体的存活的增强,是相对于未用外源性线粒体移植的免疫细胞的至少1.2倍。在一些方面,其是相对于不用外源性线粒体移植的免疫细胞的至少1.3倍,诸如至少1.5倍或2倍。在一些方面,其相对于不包含外源性线粒体(例如未用外源性线粒体移植)的免疫细胞例如适应性免疫细胞在1.2倍至50倍之间的范围(以倍数表示)内,诸如1.2至45、1.2至40、1.2至30、1.2至20、1.2至15、1.2至10、1.2至5、1.2至2.5、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3.5、1.5至30、1.5至25、1.5至20、1.5至15、1.5至10、1.5至5、1.5至3、1.5至2.5、2至50、2至40、2至30、2至20、2至15、2至10、2至5、2至4、3至30、3至20、3至10、3至5、5至50、5至40、5至30、5至20、5至10、5至8、10至50、10至40、10至30、10至20、至15、15至50、15至40、15至30、15至20、20至50、20至30、20至25、30至35、30至40、30至45、40至50倍。

[0202] 62. 本文还提供了一种增强根据前述各项中任一项所述的免疫细胞或免疫细胞群体的存活和/或促进其选择的方法,包括步骤:(a)在体外在具有能够驱动适应性细胞(诸如T细胞)活化的特异性活化受体激动剂抗体的无细胞培养基中活化免疫细胞;(b)将免疫细

胞暴露于包含分离的可存活线粒体的药物组合物至少3天,诸如持续至少5天。在一些方面,增强根据前述各项中任一项所述的免疫细胞或免疫细胞群体的存活和/或促进其选择的方法可替代地包括步骤(a) 任选地在诸如IL-2的重组白细胞介素的存在下,在体外在具有涂覆的CD3/CD28珠的无细胞培养基中活化免疫细胞;(b) 将免疫细胞暴露于包含分离的可存活线粒体的药物组合物至少3天,诸如持续至少5天。

[0203] 63. 本文还提供了一种促进根据前述各项中任一项所述的免疫细胞或免疫细胞群体的记忆分化和/或记忆选择的方法,包括步骤:(a) 在体外在具有能够驱动适应性细胞(诸如T细胞)活化的特异性活化受体激动剂抗体的无细胞培养基中活化免疫细胞;(b) 将免疫细胞暴露于包含根据前述各项中任一项所述的分离的可存活线粒体的药物组合物至少3天,诸如,例如,持续至少5天。在一些方面,促进根据前述各项中任一项所述的免疫细胞或免疫细胞群体的记忆分化和/或记忆选择的方法可替代地包括步骤(a) 任选地在诸如IL-2的重组白细胞介素的存在下,在体外在具有涂覆的CD3/CD28珠的无细胞培养基中活化免疫细胞;(b) 将免疫细胞暴露于包含分离的可存活线粒体的药物组合物至少3天,诸如,例如,持续至少5天。

[0204] 64. 如前述各项中任一项所述的方法中所用的药物组合物包含分离的可存活线粒体,其中线粒体如前述各项中任一项所公开。方法中所用的药物组合物中包含的分离的可存活线粒体的有效量是每个靶细胞0.0001ng至2.5ng之间的线粒体,例如0.001ng至2.0ng之间,诸如,例如,0.01ng至1.5ng之间或0.05ng至1.0ng之间,例如每个靶细胞0.1ng至0.5ng之间的线粒体。在一些方面,前述各项中任一项所述的方法中所用的药物组合物进一步包含一种或多种药学上可接受的载剂。载剂包括,但不限于,盐水、分散介质、等渗剂等、磷酸盐缓冲盐水、Krebs缓冲液、Tyrode溶液、对比剂、碘海醇、包含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)的缓冲液、包含250mM蔗糖、2mM KH₂PO₄、10mM MgCl₂、20mM K⁻15HEPES缓冲液(pH 7.2)和0.5mM K⁻EGTA(pH 8.0)的缓冲液,或RPMI 1640培养基GlutaMAX™补充剂500ml(ThermoFisher,61870010)。药物组合物包含一种或多种药学上可接受的载剂和分离的可存活线粒体,其量有效地相对于未用线粒体处理或未用线粒体移植的免疫细胞而言增强适应性记忆或记忆样免疫细胞的比例至至少1.1倍,诸如1.2倍、1.3倍、1.5倍或2倍。在一些实施方案中,记忆或记忆样免疫细胞的比例的增强在1.1倍至100倍之间的范围(以倍数表示)内,诸如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倍。

[0205] 65. 本文还提供了根据前述各项中任一项所述的用分离的可存活线粒体处理或包含外源性分离的可存活线粒体的免疫细胞,例如人类免疫细胞,诸如人类T细胞,用于治疗有需要的对象的方法中,该方法包括向对象施用如前述各项中任一项所述的免疫细胞或免疫细胞群体。

[0206] 66. 本公开进一步提供了根据前述各项中任一项所述的用分离的可存活线粒体处理或包含外源性分离的可存活线粒体的免疫细胞,例如人类免疫细胞,诸如人类T细胞,用于治疗癌、传染病、炎症性疾病或自身免疫性疾病。

[0207] 67. 本文还提供了一种组合物,例如药物组合物,根据该组合物,诸如,包含如前述各项中任一项所述的用分离的可存活线粒体处理的免疫细胞或包含外源性可存活线粒体的免疫细胞的组合物,该线粒体的量有效用于治疗癌症、传染病、炎症性疾病或自身免疫性疾病。

[0208] 68. 在一些方面,根据前述各项中任一项所述的用分离的可存活线粒体处理的或包含外源性分离的可存活线粒体的组合物的免疫细胞或免疫细胞群体被配制在药物组合物中,其量有效用于治疗有需要的人类对象中的癌症的方法中。

[0209] 69. 在一些方面,根据前述各项中任一项所述的用分离的可存活线粒体处理的或包含外源性可存活线粒体的免疫细胞或免疫细胞群体被配制在药物组合物中,其量有效用于治疗有需要的人类对象中的自身免疫性疾病的方法中。自身免疫性疾病包括,但不限于,多发性硬化症、糖尿病、肠易激综合征、乳糜泻、克罗恩氏疾病、狼疮、牛皮癣、类风湿性关节炎。

[0210] 70. 在一些方面,根据前述各项中任一项所述的用分离的可存活线粒体处理的或包含外源性线粒体的免疫细胞或免疫细胞群体被配制在药物组合物中,其量有效用于治疗有需要的人类对象中的炎症性疾病的方法中。

[0211] 71. 在一些方面,根据前述各项中任一项所述的用分离的可存活线粒体处理的或包含外源性线粒体的免疫细胞或免疫细胞群体被配制在药物组合物中,其量有效用于治疗有需要的人类对象中的移植物抗宿主病(GvHD)的方法中。

[0212] 72. 在一些方面,根据前述各项中任一项所述的用分离的可存活线粒体处理的或包括外源性线粒体的免疫细胞或免疫细胞群体(例如抗肿瘤细胞,例如CAR-T细胞)被配制在药物组合物中,其量有效用于杀伤肿瘤细胞,诸如比未用分离的可存活线粒体处理或缺乏外源性线粒体的同等免疫细胞或同等免疫细胞群体更有效地和/或更长久地杀伤肿瘤细胞。

[0213] 73. 在一些方面,根据前述各项中任一项所述的用分离的可存活线粒体处理的或包含线粒体的免疫细胞或免疫细胞群体被配制在药物组合物中,其量有效用于自身免疫性疾病,例如其量有效用于减少或预防异常免疫应答。具体而言,根据前述各项中任一项所述的用分离的可存活线粒体处理的或包含外源性分离的线粒体的免疫细胞或免疫细胞群体的异常免疫应答,诸如在自身免疫性疾病的情况下,当与未用分离的可存活线粒体处理或缺乏外源性线粒体的同等免疫细胞或同等免疫细胞群体的应答相比时,更温和(更小)和/或完全不存在。

[0214] 74. 在一些方面,根据前述各项中任一项所述的用分离的可存活线粒体处理或包含外源性线粒体的免疫细胞或免疫细胞群体被配制在药物组合物中,并通过自体细胞移植或同种异体细胞移植被移植到有治疗需要的对象中,其量有效地治疗有需要的人类对象中的癌症。

[0215] 在一些方面,同种异体细胞移植包括:(a)从供体获得可存活血液的样品;(b)从步骤(a)中获得的血液样品中分离免疫细胞;(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免疫细胞;(d)任选地,用小分子接触免疫细胞;以及(e)向有需要的对象施用修饰的免疫细胞。

[0216] 75. 本公开进一步提供了免疫细胞或免疫细胞群体,例如人类免疫细胞,其与根据前述各项中任一项所述的药物组合物共施用,该药物组合物包含被配制在药学上可接受的载剂中的分离的可存活线粒体,其量有效用于治疗有需要的对象中的癌症、传染病、炎症性疾病或自身免疫性疾病。可以在施用免疫细胞之前、同时或之后共施用包含分离的可存活线粒体的药物组合物。在一些方面,将药物组合物与免疫细胞通过静脉内输注共施用至有需要的对象中。在一些方面,将药物组合物与免疫细胞经由肿瘤内注射共施用。在一些方面,将药物组合物与免疫细胞经由器官内注射或通过器官特异性脉管系统共施用。在一些方面,对象患有选自下列的癌症:急性淋巴母细胞白血病(ALL)、急性髓系白血病(AML)、肺泡横纹肌肉瘤、膀胱癌症(例如,膀胱癌)、骨癌、脑癌(例如,恶性胶质瘤)、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、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓系癌、结肠癌、食道癌、宫颈癌、纤维肉瘤、胃肠类癌肿瘤、头颈癌(例如,头颈鳞状细胞癌症)、霍奇金氏淋巴瘤、下咽部癌、肾脏癌、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、黑色素瘤、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。

[0217] T细胞

[0218] 在一个实施方案中,包含外源性线粒体或被外源性线粒体增强的免疫细胞是T细胞(也被称为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力。“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细胞与其他淋巴细胞类型(诸如B细胞和自然杀伤(NK)细胞)的区别可以在于存在称为T细胞受体(TCR)的细胞表面蛋白质,T细胞受体识别呈递于细胞表面的抗原。在典型的免疫应答期间,在MHC抗原呈递的背景下,这些抗原与T细胞受体的结合引发会导致T细胞活化的细胞内转变。

[0219] T细胞被T细胞受体(TCR)分为两组, $\alpha\beta$ T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞。具有TCR2的 $\alpha\beta$ T细胞主要介导细胞免疫力和免疫调节,而具有TCR1的 $\gamma\delta$ T细胞除了维持局部微环境中的免疫稳态外,在伤口愈合、去除不良或转化的上皮细胞和抑制过度炎症方面起重要作用。 $\alpha\beta$ T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞在自身免疫性疾病、肿瘤和血管疾病中起不同的作用。 $\alpha\beta$ T细胞占外周血单核细胞(PBMC)的65-75%,而 $\gamma\delta$ T细胞占小于10%。它们表达不同的CD4和CD8表面标志物,例如,60%的 $\alpha\beta$ T细胞为CD4阳性,30%为CD8阳性,并且在 $\alpha\beta$ T细胞中二者都阳性小于1%。

[0220] 如本文所用,术语“活化T细胞”是指已经通过识别抗原决定簇(诸如,例如,在I类

或II类主要组织相容性(MHC)标志物的背景下呈现的)而刺激产生免疫应答(例如,活化的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/或淋巴因子以及分化细胞表面蛋白质簇(例如CD3、CD4、CD8等及其组合)的存在而被活化。表达差异蛋白簇的细胞通常被称为该蛋白在T细胞表面上的表达呈“阳性”(例如,CD3、CD4或CD8表达阳性的细胞被称为CD3⁺、CD4⁺或CD8⁺)。CD3和CD4蛋白是细胞表面受体或共受体,其可以直接和/或间接参与T细胞中的信号转导。

[0221] 在一些实施方案中,包含外源性线粒体和/或由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,选择、富集或纯化CAR-T细胞群体,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%的表达某种标志物、受体或细胞表面糖蛋白的细胞类型,诸如,例如CD8、CD4、CD3、CD34。

[0222] 在一些实施方案中,CAR-T细胞群体包括CD4⁺和CD8⁺ T细胞。在一些实施方案中,富集CAR-T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,富集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,在组合物中存在比基因修饰的CD4⁺ T细胞更多的基因修饰的CD8⁺ T细胞,即CD4⁺细胞与CD8⁺细胞的比例小于1,例如,小于0.9、小于0.8、小于0.7、小于0.6或小于0.5。

[0223] 富集的免疫细胞群体

[0224] 在一些实施方案中,提供了包含外源性线粒体或由外源性线粒体增强的富集的细胞群体,其中富集的细胞群体已经被选定为包含特定比例或百分比的一种或多种细胞类型。“细胞群体”或“修饰的细胞群体”意为一组细胞,诸如多于两个的细胞。细胞群体可以是同质的,包括相同类型的细胞,或每个细胞包含相同的标志物,或其可以是异质的。在一些实例中,细胞群体源自从对象获得的样品,并且包括从例如骨髓、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,其中核酸包含异源多核苷酸,诸如,例如,编码嵌合抗原受体、可诱导嵌合促凋亡多肽或共刺激多肽,诸如,例如,嵌合髓系分化初级应答88(MyD88)或截短的MyD88和CD40多肽的多核苷酸。在一些实例中,细胞群体和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。可以选择、富集或纯化细胞群体,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%的表达某种标志物、受体或细胞表面糖蛋白的细胞类型,诸如,例如,CD8、CD4、CD3、CD34。

[0225] 从患者的切除的肿瘤中收集T淋巴细胞并富集TIL细胞

[0226] T细胞,诸如由外源性线粒体增强的TIL,可以源自癌症患者。TIL是从切除的肿瘤中获得的,并在体外扩增。取决于所应用的方法,TIL的分离导致“选定的”或“年轻”TIL的重新输注。简而言之,处理切除的肿瘤,诸如通过酶消化,并且TIL在高剂量的IL-2中扩增和培养。需要获得适当数量的细胞,用于用自体TIL重新输注。在肿瘤细胞识别时测试“选定的”TIL的细胞因子产生,而不评估“年轻”TIL的肿瘤反应性。一般来说,在被重新引入癌症患者之前“选定的”TIL从培养到肿瘤反应性评估需要至多36天。值得注意的是,“年轻”TIL的扩增过程仅需要10至22天,同时相比于“选定的”TIL表现出可比较的临床应答。根据本公开,

可以从任何肿瘤中切除用外源性线粒体移植的TIL,并且可以应用任何扩增、再输注的方案。

[0227] 修饰的细胞群体中细胞类型的选择、富集或纯化可以通过任何合适的方法实现。在一些实施方案中,CD8⁺和CD4⁺ T细胞的比例可以通过流式细胞术来确定。在一些实例中,可以使用MAC柱。在一些实例中,将修饰的细胞群体冷冻并在施用于对象之前解冻,并且在施用于对象之前测试活细胞的某种细胞类型的百分比或比例。

[0228] 在一些实施方案中,选择、富集或纯化细胞群体,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⁺或CD4⁺ T细胞。

[0229] 根据本公开,包括例如具有适当基因修饰的自体线粒体、同种异体线粒体、异种线粒体、封装的线粒体或自生线粒体的线粒体制剂可以被递送至富集的T细胞。

[0230] 从患者的血液收集T淋巴细胞和富集T细胞

[0231] T细胞,诸如由外源性线粒体增强和/或工程化为表达CAR的T细胞,可以源自任何健康的供体。供体通常会成人(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)。(Di Stasi等人,2011, "Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy", *N Engl J Med* 365: 1673-83)中描述了从供体获得T细胞的合适过程的实例。一般来说,T细胞获得自供体,经过基因修饰和选择,并且然后可以被施用于受体对象。T细胞的有用来源是供体的外周血。外周血样品通常会经过白细胞单采术,以提供富含白细胞的样品。此富集的样品(也称为“白细胞单采物(leukopak)”)可以由多种血细胞组成,包括单核细胞、淋巴细胞、血小板、血浆和红细胞。通常需要使用本领域已知的方法需要的多要素方法来消除污染物,如红细胞、血小板、单核细胞和肿瘤细胞。相比于静脉穿刺或白膜层产物,白细胞单采物通常含有更高浓度的细胞。

[0232] 患有复发的癌症的患者可以具有低T细胞计数,因此难以收集足够的自体T细胞。这个问题可以通过本领域中已知的方法来克服,诸如通过使用从健康的供体收集的同种异体的T淋巴细胞。

[0233] 修饰的细胞群体中细胞类型的选择、富集或纯化可以通过任何合适的方法实现。在一些实施方案中,CD8⁺和CD4⁺ T细胞的比例可以通过流式细胞术来确定。在一些实例中,可以使用MAC柱。在一些实例中,将修饰的细胞群体冷冻并在施用于对象之前解冻,并且在施用于对象之前测试活细胞的某种细胞类型的百分比或比例。而在白细胞单采物中CD4⁺细胞与CD8⁺细胞的比例通常高于2,在一些实施方案中,本发明的组合中CD4⁺细胞与CD8⁺细胞的比例小于2,例如,小于1.5。在一些实施方案中,组合中CD8⁺ T细胞比CD4⁺ T细胞多,即,CD4⁺细胞与CD8⁺细胞的比例小于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,相对于CD4⁺ T细胞,从供体细胞开始的并产生T细胞的总流程旨在富集CD8⁺细胞T细胞。在一些实施方案中,60%或更多的T细胞是CD8⁺ T细胞,并且在一些实施方案中,65%或更多的T细胞是CD8⁺ T细胞。在CD3⁺ T细胞群体内,在一些实施方案中,CD8⁺ T细胞的百分比在55-75%之间,例如,从55%-65%、从55%-70%、从56-71%、从63-73%、从60-70%、从59%-74%、从65-71%或从65-75%。在一些实施方案中,提供了被选择、富集或纯化的细胞

群体,以包含一种细胞类型与另一细胞类型的比例(诸如,例如,CD8⁺细胞与CD4⁺ T细胞的比例),例如,3:2、7:3、4:1、9:1、19:1或39:1或更多的。在一些实施方案中,选择、富集或纯化修饰的细胞群体,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⁺细胞与CD4⁺ T细胞的比例为4比1或9比1或更大。

[0234] 在一些实施方案中,对于包含如本文所描述的共刺激多肽的基因修饰的CD3⁺ T细胞群体,CD8⁺ T细胞的百分比在55-75%之间,例如,从55-65%、从55-70%、从56-71%、从59-74%、从63-73%、从60-70%、从60-75%、从65-75%或从65-71%。在一些实施方案中,CD8⁺细胞与CD4⁺ T细胞的比例为3:2、7:3、4:1、9:1、19:1或39:1或更多。在一些实施方案中,选择、富集或纯化包含共刺激多肽的修饰的细胞群体,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⁺细胞与CD4⁺ T细胞的比例为4比1或9比1或更大。共刺激多肽可以包括一种或多种共刺激信号传导区诸如CD27、ICOS、RANK、TRANCE、CD28、4-1BB、OX40、DAP10、MyD88或CD40。共刺激多肽可以包括一种或多种共刺激信号传导区,其活化通过CD27、ICOS、RANK、TRANCE、CD28、4-1BB、OX40、DAP10、MyD88或CD40活化的信号传导通路。共刺激多肽可以是诱导型或组成型活化。

[0235] 在一些实施方案中,本发明提供了包含CAR-T细胞群体的组合物和方法,该CAR-T细胞群体包含可诱导促凋亡多肽,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,包含可诱导促凋亡多肽的修饰的细胞群体是至少80%的CD8⁺T细胞。在一些实施方案中,包含可诱导促凋亡多肽的修饰的细胞群体是至少90%的CD8⁺ T细胞。

[0236] 在一些实施方案中,本发明提供了包含CAR-T细胞群体的组合物和方法,该CAR-T细胞群体包含共刺激多肽和可诱导促凋亡多肽,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,包含共刺激多肽和可诱导促凋亡多肽的修饰的细胞群体是至少80%的CD8⁺ T细胞。在一些实施方案中,包含共刺激多肽和可诱导促凋亡多肽的修饰的细胞群体是至少90%的CD8⁺ T细胞。

[0237] 根据本公开,包括例如具有适当基因修饰的自体线粒体、同种异体线粒体、异种线粒体、封装的线粒体或自生线粒体的线粒体制剂可以在进行基因修饰(例如,引入CAR基因)之前、同时或之后递送至富集的T细胞。

[0238] 线粒体

[0239] 本发明至少部分基于这样的发现,即可以分别通过将分离的线粒体添加至细胞培养物中或通过将它们注射至患者的组织或通向组织的血管中来将分离的线粒体递送至(也被称为移植至)培养的细胞或患者的组织中(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)。

[0240] 可以将线粒体离体递送至感兴趣的细胞。感兴趣的细胞包括,但不限于,本文所描述的任何免疫细胞培养的细胞、先前工程化的免疫细胞(例如,CAR T细胞)或待进一步工程化(例如,表达CAR或人工TCR)和/或培养的(例如,分化、活化、处理或温育的)细胞。可以将

线粒体通过使用合成脂质体 (诸如Lipofectin®) 的脂质体介导转移来离体递送 (Shi等人,2008。“Mitochondria transfer into fibroblasts:liposome-mediated transfer of labeled mitochondria into cultured cells”,Ethn.Dis.18:S1-43)。可以将线粒体通过细胞 (例如本文所描述的任何免疫细胞) 与线粒体的共温育 (即,共培养) 2-24小时的时间段而离体递送 (Masuzawa等人,2013,“Transplantation of autologously derived mitochondria protects the heart from ischemia-reperfusion injury”,Am JPhysiol Heart Circ Physiol 304:H966-82)。在不希望受到理论束缚的情况下,移植的线粒体被依赖肌动蛋白的通路内化。线粒体内化,诸如先前在心肌细胞中所显示出的,可以在1小时的共温育后发生 (Pacak等人,2015,“Actin-dependent mitochondrial internalization in cardiomyocytes:evidence for rescue of mitochondrial function”,Biol Open4:622-6)。

[0241] 还可以将线粒体通过直接注射至靶向区域,或经由器官或组织特异性脉管系统 (诸如对象的冠状动脉、对象的肺动脉、对象的肝门静脉、对象的胰腺大动脉、对象的肾动脉、或对象的前列腺动脉) 的递送而递送至器官或组织中。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,线粒体几乎专一地被递送至心脏 (Shin等人,2019,“Myocardial Protection by Intracoronary Delivery of Mitochondria: Safety and Efficacy in the Ischemic Myocardium”,JACC:Basic to Translational Science Vol.4,No.8,2019),而线粒体可以通过肺动脉被递送至肺部,或通过经由肾动脉的递送而被递送至肾脏。线粒体的直接注射使得注射的线粒体的病灶集中成为可能。用于注射的线粒体数量可以不同,取决于靶向器官或组织的大小以及预期用途。线粒体可以悬浮于均质缓冲液中,并使用例如具有28-32号针头的结核菌素注射器注射至各个部位 (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)。

[0242] 可以使用单次或连续注射自体或异源线粒体进行体内线粒体移植,没有直接或间接、急性或慢性同种异体反应性、同种异体识别或损伤有关的分子模式分子 (Ramirez-Barbieri等人,2019,“Alloreactivity and allorecognition of syngeneic and allogeneic mitochondria”,Mitochondrion 46:103-15)。

[0243] 在不希望受理论约束的情况下,缺血组织和非缺血组织都通过内吞作用吸收可存活的、具有呼吸能力的线粒体 (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 Rep6:26057;Cowan等人,2017,“Transit and integration of extracellular mitochondria in human heart cells”,Sci Rep 7:17450)。

[0244] 熟练的从业者可以使用相对简单的医疗程序,出于各种目的将线粒体局部和/或普遍地分布至患者的组织和/或细胞中。相比于一些涉及纳米颗粒的传统治疗方案,进一步说明了线粒体是无毒的,并且不会引起任何实质性的不良免疫或自身免疫应答。

[0245] 虽然不旨在受任何理论的约束,但据信输注的线粒体通过首先粘附到内皮,经由

毛细血管壁外渗。在它们被注射或输注至动脉后,线粒体可以穿过血管的内皮,并通过内体肌动蛋白依赖性内化过程被组织细胞吸收。

[0246] 体内线粒体移植可以包括将本文所描述的任何感兴趣的细胞与本文所提供的外源性线粒体(例如外源性分离的活线粒体)共施用。在一些实施方案中,共施用外源性线粒体和感兴趣的细胞以促进或增强感兴趣的细胞的所需治疗效果,以治疗患者的疾病。感兴趣的细胞包括,但不限于,本文所描述的任何免疫细胞、培养的细胞、先前工程化的免疫细胞(例如,CAR T细胞)或待进一步工程化的细胞(例如,以表达CAR或人工TCR)。在将外源性线粒体和感兴趣的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以发生在施用感兴趣的细胞之前、同时或之后。在一些方面,外源性线粒体和感兴趣的细胞的施用彼此发生在约一个月内。在一些方面,外源性线粒体和感兴趣的细胞的施用彼此发生在约一周内。在一些方面,外源性线粒体和感兴趣的细胞的施用彼此发生在约五、四、三或两天内。在一些方面,外源性线粒体和感兴趣的细胞的施用彼此发生在约一天内。在一些方面,外源性线粒体和感兴趣的细胞的施用彼此发生在约十二小时内。在一些方面,外源性线粒体和感兴趣的细胞的施用彼此发生在约六小时内。在一些方面,外源性线粒体和感兴趣的细胞的施用彼此发生在约三小时内。在一些方面,外源性线粒体和感兴趣的细胞的施用彼此发生在约两小时内。在一些方面,外源性线粒体和感兴趣的细胞的施用彼此发生在约一小时内。在一些方面,外源性线粒体和感兴趣的细胞的施用彼此发生在约三十分钟内。在一些方面,外源性线粒体和感兴趣的细胞的施用彼此发生在约十五分钟内。在一些方面,外源性线粒体和感兴趣的细胞的施用彼此发生在几分钟内。在一些方面,外源性线粒体和感兴趣的细胞的共施用包括重复施用外源性线粒体和/或感兴趣的细胞。

[0247] 分离线粒体

[0248] 用于目前所描述的方法的线粒体可以从任何来源分离或提供,例如,从培养的细胞或组织中分离。示例性细胞包括,但不限于,肌肉组织细胞、心脏成纤维细胞、HeLa细胞、前列腺癌细胞、酵母等,以及任何其混合物。示例性组织包括,但不限于,肝脏组织、骨骼肌、心脏、脑和脂肪组织。可以将线粒体从自生来源、同种异体来源和/或异种来源的细胞或组织(例如,活检材料)中分离。在一些情况下,线粒体是从具有基因修饰的细胞中分离的,例如,具有修饰的mtDNA或修饰的核DNA的细胞。

[0249] 可以将线粒体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,然后均化。均化后,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,可以通过尼龙网过滤器过滤细胞匀浆。分离线粒体的典型方法在例如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.,&Scorrano,L,“Organelle isolation:functional mitochondria from mouse liver,muscle and cultured fibroblasts”,*Nature protocols*,2(2),287-295(2007);和名称为“Products and Methods to Isolate Mitochondria”的PCT申请(PCT/US2015/035584;W02015192020)中描述;其中每一项均通过引用并入。

[0250] 线粒体,诸如用于治疗或包括于药物组合物中的线粒体,可以从自生来源、同种异

体来源或异源来源的细胞或组织中分离。在一些情况下,从对象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相同对象(自体)。在一些其他情况下,从培养的细胞(例如,人类心脏成纤维细胞)或第二对象的组织中收集线粒体,并将这些线粒体施用于第一对象(同种异体)。在一些情况下,从不同的物种(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)。

[0251] 在本文所描述的方法的某些实施方案中,线粒体可以具有不同的来源,例如,外源线粒体可以是自体的、自身的、同种异体的或异种的。在某些实施方案中,已经新分离了线粒体(在采集组织活检样品后120分钟内,优选在60分钟内,更优选在30分钟内)。在一些实施方案中,线粒体已经被分离并且随后储存直至使用。在某些实施方案中,自身的线粒体可以具有外源性mtDNA。在一些实施方案中,线粒体来自对象的一级亲属。在一些实施方案中,已经封装线粒体。

[0252] 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。可以将分离的线粒体移植到感兴趣的细胞中,例如,本文所描述的任何免疫效应细胞,或与用感兴趣的细胞治疗联合施用于对象。

[0253] 工程化表达构建体

[0254] 在一些实施方案中,包含外源性线粒体或由外源性线粒体增强的免疫细胞被工程化,诸如工程化以表达本文所用的CAR,术语“cDNA”意指以信使RNA(mRNA)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的优势在于cDNA主要含有相应蛋白质的编码序列。有时使用完整或部分基因组序列,诸如所需的非编码区才能实现最佳表达,或者在反义策略中待靶向非编码区(诸如内含子)。

[0255] 在一些实施方案中,核酸构建体,例如,本文所描述的任何嵌合抗原受体,都包含在病毒载体中。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。可以理解,在一些实施方案中,细胞与病毒载体离体接触,在一些实施方案中,细胞与病毒载体在体内接触。因此,可以将表达构建体插入载体中,例如病毒载体或质粒。所提供方法的步骤可以使用任何合适的方法进行;这些方法包括,但不限于,转导、转化或以其他方式向细胞提供核酸的方法,如本文所描述。

[0256] 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。正如将要理解的,该功能术语包括基因组序列、cDNA序列以及表达或适应于表达蛋白质、多肽、结构域、肽、融合蛋白和/或突变体的更小的工程化基因片段。

[0257] 选择启动子和其他调节元件,使得它们在所需的细胞或组织中发挥作用。此外,启动子的这个列表不应被解释为详尽的或限制性的;与本文所公开的启动子和方法联合使用的其他启动子。

[0258] 表达构建体(诸如CAR基因)可以随机掺入基因组中,诸如通过病毒介导的整合,或有意整合到免疫细胞基因组(诸如T细胞基因组)的特定位置中,包括但不限于CCR5和AAVS1基因座,或整合到T细胞受体 α 常数(TRAC)基因座中。靶向整合可以使用基因编辑工具,诸如核酸酶介导的基因组编辑系统,包括成簇规则间隔短回文重复序列(CRISPR/Cas9)系统、锌指核酸酶(ZFN)和转录激活因子样效应核酸酶(TALEN)(Liu等人,2019,“Building Potent Chimeric Antigen Receptor T Cells With CRISPR Genome Editing”,*Front Immunol* 10:456)。

[0259] 共刺激

[0260] 在一些实施方案中,包含外源性线粒体或由外源性线粒体增强的免疫细胞是被工程化为表达CAR的免疫细胞,诸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由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可以被工程化为包括共刺激结构域,诸如源自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),其使CAR-T细胞在靶抗原衔接时接收适当的共刺激。

[0261] 本发明的共刺激多肽可以是诱导型或被组成型活化。共刺激多肽可以包括一种或多种共刺激信号传导区,诸如CD27、ICOS、RANK、TRANCE、CD28、4-1BB、OX40、DAP10、MyD88或CD40或例如其细胞质区域。共刺激多肽可以包含一个或多个合适的共刺激信号传导区,其活化由CD27、ICOS、RANK、TRANCE、CD28、4-1BB、OX40、DAP10、MyD88或CD40活化的信号通路。共刺激多肽包括活化肿瘤坏死因子受体(TNFR)家族(即CD40、RANK/TRANCE-R、OX40、4-1BB)和CD28家族成员(CD28、ICOS)的NF- κ B通路、Akt通路和/或p38通路的任何分子或多肽。多于一种共刺激多肽或共刺激多肽细胞质区可以在本文所讨论的修饰的T细胞中表达。

[0262] 在一些实施方案中,可诱导的嵌合信号传导多肽包括两个共刺激多肽细胞质信号传导区,诸如,例如,4-1BB和CD28或选自下列的一个或两个或更多个共刺激多肽细胞质信号传导区:CD27、ICOS、RANK、TRANCE、CD28、4-1BB、OX40、DAP10。

[0263] 载体

[0264] 在一些实施方案中,包含外源性线粒体(例如,作为具有适当基因修饰的自体线粒体、同种异体线粒体、异种线粒体、封装的线粒体或自生线粒体)或由该外源性线粒体增强的免疫细胞群体包括产自DNA、双链RNA、单链mRNA或环状RNA载体的CAR或的人工TCR亚基。可以理解,可以使用本领域已知的方法修饰本文所提供的载体,以改变区的位置或顺序,将一个区替换为另一个区。载体可以编码对一种或多种靶抗原具有特异性的抗原结合结构域,例如,作为CAR构建体的一部分,该抗原例如BCMA、CD123、CD20、CD22、CD30、CD33、EGFR、EGFRvIII、GD2、Her2、间皮素、MUC1、MUC16、NKG2D、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、ROR1等。如本文所讨论,也可以用每个多肽区的适当的取代来修饰载体。

[0265] 载体可以编码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,其包括一个或两个或更多个共刺激多肽细胞质信号传导区,诸如,例如,选自CD27、CD28、4-1BB、OX40、ICOS、RANK、TRANCE和DAP10的那些。载体可以编码接头,例如,作为CAR构建体的一部分,诸如CAR多肽与共刺激多肽之间的接头。本发明的工程化免疫细胞,诸如T细胞(例如,CAR T细胞),可以表达安全开关,也称为可诱导自杀基因或自杀开关,如果需要则其可以用于在体内根除工程化免疫细胞,例如,如果发展了移植物抗宿主病(GVHD)。在一些实例中,向引发不良事件诸如中靶肿瘤外毒性的患者提供表达嵌合抗原受体的工程化免疫细胞。在一些治疗实例中,患者在使用CAR修饰的细胞进行治疗期间可能会经历一些负面症状。在一些情况下,这些治疗已经导致不良事件,部分原因是健康组织的非特异性攻击。

在一些实例中,治疗性工程化免疫细胞可能不再被需要,或者治疗旨在持续指定的时间量,例如,治疗性工程化免疫细胞可以起作用以减少肿瘤细胞或肿瘤大小,并且可能不再被需要。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,诸如可诱导的半胱天冬酶9多肽。本领域已知的其他自杀开关系统包括,但不限于:(a)单纯疱疹病毒(HSV)-tk,其将无毒前药更昔洛韦(GCV)转化为GCV-三磷酸,从而通过阻止DNA复制导致细胞死亡,(b) iCasp9可以与小分子AP1903结合并导致二聚化,其活化内在的凋亡通路,和(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),使在施用有关的单克隆抗体后通过补体/抗体依赖性细胞毒性(CDC/ADCC)有效地消除修饰的细胞。例如,如果需要减少工程化免疫细胞的数量,可以向患者施用可诱导配体,从而诱导工程化免疫细胞的凋亡。这些开关对触发因素(诸如药物)做出应答,当需要根除工程化免疫细胞时提供该触发因素,并且这导致细胞死亡(例如,通过触发坏死或凋亡)。这些药剂可以导致毒性基因产物的表达,但如果工程化免疫细胞已经表达了蛋白质,则可以获得更迅速的应答,该蛋白质在响应于药剂时转化为毒性形式。

[0266] 选择性标志物

[0267] 在某些实施方案中,表达构建体含有核酸构建体,通过在表达构建体中包括标志物而在体外或体内识别其表达。此类标志物将赋予细胞可识别的转变,使含有表达构建体的细胞易于识别。通常,包含药物选择标志物有助于克隆和转化体的选择。例如,对新霉素、嘌呤霉素、潮霉素、DHFR、GPT、博来霉素(zeocin)和组氨酸具有抗性的基因是有用的选择性标志物。可替代地,采用诸如单纯疱疹病毒胸苷激酶(tk)的酶。还可以采用含有细胞外、非信号传导结构域或各种蛋白质(例如CD34、CD19、LNGFR)的免疫学表面标志物,为磁性或荧光抗体介导的分选提供直截了当的方法。所采用的选择性标志物不被认为是重要的,只要它能够与编码基因产物的核酸同时表达即可。选择性标志物的进一步实例包括,例如GFP、EGFP、 β -gal或氯霉素乙酰基转移酶(CAT)的报告基因。

[0268] 接头多肽

[0269] 接头多肽包括,例如,可切割和不可切割的接头多肽。不可切割的多肽可以包括,例如,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)之间可以操作连接的任何多肽。接头多肽包括例如,由约2至约30个氨基酸组成的多肽(例如,弗林蛋白酶切割位点或甘氨酸-丝氨酸接头,诸如(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,可切割接头包括通过对于群体中修饰的细胞外源的酶(例如,由通过转染或转导在与编码接头的多核苷酸在相同或不同的时间引入细胞的多核苷酸编码的酶)切割的接头。在一些实施方案中,可切割接头包括通过对于群体中修饰的细胞内源性的酶切割的接头,该包括,例如,在细胞中自然表达的酶,以及由细胞原生的多核苷酸编码的酶,诸如,例如溶菌酶。

[0270] 治疗应用

[0271] 用外源性线粒体例如本文所提供的外源性分离的可存活线粒体增强的免疫细胞(诸如将自体线粒体、同种异体线粒体、异种线粒体、封装的线粒体或具有基因修饰的线粒体移植到其中的免疫细胞)可以用于治疗涉及靶标的任何疾病或病症。如果申请公开了免

疫细胞(非结合剂特异性)的一般应用,则可以使用“肿瘤相关抗原”(“TAA”)作为靶细胞分子。在一些实施方案中,疾病或病况是可以从过继细胞疗法治疗中获益的疾病或病况。在一些实施方案中,疾病或病况是肿瘤。在一些实施方案中,疾病或病况是细胞增殖性病况。在一些实施方案中,疾病或病况是癌症。在一些实施方案中,疾病或病况是病毒感染。在一些实施方案中,疾病或病况是自身免疫性疾病。

[0272] 在一些实施方案中,本文提供了通过向对象施用有效量的用本文所提供的外源性线粒体增强的免疫细胞来治疗有需要的对象的疾病或病况的方法,例如,先前用外源性线粒体离体移植的免疫细胞。在一些实施方案中,本文提供了通过向对象共施用有效量的免疫细胞以及本文所提供至对象的外源性线粒体来治疗有需要的对象的疾病或病况的方法。在一些方面,疾病或病况是癌症。在一些方面,疾病或病况是病毒感染。在一些实施方案中,疾病或病况是自身免疫性疾病。

[0273] 任何合适的癌症都可以用本文所提供的外源性线粒体增强的免疫细胞来治疗。示例性适合的癌症包括,例如,急性淋巴母细胞白血病(ALL)、急性髓系白血病(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、原发性不明的癌症、心脏肿瘤、宫颈癌、脊索瘤、结肠癌、结直肠癌、颅咽管瘤、导管癌、胚胎肿瘤、子宫内膜癌、室管膜瘤、食道癌、嗅神经母细胞瘤、纤维组织细胞瘤、尤文肉瘤、眼癌、生殖细胞瘤、胆囊癌、胃癌、胃肠道类癌肿瘤、胃肠道间质瘤、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、霍奇金氏淋巴瘤(HL)、下咽癌、眼内黑色素瘤、胰岛细胞瘤、卡波西肉瘤、肾脏癌、朗格汉斯细胞组织细胞增生、喉癌、唇癌和口腔癌、肝癌、小叶原位癌、肺癌、巨球蛋白血症、恶性纤维组织细胞瘤、黑色素瘤、默克尔细胞癌、间皮瘤、隐匿性原发性转移性鳞状颈癌、累及NUT基因的中线束癌、口腔癌、多发性内分泌肿瘤综合征、多发性骨髓瘤、蕈样肉芽肿、骨髓增生异常综合征、骨髓增生异常/骨髓增殖性肿瘤、鼻腔癌和鼻窦癌、鼻咽癌、神经母细胞瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(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、肾脏细胞癌、肾盂癌和输尿管癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌样肿瘤、唾液腺癌、Sezary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、喉癌、胸腺瘤和胸腺癌、甲状腺癌、尿道癌、子宫癌、阴道癌、外阴癌和肾母细胞瘤。

[0274] 联合治疗

[0275] 在一些实施方案中,用本文所提供的外源性线粒体增强的免疫细胞,诸如T细胞或CAR T细胞,与至少一种附加治疗剂一起施用。用外源性线粒体增强的免疫细胞可以包括先前在体外用外源性线粒体移植的免疫细胞,或与外源性线粒体共施用的免疫细胞,使得在体内将外源性线粒体移植到免疫细胞中。任何合适的附加治疗剂都可以与本文所提供的外源性线粒体增强的免疫细胞一起施用。在一些方面,附加治疗剂选自放疗剂、细胞毒性剂、化疗剂、细胞抑制剂、抗激素剂、EGFR抑制剂、免疫刺激剂、抗血管生成剂、检查点阻断剂及其组合。

[0276] 在一些实施方案中,附加治疗剂包括免疫刺激剂。

[0277] 在一些实施方案中,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

导的药剂。在一些方面,抑制性受体或配体选自细胞毒性的T淋巴细胞相关蛋白质4 (CTLA-4,也称为CD152)、程序性细胞死亡蛋白质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 (肝炎A病毒细胞受体2或HAVCR2或CD366)、神经突蛋白、B-和T淋巴细胞弱化子 (也称为BTLA或CD272)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (KIR),及其组合。在一些方面,药剂选自抗PD-1抗体 (例如,派姆单抗或纳武单抗) 和抗PD-L1抗体 (例如,阿替利珠单抗)、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免疫调节性受体 (也称为VISR或VISTA)、白血球相关免疫球蛋白样受体1 (也称为LAIR1或CD305)、CD160、天然杀伤细胞受体2B4 (也称为CD244或SLAMF4),及其组合。在一些方面,药剂是派姆单抗。在一些方面,药剂是纳武单抗。在一些方面,药剂是阿替利珠单抗。

[0278] 在一些实施方案中,附加治疗剂是抑制PD-1与PD-L1之间的相互作用的药剂。在一些方面,抑制PD-1与PD-L1之间的相互作用的附加治疗剂选自抗体、拟肽和小分子。在一些方面,抑制PD-1与PD-L1之间的相互作用的附加治疗剂选自派姆单抗 (Keytruda™)、纳武单抗 (Opdivo™)、阿替利珠单抗 (Tecentriq™)、阿维鲁单抗 (Bavencio™)、帕利珠单抗、德瓦鲁单抗、BMS-936559、磺胺间甲氧嘧啶1和磺胺甲二唑2。在一些实施方案中,抑制PD-1与PD-L1之间的相互作用的附加治疗剂是本领域中已知的任何具有此类活性的治疗剂,例如在Weinmann等人 (Weinmann, 2016, "Corrigendum: Cancer Immunotherapy: Selected Targets and Small-Molecule Modulators", ChemMedChem 11:1576) 中所描述,通过引用将其整体并入。在一些实施方案中,抑制PD-1与PD-L1之间的相互作用的药剂被配制在与本文所提供的抗体相同的药物组合物中。在一些实施方案中,抑制PD-1与PD-L1之间的相互作用的药剂被配制在与本文所提供的抗体不同的药物组合物中。在一些实施方案中,在施用本文所提供的抗体之前施用抑制PD-1与PD-L1之间的相互作用的药剂。在一些实施方案中,在施用本文所提供的抗体之后施用抑制PD-1与PD-L1之间的相互作用的药剂。在一些实施方案中,在施用本文所提供的抗体的同时施用抑制PD-1与PD-L1之间的相互作用的药剂,但以单独的药物组合物施用药剂和抗体。

[0279] 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。

[0280] 在一些实施方案中,免疫刺激剂调控精氨酸酶、吡啶胺-2,3-双加氧酶或腺苷A2A受体的活性。

[0281] 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,及其组合。在一些方面,细胞因子是IL-2。

[0282] 在一些实施方案中,免疫刺激剂是溶瘤细胞病毒。在一些方面,溶瘤细胞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)、牛痘病毒和马拉巴病毒。

[0283] 附加治疗剂的进一步实例包括紫杉烷 (例如,紫杉醇或多西紫杉醇); 铂类药剂 (例如,卡铂、奥利沙铂和/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/或米妥蒽醌); 叶酸 (例如,亚叶酸); 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,附加治疗剂是叶酸、5-氟尿嘧啶和/或奥沙利铂。在一些实

施方案中,附加治疗剂是5-氟尿嘧啶和伊立替康。在一些实施方案中,附加治疗剂是紫杉烷和铂类药物。在一些实施方案中,附加治疗剂是紫杉醇和卡铂。在一些实施方案中,附加治疗剂是培美曲塞。在一些实施方案中,附加治疗剂是靶向治疗的,诸如EGFR、RAF或MEK靶向剂。

[0284] 可以以任何合适的方式施用附加治疗剂。在一些实施方案中,本文所提供的药物和附加治疗剂包含于相同的药物组合物中。在一些实施方案中,本文所提供的抗体和附加治疗剂包含于不同的药物组合物中。

[0285] 在其中本文所提供的抗体和附加治疗剂包含于不同的药物组合物中的实施方案中,抗体的施用可以发生在施用附加治疗剂之前、同时和/或之后。在一些方面,本文所提供的抗体和附加治疗剂的施用彼此发生在约一个月内。在一些方面,本文所提供的抗体和附加治疗剂的施用彼此发生在约一周内。在一些方面,本文所提供的抗体和附加治疗剂的施用彼此发生在约一天内。在一些方面,本文所提供的抗体和附加治疗剂的施用彼此发生在约十二小时内。在一些方面,本文所提供的抗体和附加治疗剂的施用彼此发生在约一小时内。

[0286] 使用方法

[0287] 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的供体的细胞和/或体内递送至患者组织的方法。在不希望受到理论束缚的情况下,线粒体通过肌动蛋白依赖性内吞作用被组织细胞或培养的细胞吸收,从而提供了将药物组合物直接递送至细胞中的方法。在非限制性说明性实例中,在2-24小时的时间段内将线粒体通过例如将线粒体(100 μ g/孔)与细胞(10^6 /孔)在培养基中共温育,将线粒体移植到靶免疫细胞中。本领域技术人员可以认识到施用于离体的免疫细胞或患者体内组织的线粒体的剂量可以基于在增强一种或多种靶免疫细胞方面的预期结果而改变,诸如优化生存力、存活、耐力、自我更新能力和/或选择。将线粒体离体递送至免疫细胞中,例如,通过共温育,线粒体的剂量可以在每个靶细胞0.0001ng线粒体至每个靶细胞2.5ng线粒体之间。将线粒体在体内递送至患者组织时,可以递送每1mL1个线粒体至 10^7 个线粒体之间。

[0288] 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、记忆免疫细胞(例如中枢记忆CD8 T细胞、效应记忆CD8 T细胞或记忆样T细胞)、Treg细胞(例如Treg CD4 T细胞)、CAR-T细胞等)的组合物,其中细胞包含外源性线粒体或由外源性线粒体增强,该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、封装的线粒体或具有基因修饰的自生线粒体。这些细胞可以是本领域中已知的具有抗肿瘤活性的任何效应细胞,或是能够预防自身免疫的免疫抑制性免疫细胞。因此,本说明书提供了将包含外源性线粒体或由外源性线粒体增强的免疫细胞,或包含外源性线粒体或由外源性线粒体增强的免疫细胞的药物组合物递送至细胞和/或患者的组织或源自同种异体的供体的细胞的方法。包含外源性线粒体或由外源性线粒体增强的免疫细胞可以用于治疗各种疾病,包括但不限于各种形式的癌症、肿瘤和自身免疫性疾病。

[0289] 在一些实施方案中,CAR T细胞的制备可以包括以下步骤:

[0290] 1. 通过白细胞单采术从患者的血液收集T淋巴细胞。

[0291] 2. 通过密度梯度离心、淘析和免疫磁珠选择来富集T细胞。

[0292] 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基因修

饰(例如,将CAR基因引入靶细胞的基因组)

[0293] 4.使用本领域中已知的方法,通过人工抗原呈递系统(抗CD8/抗CD28免疫磁珠/LV-APC)经由多克隆活化来活化和扩增CAR-T细胞。

[0294] 一致性通常是通过根据cGMP(现行良好生产规范)对原材料和方案进行标准化和验证来实现的。

[0295] 5.质量保证——根据FDA指南,使用本领域已知的方法检测生存力、表型、革兰氏染色、内毒素以及细菌、真菌和支原体污染物。

[0296] 6.制剂和施用——使用本领域已知的方法测试临床规定的剂量和施用途径。

[0297] 治疗性细胞的保存、包装、运输、接收和施用通常应保持产品稳定性和监管链。

[0298] 在具体实施方案中,在进行基因修饰(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。在具体实施方案中,诸如在包括离体基因修饰的方法中,在离体基因修饰(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。在具体实施方案中,在体内进行基因修饰(例如,引入CAR基因)(例如,体内病毒介导的基因修饰)之前将线粒体制剂离体递送至免疫细胞。在不希望受到理论束缚的情况下,步骤(1)通常对于从免疫功能低下的癌症患者身上提取的自体T细胞(耗竭或衰老的T细胞)的再生很重要。可以将线粒体以0.2:1至5000:1的比例与细胞离体共温育,例如以2:1、0.5:1、1:1、10:1、50:1、100:1、200:1、500:1、1000:1或5000:1的比例共温育。

[0299] 为了增强免疫细胞活性,诸如CAR-T细胞活性,还可以在体内将线粒体与免疫细胞一起递送(4)至患者体内。在具体实施方案中,在进行体内基因修饰(例如,引入CAR基因)(例如,体内病毒介导的基因修饰)(1)之前、(2)同时或(3)之后将线粒体制剂在体内递送至免疫细胞。在具体实施方案中,在进行离体基因修饰(例如,引入CAR基因)后将线粒体制剂在体内递送至免疫细胞。在本发明的具体实施方案中,CAR-T细胞或其他免疫细胞经由全身(静脉内)输注递送,而线粒体则经由(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脉管系统递送。

[0300] 实施例

[0301] 以下是本发明的方法和组合物的实施例。可以理解,鉴于本文提供的一般描述,可以实施各种其他实施方案。

[0302] 实施例1a:从组织样品或培养的细胞中分离线粒体

[0303] 进行实验以从组织样品或培养的细胞中分离线粒体。

[0304] 制备

[0305] 制备了以下溶液以分离完整、可存活、具有呼吸活性的线粒体。为了使用本方法成功分离线粒体,应将溶液和组织样品保存在冰上以保持线粒体生存力。即使在保持在冰上时,分离的线粒体将表现出随时间推移而降低的功能活性(Olson等人,J Biol Chem 242:325-332,1967)。如果可能,应提前准备以下溶液:

[0306] -1M的K-HEPES储备溶液(用KOH调整pH至7.2)。

[0307] -0.5M的K-EGTA储备溶液(用KOH调整pH至8.0)。

[0308] -1M的 KH_2PO_4 储备溶液。

[0309] -1M的 MgCl_2 储备溶液。

[0310] -均质缓冲液(pH 7.2):300mM蔗糖、10mM K-HEPES和1mMK-EGTA。在4°C下储存。

[0311] -1x PBS (ThermoFisher, 10010031)

[0312] -通过将100mL的10×PBS移液到1L双蒸馏H₂O中来制备1×PBS。通过将2mg枯草杆菌蛋白酶A称入1.5mL微量离心管中来制备枯草杆菌蛋白酶A原液。在-20°C下储存直至使用。在均质缓冲液中以2mg/ml制备。

[0313] 从组织分离线粒体

[0314] 概括了使用组织解离和差分过滤分离线粒体的程序步骤的方案如图2所示。将从骨骼肌中提取的两个6mm活检新鲜样品取样转移至温和gentleMACS C管 (Miltenyi Biotec, Somerville, MA) 中的5mL均质缓冲液中, 并使用gentleMACS™解离器 (Miltenyi Biotec) 的1分钟均质程序对样品进行均质化。将枯草杆菌蛋白酶A储备溶液 (250μL) 加入gentleMACS C管中的匀浆中, 并在冰上温育10分钟。将匀浆以750×g离心4分钟 (作为任选的步骤)。之后, 在冰上的50mL锥形离心管中通过预润湿的40μm网状过滤器过滤匀浆。将滤液在冰上的50mL锥形离心机中通过新的预润湿的40μm网状过滤器重新过滤。将滤液在冰上的50mL锥形离心管中通过新的预润湿的10μm网状过滤器再次重新过滤。将滤液在冰上的50mL锥形离心管中通过新的预润湿的6μm网状过滤器重新过滤。所得滤液被立即使用, 或通过离心浓缩。在浓缩的情况下, 将滤液转移至1.5mL微量离心管中, 并在4°C下以9000×g离心10分钟。移除上清液, 并将含有线粒体的沉淀物重新悬浮, 并结合在1mL均质缓冲液中。

[0315] 从培养的细胞分离线粒体

[0316] 将线粒体也从培养的细胞中分离, 例如, 从人类心脏成纤维细胞 (HCF) 细胞系 (从ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA获得) 中分离出来。

[0317] 人类心脏成纤维细胞 (HCF) 细胞的培养

[0318] 根据供应商的指南 (ScienCell), 将人类心脏成纤维细胞 (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。在5% CO₂的加湿气氛中, 将细胞在37°C下保持为单层, 并在达到90%汇合时传代。

[0319] 人类心脏成纤维细胞 (HCF) 细胞的制备

[0320] 将汇合度为80%的来自两个烧瓶 (T150) 的HCF细胞用PBS洗涤一次。然后使用胰蛋白酶根据供应商说明 (ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA) 拆分细胞。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停止反应。将细胞收集在50mL离心管中, 并以1000rpm (190×g) 离心5分钟。弃去上清液, 总共用1x PBS洗涤三次。

[0321] 不同于HCF的培养细胞的制备应按照制造商的说明进行。值得注意的是, 用作线粒体来源的细胞可以是贴壁的、半贴壁的或悬浮的。

[0322] 线粒体分离程序与从组织样品中分离线粒体的程序基本上相同, 除了使用人类成纤维细胞而不是活检样品。

[0323] 可替代地, 可以通过重复离心 (Kesner等人, 2016, "Characteristics of Mitochondrial Transformation into Human Cells", Sci Rep 6:26057) 分离线粒体。简而言之, 细胞通过胰蛋白酶消化收集, 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或冰上进行。将离心的细胞重新悬浮于线粒体分离缓冲液 (320mM蔗糖, 5mM Tris-HCl, pH 7.4, 2mM EGTA) 中, 并用Dounce均质器均质。通过两次以3000×g离心5分钟来移除细胞核和细胞碎片, 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,并将线粒体沉淀物重新悬浮于线粒体分离缓冲液中。通过Bradford测定法来确定线粒体浓度。

[0324] 线粒体数量

[0325] 通过用MitoTracker Orange CMTMRos (5 μ mol/L; Thermo Fisher Scientific) 标记分离的线粒体的等分试样 (10 μ L) 来确定可存活线粒体数量。将标记的线粒体的等分试样点到载玻片上,并使用带有63 \times C复消色差物镜(1.2W Korr/0.17NA, Zeiss)的转盘共聚焦显微镜进行计数。用线粒体特异性染料MitoFluor Green (Thermo Fisher Scientific) 对线粒体进行复染。选择适当的波长来测量使用未染色的细胞和组织的自发荧光和背景荧光。简而言之,将1 μ L标记的线粒体放置在显微镜载玻片上并覆盖。使用MetaMorph成像分析软件在覆盖整个样本区域的低($\times 10$)放大倍率下确定线粒体数量。

[0326] 实施例1b:从培养的细胞中分离线粒体

[0327] 进行实验以从培养细胞中分离线粒体

[0328] 制备

[0329] 制备了以下溶液以分离完整、可存活、具有呼吸活性的线粒体。为了使用本方法成功分离线粒体,应将溶液和组织样品保存在冰上以保持线粒体生存力。即使在保持在冰上时,分离的线粒体将表现出随时间推移而降低的功能活性 (Olson等人, J Biol Chem 242: 325-332, 1967)。如果可能,应提前准备以下溶液:

[0330] -1M的K-HEPES储备溶液(用KOH调整pH至7.2)。

[0331] -0.5M的K-EGTA储备溶液(用KOH调整pH至8.0)。

[0332] -均质缓冲液(pH 7.2):300mM蔗糖、10mM K-HEPES和1mMK-EGTA。在4 $^{\circ}$ C下储存。

[0333] -1x PBS (ThermoFisher, 10010031)

[0334] -通过将2mg枯草杆菌蛋白酶A称入1.5mL微量离心管中来制备枯草杆菌蛋白酶A原液。在-20 $^{\circ}$ C下储存直至使用。在均质缓冲液中以2mg/ml制备。

[0335] 人类心脏成纤维细胞(HCF)细胞的培养

[0336] 如实施例1a中所描述地培养人类心脏成纤维细胞(HCF) (从ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA获得) 并将细胞在达到90%汇合时传代。

[0337] 不同于HCF的培养细胞的制备应按照制造商的说明进行。值得注意的是,用作线粒体来源的细胞可以是贴壁的、半贴壁的或悬浮的从培养的细胞分离线粒体

[0338] 从培养的细胞分离线粒体,例如,从人类心脏成纤维细胞(HCF)细胞系。根据实施例1a进行HCF细胞的制备。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均质缓冲液中,并使用gentleMACSTM解离器(Miltenyi Biotec)的1分钟均质程序对样品进行均质化。将枯草杆菌蛋白酶A储备溶液(250 μ L)加入gentleMACS C管中的匀浆中,并在冰上温育10分钟。在冰上的50mL锥形离心管中通过预润湿的40 μ m网状过滤器过滤匀浆。滤液在冰上的50mL锥形离心机中通过新的预润湿的40 μ m网状过滤器重新过滤。将滤液在冰上的50mL锥形离心管中通过新的预润湿的10 μ m网状过滤器再次重新过滤。任选地,将滤液在冰上的50mL锥形离心管中通过新的预润湿的5 μ m网状过滤器重新过滤。所得滤液被立即使用,或通过离心浓缩。在浓缩的情况下,将滤液转移至1.5mL微量离心管中,并在4 $^{\circ}$ C下以9500 \times g离心5分钟。以相同的离心速度洗涤三次。

[0339] 分离的线粒体的定量

[0340] 将分离的线粒体悬浮于实施例1b的均质缓冲液中,并保存在冰上直至使用。为准备不同剂量的施用,使用Qubit™荧光计(ThermoFisher Scientific/Invitrogen),按照制造商的说明采用Qubit™蛋白质测定试剂盒,测量线粒体量。对于蛋白质浓度测量,将线粒体重悬于PBS中(ThermoFisher,10010031)中。就以 μg 表达的蛋白质含量而言来估计线粒体剂量。

[0341] 实施例2:T细胞分离、活化和培养

[0342] 从健康yi供体的白膜层分离 CD8^+ T细胞。根据制造商的说明,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™人类 CD8^+ T细胞分离试剂盒(Stemcell,17953)和The Big Easy™EasySep™磁体(Stemcell,18001)从PBMC中收获人类 CD8^+ T细胞。在100U/ml重组人类IL-2(Peprotech,200-02)的存在下,用免疫磁珠人类T活化剂 CD3/CD28 (ThermoFisher,111.32D)以1比1的比例活化分离的 CD8^+ T细胞。将 CD8^+ T细胞培养在RPMI 1640培养基GlutaMAX™补充剂500ml(ThermoFisher,61870010)中,其补充有1% L-谷氨酰胺(ThermomFisher,25030024)、1%青霉素-链霉素(10'000U/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)。 CD8^+ T细胞以50万个细胞/mL铺板,并且当细胞达到200万个细胞/mL的汇合度或培养基变黄时分离。

[0343] 实施例3:T细胞移植

[0344] 线粒体移植前24小时,以50万个细胞/mL将 CD8^+ T细胞铺板在24孔板中。当分离线粒体时,收集 CD8^+ T细胞并以1500rpm($430 \times g$)离心5分钟。弃去上清液,并且将细胞重悬于浓度为100万个细胞/100 μL 的新鲜T细胞培养基中。T细胞培养基描述于实施例2中。

[0345] 在最终体积为200 μL 的T细胞培养基中,在24孔板的每个孔中,以每100万个 CD8^+ T细胞中10 μg 至100 μg 蛋白质的范围,将移植的 CD8^+ T细胞与分离的线粒体温育4小时。外源性线粒体和 CD8^+ T细胞共温育后4小时,每孔加入1.8ml新鲜T细胞培养基。

[0346] 实施例4:线粒体标记和内化

[0347] 实施例4.1-采用染色的分离的线粒体的T细胞移植

[0348] 线粒体移植前24小时,以50万个细胞/mL将 CD8^+ T细胞铺板在24孔板中。根据实施例1b中所描述的程序分离线粒体。然后,在实施例1b的均质缓冲液中,用Mitotracker Red CMXRos(ThermoFisher,M7512)和Mitotracker Green FM(ThermoFisher,M7514)在37 $^{\circ}\text{C}$ 下以200nM对线粒体染色10至15分钟。用实施例1b的均质缓冲液在4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 $9500 \times g$ 对染色的线粒体进行3次、5分钟的洗涤,并将最后一次洗涤的上清液保存为对照。收集 CD8^+ T细胞并以1500rpm($430 \times g$)离心5分钟。移除上清液,并且将细胞以100万个细胞/100 μL 重悬于新鲜T细胞培养基中。T细胞培养基描述于实施例2中。将染色的线粒体(立即)加入到T细胞中,以获得24孔板的每孔200 μL 的最终体积。染色线粒体的最后一次洗涤以与对照未移植的 CD8^+ T细胞等量加入。通过流式细胞术(例如,用FACSLyric(BD Biosciences)获得的数据)或荧光显微镜(Keyence显微镜,BZ-X810)从移植后5分钟到24小时评价染色的线粒体的整合。在外源性线粒体和 CD8^+ T细胞共温育超过4小时的情况下,每孔加入1.8ml新鲜T细胞培养基。

[0349] 实施例4.2-线粒体移植后染色

[0350] 在24孔板的每个孔中,在最终体积为200 μL 的T细胞培养基中,以每100万个 CD8^+ T

细胞中10 μ g至100 μ g蛋白质的范围,将移植的CD8⁺ T细胞与分离的线粒体温育4小时。外源性线粒体和CD8⁺ T细胞共温育后4小时,每孔加入1.8ml新鲜T细胞培养基。在共温育后24小时评价移植的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RPMI 1640培养基 (ThermoFisher, 11835030)中稀释至终浓度为100nM,该培养基补充有1%青霉素-链霉素 (10'000U/mL, Gibco, 15140122)、5%胎牛血清。每100万个CD8⁺ T细胞加入100 μ l染色,并在37 $^{\circ}$ C下染色15分钟。然后用FACS缓冲液 (1x PBS (ThermoFisher, 10010031), 2% FBS, 1% EDTA 0.5M (Sigma-Aldrich, E6758))以1500rpm (430 \times g)洗涤细胞5分钟两次。弃去上清液,并将CD8⁺ T细胞重悬于300 μ L的FACS缓冲液中,并在FACS机器 (FACSLyric, BD Biosciences)上获得。

[0351] 实施例5:线粒体移植后在体外记忆CD8⁺ T细胞的比例增加

[0352] 在将外源性线粒体移植到从健康的供体分离的CD8⁺ T细胞中并随后进行培育后的第9天,通过流式细胞术评价记忆T细胞的比例。

[0353] 程序

[0354] (i)如实施例2中所描述地进行T细胞分离、活化和培养。

[0355] (ii)线粒体分离:如实施例1b中先前所描述地从人类心脏成纤维细胞 (HCF)分离线粒体。将分离的线粒体悬浮于实施例1b的均质缓冲液中,并保存在冰上直至使用。为准备不同剂量施用,使用QubitTM荧光计 (ThermoFisher Scientific/Invitrogen)按照制造商的说明采用QubitTM蛋白质测定试剂盒测量线粒体量。就以 μ g表达的蛋白质含量而言来估计线粒体剂量。

[0356] (iii)移植后第9天,根据制造商的说明使用抗人类CD45RA APC (Biolegend, 304112)、抗人类CD45RO PB (Biolegend, 304223)和抗人类CD62L FITC (Biolegend, 304804)在冰上进行染色。根据表面表达,CD8⁺ T细胞被分为幼稚 (CD62L⁺、CD45RA⁺、CD45RO⁻)、干细胞样记忆 (CD62L⁺、CD45RA⁺、CD45RO⁺)、中枢记忆 (CD62L⁺、CD45RA⁻、CD45RO⁺)、效应记忆 (CD62L⁻、CD45RA⁻、CD45RO⁺)或效应 (CD62L⁻、CD45RA⁺、CD45RO⁻)。在未处理的CD8⁺ T细胞与用外源性线粒体移植的CD8⁺ T细胞之间比较不同亚群的部分。

[0357] 结果

[0358] 线粒体移植后第9天,中枢和效应记忆CD8⁺ T细胞的比例增加

[0359] 为了研究移植的线粒体有利于记忆CD8⁺ T细胞的存活和/或分化和/或从大群体中选择记忆CD8⁺ T细胞的能力,在活化后第12天,将线粒体移植CD8⁺ T细胞中,剂量水平为每100万个CD8⁺ T细胞中30 μ g和100 μ g线粒体。移植后第9天,对CD8⁺ T细胞进行染色,使用FACSLyric (BD Biosciences)通过流式细胞术进行分析,并且被分为幼稚 (CD62L⁺、CD45RA⁺、CD45RO⁻)、干细胞样记忆 (CD62L⁺、CD45RA⁺、CD45RO⁺)、中枢记忆 (CD62L⁺、CD45RA⁻、CD45RO⁺)、效应记忆 (CD62L⁻、CD45RA⁻、CD45RO⁺)或效应 (CD62L⁻、CD45RA⁺、CD45RO⁻)。

[0360] 如图3所示,与未处理的CD8⁺ T细胞相比,线粒体移植后中枢和记忆CD8⁺ T细胞的比例明显增加。用30 μ g和100 μ g线粒体的剂量检测到中枢和效应记忆CD8⁺ T细胞的比例明显增加。

[0361] 实施例6:线粒体移植后在体内记忆CD8⁺ T细胞的比例增加

[0362] 在针对急性感染的启动的免疫应答中,随时间推移评价效应和记忆T细胞的比例。

将卵清蛋白 (OVA) 肽限制的CD45.1小鼠OT-I T细胞活化并用外源性线粒体移植,然后注射至随后感染李斯特菌-OVA的CD45.2 C57/B6小鼠中。将治疗组与未移植线粒体的OT-I T细胞的启动的免疫应答进行比较。

[0363] 程序

[0364] (i) 根据EasySep™小鼠CD8⁺ T细胞分离试剂盒(Stemcell, Cat.#19853)进行小鼠CD8⁺ T细胞分离。通过使用1-1比例的CD3/CD28免疫磁珠(Gibco, Cat.#11456.D)和重组IL-2(50U/ml)进行T细胞活化和扩增。以50万个细胞/mL铺板CD8⁺ T细胞,并且当细胞达到200万个细胞/mL的汇合度或培养基变黄时分离。

[0365] (ii) OT-I小鼠的线粒体分离:如实施例1a中先前所描述的,从骨骼肌分离线粒体。将分离的线粒体悬浮于实施例1a的均质缓冲液中,并保存在冰上直至使用。为准备不同剂量施用,使用Qubit™荧光计(ThermoFisher Scientific/Invitrogen),按照制造商的说明采用Qubit™蛋白质测定试剂盒测量线粒体量。就以μg表达的蛋白质含量而言来估计线粒体剂量。

[0366] (iii) 如实施例3中先前所描述的,在活化后第7天移植小鼠CD8⁺T细胞。

[0367] (iv) 小鼠(CD45.2)被注射在24小时前移植的20'000个OT-I CD8⁺T细胞(CD45.1),随后感染李斯特菌OVA的2'000个菌落形成单位(cfu)。评价CD8⁺ T细胞随时间推移(第7天、第14天、第21天)在动物血液中和器官(第21天的脾脏、淋巴结(LN))中的持久性和记忆分化。血液或处理的器官染色:LIVE/DEAD可固定染料Aqua Dead(ThermoFisher, L34957)、抗小鼠CD8αPe/德克萨斯红(Abcam ab25294)、抗小鼠CD45.1 BV650(BD 563754)、抗小鼠CD45.2 BV421

[0368] (BD 562895)、抗小鼠KLRG1 PE-Cy7(BioLegend 138415)、抗小鼠CD127 PE(BioLegend 121111)、抗小鼠CD44 APC-Cy7(BD 560568)、抗小鼠CD62L PerCP/Cyanine5.5(BioLegend 104431)。OT-I T细胞针对李斯特菌-OVA的启动的免疫应答分为短寿命效应细胞(SLEC)(KLRG1+CD127-和/或CD44+CD62L-)和记忆前体细胞(MPEC)(KLRG1-CD127+和/或CD44+CD62L+)。

[0369] (v) 在处死当天,肽再刺激(OVA肽)后4小时评估细胞因子产生。从均质的脾脏中收集细胞,并将LN铺板在96孔板中。将细胞与10μM的SIINFEKL(OVA)肽或PMA/离子霉素一起温育30min,然后在Golgi-stop(BD)和Golgiplug(BD)的存在下再刺激另一4小时。收集、固定和透化细胞用于细胞内细胞因子染色:评估抗小鼠IFN γ PerCP/Cyanine5.5(BioLegend 505821)、抗小鼠Pacific Blue(BioLegend 506318)、抗小鼠IL-2PE(BioLegend 503807)和抗小鼠颗粒酶B FITC

[0370] (BioLegend 515403)产生。

[0371] 结果

[0372] 外源性线粒体移植促进记忆细胞形成和在启动的免疫应答期间的持久性

[0373] 随时间推移,小鼠短寿命效应细胞(SLEC)(KLRG1+CD127-和/或CD44+CD62L-)的比例降低,并且记忆前体细胞(MPEC)(KLRG1-CD127+和/或CD44+CD62L+)在注射有移植的OT-I CD8⁺T细胞的小鼠中增加。在肽再刺激后,相比于未处理的组,具有外源性线粒体的治疗组中OT-I CD8⁺ T细胞的细胞因子产量更高。

[0374] 实施例7:线粒体移植后体在外来自TIL的记忆样CD8⁺ T细胞的比例增加

[0375] 在将外源性线粒体移植到培养的人类TIL中后,通过流式细胞术评价随时间推移记忆样T细胞的比例。

[0376] 程序

[0377] (i) TIL分离和培养:使用诸如IV型胶原酶(Sigma Aldrich)和阿法链道酶(Roche)的酶消化手术切除的肿瘤肿块,产生单细胞悬液。如前所描述,TIL用高剂量的IL-2扩增(van denBerg JH等人J Immunother Cancer 2020;8:e000848.doi:10.1136/jitc-2020-000848)。如果TIL CD8⁺ T细胞的比例在大量TIL群体中足够,则如实施例2中先前所描述,进行CD8⁺ T细胞的分离。

[0378] (ii) 线粒体分离:如实施例1b中先前所描述,从人类心脏成纤维细胞(HCF)分离线粒体。将分离的线粒体悬浮于实施例1b的均质缓冲液中,并保存在冰上直至使用。为准备不同剂量施用,使用QubitTM荧光计(ThermoFisher Scientific/Invitrogen)按照制造商的说明采用QubitTM蛋白质测定试剂盒测量线粒体量。就以 μg 表达的蛋白质含量而言来估计线粒体剂量。

[0379] (iii) 在移植后4小时至两周的时间范围内,根据制造商的说明使用抗人类CD45RA APC (Biolegend, 304112)、抗人类CD45ROPB (Biolegend, 304223) 和抗人类CD62L FITC (Biolegend, 304804) 在冰上进行染色。根据表面表达,CD8⁺ T细胞被分为幼稚(CD62L⁺、CD45RA⁺、CD45RO⁻)、干细胞样记忆(CD62L⁺、CD45RA⁺、CD45RO⁺)、中枢记忆(CD62L⁺、CD45RA⁻、CD45RO⁺)、效应记忆(CD62L⁻、CD45RA⁻、CD45RO⁺)或效应(CD62L⁻、CD45RA⁺、CD45RO⁻)。在对照与用外源性线粒体移植的CD8⁺ T细胞之间比较不同亚群的部分。

[0380] 结果

[0381] 线粒体移植后记忆样TIL CD8⁺ T细胞的比例增加

[0382] 外源性线粒体向来自大群体的TIL中的移植促进记忆样TIL的存活和选择。

[0383] 实施例8:在荷瘤小鼠中或急性感染后重新挑战的移植TIL的过继细胞转移表现出增强的回忆应答

[0384] 从表达OVA的肿瘤中提取和分离的OT-I TIL用外源性线粒体移植。为了评价体外培养后选择的记忆样TIL的特性,将处理的或未处理的TIL过继转移并向荷瘤小鼠中或在急性感染后重新挑战。在OVA限制的荷瘤小鼠中,通过测量肿瘤生长,小鼠存活以及浸润癌肿块和淋巴器官中的转移细胞的持久性来评估随时间推移OT-I TIL的回忆能力。在急性感染环境中,OT-I TIL在随后感染表达OVA的病毒或细菌的动物中过继转移。在移植的TIL或未处理的TIL之间的血液和淋巴器官中评价随时间推移启动的免疫应答。

[0385] 程序

[0386] (i) 小鼠TIL的产生和提取:CD45.2 C57/B6小鼠在一侧被皮下移植200'000个表达OVA的肿瘤细胞。移植后6天,100'000个CD45.1 OT-I T细胞被过继地静脉内转移。移植后21天和/或当达到适当的肿瘤大小时,收获肿瘤并按照制造商的说明使用肿瘤解离试剂盒(130-096-730,Miltenyi Biotec)解离。为了从肿瘤中选择小鼠CD8⁺ T细胞,根据EasySepTM小鼠CD8⁺T细胞分离试剂盒(StemCell,Cat.#19853)进行分离。为了进一步选择OT-I TIL,根据LIVE/DEAD⁻、CD45.1⁺、CD8⁺进行基于FACS的细胞分选。

[0387] (ii) 从小鼠OT-I分离线粒体:如实施例1a中先前所描述的,从骨骼肌分离线粒体。将分离的线粒体悬浮于实施例1a的均质缓冲液中,并保存在冰上直至使用。为准备不同剂

量施用,使用Qubit™荧光计(ThermoFisher Scientific/Invitrogen),按照制造商的说明采用Qubit™蛋白质测定试剂盒测量线粒体量。就以 μg 表达的蛋白质含量而言来估计线粒体剂量。

[0388] (iii) 如实施例3中先前所描述,移植小鼠 CD8^+ T细胞。

[0389] (iv) 在荷瘤小鼠中重新挑战:CD45.2 C57/B6小鼠皮下移植200'000个表达OVA的肿瘤细胞。移植后5天,施加5Gy全身辐射。移植后6天,将10'000个移植的CD45.1 OT-I TIL过继地静脉内转移。使用卡尺每2-3天测量肿瘤生长。移植后21天和/或当达到适当的肿瘤大小时,收获肿瘤并按照制造商的说明使用肿瘤解离试剂盒(130-096-730,Miltenyi Biotec)解离。通过流式细胞术通过染色评估肿瘤处的浸润和淋巴器官的持久性:LIVE/DEAD可固定染料Aqua Dead(ThermoFisher,L34957)、抗小鼠 $\text{CD8}\alpha\text{Pe}$ /德克萨斯红(Abcam ab25294)、抗小鼠CD45.1 BV650(BD 563754)、抗小鼠CD45.2 BV421(BD 562895)、抗小鼠KLRG1 PE-Cy7(BioLegend 138415)、抗小鼠CD127 PE(BioLegend 121111)、抗小鼠CD44 APC-Cy7(BD 560568)、抗小鼠CD62L PerCP/Cyanine5.5(BioLegend 104431)。

[0390] (v) 急性感染后重新挑战:小鼠(CD45.2)在移植后一天注射10'000个OT-I TIL(CD45.1),随后感染2'000cfu李斯特菌-OVA。随时间推移在动物血液中(第7天、第14天、第21天)和在器官(第21天的脾脏、LN)中评价OT-I TIL的持久性和记忆分化。血液或处理器官的染色:LIVE/DEAD可固定染料Aqua Dead(ThermoFisher,L34957)、抗小鼠 $\text{CD8}\alpha\text{Pe}$ /德克萨斯红(Abcam ab25294)、抗小鼠CD45.1 BV650(BD 563754)、抗小鼠CD45.2 BV421(BD 562895)、抗小鼠KLRG1PE-Cy7(BioLegend 138415)、抗小鼠CD127 PE(BioLegend121111)、抗小鼠CD44 APC-Cy7(BD 560568)、抗小鼠CD62LPerCP/Cyanine5.5(BioLegend 104431)。OT-I TIL针对李斯特菌-OVA的回忆免疫应答被分为短寿命效应细胞(SLEC)(KLRG1+CD127-和/或CD44+CD62L-)和记忆前体细胞(MPEC)(KLRG1-CD127+和/或CD44+CD62L+)。

[0391] 结果

[0392] 移植的TIL在荷瘤小鼠中和急性感染后表现出改善的回忆能力。

[0393] 在荷瘤小鼠或感染小鼠中重新挑战的移植的TIL表现出记忆细胞的标志,如在荷瘤动物中增强的持久性、改善的回忆能力和更好的肿瘤控制所示。

[0394] 实施例9:移植的 CD8^+ T细胞具有增强的竞争存活信号的能力

[0395] 为了评价移植的T细胞高效竞争存活信号的能力,在相同的宿主内进行处理和未处理细胞的共转移。将卵清蛋白(OVA)肽限制的CD45.1小鼠OT-I T细胞活化并用外源性线粒体移植,而不移植CD45.1.2OT-I T细胞。CD45.1处理的OT-I和CD45.1.2未处理的OT-I共转移至随后感染李斯特菌-OVA的CD45.2 C57/B6小鼠中。将治疗组与在相同的宿主内未移植线粒体并竞争有限存活信号的OT-I T细胞的启动的免疫应答进行比较。

[0396] 程序

[0397] (i) 根据EasySep™小鼠 CD8^+ T细胞分离试剂盒(Stemcell,Cat.#19853)进行小鼠 CD8^+ T细胞分离。通过使用1-1比例的CD3/CD28免疫磁珠(Gibco,Cat.#11456.D)和重组IL-2(50U/ml)进行T细胞活化和扩增。以50万个细胞/mL铺板 CD8^+ T细胞,并且当细胞达到200万个细胞/mL的汇合度或培养基变黄时分离。

[0398] (ii) OT-I小鼠的线粒体分离:如实施例1a中先前所描述的,从骨骼肌分离线粒体。将分离的线粒体悬浮于实施例1a的均质缓冲液中,并保存在冰上直至使用。为准备不同剂

量施用,使用Qubit™荧光计(ThermoFisher Scientific/Invitrogen),按照制造商的说明采用Qubit™蛋白质测定试剂盒测量线粒体量。就以 μg 表达的蛋白质含量而言来估计线粒体剂量。

[0399] (iii) 如实施例3中先前所描述的,在活化后第7天移植小鼠CD8⁺T细胞。

[0400] (iv) 小鼠(CD45.2)被注射移植后1天的10⁷ 000个OT-I CD8⁺ T细胞(CD45.1)和10⁷ 000个未处理的OT-I CD8⁺ T细胞(CD45.1.2)。随后,用2000cfu的李斯特菌-OVA感染小鼠。评价CD8⁺ T细胞随时间推移在动物的血液中(第7天、第14天、第21天)和在器官(第21天的脾脏、LN)中的持久性和记忆分化。血液或处理器官的染色:LIVE/DEAD可固定染料Aqua Dead(ThermoFisher,L34957)、抗小鼠CD8 α Pe/德克萨斯红(Abcam ab25294)、抗小鼠CD45.1 BV650(BD563754)、抗小鼠CD45.2 BV421(BD 562895)、抗小鼠KLRG1PE-Cy7(BioLegend 138415)、抗小鼠CD127 PE(BioLegend121111)、抗小鼠CD44 APC-Cy7(BD 560568)、抗小鼠CD62LPerCP/Cyanine5.5(BioLegend 104431)。OT-I T细胞针对李斯特菌-OVA的启动的免疫应答分为短寿命效应细胞(SLEC)

[0401] (KLRG1+CD127-和/或CD44+CD62L-)和记忆前体细胞(MPEC)(KLRG1-CD127+和/或CD44+CD62L+)。

[0402] 结果

[0403] 移植细胞竞争有限存活信号的增强的能力

[0404] 在急性感染后,用外源性线粒体移植的OT-I T细胞更好地竞争有限存活信号。因此,相比于未处理的T细胞,在血液和淋巴器官中循环的处理的T细胞的比例增大。

[0405] 实施例10:线粒体转移增加了CAR-T细胞在体内的持久性

[0406] 将来自健康供体的大部分CD8⁺ T细胞用外源线粒体移植,并培养以随时间推移选择中枢记忆和效应记忆T细胞。来自健康供体的CD8⁺T细胞被转导以表达抗-CD19 CAR-T构建物(抗CD19scFv-FLAG-CD28-CD3 ζ ,Promab)。在B细胞淋巴瘤的小鼠异种移植模型中评价了用线粒体或未用线粒体处理的CAR-T细胞的启动的免疫应答。

[0407] 程序

[0408] (i) 如实施例2中所描述进行CAR-T细胞培养。

[0409] (ii) 线粒体分离:根据实施例1b中所描述的程序,从人类心脏成纤维细胞(HCF)分离线粒体。

[0410] (iii) 分离的线粒体的定量:根据实施例1b中所描述的程序以 μg 表达的蛋白质含量来估计线粒体剂量。

[0411] (iv) CAR-T细胞移植根据实施例3的程序。将30 μg 或100 μg 的量的线粒体移植到CAR-T细胞中。

[0412] 淋巴瘤模型

[0413] 9周龄雌性NOD/SCID小鼠(非肥胖型糖尿病;缺乏T细胞,巨噬细胞和NK细胞;Taconic,Denmark)皮下(s.c.)注射人类伯基特淋巴瘤CD19⁺Raji细胞(2.5×10^6 个细胞/小鼠)。当肿瘤达到60-100mm³的大小时,将动物随机分配到治疗组;每组选择5-8只肿瘤大小相等的小鼠进行治疗。这些动物接受静脉内注射10⁷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。用类似卡尺的仪器在两个维度上测量肿瘤大小。单个肿瘤体积(V)通过公式 $V=0.56 \times (\text{长度}+\text{宽度})^2$ 计算。在达到肿瘤体积为1,500mm³的人

道终点后,通过颈椎脱位处死动物。使用软件程序PRISM(GraphPad)生成Kaplan-Meier存活图,并使用log-rank(Mantel-Cox)检验比较存活曲线。

[0414] 白血病模型

[0415] 从杰克逊实验室购买的八周龄雄性NSG(NOD/SCID γ 小鼠;缺乏T细胞、B细胞和NK细胞)小鼠被安置在无菌笼子中的动物饲养箱中。使用胰岛素注射器经由侧尾静脉静脉内注射100 μ L的PBS中的Raji/Luc-GFP细胞(10^6 个)(指定为第0天)。在第6天经由生物发光成像测量萤光素酶活性以评估肿瘤负荷。在第7天,在100 μ L的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CD19 CAR-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,将存活的小鼠安乐死,收获脾脏和骨髓细胞并重新悬浮在总体积为2mL的流式细胞术(FACS)缓冲液(PBS,补充有2%FCS)中。然后用抗人CD3 PE和抗人CD45 APC抗体标记200微升细胞悬液,并通过流式细胞术分析以确定人类T细胞的百分比。

[0416] 相对于非增强或对照CAR-T细胞,用外源性线粒体增强的CAR-T细胞在治疗的小鼠中显示出更高的抗肿瘤活性(更长的中位存活期)。

[0417] 实施例11:线粒体移植在体外对Treg存活和选择的影响

[0418] 在将外源性线粒体移植到从健康供体中分离并随后培养的CD4⁺T细胞大群体后,通过流式细胞术评价随时间推移Treg的比例。

[0419] 程序

[0420] (i) CD4⁺ T细胞分离、活化和培养:从健康供体的白膜层分离CD4⁺ T细胞。根据制造商的说明,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™人类CD4⁺ T细胞分离试剂盒(Stemcell,17952)和The Big Easy™EasySep™磁体(Stemcell,18001)从PBMC中收获人类CD4⁺ T细胞。在100U/ml重组人类IL-2(Peprotech,200-02)的存在下,用免疫磁珠人类T活化剂CD3/CD28(ThermoFisher,111.32D)以1比1的比例活化分离的CD4⁺T细胞。将CD4⁺ T细胞培养在RPMI 1640培养基 GlutaMAX™补充剂(ThermoFisher,61870010)中,其补充有1%L-谷氨酰胺(ThermoFisher,25030024)、1%青霉素-链霉素(10'000U/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%2 β -巯基乙醇(Gibco,31350-010)。CD4⁺ T细胞以50万个细胞/ml接种,当细胞达到200万个细胞/ml的汇合度或培养基变黄时分离。

[0421] (ii) CD4⁺ T细胞移植:在活化后第1天至第20天之间,用在每100万个CD4⁺ T细胞中10 μ g至100 μ g线粒体的范围内的不同剂量来移植CD4⁺ T细胞。

[0422] (iii) CD4⁺ T细胞移植后染色:在第1天至20天的范围内,在不同时间点通过流式细胞术对CD4⁺ T细胞进行染色和分析。根据制造商的说明,使用抗人类CD45RA APC(BioLegend,304112)、抗人类CD45RO PB(BioLegend,304223)、抗人类CD25 FITC(BioLegend,302604)和抗人类CD127 Pe(BioLegend,351304)在冰上进行染色。根据所提及的标志物的表面表达,CD4⁺ T细胞分为幼稚(CD25⁻、CD127⁺、CD45RA⁺、CD45RO⁻)、Treg(CD25⁺、CD127⁻、CD45RA⁺、CD45RO⁻)、中枢记忆(CD25⁺、CD127⁺、CD45RA⁻、CD45RO⁺)、效应记忆(CD25⁻、CD127⁺、CD45RA⁻、CD45RO⁺)或效应(CD25⁺、CD127⁻、CD45RA^{+/-}、CD45RO^{+/-})。在对照与用外源性线粒体移植的CD4⁺ T细胞之间比较不同亚群的部分。此外,根据制造商的说明,

使用真核人类Treg流试剂盒 (BioLegend, 320027) 在线粒体移植后评估Treg群体中FOXP3的水平。

[0423] 结果

[0424] 外源性线粒体移植促进从CD4⁺ T细胞大群体的Treg选择

[0425] 线粒体移植后,相比于未用外源性线粒体处理的CD4⁺ T细胞,发现Treg在大群体中的比例更高。这种选择方法可以用于增加来自CD4⁺ T细胞的大群体中Treg的比例,作为用于治疗自身免疫性疾病的过继细胞治疗。

[0426] 援引并入

[0427] 本文中列出的所有专利和非专利出版物的全部公开均各自通过引用整体并入,用于所有目的。

[0428] 其他实施方案

[0429] 上述公开可以涵盖具有独立实用性的多个不同的发明。尽管这些发明中的每一个都已经以其优选的形式公开,但本文所公开和说明的其具体实施方案不应以限制意义考虑,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素、特征、功能和/或特性的所有新颖和非显而易见的组合和子组合。以下权利要求特别指出了某些被认为是新颖和非显而易见的组合和子组合。可以在本申请,在要求本申请的优先权的申请中,或在相关申请中要求保护体现在特征、功能、元件和/或特性的其他组合和子组合中的发明。此类权利要求,无论是针对不同的发明还是针对相同发明,以及无论与原始权利要求相比,范围是否更广、更窄、相同或不同,也被视为包括于本公开的发明的主题中。

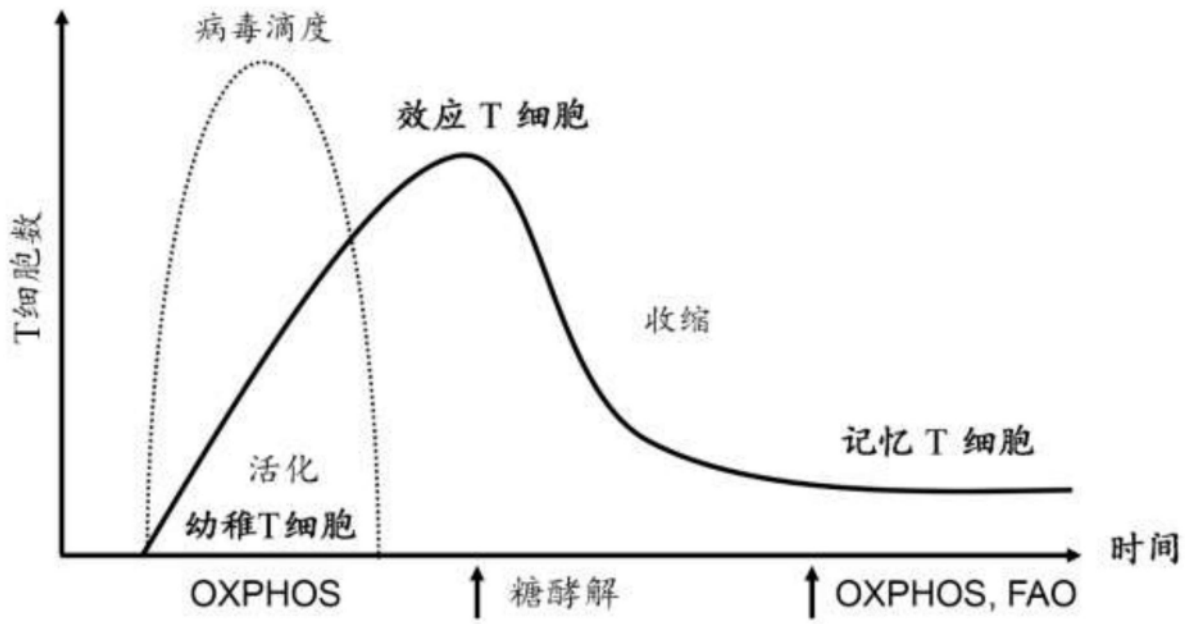


图1

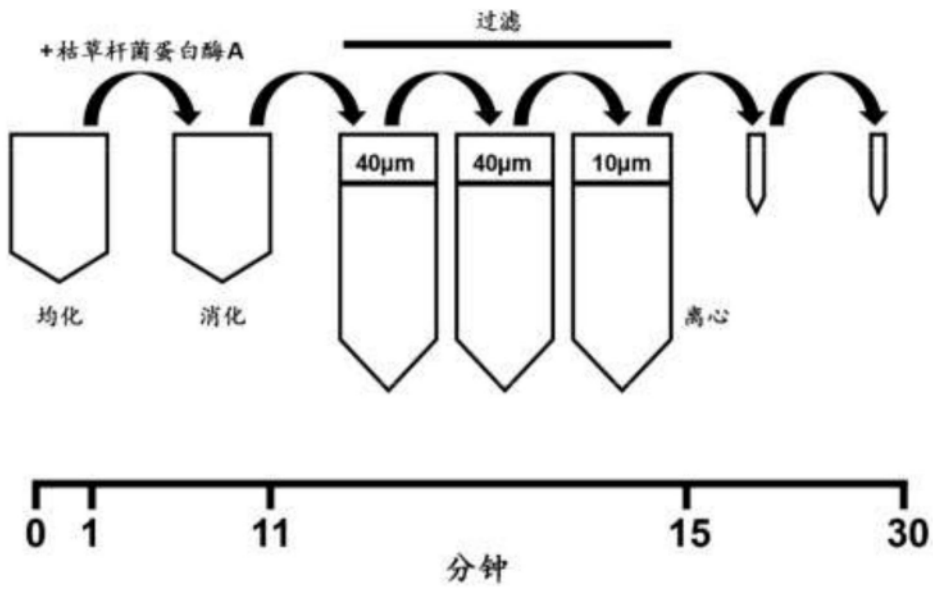


图2

中枢记忆 T 细胞

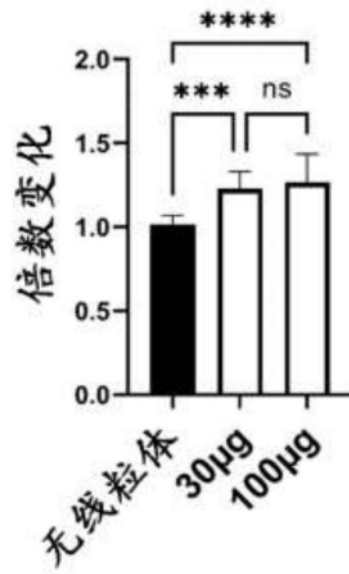


图3A

效应记忆 T 细胞

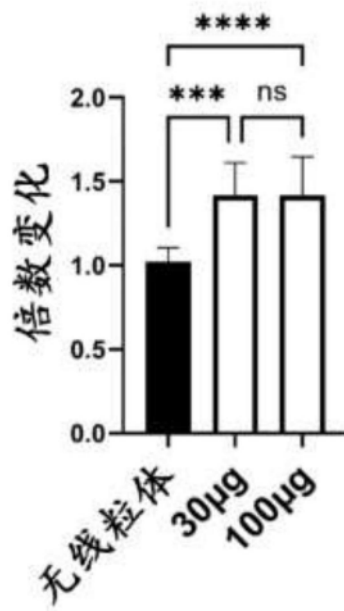


图3B