



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113573778 B

(45) 授权公告日 2025.05.13

(21) 申请号 201980089240.4

(22) 申请日 2019.11.15

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 113573778 A

(43) 申请公布日 2021.10.29

(30) 优先权数据  
62/768,176 2018.11.16 US  
62/927,075 2019.10.28 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2021.07.15

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2019/061818 2019.11.15

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02020/102731 EN 2020.05.22

(73) 专利权人 拉帕治疗有限公司  
地址 美国马里兰州

(72) 发明人 丹尼尔·哈丁·福勒

(74) 专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事  
务所(普通合伙) 11413  
专利代理师 回振海 王庆艳

(51) Int. Cl.  
G12N 5/0783 (2010.01)  
A61K 40/11 (2025.01)  
A61K 40/41 (2025.01)

A61K 40/32 (2025.01)

A61K 40/34 (2025.01)

A61P 25/28 (2006.01)

(56) 对比文件

Jason R. Thonhoff等.Expanded autologous regulatory T-lymphocyte infusions in ALS.Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.2018,第1-7页.

Jason R. Thonhoff等.Expanded autologous regulatory T-lymphocyte infusions in ALS.Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.2018,第1-7页.

Daniel H. Fowler等.Rapamycin-resistant effector T-cell therapy.Immunological Reviews.2013,第210-225页.

Miriam E. Mossoba等.Pentostatin Plus Cyclophosphamide Safely and Effectively Prevents Immunotoxin Immunogenicity in Murine Hosts.Clinical Cancer Research.2011,第3697-3705页.

(续)

审查员 姜芳馨

权利要求书2页 说明书68页 附图100页

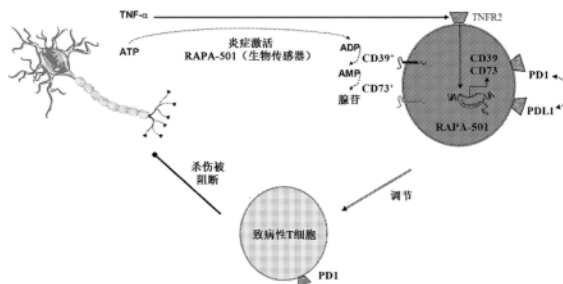
(54) 发明名称

使用诱导性调节性T(iT<sub>REG</sub>)细胞进行的ALS治疗

(57) 摘要

本公开提供了用于使用喷司他丁和环磷酰胺治疗,然后使用来自去分化的T细胞的TREG和/或TREG/Th2杂交细胞来治疗ALS的方法。本公开进一步提供了用于由去分化的T细胞产生TREG和TREG/Th2杂交细胞的方法、所述TREG和TREG/Th2杂交细胞、其群和其组合物。还提供了用于产生去分化的T细胞的方法、所述去分化的T细胞、其

群和其组合物。



CN 113573778 B

[接上页]

**(56) 对比文件**

Elizabeth A. Wohlfert等.GATA3 controls Foxp3+ regulatory T cell fate during inflammation in mice.The Journal of Clinical Investigation.2011,第121卷(第11期),第4503-4515页.

Ji Li等.Crossover Subsets of CD4+ T Lymphocytes in the Intestinal Lamina Propria of Patients with Crohn's Disease and Ulcerative Colitis.Digestive Diseases and Sciences.2017,第62卷第2357-2368页.

1. 喷司他丁和/或环磷酰胺以及包括制造的 $T_{REG}$ 细胞的组合物的组合在制备用于治疗有需要的受试者的肌萎缩性侧索硬化症的药物中的用途,其中:

所述受试者经受一个或多个初级治疗周期,所述一个或多个初级治疗周期中的每个初级治疗周期包括:

向所述受试者施用喷司他丁;和/或

向所述受试者施用环磷酰胺;以及

所述受试者经受一个或多个免疫疗法治疗周期,所述一个或多个免疫疗法治疗周期包括:

向所述受试者施用包括治疗有效量的制造的 $T_{REG}$ 细胞的组合物,其中通过在去分化培养基中培养获自受试者的T细胞以产生去分化的T细胞;和在包括IL-2、TGF- $\beta$ 、IL-4和珠:T细胞比率为3:1的抗CD3/抗CD28涂覆的磁珠的再分化培养基中培养所述去分化的T细胞,来产生所述制造的 $T_{REG}$ 细胞,其中所述去分化培养基包括维生素D、替西罗莫司和抗IL-2受体抗体,并且其中所述去分化的T细胞中RAPTOR和RICTOR的表达水平相对于在没有替西罗莫司、抗IL-2受体抗体和维生素D的情况下培养的对照T细胞群降低至少50%。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述制造的 $T_{REG}$ 细胞包括的中枢记忆细胞与效应记忆细胞的比率选自1:1、3:1、10:1、1:3和1:10。

3. 根据权利要求1和2中任一项所述的用途,其中所述IL-2以10000IU/ml的浓度存在于所述再分化培养基中。

4. 根据权利要求1和2中任一项所述的用途,其中所述TGF- $\beta$ 以10ng/mL的浓度存在于所述再分化培养基中。

5. 根据权利要求1和2中任一项所述的用途,其中在再分化培养基中培养去分化的T细胞的步骤进行3天到40天。

6. 根据权利要求1和2中任一项所述的用途,其中IL-4以1000IU/mL的浓度存在于所述再分化培养基中。

7. 制造的 $T_{REG}$ 细胞在制备用于治疗有需要的受试者的肌萎缩性侧索硬化症的药物中的用途,其中:

所述受试者经受一个或多个治疗周期,所述一个或多个治疗周期包括:

向所述受试者施用治疗有效量的制造的 $T_{REG}$ 细胞,其中通过在去分化培养基中培养获自受试者的T细胞以产生去分化的T细胞;和在包括IL-2、TGF- $\beta$ 、IL-4和珠:T细胞比率为3:1的抗CD3/抗CD28涂覆的磁珠的再分化培养基中培养所述去分化的T细胞,来产生所述制造的 $T_{REG}$ 细胞,其中所述去分化培养基包括维生素D、替西罗莫司和抗IL-2受体抗体,并且其中所述去分化的T细胞中RAPTOR和RICTOR的表达水平相对于在没有替西罗莫司、抗IL-2受体抗体和维生素D的情况下培养的对照T细胞群降低至少50%。

8. 根据权利要求7所述的用途,其中所述制造的 $T_{REG}$ 细胞包括的中枢记忆细胞与效应记忆细胞的比率选自1:1、3:1、10:1、1:3和1:10。

9. 根据权利要求7到8中任一项所述的用途,其中所述IL-2以10000IU/ml的浓度存在于所述再分化培养基中。

10. 根据权利要求7和8中任一项所述的用途,其中所述TGF- $\beta$ 以10ng/mL的浓度存在于所述再分化培养基中。

11. 根据权利要求7和8中任一项所述的用途,其中在再分化培养基中培养去分化的T细胞的步骤进行3天到40天。

12. 根据权利要求7和8中任一项所述的用途,其中IL-4以1000IU/mL的浓度存在于所述再分化培养基中。

13. 根据权利要求1或7所述的用途,其中所述制造的 $T_{REG}$ 细胞具有以下性质中的一种或多种性质:

如通过流式细胞术所测量的,至少5%的 $CD4^+$ 或 $CD8^+$  T细胞表达GATA3;

如通过流式细胞术所测量的,至少5%的 $CD4^+$ 或 $CD8^+$  T细胞表达FOXP3;

如通过流式细胞术所测量的,至少5%的 $CD4^+$ 或 $CD8^+$  T细胞表达CD73;

如通过流式细胞术所测量的,至少5%的 $CD4^+$ 或 $CD8^+$  T细胞表达CD103;

如通过流式细胞术所测量的,至少5%的 $CD4^+$ 或 $CD8^+$  T细胞表达FOXP3和GATA3两者;

如通过流式细胞术所测量的,至少20%的 $CD4^+$ 或 $CD8^+$  T细胞表达CD150;以及其组合。

14. 一种制造 $T_{REG}$ /Th2细胞的方法,所述方法包括:

在去分化培养基中培养T细胞以产生去分化的T细胞;和在包括IL-2、TGF- $\beta$ 、IL-4和珠:T细胞比率为3:1的抗CD3/抗CD28涂覆的磁珠的再分化培养基中培养所述去分化的T细胞以产生 $T_{REG}$ /Th2细胞,其中所述去分化培养基包括维生素D、替西罗莫司和抗IL-2受体抗体,并且其中所述去分化的T细胞中RAPTOR和RICTOR的表达水平相对于在没有替西罗莫司、抗IL-2受体抗体和维生素D的情况下培养的对照T细胞群降低至少50%。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述IL-2以10000 IU/mL的浓度存在于所述再分化培养基中。

16. 根据权利要求14或15所述的方法,其中所述IL-4以1000 IU/mL的浓度存在于所述再分化培养基中。

17. 根据权利要求14和15中任一项所述的方法,其中所述TGF- $\beta$ 以10 ng/mL的浓度存在于所述再分化培养基中。

18. 根据权利要求14和15中任一项所述的方法,其中所述去分化培养基包括维生素D、替西罗莫司、抗IL-2受体抗体和补充有5%人AB血清的X-Vivo 20,所述再分化培养基包括IL-2、TGF- $\beta$ 、IL-4、珠:T细胞比率为3:1的抗CD3/抗CD28涂覆的磁珠和补充有5%人AB血清的X-Vivo 20。

19. 根据权利要求14和15中任一项所述的方法,其中在再分化培养基中培养去分化的T细胞的步骤进行3天至40天。

## 使用诱导性调节性T( $iT_{REG}$ )细胞进行的ALS治疗

### [0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2018年11月16日提交的美国临时申请第62/768,176号以及于2019年10月28日提交的美国临时申请第62/927,075号的优先权,所述美国临时申请中的每个美国临时申请的全部内容通过引用并入本文。

### 背景技术

[0003] 过继性T细胞疗法是一种用于有效治疗癌症和传染病、自身免疫和神经退行性疾病的新兴干预措施。越来越清楚的是,转化为更高的增殖潜力和其它关键属性的具有更原始分化状态的T细胞的转移与过继转移后体内效应的改善相关。然而,大多数形式的过继性T细胞疗法需要离体制造步骤,这通常会导致进一步的细胞分化;这是特别成问题的,因为来自成年人的T细胞已经主要处于分化的晚期状态(称为效应记忆细胞),并且经常以处于检查点抑制性分子控制下的衰老状态存在。可以采取减轻这种限制的方法,包含在培养开始时分离(纯化)更多的原初T细胞亚群;然而,这种方法部分受限于成年人外周血中存在的原初T细胞的数量较少。因此,非常需要处于原始分化状态的分离的T细胞。

[0004] 众所周知,即使高度分化的细胞也具有朝更原始状态去分化的固有能力和能力。实际上,在最极端的实例中,可以操纵分化的细胞以达到诱导性多能干细胞(iPSC)状态,从而此类iPS细胞与胚胎干细胞共享关键特性,并且然后可以被进一步调节以再分化为不同的组织命运;使用此类iPSC方法的细胞疗法具有许多潜在的临床应用。从分化的体细胞产生iPS细胞最初是通过借助于病毒或非病毒介导的方法转移关键转录因子来证明的,所述关键转录因子包含Sox2、Oct3/4、KLF4和c-myc或Sox2、Oct3/4、Nanog和Lin28。

[0005] 然而,将体细胞转化为iPS细胞的能力低下并且部分取决于体细胞分化的程度。作为一个实例,相对于将鼠造血干细胞转化为iPS细胞,将成熟的鼠免疫T细胞转化为iPS细胞的能力要低300倍。然而,使用基因转移方法,已证明成熟的人外周血T细胞保持了转化为iPS细胞状态的能力。在过去的十年中,研究人员还对与T细胞分化最早阶段相关联的转录因子进行了表征。然而,从各种类型的干细胞前体中再分化T细胞是一个效率相对较低的过程,其通常要花费一到两个月的时间。

[0006] 尽管去分化的生物学越来越多地被表征,但在与去分化相关联的特定转录因子和转录因子动力学方面,仍然有很多未知的问题。同样重要的是要认识到,实现去分化的基因转移方法是费力的并且与如畸胎瘤产生等并发症相关,所述并发症必须通过另外的遗传干预措施(如细胞命运自杀基因编程)来解决。作为潜在的替代方案,可以利用各种药物干预措施来实现一定程度的去分化。作为一个实例,在细胞培养期间通过使用免疫抑制剂环孢菌素(cyclosporine)抑制钙调神经磷酸酶(calcineurin)引起分子改变,所述分子改变替代了对用于促进鼠iPS细胞的Sox2转录因子的基因递送的需要。另外,雷帕霉素(rapamycin)是一种抑制哺乳动物雷帕霉素靶标(mTOR)的免疫抑制药物,其可以通过饥饿诱导的转录因子KLF2上调对终末效应T细胞产生去分化作用,这继而增加了T中枢记忆分子CD62L和CCR7。另外,雷帕霉素和所得的对mTOR信号传导的抑制对于维持分化状态降低的原

初T细胞中的细胞静止至关重要。重要的是要注意,mTOR途径包括mTORC1复合体(含有Raptor亚基)和mTORC2复合体(含有Rictor亚基)两者。mTORC1和mTORC2两者的抑制与记忆T细胞的促进和维持增加相关。值得注意的是,雷帕霉素只能直接抑制mTORC1;然而,随着雷帕霉素介导的mTORC1抑制的延长,可能会发生mTORC2的下游抑制。还已知通过mTOR抑制或其它途径抑制来降低T细胞生长因子信号传导会上调与具有更原始分化状态的T细胞相关联的另一个关键分子,即IL-7受体 $\alpha$ (CD127)。在进一步的研究中,通过药理剂雷帕霉素或Wnt-P-连环蛋白信号传导激活剂TWS11抑制T细胞mTOR途径促进了人原初T细胞向分化程度较低的T干细胞记忆群的去分化,所述T干细胞记忆群先前在鼠和人T细胞中进行了鉴定和表征。在进一步的实验模型研究中,对AKT信号传导途径的药理抑制或对PI3激酶和血管活性肠肽信号传导途径的组合抑制使得产生分化状态降低并且过继转移时T细胞功能增强的T细胞。

[0007] 已经证明,通过在雷帕霉素中离体培养人T细胞来阻断mTOR降低了与效应子分化相关联的分子(如细胞因子分泌分子和溶细胞效应分子)的T细胞表达。

[0008] 另外,维生素D的1,25-羟基化形式(如本文所使用的“维生素D”)可以抑制人T细胞效应子功能。维生素D对人T细胞增殖的抑制作用可以与使用如环孢菌素A或雷帕霉素等药剂进行的免疫抑制药物暴露产生协同作用。然而,先前的研究表明,维生素D对T细胞效应子的抑制作用对Th1型分子而不是Th2型分子具有相对特异性。此外,维生素D被证明可以促进免疫抑制性调节性T( $T_{REG}$ )细胞群。

[0009] 在一个有点矛盾的发现中,确定了人CD8<sup>+</sup>T细胞表达高水平的维生素D受体,并且值最高的个体往往具有高水平的T细胞效应子功能和免疫衰老。

[0010] 在更近的研究中,使用结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)感染的鼠模型,证明了维生素D通过涉及IFN- $\gamma$ 产生和自噬的机制对于巨噬细胞消除细胞内病原体至关重要。另外,在人类非小细胞癌细胞系中,维生素D信号传导可以促进自噬的细胞毒性形式,所述细胞毒性形式当与放射组合时,有助于抗肿瘤作用。最后,维生素D受体信号传导促进正常人乳腺组织中的自噬;此类维生素D受体信号转导的丧失与罹患乳腺癌的风险增加相关。尽管有证据表明维生素D与先天免疫中的自噬有关(巨噬细胞环境),但在适应性免疫期间,缺乏有关维生素D对T细胞中自噬的作用的数据,并且在此背景下,维生素D和雷帕霉素对T细胞自噬的潜在作用是多余的。

[0011] 与维生素D在T细胞生物学中的潜在作用有关的这些有些矛盾的结果可能与最近发现的维生素D对在mRNA水平和微小RNA水平上的整个基因组的广泛作用有关。如此,维生素D对免疫的作用需要在上下文相关的框架内进行评估。

[0012] 调节性T( $T_{REG}$ )细胞对于维持免疫耐受至关重要。 $T_{REG}$ 细胞数量或质量的下降是许多原发性自身免疫性疾病的根本原因,仅举几例,所述原发性自身免疫性疾病包含I型糖尿病(T1DM)、多发性硬化症、类风湿性关节炎和系统性红斑狼疮。另外, $T_{REG}$ 缺乏与原发性神经退行性疾病自然史的加速相关。最后, $T_{REG}$ 缺乏与实体器官和造血细胞移植环境中的严重并发症(最值得注意的是,移植排斥和移植物抗宿主病(GVHD)的发生率增加)相关。鉴于 $T_{REG}$ 细胞在维持免疫稳态中的这种关键作用,已开发出许多实验方法来促进 $T_{REG}$ 细胞用于疾病的治疗。一种此类有前途的方法是过继转移 $T_{REG}$ 细胞,所述 $T_{REG}$ 细胞以两种主要的亚型存在:(1)天然(n) $T_{REG}$ 细胞,其源自胸腺(“n $T_{REG}$ ”或“天然 $T_{REG}$ ”),所述胸腺随着年龄的增长而退化,

从而减少了可用于过继转移的 $nT_{REG}$ 细胞的数量;以及(2)可诱导(i) $T_{REG}$ 细胞,其从更丰富的效应T细胞库在外周转化。由于 $nT_{REG}$ 细胞数量有限,因此将 $nT_{REG}$ 细胞用于过继性T细胞疗法的尝试依赖于离体制造方法来分离和随后扩增 $nT_{REG}$ 细胞。用于过继性细胞疗法的 $nT_{REG}$ 细胞的临床试验尚处于实施的早期阶段,主要在用于预防GVHD和治疗T1DM的I期/II期临床试验中。相比之下,在过继性细胞疗法中使用 $iT_{REG}$ 细胞(本公开的离体产生的 $T_{REG}$ 细胞,包含 $T_{REG}$ 和 $T_{REG}/Th2$ 细胞)存在其它挑战,即:(1)尽管外周效应T细胞相对丰富,但它们主要以具有有限的复制和治疗潜能的效应记忆成熟的状态存在;以及(2)此类外周效应T细胞对促成疾病发病机制的T细胞亚群,即Th1型和Th17型亚群,具有高度预先存在的效应子分化。如此,如果 $iT_{REG}$ 细胞疗法变得高度可行,则有必要开发一种体外制造方法,所述体外制造方法同时:(1)使效应T细胞向分化程度较低的记忆表型去分化,所述表型增加增值潜能并且明显改善 $T_{REG}$ 细胞治疗潜力;以及(2)消除致病性的Th1型和Th17型途径,同时促进T细胞向 $T_{REG}$ 表型分化。

[0013] 通过从待治疗的受试者(在自体疗法的情况下)或正常的供体(在异基因疗法的情况下)收集含淋巴细胞的外周血单核细胞来开始 $iT_{REG}$ 细胞的制造。通常,这种收集是在稳态下进行的,也就是说,无需任何生长因子施用;然而,在异基因的上下文中,收集有时是在施用如粒细胞集落刺激因子(G-CSF)或plerixifor等分子的上下文中进行的,如DiPersio JF, Stadtmauer EA, Nademanee A等人“用于在患有多发性骨髓瘤的患者中针对自体干细胞移植动员造血干细胞的Plerixafor和G-CSF对安慰剂和G-CSF (Plerixafor and G-CSF versus placebo and G-CSF to mobilize hematopoietic stem cells for autologous stem cell transplantation in patients with multiple myeloma)”。《血液学(Blood)》.2009;113(23):5720-5726中所描述的。在本公开中,描述了可以在收集用于 $iT_{REG}$ 制造的淋巴细胞之前施用抗TNF- $\alpha$ 治疗剂,以富集用于 $T_{REG}$ 表型的培养物输入T细胞。也就是说,证明了抗TNF- $\alpha$ 药剂依那西普(etanercept)(一种重组受体,其优先抑制血清、无细胞的TNF- $\alpha$ 并且相对保留细胞表面的膜结合形式的TNF- $\alpha$ )当通过RNA测序测量时诱导T细胞受体(TCR)谱系的全局变化。由于膜结合的TNF- $\alpha$ 通过TNFR2受体向 $T_{REG}$ 细胞提供正信号,因此我们的方法提供了用于在制造 $iT_{REG}$ 细胞之前富集 $T_{REG}$ 细胞的强有力的干预措施。优先抑制血清、无细胞的TNF- $\alpha$ 的其它治疗剂也可以用于此干预措施,包括但不限于抗TNF- $\alpha$ 单克隆抗体阿达木单抗(adalimumab)。

[0014] 肌萎缩性侧索硬化症(ALS)是一种涉及大脑皮质、脑干和脊髓的原发性神经退行性疾病,会导致进行性残疾并通常由于呼吸衰竭而死亡。由于各种遗传事件,ALS是一种家族性疾病,占10%的患者;其余患者为散发性ALS,其病因不明,但可能涉及环境因素。最新的注册表数据(2013年)表明,美国的ALS患病率为大约16,000例;这些数据还表明,ALS对白人、男性和60至69岁年龄段的个体的影响不成比例。退伍军人和可能的职业美式足球运动员似乎罹患ALS的风险增加,因此表明化学暴露或颅脑外伤可能增加罹患所述疾病的风险。ALS是一种具有多种临床表现和进展速率的异质性疾病。尽管ALS患者的平均生存期介于从诊断开始的两到四年之间,但生存期可能短至几个月或超过十年。很难估计ALS患者的预后,因为疾病评分系统(如患者报告的ALSFRS-R评分(ALS功能评分,已修订))无法说明疾病进展的线性和非线性方面。估计疾病进展速率的这一困难代表了ALS临床试验的局限性,并表明应强调潜在的疾病生物标志物(包含已经开发的免疫学监测)作为方案治疗的组成部

分。ALS的临床发作是隐性的,其中大多数患者表现为上肢或下肢无力或说话或吞咽困难(延髓性发作)。由于没有确定的血液、脊髓液或放射学检查,ALS仍是进行排除诊断;因此,ALS通常是在排除其它疾病之后的排除诊断。这种排除其它疾病的过程通常可能花费长达一年的时间,从而延迟了治疗尝试和临床试验积累;这种转诊延迟可能会产生一定影响,因为在最终ALS诊断时,多达50%的运动神经元可能不再起作用。考虑到这种情况,通常建议在诊断后的相对较早的时间点将ALS患者纳入研究试验。

[0015] ALS是一种原发性神经退行性疾病,其中神经炎症是继发性传播因子。此结论的证据部分源于以下观察结果:在绝大多数家族性和散发性ALS患者中,TAR DNA结合蛋白43(TDP-43)发生功能异常。在健康状态下仅限于细胞核的TDP-43是易受聚集影响的RNA和DNA结合蛋白,因此可以解释ALS患者神经元中看到的胞质包涵体。导致TDP-43途径改变的确切机制仍有待充分阐明,但似乎涉及各种细胞应激事件或通过RNA中间体复制自身的基因组元件(可逆转座元件,RTE)的扩增。最终,此类事件导致神经元中多方面的程序性细胞死亡,包含程序性坏死。值得注意的是,相对于更有序的凋亡细胞死亡,已经显示出在ALS患者中发生的坏死细胞死亡模式具有特殊的免疫原性。实际上,作为ALS中运动神经元死亡的已知分子介体的TNF- $\alpha$ 可以产生坏死形式的细胞死亡。坏死细胞死亡可以导致自身抗原的释放,然后将所述自身抗原呈递给适应性免疫系统以诱导自身免疫;另外,由于蛋白聚集体本身可能具有免疫原性,因此在ALS患者中出现的蛋白聚集体(包含但不限于TDP-43;SOD-1;p62)可能是神经变性后产生的自身免疫反应的靶标。实际上,最近已显示,来自ALS患者的单核细胞在被含有TDP-43的外来体脉冲后会形成炎性表型。

[0016] 响应于原发性神经变性,有广泛的证据表明,先天的炎性体和适应性外周免疫系统结合在一起会进一步导致ALS疾病的不当进展。在ALS的超氧化物歧化酶1(SOD1)转基因小鼠模型中,脊髓的CD3<sup>+</sup>T细胞浸润和小胶质细胞活化被认为是促进疾病进展的促炎性因子。此外,在ALS的PU.1敲除小鼠模型中,相对于宿主小胶质细胞,具有降低的炎性倾向性的野生型小胶质细胞的转移减少了神经变性并提高了存活率。另外,首次在ALS的SOD1鼠模型中描述了CD4<sup>+</sup>T细胞的保护作用,从而表明了外周免疫T细胞库在ALS中的双刃剑性质(充当传播因子或保护因子)。在ALS患者中,可以通过证实浸润脊髓的T细胞表达寡克隆T细胞受体(TCR)谱系来确定外周适应性免疫系统T细胞的有害作用的直接证据。此外,可以在与炎性外周源性单核细胞和常驻CNS小胶质细胞紧密相关的ALS患者脊髓组织中分离出源自外周免疫系统的专业抗原呈递细胞(树突状细胞)。另外,在ALS患者中,纯化的单核细胞表达促炎性RNA表达谱,包含先天性炎性分子IL-1- $\beta$ 的增加,其然后可以驱动促进CD4<sup>+</sup>T-辅助-1(Th1)、CD8<sup>+</sup>T-细胞毒性-1(Tc1)和CD4<sup>+</sup>Th17介导的神经退行性免疫的IL-23途径。在随后的研究中,ALS的SOD1鼠模型中保护性CD4<sup>+</sup>T细胞亚群的表型被表征为调节性T(T<sub>REG</sub>)细胞群,所述细胞群通过部分借助于反调节性Th2型细胞因子IL-4和IL-10介导的机制减轻炎症。

[0017] 这种生物学与神经炎症研究中的大量数据是一致的,这表明:小胶质细胞是大脑中驱动神经变性的关键细胞成分;并且小胶质细胞和CNS浸润性外周CD4<sup>+</sup>T细胞相互作用并影响疾病的发病机制。与鼠建模结果一致,相对于主要具有促炎性Th1型免疫谱的患者,具有富集FoxP3<sup>+</sup>T<sub>REG</sub>细胞和Th2型T细胞的外周免疫系统的患者的ALS的进展速率降低。此外,最近发现,ALS患者的T<sub>REG</sub>细胞功能异常,其中此功能异常与疾病的进展速率和严重程度有关。当前的一项临床试验正在评估多次输注nT<sub>REG</sub>细胞加低剂量IL-2施用来治疗ALS的用途

(临床试验注册中心(ClinicalTrials.gov);NCT03241784);IL-2是刺激STAT5信号传导途径并且从而可以促进 $nT_{REG}$ 细胞的体内扩增的细胞因子。

[0018] 诱导性(i) $T_{REG}$ 细胞不像 $nT_{REG}$ 细胞群那样源自胸腺;相反, $iT_{REG}$ 是从其它致病性胸腺后T细胞亚群(如Th1细胞)转化而来的群。尽管 $nT_{REG}$ 和 $iT_{REG}$ 两者在减轻炎症反应中都起着重要且非冗余的作用,但就调节性T细胞效力和制造容易性而言,开发 $iT_{REG}$ 疗法相对有利。此外,如果与此处描述的免疫监测技术和宿主治疗方案(喷司他丁(pentostatin)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、拉米夫定(lamivudine))组合使用,ALS的过继性 $iT_{REG}$ 疗法将特别有效。

[0019] 在1995年批准用于ALS治疗的首种药物利鲁唑(Riluzole)(**Rilutek®**)仅在降低ALS的发病率和死亡率方面有中等效力。尽管进行了大量的临床研究(由此已经对60种以上的分子进行了ALS治疗研究),但只有两种另外的分子在临床上取得了一定的成功,即抗氧化剂依达拉奉(edaravone)和酪氨酸激酶抑制剂马赛替尼(masitinib)。最近被FDA批准用于ALS治疗的依达拉奉(**Radicava®**)提供最小的临床益处,价格昂贵,并且需要连续2周、间隔2周的每天连续静脉内输注治疗;马赛替尼未经FDA批准。雷帕霉素用于治疗ALS的II期试验目前刚刚开始(临床试验注册中心标识符:NCT03359538)。由于雷帕霉素具有促进 $T_{REG}$ 细胞重建的趋势,因此雷帕霉素也可以是在ALS中使用的有利药剂。然而,雷帕霉素的长期治疗具有明显的毒性,需要进行药理学监测,就某些模型中的ALS实际恶化而言,可能具有矛盾的作用,并且可以限制过继转移的T细胞群的扩增。

[0020] 如此,鉴于目前非常有限的治疗选择的状态,非常需要评估用于治疗ALS的新策略。在此应用中,描述了一种以诱导性(i)调节性T( $T_{REG}$ )细胞疗法为中心的新型ALS治疗方法。

## 发明内容

[0021] 本公开涉及用于使T细胞去分化并且将此类细胞分化为 $T_{REG}$ 或 $T_{REG}/Th2$ 细胞的方法。

[0022] 在一些实施例中,初始去分化方法可以包含以在稳态下收获的输入细胞群开始培养(不施用药物)。

[0023] 在一些实施例中,所述方法包括用从已经或正在用抗TNF- $\alpha$ 治疗剂治疗的受试者(在自体上下文中)或正常供体(在异基因上下文中)收获的输入细胞群开始去分化培养,所述抗TNF- $\alpha$ 治疗剂对抑制血清、无细胞形式的TNF- $\alpha$ 具有优先选择性并相对保留了膜结合的TNF- $\alpha$ 。此类治疗剂包含但不限于:重组受体依那西普,其可以通过皮下注射以每周25或50mg的常规剂量施用;或单克隆抗体阿达木单抗,其可以通过静脉内注射以每周40mg或每隔一周40mg的常规剂量施用。在所有这些情况下,可以根据期望的生物标志物变化来调整所述抗TNF- $\alpha$ 治疗剂的剂量,所述生物标志物变化可以包含但不限于通过RNA测序分析的TCR谱系的改变和如通过流式细胞术测量的,向2型TNF受体(TNFR2)的转变和从1型TNF受体(TNFR1)的转变。

[0024] 在一些实施例中,所述方法包括:在包括维生素D、替西罗莫司(temsirolimus)和IL-2信号传导抑制剂的培养基中,以一定细胞密度接种包括来自受试者的T细胞的培养物输入细胞群;以1:1或更低的珠:T细胞比率将抗CD3/抗CD28涂覆的磁珠添加到所述T细胞和

培养基中以刺激所述T细胞,或者在最极端的实例中,不添加抗CD3/抗CD28共刺激;将所述培养物输入细胞群和培养基温育一定时间段,以产生去分化的T细胞。也可以在不存在任何珠共刺激的情况下执行此去分化过程。

[0025] 在前述实施例中的任何实施例中,所述方法可以进一步包括收获所述去分化的T细胞。

[0026] 在前述实施例中的任何实施例中,所述方法可以进一步包括在收获所述去分化的T细胞之后:将所述去分化的T细胞的至少一部分包装在包装中;以及冷冻含有所述去分化的T细胞的所述部分的所述包装。

[0027] 在前述实施例中的任何实施例中,所述方法可以进一步包括在将所述培养物输入细胞群接种到所述培养基中之前:从所述受试者收获所述培养物输入细胞群。

[0028] 在前述实施例中的任何实施例中,所述方法可以进一步包括测量所述培养物输入细胞群中RAPTOR或RICTOR的表达水平,其中所述时间段持续到所述培养物输入细胞群中RAPTOR或RICTOR的表达水平分别相对于对照T细胞群减少至少50%,并且更优选地减少90%,并且其中所述对照T细胞群是在没有替西罗莫司、IL-2信号传导抑制剂和维生素D的情况下于与所述培养物输入细胞群相同的条件下制造的。

[0029] 在前述实施例中的任何实施例中,所述方法可以进一步包括测量所述培养物输入细胞群中RAPTOR或RICTOR和管家蛋白的表达水平,其中所述时间段持续到所述制造的T细胞中RAPTOR或RICTOR的表达水平(通过所述管家蛋白归一化)分别比所述对照T细胞群中RAPTOR或RICTOR的表达水平(通过所述管家蛋白归一化)低至少50%,并且更优选地低90%,所述对照T细胞群是在没有替西罗莫司、IL-2信号传导抑制剂和维生素D的情况下于与所述培养物输入细胞群相同的条件下制造的。

[0030] 本公开还涉及一种通过前述实施例中的任何实施例所述的方法产生的去分化的T细胞。

[0031] 本公开还涉及一种组合物,所述组合物包括去分化的细胞群,其中与在没有替西罗莫司、IL-2信号传导抑制剂和维生素D的情况下于与所述培养物输入细胞群相同的条件下制造的对照T细胞群相比,所述去分化的细胞群的至少一部分表达的RAPTOR或RICTOR少至少50%,并且更优选地少90%。

[0032] 在前述实施例中的任何实施例中,所述方法可以进一步包括测量所述去分化的细胞群的至少一部分,其中相对于对照T细胞群,所述去分化的细胞群的所述至少一部分表达以下分子的RNA表达改变至少10%,并且更优选地改变50%,即:T细胞效应分子(包括但不限于颗粒酶B、IL-10和IFN- $\gamma$ )减少;与分化状态降低的细胞相关的转录因子(包括但不限于Nanog、KLF4和KLF10)增加;优先在原初T细胞亚群上表达的分子(包括但不限于CD 127、IL-7受体 $\alpha$ 链)的表达增加;与Th1型分化相关的转录因子(包括但不限于T-BET和STAT1)减少;以及促进细胞存活的转录因子(包括但不限于HIF-1 $\alpha$ )相对保留。

[0033] 在前述实施例中的任何实施例中,所述方法可以进一步包括测量所述去分化的细胞群的至少一部分,其中所述去分化的细胞群的所述至少一部分表达指示已经历自噬的细胞的分子的表达的至少改变10%,并且更优选地改变50%。作为一个实例,相对于对照T细胞,通过蛋白质印迹分析,所述去分化的细胞具有增加的p62表达。也可以使用其它测量自噬的标准方法,如在Yoshii SR, Mizushima N. “监测和测量自噬 (Monitoring and

Measuring Autophagy)”。《国际分子科学杂志(International Journal of Molecular Sciences)》.2017;18(9):1865中描述的那些方法。

[0034] 本公开还涉及一种通过前述实施例中的任何实施例所述的方法产生的去分化的T细胞。

[0035] 本公开还涉及一种组合物,所述组合物包括去分化的细胞群,其中相对于对照T细胞群,所述去分化的细胞群的至少一部分表达以下分子的RNA表达改变至少10%,并且更优选地改变50%,即:T细胞效应分子(包含但不限于颗粒酶B、IL-10和IFN- $\gamma$ )减少;与分化状态降低的细胞相关的转录因子(包含但不限于Nanog、KLF4和KLF10)增加;优先在原初T细胞亚群上表达的分子(包含但不限于CD 127、IL-7受体 $\alpha$ 链)的表达增加;与Th1型分化相关的转录因子(包含但不限于T-BET和STAT1)减少;以及促进细胞存活的转录因子(包含但不限于HIF-1 $\alpha$ )相对保留。

[0036] 本公开还涉及一种组合物,所述组合物包括去分化的细胞群,如通过表达指示已经历自噬的细胞的分子的表达改变至少10%,并且更优选地改变50%的所述去分化的细胞所限定的。作为一个实例,相对于对照T细胞,通过蛋白质印迹分析,所述去分化的细胞具有增加的p62表达。也可以应用其它测量自噬的方法,如在Yoshii SR,Mizushima N.“监测和测量自噬”。《国际分子科学杂志》.2017;18(9):1865中描述的那些方法。

[0037] 本公开还涉及一种组合物,所述组合物包括去分化的细胞群,其中与对照T细胞群相比,所述去分化的细胞群的至少一部分表达少于50%的RAPTOR和RICTOR两者。

[0038] 本公开涉及用于将去分化的T细胞分化为 $T_{REG}$ 或 $T_{REG}$ /Th2细胞的方法。

[0039] 在一些实施例中,所述方法包括:在包括IL-2、IL-4和TGF- $\beta$ 的培养基中培养本公开的去分化的T细胞或以其它方式去分化的T细胞;以3:1的比率(珠:T细胞比率)添加抗CD3/抗CD28涂覆的磁珠;以及将所述去分化的T细胞温育一定时间段以产生 $T_{REG}$ /Th2细胞。

[0040] 在一些实施例中,所述方法包括:在包括IL-2、IL-4和TGF- $\beta$ 的培养基中培养去分化的T细胞,相对于在没有替西罗莫司、IL-2信号传导抑制剂和维生素D的情况下于与所述培养物输入细胞群相同的条件下制造的对照T细胞群,所述去分化的T细胞具有至少50%的RAPTOR或RICTOR表达;以3:1的比率(珠:T细胞比率)添加抗CD3/抗CD28涂覆的磁珠;以及将所述去分化的T细胞温育一定时间段以产生 $T_{REG}$ /Th2细胞。

[0041] 在一些实施例中,所述方法包括:在包括IL-2和TGF- $\beta$ 的培养基中培养去分化的T细胞,相对于在没有替西罗莫司、IL-2信号传导抑制剂和维生素D的情况下于与所述培养物输入细胞群相同的条件下制造的对照T细胞群,所述去分化的T细胞具有至少90%的RAPTOR或RICTOR表达;以3:1的比率(珠:T细胞比率)添加抗CD3/抗CD28涂覆的磁珠;以及将所述去分化的T细胞温育一定时间段以产生 $T_{REG}$ 细胞。

[0042] 在前述实施例中的任何实施例中,所述培养基可以进一步包括培美曲塞(pemetrexed)。

[0043] 本公开还涉及一种 $T_{REG}$ 或 $T_{REG}$ /Th2细胞,其通过前述方法中的任何方法产生。

[0044] 本公开还涉及用于治疗有需要的受试者的肌萎缩性侧索硬化症的方法。

[0045] 在一些实施例中,所述方法包括使所述受试者经受一个或多个初级治疗周期,所述一个或多个初级治疗周期中的每个初级治疗周期包括:向所述受试者施用喷司他丁;和/或向所述受试者施用环磷酰胺;以及使所述受试者经受一个或多个免疫疗法治疗周期,所

述一个或多个免疫疗法治疗周期包括:向所述受试者施用包括治疗有效量的制造的T<sub>REG</sub>细胞的组合物。

[0046] 在一些实施例中,一种方法包括第一治疗周期、第二治疗周期、任选的一个或多个另外的治疗周期以及一个或多个免疫疗法治疗周期,所述第一治疗周期包括:向所述受试者施用喷司他丁,和/或向所述受试者施用环磷酰胺;所述第二治疗周期包括:向所述受试者施用喷司他丁,和/或向所述受试者施用环磷酰胺;所述一个或多个另外的治疗周期中的每个治疗周期包括:向所述受试者施用喷司他丁,和/或向所述受试者施用环磷酰胺,所述一个或多个免疫疗法治疗周期中的每个免疫疗法治疗周期包括:向所述受试者施用喷司他丁,和/或向所述受试者施用环磷酰胺,以及将制造的T<sub>REG</sub>细胞施用于所述受试者。

[0047] 在一些实施例中,一种方法包括一个或多个治疗周期,所述一个或多个治疗周期包括:向所述受试者施用治疗有效量的制造的T<sub>REG</sub>细胞。

[0048] 在一些实施例中,一种方法可以包括向所述受试者施用治疗有效量的制造的T<sub>REG</sub>细胞。

### 附图说明

[0049] 图1A描绘了对照细胞和在各种条件下处理的细胞的归一化的GAPDH mRNA表达。

[0050] 图1B描绘了对照细胞和在各种条件下处理的细胞的归一化的颗粒酶B mRNA表达。

[0051] 图1C描绘了对照细胞和在各种条件下处理的细胞的归一化的IL-10mRNA表达。

[0052] 图1D描绘了对照细胞和在各种条件下处理的细胞的归一化的IFN- $\gamma$  mRNA表达。

[0053] 图1A-1D展示了维生素D和替西罗莫司的组合降低了人CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞中效应分子的表达。

[0054] 图2A描绘了对照细胞和在各种条件下处理的细胞的归一化的NANOG mRNA表达。

[0055] 图2B描绘了对照细胞和在各种条件下处理的细胞的归一化的KLF4 mRNA表达。

[0056] 图2C描绘了对照细胞和在各种条件下处理的细胞的归一化的KLF10 mRNA表达。

[0057] 图2D描绘了对照细胞和在各种条件下处理的细胞的归一化的IL-7受体mRNA表达。

[0058] 图2A-2D展示了维生素D和替西罗莫司的组合增加了人CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞中干细胞相关转录因子和原始T细胞分子IL-7受体- $\alpha$ 的表达。

[0059] 图3A描绘了对照细胞和在各种条件下处理的细胞的归一化的T-BET mRNA表达。

[0060] 图3B描绘了对照细胞和在各种条件下处理的细胞的归一化的STAT1 mRNA表达。

[0061] 图3C描绘了对照细胞和在各种条件下处理的细胞的归一化的HIF-1- $\alpha$ mRNA表达。

[0062] 图3A-3C展示了维生素D和替西罗莫司的组合降低了与效应Th1/Tc1细胞相关的转录因子的表达,而没有降低与T细胞存活相关的转录因子HIF-1- $\alpha$ 的表达。

[0063] 图4描绘了在各种条件下处理的细胞的通过肌动蛋白表达归一化的p62表达,并且展示了维生素D、替西罗莫司和抗IL-2受体阻断的组合诱导自噬相关分子p62的表达。

[0064] 图5描绘了在各种条件下处理的细胞的通过肌动蛋白表达归一化的Raptor表达,并且展示了维生素D、替西罗莫司和抗IL-2受体阻断的组合减少mTORC1相关分子Raptor的表达。

[0065] 图6描绘了在各种条件下处理的细胞的GAPDH、p70S6K、SGK1、Raptor和Rictor表达的蛋白质印迹,并且展示了维生素D、替西罗莫司和抗IL-2受体阻断的组合降低mTORC1相关

分子Raptor和mTORC2相关分子Rictor的表达。

[0066] 图7描绘了在各种条件下处理的细胞的通过肌动蛋白表达归一化的BIM表达,并且展示了维生素D、替西罗莫司和抗IL-2受体阻断的组合降低促凋亡分子BIM的表达。图8展示了在去分化间隔期间培养组分对随后的T细胞产率(在培养的第13天)的影响。

[0067] 图8展示了在去分化间隔期间培养组分对随后的T细胞产率(在培养的第13天)的影响。

[0068] 图9A描绘了对于在各种条件下处理的细胞中,CD45RA+的CD4细胞的百分比。

[0069] 图9B描绘了对于在各种条件下处理的细胞中,CD62L+和CCR7+的CD4细胞的百分比。

[0070] 图9C描绘了对于在各种条件下处理的细胞中,CD62L+、CCR7+和CD127+的CD4细胞的百分比。

[0071] 图9A-9C展示了在去分化间隔期间培养组分对记忆标志物的CD4+T细胞表达的影响(在培养的第13天)。

[0072] 图10A描绘了对于在各种条件下处理的细胞中,CD62L+和CCR7+的CD8细胞的百分比。

[0073] 图10B描绘了对于在各种条件下处理的细胞中,CD62L+、CCR7+和CD127+的CD8细胞的百分比。

[0074] 图10A-10B展示了在去分化间隔期间培养组分对记忆标志物的CD8+T细胞表达的影响。

[0075] 图11A-11D描绘了在极化中性培养基中培养的去分化的T细胞的炎性Th1/Th17细胞因子分析。

[0076] 图11A描绘了在各种条件下处理的细胞的IFN- $\gamma$ 分泌。

[0077] 图11B描绘了在各种条件下处理的细胞的GM-CSF分泌。

[0078] 图11C描绘了在各种条件下处理的细胞的TNF- $\alpha$ 分泌。

[0079] 图11D描绘了在各种条件下处理的细胞的IL-17分泌。

[0080] 图12A-12D描绘了在极化中性培养基中培养的去分化的T细胞的IL-2和Th2型细胞因子分析。

[0081] 图12A描绘了在各种条件下处理的细胞的IL-2分泌。

[0082] 图12B描绘了在各种条件下处理的细胞的IL-4分泌。

[0083] 图12C描绘了在各种条件下处理的细胞的IL-5分泌。

[0084] 图12D描绘了在各种条件下处理的细胞的IL-13分泌。

[0085] 图13描绘了相对于Th1极化条件,在杂交Th2/TREG极化条件下的去分化的T细胞的有利扩增。

[0086] 图14A描绘了对于在各种条件下处理的细胞,CD4+CD45RA+细胞占总CD4+细胞的百分比。

[0087] 图14B描绘了对于在各种条件下处理的细胞,CD4+CD62L+CCR7+细胞占总CD4+细胞的百分比。

[0088] 图14C描绘了对于在各种条件下处理的细胞,CD4+CD62L+CCR7+CD127+细胞占总CD4+细胞的百分比。

[0089] 图14-A14C展示了在杂交Th2/TReg极化条件下去分化的T细胞的培养导致原初和三阳性T中枢记忆CD4<sup>+</sup>T细胞的产生。

[0090] 图15A描绘了对于在各种条件下处理的细胞,CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>细胞占总CD8细胞的百分比。

[0091] 图15A描绘了对于在各种条件下处理的细胞,CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>细胞占总CD8<sup>+</sup>细胞的百分比。

[0092] 图15A-15B展示了在杂交Th2/TReg极化条件下去分化的T细胞的培养导致三阳性T中枢记忆CD8<sup>+</sup>T细胞的产生。

[0093] 图16A描绘了在各种条件下处理的细胞的IL-2分泌。

[0094] 图16B描绘了在各种条件下处理的细胞的IL-4分泌。

[0095] 图16C描绘了在各种条件下处理的细胞的IL-5分泌。

[0096] 图16A-16C展示了在杂交Th2/TReg极化条件下去分化的T细胞的培养导致产生具有原始Th2细胞细胞因子表型:IL-2、IL-4和IL-5分泌的T细胞。

[0097] 图17A描绘了在各种条件下处理的细胞的IL-10分泌。

[0098] 图17B描绘了在各种条件下处理的细胞的IL-13分泌。

[0099] 图17C描绘了在各种条件下处理的细胞的IL-17分泌。

[0100] 图17A-17C展示了在杂交Th2/TReg极化条件下去分化的T细胞的培养导致产生具有原始Th2细胞细胞因子表型:IL-10、IL-13和IL-17分泌的T细胞。

[0101] 图18A描绘了在各种条件下处理的细胞的IFN- $\gamma$ 分泌。

[0102] 图18B描绘了在各种条件下处理的细胞的TNF- $\alpha$ 分泌。

[0103] 图18C描绘了在各种条件下处理的细胞的GM-CSF分泌。

[0104] 图18A-18C展示了在杂交Th2/TREG极化条件下去分化的T细胞的培养导致产生具有原始Th2细胞细胞因子表型:IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 和GM-CSF分泌的T细胞。

[0105] 图19A描绘了按照天数和培养抑制剂的在培养物中CD4<sup>+</sup>T细胞的百分比。

[0106] 图19B描绘了按照天数和培养抑制剂的培养物中CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>T细胞的百分比。

[0107] 图19C描绘了按照天数和培养抑制剂的培养物中CD4<sup>+</sup>Tbet<sup>+</sup>T细胞的百分比。

[0108] 图19D描绘了按照天数和培养抑制剂的培养物中CD4<sup>+</sup>GATA3<sup>+</sup>T细胞的百分比。

[0109] 图19A-19D展示了在含有培美曲塞的杂交Th2/TREG极化条件下去分化的T细胞的扩展培养导致表达FOXP3和GATA3转录因子的CD4<sup>+</sup>T细胞的产生。

[0110] 图20A描绘了按照天数和培养抑制剂的在培养物中CD8<sup>+</sup>T细胞的百分比。

[0111] 图20B描绘了按照天数和培养抑制剂的培养物中CD8<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>T细胞的百分比。

[0112] 图20C描绘了按照天数和培养抑制剂的培养物中CD8<sup>+</sup>Tbet<sup>+</sup>T细胞的百分比。

[0113] 图20D描绘了按照天数和培养抑制剂的培养物中CD8<sup>+</sup>GATA3<sup>+</sup>T细胞的百分比。

[0114] 图20A-20D展示了在含有培美曲塞的杂交Th2/TREG极化条件下去分化的T细胞的扩展培养导致表达FOXP3和GATA3转录因子的CD8<sup>+</sup>T细胞的产生。

[0115] 图21A描绘了按照天数和培养抑制剂的培养中的细胞的IL-4分泌。

[0116] 图21B描绘了按照天数和培养抑制剂的培养中的细胞的IL-5分泌。

[0117] 图21C描绘了按照天数和培养抑制剂的培养中的细胞的IL-13分泌。

[0118] 图21A-21C展示了在杂交Th2/TREG极化条件下去分化的T细胞的扩展培养导致产

生表达主要Th2细胞因子表型:IL-4、IL-5和IL-13分泌的T细胞。

[0119] 图22A描绘了按照天数和培养抑制剂的培养中的细胞的IL-2分泌。

[0120] 图22B描绘了按照天数和培养抑制剂的培养中的细胞的IFN- $\gamma$ 分泌。

[0121] 图22C描绘了按照天数和培养抑制剂的培养中的细胞的GM-CSF分泌。

[0122] 图22A-22C展示了在杂交Th2/TREG极化条件下去分化的T细胞的扩展培养导致产生表达主要Th2细胞因子表型:IL-2、IFN- $\gamma$ 和GM-CSF分泌的T细胞。

[0123] 图23A和23B展示了当通过RNA测序测量时,抗TNF- $\alpha$ 疗法依那西普疗法使TCR谱系显著改变,从而代表在通过单采血液成分术收集淋巴细胞之前用于受试者治疗的新方法。

[0124] 图24展示了在杂交Th2/TREG极化条件下去分化的T细胞的扩展培养导致产生相对于对照Th1/Tc1细胞表达增加水平的以下分子的T细胞:CD25、CD27、2B4、BTLA和CTLA。

[0125] 图25展示了在杂交Th2/TREG极化条件下去分化的T细胞的扩展培养导致产生相对于对照Th1/Tc1细胞表达增加水平的以下分子的T细胞:TIGIT、TIM3、ICOS、LAIR1和OX40。

[0126] 图26A描绘了如通过流式细胞术测量的,在培养开始时和培养后在CD4+和CD8+T细胞中的FOXP3表达。

[0127] 图26B描绘了如通过流式细胞术测量的,在培养开始时和培养后在CD4+和CD8+T细胞中的GATA3表达。

[0128] 图27A描绘了如通过流式细胞术测量的,在培养开始时和培养后在CD4+和CD8+T细胞中的CD73表达。

[0129] 图27B描绘了如通过流式细胞术测量的,在培养开始时和培养后在CD4+和CD8+T细胞中的CD103表达。

[0130] 图28A描绘了在培养开始时、培养后,通过流式细胞术测量的在CD4+和CD8+T细胞中和通过流式细胞术测量的针对未暴露于mTOR抑制剂的对照T细胞的CD150频率。

[0131] 图28B描绘了如通过流式细胞术测量的,在培养开始时和培养后CD4+T细胞的CD27对比CD95的表达。

[0132] 图29描绘了不同培养的细胞和对照细胞的IL-4、IL-2、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-17和GM-CSF。

[0133] 图30A描绘了在具有或不具有RAPA-501细胞的情况下Th1/Tc1细胞的跨孔测定的细胞因子含量。

[0134] 图30B描绘了实例24中CD4和PD1测定的流式细胞术结果。

[0135] 图31A描绘了在暴露于或未暴露于RAPA-501细胞的情况下人小胶质细胞的IL-6、IP-10和IFN- $\gamma$ 分泌。

[0136] 图31B描绘了在暴露于或未暴露于RAPA-501细胞的情况下人小胶质细胞的IL-6、IP-10和IFN- $\gamma$ 分泌。

[0137] 图32示意性地描绘了PC方案和整体治疗方法。

[0138] 图33示意性地描绘了通过PC方案前和PC方案后的单采血液成分术收集淋巴细胞。

[0139] 图34示意性地描绘了iT<sub>REG</sub>细胞的重复给药中的每次重复给药之前的PC方案。

[0140] 图35示意性地描绘了对用iT<sub>REG</sub>细胞治疗的患者的监测。

[0141] 图36A-36B展示了当通过RNA测序测量时,抗TNF- $\alpha$ 疗法依那西普疗法使TCR谱系显著改变,从而代表在通过单采血液成分术收集淋巴细胞之前用于受试者治疗的新方法。

[0142] 图37展示了在杂交Th2/T<sub>REG</sub>极化条件下去分化的T细胞的扩展培养导致产生相对于对照Th1/Tc1细胞表达增加水平的以下分子的T细胞:CD25、CD27、2B4、BTLA和CTLA。

[0143] 图38展示了在杂交Th2/T<sub>REG</sub>极化条件下去分化的T细胞的扩展培养导致产生相对于对照Th1/Tc1细胞表达增加水平的以下分子的T细胞:TIGIT、TIM3、ICOS、LAIR1和OX40。

[0144] 图39描绘了替代方案设计。

[0145] 图40A描绘了如通过流式细胞术测量的,CD4<sup>+</sup>细胞的RAPA-501GATA3和FOXP3。

[0146] 图40B描绘了如通过流式细胞术测量的,CD8<sup>+</sup>细胞的RAPA-501GATA3和FOXP3。

[0147] 图41描绘了本公开的去分化方法的示例性工作流程。

[0148] 图42描绘了本公开的杂交T<sub>REG</sub>/Th2细胞的推定作用机制。

## 具体实施方式

[0149] 本公开提供了一种用于T细胞去分化和所得细胞的方法、一种用于由去分化的T细胞制造人杂交调节性T/Th2细胞(杂交T<sub>REG</sub>/Th2细胞)的方法以及一种用于使用诱导性调节性T(iT<sub>REG</sub>)细胞进行ALS治疗的方法。

[0150] 定义

[0151] 如本文所使用的,除非上下文另有明确指示,否则单数形式“一个/种(a/an)”和“所述(the)”可以包含复数个提及物。

[0152] 权利要求和本公开中术语“或”用于意指“和/或”,除非明确指出仅指替代方案或替代方案是相互排斥的。

[0153] 当与数值一起使用时,术语“约”的使用旨在包含+/-10%。例如,如果鉴定出的氨基酸数目为约200,则这将包含180到220(正负10%)。

[0154] 术语“患者”、“个体”和“受试者”在本文中可互换使用,并且是指要治疗的哺乳动物受试者,其中人类患者是优选的。在一些情况下,本发明的方法可用于实验动物、兽医应用以及疾病动物模型的开发,包括但不限于包含小鼠、大鼠和仓鼠的啮齿动物以及灵长类动物。

[0155] “样品”以其最广泛的意义在本文中使用。包括细胞、多核苷酸、多肽、肽、抗体等的样品可以包括体液;细胞制剂的可溶性级分,或细胞在其中生长的培养基;从细胞中分离或提取的染色体、细胞器或膜;溶液中或与底物结合的基因组DNA、RNA或cDNA、多肽或肽;细胞;组织;组织印迹;指纹、皮肤或头发;等。

[0156] “治疗”旨在防止疾病发展或改变疾病的病理学或症状所进行的干预。因此,“治疗”可以是指治疗性治疗和防治性或预防性措施两者。需要治疗的患者包含已经患有所述病症的患者以及需要预防所述病症的患者。在肿瘤(例如,癌症)治疗中,治疗剂可以直接降低肿瘤细胞的病理学,或使肿瘤细胞更易于受到其它治疗剂(例如,放射和/或化学疗法)的治疗。

[0157] 如本文所使用的,“治疗周期”通常可以指任何初级治疗周期、第一治疗周期、第二治疗周期或一个或多个另外的治疗周期。

[0158] 如本文所使用的,“免疫细胞”意在包含可以被测定的免疫系统的任何细胞,包括但不限于B淋巴细胞(也称为B细胞)、T淋巴细胞(也称为T细胞)、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、淋巴因子激活的杀伤(LAK)细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、粒细

胞、肥大细胞、血小板、朗格汉斯 (Langerhans) 细胞、干细胞、树突状细胞、外周血单核细胞、肿瘤浸润 (TIL) 细胞、基因修饰的免疫细胞 (包含杂交瘤)、药物修饰的免疫细胞以及上述细胞类型的衍生物、前体或祖细胞。

[0159] “T细胞”或“T淋巴细胞”是源自胸腺并且具有与CD3复合物的蛋白质相关联的异二聚体受体 (例如,重排的T细胞受体、T细胞表面上负责细胞的抗原/MHC特异性的异二聚体蛋白质) 的淋巴细胞的亚群。可以通过测定T细胞应答对其它细胞的作用 (例如,靶细胞杀伤、如B细胞等其它免疫细胞的激活) 或T细胞应答产生的细胞因子来检测T细胞应答。

[0160] 如本文所使用的,术语“去分化的T细胞”是指已经通过本公开的方法中的任何方法去分化的T细胞。在某些方面,相对于在没有替西罗莫司、IL-2信号传导抑制剂和维生素D的情况下于相同条件下制造的对照T细胞群,去分化的T细胞具有降低的RAPTOR或RICTOR表达。“去分化的T细胞”不包含从患者收集的T细胞,即天然存在的T细胞。

[0161] 如本文所使用的,术语“抗CD3/抗CD28”应理解为是指抗CD3/抗CD28抗体。例如,“抗CD3/抗CD28磁珠”应理解为是指具有与其相关联的抗CD3/抗CD28抗体部分的磁珠。在公开即使通过如抗CD3/抗CD28磁珠等特定形式也没有提供抗CD3/抗CD28共刺激的情况下,应当理解,这也可以排除使用其它形式的抗CD3/抗CD28的共刺激。

[0162] 还应该理解,在本公开中,在进行通过抗CD3/抗CD28抗体共刺激的情况下,可以以任何形式的抗CD3/抗CD28抗体提供此共刺激。作为举例而非限制,在指示通过使用抗CD3/抗CD28珠进行共刺激的情况下,可以使用抗CD3/抗CD28纳米颗粒或微粒。在公开即使通过如抗CD3/抗CD28磁珠等特定形式也没有提供抗CD3/抗CD28共刺激的情况下,应当理解,这也可以排除使用其它形式的抗CD3/抗CD28的共刺激。

[0163] 如本文所使用的,除非另有说明,否则术语“人杂交TREG/Th2细胞”,“iTREG”和“TREG/Th2细胞”是指已经通过本公开的方法分化的细胞。本公开的“人杂交TREG/Th2细胞”、“iTREG”和“TREG/Th2细胞”不包含从患者收集的T细胞,即天然存在的T细胞。

[0164] 如本文所使用的,术语“制造的TREG细胞”是指通过本公开的去分化和再分化方法产生的细胞,并且除非另有说明,否则应理解为包含TREG细胞和人杂交TREG/Th2细胞。

[0165] 如本文所使用的,除非另有说明,否则“对照Th1/Tc1细胞”是指未用维生素D、替西罗莫司或IL-2信号传导抑制剂处理过,而是已经以3:1的比率 (珠:T细胞) 使用抗CD3/抗CD28涂覆的磁珠在补充有20IU/mL IL-2和20,000IU/mL IFN- $\alpha$ 的培养基中共刺激并以其它方式与和其进行比较的细胞相同地培养的细胞。还应理解的是,在对照细胞群 (或对照T细胞) 被称为在未经培养添加剂 (包含替西罗莫司、维生素D和IL-2信号传导抑制剂) 处理的情况下或在去分化的细胞的上下文中,此群 (或T细胞) 已经进一步以3:1的比率 (珠:T细胞) 使用抗CD3/抗CD28涂覆的磁珠在补充有20IU/mL IL-2和20,000IU/mL IFN- $\alpha$ 的培养基中共刺激并以其它方式与和其进行比较的细胞 (即它们是“对照Th1/Tc1细胞”) 相同地培养。

[0166] 本公开提供了用于离体产生分化状态降低的T细胞的新方法,所述方法基于使用新的药理学组合和限定的T细胞共刺激条件将分化的效应记忆T细胞转化为分化程度较低的中枢记忆型T细胞。

[0167] 如图41所示,本公开的去分化的T细胞可以具有静止表型,所述静止表型具有低表达或不表达检查点抑制剂受体 (如PD1、CTLA4、TIM3和LAG3)、记忆标志物 (如CD45RO) 和命运分子 (如TBET、ROR  $\gamma$ 、FOXP3和GATA3)。再分化的T细胞可以具有以GATA3和FOXP3表达为特征

的杂交命运,以及以CD45RA和CD150表达且无检查点蛋白表达为特征的干细胞记忆。

[0168] 如图42所示,本公开的杂交T<sub>REG</sub>/Th2细胞的推定作用机制,其中杂交T<sub>REG</sub>/Th2细胞可以通过CD39或CD73受体的炎症并且通过TNF- $\alpha$ 被激活,这可以使细胞能够调节致病性T细胞以防止杀伤。

[0169] 用于T细胞去分化和所得细胞的方法

[0170] 呈现了用于离体产生分化状态降低的T细胞的新方法,所述方法基于使用新的药理学组合和限定的T细胞共刺激条件将分化的效应记忆T细胞转化为分化程度较低的中枢记忆型T细胞。

[0171] 在一个实施例中,所述方法包括:在包括维生素D、替西罗莫司和IL-2信号传导抑制剂的培养基中,以一定细胞密度接种包括来自受试者的T细胞的培养物输入细胞群;以1:1或更低的珠:T细胞比率将抗CD3/抗CD28涂覆的磁珠添加到所述T细胞和培养基中以刺激所述T细胞,或者不添加任何共刺激珠;将所述培养物输入细胞群和培养基温育一定时间段,以产生去分化的T细胞。在一些实施例中,在收集培养物输入细胞群之前,已经用抗TNF- $\alpha$ 疗法治疗了所述受试者。在一些实施例中,所述抗TNF- $\alpha$ 疗法是依那西普或阿达木单抗。在一些实施例中,不进行使用抗CD3/抗CD28的共刺激。

[0172] 在前述实施例中的任何实施例中,所述培养基可以不含IL-2并且没有IL-2可以添加到所述培养基。

[0173] 在前述实施例中的任何实施例中,所述细胞密度可以为约每mL  $1.5 \times 10^6$ 个T细胞到每mL  $18 \times 10^6$ 个T细胞。作为举例而非限制,每mL  $6 \times 10^6$ 个T细胞到每mL  $18 \times 10^6$ 个T细胞、每mL  $12 \times 10^6$ 个T细胞到每mL  $18 \times 10^6$ 个T细胞、每mL  $1.5 \times 10^6$ 个T细胞到每mL  $12 \times 10^6$ 个T细胞、每mL  $1.5 \times 10^6$ 个T细胞到每mL  $6 \times 10^6$ 个T细胞、每mL  $6 \times 10^6$ 个T细胞到每mL  $12 \times 10^6$ 个T细胞、或每mL  $1.5 \times 10^6$ 个T细胞、每mL  $3 \times 10^6$ 个T细胞、每mL  $6 \times 10^6$ 个T细胞、每mL  $9 \times 10^6$ 个T细胞、每mL  $12 \times 10^6$ 个T细胞、每mL  $15 \times 10^6$ 个T细胞或每mL  $18 \times 10^6$ 个T细胞。在一些实施例中,作为举例而非限制,可以预期,以更高的密度如每mL  $9 \times 10^6$ 个T细胞或每mL  $18 \times 10^6$ 个T细胞开始细胞培养可能是优选的。

[0174] 在前述实施例中的任何实施例中,所述替西罗莫司可以约0.3 $\mu$ M到约10 $\mu$ M的浓度存在。作为举例而非限制,所述替西罗莫司可以以约0.3 $\mu$ M到约1 $\mu$ M、0.3 $\mu$ M到约0.75 $\mu$ M、0.3 $\mu$ M到约0.5 $\mu$ M、0.5 $\mu$ M到约1 $\mu$ M、0.75 $\mu$ M到约1 $\mu$ M、0.5 $\mu$ M到约0.75 $\mu$ M、0.3 $\mu$ M到约10 $\mu$ M、0.3 $\mu$ M到约5 $\mu$ M、0.3 $\mu$ M到约3.3 $\mu$ M、1 $\mu$ M到约3.3 $\mu$ M、5 $\mu$ M到约10 $\mu$ M、3.3 $\mu$ M到约10 $\mu$ M、3.3 $\mu$ M到约5 $\mu$ M的浓度、或作为举例而非限制以约0.3 $\mu$ M、0.4 $\mu$ M、0.5 $\mu$ M、0.6 $\mu$ M、0.7 $\mu$ M、0.8 $\mu$ M、0.9 $\mu$ M、或1 $\mu$ M、2 $\mu$ M、3 $\mu$ M、3.3 $\mu$ M、4 $\mu$ M、5 $\mu$ M、6 $\mu$ M、7 $\mu$ M、8 $\mu$ M、9 $\mu$ M或10 $\mu$ M的浓度存在于所述培养基中。

[0175] 在前述实施例中的任何实施例中,所述IL-2信号传导抑制剂可以是抗IL-2受体抗体或其片段。作为举例而非限制,所述IL-2信号传导抑制剂可以是巴利昔单抗(basiliximab)或达克珠单抗(daclizumab)。作为举例而非限制,所述IL-2信号传导抑制剂以5到50 $\mu$ g/mL、5到40 $\mu$ g/mL、5到30 $\mu$ g/mL、5到20 $\mu$ g/mL、5到10 $\mu$ g/mL、10到50 $\mu$ g/mL、20到50 $\mu$ g/mL、30到50 $\mu$ g/mL、40到50 $\mu$ g/mL、30到40 $\mu$ g/mL、20到40 $\mu$ g/mL、10到40 $\mu$ g/mL、5到40 $\mu$ g/mL、5到30 $\mu$ g/mL、5到20 $\mu$ g/mL、5到10 $\mu$ g/mL、10到20 $\mu$ g/mL、10到30 $\mu$ g/mL、20到30 $\mu$ g/mL的浓度、或作为举例而非限制以约5 $\mu$ g/mL、10 $\mu$ g/mL、15 $\mu$ g/mL、20 $\mu$ g/mL、25 $\mu$ g/mL、30 $\mu$ g/mL、35 $\mu$ g/mL、40 $\mu$ g/mL、45 $\mu$ g/mL或50 $\mu$ g/mL的浓度存在于所述培养基中。

[0176] 在前述实施例中的任何实施例中,作为举例而非限制,所述时间段可以为约1.5天到约5天、1.5天到约3.5天、1.5天到约2.5天、2.5天到约3.5天、2.5天到约5天、3.5天到约5天、或约1.5天、2天、2.5天、3天、3.5天、4天、4.5天或5天。在一些实施例中,mTORC1和mTORC2减少的水平可以用作确定最佳培养间隔的指导。在一些实施例中,去分化的细胞的其它分子标记可以用于确定最佳培养间隔,包括但不限于:T细胞效应分子的RNA表达(即,IFN- $\gamma$ 降低);转录因子的RNA表达(即,KLF4增加);自噬标记的证据(即,p62增加);以及原初T细胞亚群上存在的标志物的上调(即,CD127增加)。

[0177] 在前述实施例中的任何实施例中,作为举例而非限制,所述珠:T细胞比率可以为1:3,或者可以不进行共刺激。作为举例而非限制,所述珠:T细胞比率可以介于1:1与1:12之间、介于1:1与1:3之间、介于1:3与1:12之间。作为进一步举例而非限制,所述珠:T细胞比率可以是1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11或1:12。最后,在最极端的实例中,不能利用抗CD3/抗CD28共刺激,即在一些实施例中,在初始去分化过程期间不进行抗CD3/抗CD28共刺激。

[0178] 在前述实施例中的任何实施例中,可以使用含有抗CD3/抗CD28的纳米颗粒实现培养物输入细胞群的共刺激,所述纳米颗粒可以以低于推荐浓度的浓度使用。作为举例而非限制,此类纳米颗粒可以以推荐剂量的约0.01倍到约0.1倍、约0.025倍到约0.1倍、约0.05倍到约0.1倍、约0.075倍到约0.1倍、约0.01倍到约0.075倍、约0.01倍到约0.05倍、约0.01倍到约0.025倍、约0.025倍到约0.075倍、约0.025倍到约0.05倍、约0.05倍到约0.075倍、或约0.01倍、约0.025倍、约0.05倍、约0.075倍或约0.01倍使用。作为举例而非限制,与推荐剂量(每 $1 \times 10^6$ 个T细胞 $10\mu\text{L}$ )相比,可以以减少的剂量,作为举例而非限制,如 $1.1\mu\text{L}$ (九倍减少)或约0.11倍,来使用如Miltenyi® T Cell TransAct™等试剂。最后,在最极端的实例中,不能利用抗CD3/抗CD28共刺激,即在一些实施例中,在初始去分化过程期间不进行抗CD3/抗CD28共刺激。

[0179] 可替代地,如果要将抗CD3/抗CD28共刺激用于产生制造的T细胞,则可以通过可溶解的抗CD3/抗CD28微粒提供共刺激的来源。作为举例而非限制,可以以制造商(例如,Cloudz®;生物技术公司(Bio-Techne))推荐的强度的20%使用可溶解的抗CD3/抗CD28微粒。通过另外的实例,可以以制造商的推荐强度的5%、10%、15%、20%、25%或30%使用可溶解的抗CD3/抗CD28微粒。

[0180] 在前述实施例中的任何实施例中,如果进行抗CD3/抗CD28刺激,则其可以使用抗CD3/抗CD28以足以实现期望的去分化细胞性质的量进行。

[0181] 在前述实施例中的任何实施例中,所述培养基可以进一步包括5%的人血清。作为举例而非限制,所述培养基可以包括至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%的人血清以及包括其间值的任何范围。

[0182] 在前述实施例中的任何实施例中,所述培养基可以包括X-Vivo 20培养基。可以使用用于培养T细胞的任何合适的培养基。

[0183] 在前述实施例中的任何实施例中,作为举例而非限制,所述维生素D可以以约0.03nM到约1nM、0.03nM到约0.5nM、0.03nM到约0.1nM、0.03nM到约0.05nM、0.05nM到约

0.1nM、0.05nM到约0.5nM、0.05nM到约1nM、0.1nM到约1nM、0.1nM到约0.5nM或0.5nM到约1nM存在于所述培养基中,或者作为举例而非限制,所述维生素D以约0.03nM、0.05nM、0.1nM、0.5nM或1nM的浓度存在。

[0184] 在前述实施例中的任何实施例中,所述方法可以进一步包括测量所述培养物输入细胞群中RAPTOR或RICTOR和管家蛋白的表达水平,其中所述时间段持续到所述制造的T细胞中RAPTOR或RICTOR的表达水平分别相对于对照T细胞群降低至少50%,其中所述对照T细胞群是在没有替西罗莫司、IL-2信号传导抑制剂和维生素D的情况下于与所述培养物输入细胞群相同的条件下制造的。在一些实施例中,所述时间段持续到所述制造的T细胞中RAPTOR或RICTOR的表达水平分别相对于对照T细胞群降低50%或更多,所述对照T细胞群是在没有替西罗莫司、IL-2信号传导抑制剂和维生素D的情况下于与所述培养物输入细胞群相同的条件下制造的。作为举例而非限制,所述时间段可以持续到RAPTOR或RICTOR的表达水平分别相对于对照T细胞群降低至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或更多,所述对照T细胞群是在没有替西罗莫司、IL-2信号传导抑制剂和维生素D的情况下于与所述培养物输入细胞群相同的条件下制造的。

[0185] 在前述实施例中的任何实施例中,所述管家蛋白可以是肌动蛋白。在一些实施例中,所述管家蛋白可以是GAPDH。在前述实施例中的任何实施例中,可以通过蛋白质印迹分析来执行测量表达水平的步骤。

[0186] 在前述实施例中的任何实施例中,所述时间段可以持续到所述培养物输入细胞群中RAPTOR或RICTOR的表达水平相对于对照T细胞群降低至少50%,所述对照T细胞群是在没有替西罗莫司、IL-2信号传导抑制剂和维生素D的情况下于与所述培养物输入细胞群相同的条件下制造的。在一些实施例中,RAPTOR或RICTOR表达水平的降低可以为相对于对照T细胞群降低至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或更多。

[0187] 在前述实施例中的任何实施例中,初始去分化培养的时间段可以持续到RNA表达模式相对于在没有替西罗莫司、维生素D和IL-2信号传导抑制剂的情况下在相同条件下培养的对照T细胞相差至少10%,并且更适宜地为50%,即:T细胞效应分子(包括但不限于颗粒酶B、IL-10和IFN- $\gamma$ )减少;与分化状态降低的细胞相关的转录因子(包括但不限于Nanog、KLF4和KLF10)增加;优先在原初T细胞亚群上表达的分子(包括但不限于CD 127、IL-7受体 $\alpha$ 链)的表达增加;与Th1型分化相关的转录因子(包括但不限于T-BET和STAT1)减少;以及促进细胞存活的转录因子(包括但不限于HIF-1 $\alpha$ )相对保留。

[0188] 在前述实施例中的任何实施例中,初始去分化培养的时间段可以持续到RNA表达模式相对于在没有替西罗莫司、维生素D和IL-2信号传导抑制剂的情况下在相同条件下培养的对照T细胞相差至少10%,并且更适宜地为50%,即:其中指示已经历自噬的细胞的分子的表达改变至少10%,并且更优选地50%。作为一个实例,相对于对照T细胞,通过蛋白质印迹分析,所述去分化的细胞具有增加的p62表达;作为举例而非限制,也可以利用其它测量自噬的方法,如在Yoshii SR, Mizushima N. “监测和测量自噬”.《国际分子科学杂志》.2017;18(9):1865中描述的那些方法。

[0189] 在前述实施例中的任何实施例中,培养基可以不含人血清、替西罗莫司、维生素D、IL-2信号传导抑制剂或其任何组合,其在开始培养时可能不存在于所述培养基中。在此类实施例中,可以在接种培养物输入细胞群的大约相同时间或在随后的时间将人血清、替西

罗莫司、维生素D或IL-2信号传导抑制剂添加到培养基中。

[0190] 作为举例而非限制,可以使用1,25-维生素D的静脉内调配物(“骨化三醇(Calcitriol)”)。此调配物是优选的,因为它完全可溶于培养基中并且具有在肾脏中自然产生的1,25羟基化作用,并且因此在向培养物中添加维生素D时必须存在。骨化三醇的商品名包含罗钙全(Rocaltrol)、溉纯(Calcijex)和Decostriol。还可以设想,其它维生素D受体(VDR)配体可以替代骨化三醇,包含但不限于石胆酸,如以下中所描述的:Maestro等人;“维生素D受体2016:新颖的配体和结构见解(Vitamin D receptor 2016: novel ligands and structural insights)” ;《治疗术专利专家评论(Expert Opinion on Therapeutic Patents)》;2016年第26卷,第11期。

[0191] 在一些实施例中,提供了可以通过本公开的方法中的任何方法获得的去分化的T细胞。在一些实施例中,提供了包括去分化的T细胞群的组合物。在一些实施例中,相对于在没有替西罗莫司、IL-2信号传导抑制剂和维生素D的情况下于与所述培养物输入细胞群相同的条件下制造的对照T细胞群,所述去分化的T细胞的至少一部分表达少于50%的RAPTOR或RICTOR。在一些实施例中,相对于在没有替西罗莫司、IL-2信号传导抑制剂和维生素D的情况下于与所述培养物输入细胞群相同的条件下制造的对照T细胞群,去分化的T细胞表达少于50%的RAPTOR或RICTOR。作为举例而非限制,相对于分别在在没有替西罗莫司、IL-2信号传导抑制剂和维生素D的情况下于与所述培养物输入细胞群相同的条件下制造的对照T细胞或对照T细胞群,所述去分化的T细胞或去分化的T细胞群可以表达50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、1%或更少的RAPTOR或RICTOR。

[0192] 在一些实施例中,相对于在没有替西罗莫司、维生素D和IL-2信号传导抑制剂的情况下于相同条件下温育的对照T细胞群,去分化的T细胞群或去分化的T细胞可以通过溶细胞分子(包含但不限于颗粒酶B)和/或细胞因子分子(包含但不限于IFN- $\gamma$ )的RNA表达降低来表征。作为举例而非限制,这种减少可以是至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%或更多。

[0193] 在一些实施例中,相对于在没有替西罗莫司、维生素D和IL-2信号传导抑制剂的情况下于相同条件下温育的对照T细胞群,去分化的T细胞群或去分化的T细胞可以通过与iPSC相关联的转录因子(包含但不限于Nanog、KLF4和KLF10)和/或与原初T细胞相关联的分子(包含但不限于IL-7受体CD127)的RNA表达增加来表征。作为举例而非限制,这种增加可以是至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%或更多。

[0194] 在一些实施例中,相对于在没有替西罗莫司、维生素D和IL-2信号传导抑制剂的情况下于相同条件下温育的对照T细胞群,去分化的T细胞群或去分化的T细胞可以通过与Th1效应T细胞相关联的转录因子(包含但不限于T-Bet和STAT1)的RNA表达降低来表征,其中伴随维持约等量的HIF-1- $\alpha$ 表达。作为举例而非限制,这种减少可以是至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%或更多。作为举例而非限制,HIF-1- $\alpha$ 表达可以在对照T细胞群的约20%、15%、10%或5%之内。

[0195] 在一些实施例中,相对于在没有替西罗莫司、维生素D和IL-2信号传导抑制剂的情况下于相同条件下温育的对照T细胞群,去分化的T细胞群或去分化的T细胞可以通过p62的蛋白质表达增加来表征。作为举例而非限制,这种增加可以是至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%或更多。

[0196] 用于由去分化的T细胞制造人杂交调节性T/Th2细胞(杂交T<sub>REG</sub>/Th2细胞)和T<sub>REG</sub>的方法

[0197] 在本公开中,提供了一种产生iTREG细胞的离体制造方法,所述iTREG细胞的早期分化状态以及Th1型和Th17型极化的耗竭得到增强。此方法需要两步过程,第一步骤由T细胞去分化组成,第二步骤是iTREG细胞制造。由此去分化的T细胞底物制造人iTREG细胞可以使用细胞因子的新型组合(标准的iTREG使用IL-2和TGF- $\beta$ 细胞因子,另外使用与Th2分化经典相关的细胞因子IL-4)和任选的新型药剂(如本文所述的培美曲塞)来进行。在一些实施例中,可以在没有培美曲塞的情况下产生iTREG细胞。由于此类细胞同时表达TREG和Th2分子,因此通过此方法产生的细胞称为“人杂交TREG/Th2细胞”。

[0198] 在一些实施例中,所述方法包括:在包括IL-2、IL-4和TGF- $\beta$ 的培养基中培养本公开的去分化的T细胞;以如3:1的比率(珠:T细胞比率)添加抗CD3/抗CD28涂覆的磁珠;以及将所述去分化的T细胞温育一定时间段以产生TREG/Th2细胞。在一些实施例中,所述方法包括培养本公开的去分化的T细胞群。抗CD3/抗CD28珠的比率可以改变,只要共刺激足以分化细胞即可。

[0199] 在一些实施例中,所述方法包括:在包括IL-2、IL-4和TGF- $\beta$ 的培养基中培养去分化的T细胞,相对于在没有替西罗莫司、IL-2信号传导抑制剂和维生素D的情况下于相同条件下制造的对照T细胞群,所述去分化的T细胞具有减少的RAPTOR或RICTOR表达;以如3:1的比率(珠:T细胞比率)添加抗CD3/抗CD28涂覆的磁珠;以及将所述去分化的T细胞温育一定时间段以产生TREG/Th2细胞。在一些实施例中,所述方法包括培养本公开的去分化的T细胞群。抗CD3/抗CD28珠的比率可以改变,只要共刺激足以分化细胞即可。在一些实施例中,RAPTOR或RICTOR的表达通过管家蛋白(如作为举例而非限制,肌动蛋白或GAPDH)归一化。

[0200] 在前述实施例中的任何实施例中,IL-2可以以约100IU/ml到10,000IU/ml、100IU/ml到1,000IU/ml、1,000IU/ml到10,000IU/ml、或约100IU/ml、1,000IU/ml或10,000IU/ml的浓度存在于所述培养基中。

[0201] 在前述实施例中的任何实施例中,所述培养基可以进一步包括IL-4。在前述实施例中的任何实施例中,IL-4可以以约100IU/mL到1000IU/mL、100IU/mL到1000IU/mL、100IU/mL到250IU/mL、100IU/mL到500IU/mL、250IU/mL到1000IU/mL、500IU/mL到1000IU/mL、250IU/mL到500IU/mL、或100IU/mL、200IU/mL、300IU/mL、400IU/mL、500IU/mL、600IU/mL、700IU/mL、800IU/mL、900IU/mL或1000IU/mL的浓度存在于所述培养基中。在一些实施例中,作为举例而非限制,如果期望实现降低的Th2极化,则可以使用较低的浓度,如100IU/mL。

[0202] 在前述实施例中的任何实施例中,TGF- $\beta$ 可以以约10ng/mL的浓度存在于所述培养基中。作为举例而非限制,TGF- $\beta$ 的浓度可以为约5ng/mL、6ng/mL、7ng/mL、8ng/mL、9ng/mL或10ng/mL。

[0203] 在分化的前述实施例中的任何实施例中,所述珠:T细胞比率可以为3:1。在一些实施例中,可以使用等量的具有相同效果的抗CD3/抗CD28的替代形式。在一些实施例中,共刺激的量足以使细胞饱和。在前述实施例中的任何实施例中,共刺激的量可以足以增加人杂交TREG/Th2细胞中GATA3和FOXP3的表达。

[0204] 在前述实施例中的任何实施例中,培养基可以进一步包括培美曲塞。作为举例而非限制,培美曲塞可以以约1nM到100nM、5nM到100nM、10nM到100nM、25nM到100nM、50nM到

100nM、75nM到100nM、50nM到75nM、25nM到75nM、10nM到50nM、10nM到25nM的浓度、或以如5nM、10nM、25nM、50nM、75nM或100nM等值的浓度存在于所述培养基中。在一些实施例中,培养基不包括培美曲塞,并且不将培美曲塞添加到培养基中。

[0205] 在前述实施例中的任何实施例中,作为举例而非限制,用于温育所述去分化的T细胞的所述时间段可以为3天到40天、2天到20天、3天到10天、3天到6天、6天到10天、10天到40天、10天到20天、10天到15天、15天到40天、20天到40天、30天到40天、20天到30天、或15天到30天、或15天到20天。在一些实施例中,作为举例而非限制,如果杂交Th2/TREG细胞的分化状态非常有限,则可以考虑较短的培养间隔,如3天到10天。

[0206] 本公开还涉及方法和通过前述方法中的任何方法在不使用IL-4的情况下产生的TREG细胞。

[0207] 在一些实施例中,通过流式细胞术,相对于对照Th1/Tc1细胞,通过本公开的方法产生的TREG或TREG/Th2细胞可以具有CD25、CD27、2B4、BTLA、CTLA4、TIGIT、TIM3、ICOS、LAIR1和OX40中的至少一种的增加的表达。在一些实施例中,作为举例而非限制,此增加可以是至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多。

[0208] 在一些实施例中,相对于对照Th1/Tc1细胞,通过本公开的方法产生的TREG或TREG/Th2细胞可以具有减少的炎性细胞因子分泌。作为举例而非限制,此类细胞因子可以包含IFN- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ 。在一些实施例中,作为举例而非限制,此减少可以为至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多。

[0209] 在一些实施例中,通过本公开的方法产生的TREG或TREG/Th2细胞可以相对于对照Th1/Tc1细胞具有减少的TBET表达和增加的FOXP3表达和/或相对于对照Th1/Tc1细胞具有增加的IL-4分泌和增加的GATA3表达。在一些实施例中,作为举例而非限制,此减少或增加可以为至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多。

[0210] 在一些实施例中,TREG或TREG/Th2细胞群可以具有至少5%的表达GATA3的CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>细胞。作为举例而非限制,TREG或TREG/Th2细胞群可以具有至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少45%、至少50%或至少60%的表达GATA3的CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>T细胞。在一些实施例中,通过流式细胞术确定细胞是否表达GATA3。在一些实施例中,相对于以产生T<sub>REG</sub>或T<sub>REG</sub>/Th2细胞群的T细胞为特性的对照T细胞群,T<sub>REG</sub>或T<sub>REG</sub>/Th2细胞群可以表现出表达GATA3的CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>T细胞的增加的频率。在一些实施例中,所述增加的频率可以是50%或更多的增加。作为举例而非限制,所述增加可以是50%、100%、200%、300%、500%、1000%、2000%、3000%或更多。

[0211] 在一些实施例中,TREG或TREG/Th2细胞群可以具有至少5%的表达FoxP3的CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>细胞。作为举例而非限制,TREG或TREG/Th2细胞群可以具有至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、或至少45%的表达FoxP3的CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>T细胞。在一些实施例中,通过流式细胞术确定细胞是否表达FoxP3。在一些实施例中,相对于以产生T<sub>REG</sub>或T<sub>REG</sub>/Th2细胞群的T细胞为特性的对照T细胞群,T<sub>REG</sub>或T<sub>REG</sub>/Th2细胞群可以表现出表达FOXP3的CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>T细胞的增加的频率。在一些实施例中,所述增加的频率可以是50%或更多的增加。作为举例而非限制,所述增加可以是50%、100%、200%、300%、500%、1000%、

2000%、3000%或更多。

[0212] 在一些实施例中，TREG或TREG/Th2细胞群可以具有至少10%的表达CD73的CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>细胞。作为举例而非限制，TREG或TREG/Th2细胞群可以具有至少10%、至少15%、至少20%或至少25%的表达CD73的CD4<sup>+</sup>T细胞。作为进一步举例而非限制，TREG或TREG/Th2细胞群可以具有至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%或至少80%的表达CD73的CD8<sup>+</sup>T细胞。在一些实施例中，通过流式细胞术确定细胞是否表达CD73。在一些实施例中，相对于以产生T<sub>REG</sub>或T<sub>REG</sub>/Th2细胞群的T细胞为特性的对照T细胞群，T<sub>REG</sub>或T<sub>REG</sub>/Th2细胞群可以表现出表达CD73的CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>T细胞的增加的频率。在一些实施例中，所述增加的频率可以是50%或更多的增加。作为举例而非限制，所述增加可以是50%、100%、200%、300%、500%、1000%、2000%、3000%或更多。

[0213] 在一些实施例中，TREG或TREG/Th2细胞群可以具有至少10%的表达CD103的CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>细胞。作为举例而非限制，TREG或TREG/Th2细胞群可以具有至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的表达CD103的CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>T细胞。在一些实施例中，通过流式细胞术确定细胞是否表达CD103。在一些实施例中，相对于以产生T<sub>REG</sub>或T<sub>REG</sub>/Th2细胞群的T细胞为特性的对照T细胞群，T<sub>REG</sub>或T<sub>REG</sub>/Th2细胞群可以表现出表达CD103的CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>T细胞的增加的频率。在一些实施例中，所述增加的频率可以是50%或更多的增加。作为举例而非限制，所述增加可以是50%、100%、200%、300%、500%、1000%、2000%、3000%或更多。

[0214] 在一些实施例中，如通过流式细胞术测量的，T<sub>REG</sub>或T<sub>REG</sub>/Th2细胞群可以具有至少5%的表达FOXP3和GATA3两者的CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>细胞。作为举例而非限制，T<sub>REG</sub>或T<sub>REG</sub>/Th2细胞群可以具有至少5%、10%、20%、30%、40%或50%的表达FOXP3和GATA3两者的CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>细胞。

[0215] 在一些实施例中，TREG或TREG/Th2细胞群可以具有至少20%的表达CD150的CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>T细胞。作为举例而非限制，TREG或TREG/Th2细胞群可以具有至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%或至少50%的表达CD150的CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>T细胞。在一些实施例中，相对于在不暴露于mTOR抑制剂的情况下温育的对照T细胞群，TREG或TREG/Th2细胞群可以具有表达CD150的细胞的增加的频率。在一些实施例中，通过流式细胞术确定细胞是否表达CD150。在一些实施例中，相对于以产生T<sub>REG</sub>或T<sub>REG</sub>/Th2细胞群的T细胞为特性的对照T细胞群，T<sub>REG</sub>或T<sub>REG</sub>/Th2细胞群可以表现出表达CD150的CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>T细胞的增加的频率。在一些实施例中，所述增加的频率可以是50%或更多的增加。作为举例而非限制，所述增加可以是50%、100%、200%、300%、500%、1000%、2000%、3000%或更多。

[0216] 在一些实施例中，在以3:1的珠:T细胞比率使用抗CD3/抗CD28珠共刺激之后，TREG或TREG/Th2细胞群可以表达至少5pg/mL/1×10<sup>6</sup>个细胞/天的IL-4。作为举例而非限制，TREG或TREG/Th2细胞群可以表达至少5、至少10、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100pg/mL/1×10<sup>6</sup>个细胞/天的IL-4。

[0217] 在一些实施例中，在以3:1的珠:T细胞比率使用抗CD3/抗CD28珠共刺激之后，TREG或TREG/Th2细胞群可以表达至少100pg/mL/1×10<sup>6</sup>个细胞/天的IL-2。

[0218] 在一些实施例中，在以3:1的珠:T细胞比率使用抗CD3/抗CD28珠共刺激之后，TREG

或TREG/Th2细胞群可以表达少于100pg/mL/ $1 \times 10^6$ 个细胞/天的IFN- $\gamma$ 或GM-CSF。

[0219] 在一些实施例中,在以3:1的珠:T细胞比率使用抗CD3/抗CD28珠共刺激之后,TREG或TREG/Th2细胞群可以表达少于10pg/mL/ $1 \times 10^6$ 个细胞/天的IFN- $\alpha$ 或IL-17。

[0220] 在一些实施例中,TREG或TREG/Th2细胞可以表达GATA3和FOXP3两者。在一些实施例中,TREG或TREG/Th2细胞可以表达GATA3、FOXP3、CD103和CD73。在一些实施例中,TREG或TREG/Th2细胞群可以通过至少5%的表达GATA3的T细胞、至少5%的表达FOXP3的T细胞、至少5%的表达CD103的T细胞和至少有5%的表达CD73的T细胞来表征,如通过流式细胞术测量的。

[0221] 在前述实施例中的任何实施例中,TREG或TREG/Th2细胞或其群可以在前述性质不会不相容的程度上具有所述性质中的至少一种性质或其任何组合。

[0222] 用于使用诱导性调节性T( $iT_{REG}$ )细胞进行ALS治疗的方法

[0223] 在此方案中,将使用喷司他丁加环磷酰胺方案作为免疫耗竭和免疫抑制方法,所述免疫耗竭和免疫抑制方法将增强ALS的 $iT_{REG}$ 细胞疗法。此PC方案可以具有直接的有益作用,因为所述方案能够耗竭和抑制与ALS发病机制相关的Th1型免疫细胞。另外,所述PC方案将用作宿主调理,所述宿主调理将增加免疫性T细胞空间,从而实现更有效的 $iT_{REG}$ 细胞疗法。具体地,对于此方案,已经减少了PC方案的剂量,以帮助减轻所述方案在新的ALS患者群体中的任何潜在不良影响。对于此方案:将喷司他丁的起始剂量从 $4\text{mg}/\text{m}^2$ 减少到 $1\text{mg}/\text{m}^2$ ;与每周期一次输注的当前方案值相比,将喷司他丁的输注次数从每周期四次输注的先前值减少;并且将环磷酰胺的初始剂量从每天200mg减少到每天100mg。其次,根据关于PC方案要实现的免疫耗竭深度的既定目标,已经降低了PC方案的强度。由于在ALS患者群体中必须采取更为谨慎的方法,因此当前方案——PC方案试图更加适度地减少ALC计数,即将值刚好降低到每微升750个细胞以下。通常,就机会性感染的高发生率而言,这种水平的免疫耗竭与长期的免疫功能不佳无关。

[0224] 在不受理论的束缚的情况下,预期PC方案将耗竭并抑制与ALS发病机制的进展有关的Th1/Tc1型适应性免疫亚群。然而,此疗法并未解决ALS中潜在的主要事件,即:错误折叠的RNA种类、自噬不足以清除有害的RNA/DNA产物以及随后的在P2X7受体驱动的NLRP3炎症体的水平下的先天性炎症的RNA/DNA激活。已经证明在ALS模型中有效的此炎症体激活驱动随后的作为最早且最强效的促炎信号之一的IL-1- $\beta$ 激活,其然后驱动主要由Th1/Tc1亚群介导的适应性T细胞炎症。实际上,最近已经提出,NLRP3抑制代表了用于治疗多种神经退行性疾病的新颖方法。核苷逆转录酶抑制剂(NRTI)是被批准用于HIV疾病治疗的抗病毒药剂,所述抗病毒药剂也可以在ALS的治疗中发挥作用。ALS患者可以具有增加的人内源性逆转录病毒K(HRV-K)水平,所述增加的水平部分地通过作为ALS中的关键机制组分的TDP-43沉积物进行的调节在模型系统中驱动疾病发病机制;为了对此生物学进行临床翻译,已经开始了评估达鲁那韦(Darunavir)、利托那韦(Ritonavir)、雷特格韦(Raltegravir)和齐多夫定(Zidovudine)的HIV抗病毒混合物的临床试验(NCT02437110)。还描述了NRTI分子拉米夫定(3TC)抑制P2X7受体,所述受体驱动ALS中发生的NLRP3激活。部分地基于这些观察结果,已经开始了II期临床试验(NCT02363452),以评估拉米夫定、齐多夫定和阿巴卡韦(abacavir)的三种药物方案减轻患有艾卡尔迪-古铁雷斯综合征(Aicardi-Goutieres Syndrome, AGS)的患者的炎症的能力,所述艾卡尔迪-古铁雷斯综合征是一种模仿ALS中先

天性炎症事件的疾病,即:细胞内RNA种类的积累、炎性体途径的激活以及由此产生的系统性Th1驱动的炎症。由于拉米夫定已被表征为NLRP3炎性体的强效抑制剂,并且由于期望产生在ALS患者群体中耐受性良好的治疗方案,因此选择在此方案中利用拉米夫定进行单药剂NRTI疗法。

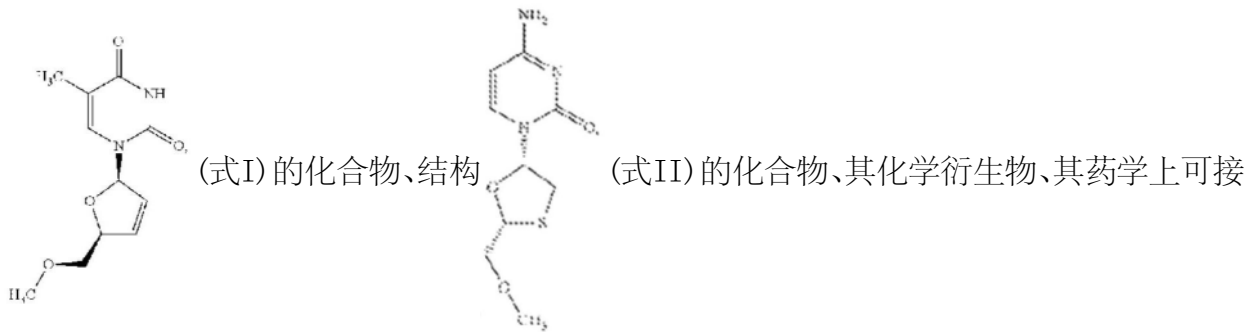
[0225] 因此,在不受理论束缚的情况下,预期其中首先耗竭并抑制Th1/Tc1应答(通过PC方案)并且然后其次控制驱动力炎性体激活的顺序策略将代表用于为涉及ALS的复杂神经炎性网络提供可持续调节的新方法。就下一步骤而言,将拉米夫定用于ALS治疗平台也可能是有益,所述下一步骤是将iT<sub>REG</sub>细胞疗法进一步并入到所述平台中。也就是说,三种治疗形式(喷司他丁/环磷酰胺;拉米夫定;和iT<sub>REG</sub>细胞)中的每种治疗形式都至少部分地通过将ATP的运输从P2X7驱动的NLRP3介导的炎性体转移到免疫抑制分子腺苷来进行操作。首先,喷司他丁通过抑制腺苷脱氨酶,从而防止腺苷转化为肌苷来增加腺苷;其次,拉米夫定是已知的P2X7抑制剂,从而直接抑制炎性体。第三,iT<sub>REG</sub>细胞提供将ATP加工成腺苷的CD39和CD73介导的外核苷酸酶活性。关于此最后的过程,重要的是要注意,小胶质细胞固有地利用CD39和CD73来减轻神经炎症。

[0226] 总而言之,这些数据提供了证据,表明ALS中的原发性神经退行性过程引起了继发性炎性反应,所述继发性炎性反应一方面可以驱动疾病进展,另一方面可以指向多个步骤的治疗干预措施,包含:控制炎性体激活、Th1/Tc1型亚群的耗竭和抑制以及T<sub>REG</sub>型亚群的促进。考虑到此信息,人们对评估ALS患者的免疫调节疗法非常感兴趣。假设对ALS患者的神经炎症的最佳控制将需要解决以上提及的组成部分中的每个组成部分的三管齐下的疗法,即:(1)控制先天性炎性体激活(通过拉米夫定施用,如下所述);(2)减少先前存在的Th1型炎性细胞(通过喷司他丁/环磷酰胺方案,如下文进一步详述);以及(3)通过过继性T细胞转移促进iT<sub>REG</sub>细胞。有若干个原因可以解释为什么可能需要此组合方法。首先,如果不能通过维持疗法解决潜在的炎性体激活,则宿主调理疗法和T<sub>REG</sub>细胞疗法期间获得的任何免疫和治疗益处将可能会被主要的潜在神经退行性过程削弱。其次,由于多种原因,即使将优化的T<sub>REG</sub>细胞群独立输注到具有不受控制的Th1驱动的炎症的宿主中也代表了严峻的免疫学挑战:先前存在的Th1型细胞可以在过继转移的T<sub>REG</sub>细胞上表现出分化可塑性,从而将保护性T<sub>REG</sub>群转化为可以促进疾病发病机制的致病性亚群。第三,过继转移的T细胞群的功效与免疫性T细胞空间的程度有着复杂的联系,这在很大程度上可以通过存在T细胞生长因子(如IL-7和IL-15)来限定;此免疫性空间的创造是由宿主制备方案(包含喷司他丁加环磷酰胺(PC)方案)创造的,所述宿主制备方案已在异基因造血干细胞移植中使用了数十年,并且现在在使用过继性T细胞转移进行癌症治疗的领域中使用。值得注意的是,先前涉及神经退行性疾病或自身免疫性疾病的T<sub>REG</sub>细胞疗法的临床试验尚未并入宿主制备方案,如PC方案。

[0227] 在一些实施例中,所述方法包括使所述受试者经受一个或多个初级治疗周期,所述一个或多个初级治疗周期中的每个初级治疗周期包括:向所述受试者施用喷司他丁;和/或向所述受试者施用环磷酰胺;以及使所述受试者经受一个或多个免疫疗法治疗周期,所述一个或多个免疫疗法治疗周期包括:向所述受试者施用包括治疗有效量的制造的T<sub>REG</sub>细胞的组合物。本领域技术人员可以通过本领域已知的和本文公开的方法确定所述治疗有效量。

[0228] 在前述实施例中,所述一个或多个免疫疗法治疗周期中的每个免疫疗法治疗周期

可以进一步包括向所述受试者施用核苷逆转录酶抑制剂。所述核苷逆转录酶抑制剂可以是NLRP3炎性体的抑制剂；或者所述核苷逆转录酶抑制剂可以是拉米夫定。所述一个或多个免疫疗法治疗周期中的每个免疫疗法治疗周期可以进一步包括：向所述受试者施用喷司他丁；和/或向所述受试者施用环磷酰胺。所述在所述一个或多个免疫疗法治疗周期中的每个免疫疗法治疗周期期间向所述受试者施用喷司他丁的步骤可以在所述一个或多个免疫疗法治疗周期中的每个免疫疗法治疗周期的第1天和第4天进行。所述在所述一个或多个免疫疗法治疗周期中的每个免疫疗法治疗周期期间向所述受试者施用喷司他丁的步骤可以在所述一个或多个免疫疗法治疗周期中的每个免疫疗法治疗周期的第1天、第2天、第3天、第4天和第5天进行。所述方法可以包括两个或更多个免疫疗法治疗周期，并且作为举例而非限制，所述两个或更多个免疫疗法治疗周期中的每个免疫疗法治疗周期间隔0到4周、0到3周、0到2周、0到1周以及作为举例而非限制，介于如0周、1周、2周、3周或4周之间的任何值。所述一个或多个免疫疗法治疗周期中的每个免疫疗法治疗周期可以长18周。所述一个或多个免疫疗法治疗周期中的每个免疫疗法治疗周期可以进一步包括向所述受试者施用腺苷受体调节剂。可以使用其它核苷逆转录酶抑制剂，包括但不限于在美国专利第9,326,983号中公开的那些（所述美国专利通过引用的方式并入本文）、拉米夫定、齐多夫定、司他夫定(stavudine)、虫草素(cordycepin)、叠氮胸苷(azidothymidine)、阿巴卡韦、结构



受的盐和其组合。

[0229] 在前述实施例中，作为举例而非限制，所述一个或多个初级治疗周期可以介于2周与5周、2周与4周、2周与3周、3周与4周或4周与5周之间以及作为举例而非限制，介于如2周、3周、4周或5周之间的任何值。所述方法可以包括两个或更多个初级治疗周期，其中所述两个或更多个初级治疗周期中的每个初级治疗周期间隔0到2周。作为举例而非限制，所述两个或更多个初级治疗周期中的每个初级治疗周期间隔0到1周或1到2周以及作为举例而非限制，介于如1天、1周或2周之间的任何值。

[0230] 在前述实施例中，所述方法可以进一步包括在所述一个或多个初级治疗周期之前：从所述受试者收获外周淋巴细胞。所述方法可以进一步包括在从所述受试者收获外周淋巴细胞之后：培养所述外周淋巴细胞以产生所述制造的 $T_{REG}$ 细胞。所述方法可以进一步包括在所述一个或多个初级治疗周期之后：从所述受试者收获外周淋巴细胞。所述方法可以进一步包括在于所述一个或多个初级治疗周期之后从所述受试者收获外周淋巴细胞之后：培养所述外周淋巴细胞以产生所述制造的 $T_{REG}$ 细胞。所述方法可以进一步包括在所述一个或多个初级治疗周期中的每个初级治疗周期之后：测量所述受试者的绝对淋巴细胞计数(ALC)，并且如果 $ALC < \mu l^{-1} 750$ 个，则进行到所述一个或多个免疫疗法治疗周期。在一些实施例中，所述目标ALC值可以变化，并且作为举例而非限制，可以为每微升0、250、500、750、

1000、1250或1500个细胞。

[0231] 在前述实施例中,所述一个或多个免疫疗法治疗周期中的第一个免疫疗法治疗周期与所述一个或多个初级治疗周期中的最后一个初级治疗周期间隔0到2周。作为举例而非限制,所述两个或更多个免疫疗法治疗周期中的每个免疫疗法治疗周期间隔0到1周或1到2周以及作为举例而非限制,介于如0周、1周或2周之间的任何值。

[0232] 在前述实施例中,作为举例而非限制,喷司他丁的剂量可以是 $0.5\text{mg}/\text{m}^2$ 到 $4\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $1\text{mg}/\text{m}^2$ 到 $4\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $2\text{mg}/\text{m}^2$ 到 $4\text{mg}/\text{m}^2$ 以及作为举例而非限制,介于如 $0.5\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $1\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $1.5\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $2\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $2.5\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $3\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $3.5\text{mg}/\text{m}^2$ 和 $4\text{mg}/\text{m}^2$ 之间的任何值的剂量。所述喷司他丁可以在所述一个或多个初级治疗周期中的每个初级治疗周期的任何天施用。作为举例而非限制,喷司他丁可以在所述一个或多个初级治疗周期中的每个初级治疗周期的第1天或第1天和第4天施用于受试者。

[0233] 在前述实施例中,环磷酰胺可以以50mg到400mg的剂量施用于受试者。作为举例而非限制,环磷酰胺的剂量可以是介于50mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、350mg或400mg与400mg、350mg、300mg、250mg、200mg、150mg、100mg或50mg的任何组合之间的剂量以及作为举例而非限制,介于如50mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、350mg或400mg之间的任何值的剂量。作为举例而非限制,环磷酰胺可以在所述一个或多个初级治疗周期中的每个初级治疗周期的第1天、第2天和第3天或第1天、第2天、第3天、第4天和第5天施用。

[0234] 在前述实施例中,所述喷司他丁和环磷酰胺可以以单一组合物的形式施用于所述受试者。所述单一组合物可以静脉内施用于所述受试者。所述向所述受试者施用喷司他丁和环磷酰胺的步骤可以包括:向所述受试者施用包括喷司他丁的第一组合物;以及向所述受试者施用包括环磷酰胺的第二组合物。

[0235] 在前述实施例中,所述拉米夫定可以以介于每天150mg与每天两次150mg之间的剂量施用于所述受试者。

[0236] 在前述实施例中,所述制造的 $T_{\text{REG}}$ 细胞可以在所述一个或多个免疫疗法治疗周期中的每个免疫疗法治疗周期期间以作为举例而非限制,介于每千克受试者的体重 $1 \times 10^6$ 个细胞与每千克受试者的体重 $5 \times 10^6$ 个细胞、每千克受试者的体重 $2 \times 10^6$ 个细胞与每千克受试者的体重 $5 \times 10^6$ 个细胞、每千克受试者的体重 $3 \times 10^6$ 个细胞与每千克受试者的体重 $5 \times 10^6$ 个细胞、每千克受试者的体重 $4 \times 10^6$ 个细胞与每千克受试者的体重 $5 \times 10^6$ 个细胞、每千克受试者的体重 $1 \times 10^6$ 个细胞与每千克受试者的体重 $4 \times 10^6$ 个细胞、每千克受试者的体重 $1 \times 10^6$ 个细胞与每千克受试者的体重 $4 \times 10^6$ 个细胞、每千克受试者的体重 $1 \times 10^6$ 个细胞与每千克受试者的体重 $2 \times 10^6$ 个细胞之间的剂量以及作为举例而非限制,介于如每千克受试者的体重 $1 \times 10^6$ 个细胞、每千克受试者的体重 $2 \times 10^6$ 个细胞、每千克受试者的体重 $3 \times 10^6$ 个细胞、每千克受试者的体重 $4 \times 10^6$ 个细胞或每千克受试者的体重 $5 \times 10^6$ 个细胞之间的任何值的剂量施用于所述受试者。作为举例而非限制,可以施用约 $1 \times 10^6$ 到约 $200 \times 10^6$ 个细胞/输注的制造的 $T_{\text{REG}}$ 细胞。作为进一步举例而非限制,可以施用约 $1 \times 10^6$ 到约 $200 \times 10^6$ 个细胞/输注、 $10 \times 10^6$ 到约 $200 \times 10^6$ 个细胞/输注、 $50 \times 10^6$ 到约 $200 \times 10^6$ 个细胞/输注、 $100 \times 10^6$ 到约 $200 \times 10^6$ 个细胞/输注、至少 $1 \times 10^6$ 个细胞/输注、 $10 \times 10^6$ 个细胞/输注、 $50 \times 10^6$ 个细胞/输注、 $100 \times 10^6$ 个细胞/输注或 $200 \times 10^6$ 个细胞/输注的制造的 $T_{\text{REG}}$ 细胞。在一些实施例中,可以施用约 $40 \times 10^6$ 个细胞/输注。在一些实施例中,可以施用约 $120 \times 10^6$ 个细胞/输注。所述制造

的 $T_{REG}$ 细胞可以包括的中枢记忆细胞与效应记忆细胞的比率选自1:1、3:1、10:1、1:3和1:10。包括制造的 $T_{REG}$ 细胞的所述组合物可以进一步包括正常 $T_{REG}$ 细胞。所述制造的 $T_{REG}$ 细胞可以在所述一个或多个免疫疗法治疗周期中的每个免疫疗法治疗周期的第8天施用于所述受试者。在一些实施例中,可以将 $iT_{REG}$ 和 $nT_{REG}$ 组合地施用于受试者。

[0237] 在一些实施例中,一种方法可以包括第一治疗周期、第二治疗周期、任选的一个或多个另外的治疗周期以及一个或多个免疫疗法治疗周期,所述第一治疗周期包括:向所述受试者施用喷司他丁,和/或向所述受试者施用环磷酰胺;所述第二治疗周期包括:向所述受试者施用喷司他丁,和/或向所述受试者施用环磷酰胺;所述一个或多个另外的治疗周期中的每个治疗周期包括:向所述受试者施用喷司他丁,和/或向所述受试者施用环磷酰胺,所述一个或多个免疫疗法治疗周期中的每个免疫疗法治疗周期包括:向所述受试者施用喷司他丁,和/或向所述受试者施用环磷酰胺,以及将制造的 $T_{REG}$ 细胞施用于所述受试者。

[0238] 在前述实施例中,所述第一治疗周期可以长14天。所述向所述受试者施用喷司他丁的步骤可以在所述第一治疗周期的第1天进行。在所述第一治疗周期期间,喷司他丁可以以 $1\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量施用于所述受试者。在所述第一治疗周期期间,环磷酰胺可以以 $100\text{mg}$ 的剂量施用于所述受试者。所述向所述受试者施用环磷酰胺的步骤可以在所述第一治疗周期期间重复,作为举例而非限制,所述向所述受试者施用环磷酰胺的步骤可以在所述第一治疗周期的第1天、第2天和第3天进行。

[0239] 在前述实施例中,所述第二治疗周期可以长14天。所述在所述第二治疗周期期间向所述受试者施用喷司他丁的步骤可以在所述第二治疗周期的第1天进行。在所述第二治疗周期期间,喷司他丁可以以 $2\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量施用于所述受试者。所述在所述第二治疗周期期间向所述受试者施用环磷酰胺的步骤可以在所述第二治疗周期期间重复。作为举例而非限制,所述在所述第二治疗周期期间向所述受试者施用环磷酰胺的步骤可以在所述第二治疗周期的第1天、第2天和/或第3天进行。在所述第二治疗周期期间,环磷酰胺可以以 $100\text{mg}$ 的剂量施用于所述受试者。

[0240] 在前述实施例中,所述受试者可以经受所述一个或多个另外的治疗周期。所述一个或多个另外的治疗周期中的每个治疗周期可以各自长14天。所述一个或多个另外的治疗周期可以间隔0到2周。作为举例而非限制,所述两个或更多个另外的治疗周期中的每个治疗周期可以间隔0到1周或1到2周以及作为举例而非限制,介于如0周、1周或2周之间的任何值。所述在所述一个或多个另外的治疗周期中的每个治疗周期期间向所述受试者施用喷司他丁的步骤可以在所述一个或多个另外的治疗周期的第1天和/或第4天进行。在所述一个或多个另外的治疗周期中的每个治疗周期期间,喷司他丁可以以 $2\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量施用于所述受试者。所述向所述受试者施用环磷酰胺的步骤可以在所述一个或多个另外的治疗周期中的每个治疗周期期间重复。所述在所述一个或多个另外的治疗周期中的每个治疗周期期间向所述受试者施用环磷酰胺的步骤可以在所述一个或多个另外的治疗周期中的每个治疗周期的第1天、第2天、第3天、第4天和/或第5天进行。在所述一个或多个另外的治疗周期中的每个治疗周期期间,环磷酰胺可以以 $100\text{mg}$ 到 $200\text{mg}$ 的剂量施用于所述受试者。所述另外的周期可以进一步包括在所述一个或多个另外的治疗周期中的每个治疗周期期间向所述受试者施用喷司他丁之前:测量所述受试者的肌酐清除率( $\text{CrCl}$ ),并且基于所述 $\text{CrCl}$ 调整向所述受试者施用喷司他丁的剂量,其中当 $\text{CrCl}>60$ 毫升/分钟/ $1.73$ 平方米时,以 $2\text{mg}/\text{m}^2$ 施

用喷司他丁,其中当60毫升/分钟/1.73平方米 $>$ CrCl $>$ 30毫升/分钟/1.73平方米时,以1mg/m<sup>2</sup>施用喷司他丁,并且其中当CrCl $<$ 30毫升/分钟/1.73平方米时,不施用喷司他丁。所述另外的周期可以进一步包括在所述一个或多个另外的治疗周期中的每个治疗周期期间向所述受试者施用环磷酰胺之前:测量绝对嗜中性粒细胞计数(ANC),并且基于ANC调整向所述受试者施用环磷酰胺的剂量,其中当ANC $>$ 每微升1000个时,以100mg的剂量施用环磷酰胺,其中当ANC为每微升500-999个时,以50mg的剂量施用环磷酰胺,并且其中当ALC $<$ 每微升50个或ANC $<$ 每微升500个时,不施用环磷酰胺。所述一个或多个另外的治疗周期可以包括至少两个另外的治疗周期,所述至少两个另外的治疗周期中的最后一个治疗周期包括在所述至少两个治疗周期中的所述最后一个治疗周期期间向所述受试者施用环磷酰胺之前:测量绝对淋巴细胞计数(ALC)和绝对嗜中性粒细胞计数(ANC),并且基于所述ALC和ANC调整向所述受试者施用环磷酰胺的剂量,其中当ALC $>$ 每微升1250个时,可以以200mg的剂量施用环磷酰胺,其中当ANC $>$ 每微升1000个并且每微升750个 $<$ ALC $<$ 每微升1250个时,可以以100mg的剂量施用环磷酰胺,其中当ANC为每微升500-999个时,可以以50mg的剂量施用环磷酰胺,并且其中当ANC $<$ 每微升500个和/或ALC $<$ 每微升750个时,可以不施用环磷酰胺。

[0241] 在前述实施例中,所述治疗周期、所述第二治疗周期以及所述一个或多个另外的治疗周期中的每个治疗周期可以间隔0到2周。作为举例而非限制,所述治疗周期、所述第二治疗周期以及所述一个或多个另外的治疗周期中的每个治疗周期可以间隔0到1周或1到2周以及作为举例而非限制,介于如0周、1周或2周之间的任何值。

[0242] 在前述实施例中,所述方法可以进一步包括在所述第一治疗周期中向所述受试者施用喷司他丁之前:测量所述受试者的肌酐清除率(CrCl),并且基于所述CrCl调整向所述受试者施用喷司他丁的剂量,其中当CrCl $>$ 60毫升/分钟/1.73平方米时,以1mg/m<sup>2</sup>施用喷司他丁,其中当60毫升/分钟/1.73平方米 $>$ CrCl $>$ 30毫升/分钟/1.73平方米时,以0.5mg/m<sup>2</sup>施用喷司他丁,并且其中当CrCl $<$ 30毫升/分钟/1.73平方米时,不施用喷司他丁。

[0243] 在前述实施例中,所述方法可以进一步包括在所述第一治疗周期中向所述受试者施用环磷酰胺之前:测量绝对嗜中性粒细胞计数(ANC),并且基于ALC和ANC调整向所述受试者施用环磷酰胺的剂量,其中当ANC $>$ 每微升1000个时,以100mg的剂量施用环磷酰胺,其中当ANC为每微升500-999个时,以50mg的剂量施用环磷酰胺,并且其中当ANC $<$ 每微升500个时,不施用环磷酰胺。

[0244] 在前述实施例中,所述方法可以进一步包括在所述第二治疗周期期间向所述受试者施用喷司他丁之前:测量所述受试者的肌酐清除率(CrCl),并且基于所述CrCl调整向所述受试者施用喷司他丁的剂量,其中当CrCl $>$ 60毫升/分钟/1.73平方米时,以2mg/m<sup>2</sup>施用喷司他丁,其中当60毫升/分钟/1.73平方米 $>$ CrCl $>$ 30毫升/分钟/1.73平方米时,以1mg/m<sup>2</sup>施用喷司他丁,并且其中当CrCl $<$ 30毫升/分钟/1.73平方米时,不施用喷司他丁。

[0245] 在前述实施例中,所述方法可以进一步包括在所述第二治疗周期期间向所述受试者施用环磷酰胺之前:测量绝对嗜中性粒细胞计数(ANC),并且基于所述ANC调整向所述受试者施用环磷酰胺的剂量,其中当ANC $>$ 每微升1000个时,可以以100mg的剂量施用环磷酰胺,其中当ANC为每微升500-999个时,可以以50mg的剂量施用环磷酰胺,并且其中当ANC $<$ 每微升500个时,可以不施用环磷酰胺。

[0246] 在前述实施例中,所述方法可以进一步包括在所述一个或多个另外的治疗周期中

的每个治疗周期之前:测量所述受试者的绝对淋巴细胞计数(ALC),并且基于所述ALC调整所述受试者的治疗,其中如果 $ALC < \text{每微升} 750$ 个,则向所述受试者施用维持治疗周期,所述维持治疗周期包括使所述患者经受所述一个或多个免疫疗法治疗周期,并且其中如果 $ALC > \text{每微升} 750$ 个,则使患者经受所述一个或多个另外的治疗周期。

[0247] 在前述实施例中,所述方法可以进一步包括在所述一个或多个另外的治疗周期中的每个治疗周期之前:测量所述受试者的绝对淋巴细胞计数(ALC),并且基于所述ALC调整所述受试者的治疗,其中如果 $ALC < \text{每微升} 750$ 个,则向所述受试者施用维持治疗周期,所述维持治疗周期包括向所述受试者施用核苷逆转录酶抑制剂,并且在所述维持治疗周期之前不再进行所述一个或多个另外的治疗周期,并且其中如果 $ALC > \text{每微升} 750$ 个,则继续使患者经受所述一个或多个另外的治疗周期。

[0248] 在前述实施例中,作为举例而非限制,所述一个或多个免疫疗法治疗周期中的每个免疫疗法治疗周期可以长18周。在一些实施例中,免疫疗法治疗周期可以间隔0到4周。免疫疗法治疗周期可以重复(包含无限期地)。免疫疗法周期的重复可以根据方案或在复发的情况下进行。作为举例而非限制,免疫疗法周期可以每年发生1-4次。喷司他丁可以在所述一个或多个免疫疗法治疗周期中的每个免疫疗法治疗周期的第1天和第4天以 $2\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量施用于所述受试者。环磷酰胺可以在所述一个或多个免疫疗法治疗周期中的每个免疫疗法治疗周期的第1天、第2天、第3天、第4天和/或第5天以100mg的剂量施用于所述受试者。所述一个或多个免疫疗法治疗周期中的每个免疫疗法治疗周期可以进一步包括:向所述受试者施用核苷逆转录酶抑制剂。所述核苷逆转录酶抑制剂可以是拉米夫定。所述拉米夫定可以在所述一个或多个免疫疗法治疗周期中的每个免疫疗法治疗周期期间以每天150mg到每天两次150mg的剂量施用于所述受试者。所述一个或多个免疫疗法治疗周期中的每个免疫疗法治疗周期可以进一步包括:在所述一个或多个免疫疗法治疗周期中的每个免疫疗法治疗周期期间:测量所述受试者的肌酐清除率( $CrCl$ ),并且基于所述 $CrCl$ 调整向所述受试者施用拉米夫定的剂量,其中当 $CrCl > 50$ 毫升/分钟/1.73平方米时,以每天两次150mg施用拉米夫定,其中当 $50$ 毫升/分钟 $> CrCl > 30$ 毫升/分钟/1.73平方米时,以每天150mg施用拉米夫定,并且其中当 $CrCl < 30$ 毫升/分钟/1.73平方米时,不施用拉米夫定。

[0249] 在前述实施例中,一种方法可以包括向所述受试者施用治疗有效量的制造的 $T_{REG}$ 细胞。

[0250] 在前述实施例中,所述制造的 $T_{REG}$ 细胞可以在所述一个或多个免疫疗法治疗周期中的每个免疫疗法治疗周期的第8天施用于所述受试者。作为举例而非限制,制造的 $T_{REG}$ 细胞可以在所述免疫疗法周期的任一天如第1天、第2天、第3天、第4天、第5天、第6天、第7天、第8天、第9天、第10天、第11天、第12天、13天、第14天或第15天施用于受试者。

[0251] 在前述实施例中,所述制造的 $T_{REG}$ 细胞可以以介于每千克受试者的体重 $1 \times 10^6$ 个细胞与每千克受试者的体重 $5 \times 10^6$ 个细胞之间的剂量,作为举例而非限制,介于每千克受试者的体重 $1 \times 10^6$ 个细胞与每千克受试者的体重 $5 \times 10^6$ 个细胞、每千克受试者的体重 $2 \times 10^6$ 个细胞与每千克受试者的体重 $5 \times 10^6$ 个细胞、每千克受试者的体重 $3 \times 10^6$ 个细胞与每千克受试者的体重 $5 \times 10^6$ 个细胞、每千克受试者的体重 $4 \times 10^6$ 个细胞与每千克受试者的体重 $5 \times 10^6$ 个细胞、每千克受试者的体重 $1 \times 10^6$ 个细胞与每千克受试者的体重 $4 \times 10^6$ 个细胞、每千克受试者的体重 $1 \times 10^6$ 个细胞与每千克受试者的体重 $3 \times 10^6$ 个细胞、每千克受试者的体

重 $1 \times 10^6$ 个细胞与每千克受试者的体重 $2 \times 10^6$ 个细胞之间的剂量以及作为举例而非限制,介于如每千克受试者的体重 $1 \times 10^6$ 个细胞、每千克受试者的体重 $2 \times 10^6$ 个细胞、每千克受试者的体重 $3 \times 10^6$ 个细胞、每千克受试者的体重 $4 \times 10^6$ 个细胞或每千克受试者的体重 $5 \times 10^6$ 个细胞之间的任何值的剂量施用。

[0252] 所述一个或多个治疗周期中的每个治疗周期可以进一步包括:向所述受试者施用喷司他丁;和/或向所述受试者施用环磷酰胺。喷司他丁可以以介于 $1\text{mg}/\text{m}^2$ 与 $2\text{mg}/\text{m}^2$ 之间的剂量以及作为举例而非限制,介于如 $1\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $1.5\text{mg}/\text{m}^2$ 或 $2\text{mg}/\text{m}^2$ 之间的任何值的剂量施用于所述受试者。所述环磷酰胺的剂量可以为介于100mg与200mg之间以及作为举例而非限制,介于如100mg、150mg或200mg之间的任何值。所述喷司他丁可以在所述一个或多个治疗周期中的每个治疗周期的第1天和第4天施用于所述受试者。所述环磷酰胺可以在所述一个或多个治疗周期中的每个治疗周期的第1天、第2天、第3天、第4天和/或第5天施用于所述受试者。所述受试者可以事先用喷司他丁和环磷酰胺治疗。所述一个或多个治疗周期中的每个治疗周期可以进一步包括向所述受试者施用核苷逆转录酶抑制剂。所述核苷逆转录酶抑制剂可以是NLRP3炎性体的抑制剂。所述核苷逆转录酶抑制剂可以是拉米夫定。所述一个或多个治疗周期中的每个治疗周期可以间隔4周。

[0253] 在前述实施例中,所述方法可以进一步包括将正常 $T_{\text{REG}}$ 细胞与所述制造的 $T_{\text{REG}}$ 细胞同时施用于所述受试者。在前述实施例中,所述方法可以进一步包括在所述一个或多个治疗周期之前:从所述受试者收获外周淋巴细胞。在前述实施例中,所述方法可以进一步包括在从所述受试者收获外周淋巴细胞之后:培养所述外周淋巴细胞以产生所述制造的 $T_{\text{REG}}$ 细胞。

[0254] 实例

[0255] 提供以下实例以更好地说明本公开的方法以及所得的去分化的T细胞和 $iT_{\text{REG}}$ 或再分化的T细胞。这些实例不旨在限制或以其它方式改变本公开中公开的方法、细胞和组合物的范围。

[0256] 实例1:维生素D和替西罗莫司的组合减少T细胞效应分子

[0257] 直接评估了维生素D、mTOR抑制(使用雷帕霉素、替西罗莫司的肠胃外形式)和维生素D加替西罗莫司的组合对人T细胞效应分子表达的单独的作用(参见图1)。

[0258] 图1A-1D展示了维生素D和替西罗莫司的组合降低了人 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T细胞中效应分子的表达。对于柱#2到#5,使T细胞经受3天的去分化间隔,所述去分化间隔包含低水平的抗CD3/抗CD28共刺激(珠与T细胞比率;1:3);高剂量的替西罗莫司( $1\mu\text{M}$ );维生素D(0.1或1.0nM);和在X-Vivo 20培养基中的培养物。第一个柱表示对照培养物(无替西罗莫司,无维生素D,使用3:1的珠与T细胞比率;并且包含I型极化细胞因子 $\text{IFN-}\alpha$ (20,000IU/mL,除非另有说明,否则在以下实例1-11中将此量用于对照培养物))。第二个柱表示具有低珠与T细胞比率和替西罗莫司但不含维生素D的培养物;相比之下,第三个柱表示具有维生素D(0.1nM)但没有替西罗莫司的培养物。第四个柱表示具有高剂量(“HD”)维生素D(1.0nM)但没有替西罗莫司的培养物。第五个柱表示具有高剂量的维生素D(1.0nM)和替西罗莫司两者的培养物。在去分化间隔结束时,收获细胞,分离RNA,并且通过Luminex Quantigene方法进行RNA表达分析。示出的所有结果表示相对RNA表达,其中Th1/Tc1对照培养物的结果归一化为值1.0。

[0259] 使用3天的培养间隔,所述培养间隔包含低水平的T细胞共刺激(抗CD3/抗CD28珠与T细胞的比率为1:3;文献中使用的典型比率是倒数3:1)、替西罗莫司(1 $\mu$ M)、0.1或1.0nM剂量的维生素D或替西罗莫司和更高剂量的维生素D的组合。培养后,收获RNA,并且将效应分子的表达水平与对照培养物进行比较。

[0260] 如图1A所示,各种培养物具有管家控制基因(包含GAPDH)的相似RNA表达。与之形成鲜明对比的是,相对于未接受维生素D或替西罗莫司的对照Th1/Tc1细胞培养物,向培养物中添加替西罗莫司、维生素D或替西罗莫司与维生素D的组合使得T细胞效应分子的RNA表达降低,所述T细胞效应分子包含细胞毒性分子颗粒酶B(图1B)和细胞因子分子IL-10(Th2细胞因子;图1C)和IFN- $\gamma$ (Th1细胞因子;图1D)。因此,作为去分化标志物的颗粒酶B和IFN- $\gamma$ 指示维生素D在0.1到1.0nM的浓度下有效。剂量为1 $\mu$ M的替西罗莫司有益地单独用作去分化药剂(柱2,颗粒酶B和IFN- $\gamma$ 减少),并且在组合使用时不会消除维生素D的作用(柱5)。

[0261] 如此,使用低水平共刺激(抗CD3/抗CD28珠与T细胞的比率为1:3)和较短的3天培养间隔,添加替西罗莫司、维生素D或替西罗莫司与维生素D的组合可以用于减少Th1和Th2细胞因子效应子以及细胞毒性效应子机制。

[0262] 实例2:维生素D和替西罗莫司的组合改变与去分化相关的关键转录因子

[0263] 还评估了在低水平的共刺激后维生素D、替西罗莫司或所述组合对关键转录因子表达的影响。

[0264] 图2A-2D展示了维生素D和替西罗莫司的组合增加了人CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞中干细胞相关转录因子和原始T细胞分子IL-7受体- $\alpha$ 的表达。维生素D和替西罗莫司的组合降低了人CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞中效应分子的表达。对于柱#2到#5,使T细胞经受3天的去分化间隔,所述去分化间隔包含低水平的抗CD3/抗CD28共刺激(珠与T细胞比率;1:3);高剂量的替西罗莫司(1 $\mu$ M);维生素D(0.1或1.0nM);和在X-Vivo 20培养基中的培养物。第一个柱表示对照培养物(无替西罗莫司,无维生素D,使用3:1的珠与T细胞比率;并且包含I型极化细胞因子IFN- $\alpha$ )。第二个柱表示具有低珠与T细胞比率和替西罗莫司但不含维生素D的培养物;相比之下,第三个柱表示具有维生素D(0.1nM)但没有替西罗莫司的培养物。第四个柱表示具有高剂量(“HD”)维生素D(1.0nM)但没有替西罗莫司的培养物。第五个柱表示具有高剂量的维生素D(1.0nM)和替西罗莫司两者的培养物。在去分化间隔结束时,收获细胞,分离RNA,并且通过Luminex Quantigene方法进行RNA表达分析。示出的所有结果表示相对RNA表达,其中Th1/Tc1对照培养物的结果归一化为值1.0。

[0265] 如图2A所示,替西罗莫司或替西罗莫司与维生素D的组合使Nanog转录因子上调,所述Nanog转录因子被认为是体细胞向iPSC状态去分化所需的少数关键因子之一。以前,在人成纤维细胞中,发现使用雷帕霉素抑制mTOR会增加Nanog表达;相比之下,发现维生素D受体信号传导减少了与iPSC状态相关的转录因子的表达。

[0266] 如此,使用低水平的共刺激,替西罗莫司增加了iPSC转录因子Nanog;替西罗莫司的这种促进作用不会被浓度在0.1到1.0nM的范围内的维生素D消除。

[0267] 通过比较,单独的替西罗莫司和维生素D均不能增加KLF4分子的RNA表达,所述KLF4分子也是与iPSC状态相关的经典转录因子之一。然而,替西罗莫司与维生素D(1.0nM)的组合增加了KLF4 RNA表达。如此,优选在T细胞去分化尝试中包含替西罗莫司和维生素D两者。如图2B所示,尽管替西罗莫司或维生素D都不单独用于有益地上调去分化分子KLF4,

但替西罗莫司(1 $\mu$ M)和维生素D(1.0nM)的组合协同地上调KLF4。

[0268] 当利用替西罗莫司与维生素D(1.0nM)的组合时,相关的转录因子KLF10也被上调。如图2C所示,1 $\mu$ M剂量的替西罗莫司单独用于有益地上调去分化分子KLF10、Nanog和IL-7受体 $\alpha$ ;尽管维生素D不单独用于上调这些分子,但在组合使用时,维生素D不消除替西罗莫司的作用(柱5)。

[0269] 最后,评估了所培养的细胞的IL-7受体 $\alpha$ 的RNA表达,所述表达在分化状态降低的T细胞中被上调。重要的是,单独的替西罗莫司而非单独的维生素D能够上调IL-7受体 $\alpha$ 。尽管如此,维生素D(1.0nM)与替西罗莫司的组合引起IL-7受体 $\alpha$ 上调,如图2D所示。

[0270] 总而言之,这些数据表明,低水平共刺激与替西罗莫司组合可以用于增强T细胞去分化;优选地,对于更完整的去分化模式,培养物应包含替西罗莫司与维生素D。

[0271] 实例3:维生素D和替西罗莫司的组合减少与Th1分化相关的关键转录因子,同时维持HIF-1- $\alpha$ 表达

[0272] 还评估了维生素D、替西罗莫司或所述组合对与Th1型分化相关的关键转录因子(即T-BET和STAT1)的表达的影响。

[0273] 图3A-3C展示了维生素D和替西罗莫司的组合降低了与效应Th1/Tc1细胞相关的转录因子的表达,而没有降低与T细胞存活相关的转录因子HIF-1- $\alpha$ 的表达。维生素D和替西罗莫司的组合降低了人CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞中效应分子的表达。对于柱#2到#5,使T细胞经受3天的去分化间隔,所述去分化间隔包含低水平的抗CD3/抗CD28共刺激(珠与T细胞比率;1:3);高剂量的替西罗莫司(1 $\mu$ M);维生素D(0.1或1.0nM);和在X-Vivo 20培养基中的培养物。第一个柱表示对照培养物(无替西罗莫司,无维生素D,使用3:1的珠与T细胞比率;并且包含I型极化细胞因子IFN- $\alpha$ )。第二个柱表示具有低珠与T细胞比率和替西罗莫司但不含维生素D的培养物;相比之下,第三个柱表示具有维生素D(0.1nM)但没有替西罗莫司的培养物。第四个柱表示具有高剂量(“HD”)维生素D(1.0nM)但没有替西罗莫司的培养物。第五个柱表示具有高剂量的维生素D(1.0nM)和替西罗莫司两者的培养物。在去分化间隔结束时,收获细胞,分离RNA,并且通过Luminex Quantigene方法进行RNA表达分析。示出的所有结果表示相对RNA表达,其中Th1/Tc1对照培养物的结果归一化为值1.0。

[0274] 重要的是,每种药剂或药剂的组合均下调T-BET RNA(图3A)和STAT1RNA(图3B)两者。如图3A-3C所示,0.1到1.0nM剂量的维生素D单独用于有益地下调分化分子T-BET和STAT1。即使在与1.0nM维生素D组合时,1 $\mu$ M剂量的替西罗莫司也不会有害地下调促存活转录因子HIF-1 $\alpha$ 。然而,1 $\mu$ M剂量的替西罗莫司单独用于有益地下调分化分子T-BET和STAT1;与维生素D组合产生类似的结果(这两种药剂不是拮抗的)。

[0275] 与之形成鲜明对比的是,1 $\mu$ M剂量的替西罗莫司、0.1到1.0nM剂量的维生素D或所述组合未下调关键转录因子HIF-1- $\alpha$ (图3C),所述关键转录因子作为对抗肿瘤作用至关重要的T细胞存活因子非常重要。

[0276] 总而言之,这些数据表明,低水平共刺激、替西罗莫司和维生素D的组合可以用于减少产生Th1所需的转录因子,而不会抑制总体T细胞存活所需的关键转录因子HIF-1- $\alpha$ 。

[0277] 实例4:维生素D、替西罗莫司和抗IL-2受体单克隆抗体的组合增加自噬标记

[0278] 还评估了维生素D、替西罗莫司或所述组合对自噬过程的影响,所述自噬过程对于促进干细胞样去分化状态至关重要。自噬的水平可以部分地借助于蛋白质印迹分析通过随

后的自噬底物p62的上调来确定。

[0279] 图4展示了维生素D、替西罗莫司和抗IL-2受体阻断的组合诱导了自噬相关分子p62的表达。使人CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞经受去分化方案,所述去分化方案涉及使用低水平共刺激(1:3珠与T细胞比率)、替西罗莫司(“TEM”,如图4中所指示的;浓度为1.0或0.3 $\mu$ M)、维生素D(“D”,如所指示的;浓度为0.01、0.03、0.1、0.3或1.0nM)和抗IL-2受体单克隆抗体(达克珠单抗,50 $\mu$ g/ml;“DAC”,如所指示的)进行的3天培养。在3天培养间隔后,收获T细胞并分离蛋白,并且使所述蛋白经受针对自噬相关基因p62和管家基因——肌动蛋白的蛋白质印迹分析。

[0280] 如图4所展现的,在T细胞培养物中包含维生素D对于增加自噬至关重要,如通过上调的p62所测量的。0.01到0.1nM剂量的维生素D与浓度为0.3到1.0 $\mu$ M的替西罗莫司协同作用以在去分化期间有益地上调自噬标志物p62。也就是说,在图4中的培养物#6(第五个柱)中,蛋白质印迹分析中p62的表达非常少,这与低水平的自噬一致;如图例所指示的,这种培养条件接受了低水平的共刺激、替西罗莫司、抗IL-2受体单克隆抗体达克珠单抗,但未接受维生素D。

[0281] 与之形成鲜明对比的是,其它培养条件各自接受了维生素D的补充,并且各自具有增加的p62表达(维生素D的有效剂量范围为0.01nM到1.0nM)。此图4还证明了不添加抗IL-2受体单克隆抗体的维生素D和不添加替西罗莫司的维生素D足以诱导T细胞自噬。

[0282] 总而言之,这些数据表明,在低水平的共刺激下包含维生素D是用于单独或与其它T细胞抑制剂(即抗IL-2受体试剂或mTOR抑制剂替西罗莫司)组合诱导T细胞自噬的有效方法。

[0283] 实例5:维生素D、替西罗莫司和抗IL-2受体单克隆抗体的组合引起mTORC1复合物的最佳破坏

[0284] 还评估了各种T细胞培养条件对Raptor表达的影响,所述Raptor是mTORC1信号传导复合物的关键组分。重要的是,最近发现抑制mTORC1对于将体细胞重编程为iPSC状态至关重要。

[0285] 图5展示了维生素D、替西罗莫司和抗IL-2受体阻断的组合减少了mTORC1相关分子Raptor的表达。使人CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞经受去分化方案,所述去分化方案涉及使用低水平共刺激(1:3珠与T细胞比率)、替西罗莫司(“TEM”,如图5中所指示的;浓度为1.0或0.3 $\mu$ M)、维生素D(“D”,如所指示的;浓度为0.01、0.03、0.1、0.3或1.0nM)和抗IL-2受体单克隆抗体(达克珠单抗,50 $\mu$ g/ml;“DAC”,如所指示的)进行的3天培养。在3天培养间隔后,收获T细胞并分离蛋白,并且使所述蛋白经受针对mTORC1复合蛋白Raptor和管家基因——肌动蛋白的蛋白质印迹分析。

[0286] 如图5所展现的,当与替西罗莫司(1.0 $\mu$ M)、维生素D(0.1nM)和抗IL-2受体单克隆抗体达克珠单抗(50 $\mu$ g/ml)组合以低的珠与T细胞比率(1:3)共刺激T细胞时(示出的第一个柱;培养物1),发生对mTORC1复合物的最佳抑制,如通过Raptor表达减少所指示的。

[0287] 如图5所展现的,达克珠单抗的省略导致Raptor表达的适度增加,从而表明抗IL-2受体试剂对于最佳mTORC1抑制的作用。因此,抗IL-2受体单克隆抗体达克珠单抗(剂量为50 $\mu$ g/ml)在抑制mTORC1亚基分子Raptor(第2个柱)中起有益作用。

[0288] 如图5所展现的,维生素D对mTORC1亚基分子Raptor的最佳抑制是维生素D剂量介

于0.03到0.1nM之间;浓度低于或高于此范围会导致Raptor的最佳抑制降低。因此,低至0.03nM的维生素D水平足以最佳地抑制Raptor;然而,将维生素D水平降低到0.01nM会导致次佳的Raptor抑制。此外,如具有较高的Raptor表达水平的培养物7(维生素D的浓度为0.3nM)所指示的,将维生素D的水平提高到超过0.1nM的浓度可能是有害的。

[0289] 此外,如图5所指示的,Raptor的最佳下调需要维生素D与替西罗莫司的组合(其中替西罗莫司的最佳剂量为1.0 $\mu$ M),因为补充有0.3 $\mu$ M浓度的替西罗莫司的培养物9具有更高水平的Raptor表达。

[0290] 实例6:维生素D、替西罗莫司和抗IL-2受体单克隆抗体的组合破坏mTORC1复合物和mTORC2复合物两者

[0291] 还评估了mTORC2复合物,所述复合物对雷帕霉素的抑制作用不直接敏感,但会受到导致延长mTORC1阻断的条件的影响。重要的是,抑制mTORC2可以促进干细胞样状态。

[0292] 图6展示了维生素D、替西罗莫司和抗IL-2受体阻断的组合减少了mTORC1相关分子Raptor和mTORC2相关分子Rictor的表达。使人CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞经受去分化方案,所述去分化方案涉及使用低水平共刺激(1:3珠与T细胞比率)、替西罗莫司(“TEM”,如图6中所指示的;浓度为1.0 $\mu$ M)、维生素D(“D”,如所指示的;浓度为0.03、0.1、0.3或1.0nM)和抗IL-2受体单克隆抗体(达克珠单抗,50 $\mu$ g/ml;“DAC”,如所指示的)进行的3天培养。在3天培养间隔后,收获T细胞并分离蛋白,并且使所述蛋白经受针对mTORC1复合蛋白Raptor;mTORC2复合蛋白Rictor;mTORC1后蛋白p70S6K;mTORC2后蛋白SGK1;和管家基因GAPDH的蛋白质印迹分析。

[0293] 如图6所示,相对于不含三种抑制剂中的任一种抑制剂的对照培养物,在含有替西罗莫司、维生素D和抗IL-2受体抗体达克珠单抗的培养基中的T细胞培养物的mTORC1分子Raptor和mTORC2分子Rictor均降低。mTORC1后分子p70S6K和mTORC2后分子SGK1的水平相对保留。因此,维生素D(浓度介于0.03与1.0nM之间)在组合药剂去分化期间对于下调mTORC2亚基Rictor是有效的。而且,浓度为1 $\mu$ M的替西罗莫司在组合药剂去分化期间对于下调mTORC2亚基Rictor是有效的。此外,抗IL-2受体单克隆抗体达克珠单抗(剂量,50 $\mu$ g/ml)没有消除替西罗莫司和维生素D下调mTORC2亚基Rictor的能力。

[0294] 如此,使用低水平的共刺激和替西罗莫司、维生素D和抗IL-2受体单克隆抗体的三部分抑制性方案的T细胞培养代表了一种用于减少Raptor和Rictor亚基两者的新颖方法。

[0295] 实例7:维生素D、替西罗莫司和抗IL-2受体单克隆抗体的组合降低了促凋亡Bcl2-家族成员基因BIM的表达

[0296] 由于在线粒体水平上的自噬(线粒体自噬),可以改变线粒体蛋白质的质量;具体地,对于线粒体自噬而言,bcl2-家族成员基因从促凋亡家族成员(如BIM)向抗凋亡家族成员基的转变可以是有利的。另外,减少凋亡趋势的培养方法与去分化能力的增加相关。

[0297] 图7展示了维生素D、替西罗莫司和抗IL-2受体阻断的组合减少了促凋亡分子BIM的表达。使人CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞经受去分化方案,所述去分化方案涉及使用低水平共刺激(1:3珠与T细胞比率)、替西罗莫司(“TEM”,如图7中所指示的;浓度为1.0或0.3 $\mu$ M)、维生素D(“D”,如所指示的;浓度为0.01、0.03、0.1、0.3或1.0nM)和抗IL-2受体单克隆抗体(达克珠单抗,50 $\mu$ g/ml;“DAC”,如所指示的)进行的3天培养。在3天培养间隔后,收获T细胞并分离蛋白,并且使所述蛋白经受针对促凋亡相关基因BIM和管家基因——肌动蛋白的蛋白质印迹分析。

[0298] 为了对此进行评估,测量了在低共刺激强度(1:3的珠与T细胞比率)和各种抑制剂的存在下培养的T细胞中BIM的水平。如图7所示,含有替西罗莫司、维生素D(0.1nM)和抗IL-2受体单克隆抗体达克珠单抗的组合的T细胞培养物的BIM表达水平最低。但是,图7仍然示出抗IL-2受体单克隆抗体达克珠单抗(剂量为50 $\mu$ g/ml)在抑制促凋亡分子BIM(第2个柱)中起着有益的作用。三种抑制剂中的每种抑制剂似乎都在BIM抑制中起作用,因为不存在任何单一抑制剂增加BIM水平。

[0299] 如此,可以得出结论,组合抑制剂方案代表了一种用于诱导线粒体控制凋亡趋势的有利转变的方法。

[0300] 实例8:三种抑制剂去分化方案产生在去除抑制剂后具有随后增殖能力的T细胞

[0301] 为证明包括低水平的共刺激、替西罗莫司、维生素D和抗IL-2受体单克隆抗体的3天方案产生能够再分化的去分化状态,进行实验,以在从培养物中去除抑制剂后,在培养的第3天使用高水平的共刺激(珠与T细胞比率为3:1)对细胞进行重新刺激。在10天(总共培养13天)后,收获T细胞,计算T细胞的量并通过流式细胞术评估T细胞。

[0302] 图8展示了在去分化间隔期间培养组分对随后的T细胞产率(在培养的第13天)的影响。使人CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞经受3天的去分化间隔,所述去分化间隔包含低水平的抗CD3/抗CD28共刺激(如所指示的,1:3或1:1的珠:T细胞比率);替西罗莫司(1 $\mu$ M;或0.1 $\mu$ M的低剂量[“Lo”]);维生素D(0.1nM;或1.0nM的高剂量[“HD”];或0.01nM的低剂量);抗IL-2受体单克隆抗体(50 $\mu$ g/ml的达克珠单抗);以及补充有5%的人AB血清的X-Vivo 20培养基中的培养物。第一个柱表示对照培养物(无替西罗莫司、维生素D或抗IL-2R抗体)。第二个柱表示不具有抗IL-2R抗体的培养物;第四个柱表示未补充血清的培养物;第五个柱表示低剂量的维生素D,而第六个柱表示使用高剂量的维生素D产生的结果;第七个柱表示使用低剂量的替西罗莫司产生的结果;并且第八个柱表示不具有替西罗莫司的培养物;第九个柱表示使用较高比率的珠产生的结果。在3天间隔后,将培养基更换为不含抑制剂的新鲜X-Vivo20,提供高水平共刺激(3:1的珠:T细胞比率),并且添加T细胞生长因子IL-2(100IU/ml)和IL-7(10ng/ml)。在培养的第13天,计算活T细胞的数量,并示出相对于第0天输入数量的总产率。

[0303] 图8示出了再分化阶段后的T细胞计数。如这些数据所示(柱#3),对于第一个3天的去分化间隔,最初使用低水平共刺激、替西罗莫司、维生素D和抗IL-2受体单克隆抗体维持的T细胞具有令人满意的T细胞产率(超过培养物输入的250%)。

[0304] 与之形成鲜明对比的是,在柱#4所表示的培养物中观察到了非常低的产率,所述培养物在初始的3天培养间隔期间未接受血清补充;如此,此数据证明,初始的3天培养间隔必须包含补充有5%AB血清的X-Vivo 20培养基。

[0305] 而且,维生素D浓度降低到0.01nM或维生素D浓度升高到1.0nM会导致非常低的产率(如分别由柱#5和柱#6所示的数据)。如此,维生素D的优选浓度为0.1nM。

[0306] 此外,替西罗莫司的浓度降低至0.1 $\mu$ M会减少所得T细胞产率(柱#7)。如此,替西罗莫司的优选浓度为1.0 $\mu$ M。

[0307] 最后,如果在去分化间隔中的共刺激水平增加(珠与T细胞比率从1:3改变为1:1;最后一个柱(柱#9)所示的结果),则所得T细胞计数会非常低。如图8所示,在去分化期间必须使用低水平的共刺激(1:3的共刺激珠与T细胞比率),因为将比率提高到1:1会导致从去分化状态制造T细胞的能力大大降低(最后一个柱)。如此,在培养的去分化阶段期间的优选

珠与T细胞比率为1:3。

[0308] 实例9:初始的三组分培养间隔会导致与分化减少一致的表达细胞表面分子的CD4<sup>+</sup>T细胞的产生

[0309] 在培养的再分化阶段期间的不同时间,通过流式细胞术评估所得CD4<sup>+</sup>T细胞的记忆标志物表达。

[0310] 图9A-9C展示了在去分化间隔期间培养组分对记忆标志物的CD4<sup>+</sup>T细胞表达的影响(在培养的第13天)。使人CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞经受3天的去分化间隔,所述去分化间隔包含(如上图9A-9C所指示)低水平的抗CD3/抗CD28共刺激(1:3的珠与T细胞比率);替西罗莫司(1 $\mu$ M或0.1 $\mu$ M[低剂量;“Lo”]);维生素D(0.1nM;或0.01nM[低剂量;“Lo”]);抗IL-2受体单克隆抗体(50 $\mu$ g/ml的达克珠单抗);以及补充有5%的人AB血清的X-Vivo 20培养基中的培养物。在3天间隔后,将培养基更换为不含抑制剂的新鲜X-Vivo 20,提供高水平共刺激(3:1的珠:T细胞比率),并且添加T细胞生长因子IL-2(100IU/ml)和IL-7(10ng/ml)。使T细胞经受流式细胞术分析,以评估CD4<sup>+</sup>和CD45RA<sup>+</sup>标志物的共表达(结果在上图示出;评估于培养的第13天);CD4<sup>+</sup>、CD62L<sup>+</sup>和CCR7<sup>+</sup>标志物的共表达(左下图;评估于培养的第3天);以及CD4<sup>+</sup>、CD62L<sup>+</sup>、CCR7<sup>+</sup>和CD127<sup>+</sup>标志物的共表达(右下图;评估于培养的第10天)。示出了相对于培养开始时CD4<sup>+</sup>T细胞的值的所有结果(图9A-9C中的最后一个柱;“第0天输入值”)。

[0311] 如图9A所示,相对于来自第0天输入T细胞的值,最初在替西罗莫司、维生素D和抗IL-2受体单克隆抗体的组合下进行繁殖的T细胞具有相对保留的CD45RA标志物表达,所述标志物在原初T细胞上表达(柱#3)。与之形成鲜明对比的是,在初始培养间隔期间不存在这三种分子会引起原初T细胞群的耗竭(培养物#1)。此外,在初期培养间隔期间,替西罗莫司的消除会导致原初T细胞群的耗竭(培养物#6)。

[0312] 如图9B所示,最初在并入低水平共刺激的3天间隔中进行繁殖的T细胞培养物中的每种培养物具有中枢记忆分子CD62L和CCR7的增加的T细胞表达。

[0313] 最后,如图9C所示,最初在替西罗莫司、维生素D和抗IL-2受体单克隆抗体的组合下进行繁殖的T细胞具有对CD62L、CCR7和IL-7受体 $\alpha$ (CD127)呈三阳性的T细胞的表达大大增加(相对于第0天输入细胞)。在初始3天培养期间(柱#1)去除所述三种抑制剂消除了初始培养间隔促进此三阳性细胞群扩增的能力。另外,在初始培养间隔内仅减少或去除替西罗莫司也极大地降低了三阳性T细胞的频率(柱#5和6)。

[0314] 总而言之,这些数据表明,三种药物的初始培养间隔使CD4<sup>+</sup>T细胞从主要的晚期效应记忆群向分化程度较低的T细胞群(其为非常有限的T细胞分化状态)转化,包含CD62L、CCR7和CD127的共表达。

[0315] 实例10:初始的三组分培养间隔会导致与分化减少一致的表达细胞表面分子的CD8<sup>+</sup>T细胞的产生

[0316] 在培养的再分化阶段期间的不同时间,通过流式细胞术评估所得CD8<sup>+</sup>T细胞的记忆标志物表达。

[0317] 图10A-10B展示了在去分化间隔期间培养组分对记忆标志物的CD8<sup>+</sup>T细胞表达的影响。使人CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞经受3天的去分化间隔,所述去分化间隔包含(如上图10A-10B所指示)低水平的抗CD3/抗CD28共刺激(珠与T细胞比率;1:3);替西罗莫司(1 $\mu$ M或0.1 $\mu$ M[低剂量;“Lo”]);维生素D(0.1nM;或0.01nM[低剂量;“Lo”]);抗IL-2受体单克隆抗体(50 $\mu$ g/ml的

达克珠单抗);以及补充有5%的人AB血清的X-Vivo 20培养基中的培养物。在3天间隔后,将培养基更换为不含抑制剂的新鲜X-Vivo 20,提供高水平共刺激(3:1的珠:T细胞比率),并且添加T细胞生长因子IL-2(100IU/ml)和IL-7(10ng/ml)。使T细胞经受流式细胞术分析,以评估CD8<sup>+</sup>、CD62L<sup>+</sup>和CCR7<sup>+</sup>标志物的共表达(左图;评估于培养的第10天);以及CD8<sup>+</sup>、CD62L<sup>+</sup>、CCR7<sup>+</sup>和CD127<sup>+</sup>标志物的共表达(右图;评估于培养的第10天)。示出了相对于培养开始时CD8<sup>+</sup>T细胞的值的所有结果(图10A-10B中的最后一个柱;“第0天输入值”)。

[0318] 如图10A所示,最初在并入低水平共刺激的3天间隔中进行繁殖的T细胞培养物中的每种培养物具有中枢记忆分子CD62L和CCR7的增加的CD8<sup>+</sup>T细胞表达。

[0319] 最后,如图10B所示,最初在替西罗莫司、维生素D和抗IL-2受体单克隆抗体的组合下进行繁殖的T细胞具有对CD62L、CCR7和IL-7受体 $\alpha$ (CD127)呈三阳性的CD8<sup>+</sup>T细胞的表达大大增加(相对于第0天输入细胞)。在初始3天培养期间(柱#1)去除所述三种抑制剂消除了初始培养间隔促进此三阳性细胞群扩增的能力。另外,在初始培养间隔内仅减少或去除替西罗莫司也极大地降低了三阳性T细胞的频率(柱#5和6)。

[0320] 总而言之,这些数据表明,三种药物的初始培养间隔使CD8<sup>+</sup>T细胞从主要的晚期效应记忆群向分化程度较低的T细胞群(其为非常有限的T细胞分化状态)转化,包含CD62L、CCR7和CD127的共表达。

[0321] 实例11:去分化的T细胞对低细胞因子潜能具有固有偏倚

[0322] 图11A-11D强调了去分化过程的组成部分,包含以下的使用:低水平共刺激(1:3的抗CD3/抗CD28珠与T细胞比率,相对于Kalamasz D, Long SA, Taniguchi R, Buckner JH, Berenson RJ, Bonyhadi M. “使用与抗CD3和抗CD28抗体缀合的磁珠优化人T细胞体外扩增(Optimization of human T-cell expansion ex vivo using magnetic beads conjugated with anti-CD3 and Anti-CD28 antibodies)《免疫疗法杂志(Journal of immunotherapy)》(马里兰州黑格斯敦(Hagerstown, Md):1997).2004;27(5):405-418中所描述的常规方法,所述比率有所降低);mTOR抑制剂替西罗莫司;维生素D;以及抗IL-2受体单克隆抗体。

[0323] 图11A-11D描绘了在极化中性培养基中培养的去分化的T细胞的炎性Th1/Th17细胞因子分析。使人CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞经受3天的去分化过程,所述去分化过程包含如以下所指示的培养组成部分:替西罗莫司(Y指示1 $\mu$ M的浓度;Y,Lo指示0.1 $\mu$ M的浓度);维生素D(Y指示0.1nM的浓度;Y,Lo指示0.01nM的浓度);抗IL-2受体单克隆抗体(50 $\mu$ g/ml的达克珠单抗);以低比率(1:3的珠与T细胞比率)使用抗CD3/抗CD28涂覆的磁珠共刺激并且补充有5%的人血清。3天后,在补充有T细胞生长因子rhu IL-2(100IU/ml)和rhu IL-7(10ng/ml)的培养基中对去分化的T细胞进行共刺激(典型的珠与T细胞比率为3:1),所述生长因子在诱导T细胞极化方面不是强效的。培养10天后(总计,培养的第13天),收获并洗涤T细胞,并用3/28珠(比率为3:1)对T细胞进行24小时的再刺激;收获所得上清液,并通过Luminex多分析物方法检测细胞因子含量。示出的所有结果均表示为细胞因子水平,单位为pg/ml/1 $\times$ 10<sup>6</sup>个细胞/ml/24小时。

[0324] 为评估去分化的T细胞状态是否对特定细胞因子分泌模式表现出固有偏倚,使用高水平共刺激(珠与T细胞比率为3:1)以及在不含任何抑制剂但只含T细胞生长因子IL-2和IL-7的培养基中的维持来培养去分化的T细胞。

[0325] 如图11A-11D的细节所示,从每种去分化的前体状态再分化的所得T细胞的炎性细胞因子分泌水平非常低,包含IFN- $\gamma$  (大多数的值低于1000pg/ml)、TNF- $\alpha$  (大多数的值低于100pg/ml)和IL-17 (所有的值低于10pg/ml)。值得注意的是,GM-CSF在一些条件下的分泌水平更高,在某些情况下会大于10,000pg/ml。在去分化条件下,GM-CSF值适中,所述条件包括更高剂量的替西罗莫司(1.0 $\mu$ M)和更高剂量的维生素D(0.1nM);如此,为了获得适中的GM-CSF的T细胞因子分泌,期望在去分化方法中扩增T细胞,所述方法并入了这些更高浓度的替西罗莫司和维生素D。

[0326] 值得注意的是,与使用较高浓度的维生素D(0.1nM)相比,去分化间隔期间包含低浓度的维生素D(0.01nM)也会产生稍高水平的IFN- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ 。如此,就使炎性细胞因子IFN- $\gamma$ 的所得T细胞分泌适中而言,优选使用浓度接近0.1nM的维生素D。

[0327] 此外,如图12A-12D所示,从每个去分化的前体状态T细胞中再分化的所得T细胞的IL-2分泌水平非常低,尽管同样地,相对于使用较低浓度的这些药剂,所述水平在并入较高浓度的替西罗莫司和维生素D的条件下较低。

[0328] 图12A-12D描绘了在极化中性培养基中培养的去分化的T细胞的IL-2和Th2型细胞因子分析。使人CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞经受3天的去分化过程,所述去分化过程包含如以下所指示的培养组成部分:替西罗莫司(Y指示1 $\mu$ M的浓度;Y,Lo指示0.1 $\mu$ M的浓度);维生素D(Y指示0.1nM的浓度;Y,Lo指示0.01nM的浓度);抗IL-2受体单克隆抗体(50 $\mu$ g/ml的达克珠单抗);以低比率(1:3的珠与T细胞比率)使用抗CD3/抗CD28涂覆的磁珠共刺激并且补充有5%的人血清。3天后,在补充有T细胞生长因子rhu IL-2(100IU/ml)和rhu IL-7(10ng/ml)的培养基中对去分化的T细胞进行共刺激(典型的珠与T细胞比率为3:1),所述生长因子在诱导T细胞极化方面不是强效的。培养10天后(总计,培养的第13天),收获并洗涤T细胞,并用3/28珠(比率为3:1)对T细胞进行24小时的再刺激;收获所得上清液,并通过Luminex多分析物方法检测细胞因子含量。示出的所有结果均表示为细胞因子水平,单位为pg/ml/ $1 \times 10^6$ 个细胞/ml/24小时。

[0329] 所得T细胞的Th2型细胞因子IL-4(值小于20pg/ml)和IL-5(值小于60pg/ml)的分泌水平也非常低。然而,在一些T细胞培养条件下,IL-13的水平提高,其中相对于使用较低浓度的这些药剂的条件,在并入较高浓度的替西罗莫司和维生素D的条件下,检测到细胞因子分泌较少。

[0330] 总而言之,这些数据表明,在第1步去分化过程后,含有T细胞生长因子(IL-2和IL-7)且无强极化信号(未添加IFN- $\alpha$ 、IL-4或TGF- $\beta$ )的培养基中的T细胞再分化对低细胞因子潜能的T细胞具有固有偏倚;具体地,证明了有害细胞因子IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 和IL-17的水平较低。如果去分化步骤并入了低水平共刺激和在含有浓度为1.0 $\mu$ M的替西罗莫司、浓度为0.1nM的维生素D以及包含抗IL-2受体单克隆抗体的培养基中的繁殖,则此观察结果特别强烈。

[0331] 实例12:去分化的T细胞在杂交T<sub>REG</sub>/Th2极化条件下和存在新型药剂培美曲塞的情况下的有利扩增

[0332] 评估了去分化组分在T细胞再分化并入了T<sub>REG</sub>极化细胞因子IL-2和TGF- $\beta$ 或Th1极化细胞因子IFN- $\alpha$ 时的作用。

[0333] 实际上,已证明TBET或GATA3可以维持T<sub>REG</sub>细胞维持免疫耐受的能力。然而,尽管有

证据表明TBET或GATA3在 $T_{REG}$ 细胞功能中发挥作用,但由于TBET与随之产生的Th1型途径在自身免疫中的紧密联系,还是选择优先考虑制造的 $T_{REG}$ 细胞中的GATA3表达。如此,评估了第1步去分化过程以及随后的包含 $T_{REG}$ 极化信号(IL-2、TGF- $\beta$ )和主要Th2极化信号(IL-4)的第2步再分化过程是否可能产生人“杂交” $T_{REG}$ -Th2细胞。就这一点而言,来自实验鼠模型的文献结果是混杂的,因为在 $T_{REG}$ 细胞体外培养中有目的地添加IL-4被证明可以促进或抑制 $T_{REG}$ 表型。除了这一与外源性IL-4在 $T_{REG}$ 细胞制造中的作用有关的有争议的鼠文献外,缺乏关于IL-4对人 $T_{REG}$ 细胞的体外作用的信息,尽管一项研究发现IL-4保留人 $T_{REG}$ 细胞的功能。

[0334] 具有杂交Th2组分的人 $iT_{REG}$ 细胞可能对过继性T细胞疗法有利,因为 $iT_{REG}$ 细胞已被表征为具有体内去分化可塑性倾向,由此 $iT_{REG}$ 细胞可以转化为致病性Th1型或Th17型亚群。另一方面,如果在 $iT_{REG}$ 制造中向Th2型表型的分化被编码,则Th2偏倚将可预测地限制向Th1/Th17表型的可塑性。

[0335] 另外,评估了药剂培美曲塞是否可能对促进 $iT_{REG}$ 细胞表型有益。使用药剂来优先产生 $iT_{REG}$ 细胞已有先例;最值得注意的是,mTOR抑制剂雷帕霉素已与向 $iT_{REG}$ 细胞的转移有关。然而,培美曲塞尚未被表征为具有 $iT_{REG}$ 促进作用。培美曲塞作为叶酸抗代谢药具有复杂的作用机制。

[0336] 图13描绘了相对于Th1极化条件,在杂交Th2/ $T_{REG}$ 极化条件下的去分化的T细胞的有利扩增。使人 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T细胞经受3天的去分化过程(“第1步”)。如图13所指示的,此第1步去分化干预措施可变地包含:无抑制剂(“无”);单独的替西罗莫司(“T”;1.0 $\mu$ M);单独的维生素D(“D”;0.1nM);单独的抗IL-R单克隆抗体巴利昔单抗(“B”;10 $\mu$ g/ml);或抑制剂的不同组合(T、D或T、D、B)。3天后,去分化的T细胞在可变地补充有以下的培养基中共刺激(经典的珠与T细胞比率为3:1):Th1极化条件(rhu IFN- $\alpha$ ;10,000IU/ml); $T_{REG}$ 极化(rhu IL-2,100IU/ml;rhu TGF- $\beta$ ,10ng/ml);或杂交Th2- $T_{REG}$ 极化条件(IL-2、TGF- $\beta$ 加rhu IL-4的添加[1000IU/ml])。另外,在不含新型抑制分子培美曲塞(“0”)或在存在不同浓度的培美曲塞的情况下(如所指示的,10nM[“10”];33nM[“33”];或100nM[“100”])进行存在不同极化条件的情况下的T细胞培养。在总共10天的培养后,收获n=24种培养物,并且对活细胞计算数量并绘图(y轴表示细胞数 $\times 10^6$ ;输入细胞数为 $1.5 \times 10^6$ 个细胞)。

[0337] 如图13所示,在第1步去分化后再分化T细胞的能力取决于:去分化期间添加的特定组分;再分化期间添加的特定细胞因子;以及再分化期间培美曲塞的存在。

[0338] 值得注意的是,在Th1型极化条件下,尝试在第1步的去分化后再分化足够数量的T细胞是不成功的(参见图13,培养物#9到#16;所有T细胞产率均低于T细胞输入数量)。如果去分化条件包含单独的替西罗莫司和维生素D或与抗IL-2受体试剂组合使用替西罗莫司和维生素D,则观察到沿Th1型途径进行再分化的能力极大地受限,并且如果在第2步培养期间未添加培美曲塞或添加在10到100nM的浓度范围内的培美曲塞,也观察到沿Th1型途径进行再分化的能力极大地受限。

[0339] 与之形成鲜明对比的是,在杂交 $T_{REG}$ -Th2极化的条件下,尝试在第1步的去分化后再分化足够数量的T细胞是成功的(参见图13,培养物#2和#5)。值得注意的是,在最严格的去分化条件下(包含替西罗莫司、维生素D和抗IL-2受体单克隆抗体),只有在第2步的培养中以10nM的浓度添加培美曲塞时,才能在 $T_{REG}$ -Th2极化条件下观察到足够的T细胞。

[0340] 使用这种最严格的去分化第1步的条件,在纯 $T_{REG}$ 极化条件下(IL-2加TGF- $\beta$ ,无IL-

4), 尝试在第2步期间再分化足够数量的T细胞是不成功的, 即使是在培美曲塞存在的情况下(培养物#20和#21)也是如此。

[0341] 总而言之, 从数值的角度来看, 成功的T细胞再分化是在使用 $T_{REG}$ -Th2杂交极化条件(IL-2、TGF- $\beta$ 和IL-4)并使用浓度为10nM的药剂培美曲塞的情况下最优执行的。

[0342] 实例13: 去分化的T细胞在杂交 $T_{REG}$ /Th2条件下培养会产生分化状态有限的 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T细胞

[0343] 还评估了在不同的细胞因子极化条件/不同的培美曲塞条件下, 第1步去分化过程和随后的第2步再分化过程对T细胞记忆状态的影响。也就是说, 研究表明, 分化状态有限的T细胞在过继性细胞疗法方面有着改良的治疗效用; 因此, 有限的T细胞分化将是第1步/第2步T细胞制造方法的有利特征。

[0344] 图14A-14C展示了在杂交Th2/ $T_{REG}$ 极化条件下去分化的T细胞的培养导致原初和三阳性T中枢记忆 $CD4^+$ T细胞的产生。使人 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T细胞经受3天的去分化过程, 并且随后在培养基中对其进行培养, 所述培养基含有不同的极化培养条件以及不同的培美曲塞存在性, 如图13所描述的。在总共 $n=24$ 种培养条件中, 仅进一步评估了具有良好细胞产率的培养物; 所有示出的含有培美曲塞(“+”)的培养物的浓度均为10nM。除非指示(“TReg, 无IL-4”), 否则以上所有 $T_{REG}$ 条件均含有IL-2、TGF- $\beta$ 和IL-4(“TReg”)。在总共10天的培养之后, 收获培养物, 并通过流式细胞术评估培养物的: 原初 $CD4^+$ T细胞的含量(表示为共表达CD45RA的 $CD4^+$ T细胞总数的百分比; 图14A); 中枢记忆 $CD4^+$ T细胞的含量(表示为共表达CD62L和CCR7的 $CD4^+$ T细胞总数的百分比; 图14B); 以及三阳性中枢记忆 $CD4^+$ T细胞的含量(表示为共表达CD62L、CCR7和CD127的 $CD4^+$ T细胞总数的百分比; 图14C)。

[0345] 如图14A所示, 杂交 $T_{REG}$ -Th2条件下(含有或不含有浓度为10nM的培美曲塞)的第2步再分化产生了高频率的 $CD4^+CD45RA^+$ 原初T细胞亚群, 这在过继性T细胞疗法的实验鼠模型中是有利的。

[0346] 另外, 如图14C所示, 杂交 $T_{REG}$ -Th2条件下(含有或不含有浓度为10nM的培美曲塞)的第2步再分化产生了高频率的具有记忆标志物CD62L、CCR7和CD127的三阳性共表达的 $CD4^+$ T细胞。此三阳性记忆表型是具有非常原始的分化状态的T细胞的标志物。

[0347] 如图14C所示, 相对于纯 $T_{REG}$ 极化条件, 对CD62L、CCR7和CD127呈三阳性的 $CD4^+$ T细胞在杂交 $T_{REG}$ -Th2极化条件下的频率更高。

[0348] 而且, 如图14C所示, 使用更严格的第1步去分化条件(不仅包含替西罗莫司和维生素D, 而且还包含抗IL-2受体单克隆抗体)在使用杂交 $T_{REG}$ -Th2极化条件的情况下产生最高频率的对CD62L、CCR7和CD127呈三阳性的 $CD4^+$ 细胞。

[0349] 图15A-15B展示了在杂交Th2/TReg极化条件下去分化的T细胞的培养导致三阳性T中枢记忆 $CD8^+$ T细胞的产生。使人 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T细胞经受3天的去分化过程, 并且随后在培养基中对其进行培养, 所述培养基含有不同的极化培养条件以及不同的培美曲塞存在性, 如图13所描述的。在总共 $n=24$ 种培养条件中, 仅进一步评估了具有良好细胞产率的培养物; 所有示出的含有培美曲塞(“+”)的培养物的浓度均为10nM。除非指示(“TReg, 无IL-4”), 否则以上所有 $T_{REG}$ 条件均含有IL-2、TGF- $\beta$ 和IL-4(“TReg”)。在总共10天的培养之后, 收获培养物, 并通过流式细胞术评估培养物的: 中枢记忆 $CD8^+$ T细胞的含量(表示为共表达CD62L和CCR7的 $CD8^+$ T细胞总数的百分比; 图15A); 以及三阳性中枢记忆 $CD8^+$ T细胞的含量(表示为共

表达CD62L、CCR7和CD127的CD8<sup>+</sup>T细胞总数的百分比;图15B)。

[0350] 而且,如图15B所示,相对于纯T<sub>REG</sub>极化条件,对CD62L、CCR7和CD127呈三阳性的CD8细胞在杂交T<sub>REG</sub>-Th2极化条件下的频率更高。此外,如图15A-15B所示,使用更严格的第1步去分化条件(不仅包含替西罗莫司和维生素D,而且还包含抗IL-2受体单克隆抗体)在使用杂交T<sub>REG</sub>-Th2极化条件的情况下产生最高频率的对CD62L、CCR7和CD127呈三阳性的CD8<sup>+</sup>T细胞。

[0351] 总而言之,这些数据表明,使用杂交T<sub>REG</sub>-Th2细胞因子极化条件(IL-2、TGF- $\beta$ 和IL-4)以及在第1步去分化后使用培美曲塞(10nM)进行T细胞再分化会产生良好的有限分化状态的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞。

[0352] 实例14:去分化的T细胞在杂交T<sub>REG</sub>/Th2极化条件下培养会产生具有原始Th2细胞因子表型的T细胞

[0353] 还评估了在第1步去分化后在第2步培养条件下进行的T细胞再分化的细胞因子分泌模式。细胞因子分泌是T细胞效应子功能的指标,并且如此,通常期望T<sub>REG</sub>细胞具有降低的细胞因子分泌潜能,特别是对于关键炎性细胞因子,如IL-17、IFN- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ 。在所提出的杂交T<sub>REG</sub>-Th2细胞群的情况下,可以预料的是,此类细胞也将分泌一定分布的Th2细胞因子。

[0354] 图16A-16C展示了在杂交Th2/TReg极化条件下去分化的T细胞的培养导致产生具有原始Th2细胞细胞因子表型:如高水平的IL-2和IL-4分泌以及低水平的IL-5分泌所指示的。使人CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞经受3天的去分化过程,并且随后在培养基中对其进行培养,所述培养基含有不同的极化培养条件以及不同的培美曲塞存在性,如图13所描述的。在总共n=24种培养条件中,仅进一步评估了具有良好细胞产率的培养物;所有示出的含有培美曲塞(“+”)的培养物的浓度均为10nM。除非指示(“TReg,无IL-4”),否则以上所有T<sub>REG</sub>条件均含有IL-2、TGF- $\beta$ 和IL-4(“TReg”)。在共计10天的培养后,收获并洗涤T细胞,并用3/28珠(比率为3:1)对T细胞进行24小时的再刺激;收获所得上清液,并通过Luminex多分析物方法检测细胞因子含量。示出的所有结果均表示为细胞因子水平,单位为pg/ml/1 $\times$ 10<sup>6</sup>个细胞/ml/24小时。

[0355] 如图16A所示,在培养物中添加或未添加培美曲塞的情况下,在杂交T<sub>REG</sub>-Th2细胞因子极化条件(IL-2、TGF- $\beta$ 和IL-4)中再分化的T细胞具有最高的IL-2分泌值。此结果与先前的理解一致,即T细胞中的IL-2分泌以处于早期分化状态的T细胞为特性,T细胞于所述状态下在杂交培养条件下再分化。

[0356] 图17A-17C展示了在杂交Th2/T<sub>Reg</sub>极化条件下去分化的T细胞的培养导致产生具有原始Th2细胞细胞因子表型:如低水平的IL-10、IL-13和IL-17分泌所指示的。使人CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞经受3天的去分化过程,并且随后在培养基中对其进行培养,所述培养基含有不同的极化培养条件以及不同的培美曲塞存在性,如图13所描述的。在总共n=24种培养条件中,仅进一步评估了具有良好细胞产率的培养物;所有示出的含有培美曲塞(“+”)的培养物的浓度均为10nM。除非指示(“TReg,无IL-4”),否则以上所有T<sub>REG</sub>条件均含有IL-2、TGF- $\beta$ 和IL-4(“TReg”)。在共计10天的培养后,收获并洗涤T细胞,并用3/28珠(比率为3:1)对T细胞进行24小时的再刺激;收获所得上清液,并通过Luminex多分析物方法检测细胞因子含量。示出的所有结果均表示为细胞因子水平,单位为pg/ml/1 $\times$ 10<sup>6</sup>个细胞/ml/24小时。

[0357] 图18A-18C展示了在杂交Th2/T<sub>REG</sub>极化条件下去分化的T细胞的培养导致产生具有

原始Th2细胞细胞因子表型:如低水平的IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 和GM-CSF分泌所指示的。使人CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞经受3天的去分化过程,并且随后在培养基中对其进行培养,所述培养基含有不同的极化培养条件以及不同的培美曲塞存在性,如图13所描述的。在总共n=24种培养条件中,仅进一步评估了具有良好细胞产率的培养物;所有示出的含有培美曲塞(“+”)的培养物的浓度均为10nM。除非指示(“TReg,无IL-4”),否则以上所有T<sub>REG</sub>条件均含有IL-2、TGF- $\beta$ 和IL-4(“TReg”)。在共计10天的培养后,收获并洗涤T细胞,并用3/28珠(比率为3:1)对T细胞进行24小时的再刺激;收获所得上清液,并通过Luminex多分析物方法检测细胞因子含量。示出的所有结果均表示为细胞因子水平,单位为pg/ml/1 $\times$ 10<sup>6</sup>个细胞/ml/24小时。

[0358] 此外,如图16B所示,在培养物中添加或未添加培美曲塞的情况下,在杂交T<sub>REG</sub>-Th2条件(IL-2、TGF- $\beta$ 和IL-4)中再分化的T细胞具有最高的IL-4分泌值。因为IL-4是决定Th2极化的关键细胞因子,所以在杂交条件下制造的T细胞实际上是Th2极化的。另一方面,与其有限的分化状态相一致,在杂交条件下再分化的细胞并未分泌高水平的效应Th2细胞因子(IL-5,参见图16C;IL-10,参见图17A;IL-13,参见图17B)或效应Th1/Th17细胞因子(IFN- $\gamma$ ,参见图18A;TNF- $\alpha$ ,参见图18B;GM-CSF,参见图18C;IL-17,参见图17C)。

[0359] 重要的是,T细胞再分化过程中未包含IL-4会产生较高水平的炎性细胞因子IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 和GM-CSF(参见图18A-18C)。

[0360] 总而言之,这些数据表明,T细胞从第1步去分化细胞向T<sub>REG</sub>表型的再分化应以最佳的方式利用杂交T<sub>REG</sub>-Th2极化条件,因为源于这种条件的T细胞的与炎性疾病相关的细胞因子分泌能力大大降低。

[0361] 实例15:去分化的T细胞在杂交T<sub>REG</sub>/Th2条件下培养会产生具有增强的杂交T<sub>REG</sub>/Th2转录因子谱的T细胞

[0362] T细胞细胞因子表型由关键转录因子决定。转录因子与T细胞亚群的关联如下:FOXP3决定T<sub>REG</sub>细胞的发育;TBET决定Th1型细胞的发育;并且GATA3决定Th2型细胞的发育。

[0363] 为了在制造方法中评估这些转录因子,首先使T细胞经受第1步去分化过程,并且然后在杂交T<sub>REG</sub>-Th2培养条件(IL-2、TGF- $\beta$ 和IL-4)中再分化。另外,比较了培美曲塞与经典mTOR抑制剂的效果。在实验中,代替使用mTOR抑制剂(雷帕霉素;Sirolimus®)的口服调配物,使用了水溶性亲本形式的药物替西罗莫司(Toracel®)。

[0364] iT<sub>REG</sub>表型被认为是不稳定的;如此,在延迟的时间点(包含培养的第20天和第32天)评估了使用杂交T<sub>REG</sub>-Th2培养条件进行再分化的T细胞的稳定性。另外,为了严谨地测试表型稳定性,在培养的第24天与第32天之间,T细胞接受了高水平的共刺激(3:1的珠与T细胞比率)并在无细胞因子或药理剂的培养基中繁殖。

[0365] 图19A-19D展示了在含有培美曲塞的杂交Th2/T<sub>REG</sub>极化条件下去分化的T细胞的扩展培养导致表达FOXP3和GATA3转录因子的CD4<sup>+</sup>T细胞的产生。使人CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞经受3天的去分化过程,并且随后在含有杂交Th2/T<sub>REG</sub>极化条件(IL-2;TGF- $\beta$ ;IL-4)的培养基中共刺激(3:1的珠与T细胞比率)和繁殖,所述培养基不含或包含药物抑制剂替西罗莫司(1.0 $\mu$ M)或培美曲塞(10nM)。在培养的第14天和第24天,使用3/28珠再刺激培养物;在培养的第24天,为了评估转录因子表达的稳定性,培养基不含有外源细胞因子或药理抑制剂。在培养的第12天、第20天、第32天,收获T细胞,并针对以下转录因子FOXP3、Tbet和GATA3进行表面流式细胞术(CD4标志物)和细胞内染色。以上数据示出了CD4细胞占总培养群的百分比(图

19A) ;表达 $T_{REG}$ 转录因子FOXP3的CD4细胞的百分比(图19B) ;表达Th1转录因子Tbet的CD4细胞的百分比(图19C) ;以及表达Th2转录因子GATA3的CD4细胞的百分比(图19D)。

[0366] 如图19A-19D的细节所示,在培养过程中,随着时间的推移,在 $T_{REG}$ -Th2条件下再分化的T细胞具有向CD4细胞逐渐转变的优势(图19A)。如图19B所示,从培养的第12天到第32天,CD4细胞以稳定的方式高频率地表达了FOXP3,这与培养物中是否存在替西罗莫司或培美曲塞无关。

[0367] 如图19C,即使在药理学抑制剂不存在的情况下,被Th1转录因子TBET的污染频率也很低。然而,在也包含培美曲塞的杂交极化条件下观察到了最一致的降低的TBET值。最后,如图19D所示,在补充有培美曲塞的杂交 $T_{REG}$ -Th2条件下制造的T细胞中观察到培养结束时Th2相关的GATA3表达的最高值。

[0368] 图20A-20D展示了在含有培美曲塞的杂交Th2/ $T_{REG}$ 极化条件下去分化的T细胞的扩展培养导致表达FOXP3和GATA3转录因子的CD8<sup>+</sup>T细胞的产生。使人CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞经受3天的去分化过程,并且随后在含有杂交Th2/ $T_{REG}$ 极化条件(IL-2;TGF- $\beta$ ;IL-4)的培养基中共刺激(3:1的珠与T细胞比率)和繁殖,所述培养基不含或包含药物抑制剂替西罗莫司(1.0 $\mu$ M)或培美曲塞(10nM)。在培养的第14天和第24天,使用3/28珠再刺激培养物;在培养的第24天,为了评估转录因子表达的稳定性的稳定性,培养基不含有外源细胞因子或药理抑制剂。在培养的第12天、第20天、第32天,收获T细胞,并针对以下转录因子FOXP3、Tbet和GATA3进行表面流式细胞术(CD8标志物)和细胞内染色。以上数据示出了CD8细胞占总培养群的百分比(图20A) ;表达 $T_{REG}$ 转录因子FOXP3的CD8细胞的百分比(图20B) ;表达Th1转录因子Tbet的CD8细胞的百分比(图20C) ;以及表达Th2转录因子GATA3的CD8细胞的百分比(图20D)。

[0369] 如图20A所示,CD8细胞的含量在培养过程中随着时间的推移逐渐轻微减少。应当注意的是,尽管 $T_{REG}$ 细胞功能通常归因于CD4细胞亚群,但CD8<sup>+</sup> $T_{REG}$ 细胞也已被很好地描述;由于抗原特异性的多样性,使用同时含有CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞亚群的 $T_{REG}$ 群可能是有利的。如此,描述的方法具有潜在的优势,部分原因是其同时产生CD4型和CD8型 $T_{REG}$ 。

[0370] 如图20B所示(右上图),使用该方法制造的CD8<sup>+</sup>T细胞确实富集了FOXP3的表达,所述表达在培养中随着时间的推移很稳定且稳定性不依赖于药理抑制剂的存在。

[0371] 如图20C所示(左下图), $T_{REG}$ -Th2极化条件下的再分化通常会导致低水平的Th1转录因子TBET的CD8<sup>+</sup>T细胞表达;然而,在存在培美曲塞的情况下,观察到了最一致的最低水平。

[0372] 最后,如图20D所示(右下图),在 $T_{REG}$ -Th2条件下进行再分化确实会产生也向Th2型分化转移的CD8<sup>+</sup>T细胞,如GATA3转录因子的表达的增加所指示的。

[0373] 图40A-40B还描述了CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>亚群中再分化的TREG-Th2细胞的GATA3和FOXP3的流式细胞术分析。

[0374] 总而言之,这些转录因子分析表明,在杂交 $T_{REG}$ -Th2培养条件以及添加培美曲塞条件下进行的再分化是最佳的,因为它可以保留表达FOXP3和GATA3两者的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞,同时具有有限的TBET表达。

[0375] 实例16:去分化的T细胞在杂交 $T_{REG}$ /Th2条件下培养会产生具有增强的Th2细胞因子分泌谱的T细胞

[0376] 除了转录因子测量外,还评估了在杂交 $T_{REG}$ -Th2极化条件下再分化的T细胞的细胞

因子分泌能力。如图21A-21D所示,在 $T_{REG}$ -Th2极化条件下繁殖的所有再分化培养物均产生能够分泌IL-4的T细胞,从而证明了此方法即使在没有药理抑制剂的情况下也具有实现Th2极性的固有能

[0377] 图21A-21D展示了在杂交Th2/ $T_{REG}$ 极化条件下去分化的T细胞的扩展培养导致产生表达主要Th2细胞因子表型:IL-4、IL-5和IL-13分泌的T细胞。使人 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T细胞经受3天的去分化过程,并且随后在含有杂交Th2/ $T_{REG}$ 极化条件(IL-2;TGF- $\beta$ ;IL-4)的培养基中共刺激(3:1的珠与T细胞比率)和繁殖,所述培养基不含或包含药物抑制剂替西罗莫司(1.0 $\mu$ M)或培美曲塞(10nM)。在培养的第14天和第24天,使用3/28珠再刺激培养物;在培养的第24天,为了评估转录因子表达的稳定性,培养基不含有外源细胞因子或药理抑制剂。在培养的第12天、第20天、第32天,收获并洗涤T细胞,并用使用3/28(比率为3:1)对T细胞进行24小时的再刺激;收获所得上清液,并通过Luminex多分析物方法检测细胞因子含量。示出的所有结果均表示为细胞因子水平,单位为pg/ml/ $1 \times 10^6$ 个细胞/ml/24小时。还对Th2细胞因子IL-10进行评估:所有的值均小于20pg/ml/ $1 \times 10^6$ 个细胞/ml/24小时。

[0378] 值得注意的是,虽然替西罗莫司削弱了在 $T_{REG}$ -Th2条件下再分化的T细胞分泌效应Th2细胞因子IL-5(图21B)和IL-13(图21C)的能力,但培美曲塞的使用完全保留了T细胞分泌IL-5和IL-13的能力。如此,这些数据提供了进一步的证据,即,与使用常规 $T_{REG}$ 促进药剂(如mTOR抑制剂替西罗莫司)相比,培美曲塞的使用是有利的,因为培美曲塞与 $T_{REG}$ -Th2杂交亚群的制造是更兼容的。

[0379] 此外,在 $T_{REG}$ -Th2极化条件下再分化的所有T细胞均具有相对较低水平的IL-2(图22A)、IFN- $\gamma$ (图22B)、IL-17(所有值均小于20pg/ml)和TNF- $\alpha$ (所有值均小于20pg/ml)表达。

[0380] 图22A-22D展示了在杂交Th2/TREG极化条件下去分化的T细胞的扩展培养导致产生表达主要Th2细胞因子表型:IL-2、IFN- $\gamma$ 和GM-CSF分泌的T细胞。使人 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T细胞经受3天的去分化过程,并且随后在含有杂交Th2/ $T_{REG}$ 极化条件(IL-2;TGF- $\beta$ ;IL-4)的培养基中共刺激(3:1的珠与T细胞比率)和繁殖,所述培养基不含或包含药物抑制剂替西罗莫司(1.0 $\mu$ M)或培美曲塞(10nM)。在培养的第14天和第24天,使用3/28珠再刺激培养物;在培养的第24天,为了评估转录因子表达的稳定性,培养基不含有外源细胞因子或药理抑制剂。在培养的第12天、第20天、第32天,收获并洗涤T细胞,并用使用3/28(比率为3:1)对T细胞进行24小时的再刺激;收获所得上清液,并通过Luminex多分析物方法检测细胞因子含量。示出的所有结果均表示为细胞因子水平,单位为pg/ml/ $1 \times 10^6$ 个细胞/ml/24小时。还对炎性细胞因子IL-17和TNF- $\alpha$ 进行评估:所有的值均小于20pg/ml/ $1 \times 10^6$ 个细胞/ml/24小时。

[0381] 值得注意的是,在进一步补充有培美曲塞(10nM;图22C)的 $T_{REG}$ -Th2杂交培养条件下再分化的T细胞中观察到了更程度的GM-CSF分泌。从文献中的实验研究推断,尚不清楚在 $T_{REG}$ -Th2杂交群中增强GM-CSF的能力是否是必然有害或有益的。

[0382] 总而言之,这些数据表明, $T_{REG}$ -Th2极化条件下的T细胞再分化是有利的,因为其会产生分泌与炎症疾病相关的Th1型和Th17型细胞因子的能力较低的T细胞。杂交 $T_{REG}$ -Th2极化条件中包含培美曲塞是有利的,因为这会使Th2细胞因子产生的能力增加,这将进一步提供针对朝向Th1型和Th17型亚群的分化可塑性的限制。

[0383] 实例17:在通过单采血液成分术收集淋巴细胞之前使用精选的抗TNF- $\alpha$ 试剂以有

益地改变输入T细胞TCR谱系

[0384] 图23A和23B描绘了在用TNF- $\alpha$ 抑制剂依那西普治疗后,使用基于RNA的T细胞受体测序来检测T细胞TCR特异性的广泛上调和下调。在图23中,从使用依那西普疗法的在治疗前后的ALS患者的外周血单核细胞中分离出RNA。使RNA经受TCR谱系分析,如先前由Rosati E,Dowds CM,Liaskou E,Henriksen EKK,Karlsen TH,Franke A.“用于T细胞受体谱系分析的方法的概述(Overview of methodologies for T-cell receptor repertoire analysis)”.《BMC生物技术(BMC Biotechnol.)》2017;17(1):61中所描述的。在图23A中,证明了在治疗后样品中大约25%的TCR特异性被上调(如红色所指示的);与之形成鲜明对比的是,治疗后样品中大约25%的TCR特异性被下调(如蓝色所指示)。如右上图(B)所指示的,依那西普疗法产生明显的T细胞克隆扩增,因为几个T细胞克隆频率从使用依那西普前的0.01(接近测定的检测极限)增加到治疗后的值247至486,从而与超过4-log的T细胞扩增相符。如右下图23B所指示,依那西普疗法产生明显的T细胞克隆收缩,因为几个T细胞克隆频率从使用依那西普前的259至598降低到治疗后的值0.01,从而与超过4-log的T细胞克隆收缩相符。

[0385] 图23A-B表明,使用优先抑制血清、无细胞形式的TNF- $\alpha$ (促进表达TNFR1的Th1型细胞)的依那西普的抗TNF- $\alpha$ 疗法与T细胞受体上调和下调的广泛变化有关。这些观察结果表明,使用依那西普或任何其它优先抑制血清、无细胞形式的TNF- $\alpha$ 的抗TNF- $\alpha$ 治疗剂(如单克隆抗体阿达木单抗)对受试者进行预处理可以被用来在抗原特异性的基础上将T细胞受体谱系从Th1型表型的T细胞中转变,从而富集TREG表型的T细胞。

[0386] 实例18:作为富集CD25、CD27、2B4、BTLA和CTLA4表达的细胞产物的TREG-Th2杂交群的表征。

[0387] 图24展示了相对于对照Th1/Tc1培养物,制造的iTREG/Th2杂交群的CD25、CD27、2B4、BTLA和CTLA4表达增加。在图24中,iTREG/Th2杂交群是通过先前详述的方法、使用T细胞去分化的初始阶段以及随后在含有IL-2、TGF- $\beta$ 和IL-4的培养基中再分化来产生的。在iTREG/Th2制造的第11天,收获细胞并且进行流式细胞术以评估相关分子(即CD25、CD27、2B4、BTLA和CTLA4)的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞表达;对评估Th1/Tc1极化的三个独立对照条件进行比较。

[0388] 图24表明,通过流式细胞术分析,根据所描述的条件制造的杂交TREG-Th2细胞相对于对照Th1/Tc1细胞具有以下细胞表面分子的增加的表达:CD25、CD27、2B4、BTLA和CTLA4。

[0389] 如图24所示,相对于对照Th1/Tc1细胞,iTREG/Th2杂交细胞产物具有表达高至少10%并且更优选地高50%的水平CD25、CD27、2B4、BTLA和CTLA4的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞。

[0390] CD25,即IL-2受体,对于TREG细胞控制自身免疫(特别是CD8<sup>+</sup>T细胞驱动的应答)的能力至关重要。因此,在iTREG/Th2制造的细胞产物上表达CD25是期望的特性。

[0391] CD27(一种在TREG细胞上的表达增加的共刺激分子)已显示出有助于TREG的抑制功能。因此,在iTREG/Th2制造的细胞产物上表达CD27是期望的特性。

[0392] 2B4(CD244)最近被证明通过减弱糖酵解和细胞分裂来抑制CD8<sup>+</sup>T细胞反应。因此,在iTREG/Th2制造的细胞产物上表达2B4是期望的特性。

[0393] BTLA(CD272)是一种共抑制受体,并且BTLA与疱疹病毒进入介体HVEM的连接可促

进TREG细胞的诱导和抑制效应免疫反应。因此,在iTREG/Th2制造的细胞产物上表达BTLA是期望的特性。

[0394] CTLA4是TREG细胞的关键效应分子,因为最近证明它有限制对疟疾感染免疫的能力。因此,在iTREG/Th2制造的细胞产物上表达CTLA4是期望的特性。

[0395] 实例19:作为富集TIGIT、TIM3、ICOS、LAIR1和OX40表达的细胞产物的TREG-Th2杂交群的表征。

[0396] 图25展示了相对于对照Th1/Tc1培养物,制造的iTREG/Th2杂交群的TIGIT、TIM3、ICOS、LAIR1和OX40表达增加。在图25中,iTREG/Th2杂交群是通过先前详述的方法、使用T细胞去分化的初始阶段以及随后在含有IL-2、TGF- $\beta$ 和IL-4的培养基中再分化来产生的。在iTREG/Th2制造的第11天,收获细胞并且进行流式细胞术以评估相关分子(即TIGIT、TIM3、ICOS、LAIR1和OX40)的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞表达;对评估Th1/Tc1极化的三个独立对照条件进行比较。图25表明,通过流式细胞术分析,根据所描述的条件制造的杂交TREG-Th2细胞相对于对照Th1/Tc1细胞具有以下细胞表面分子的增加的表达:TIGIT、TIM3、ICOS、LAIR1和OX40。

[0397] 如图25所示,相对于对照Th1/Tc1细胞,iTREG/Th2杂交细胞产物具有表达高至少10%并且更优选地高50%的水平水平的TIGIT、TIM3、ICOS、LAIR1和OX40的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞。

[0398] TIGIT是与调节性T细胞功能相关的细胞表面共抑制受体分子。因此,在iTREG/Th2制造的细胞产物上表达TIGIT是期望的特性。

[0399] TIM3是介导TREG细胞的抑制作用的共抑制受体。因此,在iTREG/Th2制造的细胞产物上表达TIM3是期望的特性。

[0400] ICOS是一种共刺激分子,其最近被确定有助于通过调节性T细胞来维持免疫抑制,以控制中枢神经系统的免疫反应。因此,在iTREG/Th2制造的细胞产物上表达ICOS是期望的特性。

[0401] LAIR1 (CD305)是一种多方面的抑制性分子,其可以在多个步骤阻断炎症,包含抑制激活的效应记忆T细胞。因此,在iTREG/Th2制造的细胞产物上表达LAIR1是期望的特性。

[0402] OX40是一种共刺激分子。因此,在iTREG/Th2制造的细胞产物上表达OX40是期望的特性。

[0403] 实例20:TREG/Th2杂交群的GATA3和FOXP3表达的表征

[0404] 获得稳态单采血液成分术样品并通过Ficoll梯度富集淋巴细胞,并且然后将其铺板在G-Rex培养皿中,并在含有维生素D(0.3nM)、替西罗莫司(3.0 $\mu$ M)和巴利昔单抗(30 $\mu$ g/mL)的培养基中进行温育。在初始的去分化间隔后,以3:1的珠与T细胞比率使用抗CD3/抗CD28涂覆的磁珠对T细胞进行共刺激,并添加细胞因子(IL-4(1000IU/mL)、IL-2(10,000IU/mL)和TGF- $\beta$ (100ng/mL))。在6天的培养后,收获T细胞,对其表面标志物(CD4和CD8)和细胞内分子表达(GATA3和FOXP3)进行染色,并通过流式细胞术对其进行评估。图26A-B中的结果示出了如通过流式细胞术测量的,培养开始时和培养后(Th2/TREG)的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞的FOXP3和GATA3表达。所提供的百分比指示被认为对CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>和细胞内标志物(示出在方框中)呈阳性的细胞的数量。

[0405] 图26A-B所示的结果示出了指示制造的Th2/TREG细胞产物表型的结果。II型细胞因子表型的T细胞可以部分地通过其转录因子GATA3的表达来表征,而调节性T细胞群可以

部分地通过其FoxP3转录因子的表达来鉴定。在培养开始时,极低频率的T细胞表达GATA3或FoxP3。与之形成鲜明对比的是,在Th2/TREG培养条件下制造的T细胞产物表达高频率的T细胞,其对GATA3呈单阳性,对FOXP3呈单阳性,或对GATA3和FOXP3两者呈双阳性(未示出);重要的是,如所示出的,此转录因子谱在制造的CD4<sup>+</sup>(上图)和CD8<sup>+</sup>(下图)T细胞中表达。不包含IL-4的对照制造培养物使GATA3阳性T细胞的频率大大降低,这表明了IL-4在Th2/TREG杂交群制造中的重要作用(未示出)。

[0406] 可以在培养结束时,确定根据本公开详述的TREG/Th2方法制造的T细胞产物的大多数表型表征。然而,重要的是要注意,T细胞产物可以冷冻保存,并且如此,在解冻后状态下T细胞的表型特征反映了将被过继转移到受试者的实际产物。相对于对照Th1/Tc1细胞,解冻后状态下的TREG/Th2细胞可以通过以下来表征:(a)通过流式细胞术,CD25、CD27、2B4、BTLA、CTLA4、TIGIT、TIM3、ICOS、LAIR1和OX40的表达增加;(b)通过Luminex细胞因子分泌分析,IFN- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ 减少,但IL-4的分泌增加;以及(c)T细胞命运转录因子的表达改变,即,TBET降低且FOXP3和GATA3增加。

[0407] 实例21:TREG/Th2杂交群的CD73和CD103表达的表征

[0408] 获得稳态单采血液成分术样品并通过Ficoll梯度富集淋巴细胞,并且然后将其铺板在G-Rex培养皿中,并在含有维生素D(0.3nM)、替西罗莫司(3.0 $\mu$ M)和巴利昔单抗(30 $\mu$ g/mL)的培养基中进行温育。在初始的去分化间隔后,以3:1的珠与T细胞比率使用抗CD3/抗CD28涂覆的磁珠对T细胞进行共刺激,并添加细胞因子(IL-4(1000IU/mL)、IL-2(10,000IU/mL)和TGF- $\beta$ (100ng/mL))。在6天的培养后,收获T细胞,对其表面标志物(CD4和CD8)和外核苷酸酶分子(CD73)或整合素分子(CD103)进行染色,并通过流式细胞术对其进行评估。图27A-B中的结果示出了如通过流式细胞术测量的,培养开始时和培养后(Th2/TREG)的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞的CD73和CD103表达。所提供的百分比指示被认为分别对CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>以及外核苷酸酶分子或整合素分子(示出在方框中)呈阳性的细胞的数量。

[0409] 调节性T细胞群可以通过几种确定的机制抑制致病性效应T细胞群,包含通过CD39和CD73外核苷酸酶分子的表达,其用于是将促炎性ATP水解为免疫抑制性腺苷底物。实际上,表达CD39的TREG细胞具有增强的抑制功能,并且与炎症肠病的消退有关。此外,人TREG细胞的抑制功能部分地由CD73介导。如下图27A所示,在Th2/TREG培养条件下制造的T细胞的TREG相关效应分子CD73的表达可以增加;CD39还在TREG/Th2制造的T细胞上被高度表达(未示出)。除了CD39/CD73外核苷酸酶之外,TREG细胞功能也与CD103(其是决定上皮淋巴细胞定位的整合素)的表达相关。实际上,CD103和IL-2受体信号传导可以协同维持肠道粘膜的免疫耐受能力;此外,表达CD103的TREG细胞对于改善实验性慢性GVHD至关重要。如下图27B所示,在Th2/TREG培养条件下制造的T细胞的TREG相关效应分子CD103的表达可以增加。

[0410] 实例22:TREG/Th2杂交群的CD150和CD27/CD95表达的表征

[0411] 通过Ficoll梯度对稳态单采血液成分术样品富集淋巴细胞,将其铺板在G-Rex培养皿中,并在含有维生素D(0.3nM)、替西罗莫司(3.0 $\mu$ M)和巴利昔单抗(30 $\mu$ g/mL)的培养基中进行温育。在此初始去分化间隔之后,以3:1的珠:T细胞比率使用抗CD3/抗CD28涂覆的磁珠共刺激T细胞,并且添加细胞因子(IL-4(1000IU/mL)、IL-2(10,000IU/mL)和TGF- $\beta$ (100ng/mL))。在6天的培养之后,收获T细胞,对表面标志物进行染色,并且进行针对CD4、CD8、CD150、CD27、CD95、CD45RA、CD62L和CCR7的多色流式细胞术分析。结果在图28A-B中示

出。

[0412] 将在TREG (RAPA-501) 条件下培养的T细胞与培养物输入T细胞(“第0天”)比较并且还与在不含mTOR抑制剂的情况下繁殖的对照培养物T细胞(“对照”)进行比较。如图28A所示,RAPA-501细胞产物所含有的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞亚群相对于培养物输入T细胞以及对照培养物T细胞具有极大增加的干细胞标志物CD150表达。如图28B所示,相对于培养物输入细胞,RAPA-501细胞产物也富集了T干细胞记忆(TSCM)表型;对照培养物中缺乏此群,因为在这种条件下产生的T细胞是效应记忆CD45RO<sup>+</sup>(未示出)。左图(培养物输入T细胞)和右图(RAPA-501细胞)示出了在选通TSCM标志物CD45RA、CD62L和CCR7后,TSCM标志物CD95和CD27的表达;对于CD8<sup>+</sup>T细胞,未观察到这些TSCM标志物表达的相似差异(未示出)。

[0413] 在实验模型中,过继性T细胞疗法的功效取决于T细胞群的成功植入和体内存留能力。重要的是,T细胞的分化状态有助于指示体内存留能力,其中分化程度较低的细胞具有更强的存留能力。在初始研究中,相对于对照T细胞,表达T中枢记忆(TCM)表型的鼠雷帕霉素抗性T细胞具有增强的体内植入潜能;另外,人雷帕霉素抗性T细胞在异种移植物抗宿主疾病的人到鼠模型中的植入也增加。其他研究人员已经确定,相对于T效应记忆(TEM)群,分化程度降低的T细胞具有更强的体内存留能力,并介导了增加的体内效应,包含TCM亚群、原初T细胞亚群,以及最近的T干细胞记忆(TSCM)亚群。T细胞分化状态与体内T细胞功能之间的这种关系相对于TREG细胞是可操作的,如:(1)与TEM表型的TREG细胞相比,TCM表型的TREG细胞在降低实验GVHD方面更有效;(2)表达干细胞标志物CD150的TREG细胞在预防干细胞移植排斥方面非常有效。如下图28A所示,在Th2/TREG培养条件下制造的T细胞富集分化状态降低的细胞,所述状态与T干细胞亚群一致,包含CD150标志物的表达。

[0414] 实例23:TREG/Th2杂交群的细胞因子分泌的表征

[0415] 通过Ficoll1梯度对稳态单采血液成分术样品富集淋巴细胞,将其铺板在G-Rex培养皿中,并在含有维生素D(0.3nM)、替西罗莫司(3.0 $\mu$ M)和巴利昔单抗(30 $\mu$ g/mL)的培养基中进行温育。在初始去分化间隔之后,以3:1的珠:T细胞比率使用抗CD3/抗CD28涂覆的磁珠共刺激T细胞,并且添加细胞因子(IL-4(1000IU/mL)、IL-2(10,000IU/mL)和TGF- $\beta$ (100ng/mL))。这种培养被称为条件“A”。条件“B”是相同的培养条件,但是未添加IL-4。条件“C”反映了雷帕霉素(1 $\mu$ M)、IL-2(100IU/mL)和TGF- $\beta$ (10ng/mL)的标准TREG培养条件。条件“D”反映了在无mTOR抑制剂时在存在IFN- $\alpha$ 的情况下制造的Th1型对照培养物。培养结束后,收获T细胞,用抗CD3/抗CD28珠对其进行刺激,并通过Luminex测定来测试所得的上清液的细胞因子含量。

[0416] 评估制造的Th2/TREG细胞的细胞因子分泌可能很重要。首先,至关重要的是,细胞产物可以分泌作为随后Th2分化的驱动细胞因子的IL-4。其次,期望过继转移的T细胞群能够分泌IL-2,因为这种能力表明了祖细胞功能,所述功能允许T细胞在无需外源IL-2的情况下在体内更容易地扩增。最后,重要的是,Th2/TREG细胞群的Th1型或Th17型细胞因子IFN- $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-17和GM-CSF的分泌减少。如图29所示,制造的Th2/TREG细胞产物分泌IL-4和IL-2,其中Th1型或Th17型细胞因子分泌最少。

[0417] 实例24:TREG/Th2杂交群对Th1/Tc1抑制的表征

[0418] 通过Ficoll1梯度对稳态单采血液成分术样品富集淋巴细胞,将其铺板在G-Rex培养皿中,并在含有维生素D(0.3nM)、替西罗莫司(3.0 $\mu$ M)和巴利昔单抗(30 $\mu$ g/mL)的培养基

中进行温育。在初始去分化间隔之后,以3:1的珠:T细胞比率使用抗CD3/抗CD28涂覆的磁珠共刺激T细胞,并且添加细胞因子(IL-4(1000IU/mL)、IL-2(10,000IU/mL)和TGF- $\beta$ (100ng/mL))以体外制造Th2/TREG细胞。同时,在I型极化细胞因子IFN- $\alpha$ 存在的情况下培养T细胞,以产生效应Th1/Tc1细胞;Th1/Tc1培养物是从与RAPA-501细胞培养物相同的供体(自体;“AUTO”)或无关的供体(异基因;“ALLO”)中产生的。在离体培养后,将Th1/Tc1效应T细胞铺板在跨孔板的底部腔室中,并以3:1的珠与T细胞比率使用抗CD3/抗CD28涂覆的珠对其进行共刺激。在Th1/Tc1细胞共刺激24小时后,将RAPA-501细胞以1:1的Th1/Tc1与RAPA-501比率添加到跨孔板的顶部腔室中。(A)细胞因子含量的RAPA-501调节。在培养的第24小时(在将RAPA-501细胞添加到上腔室之前)以及第48小时(在添加或不添加RAPA-501细胞的情况下),收获培养上清液并通过Luminex测定来检测细胞因子含量。IL-2、IFN- $\gamma$ 、GM-CSF和TNF- $\alpha$ 含量的结果以pg/ml/24小时/ $1 \times 10^6$ 个细胞/ml表示。(B)PD1的Th1/Tc1细胞表达的RAPA-501细胞调节以抗原非依赖性的方式发生。在24小时的时间点添加或未添加RAPA-501细胞后,在第48小时收获自体或异基因Th1/Tc1细胞。然后使Th1/Tc1细胞进行流式细胞术以评估PD1表达。

[0419] 在RAPA-501细胞产物的发育期间,进行了实验以表征观察到的T细胞抑制的分子机制。一种用于评估潜在机制的方法是跨孔测定,其中效应T细胞和RAPA-501细胞通过过滤器分离,所述过滤器防止细胞间接触,但允许如细胞因子等可溶小介体进行细胞通讯。图30A-B展示了RAPA-501细胞以接触非依赖性的方式调节效应T细胞(在跨孔器皿中进行的实验)。RAPA-501细胞以独立于T细胞受体的方式发挥作用,以抑制效应T细胞的细胞因子分泌能力;也就是说,因为没有将共刺激珠添加到含有RAPA-501细胞的跨孔腔室中,所以RAPA-501细胞不需要共刺激来调节炎症性细胞因子水平,所述炎症性细胞因子包含IL-2、IFN- $\gamma$ 、GM-CSF和TNF- $\alpha$ (图30A)。TREG细胞能够消耗IL-2是普遍描述的现象,尽管先前的研究确定了IL-2消耗需要细胞间接触。如此,RAPA-501细胞似乎在某种程度上具有独特的能力,其能够以接触非依赖性的方式调节多种炎症性细胞因子的水平。这些结果表明,RAPA-501细胞是中和细胞因子的合适候选细胞。其次,发现RAPA-501细胞以接触非依赖性的方式(使用跨孔实验)调节效应T细胞生物学的另外的方面,即,促进程序性死亡1(PD-1)检查点分子在效应T细胞上的表达。重要的是,如图30B所示,RAPA-501细胞上调自体 and 异基因Th1/Tc1细胞上的PD1表达,从而进一步阐明RAPA-501细胞抑制功能的一种机制是通过可溶性介体以TCR非依赖性的方式发生的。

[0420] 实例25:TREG/Th2杂交群对CNS小胶质细胞细胞因子分泌抑制的表征

[0421] 首先用IFN- $\gamma$ (10ng/ml;24小时)激活人小胶质细胞(HMC3细胞系),并且然后用LPS(10ng/ml;3小时)对其进行激活;在如前面所述制备的RAPA-501细胞不被添加至上腔室(左图)或被添加至上腔室(右图)的情况下(1:40的RAPA-501与HMC3比率),然后将经处理的HMC3细胞铺板到跨孔的下腔室中。使用专利申请中描述的方法产生RAPA-501细胞,以产生杂交的Th2/TREG表型的T细胞。24小时后,收获无细胞的上清液,并通过Luminex测定来评估IL-6、IFN- $\gamma$ 和IP-10的含量(以pg/ml/ $1 \times 10^6$ 个细胞/ml/24小时为单位来测量细胞因子分泌)。结果在图31中示出。

[0422] 小胶质细胞是CNS常驻性抗原呈递细胞,其可以在ALS中发展为促炎症因子。据知,以前尚未报道过制造的人Th2/TREG细胞抑制人小胶质细胞炎症的能力。为了解决这个问

题,通过在IFN- $\gamma$ 和LPS内毒素中进行依次培养来诱导人小胶质细胞系HMC3进入促炎性状态。如图31A-31B所示,向促炎性小胶质细胞中添加RAPA-501Th2/TREG细胞产物可减少促炎性细胞因子IL-6、IP-10和IFN- $\gamma$ 的培养上清液含量。在此实验中,所观察到的免疫抑制作用以非常低的1:40的TREG与炎性小胶质细胞比率在跨孔器皿中发生,从而表明RAPA-501细胞可以以接触非依赖性的方式(如跨孔设计所指示)并且以高效能(如1:40的TREG与小胶质细胞比率所指示)减轻CNS炎症。

[0423] 实例26:使用喷司他丁、环磷酰胺和拉米夫定宿主调理平台的ALS  $iT_{REG}$ 细胞疗法。

[0424] 图32详述了PC方案和整体的治疗方法。将在2周的周期内施用PC方案,同时在周期1到4内逐步增加喷司他丁或环磷酰胺的剂量,如所指示的(PC方案总持续时间为8周)。在14天的周期的第1天或第1天和第4天施用喷司他丁;在14天的周期的第1天、第2天和第3天或第1天、第2天、第3天、第4天和第5天施用环磷酰胺(Cy)。对于周期4,如果ALC<每微升1250个细胞,则Cy剂量将增加至每天200mg。通过施用PC方案实现免疫耗竭和免疫抑制后,首次 $iT_{REG}$ 细胞输注将在疗法的第8周进行。从方案的第8周到第26周,将以150mg BID的剂量连续施用炎性体抑制剂拉米夫定。

[0425] 图33提供了有关 $iT_{REG}$ 细胞制造的另外的细节,其描绘了PC治疗前后的通过单采血液成分术进行的淋巴细胞收集。来自ALS患者的淋巴细胞将通过稳态单采血液成分术(收集10到15升)进行收集,所述稳态单采血液成分术将刚好在PC方案之前或之后进行。PC方案之前的收集对于 $iT_{REG}$ 的制造可能更有利,因为会发现T细胞的数量将增加,并且不会受到免疫抑制;相比之下,PC方案后的收集可能是有利的,因为会污染 $iT_{REG}$ 培养物的炎性Th1/Tc1细胞在制造前会在体内被耗竭。在制造 $iT_{REG}$ 之后,将以治疗剂量将产物冷冻保存,以允许 $iT_{REG}$ 细胞的重复给药,如输注#2、#3和#4所指示的。

[0426] 图34进一步详述了 $iT_{REG}$ 细胞多次输注的策略,其描绘了 $iT_{REG}$ 细胞的重复给药中的每次给药之前的PC方案的测序。将在每次 $iT_{REG}$ 输注前施用PC方案,以(1)耗竭并抑制促发疾病发病机制的炎性Th1/Tc1细胞;并且(2)提升体内稳态细胞因子(如IL-7和IL-15)的水平,这将允许过继转移的 $iT_{REG}$ 群在体内扩增。所述PC方案将由在第1天和第4天 $2\text{mg}/\text{m}^2$ 剂量的喷司他丁以及在第1至5天每天100mg固定剂量的环磷酰胺组成。在暂停两天后,将施用 $iT_{REG}$ 细胞(方案的第8天)。从第8周起,将连续施用炎性体抑制剂拉米夫定,以限制 $iT_{REG}$ 细胞疗法期间的炎性驱动。

[0427] 图35提供了关于用 $iT_{REG}$ 细胞治疗的患者的监测的更多细节,其展示了将大致每月同时通过患者报告的ALSFRS-R和临床医生报告的Appel评分进行ALS监测,如所指示的。如所指出的,将大约每月评估用于监测ALS患者炎性状态的免疫实验室。

[0428] 实例27:在通过单采血液成分术收集淋巴细胞之前使用精选的抗TNF- $\alpha$ 试剂以有益地改变输入T细胞TCR谱系

[0429] 图36A-36B表明,使用优先抑制血清、无细胞形式的TNF- $\alpha$ (促进表达TNFR1的Th1型细胞)的依那西普的抗TNF- $\alpha$ 疗法与T细胞受体上调和下调的广泛变化有关。图36A-36B描绘了在用TNF- $\alpha$ 抑制剂依那西普治疗后,使用基于RNA的T细胞受体测序来检测T细胞TCR特异性的广泛上调和下调。在图36A-36B中,从使用依那西普疗法的在治疗前后的ALS患者的外周血单核细胞中分离出RNA。使RNA经受TCR谱系分析,如先前由Rosati E, Dowds CM, Liaskou E, Henriksen EKK, Karlsen TH, Franke A. “用于T细胞受体谱系分析的方法的概

述(Overview of methodologies for T-cell receptor repertoire analysis)”。《BMC生物技术(BMC Biotechnol.)》2017;17(1):61中所描述的。如图36A所示,证明了在治疗后样品中大约25%的TCR特异性被上调(如红色所指示的);与之形成鲜明对比的是,治疗后样品中大约25%的TCR特异性被下调(如蓝色所指示)。如图36B所示,依那西普疗法产生明显的T细胞克隆扩增,因为几个T细胞克隆频率从使用依那西普前的0.01(接近测定的检测极限)增加到治疗后的值247至486,从而与超过4-1log的T细胞扩增相符。如图36B所示,依那西普疗法产生明显的T细胞克隆收缩,因为几个T细胞克隆频率从使用依那西普前的259至598降低到治疗后的值0.01,从而与超过4-1log的T细胞克隆收缩相符。这些观察结果表明,使用依那西普或任何其它优先抑制血清、无细胞形式的TNF- $\alpha$ 的抗TNF- $\alpha$ 治疗剂(如单克隆抗体阿达木单抗)对受试者进行预处理可以被用来在抗原特异性的基础上将T细胞受体谱系从Th1型表型的T细胞中转变,从而富集T<sub>REG</sub>表型的T细胞。

[0430] 实例28:作为富集CD25、CD27、2B4、BTLA和CTLA4表达的细胞产物的T<sub>REG</sub>-Th2杂交群的表征。

[0431] 图37表明,通过流式细胞术分析,根据所描述的条件制造的杂交T<sub>REG</sub>-Th2细胞相对于对照Th1/Tc1细胞具有以下细胞表面分子的增加的表达:CD25、CD27、2B4、BTLA和CTLA4。在图37中,iT<sub>REG</sub>/Th2杂交群是通过先前详述的方法、使用T细胞去分化的初始阶段以及随后在含有IL-2、TGF- $\beta$ 和IL-4的杂交T<sub>REG</sub>/Th2培养基中再分化产生的;收获细胞并且进行流式细胞术以评估相关分子(即CD25、CD27、2B4、BTLA和CTLA4)的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞表达;对评估Th1/Tc1极化的三个独立对照条件进行比较。

[0432] 如图37所示,相对于对照Th1/Tc1细胞,iT<sub>REG</sub>/Th2杂交细胞产物具有表达高至少10%并且更优选地高50%的水平水平的CD25、CD27、2B4、BTLA和CTLA4的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞。

[0433] CD25,即IL-2受体,对于T<sub>REG</sub>细胞控制自身免疫(特别是CD8<sup>+</sup>T细胞驱动的应答)的能力至关重要。因此,在iT<sub>REG</sub>/Th2制造的细胞产物上表达CD25是期望的特性。

[0434] CD27(一种在T<sub>REG</sub>细胞上的表达增加的共刺激分子)已显示出有助于T<sub>REG</sub>的抑制功能。因此,在iT<sub>REG</sub>/Th2制造的细胞产物上表达CD27是期望的特性。

[0435] 2B4(CD244)最近被证明通过减弱糖酵解和细胞分裂来抑制CD8<sup>+</sup>T细胞反应。因此,在iT<sub>REG</sub>/Th2制造的细胞产物上表达2B4是期望的特性。

[0436] BTLA(CD272)是一种共抑制受体,并且BTLA与疱疹病毒进入介体HVEM的连接可促进T<sub>REG</sub>细胞的诱导和抑制效应免疫反应。因此,在iT<sub>REG</sub>/Th2制造的细胞产物上表达BTLA是期望的特性。

[0437] CTLA4是T<sub>REG</sub>细胞的关键效应分子,因为最近证明它有限制对疟疾感染免疫的能力。因此,在iT<sub>REG</sub>/Th2制造的细胞产物上表达CTLA4是期望的特性。

[0438] 实例29:作为富集TIGIT、TIM3、ICOS、LAIR1和OX40表达的细胞产物的T<sub>REG</sub>-Th2杂交群的表征。

[0439] 图38表明,通过流式细胞术分析,根据所描述的条件制造的杂交TREG-Th2细胞相对于对照Th1/Tc1细胞具有以下细胞表面分子的增加的表达:TIGIT、TIM3、ICOS、LAIR1和OX40。在图38中,iT<sub>REG</sub>/Th2杂交群是通过先前详述的方法、使用T细胞去分化的初始阶段以及随后在含有IL-2、TGF- $\beta$ 和IL-4的培养基中再分化来产生的。在iT<sub>REG</sub>/Th2制造的第11天,收获细胞并且进行流式细胞术以评估相关分子(即TIGIT、TIM3、ICOS、LAIR1和OX40)的CD4<sup>+</sup>

和CD8<sup>+</sup>T细胞表达;对评估Th1/Tc1极化的三个独立对照条件进行比较。

[0440] 如图38所示,相对于对照Th1/Tc1细胞,iT<sub>REG</sub>/Th2杂交细胞产物具有表达高至少10%并且更优选地高50%的水平s的TIGIT、TIM3、ICOS、LAIR1和OX40的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞。

[0441] TIGIT是一种细胞表面共抑制受体分子,其与调节性T细胞功能相关,包含在B细胞非霍奇金淋巴瘤中促成免疫抑制环境。因此,在iT<sub>REG</sub>/Th2制造的细胞产物上表达TIGIT是期望的特性。

[0442] TIM3是一种共抑制性受体,其介导T<sub>REG</sub>细胞的抑制作用,包含例如抑制浸润头颈部鳞状细胞癌的T细胞。因此,在iT<sub>REG</sub>/Th2制造的细胞产物上表达TIM3是期望的特性。

[0443] ICOS是一种共刺激分子,其最近被确定有助于通过调节性T细胞来维持免疫抑制,以控制中枢神经系统的免疫反应。因此,在iT<sub>REG</sub>/Th2制造的细胞产物上表达ICOS是期望的特性。

[0444] LAIR1 (CD305) 是一种多方面的抑制性分子,其可以在多个步骤阻断炎症,包含抑制激活的效应记忆T细胞。因此,在iT<sub>REG</sub>/Th2制造的细胞产物上表达LAIR1是期望的特性。

[0445] OX40是一种共刺激分子。因此,在iT<sub>REG</sub>/Th2制造的细胞产物上表达OX40是期望的特性。

[0446] 可以在培养结束时,确定根据本公开详述的T<sub>REG</sub>/Th2方法制造的T细胞产物的大多数表型表征。然而,重要的是要注意,T细胞产物可以冷冻保存,并且如此,在解冻后状态下T细胞的表型特征反映了将被过继转移到受试者的实际产物。相对于对照Th1/Tc1细胞,解冻后状态下的T<sub>REG</sub>/Th2细胞可以通过以下来表征:(a) 通过流式细胞术,CD25、CD27、2B4、BTLA、CTLA4、TIGIT、TIM3、ICOS、LAIR1和OX40的表达增加;(b) 通过Luminex细胞因子分泌分析,IFN- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ 减少,但IL-4的分泌增加;以及(c) T细胞命运转录因子的表达改变,即,TBET降低且FOXP3和GATA3增加。

[0447] 用于产生iT<sub>REG</sub>的单采血液成分术

[0448] 在使用喷司他丁/环磷酰胺方案治疗之前,受试者将经历淋巴细胞单采血液成分术过程。收集此外周淋巴细胞的目的是制造用于过继性T细胞疗法的iT<sub>REG</sub>细胞。

[0449] 单采血液成分术将由在CS-3000或等效机器上进行的10到15升的收集组成。单采血液成分术产物将发送给方案赞助商Rapa治疗公司(Rapa Therapeutics),并且iT<sub>REG</sub>细胞将通过使用特定培养条件的体外培养来制造。

[0450] 研究目的

[0451] 主要目的。确定在PC方案的背景下的iT<sub>REG</sub>细胞输注以及在ALS患者的炎性亚群中维持拉米夫定疗法的安全性。

[0452] 次要目的。确定iT<sub>REG</sub>疗法抑制ALS患者的炎性标志物的能力。初步确定iT<sub>REG</sub>疗法对患者报告和临床医生报告的ALS评分的影响。

[0453] 合格标准。

[0454] 根据世界神经病学联合会E1埃斯科里亚尔标准(World Federation of Neurology El Escorial Criteria)被诊断为实验室支持的疑似、可能或确定的散发性或家族性ALS的受试者。年龄>18岁且小于或等于75岁。Karnofsky机能状态为70%或更高。通过MUGA或2-D超声心动图获得的射血分数在组织正常极限内。血清肌酐小于或等于2.0mg/dl。AST和ALT小于或等于正常上限的3倍。胆红素小于或等于1.5(除非是由于吉尔伯特氏病

(Gilbert's disease)。在肺功能测试中校正的DLCO大于或等于50%。

[0455] 为了评估次要研究终点,在筛选间隔期间评估至少两个独立的血液样品后,患者必须具有外周血细胞群中炎性标志物的证据。用于评估潜在患者的炎症状态的测定将包含:流式细胞术;细胞因子分泌分析;以及通过蛋白质印迹分析的细胞信号传导事件。其它测试可以包含T细胞受体谱系的测试或对潜在自身抗原(如运动神经元蛋白或ALS相关蛋白质聚集体)的体外敏化测试。在不具有刺激(自主细胞因子分泌)和各种方式的刺激的情况下评估细胞因子分泌的,所述各种方式的刺激包含但不限于:抗CD3/抗CD28共刺激;LPS内毒素暴露;CD40配位体暴露;腺苷A2a和A3受体激动和拮抗作用;T细胞(PD1, TIM-3)和单核细胞(CD47, CD200)检查点抑制;通过RNA测序技术评估T细胞受体克隆性。决定认为潜在受试者是否具有足够的炎症来确保可以纳入研究,将基于所有这些测试的矩阵分析,同时,这些决定将由研究的PI或首席副研究员在与Rapa治疗实验室医学主任协商的情况下作出,该实验室会执行免疫测定。

[0456] 排除标准包含患者积极服用利鲁唑(Rilutek®)或依达拉奉(Radicava®)治疗剂(除非服用稳定剂量超过一个月)。以下内容还将代表排除标准:方案后30天内接受任何调查性干预措施;肺活量测量值<预期值的60%;活动性未受控制的感染;高血压不能通过3种或更少的药物得到充分控制;入组后6个月内有脑血管意外病史;入组后6个月内有肺栓塞的病史;或具有临床意义的的心脏病理(定义为入组前6个月内的心肌梗死;根据NYHY的III级或IV级心力衰竭;不受控制的心绞痛;严重的无法控制的室性心律失常;急性缺血或活动性传导系统异常的心电图证据)。有冠状动脉搭桥术或血管成形术病史的患者将接受心脏病学评估,并在个案基础上对其进行考虑。HIV、乙型肝炎或丙型肝炎血清阳性的患者将被排除在外。已知或发现怀孕的患者以及不愿进行避孕的育龄患者将被排除在外。PI可自行决定将患者排除在外,或者如果认为允许参加将构成无法接受的医学或精神病风险,则可将患者排除在外。

[0457] 用PC方案治疗ALS患者。

[0458] 8周PC方案的目的,是引起部分耗竭并抑制促成ALS疾病发病机理的Th1/Tc1细胞。此外,在第8周以及随后的PC方案之后立即输注Hreg细胞的时间点,PC方案还旨在使T细胞稳态细胞因子急性产生(特别是IL-7和IL-15)。

[0459] 将用为期14天的周期施用PC方案;但是,如果发生运作障碍,或者在评估和(或)治疗任何不良事件方面需要额外的时间,则可以允许周期之间最多两周的延迟。对于#1周期,喷司他丁(第1天静脉滴注 $1\text{mg}/\text{m}^2$ )将与环磷酰胺(第1、2天和第3天每天口服100mg)联合给药。#2周期(只要没有发生剂量限制性毒性,就可以使用该周期),将包括与同样剂量的环磷酰胺(第1、2天和第3天每天口服100mg)组合的剂量增加的一剂喷司他丁(第1天静脉滴注 $2\text{mg}/\text{m}^2$ )。#3周期和#4周期(只要没有发生剂量限制性毒性并且绝对淋巴细胞计数每微升大于750个细胞,就可以使用该周期),将包括与5天的环磷酰胺(第1、2、3、4天和第5天每天口服100mg)组合的2剂喷司他丁(第1天和第4天静脉滴注 $2\text{mg}/\text{m}^2$ )。

[0460] 如果#3周期或#4周期之前ALC计数为每微升750个细胞或更少,则将不再施用进一步的周期,并且患者将继续使用拉米夫定以维持治疗。如果在#4周期之前绝对淋巴细胞计数大于每微升1250个细胞,则环磷酰胺的剂量将增加一倍(在第1、2、3、4天和第5天每天口服200mg)。

[0461] 与喷司他丁给药有关的细节：(a) 准备将由药房按照药瓶说明将喷司他丁的浓度重新配制为2mg/ml。然后将适当的患者特定剂量添加到0.9%的氯化钠中，以使总体积为50mL；(b) 剂量和施用：喷司他丁的配量将因肾功能不全而调整（见下文）；每剂喷司他丁将在30-60分钟内静脉给药；(c) 处方药和止吐药疗法：输液前，在30-60分钟内注入1升0.9%氯化钠。喷司他丁可以致呕。止吐方案指南如下（PI可以自行决定是否允许更改）：(1) 施用每剂喷司他丁前60分钟静脉滴注12毫克的地塞米松；(2) 如果需要控制呕吐，可以在每个周期的前五天口服地塞米松；(3) 施用每剂喷司他丁前60分钟静脉滴注8毫克的恩丹西酮；(4) 对于治疗的剩余部分，可按照规定每12小时口服一次恩丹西酮，剂量为8mg（片剂），持续时间为第1天到第14天；(5) 对于恶心和呕吐不受控制的患者，可以在止吐方案中根据需要添加阿瑞匹坦。

[0462] 与喷司他丁剂量减少有关的细节：在计算喷司他丁和CrCl的每个预定剂量之前，将会获得血清肌酐水平。CrCl可以通过24小时内的尿液获得，也可以通过Cockcroft-Gault公式计算得出。如果受试者在喷司他丁和环磷酰胺治疗期间肌酐水平升高，则随后的配量将作如下修改：当CrCl>60 (mL/min/1.73m<sup>2</sup>) 时：施用100%的预期的喷司他丁剂量（对于#1、#2周期，1mg/m<sup>2</sup>的喷司他丁；对于#3、#4周期，剂量为2mg/m<sup>2</sup>）；当30<CrCl<60时：施用50%的预期的喷司他丁剂量（对于#1、#2周期，0.5mg/m<sup>2</sup>的喷司他丁；对于#3、#4周期，1mg/m<sup>2</sup>的喷司他丁）；当CrCl<30时：保持使用喷司他丁。

[0463] 由于喷司他丁很少与神经系统毒性（癫痫发作，昏迷）有关，因此应特别注意CNS的评估。如果PC方案与任何新的2级或严重程度更高的新型神经毒性或任何先前存在的神经毒性恶化相关，则应联系机构PI，以讨论是否需要批准进一步的喷司他丁治疗和进一步的方案治疗。

[0464] 环磷酰胺给药的具体方面：水合作用。由于环磷酰胺可引起膀胱炎，因此对患者而言，保持充足的水分很重要。病人至少每天应喝至少2至4升液体，以保持尿液的颜色清晰。在睡觉前排空膀胱也是特别重要的。口服环磷酰胺将在第1、2天和第3天（对于#1周期和#2周期）或第1、2、3、4天和第5天（#3周期和#4周期）按每天100mg的固定剂量给药。但是，对于#4周期前ALC并未显著降低的患者（定义为ALC每微升大于1250个细胞），#4周期的环磷酰胺的剂量将增加至在第1、2、3、4天和第5天每天200mg。如果患者不能耐受口服治疗，则允许环磷酰胺的静脉输注；静脉输注剂量将与预期的口服剂量相同。对于静脉输注，将由HUMC药房按照药瓶说明将环磷酰胺的浓度重新配制为20mg/ml。然后将适当的剂量（100mg或200mg）稀释在100ml的D5W或0.9%的氯化钠中，并在30分钟内进行静脉输注。

[0465] 预计PC周期不会导致嗜中性细胞绝对计数的大幅下降。但是，如果在下一个周期之前的测定中ANC低于某些值，则环磷酰胺的剂量将按以下方式调整：(1) 对于每微升1000个或更多细胞的ANC值，将施用100%的预期剂量；(2) 对于每微升细胞数在500和999之间的ANC值，将施用50%的预期剂量；(3) 如果ANC值小于每微升500个细胞，则不会施用环磷酰胺。此外，对于ANC值小于每微升500个细胞的情况，PI可以考虑决定开始G-CSF治疗。

[0466] 8周PC方案的定量目标，是将ALC值降低至每微升约750个细胞。假设这种导致疾病发病机理的T细胞的耗竭和抑制程度，将允许iT<sub>REG</sub>细胞成功植入并具有生物学活性，以控制神经炎症过程。然而，可能需要更严格地减少宿主Th1/Tc1细胞，以使iT<sub>REG</sub>细胞发挥其充分的抑制作用；在这种情况下，可以加强或延长PC方案，以在iT<sub>REG</sub>细胞治疗之前靶向较低的

ALC值,例如每微升500、250或0ALC。另一方面, $iT_{REG}$ 细胞疗法可能会非常有效,以至于即使每微升750个细胞的ALC值也可能被认为过于严格。在这些情况下,可以降低PC方案的强度或缩短疗程,以靶向更高的ALC值,例如每微升1000、1250或1500个细胞。

[0467] 与拉米夫定维持疗法有关的实践。

[0468] PC方案完成后,患者将继续使用拉米夫定维持治疗,这将持续到研究结束日,即方案的第6个月。拉米夫定(口服片剂)将以每次150mg每日两次的剂量给药。在估计的肌酐清除率降低到50ml/min以下的情况下,拉米夫定的剂量将减少至口服每日一次每次150mg。拉米夫定将在肌酐清除率估计值低于30ml/min时停止使用。

[0469] 如前所述,拉米夫定的既定目标是下调代表ALS发病机制中近端事件的NLRP3炎性体。因此,设想其它炎性体抑制剂将适合或可能更适合在我们的方案平台上使用;例如,已经开发出具有潜在改善的风险:收益比率的炎性体抑制剂:

[0470] 重要的是要注意,预测拉米夫定对 $iT_{REG}$ 细胞疗法具有拮抗作用,因为它们的作用机制实际上是互补的。这种互补性与针对 $T_{REG}$ 细胞治疗提出的其它干预措施形成了鲜明对比,例如雷帕霉素(可抑制多种T细胞反应)和IL-2(在体内促进 $T_{REG}$ 扩增方面具有狭窄的治疗窗口,并且可以提升炎性T细胞群)。

[0471] 支持性护理治疗。

[0472] 如果发生嗜中性白血球减少症,则不需要患者进行系统的抗生素预防。启用抗生素的决定将取决于方案PI。

[0473] 在经过研究结束并启动方案治疗时,将安排所有患者口服阿昔洛韦(或其前药伐昔洛韦)来对HSV或VZV进行抗病毒预防。

[0474] 在经过研究结束时的访问并启动方案治疗时,将安排所有患者口服抗真菌药物进行预防(一线抗菌药物:氟康唑)。在方案PI的批准下,才允许替换。

[0475] 所有患者在进入研究时都将开始预防肺孢子菌PJP。将安排所有患者口服磺胺甲基异恶唑(160mg的甲氧苄氨嘧啶/800mg的磺胺甲恶唑):在周一、周三和周五口服一粒药片;在方案PI的批准下,才允许替换或替代性方案。

[0476] 使用 $iT_{REG}$ 细胞治疗ALS患者:细胞产物的制造和表型。

[0477] 如前面详述的, $iT_{REG}$ 细胞产品将由自体T细胞制成,这些自体T细胞可在PC方案前或在8周的PC方案结束时在研究进入前,通过单采血液成分术进行收集。每种单采血液成分术收集都有其固有优势:起初收集时T细胞产率会较高,而PC方案后的收集将包括Th1/Tc1细胞相对衰弱的T细胞群。

[0478] 因为 $iT_{reg}$ 细胞是根据效应T细胞从炎症表型向抗炎 $T_{REG}$ 表型转化的原理制造的,所以不需要昂贵且费力的天然 $T_{REG}$ 纯化步骤,这些步骤需要使用单克隆抗体/柱选择方法或流式细胞术来获得通常以 $CD4^+$ 、 $CD25^+$ 和 $CD127$ 的低表达为表征的相对罕见的nTREG群体。此外,由于已经证明 $CD8^+T_{REG}$ 细胞可介导免疫抑制作用,并且在为 $iT_{REG}$ 细胞疗法提供增加的多样性方面可能是有益的,因此无需将 $CD8^+T$ 细胞从 $iT_{REG}$ 细胞群中消除。

[0479] 已经证明,可以基于细胞表面标志物(如 $CD62L$ 和 $CCR7$ )的表达将其定义为中枢记忆类型的有限分化状态的 $T_{REG}$ 细胞,具有增加的体内调节功能。另一方面,众所周知,在T细胞获得分化程度更高的效应记忆状态后,介导抑制功能的分子就会上调,例如:IL-10;CTLA-4;外切核苷酸酶分子 $CD39$ 和 $CD73$ ;细胞溶解分子,例如穿孔素和fas配体。这些数据表

明,输注包含中枢记忆亚群和效应记忆亚群的iT<sub>REG</sub>细胞产物将是有益的,并且因此,将使用的iT<sub>REG</sub>细胞产物将具有来自这两个亚群的表征。

[0480] 此外,iT<sub>REG</sub>细胞必须表达决定调节性T细胞分化程序的转录因子FoxP3。此外,由于已经证明FoxP3表达和所得的调节功能会随着时间的流逝而退化,所以iT<sub>REG</sub>细胞产物必须在培养的较长时间内具有稳定的FoxP3表达。

[0481] 此外,已经证明人内单独的FoxP3不足以识别调节性T细胞表型,因为它可以被真正的炎性T细胞亚群瞬时表达。因此,制造表达FoxP3但相对缺乏与炎性T细胞亚群相关的分子的共表达的iT<sub>REG</sub>细胞产物至关重要,例如Th1/Tc1型转录因子TBET或Th1型细胞因子IL-2或IFN- $\gamma$ 。

[0482] 最后,重要的是,iT<sub>REG</sub>细胞从调节性表型向炎性表型分化的可塑性能力降低。也就是说,已经充分地证明,Treg细胞的抑制表型可能相对不稳定,这可能导致向实际有助于介导神经退行性疾病的炎性T细胞亚群的转化。因此,iT<sub>REG</sub>细胞产物必须稳定表达FoxP3,并且也显示出向Th1/Tc1亚群转化的降低的能力。作为防止T<sub>REG</sub>细胞去分化可塑性向Th1型亚群转化的额外预防措施,有目的将IL-4加入到iT<sub>REG</sub>细胞的制造过程中,以使任何该等分化都将朝向Th2型谱系,这对于T<sub>REG</sub>细胞的维持和T<sub>REG</sub>细胞抑制器的功能似乎很重要;已被描述为T<sub>REG</sub>细胞的缺省途径;可以在ALS的环境中介导抗炎作用。尽管有证据表明调节性T细胞的Th2样状态具有潜在的有益作用,但用于T<sub>REG</sub>细胞疗法的制造方法尚未包含在培养过程中有目的地添加外源IL-4(如最近的Treg制造实例所示)。

[0483] 在制造结束时,将iT<sub>REG</sub>细胞产物分为至少四等分单独使用的治疗性细胞剂量并冷冻保存(每千克为 $1 \times 10^6$ 至 $5 \times 10^6$ 个细胞)。

[0484] 使用iT<sub>REG</sub>细胞治疗ALS患者:T<sub>REG</sub>细胞群的组合。

[0485] iT<sub>REG</sub>细胞群的输注剂量为每公斤受体体重 $1 \times 10^6$ 至 $5 \times 10^6$ 个细胞。这种与以前的研究相比相对较低的T<sub>REG</sub>细胞疗法的剂量,是有几个因素促成的:PC方案将为iT<sub>REG</sub>细胞的植入提供足够的免疫空间;iT<sub>REG</sub>细胞将在过继转移后表达与细胞持久性相关的记忆谱;将iT<sub>REG</sub>细胞产物分为至少四等分临床相关的治疗剂量,从而准许多个治疗周期。

[0486] 如前面所述,iT<sub>REG</sub>细胞产物将包含多种记忆分化状态(中枢记忆[CM]加效应记忆[EM]),从而可以分别长期控制或瞬时控制神经炎症。将有可能根据临床情况,来控制该等中枢记忆群和效应记忆群的比率,以获得最理想的结果;也就是说,基于临床参数,CM细胞:EM细胞的T<sub>REG</sub>分布可以是1:1、3:1、10:1、1:3或1:10。

[0487] 将有可能根据临床情况,以类似的方式控制CD4<sup>+</sup>iTREG细胞:CD8<sup>+</sup>iT<sub>REG</sub>细胞的比率,以达到改善的治疗效果。

[0488] 最后,因为iT<sub>REG</sub>细胞和nT<sub>REG</sub>细胞表达不同的T细胞受体谱系并且可以在介导免疫抑制方面进行互补,因此设想可以通过联合施用nT<sub>REG</sub>细胞来获得使用了iT<sub>REG</sub>细胞的最佳疗法。

[0489] 使用iT<sub>REG</sub>细胞治疗ALS患者:与药理剂的组合

[0490] 有可能的是,当与包含PC方案的免疫调节作用和拉米夫定的炎性体抑制作用的平台组合使用时,iT<sub>REG</sub>疗法可能足以控制神经炎症。

[0491] 但是,设想可以通过改变平台来优化iT<sub>REG</sub>细胞疗法。举例来说(并非限制),可以通过改变PC方案的强度来优化治疗;用另一种药剂取代环磷酰胺,使其与喷司他丁协同作用;

或在PC方案中增加第三部分,例如抗TNF治疗后的低剂量IL-2治疗,推断这将可预测地增加体内的 $T_{REG}$ 细胞。作为举例而非限制,如Pham MN,von Herrath MG,Vela JL.“抗原特异性调节性T细胞和低剂量的IL-2治疗1型糖尿病(Antigen-Specific Regulatory T Cells and Low Dose of IL-2in Treatment of Type 1Diabetes)”.《免疫学前沿(Frontiers in Immunology)》.2015;6:651中所描述的低剂量IL-2疗法。

[0492] 此外,预见到拉米夫定可能会被更强有力或更具特异性的类似于最近合成的分子的炎性小体抑制剂所取代。

[0493] 最终,更多近端事件引发了ALS炎症的驱动,例如,错误折叠的RNA元件的积累和自噬不足。在这种情况下,有理由使用能促进自噬的药物来治疗ALS,尤其是雷帕霉素。但是,雷帕霉素治疗ALS的临床试验才刚刚开始(ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03359538);此外,该方案正在评估雷帕霉素的连续治疗(可能会引起严重的毒性)、雷帕霉素的固定剂量(可能导致患者间较大程度的药物变异性)和相对较小的雷帕霉素的剂量(这将无法确保有效地抑制mTOR通路以及因此促进自噬所必需的高药物水平)。为了规避这些限制,通过使用以下参数将 $iT_{REG}$ 细胞疗法与雷帕霉素相结合,以促进自噬:使用间歇性雷帕霉素疗法来限制药物毒性并限制雷帕霉素对 $iT_{REG}$ 细胞的抑制潜能(举例来说(并非限制),一周的mTOR抑制治疗,三周的mTOR治疗后恢复);使用雷帕霉素的可变剂量(包含雷帕霉素的负荷剂量),结合雷帕霉素水平的血清检测来确保均一的药物水平,以更一致地抑制mTOR途径;并使用大剂量雷帕霉素治疗,以使雷帕霉素血清水平达到30ng/ml,以优于典型目标值约5至12ng/ml。参见Mossoba ME, Halverson DC, Kurlander R等人“大剂量西罗莫司和免疫选择性喷司他丁加环磷酰胺调理产生稳定的混合嵌合体和不足的移植物抗肿瘤反应(High-Dose Sirolimus And Immune Selective Pentostatin Plus Cyclophosphamide Conditioning Yields Stable Mixed Chimerism and Insufficient Graft-Versus-Tumor Responses)”.《临床癌症研究(Clinical Cancer Research)》2015;21(19):4312-4320

[0494] 此外,雷帕霉素治疗可能不足以促进神经退行性细胞的自噬,原因是该药物无法充分渗透到中枢神经系统;至此,即使使用雷帕霉素类似药物替西罗莫司进行静脉治疗后,也不会在脑脊液中产生显著的药物水平。为了克服这一局限性,设想我们将通过留置的Ommaya水库施用替西罗莫司(其方式类似于溶酶体贮积症的治疗方法),以实现mTOR抑制剂的稳定的CSF药物水平,从而在神经退行性疾病环境中最佳地促进自噬。

[0495] 使用 $iT_{REG}$ 细胞治疗ALS患者:免疫监测。

[0496] 在ALS的 $iT_{REG}$ 细胞疗法的背景下,就其调节与疾病相关的神经炎性途径的能力而言,对细胞疗法成功进行量化将非常重要。也就是说,神经退行性疾病的临床病程监测是不够的,病人的整个疾病进展有很大程度的可变性群组:要想获得最佳的治疗神经炎症的能力,需要多次输注 $iT_{REG}$ 细胞,其包含与多种药理剂的组合使用;因此,利用免疫生物标志物来协助指导治疗决策将至关重要。

[0497] 有关 $iT_{REG}$ 细胞输注和相关药理剂重复给药的治疗决策将基于培育的外周血单个核细胞的专门测试。这些测试解决了与炎症监测有关的几个关键问题,包含:自发的细胞因子测量;T细胞和单核细胞在细胞因子测量中的协同;重组人CD40配体,T细胞检查点抑制途径和单核细胞检查点途径在揭示细胞因子分泌中的作用;通过多种技术评估炎性体的活

化,例如通过蛋白质印迹法对蛋白质进行定量;将外周T细胞的腺苷受体生物学评价作为炎性事件的指标;使用流式细胞术评估FoxP3转录因子与Th1相关分子TBET、IL-2或IFN- $\gamma$ 的共表达;通过RNA测序表征T细胞受体谱系;检测针对潜在的神经系统自身抗原的抗原特异性T细胞反应,例如疾病发病过程中产生的蛋白质聚集体。

[0498] 方案评估。

[0499] 由医师或中级医疗服务提供者进行的临床评估将在PC方案每个周期的第1天进行,该周期计划为14天。在14天的PC方案期间(最好是在周期的第8天左右),患者的本地医疗服务提供者还会再会见一次患者。在这些访视中,将获得具有差异代谢和完整代谢组的CBC(完整代谢组通常包含大约14种检测,包含电解质、肌酐、肝转氨酶和胆红素;方案未规定所用的特定检测组),并将实验室结果发送给方案研究人员。

[0500] 在涵盖PC方案的间隔完成时(大约第2个月),将在第3、4、5个月和第6个月每月会见一次患者;第6个月的访问将代表研究结束时的访问。在进行这些临床评估时要执行的测试包含:(1)临时病史和体格检查;(2)具有差异计数和血小板计数的血常规(CBC);(3)完整代谢组;(4)免疫亚群枚举(TBNC组)。

[0501] 为了监控研究的免疫参数,会将外周血样本发送到Rapa Therapeutics,以进行集中监控和更深入的分析。血液样本将由送往Rapa Therapeutics的绿色顶部肝素化试管中的30ml(用于细胞分析)和红色顶部试管(用于血清分析)中的5ml组成。

[0502] 通过使用发送给Rapa Therapeutics的相同样本,将研究PC方案和拉米夫定维持疗法对以下方面的影响:通过RNA表达、上清液/Luminex分析、流式细胞术测定的促炎或抗炎细胞因子或细胞亚群,以及通过蛋白质印迹法磷酸化分析测得的细胞信号传导事件。

[0503] 将评估血清中ALS的潜在生物标志物。举例说明(并非限制),如在以下中描述的那些生物标志物:Beach TG.“神经退行性疾病生物标志物综述:所述标志物会带我们穿越低谷吗?(A Review of Biomarkers for Neurodegenerative Disease:Will They Swing Us Across the Valley?)”《神经病学和治疗学(Neurology and Therapy)》.2017;6(增刊1):5-13。

[0504] 将表征患者的TCR谱系,并评估治疗干预措施是否会影响该库。

[0505] 体外研究将归入“免疫特性研究”的一般类别。他们将专注于通过多参数FACS分析分离不同的细胞亚群,或专注于通过磁珠分离,随后进行表征。具体而言,将通过流式细胞术分析外周血单核细胞(PBMC),以表达指示造血谱系、免疫功能亚群、细胞因子产生和激活状态的标志物的表达将分析细胞亚群的T细胞受体谱系多样性。可以在体外用许多不同的刺激来激活细胞,包含特定的抗原和有丝分裂原,众所周知,它们可以激活T淋巴细胞或单核细胞功能的不同途径分析可以包含T细胞增殖,细胞因子的产生和基因表达。在研究过程中,随着本领域技术和知识的发展,用于正在进行的数据分析的特定测定法可能会被修改、删除或替换,但不会改变研究目的。

[0506] 应答标准。

[0507] 如先前所示,将在各个时间点测量患者报告的ALSFS-R评分和临床医生报告的Appel评分。

[0508] 毒性标准

[0509] 毒性将根据NCI的不良事件通用术语标准(CTCAE)进行分级(可查看链接:<http://>

ctep.info.nih.gov)。可以从CTEP主页下载CTCAE 4.0版的副本。研究中涉及的所有治疗领域和人员均应获得CTCAE 4.0版的副本。

[0510] 任何归因可能或肯定与研究药物(喷司他丁、环磷酰胺、拉米夫定)有关的4级或5级毒性(CTCAE 4.0版),将被视为剂量限制性毒性(DLT)。以下毒性将不被视为DLT:生化4级毒性(肾脏和肝脏值除外);4级呕吐;4级发烧;与感染相关的可在7天内消退的4级毒性。

[0511] 统计学注意事项。

[0512] 该研究设计引用了标准的3+3方法评估喷司他丁和环磷酰胺疗法以及维持拉米夫定疗法(平台)的安全性。在前三名患者中,如果没有患者通过喷司他丁/环磷酰胺疗法而发展为DLT,则将确定该方案对于将群组扩展至总共 $n=10$ 名患者是安全的。另一方面,如果首批患者中有三分之一发展为DLT,则应计人数将增加到总共 $n=6$ 名患者。在这种情况下,如果前6名患者中不超过1名发展为DLT,则群组中 $n=10$ 的人数可以继续增加。

[0513] 一旦成功开发了该平台,将评估 $iT_{REG}$ 细胞输注的安全性和潜在疗效。最初,将执行一项初步研究,以评估多次输注 $iT_{REG}$ 细胞抑制与疾病相关的神经炎性途径的能力。

[0514] 一旦记录了有效调节与神经变性相关的生物标志物的能力,将执行II期临床试验(使用历史对照数据或随机群组设计),以评估 $iT_{REG}$ 细胞疗法是否可以改善ALS患者的临床结果。

[0515] 风险/益处分析。

[0516] 从研究开始,预计该研究累积的患者的生存期大约为2至4年。

[0517] 协议的第一个组成部分包括免疫耗竭与免疫抑制疗法(PC方案)的四个周期,所述疗法包括喷司他丁和环磷酰胺。假设PC方案将消除和抑制导致ALS恶化的病原性免疫细胞;因此,患者有可能从这种效果中受益,以改善生活质量或最终减少疾病恶化。然而,就中枢神经系统而言,PC方案中可能会产生意想不到的毒性。尽管正在对配量进行修改以帮助确保PC方案在该种新的ALS患者人群中的相对安全性,但PC方案可能具有反常作用,且实际上会增加ALS的恶化速度或引起其它神经毒性。喷司他丁在极少数情况下也会对其它器官(如心脏或肾脏)产生毒性。尽管这种作用是治疗原理的一部分,但预计PC方案最常见的毒性反应将是淋巴细胞耗竭。另一方面,PC方案可能会消除骨髓细胞,从而增加细菌或真菌感染的可能性。预计PC方案与T细胞免疫抑制有关,因此,机会性病毒感染可能会发生。

[0518] 第二个方案组成部分包括使用抗病毒药物拉米夫定的维持疗法。如果药物如假设的那样能减少中枢神经系统的炎症,患者可能会从这种治疗中受益。除了主要的胃肠道副作用和胰腺炎外,拉米夫定通常是一种耐受性非常好的药物。

[0519] 第三个方案组成部分包括 $iT_{REG}$ 细胞的多次输注。患者可能会从该疗法中受益(控制炎症的细胞疗法直接发生在引发炎症的微环境中),因为细胞疗法通过多种分子作用机制起作用,而药物疗法无法轻易复制这些作用机制,并且因为细胞疗法的作用可以因记忆细胞效应而长久保持。

[0520] 替代性的方案设计

[0521] 图39提供了一种替代性的方案设计。将通过稳态单采血液成分术收集淋巴细胞;单采血液成分术产物将被运送到Rapa Therapeutics (Rockville, MD)。在制造RAPA-501细胞后,将按临床指示的细胞剂量将 $n=4$ 剂量的RAPA-501细胞冷冻保存在一次性输注袋中。治疗间隔为6个月,随后为6个月的观察间隔。群组#1将接受RAPA-501细胞,并且以每次输注

$4 \times 10^6$ 个细胞的剂量分4个周期进行给药。群组#1代表安全群组,并且将采用标准的3+3设计;如果0/3或不超过1/6的患者中出现剂量限制性毒性(DLT),则将进入群组#2。群组#2将接受与之前讨论的研究方案相同的四个周期的RAPA-501细胞,不同之处在于T细胞剂量将增加至每次输注 $120 \times 10^6$ 个细胞。群组#3将评估可以单药安全施用的最大剂量的RAPA-501细胞(按照群组#1或群组#2,分别为每次输注 $40 \times 10^6$ 个细胞或每次输注 $120 \times 10^6$ 个细胞),以及四次RAPA-501细胞输注的每次输注之前使用PC方案对宿主进行的调节。PC方案将包括喷司他丁(第1和第4天为 $2\text{mg}/\text{m}^2$ )、环磷酰胺(每天100mg,第1至第5天)、第6天和第7天不进行治疗以及第8天进行RAPA-501细胞输注。

[0522] 去分化实施例:

[0523] 1.一种用于T细胞的去分化的方法,所述方法包括:

[0524] 在包括维生素D、替西罗莫司和IL-2信号传导抑制剂的培养基中,以一定细胞密度接种包括来自受试者的T细胞的培养物输入细胞群;

[0525] 以1:1到1:12的珠:T细胞比率将抗CD3/抗CD28涂覆的磁珠添加到所述T细胞和培养基中;

[0526] 将所述培养物输入细胞群和培养基温育一定时间段,以产生去分化的T细胞。

[0527] 2.根据实施例1所述的方法,其进一步包括:收获所述去分化的T细胞。

[0528] 3.根据实施例2所述的方法,其进一步包括在收获所述去分化的T细胞之后:

[0529] 将所述去分化的T细胞的至少一部分包装在包装中;以及

[0530] 冷冻含有所述去分化的T细胞的所述部分的所述包装。

[0531] 4.根据实施例1到3中任一项所述的方法,其进一步包括在将所述培养物输入细胞群接种到所述培养基中之前:

[0532] 从所述受试者收获所述培养物输入细胞群。

[0533] 5.根据实施例1到4中任一项所述的方法,其中所述培养基不含有IL-2并且没有IL-2添加到所述培养基。

[0534] 6.根据实施例1到5中任一项所述的方法,其中所述细胞密度为至少每mL  $1.5 \times 10^6$ 个T细胞。

[0535] 7.根据实施例1到6中任一项所述的方法,其中所述替西罗莫司以约 $0.3\mu\text{M}$ 到约 $1\mu\text{M}$ 的浓度存在于所述培养基中。

[0536] 8.根据实施例1到6中任一项所述的方法,其中所述替西罗莫司以约 $1\mu\text{M}$ 的浓度存在于所述培养基中。

[0537] 9.根据实施例1到8中任一项所述的方法,其中所述IL-2信号传导抑制剂是抗IL-2受体抗体或其片段。

[0538] 10.根据实施例9所述的方法,其中所述IL-2信号传导抑制剂是巴利昔单抗或达克珠单抗。

[0539] 11.根据实施例1到10中任一项所述的方法,其中所述IL-2信号传导抑制剂以 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 到 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度存在于所述培养基中。

[0540] 12.根据实施例1到11中任一项所述的方法,其中所述时间段为约3天。

[0541] 13.根据实施例1到12中任一项所述的方法,其中所述珠:T细胞比率为1:3。

[0542] 14.根据实施例1到13中任一项所述的方法,其中所述培养基进一步包括5%的人

血清。

[0543] 15. 根据实施例1到14中任一项所述的方法,其中所述培养基包括X-Vivo 20培养基。

[0544] 16. 根据实施例1到15中任一项所述的方法,其中所述维生素D以约0.03nM到约1nM存在于所述培养基中。

[0545] 17. 根据实施例1到15中任一项所述的方法,其中所述维生素D以约0.1nM存在于所述培养基中。

[0546] 18. 根据实施例1到11和13到17中任一项所述的方法,其进一步包括:

[0547] 测量所述培养物输入细胞群中RAPTOR或RICTOR的表达水平,

[0548] 其中所述时间段持续到所述培养物输入细胞群中RAPTOR或RICTOR的表达水平相对于对照T细胞群减少至少50%,并且更优选地减少90%,所述对照T细胞群是在没有替西罗莫司、IL-2信号传导抑制剂和维生素D的情况下于与所述培养物输入细胞群相同的条件下制造的。

[0549] 19. 根据实施例1到11和13到17中任一项所述的方法,其进一步包括:

[0550] 测量所述培养物输入细胞群中RAPTOR或RICTOR和管家蛋白的表达水平,

[0551] 其中所述时间段持续到在针对管家蛋白的表达水平归一化后,所述培养物输入细胞群中RAPTOR或RICTOR的表达水平分别相对于对照T细胞群减少至少50%,所述对照T细胞群是在没有替西罗莫司、IL-2信号传导抑制剂和维生素D的情况下于与所述培养物输入细胞群相同的条件下制造的。

[0552] 20. 根据实施例19所述的方法,其中所述管家蛋白是肌动蛋白或GAPDH。

[0553] 21. 根据实施例18到20中任一项所述的方法,其中所述测量所述表达水平的步骤通过蛋白质印迹分析进行。

[0554] 22. 根据实施例1到11和13到17中任一项所述的方法,其进一步包括:

[0555] 测量所述培养物输入细胞群中RAPTOR或RICTOR的表达水平,

[0556] 其中所述时间段持续到所述培养物输入细胞群中RAPTOR或RICTOR的表达水平相对于对照T细胞群减少至少50%,并且更优选地减少90%,所述对照T细胞群是在没有替西罗莫司、IL-2信号传导抑制剂和维生素D的情况下于与所述培养物输入细胞群相同的条件下制造的。

[0557] 23. 一种去分化的T细胞,其通过根据实施例1到22中任一项所述的方法产生。

[0558] 24. 一种组合物,其包括去分化的T细胞群,

[0559] 其中所述去分化的T细胞群的至少一部分与对照T细胞群相比表达少于50%的RAPTOR或RICTOR,其中所述对照T细胞群是在没有替西罗莫司、IL-2信号传导抑制剂和维生素D的情况下于与所述培养物输入细胞群相同的条件下制造的。

[0560] 25. 一种用于T细胞的去分化的方法,所述方法包括:

[0561] 在包括维生素D和替西罗莫司的培养基中,以一定细胞密度接种包括来自受试者的T细胞的培养物输入细胞群;

[0562] 以1:1或更低的珠:T细胞比率将抗CD3/抗CD28涂覆的磁珠添加到所述T细胞和培养基中以刺激所述T细胞;

[0563] 将所述培养物输入细胞群和培养基温育一定时间段,以产生去分化的T细胞。

- [0564] 26. 根据实施例25所述的方法,其进一步包括:
- [0565] 收获所述去分化的T细胞。
- [0566] 27. 根据实施例26所述的方法,其进一步包括在收获所述去分化的T细胞之后:
- [0567] 将所述去分化的T细胞的至少一部分包装在包装中;以及
- [0568] 冷冻含有所述去分化的T细胞的所述部分的所述包装。
- [0569] 28. 根据实施例25到27中任一项所述的方法,其进一步包括在将所述培养物输入细胞群接种到所述培养基中之前:
- [0570] 从所述受试者收获所述培养物输入细胞群。
- [0571] 29. 根据实施例25到28中任一项所述的方法,其中所述培养基不含有IL-2并且没有IL-2添加到所述培养基。
- [0572] 30. 根据实施例25到29中任一项所述的方法,其中所述细胞密度为每mL  $1.5 \times 10^6$  个T细胞。
- [0573] 31. 根据实施例25到30中任一项所述的方法,其中所述替西罗莫司以约0.3 $\mu$ M到约1 $\mu$ M的浓度存在于所述培养基中。
- [0574] 32. 根据实施例25到30中任一项所述的方法,其中所述替西罗莫司以约1 $\mu$ M的浓度存在于所述培养基中。
- [0575] 33. 根据实施例25到32中任一项所述的方法,其中所述时间段为约3天。
- [0576] 34. 根据实施例25到33中任一项所述的方法,其中所述珠:T细胞比率为1:3。
- [0577] 35. 根据实施例25到34中任一项所述的方法,其中所述培养基进一步包括5%的人血清。
- [0578] 36. 根据实施例25到35中任一项所述的方法,其中所述培养基包括X-Vivo 20培养基。
- [0579] 37. 根据实施例25到36中任一项所述的方法,其中所述维生素D以约0.03nM到约1nM存在于所述培养基中。
- [0580] 38. 根据实施例25到37中任一项所述的方法,其中所述维生素D以约0.1nM存在于所述培养基中。
- [0581] 39. 根据实施例25到32和34到38中任一项所述的方法,其进一步包括:
- [0582] 测量所述培养物输入细胞群中RAPTOR或RICTOR的表达水平,
- [0583] 其中所述时间段持续到所述培养物输入细胞群中RAPTOR或RICTOR的表达水平相对于对照T细胞群减少至少50%,所述对照T细胞群是在没有替西罗莫司、IL-2信号传导抑制剂和维生素D的情况下于与所述培养物输入细胞群相同的条件下制造的。
- [0584] 40. 根据实施例25到32和34到38中任一项所述的方法,其进一步包括:
- [0585] 测量所述培养物输入细胞群中RAPTOR、RICTOR和管家蛋白的表达水平,
- [0586] 其中所述时间段持续到在针对管家蛋白表达归一化后,所述培养物输入细胞群中RAPTOR或RICTOR的表达水平相对于对照T细胞群减少50%,或更优选地减少90%,所述对照T细胞群是在没有替西罗莫司、IL-2信号传导抑制剂和维生素D的情况下于与所述培养物输入细胞群相同的条件下制造的。
- [0587] 41. 根据实施例40所述的方法,其中所述管家蛋白是肌动蛋白或GAPDH。
- [0588] 42. 根据实施例39到41中任一项所述的方法,其中所述测量所述表达水平的步骤

通过蛋白质印迹分析进行。

[0589] 43. 根据实施例25到32和34到38中任一项所述的方法,其进一步包括:

[0590] 测量所述培养物输入细胞群中RAPTOR或RICTOR的表达水平,

[0591] 其中所述时间段持续到所述培养物输入细胞群中RAPTOR或RICTOR的表达水平相对于对照T细胞群减少至少50%,并且更优选地减少90%,所述对照T细胞群是在没有替西罗莫司、IL-2信号传导抑制剂和维生素D的情况下于与所述培养物输入细胞群相同的条件下制造的。

[0592] 44. 一种去分化的T细胞,其通过根据实施例25到43中任一项所述的方法产生。

[0593] 45. 一种去分化的T细胞群,其特征在于,相对于在没有在这些方法中指定的培养添加剂的情况下培养的对照T细胞群,以下T细胞分化分子的RNA表达减少了至少10%,并且更优选地减少了50%:溶细胞分子,包含但不限于颗粒酶B;以及细胞因子分子,包含但不限于IFN- $\gamma$ 。

[0594] 46. 一种去分化的T细胞群,其特征在于,相对于在没有在这些方法中指定的培养添加剂的情况下培养的对照T细胞群,以下T细胞分化分子的RNA表达增加了至少10%,并且更优选地增加了50%:与诱导性多能干细胞相关的转录因子,包含但不限于Nanog、KLF4和KLF10;与原初T细胞相关的分子,包含但不限于IL-7受体CD127。

[0595] 47. 一种去分化的T细胞群,其特征在于,相对于在没有在这些方法中指定的培养添加剂的情况下培养的对照T细胞群,以下T细胞分化分子的RNA表达降低了至少10%,并且更优选地降低了50%:与Th1效应T细胞相关的转录因子,包含但不限于T-Bet和STAT1;然而,所述制造的T细胞将伴随地具有与细胞存活相关的转录因子(包含但不限于HIF-1- $\alpha$ )的等同表达。

[0596] 48. 一种去分化的T细胞群,其特征在于,相对于在没有在这些方法中指定的培养添加剂的情况下培养的对照T细胞群,自噬的分子标志物的表达增加了至少10%,并且更优选地增加了50%,包含但不限于:通过蛋白质印迹分析自噬相关分子p62的蛋白质水平增加。

[0597] 49. 根据实施例1到22中任一项所述的方法,其中不进行所述以1:1到1:12的珠:T细胞比率将抗CD3/抗CD28涂覆的磁珠添加到所述T细胞和培养基中的步骤。

[0598] 50. 根据实施例25到43中任一项所述的方法,其中不进行所述以1:1或更低的珠:T细胞比率将抗CD3/抗CD28涂覆的磁珠添加到所述T细胞和培养基中以刺激所述T细胞的步骤;

[0599] 51. 一种去分化的T细胞群,其通过以下性质中的一种或多种性质表征:

[0600] 相对于在没有替西罗莫司、维生素D和IL-2信号传导抑制剂的情况下于相同的条件下温育的对照T细胞群,颗粒酶B、IL-10和IFN- $\gamma$ 中的一种或多种的mRNA表达减少至少10%,并且更优选地减少50%;

[0601] 相对于在没有替西罗莫司、维生素D和IL-2信号传导抑制剂的情况下于相同的条件下温育的对照T细胞群,Nanog、KLF4、KLF10和CD127中的一种或多种的mRNA表达增加至少10%,并且更优选地增加50%;

[0602] 相对于在没有替西罗莫司、维生素D和IL-2信号传导抑制剂的情况下于相同的条件下温育的对照T细胞群,T-Bet和STAT1中的一种或多种的mRNA表达减少至少10%,并且更

优选地减少50%；

[0603] HIF-1- $\alpha$ 表达在没有替西罗莫司、维生素D和IL-2信号传导抑制剂的情况下于相同的条件下温育的对照T细胞群的约20%之内；

[0604] 相对于在没有替西罗莫司、维生素D和IL-2信号传导抑制剂的情况下于相同的条件下温育的对照T细胞群,p62表达增加至少10%,并且更优选地增加50%；

[0605] 相对于在没有替西罗莫司、IL-2信号传导抑制剂和维生素D的情况下于与所述培养物输入细胞群相同的条件下制造的对照T细胞群,RAPTOR或RICTOR的表达水平减少至少50%,并且更优选地减少90%；

[0606] 相对于在没有替西罗莫司、IL-2信号传导抑制剂和维生素D的情况下于与所述培养物输入细胞群相同的条件下制造的对照T细胞群,通过管家蛋白归一化的RAPTOR或RICTOR的表达水平减少至少50%,并且更优选地减少90%；以及

[0607] 其组合。

[0608] 52.一种去分化的T细胞,其通过以下性质中的一种或多种性质表征：

[0609] 相对于在没有替西罗莫司、维生素D和IL-2信号传导抑制剂的情况下于相同的条件下温育的对照T细胞,颗粒酶B、IL-10和IFN- $\gamma$ 中的一种或多种的mRNA表达减少至少10%,并且更优选地减少50%；

[0610] 相对于在没有替西罗莫司、维生素D和IL-2信号传导抑制剂的情况下于相同的条件下温育的对照T细胞,Nanog、KLF4、KLF10和CD127中的一种或多种的mRNA表达增加至少10%,并且更优选地增加50%；

[0611] 相对于在没有替西罗莫司、维生素D和IL-2信号传导抑制剂的情况下于相同的条件下温育的对照T细胞,T-Bet和STAT1中的一种或多种的mRNA表达减少至少10%,并且更优选地减少50%；

[0612] HIF-1- $\alpha$ 表达在没有替西罗莫司、维生素D和IL-2信号传导抑制剂的情况下于相同的条件下温育的对照T细胞的约20%之内；

[0613] 相对于在没有替西罗莫司、维生素D和IL-2信号传导抑制剂的情况下于相同的条件下温育的对照T细胞群,p62表达增加至少10%,并且更优选地增加50%；

[0614] 相对于在没有替西罗莫司、IL-2信号传导抑制剂和维生素D的情况下于与所述培养物输入细胞群相同的条件下制造的对照T细胞,RAPTOR或RICTOR的表达水平减少至少50%,并且更优选地减少90%；

[0615] 相对于在没有替西罗莫司、IL-2信号传导抑制剂和维生素D的情况下于与所述培养物输入细胞群相同的条件下制造的对照T细胞,通过管家蛋白归一化的RAPTOR或RICTOR的表达水平减少至少50%,并且更优选地减少90%；以及

[0616] 其组合。

[0617] 再分化实施例：

[0618] 1.一种用于将去分化的T细胞分化为TREG/Th2细胞的方法,所述方法包括：在包括IL-2、IL-4和TGF- $\beta$ 的培养基中培养去分化的T细胞；

[0619] 以3:1的比率(珠:T细胞比率)添加抗CD3/抗CD28涂覆的磁珠；将所述去分化的T细胞温育一定时间段以产生TREG/Th2细胞。

[0620] 2.根据实施例1所述的方法,其中所述培养基进一步包括培美曲塞。

- [0621] 3. 根据实施例1到2中任一项所述的方法,其中所述IL-2以约100IU/mL的浓度存在于所述培养基中。
- [0622] 4. 根据实施例1到3中任一项所述的方法,其中所述IL-4以约1000IU/mL的浓度存在于所述培养基中。
- [0623] 5. 根据实施例1到4中任一项所述的方法,其中所述TGF- $\beta$ 以约10ng/mL的浓度存在于所述培养基中。
- [0624] 6. 根据实施例2所述的方法,其中所述培美曲塞以至多100nM的浓度存在于所述培养基中。
- [0625] 7. 根据实施例2所述的方法,其中所述培美曲塞以约10nM的浓度存在于所述培养基中。
- [0626] 8. 根据实施例6到7中任一项所述的方法,其中所述IL-7以约100IU/mL的浓度存在于所述培养基中。
- [0627] 9. 根据实施例6到8中任一项所述的方法,其中所述IL-4以约1000IU/mL的浓度存在于所述培养基中。
- [0628] 10. 根据实施例6到9中任一项所述的方法,其中所述TGF- $\beta$ 以约10ng/mL的浓度存在于所述培养基中。
- [0629] 11. 一种用于将去分化的T细胞分化为TREG/Th2细胞的方法,所述方法包括:
- [0630] 在包括IL-2、IL-4和TGF- $\beta$ 的培养基中培养去分化的T细胞,其中所述去分化的T细胞表达RAPTOR和RICTOR的水平相对于对照T细胞降低至少10%;
- [0631] 以3:1的比率(珠:T细胞比率)添加抗CD3/抗CD28涂覆的磁珠;
- [0632] 将所述去分化的T细胞温育一定时间段以产生TREG/Th2细胞。
- [0633] 12. 根据实施例11所述的方法,其中所述培养基进一步包括培美曲塞。
- [0634] 13. 根据实施例11到12中任一项所述的方法,其中所述IL-12以约100IU/mL的浓度存在于所述培养基中。
- [0635] 14. 根据实施例11到13中任一项所述的方法,其中所述IL-4以约1000IU/mL的浓度存在于所述培养基中。
- [0636] 15. 根据实施例11到14中任一项所述的方法,其中所述TGF- $\beta$ 以约10ng/mL的浓度存在于所述培养基中。
- [0637] 16. 根据实施例12所述的方法,其中所述培美曲塞以至多100nM的浓度存在于所述培养基中。
- [0638] 17. 根据实施例12所述的方法,其中所述培美曲塞以约10nM的浓度存在于所述培养基中。
- [0639] 18. 根据实施例16到17中任一项所述的方法,其中所述IL-17以约100IU/mL的浓度存在于所述培养基中。
- [0640] 19. 根据实施例16到18中任一项所述的方法,其中所述IL-4以约1000IU/mL的浓度存在于所述培养基中。
- [0641] 20. 根据实施例16到19中任一项所述的方法,其中所述TGF- $\beta$ 以约10ng/mL的浓度存在于所述培养基中。
- [0642] 21. 根据实施例1到20中任一项所述的方法,其中所述培养基是补充有5%的人AB

血清的X-Vivo 20。

- [0643] 22. 根据实施例1到21中任一项所述的方法,其中所述时间段介于3天与40天之间。
- [0644] 23. 一种TREG/Th2细胞,其通过根据实施例1到22中任一项所述的方法产生。
- [0645] 24. 一种用于将去分化的T细胞分化为TREG细胞的方法,所述方法包括:
- [0646] 在包括IL-2和TGF- $\beta$ 的培养基中培养去分化的T细胞,所述去分化的T细胞相对于对照T细胞群具有降低的RAPTOR和RICTOR表达;
- [0647] 以3:1的比率(珠:T细胞比率)添加抗CD3/抗CD28涂覆的磁珠;
- [0648] 将所述去分化的T细胞温育一定时间段以产生TREG细胞。
- [0649] 25. 根据实施例24所述的方法,其中所述培养基进一步包括培美曲塞。
- [0650] 26. 根据实施例24到25中任一项所述的方法,其中所述IL-2以约100IU/mL的浓度存在于所述培养基中。
- [0651] 27. 根据实施例24到26中任一项所述的方法,其中所述TGF- $\beta$ 以约10ng/mL的浓度存在于所述培养基中。
- [0652] 28. 根据实施例25所述的方法,其中所述培美曲塞以至多100nM的浓度存在于所述培养基中。
- [0653] 29. 根据实施例25所述的方法,其中所述培美曲塞以约10nM的浓度存在于所述培养基中。
- [0654] 30. 根据实施例28到29中任一项所述的方法,其中所述IL-2以约100IU/mL的浓度存在于所述培养基中。
- [0655] 31. 根据实施例28到30中任一项所述的方法,其中所述TGF- $\beta$ 以约10ng/mL的浓度存在于所述培养基中。
- [0656] 32. 一种用于将去分化的T细胞分化为TREG细胞的方法,所述方法包括:
- [0657] 在包括IL-2和TGF- $\beta$ 的培养基中培养去分化的T细胞,其中所述去分化的T细胞表达RAPTOR和RICTOR的水平相对于对照T细胞降低至少10%;
- [0658] 以3:1的比率(珠:T细胞比率)添加抗CD3/抗CD28涂覆的磁珠;
- [0659] 将所述去分化的T细胞温育一定时间段以产生TREG细胞。
- [0660] 33. 根据实施例32所述的方法,其中所述培养基进一步包括培美曲塞。
- [0661] 34. 根据实施例32到33中任一项所述的方法,其中所述IL-2以约100IU/mL的浓度存在于所述培养基中。
- [0662] 35. 根据实施例32到34中任一项所述的方法,其中所述TGF- $\beta$ 以约10ng/mL的浓度存在于所述培养基中。
- [0663] 36. 根据实施例33所述的方法,其中所述培美曲塞以至多100nM的浓度存在于所述培养基中。
- [0664] 37. 根据实施例33所述的方法,其中所述培美曲塞以约10nM的浓度存在于所述培养基中。
- [0665] 38. 根据实施例36到37中任一项所述的方法,其中所述IL-2以约100IU/mL的浓度存在于所述培养基中。
- [0666] 39. 根据实施例36到38中任一项所述的方法,其中所述TGF- $\beta$ 以约10ng/mL的浓度存在于所述培养基中。

- [0667] 40. 根据实施例24到39中任一项所述的方法,其中所述培养基是补充有5% AB血清的X-Vivo 20培养基。
- [0668] 41. 根据实施例24到40中任一项所述的方法,其中所述时间段介于3天与40天之间。
- [0669] 42. 根据实施例1到41中任一项所述的方法,其中所述去分化的T细胞相对于对照T细胞群具有降低的RAPTOR和RICTOR表达。
- [0670] 43. 一种TREG细胞,其通过根据实施例1到22和24到42中任一项所述的方法产生。
- [0671] 44. 一种TREG细胞或杂交TREG/Th2细胞,其通过根据实施例1到22和24到42中任一项所述的方法产生,其中通过单采血液成分术收集的用于随后的T细胞培养的淋巴细胞是在稳态下或在用抗TNF- $\alpha$ 治疗剂进行受试者治疗后获得的,所述抗TNF- $\alpha$ 治疗剂在中和血清、无细胞形式的TNF- $\alpha$ 方面具有相当的选择性,所述抗TNF- $\alpha$ 治疗剂最显著地是重组受体分子依那西普或单克隆抗体阿达木单抗。
- [0672] 45. 一种TREG细胞或杂交TREG/Th2细胞,其通过根据实施例1到22和24到42中任一项所述的方法产生,其中通过流式细胞术,所述TREG细胞或杂交TREG/Th2细胞或其群相对于对照Th1/Tc1细胞具有至少一种以下分子的增加的表达:CD25、CD27、2B4、BTLA、CTLA4、TIGIT、TIM3、ICOS、LAIR1、OX40和其组合。
- [0673] 46. 一种TREG细胞或杂交TREG/Th2细胞,其通过根据实施例1到22和24到42中任一项所述的方法产生,其中所述TREG细胞或杂交TREG/Th2细胞或其群相对于对照Th1/Tc1细胞具有减少的炎性细胞因子分泌,所述炎性细胞因子包含IFN- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ 。
- [0674] 47. 一种TREG细胞或杂交TREG/Th2细胞,其通过根据实施例1到22和24到42中任一项所述的方法产生,其中所述TREG细胞或杂交TREG/Th2细胞或其群相对于对照Th1/Tc1细胞具有改变的T细胞命运转录因子表达,最显著地,TBET的减少和FOXP3的增加。
- [0675] 48. 一种TREG细胞或杂交TREG/Th2细胞,其通过根据实施例1到22和24到42中任一项所述的方法产生,其中所述TREG细胞或杂交TREG/Th2细胞或其群相对于对照Th1/Tc1细胞具有另外的表型性状,所述另外的表型性状包含:Th2细胞因子IL-4的分泌增加;以及Th2转录因子GATA3的表达增加。
- [0676] 49. 一种TREG或TREG/Th2细胞群,其具有至少5%的表达GATA3的CD4+或CD8+T细胞。
- [0677] 50. 一种TREG或TREG/Th2细胞群,其具有至少5%的表达FoxP3的CD4+或CD8+T细胞。
- [0678] 51. 一种TREG或TREG/Th2细胞群,其具有至少10%的表达CD73的CD4+或CD8+T细胞。
- [0679] 52. 一种TREG或TREG/Th2细胞群,其具有至少10%的表达CD103的CD4+或CD8+T细胞。
- [0680] 53. 一种TREG或TREG/Th2细胞群,其具有至少20%的表达CD150的CD4+或CD8+T细胞。
- [0681] 54. 一种TREG或TREG/Th2细胞群,其在以3:1的珠:T细胞比率使用抗CD3/抗CD28珠共刺激之后表达至少5pg/mL/ $1 \times 10^6$ 个细胞/天的IL-4。
- [0682] 55. 一种TREG或TREG/Th2细胞群,其在以3:1的珠:T细胞比率使用抗CD3/抗CD28珠

共刺激之后表达至少100pg/mL/1×10<sup>6</sup>个细胞/天的IL-2。

[0683] 56.一种TREG或TREG/Th2细胞群,其在以3:1的珠:T细胞比率使用抗CD3/抗CD28珠共刺激之后表达少于100pg/mL/1×10<sup>6</sup>个细胞/天的IFN- $\gamma$ 或GM-CSF。

[0684] 57.一种TREG或TREG/Th2细胞群,其在以3:1的珠:T细胞比率使用抗CD3/抗CD28珠共刺激之后表达少于100pg/mL/1×10<sup>6</sup>个细胞/天的TNF- $\alpha$ 或IL-17F。

[0685] 58.一种TREG或TREG/Th2细胞群,其具有以下性质中的一种或多种性质:

[0686] 如通过流式细胞术所测量的,CD25、CD27、2B4、BTLA、CTLA4、TIGIT、TIM3、ICOS、LAIR1、OX40和其组合中的一个或多个的表达相对于对照Th1/Tc1细胞增加至少10%;

[0687] IFN- $\gamma$ 的分泌相对于对照Th1/Tc1细胞减少至少10%;

[0688] TNF- $\alpha$ 的分泌相对于对照Th1/Tc1细胞减少至少10%;

[0689] TBET的表达相对于对照Th1/Tc1细胞减少至少10%;

[0690] FOXP3的表达相对于对照Th1/Tc1细胞增加至少10%;

[0691] 如通过流式细胞术所测量的,至少5%的CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>T细胞表达GATA3;

[0692] 如通过流式细胞术所测量的,至少5%的CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>T细胞表达FOXP3;

[0693] 如通过流式细胞术所测量的,至少5%的CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>T细胞表达CD73;

[0694] 如通过流式细胞术所测量的,至少5%的CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>T细胞表达CD103;

[0695] 如通过流式细胞术所测量的,至少5%的CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>T细胞表达FOXP3和GATA3两者;

[0696] 如通过流式细胞术所测量的,至少20%的CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>T细胞表达CD150;

[0697] 相对于以产生T<sub>REG</sub>或T<sub>REG</sub>/Th2细胞群的T细胞为特性的T细胞群,GATA3、FoxP3、CD73、CD103和CD150中的一种或多种的表达增加至少50%;

[0698] 在以3:1的珠:T细胞比率使用抗CD3/抗CD28珠共刺激之后,分泌至少5pg/mL/1×10<sup>6</sup>个细胞/天的IL-4;

[0699] 在以3:1的珠:T细胞比率使用抗CD3/抗CD28珠共刺激之后,分泌至少100pg/mL/1×10<sup>6</sup>个细胞/天的IL-2;

[0700] 在以3:1的珠:T细胞比率使用抗CD3/抗CD28珠共刺激之后,分泌少于100pg/mL/1×10<sup>6</sup>个细胞/天的IFN- $\gamma$ ;

[0701] 在以3:1的珠:T细胞比率使用抗CD3/抗CD28珠共刺激之后,分泌少于100pg/mL/1×10<sup>6</sup>个细胞/天的GM-CSF;

[0702] 在以3:1的珠:T细胞比率使用抗CD3/抗CD28珠共刺激之后,分泌少于10pg/mL/1×10<sup>6</sup>个细胞/天的TNF- $\alpha$ ;

[0703] 在以3:1的珠:T细胞比率使用抗CD3/抗CD28珠共刺激之后,分泌少于10pg/mL/1×10<sup>6</sup>个细胞/天的IL-17;以及

[0704] 其组合。

[0705] 59.一种TREG或TREG/Th2细胞,其具有以下性质中的一种或多种性质:

[0706] 如通过流式细胞术所测量的,CD25、CD27、2B4、BTLA、CTLA4、TIGIT、TIM3、ICOS、LAIR1、OX40和其组合中的一个或多个的表达相对于对照Th1/Tc1细胞增加至少10%;

[0707] IFN- $\gamma$ 的分泌相对于对照Th1/Tc1细胞减少至少10%;

[0708] TNF- $\alpha$ 的分泌相对于对照Th1/Tc1细胞减少至少10%;

[0709] TBET的表达相对于对照Th1/Tc1细胞减少至少10%;

- [0710] FOXP3的表达相对于对照Th1/Tc1细胞增加至少10%；
- [0711] 在以3:1的珠:T细胞比率使用抗CD3/抗CD28珠共刺激之后,分泌至少5pg/mL/ $1 \times 10^6$ 个细胞/天的IL-4；
- [0712] 在以3:1的珠:T细胞比率使用抗CD3/抗CD28珠共刺激之后,分泌至少100pg/mL/ $1 \times 10^6$ 个细胞/天的IL-2；
- [0713] 在以3:1的珠:T细胞比率使用抗CD3/抗CD28珠共刺激之后,分泌少于100pg/mL/ $1 \times 10^6$ 个细胞/天的IFN- $\gamma$ ；
- [0714] 在以3:1的珠:T细胞比率使用抗CD3/抗CD28珠共刺激之后,分泌少于100pg/mL/ $1 \times 10^6$ 个细胞/天的GM-CSF；
- [0715] 在以3:1的珠:T细胞比率使用抗CD3/抗CD28珠共刺激之后,分泌少于10pg/mL/ $1 \times 10^6$ 个细胞/天的TNF- $\alpha$ ；
- [0716] 在以3:1的珠:T细胞比率使用抗CD3/抗CD28珠共刺激之后,分泌少于10pg/mL/ $1 \times 10^6$ 个细胞/天的IL-17；
- [0717] 表达GATA3、FOXP3、CD73和CD103；以及
- [0718] 其组合。
- [0719] 60. 根据权利要求1到41中任一项所述的方法,其中所述去分化的T细胞具有以下性质中的一种或多种性质:
- [0720] 相对于在没有替西罗莫司、维生素D和IL-2信号传导抑制剂的情况下于相同的条件下温育的对照T细胞群,颗粒酶B、IL-10和IFN- $\gamma$ 中的一种或多种的mRNA表达减少至少10%,并且更优选地减少50%；
- [0721] 相对于在没有替西罗莫司、维生素D和IL-2信号传导抑制剂的情况下于相同的条件下温育的对照T细胞群,Nanog、KLF4、KLF10和CD127中的一种或多种的mRNA表达增加至少10%,并且更优选地增加50%；
- [0722] 相对于在没有替西罗莫司、维生素D和IL-2信号传导抑制剂的情况下于相同的条件下温育的对照T细胞群,T-Bet和STAT1中的一种或多种的mRNA表达减少至少10%,并且更优选地减少50%；
- [0723] HIF-1- $\alpha$ 表达在没有替西罗莫司、维生素D和IL-2信号传导抑制剂的情况下于相同的条件下温育的对照T细胞群的约20%之内；
- [0724] 相对于在没有替西罗莫司、维生素D和IL-2信号传导抑制剂的情况下于相同的条件下温育的对照T细胞群,p62表达增加至少10%,并且更优选地增加50%；
- [0725] 相对于在没有替西罗莫司、IL-2信号传导抑制剂和维生素D的情况下于与所述培养物输入细胞群相同的条件下制造的对照T细胞群,RAPTOR或RICTOR的表达水平减少至少50%,并且更优选地减少90%；
- [0726] 相对于在没有替西罗莫司、IL-2信号传导抑制剂和维生素D的情况下于与所述培养物输入细胞群相同的条件下制造的对照T细胞群,通过管家蛋白归一化的RAPTOR或RICTOR的表达水平减少至少50%,并且更优选地减少90%；以及
- [0727] 其组合。
- [0728] 61. 根据权利要求1到41中任一项所述的方法,其中所述去分化的T细胞具有以下性质中的一种或多种性质:

[0729] 相对于在没有替西罗莫司、维生素D和IL-2信号传导抑制剂的情况下于相同的条件下温育的对照T细胞,颗粒酶B、IL-10和IFN- $\gamma$ 中的一种或多种的mRNA表达减少至少10%,并且更优选地减少50%;

[0730] 相对于在没有替西罗莫司、维生素D和IL-2信号传导抑制剂的情况下于相同的条件下温育的对照T细胞,Nanog、KLF4、KLF10和CD127中的一种或多种的mRNA表达增加至少10%,并且更优选地增加50%;

[0731] 相对于在没有替西罗莫司、维生素D和IL-2信号传导抑制剂的情况下于相同的条件下温育的对照T细胞,T-Bet和STAT1中的一种或多种的mRNA表达减少至少10%,并且更优选地减少50%;

[0732] HIF-1- $\alpha$ 表达在没有替西罗莫司、维生素D和IL-2信号传导抑制剂的情况下于相同的条件下温育的对照T细胞的约20%之内;

[0733] 相对于在没有替西罗莫司、维生素D和IL-2信号传导抑制剂的情况下于相同的条件下温育的对照T细胞群,p62表达增加至少10%,并且更优选地增加50%;

[0734] 相对于在没有替西罗莫司、IL-2信号传导抑制剂和维生素D的情况下于与所述培养物输入细胞群相同的条件下制造的对照T细胞,RAPTOR或RICTOR的表达水平减少至少50%,并且更优选地减少90%;

[0735] 相对于在没有替西罗莫司、IL-2信号传导抑制剂和维生素D的情况下于与所述培养物输入细胞群相同的条件下制造的对照T细胞,通过管家蛋白归一化的RAPTOR或RICTOR的表达水平减少至少50%,并且更优选地减少90%;以及

[0736] 其组合。

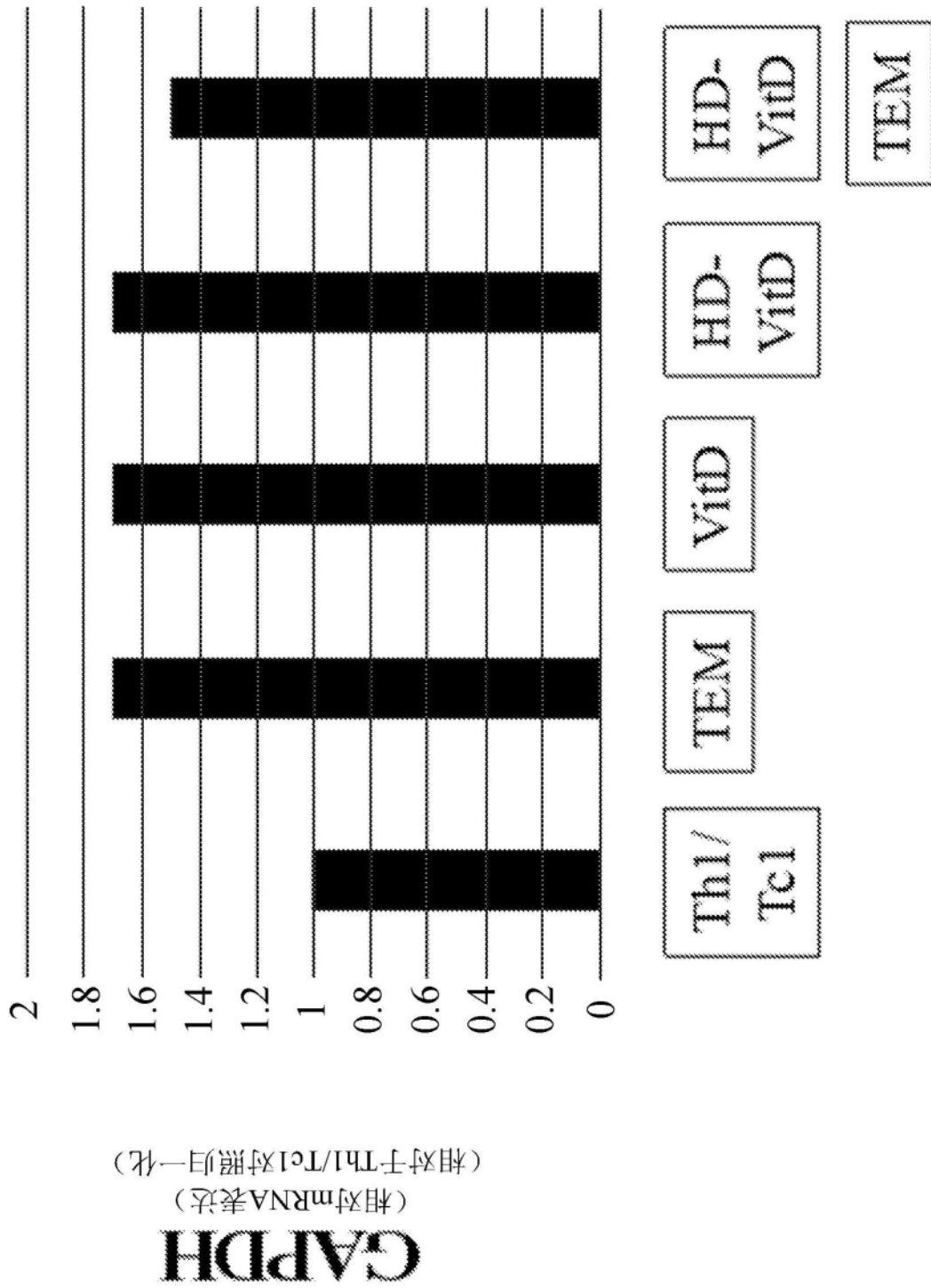


图1A

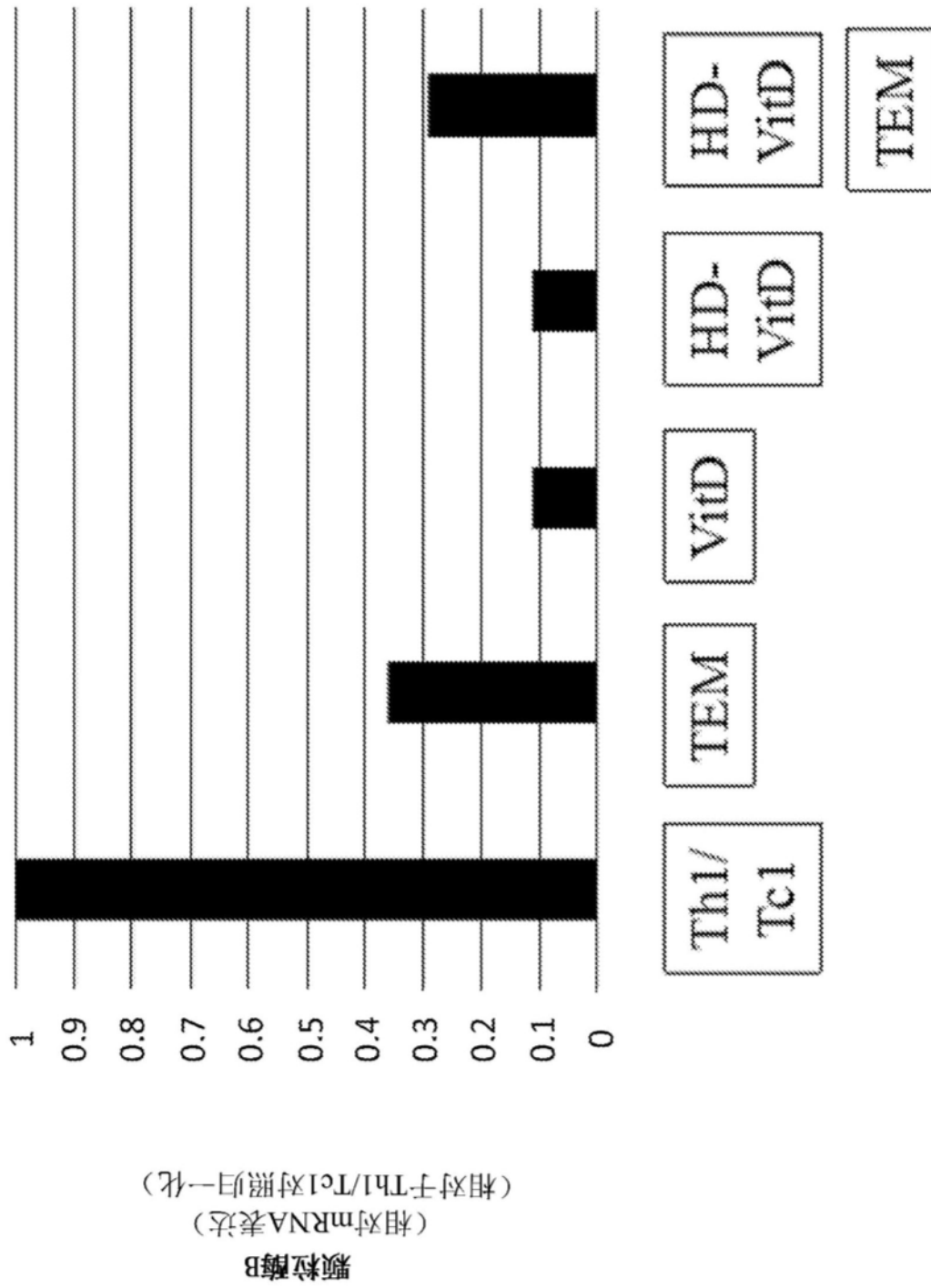


图1B

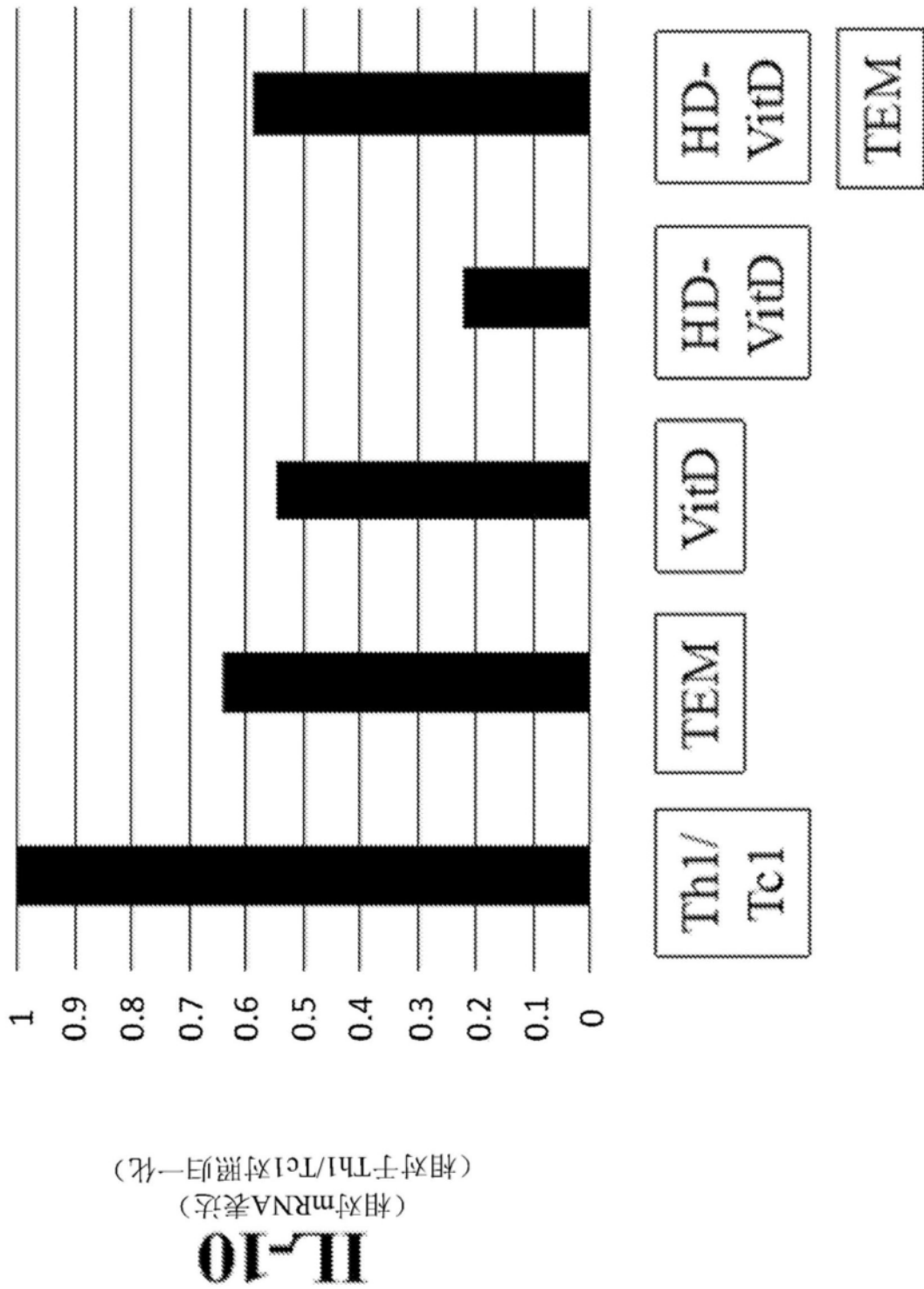


图1C

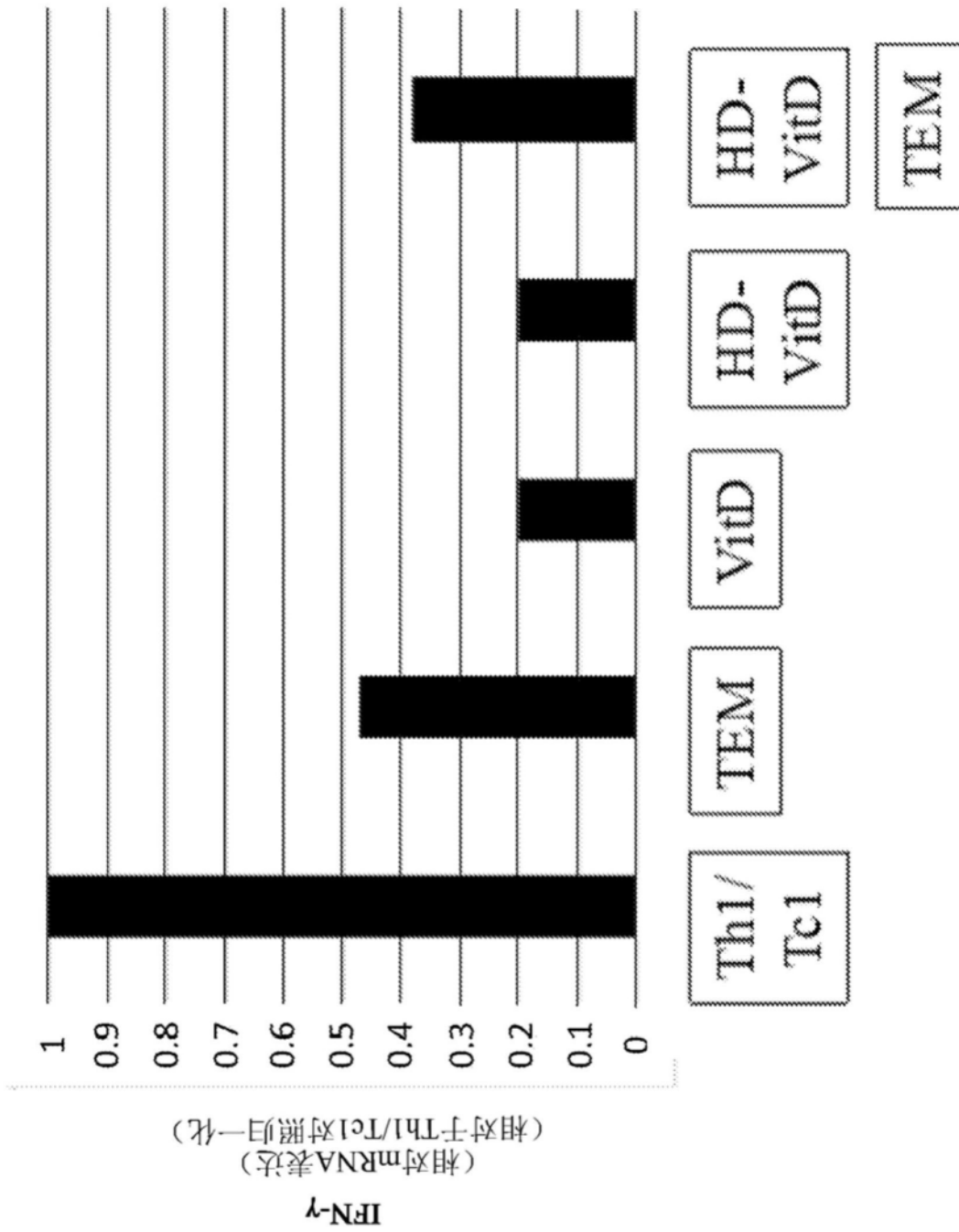


图1D

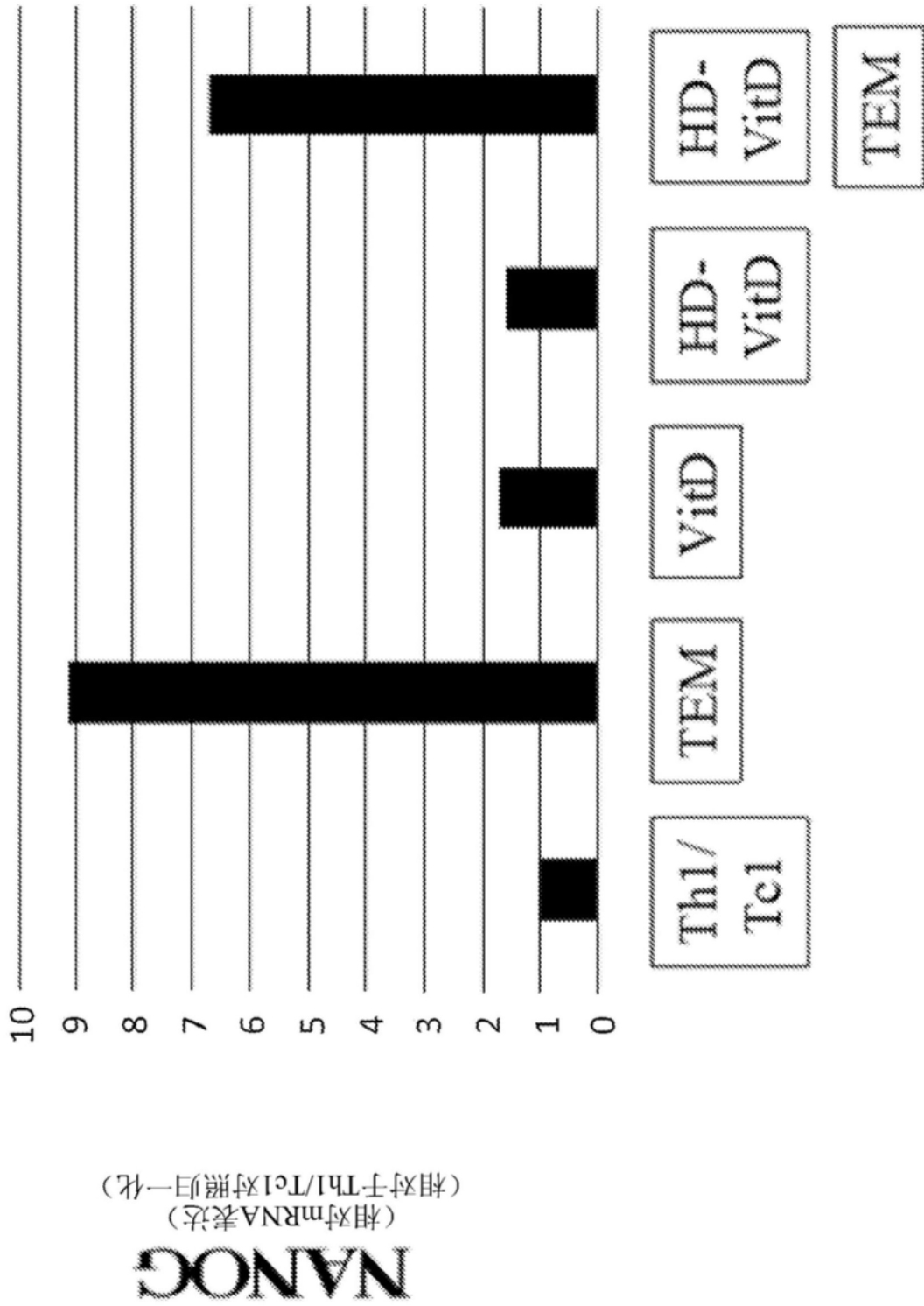


图2A

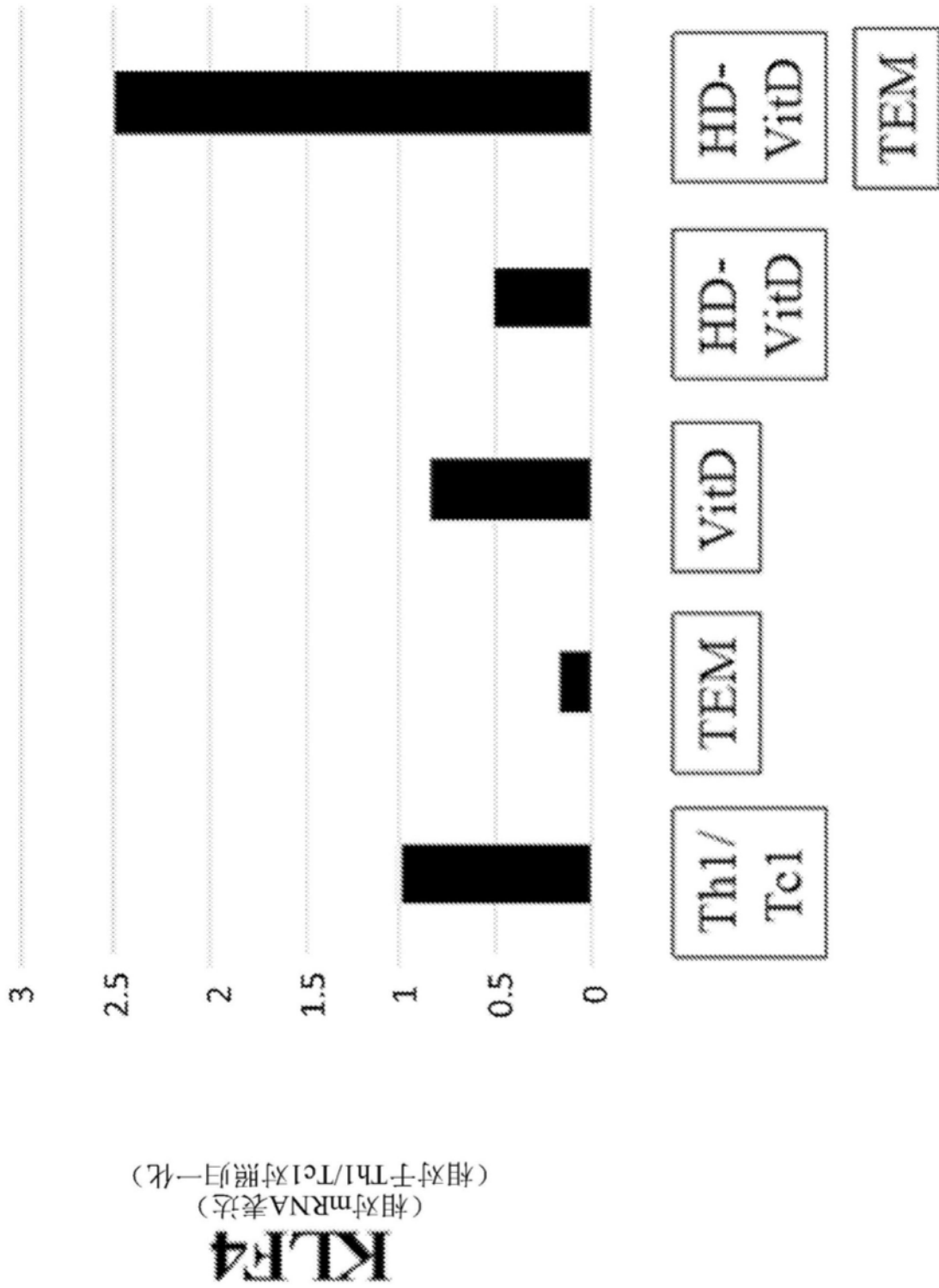


图2B

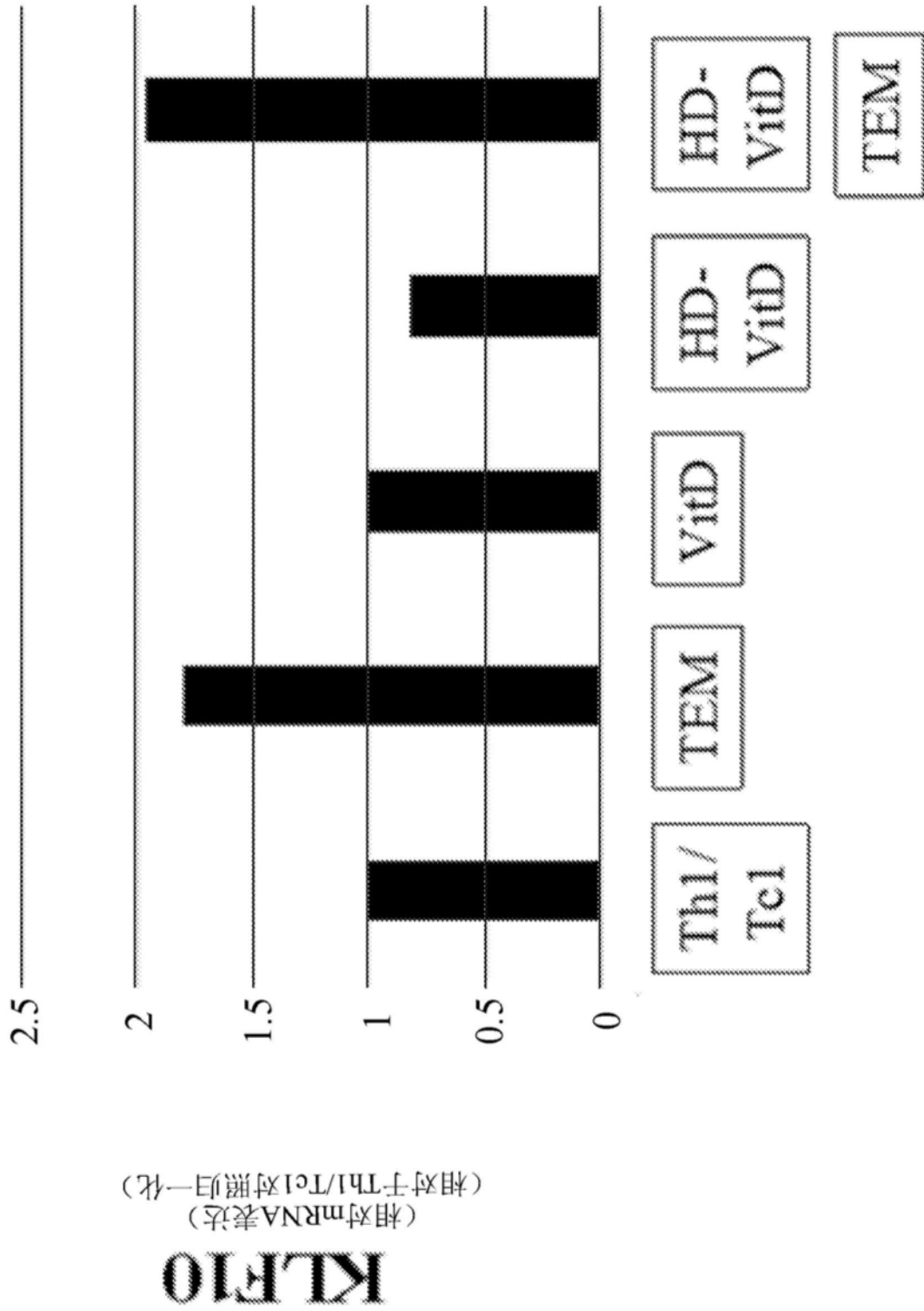


图2C

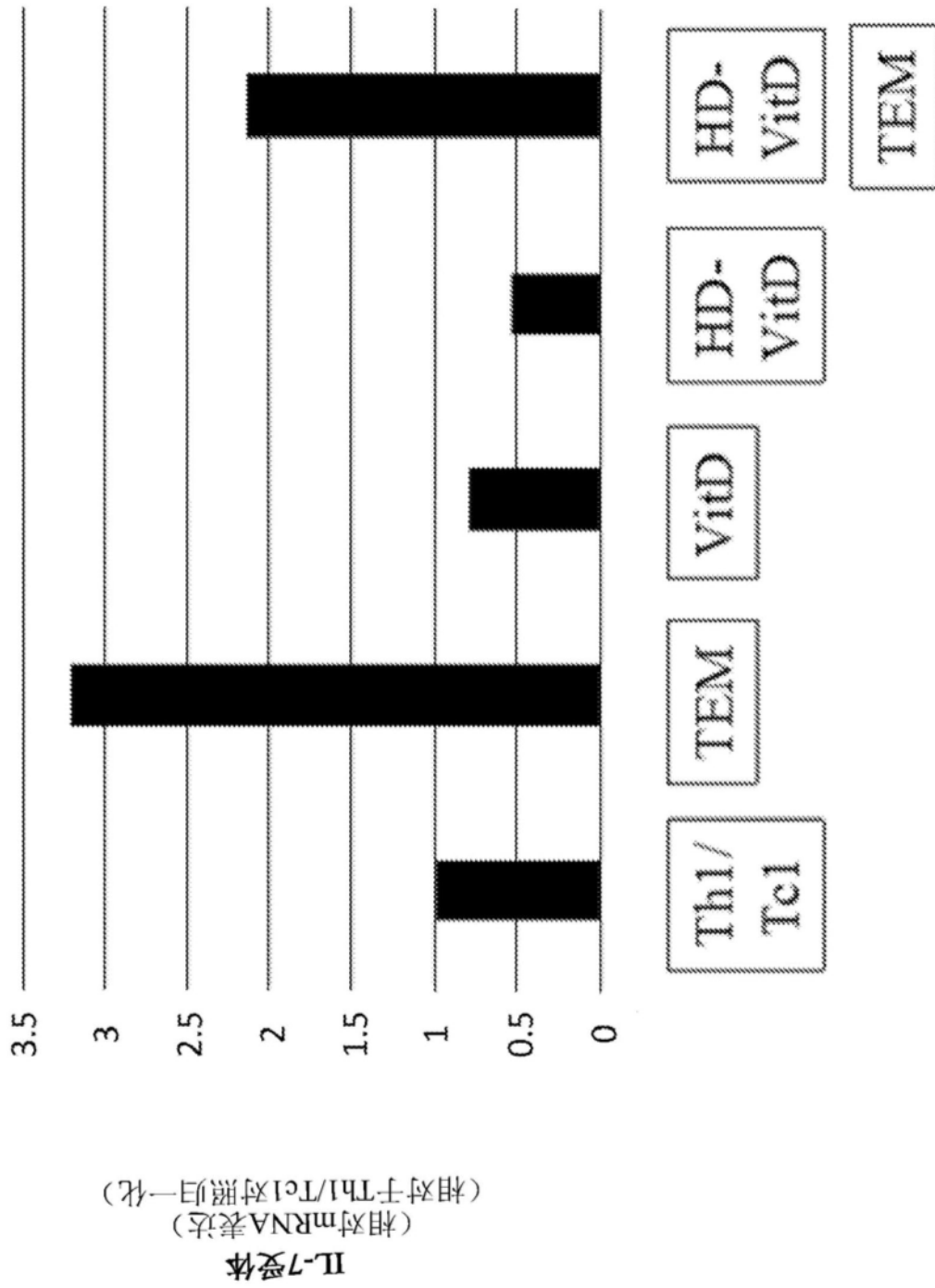


图2D

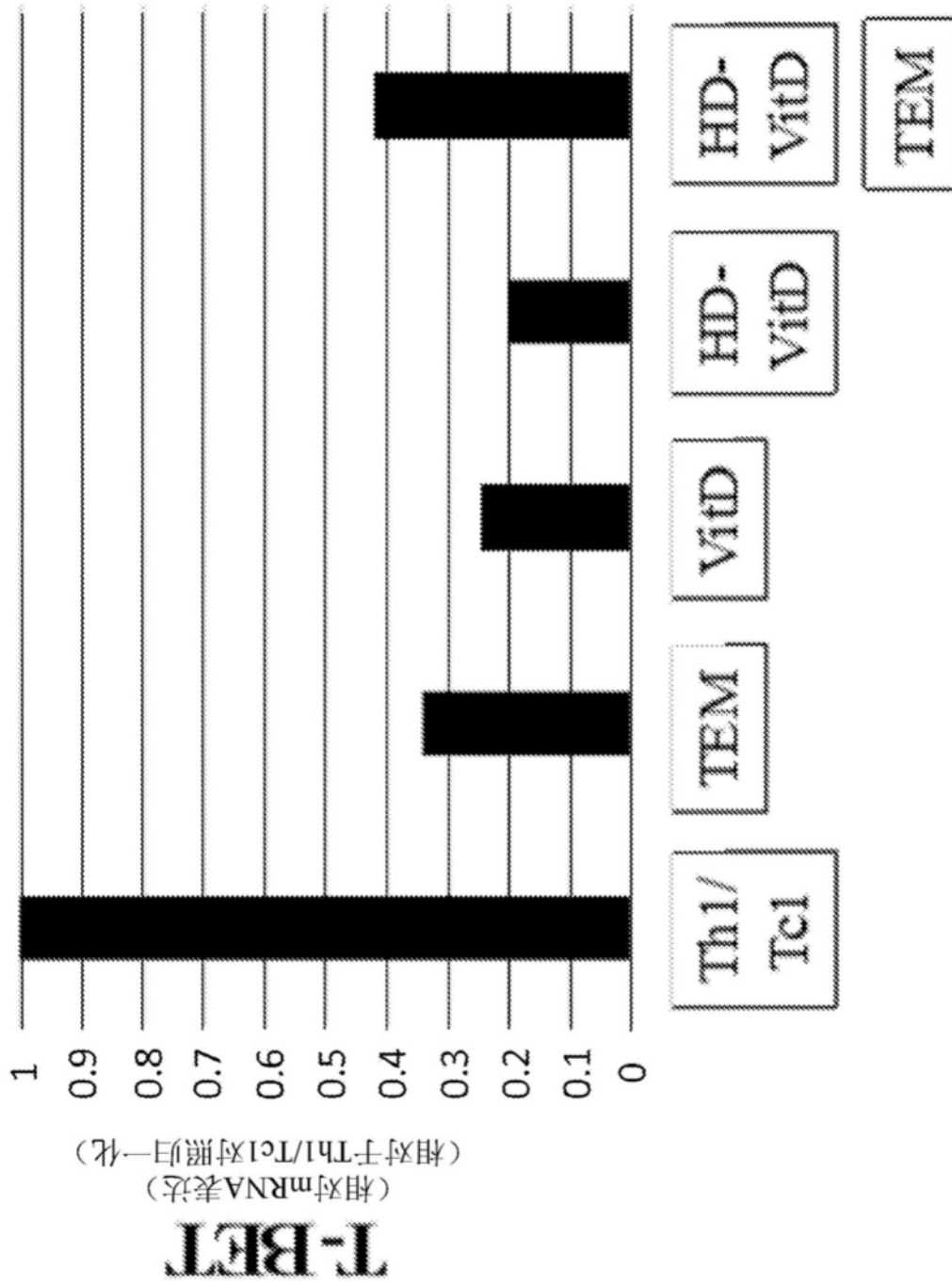


图3A

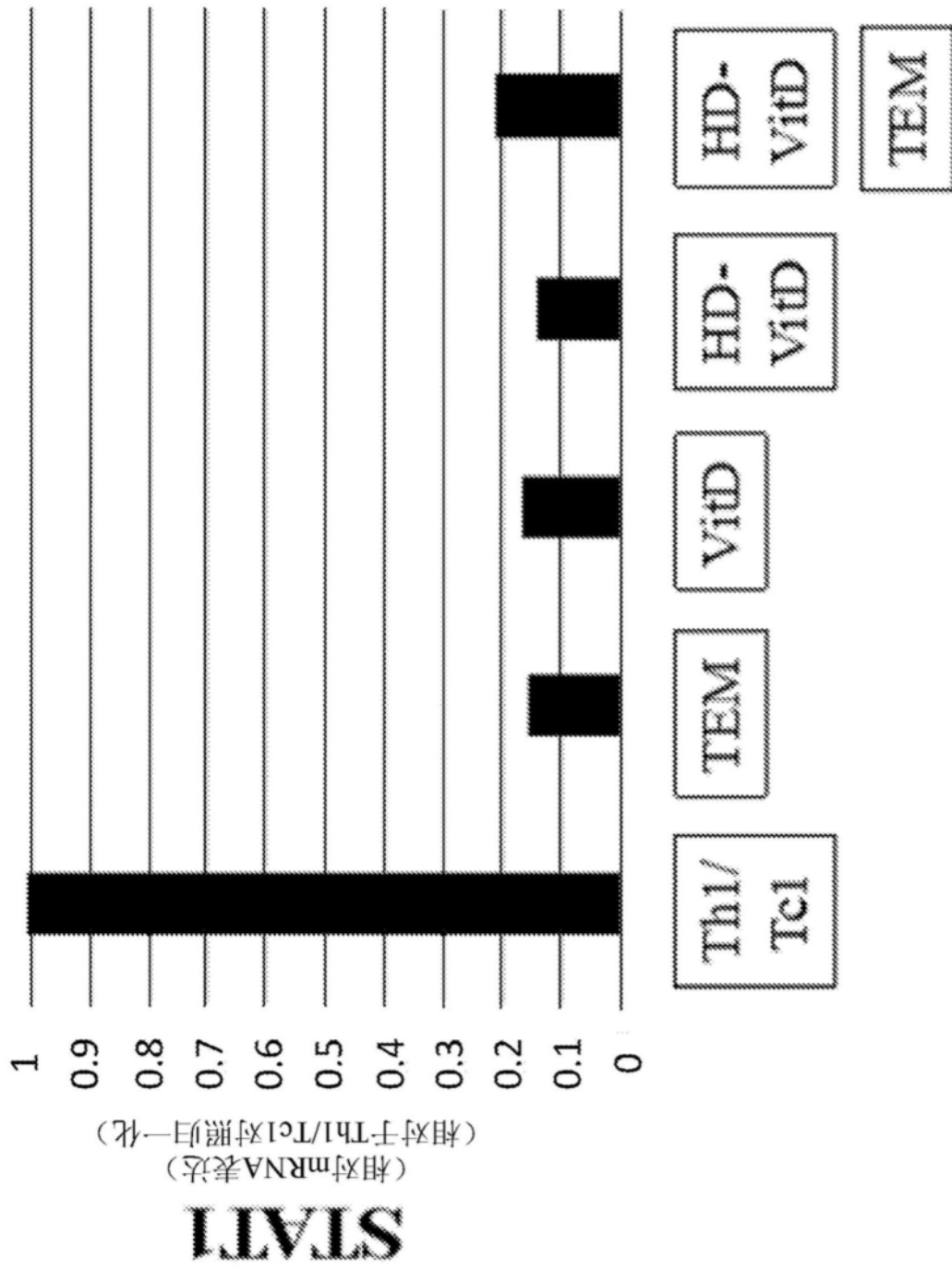


图3B

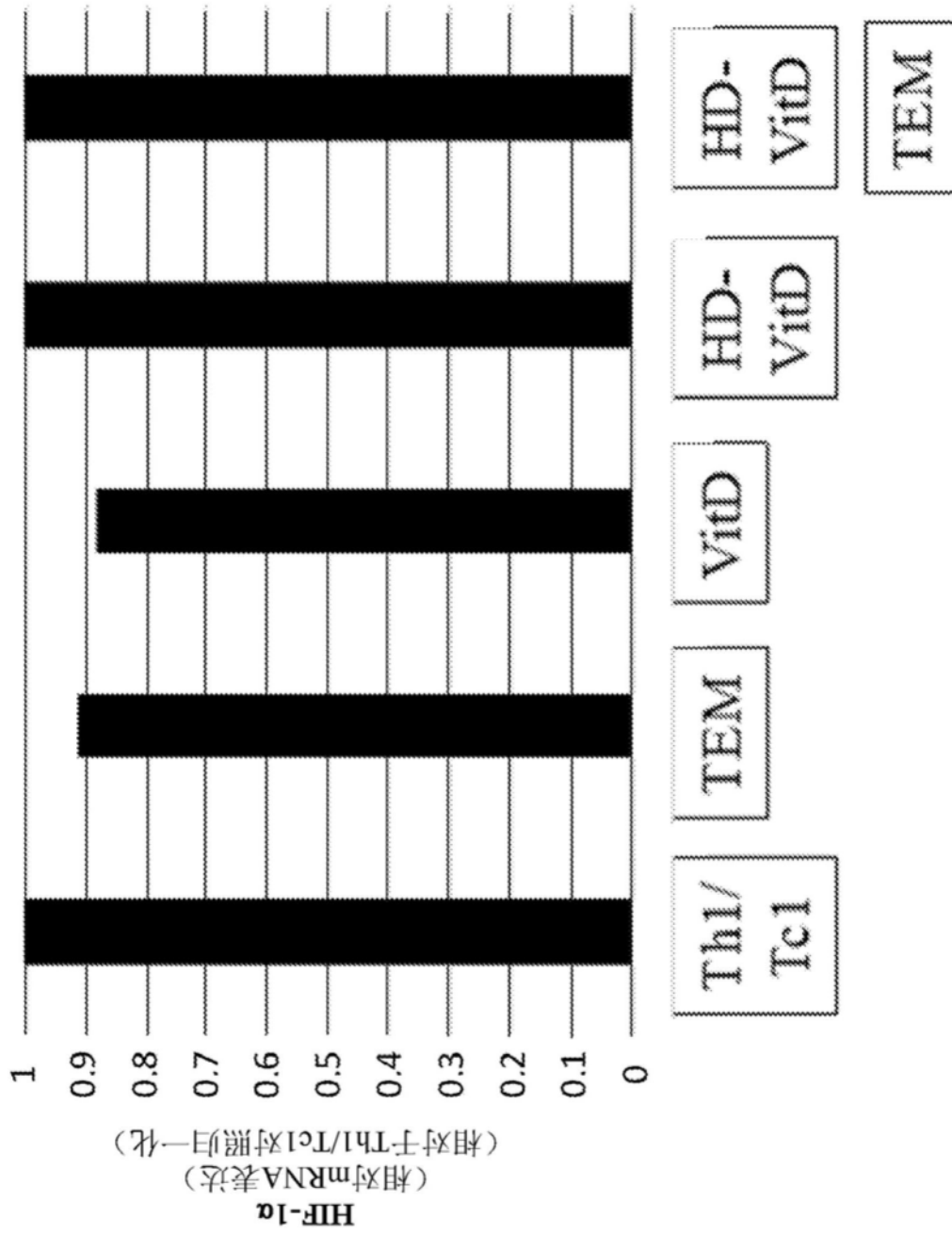


图3C

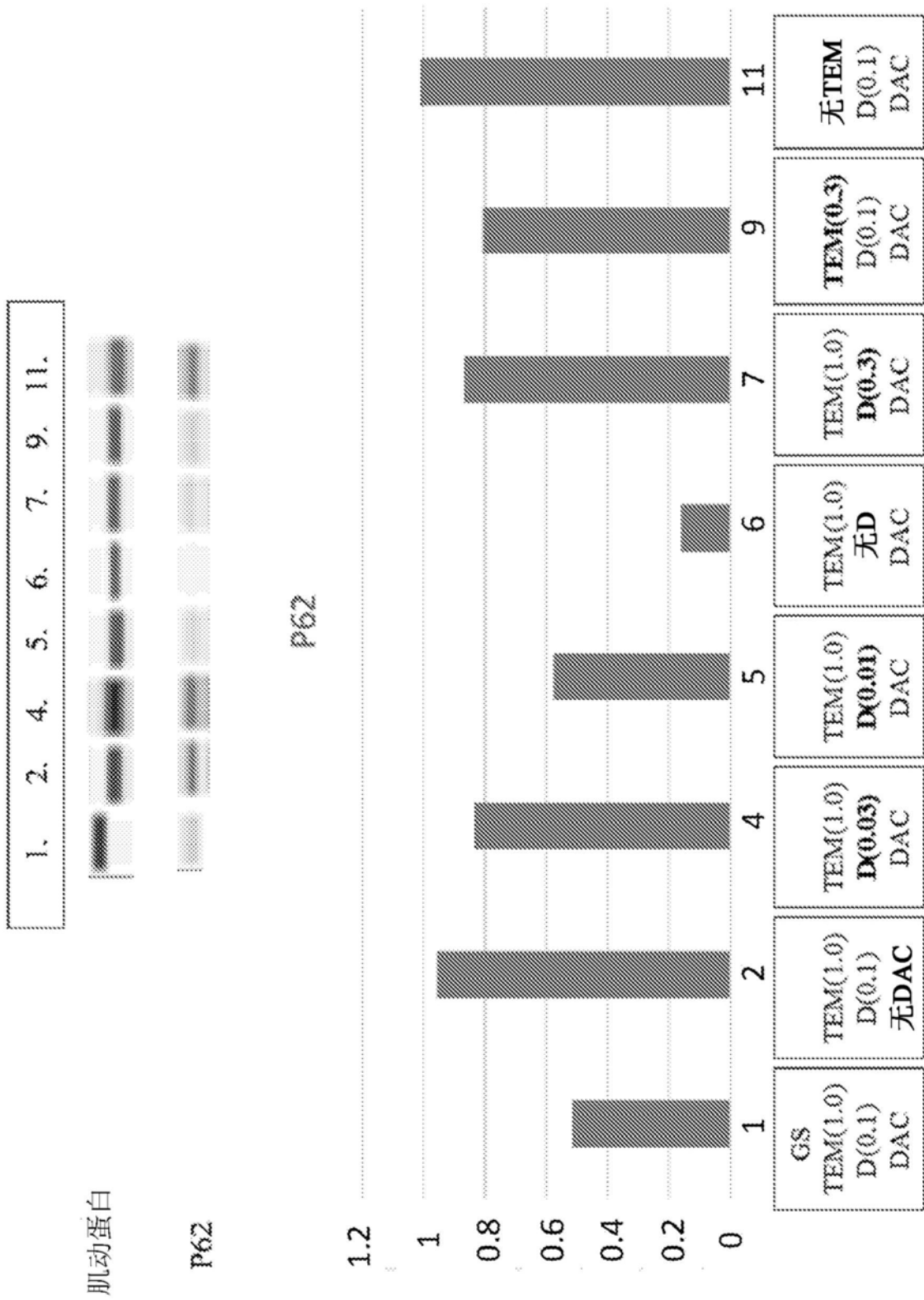


图4

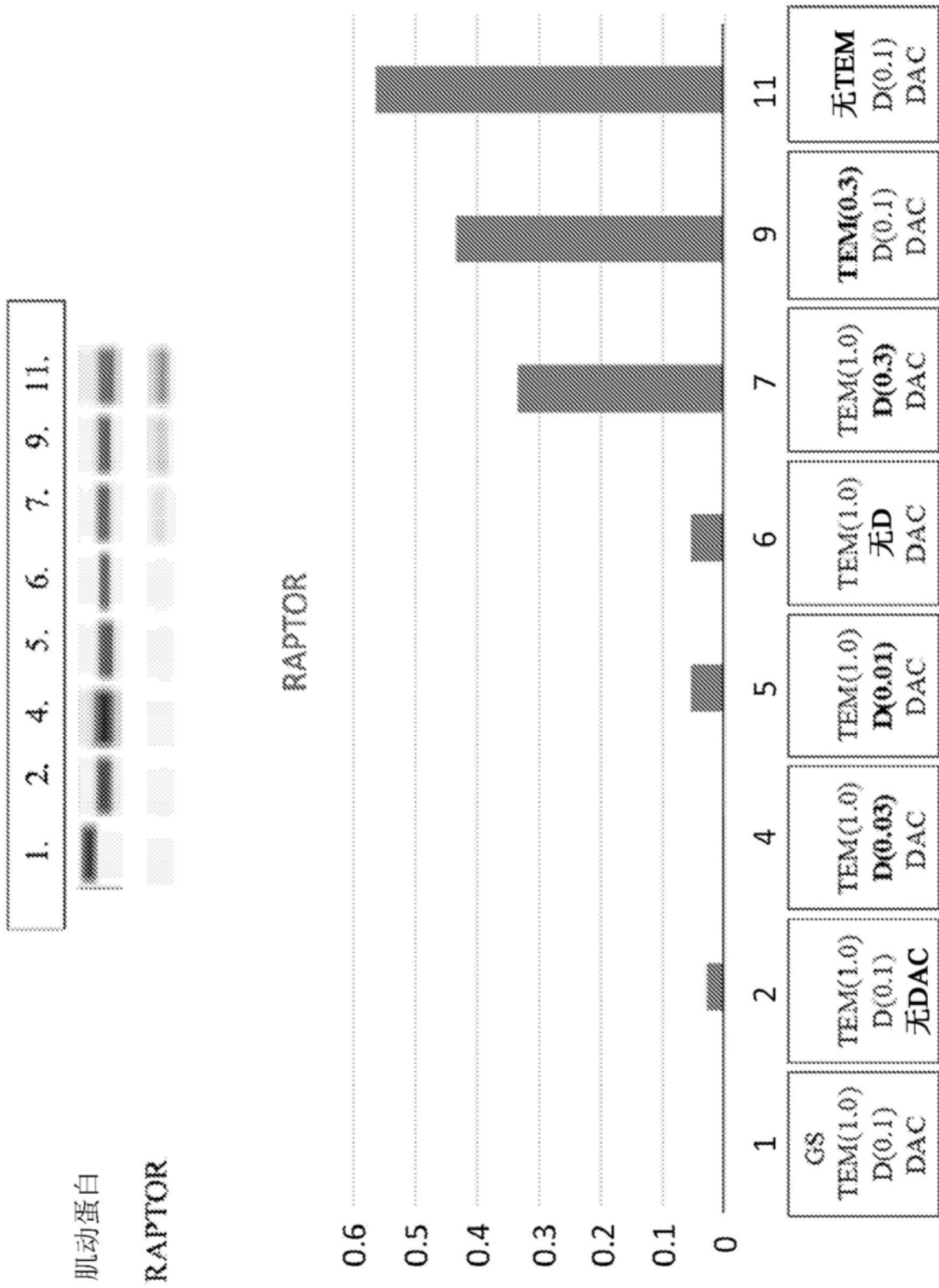


图5

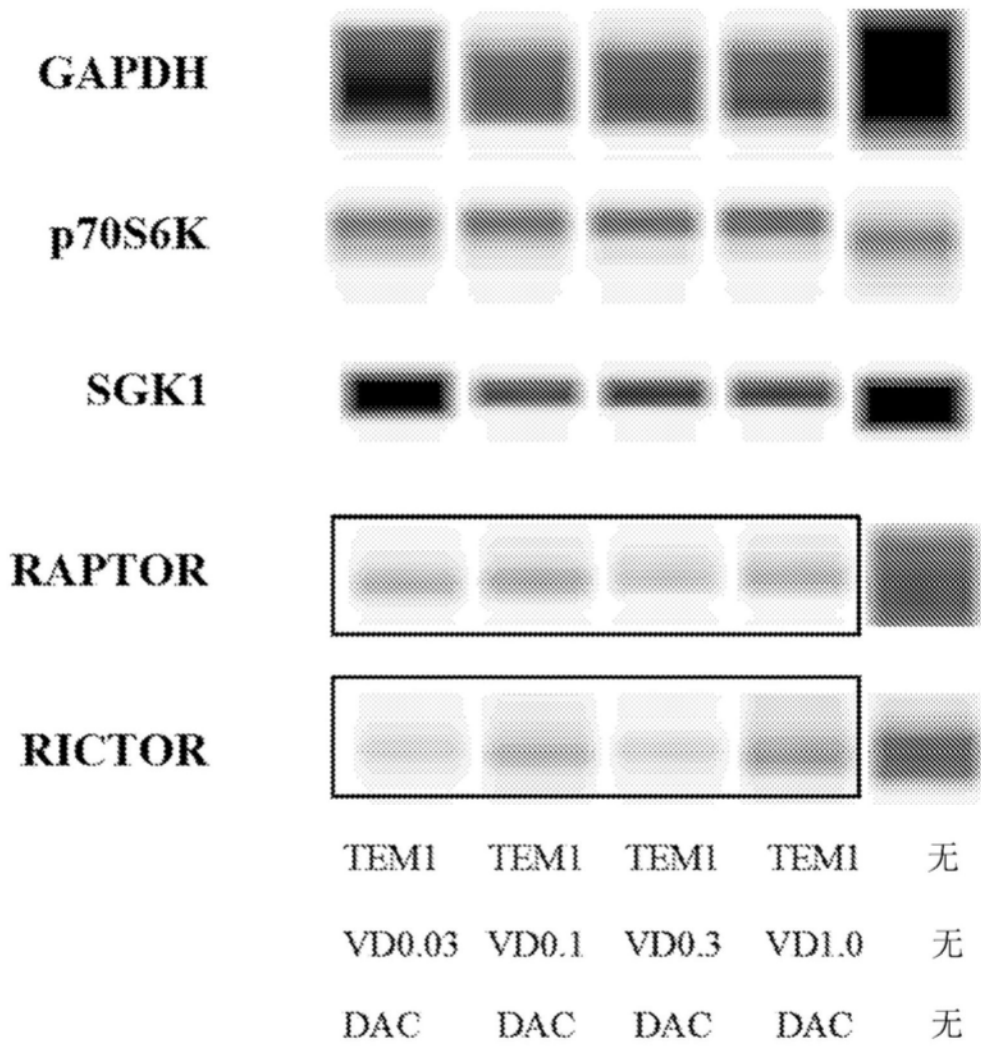


图6

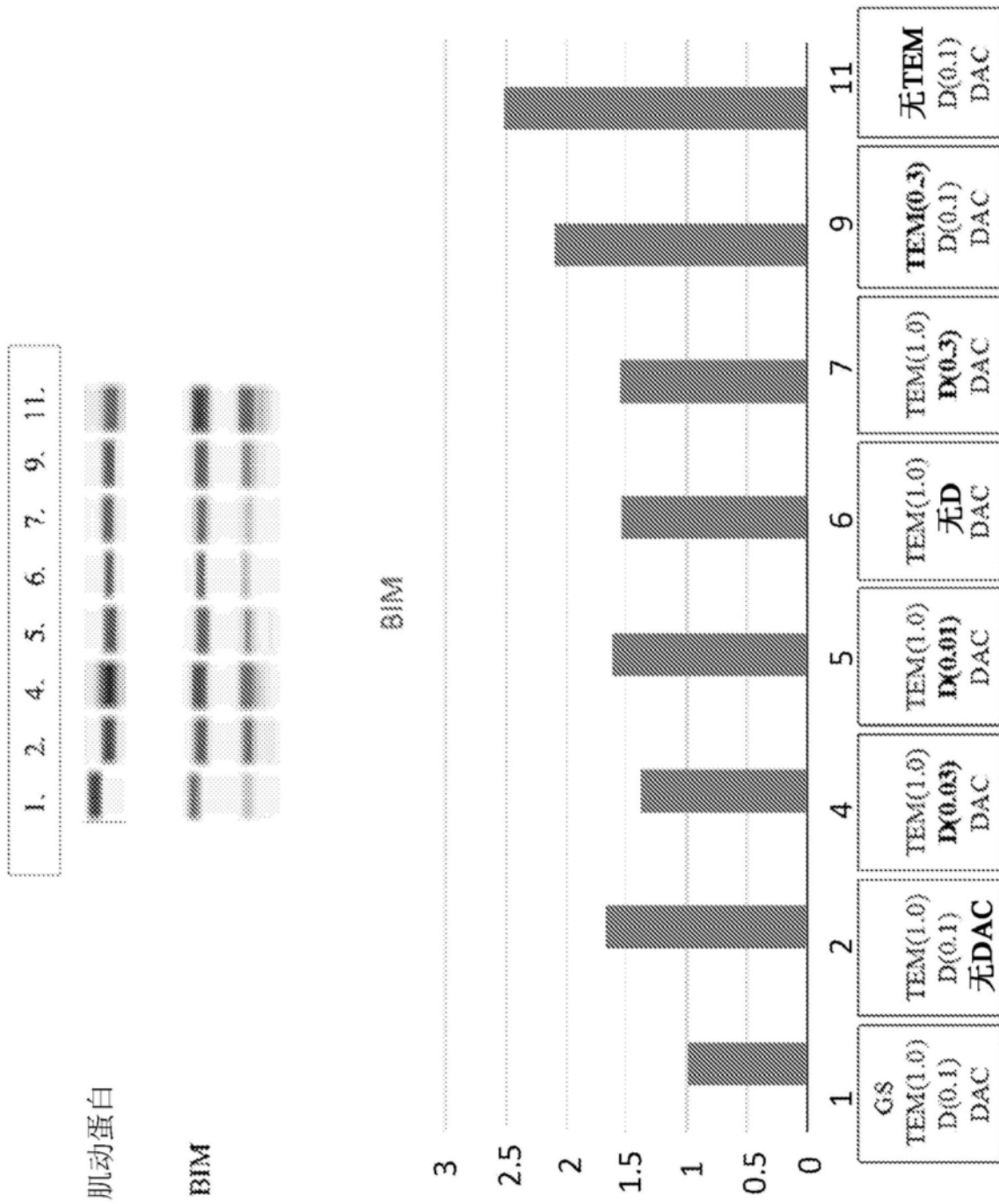


图7

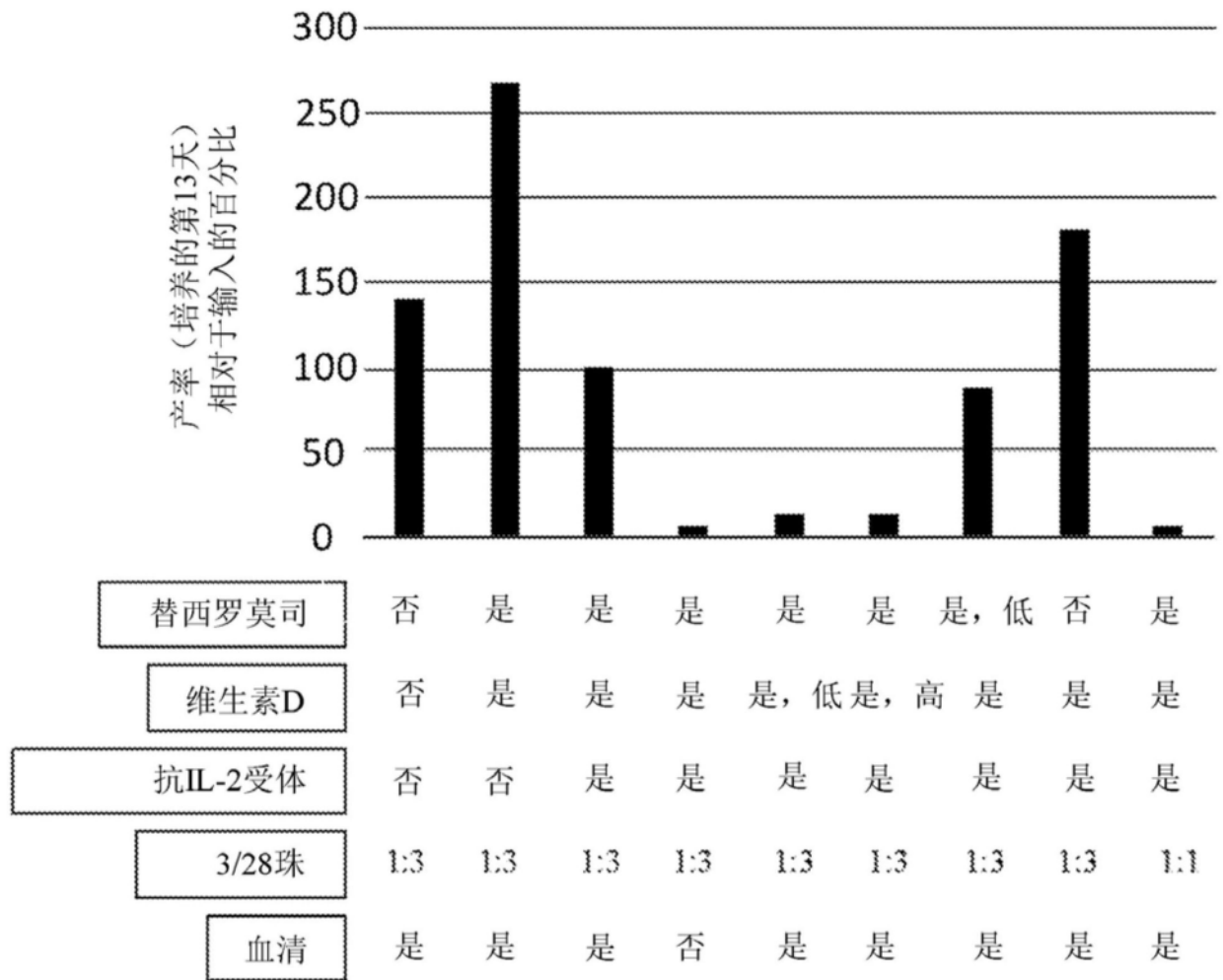


图8



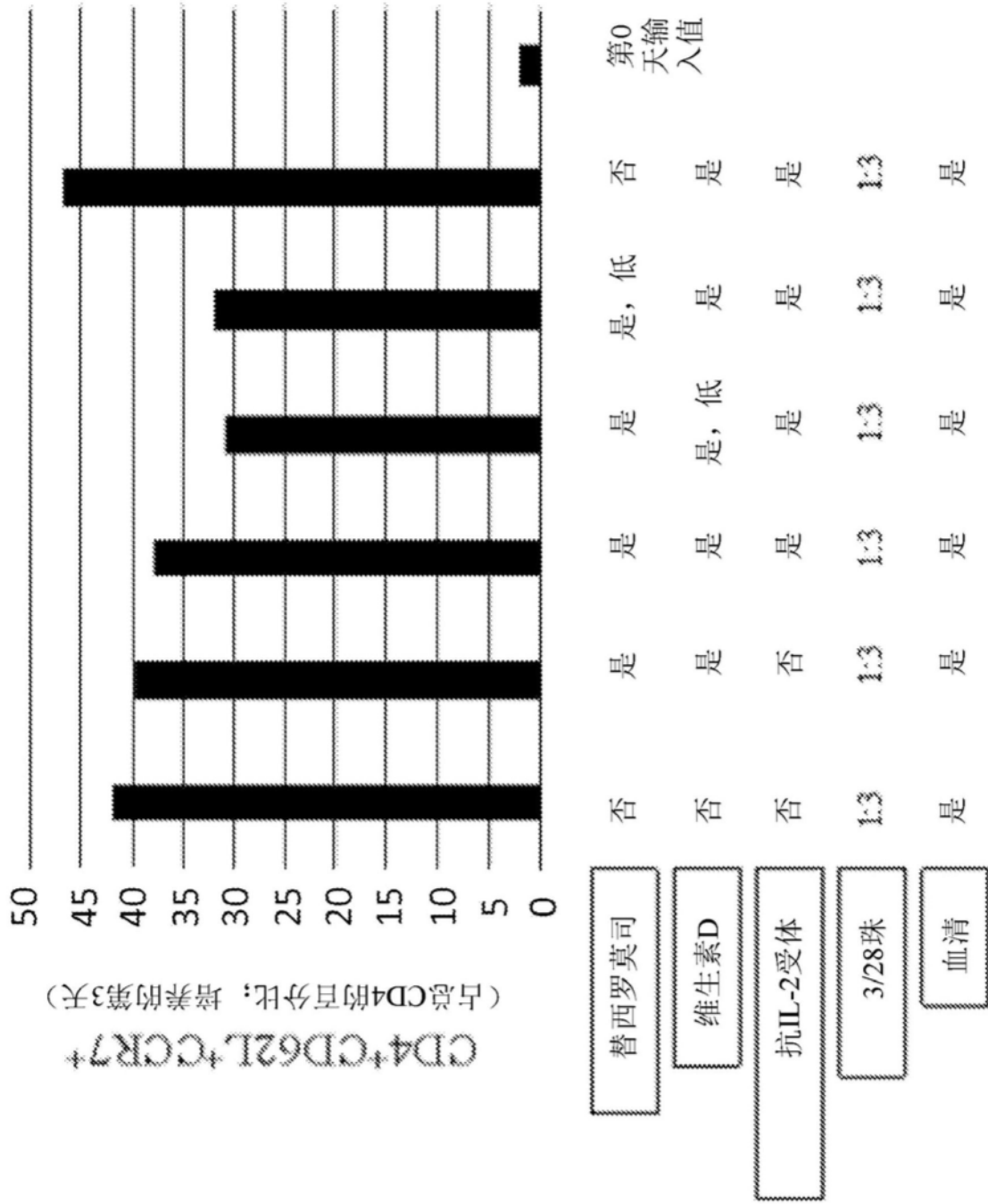


图9B

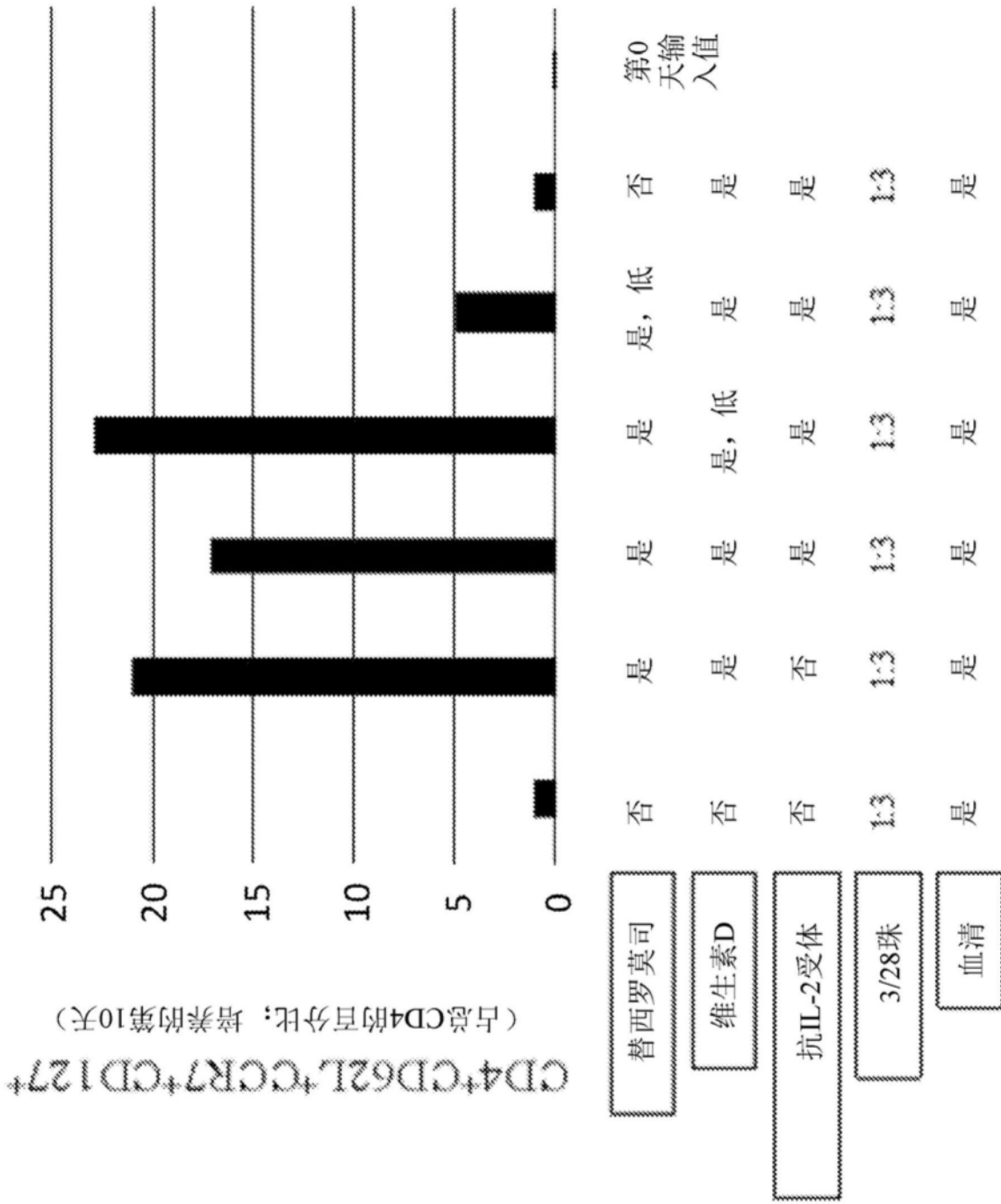


图9C

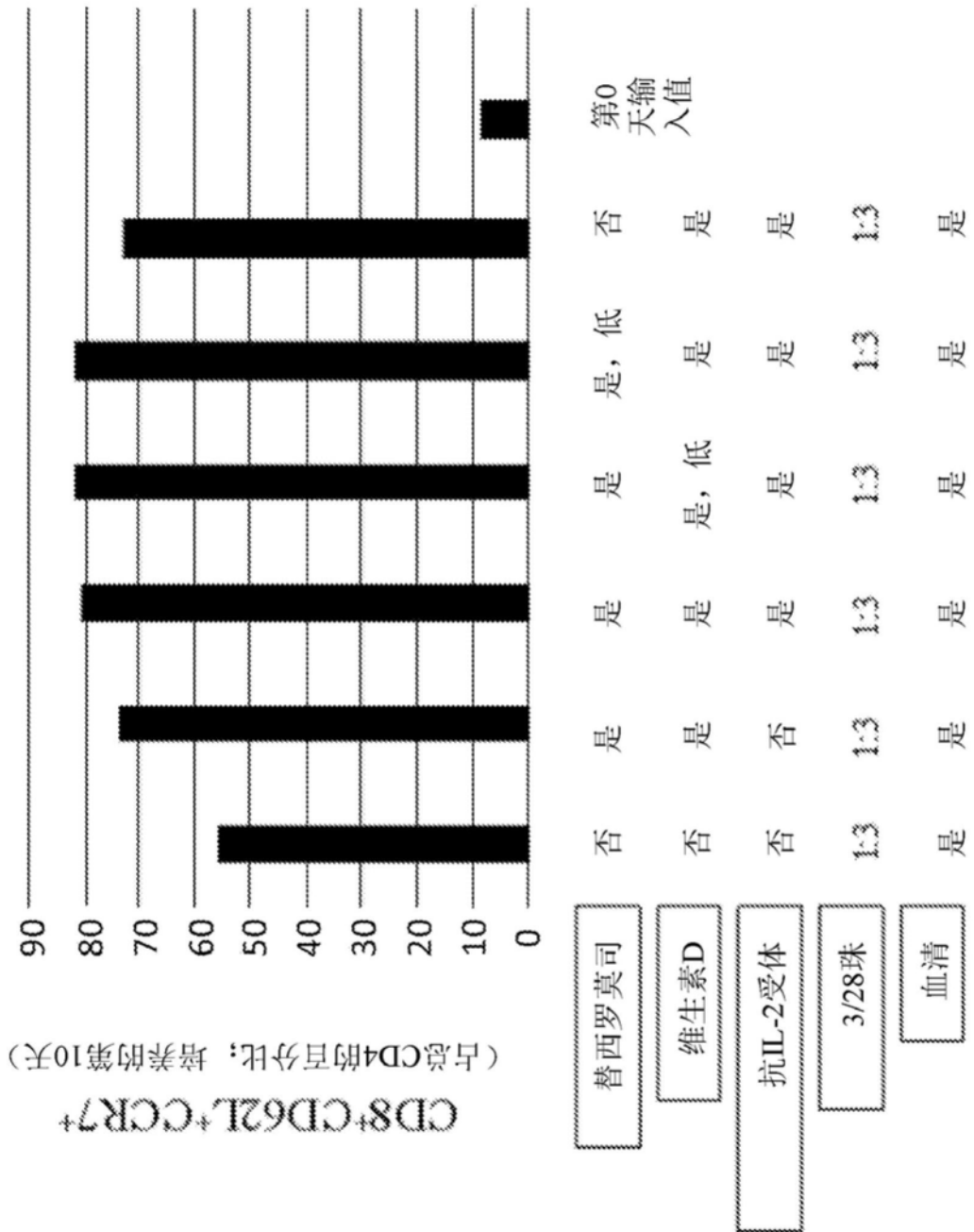


图10A

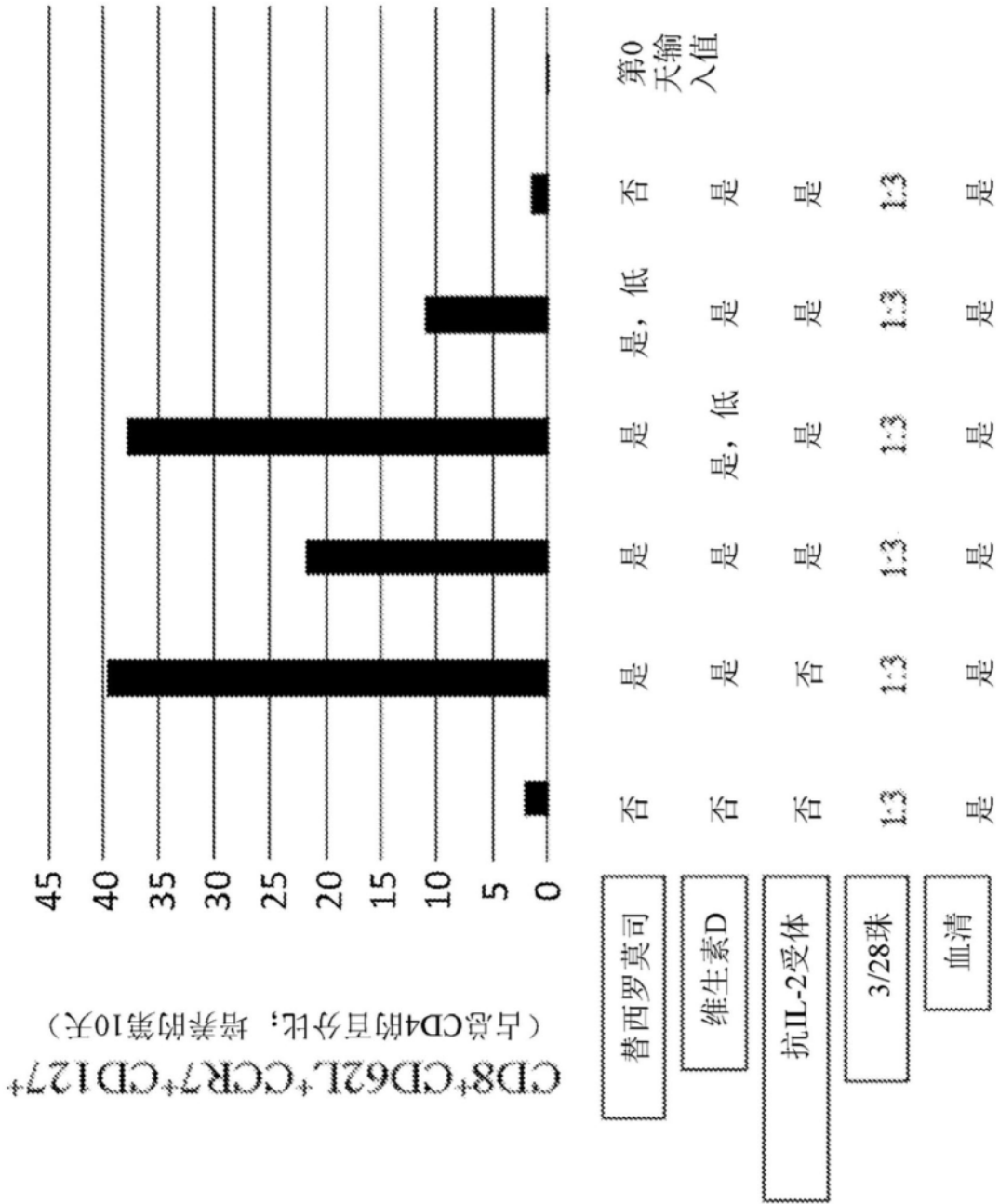


图10B

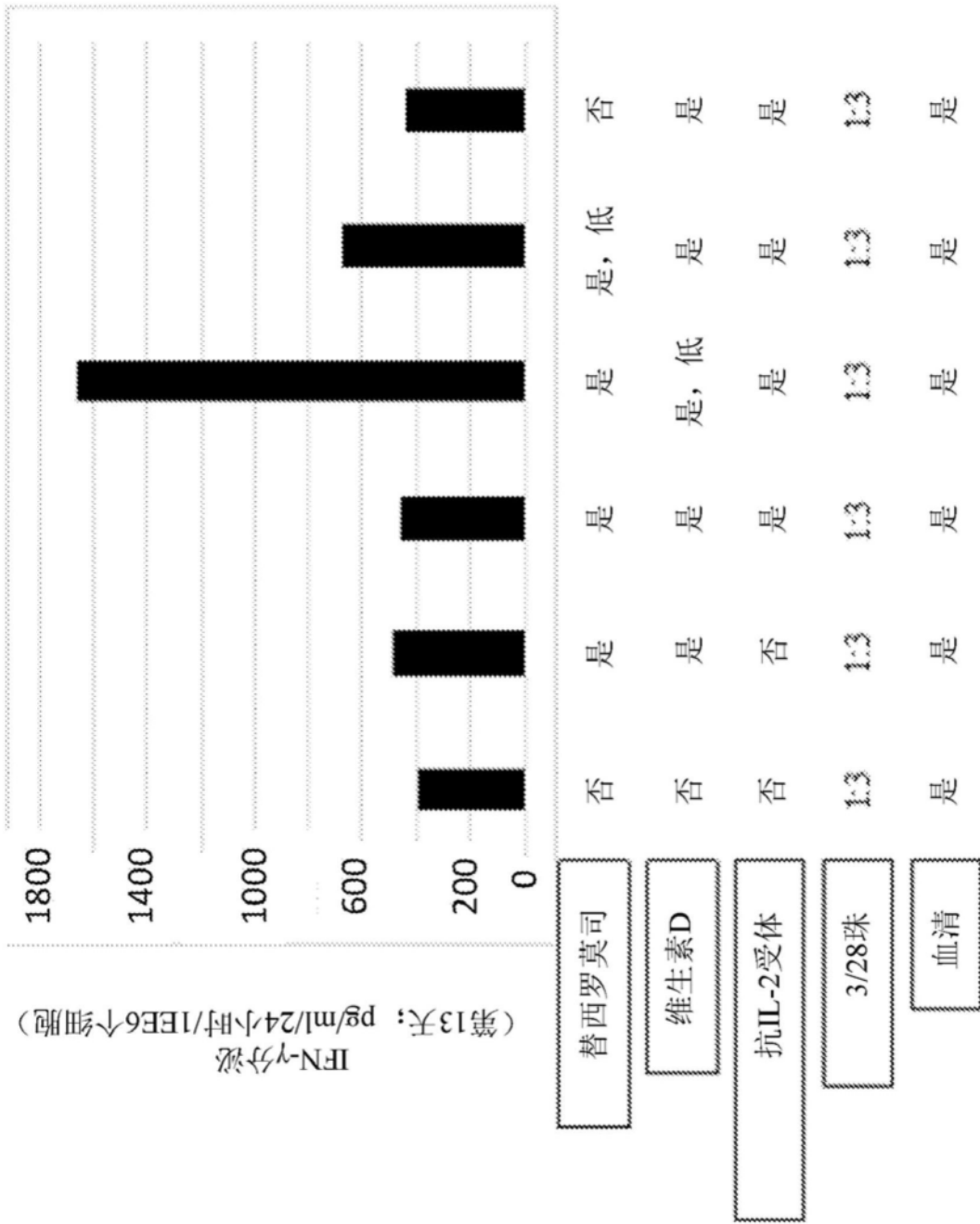


图11A





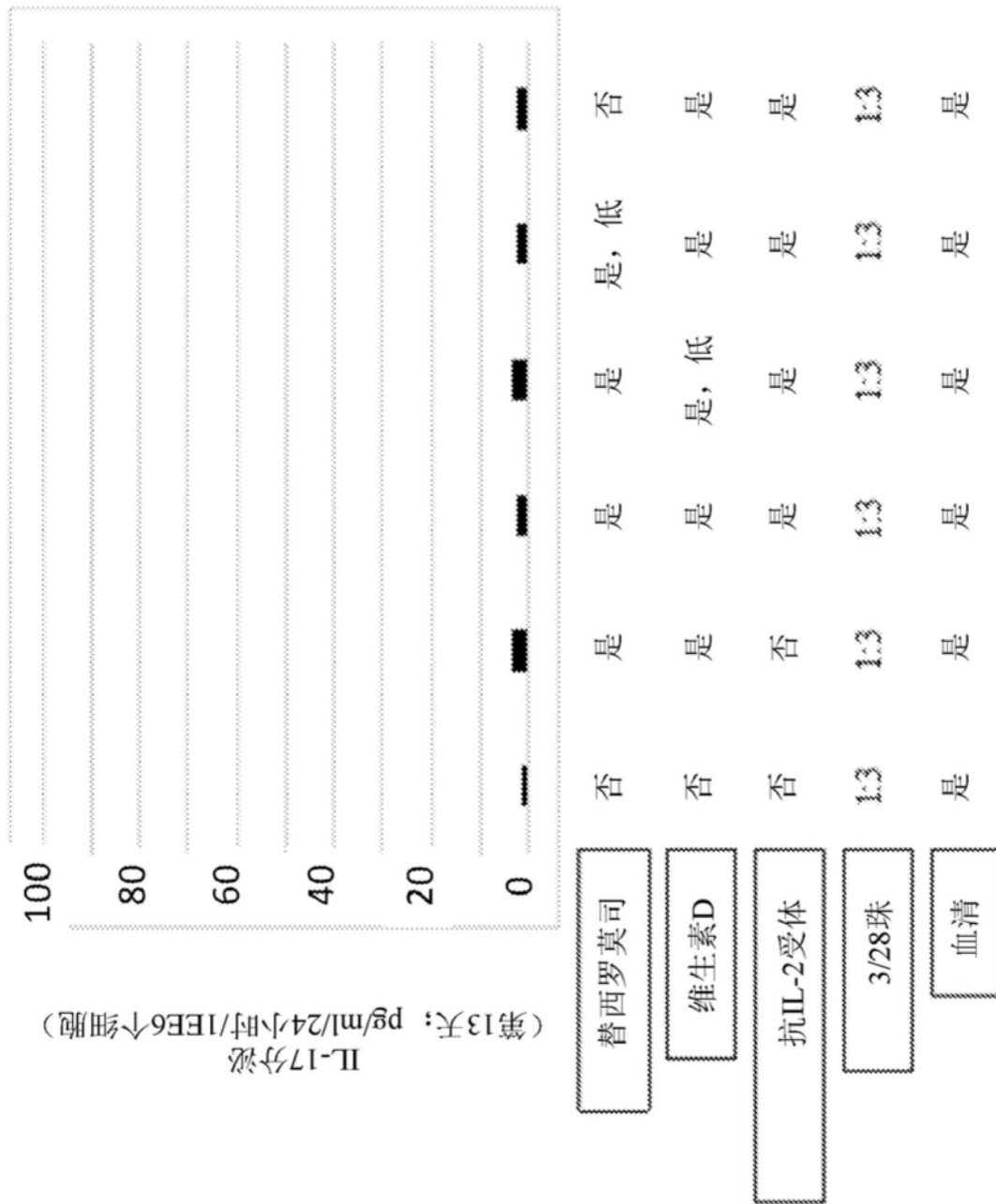


图11D

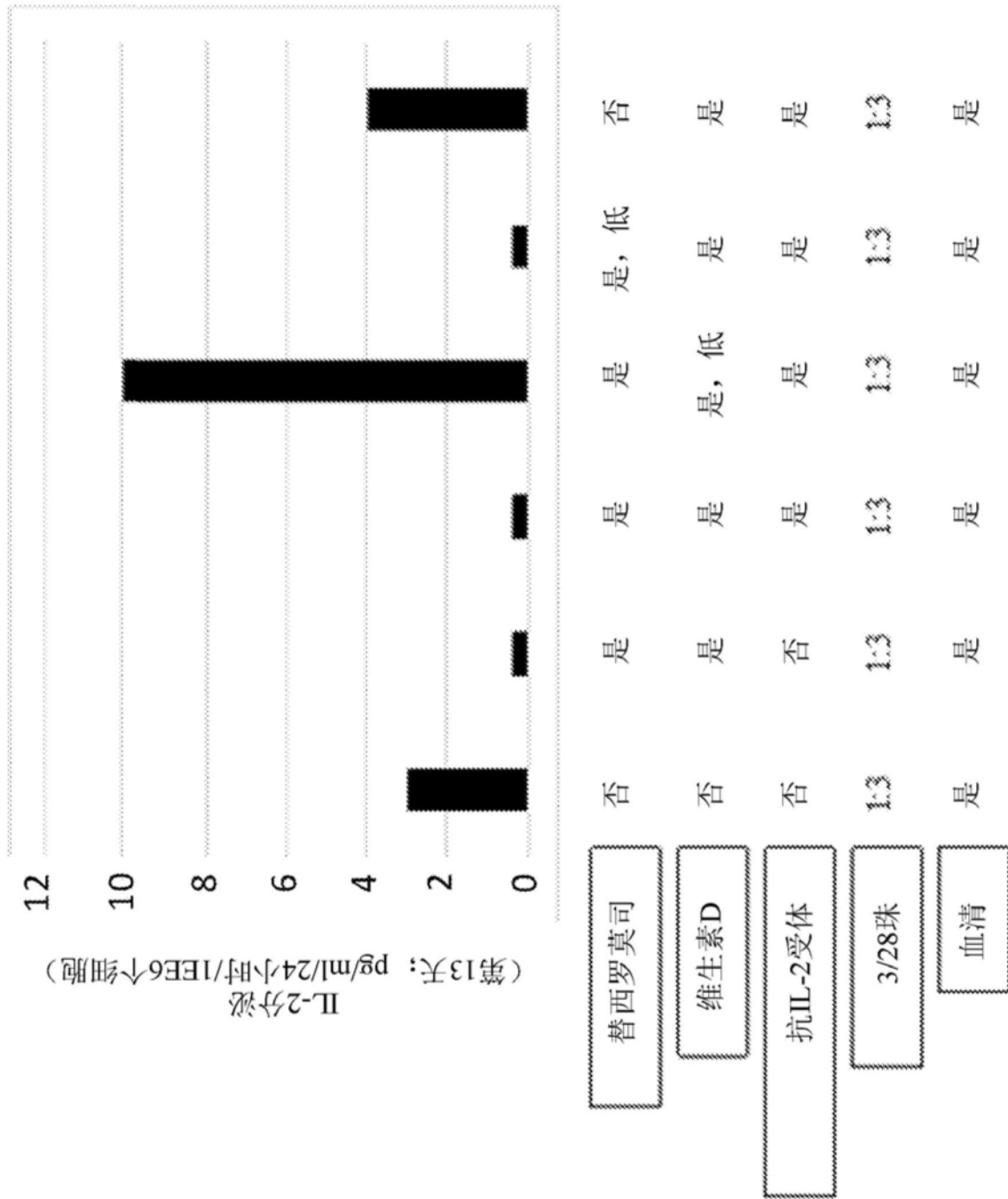


图12A

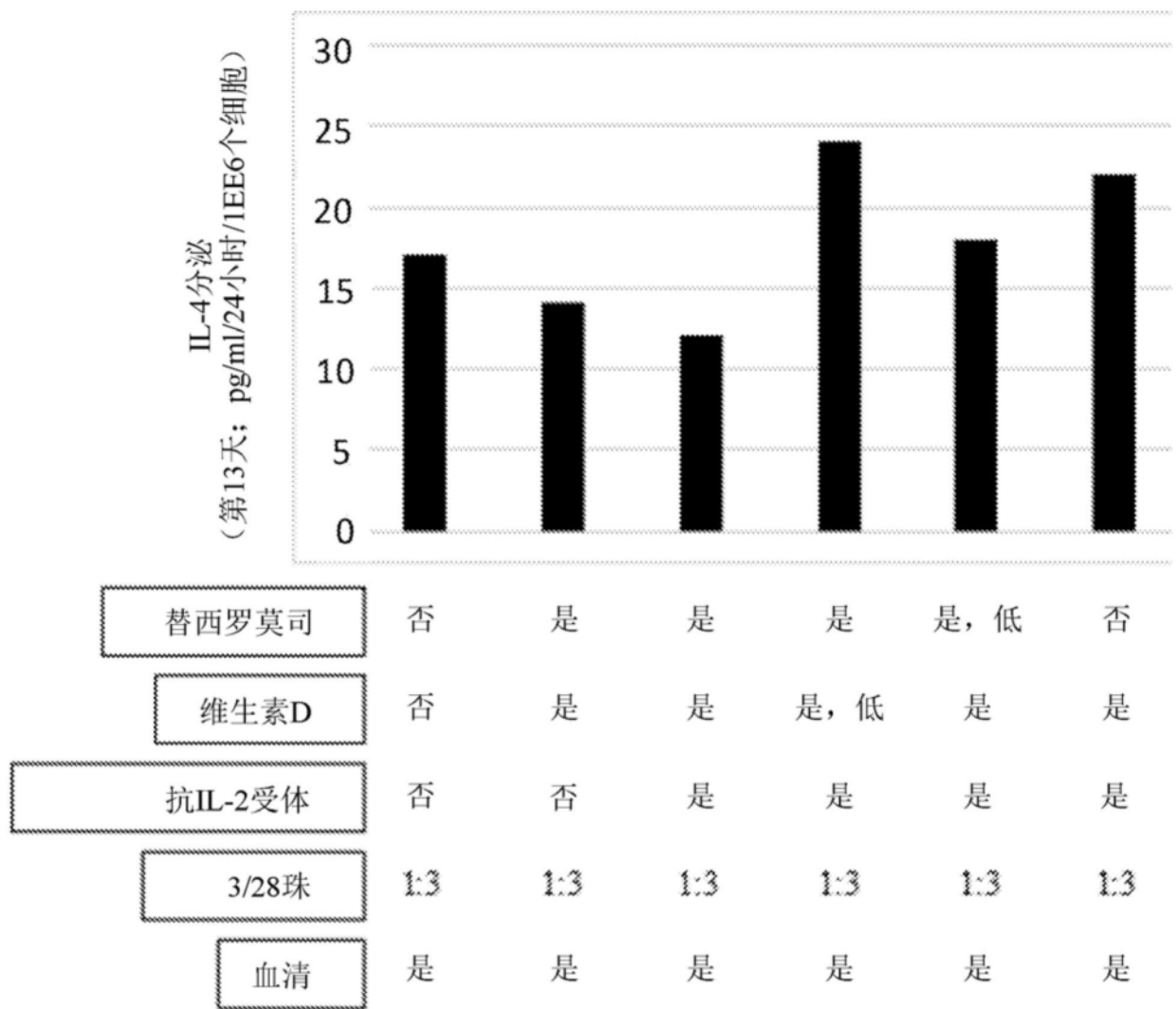


图12B

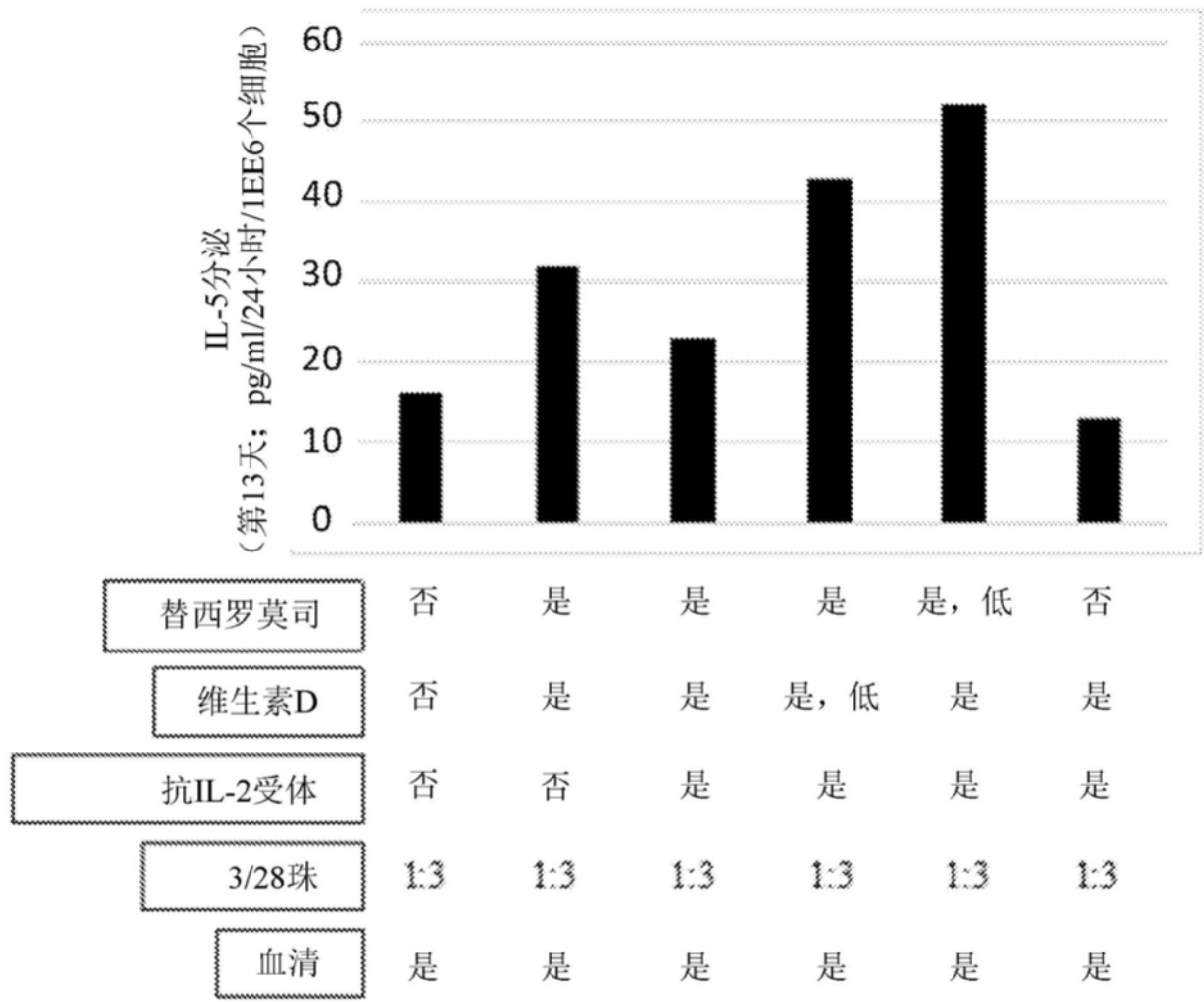


图12C

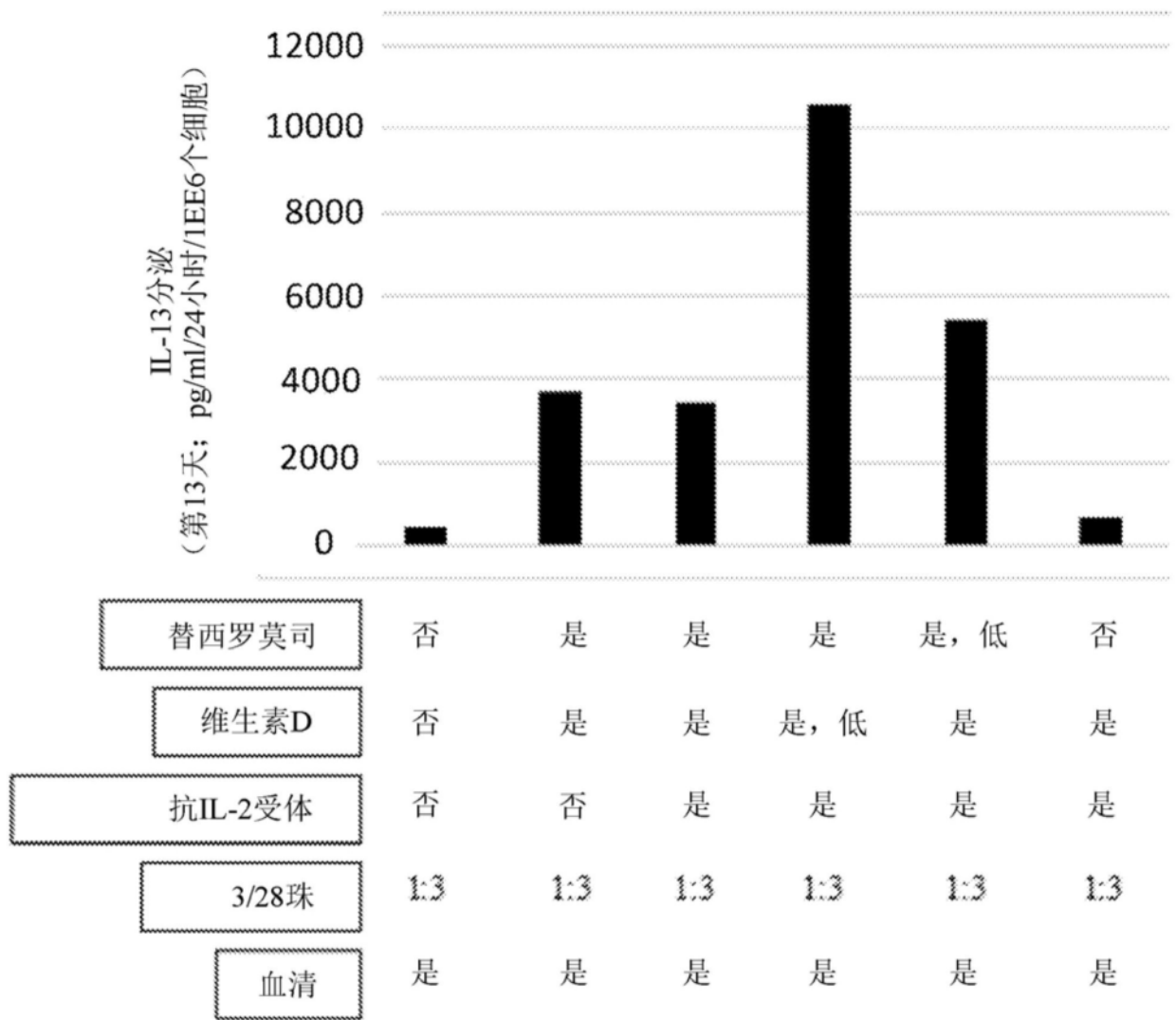


图12D



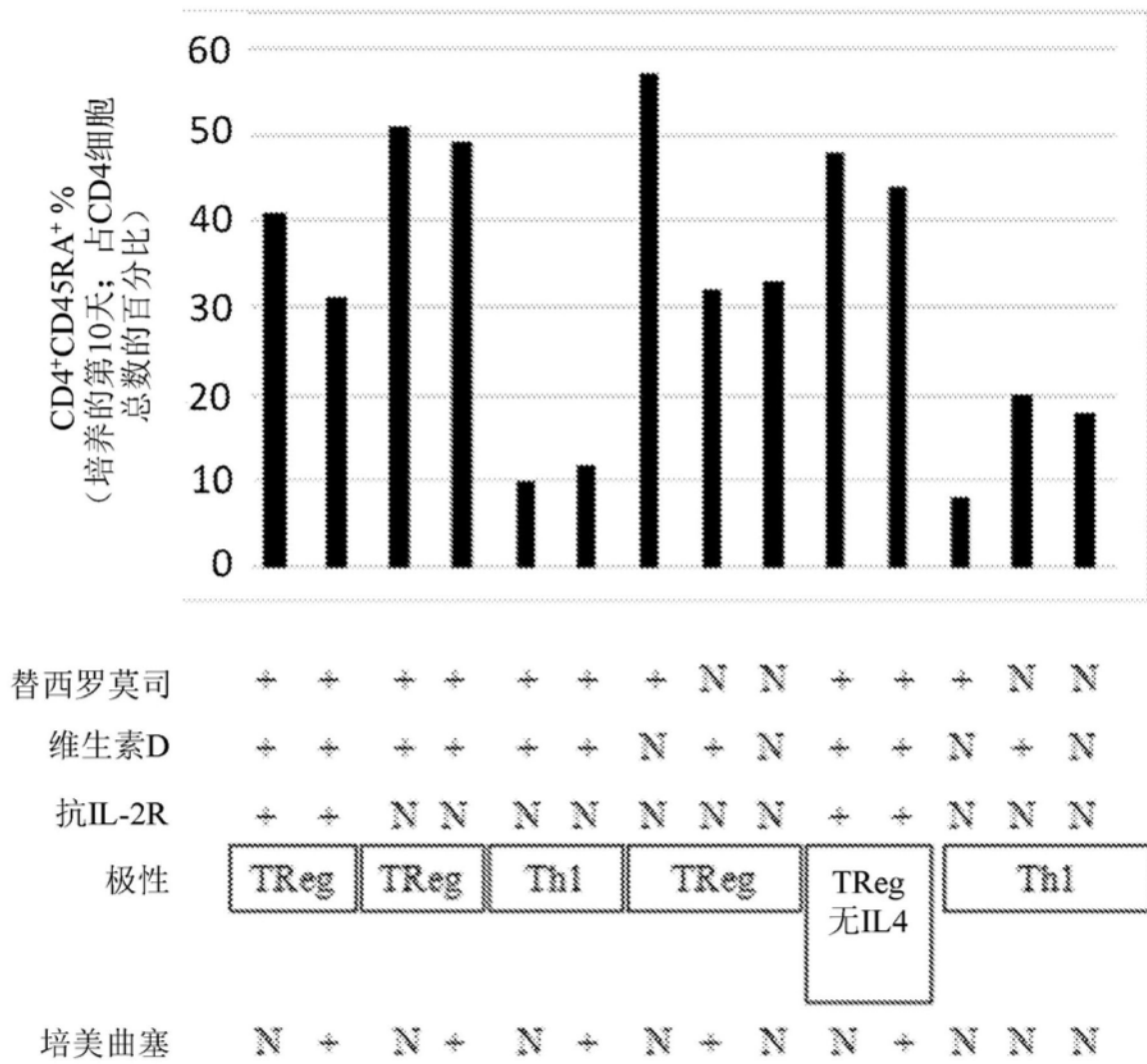


图14A

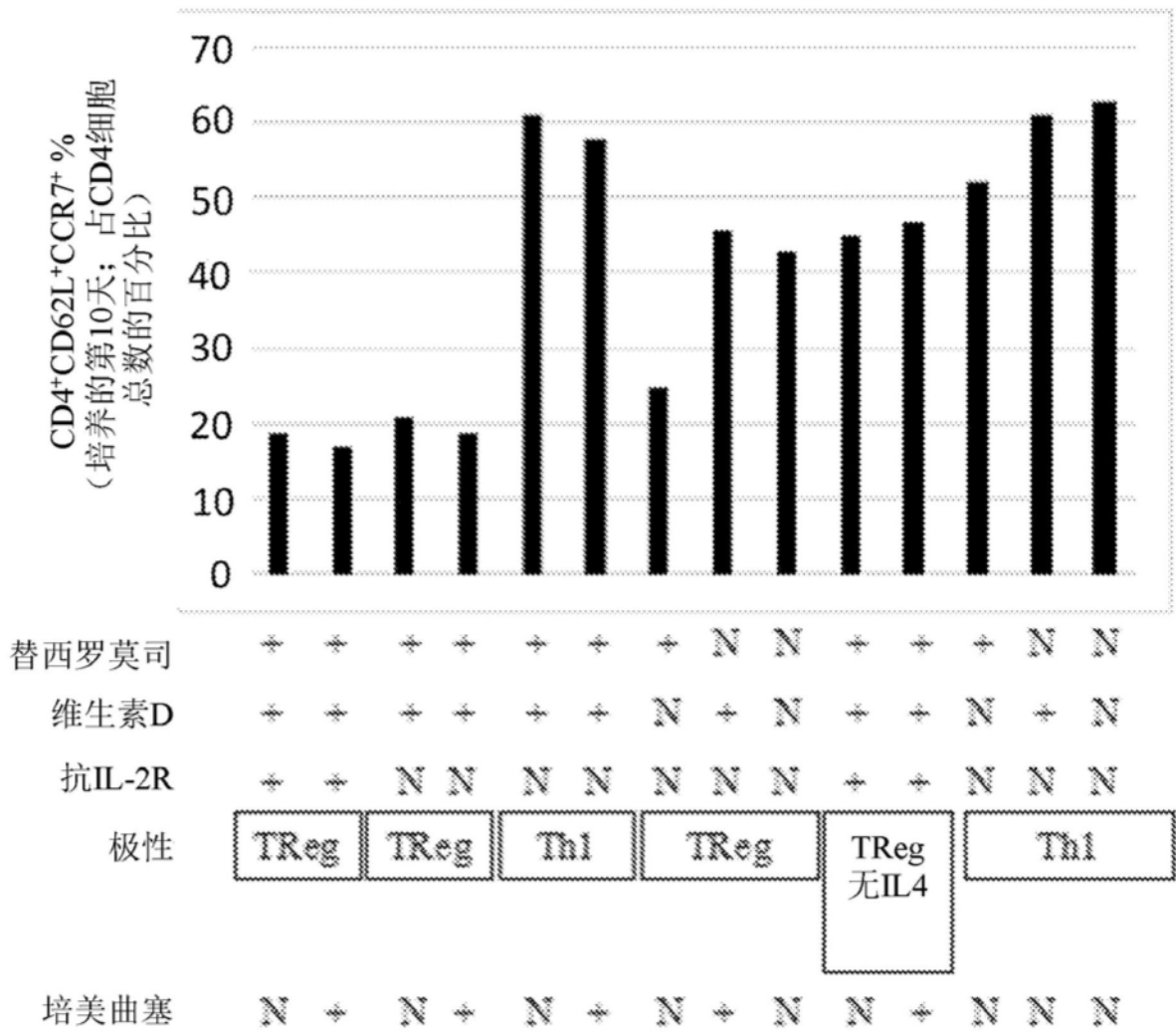


图14B

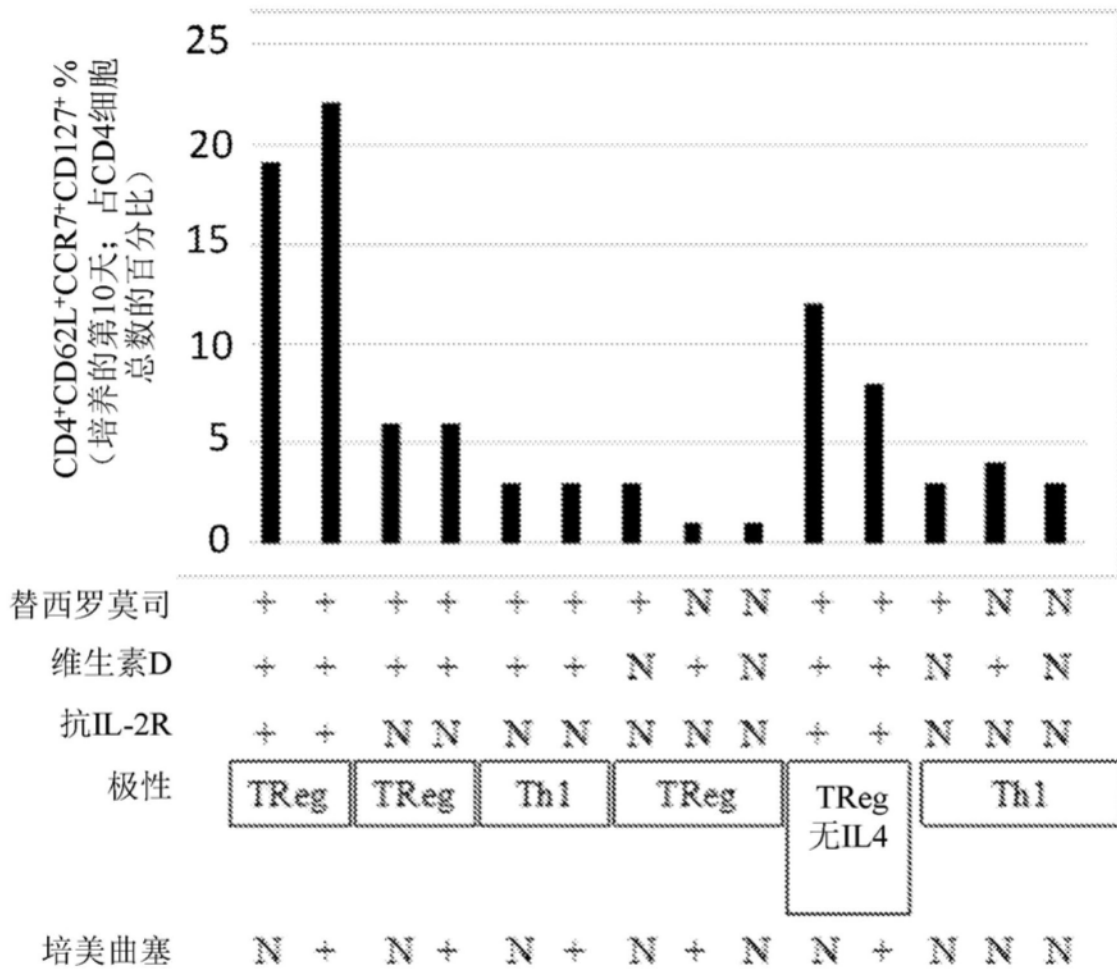


图14C

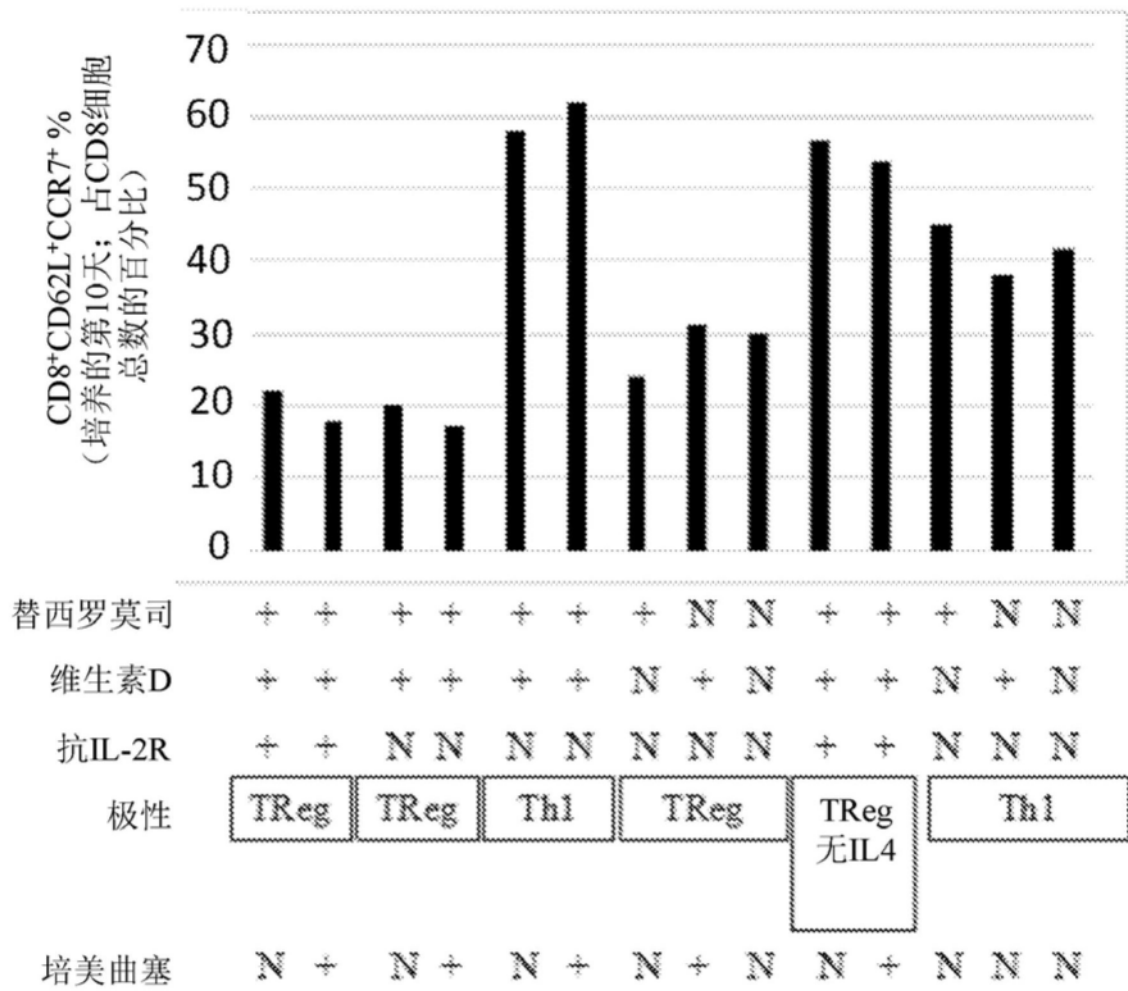


图15A

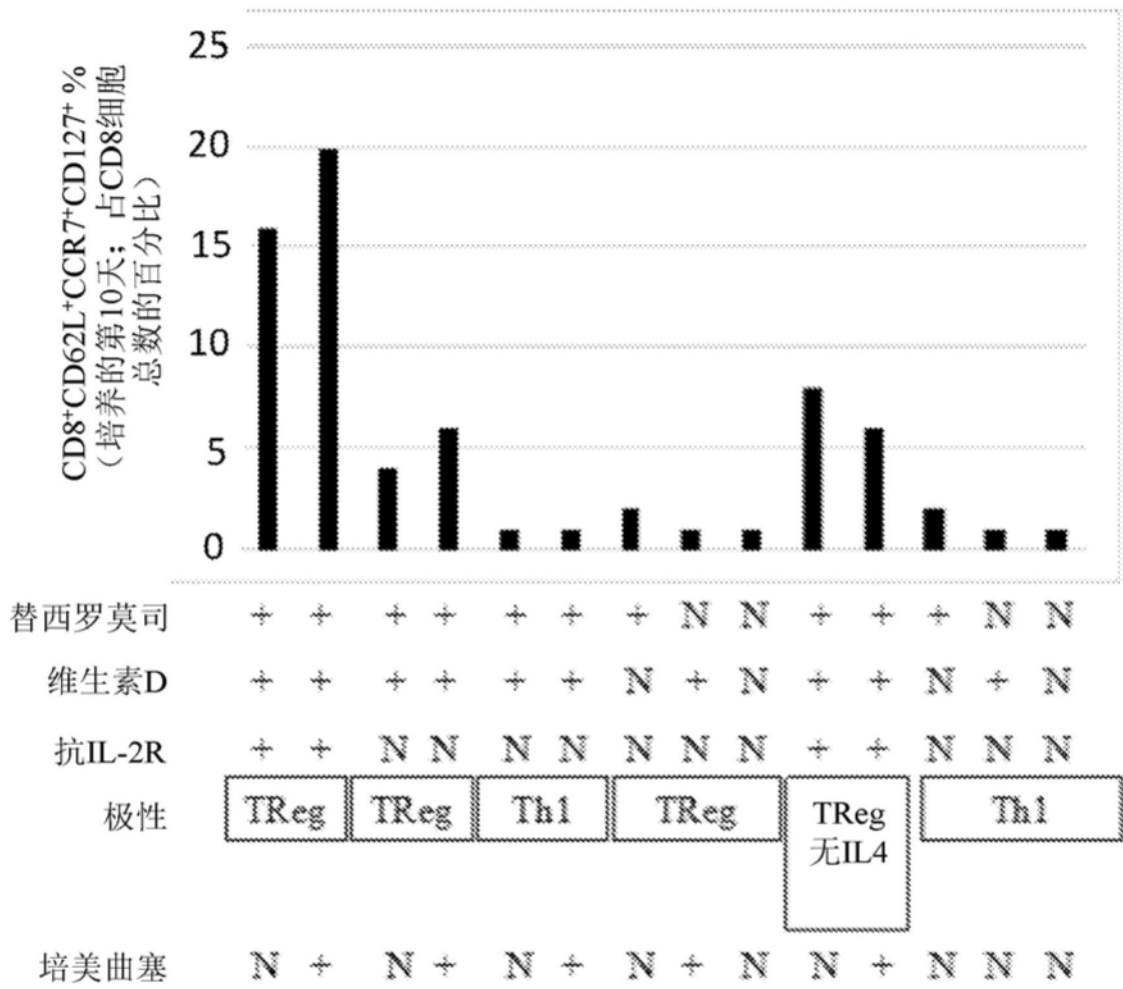


图15B

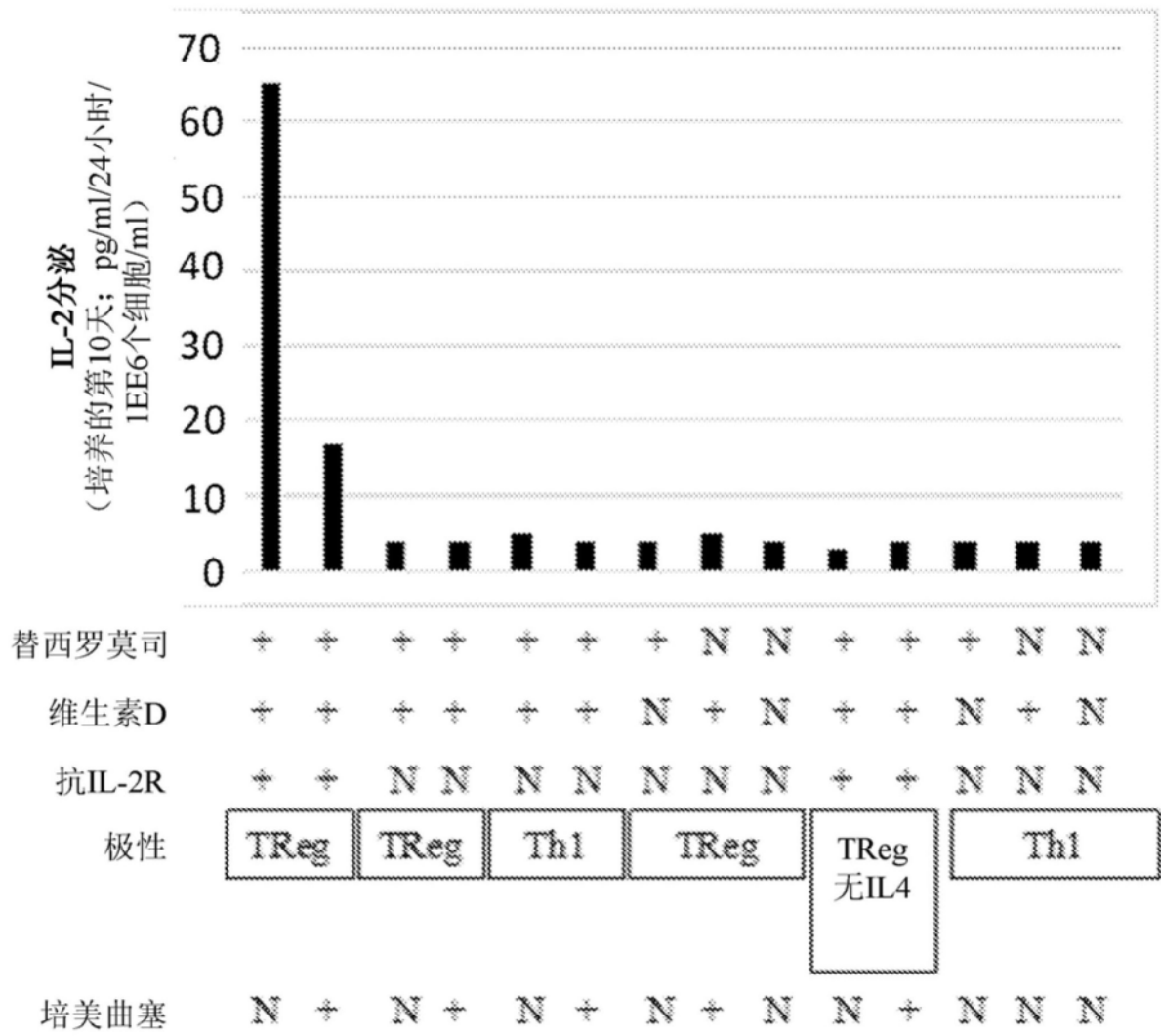


图16A

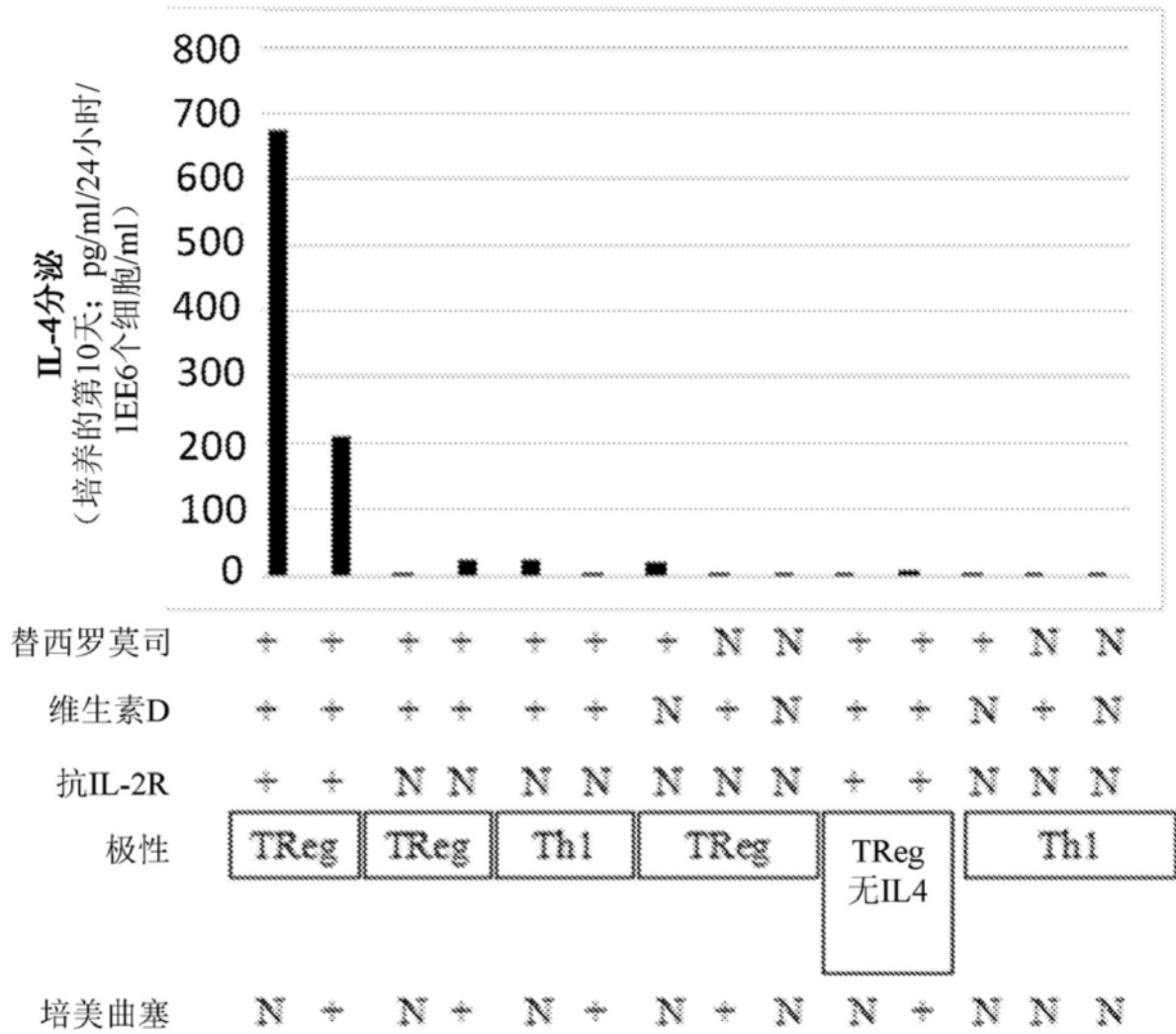


图16B

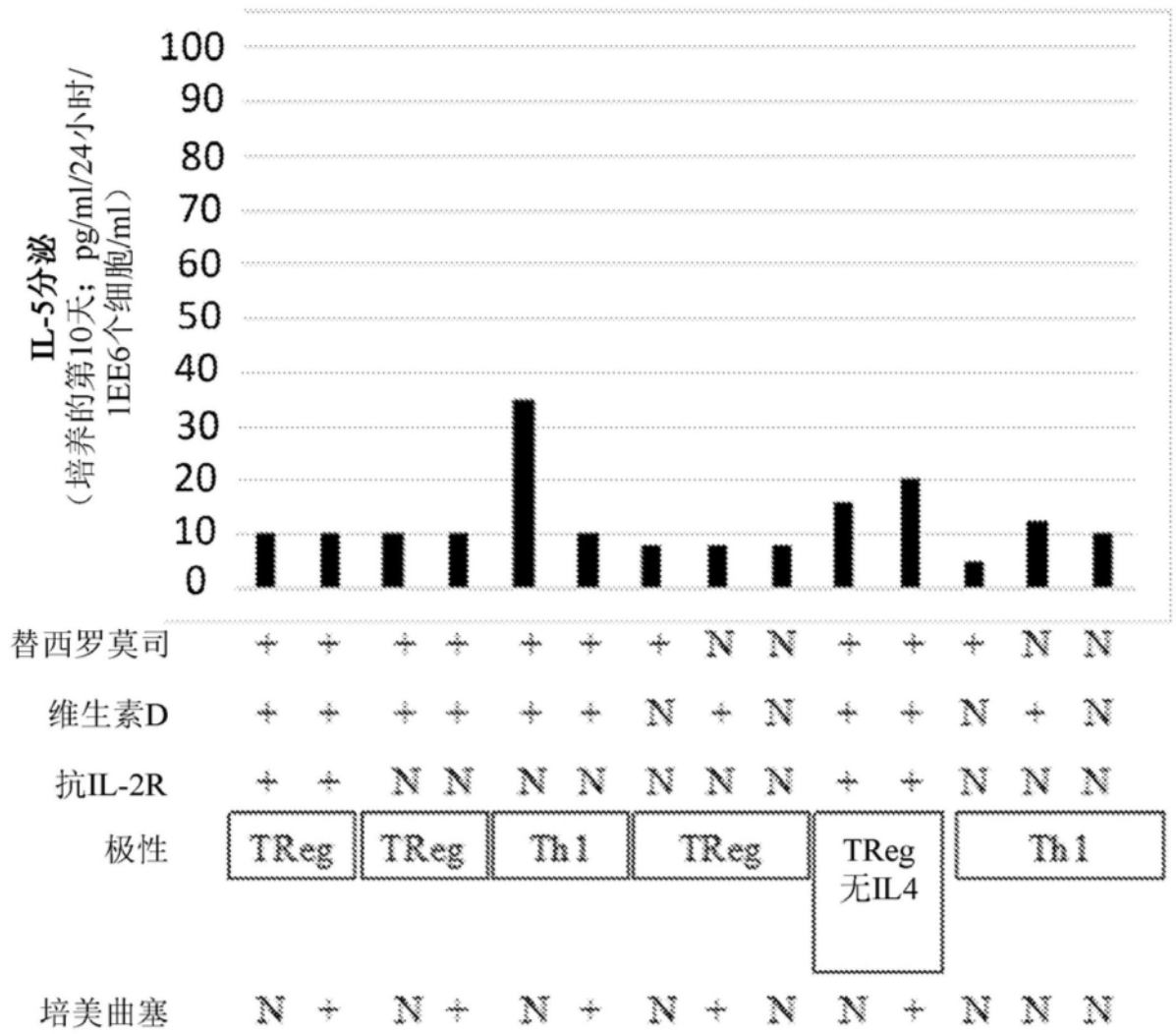


图16C

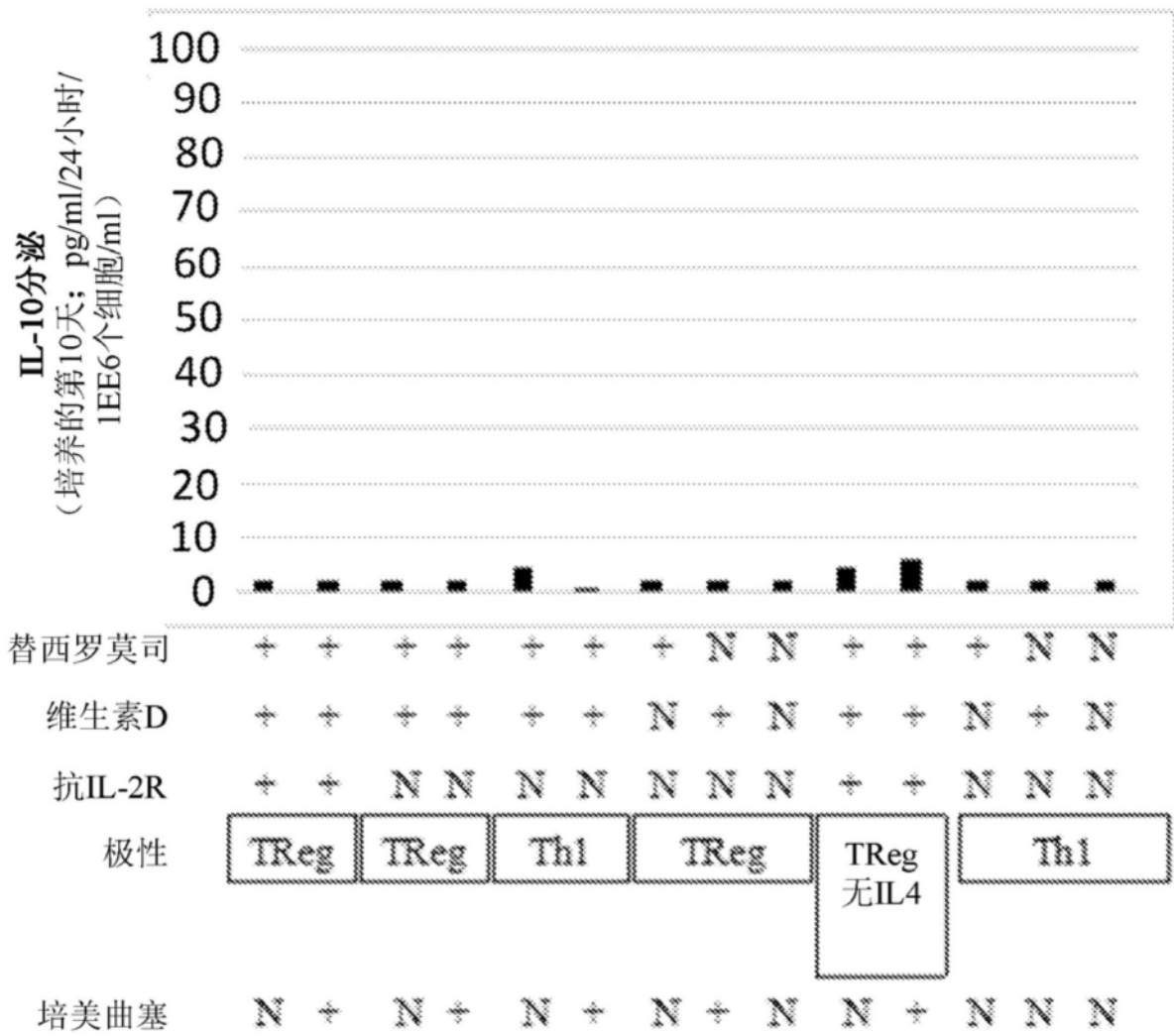


图17A

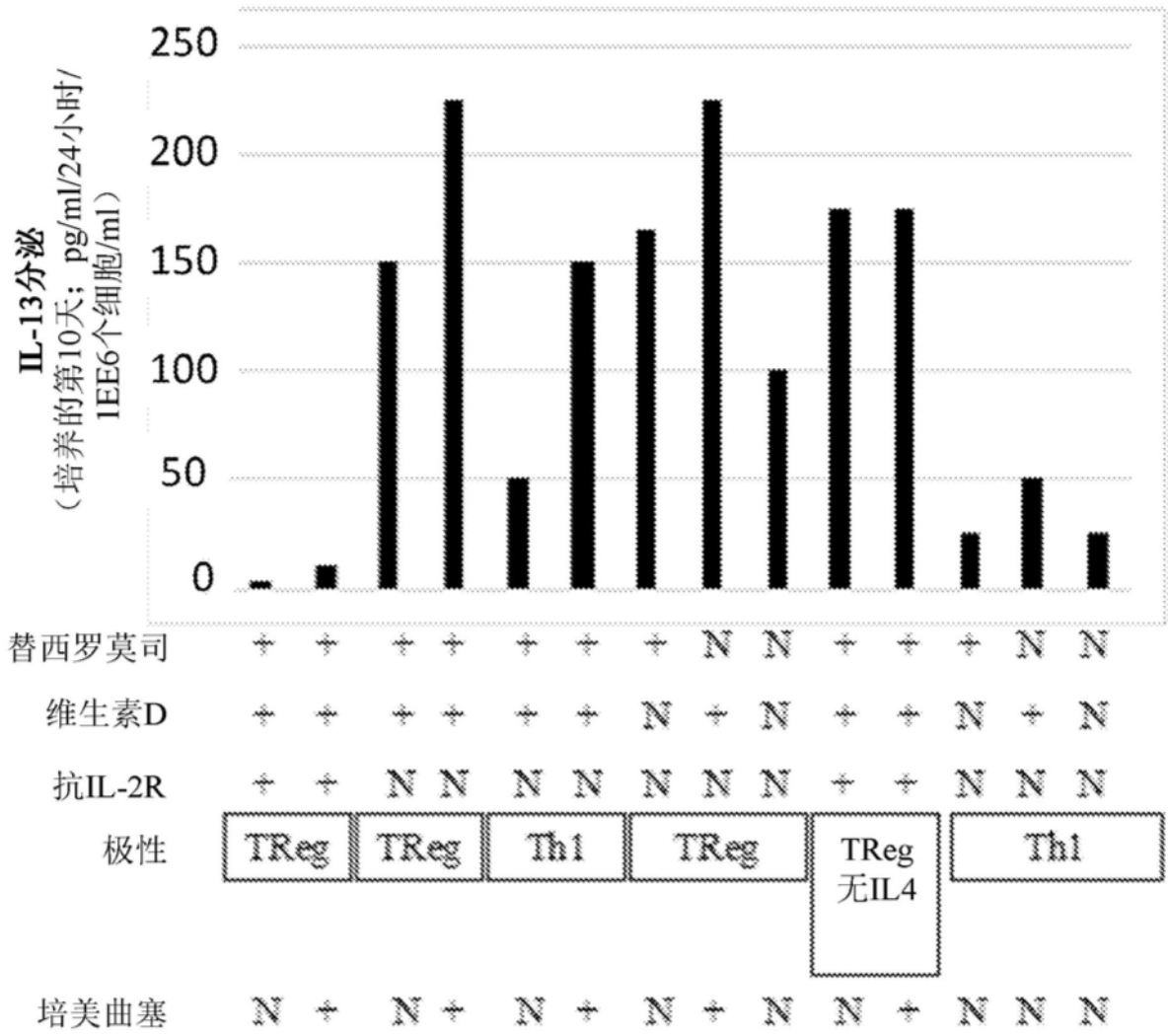


图17B

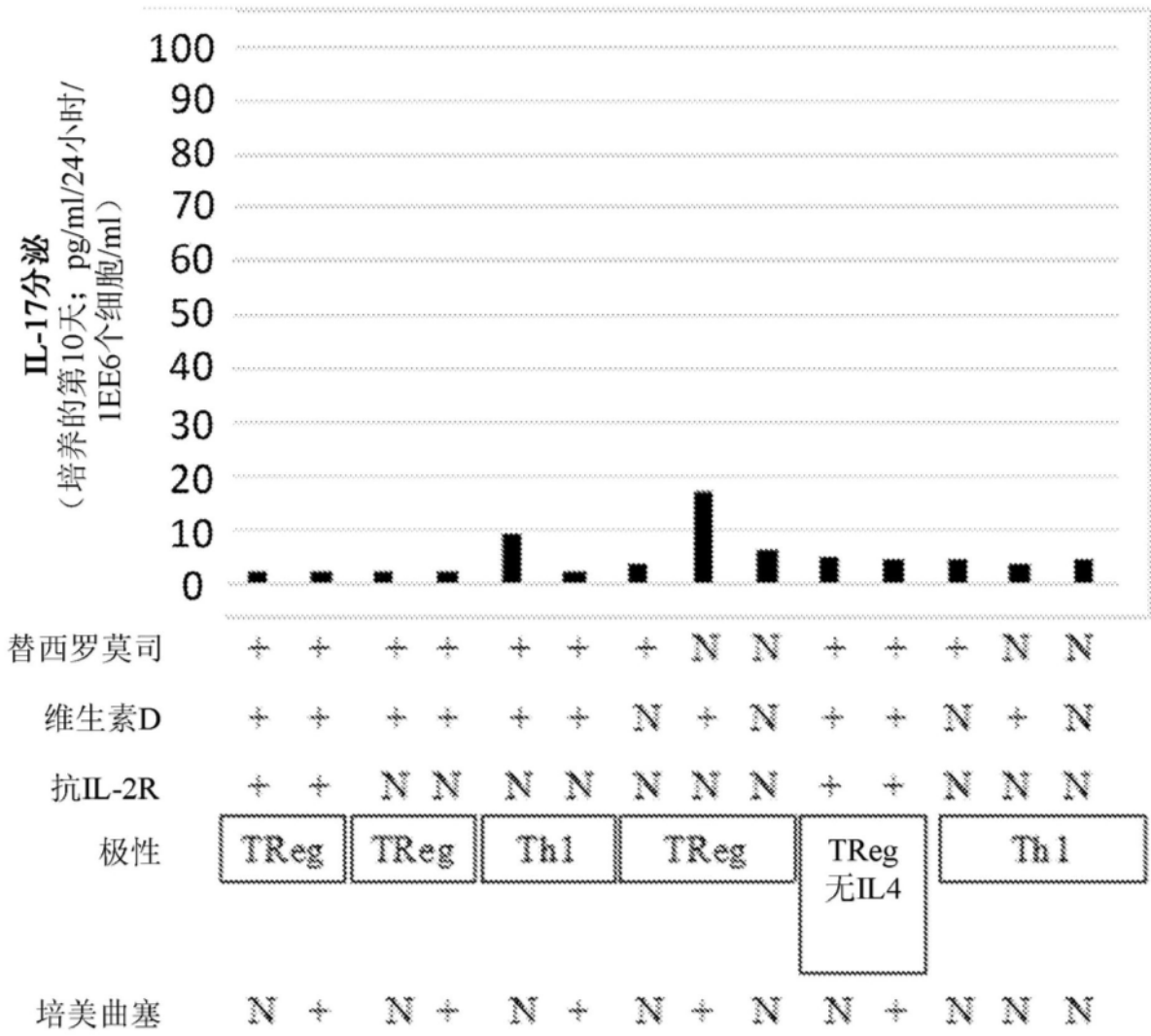


图17C

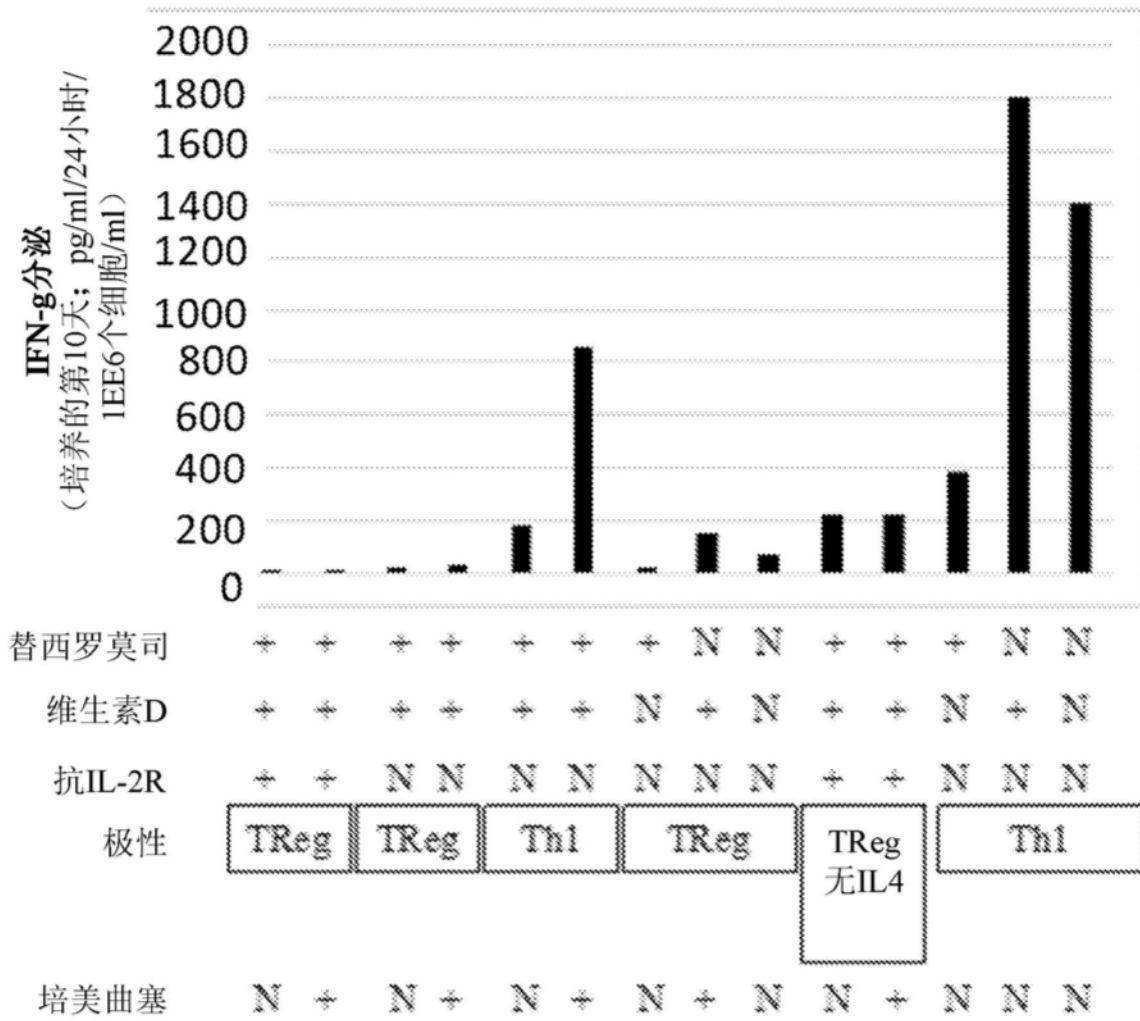


图18A

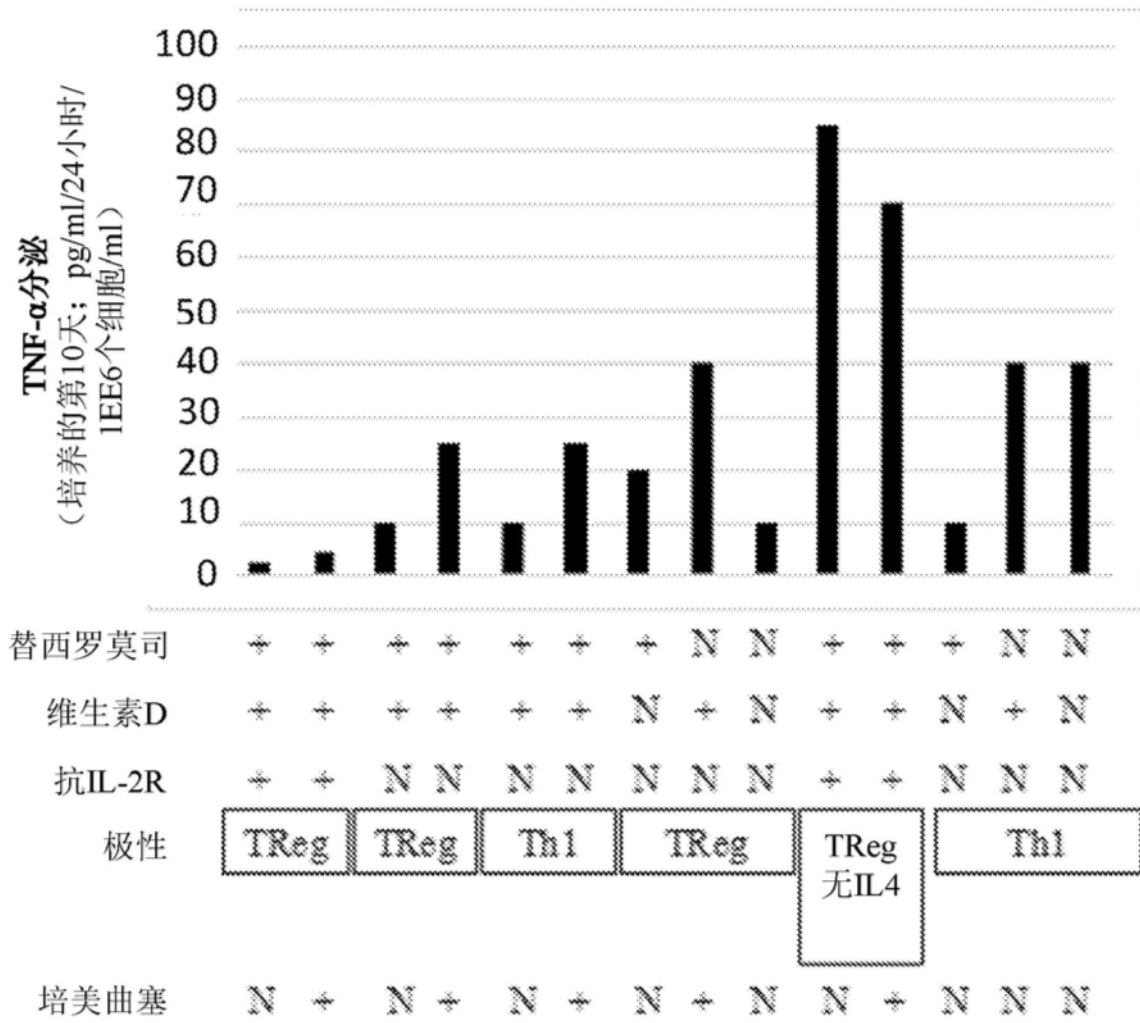


图18B

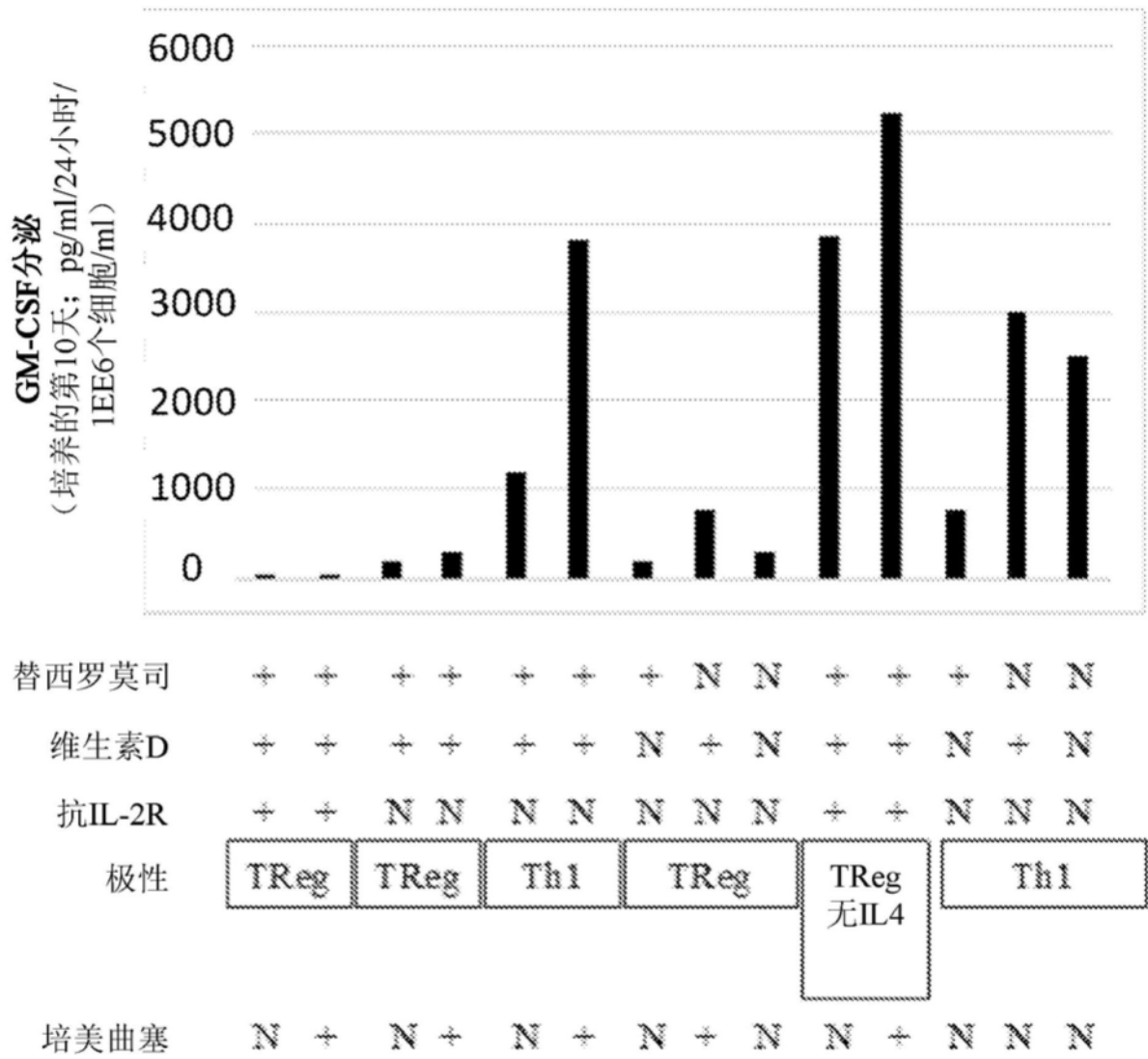


图18C

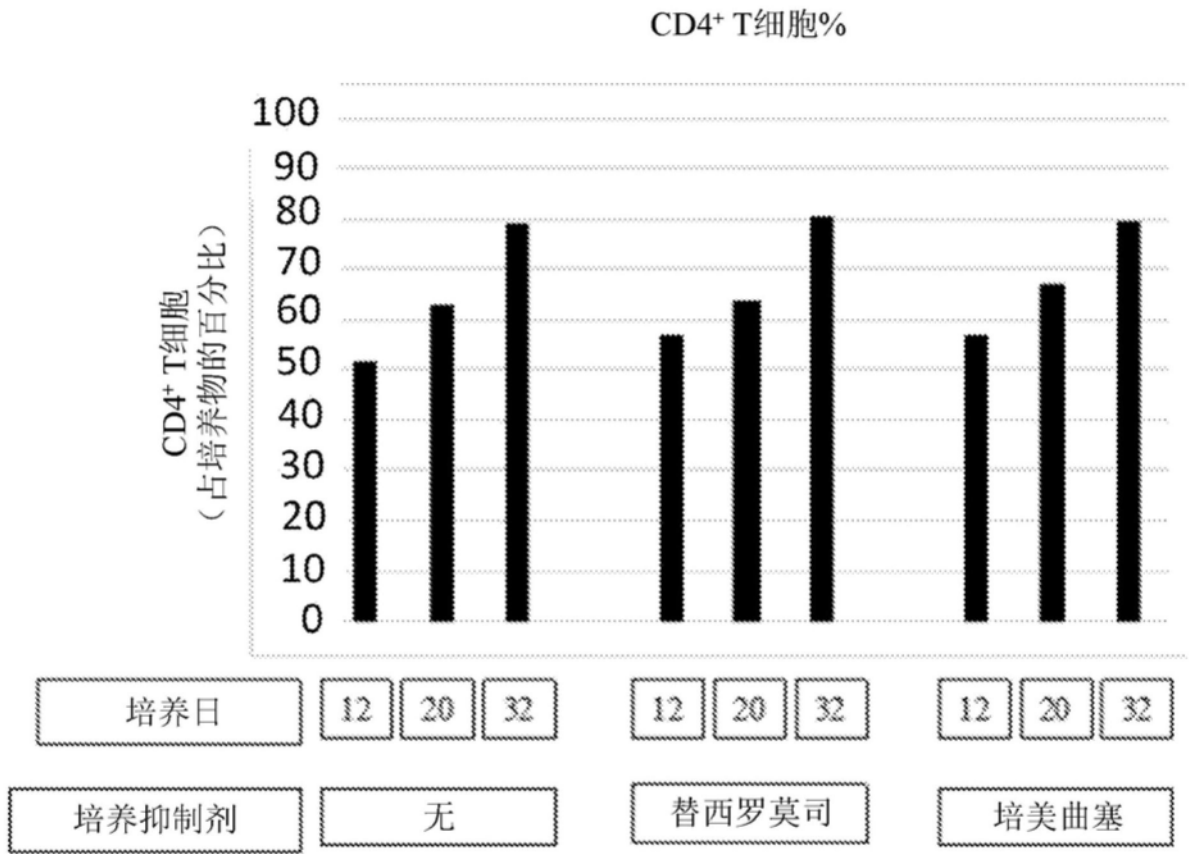


图19A

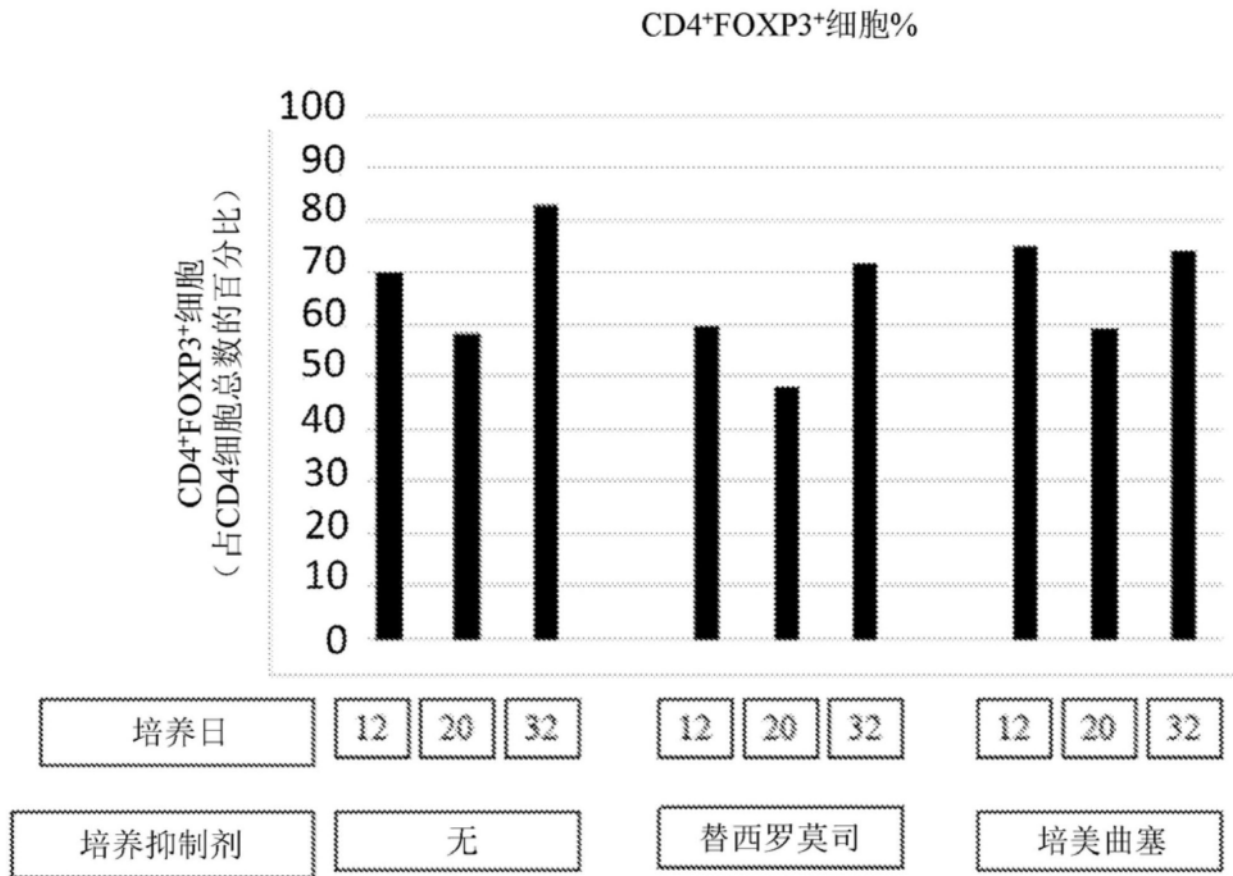


图19B

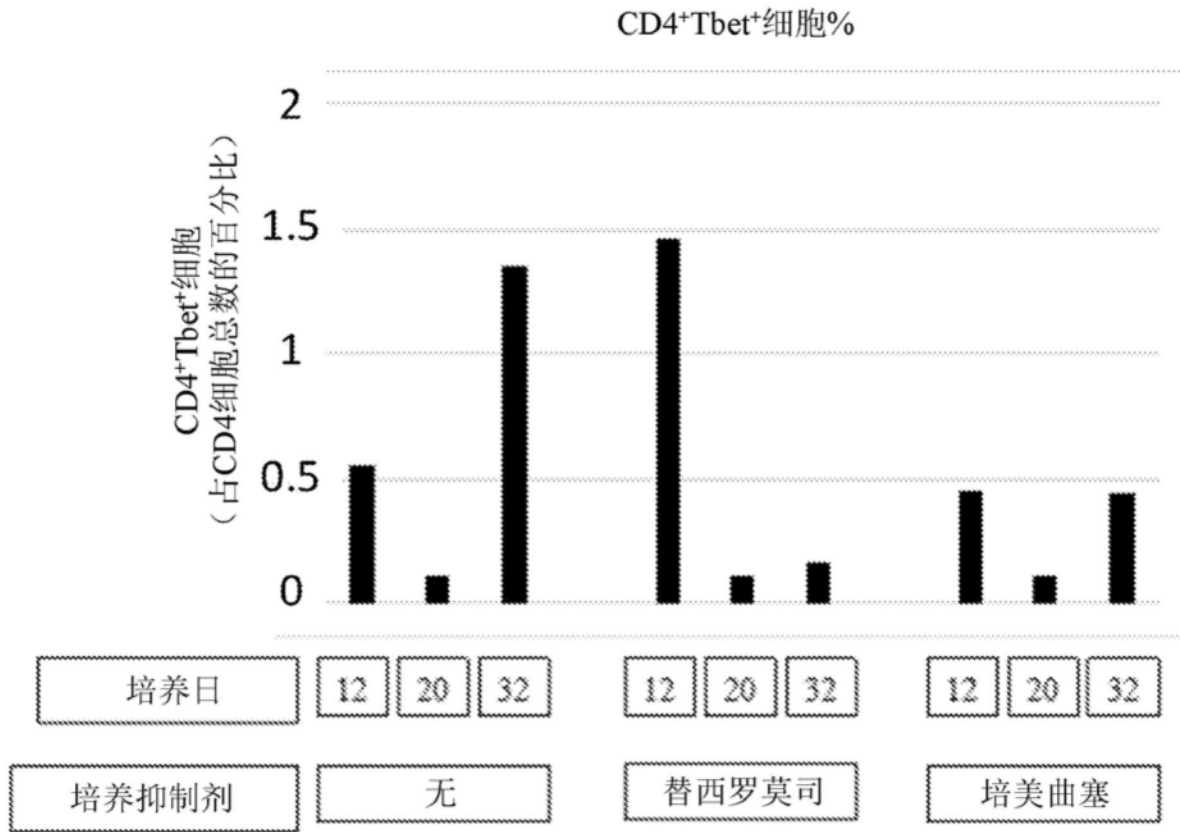


图19C

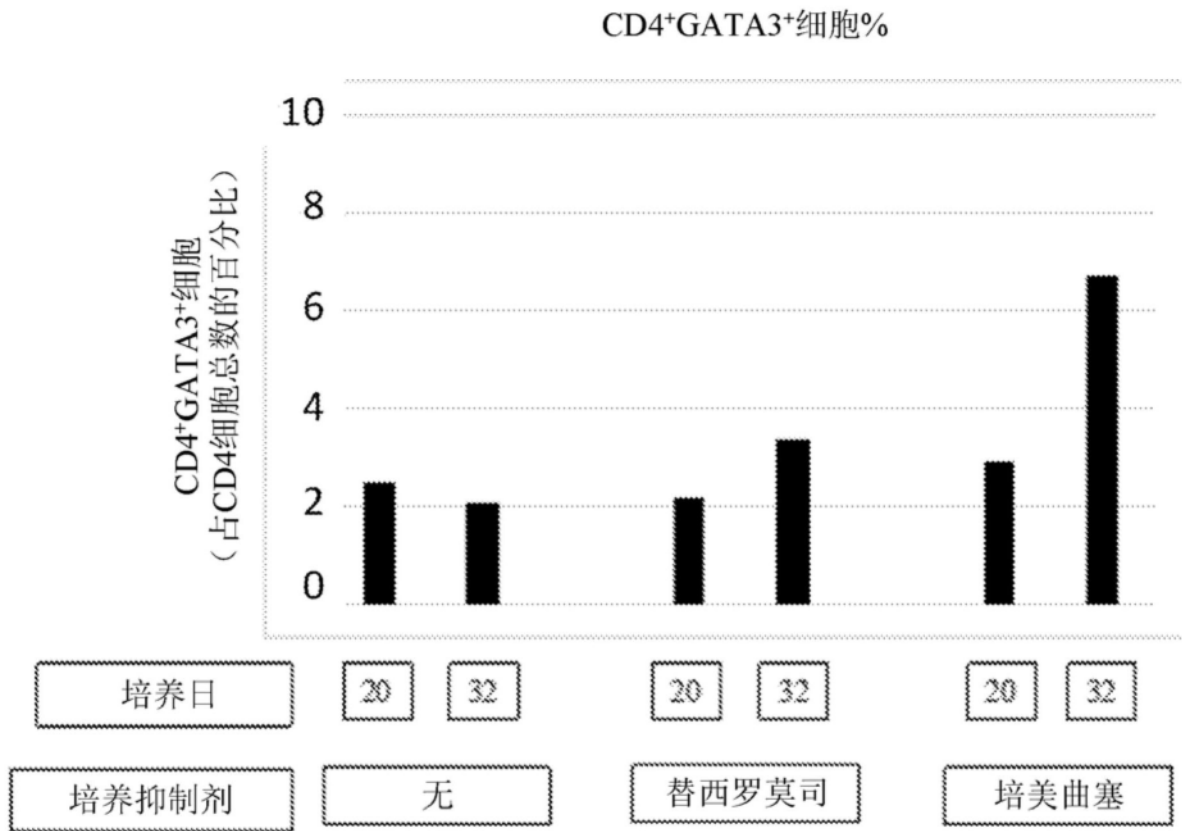


图19D

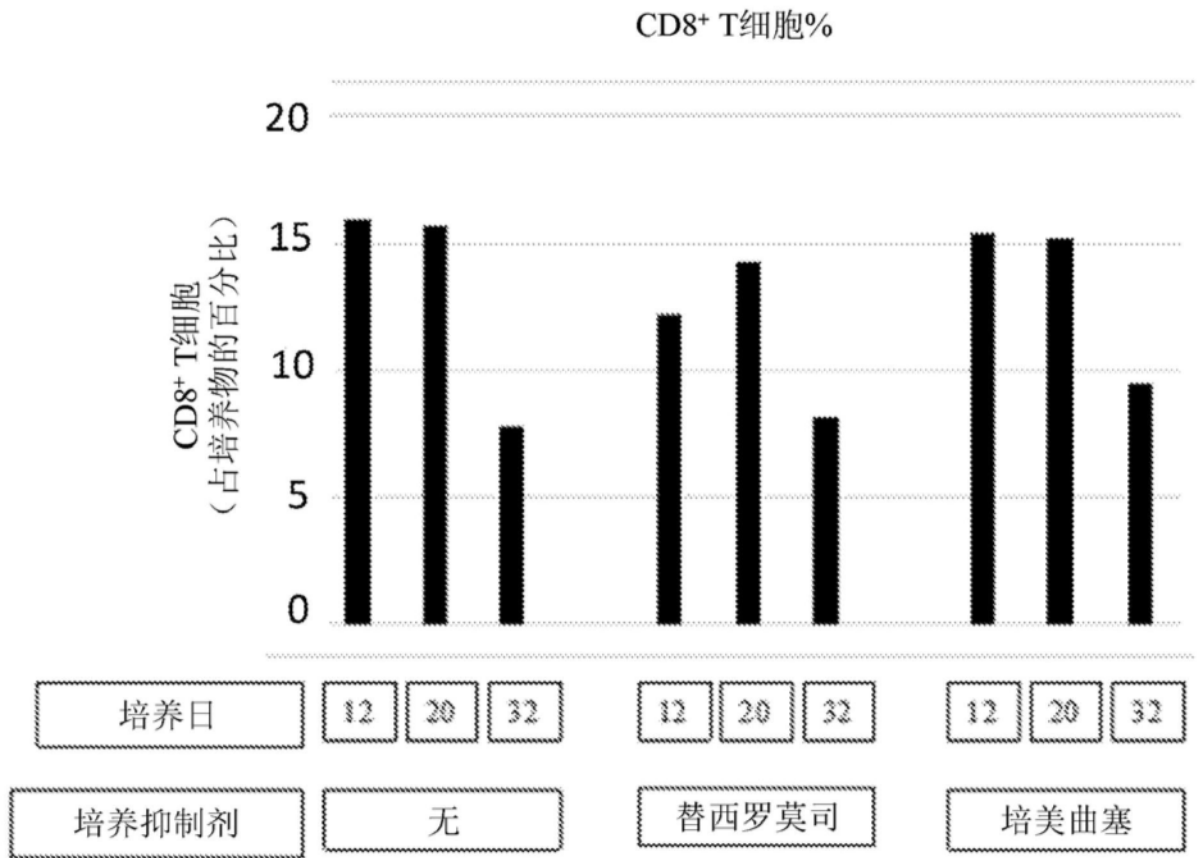


图20A

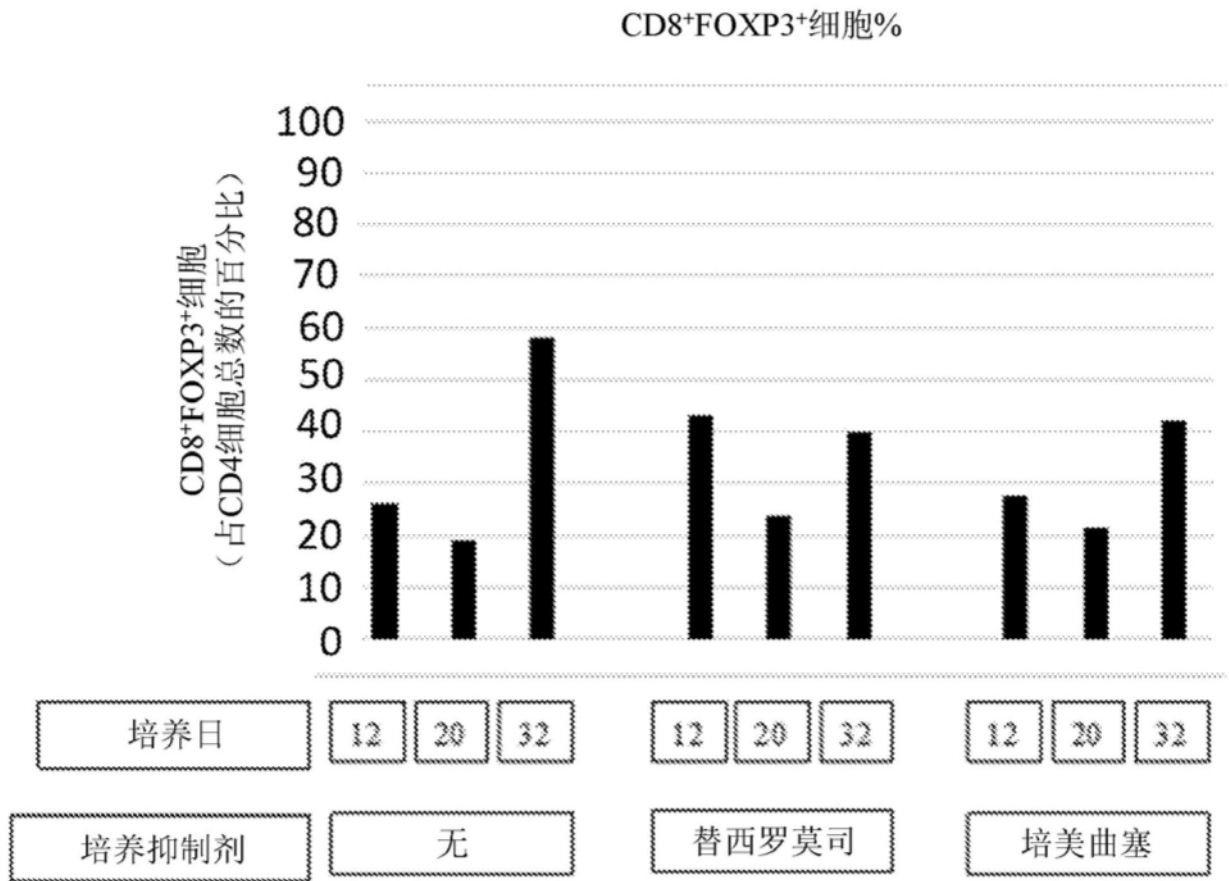


图20B

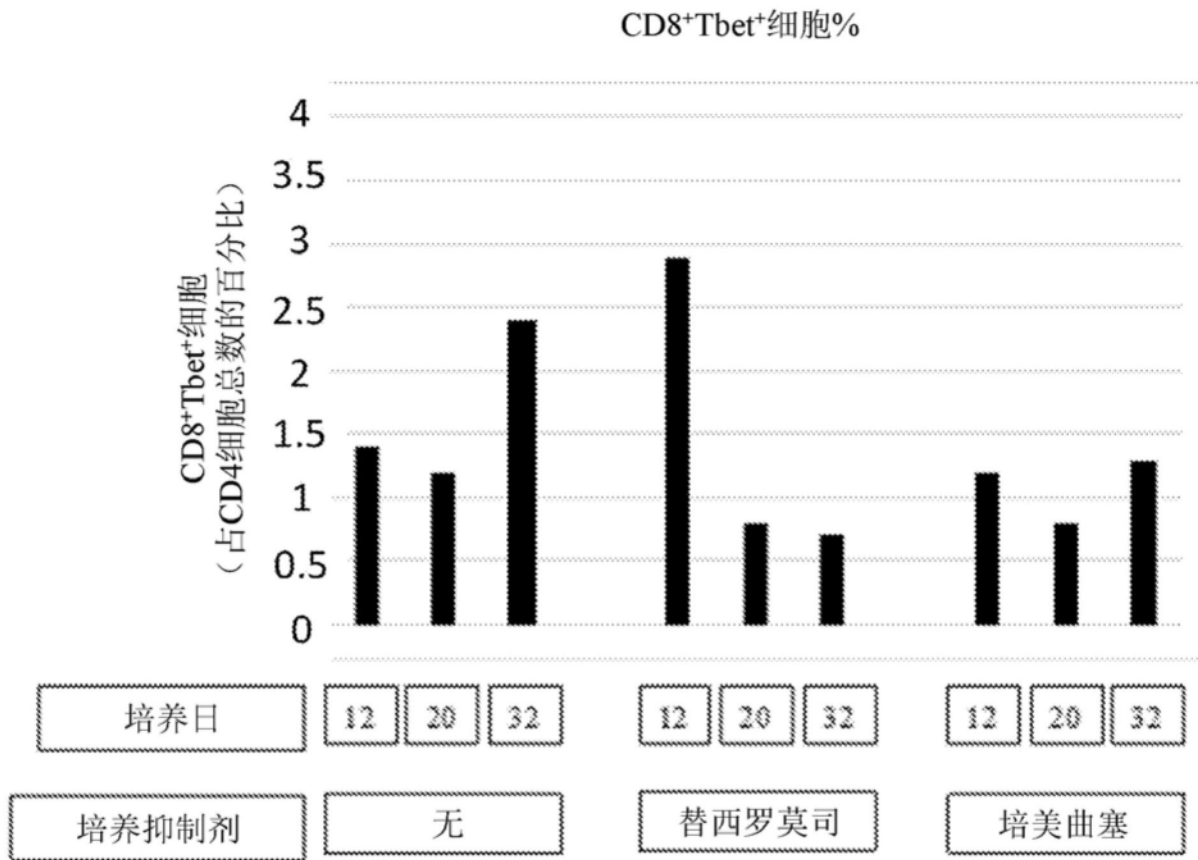


图20C

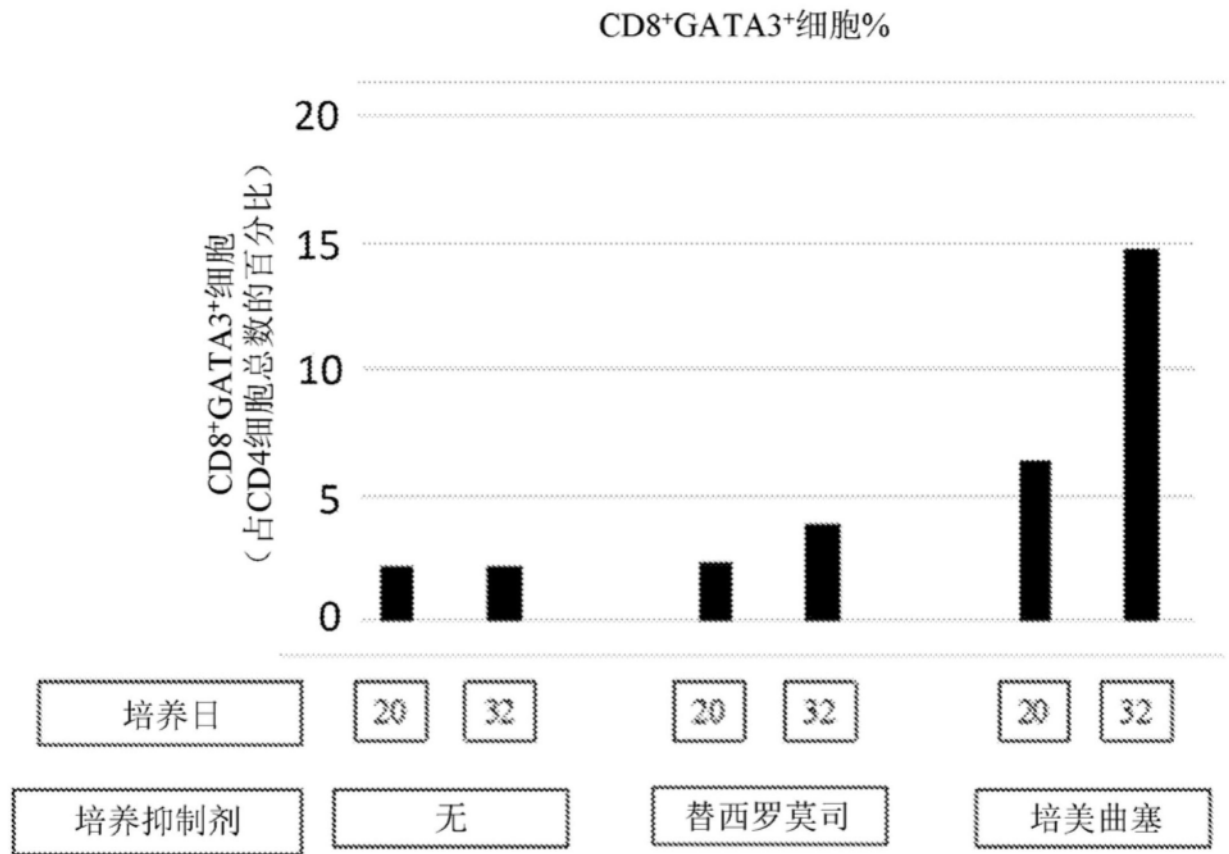


图20D

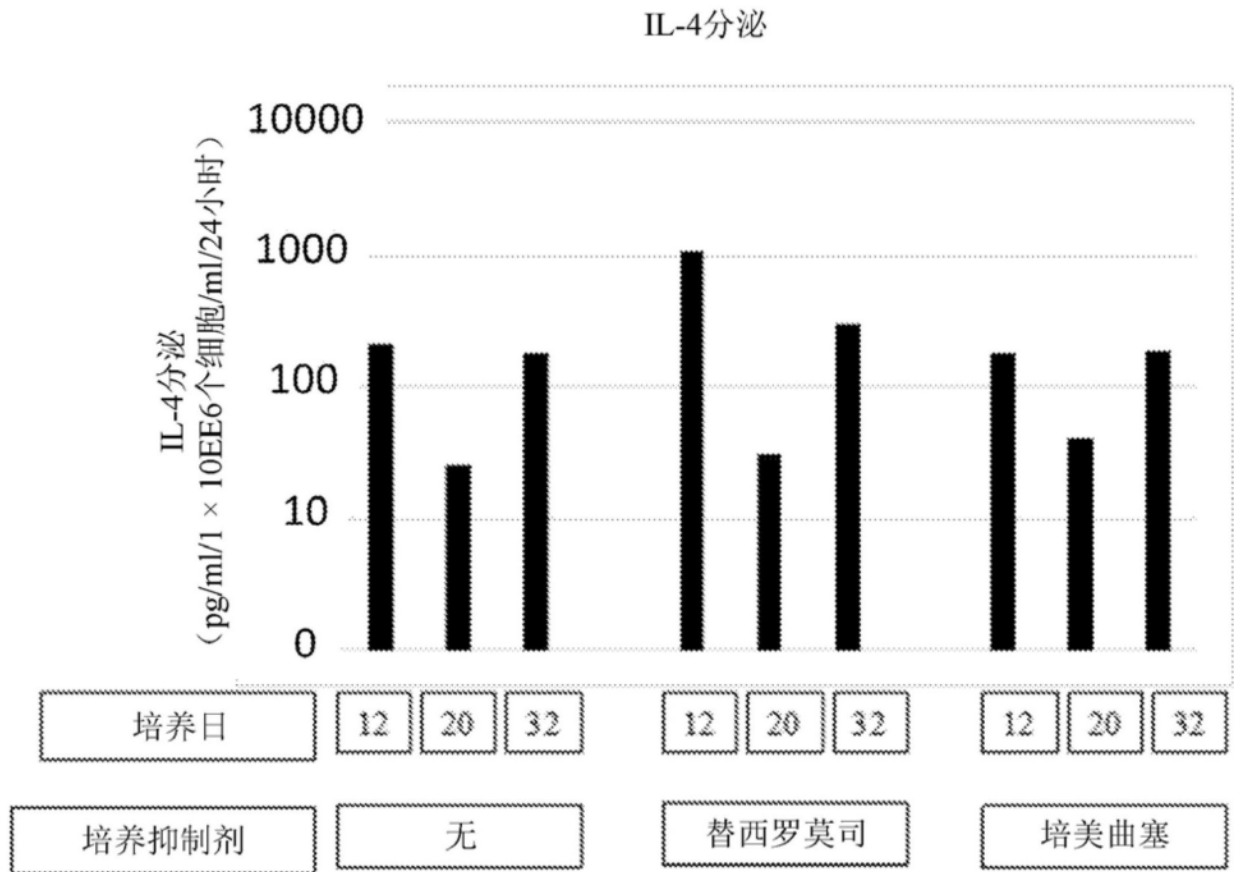


图21A

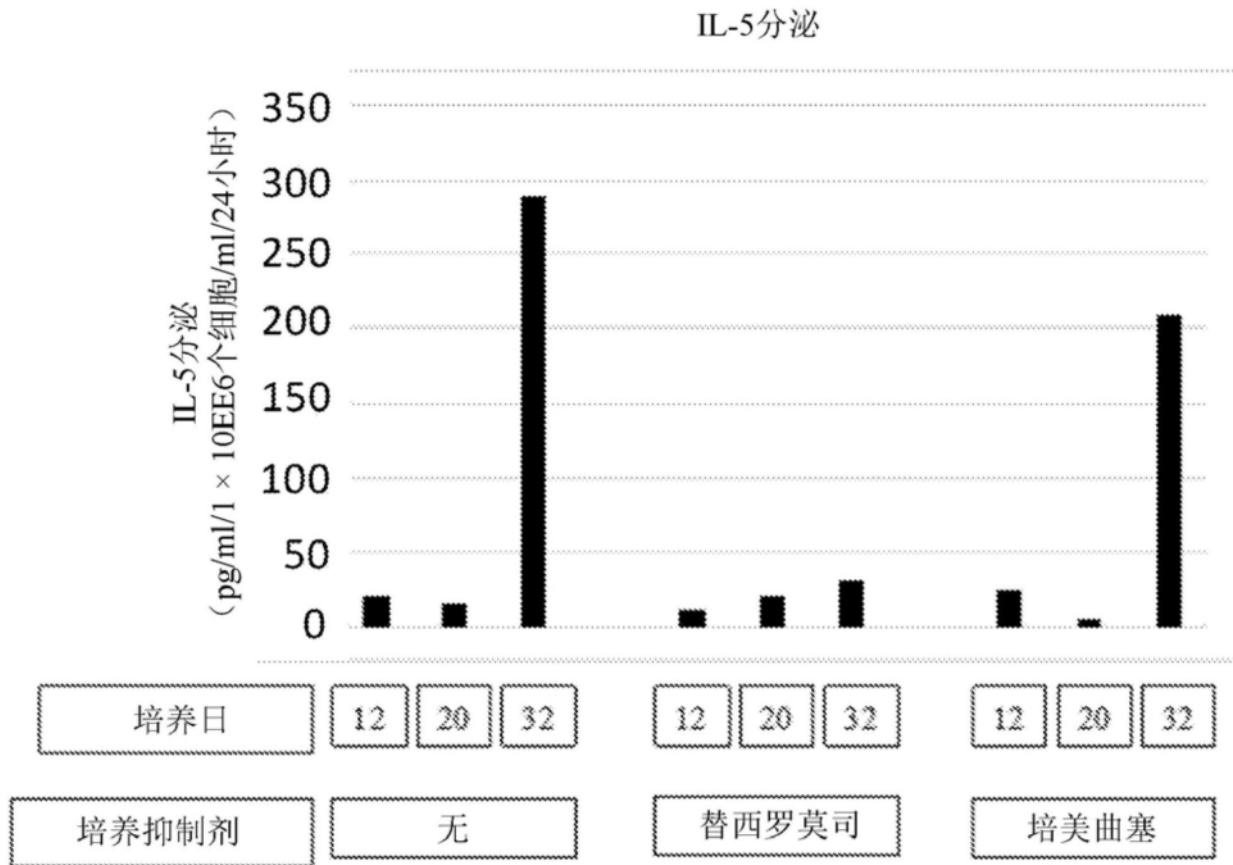


图21B

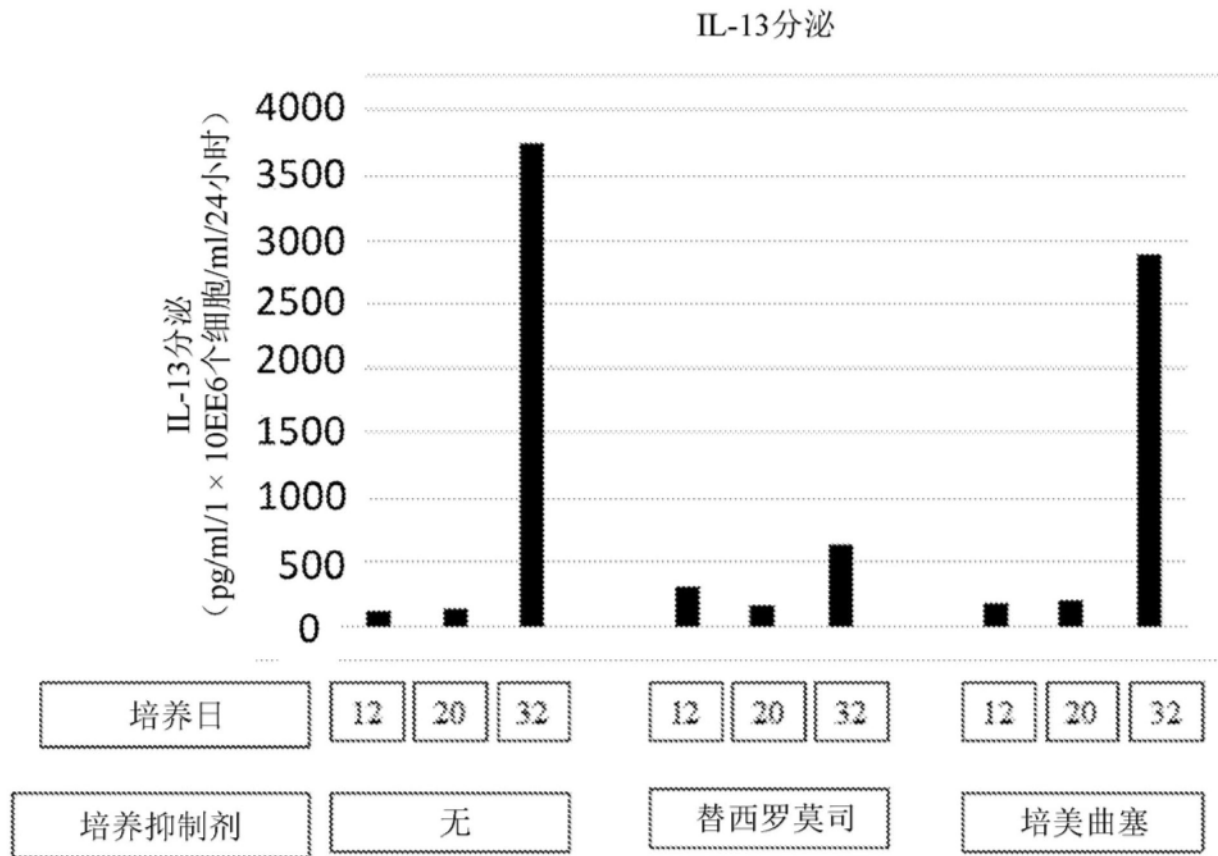


图21C

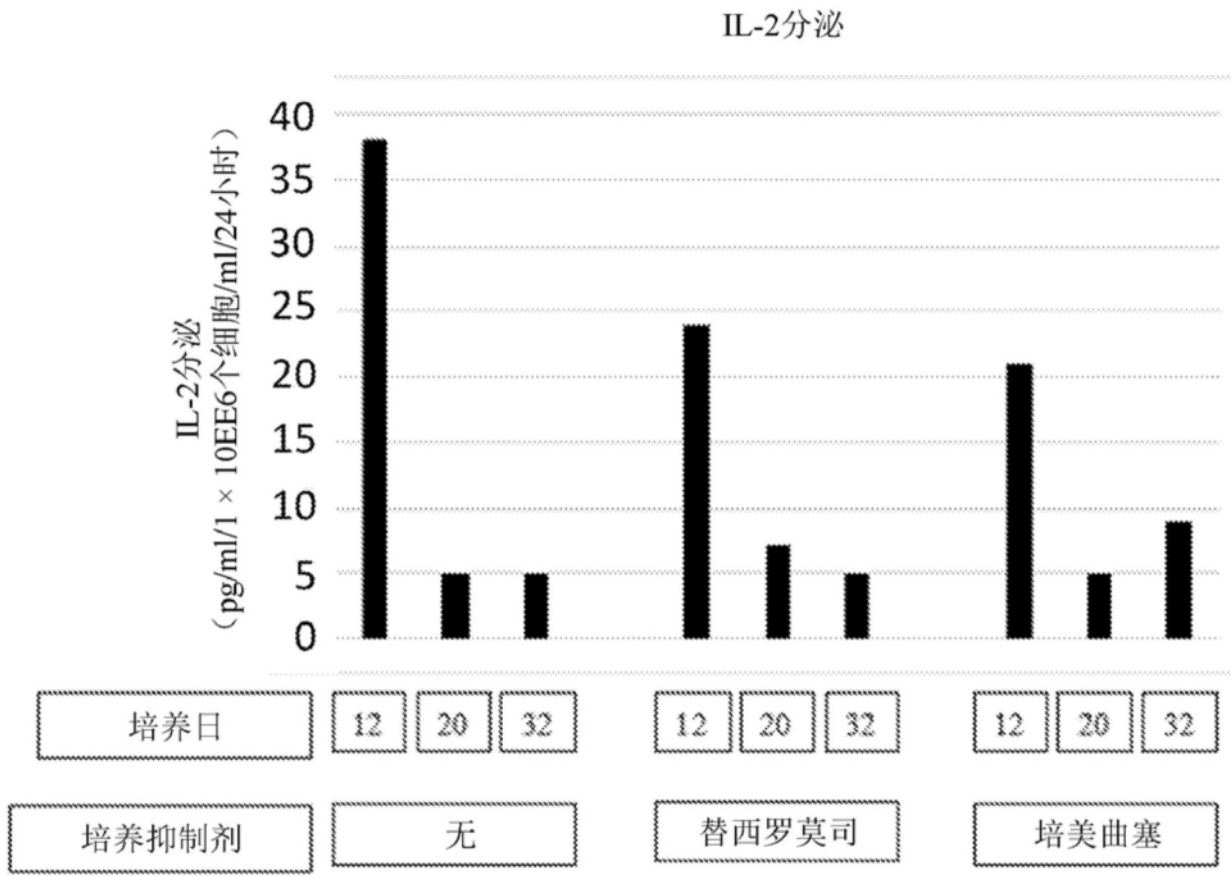


图22A

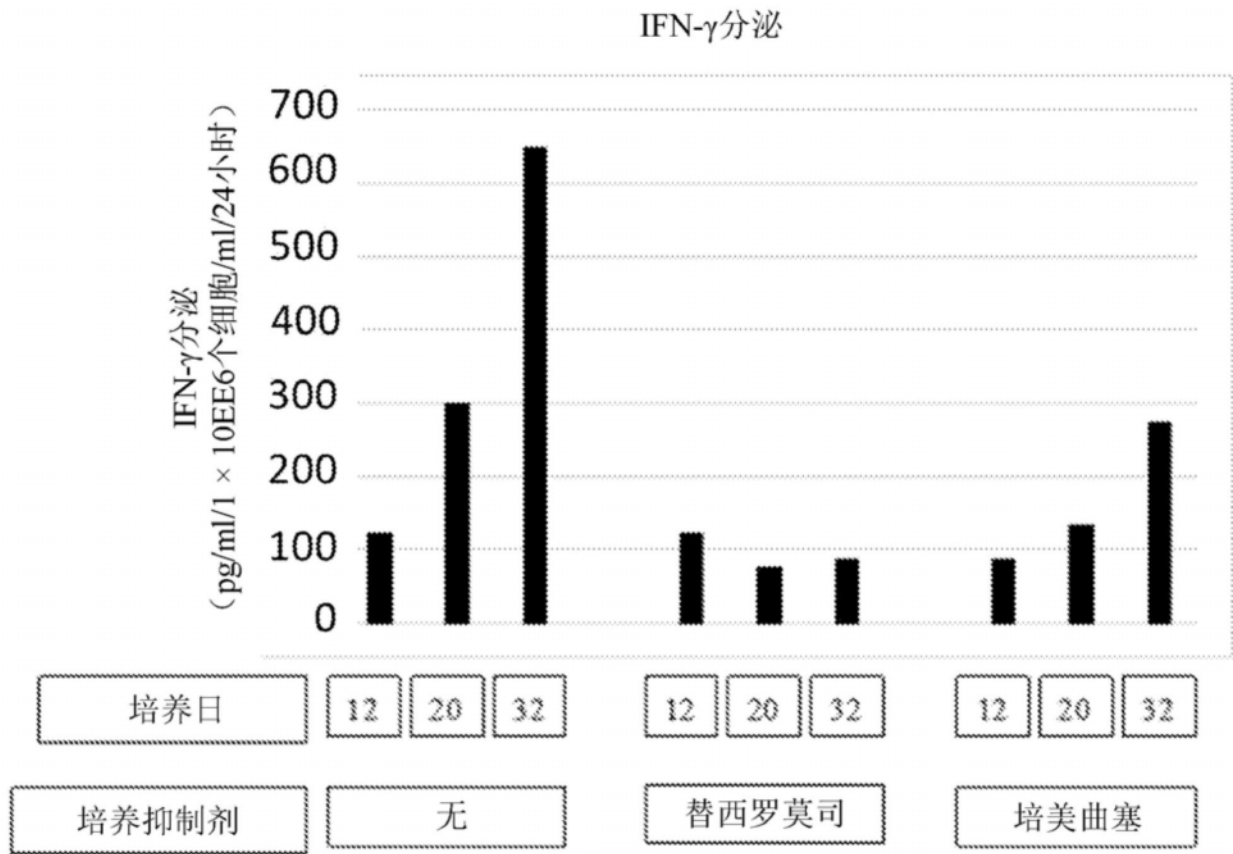


图22B

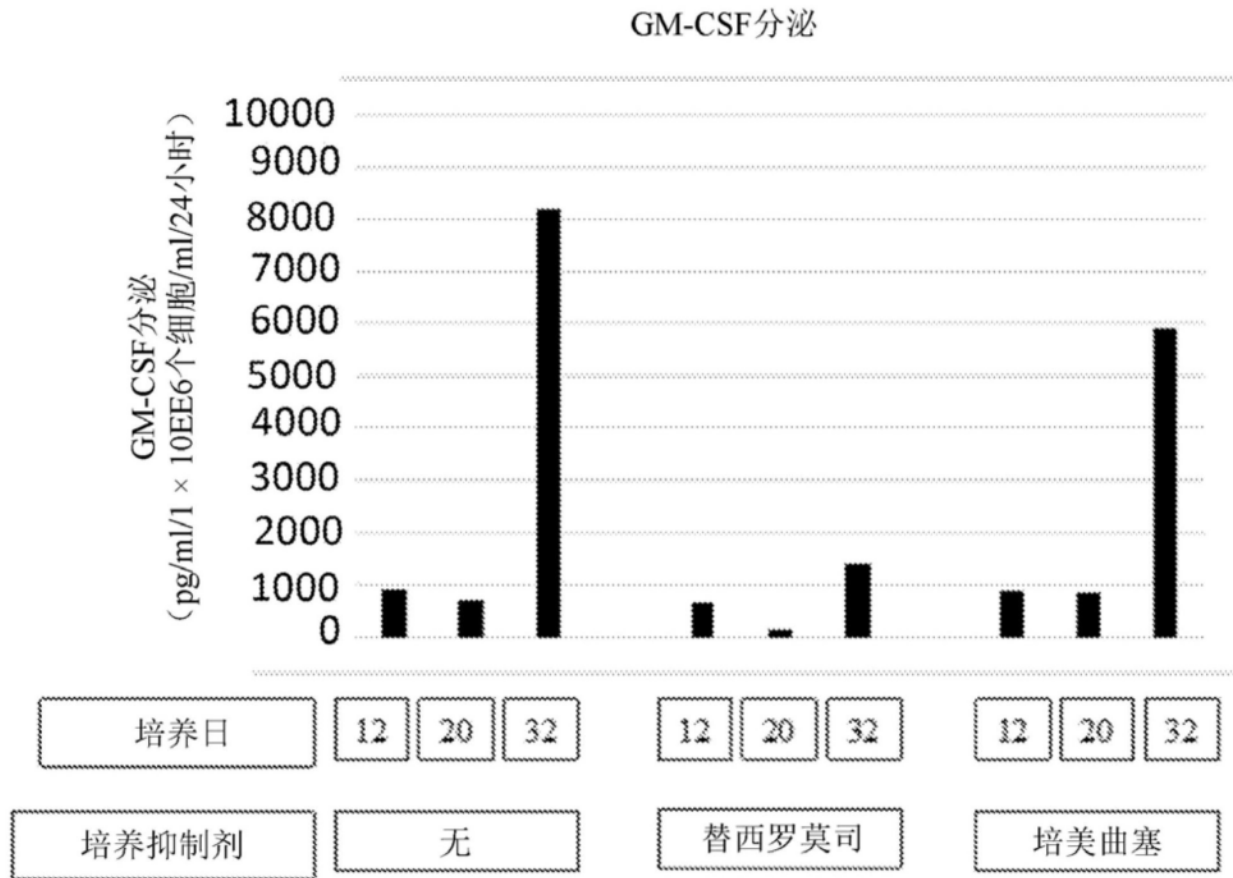


图22C

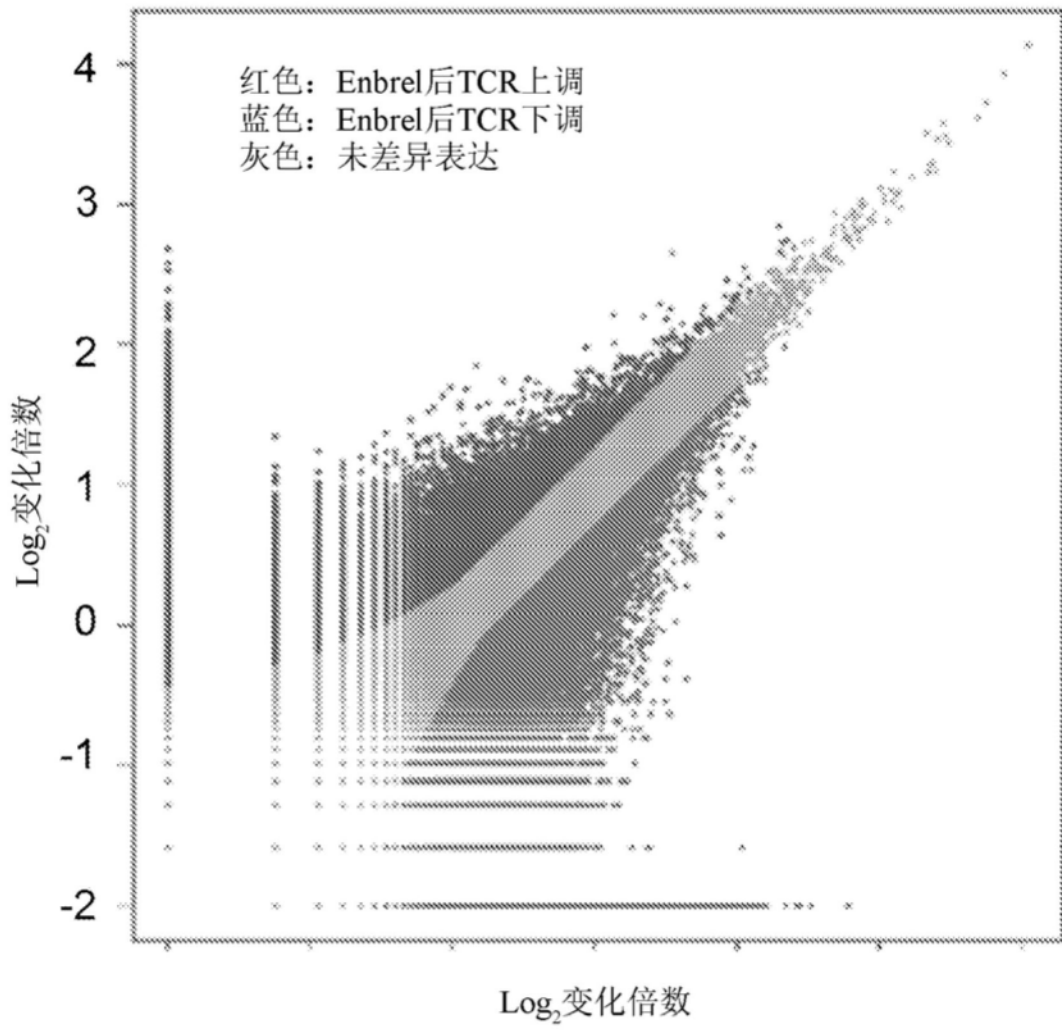


图23A

TCR基因I.D.: Enbrel后上调	Enbrel前的表达	Enbrel后的表达
CASSSTGDSYGYTF:TRBV12-3:TRBD1:TRBJ1-2:12:16:25:26	0.01	486.910399
CASSGGGPFDEQFF:TRBV12-3:TRBD1:TRBJ2-1:10:14:19:20	0.01	382.293833
CASSYTEQVF:TRBV12-4:TRBJ2-7:12-1:1:16	0.01	336.733749
CASSVEILLAGGQSPSTDTQVF:TRBV12-4:TRBD1:TRBJ2-3:11:24:34:45	0.01	247.225867

TCR基因I.D.: Enbrel后下调	Enbrel前的表达	Enbrel后的表达
CASSSTGDSYGYTF:TRBV12-4:TRBD1:TRBJ1-2:12:16:25:26	598.697014	0.01
CASSYTEQVF:TRBV12-3:TRBJ2-7:12-1:1:16	327.829549	0.01
CASSPGQINTEAFF:TRBV12-4:TRBD1:TRBJ1-1:10:11:20:22	272.227753	0.01
CASSGGGPFDEQFF:TRBV12-4:TRBD1:TRBJ2-1:10:14:19:20	259.759444	0.01

图23B

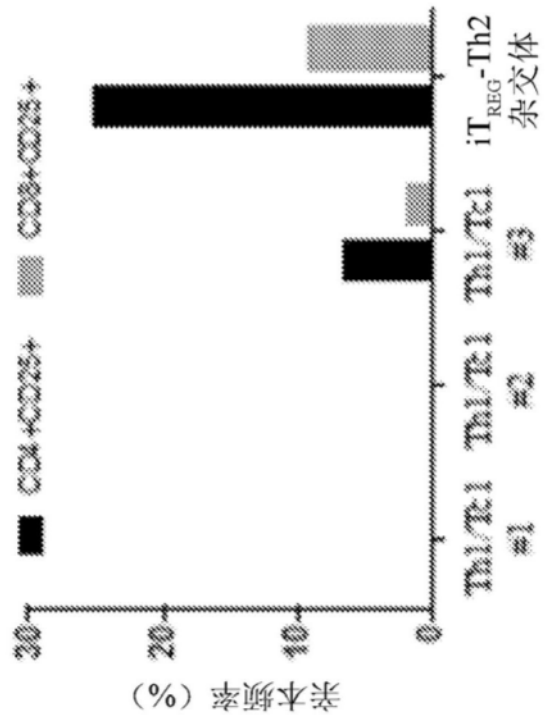
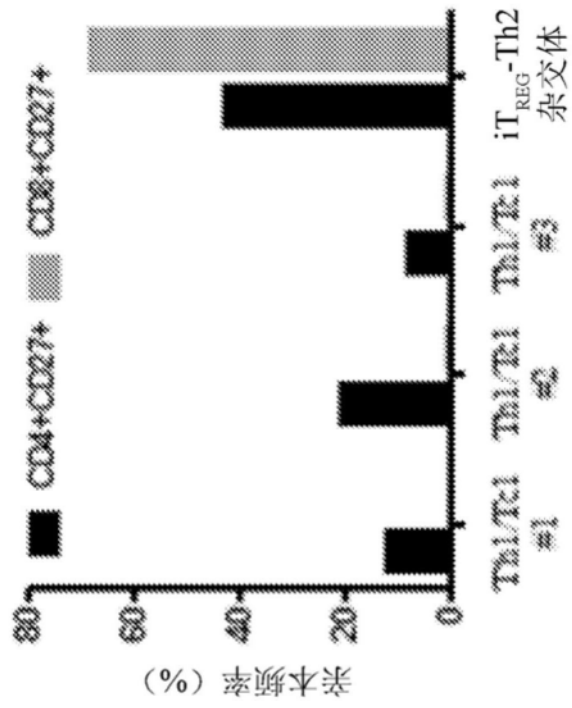


图24

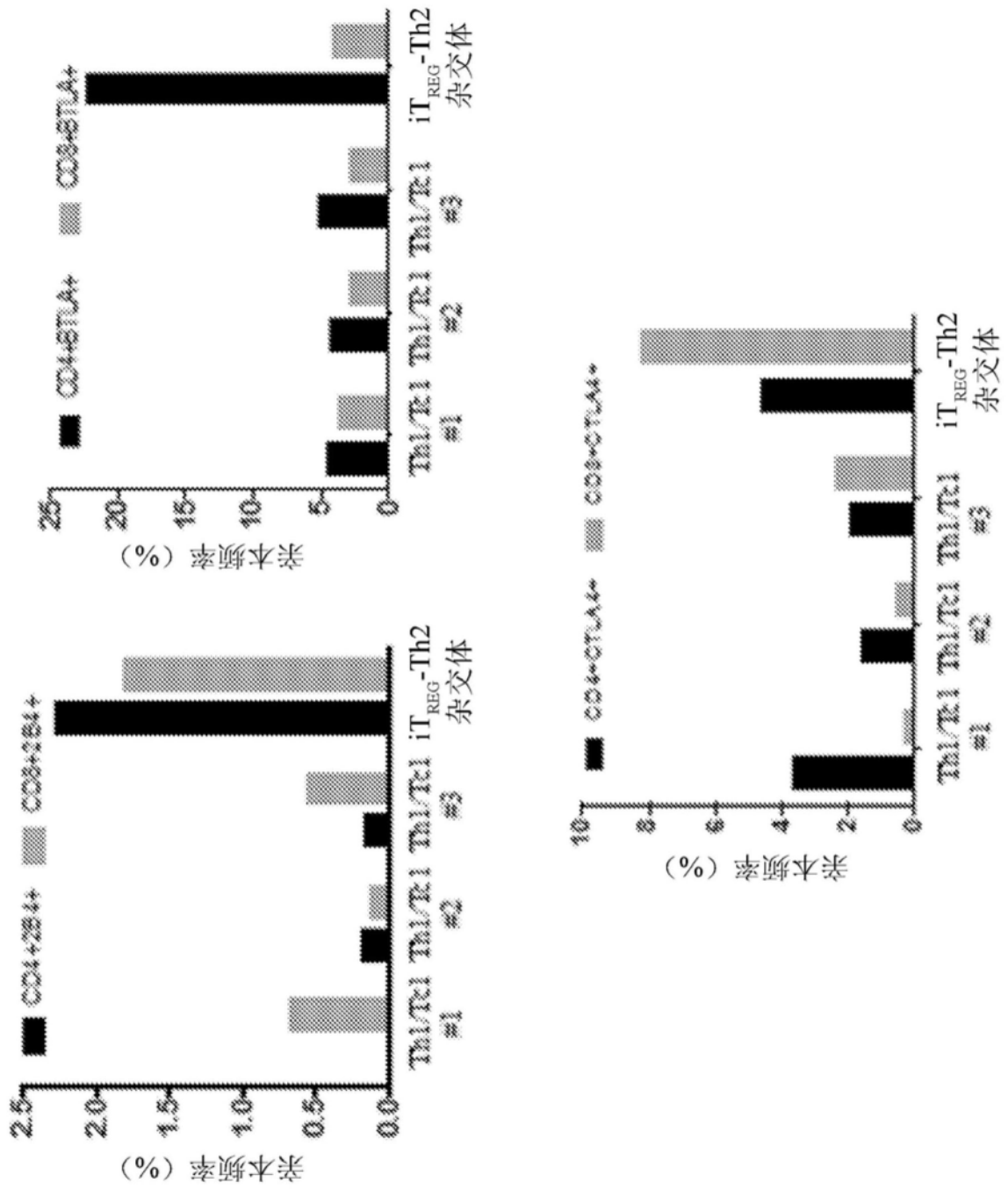


图24续

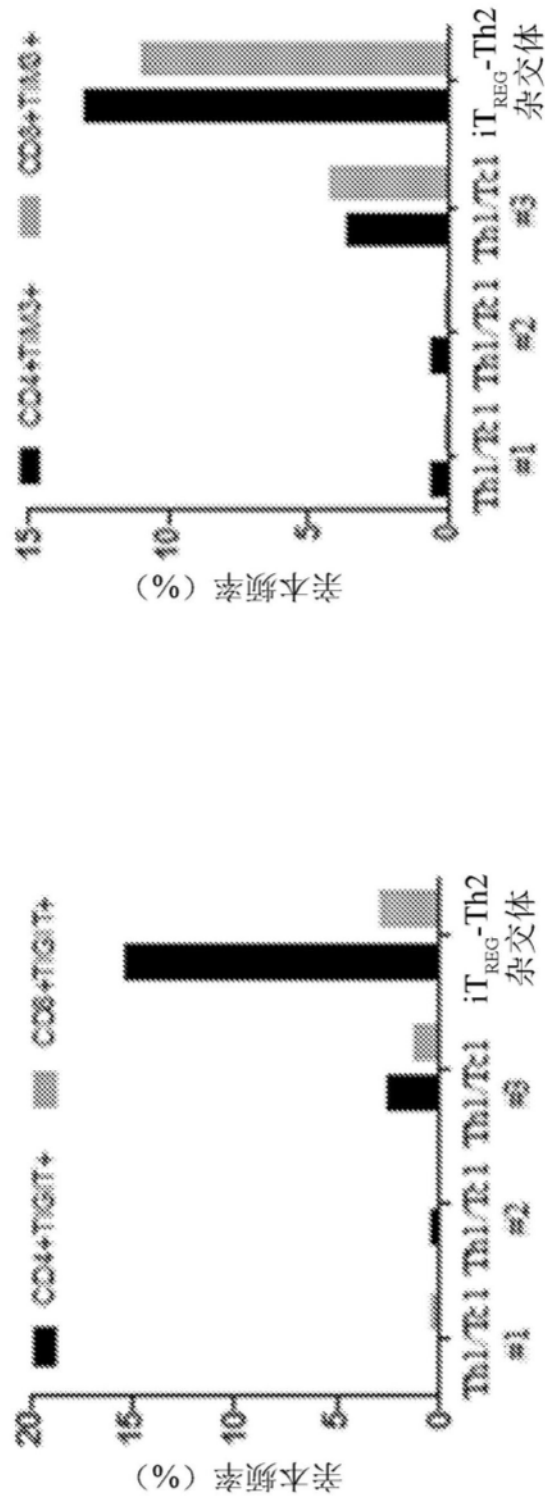


图25

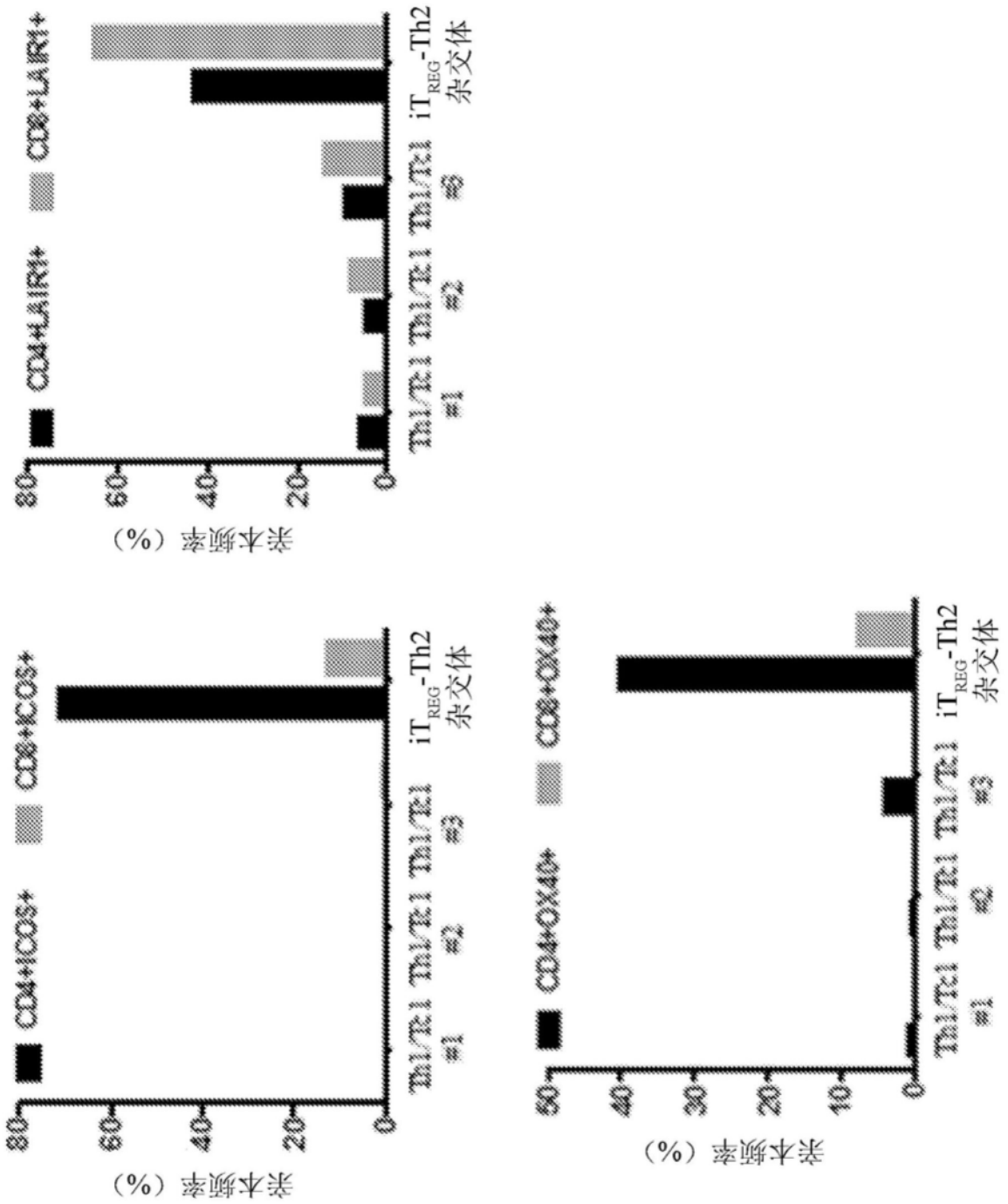


图25续

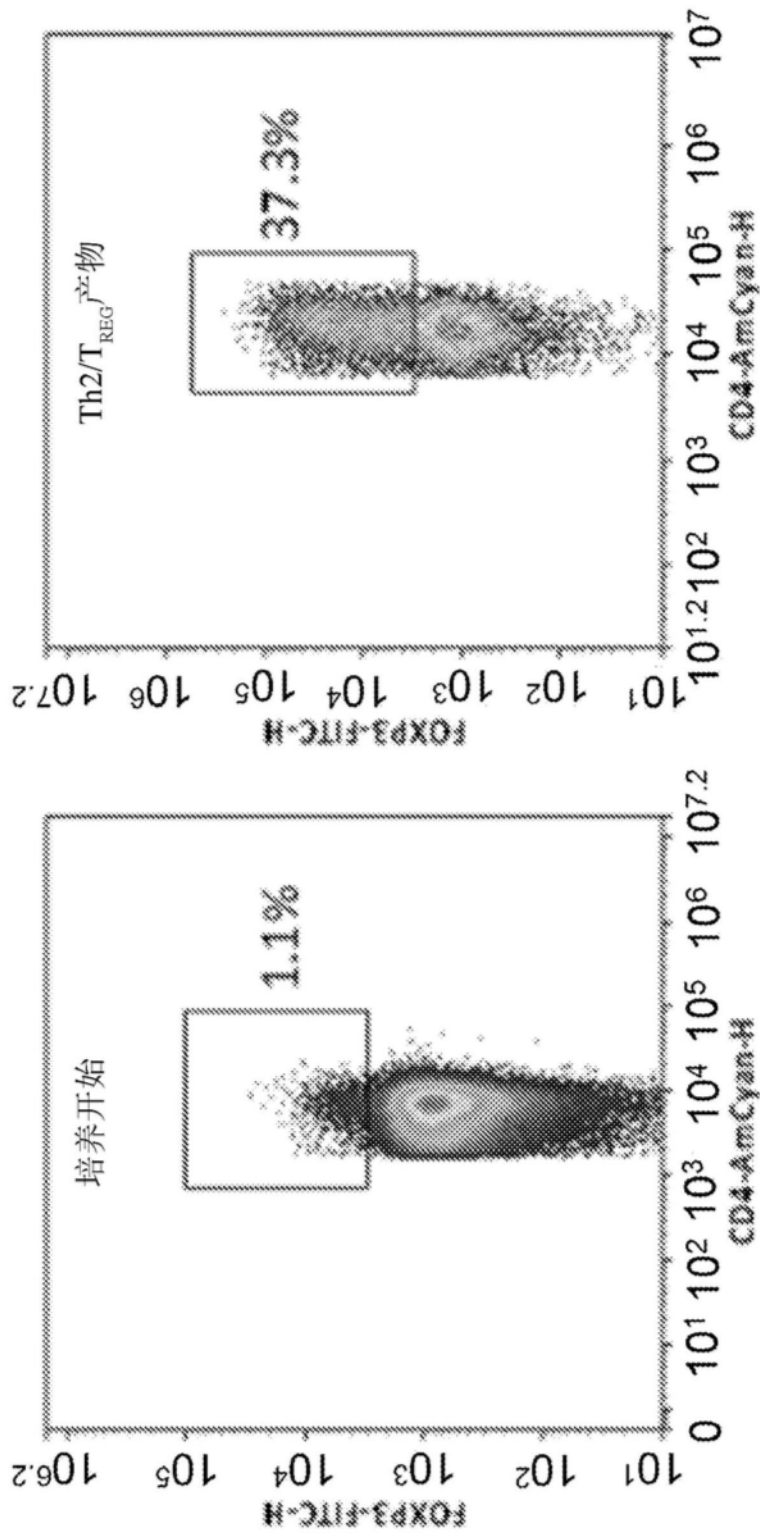


图26A

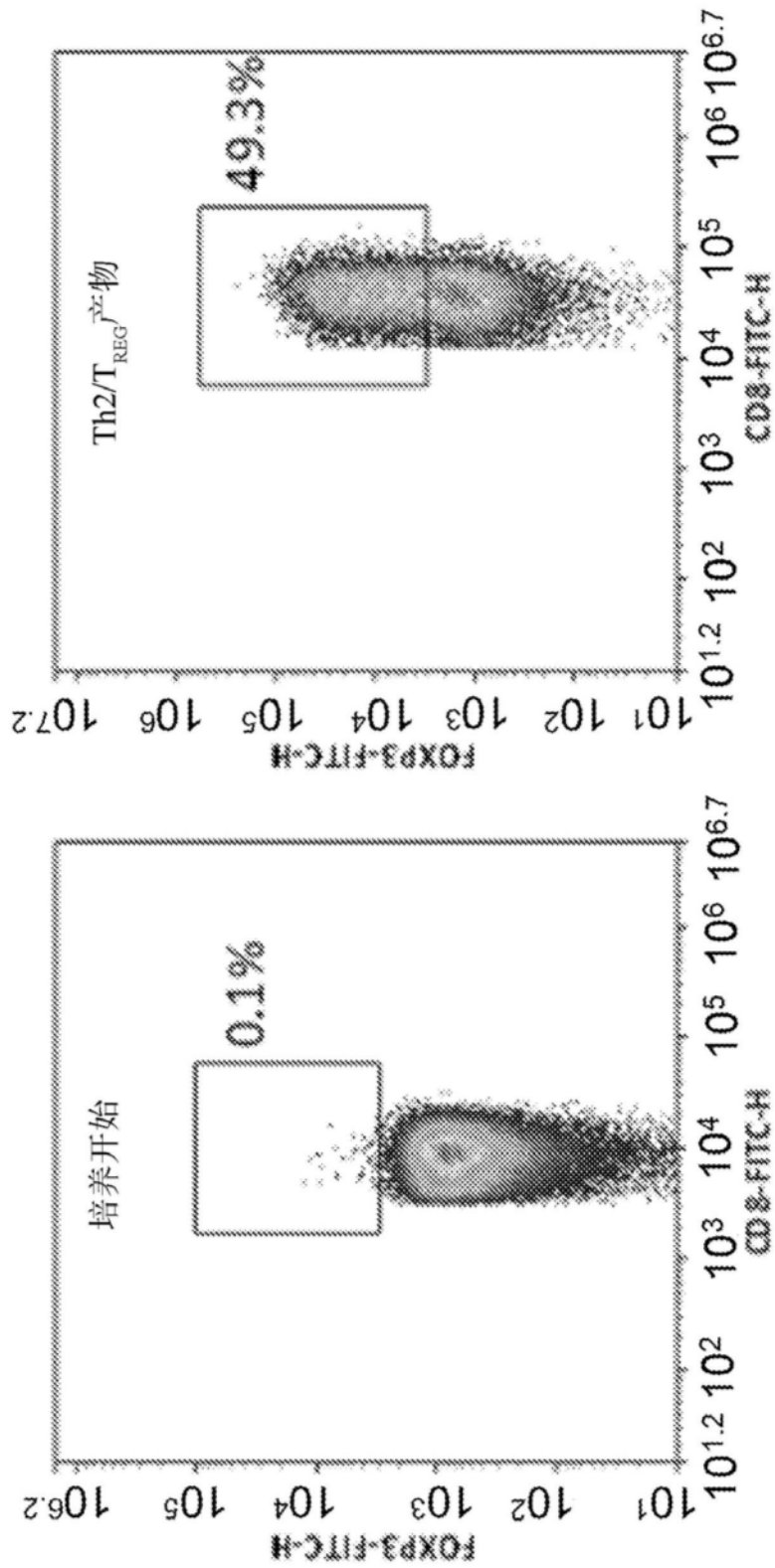


图26A续

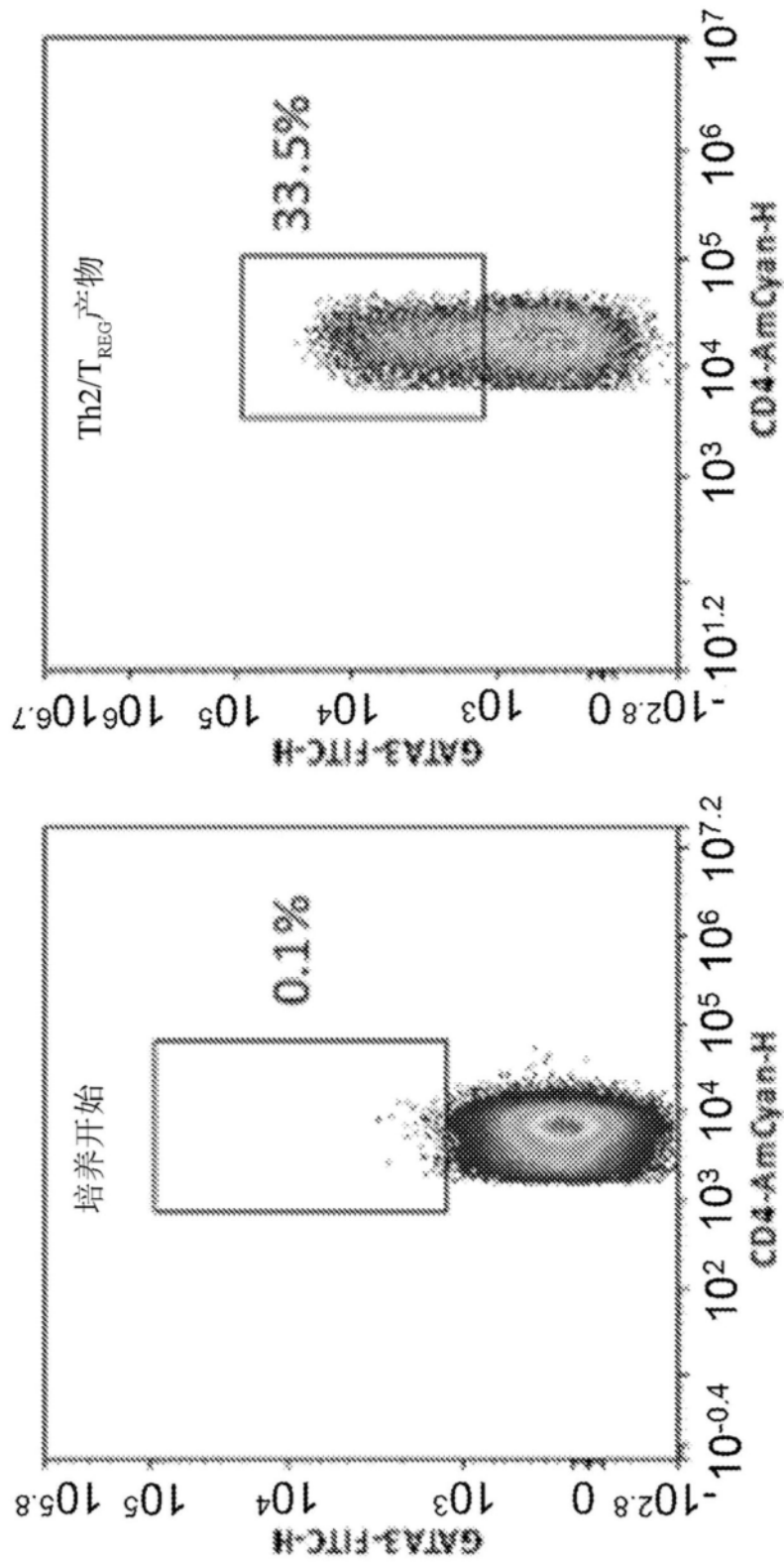


图26B

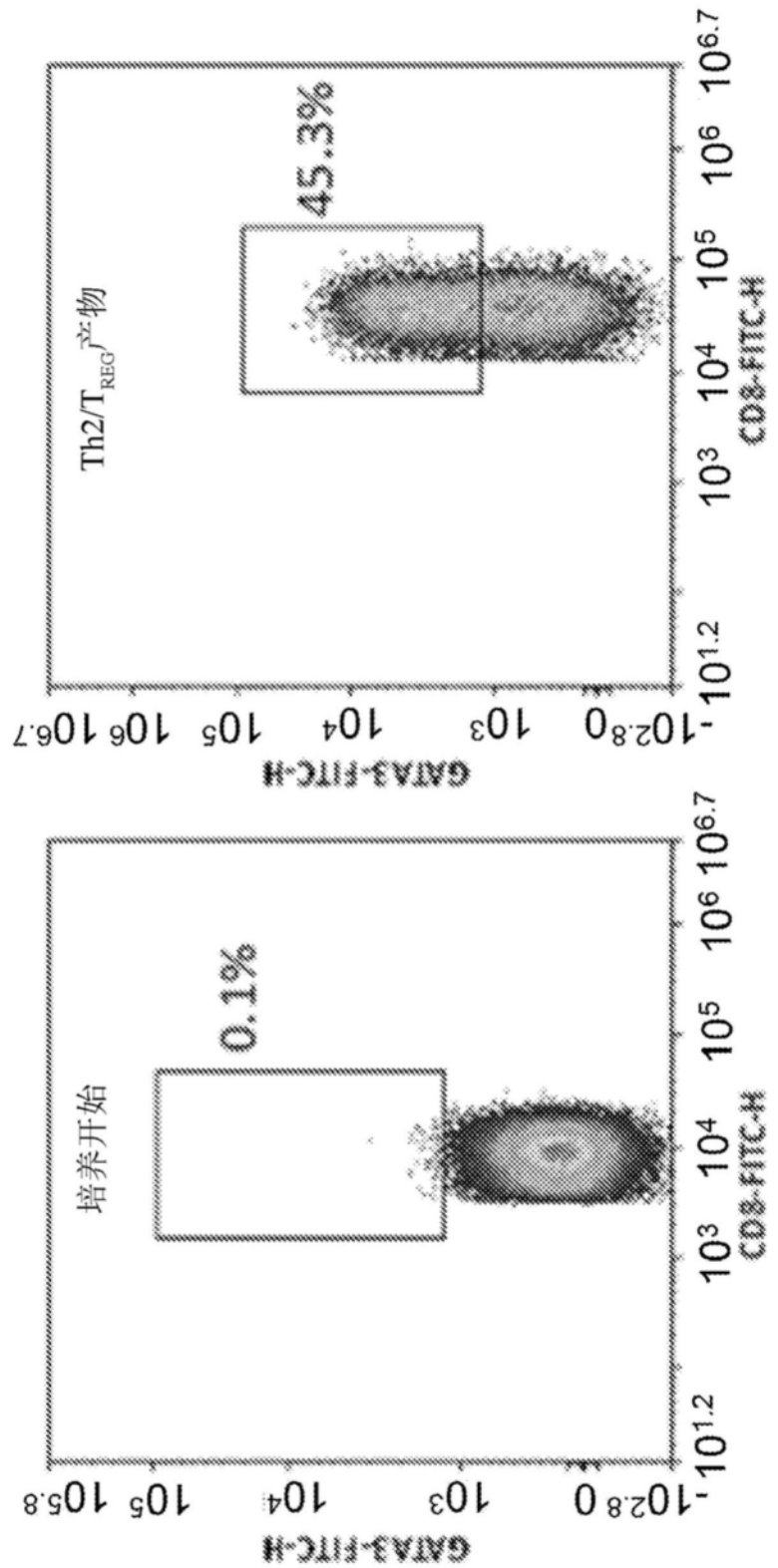


图26B续

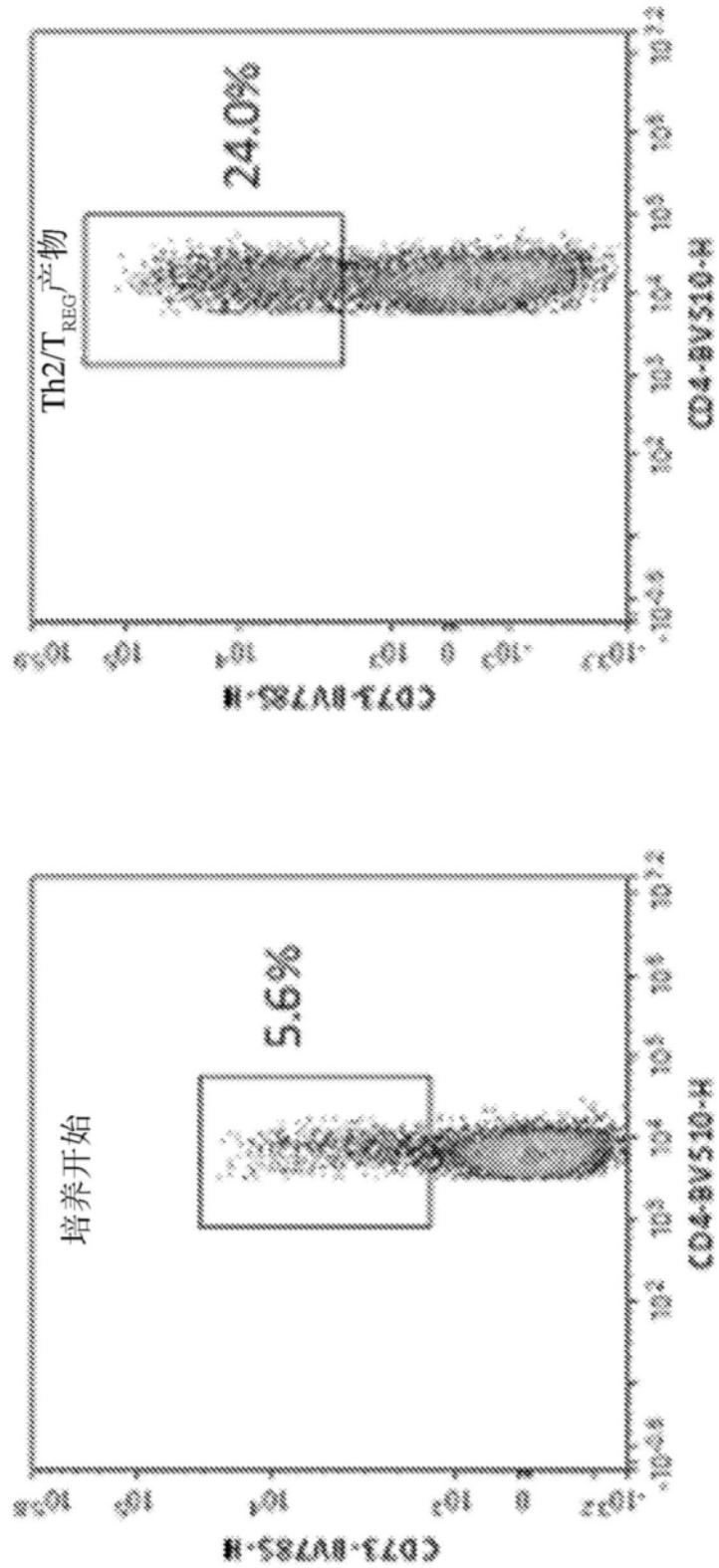


图27A

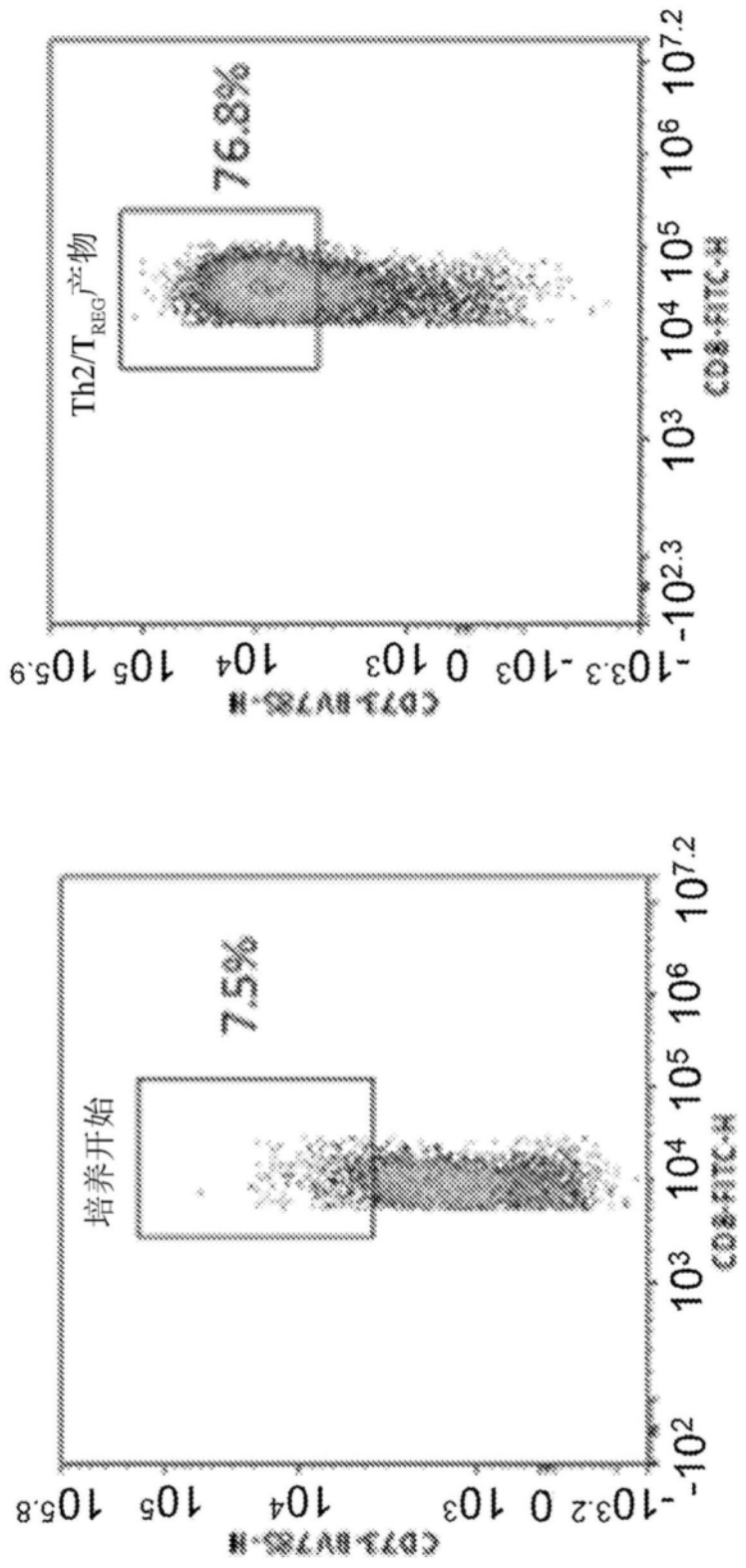


图27A续

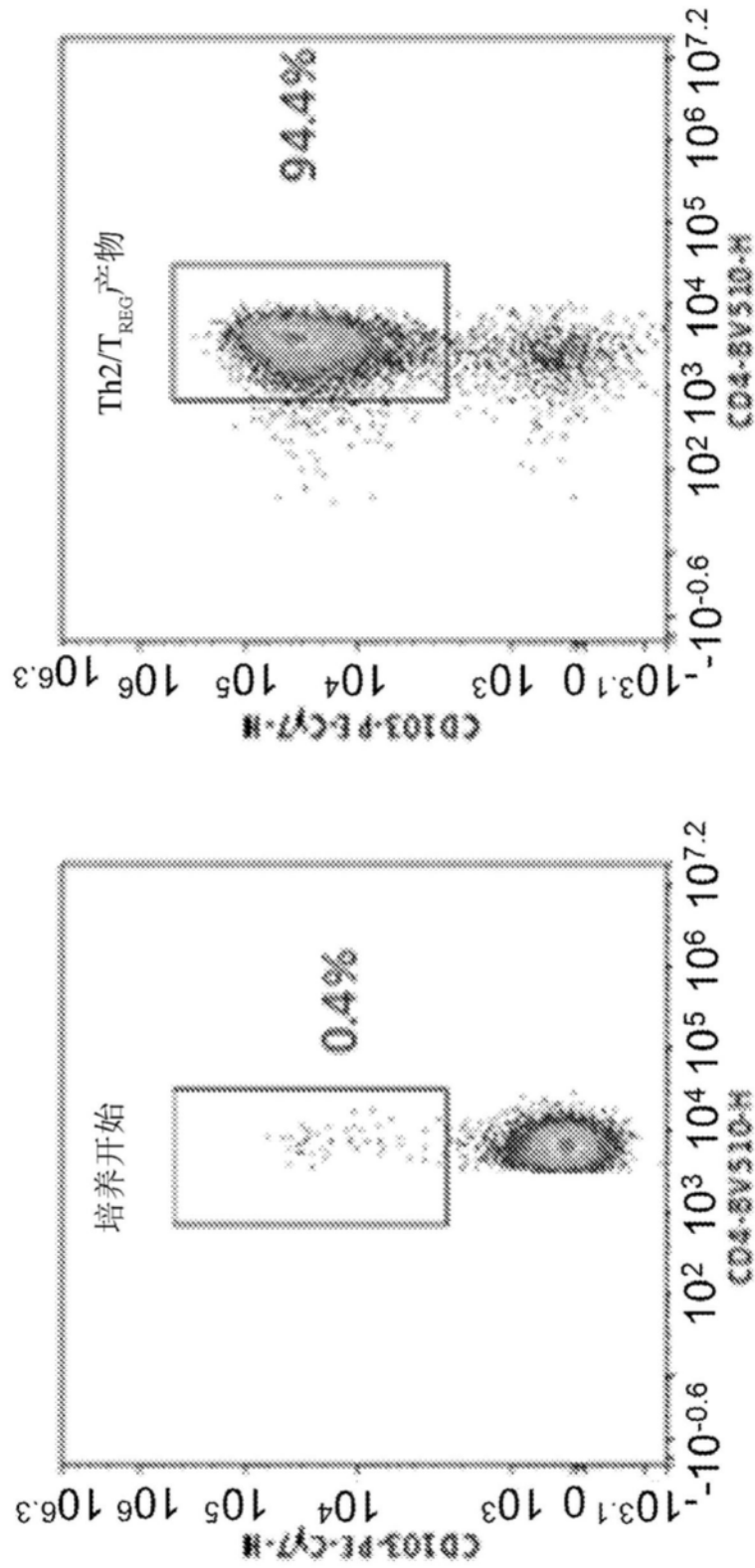


图27B

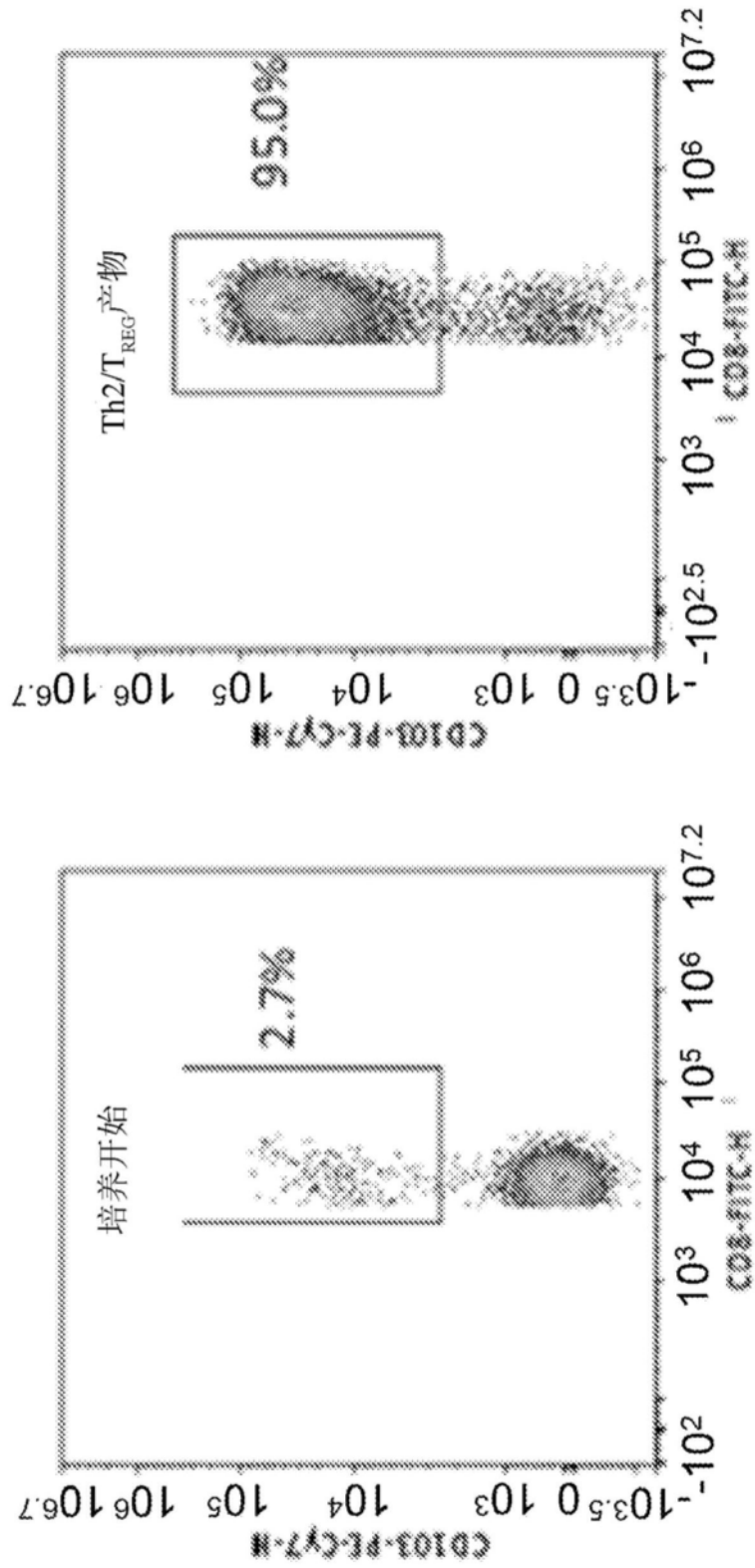


图27B续

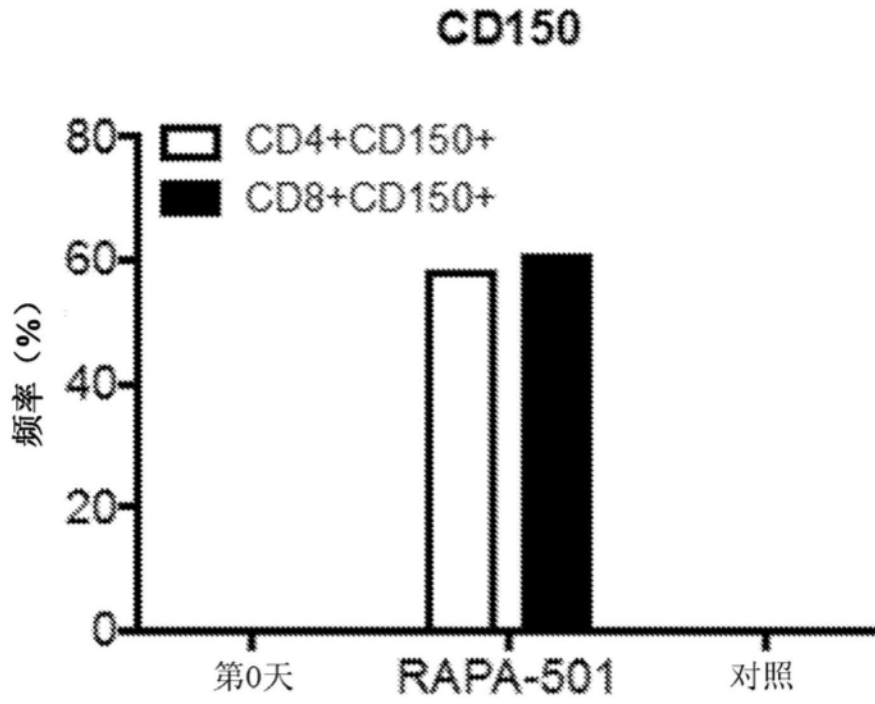


图28A

针对T干细胞记忆表型富集RAPA-501细胞  
(CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>)

第0天 (培养物输入)

RAPA-501

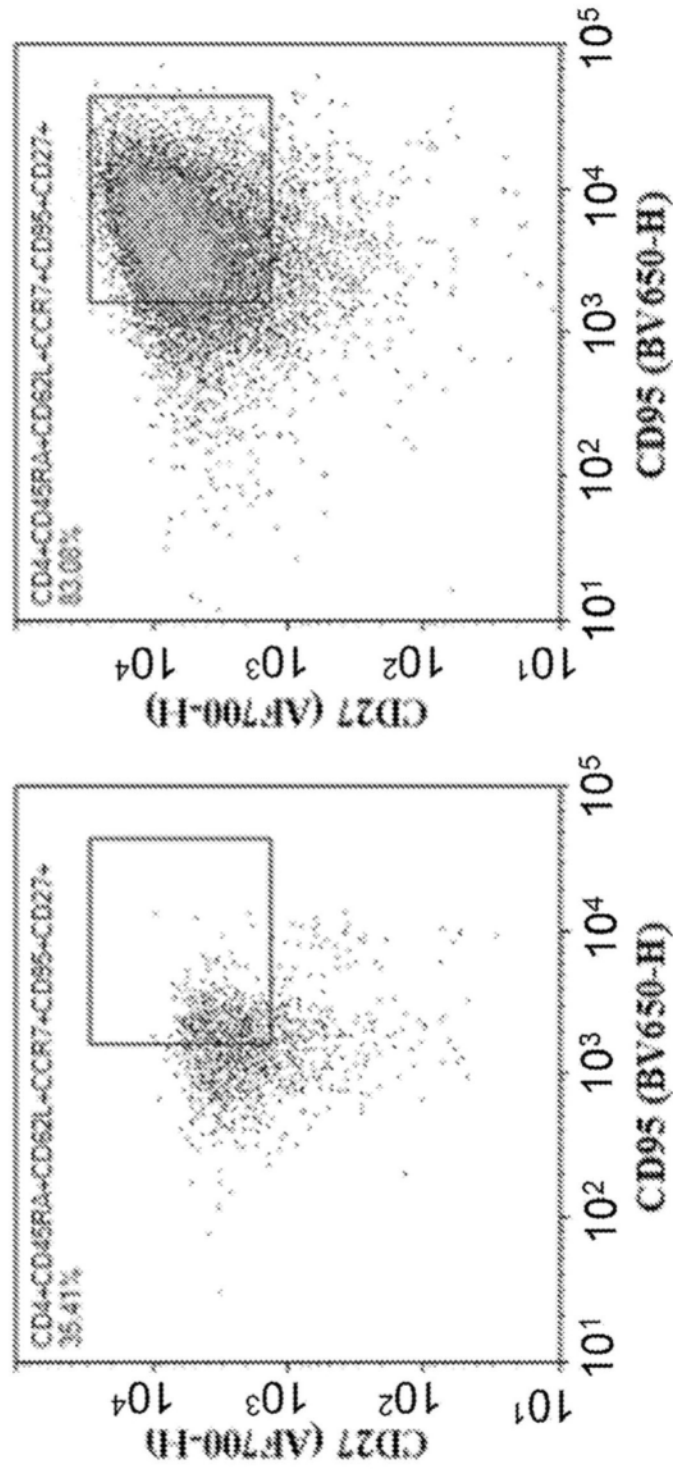


图28B

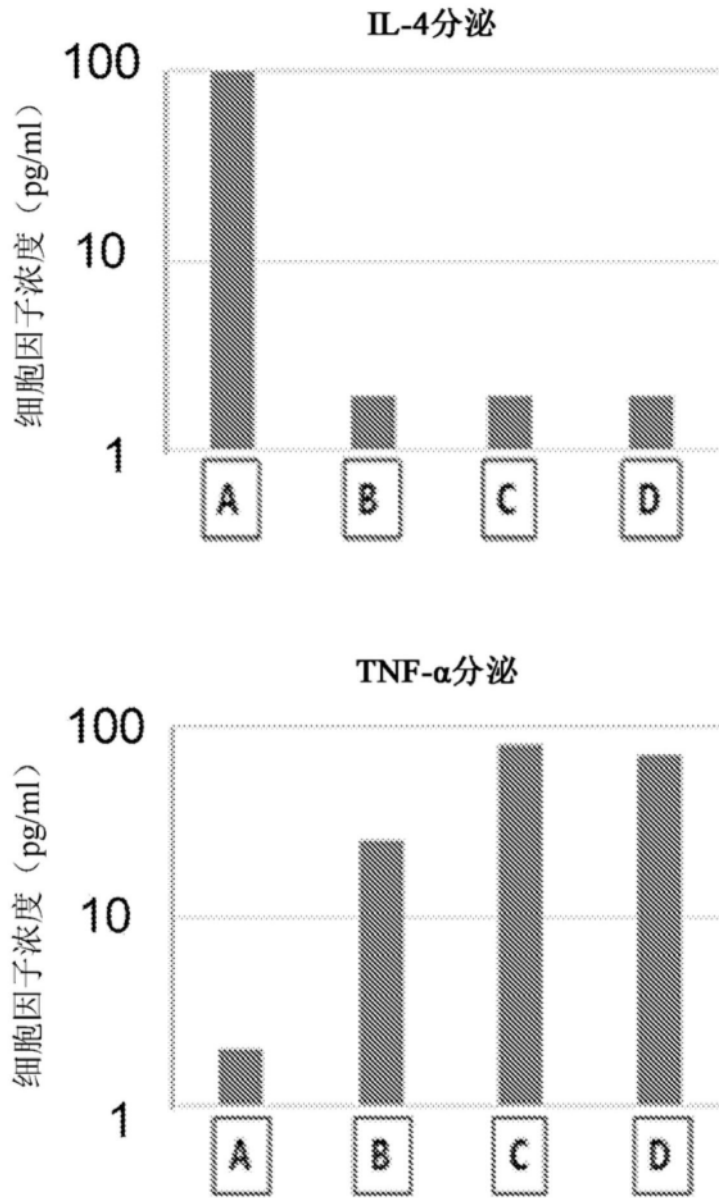


图29

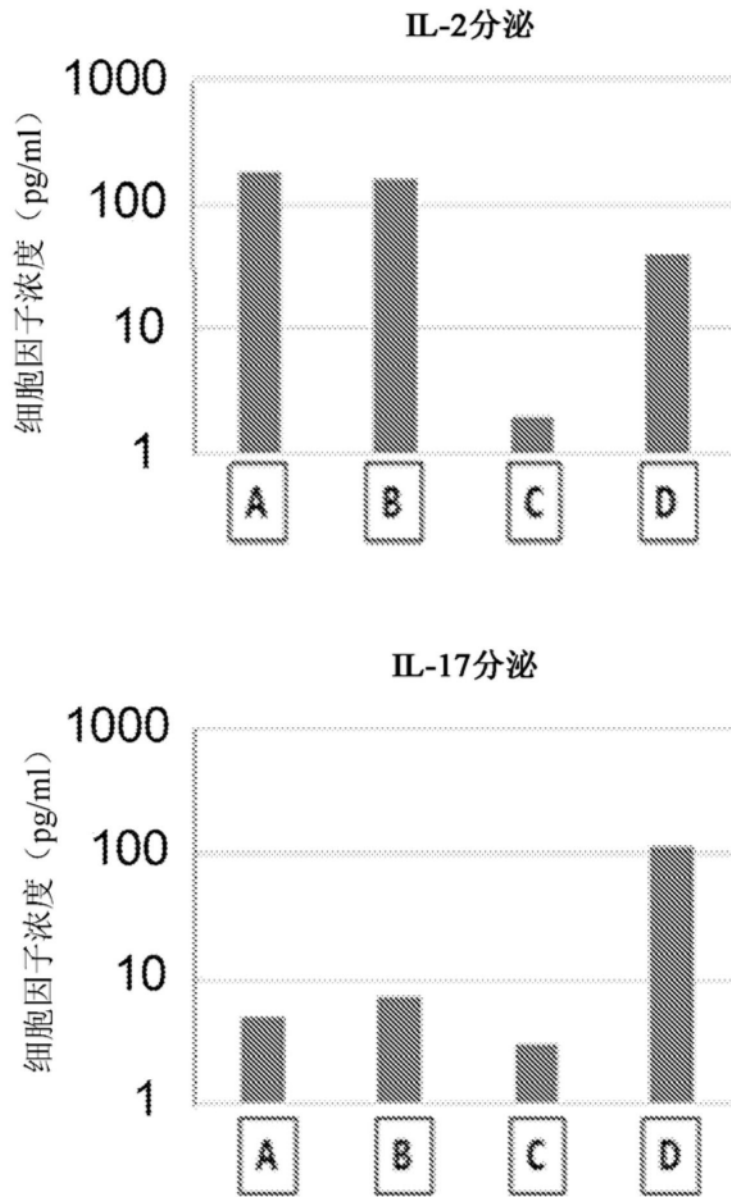


图29续

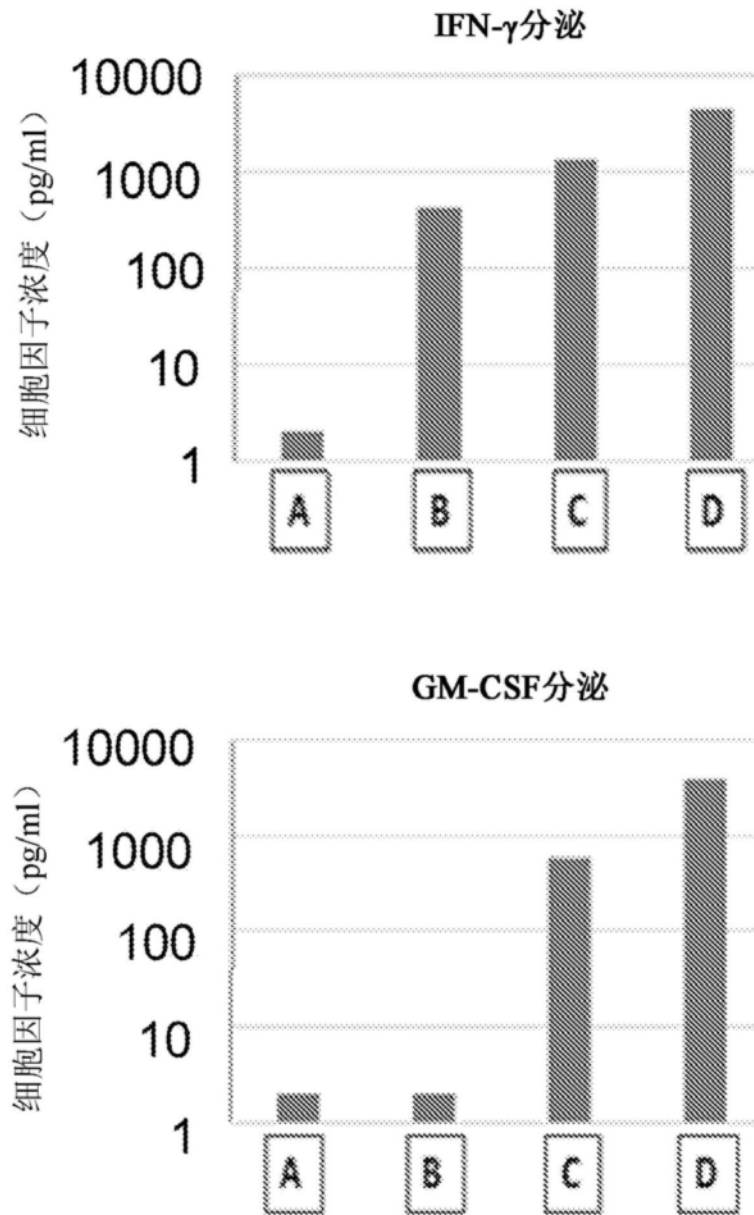


图29续

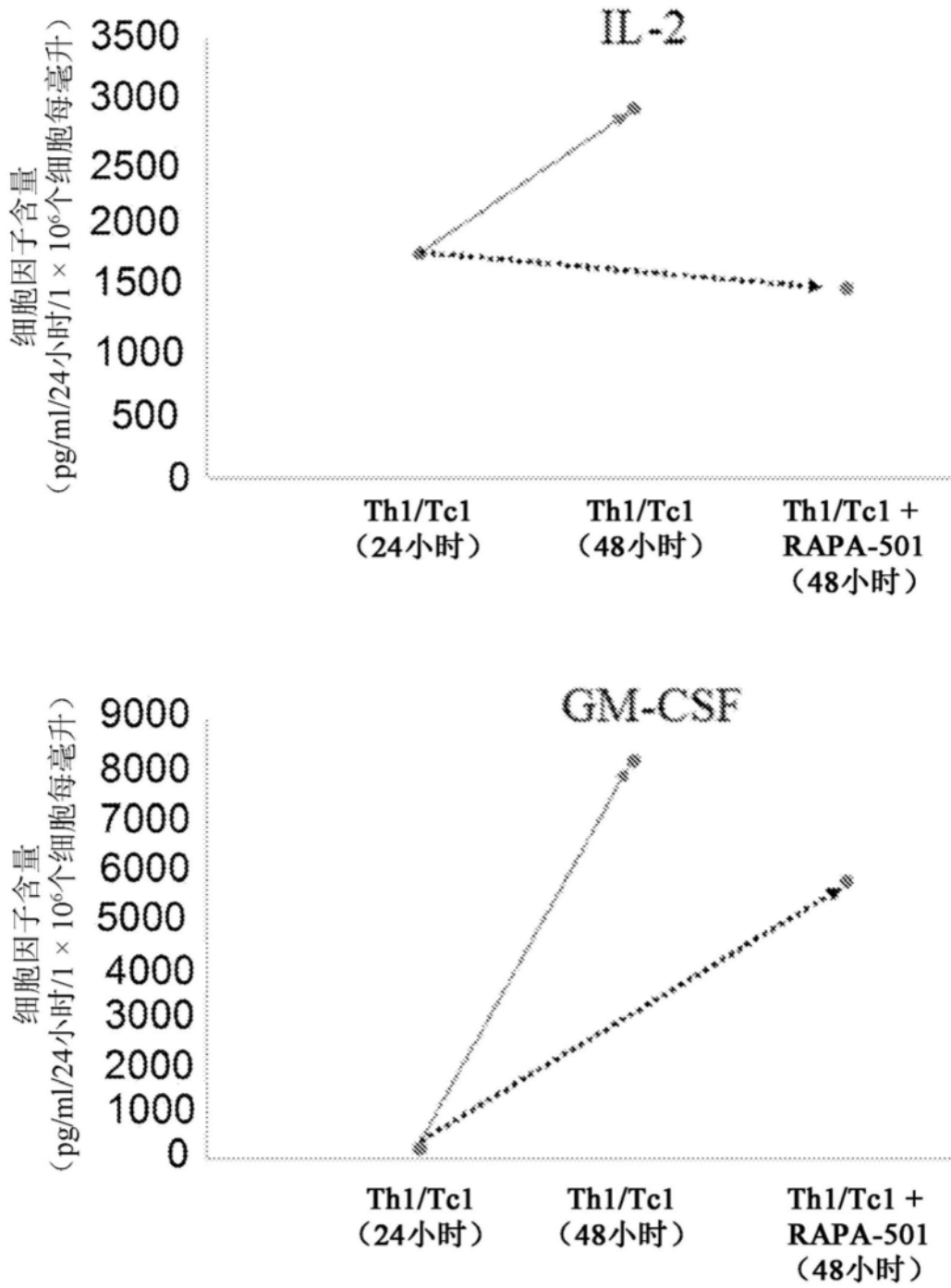


图30A

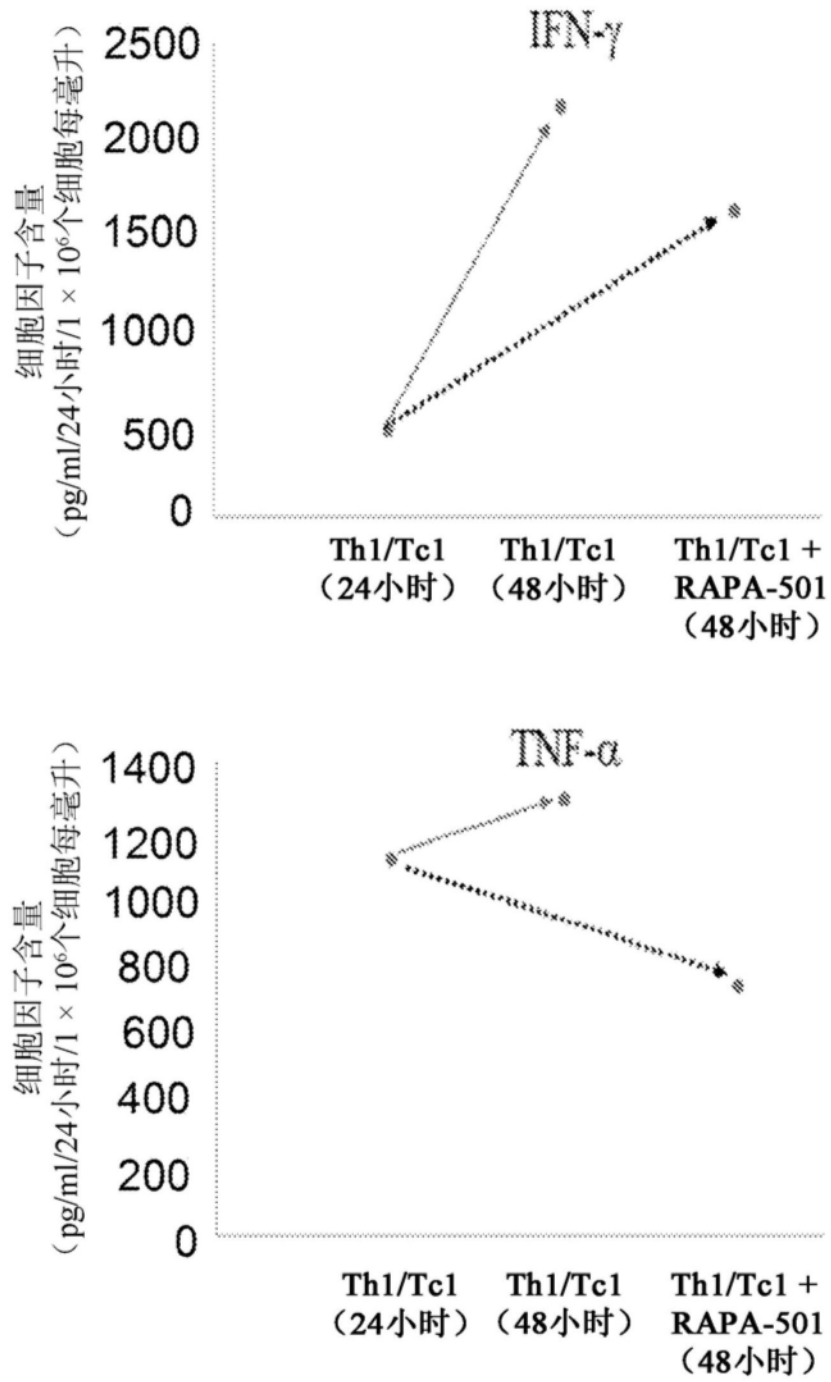


图30A续

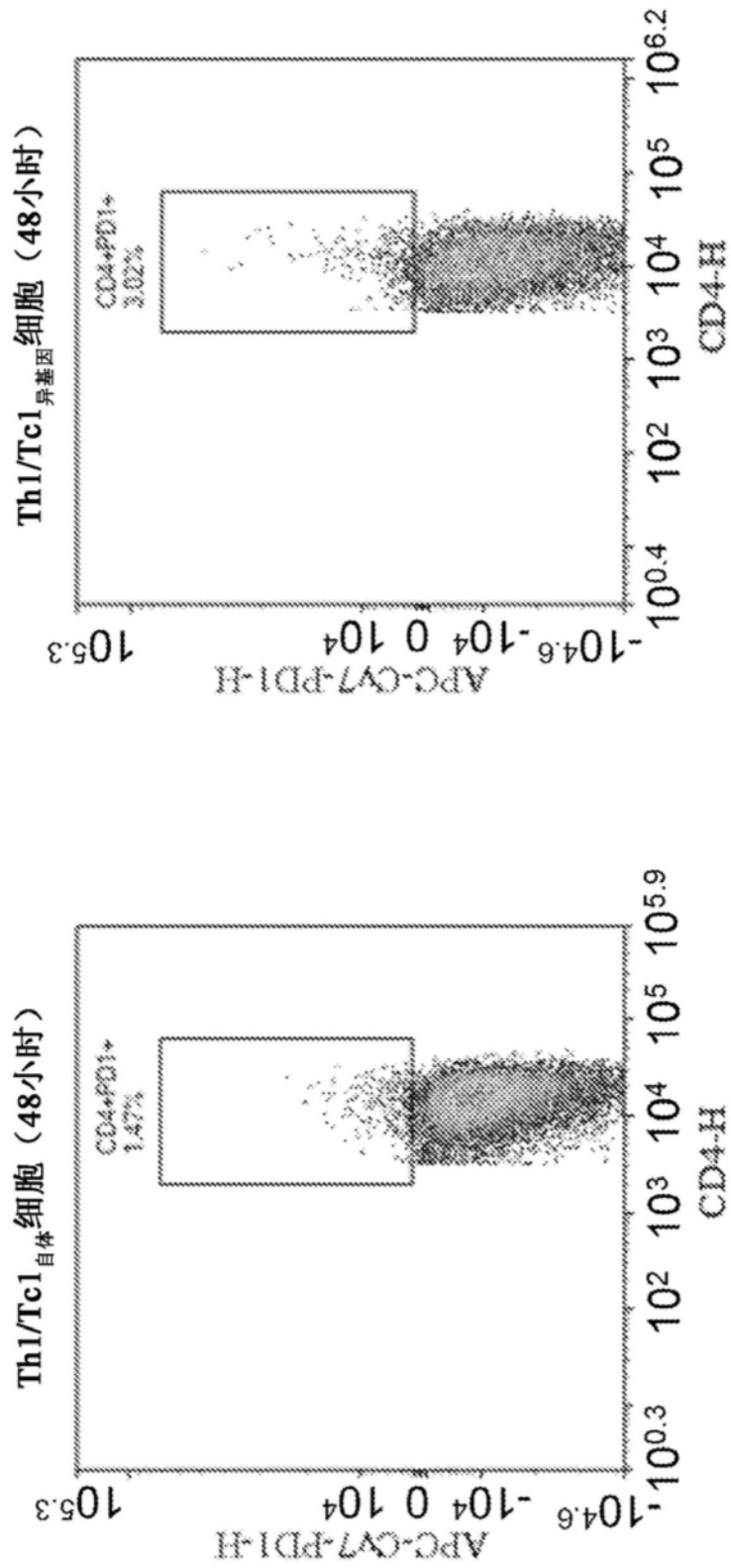


图30B

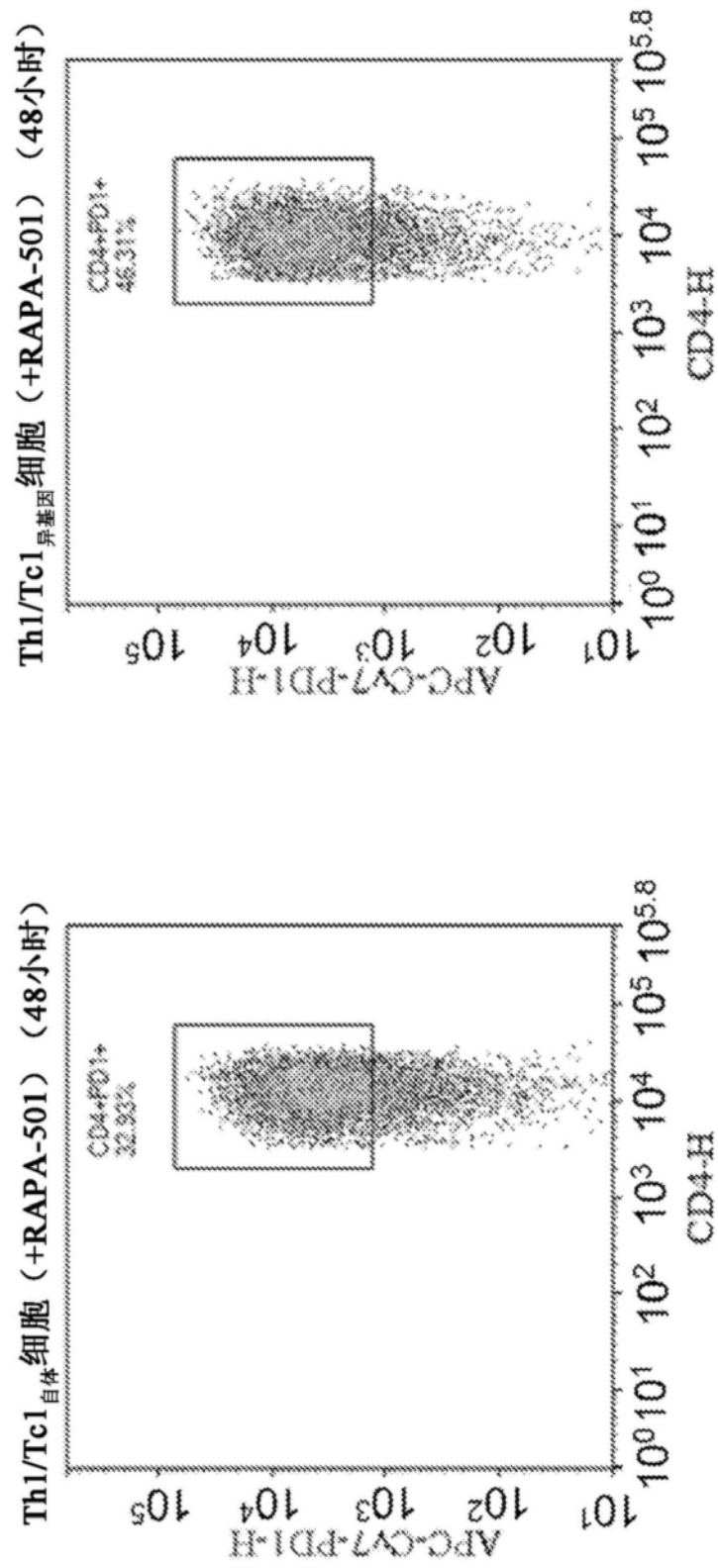


图30B续

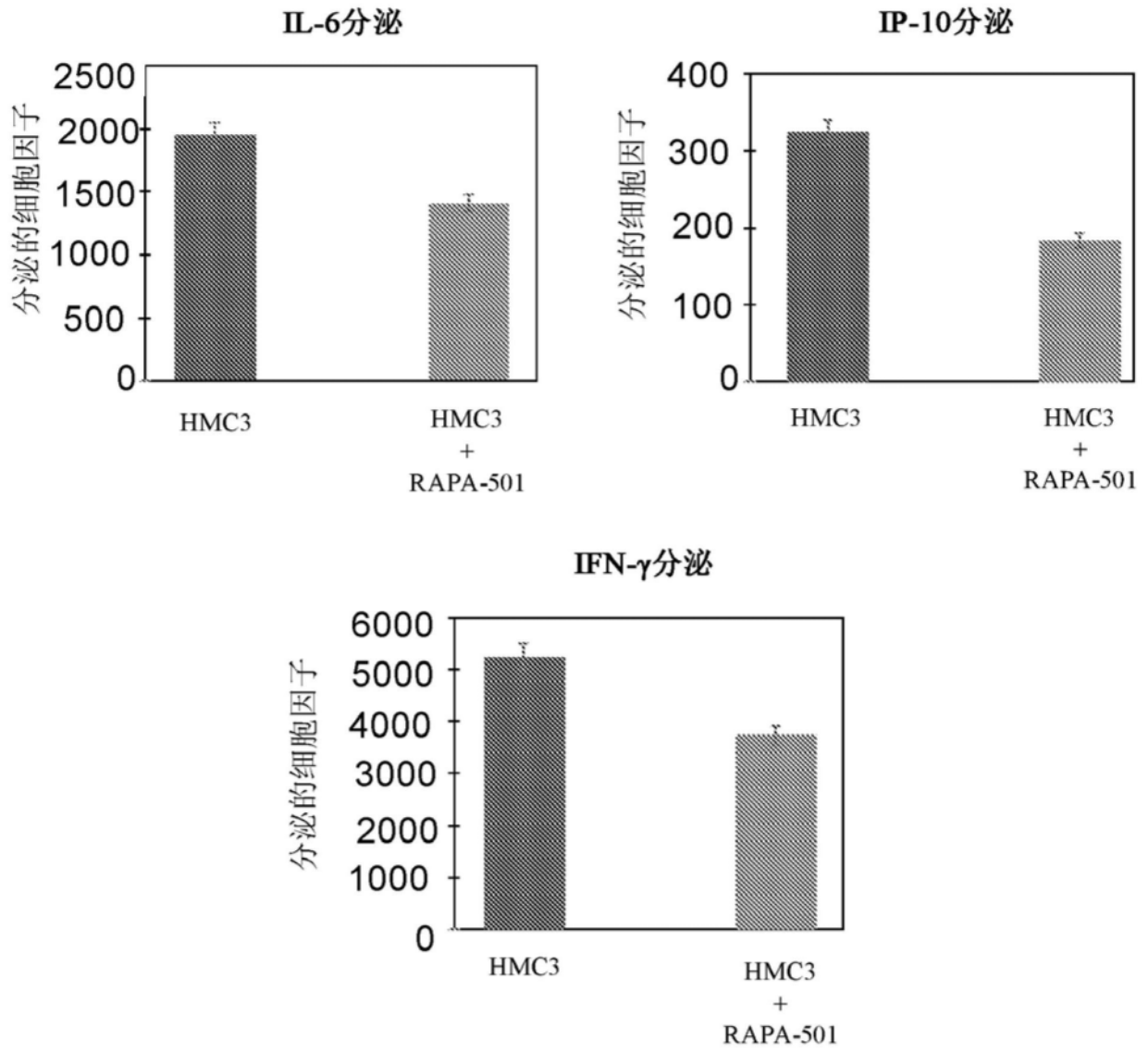


图31A

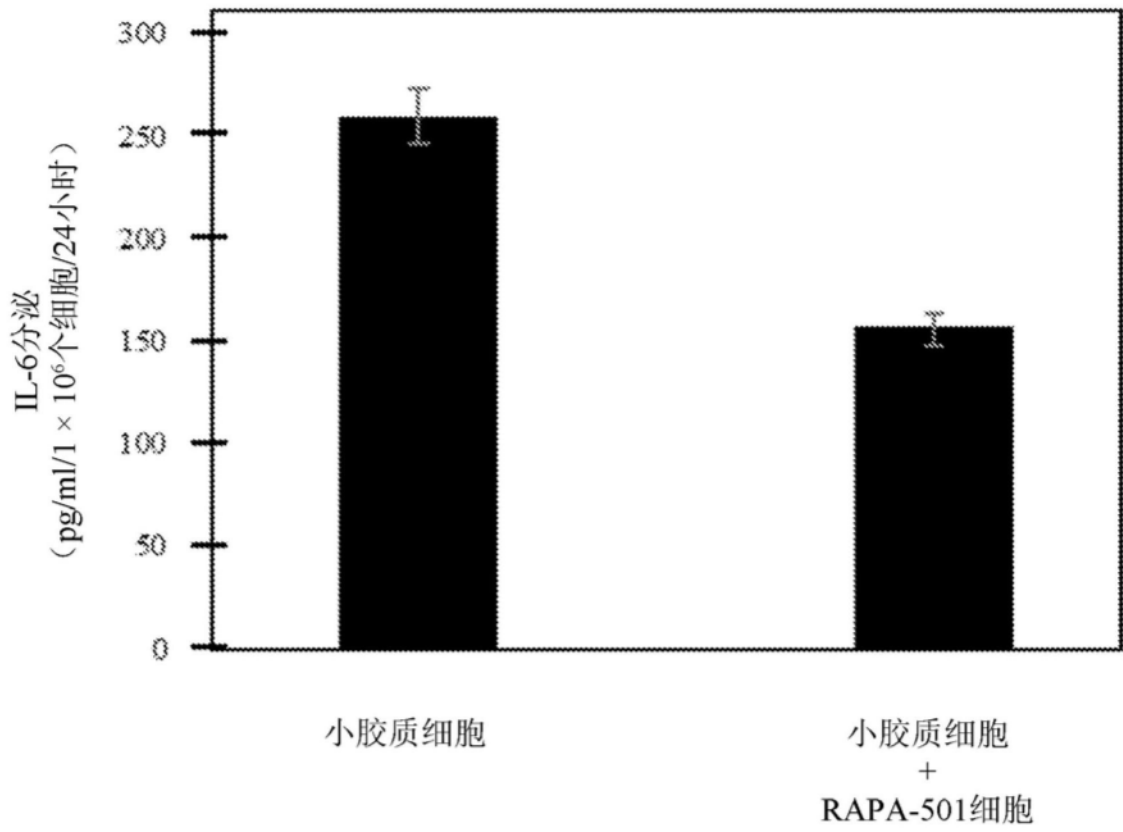


图31B

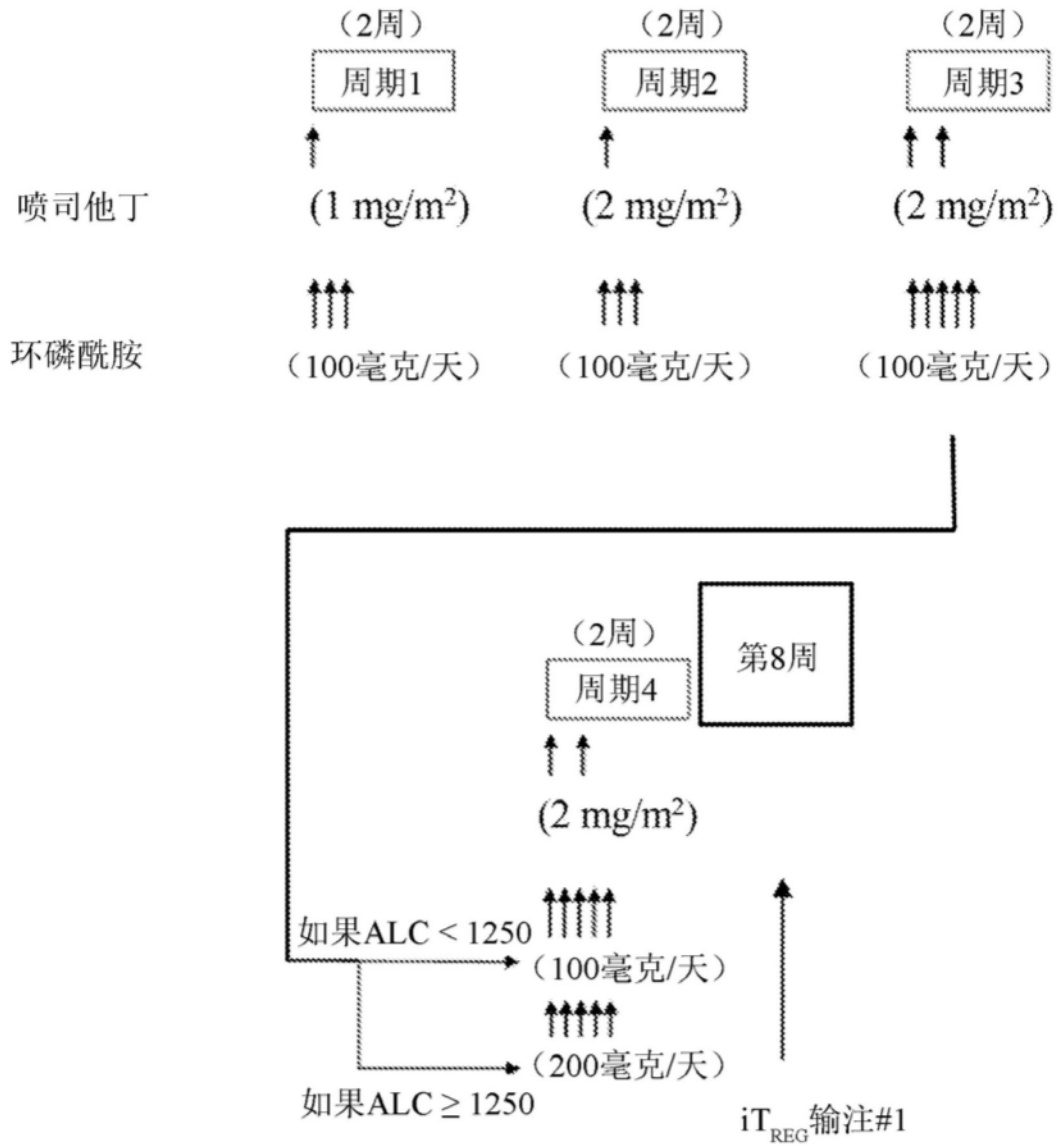


图32

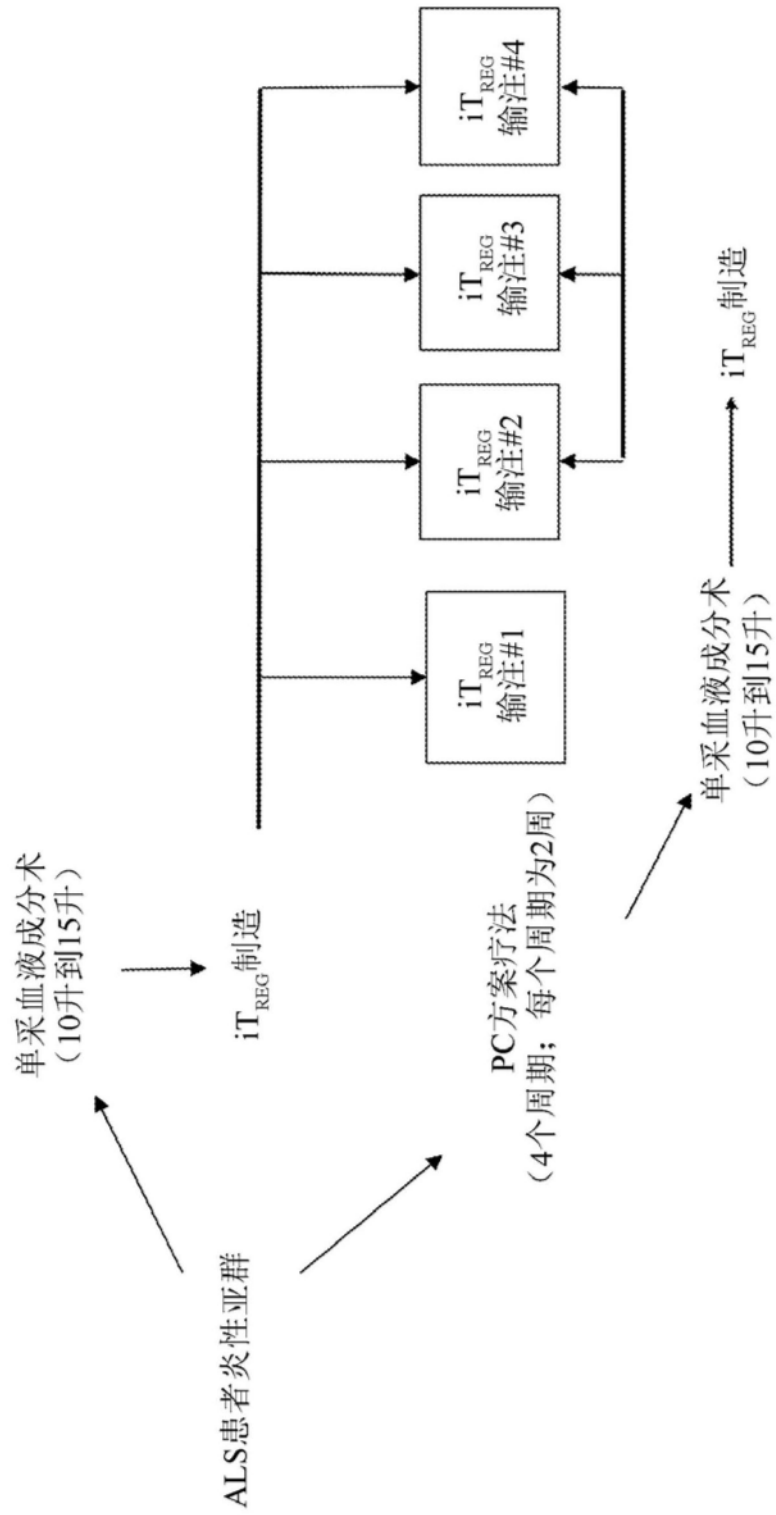


图33

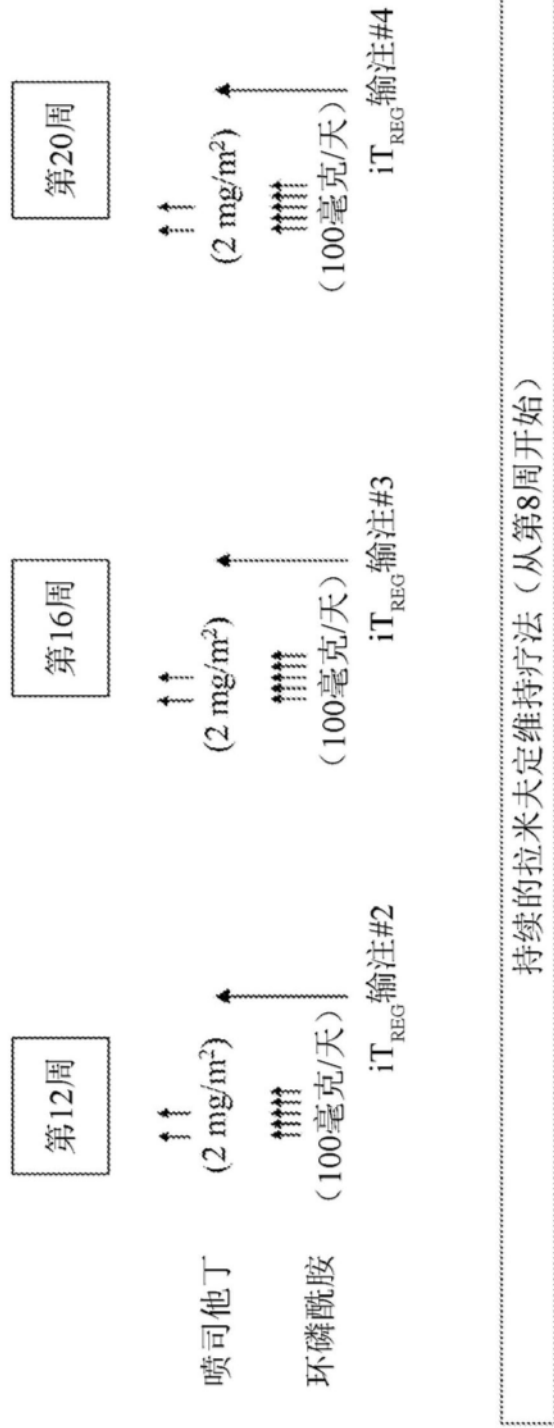


图34

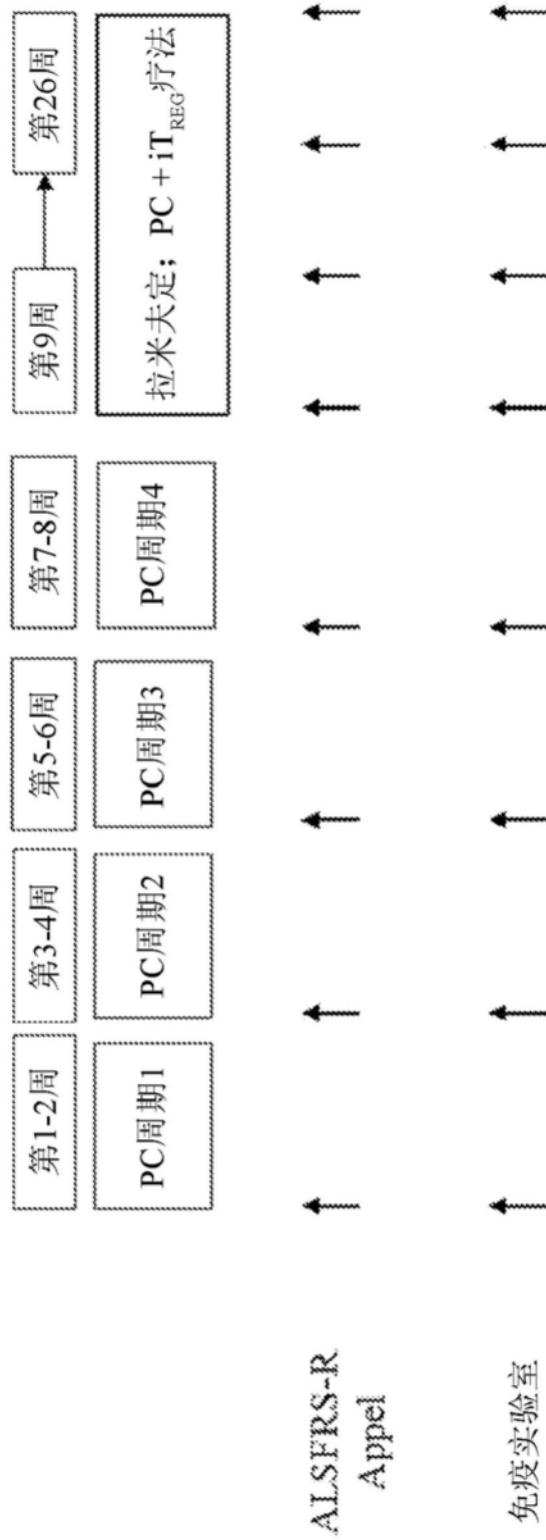


图35

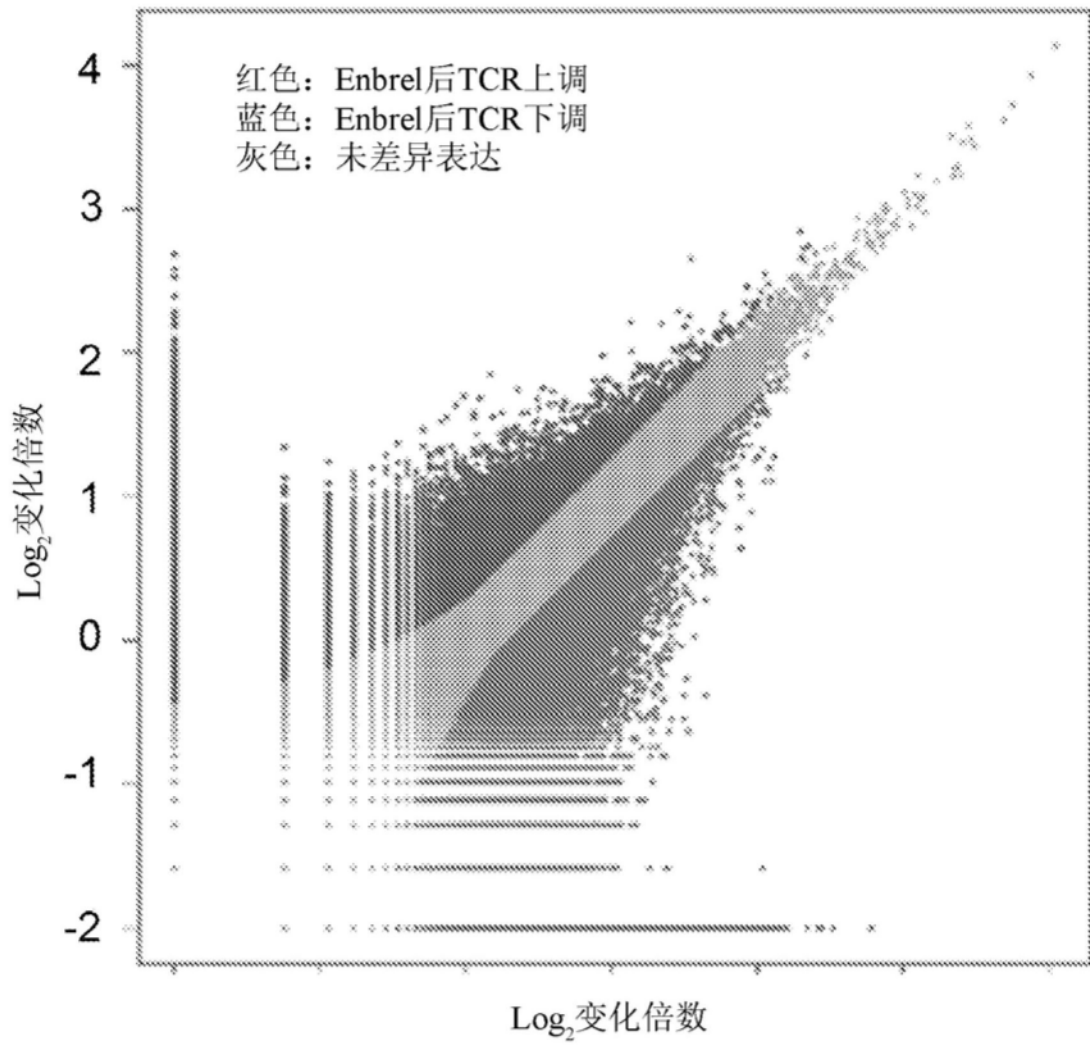


图36A

TCR基因I.D.: Enbrel后上调		Enbrel前的 表达	Enbrel后的 表达
CASSSTGDSYGYYF:TRBV12-3:TRBD1:TRBJ1-2:12:16:25:26		0.01	456.910399
CASSRGGGPFDEQFF:TRBV12-3:TRBD1:TRBJ2-3:10:14:19:20		0.01	352.293833
CASSYTYEQYF:TRBV12-4:TRBJ2-7:12:13:16		0.01	336.733749
CASSVDLACGQSPSTQYF:TRBV12-4:TRBD2:TRBJ2-3:11:24:34:45		0.01	247.225867

TCR基因I.D.: Enbrel后下调		Enbrel前的 表达	Enbrel后的 表达
CASSSTGDSYGYYF:TRBV12-4:TRBD1:TRBJ1-2:12:16:25:26		598.697014	0.01
CASSYTYEQYF:TRBV12-3:TRBJ2-7:12:13:16		927.829549	0.01
CASSPGQUNTEAFF:TRBV12-4:TRBD1:TRBJ1-4:10:11:20:22		272.227753	0.01
CASSRGGGPFDEQFF:TRBV12-4:TRBD1:TRBJ2-3:10:14:19:20		259.759441	0.01

图36B

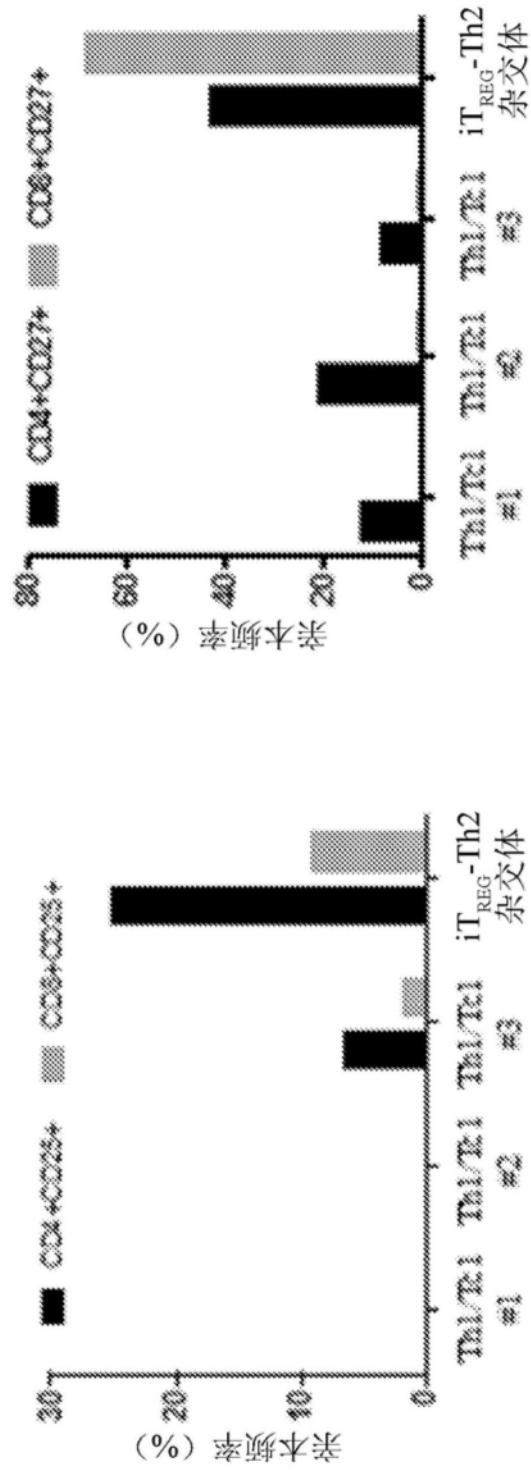


图37

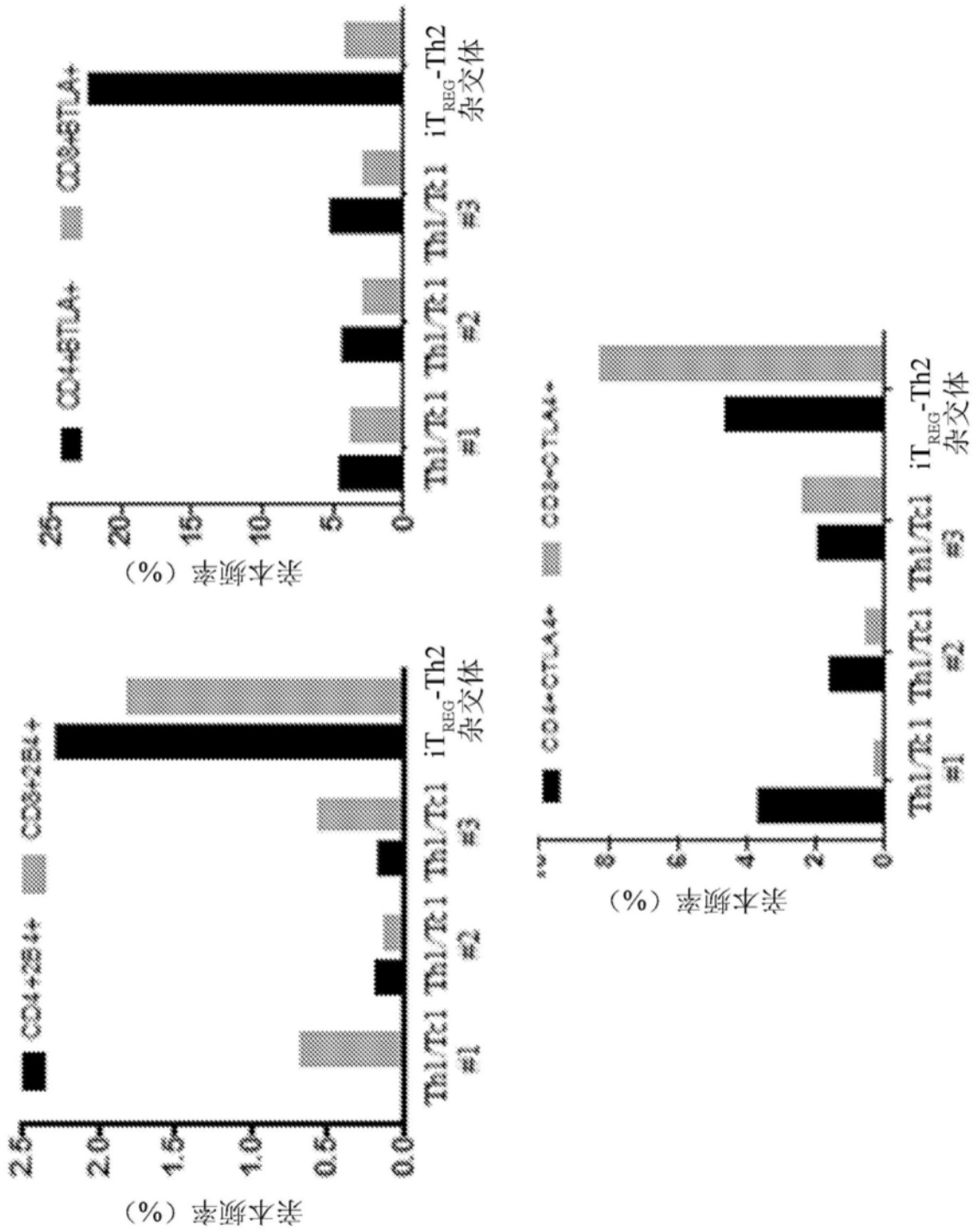


图37续

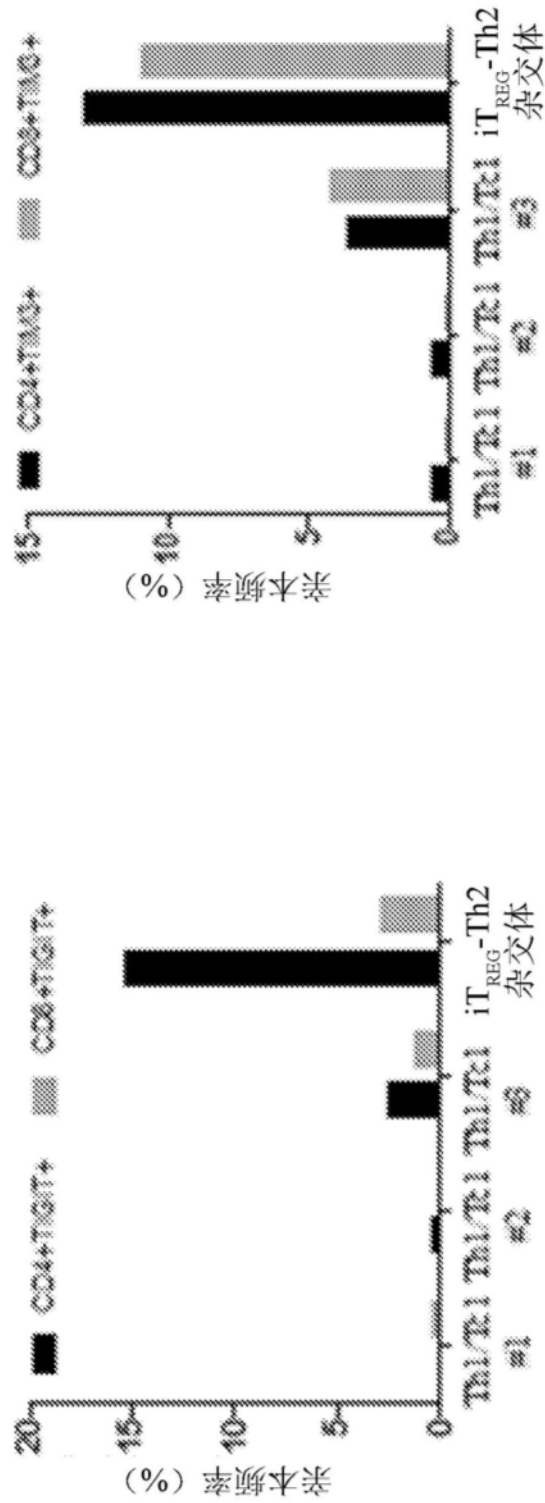


图38

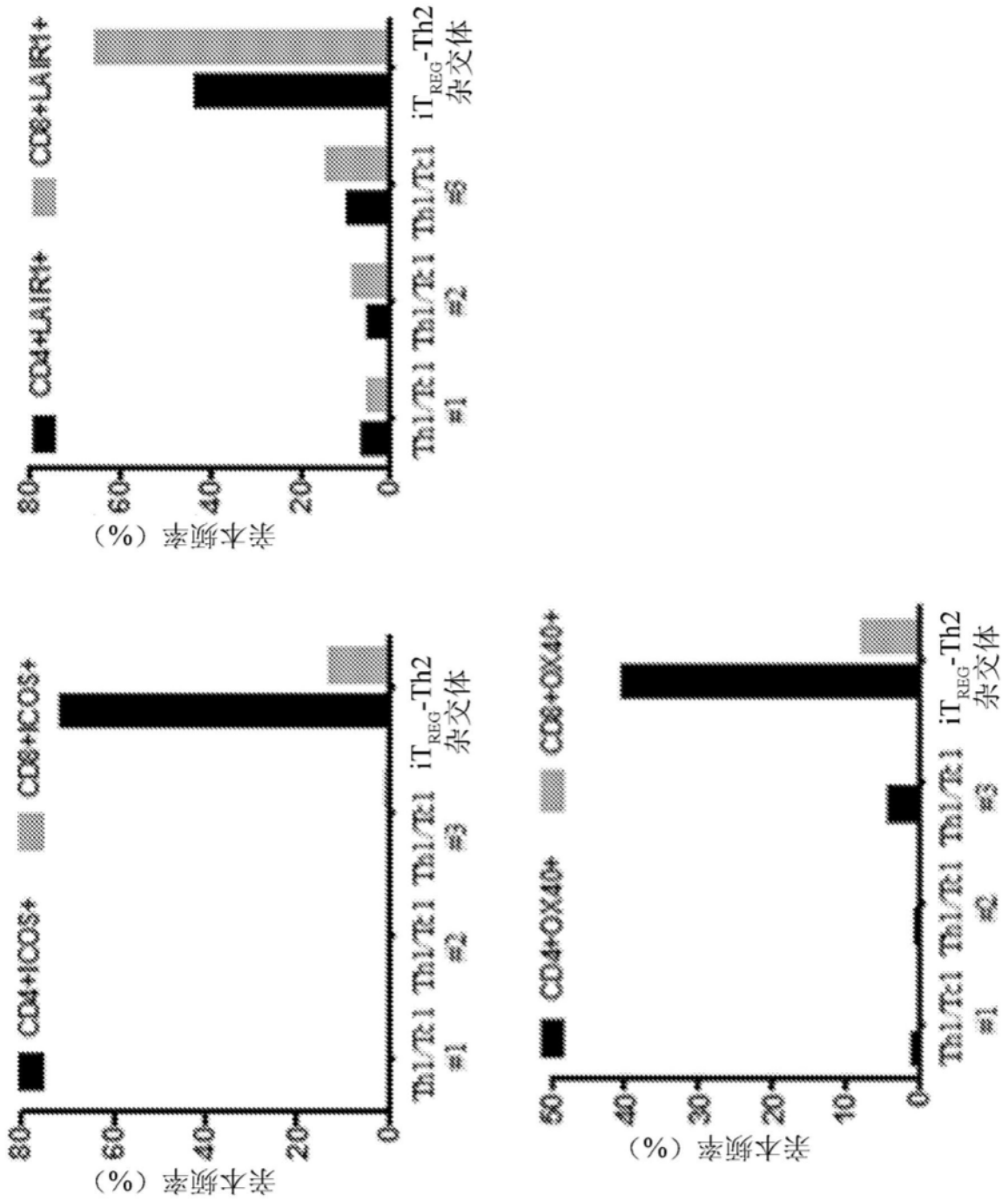


图38续

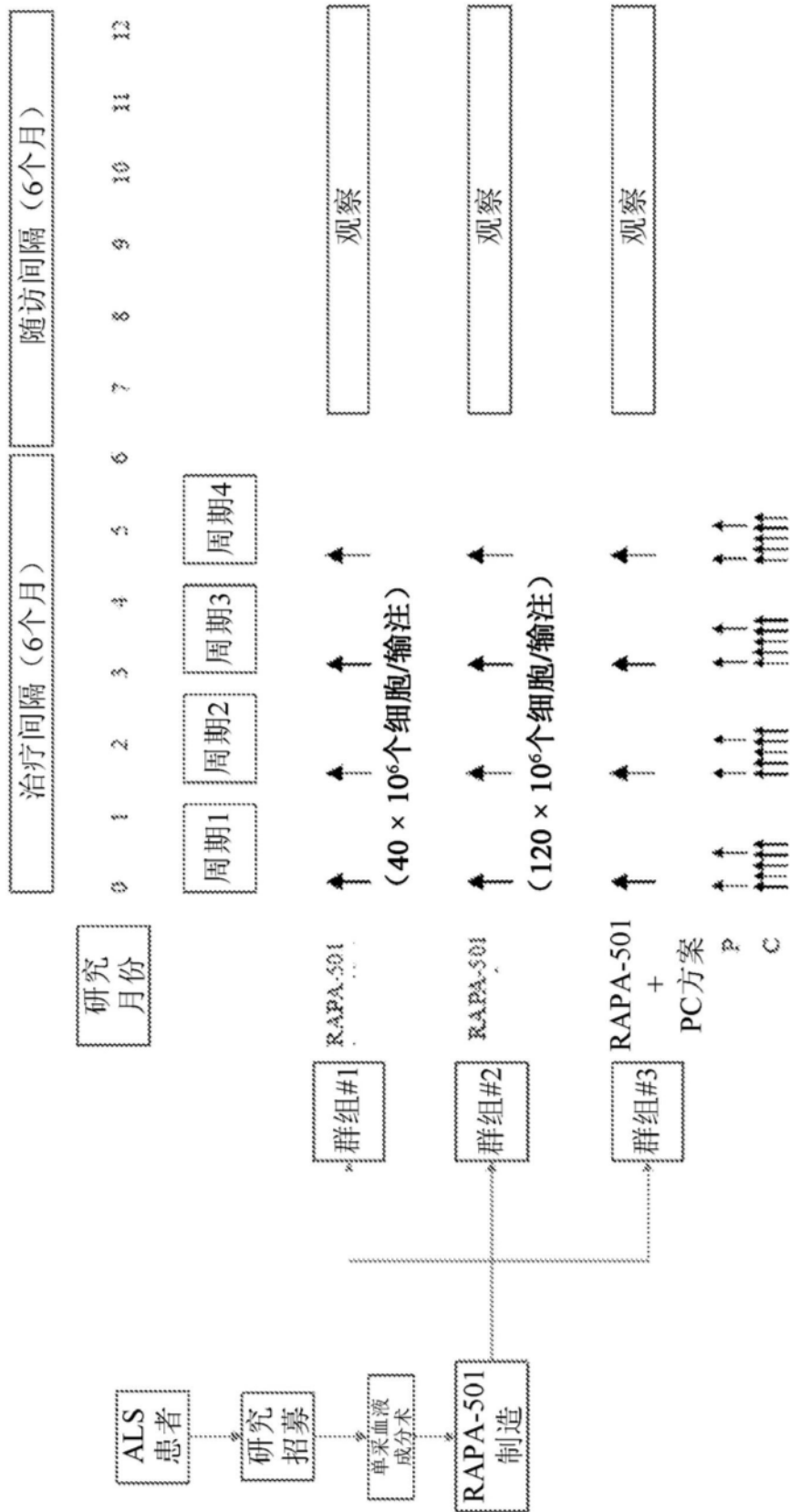


图39

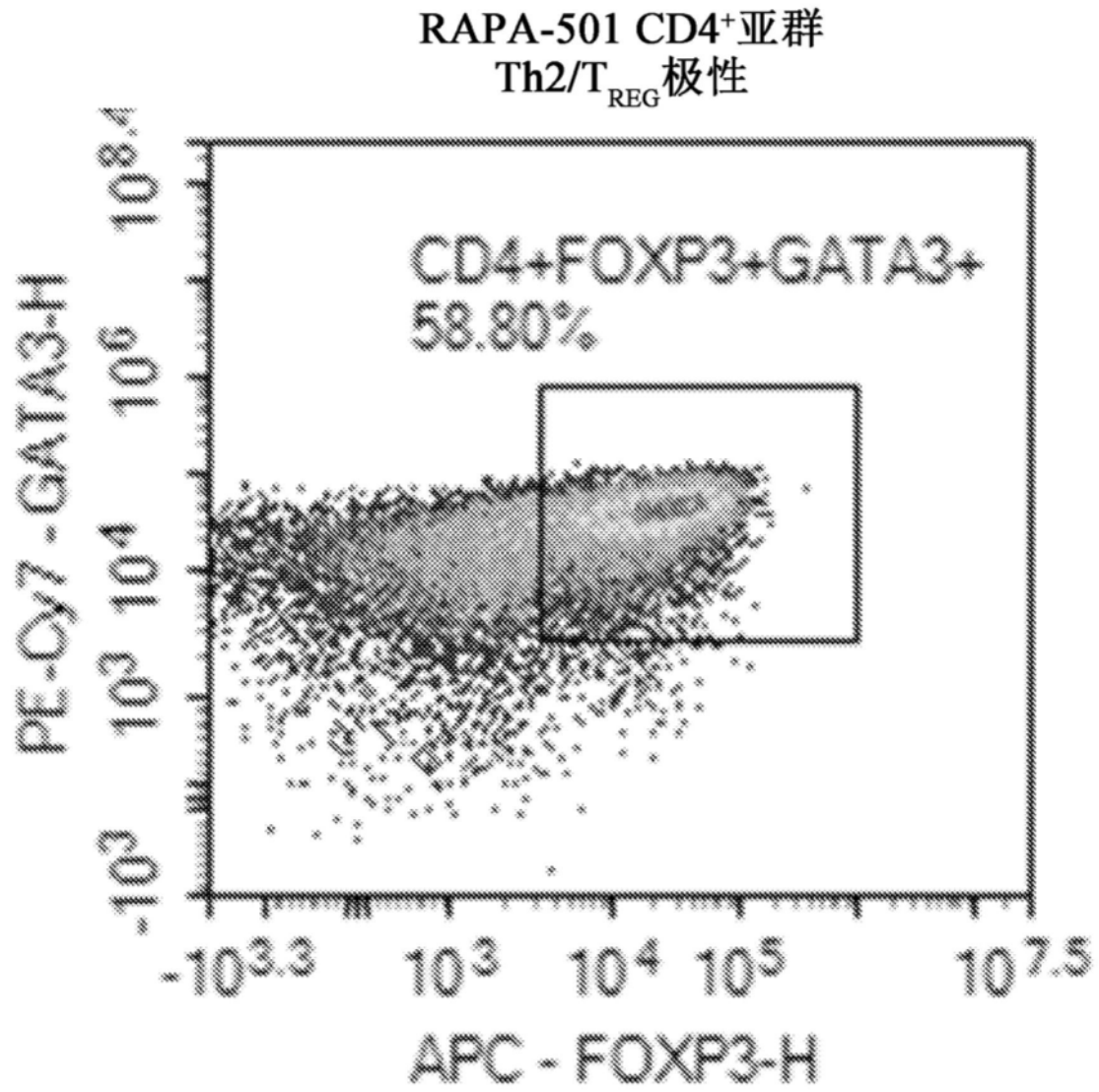


图40A

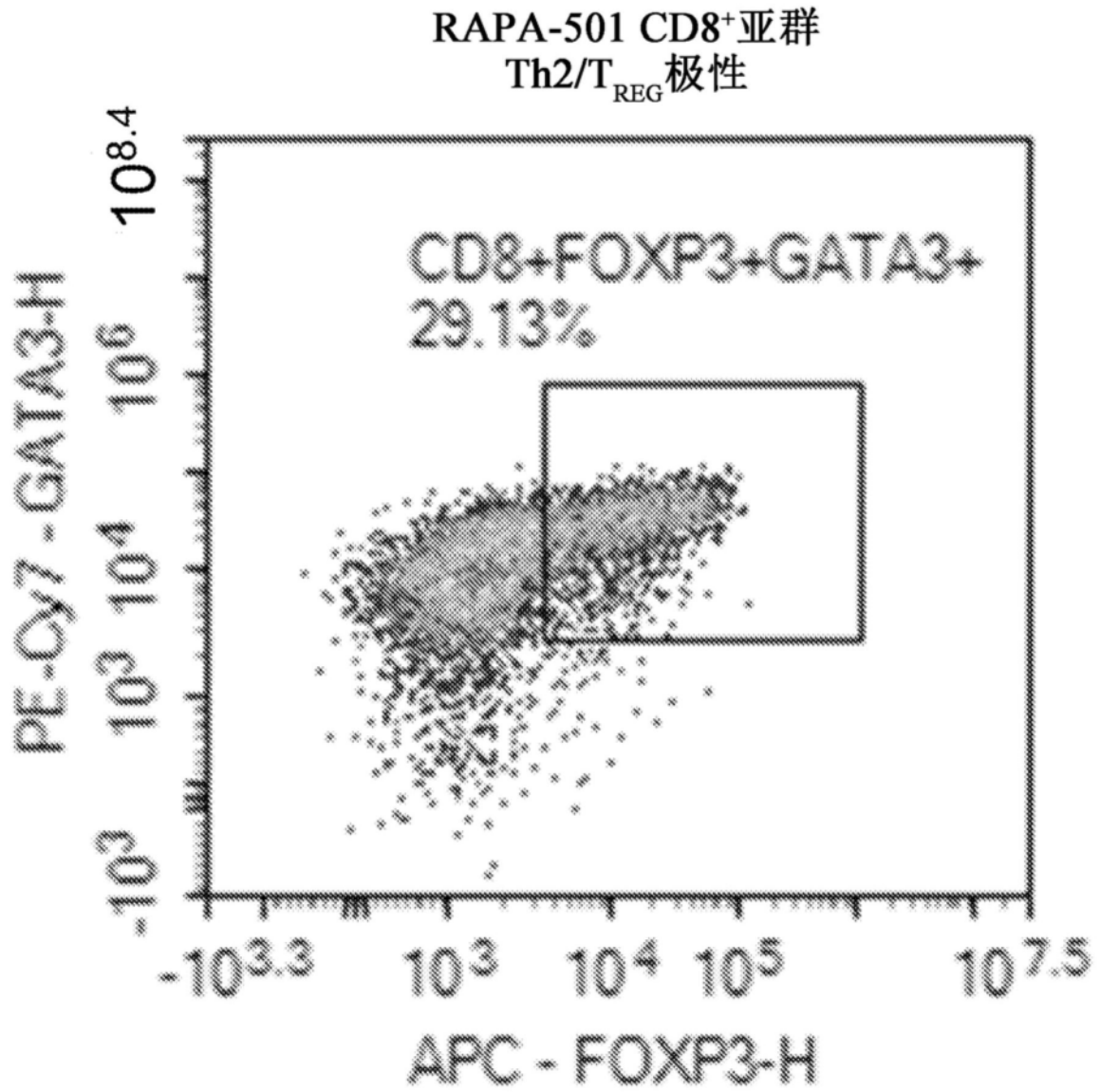
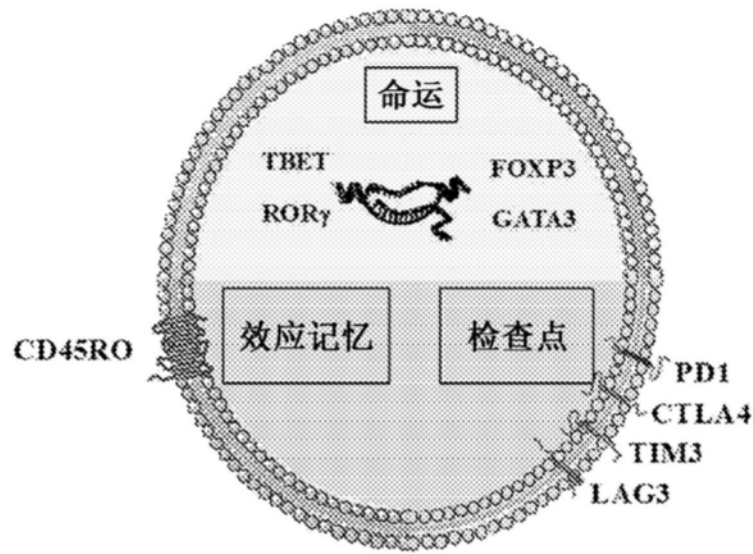


图40B

培养物输入T细胞



弥漫命运  
衰老

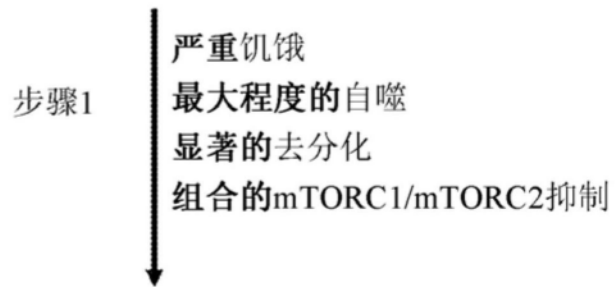
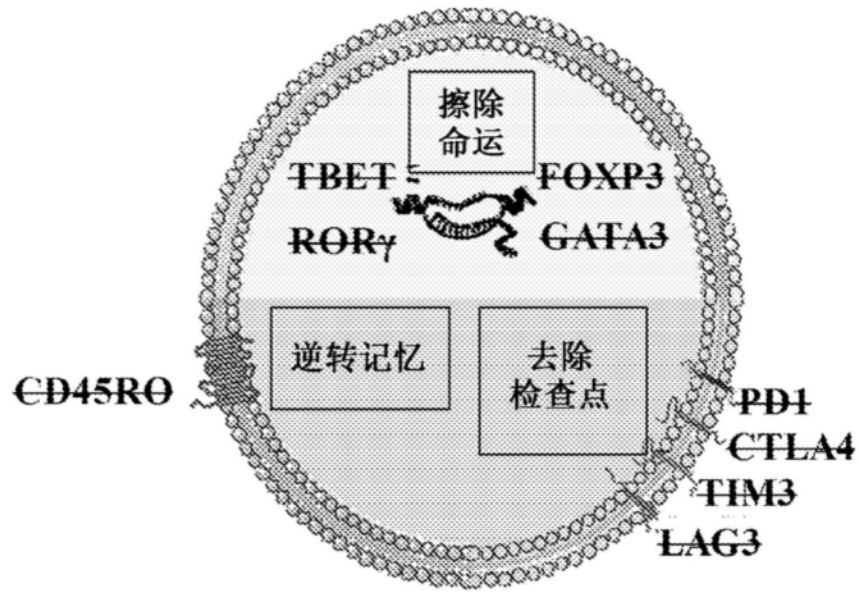


图41

培养的第2天



消除命运  
静态代谢

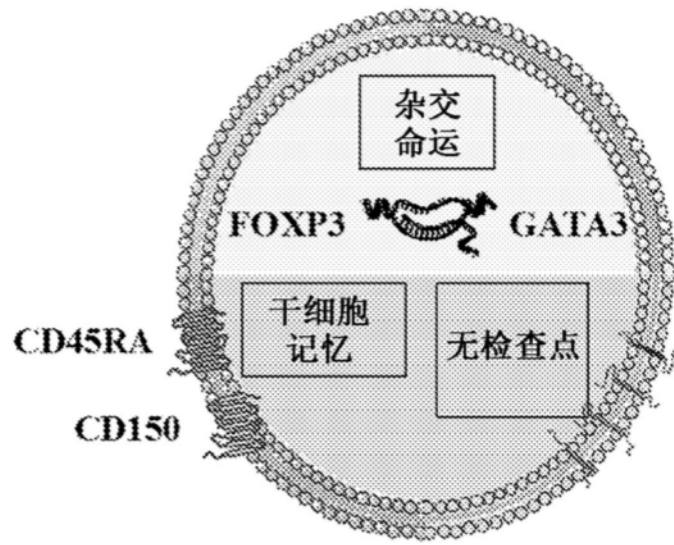
步骤2

再分化



图41续

RAPA-501产物  
(培养的第6天)



杂交T<sub>REG</sub>/Th2命运  
干细胞样记忆

图41续

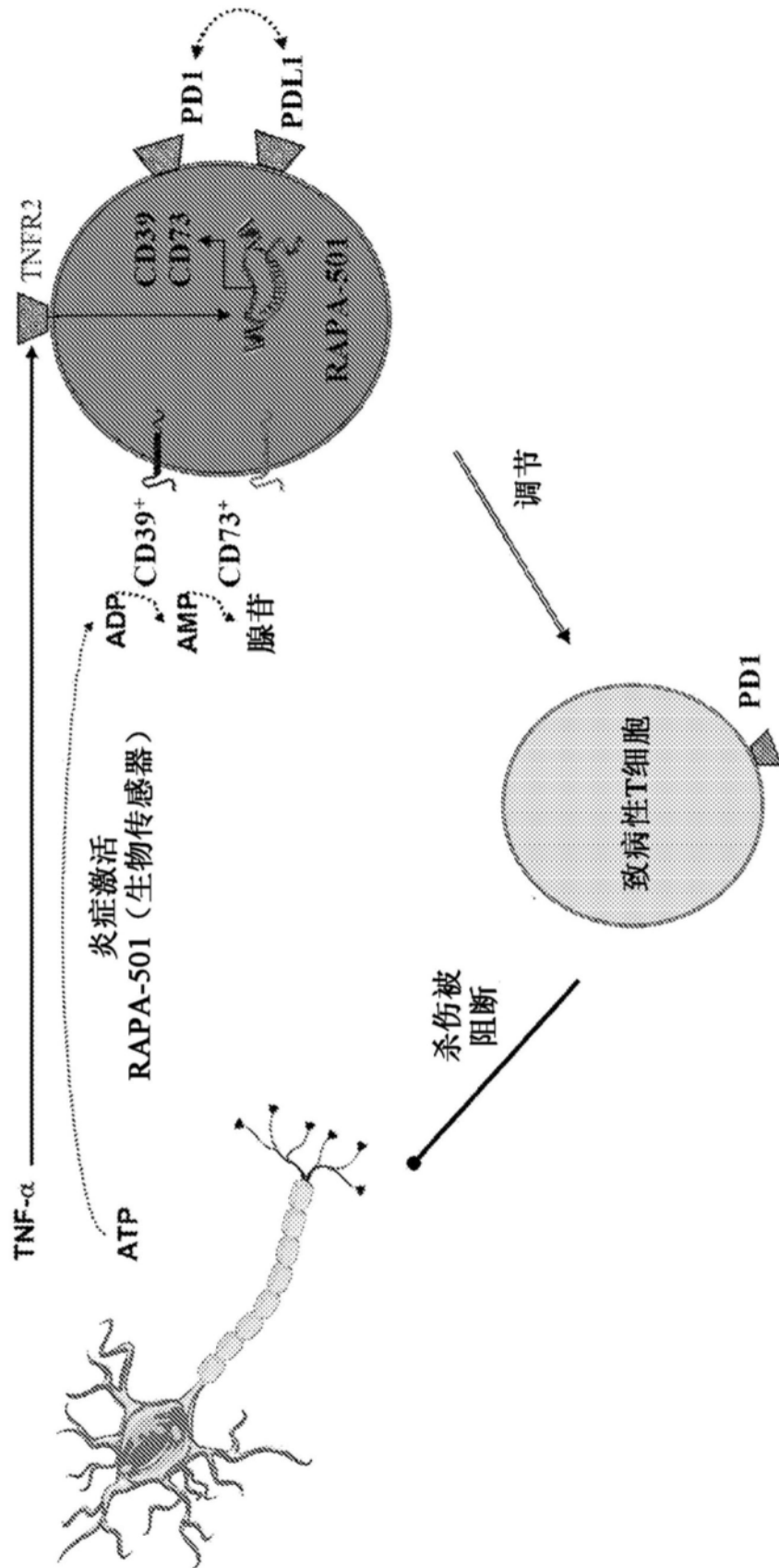


图42