(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110996974 A
(43)申请公布日 2020.04.10

(21)申请号 201880052389.0

(22)申请日 2018.06.15

(30)优先权数据
62/521,011 2017.06.16 US
62/618,399 2018.01.17 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.02.12

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/037874 2018.06.15

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/232318 EN 2018.12.20

(71)申请人 梅约医学教育与研究基金会
地址 美国明尼苏达州

(72)发明人 L·R·皮斯

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100
代理人 杨昀 陶家蓉

(51)Int.Cl.
A61K 35/17(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
C07K 14/725(2006.01)
C12N 5/0783(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)
C12N 15/09(2006.01)

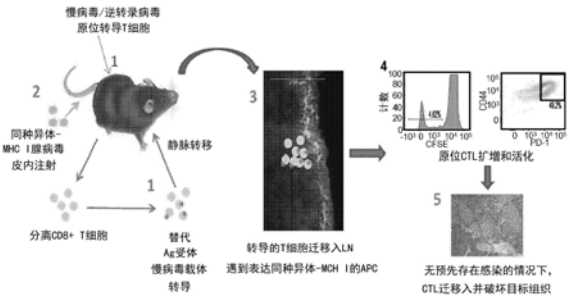
权利要求书5页 说明书13页
序列表4页 附图15页

(54)发明名称

增加免疫应答的材料和方法

(57)摘要

本文涉及用于体内活化原初T细胞的材料和方法。例如,提供了体内活化原初T细胞以治疗癌症的方法。



CN 110996974 A

1.一种在哺乳动物中活化原初T细胞的方法,所述方法包括:

(a)工程化改造原初T细胞以表达抗原受体,从而形成经工程化改造的原初T细胞;以及

(b)在所述哺乳动物中活化所述经工程化改造的原初T细胞。

2.如权利要求1所述的方法,其中,所述哺乳动物是人。

3.如权利要求1-2中任一项所述的方法,其中,所述原初T细胞是原初细胞毒性T淋巴细胞。

4.如权利要求1-3中任一项所述的方法,其中,所述抗原受体是嵌合抗原受体。

5.如权利要求1-4中任一项所述的方法,其中,所述抗原受体是肿瘤特异性抗原受体。

6.如权利要求1-5中任一项所述的方法,其中,所述工程化改造包括离体工程化改造。

7.如权利要求6所述的方法,其中,所述离体工程化改造包括:

(a)从所述哺乳动物获得所述原初T细胞;

(b)将编码所述抗原受体的核酸导入所述原初T细胞以产生所述经工程化改造的原初T细胞;以及

(b)将所述经工程化改造的原初T细胞给予所述哺乳动物。

8.如权利要求7所述的方法,其中,所述导入包括用编码所述抗原受体的病毒载体转导所述原初T细胞。

9.如权利要求8所述的方法,其中,所述病毒载体是慢病毒载体或逆转录病毒载体。

10.如权利要求7-9中任一项所述的方法,其中,所述给予包括静脉注射。

11.如权利要求1-11中任一项所述的方法,其中,所述工程化改造包括原位工程化改造。

12.如权利要求11所述的方法,其中,所述原位工程化改造包括将编码所述抗原受体的病毒载体给予所述哺乳动物。

13.如权利要求12所述的方法,其中,所述给予包括皮内注射。

14.如权利要求13所述的方法,其中,所述皮内注射为直接注射入所述哺乳动物的淋巴结。

15.如权利要求12-14中任一项所述的方法,其中,所述病毒载体是腺病毒载体。

16.如权利要求1-15中任一项所述的方法,其中,体内活化所述经工程化改造的原初T细胞包括将编码抗原的病毒载体给予所述哺乳动物。

17.如权利要求16所述的方法,其中,所述抗原是同种异体抗原。

18.如权利要求17所述的方法,其中,所述同种异体抗原是同种异体的I类主要组织相容性复合物抗原。

19.如权利要求16-18中任一项所述的方法,其中,所述病毒载体是腺病毒载体。

20.如权利要求19所述的方法,其中,所述给予包括皮内注射。

21.如权利要求20所述的方法,其中,所述皮内注射为直接注射入所述哺乳动物的淋巴结。

22.一种治疗患有癌症的哺乳动物的方法,所述方法包括:

(a)工程化改造原初T细胞以表达肿瘤特异性抗原受体,从而形成经工程化改造的原初T细胞;以及

(b)体内活化所述经工程化改造的原初T细胞。

23.如权利要求22所述的方法,其中,所述哺乳动物是人。

24.如权利要求22-23中任一项所述的方法,其中,所述癌症选自下组:急性成淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、慢性髓性白血病(CML)、急性单核细胞白血病(AMOL)、霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、骨髓瘤、卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌和结肠癌。

25.如权利要求22-24中任一项所述的方法,其中,所述癌症包括表达肿瘤特异性抗原的癌细胞。

26.如权利要求25所述的方法,其中,所述原初T细胞经工程化改造以表达靶向所述肿瘤特异性抗原的肿瘤特异性抗原受体。

27.如权利要求26所述的方法,其中,所述肿瘤特异性抗原选自下组:粘蛋白1(MUC-1)、人表皮生长因子受体2(HER-2)和雌激素受体(ER)。

28.如权利要求22-27中任一项所述的方法,其中,所述工程化改造包括离体工程化改造。

29.如权利要求28所述的方法,其中,所述离体工程化改造包括:

(a)从所述哺乳动物获得所述原初T细胞;

(b)将编码所述抗原受体的核酸导入所述原初T细胞以产生所述经工程化改造的原初T细胞;以及

(c)将所述经工程化改造的原初T细胞给予所述哺乳动物。

30.如权利要求29所述的方法,其中,所述导入包括用编码所述抗原受体的病毒载体转导所述原初T细胞。

31.如权利要求30所述的方法,其中,所述病毒载体是慢病毒载体或逆转录病毒载体。

32.如权利要求29-31中任一项所述的方法,其中,所述给予包括静脉注射。

33.如权利要求29-32中任一项所述的方法,其中,所述给予包括将约200～约1500个经工程化改造的原初T细胞给予所述哺乳动物。

34.如权利要求33所述的方法,其中,所述给予包括将约300个经工程化改造的原初T细胞给予所述哺乳动物。

35.如权利要求22-34中任一项所述的方法,其中,所述工程化改造包括原位工程化改造。

36.如权利要求35所述的方法,其中,所述原位工程化改造包括将编码所述抗原受体的病毒载体给予所述哺乳动物。

37.如权利要求36所述的方法,其中,所述给予包括皮内注射。

38.如权利要求37所述的方法,其中,所述皮内注射为直接注射入所述哺乳动物的淋巴结。

39.如权利要求36-38中任一项所述的方法,其中,所述病毒载体是慢病毒载体或逆转录病毒载体。

40.如权利要求22-39中任一项所述的方法,其中,体内活化所述经工程化改造的原初T细胞包括将编码抗原的病毒载体给予所述哺乳动物。

41.如权利要求40所述的方法,其中,所述抗原是同种异体抗原。

42.如权利要求41所述的方法,其中,所述同种异体抗原是同种异体的I类主要组织相

容性复合物抗原。

43.如权利要求40-42中任一项所述的方法,其中,所述病毒载体是腺病毒载体。

44.如权利要求40所述的方法,其中,所述给予包括皮内注射。

45.如权利要求44所述的方法,其中,所述皮内注射为直接注射入所述哺乳动物的淋巴结。

46.如权利要求22-45中任一项所述的方法,其中,所述癌症包括实体瘤。

47.如权利要求22-46中任一项所述的方法,其中,所述癌症在缓解中。

48.如权利要求22-47中任一项所述的方法,其中,所述癌症包括静息癌细胞。

49.如权利要求22-48中任一项所述的方法,其中,所述癌症包括逃逸化疗或对化疗无应答的癌细胞。

50.一种在哺乳动物内获得活化的T细胞的方法,其中,所述活化的T细胞包括异源抗原受体,其中,所述方法包括:

(a)将编码所述异源抗原受体的核酸体外导入获自哺乳动物的T细胞以获得经工程化改造的T细胞,

(b)将所述经工程化改造的T细胞给予所述哺乳动物,以及

(c)将包含编码I类MHC多肽的核酸的病毒给予所述哺乳动物,其中在步骤(b)中给予所述哺乳动物的所述经工程化改造的T细胞中的经工程化改造的T细胞是活化的。

51.如权利要求50所述的方法,其中,所述哺乳动物是人。

52.如权利要求50-51中任一项所述的方法,其中,从所述哺乳动物获得的所述T细胞是原初T细胞。

53.如权利要求52所述的方法,其中,所述原初T细胞是原初细胞毒性T淋巴细胞。

54.如权利要求50-53中任一项所述的方法,其中,所述抗原受体是嵌合抗原受体。

55.如权利要求50-54中任一项所述的方法,其中,所述抗原受体是肿瘤特异性抗原受体。

56.如权利要求50-55中任一项所述的方法,其中,将编码所述异源抗原受体的所述核酸导入所述T细胞采用了包含所述核酸的病毒载体。

57.如权利要求56所述的方法,其中,所述病毒载体是慢病毒载体。

58.如权利要求50-57中任一项所述的方法,其中,通过静脉注射将所述经工程化改造的T细胞给予所述哺乳动物。

59.如权利要求50-58中任一项所述的方法,其中,通过注射入所述哺乳动物的淋巴结将所述经工程化改造的T细胞给予所述哺乳动物。

60.如权利要求50-59中任一项所述的方法,其中,所述病毒是腺病毒或杆状病毒。

61.如权利要求50-60中任一项所述的方法,其中,通过皮内注射将所述病毒给予所述哺乳动物。

62.如权利要求50-60中任一项所述的方法,其中,通过直接给入所述哺乳动物的淋巴结将所述病毒给予所述哺乳动物。

63.如权利要求50-62中任一项所述的方法,其中,所述I类MHC多肽是同种异体的I类MHC多肽。

64.如权利要求50-63中任一项所述的方法,其中,所述I类MHC多肽是HLA-A、HLA-B或

HLA-C多肽。

65.如权利要求50-64中任一项所述的方法，其中，在所述步骤(c)中在所述哺乳动物内活化的所述经工程化改造的T细胞包括天然T细胞受体。

66.如权利要求50-65中任一项所述的方法，其中，所述步骤(c)在所述哺乳动物内活化了多个经工程化改造的T细胞。

67.如权利要求66所述的方法，其中，所述多个经工程改造的T细胞中活化的T细胞包括不同的天然T细胞受体。

68.一种在哺乳动物内获得活化的T细胞的方法，其中，所述活化的T细胞包含异源抗原受体，其中，所述方法包括给予哺乳动物：(a)编码所述异源抗原受体的核酸和(b)包含编码I类MHC多肽的核酸的病毒，其中，将所述核酸导入所述哺乳动物内的T细胞以形成包含所述异源抗原受体的经工程化改造的T细胞，其中，给予所述病毒活化了所述哺乳动物内的T细胞，且其中，所述哺乳动物内的至少一个T细胞包含所述异源抗原受体且被活化。

69.如权利要求68所述的方法，其中，所述哺乳动物是人。

70.如权利要求68-69中任一项所述的方法，其中，所述至少一个T细胞是细胞毒性T淋巴细胞。

71.如权利要求68-70中任一项所述的方法，其中，所述抗原受体是嵌合抗原受体。

72.如权利要求68-71中任一项所述的方法，其中，所述抗原受体是肿瘤特异性抗原受体。

73.如权利要求68-72中任一项所述的方法，其中，将编码所述异源抗原受体的所述核酸导入所述T细胞采用了包含所述核酸的病毒载体。

74.如权利要求73所述的方法，其中，所述病毒载体是慢病毒载体或逆转录病毒载体。

75.如权利要求68-74中任一项所述的方法，其中，通过静脉注射将所述核酸给予所述哺乳动物。

76.如权利要求68-74中任一项所述的方法，其中，通过注射入所述哺乳动物的淋巴将所述核酸给予所述哺乳动物。

77.如权利要求68-76中任一项所述的方法，其中，所述病毒是腺病毒或杆状病毒。

78.如权利要求68-77中任一项所述的方法，其中，通过皮内注射将所述病毒给予所述哺乳动物。

79.如权利要求68-77中任一项所述的方法，其中，通过直接给入所述哺乳动物的淋巴结将所述病毒给予所述哺乳动物。

80.如权利要求68-79中任一项所述的方法，其中，给予所述哺乳动物所述核酸后，再给予所述哺乳动物所述病毒。

81.如权利要求80所述的方法，其中，将编码所述异源抗原受体的所述核酸导入所述T细胞采用了包含所述核酸的慢病毒载体。

82.如权利要求68-79中任一项所述的方法，其中，给予所述哺乳动物所述核酸之前，给予所述哺乳动物所述病毒。

83.如权利要求82所述的方法，其中，将编码所述异源抗原受体的所述核酸导入所述T细胞采用了包含所述核酸的逆转录病毒载体。

84.如权利要求68-83中任一项所述的方法，其中，所述I类MHC多肽是同种异体的I类

MHC多肽。

85.如权利要求68-84中任一项所述的方法，其中，所述I类MHC多肽是HLA-A、HLA-B或HLA-C多肽。

86.如权利要求68-85中任一项所述的方法，其中，所述至少一个T细胞包含天然T细胞受体。

87.如权利要求68-86中任一项所述的方法，其中，所述至少一个T细胞是多个包含所述异源抗原受体的活化的T细胞。

88.如权利要求87所述的方法，其中，所述多个所述活化的T细胞中的各活化的T细胞包括不同的天然T细胞受体。

89.一种分离的病毒，其包含编码I类MHC多肽的核酸。

90.如权利要求89所述的病毒，其中，所述病毒是小核糖核酸病毒、腺病毒或杆状病毒。

91.如权利要求89-90中任一项所述的病毒，其中，所述病毒为复制缺陷型。

92.如权利要求89-91中任一项所述的病毒，其中，所述I类MHC多肽是同种异体的I类MHC多肽。

93.如权利要求89-92中任一项所述的病毒，其中，所述I类MHC多肽包含如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列。

94.一种试剂盒，其包含第一容器和第二容器，所述第一容器包含第一病毒，所述第一病毒包含编码抗原受体的核酸，所述第二容器包含第二病毒，所述第二病毒如权利要求89-93中任一项所述。

95.如权利要求94所述的试剂盒，其中，所述第一病毒是慢病毒或逆转录病毒。

96.如权利要求94-95中任一项所述的试剂盒，其中，所述抗原受体是嵌合抗原受体。

增加免疫应答的材料和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年1月17日提交的美国专利申请号62/618,399和2017年6月16日提交的美国专利申请号62/521,011的优先权。这些在先申请的公开内容视为本申请公开内容的组成部分并将其全文纳入本申请。

背景技术

1.技术领域

[0003] 本文涉及体内活化原初T细胞(naïve T cells)的材料和方法。例如,原初T细胞的体内活化可用于靶向表达肿瘤抗原(例如肿瘤特异性抗原)的细胞(例如癌细胞)。

[0004] 2.背景信息

[0005] 全球每日死于癌症的人数约为22,000名。CD8+ T细胞浸润的癌症相较于缺乏这些免疫细胞的癌症而言常具有更好的预后。然而,有效的抗肿瘤细胞免疫受限于可得的T细胞受体(TcR)库,该库主要由特异于肿瘤相关抗原的低亲和力受体组成。

发明内容

[0006] 本文提供了用于体内活化原初T细胞(例如表达肿瘤抗原受体的原初T细胞)的材料和方法。例如,表达肿瘤特异性抗原受体的原初T细胞在体内可通过如下途径活化(例如成为细胞毒性T淋巴细胞(CTL)):接触淋巴结中的抗原,例如抗原递呈细胞(APC,如被膜下窦巨噬细胞和/或树突状细胞)所递呈的抗原。体内活化的T细胞能靶向递呈由肿瘤特异性抗原受体识别的抗原(例如肿瘤抗原)的细胞(例如癌细胞)。在某些情况下,体内活化的T细胞可在体内扩增。本文还提供了用于如本文所述体内活化原初T细胞的方法,例如通过体内活化表达肿瘤特异性受体的原初T细胞。例如,如本文所述体内活化原初T细胞能用于治疗患有癌症的哺乳动物(例如人)。

[0007] 如本文中所证明,过继转移的原初CD8+ T细胞能够迁移到淋巴结,在此它们会遇到编码同种异体I类主要组织相容性复合物(MHC I)抗原的病毒(例如腺病毒),所述抗原能够体内活化原初CD8+ T细胞。具有体内活化表达抗原受体(例如肿瘤特异性抗原受体)的原初T细胞的能力为产生能够靶向性CTL提供了独特却尚未被认识到的机会,所述CTL靶向于(例如定位并摧毁)表达可被抗原受体识别的肿瘤抗原(例如肿瘤特异性抗原)的细胞(例如癌细胞)。例如,体内活化表达肿瘤特异性抗原受体的原初T细胞的能力为靶向不能被免疫系统检测到(例如包括静息癌细胞的癌症和/或具有化疗逃逸的癌症)的癌细胞(包括实体瘤中的癌细胞)提供了机会。此外,本文所述的材料和方法对于“现成”的试剂更有裨益。由此,肿瘤特异性免疫应答形式的个性化治疗能被迅速有效地以可控的费用应用于更多的患者群体。

[0008] 本文中还描述了采用设计用于表达MHC I多肽(例如同种异体MHC I多肽)的病毒(例如腺病毒)来活化哺乳动物体内原初T细胞能够在该哺乳动物中实现多种不同原初T细

胞的活化，从而在该哺乳动物中产生多克隆T细胞应答。在一些情况中，设计用于表达MHC I多肽(例如同种异体MHC I多肽)的病毒(例如腺病毒)能够用于活化哺乳动物体内多于1、2.5、5、10、15或20％的原初T细胞，或者能够活化哺乳动物淋巴结中多于1、2.5、5、10、15或20％的原初T细胞。此外，采用设计用于表达MHC I多肽(例如同种异体MHC I多肽)的病毒(例如腺病毒)活化的CD8+ T细胞能够有效杀死被这些活化的CD8+ T细胞识别的靶细胞。该靶细胞杀灭水平可高于采用体外活化的相应CD8+ T细胞所能观察到的水平。

[0009] 如本文进一步描述，采用如本文所述设计用于表达MHC I多肽(例如同种异体MHC I多肽)的病毒(例如腺病毒)活化的原初T细胞可在活化之前(或者，对于体内方法而言，在活化之后或同时)被工程化改造(例如体内或体外工程化改造)以表达针对所需靶标的抗原受体。例如，在对原初T细胞进行体内工程化改造时，可在给予哺乳动物设计用于表达MHC I多肽(例如同种异体MHC I多肽)的病毒(例如腺病毒)之前、给予哺乳动物设计用于表达MHC I多肽(例如同种异体MHC I多肽)的病毒(例如腺病毒)之后或者给予哺乳动物设计用于表达MHC I多肽(例如同种异体MHC I多肽)的病毒(例如腺病毒)的同时，将编码抗原受体(例如嵌合抗原受体，如特异于肿瘤抗原的嵌合抗原受体)的载体(例如病毒载体，如慢病毒载体或逆转录病毒载体)给予该哺乳动物(例如人)。在一些情况下，在对原初T细胞进行体内工程化改造时，可在给予哺乳动物设计用于表达MHC I多肽(例如同种异体MHC I多肽)的病毒(例如腺病毒)之前和之后，将编码抗原受体(例如嵌合抗原受体，如特异于肿瘤抗原的嵌合抗原受体)的载体(例如病毒载体，如慢病毒载体或逆转录病毒载体)给予该哺乳动物(例如人)。在一些情况下，在对原初T细胞进行体内工程化改造时，可在给予哺乳动物设计用于表达MHC I多肽(例如同种异体MHC I多肽)的病毒(例如腺病毒)之前、之后及同时，将编码抗原受体(例如嵌合抗原受体，如特异于肿瘤抗原的嵌合抗原受体)的载体(例如病毒载体，如慢病毒载体或逆转录病毒载体)给予该哺乳动物(例如人)。

[0010] 在一些情况下，在对原初T细胞进行体外工程化改造时，可在给予哺乳动物设计用于表达MHC I多肽(例如同种异体MHC I多肽)的病毒(例如腺病毒)之前，将编码抗原受体(例如嵌合抗原受体，如特异于肿瘤抗原的嵌合抗原受体)的载体(例如病毒载体，如慢病毒载体或逆转录病毒载体)导入获自该哺乳动物(例如人)的体外原初T细胞中并将其导回该哺乳动物。在一些情况下，可在将载体导入细胞中之前或之后或者之前和之后，用一种或多种设计用于刺激细胞的物质(例如抗CD3物质、抗CD38物质、干扰素(IL)2、IL15或其组合)处理该体外原初T细胞。

[0011] 在本文所述方法和材料特定地用于人或人细胞时，本文所述的MHC I多肽可指HLA多肽(例如HLA-A、HLA-B和/或HLA-C多肽)或人MHC I多肽。

[0012] 总体而言，本文的一个方面描述了一种活化哺乳动物中原初T细胞的方法。该方法包括如下步骤或基本由如下步骤组成：工程化改造原初T细胞以表达抗原受体，由此形成工程化改造的原初T细胞，并在哺乳细胞中活化该工程化改造的原初T细胞。哺乳动物可以是人。原初T细胞可以是原初细胞毒性T淋巴细胞。抗原受体可为嵌合抗原受体。抗原受体可为肿瘤特异性抗原受体。在一些情况下，工程化改造可包括离体工程化改造。离体工程化改造可包括：由哺乳动物获得原初T细胞，将编码抗原受体的核酸导入该原初T细胞以产生工程化改造的原初T细胞，将工程化改造的T细胞给予该哺乳动物。导入可包括用编码抗原受体的病毒载体转导该原初T细胞。病毒载体可为慢病毒载体或逆转录病毒载体。给予可包括静

脉注射。在一些情况下，工程化改造可包括原位工程化改造。原位工程化改造可包括给予该哺乳动物编码抗原受体的病毒载体。给予可包括皮内注射。可直接皮内注射到淋巴结中。病毒载体可为腺病毒载体。体内活化工程化改造的原初T细胞可包括给予该哺乳动物编码抗原的病毒载体。抗原可为同种异体抗原。同种异体抗原可为同种异体的I类主要组织相容性复合物抗原。病毒载体可为腺病毒载体。给予可包括皮内注射。可直接皮内注射到淋巴结中。

[0013] 在另一个方面，本文描述了一种患癌哺乳动物的治疗方法。该方法包括如下步骤或基本由如下步骤组成：工程化改造原初T细胞以表达肿瘤特异性抗原受体，由此形成工程化改造的原初T细胞，并在体内活化该工程化改造的原初T细胞。哺乳动物可以是人。癌症可为：急性成淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、慢性髓性白血病(CML)、急性单核细胞白血病(AMOL)、霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、骨髓瘤、卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌或结肠癌。癌症可包含表达肿瘤特异性抗原的癌细胞。原初T细胞可经工程化改造以表达靶向肿瘤特异性抗原的肿瘤特异性抗原受体。肿瘤特异性抗原可为：粘蛋白1(MUC-1)、人表皮生长因子受体2(HER-2)或雌激素受体(ER)。在一些情况下，工程化改造可包括离体工程化改造。离体工程化改造可包括：由哺乳动物获得原初T细胞，将编码抗原受体的核酸导入该原初T细胞以产生工程化改造的原初T细胞，将工程化改造的T细胞给予该哺乳动物。导入可包括用编码抗原受体的病毒载体转导该原初T细胞。病毒载体可为慢病毒载体。给予可包括静脉注射。给予可包括给予该哺乳动物约200～约1500个工程化改造的原初T细胞(例如约300个工程化改造的原初T细胞)。在一些情况下，工程化改造可包括原位工程化改造。原位工程化改造可包括给予该哺乳动物编码抗原受体的病毒载体。给予可包括皮内注射。可直接皮内注射到淋巴结中。病毒载体可为腺病毒载体。体内活化工程化改造的原初T细胞可包括给予该哺乳动物编码抗原的病毒载体。抗原可为同种异体抗原。同种异体抗原可为同种异体的I类主要组织相容性复合物抗原。病毒载体可为腺病毒载体。给予可包括皮内注射。可直接皮内注射到淋巴结中。癌症可包括实体瘤。癌症可处于缓解中。癌症可包括静息癌细胞。癌症可包括从化疗逃逸的或对化疗无应答的癌细胞。

[0014] 在另一方面，本文描述了获得哺乳动物内活化的T细胞的方法，其中所述活化的T细胞包含异源抗原受体。该方法包括如下步骤或基本由如下步骤组成：(a)将编码异源抗原受体的核酸体外导入获自哺乳动物的T细胞以获得工程化改造T细胞，(b)将工程化改造T细胞给予该哺乳动物，以及(c)给予该哺乳动物包含编码I类MHC多肽的核酸的病毒；其中，在步骤(b)中给予该哺乳动物的工程化改造T细胞中的工程化改造T细胞是活化的。哺乳动物可以是人。获自该哺乳动物的T细胞可为原初T细胞。原初T细胞可以是原初细胞毒性T淋巴细胞。抗原受体可为嵌合抗原受体。抗原受体可为肿瘤特异性抗原受体。可用包含编码异源抗原受体的核酸的病毒载体将该核酸导入T细胞中。病毒载体可为慢病毒载体。可通过静脉注射将工程化T细胞给予哺乳动物。可通过注射入哺乳动物的淋巴结来将工程化T细胞给予该哺乳动物。病毒可为腺病毒或杆状病毒。可通过皮内注射将病毒给予哺乳动物。可通过直接给入哺乳动物的淋巴结来将病毒给予该哺乳动物。I类MHC多肽可为同种异体的I类MHC多肽。I类MHC多肽可为HLA-A、HLA-B或HLA-C多肽。步骤(c)中在哺乳动物内活化的工程化改造T细胞可包含天然T细胞受体。步骤(c)可活化哺乳动物中的多个工程化改造T细胞。多个工

程化改造T细胞中的活化的T细胞可包含不同的天然T细胞受体。

[0015] 在另一方面，本文描述了获得哺乳动物内活化的T细胞的方法，其中所述活化的T细胞包含异源抗原受体。该方法包括如下步骤或基本上由如下步骤组成：给予哺乳动物(a)编码异源抗原受体的核酸以及(b)包含编码I类MHC多肽的核酸的病毒，其中将所述核酸导入该哺乳动物内的T细胞中以形成包含异源抗原受体的工程化改造T细胞，其中给予所述病毒来活化哺乳动物内的T细胞，且其中该哺乳动物内的至少一个T细胞包含所述异源抗原受体且是被活化的。哺乳动物可以是人。所述至少一个T细胞可为细胞毒性T淋巴细胞。抗原受体可为嵌合抗原受体。抗原受体可为肿瘤特异性抗原受体。可用包含所述核酸的病毒载体将编码异源抗原受体的核酸导入T细胞中。病毒载体可为慢病毒载体或逆转录病毒载体。可通过静脉注射给予哺乳动物所述核酸。可通过注射入所述哺乳动物的淋巴结来给予该哺乳动物所述核酸。病毒可为腺病毒或杆状病毒。可通过皮内注射将病毒给予哺乳动物。可通过直接给入哺乳动物的淋巴结来将病毒给予该哺乳动物。可将核酸给予哺乳动物后再将病毒给予该哺乳动物。可用包含编码异源抗原受体的核酸的慢病毒载体将该核酸导入T细胞中。可在将核酸给予哺乳动物之前，将病毒给予该哺乳动物。可用包含编码异源抗原受体的核酸的逆转录病毒载体将该核酸导入T细胞中。I类MHC多肽可为同种异体的I类MHC多肽。I类MHC多肽可为HLA-A、HLA-B或HLA-C多肽。所述至少一个T细胞可包含天然T细胞受体。所述至少一个T细胞可为包含异源抗原受体的多个活化的T细胞。多个活化的T细胞中的活化T细胞可包含不同的天然T细胞受体。

[0016] 在另一方面，本文描述了一种分离的病毒，其包含编码I类MHC多肽的核酸。该病毒可为：小核糖核酸病毒、腺病毒或杆状病毒(例如水泡性口炎病毒)。病毒可为复制缺陷型。I类MHC多肽可为人I类MHC多肽。I类MHC多肽可包括SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列。

[0017] 在另一方面，本文描述了一种试剂盒，其包含第一容器和第二容器，所述第一容器包含具有编码抗原受体的核酸的第一病毒，所述第二容器包含具有编码I类MHC多肽的核酸的第二病毒。第一病毒可为慢病毒或逆转录病毒。抗原受体可为嵌合抗原受体。第二病毒可为小核糖核酸病毒、腺病毒或杆状病毒(例如水泡性口炎病毒)。第二病毒可为复制缺陷型。I类MHC多肽可为人I类MHC多肽。I类MHC多肽可包括SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列。

[0018] 除非另外定义，本文使用的所有技术和科学术语的意义与本发明所属领域普通技术人员通常所理解的相同。虽然与本文所述类似或等同的方法和材料可用来实施本发明，但在下文描述合适的方法和材料。本文中述及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献都通过引用全文纳入本文。若有抵触，以本说明书(包括定义)为准。此外，材料、方法和实施例都仅是说明性的，并不意在构成限制。

[0019] 附图和以下说明进一步详细说明了本发明的一种或多种实施方式。本发明的其它特征、目的和优势将通过说明、附图以及权利要求书得以清楚展现。

附图说明

[0020] 图1显示了体内活化表达替代性抗原受体的原初T细胞的示例性流程。(1)用编码替代性受体的慢病毒或逆转录病毒转导分离的CD8+ T细胞，并过继性经静脉转移回宿主(底部)，或者在引流淋巴结中原位转导T细胞(顶部)。(2)由皮内导入的腺病毒表达同种异体MHC I(allo-MHC I)。(3)经转导的T细胞迁移入淋巴结并遇到表达同种异体MHC I的APC。

(4)活化同种异体反应性CTL,以及(5)离开淋巴结并破坏表达被替代性受体靶向的抗原的细胞。

[0021] 图2A和2B显示病毒活化的组织特异性CTL靶向并破坏正常组织。将1200个OT-1T细胞过继转移入RIP-OVA小鼠,然后用TMEV-OVA活化。图2A包含对胰岛素的苏木精伊红(H&E)染色和免疫组化(IHC)染色照片,显示了病毒CTL诱导5天内的胰腺炎症。图2B包含的图表显示了存活小鼠第21天胰岛被显著破坏。PCR未检测到胰腺中有病毒。数量增加的OT-1细胞完全破坏了胰腺。用编码卵清蛋白的复制缺陷型腺病毒诱导OT-1T细胞对胰腺的破坏也观察类似的结果。

[0022] 图3A-3C是荧光显微照片,显示了淋巴结(LN)细胞的转导。通过表达cre重组酶的腺病毒(adeno-cre,cre-腺病毒)的皮内注射感染mTmG小鼠。图3A显示对照腺病毒感染的LN细胞。图3B显示cre-腺病毒感染的LN以及LN中表达的cre重组酶。图3C显示低放大率下的LN,显示了经转导细胞的边缘部位。

[0023] 图4A是表达突变MHC分子(用作通用同种异体抗原)的示例性复制缺陷型腺病毒(血清型6)载体的示意图。图4B是载体构建体的一般版本,通过采用工程化改造的突变MHC分子,该MHC可对于任何人均普遍为同种异体。或者,通过采用天然存在的I类MHC分子,该MHC可对于全体的一个组群(cohort)或亚组(subset)为同种异体。

[0024] 图5包含的点阵图显示了在应答编码同种异体MHC I的腺病毒中产生了同种异体反应性CTL。通过皮内注射将同种异体MHC I腺病毒导入LN。4天后,将同系的(BALB/c)、同种异体的(B6)和第三方(C3H)的标记化靶细胞通过静脉过继转移入体内CTL测试中被攻击的宿主中。4小时后,收集脾细胞并通过流式细胞术分析被导入靶细胞的存在。在体内完全消除B6靶细胞(表达导入的同种异体MHC I的靶标)。

[0025] 图6包含的点阵图显示了过继转移的CD8+ T细胞应答腺病毒-同种异体MHC I。在转移前用羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)标记新鲜分离的同系CD8+ T细胞,然后用腺病毒-同种异体MHC I或对照病毒攻击。图6A和6C显示过继转移的CFSE标记T细胞迁移至LN,这些细胞在LN遇到转导的同种异体MHC I分子并对其应答。图6C还显示了用同种异体MHC I刺激时,被刺激的细胞发生增殖从而稀释了CFSE。图6B和6D显示:相对于用对照腺病毒攻击的从淋巴结分离的CFSE稀释细胞(B),CFSE稀释群组具有高表达CD44和PD-1的更活化表型(D)。

[0026] 图7是荧光显微照片,显示了获自mTmG报告小鼠的原初CD8+脾细胞的慢病毒转导。用cre-慢病毒转导富含CD8+的原初脾细胞。然后用抗CD3/CD28+IL-2活化细胞以在培养基中维持存活4天。成功转导使得红色荧光转变为绿色荧光。

[0027] 图8的点阵图显示了将转基因成功原位转导入活化的淋巴结细胞。将编码同种异体MHC的腺病毒载体皮内注射入mTmG报告小鼠以刺激引流淋巴结,4天后,将cre-慢病毒直接注射入扩大的淋巴结。24小时后,收获来自淋巴结的CD8+ T细胞并在IL2+IL7的存在下培养3天以使膜eGFP表达。

[0028] 图9包含的点阵图显示了将转基因成功转导入人细胞。人CAR慢病毒载体有效转导人T细胞,但对小鼠T细胞则不然。

[0029] 图10包含的照片显示了皮内导入非复制型病毒。Hu-NSG小鼠缺乏淋巴结。尾部皮内注射伊文思蓝以标记野生型、NOD Scid IL-2R$\gamma^{-/-}$(NSG)和人CD34+造血细胞再造的NSG

小鼠(hu-NSG)的腹股沟淋巴结。

[0030] 图11包含的点阵图显示了针对体内CTL的其它给予途径。如B6靶细胞的相对消耗所示,三种免疫途径均有效。

[0031] 图12显示了采用hu-NSG宿主的示例性流程。(1)评估在hu-NSG宿主中循环的人B细胞。(2)使来自nu-NSG宿主脾脏的T细胞与编码靶抗原的慢病毒接触,并静脉注射入nu-NSG宿主小鼠。静脉注射编码MHC同种异体抗原H-2K^b的复制缺陷型腺病毒6,并腹腔内注射相同剂量。(3)处理后1周,评估血液中的人B细胞组成。

[0032] 图13包含的图显示了hu-NSG小鼠试验前人白细胞组成。

[0033] 图14包含的图显示了体内CTL活化了hu-NSG宿主中的人免疫细胞。三个受者中所预期的1:1比例回收靶细胞全都发生改变,这表明对K^{b+}脾细胞的优先杀灭(分图A)。相对于K^{b-}靶细胞,回收的K^{b+}细胞的比例显著降低(分图B)。

[0034] 图15包含的图显示了在接受CART治疗和AD6接种的hu-NSG小鼠中B细胞数量下降的原始数据。

[0035] 图16包含的图显示了导入来自用获自相同人供者的CD34+细胞重构的hu-NSG小鼠的经慢病毒-CAR19转导的脾细胞和Ad6-同种异体MHC(K^b)后的CD19+B细胞的标准化变化。[a]标准化至归于重复血液取样的小鼠外周血细胞群消耗计数的统计学评估。*治疗后T细胞的增加与之前的CART治疗发现一致。

[0036] 图17包含如下序列列表:编码人MHC I多肽(HLA-B40:28)的核酸序列(SEQ ID NO:1)和该人MHC I多肽的氨基酸序列(SEQ ID NO:3),以及编码人MHC I多肽(HLA-DRB1*12:01:01:01)的核酸序列(SEQ ID NO:2)和该人MHC I多肽的氨基酸序列(SEQ ID NO:4)。

具体实施方式

[0037] 本文提供了用于体内活化原初T细胞(例如表达肿瘤特异性抗原受体的原初T细胞)的材料和方法,例如制备体内活化的CTL的材料和方法。例如,表达肿瘤特异性抗原受体的原初T细胞在体内可通过如下途径活化(例如成为CTL):接触淋巴结中的抗原,例如APC(如被膜下窦巨噬细胞和/或树突状细胞)所递呈的抗原。体内活化的CTL可包括效应T细胞和/或记忆T细胞。在一些情况下,原初T细胞可经工程化改造以离体表达肿瘤特异性抗原受体。例如,可获得原初T细胞,对其进行离体工程化改造以表达肿瘤特异性抗原受体,并将其给予(例如通过过继转移)哺乳动物。过继转移的原初T细胞可迁移到待体内活化的一个或多个淋巴结。在一些情况下,原初T细胞可经工程化改造以原位表达肿瘤特异性抗原受体。例如,可将表达载体(例如病毒载体)注射入次级淋巴器官,从而使得原初T细胞被原位工程化改造以表达肿瘤特异性抗原受体。在表达肿瘤特异性抗原受体的原初T细胞遇到抗原(例如APC(如被膜下窦巨噬细胞和/或树突状细胞)递呈的抗原)时,该原初T细胞被体内活化(例如成为CTL)。体内活化的T细胞能靶向表达由肿瘤特异性抗原受体识别的抗原(例如肿瘤抗原)的细胞(例如癌细胞)。在一些情况下,体内活化的T细胞能够靶向没有现有和/或早先存在的炎症的组织中的癌细胞。在一些情况下,体内活化的T细胞不靶向正常(例如健康的非癌)细胞。

[0038] 能如本文所述体内活化的原初T细胞可为任何合适的原初T细胞。原初T细胞的例子包括但不限于CTL,例如CD4+CTL和/或CD8+CTL。例如,能如本文所述体内活化的原初T细

胞可为CD8+CTL。在一些情况下，可从哺乳动物(例如患癌的哺乳动物)获得一或多个/种原初T细胞。例如，原初T细胞可获自待用本文所述的材料和方法治疗的哺乳动物。

[0039] 如本文所述体内活化的原初T细胞能够表达(例如可经工程化改造以表达)任何合适的抗原受体。在一些情况下，抗原受体可为异源抗原受体。在一些情况下，抗原受体可为嵌合抗原受体(CAR)。在一些情况下，抗原受体可为肿瘤抗原(例如肿瘤特异性抗原)受体。例如，原初T细胞可经工程化改造以表达肿瘤特异性抗原受体，该受体靶向由患癌哺乳动物中癌细胞表达的肿瘤抗原(例如细胞表面肿瘤抗原)。在一些情况下，抗原受体可为间接抗原受体。例如，原初T细胞可经工程化改造以表达靶向第一抗原(例如外源抗原)的间接抗原受体。在一些情况下，靶细胞(例如患癌哺乳动物中的癌细胞)可表达第一抗原(例如肿瘤抗原)，该第一抗原可被包含第二抗原的试剂(例如抗体)识别，而原初T细胞可经工程化改造以表达靶向该第二抗原的抗原受体。在一些情况下，肿瘤抗原可为肿瘤特异性抗原(TSA;例如仅在肿瘤细胞上存在的肿瘤抗原)。在一些情况下，肿瘤抗原可为肿瘤相关抗原(TAA;例如在肿瘤细胞上存在的异常蛋白质)。可被原初T细胞中表达的肿瘤抗原受体识别的肿瘤抗原的例子包括但不限于:粘蛋白1(MUC-1)、人表皮生长因子受体2(HER-2)、雌激素受体(ER)、表皮生长因子受体(EGFR)、叶酸受体α和间皮素。如本文所述，原初T细胞可经工程化改造以具有识别任何合适抗原的抗原受体(例如异源抗原受体)。在一些情况下，原初T细胞可经工程化改造以具有识别持续病毒抗原或老化细胞的抗原受体(例如异源抗原受体)。

[0040] 可用任何合适的方法在原初T细胞上表达抗原受体。例如，可将编码抗原受体的核酸导入一个或多个原初T细胞。在一些情况下，可用病毒转导将编码抗原受体的核酸引入非分裂细胞(non-dividing cell)。可采用任何合适的方法将编码抗原受体的核酸导入原初T细胞。在一些情况下，通过转导(例如采用逆转录病毒载体或慢病毒载体的病毒转导)或转染将编码抗原受体的核酸导入原初T细胞。在一些情况下，可将编码抗原受体的核酸离体引入一个或多个原初T细胞。例如，表达抗原受体的原初T细胞的离体工程化改造可包括用编码抗原受体的慢病毒载体转导分离的原初T细胞。在原初T细胞经离体工程化改造以表达抗原受体的情况下，该原初T细胞可获自任何合适的来源(例如哺乳动物，如待治疗的哺乳动物或供者哺乳动物，或细胞系)。在一些情况下，可将编码抗原受体的核酸原位导入一个或多个原初T细胞，导入淋巴系统中(例如，导入一个或多个次级淋巴器官，如淋巴结和脾脏)。例如，原初T细胞原位工程化改造以表达抗原受体可包括:编码抗原受体的慢病毒载体的皮内(ID)注射(例如直接注射入一个或多个淋巴结)。

[0041] 可用任何合适的方法来如本文所述地活化原初T细胞(例如，工程化改造的原初T细胞，如设计表达肿瘤特异性抗原受体的原初T细胞)。例如，表达肿瘤特异性抗原受体的原初T细胞可通过给予哺乳动物一或多个/种免疫原(例如抗原)被体内活化。可用任何合适的免疫原来如本文所述活化原初T细胞。在一些情况下，免疫原可为细胞表面抗原(例如癌细胞表达的细胞表面抗原)。在一些情况下，免疫原可为同种异体免疫原(例如同种异体的抗原，也称为同种异体抗原)。可用于如本文所述活化原初T细胞的抗原的例子包括但不限于:同种异体I类MHC多肽(同种异体MHC I或同种异体MHC I多肽)和同种异体II类MHC多肽(同种异体MHC II或同种异体MHC II多肽)。在涉及MHC分子(例如MHC I)的情况下，此类抗原可以一个或多个片段的形式存在。例如，表达肿瘤特异性抗原受体的原初T细胞可通过给予哺乳动物同种异体MHC I被体内活化。

[0042] 可用任何合适的方法给予哺乳动物(例如人)免疫原(例如抗原)。给予哺乳动物免疫原的方法的示例可包括但不限于注射(例如静脉内(IV)、ID、肌肉内(IM)注射或皮下)。在一些情况下,抗原可由载体(例如病毒载体)编码,并可将该载体给予哺乳动物。

[0043] 编码人同种异体MHC I的示例性核酸序列可包括SEQ ID NO:1所示的序列。编码人MHC I多肽(例如HLA-A多肽、HLA-B多肽或HLA-C多肽)的核酸可包括在病毒载体中,从而使得被该病毒载体感染的细胞表达所编码的MHC I多肽。在一些情况下,编码人同种异体MHC I的核酸序列可如其它出处中所描述(例如,参见Pimtanothai等,2000Human Immunology 61:808-815)。在一些情况下,编码人同种异体MHC I的核酸序列可如数据库(如国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information))中所示(参见例如GenBank®登录号M84384.1、AF181842和AF181843)。

[0044] SEQ ID NO:1

ATGCGGGTCACGGCGCCCCGAACCCTCCTCCTGCTGCTCTGGGGGGCAGTGGCCCTGACC
GAGACCTGGGCTGGCTCCCACTCCATGAGGTATTTCCACACCTCCGTGTCCCGGCCCGGC
CGCGGGGAGCCCCGCTTCATCACCGTGGGCTACGTGGACGACACGCTGTTCGTGAGGTTC
GACAGCGACGCCACGAGTCCGAGGAAGGAGCCGCGGGCGCCATGGATAGAGCAGGAGGGG
CCGGAGTATTGGGACCGGGAGACACAGATCTCCAAGACCAACACACAGACTTACCGAGAG
AGCCTGCGGAACCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCGGGTCTCACATCATCCAG

[0045] AGGATGTATGGCTGCGACCTGGGGCCGGACGGGCGCCTCCTCCGCGGGCATAACCAGTAC
GCCTACGACGGCAAAGATTACATCGCCCTGAACGAGGACCTGAGCTCCTGGACCGCGGCG
GACACCGCGGCTCAGATCACCCAGCGCAAGTGGGAGGCGGCCCGTGAGGCGGAGCAGCTG
AGAGCCTACCTGGAGGGCCTGTGCGTGGAGTGGCTCCGCAGACACCTGGAGAACGGGAAG
GAGACGCTGCAGCGCGCGGACCCCCCAAAGACACACGTGACCCACCACCCCATCTCTGAC
CATGAGGCCACCCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCCTGCGGAGATCACACTGACC
TGGCAGCGGGATGGCGAGGACCAAACTCAGGACACTGA

[0046] 编码人同种异体MHC II的示例性核酸序列可包括SEQ ID NO:2所示的序列。编码人MHC II多肽(例如HLA-DP多肽、HLA-DM多肽、HLA-DOA多肽、HLA-DOB多肽、HLA-DQ多肽或HLA-DR多肽)的核酸可包括在病毒载体中,从而使得被该病毒载体感染的细胞表达所编码的MHC II多肽。在一些情况下,编码人同种异体MHC II的核酸序列可如其它出处中所描述(参见,例如Robinson等,2005Nucleic Acids Research 331:D523-526;和Robinson等,2013Nucleic Acids Research 41:D1234-40)。

[0047] SEQ ID NO:2

[0048]
ATGGTGTGTCTGAGGCTCCCTGGAGGCTCCTGCATGGCAGTTCTGACAGTGACACTGATG
GTGCTGAGCTCCCCACTGGCTTTGGCTGGGGACACCAGACCACGTTTCTTGGAGTACTCT
ACGGGTGAGTGTTATTTCTTCAATGGGACGGAGCGGGTGCGGTTACTGGAGAGACACTTC
CATAACCAGGAGGAGCTCCTGCGCTTCGACAGCGACGTGGGGGAGTTCCGGGCGGTGACG
GAGCTGGGGCGGCCTGTCGCCGAGTCCTGGAACAGCCAGAAGGACATCCTGGAAGACAGG
CGCGCCGCGGTGGACACCTATTGCAGACACAACTACGGGGCTGTGGAGAGCTTCACAGTG
CAGCGGCGAGTCCATCCTAAGGTGACTGTGTATCCTTCAAAGACCCAGCCCCTGCAGCAC
CACAACCTCCTGGTCTGTTCTGTGAGTGGTTTCTATCCAGGCAGCATTGAAGTCAGGTGG
TTCCGGAATGGCCAGGAAGAGAAGACTGGGGTGGTGTCCACGGGCCTGATCCACAATGGA
GACTGGACCTTCCAGACCCTGGTGATGCTGGAAACAGTTCCTCGGAGTGGAGAGGTTTAC
ACCTGCCAAGTGGAGCACCCAAGCGTGACAAGCCCTCTCACAGTGGAATGGAGAGCACGG
TCTGAATCTGCACAGAGCAAGATGCTGAGTGGAGTCGGGGGCTTTGTGCTGGGCCTGCTC
TTCCTTGGGGCCGGGCTGTTCATCTACTTCAGGAATCAGAAAGGACACTCTGGACTTCAG
CCAAGAGGATTCCTGAGCTGA

[0049] 在一些情况下,如图17所示的核酸可包括在病毒载体内以表达人MHC I多肽,且该病毒载体可用于在哺乳动物内活化原初T细胞。

[0050] 在一些情况下,可设计如本文所述用于体内活化原初T细胞的病毒载体以表达MHC I多肽片段或MHC II多肽片段。MHC I多肽片段或MHC II多肽片段的长度可为约182个氨基酸～约273个氨基酸(例如,约182个氨基酸～约250个氨基酸,约182个氨基酸～约225个氨基酸,约182个氨基酸～约200个氨基酸,约200个氨基酸～约273个氨基酸,约225个氨基酸～约273个氨基酸,约250个氨基酸～约273个氨基酸,约190个氨基酸～约260个氨基酸,约200个氨基酸～约250个氨基酸,约215个氨基酸～约235个氨基酸,约200个氨基酸～约220个氨基酸,约220个氨基酸～约240个氨基酸,约240个氨基酸～约260个氨基酸或者约260个氨基酸～约280个氨基酸)。

[0051] 如本文所述用于体内活化原初T细胞的病毒载体可为或可源自病毒疫苗。在一些情况下,如本文所述应用的病毒载体可为复制缺陷型。在一些情况下,如本文所述应用的病毒载体可具有免疫原性。可设计以编码I类MHC或II类MHC多肽并用于在哺乳动物内活化T细胞(例如原初T细胞)的病毒载体的例子包括但不限于:小核糖核酸病毒疫苗、腺病毒疫苗、棒状病毒(例如水泡性口炎病毒(VSV))、副粘病毒和慢病毒。在一些情况下,本文所述的原初T细胞可通过给予人编码同种异体MHC I的免疫原性、复制缺陷型腺病毒载体来体内活化。编码同种异体MHC I和/或同种异体MHC II的示例性腺病毒载体如图4B所示。

[0052] 本文还提供了治疗患癌(例如包括表达肿瘤抗原的癌细胞的癌症)哺乳动物(例如人)的材料和方法。例如,可体内活化本文所述的原初T细胞(例如表达肿瘤特异性抗原的原初T细胞)以治疗患癌的人。在一些情况下,如本文所述体内活化原初T细胞可用于减少哺乳动物中癌细胞(例如表达肿瘤抗原的癌细胞)的数量。在一些情况下,如本文所述体内活化原初T细胞可用于减慢和/或防止癌症复发(例如缓解的癌症)。在一些情况下,如本文所述体内活化原初T细胞可用于靶向静息和/或非分裂的癌细胞(例如表达肿瘤抗原的癌细胞)。

[0053] 在一些情况下,用于治疗患癌哺乳动物(例如人)的本文所述方法可包括将该哺乳动物鉴定为患有癌症。可用任何合适的方法将哺乳动物鉴别为患有癌症。一旦鉴别为患有癌症,可对原初T细胞(例如获自该患癌哺乳动物的原初T细胞)进行工程化改造(例如体外或体内工程化改造)以表达抗原受体(例如肿瘤特异性抗原受体),并进行体内活化(如本文

所述)。

[0054] 任何类型的患癌哺乳动物都可用本文所述的材料和方法进行治疗。可通过如本文所述体内活化原初T细胞来治疗的哺乳动物的例子包括但不限于:灵长类动物(例如人和猴)、狗、猫、马、牛、猪、绵羊、兔、小鼠和大鼠。例如,可采用本文所述的原初T细胞的体内活化来治疗患癌的人。

[0055] 任何合适类型的癌症都可用本文所述的材料和方法进行治疗。在一些情况下,待如本文所述治疗的癌症可包括一种或多种实体瘤。在一些情况下,待如本文所述治疗的癌症可为缓解的癌症。在一些情况下,待如本文所述治疗的癌症可包括静息(例如静止或非分裂)癌细胞。在一些情况下,待如本文所述治疗的癌症可为具有化疗逃逸和/或对化疗已无应答的癌症。可如本文所述通过体内活化T细胞来治疗的癌症的例子包括但不限于:白血病(例如急性成淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、慢性髓性白血病(CML)、急性单核细胞白血病(AMOL))、淋巴瘤(例如霍奇金氏淋巴瘤和非霍奇金氏淋巴瘤)、骨髓瘤、卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、生殖细胞肿瘤、肝细胞癌、肠癌、肺癌和黑色素瘤(例如恶性黑色素瘤)。

[0056] 本文所述的材料和方法可用于特异性靶向表达抗原(例如肿瘤抗原,如肿瘤特异性抗原)的细胞(例如癌细胞)。例如,如本文所述体内活化原初T细胞可包括:工程化改造原初T细胞以表达能靶向(例如识别并结合至)肿瘤抗原的肿瘤特异性抗原受体。在一些情况下,肿瘤抗原可为细胞表面肿瘤抗原。可采用原位活化的表达肿瘤特异性抗原受体的T细胞来靶向的肿瘤抗原的例子包括但不限于:MUC-1(与乳腺癌、多发性骨髓瘤、结直肠癌和胰腺癌相关)、HER-2(与胃癌、唾液管癌、乳腺癌、睾丸癌和食管癌相关)和ER(与乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、前列腺癌和子宫内膜癌相关)。

[0057] 在如本文所述的原初T细胞被如本文所述离体工程化改造以表达异源抗原受体(例如异源肿瘤特异性抗原受体)并给予(例如通过过继转移)哺乳动物(例如,人)的情况下,可用任何合适的方法来给予该原初T细胞(例如工程化改造的原初T细胞)。将经工程化改造以表达异源抗原受体的原初T细胞给予哺乳动物的方法的例子可包括但不限于注射(例如IV、ID、IM或皮下注射)。例如,可通过IV注射给予人表达肿瘤特异性抗原受体的原初T细胞。

[0058] 在如本文所述的原初T细胞(例如表达肿瘤特异性抗原受体的原初T细胞)被如本文所述离体工程化改造以表达异源抗原受体(例如异源肿瘤特异性抗原受体)并被给予(例如通过过继转移)哺乳动物(例如,人)的情况下,可将任何合适数量的原初T细胞(例如工程化改造的原初T细胞)给予哺乳动物(例如患癌的哺乳动物)。在一些情况下,将约200个本文所述的原初T细胞～约1500个本文所述的原初T细胞(例如,约200个原初T细胞～约1300个原初T细胞,约200个原初T细胞～约1250个原初T细胞,约200个原初T细胞～约1000个原初T细胞,约200个原初T细胞～约750个原初T细胞,约200个原初T细胞～约500个原初T细胞或约200个原初T细胞～约400个原初T细胞)给予哺乳动物(例如人)。例如,可将约300个表达肿瘤特异性抗原受体的原初T细胞给予患癌的人,然后采用同种异体MHC I在体内活化所述原初T细胞,例如采用编码同种异体MHC I的免疫原性复制缺陷型腺病毒载体给予患癌的人同种异体MHC I。

[0059] 以下通过实施例进一步说明本发明,这些实施例对于权利要求书描述的本发明范

围不构成约束。

[0060] 实施例

[0061] 实施例1:致敏(priming)细胞毒性T细胞(CTL)

[0062] 为了测试CTL是否能被致敏以猎杀表达可被靶向的抗原的静息细胞,将1200OT-1T细胞过继转移入RIP-OVA小鼠(在胰岛中表达卵清蛋白(OVA)抗原),然后用TMEV-OVA小核糖核酸病毒疫苗活化。

[0063] 用H&E染色检测胰腺组织,用IHC染色检测胰岛素。在用病毒诱导CTL的5天内观察到胰腺炎症(图2A)。于第21天在存活的小鼠中观察到胰岛被明显破坏(图2B)。PCR未检测到胰腺中有病毒。用小核糖核酸病毒疫苗体内活化少至300个原初T细胞即可引起正常无病毒胰腺在活化10天内的完全破坏。相比而言,在供体小鼠中活化并转移入RIP-OVA小鼠的8×10^7个OT-1脾细胞没有致病性。

[0064] 这些结果证明了活化的T细胞能够针对相关的抗原对体内细胞进行扫描并在预先不存在炎症的情况下引起免疫破坏。

[0065] 实施例2:同种异体反应性细胞毒性T细胞(CTL)的活化

[0066] 为了确定编码同种异体MHC I分子的腺病毒是否能够活化同种异体反应性CTL,在腺病毒感染入LN抗原递呈细胞的情况下使同种异体I类MHC基因表达。

[0067] 通过皮内注射将表达Cre重组酶的腺病毒导入mTmG报告小鼠的淋巴中。mTmG报告小鼠表达floxed膜红色荧光“Tomato”以及沉默的膜GFP基因。在所表达cre的存在下,Tomato是沉默的,GFP是活化的。表达Tomato和表达GFP的T细胞可通过荧光显微镜区分,然后导入表达cre的腺病毒或对照腺病毒。成功转导使得红色荧光转变为绿色荧光。将Cre重组酶转导入被膜下窦巨噬细胞(图3A-3C)。

[0068] 通过皮内注射,将表达突变MHC分子(作为通用同种异体抗原)的重组缺陷型腺病毒(血清型6)载体(图4A)导入LN。将编码同种异体MHC I的腺病毒导入后4天,将同系的(BALB/c)、同种异体的(B6)和第三方(C3H)的标记化靶细胞通过OV过继转移入体内CTL测试中被攻击的宿主中。4小时后,收集脾细胞并通过流式细胞术分析被导入靶细胞的存在。在体内完全消除B6靶细胞(表达导入的同种异体MHC I的靶标)。仅在4天内就活化了有效的同种异体反应性CD8+ T细胞(图5)。

[0069] 这些结果证明了皮内注射表达同种异体MHC I的腺病毒能够在被膜下巨噬细胞中递呈同种异体MHC I抗原,且能够活化靶向表达同种异体MHC I的细胞的CTL。

[0070] 实施例3:原初细胞毒性T细胞(CTL)的过继转移

[0071] 为了检测过继转移的原初CTL前体是否迁移到次级淋巴器官并被MHC I-腺病毒活化,用CFSE标记带同种异体型记号的原初T细胞,并通过静脉过继转移入原初宿主,然后通过皮内给予MHC I-腺病毒攻击该原初宿主以由转移的细胞引起同种异体CTL应答。

[0072] 过继转移的CFSE标记T细胞迁移入LN,在LN它们遇到转导的同种异体MHC I分子并对其产生应答(图6A和6C)。用同种异体MHC I刺激时被刺激的细胞发生增殖,稀释了CFSE(图6C)。相对于从用对照腺病毒攻击的淋巴结分离的CFSE稀释细胞(图6B),CFSE稀释群组具有高表达CD44和PD-1的更活化表型(图6D)。约4.5%第4天存在的转移细胞发生增殖(图6A和6C)并显示活化标志物的上调(图6B和6D)。

[0073] 这些结果证明了过继转移的CD8+ T细胞能够迁移到LN,且能够被编码同种异体

MHC I的腺病毒疫苗活化。

[0074] 实施例4:原初细胞毒性T细胞(CTL)的体内活化

[0075] 为了检测体内活化的T细胞是否能迁移入肿瘤,采用mTmG报告小鼠建立了离体评估T细胞病毒转导效力的方法。用表达cre的慢病毒通过离心浓缩病毒和聚凝胺转导来自MTMG报告小鼠的原初CD8+脾细胞,然后用抗CD3/Cd28+IL-2活化这些脾细胞在培养物中维持活力4天。成功转导使得红色荧光转变为绿色荧光(图7和图8)。采用MTMG报告小鼠,可确定转导效率、过继转移T细胞进入淋巴结的迁移以及过继转移T细胞进入肿瘤的迁移。

[0076] 实施例5:原初细胞毒性T细胞(CTL)的体内活化

[0077] 具有已建立人造血作用的人源化NSG(hu-NSG)小鼠提供了使用慢病毒CAR的模型来确立对构思的证明。在与供者匹配的hu-NSG小鼠批次中获得了在循环中具有经验证的人白细胞的小鼠。这些小鼠被用作CAR转导方案中的人细胞供者。

[0078] 为了确定CAR是否能够体内活化CTL,用表达人CAR19的慢病毒(慢病毒-CAR19)转导新鲜分离的T细胞。在活化(抗CD3/Cd28)之前或之后用慢病毒-CAR19转导集中的CD4和CD8 T细胞并培养4天以使基因表达,然后用抗小鼠抗体染色并用流式细胞术分析。用慢病毒-CAR19转导新鲜分离的脾细胞1小时,并立即转移入同系hu-NSG受者(1个供者脾脏/个受者)。在细胞转移的同时,小鼠还接受了Ad6-K^b疫苗。6个受者中,约10%回收的人脾细胞是CAR+。如图9所示,人T细胞被慢病毒-CAR19有效转导,而小鼠细胞则不然。

[0079] Hu-NSG小鼠缺乏淋巴结。hu-NSG小鼠淋巴结的缺乏需要改变方法。为了评估将非复制型病毒皮内导入hu-NSG小鼠的效力,在尾部皮内注射伊文思蓝以标记野生型、NOD Scid IL-2R$\gamma^{-/-}$(NSG)和人CD34+造血细胞再造的NSG小鼠(hu-NSG)的腹股沟淋巴结(图10)。

[0080] 为了确定是否可将不同给药途径用于体内CTL,以多种途径将编码同种异体MHC I的复制缺陷型腺病毒载体(Ad6-alloMHC(K^b))递送给hu-NSG小鼠,并评估诱导强烈CTL活性的能力。BALB/c小鼠接受10^{10}个Ad6-K^b IV、ID或IP。1周后,小鼠接受差异标记的BALB/c(自体)和B6(同种异体MHC)靶细胞IV。对两种被导入的群体均评估迁移到脾脏的细胞。效力由B6靶细胞的相对消耗指示。IV、ID和IP接种在诱导强烈CTL活性中等效(图11)。在后续的试验中,小鼠接受一半IV和一半IP的疫苗,这是因为对于人免疫细胞在NSG小鼠脾脏和腹膜内的分布和转运(trafficking)知之甚少。

[0081] 为了确定编码同种异体MHC I分子的腺病毒是否能够活化同种异体反应性CTL以消除表达靶抗原的细胞,给予hu-NSG小鼠由慢病毒-CAR19转导的hu-NSG脾细胞和编码MHC同种异体抗原H-2K^b的复制缺陷型腺病毒。图12显示了该方法的概况。选择具有已知T细胞重构的三只hu-NSG小鼠作为淋巴供者。图13显示了选作供者和选作受者的hu-NSG小鼠的人白细胞组成。回收并集中来自供者动物的脾细胞,用ACK裂解红细胞,然后将整个产物悬浮在100μL未稀释的慢病毒-CAR19病毒中(MOI)。加入聚凝胺至终浓度为8μg/mL。悬浮液以800×g在31℃离心90分钟。去除病毒上清液,将细胞沉淀物悬浮在300μL PBS中,并IV注射(100μL/只小鼠)。IV注射编码MHC同种异体抗原H-2K^b的复制缺陷型腺病毒6的病毒颗粒(5×10^9个病毒颗粒),并且IP注射相同剂量。以无损表型观察,对小鼠进行1周的日常监测。在第7天将小鼠放血,评估血液中的人B细胞组成。

[0082] 为了确定体内CTL是否在hu-NSG宿主中诱导了抗K^b细胞毒活性,用K^{b-}和K^{b+}靶细胞

混合物攻击小鼠，检测受者小鼠的脾脏。从hu-NSG受者(在一周前已接受慢病毒-CAR19转导的hu-NSG脾细胞和Ad6-H-2K^b疫苗)采集血液和脾细胞前4小时，用CFSE差异标记的K^{b-}同系NOD脾靶细胞和K^{b+}同种异体B6脾靶细胞的1:1混合物攻击小鼠。在4小时的体内孵育期之后，检测各受者小鼠脾脏的持续标记K^{b-}和K^{b+}靶细胞的比例。三个受者中所预期的1:1比例全都发生改变，这表明对K^{b+}脾细胞的优先杀灭(图14，分图A)。相对于K^{b-}靶细胞，回收的K^{b+}细胞的比例显著降低(图14，分图B)。该分析表明在hu-NSG小鼠中接种Ad6-H-2K^b诱导了CTL活性，靶向表达K^b的细胞。

[0083] 为了确定CTL是否针对表达靶抗原的细胞体内活化，评估获自接受CART治疗和AD6接种的hu-NSG宿主的人脾细胞对CAR19蛋白的表达。图15中示出了hu-NSG小鼠中B细胞数量降低的原始数据。治疗前后回收的B细胞的绝对数量有极显著的差异。然而，有两个变量对该结论起作用：由于反复取血造成的外周血细胞群(包括B细胞)的非特异性消耗，以及CAT T细胞治疗的预期效果。为了确认B细胞数量的降低归因于CAR T细胞治疗，对数据进行标准化以去除可能的非特异性消耗影响。治疗后数值相对于治疗前数值的标准化采用了公式(治疗前的总CD45+细胞计数/治疗后的CD45细胞计数×治疗后细胞系+细胞的绝对计数)，这是一种保守的方法，减小了在B细胞组分(compartment)中观察到的治疗前和治疗后数值之间差异的幅度来解决因反复取血造成的非特异性B细胞消耗。单尾假设检验使用配对的T检验来反映假设。治疗后T细胞的明显增加与之前的CART治疗发现一致。然而，该可能性的评估并不是原始假设中的一部分，因此应用了双尾检验。髓细胞计数没有变化表明所观察到的B细胞减少和T细胞明显增加似乎是细胞系特异性的(图16)。在受者小鼠的脾脏中，似乎在B细胞消耗程度与T细胞增加以及CAR19表达水平之间存在一定相关性，在之前的CART治疗中也观察到该相关性。

[0084] 该分析证实了Ad6-K^b活化的抗原特异性杀伤。如受者小鼠中循环CD19+B细胞的消耗所证明，已证实了在给予Ad6-MHC后小鼠具有抗CD19靶标的活性。

[0085] 这些结果证明了表达肿瘤特异性抗原受体的原初T细胞能够通过接触靶抗原被特异性地体内活化(例如成为CTL)，并且体内活化的T细胞能够靶向表达抗原的细胞。

[0086] 实施例6：病毒载体的产生

[0087] 为了开发编码稀有I类HLA分子(如HLA-B*4028)的病毒载体，从公众可得的数据库(分别参见例如GenBank:AF181842和AF181843；因以AH008245.2替代)中获得编码外显子2和3的部分核酸序列，并用于引导能够产生全长HLA-B*4004多肽(例如SEQ ID NO:3)的HLA-B*4004全长编码序列(参见例如，GenBank:M84384.1)的修饰。为了开发还编码稀有II类HLA分子(如HLA-DRB1*12:01:01:01)的病毒载体，从公众可得的数据库(参见例如Robinson等，2005Nucleic Acids Research 331:D523-526和Robinson等，2013Nucleic Acids Research 41:D1234-40)中获得SEQ ID NO:2，并用于产生全长HLA-DRB1*12:01:01:01多肽(例如SEQ ID NO:4)。

[0088] 其它实施方式

[0089] 应理解，虽然结合具体说明描述了本发明，但上述说明旨在阐释而非限制本发明的范围，本发明的范围由所附权利要求书所限定。其他方面、优点和改进也在下述权利要求书的范围内。

序列表

<110> 梅约医学教育与研究基金会(Mayo Foundation for Medical Education and Research)

<120> 增加免疫应答的材料和方法

<130> 07039-1690WO1

<150> US 62/618,399

<151> 2018-01-17

<150> US 62/521,011

<151> 2017-06-16

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 758

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1

atgcgggtca cggcgccccg aaccctcctc ctgctgctct gggggggcagt ggccctgacc 60
gagacctggg ctggctccca ctccatgagg tatttccaca cctccgtgtc ccggcccggc 120
cgcggggagc cccgcttcat caccgtgggc tacgtggacg acacgctgtt cgtgaggttc 180
gacagcgacg ccacgagtcc gaggaaggag ccgcgggcgc catggataga gcaggagggg 240
ccggagtatt gggaccggga gacacagatc tccaagacca acacacagac ttaccgagag 300
agcctgcgga acctgcgcgg ctactacaac cagagcgagg ccgggtctca catcatccag 360
aggatgtatg gctgcgacct ggggccggac gggcgcctcc tccgcgggca taaccagtac 420
gcctacgacg gcaaagatta catcgccctg aacgaggacc tgagctcctg gaccgcggcg 480
gacaccgcgg ctcagatcac ccagcgcaag tgggaggcgg cccgtgaggc ggagcagctg 540
agagcctacc tggagggcct gtgcgtggag tggctccgca gacacctgga gaacgggaag 600
gagacgctgc agcgcgcgga ccccccaaag acacacgtga cccaccaccc catctctgac 660
catgaggcca ccctgaggtg ctgggccctg ggcttctacc ctgcggagat cacactgacc 720
tggcagcggg atggcgagga ccaaactcag gacactga 758

<210> 2

<211> 801

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 2

atggtgtgtc tgaggctccc tggaggctcc tgcatggcag ttctgacagt gacactgatg 60
gtgctgagct ccccactggc tttggctggg gacaccagac cacgtttctt ggagtactct 120
acgggtgagt gttatttctt caatgggacg gagcgggtgc ggttactgga gagacacttc 180
cataaccagg aggagctcct gcgcttcgac agcgacgtgg gggagttccg ggcggtgacg 240

gagctggggc ggcctgtcgc cgagtcctgg aacagccaga aggacatcct ggaagacagg 300
cgcgccgcgg tggacaccta ttgcagacac aactacgggg ctgtggagag cttcacagtg 360
cagcggcgag tccatcctaa ggtgactgtg tatccttcaa agacccagcc cctgcagcac 420
cacaacctcc tggtctgttc tgtgagtggt ttctatccag gcagcattga agtcaggtgg 480
ttccggaatg gccaggaaga gaagactggg gtggtgtcca cgggcctgat ccacaatgga 540
gactggacct tccagaccct ggtgatgctg gaaacagttc ctcggagtgg agaggtttac 600
acctgccaag tggagcaccc aagcgtgaca agccctctca cagtggaatg gagagcacgg 660
tctgaatctg cacagagcaa gatgctgagt ggagtcgggg gctttgtgct gggcctgctc 720
ttccttgggg ccgggctgtt catctacttc aggaatcaga aaggacactc tggacttcag 780
ccaagaggat tcctgagctg a 801

<210> 3
<211> 362
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 3

Met Arg Val Thr Ala Pro Arg Thr Leu Leu Leu Leu Leu Trp Gly Ala
1 5 10 15
Val Ala Leu Thr Glu Thr Trp Ala Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe
20 25 30
His Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Thr
35 40 45
Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Leu Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala
50 55 60
Thr Ser Pro Arg Lys Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly
65 70 75 80
Pro Glu Tyr Trp Asp Arg Glu Thr Gln Ile Ser Lys Thr Asn Thr Gln
85 90 95
Thr Tyr Arg Glu Ser Leu Arg Asn Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser
100 105 110
Glu Ala Gly Ser His Ile Ile Gln Arg Met Tyr Gly Cys Asp Leu Gly
115 120 125
Pro Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly His Asn Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly
130 135 140
Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu Asp Leu Ser Ser Trp Thr Ala Ala
145 150 155 160
Asp Thr Ala Ala Gln Ile Thr Gln Arg Lys Trp Glu Ala Ala Arg Glu
165 170 175
Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Leu Cys Val Glu Trp Leu
180 185 190

Arg Arg His Leu Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln Arg Ala Asp Pro
195 200 205
Pro Lys Thr His Val Thr His His Pro Ile Ser Asp His Glu Ala Thr
210 215 220
Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr
225 230 235 240
Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu
245 250 255
Thr Arg Pro Ala Gly Asp Arg Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val
260 265 270
Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu
275 280 285
Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu Arg Trp Glu Pro Ser Ser Gln Ser
290 295 300
Thr Val Pro Ile Val Gly Ile Val Ala Gly Leu Ala Val Leu Ala Val
305 310 315 320
Val Val Ile Gly Ala Val Val Ala Ala Val Met Cys Arg Arg Lys Ser
325 330 335
Ser Gly Gly Lys Gly Gly Ser Tyr Ser Gln Ala Ala Cys Ser Asp Ser
340 345 350
Ala Gln Gly Ser Asp Val Ser Leu Thr Ala
355 360

<210> 4
<211> 266
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 4

Met Val Cys Leu Arg Leu Pro Gly Gly Ser Cys Met Ala Val Leu Thr
1 5 10 15
Val Thr Leu Met Val Leu Ser Ser Pro Leu Ala Leu Ala Gly Asp Thr
20 25 30
Arg Pro Arg Phe Leu Glu Tyr Ser Thr Gly Glu Cys Tyr Phe Phe Asn
35 40 45
Gly Thr Glu Arg Val Arg Leu Leu Glu Arg His Phe His Asn Gln Glu
50 55 60
Glu Leu Leu Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe Arg Ala Val Thr
65 70 75 80
Glu Leu Gly Arg Pro Val Ala Glu Ser Trp Asn Ser Gln Lys Asp Ile
85 90 95

Leu Glu Asp Arg Arg Ala Ala Val Asp Thr Tyr Cys Arg His Asn Tyr
100 105 110
Gly Ala Val Glu Ser Phe Thr Val Gln Arg Arg Val His Pro Lys Val
115 120 125
Thr Val Tyr Pro Ser Lys Thr Gln Pro Leu Gln His His Asn Leu Leu
130 135 140
Val Cys Ser Val Ser Gly Phe Tyr Pro Gly Ser Ile Glu Val Arg Trp
145 150 155 160
Phe Arg Asn Gly Gln Glu Glu Lys Thr Gly Val Val Ser Thr Gly Leu
165 170 175
Ile His Asn Gly Asp Trp Thr Phe Gln Thr Leu Val Met Leu Glu Thr
180 185 190
Val Pro Arg Ser Gly Glu Val Tyr Thr Cys Gln Val Glu His Pro Ser
195 200 205
Val Thr Ser Pro Leu Thr Val Glu Trp Arg Ala Arg Ser Glu Ser Ala
210 215 220
Gln Ser Lys Met Leu Ser Gly Val Gly Gly Phe Val Leu Gly Leu Leu
225 230 235 240
Phe Leu Gly Ala Gly Leu Phe Ile Tyr Phe Arg Asn Gln Lys Gly His
245 250 255
Ser Gly Leu Gln Pro Arg Gly Phe Leu Ser
260 265

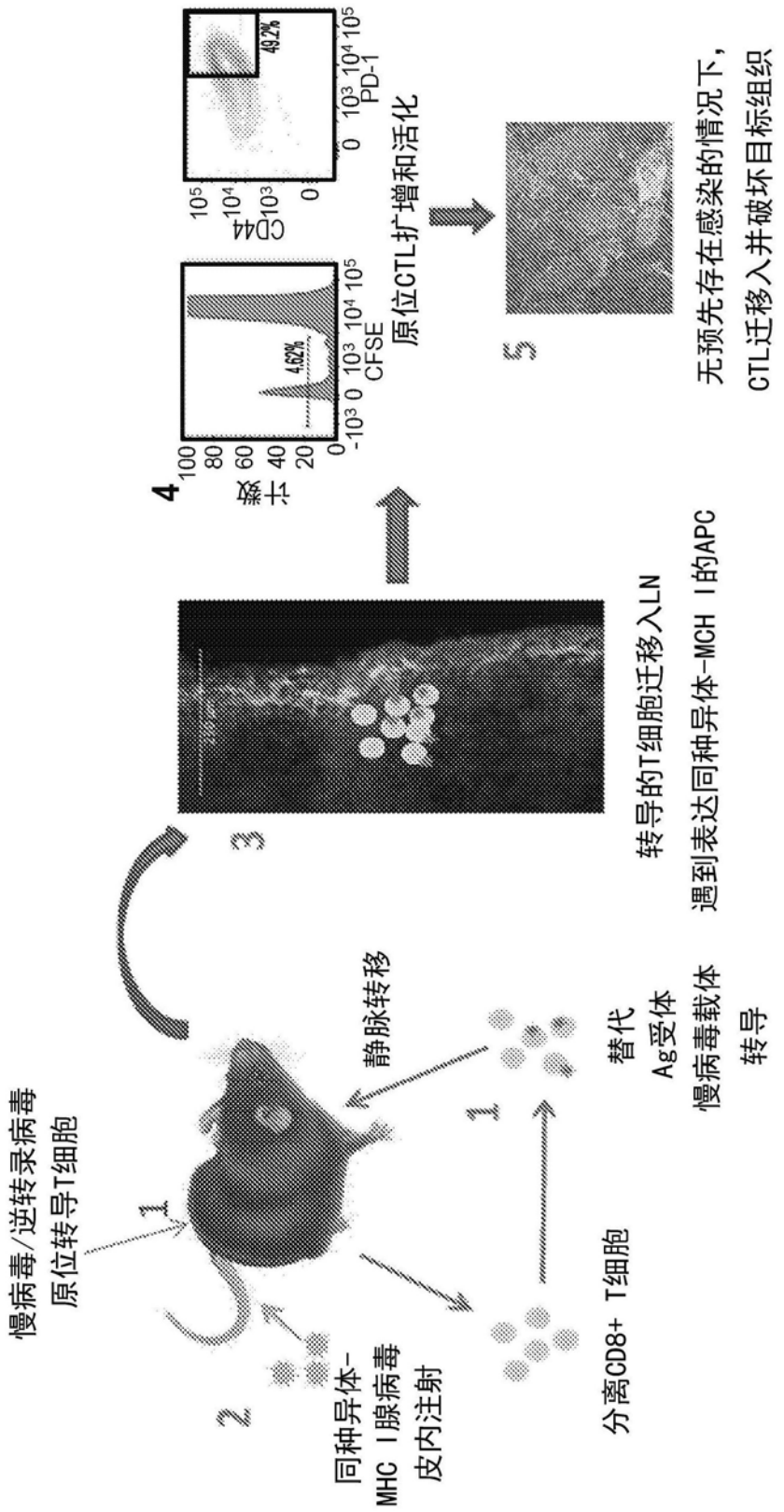

慢病毒/逆转录病毒
原位转导T细胞
1
静脉转移
2
同种异体-
MHC Ⅰ腺病毒
皮内注射
分离CD8+ T细胞
1
替代
Ag受体
慢病毒载体
转导
3
转导的T细胞迁移入LN
遇到表达同种异体-MCH Ⅰ的APC
4
4.62%
CFSE
原位CTL扩增和活化
49.2%
PD-1
5
无预先存在感染的情况下，
CTL迁移入并破坏目标组织

图1

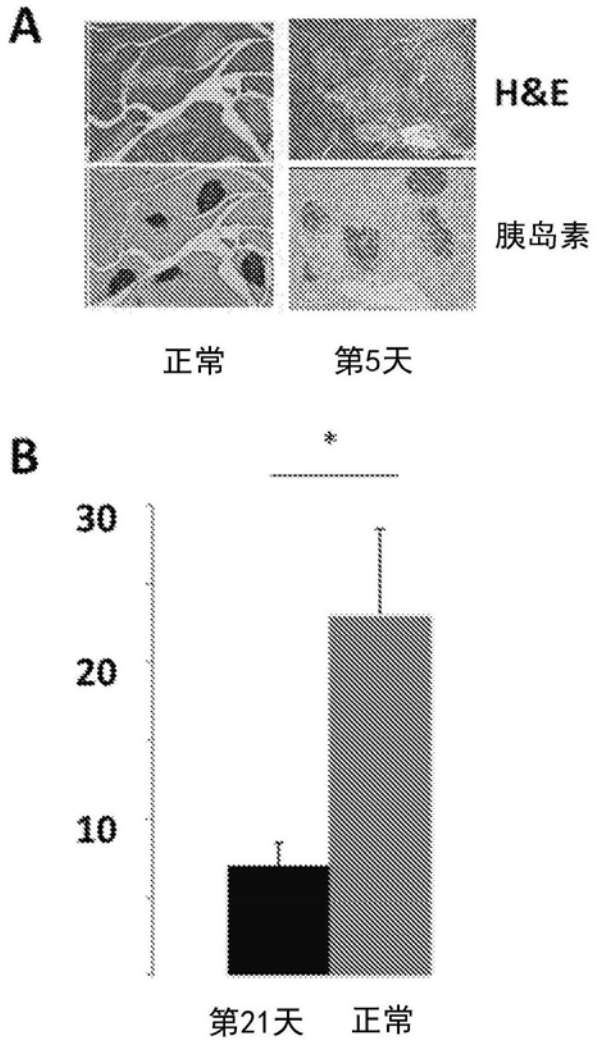


图2

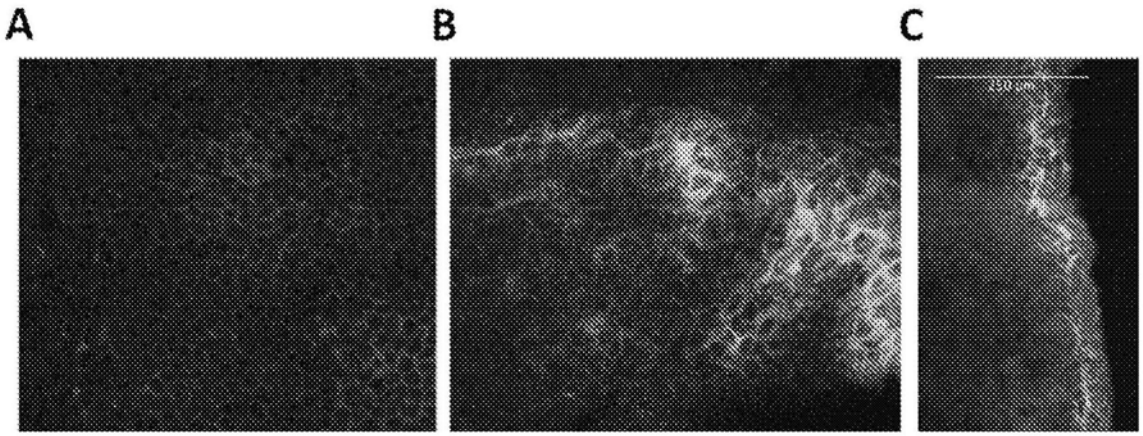


图3

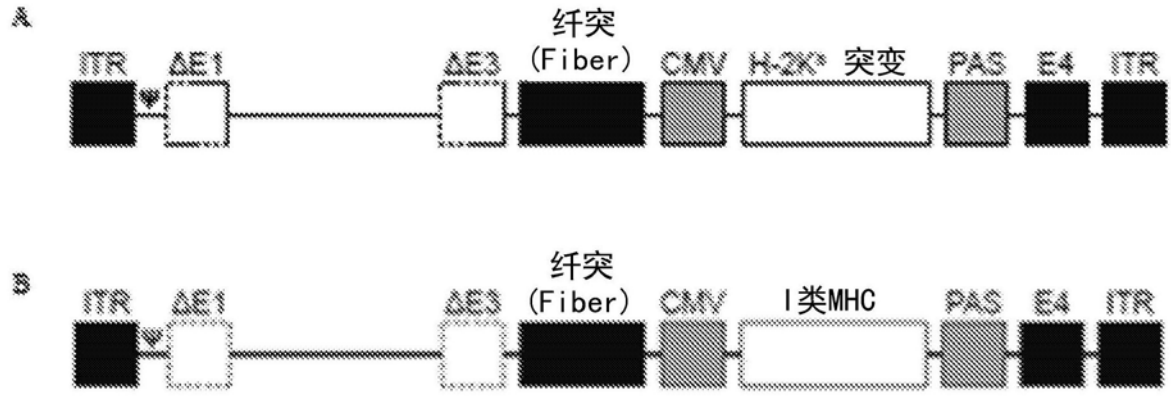

A
纤突
(Fiber)
ITR
ΔE1
ΔE3
CMV
H-2K^b 突变
PAS
E4
ITR
B
纤突
(Fiber)
ITR
ΔE1
ΔE3
CMV
I类MHC
PAS
E4
ITR

图4

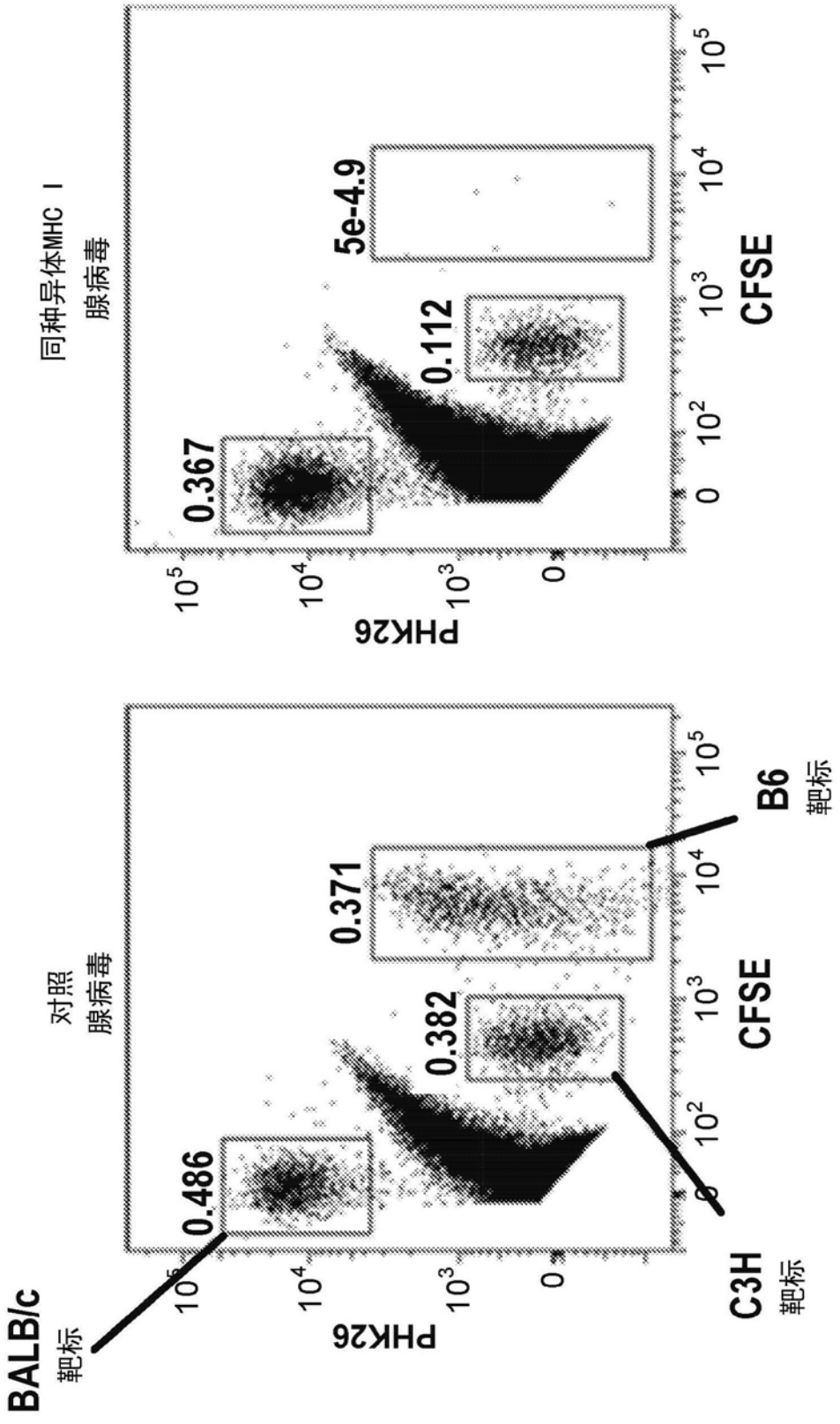

同种异体MHC I
腺病毒
0.367
0.112
5e-4.9
PHK26
CFSE
对照
腺病毒
BALB/c
靶标
0.486
0.382
0.371
C3H
靶标
B6
靶标

图5

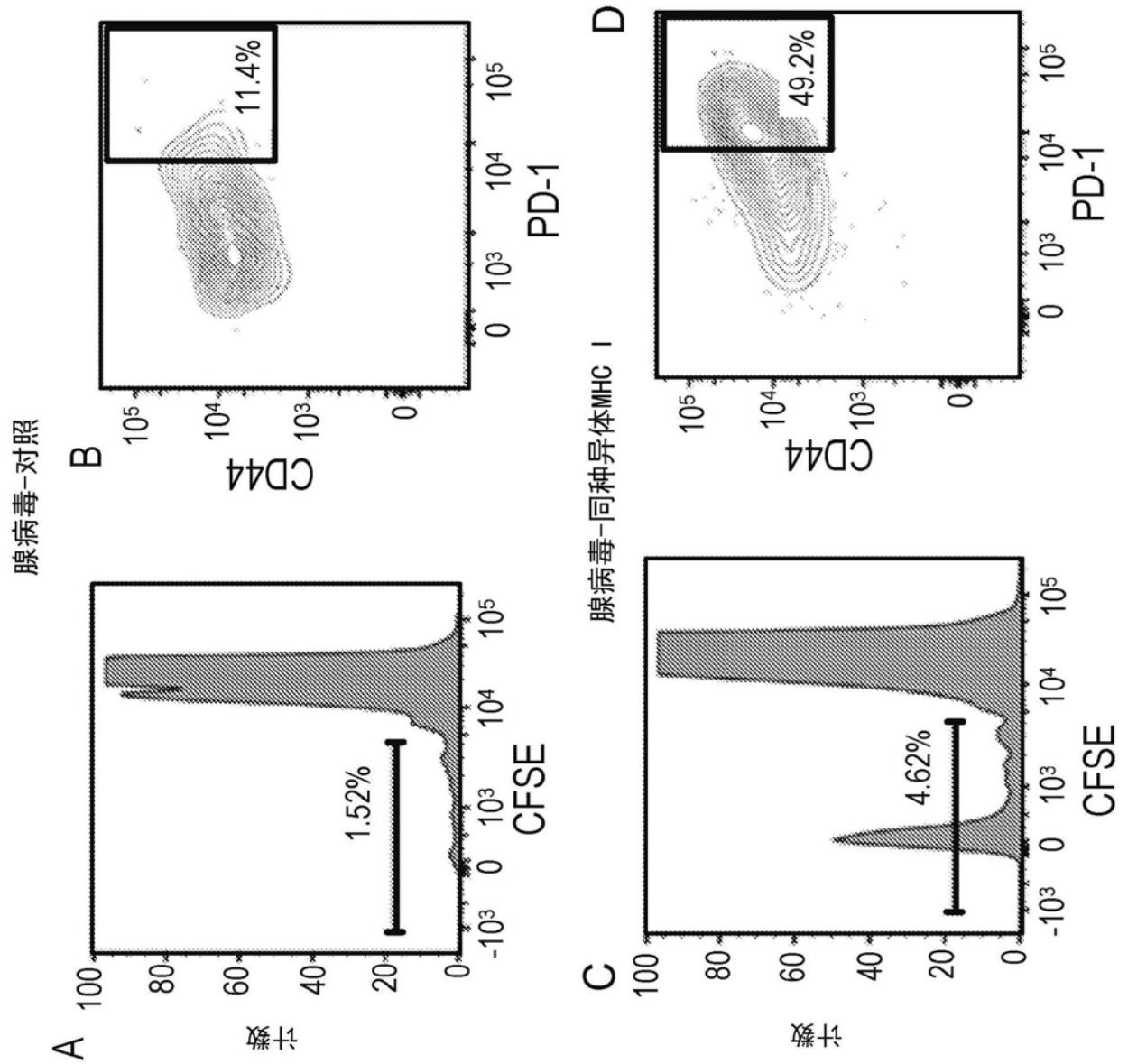


图6

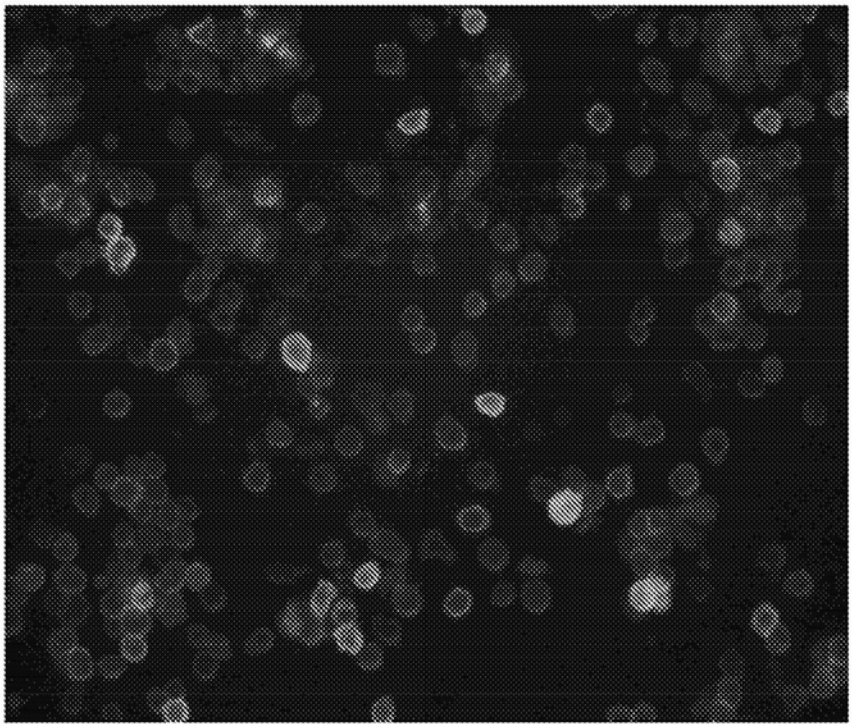


图7

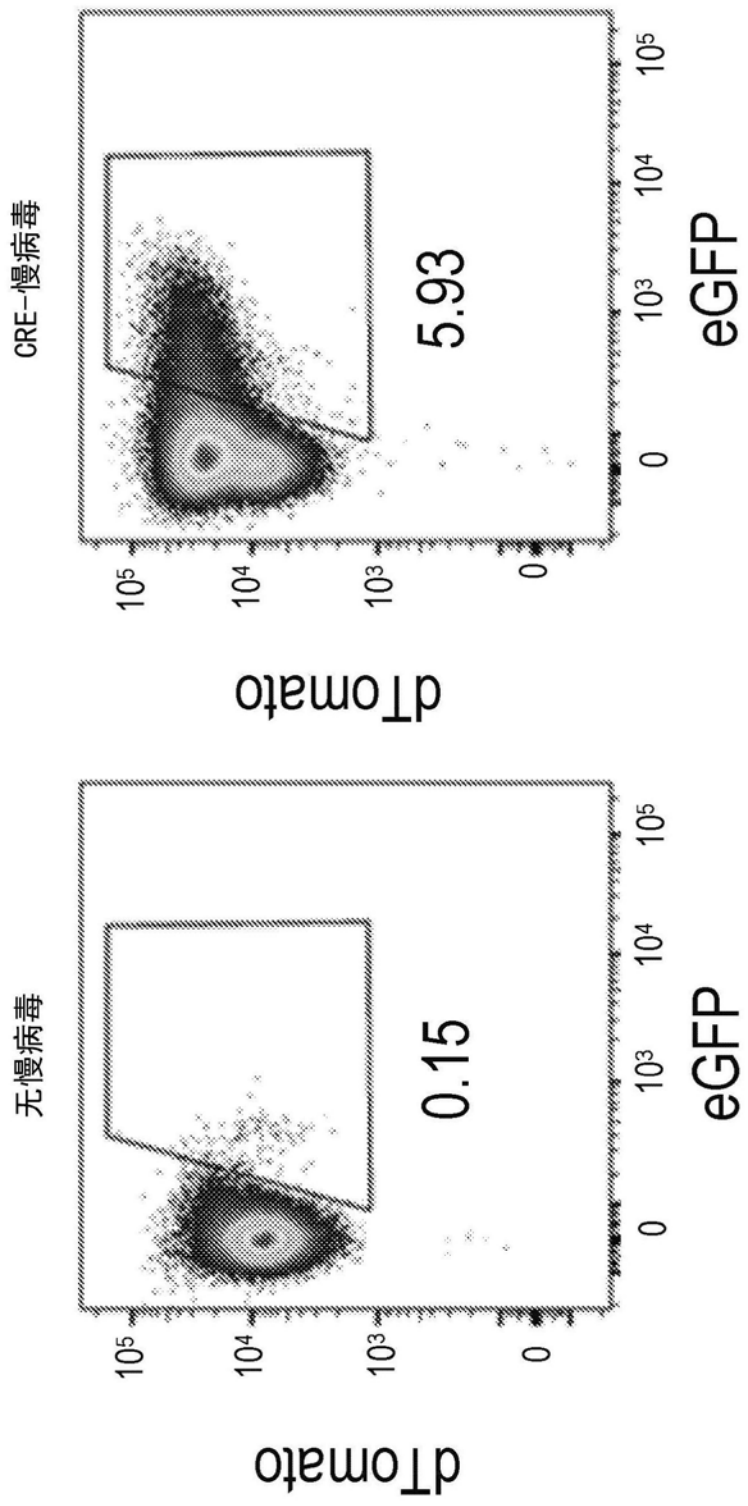


图8

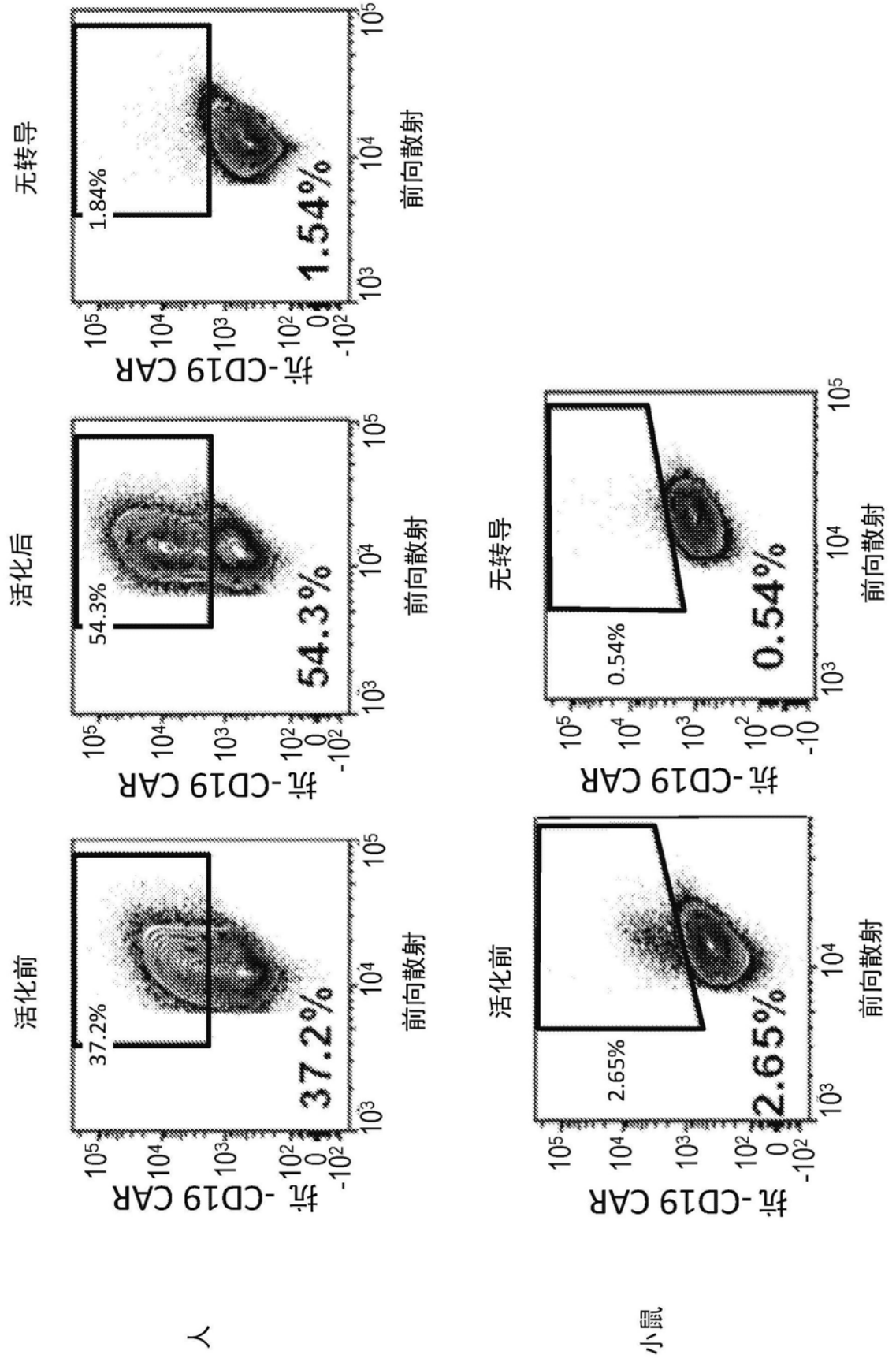


图9

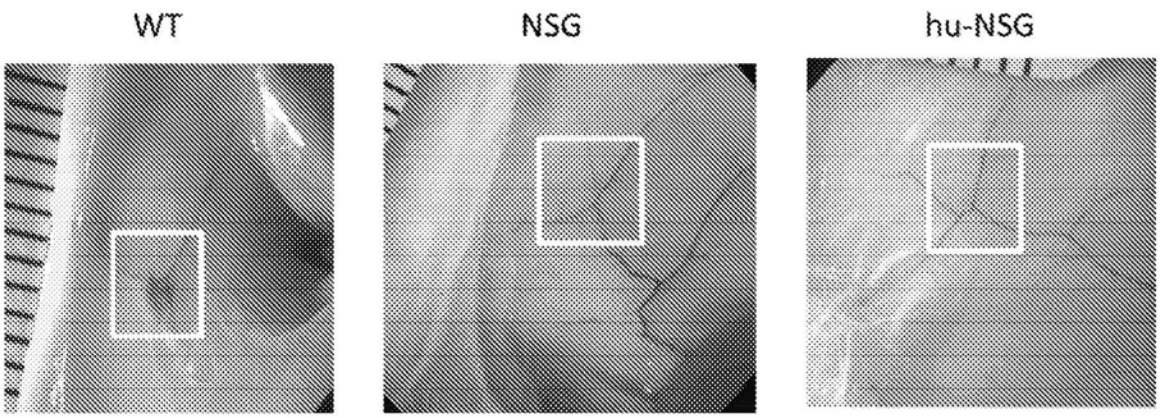


图10

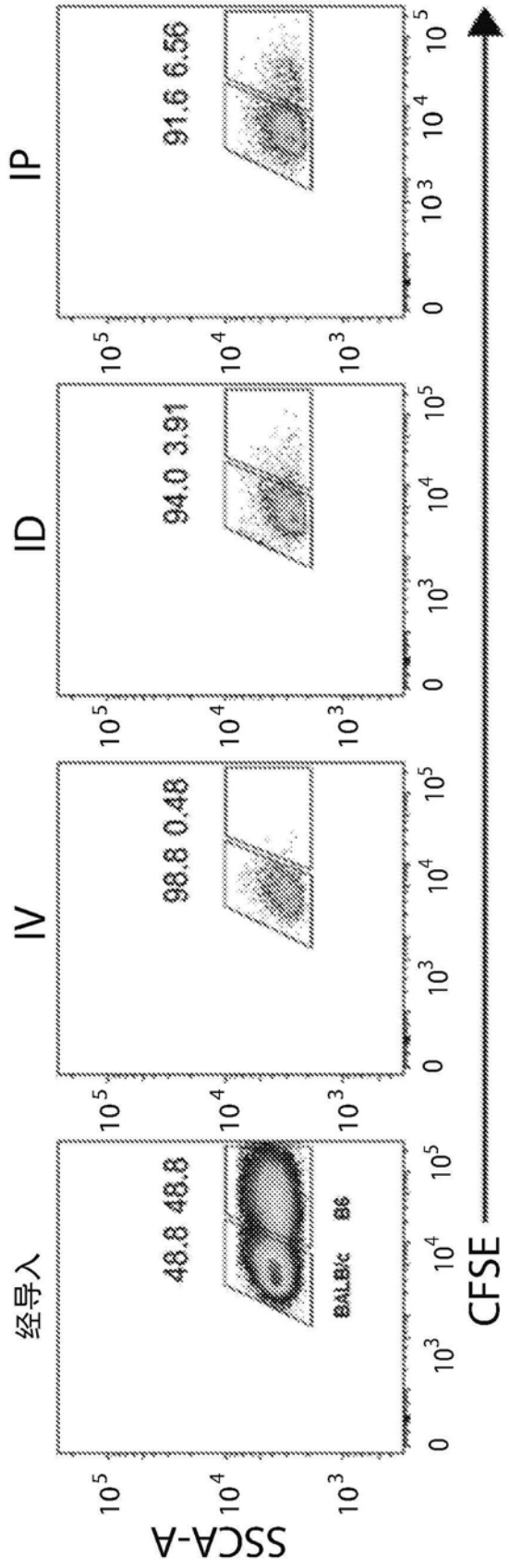


图11

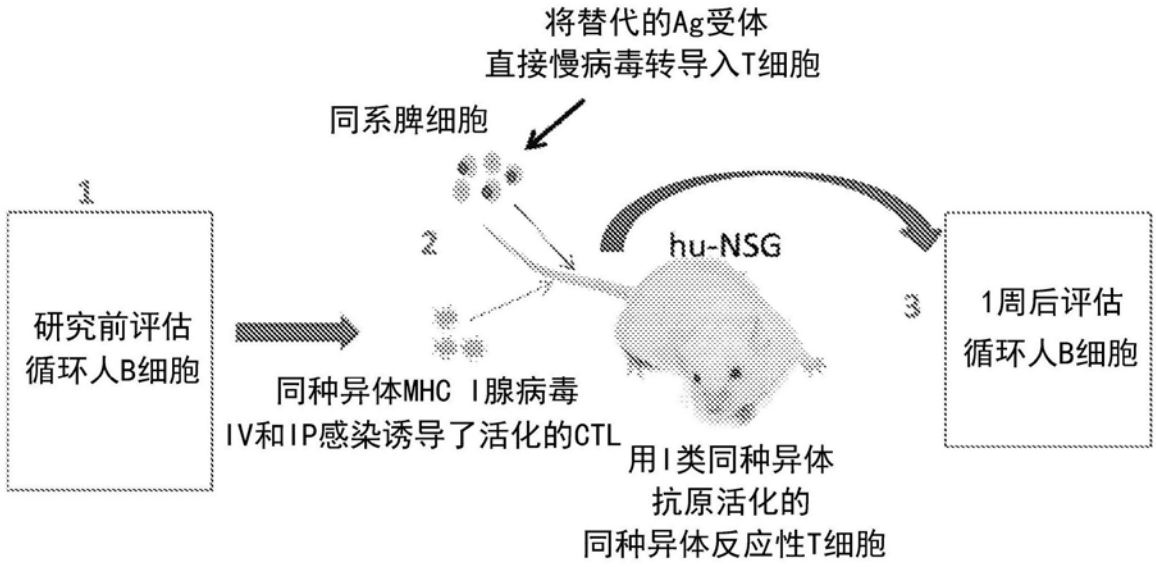

将替代的Ag受体
直接慢病毒转导入T细胞
同系脾细胞
1
研究前评估
循环人B细胞
2
hu-NSG
3
1周后评估
循环人B细胞
同种异体MHC Ⅰ腺病毒
IV和IP感染诱导了活化的CTL
用Ⅰ类同种异体
抗原活化的
同种异体反应性T细胞

图12

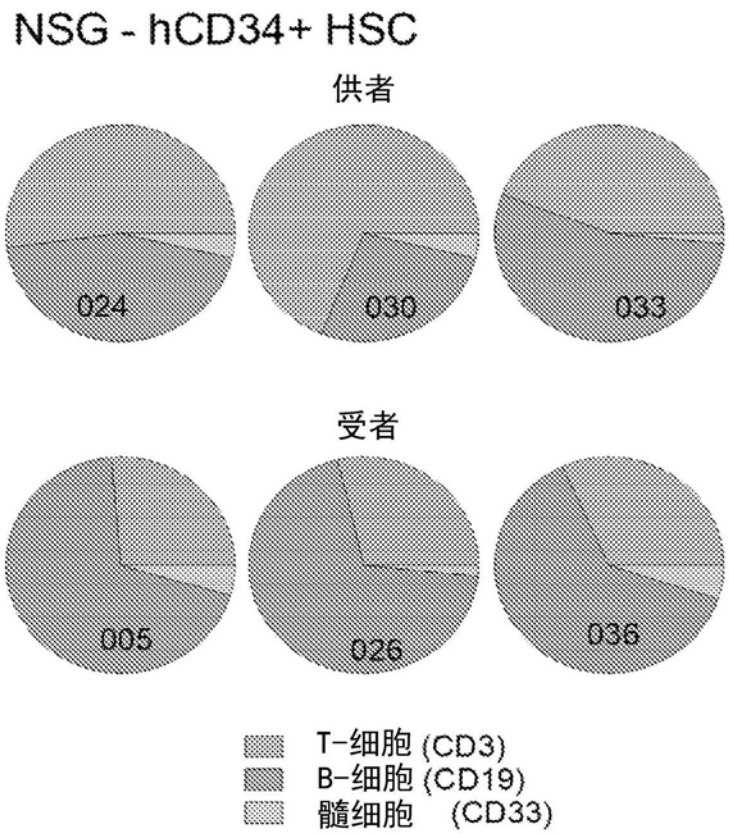

NSG - hCD34+ HSC
供者
024
030
033
受者
005
026
036
T-细胞 (CD3)
B-细胞 (CD19)
髓细胞 (CD33)

图13

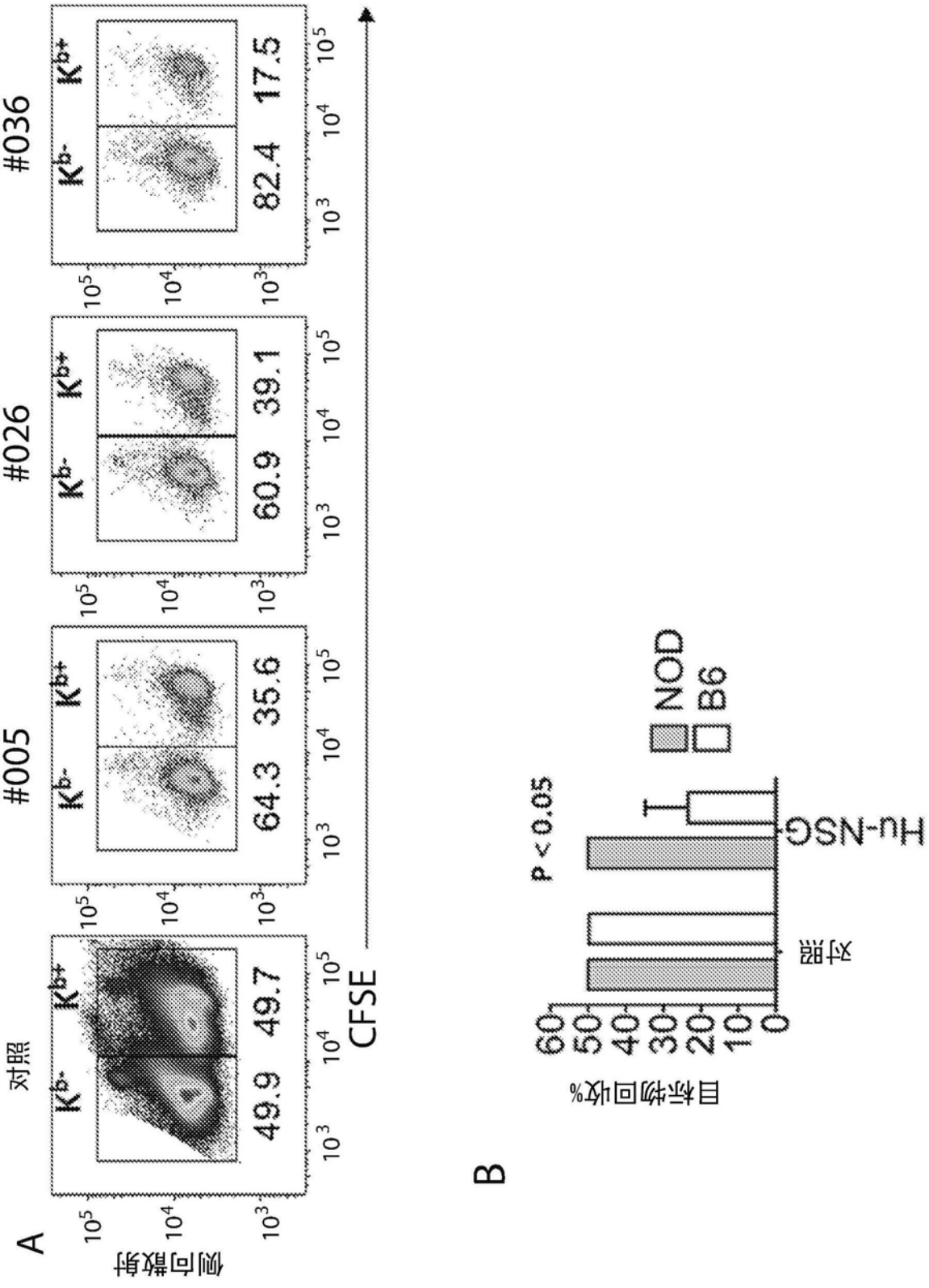

A
对照
#005
#026
#036
侧向散射
CFSE
Kb-
Kb+
49.9
49.7
64.3
35.6
60.9
39.1
82.4
17.5
B
目标物回收%
P < 0.05
NOD
B6
对照
Hu-NSG

图14

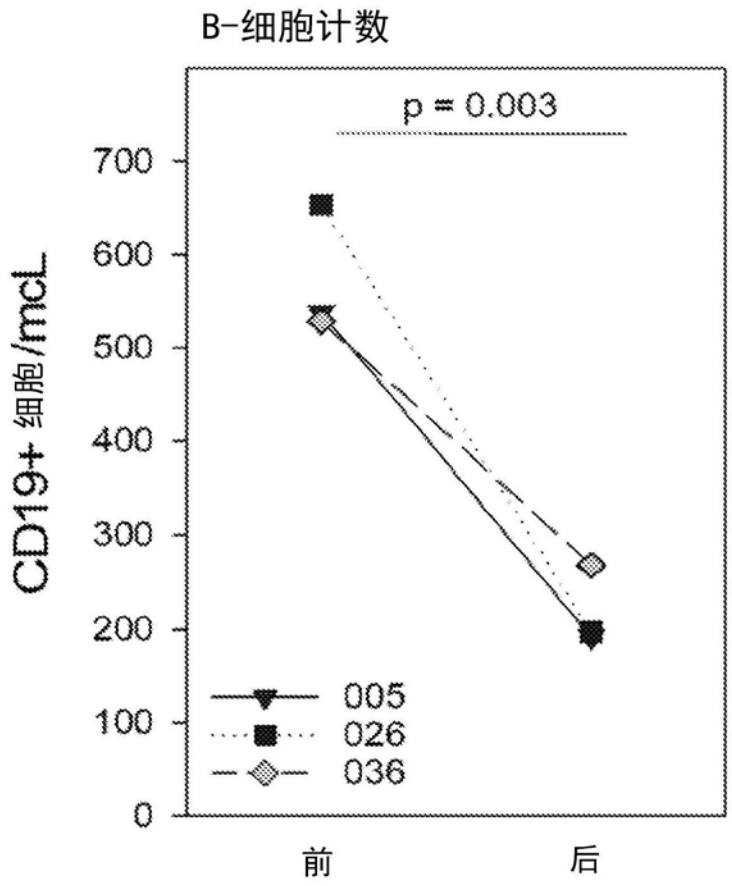

B-细胞计数
p = 0.003
CD19+ 细胞/mcL
700
600
500
400
300
200
100
0
005
026
036
前
后

图15

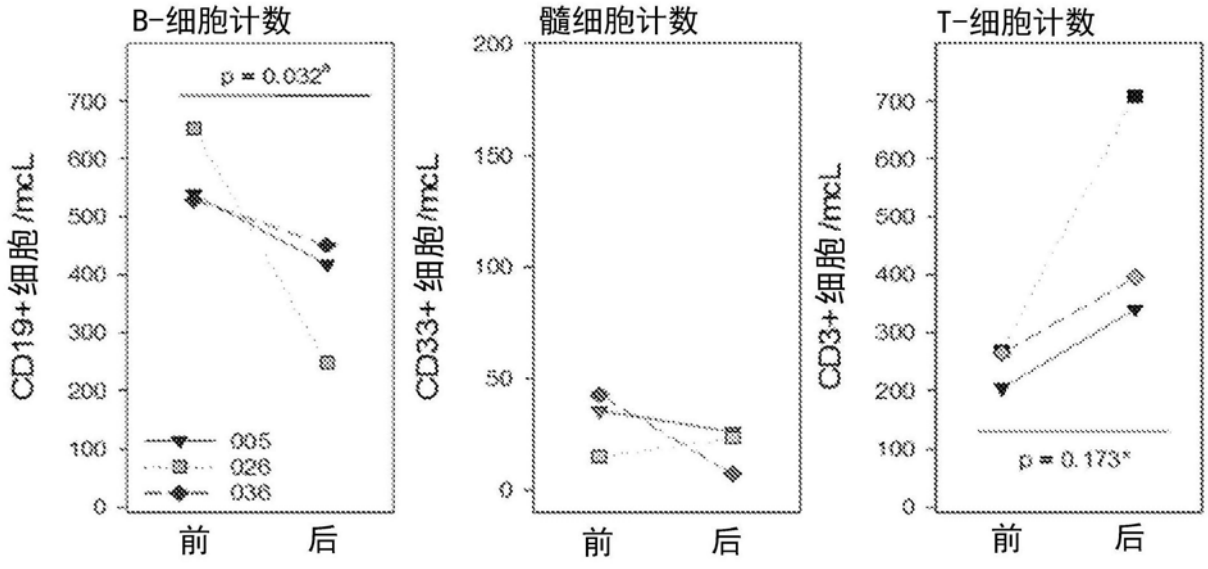

B-细胞计数
p = 0.032*
CD19+细胞/mcL
700
600
500
400
300
200
100
0
005
026
036
前
后
髓细胞计数
CD33+细胞/mcL
200
150
100
50
0
前
后
T-细胞计数
CD3+细胞/mcL
700
600
500
400
300
200
100
0
p = 0.173*
前
后

图16

SEQ_ID_NO:1

HLA-B*4028的核酸序列

ATGCGGGTCACGGCGCCCCGAACCCTCCTCCTGCTGCTCTGGGGGGCAGTGGCCCTGAC
CGAGACCTGGGCTGGCTCCCACTCCATGAGGTATTTCCACACCTCCGTGTCCCGGCCCG
GCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCACCGTGGGCTACGTGGACGACACGCTGTTCGTGAGG
TTCGACAGCGACGCCACGAGTCCGAGGAAGGAGCCGCGGGCGCCATGGATAGAGCAGGA
GGGGCCGGAGTATTGGGACCGGGAGACACAGATCTCCAAGACCAACACACAGACTTACC
GAGAGAGCCTGCGGAACCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCGGGTCTCACATC
ATCCAGAGGATGTATGGCTGCGACCTGGGGCCGGACGGGCGCCTCCTCCGCGGGCATAA
CCAGTACGCCTACGACGGCAAAGATTACATCGCCCTGAACGAGGACCTGAGCTCCTGGA
CCGCGGCGGACACCGCGGCTCAGATCACCCAGCGCAAGTGGGAGGCGGCCCGTGAGGCG
GAGCAGCTGAGAGCCTACCTGGAGGGCCTGTGCGTGGAGTGGCTCCGCAGACACCTGGA
GAACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCGCGGACCCCCCAAAGACACACGTGACCCACCACC
CCATCTCTGACCATGAGGCCACCCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCCTGCGGAG
ATCACACTGACCTGGCAGCGGGATGGCGAGGACCAAACTCAGGACACTGA

SEQ_ID_NO:3

HLA-B*4028的多肽序列

MRVTAPRTLLLLLWGAVALTETWAGSHSMRYFHTSVSRPGRGEPRFITVGYVDDTLFVR
FDSDATSPRKEPRAPWIEQEGPEYWDRETQISKTNTQTYRESLRNLRGYYNQSEAGSHI
IQRMYGCDLGPDGRLLRGHNQYAYDGKDYIALNEDLSSWTAADTAAQITQRKWEAAREA
EQLRAYLEGLCVEWLRRHLENGKETLQRADPPKTHVTHHPISDHEATLRCWALGFYPAE
ITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPAGDRTFQKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLT
LRWEPSSQSTVPIVGIVAGLAVLAVVVIGAVVAAVMCRRKSSGGKGGSYSQAACSDSAQ
GSDVSLTA

图17

SEQ_ID_NO:2

HLA-DRB1*12:01:01:01的核酸序列

ATGGTGTGTCTGAGGCTCCCTGGAGGCTCCTGCATGGCAGTTCTGACAGTGACACTGAT
GGTGCTGAGCTCCCCACTGGCTTTGGCTGGGGACACCAGACCACGTTTCTTGGAGTACT
CTACGGGTGAGTGTTATTTCTTCAATGGGACGGAGCGGGTGCGGTTACTGGAGAGACAC
TTCCATAACCAGGAGGAGCTCCTGCGCTTCGACAGCGACGTGGGGGAGTTCCGGGCGGT
GACGGAGCTGGGGCGGCCTGTCGCCGAGTCCTGGAACAGCCAGAAGGACATCCTGGAAG
ACAGGCGCGCCGCGGTGGACACCTATTGCAGACACAACTACGGGGCTGTGGAGAGCTTC
ACAGTGCAGCGGCGAGTCCATCCTAAGGTGACTGTGTATCCTTCAAAGACCCAGCCCCT
GCAGCACCACAACCTCCTGGTCTGTTCTGTGAGTGGTTTCTATCCAGGCAGCATTGAAG
TCAGGTGGTTCCGGAATGGCCAGGAAGAGAAGACTGGGGTGGTGTCCACGGGCCTGATC
CACAATGGAGACTGGACCTTCCAGACCCTGGTGATGCTGGAAACAGTTCCTCGGAGTGG
AGAGGTTTACACCTGCCAAGTGGAGCACCCAAGCGTGACAAGCCCTCTCACAGTGGAAT
GGAGAGCACGGTCTGAATCTGCACAGAGCAAGATGCTGAGTGGAGTCGGGGGCTTTGTG
CTGGGCCTGCTCTTCCTTGGGGCCGGGCTGTTCATCTACTTCAGGAATCAGAAAGGACA
CTCTGGACTTCAGCCAAGAGGATTCCTGAGCTGA

SEQ_ID_NO:4

HLA-DRB1*12:01:01:01的多肽序列

MVCLRLPGGSCMAVLTVTLMVLSSPLALAGDTRPRFLEYSTGECYFFNGTERVRLLERH
FHNQEELLRFDSDVGEFRAVTELGRPVAESWNSQKDILEDRRAAVDTYCRHNYGAVESF
TVQRRVHPKVTVYPSKTQPLQHHNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFRNGQEEKTGVVSTGLI
HNGDWTFQTLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFV
LGLLFLGAGLFIYFRNQKGHSGLQPRGFLS

图17(续)