

# (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2020 年 9 月 10 日 (10.09.2020)



(10) 国际公布号  
**WO 2020/177071 A1**

(51) 国际专利分类号:  
*C12N 5/0783* (2010.01) *A61P 35/00* (2006.01)  
*A61K 35/17* (2015.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/076957

(22) 国际申请日: 2019 年 3 月 5 日 (05.03.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 上海鑫湾生物科技有限公司(SHANGHAI SINOBY BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市金山区天工路 857 号 2 幢 419 室, Shanghai 201506 (CN)。

(72) 发明人: 徐建青(XU, Jianqing); 中国上海市金山区天工路 857 号 2 幢 419 室, Shanghai 201506 (CN)。 张晓燕(ZHANG, Xiaoyan); 中国上海市金山区天工路 857 号 2 幢 419 室, Shanghai 201506 (CN)。 廖

启彬(LIAO, Qibin); 中国上海市金山区天工路 857 号 2 幢 419 室, Shanghai 201506 (CN)。

(74) 代理人: 北京泛华伟业知识产权代理有限公司(PANAWELL & PARTNERS, LLC); 中国北京市朝阳区朝阳门外大街 16 号中国人寿大厦 1002-1005, Beijing 100020 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

(54) Title: COMPOSITION, CULTURE MEDIUM AND METHOD FOR INDUCING AND/OR AMPLIFYING T<sub>SCM</sub> IN VITRO

(54) 发明名称: 体外诱导和/或扩增T<sub>SCM</sub>的组合物、培养基和方法

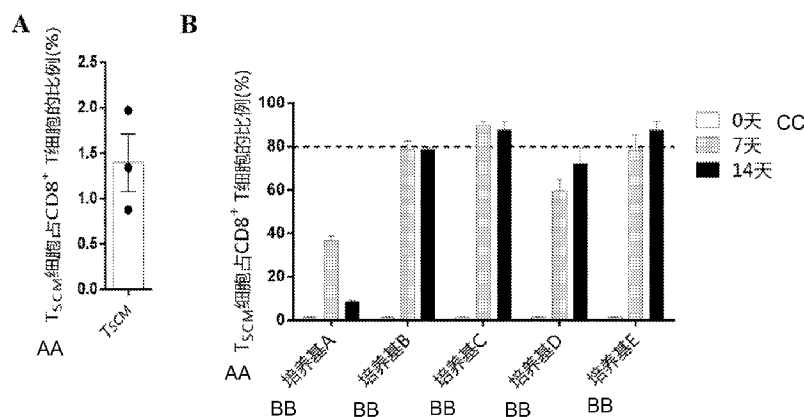


图 1

AA Proportion of T<sub>SCM</sub> cell accounting for CD8<sup>+</sup> T cell  
BB Culture medium  
CC Day

(57) Abstract: Provided are a composition for inducing and/or amplifying T<sub>SCM</sub> in vitro, a culture medium containing the composition, and a method for inducing and/or amplifying T<sub>SCM</sub> in vitro, wherein the composition comprises an inductive agent containing IL-7 and IL-21. Differentiated and amplified stem cell-like memory chimeric antigen receptor T cells induced by the addition of the composition can be directly used for reinfusion therapy of patients.

SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

- (84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区  
保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,  
NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,  
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,  
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,  
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

---

(57) 摘要: 提供了一种用于体外诱导和/或扩增 $T_{SCM}$ 的组合物、包含所述组合物的培养基, 以及体外诱导和/或扩增 $T_{SCM}$ 的方法。其中, 所述组合物包扩含有IL-7和IL-21在内的诱导剂。加入组合物诱导分化和扩增的干细胞样记忆性嵌合抗原受体T细胞可直接用于患者回输治疗。

## 体外诱导和/或扩增 T<sub>SCM</sub> 的组合物、培养基和方法

### 技术领域

- 5 本发明属于细胞培养领域。具体地，本发明涉及用于诱导和/或扩增细胞的组合物、培养基和方法。更具体地，本发明涉及用于体外诱导和/或扩增干细胞样记忆性 T 细胞的组合物、培养基和方法。

### 背景技术

- 10 T 细胞具有强大的抗感染、抗肿瘤能力，是机体适应性免疫系统防御病原体、肿瘤细胞等异物的中坚力量，不仅能够快速应答外来异物或机体赘生物，而且还能够提供较为长期的免疫保护记忆。研究已经证实通过体外诱导和扩增记忆性 T 细胞并回输至患者体内，可以治疗多种疾病，特别是严重威胁人类健康的癌症。

- 15 目前，记忆性 T 细胞的体外诱导和扩增方法中，较为成熟的是使用抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体联合 IL-2 刺激诱导分化，刺激分化的 T 细胞增殖明显加快，幼稚性 T 细胞大大减少，而终末状态的 T 细胞明显增多，这种 T 细胞在体内存活时间较短，不能提供长期的免疫保护，难以满足临床治疗的需求。

- 20 近年来，研究发现并鉴定了一个新的 T 细胞亚群，这群细胞被命名为干细胞样记忆性 T 细胞（T-memory stem cell, T<sub>SCM</sub>）。T<sub>SCM</sub> 处于记忆性 T 细胞的上游，具备干细胞的特征，具有更强的多向分化潜能，可以分化为中枢性记忆 T 细胞（T<sub>CM</sub>）、效应性记忆 T 细胞（T<sub>EM</sub>）和效应 T 细胞（T<sub>EF</sub>），从而产生大量的 IFN- $\gamma$  等效应分子，具备更为强大的杀伤能力。此外，T<sub>SCM</sub> 具备多向分化潜能的同时亦有自我更新的能力，从而在抗原不存在的情况下维持自身稳态。研究表明 T<sub>SCM</sub> 具有更为强大的抗肿瘤能力，其在体内的自我更新能力、二次免疫应答强度及体内存活时间均优于传统的记忆性 T 细胞。

- 30 临床上免疫细胞治疗的过继回输面临着一个瓶颈，特别是目前快速发展的嵌合抗原受体 T 细胞（CAR-T）免疫治疗，既要在较短时间内（14 天内）完成足量免疫细胞的诱导和扩增培养，又要尽量保持免疫细胞的活性、维持“年轻态”的免疫细胞。然而，目前诱导和扩增培养的 T 细胞多为处于终末阶段的细胞，特别是较为常用的抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体联合 IL-2 的培养方法获得的 T<sub>SCM</sub> 比例较低，仅占 9-20%，该类细胞一是难以在体外培养的条件下长期存活，从而难以获得足够量的免疫细胞；二是这种免疫细胞即使回

输回患者体内,也很难获得较为长期的免疫保护作用。然而,  $T_{SCM}$  所具备的多向分化潜能和自我更新特性则恰好解决了临床上免疫细胞治疗的过继回输体外诱导和扩增难、体内疗效差的问题。研究表明,体外诱导和扩增培养的  $T_{SCM}$  样的  $CD8^+CD45RA^+CCR7^+CAR$ -T 细胞比例与肿瘤免疫治疗临床疗效呈现正相关,表明  $T_{SCM}$  具有更为强大的体内抗肿瘤能力。原因可能是  $T_{SCM}$  具备的强大生存能力使得回输的 CAR-T 细胞的体内生存时间大大延长。因此,强大的抗肿瘤能力使得  $T_{SCM}$  成为免疫治疗中最为有效的细胞亚群。因此,利用体外诱导和扩增的抗原特异性  $T_{SCM}$ 、TCR- $T_{SCM}$  或 CAR- $T_{SCM}$  进行免疫治疗将成为细胞治疗的新途径、新手段。

基于上述目的,有目的、有针对性的开发并改良体外诱导和扩增  $T_{SCM}$  的技术方法,并找到经济、方便、且副作用小的细胞因子或者药物,具有极为重要的现实意义。然而,目前的技术方法中仍然缺乏简便且高效的体外大量诱导和扩增  $T_{SCM}$  的方法。

## 发明内容

本发明的目的是针对现有技术的不足,提供一种用于体外诱导和/或扩增干细胞样记忆性 T 细胞的组合物和培养基。本发明还提供了使用本发明的组合物体外诱导和/或扩增干细胞样记忆性 T 细胞的方法。本发明提供的方法中, CAR- $T_{SCM}$  占 CAR-T 细胞的比例有明显提高,可直接用于患者 CAR-T 治疗的回输治疗。

一方面,本发明提供了一种用于体外诱导和/或扩增干细胞样记忆性 T 细胞 ( $T_{SCM}$ ) 的组合物,所述组合物由诱导剂组成,所述诱导剂包含白细胞介素-7 (IL-7) 和白细胞介素-21 (IL-21)。

根据本发明所述的组合物,其中,所述诱导剂还包含 IL-3、IL-12、IL-15 和 IL-18 的一种或多种;优选地,所述诱导剂还包含 IL-15。

根据本发明所述的组合物,其中,所述诱导剂还包含 GSK-3 $\beta$  抑制剂;优选地,所述 GSK-3 $\beta$  抑制剂为 TWS119;

根据本发明所述的组合物,其中,所述诱导剂包含 IL-7、IL-21、IL-15 和 GSK-3 $\beta$  抑制剂;

根据本发明所述的组合物,其中,所述诱导剂以游离蛋白形式加至培养基、耦联于磁珠上,包被于细胞培养板上,或表达于细胞上。

根据本发明所述的组合物,其中,各诱导剂的工作浓度如下:

除了 GSK-3 $\beta$  抑制剂之外的每种诱导剂的工作浓度在 1-100 ng/mL 的范围内, GSK-3 $\beta$  抑制剂的工作浓度在 1-50  $\mu$ M 的范围内。

根据本发明所述的组合物,其中,所述组合物中各诱导剂的工作浓度如

下:

1-100 ng/mL 的 IL-7、1-100 ng/mL 的 IL-21;

优选地, 所述组合物还包含 1-100 ng/mL 的 IL-15;

优选地, 所述组合物还包含 1-50  $\mu$ M 的 GSK-3 $\beta$  抑制剂。

- 5 另一方面, 本发明提供了一种用于体外诱导和/或扩增干细胞样记忆性 T 细胞 ( $T_{SCM}$ ) 的培养基, 其中所述培养基包含 T 细胞生长基础培养基和所述组合物。

根据本发明所述的用于体外诱导和/或扩增  $T_{SCM}$  的培养基或培养基的制备方法, 其中包括在 T 细胞生长基础培养基中加入所述组合物的步骤;

- 10 优选地, 通过包括以下步骤的方式实现:

将所述组合物的一种或多种组分以制备的游离蛋白分子添加到 T 细胞生长基础培养基;

将所述组合物的一种或多种组分包被在磁珠上并添加至 T 细胞生长基础培养基;

- 15 将编码所述组合物的一种或多种组分的遗传物质以载体形式感染或转染的饲养细胞加至 T 细胞生长基础培养基, 与培养的目的细胞共培养;

将编码所述组合物的一种或多种组分的遗传物质以载体形式感染或转染目的细胞, 并用 T 细胞生长基础培养基培养;

- 20 或利用外源细胞表达所述组合物的一种或多种组分, 使其在使用 T 细胞生长基础培养基培养的细胞上清中起作用。

优选地, 可以使用方法的一种或多种的联合来制备所述培养基。

本发明还提供了所述组合物和/或培养基用于体外诱导和/或扩增  $T_{SCM}$  的用途。

- 25 根据本发明所述的用途, 其中所述  $T_{SCM}$  为所述  $T_{SCM}$  为外周血单个核细胞 (PBMC)、 $CD4^+$  T 细胞、 $CD8^+$  T 细胞或  $CD4^-CD8^-$  T 细胞。

根据本发明所述的用途, 其中所述  $T_{SCM}$  为 CAR-T 细胞、TCR-T 细胞或肿瘤浸润性淋巴细胞。

再一方面, 本发明提供了一种体外诱导和/或扩增  $T_{SCM}$  的方法, 所述方法包括使用本发明的组合物和/或培养基诱导和/或扩增细胞的步骤;

- 30 根据本发明所述的体外诱导和/或扩增  $T_{SCM}$  的方法, 其中所述方法包括以下步骤:

①分离外周血单个核细胞 (PBMC)、 $CD4^+$  T 细胞、 $CD8^+$  T 细胞或  $CD4^-CD8^-$  T 细胞;

- 35 ②将步骤①得到的细胞置于本发明的培养基或置于 T 细胞生长基础培养基同时加入所述组合物, 并加入刺激剂, 培养 6-7 天;

优选地,所述刺激剂为抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体/CD28 配体、抗 CD137 抗体/CD137 配体、抗 OX40 抗体/OX40 配体、抗 CD160 抗体/CD160 配体、Toll 样受体 1 (TLR1) 配体、Toll 样受体 2 (TLR2) 配体、Toll 样受体 5 (TLR5) 配体、Toll 样受体 6 (TLR6) 配体和视黄酸诱导基因蛋白 (RIG-I) 的配体、嵌合抗原受体靶抗原、PD-1 阻断抗体、CTLA-4 阻断抗体、LAG-3 阻断抗体、Tm-3 阻断抗体和 BTLA 阻断抗体中的一种或多种;

更优选地,所述刺激剂为耦联抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体的磁珠;

③将步骤②得到的细胞置于本发明的培养基或置于 T 细胞生长基础培养基同时加入所述组合物,每隔 2-4 天补充本发明的培养基或补充 T 细胞生长基础培养基同时加入所述组合物,直至细胞培养周期结束。

在一个优选的实施方案中,所述方法包括以下步骤:

①磁珠阴选出 CD8<sup>+</sup>T 细胞;

②将步骤①得到的细胞置于 T 细胞生长基础培养基,并加入工作浓度的组合物,加入耦联抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体的磁珠,培养 7 天;

③将步骤②得到的细胞置于本发明的培养基或置于 T 细胞生长基础培养基同时加入所述组合物,从第 4 天起,每隔 3 天补充新鲜的培养基或补充新鲜的 T 细胞生长基础培养基同时加入所述组合物,直至细胞培养周期结束。

在一个优选的实施方案中,所述方法为体外诱导和/或扩增干细胞样记忆性嵌合抗原受体 T 细胞 (CAR-T<sub>SCM</sub>) 的方法,包括以下步骤:

1) 分离外周血单个核细胞 (PBMC)、CD4<sup>+</sup>T 细胞、CD8<sup>+</sup>T 细胞或 CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>T 细胞;

2) 将步骤 1) 得到的细胞置于本发明的培养基或置于 T 细胞生长基础培养基同时加入组合物,并加入刺激剂,培养 1-2 天;

优选地,所述刺激剂为抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体/CD28 配体、抗 CD137 抗体/CD137 配体、抗 OX40 抗体/OX40 配体、抗 CD160 抗体/CD160 配体、Toll 样受体 1 (TLR1) 配体、Toll 样受体 2 (TLR2) 配体、Toll 样受体 5 (TLR5) 配体、Toll 样受体 6 (TLR6) 配体和视黄酸诱导基因蛋白 (RIG-I) 的配体、嵌合抗原受体靶抗原、PD-1 阻断抗体、CTLA-4 阻断抗体、LAG-3 阻断抗体、Tm-3 阻断抗体和 BTLA 阻断抗体中的一种或多种;

更优选地,所述刺激剂为耦联抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体的磁珠;

3) 使步骤 2) 得到的细胞转染或感染携带嵌合抗原受体的载体;

4) 将步骤 3) 得到的细胞置于本发明的培养基或置于 T 细胞生长基础培养基同时加入组合物,并加入刺激剂继续培养 5-6 天后去除刺激剂。从第 4 天起,每隔 2-4 天补充培养基或补充 T 细胞生长基础培养基同时加入组合物,直至 CAR-T 细胞培养周期结束;

优选地,所述刺激剂为抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体/CD28 配体、抗 CD137 抗体/CD137 配体、抗 OX40 抗体/OX40 配体、抗 CD160 抗体/CD160 配体、Toll 样受体 1 (TLR1) 配体、Toll 样受体 2 (TLR2) 配体、Toll 样受体 5 (TLR5) 配体、Toll 样受体 6 (TLR6) 配体和视黄酸诱导基因蛋白 (RIG-I) 的配体、嵌合抗原受体靶抗原、PD-1 阻断抗体、CTLA-4 阻断抗体、LAG-3 阻断抗体、Tm-3 阻断抗体和 BTLA 阻断抗体中的一种或多种;

更优选地,所述刺激剂为耦联抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体的磁珠。

在一个优选的实施方案中,所述方法包括以下步骤:

1) 分离外周血单个核细胞 (PBMC) 或 CD8<sup>+</sup>T 细胞;

2) 将步骤 1) 得到的细胞置于本发明的培养基或置于 T 细胞生长基础培养基同时加入所述组合物,并加入耦联抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体的磁珠,培养 1 天;

3) 在步骤 2) 得到的细胞中以感染复数 MOI=2-15 的比例加入携带嵌合抗原受体慢病毒载体 LV-CAR, 在 30-32°C 下, 离心感染 2h;

4) 离心结束后,将步骤 3) 得到的细胞培养过夜,置于本发明的培养基或置于 T 细胞生长基础培养基同时加入所述组合物,并加入耦联抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体的磁珠继续培养 5-6 天后去除耦联抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体的磁珠。从第 4 天起,每隔 3 天补充培养基或补充 T 细胞生长基础培养基同时加入所述组合物,继续培养直至 CAR-T 细胞培养周期结束;

优选地,所述刺激剂为抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体/CD28 配体、抗 CD137 抗体/CD137 配体、抗 OX40 抗体/OX40 配体、抗 CD160 抗体/CD160 配体、Toll 样受体 1 (TLR1) 配体、Toll 样受体 2 (TLR2) 配体、Toll 样受体 5 (TLR5) 配体、Toll 样受体 6 (TLR6) 配体和视黄酸诱导基因蛋白 (RIG-I) 的配体、嵌合抗原受体靶抗原、PD-1 阻断抗体、CTLA-4 阻断抗体、LAG-3 阻断抗体、Tm-3 阻断抗体和 BTLA 阻断抗体中的一种或多种;

更优选地,所述刺激剂为耦联抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体的磁珠。

在一个优选的实施方案中,所述方法为体外诱导和/或扩增干细胞样记忆性 T 细胞受体 T 细胞 (TCR-T<sub>SCM</sub>) 的方法,包括以下步骤:

1) 分离外周血单个核细胞 (PBMC)、CD4<sup>+</sup>T 细胞或 CD8<sup>+</sup>T 细胞;

2) 将步骤 1) 得到的细胞置于本发明的培养基或置于 T 细胞生长基础培养基同时加入所述组合物,并加入刺激剂,培养 1-2 天;

优选地,所述刺激剂为抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体/CD28 配体、抗 CD137 抗体/CD137 配体、抗 OX40 抗体/OX40 配体、抗 CD160 抗体/CD160 配体、Toll 样受体 1 (TLR1) 配体、Toll 样受体 2 (TLR2) 配体、Toll 样受体 5 (TLR5) 配体、Toll 样受体 6 (TLR6) 配体和视黄酸诱导基因蛋白 (RIG-I) 的配体、

嵌合抗原受体靶抗原、PD-1 阻断抗体、CTLA-4 阻断抗体、LAG-3 阻断抗体、Tm-3 阻断抗体和 BTLA 阻断抗体的一种或多种；

更优选地，所述刺激剂为耦联抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体的磁珠；

3) 使步骤 2) 得到的细胞转染或感染携带 T 细胞受体的载体；

- 5      4) 将步骤 3) 得到的细胞置于本发明的培养基或置于 T 细胞生长基础培养基同时加入组合物，并加入刺激剂继续培养 5-6 天后去除刺激剂。从第 4 天起，每隔 2-4 天补充培养基或补充 T 细胞生长基础培养基同时加入组合物，直至 TCR-T 细胞培养周期结束。

在一个优选的实施方案中，所述方法包括以下步骤：

- 10      1) 分离外周血单个核细胞 (PBMC)、CD4<sup>+</sup>T 细胞或 CD8<sup>+</sup>T 细胞；

2) 将步骤 1) 得到的细胞置于本发明的培养基或置于 T 细胞生长基础培养基同时加入组合物，并加入耦联抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体的磁珠，培养 1 天；

- 15      3) 在步骤 2) 得到的细胞中以感染复数 MOI=2-15 的比例加入携带嵌合抗原受体慢病毒载体 LV- TCR，在 30-32°C 下，离心感染 2h；

- 4) 离心结束后，将步骤 3) 得到的细胞培养过夜，置于本发明的培养基或置于 T 细胞生长基础培养基同时加入组合物，并加入耦联抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体的磁珠继续培养 5-6 天后去除耦联抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体的磁珠。从第 4 天起，每隔 3 天补充培养基或补充 T 细胞生长基础培养基同时加入组合物，继续培养直至 TCR-T 细胞培养周期结束。

再一方面，本发明提供了根据本发明的方法制备的 T<sub>SCM</sub>；

优选地，所述 T<sub>SCM</sub> 为 CAR-T<sub>SCM</sub>、TCR-T<sub>SCM</sub> 或肿瘤浸润性淋巴细胞。

本发明还提供了本发明的 T<sub>SCM</sub> 制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。

- 25      再另一方面，本发明提供了一种肿瘤的细胞免疫治疗方法，所述方法包括使用本发明的 T<sub>SCM</sub>。

- 本发明的发明人发现，在 T 细胞培养过程中添加细胞因子 IL-7、IL-15 和 IL-21，可以在体外高效地将 T 细胞诱导诱导和/或扩增为 T<sub>SCM</sub>，T<sub>SCM</sub> 占 T 细胞的比例显著提升，且细胞数目显著增加。本发明公开的方法可用于干细胞样记忆性嵌合抗原受体 T 细胞 (CAR-T<sub>SCM</sub>) 的体外诱导和/或扩增，亦可用于干细胞样记忆性 T 细胞受体 T 细胞 (TCR-T<sub>SCM</sub>) 的体外诱导和/或扩增。
- 30      本发明使用的组合物安全性好、易获取，组合物诱导和/或扩增的 TCR-T<sub>SCM</sub> 或 CAR-T<sub>SCM</sub> 可用于肿瘤患者的细胞治疗，为癌症免疫治疗提供了一种新策略，具有重要的开发和推广价值。

## 35      附图的简要说明

以下，结合附图来详细说明本发明的实施方案，其中：

图 1 为根据本发明的培养基对  $CD8^+ T_{SCM}$  体外诱导的效果；其中，图 1A 为健康人外周血  $CD8^+ T$  细胞中  $T_{SCM}$  所占的比例；图 1B 为根据本发明的培养基在培养第 7 天和第 14 天时诱导  $CD8^+ T$  细胞分化为  $T_{SCM}$  的效果比较图，其中  $T_{SCM}$  比例越高，说明诱导效果越好。

图 2 为根据本发明的培养基对  $CD8^+ T_{SCM}$  体外诱导和扩增的效果；其中，图 2A 为根据本发明的培养基诱导和扩增  $CD8^+ T_{SCM}$  的细胞计数图。相同的培养时间， $CD8^+ T_{SCM}$  的细胞数目越多，说明该组合物的诱导和扩增效果越佳；图 2B 为根据本发明的培养基在培养第 7 天和第 14 天时的  $CD8^+ T_{SCM}$  的诱导和扩增倍数。

图 3 为根据本发明的两种培养基对  $CD19 CAR-T_{SCM}$  体外诱导分化和扩增效果；其中，图 3A 为培养第 11 天  $CD19$  嵌合抗原受体 T 细胞 ( $CD19 CAR-T$ ) 中  $T_{SCM}$  的流式检测结果；图 3B 为培养第 7 天和第 11 天  $CD19 CAR-T_{SCM}$  占 T 细胞比例的统计图；图 3C 为培养第 7 天和第 11 天的  $CD19 CAR-T_{SCM}$  体外扩增效果。

图 4 为根据本发明的两种培养基对  $CD19 CAR-CD8^+ T_{SCM}$  体外诱导分化和扩增效果。其中，图 4A 为培养第 11 天  $CD19 CAR-CD8^+ T$  细胞中  $T_{SCM}$  的流式检测结果；图 4B 为培养第 7 天和第 11 天  $CD19 CAR-CD8^+ T_{SCM}$  占  $CD8^+ T$  细胞比例的统计图；图 4C 为培养第 7 天和第 11 天的  $CD19 CAR-CD8^+ T_{SCM}$  体外扩增效果。

图 5 为根据本发明的两种培养基培养的  $CD19 CAR-CD8^+ T$  细胞体外活化效果。

图 6 为根据本发明的两种培养基培养的  $CD19 CAR-CD8^+ T$  细胞体外杀伤活性。

图 7 为根据本发明的两种培养基培养的  $CD19^+ CAR-T$  细胞在重症联合免疫缺陷 (NSG) 小鼠体内的抗肿瘤作用。

### **实施发明的最佳方式**

本申请的以下描述只为说明本申请的多种实施方式。因此，此处讨论的具体修改方式不应理解为对申请范围的限制。本领域的技术人员在不偏离本申请范围的情况下即可很容易地得出多种等同方式、变化和修改，应理解这样的等同实施方式包括在本发明范围内。在本申请中引用的所有文献，包括公开出版物、专利和专利申请都通过引用的方式全文并入。

下面结合附图和具体实验进一步详细说明本发明。除非特别说明，本发明所用试剂、仪器、设备和方法均为本技术领域的常规市购试剂、仪器、设

备和方法。

制备本发明的培养基 B-E, 同时制备用于对照的培养基 A, 其中, 所述培养基共有组分如下:

T 细胞生长基础培养基: 淋巴细胞无血清培养基( KBM581, 康宁公司 );

5 所述培养基的差异组分如下:

培养基 A 含有 50 ng/mL IL-2;

培养基 B 含有 5 ng/mL IL-7 和 30 ng/mL IL-21;

培养基 C 含有 5 ng/mL IL-7、30 ng/mL IL-21 和 5  $\mu$ M TWS119;

培养基 D 含有 5 ng/mL IL-7、30 ng/mL IL-21 和 10 ng/mL IL-15;

10 培养基 E 含有 5 ng/mL IL-7、30 ng/mL IL-21、10 ng/mL IL-15 和 5  $\mu$ M TWS119

### **实施例 1 本发明的培养基体外诱导和扩增 CD8<sup>+</sup> T<sub>SCM</sub>**

1) 取预先制备的人原代 T 细胞 (上海鑫湾生物科技有限公司, 以下简称“鑫湾公司”), 采用磁珠阴选方法获得人原代 CD8<sup>+</sup> T 细胞 (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), 并铺在 96 孔 U 底培养板中, 每孔  $5 \times 10^4$  个 CD8<sup>+</sup> T 细胞;

2) 随后, 向含有 CD8<sup>+</sup> T 细胞的培养板中加入培养基 A-E, 并加入含有抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体耦联的磁珠, 其中磁珠: 细胞数=1: 1; 并在细胞培养的第 4 天、第 7 天、第 10 天、第 13 天补充新鲜培养基 A-E。

3) 分别在细胞培养第 0 天, 第 7 天和第 14 天进行细胞计数, 并孵育检测 T<sub>SCM</sub> 的流式抗体 (CD45RA、CCR7 和 CD95), 采用流式细胞仪进行 T<sub>SCM</sub> 的检测。

实验结果如图 1 和图 2 所示。

图 1 为培养基 A-E 对 CD8<sup>+</sup> T<sub>SCM</sub> 体外诱导效果比较图。其中, 图 1A 为健康人外周血 CD8<sup>+</sup> T 细胞 (即原代) 中 T<sub>SCM</sub> 所占的比例。如图 1A 所示, 原代 CD8<sup>+</sup> T 细胞中的 T<sub>SCM</sub> 的比例极低, 所占比例低于 2%, 图 1B 为培养基 A-E 在培养第 7 天和第 14 天时诱导 CD8<sup>+</sup> T 细胞分化为 T<sub>SCM</sub> 的效果比较。相对于常用的 IL-2, 其余培养基 B-E 均能有效地诱导 CD8<sup>+</sup> T 细胞分化为 T<sub>SCM</sub>, 且大大优于 IL-2 的诱导效果。培养至第 14 天, 培养基 A 的平均诱导效率低于 10%。然而, 培养第 14 天, 培养基 B 组的 T<sub>SCM</sub> 占整个原代 CD8<sup>+</sup> T 细胞的比例即诱导效率高达 78.7%, 培养基 D 组的 T<sub>SCM</sub> 诱导效率稍低 (72.0%)。培养基 C 组和 E 组, 也就是联合使用 TWS119 后, 均能达到 87.0% 的 T<sub>SCM</sub> 诱导效率。此外, 发明人发现, 本发明的诱导剂可有效诱导 T<sub>SCM</sub> 的形成的浓度范围如下: IL-7 (1-100 ng/mL)、IL-15 (1-100 ng/mL)、IL-21 (1-100 ng/mL)、以及和 TWS119 (1-50  $\mu$ M)。

图 2 为根据本发明的培养基 A-E 对  $CD8^+ T_{SCM}$  体外诱导和扩增的效果。

图 2A 为根据本发明的培养基 A-E 诱导和扩增  $CD8^+ T_{SCM}$  的细胞计数图。培养第 14 天，培养基 A 诱导和扩增  $CD8^+ T_{SCM}$  的效果最低，根据本发明的培养基 B 组诱导和扩增  $CD8^+ T_{SCM}$  的效果明显优于根据本发明的培养基 C 组，而根据本发明的培养基 D 组的诱导和扩增效果更佳。

图 2B 为根据本发明的培养基 A-E 在培养第 7 天和第 14 天时的  $CD8^+ T_{SCM}$  的诱导和扩增倍数。在培养第 14 天后，诱导和扩增  $CD8^+ T_{SCM}$  的效果如下：根据本发明的培养基 A 组为 800 倍、根据本发明的培养基 B 组达到 1162 倍，而根据本发明的培养基 D 组高达 5269 倍。IL-7、IL-15、IL-21 有效扩增  $CD8^+ T_{SCM}$  浓度范围均为 1-100 ng/mL。

## **实施例 2 本发明的培养基 B 和 D 对 $CD19 CAR-T_{SCM}$ 体外诱导分化和扩增效果**

1) 复苏预先制备并冻存的健康外周血单个核细胞(PBMC)(鑫湾公司)，加在 48 孔细胞培养板中 ( $1 \times 10^6$  个 PBMC / 孔)。

2) 随后，向上述细胞培养板中加入含有抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体耦联的磁珠 (细胞数: 磁珠数=1: 1) 和根据本发明的培养基 B 或 D。每种处理设置三个平行孔。

3) 培养 1 天后，向上述培养体系中加入的慢病毒载体 LV-CD19CAR(鑫湾公司)，感染复数 MOI=5。在 32°C 下，以 1200g 离心感染 2 小时后，弃去上清并补充培养基 B 或 D，继续培养。

在细胞培养的第 4 天，将上述细胞培养体系全部转移至 12 孔板，并补充含培养基 B 或 D。

在细胞培养的第 7 天，移除抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体耦联的磁珠并补充培养基 B 或 D。

在细胞培养的第 10 天，重复补充新鲜培养基 B 或 D，同第 7 天。

4) 分别在细胞培养第 7 天和第 11 天进行细胞计数，采用流式细胞仪检测  $T_{SCM}$  (CD45RA、CCR7 和 CD95)。

实验结果如图 3 所示。

图 3 为两种  $T_{SCM}$  诱导和扩增培养基 B 或 D 对  $CD19 CAR-T_{SCM}$  体外诱导分化和扩增效果。

图 3A 为培养第 11 天的  $CD19 CAR-T_{SCM}$  的流式细胞仪检测画门流程及相应的细胞亚群比例。

图 3B 为培养第 7 天和第 11 天的  $CD19 CAR-T_{SCM}$  占  $CD19 CAR-T$  细胞的比例统计结果。在培养第 11 天的  $CD19 CAR-T$  细胞中，培养基 B 和培养

基 D 诱导分化的  $T_{SCM}$  ( $CD45RA^+CCR7^+CD95^+$ ) 的比例分别达到 81.3% 和 64.4%，说明两种培养基均能有效诱导 CD19 CAR- $T_{SCM}$  的分化。

图 3C 为两种  $T_{SCM}$  诱导和扩增培养基对 CD19 CAR- $T_{SCM}$  体外诱导分化并扩增的效果。实验结果显示，培养基 D 可更为有效地诱导并扩增 CD19

5 CAR- $T_{SCM}$ 。

### **实施例 3 本发明的培养基 B 和 D 对 CD19 CAR- $CD8^+ T_{SCM}$ 体外诱导分化和扩增效果**

制备 CD19 嵌合抗原受体  $CD8^+ T$  细胞 (CD19 CAR- $CD8^+ T$  细胞)：

10 1) 复苏预先制备并冻存的健康外周血单个核细胞 (PBMC) (鑫湾公司)，接着采用磁珠进一步阴选出  $CD8^+ T$  细胞，加在 48 孔细胞培养板中 ( $1 \times 10^6$  个  $CD8^+ T$  细胞 / 孔)。

2) 随后，向上述细胞培养板中加入含有抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体耦联的磁珠 (细胞数：磁珠数=1: 1) 和根据本发明的培养基 B 或 D。每种  
15 处理设置三个平行孔。

3) 培养 1 天后，向上述培养体系中加入的慢病毒载体 LV-CD19CAR (鑫湾公司)，感染复数 MOI=5。在 32℃ 下，以 1200g 离心感染 2 小时。离心后继续培养过夜，弃去上清并补充加入根据本发明的培养基 B 或 D。

在细胞培养的第 4 天，将上述细胞培养体系全部转移至 12 孔板，并补充根据本发明的培养基 B 或 D。  
20

在细胞培养的第 7 天，移除抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体耦联的磁珠并补充根据本发明的培养基 B 或 D。

在细胞培养的第 10 天，重复补充新鲜的根据本发明的培养基 B 或 D，同第 7 天。

25 4) 分别在细胞培养第 7 天和第 11 天进行细胞计数，采用流式细胞仪检测  $CD8^+ T_{SCM}$  ( $CD45RA^+CCR7^+CD95^+CD8^+ T$  细胞)。

实验结果如图 4 所示。

图 4 为两种培养基 B 或 D 对 CD19 CAR- $CD8^+ T_{SCM}$  体外诱导分化和扩增效果。

30 图 4A 为培养 11 天的 CD19 CAR- $CD8^+ T_{SCM}$  的流式细胞仪检测画门流程及相应的细胞亚群比例。

图 4B 为 CD19 CAR- $CD8^+ T_{SCM}$  占 CD19 CAR- $CD8^+ T$  细胞的比例统计结果。在 CD19 CAR- $CD8^+ T$  细胞中，培养基 B 和 D 诱导分化的  $T_{SCM}$  ( $CD45RA^+CCR7^+CD95^+$ ) 的比例分别达到 93.2% 和 82.5%，说明两种细胞因子组合均能有效诱导 CD19 CAR- $CD8^+ T_{SCM}$  的分化。  
35

图 4C 为两种培养基 B 或 D 对 CD19 CAR-CD8<sup>+</sup> T<sub>SCM</sub> 体外诱导分化并扩增的效果。实验结果显示, 培养基 D 可更为有效地诱导并扩增 CD19 CAR-CD8<sup>+</sup> T<sub>SCM</sub>。

#### 5 实施例 4 本发明的培养基 B 和 D 所培养的 CD19 CAR-CD8<sup>+</sup> T 细胞体外活化效果

1) 自实施例 3 制备的 CAR-T 细胞中, 取  $1 \times 10^5$  个静息的效应细胞 CD19 CAR-CD8<sup>+</sup> T 细胞, 并取  $1 \times 10^5$  个 K562-CD19 靶细胞 (鑫湾公司), 以效/靶细胞 1: 1 的比例加至 96 孔 U 底细胞培养板中, 400g, 离心 1 分钟以促进效/靶细胞的接触;

2) 效/靶细胞共培养 24 小时后, 500g, 离心 5 分钟, 取培养细胞上清, 采用 ELISA 测定上清中细胞因子 IFN- $\gamma$  的含量。

实验结果如图 5 所示, 两种培养基 B 和 D 培养所诱导并扩增的 CD19 CAR-CD8<sup>+</sup> T 细胞, 在接触肿瘤靶细胞后均可有效地活化并分泌大量的功能效应分子 IFN- $\gamma$ , 但培养基 D 的活化效果更佳。未转导对照组 (UTD) 的 T 细胞则不产生效应分子 IFN- $\gamma$ 。

#### 实施例 5 本发明的培养基 B 和 D 所培养的 CD19 CAR-CD8<sup>+</sup> T 细胞的体外杀伤效果。

1) 取制备的肿瘤细胞 K562-CD19 (鑫湾公司) 作为靶细胞, 标记染料分别采用细胞增殖染料 eFluor 450 (赛默飞世尔科技有限公司) 和细胞膜染料 PKH26 (西格玛奥德里奇贸易有限公司)。

首先, 采用 eFluor 450 标记 K562-CD19 细胞。用 PBS 或无血清 RPMI1640 培养基洗涤细胞两次, 500g, 离心 5 分钟以去除细胞中残余的血清。将细胞按  $2 \times 10^7$ /mL 的密度重悬在 PBS 中 (PBS 至少 500 $\mu$ L)。用 PBS 稀释 eFluor 450 储存液至 10 $\mu$ M, 然后和细胞悬液 1: 1 混合 (总体积 1mL)。37 $^{\circ}$ C 水浴, 避光反应 10 分钟。加 200 $\mu$ L 预冷的 FBS 终止反应, 冰上孵育 5 分钟。随后用 PBS 洗涤 3 遍, 进行细胞膜染料 PKH26 的标记。

2) 采用 PKH26 标记上述靶细胞: 标记方法参考 PKH26 试剂盒内的厂家说明书。采用试剂盒中配备的 Diluent C 制备  $2 \times$  单细胞悬液, 细胞密度控制在  $2 \times 10^7$ /mL。接着使用 Diluent C 制备  $2 \times$  的 PKH26 染色液, 以 1:1 的比例将  $2 \times$  单细胞悬液加入到  $2 \times$  的 PKH26 染色液中, 室温反应 5 分钟即可。最后, 加入等体积的 FBS 反应 1 分钟, 终止染色。用完全培养基 RPMI1640 (10%FBS) 洗涤 3 遍, 细胞待用。

3) 将肿瘤靶细胞的数目固定为  $3 \times 10^4$ , 以效/靶比 2: 1、4: 1、8: 1

和 16: 1 的比例分别加入实施例 3 中制备的效应细胞 CD19 CAR-CD8<sup>+</sup> T 细胞, 37℃, 共孵育 4 小时, 收集细胞悬液, 采用流式细胞仪检测效应细胞的杀伤效率。

实验结果如图 6 所示, 培养基 B 和 D 诱导并扩增的 CD19 CAR-CD8<sup>+</sup> T 细胞在短时间内均能杀伤肿瘤靶细胞, 培养基 D 的效应细胞杀伤效果更佳。未转导对照组 UTD 的 T 细胞则几乎不杀伤肿瘤细胞。

### **实施例 6 本发明的培养基 B 和 E 所培养的 CD19 CAR-T<sub>SCM</sub> 的体内抗肿瘤作用。**

1) 采用 6-8 周龄的雌性重症联合免疫缺陷 (NSG) 小鼠 (百奥赛图基因生物技术有限公司) 为模型, 在小鼠右侧皮下接种  $5 \times 10^6$  个肿瘤细胞 (CD19<sup>+</sup>A549, 鑫湾公司), 每只小鼠接种体积为 125  $\mu$ L。

2) 接种肿瘤细胞 6 天后, NSG 小鼠右侧皮下均出现可见瘤体。将成瘤小鼠随机分为三组, 每组 5 只。分别给三组小鼠静脉回输不同的细胞 (均来自实施例 2 和 3), 包括未转导对照组 (UTD) T 细胞、两类方法制备的 CD19 CAR-T<sub>SCM</sub> 的治疗组 (培养基 B 组和培养基 D 组)。细胞回输剂量为 125  $\mu$ L ( $10^7$  细胞/只小鼠)。

3) 细胞回输后每 3 天采用游标卡尺测量肿瘤的大小并记录每组的小鼠生存状况。

肿瘤体积的计算公式为: 肿瘤体积 = (肿瘤的长径  $\times$  肿瘤的宽径<sup>2</sup>) / 2。  
实验结果如图 7 所示。

图 7A 为此次小鼠体内试验的时间进度安排。

图 7B 和图 7C 为培养基 B 和 D 所培养的 CD19 CAR-T<sub>SCM</sub> 体内抗肿瘤效果图。如图所示, 两种培养基所诱导和扩增的 CD19 CAR-T<sub>SCM</sub> 均能有效地抑制肿瘤的生长, 其中, 培养基 B 组肿瘤清除率为 80%, 而培养基 D 组联合培养组制备的 CD19 CAR-T<sub>SCM</sub> 体内抗肿瘤效果更佳, 实现了体内肿瘤的快速高效清除, 肿瘤清除率高达 100%。而对照组的 UTD T 细胞却不能抑制肿瘤的生长。

图 7D 为 CD19 CAR-T<sub>SCM</sub> 治疗后各组小鼠的生存曲线图。如图所示, 接受两种培养基所诱导和扩增的 CD19 CAR-T<sub>SCM</sub> 治疗的小鼠全部存活, 而回输了对照组 UTD T 细胞组的小鼠死亡率高达 80%。

## 权 利 要 求

1. 一种用于体外诱导和/或扩增  $T_{SCM}$  的组合物, 所述组合物包含诱导剂, 所述诱导剂包含 IL-7 和 IL-21。

5

2. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其中, 所述诱导剂还包含 IL-3、IL-12、IL-15 和 IL-18 的一种或多种; 优选地, 所述诱导剂还包含 IL-15。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的组合物, 其中, 所述诱导剂还包含 GSK-3 $\beta$  抑制剂; 优选地, 所述 GSK-3 $\beta$  抑制剂为 TWS119;  
10 优选地, 所述诱导剂包含 IL-7、IL-21、IL-15 和 GSK-3 $\beta$  抑制剂。

4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的组合物, 其中, 所述组合物中各诱导剂的工作浓度如下:

15 除了 GSK-3 $\beta$  抑制剂之外的每种诱导剂的工作浓度在 1-100 ng/mL 的范围内, GSK-3 $\beta$  抑制剂的工作浓度在 1-50  $\mu$ M 的范围内;  
优选地, 所述组合物中各诱导剂的工作浓度如下:  
1-100 ng/mL 的 IL-7、1-100 ng/mL 的 IL-21;  
优选地, 所述组合物还包含 1-100 ng/mL 的 IL-15;  
20 优选地, 所述组合物还包含 1-50  $\mu$ M 的 GSK-3 $\beta$  抑制剂。

5. 一种用于体外诱导和/或扩增  $T_{SCM}$  的培养基, 其中所述培养基包含 T 细胞生长基础培养基和权利要求 1-4 中任一项所述的组合物。

25 6. 权利要求 1-4 中任一项所述的组合物或权利要求 5 所述的培养基用于体外诱导和/或扩增  $T_{SCM}$  的用途;  
优选地, 所述  $T_{SCM}$  为 PBMC、CD4<sup>+</sup>T 细胞、CD8<sup>+</sup>T 细胞或 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞;

优选地, 所述  $T_{SCM}$  为 CAR-T 细胞、TCR-T 细胞或肿瘤浸润性淋巴细胞。

30

7. 一种体外诱导和/或扩增  $T_{SCM}$  的方法, 所述方法包括使用权利要求 1-4 中任一项所述的组合物和/或权利要求 5 所述的培养基诱导和/或扩增细胞的步骤。

35 8. 根据权利要求 7 所述的方法, 其中, 所述方法包括以下步骤:

①分离 PBMC、CD4<sup>+</sup>T 细胞、CD8<sup>+</sup>T 细胞或 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞;

②将步骤①得到的细胞置于权利要求 5 所述的培养基或置于 T 细胞生长基础培养基同时加入权利要求 1-4 中任一项所述的组合物, 并加入刺激剂, 培养 6-7 天;

5 优选地, 所述刺激剂为抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体/CD28 配体、抗 CD137 抗体/CD137 配体、抗 OX40 抗体/OX40 配体、抗 CD160 抗体/CD160 配体、TLR1 配体、TLR2 配体、TLR5 配体、TLR6 配体和 RIG-I 配体、嵌合抗原受体靶抗原、PD-1 阻断抗体、CTLA-4 阻断抗体、LAG-3 阻断抗体、Tm-3 阻断抗体和 BTLA 阻断抗体中的一种或多种;

10 更优选地, 所述刺激剂为耦联抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体的磁珠;

③将步骤②得到的细胞置于权利要求 5 所述的培养基或置于 T 细胞生长基础培养基同时加入权利要求 1-4 中任一项所述的组合物, 每隔 2-4 天补充权利要求 5 所述的培养基或补充 T 细胞生长基础培养基同时加入权利要求 1-4 中任一项所述的组合物, 直至细胞培养周期结束;

15 优选地, 所述方法包括以下步骤:

①磁珠阴选出 CD8<sup>+</sup>T 细胞;

②将步骤①得到的细胞置于 T 细胞生长基础培养基, 并加入权利要求 1-4 中任一项所述的组合物, 加入耦联抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体的磁珠, 培养 7 天;

20 ③将步骤②得到的细胞置于权利要求 5 所述的培养基或置于 T 细胞生长基础培养基同时加入权利要求 1-4 中任一项所述的组合物, 从第 4 天起, 每隔 3 天补充新鲜的权利要求 5 所述的培养基或补充新鲜的 T 细胞生长基础培养基同时加入权利要求 1-4 中任一项所述的组合物, 直至细胞培养周期结束。

25 9. 根据权利要求 7 所述的方法, 其中, 所述方法为体外诱导和/或扩增 CAR-T<sub>SCM</sub> 的方法, 包括以下步骤:

1) 分离 PBMC、CD4<sup>+</sup>T 细胞、CD8<sup>+</sup>T 细胞或 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞;

2) 将步骤 1) 得到的细胞置于权利要求 5 所述的培养基或置于 T 细胞生长基础培养基同时加入权利要求 1-4 中任一项所述的组合物, 并加入刺激剂, 培养 1-2 天;

30 优选地, 所述刺激剂为抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体/CD28 配体、抗 CD137 抗体/CD137 配体、抗 OX40 抗体/OX40 配体、抗 CD160 抗体/CD160 配体、TLR1 配体、TLR2 配体、TLR5 配体、TLR6 配体和 RIG-I 配体、嵌合抗原受体靶抗原、PD-1 阻断抗体、CTLA-4 阻断抗体、LAG-3 阻断抗体、Tm-3 阻断抗体和 BTLA 阻断抗体中的一种或多种;

更优选地,所述刺激剂为耦联抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体的磁珠;

3) 使步骤 2) 得到的细胞转染或感染携带嵌合抗原受体的载体;

4) 将步骤 3) 得到的细胞置于权利要求 5 所述的培养基或置于 T 细胞生长基础培养基同时加入权利要求 1-4 中任一项所述的组合物, 并加入刺激剂继续培养 5-6 天后去除刺激剂; 从第 4 天起, 每隔 2-4 天补充权利要求 5 所述的培养基或补充 T 细胞生长基础培养基同时加入权利要求 1-4 中任一项所述的组合物, 直至 CAR-T 细胞培养周期结束;

优选地,所述刺激剂为抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体/CD28 配体、抗 CD137 抗体/CD137 配体、抗 OX40 抗体/OX40 配体、抗 CD160 抗体/CD160 配体、TLR1 配体、TLR2 配体、TLR5 配体、TLR6 配体和 RIG-I 配体、嵌合抗原受体靶抗原、PD-1 阻断抗体、CTLA-4 阻断抗体、LAG-3 阻断抗体、Tm-3 阻断抗体和 BTLA 阻断抗体中的一种或多种;

更优选地,所述刺激剂为耦联抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体的磁珠;

优选地,所述方法包括以下步骤:

15 1) 分离 PBMC 或 CD8<sup>+</sup>T 细胞;

2) 将步骤 1) 得到的细胞置于权利要求 5 所述的培养基或置于 T 细胞生长基础培养基同时加入权利要求 1-4 中任一项所述的组合物, 并加入耦联抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体的磁珠, 培养 1 天;

3) 在步骤 2) 得到的细胞中以感染复数 MOI=2-15 的比例加入携带嵌合抗原受体慢病毒载体 LV-CAR, 在 30-32°C 下, 离心感染 2h;

4) 离心结束后, 将步骤 3) 得到的细胞培养过夜, 置于权利要求 5 所述的培养基或置于 T 细胞生长基础培养基同时加入权利要求 1-4 中任一项所述的组合物, 并加入耦联抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体的磁珠继续培养 5-6 天后去除耦联抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体的磁珠; 从第 4 天起, 每隔 3 天补充权利要求 5 所述的培养基或补充 T 细胞生长基础培养基同时加入权利要求 1-4 中任一项所述的组合物, 继续培养直至 CAR-T 细胞培养周期结束。

10. 根据权利要求 7 所述的方法, 其中, 所述方法为体外诱导和/或扩增 TCR-T<sub>SCM</sub> 的方法, 包括以下步骤:

30 1) 分离 PBMC、CD4<sup>+</sup>T 细胞或 CD8<sup>+</sup>T 细胞;

2) 将步骤 1) 得到的细胞置于权利要求 5 所述的培养基或置于 T 细胞生长基础培养基同时加入权利要求 1-4 中任一项所述的组合物, 并加入刺激剂, 培养 1-2 天;

优选地,所述刺激剂为抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体/CD28 配体、抗 CD137 抗体/CD137 配体、抗 OX40 抗体/OX40 配体、抗 CD160 抗体/CD160 配体、

TLR1 配体、TLR2 配体、TLR5 配体、TLR6 配体和 RIG-I 配体、嵌合抗原受体靶抗原、PD-1 阻断抗体、CTLA-4 阻断抗体、LAG-3 阻断抗体、Tm-3 阻断抗体和 BTLA 阻断抗体中的一种或多种；

更优选地，所述刺激剂为耦联抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体的磁珠；

5 3) 使步骤 2) 得到的细胞转染或感染携带 T 细胞受体的载体；

4) 将步骤 3) 得到的细胞置于权利要求 5 所述的培养基或置于 T 细胞生长基础培养基同时加入权利要求 1-4 中任一项所述的组合物，并加入刺激剂继续培养 5-6 天后去除刺激剂；从第 4 天起，每隔 2-4 天补充权利要求 5 所述的培养基或补充 T 细胞生长基础培养基同时加入权利要求 1-4 中任一项  
10 所述的组合物，直至 TCR-T 细胞培养周期结束；

优选地，所述刺激剂为抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体/CD28 配体、抗 CD137 抗体/CD137 配体、抗 OX40 抗体/OX40 配体、抗 CD160 抗体/CD160 配体、TLR1 配体、TLR2 配体、TLR5 配体、TLR6 配体和 RIG-I 配体、嵌合抗原受体靶抗原、PD-1 阻断抗体、CTLA-4 阻断抗体、LAG-3 阻断抗体、Tm-3  
15 阻断抗体和 BTLA 阻断抗体中的一种或多种；

更优选地，所述刺激剂为耦联抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体的磁珠；

优选地，所述方法包括以下步骤：

1) 分离 PBMC、CD4<sup>+</sup>T 细胞或 CD8<sup>+</sup>T 细胞；

2) 将步骤 1) 得到的细胞置于权利要求 5 所述的培养基或置于 T 细胞  
20 生长基础培养基同时加入权利要求 1-4 中任一项所述的组合物，并加入耦联抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体的磁珠，培养 1 天；

3) 在步骤 2) 得到的细胞中以感染复数 MOI=2-15 的比例加入携带嵌合抗原受体慢病毒载体 LV-TCR，在 30-32°C 下，离心感染 2h；

4) 离心结束后，将步骤 3) 得到的细胞培养过夜，置于权利要求 5 所述  
25 的培养基或置于 T 细胞生长基础培养基同时加入权利要求 1-4 中任一项所述的组合物，并加入耦联抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体的磁珠继续培养 5-6 天后去除耦联抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体的磁珠；从第 4 天起，每隔 3 天补充权利要求 5 所述的培养基或补充 T 细胞生长基础培养基同时加入权利要求 1-4 中任一项所述的组合物，继续培养直至 TCR-T 细胞培养周期结束。

30

11. 根据权利要求 7-10 中任一项所述的方法制备的 T<sub>SCM</sub>。

12. 如权利要求 11 的 T<sub>SCM</sub> 制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。

35 13. 一种肿瘤的细胞免疫治疗方法，所述方法包括使用如权利要求 11

所述的  $T_{SCM}$ 。

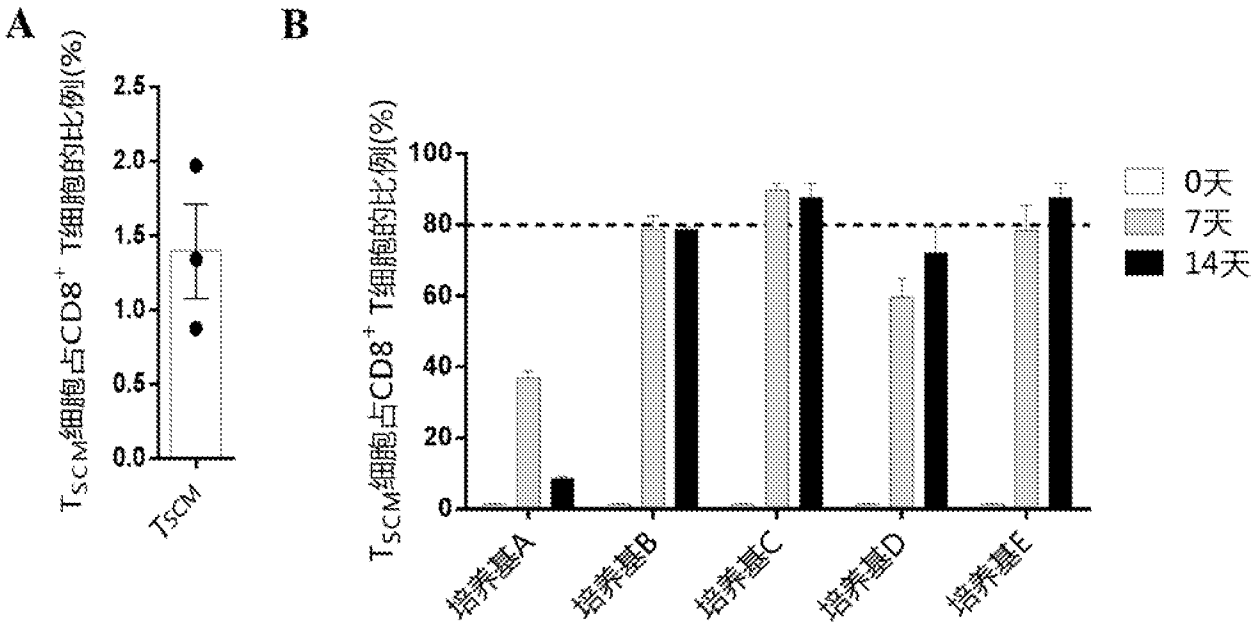


图 1

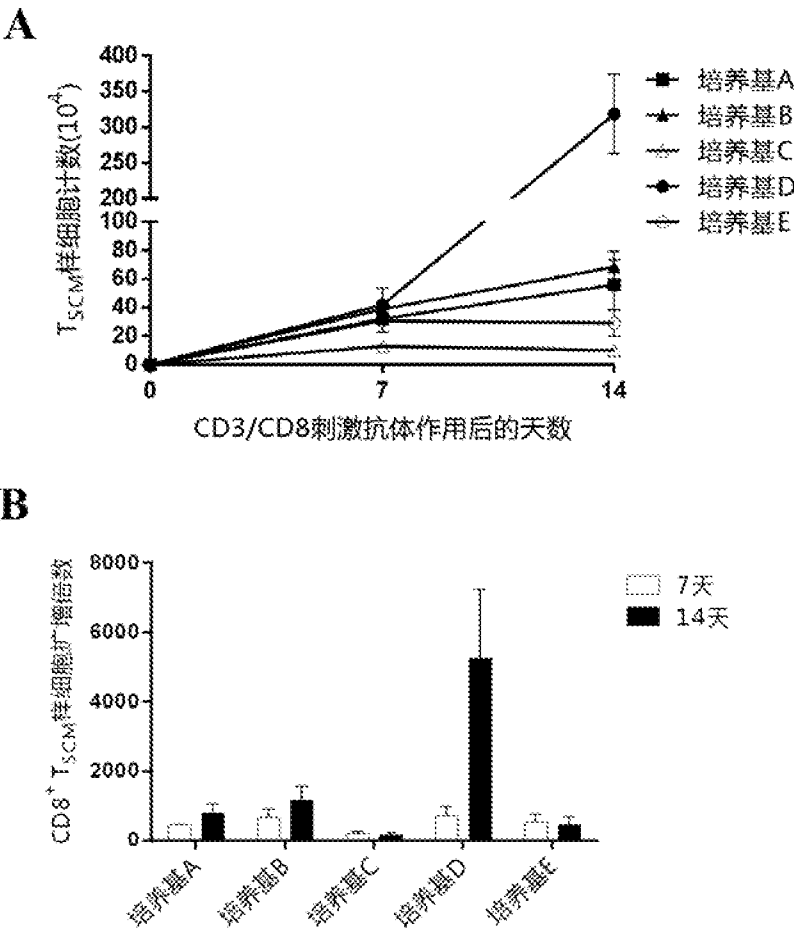


图 2

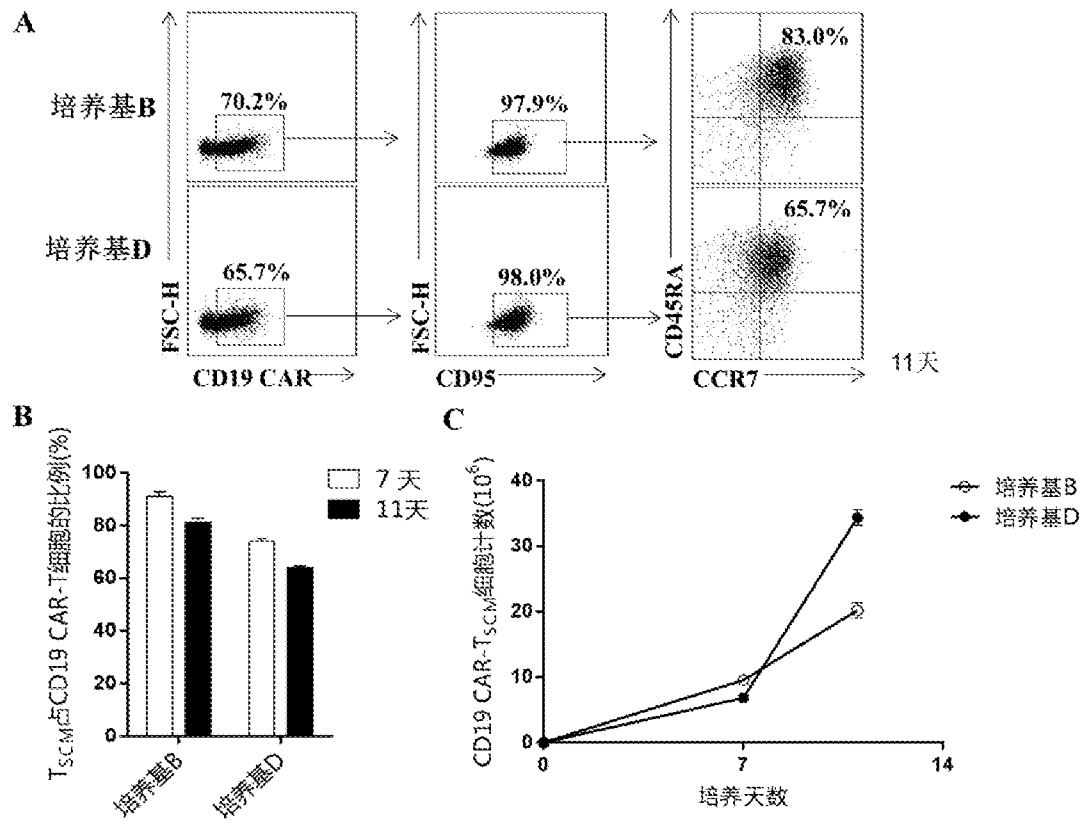


图 3

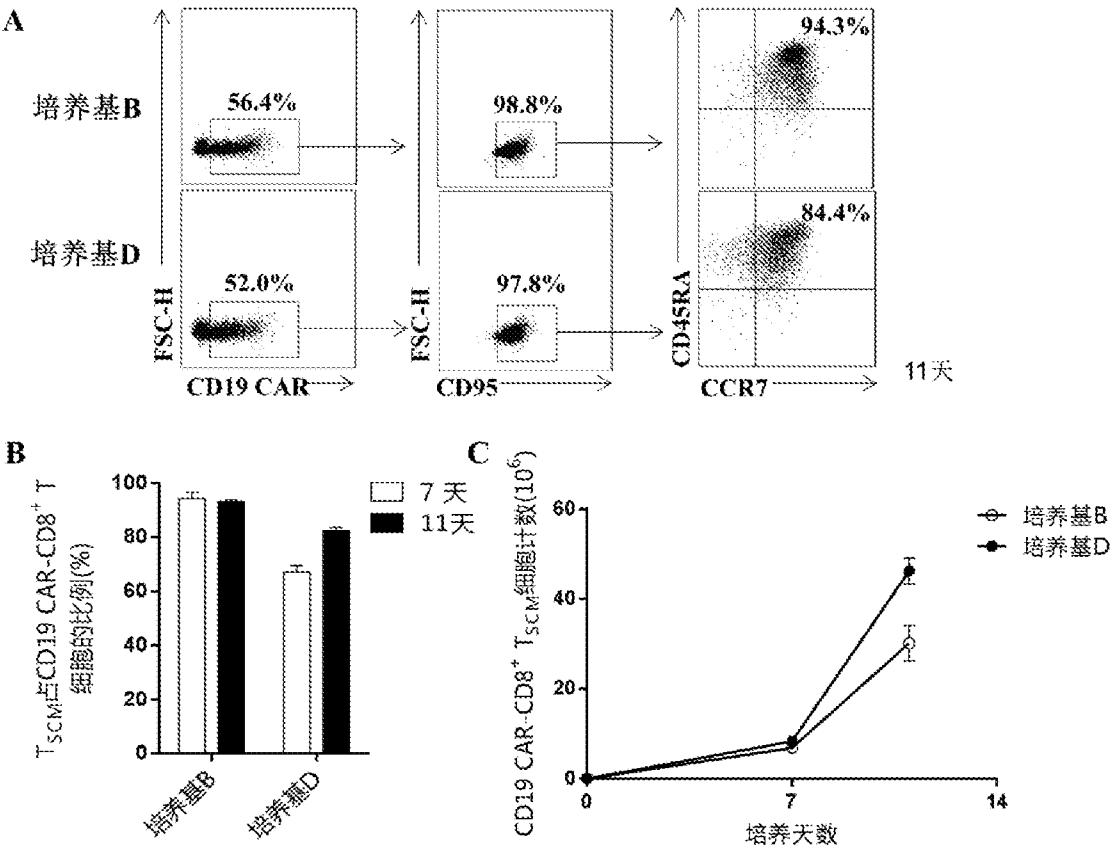


图 4

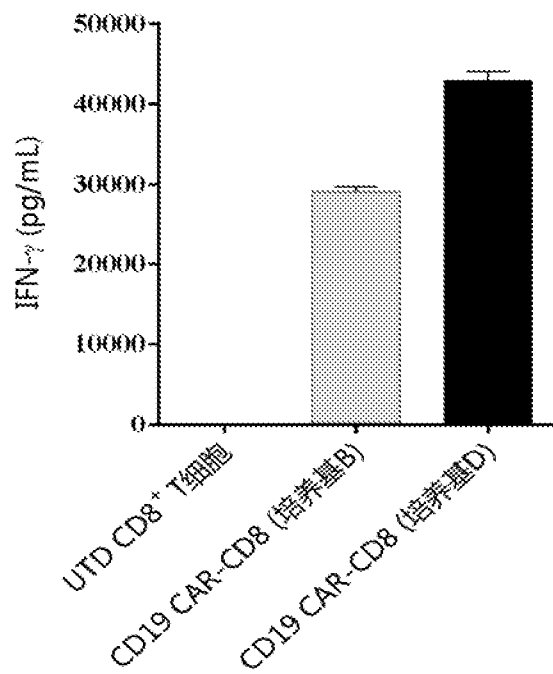


图 5

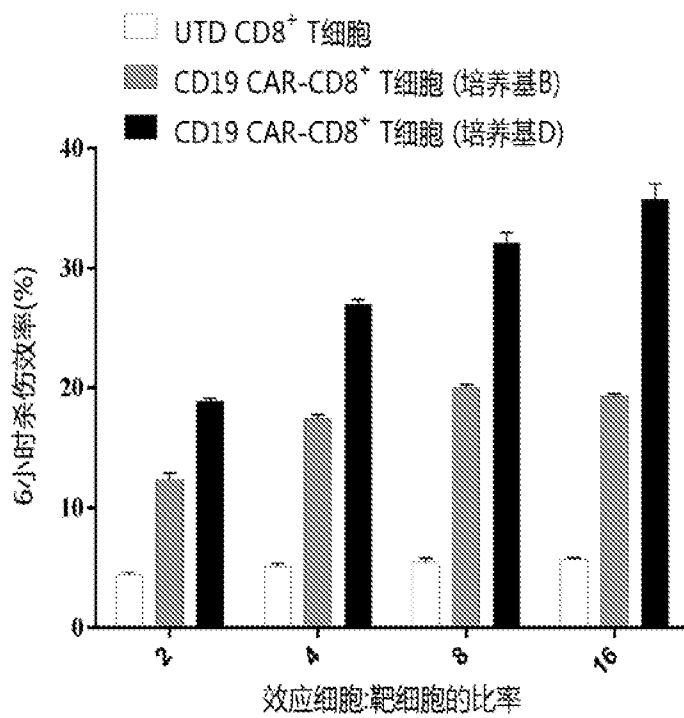


图 6

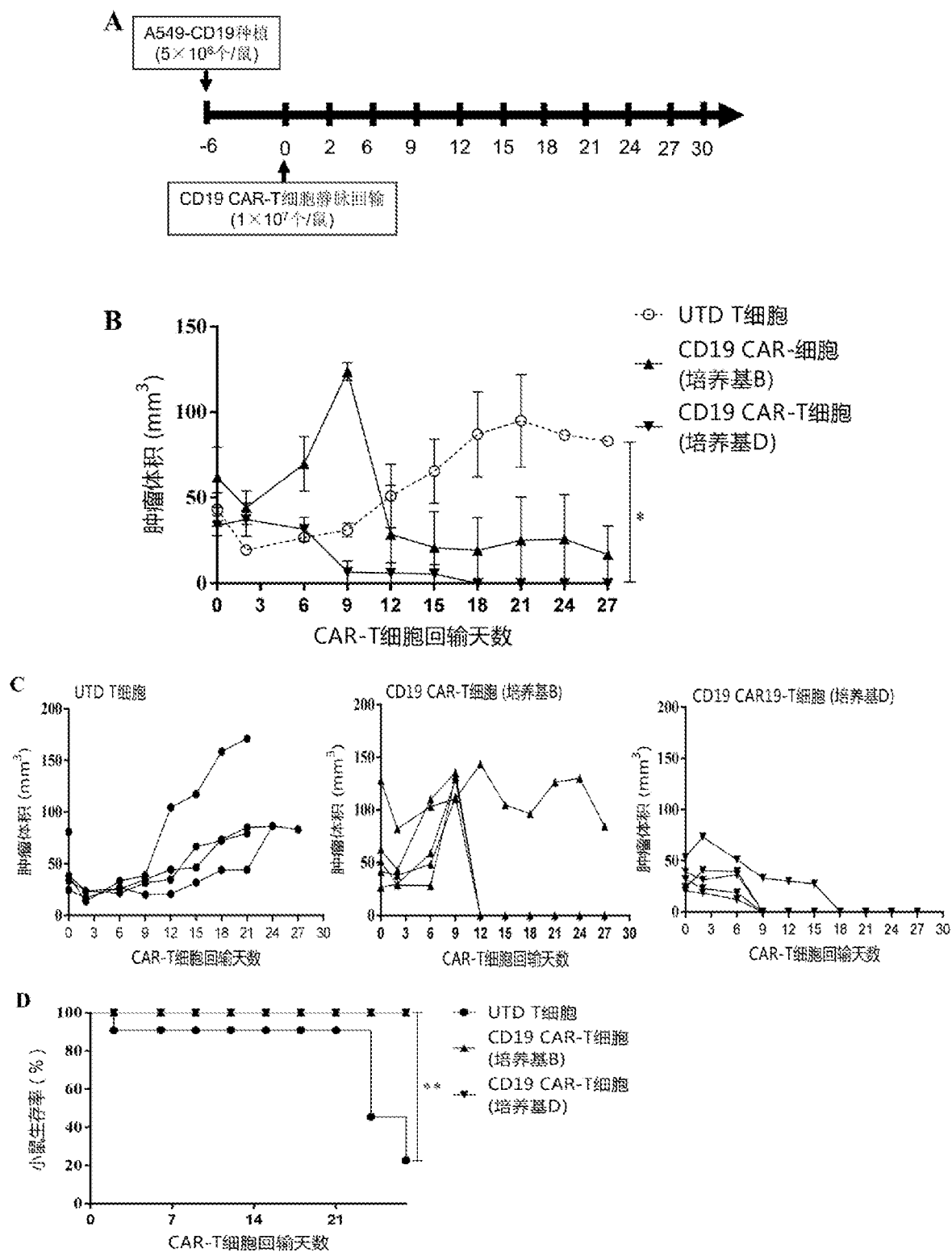


图 7

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/076957

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

C12N 5/0783(2010.01)i; A61K 35/17(2015.01)i; A61P 35/00(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Database: CNABS, CNKI, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, ISI Web of Knowledge, google学术, GOOGLE SCHOLAR, 百度学术, BAIDU XUESHU; Keywords: 干细胞样记忆性T细胞, 干细胞记忆T细胞, 白介素-7, 白介素-21, 白介素-15, 磁珠, 外周血单个核细胞, 肿瘤, 免疫治疗, 免疫疗法, CD8+, PBMC, TWS119, GSK-3 $\beta$ , stem cell memory T cell, T-memory stem cell, Tscm, IL-7, IL-21, IL-15, CD3, CD28, tumor, cancer, immunotherapy

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                   | Relevant to claim No. |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | CN 109423478 A (THE FIRST AFFILIATED HOSPITAL OF ZHENGZHOU UNIVERSITY) 05 March 2019 (2019-03-05)<br>see the abstract, description, embodiment 2, and claims 1, 6, 9 and 10                                                                                                                          | 1-13                  |
| X         | CN 105543170 A (SUN YAT-SEN UNIVERSITY) 04 May 2016 (2016-05-04)<br>see the abstract, and claims 1-5 and 8-10                                                                                                                                                                                        | 1-13                  |
| X         | C. Alvarez-Fernandez et al. "A Short CD3/CD28 Costimulation Combined with IL-21 Enhance the Generation of Human Memory Stem T Cells for Adoptive Immunotherapy"<br><i>Journal of Translational Medicine</i> , Vol. 14, No. 1, 31 December 2016 (2016-12-31),<br>ISSN: 1479-5876,<br>see the abstract | 1-13                  |
| X         | Yingshi Chen et al. "Adoptive Transfer of Interleukin-21-Stimulated Human CD8+ T Memory Stem Cells Efficiently Inhibits Tumor Growth"<br><i>Journal of Immunotherapy</i> , Vol. 41, No. 6, 22 June 2018 (2018-06-22),<br>ISSN: 1537-4513,<br>see paragraph [0001]                                    | 1-13                  |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 November 2019

Date of mailing of the international search report

24 December 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/  
CN)  
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing  
100088  
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2019/076957**

| Patent document<br>cited in search report |           |   | Publication date<br>(day/month/year) | Patent family member(s) | Publication date<br>(day/month/year) |
|-------------------------------------------|-----------|---|--------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------|
| CN                                        | 109423478 | A | 05 March 2019                        | None                    |                                      |
| CN                                        | 105543170 | A | 04 May 2016                          | None                    |                                      |

## 国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/076957

## A. 主题的分类

C12N 5/0783(2010.01)i; A61K 35/17(2015.01)i; A61P 35/00(2006.01)n

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

## B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N; A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

数据库: CNABS, CNKI, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, ISI Web of Knowledge, google学术, 百度学术;  
 关键词: 干细胞样记忆性T细胞, 干细胞记忆T细胞, 白介素-7, 白介素-21, 白介素-15, 磁珠, 外周血单个核细胞, 肿瘤, 免疫治疗, 免疫疗法, CD8+, PBMC, TWS119, GSK-3 $\beta$ , stem cell memory T cell, T-memory stem cell, Tscm, IL-7, IL-21, IL-15, CD3, CD28, tumor, cancer, immunotherapy

## C. 相关文件

| 类 型* | 引用文件, 必要时, 指明相关段落                                                                                                                                                                                                                                                        | 相关的权利要求 |
|------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| X    | CN 109423478 A (郑州大学第一附属医院) 2019年 3月 5日 (2019 - 03 - 05)<br>参见摘要, 说明书实施例2, 权利要求1, 6, 9和10                                                                                                                                                                                | 1-13    |
| X    | CN 105543170 A (中山大学) 2016年 5月 4日 (2016 - 05 - 04)<br>参见摘要, 权利要求1-5和8-10                                                                                                                                                                                                 | 1-13    |
| X    | C. Alvarez-Fernandez等人. "A short CD3/CD28 costimulation combined with IL-21 enhance the generation of human memory stem T cells for adoptive immunotherapy"<br>Journal of Translational Medicine, 第14卷, 第1期, 2016年 12月 31日 (2016 - 12 - 31),<br>ISSN: 1479-5876,<br>参见摘要 | 1-13    |

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

\* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&amp;” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2019年 11月 27日

国际检索报告邮寄日期

2019年 12月 24日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

罗霄

电话号码 62089158

| C. 相关文件 |                                                                                                                                                                                                                            |         |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 类 型*    | 引用文件，必要时，指明相关段落                                                                                                                                                                                                            | 相关的权利要求 |
| X       | Yingshi Chen等人. "Adoptive transfer of interleukin-21-stimulated human CD8+ T memory stem cells efficiently inhibits tumor growth"<br>J Immunother., 第41卷, 第6期, 2018年 6月 22日 (2018 - 06 - 22),<br>ISSN: 1537-4513,<br>参见第1段 | 1-13    |
|         |                                                                                                                                                                                                                            |         |

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/076957

| 检索报告引用的专利文件 |           |   | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利 | 公布日<br>(年/月/日) |
|-------------|-----------|---|----------------|------|----------------|
| CN          | 109423478 | A | 2019年 3月 5日    | 无    |                |
| CN          | 105543170 | A | 2016年 5月 4日    | 无    |                |